

公告本

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 91133207 ※IPC分類： C12N05/32, 15/35

※ 申請日期： 91-11-12

壹、發明名稱

(中文) 重組體植酸酶及其應用

(英文) Recombinant Bacillus Phytases and Uses Thereof

貳、發明人 (共 2 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 林文量

(英文) Boon Leong LIM

住居所地址：(中文) 香港薄扶林沙灣道 25 號譚益芳樓 3 座 11 樓 B 室

(英文)

國籍：(中文) 中國 (英文) CHINA

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1 (如發明人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 香港大學

(英文) The University of Hong Kong

住居所或營業所地址：(中文) 中國香港特別行政區薄扶林道

(英文) Pokfulam Road, Hong Kong Special

Administrative Region, P.R. of China

國籍：(中文) 中國 (英文) CHINA

代表人：(中文) 林炳麟

簽章

(英文) P.B.L. LAM

續發明人或申請人續頁 (發明人或申請人欄位不敷使用時，請註記並使用續頁)

發明人 2

姓名：(中文) 葉永健 _____

(英文) Wing Kin YIP _____

住居所地址：(中文) 香港新界青衣青敬路 33 號盈翠半島 2 座 23 樓 H 室

(英文) _____

國籍：(中文) 中國 _____ (英文) CHINA _____

發明人 3

姓名：(中文) _____

(英文) _____

住居所地址：(中文) _____

(英文) _____

國籍：(中文) _____ (英文) _____

發明人 4

姓名：(中文) _____

(英文) _____

住居所地址：(中文) _____

(英文) _____

國籍：(中文) _____ (英文) _____

發明人 5

姓名：(中文) _____

(英文) _____

住居所地址：(中文) _____

(英文) _____

國籍：(中文) _____ (英文) _____

發明人 6

姓名：(中文) _____

(英文) _____

住居所地址：(中文) _____

(英文) _____

國籍：(中文) _____ (英文) _____

捌、聲明事項

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為：_____

本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 美國；2001/11/21；60/332,060

2. _____

3. _____

主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. 美國；2001/11/21；60/332,060

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

1. 發明所屬之技術領域

本發明涉及來自於兩種一般認為是安全的微生物 (GRAS) 地衣芽孢桿菌和枯草芽孢桿菌 168 的植酸酶基因以及它們各自編碼的蛋白產物和蛋白產物的片段、衍生物、類似物和其變異體。本發明還提供了生產和純化植酸酶、衍生物、類似物和變異體和抗體的方法，還提供了這些植酸酶在動物飼料方面的用途；本發明還提供了轉入了上述兩種在中性 pH 條件下有活性的植酸酶 (中性植酸酶) 和其他中性植酸酶的轉基因植物，這種轉基因植物顯示出促進生長、開花和果實生長的性能。

2. 先前技術

植酸鹽是植酸 (肌-肌醇 1,2,3,4,5,6-hexakis 二氫磷酸) 的鹽形式，在穀類和豆科類作物中占總磷元素的 80%，這兩種作物和油料種子作物占世界作物收穫面積的 90% 以上 (Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K. and Salunkhe D.K., 1989, *Phytases in legumes and cereals*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida)。儘管植酸鹽是磷元素一種的貯存形式，但是動物和植物並不易獲得磷元素，這是由於需要一種特殊的酶才能將植酸鹽水解成無機磷酸鹽。

植酸酶優選植酸鹽作為底物，催化植酸鹽轉變為無機磷酸鹽和肌醇磷酸鹽，釋放出的磷酸鹽能夠被動物和植物利用，從而增加了磷元素的可利用性。

由於植酸酶在經濟和環境方面的重要性，在生物技術和酶製造產業，酶的過量表達是一個長期和很具競爭性的課題。研究人員已經發現了能夠最高活性過量表達該酶的方法，需進行的純化步驟最少。植酸酶表達的早期研究集中在從真菌來源提取和生產該酶，直到現在，其仍是唯一已知的動物飼料的來源。

早在二十世紀 80 年代，植酸酶已在無花果麴黴/黑色麴黴 (Ullah A.H. and Cummins B.J., 1988, *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum acid phosphatase: purification, N-terminal amino acid sequence, and biochemical characterization. *Preparative Biochemistry*, 18(1): 37-65) 胞外培養介質中得到了表達，同年 Ullah 等人對該酶進行了廣泛的研究。直到現在，來自於 *A.niger* 的植酸酶仍是最重要的商用植酸酶。二十世紀 90 年代，由於新的生物技術即重組蛋白在外源菌株中的表達方法的應用，改進了該酶的生產，新的生物技術已證明確實提高了異種蛋白的產量。已有報告顯示包括鐮孢 *venenatum* (Berka R.M., Rey M.W., Brown K.M., Byun T. and Klotz A.V., 1998, Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Fusarium venenatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11): 4423-4427)、黑色麴黴和其他的麴黴 (Pasamontes L., Haiker M., Wyss M., Tessier M. and Loon A.P.G., 1997, Gene cloning, purification and characterization of a

heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*.
Applied and Environmental Microbiology, 63(5): 1696-1700;
U.S. Patent No.5830733; U.S. Patent No. 5436156 和 U.S.
Patent No. 6153418)、土壤克雷白氏桿菌 (Greiner R., Haller
E., Konietzny U. and Jany K.D., 1997, Purification and
characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 341(2):
201-206)、*Thermomyces* species (U.S. Patent No.5866118)
種以及西方許旺氏酵母 (U.S. Patent No.5840561) 在內的
真菌菌株能以相當明顯的產量並具有值得重視的活性表達
該酶。已經進行了一些酶法水解植酸鹽的嘗試，其結果是
導致適度增加了飼料的營養價值、動物排泄出的磷元素降
低以及對環境的益處 (Pen J., Verwoerd T.C. and Hoekema
A., 1993, Phytase-containing transgenic seeds as novel feed
additive for improved phosphorus utilization.
Bio/Technology, 11:811-814)。

當利用真菌進行植酸酶的生產還在繼續的時候，其他的
研究小組已經將他們的注意力轉向用酵母 (Mayer A.F.,
Hellmuth K., Schlieker H., An expression system matures: A
highly efficient and cost-effective process for phytase
production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*.
Biotechnology and Bioengineering, 63(3): 373-381; Han Y.,
Wilson D.B. and Lei X.G., 1999, Expression of an
Aspergillus niger phytase gene(phyA) in *Saccharomyces*

cerevisiae. Applied and Environmental Microbiology, 65(5): 1915-1918; Han Y. and Lei X.G., 1999, Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus* phytase(phyA) in *Pichia pastoris*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 364(1): 83-90; Rodriguez E., Mullaney E.J. and Lei X.G., 2000, Expression of the *Aspergillus niger* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, 268:373-378)、植物(Ulah A.H.J., Sethumadhavan K., Mullaney E.J., 1999, Characterization of recombinant fungal phytase(phyA) expressed in tobacco leaves. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264:201-206) 和腸細菌大腸桿菌(*E. coli*) (Dassa J., Marck C. and Boquet P.L., 1990, The complete Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene appA reveals significant homology between pH2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. Journal of Bacteriology, 172(9):5497-5500; Ostanin K., Harms E.H., Stevis P.E., Kuciel R., Zhou M.M. and Van Etten R.L., 1992, Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. Journal of Bacteriology, 267(32):22830-22836; Rodriguez E., Han Y. and Lei X.G., 1999, Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase

gene(appA2) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257:117-123) 中表達植酸酶了。對其他來自於植物 (Maugenest S. Martinez and Lescure A, 1997, Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seeding phytase. *Biochemistry Journal*, 322:511-517) 和哺乳動物 (Craxton A., Caffrey J.J., Burkhardt W., Safrany S.T. and Shears S.B., 1997, Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochemistry Journal*, 328:75-81) 中的植酸酶也進行了研究。

已經對存在於 *E. coli* 和乳桿菌的幾種植酸酶基因包括 EcAP (Ostanin K., Harms E.H., Stevis P.E., Kuciel R., Zhou M.M. and Van Etten R.L., 1992, Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 267(32):22830-22836)、appA (Dassa J., Marck C. and Boquet P.L., 1990, The complete Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene appA reveals significant homology between pH2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 172(9): 5497-5500)、appA2 (Rodriguez E., Han Y. and Lei X.G., 1999, Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene(appA2) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

257: 117-123) 和植物乳桿菌 (Zamudio et al., 2001, *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase, *Lett. App. Microbiol.* 32: 181-184) 進行了鑒定，它們都是在 pH 低於 6.0 時表現出最適酶活性的酸性磷酸酶。其他的來自於 *E. coli*-的植酸酶見美國專利 No. 6183740 和 No. 6190897。

儘管植酸酶在真菌和 *E. coli* 中以相當明顯的量表達，但這些植酸酶的純化是相當複雜的，而且這些異源表達的酶常常不能正常折疊，例如，*E. coli* 不能表達來自於真菌 *A. niger* 的有活性的植酸酶，這是由於 *E. coli* 產生了一種具有大分子量的非糖基化的胞內內涵蛋白 (Phillippy B.Q. and Mullaney E.J., 1997, Expression of an *Asperigillus niger* phytase(phyA) in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45: 3337-3342)。此外，*E. coli* 是一種腸內細菌，有感染胃腸組織的危險。

已知幾種桿菌屬菌株是一般認為是安全的微生物菌株，編碼植酸酶的基因已從枯草芽孢桿菌菌株 VTT E-68013 (phyC; Kerovuo J., Laurarus M.m Nurminen P., Kalkkinen N. and Apajalahti J., 1998, Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2079-2085, 此處全文引入作為參考) 和枯草芽孢桿菌 DS11 (phyK; Kim Y.O., Lee J.K., Kim H.K., Yu J.H. and Oh T.K., 1998, Cloning of

the thermostable phytase gene(phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters, 162:182-191; 和美國專利 No. 6255098, 此處二者的全文引入作為參考)中得到了克隆。這些報告顯示了桿菌植酸酶與來自於真菌、*E. coli*、植物和哺乳動物的植酸酶性質區別即桿菌植酸酶不具有在已知的植酸酶的胺基酸序列中存在的保守序列—RHGX RXP 域 (Kerovuo et al., 1998, 上文; Kim et al., 1998, 上文)。此外, 研究顯示 *B. subtilis* 中的植酸酶的活性具有鈣依賴性並具熱穩定性 (Kerovuo et al., 2000, The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:365-369, 此處全文引入作為參考), 該特點在來自於真菌、*E. coli*、植物和哺乳動物的植酸酶中還未發現。而且, 枯草芽孢桿菌植酸酶表現活性的最適 pH 也不同于來自於真菌和 *E. coli* 的植酸酶。許多報告顯示, 真菌和 *E. coli* 中的植酸酶是酸性磷酸酶, 最適 pH 從 2.5 (Rodriguez et al., 1999, supra; 和 Dassa et al., 1990, 上文) 到 5.5 (Han et al., 1999, 上文)。與此對照, Kerovuo 等 (1998, 上文) 報告的結果則是枯草芽孢桿菌植酸酶的最適 pH 在 pH7。因此, 利用一般認為是安全的微生物菌株進行植酸酶的生產具有巨大的應用價值, 提供了一種新的安全的商用植酸酶資源。

Maugenest 等 (1997, Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seeding phytase. Biochemistry

Journal, 322:511-517) 報告了玉米種子植酸酶的克隆和鑒定情況，美國專利 No. 6291224 公開了來自玉米的植酸酶，而 No. 6303766 則公開了來自大豆的植酸酶的情況，這兩種植酸酶均屬酸性植酸酶。但是，一般來說，植物植酸酶的產量不足以滿足工業化生產，而且，一般來說在未萌發的種子中僅能檢測到極低的內源植酸酶活性。胞外的植酸酶活性顯然不足以利用鎖定在土壤中的植酸鹽。

植物能從水和光合作用中獲得碳、氫和氧，而磷、氮、金屬離子、鈣和微量元素則主要從土壤中獲得。因此，土壤中的磷和氮的可利用性則成爲植物生長的制約因素。主要以無機磷酸鹽形式存在的磷元素通過根從土壤中吸收然後運輸到植物的其他組織以用於各種生命過程，如 DNA 和 RNA 的合成等。然而，大部分的磷元素被鎖定在植物中，並以植酸鹽的形式儲存起來。對植物來說，以植酸鹽形式鎖定土壤中的磷元素是不能夠利用的。爲了滿足植物營養的需要，無機磷酸鹽一般以肥料形式供給植物以促進植物的生長，這樣無機磷酸鹽就成了環境的另外一個污染源。

在植物體內表達植酸酶的努力尙未導致有用的表現型出現。一種來自於真菌黑色麴黴(phyA)的酸性植酸酶已成功地轉基因煙草中得到表達 (Ullah et al., 1999, 上文)。除了最適 pH 從 pH5 漂移到 pH4，從轉基因煙草中回收到的重組植酸酶的催化能力與天然植酸酶沒有區別。同樣的基因在 *Arabidopsis* 屬植物中也有過量的表達 (Richardson et al., 2000, Extracellular secretion of

Aspergillus phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal*, 25(6): 641-649)。美國專利 No. 6022846 則公開了真菌無花果麴黴、黑色麴黴、泡盛麴黴 和 *Aspergillus nidulans* 的酸性植酸酶在各種作物果實、葉和根中的表達情況，(也見美國專利 No. 5900525)。胞內表達這些真菌酸性植酸酶並沒有使轉基因植物顯現顯著的表現型變化。

給包括豬和雞在內的許多單胃動物飼餵由大豆食物、穀類、小麥、大麥、水稻麩皮和 canola 食物組成的飼料。由於大部分的磷元素以植酸鹽形式存在，具有低的最適 pH 的外源植酸酶又主要來自於真菌，因此它們常常作為飼料添加劑加入到飼料中。替代添加外源植酸酶的措施是：將表達活性植酸酶的轉基因植物引入動物飼料中將增加飼餵該飼料的動物對植酸鹽的利用能力。因而對用基因工程技術在植物體內影響和創造植酸鹽利用的生化途徑的方法的需要和願望依然存在。

3. 發明內容

對磷元素的有效利用不僅對植物和動物的生長重要，而且對於減少因動物廢棄物和肥料引起的環境污染也同等重要，動物廢棄物和含有以植酸鹽形式未利用的磷元素的肥料引起了環境污染。為了利用存在於各種食物資源中的磷元素，可將來源於各種資源中的植酸酶添加在動物飼料中以使單胃動物能夠高效利用磷元素，同時也減少了將磷元

素排泄到環境中所造成的污染。而且，如果在中性 pH 有活性的植酸酶能在植物體內表達，可使轉基因植物的生長速率明顯加快，成熟期和/或花期縮短。因此，需要在動物飼料和植物體內顯示有最大活性並對動植物的健康是安全的植酸酶存在，更需要大量生產植酸酶以滿足商業需求。

本發明部分地基於兩種新的分別來自於兩種微生物 *Bacillus licheniformis* 和枯草芽孢桿菌 168 的植酸酶基因（見圖 1 和 2；SEQ ID NOS:1, 2, 3 和 4）的發現以及對表達的中性植酸酶能夠增加植物生長、開花和做果的觀察。因此，本發明涉及到兩種分別來自於一般認為是安全的微生物菌株（GRAS）植酸酶基因，編號分別為 phyL 和 168phyA 的核苷酸序列（SEQ ID NOS: 1 和 3，分別見圖 1A 和 2A）和它們所編碼蛋白的胺基酸序列以及這些序列的片段、衍生物、類似物和變體。為此，本發明提供了被分離出的或重組製備的源於菌株 *Bacillus licheniformis*（phyL，胺基酸序列號是 SEQ ID NO: 2；見圖 1B）和枯草芽孢桿菌 168（168phyA，胺基酸序列號是 SEQ ID NO: 4；見圖 2B）的植酸酶及其片段、衍生物、類似物或變異體，它們在本發明中統稱為“本發明所述肽”或“本發明所述蛋白”。更進一步，本發明也提供了編碼本發明所述多肽的核酸分子，包括 cDNA、基因組 DNA 和 RNA，本發明中統稱為“本發明的核酸”。

此處用斜體字標明的基因的名字即是指該基因，與此相對應的是它所編碼的蛋白或多肽產物是以非斜體形式表

示。如，“基因”表示某基因，而“基因”則表示該“基因”的蛋白或多肽產物。

由此，本發明提供了被分離出的核酸分子，其包含或與 SEQ ID NO: 1 核苷酸序列或其互補序列、或 SEQ ID NO: 3 核苷酸序列或其互補序列之間的同一性為等同於下述核苷酸序列，即約 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、645%、70%、80%、85%、90%、95%或 98%，並編碼了具有 phyL 或 168phyA 蛋白活性的蛋白或多肽的核苷酸序列。所述活性包括抗原性、免疫原性、催化活性（即植酸酶活性）以及其他的易於分析的活性。進一步，該活性還包括在中性 pH 起作用，更具體一點還要具有較寬酶活性的溫度範圍以及在中性 pH 時在各自的最適溫度時具有最高的活性（見圖 7B 和下文的章節 6.4）。更進一步，該蛋白還表現出高的熱穩定性，尤其是在 Ca^{++} 存在下。在特殊的實施例中，該核酸分子不包括編碼 phyC（SEQ ID NO:21）、phyK（SEQ ID NO:23）的核苷酸序列及具有植酸酶催化活性的，且長度分別為 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、750、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360 或 380 個胺基酸殘基的 phyC（SEQ ID NO:22）和 phyK（SEQ ID NO:24）。

本發明進一步提供了被分離出的核酸分子，這些核酸分子包含或組成了能編碼具有一種或多種 phyL 或 168phyA 蛋白活性的蛋白或多肽的來自 SEQ ID NO:1 或 3 核苷酸序

列或其互補序列的 25、30、35、40、45、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350 個或更多個連續的核苷酸。在特定的實施例中，所述核酸分子不包括編碼 phyC (SEQ ID NO:21)、phyK (SEQ ID NO:23) 的核苷酸序列及編碼，phyC (SEQ ID NO:22) 和 phyK (SEQ ID NO:24) 各自長度至少為 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360 或 380 個胺基酸殘基的片段的核苷酸序列，且具有植酸酶催化活性的。

本發明還提供了被分離出的多肽或蛋白，該多肽或蛋白由與包含或組成了至少約 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 與 SEQ ID NO:1 核苷酸序列或其互補序列、或者 SEQ ID NO:3 核苷酸序列或其互補序列同一性的核苷酸序列的核酸所編碼，所述多肽或蛋白還至少顯示有本發明多肽的一種結構和/或功能特徵。所述的本發明多肽的功能特點包括抗原性、免疫原性、催化活性以及其他的易於分析的活性。在特殊的實施例中，這些多肽或蛋白不包括分別由基因 phyC (SEQ ID NO:21) 和 phyK (SEQ ID NO:23) 編碼的多肽或蛋白，以及長度至少為 25、30、35、40、45、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、

700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250 或 1280 個核苷酸的 phyC (SEQ ID NO:21) 片段及長度至少為 25、30、35、40、45、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650 或 1700 核苷酸的 phyK (SEQ ID NO:23) 片段。

本發明還提供了被分離出的多肽或蛋白，該多肽或蛋白由包括下述核苷酸序列的或由其組成的核酸分子所編碼，所述核苷酸序列中至少包含來自 SEQ ID NO:1, 3 核苷酸序列或其互補序列中的約 25、30、35、40、45、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300 個或更多個連續核苷酸，此處的多肽或蛋白還至少顯示有本發明多肽的一種功能和/或功能特點。在特殊的實施例中，這些多肽或蛋白不包括分別由基因 phyC (SEQ ID NO:21) 和 phyK (SEQ ID NO:23) 以及長度至少為 15、30、45、60、90、120、180、240、300、420、540、780、1020、1140、1260 或 1280 核苷酸的 phyC (SEQ ID NO:21) 片段及長度至少為 15、30、45、60、90、120、180、240、300、420、540、780、1020、1140、1260、1280、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650 或 1700 核苷酸的 phyK (SEQ ID NO:23) 片段所編碼的多肽或蛋白。

本發明的特點還在於被分離出的核酸分子中包含這樣的核苷酸序列，它編碼與所述的 SEQ ID NO:2 或 4 之間的胺基酸序列同一性至少為約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的蛋白質或該蛋白的片段、衍生物、類似物或變體，或者所述的核酸分子的互補序列，所述蛋白具有與蛋白 phyC 和 phyK 一樣的抗原性、免疫原性、催化活性以及其他的易於分析的活性。在特殊的實施例中，該核酸分子不包括編碼 phyC (SEQ ID NO:21)、phyK (SEQ ID NO:23)、長度至少含有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、750、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyC (SEQ ID NO:22) 的片段或長度至少含有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyK (SEQ ID NO:24) 的片段的核苷酸序列。

本發明進一步還提供了被分離出的核酸分子，或該核酸分子的互補鏈，該核酸分子中包含的核苷酸序列編碼具有下述特徵的蛋白或其片段、衍生物、類似物或變體：即該蛋白的胺基酸序列包含了 SEQ ID NO:2 或 4 至少約 10、15、20、25、30、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375 個或更多個連續胺基酸殘基或由這些殘基組成上述蛋白具有與蛋白 phyC 和 phyK 一

樣的抗原性、免疫原性、催化活性以及其他的易於分析的活性。在特殊的實施例中，該核酸分子不包括編碼 phyC (SEQ ID NO:21)、phyK (SEQ ID NO:23)、長度至少含有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyC (SEQ ID NO:22) 的片段或長度至少含有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyK (SEQ ID NO:24) 的片段的核苷酸序列。

本發明更進一步提供了被分離出的多肽或蛋白，其胺基酸序列與 SEQ ID NO:2 或 4 所示胺基酸序列至少有約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的序列同一性或這些蛋白的片段、衍生物、類似物或變體，其中所述的多肽或蛋白還至少具有本發明多肽或蛋白的一種結構和/或功能特點。在特殊的實施例中，該多肽或蛋白不包括分別由基因 phyC (SEQ ID NO:21) 和 phyK (SEQ ID NO:23) 的核苷酸序列所編碼的多肽或蛋白、長度至少有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyC (SEQ ID NO:22) 或 phyK (SEQ ID NO:24) 的片段。

本發明還提供了這樣一些被分離出的多肽或蛋白，所包含的胺基酸序列包含 SEQ ID NO:2 或 4 蛋白或它們的片段、衍生物、類似物或變體的至少約 10、15、20、25、30、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375 個或更多個連續的胺基酸，此處的多肽或蛋白還至少具有本發明多肽的一種結構和/或功能特點。在特殊的實施例中，該多肽或蛋白不包括分別由基因 phyC (SEQ ID NO:21) 或 phyK (SEQ ID NO:23) 的核苷酸序列所編碼的多肽或蛋白、長度至少有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的 phyC (SEQ ID NO:22) 或 phyK (SEQ ID NO:24) 的片段。

在一個實施方案中，本發明提供了被分離出的核酸分子，此處限定為：該被分離出的核酸分子在嚴謹的條件下能夠與具有 SEQ ID NOS:1 或 3 序列或它們的互補序列的核酸雜交，其中所指的 SEQ ID NOS:1 或 3 序列或它們的互補序列能夠編碼顯示至少本發明多肽或蛋白的一種結構和/或功能特點。

更進一步，本發明還提供了能夠用作適合作為引物或雜交探針的核酸分子，以用於檢測編碼本發明多肽或其他與本發明多肽相似的多肽。

另外一方面是，本發明提供了包含有本發明核酸分子的載體，例如重組表達載體。更進一步，本發明還提供了含

有該載體或含有和/或表達本發明核酸分子的工程載體的宿主細胞，以及含有與異源啟動子相連的核苷酸序列的宿主細胞。在一定的實施例中，宿主細胞是芽孢桿菌屬菌種，優選為枯草芽孢桿菌 MU331。在特殊的實施例中，這種異源啟動子是一種很強的原噬菌體啟動子。

本發明進一步提供了通過重組 DNA 技術製備本發明多肽的方法，該方法包括含有編碼本發明多肽的重組表達載體或含有與異源啟動子相連的編碼本發明多肽的核苷酸序列的宿主細胞的培養、本發明多肽的製備和分離。在一定的實施例中，宿主細胞是芽孢桿菌屬菌種，優選為枯草芽孢桿菌 MU331。在特殊的實施例中，本發明提供了使用噬菌體 Φ 105 的過表達系統快速大量生產本發明多肽的方法。

另一方面，本發明提供了含有本發明多肽的動物飼料以及製備該動物飼料的方法，該飼料在植酸酶作用下釋放磷元素以供給動物利用。

在另外一個實施例中，本發明提供了含有能編碼中性 pH 下具有催化活性的植酸酶的核酸分子的轉基因植物。在一個特殊的實施例中，本發明提供了轉基因植物或能夠編碼衍生於芽孢桿菌種的植酸酶的核酸分子，該轉基因植物含有的本發明的核酸分子能夠表達本發明的植酸酶或具有功能活性的片段、同系物或它們的類似物。在一個優選的實施例中，植酸酶是胞內表達的。在另一個實施例中，植酸酶是胞外表達的，例如在轉基因植物的根部，表達的植

酸酶在中性 pH 是活性的，促使貯存於植物或環境如土壤中的植酸鹽釋放磷元素。本發明還提供了生產這種轉基因植物的方法。

本發明進一步提供了具有免疫特異性結合本發明多肽的抗體，該抗體包括但不侷限於下列抗體：來自於各種動物的抗體、人源化抗體、嵌合抗體、多克隆抗、單克隆抗、雙特異性抗體、多特異性抗體、單源鏈抗體、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、二硫鍵連接的 Fvs、含有抗體重鏈可變區或輕鏈可變區的結構域甚至是互補決定區（CDR）的片段，這些抗體都能免疫特殊性與本發明多肽結合。

在一個實施例中，本發明提供了檢測本發明多肽或其相似多肽在生物材料中的存在、活性或表達的方法，生物材料如細胞、培養介質等。相對於對照來說，樣品中多肽活性或表達的增加或減少能夠通過將生物學材料與能直接或間接檢測本發明多肽存在、活性或表達情況的試劑接觸來測定。在一個特殊的實施例中，這種試劑是一種免疫特異性地與本發明多肽結合的抗體或其片段。在另外一個特殊的實施例中，這種試劑就是植酸鹽。

在另一個實施例中，本發明提供了包含有生物活性分子和本發明的多肽或其片段一個或多個結構域的融合蛋白。優選地，本發明提供了包含有將生物活性分子與本發明的多肽或其片段一個或多個結構域的重組性融合或化學偶聯（包括共價和非共價偶聯）得到的融合蛋白。

3.1 定義

此處使用的術語“酸性的”或“酸性 pH”指 pH 低於 6.0、低於 5.5、低於 5.0 和低於 4.0。

此處使用的術語“類似物”指的是包含有與 phyL 或 168phyA、phyL 或 168phyA 的片段有相似或相同功能的多肽，但該多肽不一定包含與 phyL 或 168phyA、phyL 或 168phyA 片段有相似或相同的胺基酸序列，或者該多肽擁有 phyL 或 168phyA、抗體或抗體片段的相似或相同的結構。具有相似的胺基酸序列的多肽指的是能夠至少滿足下列條件之一的多肽：(i) 多肽具有的胺基酸序列有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 與 phyL 或 168phyA、或者是 phyL 或 168phyA 的片段的胺基酸序列一致，其附帶條件是該多肽既不是 phyC 也不是 phyK，也不是具有至少有 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、或 360 個胺基酸殘基長度的 phyC 或 phyK 片段；(ii) 該多肽是由核苷酸序列編碼的，該核苷酸序列有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 與編碼 phyL 或 168phyA、phyL 或 168phyA 片段的核苷酸序列一致，其附帶條件是該多肽

既不是 phyC 也不是 phyK，也不是 phyC 或 phyK 的片段；
(iii) 該多肽是由核苷酸序列編碼的，編碼該多肽的核苷酸序列在極其嚴格的條件下能夠與編碼 phyL 或 168phyA、或含有至少 10 個胺基酸殘基、至少 15 個胺基酸殘基、至少 20 個胺基酸殘基、至少 25 個胺基酸殘基、至少 40 個胺基酸殘基、至少 80 個胺基酸殘基、至少 90 個胺基酸殘基、至少 100 個胺基酸殘基、至少 125 個胺基酸殘基、至少 150 個胺基酸殘基、至少 175 個胺基酸殘基、至少 200 個胺基酸殘基、至少 225 個胺基酸殘基、至少 250 個胺基酸殘基、至少 275 個胺基酸殘基、至少 300 個胺基酸殘基、至少 325 個胺基酸殘基、至少 350 個胺基酸殘基或至少 375 個胺基酸殘基的 phyL 或 168phyA 片段的核苷酸雜交，其附帶條件是該多肽既不是 phyC 也不是 phyK，也不是 phyC 或 phyK 的片段；具有與 phyL 或 168phyA、或 phyL 或 168phyA 片段有相似結構和功能並顯示有抗原性、免疫原性、催化活性或其他易分析的活性的多肽指的是具有與 phyL 或 168phyA、或 phyL 或 168phyA 片段有相似的二級、三級或四級結構的多肽。多肽結構能夠用本領域技術人員所熟知的方法測定，包括但不侷限於 X-射線晶體學、核磁共振、晶體電子顯微技術等，而多肽的功能則通過多肽的各種生物學活性的分析來測定。

此處使用的術語“與 phyL 或 168phyA 免疫特異性結合的抗體或抗體片段”指的是該抗體或其片段與 phyL 或 168phyA 或者是 phyL 或 168phyA 的片段發生免疫特異性

結合，而與別的多肽不發生特異性結合。與 phyL 或 168phyA 或者是 phyL 或 168phyA 的片段發生免疫特異性結合的抗體或其片段也可能與別的抗原發生交叉反應。優選地，與 phyL 或 168phyA 或者是 phyL 或 168phyA 的片段發生免疫特異性結合的抗體或片段不與別的抗原發生交叉反應。與 phyL 或 168phyA 或者是來自於 phyL 或 168phyA 的片段發生免疫特異性結合的抗體或其片段是能夠鑒定的，例如通過免疫分析或其他本領域技術人員熟知的技術。與 phyL 或 168phyA 免疫特異性結合的抗體或抗體片段可以分別互換稱為抗 phyL 抗體或抗 168phyA 抗體。

此處使用的術語“衍生物”是指給定的已被修飾的肽或蛋白質，例如在優先保證生物活性的前提下通過共價連接在肽或蛋白質上連接了其他類型的分子，該類分子包括非天然的胺基酸。這類處理的結果保留了肽或蛋白的一種或多種生物活性。

此處使用的術語“片段”指的是至少含有大約 25、30、35、40、45、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350 個核苷酸、或其他在長度上與該核酸分子相接近的核酸片段而且至少具有該核酸分子一種功能特點（或編碼的蛋白具有該核酸分子所編碼蛋白的特點）；“片段”或者指的是在長度上含有相關蛋白或多肽的至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、

120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340 或 360 個胺基酸殘基的多肽或蛋白片段而且它至少具有蛋白或多肽的一種功能特點。

此處使用的術語“一般認為是安全的(GRAS)”指的是某些物質在特定用途時被美國食品藥品管理局(FDA)歸類為“GRAS”。假如這種成分有良好的生產實踐，便能夠用於食品生產。基於現有的文件，“GRAS”可以用於酶製備是經過 FDA 授權的。從植物和動物以及微生物來製備酶作為酶的來源已有很長時間了，“GRAS”所製備的酶用於人用沒有引起嚴重的健康問題。

術語“被分離出的”或“純化的”肽或蛋白指的是基本上不含有細胞成分或產生該蛋白的細胞或組織中的其他的污染蛋白；當化學合成時，這些“被分離出的”或“純化的”肽或蛋白基本上不含化學前體或其他的化學試劑。上述“基本上不含有細胞成分”包括多肽/蛋白的製備，在此過程中多肽/蛋白與細胞組分分離。因此，基本上不含有細胞成分的多肽/蛋白包括污染蛋白少於約 30%、20%、10%、5%或 1%（乾重）的多肽/蛋白的製備。當該多肽/蛋白通過重組法產生時，它還優選基本不含有培養介質即培養介質占蛋白製備物的體積少於約 20%、10%或 5%。當多肽/蛋白通過化學法合成時，它優選基本不含有化學前體或其他的化學試劑即它是與參與到蛋白合成的化學前體或化學試劑被分離出的。為此，除了該有益多肽/蛋白片段之外，這種多肽/蛋白的製備物含有少於約 30%、20%、10%、

5% (乾重) 的化學前體或化合物。在本發明的一個優選的實施例中，該多肽/蛋白是被分離出的或純化的。

此處的“被分離出的”核酸分子是一種與其他天然來源核酸分子分開的核酸分子庫。而且，該“被分離出的”核酸分子如 cDNA 分子基本上是不含其他的細胞成分的，或者說是當來自於重組法生產時，它不含培養介質，當來自於化學法合成時，它不含有化學前體或其他的化學試劑，但當該核酸分子存在於重組 DNA 文庫時，情況例外。在本發明的優選的一個實施例中，編碼本發明的多肽/蛋白的核酸分子是被分離出的或純化的。

此處使用的術語“中性 pH”指的是 pH 值在約 5.5 和約 8.5 之間，優選為約 6.0 至約 8.0，更優選為約 6.5 至約 7.5 以及最優選為約 7.0。

此處使用的術語“可操作鏈結”指的是在該“可操作鏈結”啓動子的控制下，在轉錄時能夠產生功能性 mRNA，而翻譯則導致與該啓動子鏈結的 DNA 編碼的多肽的產生。

此處使用的術語“在嚴格的條件下”指的是雜交和清洗條件，在此條件下，核苷酸序列之間具有至少 70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 的一致性時，能保持相互之間的雜交。這種雜交條件在“Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.; Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y. (1986), pp.75-78, and

84-87; 和 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1992), pp.387-389,” 以及其他本領域技術人員熟知的資料中有詳細描述，但也不侷限於這些資料。優選的非限制性的嚴格的雜交條件的例子是：6 倍 NaCl/檸檬酸鈉 (SSC)，0.5%SDS，68℃，然後於室溫下，用 2 倍 SSC 和 0.5%SDS 溶液清洗一次或多次。另一個優選的非限制性的嚴格的雜交條件的例子是：6 倍 NaCl/檸檬酸鈉 (SSC)，約 45℃，然後於約 50-65℃，用 0.2 倍 SSC 和 0.1%SDS 溶液清洗一次或多次。

此處使用的術語“變體”指的是一種給定肽的天然產生的同位性變體或給定多肽/或蛋白的重組製備的變體，其中一個或多個胺基酸殘基被取代、添加或缺失。

5. 實施方式

5.1 PhyL 和或 168phyA

在 *B. subtilis* 168 的基因組中發現了與枯草芽孢桿菌中的兩個已公開的植酸酶基因具有高度序列同源性的閱讀框架 (ORF)。如 6.3 節描述的那樣，克隆基因 168phyA 表達出成熟的植酸酶 168phyA，通過 SDS-PAGE 測定其分子量 (MW) 為 44kDa (見圖 5A)。基於蛋白 168phyA、PhyK (Kim Y.O., et al., 1998, Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letter, 162:182-191) 和 phyC (Kerovuo J., et al., 1998,

Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*.

Applied and Environmental Microbiology,

64(6):2079-2085) 中的保守的胺基酸序列，應用變性寡聚核苷酸通過變性 PCR 反應從 *Bacillus licheniformis* 中克隆得到基因 PhyL。從核苷酸序列推斷出的胺基酸序列顯示該蛋白含有 381 個胺基酸殘基，像蛋白 168phyA 和其他的 *B. subtilis* 植酸酶一樣，該胺基酸序列中不包含一般在真菌和 *E. coli* 的植酸酶中存在的高度保守的 RHGXRXP 序列。由 SDS-PAGE 測定 PhyL 的分子量(MW)為 47kDa(見圖 5B)。

按照 Engelen A.J.等 (1994, Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*, 77(3): 760-764) 介紹的分析方法測定本發明的兩種植酸酶的酶活性。結果顯示，對與它們的酶活性來說，168phyA 和 phyL 二者都具有寬的溫度最適值，phyL 的溫度最適值是 65°C，168phyA 是 55°C (見圖 7A 和下文 6.4 節)。另外，在中性 pH 下，本發明的兩種酶在各自的最適溫度點均顯示最高的酶活性(見圖 7B 和下文 6.4 節)。更進一步，本發明的兩種酶尤其在 Ca²⁺存在時均顯示高的熱穩定性(見 6.4 節)。本發明多肽的這些特點即寬的最適溫度範圍、高的熱穩定性以及在中性 pH 時最適酶活性都指出了在 5.10 節所討論的該多肽的巨大的商業應用價值。

因此，本發明提供了序列為 SEQ ID NOS:1 和 3 的核酸分子、即分別為基因 phyL 和 168phyA，以及由此各自編碼

序列為 SEQ ID NOS:2 和 4 的多肽，phyL 和 168phyA。

5.2 phyL 和 168phyA 的類似物、衍生物和變體

除了上述描述的核酸分子和多肽之外，本發明的核酸分子和多肽也包括那些核酸分子和多肽，它們與上述本發明描述的核酸分子和多肽一樣具有一般的生物學活性、相似或相同的結構域和/或具有足夠的核苷酸序列或胺基酸一致性（類似物）。

這種本發明多肽的一般生物學活性包括抗原性、免疫原性、尤其是在中性 pH 時催化活性和本領域技術人員易於分析的其他活性。

具有相似的胺基酸序列的多肽指的是至少滿足下列條件的一個：(i) 多肽具有的胺基酸序列是至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 與 phyL (SEQ ID NO:2) 或 168phyA (SEQ ID NO:4)、或者是 phyL 或 168phyA 的片段的胺基酸序列一致，其附帶條件是該多肽既不是 phyC 或 phyK，也不是 phyC 或 phyK 的片段；(ii) 該多肽就是 phyL 或 168phyA 的片段，編碼該多肽的核苷酸序列有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 與編碼 phyL (SEQ ID NO:1) 或 168phyA (SEQ ID NO:3)、

或者是 phyL 或 168phyA 的片段的核苷酸序列一致，而且至少具有本發明多肽的一種結構和/功能，其附帶條件是該多肽既不是 phyC 也不是 phyK，也不是 phyC 或 phyK 的片段；(iii) 編碼該多肽的核苷酸在極其嚴格的條件下能夠與編碼基因 phyC (SEQ ID NO:1) 或 168phyA (SEQ ID NO:3) 的核苷酸雜交，而且至少具有本發明多肽的一種結構和/功能特點以及含有至少 10 個胺基酸殘基、至少 15 個胺基酸殘基、至少 20 個胺基酸殘基、至少 25 個胺基酸殘基、至少 40 個胺基酸殘基、至少 80 個胺基酸殘基、至少 90 個胺基酸殘基、至少 100 個胺基酸殘基、至少 125 個胺基酸殘基、至少 150 個胺基酸殘基、至少 175 個胺基酸殘基、至少 200 個胺基酸殘基、至少 225 個胺基酸殘基、至少 250 個胺基酸殘基、至少 275 個胺基酸殘基、至少 300 個胺基酸殘基、至少 325 個胺基酸殘基、至少 350 個胺基酸殘基或至少 375 個胺基酸殘基，其附帶條件是該多肽既不是 phyC 也不是 phyK，也不是 phyC 或 phyK 的片段。具有與 phyL 或 168phyA、或是 phyL 或 168phyA 的片段類似的結構的多肽指的是該多肽具有與 phyL 或 168phyA、或是 phyL 或 168phyA 的片段類似的二級、三級或四級結構的多肽，而且具有至少一種本發明多肽的功能特點。多肽結構的能夠用本領域技術人員所熟知的方法測定，包括但不侷限於 X-射線晶體學、核磁共振、晶體電子顯微技術等。在一個優選的實施例中，本發明的多肽衍生自一般認為是安全的芽孢桿菌菌株。

本發明還包括本發明多肽的衍生物。如，但不限於，該衍生物可以包括修飾後的多肽或蛋白，這種如糖基化、醯基化、PEG化、磷酸化、胺化、通過已知的保護/阻斷基團的衍生、蛋白水解酶的切割、與細胞中配基或其他蛋白的交聯等。通過已知的技術包括但不侷限於特異性化學切割、醯基化、甲醯基化等來進行任何一種化學修飾，衍生物分子中可能含有一個或多個非典型的胺基酸。

另一方面，本發明的多肽變體是由本發明中所述的被分離出的核酸分子所編碼的，該多肽變體的胺基酸序列已通過基因工程技術進行了修飾以便增加或降低該多肽的生物活性，或者是在沒有顯著改變其生物學活性的情況下改變了其局部結構。一方面，該多肽變體能夠用作激動劑或拮抗劑。激動劑能夠基本上保持本發明多肽的相同或部分的生物學活性，而抗激動劑則能抑制本發明多肽的一種或多種生物學活性。這種修飾包括胺基酸的取代、缺失、和/或插入。胺基酸的修飾方法可以通過本領域已知的任何方法和本領域技術人員所例行的各種可以應用的方法和路線。

如，根據本領域的任何技術所進行的誘變，包括但不侷限於合成具有一個或多個修飾位點的寡核苷酸，由此也就修飾了給定的多肽。通過使用含有所需突變體的核苷酸序列的特異性的寡核苷酸序列可以誘發定點誘變，還在編碼該多肽的核苷酸序列中有充足的相鄰核苷酸的數目。這種寡核苷酸能夠充當引物，在刪除聯接的核苷酸序列的兩端能夠形成穩定的雙螺旋。典型地，優選的核苷酸引物的長

度約 17-75 個核苷酸，序列接頭處兩側約 10 到約 25 個或更多個殘基被替換。使用大量這種能在一個或多個位點引入不同突變的引物可用來製備突變文庫。

如像各種出版物中所描述的那樣（例如，Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154: 367-382, 1987, 在此引入其全文作為參考），定點誘變技術在本領域是為大家所熟知的。一般來說，定向誘變的進行是首先獲得單鏈載體或雙鏈載體解開後的兩條鏈，這些鏈的序列中包含有編碼所需肽的 cDNA 序列，由此即可製備出產生所需突變序列的寡核苷酸引物，一般是人工合成的。然後，該引物連同單鏈載體一起退火，該過程受 DNA 聚合酶如 T7DNA 聚合酶所控制，以便完成產生突變的鏈的合成。因而，異型雙鏈產生了，一個鏈編碼原始的非突變的序列，另一個鏈產生所需的突變序列。然後用該異型雙鏈載體進行轉導或轉染合適的細胞，如 *E. coli* 細胞，選擇包含能產生突變序列的重組載體的克隆。應該感激的是，該技術典型地應用了存在有單鏈和雙鏈形態的噬菌體載體。在定向誘變方面典型的可用載體包括載體如 M13 噬菌體等。這些噬菌體易於商業化應用，而且它們的應用對本領域的技術人員來說是熟知的。在定向誘變方面，雙鏈質體也是常規使用的載體，它能減少將目的基因從質體轉移到噬菌體的步驟。

另一方面，商業上有可利用性的熱穩定性酶如 Taq DNA 聚合酶的 PCR 技術也可以將誘變的寡核苷酸引物引入到擴增 DNA 片段中，然後克隆到合適的克隆系或表達載體中。

見，例如 Tomic 等 (*Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987) 和 Upende 等 (*Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995) 所述的 PCR 介導的誘變程式，在此引入它們的全文作為參考。使用熱穩定連接酶以及熱穩定聚合酶的 PCR 技術也可以將磷酸化的誘變的寡核苷酸並入擴增的 DNA 片段，然後克隆到合適的克隆系或表達載體中 (見，例如 Michael, *Biotechniques*, 16(3): 410-412, 1994, 在此引入全文作為參考)。

其他的對於本領域技術人員所知的產生給定多肽或其片段的突變序列的方法均能應用，如編碼多肽或其片段的胺基酸序列的重組載體可用誘變劑如羥胺處理以獲得序列突變體。

優選地，被修飾的胺基酸殘基是暴露於表面的殘基。而且，在進行胺基酸取代時，優選的是保守性胺基酸取代，如極性殘基用極性殘基替代，親水性殘基用親水性殘基替代，疏水性殘基用疏水性殘基替代，帶正電荷的殘基用帶正電荷的殘基替代，帶負電荷的殘基用帶負電荷的殘基替代。此外還優選被修飾的胺基酸殘基並非是株系或種間高度保守或完全保守的和/或對於保持蛋白的生物活性卻是關鍵的。

據此，編碼本發明多肽的核酸也包含在本發明範圍之內，編碼的多肽中所含的胺基酸修飾對於其生物學活性不是關鍵的。

5.3 通過噬菌體 Φ 105 的過表達系統進行的酶的生產

報道的植酸酶過表達的誘導方法包括由 IPTG 介導的來自於 *B. subtilis* DS11 的基因 *phyK* 在 *E. coli* 中表達 (Kim 等, 1998, 上文)、甲醇介導的來自於 *Aspergillus* 的基因 *phyA* 在巴氏德比赤氏酵母 *Pichia pastoris* 中表達 (Han & Lei, 1999, 上文) 以及在 *E. coli* 中使用底物植酸鹽作誘導劑來誘導來自於 *Klebsiella terrigena* 的植酸酶基因 (Greiner 等, 1997) 和編碼植酸酶的 *phyC* 以生產植酸酶。使用植酸鹽作誘導劑是基於底物特異性理論。

在以前用枯草芽孢桿菌建立的 Φ 105 系統中 (Thornewell, S.J., Ease A.K., Errington J., 1993, An efficient expression and secretion system based on *Bacillus subtilis* phage Φ 105 and its use for the production of *B. cereus* α -lactamase I. *Gene*, 133:47-53, 在此引入全文作為參考), 一種有缺陷型原噬菌體載體即 Φ 105MU331 用來在 *B. subtilis* 中構建高水準的蛋白過表達系統 (Leung Y.C. and Errington J., 1995, Characterization of an insertion in the phage Φ 105 genome that blocks host *Bacillus subtilis* lysis and provides strong expression of heterologous genes. *Gene*, 154:1-6, 在此引入全文作為參考)。在該衍生系統中, *lacZ* 報告基因 (即來自於質體 pSG23 的 *lacZ*-cat 盒; Errington J., 1986, A general method for fusion of the *Escherichia coli lacZ* gene to chromosomal genes in *Bacillus subtilis*, *J. Gen. Microbiolo.* 132: 2953-2966) 插

入到該區中，類似於各種噬菌體如 ϕ 噬菌體的水解盒。這種系統不僅提供了有效地誘導（熱誘導）基因的轉錄，而且也提供阻止了宿主細胞的水解該酶的系統。因而在培養介質中產生的酶在不破碎細胞的情況下很易分離，因此純化步驟大大簡化。而且，不像 *E. coli* 那樣，桿菌屬細菌一般認為是安全的細菌而且它們的蛋白產物對動物包括人來說也一般是安全的。

據此，將本發明的核酸分子插入到表達載體 pSG 以構建 pSGt-pL 用於 phyL 的表達而構建 pSG-pA 以用於 168phyA 的表達。通過 PCR 技術擴增編碼成熟 phyL 的片段，在使用的引物的兩側有從翻譯密碼子 ATG 到基因的終止密碼子的 phyL 基因的編碼區，然後將該擴增片段亞克隆進入表達載體 pSGt，後者是將 *B. licheniformis* 的 α 澱粉酶基因的終止子亞克隆到 pSG 表達載體構建而成（見圖 4B 和下文 6.2 節）。在 pSGt-pL 構建體中，phyL 蛋白的基因受制於 Φ 105 原噬菌體的啓動子。構建體 pSG-pA 是通過將 PCR 產物亞克隆到表達載體 pSG 中而製備的，PCR 產物是通過使用基因 168phyA 的開放的閱讀框架（ORF）而獲得的。在該構建體中，基因 168phyA 的兩側是 Φ 105 啓動子和原始基因 168phyA 的終止子（見圖 A 和 6.3 節）。這些質體引入到 *E. coli* 株系 JM109 中以用於擴增和抗生素抗性克隆系的篩選，然後再引入到宿主株系如 *B. subtilis* MU331 以用於酶的生產。因此，本發明進一步包括載體、宿主細胞以及重組生產植酸酶的方法（詳見 6.2 和 6.3

節)。在一定的實施例中，宿主細胞是芽孢桿菌種，優選為枯草芽孢桿菌 MU331。

5.4 融合蛋白

本發明進一步包括融合蛋白，在該融合蛋白中本發明的多肽或其片段重組性地融合到或者化學性偶聯（如共價和非共價偶聯）到異源多肽（即非相關多肽或其部分，優選是該多肽的至少 10 個、至少 20 個、至少 30 個、至少 40 個、至少 50 個、至少 60 個、至少 70 個、至少 80 個、至少 90 個、至少 100 個胺基酸殘基）上從而生成融合蛋白。這種融合可以是直接的，但也可能通過連接序列進行。

一方面，融合蛋白包含本發明的多肽，在該多肽的 N 末段融合了異源信號序列。如本來就存在於本發明多肽中的信號序列能夠被衍生於異種起源的信號序列取代。各種信號序列均有商品銷售，如 *phoA* 分泌信號（Sambrook 等，詳見前述；和 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992）和蛋白的分泌信號（Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ）就像原核的異源信號序列一樣均有商品銷售。

在另一個實施例中，本發明的多肽能夠與標記序列融合，如含六個織胺酸的肽，pQE 載體（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）提供了該標記，在其他已商業化的載體中也有。如 Gentsz（1989, *Proc. Acad. Sci. USA*, 86:821-824）等所描述的那樣，六織胺酸肽為融

合蛋白的純化提供了便利。其他的肽標記的例子是血球凝集素蛋白“HA”標記物，它對應於來自於流感血球凝集素蛋白的表位（Wilson et al., 1984, Cell, 37:767）和“旗型”標記物（Knappik et al., 1994, Biotechniques, 17(4): 754-761）。這些標記物對於本發明的重組多肽的純化很有幫助。

通過標準的重組 DNA 技術或蛋白合成技術如使用肽合成儀能夠生產融合蛋白，如編碼融合蛋白的核酸分子可通過包括自動化的 DNA 合成儀在內的傳統技術合成。換句話說，PCR 擴增基因片段可通過使用錨定引物進行，該錨定引物讓兩個連續的基因片段互補延伸，隨後退火以及再擴增從而生成嵌合的基因序列（見，例如，Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992）。

編碼融合蛋白的核苷酸序列中能夠插入適當的表達載體，即載體含有用於插入蛋白的轉錄和翻譯的必要元件。

在一個特殊的實施例中，融合蛋白的表達是通過可誘導的啟動子調節的。

5.5 重組蛋白的純化

一旦本發明的多肽由上述的方法產生，該重組蛋白可以用本領域所熟知的任何一純化重組蛋白的方法來純化，如下述方法但不侷限於它們，層析（如離子交換層析、親和層析具體為特異性抗體親和、凝膠過濾層析）、離心沈澱、

溶解性差異、或其他任何的蛋白純化的標準技術。進一步，本發明的多肽或其片段能夠融合成在此所述的異源性多肽序列，或者用本領域所已知的技術純化。

在一個特殊的實施例中，由枯草芽孢桿菌表達的蛋白 phyL 或 168phyA 的純化是，將來自於細胞培養液的上清部分，先經乙醇沈澱、然後離心沈澱和對上述沈澱的溶解物進行凝膠過濾（見 6.2 節和 6.3 節）。

5.6 動物飼料的製備

如上面 5.1 節-5.5 節所製備的本發明的多肽，在中性 pH 下具有植酸酶活性，能夠用於提供動物飼料，使得餵養該飼料的動物能夠有效地利用磷元素。因而，本發明的另一項內容就是提供含有本發明多肽的動物飼料以便從植酸鹽中釋放可利用的磷元素供給動物。例如，這種動物飼料在造粒之前可借助與本發明的植酸酶酶粉混合來製備混合的重量比為一噸飼料約 1kg 酶粉，其酶活性為 200000-400000EU/kg。為了徹底混合，酶粉可先與少量的飼料如 10kg 混合，然後再與飼料的剩餘部分混合。飼料中的酶劑量至少是 200 酶單位（EU）/kg 飼料，優選為至少 250EU/kg 飼料，最優選為至少 300EU/kg 飼料。一個酶活性單位是在 37°C 和 pH7.0 時，在 1 分鐘內從 5.1mM 植酸鈉鹽釋放 1 μ mole 正磷酸鹽所需的酶量。飼料中包含有玉米、穀物、小麥、大麥、水稻麩皮、食用大豆和食用 canola、或者是其他用作動物飼料的材料。

5.7 轉基因植物的製備

植物生長需要的元素包括碳、氫、氧、磷、氮、金屬離子和痕量元素。植物通過水和光合作用獲取碳、氫和氧，而磷、氮、金屬離子和痕量元素則主要是從土壤獲得。因此，土壤中的磷元素和氮元素的可利用能力則成爲植物生長的限制因數。

本發明基於如下發現：如果不考慮兩種生物的植酸酶在基因和蛋白序列及其結構的廣泛差異，來自於一種生物體的植酸酶能夠以該植物體中基本的生物途徑組成在另外一種植物中有效地起作用。因此，本發明涉及到在植物體內一種新的生化途徑的創建，它能將從不可利用磷元素提升到可利用的無機磷酸鹽，因而增加了植物的生長，就像例子中所述的那樣，增加了側芽的數目。由於在開花和做果時也需要磷酸鹽，爲此本發明也提供了經過改良後的開花植物（如開花早以及增加了芽/花的數目）和做果植物（如增加果實數量）。

由此，本發明提供了含有編碼和表達植酸酶的核酸分子的轉基因植物，表達的植酸酶在中性 pH 時有最佳的催化活性。本發明的轉基因植物相對於可比的非工程植物即同種（株）來說，改進了植物的生長、開花和做果。在一個特殊的實施例中，這種植酸酶來自於芽孢桿菌菌株，在中性 pH 時有最佳的催化活性。在一個優選的實施例中，本發明的轉基因植物包含有本發明的核酸分子並表達蛋白

PhyL (SEQ ID NO:2) 或 168phyA (SEQ ID NO:4), 兩種蛋白在中性 pH 時是有活性的而且具有寬的溫度範圍, 如對於 PhyL 來說是 37°C 到 70°C, 對於 168phyA 是 37°C 到 65°C。在一個優選的實施例中, 該植酸酶不是以可檢測量分泌的或者分泌量不是很明顯 (即不超過總植酸酶的 1%、2%、5% 或 10%)。儘管 SEQ ID NO:2 和 4 具有原始的信號肽, 但對蛋白的分泌卻不盡如人意。在另一個優選的實施例中, 植酸酶是胞外表達的, 如可以從轉基因植物的根部分泌。在植物體內, 這種胞外表達的中性蛋白能夠通過融合的方法獲得, 即將異源核苷酸序列融合到編碼植物信號肽的 N 末端或用於取代編碼植酸酶基因的原始信號肽的核苷酸序列 (對 phyL (SEQ ID NO:2) 來說, 即胺基酸殘基 1-80 的全部或部分尤其是 N 末端部分, 優選的是胺基酸殘基 1-20 的全部或部分; 或者對 168phyA (SEQ ID NO:4) 來說, 即胺基酸殘基 1-80 的全部或部分尤其是 N 末端部分, 優選的是胺基酸殘基 1-26 的全部或部分), 該異源核苷酸序列編碼的信號肽能使給定植物細胞翻譯後的植酸酶有效的分泌出來。植物信號肽的例子包括但不侷限於來自於伸展蛋白或與伸展蛋白相關多肽的信號肽 (Richardson et al., 2001, Plant Journal, 25:641-649)、酸性磷酸酶 (Haran, -S; Logendra, -S; Seskar, -M; Bratanova, -M; Raskin, -I., Oct., 2000, Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression, Plant-Physiol.

124(2):615-626)·內質網信號肽 (Borisjuk, -N-V; Borisjuk, -L-G; Logendra, -S; Petersen, -F; Gleba, -Y; Raskin, -I., May, 1999, Production of recombinant proteins in plant root exudates, Nat-Biotechnol. 17(5):466-469)· α -澱粉酶 (Park CS, Chang CC, Kim JY, Ogrydziak DM, Ryu DD., 1997, Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*, J Biol Chem, 272:6876-6881) 以及 PVR3 (Choi, -D-W; Song, -J-Y; Oh, -M-H; Lee, -J-S; Moon, -J; Suh, -S-W; Kim, -S-G., Mar., 1996, Isolation of a root-specific cDNA encoding a ns-LTP-like protein from the roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, Plant-Mol-Biol. 30(5): 1059-1066)。

由此，在另外一個優選實施例中，本發明的轉基因植物包含有本發明的核酸序而且表達蛋白 PhyL (SEQ ID NO:2) 或 168phyA (SEQ ID NO:4)，但通過基因工程的方法用異源植物信號肽取代了蛋白的 N 末端部分，對 SEQ ID NO:2 來說，即胺基酸殘基 1-80 的全部或部分尤其是 N 末端部分，優選的是胺基酸殘基 1-20 的全部或部分；或者對 SEQ ID NO:4 來說，即胺基酸殘基 1-80 的全部或部分尤其是 N 末端部分，優選的是胺基酸殘基 1-26 的全部或部分。在這種轉基因植物中，中性植酸酶分泌到土壤中，將土壤植酸鹽轉化為無機磷酸鹽供植物吸收。在另外一個優選的實施例中，本發明的轉基因植物至少包含兩種本發明的核酸分子，其中一種核酸分子編碼蛋白 PhyL (SEQ ID NO:2)，

而另一種核酸儘管也編碼蛋白 PhyL，但用異源植物信號肽取代了 SEQ ID NO:2 的 N 末端部分，即 N 末端胺基酸殘基 1-80 的全部或部分，優選的是胺基酸殘基 1-20 的全部或部分。在另外一個優選的實施例中，本發明的轉基因植物至少包含兩種本發明的核酸分子，其中一種核酸分子編碼蛋白 168PhyA (SEQ ID NO:4)，而另一種核酸儘管也編碼蛋白 168PhyA，但用異源植物信號肽取代了 SEQ ID NO:4 的 N 末端部分，即 N 末端胺基酸殘基 1-80 的全部或部分，優選的是胺基酸殘基 1-20 的全部或部分。這種轉基因植物可以表達胞內和胞外兩種植酸酶。在另外一個優選的實施例中，本發明的轉基因植物包含本發明的核酸分子並表達本發明多肽的類似物、衍生物和/或它們的片段，後者至少具有一種本發明多肽的功能特點和/或結構特點。還是在另外一個優選的實施例中，本發明的轉基因植物包含本發明的核酸分子在極其嚴格的條件下能夠與具有 SEQ ID NO:1 或 3 的序列、或它們的互補鏈雜交並編碼至少具有本發明多肽的一種結構和/功能特點的蛋白或多肽。本發明還特別提供了能夠產生中性植酸酶的轉基因煙草和轉基因水稻的生產，產生的中性植酸酶有益於改善植物生理如植物生長速率和特性，例如在改善開花反應方面。而且，當這些植物產生的中性植酸酶供應給動物時，這種植酸酶能夠作用於存在動物飼料中的其他的植酸鹽資源以水解植酸鹽，釋放的無機磷酸鹽用於動物的同化作用。這就降低或排除了動物飼料中補加植酸酶或無機磷酸鹽的需求，也減少了動

物分泌磷元素的，而帶來的環境污染問題。因此，本發明進一步提供了包含本發明的轉基因植物（尤其來自於這些轉基因植物的種子或果實）的動物飼料。

因此，本發明還提供了用於對植物遺傳修飾的嵌合基因構建體，增加磷元素可利用，從而提高了植物的生長速率和縮短了開花所需的時間。嵌合基因構建體中包含率的基因序列基本上僅僅編碼植酸酶，該酶在中性 pH 條件下催化植酸鹽的水解。優選的植酸酶衍生於芽孢桿菌屬菌株。在一個特殊的實施例中，嵌合基因構建體中包含具有序列 SEQ ID NO:1 或 3 的核酸。在另一個實施例中，嵌合基因構建體中包含具有序列 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:3 的核酸，但對於序列 SEQ ID NO:1 來說，241 至 480 核苷酸序列的全部或部分優選是 241 至 300 核苷酸序列的全部或部分被編碼植物信號肽的異源核苷酸序列所取代，和/或對於序列 SEQ ID NO:3 來說，100 至 339 核苷酸序列的全部或部分優選是 100 至 177 核苷酸序列的全部或部分被編碼植物信號肽的異源核苷酸序列所取代。在另外一個優選的實施例中，嵌合基因構建體中包含的核酸分子編碼至少具有一種本發明多肽的功能特點和/或結構特點的多肽的類似物或它們的片段。在另外一個特殊的實施例中，嵌合基因構建體中包含的核苷酸序列能夠與具有序列 SEQ ID NO:1 或 3 的序列、或它們的互補鏈雜交的核酸雜交，該序列編碼的蛋白或多肽顯示至少具有本發明多肽的一種結構和/功能特點。更進一步，由本發明的嵌合基因構建體

中包含的核酸分子編碼的植酸酶可以是任何其他的在中性 pH 條件下有最佳催化活性的植酸酶，而且具有任意相似的結構特性如對於本發明的植酸酶而言的多鈣結合位點。這種植酸酶包括但不侷限於下列多肽：

來自於芽孢桿菌種的植酸酶（接受序列號：AAC38573, AAC31775, 7767024）；來自於枯草芽孢桿菌的植酸酶（接受序列號：AAC31775, AAG17903, AAB72078, AAA87722）；來自於解澱粉芽孢桿菌的植酸酶（接受序列號：7246002, 7245653）；來自於新月柄桿菌的植酸酶（接受序列號：AAK23276）以及來自於天藍色鏈黴菌（接受序列號：CAC17528）。

編碼植酸酶的序列任選地連接到調節組分的上游和下游，優選用異源性植酸酶序列；如 CMV35S 啓動子促使植物細胞中基因（產生酶的基因）的表達（見 6.5.1-6.5.4 節）。根據本發明，用傳統的轉形方法將含有植酸酶基因的構建體引入植物細胞時，如微粒轟擊法、農桿菌感染法或顯微注射法，在調節序列的控制下這種基因在細胞內表達。成功表達的植酸酶與天然存在於植物細胞中的生物合成機制相互作用，在中性 pH 下催化植酸鹽以釋放無機磷酸鹽。通過增加無機磷酸鹽的可利用性，本發明也就有益於生長速率的提高，促進開花和做果。因而，縮短了植物成熟和開花的時間。由此，本發明還提供了具有低水平植酸鈉鹽植物細胞和植物整株，在此種植物的細胞中含有根據本發明的嵌合基因構建體。本發明還提供了增加存在於植物細

胞和整株植物的無機磷酸鹽的可利用性的方法，它包含在這種植物細胞或這種整株植物的細胞中插入根據本發明的假想基因的步驟。

在特殊的實施例中，採用水稻（見 6.5.3 節）和煙草（見 6.5.4 節）作為兩種模型系統。含有編碼植酸酶的基因的兩種假想的構建體引入到這兩種植物中。

在本發明的一個優選的實施例中，應用了來自於枯草芽孢桿菌的植酸酶。當這種植酸酶含有用於分泌的信號肽時，它能從細胞中分泌出來。在中性 pH 下這種酶能從植酸鹽中釋放出無機磷酸鹽，而且該酶具有高溫穩定性。因此，已經發現，如果不考慮兩種生物的植酸酶在基因和蛋白序列及其結構的廣泛差異，來自於一種生物體的植酸酶能夠以該植物體中基本的生物途徑組成在另外一種植物體中有效地起作用。因此，本發明也涉及到植物體中生化途徑的創建，創建的途徑提高了磷從植酸鹽形式到無機磷酸鹽形式的轉化。根據本發明所得到的結果說明了新型的生化途徑增加了植物的生長速率（見 6.5.9 節和圖 12 和 13）。

已經觀察到植物的開花需要磷，因而，本發明還提供了轉基因開花植物，由於中性植酸酶的轉基因的表達，增加了磷的可利用性，從而縮短了開花所需的時間。

任何的植物種用本發明的表達盒和方法修飾時，優選包括但不侷限於下列各屬植物及括弧內的各自的種：

單子葉植物：天門冬屬 *Asparagus*（天門冬）、雀麥屬（雀麥）、萱草屬（*Daylily* 萱草）、大麥屬（大麥）、黑麥草

屬 (黑麥草)、稻屬(水稻)、黍屬 (witchgrass 黍)、狼尾草屬 (Fountaingrass 狼尾草)、蜀黍、葫蘆巴屬 (fenu grass 葫蘆巴)、小麥屬 (小麥)、玉蜀黍屬 (玉米) 和

雙子植物：金魚草屬 (flower sp.)、*Arabidopsis* 擬南芥屬 (thaliana)、*Arachis* (落花生)、顛茄屬 (顛茄)、芥屬 (油菜)、*Browallia*, 辣椒屬 (胡椒), *Carthamus* 紅花屬 (紅花), 菊苣屬 (菊苣), *Citrus* 桔屬 (柑橘、檸檬), 菊屬, *Cucumis* 黃瓜屬 (黃瓜), 曼佗羅屬 (thorn apple), 胡蘿蔔屬 (胡蘿蔔), 毛地黃屬 (毛地黃), 草莓屬 (草莓), 老鸛草屬 (flower sp.), 大豆屬 (大豆), 向日葵屬 (向日葵), *Hyscyam*, *Ipomoea* (牽牛花), *latuca* 萵苣屬 (萵苣), 亞麻屬 (亞麻), 百脈根屬 (flower sp.), *Lycopersicon*, 番茄屬 (番茄), 茛菪樂那 (擬), 錦葵屬 (棉花), 木薯屬, *Medicago* (苜蓿), 龍面花屬, *Nicotiana* (煙草), 驢喜豆屬, 天竺葵屬 (*citrosa*), 矮牽牛屬 (flower sp.), 毛茛屬 (flower sp.), 蘿藦屬 (蘿藦), *Salpiglossis*, 千里光屬 (flower sp.), *Sinapis* (*albae* semen), 茄屬 (土豆), *Trifolium* (clovers 三葉草), 豇豆屬 (mungbean 綠豆, faba bean), 葡萄屬 (葡萄)。

植物的基因構建可以通過幾種方式獲得成功，最常用的方法是土壤農桿菌介導的轉形。在該方法中，對土壤農桿菌的根癌農桿菌種進行了處理，該種通過將致腫瘤基因插入植物基因組中從而感染植物。在實驗室條件下，將選擇的基因轉入 *A. tumefaciens* 的 Ti 質體的 T-DNA 中，通過細菌自身的內部轉移機制將其 T-DNA 轉入植物體內，從而使

該基因整合到植物的染色體中。T-DNA 的唯一基本部分是它的兩個小的（25 個鹼基對）端部重復序列，至少其中之一是用於植物轉形的。編碼用於啓動腫瘤生長的植物激素的細菌基因從 T-DNA 中除去，取而代之的 DNA 序列，通常包括：選擇性標記物（如抗生素抗性基因，常用卡那黴素抗性）、限制性酶切位點—該點具有特殊的核苷酸序列，限制性內切酶可以切割該 DNA 該位點以及待引入植物體內的的目的基因（B. Tinland, 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. Trends in Plant Science1, 178-184; D. Grieson(ed.) 1991. Plant Genetic Engineering. Blackie, Glasgow)。將土壤農桿菌加入到培養物中植物原生質體（去掉細胞壁的植物細胞）然後允許再生出細胞壁，當使用抗生素時未轉形的植物細胞被殺死而轉形的植物則授予了抗生素抗性基因。之後用標準的植物組織培養技術從生還的轉形細胞中再生出植物幼苗。另一個技術是，將植物營養體的片段或其他的無菌部分在液體培養介質中和土壤農桿菌一同培養，然後在選擇性培養介質中加入激素以誘導生根，從再生出植物幼苗。對於一些植物如 *Arabidopsis* 而言，第三個傳遞基因的技術是可行的土壤農桿菌或甚至裸 DNA 能夠通過種子包衣融合到植物細胞內而導致轉形（Clough SJ and Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16:735-743）

最近用於植基因工程的生物法得到了發展而且受到了

廣泛的應用。在這種方法中，包裹有生物活性 DNA 的非常小的鎢或金顆粒（微射彈），用電脈衝、氣壓或散彈槍將其高速擠入植物細胞。由於顆粒穿過細胞，DNA 可溶解其中然後整合到細胞或其後代的基因組中。已有的結果顯示該方法能產生穩定的轉形植物（Christou, P., et al., 1988.

Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles, Plant Physiology, 87: 671-674）。該方法可以用於整株植物，尤其對分生組織有效。該方法還能傳遞 DNA 到核或線粒體（Johnston SA., et al., 1988.

Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. Science, 240:1538-1541）和葉綠體（Svab Z., et al., 1990. *Stable transformation of plastids in higher plants, Proc Natl Acad Sci. USA 87, 8526-8530*）。

植物基因工程的電穿孔法成功不多，在該技術中，當用一定的膜-活化劑或用電穿孔法即一種高壓直流電的脈衝處理培養中的原生質體時，它可以吸收純的 DNA。一旦 DNA 進入原生質體內，它可以整合到細胞的染色體組中，然後用標準化的組織培養技術即可再生出轉基因植株。

植物基因工程的顯微注射法可能是最困難的，在該方法中，應用非常細的玻璃針將 DNA 顯微注射到植物靶細胞中，該法相似於在動物中的應用。對於大量轉基因植物的生產來說，該法是辛苦的、無效的和不實用的工作。

用於基因工程植物的方法的遴選常常主要取決於靶植物的種和業已證明的有效方法。

5.8 抗體的製備

特異性識別本發明多肽或其片段的抗體能夠用於本發明多肽或其片段或編碼來自於其他生物的相似酶的相似序列的檢測、篩選以及分離。如，在一個特殊的實施例中，能夠免疫特異性結合 PhyL 或 168phyA 或其片段的抗體可用於進行各種體外檢測分析，包括酶聯免疫吸附

(ELISA)、放射免疫分析、West 印跡等，以檢測本發明多肽或片段、衍生物、類似物或其變體、或在樣品中同本發明肽具有相似酶活性的相似分子，如生物材料，包括細胞、細胞培養介質（如細菌培養介質、哺乳類細胞培養介質、昆蟲細胞培養介質、酵母細胞培養介質）、血液、血漿、血清、組織等。

本發明多肽的特異性抗體可通過任何本領域已知的方法產生。對於有益抗原的多抗可用本領域所熟知的各種工藝產生。如將來自於本發明多肽的衍生的抗原用於各種宿主動物，包括但不侷限於兔、小鼠、大鼠等，誘導含有對抗原有特異性的多抗的抗血清。各種佐劑可用以增加免疫反應，這取決於宿主的種類，佐劑包括但不侷限於弗氏佐劑（完全和不完全）、礦物膠如氫氧化鋁、表面活性物質如溶血卵磷脂、pluronic 多元醇、聚陰離子、肽、油乳劑、血銅蛋白輔基鑰孔血藍素、二硝基苯酚以及潛在的可用於人的佐劑如 BCG (卡介菌) 和小棒桿菌。這些佐劑在本領域也是熟知的。

單克隆抗體的製備可通過本領域已知的多種技術進行，包括使用雜交瘤、重組體以及噬菌體展示技術，或者這幾種技術的組合。例如，單抗的製備可通過雜交瘤技術所產生，包括本領域已知的且用於教學的方法，如在下列書籍中的方法，Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling 等: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pp. 563-681 (Elsevier NY, 1981) (此處引入二者的全文作為參考)。此處使用的術語“單克隆抗體”不侷限於通過雜交瘤技術產生的抗體。術語“單克隆抗體”指的是衍生自單克隆系的抗體，包括任何的真核細胞、原核細胞或噬菌體的克隆，而不是指生產單克隆抗體的方法。

應用雜交瘤技術製備和篩選特異性抗體的方法在該領域已經是常規和熟知的，在一個非限制性的例子中，小鼠可以用目的抗原或者用表達這種抗原的細胞免疫。一旦檢測到免疫應答，如在鼠血清中檢測到對應於抗原的特異性抗體，收集脾臟並分離出脾臟細胞。然後用熟知的技術將該脾臟細胞與合適的骨髓瘤細胞融合。通過有限稀釋篩選出雜交瘤並克隆。用本領域已知的方法分析雜交瘤克隆系，分泌抗體的細胞具有結合抗原的能力。腹腔積液可以用陽性雜交瘤克隆腹膜內接種小鼠來製備通常含高水準抗體的腹水。

識別特異性表位的抗體片段可借助已知的技術製備，如 Fab 和 F(ab')₂ 片段可通過免疫球蛋白分子的蛋白水解作

用的切割來實現，使用的酶如木瓜蛋白酶（產生Fab片段）或胃蛋白酶（產生F(ab')₂片段）。F(ab')₂片段含有完整的輕鏈以及重鏈的可變區、CH1區和轉折區。

本發明的抗體或其片段由本領域已知的合成抗體的方法來製備，具體是通過化學合成法，優選的是重組體的表達技術。

編碼抗體的核苷酸序列可來自於對本領域技術人員來說能夠利用的任何來源（即來自於Genbank、文庫或通過常規克隆方法）。如果無法獲得含有編碼特異抗體或其表位結合片段的核酸克隆，但抗體分子或其表位結合片段的序列是已知的，則可以化學合成編碼免疫球蛋白的核酸或借助PCR擴增方法從合適的來源（如抗體的cDNA文庫，或從核酸產生出的cDNA文庫，優選借助polyA+RNA，從任何表達抗體的組織或細胞中分離出的，如表達抗體的雜交瘤）獲得，使用的合成引物能夠與核酸的3'端序列和5'端雜交，或通過使用對特殊基因序列有特異性的寡聚核苷酸探針來克隆與來自於cDNA文庫能夠編碼抗體的cDNA克隆來獲得相一致的核苷酸序列。PCR擴增產生的核酸可借助本領域任何已知的方法克隆到可以複製的克隆載體中。

一旦抗體的核苷酸序列確定，可用本領域任何熟知的核苷酸序列處理方法來處理該抗體的核苷酸，如重組DNA技術、定點誘變、PCR等（例如，見前述Sambrook等所描述的技術以及Ausubel等編著，1998，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY，此處引入二者

的全文作為參考)以產生具有不同的胺基酸序列的抗體，如引入了胺基酸替換、刪除和/或在抗體或其部分的特異性抗原決定部位插入胺基酸，增加或降低抗體的生物學活性。

抗體的重組表達需要構建表達載體，該表達載體中含有編碼抗體的核苷酸的序列。一旦獲得編碼抗體分子或其重鏈或輕鏈或其部分的核苷酸序列，用於抗體產生的載體可通過重組DNA技術來產生，這些本領域所熟知的技術在以前的章節中已經討論過。這些對本領域技術人員所熟知的方法常用於構建表達載體，所構建的表達載體中含有編碼抗體的序列以及合適的轉錄和翻譯的控制信號。例如，這些方法包括體外重組DNA技術、合成技術和體內基因重組。編碼抗體重鏈可變區、輕鏈可變區、重鏈可變區和輕鏈可變區、重鏈和/或輕鏈可變區中的表位結合片段、或抗體的一個或多個互補決定區(CDRs)的核苷酸序列均能克隆到這種表達載體中。這種製備好的表達載體可隨後引入合適的宿主細胞中以表達抗體。因此，本發明包括含有多聚核苷酸的宿主細胞，該多聚核苷酸編碼了對本發明多肽或其片段有特異性的抗體。在一定的實施例中，宿主細胞是芽孢桿菌種，優選枯草芽孢桿菌 MU331。

宿主細胞可用兩個本發明的表達載體共同轉染，第一個載體是編碼重衍生多肽鏈，第二個載體編碼輕衍生多肽鏈。兩個載體可含有相同的可選擇性的標記，從而使重鏈和輕鏈有相同的表達，兩個載體也可以含有不同的可選擇性的標記以確保兩個質體的穩定。作為替換，也可使用能

夠編碼和表達重鏈和輕鏈多肽的單一載體。在此種情況下，輕鏈應該放到重鏈之前以避免毒性的游離重鏈的過量表達（Proudfoot, 1986, *Nature*, 322:52; 和 Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2197）。用於編碼重鏈和輕鏈的序列可以包含 cDNA 或基因組 DNA。

在另一個實施例中，抗體也可通過使用本領域已知的各種噬菌體展示方法來產生。在噬菌體展示方法中，功能性的抗體域位於噬菌體顆粒的表面，該噬菌體攜帶有編碼抗體的多聚核苷酸序列。在一個特殊的實施例中，這種噬菌體可用於展示與域結合的抗原，此處的域指 Fab 和 Fv 或二硫鍵穩定的 Fvs，它們來自於全組份的或重組配的抗體文庫（如人或鼠）。表達能夠與目的抗原結合的抗原結合域的噬菌體能夠用於抗原的篩選或者鑒定，如使用標記的抗原或者被結合或捕獲在固相表面或小珠上的抗原結合物。這些方法中使用的噬菌體是典型的絲狀噬菌體，包括 fd 和 M13。抗原結合域以該蛋白與噬菌體基因 III 或基因 VIII 蛋白融合形式的表達。噬菌體展示方法例子可用於製造本發明的免疫球蛋白或其片段，包括以下公開的文獻中免疫球蛋白或其片段，Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50、Ames et al., 1995, *Immunol. Methods*, 184:177-186、Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene*, 187:9-18、Burton et al., 1994, *Advances in Immunology*, 57:191-280、PCT applications No. PCT/GB91/01134、PCT applications WO

90/02809、WO 91/10737、WO 92/02047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401和U.S. Patent Nos. 5698426、5223409、5403484、5580717、5427908、5750753、5821047、5571698、5427908、5516637、5780225、5658727、5733743和5969108，在此引入作為參考。

如上述參考文獻所述，噬菌體篩選後，來自於噬菌體的抗體編碼區能夠分離出來並用於製備完整的抗體，包括人抗體，或其他任何目的片段，以及能在任何需要的宿主包括哺乳類細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母和細菌中表達，如下面詳述的那樣。例如，用於製備重組Fab、Fab'和F(ab')₂的技術也可使用，這些在本領域已知的方法如PCT 公開文本 WO 92/22324、Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12(6):864-869 和 Sawai et al., 1995, AJRI, 34:26-34、Better et al., 1988, Science, 240:1041-1043（在此引入它們的全部作為參考）。用於產生單鏈Fvs和抗體的例子包括如下文獻：美國專利Nos. 4946778和5258498、Huston et al., 1991, Methods in Enzymology, 203:46-88、Shu et al., 1993, PNAS, 90:7995-7999和Skerra et al., 1988, Science, 240:1038-1040。

一旦本發明的抗體分子按照上述的方法產生，隨後用本領域已知的純化免疫球蛋白分子的方法來純化該抗體分子，如用層析法（如離子交換層析、親和層析、尤其蛋白A或蛋白G純化後對特異性抗原的親和層析和凝膠排阻層析）、沈澱法、溶解度差異法或其他任何蛋白純化的標準

技術。更進一步，可將本發明的抗體或其片段融合到本發明所述的或其他本領域已知的實現純化的異源性多肽序列上。

就一些用途而言，包括抗體的人體內應用和體外檢測分析，優選使用嵌合抗體、人源化的抗體或人抗體。嵌合抗體是這樣一種分子，該抗體的不同部分衍生自不同的動物種，如該抗體具有衍生自鼠單克隆抗體的可變區和衍生自人免疫球蛋白的不變區。用於產生嵌合抗體的方法在本領域是已知的，例如見：Morrison, 1985, *Science*, 229: 1202、Oi et al., 1986, *Bio Technique*, 4:214、Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods*, 125:191-202、U.S. Patent Nos. 5807715、4816567以及4816397，在此引入它們的全部作為參考。人源化的抗體是能夠結合目標抗原的非人源抗體，其具有1個或多個非人來源的互補決定區（CDRs），以及來源於人免疫球蛋白的框架結構區和恒定區。在人框架結構區中的框架殘基常常被來自於CDRs供體抗體的對應胺基酸殘基所取代，以改變優選提高對抗原的結合性。所述框架取代由本領域所熟知的方法測定，如通過類比CDR與框架中胺基酸殘基的相互作用以確定框架中殘基對抗原結合的重要性以及序列的比較以確定在特殊位置的非同一般的胺基酸殘基。例如見Queen et al., U.S. Patent No. 5585089、Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332: 323，在此引入它們的全部作為參考。本領域的已知的多種技術都能夠使抗體人源化，如這種技術包括CDR稼接（EP 239400、

PCT publication WO 91/09967、U.S. Patent Nos. 5225539、5530101和5585089)、表面修飾或整理(EP 592106、EP519596以及Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498、Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6): 805-814、Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973)和鏈拖動(Patent Nos. 5565332), 所有這些文獻在此全文引入作為參考。

完全的人抗體尤其適合於對人患者的治療處理。人抗體能夠通過本領域已知多種方法來製備, 包括上述的噬菌體展示方法, 該方法使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗體文庫。見U.S. Patent Nos. 4444887和4716111、PCT Publications WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741, 所有這些文獻在此全文引入作為參考。

應用轉基因小鼠也可獲得人抗體, 該鼠不能再表達功能性的內源免疫球蛋白, 而能表達人免疫球蛋白的基因。回顧製備人抗體的技術, 見Lonberg and Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93。關於製備人抗體和人單克隆抗體及其製備這種抗體的方法的詳盡的描述詳見, 如PCT 公開號WO 98/24893、WO 96/34096、WO 96/33735、European Patent No. 0598877、US Patent Nos. 5413923、5625126、5633425、5569825、5661016、5545806、5814318、5885793、5916771和5939598, 所有這些文獻在此全文引入作為參考。另外, 像Abgenix, Inc. (Fremont, CA)、Medarex (NJ)和Genpharm

(San Jose, CA)等公司利用上述相似的技術均可提供對選擇性抗原有針對性的人抗體。

用一項被稱作“指導選擇”的技術能夠製備出可識別選擇表位的完整人抗體。在該方法中，用選擇性的非人源單克隆抗體如鼠抗體來指導識別同一表位的完整人抗體的選擇 (Jespers et al., 1988, *Bio/Technology*, 12:899-903)。

融合或交聯到異源性多肽上的抗體可用於體外的免疫分析和本領域所熟知的純化方法（如親和層析）中。例如見PCT publication Number WO 93/21232、EP 439095、Naramura et al., 1994, *Immunol. Lett.*, 39: 91-99、US Patent 5474981、Gillies et al., 1992, *PNAS*, 89: 1428-1432和Fell et al., 1991, *J. Immunol.*, 146: 2446-2452，所有這些文獻在此全文引入作為參考。

抗體也可以同固相支援物連接，尤其適合於本發明多肽或其片段、衍生物、類似物或其變體、或具有本發明多肽相似酶活性的相似分子的免疫分析或純化。這種固相支援物包括但不侷限於玻璃、纖維素、聚丙烯醯胺、尼龍、聚苯乙烯聚氫乙烯或聚丙烯。

5.9 檢測分析

用於檢測本發明多肽或核酸存在與否的示範性方法包括從各種來源中獲得生物樣品並使之與能夠檢測本發明所述多肽或核酸（如mRNA、基因組DNA）的化合物或試劑接觸，從而檢測了樣品中本發明多肽或核酸的存在。優選

的用於檢測編碼本發明多肽的 mRNA 或基因組 DNA 的試劑是標記的核酸探針，它能夠與編碼本發明多肽的 mRNA 或基因組 DNA 雜交。例如，該核酸探針可以是全長的 cDNA 如核酸 SEQ ID NO:1 或 3，或者其中的一部分如長度至少有 15、20、25、30、50、100、250、500 個或更多個連續核苷酸的寡聚核苷酸，確保在嚴格的條件下與編碼本發明多肽的 mRNA 或基因組 DNA 特異性雜交。

優選的用於檢測本發明多肽的試劑是能與本發明多肽結合的抗體，優選抗體上連有可探測的標記物。抗體可以是多克隆，更優選為單克隆。完整的抗體或其片段（如 Fab 或 F(ab')₂）均可使用。見 5.5 節中有關抗體的詳盡描述。

此處術語“標記的”主要是針對於探針或抗體而言的，意指對探針或抗體的直接標記和間接標記，直接標記是指在探針或抗體上耦合（如物理性連接）了可檢測的物質，間接標記是指通過探針或抗體與可直接標記的試劑的反應活性來實現的。間接性標記的實例包括用螢光標記二抗來檢測一抗以及在 DNA 末端標記上生物素從而使得能用螢光標記鏈黴素來檢測。本發明的檢測方法可用於檢測體外或體內樣品中的 mRNA、蛋白質或基因組 DNA。例如，體外檢測 mRNA 的技術包括 Northern 雜交和原位雜交。體外檢測本發明多肽的技術包括酶聯免疫吸附（ELISAs）、Western 印記 s、免疫沈澱和免疫螢光。體外檢測基因組 DNA 的技術包括 Southern 雜交。更進一步，體內檢測本發明多肽的技術包括直接將抗多肽的抗體引入目標生物體

內。例如，抗體可用放射性標記物標記，它在目標生物體內的存在和位置可用包括放射自顯影在內的標準成像技術檢測。

在一個特殊的實施例中，該方法進一步涉及從對照體中獲得對照樣品、將對照樣品與可檢測本發明多肽或編碼本發明多肽的 mRNA 或基因組 DNA 的化合物或試劑接觸，從而在檢測樣品中多肽或編碼多肽的 mRNA 或基因組 DNA 的存在，然後將對照樣品中與待測樣品中多肽或編碼多肽的 mRNA 或基因組 DNA 的存在情況進行比較。

本發明也包括檢測待測樣品中有無本發明多肽或核酸存在的試劑盒。

例如，該試劑盒可以包括標記化合物或試劑，它能夠檢測同一樣品中多肽或編碼多肽的 mRNA 的存在並包括確定樣品中多肽或 mRNA 量的方法（如與多肽結合的抗體或與編碼該多肽的 DNA 或 mRNA 結合的寡聚核苷酸）。檢測試劑盒包括有使用說明。

對基於抗體的試劑盒來說，該試劑盒包括，如：(1) 能夠與本發明所述多肽結合的一抗（如與固體支援物相連）以及可以選擇的(2)二抗，其中一種能夠與多肽結合或者與一抗結合的不同抗體並且偶聯有一可檢測標記物。

對基於寡聚核苷酸的試劑盒來說，該試劑盒包括，如：(1)寡聚核苷酸，如可探測的標記核苷酸，它可以與編碼本發明多肽的核酸序列雜交或(2)用於擴增編碼本發明多肽的核酸分子的一對引物。該試劑盒還可以包括，如緩衝試

劑、防腐劑或蛋白穩定劑。該試劑盒還可以包括用於檢測可檢測試劑的的必須組分（如酶或底物）。該試劑盒還可以含有對照樣品或一系列對照樣品，以便分析和與實驗樣品相比較。試劑盒的每一組分常用單一容器包裝並且各種容器在同一包裝盒內並附有說明書。

5.10 植酸酶和轉基因植物的商業應用

如上所述，植酸酶大量存在於食物資源中，充當動物食物的主要組成部分。但是對於包括家禽和魚在內的單胃動物來說，是不能利用磷元素的，而且當它分泌到環境中時，植酸鹽又對生態系統造成了嚴重的污染問題。由於這種反應發生在食物鏈的低層，環境更換的不會很快看到，但是污染一直在持續，所以這種更換造成的影響將會累積並滲透到所有的生態系統，從而對整個生態系統造成永久性傷害。

基於本發明多肽對單胃動物的無毒以及可通過本發明所述多肽的過量表達系統可以大量生產，通過製備含有本發明多肽的動物飼料使得本發明的多肽具有巨大的商業用途。本發明多肽被單胃動物利用從而減少了不被利用磷元素的環境排放量，因而減輕了環境污染。

另外，常常將磷酸鹽加入到肥料中以促進植物生長，但這同時也增加了環境污染。雖然磷元素資源存在於土壤中，但卻是以植酸鹽的形式而不能被植物所利用。因此，根據帶有本發明嵌合基因構件體的轉基因植物能夠表達胞

內植酸酶和胞外植酸酶，這些植酸酶作用巨大能夠利用其他情況下植物本身及動物無法獲得的磷元素。也就是說，轉基因植物對磷元素的有效利用的貢獻不僅體現在減少了磷元素的環境污染，同時也體現在促進了植物的生長，包括開花和做果，顯示了明顯的農業和園藝方面的應用前景。而且，將具有胞內表達本發明植酸酶的轉基因植物的引入到動物飼料中進一步提高動物對磷元素的利用能力。減少了環境污染。

實施例

下列實施例說明了植酸酶及其抗體的克隆、生產、分離和鑒定過程，這些實施例不能看作是對本發明的限制。

基因 PhyL 的分子克隆

從 *B. licheniformis* 克隆基因 PhyL 的策略顯示在圖 3 中，*Bacillus licheniformis* 細胞能夠購買到 (ATCC#10716)。該細菌細胞於 37°C 生長在營養瓊脂板上 (含 2.5% (重量/體積) 的肉湯粉，1.5% (重量/體積) 的微生物學用瓊脂)，並作為變性 PCR 反應用的模板。根據 PhyK (Kim YO, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK, 1998, Cloning of the thermostable phytase gene(phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters, 162:182-191) 和 Phy C (Kerovuo September 25, 2002, J., Laurarus M., Nurminen

P., Kalkkinen N., Aapajalahti J., 1998, Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2079-2085) 以及 168phyA (SEQ ID No: 4) 的保守胺基酸序列來設計變性的寡聚核苷酸鏈 (SEQ ID NO:5 和或 SEQ ID NO:6) 以作為 PCR 反應的引物。擴增反應在 PCR 儀 (Robercyler gradient 40, Stratagene, USA) 上進行, 在磷酸化的寡聚物存在下進行 30 次迴圈 (94°C 下 45 秒、50°C 下 45 秒、72°C 下 2 分 30 秒)。從 2% (重量/體積) 瓊脂糖凝膠上切取需要的 PCR 產物並用 GeneClean III 試劑盒 (Qbiogene, Inc, CA) 純化。純化的產物經 X-gal/IPTG 誘導克隆到 pBSSK 中並篩選抗青黴素菌株。培養在補加有 100 μ g/ml 青黴素的 LB 肉湯培養基上的具有抗青黴素的質體用 Quantum mini-prep 試劑盒 (Bio-Rad, Hong Kong) 提取並測序 (MWG Biotech AG, Germany)。

使用基因組 DNA 純化試劑盒 (Promega, Hong Kong) 提取出 *B. licheniformis* 的基因組 DNA 並在 260nm 下用光密度分析法確定 DNA 的濃度。兩組基因組 DNA (20 μ g/組) 分別用 10 單位 Hae III 酶 (Boehringer Mannheim, Hong Kong) 或 10 單位 SAU3AI 酶 (Boehringer Mannheim, Hong Kong) 進行限制性酶解 1 小時。酶解後的 DNA 經純化和稀釋到 1 μ g/ml 後, 用 T4DNA 連接酶環化 (Life Technologies, Hong Kong)。環化後的 DNA 用苯酚-氯仿抽

提並用乙醇沈澱。

正向及反向寡聚核苷酸 (SEQ ID NOS:7-12) 設計為與變性 PCR 獲得的序列的 5'端和 3'端的序列側面連接。使用部分消化的基因組 DNA 作模版，反向 PCR 進行 30 次迴圈 (94°C 下 45 秒、55°C 下 45 秒、72°C 下 2 分)。陰性 PCR 產物用乙醇沈澱並用相應的限制性內切酶處理，之後亞克隆到質體 pBSSK 的 Eco RI 和 Bam HI 的酶切位點。選擇所需的陰性克隆並用上述方法提取。對所得克隆進行測序並用 DNA 處理軟體對序列資料進行評估和分析，這些軟體包括 MAC DNASIS (Hitachi, Japan) 和 DNA Strider (Christian Marck, Service de Biochimie, Department de Biologie, Institut de Recherche Fondamentale, CEA, Frande) 在內的。用 Geneworks for Mac (Intelligenetics, Mountain View, CA) 軟體進行系統發育分析。

DNA 和根據基因 PhyL 推測出的胺基酸序列分別展示在 SEQ ID NOS:1 和 2 中。發現在推測的核糖體結合位點有相應的序列 GGAGG，在起始密碼 ATG 的上游有 12 個鹼基對。從該核苷酸序列推測出的胺基酸表明是一個具有 381 個胺基酸殘基的蛋白質，該鏈的長度短於其他的三種 *B. subtilis* 植酸酶。該 DNA 序列和由其推測出的胺基酸序列用 BLAST 檢測在 NCBI 資料庫中對比，結果表明在蛋白水平 phyL 與 phyK 有 64% 的一致性，phyL 與 phyC 有 65% 的一致性，phyL 與 168phyA 有 69% 的一致性，而在 DNA 水平與基因 PhyK 有 79% 的一致性，與基因 phyC 有 79% 的

一致性，與基因 168phyA 有 90% 的一致性。與其他三種 *B. subtilis* 植酸酶相類似，基因 phyL 編碼的植酸酶不含有高度保守的 RHGXRXP 序列的基本框架，而該基本框架在所有的真菌和 *E. coli* 的植酸酶中均是存在的。

基因 phyL 編碼的植酸酶的過量表達

根據從基因 phyL 翻譯起始密碼子 ATG 到終止密碼子兩端的編碼區來設計 PCR 引物 (SEQ ID NOS:13 和 14)。編碼成熟酶的基因片段通過 pfu 聚合酶 (Promega, WI) 擴增並亞克隆到表達載體 pSGt 中，該表達載體是通過將 *B. licheniformis* 的 α -澱粉酶基因的終止子克隆到表達載體 pSG 中而成。因此，基因 phyL 是在 Φ 105 原噬菌體的啟動子的控制之下。

通過電穿孔法將質體引入到 *E. coli* JM109 菌株中。篩選出抗青黴素的菌落，提取到陰性克隆系並用 Quantum Mini-prepKit 試劑盒 (BIO-RAD, Hong Kong) 純化。

爲了將重組質體轉形到宿主菌株內以生產該酶，按 Osburne 等 (Osburne MS, Craig RJ and Rothstein DM, 1985, Thermoinducible transcription system for *Bacillus subtilis* that utilizes control elements from temperate phage Φ 105, *J. of Bacteriology*, 16:1101-1108) 描述的方法，製備枯草芽孢桿菌 MU331 感受整細胞。通過將轉形體分別鋪在加有氯黴素紅黴素的瓊脂上對其進行篩選，對兩種抗生素的均有抗性菌落進一步用含有噬菌體 Φ 105 特異引物和特異於

phyL (SEQ ID NO:14) 的引物 PCR 擴增篩選。按此方式建立了在酶性質研究中使用的重組體菌株 pL-01 並於 -80 °C 在 30% (v/v) 甘油中凍存。

細菌培養和酶製備用培養基如下：

腦心浸液肉湯包含：

小牛腦浸液固形物	12.5%
牛心浸液固形物	5%
蛋白酶胰	10%
葡萄糖	2%
NaCl	5%
Na ₂ PO ₄	2.5%
中性 pH 時的酵母提取物	2.5%

將菌株 pL-01 在補加有 5 μ g/ml 氯黴素的 LB 瓊脂培養基上劃線培養。在以後的數天內，挑選出單個菌落並轉移到補加有 5 μ g/ml 氯黴素的細菌培養介質中培養。該細菌細胞在 280rpm 搖動下培養至溶液的光密度值 OD₆₀₀ 到 7.0。然後將 1ml 培養液轉入 15ml 不含抗生素的細菌培養基中，使細胞生長到溶液的光密度值 OD₆₀₀ 到 4.5，在劇烈搖動的情況下用 50°C 水浴進行熱誘導 5min。誘導後不同時間採樣。

除非特別說明，酶純化的所有步驟均在 0-4°C 進行。用 3000rpm 離心 30min 的方法收集生長在培養介質中的細

菌。收集的上清液與 3 倍體積的冷 (-20°C) 乙醇混合並將沈澱於 4°C 攪拌過夜。6000rpm 離心 30min 以收集溶液中的沈澱部分，然後將沈澱用空氣乾燥並再重新懸浮於含有 5mM CaCl_2 的 100mM Tris-HCl 中，pH7。重懸後的酶通過 NAP-10 Sephadex 凝膠過濾柱 (Marsha Pharmacia, Hong Kong) 以交換緩衝液。用預先設計好的分析緩衝液將酶洗脫出來並於 -20°C 保存直到用於酶分析。

由 SDS-PAGE 法測定的基因 phyL 編碼的成熟的植酸酶的分子量約為 47kDa (圖 5B)。在 5hrs 熱誘導後的收集液中，基因 phyL 編碼的植酸酶產物的量達 175mg/L。酶活性達 4.1 單位/ml 培養基以及 23.6 單位/mg 酶，其中酶活性單位定義為：在給定的分析條件下，在 1 分鐘內釋放 $1\mu\text{mol}$ 無機磷酸鹽所需要的酶量 (圖 6)。當與曾經研究過的芽孢桿菌植酸酶活性相比時發現，本發明的新的 phyL 酶在培養時間縮短 14 倍的情況下，其酶活性卻增加了 17 倍。由雙向 SDS-PAGE 法測定的酶的等電點大約為 5.1。

基因 168phyA 編碼的植酸酶的生產及其活性

對枯草芽孢桿菌基因組的序列同源性的研究表明，在 *B. subtilis* 168 的基因組中發現的讀框架 (ORF) 與枯草芽孢桿菌中兩種已公開的植酸酶具有高度的序列同源性。設計 PCR 引物 (SEQ ID NOS:15 和 16) 以擴增具有該 ORF 的基因片段並將 PCR 產物亞克隆到表達載體 pSG 中以創建 pSG-pA。在該構建體中，基因 168phyA 的兩端連有噬菌體

Φ 105 的啓動子和基因 168phyA 的天然終止子 (圖 4A)。如上述 6.2 節所述，將質體轉入到適合的枯草芽孢桿菌 MU331 菌株中以構建重組體菌株 pA-01。用噬菌體 Φ 105 的特異引物和基因 168phyA (SEQ ID NO:16) 的特異引物在 PCR 上掃描顯性克隆，然後上述 6.2 節所述的方法進行酶生產。

由 SDS-PAGE 法知基因 168phyA 編碼的成熟的植酸酶的分子量是 44kDa (圖 5A)，從胺基酸序列 (SEQ ID NO:4) 的計算值也可以肯定這一點。在 4hrs 熱誘導的收集液中，基因 168phyA 編碼的植酸酶產物的量達 246.2mg/L。酶活性達 5.3 單位/ml 培養基以及 36.8 單位/mg 酶。當與曾經研究過的芽孢桿菌植酸酶活性 (Powar and Jagannathan, 1982, 上述) 相比時發現，本發明的新的 168phyA 酶在培養時間縮短 18 倍的情況下，其酶活性卻增加了 22 倍。酶的等電點大約為 5。

爲了增加酶產量，用菌株 pA-01 進行了 2L 量的發酵。在該發酵過程中，通過 pH-stat 方法控制了碳源 (葡萄糖) 和氮源 (胰蛋白胨) 的添加量。在 6hrs 誘導後，酶活性增加到 28 單位/ml 培養基，與上述描述的簡單的搖瓶培養法相比，活性增加了 5 倍。

植酸酶活性的測定

在不同的 pH 和溫度條件下，在特定的緩衝液中進行酶活性分析。在 pH 試驗中使用的緩衝液包括 100mM 檸檬酸

鈉-HCl, pH3.5 和 6.5 ; 100mM 醋酸鈉-HCl, pH4.5-6.0 ; 100mM Tris-HCl, pH7-8.5 ; 100mM 甘胺酸-NaOH, pH9、9.5 和 10.5。上述所列舉的緩衝液均補加有 5mM CaCl₂。在微量分析範圍內，酶濃度按標準 Bradford 蛋白分析法測定 (BIO-RAD, Hong Kong)。純化後的酶稀釋到分析緩衝液中，按 Engelen 等描述的方法 (1994, 上已述及) 進行比色分析，除了分析範圍降至 1ml。簡要來說，將該酶用不同的緩衝液稀釋到總體積為 200 μ l。在酶活性分析中，0.4 ml 植酸鈉稀釋到雙蒸水中到 10 mM，酶和植酸鈉的混合溶液對於基因 168phyA-和基因 phyL 編碼的植酸酶來說分別於 55°C 或 65°C 保溫 30min。為了終止酶活性，在反應液中加入 0.4 ml 的新鮮製備的終止溶液。5min 後，200 μ l 終止後的混合液轉入 96 孔酶聯免疫吸附板中 (Nunc, Denmark)，在 405nm 進行光密度測定。

溫度試驗在中性 pH 下進行 (圖 7A)，結果顯示基因 168phyA-和基因 phyL 編碼的植酸酶具有寬的最適溫度範圍，對於基因 phyL 編碼的植酸酶來說，其活性峰在 65°C 而對於基因 168phyA 編碼的植酸酶來說，其活性峰在 55°C。圖 7B 顯示了在限定的分析緩衝液 (如上所述) 中，在兩種酶各自的最適 pH 時，pH 對植酸酶活性的影響。在中性 pH 時，兩種酶均顯示最高的酶活性。

對於酶穩定性試驗來說，不同的酶稀釋等份分別培養在不同的高溫下 10min，溫度範圍是 70-90°C，然後冷卻至室溫 1hr 以使蛋白重新折疊，之後進行酶活性實驗。

研究表明，在高溫變性後，甚至在低 Ca^{2+} 濃度（1mM）情況下，基因 phyL 編碼的植酸酶能夠恢復原始活性的 60-70%。該酶甚至能耐受高達 95°C 的變性處理，此時仍能保留原始活性的 50% 以上。

在高溫下變性後，在高 Ca^{2+} 濃度（5mM）情況下，*B. subtilis* 的基因 168phyA 編碼的植酸酶能夠恢復原始活性的 50-60%。該酶甚至能耐受高達 95°C 的變性處理，此時仍能保留原始活性的 46.7%。儘管如此，酶 168phyA 在低 Ca^{2+} 濃度（1mM）情況比高 Ca^{2+} 濃度（5mM）情況，其活性保留量減少 20%。

轉基因植物的產生

水稻是一種重要的世界性的農作物，尤其在亞洲更為重要。在中國，水稻產量占總作物產量的 42%，占總種植面積的 29%。水稻是單子葉植物，依賴於氣候和生長條件，一些熱帶變種能在一年中完成三個生命週期。當溫度在 24°C 以上且光期長於 14 hrs 時，從幼苗到開花需要 60 天。從開花到收穫種子需要另外 30 天的時間。一般來說，一粒種子在完成一個生命週期後能產生 500 粒種子。

由於煙草的高轉形速率和組織培養中易於繁殖的特性，所以在植物轉形中，煙草是一個良好的模型系統。從其寬闊的葉子就可以識別出來，煙草是一種雙子葉植物，具有高的商業價值。煙草是一種一年生植物，完成其生命週期需要 120 天。當溫度在 24°C 以上且光期長於 14 hrs

時，從育秧到開花需要 60 天，從幼苗到第一次開花需要 96-100 天。在一棵煙草上能收穫 20-30 個果實，每個果實重 0.3-0.4 克，至少有 1000 粒種子。一般來說，煙草在第一次盛花後，需要 30 天才能產生有生命力的種子。

通過在植物如水稻和煙草細胞中引入含有含有本發明植酸酶基因的嵌合構建體，由於增加了對植物體內和/或土壤中無機磷的可利用性，這類植物加快了生長速度，因而縮短了成熟和開花的時間。

植物表達載體的構建

構建植物表達載體的策略顯示在圖 8 中。應用位於基因 (SEQ ID NOS:17 和 18) 兩端的一對引物用 PCR 對基因 168phyA (SEQ ID NO:3) 進行擴增。E. coli 的 pBI221 載體 (Clontech laboratories) 中，在 BamH I 和 SacI 的酶切位點內的 α -D-葡糖苷酸酶 (GUS) 基因被基因 168phyA 取代以獲得含有 phyA-221 的 inter-載體。雙價載體 pCAMBIA1300 (Genebank accession number AF234296) 上帶有被對植物有選擇性的 CAMV35S 啟動子所驅動的抗潮黴素基因，用限制性內切酶 Hind III 和 EcoR I 消化該載體並將其與用 Hind III/EcoR I 線性化後的 phyA-221 的載體連接，從而得到新的表達構建體 pCX-0168phyA (圖 9)。

Agrobacterium 培養和轉形

採用 Höfgen 和 Willmitzer 介紹的冰凍轉形方法 (1988,

Storage of competent cells for agrobacterium

transformation, *Nucleic Acids Res*, 16:9877) 將兩個單獨的 pCX-168phyA 克隆 (克隆 04 和 13) 轉入 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 菌株中。取單個菌落在含有 50 μ g/ml 卡那黴素、25 μ g/ml 氯黴素和 50 μ g/ml 利福平的 20ml LB 液體培養基中孵育，28°C 快速振蕩培養 2 天，直到培養液的上清部分的 OD_{600nm} 約為 0.8-1.0。然後將培養液 4000rpm 離心 10min，將沈澱重懸於 20ml AAM 介質 (見下述表 1) 以用於植物轉形。

轉基因水稻的產生

使用日本水稻 *Oryza sativa* L 栽培系 “Zhonghua11 號” 進行實驗。成熟的種子消毒後在 N6D 培養基上萌發 2 周。從小盾片誘導出來的愈傷組織亞接種到 N6D 培養基上再培養 1 周。3 周齡的愈傷組織浸泡在細菌懸液中 20min 後，用無菌濾紙吸去多餘的菌液，接著將帶有細菌的愈傷組織轉移到濾紙片上，將該濾紙放在 N6DC 培養基的上面，暗室中於 25°C 共培養 3 天。共培養後，感染的愈傷組織用含有 500mg/L 羧苄青黴素的 ADD 培養基 (見下文表 1) 清洗，用無菌濾紙吸乾，最後轉移到 N6DS1 培養基 (見下文表 1) 上培養。

上述愈傷組織在 N6DS1 培養基上培養 2 周後轉移到 N6DS2 培養基 (見下文表 1) 上進一步選擇性培養 3-4 周。有抗性的愈傷組織再轉移到 HIGROW 培養基 (見下文表 1)

在暗室中進行預分化 10 天，之後單個轉入盛有 MSRS 培養基（見下文表 1）的生長小室在 24-26℃ 進行苗再生，16hrs 光期，螢光燈光照強度為 $120 \mu \text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光通量。再生的植株轉入 MSCN 培養基（見下文表 1）進一步生長。當具有抗性的植株大約高 10cm 時，轉至溫室的土壤中生長，直至成熟。

轉基因煙草的產生

栽培系煙草變種“Gexin 1 號”（*Nicotiana tobacum*）的種子用 30%(v/v) Clorox 消毒 15min，無菌水清洗 5 次後在 Murashige 和 Skoog 基本培養基（MS 培養基，Sigma M-9274, St. Louis, MO）上萌發。籽苗在同樣的培養基上體外培養，22℃ 下，16hrs 光期/8hrs 暗期的光周期，螢光燈光照強度為 $120 \mu \text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光通量。

將含有所需基因的農桿菌 EHA105 的單菌落接種到含有 $50 \mu \text{g/ml}$ 卡那黴素、 $25 \mu \text{g/ml}$ 氯黴素和 $50 \mu \text{g/ml}$ 利福平的 20ml LB 液體培養基中，28℃ 快速振蕩培養 2 天。上述煙草葉子切割成 1cm^2 見方，然後浸入上述 20ml 細菌懸液中 2-3min。用無菌濾紙吸去多餘的菌液後，該外植體轉入補加有 2mg/L 6-BA（MSB medium）的 MS 培養基（見下文表 1）上暗室中培養 2 天，25-26℃。共培養 2 天後，外植體轉入補加有 30mg/L hydromycin 和 500mg/L 羧苄青黴素的 MSB 培養基以進行苗再生，26℃，3-4 周，標準光照條件。當具有抗性的幼苗約 1cm 時，將其切除並轉移到

補加有 25mg/L hydromycin 和 200mg/L 羧苄青黴素的 MS 培養基上生根。當該抗性植株生長至約 8cm 高時，將其轉入溫室的土壤中生長至成熟。每個 pCX-168phyA 克隆 (004 和 013) 各製備了 4 個植株，分別命名為 0041、0042、0043、0044 以及 0131、0132、0133 和 0134。

表 1

用於組織培養和植物轉形的培養基

培養基	組成
N6D	N6 ¹ , 500 mg/L 酪蛋白, 30g/L 蔗糖, 2.5 mg/L 2,4-D, 2.5 g/L phytigel, pH5.7
N6DC	N6D 培養基+10 g/L 葡萄糖+100 μ mol/L acetosyringone, pH5.2
AAM	AA ² , 500 mg/L 酪蛋白, 68.5 g/L 蔗糖, 36 g/L 葡萄糖, 200 μ mol/L Acetosyringone, pH5.2
AAD	AA, 30 g/L 蔗糖, 2 mg/L 2,4-D, pH5.7
N6DS1	N6D 培養基+500 mg/L 頭孢噻肟 + 25 mg/L hydromycin
N6DS2	N6D 培養基+300 mg/L 頭孢噻肟+ 50 mg/L hydromycin
HIGROQ	培養基(Gibcco BRL 10924-017) + 2.5 g/L phytigel
MSRS	MS 培養基 ³ (Sigma M-9274) + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L ZT + 200 mg/L 頭孢噻肟+ 50 mg/L hydromycin, pH5.8
MSCN	MS 培養基+ 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 矮壯素 (CCC)

注：¹ Zhu Z-Q, Wang J-J, Sun J-S, Xu Z, Yin G-C, Zhu Z-Y, Bi F-Y, 1975, Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources, Sci Sin, 18:659-668. (English abstract)

² Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T., 1994, Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, Plant J, 6:271-282

³ Murashige T. and Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, Plant Physiol. 15:473-479.

下列章節對轉基因煙草克隆進行鑒定和描述。

DNA 製備和 PCR 分析

用 PCR 檢測 hydromycin B 抗性基因的 DNA 序列。按如下方法製備來自於轉形和非轉形（對照）植物葉子的基因組 DNA：植物葉子稱重和液氮冷凍後進行勻漿處理，50mg 組織中加入 600 μ l 抽提緩衝液（100 mM Tris-HCl, pH8.0, 500mM NaCl 和 10 mM β -巰基乙醇），將混合液煮沸 10min。煮沸後的混合液於冰上冷卻後 16000g 離心 15min。存在於上清部分的植物基因組 DNA 用 0.1 體積的 10 mM 醋酸銨和 2 體積的 -20°C 的冷無水乙醇沈澱 2hrs，16000g 離心 30min 以收集基因組 DNA 的沈澱物。所得的 DNA 的沈澱在重新溶於水之前需用 75%乙醇清洗。通常，0.1g 植物組織中能夠獲得 50 μ g 植物基因組 DNA。

PCR 反應包括 30 個迴圈（94°C 變性 30 秒、56°C 退火 40 秒、72°C 延伸 60 秒）。Hydromycin 抗性基因正向前引物和反向引物分別是

5'-CTACCAATGCGGAG-GATCGTTATCGGCA-3' (SEQ ID NO:19)和 5'-AGACCAATGCGGAG-CATATACG-3' (SEQ ID NO:20)，其中 hydromycin 抗性基因（E00287）的序列中從 162 到 803 共 641 個鹼基對被擴增。正向引物和反向引物（SEQ ID NO:17 和 18）用於擴增基因 168phyA。用 PCR 篩選轉基因煙草的結果顯示在圖 10 中。如圖 10A 所示，抗 hydromycin 抗性基因（E00287）的 PCR 產物可以從所

有轉形的煙草中產生，包括用 pCAMBIA1300 轉形的植物。與此相比，基因 168phyA 的 PCR 產物僅可以從由 pCX-168PhyA 轉形的植物中產生而不能從由 pCAMBIA1300 轉形的植物中產生。該結果表明，按上述方法，載體 pCX-168PhyA 和 pCAMBIA1300 成功地導入到相應的煙草植株了。

Northern 印跡

從植物葉子中抽提出的總 RNA 作模板用於 Northern 印跡檢測。不同單個轉基因植物的 RNA 加樣於瓊脂糖凝膠上，很好分離之後，依靠毛細管作用過夜轉到尼龍膜上。去掉細菌信號肽的基因 168phyA 的 DIG 標記的 cDNA 用作 Northern 雜交的探針。所用的所有的試劑從 Roche Diagnostics 公司 (Hong Kong) 購得，所有的步驟按照產品使用指南進行。轉基因煙草系的 F0 和 F1 代的 Northern 印跡的結果分別展示在圖 11 和圖 16 中。對來自於 F0 系的 0042、0043 和 0134 的蛋白提取物中的植酸酶活性進行了檢測。如圖 16 所示，mRNA 的表達情況遺傳到了 F1 系的 0042 和 0134。

Western 印跡

提取於煙草葉子的總蛋白用於 Western 印跡實驗。單個蛋白樣品用 10%濃度的丙烯醯胺凝膠在 SDS-PAGE 上很好的分離後，在 4°C，100V 的條件下將蛋白轉移到硝基纖維

素膜上。用在枯草芽孢桿菌中過量表達的基因 168phyA 編碼的植酸酶免疫後，制得抗 168phyA 的多克隆抗體。在作為探針添加於樣品蛋白之前先用野生型煙草對多克隆抗體吸附。NBT/BCIP 底物用於信號檢測，操作程式參照產品使用說明進行。

F0 和 F1 轉基因煙草的 Western 印跡實驗結果展示分別在圖 12 和圖 17 中。來自於 F0 品系的 0042、0043 和 0134 樣品的蛋白提取物中檢測到了植酸酶。如圖 17 所示，植酸酶的表達情況遺傳到了 F1 品系的 0042 中。通常，由於轉基因蛋白在轉基因植物的低水平表達，所以能在轉基因植物提取物中檢測出來。例如，在煙草葉中表達的重組的真菌植酸酶（phyA）在層析純化後，在 Western 印跡中僅能給出信號（Ullah 等，1999，上文）。因此，如圖 12 和圖 17 所示 Western 印跡中有可見植酸酶，該結果說明植酸酶在轉基因植物中的表達量是很高的。

Southern 印跡

從植物葉子抽提出的基因組 DNA 用於 Southern 分析。基因組 DNA 在 RNA 酶活性作用下限制性內切酶 HindIII 酶切。不同轉基因植物的 DNA 經酶解後裝到 0.7%瓊脂糖凝膠上並很好的分離，之後依靠毛細管作用過夜轉到尼龍膜上。去掉細菌信號肽的基因 168phyA 的放射性標記的 cDNA 用作 Southern 雜交的探針。所用的所有試劑從 Roche Diagnostics 公司（Hong Kong）購得，所有的步驟按產品

使用指南進行。

如圖 15 所示，在 F01 系（0042 和 0134）中檢測到了特異性條帶，在對照系中沒有檢測到。來自於 0042（42-1 和 42-2）的 F1 系顯示含有單拷貝的基因，而來自於 0134（134-1）的 F1 品系顯示含有兩個拷貝的基因。

對照煙草和轉基因煙草的表現型

由於煙草的高轉形速率和組織培養中易於繁殖的特性，所以在植物轉形中，煙草是一個良好的模型系統。從其寬闊的葉子就可以識別出來，煙草是一種雙子葉植物，具有高的商業價值。煙草是一種一年生植物，完成其生命週期需要 120 天。當溫度在 22℃ 以上且光期長於 14 hrs 時，從幼苗到第一次開花需要 96-100 天。在一棵煙草上能收穫 20-30 個果實，每個果實重 0.3-0.4 克，至少有 1000 粒種子。一般來說，煙草在第一次盛花後，需要 30 天就能產生有生命力的種子。

煙草轉形後接著進行表現型測定並列於表 2 中。一般來說，用植酸酶基因轉形後的煙草生長到 101-130 cm 時出現第一次盛花，該高度短於用載體轉形的植物的第一次盛花時的高度（135-158 cm）。開花後，用植酸酶基因轉形後的煙草高度（142-168 cm）仍然短於用載體轉形的植物的高度（182-206 cm）。儘管用植酸酶基因轉形後的煙草一般較短，但它們常常比用載體轉形的植物（6 枝/株）擁有的花枝（8-10 枝/株）（見表 2 和圖 13）。從形態學看，煙

草常常具有單個主莖。但 4 株用植酸酶基因轉形後的煙草卻發育成具有至少一個側枝（圖 14）。從花芽的數量看，用植酸酶基因轉形後的煙草與用載體轉形的煙草的單個花芽相比，增加了花芽數量（見表 2）。從花期來看，用植酸酶基因轉形後的煙草顯示有較長的花期（50-超過 88 天），而對照則僅有 35-37 天的花期（見表 2）。

在磷酸鹽缺乏情況下轉基因煙草幼苗的生長

對照和轉基因（品系 42-1）煙草的種子用 30%(v/v) Clorox 消毒 15min，無菌水清洗 5 次後在 MS 培養基（含 1.25 mM 磷酸鹽和 30g/L 蔗糖）上萌發。15 天後，幼苗轉入修改過的 MS 培養基（不含磷酸鹽且蔗糖濃度降至 5g/L）再生長 17 天。在磷酸鹽饑餓實驗中，與對照幼苗相比，轉基因的幼苗具有更多的生物量（圖 18）。

在磷酸鹽不足情況下轉基因煙草幼苗的生長

表面消毒的對照和轉基因煙草的種子種植在盛有 20ml 修改過的 MS 瓊脂糖培養基（標準 MS 培養基，除了加入 10g/L 蔗糖， 10^{-3} 或 10^{-5} M 磷酸鹽）的培養皿中（60 粒/9-cm 盤）。20 天後，從高濃度（ 10^{-3} M）或低濃度（ 10^{-5} M）磷酸鹽培養平板上取出 9 粒種子轉入每個含有不同濃度磷酸鹽（ 10^{-3} 、 10^{-4} 或 10^{-5} M）的組織培養盒（7cm×7cm，50ml 修飾後的 MS 瓊脂糖）中。繼續生長 30 天後，收穫並稱重。每株幼苗分別稱重。每組稱重 18 株煙草幼苗，其平均重量

顯示在圖 19 中。轉基因品系 0042 的重量明顯重於對照，這一點具有統計學特徵，尤其是在磷酸鹽受限的情況下。而且，也進行了幼苗在液體培養基上的生長實驗。簡而言之，煙草種子在 MS0 培養基（10g 蔗糖，1.25mM 磷酸鹽）萌發 10 天，然後轉入液體 MS 培養基（30g 蔗糖，0.01 或 0.1 mM 磷酸鹽）中生長 20 天。每個品系的 25 株植物分成 5 組並測定每組的乾重。如圖 20 所示，在低濃度磷酸鹽的情況下，轉基因植株（0042 和 0134）比對照能獲得更多的乾重。

HPLC 對植酸酶活性的體外分析

5g 幼葉組織放入預冷的 10ml 提取緩衝液中（0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 1mM 苯基甲磺基氟化物 (phenylmethylsulfonyl fluoride) 和 0.1 mM CaCl₂）。12000g 離心 20min 後收集水相中的可溶性蛋白，蛋白濃度按 Bradford 蛋白分析法（Bio-Rad）定量。為了評價植物提取物中的植酸酶活性，來自於對照和轉基因植物的 200 μ g 植物蛋白分別與 400 μ g IP6（Sigma, P9910）於 37°C 保溫。在 4、6 和 8hrs 之後，加入 1 體積的 0.05 M HCl 以終止酶反應。為了比較植物提取物中的植酸酶活性，用陰離子交換層析純化了肌醇磷酸（IP6、IP5、IP4、IP3）（Sandberg and Ahderinne, 1986, HPLC method for determination of inositol Tri-, Tetra-, Penta- and Hexaphosphates in foods and intestine contents, Journal of Food Science, 51(3):

547-550)。簡而言之，0.5ml 酶混合物裝入 2ml 的 AG-1X8 陰離子柱 (Bio-Rad) 中，用 10 體積的 0.025 M HCl 將雜質淋洗出去。接著用 3 M HCl 將肌醇磷酸一同洗脫出來。洗脫所得的樣品經冰凍乾燥後再重新懸浮到 100 μ l 流動相中 [50% (v/v) 甲醇、0.1% (v/v) 甲酸、1.5% (v/v) 四丁基胺氫氧化物 (tetrabutylammonium hydroxide) 和 0.05M EDTA] 後進行 HPLC (Waters 600) 分析 (Sandberg and Ahderinne, 1986, 上述)。20 μ l 樣品注射到 C18 柱 (Alltech Alltima C18) 中以測定肌醇磷酸。IP6 和 IP5 的各自的峰由折射率檢測器測量 (Shimadzu RID-10A, Shimadzu Corporation, Japan) 並校對 IP6/IP5 比率。迅速混合植物提取物，植酸底物中 IP6/IP5 比率是 3.61 ± 0.14 (n=4)。在保溫期間，IP6 漸漸降解成低分子量的肌醇磷酸 (IP5、IP4 和 IP3)，因而，IP6/IP5 比率隨時間的延長而降低。如圖 21 所示，來自於品系 42 (N=4) 的植物提取物與對照植物 (N=4) 相比，有低的 IP6/IP5 比率。

總之，用植酸酶基因轉形的煙草具有如下表現型：(1) 增加了花枝數量；(2) 增加了主莖數目；(3) 增加了芽的數量以及 (4) 延長了花期 (見表 2)。由於在用植酸酶基因轉形的煙草中花芽數量增加了，故植酸酶基因轉形的植物與對照相比將會產生更多的果實。

表 2 轉形的煙草植株的表現型

植物品系	轉移到土壤中生長的時間	第一枝花盛開的時間	第一枝花盛開時的植株高度	開花後的植株高度	主花枝的數量	主莖數目*	花芽數目*	花期
0042	6月8號	8月25號	102	142	10	3	74	>88 ⁺
0043	6月8號	9月8號	101	142	9#	3	31#	58
0131	6月8號	9月12號	125	160	8	1	33	3
0133	6月8號	9月10號	130	168	8#	3	47#	44
0134	6月8號	9月4號	120	150	9#	2	36#	50
載體對照 1	6月8號	9月4號	135	182	6	1	30	36
載體對照 2	6月8號	9月16號	158	206	6	1	37	34
非轉基因對照	6月8號	9月22號	150	185	6	1	32	35

* 資料獲取日期 2001 年 10 月 4 號；

只有主莖上的花芽才計算在內。位於側枝上的花芽因不完全成熟而不計算在內。

+ 直到 2001 年 11 月 20 號。

新花在 2001 年 11 月 18 號。

等同方案

本領域技術人員能夠認識到或確信，使用的常規實驗可以得到與本文所述的本發明特定技術方案的等同方案。因而這些等同方案也包含在以下的如申請專利範圍第項中。

本發明申請書所提到的所有的出版物、專利和專利申請在此引入作為參考，其範圍如同每一出版物、專利和專利申請專門並單獨引入作為參考一樣。

本發明中參考文獻的引述或討論並不等於該文獻就視作本發明的現有技術。

4.圖式簡單說明

下列圖是爲了闡述本發明的實施方案，而並非對申請專利範圍包括的本發明的範圍構成限制。

圖 1A 和 1B 分別顯示了基因 phyL(SEQ ID NO:1)的核苷酸序列和蛋白 phyL(SEQ ID NO:2)的胺基酸序列。

圖 2A 和 2B 分別顯示了基因 168phyA(SEQ ID NO:3)的核苷酸序列和蛋白 168phyA(SEQ ID NO:4)的胺基酸序列。

圖 3 代表了 PCR 克隆基因 phyL 的設計路線。DP 代表用於變性 PCR 的變性過的引物，IP 代表反義 PCR 引物。基因 PhyL 通過先進行變性 PCR 然後用反義 PCR 法克隆得到。來自於反義 PCR 的片段對齊，全基因是從上游區域(5' 端到 ATG 翻譯起始密碼子)克隆到基因終止密碼子。

圖 4A 和 4B 顯示了用於過量生產植酸酶的表達載體的構建。圖 4A 表示用於 *B. subtilis* 168 菌株過量表達植酸酶的表達質體，該構建體中攜帶有 Φ 105 啓動子、之後是 Shine-Delgarno (SD)序列、天然的基因 168phyA 和它的天然終止子。圖 4B 表示用於 *B. licheniformis* 菌株過量表達植酸酶的表達質體，該構建體中攜帶有 Φ 啓動子、之後是 SD 序列、天然的基因 phyL 和來自於 *B. licheniformis* 的 α -澱粉酶的終止子。

圖 5A 和 5B 顯示了兩種芽孢桿菌屬菌株植酸酶的表達

水平。樣品直接來自於細菌培養物，在進 SDS-PAG 電泳之前離心沈澱。預熱誘導後 0-5 小時，收集細菌培養物。從該圖中可以看到，在熱誘導後，隨著時間的延長，酶產生量增加。LRW 是低分子量標準蛋白（BIO-RAD 公司，香港），作為蛋白大小的參照位於圖的左側。圖 5A 顯示由基因 168phyA 編碼的酶的表達情況，圖 5B 則顯示由基因 phyL 編碼的酶的表達情況。

圖 6A 和 6B 顯示了兩種植酸酶的酶活性。圖 6A 顯示的是收集的培養液的酶活性（酶活性單位/ml 培養物），圖 6B 顯示的是實際用於每單個反應中的酶活性（酶活性單位/mg 酶）。

圖 7A 和 7B 分別顯示了溫度和 pH 對包括本發明在內的植酸酶的酶活性的影響。植酸酶酶活性的測定是根據 Engelen 等描述的方法（1994, Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*, 77(3):760-764），除了將反應液降至 1ml。比色測定是檢測 405nm 處的光密度值。保溫時間設定為 30 分。所有的反應均補加 5mM CaCl₂ 以保證酶活性。

圖 8 表示植物表達載體的構建路線。將刪除天然信號肽之後的基因 168phyA 克隆入載體 pBI221 中的限制性內切酶 BamH I 和 SacI 位點處，以取代 *E. coli* 的 α -D-葡萄糖苷酸酶(GUS)基因。攜帶有 168phyA 基因盒的 Hind III/EcoRI 片段即可從質體 pBI221 中釋放出來，之後通過亞克隆技術進入雙載體 pCAMBIA1300 的 Hind III 和 EcoR I 位點，從

而產生重組克隆 pCX0168phyA。

圖 9 是表達載體 pCX168phyA 的框架圖。168phyA：來自於 *B. subtilis* 168 菌株的植酸酶基因；CaMV：花椰菜的花葉病毒的 35S 啟動子；CaMV35S 多聚腺苷信號：來自於花椰菜的花葉病毒的 3'UTR 端的多聚腺苷信號；Kan^R：抗卡那黴素抗性；NOS：胭脂鹼合成酶基因；pBR322 起始位點：來自於 pBR322 的複製起始點；pVS1-REP：來自於 pVS1 的複製起始點；pVS1-STA：來自於質體 pVS1 的 STA 區；T-邊界(L)：左邊界 T-DNA 重復序列；T-邊界(R)：右邊界 T-DNA 重復序列。來自於 pVS1 的 rep 和 sta 區

(Hajdukiewicz et al., 1994, Plant Molecular Biology, 25:989-994) 的出現增加了這些載體在土壤農感菌的穩定性，即使是在非選擇性培養基中。

圖 10A 和 10B 分別顯示在轉基因煙草中基因 hygromycin (圖 10A) 和基因 168phyA (圖 10B) 的篩選結果。(圖 A) 1 道：1KB 加 DNA 梯度；2 道：未轉形的煙草，作為陰性對照；3-4 道：僅用 pCAMBIA1300 轉形的轉基因煙草 (對照)；5-8 道：轉基因煙草 004 品系 (0041、0042、0043、0044)；9-12 道：轉基因煙草 013 品系 (0131、0132、0133、0134)。(圖 B) 1 道：1KB 標記物；2-3 道：作為陽性對照的質體 pCX-168phyA 對照；4 道：未轉形的煙草，作為陰性對照；5-6 道：僅用 pCAMBIA1300 轉形的轉基因煙草 (對照)；7-10 道：轉基因煙草 004 品系 (0041、0042、0043、0044)；11-14 道：轉基因煙草 013 品系 (0131、

0132、0133、0134)。

圖 11 顯示 F0 轉基因煙草的 Northern 雜交分析結果。從植物組織中抽提出 20 μ g 的總 RNA 上樣於 1% (重量/體積) 瓊脂糖凝膠中，由 DIG-PCR 試劑盒標記的 168phyA cDNA 用作探針。(Roche Diagnostics, Hong Kong)。mRNA 信號在轉基因品系 (0042、0043 和 0134) 中檢測到，在對照中沒有。

圖 12 顯示轉基因煙草的 Western 雜交分析。每個樣品孔中加入從煙草葉子中抽提出 30 μ l 可溶性蛋白。在轉基因煙草樣品 0042、0043 和 0134 中檢測到了植酸酶，在對照植物中未檢測則沒有。

圖 13 顯示轉基因煙草 (圖 13b-13d) 和對照煙草 (僅用空載體轉基因的煙草；圖 13a) 的花莖的數量。

圖 14 顯示轉基因煙草 (圖 14a-14c) 和對照煙草 (圖 14d) 的主莖數目。

圖 15 顯示 F1 代轉基因煙草的 Southern 雜交分析。每道加入 10 μ g 從不同的 F1 品系得到的限制性酶 Hind III 酶切得到的基因組 DNA，PCR 試劑盒放射性標記的 168phyA cDNA 用作探針。在轉基因品系 (0042 和 0134) 檢測到特殊的帶存在，而在對照品系中未檢到。來自於 0042 (42-1 和 42-2) 的 F1 代顯示出含有單拷貝基因，而來自於 0134 (134-1) 的 F1 代顯示出含有兩個基因拷貝。

圖 16 顯示 F1 代轉基因煙草的 Northern 雜交分析結果。從植物組織中抽提出 20 μ g 的總 RNA 上樣於 1% (重量/

體積) 瓊脂糖凝膠中，由 DIG-PCR 試劑盒放射性標記的 168phyA cDNA 用作探針。(Roche Diagnostics, Hong Kong)。在轉基因品系(0042 和 0134)中檢測到 mRNA 信號，在對照中沒有。

圖 17 顯示 F1 代轉基因煙草的 Western 雜交分析結果。每個樣品孔中加入從煙草葉子中抽提出 10 μ g 可溶性蛋白。在轉基因品系 0042 的 F1 代中檢測到了植酸酶，在對照品系的 F1 代中未檢測。

圖 18 顯示轉基因煙草 F2 代幼苗在磷酸鹽缺乏的條件時的生長情況。F2 代煙草的種子在 MS 培養基(含有 1.25mM 磷酸鹽和 30g/L 蔗糖)上生長 15 天後，幼苗轉入修改過的 MS 培養基(去掉磷酸鹽並減少蔗糖的濃度到 5g/L)上繼續生長 17 天。與對照品系相比，在轉基因品系中能觀察到更多的生物量。

圖 19 顯示轉基因煙草幼苗在低濃度磷酸鹽條件中生長在瓊脂介質上的情況。幼苗先在含 10^{-3} M 或 10^{-5} M 磷酸鹽的 MS 瓊脂糖培養基上生長 20 天，然後再在含 10^{-3} M、 10^{-4} M 或 10^{-5} M 磷酸鹽的 MS 瓊脂糖培養基上生長 30 天，然後乾燥植物並分別稱重。每根柱代表 18 棵單個植株的平均值(N=18)。

圖 20 顯示轉基因煙草幼苗在低濃度磷酸鹽條件中生長在液體培養基中的情況。幼苗先在含 1.25mM 磷酸鹽的 MS0 培養基上生長 10 天，然後再在含 0.01 或 0.1mM 磷酸鹽的 MS 液體培養基上生長 20 天，最後乾燥植物並分別稱重。

每根柱代表 25 棵單個植株的平均值 (N=25)。在低濃度磷酸鹽條件下，在轉基因品系 (0042 和 0134) 中得到的乾重高於對照品系。

圖 21 顯示在轉基因植物中增加內源性植酸酶活性的情況。從葉中抽提出的蛋白 (200 μ g) 與外源性 IP6 (400 μ g) 一起於 37°C 保溫 4、6 和 8 小時。然後通過陰離子交換層析純化肌醇磷酸鹽 (IP6、IP5、IP4、IP3) 並用 HPLC 分析，IP6 和 IP5 的各自的峰由折射率檢測器測量。如圖所示，與對照植物提取物相比，來自於品系 42 (N=4) 的植物抽提物 (N=4) 產生較低的 IP6/IP5 比率，這表明，與對照相比，轉基因植物具有較高的內源植酸酶活性。

序列表

<110> 林文量

<120> 重組體植酸酶及其應用

<130> 9661-020-888

<140> TW 91133207

<141> 2002-11-12

<150> 60/332,060

<151> 2001-11-21

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1390

<212> DNA

<213> 地衣芽孢桿菌

<220>

<221> CDS

<222> (241)...(1390)

<400> 1

```

ttttaccoga tggatgggga cttaaacgaa cttgcggttg agatatacat tccgattcat 60
tgagagatag cgatgttaaa ggcagcccc ggaaaaaatt cggggggtt tctttgggtt 120
tcgtactcta gagtatcggc ggtcttttt agccatcact ttaacaaaa gtttacatac 180
cctcaaatga taattttcat tggtttgcta ggataaatgt tatgaaaagg aggttaatat 240
atgaactttt acaaacgct cgctttatca acactcgcag catccttag gtctccctca 300
tggagcagtc tccccataa cgaagctgcg gtcacaaaag aattcacggt gactgccgat 360
gcagagacag agccggtgga taccctgac gacgcgccag atgaccggc gatttgggtt 420
catccgaagc agcctgaaaa aagcaggctc atcaccacia acaaaaagtc gggcttaatc 480
gtctatgatt tgaagggaaa acagcttgcg gcctatccgt ttggcaaatt aaacaatgtc 540
gacctgcgct acaattttcc gctcgatggc aaaaaaattg atattgccgg ggcctcaaac 600
cggtcagacg gcaaaaacac ggttgaaatt tacgcctttg acggcgaaa aagcaagctg 660
aagaacatcg tcaatcctca aaaacctatt caaaccgata tccaggagg atatggcttc 720
agcctgtatc acagccagaa aaccggcaag ttctacgcca tggtgaccgg aaagaacgga 780
gaattcgagc aataggaact gtttgacaac ggaaaaggac aagtcgaggg caaaaaggta 840
cgctcattca aatgagctc tcaaacagaa gggcttgccg cagatgatga ataccgcaa 900
atgtacatcg ccgaagaaga cgttgcgatt tggcttttca gcgccgagcc ggacggcgga 960
gataaaggaa aatcgtcga tcgtgccgac ggaccgcatc taacttctga tattgaaggg 1020
ctgacgattt actacggaga agacggagaa gggatattga tcgctccag tcagggcgat 1080
aaccgctatg ccatctatga ccggcgccgg aaaaacgact acgtcactgc tttttcaatt 1140
gaggacggca aagaaatcga cgggacaagc gataccgatg gaatcgacgt catcggcttc 1200
ggcctcggca aaacatatcc ataccgcatc tttgtcggcc aagacggcga aaatacggaa 1260
aatggacaac cggccaatca gaacttcaaa attgtctcct gggaaaaaat cgcgcagcgc 1320
ctggacgaca aacctgatat cgatgatcag gtcgatcccc gaaaactgaa aaaccgagcc 1380
aaataaggac                                     1390
    
```

<210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 2

```

Met Asn Phe Tyr Lys Thr Leu Ala Leu Ser Thr Leu Ala Ala Ser Leu
1          5          10          15
Trp Ser Pro Ser Trp Ser Ser Leu Pro His Asn Glu Ala Ala Ala His
20          25          30
    
```


Lys Glu Phe Thr Val Thr Ala Asp Ala Glu Thr Glu Pro Val Asp Thr
 35 40 45
 Pro Asp Asp Ala Ala Asp Asp Pro Ala Ile Trp Val His Pro Lys Gln
 50 55 60
 Pro Glu Lys Ser Arg Leu Ile Thr Thr Asn Lys Lys Ser Gly Leu Ile
 65 70 75 80
 Val Tyr Asp Leu Lys Gly Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Pro Phe Gly Lys
 85 90 95
 Leu Asn Asn Val Asp Leu Arg Tyr Asn Phe Pro Leu Asp Gly Lys Lys
 100 105 110
 Ile Asp Ile Ala Gly Ala Ser Asn Arg Ser Asp Gly Lys Asn Thr Val
 115 120 125
 Glu Ile Tyr Ala Phe Asp Gly Glu Lys Ser Lys Leu Lys Asn Ile Val
 130 135 140
 Asn Pro Gln Lys Pro Ile Gln Thr Asp Ile Gln Glu Val Tyr Gly Phe
 145 150 155 160
 Ser Leu Tyr His Ser Gln Lys Thr Gly Lys Phe Tyr Ala Met Val Thr
 165 170 175
 Gly Lys Asn Gly Glu Phe Glu Gln Tyr Glu Leu Phe Asp Asn Gly Lys
 180 185 190
 Gly Gln Val Glu Gly Lys Lys Val Arg Ser Phe Lys Met Ser Ser Gln
 195 200 205
 Thr Glu Gly Leu Ala Ala Asp Glu Tyr Gly Lys Met Tyr Ile Ala
 210 215 220
 Glu Glu Asp Val Ala Ile Trp Ser Phe Ser Ala Glu Pro Asp Gly Gly
 225 230 235 240
 Asp Lys Gly Lys Ile Val Asp Arg Ala Asp Gly Pro His Leu Thr Ser
 245 250 255
 Asp Ile Glu Gly Leu Thr Ile Tyr Tyr Gly Glu Asp Gly Glu Gly Tyr
 260 265 270
 Leu Ile Ala Ser Ser Gln Gly Asp Asn Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Arg
 275 280 285
 Arg Gly Lys Asn Asp Tyr Val Thr Ala Phe Ser Ile Glu Asp Gly Lys
 290 295 300
 Glu Ile Asp Gly Thr Ser Asp Thr Asp Gly Ile Asp Val Ile Gly Phe
 305 310 315 320
 Gly Leu Gly Lys Thr Tyr Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ala Gln Asp Gly
 325 330 335
 Glu Asn Thr Glu Asn Gly Gln Pro Ala Asn Gln Asn Phe Lys Ile Val
 340 345 350
 Ser Trp Glu Lys Ile Ala Asp Ala Leu Asp Asp Lys Pro Asp Ile Asp
 355 360 365
 Asp Gln Val Asp Pro Arg Lys Leu Lys Asn Arg Ala Lys
 370 375 380

<210> 3
 <211> 1380
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢桿菌

<220>
 <221> CDS
 <222> (100)...(1248)

<400> 3
 gagtcagaaa ccctataaaa aaaggttcat tttcctcacg gtaatcacct gtatatattt 60
 tacaatagta gtgtagtgta taaaagagga gggtagcaa atg aag gtt cca aaa 114
 Met Lys Val Pro Lys
 1 5

aca atg ctg cta agc act gcc gcg ggt tta ttg ctt agc ctg aca gca 162

Thr	Met	Leu	Leu	Ser	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala		
				10					15					20			
acc	tcg	gtg	tcg	gct	cat	tat	gtg	aat	gag	gaa	cat	cat	ttc	aaa	gtg	210	
Thr	Ser	Val	Ser	Ala	His	Tyr	Val	Asn	Glu	Glu	His	His	Phe	Lys	Val		
			25					30					35				
act	gca	cac	acg	gag	aca	gat	ccg	gtc	gca	tct	ggc	gat	gat	gca	gca	258	
Thr	Ala	His	Thr	Glu	Thr	Asp	Pro	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	Ala		
		40					45					50					
gat	gac	ccg	gcc	att	tgg	gtt	cat	gaa	aaa	cac	ccg	gaa	aaa	agc	aag	306	
Asp	Asp	Pro	Ala	Ile	Trp	Val	His	Glu	Lys	His	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys		
	55					60					65						
ttg	att	aca	aca	aat	aag	aag	tca	ggg	ctc	gtt	gtg	tat	gat	tta	gac	354	
Leu	Ile	Thr	Thr	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Leu	Asp		
70					75					80					85		
gga	aaa	cag	ctt	cat	tct	tat	gag	ttt	ggc	aag	ctc	aat	aat	gtc	gat	402	
Gly	Lys	Gln	Leu	His	Ser	Tyr	Glu	Phe	Gly	Lys	Leu	Asn	Asn	Val	Asp		
				90					95					100			
ctg	cgc	tat	gat	ttt	cca	ttg	aac	ggc	gaa	aaa	att	gat	att	gct	gcc	450	
Leu	Arg	Tyr	Asp	Phe	Pro	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Ile	Asp	Ile	Ala	Ala		
			105					110					115				
gca	tcc	aac	cgg	tcc	gaa	gga	aaa	aat	aca	att	gaa	gta	tat	gca	ata	498	
Ala	Ser	Asn	Arg	Ser	Glu	Gly	Lys	Asn	Thr	Ile	Glu	Val	Tyr	Ala	Ile		
		120					125					130					
gac	ggg	gat	aaa	gga	aaa	ttg	aaa	agc	att	aca	gat	ccg	aac	cat	cct	546	
Asp	Gly	Asp	Lys	Gly	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Thr	Asp	Pro	Asn	His	Pro		
	135					140					145						
att	tcc	acc	aat	att	tct	gag	gtt	tat	gga	ttc	agc	ttg	tat	cac	agc	594	
Ile	Ser	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Val	Tyr	Gly	Phe	Ser	Leu	Tyr	His	Ser		
150					155					160					165		
cag	aaa	aca	gga	gca	ttt	tac	gca	tta	gtg	aca	ggc	aaa	caa	ggg	gaa	642	
Gln	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ala	Leu	Val	Thr	Gly	Lys	Gln	Gly	Glu		
				170					175					180			
ttt	gag	cag	tat	gaa	att	gtt	gat	ggt	gga	aag	ggt	tat	gta	aca	ggg	690	
Phe	Glu	Gln	Tyr	Glu	Ile	Val	Asp	Gly	Gly	Lys	Gly	Tyr	Val	Thr	Gly		
			185					190					195				
aaa	aag	gtg	cgt	gaa	ttt	aag	ttg	aat	tct	cag	acc	gaa	ggc	ctt	gtt	738	
Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Phe	Lys	Leu	Asn	Ser	Gln	Thr	Glu	Gly	Leu	Val		
		200					205					210					
gcg	gat	gat	gag	tac	gga	aac	cta	tac	ata	gca	gag	gaa	gat	gag	gcc	786	
Ala	Asp	Asp	Glu	Tyr	Gly	Asn	Leu	Tyr	Ile	Ala	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala		
	215					220					225						
atc	tgg	aaa	ttt	aac	gct	gag	ccc	ggc	gga	ggg	tca	aag	ggg	cag	gtt	834	
Ile	Trp	Lys	Phe	Asn	Ala	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	Gly	Gln	Val		
230					235					240					245		
gtt	gac	cgt	gcg	aca	gga	gat	cat	ttg	aca	gct	gat	att	gaa	gga	ctg	882	
Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Gly	Asp	His	Leu	Thr	Ala	Asp	Ile	Glu	Gly	Leu		
				250					255					260			

aca atc tat tat gca cca aat ggc aaa gga tat ctc atg gct tca agt 930
 Thr Ile Tyr Tyr Ala Pro Asn Gly Lys Gly Tyr Leu Met Ala Ser Ser
 265 270 275

caa gga aat aac agc tat gca atg tat gaa cgg cag ggg aaa aat cgc 978
 Gln Gly Asn Asn Ser Tyr Ala Met Tyr Glu Arg Gln Gly Lys Asn Arg
 280 285 290

tat gta gcc aac ttt gag att aca gat ggc gag aag ata gac ggt act 1026
 Tyr Val Ala Asn Phe Glu Ile Thr Asp Gly Glu Lys Ile Asp Gly Thr
 295 300 305

agt gac acg gat ggt att gat gtt ctc ggt ttc gga ctt ggc cca aaa 1074
 Ser Asp Thr Asp Gly Ile Asp Val Leu Gly Phe Gly Leu Gly Pro Lys
 310 315 320 325

tat ccg tac ggg att ttt gtg gcg cag gac ggc gaa aat att gat aac 1122
 Tyr Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ala Gln Asp Gly Glu Asn Ile Asp Asn
 330 335 340

gga caa gcc gtc aat caa aat ttc aaa att gta tcg tgg gaa caa att 1170
 Gly Gln Ala Val Asn Gln Asn Phe Lys Ile Val Ser Trp Glu Gln Ile
 345 350 355

gca cag cat ctc ggc gaa atg cct gat ctt cat aaa cag gta aat ccg 1218
 Ala Gln His Leu Gly Glu Met Pro Asp Leu His Lys Gln Val Asn Pro
 360 365 370

agg aag ctg aaa gac cgt tct gac ggc tag aatagaaagc agcttgtgca 1268
 Arg Lys Leu Lys Asp Arg Ser Asp Gly *
 375 380

gctgcttttt tctatgaata aaaaaatcgt tcatatgcaat gaacgatttt tcaagaaagc 1328
 gccagatgaa tcgcttttag ttttgcagga agctcatcaa acgtaaagc gg 1380

<210> 4
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢桿菌

<400> 4
 Met Lys Val Pro Lys Thr Met Leu Leu Ser Thr Ala Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Thr Ala Thr Ser Val Ser Ala His Tyr Val Asn Glu Glu
 20 25 30
 His His Phe Lys Val Thr Ala His Thr Glu Thr Asp Pro Val Ala Ser
 35 40 45
 Gly Asp Asp Ala Ala Asp Asp Pro Ala Ile Trp Val His Glu Lys His
 50 55 60
 Pro Glu Lys Ser Lys Leu Ile Thr Thr Asn Lys Lys Ser Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Val Tyr Asp Leu Asp Gly Lys Gln Leu His Ser Tyr Glu Phe Gly Lys
 85 90 95
 Leu Asn Asn Val Asp Leu Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Asn Gly Glu Lys
 100 105 110
 Ile Asp Ile Ala Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu Gly Lys Asn Thr Ile
 115 120 125
 Glu Val Tyr Ala Ile Asp Gly Asp Lys Gly Lys Leu Lys Ser Ile Thr
 130 135 140
 Asp Pro Asn His Pro Ile Ser Thr Asn Ile Ser Glu Val Tyr Gly Phe
 145 150 155 160

Ser Leu Tyr His Ser Gln Lys Thr Gly Ala Phe Tyr Ala Leu Val Thr
 165 170 175
 Gly Lys Gln Gly Glu Phe Glu Gln Tyr Glu Ile Val Asp Gly Gly Lys
 180 185 190
 Gly Tyr Val Thr Gly Lys Lys Val Arg Glu Phe Lys Leu Asn Ser Gln
 195 200 205
 Thr Glu Gly Leu Val Ala Asp Asp Glu Tyr Gly Asn Leu Tyr Ile Ala
 210 215 220
 Glu Glu Asp Glu Ala Ile Trp Lys Phe Asn Ala Glu Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Lys Gly Gln Val Val Asp Arg Ala Thr Gly Asp His Leu Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ile Glu Gly Leu Thr Ile Tyr Tyr Ala Pro Asn Gly Lys Gly Tyr
 260 265 270
 Leu Met Ala Ser Ser Gln Gly Asn Asn Ser Tyr Ala Met Tyr Glu Arg
 275 280 285
 Gln Gly Lys Asn Arg Tyr Val Ala Asn Phe Glu Ile Thr Asp Gly Glu
 290 295 300
 Lys Ile Asp Gly Thr Ser Asp Thr Asp Gly Ile Asp Val Leu Gly Phe
 305 310 315 320
 Gly Leu Gly Pro Lys Tyr Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ala Gln Asp Gly
 325 330 335
 Glu Asn Ile Asp Asn Gly Gln Ala Val Asn Gln Asn Phe Lys Ile Val
 340 345 350
 Ser Trp Glu Gln Ile Ala Gln His Leu Gly Glu Met Pro Asp Leu His
 355 360 365
 Lys Gln Val Asn Pro Arg Lys Leu Lys Asp Arg Ser Asp Gly
 370 375 380

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 6, 9, 18
 <223> n = deoxyinosine

<400> 5
 gaygcngcng aygayccngc

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 18
 <223> n = deoxyinosine

<400> 6
 tcrtaytgyt craaytcncc

20

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 7
atgaattcgt cgggcttaat cgtctatg

28

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 8
atggatcctc aggctgcttc ggatgaa

27

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 9
atgaattcat ggcttcagcc gtatcac

27

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 10
atggatccgt gtttttgccg tctgacc

27

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 11
gcgaattcga taccgatgga atcgacg

27

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 12
atggatcctc atagatggca tagcggg 27

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 13
atttaacata tgaactttta caaaacgctc 30

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14
atggatccgt ccttatttgg ctcggg 26

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
aggaattcca tatgaagggt ccaaaaacaa tgc 33

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 16
taggatcctc atctggcggt ttottgt 27

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
atggatccat ggctcattat gtgaatgagg aacat 35

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 18
attagagctc ctagccgtca gaacggtctt 30

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 19
ctacaaagat cgttatgttt atcggca 27

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 20
agaccaatgc ggagcatata cg 22

<210> 21
<211> 1290
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌

<400> 21
cacatttgac aattttcaca aaaacttaac actgacaatc atgtatatat gttacaattg 60
aagtgcacgt tcataaaagg aggaagtaaa atgaatcatt caaaaacact tttgttaacc 120
gcggcggcog gactgatget cacatgcggt gcggtgtctt cccaggcaaa gcataagctg 180
tccgatcctt atcattttac cgtgaatgca gcggcggaaa cggaaccggt tgatacggcc 240
ggtgacgagg ctgatgatcc tgcgatttgg ctggacccca agactcctca gaacagcaaa 300
ttgattacga ccaataaaaa atcaggttta gtcgtttaca gccttgatgg taagatgctt 360
cattcctata ataccgggaa gctgaacaat gtcgatatcc gttatgattt tccggtgaac 420
ggcaaaaaag tcgatatcgc ggcagcatcc aatcggctcg aaggaaaaaa taccattgag 480
atttacgcta ttgatggaaa aaacggcaca ttacaaagca tgacagatcc agaccatccg 540
attgcaacag caattaatga ggtatacgggt tttaccttat accacagtca aaaaacagga 600
aaatattacg cgatggtgac aggaaaagag ggtgaatttg aacaatacga attaaaggcg 660
gacaaaaatg gatacatatc cggcaaaaag gtacgggctt ttaaaatgaa ttcccagacg 720
gaagggatgg cagcagacga tgaatacggc aggctttata tcgcagaaga agatgaggcc 780
atttggaagt tcagcgccga gccggacggc ggcagtaacg gaacggttat cgaccgtgcc 840
gacggcaggc atttaactcg tgatattgaa ggattgacga tttactacgc tgctgacggg 900
aaaggctatc tgatggcatc aagccagga aacagcagct acgccattta tgacagacaa 960
ggaaaagaaca aatatgttgc ggattttcgc ataacagacg gtcctgaaac agacgggaca 1020
agcgatacag acggaattga cgttctgggt ttccgactgg ggcctgaata tccgttcggg 1080
atttttgtcg cacaggacgg tgaaaatata gatcacggcc aaaaggccaa tcaaaatfff 1140
aaaatcgtgc catgggaaaag aattgctgat caaatcgggt tccgcccgt ggcaaatgaa 1200
caggttgacc cgagaaaact gaccgacaga agcggaaaat aaacatgcaa aaagcagctt 1260
atacaagctg ctttttgcac gtgaagaacg 1290

<210> 22
<211> 383
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌

<400> 22

Met Asn His Ser Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Gly Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Thr Cys Gly Ala Val Ser Ser Gln Ala Lys His Lys Leu Ser Asp
 20 25 30
 Pro Tyr His Phe Thr Val Asn Ala Ala Ala Glu Thr Glu Pro Val Asp
 35 40 45
 Thr Ala Gly Asp Ala Ala Asp Asp Pro Ala Ile Trp Leu Asp Pro Lys
 50 55 60
 Thr Pro Gln Asn Ser Lys Leu Ile Thr Thr Asn Lys Lys Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Val Val Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Met Leu His Ser Tyr Asn Thr Gly
 85 90 95
 Lys Leu Asn Asn Val Asp Ile Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Asn Gly Lys
 100 105 110
 Lys Val Asp Ile Ala Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu Gly Lys Asn Thr
 115 120 125
 Ile Glu Ile Tyr Ala Ile Asp Gly Lys Asn Gly Thr Leu Gln Ser Met
 130 135 140
 Thr Asp Pro Asp His Pro Ile Ala Thr Ala Ile Asn Glu Val Tyr Gly
 145 150 155 160
 Phe Thr Leu Tyr His Ser Gln Lys Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Met Val
 165 170 175
 Thr Gly Lys Glu Gly Glu Phe Glu Gln Tyr Glu Leu Lys Ala Asp Lys
 180 185 190
 Asn Gly Tyr Ile Ser Gly Lys Lys Val Arg Ala Phe Lys Met Asn Ser
 195 200 205
 Gln Thr Glu Gly Met Ala Ala Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Leu Tyr Ile
 210 215 220
 Ala Glu Glu Asp Glu Ala Ile Trp Lys Phe Ser Ala Glu Pro Asp Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Asn Gly Thr Val Ile Asp Arg Ala Asp Gly Arg His Leu Thr
 245 250 255
 Arg Asp Ile Glu Gly Leu Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Asp Gly Lys Gly
 260 265 270
 Tyr Leu Met Ala Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ser Tyr Ala Ile Tyr Asp
 275 280 285
 Arg Gln Gly Lys Asn Lys Tyr Val Ala Asp Phe Arg Ile Thr Asp Gly
 290 295 300
 Pro Glu Thr Asp Gly Thr Ser Asp Thr Asp Gly Ile Asp Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Phe Gly Ile Phe Val Ala Gln Asp
 325 330 335
 Gly Glu Asn Ile Asp His Gly Gln Lys Ala Asn Gln Asn Phe Lys Ile
 340 345 350
 Val Pro Trp Glu Arg Ile Ala Asp Gln Ile Gly Phe Arg Pro Leu Ala
 355 360 365
 Asn Glu Gln Val Asp Pro Arg Lys Leu Thr Asp Arg Ser Gly Lys
 370 375 380

<210> 23

<211> 1724

<212> DNA

<213> 枯草芽孢桿菌種

<400> 23

catatgttga acaatttcag cgagttaatg aaagaaccca ataaatcaaa aattagagaa 60
 aaacattaat ctgatgcgct ttcatatcgc gttaccgat taatagaata gaaattacaa 120
 ataaaacatt gtactaaata ttcattttaa atattgtct acgtcaattt tttctcttca 180
 taaatcctca cattcggaca atcttcacaa aaacttaaca ctgaacttcc tgtatgtatt 240
 ttacaattaa agtgcacggt cataaaagga ggatggaaaa tgaatcattc aaaaacactt 300


```

ttgtaaccg cggcagccg attgatgctc acatgcggtg cggtttcttc tcaggccaaa 360
cataagctgt ctgatcctta tcattttacc gtgaatgcgg cggcggaaac ggagccgggt 420
gatacagccg gtgatgcagc tgatgatcct gcgatttggc tggaccccaa gaatcctcag 480
aacagcaaat tgatcacaac caataaaaaa tcaggcttag ccgtgtacag cctagaggga 540
aagatgcttc attcctatca taccgggaag ctgaacaatg ttgatatccg atatgatttt 600
ccgttgaacg gaaaaaaagt cgatattgcg gcggcatcca atcggctctga aggaaagaat 660
accattgaga tttacgccat tgacgggaaa aacggcacat taciaagcat tacggatcca 720
aaccgcccga ttgcatcagc aattgatgaa gtatacggtt tcagcttgta ccacagtcaa 780
aaaacaggaa aatattacgc gatggtgaca ggaaaagaag gcgaatttga acaatacгаа 840
ttaaattgagg ataaaaatgg atacatatcc ggcaaaaagg taagggcggt taaaatgaat 900
tctcagacag aagggatggc agcagacgat gaatacggca gtctttatat cgcagaagaa 960
gatgaggcca tctggaagt cagcgctgag ccggacggcg gcagtaacgg aacggttatc 1020
gatcgtgccg atggcaggca tttaacccct gatattgaag gactgacgat ttactacgct 1080
gctgacggga aaggctatct gcttgccctca agccagggtta acagcagcta tgcgatttat 1140
gaaagacagg gacagaacaa atatgttgcg gactttcaga taacagacgg gcctgaaaca 1200
gacggcacaa gcgatacaga cgggaattgac gttctggggtt tcgggctggg gcctgaatat 1260
ccgttcggtc ttttgtcgc acaggacgga gagaatatag atcacggcca aaaggccaat 1320
caaaatttta aaatggtgcc atgggaaaga atcgtgata aaatcggctt tcacccgcag 1380
gtcaataaac aggtcgaccc gagaaaaatg accgacagaa gcggaaaata aacatgaaaa 1440
aagcagctta tccaagctgc tttttgatgt gaagagcgtt tcatgagaaa gtcttggaac 1500
ggatagccgt aagcacagcc ggcagccggt catacgtgta cgccggctact gtctcttgat 1560
aattaagcgc cgcgatttgt ttacgttcc cggggttgt catataaaaa tggatcttat 1620
ccggaaaatc cgcaaacccg ctgtaagaaa caaatgttga aaacgggggc gcgggagaaa 1680
ggtctgtcag ctgaaaggcc tgacaagccg caatgtctaa gctt 1724

```

<210> 24
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢桿菌種

```

<400> 24
Met Asn His Ser Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Gly Leu Met
 1          5          10          15
Leu Thr Cys Gly Ala Val Ser Ser Gln Ala Lys His Lys Leu Ser Asp
 20          25          30
Pro Tyr His Phe Thr Val Asn Ala Ala Ala Glu Thr Glu Pro Val Asp
 35          40          45
Thr Ala Gly Asp Ala Ala Asp Asp Pro Ala Ile Trp Leu Asp Pro Lys
 50          55          60
Asn Pro Gln Asn Ser Lys Leu Ile Thr Thr Asn Lys Lys Ser Gly Leu
 65          70          75          80
Ala Val Tyr Ser Leu Glu Gly Lys Met Leu His Ser Tyr His Thr Gly
 85          90          95
Lys Leu Asn Asn Val Asp Ile Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Asn Gly Lys
 100          105          110
Lys Val Asp Ile Ala Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu Gly Lys Asn Thr
 115          120          125
Ile Glu Ile Tyr Ala Ile Asp Gly Lys Asn Gly Thr Leu Gln Ser Ile
 130          135          140
Thr Asp Pro Asn Arg Pro Ile Ala Ser Ala Ile Asp Glu Val Tyr Gly
 145          150          155          160
Phe Ser Leu Tyr His Ser Gln Lys Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Met Val
 165          170          175
Thr Gly Lys Glu Gly Glu Phe Glu Gln Tyr Glu Leu Asn Ala Asp Lys
 180          185          190
Asn Gly Tyr Ile Ser Gly Lys Lys Val Arg Ala Phe Lys Met Asn Ser
 195          200          205
Gln Thr Glu Gly Met Ala Ala Asp Asp Glu Tyr Gly Ser Leu Tyr Ile
 210          215          220
Ala Glu Glu Asp Glu Ala Ile Trp Lys Phe Ser Ala Glu Pro Asp Gly
 225          230          235          240
Gly Ser Asn Gly Thr Val Ile Asp Arg Ala Asp Gly Arg His Leu Thr

```

				245					250					255			
Pro	Asp	Ile	Glu	Gly	Leu	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	Gly		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Glu		
		275					280					285					
Arg	Gln	Gly	Gln	Asn	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Asp	Gly		
	290					295					300						
Pro	Glu	Thr	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	Asp	Gly	Ile	Asp	Val	Leu	Gly		
305					310					315					320		
Phe	Gly	Leu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Pro	Phe	Gly	Leu	Phe	Val	Ala	Gln	Asp		
				325					330					335			
Gly	Glu	Asn	Ile	Asp	His	Gly	Gln	Lys	Ala	Asn	Gln	Asn	Phe	Lys	Met		
			340					345					350				
Val	Pro	Trp	Glu	Arg	Ile	Ala	Asp	Lys	Ile	Gly	Phe	His	Pro	Gln	Val		
		355					360					365					
Asn	Lys	Gln	Val	Asp	Pro	Arg	Lys	Met	Thr	Asp	Arg	Ser	Gly	Lys			
	370					375					380						

肆、中文發明摘要

在本發明中，從兩種一般認為是安全的微生物即 *Bacillus licheniformis* 和枯草芽孢桿菌 168 中克隆出兩種植酸酶基因並定性。本發明同時還提供了植酸酶的過量表達和純化的方法。該酶的分子量約為 48kDa 而且顯示有胞外植酸鹽水解活性。該重組酶能夠增加植酸酶在各種商業領域的應用，包括動物飼料和能夠提高生長速率以促進成熟、開花和做果的轉基因植物的製備。

伍、英文發明摘要

In this invention, two phytase genes from two generally-regarded-as-safe microorganisms, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* 168, were cloned and characterized. A process for phytase enzyme over-expression and purification was also developed. The enzymes have molecular weight of about 48 kilodaltons and showed extracellular phytate-hydrolyzing activities. The recombinant enzyme can be used to enhance phytase utilization in various commercial areas, including preparation of animal feed and transgenic plants that have increased growth rates for maturity, flowering and fruiting.

公告本

ttttaccga tggatggga cttaaacgaa cttgcggttg agatatacat tccgattcat tgagagatag cgatgttaaa
 ggcagcccc ggaaaaaatt ccgggggtt tctttgggtt tegtactcta ggtatcggc ggtctttttt agccatcact
 tttacaataa gtttacatac cctcaaatga taattttcat tggtttgcta ggataaatgt tatgaaaagg aggttaatat
 ATGAACCTTT ACAAAACGCT CGCTTTATCA ACACTCGCAG GACTGCCGAT GCAGAGACAG AGCCGGTGA TACCCCTGAC GACGGGGCAG
 CGAAGCTGG GCTCACAAAG AATTCAGGT AATCCGAAGC AGCCTGAAA AAGCAGGTC ATCACCACAA ACAAAAAGTC GGGCTTAATC
 ATGACCCGGC GATTTGGGT TGAAGGAAA ACAGTTGG GCCTATCCGT TTGGCAAAT AAACAATGTC GACCTGCGT ACAATTTTCC
 GTCTATGAT TGAAGGAAA AAAAATG ATATTGCCG GGCCTCAAAC CGETCAGAC GCAAAAACAC GGTGAAAT TACGCCTTG
 CCTCGATGGC AAAAATG AAGCAAGCTG AAGAACATCG TCAATCTCA AAAACCTATT CAAACCGATA TCCAGGAGG ATATGGCTTC
 ACGCGAAA AAGCAAGCTG AAGCAAGCTG AACCGCAAG TTCTACGCCA TGGTGACCG AAAGAACGGA GAATTCGAGC AATATGAACT
 AGCCTGTATC ACAGCCAGAA AAGTCAGG GAAAGAGGTC CAAAAAGGTC CAAACCGATA TCCAGGAGG AAATGAACT
 GTTTGACAA GAAAGAGG ATACGGCAA ATGTACATCG CCGAAGAAGA CGTTGCGATT TGGTCTTTCA GCGCCGAGCC GACGGGGCGG
 CAGATGATG ATACGGCAA AAATCGTCGA TCGTGCCGAC GGACCGCAT TAACCTCTGA TATTGAAGG CTGACGATTT ACTACGGAGA
 GATAAAGGAA AAATCGTCGA TCGTGCCGAC GGACCGCAT TAACCTCTGA TATTGAAGG CTGACGATTT ACTACGGAGA
 AGACGGAGAA GGGTATTGA TCGCGTCCAG TCAGGGCGAT AACCGCTATG CCATCTATGA CCGCGCGGG AAAAACCGACT
 ACGTCACTG TTTTCAAT GAGGACGGCA AAGAAATCGA AAGAAATCGA CCGGACAAGC GATACCGATG GAATCGACGT CATCGGCTTC
 GGCCTCGGCA AAACATATCC ATACGGCATC TTTGTCCGCC TTGTGTCGCC AAGACGGCGA AAATACGGAA AATGGACAA CCGCCCAATCA
 GAACTTCAA ATTTCTCCT GGAATAAAT CGCCGACCGG CTGGACGACA AACCTGATAT CGATGATCAG GTCGATCCCC
 GAAAAC TGAA AAACCGAGCC AAATAAGGAC

圖 1A

MNFYKTLALS TLAASLWSPS WSSLPHNEAA AHKEFTVTAD AETEPVDTPD DAADDPAIWV HPKQPEKSRL ITTNKKSGLI
VYDLKKGQLA AYPFGKLNIV DLRYNFPLDG KKIDIAGASN RSDGKNTVEI YAFDGEKSKL KNIVNPQKPI QTDIQEVYGF
SLYHSQKTGK FYAMVTGKNG EFEQYELFDN GKGQVEGKIV RSEKMSQTE GLAADDEYVK MYIAEEDVAI WSFSAEPDGG
DXGKIVDRAD GPHLTSIDIEG LTIYGEDGE GYLIASSQGD NRYAIYDRRG KNDYVTFASI EDGKEIDGTS DTDGIDVIGF
GLGKTYPIGI FVAQDGENTE NGQPANQNFK IVSWEKIADA LDDKPDIDDQ VDPRKLNRA K

圖 1B

gagtcagaaa ccctataaaa aaaggttcat tttcctcacg gtaatcacct gatatattt tacaatagta gtgtagtga
 taaaagagga gggtaaccaaa TGAAGGTTC AAAAAAATG AAAAAAATG CTGCTAAGCA CTGCGCGGG TTTATTGCTT AGCCTGACAG
 CAACCTCGGT GTCGGCTCAT TATGTGAATG AGGAACAATG AGGAACAATG TTTCAAAGTG ACTGCACACA CGGAGACAGA TCCGGTCCGA
 TCTGGCGATG ATGCAGCAGA TGACCCGGCC ATTTGGGTTT AGACGGAAA CAGCTTCATT TATTGCTGCC GCATCCAACC GGTCCGAAGG AAAAAATACA
 TAAGAAGTCA GGGCTCGTTG TGTATGATTT TTGAACGGCG AAAAAAATGA TATTGCTGCC AGATCCGAAC CATCCTATTT CCACCAATAT
 ATCTGCGCTA TGATTTTCCA CCGGATATA GGGGATATA GGGGATATA CAGCCAGAAA ACAGGAGCAT TTTACGCATT AGTGACAGGC AAACAAGGGG
 ATTGAAGTAT ATGCAATAGA GTTGGATTCA GCTTGTATCA GCTTGTATCA CAGCCAGAAA GAAAAATGA AAGCATTAC AGATCCGAAC TTTACGCATT
 TTCTGAGGTT TATGGATTCA GCTTGTATCA GCTTGTATCA GCTTGTATCA TGTAAACAGGG AAAAAAGTGC GTGAATTTAA GTTGAATTTCT
 AATTGAGCA GTATGAAATT GTTGTATGAG GTTGTATGAG GTTGTATGAG TATACATAGC TATACATAGC AGAGGAAGAT GAGGCCATCT GGAATTTTAA
 CAGACCGAAG GCCTTGTTGC GGATGATGAG CAAGGGGCA AATGGCAAAG AATGGCAAAG GATATCTCAT GGTTCGACAG CGTCCGACAG GAGATCATTT
 CGCTGAGCCC GGCGGAGGGT CAAGGGGCA AATGGCAAAG AATGGCAAAG GATATCTCAT GGTTCGACAG CGTCCGACAG CAAGGAARTA ACAGCTATGC
 TGACAAATCTA TTATGCACCA AATGGCAAAG AATGGCAAAG TTTGAGATTA CAGATGGCGA TACGGGATTT TTGTGGCGCA GGACGGCGAA AATATTGATA
 CGGCAGGGGA AAAAAATGCTA TGTAGCCCA GACTTGGCC AAAAAATGCTA CAGATGGCGA TACGGGATTT TTGTGGCGCA GGACGGCGAA AATATTGATA
 TATTGATGTT CTCGGTTTCG GACTTGGCC AAAAAATGCTA CAGATGGCGA TACGGGATTT TTGTGGCGCA GGACGGCGAA AATATTGATA
 ACGGACAAGC CGTCAATCAA AATTICAAA TTTGTATCGTG GAAACAAATTT GCACAGCATC TCGGCGAAT GCCTGATCTT
 CATAAACAGG TAAATCCGAG GAAAGCTGAAA GACCGTCTG ACGGCTAGAA tagaaagcag cttgtgcagc tgcttttttc
 tatgaataaa aaaatcgttc atagcaatga acgatatttc aagaagcgc cagatgaatc gcttttagtt ttgcaggaag
 ctcatcaaac gtaaatgagg

MKVPKTMLLS TAAGLLLSLT ATSVSAHYVN EEHFKVTAH TETDPVASGD DAADDPAIWV HEKHPEKSKL ITTNKKSGLV
 VYDLGKQLH SYEFGKLNIV DLRDYDFPLNG EKIDIAAASN RSEGKNTIEV YAIDGDKGKL KSITDPNHP I STNISEVYGF
 SLYHSQKTGA FYALVTGKQG EFEQYEIVDG GGYVTGKKV REFKLSQTE GLVADDEYGN LYIAEEDEAI WKFNAEPGGG
 SKGQVVDRAI GDHLTADIEG LTIYYAPNGK GYLMASSQGN NSYAMYERQG KNRYVANFEI TDGEKIDGTS DTDGIDVLGF
 GLGPKYPIGI FVAQDGENID NGQAVNQNFK IVSWEQIAQH LGEMPDLLHKQ VNPRLKDRS DG

圖 2B

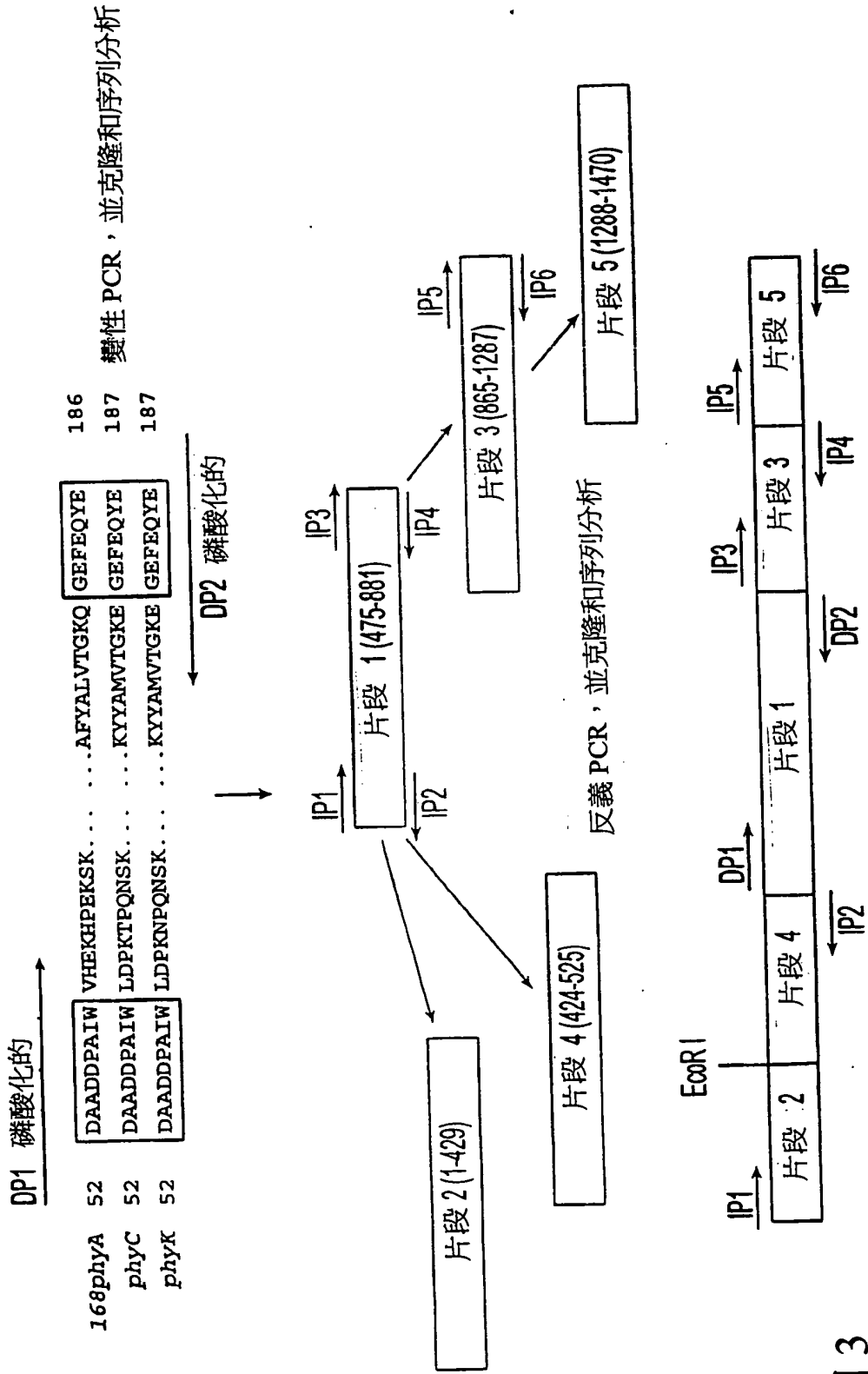
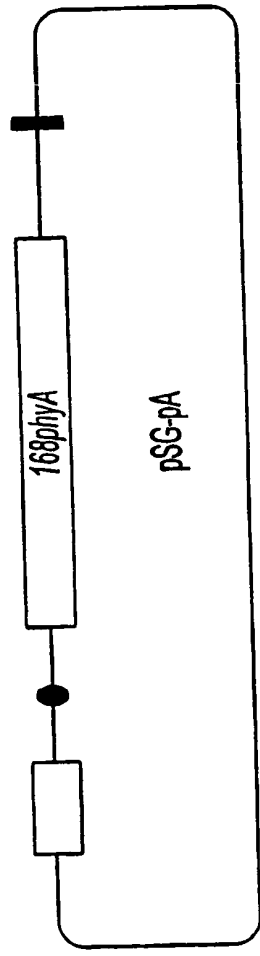


圖 3

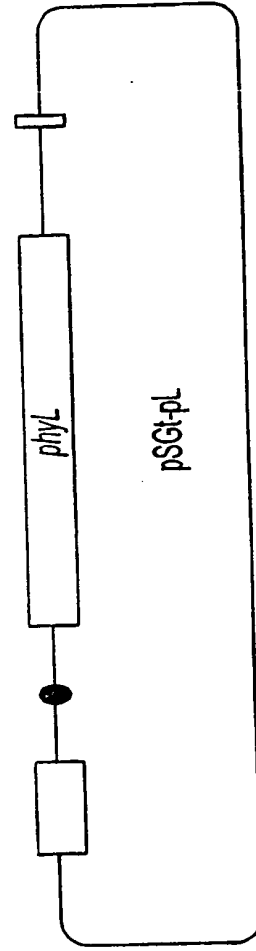


105 啓動子

● S.D. 序列

■ B. subtilis 的 168phyA 基因的天然終止子

圖 4A



105 啓動子

● S.D. 序列

■ B. licheniformis 的 α -澱粉酶基因的終止子

圖 4B

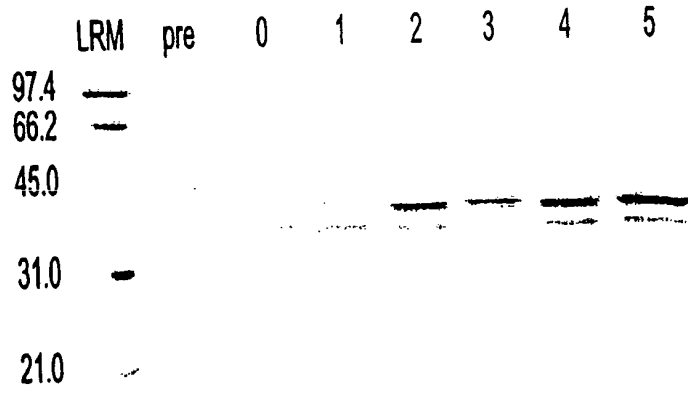


圖 5A

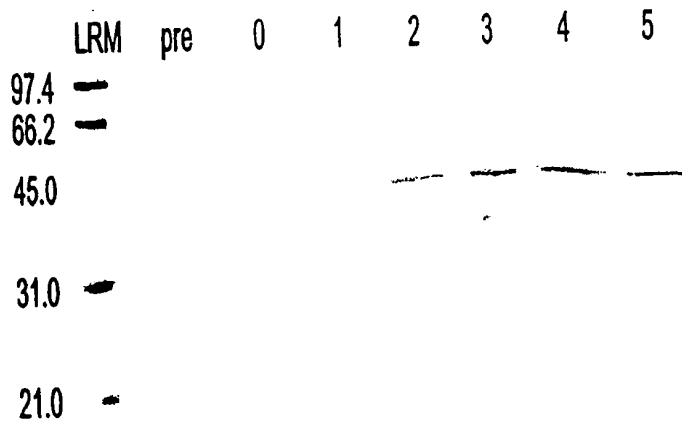


圖 5B

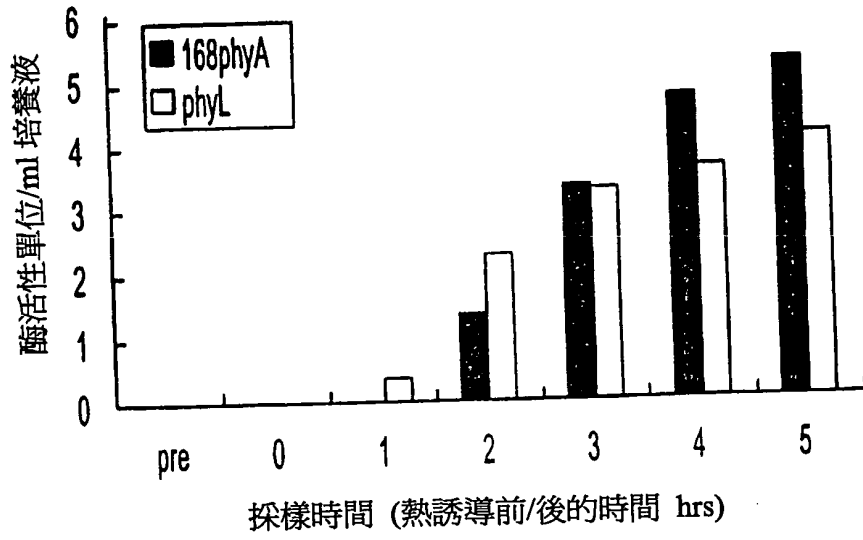


圖 6A

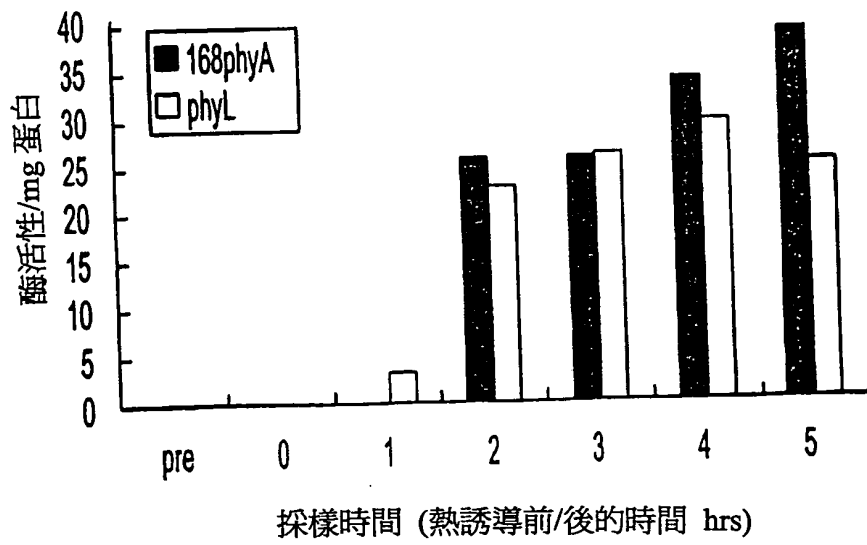


圖 6B

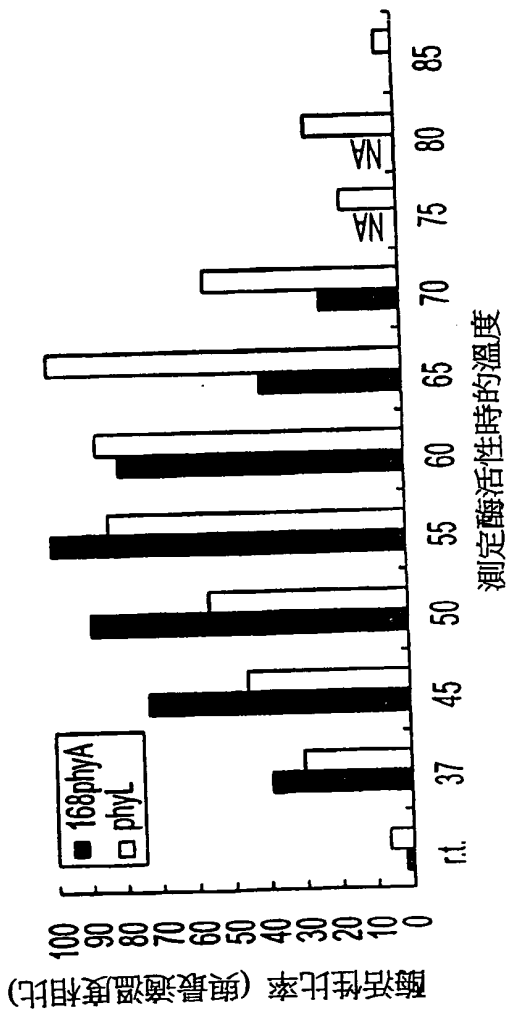


圖 7A

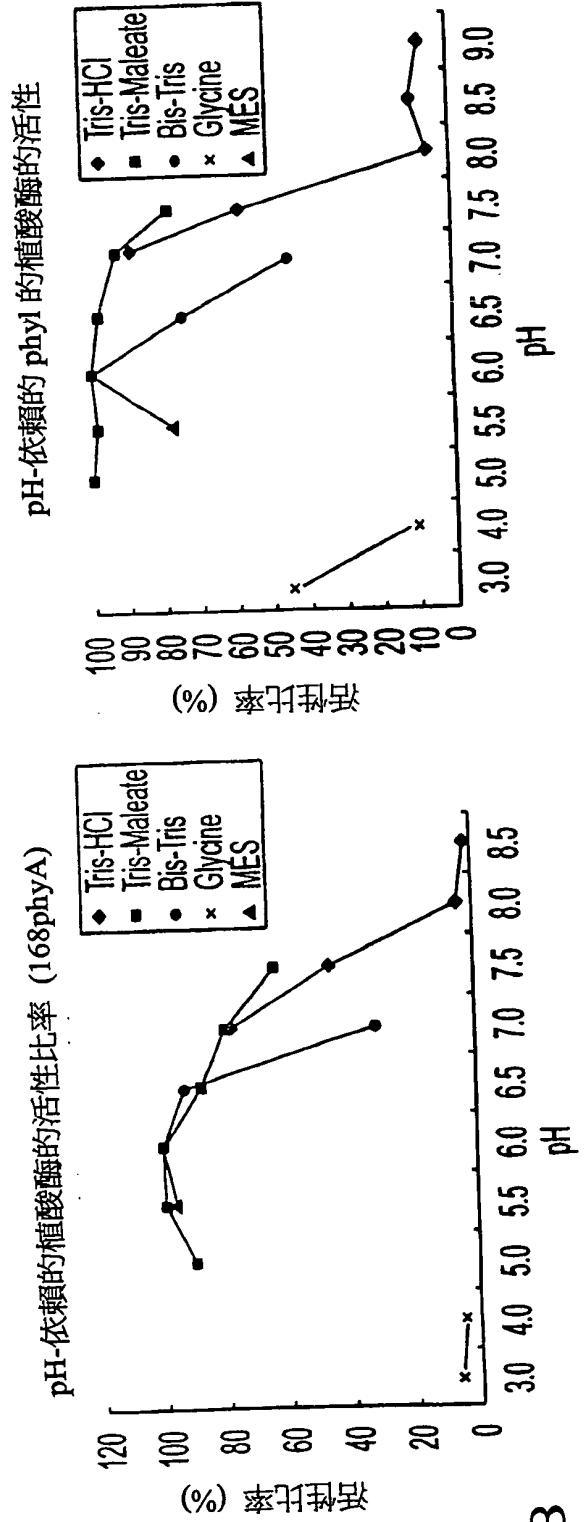


圖 7B

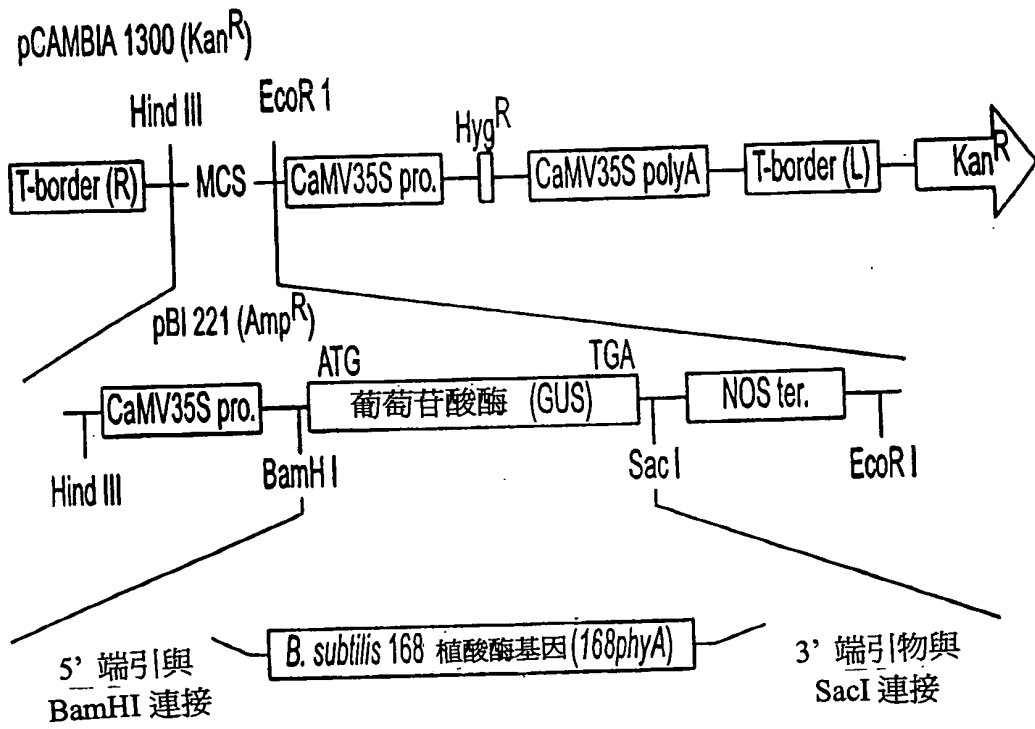


圖 8

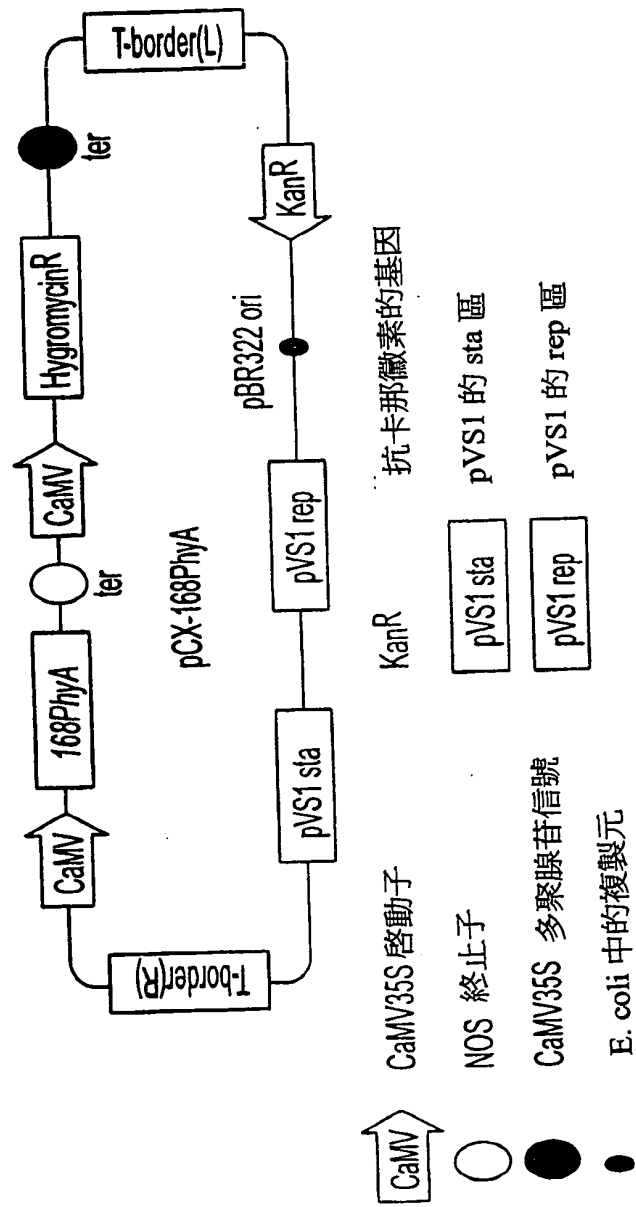


圖 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

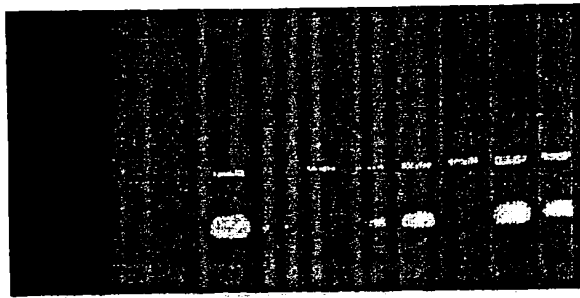


圖 10A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

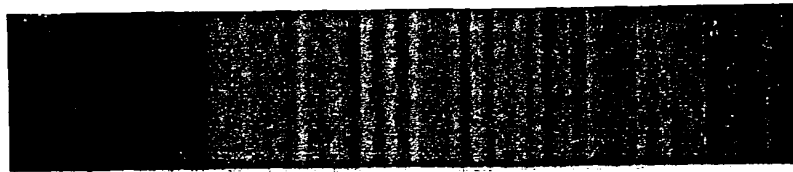


圖 10B

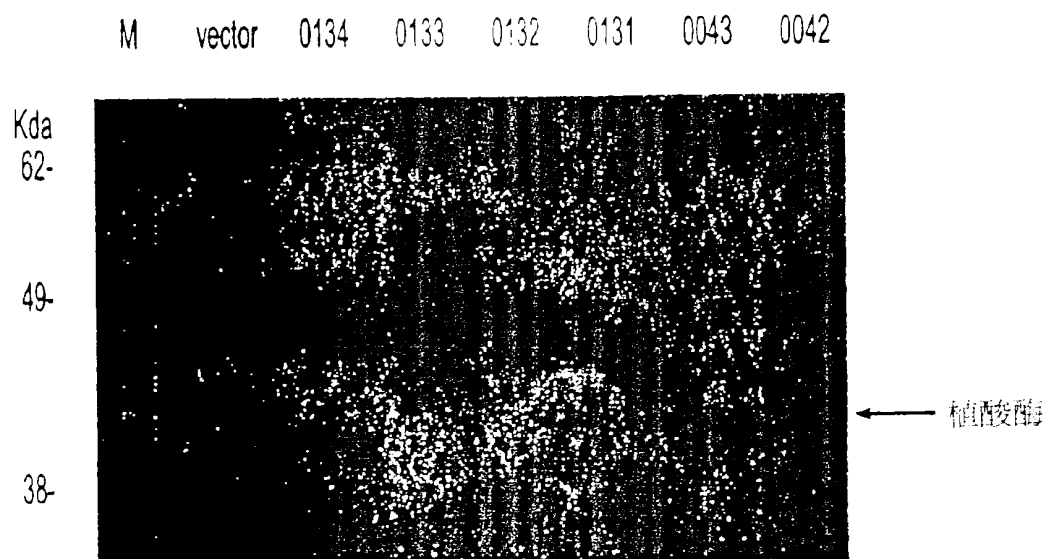


圖 11

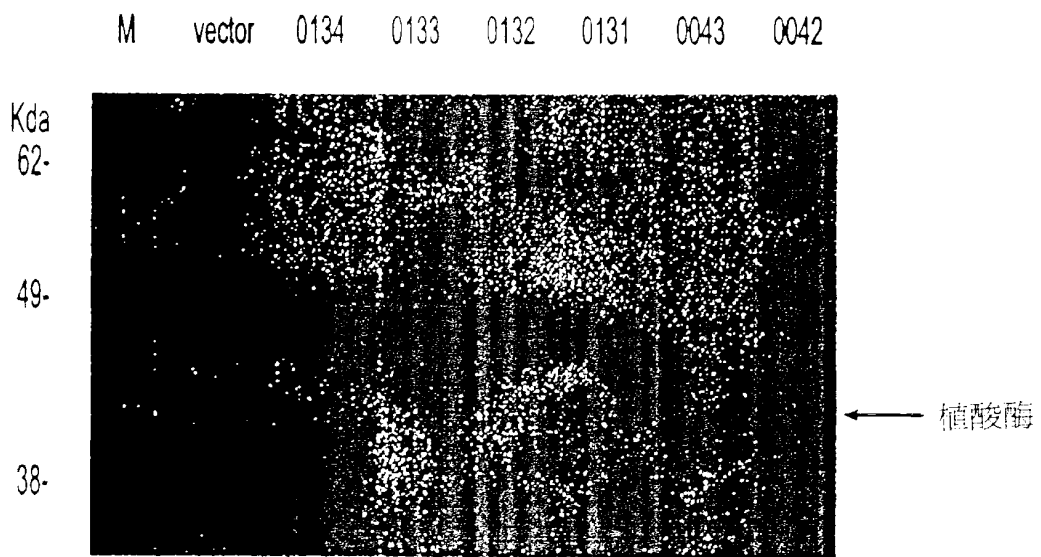


圖 12



載體

圖 13A



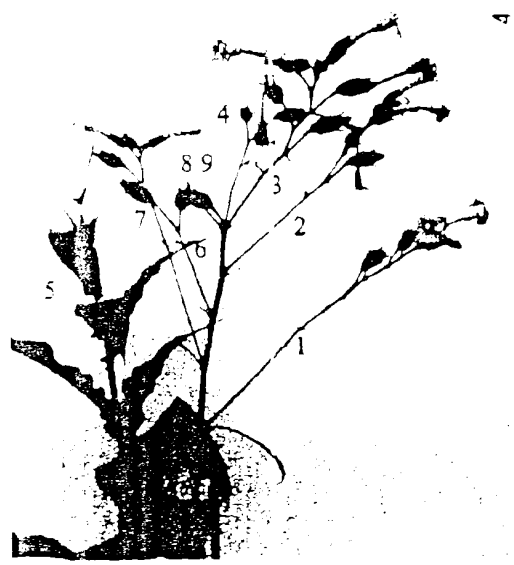
0134

圖 13B



0042

圖 13C



0043

圖 13D



0042

圖 14A



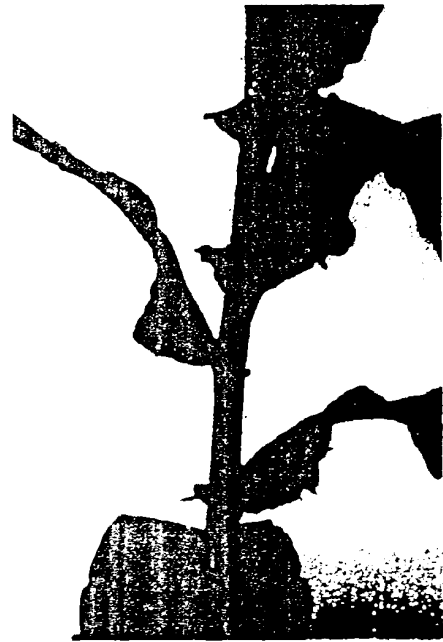
0043

圖 14B



0134

圖 14C



載體

圖 14D

對照 1 42-1 42-2 134-1 對照 2 對照 3 對照 4



圖 15

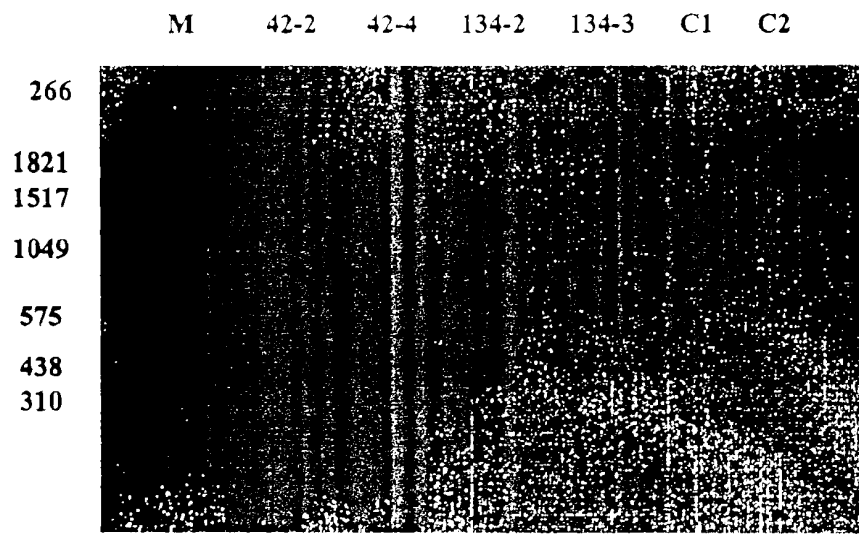


圖 16

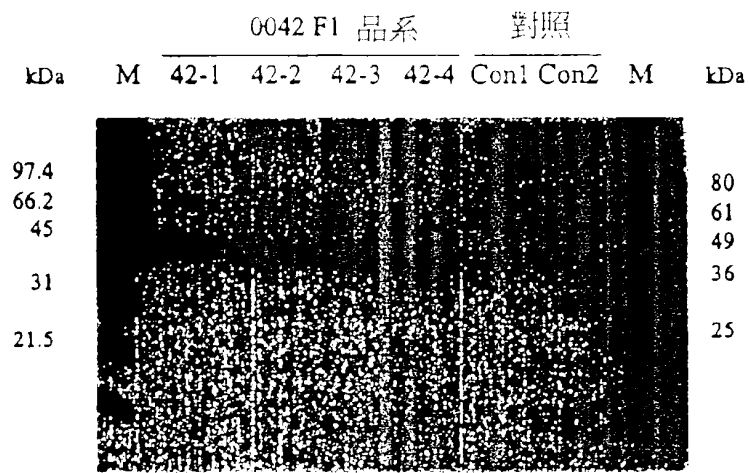


圖 17



圖 18

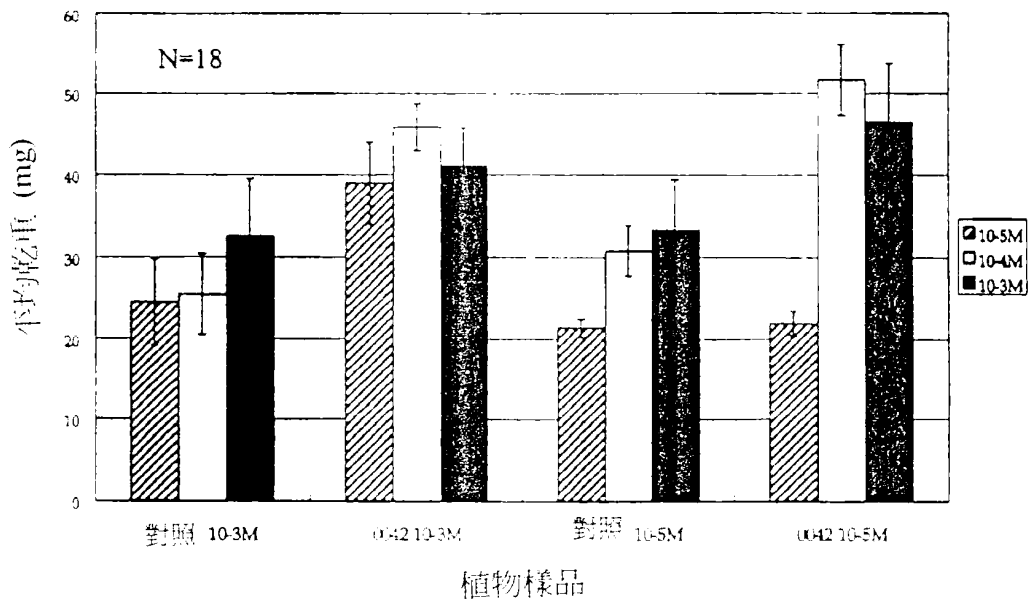


圖 19

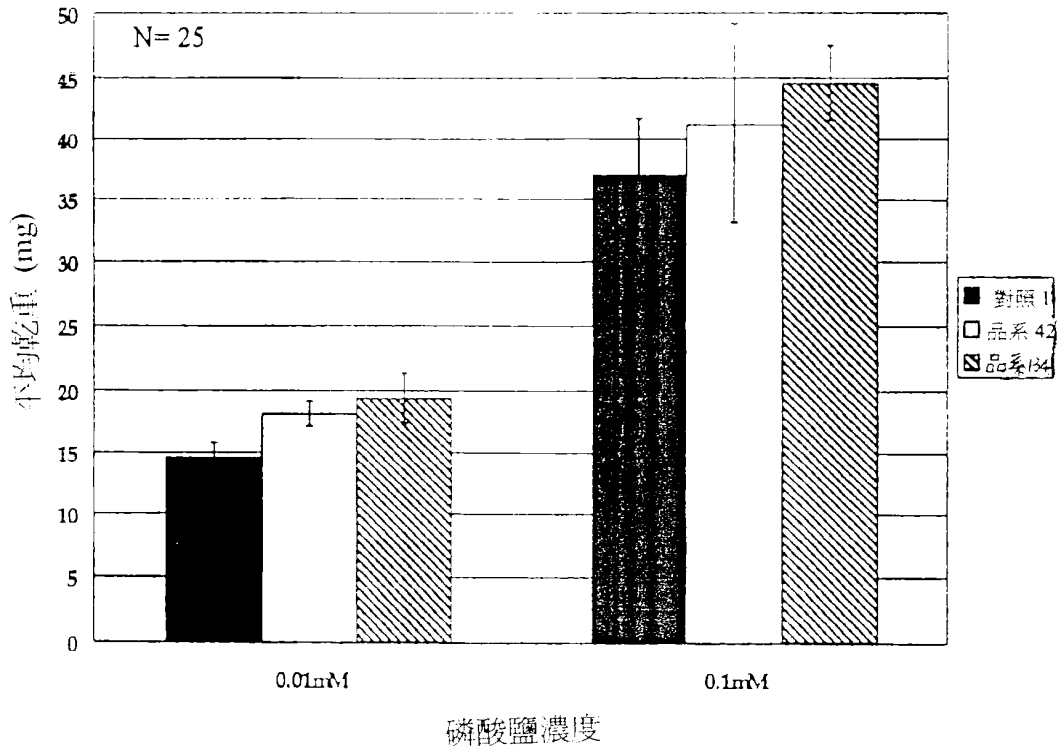


圖 20

植物葉中的植酸酶活性

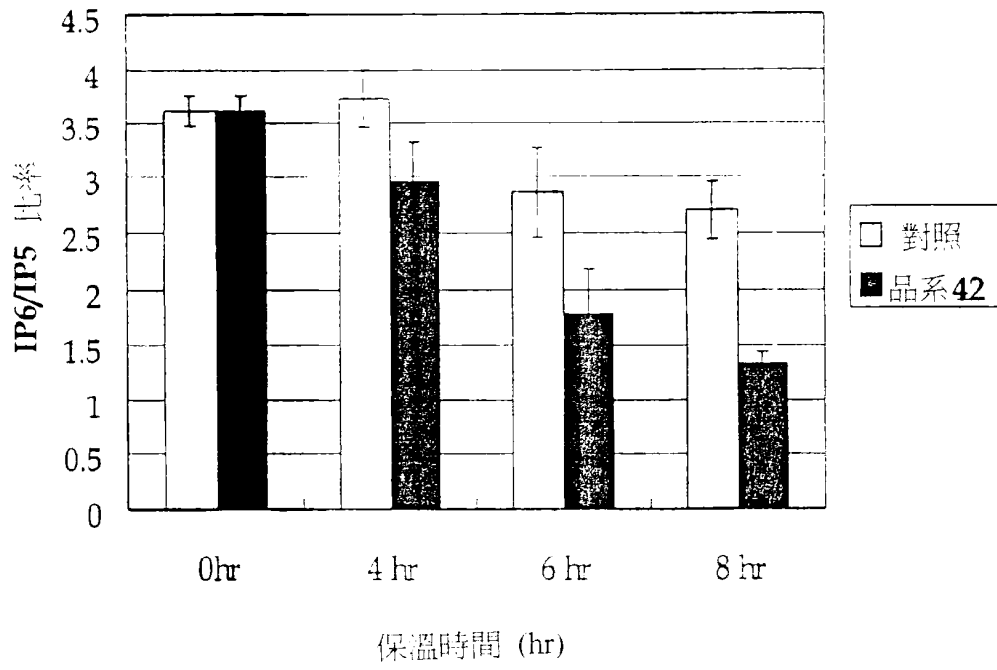


圖 21

陸、(一)、本案指定代表圖為：第 3 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

申請專利範圍

1. 一種嵌合表現匣，其包含(1)能編碼植酸酶的 DNA 分子，其中所述的植酸酶來自於芽孢桿菌株系，以及(2)調控核苷酸序列，其中所述的 DNA 分子係功能性地連接所述之調控序列，且其中所述之調控序列可刺激所述之植酸酶在植物細胞中表達，以及所述之 DNA 分子係選自(a) SEQ ID NO:1 或 NO:3 所示的 DNA 分子；(b)於核苷酸序列能保持相互之間的雜交之高度嚴格的條件下可與 SEQ ID NO:1 或 NO:3 所示的核酸分子雜交之 DNA 分子；以及(c)可編碼出 SEQ ID NO:2 或 NO:4 所示之序列之 DNA 分子。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，其中所述的植酸酶是胞內表現的。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述的嵌合表現匣，其中所述的植酸酶具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所示的胺基酸序列。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述的嵌合表現匣，其中所述的核苷酸序列是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，其中所述的植酸酶除了具有上述 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的胺基酸序列外，亦包含 SEQ ID NO:2 中第 1-80 胺基酸殘基的

全部或 N-末端部分或者 SEQ ID NO:4 中第 1-80 胺基酸殘基的全部或 N-末端部分被植物信號肽所取代的胺基酸序列，以便所述的植酸酶能從植物細胞中分泌出來。

6.如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，所述的植酸酶除了具有上述 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的胺基酸序列外，亦包含 SEQ ID NO:2 中第 1-20 胺基酸殘基的全部或 N-末端部分或者 SEQ ID NO:4 中第 1-26 胺基酸殘基的全部或 N-末端部分被植物信號肽所取代的胺基酸序列，以便所述的植酸酶能從植物細胞中分泌出來。

7.如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，所述的核苷酸序列除了具有上述 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列外，亦包含 SEQ ID NO:1 中的第 241-480 核苷酸的全部或部分，或者 SEQ ID NO:3 中的第 100-339 核苷酸序列的全部或部分被編碼的植物信號序列肽之核苷酸序列所取代者，以便所述的植酸酶能從植物細胞中分泌出來。

8.如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，其中所述的核苷酸序列除了具有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列外，亦包含 SEQ ID NO:1 中的第 241-300 核苷酸的全部或部分或者 SEQ ID NO:3 中的第 100-177 核苷酸序列的全部或部分被編碼的植物信號肽序列之核苷酸序列所取代者，以便所述的植酸酶能從植物細胞中分泌出來。

9.如申請專利範圍第 1 項所述的嵌合表現匣，其中包含有編碼在中性 pH 下具有催化活性的植酸酶的核苷酸序列，其中所述的核苷酸序列在高度嚴格的條件下可以與 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:3 核苷酸序列雜交並可操作地與調控核苷酸序列相連，這種調控核苷酸序列促使該核苷酸序列在植物細胞中的表現，而且該調控核苷酸序列對於該核苷酸序列來說是異源性的。

10.一種表現載體，其中包含如申請專利範圍第 1-9 項中任一項所述的嵌合表現匣。

11.一種轉形後的植物細胞，其中包含有如申請專利範圍第 10 項所述的表現載體，其中所述的植物細胞表達所述植酸酶。

12.如申請專利範圍第 11 項所述的轉形後的植物細胞，該細胞是一種單子葉植物細胞。

13.如申請專利範圍第 12 項所述的轉形後的植物細胞，其中所述的單子葉植物細胞選自玉米、高粱、小麥、棕櫚樹和水稻。

14.如申請專利範圍第 11 項所述的轉形後的植物細胞

胞，該細胞是一種雙子葉植物細胞。

15.如申請專利範圍第14項所述的轉形後的植物細胞，其中所述的雙子葉植物細胞選自大豆、油菜種子、加州希蒙得木(jojoba)、中國白蠟樹、煙草、紅花、花生和向日葵。

16.一種體外培養物，其中含有如申請專利範圍第12項所述的轉形後的植物細胞。

17.一種體外培養物，其中含有如申請專利範圍第14項所述的轉形後的植物細胞。

18.一種從植物細胞的植物植酸鹽中移動無機磷酸以促進植物生長、開花和/或做果的方法，該方法包括在所述的植物細胞中引入核酸分子以產生轉形的植物細胞，該核酸分子包括如申請專利範圍第1-9項中任一項所述的嵌合表現匣，其中轉形後的植物細胞表現了所述植酸酶，該酶從植物的植酸鹽中移動了所述的無機磷酸。

19.如申請專利範圍第18項所述的方法，該方法進一步還包括從轉形的植物細胞製備出完整植株，其中所述的植物包含表現所述的植酸酶的細胞。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述的方法，該方法進一步還包括通過有性或克隆再生所述的完整植株的步驟，此處所述的完整植株的後代中含有表現所述的植酸酶的細胞。

21. 如申請專利範圍第 18 項所述的方法，其中所述的表現匣是通過電穿孔方法引入所述的植物細胞的。

22. 如申請專利範圍第 18 項所述的方法，其中所述的表現匣是通過微粒子散射方法引入所述的植物細胞的。

23. 如申請專利範圍第 18 項所述的方法，其中所述的表現匣是通過顯微注射的方法引入所述的植物細胞的。

24. 一種在易感染土壤農桿菌的單子葉植物中從植物的植酸鹽中移動無機磷酸以促進植物生長、開花和/或做果的方法，該方法包括用包含有如申請專利範圍第 1-9 項中任一項所述的嵌合表現匣的土壤農桿菌感染所述的植物的細胞，其中所述的感染的植物細胞表現了所述的能夠移動無機磷酸鹽的植酸酶。