



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98800345.7

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1107723C

[22] 申请日 1998.2.10 [21] 申请号 98800345.7
 [30] 优先权
 [32] 1997. 2. 10 [33] JP [31] 26658/1997
 [86] 国际申请 PCT/JP98/00537 1998.2.10
 [87] 国际公布 WO98/35030 日 1998.8.13
 [85] 进入国家阶段日期 1998.11.24
 [71] 专利权人 日本烟草产业株式会社
 地址 日本东京都
 [72] 发明人 新井雅雄 铃木庄一 村井宣彦
 山田茂裕 太田象三
 詹姆斯·N·伯内尔
 [56] 参考文献
 PIANT PHYSIOL. VOL. 98 1992-01-01 HUDSPETH
 ET AL. "EXPRESSION OF MAIZE PHOSPHOENOLPYRU-
 VATE CARBOXYLASE IN TRANSGENIC TOBACCO"
 审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称 烯醇丙酮酸磷酸羧激酶 C4 循环

[57] 摘要

一种转化 C3 植物的方法，包括导入一些参与 C4 光合循环的酶到 C3 植物从而赋予其 C4 循环。在此方法中，编码 PEPC 的基因和连接到编码转运肽的基因的编码 PCK 的基因被导入该 C3 植物。

ISSN 1008-4274

- 1.转化具有 C3 型光合途径的植物的方法，包括将编码烯醇丙酮酸磷酸羧化酶的基因和编码烯醇丙酮酸磷酸羧激酶的基因导入所述具有 C3 型光合途径的植物，导入方式使得被导入的基因发挥作用从而为该植物提供 C4 光合途径，其中所述编码烯醇丙酮酸磷酸羧激酶的基因与编码转运肽的 DNA 片段连接。
- 2.权利要求 1 的方法，其中将编码碳酸酐酶的基因也导入所述具有 C3 型光合途径的植物。
- 3.权利要求 1 的方法，其中将编码丙酮酸，正磷酸二激酶的基因也导入所述具有 C3 型光合途径的植物。
- 4.权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其中启动子序列是光合组织特异性的启动子序列。
- 5.权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其中所述基因中的两种或多种或全部由能将所述基因导入植物的单个基因构建体携带，从而将所述基因导入所述具有 C3 型光合途径的植物。
- 6.一种嵌合基因，其含有编码烯醇丙酮酸磷酸羧化酶的基因和编码烯醇丙酮酸磷酸羧激酶的基因，所述编码烯醇丙酮酸磷酸羧激酶的基因与编码转运肽的 DNA 片段连接。
- 7.一种植物细胞，其通过权利要求 1 至 5 中任一项的方法转化以使所述植物细胞具有 C4 光合途径。

烯醇丙酮酸磷酸羧激酶 C4 循环

5 发明背景

本发明涉及通过导入两种或多种参与 C4 光合途径的酶来转化 C3 植物从而为其提供 C4 循环的方法。

现有技术

- 10 已知在高等植物中存在三种类型的光合途径，即 C3，C4 和 CAM 型。具有 C4 型光合途径的植物(下文中有时称之为 C4 植物)的叶组织含有叶肉细胞和存在于维管束周围的维管束鞘细胞，形成被称作克兰茨型解剖(Kranz-type anatomy)的特殊的叶组织结构。C4 植物利用位于叶肉细胞胞质中的磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(下文中有时称之为 PEPC)的作用将
- 15 二氧化碳固定为 C4 化合物，被固定的二氧化碳由维管束鞘细胞中的脱羧酶释放，增加了核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(下文中有时称之为核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶)附近的二氧化碳水平，所述酶是必不可少的二氧化碳固定所需的酶。通过位于叶肉细胞中的丙酮酸，正磷酸二激酶(下文有时称之为 PPDK)的作用，同时消耗 ATP 可将因维管束鞘细胞中
- 20 的脱羧化作用产生的代谢物转移到叶肉细胞中并转化为 PEPC 的底物-磷酸烯醇丙酮酸(下文有时称之为 PEP)。即 C4 植物绿叶中两种类型的细胞在功能上有所分化；叶肉细胞是最初固定碳时 C4 化合物形成的场所，也是 PEPC 底物重新产生的场所，而维管束鞘细胞是利用卡尔文-本森循环
- (Calvin-Benson cycle)使 C4 化合物脱羧和进行必要的二氧化碳固定的场
- 25 所。

- 三个步骤构成了被称为 C4 光合途径的循环反应系统，即由 PEPC 固定二氧化碳，在核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶附近释放二氧化碳，和消耗 ATP 的同时重新产生 PEPC 底物。所述途径使 C4 植物积累二氧化碳的能力有所增强，并使光合效率不致于降低，否则，由于 ATP 的过量产生会使 C4 植物在高光强度下的光合效率降低(避免了光抑制)。在具有规
- 30 则的光合途径(C3 型光合作用)的 C3 植物中未发现这些特性，因此，C4

植物未表现出如 C3 植物中的光呼吸，故当置于干燥的空气，高光强度或高温下时，前者光合作用的效率比后者较不易恶化，因此 C4 植物在其进行光合作用的能力方面优于 C3 植物。

5 预期利用杂交和育种可将 C4 光合途径导入 C3 植物，然而，具有 C4 光合途径的大多数种和具有规则的 C3 光合途径的种被分成不同的属或科，难以在它们之间进行杂交。另外，通过使 C3 植物与选自相同属 *orache* 的 C4 植物杂交来导入 C4 植物之特性的尝试未能成功(Ohsugi, R. *Nogyogijutsu*(1995) vol.50, p30-36)。

10 Hudspeth 等人观察到：导入受烟草叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子 (*cab* 启动子)控制的 PEPC 基因的转基因烟草的绿叶显示出倍增或 PEPC 活性以及苹果酸水平的增加(Hudspeth 等, *植物生理学*(1992) 98:458-464)。Kogami 等人观察到导入受花椰菜花叶病毒 35S 启动子控制的 PEPC 基因的转基因烟草的绿叶所含的 PEPC 活性约为未转化烟草的 2 倍(Kogami 等, *转基因研究*(1994) vol.3:287-296)。

15 因此，Hudspeth 等人和 Kogami 等人只观察到 C4 化合物苹果酸的积累，而未进一步证实将 PEPC 作为单个基因导入 C3 植物烟草而导致的光合特性中的任何变化。C3 植物的细胞不能快速使 C4 化合物脱羧从而为卡尔文循环提供二氧化碳，因此，当需要改善 C3 植物的光合特性时，通过将 PEPC 基因简单地导入 C3 植物尝试为植物提供 C4 光合途径浓缩碳酸盐或避免光抑制的能力是不可能的。

20 日本专利公开特许 8-80197 公开了编码转运肽的 DNA 片断与烯醇丙酮酸磷酸羧激酶(PCK)基因连接，将嵌合基因导入 C3 植物水稻，由此检测到绿叶粗提取物中的酶活性，并且将 PCK 蛋白定位于叶绿体中。这些事实表明：可以允许将 PCK 活性定位于叶绿体中，然而，有关 C4 光合途径的建立或转基因植物中光合特性的改变未见描述。

25 Ichikawa 等人(*Nihon Sakumotsu Gakkai Kiji*, vol.63, Suppl.2, (1994),p.247)公开了当将 PPDK 导入 C3 植物芥菜(*Arabidopsis*)和番茄时，植物中积累了蛋白质，然而，有关 C4 光合途径的建立或转基因植物中光合特性的改变未见描述。日本专利公开特许 6-12990 中公开了其中掺入了碳酸酐酶(本文中有时指的是 CA)蛋白质的 *Lycopersicon esculentum* 的具子叶的原生质体中光合效率的变化。另一方面，Majeau 等人公开了

体内过量表达 CA 不会使植物的光合能力产生任何改变(植物分子生物学, 1994, 25:337-385)。

如上所述, 以前通过基因工程方法欲将源于 C4 光合途径的基因导入 C3 植物的尝试只局限于导入单个基因, 即 CA, PEPC, PCK 或 PPDK 5 基因。即使在一些尝试中观察到被导入基因的表达或酶活性, 但这些尝试不能进一步证实任何 C4 光合途径或光合效率的变化。

发明简述

本发明的目的是提供改良 C3 植物之光合特性的方法, 具体地说, 本 10 发明提供了通过导入两个或多个参与 C4 光合途径的酶以转化 C3 植物, 为其提供 C4 光合途径的方法。

本发明的另一个目的是提供已根据本发明方法被转化从而具有 C4 途径的植物。

本发明的另一个目的是提供用于进行转化 C3 植物的载体。

15 图的简述

图 1 图示了 PCK 型 C4 光合循环。

图 2 图示了用于 C3 植物转化的基因构建体。

图 3 为同位素标记的碳化合物的相对量对时间进程作图。

图 4 显示了经转化的水稻的光合活性。

20

详细描述

本发明人通过将 PEPC 基因以及与编码转运肽的 DNA 片断连接的 PCK 基因一起导入 C3 植物深入研究的结果完成了本发明。

本发明人致力于以下事实, 即在以前的尝试中, C4 光合组分的各个 25 基因作为单个基因被导入 C3 植物的细胞质中, 因此本发明人假定上述事实可能是为何即使一些转基因 C3 植物获得了经导入酶的活性, 但以前的尝试不能驱动 C4 光合途径或改良光合特性的原因所在。

在所述设想的基础上, 本发明人设计了以下系统, 其中: 以每种酶 30 在限定的胞内位置处表达的方式将两种或多种酶的基因导入 C3 植物; 叶绿体将担当 C4 植物维管束鞘细胞的角色; C4 光合途径中需要的所述两种或多种酶将在绿色的叶肉细胞中同时表达。根据所述的设计, 也许不

仅可为 C3 植物提供各个酶活性，也可以使 C3 植物能够利用模拟 C4 植物的 C4 光合途径的循环反应，从而增强在叶绿体中积累二氧化碳的能力，并避免由过量消耗 ATP 导致的光抑制作用。预期提供了这种特性的植物因光合特性的改良会表现出改良的生产能力，改良的干旱耐受性，

5 改良的高温耐受性，和在低二氧化碳条件下改良的光合特性。

本发明提供 C4 光合途径的方法包括：提供 C3 植物(如水稻)绿叶的叶肉细胞；使 C4 植物第一的二氧化碳固定过程的酶(PEPC)在所述细胞的细胞质中起作用；使 C4 化合物脱羧酶在所述细胞的叶绿体中起作用；和同时使酶表达以在所述细胞的细胞质或叶绿体中重新产生 PEP。

10 用于所述目的的脱羧酶包括 PCK，PCK 是消耗 ATP 的同时使草酰乙酸脱羧以产生 PEP 的酶，因此，PCK 可有利地用作脱羧酶，因为脱羧，ATP 的消耗，和 PEP 的重新产生可由该单个酶实现。为了使脱羧酶在叶绿体中表现出其活性，可将此酶的基因与转运肽的序列连接。转运肽将脱羧酶多肽转移到叶绿体中以使酶在叶绿体中表现出其功能。

15 利用上文所述的转化，在 C3 植物中构成了二氧化碳固定途径，该途径模拟了得自 C4 植物分化的叶组织结构的 C4 光合途径，其中 C3 植物绿叶叶肉细胞的细胞质模拟 C4 植物的叶肉细胞，C3 植物的叶绿体模拟 C4 植物的维管束鞘细胞(图 1)，因此，可能为 C3 植物提供浓缩二氧化碳和避免光抑制的能力。

20 PEPC，脱羧酶和重新产生 PEP 的酶的联合足以构成所需的 C4 光合途径，然而，在优选的实施方案中，可在细胞质中共表达 CA 以提供碳酸氢盐离子作为 PEPC 直接的底物，以使 C4 光合途径更顺畅地行使功能。另外，如果作为 PEPC 底物的 PEP 的供应需要增加，则除了 PEPC，PCK 和 CA 外，也可共表达催化由丙酮酸形成 PEP 的 PPDK，从而使 C4 光合

25 循环仍能更顺畅地行使功能。

下文将更详细地描述本发明。

本发明涉及通过将编码 PEPC 的基因，已与编码转运肽的 DNA 片断连接的编码 PCK 的基因导入 C3 植物以转化所述植物，为其提供 C4 光合途径的方法。

30 可用于本发明的 PEPC 基因包括得自细菌，原生动物，植物等的 PEPC 基因，已知的细菌 PEPC 基因的具体的例子是棒状杆菌属产生谷氨酸之菌

株的 PEPC 基因(日本专利特许公报 7-83714)。

然而, 优选的 PEPC 来源于植物, 例如优选的那些 PEPC 得自玉米(日本专利特许公报 6-30587), *Amaranthus*(Rydzik, E.和 Berry, J. O., 植物生理学, 1995, 110:713), *Flaveria trinervia*(Poetsch, W 等, FEBS Lett, 5 1991, 292:133-136), 烟草(Koizumi, N 等, 植物分子生物学, 1991, 17:535-539), 大豆(日本专利公开特许 6-319567), 油菜(日本专利公开特许 6-90766), 马铃薯(Merkelbach, S 等, 植物分子生物学, 1993, 23:881-888), 苜蓿(Pathariana, S. M 等, 植物分子生物学, 1992, 20:437-450), *Mesembryanthemum crystallinum*(Cushman, J. C 和 Bohnart, 10 H. J, 核酸研究, 1989, 6743-6744), 尤其优选玉米的 PEPC。

用于本发明的 PCK 编码基因的例子是得自植物和细菌的依赖于 ATP 的 PCK 编码基因, 植物 PCK 的例子包括得自 *Urochloa panicoides*(日本专利公开特许 8-80197)和黄瓜(Kim, D. J 和 Smith, S. M, 植物分子生物学, 1994, 26:423-434)的 PCK, 细菌 PCK 的例子包括得自大肠杆菌 15 (Medina, V 等, 细菌学杂志, 1990, 172:7151-7156)和根瘤菌属(Osteras, M 等, 细菌学杂志, 1995, 177:1452-1460)的 PCK, 优选得自植物, 尤其是得自 *Urochloa panicoides* 的 PCK 基因。

另外, 如上所述, 需要 PCK 在叶绿体中表现出其功能。为了确保这一点, 可将编码转运肽序列的 DNA 片断与 PCK 基因连接。

20 在定位于叶绿体的蛋白质中已报道了一些可与 PCK 基因连接的转运肽序列(Keegstra, K 等, Annu. Rev. Plant Mol. Biol, 1989, 40:471-501)。本发明中优选转运肽序列得自水稻蛋白质, 尤其优选转运肽序列是核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位的序列(SEQ ID NO:2), 根据下文实施例中所所述的方法可得到该序列。编码转运肽序列的 DNA 片断在 25 框内与 PCK 结构基因在其上游, 优选在其立即上游处连接。

在本发明中, 编码 CA 的基因可进一步地被导入 C3 植物的细胞质中以提供碳酸氢盐离子作为上述 PEPC 的底物。

30 已知的可用于本发明的一些编码 CA 之基因的例子为得自动物和植物的那些基因, 然而, 高等植物和其它生物体的 CA 之间的序列同源性不高, 而且, 高等植物的 CA 的酶活性受无机磷酸盐的影响(Sultemeyer, D 等, Physiol. Plant, 1993, 88:179-190), 因此, 优选基因得自植物,

如菠菜(Burnell等, 植物生理学, 1990, 92:37-40), 豌豆(Roeske, C. A 和 Ogren, W. L, 核酸研究, 1990, 18:3413), 芥菜(Arabidopsis)(Raines, C. A 等, 植物分子生物学, 1992, 20:1143-1148), 水稻(WO95/11979) 和玉米(WO95/11979), 特别优选 CA 得自菠菜, 因为菠菜 CA 位于叶绿体
5 中, 该酶基因含有转运肽编码区, 因此, 通过如实施例 1 所述诱导点突 变可除去转运肽编码区 SEQ ID NO:3, 并将具有 SEQ ID NO:3 所示序列 的基因用于基因构建。

本发明中所用的编码 PPDK 的基因包括玉米 C4 型 PPDK 基因 (Matsuoka, M 等, 生物化学杂志, 1988, 263:11080-11083), 水稻 PPDK
10 基因(日本专利公开特许7-184657), *Flaveria pringlei* PPDK 基因(Rosche, E 等, 植物分子生物学, 1994, 26:763-769), *Mesembryanthemum crystallinum*(Fisslthaler, B 等, Planta, 1995, 196:492-500), 优选玉米 C4 型 PPDK 基因。

PPDK 基因可以在叶绿体中表达, 也可在细胞质中表达。如果需要在
15 叶绿体中表达 PPDK 基因, 基因可与编码转运肽的 DNA 片断连接。

尽管优选特异于光合器官的启动子序列, 但可用于表达上述酶基因 的启动子序列并不局限于任何特定的种类, 例如, 优选玉米 C4 型 PPDK 启动子(Glackin 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3004-3008), 玉米 C4 型 PEPC 启动子(Hudspeth, R. L 和 Grula, J. W, 植物分子
20 生物学, 1989, 12:579-589), 水稻核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小 亚单位启动子(Kyozuka, J 等, 植物生理学, 1993, 102: 991-1000), 和 收集光的叶绿素 a/b 结合蛋白启动子(Sakamoto, M 等, 植物细胞生理学, 1991, 32:385-393)是优选的, 特别优选的是玉米 C4 型 PPDK 启动子。 在下文的实施例中, 将 SEQ ID NO:1 用作启动子。

25 根据本发明, 在用于转化 C3 植物的各个基因构建体(导入基因的构 建体)上可携有编码上述各个 C4 途径酶的基因。然而, 优选导入 C3 植物 以实现其转化的基因 - 导入的单个构建体上携有两个或多个该基因, 在 这种情况下, 对基因的次序没有特别的限制。

根据标准方法, 通过将基因 - 导入的构建体导入选定 C3 植物的细胞
30 中, 即可用这种含有分开的或互相连接的衍生基因的基因 - 导入的构建 体转化 C3 植物细胞。导入基因的一般性方法是本领域中已知的方法, 如

电穿孔, 电注射, 用如聚乙二醇(PEG)化学处理和基因轰击。其中优选使用农杆菌方法导入基因以转化 C3 植物细胞。农杆菌属方法是本领域中熟知的方法, 能转化双子叶植物(日本专利公开特许 4-330234)和单子叶植物(WO94/00977)。通过下文所述的方法可选择成功的转化体。

5 通过任何适当的常规的育种方法可固定转化体的表型, 因此, 被导入的基因可转移到转化体的后代中。

本发明的方法可适用于任何 C3 植物, 所述方法对如水稻, 小麦, 大麦, 大豆, 马铃薯, 烟草, 油菜等的作物特别有利, 而预期由于光合能力的提高会使每份干重的生产能力增加。优选本发明适用于单子叶植物, 最优选适用于水稻。

本发明的 C4 光合途径由三个过程构成, 即由上述 PEPC 固定二氧化碳, 通过脱羧酶在核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶的附近释放二氧化碳, 和利用 ATP 重新产生 PEPC 的底物。

下文实施例中将详细描述确证 C4 光合途径在被转化的 C3 植物中行使功能的方法。简单地说, 所述方法包括:

(1)当使转化体和对照植物分离的叶掺入放射性的二氧化碳($^{14}\text{CO}_2$)时, 研究作为最初产物的 C4 化合物是否由转化体中的 PEPC 作用而形成, 或通过检测标记的碳化合物随时间推移的比例而研究导入的 C4 光合途径是否在转化体中行使功能;

20 (2)使转化体和对照植物分离的叶掺入放射性的苹果酸($[^{14}\text{C}]$ 苹果酸), 在确定的时间之后比较转化体和对照植物标记的蔗糖的相对量, 从而研究 C4 化合物的脱羧作用是否在转化体中通过 PCK 作用而行使功能; 和/或

(3)通过测量光合特性研究转化体光合特性中的任何变化。

25

实施例

为了更详细地进一步阐明而不是为了限制本发明, 给出了下列实施例。

A.PCK 型 C4 光合途径

30 实施例 1 转基因的构建

(1)启动子序列

通过 PCR 法(Mcpherson, M. J, Quirke, P 和 Taylor, GR 编, PCR : 操作方法, Oxford Express Press, Oxford NY(1991))得到谷物(corn)C4 型 PPK 启动子区的 DNA 片断, 所述 PCR 利用了根据已知的核苷酸序列(Glackin, C. A 和 Grula, J. W(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3004-5 3008)制备的下列两个合成引物:

5'-CTAAAGACATGGAGGTGGAAG-3'(5'侧)(SEQ ID NO:4)

5'-GTAGCTCGATGGGTGCACG-3'(3'侧)(SEQ ID NO:5)。

通过 SDS-苯酚法, 接着使用氯化铯-溴化乙锭超速离心从玉米近交 B73 绿叶中提取总核酸可得到玉米基因组 DNA, 使用所述 DNA 为模板进行扩增。将所得 DNA 片断插入质粒载体 pCR1000(Invitrogen, USA) 的克隆位点中, 用 SacI 消化所得质粒并使之成为钝端, 然后在其中加入 NcoI 接头, 用 HindIII 消化后, 将所得的含有 PPK 启动子区的 950bp DNA 片断用于基因构建, SEQ ID NO:1 显示出其中所用的 DNA 序列。

(2)PEPC 基因

使用通过盐酸胍法由玉米秧苗(杂交品种“Harvest queen”)的绿叶和λZAP 载体(Stratagene, USA)制备的 mRNA 可得到 cDNA 文库, 根据所附手册中给出的说明, 使用下列合成寡核苷酸为探针, 通过筛选所述文库中的 20,000 个克隆可分离出玉米 C4 PEPC 的 cDNA, 所述寡核苷酸是通过常规方法(Sambrook, J, Fritsch, E. F 和 Maniatis, T 编: 分子克隆: 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约(1989)), 根据已知的核苷酸序列(Hudspeth, R. L 和 Grula, J.W(1989), 植物分子生物学, 12:579-589)制备得到的, 其序列为:

5'-GCCATGGCGCGGCGGGAAGCTAAGCACGGAAGCGA-3'(SEQ ID NO:6)

用 XhoI 消化所得克隆, 然后用 NcoI 部分消化, 在基因构建中使用所得的约为 3kbp 的 DNA 片断。

(3)PCK 基因

将 *Urochloa panicoides* PCK 的 cDNA 用于基因构建体中, 以前曾报道过在该构建体中加入了编码水稻核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位转运肽的区域(日本专利公开特许 8-80197), 即在其插入物中存在的 KpnI 位点处将λPCK170204 和λPCK100101 连接起来。通过使用所得

DNA 片断为模板, 使用下列合成引物进行 PCR:

PCK-f2:5'-GCTCTAGATCTCTGGCACGTGAATATGGCCCCAACCT
CG-3'(SEQ ID NO:7); 和

PCK-r2:5'-CAGTGCATGCCGCCGAACAGGCATACAGATTTACACC
5 AG-3'(SEQ ID NO:8).

分别地, 通过 PCR 法, 使用根据水稻核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位序列(Matsuoka 等, 植物细胞生理学, 29:1015-1022(1988))合成的下列引物:

TP-f1:5'-GGAATTCCATGGTGCATCTCAAGAAGTAC-3'(SEQ ID NO:9)
10 和

TP-r1:5'-GCTCTAGACTGCATGCACCTGATCC-3'(SEQ ID NO:10)
可分离出编码水稻核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位转运肽的 DNA 片断。模板是通过 SDS-苯酚法由日本水稻品种“Nihonbare”的绿叶中制备的水稻基因组 DNA。

15 使用扩增的 DNA 片断为模板, 使用下列合成的引物:

TP-f2:5'-GGAATTCCATGGCCCCCTCCGTGATGG-3'(SEQ ID NO:11)
和上述引物 TP-r1 再次进行 PCR。接着, 将通过用 XbaI 和 SphI 部分消化经 PCR 扩增的 PCK cDNA 片断得到的约 2kbp 的 DNA 片断与通过用 NcoI 和 XbaI 消化经第二次 PCR 扩增的转运肽序列 DNA 片断得到的约 150bp
20 的片断(由 SEQ ID NO:2 表示)连接, 所得的约为 2.2kbp 的 DNA 片断被用于基因构建。

(4)CA 基因

通过将含有菠菜 CA cDNA 区域的 1.8kbp 的片断(用 HindIII 和 KpnI 消化以前报道过的λ噬菌体克隆(λLCA48)(Burnell, J. N 等, 1990, 植物
25 生理学, 92:33-40)得到的)插入 pBluescriptSK-(Stratagene, USA)的 HindIII/KpnI 位点可得到载体。从此 cDNA 中缺失编码转运肽的区域, 所述转运肽参与 CA 至叶绿体的转移。为了实现缺失的目的, 将转运肽区域中最终的氨基酸残基由丝氨酸转变为甲硫氨酸以使点突变可导入 NcoI 识别位点, 使用下列合成的寡核苷酸:

30 5'-GGTGGCACAGATAACCATGGATCCAGTTAGCCGACGGTGGC-
3'(SEQ ID NO: 12)和 Mutan-KTM(Takara Shuzo 有限公司)可进行突变。

用 NcoI 消化携有突变的所得质粒, 籍此可从中缺失编码转运肽的区域。然后用 SphI 消化此质粒, 将所得的约 700bp 的 DNA 片断用于基因构建, SEQ ID NO:3 显示出所述片断的序列。

(5)终止子序列

- 5 所用终止子序列是通过用 SalI 和 EcoRI 消化 pBI121(Jefferson, R. A.(1987), Plant Mol. Biol. Repr, 5:387-405)得到的 NOS 终止子区的 DNA 片断, 和通过用 SphI 和 EcoRI 消化 pGL2(Bilang, R 等, 1991, 基因, 100:247-250)得到的 35S 终止子区的 DNA 片断。

(6)构建导入的质粒

- 10 将启动子, cDNA 和所得的终止子 DNA 片断组合并按下述方式连接, 然后插入 pBluescriptIIISK-(Stratagene, USA)的 HindIII-EcoRI 位点之间以构建质粒(用于导入单个基因的质粒, 见图 2)。

- PPDK 启动子::PEPC cDNA::NOS 终止子(pDPN)
- PPDK 启动子::CA cDNA::35S 终止子(pDCS)
- 15 · PPDK 启动子::PCK cDNA::35S 终止子(pDKS)。

- 另外, 用 ClaI 消化 pDKS, 使之成为平端, 然后用 XbaI 消化, 将所得 DNA 片断插入 pDPN 的经 SmaI 和 XbaI 消化的位点处, 得到携有两个基因, 即 PEPC 和 PCK 的质粒 pPK(见图 2)。接着, 用 SmaI 消化 pDCS, 在其中加入 HindIII 接头, 用 HindIII 消化后, 将所得 DNA 片断插入 pDPN
- 20 的 HindIII 位点, 从而得到质粒 pCP。另外, 用 ClaI 消化 pDKS, 使之成为平端, 然后用 XbaI 消化, 将所得 DNA 片断插入 pCP 的经 SmaI 和 XbaI 消化的位点处, 得到携有三个基因, 即 CA, PEPC 和 PCK 的质粒 pCPK(见图 2)。接着, 用 XbaI 消化 pPK, 然后用 HindIII 部分消化, 从而得到约 7.5kbp 的 DNA 片断, 同时用 XbaI 消化 pCPK, 然后用 HindIII
- 25 部分消化, 从而得到约 9.5kbp 的另一个 DNA 片断。将这些 DNA 片断分别插入 pSB11(Komara, T 等, 植物学杂志, 1996, 10:165-174)的经 XbaI 和 HindIII 消化的位点处, 从而构建了超二元的中间体质粒 pSPK 和 pSCPK。

- 将这些载体各导入 *E. coli* LE392 菌株中, 然后通过与农杆菌
- 30 LBA4404/pSB4 和 *E. coli* HB101/pRK2013 的三亲本交配进行对农杆菌的导入和同源重组(Komari, T 等, 植物学杂志, 1996, 10:165-174), 从而

得到质粒 pSB4PK 和 pSB4CPK。

(7)构建携有 CA, PEPC, PCK 和/或 PPDK 的载体

用 HindIII 和 EcoRI 消化通过如上所述的 PCR 法得到的具有 PPDK 启动子区的质粒载体 pCR1000(Invitrogen, USA), 然后插入其中已缺失了 SacI 位点的 pBluescript IISK-(Stratagene, USA)的 HindIII 和 EcoRI 位点之间, 然后用 SacI 消化所得产物并使之成为平端, 接着, 在其中插入含有 *Ricinus communis* 过氧化氢酶的第一个内含子的约 200bp 的片断(通过用 BamHI 和 SalI 消化 pIG221(Ohta 等: 在烟草中构建和表达在编码序列内含有内含子的 β -葡糖醛酸酶(GUS)报道基因, 植物细胞生理学, 10 31:805-813(1990)), 接着使之成为平端而得到), 从而得到含有 PPDK(catI) 启动子的质粒 pSK-Di, 然后用 NdeI 消化此质粒, 接着使之成为平端, 从而得到其中插入了 NcoI 接头的另一个质粒 pSK-Di2。

通过常规方法(Sambrook, J 等, 文献同上), 使用 λ ZAP 载体(Stratagene, USA)可制备 cDNA 文库, 通过使用根据已知的核苷酸序列 (Matsuoka, M, Ozeki, Y, Yamamoto, N, Hirano, H, KanoMurakami, Y 和 Tanaka, Y: 由 cDNA 序列推定的玉米丙酮酸, 正磷酸二激酶的一级结构, 生物化学杂志, 163:11080-11083(1990))制备的下列合成寡核苷酸:

5'-TAGCTCGATGGGTTGCACGATCATATGGAGCAAGG-3'(SEQ ID NO:13)筛选上述 cDNA 文库可分离出玉米 C4 PPDK 的 cDNA。另外, 使用根据已知的序列(Sheen, J: 玉米丙酮酸, 正磷酸二激酶基因示差表达的分子机理, 植物细胞, 3:225-245(1991))制备的下列合成引物:

5'-TTTCATATGGCGCCCGTTCAATGTGCGC GTTCGCAGAGGGTGTTC CACTTC GGCAA-3'(5'侧)(SEQ ID NO:14); 和

25 5'-GTACTCCTCCACCCACTGCA-3'(3'侧)(SEQ ID NO:15), 通过 PCR 法(Mcpherson, M. J 等, 文献同上)扩增分离的玉米 PPDK cDNA 可得到约 250bp 的 DNA 片断。用 NdeI 和 SacII 消化此片断, 用此片断取代上述 PPDK cDNA 的 NdeI 和 SacII 位点之间的区域, 接着, 用 NdeI 和 ClaI 消化, 将所得的约 2.9kbp 的 DNA 片断用作基因构建中的 PPDK cDNA。

30 使用质粒 pPGA643A(Gynheung AN, Paul R. Ebert, Amitava Mitra and Sam B. HA: 二元载体, 植物分子生物学手册 A3:1-19(1988))中所含的基

因 7 终止子作为终止子区, 通过用 ClaI 和 KpnI 消化 pPGA643 (Gynheung AN 等, 文献同上) 可得到基因 7 终止子, 将该终止子插入 pBluescript IISK-(Stratagene, USA) 的 ClaI 和 KpnI 位点之间可得到质粒, 用 KpnI 消化此质粒并使之成为平端, 在其中加入 XbaI 接头, 用 ClaI 和 XbaI 消化后, 将所得 DNA 片断用于基因构建。

将 PPKK cDNA 和基因 7 终止子插入 pSK-Di 的 NdeI 和 XbaI 位点之间, 从而得到含有 PPKK 基因的质粒 pSK-DiDT。

将通过用 XbaI 消化然后用 NcoI 部分消化上述 pDPN 得到的约 3.4kbp 的 DNA 片断插入 pSK-Di2 的 NcoI 和 XbaI 位点之间, 从而得到含有 PEPC 基因的质粒 pSK-DiPN。

将通过用 NcoI 和 XbaI 消化上述 pDKS 得到的约 2.4kbp 的 DNA 片断插入 pSK-Di2 的 NcoI 和 XbaI 位点之间, 从而得到含有 PEPCCK 基因的质粒 pSK-DiKS。

将通过用 NcoI 和 XbaI 消化上述 pDCS 得到的约 1kbp 的 DNA 片断插入 pSK-Di2 的 NcoI 和 XbaI 位点之间, 从而得到含有 CA 基因的质粒 pSK-DiCS。

将 SmaI 接头插入 pSK-DiPN 的 XhoI 位点, 然后用 SmaI 消化, 将所得的约 4.5kbp 的 DNA 片断插入 pSK-DiCS 经 PstI 消化的位点处, 使之成为平端, 从而得到质粒 pSK-CiPi。缺失了 pSK-DiDT 的 XbaI 位点之后, 在质粒的 XhoI 位点加入 XbaI 接头, 用 XbaI 和 NotI 消化该质粒, 将所得的约 4.8kbp 的 DNA 片断插入质粒 pSK-CiPi 的 XbaI 和 NotI 位点之间, 得到质粒 pSK-CiPiDi。在 pSK-CiPiDi 的 XhoI 位点加入 NotI 接头, 用 NotI 进行消化以得到约 12kbp 的 DNA 片断。用 HindIII 和 EcoRI 消化 pSB11(Komari, T 等, 植物学杂志, 10:165-174(1996)) 并使之成为平端, 接着, 在其中加入 NotI 接头。在此 NotI 位点插入约 12kbp 的上述 DNA 片断, 从而得到质粒 pSBmCiPiDi。在 pSK-DiKS 的 XhoI 位点加入 XbaI 接头, 用 XbaI 进行消化, 将所得的约 3.3kbp 的 DNA 片断插入 pSBmCiPiDi 的 XbaI 位点, 得到质粒 pSBmCiPiKiDi。

通过在携有质粒 pSBmCiPiKiDi 的 *E.coli* DH5a 菌株, 农杆菌 LBA4404/携有 pSB4 和携有 pRK2013 的 *E.coli* HB101 菌株中的三亲本交配进行对农杆菌的导入和同源重组(Komari, T 等, 文献同上), 得到质粒

pSB4CiPiKiDi。

实施例 2 转化体的构建

在水稻转化的整个研究过程中使用了 Japonica 水稻(品种为
5 “Tsukinohikari”)。

通过先前描述的电穿孔法(日本专利公开特许 8-80197)构建了其中已
导入 pDPN, pDKS 和 pDCS 的水稻转化体。

通过文献中描述的农杆菌法(Hiei, Y 等, 1994, 植物学杂志, 6:
271-282)构建其中导入了 pSB4PK, pSB4CPK 和 pSB4CiPiDiKi 的水稻
10 转化体。

在空调温室(光照期:16 小时, 白天:28 °C, 夜晚:23 °C)中培养这些转
化体。

实施例 3 检测酶蛋白质并测定酶活性

15 用 1ml 冰冷的提取缓冲液(50mM HEPES-KOH pH7.0, 10mM 氯化
镁, 2mM 氯化锰, 1mM 丙酮酸钠, 1mM 磷酸, 1mM EDTA, 0.1 %
2-巯基乙醇, 20 % 甘油, 1mM 苯甲基磺酰氟, 1mM 苜蓿, 1mM 6-氨
基-正己酸, 0.2 % (w/w) 异抗坏血酸, 和 2 % (w/v) polyclar AT)匀浆转化
体或对照水稻(“Tsukinohikari”)约 0.1g 的绿叶, 4 °C 下以 15,000 × g
20 离心匀浆物 20 分钟, 然后穿过室温下已用柱缓冲液(50mM HEPES-KOH
pH7.0, 10mM 氯化镁, 2mM 氯化锰, 1mM EDTA, 0.1 % 2-巯基乙
醇, 和 20 % 甘油)平衡的 NAP5TM 柱(Pharmacia, Sweden)使所得的上
清液脱盐, 从而得到粗的提取液。通过以前报道的方法(Wintermans 和
deMots(1965) Biochem. Biophys. Acta 109:448-453)测定匀浆物中叶绿素
25 的含量, 同时通过使用 Protein Assay Kit™ (BioRad, USA)测定粗提取
物中蛋白质的含量。

按下述通过 Western 印迹检测转化体中酶的表达, 以将蛋白质浓度调
节为相同水平的方式对上文所得的粗提取物进行 SDS-PAGE。将凝胶中
分离的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜(Schleicher & Schull, 德国)上, 使
30 用兔抗玉米 PEPC 蛋白, Urochloa panicoides PCK 蛋白, 菠菜 CA 蛋白或
玉米 PPDK 蛋白的抗血清, 与碱性磷酸酶缀合的山羊抗兔 IgG(Organon

Teknika, USA)和 AP Immun-Blot Assay KIT™ (Bio-Rad, USA)检测各个蛋白质的表达。

通过使用 1ml 含有 25mM HEPES-KOH(pH8.0), 5mM 硫酸镁, 4mM 二硫苏糖醇, 5mM 碳酸氢钾, 0.25mM NADH, 1mM 葡萄糖-6-磷酸, 5mM 烯醇丙酮酸磷酸, 1U 苹果酸脱氢酶(Boehringer Mannheim, 德国)和 25 μ l 粗提取物的反应混合物测量 340nm 下 NADH 吸收降低的速率可测定 PEPC 的活性。

通过使用 1ml 含有 25mM HEPES-KOH(pH8.0), 4mM 二硫苏糖醇, 0.2mM 草酰乙酸, 1U 丙酮酸激酶(Boehringer Mannheim, 德国), 0.2mM ATP 和 50 μ l 粗提取物的反应混合物测量 280nm 下草酰乙酸吸收降低的速率可测定 PCK 的活性。

通过在 0.3ml 用溴百里酚蓝染色的 50mM HEPES-KOH 缓冲液 (pH8.0)和 10 μ l 粗提取物中加入 0.5ml 冰冷的, 用二氧化碳饱和的水, 并测量反应混合物在冰上颜色消失所需的时间可测定 CA 活性。根据以前报道的方法(Burnell, J. N和 Hatch, M. D(1988), 植物生理学, 86:1252-1256)计算活性。

通过使用 1ml 含有 25mM HEPES-KOH(pH8.0), 10mM 二硫苏糖醇, 10mM 碳酸氢钾, 8mM 硫酸镁, 5mM 氯化铵, 2.5mM 磷酸二氢钠, 1mM ATP, 1mM 葡萄糖-6-磷酸, 5mM 丙酮酸钠, 0.2mM NADH, 2U 苹果酸脱氢酶, 2U PEPC(Wako Pure Chemical Industries, 日本)和 200 μ l 粗提取物的反应混合物测量 340nm 下 NADH 吸收降低的速率可测定 PPK 的活性。

实施例 4 用 $^{14}\text{CO}_2$ 进行示踪实验

25 分离在空调温室中培养的水稻转化体和对照(“Tsukinohikari”)的叶尖(约 5cm), 用浸满水的脱脂棉覆盖切下的每个叶尖。将这些样品放置在由本发明人自制的同化室(容量约为 120ml 或 50ml)中, 在约 27,000 $1 \times$ 的照射下, 以约 5 升/分钟的流速通过空气达 30 分钟后, 将通过在不漏气的注射器中混合 100-180 μ l 60 % 高氯酸和 50-70 μ Ci $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 溶液 (Amersham, 英国)产生的放射性二氧化碳气体注射到密闭的系统中。5 30 秒的脉冲后, 将叶在液氮中冷冻以停止任何生物活性, 然后将叶放入 80

%热乙醇中约30分钟以提取可溶性物质。脉冲5秒后,将空气导入系统,10,30和90秒后,从同化室中取出叶样品并浸入液氮中以停止任何生物活性,然后在80%热乙醇中提取可溶性物质。将所得的各个提取物在蒸发器中蒸发,并在Funaseru SF Cellulose Thin Layer Plate™(Funakoshi Japan, 20cm × 20cm)上进行二维薄层层析。

室温下,通过使用苯酚-水-冰醋酸-0.5M EDTA(47:84:5.5:1.14, v/v)的混合物作为主要的显色溶剂,溶液A(正丁醇:水,74:5, v/v)与溶液B(丙酸:水,9:11, v/v)等体积的混合物作为次要的显色溶剂来进行显色。完成显色之后,使层析板干燥,接着用Bioimage Analyzer Bas 1000 System(富士胶片,日本)进行放射自显影以测定每个点的相对量,从而检查了被放射性同位素标记的物质比例。

实施例5 用[14C]苹果酸进行示踪实验

分离空调温室中培养的水稻转化体和对照(“Tsukinohikari”)的叶,将叶放入10mM磷酸盐缓冲液(pH6.4)中,然后以27,000 1 × 照射1小时,接着,将这些叶放入100μl其中已加入5μl 1μCi[14C]苹果酸(Amersham, 英国)的溶液中,确定的时间之后,取出叶样品,然后取出浸在溶液中的部分,将之浸入煮沸的80%乙醇中以停止任何生物活性,煮沸30分钟以从中洗脱可溶性的物质,在蒸发器中蒸发洗脱物,通过二维薄层层析分离经放射性同位素标记的物质,接着用Bioimage Analyzer Bas 1000 System进行放射自显影以测定每个点的放射性,从而检查了被放射性同位素标记的物质的相对量。

实施例6 测量光合活性

将空调温室中培养的导入了3个基因的水稻转化体和对照(“Tsukinohikari”)转移到生长培养箱(光照期:12小时,照明:约35,000 lx, 25℃)中培养以适应环境,然后用光合测定系统(LI-6200, LICOR, 美国)测定未显示出衰老迹象的完全张开的叶的光合活性。

30 实施例7 生产具有PCK型C4途径的转基因水稻和检测数据

产生上文制备的各个基因构建体的转化体个体,并通过Western印迹

检查转基因的表达。在 19 个其中导入了基因构建体 pDPN 的水稻转化体 (PEPC 转化体) 中, 在 15 个转化体中进一步证实了 PEPC 蛋白质的表达。在 31 个其中导入了基因构建体 pDKS 的水稻转化体 (PCK 转化体) 中, 在 20 个转化体中进一步证实了 PCK 蛋白质的表达。在 41 个其中导入了基因构建体 pDCS 的水稻转化体 (CA 转化体) 中, 在 3 个转化体中进一步证实了 CA 蛋白质相对高水平的表达。在 21 个其中导入了基因构建体 pSB4PK 的水稻转化体 (两种基因的转化体) 中, 在 12 个转化体中进一步证实了两种蛋白质, 即 PEPC 和 PCK 的表达。在 40 个其中导入了基因构建体 pSB4CPK 的水稻转化体 (三种基因的转化体) 中, 在 15 个转化体中进一步证实了三种蛋白质, 即 CA, PEPC 和 PCK 的表达。在 72 个其中导入了基因构建体 pSB4CiPiKiDi 的水稻转化体 (四种基因的转化体) 中, 在 22 个转化体中进一步证实了四种蛋白质, 即 CA, PEPC, PCK 和 PPKD 的表达。

由这些显示出导入酶的相对高表达水平的水稻转化体制备 R1 子代, 然后检查绿叶粗提取物中每种酶的活性, 表 1 显示了结果。表 1 清楚地表明: R1 代转化体的粗提取物中导入酶的活性比对照水稻 (“Tsukinohikari”) 中的高。这些事实表明由转化体中被导入基因表达的酶表现出它们的酶活性。此实施例中所用的用于 PCK 导入的基因构建体为嵌合基因, 其中加入了编码水稻核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位之转运肽的区域, 这一点类似于以前的报道 (日本专利公开特许 8-80197), 因此, 因转运肽的作用, PCK 蛋白可位于叶绿体中。

表 1: 水稻转化体中的酶活性

	酶活性(U/mg 叶绿素)			
	CA	PEPC	PCK	PPDK
CA 转化体	18,760	0.458	0	未测
PEPC 转化体	2,250	1.880	0	未测
PCK 转化体	1,364	0.474	7.744	未测
2 种基因的转化体	2,143	1.171	5.780	未测
3 种基因的转化体	9,269	1.071	3.001	未测
4 种基因的转化体	9,450	1.490	3.170	0.37
对照(Tsukinohikari)	2,171	0.322	0	0.29

为其中导入了两种和三种基因的水稻转化体和对照(Tsukinohi-kari)的 R1 子代植株的叶切片提供 $^{14}\text{CO}_2$ ，5 秒后，停止组织中的生物活性，检测经标记的 C4 化合物的相对量，结果发现转化体中经标记的苹果酸和经标记的天冬氨酸的含量分别约比对照样品中的高约 10 倍和约 2 倍(见表 2)，这些事实表明导入的 PEPC 在转化体的绿叶组织中起作用以使其中进行了 C4 光合途径中的初次二氧化碳固定过程。

表 2: $^{14}\text{CO}_2$ 示踪实验

	$^{14}\text{CO}_2$ 摄取 (%)	
	苹果酸	天冬氨酸
(Tsukinohikari)	0.7	0.9
2 种基因的转化体	9.8	2.0
3 种基因的转化体	8.1	1.9

10

对其中导入了两种，三种或四种基因的水稻转化体以及水稻对照(Tsukinohikari)和玉米对照的 R1 子代植株的叶切片提供 $^{14}\text{CO}_2$ 达 5 秒，随后，随时间的推移追踪经标记的 C4 化合物的行为。在水稻转化体中，经标记的 C4 化合物与玉米(即 C4 植物)中的类似而有所减少。与之形成对照的是水稻对照中经标记的 C4 化合物未显示出任何显著的变化(见图 3)，这些事实表明在水稻转化体中，由导入的 PEPC 固定的二氧化碳形成的 C4 化合物立即被代谢成其它物质，这与在 C4 植物绿叶组织中观察到的现象类似。

15

为其中导入了两种和三种基因的水稻转化体和对照(Tsukinohi-kari)的 R1 子代的叶切片提供 $[^{14}\text{C}]$ 苹果酸，15 分钟后，停止组织中的生物活性，检测经标记的化合物比例，结果发现转化体中经标记的蔗糖的相对量约比对照样品中的高约 3 倍(见表 3)，这些事实表明导入的 PCK 在水稻转化体的绿叶组织中起作用以使二氧化碳由 C4 光合途径中的 C4 化合物传递给卡尔文-本森循环(Calvin-Benson cycle)。

20

25

表 3: [¹⁴C] 苹果酸示踪实验

	[¹⁴ C] 摄入蔗糖(%)
对照(Tsukinohikari)	6.2
2 种基因的转化体	15.7
3 种基因的转化体	22.5

改变提供给叶的二氧化碳的浓度, 同时测定其中导入 3 个基因的水稻转化体和水稻对照(Tsuki no Hikari)的 R1 子代的光合活性, 将光合速率对细胞间的二氧化碳浓度作图(见图 4)。结果, 在假定表观光合活性消失的点处(即图 4 线之 X 轴上的截距), 转化体细胞间二氧化碳的浓度低于水稻对照中的相应浓度, 这一事实意味着水稻转化体的 CO₂ 补偿点低于对照的相应补偿点。通常, C4 植物显示出低于 C3 植物的 CO₂ 补偿点, 因此, 可得出结论: 本文构建的水稻转化体与水稻对照相比, 其光合特性类似于 C4 植物。

上文所述的结果表明其中导入 2 个和 3 个基因的水稻转化体含有与 C4 光合作用相关的酶的活性形式, 所述酶是导入基因的表达产物, 另外, C4 光合途径在这些植物中起作用以增强光合效力, 因此, 本发明能使 PCK 型 C4 光合途径在 C3 植物中起作用, 从而改变光合效力。

15 本发明效果

根据本发明, 可在 C3 植物的叶肉细胞中驱动类似于 C4 植物之 C4 光合途径的循环反应, 以赋予 C3 植物提高叶绿体中二氧化碳浓度的功能和另一种可避免因 ATP 的消耗而导致的光抑制的功能。由于光合效力有所增强, 预期获得这些功能的植物可提高每份干重的产量, 改良对于干旱的抗性, 改良对高温的抗性, 改良对高光强度的耐受性并增强低二氧化碳条件下的光合效力。

序列表

(2)SEQ ID NO:1 的资料:

(i)序列特征:

- 5 (A)长度: 930 个碱基对
 (B)类型: 核酸
 (C)链型: 双链
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

10 (vi)来源:

- (A)生物体: *Zea mays*
 (B)种子: 近交 B73

(ix)特征: C4 型 PDK 基因启动子区域(部分)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:1:

15	CTAAAGACAT GGAGGTGGAA GGCCTGACGT AGATAGAGAA GATGCTCTTA GCTTTCATTG	60
	TCTTTCTTTT GTAGTCATCT GATTTACCTC TCTCGTTTAT ACAACTGGTT TTTTAAACAC	120
	TCCTTAACTT TTCAAATTGT CTCTTTCTTT ACCCTAGACT AGATAATTTT AATGGTGATT	180
	TTGCTAATGT GGCGCCATGT TAGATAGAGG TAAAATGAAC TAGTTAAAAG CTCAGAGTGA	240
	TAAATCAGGC TCTCAAAAAT TCATAAACTG TTTTTTAAAT ATCCAAATAT TTTTACATGG	300
20	AAAATAATAA AATTTAGTTT AGTATTAAAA AATTCAGTTG AATATAGTTT TGTCTTCAAA	360
	AATTATGAAA CTGATCTTAA TTATTTTTCC TTA AACCGT GCTCTATCTT TGATGTCTAG	420
	TTTGAGACGA TTATATAATT TTTTTTGTGC T TACTACGAC GAGCTGAAGT ACGTAGAAAT	480
	ACTAGTGGAG TCGTGCCGCG TGTGCCTGTA GCCACTCGTA CGCTACAGCC CAAGCGCTAG	540
	AGCCCAAGAG GCCGGAGTGG AAGGCGTCGC GGC ACTATAG CCACTCGCCG CAAGAGCCCA	600
25	AGAGACCGGA GCTGGAAGGA TGAGGGTCTG GGTGTTACAG AATTGCCTGG AGGCAGGAGG	660
	CTCGTCGTCC GGAGCACAGG CGTGGAGAAC GTCCGGGATA AGGTGAGCAG CCGCTGCGAT	720
	AGGCGCGTGT GAACCCCGTC GCGCCCCACG GATGGTATAA GAATAAAGGC ATTCCGCGTG	780
	CAGGATTCAC CCGTTCGCCT CTCACCTTTT CGCTGTACTC ACTCGCCACA CACACCCCT	840
	CTCCAGCTCC GTTGGAGCTC CGGACAGCAG CAGGCGCGGG GCGGTCACGT AGTAAGCAGC	900
30	TCTCGGCTCC CTCTCCCCTT GCTCCATATG	930

(2)SEQ ID NO:2 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 153 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA-mRNA

(vi)来源:

(A)生物体: *Oryza sativa*

10 (B)品种: Nihonbare

(ix)特征: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶小亚单位的转运序列区

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2:

ATG GCC CCC TCC GTG ATG GCG TCG TCG GCC ACC ACC GTC GCT CCC TTC 48

Met Ala Pro Ser Val Met Ala Ser Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro Phe

15 1 5 10 15

CAG GGG CTC AAG TCC ACC GCC GGC ATG CCC GTC GCC CGC CGC TCC GGC 96

Gln Gly Leu Lys Ser Thr Ala Gly Met Pro Val Ala Arg Arg Ser Gly

20 20 25 30

AAC TCC AGC TTC GGC AAC GTC AGC AAT GGC GGC AGG ATC AGG TGC ATG 144

Asn Ser Ser Phe Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Met

35 40 45

CAG TCT AGA 153

Gln Ser Arg

50

25

(2)SEQ ID NO:3 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 697 个碱基对

(B)类型: 核酸

30 (C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA-mRNA

(vi)来源:

(A)生物体: *Spinacia oleracea*

(ix)特征: 无转运肽编码区的碳酸酐酶 mRNA

5

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3:

CC ATG GAG TTA GCC GAC GGT GGC ACA CCA TCC GCC AGT TAC CCG GTT 47

Met Glu Leu Ala Asp Gly Gly Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Pro Val

5

10

15

10

CAG AGA ATT AAG GAA GGG TTT ATC AAA TTC AAG AAG GAG AAA TAC GAG 95

Gln Arg Ile Lys Glu Gly Phe Ile Lys Phe Lys Lys Glu Lys Tyr Glu

20

25

30

AAA AAT CCA GCA TTG TAT GGT GAG CTT TCT AAG GGC CAA GCT CCC AAG 143

Lys Asn Pro Ala Leu Tyr Gly Glu Leu Ser Lys Gly Gln Ala Pro Lys

15

35

40

45

TTT ATG GTG TTT GCG TGC TCA GAC TCC CGT GTG TGT CCC TCG CAC GTA 191

Phe Met Val Phe Ala Cys Ser Asp Ser Arg Val Cys Pro Ser His Val

50

55

60

CTA GAT TTC CAG CCC GGT GAG GCT TTC ATG GTT CGC AAC ATC GCC AAC 239

20

Leu Asp Phe Gln Pro Gly Glu Ala Phe Met Val Arg Asn Ile Ala Asn

65

70

75

ATG GTG CCA GTG TTT GAC AAG GAC AAA TAC GCT GGA GTC GGA GCA GCC 287

```

Met Val Pro Val Phe Asp Lys Asp Lys Tyr Ala Gly Val Gly Ala Ala
 80                85                90                95
ATT GAA TAC GCA GTG TTG CAC CTT AAG GTG GAG AAC ATT GTC GTG ATT 335
Ile Glu Tyr Ala Val Leu His Leu Lys Val Glu Asn Ile Val Val Ile
                100                105                110
GGA CAC AGT GCT TGT GGT GGA ATC AAG GGG CTT ATG TCT TCT CCA GAT 383
Gly His Ser Ala Cys Gly Gly Ile Lys Gly Leu Met Ser Ser Pro Asp
                115                120                125
GCA GGA CCA ACC ACA ACT GAT TTT ATT GAG GAT TGG GTC AAA ATC TGC 431
Ala Gly Pro Thr Thr Thr Asp Phe Ile Glu Asp Trp Val Lys Ile Cys
                130                135                140
TTG CCT GCC AAG CAC AAG GTG TTA GCC GAG CAT GGT AAT GCA ACT TTC 479
Leu Pro Ala Lys His Lys Val Leu Ala Glu His Gly Asn Ala Thr Phe
                145                150                155
GCT GAA CAA TGC ACC CAT TGT GAA AAG GAA GCT GTG AAT GTA TCT CTT 527
Ala Glu Gln Cys Thr His Cys Glu Lys Glu Ala Val Asn Val Ser Leu
160                165                170                175
GGA AAC TTG TTG ACT TAC CCA TTT GTA AGA GAT GGT TTG GTG AAG AAG 575
Gly Asn Leu Leu Thr Tyr Pro Phe Val Arg Asp Gly Leu Val Lys Lys
                180                185                190
ACT CTA GCT TTG CAG GGT GGT TAC TAC GAT TTT GTC AAT GGA TCA TTC 623
Thr Leu Ala Leu Gln Gly Gly Tyr Tyr Asp Phe Val Asn Gly Ser Phe
                195                200                205
GAG CTA TGG GGA CTC GAA TTC GGC CTC TCT CCT TCC CAA TCT GTA 668
Glu Leu Trp Gly Leu Glu Phe Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ser Val
                210                215                220
TGAACCAACA CAACCATTTG ACTGCATGC 697

```

(2)SEQ ID NO:4 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4:

CTAAAGACAT GGAGG TGGAA G 21

10

(2)SEQ ID NO:5 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 19 个碱基对

(B)类型: 核酸

15 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5:

GTAGCTCGAT GGGTGCACG 19

20

(2)SEQ ID NO:6 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 35 个碱基对

(B)类型: 核酸

25 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6:

GCCATGGCGC GGCGGAAGC TAAGCACGGA AGCGA 35

30

(2)SEQ ID NO:7 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 39 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

5 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:7:

GCTCTAGATC TCTGGCACGT GAATATGGCC CCAACCTCG 39

(2)SEQ ID NO:8 的资料:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 39 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

15 (ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:8:

CAGTGCATGC CGCCGAACAG GCATACAGAT TTACACCAG 39

(2)SEQ ID NO:9 的资料:

(i)序列特征:

20 (A)长度: 29 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

25 (xi)序列描述: SEQ ID NO:9:

GGAATTCCAT GGTGCATCTC AAGAAGTAC 29

(2)SEQ ID NO:10 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

30 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

- (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA(合成的)
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:10:
GCTCTAGACT GCATGCACCT GATCC 25
- 5 (2)SEQ ID NO:11 的资料:
- (i)序列特征:
- (A)长度: 27 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- 10 (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA(合成的)
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:11:
GGAATTCCAT GGCCCCCTCC GTGATGG 27
- (2)SEQ ID NO:12 的资料:
- 15 (i)序列特征:
- (A)长度: 41 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑结构: 线性
- 20 (ii)分子类型: DNA(合成的)
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:12:
GGTGGCACAG ATAACCATGG ATCCAGTTAG CCGACGGTGG C 41
- (2)SEQ ID NO:13 的资料:
- (i)序列特征:
- 25 (A)长度: 35 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA(合成的)
- 30 (xi)序列描述: SEQ ID NO:13:
TAGCTCGATG GGTGACACGA TCATATGGAG CAAGG 35

(2)SEQ ID NO:14 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 56 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:14:

TTTCATATGG CGCCCGTTCA ATGTGCGCGT TCGCAGAGGG TGTTCCACTT CGGCAA 56

10 (2)SEQ ID NO:15 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

15 (D)拓扑结构: 线性

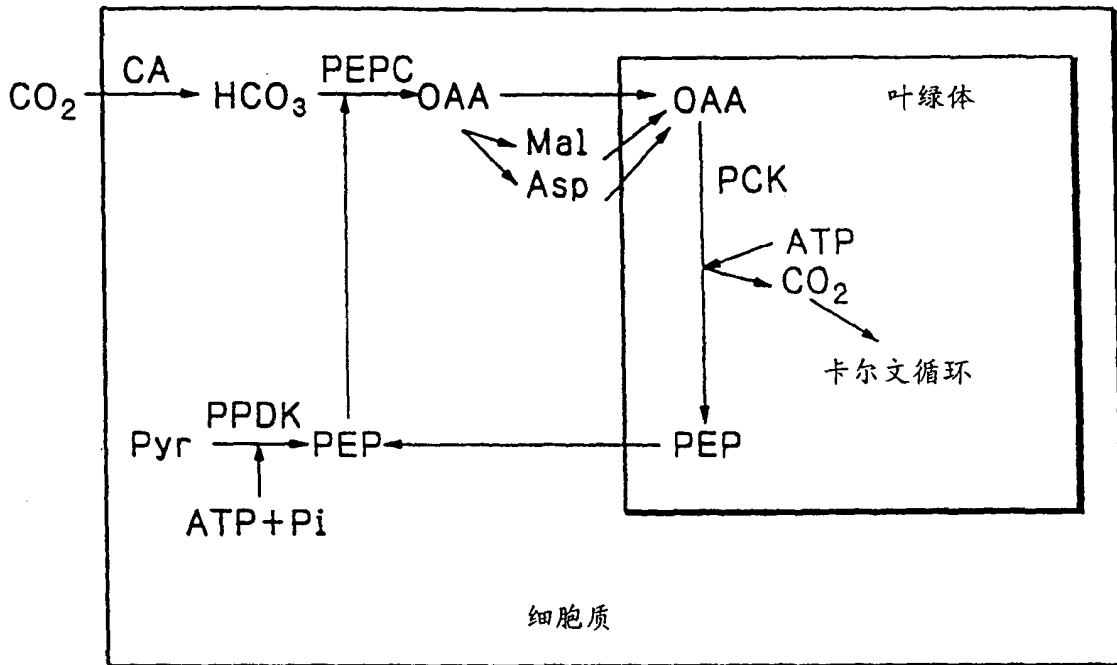
(ii)分子类型: DNA(合成的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:15:

GTACTCCTCC ACCCACTGCA 20

图 1

PCK 型 C4 光合循环



• 粗写字母表示待导入的酶

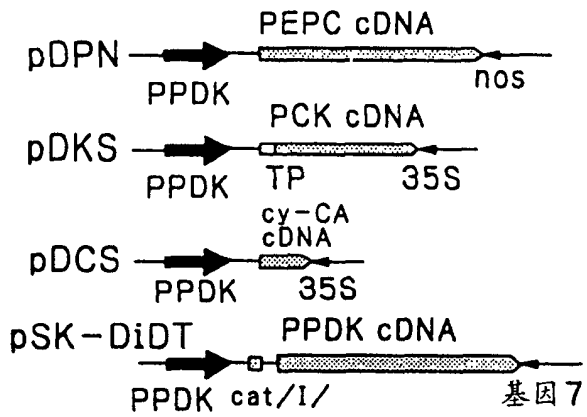
• OAA→[MAL OR ASP]→OAA 的反应是由胞内酶介导的

• OAA: 草酰乙酸
 Asp: 天冬氨酸
 Pyr: 丙酮酸

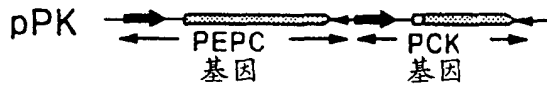
Mal: 苹果酸
 PEP: 烯醇丙酮酸磷酸

图 2

转化中所用的基因构建体



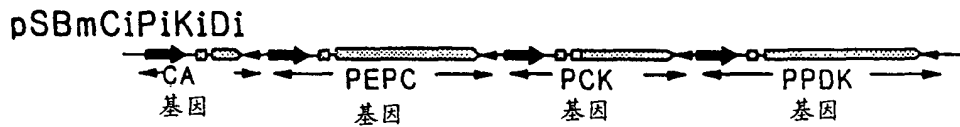
导入2个基因的基因构建体



导入3个基因的基因构建体



导入4个基因的基因构建体



➡ 启动子

▭ cDNA

◀ 终止子

□ 水稻核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶-加氧酶小亚单位的转运肽区域

□ castor bean 过氧化氢酶的第一个内含子

图 3

随时间的推移，经标记的碳化合物的行为

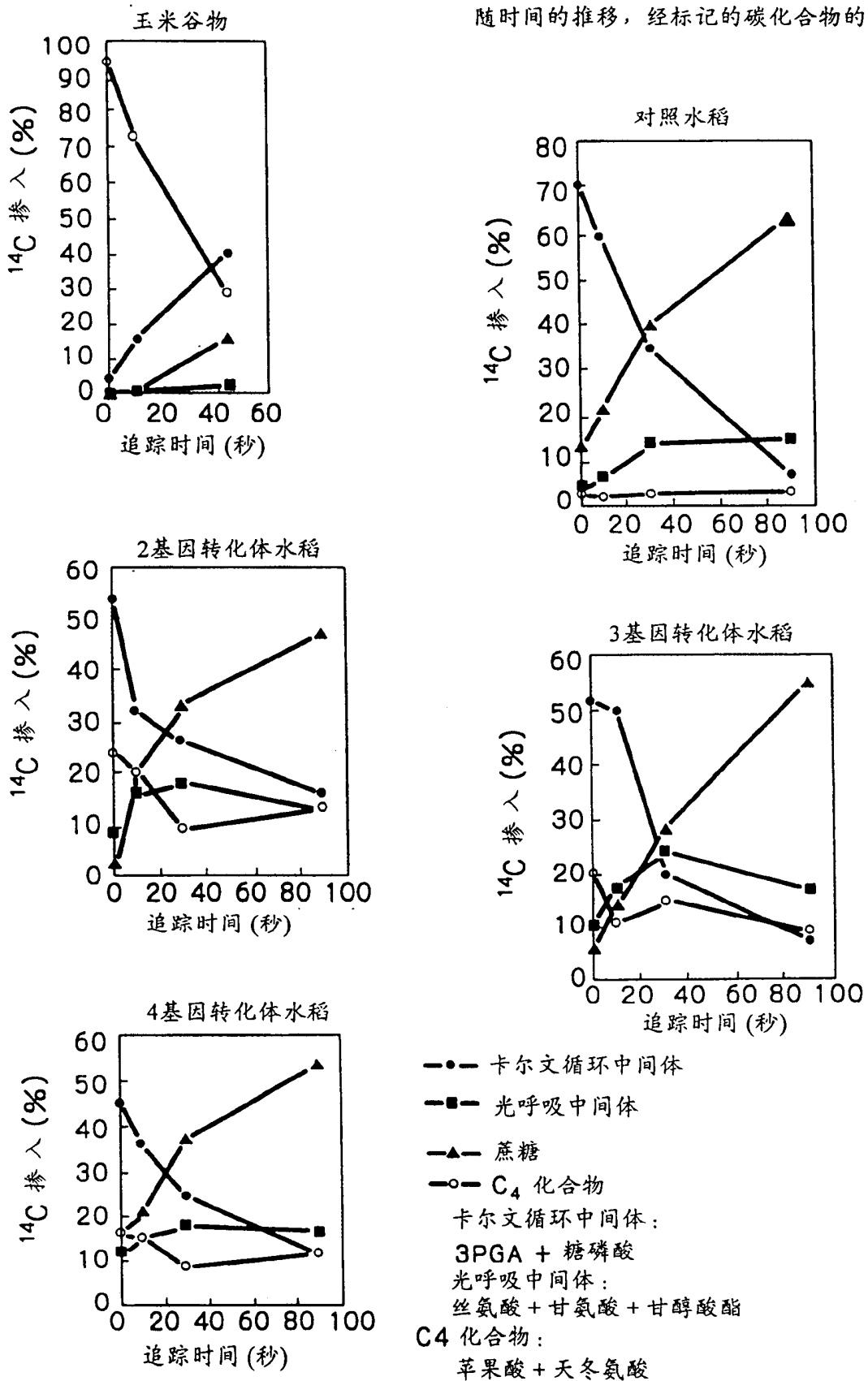


图 4

对照水稻 (TSUKINOHIKARI) 和导入了3个基因的转化体水稻的光合活性
(光合活性-细胞间 CO_2 浓度曲线)

