

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/82

C12N 15/12 C12N 15/62

A01H 5/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]·申请号 00805132.1

[43]公开日 2002年5月29日

[11]公开号 CN 1351667A

[22]申请日 2000.3.16 [21]申请号 00805132.1

[30]优先权

[32]1999.3.17 [33]US [31]60/125,072

[86]国际申请 PCT/CA00/00288 2000.3.16

[87]国际公布 WO00/55337 英 2000.9.21

[85]进入国家阶段日期 2001.9.17

[71]申请人 维多利亚大学创新和发展公司

地址 加拿大哥伦比亚

[72]发明人 桑托什·米斯拉 威廉·W·凯

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书3页 说明书51页 附图页数3页

[54]发明名称 抗广谱病原体的转基因植物

[57]摘要

公开了表达 dermaseptin 和/或 temporin 肽的转基因植物。在某些实施方案中,这些植物具有增强的、广谱病原体抗性并可用作农业或园艺作物。在其它实施方案中,该植物用于生产大量的 dermaseptin 和 /或 temporin 肽。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版



权 利 要 求 书

1. 一种表达阳离子肽的转基因植物，所述阳离子肽选自：

(a) temporin; 和

5

(b) dermaseptin。

2. 一种包含重组核酸分子的转基因植物，其中所述核酸分子编码选自以下的肽：

(a) temporin; 和

10

(b) dermaseptin。

3. 按照权利要求 2 的转基因植物，其中所述肽包括一种氨基酸序列，该序列选自由 SEQ ID: 3-14 和 17-26 列出的氨基酸序列。

15

4. 按照权利要求 3 的转基因植物，其中所述肽进一步包括 2-25 个氨基酸长度的 N 末端肽延伸。

5. 按照权利要求 4 的转基因植物，其中所述 N 末端肽延伸选自 AMWK、ASRH 和 ALWK。

20

6. 一种包含重组核酸分子的转基因植物，其中所述核酸分子编码融合肽，该肽具有选自以下的式：

(a) P-D; 和

(b) P-T,

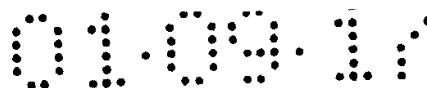
25

其中 D 是 dermaseptin 肽, T 为 temporin 肽, 并且 P 是阴离子前区肽。

7. 一种包含重组核酸分子的转基因植物，其中所述核酸分子编码融合肽，该肽具有选自以下的式：

30

(a) P-S-D ; 和



(b) P-S-T,

其中 D 是 dermaseptin 肽, T 为 temporin 肽, P 是阴离子前区肽, S 为间隔肽。

5 8. 一种包含核酸分子的转基因植物, 所述核酸分子编码一种包含选自以下的氨基酸序列的肽:

(a) SEQ ID: 3-14 及其片段;

(b) 通过一种或多种保守氨基酸替换与(a)指定的氨基酸序列不同的氨基酸序列; 和

10 (c) 具有与(a)指定的氨基酸序列的至少 40%同一性的氨基酸序列,

其中所述肽具有 dermaseptin 的生物学活性。

15 9. 按照权利要求 8 的转基因植物, 其中所述肽进一步包括与所述肽的 N-末端可操作地连接的阴离子前区肽。

20 10. 一种包含核酸分子的转基因植物, 所述核酸分子编码一种包含选自以下的氨基酸序列的肽:

(a) SEQ ID: 17-26 和其片段;

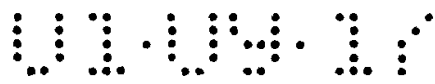
(b) 通过一种或多种保守氨基酸替换与(a)指定的氨基酸序列不同的氨基酸序列; 和

(c) 具有与(a)指定的氨基酸序列的至少 50%同一性的氨基酸序列,

其中所述肽具有 temporin 的生物学活性。

25 11. 按照权利要求 8 的转基因植物, 其中所述肽进一步包括与所述肽的 N-末端可操作地连接的阴离子前区肽。

30 12. 一种包含重组核酸分子的转基因植物, 所述核酸分子编码一种包含氨基酸序列的肽, 所述序列选自 SEQ ID: 28 和 34。



13. 一种生产生物学活性阳离子肽的方法，包括：
提供按照权利要求 1 的转基因植物；和
从该植物中分离出至少一种生物学活性阳离子肽。



说明书

抗广谱病原体的转基因植物

5 发明领域

本发明涉及到基因工程的植物，其被改造用以表达一种或多种属于 *temporin* 和/或 *dermaseptin* 家族的肽。

背景技术

10 植物是由成千上万种由大量植物病原体真菌、细菌、病毒和线虫引起的传染疾病的宿主。这些病原体是造成全球性显著的作物损失，引起生长植物的感染和收获作物的毁灭的主要原因。减小由这些病原体引起的损害的最广泛实践的方法包括各种化学试剂。不幸地，许多病原体产生对这些化学剂的抗药性，一些病原体（特别是病毒）并不容易通过化学手段控制。此外，采用的化学试剂中的许多具有广谱毒素，许多引起严重的环境损害，以及人体内的毒性。

20 新近，植物育种和基因工程技术已经用于抵抗植物病原体。在一定情形下，育种者和分子生物学家已经成功地改造了对某些病原体的抗性。过去一些年里，许多植物 R (抗性)基因已经从植物中分离出来。当引入其它的易染病作物时，这些 R 基因产生对某些病原体的增强的抗性。例如，美国专利 5,571,706 介绍了烟草 N 基因的分离，它赋予对烟草花叶病毒的抗性。然而，尽管迄今报道的常规的育种和基因工程方法可成功地增强病原体的抗性，它们一般解决仅仅由一种病原体，或者小量紧密联系的病原体引起的问题。结果，尽管采用这些方法生产的作物具有增强的抗一种病原体的保护力，仍然必须采用常规的化学试剂以控制其它的病原体。

30 生产对广谱病原体，包括细菌和真菌病原体，具有增强的抗性的植物，将具有极大的农业利益。本发明涉及到这样的植物。

发明概述

5 本发明者已经发现转基因植物内某些肽的表达赋予广谱病原体抗性，包括对真菌和细菌增强的抗性。这些肽是少量的、带正电的(阳离子的)属于 temporin 和 dermaseptin 家族的肽，它们天然存在在某些种青蛙的皮肤内。本发明提供的转基因植物可用于常规的农业用途，例如粮食作物。还可收割和处理这些植物以提取已表达的 temporin 和/或 dermaseptin 肽，它接着可以纯化以用于医疗和其它用途。

10 因而本发明包括表达至少一种 dermaseptin 或 temporin 肽的转基因植物，以及生产这些植物的方法。这些植物的部分，包括种子、果实、茎、叶和根，可以以常规方式利用，作为食物原料，或者作为 dermaseptin 或 temporin 肽的来源。由于所有植物种类易感染一种或多种植物病原体，可有效地应用本发明以在任何植物种类中产生广谱抗性。从而，本发明可应用至单子叶植物、双子叶植物和裸子植物，包括但并非限于，玉米、小麦、水稻、大麦、大豆、棉花、一般意义的豆、油菜/菜籽(canola)、紫花苜蓿、亚麻、向日葵、红花、芸苔、棉花、亚麻、花生、三叶草；蔬菜，例如莴苣、西红柿、葫芦、木薯、马铃薯、胡萝卜、萝卜、豌豆、小扁豆、甘蓝、花椰菜、椰菜、芽甘蓝、胡椒；树果实例如柑橘、苹果、梨子、桃子、杏、胡桃；和花，
15 例如兰花、康乃馨和玫瑰。

20 在其最基本形式中，本发明提供表达一种或多种 dermaseptin 和/或 temporin 肽的转基因植物。dermaseptin 和 temporin 肽家族的成员本领域是公知的。本发明可采用的 dermaseptin 的例子包括，但并非限于，由 Mor. 等人，Biochemistry, 30:8824-8830, 1991，Strahilevitz, Biochemistry, 33:10951-10960, 1994 和 Wechselberger, Biochim. Biophys. Acta 1388: 279-283, 1998.介绍的 dermaseptin。可采用的 emporin 例子包括，但并非限于，由 Simmaco 等人, Eur. J. Biochem., 242:788-92, 1996
25 介绍的 temporin。在它们的天然状态(即，在青蛙细胞中表达的)，



dermaseptin 和 temporin 肽以前体形式产生，随后通过蛋白水解剪切加工以形成成熟蛋白质。Dermaseptin 的成熟形式长度一般为大约 27-34 个氨基酸，而 temporin 的成熟形式长度一般为大约 10-13 个氨基酸。本发明预料这些肽的天然存在的全长(未加工过)形式，以及肽的成熟（加工过）形式和中间形式的用途。此外，也可以采用这些肽的合成形式。肽的合成形式包括任何不是天然存在的形式，以及包括在氨基酸序列上不同于天然存在肽，但仍然保持 dermaseptin 或 temporin 生物活性的肽。该序列变异体通常保留与至少一种天然存在的 dermaseptin 或 temporin 肽的至少 40%的氨基酸序列同一性。

5

10

其它的可采用的 dermaseptin 或 temporin 的合成形式 包括具有 N-末端肽延伸的形式。这样的肽延伸可包括通常在蛋白质加工过程中清除的 dermaseptin 或 temporin 的前体形式的部分，或者可以是合成序列。这些 N-末端肽延伸可对蛋白水解剪切产生增强的抵抗力，并且也可增强肽的抗菌活性。通常地，这些 N-末端延伸长度在 2 和 25 个氨基酸之间，尽管也可以采用更长的延伸。在某些实施方案中采用的 N-末端延伸序列的例子包括肽序列 MAMWK 和 MASRH。AMWK 序列是天然存在的肽延伸；它是通常在加工过程中剪切的全长 dermaseptin-b 肽序列的部分。ASRH 是一种合成的延伸序列。在每种情形下，N-末端蛋氨酸加入延伸肽以确保肽的适当表达。

15

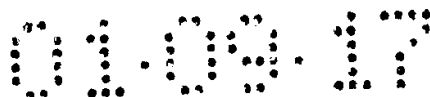
20

本发明的基本方面基于在转基因植物中 temporin 和 dermaseptin 肽的表达，其它的氨基酸序列也可连接这些肽中，以便制备融合肽。转基因植物中这种融合肽的表达可提供甚至比单独 temporin 或 dermaseptin 肽的表达更有效的广谱病原体抗性，或者可增强已表达的 temporin/dermaseptin 分子的稳定性以提供更高的表达水平，因此促进源于植物组织的肽的纯化。因而，在另一实施方案中，本发明提供表达融合肽的转基因植物，它包括：

25

30

(1)为 temporin 或 dermaseptin 的第一肽序列；和



(2)与第一肽序列可操作地连接的第二肽序列。

第二肽序列通常地，但并不是必需地，与第一肽序列的氨基 (N-) 末端连接。

5

在某些实施方案中，第二肽序列包括阴离子的(带负电荷的)“前区”肽序列。这种前区肽用来中和 dermaseptin 或 temporin 的阳离子本质，因而在细胞环境中可以提供增强的稳定性。因此，这些前区通常包括大量的带负电荷的氨基酸，例如谷氨酸 (Glu 或 E)和天门冬氨酸 (Asp 或 D)。适合的前区包括发现在天然存在的未加工过的(全长) dermaseptin 和 temporin 肽中的那些，以及阴离子的源自其它肽的前区，包括哺乳动物起源的那些，例如源自绵羊 cathelin 蛋白质的前区。包括这样的前区的融合肽可以以 P-D 或 P-T 表示，其中 P 为前区肽，T 为 temporin 肽，D 为 dermaseptin 肽。

10

15

尽管这样的前区肽可以直接接入 dermaseptin 或 temporin 肽的 N-末端，采用间隔肽以连接这两种肽是有益的。本领域中连接两种肽的间隔肽的应用是公知的；这种间隔肽通常长度在 2 和 25 氨基酸之间，并且提供一种连接第一肽序列至第二肽的灵活的铰合部。已经被用于提供连接两种肽的灵活的铰合部的间隔序列包括甘氨酸(4)丝氨酸间隔(GGGGS x3)，Chaudhary 等人介绍, Nature 339: 394-397, 1989。如上介绍的 N-末端肽延伸还可用于提供间隔肽功能。包括前区肽、间隔肽和 dermaseptin 或 temporin 肽的融合肽可以表示为 P-S-D 或 P-S-T，其中 S 表示间隔肽。

20

25

间隔序列也可包括剪切位点，例如由蛋白酶识别和剪切的肽序列。这样的位点有助于接着植物组织的纯化之后从 dermaseptin 或 temporin 肽中清除前区。

30

在下列章节更详细地介绍本发明的这些和其它的方面。



序列表

显示列在附随的序列表中的核酸和氨基酸序列，对于核苷酸碱基采用标准字母缩写，对于氨基酸采用三字母密码。每个核酸序列仅仅显示一链，但是通过参考显示的链应认为包括互补链。

5

SEQ ID: 1 显示 dermaseptin b cDNA 序列。

SEQ ID: 2 显示前体 dermaseptin b 肽(未加工过)的氨基酸序列。

SEQ ID: 3 显示成熟 dermaseptin b 肽的 27 个氨基酸的序列。

10

SEQ ID: 4 显示成熟 dermaseptin B 肽的 31 个氨基酸的序列。

SEQ ID: 5-14 显示各种成熟(加工过)dermaseptin 肽的氨基酸序列。

SEQ ID: 15 显示一种编码 temporin G 的 cDNA 序列。

SEQ ID: 16 显示 temporin G 前体(未加工过)形式的氨基酸序列。

15

SEQ ID: 17 显示成熟 temporin G 肽的 13 个氨基酸的序列。

SEQ IDs: 18-26 显示各种成熟(加工过) temporin 肽的氨基酸序列。

SEQ ID: 27 显示编码 MSRA₂ 的核酸序列。

SEQ ID: 28 显示 MSRA₂ 的氨基酸序列。

20

SEQ ID: 29-32 显示用于产生编码 MSRA₂ 的核酸序列的寡核苷酸。

SEQ ID: 33 显示编码 MSRA₃ 的核酸序列。

SEQ ID: 34 显示 MSRA₃ 的氨基酸序列。

25

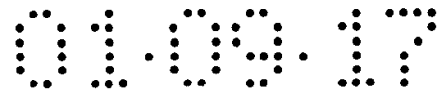
SEQ ID: 35-38 显示用于产生编码 MSRA₃ 的核酸序列的寡核苷酸。

SEQ ID: 39-41 显示各种 N-末端延伸序列的氨基酸序列。

附图简要说明

图 1 显示试验转基因马列铃薯块茎抗软腐病的试验结果图。由 Desiree 对照和表达 Demaseptin B (样品编号 D1, D2, D6, D10) 或者

30



Temporin A (样品编号 T1, T2, T3) 的转基因植物的块茎制备的盘被胡萝卜欧文菌感染。室温下放置 6 天后, 从盘上轻轻地清除腐烂的组织, 对胡萝卜欧文菌的敏感性/抗性以块茎组织的重量损失表示。

5 图 2 是显示肽 MSRA₂ (Dermaseptin B)和 MSRA₃ (Temporin A)对大肠杆菌的抗菌作用的图。该细胞培养物在室温下在指定浓度的 Dermaseptin B (DSB; 7 μg/ml, 30 μg/ml,和 75 μg/ml), Temporin A (TA; 75 μg/ml, 133 μg/ml, 200 μg/ml)以及 Temporin A 和 Dermaseptin B 的组合(133 μg/ml Temporin A 和 30 μg/ml Dermaseptin B)存在时培养 4 小时, 稀释并涂在 LB 板上。在于 37°C 培养过夜之后, 对菌落计数并记下幸存的细菌。

15 图 3 是显示肽 MSRA₂ (Dermaseptin B)和 MSRA₃ (Temporin A) 对胡萝卜欧文菌的抗菌作用的图。该细胞培养物于室温下, 在指定浓度的 Dermaseptin B (DSB; 23 μg/ml, 45 μg/ml)或 Temporin A (TA; 67 μg/ml, 133 μg/ml)存在时培养 4 小时, 稀释并涂在 LB 板上。在于 28°C 培养过夜之后, 对菌落计数并记下幸存的细菌。

I. 定义

20 dermaseptin:如本文采用的, 术语 “dermaseptin”指天然存在的称为 dermaseptins 的阳离子肽家族的任何成分, (Strahilevitz, Biochemistry, 33:10951-960, 1994), 以及这些天然存在的肽的显示如下定义的 dermaseptin 生物活性的片段和变体。

25 dermaseptin 首先在南美洲树蛙 *Phyllomedusa sauvagii* 的皮肤提取物中鉴别出(Mor 等人, J. Biol. Chem., 269: 31635-31641, 1994)。它们是广谱杀微生物的肽, 可抑制细丝状真菌以及细菌、酵母和原生动物的生长(Strahilevitz, Biochemistry, 33:10951-10960, 1994)。自从鉴别出第一个 dermaseptin, 即 dermaseptin S, 这个肽家族的大量的其它成分业已被表征和克隆, 包括: dermaseptin-b, 分离自 *Phyllomedusa bicolor*

30

的皮肤(Mor 等人, J. Biol. Chem., 269: 31635-31641, 1994), (SEQ ID: 2); 从 *Pachymedusa dactylos* 分离出两种 dermaseptin, 其由克隆 PD-3-3 和 PD-2-2 编码, 如 Wechselberger 介绍的, Biochim. Biophys. Acta 1388:279-283, 1998 (分别为 SEQ ID: 5-6 所示的肽序列); 从 *Agalychnis annae* 分离出三种 dermaseptin, 其由克隆 AA-3-6, AA-3-3, AA-3-1 编码, 如 Wechselberger 介绍的, Biochim. Biophys. Acta 1388:279-283, 1998 (分别为 SEQ ID: 7-9 所示的肽序列); 以及源自 *Phyllomedusa sauvagii* 的五种 dermaseptin 肽, 称为 dermaseptin 5、dermaseptin 4、dermaseptin 3、dermaseptin 2 和 dermaseptin 1, 如 Mor 和 Nicolas 介绍的, Journal Biochemical Chemistry, 269:1934-1939, 1994 (分别为 SEQ ID: 10-14 所示的肽序列)。这些序列易于从公众数据库中得到, 包括得自 GenBank。

dermaseptin 肽通常表达为大约 60-80 个氨基酸长度的前体形式, 并且随后加工成大约 27-34 个氨基酸长度的成熟形式。例如, 编码 dermaseptin-b 的 cDNA (SEQ ID:1; Amiche 等人, J. Biol. Chem. 269:1747-1852, 1994; Chapentier 等人, Biol. Chem. 273:14690-14697, 1998; 位于 GenBank 核苷酸序列数据库, 入藏登记号为 X72387)编码 78 氨基酸长度的前体肽(SEQ ID: 2)。加工这种 dermaseptin-b 的前体形式以生产两种成熟形式, 称为 dermaseptin b 和 dermaseptin B (Strahilevitz, Biochemistry, 33:10951-10960, 1994)。Dermaseptin b (SEQ ID: 3)长度为 27 氨基酸并且包括前体形式的 49-75 位氨基酸残基。Dermaseptin B 是另一种长度为 31 个氨基酸的剪切产物, 包括 4 个氨基酸的 N 末端延伸(AMWK) (SEQ ID: 4)。Dermaseptin B 包括前体形式的 45-75 位氨基酸残基。除显示 dermaseptin b 全长前体形式的 SEQ ID: 1 和 2 之外, 序列表显示的 dermaseptin 肽表示肽的加工过的、成熟形式。

假如可得到大范围 dermaseptin 肽序列和编码这些肽的核酸序列, 本领域的普通技术人员, 采用标准的分子生物学技术, 能够容易地生产这些肽和它们相应的核酸序列。

除了采用以上介绍的天然存在的 dermaseptin 之外，采用与天然存在的 dermaseptin 肽稍微不同，然而在植物中表达时仍然赋予增强的广谱病原体抗性的肽，也可以实施本发明，这对于本领域的熟练技术人员而言是明显的。例如，成熟 dermaseptin 肽 N-末端的 α 螺旋状两性分子部分，尤其是前 18 个氨基酸残基，已经被证明对于抗菌活性重要 (Mor 等人, J. Biol. Chem., 269:31635-31641, 1994; Mor 和 Nicolas, Journal Biochemical Chemistry, 269:1934-39, 1994) ，并且该片段可用来代替全长 dermaseptin。因此，术语“dermaseptin”也包括变异的 dermaseptin 肽，以及天然存在肽的片段，它们分享与天然存在的 dermaseptin 肽的特定序列同一性水平，或者通过一种或多种保守的氨基酸替换与天然存在的 dermaseptin 肽不同。

这些变异的肽和片段保留了 dermaseptin 生物活性，它可通过以下介绍的方法测定。变异的 dermaseptin 通常具有与天然存在的 dermaseptin 肽(例如 SEQ ID: 3 显示的那种)至少 40%的氨基酸序列同一性，并通过以下介绍的方法测定。

dermaseptin 生物活性: dermaseptin 肽抑制细菌生长和 /或真菌生长的能力。通过采用以下给定的方案可容易地确定 dermaseptin 生物活性。

给定的 dermaseptin 肽的抗菌活性通过测定其抑制果胶分解性菌株例如胡萝卜欧文菌或大肠杆菌 DH5 α 的能力评估。通过在 LB 中连续地稀释肽并 100:1 等分试样至 96 孔微量滴定板的孔中，测定给定肽的活性。新鲜的细菌培养物(~0.3 A550)接着在 Luria-Bertani 培养基(LB)中生长(1% w/v 胰胨和 0.5% w/v 酵母提取物)并在 LB 中稀释至 10^{-2} 以表示大约 10^4 - 10^5 菌落形成单位(CFU) ml^{-1} 。10:1 的细菌培养物然后接种入含有肽的孔中，样品在 37 °C 培养 4 小时。孔的成分接着以 LB 稀释，涂在 LB 琼脂上并在 37 °C 放置过夜。接着数与每个 dermaseptin

稀释液（和未加入肽的对照）相对应的菌落，试验下的肽的抗菌活性通过与对照板的比较测定。

5 本试验的条件下，如果它在 7: g /ml 的浓度能够抑制至少 10% 的细菌生长(即，在此浓度，细菌菌落的数量不超过对照板的 90%)，就测定 dermaseptin 肽具有生物活性。

10 给定 dermaseptin 肽的抗真菌生物活性通过利用真菌菌株仙人掌疫霉和/或茄病镰孢菌评估。所选择的真菌菌株在五种谷物琼脂(Five Cereal Agar, 含有 20 gL⁻¹ 五种谷物婴儿食物方便薄片以及 8 gL⁻¹ 琼脂³的 FCA(Terras 等人, The Plant Cell 7:573-588, 1995)上生长。室温下生长 5 天之后，取出菌丝体塞并倒置在新鲜 FCA 板中心。试验肽的无菌溶液(10:1)接着引入距板边缘 3cm 的孔中，在同一板上建立含无菌水的对照孔。在同一板上（或者在另外的板上）可以试验各种浓度的试验肽。试验板室温下培养 5 天，之后测量每个孔周围的生长抑制区。

15 在本试验条件下，如果它能够在 5: g /ml 的浓度抑制真菌生长(即，含有这种浓度肽的孔周围有可辨别的抑制区)，就确定 dermaseptin 肽具有生物活性。

20 temporin: 如本文采用的，术语“temporin”指天然存在的称为 temporins 的阳离子肽家族的任何成分 (Simmaco 等人, Eur. J. Biochem., 242:788-92. 1996) ，以及这些天然存在的肽的显示如下定义的 temporin 生物活性的片段和变异体。

25 temporin 是最初从由 *Rana temporaria* 蛙皮肤制备的 cDNA 库中识别的具有抗菌活性的小型阳离子肽。这些肽显示与从 *Vespa* 蛇毒分离的溶血肽的一些序列相似性,然而, temporin 肽并不是溶血的 (Simmaco 等人, Eur. J. Biochem., 242:788-92. 1996)。

30

temporin 家族的十个成分， temporin A、B、C、D、E、F、G、H、K 和 L，已经由 Simmaco 等人介绍，*Eur. J. Biochem.*, 242:788-92. 1996。类似 dermaseptin， temporin 通常表达为前体形式，随后加工以产生成熟形式。例如，编码 temporin G 的 cDNA 分子(示为 SEQ ID: 15，位于 GenBank 核苷酸序列数据库，入藏登记号为 Y09395)编码一种 61 个氨基酸的 temporin G 前体形式(示为 SEQ ID: 16)。氨基酸 1-22 包括信号序列，氨基酸 23-46 包括前区，氨基酸 47-59 包括被加工的、成熟的 temporin G 肽(成熟形式示为 SEQ ID: 17)。一般地，预计的成熟 temporin 肽长度在 10 和 13 氨基酸之间，一些已经被发现在 C-末端酰胺化(Simmaco 等人，*Eur. J. Biochem.*, 242:788-92. 1996)。Temporin A、B、C、D、E、F、G、H、K 和 L 的成熟形式分别示为 SEQ ID: 18、19、20、21、22、23、17、24、25 和 26。

如果可得到大范围 temporin 肽序列和编码这些肽的核酸序列，本领域的普通技术人员，采用标准的分子生物学技术，能够容易地生产这些肽和它们相应的核酸序列。

除了采用以上介绍的天然存在的 temporin 肽之外，采用与天然存在的 temporin 肽稍微不同，然而在植物中表达时仍然赋予增强的广谱病原体抗性的肽，也可以实施本发明，这对于本领域的熟练技术人员而言是明显的。从而，术语“temporin”也包括变异的 temporin 肽，以及天然存在肽的片段，它们显示与天然存在的 temporin 肽的特定序列同一性水平，或者通过一种或多种保守的氨基酸替换与天然的 temporin 肽不同。

这样的变异的肽和片段保留了 temporin 的生物活性，这种生物活性可通过以下描述的方法测定。如以下描述的方法测定的，一种变异的 temporin 具有天然存在的 temporin 肽(例如 SEQ ID: 17 表示的那种)至少 40%的氨基酸序列同一性。

temporin 生物活性: temporin 肽抑制细菌生长的能力。

5 给定的 temporin 肽的抗菌活性通过测定其抑制果胶分解性菌株例如胡萝卜欧文菌或大肠杆菌 DH5 α 的能力评估。通过在 LB 中连续地稀释肽并 100:1 等分试样至 96 孔微量滴定板的孔中测定给定肽的活性。新鲜的细菌培养物(~ 0.3 A550)接着在 Luria-Bertani 培养基(LB)中生长(1% w/v 胰胨和 0.5% w/v 酵母提取物)并在 LB 中稀释至 10^{-2} 以表示大约 10^4 — 10^5 菌落形成单位(CFU) ml^{-1} 。10:1 的细菌培养物然后接种入含有肽的孔中, 样品在 37 °C 培养 4 小时。孔的成分接着以 LB 稀
10 释, 涂在 LB 琼脂上并在 37 °C 培养过夜。接着数与每个 temporin 稀释液(和未加入肽的对照) 相对应的菌落, 试验下的肽的抗菌活性通过与对照板的比较测定。

15 本试验的条件下, 如果它在 100:g /ml 的浓度能够抑制至少 10% 的细菌生长(即, 在此浓度, 细菌菌落的数量不超过对照板的 90%), 就测定 temporin 肽具有生物活性,

20 给定 temporin 肽的抗真菌生物活性通过利用真菌菌株仙人掌疫霉和/或茄病镰孢菌评估。所选择的真菌菌株在五种谷物琼脂(含有 20 gL^{-1} 五种谷物婴儿食物方便薄片, 以及 8 gL^{-1} 琼脂³ 的 FCA (Terras 等人, The Plant Cell 7:573-588, 1995)上生长。室温下生长 5 天之后, 取出菌丝体塞并倒置在新鲜 FCA 板中心。一种试验肽的无菌溶液(10:1)接着引入距板边缘 3cm 的孔中, 在同一板上建立含无菌水的对照孔。在同一板上或者在另外的板上可以试验各种浓度的试验肽。试验板室温下
25 培养 5 天, 之后测量每个孔周围生长抑制区。

30 在本试验条件下, 如果它能够在 5:g /ml 的浓度抑制真菌生长(即, 含有这种浓度肽的孔周围有可辨别的抑制区), 就确定 temporin 肽具有生物活性。

转基因植物：如本文采用的，该术语指含有通常未在该种野生型植物中发现的重组遗传物质的植物。从而，由通过转化被引入放重组 DNA 的植物细胞生长的植物是转基因植物，含有引入的转基因的植物的一切后代（无论是有性还是无性繁殖）也是。

5

序列同一性：两个核酸序列，或者两个氨基酸序列之间的相似性，以序列之间共享的序列同一性的水平表示。序列同一性通常按照百分比同一性表示；百分比越高，两个序列越相似。

10

比较各种序列的对比方法在本领域是公知的。下列文献介绍了各种程序和对比算法：Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math*, 2:482, 1981; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-244, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS*, 5:151-153, 1989; Corpet 等人, *Nucleic Acids Research*, 16:10881-10890, 1988; Huang, 等人, *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-165, 1992; 以及 Pearson 等人, *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331, 1994。Altschul 等人, *Nature Gene* 6:119-129, 1994 介绍了一种关于序列对比方法和同源性计算的详细的考虑。

15

20

可以从几种来源得到 NCBI 基本局部序列对比搜索工具(BLAST) (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), 包括国家生物学信息中心 (NCBI, Bethesda, MD)和因特网上, 以和有关序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 一起使用。在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 可以访问它。在 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html可以得到如何采用该程序测定序列同一性的介绍。

25

30

用于本发明的天然存在的 dermaseptin 和 temporin 肽的变异体一般特征在于，当采用 NCBI Blast 2.0.1 对比时，与天然存在的 temporin

或 dermaseptin 的氨基酸序列全长对比, 具有至少 40% 的序列同一性 (Altschul 等人介绍, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997)。为了比较超过约 30 个氨基酸的氨基酸序列, 采用 Blast 2 序列功能, 缺省 BLOSUM62 矩阵设置成默认参数(间隙存在值 11, 每个残基间隙值 1)。

5 当对比短肽(小于大约 30 个氨基酸) 时, 采用 Blast 2 序列功能, PAM30 矩阵设置成默认参数(开放间隙 9, 延伸间隙 1 惩罚), 进行序列对比。当通过此方法评估时, 具有与参考肽更高相似性的蛋白质会显示更高的百分比同一性, 例如至少 45%, 至少 50%, 至少 70%, 至少 80%, 至少 85%, 至少 90% 或者至少 95% 的序列同一性。

10

重组: 重组核酸是一种具有非天然存在的序列, 或者具有一种通过两个单独的序列片段的人工结合制备的序列。这种人工结合通过由化学合成完成, 更通常地, 通过对分离的核酸片段的人工操作, 例如, 通过基因工程技术完成。

15

寡核苷酸(oligo): 一种长度至多大约 100 核苷酸碱基的线性多核苷酸序列。

20

探针和引物: 基于本发明提供的氨基酸序列, 可容易地制备核酸探针和引物。探针包括与可检测标记或报道分子连接的分离核酸。常规的标记包括放射性同位素、配体、化学发光剂和酶。标记方法和适用于各种目的的标记的选择指南, 参见, 例如, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene 出版公司和 Wiley-Intersciences, 1987。

25

30

引物是短核酸, 优选 DNA 寡核苷酸长 15 个核苷酸或更多。引物通过核酸的杂交可以被退火成互补的靶 DNA 链, 以在引物和靶 DNA 链之间形成杂合体, 接着通过 DNA 聚合酶沿靶 DNA 链延伸。引物对可以用于核酸序列的扩增, 例如通过聚合酶链反应 (PCR) 或者其它的

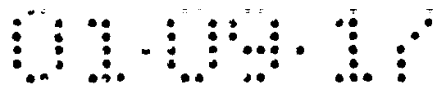
本领域公知的核酸扩增方法。

5 制备和使用探针和引物的方法参见，例如， Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989; Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Greene 出版公司和 Wiley-Intersciences, 1987; 以及 Innis 等人, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, 1990。PCR 引物对可以由公知序列衍生，例如通过采用以例如引物为目标的计算机程序 (0.5 版, © 1991, Whitehead 生物医学研究所, 剑桥, MA)。本领域的熟练技术人员会理解特定的探针或引物的特异性随其长度增加。因此，例如，一种包括
10 20 个连续核苷酸的引物会与具有比相应的仅有 15 个核苷酸的引物更高特异性的靶退火。因而，为了获得更高的特异性，可选择包括 20、25、30、35、40、50 或更多连续性核苷酸的探针或引物。

15 分离的一种“分离的”生物成分(例如核酸或蛋白质或细胞器)是已经从天然存在该成分的生物体细胞中与其它的生物学成分基本上分离或者纯化，即与其它的染色体和染色体外的 DNA 和 RNA、蛋白质和细胞器分离或从其中纯化出来。已经“分离的”核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语也包含通过在宿主细胞
20 中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

载体:一种核酸分子引入宿主细胞，因此产生一种转化宿主细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞克隆的核酸序列，例如复制起点。载体也可包括一种或多种可选择的标记基因和其它的本领域公知的遗传
25 因子。

可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列以功能关联放置时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，启动子可操作地连接在编码序列上。一
30 般地，可操作连接的 DNA 序列是邻接的，并且，必需将两个蛋白编



码以符合同一读框的方式连接。通过正常的肽键，或者通过其它的共价连接，两个肽序列可以可操作地连接。

II. dermaseptin 和 temporin 肽的选择

5 a. dermaseptin 肽

以上提供了一些示范性的 dermaseptin 肽。编码这些 dermaseptin 多肽的核酸分子或者通过遗传密码简单应用衍生至该肽序列，或者可采用天然存在的 cDNA 或基因序列。例如编码 dermaseptin-b 的 cDNA 序列如 SEQ ID: 1 所示(并且公开在 Amiche 等人, J. Biol. Chem. 10 269:1747-852, 1994)。一般地，选择适于表达的成熟形式的 dermaseptin 肽。然而，可以选择全长 dermaseptin 肽的任意片段，随具有 dermaseptin 生物活性的片段而定，如果它用于生产抗病原体植物。

本领域的普通技术人员可理解，具有不同程度的抗菌活性的各种 15 dermaseptin 肽，它具有比其它的更有效地抗某些病原体的作用。因此，当选择肽用于生产具有增强的耐病原体性的转基因植物时，在各种因素中，具体的 dermaseptin 的选择取决于要表达肽的植物的种类，以及通常感染那种植物种类的病原体的种类。

20 选择好所希望的要表达的 dermaseptin，可通过标准分子生物学技术制备编码该肽的核酸分子。由于 dermaseptin 肽相对短，合成该核酸分子最简单的方法很可能是在商业上可得到的寡核苷酸合成仪上经由合成重叠寡核苷酸而进行。接着将寡核苷酸体外组装成全长编码区。这种方法也允许选择编码反映其中要引入核酸分子的植物的密码子使用 25 偏向性的特定氨基酸残基的密码子，从而增强表达效率。在以下的实施例中提供采用这种方法的编码序列的产生的详细实例。

b. temporin 肽

30 以上提供了一些示范性 temporin 肽。编码这些 temporin 多肽的核酸分子或者通过遗传密码简单应用衍生至该肽序列，或者采用天然

存在的 cDNA 或基因序列。例如，如 SEQ ID: 15 所示的编码 temporin G 的 cDNA 序列。一般地，选择适于表达的成熟形式的 temporin 肽。然而，可以选择全长 temporin 肽的任意片段，随具有 temporin 生物活性的片段而定，如果它用于生产抗病原体植物。

5

当选择 dermaseptin 肽时，本领域的普通技术人员可理解，具有变动程度的抗菌活性的各种 dermaseptin 肽，它具有比其它的更有效地抗某些病原体的作用。因此，当选择肽用于生产具有增强的耐病原体性的转基因植物时，在各种因素中，特别的 temporin 的选择取决于要表达肽的植物的种类，以及引起那种植物种类损失的病原体的种类。

10

如以上对 dermaseptin 的介绍，重叠寡核苷酸的合成和装配是一种简单和方便的生产编码 temporin 的核酸分子的方法。

15

c. 其它肽序列的添加

在转基因植物中 temporin 和 dermaseptin 蛋白也可以以融合蛋白的形式表达。尽管可以将选择的适于在植物中表达的 temporin 和 dermaseptin 蛋白与任何所希望的肽融合，但包括一种可操作地连接在 dermaseptin 或 temporin 氨基端的阴离子前区肽的融合蛋白的表达预期是特别有益的。为了这种目的可以采用任何阴离子前区肽，包括在天然存在的全长(即，未加工)dermaseptin 和 temporin 肽中发现的阴离子前区。例如，包括 temporin G 的 23-46 位氨基酸的前区(显示为 SEQ ID: 16)可以用作一种前区。这样的前区肽用以中和 dermaseptin 或 temporin 的阳离子本质，从而可在细胞环境中提供增强的稳定性。因此，这些区域通常包括大量的带负电荷的氨基酸，例如谷氨酸(Glu 或 E)和天门冬氨酸(Asp 或 D)。

20

25

30

本领域公知的其它天然存在的前区肽的例子包括以下蛋白的前区肽：人嗜中性防卫素蛋白 (Daher 等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85:7327-7331, 1988); 牛抗菌性 cathelicidin 蛋白 BMAP28 (Skerlavaj 等

人, *J. Biol. Chem.* 271: 28375-381, 1996); 绵羊抗菌性 cathelin 家族蛋白 (Mahoney 等人., *FEBS Lett.* 377:519-522, 1995); 牛 indolicidin (Del Sal 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:467-472, 1992); 猪抗菌肽 prophenin-2 和 PR-39 (Zhao 等人, *FEBS Lett.* 367:130-134, 1995) 和 PMAP-37 (Tossi 等人, *Eur. J. Biochem.* 15:941-946, 1995); 人抗菌脂多糖结合蛋白 CAP18 (Larrick 等人, *Infect. Immun.* 63:1291-1297, 1995); 以及鼠蛋白 E3 (Scott 和 Collins, *Blood* 88:2517-2530, 1996)。

5 10 15 20 尽管阴离子前区肽可直接与阳离子肽 N-末端结合, 另一实施方案包括采用间隔肽序列连接前区肽至 dermaseptin 或 temporin 肽。在本领域连接两个肽域的间隔肽的使用是公知的; 这样的间隔肽长度通常是 2 和 25 氨基酸之间, 并提供灵活的连接第一肽序列至第二肽的铰合部。已经用于提供连接两个肽序列的灵活的铰合部的间隔序列包括甘氨酸 glycine(4)—丝氨酸间隔(GGGGS x3), 由 Chaudhary 等人描述, *Nature* 339: 394-397, 1989。如下介绍的 N—末端肽延伸也可用于提供间隔肽功能。间隔序列肽也可包括剪切位点, 例如由蛋白酶识别和剪切的肽序列, 如因子 Xa。这样的位点有助于在从植物组织中纯化之后从 dermaseptin 或 temporin 清除前区。在微生物体系中采用阴离子前区肽和间隔肽以表达某些阳离子肽在本领域是公知的, 并且在授予 Hancock 的美国专利 5,593,866 中。

25 30 在某些实施方案中, N-末端延伸肽序列可以被加入 dermaseptin 或者 temporin 肽。这样的肽延伸可包括通常在蛋白加工期间清除的 dermaseptin 或 temporin 的前体形式的部分, 或者可以是合成的序列。这些 N-末端肽延伸用于提供增强的抗蛋白水解剪切性, 增强转录水平或增强这些肽的抗菌活性。一般地, 这些 N-末端延伸长度在 2 和 25 氨基酸之间, 尽管也可以采用更长的延伸。在某些实施方案中采用的 N-末端延伸序列的例子包括肽序列 AMWK、ASRH 以及 ALWK。AMWK (SEQ ID: 39) 序列是天然存在的肽延伸; 它是全长 dermaseptin-b 肽的部分, 通常在加工过程中剪切掉。已经报道向 dermaseptin b 肽

的 N-端添加这种序列 (以产生 dermaseptin B)可增强该肽的体外抗菌活性 (Strahilevitz, Biochemistry, 33:10951-10960, 1995)。ASRH (SEQ ID: 41)和 ALWK (SEQ ID:41)肽是合成的延伸序列。在每个情形下, 加入 N-末端的蛋氨酸以确保这种肽的合适的延伸。本领域的熟练技术人员可理解加入任何特定的 N-末端延伸肽的对生产中的肽(dermaseptin 或 temporin)的生物学活性的影响, 可以采用以上介绍的生物学活性试验容易地评估。

d. dermaseptin 和 temporin 肽变异体

如上描述的, 大量的天然存在的 temporin 和 dermaseptin 肽是公知的, 通过显示在序列表里的那些例示。通过引入氨基酸替换、添加的氨基酸残基或者通过删除氨基酸残基, 可以选择这些天然存在的肽的变异体。这些变异肽或者通过化学合成生产 (例如, 以便确认这种变异肽保留功能活性), 或者在生物学表达体系中生产。在后一种情况下, 可以操作编码相应天然存在的肽的核酸序列以便它编码变异肽。这可以通过许多方法实施, 例如通过采用定点诱变或者聚合酶链反应。由于这种肽是相对短分子, 变异肽的编码区还可以简单地从头合成并引入适合的表达载体。

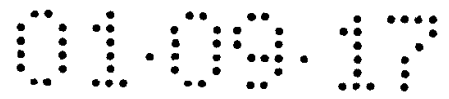
氨基酸序列的最简单的修饰包括用一种或多种氨基酸替换具有类似生物性能的氨基酸。这些所谓的保守替换很可能对所得的蛋白质活性具有最小的影响。因此, 通过一种或多种保守的氨基酸替换与天然存在的 temporin 或 dermaseptin 不同的肽, 在本发明中可以用于代替天然存在的肽。表 1 显示在蛋白质中可替换原始的氨基酸并且被认为是保守替换物的氨基酸。

表 1

原始残基	保守替换物
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

5 通过选择比表 1 的那些不保守的替换物，可以得到更多的在功能或其它特征上实质上的变化，即选择在其下述作用上明显不同的残基：保持(a)替换区多肽骨架结构，例如，如折叠或螺旋构造，(b)靶位分子的电荷或疏水性，或者(c)侧链的大小。一般希望在蛋白性能上产生最大变化的替换物是那些基团，其中(a)一种亲水性残基，例如丝氨酰基或者苏氨酰基，替换掉疏水性残基，例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或者丙氨酰基（或被其替换）；(b)半胱氨酸或脯氨酸替换掉任何其它残基（或被其替换）；(c)一种带正电侧链

10



的残基，例如赖氨酰基、精氨酰基、组氨酰基，替换掉带负电的残基，
例如谷氨酰基或天冬氨酰基（或被其替换）；或者(d)具有大侧链的残
基，例如苯丙氨酸，替换掉一种不具有侧链的基团例如甘氨酸（或被
其替换）。本发明也可采用具有这些更实质的变化中的一种或多种的
5 变异肽，条件是保留 **temporin** 或 **dermaseptin** 生物学活性。

更广泛的氨基酸变化也可在变异 **dermaseptin** 或 **temporin** 进行。
然而如上注解的，采用以上介绍的对比程序与它们各自的天然存在序
列的氨基酸序列全长对比时，这些变异肽通常特征在于，计算出它们
10 具有至少 40%序列同一性。此外，这些变异肽保留生物学活性。

采用以上介绍的试验体系可以确认 **dermaseptin** 或 **temporin** 肽具
有生物学活性。确认肽具有希望的活性之后，采用标准分子生物学技
术可以容易地生产编码该肽的核酸分子。合适时，开放读框的选择要
15 考虑其中要表达肽的植物种的密码子使用偏向性。

III. **dermaseptin** 和/或 **temporin** 引入植物

一旦生产了编码 **dermaseptin** 和/或 **temporin** 肽的核酸序列，可以
采用标准技术以在转基因植物中表达该序列，以便赋予植物抗病原体
20 性。基本方法是克隆核酸进入转化载体，这样以致于它可操作地与指
引该核酸在植物细胞表达的控制序列(例如启动子)连接。这种转化载
体接着通过许多技术中的一种(例如，电穿孔法)引入植物细胞，整个
植物由这些细胞再生，选择含有这些引入的核酸的后裔植物。优选地，
一切或者部分的转化载体稳定整合入植物细胞基因组。整合入植物细
25 胞并含有引入序列以及用于控制表达的有关的序列(引入的“转基因”)
的转化载体的那部分被称为重组表达盒。

含有引入转基因的后裔植物的选择可基于检测改变的表型进行。
这样一种表型可直接来自引入序列所赋予的抗病力，或者作为导入到
30 转化载体中的可选择显性标记基因引入的结果，被证明具有对化学

试剂(例如抗生素)增强的抗性。

在技术和科学文献中充满了特征为用克隆核酸序列转化的植物改性的成功的例子。所选择的用于说明本技术领域所述知识的例子包括：

美国专利 5,571,706 (“植物病毒抗性基因和方法”)

美国专利 5,677,175 (“植物病原体诱导蛋白”)

美国专利 5,510,471 (“用于植物转化的嵌合基因”)

美国专利 5,750,386 (“抗病原体转基因植物”)

美国专利 5,597,945 (“遗传增强抗病力的植物”)

美国专利 5,589,615 (“通过已修饰的 25 贮存清蛋白的表达具有改善的营养值的转基因植物的生产方法”)

美国专利 5,750,871 (“芸苔种的转化和外源基因表达”)

美国专利 5,268,526 (“转基因植物中植物色素的超量表达”)

美国专利 5,780,708 (“可繁殖的转基因玉米植物”)

美国专利 5,538,880 (“可繁殖的转基因玉米植物的生产方法”)

美国专利 5,773,269 (“可繁殖的转基因燕麦植物”)

美国专利 5,736,369 (“转基因谷类植物的生产方法”)

美国专利 5,610,042 (“小麦的稳定的转化方法”).

这些例子包括介绍转化载体的选择、转化技术以及被设计用于超量表达所引入的转基因的构建体的构建。

a. 植物种类

由许多病原体引起的疾病作用于多种植物种。这些植物是单子叶植物、双子叶植物或裸子植物。因此，例如， **dermaseptin** 和/或 **temporin** 肽可以引入的植物种包括，但是并非限于，玉米、小麦、稻、大麦、大豆、棉花、一般意义的豆、油菜/菜籽(**canola**)、紫花苜蓿、亚麻、向日葵、红花、芸苔、棉花、烟草、亚麻、花生、三叶草、豇豆、葡萄；蔬菜，例如莴苣、西红柿、葫芦、木薯、马铃薯、胡萝卜、

萝卜、豌豆、小扁豆、甘蓝、花椰菜、椰菜、芽甘蓝、胡椒；树果实例如柑橘、苹果、梨子、桃子、杏、胡桃；毛皮树例如花旗松和火炬松；和花，例如康乃馨和玫瑰。

5 b. 载体构建和启动子选择

已经介绍了大量适于植物细胞稳定转染或者转基因植物确立的重组载体，包括在 Pouwels 等人, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp., 1987; Weissbach 和 Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 5:173-184, 1989; 以及 Gelvin 等人, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer 学院出版社, 1990 中介绍的那些。通常，植物转化载体包括在 5'和 3'调节序列和显性选择标记控制下的一种或多种已克隆的序列。这样的植物转化载体通常也包含启动子调节区（例如，一种控制诱导或组成型、经环境或发育调节的、或者细胞或组织特异性表达的调节区）、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA 加工信号、转录终止位点和/或多腺苷酸化信号。可用于表达一种转基因的组成型植物启动子包括：花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子，它能够在大多数植物组织中赋予组成型、高水平的表达（参见例如，Odel 等人, *Nature*, 313:810, 1985; Dekeyser 等人, *Plant Cell*, 2:591, 1990; Terada 和 Shimamoto, *Mol. Gen. Genet.* 220:389, 1990;以及 Benfey 和 Chua, *Science*, 250:959-966, 1990); 胭脂氨酸合酶启动子 (An 等人, *Plant Physiol.* 88:547, 1988); 章鱼氨酸合酶启动子 (Fromm 等人, *Plant Cell*, 1:977, 1989) 以及具有易位增强序列的 2x CaMV/35S 启动子(Kay 等人, *Science*, 236:1299-1302, 1987)。

25 响应环境、激素、化学和/或发育信号而被调节的各种植物基因启动子也可以用于在植物细胞中转基因的表达，包括由以下因素调节的启动子：(a)热(Callis 等人, *Plant Physiol.*, 88:965, 1988; Ainley 等人., *Plant Mol. Biol.*, 22:13-23, 1993;和 Gilmartin 等人, *The Plant Cell*, 4:839-949, 1992) (b)光(例如，豌豆 *rbcS-3A* 启动子, Kuhlemeier 等人 *Plant Cell*, 1:471, 1989, 和玉米 *rbcS* 启动子, Schaffner & Sheen, *Plant Cell*,

3:997, 1991); (c) 激素,例如脱落酸(Marcotte 等人, *Plant Cell*, 1: 471, 1989); (d) 创伤 (例如, 马铃薯 PinII 启动子 (Keil 等人, *Nucl. Acids. Res.* 14: 5641-5650, 1986), 农杆菌属 mas 启动子 (Langridge 等人 *Bio/Technology* 10:305-308, 1989), 和葡萄藤 vst1 启动子 (Weise 等人, *Plant Mol. Biol.*, 26:667-677, 1994); 和(e) 化学品例如茉莉酮酸甲酯或水杨酸 (亦参见 Gatz 等人. *Plant Mol. Biol.* 48:89-108, 1997)。

组织特异性 (例如根、叶、花和种子)启动子(Carpenter 等人, *The Plant Cell* 4:557-571, 1992; Denis 等人, *Plant Physiol.* 101:1295-1304, 1993; Opperman 等人, *Science* 263:221-223, 1993; Stockhause 等人, *The Plant Cell* 9:479-489, 1997; Roshal 等人, *The EMBO J.* 6:1155, 1987; Scherthaner 等人, *EMBO J.* 7:1249, 1988; Yamamoto 等人, *Plant Cell* 3:371-382, 1990; and Bustos 等人, *Plant Cell* 1:839, 1989)也可以被融合入编码序列以获得在各个器官中特定的表达。

植物转化载体也可以包括 RNA 加工信号, 例如, 内含子, 它可以位于该转基因 ORF 序列的上游或者下游。此外, 表达载体也可包括来自植物基因的 3'-非翻译区的其它调节序列, 例如, 一种增强 mRNA 的 mRNA 稳定性的 3'终止区, 如马铃薯的 PI-II 终止区或者章鱼氨酸或胭脂氨酸合酶 (NOS) 3' 终止区。

最后, 如上注明的, 植物转化载体也可包括显性选择标记基因, 以允许易选择出转化体。这些基团包括编码抗生素抗性基团(例如, 抗潮霉素、卡那霉素、博莱霉素、G418、链霉素或奇放线菌素)和抗除草剂基因 (例如, 膦丝菌素乙酰基转移酶)的那些。

c. 转化和再生技术

单子叶植物和双子叶植物的植物细胞的转化和再生现在是常规的, 专业人员可以确定恰当的转化技术。方法的选择随待转化的植物类型改变; 本领域熟练技术人员会识别特定方法对于给定植物种类的

适当性。适当的方法包括，但并非限于：植物原生质体的电穿孔；脂质体介导的转化；聚乙二醇(PEG)介导的转化；采用病毒的转化；植物细胞微注射；植物细胞微粒轰击；真空渗入；以及根瘤农杆菌(AT)介导的转化。本章节开始列出的专利文献描述了转化和再生植物的典型步骤。

d. 已转化植物的选择

采用转化载体进行植物转化和再生后，通常采用掺入转化载体的显性选择标记选择已转化的植物。通常地，这样的标记会赋予已转化植物的秧苗以抗生素抗性，转化体的选择可通过暴露秧苗至适当浓度的抗生素完成。

选择也可通过利用经转基因赋予植物的病原体抗性完成。如以下实施例介绍的，这样的筛选或者在转基因植物已经再生之后完成，或者(取决于采用的转化方法)于植物再生之前在绿化转基因愈伤组织上进行。

IV. 含多阳离子肽编码区的植物

一些情形下，由编码 *dermaseptin* 或 *temporin* 肽的转基因单一拷贝赋予的抗性水平，可以通过引入单一阳离子肽基因的多次拷贝或者编码不同阳离子肽的几个基因增强。

通过采用基因工程，将多阳离子肽编码区引入单一载体是可能的。通常地(尽管非必需地)，这样的载体包括两种或多种 *dermaseptin* 和/或 *temporin* 开放读框，每个可操作地与其自身 5'和 3'调节序列连接。当被引入植物时，这样的载体可导致多种阳离子肽的表达。

含多转基因的植物的创造也可通过采用标准育种技术完成。编码第一阳离子肽的转基因可以被引入第一植物，编码第二阳离子肽的第二转基因可以被引入第二植物。所得的转基因植物接着可杂交以生产

载有两种转基因的后代。

V. dermaseptin 和 temporin 的生产和分离

5 以上介绍的组合物和方法不仅可以用于生产具有增强的、广谱病原体抗性的植物，而且也可以用于适于广泛其它用途的 dermaseptin 和 temporin 的大规模生产。例如，植物中大量产生的 temporin 和 dermaseptin 可以纯化和用于医疗用途。

10 植物中生物活性肽的生产现在已广泛实施，大批的表达和纯化方法是公知的。促进植物中生物学活性蛋白产生的构建体例子可以在 Goodman 等人的美国专利 4,956,282 中发现。这些构建体例子通常包含启动子区和编码后来在纯化加工中利用的氨基酸序列的附加核酸序列。用于促进 dermaseptin 和/或 temporin 肽分离的氨基酸序列随后可以剪切且丢弃。

15

实施例

1. 编码 dermaseptin 和 temporin 肽的核酸序列的选择和创造

a. dermaseptin 编码序列

20 核酸分子设计为 dermaseptin b 的成熟的 27 个氨基酸长度形式 (SEQ ID: 3)，具有 5 个氨基酸的 N-末端延伸序列，MAMWK。这种核酸构建体命名为 MSRA₂ 并且在单一 PCR 反应中采用四个重叠寡核苷酸合成。采用的寡核苷酸如表 2 所示。头两个寡核苷酸 (寡核苷酸#1 和寡核苷酸#2) 分别包含编码肽的 N-末端和 C-末端部分的核酸序列。在
25 PCR 反应中采用的这些寡核苷酸浓度为 20 nM。后两个寡核苷酸包含通过各种限制酶识别的序列。具体地，寡核苷酸#3 包含 XbaI、KpnI 和 NcoI 的限制位点，寡核苷酸#4 包含 SstI、PstI 和 HindIII 的限制位点。在 PRC 反应中采用的这些寡核苷酸浓度为 200 nM。产品扩增之后，采用嵌入限制位点将它克隆进常规的克隆载体。MSRA₂ 编码区的
30 核酸序列显示为 SEQ ID: 27，被编码的肽显示为 SEQ ID: 28。寡核苷

酸# 1-4 显示为 SEQ ID: 29-32。

表 2

5	寡核苷酸# 1: 5' - <u>ATG GCC ATG TGG AAA GAC GTT CTG AAA AAG</u> (SEQ ID: 29) ATC GGT ACT GTC GCC CTC CAT GCA GGG - 3'
	寡核苷酸# 2: 3' - TGA CAG CGG GAG GTA CGT CCC TTC CGG CGC (SEQ ID: 30) GAA CCT CGT CAT <u>CGG CTG TGG TAG AGC GTC ATT</u> - 5'
10	寡核苷酸# 3: 5' - TCT AGA GGT ACC <u>ATG GCC ATG TGG AAA GAC G-</u> (SEQ ID: 31) <u>3'</u>
15	寡核苷酸# 4: 3' - <u>GGC TGT GGT AGA GCG TCA TTC TCG AGA CGT CTT</u> (SEQ ID: 32) CGA AC - 5'

粗体核苷酸代表寡核苷酸#1 和寡核苷酸#2 之间的互补性区域。寡核苷酸#1 的下划线部分与寡核苷酸#3 的下划线部分一样，因此允许寡核苷酸#3 与源自寡核苷酸#1 和#2 开始延长的 PCR 产物结合。同样地，寡核苷酸#4 的下划线部分与寡核苷酸#2 的下下划线部分一样。这允许寡核苷酸#4 与由寡核苷酸#1 和#2 的延长创造的 PCR 产物结合。

25 b. temporin 编码序列

核酸分子设计为 temporin A 的成熟的 13 个氨基酸长度形式，其具有 6 个氨基酸的 N-末端延伸序列，MASRHM (SEQ ID: 33)。这种核酸构建体命名为 MSRA₃ 并且在单一 PCR 反应中采用四个重叠寡核苷酸合成。采用的寡核苷酸如表 3 所示。头两个寡核苷酸 (寡核苷酸#1 和寡核苷酸#2) 分别包含编码原型肽的核酸序列。然而，和用于编码

原型 dermaseptin 肽的寡核苷酸不同，这些寡核苷酸是完全互补的，从而消除了寡核苷酸#3 和#4 结合之前对起始延伸循环的需要。在 PCR 反应中采用的寡核苷酸#1 和寡核苷酸#2 的浓度为 20 nM。后两个寡核苷酸包含通过各种限制酶识别的序列。具体地，寡核苷酸#3 包含 XbaI、KpnI 和 NdeI 的限制位点，寡核苷酸#4 包含 SstI 和 PstI 的限制位点。在 PCR 反应中采用的这些寡核苷酸浓度为 200 nM。

产品扩增之后，采用嵌入限制位点将它克隆进常规的克隆载体。MSRA₃ 编码区的核酸序列显示为 SEQ ID: 33，已编码的肽显示为 SEQ ID: 34。寡核苷酸# 1-4 显示为 SEQ ID: 35-38。

表 3

寡核苷酸# 1: 5' – **ATG TTT CTG CCC CTA ATC GGG AGG GTT CTC**
(SEQ ID: 35) **TCG GGA ATC CTG TAA** – 3'

寡核苷酸# 2: 3' – **TAC AAA GAC GGG GAT TAG CCC TCC CAA GAG**
(SEQ ID: 36) **AGC CCT TAG GAC ATT** – 5'

寡核苷酸# 3: 5' – GGT ACC TCT AGA CAT **ATG TTT CTG CCC CTA** – 3'
(SEQ ID: 37)

寡核苷酸# 4: 3' – **GAG AGC CCT TAG GAC ATT** CTC GAG ACG TC – 5'
(SEQ ID: 38)

粗体核苷酸表示寡核苷酸#1 和寡核苷酸#2 之间的互补性区域。如表里描述的这些序列是完全互补的。寡核苷酸#2 下划线部分与寡核苷酸#3 下划线部分互补，寡核苷酸#1 下划线部分与寡核苷酸#4 下划线部分互补。

所得的双链 DNA 接着克隆进一种或多种以下描述的载体。

2. 含各种启动子序列的载体

5 编码 MRSA₂ 和 MRSA₃ 的核酸序列装配入各种植物转化载体，从而将其置于各种不同的启动子控制下。

10 克隆 MRSA₂ 和 MRSA₃ 序列进入一种这样的载体，将不同的序列置于包含 CaMV 35S 启动子的两个拷贝和 AMV RNA4 翻译增强元件的启动子的控制下(Kay 等人, *Science* 236:1299-1302, 1987)。由连接入该载体所得的克隆以前缀 pD 作为名称。因此，pDMSRA₂ 表示包含在双 CaMV 35S 启动子和 AMV RNA4 翻译增强子控制下的含有 MSRA₂ 构建体的载体。同样地，pDMSRA₃ 表示包含在双 CaMV 35S 启动子和 AMV RNA4 翻译增强子控制下的含有 MSRA₃ 构建体的载体。

15 设计了另一种载体，以使 MSRA₂ 构建体受重建“超级启动子”的控制。这种启动子包含在 ocs (章鱼氨酸合酶)上游活化序列(反向)三联体之后的 mas (甘露氨酸合酶) 启动子/活化区(Langridge 等人, *Bio/Technology* 10:305-308, 1989)。这种超级启动子更详细地介绍参见 Ni 等人, *The Plant J.*, 7: 661-676, 1995。这种特别的构建体也包括 6 x His 标记的编码区，位于 MSRA₂ 编码区上游并可操作地与其连接。因此，将这种 6 x His 标记氨基酸序列表达为附加至被编码的 dermaseptin/MAMWK 肽的 N-末端。编码这种肽的载体被命名为 pRSHMSRA₂。

25 3. 马铃薯和烟草的转化

马铃薯品种，Russert Burbank 和 Desiree，以及烟草被用作适于转化的代表性植物品种。按照 DeBlock, *Theoret. Appl. Genet.* 76:767-774, 1988，加以一些改变，来实施植物的转化。

30 简要地，通过从 4 周龄枝分离叶子(5 mm)和茎来实施烟草和马铃薯

薯的转化。切下这些叶和枝并且通过以玻璃移液管尖刮擦进一步损伤。受伤的叶子和茎接着在含 15ml 的 S2 培养基的皮氏培养皿中颠倒漂浮。这种培养基包含如 Murashige 和 Skoog, *Physiol. Plant.* 15:473-479, 1962 所列的成分, 补充有 30 g/L 蔗糖、pH 5.5 的 0.5 g/L MES 和 20 g/L 甘露醇。

5

含有农杆菌(以感兴趣的载体转化)的 60 μ l 的 LB 培养基在后对数生长期加入每个培养皿, 这些培养皿接着在低光强度(500 lux)下在农杆菌存在下培养 3 天。接着以含有 1 g/L 羧苄青霉素的 S2 培养基洗涤植物组织, 以滤纸吸干, 颠倒置入 S4 培养基。S4 培养基包含 Murashige 和 Skoog, *Physiol. Plant.* 15:473-479, 1962 列出的成分, 减去蔗糖并补充 200 mg/L 谷氨酸、pH 5.7 的 0.5 g/L MES、0.5 g/L PVP、20 g/L 甘露醇、20 g/L 葡萄糖、40 mg/L 腺嘌呤-SO₄、0.5%琼脂糖、1 mg/L 反式玉米素、0.1 mg/L NAA、1 g/L 羧苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素、10 mg/L AgNO₃)。室温(RT)下在 3000 lux 下放置植物组织样品以允许愈伤组织形成。两周之后, 在叶和茎的伤口边缘形成了许多小愈合组织 (Calli)。取出小愈合组织并转移入新鲜 S6 培养基(不含 NAA 的 S4)。2-3 周之后, 这些愈合组织转移入 S8 培养基(补充了 0.1 mg/L GA₃ 的 S6) 以允许形成芽。

10

15

20

在 S8 培养基放两周之后, 第一批芽(0.5 cm)转移至 S1 培养基。该培养基包含 Gamborg 等人描述的成分 (*Exp. Cell Res.* 50:151-158, 1968), 并还加入 20 g/L 蔗糖、150 mg/L CaCl₂、pH 5.8 的 0.4%琼脂糖、1 g/L 羧苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素。S1 培养基和芽放入 Magenta 瓶以允许根形成。一周之后芽已生根。为了避免选择相同的根, 避免从同一或紧密连接的愈合组织转移芽。

25

再生的推定的转基因植物转入含 1 g/L 羧苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素的 MS 培养基以进一步分析。

30

4. 抗病性愈合组织的筛选

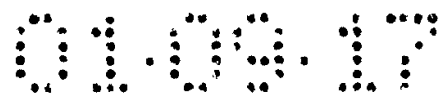
发展了适于抗病试验的简化早期检测方法。对照和转基因愈合组织生长在 S4 培养基 (MS 培养基, 其中无蔗糖并补充 200 mg/L 谷氨酸、pH 5.7 的 0.5 g/L MES、0.5 g/L PVP、20 g/L 甘露醇、20 g/L 葡萄糖、40 mg/L 腺嘌呤-SO₄、0.5% 琼脂糖、1 mg/L 反式玉米素、0.1 mg/L NAA、1 g/L 羧苄青霉素和 50 μg/ml 卡那霉素、10 mg/L AgNO₃)。样品接着在 RT 和 3000 lux 下放置以允许愈伤组织形成。两周之后, 在叶和茎的伤口边缘形成了许多小愈合组织。取出小愈合组织并转移入新鲜 S6 培养基(无 NAA 的 S4)。2-3 周之后, 愈合组织转移至新鲜培养基并在植物病原体, 镰孢菌属或疫霉属存在的条件下生长。实验结尾, 记下存活并保持明亮绿色的愈合组织。在对照样品中未发现抗真菌性愈合组织, 发现抗真菌病原体的愈合组织已转化。

5. 转基因植物的分子鉴定

采用以下描述的方法从转基因马铃薯和烟草植物中分离 DNA。进行纯化, 在某些情形下涉及一种更严格的方案, 在其它情形下涉及一种简单的粗提取步骤。通过获得 10 克的新鲜叶组织并且立即在液氮中冷冻样品, 开始更严格的提取步骤。冷冻过的组织接着研成细粉并以 20 ml 提取缓冲液 (50 mM Tris-HCl 缓冲液、5 mM EDTA、0.35 M 山梨醇、0.1% BSA、0.1% β 巯基乙醇、10% PEG 4000) 提取。通过几层粗棉布和一层微孔布过滤匀浆。接着按照 Wagner 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:2097-5100, 1987, 实施最后的纯化步骤。

当为 PCR 分析目的进行分离时, 主要采用粗提取步骤。对于此步骤, 收集大约 200 mg 的新鲜叶并在液氮中研成粉状。100 μl 的 0.5 N NaOH 加入粉末中并混合 (旋转) 30 秒。这种悬浮液离心 5 分钟, 5 μl 上清液加入 45 μl 的 100 mM 的 Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中。这种粗基因组 DNA 提取物被用作 PCR 扩增的模板。

通过用提取的基因组 DNA 和以上表 2 的寡核苷酸# 3 和# 4 实施



PCR 反应，进行 MSRA₂ 构建体存在与否的检测。来自此反应的期待的产物大小是 129 bp。这种方法允许鉴定用 pDMSRA₂ 或 pRSHMSRA₂ 构建体转化的转基因烟草和马铃薯。

5 通过用上表 3 的寡核苷酸# 3 和# 4，或者以特异性针对 2 x 35S CaMV 启动子的引物和上表 3 的寡核苷酸#4 的组合，实施 PCR 反应，进行 MSRA₃ 构建体的检测。鉴别出含有 pDMSRA₃ 构建体的转基因烟草植物。

10 在含有在 ocs (章鱼氨酸合酶)上游活化序列(反向)的三联体之后的 mas (甘露氨酸合酶) 启动子/活化区的超级启动子的控制下，也将对照植物改造成包含 GUS 基因 (Ni 等人, The Plant J. 7: 661-676. 1995)。经 PCR 技术确认这种转基因已插入烟草植物基因组。

15 某些情形下，通过 Northern 印迹分析确认转基因的活性表达。从转基因烟草和马铃薯植物中分离和纯化出用于这些实验的 RNA 底物。按照 Verwoerd 等人, Nucl. Acids Res. 17:2362, 1989，实施用于这种分离的方案。

20 6. 抗细菌病原体性

 为了检测这种转基因马铃薯和烟草植物对细菌病原体胡萝卜欧文菌的抗性，室温下让这种细菌在 LB 培养基生长整夜 (A600= 2.9)。2 ml 等分量的欧文菌培养物在 dH₂O 中稀释 5 倍，1 ml 稀释的培养物加入 2 ml MS 液体培养基中并用于这种抗菌试验。从转基因植物或对照植物上新切的枝 (~3.5 cm)插入含有已稀释的欧文菌培养物的试管以致该植物切边的底部浸入细菌培养物中。试验管室温下在 3000 lux 培养下并间歇地观察。

 含有 pDMSRA₂ 的转基因马铃薯植物和含有 pDMSRA₂ 或
30 pRSHMSRA₂ 的转基因烟草植物如上介绍进行试验，并显示抗病原体

性: 在细菌培养物存在下生长一周之后, 这种转基因植物未受感染 (通过视觉检查确定) 并持续生长。大不相同地, 与细菌培养物斗争的对照植物在培养一周之后严重感染, 生长被抑制, 在暴露至真菌病原体 2-3 周之后植物死亡。

5

为了检测转基因马铃薯块茎对细菌病原体 *Erwinia carotovora* cv *carotovora* 的抗性, 在块茎圆盘上开一小孔 (直径 2 cm, 厚 3 cm)。20 微升的 100x 稀释的隔夜的细菌培养物 (大约 2×10^7 CFU) 移放孔中, 盘在室温下培养 6 天。从盘上轻轻地清除腐烂的组织, 测定块茎组织的重量损失。由此试验得到的结果显示, 与非转基因对照组比较, 转基因的马铃薯组织抗软腐病(图 1)。

10

在微量滴定板中, 以含有大约 1×10^5 细菌/ml 和指定浓度抗菌肽的 220 μ l 最后体积, 测定抗菌肽 (SEQ ID NO: 34 (MRSA₃) 和 SEQ ID NO: 28 (MRSA₂)) 对抗大肠杆菌 (图 2) 和胡萝卜欧文菌 (图 3) 的抗菌作用。细胞培养物室温下培养 4 小时, 稀释并涂在 LB 板上。在 37°C (大肠杆菌) 或 28°C (胡萝卜欧文菌) 过夜培养之后, 菌落计数并记录存活的细菌。两个试验结果显示该肽具有显著的抗菌活性。

15

20 7. 抗真菌性

采用下列方案测定成熟植物对各种真菌的抗性。切 $1 \text{ cm}^2 \times 0.5 \text{ cm}$ 的包含镰孢菌属或疫霉属 (*Phytophthora* sp.) 培养基片并放入 9cm 的培养皿中的 V8 琼脂培养基 (250 ml/L V8 汁, 7 克/L 琼脂) 新鲜板的中心, 并在室温下生长大约一个月, 或者直到真菌菌丝体彻底覆盖该培养皿。切下转基因植物的芽 (~10 cm) 并转入 MS 培养基以进一步生长。按照各种处理, 允许植物生长 3 天或 2 周直到芽生根。不伤害植物, 接着将两片 $1 \text{ cm}^2 \times 0.5 \text{ cm}$ 的真菌琼脂切片施加至植物芽的两侧。然后视觉确定所得的感染程度。

25

30 在典型的试验中, 以 pDMSRA₂ 转化的转基因马铃薯植物, 以

pRSHMRS_{A2} 或 pDMSR_{A2} 转化的烟草植物，以及对照的马铃薯和烟草植物暴露在仙人掌疫霉下。7 天之后，仙人掌疫霉已在 MS 培养基的整个表面生长，并透入对照植物的根和茎，引起对重要植物功能的损害。对照植物的根被严重损害，这是明显的。植物和真菌之间相互作用引起指示腐败过程的黄-棕色色素的分泌。随后，植物失水，叶子卷曲，茎的底部变柔软，根死亡。然而，转基因植物依然健康并无疾病症状，即使真菌菌丝体完全覆盖 MS 培养基。

以上介绍的实施也用于试验转基因植物对蔓延疫霉的抗性。这些试验结果显示转基因植物对蔓延疫霉也具有抗性。

进行用茄病镰孢菌进攻 pDMSR_{A2} 转基因马铃薯植物的另一项实施。6 天之后，镰孢菌生长遍及 MS 培养基表面，在对照植物中对根的伤害是严重的，镰孢菌穿入茎基底部，茎软化，感染的叶子的叶脉显示出清晰的褐变和坏死。几天之后，对照植物萎缩并死亡。然而，转基因植物持续生长，即使在茄病镰孢菌的严重侵袭下。

在多个实施方案和实施例中已经举例说明和介绍了本发明的原理，不背离这些原理在安排和细节上改变本发明，对本领域熟练技术人员而言是明显的。我们要求保护一切在随后权利要求中的精神和范围内的一切改变。

参考文献

- Ainley 等人 (1993). *Plant Mol. Biol.*, 22:13-23.
- Allefs 等人 (1996). *Mol. Breeding*, 2: 97-105.
- 5 Altschul 等人 (1990). *J. Mol. Biol.*, 215:403-10
- Altschul 等人 (1994). *Nature Gene.*, 6:119-29.
- Altschul 等人 (1997). *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Amiche 等人 (1994). *J. Biol. Chem.* 269:1747-852.
- An 等人 (1988). *Plant Physiol.*, 88:547.
- 10 Anzai 等人 (1989). *Mol. Gen. Genet.*, 219:492-494.
- Ausubel 等人, (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*,
Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences.
- Baker 等人 (1997). *Science*, 276: 726-733.
- Beachey 等人 (1990). *Ann. Rev. Phytopathology*, 28:451-474.
- 15 Benfey & Chua (1990). *Science*, 250:959-966.
- Brogie 等人 (1991). *Science*, 254:1194-1197.
- Bustos 等人 (1989). *Plant Cell*, 1:839.
- Callis 等人 (1988). *Plant Physiol.*, 88:965.
- Carpenter 等人 (1992). *The Plant Cell*, 4:557-571.
- 20 Chapentier 等人 (1998). *Biol. Chem.* 273:14690-14697.
- Chaudhary 等人 (1989). *Nature* 339: 394-397.
- Conrad and Fiedler (1994). *Plant Mol. Biol.*, 26:1023-1030.
- Corpet 等人 (1988). *Nucleic Acids Research*, 16:10881-90.
- Daher 等人 (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85:7327-7331.
- 25 Datla 等人 (1993). *Plant Sci.*, 94:139-149.
- De Block, M. (1988). *Theoret. Appl. Genet.*, 76:767-774.
- Dekeyser 等人 (1990). *Plant Cell*, 2:591.
- Del Sal 等人 (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:467-
472.
- 30 Denis 等人 (1993). *Plant Physiol.*, 101:1295-1304.

- Düring (1996). *Mol. Breeding*, 2:297-305.
- Eppel and Bohlmann (1997). *The Plant Cell*, 9: 509-520.
- Fillati 等人 (1987). *Bio/Technology*, 5:726-730.
- Firek 等人 (1993). *Plant Mol. Biol.*, 23:861-870.
- 5 Fischhoff 等人 (1987). *Bio/Technology*, 5:807-814.
- Florak 等人 (1995). *Transgenic Res.*, 4:132-141
- Fromm 等人 (1989). *Plant Cell*, 1:977.
- Gamborg 等人 (1968). *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.
- Gan & Amansino (1995). *Science*, 270:1986-1988.
- 10 Gatz 等人 (1997). *Plant Mol. Biol.*, 48:89-108.
- Gelvin 等人 (1990). *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers.
- Gilmartin 等人 (1992). *The Plant Cell*, 4:839-949.
- Hancock and Lehrer (1998). *TIBTECH.*, 16: 1-7
- 15 Higgins & Sharp (1988). *Gene*, 73:237-244.
- Higgins & Sharp (1989). *CABIOS*, 5:151-153.
- Huang, 等人 (1992). *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-65.
- Innis 等人 (1990). *PCR Protocols, A Guide to Methods and*
- 20 *Applications*.
- Jaynes (1993). *Plant Science*, 89:43-53.
- Kay 等人 (1987). *Science*, 236:1299-1302.
- Keil 等人 (1986). *Nucl. Acids. Res.*, 14: 5641-5650.
- Kenny and Alcorn (1980). *Plant Dis.*, 64:674-676.
- 25 Kuhlemeier 等人 (1989). *Plant Cell*, 1:471.
- Langridge 等人 (1989). *Bio/Technology*, 10:305-308.
- Larrick 等人 (1995). *Infect. Immun.* 63:1291-1297.
- Mahoney 等人, (1995). *FEBS Lett.* 377:519-522.
- Marcotte 等人 (1989). *Plant Cell*, 1: 471.
- 30 Mason 等人 (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:11745-

11749.

Ni 等人 (1995). *The Plant J.*, 7: 661-676

Mor & Nicolas (1994). *Journal Biochemical Chemistry*, 269:1934-39.

5 Mor. 等人 (1991). *Biochemistry*, 30:8824-830.

Mor 等人 (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 31635-31641

Murashige & Skoog (1962). *Physiol. Plant.*, 15:473-479.

Needleman & Wunsch (1970). *J. Mol. Biol.*, 48:443.

Odel 等人 (1985). *Nature*, 313:810.

10 Odell 等人 (1994). *Plant Physiol.*, 106:447-458.

Opperman 等人 (1993). *Science*, 263:221-223.

Pearson & Lipman (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444.

Pearson 等人 (1994). *Methods in Molecular Biology*, 24:307-31.

15 Perombelon and Kelman (1980). *Ann. Rev. Phytopathology*, 18:361-387.

Pouwels 等人 (1987). *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp.

Roshal 等人 (1987). *The EMBO J.*, 6:1155.

20 Sambrook 等人, (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

Sanchez-Serrano 等人 (1987). *The EMBO J.*, 6:303-306.

Sawyer, R.L. (1984). *Potatoes for the developing world*. Lima Peru International Potato Center.

Schaffner & Sheen (1991). *Plant Cell*, 3:997.

25 Schernthaner 等人 (1988). *EMBO J.*, 7:1249.

Scott and Collins. (1996). *Blood* 88:2517-2530.

Shah 等人 (1986). *Science*, 233:478.

Siebertz 等人 (1989). *Plant Cell*, 1:961.

Simmaco 等人 (1996). *Eur. J. Biochem.*, 242:788-92.

30 Skerlavaj 等人 (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 28375-381.

- Smith & Waterman (1981). *Adv. Appl. Math.*, 2:482.
- Stockhause 等人 (1997). *The Plant Cell*, 9:479-489.
- Strahilevitz (1994). *Biochemistry*, 33:10951-960.
- Terada & Shimamoto (1990). *Mol. Gen. Genet.*, 220:389.
- 5 Terras 等人 (1995). *The Plant Cell*, 7:573-588.
- Tossi 等人 (1995). *Eur. J. Biochem*, 15:941-6.
- Vaeck 等人 (1987). *Nature*, 328:33-37.
- Verwoerd 等人 (1989). *Nucl. Acids Res.*, 17:2362.
- Wagner 等人 (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:2097-
10 5100.
- Wechselberger (1998). *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 279-283.
- Weise 等人 (1994). *Plant Mol. Biol.*, 26:667-677.
- Weising 等人 (1988). *Ann. Rev. Genet.*, 22:421-477.
- Weissbach & Weissbach (1989). *Methods for Plant Molecular
15 Biology*, Academic Press, 5:173-184.
- Yamamoto 等人 (1990). *Plant Cell*, 3:371-382.
- Zhao 等人 (1995). *FEBS Lett.* 367:130-134.SW

序列表

<110> 桑托什·米斯拉
比尔·凯

<120> 抗广谱病原体的转基因植物

<130> 54447

<140>

<141>

<150> 60/125,072

<151> 1999-03-17

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 443

<212> DNA

<213> *Phyllomedusa bicolor*

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(294)

<400> 1

ccacgcgtcc gattctgtcc tccagtactc aacacattct gaattgtaag aacaaac 57

atg gat atc ctg aag aaa tct ctt ttc ctt gta tta ttc ctt gga ttg 105

Met Asp Ile Leu Lys Lys Ser Leu Phe Leu Val Leu Phe Leu Gly Leu

1 5 10 15

gtt tcc ctt tcc atc tgt gaa gaa gag aaa aga gaa aat gaa gat gag 153

Val Ser Leu Ser Ile Cys Glu Glu Glu Lys Arg Glu Asn Glu Asp Glu

20 25 30

gag aaa caa gat gac gag caa agt gaa atg aag aga gct atg tgg aaa 201

Glu Lys Gln Asp Asp Glu Gln Ser Glu Met Lys Arg Ala Met Trp Lys

35 40 45

gat gtg tta aaa aaa ata gga aca gtg gcc tta cat gca gga aaa gcg 249

Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu His Ala Gly Lys Ala
 50 55 60

gct tta ggt gca gtt gct gat aca ata agt caa gga gag caa taa 294
 Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln Gly Glu Gln
 65 70 75

agtgaaaaaa atttaaaatt gaattactct aaatagaaca attagcaata attgtgtcaa 354

acctacatta aagcatactg aaccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 414

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 443

<210> 2

<211> 78

<212> PRT

<213> Phyllomedusa bicolor

<400> 2

Met Asp Ile Leu Lys Lys Ser Leu Phe Leu Val Leu Phe Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Val Ser Leu Ser Ile Cys Glu Glu Glu Lys Arg Glu Asn Glu Asp Glu
 20 25 30

Glu Lys Gln Asp Asp Glu Gln Ser Glu Met Lys Arg Ala Met Trp Lys
 35 40 45

Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu His Ala Gly Lys Ala
 50 55 60

Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln Gly Glu Gln
 65 70 75

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Phyllomedusa bicolor

<400> 3

Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu His Ala Gly Lys Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln
 20 25

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa bicolor*

<400> 4

Ala Met Trp Lys Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu His
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln
 20 25 30

<210> 5

<211> 36

<212> PRT

<213> *Pachymedusa dactinicolor*

<400> 5

Gly Met Trp Ser Lys Ile Lys Asn Ala Gly Lys Ala Ala Ala Lys Ala
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Ala Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Val Ser Glu Ala
 20 25 30

Leu Gly Glu Gln
 35

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> *Pachymedusa dactinicolor*

<400> 6

Ala Leu Trp Lys Thr Leu Leu Lys Lys Val Gly Lys Val Ala Gly Lys
 1 5 10 15

Ala Val Leu Asn Ala Val Thr Asn Met Ala Asn Gln Asn Glu Gln

20

25

30

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> *Agalychnis annae*

<400> 7

Gly Met Trp Ser Thr Ile Arg Asn Val Gly Lys Ser Ala Ala Lys Ala

1

5

10

15

Ala Asn Leu Pro Ala Lys Ala Ala Leu Gly Ala Ile Ser Glu Ala Val

20

25

30

Gly Glu Gln

35

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> *Agalychnis annae*

<400> 8

Gly Met Phe Thr Asn Met Leu Lys Gly Ile Gly Lys Leu Ala Gly Gln

1

5

10

15

Ala Ala Leu Gly Ala Val Lys Thr Leu Ala Gly Glu Gln

20

25

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> *Agalychnis annae*

<400> 9

Ser Leu Trp Ser Lys Ile Lys Glu Met Ala Ala Thr Ala Gly Lys Ala

1

5

10

15

Ala Leu Asn Ala Val Thr Gly Met Val Asn Gln Gly Glu Gln

20

25

30

<210> 10

<211> 34

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa sauvagei*

<400> 10

Ala	Leu	Trp	Lys	Thr	Met	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Thr	Met	Ala	Leu	His
1				5					10					15	

Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Gln	Gly
			20						25					30	

Thr Gln

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa sauvagei*

<400> 11

Ala	Leu	Trp	Phe	Thr	Met	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Thr	Met	Ala	Leu	His
1				5					10					15	

Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Asn	Thr	Ile	Ser	Gln	Gly
			20						25					30	

Thr Gln

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa sauvagei*

<400> 12

Ala	Leu	Trp	Lys	Asn	Met	Leu	Lys	Gly	Ile	Gly	Lys	Leu	Ala	Gly	Lys
1				5					10					15	

Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Val	Gly	Ala	Glu	Ser
			20					25					30

<210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Phyllomedusa sauvagei

<400> 13
 Ala Leu Trp Met Thr Leu Leu Lys Lys Val Leu Lys Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 Ala Leu Asn Ala Val Leu Val Gly Ala Asn Ala
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Phyllomedusa sauvagei

<400> 14
 Gly Leu Trp Ser Lys Ile Lys Thr Ala Gly Lys Ser Val Ala Lys Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Ala Ala Val Lys Ala Val Thr Asn Ala Val
 20 25

<210> 15
 <211> 329
 <212> DNA
 <213> Rana temporaria

<220>
 <221> CDS
 <222> (53).. (238)

<400> 15
 cccctccagc tgtctacatt ctcataacca actgaaccac ccgagcccaa ag atg ttc 58
 Met Phe
 1

acc ttg aag aaa tcc ctc tta ctc ctt ttc ttc ctt ggg acc atc aac 106
 Thr Leu Lys Lys Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Leu Gly Thr Ile Asn

Phe Phe Pro Val Ile Gly Arg Ile Leu Asn Gly Ile Leu
 1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Rana temporaria

<400> 18

Phe Leu Pro Leu Ile Gly Arg Val Leu Ser Gly Ile Leu
 1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Rana temporaria

<400> 19

Leu Leu Pro Ile Val Gly Asn Leu Leu Lys Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Rana temporaria

<400> 20

Leu Leu Pro Ile Leu Gly Asn Leu Leu Asn Gly Leu Leu
 1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Rana temporaria

<400> 21

Leu Leu Pro Ile Val Gly Asn Leu Leu Asn Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Rana temporaria

<400> 22
 Val Leu Pro Ile Ile Gly Asn Leu Leu Asn Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Rana temporaria

<400> 23
 Phe Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Leu Ser Gly Ile Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Rana temporaria

<400> 24
 Leu Ser Pro Asn Leu Leu Lys Ser Leu Leu Gly Lys
 1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rana temporaria

<400> 25
 Leu Leu Pro Asn Leu Leu Lys Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Rana temporaria

<400> 26

Phe Val Gln Trp Phe Ser Lys Phe Leu Gly Arg Ile Leu
 1 5 10

<210> 27

<211> 99

<212> DNA

<213> Phyllomedusa bicolor

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (99)

<400> 27

atg gcc atg tgg aaa gac gtt ctg aaa aag atc ggt act gtc gcc ctc 48
 Met Ala Met Trp Lys Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu
 1 5 10 15

cat gca ggg aag gcc gcg ctt gga gca gta gcc gac acc atc tcg cag 96
 His Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln
 20 25 30

taa 99

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Phyllomedusa bicolor

<400> 28

Met Ala Met Trp Lys Asp Val Leu Lys Lys Ile Gly Thr Val Ala Leu
 1 5 10 15

His Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Asp Thr Ile Ser Gln
 20 25 30

<210> 29

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 29

atggccatgt ggaaagacgt tctgaaaaag atcggctactg tgcacctcca tgcaggg 57

<210> 30

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 30

ttactgcgag atggtgtcgg ctactgctcc aagcgcggcc ttccctgcat ggagggcgac 60

agt

63

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 31

tctagaggta ccatggccat gtggaaagac g 31

<210> 32

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 32

caagcttctg cagagctctt actgcgagat ggtgtcgg

38

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Rana temporaria

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (57)

<400> 33

atg gcc tct aga cat atg ttt ctg ccc cta atc ggg agg gtt ctc tcg 48

Met Ala Ser Arg His Met Phe Leu Pro Leu Ile Gly Arg Val Leu Ser

1 5 10 15

gga atc ctg taa

60

Gly Ile Leu

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Rana temporaria

<400> 34

Met Ala Ser Arg His Met Phe Leu Pro Leu Ile Gly Arg Val Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ile Leu

<210> 35

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 35

atgtttctgc ccctaatcgg gagggttctc tcgggaatcc tgtaa

45

<210> 36

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 36

ttacaggatt cccgagagaa ccctcccgat taggggcaga aacat

45

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 37

ggtaccteta gacatatgtt tctgcccta

30

<210> 38

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 38

ctgcagagct cttacaggat tcccgagag

29

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa bicolor*

<400> 39

Ala Met Trp Lys

1

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:间隔序列

<400> 40

Ala Ser Arg His

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:间隔序列

<400> 41

Ala Leu Trp Lys

1

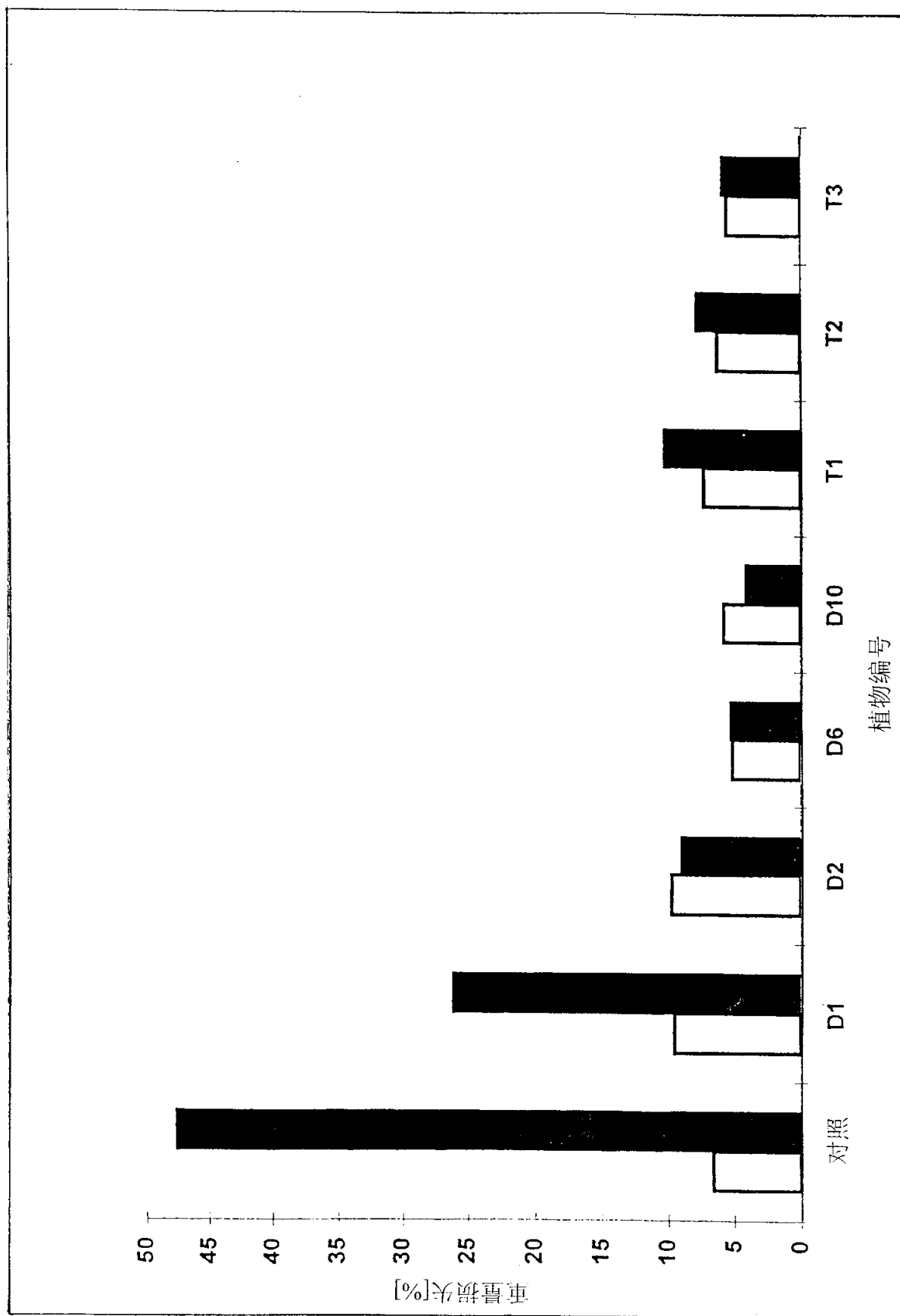


图 1

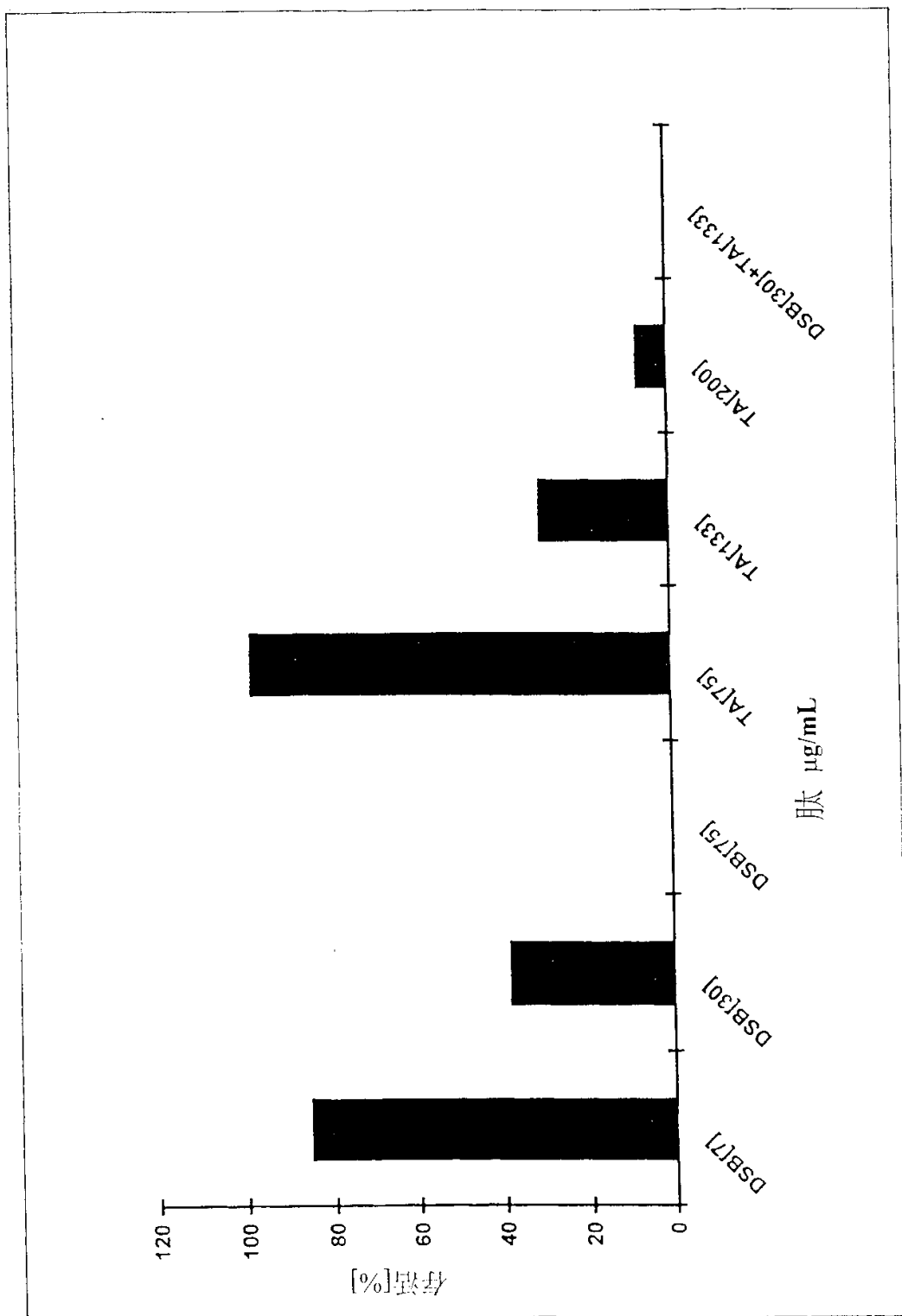


图 2

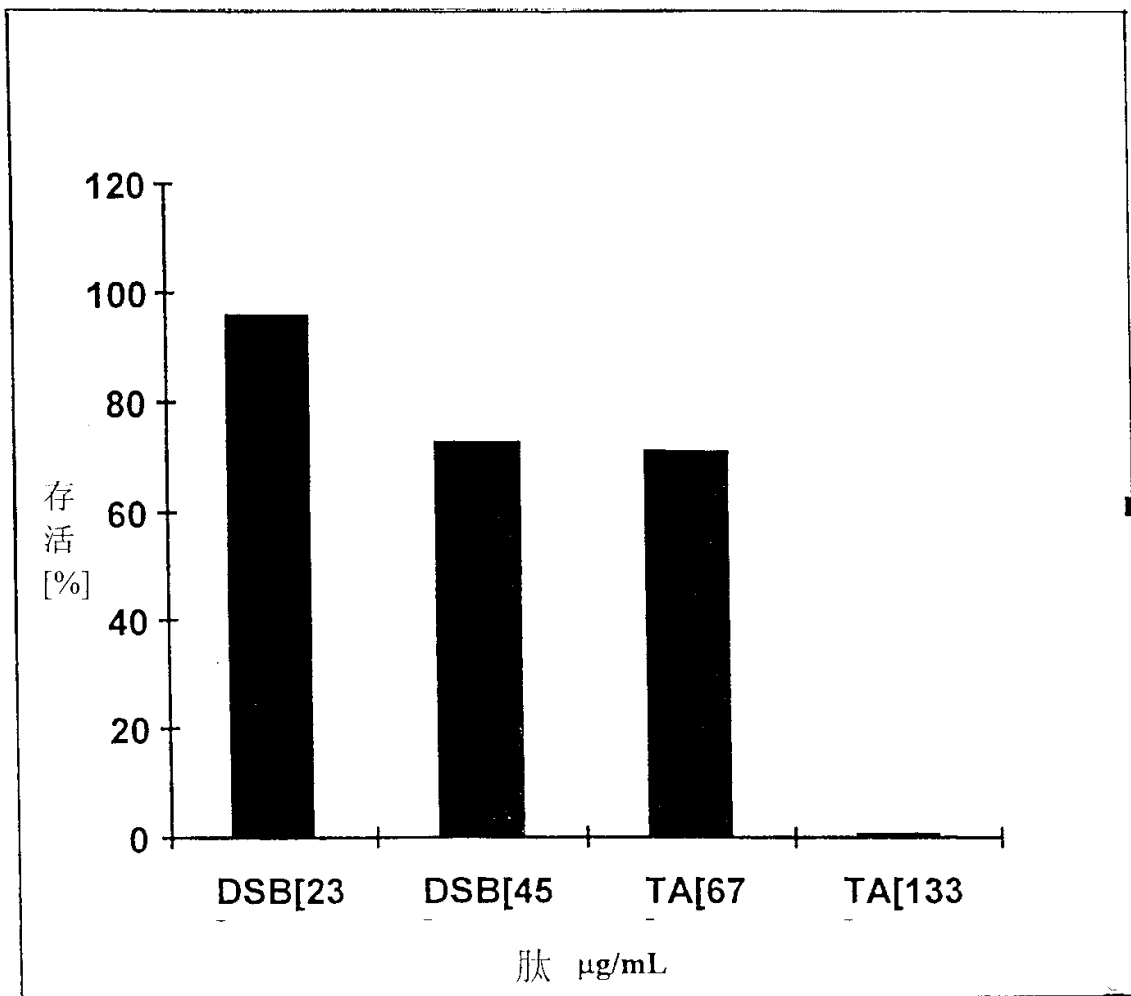


图 3