



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94194169.8

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/82

[43]公开日 1996 年 11 月 27 日

[22]申请日 94.11.17

[30]优先权

[32]93.11.19[33]US[31]08/155,067

[86]国际申请 PCT/US94/12946 94.11.17

[87]国际公布 WO95/14098 英 95.5.26

[85]进入国家阶段日期 96.5.16

[71]申请人 生物技术研究及发展有限公司

地址 美国马里兰州

共同申请人 泊达研究基金会

[72]发明人 S·B·格尔文 R·豪普特曼

倪敏 崔德才

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 白益华

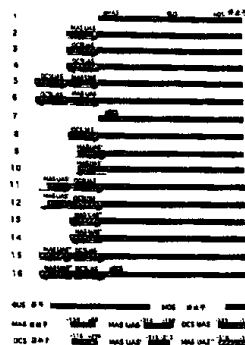
A01H 5/00

权利要求书 5 页 说明书 33 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 用于植物体内基因表达的嵌合调节区和基因盒

[57]摘要

本发明提供了用于在植物体内表达外源基因的以根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因为基础的嵌合调节区和基因盒。各种衍生自如甘露碱合成酶和章鱼碱合成酶基因等冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列与启动子(或启动子加激活序列)可操作性地连接,然后将以上两者与外源基因可操作性地连接。这些调节区和基因盒可产生前所未有的表达水平和表达方式。



权 利 要 求 书

1. 用于在植物体内表达基因的嵌合调节区,其特征在于,它含有衍生自第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活序列,并与衍生自与所述第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因不同的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接。

2. 根据权利要求1所述的嵌合调节区,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌基因是甘露碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌基因是章鱼碱合成酶基因。

3. 根据权利要求1所述的嵌合调节区,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌基因是章鱼碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌基因是甘露碱合成酶基因。

4. 表达某一基因的基因盒,其特征在于,它与嵌合调节区可操作性地连接,该调节区含有衍生自第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活序列,并与衍生自与所述第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因不同的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接。

5. 根据权利要求4所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌基因是甘露碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌基因是章鱼碱合成酶基因。

6. 根据权利要求4所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌基因是章鱼碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌基因是甘露碱合成酶基因。

7. 根据权利要求4所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的基因盒还含有一段胭脂碱合成酶的聚腺苷酸信号序列。

8. 在植物体内表达基因的嵌合调节区,其特征在于,它含有至少两段衍生自某种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列,并与衍生自某种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接。

9. 根据权利要求 8 所述的嵌合调节区,其特征还在于,其中所述的上游激活序列衍生自不同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

10. 根据权利要求 8 所述的嵌合调节区,其特征还在于,其中所述的上游激活序列衍生自相同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

11. 根据权利要求 8 所述的嵌合调节区,其特征还在于,其中所述的上游激活序列之一与所述的启动子衍生自相同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

12. 表达某一基因的基因盒,其特征在于,它含有与一个嵌合调节区可操作性地连接的某一基因,该嵌合调节区含有至少两段衍生自根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列,并与衍生自某种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接。

13. 根据权利要求 12 所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的上游激活序列衍生自不同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

14. 根据权利要求 12 所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的上游激活序列之一和所述的启动子衍生自相同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

15. 根据权利要求 12 所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的上游激活序列衍生自相同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

16. 根据权利要求 12 所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的基因盒还含有一段胭脂碱合成酶的聚腺苷酸信号序列。

17. 诱导型表达某一外源基因的基因盒,其特征在于,它含有与一个调节区可操作性地连接的所述外源基因,该调节区含有一个缺失至-138 核苷酸位的根癌土壤杆菌甘露碱合成酶基因的衍生启动

子和衍生自根瘤土壤杆菌甘露碱合成酶基因的一段上游激活序列。

18. 根据权利要求 17 所述的基因盒,其特征还在于,其中所述的基因盒还含有一段胭脂碱合成酶的聚腺苷酸信号序列。

19. 诱导型表达某一外源基因的基因盒,其特征在于,它含有与某一调节区可操作性地连接的所述外源基因,该调节区含有一个衍生自根瘤土壤杆菌甘露碱合成酶基因的启动子、衍生自根瘤土壤杆菌甘露碱合成酶基因的一段上游激活序列和衍生自根瘤土壤杆菌章鱼碱合成酶基因的一段上游激活序列。

20. 在植物体内表达某一基因的方法,其特征在于,它具有以下步骤:将所述基因与某一嵌合调节区连接,该嵌合调节区含有衍生自第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活序列,并与衍生自与所述第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因不同的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接;将所述基因和所述嵌合调节区插入某植株;令所述植株表达所述基因。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因是甘露碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因是章鱼碱合成酶基因。

22. 根据权利要求 20 所述的方法,其特征还在于,其中所述的第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因是章鱼碱合成酶基因,而所述的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因是甘露碱合成酶基因。

23. 在植物体内表达某一基因的方法,其特征在于,它具有以下步骤:将所述基因与某一嵌合调节区连接,该嵌合调节区含有至少两段衍生自某种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列,并与衍生自某种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一个启动子可操作性地连接;将所述基因和所述嵌合调节区插入某一植株;使所述植株表达所述基因。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其特征还在于,其中所述的上

游激活序列衍生自不同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

25. 根据权利要求 23 所述的方法,其特征还在于,其中所述的上游激活序列衍生自不同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

26. 根据权利要求 23 所述的方法,其特征还在于,其中所述的上游激活序列之一与所述的启动子衍生自相同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

27. 在植物体内诱导型表达某一外源基因的方法,其特征在于,它具有以下步骤:将所述外源基因与某一调节区连接,该调节区含有一个缺失至-138 核苷酸位的根癌土壤杆菌甘露碱合成酶基因的衍生启动子和衍生自根癌土壤杆菌甘露碱合成酶基因的一段上游激活序列;将所述外源基因和所述调节区插入所述植株;诱导表达所述外源基因。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其特征还在于,其中所述的诱导是通过昆虫或线虫对所述植株的进攻而实现的。

29. 在植物体内诱导型表达某一外源基因的方法,其特征在于,它具有以下步骤:将所述外源基因与某一调节区连接,该调节区含有一个衍生自根癌土壤杆菌甘露碱合成酶基因的启动子、衍生自根癌土壤杆菌甘露碱合成酶基因的一段上游激活序列和衍生自根癌土壤杆菌章鱼碱合成酶基因的一段上游激活序列;将所述外源基因和所述调节区插入所述植株;诱导表达所述外源基因。

30. 一种质粒,其特征在于,它含有权利要求 1 所述的嵌合调节区。

31. 一种质粒,其特征在于,它含有权利要求 8 所述的嵌合调节区。

32. 一种质粒,其特征在于,它含有权利要求 12 所述的基因盒。

33. 一种转基因植物,其特征在于,它含有权利要求 30 所述的质粒。

34. 一种转基因植物,其特征在于,它含有权利要求 31 所述的质粒。

35. 一种转基因植物,其特征在于,它含有权利要求 32 所述的质粒。

说明书

用于植物体内基因表达的嵌合调节区和基因盒

发明背景

本发明涉及用于调控植物体内基因表达的嵌合调节区。这些嵌合调节区来源于植物病原体根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的冠瘿碱合成酶基因。

根癌土壤杆菌是一种革兰氏阴性土壤菌,它能感染大多数双子叶植物和某些单子叶植物。由根癌土壤杆菌引起的感染常会导致在被感染植物中形成冠瘿瘤。

在根癌土壤杆菌感染过程中,大的瘤诱导质粒(“Ti”)中一特定DNA片段(“T-DNA”)转移至易感植物细胞中并整合入细胞核基因组,由此使T-DNA表达。有些T-DNA基因编码涉及合成植物体内活性激素的酶。这些激素会在被感染植物中引起肿瘤。其它T-DNA基因指导合成与分泌特有的氨基酸和糖的衍生物,即冠瘿碱。根癌土壤杆菌可利用这些冠瘿碱作为碳源,并有时作为氮源。参见 Gelvin, *Plant Physiol.* 92:281—85(1990); Gelvin, *TRANSGENIC PLANTS*(Academic Press 1993); Ream, *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 583—618(1989); Zambryski, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:465—90(1992)。

T-DNA 基因含有在植物环境中具有功能,并与植物调节区相似的区域。例如,大多数植物启动子含有诸如上游激活序列(“UAS”)的顺式作用元件(通常称为“增强子”),它们通过与反式作用因子结合来确定或影响启动子的强度和组织特异性表达方式。参见 Atchison, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:127—53(1988)。顺式作用元件

的组合和空间取向以及可以与这些元件相互作用的核因子的存在会影响某一给定启动子的总体强度和它的表达方式。参见 Dynan, *Cell* 58:1—4(1989)。虽然 T—DNA 基因原先位于原核质粒上,但它具有在植物体内进行转录所需的全部序列元件(启动子和 UAS)。例如, T—DNA 基因具有确定转录起始位置的 TATA 盒序列,而且通常含有位于离转录起始位点 100bp 以上处的上游元件,这些元件调节转录水平。参见 Gelvin, *TRANSGENIC PLANTS* (Academic Press 1993)。

章鱼碱合成酶(ocs)和甘露碱合成酶(mas)基因是两种含有上游激活序列的 T—DNA 基因。ocs 基因编码的产物将精氨酸和丙酮酸缩合成章鱼碱。参见 Hack 和 Kemp, *Plant Physiol.* 65:949—55 (1980)。位于 ocs 基因上游的一个 16 碱基对回文序列能在一瞬时表达系统中激活异源的玉米 *adh1* 启动子。参见 Ellis 等, *EMBO J.* 6:11—16(1987); Ellis 等, *EMBO J.* 6:3202—08(1987)。该回文序列也是激活已稳定转化的烟草愈伤组织中 ocs 启动子所必需的。参见 Leisner 和 Gelvin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2553—57(1988); Leisner 和 Gelvin, *Plant Cell* 1:925—36(1989)。

mas1' 和 *2'* 基因共有—个双重双向启动子和—个 479bp 的基因间隔区。这些基因编码用于两步法合成甘露碱的酶。参见 Ellis 等, *Mol. Gen. Genet.* 195:466—73(1984); Komro 等, *Plant Mol. Biol.* 4:253—63(1985)。两个 mas 基因的转录呈背离式,基因间隔区包含了两种基因转录所需的全部顺式作用元件。参见 DiRita 和 Gelvin, *Mol. Gen. Genet.* 207:233—41(1987); Fox 等, *Plant Mol. Biol.* 20:219—33 (1992); Leung 等, *Mol. Gen. Genet.* 230:463—74(1991); Guevara-Garcia 等, *Plant J.* 4:495—505(1993)。

ocs 和 mas 基因的启动子已被用于指导连锁基因在转基因植物中的表达。但是,这些启动子的应用由于在转基因植物某些组织中的

弱表达水平而受到限制。参见 DiRita 和 Gelvin, 同上; Harpster 等, Mol. Gen. Genet. 212:182—90(1988); Sznger 等, Plant Mol. Biol. 14:433—43(1990)。例如,ocs 启动子在转基因烟草中指导一种明显的细胞特异性的表达方式。参见 Kononowicz 等, Plant Cell 4: 17—27(1992)。mas 基因在叶和茎中呈现弱表达,但在根中的表现较强,并表现出一定程度的创伤和植物生长素诱导性。参见 Langridge 等, Proc. Nat'l Acad. Sci 86:7890—94(1989); Teeri 等, EMBO J., 8:343—50(1989); Saito 等, Planta 184:40—46(1991); Guevara—Garcia 等, Loc. cit。

因为启动子和其它调节区表现出不同的强度和组织特异性,所以发展了某些重组调节区。例如,与某些反式作用因子特异性结合的增强子可调控转录活性和细胞特异性的表达方式。参见 Bienz 和 Pelham, Cell 45:753—60(1986)。

某些组成型启动子如花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 结构的使用也是已知的。CaMV 35S 启动子含有活化剂,活化剂具有多个结构域,能功能性地以一种发展性和组织特异性的方式激活 35S 启动子。参见 Benfey 等, EMBO J. 8:2195—2202(1989); Benfey 等, EMBO J. 9:1677—1684(1990); Benfey 等, EMBO J. 9:1685—96。

Koziel 等在 Bio/Technology 11:194—199(1993)中主要涉及在试图获得异源基因的组织特异性启动作用的一个启动子组套结构中所使用的启动子。Koziel 给出了一种基因表达系统的结构,它具有一个与 CaMV 35S 启动子或与衍生自玉米的两种组织特异性启动子(磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(“PEPC”)启动子和花粉特异性启动子)组合体连接的截短的 cryIA (b) 基因(该基因片段编码苏芸金杆菌(Bacillus thuringiensis)产生的一种 1155 个氨基酸杀虫蛋白的前 648 个氨基酸)。Koziel 报导了两种启动子构型的高水平表达。Koziel 等还使用了(1)已知引起绿色组织特异性表达的 PEPC 启动子和

(2)玉米花粉特异性启动子。观察到的 1500—4000ng/mg 杀虫蛋白的表达是一种相当高水平的表达。另外,PEPC/花粉特异性启动子的使用产生了组织特异性表达。

有人还尝试利用其它技术进行重组表达。Bevan 等在 PCT/GB92/00566(1992)中主要涉及与 Koziel 等人的启动子不同的一种单个启动子的非组套性应用,以获取异源基因的组织特异性表达。该申请主要涉及利用菜豆苯丙氨酸氨裂解酶(“PAL”)启动子来产生组织特异性表达。将 PAL 基因组克隆(即除编码序列外,还含有作为 PAL 基因序列一部分的间插序列的克隆)的“假定转录调节区”、PAL 蛋白氨基端 68 个氨基酸构成的开放式阅读框架(“ORF”)和完整的 β -葡萄糖苷酸酶(“GUS”)ORF 以及其后的胭脂碱合成酶的聚腺苷酸化和转录终止区(通常在大多数真核植物表达载体中将后两种元件融合以确保有效表达)融合构建一个杂交基因。这种最初的结构的确在某些植物中表现出较强的活性,研究者后来在杂交基因的 PAL 启动子区进行了一些删除。充分表达所必需的最短 PAL 启动子被发现是从 PAL 的转录起始位点起的 253 碱基对。研究者发现通过主要改变此最短区域内的缺失方式,可在一定程度上调节组织特异性表达。

美国专利 No. 5,034,322 主要涉及胭脂碱合成酶启动子与一核酮糖—1,5—双—磷酸酯羧化酶小亚基基因的利用。

还报导道一种被称为“Mac”的嵌合启动子,它将+65 至—301 的 mas 区和—90 至—941 的 35S 增强子区结合,表现出数倍于转基因烟草植株中双倍 CaMV 35S 启动子的 GUS 活性。参见 Comai 等, Plant Mol. Biol. 15:373—81(1990)。

上述构建物在表达效率和调控性方面表现出了某些限制。例如,已有方法不能在需要时进行类似于组成型方式的强效表达。

发明概述

本发明目的之一是提供改善植物体内基因表达的嵌合调节区。

本发明目的之二是提供由根瘤土壤杆菌的启动子和上游激活序列构成的嵌合调节区。

本发明目的之三是提供含有在由根瘤土壤杆菌的启动子和上游激活序列构成的嵌合调节区调控下进行表达的基因的基因盒。

本发明目的之四是提供外源基因在植物体内的诱导型表达。

本发明的另一目的是提供含有基因盒的质粒和转基因植物。

在实现上述及其它目的的过程中,根据本发明的一方面内容,提供了一种用于植物体内基因表达的嵌合调节区,其构成是将衍生自第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列与衍生自不同于第一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的启动子进行可操作性地连接。第一和第二种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因最好是甘露碱合成酶基因或章鱼碱合成酶基因。

根据本发明的另一方面内容,提供了一种用于植物体内基因表达的嵌合调节区,其构成是将至少两种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶上游激活序列与一种根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶启动子可操作性地连接。上游激活序列可衍生自相同或不同的根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因,例如甘露碱合成酶和章鱼碱合成酶。另外,上游激活序列之一或两者和启动子可衍生自相同的根瘤土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因。

根据本发明的另一方面内容,提供了一种基因盒,它含有一个与前述嵌合调节区可操作性地连接的待表达基因。基因盒还可包括转录终止子和聚腺苷酸化信号,如胭脂碱合成酶聚腺苷酸化信号。

根据本发明的另一方面内容,提供了一种用于外源基因诱导型表达的基因盒,其中将一种外源基因与由衍生自根瘤土壤杆菌甘露

碱合成酶基因的启动子及衍生自根瘤土壤杆菌甘露碱合成酶基因的上游激活序列构成的调节区有操作性地连接。该调节区也可含有一段衍生自根瘤土壤杆菌章鱼碱合成酶基因的上游激活序列。

根据本发明的另一方面内容,提供了一种在植物体内进行基因表达的方法,包括将某一基因与本发明的嵌合调节区连接、将该基因和嵌合调节区插入植物体内以及允许在植物体内表达该基因等步骤。

根据本发明的另一方面内容,提供了一种含有本发明的嵌合调节区和基因盒的质粒和转基因植物。

本发明的其它目的、特征和优点将由本文中的论述、数据和图表而变得显而易见。

附图简述

图 1 表示了以 mas 和 ocs 为基础的嵌合调节区的结构。箭头所示为 mas 或 ocs 启动子的上游激活序列的取向。数字表示相对于转录起始位点的核苷酸位置。在结构 3 和 4 中使用了 ocs 上游激活序列的三聚体。在结构 5 和 6 中使用了 ocs 上游激活序列的单体或三聚体。

图 2 表示了烟草原初转化子提取液中以 mas 启动子为基础结构的 GUS 活性。利用由叶(图 A)、茎(图 B)或根组织(图 C)制备的总蛋白来测定 GUS 活性。每一栏代表一单个转化子的活性。不同的结构如图底所示。用于每一种结构分析的转基因植株数量由“n.”表示。每一种结构的 GUS 活性平均值由“x.”表示。A=激活序列;P=启动子;(Aocs)₃=ocs 激活序列的三聚体。

图 3 表示了烟草原初转化子提取液中以 mas 启动子加上激活序列为基础结构的 GUS 活性。利用由叶(图 A)、茎(图 B)或根组织(图 C)制备的总蛋白来测定 GUS 活性。每一栏代表一单个转化子的活性。不同的结构如图底所示。用于每一种结构分析的转基因植株

数量由“n.”表示。每一种结构的 GUS 活性的平均值由“x.”表示。A = 激活序列; P = 启动子; AocsAmasPmas = ocs 激活序列单体与 mas 激活序列加上启动子连接; (Aocs)₃AmasPmas = ocs 激活序列的三聚体与 mas 激活序列加上启动子连接。

图 4 表示以烟草原初转化子提取液中以 ocs 启动子为基础结构的 GUS 活性。利用由叶(图 A)、茎(图 B)或根组织(图 C)制备的总蛋白来测定 GUS 活性。每一栏代表一单个转化子的活性。不同的结构如图底所示。用于每一种结构分析的转基因植株数量由“n.”表示。每一种结构的 GUS 活性平均值由“x.”表示。A = 激活序列; P = 启动子; Amas' = mas 区 -213 至 -318; Amas'' = mas 区 -111 至 -318。

图 5 表示以烟草原初转化子提取液中以 ocs 启动子加上激活序列为基础结构的 GUS 活性。利用由叶(图 A)、茎(图 B)或根组织(图 C)制备的总蛋白来测定 GUS 活性。每一栏代表一单个转化子的活性。不同的结构如图底所示。用于每一种结构分析的转基因植株数量由“n.”表示。每一种结构 GUS 活性的平均值由“x.”表示。A = 激活序列; P = 启动子; Amas' = mas 区 -213 至 -318; Amas'' = mas 区 -111 至 -318。

图 6 表示双倍 35S 和 Mac 启动子在几种转基因烟草植株的叶(双倍 35SL、MacL)、茎(双倍 35SS、MacS)和根(双倍 35SR、MacR)中 GUS 活性表达的大致水平。

图 7 表示了用于诱导型表达研究的结构。“UAS”=上游激活序列;“pmas”=mas 启动子;“GUS”=β-葡萄糖苷酸酶基因;“NOS”=胭脂碱合成酶聚腺苷酸信号序列。

图 8 表示纯化的成熟线虫卵中 GUS 活性水平。在 pH5.5 和 7.5 进行测定以检查细菌或动物的 GUS 活性。

图 9 表示各种转基因植物中线虫诱导的 GUS 活性。A 块对应

于具有 Pmas 启动子但无激活序列的转基因植物。B 块对应于具有一个 AmasPmas 启动子的转基因植物。C 块对应于具有一个 Aoc-sAmasPmas 启动子的转基因植物。

优选实施例的具体说明

本发明涉及用于调控外源基因表达的嵌合型调节区,它由各种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的上游激活序列和启动子构成。外源基因包括欲在转基因植物中表达的任何 DNA。本文中,不论何种来源的基因均被插入植物基因组中,所以插入位置对该植株来说是外源性的,即使该基因起源于被转化植株。1993 年 11 月 19 日申请的美国申请 No. 08/155,067 中也揭示了根据本发明的新结构,在此引作参考。

对本发明而言,任何类型的基因编码产物都可用于本发明中。在本发明的转基因植物中进行表达的外源基因包括但不限于 β -葡萄糖苷酸酶;编码杀虫和杀真菌毒素的基因;病原体抗性化合物;超敏反应化合物,例如过氧化物酶、葡聚糖酶和几丁质酶以及植物抗毒素;杀虫剂、除草剂和杀真菌剂耐受性基因;植物酶,例如那些与蛋白质、淀粉、糖和脂肪成分有关的酶;植物酶抑制剂,如蛋白酶和淀粉酶抑制剂;植物激素;昆虫激素和信息素;药物和营养化合物,如 β -胡萝卜素;维生素和抗体,包括抗体的片段和单链衍生物;干扰植物体内现有核苷酸序列的反义转录产物。参见 Kung 和 Wu, TRANS-GENIC PLANTS, Vol. 1 (Academic Press 1993)。

通常,天然的甘露碱启动子加上激活序列,或天然的章鱼碱启动子加上激活序列在转基因烟草植株组织中强度较弱(连锁的 gusA 报道基因产生的 GUS 活性为几百至几千 GUS 活性单位)。根据本发明内容,将来自这些基因的 UAS 组套地连在一个启动子加激活序列前显著提高由连锁的 gusA 报道基因产生的 GUS 活性至两个数量级,由此产生的活性高达几十万 GUS 活性单位。对这些表达新

启动子—gusA 融合基因的转基因烟草植株的组织进行的组织化学检查显示,这种新的启动子和激活序列组合体可在多数类型的植物细胞中发挥作用。所以,这些组合体(嵌合调节区)可能比本领域已知的启动子具有大得多的组成型。

本发明涉及可强效、连续启动基因表达的改良型植物调节区。另外,还可获得组织非特异性和/或组织增强性的表达。根据本发明选择激活序列和启动子将得到期望的表达类型。

新嵌合调节区在烟草中表现出强于任何其它已知调节区的表达特性。烟草可能是植物转化的常用模型。而且,新调节区可以几乎是组成型的(始终处于启动状态),因而在许多植物组织中,它比现有技术中的调节区更具有利用潜能。

本发明涉及用于植物体内基因表达的嵌合调节区,它可以具有衍生自第一种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活序列,该序列与衍生自第二种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段启动子序列或与衍生自第二种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活和启动子序列可操作性地连接。

本发明的嵌合调节区可与外源基因可操作性地连接,再与一个植物功能性终止子可操作性地连接,然后再与一段植物功能性聚腺苷酸信号序列可操作性地连接。本发明内容之一的嵌合调节区在很多时候将是高度组成型的。

上游激活序列是天然状态下通常位于天然转录起始位点前至少100 碱基对的序列,它能对表达产生影响。在这方面,章鱼碱和甘露碱合成酶基因的 UAS 特别有用。这些 UAS 可以与启动子序列或上游激活序列和衍生自不同的根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的启动子序列可操作性地连接。

“衍生”一词用于有关启动子及上游激活序列等 DNA 区域的论述中时,指“衍生”DNA 区域来自某种天然存在的 DNA 区域或其它

来源的 DNA 区域或以其为基础。“衍生”DNA 区域可以与天然存在的 DNA 区域或其它来源的 DNA 区域有所不同(通常是通过人工诱变)。

“可操作性地连接”指第一序列与第二序列足够靠近,从而可使第一序列对第二序列或对受第二序列调控的某一区域产生影响。例如,一个 UAS 可与一个启动子可操作性地连接,UAS 可由此增强启动子的转录强度。此时,UAS 通常位于启动子的 5' 端。然后,UAS 和启动子可以再与某一基因或操作性地连接,从而使该基因在通常位于其 5' 端的 UAS/启动子组合体的调控下得以表达。通常,启动子距转录起始位点 30—50 碱基对内,距翻译起始位点几百碱基对内。激活序列通常距启动子几百碱基对内。例如,多数激活序列距被增强的启动子约 300 至 400 碱基对内。在使用了一个以上激活序列的本发明实施例中,激活序列彼此间距在 100 至 200 碱基对内。

用于构建本发明嵌合调节区的源冠瘿碱合成酶基因可以互不相同,而且最好选自由甘露碱、章鱼碱、胭脂碱和农杆菌碱合成酶基因组成的冠瘿碱合成酶基因。

由天然 mas 和 ocs 启动子加激活序列指导的 GUS 活性的表达局限于特定的细胞类型。与天然结构相比,将一段 ocs 激活序列与 mas 启动子加激活序列可操作性地连接,以及将一段 mas 激活序列与 ocs 启动子加激活序列可操作性地连接表现出了可调控表达方式。所以,根据本发明的另一方面内容,可在包括木质部导管细胞和叶表皮细胞在内的许多细胞类型中获得 GUS 及其它基因的表达。另外,根据本发明的另一方面内容,也可以获得限定方式的表达。一个 ocs UAS 和一个 mas 最短启动子可操作性地连接而成的嵌合调节区在叶维管组织中产生弱表达,而在韧皮部组织中产生强表达。

本发明还涉及编码一种外源多肽的重组基因盒。重组基因盒可含有衍生自第一种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段上游激活

序列和衍生自与之不同的第二种根癌土壤杆菌冠瘿碱合成酶基因的一段启动子序列或上游激活序列加启动子序列,上述序列均与一外源基因可操作性地连接。该结构中的外源基因可与一段植物功能性终止子序列和/或一段植物功能性聚腺苷酸信号序列可操作性地连接,从而使终止子序列和聚腺苷酸信号序列可对该基因或该基因的转录产物产生影响。终止子序列和聚腺苷酸信号序列位于基因的3'端。

本发明的另一方面内容涉及可通过创伤或害虫感染诱导的启动子和上游激活序列组合体(调节区)。开发出的一种组合体(AmasP-mas)在根组织中表达良好并可被病原体进攻所诱导,而另一种(AocsAmasPmas)表达更广泛,但可被害虫进攻所诱导。这些表达系统将可用于针对根害虫,如线虫或真菌的基因,并将被用于抵抗昆虫类害虫和叶病原体。例如,编码干扰线虫繁殖循环的杀线虫毒素和蛋白的基因可与本发明联用。

病原体侵染可诱导如上所述的使用了甘露碱合成酶和 mas 或 ocs 激活序列的调节区。Keen 在 Plant Molec. Biol. 19:109—22 (1992)中描述了多种用于抗病原体的基因。

根据已有的序列信息可方便地制得冠瘿碱合成酶基因的启动子和上游激活序列等转录元件。例如 Leisner 等在 Proc. Nat'l Acad. Sci USA 85:2553—57(1988)、Leisner 等在 Plant Cell 1:925—36 (1989)中揭示了章鱼碱合成酶基因的转录元件。DiRita 和 Gelvin (同上)、Fox 等在 Plant Molec. Biol. 20:219—33(1992)、Leung 等在 Mol. Gen. Genet. 230:463—74(1991)、Langridge 等在 Proc. Nat'l Acad. Sci USA 86:3219—23(1989)中揭示了甘露碱合成酶基因的转录元件。Ha 等在 Nucl. Acids Res. 17:215—23(1989)、Mitra 等在 Mol. Gen. Genet. 215:294—99(1989)、Ebert 等在 Proc. Nat'l Acad. Sci USA 84:5745—49(1987)、An 等在 Mol. Gen.

Genet. 203:245—50(1986)中揭示了胭脂碱合成酶基因的转录元件。Bandyopadhyay 等在 J. Biol. Chem. 264:19399—406(1989)中揭示了农杆菌合成酶基因的转录调控元件。另外, Barker 等在 Plant Molec. Biol. 2:335—50(1983)中揭示了一种 T—DNA 的全部序列。

根据本文中的说明可获得不同的表达水平和方式。利用标记系统,如在此描述的 gusA 可评价以某一给定实施方法获得的表达量和方式。以下实施例将进一步解释本发明。这些实施例是对本发明的说明,绝不是限定本发明。

实施例 1

一段 ocs 或 mas 上游激活序列与一段 mas 或 ocs

启动子和激活序列的结合强效地提高了 GUS 的表达

如图 1 所示,创建新的 mas 和 ocs 启动子和上游激活序列的组合物。对 mas UAS 的多个亚结构域进行了测试,因为过去的缺失试验已表明转录起始位点上游 138 碱基内的序列足以准确启动向日葵冠瘿瘤组织中 mas2'/nptII 融合基因的转录。但是,—138 至—318 之间的序列也可能与 mas2' 启动子活性的定量调控有关。参见 DiRita 和 Gelvin, Mol. Gen. Genet. 207:233—41(1987)。被测试的 mas UAS 是:i) UAS=—318 至—138; ii) UAS'=—318 至—213; iii) UAS''=—318 至—111。参见图 1。

利用自转录起始位点起在—318 和—138 碱基对处缺失的两种 mas 启动子构建第一组嵌合调节区并将其作为转录融合体与 uidA (gusA) 粘接(图 1 中的结构 1—6)。第一类嵌合调节区在—138 处缺失的 mas 启动子上游含有(两种取向)ocs 激活序列(—116 至—333)单体或三聚体(图 1 中的结构 3 和 4)。第二类嵌合调节区在—318 处缺失的 mas 启动子上游含有相似的 ocs 激活序列单体或三聚

体(图 1 中的结构 5 和 6)。该 ocs 区含有一个 16 碱基对的回文序列及 5' 和 3' 的调控序列,当它们稳定地整合入植物基因组后,对在烟草愈伤组织和植株中激活 ocs 启动子是十分重要的。参见 Leisner 和 Gelvin, 1998 和 1989(同上);Kononowicz 等,Plant Cell 4:17—27 (1992)。

利用转录起始位点起在 -333 和 -116 处的两种 ocs 缺失体构建作为 uidA 基因的翻译融合体的第二组嵌合调节区(图 1 中的结构 8—16)。创建了两两种 mas 上游激活序列。图 1 中结构 9—12 使用了含 -213 至 -318 序列的短 mas 区。图 1 中结构 13—16 使用了含 -111 至 -318 序列的长 mas 区。短或长 mas 区被加在两种 ocs 缺失体的上游。

如下制备嵌合结构。所有结构的基础是 Clontech 公司的二元载体 pBI101.2。而质粒 pBI101.2 的基础是复制子 pRK290。质粒 pBI101.2 含有 T-DNA 边缘序列、在植物体中用卡那霉素选择的 nos-nptII 嵌合基因和一个跟有聚腺苷酸信号序列的不带启动子的 GUS 基因。从 pKan2-138 的一个 EcoRV-XbaI 片段制得 mas 启动子,其中含有与转录起始位点有关的一138 至 +65 区(20128 至 20343 碱基对)。参见 Barker 等,Plant Mol. Biol. 2: 335—50 (1983);DiRita 和 Gelvin, 同上。先将取自 pKan2-318 的 mas 激活序列和启动子序列区即与转录起始位点有关的一318 至 +65 区(20128 至 20513 碱基对)克隆入 CUp31(pUC13 的衍生体,具有 pUC13 骨架但含有一个由 5' 向 3' 读作 HindIII、PstI、SstI、SmaI、BamHI、XbaI 的多接头)的 SmaI-XbaI 位置。再将所得的 CUp31 的 HindIII-XbaI 限制性核酸内切酶解片段克隆入 pBI101.2 多接头的 HindIII-XbaI 位置,由此得到质粒 pNi1 和 pNi2(分别对应于结构 1 和 2)。

由质粒 pEN Δ 1(Leisner 和 Gelvin(1988), 同上)制取一个带

HindIII 接头的 ocs 增强子片段。该片段位于转录起始位点-333 至-116(13774 至 13991 碱基对, Barker 等, 同上), 将其三聚体以两种取向克隆入 pNi1 中 mas 上游的 HindIII 位置, 由此得到图 1 中结构 3 和 4。为了创建结构 5 和 6, 将相同的 ocs 激活序列片段的三聚体或单体克隆入 pNi2 中 mas 激活序列加启动子上游的 HindIII 位置。

将取自 pEN1(Leisner 和 Gelvin, 同上)的含 ocs 启动子区和部分 ocs 结构基因的一个 BamHI-EcoRI 片段即转录起始位点起-116 至+296(13774 至 13362 碱基对)和含 ocs 激活序列和启动子区的 XbaI-EcoRI 片段即转录起始位点起-333 至+296(13991 至 13362 碱基对)分别克隆入 pBluescriptII SK⁺(Stratagene 公司)的 BamHI-EcoRI 和 XbaI-EcoRI 位置。再将由所得的 pBluescript 衍生体制得的 XbaI-EcoRI 片段克隆入 pBI101.2 的 XbaI-SmaI 位置, 由此创建质粒 pLH3(结构 7)和质粒 pNi3(结构 8)中的 GUS 翻译融合体。将来自 pKan2-318 的含有一段“短”mas 激活序列即转录起始位点起-318 至-213(20513 至 20407 碱基对)的 XhoI-HaeIII 片段克隆入 pUX31(pUC13 的衍生体, 具有 pUC13 的骨架但其中的 SamI 位点被换成 XhoI 位点)的 XhoI-HincII 位置。用 Klenow 片段将所得的 XhoI-HindIII 片段制成平端, 加上 XbaI 接头, 将片段以两种取向克隆在 pLH31(创建结构 9 和 10)和 pNi3(创建结构 11 和 12)的 XbaI 位置。同样, 利用 Klenow 片段将取自 pKan2-318 的一个长 XhoI-MnlI mas 激活序列片段即转录起始位点起-318 至-111(20513 至 20305 碱基对)制成平端, 加上 XbaI 接头后将片段以两种取向克隆在 pLH31(创建结构 13 和 14)和 pNi3(创建结构 15 和 16)的 XbaI 位置。

然后将上述每一种结构转化至大肠杆菌 DH52 中, 于 37℃ 生长在含卡那霉素的 LB 培养基中。由限制性酶切图谱确定插入取向。含 800bp HindIII-BamHI 片段和 CaMV 35S 启动子的质粒 pBI121

(Clontech 公司)被用作比较嵌合调节区相对强度的参照物。

利用含迁移质粒 pRK2013 的 *E. coli* MM294, 通过三亲株接合过程将带有插入子的重组质粒迁移入 (*A. tumefaciens* LBA4404。参见 Hoekema 等, *Nature* 303: 179—80 (1993); Ditta 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 77: 7347—51 (1980)。在 LBA4404 中, 重组质粒保留作为独立的复制子(“二元载体”), 该质粒可转移入植物体, 然后整合到植物体的细胞核 DNA 中。也可使用其它方法, 如电穿孔来用将质粒转化入根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 细胞。

在含 0.5% 葡萄糖、10 μ g/ml 利福平和 50 μ g/ml 卡那霉素的 AB 基本培养基平板上选择根癌土壤杆菌转接合体。参见 Lichtenstein 和 Draper, *DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH* (Glover 编辑, Oxford—IRL Press 1986)。由 DNA 斑点分析确定受体 *A. tumefaciens* 菌株中迁移质粒的导入。

利用叶片转化法通过含有这些结构的 *A. tumefaciens* 菌株转化取自红花烟草 (*Nicotiana tabacum*) Wisconsin 38 变种的 6 周大的不结果枝尖培养物的叶片。参见 Horsch 等, *Science* 227: 1229—31 (1985)。被感染叶片在不含抗生素的 MS3⁺ 培养基上生长 3 天。然后将叶片转移到新鲜的含 1250mg/l 羧苄青霉素和 200mg/l 卡那霉素的枝诱导性培养基中。参见 Kononowicz 等, *Plant Cell* 4: 17—27 (1992)。4 至 5 周后, 由每一叶片长出的单个枝条被转移到含 500mg/l 羧苄青霉素和 50mg/l 卡那霉素的根诱导性培养基中。2 周后, 将枝尖转移到含 50mg/l 卡那霉素的 BGS 培养基(含 1mg/l 叶酸、10mg/l 吲哚乙酸和 30mg/l 激动素的 MS 培养基)中以体外保持每一系的枝尖培养物。

检查含有各种结构的再生转基因植株的 GUS 活性。当植株长到 10 至 12 叶阶段时, 由第 4 或第 5 片已充分舒展的叶及附近的茎和生长活跃的新生根收获少量的烟草组织。在 200 μ l 提取缓冲液中

将组织磨碎并于 -70°C 保存。参见 Jefferson 和 Wilson, PLANT MOLECULAR BIOLOGY (Gelvin & Schilperoot 编辑, Kluwer Acad. Press 1991)。使用 $10\mu\text{l}$ 提取液 (约 20 至 $30\mu\text{g}$ 蛋白质), 以 MUG (4-甲基伞酮酰基- β -D-葡萄糖苷酸 (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)) 为底物, 根据 Jefferson 和 Wilson 的方法测定 GUS 活性。蛋白质浓度是根据 Patterson, *Analyt. Biochem.* 83: 346—56 (1977) 测定的。

含有相同结构的单个转基因植株表现出一系列不同的 GUS 活性 (见附图 2—5)。但是, 通过测定大量含相同结构植株中的 GUS 活性, 可估计每一种嵌合调节区的相对强度。因为未能测出使用激活序列元件以相反方向克隆的结构在 GUS 范围上的区别, 所以将每一种双成员结构小组的数据合并 (3 和 4、5 和 6、9 和 10、11 和 12、13 和 14、15 和 16)。

在所有被检组织中, 由 mas-138 缺失体指导的表达产生 GUS 活性的最小基础水平 (图 2, 结构 1)。最短 mas 启动子加上天然 mas 激活序列产生结构 2, 它在叶和茎组织中指导平均值约为 1000 单位的低水平 GUS 活性 (附图 2, 图表 A 和 B)。在根组织中可观察到该结构较强的 GUS 活性, 平均值约为 12,000 单位 (附图 2, 图 C)。如上所述, 这些结果表明该 mas 启动子加激活序列区造成了 mas2' 启动子的根中优先性表达。以异源 ocs 激活序列 (三聚体) 在 mas-138 缺失体的上游替换 mas 激活序列 (结构 3 和 4) 基本不改变叶和茎中与同源 mas 启动子和激活序列复合体相比的 GUS 活性水平 (附图 2, 图 A 和 B)。综合数据表明, ocs 激活序列加启动子的表达在根中并不比在茎中有显著提高 (见下文, 结构 8), 这些数据提示 mas 启动子的根中优先性表达缘于由转录起始位点 138bp 内的某一元件。ocs 激活序列或 mas 激活序列都可以进一步增强这种组织特异性表达方式的表达量。

在 mas 启动子区的 -66 位鉴定出一个 AS-1 串联重复基序 (Lam 等, Proc. Nat'l Acad. Sci USA 86:7890-94(1989)) 的同系物。当该元件在 CaMV 35S 中被发现时,其可与反式作用因子 ASF-1 相互作用 (Lam 等, loc. cit.) 并据说可指导根中高活性的组织特异性表达方式 (Benfey 等, 同上)。

将由嵌合结构指导产生的 GUS 活性与由 CaMV 35S 启动子 (pBI121 的 -800) 获得的活性比较。多数 35S-GUS 转化子表现出相似或低于含 mas 激活序列和启动子结构植株的 GUS 活性 (附图 2)。如 Lam 等 (同上) 所报道的, 观察到了 35S 启动子的根中优先性表达。

结果显示, ocs 和 mas 启动子含有指导组织特异性转录的顺式作用元件。参见 Kononowicz 等, Plant Cell 4:17-27(1992); Leung 等, Mol. Gen. Genet. 230:463-74(1991)。根据这些结果, 测定异源激活序列复合体是否能改变由 ocs 或 mas 启动子单独指导的表达方式, 从而在特定的植物组织中引起被增强或被减弱的启动子活性。为测试该假定, 将附图 1 中所示的结构 5 和 6 (在 mas 激活序列和启动子的上游有一个 ocs 激活序列三聚体或单体) 引入烟草并测定不同组织中的 GUS 活性 (见附图 3)。与 mas2' 启动子和激活序列相比, 含一个 ocs 激活序列单体的新嵌合区提高了叶 (6.6 倍)、茎 (3.0 倍) 和根 (3.4 倍) 中 GUS 活性的表达 (见附图 2 和附图 3)。与缺少附加的 ocs 激活序列的 mas2' 启动子和激活序列 (图 1 和 2 中的结构 2) 相比, 含一个 ocs 激活序列三聚体的结构极大地提高了叶 (22 倍)、茎 (1.7 倍) 和根 (9 倍) 中 GUS 活性的表达。这些结果表明, 至少在叶和茎组织中, 加上多拷贝的 ocs 激活序列对 mas2' 启动子和激活序列的相对活性有惊人的强效扩增效应。

试验表明, 在转基因植物叶中的 CaMV 35s 启动子的活性 (平均 200pmol/min/mg 蛋白) 与 Comai 等在 Plant Mol. Biol. 15:373-

81(1990)中的数据相当。35S 增强子增倍后在叶中将 GUS 活性提高了两倍。将 Comai 等在 *loc. cit.* 中的数据与利用本发明结构获得的数据比较,结构 5 和 6 嵌合区分别在叶中指导的 GUS 表达比由 35S 启动子和增强的双倍 35S 启动子分别引导的强 156 倍和 26 倍。

还对含双倍 35S—GUS 或 Mac—GUS 结构的烟草植株的 T2 代的种子进行了试验。这些转基因植物叶中 GUS 活性的测定证实了上述启动子的相对强度。以下表 I 显示了含各种启动子—uidA 融合体的转基因烟草植株叶中的平均 GUS 活性。

表 I

启动子/激活序列	结构	GUS 活性 (pmole/min/mg 蛋白)
Pmas	1	69 ^a
AmasPmas	2	987 ^a
(Aocs) ₃ Pmas	3 和 4	1213 ^a
AocsAmasPmas	5 和 6	5474 ^a
(Aocs) ₃ AmasPmas	5 和 6	22142 ^a
Pocs	7	0 ^a
AocsPocs	8	566 ^a
Amas'Pocs	9 和 10	66 ^a
Amas' AocsPocs	11 和 12	13957 ^a
Amas''Pocs	13 和 14	138 ^a
Amas'' AocsPocs	15 和 16	1617 ^a
CaMV 35S		142 ^a
CaMV 双倍 35S		850 ^b
Mac(A35SAmasPmas)		5230 ^b

^a 所有原转化体中的平均 GUS 活性

^b GUS 活性高表达原初转化体(Comai 等, 同上)的 F1 后代中的平均 GUS 活性

表 II 给出了含启动子—uidA 融合体的转基因烟草植株 F1 代叶中的平均 GUS 活性。

表 2

启动子加激活 序列复合体	结构号	GUS 活性 (pmole/min/mg 蛋白质) 40 天 土壤中	
AmasPmas	2—2	206	225
	2—4	180	203
3 平均值		193	214
(Aocs) ₂ AmasPmas	5—2	398	3148
	5—3	8297	3513
	5—4	1555	1870
	5—5	3836	23631
	6—1	4616	774
	6—2	779	1363
	6—3	3628	933
平均值		3301	5033
AocsPocs	8—4	279	216
	8—6	252	90
	8—7	460	258
	8—10	115	998
	8—14	546	1460
平均值		330	604
AmasAocsPocs	11—1	621	975
	11—2	194	169
	11—3	1194	1033
	11—6	615	1084
	12—2	199	103
	12—5	8949	5157
平均值		1962	1420
CaMV35S	17—2	286	139
	17—5	260	153
	17—7	125	195
		224	162

- a. 第一个数字表示特定的结构。第二个数字表示一种原初转化体。
b. 原初转化体的种子在含卡那霉素的琼脂板上萌发,将芽胚转移至含卡那霉素的培养基中并在约 40 天后进行测定。

试验了一系列以 ocs 最短启动子(−116 至 +296)为基础的嵌合结构以评价其组织特异性表达的强度和方式。如图 4 所示,ocs 激活序列和启动子(图 1 中的结构 8)在转基因烟草的叶、茎和根组织中指导低浓度但较一致的 GUS 活性(平均值在 200 和 400pmole/min/mg 蛋白间)。以一段较短的 mas 激活序列(−213 至 −318)替换 ocs 激活序列(结构 9 和 10)产生的嵌合结构只在所有被检组织中指导低水平的 GUS 活性。

还试验了位于 ocs 启动子上游的一段较长 mas 激活序列(−111 至 −318; 结构 13 和 14)。这些结构只在根组织中指导了略有提高的 GUS 活性。除了在 −66 位发现的 AS−1 同系物外,在 −290 位也有一类似于 AS−1 元件的序列。虽然在较短的 mas 激活序列中也有该序列,但 −213 至 −103 之间的序列似乎才是指导根中优先性表达所必需的。

将一段较短的 mas 激活序列(−318 至 −213)邻接在 ocs 激活序列加启动子的上游(结构 11 和 12)。与只含 ocs 激活序列加启动子的结构(结构 8)相比,这些结构在叶、茎和根组织中指导的 GUS 活性分别提高了 6 倍、2.5 倍和 15 倍(图 5)。这些结构的表达略带根中优先性,表明可能发生了 AS−1 类似元件与 ocs 激活序列的相互作用。有趣的是,含较长 mas UAS 的结构(与 ocs 激活序列加启动子粘接; 结构 15 和 16)指导的 GUS 活性比含较短的 mas 激活序列的结构(结构 11 和 12)指导的略低(见图 5)。但是,与由 ocs 激活序列加启动子单独指导的表达相比,在 mas 启动子 5'端组套的 ocs 和 mas 激活序列都能产生较大提高。

实施例 2

转基因烟草植株中 T−DNA 拷贝数与 GUS 活性间的相关

为了确定 T−DNA 拷贝数与 GUS 活性间的关系,对取自 16 株

含结构 5 或 11 的转基因植物的基因组 DNA 进行了分析。首先,从植物组织中抽提出基因组 DNA 并用 HindIII 完全消化。参见 Rogers 和 Bendich, PLANT MOLECULAR BIOLOGY (Gelvin 和 Schilperroot 编辑, Kluwer Acad. Pub., 1992)。用 HindIII 消化 10 微克 DNA, 以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离片段, 利用毛细管转移法将 DNA 洗脱到尼龙膜上。参见 Maniatis 等, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor 1982)。在 80℃ 真空烘烤 2 小时将核酸固定在膜上。在 65℃, 1.5×SSC (1×SSC 为 0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠)、1.0% SDS、0.5% Blotto 和 0.5mg/ml 切断的鲑精子 DNA 中预杂交 2—4 小时。用 ³²P—dCTP 标记的含 GUS 编码区序列 (由 pBI101.2 制得的 XbaI—SstI 限制性核酸内切酶酶解片段) 的探针在新鲜溶液中 65℃ 杂交过夜。杂交完成后, 将膜用以下溶液在室温下顺次洗涤 15 分钟: 2×SSC/0.1% SDS, 0.5×SSC/0.1% SDS, 0.1×SSC/0.1% SDS。最后一次以 0.1×SSC/0.1% SDS 在 50℃ 洗涤 30 分钟。

利用限制性核酸内切酶和杂交探针的复合体, 根据杂交条带的数量和强度可以估计 T—DNA 拷贝数。在各个转化体中的整合的拷贝数由一至数个不等。GUS 活性与整合的 uidA 基因数不相关。例如在某些情况下, 含单个整合的 uidA 基因的植株在叶中表现出比含多个整合的 uidA 拷贝的植株高得多的 GUS 活性。

实施例 3

转基因烟草植株中 GUS 活性和 uidA mRNA 间的相关

因为 GUS 活性被用作表达强度的衡量标准, 所以有必要确证该活性反映了 uidA mRNA 的稳态浓度。有报道说当使用 mas2' 启动子和 uidA 报道基因时, GUS 活性与高浓度 uidA mRNA 不相关, 这一关系因为该报道而显得特别重要。参见 Hensgens 等, Plant

Mol. Biol. 20:921—38(1992)。

所以,检查了含4种不同结构(结构2、5、8和11)的转基因植株个体的叶中分离得到的 uidA mRNA 稳态浓度。首先,根据 Vries 等,PLANT MOLECULAR BIOLOGY (Gelvin 和 Schilperroot 编辑,Kluwer Acad. Pub., 1992)中的方法分离出总 RNA。取5毫克样品在 MOPS/EDTA 缓冲液(50mM MOPS,1mM EDTA,pH7.0)中通过1.2%的琼脂糖凝胶进行甲醛凝胶电泳分级,然后印迹到尼龙膜上。利用琼脂糖凝胶电泳和溴乙锭染色来检查 RNA 的完整性。核酸的荧光还可用于确定每一道加入了等量的 RNA。杂交条件与前述基因组 DNA 分析相同。

杂交完成后,将膜用以下溶液在室温下顺次洗涤15分钟: $2\times$ SSC/0.1%SDS, $0.5\times$ SSC/0.1%SDS, $0.1\times$ SSC/0.1%SDS。最后一次用 $0.1\times$ SSC/0.1%SDS 在 60°C 洗涤30分钟。

使用衍生自 GUS 编码序列的杂交探针进行 RNA 印迹分析,发现了一个预期长度的转录产物(约2300核苷酸)。GUS 活性与 uidA 稳态浓度间存在着紧密相关,这与 Hensgens 等的报道正相反。

实施例4

ocs 和 mas 启动子与激活序列的不同复合体对细胞特异性的 GUS 表达方式的调控

对转基因烟草组织进行组织学检查以确定 GUS 活性的细胞特异性表达方式。利用 X-gluc 对植物组织切片进行组织化学染色来揭示这些表达方式。

根据 Jeffeerson 和 Wilson(同上)的方法进行这些组织化学研究。简而言之,植物材料用0.1—0.3%的甲醛、0.1M Triton X-100、0.1M 磷酸盐缓冲液预固定20—40分钟,用0.1M 磷酸盐缓冲液漂洗,然后以1—2mM X-gluc(溶于0.1M Triton X-100、0.1M

EDTA、0.1M 磷酸盐缓冲液)染色 2—14 小时。在含 3—5% 甲醛的 0.1M 磷酸盐缓冲液中再固定 2 小时后,用 70% 的乙醇清洗样品,将其包埋在石蜡中,用旋转切片机切片(12—18mm)。以 1.0% 的高碘酸—0.5% 希夫试剂(“PAS”)对组织切片进行复染色。

在含有 mas 启动子但没有 mas 激活序列(结构 1)的植株叶组织的所有类型细胞中都没有测得 GUS 活性。含有受天然 mas 激活序列加启动子调控的 uidA 基因的植物叶肉细胞(包括栅栏细胞和海绵组织细胞)和保卫细胞中表现出中等 GUS 活性,但在表皮细胞中未测得 GUS 活性。在维管组织中,木质部管胞细胞中可观察到中强度的染色,但在韧皮部细胞和射线薄壁组织细胞中只见到较弱的染色。在含 ocs 激活序列三聚体和 mas 启动子(结构 3 和 4)的叶片中可观察到相似的 GUS 活性表达方式。但是,在叶维管组织的所有类型细胞中,GUS 活性极大地减弱。在 mas 激活序列加 mas 启动子前组套地连接 ocs 激活序列三聚体(结构 5 和 6)不仅在叶肉细胞和保卫细胞中,而且在表皮细胞中产生了强 GUS 活性。该结果表明远端和近端激活序列都能相互作用以调控表达方式。在叶维管组织中,不论 ocs 激活序列三聚体是否与 mas 激活序列加启动子连接,表达方式都相似。

在含有最短 ocs 启动子(结构 7)的叶组织中没有测得 GUS 活性。在叶片的横切面中,由 ocs 激活序列加启动子(结构 8)指导的 GUS 活性表达与 mas 激活序列加启动子指导的相似。在 uidA 基因受由一个短 mas 激活序列和 ocs 激活序列加启动子构成的嵌合启动(结构 11 和 12)子调控的植株叶片中也观察到该 GUS 活性表达方式。在叶支维管组织中,ocs 激活序列加启动子只在管胞细胞中指导 GUS 活性表达。与 mas 激活序列加启动子相比,ocs 激活序列加启动子在射线细胞和韧皮部细胞中指导中强度的 GUS 活性表达,在叶主维管组织的薄壁组织细胞、木质部管胞细胞中指导很弱的表达。

在 ocs 激活序列加启动子前加或不加一个短 mas 激活序列,在叶维管组织中都可观察到相似的 GUS 活性表达方式。但是,在薄壁组织细胞、射线细胞和韧皮部细胞中的活性极大地提高。在含有 mas 激活序列加 ocs 启动子(结构 9 和 10)的植株中未能测得 GUS 活性。

mas 激活序列加启动子(结构 2)在腺毛状体柄部指导 GUS 活性的弱表达,但在腺毛状体头部指导强表达。ocs 激活序列三聚体与 mas 激活序列加启动子的可操作性地连接(结构 5 和 6)产生相似的表达方式;但是,柄部细胞中 GUS 活性的相对水平有较大提高。毛状体中由含有一段短 mas 激活序列连接 ocs 激活序列加启动子的结构(结构 11 和 12)指导的 GUS 活性表达在腺毛状体头部较强,而在柄细胞中较弱。

在转基因植株的茎中,mas 激活序列加启动子(结构 2)在皮层细胞中指导 GUS 活性弱表达。在射线细胞和韧皮细胞中可观察到强的 GUS 活性,但在木质部管胞细胞中的表达较弱。即使在 mas 激活序列加启动子的上游克隆一段 ocs 激活序列的三聚体(结构 5 和 6)也不改变这种表达方式。当以 ocs 激活序列三聚体取代 mas 激活序列(结构 3 和 4)时,可观察到一种不同的表达方式。在韧皮部细胞中 GUS 活性的表达仍然较强,但此时在射线细胞和木质部管胞细胞中变得较弱。与 mas 激活序列加启动子相比,ocs 激活序列加启动子(结构 8)在射线细胞和韧皮部细胞中指导较弱的表达,而在管胞细胞中指导强表达。当在 ocs 激活序列加启动子的上游加一段短 mas 启动子(结构 11)时,表达方式基本保持不变。

由 mas 激活序列加启动子(结构 2)指导的 GUS 活性在根组织中较不稳定。实际上,存在一种再生植株,在其根成熟区的根冠细胞、表皮细胞和根毛以及根皮层细胞、韧皮部细胞和木质部细胞中可测得 GUS 活性。但是,在根伸长区几乎测不到 GUS 活性。在 mas 激活序列加启动子前加上 ocs 激活序列三聚体(结构 5 和 6)时,在根成熟

区的各种类型细胞中不时地,但非总是能测得 GUS 活性。以 ocs 激活序列三聚体取代 mas 激活序列(结构 3 和 4)只在根伸长区周围根皮层细胞和的内皮细胞中产生 GUS 活性。ocs 启动子和激活序列(结构 8)或一段短 mas 激活序列加 ocs 激活序列和启动子(结构 11 和 12)指导 uidA 基因表达时,可观察到相似的 GUS 活性表达方式。

实施例 5

新嵌合调节区与其它调节区的比较

mas 激活序列加启动子的活性在根组织中最强。mas 激活序列加启动子结合一段 ocs 激活序列三聚体可提高 GUS 活性水平 2 至 23 倍。这种活性提高在叶组织中最显著,但也可见于茎和根组织。ocs 激活序列加启动子的活性在转基因植株的叶、茎和根中大致相同。在 ocs 激活序列加启动子前连接“短”mas 激活序列可提高 GUS 表达水平 2 至 20 倍。这种提高在叶组织中最显著。将多拷贝的 ocs 激活序列与 mas 激活序列加启动子组合可产生一个转录调控元件,它在叶中比 35S 启动子强约 156 倍,比“增强的”双倍 CaMV 35S 启动子强 26 倍,比 Comai 等在 Plant Mol. Biol. 15:373—81(1990)中描述的“Mac”和“大 Mac”启动子强 4.2 倍(参见图 2 和 3,表 I)。有关叶(“L”)、茎(“S”)和根(“R”)中 35S 和 Mac 启动子的数据显示在图 6 中。必须注意,由结构 5 和 6 表示的嵌合启动子的活性强于双倍 CaMV 35S 启动子、Mac 启动子和大 Mac 启动子的活性是最小估计值。另外,含有这些结构的转基因植株细胞的组织化学分析表明,这些“组套”激活序列几乎在所有类型细胞中指导 GUS 活性的表达。例如,在木质部和叶表皮细胞经及叶肉细胞、保卫细胞、毛状体细胞、和韧皮部细胞中可测得 GUS 活性的强表达。在茎中,可在韧皮部细胞、皮层细胞和薄壁组织细胞中测得活性。在根中,在根成熟区的根尖、根毛和多数细胞中表现有 GUS 活性。

已经有了植物生长条件对不同嵌合启动子—uidA 基因的可能影响的证据。Hensgens 等在 Plant Mol. Biol. 20:921—38(1992)中报道了在试管内生长的(其根生长在无菌琼脂中)植株中的 GUS 活性比在暖房中种植于土壤中的植株中的高 3 至 10 倍。另外,已发现,在受控环境条件下的土壤中种植的植物叶的 GUS 活性表达水平比在试管内种植的植株低。但是,由各种调节区指导的 GUS 活性相对水平基本保持相同,与植株的种植方式无关(表 2,同上)。另外,自花传粉转基因烟草植株 F1 代叶中各种嵌合调节区的相对强度与原代转化体和再生植株中的相似(表 2)。

在一特定植株中发现了 mRNA 稳态浓度与 GUS 活性间的紧密相关。该结果证实了将 GUS 活性分析用作表达强度的测定的可靠性。但是,这一发现与 Hensgens 等(同上)的发现相反。Hensgens 等的相反发现可能是由于它们在 RNA 印迹分析中未使用变性条件。

Comai 等(同上)发现,当植物种植在土壤中时,短于本文所用的一 mas2' 激活序列和启动子区段(—301,相对于—318)指导的 GUS 活性只有 CaMV 35S 指导的 10%。包括—301 上游在内的序列将 GUS 活性提高至是 35S 启动子指导的 40%。Comai 等总结,位于—300 上游但与之靠近的一区段是 mas2' 启动子完全活性所必需的。由本文所述试验中所用的 mas2' 启动子(—318)指导的活性略强于 35S 启动子。

Langridge 等(同上)证明,激素可诱导高出几倍的 mas2'—lux 融合基因的活性。虽然最初的分析是在含激素的试管种植植株上进行的,但是这些生长条件对结果并没有大的影响,土壤种植植株表现出相似的 GUS 活性相对水平证明了这一点。

Langridge 等还证明,在转基因烟草的茎中,mas2' 启动子在维管组织中表现出最大活性,而 Saito 等(同上)描述,烟草根部的根冠

中染色较强,而在韧皮部细胞中较弱。本文所揭示的数据与这些报道十分一致。但是,Saito 等在叶脉中测得了 GUS 活性而在叶肉细胞中却没有。在本文所述试验中,在含有 mas2'-uidA 嵌合基因的转基因植株叶肉细胞中可清楚地测得 GUS 活性。关于 mas2' 启动子在转基因烟草植株各种组织中的表达,本文所述的许多结果与 Leung 等的也十分一致。但是,Leung 等在茎维管细胞中没有测出由他们的结构指导的 GUS 活性。

异源 ocs 或 mas 激活序列与一段 mas 或 ocs 激活序列加启动子的组合极大地增强了被检转基因烟草所有组织中的 GUS 活性水平。这些数据表明这些嵌合调节区的高表达是由在这些嵌合调节区中存在的正调控元件间的协作性相互作用而不是单纯的累加作用产生的。

实施例 6

嵌合调节区在诱导型表达中使用

本发明另一方面内容涉及可被创伤或害虫侵染诱导的启动子和上游激活序列的组合物。开发出的一种组合物(AmasPmas)在根组织中优先表达并可被病原体进攻所诱导,而另一种(AocsAmasPmas)的表达更广泛,但可被害虫的进攻进一步诱导。这些表达系统可用于针对如线虫或真菌等根害虫的基因,并将被用于抵抗昆虫类害虫和其它叶病原体。

使用被删除至-138 的核心甘露碱合成酶启动子区来构建嵌合调节区。将该核心启动子与 GUS 编码序列融合并以胭脂碱合成酶("NOS")的聚腺苷酸化信号序列为末端。参见图 7 中结构 1。

联用甘露碱合成酶启动子-318 至-138 的 UAS 和甘露碱合成酶核心启动子创建出图 7 中的结构 2。图 7 中结构 5 和 6 含有两种取向的章鱼碱合成酶基因-333 至-116 的 UAS 三聚体。利用根癌

土壤杆菌转化法将这些结构转染入烟草中。测定大量转基因植株体的叶、茎和根中的 GUS 活性。mas 启动子加激活序列(图 7 中结构 2)的活性在根中最强,在叶和茎中较弱。与结构 2 相比,mas 激活序列和启动子加上 ocs 激活序列(图 7 中结构 5 和 6)在根中将 GUS 活性提高 10 倍,在茎和叶中提高 50 至 100 倍。ocs 激活序列的取向对结果无影响。

mas 启动子加激活序列的创伤诱导性在转基因烟草植株的叶中可诱导 30 倍的活性,在茎中诱导 17 倍,在根中诱导 3 倍。

为了测试各种嵌合调节区通过病原体进攻的诱导性,以线虫感染含有结构 1、2、5 和 6 的各个转基因烟草植株,并监测其 GUS 活性的诱导作用。为了保证不发生线虫内 GUS 活性的内源表达,对成熟线虫卵的纯化制剂进行了分析。所用的线虫种为从西红柿根部分离的 Meloidogyne incognita 品种 3。将感染后的根在 10% 的 chlorox 溶液中持续搅拌 4 分钟来分离成熟的虫卵。通过一个 200 目的网筛洗涤该溶液以去除根渣,并在一个 500 目的网筛上收集虫卵。清洗后使用一种线虫计数片(Olympic Equine Products 公司)计数虫卵。作为对照,为了测定线虫内源 GUS 活性的存在,在 pH5.5 和 pH7.5 对虫卵进行试验。pH5.5 时的 GUS 活性缘于由动物基因引发的内源表达,这将被作为背景活性。pH7.5 时的 GUS 活性缘于细菌基因的表达。在两种 pH 下都只发现成熟线虫卵中 GUS 活性的最小值。所以,Meloidogyne incognita 中没有可能导致试验中由于线虫卵存在而出现严重背景活性问题的细菌或动物的 GUS 活性。

以 10,000 个纯化线虫卵感染转基因植株,并在暖房条件下于沙土中种植数月。收获成熟植株的根并目测线虫感染部位。被感染部位会形成一个含线虫和卵囊的根瘤,而未被感染部位则具有正常外观,由此可目测 Meloidogyne incognita 感染部位。用根瘤来测定被感染区的 GUS 活性,而正常根区被用作未感染对照。所有未感染和被

感染根之间的比较都以同一植株为基础,从而避免了位置效应和植株间基因表达的不同。在 pH5.5 和 pH7.5 测定使用结构 1 的 7 号植株(1—7)中 GUS 活性的诱导作用(图 9 中图 A)。

表达水平低于含有结构 2、5、6 的转基因植株表明单独的 Pmas 启动子只表达基本活性水平且不被线虫感染所诱导。

当 Pmas 启动子含有 mas 激活序列 A_{mas} 时(结构 2),GUS 活性的表达水平较高且可被线虫感染所诱导(图 9 中 B)。加上 ocs 启动子的 UAS(A_{ocs})产生相似的线虫感染诱导作用(图 9 中 C)。有一植株(5—5)不表现出诱导型表达。这可能是由于所用的根组织的老化或基因插入了染色体中某个会改变表达的位置,因为另一转化体(5—2)发生了诱导性应答。

这些结果说明,病原体侵染可诱导使用甘露碱合成酶启动子和 mas 或 ocs 激活序列的嵌合调节区。这些区域可被用于杀线虫毒素基因或可中断线虫摄食和增殖的激素化合物基因的表达。例如,苏芸金杆菌的某种毒素(“Bt 毒素”)被发现可有效抵抗线虫。参见 Adang 等,Plant Molec. Biol. 21:1131—45(1993)。美国专利 5,281,530、美国专利 5,322,932、PCT 出版物 WO92/04453 和欧洲专利公开 0 517 367A1 揭示了这些毒素的氨基酸序列和编码这些毒素的核苷酸序列。

这些诱导型调节区的应用并不限于杀线虫。这些调节区对导致创伤的其它病原体同样有效。

实施例 7

嵌合调节区对杀虫毒素表达的调控

本发明的嵌合调节区可被用于在转基因植株中调控杀虫毒素的表达。在某个优选实施例中,可将 Bt 毒素置于本发明调节区的调控下。

已开发出了改进型 Bt 毒素的编码基因以提高其在转基因植株中的表达水平。Perlak 等在 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:3324—28(1991)中揭示了对 cryIA 基因的修饰作用以置换在植株中不被优选的序列。这些修饰作用被发现可提高活性 CryIA 毒素的水平。同样,Adang 等(同上)揭示了为优化表达而进行的 CryIIIA 基因的修饰作用。Bt 毒素家族中的其它成员也可被修饰并用于本发明中。还可以使用与超敏性应答有关的基因。参见 Keen(同上)。总之,本发明不限于任何特定类型的毒素或化合物。由基因编码或由酶生产的任何类型的杀虫毒素或抗昆虫化合物,或由基因编码的其它实例都可与本发明联用。

实施例 8

嵌合调节区对除草剂耐受性表达的调控

本发明的嵌合调节区可被用于在转基因植株中表达对除草剂具有耐受性的基因。获得对除草剂耐受性有三种主要方式,即:i)植物介导的除草剂解毒作用;ii)除草剂作用靶的增强表达;iii)除草剂结合位置的突变。参见 Schulz 等,Crit. Rev. Plant Sci. 9:1—15(1990)。以上方式中的任何一种都可与本发明联用,但前两种方式更适于本发明。

已知有几种酶对多种常用除草剂有解毒能力。例如,谷胱甘肽-S-转移酶可提供对对称三嗪(s-triazine)和氯乙酰胺类除草剂的耐受性。例如参见 Schulz 等,同上;Shah 等,Plant Molec. Biol. 6:203—11(1986);Weigand 等,Plant Molec. Biol. 7:235—43(1986)。可利用取自吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的某一基因灭活除草剂 phosphinothricin。参见 De Block 等,EMBO J. 6:2513—18(1987);Thompson 等,EMBO J. 6:2519—23(1987)。腈水解酶被发现可解毒除草剂 bromoxynil。参见 Stalker 等,Science 242:419—23

(1988)。其它解毒酶也可与本发明联用。

另一种主要的耐药性产生途径是以除草剂作用靶的增强表达为基础的。例如除草剂草甘磷是 5-烯醇-丙酮酰莽草酸(pyruvylshikimate)-3-磷酸酯合成酶(“EPSP 合成酶”)的一种竞争性抑制剂。EPSP 合成酶的增强表达可产生草甘磷耐受性。利用本发明的强效、组成型启动子来调控 EPSP 合成酶序列的表达可获得 EPSP 合成酶的增强表达。另外,可将含有本发明启动子的多拷贝 EPSP 合成酶序列置于转基因植株中以获得更高水平的表达。各种来源的 EPSP 合成酶编码序列是已知的。参见 Duncan 等,FEBS Lett. 170:59(1984); Stalker 等,J. Biol. Chem. 260:4724—28(1985);Shah 等,Science 233:478—81(1986)。

最后,改变除草剂的结合位置也可被用于提供除草剂耐受性。Stalker 等和 Shah 等发现,改变 EPSP 合成酶中的氨基酸可产生对草甘磷的耐受性。同样,乙酰羟酸(acetohydroxy acid)合成酶可提供对磺酰脲类和咪唑啉酮类的抗性。参见 Schulz 等,同上;Wek 等,Nucl. Acid. Res. 13:3995—4010(1985)。

实施例 9

嵌合调节区对抗病毒基因表达的调控

通过病毒基因或其反义对等物的表达可使植物具有抗病毒性。产生对病毒抗性的主要途径是通过:i)蛋白质介导的抗性,通常是外壳蛋白;ii)反义 RNA 介导的抗性。Beachy 等在 Annu. Rev. Phytopathol. 28:451—74(1990)中综述了以上两种途径。表达病毒外壳蛋白而不是反义 RNA 的转基因植物似乎表现出了对病毒更大的抗性。参见 Beachy 等,同上;Cuozzo 等,Bio/technology 6:549—57(1988)。

本发明的嵌合调节区被用于表达在转基因植物中产生抗病毒性

的任何基因。例如,许多植物病毒的外壳蛋白氨基酸序列是已知的,由此就可以推断出核苷酸序列。另外,已知病毒外壳蛋白的核苷酸序列就可以准确合成反义 RNA 序列。这些序列可以在转基因植物中表达以获得抗性。

Cuozzo 等(同上)揭示了黄瓜花叶病毒外壳蛋白的序列。还构建了含其它病毒序列的转基因植物。例如,Anderson 等在 *Phytopath.* 79:1284—90 中揭示了表达烟草花叶病毒和苜蓿花叶病毒的外壳蛋白的转基因植物。Hemenway 等在 *EMBO J.* 7:1273—80(1988)中揭示了表达马铃薯病毒 X 的外壳蛋白和反义 RNA 的转基因植物。Huisman 等在 *J. Gen. Biol.* 69:1789—98(1988)中揭示了该病毒的序列。Gerlach 等在 *Nature* 328:802—05(1987)中揭示了表达烟草环斑病毒的卫星 RNA 的转基因植物。该卫星 RNA 可改善环斑病毒引起的病症。Eggenberger 等在 *J. Gen. Virol.* 70:1853—60 中揭示了黄豆花叶病毒的序列。但是,本发明的使用并不限于任何特定类型的病毒。任何类型病毒的序列可与本发明联用。

应当理解,说明、特定实施例、附图和数据在表明优选实施方法时被作为论述和例证,但并不是对本发明的限定。通过本文论述所揭示的内容,本发明范围内的各种改变和修饰对熟练技术人员来说将是显而易见的。

说明书附图

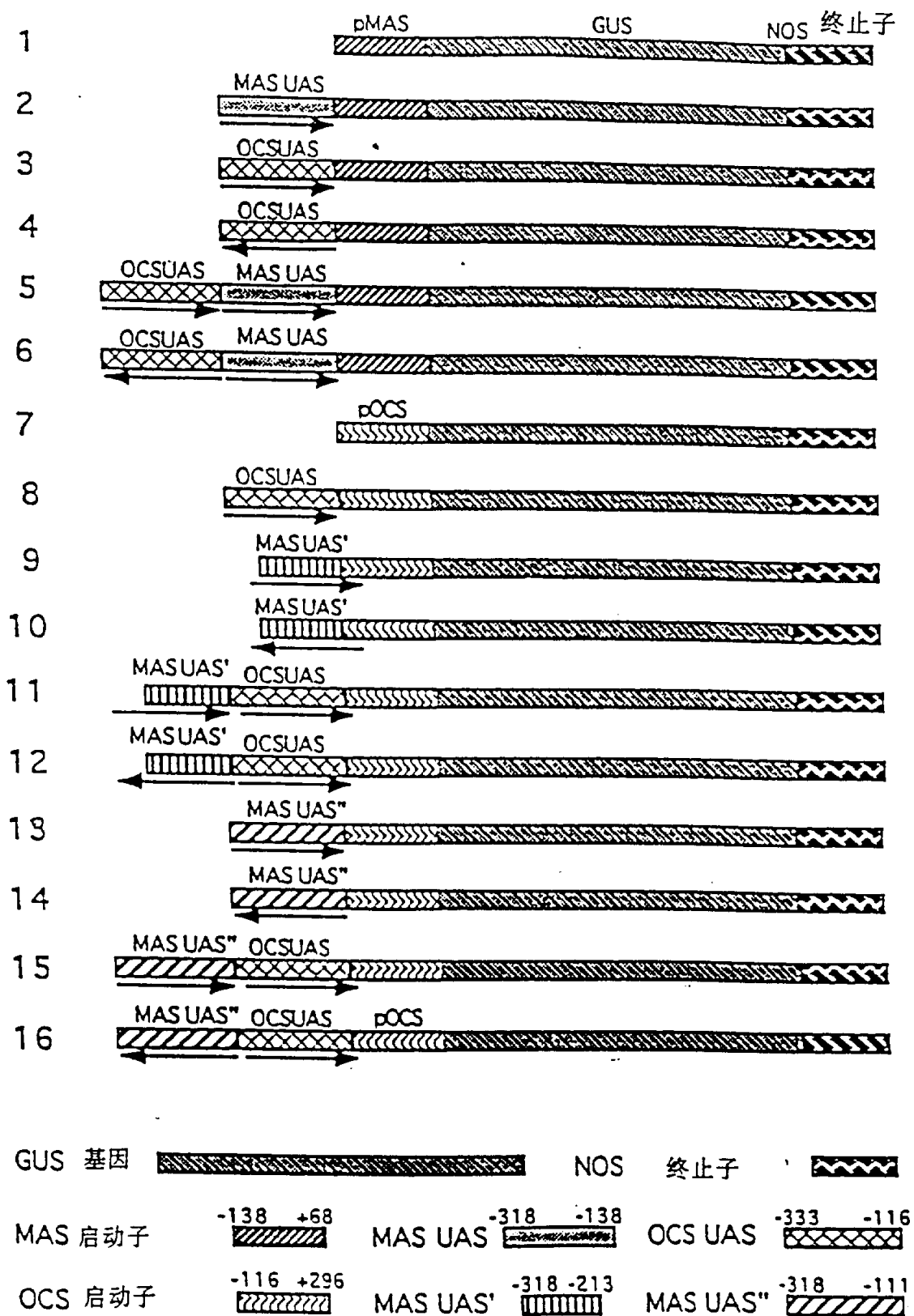
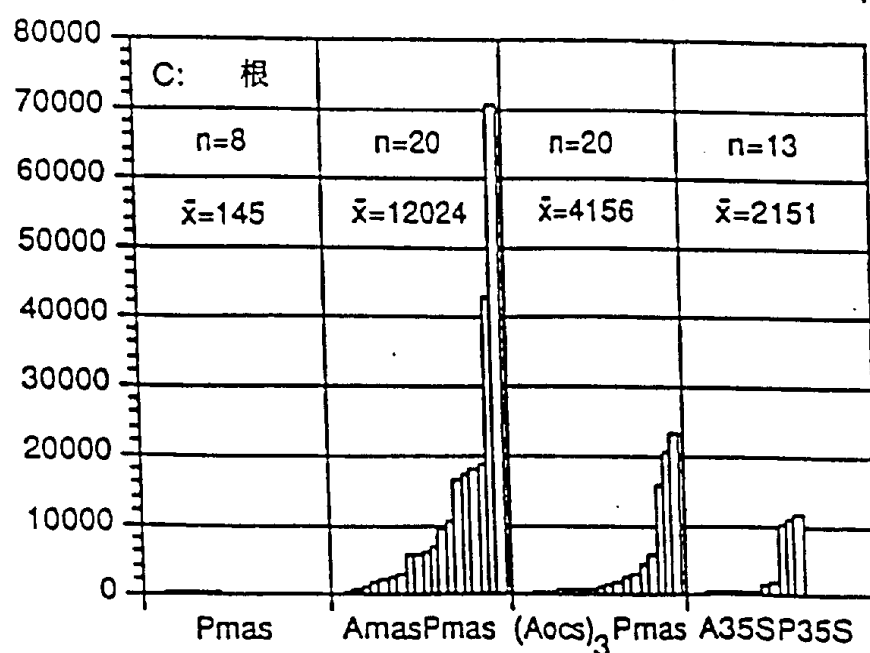
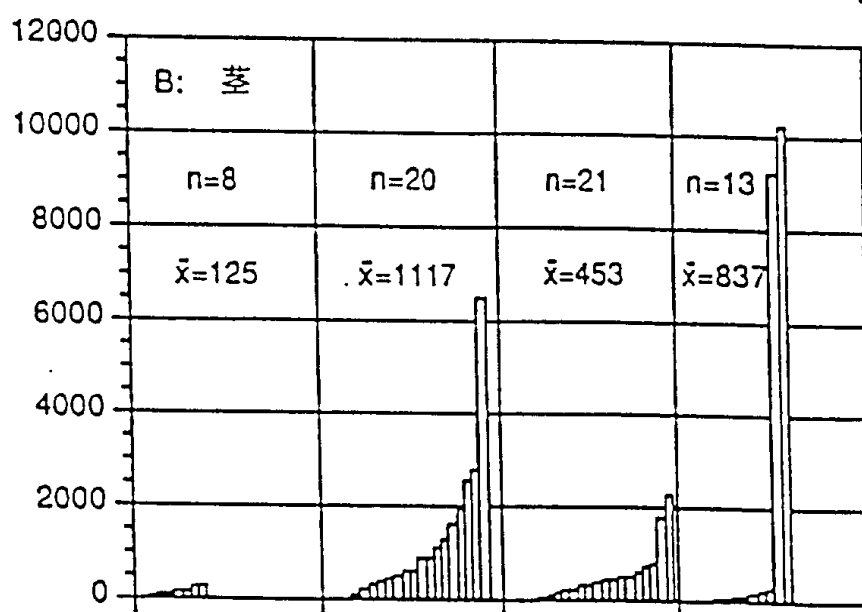
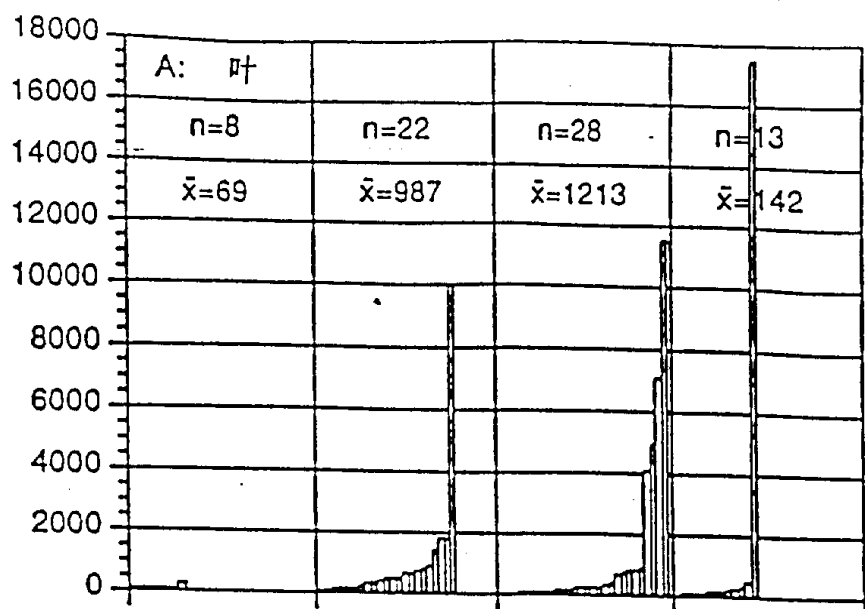


图 1

GUS 活性 (pmole/min/mg 蛋白质)



结构

1

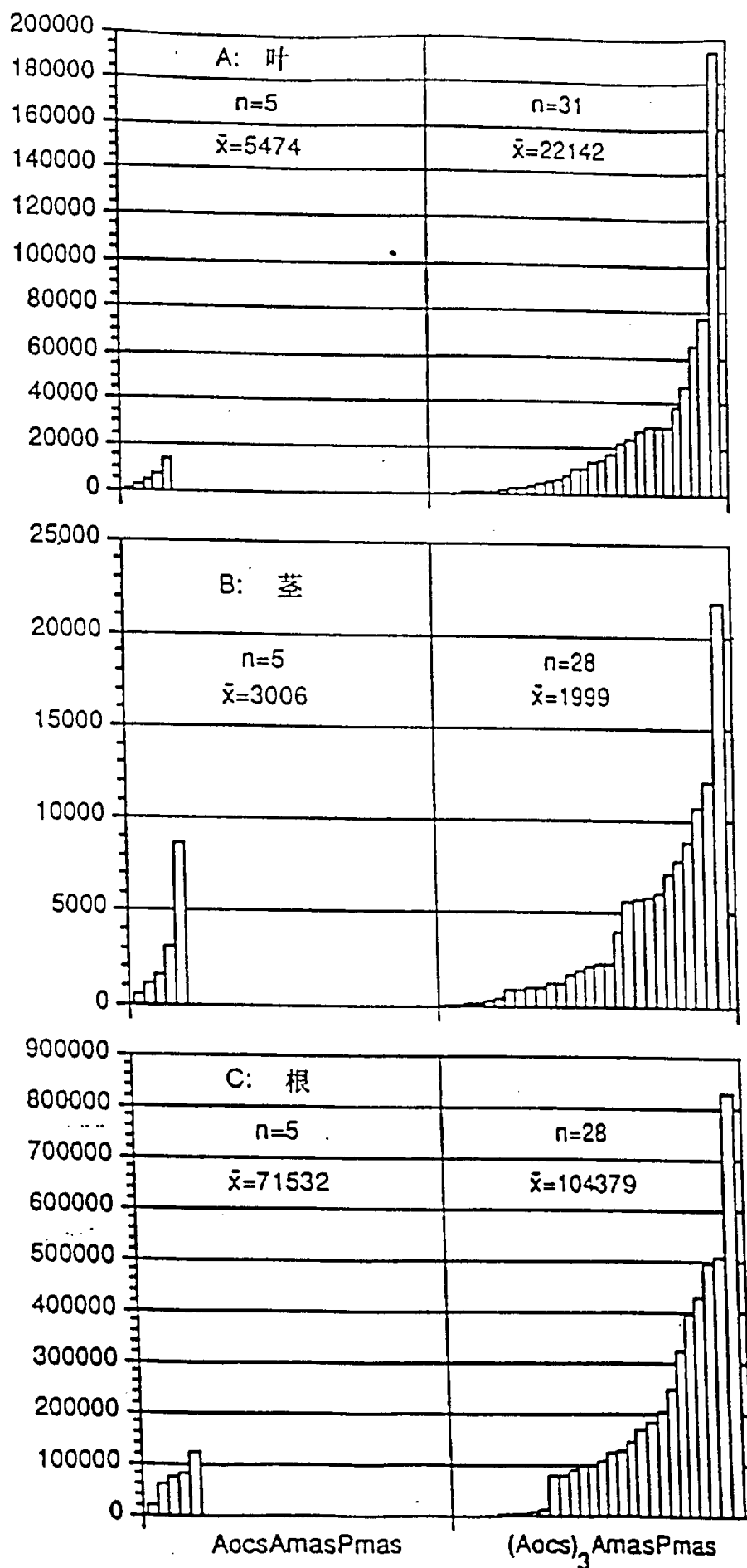
2

3 和 4

图

2

GUS 活性 (pmole/min/mg 蛋白质)



结构

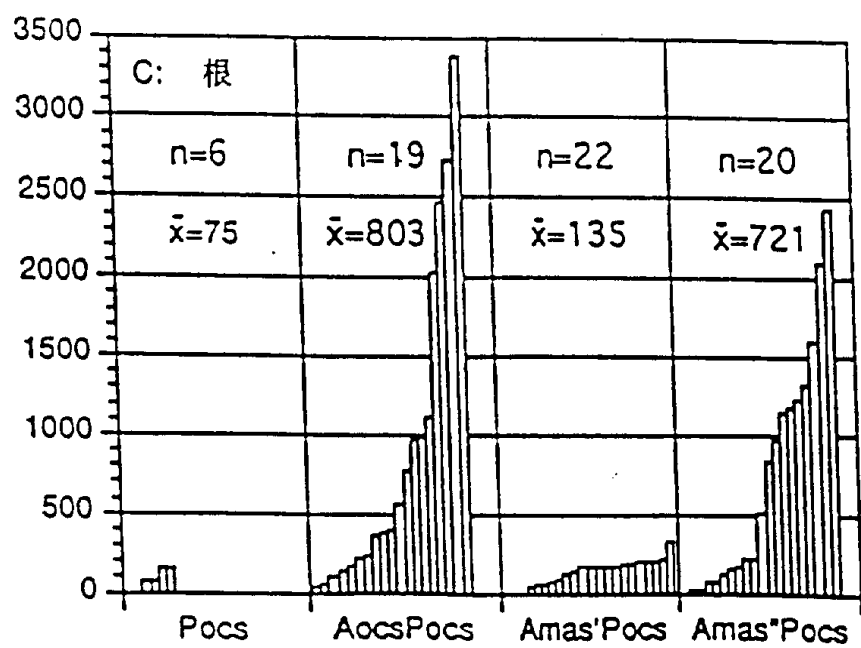
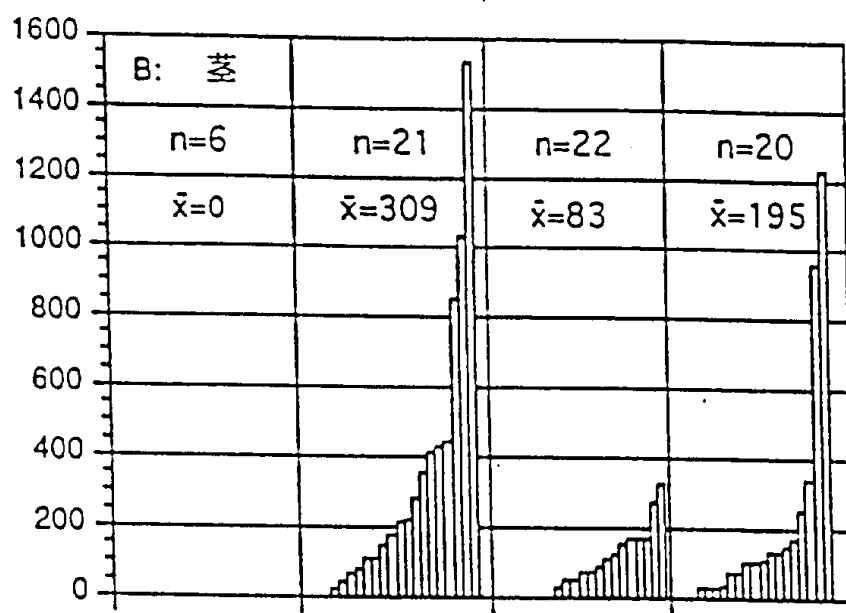
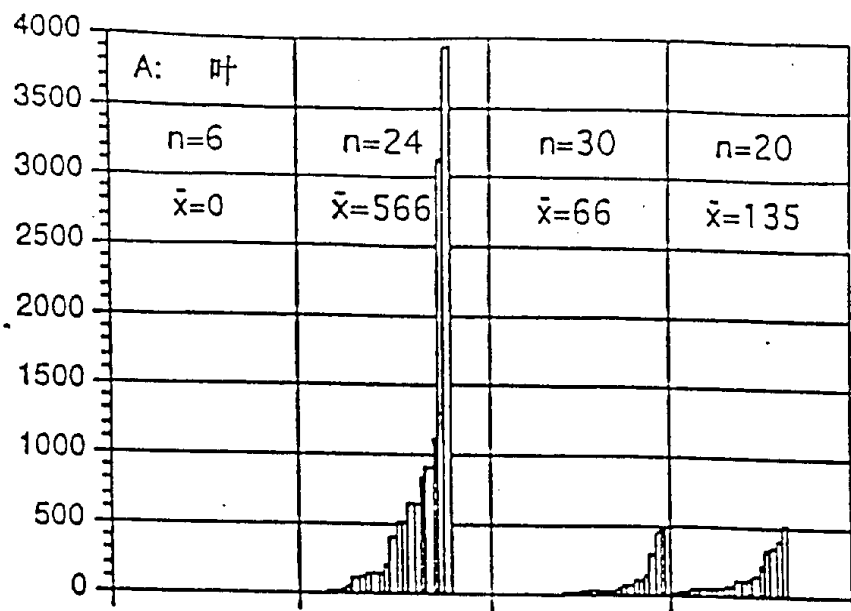
5 和 6



3

5 和 6

GUS 活性 (pmole/min/mg 蛋白质)



结构 7 8 9 和 10 13 和 14



4

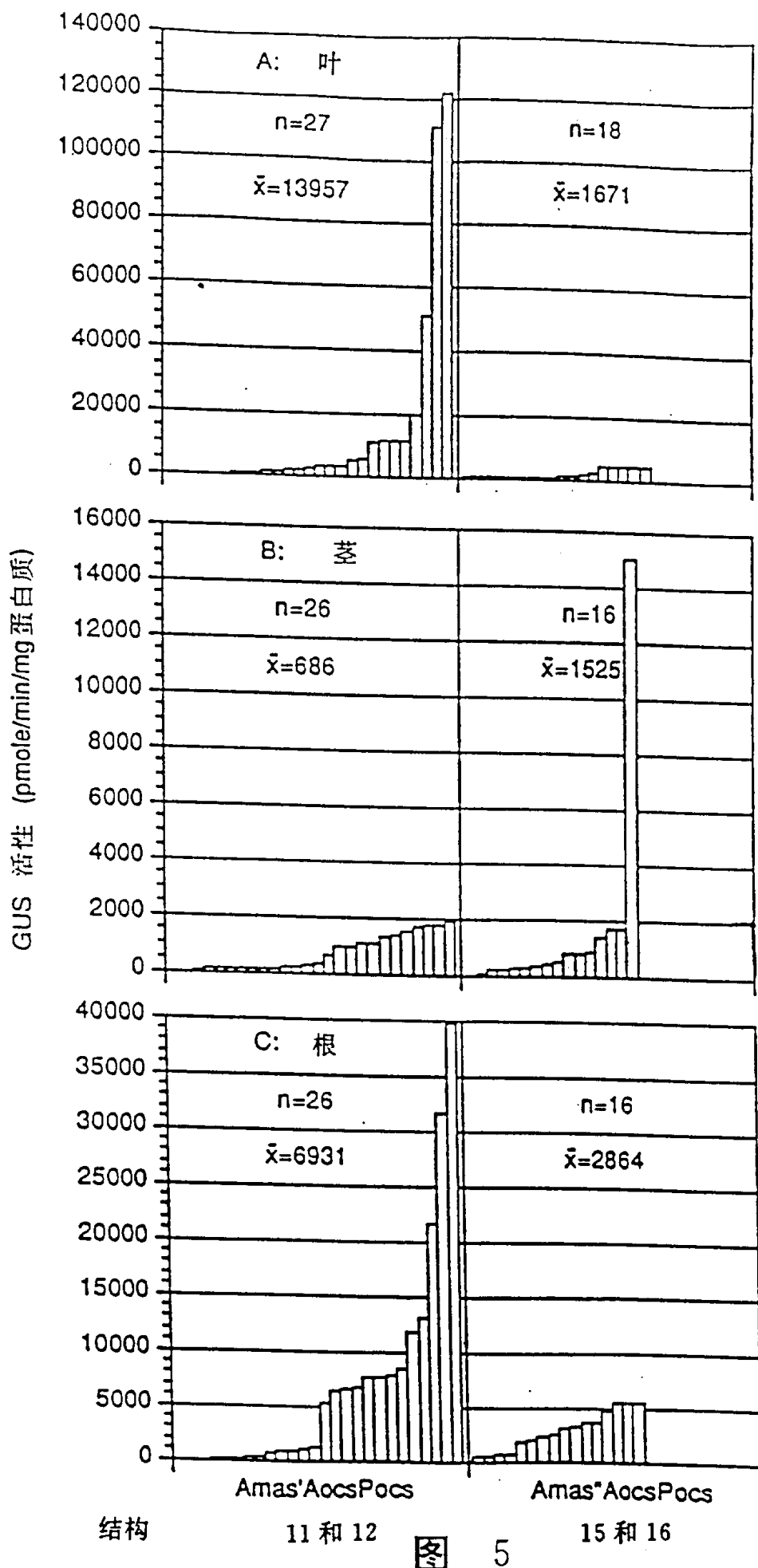


图 5

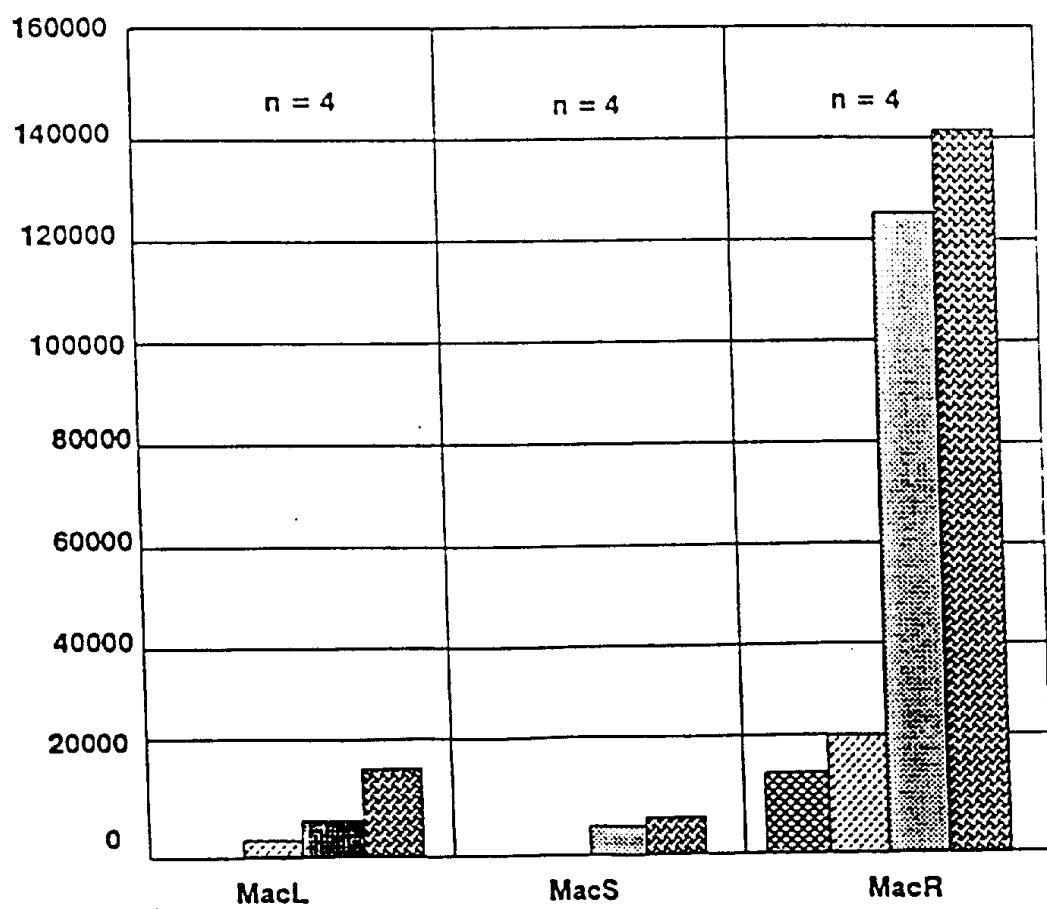
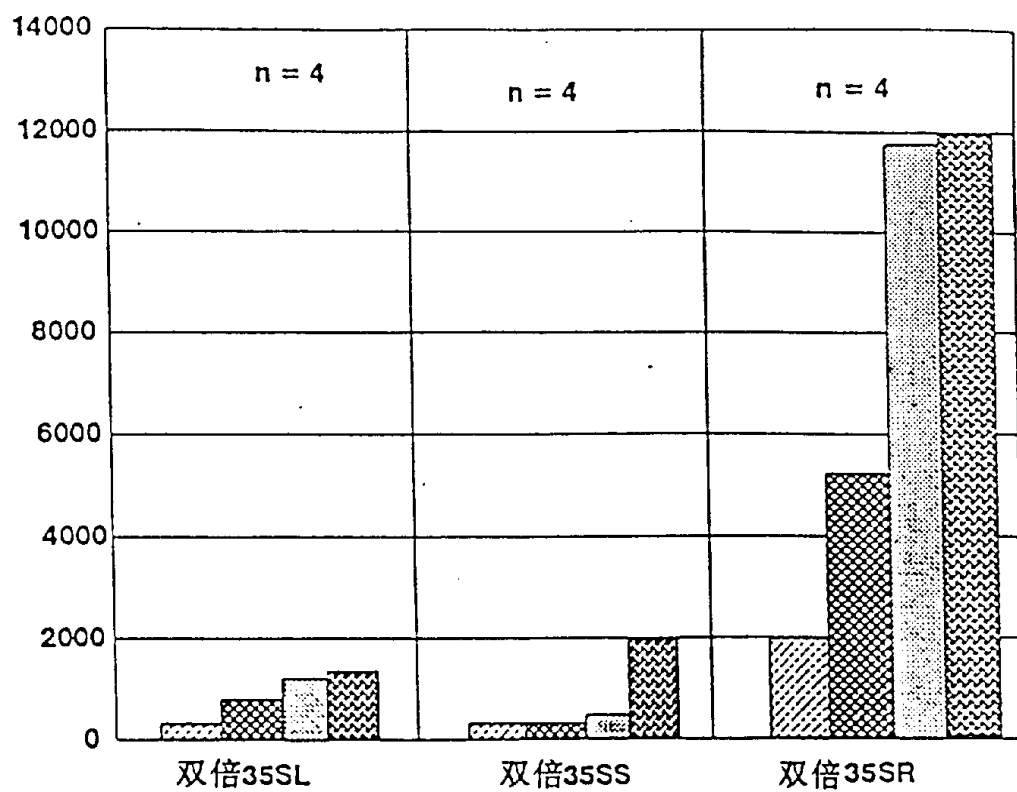


图 6

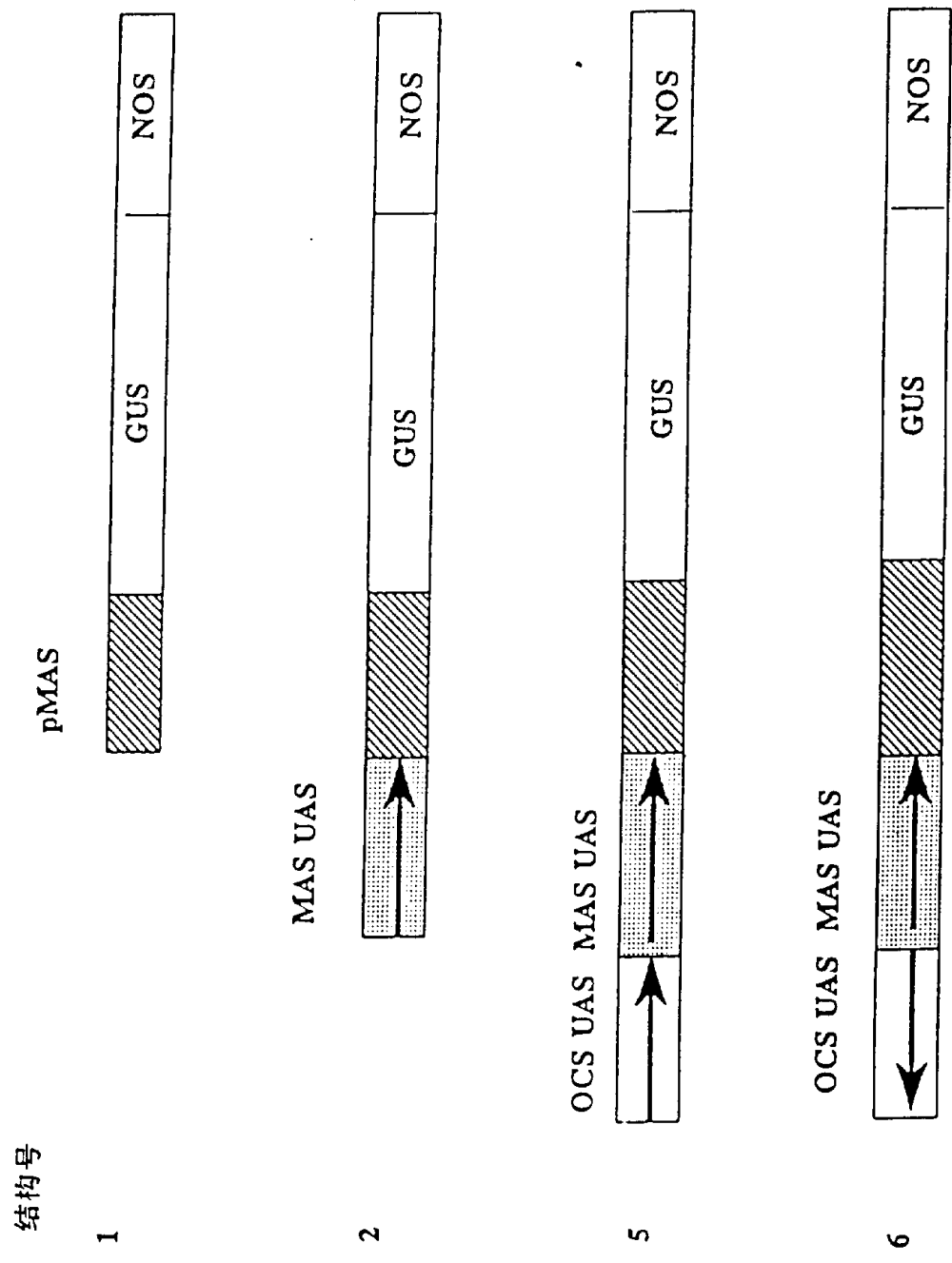


图 7

纯化的线虫体内在 pH5.5 和 7.5 时的 GUS 活性

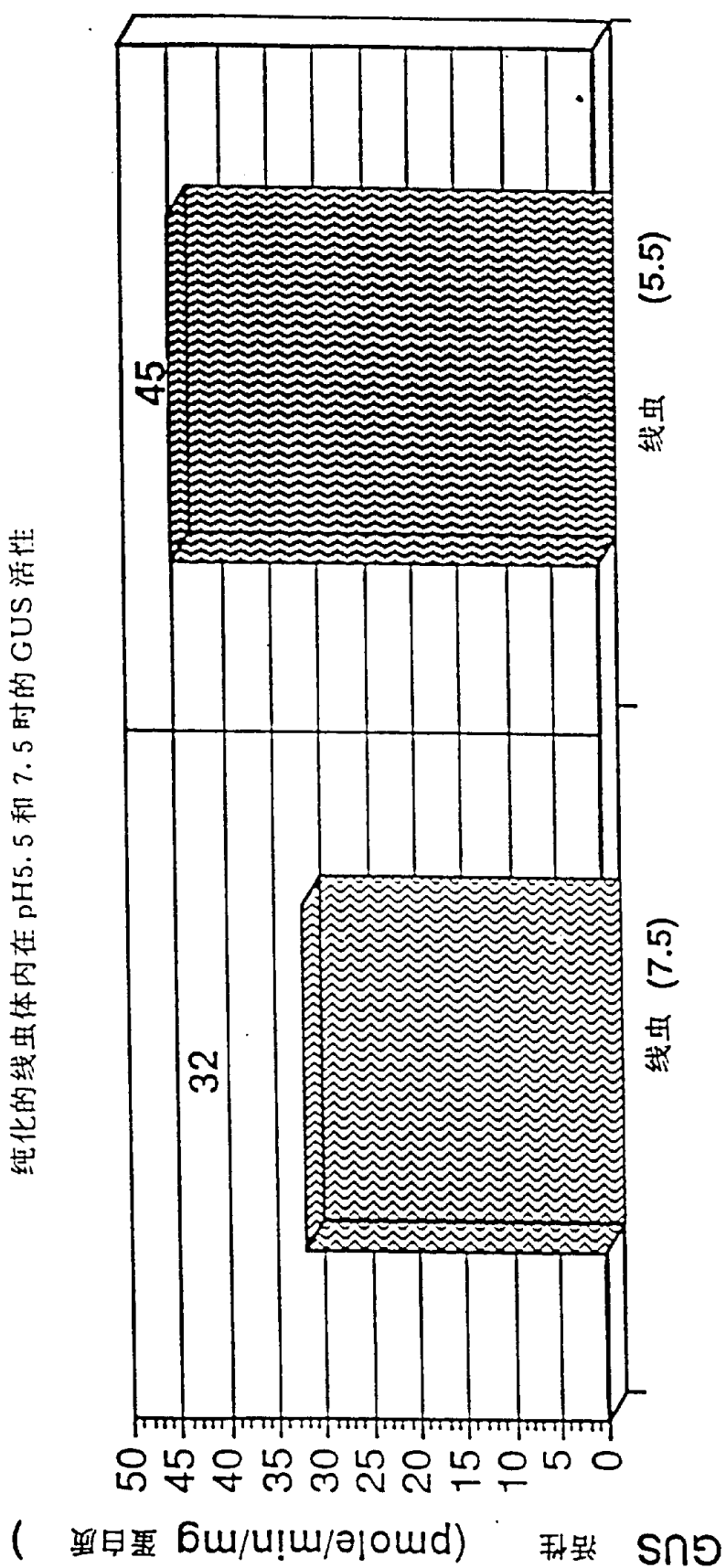


图 8

MAS 启动子的线虫诱导

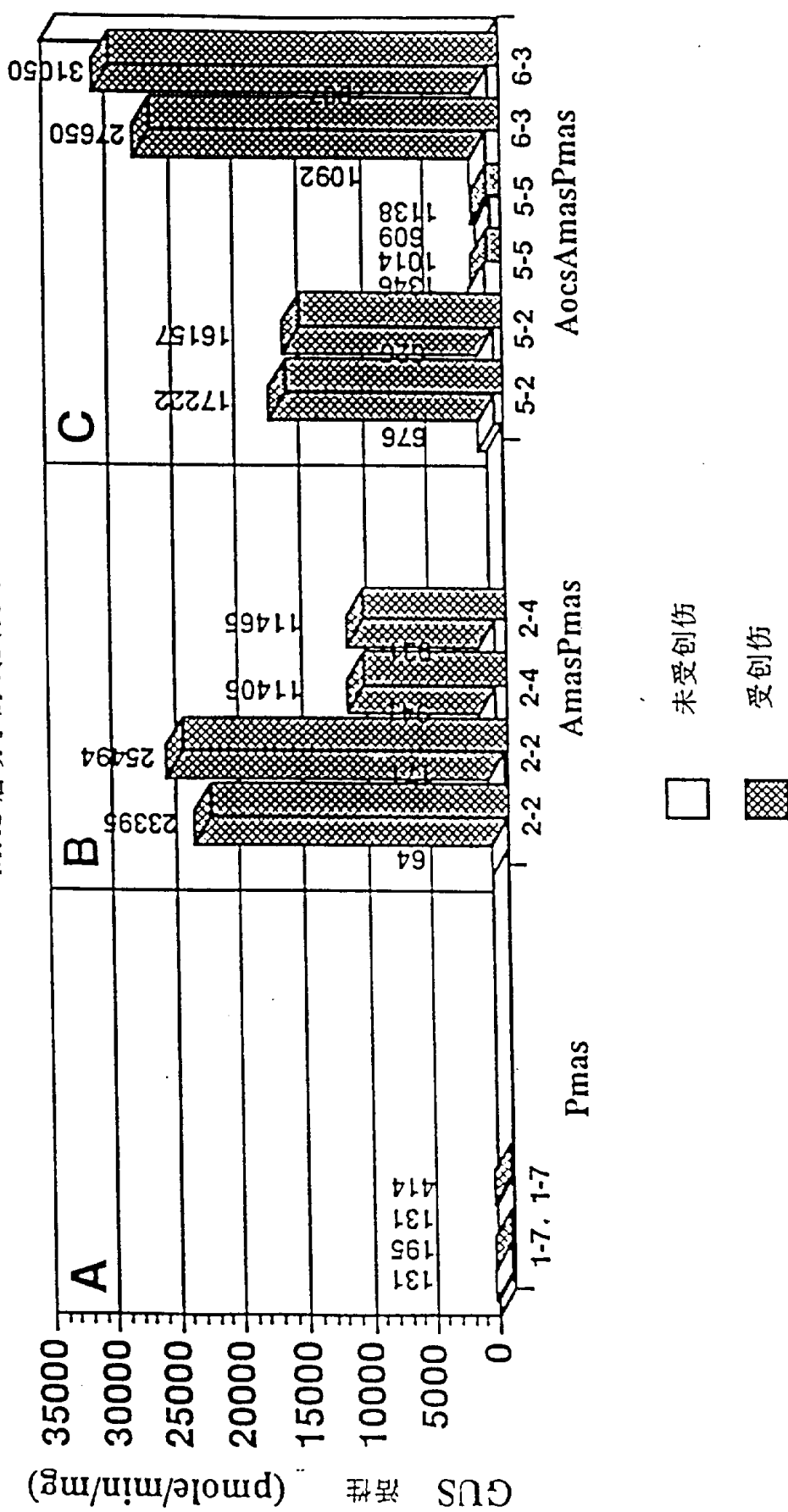


图 9