

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95108877.7

[45] 授权公告日 2001 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1062017C

[22] 申请日 1995.9.1 [24] 颁证日 2000.12.22

[21] 申请号 95108877.7

[73] 专利权人 中国科学院遗传研究所

地址 100101 北京市安外大电路 917 大楼遗传
所

[72] 发明人 孙勇如 付荣昭 曹光诚 李文彬

舒群芳 马江生 张利明 李忠阳

[56] 参考文献

EP607080 1994. 7.20 _

审查员 孙广秀

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 防御素基因的植物表达载体质粒

[57] 摘要

将兔子的防御素基因 NP-1 基因构建成植物表达载体质粒,将该质粒导入植物后,可以在植物体内表达,在植物体内产生防御素(defensin),从而赋予植物抗细菌、抗真菌、抗病毒的能力,用于农业、林业、果树等抗病新品种培育,同时也可以从转基因植物中提取防御素,用于医药。

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

权利要求书

1. 一种质粒载体，含有启动子、防御素（defensin）基因、终止子和筛选标记基因，其特征在于将源自动物的防御素（defensin）基因重组到植物表达载体上，该基因表达产生的防御素含有六个高度保守的半胱氨酸，形成三对分子内的二硫键，对细菌、螺旋体及有被膜病毒具有非特异性的杀伤作用。
2. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于防御素基因的 5' 端组装基因调控元件 CaMV35S 启动子，它能使防御素基因在植物体中表达。
3. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于防御素基因的 5' 端组装基因调控元件 ubiquitin 启动子，它能使防御素基因在植物体中强表达。
4. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于防御素基因的 5' 端组装基因调控元件 Actin 启动子，它能使防御素基因在单子叶植物体中强表达。
5. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于防御素基因的 5' 端组装基因调控元件 pEmu 启动子，它能使防御素基因在单子叶植物体中强表达。
6. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于防御素基因的 3' 端组装了增强表达能力的 nos 终止子。
7. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于该质粒组装 NPT-II 基因，作为转基因植物的筛选标记，可以用卡那霉素筛选。
8. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于该质粒组装 Hyg^r 基因，作为转基因植物的筛选标记，可以用潮霉素筛选。
9. 根据权利要求 1 所述的载体质粒，其特征在于该质粒组装 Bar 基因，作为转基因植物的筛选标记，可以用除草剂 Bastar 筛选。

说明书

防御素基因的植物表达载体质粒

本发明涉及到植物基因工程领域，即将源自动物的防御素(defensin)基因重组到植物表达载体上。防御素(defensin, DEF)是一类微生物抗性和细胞毒性肽，主要存在于哺乳动物的白血细胞、吞噬细胞、小肠的潘氏细胞、昆虫的脂肪体中。防御素通常含有29—35个氨基酸，包括6个高度保守的半胱氨酸。通过核磁共振光谱与X射线晶体学分析表明，哺乳动物防御素是通过分子内二硫键连接了其氨基端与羧基端的半胱氨酸残基，从而形成稳定的 β 片状刚性结构，这可能对于发挥其功能是必要的。昆虫的防御素的立体结构与哺乳动物有些不同，尽管它们也是含有6个高度保守的半胱氨酸残基的多肽，但它们的立体结构不仅含有反向平行的 β 片状结构，而且含有 α 螺旋结构。

体外实验表明[参考Lehrer, K. I. 等, Immun Rev. Immunol 11:105 — 128(1993)]，防御素的微生物素抗性谱包括革兰氏阴性与阳性细菌、

螺旋体及许多种真菌和一些被膜病毒。此外，防御素表现出对广泛的正常与恶性细胞具有非特异性的毒杀性，这些靶细胞包括抗TNF- α 和NK-细胞溶解因子的细胞。防御素抗微生物的机理与对哺乳动物靶细胞的毒杀机理是相同的：即带正电荷的防御素分子先与带负电荷的靶细胞表面分子（可能是极性膜脂层的头部基团）靠静电相互作用，随后插入到细胞膜中，形成电压依赖离子通道，扰乱了细胞膜的通透性及细胞能量状态，导致细胞膜去极化、呼吸作用受到抑制以及细胞ATP含量严重下降，从而使微生物细胞或哺乳动物靶细胞致死。防御素的抗病毒作用则是通过与病毒外壳蛋白结合而导致病毒失去生物活性。

基于防御素具有广谱的微生物抗性，特别是兔子防御素：嗜中性白细胞肽（neutrophil peptide, NP）NP-1 和NP-2，既抗多种革兰氏阳性与阴性细菌，又抗多类真菌与病毒，使防御素在基因工程上颇具诱惑力。这种应用主要表现在两个方面：一是在医学上，研究出高效的细菌、酵母或植物等表达系统，以大量生产防御素；另一方面是从兔子等哺乳动物或昆虫中分离防御素基因，然后导入到植物中去，以培育出抗病植物新品种。

诚然，从宿主有机体中分离防御素，其成本是相当昂贵的。为此，科学家试图研究出高效的细菌、酵母等表达系统。Reichhart等[参见 *Invert. Reproduct. Develop.* 21:15—24(1992)]首次报道昆虫防御素A 在酵母中得到表达，并从酵母中分离纯化出昆虫防御素A。Piers等[参见 *Gene* 134: 7-13(1993)]报道利用蛋白A作载体，与人类防御素HNP-1构建融合蛋白，在细菌*S. aureus*中得到表达，但表达的HNP-1不具有活性。植物抗病基因工程仍然是植物基因工程的重大课题。尽管抗病基因工程已取得相当大的进展，一些抗病基因工程产品不久将上市。但是，目前可利用的抗病基因不多，而且大多数抗病基因的微生物抗性谱不广。

本发明的目的之一是将防御素基因构建成植物表达载体质粒，再将该载体质粒导入植物中，旨在植物体中生产防御素，然后从转基因植物中提取防御素，以降低防御素的生产成本。

本发明的目的之二是：利用防御素基因构建成植物表达载体质粒，再将该载体质粒通过土壤根癌或发根农杆菌、基因枪、Polyethylene Glycol (PEG)等多种转化技术导入植物中，使植物具有抗细菌、病毒及（或）真菌的特点，从而培育出作物、林木、果蔬以及花卉等植物抗病新品种，为农林果木业生产及减少农药污染作出贡献。由于原核细胞与真核细胞的结构，尤其是膜结构的差异，防御素在植物中的表达只会毒杀微生物而不会毒杀植物本身。

本发明主要包括以下四个方面的技术：

一、从兔子肝脏中提取总DNA。

二、兔子防御素 NP-1 基因的聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增: 兔子NP-1基因由两个内含子(Intron)和3个外显子(Exon)组成, 其中第一个外显子对应于5'端不翻译区, 第二外显子主要是编码防御素信号肽和前导肽(Preproprotein)序列。第三个外显子则是编码成熟肽段及3'端不翻译区[参见 Gang, T.等 J. of Immunology 143: 1358—1365 (1989)]。由于植物中翻译加工机制和动物中翻译加工机制存在着不同, 为了使NP-1基因在植物中高效表达出有功能活性的成熟防御素以达到植物抗病的目的, 在5'端引物第一个密码子前加了起始密码子ATG, 而且5'、3'端引物分别有外加的酶切位点BamH I 和Sac I, 便于PCR产物的克隆。这样用于NP-1基因的PCR扩增的双端引物分别设计为5'端引物(5' GTGTAGGATCCATGGTGGTCTGTGCGTGCAGACG3') 和3'端引物(5' GGGAGAGC TCAGTAGTCAAAACATGT3')。反应体系为50ul, 其中Taq酶0.5ul(5U/ul), 4种dNTP中每种终浓度为200umol/L, Mg^{2+} 的终浓度为1.5mmol/L, 10×反应缓冲液5ul, 双端引物各2ul, 模板DNA 20ng, 其余加双蒸水补齐。反应条件为: 94℃预变性3分钟, 然后94℃变性45秒, 58℃复性45秒, 72℃延伸1分钟, 共35个循环, 最后72℃延伸5分钟以补齐末端。

三、NP-1基因的克隆和序列分析: 将PCR扩增的NP-1基因产物用内切酶BamH I 和SacI在37℃消化2小时, 然后75℃10分钟失活内切酶, 与经同样酶切处理的PUC19载体16℃连接5小时, 然后转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。这样NP-1基因定向插入到PUC19的BamHI和SacI位点。在含有100ug/ul氨苄青霉素及X-gal和IPTG各800ug的LB平板上经蓝白斑系统筛选出阳性克隆。用 BamHI 和 SacI 双酶切鉴定出有正确插入的重组子, 再用 Applied Biosystem 381A型DNA 序列分析仪测定序列。

四、NP-1基因植物中高效表达载体的构建：我们将 NP- 1 基因替换 pBI121 质粒中GUS基因，这样NP-1基因5'端有在植物中高效表达的花椰菜花叶病毒(Califlower Mosaic Virus CaMV)35S启动子，3'端有增强表达的nos终止子。而且这个载体还含有能在植物中和细菌中表达的卡那霉素抗性基因。

图例说明

在图例1中，(1)表示植物表达载体质粒pBI121，其中RB为右边界序列，NPT-Ⅱ为卡那霉素抗性基因，35S CaMV为花椰菜花叶病毒 35S 启动子，GUS为β-葡萄糖苷酸酶基因，Noster为nos终止子，HindⅢ、Xba I、BamH I、Sac I和EcoR I为限制性内切酶位点，LB为左边界序列。

在图例1中，(2)表示插入了成熟NP-1基因的pUC19质粒载体，其中Ap^r为氨苄青霉素抗性基因，Polycloning Site为多酶切位点，EcoR I、Sac I、Xba I、Sal I、Pst I、Sph I和HindⅢ。

在图例1中，(3)表示已构建好的兔防御素NP-1 基因的植物表达载体质粒pBIC-35SNP1，其中NPT-Ⅱ为卡那霉素抗性基因，CaMV35S启动子为花椰菜花叶病毒35S启动子，RB为右边界序列，LB为左边界序列，HindⅢ、Xba I、Sac I和EcoR I为限制性内切酶位点，ATG为NP-1基因的起始密码子。

实施例 1

兔子肝脏总DNA的提取 [参照 Kavis, L. G. 等 Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc (1986)]:

1. 将抽提DNA的组织(兔子肝脏, 100mg以上)放在一个10ml 的聚丙烯管

内；2. 加入2ml匀浆缓冲液[0.1M NaCl, 0.2M 蔗糖, 0.01M EDTA, 0.3M Tris(PH8.0)]；3. 用组织匀浆器(Polytron)碾磨，直到看不见块状组织；4. 加入125ul 10%SDS，振荡混合；5. 65℃水浴中至少保温30分钟；6. 加入350ul 8M醋酸钾振荡混合，样品置冰上60分钟；7. 4℃，5000×g离心10分钟；8. 将上清液转移入新的10ml管中，弃去沉淀；9. 加2ml 氯仿和2ml饱和酚抽提，短暂振荡混合或倒转管子混合之后，静止或短暂离心使液层分开；10. 将上层移入一个新管，弃去下层；11. 再加2ml 氯仿，混合方法如上，静止使液层分开后，弃去下面的氯仿层；12. 在水相层上加5ml乙醇，沉淀DNA，倒转管子温和混合，1500×g离心10分钟，沉淀的DNA将形成团；13. 弃去上清层，加5ml 80%乙醇，温和混合；14. 1500×g离心5分钟；15. 移去乙醇，倒干液体，管子在室温下放置至少30分钟，使沉淀基本干燥，不要干透；16. 将沉淀溶解在300ul无菌双蒸水中，室温下温和振荡90分钟，4℃贮存，DNA样品可以稳定保存6个月；17. 制备的样品可供限制性内切酶酶切并可作琼脂糖凝胶电泳。一般30ul无菌双蒸水中含有10ug DNA。

实施例 2

兔子防御素NP-1基因的PCR扩增： 取上述提取的兔子总DNA 20ng作 PCR 扩增模板，于50ul反应体系中，加入Taq酶0.5ul(5U/ul)，4种dNTP(每种dNTP终浓度为200umol/L)，Mg²⁺(终浓度为1.5mmol/L)，10×反应缓冲液(GeneAmp试剂盒，购自Perkin-Elmer-Cetus公司)5ul，双端引物(5'端为5' GTGTAGGATCCATGGTGGTCTGTGCGTGCAGACG3'，3'端为5' GGGAGAGCTCAGTAG TCAAAACATGT3')各2ul，其余加双蒸水补齐。反应条件为：94℃预变性3

分钟，然后94℃变性45秒，58℃复性45秒，72℃延伸1分钟，共35个循环，最后72℃延伸5分钟以补齐末端。取少量扩增产物于2%的琼脂糖（购自Promega公司）凝胶中电泳鉴定，结果扩增出一条大小约200bp的条带。

实施例3

NP-1 基因的克隆和序列分析： 1. 将PCR 扩增的大小约200bp的NP-1 基因产物用内切酶BamHI和SacI在37℃消化2小时，然后75℃反应10分钟以失活内切酶； 2. 连接到经同样酶处理过的PUC19载体（购自Promega公司），16℃连接5小时，然后转化感受态大肠杆菌DH5α，这样NP-1 基因定向插入到PUC19的BamHI和SacI位点； 3. 在含有100ug/ul氨苄青霉素及X-gal和IPTG各800ug的LB（1升LB含10g蛋白胨，10g氯化钠，5g酵母提取粉，15g琼脂粉，PH7.0）平板上经蓝白斑系统筛选出阳性克隆，即从转化皿中共挑选出12个白斑进行鉴定，其9个白斑质粒变大。对这9个质粒HindⅢ和EcoRⅠ双酶切，有8个切出了小片段，其中6个小片段约250bp，另两个小片段大小约500~600bp，可能是两个片段串连而成。取前面6个中的两个用PstⅠ单酶切，若能用PstⅠ单酶切切下80bp左右的小片段，则认为是NP-1 的克隆，结果两个克隆都切出了80bp左右的小片段； 4. 用BamHI和SacI双酶切鉴定出有正确插入的克隆（即重组子），用Applied Biosystem 381A型 DNA序列分析仪测定其序列，结果与已发表的序列完全一致（参见 Gang, T.等 J. of Immunology 143:1358-1365(1989)和Ligmer, R.等FEBS 321:267—273(1993)】。

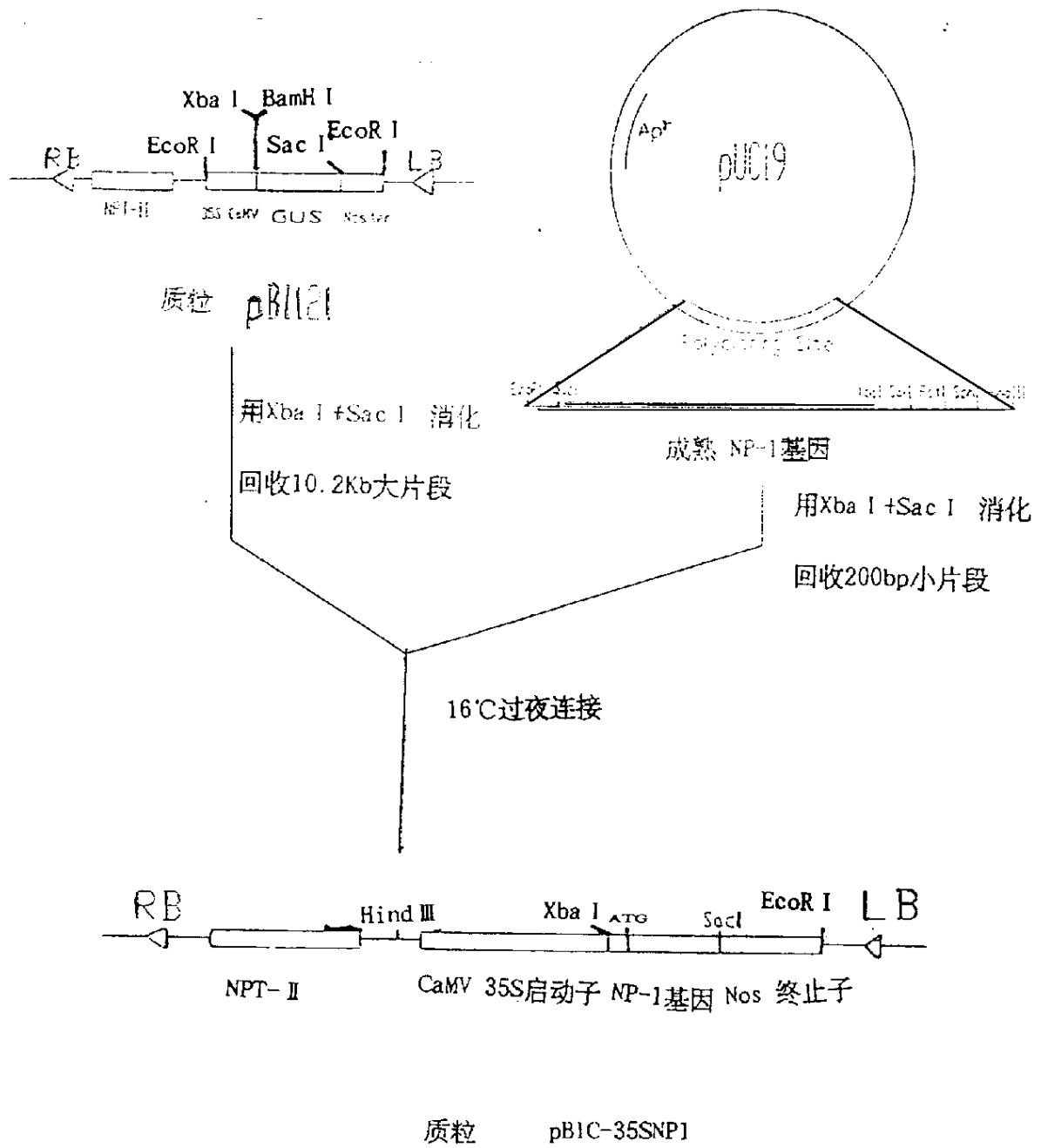
实施例4

NP-1 基因的植物表达载体质粒的构建： 1. 用限制性内切酶 Xba I 和 SacI 双酶切消化已插入大小约200bp NP-1基因的PUC19载体；2. 连接到用同样酶处理过的植物表达载体pBI121上，16℃连接5小时，然后转化感受态大肠杆菌DH5α，这样NP-1基因定向插入到pBI121 质粒XbaI和SacI位点处。其5'端有植物中高效表达的CaMV35S启动子，3'端有增强表达的nos终止子，以保证NP-1基因在植物中高效表达。pBI121上的卡那霉素抗性基因作为转化植株的筛选标记；3. 然后用XbaI和SacI双酶切鉴定NP-1 基因的插入，并用没有插入NP-1 的 pBI121 载体作对照。构建的载体切出了200bp的NP-1基因，说明NP-1已经正确插入到pBI121 的质粒XbaI和SacI位点处。这样NP-1 基因的植物表达载体已构建成功，并命名为pBIC-35SNP1，可以用农杆菌、基因枪、激光等转化技术导入植物中。

本发明不受所述实施例4的限制，任何相类似的启动子（如Patatin、ubiquitin、Actin和pEmu启动子）在本发明之内，任何相类似的筛选标记基因（如Hyg^r基因和Bar基因等）在本发明之内，任何相类似的动物（如哺乳动物、两栖类动物、爬行类动物、昆虫等）的防御素基因在本发明之内。

由以上可以总结出本发明的效果有以下二点： 1. 用DNA重组技术将防御素NP-1基因定向插入到植物表达载体pBI121质粒的XbaI和SacI位点处，其5'端是CaMV35S启动子，3'端是nos终止子。保证了NP-1基因在植物中的高效表达，卡那霉素基因NPT-II基因作为转基因植物的筛选标记；2. 用Xba I 和Sac I 双酶切该载体质粒，证明了NP-1基因已经正确地插入到植物表达载体pBI121 质粒的Xba I 和SacI的位点处，可以用农杆菌感染法、基因枪法、花粉管导入法等多种转化方法导入植物中。

说明书附图



兔防御素NP-1基因植物中表达载体的构建示意图

图1