

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680036777.7

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101473226A

[22] 申请日 2006.8.2
 [21] 申请号 200680036777.7
 [30] 优先权
 [32] 2005.8.2 [33] US [31] 60/704,933
 [86] 国际申请 PCT/US2006/030291 2006.8.2
 [87] 国际公布 WO2007/016680 英 2007.2.8
 [85] 进入国家阶段日期 2008.4.2
 [71] 申请人 密苏里大学管委会
 地址 美国密苏里州
 [72] 发明人 詹姆士·T·英格利希
 弗朗西斯·J·施米特
 加里·斯泰希 方志伟

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有
 限责任公司
 代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 3 页 说明书 40 页 序列表 20 页
附图 8 页

[54] 发明名称

针对豆薯层锈菌和疣顶单胞锈菌的噬菌体展示植物防御肽

[57] 摘要

本发明提供了鉴别与真菌表面有亲和力的肽的方法，同时也是鉴别能够影响真菌发育的肽的方法。还提供了包含使用本发明方法鉴别的肽的组合物。此外，提供了能够表达根据本发明方法鉴别的肽的分离的多核苷酸、载体、表达盒以及转化的细胞。

MRFFSIETAV	LPAASSALAA	PVNTTTEDET	AQIPADAVIG	YSDLEGDFDV
AVLFFSNSTN	NGLLFINTTI	ASIAAKEEGV	SLEKRLAAGT	PALGDDRRRP
WPAFLAALAL	DGKLRFTDSNA	TAAASTDFGN	ITSALPAAVL	YFSTGDLVAL
LSAANSTFGW	PYTIAFRGRG	HSLMGQAFAP	GGVVVNMASL	GDAAPPFRIN
VSADGRYVDA	GGEQWIDVL	RASLARGVAP	RSWNDYLYLT	VGGTLSNAGI
SGQAFRHGPQ	ISNVLEMDVT	TGHGEMVCS	KQLNADLFDA	VLGGLGQFGV
ITRARIIVEFP	APARARWVRF	VYTFDAFSA	DQERLTAPRP	GGGASFGFM
SYVEGSVFVN	QSLATDLANT	GFPTDADVAR	IVALAGERNA	TTVYSIEATL
NYDNATAAAA	AVDQELASVL	GTLASYVEGFA	FQRDVAYAAF	LDRVHGEEVA
LNKLGWVRVP	HPWLNMFVPR	SRIADFDRGV	FKGILQGTDI	VGPLIVYPLN
KSMWDDGMSA	ATPSEDFVYA	VSLLFSSVAP	NDLARLQEQN	RRILRPCDLA
GIQYKTYLAR	HTDRSDWVRH	FGAAKWNRFP	EMKNKYDPKR	LLSPGQDIFN
KLADRFMSMP		T		

1. 鉴别对真菌表面有亲和力的非免疫球蛋白肽的方法，其包括：
 - (a) 通过以下构建肽库，
 - (i) 制备随机寡核苷酸；
 - (ii) 将所述寡核苷酸插入适合的载体，所述载体在它的表面表达由所述随机寡核苷酸编码的肽并能够转染宿主细胞；
 - (iii) 用所述载体转染适合的宿主细胞来扩增感染形式的所述载体以在所述载体表面上产生肽库；
 - (b) 将表达所述肽库的所述载体与靶真菌接触并除去未结合的载体；
 - (c) 从所述真菌洗脱结合的载体；
 - (d) 扩增所述结合的载体；
 - (e) 对包含于所述洗脱的载体中的寡核苷酸测序；
 - (f) 推导被包含于所述洗脱的载体中的所述寡核苷酸编码的肽的氨基酸序列；以及
 - (g) 选择非免疫球蛋白肽。
2. 如权利要求 1 所述的方法，进一步包括重复步骤(b)至(d) 至少一次。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述载体是融合噬菌体载体。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽作为所述载体的外壳蛋白的部分而表达。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述靶真菌包括疫霉菌属 (*Phytophthora*) 的成员。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述靶真菌包括辣椒疫霉菌

(*Phytophthora capsici*).

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述靶真菌包括豆薯层锈菌 (*Phakopsora pachyrhizi*).

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述靶真菌包括疣顶单胞锈菌 (*Uromyces appendiculatus*).

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述靶真菌包括锈病病原体。

10. 重组多核苷酸, 其包含编码植物防御肽的序列, 所述肽选自 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54 及其组合。

11. 如权利要求 10 所述的重组多核苷酸, 进一步编码附于所述植物防御肽的植物多肽以将植物防御肽提呈至靶病原体。

12. 如权利要求 10 所述的重组多核苷酸, 其中所述植物多肽包括 CKX。

13. 权利要求 10 所述的重组多核苷酸转化的细胞。

14. 包含编码肽的核苷酸序列的重组载体, 所述肽选自 SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63 及其组合。

15. 权利要求 14 所述的重组多核苷酸转化的植物。

16. 如权利要求 14 所述的重组多核苷酸, 进一步编码附于所述植物

防御肽的植物多肽以提呈所述植物防御肽至靶病原体。

17. 如权利要求 18 所述的重组多核苷酸，其中所述植物多肽包括 CKX。

18. 基于影响真菌发育的能力来筛选肽的方法，其包括：

- (a) 通过以下构建肽库，
 - (i) 制备随机寡核苷酸；
 - (ii) 将所述寡核苷酸插入适合的载体，所述载体在其表面表达由所述随机寡核苷酸编码的肽并能够转染宿主细胞；
 - (iii) 用所述载体转染适合的宿主细胞而扩增感染形式的所述载体以在所述载体上产生肽库；
- (b) 将表达所述肽库的所述载体与靶真菌接触并除去未结合的载体；
- (c) 从所述真菌洗脱结合的载体；
- (d) 扩增所述结合的载体；
- (e) 分离包含于所述洗脱的载体中的所述寡核苷酸；
- (f) 产生由包含于所述洗脱的载体中的所述寡核苷酸编码的肽；
- (g) 将所述肽与靶真菌接触；以及
- (h) 测定所述肽对所述真菌的影响。

19. 如权利要求 18 所述的方法，进一步包括至少一次地重复步骤(b)至(d)。

针对豆薯层锈菌和疣顶单胞锈菌的噬菌体展示植物防御肽

相关申请

本申请是2001年4月10日递交的美国专利申请号09/829,549的部分继续申请,并要求于2000年4月10日递交的美国临时专利申请号60/195,785的优先权。本申请还要求于2005年8月2日递交的美国临时专利申请第60/704,933号的权益。所有上述申请以参考的方式引入本文。

序列表

本申请附有准确再现本文描述的序列的计算机可读的形式的序列表。

技术背景

本公开涉及使用噬菌体展示技术来鉴别与病原真菌类结合的肽,更具体地,与疫霉菌(*Phytophthora*)属、层锈菌(*Phakapsora*)属和单胞锈菌(*Uromyces*)属的病原真菌类结合的肽。使用简并寡核苷酸构建随机噬菌体展示库。在其表面表达肽的噬菌体与不同生命阶段的真菌相接触,并且分离、扩增结合的噬菌体并鉴别肽。一旦鉴别出,可基于抗真菌活性筛选肽并用于鉴别和表征在真菌上的结合位点。

疫霉菌在美国是经济上重要的致病有机体,其导致很多农事上重要的农作物品种的巨大损失。大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)是美国大豆的第二重要的病原体(Doupnik, *Plant Dis.* 77:1170-1171, 1993)。辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)具有广泛的宿主范围并最显著地限制高价值、茄属的蔬菜作物的生产。控制病原体特别困难,通常需要用杀生化合物处理整个区域。虽然有效,但对这种处理方法的环境成本和经济成本日益增长的关注需要其它替代的控制方法。

疫霉菌类(*Phytophthora*)是适应于在宿主植物不存在的情况下长期存活于土壤中的专性寄生物。卵孢子或厚垣孢子低密度地存在于土

壤中并使病原体能够存活。在易受感染的植物存在下，病原体通过一系列产生感染和疾病周期的、精细调节的发育步骤快速发育。通过游动孢子的释放、成囊、萌芽和感染，由卵孢子或厚垣孢子开始的病原体发育最初看起来显得直接了当。但生命阶段的进程是受环境信号的精细调节的，尤其是那些来自于宿主植物的信号。

游动孢子是扩散至根部感染部位最重要的生命阶段。主要易感部位位于根部的顶端分生组织，细胞在此处伸长。从伸长的细胞释放出的流出物作为引导游动孢子向该部位趋化性移动的信号(Carlile, in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (疫霉菌: 其生物学、分类学、生态学和病理学), Erwin et al., eds., APS Press, 1983; Deacon and Donaldson, *Mycol Res.* 97:1153-1171, 1993)。游动孢子的趋化性反应随根部流出物的组成变化并且是种特异性的。例如，辣椒疫霉菌、恶疫霉菌(*P. cactorum*)和其它种的游动孢子被吸引到糖和氨基酸的阵列中(Hickman, *Phytopathology*, 60:1128- 1135, 1970; Khew and Zentmyer, *Phytopathology*, 63:1511-1517, 1973)，但大豆疫霉菌的游动孢子被吸引到特定异黄酮化合物中(Norris et al., *Plant Physiol*, 117:1171-1178, 1998)。虽然化学吸引的确切机理是未知的，但是，Deacon 和 Donaldson (*Mycol. Res.*, 97:1153-1171, 1993)以及 Carlile (in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983)概括了试验，表明了游动孢子表面的化学受体的参与。

游动孢子在响应环境信号而接近根部表面时是被包在囊内的。棕榈疫霉菌(*P. palmivora*)和其它疫霉菌类的游动孢子的包囊形成，例如，可能受局部钙离子浓度的影响(Griffith et al., *Arch. Microbiol*, 149:565-571, 1988; Warburton and Deacon, *Fungal Genetics Biol*, 25:54-62, 1998)。包囊形成还可被高浓度的化学引诱剂或被根细胞壁成分引起。例如，大豆疫霉菌的游动孢子在高浓度的大豆异黄酮化合物存在下被包在囊内(Morris and Ward, *Physiol Mol Plant Pathol*, 40:17-22, 1992)。与此对比，瓜果腐霉菌(*Pythium aphanidermatum*)游动孢子在与水芹根部细胞表面的岩藻糖基和半乳糖基残基接触时被包在囊内

(Longman and Callow, *Physiol. Mol Plant Pathol*, 30:139-150, 1987; Estrada-Garcia et al., *J. Exp. Bot.* 41 :693-699, 1990)。Deacon 和 Donaldson (*Mycol Res.*, 97:1153-1171, 1993)指出, 在高浓度引诱剂存在下的包囊形成对侵染力是有害的, 并因此随时间的推移而不被选择。然而, 他们建议, 可充分浓缩根部表面的引诱物以在接触根部表面残基后使游动孢子倾向于形成包囊。

当与根部接触时, 游动孢子以特定方向形成包囊, 所以, 朝着根部方向形成了芽管。如果游动孢子在与根部接触前形成包囊, 芽管会在任何方向上形成, 而为了定位根部并感染该植物必须重新定向。在芽管上的细胞表面的受体被认为与此根部定向过程有关。例如, Morris 等人(*Plant Physiol.*, 117:1171-1178, 1998)说明了大豆疫霉菌幼体生长对源自大豆疫霉菌的异黄酮化合物的低浓度、无毒的定向响应。Zentmyer (*Science*, 133:1595-1596, 1961)报导了樟疫霉菌(*P. cinnamomi*)朝着宿主根部方向的菌丝定向, 但对引诱化合物的特性没有说明。

感染后, 菌丝穿过植物组织在细胞间和/或细胞内生长, 其取决于病原体的种类(Stossel et al., *Can. J. Bot.*, 58:2594-2601, 1980; Coffey and Wilson, in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983; Enkerli et al., *Can. J. Bot.*, 75:1493-1508, 1997; Hardham and Mitchell, *Fungal Gen. Biol.*, 24:252-284, 1998; Murdoch and Hardham, *Protoplasma*, 201:180-193, 1998)。通过某些疫霉菌类, 包括致病疫霉(Coffey and Wilson, in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983)、辣椒疫霉菌 (Jones et al., *Phytopathology*, 64:1084-1090, 1974)和大豆疫霉菌 (Stossel et al., *Can. J. Bot.*, 58:2594-2601, 1980), 形成吸器。菌丝和吸器都与宿主细胞壁和细胞膜形成紧密的接触。虽然缺乏直接的证据, 但据推测, 细胞表面的受体对于感知植物信号很重要。细胞表面受体的间接证据来自于观察到诸如于吸器末梢部分出现的泡囊(Coffey and Wilson, in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983)。Heath (*Can. J. Bot.*, 73(Suppl.):S131-S139, 1995)论述了真菌菌丝

末端生长的可能事件，包括通过离子通道和泡囊功能与周围环境的通讯。

如上所述，证据指向了细胞表面受体对触发疫霉的行为和发育步骤的突出物。因此，细胞表面受体可提供破坏病原体发育以及由此的感染性的方法。由于游动孢子仅有有限的时间来定位、接触和穿入随生长的根部末端有效移动的感染部位，因此发育的延迟或破坏会具有很大影响。此时间限制来源于根部组织易感染性的改变，因为，当在伸长区域的成熟组织时，其变得明显不易受感染影响(English and Mitchell, *Phytopathology*, 78:1478-1483, 1988)。

“融合噬菌体”是丝状的细菌噬菌体载体，其中，外来肽和蛋白被克隆到噬菌体外壳基因中并作为部分噬菌体外壳蛋白而被展现。常用的产生融合噬菌体的外壳基因为 pVIII 基因和 pIII 基因。约 3900 拷贝的 pVIII 组成管状病毒体蛋白质外壳的主要部分。各 pVIII 外壳蛋白与病毒体长轴成低角度，其 C-端埋在靠近 DNA 的内部而其 N-端暴露于外部环境。pIII 外壳蛋白的 5 个拷贝位于每一病毒体的末端并且参与将噬菌体附到大肠杆菌的 pIII 上以及在感染和复制之后对病毒的重新组装。作为部分 pVIII 展示的肽被限制于其在病毒体外壳上展示的基质中。相反，由于 pIII-蛋白的末端位置，作为部分 pIII 展示的肽更具有柔韧性。特定噬菌体可构建为展示为 6 至 15 个氨基酸长度的肽。将随机的或简并寡核苷酸插入外壳蛋白基因使之能够产生展示随机肽库的噬菌体。典型的展示库包含多如 10^8 个随机序列肽的 10 至 100 个拷贝。因此，噬菌体展示对筛选具有所需结合特征的稀有肽是有帮助的。

噬菌体展示的随机肽库已用于分离哺乳动物细胞上的细胞表面受体的配体。例如，已从噬菌体展示库将肽分离出来，该噬菌体展示库与跨膜整合素糖蛋白结合并涉及细胞-细胞外基质和细胞-细胞相互作用(O'Neil et al, *Proteins*, 14:509-515, 1992; Smith et al., *J Biol Chem.*, 269:32788- 32795, 1994; Healy et al., *Biochemistry*, 34:3948-3955, 1995)。噬菌体展示的肽特异地阻断细胞与定义的细胞外分子及其它细胞的粘附(Koivunen et al., *J Biol Chem.*, 268:20205-20210, 1993;

Koivunen et al., *J Cell Biol*, 124:373-380, 1994; Healy et al., *Biochemistry*, 34:3948-3955, 1995; Pasqualini et al., *Nature Biotech.*, 15: 542-547, 1997)。噬菌体展示的随机肽库也已被用于选择区分脑组织和肾组织的肽(Pasqualini and Ruoslahti, *Nature*, 380:364-366, 1996)。在体内, 噬菌体展示的随机肽的亲和力选择性也已被用于选择与特异肿瘤组织的血管内皮细胞选择性结合的肽(Pasqualini et al., *Nature Biotech.*, 15: 542-547, 1997)。当这些肽与抗癌药融合并被注射到荷瘤小鼠时, 这些肽成功地将药物靶向肿瘤血管并阻止进展期的肿瘤发育 (Arap et al., *Science*, 279:377-380, 1998)。

噬菌体展示方法仅在有限的情况下应用于植物病原体。噬菌体展示方法几乎已专用于鉴别植物病毒诊断的抗体(Susi et al., *Phytopathology*, 88:230-233, 1998; Ziegler et al., *Phytopathology*, 88:1302-1305, 1998; Griep et al., *J Plant Pathol.*, 105:147-156 1999; Toth et al., *Phytopathology*, 89:1015-1021, 1999)。噬菌体展示用于选择在病疫霉(*Phytophthora infestans*)的幼体和孢子上与表面暴露的抗原表位有亲合性的抗体的单一情况(Gough et al., *J. Immunol. Methods*, 228:97-108, 1999)。对分离的噬菌体展示的、单链可变区片段(Fv)的抗体片段未进行评价, 因为其可能影响孢子或幼体行为。对抗体对于孢子囊的抗真菌活性进行测试, 但是没有发现其可检测到的抗真菌活性。

豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*)是产生大豆(槽豆, *Glycines max*)锈病的真菌。该病原体已从亚洲传播到世界上所有其它大豆生产区域。在2004年秋季期间, 豆薯层锈菌到达美国。目前, 在任何大豆品种中都没有已知的持久抗性。疣顶单胞锈菌(*Uromyces appendiculatus*)是在豆类(菜豆, *Pheaseolus vulgaris*)上产生锈病的真菌。育种家正努力识别大豆中可控制为锈病抗性的基因。由于在巴西已报导出现了豆薯层锈菌, 产生大豆锈病的真菌, 美国大豆生产者已预料到它的到来。在去年秋天到达美国的豆薯层锈菌终结了这种预料, 并且, 目前农场主必须对这种新疾病可能每年出现的情况作出反应。农场主的担心是基于在没有成功实施控制措施时, 世界上其它区域

10%至 80%的损失报导。

因为在测试了超过 18,000 个美国大豆品种后还没有发现对锈病持久的、天然的抗性，大豆生产者已经在担心了，并且，病原体，豆薯层锈菌，可能潜在地感染产出的任何栽培种。在对锈病病原体到来的预期中，已进行了大量的研究以确定有效的杀真菌剂，并且已获得了用于大豆的紧急政府许可。传统的筛选和育种方法已被确定对上述病原体没有主要的抗性基因，并且尤其是疣顶单胞锈菌（*U. appendiculatus*）和豆薯层锈菌的情况。

抗真菌剂将可能是多年的防卫前线，直到新的抗性基因或其它形式的抗性被确定之前。

传统上，抗真菌剂还没有用在大部分的大豆生产。因此，关于此疾病管理实践的成本及其可能的经济活力只有有限的信息。在密苏里州及其它州，这些问题已导致对于可将大豆替换为备选农作物的面积不确定的估计。

为了保护大豆农场主以及保证产品满足国家的需要，必须尽快开发出替代的抗真菌剂。本公开提出了基于生物技术的新型锈病抗性。该技术包括转基因植物中防御肽的开发和部署，例如大豆。该技术同样影响了重要领域豆类(菜豆)锈病病原体，疣顶单胞锈菌。

作为诱导锈病的真菌，疣顶单胞锈菌和豆薯层锈菌属于担子菌（Basidiomycetes）纲中的锈菌(Uredinales)目。疣顶单胞锈菌在单一宿主植物上产生 5 个孢子阶段。豆薯层锈菌主要通过单一宿主植物上的夏孢子(uredospores)而复制。夏孢子负责快速传播真菌。除了大豆，豆薯层锈菌可感染许多豆类。

疣顶单胞锈菌的夏孢子通过叶子的气孔口穿透。豆薯层锈菌的不同之处在于发芽的夏孢子直接通过叶子表皮细胞层穿透。通常，落在叶子表面的夏孢子发芽以产生附着在表面的感染垫(附着胞)。在这两种类型中，附着胞都产生穿透植物的菌丝突。穿入后，各真菌发育成通过叶组织在细胞间生长的线状结构(菌丝)。菌丝在不杀死宿主细胞的情况下进入宿主细胞。在那里，它们形成球形结构(吸器)，从活着的叶细胞中吸取营养。感染后不久，各真菌形成产生额外孢子的夏孢

子堆。

组合的噬菌体展示库提供大量的随机肽阵列，并由其选择针对感兴趣的蛋白质的配体(O'Neil et al., 1992)。噬菌体展示肽库是丝状噬菌体克隆的混合物，其每一个在病毒体表面上展示单一外来肽序列(Cwirla, 1990; Scott and Smith, 1990)。展示的肽与该噬菌体基因组中的其编码 DNA 物理连接。因此，肽可容易地且快速地被鉴别并被转移至其它载体系统或展示系统。典型的库包含 10^9 种随机肽变体。

随机肽库可用于分离对于哺乳动物细胞的细胞表面分子重要的配体。例如，通过针对纯化的分子进行生物淘洗，与跨膜糖蛋白，整合素，有亲和力的肽已被从库中分离出(O'Neil et al., 1992; Smith et al., 1994; Healy et al., 1995)。有些肽被发现阻断细胞与定义的细胞外分子及其它细胞的粘附。肽的结合与抑制的有效性对肽序列基序是特异的(Koivunen et al., 1993; Koivunen et al., 1994; Healy et al., 1995; Pasqualini et al., 1995)，并且选择的有效性对特定器官组织是特异的(Pasqualini and Ruoslahti, 1996)。

因此，需要筛选与植物病原体特异结合的肽的快速且有效的方法。一旦鉴别出，肽可进一步被评价其预防病原体感染植物的能力，并且，合适的肽可直接用于植物、用于处理土壤，或者，任选地，可将编码肽的序列引入植物中以使植物对病原体具有免疫性或抗性。在此情况下，可开发出控制植物病原体的经济的并且对环境安全有效的方法。

发明概述

本发明克服了上述问题并通过对植物中的病原体提供抗性发展了本领域技术。一方面，使大豆对目前没有持久抗性的大豆锈病有抗性。在另一实例中，相同的常用技术可提供对常见锈病有抗性的菜豆。

在一实例中，鉴别对植物病原体的表面具有亲和力的肽的方法。在此方法中，通过提供编码肽的简并寡核苷酸构建了包含随机肽的库。将该寡核苷酸插入到合适的载体中，所述载体在其表面表达编码的肽并能够转染宿主细胞。宿主细胞用载体转染而扩增感染形式的载体以在载体上产生肽库。然后将表达肽库的载体与靶病原体接触并使其与

病原体结合。除去未结合的载体并洗脱与病原体结合的载体。然后将洗脱的载体在合适的宿主细胞中扩增并分离插入的寡核苷酸。然后通过任何合适的方法对该寡核苷酸测序，并且，从该寡核苷酸序列推导出该肽的氨基酸序列。

本公开的手段的一方面涉及作为新型的大豆及豆类抗性因子的肽及其选择的方法。在无需知道病原体中特定致病性目标的情况下，肽可被方便地鉴别和选择。由于事实上这些肽不是必须存在于天然大豆或豆类中，病原体之前没有暴露其中。因此，用于大豆和豆类的肽的有效性可扩展至各种病原体种群，且其效力很可能是耐久的。

噬菌体展示肽选择的传统方法是基于针对特异感兴趣的纯化分子的库的淘洗，如 Barbas et al., 2001 所述的实例。本方法学与先前技术的不同之处在于针对全细胞的库筛选无需预先知道特定靶标或高浓度的纯化靶分子。

在所述的一个方面中，当作为脚手架蛋白的一部分展示时，称为肽的小分子可在转化的植物中提供锈病抗性。在一实例中，可根据在此公开的手段，通过对疣顶单胞锈菌和豆薯层锈菌的幼体(即发芽的孢子)的传染性结构的结合亲和力来选择这些肽。此结合亲和力可抑制孢子的进一步发育和致病。因此，肽表现为抑制这些真菌的致病。在具体的实例中，细胞分裂素氧化酶可被修饰作为展示植物中所选肽的脚手架蛋白。

经过一段时间，病原体种群能够适应所选的赋予抗性的肽的存在。然而，如果肽的选择和筛选很方便，可快速选择新的防御肽以应对改变病原体种群的挑战。本公开手段的具体优势包括肽选择方法和表型评价的快速和简单，肽的选择无须知道病原体中的致病性靶标，有效肽的高百分率的回收，快速鉴别所需新防御肽的能力，将脚手架肽用于易感植物组织的能力以及快速修饰所需脚手架肽构建体的能力。

另一方面提供了抗真菌组合物，该组合物包含至少一种肽，其选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:

24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33)以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4)。

另一方面是重组核苷酸，其包含编码肽的序列，所述肽选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO: 24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33)以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4)。

另一方面是重组载体，其包含编码肽的核苷酸序列，所述肽选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO: 24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33)以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4)。

还有一方面是用载体转化的细胞，所述载体包含编码肽的核苷酸序列，所述肽选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO: 24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33)以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4)。

在另一方面提供了表达盒，其包含作为可操作地连接的组分，启动子；编码肽的核苷酸序列，所述肽选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO: 24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33)以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4)；以及转录终止信号序列。

另外的方面提供包含表达盒的重组体植物，该表达盒包含启动子；编码肽的核苷酸序列，所述肽选自 ADPPRTVST (SEQ ID NO: 7)、

ADRPSMSPT (SEQ ID NO: 8)、ADITDPMGA (SEQ ID NO: 20)、AVGTHTPDS (SEQ ID NO: 21)、AVSPNVHDG (SEQ ID NO: 22)、LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO: 24)、EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO: 31)、LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO: 33) 以及 AAPDLQDAM (SEQ ID NO: 4); 以及转录终止信号序列。

另一方面提供了对植物病原体表面具有亲和力的肽的表征方法, 该方法包括: 提供随机肽库, 该肽库通过提供编码肽的简并寡核苷酸而制成的; 将寡核苷酸插入到合适的载体中, 所述载体在其表面表达所述肽并转染使宿主细胞; 以及用载体转染合适的宿主细胞而扩增感染形式的载体以在载体上产生肽库。

然后将表达肽库的载体与感兴趣的植物病原体接触并使其与该病原体结合。结合后, 除去未结合的载体并将结合的载体从该病原体洗脱。将洗脱的载体在合适的宿主细胞中扩增并分离在洗脱的载体中插入的所述寡核苷酸。然后, 由该寡核苷酸编码的肽被制备出, 与感兴趣的植物病原体接触, 并被观察对传染性的影响。在一实施方案中, 对该分离的寡核苷酸测序, 从所述核苷酸序列推导出所述肽的氨基酸序列, 并且所述肽通过化学合成制备。在另一实施方案中, 通过将分离的寡核苷酸插入用于转化合适宿主细胞的表达载体而制备肽。然后将转化的宿主细胞保持在适于肽的表达的条件下。

为了回收与不确定的表面蛋白的种群相结合的肽, 还针对全细胞筛选了组合库。可对感兴趣的表型评价通过这种筛选回收的肽。例如, 我们选择了与霉菌植物病原体(疫霉)的能动的游动孢子有亲和力的肽。表型筛选产生了通过诱导未成熟的包囊来破坏孢子正常发育的肽的子集(Bishop-Hurley et al., 2002)。我们还表明了, 当展示为噬菌体展示形式或当作为自由分子而合成时, 亲和力选择的肽破坏游动孢子发育(Laskey et al., 2001; Bishop-Hurley et al., 2002)。

附图简要说明

这些以及其它特征、方面和优势通过以下说明、所附的权利要求及附图将变得更容易理解。其中:

图 1 显示分为 6 个家族的 f8 肽序列的组成。左边为树状图，右边为肽的名称和序列。

图 2 显示辣椒疫霉菌游动孢子响应与给定不同浓度的所述 f8 噬菌体展示肽接触的成囊作用。百分比值表示两个试验的平均值。不包含噬菌体的对照游动孢子种群的成囊百分比在 0 至 10% 之间变化。

图 3 显示辣椒疫霉菌游动孢子响应与给定不同浓度的所述 f8 及 f88-4 噬菌体展示肽接触的成囊作用。

图 4 显示所述噬菌体展示肽与辣椒疫霉菌游动孢子的结合。数值表示 3 个试验的平均值。

图 5 显示所述噬菌体展示肽与辣椒疫霉菌结合的特异性。数值表示 3 个试验的平均值。

图 6 是质粒 pJE-7 的图谱。AOX-P 是乙醇氧化酶启动子，Mat- α 是 mat- α 的分泌序列，CKX1 是细胞分裂素氧化酶 1 序列，Pc87 是示例的肽，以及 AOX-TT 是乙醇氧化酶终止序列。图下面是为编码 Pc87 的、显示(+)链(5' AG CTA GCA GAT AGA CCA TCA ATG TCA CCA ACA TAG T 3', SEQ ID NO: 46)和(-)链(5' CT AGA CTA TGT TGG TGA CAT TGA TGG TCT ATC TGC T 3', SEQ ID NO: 47)的双链序列。

图 7 显示包含于 pJE-7 中的示例插入物的氨基酸序列(SEQ ID NO: 48)，其中，加下划线的核苷酸是 mat- α 分泌序列(由 Kex2 酶的断裂出现在最后加下划线的精氨酸)，接着是细胞分裂素氧化酶 1 序列。将两个加双下划线的氨基酸(KL)加入以辅助构建融合蛋白质。示例的肽 Pc87 的氨基酸序列用黑体字显示。

图 8 是显示鉴别植物防御肽的一种方法的方法流程图，所述肽可用于转化植物以及对锈病病原体赋予抗性。

图 9 显示转化的根部顶端区域附近的游动孢子的成囊作用(左)和在野生型根尖附近的正常游动孢子的成囊作用模式(右)，该转化的根部分泌展示亲和力选择的肽的细胞分裂素氧化酶(CKX)。

图 10 显示亲和力选择的噬菌体肽克隆 19 对疣顶单胞锈菌幼体生长的抑制作用(左)，以及在非选择的噬菌体库存在下正常的夏孢子发芽和生长(右)。

定义

“分泌序列”是指指引新合成的分泌蛋白或膜蛋白至并且经过内质网的细胞膜、或经细菌内膜从细胞质至周质、或从线粒体基质至内部空间、或从叶绿体子座至类囊体的序列。此序列融合至异源宿主中表达的基因保证了重组体蛋白质从宿主细胞的分泌。

“幼体”是指具有自然发生的芽管的新发芽的包囊(发芽后 5-8 小时)

“TBS”是指 Tris 缓冲盐水(50 mM Tris-HCl (三羟甲基氨基甲烷盐酸盐), pH 7.5, 150 mM NaCl)。

“重组多核苷酸”是指多核苷酸, 其不含一个或全部两个将天然发生的有机体基因组中多核苷酸侧翼连接的核苷酸序列, 所述多核苷酸是衍生自所述有机体基因组。此术语包括, 例如, 并入载体或表达盒、自主复制的质粒或病毒、原核生物或真核生物的基因组的 DNA 的多核苷酸及其片段, 或作为独立于其它多核苷酸的单个分子存在的多核苷酸及其片段。其还包括作为杂交多核苷酸的一部分的重组多核苷酸, 例如, 编码多肽序列的重组多核苷酸。

“IPTG”是异丙基硫代半乳糖苷。

“TU”是指转导单位。

“NAP 缓冲液”是 80 mM NaCl、50 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 并用 NH_4OH 调节 pH 为 7.0。

“NZY-Tc”是包含 1% NZ 胺 A(tryptone 型培养液; Humko-Sheffield Chemical, Norwich, N. Y.)、0.5% 酵母提取物、0.5% NaCl、用 NaOH 调节 pH 为 7.0 的细菌生长培养液。

“PCR”是指聚合酶链式反应。

此处用到的“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用并且指的是任意长度的核苷酸, 核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸, 聚合的(2 个或多个单体)形式。虽然核苷酸通常通过磷酸二酯键结合, 所述术语也包括含有由氨基乙基甘氨酸单元组成的中性酰胺骨架键的多聚核苷酸。所述术语仅指分子的一级结构。因此, 该术语包括双链和单链的 DNA 和 RNA。

其还包括已知类型的修饰,例如,标记,甲基化,“帽子”,用类似物取代一个或多个天然发生的核苷酸,核苷酸间修饰,例如,具有不带电荷的键的修饰(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酰胺酯、氨基甲酸酯等),包含悬挂部分的修饰,如蛋白质(包括,例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等),具有嵌入剂的修饰(例如吡啶、补骨脂素等),含有螯合剂的修饰(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等),含有烷化剂的修饰,具有修饰键的修饰(例如, α 异头核酸等),以及多核苷酸未修饰的形式。多核苷酸既包括有义链又包括反义链。

“序列”是指单体在聚合物中出现的线性次序,例如,氨基酸在多肽中的次序或核苷酸在多核苷酸中的次序。

“肽”、“蛋白质”和“多肽”可互换使用并且是指由两个或多个通过肽键方式连接的氨基酸组成化合物。

“重组体蛋白质”是指,不管包含天然的还是变异的一级氨基酸序列,通过表达细胞中重组体 DNA 分子携带的基因而获得的蛋白质,该细胞不同于基因和/或蛋白质被天然发现的细胞。换句话说,所述基因与其表达的宿主是异源的。应理解,基因的任何改变,包括添加编码亲和力纯化片段的多核苷酸,基于此定义的目的使该基因成为非天然,因此,该基因不能在任何细胞中“天然地”发现。

“非免疫球蛋白肽”是指不是免疫球蛋白的肽、公认的免疫球蛋白区域、或包含免疫球蛋白的区域。例如,免疫球蛋白的单链可变区被排除在此定义之外。

“基本纯的”或“基本纯化的”是指物质不含其它污染的蛋白质、核酸及其它源自有机体来源的生物材料。纯度可通过标准方法测定,并且常见为至少约 40%纯、更常见为至少约 50%纯、通常为至少约 60%纯、更通常为至少约 70%纯、经常为至少约 75%纯、更经常为至少约 80%纯、典型地为至少约 85%纯,更典型地为至少约 90%纯、优选为至少约 95%纯、更优选为约 98%纯,且在还更优选的实施方案中为至少 99%纯。分析可为重量或摩尔百分比,通过例如凝胶染色法、分光光度法或末端标记法等评价。

发明详述

以下提供了详细的描述以帮助本领域技术人员实践本发明方法。虽然如此，此详细描述不应理解为过度限制本发明，因为在不偏离本发明性的发现的精神和范畴的情况下，本领域普通技术人员可在此讨论的实施方案中做出修改和改变。

所有在本申请中引用的刊物、专利、专利申请、数据库和其它参考都在此以参考的方式全部引入，如同各单独的刊物、专利、专利申请、数据库和其它参考被特定地且单独地表示为通过参考而引入。

大豆生产者越来越多的关注豆薯层锈菌，大豆锈病的起因，在不久的将来将进入北美的生产区域并传播。此关注起因于在世界上某些区域超过50%的农作物损失的估计。对于此病的关注随着最近在北纬5度以上的巴西发现的锈病真菌而增多。很可能在不久的将来，豆薯层锈菌的孢子将通过盛行的北风被带入美国(Rizvi, 2004)。因为没有已知的对锈病有效的疾病抗性基因，目前的疾病管理计划依赖重复的保护杀菌剂的应用。以下的本公开提供了另外的选择，使用新的肽技术鉴别和递送与豆薯层锈菌和相关锈病病原体的传染性结构结合的防御肽以停止锈病发展。防御肽可设计为在植物中表达并被递送至病原体感染和群集的部位。植物体，例如大豆和蚕豆，可被设计为表达这些肽以产生对锈病具有独特抗性的植株系。

因此，开发的方案鉴别与传染性的豆薯层锈菌孢子和幼体结合的肽，评价结合的肽抑制孢子发芽和真菌生长的有效性，引入并测试植物中候选防御肽的抗性潜力。

锈病病原体产生孢子(夏孢子)，感染大豆的叶、茎和籽皮。这些孢子被风吹动并落在植物上，它们在该植物上发芽以产生穿透植物组织的芽管(定义为幼体阶段)。穿透之后，真菌通过产生经组织在细胞间和细胞内蔓延的丝状生长而进一步发育(Bonde 等, 1976; Koch 和 Hoppe, 1988)。经过一段时间，组织群集导致另外传染性孢子的产生，这些孢子在风中释放并移动到其它植物。

虽然假想了一些对大豆锈病的抗性基因，但大部分已经在野外条件下或温室接种试验中失败了。一旦病原体到达新的地理区域，培育

者面临事实上在市售大豆品种或育成品系中没有可用的完全的锈病抗性的情况。对于可预知的未来，培育者将需要在每个生长季节期间周期性地施用杀菌剂。

使用常规技术在大豆或其近亲植物中发现新的抗性基因并将这种基因结合至市售大豆品系中预期需要很多年。以下的公开有利地加快了这个过程。其可能性是从目前的肽技术、植物转化技术和分子生物学的发展得到的，将这些技术组合用于本文公开的发展。组合的肽技术能够对大量的、多种多样的肽集合筛选出与植物病原体的传染性结构结合并在植物感染前或感染期间破坏其发育的肽。分子生物学和植物转化的工具能够构建在植物的感染部位表达这些防御肽的递送系统。

防御肽可定义为与植物和动物病原体的传染性结构，例如孢子，相结合来破坏该病原体正常发育的肽。结合并破坏或阻止病原体功能的肽是通过结合对调节发育很重要的病原体表面蛋白而得到此效果的。选作此用途的表面蛋白可以是，例如，细胞壁形成和植物生长所需的酶，或可能地，控制对生长必不可少的矿物的摄取的蛋白质。在此公开的方法，示例性地说明，可有效筛选针对包含十亿或更多随机肽组合的多种肽集合的病原体。所述技术特别应用于击败豆薯层锈菌及相关病原体。

通过以下实例的方式将表明如何鉴别与传染性豆薯层锈菌孢子和幼体以及相关的或类似的病原体的孢子相结合的肽。产生肽的集合并确认与病原体的传染性孢子或芽管(幼体)相结合。为了鉴别结合的肽，将孢子或幼体与随机肽的集合，通常称为库，相混合，该随机肽在细菌噬菌体(病毒)颗粒上展示，例如，如 Wilson 等, 1998 所述。通过此方法，示例性说明，孢子和幼体可暴露于十亿随机肽中。广泛的很多种适合的肽库是本领域公知的。在某些库中，肽仅包含 8 个氨基酸，而在其它库中，每个肽包含 15 个氨基酸。

在混合与适当培养的暴露之后，洗涤可除去所有与孢子和幼体粘合不牢固的肽。可处理所述孢子和幼体以释放附着的肽，增加其数量，并重复筛选过程。在几个反复的筛选步骤后，其中，每个步骤确定了前一步骤中结合肽的结合亲和力，回收确定为与蛋白质及孢子与芽管

表面的其它组分粘合非常牢固的很多种肽。在一个实例中，3个或4个连续筛选步骤是足够提供此结果的。

只要肽的结合亲和力如上述方法确定，就可以评价结合肽抑制孢子发芽和真菌生长的有效性。一旦很多肽被鉴别出来，就可以选择对病原体功能有影响的肽。尤其感兴趣的是阻止孢子发芽和幼体生长的肽。这两种破坏性行为的任一种都将导致阻止或减少的病原体感染和疾病。高通量测定可用于检测在疫霉、豆薯层锈菌或类似病原体中阻止或减慢孢子发芽或植物生长的能力的大量的肽。经验表明很大比例的测试的肽可能对病原体发育有影响。

一旦鉴别出防御肽，在不被植物的酶降解的情况下将其递送至植物内的感染处。获得此递送的一种方法是将所述肽附在由植物天然产生的并且在被病原体群集的组织中产生的蛋白质上。在一个实例中，细胞分裂素氧化酶已被成功用于此目的。此蛋白质是由植物天然产生的，且其参与植物生长激素(细胞分裂素)的调节。防御肽可附于此蛋白质上，并且用于改变病原体功能。在一个实例中，这已在疫霉中实现。

防御肽可与由细胞天然分泌于细胞间隙的细胞分裂素氧化酶及其它蛋白质融合，其中它们能够与群集的锈病病原体接触。或者，此融合可包括属于植物细胞壁组分的蛋白质。这些蛋白质也被置于细胞间和细胞内与病原体互相作用的位置。市售的蛋白质组数据库为可用作CKX替代物的候选肽载体蛋白质提供多种多样的基因序列。可使用用于防御肽的最佳表现或展示的常规结构蛋白质组算法分析这些载体蛋白质的结构。

候选的蛋白质-肽构建体可首先在酵母、毕赤酵母中表达和分泌。此宿主促进浓缩或纯化蛋白质或多肽，以及测试它们对病原体孢子发芽或幼体生长的抑制作用。

只要确定了最好的防御肽以及在载体蛋白质上展示的最好的模式就可确定地在植物，如大豆或蚕豆中，形成遗传构建体。外源基因的植物转化和表达的方法在本领域是众所周知的。

特别恶性的和危险的病原体，如豆薯层锈菌，是被政府规章限制的。

通过利用最初的肽选择方案而采用锈病病原体的替代物或类似物可避免此危险以及规章的复杂性。Hollier 和 King, 1985 已报导了导致南方玉米锈病的真菌病原体, 多堆柄锈菌(*Puccinia polysora*)。此病原体没有限制容易获得, 并且可在标准试验室条件下操作。

在一实施方案中, 通过将编码 6 至 15 个氨基酸长度的肽的核酸序列插入到合适的载体中而构建肽库, 尽管可使用为更长的编码肽的序列。被核苷酸编码的肽事实上可以是完全随机的或者可以限制其组成以满足结构上或功能上的需要。例如, 而不是限制, 半胱氨酸桥可插入肽中。在一实施方案中, 核酸序列不编码免疫球蛋白(抗体)或公认的免疫球蛋白区, 如可变区。可使用表达插入的寡核苷酸的任一载体。优选使用导致在细胞或病毒表面的、或在细胞或病毒的细胞内隔室或细胞器表面表达肽库的载体。在此情况下, 表达的肽可用于与潜在的靶分子或细胞相互作用, 所述分子或细胞与包含所述肽的表面相接触。正如对本领域普通技术人员显而易见的, 如果肽在细胞内隔室或细胞器的表面表达, 所述潜在的靶标也必须存在于细胞内, 或者细胞器或细胞内隔室, 必须通过诸如细胞的溶解暴露于外部环境。

产生寡核苷酸并将其插入载体的方法对本领域普通技术人员是公知的, 并仅在此简单回顾。最普通地, 使用 Beaucage 和 Caruthers 的亚磷酸三酯方法在固相支持物上合成寡核苷酸 (*Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862, 1981; 同时参见美国专利号 4,973,679 和 4,458,066)。大量的固相支持物可用, 包括可控孔玻璃珠、聚苯乙烯共聚物、硅胶和纤维素纸。寡核苷酸的制备开始于第一个核苷酸的 3'-羟基基团与固相支持物的键合。包含核苷酸的固相支持物是从商业来源可得的。寡核苷酸是从 3'位至 5'位合成的, 并且, 链通过在可溶的 5'-保护结构单元的、活化的 3'磷酸酯或亚磷酰胺上固定的寡核苷酸的 5'-羟基的亲核攻击而延长。形成的中间体二核苷亚磷酸酯必须在链延长之前紧接着被氧化为更稳定的磷酸酯。重复此过程直到已加入了所需数量的核苷酸。有市售的自动化设备来合成寡核苷酸。此外, 很多商户提供定制寡核苷酸合成服务。

任何能够表达肽库中的肽的载体系统均可用在此处的实践中, 并且很多载体系统在本领域是公知的(参见, 例如 Wilson and Findlay, *Can. J*

Microbiol, 44:313-329, 1998)。当肽作为部分 pVIII 展示时, 适合的噬菌体系统包括 8 型、88 型和 8+8 型。当使用 pVIII 时, 适合的噬菌体系统包括 3 型、33 型和 3+3 型。当肽被插入 pVI 中时, 适合的噬菌体系统包括 6 型、66 型和 6+6 型。此外, 可使用噬菌体 T7 和噬菌体 T8 载体系统。在一优选实施方案中, 文库中的肽表达为与丝状细菌噬菌体的外壳蛋白融合, 以便所述肽在病毒体表面表达并可与靶分子或细胞表面受体相互作用。在一优选实施方案中, 使用了 f8-1 文库, 其中, 随机 8-mer 肽与 pVIII 的外壳蛋白融合。在另一优选实施方案中, 使用 f88-4 文库, 其中, 随机 15-mer 肽与 pVIII 的外壳蛋白融合。f88-4 文库中的噬菌体展示了没有任何氨基酸存在偏好的肽。f8-1 文库中的噬菌体是无偏好的, 除了在第一位的丙氨酸和第二位的四个残基之一。所有其它位置都被任意氨基酸占用。

生产 f8-1 噬菌体展示肽库的方法已在先前描述(参见, Petrenko 等, *Prot. Engineering*, 9:797-801, 1996 以及其中引用的参考文献)。所述文库在主要外壳蛋白 pVIII 的 3900 个拷贝的每一拷贝上展示异源肽。肽的表达无须由 IPTG 的诱发。用于 8-氨基酸插入的简并寡核苷酸是: GCA GNN (NNN)₇, 其中 N 是任一核苷酸。因此, 第一氨基酸是丙氨酸(A)且第二氨基酸是缬氨酸(V)、丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)或甘氨酸(G)。肽中其余的氨基酸完全随机排列。

同样地, 生产 f88-4 噬菌体展示肽库的方法也已在先前描述(Zhong 等, *J. Biol. Chem.* 269:24183-24188, 1994; Smith 和 Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Smith, *Gene*, 128:1-2, 1993 以及其中引用的参考文献)。此文库在主要外壳蛋白 pVIII 的 150 至 300 个拷贝上展示 15-氨基酸异源肽。pVIII 亚基的 3900 个拷贝的剩余部分源自野生型 pVIII。因此, 该噬菌体基因组具有编码两种不同类型的 pVIII 分子的两种 pVIII 基因。一种 pVIII 是展示异源 15-mer 肽的重组体, 而另一种是通常存在于噬菌体上的野生型 pVIII。重组 pVIII 的表达是由 IPTG 诱导型 tac 启动子/操纵子驱动的。由于两种 pVIII 基因的存在, 所述 f88 病毒体是由野生型和重组 pVIII 亚基的镶嵌形式组成的。

用于 15-mer 氨基酸插入物的寡核苷酸序列是(NNK)₁₅, 其中 N 为 A、

T、C 或 G 且 K 表示 G 或 T。因此，围绕该 15-mer 氨基酸插入物的区域是：LVPMLSFA(X)₁₅PAEGDDPAKA (SEQ ID NO: 1)，其中 X 是被密码子 NNK 编码的任何氨基酸。

噬菌体颗粒可用于基于其与感兴趣的化合物及细胞的结合能力来筛选在病毒体上表达的随机肽。在一优选实施方案中，噬菌体展示肽库用于筛选与植物病原体结合的肽。在另一优选实施方案中，对肽与病原真菌类的结合能力进行筛选。还有另一优选实施方案，对噬菌体展示肽与疫霉菌属成员结合的能力进行筛选。当研究多于单一生命阶段的病原体时，优选研究每个生命阶段，因为随着发展阶段的变化，在数量、类型和与结合部位的亲和力上可能出现显著差异。

例如，当研究疫霉菌属的成员时，将约 10^5 至 10^6 的有机体与约 10^8 至 10^9 的噬菌体展示肽相混合，并孵育一段足够使其结合的时间。对于本领域普通技术人员显而易见的，取决于诸如病原体、噬菌体和肽的种类的因素，根据本公开可使用有机体和展示肽的其它浓度。某些情况下，预孵育展示肽与相同有机体的其它生命阶段是需要的，目的是鉴别仅与特定生命阶段结合的肽。孵育后，有机体经过多次洗涤以除去未结合的和牢固地结合的肽。对疫霉游动孢子的情况，使用约 50 mM 的 LiCl 溶液进行洗涤。洗涤后，洗脱结合的噬菌体展示肽，优选在低 pH 下，并且在合适的宿主中扩增洗脱的噬菌体。在一实施方案中，宿主是饥饿的 K91 大肠杆菌。在大肠杆菌中扩增细菌噬菌体的方法在本领域是公知的并可见于，例如，Smith and Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., Wiley & Sons, 1995; and Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。在一实施方案中，至少一次重复筛选过程以使高亲和力的噬菌体展示肽富集。在另一实施方案中，3 次重复筛选过程。

一旦鉴别出高亲和力的肽展示的噬菌体，扩增该噬菌体，优选在大肠杆菌中，并且该噬菌体 DNA 的分离使用标准方法，例如在以下文献中见到的方法：Smith and Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., Wiley &

Sons, 1995; and Sambrook et al., *Molecular Cloning, 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。一旦分离出噬菌体 DNA, 使用与用于插入寡核苷酸的相同的限制性内切酶将插入的寡核苷酸从 DNA 裂解, 而限制性内切酶的片段则从 DNA 的剩余物中分离。然后, 可使用任何标准方法对寡核苷酸测序。测序可通过任何合适的方法进行, 例如, 双脱氧测序法(Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467, 1977)、化学测序法(Maxam and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560-564, 1977)或其任何改变, 包括使用自动测序。在一实施方案中, 使用 ABI Prism 377 型自动测序仪(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)。一旦知道了寡核苷酸的序列, 使用遗传密码可容易地推导出编码的肽的氨基酸序列。

高亲和力的噬菌体展示肽可就其改变病原体的发育、生长和/或传染性的能力进一步筛选。在此实施方案中, 孵育噬菌体展示肽与目标病原体一段足够使其结合的时间。结合之后, 可观察到病原体在其发育或感染宿主的能力上的改变。在一实施方案中, 约 200 个疫霉菌属成员中的游动孢子与培养皿中的以恒定体积两倍连续稀释的蒸馏水中噬菌体展示肽结合。噬菌体的浓度范围可变化, 但通常在 1 至 10×10^9 病毒体/ μl 之间。在每一筛选步骤中都包括不包含噬菌体的阴性对照。在室温下, 通常为 20 分钟的孵育时间之后, 测定在每个噬菌体浓度下包在囊内的游动孢子的数量。使用此方法可合理地选择定义性质的肽并对其种类或生命阶段特有的受体介导的功能反应的诱导进行评价, 该功能反应如游动孢子的成囊。被发现干扰病原体的发育的肽可用于防止或限制该病原体对宿主的感染。

本方法还可用于表征在植物病原体表面上结合受体的肽。在此实施方案中, 被标记的肽展示噬菌体(测试噬菌体)与不同有机体的并在不同发育阶段的细胞进行培养。然后, 标记的噬菌体的相对结合亲和力可通过竞争结合与 Scatchard 分析进行测定。在竞争结合分析中, 使恒定浓度的测试噬菌体与靶病原体结合, 然后加入一定浓度范围下的未标记的刺激噬菌体。该刺激噬菌体可与测试噬菌体相同或不同。然后洗涤靶病原体以除去非特异地或不牢固地结合的噬菌体, 并通过测量存在于靶细胞上的标记的量来测定结合的测试噬菌体的量。竞争的程度可通过需要抑制

50%的测试噬菌体的结合(IC₅₀)的刺激噬菌体的浓度来测试。竞争测试的结果可用于测定细胞表面受体随时间的数量、类型和亲和力的变化。

重组寡核苷酸在公开的手段的范围內，其通过此处所述的方法被发现，并编码具有抗真菌活性的肽。这些重组寡核苷酸可用于产生通常用作克隆或表达载体的重组多核苷酸，尽管其它用途是可能的。克隆载体是作为转移 DNA 片段至宿主细胞的自我复制的 DNA 分子。克隆载体的三种最普通的类型是细菌质粒、噬菌体以及其它病毒。表达载体是经设计以便插入在特定部位的编码序列将被转录且翻译为蛋白质的克隆载体。

克隆载体和表达载体都包含使载体在一个或多个适合宿主细胞中复制的核苷酸序列。在克隆载体中，此序列通常是使载体能够独立于宿主细胞染色体进行复制，并且还包含复制起点或自主复制序列。很多细菌和病毒的复制起点对本领域技术人员是众所周知的并包括，但不限于 pBR322 质粒起点、2 μ 质粒起点以及 SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 和 BPV 的病毒起点。

本公开的寡核苷酸序列可通过使用含有寡核苷酸序列的重组表达载体用于产生抗真菌肽。适合的表达载体包括染色体的、非染色体的和合成的 DNA 序列，例如 SV 40 衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、由质粒和噬菌体 DNA 的组合衍生的载体、以及病毒 DNA，例如牛痘、腺病毒、鸡痘病毒和伪狂犬病毒。此外，可使用任何在宿主中可复制且有生存力的其它载体。

通过多种方法可将感兴趣的核苷酸序列插入载体中。在最常见的方法中，使用通常对于本领域技术人员已知的、并在例如以下的文献中详述的方法：Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, (1989) and Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons 50 (1992)，可将序列插入合适的限制性内切酶位点。

在表达载体中，将感兴趣的序列可操作地连接至由宿主细胞识别以指导 mRNA 合成的适合的表达控制序列或启动子。启动子是通常位于从结构基因的起始密码子上游的 100 至 1000 碱基对(bp)处的非翻译序列，

启动子在在其控制下调节核酸的转录和翻译。启动子通常分为诱导型的或组成型的。诱导型启动子是这样的启动子，其作为对环境中的某些变化的反应，例如养料的存在或不存在或者温度的变化，促使在其控制下引发 DNA 转录水平增加。与此相反，组成型启动子维持相对恒定的转录水平。

当核酸序列处于与另一核酸序列的官能关系时，其被可操作地连接。例如，前序列或分泌引导者的 DNA 与多肽的 DNA 可操作地连接，如果该多肽 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白；启动子与编码序列可操作地连接，如果该启动子影响序列的转录；或者核糖体结合部位与编码序列可操作地连接，如果该核糖体被置于方便翻译的位点。通常，可操作地连接的序列是邻接的，并且对于分泌引导者的情况是邻接的且在阅读相中。结合是通过在限制性内切酶部位的拼接而实现的。如果没有合适的限制性位点，则可使用对本领域技术人员公知的合成寡核苷酸接头或连接物 (adapter or linker)。Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, (1989) and Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons (1992)。

用于表达载体的常见启动子包括，但不限于，LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac 或 trp 启动子以及噬菌体 λ PL 启动子。有效的诱导型植物启动子包括热休克启动子(Ou-Lee et al. (1986) *Proc. Natl Acad. Set USA* 83: 6815; Ainley et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14: 949)、源自菠菜亚硝酸还原酶基因的硝酸盐诱导型启动子(Back et al. (1991) *Plant Mol Biol.* 17: 9)、激素诱导型启动子(Yamaguchi-Shinozaki et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 905; Kares et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 905)以及与 RuBP 羧化酶的小亚单位和 LHCP 基因家族相关的光诱导型启动子(Kuhlemeier et al. (1989) *Plant Cell* 1 : 471; Feinbaum et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 226: 449; Weisshaar et al. (1991) *EMBOJ.* 10: 1777; Lam and Chua (1990) *Science* 248: 471; Castresana et al. (1988) *EMBOJ.* 7: 1929; Schulze-Lefert et al. (1989) *EMBOJ.* 8: 651)。可使用已知的在原核或真核细胞中控制基因表达的、本领域技术人员公知的其它启动子。表达载体也可包含翻译起始的核糖体结合部位以及转录终止子。该载体还可包含用于扩增基因表达的序列。

表达载体和克隆载体可以，且通常是，包含选择基因或选择标志物。典型地，此基因编码对于被载体转化的宿主细胞的生存和生长必要的蛋白质。适合的标志物的实例包括真核细胞的二氢叶酸还原酶(DHFR)或新霉素的抗性以及大肠杆菌对四环素或氨基青霉素的抗性。植物中的选择标志物包括对博来霉素、庆大霉素、甘草磷、潮霉素、卡那霉素、氨基甲喋呤、腐草霉素、麟丝菌素(phosphinothricin)、放线壮观素、链霉素、磺酰胺和磺酰脲的抗性。Maliga et al., *Methods in Plant Molecular Biology* (植物分子生物学方法), Cold Spring Harbor Press, 1995, p. 39。

此外，表达载体还可包含与蛋白质的核苷酸序列可操作地连接的、为用作标志物的编码其他蛋白质的标志物序列。其结果为包含两个连接的且不同的蛋白质的杂化或融合蛋白质。所述标志物蛋白质可为由表达载体产生的重组体蛋白质提供，例如，免疫的或生物酶的标志物。合适的标志物包括，但不限于，碱性磷酸酶(AP)、myc、血凝素(HA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)、荧光酶以及绿色荧光蛋白(GFP)。

本公开的多核苷酸序列也可以是表达盒的部分，该表达盒至少包括，可操作地在5'至3'位方向上连接，诸如启动子的调节序列、编码本公开的肽的多核苷酸以及在宿主细胞中起作用的转录终止信号序列。所述启动子可以是任何此处所述的类型，例如，组织特异性启动子、种子特异性启动子、质粒特异性启动子等。所述表达盒可进一步包含可操作地连接的靶向、运输或能够引导产生的蛋白质的传输的分泌肽编码区。所述表达盒还可进一步包含编码筛选标志物和/或纯化部分的核苷酸序列。

更具体地，本公开包括重组构建体，其含有编码本公开的抗真菌肽的分离的多核苷酸序列。所述构建体可包载体，例如质粒载体或病毒载体，所述序列正向或反向已被插入其中。该重组构建体可进一步包含调节序列，包括，例如，与序列可操作地连接的启动子。许多适合的载体和启动子对本领域技术人员是公知的并且是市售的。

本公开进一步的实施方案涉及包含构建体的转化宿主细胞，该构建体含有本公开的寡核苷酸序列。所述宿主细胞可以是更高级的真核细胞，例如哺乳动物细胞或植物细胞，或是更低级的真核细胞，例如酵母细胞，或者宿主可以是原核细胞，例如细菌细胞。将所述构建体引入宿主细胞

可通过多种方法实现, 包括: 磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、原生质体融合、脂质体、直接显微注射到细胞核、刮研装载以及电穿孔。在植物中, 可使用多种不同的方法将转化/表达载体引入到植物原生质体、细胞、愈伤组织、叶盘等, 以产生转基因植物。这些方法包括, 例如, 土壤杆菌-介导的转化、基因枪传输、显微注射、电穿孔、聚乙二醇-介导的原生质体转化、脂质体-介导的转化等(Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 42: 205)。

通过本公开的多核苷酸的表达产生的肽可通过以下步骤获得: 通过任何前述的方法转化宿主细胞, 在适合条件下生长宿主细胞; 诱导多核苷酸的表达以及分离感兴趣的蛋白质。如果蛋白质是保留在宿主细胞内的, 则可通过宿主细胞的溶解而获得该蛋白质, 而如果蛋白质是分泌性蛋白质, 则可从培养基中分离。有一些方法可提纯蛋白质并且对本领域普通技术人员是公知的。这些方法包括沉淀, 例如硫酸铵沉淀或乙醇沉淀, 酸提取, 阴离子或阳离子交换层析, 磷酸纤维素层析, 疏水作用层析, 亲和层析, 羟磷灰石层析, 外源凝集素层析, 高效液相色谱(HPLC), 天然或变性条件下的电泳, 等电聚焦以及免疫沉淀反应。

或者, 由本公开的多核苷酸编码的肽可通过使用固相肽合成或经典的溶液肽合成(也称为液相肽合成)的化学合成法产生。在寡聚体支持的液相合成中, 生长的产品附在大的可溶聚合物基团上。因此, 基于相对很大的附于聚合物上的产品与未反应的反应物在尺寸上的巨大不同, 每个合成步骤的产品可从未反应的反应物中分离。这样使反应能够在均相的溶液中进行, 并且消除了与传统液相合成相关的繁琐的纯化步骤。寡聚物支持的液相合成还可适应肽的自发液相合成。

对于固相肽合成, 此过程引起适合的氨基酸的顺序装配为所需序列的肽, 而生长的肽的末端与不溶载体相连接。通常, 肽的羧基端与聚合物相连接, 并在解离剂处理时可从所述聚合物释放。在常见方法中, 氨基酸与树脂颗粒结合, 并且, 通过逐步添加保护的氨基酸以产生氨基酸链的步进式产生肽。通常使用由 Merrifield 描述的修改的此技术(参见, 例如, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 96: 2989-93, 1964)。在自动固相法中,

通过将羧基端的氨基酸装载到有机连接剂(例如, PAM, 4-氧代甲基苯基乙酰胺甲基)上而合成肽, 所述有机连接被共价地连接到与二乙烯基苯交联的不溶聚苯乙烯树脂上的。通过用叔丁氧羰基来阻挡可保护末端氨基。羟基和羧基基团通常可通过利用 O-苄基基团来阻挡得到保护。在自动肽合成器中完成合成, 有很多市售的合成器。合成后, 可从树脂上脱去产物。通常根据已有方法(例如, Bergot and McCurdy, Applied Biosystems Bulletin, 1987)使用氢氟酸或三氟甲磺酸脱去保护基团。分离和纯化之后, 通常得到约 60%至 70%的收率。完成产物肽的纯化是通过, 例如, 从有机溶剂例如甲基丁基醚中使肽结晶, 然后溶于蒸馏水, 以及使用透析(如果肽的分子量大于约 500 道尔顿)或反向高压液相色谱(例如, 使用 0.1% 三氟乙酸和乙腈作为溶剂的 C18 柱)如果肽的分子量小于 500 道尔顿。纯化的肽可被冻干并以干态储存备用。可使用常见的高压液相色谱(HPLC)和电喷射质谱(ES-MS)分析方法完成所得态的分析。

通常, 包含含有本公开多核苷酸的细胞的转基因植物可通过任何前述方法生产; 筛选在选择性培养基中转化的植物细胞; 使已被转化的植物细胞再生以产生分化的植物; 以及选择转化的植物, 其以所需水平表达由本公开的多核苷酸编码的蛋白质。转化多种双子叶植物并获得转基因植物的具体方法在文献中很好的记录了(Gasser and Fraley, Science 244:1293, 1989; Fisk and Dandekar, Scientia Horticulturae 55:5, 1993; 及其引用的文献)。

转化和植物再生已在多种单子叶植物中获得成功。具体实例如下: 芦笋 (*Asparagus officinalis*; Bytebier et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5345)、大麦(*Hordeum vulgare*; Wan and Lemaux (1994) Plant Physiol. 104: 37)、玉米(*Zea mays*; Rhodes et al. (1988) Science 240: 204; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2: 603; Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8: 833; Koziel et al. (1993) Bio/Technology 11: 194)、燕麦 (*Avena sativa*; Somers et al. (1992) Bio/Technology 10: 1589)、野茅(*Dactylis glomerata*; Horn et al. (1988) Plant Cell Rep. 7: 469)、大米(*Oryza sativa*, including indica and japonica varieties; Toriyama et al. (1988) Bio/Technology 6: 10; Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep. 7: 379; Luo and

Wu (1988) *Plant Mol. Biol Rep.* 6: 165; Zhang and Wu (1988) *Theor. Appl. Genet.* 16: 835; Christou et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 957)、黑麦(*Secale cereale*; Dela Pena et al. (1987) *Nature* 325: 274)、高粱(*Sorghum bicolor*; Cassas et al. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 90: 11212)、甘蔗(*Saccharum spp.*; Bower and Birch (1992) *Plant J.* 2: 409)、高羊茅(*Festuca arundinacea*; Wang et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 691)、草坪草(*Agrostis palustris*; Zhong et al. (1993) *Plant Cell Rep.* 13: 1)以及小麦(*Triticum aestivum*; Vasil et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 667; Weeks et al. (1993) *Plant Physiol.* 102: 1077; Becker et al. (1994) *Plant J.* 5: 299)。

在一优选实施方案中,采用编码本公开的抗真菌肽的重组多核苷酸转化植物,其中该多核苷酸形成由植物分泌的肽。在另一优选实施方案中,转基因植物的根分泌出抗真菌的肽。分泌抗真菌肽的植物可通过上述方法构建,使用了将指引肽分泌的分泌序列引入的表达盒。或者,可采用核苷酸序列转化植物,该核苷酸序列编码由本公开的抗真菌肽及通常被植物分泌的蛋白质构建的融合蛋白质。例如,在抗真菌肽和细胞分裂素氧化酶可产生融合蛋白质。细胞分裂素氧化酶是表现为降解可干扰植物生长控制的外源细胞分裂素的防卫性酶。通过将抗真菌肽与控制分泌的细胞分裂素氧化酶基因区域融合,抗菌素肽将被转化植物分泌出,从而提供免受病原体真菌的保护。

在融合蛋白质用于转化植物之前,可使用本公开的噬菌体展示的方法对包含抗真菌肽的融合蛋白质的活性进行筛选。通常,融合蛋白可以是包含以下的物质的结构:抗真菌肽;蛋白质的分泌控制部分,例如细胞分裂素氧化酶;以及 pVIII 或 pIII 噬菌体外壳蛋白。然后,可使用本公开的方法筛选如此构建的噬菌体展示融合蛋白质以选择那些与靶病原体真菌结合并且导致限制致病性的变化的融合蛋白质。

实施例

以下实施例的目的是提供本公开的应用的说明。以下实施例不是为了完全定义或用其它方式限制本发明的范围。

实施例 1: 真菌种类和游动孢子的产生

使用的真菌菌株为辣椒疫霉菌(*P. capsici*)(ATCC 15399)、大豆疫霉菌(*P. sojae*) (菌株 7-6-1, 类别 25) (A. F. Schmitthenner, Ohio State University) 和寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)。所有培养物都作为菌丝体保持在 15 °C 下的利马豆琼脂平板(大豆疫霉菌)或玉米粉琼脂平板(Difco, USA) (辣椒疫霉菌和寄生疫霉)上。通过将菌丝栓(5 mm x5 mm)转移至包含澄清的 10% V8®蔬菜汁(Campbell Soup Co., USA)的琼脂平板上制得菌丝体拷贝。每个板上有 3 个栓在 25 °C 下生长 3 至 6 天。通过修整所述平板并在 25 °C、光照下培养, 在辣椒疫霉菌中可引起孢子囊的产生。1 至 2 天后, 通过无菌水冲洗所述平板 20 至 30 分钟可引发游动孢子的释放。寄生疫霉游动孢子的产生与辣椒疫霉菌的产生相同, 除了在 25 °C、光照下培养前用无菌水洗涤所述平板 2 分钟。从大豆疫霉菌孢子囊中引发游动孢子的释放是通过用无菌水以 30 分钟的间隔冲洗平板 4 次。游动孢子在 2 至 4 小时内释放。在其释放之后, 通过 4 层粗滤布过滤游动孢子以除去孢子囊壳以及菌丝体碎片。悬浮液的样品涡流 30 秒以引发成囊, 然后在显微镜下用血细胞计数器对包囊计数。

实施例 2: 作为转换单位的饥饿的 K91kan 大肠杆菌细胞和 Titerinz 噬菌体的制备

在文库筛选前, 根据公开的方法(Smith & Scott, Methods in Enzymology, 217:228-257, 1993; Yu and Smith, Methods in Enzymology, 267:3-27, 1996), 将噬菌体作为饥饿的 K91BluKan (卡那霉素抗性)大肠杆菌中的四环素转换单位(TU)进行浓度测定。转换单位是测量噬菌体传染性的有效方法, 并通常表示为噬菌体的 TU/ml。简言之, K91BluKan 细胞在 20 ml 的超级肉汤 (superbroth) 中、37 °C、激烈摇动(约 170 rpm) 下(Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217:228-257, 1993)生长为中期指数阶段(OD₆₀₀ 约 0.45)。然后将该细胞在轻柔摇动下培养另外的 5 分钟以使任何修剪过的 F pIII 再生。在 4 °C 下的 Sorvall SS34 转子中, 将该细胞在无菌的 50 ml 圆底旋盖(Oak Ridge)管中以 2,200 rpm 离心分离 10 分钟。倾倒入上清液, 然后将该细胞再悬浮于 20 ml 的 80 mM NaCl 中,

置于 125 ml 培养瓶并在 70 rpm、37 °C 下轻柔摇动 45 分钟。然后如上离心分离该细胞并再悬浮于 1 ml 冷 NAP 缓冲溶液中。饥饿的细胞在 4 °C 下保存且保持传染性 3 至 5 天。

将噬菌体作为在大肠杆菌 K91BluKan 中饥饿细胞(如上制备)的转换单位(TU)进行浓度测定。使用 TBS/凝胶作为稀释剂对噬菌体进行分析测定。10 微升的各噬菌体稀释物以液滴形式沉积在与水平面成 10°角设置的 15 ml 无菌一次性管的内壁上。将 10 微升饥饿的大肠杆菌 K91BluKan 细胞加入各噬菌体液滴并在室温下将其培养 10 分钟以允许噬菌体感染浓缩的细胞的时间。10 分钟后, 将包含 0.2 mg/ml 四环素的 1 ml 超级肉汤加入至所述细胞并在摇动下、37 °C 培养 20 至 40 分钟。为了 f88-4/15 mer 噬菌体的扩增, 该超级肉汤还包含 1 mM IPTG 以诱导重组体 pVIII 的表达。然后将感染的细胞在包含 40 mg/ml 四环素的 Luria-Bertani (LB)平板上展开(200 ml 每个平板)。然后在 37 °C 培养该平板约 24 小时。

实施例 3: 结合噬菌体的游动孢子的选择

将 f8-1 文库中 10^{11} 转换单位(TU)的等分试样(Petrinko et al., Protein Engineering, 9:797-801, 1996)在室温下加入至 4 ml 的 50 mM LiCl 中 10^6 新释放的辣椒疫霉菌游动孢子中, 然后在室温、轻柔搅拌下培养 30 分钟。除了使用大豆疫霉菌的游动孢子的情况(Soj 克隆), 对 f88-4 文库使用相同的方法。用 150 μ l 的 50 mL LiCl 洗涤包含结合噬菌体的游动孢子 10 次, 然后以 1000x g 离心分离 45 秒钟以除去未结合的噬菌体。10 次洗涤后, 用 200 μ l 的洗脱缓冲液(0.1 N HCl, 足够使 pH 为 2.2 的甘氨酸, 1 mg/ml 牛血清清蛋白)洗脱结合的噬菌体。通过感染如上所述的饥饿的大肠杆菌 K91BluKan 细胞将洗脱的噬菌体扩增。然后通过如下所述的与聚乙二醇沉积的方法纯化该扩增的噬菌体, 并如 Smith 和 Scott 所述的方法将其再悬浮于 TBS 缓冲液中(Methods in Enzymology, 217:228-257, 1993)。纯化噬菌体小份等分试样随后再用于新释放的游动孢子中, 如上所述用于总共 3 次亲和力纯化和 2 次扩增步骤。如 Smith 和 Scott 所述(Methods in Enzymology, 217:228-257, 1993), 通过计算每一轮选择后的百分收率监测结合游动孢子的噬菌体的选择性富集。该计算是通过计算用于游动孢子

的总噬菌体(表示为转换单位)以及测量从游动孢子再生的噬菌体(作为转换单位)的总产量来进行,并以百分比表示该结果。每一轮的筛选后从游动孢子中洗脱的噬菌体的收率是在 $10^{-4}\%$ 至 $10^{-5}\%$ 之间,表明所述方法在筛选与游动孢子结合的噬菌体上是成功的。洗涤步骤后游动孢子是完好无缺的、球形的,表明在筛选过程期间几乎没有出现成囊。

实施例 4: 噬菌体纯化

被噬菌体感染的大肠杆菌 K91BluKan 细胞在 20 ml 超级肉汤(含有 40 mg/ml 的四环素)中、 37°C 、170 rpm 下过夜生长。将该培养液在 SS34 转子中以 $5,000\times g$ 离心分离 10 分钟以沉淀该大肠杆菌细胞(含噬菌体)。移除上清液并将其置于新的圆底旋盖管中,然后以 150 l 每 ml 上清液的比例加入 PEG/NaCl (16.7%聚乙二醇/3.3 M NaCl)以沉积噬菌体。在 4°C 下将噬菌体过夜沉积,然后通过 SS34 转子的 50 ml 圆底旋盖管中以 10,000 rpm 离心分离 20 分钟来沉淀。将沉淀噬菌体再悬浮于 1 ml 的 Tris 缓冲生理盐水(TBS)中。通过加入 150 ml 的 PEG/NaCl 将其再次沉积并在 4°C 下过夜。通过在台式离心机上的离心分离将噬菌体沉淀并将此沉淀再悬浮于 TBS 中。

实施例 5: DNA 分离、测序和分析

根据 Smith 和 Scott 的方法(Methods in Enzymology, 217:228- 257, 1993)将用于测序的 DNA 从单独的噬菌体克隆中分离。使用 ABI Prism 377 型自动测序仪(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)按照厂商方案对单链 DNA 从 3' 端进行测序。用于 f8 克隆的引物是 5'-GGAGCCTTTAATTGTATCGG-3' (SEQ ID NO: 2)。用于 f88 克隆的引物是 5'-AGT AGC AGA AGC CTG AAG A-3' (SEQ ID NO: 3)。

使用 ExPASy 分子生物学服务器(网址: <http://www.expasy.ch/>)的“翻译”程序对 DNA 序列进行翻译。使用标准算法(即)FASTA (Lipman and Person, Science, 227:1435-1441, 1985)和 BLAST (Altschul et al., J. Molecular Biol., 215:403-410, 1990)命令对序列与存储于序列数据库(GenBank, EMBL, dbEST, SwissProt, PIR)的核酸和蛋白质序列进行比较。

使用 ClustalW (Thompson et al., *Nuc. Acid Res.*, 22:4673-4680, 1994)以及 PAM250 重量表对肽序列进行比对, 并使用 TreeView (Page, *Computer Applic. Biosci.*, 12:357-358, 1996)对观察树状图。获得的 f8-mer DNA 序列编码 19 个预期的肽序列(表 1)。多数的肽包含预期为强 α -螺旋形成者(即 Glu、Ala 和 Leu)和 α -螺旋破坏者(即 Gly 和 Pro)的氨基酸残基。尽管缺少共用基序, ClustalW 多序列比对程序用于将类似的肽以树状图的形式簇集。由匹配的肽构建的树状图表明 f8-mer 肽序列可分组为 6 个主要的家族群, 如图 1 和表 1 所示。由 f88-4/15 mer 文库挑选的序列如表 2 所示。

实施例 6: 成囊检测

根据 Smith 和 Scott 的方法分离挑选的噬菌体克隆(*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993), 并除了噬菌体再悬浮于蒸馏水中而不是 TBS, 如上所述使用聚乙二醇对其进行两次纯化。通过在 A_{269} 测量吸光度计算该病毒体的浓度(Smith and Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993)。将包含约 400 个新释放的游动孢子的约 20 μ l 的水滴与噬菌体培养, 该噬菌体经两倍连续稀释以便其包含含有肽的噬菌体浓度为 1×10^{10} 、 5×10^9 、 2.5×10^9 或 1.25×10^9 病毒体/ μ l 水滴。阴性对照没有得到噬菌体并用于监测在游动孢子种群中自发成囊的量。室温下培养 20 分钟后, 使用 100x 放大率的显微镜对成囊的游动孢子的数量进行计数。根据 Smith 和 Scott (*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993)计算噬菌体的病毒体浓度。

f8 肽诱导未成熟包囊的效力随着序列家族以及噬菌体浓度而变化(图 2)。浓度为 1×10^{10} 病毒体/ μ l (64 μ M)时, 很多肽的家族对诱导包囊是有效的。然而, 浓度为 2.5×10^9 病毒体时, 在产生高水平成囊作用(Pc42、Pc78、Pc87 和 Pc64)的肽与产生低水平成囊作用(Pc15B、Pc56 和 Pc45)的肽间具有 3 至 5 倍的差别。浓度为 1.25×10^9 (8 μ M)时, 所有肽的家族都对诱导成囊作用具有最低限度的效力。野生型噬菌体也对辣椒疫霉菌游动孢子产生成囊作用; 然而, 在所有试验中, 由选择的噬菌体产生成囊的游动孢子的部分大于由野生型噬菌体的成囊的部分 2 至 7 倍。辣椒疫霉菌选择的、含肽的噬菌体未成熟地将游动孢子包在囊内的能力对辣椒疫霉菌

是特有的。当大豆疫霉菌与寄生疫霉菌游动孢子与 1×10^{10} 病毒体/ μl 的含肽噬菌体培养时，几乎没有观察到成囊，其中所述浓度对辣椒疫霉菌游动孢子产生几乎 100% 的成囊。对于 f88-4 15 mer 肽得到相似的结果。有代表性的 15 mer 肽产生未成熟成囊的能力与 f-8 克隆 Pc87 的比较如图 3 所示。

实施例 7: 结合特异性

比较具有高和低成囊诱导能力的噬菌体展示肽的结合辣椒疫霉菌游动孢子的能力。随机选择噬菌体克隆 Pc87 和 Pc45 作为分别诱导高和低水平的成囊作用的代表性克隆(图 2)。引入噬菌体载体作为对照处理。噬菌体克隆通过大肠杆菌感染扩增并如上所述被纯化。对于每个结合反应， 5×10^{10} TU 的噬菌体与 200,000 的辣椒疫霉菌游动孢子一起培养。如实施例 3 中的噬菌体选择进行结合反应和洗涤。对从游动孢子种群洗脱的噬菌体在大肠杆菌 K91BluKan 细胞中进行浓度测定并作为全部转换单位来表示。使用类似的过程确定选择的噬菌体是否与辣椒疫霉菌包囊结合。

噬菌体载体与克隆 Pc45 和 Pc87 不同地结合辣椒疫霉菌游动孢子。30 分钟的孵育之后，超过 10^7 TU 的噬菌体 Pc87 从游动孢子上被洗脱，而只有约 50,000 TU 的噬菌体 Pc45 或噬菌体载体在相同条件下被洗脱(图 4)。此外，结合对游动孢子的阶段时特有的：少于 10^4 Pc87 TU 从包囊上被洗脱-在对照载体噬菌体观察到大约相同的背景结合(图 5)。

实施例 8: 分泌融合蛋白的构建

通过将合成的寡核苷酸连接至载体 pJE-6 的限制性内切酶位点，HindIII 和 XbaI，构建羧基末端的 DNA 融合来编码感兴趣的肽。质粒载体 pJE-6 是由源于质粒 pPICZ-alpha (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 的 *Pichia pastoris* 表达构建体 pROM-46 构建的，如前述(Cregg et al., Bio/Technology, 11: 905-910, 1993; Rosenfeld, Methods in Enzymology, 306:154-169, 1999)。质粒 pROM-46 用限制性内切核酸酶(HindIII)消化，用 Klenow 酶和 dNTP's 补平，用 T4 DNA 连接酶再连接。这些步骤消除了存在于 pPICZ-alpha 质粒序列内的 HindIII 限制性位点，并且质粒被指定为 pJE-4。通过 PCR 将

在编码序列 3'端的序列突变以采用限制性内切位点 HindIII 取代终止密码子。此质粒指定为 pJE-6。编码代表性的肽(Pc87, ADRPSMSPT, SEQ ID NO: 8)的合成寡核苷酸与用 HindIII 和 XbaI 消化的质粒 pJE-6 连接。此质粒指定为 pJE-7 (图 6)。对 pJE-7 质粒测序以确定插入, 并且结果如图 7 所示。

表 1

家族	克隆	氨基酸序列	SEQ ID NO
1	Pc56	AAPDLQDAM	4
2A	Pc19	ADRLNSDAG	5
	Pc36	ADRPSTTSL	6
	Pc78	ADPPRTVST	7
	Pc87	ADRPSMSPT	8
	Pc11	ADRTSNAST	9
2B	Pc76	ADKSYIPSS	10
	Pc65	AVRNPSHHS	11
	Pc44	ADPTRGHS	12
	Pc58	ADPTRQPHS	13
3A	Pc45	AEHQNSAGP	14
	Pc14	ADARSAGAIS	15
	Pc39	ADSKNAGPM	16
	Pc53	AETKFSGSA	17
	Pc15A	ADPKGSGVT	18
3B	Pc15B	AGLTSPNDM	19
	Pc43/PC64	ADITDPMGA	20
4	PC29B	AVGTHTPDS	21
	Pc12/Pc42	AVSPNVHDG	22

表 2

克隆	氨基酸序列	SEQ ID NO.
Cap1/18	VAAFSLVWATHLMLS	23
Cap1/12	LTRCLVSTEMAARRP	24
Cap1/9	SAPYLPYFDLLHFPI	25
Cap1/13	PSSYEASRRPEHWXF	26
Cap1/11	SATDTTLPMMTAIRS	27
Cap1/22	TRLSPMESXAMLLAP	28
Cap1/20	LLPVSPPFAPNASST	29
Cap1/24	MSNFPTSHAPCPVEI	30
Cap1/6	EFRKNYPSAAPLIPR	31
Cap1/23	PXVHGSIPLTPPLGF	32
Cap1/30	LFXCYPPCTYSYCLS	33
Cap1/1	MSNFPTSHAPCPVXI	34
Cap1/16	PEWKSSWSPCTPRCP	35
Cap1/28	AMSRWLRPRE(M/D)NAPP	36
Cap1/19	THTTFXVTVXLHEPP	37
Cap1/27	MTSPRNSQLIVPFCL	38
Cap1/7	PTLGRFNRPSCSIIV	39
Soj2-2	APQCHPHLPFDMIHV	40
Soj2-3	NHNSLPAQYLVXILR	41
Soj2-4; Soj2-6	DQPCTPSPDVSFYRS	42
Soj2-8	VAAPSHWLKPSLDCF	43
Soj2-9	NPLYKNPPPRVAMCL	44
Soj2-19	LIFRYAPPPLFLRPP	45

如上所述，蛋白质脚手架可设计为在肽转化入植物时展示所述肽。出于说明的目的，细胞分裂素氧化酶(CKX)可用作肽传输脚手架。源自玉米的 CKX 家族的成员(Morris, 1997)可以，例如，用作传输分子。CKX 是内源性地产生的，具有从细胞分泌的肽信号序列，并且在蛋白酶存在于细胞间区域的情况下被充分糖基化以提供稳定性(Morris et al., 1999)。

基于已知的 CKX 的三维结构，如 Malito et al., 2004 报导，可将 CKX 工程化为在暴露的 C-末端展示肽。例如，可表达脚手架构建体并从酵母中将其分泌出。在最初的试验中，所选肽的抑制能力是显著的，并获得 80%至 90%的游动孢子成囊。在水的对照组中，疫霉菌游动孢子成囊为 25%或更低(Fang et al., 2004)。例如，可利用这种构建体产生番茄发根，并且在这种情况下，发现脚手架蛋白被分泌至根际，其中，脚手架蛋白在其于根部表面聚集之前在所述根际诱导游动孢子成囊，因此阻止了感染。如图 9 所示。

除了以上的工作但通过相同技术的扩展，从与疣顶单胞锈菌的夏孢

子牢固结合的组合文库中选择 15-mer 的肽。此真菌用作豆薯层锈菌的替代物或是经选择的类似物，其中，接近豆薯层锈菌之处被严密控制以保留此病原体。此筛选鉴别出很多在最初的孢子发芽后抑制生长的肽，例如，如图 10 所示。所述肽在微摩尔级的浓度是有效的。防御肽在 CKX 中的发育可使其能够传输至穿入叶子细胞间的真菌菌丝的表面。

实施例 9: 肽选择方法学

图 8 是表明肽选择的方案 800 的方法流程图。首先，起始的噬菌体展示肽库可在步骤 802 与植物提取物混合以除去与植物蛋白质及其它因子发生作用的肽。如此除去肽的产物被指定为子库 1。

子库 1 与发芽的夏孢子或幼体通过公知的生物淘洗技术混合 804。结合的噬菌体展示肽从幼体中回收 806。各回收的噬菌体展示肽的浓度通过大肠杆菌中的扩增 808 而增加。噬菌体展示肽扩增后回收再生 810 并与植物提取物混合 812 以再次确保除去与植物蛋白质和其它因子发生作用的肽。如此除去肽的产物被指定为子库 2。

步骤 814 确定是否以上步骤已进行了足够的次数以保证选择候选植物防御肽的严紧性。从子库 2 开始，子库 3、4 和 5 是通过重复步骤 806 至步骤 812 的 n 次连续反复产生的。在使用生物淘洗的情况下，每次反复使最新产生的子库，例如，子库 2，与发芽的夏孢子或幼体混合。结合的噬菌体展示库从幼体中回收。每次回收的噬菌体展示肽的浓度通过在大肠杆菌中扩增而增加。

根据处理过程设计，一旦所述过程已重复了 n 次，可对从子库 n 中(或从任一其它的 n 个子库中)随机选择的噬菌体克隆测试 816 其抑制幼体(即发芽的夏孢子)生长的能力。表现出成功抑制作用的候选肽可作为将植物防御肽与植物表面蛋白基因(例如 CKX)结合的融合基因构建体而提供 818，在中间宿主(例如 *Pichia*)中被扩增 820，以及最终用于转化 822 大豆或耕地蚕豆以赋予锈病抗性。

前述方法的具体实施方案可按 5 个部分来描述，A 至 E。

部分 A 涉及通过除去与植物组分发生作用的肽而制备子库 1。将 3.0 g 的斑豆叶与 7 ml 缓冲液(20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.0)

混合，然后将此混合物磨碎以提供匀浆。在 2 ml 微管中，将 0.9 ml 该匀浆与 0.1 ml 10^{14} 噬菌体(f88-4/15-mer)合并以提供总计 10^{13} 的病毒体。在约 23 °C 的室温下，将所得混合物在轨道式震荡器(约 500 rpm)孵育 30 分钟。使用常规的离心机在高速下将孵育的混合物离心 5 分钟。将上清液回收、保存、然后再次离心。该上清液用于噬菌体扩增。

部分 B 涉及第一轮的生物淘洗。来自所选病原体约 1.5 百万孢子在 20 °C 下、0.01%吐温 20 和 25 ppm B-紫罗酮中培养 5 小时。加入 10^{12} TU 噬菌体。将该混合物分到总体积为 3 ml 的 2 个微管中。将包含孢子/噬菌体混合物的微管在约 23 °C 的室温下、在轨道式震荡器上(约 500 rpm)孵育 30 分钟。离心分离孵育的混合物；除去上清液；加入 0.5 ml 的水；以及将剩余物合并到一个微管中。将合并的物质离心分离；除去上清液；以及用 1 ml 水洗涤该沉淀物。将此上清液去除的离心分离步骤和洗涤重复 10 次。将 150 μ l 的洗脱缓冲液加入包含噬菌体和孢子的所述沉淀物 11 中。将所述洗脱缓冲液混合均匀并在室温下静置该混合物 5 分钟。然后将该混合物离心分离并保存上清液。将 75 μ l 洗脱缓冲液加入并混合以进行如前所述的另外的离心分离。合并所有上清液。使用 210 μ l 洗脱缓冲液进行重复。加入 44 μ l 的 1 M Tris-HCl (pH 9.0)以中和洗脱的上清液。将中和的上清液扩增以产生子库 1。

部分 C 涉及制备子库 2。使用部分 B 中第一轮生物淘洗的扩增的子库 1 产生子库 2。其完成是通过使用子库 1 而不是部分 A 中最初的 f88-4/15-mer 库，但在其它方面仿效部分 A 的方案。

部分 D 涉及通过使用包括 2、3 和 4 轮的更多生物淘洗轮次产生其他的子库。部分 B 被重复 3 次：

1. 对第 2 轮生物淘洗，使用来自第 2 子库的 4.2×10^{11} TU 噬菌体以产生子库 3；

2. 对第 3 轮生物淘洗，使用从第 2 次生物淘洗扩增的 5.6×10^{11} TU 噬菌体以产生子库 4；以及

3. 对第 4 轮生物淘洗，使用从第 3 次生物淘洗扩增的 5.1×10^{11} TU 噬菌体以产生子库 5。

将来自第 4 轮生物淘洗的菌落采集、测序并测试其对幼体生长的抑制。

部分 E 涉及测试对夏孢子生长的抑制。将 3×10^{12} 的 30 μ l 发芽的孢子(约 250)在 20 C 过夜孵育。评价真菌胚芽管生长(即幼体生长)并与作为对照的水和 f88, 即没有任何展示肽的单独的噬菌体, 进行比较。

实施例 10: 通过阻止幼体(发芽的孢子)发育抑制疣顶单胞锈菌生长的肽
对病原体疣顶单胞锈菌可重复实施例 9 的方法学。表 3 和表 4 显示可用于抑制从这些病原体发芽的夏孢子(幼体)生长的肽。

表 3

显示对疣顶单胞锈菌的生长很强抑制作用的肽:

<u>噬菌体肽克隆</u>	<u>序列</u>	<u>序列 ID 号:</u>
Pp 15	ADPCHMPPRMPPLPI	49
Pp 19	NHVSTLKTRHRLIPF	50
Pp 18	SSNAPPLSYPLLVP	51
Pp 31	TMARPIPTFLPPSL	52
Pp 6	TVAPTTHRHYVWSMD	53
Pp 16	VFTPMNLSPPFMQPP	54

表 4

显示对疣顶单胞锈菌的生长中等抑制作用的肽:

<u>噬菌体肽克隆</u>	<u>序列</u>	<u>序列 ID 号:</u>
Pp 55	AAGPNIPPPHRASTW	55
Pp 28	AHLYSGASLYRVYRS	56
Pp 56	GPPSILLAIGTSLT	57
Pp 50	LSSPYACALFVVKGA	58
Pp 39	RGWSVSHHSLMPVP	59
Pp 21	RSTASPQALNPLVAS	60
Pp 53	SLFFEVSRLVRLLS	61
Pp 2	SRWWRCVTMTQPCTT	62
Pp 37	VVALRWGWSPLRPPG	63

实施例 11: 使用细胞分裂素氧化酶作为蛋白质脚手架以传输所选肽至疣顶单胞锈菌感染豆类(菜豆)组织的部位

将 CKX 如上述修饰以融合表 3 和表 4 中的防御肽。进行土壤杆菌-

介导的菜豆的转化以提供表达每种肽的植物。转化的植物暴露于疣顶单胞锈菌中。感染的比例和严重程度与对照植物比较以确定防御肽针对病原体的效力。

实施例 12: 使用细胞分裂素氧化酶作为蛋白质脚手架以传输所选肽至豆薯层锈菌感染大豆(槽豆)组织的部位

将 CKX 如上述修饰以融合表 3 和表 4 中的防御肽。进行土壤杆菌介导的大豆的转化以提供表达每种肽的植物。转化的植物暴露于豆薯层锈菌中。感染的比例和严重程度与对照植物比较以确定防御肽针对病原体的效力。

结论

根据本发明的详细描述以及上述实施例，可理解，已实现了本发明的几个方面。

应理解，通过说明和实施例已详细描述了本发明，目的是使本领域其他技术人员熟悉本发明、其原理以及其实际应用。本发明具体的制剂和方法并不限于提出的具体实施方案的描述，而宁可说是根据所附权利要求书及其等价物看待这些描述和实施例。当以上的某些实施例和描述包含某些关于本发明可能起作用的方式的结论时，本发明者并不意欲受那些结论和作用约束，而仅作为可能的解释将其提出。

应进一步理解，本发明提出的具体实施方案并不意味着是无遗漏的或者限制本发明的，而根据前述实施例和详细描述，其很多替换、修饰和变化对本领域普通技术人员将是显而易见的。因此，本发明的意图是包括所有那些落在以下权利要求的精神和范畴内的替换、修饰和变化。

参考文献

以下文献以引用的方式并入本文，如同本文将其全部内容公开的程度一样：

- Barbas, C.F., III, Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (2001). Phage Display (噬菌体展示). A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Bishop-Hurley, S. L., Schmidt, F.J., Erwin, A.L., and Smith, A.L. (2005). Peptides Selected for Binding to a Virulent Strain of *Haemophilus influenzae* by Phage Display Are Bactericidal (为了通过噬菌体展示选择的结合流感嗜血杆菌的有毒菌株的肽是杀菌性的). *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 2972-2978.
- Bishop-Hurley, S., Schmidt, F.J., Smith, G.P., Morris, R.O., Elder, J., Roop, P., and English, J.T. 2002. Phage display peptides that disrupt life-stage progression in *Phytophthora* (破坏疫霉菌属生命阶段进展的噬菌体展示肽). *App. Env. Micro.* 68:3315-3320.
- Bonde, M.R., Melching, J.S., and Bromfield, K.R. 1976. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust (大豆和豆薯层锈菌之间的感病体-病原体关系的组织学，大豆锈病的根源). *Phytopathology* 66:1290-1294.
- Cwirla, S.E., Peters, E. A., Barrett, R. W., and Dower, W.J. (1990). Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands (噬菌体上的肽：鉴别配体的大量肽库). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382.
- Fang, Z, Mounter, S. Simon, M., Schmidt, F.J., and English, J.T. (2004). Protein scaffold design for delivery of peptides that induce encystment of *Phytophthora capsici* zoospores (传输诱导辣椒疫霉菌游动孢子成囊的蛋白质脚手架设计). Abstract presented at the NSF *Phytophthora* Molecular Genetics Workshop. New Orleans, LA.
- Healy, J.M., Murayama, O., Maeda, T., Yoshino, K., Sekiguchi, K., and Kikuchi, M. (1995). Peptide ligands for integrin V3 selected from

- random phage display libraries (选自随机噬菌体展示库的整合素 V3 的肽配体). *Biochemistry* 34:3948-3955.
- Hollier, C.A., and King. S.B. 1985. Effects of temperature and relative humidity on germinability and infectivity of *Puccinia polysora* uredospores (温度和相对湿度对多堆柄锈菌夏孢子的发芽力和传染性的影响). *Plant Dis.* 69:937-939.
- Koch, E., and Hoppe, H.H. 1988. Development of infection structures by the direct- penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) On artificial membranes (在人工膜上直接渗透大豆锈菌(豆薯层锈菌)的感染结构的开发). *J. Phytopathol.* 122:232-244.
- Koivunen, E., Gay, D. A., Ruoslahti, E. (1993). Selection of peptides binding to the 51 integrin from phage display library (从噬菌体展示库选择与 51 整合素结合的肽). *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210
- Koivunen, E., Wang, B., and Ruoslahti, E. (1994). Isolation of a highly specific ligand for the 51 integrin from phage display library (从噬菌体展示库分离 51 整合素的高特异性配体). *J. Cell Biol.* 124:373-380.
- Laskey, J.T., Bishop-Hurley, S., Mounter, S.A., English, J.T., and Schmidt, F.J. (200). Phage-display peptides that disrupt developmental progression of *Phytophthora* species (破坏疫霉菌属发育进行的噬菌体展示肽). *Phytopathology* 91: S53.
- Morris, R.O. 1997. Hormonal regulation of seed development (种子发育的激素调节), ppl 17-149 in: Larkins, B.A., and Vasil, I.K., eds. *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Kluwer Academic Publ., Boston.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize (从玉米中分离糖基化细胞分裂素氧化酶编码基因). *Biochemical & Biophysical Research Communications* 255: 328-333.
- O'Neil, K.T., Hoess, R.H., Jackson. S.A., Ramachandran, N.S., Mousa, S.A., and DeGrado, W.F. (1992). Identification of novel peptide antagonists

for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage display library (从构象上约束的噬菌体展示库鉴别新的 GPIIb/IIIa 肽拮抗剂).
Proteins 14:509-515.

Pasqualini, R., Koivunen, E., Ruoslahti, E. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural mimic of an RGE-binding site on integrins (从噬菌体展示库分离的肽是整合素上结合 RGE 部位的结构模拟物). J. Cell Biol. 130:1189-1196.

Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. 1996. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries (使用噬菌体展示肽库的体内器官靶向).
Nature. 380:364-366.

Rizvi, A. 2004. Soybean Rust Colloquium, Annual Meeting of the Southern Soybean Disease Workers, St. Louis, MO.

Scott, J.K., and Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library (利用表位库筛选肽配体). Science 249:386-390.

Smith, J.W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., and Barbas III, CF. (1994). Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins (建立作为整合素的粘附配体的合成抗体). J. Biol. Chem. 269:32788-32795.

Wilson, D.R., and Finlay, B.B. 1998. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology (噬菌体展示: 在噬菌体和宿主生物中的应用、新方法和问题). Can. J. Microbiol. 44:313-329.

- <110> University of Missouri
ENGLISH, JAMES T
SCHMIDT, FRANCIS J
STACEY, GARY
ZHIWEI, FANG
- <120> 针对豆薯层锈菌和疣顶单胞锈菌的噬菌体展示植物防御肽
- <130> Matter 438962
- <150> 10/829,549
<151> 2001-04-10
- <150> 60/195,785
<151> 2000-04-10
- <160> 63
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 33
<212> PRT
<213> 类型88丝状细菌噬菌体
- <220>
<221> 变体
<222> (9)..(23)
<223> x是由密码子NNK编码的任一氨基酸,其中N是A、T、C或G;
且K指定为G或T
- <400> 1
- Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
- Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ala Glu Gly Asp Asp Pro Ala Lys
20 25 30
- Ala
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 引物

<220>
<221> 混合特征
<222> (1)..(20)
<223> 引物

<400> 2
ggagccttta attgtatcgg
20

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 3
agtagcagaa gcctgaaga
19

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 4
Ala Ala Pro Asp Leu Gln Asp Ala Met
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 5
Ala Asp Arg Leu Asn Ser Asp Ala Gly
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 6

Ala Asp Arg Pro Ser Thr Thr Ser Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 7

Ala Asp Pro Pro Arg Thr Val Ser Thr
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 8

Ala Asp Arg Pro Ser Met Ser Pro Thr
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 9

Ala Asp Arg Thr Ser Asn Ala Ser Thr
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 10

Ala Asp Lys Ser Tyr Ile Pro Ser Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 11

Ala Val Arg Asn Pro Ser His His Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 12

Ala Asp Pro Thr Pro Arg Gly His Ser
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 13

Ala Asp Pro Thr Arg Gln Pro His Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 14

Ala Glu His Gln Asn Ser Ala Gly Pro
1 5

<210> 15
<211> 10

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 15

Ala Asp Ala Arg Ser Ala Gly Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 16

Ala Asp Ser Lys Asn Ala Gly Pro Met
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 17

Ala Glu Thr Lys Phe Ser Gly Ser Ala
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 18

Ala Asp Pro Lys Gly Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 19

Ala Gly Leu Thr Ser Pro Asn Asp Met
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 20

Ala Asp Ile Thr Asp Pro Met Gly Ala
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 21

Ala Val Gly Thr His Thr Pro Asp Ser
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 22

Ala Val Ser Pro Asn Val His Asp Gly
1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 23

Val Ala Ala Phe Ser Leu Val Trp Ala Thr His Leu Met Leu Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 24

Leu Thr Arg Cys Leu Val Ser Thr Glu Met Ala Ala Arg Arg Pro
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 25

Ser Ala Pro Tyr Leu Pro Tyr Phe Asp Leu Leu His Phe Pro Ile
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<220>
<221> 变体
<222> (14)..(14)
<223> x=未知氨基酸

<400> 26

Pro Ser Ser Tyr Glu Ala Ser Arg Arg Pro Glu His Trp Xaa Phe
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 27

Ser Ala Thr Asp Thr Thr Leu Pro Met Met Thr Ala Ile Arg Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> x = 未知氨基酸

<400> 28

Thr Arg Leu Ser Pro Met Glu Ser Xaa Ala Met Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 29

Leu Leu Pro Val Ser Pro Pro Phe Ala Pro Asn Ala Ser Ser Thr
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 30

Met Ser Asn Phe Pro Thr Ser His Ala Pro Cys Pro Val Glu Ile
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 31

Glu Phe Arg Lys Asn Tyr Pro Ser Ala Ala Pro Leu Ile Pro Arg
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> x = 未知氨基酸

<400> 32

Pro Xaa Val His Gly Ser Ile Pro Leu Thr Pro Pro Leu Gly Phe
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (3)..(3)

<223> x = 未知氨基酸

<400> 33

Leu Phe Xaa Cys Tyr Pro Pro Cys Thr Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (14)..(14)

<223> x = 未知氨基酸

<400> 34

Met Ser Asn Phe Pro Thr Ser His Ala Pro Cys Pro Val Xaa Ile
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 35

Pro Glu Trp Lys Ser Ser Trp Ser Pro Cys Thr Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (11)..(11)

<223> x 是 M 或 I

<400> 36

Ala Met Ser Arg Trp Leu Arg Pro Arg Glu Xaa Asn Ala Pro Pro
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (6)..(6)

<223> x = 未知肽

<220>

<221> 变体

<222> (10)..(10)

<223> x = 未知肽

<400> 37

Thr His Thr Thr Phe Xaa Val Thr Val Xaa Leu His Glu Pro Pro
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<220>

<221> 变体

<222> (6)..(6)

<223> x = 未知肽

<220>

<221> 变体

<222> (10)..(10)

<223> x = 未知肽

<400> 38

Thr His Thr Thr Phe Xaa Val Thr Val Xaa Leu His Glu Pro Pro
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 39

Pro Thr Leu Gly Arg Phe Asn Arg Pro Ser Cys Ser Ile Ile Val
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 40

Ala Pro Gln Cys His Pro His Leu Pro Phe Asp Met Ile His Val
1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<220>
 <221> 变体
 <222> (12)..(12)
 <223> x = 未知肽

<400> 41

Asn His Asn Ser Leu Pro Ala Gln Tyr Leu Val Xaa Ile Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 42

Asp Gln Pro Cys Thr Pro Ser Pro Asp Val Ser Phe Tyr Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 43

Val Ala Ala Pro Ser His Trp Leu Lys Pro Ser Leu Asp Cys Phe
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 44

Asn Pro Leu Tyr Lys Asn Pro Pro Pro Arg Val Ala Met Cys Leu
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 45

Leu Ile Phe Arg Tyr Ala Pro Pro Pro Leu Phe Leu Arg Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 编码肽Pc87的DNA+链

<400> 46
 agctagcaga tagacatca atgtcaccaa catagt
 36

<210> 47
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 编码肽Pc87的DNA-链

<400> 47
 ctagactatg ttggtgacat tgatggtcta tctgct
 36

<210> 48
 <211> 611
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽Pc87

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(1)
 <223> Mat- α 分泌序列

<220>
 <221> 结构域
 <222> (1)..(1)
 <223> 细胞分裂素氧化酶1

<220>

<221> 结构域

<222> (1)..(1)

<223> 连接物

<220>

<221> 结构域

<222> (1)..(1)

<223> 随机肽Pc87

<400> 48

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Asp Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Leu Ala Ala Gly Thr Pro Ala Leu Gly Asp Asp
85 90 95

Arg Gly Arg Pro Trp Pro Ala Ser Leu Ala Ala Leu Ala Leu Asp Gly
100 105 110

Lys Leu Arg Thr Asp Ser Asn Ala Thr Ala Ala Ala Ser Thr Asp Phe
115 120 125

Gly Asn Ile Thr Ser Ala Leu Pro Ala Ala Val Leu Tyr Pro Ser Thr
130 135 140

Gly Asp Leu Val Ala Leu Leu Ser Ala Ala Asn Ser Thr Pro Gly Trp
145 150 155 160

Pro Tyr Thr Ile Ala Phe Arg Gly Arg Gly His Ser Leu Met Gly Gln
165 170 175

Ala Phe Ala Pro Gly Gly Val Val Val Asn Met Ala Ser Leu Gly Asp
180 185 190

Ala Ala Ala Pro Pro Arg Ile Asn Val Ser Ala Asp Gly Arg Tyr Val
195 200 205

Asp Ala Gly Gly Glu Gln Val Trp Ile Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu
210 215 220

Ala Arg Gly Val Ala Pro Arg Ser Trp Asn Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr
225 230 235 240

Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe Arg
245 250 255

His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly
260 265 270

His Gly Glu Met Val Thr Cys Ser Lys Gln Leu Asn Ala Asp Leu Phe
275 280 285

Asp Ala Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Val Ile Thr Arg Ala
290 295 300

Arg Ile Ala Val Glu Pro Ala Pro Ala Arg Ala Arg Trp Val Arg Phe
305 310 315 320

Val Tyr Thr Asp Phe Ala Ala Phe Ser Ala Asp Gln Glu Arg Leu Thr
325 330 335

Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Gly Ala Ser Phe Gly Pro Met Ser Tyr
340 345 350

Val Glu Gly Ser Val Phe Val Asn Gln Ser Leu Ala Thr Asp Leu Ala
355 360 365

Asn Thr Gly Phe Phe Thr Asp Ala Asp Val Ala Arg Ile Val Ala Leu
370 375 380

Ala Gly Glu Arg Asn Ala Thr Thr Val Tyr Ser Ile Glu Ala Thr Leu
385 390 395 400

Asn Tyr Asp Asn Ala Thr Ala Ala Ala Ala Val Asp Gln Glu Leu
405 410 415

Ala Ser Val Leu Gly Thr Leu Ser Tyr Val Glu Gly Phe Ala Phe Gln
420 425 430

Arg Asp Val Ala Tyr Ala Ala Phe Leu Asp Arg Val His Gly Glu Glu
435 440 445

Val Ala Leu Asn Lys Leu Gly Leu Trp Arg Val Pro His Pro Trp Leu
450 455 460

Asn Met Phe Val Pro Arg Ser Arg Ile Ala Asp Phe Asp Arg Gly Val
465 470 475 480

Phe Lys Gly Ile Leu Gln Gly Thr Asp Ile Val Gly Pro Leu Ile Val
485 490 495

Tyr Pro Leu Asn Lys Ser Met Trp Asp Asp Gly Met Ser Ala Ala Thr
500 505 510

Pro Ser Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Ser Leu Leu Phe Ser Ser Val
515 520 525

Ala Pro Asn Asp Leu Ala Arg Leu Gln Glu Gln Asn Arg Arg Ile Leu
530 535 540

Arg Phe Cys Asp Leu Ala Gly Ile Gln Tyr Lys Thr Tyr Leu Ala Arg
545 550 555 560

His Thr Asp Arg Ser Asp Trp Val Arg His Phe Gly Ala Ala Lys Trp
565 570 575

Asn Arg Phe Val Glu Met Lys Asn Lys Tyr Asp Pro Lys Arg Leu Leu
580 585 590

Ser Pro Gly Gln Asp Ile Phe Asn Lys Leu Ala Asp Arg Pro Ser Met
595 600 605

Ser Pro Thr
610

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 随机肽插入物

<400> 49

Ala Asp Pro Cys His Met Pro Pro Arg Met Pro Pro Leu Pro Ile

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 54

Val Phe Thr Pro Met Asn Leu Ser Pro Pro Phe Met Gln Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 55

Ala Ala Gly Pro Asn Ile Pro Pro Pro His Arg Ala Ser Thr Trp
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 56

Ala His Leu Tyr Ser Gly Ala Ser Leu Tyr Arg Val Tyr Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 随机肽插入物

<400> 57

Gly Pro Pro Ser Ile Leu Leu Ala Ile Gly Thr Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 58

Leu Ser Ser Pro Tyr Ala Cys Ala Leu Phe Val Val Lys Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 59

Arg Gly Trp Ser Val Ser His His Ser Leu Leu Met Pro Val Pro
 1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 60

Arg Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Leu Asn Pro Leu Val Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 61

Ser Leu Phe Phe Glu Val Ser Arg Met Leu Val Arg Leu Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 62

Ser	Arg	Trp	Trp	Arg	Cys	Val	Thr	Met	Thr	Gln	Pro	Cys	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 随机肽插入物

<400> 63

Val	Val	Ala	Leu	Arg	Trp	Gly	Trp	Ser	Pro	Leu	Arg	Pro	Pro	Gly
1				5					10					15

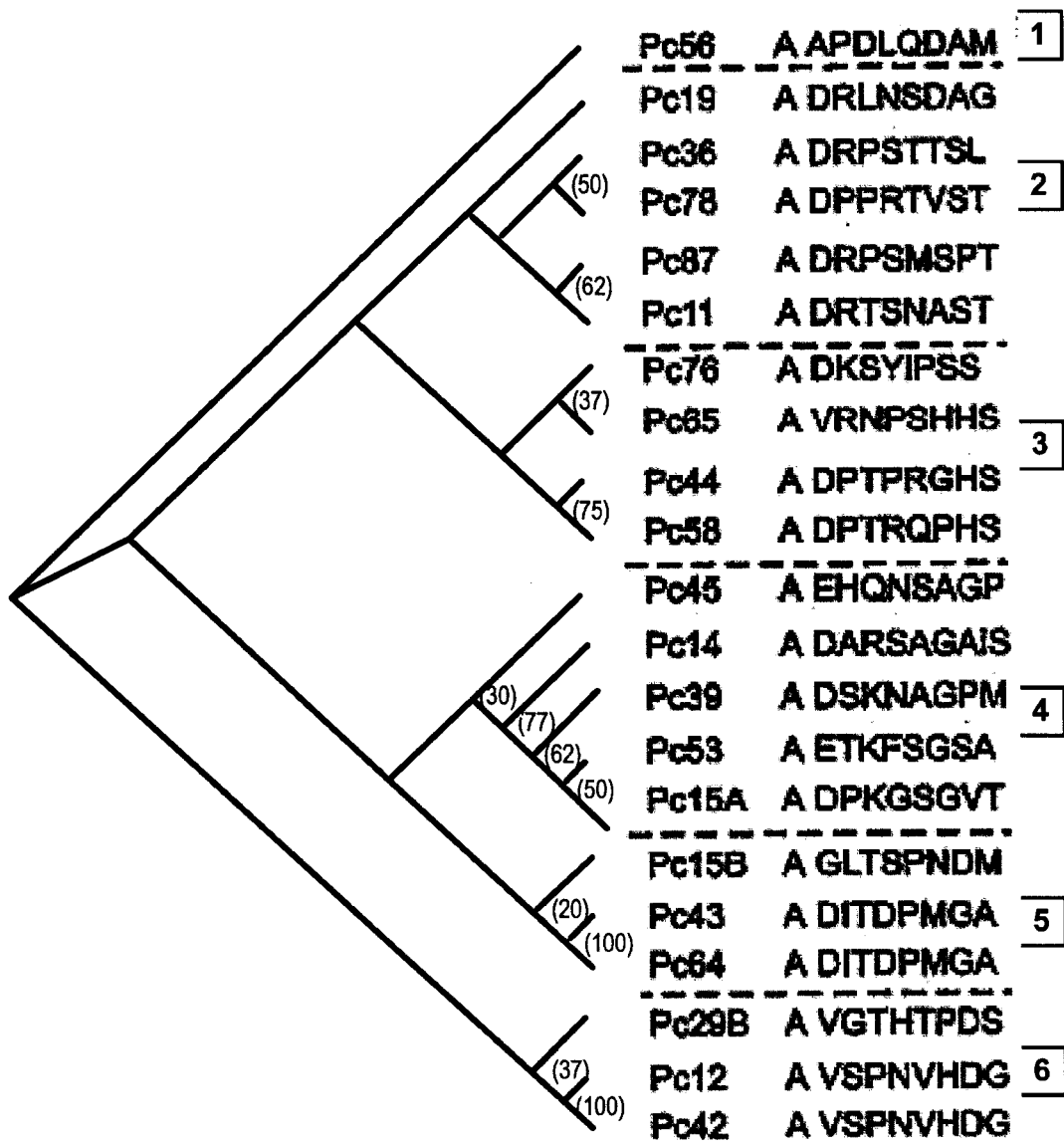


图 1

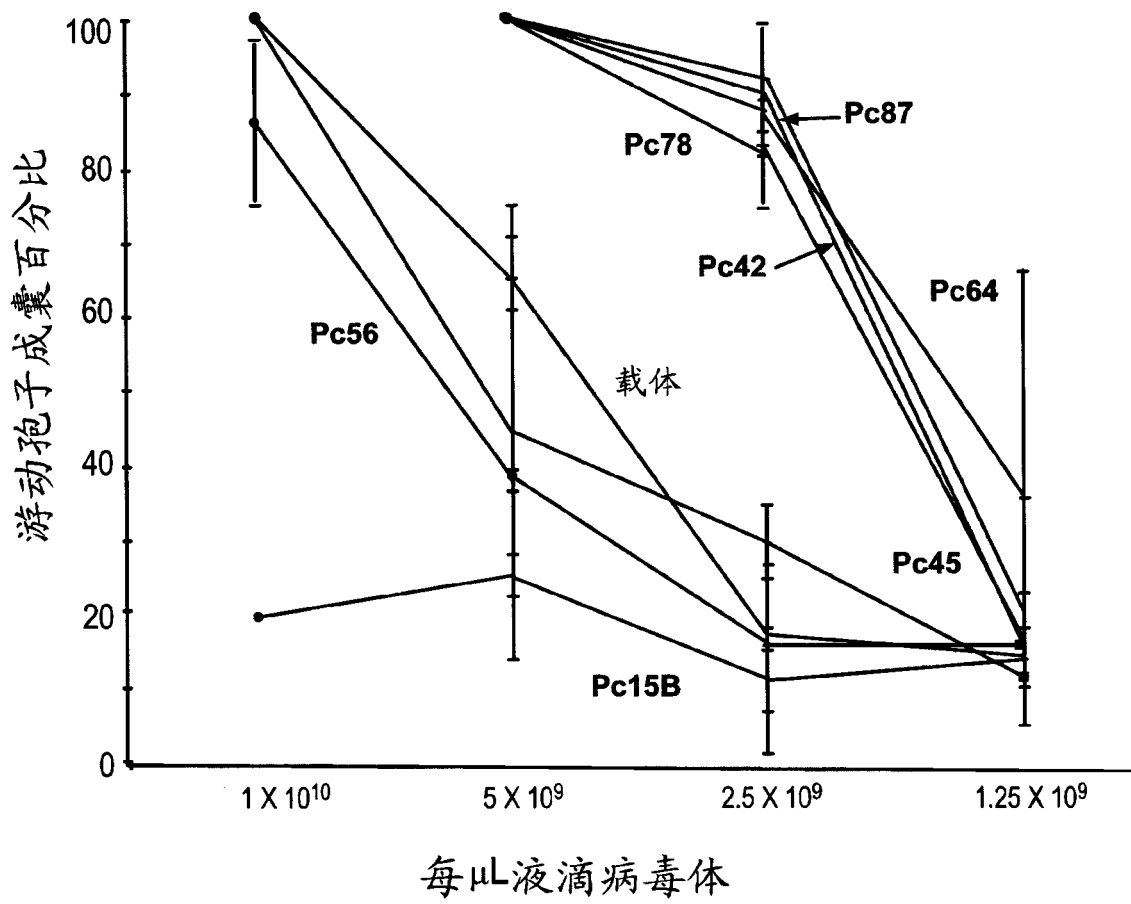


图 2

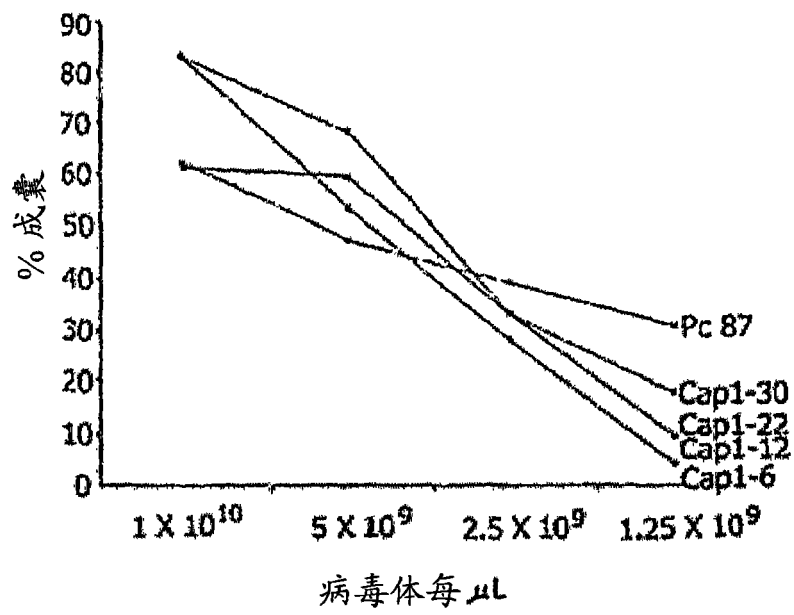


图 3

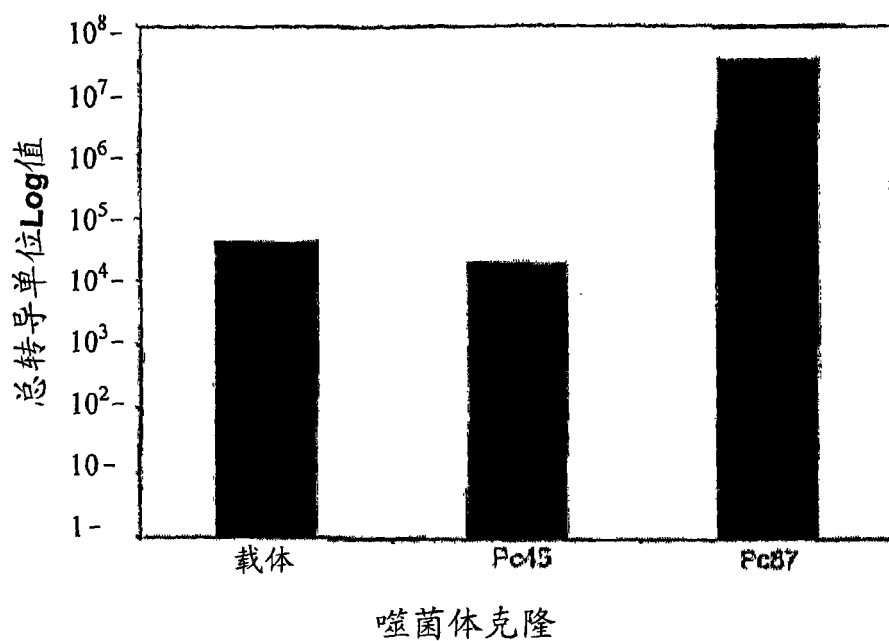


图 4

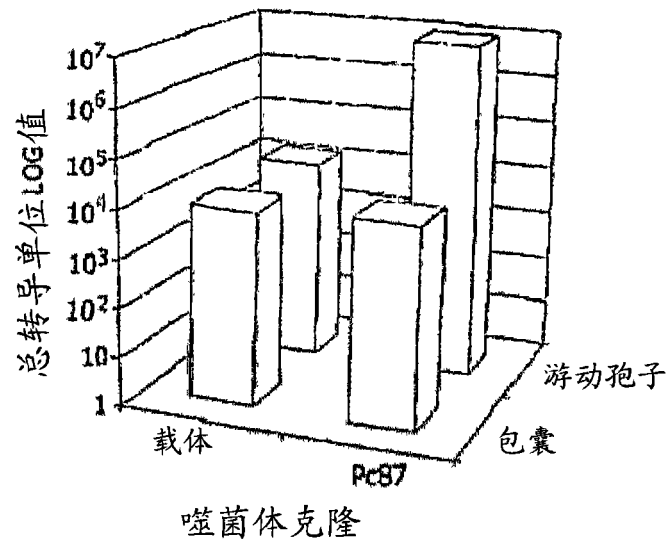
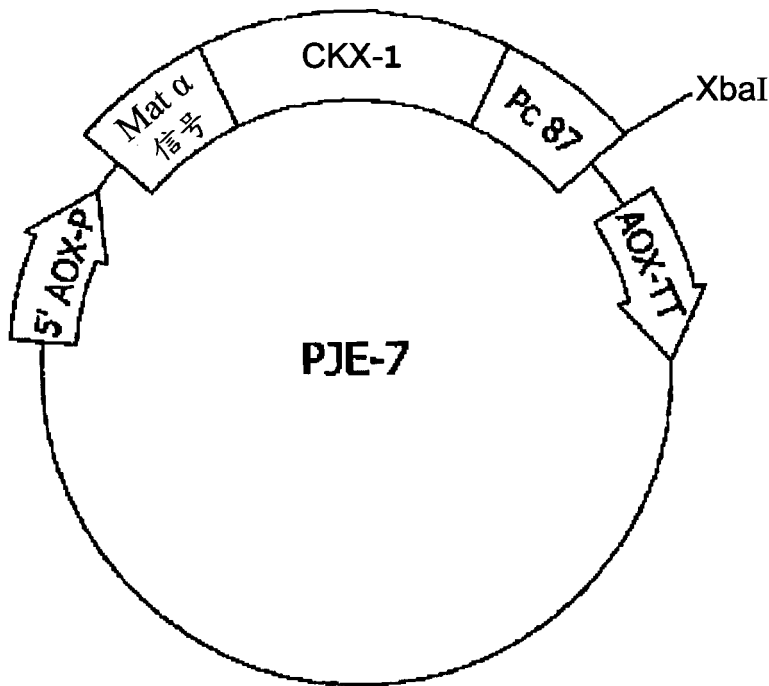


图 5



5' AG CTA GCA GAT AGA CCA TCA ATG TCA CCA ACA TAG T 3'
 3' T CGT CTA TCT GGT AGT TAC AGT GGT TGT ATC AGA TC 5'

图 6

<u>MRFPSIFTAV</u>	<u>LFAASSALAA</u>	<u>PVNTTTEDET</u>	<u>AQIPADAVIG</u>	<u>YSDLEGDFDV</u>
<u>AVLPFSNSTN</u>	<u>NGLLFINTTI</u>	<u>ASIAAKEEGV</u>	<u>SLEKRLAAGT</u>	<u>PALGDDRGRP</u>
<u>WPASLAALAL</u>	<u>DGKLRTDSNA</u>	<u>TAAASTDFGN</u>	<u>ITSALPAAVL</u>	<u>YPSTGDLVAL</u>
<u>LSAANSTPGW</u>	<u>PYTIAFRGRG</u>	<u>HSLMGQAFAP</u>	<u>GGVVVNMASL</u>	<u>GDAAAPPRIN</u>
<u>VSADGRYVDA</u>	<u>GGEQVWIDVL</u>	<u>RASLARGVAP</u>	<u>RSWYDYLTL</u>	<u>VGGTLSNAGI</u>
<u>SGQAFRHGPQ</u>	<u>ISNVLEMDVT</u>	<u>TGHGEMVTCS</u>	<u>KQLNADLFDA</u>	<u>VLGGLGQFGV</u>
<u>ITRARIAVEP</u>	<u>APARARWVRF</u>	<u>VYTDFAAFSA</u>	<u>DQERLTAPRP</u>	<u>GGGASFGPM</u>
<u>SYVEGSVFN</u>	<u>QSLATDLANT</u>	<u>GF'TDADVAR</u>	<u>IVALAGERNA</u>	<u>TTVYSIEATL</u>
<u>NYDNATAAAA</u>	<u>AVDQELASVL</u>	<u>GTLSYVEGFA</u>	<u>FQRDVAYAAF</u>	<u>LDRVHGEEVA</u>
<u>LNKLGLWRVP</u>	<u>HPWLNMFVPR</u>	<u>SRIADFDRGV</u>	<u>FKGILQGTDI</u>	<u>VGPLIVYPLN</u>
<u>KSMWDDGMSA</u>	<u>ATPSEDVFYA</u>	<u>VSLLESSVAP</u>	<u>NDLARLQEQN</u>	<u>RRILRFCDLA</u>
<u>GIQYKTYLAR</u>	<u>HTDRSDWVRH</u>	<u>FGAAKWNRFV</u>	<u>EMKNKYDPKR</u>	<u>LLSPGQDIFN</u>
<u>KLADRPSMSP</u>	T			

图 7

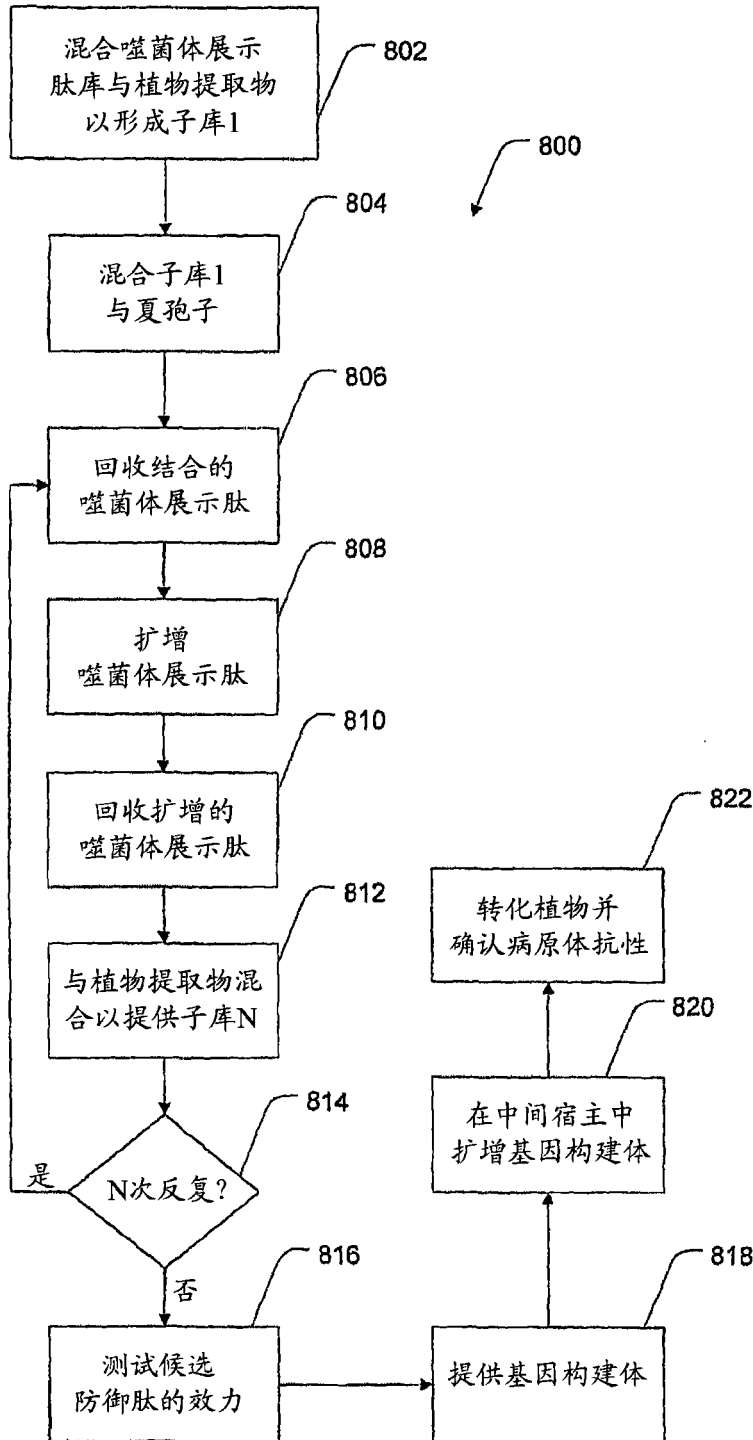


图 8

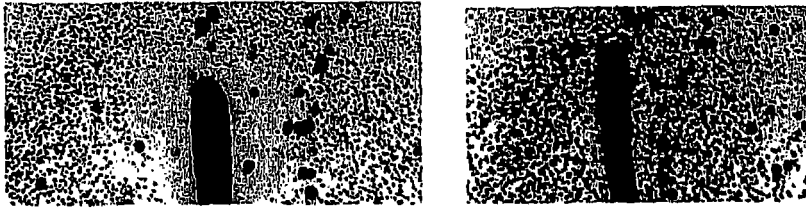


图 9

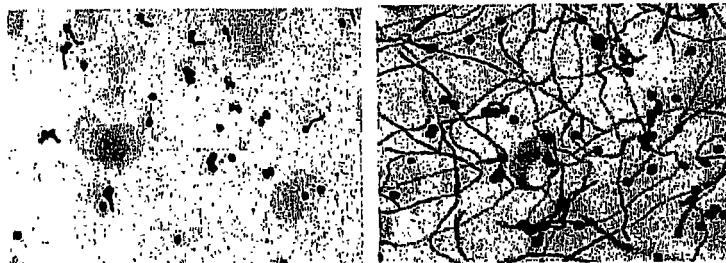


图 10

专利名称(译)	针对豆薯层锈菌和疣顶单胞锈菌的噬菌体展示植物防御肽		
公开(公告)号	CN101473226A	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN200680036777.7	申请日	2006-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	密苏里大学管委会		
申请(专利权)人(译)	密苏里大学管委会		
当前申请(专利权)人(译)	密苏里大学管委会		
[标]发明人	詹姆士T英格利希 弗朗西斯J施米特 加里斯泰希 方志伟		
发明人	詹姆士·T·英格利希 弗朗西斯·J·施米特 加里·斯泰希 方志伟		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/70		
CPC分类号	C07K14/415 C12N15/8282 C12N15/8257 C12N15/1037		
代理人(译)	韩克飞		
优先权	60/704933 2005-08-02 US		
其他公开文献	CN101473226B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明提供了鉴别与真菌表面有亲和力的肽的方法，同时也是鉴别能够影响真菌发育的肽的方法。还提供了包含使用本发明方法鉴别的肽的组合物。此外，提供了能够表达根据本发明方法鉴别的肽的分离的多核苷酸、载体、表达盒以及转化的细胞。

```

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPADAVIG YSDLEGDFDV
AVLPFSNSTN NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKRLAAGT PALGDDRGRP
WPASLAALAL DGKLRDTSNA TAAASTDFGN ITSALPAAVL YPSTGDLVAL
LSAANSTPGW PYTIAFRGRG HSLMGQAFAP GGVVVNMASL GDAAAPPRIN
VSADGRYVDA GGEQVWIDVL RASLARGVAP RSWNDYLYLT VGGTLSNAGI
SGQAFRHGPO ISNVLEMDVT TGHGEMVTC S KQLNADLFDA VLGGLGQFGV
ITRARIAVEP APARARWVRF VYTDFAAFSA DQERLTAPRP GGGGASFGPM
SYVEGSVFNV QSLATDLANT GFFTDADVAR IVALAGERNA TTVYSIEATL
NYDNATAAAA AVDQELASVL GTLSYVEGFA FORDVAYAAF LDRVHGEEVA
LNKLGWRVVP HPWLNMFVPR SRIADFDRGV FKGILQGTDI VGPLIVYPLN
KSMWDDGMSA ATPSEDFVYA VSLLFSSVAP NDLARLQEQN RRILRPCDLA
GIQYKTYLAR HTDRSDWVRH FGAAKWRFV EMKNKYDPKR LLSPGQDIFN
KLADRPSMSP T
  
```