

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/82

A01H 5/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96198388.4

[43]公开日 1998 年 12 月 16 日

[11] 公开号 CN 1202203A

[22]申请日 96.8.30

[30]优先权

[32]95.9.22 [33]GB[31]9519406.4

[32]95.9.22 [33]GB[31]9519404.9

[86]国际申请 PCT/GB96/02116 96.8.30

[87]国际公布 WO97/11189 英 97.3.27

[85]进入国家阶段日期 98.5.18

[71]申请人 普尼卡有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72]发明人 I·耶普森 A·J·格林兰 M·贝范
H·谢泼德

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图页数 19 页

[54]发明名称 植物谷胱甘肽S-转移酶启动子

[57]摘要

化学诱导型基因启动子序列,特别是(但非排他的)基于玉米谷胱甘肽S-转移酶 27(GST-27)基因的顺式调控元件的化学诱导型基因启动子序列。在推荐实施方案中,该启动子序列操作性地与一个基因或一系列基因连接或融合,由此可以通过应用有效的外源诱导物控制该基因或该系列基因的表达。

权 利 要 求 书

1. 一个化学诱导型基因启动子序列, 包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列的转录起始点上游的 897 碱基对。

5 2. 一个化学诱导型基因启动子序列, 包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列的转录起始点上游的 760 碱基对。

3. 一个化学诱导型基因启动子序列, 包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列的转录起始点上游的 570 碱基对。

10 4. 一个化学诱导型基因启动子序列, 包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列的转录起始点上游的 378 碱基对。

5. 一个化学诱导型基因启动子序列, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 267-332 碱基对区的序列。

15 6. 一个化学诱导型基因启动子序列, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 275-290 碱基对区的序列。

7. 一个化学诱导型基因启动子元件, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 267-279 碱基对区的序列。

20 8. 一个化学诱导型基因启动子元件, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 278-288 碱基对区的序列。

25 9. 一个化学诱导型基因启动子元件, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 286-296 碱基对区的序列。

10. 一个化学诱导型基因启动子元件, 具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 320-332 碱基对区

的序列。

11. 按照任一前述权利要求的化学诱导型基因启动子序列或元件, 其中该序列或元件恰好在玉米谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列的转录起始点上游。

5 12. 按照任一前述权利要求的化学诱导型基因启动子序列或元件, 其中第 II 种同型谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子序列示于图 1 中。

13. 化学诱导型基因启动子序列或元件, 与权利要求 1-12 任一项的序列或元件或其变异体基本同源。

10 14. DNA 分子, 包含一个或多个权利要求 1-13 任一项的序列或元件。

15. 权利要求 8-13 任一项的序列或元件的多体。

15 16. 包含权利要求 1-15 任一项的序列或元件的基因构建物, 该序列或元件操作性地与一个基因或一系列基因连接, 由此通过应用有效的外源诱导物可以控制该基因或该系列基因的表达。

17. 一个植物, 具有通过转化整合(最好稳定整合)到植物基因组 DNA 中的权利要求 16 要求保护的构建物。

20 18. 一个启动子/诱导物组合物, 其中该启动子取决于权利要求 1-6 时, 为权利要求 1-6 和 11-13 任一项要求保护的化学诱导型基因启动子序列; 或当取决于权利要求 7-10 时, 为权利要求 7-10 和 11-13 任一项要求保护的化学诱导型启动子序列元件。

25 19. 植物表达系统, 该表达系统包含与权利要求 1-15 任一项要求保护的序列或元件融合的一个基因或一系列基因, 其中该表达系统能够在植物中表达, 并且通过应用有效的外源诱导物可以控制该基因或该系列基因的表达。

20. 按照权利要求 19 的表达系统, 包含一个按照权利要求 16 的构建物。

21. 一个转基因植物, 包含按照权利要求 16 的基因构建物或按照

权利要求 19 或权利要求 20 的表达系统，其中该构建物或该表达系统整合(最好稳定地整合)到该植物的基因组 DNA 中。

5 22. 按照权利要求 1-15 任一项要求保护的序列或元件的用途，即当一个基因或一系列基因与该序列或该元件融合时，在植物中诱导该基因或该系列基因的表达，由此可以通过应用有效的外源诱导物控制该基因或该系列基因的表达。

10 23. 在植物中表达按照权利要求 16 的构建物或按照权利要求 19 的表达系统的方法，其中该表达系统或该构建物整合(最好稳定地整合)到植物材料的基因组 DNA 中，由此通过应用有效的外源诱导物可以控制该基因或该系列基因的表达。

24. 基本上同以上图 1、图 2、图 3、图 6 或图 14 所述一样的启动子、构建物或表达系统。

说明书

植物谷胱甘肽 S-转移酶启动子

5 本发明涉及一种启动子和包含该启动子的构建物。

具体地说,本发明涉及化学诱导型基因启动子序列,特别是(但不是排他的)基于玉米谷胱甘肽 S-转移酶 27 (GST-27)基因的顺式调控元件的化学诱导型基因启动子序列。本发明也涉及包含该化学诱导型基因启动子序列的基因构建物、表达系统、植物和启动子/诱导物组合物。

10 最近分子生物学技术的进展已经导致更好地理解植物启动子。已经识别并使用顺式调控元件将报道基因活性定位于特定的分化细胞类型和植物的特定发育阶段(Drews 等, 1992; Gurrero 等, 1990)。尽管目前有以空间或时间方式调控转基因活性的技术,但在植物中没有很好地建立通过应用诱导化学药品进行导入基因的外部控制。

15 在细菌、真菌、昆虫和动物细胞培养物中很好地建立了以诱导方式调控基因的能力。对于有效的诱导型调控系统而言,在缺乏诱导物时应该为零水平或低水平表达,在用诱导物处理后为高水平表达,而该诱导物对细胞的其它功能没有影响。

20 尽管已经从植物中分离出大量的诱导型基因(Kuhlemeier 等, 1987),但在常规使用中还没有很好定义的诱导型调控系统。已经描述了由病原体攻击或环境刺激(包括光、氧气和温度水平)激活的大量基因。尽管这些基因中的一些在分子水平上的特征已经明确,然而由于由环境信号引起的不合理的激活,使得它们不能用于诱导型基因系统。

25 在植物中有许多文献证明在基因转录的激活中涉及化学刺激,包括植物生长调节剂。与环境刺激相比,可以较好地控制这些化合物的

应用, 然而, 由于不需要的基因多效作用, 认为它们不能用于诱导型基因系统。

最近大量研究已经证明, 通过应用外源化学药品, 可以达到植物中转基因的控制。这些包括用水杨酸(Williams 等, 1992)、四环素(Weinmann 等, 1994)、糖皮质激素(Schena 等, 1991)和铜离子(Mett 等, 1993)激活。尽管这些系统满足前述的必要条件, 并因此具有研究的实用性, 但由于所述化学药品不能与目前的农业实践相容, 因此它们的使用是有限的。

有潜在吸引力的、在转基因植物的调控基因表达中可能具有实用性的一组化学药品是除草剂防护剂。这些化合物目前用于农业中, 功能是通过诱导解毒酶谷胱甘肽 S-转移酶(Hatzios, 1991)和依赖于细胞色素 p450 的混合功能氧化(Fonne-Pfister 和 Kreuz, 1990), 选择性地提高某些除草剂的代谢。谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是多功能酶, 催化谷胱甘肽的巯基与亲脂化合物的亲电性中心结合, 导致它们解毒(Mannervik 和 Danielson, 1988)。GST 到处存在, 已明确地确定了它们在哺乳动物和植物中异生物质代谢中的作用(Lamoureux 和 Rusness, 1989)。

在玉米中发现了表征最好的植物 GSTs 系统, 在此它们占可溶性蛋白的 1-2% (Timmerman, 1989)。在玉米中已经描述了四种同型 GST, 即 GST I (Mozer 等, 1983; Weigand 等, 1986)、GST II (Mozer 等, 1983; Holt 等, 1995)、GST III (Moore 等, 1986)和 GST IV (Irzyk 和 Feurst, 1993)。GST-27 为 GST II 和 GST IV 的组分, 表现出依赖于防护剂的诱导性。

在我们的国际专利公开 WO93/01294 中(其内容通过引用结合到本文中), 我们证明控制 GST-27 的启动子区可以用来达到依赖于防护剂的转基因表达。这些研究揭示, 3.8 kb GST-27 启动子除指导防护剂诱导的转基因表达外, 也在根组织中产生组成型水平的表达。

本发明试图通过用详细的启动子分析, 提供缺失的 GST 启动子,

它仍保持化学诱导性的优点。在这方面，我们通过利用缺失和对顺式调控元件进行图谱分析，鉴定防护剂反应中涉及的序列。使用这些序列可以增强基因开关性能。例如，一旦鉴定出诱导型表达涉及的顺式元件，则可能例如通过多体化该元件增强诱导性。

5 有一些已经开发用于植物诱导型启动子系统的实例(铜诱导型开关, Mett 等, 1993), 其中提供诱导性的顺式调控元件已经与基本启动子融合, 产生对化学处理起反应的嵌合启动子。在这方面, 本发明试图提供一个包含本发明化学诱导型基因启动子序列的嵌合化学诱导型基因启动子序列。

10 因此, 本发明的另一方面是使用顺式元件鉴定诱导型调控中涉及的转录因子。然后可以对转录因子进行操作, 以增加诱导性, 例如可以通过加入强激活剂(诸如单纯疱疹病毒的 VP16 区), 对嵌合因子进行加工。

按照本发明的第一个方面, 提供包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶
15 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游的 897 个碱基对的化学诱导型基因启动子序列。

按照本发明的第二个方面, 提供包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶
27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游的 760 个碱基对的化学诱导型基因启动子序列。

20 按照本发明的第三个方面, 提供包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游的 570 个碱基对的化学诱导型基因启动子序列。

按照本发明的第四个方面, 提供包含恰好在谷胱甘肽 S-转移酶
25 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游的 378 个碱基对的化学诱导型基因启动子序列。

按照本发明的第五个方面, 提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 267-332 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子序列。

按照本发明的第六个方面，提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 275-290 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子序列。

按照本发明的第七个方面，提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 267-279 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子元件。

按照本发明的第八个方面，提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 278-288 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子元件。

按照本发明的第九个方面，提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 286-296 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子元件。

按照本发明的第十个方面，提供具有恰好在谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列转录起始点上游第 320-332 碱基对区序列的化学诱导型基因启动子元件。

按照本发明的第十一个方面，提供与以上特定序列或其变异体基本同源的化学诱导型基因启动子序列或元件。

按照本发明的第十二个方面，提供包含一个或多个本发明序列或元件的 DNA 分子。

按照本发明的第十三个方面，提供包含一个以上拷贝的任一上述特定的化学诱导型基因启动子序列或元件的多体。

按照本发明的第十四个方面，提供包含一个本发明序列或元件的化学开关性基因构建物，该序列或元件操作性地与一个基因或一系列基因连接，由此通过应用有效的外源诱导物可以控制该基因或该系列基因的表达。

按照本发明的第十五个方面，提供一种具有通过转化整合(最好稳定整合)到植物基因组 DNA 内的按照本发明构建物的植物。

按照本发明的第十六个方面，提供一种启动子/诱导物组合物，其

中该启动子为本发明的化学诱导型基因启动子序列或化学诱导型启动子元件。

按照本发明的第十七个方面，提供一种植物表达系统，该表达系统包含与本发明序列或元件融合的一个基因或一系列基因，其中该表达系统能够在植物中表达，并且可以通过应用有效的外源诱导物控制该基因或该系列基因的表达。

按照本发明的第十八个方面，提供一种转基因植物，后者包含一个按照本发明的基因构建物或表达系统，其中该构建物或表达系统整合(最好为稳定整合)到植物的基因组 DNA 中。

按照本发明的第十九个方面，提供本发明序列或元件的用途，即当一个基因或一系列基因与该序列或元件融合时，诱导该基因或该系列基因在植物中表达，由此可以通过应用有效的外源诱导物控制该基因或该系列基因的表达。

按照本发明的第二十个方面，提供一种在植物、按照本发明的构建物或表达系统中的表达方法，其中该表达系或构建物整合(最好为稳定整合)到植物的基因组 DNA 中，并且通过应用有效的外源诱导物可以控制该基因或该系列基因的表达。

该化学诱导型启动子序列或元件最好恰好在第 II 种同型谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基或第 IV 种同型谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的基因启动子序列的转录起始点上游。

该化学诱导型启动子序列或元件最好恰好是在玉米谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基的转录起始点上游。

编码第 II 种同型谷胱甘肽 S-转移酶 27kD 亚基基因启动子的序列最好如图 1 所示。

该表达系统最好包含按照本发明的一种基因构建物。

本发明的一个优选实施方案为化学诱导型基因启动子序列，它基于玉米第 II 种同型谷胱甘肽 S-转移酶 27(GST-27-II)基因的顺式调控元件(如图 1 所示)，或它与图 1 元件或其变异体基本上同源，其中该启动

子序列操作性地与一系列基因连接或融合，由此通过应用外源诱导物，可以控制该基因或该系列基因的表达。

本发明的一个更优选实施方案为化学诱导型基因启动子序列，它基于玉米第 II 种同型玉米谷胱甘肽 S-转移酶 27(GST-17-II)基因的顺式调控元件(如图 1 所示)，或它与图 1 元件或其变异体基本上同源，并且该启动子元件整合(最好稳定地整合)到植物材料的基因组 DNA 中，通过应用有效的外源诱导物可以控制一个基因或一系列基因的表达。

术语“植物材料”包括萌芽谷类或幼苗、小植株或植株、或植物组织或植物细胞(例如根、叶和茎中的细胞)。

术语“基本同源”包括就作为化学诱导型启动子提供同源序列的启动子序列或元件而论，至少相对于其基本核苷酸/核苷酸残基的同源性。与本发明化学诱导型启动子序列或元件的同源性优选至少为大约 70%，更优选为至少大约 80%，甚至更优选为至少大约 90%。

关于本发明的术语“其变异体”是指该启动子序列的一个或多个核苷酸的任何置换、变异、修饰、取代、缺失或插入，只要所得序列起化学诱导型启动子的作用。该术语也包括可以基本上与该启动子序列杂交的序列。

术语“构建物”与诸如“盒(cassette)”、“杂种(hybrid)”和“缀合物(conjugate)”同义，包括直接或间接与该启动子序列或元件连接的一个基因或一系列基因。与本发明有关的术语“融合”亦是如此，它包括直接或间接连接。

术语“表达系统”是指上面限定的系统可以在适当的生物体、组织、细胞或媒体中表达。在这方面，本发明的表达系统可以包含通过使用化学诱导型基因启动子或元件，确保增加该基因或该系列基因表达的额外组分。该术语也包括能够与化学诱导型启动子序列或元件结合的转录因子。

与本发明有关、特别是与本发明萌芽幼苗和植物有关的术语“转基因”不包括在其自然环境下与相关基因或系列基因结合的自然环境

下的野生型启动子。因此，该术语包括加入一个基因或一系列基因(对正在讨论的幼苗或植物可能为天然或非天然的)的幼苗或植物，该基因或该系列基因操作性地与本发明化学诱导型基因启动子序列或元件连接。

5 然后，本发明的基因开关与外源基因连接并通过转化导入植物时，提供一种外部调控该外源基因表达的方法。用于植物细胞转化的方法于本发明没有特别的关系，可以使用适用于靶植物的任何方法。由转化细胞进行再生获得转基因植物。从文献中已知多种转化方法，诸如采用根癌农杆菌或其 Ti 质粒进行农杆菌感染(agroinfection)、电穿孔、微注射或植物细胞和原生质体、微弹转化，提到的方法只是少数。
10 可以参考文献 - 已知方法的全部细节。

 插入化学诱导型序列植物物种与本发明也不是特别重要。可以转化双子叶植物和单子叶植物。本发明可以用于可利用转化方法的任何植物。因此，本发明可以用来控制多种遗传修饰植物中的基因表达，
15 这些植物包括大田作物，诸如 canola、向日葵、烟草、甜菜和棉花；谷类，诸如小麦、大麦、水稻、玉米和高粱；水果，诸如番茄、芒果、桃子、苹果、梨、草莓、香蕉和西瓜；和蔬菜，诸如萝卜、莴苣、卷心菜和洋葱。该开关也适用于多种组织，包括根、叶、茎和生殖组织。

 由于可以用来得到诱导性的较小元件的鉴定，因此本发明的一个
20 主要优点在于，较小的片断对于载体的研制更为方便。

 限定核心元件的另一优点在于，可以将其多体化，以增强防护剂的反应。

 使用核心元件的再一优点为，它允许产生防护剂诱导型嵌合启动子。这可以包括组织特异性启动子或发育启动子，然后可以对它进行
25 操作，以成为防护剂增强型。

 另一优点为，这一核心元件可以通过突变策略进行优化。

 限定一个核心启动子允许通过 south western 筛选分离相应的转录因子。然后通过突变或过量表达对该元件进行操作，以达到较

高的依赖于防护剂的表达。

可以用一些诸如先前我们国际专利申请 WO90/08826(其说明书通过引用结合到本文中)中所示的已知为“除草剂防护剂”的那些化学化合物诱导该启动子, 这些化合物可以例如作为喷雾剂喷洒到生长中的植物上。

以下实施例描述 GST-27 启动子内的除草剂防护剂诱导型顺式调控元件的鉴定。通过启动子缺失、体内足迹、电泳迁移率变化分析、稳定和瞬时报道基因分析的组合, 鉴定这些元件。这已经定义了具有多种用途的一些特异性片断和一个特异性核心元件。

现在仅仅通过非限制性实施例并参考附图, 描述本发明的多个推荐特征和实施方案, 其中:

图 1 为第 II 种同型谷胱甘肽 S-转移酶的 27kD 亚基基因启动子序列的核苷酸序列;

图 2 为质粒 pZM/RMS-3 的环形图谱;

图 3 为质粒 pZM/RMS-3-S 的环形图谱;

图 4 为表明玉米中 pZM/RMS-3 和 pZM/RMS-3-S 诱导性的图表;

图 5 为表明用防护剂处理对稳定地转化 RMS-3-S 的玉米的效果;

图 6 表示质粒 pPUG1、pPUG3、pPUG4、pPUG5、pPUG6 和 pPUG7;

图 7 表示图 6 所示的质粒 pPUG3 至 pPUG7 的诱导性;

图 8 表示 GST-27 启动子底链的体内足迹;

图 9 表示与麝香石竹 GST-1 乙烯反应元件互补的玉米 GST-27 的足迹;

图 10 表示用于 G290 足迹的延迟探针(retard probe);

图 11 表示采用 WT290 和 MUT290 探针的 EMSA 放射自显影;

图 12 表示 EMSA 竞争分析的放射自显影;

图 13 表示 pPUG5 突变的瞬时转化分析结果;

图 14 表示用于 GST-27 启动子和 ERE₁ 的延迟探针的部分序列;

图 15 表示采用 G275 的 WT 探针和 MUT 探针的延迟;

图 16 表示采用 G2326、G284 和 ERE 的 WT 探针和 MUT 探针的延迟;

图 17 表示一个竞争分析结果, 其中冷 WT 探针与热 WT290 竞争。

5

启动子的分离

在国际专利公开 WO90/01294 中描述了 GST-27 启动子区的分离和表征。总之, 采用 PCR 扩增对应于 GST-27 cDNA 的 3' 未翻译区的 205 bp 杂交探针。该 PCR 产物用随机引物进行 ^{32}P 标记, 并用来从 10 1EMBL3 (Clontech) 的玉米基因组文库 (*Zea mays* cv. W22) 中筛选 5×10^6 重组子。按照 Sambrook 等, 1989 描述的方法进行噬斑纯化。从基因组克隆中分离 1EMBL3 DNA, 将其用于限制性降解图谱分析和 Southern 印迹分析。将多个亚克隆构建到包括 pG1E7 (将 3.9 kb *EcoR* I 片断构建到 pBS (Stratagene) 中)、pG1S15 (将 2.1 kb *Sac* I 片断构建到 15 pBluescript KS (Stratagene) 中) 和 pG1X3 (将 2.2 kb *Xho* I 片断构建到 pBluescript KS 中) 在内的质粒载体中。质粒 pG1E7 于 1991 年 6 月 14 日保藏在国家工业和海洋细菌保藏中心 (NCIMB) 中, 登记号为 NCIMB 40426。GST-II-27 启动子的核苷酸序列示于图 1 中。

采用测序酶 2.0 版 (USB) (Sanger 等, 1977), 通过二脱氧链终止法 20 测定基因组亚克隆的 DNA 序列。采用 380B 型 ABI DNA 合成仪制备寡核苷酸测序引物。采用 Intelligenetics 分子生物学软件包的 PC/Gene 和 IG 程式组分析 DNA 序列数据。

测试转基因玉米植株中 GST-27 启动子的缺失

25 在质粒载体的构建中采用标准重组 DNA 方法 (Sambrook 等, 1989)。使含有 pG1E7 的 GST-27 3.8 kb *EcoRI*-*Nde* I 5' 侧翼区的报道基因构建物变为平端, 将其连接到农杆菌 Ti 载体 pTAK 的 *Sma* I 位点中 (Jefferson 等, 1987)。位于预测的 GST-27 翻译起始密码子的 *Nde* I 位点

在钝化后被破坏。这在 pTAK 中形成用于与编码 b-葡糖苷酸酶(GUS)的大肠杆菌 *UidA* 基因融合的便利的点。分离含有 3.8 kb 的 GST 启动子 GUS 报道基因和 nos 终止子的 *EcoRI* 片断, 将其亚克隆到 *EcoRI* 切割的 pIJ109 中, 后者为一种基于 pUC19 的载体, 含有 PAT 选择性标记盒(CaMV 35S 启动子、 AdH I 内含子、高丙氨酸基甲基膦酸酯(phosphinothricin)乙酰转移酶(PAT)和 nos 终止子), 形成玉米转化盒 pZMRMS3 (参见图 2)。通过除去 1.9 kb 片断 (*EcoRI-EagI*), 产生含有 GST-27 启动子的 0.9 kb 缺失构建物 pZMRMS3S (参见图 3)。

pZMRMS3 和 pZMRMS3S 用来通过轰击胚细胞悬浮液, 产生可育转基因玉米植株(Fromm 等, 1990)。

采用聚合酶链式反应(PCR), 选择携带转基因的植株。制备用于转基因植株 PCR 分析的基因组 DNA。使用 Jepson 等(1991)描述的条件进行 PCR。用对 GST-27 启动子 3'区特异性的引物 GSTPCR 5'-CTCCCGTCGACCAAATACACTTGGT-3'和对 GUS 基因 5'部分特异性的 GUS 115 5'-GGATTCCGGCATAGTTAAAGAAATCAT-3'分析用 pZMRMS3 和 pZMRMS3S 转化的植株。

为了确定是否 0.9 kb 片断和 3.8 kb 片断都保持转基因玉米中的诱导型表达, 在存在或缺乏防护剂的情况下进行 GUS 酶分析。或者通过叶涂剂或者通过喷洒在 81.5g/L 环己酮、3.3g/L synperonic NPE 1800、1.5g/L 吐温 85 中配制的 10g/L R-29148, 制备由成熟温室植株诱导的组织(16 H 光/8 H 黑暗周期)。用底物 4-甲基伞形基(umbelliferyl)-D-葡糖苷酸(Sigma), 按照 Jefferson 等, 1987 描述的方法进行 GUS 活性的荧光分析。在用 0.2 M 碳酸钠终止前, 于 37 °C 温育 2 小时, 用 Perkin-Elmer LS-35 荧光计测定荧光。按照生产商建议的步骤, 通过 Bio-Rad 蛋白分析测定组织匀浆液的蛋白浓度。图 4 和图 5 证明了 pZMRMS3 和 pZMRMS3S 都保留诱导性。

GST-27 启动子的精细缺失

在转基因玉米植株中产生的初步缺失分析表明, 提供诱导性的元件必须恰好位于转录起始点(TSP)上游的 900 bp 内。通过将 900 bp 区的 200 bp 缺失片断与 GUG 标记基因融合, 制备一系列精细缺失的构建物。鉴定出 Pst I 位点与 GST-27 启动子转录起始点相邻。设计 PCR 引物 AI2 对应于该区(5' TGCCTGCTGCAGCTGCTACTTAT 3')。引物 AI2 与 4 个引物(AI3、AI4、AI5 和 AI6)结合使用, 所有引物都邻接 Hind III 位点。AI3 (5' GTTAAAGCTTCGCAAGTCGCACCCCACT A 3')、AI4 (5' CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT 3')、AI5 (5' GCG GCAAGCTTAATATGTGATGATGATA 3')和 AI6 (5' TTACAAGCTTC GCAAGTATCGGTAGGCAT 3')与 AI3 一起用于 PCR 实验中, 分别产生 217 bp、378bp、570bp 和 760bp 的片断。产生的 PCR 产物用 Pst I 和 Hind III 切割, 将片断克隆到用 Pst I 和 Hind III 切割的 pZMRMS3 中。所得的载体 pUG4、pUG5、pUG6 和 pGU7 示于图 6 中。

在存在或缺乏防护剂(dichlormid 40 ppm)情况下生长的 BMS(Black Mexican Sweet)悬浮细胞中, 用 pPUG 载体进行瞬时转化分析。采用碳化硅晶须转化法(Wang 等, 1994)传递 DNA。通过对颜色形成单位计数, 记录启动子活性。图 7 揭示, 除一种只含有启动子 217 bp 的构建物(命名为 pPUG7)外, 所有的 pPUG 构建物都是诱导型的。含有 378 bp 的构建物(命名为 pPUG6)仍提供诱导性。该数据表明, 诱导型元件位于转录起始点上游的-217 bp 和-378 bp 之间。

用体内足迹法对 GST-27 启动子内的诱导型元件进行图谱分析

体内足迹法(参见下面的方法)用来检测蛋白质与该启动子的相互作用, 由此将提供诱导性的元件定位。硫酸二甲酯(DMS)用来通过将 N7 位置甲基化, 体内修饰鸟氨酸残基。如果一种蛋白质与该 DNA 紧密相联, 那么将抑制该反应, 因此可以将 DNA 结合因子涉及的碱基进行图谱分析。在 DMS 处理后, 扩增该 DNA 并进行测序。在基因组放

射自显影上以 G 残基鉴定接触点, 当它与未诱导 DNA 的泳道相比时, 强度较弱。

设计引物, 使得可以采用该方法分析-217 和-378 之间的区域。用防护剂处理一个玉米植株, 诱导 GST-27 的表达。在处理前(0 小时)和处理后 6 小时、24 小时和 48 小时时进行体内足迹分析。结果示于图 8 中。可以看出, 在该植株用防护剂处理后 24 小时时, 一种蛋白与位置-290 的 G 残基结合(无可见条带), 但在处理后 0 小时、6 小时和 48 小时时没有蛋白结合(可见条带)。在 24 小时时, 位置-275、-283 和-284 也有较弱的条带。该结果可重复。简单地说, 我们已经鉴定了似乎依赖于防护剂的方式与蛋白因子结合的 2 个假定元件。

这些元件相互之间具有同源性。此外, 有趣是我们注意到同源区与麝香石竹的 GST1 基因中已知的乙烯反应元件(Itzhaki 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 19, 8925-8929, 1994)互补, 如图 9 所示。

玉米叶体内足迹的方案:

(由 Hammond-Kosack 和 Bevan, Plant Mol. Biol. Reporter, Vol. 11, No. 3, Sept. 1993 修改)

1. 体内 DMS 处理 1 分钟, 然后缓慢地释放。5 分钟后, 除去培养基, 该组织在 MS 培养基中洗涤几次。将该组织吸干并贮存在-70 °C 下直至所有时间点(0 小时、6 小时、24 小时和 48 小时)进行收集。

2. 染色质 DNA 的制备:

用杵和研钵以及液氮将 DMS 处理的冷冻组织压碎为细粉。加入 30 ml 热(65 °C)抽提缓冲液(100 mM Tris HCl pH 8.0、50 mM EDTA pH 8.0、500mM NaCl、1.25% SDS、8.3mM NaOH、0.38g/100 ml 亚硫酸氢钠), 进行混合, 于 65 °C 温育 15 分钟。加入 6.16ml 5M KAc, 然后该样品在冰上保持 20 分钟。以 3.5K 离心 5 分钟后, 上清液通过

Miracloth 过滤, 加入 0.7 体积丙-2-醇。以 4K 离心 10 分钟, 沉淀在 70% 乙醇中洗涤 2 次, 然后重悬浮于 0.84ml T5E 和 0.36ml 10M NH₄Ac 中。该溶液以 13K 离心 5 分钟。上清液用 0.73ml 丙-2-醇沉淀。

沉淀在溶于 100ml T10E 之前再沉淀 1 次。该 DNA 用 *Hind* III 降解。

3. 连接介导的 PCR (LMPCR):

用 LMPCR 扩增该 DNA 样品。设计 3 个嵌套引物扩增 TSP 上游 0-350bp 之间 GST-27 启动子的双链。使每条链的第一引物退火, 然后让该分子的末端延伸。将一种已知序列的接头退火到每个延伸分子的末端上。然后用一种对该接头和第二嵌套引物特异性的引物进行正常的 PCR。当扩增时, 用加入末端标记的第三引物标记该 DNA 分子。样品用苯酚-氯仿抽提, 用丙-2-醇沉淀, 再悬浮于测序加样缓冲液中。为了目测该足迹, 这些样品在 6%测序凝胶中电泳。

电泳迁移率变化分析(EMSA):

用该方法测试体内足迹分析区在体外可以结合特异性核蛋白的假设。放射性标记的启动子短片断(探针)将以由其大小和电荷决定的速度通过电泳凝胶迁移。如果一种探针具有与其结合的蛋白, 那么迁移将会迟缓。在放射自显影中, 这可以作为一个条带可见, 在缺乏蛋白的情况下不存在该条带。与冷探针的竞争分析测定结合是否为特异性的。

由诱导和非诱导的玉米叶中制备核蛋白提取物。制备 2 个短(25bp)探针(参见图 10)与该蛋白温育:

1. WT290 - 覆盖-290 和-283/284 足迹分析区
2. MUT290 - 同 1 一样, 但包括-290 周围的 5bp 突变。

结果示于图 11 中。WT 探针结合一种蛋白(第 3 泳道和第 5 泳道中的可见条带)。MUT290 中的突变消除了结合(在第 4 泳道和第 6 泳

道中的弱带)。无论核蛋白提取物是来自诱导叶还是来自非诱导叶,该带型都相同。因此,该结合蛋白必定总是存在的。该蛋白在体内必须进行修饰,使得结合仅仅发生在该基因诱导时。图 12 表示竞争分析结果。冷 WT290 探针成功地与放射性标记的 WT290 探针竞争与该蛋白的结合,导致该条带的丧失(第 2、3、4 和 10、11、12 泳道)。当加入冷 MUT290 时没有见到该效果(第 6、7、8 和 14、15、16 泳道)。因此所见的结合是特异性的。

除 290 区外,我们也证明-275 区(参见图 14)涉及转录因子的结合。图 15 表示 EMSA 的结果,其中 275 探针结合转录因子,而突变的 275 元件不能结合转录因子。在随后的实验中,284 区和 326 区(参见图 14)已经表明涉及与未诱导核提取物和诱导核提取物的蛋白结合(参见图 16)。与 275 区、284 区、290 区和 326 区的竞争分析(参见图 17)表明,在 EMSA 研究中观察到的结合是特异性的。下面列出用于 EMSA 研究中的各种突变探针和野生型探针:

探针名称	序列
290WTN	5 AGCTT GC TATTTTCAGAAT GC A3 3 A CG ATAAAGTCTTC AG TTCGA 5
290MUTN5	5 AGCTT GC TATGGCCTAAT GC A3 3 A CG ATACCTGATTA CG TTCGA 5
284WTN	5 AGCTT GC GAATCCGAAAT GC A3 3 A CG CTTAGGCTTTA CG TTCGA 5
284MUTN6	5 AGCTT GC GACGAATCAAT GC A3 3 A CG CTGCTTAGTTA CG TTCGA 5
275WTN	5 AGCTT GC AATTTTCATAAA GC A3 3 A CG TTAAAGTATTT CG TTCGA 5
275MUTN5	5 AGCTT GC AATGGACGAAA GC A3 3 A CG TTACCTGCTTT CG A 5
326WTN	5 AGCTT GC GGTTCCTAAAA GC A3

3 A CG CCAAGGATTTT CG TTCGA 5
 326MUTN6 5 AGCTT GC GGCGGAAGCAAAGC A3
 3 A CG CCGCTTCGTTT CG TTCGA 5
 ERE-WT 5 AGCTT GC TATTTCAAAAT GC A3
 3 A CG ATAAAGTTTTA CG TTCGA 5
 5 ERE-MUT 5 AGCTT GC TATGGTCCAAT GC A3
 3 A CG ATACCAGGTTA CG TTCGA 5

这些数据与体内足迹法数据一起表明， GST-27 启动子的该区涉及依赖于化学药品的转录因子的结合， 导致基因激活。

10 电泳迁移率变化分析(EMSA)流程:

(由 Watson 和 Thompson, Meth. Enzymol. Vol. 118, pp. 57-75, 1986 和 Holdsworth 和 Laties, Planta, Vol. 179, pp. 17-23, 1989 进行修改)

1. 由玉米叶制备核蛋白提取物:

15 将 1% R-29148 防护剂溶液涂在 3 周大玉米叶的上表面和下表面上。在 0 小时和 24 小时收获 15g 材料。用杵和研钵以及液氮将该组织压碎为细粉。将该组织分为 2 份，每份样品加入 70ml 抽提缓冲液 (0.25M 蔗糖、 10mM NaCl、 10mM MES-NaOH pH 6.0、 5mM EDTA、 0.15mM 精胺、 0.5mM 亚精胺、 0.2mM PMSF、 10mM NaF、 20mM b-ME、 0.1% BSA、 0.6% nonidet P40)。匀浆液通过 3 层 Miracloth 过滤到 corex 管中。将 25% Percoll 垫层加入该管底部。在水平式离心转头中于 4 °C 以 3K 离心 30 分钟。由该管底部收集核，再悬浮于抽提缓冲液(不包含 BSA)中。该样品于 4 °C 以 5K 离心 5 分钟。将核再悬浮于 100ml 透析缓冲液(40mM KCl、 24.7mM HEPES-NaOH pH 7.9、 5mg/ml 亮抑酶肽、 5mM EDTA、 5mg/ml 木瓜蛋白酶抑制剂、 1mM DTT、 25%甘油、 10mM NaF)中。加入 1/10 体积的硫酸铵，
 25 该样品在冰上保持 30 分钟，然后以 13K 离心 20 分钟。将 1.5 体积的硫酸铵加入上清液中，在冰上保持 60 分钟，然后以 13K 离心 20 分钟。

将该样品再悬浮于 100ml 透析缓冲液中, 在该缓冲液中透析 2×2 小时。用 Bradford 法分析测定最终样品中的该蛋白浓度。

2. EMSA:

5 1mg 蛋白提取物于室温下, 与 10ml 结合缓冲液(250mM HEPES pH 7.6、10mM EDTA、50%甘油)中的 20000cpm (c. 0.5ng)探针(通过采用 Klenow, 用标记的 dNTP 填满 3'凹进的末端进行标记)、1mg poly d(I-C)、50mM DTT、50mM KCl、100mM $MgCl_2$ 一起温育 20 分钟。将样品加到在 $0.25 \times TBE$ 缓冲液中电泳的 6%聚丙烯酰胺凝胶中。

10

瞬时表达分析

为了测试足迹分析区显示诱导型元件的位置, 进行了瞬时分析。通过使假定诱导型元件突变, 以防止反式作用蛋白因子的结合, 应该丧失诱导性。含有与 GUS 融合的该启动子 570bp 的一种构建物(pPUG5) 15 先前表现出保持诱导性。采用锚式 PCR 在已经进行足迹分析的区域将其突变。制备 3 个构建物, 每个含有 10bp 突变:

15

1. MUT290, 在 G-290 周围含有 10bp 突变
2. MUT284, 在 G-284 周围含有 10bp 突变
- 20 3. MUT326, 在 G-326 周围含有 10bp 突变

20

当在 48 小时见到涉及 G325/326 令人信服的足迹时, 制备 MUT326 构建物。采用我们的美国专利 5,302,523 中描述的所谓硅纤维的晶须技术, 将构建物转化到 BMS 悬浮细胞中。结果示于表 1 中(图 13)。突变 25 构建物仍为诱导型。所有构建物的 fold 诱导比得上 WT pPUG5。

25

根据该结果, 在 pPUG5 中的 570bp 片断上调查同源性, 以鉴定假设元件的任何复制。如果存在多个元件, 那么可能见不到突变一个元件的作用。没有发现直接的复制。然而, 观察到在该片断内有高度(67%)

的同源性。由该数据我们相信，已经发生了涉及 150bp 的复制和倒位。此外，由于-290 和-275 足迹分析区显示出显著的同源性，因此在所有三种突变都在同一载体中的情况下，在 pPUG6 (378bp)背景启动子中重复瞬时分析实验。

5

植物转化载体

PCR 介导的 GST-27 启动子的诱变

PCR 介导的诱变需要四种引物，下面列出所用的引物：

10 用来在 pPUG6 中产生 3XMUT 的引物：

R1 = 5' CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT 3' (pAI4)

R2 = 3' TATTCATCGTCGACGTCGTCCGT 5' (pAI2)

M=5'CCTAAAATTATTTTAAAAATTTTGGTTCTCATATGGACTACGAATCAA
TGGACGAAATCCAAATAGACCG 3'

15

rev = 3' GGATTTTAATAAAATTTTAAAACCAAGAGT 5'

引物 R1 和 R2 在该启动子每个待突变区域的侧翼，并含有用于克隆的适当酶的限制位点。引物 M 的 5'末端和 3'末端与该启动子相同，而中部含有改变的序列。引物 rev 与野生型引物 M 的 5'末端相同。

在步骤 1 中，在具有 20ng 野生型模板质粒、 10×PCR 缓冲液、
20 2.5μl 2mM dNTPs、 2μl 20mM 引物 R1 或 M、 2μl 20mM 引物 rev
或 R2 和 0.25μl Amplitaq (Perkin Elmer)的 25μl 体积中进行 2 次 PCR。
所用的程序为 92 °C 2.5 分钟，然后以 94 °C 1 分钟、 50 °C 1 分钟和 72
°C 1 分钟进行 30 个周期。每个反应进行 4 次，以产生足够的产物用于
步骤 2。纯化和定量分析所得的片断 R1/rev 和 M/R2。

25 在步骤 2 中，将共享重叠序列的片断 R1/rev 和 M/R2 退火。250ng
的每个片断在具有 10×PCR 缓冲液、 2.5μl 2mM dNTPs 和 0.25μl
Amplitaq 的 25μl 体积中混合。采用 94 °C 2.5 分钟，随后以 94 °C 1 分钟、
40 °C 1 分钟和 72 °C 1 分钟进行 9 个周期的程序，进行退火和退火产

物的延伸。

在步骤 3 中, 通过加入引物 R1 和 R2, 扩增由含有突变的整个启动子序列组成的延伸的异源二聚体。将 2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液、 2.5 μ l 2mM dNTPs、 2ml 20mM R1、 2ml 20mM R2、 15.75 μ l 水和 0.25 μ l Amlitaq 加入来自步骤 2 的同一反应中。采用步骤 1 所用的相同程序进行 PCR。纯化所得的片断, 将其克隆到 pGEM-T 载体(Promgea)中, 进行测序, 以保证突变正确的碱基。3XMUTBin/6 在足迹分析的 G 残基 G-290、 G-283/284 和 G-275 及其侧翼的核苷酸处含有 5bp 突变。

采用相似的策略, 用下面给出的引物在 pPUG6 背景中产生 4 个突变。

用来在 pPUG6 中产生 4XMUT 的引物:

R1 = 5' CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT 3' (pAI4)

R2 = 3' TATTCATCGTCGACGTCGTCCGT 5' (pAI2)

M = 5' GTCTATTCAGGTTCGGGGAAGCAAATTAT 3'

rev = 3' CAGATAAGTCCAAG 5'

采用 p3XMUT/PUG6 作为模板 DNA 进行进一步的 PCR 介导的诱变, 以便突变足迹分析的 G 残基 G-325/326 和侧翼的四个核苷酸。

4XMUTBin/6 在足迹分析的 G 残基 G-290、 G-283/284、 G-275 和 G-325/326 及其侧翼核苷酸处含有 5bp 突变。

通过用 HindIII 和 PstI 切割 pGEM-T 载体, 将突变片断导入 GST-27 启动子中, 并克隆到已用相同的酶线性化的 pPUG6 中。这样, 除去 pPUG6 中的野生型启动子, 用 3XMUT 或 4XMUT 版取代, 因此产生质粒 p3XMUT/PUG6 或 p4XMUT/PHG6。采用上述用于野生型 pPUG6 质粒的相同策略, 将其克隆到 pBin400 中, 形成 3XMUT/Bin6 或 4XMUT/Bin6。

载体的构建

用 5 个构建物转化烟草植株, 所有构建物都基于双载体 pBin400 (Spychalla 和 Bevan, 1993)。制备与报道基因 GUS 融合的 GST-27 启动子的 3 个 5' 缺失, 后者含有 TSP 上游启动子的 570bp、378bp 和 217bp。这些缩短的启动子:GUS 的融合存在于构建物 pPUG5 (570bp)、pPUG6 (378bp) 和 pPUG7 (217bp) 中。从这三个质粒切下 HindIII、EcoRI 片断上的与 GUS 融合的缩短启动子, 将其直接克隆到用相同的酶线性化的 pBin400 中。所得的构建物命名为 pBin/5、pBin/6 和 pBin/7。此外转化 3XMUT/Bin6 和 4XMUT/Bin6。

农杆菌的转化

在具有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 10ml YEP 肉汤(1% (w/v) Bactopeptone [Difco]、1% (w/v) 酵母膏[Difco]、0.5% NaCl)中建立根癌农杆菌(T37SE 菌株)过夜培养物, 于 30 $^{\circ}$ C 进行生长。用 4ml 该培养物接种含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 100ml YEP 肉汤, 使其生长 4-5 小时。细胞以 2,500 rpm 沉淀 10 分钟(Sorvall RC3C 离心机, H6000A 转头), 再悬浮于 2ml YEP 肉汤中, 在冰上以 200 μ l 等份急冷 5 分钟。将 10 μ l 0.1-0.2 μ g/ml pBin DNA 加入细胞中。将细胞立刻在液氮中冷冻大约 15 秒, 然后 37 $^{\circ}$ C 热激 5 分钟。然后加入 1ml YEP, 细胞于 30 $^{\circ}$ C 生长 1-2 小时。将每种转化的 100ml 等份涂布在含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 YEP 平板上(具有 1.5% (w/v) 琼脂的 YEP), 以选择农杆菌, 涂布在含有 50 μ g/ml 盐酸壮观霉素的 YEP 平板上, 以选择双载体。于 30 $^{\circ}$ C 培养 48 小时后检查平板。将单个菌落挑到含有选择抗生素的 Minimal T 平板(350ml 水琼脂[1.5% (w/v) 琼脂]、20ml 20 $\times$ 盐、20ml 20 $\times$ T 缓冲液、20%葡萄糖)上, 于 30 $^{\circ}$ C 生长 3 天。来自这些平板的细菌菌落用来接种液体培养物, 以制备 DNA。

由根癌农杆菌中制备质粒 DNA

用单菌落根癌农杆菌接种含有抗生素以选择双载体和农杆菌的 10ml YEP 肉汤，于 30 °C 生长过夜。以 2,500 rpm 离心 20 分钟收集细胞(Sorvall RC3C 离心机，H6000A 转头)，然后再悬浮于 200ml 冰冷的溶液 I (Horsch 等 1985) 中，让其于室温下静置 30 分钟，然后进行涡旋混合。加入 200ml 溶液 II，轻轻摇动进行混合，于室温下温育 30 分钟。然后加入 150ml 冰冷的溶液 III，该混合物在冰上保持 5 分钟。该样品以 13,000 rpm 离心 5 分钟(MSE Microcentaur 台式微量离心机)。用等体积苯酚/氯仿抽提上清液，然后进行 IPA 沉淀。将沉淀再悬浮于 50ml T10E1 中。加入 1ml 1mg/ml RNA 酶 A 降解 RNA，然后于 37 °C 温育 30 分钟。10 微升该 DNA 用于限制酶降解，通过琼脂糖凝胶电泳证实双质粒的鉴定。

烟草的转化

采用 Horsch 等(1985)开发的方法转化烟草。含有双载体构建物的农杆菌在转化前，于 30 °C 在含有适当抗生素的 YEP 肉汤中生长 24 小时。通过于室温下以 3,000 rpm 离心 20 分钟沉淀细胞(Sorvall RC3C 离心机，H6000A 转头)，再悬浮于 10ml 新鲜的 YEP 中。用穿孔器(7mm)从烟草 Samsun 变种的叶切下叶盘，转移到 14cm 陪替氏培养皿中。将农杆菌加入陪替氏培养皿中，于室温下放置 30 分钟。在开始实验前，制备饲养平板。40 个平板需要 1 升 NBM 培养基(4.6g MS 盐[Flow Laboratories]、30g 蔗糖、0.1mg EtOH NAA [Sigma]、0.1mg BAP [Sigma]、8g 琼脂[Difco]、100× B5 VITS, pH 5.9)。将 1ml 烟草细胞悬浮培养物均匀地涂布在平板表面上，然后覆盖一个无菌的 9cm Whatman 1 号滤纸圆片。将叶盘转移到饲养平板上，下表皮在最上面。与农杆菌共培养 2 天后，将叶盘转移到含有 100g/ml 硫酸卡那霉素和 500µg/ml 羧苄青霉素钠盐的 NBM 平板上，以便消除农杆菌和选择转化体。每 2 周将叶盘转移至含有抗生素的新鲜 NBM 平板上。大约 4

周后，在叶盘上可见到小芽。将这些小芽转移至含有 200 μ g/ml 羧苄青霉素钠盐和 100 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 MA 培养基(4.6g MS 盐、30g 蔗糖、8g 琼脂, pH 5.9)中。在大约 14 天后转化体生根，而未转化的植株黄化并死亡。当将转化植株移植生长时，将它们转移至土壤中，在温室中生长。

5

不偏离本发明范围的本发明的其它修改对本领域技术人员是显而易见的。

参考文献

Hatzios KK: 除草剂防护剂作用机制的综述。 Z Naturforsch 46c: 819-827 (1991).

Holt DC, Lay V, Clarke ED, Dinsmore A, Jepson I, Bright SWJ, Greenland AJ: 防护剂诱导的玉米第II同型谷胱甘肽S-转移酶的特征。 Planta (1995) 196: 295-302.

Irzyk GP, Fuerst EP: 来自 benoxacor 处理玉米(*Zea mays*)的谷胱甘肽 S-转移酶的纯化和特征。 Plant Physiol 102: 803-810 (1993).

Jepson I, Bray J, Jenkins G, Schuch W, Edwards K: 一种由少量植物组织构建 PCR cDNA 文库的快速方法。 Plant Mol Biol Rep 9 (2): 131-138 (1991).

Lamoureux GL, Rusness DG: 杀虫剂在植物和昆虫中的代谢、选择性和作用模式中谷胱甘肽和谷胱甘肽 S-转移酶的作用。 Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (eds), Coenzymes and cofactors, 第3卷: 谷胱甘肽: 化学、生化和医药方面, B 部分, 第 153-196 页. John Wiley and sons, New York (1989).

Mannervik B, Danielson UH: 谷胱甘肽转移酶 - 结构和催化活性。 Crit Rev Biochem 21: 283-337 (1988).

Mozer TJ, Tiemeier DC, Jaworski EG: 玉米谷胱甘肽 S-转移酶的纯化和特征. Biochemistry 22: 1068-1072 (1983).

Moore RE, Davies MS, O'Connell KM, Harding EI, Wiegand RC, Tiemeier DC: 编码玉米谷胱甘肽 S-转移酶的 cDNA 在大肠杆菌中的克隆和表达。 Nucl Acids Res 14: 7227-7235 (1986).

Sanger F, Milkin S, Coulson AR: 用链终止抑制剂进行 DNA 测序。 Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977).

Timmerman KP: 参与除草剂去毒性的玉米谷胱甘肽 S-转移酶同工酶的分子特征: Physiologia Plantarum 77: 465-471 (1989).

Wiegand RC, Shah DM, Mozer TJ, Harding EI, Diaz-Collier J,

Saundres C, Jaworski EG, Tiemeier DC: 相应于防护剂处理诱导编码负责玉米除草剂耐受性的谷胱甘肽 S-转移酶的信使 RNA : Plant Mol Biol 7: 235-243 (1986).

Kuhlemeier 等, Ann Rev Plant Physiol. 38 221-257 (1987)

5 Drews, G.N., Beals, T.P., Bui, A.Q.和 Goldberg, R.B. (1992). 花瓣发育期间的区域性表达模式和细胞特异性表达模式. Plant Cell 1383-1404.

Guerrero, Felix D., Crossland, Lyle., Smutzer, Gregory S., Hamilton, Douglas A. 和 Mascarenhas, Joseph P. (1990). 来自玉米的启动子序列在烟草中的花粉特异性转录. Mol Gen Genet (1990) 224: 161-168.

Fonne-Pfister, Raymonde.和 Kreuz, Klaus. (1990). 用玉米诱导型依赖于细胞色素P450的酶进行绿麦隆的环-甲基羟基化. Phytochemistry, 第 29 卷, 第 9 期, 第 2793-2796 页, 1990.

15 Schena, Mark., Lloyd, Alan M.和 Davis, Ronald W. (1991). 类固醇诱导的植物细胞基因表达系统. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 第 88 卷, 第 10421-10425 页, 1991 年 12 月, Genetics.

Williams, Shericca., Friedrich, Leslie., Dincher, Sandra., Carozzi, Nadine., Kessmann, Helmut., Ward, Eric.和 Ryals, John. (1992). 在转基因植物中苏云金杆菌 α -内毒素表达的化学调节. Bio/Technology 第 10 卷, 1992 年 5 月.

Mett, Vadim L., Lochhead, Lessa P.和 Reynolds, Paul H.S. (1993). 用于整个植物的铜可控制的基因表达系统. Proc. Natt. Acad. Sci. USA. 第 90 卷, 第 4567-4571 页, 1993 年 5 月, Plant Biology.

25 Weinmann, Pamela., Gossen, Manfred., Hillen, Wolfgang., Bujard, Hermann.和 Gatz, Chrisiane. (1994). 嵌合反式激活蛋白允许在整个植物中表达四环素应答基因. The Plant Journal (1994) 5 (4), 559-569.

Jefferson, R.A., Bevan, M.和 Kavanagh, T. 使用大肠杆菌 β -葡萄糖苷酸酶作为一个基因融合标记, 用于高等植物中基因表达的研究 - 启动

子克隆载体质粒 ptaki 的构建和通过荧光计分析的酶活性检测(会议论文)。 060617 DBA 登记号: 87-04965。

Horsch, R.B.等(1985).一种将基因转移至植物的一般简单方法。
Science 227: 1229-1231.

- 5 Spychalla, J.P.和 Bevan, M.W. (1993).土豆茎和块茎组织的农杆菌介导的转化、再生和转化的 PCR 筛选。 Plant Tissue Culture Manual. B11: 1-18.

图 1

gaattccaaatatatgatgatgtgtgtccctagtcagagaactaaatatatactagcgaaaaaaccttc
ctagtcataagtgatgggcataatagaaaaataaacatctcaagactccaaactagtcataagcttcta
gtcacaacttcaaacacttcatgccaagaatcatggattttttttgtccctaagacaaaaactagaat
gagaaaagaactaaactcatcatatataatagtgatggcatcacaaaaaaatgacacatatatgatACTAT
ATCACACAGGCCCTTCAGTTCTTAGAACACAGTGCAGATCGAtgtgtgggtatgcatgtctaatatttact
aggttggatatgcatggggttcattcagaatcagtttcacacagtttatcgcacttctgtttacaaaaac
atggatttcattgtctgtactggctacatgctgaaggatcaacttgtctaatcttaggtgcatacctcctt
gtcaaggcaaaacttaacaaatttgataaaaaaaatgcagcttttatatgtgaacccaataaataatgga
caggaaactgatgtgcaacaacAAAACCTAAATAGGAAGGaaacacaagtcccaaatgtataataattg
tcaccatagtgcaaaaagaaccaaatatatctgcagagaaaacttcctagtcattgtaagtgtATGGACATAT
AGAAATAAAACATCTCAAGACTCCAATAACAGGCTCAAGCTAACCTAGTCATGGCTTTAAACCTTCATGAT
GCAAACTAGTCACAACTTTAAACATTTCAATGCCAACACAGATCATGGATGGTGTTTTTCCTAGGGAA
AAGCTAGAAATGAGAAAGACCTAACCTCAGCATACATATCAGGATAGTATCGTATAGACACGTATATGATA
CTATATCACGCCGCTCAATTTCTAGAACAAATGCCAGATTGATCTGTGAATATGCCATGCTCATATTT
TACTAGGTTGGATGGACTGAATCCCGTGAAACAAACAATTTATTCACACAAGtttctgcatgaatatcatc
tcaaatccaataatcactctcgttgataaaaaaatgcaaccacagttaaccagaaagtgaatagaaac
tatttgaaatcagatcactccgttatccacatcaaaaataattgtgtgatctataaaaagcagtaggaac
attgtttaccatcaatttcaagtaacagtaacaagaacagtaacagctagaatttgagcatgtgagtATT
GTTGATACCTCGTTGAGCTCTCTGCGCGGGCTTTCTGCTCGGCagcaagagccagctcaggatccacc
ccgaaagcttgggcgtagggtgtgtctatcggcgaaaaacacgcgcgttacgcgaagaacagcgcgcgat

— 100 —

2

图 1(续 ii)

AAAA ACTACAAACTCTTCC TGAAGTGTGGTGTGAAGCCGAGAAATCCTTTTCATTTCGGTGACG
 GAGCCCCCTTGCTGGCTGCTCAGTGCACTCCGTTCCGCTGCTGCCACTACAAGCGACGGCCGACGAC
 TCGCAAGTATCGGTAGGCATTTTAAACTGAACCAAACTCTAAACCCGAATAGACCAAAATTGTTGGTTT
 ATTCCGGGTTTTTGGGTTCCGGATTCCGTTCTAAATATGCTATATTTTAGGGTATAGGTTCCGGTTCAGTT
 TCTAACCCTTTAAACCTGAATAGACGAATAACCCGAAATATAAAATCTCTTAATATGTGATGATATTA
 TTATATGATTTATGAACTTATTAAACCGAAATAATGATACCATCCTAACGATAGTATATATCTATGTA
 TGCTATTTTATAGTCACTTGTGTTGTAATAATAGTACTTCCAAATTAATCAGTGTATATATTTTAACA
 AAAGATAGCTAGCCCTCTCTACTATTGTAGTATATTCCGGTGCCACCGAAATAGACCCGAAATTTGTAAGTC
 TATTCAGGTTCCGTTCCCTAAATTAATTTTAAATAATTTTGGTTCTCATATTTTCAGAAATCCGAAATTTCTATA
 AATCCAAATAGACCCGAACCAAAATTaCGCTAATAGACCGAAATACTAGCGTACTCgCAAGTcGCCACCCAC
 TAGCCCTGCTGCGTAAGCGAGGACGTCACGCGTTCTCCCTCCCGTCGACCCAAATACACTTGGTCTTC
 TAGCACCTTCTTCCCTCCTCCAAGaCTCCAATCCCCCAACCAAGAACCGCCagCTctAACGTCACTC
 CTGATTTCTCTCTCTCTATGCTAGCTGCTTTATTAATAGTAGCAGCTGCCAGGCAAGAGCTGCA
 CACACCCATCCAAATTCAGCTGCTGATCTTGATCCTGCACCCCCGAGCCGTACACAGAGCTAGTCGGTAG
 AAC TTGCAGGAGCGGagCAGAACTAAGTGCAGAGAACAGGACATATG

TSP

图 2

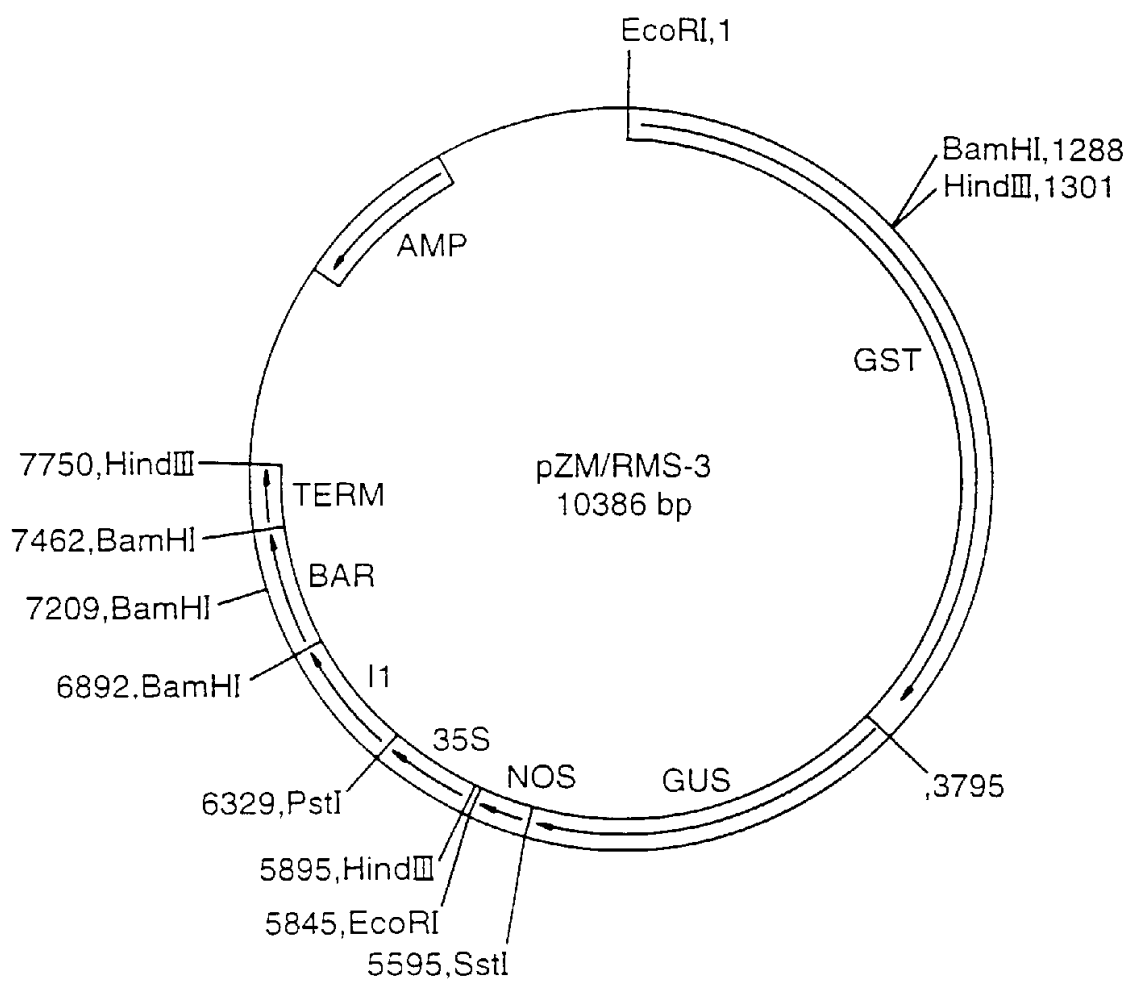
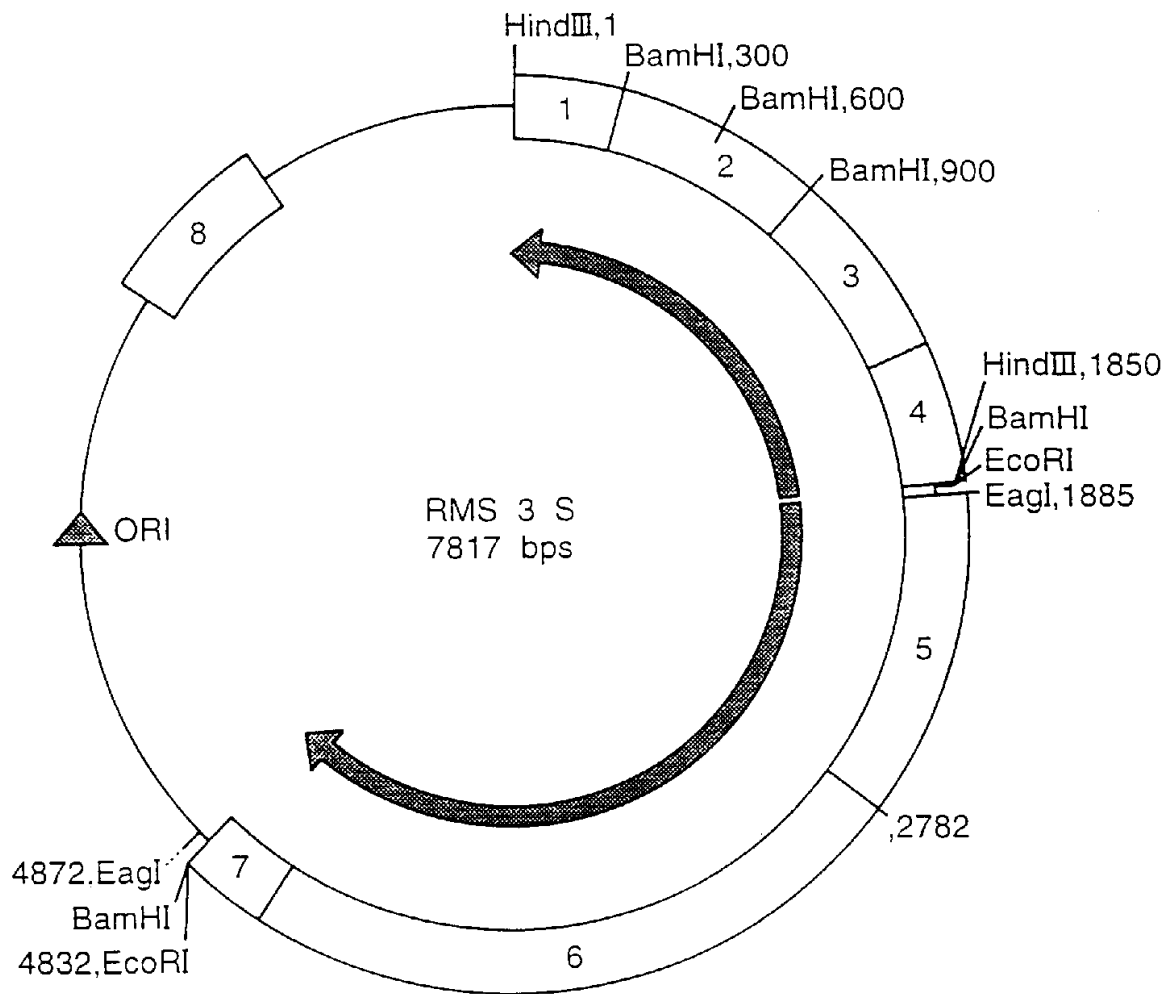


图 3



基因的解答

1=nos 终止子
2=BAR 基因
3=Adh 1 内含子
4=CaMV 35S
5=GST 启动子

6=GUS 基因
7=nos 终止子
8=氨苄青霉素抗性

图 4

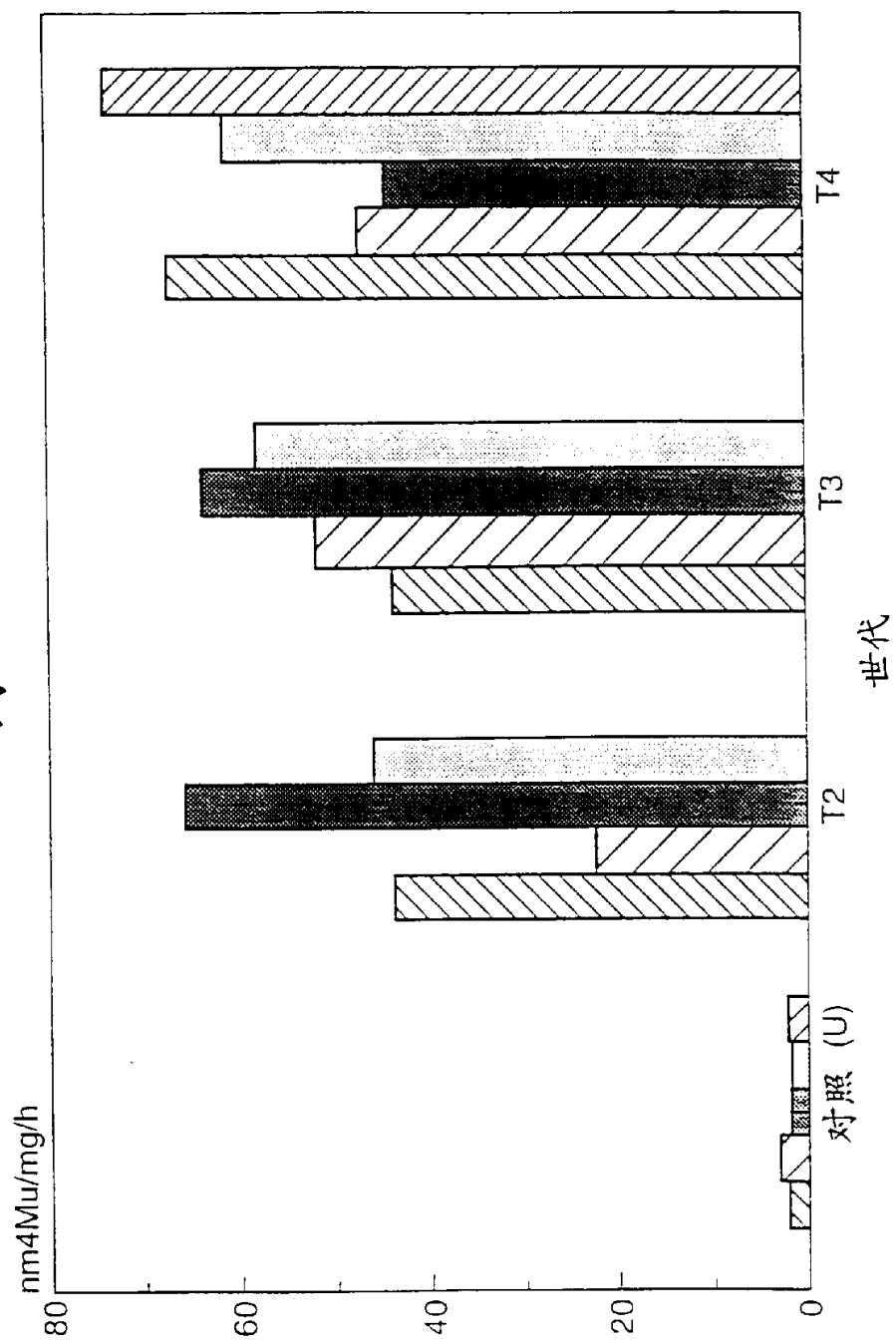


图 5

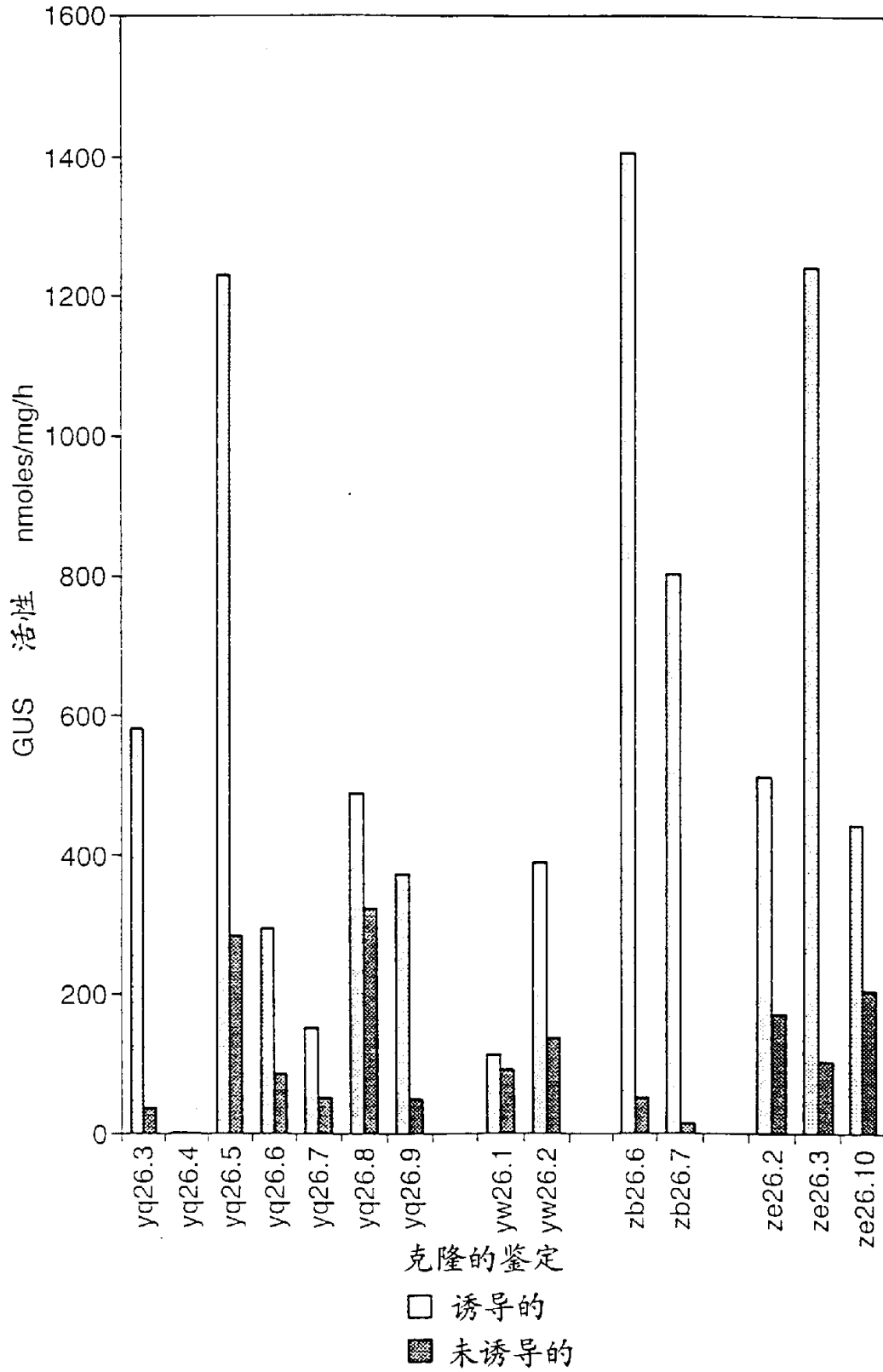


图 6

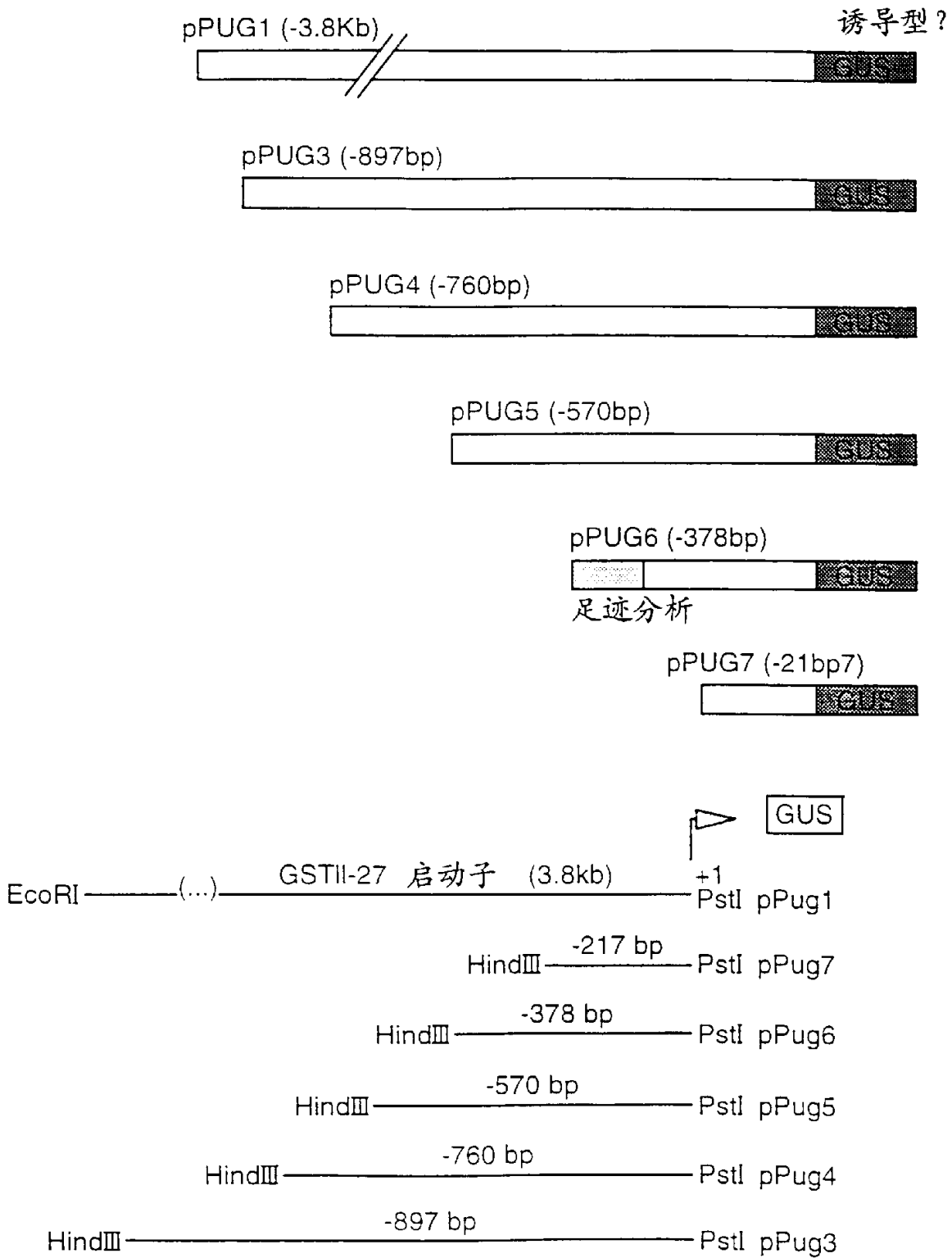
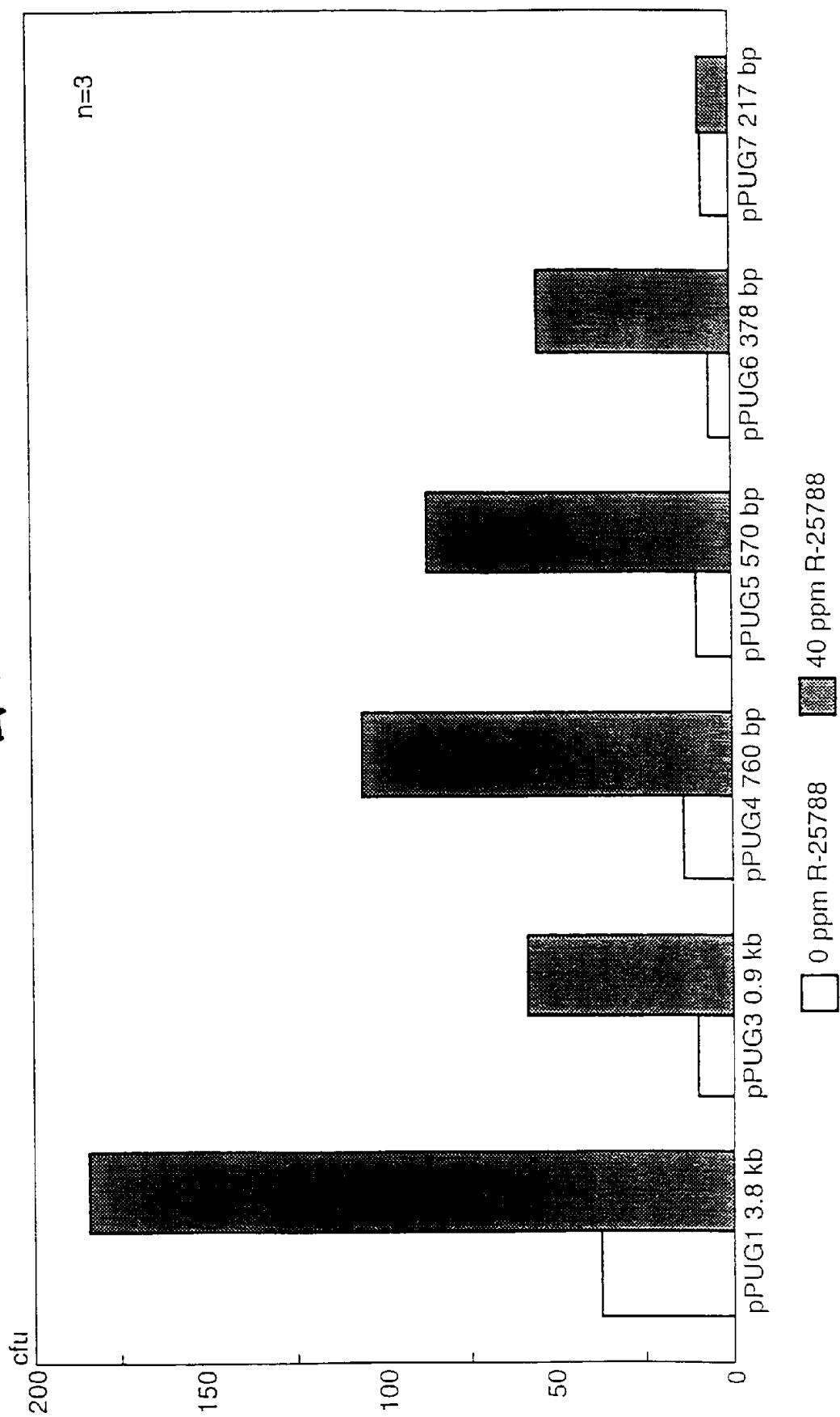


图 7



0 6 24 48



3' CAAGGATTTTAAATAAAATTTTAAAAACAAGAGTATAAAGTCTTAGGCTTTAAAGTATTTAGGTTTATCTGGCTTGG 5'

图 9

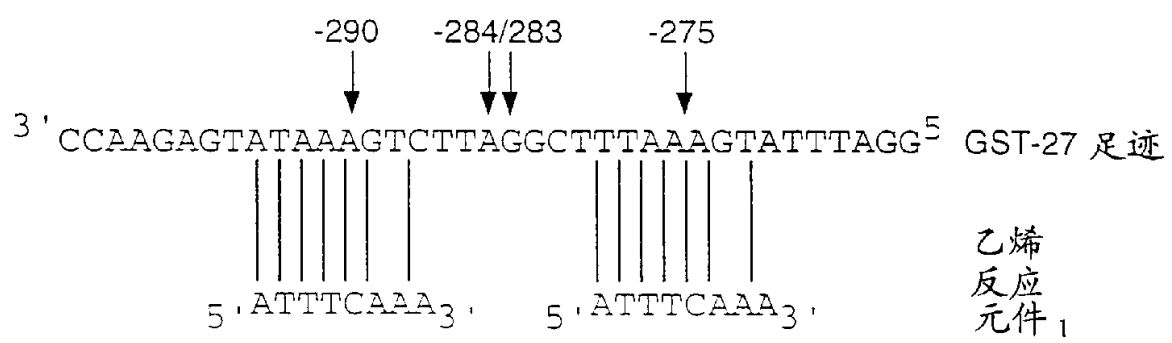


图 10

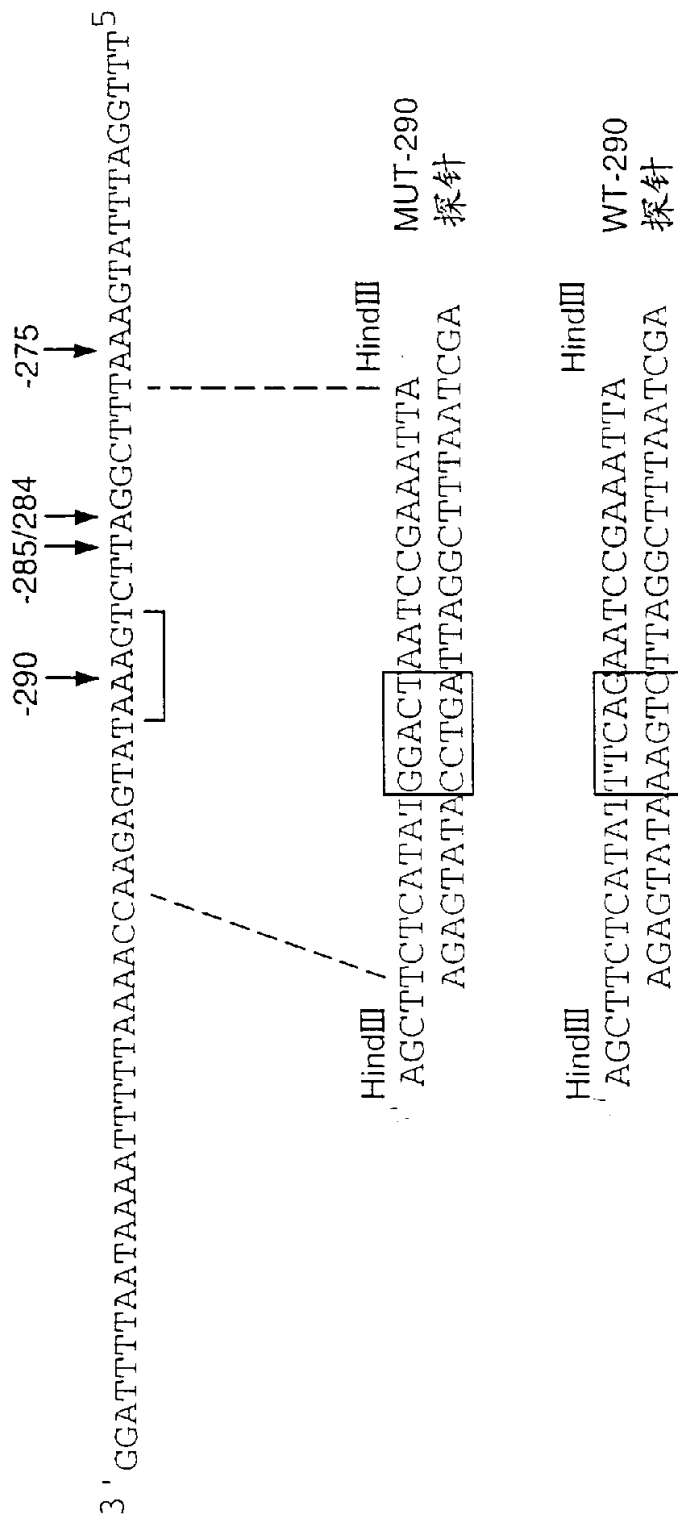


图 11

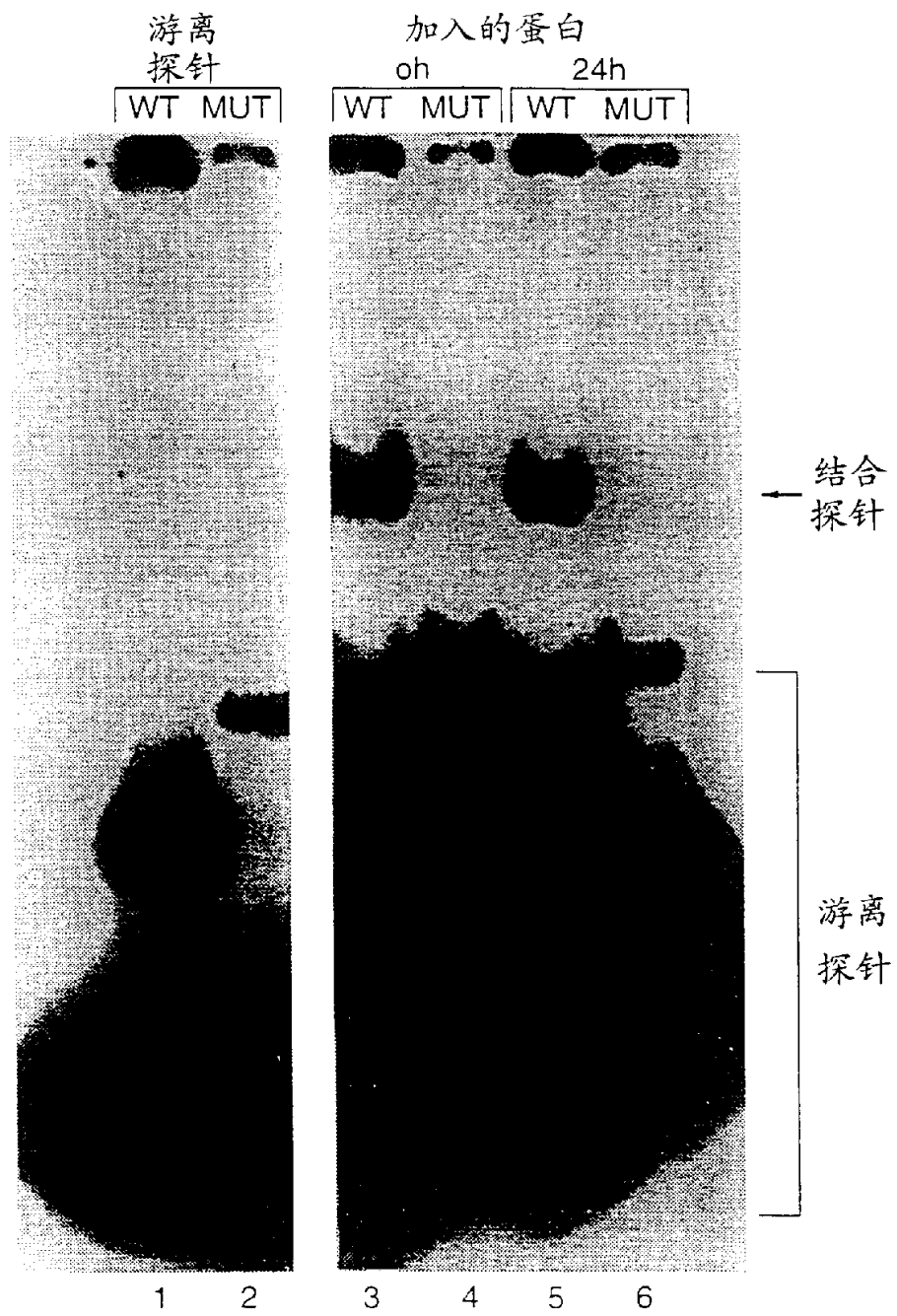


图 12

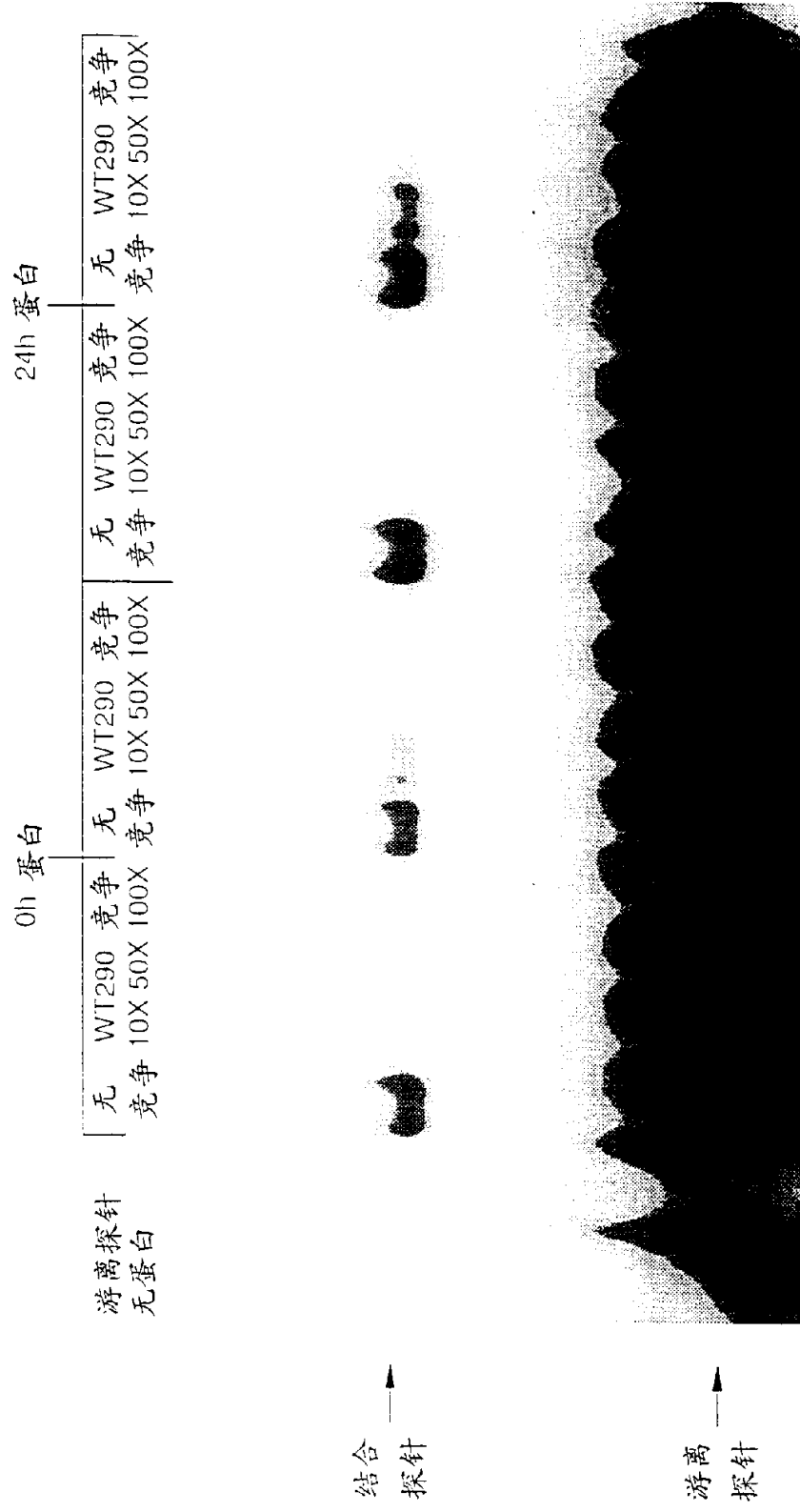


图 13

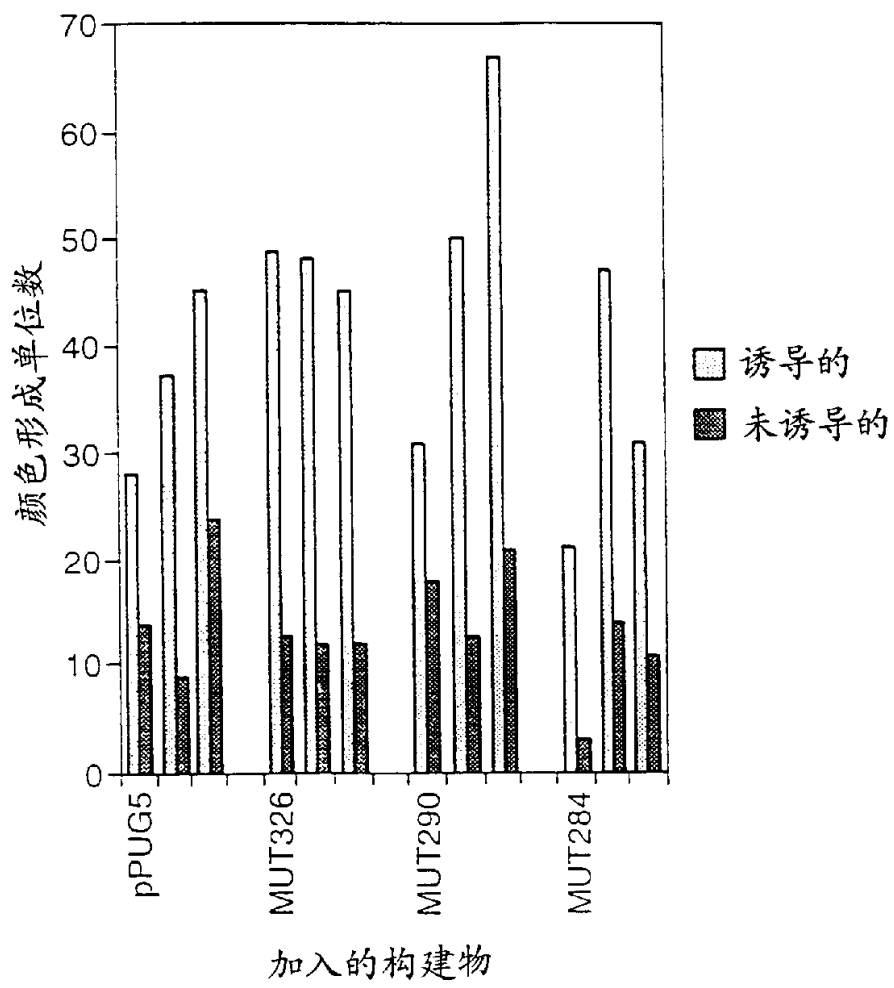


图 14

	探针 284	
	3' CTTAGGCTTTA 5'	
5' TCGGTTCCTAATAATTATTATAAAATTTTGGTTCTCATATTTTCAGAAATCCGAAATTTTCATAAATCC		
3' CCAAGGATTTT 5'	3' ATAAAGTCCTTA 5' 3' TTAAAGTATTT 5'	
探针 326	探针 290	探针 275
探针 ERE	TATTTCAAAAT	
	ATAAAGTTTTA	

图 15

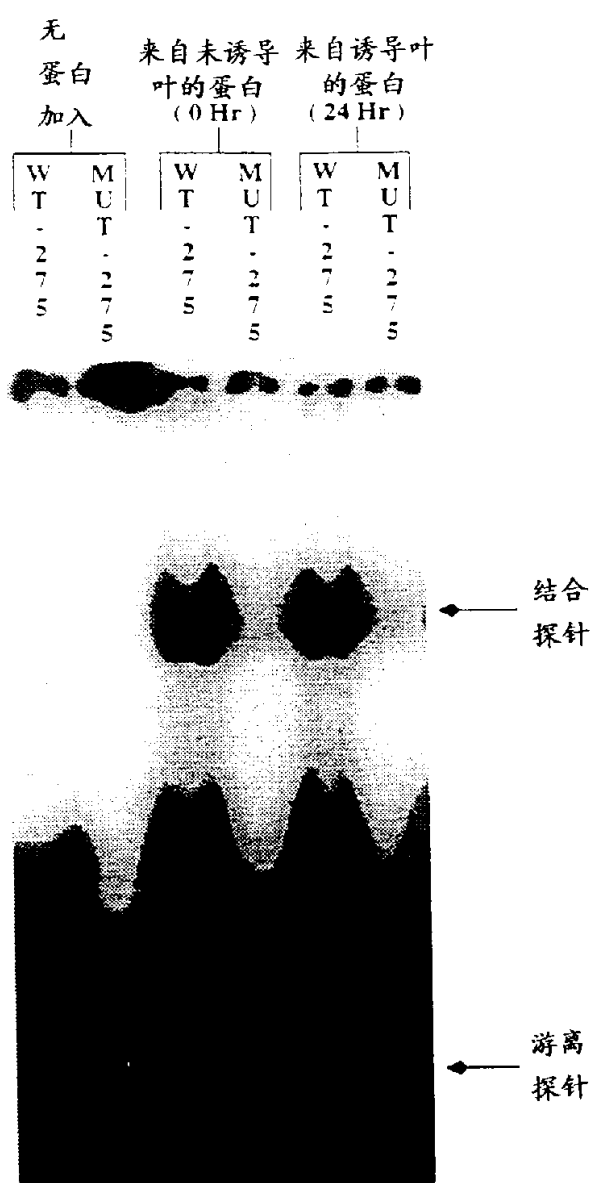


图 16

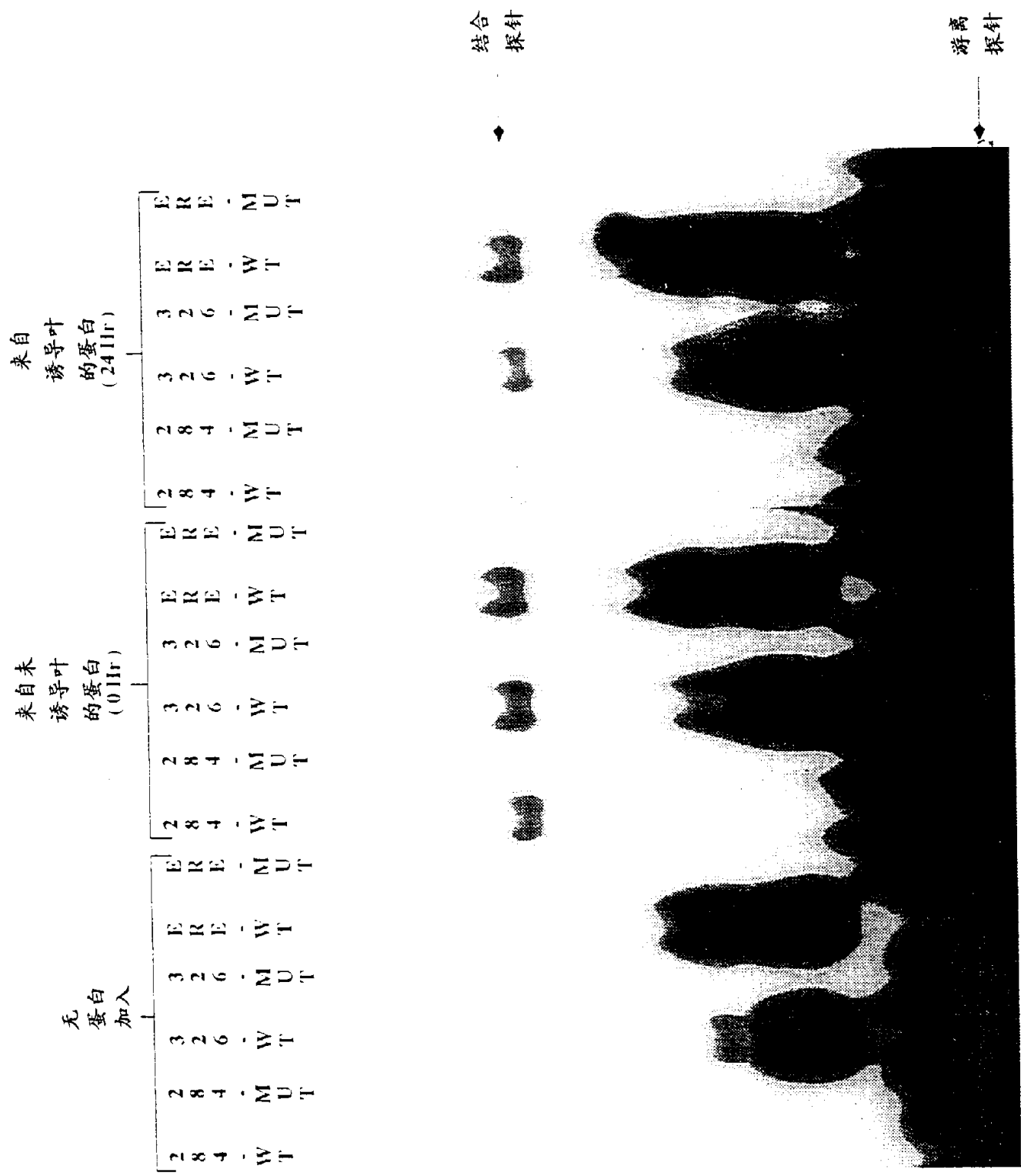


图 17

