



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104894158 B

(45)授权公告日 2018.05.25

(21)申请号 201510098497.X

(22)申请日 2007.06.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104894158 A

(43)申请公布日 2015.09.09

(30)优先权数据
60/814,542 2006.06.19 US
60/901,654 2007.02.16 US

(62)分案原申请数据
200780030894.7 2007.06.19

(73)专利权人 22世纪有限责任公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 乔纳森·E·佩奇 刘恩武

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 温旭 郝传鑫

(51)Int.Cl.

C12N 15/82(2006.01)

C12N 15/53(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

A01H 6/82(2018.01)

(56)对比文件

WO 0210210 A2,2002.02.07,

US 20040031072 A1,2004.02.12,

CN 102083987 A,2011.06.01,

David O'Hagan.Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids.《Natural Products Report》.2000,第17卷(第5期),435-446.

审查员 滕文静

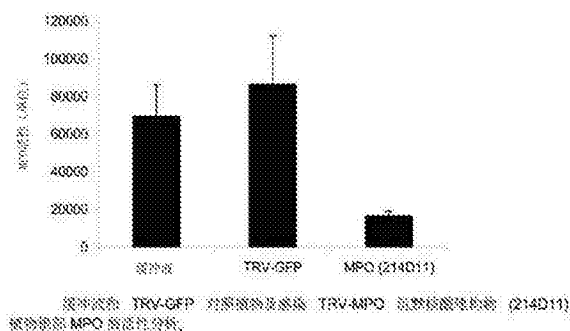
权利要求书2页 说明书24页
序列表7页 附图11页

(54)发明名称

编码N-甲基腐胺氧化酶之核酸及其应用

(57)摘要

本发明提供编码N-甲基腐胺氧化酶(MPO)的基因及其核酸建构物,包括独自调控MPO表达的方法,或与调控其它生物碱合成基因相结合调控MPO表达以调节植物和宿主细胞中生物碱的生成。MPO基因或其片段因而有助于减少或增加植物吡咯烷类生物碱或托烷类生物碱的生成和在宿主细胞内生产MPO酶。



1. 一种减少植物中的生物碱的方法,所述方法包括相对于对照植物下调内源性MPO基因的N-甲基腐胺氧化酶MPO的表达,其中,所述方法包括:

(a) 在所述植物中引入核酸,所述核酸包含:

(i) RNAi质粒或病毒诱导的基因沉默载体中的至少一种;以及

(ii) 选自下列的核苷酸序列:

(1) SEQ ID NO:1的核苷酸754-1132;

(2) SEQ ID NO:1的核苷酸1521-1772;

(3) SEQ ID NO:1的核苷酸1129-1405;

(4) SEQ ID NO:1;以及

(5) SEQ ID NO:2;以及

(b) 使植物在使所述核苷酸序列被转录的条件下生长,并且由此所述转录导致所述植物中的生物碱的水平相对于在相似条件下生长的对照植物降低。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述方法还包括下调NBB1、A622、QPT和PMT中的至少一个。

3. 如权利要求1所述的方法,其中,所述生物碱是吡咯烷类生物碱。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述吡咯烷类生物碱是烟碱。

5. 如权利要求1所述的方法,其中,所述植物是菸草。

6. 一种减少植物种群中的吡咯烷类生物碱的水平的方法,所述方法包括:

(a) 提供突变的植物种群;

(b) 检测所述植物种群内的靶向突变植物,其中与相似条件下提供的对照植物相比,所述靶向突变植物的N-甲基腐胺氧化酶基因表达降低,或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低,所述检测包括:

(i) 利用根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2设计的引物对突变植物种群中突变植物中的N-甲基腐胺氧化酶基因区域进行PCR扩增,

(ii) 识别在被扩增区域和野生型基因的相应区域之间导致N-甲基腐胺氧化酶基因的表达降低或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低的错配,以及

(iii) 识别含有所述错配的突变植物;和

(c) 选择性培育所述靶向突变的植物,以产生下述植物种群:其与相似条件下产生的对照植物种群相比,N-甲基腐胺氧化酶基因的表达降低或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低。

7. 如权利要求6所述的方法,其中,所述吡咯烷类生物碱是烟碱。

8. 如权利要求6所述的方法,其中,所述植物是菸草。

9. 一种由权利要求1至8中任一项所述的方法制备的植物生成的生物碱减少的植物产品,其中,所述植物产品不具有发育成完整植株的能力。

10. 如权利要求9所述的生物碱减少的植物产品,其中,所述产品是烟草产品。

11. 如权利要求10所述的生物碱减少的植物产品,其中,所述生物碱减少的烟草产品选自:戒烟产品、卷烟、卷烟烟叶、雪茄、雪茄烟叶、烟斗烟叶、嚼烟、鼻烟叶、唇齿烟和烟草含片。

12. 一种增加植物中生物碱水平的方法,所述方法包括:

(a) 在所述植物中引入编码MPO酶的核苷酸序列,其中,所述核苷酸序列选自:SEQ ID

NO:1和SEQ ID NO:2;以及

(b) 在与相似条件下生长的对照植物相比使所述植物产生提高的MPO水平的条件下使所述植物生长。

13. 如权利要求12所述的方法,所述方法还包括在所述植物中引入编码选自NBB1、A622、QPT和PMT中的至少一种酶的核苷酸序列。

14. 如权利要求12所述的方法,其中,所述植物是茄科或古柯科植物。

15. 如权利要求12所述的方法,其中,所述植物选自:烟草属,曼陀罗属,颠茄属,澳茄属,天仙子属,茄参属,木曼陀罗属,赛茛菪属和红木属。

16. 一种由权利要求12至15中任一项所述的方法制备的植物生成的生物碱增加的植物产品,其中,所述植物产品不具有发育成完整植株的能力。

17. 如权利要求16所述的生物碱增加的植物产品,其中,所述产品是烟草产品。

18. 如权利要求17所述的生物碱增加的植物产品,其中,所述生物碱增加的烟草产品选自:戒烟产品、卷烟、卷烟烟叶、雪茄、雪茄烟叶、烟斗烟叶、嚼烟、鼻烟叶、唇齿烟和烟草含片。

编码N-甲基腐胺氧化酶之核酸及其应用

[0001] 本申请是2009年2月19日进入中国国家阶段、申请号为200780030894.7、申请日为2007年6月19日、发明名称为“编码N-甲基腐胺氧化酶之核酸及其应用”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 临时专利申请之优先权

[0003] 本发明要求于2006年6月19日所申请美国临时专利申请,申请号为60/814,542及于2007年2月16日所申请美国临时专利申请,申请号为60/901,654之优先权。

技术领域

[0004] 本发明涉及植物,植物细胞或其它类细胞之分子生物学及生物碱合成。除与其它事项相关外,该发明还涉及编码N-甲基腐胺氧化酶(N-methylputrescine oxidase,MPO)的核酸序列以及应用该核酸序列改良植物中生产生物碱的方法,尤其是但不完全是应用该核酸序列在烟草植物中生产烟碱,及在植物细胞或其它类细胞中生产生物碱合成酶的方法。

背景技术

[0005] 吡咯烷类生物碱(例如烟碱)及托烷类生物碱(例如东莨菪碱和古柯碱)是具有多种不同药理活性的植物天然产物。例如,烟碱可以促进认知机能,并应用于戒烟治疗中的烟碱替代疗法。托烷类生物碱是重要的抗胆碱能类药物。古柯碱被用作局部麻醉药。这些化合物均从植物分离,并被作为药物使用。

[0006] 人们有兴趣通过遗传工程方式来增加植物和植物细胞中吡咯烷类生物碱及托烷类生物碱的生产,以便更有效地商业化生产这些化合物以用于药物制造业。增加上述两种生物碱的生产可以通过选择育种,或通过使用编码这些生物碱合成酶基因的遗传工程。累积代谢途径中间产物或减少生物碱终末产物的遗传工程方法包括经典或定向诱变,如定向诱导基因组局部突变技术(Targeting Induced Local Lesions in Genomes,TILLING),或利用RNA干扰及相关技术特异性沉默编码这些酶的基因。

[0007] 人们也有兴趣阻断上述生物碱合成途径中某些特定的代谢步骤,以累积本身可能具有高价值的代谢途径中间产物,或生产包括修饰过或含量减少的生物碱终末产物的植物。烟碱含量经遗传工程而减少的烟草植物可能有助于生产来自于植物的药物,烟碱含量低或无烟碱的香烟。所述香烟可以用于辅助戒烟(Benowitz et al.Clin Pharmacol Ther.80(6):703-14(2006)),和用于生产低毒性工业产品,食品或生物量农作物。

[0008] 人们对编码吡咯烷类生物碱及托烷类生物碱的生物合成酶的基因知之甚少,这限制了通过遗传工程生成这些有效化合物代谢途径的能力。

[0009] 一个编码参与吡咯烷类生物碱合成酶的已知基因的例子是喹啉磷酸核糖转移酶(QPT)基因,所述的QPT基因从烟草和黄花烟草中克隆的。见美国专利6,423,520及专利6,586,661及Sinclair et al.,Plant Mol.Biol.44:603-17(2000)。抑制QPT基因表达能显著降低转基因烟草植物中烟碱含量。Xie et al.,Recent Advances in Tobacco Science 30:17-37(2004)。

[0010] 美国专利5,369,023及5,260,205讨论通过抑制腐胺甲基转换酶(PMT)核酸序列来降低烟碱含量。抑制内源性PMT核酸序列降低烟碱含量,并增加去氢新烟碱含量2至6倍。Hibi et al.,*Plant Cell* 6:723-35(1994);Sato et al.*Proc Natl Acad Sci USA* 98:367-72(2001);Chintapakorn and Hamill,*Plant Mol.Biol.*53:87-105(2003);Steppuhn et al.,*PLoS Biol.*2:8:e217:1074-1080(2004)。烟草PMT基因在美花烟草超表达可增加烟碱含量。(Sato et al.*Proc Natl Acad Sci USA* 98:367-72(2001))。

[0011] 抑制内源性基因序列A622及NBB1可降低烟草植物中烟碱含量。见国际专利公开号WO 2006/109197。已从烟草中克隆转换烟碱为去甲烟碱的细胞色素P450单氧化酶基因。Siminszky B.,et al.,*Proc Natl Acad Sci USA*102:14919-24,(2005);Gavilano et al.*J.Agric.Food Chem.*54,9071-9078(2006)。

[0012] MPO酶活性是三十年前在烟草植物根部最初检测到,Mizusaki S et al.,*Phytochemistry* 11:2757-2762(1972),但MPO基因在本发明前并未得到确定。

[0013] MPO在植物生物碱包括药用托烷类生物碱的合成途经中起作用。Hashimoto and Yamada,*Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*45:257-285(1994);Kutchan,In:Cordell,G.A.(ed.)*ALKALOIDS*(San Diego),vol.50.Academic Press,Inc.,San Diego,CA,USA,(1998)pp.257-316。

[0014] 已从烟草,黄花烟草,天仙子,及白曼陀罗与黄花曼陀罗杂种植物根部纯化MPO酶,与氧化腐胺和尸胺相比,该酶能更有效地氧化N-甲基腐胺。Mizusaki et al.,*Phytochemistry* 11:2757-2762(1972);Feth and Wagner,*Phytochemistry* 24:1653-1655(1985);Davies et al.,*Phytochemistry* 28:1573-1578(1989);Hashimoto et al.*Plant Physiol.*93:216-221(1990);Walton and McLauchlan,*Phytochemistry* 29:1455-1457(1990);Haslam and Young,*Phytochemistry* 31:4075-4079(1992);McLauchlan et al.,*Planta* 19:440-445(1993);Boswell et al.,*Phytochemistry* 52:871-878(1999)。

[0015] 消旋毒藜碱和新烟草灵[顺-2,4-二(3-吡啶基)哌啶]含有哌啶成分,消旋毒藜碱的哌啶成分被认为经由烟草中 Δ -1-哌啶来自尸胺。Watson and Brown,*J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*:2607-2610(1990)。虽然其亲合性低于N-甲基化二氨,尸胺是二氨氧化酶的良好底物,亦是MPO的底物。Hashimoto et al.(1990),supra;Walton and McLauchlan,*Phytochemistry* 29:1455-1457(1990);Boswell et al.,*Phytochemistry* 52:871-878(1999)。

[0016] 在我们申请美国临时专利60/814,542之后,Katoh等在*Plant Cell Physiol.*48(3):550-554(2007)及Heim等在*Phytochemistry* 68:454-463(2007)披露了烟草中参与烟碱合成途经的MPO基因。但是,他们在文献中并未提及利用该基因在烟草植物中改变烟碱或其它生物碱含量的方法或用途。

[0017] 因此,有必要持续认定其它表达可以调节的基因,以减少或增加生物碱生物合成,或通过改变植物中某一特定生物碱的合成来改变该植物的生物碱生成图谱。

发明内容

[0018] 一方面,本发明提供一种分离的核酸分子,其包括选自以下的核苷酸序列:(a) SEQ ID NO:1表示的核苷酸序列;(b) SEQ ID NO:2表示的核苷酸序列;(c) 编码具有SEQ ID NO:3

表示的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列; (d) 与 (a), (b) 或 (c) 的核苷酸序列至少85%相同, 并编码MPO酶的核苷酸序列; (e) 与 (a), (b), (c) 或 (d) 的核苷酸序列在严格条件下杂交, 并编码MPO酶的核苷酸序列; 和 (f) 因遗传密码的简并性而与 (a) 或 (b) 的核苷酸序列不同并编码MPO酶的核苷酸序列。

[0019] 另一方面, 本发明提供一种生产MPO酶的方法, 包括: (a) 使用包含权利要求1所述分离的核酸分子的核酸构建体遗传改造细胞和; (b) 在可以产生MPO酶的条件下培养所述细胞。

[0020] 另一方面, 本发明提供一种重组MPO酶, 其具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或SEQ ID NO:3的变体。

[0021] 在一个实施例中, 一种遗传工程宿主细胞包含权利要求1所述的核酸序列。在进一步实施例中, 宿主细胞选自: 细菌、酵母、丝状真菌、藻类、绿色植物及哺乳动物细胞。在另一个实施例中, 一种植物包含所述宿主细胞。

[0022] 另一方面, 本发明提供减少植物中生物碱的方法, 所述方法包括相对于对照植物, 下调N-甲基腐胺氧化酶的表达。在一个实施例中, 生物碱是吡咯烷类生物碱。在进一步实施例中, 吡咯烷类生物碱是烟碱。在另一个实施例中, 植物属于菸草属。在另一个实施例中, 植物是菸草。在另一个实施例中, 通过 (a) 在所述植物中引入核酸序列, 所述核酸序列包含 i) SEQ ID NO:1的至少21个连续核苷酸, 其中所述连续核苷酸位于正义或反义方向上; 和 (b) 在与相似条件下培养的对照植物相比, 所述核苷酸序列减少所述植物中N-甲基腐胺氧化酶的水平, 的条件下培养所述植物, 来下调N-甲基腐胺氧化酶的表达。在一个实施例中, 所述条件诱导内源性MPO基因的共抑制。

[0023] 另一方面, 本发明提供一种减少植物中吡咯烷类生物碱的方法, 所述方法包括下调MPO及下调NBB1、A622、QPT和PMT中的至少一种。

[0024] 另一方面, 本发明提供一种减少植物种群中吡咯烷类生物碱的方法, 其包括: (a) 提供突变的植物种群; (b) 检测所述植物种群内的靶向突变植物, 其中与相似条件下提供的对照植物相比, 所述靶向突变植物的N-甲基腐胺氧化酶基因表达降低, 或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低, 所述检测包括 (i) 利用根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2设计的引物来PCR扩增来自突变植物种群中突变植物中的N-甲基腐胺氧化酶基因区域, (ii) 确定在被扩增区域和野生型基因相应区域之间导致N-甲基腐胺氧化酶基因的表达降低或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低的错配, 和 (iii) 确定含有所述错配的突变植物; 和 (c) 选择性培育所述靶向突变的植物, 以产生下述植物种群, 即其与相似条件下产生的对照植物种群相比, N-甲基腐胺氧化酶基因的表达降低或N-甲基腐胺氧化酶的活性降低。

[0025] 在一个实施例中, 所述吡咯烷类生物碱是烟碱。在另一个实施例中, 所述植物是菸草。

[0026] 另一方面, 本发明提供一种使用包含SEQ ID NO:1的至少21个连续核苷酸的核苷酸序列遗传工程化的宿主细胞, 其中所述连续核苷酸位于正义或反义方向上。在一个实施例中, 细胞是茄科或古柯科植物细胞。在另一个实施例中, 细胞是烟草属, 曼陀罗属, 颠茄属, 澳茄属, 天仙子属, 茄参属, 木曼陀罗属, 赛莨菪属及红木属植物细胞。在另一个实施例中, 该细胞为烟草植物细胞。在进一步实施例中, 该核苷酸序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0027] 在另一个实施例中,本发明提供通过前述任一方法生产的生物碱减少的植物。在另一个实施例中,减少的生物碱是烟碱。在进一步实施例中,生物碱减少的产品产自生物碱减少的植物。在另一个实施例中,减少的生物碱是烟碱。

[0028] 另一方面,本发明提供一种增加植物中MPO酶的方法,包括(a)在所述植物中引入含有编码MPO酶的核苷酸序列的核酸构建体;(b)在所述核苷酸被表达的条件下培养所述植物,从而与相似条件下培养出的对照植物相比,增加所述植物中MPO酶的水平。

[0029] 在一个实施例中,所述植物是茄科或古柯科植物。在另一个实施例中,所述植物是烟草属,曼陀罗属,颠茄属,澳茄属,天仙子属,茄参属,木曼陀罗属,赛茛菪属及红木属植物。在另一个实施例中,托烷类生物碱被增加,所述托烷类生物碱包括东茛菪碱或古柯碱。

[0030] 另一方面,本发明提供一种增加植物中吡咯烷类生物碱水平的方法,其包括:(a)在所述植物中引入编码MPO酶的核苷酸序列和编码至少一种选自NBB1、A622、QPT和PMT的酶的核苷酸序列;和(b)在与相似条件下培养出的对照植物相比,所述植物产生增加的水平水平的N-甲基腐胺氧化酶和至少一种选自NBB1、A622、QPT和PMT的酶的条件下培养所述植物。

[0031] 在一个实施例中,本发明提供一种通过前述任一方法生产的生物碱增加的植物。

附图说明

[0032] 图1描述吡咯烷类生物碱(烟碱)及托烷类生物碱(东茛菪碱和古柯碱)生物合成途径。

[0033] 图2描述用RT-PCR分析本塞姆氏烟草不同组织中MPO的表达。

[0034] 图3描述用定量RT-PCR(qRT-PCR)分析经茉莉酸甲酯(MeJa)处理后本塞姆氏烟草根部PMT及MPO的表达。

[0035] 图4描述用病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing,VIGS)技术在本塞姆氏烟草沉默生成烟碱的基因,图4标示出这些基因片段相对于全长MPO cDNA的位置及长度。

[0036] 图5A描述用HPLC方法测定对照植物及MPO VIGS载体侵染的植物叶部烟碱含量。

[0037] 图5B描述经茉莉酸甲酯(MeJa)处理后对照植物及TRV-MPO核酸建构物403B01侵染的植物烟碱含量。

[0038] 图6描述用HPLC方法测定MPO VIGS载体或含有GFP序列对照载体侵染的植物根部组织N-甲基腐胺含量。

[0039] 图7描述MPO VIGS载体侵染的植物根部MPO转录水平。

[0040] 图8描述MPO VIGS载体侵染的植物根部MPO活性。

[0041] 图9描述重组MPO的底物特异性及酶动力学。

[0042] 图10描述质谱(MS)检测分析MPO产物。

[0043] 图11描述气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析MPO衍生产物。

[0044] 图12描述电泳分析MPO超表达核酸建构物转染的植物的PCR放大产物。

[0045] 图13描述野生型及超表达MPO的转基因植物叶部烟碱含量。

具体实施方式

[0046] 本发明者克隆了编码MPO的基因。MPO基因的核酸序列,序列1(SEQ ID NO:1),已经

确定。序列2 (SEQ ID NO:2) 列出序列1 (SEQ ID NO:1) 中的开放读码区 (ORF), 其编码序列3 (SEQ ID NO:3) 中的多肽序列。

[0047] 根据图1, 吡咯烷类生物碱 (例如烟碱) 及托烷类生物碱 (古柯碱和例如东莨菪碱) 的生物合成均涉及中间代谢产物N-甲基吡咯啉离子。很明显, 可以通过影响代谢途径中的酶和/或中间产物来调控这些生物碱的生成。

[0048] MPO催化N-甲基腐胺的氧化脱胺反应形成4-甲基氨基丁醛, 后者自动环化形成N-甲基吡咯啉离子。N-甲基吡咯啉离子是合成高价值生物碱的一个关键构件分子。图1显示这一关键中间代谢产物的结构, 以及它在烟碱, 古柯碱和东莨菪碱中的位置。图1亦标明两个已知酶QPT及PMT。

[0049] 假设有足够的N-甲基腐胺, 根据图1, 很明显MPO含量和/或酶活性增加会增加N-甲基吡咯啉离子含量, 这会进一步增加烟碱, 古柯碱和东莨菪碱的生成。另一方面, 如果MPO含量和/或酶活性足够地降低, 烟碱, 古柯碱和/或东莨菪碱生物合成亦相应下降。

[0050] 在天然合成吡咯烷类生物碱的植物中, MPO基因或基因片段可以用来抑制吡咯烷类生物碱的生物合成 (例如, 烟碱的生物合成)。例如, 烟草属植物 (例如, 烟草, 黄花烟草和本塞姆氏烟草) 天然合成烟碱。烟草为高价值农作物, 其在生物科技中的应用日益增加。通过抑制MPO阻断烟碱生物合成, 这可以用来生产不含烟碱或烟碱含量低的烟草植物, 这些植物可作为低毒性产品平台以生产来自于植物的药物, 即所谓产于植物的药物 (plant-made pharmaceuticals, PMPs) (例如, 重组蛋白和抗体), 或作为工业产品, 食品或生物量农作物生产平台。

[0051] 定义

[0052] 本说明书所用所有技术术语在生物化学, 分子生物学和农业学中通常使用; 因此, 本发明所属领域的技术人员通晓这些术语。那些技术术语可以在下列出版物查找到, 例如在: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 3rd ed., vol.1-3, ed.Sambrook and Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed.Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988 (including periodic updates); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 5th ed., vol.1-2, ed.Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, vol.1-2, ed.Green et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997。植物生物学技术方法在本处描述和在下列文献中详细阐述, 例如METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL, ed.Maliga et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1995。

[0053] 术语“编码 (encoding和coding)”指基因通过转录和翻译机制把信息提供到细胞里, 一系列氨基酸在细胞中被装配成特定氨基酸序列以产生活性酶的过程。由于遗传密码的简约性, DNA序列中某些碱基变化并不改变蛋白质的氨基酸序列。

[0054] 正如这里所使用, “表达 (expression)”指通过基因转录生成RNA产物, 或经由核苷酸序列编码产生蛋白质。

[0055] “超表达 (overexpression)”或“上调 (up-regulation)”是指相对对照细胞或植

物,在细胞或植物及其衍生后代植物通过遗传工程增加某一基因序列或其变异的表达(例如,“MPO超表达”)。

[0056] 术语“抑制(suppression)”或“下调(down-regulation)”同义,表示相对对照细胞或植物,在细胞或植物及其衍生后代植物通过遗传工程降低某一基因序列或其变异的表达(例如,“MPO下调”)。

[0057] “生物碱(alkaloid)”指植物中次级代谢生成的含氮基本化合物。“吡咯烷类生物碱(pyrrolidine alkaloid)”指分子结构中含有吡咯烷环的生物碱,例如,烟碱。烟碱和相关生物碱在已发表文献中亦指吡啶烷类生物碱。“吡啶烷类生物碱(pyridine alkaloid)”指分子结构中含有吡啶烷环的生物碱,例如,烟碱。“托烷类生物碱(tropane alkaloid)”指分子结构中含有双环托烷环的生物碱,例如,东莨菪碱或古柯碱。“烟碱类生物碱(nicotinic alkaloid)”指烟碱或结构上与烟碱相关的生物碱,或指烟碱合成途径中生成的生物碱。具有代表性的烟碱类生物碱包括,但不局限于,烟碱,去甲烟碱,去氢新烟碱,消旋毒藜碱,新烟草灵[顺-2,4-二(3-吡啶基)哌啶],N-甲基去氢新烟碱,N-甲基消旋毒藜碱,麦斯明,假木贼因,甲酸基去甲烟碱,二烯烟碱及古丁尼。亦有报道烟草叶中含有其它非常次要的烟碱类生物碱,例如,Hecht,S.S.et al.,Accounts of Chemical Research 12:92-98(1979);Tso,T.C.,Production,Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant.Ideals Inc.,Beltsville,MD(1990)。

[0058] 正如这里所使用,“生物碱含量(alkaloid content)”指植物中生物碱总量,例如,以pg/g干重(DW)或ng/mg鲜重(FW)为单位。“烟碱含量(nicotine content)”指植物中烟碱总量,例如,以mg/g DW或FW为单位。

[0059] “烟碱含量减少的烟草植物(decreased nicotine tobacco plant)”或“烟碱含量下降的烟草植物”包括经遗传工程改良烟碱含量减少至不超过50%的烟草植物,最好烟碱含量少于对照的同种或同类植物的10%或1%。

[0060] “烟碱含量增加的烟草植物(increased nicotine tobacco plant)”包括经遗传工程改良烟碱含量多于对照的同种或同类植物10%,最好烟碱含量多于对照的同种或同类植物的50%,100%或200%。

[0061] “MPO酶活性(MPO activity)”指N-甲基腐胺经N-甲基腐胺氧化酶(MPO)催化形成4-甲基氨基丁醛和过氧化氢的氧化过程。

[0062] “N-甲基腐胺氧化酶(N-methylputrescine oxidase),”“MPO”或“MPO酶(MPO enzyme)”指氧化N-甲基腐胺形成N-甲基氨基丁醛的酶。

[0063] I. 减少植物中生物碱生成

[0064] A. 通过抑制MPO减少生物碱。

[0065] 利用本发明中的MPO核酸序列可以以若干本领域已知的技术抑制内源性MPO基因以减少生物碱(例如,烟碱)生成,例如,RNA干扰(RNAi)技术,人工微小RNA技术,病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术,反义技术,有义协同抑制技术和定向突变技术。因此,本发明提供通过抑制MPO基因减少植物中生物碱含量的方法和核酸建构物。抑制一个以上的MPO基因可以进一步减少植物中生物碱含量。

[0066] B. 通过抑制MPO和A622,NBB1,QPT及PMT其中至少之一减少生物碱。

[0067] 以往报告显示在烟草中抑制一个以上的生物碱合成基因比仅抑制一个基因能更

有效地减少烟碱类生物碱含量。例如,同时抑制A622和NBB1要比抑制其中之一能更有效减少烟碱含量。见WO/2006/109197。因此,本发明考虑协同抑制MPO和A622,NBB1,QPT,和PMT其中至少之一来进一步减低生物碱含量。根据本法明的一个方面,将含有MPO和A622,NBB1,QPT及PMT其中至少之一的核酸建构物导入细胞或植物中。一个有说明性的核酸建构物可以包括MPO和QPT。

[0068] II. 增加植物中生物碱生成

[0069] A. 通过超表达MPO增加生物碱。

[0070] 本发明还涉及通过在植物中超表达MPO增加生物碱相关。MPO基因或其开放读码区可以用来增加药用生物碱含量,例如,植物中的吡咯烷类生物碱(例如,烟碱)及托烷类生物碱(例如,东莨菪碱和古柯碱)。

[0071] B. 通过超表达MPO和A622,NBB1,QPT及PMT其中至少之一增加生物碱。

[0072] WO 2005/018307探讨通过超表达生物碱合成途经中一个以上的基因以进一步增加生物碱,如烟碱。Sato,F.,et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(1):367-72(2001)。因此,本发明考虑超表达MPO和至少另外一个基因如PMT,与单独上调MPO相比,将导致进一步增加生物碱含量。

[0073] 根据本发明的一个方面,将含有MPO和A622,NBB1,QPT及PMT至少其中之一的核酸建构物导入植物细胞中。一个有说明性的核酸建构物可以包括例如MPO和PMT。类似地,例如,可以通过杂交超表达MPO的转基因植物和超表达PMT的转基因植物这一遗传工程方式来产生超表达MPO和PMT的植物。连续杂交和选择可生成超表达MPO和PMT的植物。

[0074] III. 生产MPO酶

[0075] MPO可以导入宿主细胞,从而在先前不产生该酶的生物或细胞中制造MPO酶。从这些经遗传工程改良的生物或细胞中可以生产若干系列产品,包括生物碱,生物碱前驱物,生物碱类似物和生物碱合成酶。这些产品可以包括烟碱,烟碱前驱物,烟碱类似物和烟碱合成酶。因为MPO催化托烷类生物碱(例如,东莨菪碱和古柯碱)合成途径的一个关键步骤,含有导入MPO基因的细胞可以用来生产托烷类生物碱,托烷类生物碱前驱物,托烷类生物碱类似物及托烷类生物碱合成酶。有代表性的宿主细胞包括,但不局限于,绿色植物细胞,细菌,酵母,丝状真菌,藻类及哺乳动物细胞。

[0076] 生物碱合成序列

[0077] 已在若干植物中确定生物碱合成基因,例如烟草植物。因此,本发明包含旨在增加生物碱合成的任何核酸,基因,多聚核苷酸,DNA,RNA,mRNA,或cDNA分子,无论它来自何种植物的染色体或由人工合成。此外,这些生物碱合成序列在细胞如昆虫细胞表达产生生物碱。DNA或RNA可以是双链或单链。单链DNA可以是编码链,亦称为有义链,它也可以是非编码链,亦称为反义链。

[0078] 本领域的技术人员知晓本发明中的MPO包括序列1 (SEQ ID NO:1) 和2 (SEQ ID NO:2) 所含序列,其中包括含至少21个连续核苷酸的片段,该片段长度足以有效沉默植物中基因(Hamilton,AJ and Baulcombe,DC Science 286,950-952(1999))。本发明还由序列1 (SEQ ID NO:1) 和2 (SEQ ID NO:2) 的各种“变异序列”中核酸分子组成,包括在序列中删除,替代,插入或加入一个或多个碱基,而该“变异序列”编码具有生物碱合成活性的多肽。因此,“删除,替代,插入或加入一个或多个碱基”的序列编码多肽,该多肽即使是在一个或多

个氨基酸被删除,替代,插入或加入的情况下仍保持生理活性。此外,可能由于基因产物翻译后修饰或MPO基因的多态性,MPO能以多种形式存在。本发明的范围涵盖含有这样修饰且能编码生物碱合成酶的核苷酸序列。

[0079] 例如,可删除多聚腺苷酸尾链,删除5'-或3'-端,删除非翻译区和删除碱基在一定程度上导致删除氨基酸。只要不导致移码突变,碱基也可以被替代。也可以通过“加入”碱基加入氨基酸。但任何改变不应导致生物碱合成酶活性的丢失。在这个意义上,可以通过改变本发明中DNA碱基序列来修饰DNA以达到在某些特定位点替代,删除,插入或加入氨基酸,或通过定向突变加入氨基酸,见Zoller&Smith,Nucleic Acid Res.10:6487-500(1982)。

[0080] 也可以用适当的碱基从头开始合成生物碱合成序列,例如,引用我们在这里披露的蛋白质序列来制造DNA分子,虽然不同于天然DNA序列,合成的DNA分子可以编码产生具有相同或相似氨基酸序列的蛋白质。这类合成DNA分子有益于将DNA序列导入非植物细胞,编码外源蛋白,由于不同的(非植物)密码子利用频率,如果不修饰而应用,会导致宿主细胞翻译效率低效。

[0081] 在这里所说的“分离的”核酸分子是指从天然环境分离的核酸分子,DNA或RNA。例如,包含在DNA建构物中的重组DNA分子在本发明中被认为是分离的核酸分子。其它例子包括外源宿主细胞中的重组DNA分子或在溶液中部分或大部分纯化的DNA分子。分离的RNA分子包括本发明中DNA分子体外转录的RNA。根据本发明,分离的核酸分子也包括合成产生的分子。

[0082] “嵌合核酸”包括编码序列或片段,其连接到与细胞中天然核苷酸编码序列不同的核苷酸序列。

[0083] “异源性核酸”指导入细胞(或祖先细胞)中的核酸,DNA或RNA,该异源性核酸不是所导入细胞中天然核酸序列的拷贝。该异源性核酸可以包含其导入细胞中天然核酸序列的部分拷贝,或包含其部分片段。

[0084] “内源性核酸”或“内源性序列”指将通过经遗传工程改变的植物或生物中“天然的,”即固有的,核酸序列。它将通过经遗传工程改变的植物或有机体之基因组中存在的核酸,基因,多核苷酸,DNA,RNA,mRNA,或cDNA分子。

[0085] “外源性核酸”指人为导入细胞(或祖先细胞)中的核酸,DNA或RNA。该外源性核酸片段可以是其导入细胞中天然核酸序列的部分拷贝或是天然核酸序列的部分片段。

[0086] 除非另外标明,这里所有通过DNA分子测序确定的核苷酸序列均用DNA自动测序仪(例如Model 3730xl,Applied Biosystems,Inc.)确定。因此,作为本领域的一个常识,使用这种自动测序方式确定的任何DNA序列可能含有差错,这里确定的任何核苷酸序列也可能含有差错。自动测定的核苷酸序列典型地与所测序的DNA分子实际序列至少95%同序,更典型地至少与所测序的DNA分子实际序列96%到99.9%同序。DNA分子实际序列可以通过其它方式更为准确地确定,例如,通过本领域所熟知的人工DNA测序。也正如本领域普通技术人员所熟知,与实际序列相比,插入或删除一个确定的核苷酸序列,在翻译该核苷酸序列时会导致移码;因此,根据某一确定核苷酸序列预测的氨基酸序列,其可能与被测序的DNA分子实际编码的氨基酸序列从插入或删除点起开始完全不同。

[0087] 为实现本发明,两个序列在杂交液中杂交形成双链复合物,杂交液含有6X SSC,0.5%SDS,5X Denhardt氏溶液和100μg非特异性载体DNA。见Ausubel et al.上述,及部分

2.9, 补充27 (1994)。序列在“中杂交严格度”杂交, 中杂交严格度指在温度60°C使用上述杂交液进行杂交。在“高杂交严格度”杂交, 温度升至68°C。在中杂交严格度下杂交反应后, 在室温下用2X SSC加0.05% SDS溶液清洗核苷酸5次, 然后在60°C用0.1X SSC加0.1% SDS溶液清洗核苷酸1小时。高杂交严格度杂交反应后, 清洗核苷酸在68°C条件下进行。为实现本发明, 杂交核苷酸是指用1ng, 比放射性为10,000cpm/ng的放射标记探针能检测到的杂交核苷酸, 其中在-70°C X-射线胶片曝光不超过72小时杂交核苷酸清晰可见。

[0088] 在有多个多核苷酸(核酸)或多肽序列的情况下, “序列同源性”或“同源性”指在某一特定区域比对两个序列时残基相同。当序列同源性百分比指蛋白质时, 人们认识到残基的不同源通常通过保守氨基酸替代不同来体现, 既氨基酸残基被具有相似化学特性(例如, 电荷及疏水性)的其它氨基酸残基代替, 而该分子的功能特性不改变。当序列在保守替代上不同时, 可以上调序列同源性百分比以纠正替代的保守性。具有该种保守替代不同的序列可以说具有“序列相似性”或“相似性”。调整序列同源性百分比的方法为本领域普通技术人员所熟知。这典型地涉及给保守性替代作为部分而不是完全错配评分, 从而增加同源性百分比, 例如, 一个同源氨基酸给1分, 非保守性替代氨基酸给0分, 保守性替代氨基酸则介乎于0到1分。例如, 保守性替代氨基酸评分通过装载有Meyers&Miller算法的程序PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA) 计算, Meyers&Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4:11-17 (1988)。

[0089] 本说明书所使用的序列同源性百分比是指通过在某一比较窗口内比较两个最佳比对序列值, 两个最佳比对序列在比较窗口内的多核苷酸序列部分与参照序列(其不含加入或删除)比较可能含有加入或删除(即空位)。序列同源性百分比的计算是通过确定两个序列中同源核酸碱基或氨基酸残基发生的数量以产生匹配残基数量, 匹配残基数量再除以比较窗口内全部残基数量, 其结果再乘以100以产生序列同源性百分比。

[0090] 本发明中的核酸序列应与序列1-2 (SEQ ID NO:1-2) 的核酸序列至少60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同源, 最好应与序列1-2 (SEQ ID NO:1-2) 的核酸序列至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同源。两个核酸序列间的差异可以发生在参照核苷酸序列5' 或3' 末端部位, 或两末端间的任何部位, 或单独分散在参照序列的核苷酸中, 或在参照序列中簇集。

[0091] 从实用方面讲, 任何特定的核酸分子与参照核苷酸序列是否至少85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同源是通过使用本领域所熟知的标准算法比较两个分子, 并可以利用公开的计算机程序如BLASTN程序来确定。见Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997)。

[0092] 本发明进一步提供含序列1 (SEQ ID NO:1) 和序列2 (SEQ ID NO:2) 中核苷酸序列的核酸分子, 其编码具活性的生物碱合成酶, 该酶的氨基酸序列相对于序列3 (SEQ ID NO:3), 并且本发明中的蛋白质包括未改变生物碱合成酶功能的氨基酸替代, 加入和删除。

[0093] “变异序列”指与标准或某一给定基因或蛋白质的核苷酸或氨基酸序列有差异的核苷酸或氨基酸序列。术语“同种异形”, “同种异体”和“类似物”亦指核苷酸或氨基酸序列的“变异序列。”通过加入, 删除, 或替代一个或多个氨基酸而改变的氨基酸序列, 或发生改变的核苷酸序列, 可以被认为是“变异序列。”“变异序列”也可以是“保守性”改变, 即一个氨基酸被结构或化学特性类似的氨基酸所替代, 例如, 异亮氨酸替代亮氨酸。“变异序列”也可

能由于“非保守性”改变,例如,色氨酸替代缬氨酸。类似次要序列变异也可包括删除和/或插入氨基酸。可以利用本领域所熟知的计算机程序所提供的指南,如Vector NTI Suite (InforMax, MD) 软件,来确定哪些氨基酸残基可以被替代,插入或删除。“变异序列”也可指如Maxygen公司专利中所描述的那些“重排基因”(例如,美国专利6,602,986号)。

[0094] 减少生物碱的方法

[0095] 在一方面,本发明提供减少MPO活性和生物碱含量的方法和核酸建构物,也提供生产物碱含量减少的植物的方法和核酸建构物。虽然其它方法也可以用来减少生物碱含量,本发明主要应用反义技术,有义协同抑制技术, RNA干扰 (RNAi) 技术,人工微小RNA技术,病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 技术,反义技术,有义协同技术和定向突变技术。

[0096] RNAi技术利用RNAi质粒建构物进行稳定转染(Helliwell and Waterhouse, *Methods Enzymol.* 392:24-35 (2005))。该质粒由反向重复结构中要被沉默的靶基因片段组成。DNA间区,通常是内含子,隔离反向重复结构。由适当启动子驱动的RNAi建构物,例如,花椰菜镶嵌(花叶)病毒(CaMV) 35S启动子,其整合在植物基因组中,驱动转基因转录合成RNA分子,后者通过碱基配对形成双链发夹结构RNA(hairpin RNA, hpRNA)。植物识别该双链RNA结构,并将其切为小片段RNAs(长约21个核苷酸),即小片段干扰RNAs(siRNAs)。siRNAs与蛋白质复合物RISC相结合,RISC直接引导降解靶基因mRNA。

[0097] 人工微小RNA(amiRNA)技术利用可以沉默植物和其它真核细胞内源性基因的微小RNA(miRNA)途径(Schwab et al., *Plant Cell* 18:1121-33 (2006); Alvarez et al., *Plant Cell* 18:1134-51 (2006))。该方法使用大约由21个核苷酸组成的沉默基因片段,将其导入先质miRNA基因以形成先质amiRNA建构物。后者通过本领域普通技术人员所熟知的转染方法转移至植物基因组。先质人工微小RNA(Pre-amiRNA)转录后经加工生成人工微小RNA(amiRNA)靶基因,其与人工微小RNA序列的21个核苷酸同序。

[0098] RNAi沉默技术中,两个因素可能影响所用片段的长度。片段越短,基因沉默成功的可能性越小,但是发夹结构很长会增加其在细菌宿主细胞重组的机会。沉默的有效性似乎也依赖于靶基因,这可能反映靶mRNA的可接近度,或在该基因活跃的细胞中靶mRNA和hpRNA的相对多寡。长度为100到800的碱基对片段,最好是300和600碱基对之间,通常适于以最大程度增加沉默的有效性。另外一个考虑是靶基因所在部位,在5' -非翻译区,编码区和3' -非翻译区沉默基因均可取得良好效果。由于沉默的机制取决于序列同源性,有可能交叉沉默相关mRNA序列。如果不想这样,应选择与其它序列同源性低的区域,例如,5' -或3' -非翻译区。避免交叉沉默同源性序列的一条规则是在核酸建构物和非靶基因序列间的同源性少于20个碱基。这些原则大部分也适用于设计amiRNAs时靶区域的挑选。

[0099] 病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术利用植物天然抗病毒机制,其类似于RNAi技术。VIGS重组病毒含有宿主DNA片段,感染植物后导致靶基因转录后基因沉默。在一个实施例中,可以使用基于VIGS系统的烟草脆裂病毒(TRV)。有关该系统的描述参见如下文献, Baulcombe D.C., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:109-113 (1999); Lu R, et al., *Methods* 30: 296-303 (2003); Ratcliff F. et al., *The Plant Journal* 25:237-245 (2001); 及美国专利7,229,829。

[0100] 反义技术将能与靶基因产生的信使RNA(mRNA)结合的反义寡核苷酸导入植物。该“反义”寡核苷酸的碱基序列与靶基因mRNA的序列,即“有义”序列,互补。反义mRNA片段阻止

有义mRNA片段的活性,从而有效地灭活该基因的表达。有关应用反义技术沉默植物基因更详尽的描述参见Stam et al.,Plant J.21:27-42(2000)。

[0101] 有义协同抑制技术将高度表达的有义转基因导入植物,造成该转基因及内源性基因表达的下降(Depicker and van Montagu,Curr Opin Cell Biol9:373-82(1997))。其效果取决于转基因与内源性基因之间的序列同源性。

[0102] 可以利用诸如定向局部病变的诱发基因组(TILLING)及快速中子撞击“删除基因”等定向突变技术敲除植物基因(Henikoff,et al.,Plant Physiol135:630-6(2004);Li et al.Plant J.27:235-242(2001))。TILLING使用诱变剂处理种子或个体细胞以引发点突变,使用检测单个核苷酸突变的敏感方法可以发现靶基因中的点突变。可以用诸如PCR方法检测所需突变(例如,导致靶基因产物灭活的突变)。例如,可以预备根据靶基因设计的寡核苷酸引物,也可以通过PCR在诱变植物群体放大靶基因区域。经放大的诱变基因与野生基因退火,从而可以发现诱变基因与野生基因间的错配。检测到的基因序列差异可以溯源于含有诱变基因的植物,从而显露哪些突变植物会有所需的表达(例如,靶基因的沉默)。这些植物可以通过选择育种来产生具备所需表达的植物群体。TILLING可以提供包括错义和敲除突变等使靶基因表达下降的等位基因系列,它被视为是一种不需要导入转基因就可能敲除基因的方法,更可能被消费者所接受。快速中子撞击在植物基因组引发突变,即基因删除,这可以通过与TILLING相似的方式用PCR检测到。

[0103] 核酸建构物

[0104] 根据本发明的一个方面,抑制生物碱合成的序列被加入适合导入植物或细胞内的核酸建构物。因此,该类核酸建构物可以用于在植物或细胞中抑制MPO,并抑制A622,NBB1,PMT及QPT中至少之一。

[0105] 另一方面,增加生物碱合成的序列被加入适合导入植物或细胞内的核酸建构物。因此,该类核酸建构物可以用于在植物中超表达MPO和可选择地超表达例如A622,NBB1,PMT及QPT中至少之一以及在细胞中表达MPO和表达例如A622,NBB1,PMT及QPT中至少之一。

[0106] 可以利用标准技术构建重组核酸建构物。例如,可以用限制性内切酶切割载体中含有供转录用DNA序列的相关片段。供转录用DNA序列也可以通过退火和连接人工寡核苷酸,或经聚合酶链反应(PCR)利用人工寡核苷酸在DNA末端生成适当的内切酶切割位点。然后,将该DNA序列克隆入含有适当调控元素例如上游启动子和下游终止子的载体。

[0107] 本发明的一个重要方面是对核酸建构物的利用,其中生物碱合成酶编码序列与一个或多个调控序列操纵联结,在不影响正常发育或生理的情况下,这些调控序列驱动生物碱合成酶编码序列在某些细胞类型,器官或组织的表达。

[0108] “启动子”指转录起始点上游参与识别和结合RNA聚合酶及其它蛋白质以启动转录的DNA区域。“组成型启动子”指在植物中终生活跃和在绝大多数环境条件下活跃的启动子。组织特异的,组织优先的,细胞类型特异的和可诱导启动子构成所谓的“非组成型启动子。”“操纵联结”指启动子与第二个序列在功能上联结,启动子序列启动和介导第二个DNA序列的转录。通常,“操纵联结”意味着联结的核酸序列是连续的。

[0109] 组成型启动子有助于导入细胞中的核酸序列的表达,以减少或增加MPO,A622,NBB1,PMT,或QPT的表达,例如,香石竹(康乃馨)蚀环病毒(CERV)启动子,花椰菜镶嵌(花叶)病毒(CaMV)35S启动子,或更特别的双重增强的CaMV启动子,其由两个CaMV 35S启动子串联

排列组成(称为“双35S”启动子)。组织特异的,组织优先的,细胞类型特异的和可诱导启动子可能适用于某些情况。例如,在不影响在其它组织表达的情况下,组织特异的启动子允许上述蛋白质在某些组织中超表达。

[0110] 组织优先的启动子包括在根部组织活跃的启动子,例如,烟草RB7启动子(Hsu et al. *Pestic. Sci.* 44:9-19 (1995);美国专利号5,459,252),玉米CRWAQ81启动子(美国公开专利申请20050097633);拟南芥ARSK1启动子(Hwang and Goodman, *Plant J* 8:37-43 (1995)),玉米MR7启动子(美国专利号5,837,848),玉米ZRP2启动子(美国专利号5,633,363),玉米MTL启动子(美国专利号5,466,785和6,018,099),玉米MRS1, MRS2, MRS3, 和MRS4启动子(美国专利申请20050010974),拟南芥隐蔽性启动子(美国专利申请20030106105)和在导致烟碱生物合成酶表达升高的条件下激活的启动子,例如,烟草RD2启动子(美国专利号5,837,876),PMT启动子(Shoji T. et al., *Plant Cell Physiol.* 41:831-39 (2000b), WO2002/038588);或A622启动子(Shoji T. et al., *Plant Mol Biol.* 50:427-40 (2002))。

[0111] 本发明中的载体也可以含有终止序列,其位于本发明涵盖的核酸分子的下流,终止mRNA转录,导致聚腺苷酸序列的加入。此类终止子的例子包括根癌农杆菌胭脂碱合酶终止子(Tnos),根癌农杆菌甘露碱合酶终止子(Tmas)和CaMV 35S终止子(T35S)。根据本发明,尤为优先使用的终止区域包括豌豆二磷酸核酮糖羧化酶小亚基终止区(TrbcS)或Tnos终止区。表达载体也可以含有增强子,起始密码子,剪接信号序列及靶序列。

[0112] 本发明中的载体也可以含有选择标记,以便于识别培养细胞中被转化细胞。该选择标记可以和外源核酸分子结合,即该基因与启动子操纵联结。正如在此所使用的,“标记”指编码某一特征或表型的基因,其允许选择或筛选含有该标记的植物或细胞。例如,植物中编码对抗菌素或除草剂有抗性的标记基因,其允许选择被转化细胞。

[0113] 合适的选择性标记包括腺苷脱氨酶,二氢叶酸还原酶,潮霉素磷酸转移酶,胸苷激酶,黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,草甘膦和草铵膦抗性及氨基糖苷3'-O-磷酸转移酶(卡那霉素,新霉素和G418抗性)。这些标记可以包括对G418,潮霉素,博来霉素,卡那霉素和庆大霉素抗性。核酸建构物也可以含有选择性标记基因Bar,其提供对除草剂草丁膦类似物如草铵膦的抗性。Thompson et al., *EMBO J.* 9:2519-23 (1987)。亦有其它合适的选择性标记。

[0114] 也可以使用可视标记,如绿色荧光蛋白(GFP)。根据控制细胞分裂来确定或选择转化植物的方法亦有描述。见WO 2000/052168和WO 2001/059086。

[0115] 也可以包括源于细菌或病毒的复制序列,以便在细菌或噬菌体宿主克隆载体。优选地,使用源自原核细胞宿主范围广泛的复制序列。可以在细菌中放入合适的选择性标记以选择含有所需核酸建构物的细菌细胞。合适的原核细胞选择性标记也包括抗菌素如卡那霉素或四环素抗性。

[0116] 正如本领域所熟知的,载体也可含有编码其它功能的核酸序列。例如,根癌农杆菌为宿主时,可以加入T-DNA序列以易化随后向植物染色体的转移和整合。

[0117] 该类基因建构物活性的筛选可以通过根癌农杆菌转染宿主植物及筛选改变的生物碱水平。

[0118] 可以适当地从Genbank™核苷酸数据库获取基因核苷酸序列,并寻找核酸内切酶不能切割的位点。可以通过常规方法给这些基因加入上述位点,如用PCR引物或通过亚克隆加入上述位点。

[0119] 优选地,核酸建构物包含在载体内,最为合适的是,其包含在能在适合表达的合适宿主(植物)细胞内表达的载体内。任一能够产生含有导入DNA序列植物的载体均可达到这一目的。

[0120] 这些合适的载体为本领域的普通技术人员所熟知,并在普通技术参考书中有描述,如Pouwels et al.,Cloning Vectors.A Laboratory Manual,Elsevier,Amsterdam (1986)。尤为合适的载体包括Ti质粒载体。

[0121] 遗传工程和选择

[0122] 本发明包括通过导入编码生物碱合成酶的多聚核苷酸序列来遗传操纵植物或细胞,以达到调控生物碱合成的目的。因此,本发明提供在植物中减少或增加生物碱合成的方法和核酸建构物。此外,本发明提供在宿主细胞如细菌,酵母,丝状真菌,藻类,绿色植物及哺乳动物细胞生产生物碱及其关联化合物的方法。

[0123] “遗传工程”包括将核酸或特定突变导入生物宿主的任何方法。例如,植物遗传工程包括在植物中转染能抑制某一靶基因表达的多聚核苷酸序列,以达到和对照植物相比降低该靶基因表达的目的。植物遗传工程也包括在植物中导入多聚核苷酸序列以表达某一新基因,或增加植物中天然存在基因产物的含量。在本申请文件中,“遗传工程”包括转基因植物和植物细胞,以及通过定向诱变生成的植物和植物细胞,例如,通过使用嵌合RNA/DNA寡核苷酸,描述见Beetham et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:8774-8778(1999)和Zhu et al.,Proc Natl Acad Sci USA.96:8768-8773(1999),或所谓的“重组诱导寡聚核碱基,”描述见PCT申请W0 2003/013226。类似地,植物遗传工程也包括在植物或植物细胞导入修饰过的病毒,后者导致宿主遗传改变,正如这里所描述的那样,产生类似于转基因植物的结果。见,例如,美国专利号4,407,956。此外,也可以通过简单的(即不涉及外源核苷酸序列)方法导入仅从宿主同类植物或性匹配植物获得的核酸序列,生成经遗传工程改变的植物或植物细胞。例如,见美国公开专利申请号2004/0107455。

[0124] A. 植物

[0125] “植物”一词包括整个植物,植物器官(例如,根,茎,叶等),种子,分化或未分化植物细胞及其子代。植物物质不受限地包括种子悬浮培养物,胚胎,分生组织,愈伤组织,叶,根,茎,芽,果,配子体,孢子体,花粉及小孢子。可以在本发明中应用的植物种类通常与可以接受遗传工程技术改变的高等植物的范围一样广,包括单子叶植物和双子叶植物以及裸子植物。生产烟碱较好的植物包括茄科中的烟草属,澳茄属,茄属,花烛属,和蛾蝶花属或菊科中的鳢肠属和百日菊属。

[0126] “烟草”或“烟草植物”指烟草属中任何产生烟碱的物种,包括但不限于如下成员:丛生烟草(*Nicotiana acaulis*),渐尖叶烟草(*Nicotiana acuminata*),渐尖叶烟草(*Nicotiana acuminata* var.*Multzjlora*),非洲烟草(*Nicotiana africana*),花烟草(*Nicotiana alata*),抱茎烟草(*Nicotiana amplexicaulis*),阿伦特氏烟草(*Nicotiana arentsii*),渐狭叶烟草(*Nicotiana attenuata*),贝纳米特氏烟草(*Nicotiana benavidesii*),本塞姆氏烟草(*Nicotiana benthamiana*),毕基劳氏烟草(*Nicotiana bigelovii*),博内里烟草(*Nicotiana bonariensis*),洞生烟草(*Nicotiana cavicola*),克利夫兰式烟草(*Nicotiana clevelandii*),心叶烟草(*Nicotiana cordifolia*),伞状烟草(*Nicotiana corymbosa*),迪勃纳氏烟草(*Nicotiana debneyi*),高烟草(*Nicotiana*

excelsior), 福尔吉特氏烟草 (*Nicotiana forgetiana*), 香烟草 (*Nicotiana fragrans*), 粉蓝烟草 (*Nicotiana glauca*), 粘烟草 (*Nicotiana glutinosa*), 古特斯皮德氏烟草 (*Nicotiana goodspeedii*), 哥西氏烟草 (*Nicotiana gossei*), 混合烟草 (*Nicotiana hybrid*), 因古儿巴烟草 (*Nicotiana ingulba*), 川上烟草 (*Nicotiana kawakamii*), 奈特氏烟草 (*Nicotiana knightiana*), 蓝格斯多夫烟草 (*Nicotiana langsdorfi*), 狭叶烟草 (*Nicotiana linearis*), 长花烟草 (*Nicotiana longiflora*), 海滨烟草 (*Nicotiana maritima*), 拟似烟草 (*Nicotiana megalosiphon*), 摩西烟草 (*Nicotiana miersii*), 夜花烟草 (*Nicotiana noctiflora*), 裸茎烟草 (*Nicotiana nudicaulis*), 耳状烟草 (*Nicotiana obtusifolia*), 西方烟草 (*Nicotiana occidentalis*), 西方 subsp. *Hesperis* 烟草 (*Nicotiana occidentalis* subsp. *Hesperis*), 耳状烟草 (*Nicotiana otophora*), 圆锥烟草 (*Nicotiana paniculata*), 少花烟草 (*Nicotiana pauczjlora*), 碧东烟草 (*Nicotiana petunioides*), 蓝茉莉叶烟草 (*Nicotiana plumbaginifolia*), 四科烟草 (*Nicotiana quadrivalvis*), 雷蒙德氏烟草 (*Nicotiana raimondii*), 残波烟草 (*Nicotiana repanda*), 莲座叶烟草 (*Nicotiana rosulata*), 莲座叶 subsp. *Ingulba* 烟草 (*Nicotiana rosulata* subsp. *Ingulba*), 圆叶烟草 (*Nicotiana rotundifolia*), 黄花烟草 (*Nicotiana rustica*), 赛特式烟草 (*Nicotiana setchellii*), 特大管烟草 (*Nicotiana simulans*), 茄叶烟草 (*Nicotiana solanifolia*), 斯佩格茨烟草 (*Nicotiana spegauinii*), 斯托克通氏烟草 (*Nicotiana stocktonii*), 香甜烟草 (*Nicotiana suaveolens*), 林烟草 (*Nicotiana sylvestris*), 普通烟草 (*Nicotiana tabacum*), 蓝烟草 (*Nicotiana thyrsoflora*), 绒毛烟草 (*Nicotiana tomentosa*), 绒毛状烟草 (*Nicotiana tomentosifomis*), 三角叶烟草 (*Nicotiana trigonophylla*), 阴生烟草 (*Nicotiana umbratica*), 波叶烟草 (*Nicotiana undulata*), 颤毛烟草 (*Nicotiana velutina*), 芹烟草 (*Nicotiana wigandioides*), 和 *Sanderae* 烟草 (*Nicotiana x sanderae*)。

[0127] “烟草产品”指含有烟草植物物质的产品,包括例如用于戒烟的尼古丁胶姆糖和尼古丁贴片,卷烟烟叶,膨化烟叶和再造烟叶,雪茄烟叶,烟斗烟,卷烟,雪茄,和所有类型的无烟烟叶如嚼烟,鼻烟叶,唇齿烟和尼古丁含片。

[0128] 古柯科为开花植物,由4个属和大约240种组成,其最著名成员为古柯。曾有报道,被标记的4-甲胺基丁醛缩二乙醇(N-甲基吡咯啉离子的乙缩醛二乙醇衍生物)加入古柯叶中后,标记物参入到古柯碱的托烷类生物碱部分。Leete, *Planta Med.* 56:339-352 (1990)。因此,可以有理由地推测本发明中的MPO基因参与古柯碱的形成。

[0129] 正如本领域所熟知的,有若干种方式可以将基因和基因建构物导入植物,植物转染和组织培养技术的结合已成功地成为创造转基因植物有效策略不可缺少的一部分。

[0130] 本发明中可使用的这些方法已在它处描述 (Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205-225 (1991); Vasil, *Plant Mol. Biol.* 5:925-937 (1994); Walden and Wingender, *Trends Biotechnol.* 13:324-331 (1995); Songstad et al., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40:1-15 (1995)), 并为本领域普通技术人员所熟知。例如,本领域普通技术人员知道,通过真空浸渗 (Bechtold et al., *C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie*, 316:1194-1199 (1993)) 或有伤接种 (Katavic et al., *Mol. Gen. Genet.* 245:363-370 (1994)) 根癌农杆菌能够介导拟南芥的转染;此外,利用根癌农杆菌Ti-质粒同样可以介

导其它植物或作物的转染(例如,下胚轴(DeBlock et al., Plant Physiol. 91:694-701 (1989))或子叶柄伤口感染(Moloney et al., Plant Cell Rep. 8:238-242 (1989)),亦可以利用颗粒撞击/生物弹道法(Sanford et al., J. Part. Sci. Technol. 5:27-37 (1987); Nehra et al., Plant J. 5:285-297 (1994); Becker et al., Plant J. 5:299-307 (1994))或聚乙烯乙二醇辅助的原生质体转染方法(Rhodes et al., Science 240:204-207 (1988); Shimamoto et al., Nature 335:274-276 (1989))。

[0131] 发根农杆菌可以用于生产转基因植物发根培养物,包括烟草,正如所描述的那样,例如,Guillon et al., Curr. Opin. Plant Biol. 9:341-6 (2006)。“烟草发根”指烟草根部含有来自发根农杆菌Ri质粒并整合到基因组的T-DNA,其在不补充生长素和其它植物激素情况下能培养生长。烟草发根和完整烟草植物根部一样能够生产烟碱。

[0132] 此外,可以用根瘤菌属,中华根瘤菌属,或中慢生根瘤菌属转染植物(Broothaerts et al., Nature 433:629-633 (2005))。

[0133] 植物或植物细胞转染后,已整合所需DNA的植物或植物可以通过如下方法筛选,抗生素抗性,杀草剂抗性,氨基酸类似物耐性,或表型标记。

[0134] 可以用若干种方法如Northern杂交或定量反转录PCR(RT-PCR)确定植物细胞是否发生基因表达改变。完整转基因植物可以通过常规方法从转化细胞产生。这样的转基因植物可以繁殖和自花授粉来产生纯合株系。这些植物产生种子,后者含有编码引入特征的基因,可以生长具有产生选择表型的植物。

[0135] 通过本发明实现的生物碱成分改良可以和其它令人感兴趣的性状相结合,如疾病抗性,害虫抗性,高产量,或其它性状。例如,含有改良生物碱成分的适合的转基因的遗传工程生成的稳定转染植物,可以被用来将改良生物碱成分的性状渗入到一个商业上可以接受的遗传背景中,从而获得既含有改良生物碱成分又具有所需遗传背景的品种。例如,遗传工程生成的烟碱含量减少的烟草植物,可以将烟碱含量减少的性状渗入到具有抗病性如TMV,烟草黑胫病菌,或青霉抗性的烟草品种中。此外,可以将能够赋予其它性状的核酸建构物转染至本发明中含有改良生物碱成分植物的细胞中。

[0136] B. 细胞

[0137] 本发明考虑用编码生物碱合成酶的核酸序列来经由遗传工程生成细胞。例举的细胞包括,但不局限于植物细胞,例如颠茄,莨菪叶,拟南芥,及昆虫,哺乳动物细胞,酵母,真菌,藻类或细菌细胞。有关适用的宿主细胞的进一步讨论见Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990)。

[0138] “昆虫细胞”指任何可以被编码生物碱合成酶的基因转染的昆虫细胞,其表达的酶或其产物在产量上足以被回收。有说明性的昆虫细胞包括Sf9细胞(ATCC CRL 1711)。

[0139] “真菌细胞”指任何可以被编码生物碱合成酶的基因转染的真菌细胞,其表达的酶或其产物在产量上足以被回收。有说明性的真菌细胞包括酵母细胞如啤酒酵母(Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6:229-234)和甲醇酵母(例如,Invitrogen提供的KM714甲醇酵母)。也可以使用丝状真菌细胞如曲霉菌和木霉。Archer, et al., Antonie van Leeuwenhoek 65:245-250 (2004)。

[0140] “细菌细胞”指任何可以被编码生物碱合成酶的基因转染的细菌细胞,其表达的酶或其产物在产量上足以被回收。有说明性的细菌细胞包括大肠杆菌,如QIAGEN商业上提供

的M15/rep4大肠杆菌。

[0141] “哺乳动物细胞”指任何可以被编码生物碱合成酶的基因转染的哺乳细胞,其表达的酶或其产物在产量上足以被回收。有说明性的哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞。哺乳动物细胞也可以包括导入编码生物碱合成酶序列的受精卵细胞或胚胎干细胞。该类宿主细胞可以用来制造人以外的转基因动物。应用在哺乳动物细胞调控蛋白表达的系统的例子包括Clontech公司的Tet-Off及Tet-On基因表达系统和其它类似系统。Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:55475551 (1992)。

[0142] “藻类细胞”指在不影响藻类正常发育或生理的情况下任何可以被编码生物碱合成酶的基因转染的藻类细胞。有说明性的藻类细胞包括莱茵衣藻(Mayfield and Franklin, Vaccine 23:1828-1832 (2005))。

[0143] 由于在昆虫细胞中生产生物碱可能对昆虫的生长和发育产生不利影响,使用诱导表达系统可以减轻这些副作用。例如,昆虫细胞可以先在非诱导条件下生长至所需状态,然后再诱导酶表达。

[0144] 此外,可以给表达生物碱合成酶基因的细胞提供前驱物质以增加烟碱合成底物的可利用度。也可以给细胞提供前驱物质类似物,后者可以参合到天然烟碱类生物碱的类似物中。

[0145] 根据本发明,可以利用适当的技术将核酸建构物导入细胞,这些技术包括根癌农杆菌介导的植物细胞转染,颗粒撞击,电穿孔和聚乙烯乙二醇融合,磷酸钙法转染,DEAE-葡聚糖介导的转染或阳离子脂质介导的转染。

[0146] 在不使用选择性或可视标记的情况下,可以使用本发明中的核酸建构物对该类细胞施行遗传工程,所生成的转基因生物可以通过检测导入的核酸建构物来识别。例如,可以测量一个特定细胞中的蛋白,多肽或核酸来确定一个细胞是否被成功转染。正如在本行业常规进行的,例如,可以通过PCR或其它适当方法检测特定核酸序列或多肽序列以确定导入的核酸建构物的存在。此外,可以通过与在相似条件下生长的非转化细胞对比来识别生长率的差异或形态学特征上的差异以确定经遗传工程改良的细胞。见W02004/076625。

[0147] IV. 定量测定生物碱含量

[0148] A. 生物碱含量下降

[0149] 在本发明的一个方面,遗传工程生成的植物和细胞以生物碱含量下降为特征。

[0150] 有若干方法可以定量检测生物碱水平的减少,例如根据气液色谱法,高效液相色谱法,放射免疫法及酶联免疫法定量测量生物碱水平。本发明使用Waters公司的2695型分离模块进行高效液相色谱分析测量生物碱水平,该分离模块在色谱柱温度60°C条件下装备有Waters X-Terra RP185 μ m4.6x 150mm预柱。等度洗脱系统由80%A:20%B组成,溶剂A成份为50mM柠檬酸,10mM辛基磺酸(pH 3.0) (pH由三乙胺调节)及5%MeOH;溶剂B成份为甲醇;流速为1ml/分钟,共15分钟。注射容积为20 μ l。用光电二极管阵列检测法在261nm检测烟碱。

[0151] 在描述本发明中植物时,“生物碱含量减少的植物”或“生物碱含量下降的植物”一语包括生物碱含量是同种或同品种对照植物的50%以下,最好是所述对照植物的10%或1%以下的植物。

[0152] B. 生物碱含量增加

[0153] 在本发明的一个方面,遗传工程生成的植物和细胞以生物碱含量增加为特征。类

似地,遗传工程生成的细胞以生物碱含量增加为特征。

[0154] 在描述本发明中植物时,“生物碱含量增加的植物”一语包括生物碱含量是同种或同品种对照植物的10%以上,最好是所述对照植物的50%,100%或200%以上的植物。

[0155] 遗传工程生成的细胞以烟碱类生物碱合成为特征。例如,遗传工程发明的细胞比对照细胞能生产更多的烟碱。

[0156] 有若干方法可以定量检测生物碱水平的增加,例如根据气液色谱法,高效液相色谱法,放射免疫法及酶联免疫法定量测量生物碱水平。本发明使用装备有上述逆相色谱柱和光电二极管阵列检测仪的高效液相色谱法检测生物碱水平。

[0157] 产物

[0158] MPO基因可以用于在宿主细胞生产MPO。此外,可利用重组MPO的活性生产产物。例如,重组MPO可以用来合成或部分合成生物碱。MPO作用于部分N-甲基腐胺类似物产生非天然产物。见Boswell et al.,*Phytochemistry* 52:855-869(1999);Boswell et al.,*Phytochemistry* 52:871-878(1999)。因此,重组MPO有助于生产生物碱类似物,包括烟碱类似物。为此目的,有若干种方法生产大规模或商业化数量的MPO,包括从遗传工程生成的植物,细胞或培养系统提取重组酶,这包括,但不局限于,发根培养物,昆虫,细菌,真菌,植物,藻类,哺乳动物细胞培养和体外翻译系统。

[0159] *****

[0160] 下列例子利用功能基因组学阐释MPO基因在吡咯烷类生物碱(例如,烟碱)和托烷类生物碱(例如,东莨菪碱和古柯碱)生物合成中的重要作用。从模本植物本塞姆氏烟草通过测定消减cDNA文库序列获得表达序列标签(ESTs),该文库富含茉莉酸甲酯处理过的本塞姆氏烟草根部表达的基因。分析EST数据集以确定编码烟碱生物合成酶DNA序列的存在。利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术沉默候选基因,参与烟碱生物合成基因的沉默导致烟碱水平显著降低。

[0161] 本发明实验数据显示从本塞姆氏烟草分离出的基因,其编码参与烟碱生物合成的N-甲基腐胺氧化酶(MPO)。这些结果表明被克隆的MPO属于胺氧化酶超家族,在原核细胞和真核细胞广泛存在,其含有结合紧密的Cu II和来自酪氨酸的6-羟基多巴醌(TPQ)成份。

[0162] 下述这些例子只是说明而已,不应解读为对本发明的限制。

[0163] 例1.消减cDNA文库的建立,EST序列测定和MPO候选基因的选择。

[0164] 烟碱生物合成在烟草根部进行(Dawson RF,*Science* 94:396-397(1941)),通过昆虫伤害,创伤和施用茉莉酮酸酯(MeJa)诱导烟碱生物合成(Winz RA et al.,*Plant Physiol.*125:2189-2202(2001))。为了识别编码烟碱生物合成酶的基因,采用MeJa诱导的本塞姆氏烟草根部ESTs序列测定与利用VIGS功能分析相结合的新方式。

[0165] 本塞姆氏烟草的无基质栽培

[0166] 本塞姆氏烟草(茄科)秧苗在无基质栽培条件下生长,营养液为0.25x Hoagland氏溶液,其配有螯合铁溶剂,并用起泡器加入氧气。在3周大的植物根部加入MeJa至最后的浓度为11 μ M,分别在处理前(t=0)和处理后1,4,和7小时取样分析。利用RNeasy Midi试剂盒(Qiagen)分离全部RNA,即从未处理的叶和根部,各450mg,分离RNA,以及从MeJa处理1,4,和7小时的根部,各150mg,分别分离RNA,并将其合并。我们构建了三个不同的消减cDNA文库:NBREL2,用合并的MeJa处理的根部mRNA做检测子和未处理的根部mRNA做驱赶子;NBLEL3,用

合并的MeJa处理的根部mRNA做检测子和未处理的叶部mRNA做驱赶子;及NBREL4,用合并的MeJa处理的根部mRNA做检测子和驱赶子。

[0167] 消减VIGS-cDNA文库的建立

[0168] 利用PCR选择消减cDNA文库试剂盒(Clontech)进行cDNA合成,并作出部分改良。简单地,约250 μ g全体RNA与300 μ l Oligo(dT) 25Dynabeads(Dynal Biotech)在结合液(20mM Tris-HCl pH 7.5,1M LiCl,2mM EDTA)中混合。孵育10分钟后,用洗液B(10mM Tris-HCl pH 7.5,0.15M LiCl,1mM EDTA)洗涤微球3次,再用一链缓冲液洗2次。洗涤后含有mRNA的微球重新悬浮于40 μ l cDNA合成液(8 μ l 5X一链缓冲液,4 μ l 10mM dNTPs,24 μ l不含RNA酶的水和4 μ l (8U)AMV反转录酶),并在42 $^{\circ}$ C孵育1.5小时。加入120 μ l二链合成液(32 μ l 5X次链缓冲液,3.2 μ l 10mM dNTPs,8 μ l 20X混合酶和77 μ l不含RNA酶的水)进行二链合成,并在16 $^{\circ}$ C孵育2小时,而后加入4 μ l (12U)T4DNA聚合酶,孵育30分钟。加入20 μ l 0.5M EDTA终止反应。磁性分离微球,除去上清液,将微球再悬浮于500 μ l洗液(5mM Tris-HCl pH 7.5,0.5mM EDTA,1M NaCl,1% SDS和10 μ g/ml糖原),在75 $^{\circ}$ C加热15分钟。用洗液(5mM Tris-HCl pH 7.5,0.5mM EDTA,1M NaCl和200 μ g/ml BSA)洗涤微球3次,再用RsaI液洗涤2次。将微球悬浮于84 μ l H₂O,10 μ l 10x RsaI液,3 μ l (30U)RsaI,在37 $^{\circ}$ C过夜孵育。通过磁性分离微球来分离未结合的cDNA,并根据厂家的说明,将cDNA用于适配器连接,杂交和初次PCR。第2次PCR使用的引物为5' -CGGGATCCTCGAGCGGCCCGGGCAGGT-3' (BamHI位点底部划有横线)和5' -CGGAATTCAGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3' (EcoRI位点底部划有横线)。用EcoRI和BamHI消化PCR选择放大的cDNA片段(700ng)和TRV-RNA2载体pYL156,将消化产物连接(Liu Y,et al., Plant J.30:415-429,2002)。将联结产物经电穿孔导入DH10B大肠杆菌以生成初级文库。将其在琼脂平板放大,经电穿孔分离质粒DNA,将质粒DNA转染C58根癌农杆菌。连接效率经菌落PCR确定为98%。

[0169] 消减VIGS-cDNA文库EST测序和确定MPO候选基因

[0170] 用如下载体引物5' -GTTACTCAAGGAAGCACGATGAG-3' 和5' -CAGTCGAGAATGTCAATCTCGTAG-3' 进行PCR来放大cDNA插入物以用于序列测定,并随机选择根癌农杆菌菌落作为模版。生成的PCR产物用Big DyeTerminators测序试剂盒和引物5' -GTTACTCAAGGAAGCACGATGAG-3' 直接进行测序。分别从NBREL2,NBLEL3和NBREL4测定了2016,1920和1920个ESTs序列。去除质量不良的序列后,把3个数据集合并后共获得3480个特异转录体,包括606邻接片段和2874单例片段。全部VIGS-EST数据集通过经BLASTX与NCBI非冗余数据库比较来注解。

[0171] 已证明N-甲基腐胺氧化酶(MPO)是烟碱和其它生物碱生物合成的主要酶蛋白(图1),其为含铜的醌蛋白,氧化N-甲基腐胺形成N-甲基氨基丁醛(Mizusaki S. et al., Phytochemistry 11:2757-2762, (1972); Davies HM et al., Phytochemistry 28:1573-1578 (1989))。N-甲基氨基丁醛自动环化形成N-甲基吡咯啉离子。利用主题词查找BLASTX结果,我们确定7个被注解为铜胺氧化酶的ESTs。7个克隆形成2个簇(CL181邻接片段1,3个成员;CL547邻接片段1,2个成员)和3个单例片段(表1)。

[0172] 例2.克隆N-甲基腐胺氧化酶候选基因全长度cDNA

[0173] cDNA片段用于EST测序和VIGS分析,因此有必要利用RACE PCR获得全长度cDNA序列。

[0174] N-甲基腐胺氧化酶候选基因全长度cDNA RACE PCR

[0175] 根据生产商说明,利用GeneRacer试剂盒(Invitrogen)对5 μ g MeJa处理的本塞姆氏烟草根全体RNA进行逆转录以获取MPO 5' cDNA末端。使用PCR程序(95 $^{\circ}$ C 2分钟;循环35次,95 $^{\circ}$ C 30秒,58 $^{\circ}$ C 30秒,66 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 1分钟;72 $^{\circ}$ C 10分钟)和Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)以GeneRacer 5'引物和基因特异引物(5'-CTTGAGCATCTATGGGTGGC-3')进行5' RACE PCR的反应,。使用同一PCR程序以GeneRacer 3'引物和基因特异引物(5'-AGCAATGCGTGACTGTGATCCG-3')进行3' RACE反应。形成的平端PCR产物被克隆至pCR4Blunt-TOPO载体(Invitrogen),并从两端测序。

[0176] MPO基因全长2738碱基对(bp),编码2379bp的开放读码区(ORF)。该MPO基因序列列于SEQ ID NO:1。MPO开放读码区序列(ORF)列于SEQ ID NO:2。预测的氨基酸序列列于SEQ ID NO:3。

[0177] 根据对一级氨基酸序列的计算机分析(SEQ ID No:3),烟草MPO含有若干个具有铜胺氧化酶特征的功能区。氨基酸残基96-141形成铜胺氧化酶N2区,氨基酸残基221-325形成铜胺氧化酶N3区。MPO氨基酸514为保守的酪氨酸,其被翻译后修饰为氧化还原因子6-羟基多巴醌(TPQ)。在562,564和728位点保守的组氨酸残基可能行使与铜结合的功能。因此,很显然,来自某一对应物种的MPO可能在这些区域更为高度保守并含有类似的功能区。物种间这些功能区的高度同源性提供了烟草MPO基因靶区域,其核苷酸序列有助于在其它相关植物制备干扰RNA或其它基因沉默建构物。

[0178] 例3.MPO候选基因表达分析

[0179] 正如腐胺甲基转换酶(PMT)和催化烟碱生物合成的其它酶蛋白在烟草根特异性表达所证明的,烟碱生物合成发生在烟草根(Sinclair SJ et al.,Functional Plant Biol.31:721-729,(2004))。为确定克隆的MPO是否在根部表达,并为MeJa诱导,我们使用逆转录PCR(RT-PCR)测量MPO转录体的水平。

[0180] RT-PCR分析MPO和PMT在本塞姆氏烟草不同组织的表达

[0181] 使用逆转录PCR(RT-PCR)测定MPO在本塞姆氏烟草不同组织的表达,并将其与PMT相比较,已知后者参与烟碱生物合成,并作用于紧接MPO上游的一步(图1)。利用RNeasy Plant Mini试剂盒(Qiagen),并根据生产商的说明,从本塞姆氏烟草组织(嫩叶,老叶,茎,主根部,侧根部和整个幼苗)分离RNA。根据SuperScript III一链RT-PCR合成系统所描述的步骤(Invitrogen),从1.7 μ g全体RNA合成一链cDNA,随后进行PCR放大2 μ l cDNA,反应容积为50 μ l,使用PCR程序(95 $^{\circ}$ C 30秒,58 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 50秒,循环30次)和Taq聚合酶。肌动蛋白引物为

[0182] 5'-CTACAATGAGCTTCGTGTTGC-3' 和

[0183] 5'-TGCTGAGGGAAGCCAAGATA-3',PMT引物为

[0184] 5'-TCATGCTCTTTGAGTCAGCAA'-3' 和

[0185] 5'-CACCAGTGTTTATTGTTCACT-3',MPO引物为

[0186] 5'-AGGTGGACATCACAGAGGAA-3' 和

[0187] 5'-AGTCGTTTCAACTCCTCCCGTA-3'。各反应的一部分经含有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶电泳分析。

[0188] 如图2所示,MPO在本塞姆氏烟草植物的细侧根部表达最高。在主根部和包括根部

和叶组织的整个幼苗均检测到MPO转录体。因此,MPO在根部的特异性表达支持其在烟碱生物合成的作用。

[0189] qRT-PCR分析MPO和PMT在MeJa处理的本塞姆氏烟草根部的表达

[0190] 我们利用定量RT-PCR (qRT-PCR) 测定MeJa对MPO的诱导。我们使用和RT-PCR分析MPO在不同组织表达相同的PCR引物。分别在处理前和加入MeJa (11 μ M) 到无基质溶液后1,4,和7小时提取无基质栽培生长的根部组织全体RNA。无基质栽培条件已在例1中详述。利用RNeasy Plant Mini试剂盒(Qiagen)分离RNA。根据SuperScript III Platinum SYBR Green两步qRT-PCR试剂盒(Invitrogen)所描述的步骤,我们使用iCycler iQ Real-Time测定系统(BioRad)进行qRT-PCR。简单地,在20 μ l反应容积中使用1.7 μ g全体RNA进行一链cDNA合成,随后在96孔光学PCR板(BioRad)对1 μ l cDNA进行实时PCR放大,反应容积为25 μ l,反应条件为95 $^{\circ}$ C 30秒,58 $^{\circ}$ C 15秒,72 $^{\circ}$ C 50秒,循环40次。用肌动蛋白作为转录体标准化的参考基因,靶基因表达水平的变化根据Ramakers et al. (Neuroscience Letters 339:62-66 (2003))描述的方法确定。

[0191] 图3显示MeJa诱导的PMT和MPO表达的改变。和诱导前水平相比,MeJa增加MPO表达23倍。MPO表达跟随PMT的表达,虽然MeJa导致后者转录体水平发生更为戏剧性的增加。

[0192] 例4. 利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术在植物沉默MPO表达。

[0193] 利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术检测沉默候选MPO基因对烟碱生物合成的作用。VIGS是功能性基因组学工具,可在植物进行快速功能缺失或下降实验(Baulcombe D.C., Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113 (1999))。VIGS的优缺点已有论述(Lu R, et al., Methods 30:296-303 (2003))。

[0194] 含MPO片段的VIGS沉默建构物

[0195] 我们检测了3个代表MPO不同区域独立的VIGS建构物降低烟碱水平的能力。图4标明这些片段相对于MPO ORF的位置。VIGS建构物214D11长度为378bp,对应于全长度MPO cDNA核苷酸754-1132。214D11与烟草脆裂病毒(TRV)外壳蛋白反方向(反义方向)排列。VIGS建构物317A08长度为252bp,对应于全长度MPO cDNA核苷酸1521-1772。317A08亦逆向排列。VIGS建构物403B01长度为277bp,对应于全长度MPO cDNA核苷酸1129-1405。403B01相对于TRV外壳蛋白正义方向排列。

[0196] VIGS方法

[0197] 本塞姆氏烟草植物在可控环境箱生长,白天23 $^{\circ}$ C,16小时;黑夜,20 $^{\circ}$ C,8小时;光强度约为100 μ mol/m²/s。含有TRV-RNA1质粒或TRV-RNA2建构物(pYL156) (Liu et al, 2002)的C58根癌农杆菌培养物在28 $^{\circ}$ C过夜生长。离心后,将细菌悬浮于含有1mM MES (pH 5), 10mM MgCl₂和100 μ M乙酰丁香酮的渗透液,OD₆₀₀=1,在渗透前置于室温3-6小时。TRV-RNA1和TRV-RNA2建构物悬液1:1混合,并用1ml注射器将其渗透至年龄为3-4周植物上方叶子的底部。仅用缓冲液或含无功能的绿色荧光蛋白(GFP) TRV-RNA2建构物渗透阴性对照植物。植物生长3周后用离子对-HPLC法测定叶子中烟碱含量。

[0198] 离子对-HPLC法分析烟碱

[0199] 从各植物切割年幼(~3-5cm)叶子的一半作为样品。测定样品鲜重后,加入200 μ l 锆微球和300 μ l 50mM柠檬酸缓冲液(pH 3):甲醇(70:30)。用Beadbeater使样品均质,超声水浴10分钟。所产生的提取液在4 $^{\circ}$ C过夜孵育,离心和过滤(0.45 μ m, Spin-X)以澄清提取液。

使用Waters公司的2695型分离模块进行离子对-HPLC,该分离模块在色谱柱温度60℃条件下装备有Waters X-Terra RP18 5 μ m 4.6x 150mm预柱。等度洗脱系统由80%A:20%B组成,溶剂A成份为50mM柠檬酸,10mM辛基磺酸pH3.0 (pH由三乙胺调节)及5%MeOH,溶剂B成份为甲醇,流速为1ml/分钟,共15分钟。注射容积为20 μ l。用光电二极管阵列检测法在261nm检测烟碱。标准曲线(r^2 0.999)通过注入1040 μ g/ml到10.4 μ g/ml真正烟碱溶液获得,通过与该标准曲线比较,利用峰区面积进行烟碱定量。

[0200] 3个MPO VIGS建构物在被感染的植物中均导致烟碱水平降低(图5)。TRV-GFP对照植物的烟碱水平与只用缓冲液处理的植物的烟碱水平相似。这表明TRV感染对烟碱生物合成几乎没有影响。我们对VIGS建构物403B01进行进一步检测。MeJa (0.1% (v/v) 溶解于含有0.1% (v/v) Tween-20的水中,我们测定给叶子喷洒MeJa前和喷洒5天后感染有403B01的植物的烟碱含量(图4)。MeJa诱导的烟碱水平在MPO被沉默,感染有建构物403B01的植物中与TRV-GFP对照相比降低了77%。

[0201] MPO被沉默植物N-甲基腐胺水平的测定

[0202] 用Minocha SC et al., (J.Chromatography 511:177-183 (1990)) 描述的方法测量MPO被沉默的植物根部的多胺。简单地,用液氮冷冻根部组织并将其磨成细粉末状。确定样品鲜重后,加入200 μ l 锆微球和300 μ l 含100nmol/ml 1,7-二氨基庚烷 (DAH) 的冰冷5%高氯酸,用Beadbeater使样品均质。离心和过滤(0.45 μ m, Spin-X) 以澄清提取液。50 μ l 样品中加入100 μ l 饱和碳酸钠,再加入100 μ l 丹磺酰氯 (10mg/ml)。涡激振动混合样品,在暗处60℃ 孵育1小时。加入50 μ l 脯氨酸 (100mg/ml 溶解在5%高氯酸) 和剩余的丹磺酰氯反应。用400 μ l 甲苯提取反应物,涡激振动,离心分离有机相。用SpeedVac烘干200 μ l 甲苯层,残余物悬浮于1ml 乙腈。使用Waters公司的2695型分离模块进行离子对-HPLC,该分离模块在色谱柱温度40℃条件下装备有Waters X-Terra RP18 5 μ m 4.6x 150mm预柱。洗脱剂由乙腈(溶剂A)和10mM辛基磺酸 (pH 3.0) (pH由磷酸调节)及10%乙腈(溶剂B)。30%A到100%A梯度30分钟,而后100%A 3分钟。注射容积为10 μ l,流速为1ml/分钟。通过Waters 2475紫光检测器在340nm激发和在510nm发射检测多胺。

[0203] N-甲基腐胺在感染有TRV-MPO沉默建构物214D11的本塞姆氏烟草植物根部聚集(图6)。MPO底物在这些植物中的聚集进一步支持我们的结论,即我们用VIGS方法识别出在烟碱生物合成中发挥功能的MPO酶的基因。N-甲基腐胺也在TRV-GFP对照植物中低水平地检测出。

[0204] 感染MPO-VIGS建构物之植物MPO表达的测定

[0205] qRT-PCR被用于检测MPO在感染有TRV-MPO建构物214D11或TRV-PMT建构物的植物根部的表达。根部从缓冲液或TRV-GFP对照植物取样。RNA分离,cDNA合成和qRT-PCR条件,包括引物序列,前面已有描述。与缓冲液对照植物相比,MPO和PMT在TRV-GFP植物中表达增加,(图7)而TRV-MPO介导的沉默大大减少了MPO转录体的水平。

[0206] 感染MPO-VIGS建构物之植物MPO活性的测定

[0207] 从缓冲液对照组植物根部及TRV-GFP和TRV-MPO (214D11) 感染植物根部制备蛋白质提取液。按Hashimoto T. et al. (Plant Physiol. 93:216-221 (1990)) 描述的方法进行提取。简单地,1g根部组织在液氮中磨碎,并悬浮在20ml 提取缓冲液中,该缓冲液含有100mM磷酸钾,(pH 7.5),0.25M蔗糖,5mM EDTA,0.3%抗坏血酸和10%PVPP。在500g离心30分钟,上

清液在11,000g再次离心30分钟。用20%和40%硫酸铵两度沉淀上清液,将沉淀物悬浮于1ml水中,然后用2升缓冲液过夜透析,缓冲液含有20mM磷酸钾,(pH 7.5),1mM DTT及20%甘油。用DC蛋白试剂盒(BioRad)测定蛋白质浓度。用Amplex红过氧化氢/过氧化物酶试剂盒(Molecular Probes)检测N-甲基腐胺氧化后的MPO生成的H₂O₂。简单地,50μl反应中含有8μg蛋白粗提物,1mM N-甲基腐胺和20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.5)与50μl H₂O₂检测剂混合,该检测剂含有0.1mM Amplex红和0.2U/ml过氧化物酶。混合物在30℃孵育30分钟后,用微板萤光光度计(Victor3UV多标记光度计,PerkinElmer)在530-560nm激发和在590nm发射的设定中读取紫光强度。

[0208] 如图8所示,感染TRV-MPO的植物根部MPO活性低于缓冲液对照和TRV-GFP植物。

[0209] 例5. 重组MPO催化活性分析。

[0210] 为确实证明所克隆的基因编码MPO酶,我们阐述其生物化学特性并确定MPO与N-甲基腐胺孵育后生成产物的结构。

[0211] 重组MPO表达与纯化

[0212] 在大肠杆菌表达本塞姆氏烟草MPO ORF,纯化重组酶蛋白以用于生物化学分析。设计引物5'-ATGGCCACTACTAAACAGAAAG-3'和5'-TAGTTTAGCGGCCGCTCAAAGCTTGCCAGCAAGCT-3'以放大MPO ORF。利用一链cDNA为模版,用Pfu(Stratagene)放大cDNA克隆,PCR条件为95℃ 30秒,58℃ 30秒72℃ 2.5分钟,循环35次。产物与Taq聚合酶在72℃孵育15分钟加入附加的“A”碱基。将生成的PCR产物克隆至pCR8/GW/TOPO载体(Invitrogen)以生成Gateway入门载体,其与目的载体pHIS8GW通过Gateway LR克隆酶(Invitrogen)重组生成表达克隆pHIS8GW-MPO。用pHIS8GW-MPO载体转染Rosetta(DE3)pLysS(Novagen)大肠杆菌菌株,pHIS8GW-MPO载体N-末端含有由8个组氨酸组成的融合标签。将单一菌落接种于100ml隔夜自我诱导表达系统(Novagen),其含有50μg/ml卡那霉素和34μg/ml氯霉素,在28℃过夜振荡孵育。使用Talon Superflow金属亲和树脂(Clontech)纯化重组MPO。隔夜细菌培养物离心后,将细菌悬浮于10ml裂解缓冲液,后者含有50mM磷酸钠缓冲液(pH 8.0),150mM NaCl,0.1% Triton-X100,5mM咪唑和混合蛋白酶抑制剂(Novagen)。声纳处理细胞悬液2分钟以裂解细菌。裂解物在12,000rpm离心15分钟,将上清液加入200μl Talon树脂交换柱。交换柱用30ml洗涤液洗涤,洗涤液成份为50mM磷酸钠(pH 7.0),150mM NaCl和10mM咪唑,然后用10ml洗脱液洗脱,洗脱液成份为50mM磷酸钠(pH 7.0),150mM NaCl和200mM咪唑。聚积含有MPO的部分,用2L储藏液透析,储藏液成份为50mM磷酸钾(pH 7.5)和50%甘油。用DC蛋白试剂盒(BioRad)测定蛋白质浓度。用SDS-PAGE电泳(BioRad)分析MPO纯度。100ml隔夜细菌培养物可生成1mg可溶性MPO。

[0213] 重组MPO酶功能测定:底物选择

[0214] 我们使用前述的Amplex红系统检测重组MPO,在此处还使用了1μg Talon纯化的MPO。为测量MPO动力学参数,在30℃ 30分钟我们对N-甲基腐胺从10mM到0.01mM进行了2倍系列稀释。

[0215] 用1mM N-甲基腐胺,腐胺,1,3-二氨基丙烷,尸胺,精胺及精脞进行上述的底物特异性实验。

[0216] N-甲基腐胺Km值被确定为100μM。重组MPO优选采用N-甲基腐胺作底物(图9)。在pH为6.5,7.0,7.5,8.0,8.5and 9.5的范围内,用20mM磷酸钾缓冲液和0.5mM N-甲基腐胺确定

MPO的最佳pH为7.5。

[0217] 阳离子电喷雾离子阱质谱法 (ESI-MS) 分析MPO反应产物

[0218] 用质谱 (MS) 和气相色谱法-质谱 (GC-MS) 方法确定重组MPO氧化N-甲基腐胺形成的催化产物。

[0219] 在容积为50 μ l的反应中,1 μ g纯化MPO,2mM N-甲基腐胺和20mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 在30 $^{\circ}$ C孵育1小时,而后进行质谱分析以确定产物成份。亦使用蛋百储藏液代替MPO溶液作为对照反应。利用配有充气式电喷雾离子源 (Z-spray, Micromass) 的串联四极体质谱仪 (Quattro LC, Micromass, UK) 通过电喷雾离子阱质谱法 (ESI-MS) 进行MS分析。利用流速为20 μ L/分钟的二元溶剂泵和自动进样器 (1100系列, Hewlett Packard) 通过流动注射加入样本。载体溶剂由50:50v/v甲醇/水组成,含有0.1%蚁酸。

[0220] 反应产物在m/z 84Da产生峰形,相应于预期的N-甲基吡咯啉离子的大小 (图10)。

[0221] GC-MS (ESI-MS) 分析MPO反应产物

[0222] 按Hashimoto et al., (Plant Physiol.93:216-221 (1990)) 描述的进行氰化物捕集N-甲基吡咯啉阳离子和GC-MS分析。N-甲基吡咯啉离子与KCN反应产生1-甲基-2-氰吡咯烷,GC-MS可以分离和分析后者。简单地,MPO反应混合物与10 μ l 10%KCN溶剂混合,在室温孵育30分钟,加入100 μ l氯仿。涡激振动后,GC-MS分析氯仿液相。用KCN处理真正的N-甲基吡咯啉阳离子,产生1-甲基-2-氰吡咯烷作为参照化合物。用Agilent 5973质谱选择性检测仪进行GC-MS分析,该检测仪与配备有30-m X 0.25-mm DB5MS色谱柱且膜厚度为0.25 μ m (J&W Scientific) 的Agilent 6890N气相色谱仪偶联。由G1701DA MSD ChemStation软件控制该系统。色谱分析条件包括色谱柱分流进样 (20:1),氦流速为0.4ml/分钟,初始温度为70 $^{\circ}$ C 1分钟,随后温度以10 $^{\circ}$ C/分钟速度升高至300 $^{\circ}$ C。质谱选择性检测仪在标准电子轰击条件 (70eV) 下运行,有效扫描范围为40至700m/z,速度为2.26扫描/秒。

[0223] GC-MS分析显示氰化物捕集N-甲基吡咯啉离子产生的1-甲基-2-氰吡咯烷参照物在6.1分钟及m/z 109产生峰形。MPO反应混合物亦产生具有相同保留时间 (6.1分钟) 和质谱的峰形。每一峰形的质谱亦有与Hashimoto et al., Plant Physiol.93:216-221 (1990) 报道的N-甲基吡咯啉离子的质谱相对映的具有相同诊断性意义的离子。该产物的检测核实重组MPO催化N-甲基腐胺氧化形成N-甲基吡咯啉离子。

[0224] 例6.MPO超表达建构物对植物的稳定转染

[0225] 用MPO超表达建构物对本塞姆氏烟草进行转染。设计引物5'-ATGGCCACTACTAAACAGAAAG-3'和5'-TAGTTTAGCGGCCCTCAAAGCTTGCCAGCAAGCT-3'以放大MPO ORF。利用一链cDNA为模版,用Pfu (Stratagene) 放大cDNA克隆,PCR条件为95 $^{\circ}$ C 30秒,58 $^{\circ}$ C 30秒72 $^{\circ}$ C 2.5分钟,循环35次。产物与Taq聚合酶在72 $^{\circ}$ C孵育15分钟加入附加的“A”碱基。将生成的PCR产物克隆至pCR8/GW/TOPO载体 (Invitrogen) 以生成Gateway入门克隆,其与目的载体pK7GW2通过Gateway LR克隆酶 (Invitrogen) 重组生成表达克隆pK7GW2-MPO。将该克隆经电穿孔导入根癌农杆菌 (C58),并用叶碟法转染植物 (Draper et al,1988)。转基因植物在含卡那霉素的选择性琼脂培养基再生,并用PCR分析核实转基因状态,PCR分析所用引物被涉及用来放大MPO转基因和启动子融合区域 (5'-ACTCCTCCCGTAAAATTTGTGA-3'及5'-GCGGCCGCACTAGTGATATC-3') (图12)。在土壤生长T1种子,用前述的离子对-HPLC法检测叶子中烟碱水平。在含有3个叶碟 (~50mg FW) 的样品而不是基于鲜重检测烟碱。

[0226] 筛选含MPO超表达建构物的转基因植物以识别MPO转录体和酶含量高的植物,以识别MPO的活性。使用Northern杂交,RT-PCR或实时qRT-PCR等方法确定转染植物MPO转录体的含量。利用MPO蛋白特异性抗体通过Western印迹法检测MPO酶含量,或使用其它定量蛋白质的方法,包括蛋白质组学分析,检测MPO酶含量。以N-甲基腐胺为底物测定MPO超表达植物中MPO酶活性含量的生物化学方法亦可用来确定含MPO转基因的植物是否生产更高含量的MPO蛋白质。与野生植物或只转染载体建构物的对照植物相比,MPO转录体,蛋白和酶活性较高的植物有助于增加生物碱的种类。

[0227] 表1. 本塞姆氏烟草根部消减EST数据集中的铜胺氧化酶

[0228]

名称	最高 Blast ¹ 匹配	登录号	V.	# ES Ts (名称)
CL181contig1	待确定铜胺氧化酶 (拟南芥)	BAD95322	3	(312G01, 317A08, 101G06)
CL547contig1	过氧化物酶体含铜胺氧化酶酸 OMT (栽培大豆)	AAD40979	2	(319E11, 213D05)
205C09	过氧化物酶体含铜胺氧化酶酸 OMT (栽培大豆)	AAD40979	1	
214D11	铜离子结合 (拟南芥)	CAI05934	1	
403B01	过氧化物酶体含铜胺氧化酶酸 OMT (栽培大豆)	AAD40979	1	

[0229] ¹BLASTX与NCBI非冗余(nr)数据库比较

序列表

<110> 加拿大国家研究委员会

<120> 编码N-甲基腐胺氧化酶之核酸及其应用

<130> F01-IOPDV-SYQ

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 2763

<212> DNA

<213> 烟草属 (Nicotiana sp.)

<400> 1

```

gaaacaacac gtaacacac agtcaagaaa ctatatactg acagacatag tttgaaggga 60
cgclaaaagt gatllaaagtl alaateacag talatgtcag lagccctetaa taatcacigt 120
iggggttctc atccacagatt tcttctctage taaccagtag tctcaatggc cactactaaa 180
cagaaagtga cggcaaccttc tecttctctct tctctctctt cttegactgc ttcttgetgt 240
ccttccactt ccttccctccg tctgtaggcg acagcggcca tttcagtcgt gggtagcgga 300
ctgcagaatt ggacgtccaa catccccctc gtcgatgata aacagaaaaa gacggcctca 360
tcagctctag catcatgtcc aaccactgaa cctctttcct caaataacct taccaaaaggf 420
atccaaatca tgacaagggc teagacctgc catcctttgg accctttatc tgetgctgag 480
atctcagtgg ctgtgccaac tgttagagct gccggtgaaa cacttgaggt cagagatggg 540
atgctgatta ttgaggtggt tctggtagaa ccagataaaa gtgtagtfgc actggcagat 600
gcatatttct tcccaccttt tcagtcatca ttgatgccga gaaccaaagg aggatctcat 660
attcctacta agcttccacc aaggagagct agccttatg tttacaataa gaaaacaaat 720
gagacaagca tatgattgtg tgagctaaat gaagtacatg ctgetgeteg aggtggacat 780
cacagaggaa aagtcacttc atccaatggt gtcctgatg ttcagccacc catagatgct 840
caagaglatg ctgaatgtga agctgtggtg aaaagttatc ctccctttcg agacgeaatg 900
aggagagggg gtatttgatga cttggatctt gtgatggtg accctttggtg tgttggttat 960
catagttagg ctgatgtccc tagccgcagg ctccgcaaac cactttgtatf ctgcaggaca 1020
gagagtgaat gcccaatgga aatgtgatat gcaagaccag ttgaaggaaat atatgtgctt 1080
gttgatgtac aaaacatgaa gattatagaa tttgaagacc gaaaacttgt accgttacct 1140
ccagttgact cactgaggaa ctacactgct gctgagacaa gaggaggggf tgatcgaagt 1200
gatgtgaaac ctctacatat taitcagccc gagggtccaa gctttctgat cagtggaaac 1260
tacgttagag ggacagaagt gaattttcgg attgttttca cccctagaga gggtttagtc 1320
atacactctg tggcgtatct tgatggtagc agaggctcga gaccaatagc acataggttg 1380
agttttgtag agatggttgt ccttatggg gatccaaatg atccacatta taggaagaat 1440
gcatttgatg caggagaaga tgcccttggg aagaatgctc attcaactga gagggggtgt 1500
gattgtttgg ggtacattaa gtactttgat gcccatitca caaattttac gggaggagtt 1560
gaaacgactg aaaatttgtt atgcttgcct gaagaagatc acggaatgct ttggaagcat 1620
caagattgga gaactggcct tgetgaaagt agacggctca ggcactaac agtgtetttt 1680
gtttgtacag tggccaatta tgaatatgca ttctactgce acttctacca ggatggaaaa 1740
attgaaagcg aagttaaact cacttgaatt cttagtttgg gageattgca acctggagaa 1800
tatcgcaaat atgttaccac aattttacca ggtttglatg caccagtcca tcaacacttc 1860
tttgttcac aatgtaatat ggcagttgat tgaagccag gagaagcaca caatcaggtt 1920
gttgaagtaa atgcaaaagt lgaagaaact ggcaaggaaa atgllcatala taalgcattc 1980
tatgctgaag aaacattgct tagttctgaa ttgcaagcaa tgcgtgactg tgatccgttc 2040
tctgctcgtc atltgallgl laggaaacag agaacggtaa atagaaacag acagcaca 2100
gggtacaagc tggtaacctg tccaanaact ttgcaattgg ctggtctcga ggcgaaattf 2160
ttgagaagag ctgcatttct gaagcacaat ctatgggfta cacaatatge acctggagaa 2220
gattttccag gaggagaggt cccaaatcaa aatccccgtg ttggcgaggg attagcttct 2280
tgggtcaagc aagaccggcc tctggaagaa agtgatattg ttctctggtg ttttttggg 2340
atcacacatg ttctctggft ggaagactgg cctgttatgc cagtccaaca cattggtttf 2400
gtgctacagc cacatggatt ctttaactgc tccccgctg ttgatgtccc tccgcecttt 2460
gcttgcgact cagagagcac agacagtgat gttactgaaa ctagtgtage aaagtcact 2520
gccactagct tgetggccaa gctttgaatg attatgtiat cctaactatg gtctctctcg 2580
ategctattf facctacgga taccanaact ccattttctt ttgatagagt attgaattag 2640
ttgtgcaagg aacattgttt tgattggtct catatatggc acgtttfaagc aaagcaagtc 2700
cctttgtgta ttgatcttga attaagcatg ttatagggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760
aaa 2763

```

[0001]

<210> 2

<211> 2379

<212> DNA

<213> 烟草属 (Nicotiana sp.)

<400> 2

```

atggccacta ctaaacagaa agtgacggca ctttctctt ctctttctcc ttctttcteg 60
actgcttctt gctgtcette cacttceatc ctctgctgtg aggcgacagc ggccatttca 120

```

```

gtcgtgggtg acggactgca gaattggagc tccaacatcc cctccgtcga tgataaacag 180
aaaaagacgg cctcaticgc tctagcatca ttgccaacca ctgaacctct ttcctcaaat 240
acctctacca aaggtatcca aatcatgaca agggctcaga cctgccatcc tttggacct 300
ttatctctgt ctgagatctc agtggctgtg gcaactgta gagetgccgg tgaaacacct 360
gaggtcagag atgggatgcg atttattgag gtggttctgg tagaaccaga taaaagtgt 420
gttgcaactgg cagatgcata tttcttccca ccitttcagt catcattgat gccgagaacc 480
aaagagggat ctcatattcc tactaagcct ccaccaagga gagctaggct tattgtttac 540
aataagaaaa caaatgagac aagcatatgg attgttgagc taactgaagt acatgctgct 600
gctcgagggt gacatcacag aggaaaagtc atctcatcca atgttgtccc tgatgttcag 660
ccaccatag atgctcaaga gtatgctgaa tgtgaagctg tggtgaaaag ttatcctccc 720
tttcgagacg caatgaggag aaggggtatt gatgacttgg atcttgtgat ggttgacct 780
tgggtgtgtg gttatcatag tgggctgat gctctagccc gcaggctcgc gaaaccactt 840
gtattctgca ggacagagag tgaactgccc atggaaaatg gatatgcaag accagttgaa 900
ggaatatatg tgcctgttga tgtacaanaa atgaagatta tagaatttga agaccgaaaa 960
cttgtaaccgt tacctccagt tgatccactg aggaactaca ctgctgctga gacaagagga 1020
ggggtttgat gaagtgatgt gaaacctctc catattatcc agcccagggg tccaagcctt 1080
cgtatcagtg gaaactacgt agagtggcag aagtggaatt ttccgattgg tttcaccct 1140
agagagggtt tagtcataca ctctgtggcg tatcttgatg gtagcagagg tcttagacca 1200
atagcacata ggltgagllf tglagagatg gllglcctll atggggalcc aaatgatcca 1260
caitfatagga agaattcatt tgatgcagga gaagatggcc ttggaaagaa tgcctattca 1320
ctgaagaggg ggtgtgattg tttgggttac attaangtact ttgatgccc tttcacaat 1380
tttacgggag gagtgaaac gactgaaaat tgtgtatgct tgcattgaga agatcacgga 1440
atgcttttga agcttcaaga ttgagaact ggcttgcctg aagttagacg gcttaggcga 1500
ctaacagtgt cttttgtttg tacagtggcc aattatgaat atgcattcta ctggcacttc 1560
taccaggatg gaaaaattga agcggaggtt aaactcactg gaattcttag tttgggagca 1620
ttgcaacctg gagaatfcg caaatatggt accacaattt taccagttt gtatgcacca 1680
gttcatcaac actctttgt tgcacgaatg aatatgagc ttgattgtaa gccaggagaa 1740
gcacacaatc aggtttgtga agtaaatgct aaagtgaag aacctggcaa ggaaaatgtt 1800
cataataatg caitctatgc tgaagaanaa ttgcttagtt ctgaattgca agcaatgct 1860
gactgtgate cgttctctgc tctcatggg attgttagga acacgagaae ggtaaataga 1920
acaggacagc taacagggtg caagctggta cctggtccaa actgtttgcc attgctggt 1980
cctgagcaga aatttttgag aagagctgca tttctgaagc acaatctatg ggttacaca 2040
tatgcacctg gagaatattf tccaggagga gagttcccaa atcaaaatcc cctgtttggc 2100
gagggttagt ctctttgggt caagcnagac cggectctgg aagaaagtga tattgttctc 2160
tggtatattt ttggaatcac acatgttctt cggttggaag actggcctgt tatgccagtc 2220
gaacacattg gttttgtgct acagccacat ggattcttta actgctcccc ggctgttgat 2280
gtcctctcgc cttttgcttg cgactcagag agcacagaca gtgatgttac tgaaactagt 2340
gtagcaaatg ccaactgccac tagcttctctg gccaagett 2379

```

[0002]

```

<210> 3
<211> 793
<212> PRT
<213> 烟草属 (Nicotiana sp.)

<400> 3
Met Ala Thr Thr Lys Gln Lys Val Thr Ala Pro Ser Pro Ser Pro Ser
 1          5          10          15
Pro Ser Ser Ser Thr Ala Ser Cys Cys Pro Ser Thr Ser Ile Leu Arg
 20          25          30
Arg Glu Ala Thr Ala Ala Ile Ser Val Val Gly Asp Gly Leu Gln Asn
 35          40          45
Trp Thr Ser Asn Ile Pro Ser Val Asp Asp Lys Gln Lys Lys Thr Ala
 50          55          60
Ser Ser Ala Leu Ala Ser Leu Pro Thr Thr Glu Pro Leu Ser Ser Asn
 65          70          75          80
Thr Ser Thr Lys Gly Ile Gln Ile Met Thr Arg Ala Gln Thr Cys His
 85          90          95
Pro Leu Asp Pro Leu Ser Ala Ala Glu Ile Ser Val Ala Val Ala Thr
100          105          110
Val Arg Ala Ala Gly Glu Thr Pro Glu Val Arg Asp Gly Met Arg Phe
115          120          125
Ile Glu Val Val Leu Val Glu Pro Asp Lys Ser Val Val Ala Leu Ala
130          135          140
Asp Ala Tyr Phe Phe Pro Pro Phe Gln Ser Ser Leu Met Pro Arg Thr
145          150          155          160

```

Lys Gly Gly Ser His Ile Pro Thr Lys Leu Pro Pro Arg Arg Ala Arg
 165 170 175
 Leu Ile Val Tyr Asn Lys Lys Thr Asn Glu Thr Ser Ile Trp Ile Val
 180 185 190
 Glu Leu Thr Glu Val His Ala Ala Ala Arg Gly Gly His His Arg Gly
 195 200 205
 Lys Val Ile Ser Ser Asn Val Val Pro Asp Val Gln Pro Pro Ile Asp
 210 215 220
 Ala Gln Glu Tyr Ala Glu Cys Glu Ala Val Val Lys Ser Tyr Pro Pro
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ala Met Arg Arg Arg Gly Ile Asp Asp Leu Asp Leu Val
 245 250 255
 Met Val Asp Pro Trp Cys Val Gly Tyr His Ser Glu Ala Asp Ala Pro
 260 265 270
 Ser Arg Arg Leu Ala Lys Pro Leu Val Phe Cys Arg Thr Glu Ser Asp
 275 280 285
 Cys Pro Met Glu Asn Gly Tyr Ala Arg Pro Val Glu Gly Ile Tyr Val
 290 295 300
 Leu Val Asp Val Gln Asn Met Lys Ile Ile Glu Phe Glu Asp Arg Lys
 305 310 315 320
 Leu Val Pro Leu Pro Pro Val Asp Pro Leu Arg Asn Tyr Thr Ala Ala
 325 330 335
 Glu Thr Arg Gly Gly Val Asp Arg Ser Asp Val Lys Pro Leu His Ile
 340 345 350
 [0003] Ile Gln Pro Glu Gly Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Asn Tyr Val Glu
 355 360 365
 Trp Gln Lys Trp Asn Phe Arg Ile Gly Phe Thr Pro Arg Glu Gly Leu
 370 375 380
 Val Ile His Ser Val Ala Tyr Leu Asp Gly Ser Arg Gly Arg Arg Pro
 385 390 395 400
 Ile Ala His Arg Leu Ser Phe Val Glu Met Val Val Pro Tyr Gly Asp
 405 410 415
 Pro Asn Asp Pro His Tyr Arg Lys Asn Ala Phe Asp Ala Gly Glu Asp
 420 425 430
 Gly Leu Gly Lys Asn Ala His Ser Leu Lys Arg Gly Cys Asp Cys Leu
 435 440 445
 Gly Tyr Ile Lys Tyr Phe Asp Ala His Phe Thr Asn Phe Thr Gly Gly
 450 455 460
 Val Glu Thr Thr Glu Asn Cys Val Cys Leu His Glu Glu Asp His Gly
 465 470 475 480
 Met Leu Trp Lys His Gln Asp Trp Arg Thr Gly Leu Ala Glu Val Arg
 485 490 495
 Arg Ser Arg Arg Leu Thr Val Ser Phe Val Cys Thr Val Ala Asn Tyr
 500 505 510
 Glu Tyr Ala Phe Tyr Trp His Phe Tyr Gln Asp Gly Lys Ile Glu Ala
 515 520 525
 Glu Val Lys Leu Thr Gly Ile Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gln Pro Gly
 530 535 540
 Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Thr Thr Ile Leu Pro Gly Leu Tyr Ala Pro
 545 550 555 560

Val His Gln His Phe Phe Val Ala Arg Met Asn Met Ala Val Asp Cys
 565 570 575

Lys Pro Gly Glu Ala His Asn Gln Val Val Glu Val Asn Val Lys Val
 580 585 590

Glu Glu Pro Gly Lys Glu Asn Val His Asn Asn Ala Phe Tyr Ala Glu
 595 600 605

Glu Thr Leu Leu Ser Ser Glu Leu Gln Ala Met Arg Asp Cys Asp Pro
 610 615 620

Phe Ser Ala Arg His Trp Ile Val Arg Asn Thr Arg Thr Val Asn Arg
 625 630 635 640

Thr Gly Gln Leu Thr Gly Tyr Lys Leu Val Pro Gly Pro Asn Cys Leu
 645 650 655

Pro Leu Ala Gly Pro Glu Ala Lys Phe Leu Arg Arg Ala Ala Phe Leu
 660 665 670

Lys His Asn Leu Trp Val Thr Gln Tyr Ala Pro Gly Glu Asp Phe Pro
 675 680 685

Gly Gly Glu Phe Pro Asn Gln Asn Pro Arg Val Gly Glu Gly Leu Ala
 690 695 700

Ser Trp Val Lys Gln Asp Arg Pro Leu Glu Glu Ser Asp Ile Val Leu
 705 710 715 720

Trp Tyr Ile Phe Gly Ile Thr His Val Pro Arg Leu Glu Asp Trp Pro
 725 730 735

Val Met Pro Val Glu His Ile Gly Phe Val Leu Gln Pro His Gly Phe
 740 745 750

[0004] Phe Asn Cys Ser Pro Ala Val Asp Val Pro Pro Pro Phe Ala Cys Asp
 755 760 765

Ser Glu Ser Thr Asp Ser Asp Val Thr Glu Thr Ser Val Ala Lys Ser
 770 775 780

Thr Ala Thr Ser Leu Leu Ala Lys Leu
 785 790

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明：合成引物

<400> 4
 tttttttttt tttttttttt tttttt 25

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明：合成引物

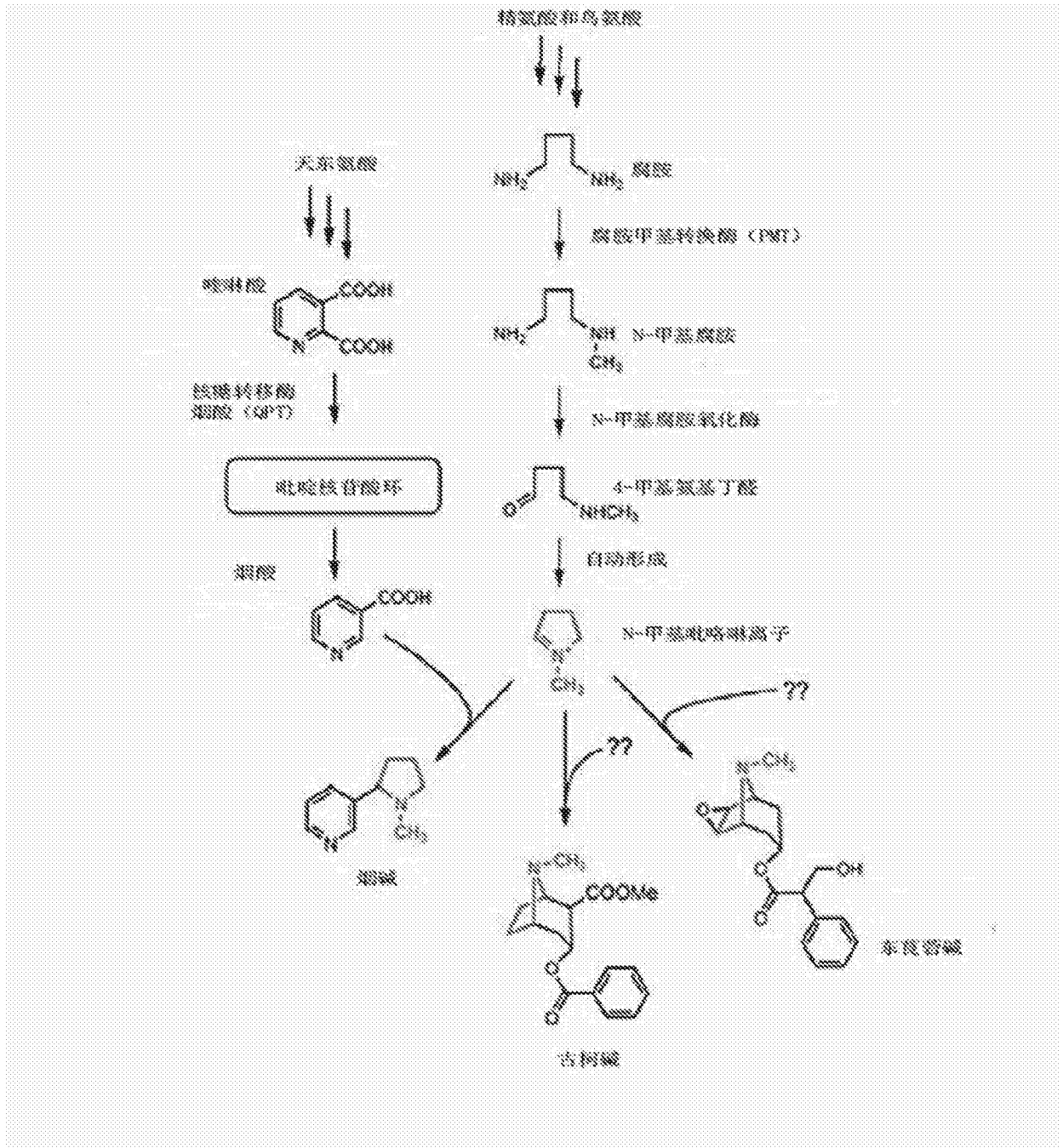
<400> 5
 cgggatcetc gageggccgc ccgggcaggt 30

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	6	
		cggaattcag cgtggtcgcg gccgaggt	28
	<210>	7	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	7	
		gttactcaag gaagcacgat gag	23
	<210>	8	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	8	
		cagtcgagaa tgccaatctc gtag	24
	<210>	9	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0005]	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	9	
		ctfgagcacc taagggtggc	20
	<210>	10	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	10	
		agcaatgcgt gactgtgac c	22
	<210>	11	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	
	<400>	11	
		ctacaatgag cttcgtgttg c	21
	<210>	12	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列说明：合成引物	

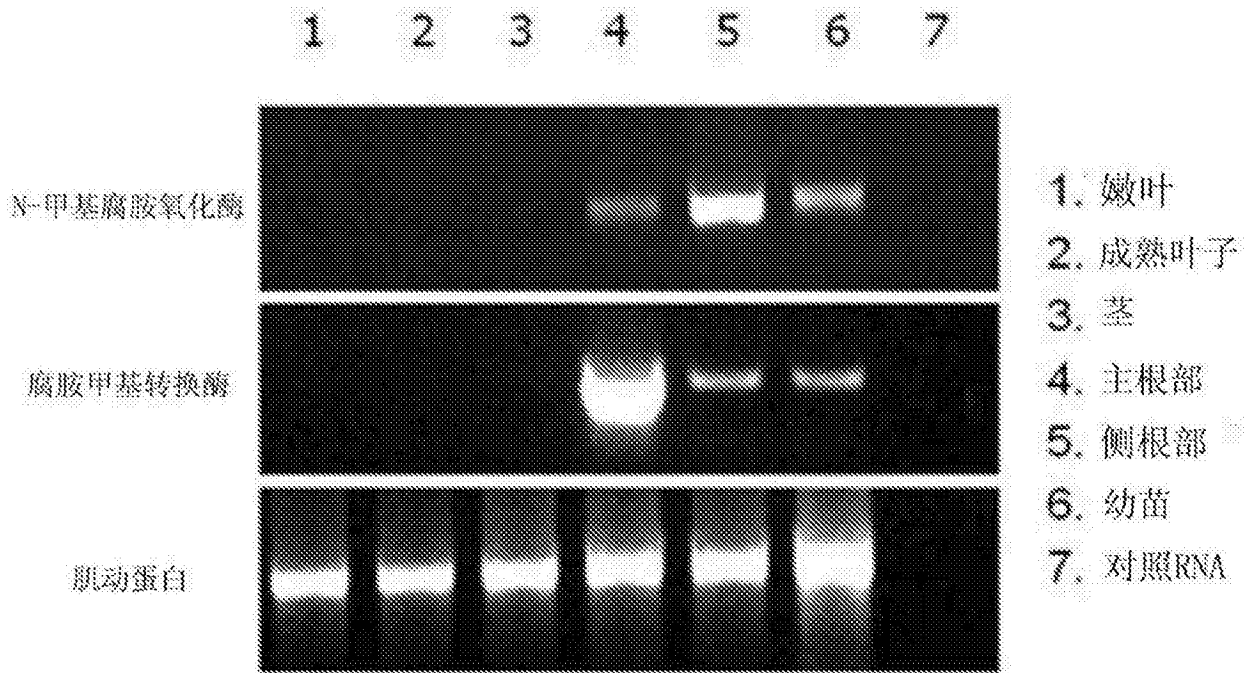
	<400> 12 tgctgagggg agccaagata	20
	<210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 13 tcattgctctt tgagtcagca a	21
	<210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 14 caccagtgtt caffgttcac t	21
	<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
[0006]	<400> 15 aggtggacat cacagaggaa	20
	<210> 16 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 16 agtcgtttea actcctccg ta	22
	<210> 17 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 17 atggccacta ctaaacagaa ag	22
	<210> 18 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 18 tagtttagcg gcegctcaaa gcttggccag caagct	36

	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 19	
	actcctcccg taaaatttgt ga	22
[0007]		
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列说明：合成引物	
	<400> 20	
	gcggccgcac tagtgatac	20



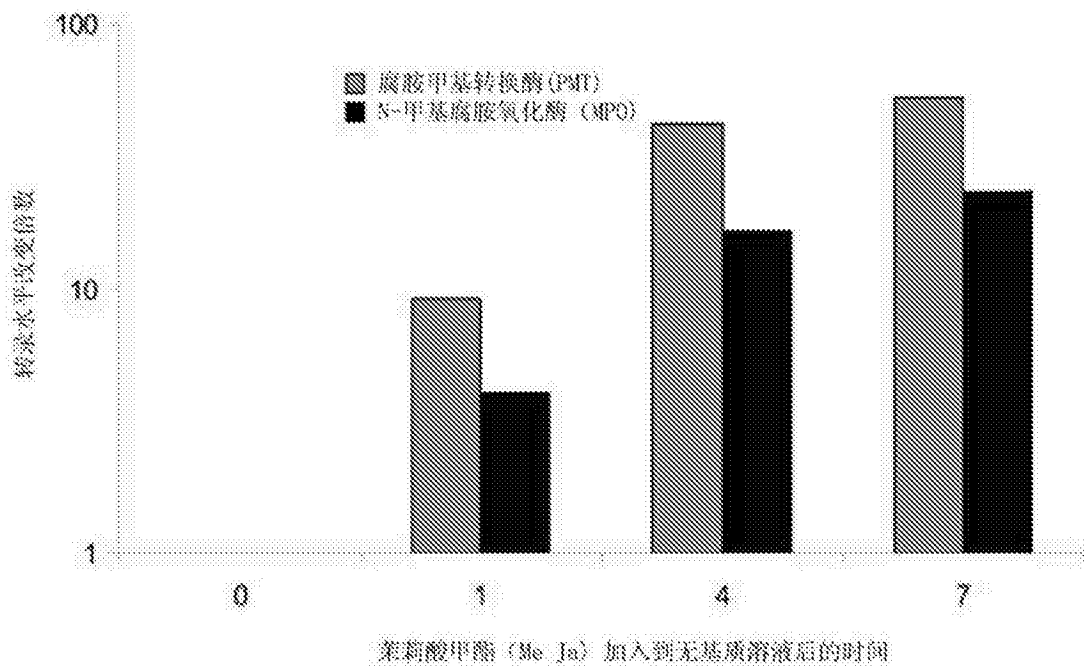
烟碱和托烷类生物碱 (例如东莨菪碱和古柯碱) 生物合成途径。N- 甲基腐胺氧化酶 (MPO) 在该合成途径起主要作用。

图1



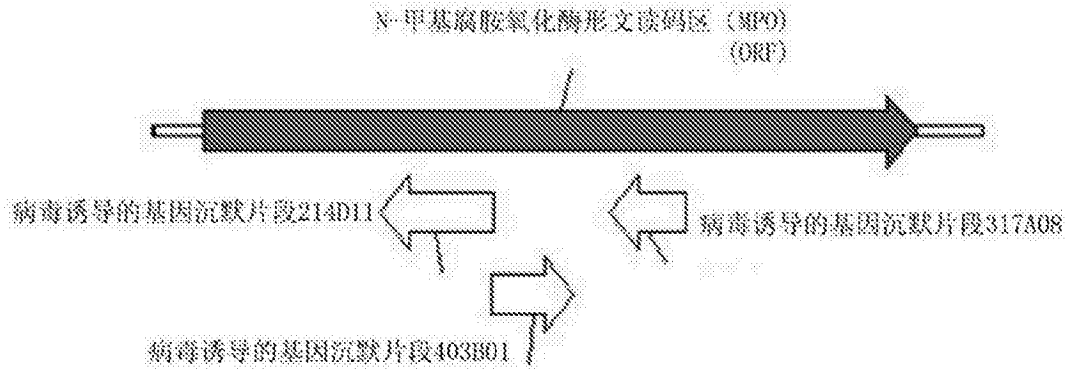
RT-PCR 分析本塞姆氏烟草不同组织中 MPO 的表达。

图2



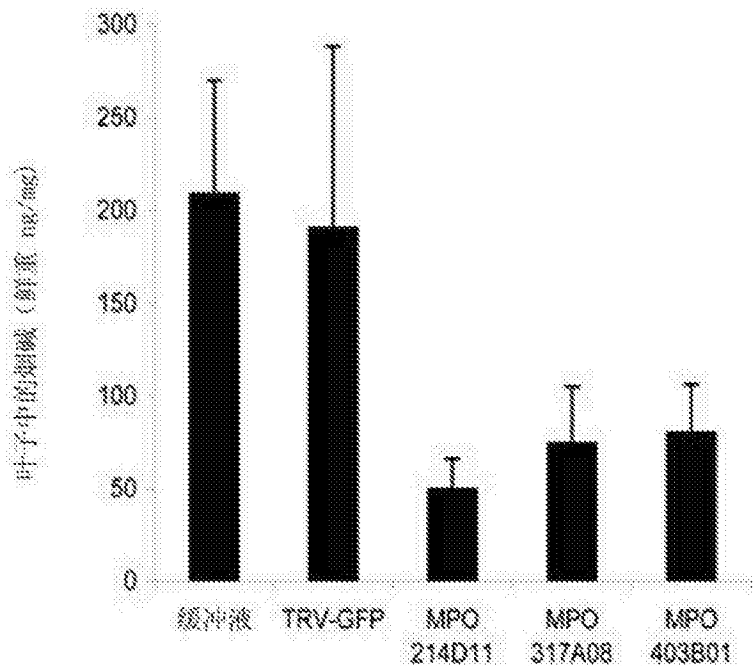
定量 RT-PCR (qRT-PCR) 分析经茉莉酸甲酯 (MeJa) 处理后本塞姆氏烟草根部 PMT 及 MPO 的表达。

图3



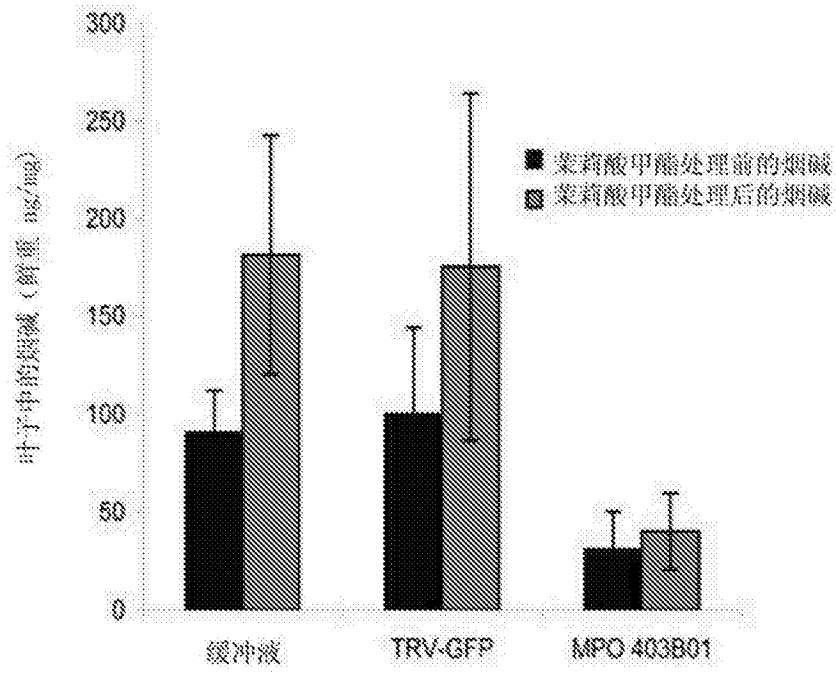
应用于 VIGS 的 MPO 基因片段的位置及长度。VIGS 片段的箭头代表 VIGS 片段相对于烟草脆裂病毒 (TRV) 外壳蛋白走向。ORF 为开放阅读区。

图4



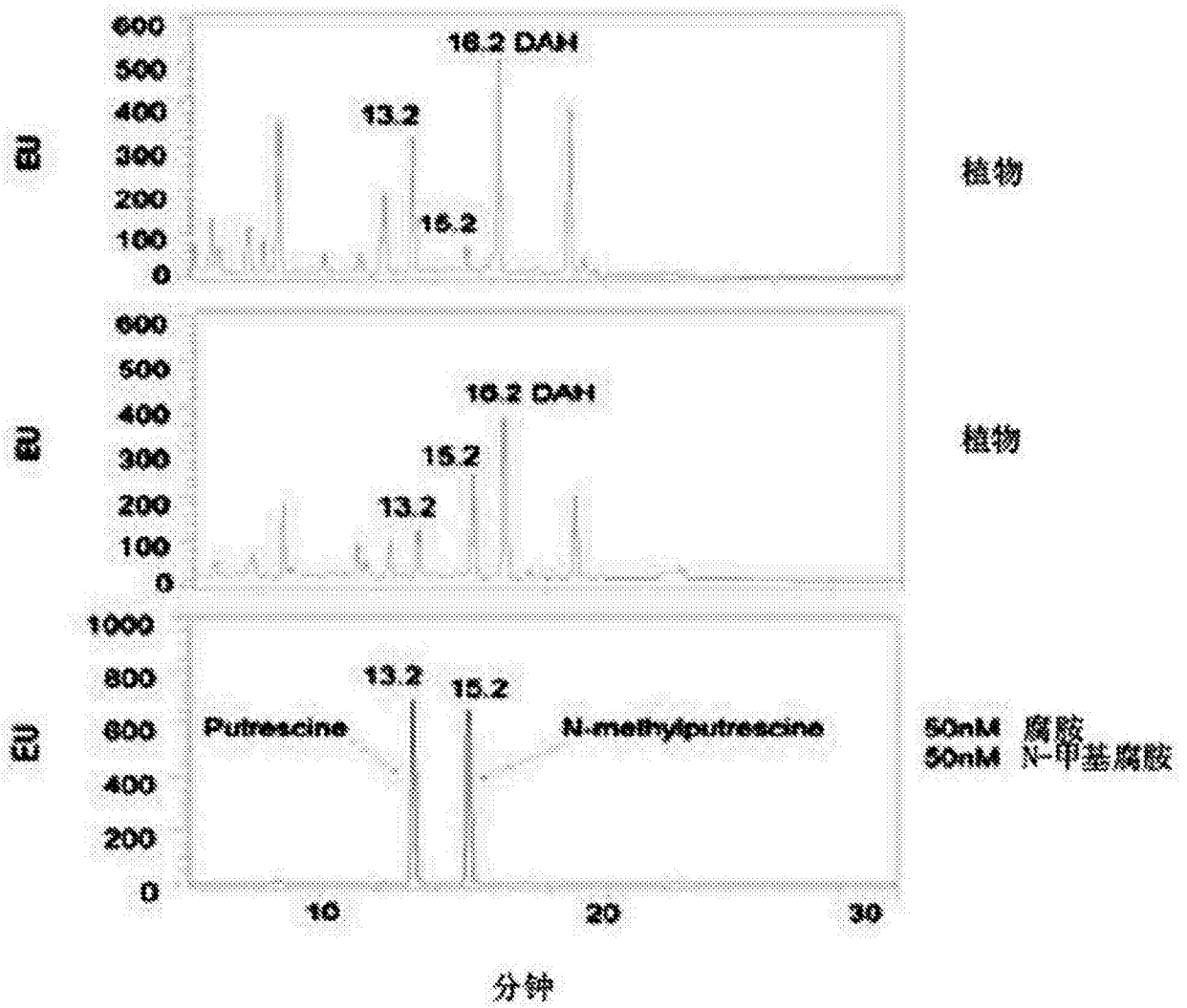
对照 (缓冲液和 TRV-GFP) 植物和感染 TRV-MPO 沉默核酸建构物 (214D11, 317A08 and 403B01) 植物烟碱水平。

图5A



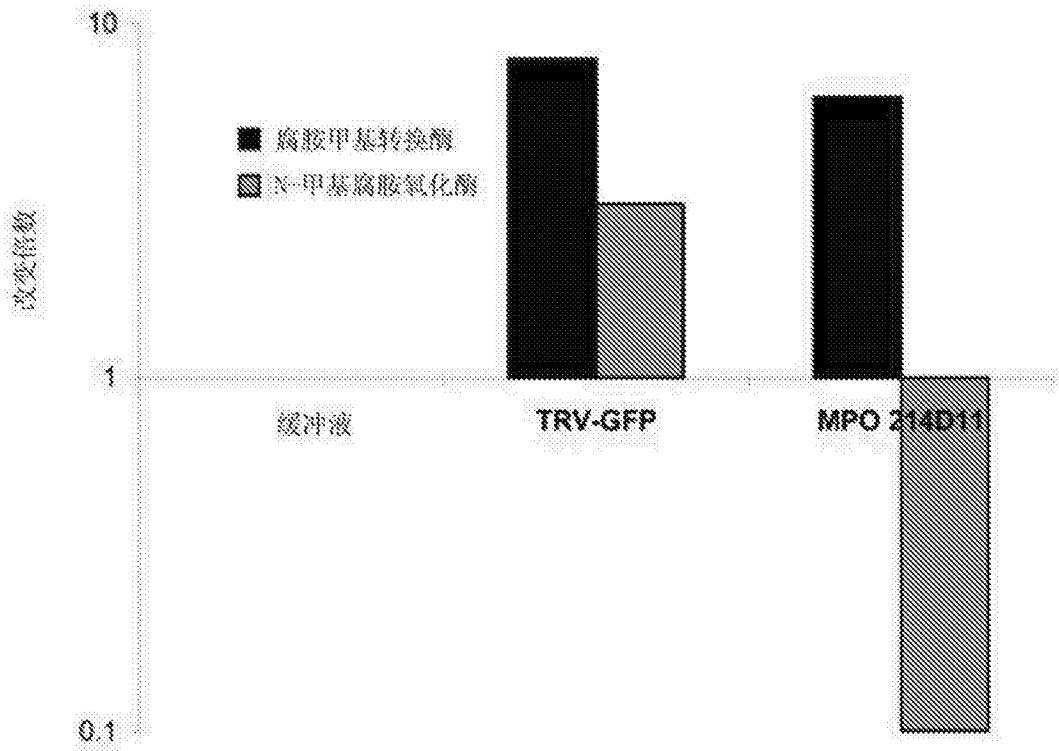
茉莉酸甲酯 (MeJa) 诱导对照 (缓冲液和 TRV-GFP) 植物和感染 TRV-MPO 沉默核酸建构物 403B01 植物烟碱水平的改变。

图5B



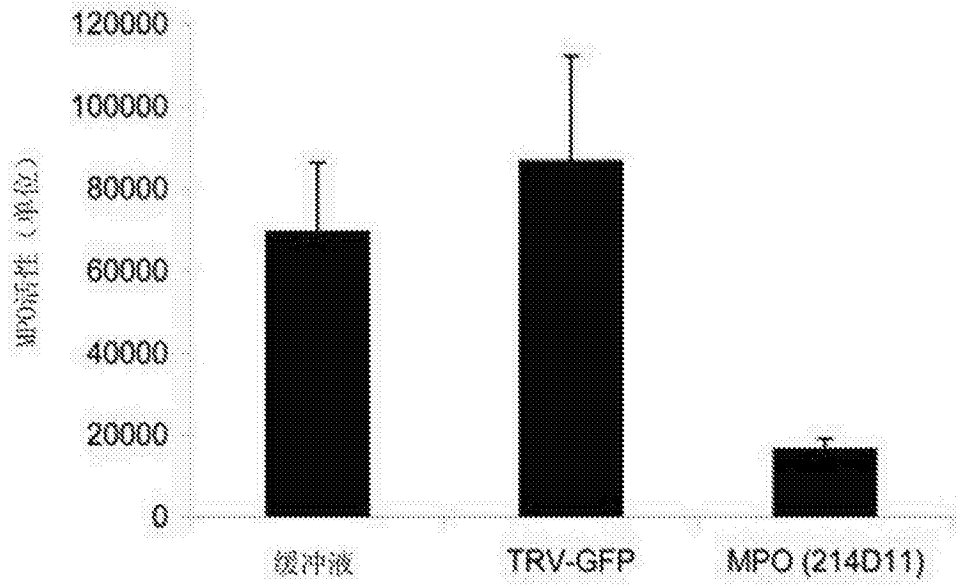
HPLC 方法分析 TRV-GFP 和 TRV-MPO 侵染的植物根部的多胺。

图6



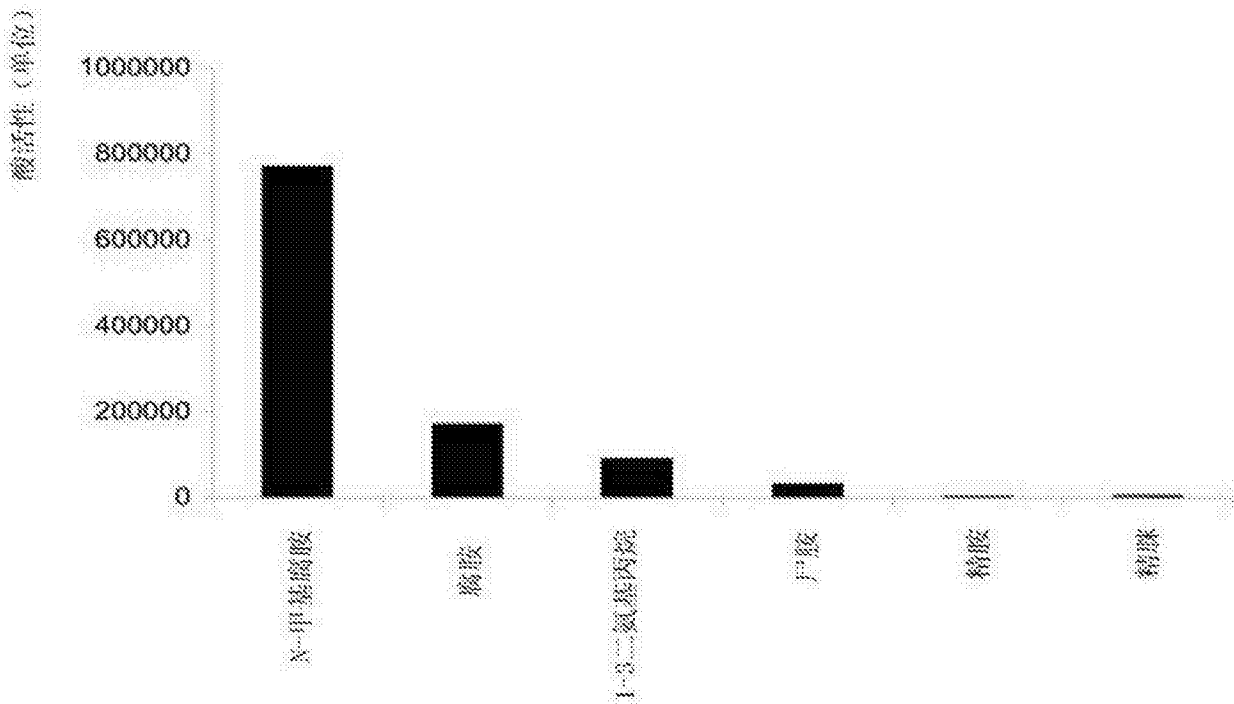
qRT-PCR 分析缓冲液和 TRV-GFP 对照植物和感染 TRV-MPO 沉默核酸建构物 (214D11) 植物中 MPO 和 PMT 的表达。

图7



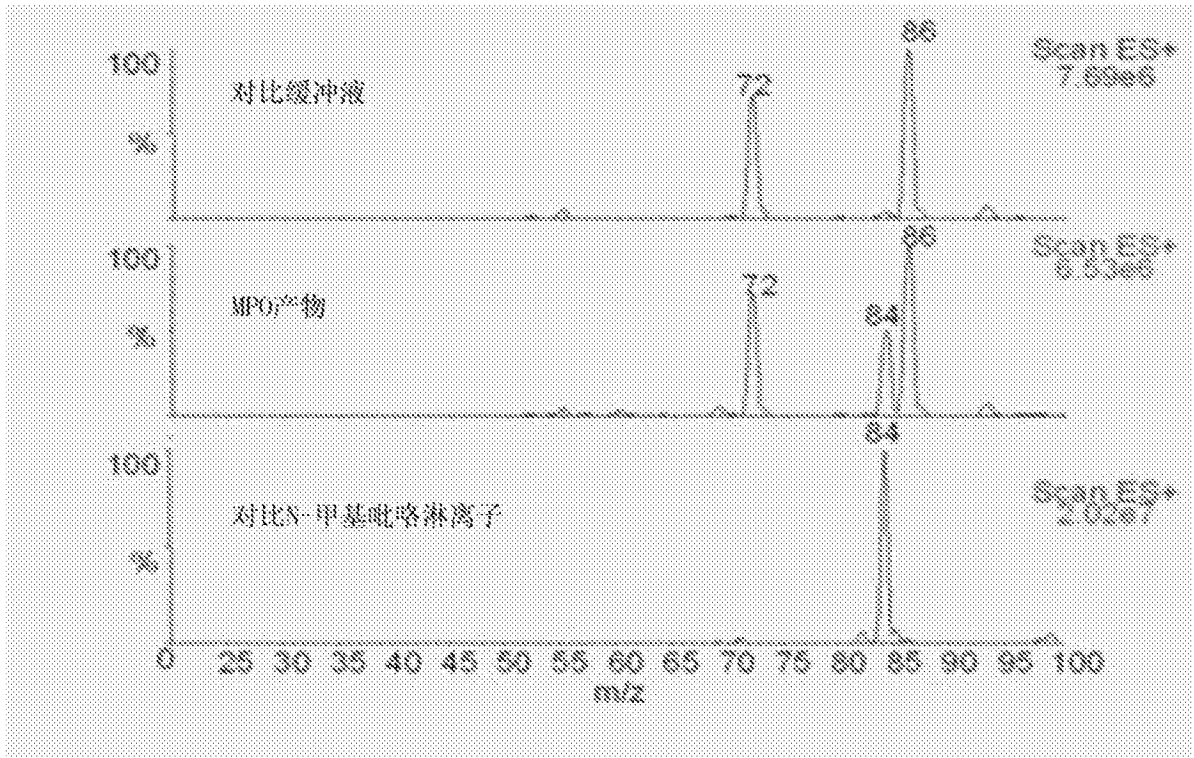
缓冲液和 TRV-GFP 对照植物及感染 TRV-MPO 沉默核酸建构物 (214D11) 植物根部 MPO 酶活性分析。

图8



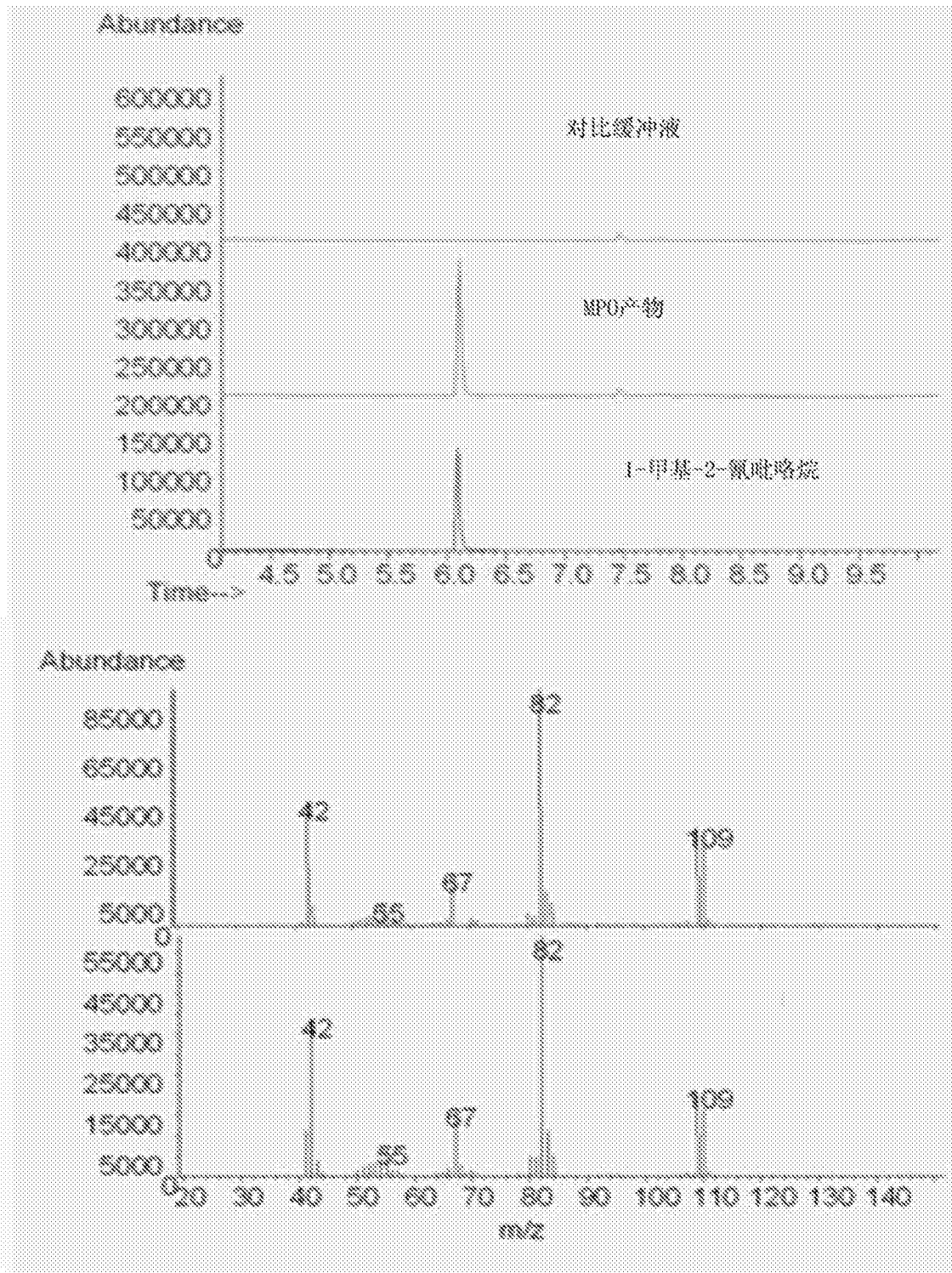
重组 MPO 酶蛋白底物选择性。

图9



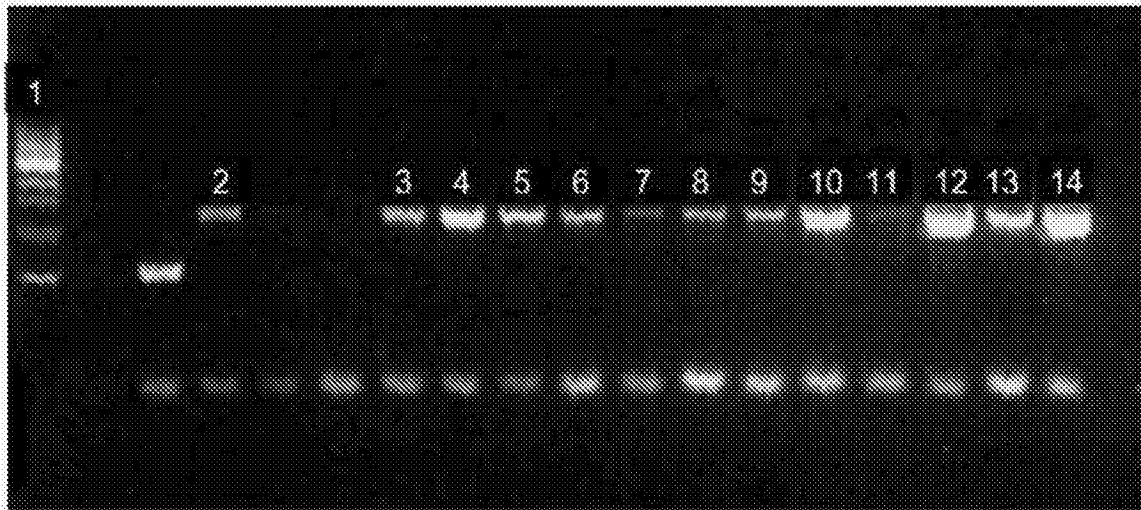
阳离子电喷雾离子阱质谱法 (ESI-MS) 分析重组 MPO 酶氧化 N-甲基腐胺形成的反应产物。

图10



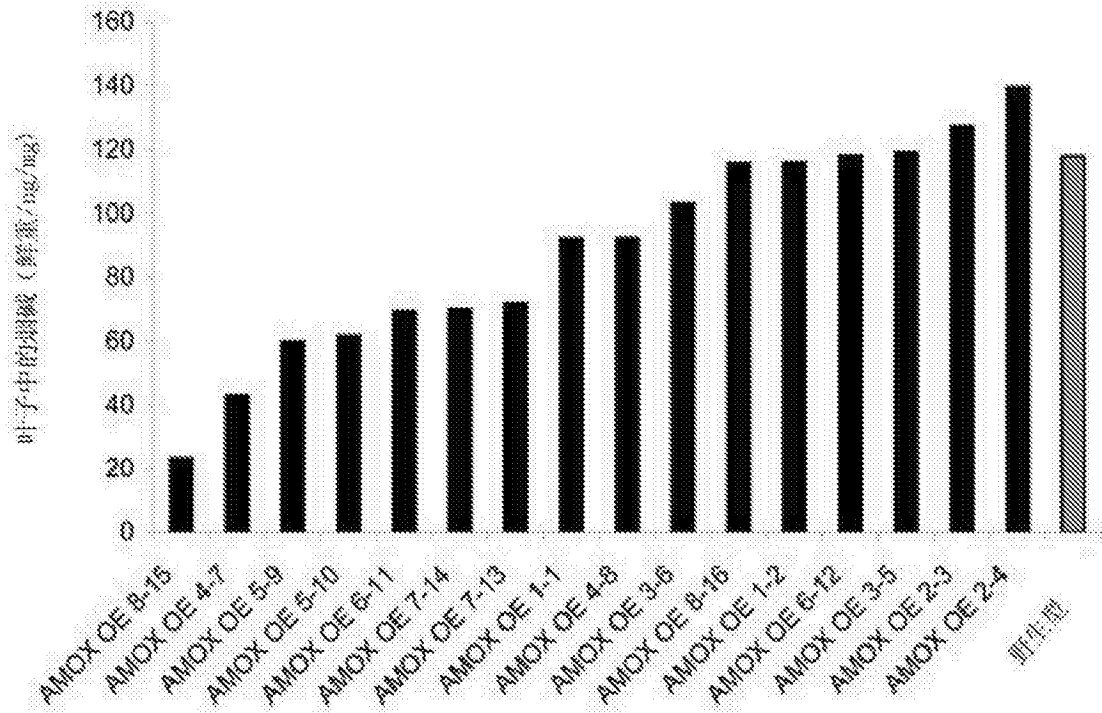
GC-MS 分析重组 MPO 酶氧化 N-甲基腐胺形成的反应产物。

图11



PCR 分析转染 *MPO* 基因的本塞姆氏烟草植物。从每一 T0 植物分离基因组 DNA 作为 PCR 模版，引物与启动子区和 *MPO* 编码区退火。PCR 产物大小为 1.4 kbp。电泳道 1 为 1 kb 分子量标记；电泳道 2-14 代表来自含有 pK7GWG2-*MPO* 转基因植物的放大产物。在电泳道 2 左侧较短片段 (~500 bp) 代表来自另一转基因建构物的放大产物。

图12



稳定转染的木薯烟草植物叶部烟碱水平。每一转基因株系代表独立转染事件。从 T1 转染植物叶部切除叶碟用离子对-HPLC 法分析烟碱含量。

图13