

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

A01H 5/00 C12N 5/04

C12N 15/29 C12N 15/54

C12N 15/82



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96193703.3

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1154737C

[22] 申请日 1996.2.20 [21] 申请号 96193703.3

[30] 优先权

[32] 1995. 3. 29 [33] US [31] 08/413,135

[86] 国际申请 PCT/US1996/002313 1996.2.20

[87] 国际公布 WO1996/029858 英 1996.10.3

[85] 进入国家阶段日期 1997.11.3

[71] 专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 R·M·阿马西诺 S·甘

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 3 页

[54] 发明名称 衰老特性被改变的转基因植物

[57] 摘要

本发明公开了一种遗传构建物，包含与一段编码蛋白质的 DNA 序列可操作地连接的 SAG12 启动子序列，该序列并非天然地与该启动子序列连接。较好的是，该 SAG12 启动子序列是序列 2 (SEQ ID NO.2) 的开头 602bp，而蛋白质编码序列编码的是异戊烯基转移酶。

ISSN 1008-4274

1. 一种遗传构建物，它包含衰老特异性启动子序列和与之操作性连接的蛋白质编码 DNA 序列，所述启动子序列是 SAG12 启动子序列，所述 SAG12 启动子包含
5 SEQ ID NO:2 的 1-602bp，所述蛋白质编码 DNA 序列并不天然与所述启动子序列相关联。
2. 根据权利要求 1 所述的构建物，其中的蛋白质编码序列编码一种植物激素合成酶。
3. 根据权利要求 2 所述的构建物，其中的蛋白质编码序列编码催化植物激素
10 细胞分裂素合成的酶。
4. 根据权利要求 3 所述的构建物，其中的蛋白质编码序列编码异戊烯基转移酶。
5. 根据权利要求 1 所述的构建物，它还包含 SAG12-1 的 5'非翻译区。
6. 一种遗传构建物，它包含一个如权利要求 1 所述的 SAG12 启动子，该启动
15 子与编码催化细胞分裂素合成的酶的 DNA 序列可操作地连接。
7. 根据权利要求 6 所述的构建物，其中的 DNA 序列编码异戊烯基转移酶。
8. 一种细胞，它包含权利要求 1 所述的构建物。
9. 一种细胞，它包含权利要求 6 所述的构建物。
10. 一种制造转基因植物的方法，包括用权利要求 1 所述的构建物转化植物
20 细胞。
11. 根据权利要求 10 所述的方法，包括用权利要求 2 所述的构建物转化植物细胞。
12. 根据权利要求 11 所述的方法，包括用权利要求 3 所述的构建物转化植物细胞。
- 25 13. 根据权利要求 11 所述的方法，包括用权利要求 4 所述的构建物转化植物细胞。

衰老特性被改变的转基因植物

发明领域

5 本发明主要涉及植物分子生物学领域。具体地说，本发明涉及被发育特异性启动子激活的插入基因的转基因植物。

技术背景

叶衰老是细胞发生特殊代谢和结构改变直至死亡的一个发育阶段(Nooden, 植物的衰老和老化(Senescence and Aging in Plants), (L. D. Nooden 和 A. C. Leopold, 编), pp.391-439, Academic Press, San Diego, CA, 1988)。这是植物生活周期中的一个重要阶段, 被认为通过将营养物质重新循环到生长活跃的区域而有益于植物的健康。叶衰老可能由许多外因诱导, 例如避光、缺乏无机盐、干旱和病原体侵染(Thomas 等, 植物生理学年鉴(Ann. Rev. Plant Physical.)31:83-111, 1980), 也可能是由种子的发育之类的发育过程(Nooden, 1988, 同上)诱导的。没有上述因素时, 在许多种植物中, 叶衰老以年龄依赖型方式发生(Batt 等, 实验植物学杂志(J. Exp. Bot.) 26:569-579, 1975; Hensel 等, 植物细胞(Plant Cell)5:553-564, 1993; Jiang 等, 植物生理学(Plant Physicol.) 101:105-112, 1993)。

生理学及遗传学研究显示, 衰老是一个很有规律的过程(Nooden, 1988, 同上; Thomas, 1980, 同上)。叶衰老进程通过因叶绿素损失而导致枯黄表现出来, 这是叶绿体分解的结果(Thomson 等, 植物的衰老: 其生物化学及生理学(Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology)pp.20-30, 1987; Woolhouse, 加拿大植物学杂志(Can. J. Bot.)62:2934-2942, 1984)。叶衰老涉及蛋白质、核酸及膜的降解, 以及营养物质因这些降解而运输到植物的其它器官例如发育中的种子, 叶或贮藏器官(Nooden 1988, 同上; Woolhouse, 1984, 同上)。

25 分子研究显示, 基因表达的改变与衰老程序有关。在衰老过程中, 编码与光合作用相关的蛋白质的 mRNA 水平下降(Bate 等, 实验植物学杂志(J. Exp. Bot.)42:801-811, 1991; Hensel 等, 植物细胞(Plant Cell)5:553-564, 1993; Jiang 等, 植物生理学(Plant Physicol.)101:105-112, 1993), 而编码与衰老程序相关的蛋白质的基因的 mRNA 水平上升(Graham 等, 植物细胞(Plant Cell)4:349-357, 1992; Hensel 等, 植物细胞(Plant Cell)5:553-564, 1993; Kamachi 等, 植物生理学(Plant Physicol.)93:1323-1329, 1992; Taylor 等, 美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:5118-5122, 1993)。几种在营养物质的降解和代谢中起作用的酶的活性也被证实在衰老过程中有所上升(Blank 等, 植物生理学

(Plant Physicol.)97:1409-1413, 1991; Debellis 等, 植物细胞生理学(Plant Cell Physicol.)32:1227-1235, 1991; Friedrich 等, 植物生理学(Plant Physicol.)65:1103-1107, 1980; Pistelli 等, 植物生理学杂志(J. Plant Physicol.)19:723-729, 1992)。

5 虽然已经知道了衰老过程中的一般变化,但是有关营养物质的再转移如何发生的许多生化细节仍然不确定。而且,对于伴随衰老的基因表达的改变是如何调控的知之甚少。

在植物分子生物学领域需要有一种在植物发育的衰老阶段启动基因表达的启动子。

作为达到该目标的第一步,我们研究了拟南芥叶衰老阶段发生的大分子改变。拟南芥中叶衰老的开始由叶龄确定(Hensel 等, 同上)。拟南芥中叶衰老的这种可预测性方便了在完整植株中对与自然发生的叶衰老有关的 RNA、叶绿素、蛋白质和基因表达的改变所进行的整体研究。我们还使用该体系分离和鉴定了丰度增加和减少的 mRNA 在叶衰老过程中时序表达方式。这些衰老特异性 mRNA 使得我们能够如后文所述分离和鉴定新的衰老特异性启动子。

15 发明综述

本发明涉及一种遗传构建物,包含与一段编码蛋白质的 DNA 序列可操作地连接的 SAG12 启动子序列,该序列并非天然地与该启动子序列连接。较好的是,该 SAG12 启动子是 SAG12-1 序列。最好是, SAG12 启动子是 SEQ ID NO:2 的开头 602bp,所述蛋白质编码 DNA 序列并不天然与所述启动子序列相关联。该蛋白质编码序列可以编码,例如,异戊烯基转移酶。

20 本发明还涉及一种遗传构建物,它包含本发明所述的 SAG12 启动子,该启动子与编码催化细胞分裂素合成的酶的 DNA 序列可操作地连接。

本发明还涉及包含本发明所述的遗传构建物。

25 本发明还涉及一种制造转基因植物的方法,包括用本发明所述的构建物转化植物细胞。

本发明还涉及包含这种遗传构建物的细胞或植物。

本发明的目的之一是提供一种遗传构建物,它包含与蛋白质编码序列可操作地连接并启动衰老特异性基因表达的启动子序列。

30 本发明的目的之二是提供与一种酶的编码序列连接的衰老特异性启动子,该酶催化一种植物激素最好是细胞分裂素的合成。

本发明的目的之三是提供与异戊烯基转移酶序列连接的衰老特异性启动子。

本发明的目的之四是提供包含只在衰老组织中表达的转基因的转基因植物。

本发明的特征在于,基因表达可以特异性地定位于衰老组织,由此避免可能造成损伤的组成型表达。

35 阅读以下说明、附图和权利要求后,本发明的其它目的、优点和特征将是显而易见的。

附图说明

图 1 是一个二元载体中的 SAG12-1 启动子/GUS/MAS-ter 构建物图。

图 2 是一个二元载体中的 SAG12-1 启动子/IPT/NOS-ter 构建物图。

图 3 是 SAG12-1 启动子/IPT/NOS-ter 构建物的核酸序列。“a”和“b”标记对应于图 1 和图 2 中的“a”和“b”。

本发明的说明

本发明内容之一是一种遗传构建物，它包含与一段外源性基因序列可操作地连接的衰老特异性启动子，该外源性基因序列非天然地与该启动子相关。本发明鉴定了一个有用的衰老特异性启动子，在本文中定义为 SAG12。衰老特异性启动子的获得使得衰老形态学被改变例如延缓衰老的转基因植物的生成成为可能。这一发现提供了延长有用植物生长的机制。

后文对从拟南芥中分离特定的 SAG12 启动子 SAG12-1 进行了详细描述。简而言之，分离出与 SAG12 cDNA 对应的基因组克隆在一起的此处称为“SAG12”的衰老特异性 cDNA。从该基因组材料中分离出 SAG12-1 启动子。“SAG”表示衰老相关基因。

SEQ ID NO:1 和图 3 包含 SAG12-1 启动子的一种实施方式的序列。SEQ ID NO:2 描述了该启动子的截短形式。两种形式的 SAG12-1 启动子都足以按衰老特异性方式启动基因表达。

后文还描述了一种以相似方法分离自拟南芥的第二种衰老特异性启动子。第二种启动子在此表示为“SAG13”。SAG13 启动子也是从拟南芥基因组中分离的。SEQ ID NO:3 包含 SAG13 启动子核苷酸序列，其中包括转录起始位点上游的 1782 碱基对。

利用“衰老特异性启动子”来表示 SAG12-1 启动子和 SAG13 启动子能够在植物组织中以发育调控方式优先启动基因表达，从而基本上只在植物组织衰老时表达 3'蛋白质编码区。

较好的是，SAG12 启动子包含与 SEQ ID NO:2 的开头 602bp 具有足够同源性的核苷酸，从而使该启动子能够较好地衰老组织中表达基因。

较好的是，SAG13 启动子包含后文 SEQ ID NO:3 中的某一部分。虽然该完整序列对衰老特异性启动子活性来说已足够，但较短的序列可能也已足够。截短 SEQ ID NO:3，然后凭经验测试这些截短的衰老特异性启动子活性，由此可以方便地确定这种较短序列的边界。

后文中的实施例描述了来自拟南芥的衰老特异性 cDNA 克隆的产生、这些克隆的鉴定，以及使用这些 cDNA 克隆来获得特定的 SAG12 衰老特异性启动子 SAG12-1 和另

一启动子 SAG13。据信，适用于本发明的还有与 SAG12-1 或 SAG13 充分同源的其它衰老特异性启动子。利用以下所述的技术可以方便地得到这些同源启动子。

SAG12 启动子的创建

在后文实施例中描述了使用 SAG12 cDNA 克隆来分离 SAG12 启动子。该 cDNA 5 克隆是由似乎仅在衰老过程中表达的 RNA 获得的。

已经使用 SAG12 cDNA 筛选拟南芥文库来获得 SAG12 基因。该基因原先被表示为 SAG12-1，因为认为在拟南芥中有两个 SAG12 基因，但是现在认为只有一个。SAG12-1 启动子是从 SAG12-1 基因组克隆获得的。SEQ ID NO:1 和图 3 揭示了 SAG12-1 启动子的 2073bp 序列。此外，后文的研究还表明可以将 SAG12-1 启动子截短至 602bp 而仍然 10 具有功能。SEQ ID NO:2 描述与 SAG12-1 基因 5'非翻译区连接的 602bp。

有多条路径可以获得 SAG12 启动子。最简便的是根据 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 以及图 3 显示的序列合成一寡核苷酸探针，然后在拟南芥基因组文库中探测 SAG12 启动子的拷贝。

估计，少量的核苷酸增加、缺失和突变不影响 SAG12 启动子的功能。此外，由于 15 正常的等位变异，在拟南芥种群中可能存在 SAG12 基因(或 SAG13)及启动子序列中的变异。此外，很可能而且据估计，可以从其它植物中回收得到同源的序列。所以，合适的 SAG 启动子序列可能并不与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 完全一致。后文详细说明了一种测定方法，通过它可以确定一个候选基因组序列是否与衰老特异性 SAG12-1 启动子充分同源以适用于本发明。

此外，据估计，602bp 的 SEQ ID NO:1 可以进一步截短而仍然产生合适的 SAG12 20 启动子。本领域的一般技术人员很容易理解，可以从该 602bp 序列进行 5'或 3'的截短，或内部缺失，并对这些截短片段的衰老特异性活性进行经验测试，以找出 SAG12-1 启动子较小的截短形式。

较好的是，将 SAG12-1 的 5'非翻译区部分与启动子序列相加。SEQ ID NO:1 和 25 SEQ ID NO:2 显示了该序列。在图 3 中，5'非翻译区是标记+1 和“Nco I”之间的区域。

SAG13 启动子创建

用相同的方法分离和鉴定后文实施例中的 SAG13 启动子。同时考虑由等位变异等造成的 SAG13 序列中的变异。SAG12 与 SAG13 并不明显同源。

候选启动子的测定

一旦分离出一个候选基因组序列，就可能希望确定该 DNA 序列是否是 SAG12 启 30 动子或 SAG13 启动子。可以利用植物分子生物学中的常用方法来测序该 DAN 序列，以确定该序列是否与 SEQ ID NO:1，2 或 3 一致。如果候选序列与 SEQ ID NO:1 的开

头 2073bp、SEQ ID NO:2 的开头 602bp，或 SEQ ID NO:3 的开头 1782bp 一致或同源，那么该序列就是合适的 SAG12 启动子或 SAG13 启动子。

如果序列不一致但高度同源，即同源性超过 95%，可能分离到的是等位 SAG12 或 SAG13 启动子。可能希望进行一次功能测试来确定该序列是否与 SEQ ID NO:1 的开头 2073bp，SEQ ID NO:2 的开头 602bp，或 SEQ ID NO:3 的开头 1782bp 充分同源而适用于本发明。

“充分同源”指候选序列的核苷酸序列同源性至少为 95%，而且其在衰老植物组织中优先启动基因表达的能力与 SAG12-1 启动子序列基本相当。以下说明的是确定候选序列是否适用的测定法。

为了进行这种确定，可以根据以下所述的实施例将候选启动子与报道蛋白的编码序列例如编码 β -葡糖醛酸酶的 GUS 序列连接。美国专利 5,268,463 公开了 GUS 基因的序列。用包括 GUS 基因在内的表达盒转化植物可以确定 GUS 报道序列是否只在衰老组织中表达，是否被组成型表达，或根本没有表达。只有显示报道序列仅在衰老组织而在其它组织中表达的结果才表明是合适的启动子。

或者，如后文所述，可以将候选序列与异戊烯基转移酶序列连接后转化到烟草植株中。实施例的表 2 显示了用连接 IPT 基因的 SAG12 启动子转化的植株和包含 SAG12 启动子与 GUS 报道基因连接而成的构建物的转基因对照植株之间的具体差异。候选启动子必需表现出相当的功能才适用于本发明。

所以，候选启动子必需满足三条标准。第一，它必须可以用根据 SEQ ID NO:1 的开头 2073bp、SEQ ID NO:2 的开头 602bp 或 SEQ ID NO:3 的对应部分合成的寡核苷酸探针分离或杂交。第二，它必须与 SEQ ID NO:1 的开头 2073bp、SEQ ID NO:2 的开头 602bp 或 SEQ ID NO:3 的对应部分充分同源以启动报道基因例如 GUS 的衰老特异性表达。第三，它必须提供与实施列表 2 中所述的 SAG12 或 SAG13 启动子相当的衰老特异性表达。

25

创建遗传构建物

一旦获得了 SAG12 或 SAG13 启动子，创建的遗传构建物必须同时包含该启动子和一段蛋白质编码序列。“遗传构建物”用于描述一段可操作地连接的启动子和基因序列。通常，启动子序列是基因序列的 5'端或“上游”。启动子应该能够启动以基因序列为模板的转录活性。

合适的外源性基因序列能够表达一种 RNA 分子。该 RNA 分子可以被翻译或不被翻译成成熟蛋白质。为了表达反义 mRNA，“外源性基因序列”的可以是反义取向的。

较好的是，外源性基因序列编码一种蛋白质。

在本发明的一种实施方式中，外源性基因编码催化某种植物激素生物合成的酶，这种生物激素以细胞分裂素为佳。最好的是，酶是 IPT(异戊烯基转移酶)。

可以利用标准分子生物学方法将克隆得到的启动子与蛋白质的编码序列例如 IPT 序列连接。已经分离、测序并公开了多个编码 IPT 的基因。携有这些基因的菌株已经在 ATCC 保藏，并可以向其获取，同时包括已公开的序列信息，可以使用 PCR 及其它基因扩增和回收技术来分离 IPT 基因。IPT 序列的实例(同时被称为 tnr 或 tzs)存在于：Crespi 等，欧洲分子生物学协会杂志(EMBO J.)11:795-804(1992); Goldberg 等，核酸研究(Nucleic Acid. Res.)12:4665-4677(1984); Heide Kamp 等，核酸研究(Nucleic Acid. Res.)11:6211-6223(1983); Strabala 等，分子和普通遗传学(Mol. Gen. Genet.)216:388-394(1989)。

可以利用质粒或病毒载体或分子生物学领域已知用于创建能够转化到植物细胞内的构建物的方法来创建遗传构建物。本文描述的是适合利用农杆菌属(Agrobacterium)系统转化的遗传构建物的创建。但是，还有转化植物和创建转基因植物的其它方法，例如粒子轰击和电穿孔，这些需要许多不同的载体系统。构建和将这些载体用到转化系统中的能力是本领域技术人员众所周知的。

植物衰老的改变

得到了有效的植物衰老特异性启动子就能够创建衰老特性被改变的转基因植物。可以将只在植物细胞进入衰老时才变得有效的遗传构建物插入植物。这种衰老特异性表达作用允许这样一类基因在植物中表达，即此类基因在植物发育的任何其它阶段的表达都会导致植物形态学或繁殖能力的衰退。例如，现在可以将编码细胞分裂素生物合成酶的基因插入在衰老特异性启动子的调控之下，使得植物组织不会在衰老前的生长阶段受到过量细胞分裂素的影响。然后，在衰老开始时，衰老特异性基因激活细胞分裂素的产生，从而改变植物中衰老的进程。具体地说，已经发现，衰老特异性启动子与细胞分裂素产生基因序列的组合创建了一种转基因植物，该植物从根本上延缓了衰老。与对应的非转基因植物相比，这类植物的营养性生长将更长，产生更多的花、种子或果实。估计，可以将影响植物成熟和衰老的其它区域置于衰老特异性启动子之后，并转化到植物中以产生改变了衰老特性的有用的转基因植物。

30

实施例

材料和方法

植物材料

拟南芥生态型 *Landsberg erecta* 种子在 2.5% 的氯化钠溶液中灭菌 5 分钟, 然后用无菌水洗涤 5 次。灭菌后的种子于 4 °C 在 1mM 的赤霉素 A₃ 中浸泡 5 小时, 然后播种在 Somerville 等在叶绿体分子生物学中的方法(Methods in Chloroplast Molecular Biology), Elsevier Biomedical Press, New York, NY, pp.129-137, 1982 中所述的以拟南芥营养液饱和的泥炭藓、蛭石和珍珠岩(1:1:1)混合物上。植株的生长条件为, 23 °C, 相对湿度 60%, 120 μmol m⁻² s⁻¹ 的连续光, 连续光来自冷白色荧光(80%)和白炽灯泡(20%)的混合光, 下灌溉以水。在这些条件下, 植物营养性生长约 3 周, 形成 6-7 片莲座叶, 然后抽苔。在不同的时刻, 收获完全舒展的第 5 和第 6 莲座叶。收获后立即将全部组织冷冻在液氮中并在 -80 °C 保存。

10

叶绿素和蛋白质的定量

将 45cm² 的新鲜叶在 65 °C 于乙醇中浸泡 2 小时, 利用分光光度法测定叶绿素的量 (Wintermans 等, 生物化学和生物物理学学报(Biochem. Biophys. Acta.)109:448-453(1965))。乙醇孵育并大致真空干燥后, 将这些叶用于总蛋白提取。45cm² 叶原料的边角料在液氮中粉碎, 重悬在 9ml pH8 的 10mM 柠檬酸钠、1mM EDTA、1%SDS 溶液中, 在 70 °C 搅拌孵育 30 分钟。离心分离可溶性成份和不溶性成份。将沉淀组分溶解在 10ml 1N NaOH 中, 在 30 °C 放置通宵。然后, 根据 Lowry 等在生物化学杂志(J. Biol. Chem.)193:265-275(1951)中所示的方法, 和修改后的 Pterson 在生物化学纪事(Aanl. Biochem.)83:346-356(1977)中和 Larson 等在生物化学纪事(Aanl. Biochem.)155:243-248(1986)中所示的方法定量可溶性组分和沉淀组份中的蛋白质水平。对来自三批相互独立的拟南芥的三份复制样品进行了分析。

20

RNA 分析

如 Puissant 等在生物技术(BioTechniques)8:148-149(1990)中所示抽提总 RNA, 并利用分光光度法定量(Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Press, NY, 1989)。为了进行 RNA 凝胶印迹分析, 在甲醛-琼脂糖凝胶上电泳分离 RNA 样品, 转移到聚砜薄膜(Gelman, Ann Arbor, MI)上, 与随机引物法(John 等, 细菌杂志(J. Bacteriol.)170:790-795, 1988)制备的 ³²P 标记的探针杂交。将 RAN 按质量基础(每根泳道 5 μg RNA)和面积基础(每根泳道半片叶当量的 RNA)上样。利用 Betagen β 颗粒扫描仪(IntelliGenetics, Inc., Mountain View, CA)定量与 RNA 杂交的探针的量。分析了用相互独立的三批组织制备的 RNA 凝胶印迹的 cDNA 克隆。

30

cDNA 文库的构建和筛选

如 Crowell 等在美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)87:8815-8819(1990)中所述分离用于构建 cDNA 文库的 Poly(A)+RNA。从 S2 叶和 S3 与 S4 叶的集合中分离的 RNA 用于构建两个 cDNA 文库。以寡聚(dT)₁₇-Xba I 为引物,利用 SuperScript™ RNase H 逆转录酶合成 cDNA 第一链,根据制造商的建议(BRL, Gaithersberg, MD),利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、大肠杆菌连接酶和 RNase H 合成第 cDNA 二链。双链 cDNA 在 BioGel A 0.5m 色谱柱(BioRad, Richmond, CA)上按大小分离以去除短于 200bp 的 cDNA。EcoR I 接头衔接子(Promega; Madison, WI)连接 cDNA,然后用聚核苷酸激酶磷酸化 cDNA 的 5'末端。利用琼脂糖凝胶电泳将 cDNA 按大小分离,电洗脱大于 500bp 的 cDNA,将他们连接到用 EcoR I 切割并去磷酸化的 pBluescript SKII(+)(Stratagene, La Jolla, CA)中。利用电穿孔法将连接产物引入大肠杆菌 DH5α。S2 和 S3/4 cDNA 文库都包含 1×10^5 个重组克隆。为了筛选文库,根据记载(Sambrook 等 1989, 同上)制备文库的复制滤膜,并与用脱氧腺苷 5-[α -³²P]三磷酸进行的 Poly (A)+RNA 逆转录制备的 cDNA 探针杂交。为了进行交叉杂交分析,利用随机引物法制备对应于 cDNA 插入片段的探针,并与候选质粒的斑点印迹杂交(Sambrook 等 1989, 同上)。

经历特定的表型和生物化学改变的拟南芥的叶衰老

我们根据表型外观将拟南芥的莲座叶分为 S1 至 S5 五个阶段,测定每个阶段的 RNA、蛋白质和叶绿素的量。S1 阶段的叶表现出最早的可见的衰老表征-叶端的叶绿素流失。随着叶的继续衰老,叶绿素继续流失。在 S2、S3、S4 和 S5 阶段的叶中,约 25%、25-50%、50-75% 和 75% 以上的叶面变黄。我们的目测评价对应于特定的叶绿素流失程度。在我们的培养条件下,在叶完全舒展后的 3、5、7、9 和 10 天,叶子分别到达 S1、S2、S3、S4 和 S5 阶段。

在衰老过程中,叶中 RNA、蛋白质和叶绿素的量逐渐减少。RNA 和蛋白质的减少开始于最早被察觉的叶绿素流失(S1 阶段)之前,随着叶的衰老而继续。在叶绿素流失量和 RNA 及蛋白质的减少之间有一个高度可再现性关联。

衰老相关基因的分离

为了确定在衰老过程中拟南芥叶中丰度升高的 mRNA,我们示差筛选了一个由衰老中的叶的 mRNA 构建的 cDNA 文库。具体地说,用分离自 S2 叶以及 S3 和 S4 叶混合物的模板 RNA 构建了两个 cDNA 文库。分别用分离自非衰老(NS)叶和 S2 或 S3/S4 叶的 Poly(A)+RNA 逆转录生成的 cDNA 探针示差筛选 S2 和 S3/S4 的 cDNA 文库。

示差筛选 S3/S4 的 cDNA 文库鉴定出在衰老过程中丰度升高的 mRNA。从该文库中挑选出 23 个与 S3/S4 的 cDNA 探针的杂交强于与 NS cDNA 探针的 cDNA 克隆用于进一步的鉴定。我们称之为衰老相关性基因(SAGs)。交叉杂交显示, 该集合包括 6 种 cDNA。随后对每一家族中最长的 cDNA 进行分析。表 1 列出了对应于 SAG cDNA 的 mRNA 的长度。

表 1. SAG 核苷酸中的 mRNA 的大致长度

SAG	大小	SAG	大小
12	1360	15	4560
13	1340	16	1150
- 14	1140	17	800

用 NS 和 S2 cDNA 探针示差筛选 S2 cDNA 文库显示, 大多数差异表达的克隆与 NS cDNA 探针的杂交强于与 S2 cDNA 探针的杂交。这些 cDNA 克隆对应于在衰老过程中丰度降低的 mRNA。在衰老过程中, 叶的光合作用产量以及编码光合作用所需蛋白质的转录产物的水平下降(Hensel 等, 1993, 同上)。所以, 编码光合作用相关性蛋白的转录产物的对应 cDNA 可能存在于丰度随衰老下降的克隆组中。随机挑选了 6 种与 NS 杂交强于与 S2 cDNA 探针杂交的 cDNA 用于进一步研究, 以提供 SAG cDNA 的对照。我们称之为衰老负调节基因(SDG)1 至 6。我们想要强调的是, SDG1 至 6 对应于文库中很少量的丰度随衰老急剧下降的组分。

15

自然的叶衰老过程中的基因表达

在叶衰老过程中测定不同时刻对应于分离的 cDNA 克隆的稳态 mRNA 水平。按质量基础上的差异表达为基础分离出该 cDNA 集合。具体地说, 用等质量(dpm)³²P 标记的 cDNA 筛选文库的复制滤膜, cDNA 通过分离自 NS 或衰老叶的 Poly(A)+RNA 经逆转录来制备。由于在衰老过程中叶中的总 RNA 量下降, Poly(A)+RNA 也可能相应地减少。如果 Poly(A)+RNA 水平随衰老过程下降, cDNA 示差筛选可能选出的 SAG 克隆其对应信息如果按照单个细胞测定表达, 则在衰老过程中保持恒定, 而在将表达与 RAN 质量相关时, 这些信息的丰度增加。例如, 如果大多数 mRNA 减少, 以单个细胞为基础保持恒定水平的 SAG 信息在质量基础的丰度上会表现为增加。

25

为了确定 SAG mRNA 水平在衰老过程中是否增加, 我们在每个阶段检测了同时与质量和叶面积相关的这些信息的表达。同时按质量基础和面积基础检测时, 对应于 SAG 基因的稳态 mRNA 水平上升。基于叶面积的上升表明 SAG mRNA/细胞在衰老过程中上升。在质量基础上检测时, 所有 SAG mRNA 水平在衰老的后期(S3-S5)最高。但是, 在

叶面积基础上检测时, 某些 SAG mRNA(例如 13 和 15)再现性地在衰老前期表现出最高水平。SAG12 表现出最高诱导水平之一, 并且在检测手段的限制内, 似乎只在衰老过程中表达。即使进行长时间的自显影或用 β 粒子收集器测定, 在非衰老叶 RNA 的泳道中也没有可检知的 SAG12 信号。SAG12 mRNA 水平在衰老的全过程中都增加, 在衰老后期达到最大值。

在同时与 RAN 质量和叶面积相关联进行检测时, 对应于 6 种负调节基因的稳态 RNA 水平随衰老下降, 和预计的一样, 这种下降在检测随面积的表达时比检测随质量的表达时大得多。如前所述, 叶中大多数 mRNA 遵循这种方式, 其中包括光合作用中涉及的例如叶绿素 a/b 结合蛋白(CAB)和二磷酸核酮糖羧基酶/加氧酶小亚基(Rubisco)(Hensel,等, 1993, 同上)的核编码基因的对应 mRNA。我们还检测了我们所定义的衰老阶段的 CAB mRNA 水平。我们发现, 在叶的衰老过程中, CAB mRNA 以与 SDG 相近的速度下降。但是, 交叉杂交分析显示 6 种 SDG 克隆都不是 CAB 或 Rubisco 基因家族的成员。

衰老特异性启动子的分离

我们用 SAG12 cDNA 筛选拟南芥基因组文库中含有 SAG12 的 SAG12 启动子区的克隆。该文库由明尼苏达大学的 David Marks 提供。

我们发现, 在拟南芥基因组中有一个 SAG12 拷贝。图 1 是一个包含与 GUS 报道基因连接的 2073bp 的 SAG12-1 启动子和 5'非翻译区的构建物图。图 2 是与 SAG12-1 的 5'非翻译序列、异戊烯基转移酶基因和 NOS 终止序列连接的 SAG12-1 启动子的核苷酸序列图。

将 SAG12-1 启动子片段(开始于-2073bp 的 EcoR V 位点, 并通过一个由寡聚诱变在 SAG12-1 起始密码子位置人工生成的 Nco I 位点)克隆在 pGEM5Zf(+)(Promega, Madison, WI)的 EcoR V-Nco I 位置。该构建物被命名为 pSG499。将包含 1.87kb 的 GUS 和 0.8kb 的 MAS 终止子的一段 2.6kb 的 Sal I-Sal I 片段克隆在 pUC18 的 Sal I 位点。植物分子生物学(Plant Mol. Biol.)15:373-381(1990)中记述了 MAS 终止子。该构建物被命名为 pSG486-2。将 pSG499 中 Nco I 到 Pst I 的 2.2kb 的 SAG12-1 启动子克隆到 pSG486-2 中的 Nco I-Pst I 位置。该构建物被命名为 pSG506。然后将含有 SAG12-1 启动子:GUS:MAS 终止子的 Pst I-Xba I 片段克隆到一个二元载体的 Pst I-Xba I 位置, 形成图 1 所示的构建物。

将含有 0.7kb IPT 和 0.3kb NOS 终止子序列(Yi Li 等, 生物学进展(Dev. Biol.)153:386-395(1992))的一段 1kb 的 Nco I-Xba I 片段克隆到 pSG506 的 Nco I-Xba I 位

置, 取代 GUS:MAS 终止子片段。这一新的构建物被命名为 pSG516。然后将 pSG516 中含有 SAG12-1 启动子:IPT:NOS 终止子片段的 Spe I-Spe I 片段克隆到一个二元载体的 Xba I 位置(Spe I 和 Xba I 都具有相容的粘性限制性末端), 形成图 2 所示的构建物。

我们测绘了 SAG12-1 的转录起始位点(在图 3 中以+1 示出), 并且融合了一段 2180bp 5 的片段, 该片段包括位于该起始位点上游的 2073bp 和 107bp 的以下两个基因的 SAG12-1 5'非翻译区(UTR): 报道基因葡糖醛酸酶(GUS)和异戊烯基转移酶(IPT), 后者是催化细胞分裂素生物合成中限速步骤的酶。启动子片段开始于图 1, 2 和 3 中点“a”。SEQ ID NO:1 是 SAG12-1 启动子的序列, IPT 基因的序列和 NOS-终止子的序列。

利用农杆菌介导的转化(Horsch 等, 科学(Science)227:1229-1231, 1985; Valvekens 10 等, 美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)87: 5536-5540, 1988)将上述基因转导到拟南芥和烟草中。固定形成的植株, 并用比色法测定 GUS 基因的表达。转基因表达测定表明, 与报道基因融合的 SAG12-1 基因组序列包含一个衰老特异性启动子。在拟南芥和烟草中, GUS 报道基因都在衰老叶中表达, 但不会在衰老前的叶中检测到。

在转基因烟草中, 我们进行了更广泛的测定, 并发现 SAG12-1 启动子在衰老过程 15 中在花部分也很活跃。该结果并不出奇, 因为花器官在发育和进化上与叶相关(即, 花器官被认为是改性的叶)。

我们发现, 与 GUS 基因融合的一段 709bp 片段(转录起始位点上游 602bp; 图 1 的 “b” 点)在转基因植物中的 GUS 表达方式与使用 2180bp 片段的相同。所以, 这一较小的区域包含了衰老特异性调节所必需的全部调控信号。SEQ ID NO:2 是 SAG12-1 基 20 因转录起始位点上游的这 602bp 和 107bp 的 5'非翻译区。

使用衰老特异性启动子延缓衰老

在包括单子叶植物和双子叶植物的许多植物中, 细胞分裂素被认为能够在离体的 和植株上正在自然衰老的叶中抑制叶衰老(参见 Nooden, 植物的衰老和老化(Senscence 25 and Ageing in Plant)pp.391-439, 1988 和 Van Staden 等, 植物的衰老和老化(Senscence and Ageing in Plant)pp.281-328, 1988)。而且, 细胞分裂素防止叶衰老还能够保持叶的光合作用活性。多项研究证明用细胞分裂素处理在防止叶绿体降解的同时刺激光合作用以及叶绿体和胞质蛋白的合成(Van Staden 等, 同上)。

虽然大多数关于细胞分裂素对衰老的作用的研究涉及使用外源性细胞分裂素, 但 30 是有证据表明, 内源性细胞分裂素是天然的叶衰老调节剂。Nooden 等(Nooden 等, 植物生理学(Plant Physiol.)93:33-39, 1990)最近研究了在完整植株上正在自然衰老的黄豆叶中的细胞分裂素流量。在引起黄豆衰老的种子发育后期阶段, 由根流向叶的细胞分裂

素急剧减少。而且，去除豆类逆转了衰老过程，恢复了细胞分裂素向叶的流动。转基因植物研究为此提供了进一步的支持。来自根癌农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 的异戊烯基转移酶基因(IPT)催化细胞分裂素生物合成中的限速步骤。过量表达 IPT 基因的转基因植物通常表现出一定程度的叶衰老延缓(Li 等, 生物学进展(Dev. Biol.)153:386-395, 1992; Ooms 等, 植物分子生物学(Plant Mol. Biol.)17:727-743, 1991; Smart 等, 植物细胞(The Plant Cell)3:647-656, 1991)。但是, IPT 在这些转基因植物中的表达并不是叶特异性的, 所以表现出典型由细胞分裂素过量引起的发育异常, 例如根发育迟缓和没有顶端优势。

本发明的目标是使得细胞分裂素以一定的水平仅在衰老的叶中产生, 从而抑制衰老又不干扰植物其它方面的发育。

10 用图 2 所示的遗传构建物生成了 8 个转基因烟草系。表达 SAG12-1/IPT 融合体的 8 种转基因烟草表型都很正常(即没有分支、花的发育和根生长方面的改变), 但是转基因植物所有的叶在花和种子发育的全过程中都保持了高水平的叶绿素。没有转化的对照植株和用与 SAG12-1/IPT 融合体类似但以 GUS 基因取代 IPT 序列的构建物转化的植株在花和种子发育过程中表现为大量下部叶衰老。这样, 在不干扰植物发育其它方面的同时
15 达到的改变衰老的目的。

转基因植物具有显著提高的生物量和花及种子产量。以下表 2 所示, 虽然叶的数量和开花时间相同, 但和表达 GUS 的对照转基因植物相比, IPT 转基因植物中的总生物量和开花数量明显增加。由于对照和 IPT 植株中每朵花中的种子产率相同, IPT 转基因植物中的种子产量几乎增加一倍。在因虫害而终止实验后, IPT 转基因植物仍继续生长(对照植株停止生长), 如果实验继续, 产量的提高可能还要大。所以, 该系统能够用于同时提高生物量和种子的产量, 并促进观赏植物的开花。

我们还将图 2 所示的 SAG12-IPT 构建物引入拟南芥中并证明它在这种植物中也抑制叶衰老。

25 SAG12-1/IPT 构建物是利用 Yi Li 提供的 IPT 构建物(Li 等, 生物学进展(Dev. Biol.)153:386-395, 1992)构建的。该 IPT 基因的有用特性是在转录起始位点引入了一个 Nco I 位点。IPT 基因可以由我们以前的工作中方便地获得(参见例如 Akiyoshi 等, 美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)81:5994-5998), 但是我们选用 Li 的构建物以省略克隆步骤。该构建物使用了一个胭脂氨酸合成酶基因(NOS)的终止子(在 mRNA 生成正确 3'末端的序列)(Bevan 等, 核酸研究(Nucleic Acids Research)11:369-385, 1983)。

30

SAG13 启动子的分离

在前文所述的 mRNA 文库中鉴定了 23 个与叶衰老相关的 cDNA 克隆。前文描述

了其中之一 SAG12 的鉴定, 使用相似的方法鉴定 SAG13 及其相关的启动子。

SAG13 克隆包含一段 1.24kb 插入片段。该插入片段被用于制造筛选前文所述拟南芥基因组文库的探针。找到两个不同的基因组克隆(即, 在拟南芥基因组中有两个 SAG13 拷贝)。这两个克隆包含一段 3.53kb 的 EcoRI-SalI 片段, 该片段包含转录起始位点的上游区域。将这些 DNA 片段亚克隆在 pBluescript II SK 载体的 EcoRI 和 SalI 位点, 然后
5 测序。该片段包含全部 SAG13 cDNA 序列和上游启动子序列。后文 SEQ ID NO:13 显示 SAG13 上游启动子的序列。转录起始位点在第 1782 位核苷酸, 翻译起始位点在第 1957 位核苷酸。两个序列基本一致, 但在 1009 处, 该基因的一个拷贝具有一个 G 残基, 而另一个是 A 残基。

表 2
SAG12-IPT 转基因及相关植株某些特性的比较

	Wisconsin 38 (野生型)	SAG12-GUS 植株	SAG12-GUS/ SAG12-IPT 植株	SAG12-IPT 植株
叶绿素含量($\mu\text{g cm}^{-2}$ 叶#7)				
39 天 ^a	19.911±0.642	21.627±1.893	22.117±1.944	25.638±1.877
68 天 ^b	1.239±0.719	1.797±1.575	16.905±1.551	18.527±2.855
蛋白质含量($\mu\text{g cm}^{-2}$ 叶#7)				
39 天 ^a	52.47±1.75	52.27±1.01	71.33±7.04	71.60±3.86
68 天 ^b	16.00±5.29	19.60±10.65	54.40±3.49	49.60±5.88
花总数	178.3±28.1	176.2±51.1	318.6±44.2	327.5±46.3
种子产量(g/株)	20.436±4.182	21.142±3.683	30.240±4.037	31.154±4.100
生物量(g/株) ^c	107.51±14.41	101.64±10.97	151.80±20.40	150.79±20.15
植株高度(cm) ^d	176.25±14.27	172.54±6.70	178.38±10.54	180.15±7.91
主干上的叶数	33.3±0.5	33.0±0.9	33.1±1.0	33.5±1.4

a)在出芽 39 天后, 各种基因型植株的第 7 叶完全展开但并不衰老

b)在出芽 68 天后, 野生型和 SAG12-GUS 植株的第 7 叶完全衰老

5 c)除种子之外, 植株地上部分的干重

d)从地面至最高花柄

取样量: Wisconsin 38: 8 株; SAG12-GUS: 13 株; SAG12-GUS/SAG12-IPT:
8 株; SAG12-IPT: 13 株

序列表

(1)一般信息

- 5 (i)申请人: Amasino, Richard M
Gan, Sushang
- (ii)发明名称: 衰老特性被改变的转基因植物
- 10 (iii)序列数量: 3
- (iv)通讯地址:
- (A)收件人: Quarles & Brady
(B)街道: 1 South Pinckney Street
(C)城市: Madison
15 (D)州: WI
(E)国家: US
(F)邮编: 53703
- (v)计算机可读形式:
- 20 (A)介质类型: 软盘
(B)计算机: IBM PC 兼容机
(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS
(D)软件: PatentIn Release #1.0 1.30 版
- 25 (vi)本申请资料:
- (A)申请号:
(B)申请日:
(C)分类:
- 30 (viii)律师/代理人信息:
- (A)姓名: Seay, Nichlas J
(B)登记号: 27,386
(C)参考/案卷号: 960296, 92808

(ix)电讯信息:

(A)电话: 608-251-5000

(B)电传: 608-251-9166

5 (2)SEQ ID NO:1 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 3183 碱基对

(B)类型: 核酸

10 (C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)说明: /desc= " SAG12-1 启动子 DNA "

15 (xi)序列描述: SEQ ID NO:1 :

```

GATATCTCTT TTTATATTCA AACATAAGT TGAGATATGT TTGAGAAGAG GACAACTATT 60
CTCGTGGAGC ACCGAGTCTG TTTTATATTA GAAACCCGAT TGTTATTTTT AGACTGAGAC 120
AAAAAAGTAA AATCGTTGAT TGTTAAAAT TAAAATTAGT TTCATCACGT TTCGATAAAA 180
AAATGATTAG TTATCATAGC TAATATAGCA TGATTCTAAA TTGTTTTTTT GACACCCTTT 240
TTTTCTCTCT TTGGTGTITT CTTAACATTA GAAGAACCCA TAACAATGTA CGTTCAAATT 300
AATTAAAAAC AATATTTCCA AGTTTTATAT ACGAACTTG TTTTTTAAAT GAAAACAGTT 360
GAATAGTTGA TTATGAATTA GTTAGATCAA TACTCAATAT ATGATCAATG ATGTATATAT 420
ATGAACTCAG TTGTTATACA AGAAATGAAA ATGCTATTTA AATACCGATC ATGAAGTGTT 480
AAAAAGTGTC AGAATATGAC ATGAAGCGTT TTGTCCTACC GGGTATCGAG TTATAGGTTT 540
GGATCTCTCA AGAATATTTT GGGCCATATT AGTTATATTT GGGCTTAAGC GTTTTGCAAA 600
GAGACGAGGA AGAAAGATTG GGTCAAGTTA ACAAACAGA GACACTCGTA TTAGTTGGTA 660
CTTTGGTAGC AAGTCGATTT ATTTGCCAGT AAAAAGTTGG TACACAAGT ACAACTCGTA 720
TCGTTATTAG TTTGTACTTG GTACCTTTGG TTAAGAAAAA GTTGATATAG TTAAATCAGT 780
TGTSTTCATG AGGTGATTGT GATTTAATTT GTTGACTAGG GCGATTCCTT CACATCACAA 840
TAACAAAGTT TTATAGATTT TTTTTATAA CTTTTTTGCC ACGCTTCGTA AAGTTTGGTA 900
TTTACACCGC ATTTTCCCT GTACAAGAAT TCATATATTA TTTATTTATA TACTCCAGTT 960
GACAATTATA AGTTTATAAC GTTTTTACAA TTATTTAAAT ACCATGTGAA GATCCAAGAA 1020
TATGTCTTAC TTCTTCTTTG TGTAAGAAAA CTAACTATAT CACTATAATA AAATAATTCT 1080

```

AATCATTATA TTTGTAAATA TGCAGTTATT TGTCAATTTT GAATTTAGTA TTTTAGACGG 1140
TTATCACTTC AGCCAAATAT GATTTGGATT TAAGTCCAAA ATGCAATTC GTACGTATCC 1200
CTCTTGTCGT CTAATGATTA TTTCAATATT TCTTATATTA TCCCTAACTA CAGAGCTACA 1260
TTTATATTGT ATTCTAATGA CAGGGAAACT TTCATAGAGA TTCAGATAGA TGAAATTGGT 1320
GGGAAACATC ATTGAACAGG AAACITTTAG CAAATCATAT CGATTTATCT ACAAAGAAT 1380
ACTTAGCGTA ATGAAGTTCA CTTGTTGTGA ATGACTATGA TTTGATCAAA TTAGTTAATT 1440
TTGTCGAATC ATTTTTCTTT TTGATTTGAT TAAGCTTTTA ACTTGACGA ATGGTTCTCT 1500
TGTGAATAAA CAGAATCTTT GAATTCAAAC TATTTGATTA GTGAAAAGAC AAAAGAAGAT 1560
TCCTTGTTTT TATGTGATTA GTGATTTTGA TGCATGAAAG GTACCTACGT ACTACAAGAA 1620
AAATAAACAT GTACGTAAC TCGTATCAGC ATGTAAAAGT ATTTTTTCC AAATAATTTA 1680
TACTCATGAT AGATTTTTTT TTTTIGAAAT GTCAATTAAA AATGCTTCT TAAATATTA 1740
TTTTAATTAA TTAAATAAGG AAATATATTT ATGCAAAACA TCATCAACAC ATATCCAAC 1800
TCGAAAATCT CTATAGTACA CAAGTAGAGA AAATAAATTT TACTAGATAC AAACITCCTA 1860
ATCATCAATT ATAAATGTTT ACAAACATAA TTAACCCAC CACTAAAATT AACTAAAAT 1920
CCGAGCAAAG TGAGTGAACA AGACTTGATT TCAGGTTGAT GTAGGACTAA AATGGCTACG 1980
TATCAAACAT CAACGATCAT TTAGTTATGT ATGAATGAAT GTAGTCATTA CTTGTAAAAC 2040
AAAAATGCTT TGATTTGGAT CAATCACTTC ATGTGAACAT TAGCAATTAC ATCAACCTTA 2100
TTTTCACTAT AAAACCCAT CTCAGTACCC TTCTGAAGTA ATCAAATTA GAGCAAAGT 2160
CATTTAACTT TCCTAAAACC ATGGACCCTG CATCTAATTT TCGGTCCAAC TTGCACAGGA 2220
AAGACGACGA CCGCGATAGC TCTTGCCCAG CAGACAGGGC TTCCAGTCCT TTCGCTTGAT 2280
CGGGTCCAAT CGTGTCTCA ACTATCAACC GGAAGCGGAC GACCAACAGT GGAAGAAGT 2340
AAAGGAACGA CGCGTCTCTA CCTTGATGAT CGGCCTCTGG TGGAGGGTAT CATCGCAGCC 2400
AAGCAAGCTC ATCATAGGCT GATCGAGGAG GTGTATAATC ATGAGGCCAA CGGCGGGCTT 2460
ATTCTTGAGG GAGGATCCAC CTCGTTGCTC AACTGCATGG CGCGAAACAG CTATTGGAGT 2520
GCAGATTTTC GTTGGCATAT TATTCGCCAC AAGTTACCCG ACCAAGAGAC CTTCATGAAA 2580
GCGGCCAAGG CCAGAGTTAA GCAGATGTTG CACCCCGCTG CAGGCCATTC TATTATCAA 2640
GAGTTGGTTT ATCTTTGGAA TGAACCTCGG CTGAGGCCCA TTCTGAAAGA GATCGATGGA 2700
TATCGATATG CCATGTTGTT TGCTAGCCAG AACCAGATCA CGGCAGATAT GCTATTGCAG 2760
CTTGACGCAA ATATGGAAGG TAAGTTGATT AATGGGATCG CTCAGGAGTA TTTTATCCAT 2820
GCGCGCCAAC AGGAACAGAA ATTCCCCCAA GTTAACGCAG CCGCTTTCGA CGGATTCGAA 2880
GGTCATCCGT TCGGAATGTA TTAGGTTACG CCAGCCCTGA GCTCGATCGT TCAAACATTT 2940
GGCAATAAAG TTTCTTAAGA TTGAATCCTG TTGCCGGTCT TGCGATGATT ATCATATAAT 3000
TTCTGTTGAA TTACGTTAAG CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA 3060

```
GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGCGATA GAAAACAAAA 3120
TATGGCGCGC AAAGTGGGAT AAATTATCGC GCGCGGTGTC ATCTATGTTA CTAGATCGAA 3180
TTC 3183
```

(2)SEQ ID NO:2 的信息:

5 (i)序列特征:

(A)长度: 709 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

10

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)说明: /desc= "SAG12-1 启动子 DNA(截短形式)"

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2:

```
AAGCTTTTAA CTGACAGAA TGTTCTCTT GTGAATAAAC AGAATCTTG AATTCAAAC 60
ATTTGATTAG TGAAAAGACA AAAGAAGATT CCTTGTTTT ATGTGATTAG TGATTTTGAT 120
GCATGAAAGG TACCTACGTA CTACAAGAAA AATAAACATG TACGTAAC TA CGTATCAGCA 180
TGTAAGAGTA TTTTTTCCA AATAATTTAT ACTCATGATA GATTTTTTTT TTTTGAAATG 240
TCAATTAAAA ATGCTTCTT AAATATTAAT TTTAATTAAT TAAATAAGGA AATATATTTA 300
TSCAAACAT CATCAACACA TATCCACTT CGAAAATCTC TATAGTACAC AAGTAGAGAA 360
AATAAATTTT ACTAGATACA AACTTCCTAA TCATCAATTA TAAATGTTTA CAAAAC TAAT 420
TAAACCCACC ACTAAAATTA ACTAAAAATC CGAGCAAAGT GAGTGAACAA GACTTGATTT 480
CAGGTTGATG TAGGACTAAA ATGGCTACGT ATCAAACATC AACGATCATT TAGTTATGTA 540
TGAATGAATG TAGTCATTAC TTGTAAAACA AAAATGCTTT GATTTGGATC AATCACTTCA 600
TGTGAACATT AGCAATTACA TCAACCTTAT TTTCACTATA AAACCCCATC TCAGTACCCT 660
TCTGAAGTAA TCAAATTAAG AGCAAAGTC ATTTA ACTTT CCTAAAACC 709
```

15

(2)SEQ ID NO:3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1974 碱基对

20

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

5

(A)说明: /desc= " SAG13 启动子 DNA "

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3 :

```

GAATTCTCAG TGTTCCTTA AATCAAATCT CTCACACTAT GAGTATATGA ACAAATCAT 60
ATACATATCA CAATTCATT ATGGATATCT CCCAATCTAT CTCTCATACA TGAAAATGTT 120
CTATTTTCGAT CTTGTATTTA AATAATGTAA TACTCTGTTT TAATTTGTGT ATCCTGATTT 180
TTTTTTCTTT TTGAAGTTCA ACAAATATAT CAAAATAACT CAGAACCATT ACTATTTTTT 240
CTTAGTTCAT CAATTCCTTA CTACACATAG AAACGTATTT ATCTTGTTTG ATCTACTTTG 300
ACTCTATATA TGTTCATGTGG CATCTCTGGT CATTGCTAGT CACAGGTAAG AGTAAAAATT 360
GATCAAAGAT AAAGAGTCTT TCATGGTAAA AATTCTCTTG TAACTGGTGG AGATAGTAGA 420
TGTCAATTCTG TTTGCAATAA CTTACATTTG CAATAACATG TCAGCCATAT TTATTTAAAT 480
TTCCATGCAT TTGATATTAT TTTCTCTCTA ATACATATAT GATGTGTTAC GGTCATTCTA 540
AAAATCCAGT TGACAGCATA ATGAAGCTGG TACACCATAC ATGCACTTGA TTATATATGG 600
ATGTTACTGC CATGATTGAT GTTTTGATGG AATTAGTGTT AAAGGATGGA CCCTCACTAA 660
CGCGGTTGGA AATTATGATC AAATCTTCA ATGTCACCTA TCAAGAGAGC TAATGACTAG 720
CACGTTTAGT TGTTCGTGTTG TTTCTTATGG CTGCTTAATG TCTCCATCAA ATATTTAGAC 780
ATTGTGGCTA GTAAAATGCC ATCTACCTTA ATCCTATATA TAAGTATAAC TAGATAATAA 840
TCCATATTTT TGCTGGGTTT AGTAGCTGAT ACGACGTTTA TGGTTGTTAT TGAGTTTGAA 900
TACAAAATAT AGAGTATTGT TGGAGTTATA TTGATTTTTG TTCATATTAG TTAACAAATA 960
ATAAAAAAAT TAAGAAAGGT TTTTGAAAAT GCATCTTCTA GAATATATRT ATATTCGAAA 1020
AAGTCACATC TTTAATTGAC ATATGTTTTG TTGTTTGTG TTTTTTTACT GGCCACACAA 1080
ATTGACAACA ATGGTCATGC ATGAAATGAA ATGTTTGTG TCAATTTTTT TTAATAACTT 1140
GTAATATCAT TATGAAATGA AATAGAAGGT ATATATTACA AAATATTACC TAAAAGTAGA 1200
GCAATCTTAG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAGAAA AAGAAAAAGA AACAAAGATTA 1260
CAATGCATTT AAAAAAGAGT GGAAAGAATC CGAGCTATCG AATCCAAAGA AGCATCTACT 1320

TCCCTCATCT GTTCTTGAT CGTCTACCAG AGATGGTGTT CCGGATCTCT CGATCAATAT 1380
TCTTAAAGAT GGTGTTGGA GGGATCCTTT GGCTATTATG GAGAACATA TTCGTTTATC 1440
TCCAGATGTG ATAGACAAAG GGCTGTGTGG CCTGTGAGAC CGATGGCCAC TTAATTATTG 1500
GTTTTTTGTC AATGGTTGTG TATGCATAGA AATCCCACA ACCGTTTGTG GCTTAACACA 1560

```

ATTTACCAGG GGTTTAAGTG GTTAAATTGA TACATGTAGA TCTAAAGTTT TATGCTAATA 1620
TAAATTAGTT TTAATTATAT AAATTTTAAC TACGCTCATG ACACGTAAAT GGTAGACCAA 1680
TATGTGGTGC TCTATTA ACT AAGGGGTGCT TCATTATTAA TTCATAAAGA TTTCTTTACT 1740
ATACAAGACT TGTCAAAGG AAAAGTAGTA TTTTCGTACT ACGTCTACCC CTCTCACGGA 1800
TATGTGTGGT CGAGCAGTCA TTATCATAAT GTGGAATTTT GAATTGAGCG AGGTTTCAA 1860
GTTCAA AACT ATCACAACTA GTCTTGATCA ATTCTATATA AGATCTGTGA TCTTGGTTGA 1920
AGAAAAGAAT CGTCGTAGGT TGATATTTAA CAAGGAATGG CAAAGGAAGG GGGC 1974

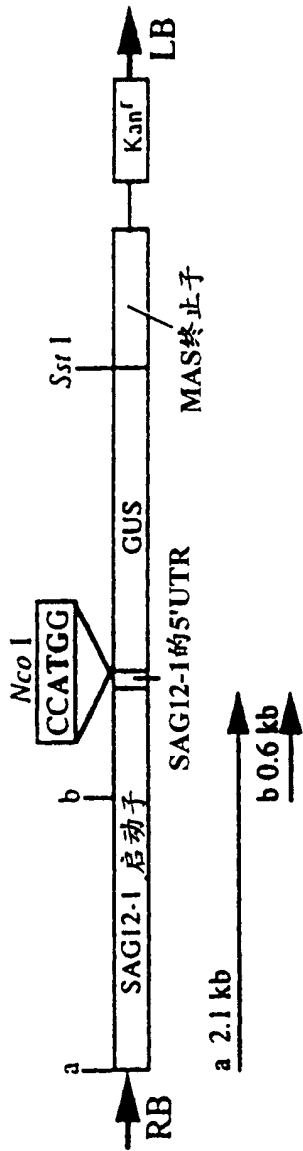


图 1

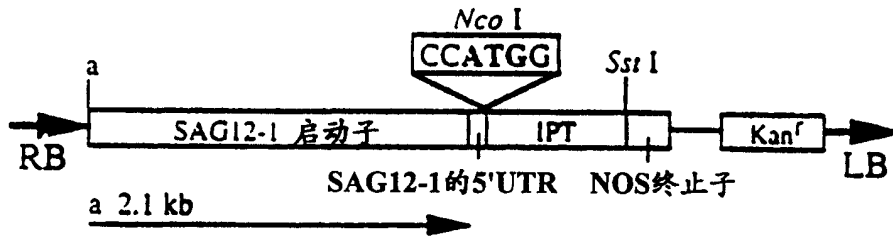


图 2

▼ a -2073 bp *EcoR* V

JATATGTCTT TTTATATTTCA AACAAATAAGT TGAGATATGT TTGAGAGAG GACAACTATT
CTCGTGGAGC ACCGAGTCTG TTTTATAATA GAAACCGGAT TGTATATTTT AGACTGAGAC
AAAAAAGTAA AATCGTTGAT TGTAAAAAT TAAAAATAGT TTGATCAGCT TTGATAAAA
AAATGATTAG TTATCATAGC TAATATAGCA TGATTCTAAA TTGGTTTTTT GACACCCCTT
TTTTCTCTCT TTGCTGTTTT CTAAACATTA GAAGAACCCA TAACAATGTA CTTTCAAAAT
AATTAAAAAC AATATTTTCA AGTTTTATAT ACCAAACTTG TTTTTTTAAT GAAAACAGTT
GAATAGTTGA TTATGAATTA GTTAGATCAA TACTCAATAT ATGATCAATG ATGTATATAT
ATGAACTCAG TTGTTATACA AGAAATGAAA ATGCTATTTA AATACCGATC ATGAAAGTGT
AAAAAGTGTG AGAATATGAC ATGAAGCGTT TTGTCTTACC GGGTATCGAG TTATAGGCTT
GGATCTCTCA AGAATATTTT GGGCCATATT AGTTATATTT GGGCTTAAGC GTTTTGCAAA
GAGACGAGGA AGAAAGATTG GGTCAAGTTA ACAAACAGA GACACTCGTA TTAGTTGGTA
CTTTGGTAGC AAGTCGATTT ATTTGCCAGT AAAAACTTGG TACACAAC TG ACAACTCGTA
TCGTTATTAG TTGTACTTTG GTACCTTTGG TTAAGAAAA GTTGATATAG TTAATTCAGT
TGTGTTCAATG AGGTGATTGT GATTTAATTT GTTGACTAGG GCGATTCTCT CACATCAGAA
TAACAAAGTT TTATAGATTT TTTTTTATAA CATTTTTGGC ACGCTTCGTA AAGTTTGGTA
TTTACACCGC ATTTTTCCCT GTACAAGAAT TCATATATTA TTTATTTATA TACTCCAGTT
GACAAATATA AGTTTTATAAC GTTTTTACAA TTAATTAAT ACCATGTGAA GATCCAAAGAA
TATGCTTTAC TTCTTCTTTG TGTAAGAAAA CTAACATAT CACTATAATA AAATAATCTT
AATCATT JA TTGTAAAAA TGCACTTATT TGTCAATTTT GAATTTAGTA TTTTAGACGG
TTATCACTTC AGCCAAATAT GATTTGGATT TAACTCCAAA ATGCAATTTG GTACGTATCC
CTCTGCTGCT CTAATGATTA TTTCAATATT CCTTATATTA TCCCTAACTA CAGAGCTACA
TTTATACTGT ATTCTAATGA CAGGGAAACT TCCAT AGAGA TTCAGATAGA TGAAATGGT
GGGAAACATC ATTGAACAGG AAACCTTTAG GAAATCATAT CGATTTATCT ACAAAGAAAT
ACTTAGCGTA ATGAAGTTCA CTTGTTGTGA ATGACTATGA TTTGATCAAA TTAGTTAAAT

▼ b -602 bp *Hind* III

TTGCTGAAATC ATTTTTCTTT TTAGATTGAT TAAGCTTTTA ACTTGCACGA ATGGTCTCTT
TGTGAATAAA CAGAATCTTT GAATTCAAAC TATTTGATTA GTGAAAAGAC AAAAGAAGAT
TCCTTGTTTT TATGTGATTA GTGATTTTGA TGCAATGAAAG GTACCTACGT ACTACAAGAA
AAATAAACAT GTACGTAAC ACGTATCAGC ATGTAAAAGT ATTTTTTCC AAATAATTTA
TACTCATGAT AGATTTTTTT TTTTTGAAAT GTCAATTAAT AATGCTTTCT TAAATATTA
TTTTAATTA TAAATAAGG AAATATATTT ATGCAAAACA TCATCAACAC ATATCCAAT
TCGAAAATCT CTATAGTACA CAAGTAGAGA AAATAAATTT TACTAGATAC AAACCTTCCTA
ATCATCAATT ATAAATGTTT ACAAACCTAA TTAACCCAC CACTAAAAT AACTAAAAAT
CCGAGCAAAG TGAGTGAACA AGACTTGATT TCAGTTGAT GTAGGACTAA ATGGCTACG
TATCAAACAT CAACGATCAT TTAGTTATGT ATGAAATGAAT GTAGTCAATTA CTTGTAAAC

-1 ▼ +1

AAAAATGCTT TGATTTGGAT CAATCACTTC ATGTGAACAT TAGCAATTAC ATCAACCTTA
TTTTCACTAT AAAACCCCAT CTCAGTACCC TTCTGAAGTA ATCAAAATTA GAGCAAAAGT

▼ *Nco* I → IPT

CATTTAACTT TCCTAAAACC ATGGACCCTG CATCTAATTT TCGGTCCAAC TTGCACAGGA
AAGACGACGA CCGCGATAGC TCTTGCCAG CAGACAGGGC TTCCAGTCTT TTCCCTTSAT
CGGGTCCAAT GCTGTCTCTA ACTATCAACC GGAAGCGGAC GACCAACAGT GGAAGAAGCTG
AAAGGAACGA CCGCTCTCTA CCTTGATGAT CGGCCTCTGG TGGAGGGTAT CATCCAGCC
AAGCAAGCTC ATCATAGGCT GATCGAGGAG GTGTATAATC ATGAGGCCAA CCGCGGCTT
ATTCCTGAGG GAGGATCCAC CTCGTTGCTC AACTGCATGG CGCGAAACAG CTATTTGAGT
GCAGATTTTC GTTGGCATAT TATTCGCCAC AAGTTACCCG ACCAAGAGAC CTTCATGAAA
GCGGCCAAGG CCAGAGTTAA GCAGATGTTG CACCCGCTG CAGGCCATTC TATTATTCAA
GAGTTGGTTT ATCTTTGGAA TGAACCTCGG CTGAGGCCCA TTCTGAAAGA GATCGATGGA
TATCGATATG CCATGTTGTT TGCTAGCCAG AACCAGATCA CGGCAGATAT GCTATTGCAG
CTTGACGCAA ATATGGAAGG TAAGTTGATT AATGGGATCG CTCAGGAGTA TTTCATCCAT
GCGCGCCAAC AGGAACAGAA ATTCGCCCAA GTTAACGCAG CCGCTTTTCA CCGATTGAAA

▼ *Sst* I → NOS-ter

GGTCATCCCT TCGGAATGTA TTAGGTTAGG CCAGCCCTGA GCTCGATCGT TCAAAACATTT
GGCAATAAAG TTTCTTAAGA TTGAATCCTG TTGCCGGTCT TCCGATGATT ATCATATAAT
TTCTSTTGAA TTACGTTAAG CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACC TTATTTATGA
GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGGGATA GAAAACAAAA
TATGGCGCGC AAACCTGGGAT AAATTATCGC GCGCGGCTC ATCTATGTTA CTAGATCGAA
TTT

图 3