



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107177606 A

(43)申请公布日 2017.09.19

(21)申请号 201710396169.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2008.05.09

C12N 15/53(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 15/82(2006.01)

60/928,303 2007.05.09 US

C12N 5/10(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

200880023017.1 2008.05.09

(71)申请人 美国陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 J·M·里拉 E·M·斯诺德莱

A·E·罗宾逊 T·R·莱特

D·J·默洛

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡志君 黄革生

权利要求书1页 说明书64页

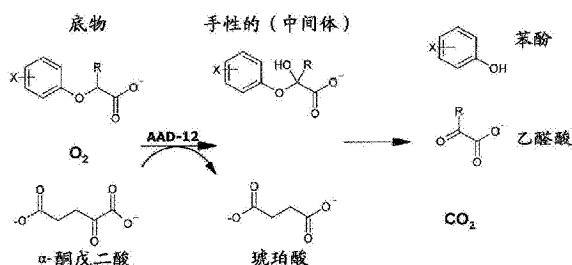
序列表5页 附图3页

(54)发明名称

新除草剂抗性基因

(57)摘要

本发明提供不仅对2,4-滴具有抗性,而且还对吡啶氧乙酸类除草剂具有抗性的新植物。本发明还包括这样的植物:其产生与一种或多种其他除草剂抗性基因“叠加”的一种或多种本发明的酶。本发明使得可以以新的方式使用除草剂的新组合。此外,本发明提供预防产生并控制对一种或多种除草剂(如草甘膦)具有抗性的杂草株系的新方法。本发明用途中优选的酶和基因在本文中称为AAD-13(芳氧基链烷酸酯双加氧酶)。这一高度新颖的发现是重要的除草剂耐性作物性状和选择标记可能性的基础。



- O<sub>2</sub> 的加入是立体特异性的
- 中间体分解成苯酚 + 乙酸是自发的

1. 多核苷酸,其包含选自SEQ ID NO:3和5的序列,其中SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5中的每种序列包含除草剂抗性基因。

2. 权利要求1的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码酶促降解吡啶氧乙酸和苯氧乙酸生长素除草剂的蛋白质。

3. 权利要求1或2的多核苷酸,其中所述多核苷酸与在植物细胞中具有功能的启动子有效连接。

4. 权利要求1至3中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:3。

5. 权利要求1至3中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:5。

6. 权利要求1至5中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸是分离的多核苷酸。

7. 表达盒,其包含权利要求1至6中任一项所述的多核苷酸。

8. 权利要求7的表达盒,其转基因地插入大豆植物基因组DNA的节段,以在大豆植物基因组中产生权利要求1至6中任一项所述的多核苷酸。

9. 转基因的非全能大豆植物细胞,其包含权利要求1至6中任一项所述的多核苷酸。

10. 权利要求9的大豆植物细胞,其中所述植物细胞还包含选自真菌抗性、胁迫耐受性、增加的产量、改良的油谱、改良的纤维质量、病毒抗性、延缓成熟、寒冷耐受性和盐耐受性的农学性状的基因。

11. 权利要求9或10所述的大豆植物细胞,其中所述大豆植物细胞还包含另一除草剂抗性基因。

12. 权利要求11的大豆植物细胞,其中所述大豆植物细胞对芳氧基链烷酸酯除草剂有抗性和对选自草甘膦除草剂和草铵膦除草剂中的至少一种额外的除草剂有抗性。

13. 权利要求9至12中任一项所述的大豆植物细胞,其中所述大豆植物细胞还包含昆虫抗性基因。

14. 保护作物植物免于芳氧基链烷酸酯除草剂伤害的方法,所述方法包括对植物施用包含权利要求1至6中任一项所述的多核苷酸的除草剂。

15. 权利要求14所述的方法,其中所述除草剂是2,4-滴。

16. 选择权利要求9的大豆植物细胞的方法,其中所述方法包括用多核苷酸转化植物细胞,以在大豆植物细胞基因组中产生权利要求1至6中任一项所述的多核苷酸,和然后以允许转化细胞生长而杀死或抑制非转化细胞生长的除草剂浓度施用除草剂至所述大豆植物细胞,其中所述除草剂选自苯氧基生长素除草剂和吡啶氧基生长素除草剂。

17. 权利要求16的方法,其中所述除草剂是2,4-滴。

## 新除草剂抗性基因

[0001] 本申请是中国专利申请200880023017.1的分案申请,原申请的申请日是2008年5月9日,发明名称是“新除草剂抗性基因”。

[0002] 发明背景

[0003] 杂草可以迅速耗尽土壤中作物和其他目的植物所需的有价值的养分。目前有多种不同类型的除草剂用于控制杂草。一种特别流行的除草剂是草甘膦。

[0004] 已经开发了对草甘膦具有抗性的作物,如玉米、大豆、芸苔、棉花、甜菜、小麦、草坪草和稻。因此可以例如对草甘膦抗性大豆生长活跃的田地喷洒草甘膦以控制杂草而不显著损害大豆植物。

[0005] 随着二十世纪九十年代中期遗传改造的草甘膦耐性作物(GTC)的引入,在农业中前所未有地使种植者能够以简单、便利、灵活且廉价的工具控制广谱阔叶和禾本科杂草。因此,生产者迅速采用了GTC,并在很多情况下放弃了多种公认最佳的农业实践,如作物轮作、除草剂作用方式轮作、罐混、将杂草的化学防治和栽培防治与机械防治有机结合起来。目前在美国和西半球其他地方可以购买到草甘膦耐性大豆、棉花、玉米和芸苔。苜蓿是第一种引入的多年生GTC,助长了在一定的年限内反复地对相同的作物和田地重复使用草甘膦的可能性。取决于全球市场的接受度,更多的GTC(如小麦、稻、甜菜、草坪草等等)正准备引入。许多其他草甘膦抗性物种正处于实验至开发阶段(如甘蔗、向日葵、甜菜、豌豆、胡萝卜、黄瓜、莴苣、洋葱、草莓、番茄和烟草;林业物种如白杨和香枫;园艺物种如金盏花、矮牵牛花和秋海棠;参阅站点“[isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm](http://isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm),2005”)。此外,近年来草甘膦的费用已经急剧降低,达到了几乎没有常规杂草控制程序能在价格和性能上与草甘膦GTC系统有效竞争的程度。

[0006] 草甘膦已经在灭生(burndown)地区和其他非作物地区成功用于总植被控制15年以上。在许多情况下(如对于GTC),可以在连续的3、5、10直至15年中每年使用草甘膦1-3次。这些情况已经导致对草甘膦和GTC技术的过度依赖,并对天然杂草物种中对草甘膦天然更具耐受性或已经发展出抗草甘膦除草剂活性机制的植物施加了高选择压。

[0007] 仅用草甘膦的杂草控制程序的广泛使用正导致对草甘膦抗性杂草的选择,并且正在选择固有地比多数靶物种更能耐受草甘膦的杂草物种后代(即杂草演替)(Powles和Preston,2006;Ng等,2003;Simarmata等,2003;Lorraine-Colwill等,2003;Sfiligoj,2004;Millar等,2003;Heap,2005;Murphy等,2002;Martin等,2002)。尽管草甘膦已经在全球广泛使用15年以上,仅有少数杂草据报道已发展出对草甘膦的抗性(Heap,2005),然而它们中的大多数都鉴定于过去的5年。抗性杂草包括禾本科植物和阔叶物种—硬直黑麦草(*Lolium rigidum*)、多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)、牛筋草(*Eleusine indica*)、假高粱(*Sorghum halepense*)、豚草(*Ambrosia artemisiifolia*)、小飞蓬(*Conyza canadensis*)、野塘蒿(*Conyza bonariensis*)、长叶车前(*Plantago lanceolata*)、长芒苋(*Amaranthus palmerii*)和*Amaranthus rudis*。此外,在广泛使用GTC之前并不是农业问题的杂草现在开始大大盛行,并且难于在GTC的范围内(包括>80%的美国棉花和大豆地区和>20%的美国玉米地区)控制(Gianessi,2005)。这些杂草演替主要与(但不仅与)难于控制

的阔叶杂草一起出现。一些实例包括番薯属 (*Ipomoea*)、苋属 (*Amaranthus*)、藜属 (*Chenopodium*)、蒲公英属 (*Taraxacum*) 和鸭跖草属 (*Commelina*) 的物种。

[0008] 在种植者要面对草甘膦抗性杂草或演替成更难于控制的杂草物种的地区,种植者可以通过罐混或换用能控制遗漏杂草的其他除草剂来弥补草甘膦的弱点。在许多情况下控制阔叶逃逸的一种流行且有效的罐混伴侣为2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-滴)。2,4-滴已经在农业和非作物条件下用于广谱阔叶杂草控制60年以上。已有关于更具耐性物种的个案报道,但2,4-滴仍是全球最广泛使用的除草剂之一。对进一步使用2,4-滴的限制在于它在双子叶农作物(如大豆或棉花)中的选择性极差,因此2,4-滴一般不用于(且一般不靠近)敏感性双子叶作物。此外,2,4-滴在禾本科作物中的用途在某种程度上受限于会发生的作物损伤的性质。2,4-滴和草甘膦的组合已经用于在种植免耕大豆和棉花之前提供更强的灭生处理,然而,由于这些双子叶物种对2,4-滴的敏感性,这些灭生处理必须至少在种植前14-30天进行(Agrilience, 2005)。

[0009] 和MCPA一样,2,4-滴是苯氧酸类除草剂。2,4-滴已经用于在许多单子叶作物(如玉米、小麦和稻)中选择性控制阔叶杂草而不严重损伤目的作物植物。2,4-滴是合成的植物生长素衍生物,其作用为使正常的细胞激素内稳态失调,并阻碍平衡的受控生长,然而其确切的作用模式仍不了解。绿草定和氟草烟是吡啶氧乙酸类除草剂,其作用模式也与合成的植物生长素相同。

[0010] 这些除草剂对某些植物具有不同水平的选择性(如双子叶植物比禾本科植物更敏感)。不同植物对这些除草剂的差异代谢是不同水平选择性的一种解释。通常植物缓慢代谢2,4-滴,因此靶位点的不同活性更可能解释植物对2,4-滴不同的应答(WSSA, 2002)。2,4-滴的植物代谢一般通过两步代谢实现,通常是羟基化后接着与氨基酸或葡萄糖缀合(WSSA, 2002)。

[0011] 随着时间的发展,微生物种群已经发展出降解此特定外来物的有效的替代途径,这导致2,4-滴的完全矿化。对微生物连续应用除草剂选择了能利用除草剂作为碳源生长(从而使其在土壤中具有竞争优势)的微生物。因为这个原因,目前制备的2,4-滴具有相对短的土壤半衰期,并且没有遇到对其后的作物明显的延续效应(carryover effect)。这促进了2,4-滴的除草剂应用。

[0012] 已经广泛研究了其降解2,4-滴能力的一种生物是真养雷氏菌(*Ralstonia eutropha*) (Streber等,1987)。编码矿化途径中第一个酶促步骤的基因为tfdA。参阅美国专利No.6,153,401和GENBANK登录号M16730。TfdA通过 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶反应催化2,4-滴酸转化成二氯苯酚(DCP) (Smejkal等,2001)。DCP与2,4-滴相比几乎不具有除草剂活性。TfdA在转基因植物中用于向通常对2,4-滴敏感的双子叶植物(如棉花和烟草)赋予2,4-滴抗性(Streber等(1989), Lyon等(1989), Lyon(1993)和美国专利No.5,608,147)。

[0013] 已在环境中鉴定了大量编码能降解2,4-滴的蛋白质的tfdA型基因并已保存于Genbank数据库。许多同源物与tfdA类似(氨基酸同一性>85%)并具有与tfdA相似的酶特性。然而,有大量同源物与tfdA具有显著更低的同一性(25-50%),但却具有与 $\alpha$ -酮戊二酸双加氧酶 $Fe^{+2}$ 双加氧酶相关的特征性残基。因此这些不同的双加氧酶的底物特异性是什么并不明确。

[0014] 与tfdA具有低同源性(氨基酸同一性35%)的独特实例是来自*Sphingobium*

herbicidovorans的sdpA (Kohler等,1999,Westendorf等,2002,Westendorf等,2003)。已经显示此酶催化(S)-2,4-滴丙酸(和其他(S)-苯氧丙酸)以及2,4-滴(苯氧乙酸)矿化的第一步(Westendorf等,2003)。迄今仍没有将此基因转化进植物的报道。

[0015] 新除草剂耐受作物(HTC)技术的开发很大程度上受到GTC的效力、低费用和便利性的限制。因此,GTC在生产者中的采用率非常高。这很难刺激开发新的HTC技术。

[0016] 芳氧基链烷酸酯化学亚结构是许多商业除草剂(包括苯氧乙酸植物生长素(如2,4-滴和2,4-滴丙酸)、吡啶氧乙酸植物生长素(如氟草烟和绿草定)、芳氧基苯氧丙酸酯(AOPP)乙酰辅酶A羧化酶(ACC酶)抑制剂(如吡氟氯禾灵(haloxyfop)、喹禾灵(quizalofop)和禾草灵(diclofop))和5-取代的苯氧乙酸原卟啉原氧化酶IX抑制剂(如霸草灵(pyraflufen)和氟胺草酯(flumiclorac)))的通用实体。然而,这些除草剂类别的差别都很大,并且目前的文献中没有这些化学制品类别中共有的降解途径的证据。最近已描述降解涵盖多种作用模式的除草剂的多功能酶(PCT US/2005/014737;2005年5月2日提交)。下文将描述另一种独特的多功能酶和潜在用途。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明提供不仅对2,4-滴具有抗性,而且还对吡啶氧乙酸类除草剂具有抗性的新植物。迄今为止,还没有预期或提出可通过引入单个基因产生具有这两种有利特性的植物。本发明还包括这样的植物:其产生与一种或多种其他除草剂抗性基因(包括但不限于草甘膦-、ALS-(咪唑啉酮、磺酰脲)、芳氧基链烷酸酯-、HPPD-、PPO-和草铵膦-抗性基因)“叠加”的一种或多种本发明的酶,以提供与更广更多的强杂草控制和除草剂抗性管理选择相容的除草剂耐性植物。本发明还包括利用本文举例说明的基因和蛋白质的同源物的方法和组合物。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供对2,4-滴、MCPA、氟草烟和一种或多种市售除草剂(如草甘膦、草铵膦、百草枯、ALS抑制剂(如磺酰脲类、咪唑啉酮类、三唑并嘧啶磺酰胺类等)、HPPD抑制剂(如硝草酮(mesotrione)、异噁唑草酮(isoxaflutole)等)、麦草畏(dicamba)、溴草腈、芳氧基苯氧丙酸酯等等)具有耐受性的单子叶和双子叶植物。还公开了含有负责这类除草剂耐性的核酸序列的载体以及将这些耐性植物和除草剂组合用于杂草控制和防止杂草种群演替的方法。本发明使得可以以新的方法使用除草剂的新组合。此外,本发明提供预防产生并控制对一种或多种除草剂(如草甘膦)具有抗性的杂草株系的新方法。本发明赋予除草剂和作物的新组合的新用途,包括在种植否则会对该除草剂(如2,4-滴)敏感的植物的种子之前对将种植的地区进行的种植前应用。

[0020] 本发明部分涉及酶的鉴定,所述酶不仅能降解2,4-滴,而且还令人吃惊地具有例如使本发明的酶区别于先前已知的tfdA型蛋白质的新特性。更具体的,本发明涉及能降解2,4-滴和吡啶氧乙酸类除草剂的酶的用途。先前已报道的 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶均不具有降解苯氧乙酸和吡啶氧乙酸类植物生长素除草剂的能力。本发明使用的优选酶和基因在本文中称为AAD-13(芳氧基链烷酸酯双加氧酶)。这一高度新颖的发现是重要的除草剂耐性作物(HTC)性状和选择标记可能性的基础。本发明所述植物在其全部生命周期中具有抗性。

[0021] 之前没有动机产生含有AAD-13基因(优选如本文所示例的具有为了在一种或多种类型植物中表达而优化的序列的AAD-13多核苷酸)的植物,也不会预期这类植物能有效的

产生AAD-13酶以使植物对苯氧乙酸类除草剂(如2,4-滴)和/或一种或多种吡啶氧乙酸类除草剂(如绿草定和氟草烟)具有抗性。因此,本发明提供了许多本领域迄今未曾设想过的优点。

[0022] 本发明还部分涉及编码能降解苯氧乙酸类植物生长素和/或吡啶氧乙酸类植物生长素除草剂的芳氧基链烷酸酯双加氧酶的基因的鉴定和用途。筛选蛋白质的这些活性的方法也在本发明的范围内。因此,本发明包括通过重组表达的AAD-13酶对2,4-二氯苯氧乙酸和其他芳氧基链烷酸酯类植物生长素除草剂的降解。本发明还包括控制杂草的方法,其中所述方法包括对含有AAD-13基因的植物应用一种或多种吡啶氧乙酸类或苯氧乙酸类植物生长素除草剂。本发明还提供使用AAD-13基因作为鉴定转化了AAD-13的植物细胞和完整植物的选择标记的方法,所述植物细胞和完整植物任选地包含同时插入靶植物细胞的一种、两种或更多外源基因。本发明的方法包括选择对适当水平的除草剂具有抗性的转化细胞。本发明还包括通过培养本发明的植物和/或细胞制备具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶生物活性的多肽的方法。

[0023] 附图简述

[0024] 图1显示本发明AAD-13酶催化的一般化学反应。

[0025] 图2是 $\alpha$ -酮戊二酸双加氧酶的ClustalW比对。在80%的序列中保守的残基被突出显示。(突出显示相同和相似的残基)。

[0026] 图3图解了通过AAD-13对 $\alpha$ -酮戊二酸和目的底物的同时分解。

[0027] 序列简述

[0028] SEQ ID NO:1是来自*Sphingobium herbicidovorans*的AAD-13的天然核苷酸序列。

[0029] SEQ ID NO:2为翻译的由SEQ ID NO:1编码的蛋白质序列。

[0030] SEQ ID NO:3为植物优化的核苷酸序列AAD-13(v1)。

[0031] SEQ ID NO:4为翻译的由SEQ ID NO:3编码的蛋白质序列。

[0032] SEQ ID NO:5为大肠杆菌优化的核苷酸序列AAD-13(v2)。

[0033] SEQ ID NO:6显示了“sdpacodF”AAD-13(v1)引物的序列。

[0034] SEQ ID NO:7显示了“sdpacodR”AAD-13(v1)引物的序列。

[0035] SEQ ID NO:8显示了“sucCD”引物的序列。

[0036] SEQ ID NO:9显示了“sucCD”引物的序列。

[0037] SEQ ID NO:10显示了AAD-13(v2)引物的序列。

[0038] SEQ ID NO:11显示了AAD-13(v2)引物的序列。

[0039] 发明详述

[0040] 本发明开发的2,4-滴抗性基因及相应的抗性作物提供用于在作物中控制草甘膦抗性(或高耐性和演替的)阔叶杂草物种的优良选择。2,4-滴是广谱、相对便宜且强力的阔叶除草剂,如果在双子叶和单子叶作物中同样能提供更强的作物耐性,则可为种植者提供优良的效用。2,4-滴耐性转基因双子叶作物还可在应用时间和用量上具有更高的灵活性。2,4-滴除草剂耐性性状的另一用途是它可用于预防2,4-滴漂移、挥发、转化(inversion)(或其他远距离的移动现象)、误用、破坏等等对正常敏感性作物的损害。AAD-13基因的另一益处是,与目前已表征的所有tfdA同源物不同,AAD-13除了能降解非手性苯氧基植物生长素(如2,4-滴、MCPA、4-氯苯氧乙酸)以外,还能降解吡啶氧乙酸类植物生长素(如氟草烟)。

见表1。图1所示为本发明AAD-13酶催化的化学反应的一般图解( $O_2$ 的加入是立体特异性的;中间产物自发分解为苯酚和乙醛酸)。应当理解图1中的化学结构表示分子骨架,还应理解图1包含多种R基团以及相似的基团(如表1所示),但并未对其进行必要地具体阐明。已经全球使用不同苯氧基植物生长素组合的多种混合来处理不同地区特定的杂草谱和环境条件。在植物中使用AAD-13基因可以提供对更广谱的植物生长素除草剂的防护,从而提高灵活性和可控制的杂草谱。本发明还可用于对所有市售苯氧基植物生长素的漂移或其他远距离合成的植物生长素除草剂损伤的防护。表1详细说明市售的吡啶氧基和苯氧基植物生长素,并提供相应的化学结构。

[0041]

表 1. 市售的苯氧乙酸和吡啶氧乙酸植物生长素。述及的苯氧基植物生长素和吡啶氧基植物生长素除草剂通常制备为活性酸, 但也有一些商品化配制为多种相应酯制剂之一, 由于一般的植物酯酶在植物中将这些酯转化成活性酸, 因此这些也同样被视为植物中 AAD-13 酶的底物。类似的还可以是相应酸的相应有机或无机盐。可能的用量范围可以是作物和非作物用途中单独处理或与其他除草剂组合。

化学名	CAS 号	可能的用量范围 (g ae/ha)	优选的用量范围 (g ae/ha)	结构
2,4-滴	94-75-7	25 - 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 - 4000	25 - 4000	
4-CPA	122-88-3	25 - 4000	25 - 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 - 4000	25 - 4000	
MCPA	94-74-6	25 - 4000	125 - 1550	
绿草定	55335-06-3	50 - 2000	70 - 840	

[0042]

氟草烟	69377-81-7	25 - 2000	35 - 560	
-----	------------	-----------	----------	--



[0043] 现已鉴定了单个基因 (AAD-13), 其在遗传改造用于植物表达后具有允许在植物中使用苯氧基植物生长素除草剂的特性, 所述植物中固有耐性根本不存在或不足以允许使用这些除草剂。此外, AAD-13 可以在植物天然耐性不足以允许选择性时在植物中提供对吡啶氧乙酸除草剂的防护, 扩展了这些除草剂的潜在效用。现在可以以一种、两种或几种苯氧基植物生长素除草剂的组合相继或罐混地处理仅含 AAD-13 的植物。用于控制广谱双子叶杂草的每种苯氧基植物生长素除草剂的用量范围从 25 到 4000g ae/ha, 更通常从 100 到 2000g ae/ha。类似的, 可以对具有降低的来自吡啶氧乙酸植物生长素除草剂损伤风险的表达 AAD-13 的植物应用一种、两种或几种所述除草剂化合物的混合物。用于控制其他双子叶杂草的每种吡啶氧乙酸除草剂的用量范围可以从 25 到 2000g ae/ha, 更通常是从 35 到 840g ae/ha。

[0044] 草甘膦被广泛地使用, 因为它控制非常广谱的阔叶和禾本科杂草物种。然而, 在 GTC 和非作物应用中重复使用草甘膦已经 (而且仍将继续) 选择使杂草演替为天然更具耐性的物种或草甘膦抗性生物型。多数除草剂抗性管理策略建议使用有效用量的罐混除草剂伴侣作为延缓出现抗性杂草的方法, 所述除草剂伴侣提供对同一物种的控制, 但具有不同的作用模式。将 AAD-13 与草甘膦耐性性状 (和/或其他除草剂耐性性状) 叠加可通过能对同一作物选择性使用草甘膦、苯氧基植物生长素 (如 2, 4-滴) 和吡啶氧乙酸类植物生长素除草剂 (如 fluroxypyr) 来提供允许控制 GTC 中草甘膦抗性双子叶杂草物种的机制。这些除草剂的应用可以是在含有不同作用模式的两种或更多除草剂的罐混合物中同时使用; 在相继应用 (如种植前、出苗前或出苗后) 中单个除草剂组合物的单独使用 (使用的间隔时间范围从大约 2 小时到大约 3 个月); 或者备选地, 可以在任何时间 (从种植作物大约 7 个月内到收获作物时 (或对于单个除草剂为收获前间隔, 取最短者)) 应用代表每种化学类别的任意数目除草剂的任意组合。

[0045] 在控制广谱禾本科和阔叶杂草中具有灵活性是很重要的, 即使用时间、单个除草剂用量和控制顽固或抗性杂草的能力。作物中与草甘膦抗性基因/AAD-13 叠加的草甘膦应用的范围可以是大约 250-2500g ae/ha; 苯氧基植物生长素除草剂 (一种或多种) 可按照大约 25-4000g ae/ha 应用; 而吡啶氧乙酸植物生长素除草剂 (一种或多种) 可按照 25-2000g ae/ha 应用。这些应用的最佳组合和时间取决于具体的情况、物种和环境, 并可由杂草控制领域得益于本公开内容的技术人员最佳决定。

[0046] 在完整的生长周期中, 幼苗通常是抗性的。转化的植物在基因表达的任意时间一般对新除草剂应用具有抗性。本文显示贯穿生命周期的对 2, 4-滴的耐受性, 通过使用迄今检测的组成型启动子 (主要是 CsVMV 和 AtUbi 10)。一般期望如此, 但是这是一种基于其他非代谢活性的改进, 比如, 通过减少抗性作用机制位点的表达显著影响耐性。一个例子是抗农达 (Roundup Ready) 棉花, 如果在早期喷洒, 植物具有抗性, 但是如果喷洒太晚, 草甘膦在分生组织聚集 (因为其不被代谢和转位); 使用的病毒启动子孟山都 (Monsanto) 不能在花中很好的表达。本发明在这些方面提供改进。

[0047] 除草剂制剂 (如酯、酸或盐制剂或可溶浓缩剂、乳化浓缩剂或可溶液体) 和罐混添加剂 (如佐剂、表面活性剂、漂移阻滞剂或相容剂) 可显著影响给定的除草剂或一种或多种除草剂的组合的杂草控制。这些和任意前述除草剂化学性质的任意组合都在本发明的范围内。

[0048] 本领域技术人员还会了解, 两种或更多作用模式的组合在提高受控杂草谱和/或

在控制天然更具耐性或抗性杂草物种方面的益处,并还可扩展到通过人工参与(转基因或非转基因)在作物中产生除GTC外的除草剂耐性的化学性质。事实上,可以单独或以多重组合叠加编码以下抗性的性状以提供有效控制或防止杂草演替和/或对任意所述类别除草剂的抗性的能力:草甘膦抗性(如抗性植物或细菌EPSPS(包括Agro.菌株CP4)、草甘膦氧化还原酶(GOX)、GAT)、草铵膦抗性(如Pat、bar)、乙酰乳酸合酶(ALS)抑制性除草剂抗性(如咪唑啉酮类、磺酰脲类、三唑并嘧啶磺酰胺类、嘧啶硫代苯甲酸类(pyrimidinylthiobenzoates)和其他化学品如AHAS,Csr1, SurA等)、溴草腈抗性(如Bxn)、对HPPD(4-羟苯基丙酮酸双加氧酶)酶抑制剂的抗性、对八氢番茄红素去饱和酶(PDS)抑制剂的抗性、对光系统II抑制性除草剂的抗性(如psbA)、对光系统I抑制性除草剂的抗性、对原卟啉原氧化酶IX(PPO)抑制性除草剂的抗性(如PPO-1)、对苯脲除草剂的抗性(如CYP76B1)、二氯甲氧苯酸降解酶(参阅如US 20030135879)等等。体内修饰的EPSPS以及I类、II类和III类草甘膦抗性基因可用于某些优选的实施例。

[0049] 关于其他除草剂,一些其他优选的ALS抑制剂包括但不限于:磺酰脲类(如绿磺隆(chlorosulfuron)、氯吡嘧磺隆(halosulfuron)、烟嘧磺隆(nicosulfuron)、甲磺隆(sulfometuron)、磺酰磺隆(sulfosulfuron)、三氟啶磺隆(trifloxysulfuron))、咪唑啉酮类(如甲氧咪草烟(imazamox)、咪草烟(imazethapyr)、灭草喹(imazaquin))、三唑并嘧啶磺酰胺类(如氯酯磺草胺、双氯磺草安、双氟磺草胺、唑嘧磺草胺、磺草唑胺(metosulam)和嘧啶并三唑类磺胺(penoxsulam)、嘧啶硫代苯甲酸类(如双草醚(bispyribac)和嘧草硫醚(pyriothiobac))和氟酮磺隆(flucarbazone)。一些优选的HPPD抑制剂包括但不限于:甲基磺草酮、异噁唑草酮和磺草酮。一些优选的PPO抑制剂包括但不限于:氟胺草酯、丙炔氟草胺、氟吡嗪草酯(flufenpyr)、吡草醚(pyraflufen)、吡草氟(fluthiacet)、氟丙嘧草酯、唑草酮、甲磺草胺和二苯醚(如三氟羧草醚、氟磺胺草醚、乳氟禾草灵和乙氧氟草醚)。

[0050] 此外,可以将AAD-13单独或与一种或多种其他HTC性状叠加后再与一种或多种其他输入(如昆虫抗性、真菌抗性或胁迫耐受性等)或输出(如提高的产量、改进的油谱、提高的纤维品质等)性状叠加。因此,本发明可用于提供以灵活且经济地控制任何数目的农学害虫的能力来提高作物品质的完整农学解决方案。

[0051] 本发明部分涉及鉴定不仅能降解2,4-滴,而且令人惊奇地具有使本发明的酶区别于先前已知的(例如)tfdA蛋白的新特性的酶。尽管此酶与tfdA的同源性很低,但本发明的基因一般仍可归类到 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶的同一家族。此家族蛋白质的特征在于包含活性位点的“HX(D/E)X<sub>23-26</sub>(T/S)X<sub>114-183</sub>HX<sub>10-13R</sub>”基序中的三个保守性组氨酸残基。组氨酸与活性位点中催化活性所必需的Fe<sup>+2</sup>离子配位(Hogan等,2000)。设计了本文所讨论的初步体外表达实验以帮助选择新属性。这些实验还说明AAD-13酶与先前提交的专利申请(PCT US/2005/014737;2005年5月2日提交)中公开的同类另一种不同的酶有区别。前一申请中的AAD-1酶与本发明中AAD-13蛋白质只具有大约25%的序列同一性。

[0052] 更具体的,本发明部分涉及不仅能降解2,4-滴而且还能降解吡啶氧乙酸类除草剂的酶的用途。除了以前鉴定的AAD-1和AAD-12酶(分别为专利申请PCT US/2005/014737(WO 2005/107437)和WO 2007/053482的主题),先前已经报道的 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶不具有以不同作用方式降解不同化学类别的除草剂的能力。本发明用途中优选的酶和基因在本文中称为AAD-13(芳氧基链烷酸酯双加氧酶)基因和蛋白质。

[0053] 本发明还部分涉及编码能降解苯氧基生长素和吡啶氧乙酸类除草剂的芳氧基链烷酸酯双加氧酶的基因的鉴定和用途。因此,本发明部分涉及通过重组表达的AAD-13酶降解2,4-二氯苯氧乙酸、其他苯氧乙酸和吡啶氧乙酸类除草剂。

[0054] 在分析测定中,本发明的蛋白质对2,4-滴到2,4-二氯苯酚(“DCP”,无除草剂活性)的转化测试为阳性。部分纯化的本发明蛋白质能在体外将2,4-滴迅速转化为DCP。转化AAD-13的植物提供的另一优点是母体除草剂代谢为失活形式,从而降低谷物或秸秆中收获除草剂残留物的可能。

[0055] 本发明还包括控制杂草的方法,其中所述方法包括对含有AAD-13基因的植物应用吡啶氧乙酸和/或苯氧基生长素除草剂。

[0056] 根据这些发现,现在提供了含有编码这类酶的多核苷酸的新植物。迄今为止还没有产生这类植物的动机,也不会预期这样的植物能有效产生此酶,不仅赋予植物对苯氧乙酸类除草剂(如2,4-滴)的抗性,而且赋予植物对吡啶氧乙酸类除草剂的抗性。因此,本发明提供本领域从未设想过的许多优点。

[0057] 可以获得(保藏于培养物保藏中心如ATCC或DSMZ的)公共可得的菌株并使用本文公开的技术筛选新基因。本文公开的序列可用于扩增同源基因并克隆进重组表达系统,以根据本发明进一步进行筛选和测试。

[0058] 如上文背景章节所讨论的,已被广泛研究其降解2,4-滴能力的一种生物为真养雷氏菌(Streber等,1987)。编码降解途径中第一种酶的基因为tfdA。参阅美国专利No.6,153,401和GENBANK登录号M16730。tfdA通过 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶反应催化2,4-滴酸转化成无除草剂活性的DCP(Smejkal等,2001)。tfdA已在转基因植物中用于将2,4-滴抗性赋予通常对2,4-滴敏感的双子叶植物(如棉花和烟草)(Streber等,1989;Lyon等,1989;Lyon等,1993)。已经从环境中鉴定了编码能降解2,4-滴的蛋白质的大量tfdA型基因并保存于NCBI数据库。许多同源物与tfdA非常相似(氨基酸同一性>85%)并具有与tfdA相似的酶特性。然而,现在鉴定了与tfdA具有低水平同源性的少部分 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶同源物。

[0059] 本发明部分涉及远缘酶sdpA新用途和功能的令人惊奇的发现,该酶来自Sphingobium herbicidovorans(Westendorf等,2002、2003)与tfdA具有低源性(氨基酸同一性35%)且与最近鉴定的AAD-1具有低源性(27%氨基酸同一性)。先前已经显示以其天然形式纯化的这种 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶可降解2,4-滴和S-2,4-滴丙酸(Westendorf等,2002和2003)。然而,先前已报道的 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶均不具有降解吡啶氧乙酸化学类别的选择性除草剂的能力。从未在植物中表达过sdpA(来自Sphingobium herbicidovorans),也没有动机这样做,部分是因为新HTC技术的开发已经在很大程度上受到GTC的效能、低费用和便利性的限制(Devine,2005)。

[0060] 根据新的活性,本发明的新蛋白质和基因在本文中称为AAD-12蛋白和基因。目前已证实AAD-13在体外降解多种苯氧乙酸类生长素除草剂。见下文实施例5中的表5.4.4-1。此外,如本文所第一次报道的,惊奇地发现此酶还能降解芳氧基链烷酸酯类分子的其他底物。具有重要农学意义的底物包括吡啶氧乙酸类生长素除草剂。这一高度新颖的发现是重要的除草剂耐受作物(HTC)和选择标记性状可能性的基础。此酶的独特性在于其传递对一系列广谱阔叶除草剂(苯氧乙酸类和吡啶氧乙酸类生长素)的除草剂降解活性的能力。

[0061] 因此,本发明部分涉及通过重组表达的芳氧基链烷酸酯双加氧酶(AAD-13)降解2,

4-二氯苯氧乙酸、其他苯氧乙酸类生长素除草剂和吡啶氧乙酸类除草剂。本发明还部分涉及编码能降解苯氧基和/或吡啶氧基生长素除草剂的芳氧基链烷酸酯双加氧酶降解酶(AAD-13)的基因的鉴定和用途。

[0062] 本发明的酶可进行转基因表达,导致对控制几乎所有阔叶杂草的除草剂组合的耐性。AAD-13可作为优秀的除草剂耐受作物(HTC)性状与例如其他HTC性状(如草甘膦抗性、草铵膦抗性、ALS-抑制剂(如咪唑啉酮类、磺酰脲类、三唑并嘧啶磺酰胺类)抗性、溴草腈抗性、HPPD抑制剂抗性、PPO抑制剂抗性等)和昆虫抗性性状(Cry1F、Cry1Ab、Cry 34/45、其他苏云金芽孢杆菌(Bt)蛋白质或非芽孢杆菌属来源的杀虫剂蛋白质等)叠加。此外,AAD-13可作为选择标记辅助选择用另一个基因或基因群遗传改造的植物的原代转化体。

[0063] 此外,已经重新设计了本发明的微生物基因,以使该蛋白质由单子叶和双子叶植物使用偏好的密码子编码(hemicot)。已经用含有AAD-13的构建体转化了拟南芥、玉米、烟草、棉花、大豆、芸苔和稻,并已证明了对苯氧基和吡啶氧基生长素除草剂的高水平抗性。因此,本发明还涉及编码本发明蛋白质的“植物优化的”基因。

[0064] 氧基链烷酸酯(Oxyalkanoate)基因可用于将稳定的酸官能团引入除草剂。酸性基团可通过“酸捕获”赋予韧皮部活动性(除草剂作用所需的属性),从而可以为了活动性目的而整合进新除草剂。本发明的方面还提供产生HTC的机制。存在很多可能为AAD-13底物的市售和实验性除草剂。因此,使用本发明基因还可以导致对其他除草剂的除草剂耐性。

[0065] 本发明的HTC性状可用在与其他HTC性状(包括但不限于草甘膦耐性)的新组合中。由于对除草剂(如草甘膦)的新获得的抗性或固有的耐性,这些性状组合产生控制杂草(等)物种的新方法。因此,除了HTC性状,本发明的范围包括使用除草剂控制杂草的新方法,其中通过转基因作物中的所述酶产生对所述除草剂的耐性。

[0066] 本发明可以用于使(例如)大豆中与目前的草甘膦抗性性状叠加的2,4-滴抗性性状商品化。因此,本发明提供对抗阔叶杂草物种演替和/或选择除草剂抗性阔叶杂草的工具,所述任务由于种植者在多种作物的杂草控制中对草甘膦极高的依赖性而达到白热化的程度。

[0067] 本发明AAD-13基因的转基因表达示例于如拟南芥和烟草。大豆是本发明优选转化的作物。不过,本发明可应用于多种其他单子叶(如牧草禾本科或草坪草禾本科)和双子叶作物(如苜蓿、三叶草、乔木物种等)。类似的,2,4-滴(或其他AAD-13底物)可更积极地用于耐性适中的禾本科作物中,由此性状得到的提高的耐性将为种植者提供能以更有效的用量和更广的施用时间来使用这些除草剂而无作物损伤风险的可能性。

[0068] 另外,本发明提供了可提供对控制阔叶杂草除草剂的抗性的单个基因。此基因可用于多种作物中,能使用广谱除草剂组合。本发明还可控制对目前的化学品具有抗性的杂草,并辅助控制目前的农业实践产生的演替的杂草谱。本发明的AAD-13还可以用于将其他除草剂底物有效解毒成非除草剂形式的尝试。因此,本发明提供了其他HTC性状和/或选择标记技术的发展。

[0069] 除了使用本发明基因产生HTC以外,本发明基因还可用作细胞培养物、温室和大田中成功选择转化体的选择标记。本发明基因仅作为生物技术工程的选择标记就具有很高的内在价值。AAD-13与其他芳氧基链烷酸酯生长素除草剂的混杂性提供了将此基因用于HTC和/或选择标记目的的许多可能。

[0070] 本发明的蛋白质(和来源分离物)。本发明提供功能蛋白质。“功能活性”(或“活性”)在本文中指本发明用途的蛋白质/酶(单独或与其他蛋白质组合)具有降解或减弱除草剂活性的能力。产生本发明蛋白质的植物优选产生“有效量”的蛋白质,从而在用除草剂处理植物时,蛋白质表达的水平足以给予植物对除草剂(若无特别说明则为一般用量;一般应用量可见于例如熟知的《Herbicide Handbook》(Weed Science Society of America,第八版,2002))完全或部分的抗性或耐性。可以以通常杀死靶植物的用量、正常的大田用量和浓度使用除草剂(由于本发明,水平和/或浓度可以任选地比先前所使用的更高)。优选地,本发明的植物细胞和植物被保护免受除草剂处理引起的生长抑制或损伤。本发明的转化植物和植物细胞优选具有对本文讨论的除草剂的抗性或耐性,即转化的植物和植物细胞能在有效量的一种或多种本文讨论的除草剂存在下生长。本发明优选的蛋白质具有代谢一种或多种芳氧基链烷酸酯化合物的催化活性。

[0071] 不使用动词“耐受”或形容词“耐性的”,人们就无法简单地讨论术语“抗性”。工业界已花费无数的时间争论除草剂耐性作物(HTC)与除草剂抗性作物(HRC)。HTC是工业界优选的术语。然而,权威的美国治草科学学会(Weed Science Society of America)对抗性的定义是“植物接触通常对野生型致死剂量的除草剂后生存和繁殖的遗传能力,在植物中抗性可以自然发生或由诸如遗传工程的技术诱导产生或挑选通过组织培养或变异产生的突变体。”除非其他说明,正如《The Herbicide Handbook》在本发明公开递交之日时的通用版本所建议的一样,本文使用的除草剂“抗性”是可遗传的,并允许植物在除草剂对给定植物进行一般除草剂有效处理的情况下生长和繁殖。正如本领域中技术人员认可的,即使植物受到除草剂处理的一定损伤程度明显,植物仍可被认为“抗性”。如本文中所述的术语“耐性”比术语“抗性”更广泛,并包括本文定义的“抗性”,以及特定植物具有的抵抗除草剂诱导的各种程度损伤的提高了的能力,而在同样的除草剂剂量下一般导致相同基因型野生型植物损伤。

[0072] 功能活性到植物或细菌系统的转移可涉及编码本发明蛋白质氨基酸序列的核酸序列,所述核酸序列整合进蛋白质表达载体,所述载体适于其将居留的宿主。获得编码具有功能活性的蛋白质的核酸序列的一种方法是使用从本文公开的蛋白质的氨基酸序列推出的信息,从产生目的蛋白质的细菌物种中分离天然遗传物质。如下文更详细讨论的,可以优化天然序列进行例如植物表达。也可以基于蛋白质序列设计优化的多核苷酸。

[0073] 本发明提供具有本文所鉴定新活性的蛋白质类别。表征这些蛋白质类别和编码它们的多核苷酸的一种方法是通过多核苷酸在一系列特定条件下与示例核苷酸序列(其互补序列和/或来自任一链的一种或多种探针)杂交的能力和/或其使用来自示例序列的引物通过PCR被扩增的能力来定义多核苷酸。

[0074] 有许多获得本发明用途的蛋白质的方法。例如,可以用本文所公开蛋白质的抗体从蛋白质混合物中鉴定和分离其他蛋白质。具体的,可以针对蛋白质中与其他相关蛋白质相比最保守或最特殊的部分产生抗体。接着可使用这些抗体通过免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)或免疫印迹来具体鉴定具有特征活性的等同蛋白质。可以使用标准方案便利的制备针对本文公开蛋白质、或针对等同蛋白质或针对这些蛋白质的片段的抗体。这样的抗体是本发明的一个方面。本发明的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体,优选针对示例或提出的蛋白质产生。

[0075] 本领域技术人员容易认识到,可以从多种来源获得本发明的蛋白质(和基因)。由于已知完整的除草剂降解操纵子可编码在转座元件(如质粒)上、以及整合在基因组中,因此可以从广泛的多种微生物(如包括重组和/或野生型细菌)获得本发明的蛋白质。

[0076] 可以通过本领域所熟知的方案产生细菌分离物的突变体。例如,可以通过分离物的甲基磺酸乙酯(EMS)诱变来获得不产孢子突变体。可以通过本领域熟知的方案使用紫外光和亚硝基胍产生突变株。

[0077] “来自”或“得自”任意受试分离物的蛋白质在本文中指该蛋白质(或相似的蛋白质)可得自该分离物或其他一些来源,如其他细菌菌株或植物。“源自”也具有这一含义,并包括可从经修饰用于(例如)在植物中表达的给定类型的细菌获得的蛋白质。本领域技术人员容易理解,在细菌基因和蛋白质公开后就可以改造植物以产生该蛋白质。可以使用本文公开的多核苷酸和/或氨基酸序列制备抗体制剂、核酸探针(如DNA、RNA或PNA)等,并用于从其他(天然)来源筛选和回收其他相关基因。

[0078] 可以使用标准分子生物学技术克隆和测序本文所述蛋白质和基因。其他信息可见于本文引为参考的Sambrook等,1989。

[0079] 多核苷酸和探针。本发明还提供编码本发明用途蛋白质的核酸序列。本发明还提供鉴定和表征编码具有所需除草剂活性的蛋白质的基因的方法。在一个实施方案中,本发明提供可作为杂交探针和/或PCR技术的引物使用的独有核苷酸序列。引物产生可用于鉴定、表征和/或分离特定目的基因的特征性基因片段。本发明的核苷酸序列编码与先前已描述蛋白质不同的蛋白质。

[0080] 本发明的多核苷酸可用于形成完整“基因”,以在期望的宿主细胞中编码蛋白质或肽。例如,本领域技术人员容易了解,可以如本领域所熟知的那样,在目的宿主中将本发明的多核苷酸适当地置于启动子的控制之下。基因表达和时间/组织特异性表达的水平可极大地影响本发明的应用。一般而言,降解基因蛋白质较高水平的表达会导致底物(本文中为靶除草剂)更快更完全的降解。除非高表达对植物健康具有继发的负面影响,一般期望启动子以高水平表达靶基因。为了在全部生长阶段中完全保护植物,一般希望AAD-13基因在所有组织中组成型表达。然而,也可以使用无性繁殖表达的抗性基因;这允许在植物中使用靶除草剂进行杂草控制,接着通过在开花期使用来控制靶作物的有性繁殖。此外,表达所需的水平和时间还依赖于植物的类型和期望的耐性水平。一些优选的实施方案使用组合转录增强子等的强组成型启动子来增加表达水平和增强耐性至所需水平。在实施例部分之前,一些此类的应用会在下面更详细讨论。

[0081] 如本领域技术人员所知,DNA一般以双链形式存在。在这种排列下,一条链与另一条链互补,反之亦然。当DNA在(例如)植物中复制时产生了额外的互补DNA链。本领域中经常使用“编码链”指代与反义链结合的链。mRNA转录自DNA的“反义”链。“有义”或“编码”链具有一连串密码子(密码子是可以作为三残基单位阅读以指定特定氨基酸的三个核苷酸),所述密码子可以作为开放读码框(ORF)阅读以形成目的蛋白质或多肽。为在体内产生蛋白质,一般将DNA链转录成用作蛋白质模板的mRNA互补链。因此,本发明包括所附序列表中所示的示例多核苷酸和/或等同物(包括互补链)的用途。与示例DNA分子功能性等同的RNA和PNA(肽核酸)也包含于本发明中。

[0082] 在本发明的一个实施方案中,可以在使微生物高度增殖的条件下培养细菌分离

物。在处理微生物以提供单链基因组核酸后,可以用本发明的引物与DNA接触并进行PCR扩增。目的基因的特征性片段将通过该操作而得以扩增,从而鉴定目的基因的存在。

[0083] 本发明的其他方面包括使用本文公开的方法和核苷酸序列鉴定的基因和分离物。所鉴定的基因可编码本发明的除草剂抗性蛋白质。

[0084] 可以通过如使用寡核苷酸探针鉴定和获得本发明用途的蛋白质和基因。这些探针为可检测的核苷酸序列,所述核苷酸序列由于适当的标记可被检测或如国际申请W0 93/16094所述使其具有固有的荧光性。探针(和本发明的多核苷酸)可以是DNA、RNA或PNA。除了腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U,RNA分子中)之外,本发明的合成探针(和多核苷酸)还可以含有肌苷(能与全部四种碱基配对的中性碱基,有时用于在合成探针中代替全部四种碱基的混合物)和/或其他合成的(非天然)碱基。因此,当本文中提到的合成的简并寡核苷酸时一般使用“N”或“n”,“N”或“n”可以是G、A、T、C或肌苷。本文使用的多义密码子与提交本申请时的标准IUPAC命名惯例一致(如R为A或G、Y为C或T等)。

[0085] 如本领域所熟知,如果探针分子与核酸样品杂交,可以合理的假设探针和样品具有显著同源性/相似性/同一性。优选地,首先进行多核苷酸杂交,之后使用本领域所熟知的技术在低、中或高严格条件下进行洗涤,如Keller,G.H.,M.M.Manak(1987)《DNA Probes》,Stockton Press,New York,NY,169-170页中所述。例如,如文中所述,可以通过首先在室温用 $2\times$ SSC(标准柠檬酸盐水)/0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)洗涤15分钟来得到低严格条件。一般进行两次洗涤。然后通过降低盐浓度和/或通过提高温度得到较高的严格度。例如,在上述洗涤之后可以接着在室温用 $0.1\times$ SSC/0.1%SDS洗涤两次,每次15分钟,然后在 $55^{\circ}\text{C}$ 用 $0.1\times$ SSC/0.1%SDS接着洗涤30分钟。如本领域技术人员所知,这些温度可以与本文所示的其他杂交和洗涤方案一起使用(例如可以用SSPE代替SSC作为盐使用)。可以通过向445ml水中加入50ml  $20\times$ SSC和5ml 10%SDS制备 $2\times$ SSC/0.1%SDS。可以通过混合NaCl(175.3g/0.150M)、柠檬酸钠(88.2g/0.015M)和水,用10N NaOH调整pH至7.0,然后将体积调整至1升来制备 $20\times$ SSC。可以通过将10g SDS溶解到50ml高压灭菌水中,然后稀释到100ml来制备10%SDS。

[0086] 检测探针提供了用已知方式测定是否保持了杂交的方法。这样的探针分析提供了鉴定本发明基因的快速方法。可以使用DNA合成仪和标准程序合成本发明用作探针的核苷酸片段。这些核苷酸片段还可以用作PCR引物以扩增本发明的基因。

[0087] 可以用分子的杂交特征定义本发明的多核苷酸。因此本发明包括与本文示例的多核苷酸杂交的多核苷酸(和/或其互补序列、优选其全长互补序列)。即,定义基因(和其编码的蛋白质)的一种方法是通过其与已知或具体示例的基因(在本文具体公开的任意条件下)杂交的能力。

[0088] 本文使用的“严格”杂交条件指实现与本申请人所使用条件相同或大致相同程度杂交特异性的条件。具体地,通过标准方法进行固定在Southern(DNA杂交)印迹上的DNA与 $^{32}\text{P}$ 标记的基因特异性探针的杂交(参阅如Maniatis等,1982)。一般在允许检测靶序列的条件下进行杂交和其后的洗涤。对于双链DNA基因探针,在 $6\times$ SSPE、 $5\times$ Denhardt溶液、0.1%SDS、0.1mg/ml变性DNA中在DNA杂合体解链温度( $T_m$ )以下 $20-25^{\circ}\text{C}$ 进行过夜杂交。按下式描述解链温度(Beltz等,1983):

[0089]  $T_m=81.5^{\circ}\text{C}+16.6\text{Log}[\text{Na}^+]+0.41(\text{G}+\text{C}\%)-0.61(\text{甲酰胺}\%)-600/\text{双链体碱基对长}$

度

[0090] 一般如下述进行洗涤:

[0091] (1) 在 $1 \times$ SSPE、0.1% SDS中室温15分钟洗涤两次(低严格洗涤)。

[0092] (2) 在 $0.2 \times$ SSPE、0.1% SDS中在 $T_m - 20^\circ\text{C}$  15分钟洗涤一次(中等严格洗涤)。

[0093] 对于寡核苷酸探针,在 $6 \times$ SSPE、 $5 \times$  Denhardt溶液、0.1% SDS、0.1mg/ml变性DNA中在杂合体解链温度( $T_m$ )以下 $10-20^\circ\text{C}$ 进行过夜杂交。按下式确定寡核苷酸探针的 $T_m$ :

[0094]  $T_m(^\circ\text{C}) = 2(T/A\text{碱基对数}) + 4(G/C\text{碱基对数})$  (Suggs等,1981)。

[0095] 一般如下述进行洗涤:

[0096] (1) 在 $1 \times$ SSPE、0.1% SDS中室温15分钟洗涤两次(低严格洗涤)。

[0097] (2) 在 $1 \times$ SSPE、0.1% SDS中在杂交温度15分钟洗涤一次(中等严格洗涤)。

[0098] 一般可以改变盐和/或温度以改变严格度。对于长度 $>70$ 左右碱基的标记DNA片段,可以使用以下条件:

**低:  $1$  或  $2 \times$ SSPE, 室温**

**低:  $1$  或  $2 \times$ SSPE,  $42^\circ\text{C}$**

[0099]

**中:  $0.2 \times$ 或  $1 \times$ SSPE,  $65^\circ\text{C}$**

**高:  $0.1 \times$ SSPE,  $65^\circ\text{C}$ 。**

[0100] 双链体的形成和稳定依赖于杂合体两条链间的显著互补性,且如上文所提到的,某种程度的错配是允许的。因此,本发明的探针序列包括所述序列的突变(单突变和多重突变均包括在内)、缺失、插入及其组合,其中所述突变、插入和缺失允许与目的靶多核苷酸形成稳定的杂合体。可以以多种方法在给定的多核苷酸序列中产生突变、插入和缺失,这些方法为本领域普通技术人员所共知。其他方法可在将来逐渐被了解。

[0101] PCR技术。聚合酶链式反应(PCR)是核酸序列的引发式重复性酶合成。此方法为本领域技术人员所熟知并普遍使用(参阅Mullis,美国专利No.4,683,195、4,683,202和4,800,159;Saiki等,1985)。PCR是基于目的DNA片段的酶扩增,所述DNA片段两侧侧接与靶序列相反链杂交的两个寡核苷酸引物。引物优选在 $3'$ 末端彼此指向对方。模板热变性、引物与其互补序列退火和用DNA聚合酶延伸退火引物的重复循环导致所述PCR引物 $5'$ 末端所界定片段的扩增。每一引物的延伸产物可作为其他引物的模板,因此每个循环基本上倍增前一循环中产生的DNA片段数量。这导致特定靶片段的指数积累,可在几小时内多达数百万倍。通过使用热稳定的DNA聚合酶(如分离自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的Taq聚合酶)能完全自动地完成扩增过程。可以使用的其他酶为本领域技术人员所公知。

[0102] 示例DNA序列或其片段能用作PCR扩增的引物。在PCR扩增中,引物和模板间某种程度的错配是可以接受的。因此,示例引物的突变、缺失和插入(特别是在 $5'$ 末端加入核苷酸)在本发明的范围内。可以通过本领域普通技术人员已知的方法在给定的引物中产生突变、插入和缺失。

[0103] 基因和蛋白质的修饰。本发明的基因和蛋白质能与其他基因和蛋白质融合以产生嵌合或融合蛋白。用于本发明的基因和蛋白质不仅包括具体示例的全长序列,还包括这些序列的部分、区段和/或片段(包括连续片段和与全长分子相比内部和/或末端缺失)、其变



体、突变体、嵌合体 and 融合物。只要保留所需的功能活性,本发明的蛋白质可以具有取代的氨基酸。“变体”基因具有编码与示例蛋白质具有等同或相似的活性的相同蛋白质或等同蛋白质的核苷酸序列。

[0104] 术语“变体蛋白质”和“等同蛋白质”指对靶底物具有相同或基本相同的生物/功能活性的蛋白质和与示例蛋白质具有等同序列的蛋白质。本文所使用的“等同”序列指含有提高或不对活性产生显著不利影响的氨基酸取代、缺失、添加或插入的序列。保留活性的片段也包含于此定义中。保留了如示例蛋白质相应片段的相同或相似功能或活性的片段和其他等同物在本发明的范围内。可以为了多种目的(如(不严重/显著降低蛋白质功能活性地)提高(或降低)蛋白质的蛋白酶稳定性、去除或加入限制性位点等)产生变化,如氨基酸取代或添加。例如,可以使用产生点突变的标准技术便利地构建基因的变异。

[0105] 另外,如美国专利No.5,605,793描述了在随机或聚焦破碎后通过DNA重组产生额外的分子多样性的方法。这可称为基因“改组”,一般包括混合两种或更多不同DNA分子的(所需大小的)片段,接着重复若干轮的复性。这可以改进起始基因所编码蛋白质的活性。结果为具有改进的活性、改变的底物特异性、提高的酶稳定性、改变的立体特异性或其他特征的嵌合蛋白。

[0106] 得到并检查目的蛋白质的原子3D(三维)坐标和晶体结构之后可设计并靶向“改组”。因此,可以针对修饰理想的蛋白质的某些片段,如表面暴露的片段进行“聚焦改组”,且优选不是参与蛋白质折叠和基本的3D结构完整性的内部片段。

[0107] 可对酶“活性点位”进行特定变化,以影响固有的与活性或立体特异性有关的功能性(参阅比对图2)。Mullery等(2006)。利用与其固有的底物牛磺酸结合时的已知tauD晶体结构作为双加氧酶模型确定活性位点残基。Elkins等(2002)“X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/ $\alpha$ -ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates,”*Biochemistry* 41(16):5185-5192。关于酶活位点的序列优化和设计参阅Chakrabarti等,PNAS,(2005年8月23日),102(34):12035-12040。

[0108] 可利用变体基因产生变体蛋白质;可以使用重组宿主产生变体蛋白质。使用这些“基因改组”技术可以构建含有本文示例的任何序列中任何5、10或20个连续残基(氨基酸或核苷酸)的等同基因和蛋白质。例如,如本领域技术人员所了解的,可以调整基因改组技术以获得具有如与任何示例或提出的序列(或其互补序列(全长互补序列))中(相同大小)的片段相对应的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、

235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287或288个连续残基(氨基酸或核苷酸)的等同物。类似大小的片段特别是保守区的片段也能作为探针和/或引物。

[0109] 可以根据标准方法使用市售的外切核酸酶或内切核酸酶产生全长基因的片段。例如,可以使用酶如(Ba131)或定点诱变从这些基因的末端系统地切除核苷酸。还可以使用多种限制性酶获得编码活性片段的基因。可以使用蛋白酶直接获得这些蛋白质的活性片段。

[0110] 如本文所公开的,可以截短蛋白质而仍保留功能活性,这在本发明的范围内。“截短的蛋白质”指蛋白质的部分可被切割,而切割后剩下的截短的蛋白质仍保留并表现所需活性。可以通过多种蛋白酶进行切割。另外,使用分子生物学技术能产生有效切割的蛋白质,其中通过用限制性内切核酸酶消化或本领域技术人员可使用的其他技术去除编码所述蛋白质的DNA碱基。截短后,可以在异源系统(如大肠杆菌、杆状病毒、基于植物的病毒系统、酵母等)中表达所述蛋白质,然后置于本文公开的昆虫实验中测定活性。如本领域所熟知,可以成功地产生小于完整的全长序列而保留功能活性的截短蛋白质。例如,可以以截短(核心蛋白质)形式使用Bt蛋白质(参阅如Höfte等(1989)和Adang等,(1985))。本文所使用的术语“蛋白质”包括功能活性的截短物。

[0111] 在一些情况下(特别是植物中的表达),使用表达截短蛋白质的截短基因是有利的。优选的截短基因一般编码全长蛋白质的40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。

[0112] 本发明的某些蛋白质已在本文中具体示例。由于这些蛋白质仅是本发明蛋白质的范例,很显然本发明包括具有与示例蛋白质相同或相似活性的变体或等同蛋白质(和编码其等同物的核苷酸序列)。等同蛋白质与示例蛋白质具有氨基酸相似性(和/或同源性)。氨基酸同一性一般至少为60%,优选至少为75%,更优选至少为80%,甚至更优选至少为90%并可以至少为95%。还可以根据更具体的同一性和/或相似性范围定义本发明优选的蛋白质。例如,与本文示例或提出的序列相比,同一性和/或相似性可以为49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。上文列出的任意数字可用于定义上限和下限。

[0113] 除非另有说明,使用如Karlin和Altschul(1993)中所改良的Karlin和Altschul(1990)算法测定本文所用的两个核酸的序列同一性和/或相似性百分比。这样的算法整合在Altschul等(1990)的NBLAST和XBLAST程序中。使用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索,评分=100、字宽=12。可以如Altschul等(1997)中所述使用Gapped BLAST。使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用程序(NBLAST和XBLAST)各自的默认参数。参阅NCBI/NIH网址。使用默认参数用Vector NTI Suite 8(InforMax有限公司, North Bethesda, MD, U.S.A)中的AlignX函数得到用于比较目的的空位容许比对。它们是:空位开放罚分15、空位延伸罚分6.66和空位分隔罚分范围8。

[0114] 还可以改变蛋白质的多种特性和三维特征而不对蛋白质的活性/功能性产生不利影响。保守性氨基酸取代是可以接受的/可以进行而不对分子的活性和/或三维构型产生不

利影响。氨基酸可按以下分类：非极性、极性不带电荷、碱性和酸性。只要取代不损害化合物的生物活性，则一类氨基酸被同类其他氨基酸替换的保守取代落在本发明的范围内。表2提供属于每一类的氨基酸实例列表。

[0115]

表 2	
氨基酸类别	氨基酸实例
非极性	丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、 脯氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸
极性不带电荷	甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、 半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺
酸性	天冬氨酸、谷氨酸
碱性	赖氨酸、精氨酸、组氨酸

[0116] 在一些情况下，还可以进行非保守取代。然而，优选的取代不显著降低蛋白质的功能/生物活性。

[0117] 本文提到的“分离的”多核苷酸和/或“纯化的”蛋白质是指这些分子不伴随有与其天然共存的其他分子。因此，提到“分离的”和/或“纯化的”表示与本文所述的“人为”相关。例如，放入植物进行表达的本发明细菌“基因”是“分离的多核苷酸”。同样，植物所产生的来自细菌蛋白质的蛋白质是“分离的蛋白质”。

[0118] 由于遗传密码的简并性/冗余性，多种不同的DNA序列可以编码本文公开的氨基酸序列。产生编码相同或基本相同蛋白质的替代DNA序列在受本领域训练的技术人员的能力范围内。这些变体DNA序列在本发明的范围内。在下文标题为“用于植物表达的序列优化”的章节中对此也有更详细的描述。

[0119] 用于植物表达的序列优化。为了在植物中实现异源基因的高表达，通常优选重新设计所述基因以使其在植物细胞(的胞质)中更有效的表达。玉米就是这样的一种植物，其中在转化前重新设计异源基因以提高其在所述植物中的表达水平可能是优选的。因此，在设计编码细菌蛋白质的基因中额外的步骤是使用与靶植物序列(双子叶或单子叶物种)比对更接近的密码子偏好性重新改造异源基因以得到最优表达。还可以优化序列以在本文别处讨论的更多具体类型植物中的任意一种中进行表达。

[0120] 转基因宿主。可以将本发明的蛋白质编码基因引入多种微生物或植物宿主中。本发明包括转基因植物细胞和转基因植物。优选的植物(和植物细胞)为玉米、拟南芥、烟草、大豆、棉花、芸苔、稻、小麦、草坪草、豆科植物草料(如苜蓿和三叶草)和牧草等等。还可以根据本发明产生其他类型的转基因植物，如水果、蔬菜、观赏植物和树木。更一般的，双子叶植物和/或单子叶植物可用于本发明的多个方面。

[0121] 在优选的实施方案中，基因的表达直接或间接导致目的蛋白质在细胞内的产生(和保持)。植物可以以这种方式得到除草剂抗性。这类宿主可以指转基因、重组、转化和/或转染的宿主和/或细胞。在本发明的一些方面(例如克隆和制备目的基因)，可以受益于本发明的公开内容根据标准技术产生和使用微生物(优选细菌)细胞。

[0122] 转染了本发明多核苷酸的植物细胞可以再生为整个植株。本发明包括细胞培养物,包括组织细胞培养物、液体培养物和固体平板培养物。由本发明植物所产生和/或用于再生本发明植物的种子也包括在本发明范围内。其他植物组织和部分也包括在本发明中。本发明同样包括产生含有本发明多核苷酸的植物或细胞的方法。产生这类植物的一种优选方法为通过种植本发明的种子。

[0123] 尽管可以优选植物,本发明还包括在如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*, Pf) 宿主菌株中产生高活性的重组AAD-13。本发明包括优选的生长温度、配制方法以及冻干方法;其中所述生长温度以在宿主中保持可溶性的活性AAD-13;所述配制方法能在溶液中贮存和复原AAD-13活性;而所述冻干方法能长贮藏期和保质期地保留AAD-13活性。

[0124] 插入基因以形成转基因宿主。本发明的一个方面是用表达本发明蛋白质的本发明多核苷酸转化/转染植物、植物细胞和其他宿主细胞。以这种方式转化的植物可以获得对多种具有不同作用模式的除草剂的抗性。

[0125] 可以使用多种方法在允许稳定保持和表达基因的条件下将编码所需蛋白质的基因引入靶宿主。这些方法为本领域技术人员所熟知,并描述于如美国专利No. 5,135,867。

[0126] 含有AAD-13多核苷酸的载体包括在本发明范围内。例如,大量克隆载体可用于将外来基因插入到高等植物中,所述载体含有大肠杆菌复制系统和允许选择转化的细胞的标记。载体包括如pBR322、pUC系列、M13mp系列、pACYC184等。因此,可以在合适的限制性位点将编码蛋白质的序列插入载体。得到的质粒用于转化进大肠杆菌中。在合适的营养培养基上培养大肠杆菌细胞,然后收获并裂解。通过纯化从基因组DNA中回收质粒。作为分析方法,一般进行序列分析、限制性分析、电泳和其他生物化学-分子生物学方法。每次操作之后,可以限制性消化所使用的DNA序列并与下一个DNA序列连接。每个质粒序列都可以克隆到同一个或其他质粒中。取决于将所需基因插入到植物中的方法,其他DNA序列可能是必要的。例如,如果使用Ti或Ri质粒转化植物细胞,则必须连接Ti或Ri质粒T-DNA序列的至少右边界(但常为右边界和左边界)作为待插入基因的侧翼区域。T-DNA用于转化植物细胞的用途已在EP 120 516、Hoekema (1985)、Fraley等 (1986) 和An等 (1985) 中有深入的研究和描述。

[0127] 大量技术可用于将DNA插入植物宿主细胞。这些技术包括使用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化剂用T-DNA转化、融合、注射、生物射弹(微粒轰击)、碳化硅晶须、气溶胶柱、PEG或电穿孔以及其他可能的方法。如果用农杆菌进行转化,必须将待插入的DNA克隆进特殊的质粒中,即中间载体或二元载体中。由于存在与T-DNA中序列同源的序列,中间载体可以通过同源重组整合进Ti或Ri质粒。Ti或Ri质粒还含有转移T-DNA所必需的vir区。中间载体不能在农杆菌中自我复制。可以通过辅助质粒(接合)将中间载体转移到根癌农杆菌中。二元载体在大肠杆菌和农杆菌中都可以自我复制。它们含有选择标记基因和接头或多聚接头,两侧为右和左T-DNA边界区。它们可以直接转化进农杆菌中(Holsters等,1978)。作为宿主细胞的农杆菌含有携带vir区的质粒。vir区是将T-DNA转移进植物细胞所必需的。还可以含有额外的T-DNA。将这样转化的细菌用于转化植物细胞。可以有利地用根癌农杆菌或发根农杆菌培养植物外植体,以将DNA转移进植物细胞。然后可以在合适的培养基中从感染的植物材料(如叶碎片、茎节段、根以及原生质体或悬浮培养的细胞)再生完整植物,所述培养基可以含有用于选择

的抗生素或杀虫剂。然后可以测试这样得到的植物中插入DNA的存在。在注射和电穿孔的情况下质粒没有特殊的要求。可以使用普通质粒,如pUC衍生物。

[0128] 转化细胞以通常的方式在植物中生长。它们可以形成生殖细胞并将转化的性状传递到子代植物。这样的植物能以正常方式培养并与具有相同转化遗传因子或其他遗传因子的植物杂交。得到的杂合个体具有相应的表型特性。

[0129] 在本发明一些优选的实施方案中,从插入植物基因组的转录单位表达编码细菌蛋白质的基因。优选地,所述转录单位是重组载体,所述重组载体能够稳定整合进植物基因组,并使得可以选择表达编码蛋白质的mRNA的转化植物株系。

[0130] 插入DNA一旦整合进基因组,则相对稳定(并不再释放出来)。它一般包含赋予转化植物细胞对杀虫剂或抗生素(如卡那霉素、G418、博来霉素、潮霉素或氯霉素等)抗性的选择标记。植物选择标记一般还提供对多种除草剂(如草铵膦(如PAT/bar)、草甘膦(EPSPS)、ALS抑制剂(如咪唑啉酮类、磺酰脲类、三唑并嘧啶磺酰胺类等)、溴草腈、HPPD抑制剂抗性、PPO抑制剂、ACC-ase酶抑制剂及许多其他除草剂)的抗性。单独使用的标记应相应允许选择转化细胞而非不含插入DNA的细胞。目的基因在植物细胞中优选由组成型或诱导型启动子表达。mRNA一旦表达之后,就被翻译成蛋白质,从而将目的氨基酸掺入蛋白质中。在植物细胞中表达的编码蛋白质的基因可以在组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子的控制下。

[0131] 存在若干将外来重组载体引入植物细胞以及获得稳定保持和表达引入基因的植物的技术。这类技术包括将包裹在微粒上的遗传物质直接引入细胞(Cornell的美国专利No.4,945,050和DowElanco公司现为陶氏益农公司(Dow AgroSciences,LLC)的US 5,141,131)。此外,可以使用农杆菌技术转化植物,参阅托莱多大学(University of Toledo)的美国专利No.5,177,010;德克萨斯农工大学(Texas A&M)的US 5,104,310;欧洲专利申请0131624B1;Schilperoot的欧洲专利申请120516、159418B1和176112;Schilperoot的美国专利No.5,149,645、5,469,976、5,464,763和4,940,838和4,693,976;Max Planck的欧洲专利申请116718、290799、320500;日本烟草公司(Japan Tobacco)的欧洲专利申请604662和627752和美国专利No.5,591,616;汽巴-嘉基公司(Ciba Geigy)现为先正达公司(Syngenta)的欧洲专利申请0267159和0292435和美国专利No.5,231,019;Calgene公司的美国专利No.5,463,174和4,762,785和艾格瑞斯特公司(Agracetus)的美国专利No.5,004,863和5,159,135。其他转化技术包括晶须技术。参阅捷利康公司(Zeneca)现为先正达公司(Syngenta)的美国专利No.5,302,523和5,464,765。其他直接DNA递送的转化技术包括气溶胶柱技术。参阅美国专利No.6,809,232。还可以使用电穿孔技术转化植物。参阅鲍依斯·汤普森研究所(Boyce Thompson Institute)的W0 87/06614;迪卡布公司(Dekalb)的美国专利No.5,472,869和5,384,253和植物遗传系统公司(Plant Genetic Systems)的W0 92/09696和W0 93/21335。另外,也可以用病毒载体产生表达目的蛋白质的转基因植物。例如,可以用麦克津植物科学有限公司(Mycogen Plant Science)和汽巴-嘉基公司(Ciba-Geigy)(现为先正达公司(Syngenta))的美国专利No.5,569,597以及生物资源公司(Biosource)现为大型生物公司(Large Scale Biology)的美国专利No.5,589,367和5,316,931中所述的方法用病毒载体转化单子叶植物。

[0132] 如前所述,将DNA构建体引入植物宿主的方法对于本发明不是关键的。任何提供有

效转化的方法都可以使用。例如,本文描述了多种植物细胞转化的方法并包括使用Ti或Ri质粒等进行农杆菌介导的转化。在许多情况下,期望用T-DNA边界(更具体地为右边界)与用于转化的构建体的一侧或两侧相连。这在构建体使用根癌农杆菌或发根农杆菌作为转化模式时特别有用,不过T-DNA边界也可在其他转化模式中使用。在将农杆菌用于植物细胞转化时,可以使用能引入宿主以与宿主中存在的T-DNA或Ti或Ri质粒同源重组的载体。可以通过电穿孔、三亲杂交和本领域技术人员已知的用于转化革兰氏阴性菌的其他技术进行载体引入。载体转化进农杆菌宿主的方式对于本发明不是关键的。含有用于重组的T-DNA的Ti或Ri质粒可以能够或不能引起瘤形成,只要所述宿主中存在vir基因,这对本发明就不是关键的。

[0133] 将农杆菌用于转化时,在一些情况下,将T-DNA边界内的表达构建体插入广谱载体如pRK2或其衍生物中,如Ditta等(1980)和EP0 0 120 515中所述。表达构建体和T-DNA内包括一个或多个如本文所述允许选择转化农杆菌和转化植物细胞的标记。使用的具体标记对于本发明并不重要,优选的标记物取决于所使用的宿主和构建体。

[0134] 为了用农杆菌转化植物细胞,可以将外植体与转化的农杆菌混合并孵育足够的时间以允许其转化。转化后,通过用适当抗生素的选择杀死农杆菌,并用适当的选择培养基培养植物细胞。一旦形成愈伤组织,可以根据植物组织培养和植物再生领域熟知的方法通过使用适当的植物激素促进芽形成。然而,愈伤组织中间期并不总是必要的。芽形成以后,可以将所述植物细胞转移到促进根形成的培养基,从而完成植物再生。然后可以培养植物产生种子,所述种子可以用于建立将来的世代。不论转化技术如何,优选将编码细菌蛋白质的基因整合进基因转移载体中,通过在载体中纳入植物启动子调节元件以及3'非翻译转录终止区(如Nos等)使所述转移载体适于在植物细胞中表达该基因。

[0135] 除了用于转化植物的大量技术之外,与外来基因接触的组织类型也可以多样化。这样的组织包括但不仅限于胚胎发生组织、I、II和III型愈伤组织、下胚轴、分生组织、根组织、用于韧皮部表达的组织等。使用本文所述的适当技术可在去分化过程中转化几乎所有的植物组织。

[0136] 如上文所述,需要时可以使用多种选择标记。具体标记的优选由技术人员决定,但是任何以下的选择标记以及本文未列出的能发挥选择标记功能的任意其他基因都可以使用。这些选择标记包括但不仅限于编码对抗生素卡那霉素、新霉素和G41的抗性、潮霉素抗性、甲氨碟呤抗性的转座子Tn5氨基糖苷磷酸转移酶基因(Aph II)以及编码对草甘膦、草丁膦(双丙氨膦或草铵膦)、ALS-抑制除草剂(咪唑啉酮类、磺酰胺类和三唑并嘧啶类除草剂)、ACC-ase酶抑制剂(如芳氧基丙酸酯类或环己烯酮类)和其他如溴草腈和HPPD抑制剂(如硝草酮)等抗性耐性的基因。

[0137] 除了选择标记以外,可能需要使用报道基因。在一些情况下,报道基因可以与或不与选择标记一起使用。报道基因一般是在受体生物或组织中不存在的基因,一般编码引起一些表型变化或酶特性的蛋白质。Weising等1998中提供了这些基因的实例。优选的报道基因包括大肠杆菌uidA基因座的 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶(GUS)、来自大肠杆菌Tn9的氯霉素乙酰转移酶基因、来自生物发光水母维多利亚水母(*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白和来自北美萤火虫(*Photinus pyralis*)的荧光素酶基因。接着可以在所述基因引入受体细胞后的适当时间实施检测报道基因表达的试验。优选的这类试验可使用编码Jefferson等1987所

述的大肠杆菌uidA基因座的β-葡糖醛酸糖苷酶(GUS)的基因鉴定转化细胞。

[0138] 除了植物启动子调节元件以外,可以在植物细胞中有效地使用来自多种来源的启动子调节元件表达外源基因。例如细菌来源的启动子调节元件,如章鱼碱合酶启动子、胭脂碱合酶启动子、甘露碱合酶启动子;病毒来源的启动子,如花椰菜花叶病毒(35S和19S)、35T(再改造的35S启动子,参阅美国专利No.6,166,302,特别是实施例7E)等。植物启动子调节元件包括但不限于核酮糖-1,6-二磷酸(RUBP)羧化酶小亚基(ssu)、β-伴大豆球蛋白(conglycinin)启动子、β-菜豆素启动子、ADH启动子、热休克启动子和组织特异性启动子。还可以存在其他元件,如基质附着区、支架附着区、内含子、增强子、多腺苷酸化序列等,从而提高转录效率或DNA整合。尽管这些元件能通过影响转录、mRNA稳定性等提供较好的DNA表达或功能,但是它们对DNA功能可能是或不是必需的。这些元件可以如所需包含在DNA中,以得到转化DNA在植物中的优化表达。典型元件包括但不限于Adh-内含子1、Adh-内含子6、苜蓿花叶病毒外壳蛋白前导序列、渗透蛋白(osmotin)UTR序列、玉米线条病毒外壳蛋白前导序列以及其他本领域技术人员可用的元件。还可以使用组成型启动子调节元件从而指导在所有细胞类型和所有时间的持续基因表达(如肌动蛋白、泛素、CaMV 35S等)。组织特异性启动子调节元件负责在特定细胞或组织类型(如叶或种子)中的基因表达(如玉米醇溶蛋白、油质蛋白、napin、ACP、球蛋白等),这些也可以使用。

[0139] 启动子调节元件也可以在植物发育的某些阶段有活性(或无活性)以及在植物组织和器官中有活性。这些的实例包括但不限于花粉特异性、胚胎特异性、玉米穗丝特异性、棉花纤维特异性、根特异性、种子胚乳特异性或无性繁殖期特异性启动子调节元件等。在某些情况下可能需要使用诱导型启动子调节元件,其负责应答于特定信号(如物理刺激(热休克基因)、光(RUBP羧化酶)、激素(Em)、代谢物、化学品(四环素应答)和胁迫)的基因表达。可以使用在植物中发挥功能的其他所需的转录和翻译元件。本领域已知大量植物特异性基因转移载体。

[0140] 基于植物RNA病毒的系统也可用于表达细菌蛋白质。为此,可以将编码蛋白质的基因插入感染目的宿主植物的适当植物病毒的外壳启动子区。然后可以表达蛋白质从而为植物提供对除草剂损害的保护。基于植物RNA病毒的系统描述于麦克津植物科学有限公司(Mycogen Plant Sciences, Inc.)的美国专利No.5,500,360和生物资源公司(Biosource)现为大型生物公司(Large Scale Biology)的美国专利No.5,316,931和5,589,367。

[0141] 进一步增加耐性或抗性水平的方法。本文显示可赋予本发明植物新除草剂抗性性状,并且未观察到对表型包括产量的不利影响。这些植物在本发明范围之内。本文示例和提出的植物能耐受住如至少一种受试除草剂2×、3×、4×和5×一般应用水平。这些抗性水平的提高在本发明范围之内。例如可对本领域已知的多种技术进行可预见到的优化和进一步发展,以增加给定基因的表达。

[0142] 这些方法之一包括增加本发明AAD-13基因的拷贝数(在表达盒中等)。也可以选择具有多拷贝基因的转化事件。

[0143] 强启动子和增强子能用于“过度”表达。这类启动子的实例包括使用35S增强子的优选35T启动子。这类使用包括35S、玉米泛素、拟南芥泛素、拟南芥肌动蛋白和CSMV启动子。其他强病毒启动子也是优选的。增强子包括40CS和35S双增强子。基质粘附区(MAR)也能用于如增加转化效率和转基因表达。

[0144] 根据本发明,改组(直接进化)和转录因子也能用于实施方案。

[0145] 还能设计多种蛋白质,所述蛋白质在序列水平变化但是保留相同或相似的全部必需的三维结构、表面电荷分布等等。参阅如美国专利No.7,058,515;Larson等Protein Sci.2002 11:2804-2813,“Thoroughly sampling sequence space:Large-scale protein design of structural ensembles.”;Cramer等Nature Biotechnology 15,436-438 (1997),“Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling.”;Stemmer,W.P.C.1994.DNA shuffling by random fragmentation and reassembly:in vitro recombination for molecular evolution.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751;Stemmer,W.P.C.1994.Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.Nature370:389-391;Stemmer,W.P.C.1995.Searching sequence space.Bio/Technology 13:549-553;Cramer,A.,Cwirla,S.和Stemmer,W.P.C.1996.Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling.Nature Medicine 2:100-103以及Cramer,A.,Whitehorn,E.A.,Tate,E.和Stemmer,W.P.C.1996.Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.Nature Biotechnology 14:315-319。

[0146] 插入植物细胞的重组多核苷酸活性依赖于与插入物相邻的内源植物DNA的影响。因此另一种选择是利用已知的植物基因组中用于插入的绝佳位置。参阅如WO 2005/103266 A1,涉及cry1F和cry1Ac棉花事件;在这些基因座本发明AAD-13基因可以替代cry1F和/或cry1Ac插入。因此,根据本发明可以使用如靶向同源重组。这类技术是例如WO 03/080809 A2和相应的涉及锌指在靶向重组中的用途的已公开美国申请(USPA20030232410)的主题。本领域也已知重组酶的用途(例如cre-lox和flp-frt)。

[0147] 确信AAD-13的解毒在细胞质中发生。因此本发明的方面包括进一步稳定这种蛋白质和mRNA(包括阻断mRNA的降解)的方法,并相应地应用已知的技术。可以设计本发明蛋白质以抵抗蛋白酶的降解等(通过再设计蛋白质的氨基酸序列能有效去除蛋白酶的切割位点)。这些实施方案包括使用来自渗调蛋白的5'和3'茎环结构样UTR及per5(富含AU的5'非翻译序列)。还可以使用类似7-甲基或2'-O-甲基基团的5'帽子,如7-甲基鸟苷酸残基。参阅如Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74卷,7期,2734-2738页(1977年7月)Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis。也可以使用蛋白质复合体或配体封闭基团。

[0148] 还可以在本发明范围内进行对于AAD-13最适的5'或3'UTR的计算机设计(合成的发夹)。一般的计算机建模以及基因改组和直接进化在本文的别处进行讨论。至于更具体的计算机建模和UTR,用于预测/评测本发明5'和3'UTR衍生物的计算机建模技术包括但不限于:从Genetics Corporation Group, Madison, WI获得的Mfold version 3.1(参阅Zucker等Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark 编, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker等Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940 (1999); Zucker等RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid





**Surpass®**、**Keystone®**、Keystone LA、**FulTime®**和**TopNotch®**除草剂)和/或氟乐灵(如**Treflan®**)。某些优选的实施方式包括在大豆和/或玉米中的这种抗性。关于这些实施方式的另外的指导,参阅如Inui等“A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation,”*Plant Biotechnology* 22, 281-286 (2005) (涉及通过使用代谢除草剂的人细胞色素P450单加氧酶的根癌农杆菌转化拟南芥的选择系统;转化除草剂抗性树苗,并用除草剂乙草胺、甲基胺草磷、氯苯胺灵、氯磺隆、氟草敏和二甲戊乐灵选择);Siminszky等“Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides,”*PNAS* 96卷,4期,1750-1755,1999年2月16日;Sheldon等*Weed Science*:48卷,3期,291-295页,“A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*”和“Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19,”*J Agric Food Chem.* 2006年4月19日;54(8):2985-91 (涉及在稻中测试人细胞色素p450单加氧酶,其中稻植物被报道显示对氯乙酰胺类(乙草胺、甲草胺、异丙草胺、丙草胺和噁吩草胺)、氧乙酰胺类(苯噻草胺)、吡嗪酮类(氟草敏)、2,6-二硝基苯胺类(氟乐灵和二甲戊乐灵)、磷酸胺类(甲基胺草磷、硫代氨基甲酸酯类(稗草畏)和尿素类(绿麦隆))高抗性。

[0156] 改变或使用不同的2,4-滴化学反应令本发明AAD-13基因更有效也是可能的。这种可能的改变包括创造更好的底物和更好的离去基团(更高的电负性)。

[0157] 植物生长素运输抑制剂(如氟吡草腓)也能用于增加2,4-滴除草剂活性。

[0158] 除非具体说明或暗示,如本文中所示,术语“一”、“一个/一种”和“所述”表示“至少一个”。

[0159] 本文提到或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物整体引为参考,引用程度不与本说明书的明确教导相冲突。

[0160] 以下为说明本发明操作方法的实施例。这些实施例不应理解为限制性的。除非另有说明,所有的百分比均以重量计并且所有的溶剂混合物比例以体积计。

[0161] 实施例1—鉴定在植物中赋予除草剂抗性的基因的方法

[0162] 作为鉴定在植物中具有除草剂降解活性的基因的方法,可以发掘现有的公共数据库如NCBI(美国国家生物技术信息中心)。为开始此过程,需要有已鉴定为编码具有所需特征(即 $\alpha$ -酮戊二酸双加氧酶活性)的蛋白质的功能基因序列。接着将此蛋白质序列用作BLAST(基本局部比对检索工具)(Altschul等,1997)算法的输入,以与存储的可用NCBI蛋白质序列进行比较。使用默认设置,此检索返回不同水平的100个以上同源蛋白质序列。它们在氨基酸水平的范围从高同一性(85%-98%)到极低同一性(23%-35%)。通常仅高同源性的序列可预期保留与输入序列相似的特性。在这种情况下仅选择具有 $\leq 50\%$ 的同源性的序列。如本文示例,克隆和重组表达低至35%氨基酸保守性的同源物(相对于来自于真养雷氏菌的tfdA)不仅可用于赋予对计划内的除草剂的商品水平的抗性,还可用于对以前从未用这些酶测试过的底物赋予商品水平的抗性。

[0163] 从NCBI数据库鉴定了单个基因(sdpA),其作为与tfdA仅有35%氨基酸同一性的同源物(参阅ncbi.nlm.nih.gov站点,登录号AJ628860)。通过首先将数据库中保存的sdpA和

tfdA DNA序列翻译成蛋白质,然后用VectorNTI软件包中的ClustalW进行多重序列比对来测定同一性百分比。

[0164] 实施例2—在植物和细菌中表达的序列优化

[0165] 2.1—背景

[0166] 为了在植物中得到异源基因的高表达,可以优选重新改造基因的蛋白质编码序列以使其在植物细胞中更有效的表达。玉米就是这样的一种植物,其中在转化前重新设计异源蛋白质编码区域以提高在植物中的基因表达水平和编码蛋白质的水平可能是优选的。因此,在设计编码细菌蛋白质的基因中额外的步骤是重新改造异源基因以得到最优表达。

[0167] 重新改造在玉米中表达的细菌基因的一个原因是由于天然基因的非最优G+C含量。例如,许多天然细菌基因极低的G+C含量(和因此高A+T含量的偏移倾向)引起产生模拟或复制已知为高度富含A+T的植物基因控制序列的序列。在引入植物的基因DNA中存在一些富含A+T的序列(如一般见于基因启动子中的TATA盒区)可能引起基因的异常转录。另一方面,转录的mRNA中其他调节序列(如多腺苷酸化信号序列(如AAUAAA)或与参与前mRNA剪接的小核RNA互补的序列)的存在可能导致RNA的不稳定性。因此,设计用于玉米表达的编码细菌蛋白质的基因(更优选称为植物优化基因)的一个目的是产生具有G+C含量(优选与编码代谢酶的玉米基因具有接近的G+C含量)的DNA序列。设计编码细菌蛋白质的植物优化基因的另一个目的是产生其序列修饰不阻碍翻译的DNA序列。

[0168] 表3展示了玉米基因的G+C含量。对于表Ex2-1中的数据,基因的编码区出自GenBank(第71次发布)条目,并用Mac Vector™程序(Accelrys公司, San Diego, California)计算碱基组成。计算中忽略了内含子序列。

[0169]

**表 Ex2-1: 玉米基因蛋白质编码区 G+C 含量汇编**

蛋白质分类 <sup>a</sup>	G+C 百分比范围	平均 G+C 百分比 <sup>b</sup>
代谢酶(76)	44.4-75.3	59.0 (±8.0)
结构蛋白(18)	48.6-70.5	63.6 (±6.7)
调节蛋白(5)	57.2-68.8	62.0 (±4.9)
未表征蛋白质(9)	41.5-70.3	64.3 (±7.2)
所有蛋白质(108)	44.4-75.3	60.8 (±5.2) <sup>c</sup>

[0170] <sup>a</sup>每一类基因的数目在括号内给出。

[0171] <sup>b</sup>标准差在括号内给出。

[0172] <sup>c</sup>平均值计算中忽略了混合组平均值。

[0173] 存在多个可公开利用的DNA序列数据库,其中可以发现关于植物基因组或多种植物基因的蛋白质编码区的G+C含量的信息。一个此类数据库位于万维网的URL <http://www.kazusa.or.jp/codon/>。在该网站,可以发现例如烟草(Nicotiana tabacum)蛋白质编码序列的平均G+C含量为43.3%(分析了包含453,797个密码子的1268个序列)。还可以发现玉米(Zea mays)蛋白质编码序列的平均G+C含量为54.9%(包含973,578个密码子的2280个序列的分析)。相比,在SEQ ID NO:2中公开的Sphingobium herbicidovorans AAD-13蛋白

质编码序列的G+C含量为67.2%。从而,设计用于在玉米或双子叶植物中表达以将蛋白质编码区的G+C含量降低到40-55%的范围时是有利的。因此,在编码用于植物表达的细菌蛋白质的基因,更优选称作植物优化基因的设计中的一个目的是产生G+C含量优选与编码代谢酶的天然宿主植物基因的G+C含量接近的DNA序列。

[0174] 由于遗传密码的冗余性/简并性(即一些氨基酸由多于一个密码子指定)提供的可塑性,基因组在不同生物或不同纲的生物中的进化引起了对冗余密码子不同的使用。在蛋白质编码区的平均碱基组成中反映了这种“密码子偏好”。例如,具有相对低G+C含量的生物使用冗余密码子的第三个位置上为A或T的密码子,而具有较高G+C含量的使用第三个位置上为G或C的密码子。mRNA中“少见”密码子的存在被认为可降低该mRNA的绝对翻译率,特别是对应于少见密码子的载荷tRNA的相对丰度低时。这一事实可扩展为:对于多个少见密码子,单个少见密码子对翻译率的降低将至少是累加的。因此,具有相对高含量少见密码子的mRNA将相应的具有低翻译率。该翻译率将进而反映为低水平的编码蛋白质。

[0175] 在设计编码用于在玉米(或其他植物,如棉花或大豆)中表达的细菌蛋白质的基因中,有帮助的是确定了预期的宿主植物的密码子偏倚。可以将密码子偏倚计算为单个密码子相对于所有氨基酸的密码子使用的频率。备选地,如表Ex2-2第C,D,I和J列中公开的,可以将密码子偏倚计算为单个密码子用于编码特定氨基酸的频率(相对于该氨基酸的所有其他密码子(同义密码子))。玉米的密码子偏倚是植物用来编码其蛋白质的统计学密码子分布,并且从706种玉米基因计算的密码子选择在表Ex2-2的C和I列中显示。在设计编码用于植物表达的细菌蛋白质的基因的编码区中,应该确定植物优选的主要(“第一选择”)密码子,当存在多个选择时,也应该确定优选密码子的第二个、第三个、第四个选择等。然后设计编码细菌蛋白质的氨基酸序列的新DNA序列,但新DNA序列由于用植物(第一优选,第二优选、第三优选或第四优选等)密码子进行取代以指定蛋白质氨基酸序列内每个位置的氨基酸而区别于(编码蛋白质的)天然细菌DNA序列。然后分析新序列中可能由修饰产生的限制性酶切位点。通过用第一、第二、第三或第四选择的优选密码子替换该密码子来进一步修饰鉴定出的位点。序列中可能影响目的基因转录或翻译的其他位点为外显子-内含子接合处(5'或3')、多腺苷酸添加信号或RNA聚合酶终止信号。进一步分析和修饰序列,以降低TA或CG双联体的频率。除了双联体之外,具有多于约六个相同残基的G或C序列嵌段也能影响序列的转录或翻译。因此,有利地通过用下一优选的密码子选择替换首选或次选等密码子来修饰这些嵌段。

[0176] 因此,为了设计编码细菌蛋白质的植物优化基因,使用建立自密码子偏好表的冗余遗传密码设计编码所述蛋白质的氨基酸序列的DNA序列,所述偏好表整理自特定的一种或多种植物的基因序列。得到的DNA序列具有较高程度的密码子多样性、所需的碱基组成,可含有策略性放置的限制性酶识别位点并缺少可能干扰基因转录或产物mRNA翻译的序列。功能性等同于本发明基因/蛋白质的此类合成基因可用于转化包括植物在内的宿主。关于合成基因产生的其他指导可见于如美国专利No.5,380,831和PCT申请WO 97/13402。

[0177] 为了设计编码AAD-13蛋白质的植物优化的基因中,利用从特定宿主植物(玉米和双子叶植物)的蛋白质编码序列编撰的密码子偏倚表建立的冗余遗传密码,设计编码AAD-13氨基酸序列的DNA序列。在表Ex2-2中,C、D、I和J列给出了每种氨基酸的同义密码子的分布(以该氨基酸的所有密码子的%选择表示),如在706种玉米编码区和154种双子叶植物基

因中发现的[REF:Murray,E.E.,Lotzer,J.,Eberle,M.(1989)Codon usage in plant genes.Nucl.Acids Res.17:477-497]。每种植物类型最优的密码子以粗体表示,当存在多个选择时,可以鉴定密码子的第二个、第三个或第四个选择。显然一些氨基酸的一些同义密码子在植物中仅仅很少见(例如,玉米中的AGT和双子叶植物中的CCG)。而且,玉米和双子叶植物的各自密码子选择不同(例如,丙氨酸密码子GCG在玉米基因中比在双子叶植物基因中更经常地发现,而精氨酸密码子AGA在双子叶植物基因中比玉米基因更经常地使用)。从而,显而易见的是,被设计用来反映一个植物物种的基因的最优密码子组成的蛋白质编码区对于在另一植物物种中的表达可能具有次优的密码子组成。在产生接近玉米和双子叶植物基因两者的平均密码子分布的编码蛋白质的DNA序列的设计方法中,排除这样的密码子,其相对于任一类型植物中的该氨基酸的其他同义密码子而言不经常使用(通过表Ex2-2中的F和L列中的DNU指出)。通常,如果密码子在编码任一植物类型的基因中相关氨基酸的次数为约10%或更少,那么该密码子不常使用(通过表Ex2-2的E和K列中的NA表示)。为了平衡氨基酸的剩余密码子选择的分布,使用下式计算每个密码子的加权平均表示:

[0178]  $C1$ 的加权平均% =  $1 / (\%C1 + \%C2 + \%C3 + \dots) \times \%C1 \times 100$ , 其中 $C1$ 是所讨论的密码子,  $\%C2$ ,  $\%C3$ 等代表对于玉米和双子叶植物而言表Ex2-2的剩余同义密码子的%平均值(相关密码子的%平均值来自E和K列)。

[0179] 每个密码子的加权平均%值在表Ex2-2的F和L列中给出。

[0180] 表Ex2-2.706种玉米基因(C和I列)和154种双子叶植物基因(D和J列)的编码区中的同义密码子表示。在F和L列为对植物优化的合成基因设计设置的平衡偏倚的密码子表示值。

[0181]

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
氨基酸	密码子	玉米 %	双子叶植物 %	玉米-双子叶植物平均值	加权平均值	氨基酸	密码子	玉米 %	双子叶植物 %	玉米-双子叶植物平均值	加权平均值
ALA (A)	GCA	18	25	21.7	25.5	LEU (L)	CTA	8	8	NA	DNU
	GCC	34	27	30.3	35.6		CTC	26	19	22.5	34.3
	GCG	24	6	NA	DNU		CTG	29	9	NA	DNU
	GCT	24	42	33.2	39.0		CTT	17	28	22.5	34.3
ARG (R)	AGA	15	30	22.4	27.4	LYS (K)	TTA	5	10	NA	DNU
	AGG	26	25	25.7	31.5		TTG	15	26	20.6	31.4
	CGA	9	8	NA	DNU	MET (M)	AAA	22	39	30.6	30.6
	CGC	24	11	17.7	21.7		AAG	78	61	69.4	69.4
	CGG	15	4	NA	DNU		ATG	100	100	100	100
ASN (N)	AAC	68	55	61.4	61.4	PHE (F)	TTC	71	55	63.2	63.2
	AAT	32	45	38.6	38.6		TTT	29	45	36.8	36.8
ASP (D)	GAC	63	42	52.6	52.6	PRO (P)	CCA	26	42	33.8	41.4
	GAT	37	58	47.4	47.4		CCC	24	17	20.7	25.3
CYS (C)	TGC	68	56	61.8	61.8		CCG	28	9	NA	DNU
	TGT	32	44	38.2	38.2	CCT	22	32	27.2	33.3	
END	TAA	20	48	33.8		SER (S)	AGC	23	18	20.4	26.0
	TAG	21	19	20.1			AGT	9	14	NA	DNU
	TGA	59	33	46.1			TCA	16	19	17.5	22.4
							TCC	23	18	20.6	26.3
GLN (Q)	CAA	38	59	48.4	48.4	THR (T)	TCG	14	6	NA	DNU
	CAG	62	41	51.6	51.6		TCT	15	25	19.9	25.4
GLU (E)	GAA	29	49	38.8	38.8		ACA	21	27	23.8	28.0
	GAG	71	51	61.2	61.2		ACC	37	30	33.6	39.5
GLY (G)	GGA	19	38	28.5	28.5	ACG	22	8	NA	DNU	
	GGC	42	16	29.1	29.0	ACT	20	35	27.7	32.5	

[0182]

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
氨基酸	密码子	玉米 %	双子叶植物 %	玉米-双子叶植物平均值	加权平均值	氨基酸	密码子	玉米 %	双子叶植物 %	玉米-双子叶植物平均值	加权平均值
HIS (H)	GGG	20	12	16.1	16.0	TRP (W)	TGG	100	100	100	100
	GGT	20	33	26.7	26.6		TYR (Y)	TAC	73	57	65.0
	CAC	62	46	54.1	54.1	TAT		27	43	35.0	35.0
ILE (I)	CAT	38	54	45.9	45.9	VAL (V)	GTA	8	12	NA	DNU
	ATA	14	18	15.9	15.9		GTC	32	20	25.8	28.7
	ATC	58	37	47.6	47.9		GTG	39	29	34.1	38.0
	ATT	28	45	36.4	36.4		GTT	21	39	29.9	33.3

[0183] 为在玉米和双子叶植物细胞中均最优表达,使用在玉米和双子叶植物基因中发现

的经常使用的密码子的平衡密码子分布,设计基本上编码SEQ ID NO:2的Sphingobium herbicidovorans AAD-13蛋白质的氨基酸序列的新的DNA序列。

[0184] 2.2—AAD-13植物重建分析

[0185] 对AAD-13的天然DNA序列编码区 (SEQ ID NO:1) 的861个碱基对 (bp) 的深入分析显示存在若干认为不利于最佳植物表达的序列基序以及非最佳密码子组成。SEQ ID NO:1 (AAD-13) 编码的蛋白质如SEQ ID NO:2所示。为改善重组蛋白在玉米和双子叶植物中的生产,产生了“植物优化”DNA序列 (AAD-13 v1) (SEQ ID NO:3),其编码的蛋白质 (SEQ ID NO:4) 除了在第二个位置 (在SEQ ID NO:4中以下划线标出) 加入丙氨酸残基外,它与SEQ ID NO:2中公开的天然蛋白质相同。额外的丙氨酸密码子 (GCT, 在SEQ ID NO:3中以下划线标出) 编码跨越ATG翻译起始密码子的部分NcoI限制性酶识别位点 (CCATGG)。因此,它服务于双重目的,即在改善ATG起始密码子周围的序列以优化翻译起始的同时,促进其后的克隆操作。天然和植物优化 (v1) 的编码区所编码的蛋白质99.3%相同,仅2号氨基酸不同。相反,天然和植物优化 (v1) 的编码区的DNA序列仅77.3%相同。进行了天然和植物优化的DNA的序列比对,表Ex2-3显示天然 (列A和D) 和植物优化序列 (列B和E) 密码子组成的差异,并允许与理论上植物优化的序列 (列C和F) 比较,所述理论上植物优化的序列将精确地具有表Ex2-2的F和L列指出的密码子组成。

[0186] 表Ex2-3.天然AAD-13、植物优化的形式 (v1) 和理论上植物优化的形式的编码区的密码子组成比较。

[0187]

		A	B	C			D	E	F	
氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #	氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #	
ALA (A)	GCA	1	10	9	LEU (L)	CTA	0	0	0	
	GCC	24	11	13		CTC	11	11	10	
	GCG	10	0	0		CTG	17	0	0	
	GCT	1	16	14		CTT	0	10	10	
ARG (R)	AGA	0	4	4		TTA	0	0	0	
	AGG	0	5	5		TTG	2	9	9	
	CGA	1	0	0		LYS (K)	AAA	0	3	3
	CGC	10	4	3			AAG	10	7	7
	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9	
CGT	1	3	3	PHE (F)	TTC	8	6	6		
ASN (N)	AAC	3	2		2	TTT	1	3	3	
	AAT	1	2	2	PRO (P)	CCA	2	7	7	
ASP	GAC	19	13	13		CCC	5	5	5	



[0188]

		A	B	C			D	E	F
氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #	氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #
(D)	GAT	5	11	11		CCG	10	0	0
	CYS (C)	TGC	2	1		1	CCT	1	6
END		TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4
	TAA	0	0		AGT		1	0	0
	TAG	0	0		TCA		1	3	3
GLN (Q)	TGA	1	1	1		TCC	1	4	4
	CAA	0	7	7		TCG	3	0	0
GLU (E)	CAG	14	7	7	THR (T)	TCT	0	4	4
	GAA	3	5	5		ACA	0	3	3
GLY (G)	GAG	11	9	9		ACC	7	4	4
	GGA	1	6	6		ACG	4	0	0
	GGC	16	6	6	TRP (W)	ACT	0	4	4
	GGG	3	3	3		TGG	7	7	7
HIS (H)	GGT	1	6	6	TYR (Y)	TAC	5	4	5
	CAC	7	7	8		TAT	2	3	2
ILE	CAT	7	7	6	VAL (V)	GTA	0	0	0
	ATA	0	2	2		GTC	6	4	4

[0189]

		A	B	C			D	E	F
氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #	氨基酸	密码子	天然的	植物优化的 v1 #	理论上植物优化的 #
(I)									
	ATC	10	5	5		GTG	7	6	6
	ATT	1	4	4		GTT	2	5	5
	总的	157	158	158		总的	131	131	131

[0190] 表Ex2-3的研究清楚得出天然和植物优化编码区尽管编码几乎相同的蛋白质,但是二者之间有显著的不同。植物优化形式(v1)接近模拟编码AAD-13蛋白的理论植物优化编码区的密码子组成。

### [0191] 2.3大肠杆菌表达的重建

[0192] 特定设计的大肠杆菌菌株和相关的载体系统经常用来产生相对大量的蛋白质,用于生物化学和分析研究。时常发现编码所需蛋白质的天然基因(即使基因的来源生物是另一种细菌生物)不是很适合在大肠杆菌中高水平表达。在这样的情况下,重新改造基因的蛋白质编码区使其更适合在大肠杆菌中表达是可能和需要的。大肠杆菌II类基因定义为在大肠杆菌细胞的指数生长期可高水平和持续表达的基因[REF:Henaut,A.和Danchin,A.(1996) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*,卷2,2047-2066页.Neidhardt,F.,Curtiss III,R.,Ingraham,J.,Lin,E.,Low,B.,Magasanik,B.,Reznikoff,W.,Riley,M.,Schaechter,M.和Umberger,H.(编)American Society for Microbiology,Washington,DC]。通过研究大肠杆菌II类基因编码区的密码子组成,可以对这些大肠杆菌II类基因编码区设计平均密码子组成。认为具有模拟大肠杆菌II类基因密码子组成的平均密码子组成的蛋白质编码区将适宜在大肠杆菌细胞的指数生长期表达。使用这些指导,根据大肠杆菌II类基因编码区的平均密码子组成,设计编码AAD-13蛋白(SEQ ID NO:4)的新DNA序列;包括,如上面所提到的第二个位置上的额外的丙氨酸。将最初仅基于密码子组成设计的序列,进一步改造为包括适合于克隆进大肠杆菌表达载体的一些限制性酶识别序列。避免有害的序列特征如高度稳定的茎环结构、以及与16S核糖体RNA的3'末端同源的基因内序列(如Shine Dalgarno序列)。大肠杆菌优化序列(v2)作为SEQ ID NO:5公开,并且编码SEQ ID NO:4公开的蛋白质。

[0193] 天然和大肠杆菌优化(v2)DNA序列具有80.2%同一性,而植物优化(v1)和大肠杆菌优化(v2)DNA序列具有84.4%同一性。表Ex2-4显示天然AAD-13编码区(列A和D)、在大肠杆菌中表达的优化AAD-13编码区(v2;列B和E)的密码子组成,以及具有大肠杆菌II类基因优化密码子组成的AAD-13蛋白的理论编码区的密码子组成(列C和F)。

[0194] 表Ex2-4.天然AAD-13、大肠杆菌优化的形式(v2)和理论大肠杆菌II类优化的形式的编码区的密码子组成比较。

[0195]

		A	B	C			D	E	F
氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 #	氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 II #
ALA (A)	GCA	1	11	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	0	0		CTC	11	0	0
	GCG	10	14	14		CTG	17	30	30
	GCT	1	12	12		CTT	0	0	0
ARG (R)	AGA	0	0	0		TTA	0	0	0
	AGG	0	0	0		TTG	2	0	0
	CGA	1	0	0		LYS (K)	AAA	0	8

[0196]

		A	B	C			D	E	F
氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 #	氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 II #
	CGC	10	7	5		AAG	10	2	2
	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	9	11	PHE (F)	TTC	8	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4		TTT	1	3	3
	AAT	1	0	0	PRO (P)	CCA	2	3	3
ASP (D)	GAC	19	13	13		CCC	5	0	0
	GAT	5	11	11		CCG	10	15	15
CYS (C)	TGC	2	1	1		CCT	1	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4
END	TAA	0	1	1		AGT	1	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	1	0	0
	TGA	1	0	0		TCC	1	5	5
GLN (Q)	CAA	0	3	3		TCG	3	0	0
	CAG	14	11	11		TCT	0	6	6
GLU (E)	GAA	3	10	11	THR (T)	ACA	0	0	0
	GAG	11	4	3		ACC	7	7	7
GLY (G)	GGA	1	0	0		ACG	4	0	0

[0197]

		A	B	C			D	E	F
氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 #	氨基酸	密码子	天然的	大肠杆菌优化的 v2 #	理论 II 类 II #
	GGC	16	10	10		ACT	0	4	4
	GGG	3	0	0	TRP (W)	TGG	7	7	7
	GGT	1	11	11	TYR (Y)	TAC	5	5	5
HIS (H)	CAC	7	10	10		TAT	2	2	2
	CAT	7	4	4	VAL (V)	GTA	0	3	3
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	7	5	5
	ATT	1	4	4		GTT	2	7	7
	总的	157	158	158		总的	131	131	131

[0198] 表Ex2-4的研究清楚得出天然和大肠杆菌优化编码区尽管编码几乎相同的蛋白质,但是二者之间有显著的不同。大肠杆菌优化形式(v2)接近模拟编码AAD-13蛋白的理论大肠杆菌优化编码区的密码子组成。

[0199] 实施例3-表达和转化载体的克隆

[0200] 3.1大肠杆菌pET表达载体的构建。

[0201] 使用与加入额外克隆接头位点相应的限制性酶(XbaI、XhoI)将AAD-13(v2)从picroscript载体中切出并连接进pET 280链霉素/壮观霉素抗性载体中。然后将连接产物转化进TOP10F' 大肠杆菌,并涂在Luria Broth+50μg/ml链霉素&壮观霉素(LB S/S)琼脂平板上。

[0202] 为区分AAD-13(v2):pET 280和pCR2.1:pET 280连接,挑取约20个分离菌落至6ml LB-S/S中,并在37℃摇动培养4小时。然后将每个培养物点种到LB+50μg/ml卡那霉素平板上,在37℃过夜孵育。假定在LB-K上生长的菌落具有连接进的pCR2.1载体,将其弃去。如前述从剩余的培养物提取质粒,用FspI消化检验正确性。最终表达构建体被命名为pDAB4115。

[0203] 3.3-双元载体的完成

[0204] 植物优化基因AAD-13(v1)从Picroscript获得(完成了基因重建设计(见上文)并外包给Picroscript进行构建)。将AAD-13(v1)基因作为Nco I-Sac I片段克隆到pDAB4055中。将所得的构建体称作pDAB4113,含有:[AtUbi10启动子: AAD-13(v1):AtuORF1 3' UTR](用

Nco I和Sac I限制酶消化验证)。然后将含有所述盒的Not I-Not I片段克隆到双元载体pDAB3038的Not I位点中。对所得的双元载体pDAB4114进行限制性消化(用SacI)以验证正确的方向,所述载体含有下面的盒[AtUbi10启动子:AAD-13(v1):AtuORF1 3' UTR:CsVMV启动子:PAT:ORF25/26 3' UTR]。所验证的完成的构建体(pDAB4114)用于转化到农杆菌中(见实施例6)。

#### [0205] 实施例4-重组AAD-13在荧光假单胞菌中的表达和纯化

##### [0206] 4.1-荧光假单胞菌发酵

[0207] 对于摇瓶实验,将200 $\mu$ l携带AAD-13(v1)构建体(3.2节)的荧光假单胞菌菌株甘油保藏物接种到50ml添加了30 $\mu$ g/ml四环素/HCl的新鲜LB培养基中。将培养物(在250ml挡板锥形瓶中)置于振荡器(New Brunswick Scientific Model Innova 44)上,将在300rpm和30 $^{\circ}$ C培养16小时。20ml种子培养物将被转移进2.8L挡板锥形瓶中1L添加了20 $\mu$ g/ml四环素/HCl和250 $\mu$ l Pluronic L61(抗发泡)的荧光假单胞菌培养基(酵母膏,5g/L;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,5g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,7.5g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O,1g/L;KCl,0.5g/L;CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O,0.5g/L;二水合柠檬酸钠,15g/L;甘油,95g/L;微量元素溶液,10ml/L;微量元素溶液:FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O,5.4g/L;MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O,1g/L;ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O,1.45g/L;CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O,0.25g/L;H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,0.1g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>,0.1g/L;浓盐酸,13ml/L)中。培养物将在30 $^{\circ}$ C和300rpm培养24小时。在培养物中将加入终浓度为1mM的异丙基- $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),在25 $^{\circ}$ C继续培养约48小时。4 $^{\circ}$ C,7krpm离心15分钟收集细胞,细胞糊置于-80 $^{\circ}$ C保存或立即进行纯化。

[0208] 对于发酵罐实验,1ml每种甘油保藏物将接种到含有添加了30 $\mu$ g/ml四环素/HCl的200ml LB培养基的1L挡板烧瓶中,300rpm和32 $^{\circ}$ C培养16-24小时。然后将来自三个烧瓶的混合培养物(600ml)无菌转入含有10L用于支持高细胞密度生长的Dow proprietary已知成分培养基(来自Teknova,Hollister,CA)的20L发酵罐(B.Braun Bioreactor Systems)中。生长温度维持在32 $^{\circ}$ C,并通过加入氨水将pH控制在所需的设定点。通过调节喷射气流和搅拌速率将液体培养物中的溶解氧维持在正水平。分批补料发酵过程进行大约24小时至细胞密度达到170-2000D<sub>575</sub>。加入1mM的IPTG诱导重组蛋白质的表达,使用循环的冷水供给降低温度并维持在25 $^{\circ}$ C。使发酵的诱导期再持续24小时。收集样品(30ml)进行多种分析,以检测在诱导后6、12和18小时时间点的细胞密度和蛋白质表达水平。发酵过程的最后,10krpm离心30分钟收集细胞。细胞沉淀冻存于-80 $^{\circ}$ C用于进一步的处理。

##### [0209] 4.2-纯化AAD-13用于生物化学表征和抗体产生

[0210] 融化大约100-200g冷冻(或新鲜)的假单胞菌细胞并重悬于1-2L含有20mM Tris-HCl,pH 8.5和25ml蛋白酶抑制剂混合物(Sigma cat#P8465)的抽提缓冲液中。在冰上使用微射流仪(型号M110L或110Y)(Microfluidics,Newton,MA)以11,000-12,000psi一次性通过来裂解细胞。将裂解物24,000rpm离心20分钟。将转移上清并在4 $^{\circ}$ C用10倍体积的20mM Tris-HCl,pH8.5过夜透析,或在使用层析柱分离之前用这种缓冲液渗滤并经0.45 $\mu$ m的膜过滤。使用法玛西亚(Pharmacia)AKTA Explorer 100进行随后所有蛋白质的分离且在4 $^{\circ}$ C操作。在上柱之前,用20mM Tris-HCl,pH 8.5的缓冲液平衡Q Sepharose Fast Flow层析柱(Pharmacia XK 50/00,柱床体积500ml)。样品以15ml/min加到层析柱上,然后用这种缓冲液洗涤直到洗脱液的OD<sub>280</sub>回到基线。用2L 0到0.3M的线性梯度NaCl以15ml/min的流速洗脱蛋白质,同时收集45ml级分。合并用比色酶检测法确定为含AAD-13活性的级分,以及和预知

的AAD-13蛋白分子量(在SDS-PAGE上大约32kDa的条带)对应的级分。在样品中加入终浓度为0.5M的固体硫酸铵,然后施加于在0.5M硫酸铵(溶于20mM Tris-HCl, pH 8.0)中平衡的Phenyl HP层析柱(Pharmacia XK 50/20,柱床体积250ml)。该层析柱用10ml/min的结合缓冲液洗涤,直到洗脱液的OD<sub>280</sub>回到基线,蛋白质用2倍柱体积0.5M到0的线性梯度硫酸铵(溶于20mM Tris-HCl, pH 8.0)以10ml/min洗脱,收集12.5ml的级分。将合并含有AAD-13的主峰级分,如果必要的话,使用MWC0 10kDa截留膜离心过滤装置(Millipore)浓缩。在一些情况下,样品还用PBS缓冲液以1ml/min的流速施加于Superdex 75gel filtration层析柱(Pharmacia XK 16/60,柱床体积110ml)。合并含有纯AAD-13的峰级分并储存在-80℃备用。

[0211] 实施例5-体外测定AAD-13活性

[0212] 5.1-通过比色酚检测测定。

[0213] 将通过产物酚的比色检测测量酶活性,其中使用由Fukumori和Hausinger (1993) (J.Biol.Chem.268:24311-24317)的改良方案以允许使用96孔微孔板形式的方案。已有描述将比色测定用于测量双加氧酶的活性,其裂解2,4-滴和2,4-滴丙酸以释放产物2,4-二氯苯酚。使用前述检测方法将来自若干酚的颜色与2,4-二氯苯酚的进行比较,以确定哪种酚产物便于检测。在含有200μM NH<sub>4</sub>(FeSO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、200μM抗坏血酸钠的0.15ml 20mM MOPS pH 6.75中以100μM终浓度检测酚和酚类似物。来自氟草烟和绿草定的吡啶酚未产生明显的颜色。在高至约500μM的测定中,2,4-二氯苯酚的颜色产生是线性的,并与酚浓度成正比。在标准测定条件(160μl终测定体积)下得到的校正曲线表明从17.2μM酚可得到510nm处0.1的吸收。

[0214] 在含有200μM NH<sub>4</sub>FeSO<sub>4</sub>、200μM抗坏血酸钠、1mMα-酮戊二酸、适当底物(以DMSO中制备的100mM原液加入)和酶的总体积0.16ml的20mM MOPS pH 6.75中进行酶测定。在零时间点加入芳氧基链烷酸酯底物、酶或α-酮戊二酸起始反应。在25℃孵育5分钟后,通过加入30μl 1:1:1混合的50mM Na EDTA、pH 10缓冲液(3.09g硼酸+3.73g KCl+44ml 1N KOH)和0.2%4-氨基安替比林终止反应。再加入10μl 0.8%铁氰化钾。5或10分钟之后,在分光光度微孔板读数器中记录510nm处的吸收。空白含有除酶以外的所有试剂,以解释底物被少量酚造成的偶然的轻微污染。

[0215] 5.2-通过氯吡啶酚检测测定

[0216] AAD-13作用于潜在的底物如包含取代吡啶(而非苯环)的除草剂绿草定,在断裂芳氧基链烷酸酯键时,将释放吡啶酚。使用前面章节中所述的氨基安替比林/铁氰化苯酚测定法不能检测吡啶酚。然而,发现产物氯吡啶酚在近UV处有强吸收,其中λ<sub>max</sub>出现在pH7.325nm处(消光系数~8,400M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)。这用于创建连续的基于微孔板的分光光度检测法。在总体积为0.2ml, pH 6.75的20mM MOPS中进行测定,其中含200μM NH<sub>4</sub>FeSO<sub>4</sub>、200μM抗坏血酸钠、1mMα-酮戊二酸、适当的底物(加入配制在DMSO中的100mM的贮液)和酶。在零时间点通过加入芳氧基链烷酸酯底物、酶或α-酮戊二酸起始测定,并在酶标仪中对325nm处吸光度的增加进行10分钟的跟踪检测。反应最初2分钟将用于确定初始速率。

[0217] 5.3-使用2-(2-氯,4-硝基苯氧基)丙酸酯的比色测定法

[0218] 使用2-(2-氯,4-硝基苯氧基)丙酸酯(CNPP)作为底物,发明了方便的AAD-13测定法。AAD-13断裂将CNPP释放2-氯,4-硝基苯酚。苯酚在pH7.410nm处有亮黄吸收,使反应随后能进行连续或终点分析。不需要加入另外的试剂,能可视监测AAD-13活性的存在。在总体积为0.2ml, pH 6.75的20mM MOPS中进行基于微孔板的分光光度测定,其中含200μM NH<sub>4</sub>FeSO<sub>4</sub>、

200 $\mu$ M抗坏血酸钠、1mM $\alpha$ -酮戊二酸、适量的CNPP(加入配制在DMSO中的10mM贮液)和酶。在零时间点通过加入CNPP、酶或 $\alpha$ -酮戊二酸起始测定,并在酶标仪中对410nm处吸光度的增加进行10分钟的跟踪检测。反应最初2分钟将用于确定初始速率。在标准测定条件下(200 $\mu$ l最终测定体积)进行的校正曲线表明从25.1 $\mu$ M 2-氯,4-硝基苯酚获得410nm处的吸光度为0.1。使用这种测定法,确定CNPP作为底物的动力学常数是 $K_m = 31 \pm 5.5 \mu\text{M}$ ,而 $k_{cat} = 16.2 \pm 0.79 \text{min}^{-1}$ 。

#### [0219] 5.4-偶联的测定法

[0220] 为了测试宽范围的底物,使用基于Luo et.al. (2006) (Anal.Biochem.353:69-74)的方法的方案,通过分光光度法检测从 $\alpha$ -酮戊二酸分解产生琥珀酸。如图3中所述,通过AAD-13对 $\alpha$ -酮戊二酸和目的底物的同时分解,导致产生琥珀酸。琥珀酸被琥珀酰辅酶A合成酶进一步修饰成琥珀酰辅酶A,该酶消耗ATP并产生ADP。ATP然后被常用的琥珀酸激酶/乳酸脱氢酶酶促偶联系统(Sigma P0294)消耗。通过分光光度法在340nm处监测所导致的NADH向NAD的转化。

#### [0221] 5.4.1-His-标记的琥珀酰辅酶A合成酶和AAD-13(v2)的克隆和表达

[0222] 从Invitrogen的大肠杆菌的Top10菌株作为单个扩增子扩增出编码合成酶sucC和sucD的两种大肠杆菌基因。通过煮沸细胞的等分试样10分钟,然后离心,并保留含有DNA的上清液,得到基因组DNA。使用以前产生的pET克隆pDAB4115作为AAD-13(v2)的模板。为了扩增sucCD基因,使用下面的引物:suc-Nde (SEQ ID 9) 5' CATATGAACCTTACATGAATATCAGGCAAAAC 3' 和suc-Xho (SEQ ID 10) 5' CTCGAGTTTCAGAACAGTTTTCAGTGCTC 3'。对于AAD-13(v2),使用下面的引物:aad-13F (SEQ ID 11) 5' CATATGGCGAGCCCGGCG 3' 和aad-13R (SEQ ID 12) 5' CTCGAGGTGTGCCAGTGCGGTCTC 3'。这些加入了用于下游克隆的合适的限制酶位点并除去了终止密码子以允许His标记。对于该反应,热循环仪条件为:96 $^{\circ}$ C 2min,然后35个循环的:96 $^{\circ}$ C 30sec,53 $^{\circ}$ C 30sec,72 $^{\circ}$ C 1.5min,接着是最后一个循环72 $^{\circ}$ C 5min。将所得的扩增子亚克隆以验证正确序列。将每个含有正确插入片段的克隆用NdeI/XhoI消化并将插入片段克隆到pET-26b(+)表达载体中。为了表达,将经转化的BL-21大肠杆菌菌苔刮入到50ml LB+Kan(50 $\mu$ g/ml)中并在37 $^{\circ}$ C生长2小时。将2毫升该培养基转移到100ml LB+Kan中。这些培养瓶在37 $^{\circ}$ C培养4小时。细胞用50 $\mu$ M IPTG诱导,在25 $^{\circ}$ C过夜生长。离心培养物,并将细胞沉淀用于蛋白质纯化。

#### [0223] 5.4.2-纯化AAD-13和His标记的琥珀酰辅酶A合成酶用于体外底物鉴定

[0224] 用金属亲和层析方案,基于柱生产商的指导纯化His标记的AAD-13。将从1L培养物收获并在-80 $^{\circ}$ C保存的细胞沉淀解冻并重悬浮在20mL提取缓冲液(100mM Tris-HCl,pH 8; 200-300 $\mu$ L蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849),1mg/mL溶菌酶,和1mM MgCl<sub>2</sub>)中。重悬浮的细胞在室温培养10-15min后用DNA酶处理以降低粘度。在4 $^{\circ}$ C进行所有的随后步骤。将提取物以20,000x g离心20分钟进行澄清。使用1mL/min的流速,将所得的上清液加到事先用缓冲液A(25mM Tris pH 8.0,0.5M NaCl)平衡的2个连续的1mL Co-MAC<sup>TM</sup> Cartridges (EMD/Novagen 71650)中。装载提取物后,用缓冲液A中的5mM咪唑洗涤柱子直到OD<sub>280</sub>返回到基线。用缓冲液A中的50mM咪唑洗脱蛋白质。使用BG-10脱盐柱(Bio-Rad),将如通过在SDS-PAGE上约30kDa带指示的主要含有AAD-13的级分交换到缓冲液C(20mM Tris pH 8.0,100mM NaCl,2mM DTT)中。然后根据体外偶联测定法通过分光光度法测定缓冲液C中的AAD-13。



[0225] 利用连续1mL Co-MAC™ Cartridges (EMD/Novagen 71650) 和基于生产商的指导的方案纯化His标记的琥珀酰辅酶A合成酶。将在-80℃保存的细胞沉淀解冻并重悬浮在50mL提取缓冲液(100mM Tris pH 7.2, 200-300μL蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849), 1mg/mL溶菌酶, 和1mM MgCl<sub>2</sub>)/L细胞培养物。重悬浮的细胞在室温培育10-15分钟后用DNA酶处理以降低粘度。除非另外指出, 所有的随后步骤都在4℃进行。将提取物以20,000x g离心20分钟进行澄清。在此时, 可以将上清液直接加到用结合缓冲液(0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.9和5mM咪唑)预先平衡的Co-MAC™ Cartridges或者置于80%硫酸铵中。然后将硫酸铵处理的样品在20,000x g下离心20分钟以沉淀蛋白质。将沉淀物重悬浮在缓冲液A(20mM Tris-HCl pH 8.0和0.5M NaCl)中并使用以缓冲液A预平衡的BG-10脱盐柱(Bio-Rad)除去残留的硫酸铵。所得的样品加到用结合缓冲液预平衡的Co-MAC™ Cartridges, 流速为1mL/min。加入提取的蛋白质后, 用10个柱体积的0.5%缓冲液B(20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 和1M咪唑)冲洗柱子。接着是5个柱体积的6%缓冲液B的不连续梯度和额外10个柱体积的50%缓冲液B的不连续梯度。用6%缓冲液B梯度洗脱多数希望的蛋白质。通过SDS PAGE检测到对应于琥珀酰辅酶A合成酶亚基(~40&33kDa)的两条带来鉴定含有琥珀酰辅酶A合酶的级分, 并检测对应的体外活性。使用下面的体外偶联测定法的修改版本证实琥珀酰辅酶A合成酶活性。简言之, 在100mM tris pH 8.0, 1mM PEP 0.4mM NADH 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM CoA, 0.2mM ATP, 3.5U/mL PK, 5U/mL LDH, 和SCS存在下, 通过分光光度法在340nm处监测反应进展。通过加入1mM琥珀酸启动反应。

#### [0226] 5.4.3-体外偶联测定法

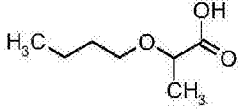
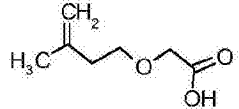
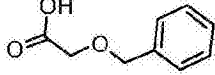
[0227] 在体外AAD-13(v2)底物的鉴定是基于在96孔微量滴定板中0.2mL反应体积的连续分光光度监测期间检测到的酶促活性。反应条件如下: 100mM MOPS pH 7.0, 0.4mM NADH, 0.4mM ATP, 0.4mM CoA, 1mM PEP, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM FeSO<sub>4</sub>(HCl中溶解), 和0.1mM抗坏血酸盐, 1mMα-酮戊二酸和足够的AAD-13(v2)以在2,4-滴存在下产生可观察到的速率。分批调节偶联酶(SCS/PK/LDH)以确保足够偶联, 一般在1mM下测定潜在底物。如需要进行底物浓度的改变以进行溶解度调节。通过加入AAD-13(v2)或潜在的底物启动反应。在上面的测定条件下监测AAD将α-酮戊二酸向琥珀酸转化的底物独立转化速率并从所观察到的反应速率扣除。将用丙酸底物观察到的反应速率除以2以对通过AAD对这些化合物的切割得到的丙酮酸的产生进行调节。此外, 通过分光光度法监测在化合物和PK/LDH存在下NADH的消耗来检查丙酮酸化合物的丙酮酸污染。

#### [0228] 5.4.4体外筛选结果

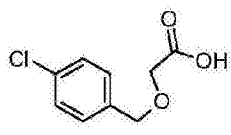
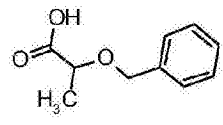
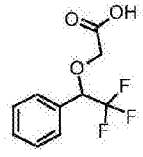
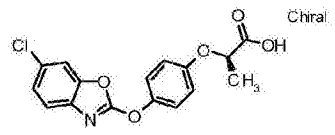
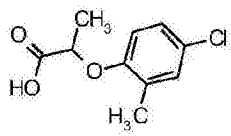
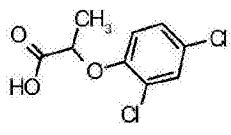
[0229] 表Ex5显示了通过体外偶联测定法用多种化学方法观察到的AAD-13(v2)反应速率。反应速率以相同的样品组中得到的2,4-滴反应速率的百分比报告。该数据用于从非底物定性分离底物, 以及鉴定底物效率趋势。应注意到取决于消耗的可用底物的百分比, 较快的速率更难以准确比较。对于丙酸盐化合物尤其是这样, 对于相等数目的酶转化, 丙酸盐化合物显示出非丙酸盐化合物速率的两倍。结果, 当与低效率底物比较时, 高效的底物将被正确分组。然而, 在高效底物分组内, 通过使用底物和AAD的单一速率筛选, 不能定性分离化合物。由于较高浓度下的吸光度干扰, 在0.5mM而不是1mM下测试以星号表示的化合物。

#### [0230] 表Ex5

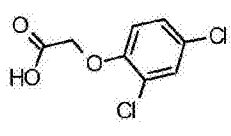
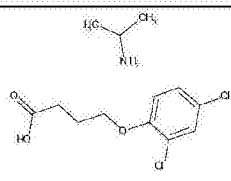
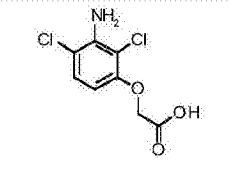
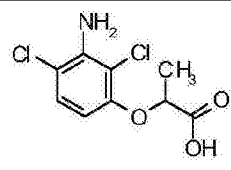
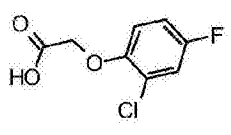
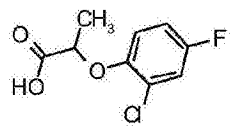
[0231]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
	191716	y	66	 <chem>CC(C)C(O)OCCCCO</chem>
	571320	y	39	 <chem>CC(C)C=COCOC(=O)O</chem>
	93116	y	128	 <chem>CC(O)COCc1ccccc1</chem>

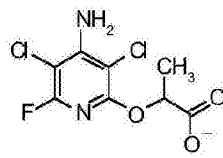
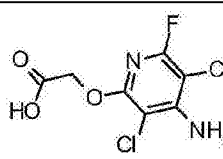
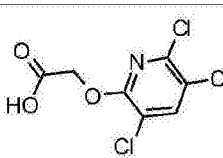
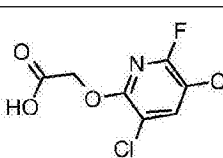
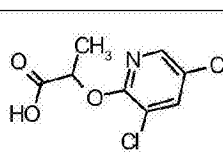
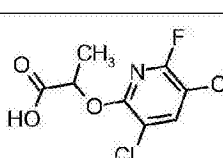
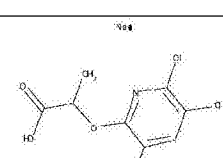
[0232]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
	475726	y	112	
	118942	y	46	
	470901	y	30	
R-噁唑禾草灵	11044492	N	2	
2 甲 4 氯丙酸	188874	y	169	
r 2,4-滴丙酸			19	
r,s 2,4-滴丙酸	117613	Y	195	

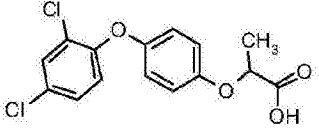
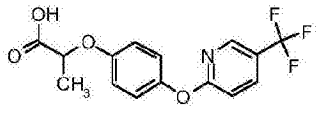
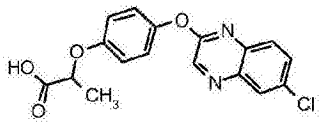
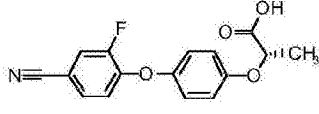
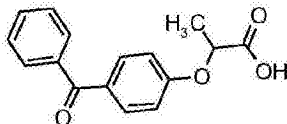
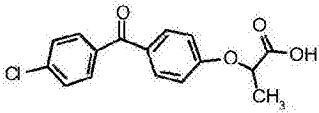
[0233]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
S-2,4-滴丙酸		y	233	
2,4-滴	195517	y	100	
24DB	178577	N	2	
3-氨基 24D	11263526	y	151	
	11113675	y	113	
	124988	y	44	
	83293	y	106	

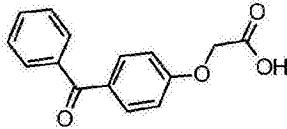
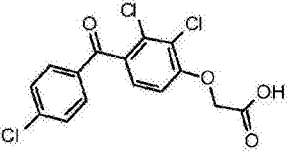
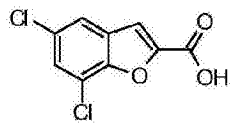
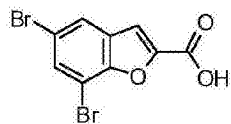
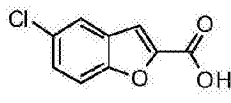
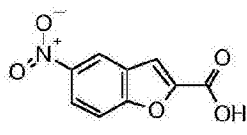
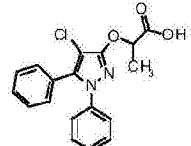
[0234]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
$\alpha$ 甲基氟草烟	11182286	y	43	
氟草烟	68316	y	67	
定草酯	156136	N	6	
	93833	y	33	
	66357	y	24	
	91767	y	88	
	116844	y	25	

[0235]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
氯草甲	460511	y	>100	
fluazifop	67131	y	~50	
喹禾灵	44936*	Y		
cyhalofop	7466	y		
	66732	y	>100	
	8563	y	64	

[0236]

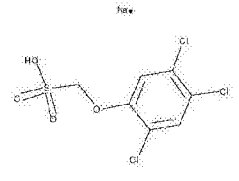
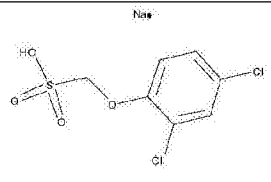
名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
	193908	y	56	
	761310*		未检测	
	11077344*		未检测	
	198167		未检测	
	11077347*		未检测	
	238166*		未检测	
	657338	N	5	

[0237]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
	657339	N	5	
	11213586	N	2	
	11453845	N	13	
	187507	N	10	
	204558*		未检测	
	188495	M	19	



[0238]

名称	X#	底物 Y/N	24D 活性 %	分子结构
	187439		未检测	
	1190305		未检测	

[0239] AAD-13不像其他报导的具有2,4-滴降解活性的依赖 $\alpha$ -酮戊二酸的加双氧酶。关键的不同是多种芳氧基和烷氧基-链烷酸底物,许多吡啶氧基取代基是有效的除草剂和底物(例如,氟草烟),但是其他除草剂像定草酯是差得多的底物。这产生了使用备选除草剂控制使用AAD-13底物的转基因植物的新的机会。还提供了在植物中互补相似的基因以扩宽耐受性或者增加植物耐受的底物的宽度。

[0240] 实施例6—转化进拟南芥并选择

[0241] 6.1-拟南芥培养条件

[0242] 将野生型拟南芥种子悬于0.1%琼脂糖(希格玛化学公司,Sigma Chemical Co., St.Louis,MO)溶液中。将悬浮的种子在4℃保存2天以完成对休眠的需要并保证种子同步萌发(层积)。

[0243] 用细蛭石覆盖Sunshine Mix LP5(Sun Gro Horticulture公司,Bellevue,WA)并用Hoagland溶液地下灌溉至湿润。使土壤混合物排水24小时。将层积的种子种在蛭石上并用保湿罩(KORD Products公司,Bramalea,Ontario,Canada)覆盖7天。

[0244] 使种子萌发并在恒温(22℃)恒湿(40-50%)光强度为120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 秒的长日照条件(16小时光照/8小时黑暗)下在Conviroon(型号CMP4030和CMP3244,Controlled Environments Limited公司,Winnipeg,Manitoba,Canada)中培养植物。开始用Hoagland溶液灌溉植物,接着用去离子水灌溉,保持土壤潮湿但不湿透。

[0245] 6.2-农杆菌转化

[0246] 带有划线接种的DH5 $\alpha$ 菌落的含红霉素(希格玛化学公司,Sigma Chemical Co., St.Louis,MO)(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)的LB+琼脂平板用于提供菌落,接种到4ml小量制备培养物(液体LB+红霉素)中。将培养物在37℃持续摇动孵育过夜。按照生产商的说明使用Qiagen(Valencia,CA)旋转小量制备试剂盒(Spin Mini Preps)纯化质粒DNA。

[0247] 使用来自Weigel和Glazebrook(2002)的方案制备电感受态的根癌农杆菌(菌株Z707、EHA101和LBA4404)细胞。使用修改自Weigel和Glazebrook(2002)的电穿孔方法转化感受态农杆菌细胞。在冰上融化50 $\mu\text{l}$ 感受态农杆菌细胞并在细胞中加入10-25ng所需的质

粒。将DNA和细胞混合物加入预冷的电穿孔杯(2mm)中。用以下条件使用Eppendorf电穿孔仪2510进行转化:电压:2.4kV,脉冲长度:5毫秒。

[0248] 电穿孔后,向杯中加入1ml YEP培养液(每升:10g酵母膏、10gBacto蛋白胨、5g NaCl)并将细胞-YEP悬液转移到15ml培养管中。将细胞在水浴中持续摇动以28℃孵育4小时。孵育后,将培养物涂到含红霉素(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)和链霉素(希格玛化学公司,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO)(250mg/L)的YEP+琼脂板上。28℃孵育平板2-4天。

[0249] 选取菌落并划线接种到含红霉素(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)和链霉素(250mg/L)的新鲜YEP+琼脂平板上,在28℃孵育1-3天。选取菌落使用载体特异性引物进行PCR分析,以确认基因插入片段的的存在。按照生产商的说明使用Qiagen Spin Mini Prep从选取的农杆菌菌落纯化质粒DNA,例外是另将15ml过夜小量制备培养物(液体YEP+红霉素(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)和链霉素(250mg/L))的4ml等分式样用于DNA纯化。使用Qiagen Spin Mini Prep DNA的替代是裂解转化的农杆菌细胞,在100℃于10 $\mu$ l水中悬浮5分钟。来自农杆菌转化中使用的二元载体的质粒DNA纳入作为对照。以0.5 $\times$ 的浓度按照生产商的说明使用Takara Mirus Bio Inc.(Madison,Wisconsin)的Taq DNA聚合酶完成PCR反应。按以下条件设置程序在MJ Research Peltier热循环仪中进行PCR反应:1)94℃3分钟,2)94℃45秒,3)55℃30秒,4)72℃1分钟,共29个循环,其后是72℃10分钟的一个循环。循环后将反应物保持在4℃。通过1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,并通过溴化乙锭染色显像。选择了其PCR产物与质粒对照相同的菌落。

[0250] 6.3-拟南芥转化。

[0251] 使用花浸泡法转化拟南芥。用选取的菌落接种一份或多份15-30ml含红霉素(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)和链霉素(250mg/L)的YEP培养液的预培养物。以220rpm将培养物在28℃恒速摇动孵育过夜。每个预培养物用于接种两份500ml含红霉素(200mg/L)或壮观霉素(100mg/L)和链霉素(250mg/L)的YEP培养液的培养物并将培养物在28℃持续摇动孵育过夜。室温以约8700 $\times$ g离心10分钟沉淀细胞,弃去得到的上清液。将细胞沉淀轻柔重悬于500ml渗透培养基中,所述渗透培养基含有1/2 $\times$ Murashige和Skoog盐/Gamborg B5维生素、10%(重量/体积)蔗糖、0.044 $\mu$ M苄氨基嘌呤(10 $\mu$ l/升(1mg/ml DMSO中的原液)和300 $\mu$ l/升Silwet L-77。将约1月龄的植物在培养基中浸泡15秒,确保浸没最新的花序。接着将植物侧面放倒并覆盖(透明或不透明)24小时,接着用水洗涤并竖直放置。在22℃以16小时光照/8小时黑暗的光周期培养植物。浸泡约4周后收获种子。

[0252] 6.4-转化植物的选择

[0253] 将新收获的[(AAD-13(v1)基因)]T<sub>1</sub>种子在室温干燥7天。将种子种在26.5 $\times$ 51cm萌发盘(T.O.Plastics Inc.有限公司,Clearwater,MN)中,每盘接受200mg等分式样的层积T<sub>1</sub>种子(~10,000个种子),所述种子事先已悬于40ml 0.1%琼脂糖溶液并在4℃保存2天以完成休眠需要并保证同步的种子萌发。

[0254] 用蛭石覆盖Sunshine Mix LP5(Sun Gro Horticulture Inc.有限公司,Bellevue,WA)并用Hagland溶液地下灌溉至湿透,利用重力排水。用移液管将层积种子的每个40ml等分式样均匀地种到蛭石上,并用保湿罩(KORD Products,Bramalea,Ontario,Canada)覆盖4-5天。在使用出苗后喷洒草铵膦(选择共转化的PAT基因)进行最初转化体选

择前1天移去罩。

[0255] 在7个种植后天数(DAP)并于11DAP再次使用DeVilbiss压缩空气喷嘴以10ml/盘(703L/ha)的喷洒体积用Liberty除草剂(200g ai/L的草铵膦,拜耳作物科学集团(Bayer Crop Sciences),Kansas City,MO)的0.2%溶液喷洒T<sub>1</sub>植物(分别为子叶期和2-4叶期),以提供每次应用280g ai/ha有效量的草铵膦。在最后喷洒后4-7天鉴定存活株(活跃生长的植物),并分别移植到用盆栽基质(Metro Mix 360)制备的3英寸盆中。用保湿罩覆盖移植的植物3-4天,并如前置于22℃培养室中或直接移入温室。接着移去罩并在测试AAD-13(v1)提供苯氧基生长素除草剂抗性的能力之前至少1天将植物栽种到温室(22±5℃,50±30%RH,14小时光照:10小时黑暗,最小500μE/m<sup>2</sup>s<sup>1</sup>天然+补充光)。

[0256] 然后将T<sub>1</sub>植物随机分配到多个用量的2,4-滴。对于拟南芥,50g ae/ha 2,4-滴是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开的有效剂量。还使用提高的用量(280、560、1120或2240g ae/ha)确定抗性的相对水平。表11和12显示与先前在PCT/US2006/042133中描述的芳氧基链烷酸酯除草剂抗性基因(AAD-12(v1))的比较。

[0257] 如上述使用DeVilbiss喷雾器实现所有的生长素除草剂应用,以应用703L/ha的喷洒体积(0.4ml溶液/3英寸盆),或者通过履带式喷雾机以187L/ha的喷洒体积应用。使用的2,4-滴为溶于DMSO并稀释于水中(<1%DMSO终浓度)的工业级(希格玛Sigma,St.Louis,MO)或为商用二甲胺盐制剂(456g ae/L,NuFarm,St Joseph,MO)。使用的2,4-滴丙酸是商业级制备成R-2,4-滴丙酸钾盐(600g ai/L,AH Marks)。随着除草剂的量提高到超过800g ae/ha,喷洒溶液的pH变的极度酸性,烧伤拟南芥植物的幼小嫩叶,并使评估除草剂的首效变得复杂。

[0258] 使一些T<sub>1</sub>个体接受代替苯氧基生长素的备选商品除草剂。一个兴趣点是测定吡啶氧乙酸生长素除草剂、绿草定和氟草烟在植物中是否可被有效降解。使用履带式喷雾机以187L/ha的喷洒体积对T<sub>1</sub>植物应用除草剂。对2,4-滴二甲胺盐表现出耐性的T<sub>1</sub>植物可进一步在T<sub>2</sub>代使用。

#### [0259] 6.5-转化植物的选择结果

[0260] 用AAD-13(v1)(植物优化基因)进行首次拟南芥转化。首先使用草铵膦选择方案从未转化种子背景中选择T<sub>1</sub>转化体。筛选了超过160,000个T<sub>1</sub>种子并鉴定了238个草铵膦抗性植物(PAT基因),等于0.15%的转化/选择频率,该转化频率处于构建体选择频率的正常范围内,其中PAT+Liberty用于选择。其后将上述选择的T<sub>1</sub>植物移植到单个盆中并用多个用量的商品芳氧基链烷酸酯除草剂喷洒。表11比较了AAD-13(v1)和对照基因赋予拟南芥T<sub>1</sub>转化体2,4-滴抗性的应答。以目测损伤百分比2WAT显示应答。以表现小或无损伤(<20%)、中度损伤(20-40%)或严重损伤(>40%)的个体的直方图显示数据。显示了每种处理的算术平均值和标准差。还在最后一列标出了每一用量和转化的个体应答的范围。转化PAT/Cry1F的拟南芥用作为生长素敏感型转化对照。AAD-13(v1)基因赋予个体拟南芥植物除草剂抗性。在给定的处理内,植物应答的水平变化显著,这可能是由于每个植物代表独立的转化事件的事实。特别需要注意在测试的每个2,4-滴用量中都存在未受影响的个体,而另一些则受到严重的影响。总体种群平均损伤率示于表11,仅证明转化AAD-13(v1)与AAD-12(v1)或转化PAT/Cry1F的对照之间的显著差异。高用量下,如果不进行缓冲则喷洒溶液变成高酸性,因此,一些损伤可以归因于喷雾溶液的酸性。主要在生长室中培养的拟南芥角质层很薄,严重

的烧伤效应会使这些提高剂量下的测试复杂化。尽管如此,仍有一些个体在2,240g ae/ha 2,4-滴的情况下小损伤或无损伤的存活下来。

[0261]

表 11. 与 AAD-12 v1(T4) 同源抗性群体或者 Pat Cry1F 转化的生长素敏感型对照相比, AAD-13(v1) 转化的 T1 拟南芥对种子发芽后施用的一系列 2,4-D 用量的反应 (14 DAT).						
AAD-13 (v1) 基因 T <sub>1</sub> 植物 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	12	4	4	21	31	0-90
560 g ae/ha 2,4-D DMA	17	2	0	2	6	0-20
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-10
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	14	3	3	15	23	0-70
PAT / Cry1F (转化的对照)						
平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
560 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
同源 AAD-12 (v1) 基因 T <sub>4</sub> 植物						
平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	1	3	0-10
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-15
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	16	3	1	13	13	0-50

[0262] 表12显示T<sub>1</sub>拟南芥对苯氧丙酸、2,4-滴丙酸类似的剂量应答。数据显示除草剂活性的2,4-滴丙酸(R-)同分异构体不能作为AAD-13(v1)或AAD-12(v1)的合适的底物。事实上AAD-1(v3)将代谢R-2,4-滴丙酸足以赋予商业上可接受的耐性,这是区分三种基因一个显著特征(表12和PCT/US2006/042133(Wright et al., 2006年10月27日申请)的实施例7)。认为AAD-1和AAD-13分别是R-和S-特异性的 $\alpha$ -酮戊二酸双加氧酶。

[0263]

表 12. T1 拟南芥对种子发芽后施用的一系列 R-2,4-滴丙酸用量的反应 (14 DAT)						
AAD-13 (v1) 基因 T <sub>1</sub> 植物 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-2,4-滴丙酸	0	0	20	100	0	100
野生型 (未转化的对照) 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-2,4-滴丙酸	0	0	20	100	0	100
同源 AAD-12 (v1) 基因 T <sub>4</sub> 植物 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-2,4-滴丙酸	0	0	20	100	0	100

[0264] 6.6-AAD-13 (v1) 作为选择标记

[0265] 将用如上述转化的拟南芥分析使用 AAD-13 (v1) 作为选择标记的能力, 其中使用 2, 4-滴作为选择剂。将大约 50 颗 T<sub>4</sub> 代拟南芥种子 (AAD-13 (v1) 纯合) 掺入大约 5000 颗野生型 (敏感) 种子。将比较一些处理, 每盘植物将按以下处理方案中的一种接受一次或两次应用 2, 4-滴的时间: 7DAP、11DAP 或 7DAP 之后 11DAP 再次应用。由于所有个体在同一转化载体中也含有 PAT 基因, 用 2, 4-滴选择的 AAD-13 能直接与用草铵膦选择的 PAT 进行比较。

[0266] 将如前面所述用 DeVilbiss 喷嘴实施处理。在 17DAP 鉴定植物为抗性或敏感。最佳处理是在种植后 7 和 11 天 (DAP) 运用 2, 4-滴 (75g ae/ha), 在选择频率上同等有效, 并导致对转化个体的除草剂损伤比 Liberty 选择方案小。这些结果将表明对于转化的拟南芥群, AAD-13 (v1) 能有效作为替代的选择标记使用。

[0267] 6.7-遗传力。

[0268] 使多个 T<sub>1</sub> 事件自花授粉产生 T<sub>2</sub> 种子。通过对 100 株随机 T<sub>2</sub> 同胞应用 Liberty (280g ae/ha) 对这些种子进行子代测试。在喷洒应用 (187L/ha 的应用量的履带式喷雾机) 之前, 先将每个 T<sub>2</sub> 个体植物移植到 7.5cm 见方的盆中。卡方分析 (P>0.05) 确定 50% 的 T<sub>1</sub> 家系 (T<sub>2</sub> 植物) 以预期的孟德尔遗传单基因座显性遗传的 3 抗性: 1 敏感模式分离。

[0269] 收集 12 到 20 个 T<sub>2</sub> 个体的种子 (T<sub>3</sub> 种子)。如前述对 8 个随机选择 T<sub>2</sub> 家系按每个家系 25 个 T<sub>3</sub> 同胞进行子代测试。在每个株系中约半数的测试为纯合的 T<sub>2</sub> 家系 (未分离种群)。这些数据将显示 AAD-13 (v1) 稳定整合, 且以孟德尔方式遗传至少 3 代。

[0270] 6.8-AAD-13 拟南芥中其它除草剂抗性的叶敷应用。

[0271] 通过叶敷应用多种底物测定 AAD-13 (v1) 在转基因拟南芥中提供对其他芳氧基链烷酸酯生长素除草剂的抗性的能力。使 T<sub>2</sub> 代拟南芥种子层积并种到与拟南芥相似的选择盘 (实施例 6.4) 中。以类似的方式种植含有 PAT 和昆虫抗性基因 Cry1F 的转化对照株系。将苗转移到温室中单独的 3 英寸盆中。以 187L/ha 用履带式喷雾机对所有植物喷洒。对植物喷洒一系列吡啶氧乙酸类除草剂: 200-800g ae/ha 绿草定 (Garlon 3A, 陶氏益农, Dow AgroSciences) 和 200-800g ae/ha 氟草烟 (Starane, 陶氏益农, Dow AgroSciences); 以及由

AAD-13活性引起的2,4-滴代谢物2,4-二氯苯酚(DCP,希格玛,Sigma)(摩尔数等于280-2240g ae/ha 2,4-滴,将也测试工业级)。所有的应用配制到水中。每个处理重复3-4次。在处理第3和第14天评估植物。

[0272] AAD-13-转化的植物也清楚地受到保护而免于在转化的对照株系Pat/Cry1F中看到的氟草烟除草剂损伤(见表13);然而,AAD-13-转化的植物受到定草酯的严重损伤。这些结果证实拟南芥中的AAD-13(v1)提供了对测试的吡啶氧基乙酸生长素的耐受性。AAD-13(v1)基因提供了高达400g ae/ha氟草烟的强烈耐受性,而AAD-12(v1)基因仅仅提供了低至200g/ha的中等水平耐受性。AAD-13(v1)基因比AAD-12(v1)基因提供了对定草酯显著更低的耐受性。对氟草烟的显著更高的耐受性是出乎意料的并且允许区分AAD-13(v1)-型活性与AAD-12(v1)并且得到实施例5的酶数据的支持。

[0273]

除草剂处理	吡啶氧基乙酸生长素		
	平均值% 损伤14DAT		
	分离 T2 AAD-13 (v1) 植物(pDAB4114.01.094)	同源 T4 AAD-12 (v1) 植物	Pat/Cry1f- 对照
200 g ae/ha 定草酯	75	25	100
400 g ae/ha 定草酯	90	33	100
800 g ae/ha 定草酯	100	79	100
200 g ae/ha 氟草烟	10	48	100
400 g ae/ha 氟草烟	16	55	100
800 g ae/ha 氟草烟	55	60	100

[0274] 实施例7-额外作物种类的转化

[0275] 通过利用以前在W0 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)) 的实施例#8中描述的技术,可以转化玉米以提供对2,4-滴和氟草烟的高水平抗性。

[0276] 通过利用以前在W0 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)) 的实施例#11或实施例#13中描述的技术,可以转化大豆以提供对2,4-滴和氟草烟的高水平抗性。

[0277] 通过利用以前在专利申请PCT/US2005/014737 (Wright et al., 2005年5月2日申请) 的实施例#14或W0 2007/053482 (Wright et al.) 的实施例#12中描述的技术,可以转化棉花以提供对2,4-滴和氟草烟的高水平抗性。

[0278] 通过利用以前在专利申请PCT/US2005/014737 (Wright et al., 2005年5月2日申请) 的实施例#26或W0 2007/053482 (Wright et al.) 的实施例#22中描述的技术,可以转化芸苔以提供对2,4-滴和氟草烟的高水平抗性。

[0279] 实施例8-通过抗体对来自转化植物的蛋白质检测

[0280] 可以如W0 2007/053482 (Wright et al.) 的实施例9所述的开发和实现抗体和随后的ELISA测定法。

[0281] 实施例9-烟草转化

[0282] 通过与已发表的方法 (Horsch等, 1988) 类似但不完全相同的方法用根癌农杆菌转化烟草。为提供用于转化的来源组织,将烟草种子 (Nicotiana tabacum栽培种KY160) 表面灭菌并种到TOB培养基的表面上,TOB培养基是用琼脂固化的无激素Murashige和Skoog培养

基 (Murashige和Skoog,1962)。在有光照的培养室中在28-30℃培养植物6-8周,无菌收集叶用于转化方案。从这些叶上无菌切下约1平方厘米不含中脉的块。将在设置为250rpm振荡器上,28℃瓶中培养过夜的农杆菌菌株(含有pDAB3278, aka pDAS1580, AAD-13 (v1) +PAT的EHA101S)培养物离心沉淀并重悬于无菌Murashige&Skoog盐中,调整至600nm处的终光密度为0.5。将叶块在此细菌悬液中浸泡约30秒,接着在无菌纸巾上蘸干,右侧朝上放在TOB+培养基(含有1mg/L吲哚乙酸和2.5mg/L苄基腺嘌呤的Murashige和Skoog培养基)上并在28℃在黑暗中孵育。两天后将叶块移至含有250mg/L头孢噻肟 (Agri-Bio, North Miami, Florida) 和5mg/L草铵膦 (Basta的活性成分,拜耳作物科学集团 (Bayer Crop Sciences)) 的TOB+培养基并在28-30℃光照条件下孵育。前两周每周两次将叶块转移到含有头孢噻肟和Basta的新鲜TOB+培养基,其后每周一次。用农杆菌处理叶块四到六周后,从此组织制备物中取出从转化灶发出的小植物并种到Phytatray™II管 (Sigma) 中含有250mg/L头孢噻肟和10mg/L Basta的培养基TOB中。在光照孵育室中培养这些小植株。3周后,进行枝插并在相同的培养基中重新生根。再过2-3周后,植物即可移出至温室。

[0283] 通过以下步骤将植物移至温室中:从根上洗掉琼脂,移植到13.75cm见方盆的土壤中,将盆放在Ziploc®袋子 (SC Johnson&Son, Inc.) 中,在袋子的底部放入自来水并在30℃温室中间接光照下放置一周。3-7天后,打开袋子,给植物施肥并使其在打开的袋子中生长直至植物适应温室,此时去掉袋子。在普通温暖温室条件(30℃,16小时白天、8小时黑夜、最小自然光+补充光=500μE/m<sup>2</sup>s<sup>1</sup>)下培养植物。

[0284] 繁殖前,对T<sub>0</sub>植物取样用于DNA分析以测定其插入物拷贝数。为方便起见,测定与AAD-13 (v1) 分子连接的PAT基因。将新鲜组织置于管中并在4℃冻干两天。组织完全干燥后,将钨珠 (Valenite) 放入管中并使用Kelco玻璃珠研磨机干磨样品1分钟。然后遵循标准DNeasy DNA分离方法 (Qiagen, DNeasy 69109)。接着用Pico Green (Molecular Probes P7589) 对提取的DNA的等分试样进行染色,并与已知标准品一起在荧光计 (BioTek) 中读数,以得到以ng/μl计的浓度。

[0285] 将DNA样品稀释到约9ng/μl,接着通过在热循环仪中以95℃孵育10分钟变性。然后使用提供的寡核苷酸混合物和MgCl<sub>2</sub> (Third Wave Technologies) 制备信号探针混合物。在侵入物测定板的每个孔中加入7.5μl的等分试样,接着加入7.5μl对照、标准品和20ng/μl稀释的未知样品的等分试样。用15μl矿物油 (希格玛, Sigma) 覆盖每个孔。然后将平板在63℃孵育1.5小时并在荧光计 (Biotek) 上读数。计算的靶探针信号占背景的百分比除以内参探针信号占背景的百分比得出比率。使用Southern印迹分析获得和确认的已知拷贝数标准品的比率来鉴定未知事件的估计拷贝数。

[0286] 还使用相同的提取的DNA样品通过PCR测定所有事件中AAD-13 (v1) 基因的存在。使用总计100ng总DNA作为模板。使用20mM的每种引物和Takara Ex Taq PCR聚合酶试剂盒。用于植物转录单位 (PTU) PCR AAD-13的引物为 (SdpacodF: ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:6) 和 (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:7)。在9700Geneamp热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行PCR反应,将样品置于94℃3分钟,接着是94℃30秒、64℃30秒和72℃1分45秒的35个循环,接着是72℃10分钟。在溴化乙锭染色的1%琼脂糖凝胶上通过电泳分析PCR产物。

[0287] 9.1-转化植物的选择

[0288] 在温室中适应后,将T<sub>0</sub>植物以4倍增量随机分配2,4-滴DMA的从140到2240g ae/ha的不同施用率。对于烟草,140g ae/ha 2,4-滴是区分敏感植物与具有有意义水平抗性的植物的有效剂量。表14显示了用草铵膦除草剂抗性基因转化的T<sub>0</sub>植物(PAT/Cry1F-转化的烟草)的比较。数据表明AAD-13(v1)当在烟草植物中转化时提供了对至少2240g ae/ha的2,4-滴DMA的强烈耐受性。

[0289]

PAT/Cry1F (转化的对照)	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
平均值						
0 g ae/ha 2,4-D DMA	3	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	0	1	2	47.0	6.0	40-50
560 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	75.0	0.0	75
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	97.0	8.0	90-100

AAD-13 (v1) 基因 T <sub>0</sub> 植物	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
平均值						
0 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	8.0	11.0	0-15
560 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	3.0	4.0	0-5
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	5.0	0.0	5

[0290] 保存了来自各T<sub>0</sub>转化体的T<sub>1</sub>种子并将种子分层并像实施例5中一样播种在温室中的选择盘中。在测试2,4-滴DMA的升高比率之前,通过将2,4-滴DMA(560g ae/ha)应用到100个随机T<sub>1</sub>同胞,测试每个T<sub>1</sub>株系的后代。用校准到187L/ha的应用率的轨道喷雾器如以前所述的进行喷雾应用。如通过卡方分析,43%的T<sub>0</sub>家族(T<sub>1</sub>植物)以预期的3抗性:1敏感模型分离,所述模型用于具有孟德尔遗传的显性遗传的单基因座(P>0.05)。

[0291] 从12到20个T<sub>2</sub>个体收集种子(T<sub>2</sub>种子)。将如前述测试来自8个随机选择的T<sub>2</sub>家族每一个的25个T<sub>3</sub>同胞的后代。预期T<sub>2</sub>家族的约1/3在每个株系中是纯合的(非分离的群体)。这些数据将表明AAD-13(v1)稳定整合并以孟德尔方式遗传至少三代。

[0292] 然后将存活的T<sub>1</sub>植物随机分配不同的2,4-滴施用率。对于烟草,140g ae/ha 2,4-滴是区分敏感植物与具有有意义水平抗性的植物的有效剂量。也应用升高的比率以确定相对抗性水平(140,560,或2240g ae/ha)。表15显示了与烟草的未转化对照(KY160)品种的比较。

[0293] 通过轨道喷雾器以187L/ha喷雾体积应用所有生长素除草剂施用。使用的2,4-滴是商业上的二甲胺盐制剂(456g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO)。一些个体施用备选的商业除草剂代替苯氧基生长素。一个兴趣点是确定吡啶基氧基乙酸生长素除草剂定草酯和氟草烟是否可以在植物中被有效降解。使用轨道喷雾器以187L/ha喷雾体积对T<sub>1</sub>植物应用除草剂。在T<sub>2</sub>代中进一步评估显示出耐受2,4-滴DMA的T<sub>1</sub>植物。

[0294] 9.2-转化植物的选择结果

[0295] 首先使用2,4-滴选择方案从未转化植物背景选择T<sub>1</sub>转化体。表15比较了AAD-13(v1)和对照基因的应答以赋予烟草T<sub>1</sub>转化体的2,4-滴抗性。应答以%视觉损伤2WAT给出。数据作为显示出很少损伤或无损伤(<20%)、中度损伤(20-40%)或严重损伤(>40%)的个体的直方图给出。对于每次处理给出了算术平均值和标准差。对于每个比率和转化也在最



后一列指出个体应答范围。KY160未转化的烟草作为生长素敏感对照。AAD-13 (v1) 基因赋予个体T<sub>1</sub>烟草植物的除草剂耐受性。

[0296]

**表 15. 与未转化的生长素敏感性对照相比, AAD-13(v1) 转化的 T<sub>1</sub> 烟草对种子发芽后应用的一系列 2,4-D 用量的反应**

野生型 (未转化的对照) 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
未处理的对照	3	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	80.0	0.0	80
560 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	88.0	1.0	88-89
2240 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	92.0	3.0	90-95

AAD-13 (v1) 基因 T <sub>1</sub> 植物 平均值	% 损伤			% 损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围 (%)
未处理的对照	3	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	2.0	3.0	0-5

[0297] 9.3-AAD-13烟草中额外的叶施用除草剂抗性

[0298] 通过对叶子施用多种底物来确定AAD-13 (v1) 在转基因烟草中提供对其他芳氧基链烷酸生长素除草剂抗性的能力。T<sub>1</sub>后代测试后额外的T<sub>1</sub>代植物用轨道喷雾器以187L/ha进行喷雾。植物用不同的吡啶氧基乙酸除草剂喷雾:140-1120g ae/ha定草酯 (Garlon 3A, Dow AgroSciences) 和280-1120g ae/ha氟草烟 (Starane, Dow AgroSciences)。所有的应用都以水配制。每个处理重复三次。处理后3和14天评估植物。

[0299] AAD-13-转化的植物受到保护免于定草酯的损伤程度很弱但是受到良好保护而免于氟草烟损伤,该损伤可在未转化的对照株系中看到(见表16)。这些结果证实烟草中的AAD-13 (v1) 提供了对某些所选的测试吡啶氧基乙酸生长素的抗性。AAD-13 (v1) 基因提供了高达1120g ae/ha氟草烟的显著耐受性,而该基因仅仅提供了对定草酯的中等水平的耐受性,其低至280g/ha。这些数据证实AAD-13 (v1) 在多个物种中提供了相对于吡啶氧基生长素类的定草酯对氟草烟的选择性偏倚。该出人意料的观察结果进一步将AAD-13 (v1) 基因从相似机理的其他除草剂耐受性酶区分出来并且在多个植物物种中观察到。

[0300]

**表 16. 应用后 14 天, T<sub>1</sub> AAD-13(v1) 和未转化的对照烟草植物对多种叶应用的生长素除草剂的反应的比较**

除草剂处理	吡啶氧基乙酸生长素	
	分离 T <sub>1</sub> AAD-13 (v1) 植物 (pDAB4114 1 003.006)	KY160 (未转化的对照)
280 g ae/ha 定草酯	53.0	82.0
560 g ae/ha 定草酯	65.0	88.0
1120 g ae/ha 定草酯	75.0	92.0
280 g ae/ha 氟草烟	7.0	100.0
560 g ae/ha 氟草烟	25.0	100.0
1120 g ae/ha 氟草烟	37.0	100.0

[0301] 实施例10-芸苔中的AAD-13 (v1) 和其他作物的转化

[0302] 10.1-芸苔转化

[0303] 使用农杆菌介导的转化,用PAT作为选择标记,赋予2,4-滴抗性的AAD-13(v1)基因可以用于转化欧洲油菜(*Brassica napus*)。

[0304] 用10%商品漂白剂可以对种子进行10分钟表面灭菌并用无菌蒸馏水洗涤3次。然后种子将被置于半浓度MS基础培养基(Murashige和Skoog,1962)上并在设置为25℃和16小时光照/8小时黑暗的光周期的生长方案下维持。

[0305] 将从5—7天龄的幼苗上切下下胚轴段(3—5mm)并置于愈伤组织诱导培养基K1D1(含1mg/L激动素和1mg/L 2,4-滴的MS培养基)上3天作为预处理。接着将下胚轴段转移进皮氏平板,用含有pDAB3759的农杆菌Z707S或LBA4404菌株处理。农杆菌在28℃黑暗中150rpm的振荡器上过夜培养,并接着重悬于培养基中。

[0306] 用农杆菌处理下胚轴段30分钟后,其将被放回愈伤组织诱导培养基3天。共培养之后片段将被置于K1D1TC(含有250mg/L羧苄青霉素和300mg/L特美汀的愈伤组织诱导培养基)恢复1周或2周。或者,直接将下胚轴段置于选择培养基K1D1H1(带有1mg/L好必思(Herbiace)的上文培养基)。羧苄青霉素和特美汀抗生素将被用于杀死农杆菌。选择剂好必思允许转化细胞生长。

[0307] 接着将形成愈伤组织的下胚轴段置于B3Z1H1(MS培养基、3mg/L苄氨基嘌呤、1mg/L玉米醇溶蛋白、0.5mg/L MES[2-(N-吗啉代)乙磺酸],5mg/L硝酸银、1mg/L好必思、羧苄青霉素和特美汀)芽再生培养基。2-3周后芽再生并将下胚轴片段与芽一起转移到B3Z1H3培养基(MS培养基、3mg/L苄氨基嘌呤、1mg/L玉米醇溶蛋白、0.5mg/L MES[2-(N-吗啉代)乙磺酸]、5mg/L硝酸银、3mg/L好必思、羧苄青霉素和特美汀)再过三周。

[0308] 将从下胚轴片段上剪下芽并转移到芽伸长培养基MESH5或MESH10(MS、0.5mg/L MES、5或10mg/L好必思、羧苄青霉素、特美汀)上2-4周。将伸长的芽在MS1.1(含0.1mg/L吲哚丁酸的MS)上进行根诱导培养。待植物具有良好建立的根系时其将被移植到土壤中。转移到温室之前,植物在Convicon中受控环境条件下适应1-2周。

#### [0309] 10.2-其他作物的农杆菌转化

[0310] 按照本文公开的内容,可以根据本发明使用本领域已知的技术转化其他作物。对于农杆菌介导的黑麦转化,参阅如Popelka和Altpeter(2003)。参阅如Hinchee等,1988。对于农杆菌介导的高粱转化,参阅如Zhao等,2000。对于农杆菌介导的大麦转化,参阅如Tingay等,1997。对于农杆菌介导的小麦转化,参阅如Cheng等,1997。对于农杆菌介导的稻转化,参阅如Hiei等,1997。

[0311] 下文给出了这些和其他植物的拉丁名。应该明确,这些和其他(非农杆菌)转化技术可用于将例如AAD-13(v1)转化进这些植物和其他植物,包括但不限于玉蜀黍(*Zea mays*)、小麦(小麦属物种(*Triticum spp.*))、稻(稻属物种(*Oryza spp.*)和菰属物种(*Zizania spp.*))、大麦(大麦属物种(*Hordeum spp.*))、棉花(水麻(*Abroma augusta*)和棉花属物种(*Gossypium spp.*))、大豆(*Glycine max*)、甜菜以及食用甜菜(甜菜属物种(*Beta spp.*))、甘蔗(桄榔(*Arenga pinnata*))、番茄(番茄(*Lycopersicon esculentum*)和番茄属其他物种)、浆果酸浆(*Physalis ixocarpa*)、*Solanum incanum*和茄属其他物种,以及树番茄(*Cyphomandra betacea*))、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、甘薯(*Ipomoea batatas*)、黑麦(黑麦属物种(*Secale spp.*))、胡椒(辣椒(*Capsicum annum*)、*C. sinense*和鸟辣椒(*C. frutescens*))、莴苣(生菜(*Lactuca sativa*))、山莴苣(*L. perennis*)和野莴苣

(*L. pulchella*))、卷心菜(芸苔属物种(*Brassica* spp.))、芹菜(旱芹(*Apium graveolens*))、茄子(*Solanum melongena*)、花生(*Arachis hypogea*)、高粱(所有高粱属(*Sorghum*)物种)、苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago sativum*))、胡萝卜(*Daucus carota*)、豆类(菜豆属物种(*Phaseolus* spp.)和其他属)、燕麦(燕麦(*Avena Sativa*)和粗燕麦(*A. Strigosa*))、豌豆(豌豆属(*Pisum*))、豇豆属(*Vigna*)和四棱豆属物种(*Tetragonolobus* spp.))、向日葵(*Helianthus annuus*)、南瓜(南瓜属物种(*Cucurbita* spp.))、黄瓜(*Cucumis sativa*)、烟草(烟草属物种(*Nicotiana* spp.))、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、草坪草(黑麦草属(*Lolium*))、剪股颖属(*Agrostis*)、早熟禾属(*Poa*)、狗牙根属(*Cynodon*)和其他属)、三叶草(三叶草属(*Tifolium*))、野豌豆(野豌豆属(*Vicia*))。带有如AAD-13(v1)基因的这些植物包括于本发明中。

[0312] 在许多落叶和常绿木材的耕作制度中,AAD-13(v1)具有增加主要生长素除草剂应季使用的实用性的潜能。绿草定、2,4-滴和/或氟草烟抗性木材物种增加了过分使用这些除草剂而不担心损伤的灵活性。这些物种包括但不局限于:桤木(桤木属物种(*Alnus* spp.))、椴(椴属物种(*Fraxinus* spp.))、白杨和杨木物种(杨属物种(*Populus* spp.))、山毛榉(水青冈属物种(*Fagus* spp.))、桦(桦木属物种(*Betula* spp.))、樱桃(李属物种(*Prunus* spp.))、桉树(桉属物种(*Eucalyptus* spp.))、山核桃树(山核桃属物种(*Carya* spp.))、枫树(枫属物种(*Acer* spp.))、橡树(栎属物种(*Quercus* spp.))和松树(松属物种(*Pinus* spp.))。在观赏性和结果物种中利用生长素抗性进行选择性的杂草控制也在本发明范围内。实例包括但不局限于:玫瑰(蔷薇属物种(*Rosa* spp.))、地肤(burning bush)(卫矛属物种(*Euonymus* spp.))、矮牵牛(矮牵牛属物种(*Petunia* spp.))、秋海棠(秋海棠属物种(*Begonia* spp.))、杜鹃(杜鹃属物种(*Rhododendron* spp.))、山楂或苹果(苹果属物种(*Malus* spp.))、梨(梨属物种(*Pyrus* spp.))、桃(李属物种)和万寿菊(万寿菊属物种(*Tagetes* spp.))。

[0313] 实施例11-令人惊奇的结果的进一步证据:AAD-13对AAD-2

[0314] 种植新鲜收集的用植物优化的AAD-13(v1)或天然AAD-2(v1)基因(见PCT/US2005/014737)转化的T<sub>1</sub>拟南芥种子,然后将选择的如前述草铵膦抗性植物随机分配多种剂量的2,4-滴(50-3200g ae/ha)。通过喷雾体积为187L/ha的履带式喷雾机应用除草剂。使用的2,4-滴是商业二甲胺盐制剂(456g ae/L,NuFarm,St Joseph,MO)混合到200mM Tris缓冲液(pH 9.0)或200mM HEPES缓冲液(pH7.5)中。

[0315] 相对于转化和未转化对照株系,AAD-13(v1)和AAD-2(v1)确实提供了可检测到的2,4-滴抗性,然而,个体在其向个体T<sub>1</sub>拟南芥植物赋予2,4-滴抗性的能力上存在可变性。令人惊奇地,从高抗性植物的频率和整体平均损伤来看,AAD-2(v1)和AAD-2(v2)转化体对2,4-滴的抗性都比AAD-13(v1)基因差很多。AAD-2(v1)转化的植物不能在200g ae/ha 2,4-滴下相对无损伤(<20%的目测损伤)地存活,且总体种群损伤约为83%(参阅PCT/US2005/014737)。相反,用2,240g ae/ha 2,4-滴处理AAD-13(v1)时,其种群平均损伤约为15%(表11)。AAD-13和AAD-2植物优化基因的比较表明AAD-13(v1)在植物中具有显著的优势。

[0316] 考虑到AAD-2(v1)(参阅PCT/US2005/014737)和AAD-13(v1)的体外比较表明二者都高效降解2,4-滴,并且均享有对手性芳氧基链烷酸酯底物的S型特异性,这些结果是未曾预料到的。在个体T<sub>1</sub>植物中AAD-2(v1)以变化的水平表达,然而,这种表达的蛋白质几乎不

提供对2,4-滴损伤的保护。天然和植物优化的AAD-2基因(参阅PCT/US2005/014737)的蛋白质表达水平(在植物中)没有明显的实质性差异。这些数据证实了早前的发现,即在植物中产生AAD-13(v1)的功能性表达并得到对2,4-滴和所选的吡啶氧乙酸类除草剂的除草剂抗性是未预料的。

#### [0317] 实施例12-种植前灭生性应用

[0318] 此实施例和其后的实施例是本发明AAD-13可能带来的新除草剂用途的具体实例。

[0319] 种植前灭生性除草剂应用旨在在种植给定作物前杀死在冬天或早春出现的杂草。一般在种植前未完成物理除草的非耕地或减少的耕地管理系统中应用。因此除草剂程序必须控制种植时存在的非常广谱的阔叶和禾本科杂草。草甘膦、克无踪和草铵膦是种植前灭生性除草剂应用中广泛使用的非选择性无残留除草剂的实例。然而,由于以下一种或多种原因使这个季节的一些杂草很难控制:杂草物种或生物型对除草剂的内在不敏感性、冬季一年生杂草的相对较大的尺寸和限制除草剂摄取和活性的凉爽的天气条件。一些除草剂选择可以与这些除草剂罐混以提高对杂草的谱系和活性,而非选择性除草剂对杂草不太有效。实例为2,4-滴与草甘膦罐混应用以辅助控制小飞蓬(*Conyza canadensis*) (加拿大飞蓬)。用于出现的多数杂草的种植前灭生控制的草甘膦用量可从420到1680g ae/ha,更一般的从560到840g ae/ha;然而,可以应用280-1120g ae/ha的2,4-滴以辅助控制许多阔叶杂草物种(如加拿大飞蓬)。2,4-滴是精选的除草剂,因为它对范围非常广泛的阔叶杂草有效、甚至在低温下也有效并且非常廉价。然而,如果其后的作物为敏感性双子叶作物,则土壤中的2,4-滴残留(尽管残留很短)可能对作物产生负影响。大豆是敏感性作物,需要在灭生应用和种植之间存在7天(对于280g ae/ha的2,4-滴用量)到至少30天(对于1120g ae/ha的2,4-滴应用)的最小时间周期。在棉花种植前禁止用2,4-滴进行灭生性处理(参阅联邦说明(federal labels),多数通过CPR,2005提供或在cdms.net/manuf/manuf.asp在线提供)。使用AAD-13(v1)转化的棉花或大豆,这些作物在土壤中来自之前甚至在种植后作物出苗前的灭生性应用的2,4-滴残留下存活。罐混(或商品预混)伴侣提高的灵活性和降低的费用可改善杂草控制的选择并提高在重要的非耕地和减少耕地的地点灭生性应用的强度。此实例是可利用的多种选择之一。通过使用联邦除草剂说明(CPR,2005)中所述产品和例如Agrilience Crop Protection Guide(2003)所描述的用途,杂草控制领域的技术人员会注意到多种其他应用,包括但不仅限于克无踪+2,4-滴或草铵膦+2,4-滴。本领域技术人员还会认识到,以上实例可应用于任何由AAD-13(v1)基因(如果稳定转化)保护的2,4-滴敏感性(或其他苯氧基生长素除草剂)作物。同样,AAD-13降解氟草烟的独特性质增强其效用,分别通过取代或罐混35-560g ae/ha的氟草烟来增加谱系和/或提高控制多年生或藤本杂草物种的能力。

#### [0320] 实施例13-生长素除草剂在仅转化AAD-13(v1)的大豆、棉花和其他双子叶作物中的作物内应用

[0321] AAD-13(v1)使得可以在通常对2,4-滴敏感的作物中使用苯氧基生长素除草剂(如2,4-滴和MCPA)和吡啶氧基生长素(氟草烟)直接控制广谱阔叶杂草。280到2240g ae/ha的2,4-滴应用可控制农业环境中存在的多数阔叶杂草物种。更一般地使用560-1120g ae/ha。对于氟草烟,应用剂量范围一般为35-560g ae/ha,更一般70-280g ae/ha。

[0322] 这种额外的工具的优势是阔叶除草剂成分极低的费用和以较高用量使用时较高

用量的2,4-滴、和氟草烟提供的可能的短期残留杂草控制,而非残留除草剂如草甘膦不提供对后来萌发的杂草的控制。这种工具还提供了除草剂作用模式联合HTC便利性的机制,作为将除草剂抗性与杂草演替有机整合在一起的管理策略。

[0323] 该工具提供的另一个优点是将广谱阔叶杂草控制除草剂(如,2,4-滴和氟草烟)和通常使用的残留杂草控制除草剂罐混的能力。这些除草剂一般在种植前或种植期应用,但是通常对种植前在大田中存在的已出现和确定的杂草低效。通过扩展这些芳氧基生长素除草剂的效用(包括种植期、出苗前或种植前应用),增加了残留杂草控制程序的灵活性。本领域技术人员认识到残留除草剂程序将因目的作物而异,但是一般的程序包括氯乙酰胺(chloracetamide)除草剂和二硝基苯胺除草剂家系,还包括诸如异噁草松和甲磺草胺的除草剂以及多种ALS-抑制、PPO-抑制和HPPD-抑制除草剂。

[0324] 其他益处包括(提供)在芳氧基乙酸生长素除草剂应用之后,种植前所必须的对2,4-滴或氟草烟的耐受性(参阅前述实施例);且由未完全清洁的含有2,4-滴或氟草烟的大罐引起的对双子叶作物的污染损伤问题较小。麦草畏、R-2,4-滴丙酸,和一些其他除草剂仍可用于继续控制转化了AAD-13(v1)的双子叶作物自生作物。

[0325] 本领域技术人员还会认识到,以上实例可用于被AAD-13(v1)基因(如果稳定转化)保护的任意2,4-滴(或其他芳氧基生长素除草剂)敏感性作物。杂草控制领域的技术人员会认识到,AAD-13(v1)转化使得可以使用单独或与除草剂联合的多种商品苯氧基或吡啶氧基生长素除草剂。可以通过《作物保护参考》(Crop Protection Reference,CPR)书籍中汇编的除草剂说明或类似的汇编或任何商品或学术作物保护参考文献(如来自Agrilience(2005)的《作物保护指南》(Crop Protection Guide))确定这些化学中其他代表性除草剂的具体用量。每种由于AAD-13(v1)可在HTC中使用(无论单独、罐混或相继使用)的可选除草剂都在本发明范围内。

[0326] 实施例14—苯氧基生长素和吡啶氧基生长素除草剂在仅转化AAD-12(v1)的玉米、稻和其他单子叶物种中的作物内用途

[0327] 以类似的方式用AAD-13(v1)转化禾本科物种(例如但不限于玉米、稻、小麦、大麦或草坪草和牧草)将使得在通常选择性不确定的作物中使用高效的苯氧基和吡啶氧基生长素。多数禾本科物种对生长素除草剂如苯氧基生长素(即2,4-滴)具有天然耐受性。然而,由于应用时间窗口变短或无法接受的损伤风险,相对低水平的作物选择性导致了在这些植物中应用的减少。因此转化了AAD-13(v1)的单子叶作物能使用已述用于双子叶作物的相似处理组合,如应用280到2240g ae/ha的2,4-滴控制多数阔叶杂草物种。更一般地使用560-1120g ae/ha。对于氟草烟,一般应用剂量范围是35-560g ae/ha,更一般是70-280ae/ha。

[0328] 这种额外的工具的优势是阔叶除草剂成分极低的费用和较高用量的2,4-滴或氟草烟提供的可能的短期残留杂草控制。相比之下,非残留除草剂(如草甘膦)不提供对后来萌发的杂草的控制。这种工具还提供了将除草剂作用模式与HTC的便利性进行轮换的机制,在草甘膦耐受性作物/AAD-13(v1)HTC联合策略中作为将除草剂抗性与杂草演替有机整合在一起的管理策略(无论是否轮作作物物种)。

[0329] 该工具提供的另一个优点是将广谱阔叶杂草控制除草剂(如,2,4-滴和氟草烟)和通常使用的残留杂草控制除草剂罐混的能力。这些除草剂一般在种植前或种植期应用,但是通常对种植前在大田中存在的已出现和确定的杂草低效。通过扩展这些芳氧基生长素除

草剂的效用(包括种植期、出苗前或种植前应用),增加了残留杂草控制程序的灵活性。本领域技术人员认识到残留除草剂程序将因目的作物而异,但是一般的程序包括氯乙酰胺除草剂和二硝基苯胺除草剂家系,还包括诸如异噁草松和甲磺草胺的除草剂以及多种ALS-抑制、PPO-抑制和HPPD-抑制除草剂。

[0330] 玉米、稻和其它单子叶植物对苯氧基或吡啶氧基生长素的增加的耐性使得能作物内使用这些除草剂,没有生长阶段的限制或作物倒伏的可能性,展开的现象如鼠尾(“rat-tailing”)、玉米中生长调控因子诱导的茎脆性或变形的支柱根。通过AAD-13(v1)能用于HTC的每种可选的除草剂,不论是单独、罐混或相继使用,认为在本发明范围之内。

[0331] 实施例15—在任意作物中与草甘膦耐性性状叠加的AAD-13(v1)

[0332] 北美大田种植的绝大多数棉花、芸苔、玉米和大豆含有草甘膦耐性(GT)性状,并且对GT玉米的采用正在增加。其他GT作物(如小麦、稻、甜菜和草坪草)已在开发中,但目前尚未上市。许多其他草甘膦抗性物种正处在实验至开发阶段(如苜蓿、甘蔗、向日葵、甜菜、豌豆、胡萝卜、黄瓜、莴苣、洋葱、草莓、番茄和烟草;林业物种如白杨和香枫以及园艺物种如万寿菊、牵牛花和秋海棠,万维网上的isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm,2005)。GTC是有价值的工具,在于受控杂草的范围以及此系统提供的便利性和费用效益。然而,草甘膦作为目前标准的基础处理的用途正在选择草甘膦抗性杂草。此外,在实行仅用草甘膦化学品程序的大田中草甘膦固有效力较低的杂草正在演替为主要物种。通过常规育种或共同作为新转化事件将AAD-13(v1)与GT性状叠加可以改进杂草控制的效力、灵活性和管理杂草演替及除草剂抗性发展的能力。如前述实施例中所提到的,通过用AAD-13(v1)转化作物,单子叶作物将具有较高的苯氧基或吡啶氧基生长素安全余地,并可以在双子叶作物中选择性应用苯氧基生长素。可以设想改善的杂草控制选择的一些方案,其中在任意单子叶或双子叶作物物种中叠加了AAD-13(v1)和GT性状:

[0333] a) 可以以标准出苗后用量(420至2160g ae/ha,优选560至840g ae/ha)应用草甘膦,用于控制多数禾本科和阔叶杂草物种。为控制草甘膦抗性阔叶杂草如小飞蓬或内在难以用草甘膦控制的杂草(如鸭跖草属物种(*Commelina* spp.)、番薯属物种(*Ipomoea* spp.)等),可以相继、罐混或作为预混料与草甘膦一起应用280-2240g ae/ha(优选560-1120g ae/ha)2,4-滴以提供有效控制。对于氟草烟,一般用量范围是35-560g ae/ha,更一般是70-280ae/ha。

[0334] b) 目前,应用于GTC的草甘膦用量范围一般为每个应用时间560至2240g ae/ha。草甘膦对于禾本科物种的效力远高于阔叶杂草物种。AAD-13(v1)+GT叠加性状可允许禾本科有效的草甘膦用量(105-840g ae/ha,更优选210-420g ae/ha)。接着可以相继、罐混或作为预混料与禾本科有效用量的草甘膦一起应用2,4-滴(280-2240g ae/ha,更优选560-1120g ae/ha)以提供必要的阔叶杂草控制。上文提到的剂量水平上的氟草烟是处理方案中可接受的成分。草甘膦的低用量还可为阔叶杂草控制提供一些益处;然而初期控制可来自2,4-滴或氟草烟。

[0335] 杂草控制领域的技术人员会认识到,AAD-13(v1)转化进作物使得可以单独或组合(相继或独立地)使用一种或多种商品芳氧基生长素除草剂。通过CPR《作物保护参考》书中汇编的除草剂说明或类似的汇编、在线(如cdms.net/manuf/manuf.asp)汇编的说明或任意商品或学术作物保护指南(如Agrilience的《作物保护指南》(2005))可以确定这些化学物

质中其他代表性除草剂的具体用量。每种由于AAD-13 (v1) 而可以在HTC中使用(无论单独、罐混或相继使用)的可选除草剂都考虑在本发明范围内。

[0336] 实施例16—任意作物中与草铵膦耐性性状叠加的AAD-13 (v1)

[0337] 草铵膦耐性(PAT, bar) 目前作为输入性状(如昆虫抗性蛋白)的选择标记或具体作为HTC性状存在于北美种植的大量作物中。作物包括但不限于草铵膦耐性芸苔、玉米和棉花。其他的草铵膦耐性作物(如稻、甜菜、大豆和草坪草)已在开发中,但目前尚未准予上市。与草甘膦相似,草铵膦是相对非选择性广谱禾本科和阔叶除草剂。草铵膦的作用方式与草甘膦不同。其作用较快,在除草剂应用24—48小时后导致受到处理的叶的脱水和“烧伤”。这对于表现快速杂草控制是有利的。然而,这也限制了草铵膦向靶植物分生组织区的转移,导致较弱的杂草控制,这被两种化合物在许多物种中的相对杂草控制性能评定所证明(Agrilience, 2005)。

[0338] 通过常规育种或共同作为新转化事件将AAD-13 (v1) 与草铵膦耐性性状叠加可以改进杂草控制的效力、灵活性和管理杂草演替及除草剂抗性发展的能力。可以设想改善的杂草控制选择的一些方案,其中在任意单子叶或双子叶作物物种中叠加了AAD-13 (v1) 和草铵膦耐性性状:

[0339] a) 可以以标准出苗后用量(200至1700g ae/ha, 优选350至500g ae/ha)应用草铵膦,用于控制多种禾本科和阔叶杂草物种。目前尚未确认草铵膦抗性杂草;然而固有对草铵膦更有耐性的杂草数目多于草甘膦。

[0340] i) 内在耐性阔叶杂草物种(如田蓟(Cirsium arvensis)、加拿大麻(Apocynum cannabinum)和小飞蓬)的控制可通过罐混280-2240g ae/ha(更优选560-2240g ae/ha)的2,4-滴以有效控制这些更难以控制的多年生物种并改进对一年生阔叶杂草物种的控制强度。在杂草控制方案中,认为氟草烟是可接受的成分。对于氟草烟,一般用量范围是35-560g ae/ha,更一般是70-280ae/ha。

[0341] b) 多重组合(如草铵膦(200-500g ae/ha)+/-2,4-滴(280-1120g ae/ha)+/-氟草烟(以上文所列用量))可提供更强的重叠杂草控制谱。另外,重叠谱提供管理或延缓除草剂抗性杂草的另一种机制。

[0342] 杂草控制领域的技术人员会认识到,AAD-13 (v1) 转化进作物使得可以单独或组合(相继或独立地)使用一种或多种商品芳氧基乙酸生长素除草剂。通过CPR《作物保护参考》书中汇编的除草剂说明或类似的汇编、在线(如cdms.net/manuf/manuf.asp)汇编的说明或任意商品或学术作物保护指南(如Agrilience的《作物保护指南》(2005))可以确定这些化学物质中其他代表性除草剂的具体用量。每种由于AAD-13 (v1) 而可以在HTC中使用(无论单独、罐混或相继使用)的可选除草剂都考虑在本发明的范围内。

[0343] 本发明从而包括转基因植物(和植物细胞),其包含与PCT/US2007/086813(2007年12月7日提交)“叠加”的本发明的AAD-13基因。此类DSM-2基因包括该申请的SEQ ID NOS:1和3。那些基因编码包含那个申请的SEQ ID NOS:2和4的蛋白质。此外,额外的除草剂耐受基因可以包括在包含三个或更多此类基因的多个“叠加”中。

[0344] 实施例17—任一作物中与AAD-1 (v3) 性状叠加的AAD-13 (v1)

[0345] 纯合AAD-13 (v1) 和AAD-1 (v3) (对于后者见PCT/US2005/014737)可以反交并收集F<sub>1</sub>种子。来自每种基因的两个反交的F<sub>1</sub>种子分层并且每次杂交的所处理的4个重复在与用于

其他测试相同的喷雾方案下用下面处理之一进行处理:70,140,280g ae/ha氟草烟(选择AAD-12(v1)基因);280,560,1120g ae/ha R-2,4-滴丙酸(选择AAD-1(v3)基因);或560,1120,2240g ae/ha 2,4-滴DMA(以证实2,4-滴耐受性)。还种植每种基因的纯合T<sub>2</sub>植物用作对照。在3和14DAT对植物分级。喷雾结果在表24中显示。

[0346] 结果证实AAD-13(v1)可以与AAD-1(v3)成功地叠加,从而增加可以应用于目的作物的除草剂范围(对于AAD-1和AAD-13分别为苯氧基乙酸+苯氧基丙酸对苯氧基乙酸+吡啶氧基乙酸)。除草剂杂交抗性模式的互补性质允许方便地使用这两种基因作为互补的和可叠加的大田选择标记。在其中使用单个基因的耐受性不重要的作物中,本领域技术人员将认识到可以通过对相同除草剂叠加第二种耐受性基因增加耐受性。这可以使用相同基因用相同或不同的启动子来进行,然而,如本文观察到的,通过区分杂交保护与苯氧基丙酸(来自[AAD-1(v3)]或吡啶氧基乙酸[AAD-13(v1)]),可以促进叠加和追踪两种互补的性状。

[0347] 本发明从而包括转基因植物(和植物细胞),其包含与WO 2005/107437(2005年11月17日公开;PCT/US2005/014737(2005年5月2日申请))的AAD-1基因“叠加”的本发明的AAD-13基因。此类AAD-1基因包括该申请的SEQ ID NOS:3,4,5和12。这些基因编码包含该申请的SEQ ID NOS:9,10,11和13的蛋白质。此外,额外的除草剂耐受基因可以包括在包含三个或更多此类基因的多个“叠加”中。

[0348] 实施例18-在任一作物中与AAD-12(v1)性状叠加的AAD-13(v1)

[0349] 可以将纯合AAD-13(v1)和AAD-12(v1)植物(后者见WO 2007/053482)杂交并收集F<sub>1</sub>种子。可以播种来自每种基因的两次反交的F<sub>1</sub>种子并在与用于其他测试的相同喷雾方案下使用下面的处理之一处理F<sub>1</sub>植物:70,280,1120g ae/ha氟草烟(选择AAD-12(v1)基因);70,280,1120g ae/ha定草酯(选择AAD-13(v1)基因);或560,1120,2240g ae/ha 2,4-滴DMA(以证实2,4-滴耐受性)。

[0350] AAD-13(v1)可以与AAD-12(v1)叠加,从而增加可应用于目的作物的除草剂范围(对于AAD-12和AAD-13分别为苯氧基乙酸+定草酯对苯氧基乙酸+氟草烟)。除草剂杂交抗性模式的互补性质允许方便地使用这两种基因作为互补的和可叠加的大田选择标记。在其中使用单个基因的耐受性不重要的作物中,本领域技术人员将认识到可以通过对相同除草剂叠加第二种耐受性基因增加耐受性。这可以使用相同基因用相同或不同的启动子来进行,然而,如本文观察到的,通过区分杂交保护与氟草烟[来自AAD-13(v1)]或定草酯[AAD-12(v1)],可以方便叠加和追踪两种互补的性状。

[0351] 本发明从而包括转基因植物(和植物细胞),其包含与WO 2007/053482(2007年5月10日公开;PCT/US2006/042133(2006年10月27日申请))的AAD-12基因“叠加”的本发明的AAD-13基因。此类AAD-12基因包括该申请的SEQ ID NOS:1,3,和5。这些基因编码包含该申请的SEQ ID NOS:2和4的蛋白质。此外,额外的除草剂耐受基因可以包括在包含三个或更多此类基因的多个“叠加”中。

[0352] 实施例19-在任意作物中与AHAS性状叠加的AAD-13(v1)

[0353] 咪唑啉酮除草剂耐性(AHAS等)目前存在于北美种植的大量作物中,包括但不限于玉米、稻和小麦。其他的咪唑啉酮耐性作物(如棉花和甜菜)已在开发中,但目前尚未上市。目前将许多咪唑啉酮类除草剂(如甲氧咪草烟、咪草烟、灭草啞和甲咪唑啉酸)选择性用于多种常规作物中。通过咪唑啉酮耐性性状如AHAS等使得可以使用咪草烟、甲氧咪草烟和



非选择性的咪唑烟酸。这类化学品还具有显著的土壤残留活性,因此与基于草甘膦或草铵膦的系统不同,它能提供超过应用时间的延长的杂草控制。然而,咪唑啉酮类除草剂控制的杂草谱不如草甘膦广泛 (Agrilience, 2005)。另外,针对咪唑啉酮类除草剂具有的作用模式 (抑制乙酰乳酸合酶, ALS), 许多杂草已经发展出抗性 (Heap, 2007)。通过常规育种或共同作为新转化事件将AAD-13 (v1) 与咪唑啉酮耐性性状叠加可以改进杂草控制的效力、灵活性和管理杂草演替及除草剂抗性发展的能力。如前述实施例中所提到的, 通过用AAD-13 (v1) 转化作物, 单子叶作物将具有较高的苯氧基或吡啶氧基生长素安全余地, 并可以在双子叶作物中选择性应用这些生长素。可以设想改善的杂草控制选择的一些方案, 其中在任意单子叶或双子叶作物物种中叠加了AAD-13 (v1) 和咪唑啉酮耐性性状:

[0354] a) 可以以标准出苗后用量 (35至280g ae/ha, 优选70-140g ae/ha) 应用咪唑啉酮, 用于控制许多禾本科和阔叶杂草物种。

[0355] i) 可以通过罐混280-2240g ae/ha (更优选560-2240g ae/ha) 的2,4-滴来控制ALS抑制剂抗性阔叶杂草 (如Amaranthus rudis、三裂叶豚草 (Ambrosia trifida)、藜 (Chenopodium album) (等等, Heap, 2005))。对于氟草烟, 一般用量范围是35-560g ae/ha, 更一般是70-280ae/ha。

[0356] ii) 也可以通过罐混280-2240g ae/ha (更优选560-2240g ae/ha) 的2,4-滴来控制固有对咪唑啉酮类除草剂更具耐性的阔叶物种 (如番薯属物种)。参阅上文绿草定或氟草烟的用量。

[0357] b) 多重组合 (如咪草烟 (35至280g ae/ha, 优选70-140g ae/ha) +/-2,4-滴 (280-1120g ae/ha) +/-氟草烟 (以上文所列用量)) 可提供更强的重叠杂草控制谱。另外, 重叠谱提供管理或延缓除草剂抗性杂草的另一种机制。

[0358] 杂草控制领域的技术人员会认识到, 通过AAD-13 (v1) 转化并通过常规育种或遗传工程与任意咪唑啉酮耐性性状叠加使得可以单独或以多种组合使用多种商品咪唑啉酮类除草剂、苯氧乙酸或吡啶氧乙酸生长素除草剂的任意一种。代表这些化学品的其他除草剂的特定比率可以通过如下除草剂标签确定: 通过在CPR (农作物保护参考) 书或类似的编辑物中编撰的除草剂标签、在线编撰的标签 (例如, [cdms.net/manuf/manuf.asp](http://cdms.net/manuf/manuf.asp)) 或者任何商业或学术作物保护指导, 如来自Agrilience的作物保护手册 (2005)。能够被AAD-13 (v1) 用于HTC的每种备选除草剂, 无论其单独使用、罐混合还是顺序使用, 都认为在本发明的范围内。

[0359] 实施例20—在任意作物中AAD-13 (v1) 与昆虫抗性 (IR) 或其他输入性状叠加

[0360] 作物中由转基因性状提供的昆虫抗性在北美及全球的玉米和棉花产品中是普遍的。多家种子公司已开发具有联合IR和HT性状的商业产品。这些包括Bt IR性状 (如在网址 [lifesci.sussex.ac.uk](http://lifesci.sussex.ac.uk) 列出的Bt毒素, 2006) 和任一或所有上文提到的HTC性状。这种性状提供带来的价值是通过单个性状提供的遗传方法控制多种害虫问题的能力。如果杂草控制和昆虫控制彼此独立完成, 这种性状提供的便利性将受到限制。单独或与一个或多个其他HTC性状叠加的AAD-13 (v1), 通过常规育种或共同作为新的转化事件, 能与一个或多个其他输入性状 (如昆虫抗性、真菌抗性 or 胁迫耐受性等) ([isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm](http://isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm), 2005) 叠加。除了由AAD-13提供的改良的杂草控制和相关的除草剂耐性之外, 益处包括前面实施例所述的便利性和灵活性, 以及控制昆虫害虫和/或其他农事胁迫

的能力。因此,本发明可用于提供完整的改良作物品质的农事工具包,其具有灵活和低成本高效控制许多农事问题的能力。

[0361] IR和HT的联合性状应用于大部分的农事和园艺/观赏性作物以及林业。AAD-13和它相称的除草剂耐性的联合以及任意数量的Bt或非Bt IR基因给予的昆虫抗性可应用到实施例13列出的作物种类(但不局限于此)。杂草控制领域的技术人员将认识到AAD-13(v1)转化和通过常规育种或基因工程与相应的HT性状或IR性状叠加,使之能够利用单独或多种组合的任何在实施例18-20中描述的多种商业除草剂、苯氧乙酸或吡啶氧乙酸类植物生长素除草剂。通过CPR《作物保护参考》书中汇编的除草剂说明或类似的汇编、在线(如cdms.net/manuf/manuf.asp)汇编的说明或任意商品或学术作物保护指南(如Agriliance的《作物保护指南》(2005))可以确定这些化学品中其他代表性除草剂的具体用量。通过AAD-32(v1),能在HTC中使用(不管单独使用、罐混还是相继使用)的每种可选的除草剂,被认为在本发明范围内。

[0362] 实施例21-作为体外双子叶植物选择标记的AAD-13(v1)

[0363] 使用合适的递送方法将目的基因插入植物细胞的过程起始植物细胞、组织、器官和植物或细胞器(如质体)的遗传改造。然而,当基因递送进入植物细胞中,只有极少百分比的细胞将异源基因整合到其基因组中。为了选择这些已整合了目的基因的少数细胞,研究人员将可选择或筛选的“标记基因”与载体中的目的基因(GOI)连接。含有这些标记的细胞可从递入DNA质粒载体的全体细胞群/组织中鉴定出来。通过选择那些表达标记基因的细胞,研究人员能鉴定可能将GOI整合进其基因组的少数细胞。AAD-13(v1)当如专利申请WO 2007/053482(Wright et al.)中的实施例#24所用时可以作为选择标记发挥功能。

## 序列表

- <110> J·M·里拉  
 E·M·斯诺德莱  
 A·E·罗宾逊  
 T·R·莱特  
 D·J·默洛
- <120> 新除草剂抗性基因
- <130> DAS-142XC1 PCT
- <140> PCT/US08/63212
- <141> 2008-05-09
- <150> 60/928,303
- <151> 2007-05-09
- <160> 7
- <170> PatentIn版本3.3
- <210> 1
- <211> 864
- <212> DNA
- <213> *Sphingobium herbicidovorans*
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| atgtcaccg ccttcgacat cgccccgctc gacgccacgt tcggcgccgt cgtcaccggc   | 60  |
| gtgaagctcg ccgatctcga tgatgccgga tggetcgacc tgcaggetgc ctggctcgag  | 120 |
| tacgcactcc tcgttttccc cgatcagcat ctacgcgcgc agcagcagat cgcctttgcc  | 180 |
| cgctcgcttcg ggccactcga gttcgagatg gccgcgatca gcaacgtgcg gcccgacggc | 240 |
| agcctgcggg tcgagagcga caacgacgac atgatgaaga tcctgaaggg caacatgggc  | 300 |
| tggcatgccg acagcaccta catgccggtc caggccaagg gcgcggtggt cagtgccgaa  | 360 |
| gtggttccta gcgtcggcgg ccagaccggc ttcgccgaca tgcgcgcggc ctacgacgcg  | 420 |
| ctcgacgagg atctgaaggc gcgcgtcgag acgctgcagg cccggcactc gctgcattac  | 480 |
| agccagtcga agctcggcca ccagaccaag gcggccgacg gtgaatatag cggctacggg  | 540 |
| ctgcatgacg ggccggtgcc gctgcggccg ctggtgaaga tccatcccga gaccggccgc  | 600 |
| aagtcgctgc tgatcggccg ccacgcccac gccatccccg gcttgagcc agccgagtc    | 660 |
| gaacgcttgc tgcagcagct gatcgacttc gectgccage cgcgcgaat ctatcatcac   | 720 |
| gactggggcg cgggcgacgc cgtgctgtgg gacaatcget gectgctgca ccaggcgacg  | 780 |
| ccgtgggaca tgaccagaa gcgcatcatg tggcacagcc gcatcgccg cgaccggcc     | 840 |
| agcgagaccg cgctggcgca ttga   | 864 |
- <210> 2
- <211> 287
- <212> PRT
- <213> *Sphingobium herbicidovorans*

&lt;400&gt; 2

Met Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp Leu  
                   20                   25                   30  
 Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro Asp  
                   35                   40                   45  
 Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe Gly  
                   50                   55                   60  
 Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp Gly  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu Lys  
                   85                   90                   95  
 Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln Ala  
                   100                   105                   110  
 Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly Gln  
                   115                   120                   125  
 Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Asp  
                   130                   135                   140  
 Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His Tyr  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu Tyr  
                   165                   170                   175  
 Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu Val  
                   180                   185                   190  
 Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg His  
                   195                   200                   205  
 Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu Leu  
                   210                   215                   220  
 Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His His  
 225                   230                   235                   240  
 Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu Leu  
                   245                   250                   255  
 His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp His  
                   260                   265                   270  
 Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His  
                   275                   280                   285

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 867

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	植物优化的 (v1)	
<400>	3	
atggcttcac	ctgccttcga	cattgcecca
cttgatgcca	catttggggc	agttgtcact
60		
gggggtcaagt	tggctgatct	tgatgacgct
ggatggttgg	acctccaagc	tgectggctt
120		
gaatatgccc	tccttgtcct	ccttgaccag
cacttgacaa	gggaacagca	aatagctttc
180		
gctcgcagat	tcggaccact	tgagtccgag
atggcagcca	tctccaatgt	tagaccgat
240		
ggcagcttga	gggttgagtc	tgacaatgat
gacatgatga	agatcctcaa	aggcaacatg
300		
ggatggcacg	ctgacagcac	ctacatgcca
gtgcaagcaa	agggtgcagt	gttctcagct
360		
gaagtggttc	cctctgtggg	tggccagact
ggttttctg	acatgagagc	tgectatgat
420		
gcacttgatg	aagaactgaa	ggetcgtgtc
gagacattgc	aagcccgtca	ctccctccat
480		
tactcccaga	gcaagctcgg	acaccagacc
aaggetgcag	atggtgagta	ctctggttat
540		
ggcctccatg	atgggcctgt	tcccttgagg
ccaattgtga	agatccatcc	agagactggc
600		
agaaaatccc	ttctcatagg	ccgtcatgcc
catgceattc	ctggattgga	gccagctgag
660		
tcagaaaggt	tgetccagca	actcattgat
tttgettgtc	aaccccctag	gatctaccac
720		
catgactggg	ctcctggaga	tgcagtgtc
tgggacaacc	getgcctcct	tcaccaagcc
780		
actccctggg	acatgacce	gaaacgcate
atgtggcaca	gccgcattgc	tggtgacce
840		
gcacttgaga	ccgcacttgc	acattga
867		
<210>	4	
<211>	288	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	植物优化的 (v1)	
<400>	4	
Met Ala Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly		
1	5	10
15		
Ala Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp		
20	25	30
35		
Leu Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro		
40	45	
50		
Asp Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe		
55	60	
65		
Gly Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp		
70	75	80
85		
Gly Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu		
90	95	

Lys Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln  
                   100                  105                  110  
 Ala Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly  
                   115                  120                  125  
 Gln Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu  
                   130                  135                  140  
 Asp Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His  
 145                  150                  155                  160  
 Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu  
                   165                  170                  175  
 Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu  
                   180                  185                  190  
 Val Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg  
                   195                  200                  205  
 His Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu  
                   210                  215                  220  
 Leu Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His  
 225                  230                  235                  240  
 His Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu  
                   245                  250                  255  
 Leu His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp  
                   260                  265                  270  
 His Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His  
                   275                  280                  285

<210> 5

<211> 867

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 大肠杆菌优化的 (v2)

<400> 5

atggcgagcc cggcgttcga cattgcgcca ctggatgcta cttttggcgc agttgtaact 60  
 ggcgtaaaac tggcggatct ggatgacget ggctggctgg acctgcagge tgcgtggctg 120  
 gaatatgcac tgctggtatt cccggaccag cacctgacce gtgaacagca gatcgctttc 180  
 gcacgccget tcggtccaact ggagttcgaa atggcagcga tctccaacgt tcgtccggat 240  
 ggcagcctgc gtgttgaate tgacaacgat gacatgatga aatcctgaa aggcaacatg 300  
 ggttggcacg ctgactctac ctacatgcca gttcaggcaa agggtgcagt gttcagcget 360  
 gaagtggttc cgtctgtggg tggccagact ggttttgceg acatgcgcgc tgcttatgat 420  
 gcaactggatg aagacctgaa agctcgtgtt gaaacctgc aagcgcgtea ctccctgcat 480

tactcccagt ccaagctggg tcaccagacc aaagctgcgg atggtgagta ctctggttac 540  
 ggctcgcag atggtccggt tccgctgcgt ccgctggtga aaatccatcc ggaaactggc 600  
 cgcaaattccc tgctgatcgg ccgctatgcg cacgcgattc cgggcctgga accggctgag 660  
 tctgaacgtc tgctgaaca gctgattgat tttgcttgtc agecgcgcgc tatctaccac 720  
 cacgactggg cgccgggtga tgcagtgctg tgggacaacc gctgcctgct gcaccaagcg 780  
 actccgtggg acatgacca gaaacgcatt atgtggcaca gccgcattgc gggtagcccg 840  
 gcatctgaga ccgcactggc aactaa 867

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAD-13 PTU引物

<400> 6

Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys

1

5

10

15

Thr Cys Ala Gly Cys Cys

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

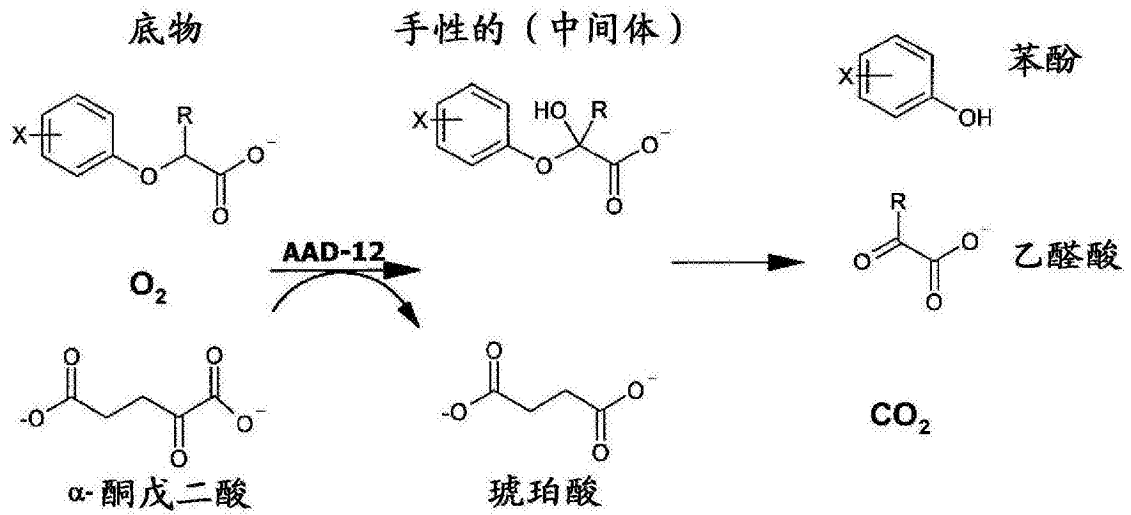
<220>

<223> AAD-13 PTU引物

<400> 7

cgggcaggcc taactccacc aa

22



- $O_2$  的加入是立体特异性的
- 中间体分解成苯酚 + 乙醛酸是自发的

图1



		10	20	30	40	50	60
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	1	-----MSPAFDIAPLEDATFGAVVTGVKLAD-LDDAGWLDLQAAWLEYALLVFPDQ					
aad 12	1	-----MOTLQITPTGATLGATVTVGVHLAT-LDDAGFAALHAAWLQHALLIIFPGQ					
aad 1	1	MHAALSPLSQRFERLAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVITYEFGQ					
aad 2	1	-----MTIATROLOQTHFVGOVSGLDLRKPLTPGEAREVESAMDKYAVLVFHDQ					
tfdA	1	-----MSVVANPLHPLFAAGVEDIDLREALGSTEVRETERIMDEKSVLVERGQ					
tauD	1	-----MSERLSITPLGPYIGAQLSGADLTRPLSDNQFELYHAVLRHQVVFRLDQ					
		70	80	90	100	110	120
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	50	HLTREQQIAPFARFGPLE-----FEMAAISNVRPDGSLRVES--DNDD					
aad 12	50	HLSNDQOITFAKREGAIER-----IGGGDIVAISNVKADGTVRQHSAPAEWDD					
aad 1	61	AITNEQHIAFSRRFGPVDP-----VPLLKSLGEGYEVQMIIRREA-----					
aad 2	49	DITDEQOMAFALNFGQREDARGGTVTREKDYRLQ-SGLNDVSNIGKDGKPLAKD----SR					
tfdA	49	PLSQDQOIAFARNFGPLEG--GFIKVNQRPSRFKYAELADISNVSLDGKVAQRD----AR					
tauD	51	AITPQQRALAQRFELHI-----HPVYPHAEGVDEIIVLDTHN-----					
		130	140	150	160	170	180
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	91	MMKILKGNMGWHADSTYMPVQAKGAVFSAEVVPSVGGQTGFADMRAAYDALDEDLKVARE					
aad 12	97	MMKVIVGNMAWHADSTYMPVMAQGAVFSAEVVPAVGGRTCFADMRAAYDALDEATRALVH					
aad 1	100	NESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVMRAIDVPEHGGDTGFLSMYTAWETLSPTMQATIE					
aad 2	104	THLFNLGNCLWHSDSSEFPIPAKFSLLSARVVNPTGGNTEFADMRAAYDALDDETKAETIE					
tfdA	103	EVVGNFANQLWHSDSSEFQQAARYSMLSAVVVPPSGGDTFCMDRAAYDALPRDLQSELE					
tauD	90	DNPP--DNDNWHTDVTEIETPPAGALAAKELPSTGGDTLWTSFGIAAYEALSVPFRLLS					
		190	200	210	220	230	240
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	151	TLQARHSLHYSQS---KLGHQTKAADGEYSYGLHDGPVPLRPLVKIHPETGRKSLIIGR					
aad 12	157	QRSARHSLVYSQS---KLGHVQQAGS-AYIGYMDTTATPLRPLVKVHPETGRPSLLIIGR					
aad 1	160	GLNVVHSATRVFGLYQAQNRFRSNTSVKVMVDVAGDRETVHPLVVTHTPGSGRKGLYVNO					
aad 2	164	DLVCEHSLMYSRG---SLGFT-----EYTDEEKQMFKPVLRQLVTRTHPVHRRKSLYLS					
tfdA	163	GLRAEHYALNSRF---LLGDT-----DYSEAQRNAMPPVNWPLVTRTHAGSGRKFLEFIGA					
tauD	148	GLRAEHDFRKSEFP---EYKYRKTEEEHQRWREAVAKNPPLLHPVVRTRTHPVSGKQALFVNE					
		250	260	270	280	290	300
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	207	-HAHAIPGLEPAESERILQQLIDFACQPPRIYHHDWAPGDAVLWDNRCLLHQATPWDMTQ					
aad 12	212	-HAHAIPGMDAAESERFLEGLVDWACQAPRVHAHQWAAAGDVVVWDNRCLLHRAEPWDFKL					
aad 1	220	VYCQRIEGMTDAESKPLLOFLYEHATRFDFTCRVVRWKKDQVIVVDNLCTMHRVAVPDYAGK					
aad 2	214	-HAGKIASMSVPEGRLLLRDLNEHATQPEFVYVHKWKLHDLVWMDNRQTMHRVRRYDQSQ					
tfdA	213	-HASHVEGLPVAEGRMLLAELEHATQREFVYRHRWNVGDVLMWMDNRQTMHRGRRYDISA					
tauD	205	GFTTRIVDVSEKRESEALLSFLFAHITKPEFQVRWRWQPNDAIWDNRKVTQHYANADYLPQ					
		310	320				
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
aad 13	267	KRIMWHSRIAQDPASETALAH-					
aad 12	272	PRVMWHSRLAGRPETEGAALV-					
aad 1	280	FRYLTRTTVGGVRRPAR-----					
aad 2	274	PRDMRRATVAGTEPTVQQAAE					
tfdA	273	RRELRRATTLDDAVV-----					
tauD	265	RRIMHRATILQDKPFYRAG----					

图2

用于检测AAD-13底物的偶联酶测定

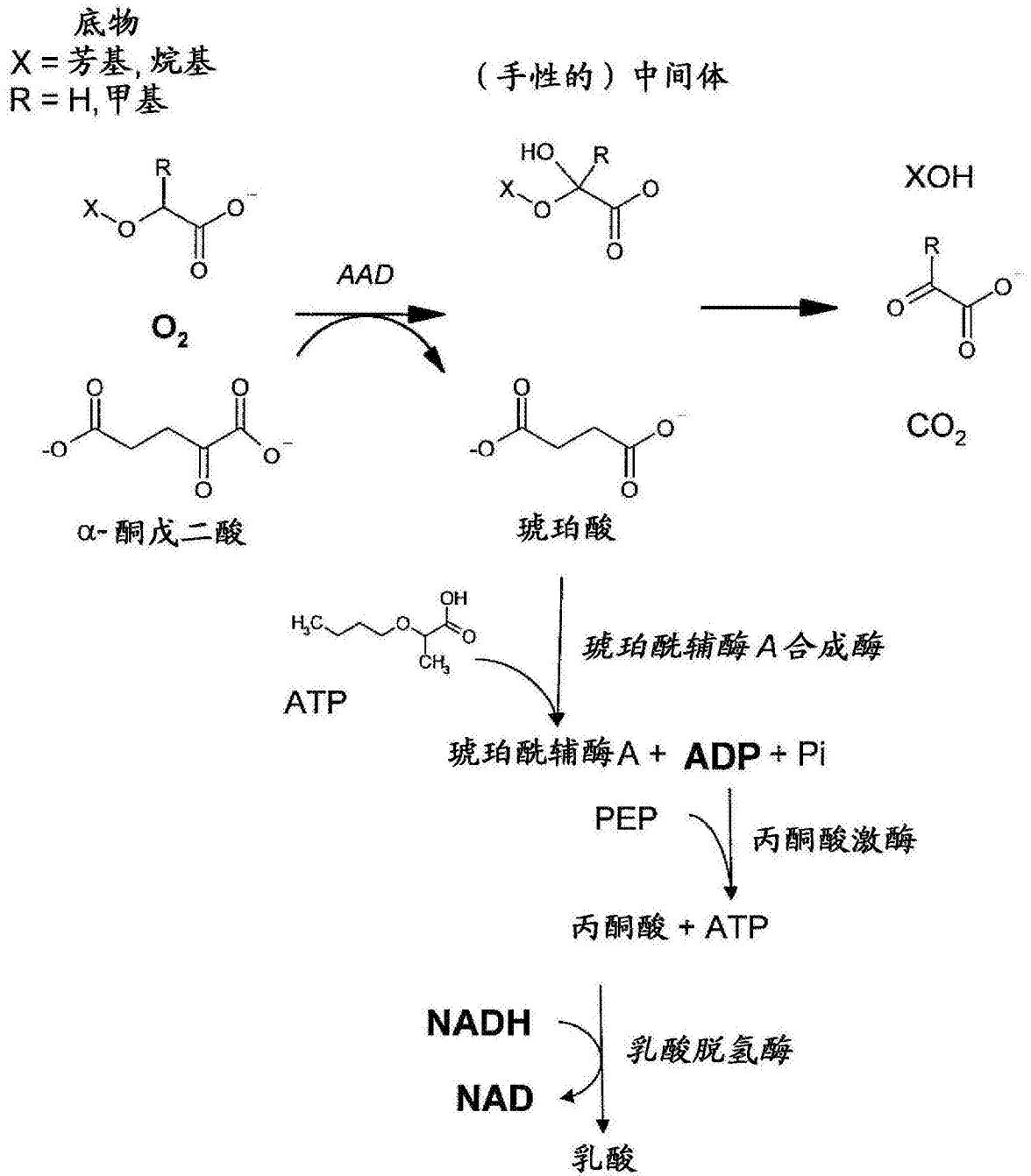


图3