

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00810648.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1234870C

[22] 申请日 2000.7.19 [21] 申请号 00810648.7

[30] 优先权

[32] 1999.7.21 [33] JP [31] 206316/99

[32] 1999.7.21 [33] JP [31] 206320/99

[32] 2000.6.12 [33] JP [31] 175825/00

[86] 国际申请 PCT/JP2000/004837 2000.7.19

[87] 国际公布 WO2001/005986 英 2001.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.21

[71] 专利权人 三荣源有限公司

地址 日本大阪

共同专利权人 小关良宏

[72] 发明人 小关良宏 小柳美喜子 福田崇

香田隆俊

审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 3 页 说明书 45 页 附图 13 页

[54] 发明名称

新的类似微型反向重复转座元件 (MITE) 的转座元件和转录活化元件

[57] 摘要

本发明提供新型胡萝卜来源的 MITE 类似元件 (转座元件)。进一步提供包括至少一个转座元件的转录活化元件,特别是上述 MITE 类似元件。具体的,提供具有包括如 SEQ ID NO: 1 所示核酸序列或其功能类似物的 DNA 和/或包含如 SEQ ID NO: 2 所示核酸序列或其功能类似物的转录活化元件。本发明的转录活化元件能够增加或活化被减少的通过转基因技术转入的外源基因的表达。因此,转基因活化元件对于转入到植物基因组的外源基因的的稳定表达起作用,并用于稳定的产生遗传修饰的植物。

1. 一种微型反向重复转座元件类似元件，其能够造成在基因组基因中其插入位点上的靶序列： $(A)_nG(A)_n$ 的重复， n 为不小于 1 的整数，
5 具有作为完全或不完全末端反向重复序列的在 5'末端区域如 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列以及在 3'末端区域如 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的微型反向重复转座元件类似元件，其特征是在其序列中包括多个重复的至少一种由下列公式代表的核苷酸序列，
10 公式(1): $XttgcaaY$ ，其中的 X 代表 g 或 t ， Y 代表 a 或 c ，或公式(2): $Zatgcaa$ ，其中的 Z 代表 t 或 a 。

3. 微型反向重复转座元件类似元件，其包括下列 DNA(a)或(b):
15 (a) 一种 DNA，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列；
(b) 一种 DNA，其能够与具有上述 (a) 中的核苷酸序列的互补序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并能够造成在基因组基因中其插入位点上的靶序列： $(A)_nG(A)_n$ 的重复， n 为不少于 1 的整数，具有作为完全或不完全末端反向重复序列的在 5'末端区域如 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列以及在 3'末端区域如 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列。
20

4. 转录活化元件，其特征在于包含至少一个如权利要求 1-3 中任一项所述的微型反向重复转座元件类似元件作为转座元件。

25 5. 如权利要求 4 所述的转录活化元件，其中的转座元件为包括下述 DNA(a)或(b)的微型反向重复转座元件类似元件以及包括如下 DNA(c)或(d)的微型反向重复转座元件类似元件的串联产物：

(a) 一种 DNA，其具有如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；
(b) 一种 DNA，其能够与具有上述 (a) 中的核苷酸序列的互补
30 序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并能够造成在基因组基因中其插入位

点上的(A)_nG(A)_n的重复, n 为不小于 1 的整数, 具有作为完全或不完全末端反向重复序列的在 5'末端区域如 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列以及在 3'末端区域如 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列;

(c) 一种 DNA, 其具有如 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列;

5 (d) 一种 DNA, 其能够与具有上述 (c) 中的核苷酸序列的互补序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 并能够造成在基因组基因中其插入位点上的 TA 的重复, 具有作为完全或不完全末端反向重复序列的在 5'末端区域如 SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列以及在 3'末端区域如 SEQ ID NO:13 所示的核苷酸序列。

10

6. 如权利要求 4 所述的转录活化元件, 其包括具有如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的 DNA。

15

7. 如权利要求 4 所述的转录活化元件, 其包括具有如 SEQ ID NO:14 所示的核苷酸序列的 DNA。

8. 转基因表达盒, 其包括如权利要求 4、6 和 7 中任一项所述的转录活化元件和可操纵地连接到所述的元件上的 DNA 序列。

20

9. 如权利要求 8 所述的转基因表达盒, 其中与所述转录活化元件可操纵地连接的 DNA 序列包括启动子和/或终止子。

25

10. 如权利要求 9 所述的转基因表达盒, 当所述 DNA 序列可操纵地连接到转录活化元件上时, 其进一步包括将要被表达的目的转基因序列。

11. 一种质粒, 其包含权利要求 4、6 和 7 中任一项所述的转录活化元件。

30

12. 一种质粒, 其包含权利要求 8-10 中任一项所述的转基因表达

盒。

5 13. 生产转基因植物的方法，其包含将权利要求 8 所述的转基因表达盒导入到植物中，所述表达盒具有启动子和终止子作为可操作连接到转录活化元件上的 DNA 序列。

 14. 如权利要求 13 所述的生产转基因植物的方法，其中所述表达盒具有启动子和终止子作为可操作连接到转录活化元件上的 DNA 序列以及所需的待表达转基因序列。

10 15. 如权利要求 13 所述的生产转基因植物的方法，其中所述植物为玉米、水稻、小麦、百合、菊花、棉花、大豆、甜菜、马铃薯或番木瓜。

新的类似微型反向重复转座元件（MITE）的
转座元件和转录活化元件

5

技术领域

本发明相关于新型植物来源的转座元件，更具体的，相关于一个MITE（微型反向重复转座元件）类似序列。更具体的，本发明相关于分离自胡萝卜(*Daucus cartota*)的新型转座元件。

本发明进一步相关于包含转座元件的新型转录活化元件。更具体的，当与本发明相关的转录元件被插入到一个基因中时，能够促进周围或其插入位点附近的基因的转录，或者抑制所述基因转录的被灭活。本发明更进一步相关于包含所述转录活化元件的转基因植物。

15

技术背景

在几乎所有的生物体的基因组中都能够发现转座元件，在原核生物与真核生物之间或动物与植物之间毫无例外的都存在着。现在已经知道这些转座元件能够从一个基因组的基因中转移到另一个之中，并能够使得插入该元件的序列的上游或下游的基因组基因失去活性。此外，已经表明除了这种活性，转座元件导致不同类型的基因组重排（缺失，倒转，重复等）；并已有报道表明上述事实导致基因组可塑性，这对于生物体的进化十分重要，并且更具体的，这些转座元件在生物体适应环境中基因组压力的进化中扮演重要的角色(McClintock, Science 26: 792-801 (1984); Arber et al., FEMS Microb. Ecol., 15: 5-14 (1994))。

25

30

转座元件被粗略的分为三类：DNA型（转座子和插入序列），RNA型（逆转座子）(Berg et al. (ed.), Mobile DNA (1989))，和不属于上述两种的微型反向重复转座元件(MITE)(Wessler et al., Curr. Opin. Genet.

Dev. 5: 914-821 (1995))。

对于其中的 DNA 型和 RNA 型转座元件，它们在基因组中的实际转座反应已经确定，而对于 MITE，尽管它们与 DNA 型转座元件非常相似，但还没有报道作为它们在基因组中转座的证明。

大多数 MITE 都是通过计算机检索，从正在进行的基因组计划所阐明的不同生物体基因组基因的核酸序列数据库中发现的。第一个发现是由 Bureau et al. (Bureau et al., Plant Cell 4: 1283-1294 (1992))于 1992 年发现的 Tourist 家族。从此，在不同的植物和昆虫以及动物基因组中都发现不同的 MITE。

通常，MITE 被定义为具有如下特征：（1）在其 5'- 和 3'- 末端具有完全或者非完全反向倒转重复序列（这一点与 DNA 型转座元件相似），（2）在反向重复序列的两个末端出现类似目标复制序列，一段包含两个或更多核苷酸的序列，类似于 DNA 型转座元件插入到基因组 DNA 中所形成的，以及（3）它们通常大小为小于 2kb(Wessler et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 914-821 (1995))。

至于那些如同 DNA 型转座元件一样，在其末端反向重复序列之间具有编码转座酶的开放阅读框的 MITE，已知只有在真菌和动物中发现的 IS630-Tc1/Mariner 家族(Kachroo et al., Mol. Gen. Genet. 245: 339-348 (1994); Smit et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1443-1448 (1996))。但是，对于植物来源的 MITE，还未发现有这种编码转座酶的开放阅读框。所以，关于植物 MITE 的转座机制和其作用还有很多点尚不清楚。

附带的，在高等生物体的基因操纵中进行的基因转移试验多数为核基因组插入类型。这是因为在高等生物体中没有类似于原核生物中质粒的物质。

对于这种插入到核基因组中的基因转移，可以使用物理方法包括基因枪，脂质体或电穿孔技术将偶联用于插入到高等生物体核基因组中的目的基因的载体转入，以及使用生物方法包括将如前所述的包含基因的载体转入到病毒或微生物体中，利用所述病毒或微生物体所具有

但是，这些物理和生物方法都存在问题，因为插入到高等生物体中的基因的表达活性在不同的个体中是不同的，因此并不稳定。在许多例子中，这是由位置效应所引起的基因沉默所造成的(Peach et al., Plant Mol. Biol. 17: 46-60 (1991))。这种位置效应是在酵母以及其它许多真核生物中都能够发现的一种现象，而且已知在插入的基因本身的核苷酸序列没有变化，表达活性的变化主要依赖于所述基因在染色体上插入位点的变化，在某些例子中，基因的表达被完全灭活（基因沉默）(Molecular Biology of the Cell, 3rd edition, 434-435 (1995))。

假定造成基因沉默这种现象是由于所有在真核生物体中的基因都不是均一转录的，并且在核基因组中基因被转录的活性位点和基因沉默的隐藏位点是相互交织的。已经知到由于对于转录所必需的蛋白不能接触到基因，或者由于该位点基因组 DNA 的甲基化所造成的核小体结构变化或异染色质化，插入到隐藏位点的基因根本不能被转录，结果发生基因表达的灭活(基因沉默)(Ng et al., Curr. Opin. Genet. Dev., 9: 158-163 (1999); Matzke et al., Curr. Opin. Plant Biol. 1: 142-148 (1999))。

进一步了解到，即使在同一生物体中，如同哺乳动物的 X 染色体可见一样，基因沉默还依赖于细胞分化的时期。而且，已知由当前尚未知的机制造成的基因沉默一旦发生，能够通过交配由其后代继承(Molecular Biology of the Cell, 3rd edition, 434-453 (1995))。

同时，在基因操作中，目的基因（外源基因）通过物理或生物方法（除了用于基因敲除的同源重组方法）被转入到高等生物体中，基因在细胞核基因组中的插入位点在不同细胞中是不同的而且几乎不可能人为控制。因此，外源基因转入到高等生物中以不确定的方式导致包含外源基因在活性位点的细胞或包含外源基因在隐藏位点的细胞的形成。

在植物中，已知当外源基因被转入到隐藏位点，会受到隐藏位点的影响，导致外源基因的表达显著减小或者接近于零；而且也知道即使外源基因被插入到活性位点，外源基因的表达也会随着重复的细胞分裂造成的生长过程产生的基因沉默而变得不稳定并减小(Peach et al., Plant Mol. Biol. 17: 46-60 (1991))。

所假定的外源基因表达灭活的一个主要原因是染色体上核 DNA 结构。参与核 DNA 结构的一个元件为 MAR（基质结合区），也被称为 SAR（脚手架结合区）序列。其被发现为一种将核基因组 DNA 锚定于核基质的序列。在动物中，已经表明在基因转移后，当包含 MAR 的鸡 A 元件被连接到外源基因上时，插入的基因的表达上升(Stief et al., Nature 341: 343-345 (1989))。但是，后续的研究表明 MAR 对基因表达的增加有效，但是其单独使用并不能抵消位置效应(Bonifer et al., Nucleic Acids Res. 22: 4202-4210 (1994); Poljak et al., Nucleic Acids Res. 22: 4386-4394 (1994))。在植物中，用转化株研究 MAR 的效应。但是，至今还未得到任何可重复的结果。现在认为单独用 MAR 不能抵消位置效应(Meshi: Shokubutsu no Genome Science (Genome Science of Plants), 153-160 (1996), published by Shujunsha)。

目前，遗传修饰的植物已经被用作遗传修饰的食品。但是，在发展基因食品中待解决的最重要的问题是上述的会导致外源基因表达灭活的基因沉默现象。为避免基因沉默现象，从大量其外源基因插入位点尽可能的少的发生基因沉默的植物个体中以及即使经过很多年的传

代也不会发生基因沉默的植物个体中进行选择对于发展基因修饰的植物是必需的。对于这种选择，必须培养大量的植物个体并且要重复很多代，因此不但需要大量的人力和时间还需要大量的土地，也即会发生土壤面积问题。

5

因此，找到另一种避免基因沉默的策略在植物的基因工程中是一个迫切并非常重要的问题，要发展一种抑制由基因沉默造成的位置效应或者活化插入的外源基因转录的方法，更具体的为发展具有这种效应的“转录活化元件”。

10

发明公开

如上文所述，植物 MITE 的功能还有许多点尚不清楚。关于 MITE 的功能，基于研究发现 MITE 经常出现在不同基因的启动子的上游 (Wessler et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 914-821 (1995))推测其可能对基因表达的活化其作用。而且，因为发现大量的 MITE 经常出现在基

15 质结合区 (MAR) (Avramova et al., Nucleic Acids Res. 26: 761-767 (1998))，推测它们与基因组结构相关。

因此，从阐明还未经充分研究的基因组结构和基因表达关系的科研角度来说，MITE 是非常令人感兴趣的转座元件（插入元件）。考虑到 MITE 的可能性，当在基因组基因间进行转座后整合到基因组结构中时，能够改变基因组结构并且控制基因表达，可以预期它们能够

20 在外源基因插入情况中作为稳定或阻止基因表达活性灭活的因子。

因此，一方面本发明的目的是提供新型植物来源的 MITE 类似元件，以及如上所述的科研和工业用途。

25

具体的，本发明首先相关于如下 1 到 5 所述的新型 MITE 类似的元件(下文中为方便起见这种 MITE 类似元件有时被称为“IS2 元件”)：

30 1. 一种能够导致靶序列重复的 MITE 类似元件：(A)_nG(A)_n[n

为不小于 1 的整数];

2. 如上述 1 所定义的 MITE 类似元件, 在其 5' 和 3'末端各有完全或不完整末端倒转重复序列;

5 3. 如上述 1 或 2 所定义的 MITE 类似元件, 其包括核苷酸序列中至少一个具有一种以上的副本, 如下述公式所代表 (1): XttgcaaY(其中 X 代表 g 或 t, Y 代表 a 或 c), 或公式 (2): Zatgcaa (其中 Z 代表 t 或 a);

10 4. 如上述 1 到 3 中任一所定义的 MITE 类似元件, 其末端反向重复序列包括如 SEQ ID NO:10 所出示的核酸序列为其 5'末端, 以及如 SEQ ID NO:11 所出示的核酸序列为其 3'末端;

5. 包括如 SEQ ID NO:1 所示核酸序列的 MITE 类似元件;

本发明进一步相关于如下 6 和 7 所述新型 MITE 类似元件 (下文中, 为方便起见这种 MITE 类似元件被称为 “IS1 元件”):

15 6. MITE 类似元件的末端反向重复序列包括如 SEQ ID NO:12 所出示的核酸序列为其 5'末端, 以及如 SEQ ID NO:13 所出示的核酸序列为其 3'末端, 并且其能够导致靶序列 TA 的重复;

7. 包括如 SEQ ID NO:2 所示核酸序列的 MITE 类似元件

20 第二方面, 本发明的目的是提供 “转录活化因子”, 其能够抑制由位置效应引起的被称为基因沉默的基因活化现象, 或者能够激活其附近或边缘区的基因转录。

具体的, 本发明相关于如下 8 到 12 中所述的转录活化因子:

8. 包含至少一个转座元件的转录活化因子;

25 9. 如 8 中所定义的转录活化因子, 其中的转座元件为 MITE 类似元件;

10. 如 9 中所定义的转录活化因子, 其中的转座元件包括的 MITE 类似元件包含如下的 DNA(a)或 DNA(b):

(a) 具有如 SEQ ID NO:1 所示核酸序列的 DNA;

30 (b) 能够与上面核酸序列(a)在严谨条件下杂交的 DNA, 并编码

能够造成插入位点的(A)_nG(A)_n [n 为不小于 1 的整数]重复的 MITE 类似元件；

和/或包含如下面 DNA (c)或 (d)的 MITE 类似元件：

(c) 具有如 SEQ ID NO:2 所示核酸序列的 DNA；

5 (d) 能够与上面核酸序列(c)在严谨条件下杂交的 DNA，并编码能够造成插入位点的 TA 重复的 MITE 类似元件。

11. 如 9 中所定义的转录活化元件，其中的转座元件为串联偶联产物，其来自于包含如下 DNA (a) 或 (b)的 MITE 类似元件：

(a) 具有如 SEQ ID NO:1 所示核酸序列的 DNA；

10 (b) 能够与上面核酸序列(a)在严谨条件下杂交的 DNA，并编码能够造成插入位点的(A)_nG(A)_n [n 为不小于 1 的整数]重复的 MITE 类似元件；

和/或包含如下面 DNA (c)或 (d)的 MITE 类似元件：

(c) 具有如 SEQ ID NO:2 所示核酸序列的 DNA；

15 (d) 能够与上面核酸序列(c)在严谨条件下杂交的 DNA，并编码能够造成插入位点的 TA 重复的 MITE 类似元件。

12. 转录活化元件包括具有如 SEQ ID NO:3 所示核酸序列的 DNA；

20 本发明进一步相关于被引入的外源基因表达盒，其包括如上所述的转录活化元件。具体的，如下面 13 到 15 所述的表达盒：

13. 用于植物中的基因表达盒包括如上面 8 到 12 中任一条所定义的转录活化元件，和一段 DNA 序列可操纵地连接到所述的因子上；

14. 如上面 13 中所定义的被插入的基因表达盒，其中的 DNA 序列被可操纵地连接到包含启动子和/或中止子的转录活化元件；

25 15. 如上面 14 中所定义的被插入的基因表达盒，其中进一步包括 DNA 序列可操纵地连接到转录活化元件上，插入的目的基因序列得到表达。

30 本发明进一步相关于包含上述转录活化元件的质粒（例如作为插入的外源基因表达盒）以及包含利用所述质粒引入转录活化元件的转

基因植物。

附图简述

图 1 表示相应于本发明中 MITE 类似元件的 IS2 元件的结构。

5 图 2 表示相应于本发明中 MITE 类似元件的 IS1 元件的结构，以及其末端反向重复序列和其被插入的重复序列（划线的部分中的 TA）。

图 3 为构建 gDCPAL3-pro/SK 方法的示意图。

图 4 为胡萝卜 PAL 基因 gDCPAL3 和 gDCPAL4 的比较示意图。

10 图 5 为本发明中的 MITE 类似元件（IS1 元件）的核酸序列和已知为 Stowaway 家族(Bureau and Wessler, Plant Cell, 6: 907-917 (1994)) 的比较示意图。黑色背景中白色字母所指示的序列为表现出同源性的末端倒转重复序列。

图 6 作为本发明中 MITE 类似元件的 IS2 元件末端所发现的不完全重复序列和靶重复序列（划线的部分中的 AAAAGAAAA）。

15 图 7 为构建 IS1-35S/SK 方法的示意图。

图 8 为构建 IS2-35S/SK 方法的示意图。

图 9 为构建 IS12-35S/SK 方法的示意图。

图 10 为构建 MU3-35S/SK 方法的示意图。

20 图 11 为构建 pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35S 和 pMU3-35S/AB35S 方法的示意图。

25 图 12 表示了实施例 3（1）的结果，在包含卡那霉素的选择培养基中培养的转化有 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2), pIS12-35S/AB35S (IS12) 和 pAB35S (35S) (对照)烟草 BY-2 细胞中，对新生的愈伤组织的数目进行了比较。图中上面和下面的图分别表示了用包含 100 μ g/ml 和 300 μ g/ml 卡那霉素的选择培养基获得的结果。

图 13 表示实施例 3（2）的结果，对引入 pAB35S (35S)形成的烟草愈伤组织（对照）（左图）和引入 pIS12-35S/AB35S (IS12)形成的烟草愈伤组织（右图）的 GUS 活性进行了比较。

实现本发明的最佳模式

I. 新型 MITE 类似元件

已发现的 MITE 不只包括如上所述的 Tourist 和 Stowaway 家族，还包括 Castaway, Crackle, Emigrant, Explorer, Ditto, Gaijin, Krispie, Pop,
5 Snap, Wanderer, Wujin, Wukong, Wuneng 和 Xbr 家族。当 MITE 在其末端区具有完全或非完全反向重复序列的结构特征时，反向重复序列在 MITE 的核酸序列和长度上有很大的不同。而且，在 MITE 中靶重复序列为：对于 Tourist 为 TAA，对于 Stowaway 为 TA，对于 Castaway 为 TAA，对于 Crackle 为 GTTGATAT，对于 Ditto 为 TTA，对于 Emigrant
10 为 TA，对于 Gaijin 为 ATT 或 TAG 或 TGA 或 GGT 或 GTT 或 GAA，对于 Krispie 为 TTGAAC，对于 Pop 为 AAAACAAA 或 AAAAAAAAAA，对于 Snap 为 TTTTTTTT，对于 Wanderer 为 TTA 或 TAA，对于 Wujin 为 TA 或 CATA，对于 Wukong 为 TATA 或 TACA，对于 Wuneng 为 TTAA 或 TTAT，对于 Xbr 为 TTAA，（任何明确的靶重复序列都未在 Explorer 中发现）(Bureau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8524-8529 (1996); Casacuberta et al., Plant J., 16: 79-85 (1998); Song et al., Mol. Gen. Genet., 258: 449-456 (1998); Tu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 7475-7480 (1997); Unsal and Morgan, J. Mol. Biol., 248: 812-823 (1995))。

20

另一方面，IS2 元件作为上述本发明中的新型 MITE 类似元件的一个具体体现，其具有(A)nG(A)n[n 为不小于 1 的整数]作为其靶重复序列，这在已知的任何 MITE 中（插入元件）都未曾发现。从这个角度，IS2 元件可以被称为不同于任何已知家族的属于新家族的插入元
25 件。

25

关于 IS1 元件，其作为本发明中的新型 MITE 类似元件的一个具体体现，具有 TA 作为靶重复序列，因此可以被称为属于已知 Stowaway 家族的新型 MITE 类似元件(Bureau, T. E. and Wessler, S. R., Stowaway:
30 a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both

monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*, 6: 907-16 (1994))。

下文中，描述了这些 IS2 和 IS1 元件。

5

1. IS2 元件

IS2 元件的特征为能够在插入位点的基因组基因中造成(A)_nG(A)_n的靶重复。数字 n 为不小于 1 的整数。当没有特别限制时，其具体的为如 2 到 6，优选的为 3 到 5，更加优选的为 4。

10

更具体的，本发明中的 MITE 类似元件为一类大小不超过 2kb 的 DNA，优选的为 0.2 到 2kb，在其 5' 和 3'末端区域具有相互方向相反的重复序列（末端反向重复序列）。

15

从这个观点，本发明中的 IS2 元件符合上述的 MITE 的三点特征的要求(Wessler et al. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 914-821 (1995))，也即(1)在 5' 和 3'末端具有完全或不完全反向重复序列；(2)在基因插入位点两端的反向重复序列的相同方向中发现重复序列包括两个或更多个碱基对作为靶重复序列；(3)它们的大小不超过 2kb；因此能够被证实为具有 MITE 类似序列的转座元件（插入元件，MITE 类似元件）。

20

本发明的 IS2 元件结构特征为在其核酸序列中包含至少一个如下述公式所表示的核酸序列(1): XttgcaaY（其中 X 代表 g 或 t，Y 代表 a 或 c）(SEQ ID NO: 4 to 7)或公式(2): Zatgcaa（其中 Z 代表 t 或 a）(SEQ ID NO: 8 to 9)，都是以连续或不连续重复方式。

25

这种重复序列的位置和数目没有特别的限制，而且它们可以包含在出现在 IS2 元件两个末端的末端反向重复序列中，或者在所述的末端反向重复序列之间的中间区域中。

30

本发明中的 IS2 元件具体的包括在末端重复序列之间的中间序列中的如上述公式(1)和(2)所代表的复数形式重复序列，以及在末端反向重复序列中如公式(1)所代表的复数形式重复序列，如图 1 所示。

5 本发明中的 IS2 元件的末端反向重复序列并不需要严格互补，但唯一的要求是 5' 和 3'末端区能够在严格的条件下相互杂交，结果，IS2 元件具有如图 1 所示的茎干结构。从这一角度，本发明的 IS2 元件不仅包括那些完全反向重复序列作为其末端反向重复序列，还包括那些不完全反向重复序列作为其末端反向重复序列。

10

作为相应于本发明 IS2 元件的具体例子，其包含的末端反向重复序列为如 SEQ ID NO:10 所示的核酸序列在其 5'末端区域，如 SEQ ID NO:11 所示的核酸序列在其 3'末端区域。作为 IS2 元件的一个更具体的例子，其具有如 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列。IS2 可以具有一个或更多个替换，增加或缺失的核苷酸在其末端反向重复序列或出现在所述的重复序列之间的序列中，只要所产生的变体保持的功能等价物具有与 IS2 元件基本相同的功能或活性。本发明的 MITE 类似元件也包括这种功能等价物。

15

20 作为优选的功能等价物，其具有和 IS2 元件基本相同的功能和活性，该 IS2 元件具有如 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列，并能造成插入位点的(A)_nG(A)_n[n 为不小于 1 的整数]靶重复，等价物能够在严谨条件下与 IS2 元件杂交。关于“严谨条件”，所述的条件为 1 × SSC 加 0.1% (w/w) SDS 在 50°C 或更高温度处理超过 1 小时的时间。关于功能等价物，更具体所述的其核酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的 IS2 具有不低于 70%，优选的不低于 85%，更优选的不低于 90%，进一步优选的不低于 95%的同源性。

25

2. IS1 元件

30 本发明的 IS1 元件使得基因组基因插入位点 TA 靶重复，以及特

征性的具有末端反向重复序列，如 SEQ ID NO:12 所示的核酸序列在 5' 端区域，如 SEQ ID NO:13 所示的核酸序列在 3' 端区域。本发明的 IS1 元件具体的为具有不超过 1kb 大小的 DNA，优选的为 100bp 到 500bp。根据这些事实，本发明的 IS1 元件可以被定义为 MITE 类似元件，如

5 上述 IS2 元件。

关于本发明中的 IS1 元件，所具体提及的具有如图 2 所示的结构。更具体的，所提及的具有如 SEQ ID NO:2 示的核酸序列。具有这种核酸序列的 MITE 类似元件可以有一个或多个核苷酸发生替代，增加

10 或缺失在其末端反向重复序列或者出现在 5' 和 3' 的这些重复序列之间的序列，只要所产生的变体保持的功能等价物具有与 IS2 元件基本相同的功能或活性。本发明的 MITE 类似元件也包括这种功能等价物。

优选作为功能等价物为那些基本具有如 SEQ ID NO:2 所示核酸序列的 MITE 类似元件（IS1 元件）的功能或活性，其核酸序列与所述的 IS1 具有不低于 70%，优选为不低于 85%，更优选为不低于 90%，进一步优选为不低于 95% 的同源性。

15

上文所述的 MITE 类似元件（IS2 和 IS1 元件）都发现自胡萝卜基因组，更具体的来自于胡萝卜苯基丙氨酸氨裂解酶基因，如后文所述，能够如后面实施例部分所述的被分离得到。只要具有如上文所述的结构和特征，本发明的 MITE 类似元件的起源没有限制。

20

应指出转座元件通常作为植物基因组自身进行自我修饰的机制，

25 对其生物体的进化以及对环境的适应可能具有显著作用。

关于本发明中的 MITE 类似元件，其相关于植物基因组自我修饰机制的功能的机制还不清楚。但是，和逆转座子的例子不同(McDonald, BioScience 40: 183-191 (1990))，其具有增强子元件并且基因启动子由

30 所述元件发生转座产生的所述增强子元件的插入导致的活化的事实还

没有被发现。

因此，本发明的 MITE 类似元件可以被认为具有很高的可能性导致插入的植物基因组的基因结构的变化，并且造成基因组结构的动态变化，例如基因组 DNA 或者核小体结构的不可卷绕性的变化，通过

用本发明的 MITE 类似元件，利用上述特性，通过与已知技术不同的技术使控制位于所述元件附近的基因的表达变得可能。一般认为当外源基因被插入到基因组 DNA 的隐藏位点时，其表达被抑制或灭活。因此，利用本发明的 MITE 类似元件并基于上述特性去激活或活化通过转基因技术被引入的外源基因的被降低或抑制的表达能力被认为是可能的。相应的，本发明的 MITE 类似元件对于构建转基因表达盒和包含所述的表达盒的质粒来稳定的产生经遗传工程处理的植物是有用的，并且对利用所述表达盒和质粒稳定的产生经遗传工程处理的植物也是有用的。

II. 转录活化元件

本发明进一步相关于一种转录活化元件。

此处所指转录活化元件包括能够促进在所述元件附近或边缘的一组基因转录的元件，或能够阻止被转入基因组 DNA 的目的外源基因的抑制或抑制因位置效应产生基因沉默使其失活的元件。每一种已知负责转录活化的元件（因子）能够活化特定基因的转录，通过作为增强子出现在所述基因启动子的附近并且对所述启动子直接顺式作用。相反的，本发明的转录活化元件能够促进位于其附近或边缘的单一基因或一组复数形式基因的转录，而不论相对于启动子的位置；而且包括那些能够通过抑制转录灭活的遗传现象来促进转录的元件，因此与已有的转录活化元件的概念相比在概念上包括更广范围的因子。

本发明的转录活化元件的特征为包含至少一个转座元件。

在此所指的转座元件包括所有上述 DNA 型和 RNA 型以及 MITE。因此，本发明的转录活化元件包括前述种类中至少一种作为转座元件，而不论其来源于同一物种或不同物种。

优选的转录活化元件包含 MITE 作为转座元件。

MITE 按照前面所述定义为具有如下特征的元件(1)在其 5' 和 3' 末端区域具有完全或不完全反向重复序列(相似于 DNA 型转座元件)；(2)在反向重复序列的两端具有靶重复序列，其包含按照相同方向排列的重复序列和包含两个或更多个碱基对，类似于 DNA 型转座元件插入到基因组 DNA 中所形成；(3)大小通常小于 2kb (Wessler et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 914-821 (1995))；任何属于如上所定义的种类的 MITE 都能够作用实现本发明的转座元件。其中作为特别适合的 MITE 为前面所提到的本发明中的新型 MITE 类似元件，即“IS2 元件”，“IS1 元件”以及功能类似物。

因此，本发明的转录活化元件优选的包含至少一种核酸序列，其选自所述 IS2 元件，IS1 元件和功能类似物。

更具体的，本发明的转录活化元件包括(1)具有 IS1 元件或其功能类似物的核酸序列；(2) 具有 IS2 元件或其功能类似物的核酸序列；(3) 具有 IS1 元件或其功能类似物的核酸序列和 IS2 元件或其功能类似物的核酸序列串联所产生的核酸序列（IS1 元件和 IS2 元件的顺序是任意的）；以及(4)具有 IS1 元件（或 IS2 元件）或其功能类似物通过任意核酸序列与 IS2 元件（或 IS1 元件）或其功能类似物相连接产生的核酸序列。转录活化因子的优选实施例包括(i)IS2 元件或其功能类似物和(ii)IS1 元件（或 IS2 元件）或其功能类似物和 IS2 元件（或 IS1 元件）或其功能类似物前后连接的产物。作为后面(ii)的一个具体实施

例，所提到的元件具有如 SEQ ID NO:3 所示的核酸序列。

关于上述(4)中所提到的转录活化元件，在 IS1 元件和 IS2 元件之间（顺序是任意的）的核酸序列并没有特别的限制，只要不会阻碍发明所产生的效果，可以为任意的核酸序列。作为具体的，但并非限制性的例子，此处所提及的为来源于胡萝卜 PAL 启动子序列。通常，这种核酸序列具有 5 到 1,000bp 的大小，优选的为 300 到 500bp。作为这种转录活化元件模型的具体体现，此处具体的提到了具有如 SEQ ID NO:14 所示的核酸序列的一种。

本发明的转录活化元件能够可操纵地连接到转入植物体中的目的基因序列（转基因序列（包括外源基因序列）），以及进一步的，连接于所述转基因的转录活化元件能够可操纵地连接到功能 DNA 序列或如植物中作为启动子功能和/或植物中作为增强子功能的序列上。

此处所用的术语“可操纵地连接”是指转录活化元件所处的位置能够有效的接近于上述转基因序列或各种功能 DNA 序列来发挥它对这些序列的影响，而不论插入位点和方向。

实际应用于本发明的转基因包括那些需要在植物中表达的 DNA，而不论其对于所述植物是同源性或异源性。这些转基因包括，但不限于，编码 β -葡萄糖苷酸酶的基因；抗生素抗性基因；编码杀虫剂和杀菌剂蛋白毒素基因；抗病原复合物基因；合成高敏感性复合物基因，如过氧化物酶，葡聚糖酶，几丁质酶和植物抗毒素；农用化学品，除草剂和杀虫剂抗性基因；合成植物酶的基因（如与蛋白，淀粉，糖和脂肪含量和质量相关的酶）以及编码其调控因子的基因；相关于植物酶抑制剂的基因，如蛋白酶和淀粉酶抑制剂；涉及植物激素合成的基因；涉及昆虫激素和信息素合成的基因；涉及药用和营养的复合物，如 β -胡萝卜素和维生素；以及干扰出现在植物中核酸序列的反义序列(Transgenic Plant, vol. 1, Academic Press, 1993)。

本发明进一步相关于适合应用于植物中的基因表达盒，其包括上述转录活化元件和可操纵地连接于其上的 DNA 序列。此处所指的“基因表达盒”是指能够被转入到植物中的质粒或其亚片段。

5

作为可操纵地连接到转录活化元件上的 DNA 序列，包括功能性 DNA 序列例如启动子和终止子。所述的 DNA 序列包括上面所述的任何一种转基因序列。

10

此处所指的启动子表示一段 DNA 序列，当产生目的蛋白的结构基因被连接到所述启动子的下游时，启动子能够通过植物细胞中的转录和随后的翻译调控所述蛋白的表达，其还包括在植物中有功能的和用于植物转化的相关技术领域的所有启动子。大量的启动子已经应用于植物的转化，包括如从根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 分离的启动子，即羧乙基精氨酸合成酶(ocs)启动子 (L. Comai et al., 1985; C. Waldron et al., 1985)，甘露氨酸合成酶(mas)启动子和胭脂氨酸(nos)启动子。花椰菜花叶病毒 35S 启动子，其通常用于转化，也能够充分的用于本发明。35S 启动子的修饰形式，例如两个并联的 35S 启动子(R. Kay et al., 1987)和 mas-35S 启动子(L. Comai et al., 1990)也能够被使用。而且，花椰菜花叶病毒 19S 启动子(J. Paszkowski et al., 1984)和玄参花叶病毒来源的 34S 启动子(M. Sanger et al., 1990)也能够被应用。更多的例子还包括肌动蛋白启动子，核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚单位(rbcS)启动子等植物来源的启动子。

15

20

25

终止子包括能够有效的终止植物中目的结构蛋白的转录的核酸序列，并包括用于植物转化相关技术领域在植物中有功能的所有终止子。具体的，例如胭脂氨酸合成酶 (nos)终止子作为典型例子。

30

本发明的转录活化元件或转基因表达盒包含所述元件，其能够用于诱导或调控被转入到植物中的基因的表达，并且这通常广泛应用于

植物中。

植物包括但不限于农业上有用的植物，而不论其为单子叶植物或双子叶植物。例如在单子叶植物中有玉米，稻，小麦，大麦，非洲或印度黍，燕麦，黑麦，黍和其它谷类农作物，以及百合，兰花，鸢尾属植物，棕榈，郁金香，莎草等其它不同种类的观赏植物。双子叶植物包括菊花，金鱼草，康乃馨，木兰，罂粟，甘蓝，玫瑰，豌豆，猩猩木，棉花，仙人掌，胡萝卜，越橘，胡椒薄荷，向日葵，西红柿，榆树，橡树，枫树，白杨，大豆，瓜类，甜菜，油菜，马铃薯，莴苣，番木瓜等。

本发明进一步提供了转基因植物，其包括本发明的转录活化元件或者本发明的包含所述元件的转基因表达盒，其中对于被转入的目的外源基因由位置效应造成的基因沉默（灭活）现象已经被抑制，或外源基因的转录已经被活化。所述的转基因植物包括其后代。

在此使用的“植物”这一术语是指不仅包括完全的植物体还包括植物体的一部分，例如叶子，种子，茎或切开物。其进一步包括原生质体，植物愈伤组织，分生组织和类似的植物细胞。

产生转基因植物的方法没有特别的限制，可以为任何一种常规用于相关技术领域的 DNA 转移方法。具体的，为一种用包含本发明的转录活化元件或包含所述元件的转基因表达盒的表达质粒将 DNA 转入植物细胞的方法；还包括如已知的用土壤杆菌，电学方法（电穿孔）和基因枪方法。

所得到的植物细胞包含本发明的转录活化元件，所述元件的转基因表达盒，或者表达质粒，该细胞能够用所描述的植物组织培养技术中的常规方法进行复制，例如 S. B. Gelvin, R. A. Schilperoot and D. P. S. Verma: Plant Molecular Biology Manual (1991), Kluwer Academic

Publishers or Valvekens et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 5536-5540 (1988), 可以得到来源于所述植物细胞的植物体或其部分。

本发明的表达质粒可以为任何一种，只要它包括要被插入目的 DNA 序列（转基因）以及转录活化元件和功能性 DNA 序列例如启动子和终止子。但优选的这些 DNA 序列被可操纵的相互连接。术语“可操纵地连接”是指质粒具有达到预期目的的功能。具体的，当所讨论的质粒被引入到植物细胞中时，目的转基因（结构基因）在转录活化元件的控制下进行表达并且表达能够被终止子有效的终止，在所述的质粒中不存在启动子的灭活。

本发明进一步包括能够使转基因在植物中表达的方法。这种方法的实现至少如上文所述的通过将整合着外源基因的转基因表达盒转入到植物中的步骤，以及使所述转基因在所述植物中表达的步骤。将转基因表达盒（DNA）转入到植物中以及所述转基因的表达能够通过本领域已知的技术来实施(Plant Molecular Biology Manual, 1991, Kluwer Academic Publishers)。

实施例

下面的实施例进一步详细的阐明了本发明。但并不意味着它们是对本发明范围的限制。实施于本发明的遗传工程技术和分子生物学试验程序(限制酶切处理条件，连接反应条件，大肠杆菌的转化等)能够被常规并广泛的应用，例如 J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis: Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and D. M. Glover: DNA Cloning, IRL Press, 1985 中所描述的。

实施例 1

1) 靶植物，靶基因

为寻找 MITE 类似元件，胡萝卜(Daucus carota L. cv. Kurodagosun)作为靶植物，所述胡萝卜中苯基丙氨酸氨裂解酶（PAL）的基因作为

靶基因。

2) 胡萝卜 PAL 基因 gDCPAL3 和 gDCPAL4 的克隆

从胡萝卜基因组文库中克隆得到胡萝卜基因组序列。按照如发明
5 人以前所描述的(Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J.: Structure and
expression of chalcone synthase gene in carrot suspension cultured cells
regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiol.*, 34: 1029-1037 (1993)), 用 λ
EMBL3 质粒(Toyobo 的产品)从培养的胡萝卜细胞中(Ozaki, Y. and
Komamine, A.: Induction of anthocyanin synthesis in relation to
10 embryogenesis in a carrot suspension culture; Correlation of metabolic
differentiation with morphological differentiation. *Physiol. Plantarum*, 53:
570-577 (1981))构建胡萝卜基因组文库。

具体的, 按照 Murray 和 Thompson (1980) 的方法(Murray, M. G.
15 and Thompson, W. F.; Rapid isolation of high molecular weight plant
DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325 (1980))用溴化十六烷基三甲基铵
(CTAB) 溶液从冻干的胡萝卜中制备胡萝卜基因组 DNA。所得到的
基因组 DNA 用 Sau3AI 部分酶切, 酶切得到的 DNA 片段用蔗糖密度
梯度方法根据大小使其分开。收集 15 到 20kb 的 DNA 片段并将其连
20 接到经 BamHI 酶切的 λ EMBL3 载体上, 随后用噬菌体颗粒包装从而
构建了胡萝卜核酸文库。

然后, , 按照 Ozeki et al.的方法(Ozeki, Y., Matsui, K., Sakuta, M.,
Matsuoka, M., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N, and Tanaka,
25 Y.: Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during
anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension
cultures. *Physiol. Plantarum*, 80: 379-387 (1990))使用 PAL cDNA (ANT-
PAL cDNA)作为克隆探针, 从胡萝卜基因组文库中筛选(Sambrook et al.,
1989)PAL 的基因组克隆。用于筛选胡萝卜基因组文库的杂交反应于
30 68°C 经过夜处理, 使用的溶液包含 $6 \times \text{SSC}$, 60 mM 磷酸钠(pH 6.8),

10 mM EDTA, 1% SDS, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% Ficoll 400 和 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA。膜在室温下在包含 0.5% SDS 的 $2 \times$ SSC 溶液中清洗两次(15 分钟 $\times$ 2), 在室温下在包含 0.1% SDS 的 $0.1 \times$ SSC 或 $1 \times$ SSC 溶液中清洗两次(10 分钟 $\times$ 2), 最后, 在 68°C 在 $0.1 \times$ SSC 溶液中清洗两次(30 分钟 $\times$ 2)。

结果, 得到 8 个阳性克隆。制备这些克隆的限制性酶谱, 并根据酶谱, 克隆鉴别为两个基因, 分别命名为 gDCPAL3 和 gDCPAL4。

10 用 gDCPAL3, 培养阳性克隆的 λ 噬菌体, 提取 λ DNA, 用 BamHI 酶切, 并根据 Sambrook et al. (1989)等所描述的 Southern 方法转移到尼龙膜上。然后, 从上述 ANT-PAL cDNA 经 EcoRI 酶切并在所得到的 DNA 片段(984 bp)的 5' 端标记 [^{32}P], 其作为探针进行 Southern 分析, 得到与上述探针杂交的 2.77 kbp DNA 片段。该 DNA 片段用 BamHI 15 酶切, 并亚克隆到经小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 处理过的 pBluescript SK 质粒上, 得到 gDCPAL3-pro/SK (图 3)。然后, 所得的质粒 gDCPAL3-pro/SK 用限制性内切酶 SalI 和 ApaI 酶切, 并按照 Sambrook et al. (1989)所描述的方法用核酸外切酶 III 和绿豆核酸酶酶切得到一系列缺失的 DNA 片段, 用这些片段来测定 gDCPAL3 DNA 的核酸序 20 列。按照 Ozeki and Takeda (1994)所描述的方法 (Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 38: 221-225 (1994)), 从胡萝卜中提取的 mRNA 用于延伸引物方法, 根据得到的条带的位置来测定转录起始位点 (+1)。

25

用 gDCPAL4, 根据上述同样的方法得到 gDCPAL4-pro/SK 质粒并测定 gDCPAL4 DNA 的核酸序列。具体的, 从阳性 gDCPAL4 克隆的 λ 噬菌体中所得到的 λ DNA 用 HindIII 和 BamHI 酶切, 用上述探针进行 Southern 分析, 与探针杂交的 1.63 kbp DNA 片段用 HindIII 和 30 BamHI 酶切, 并亚克隆到经小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 处理过的

pBluescript SK 质粒上，得到 gDCPAL4-pro/SK。然后，得到的 gDCPAL4-pro/SK 质粒用限制性酶 XbaI 和 BstXI 酶切，并按照 Sambrook et al. (1989)所描述的方法用核酸外切酶 III 和绿豆核酸酶酶切得到一系列缺失的 DNA 片段，用这些片段来测定 gDCPAL4 DNA 的核酸序列。

3) 结果

对照 gDCPAL3 和 gDCPAL4 的核酸序列表明 gDCPAL3 的启动子区有微型反向重复转座元件 (MITE)，其具有在 gDCPAL4 中未发现的完全反向重复序列，存在于两处，即-1897 到-1599 (长度为 299 bp) 和-1157 到 -389(长度为 769 bp) (图 4)。这些序列被分别命名为 IS1 和 IS2。

这些序列和插入位点周围的核酸序列用自动测序仪(LICOR 4000L 型产品)进行测序。IS1 的核酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，IS2 的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

IS1 和 IS2 的特征如下所述：

(1) IS1

其具有如 SEQ ID NO:2 (全长 299 bp)所示的核酸序列，分别在 5' 和 3' 末端区域具有非完全反向重复序列(32 bp)，以及在基因组插入位点具有靶重复序列 TA 来作为靶基因。基于这些事实，估计新型 MITE 元件的核酸序列属于已经报道的 Stowaway 家族(Bureau, T. E. and Wessler, S. R. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. Plant Cell, 6: 907-16 (1994))。IS1 的主干结构和末端反向重复序列区域和插入位点区域的结构如图 2 所示。

基于所得到的核酸序列的信息，用商业数据库(如，GENE TYX-MAC/CD1995)对核酸序列进行同源性分析，在其末端反向重复序列

中,发现 MITE 元件有 70-90%的同源性属于 Stowaway 家族(Bureau and Wessler (1994))。证实了所述元件为属于 Stowaway 家族的转座元件(图 5)。

5 (2) IS2

其具有如 SEQ ID NO:1 (全长 769bp)所示的核酸序列,分别在 5' 和 3' 末端区域具有非完全反向重复序列(158 bp),以及在基因组插入位点具有靶重复序列 AAAAGAAAA 来作为靶基因。核酸序列进行同源性比较,但没有检测到其与已知的转座元件具有同源性。因而发现
10 其为一类转座元件,特别为 MITE 类似元件,组成了一类不属于任何已知的转座元件家族的新的家族。IS2 的全部结构(主干结构)如图 1 所示,其末端反向重复序列区和其插入位点的结构如图 6 所示。

实施例 2

15 (1) IS1, IS2, IS12 和 MU3 的克隆

(i) IS1 的克隆(图 7)

从来源于如实施例 1 所述的制备用于核酸序列测定的 gDCPAL3 启动子区的 3'终点具有缺失 DNA 片段的质粒中,选择具有缺失到-1581 的质粒 gDCPAL3-IS1/SK,用 Kpn I 酶切质粒,并用 T4DNA 聚合酶使其末端补平并用 ScaI 酶切随后用琼脂凝胶电泳得到 321 bp DNA 片段。该片段被亚克隆到用 HincII 酶切并经 CIP 处理过的 pBluescript SK 质粒。从含有上述亚克隆的大肠杆菌中提取质粒,并测定核酸序列来表明每个插入 DNA 片段的方向。通过这种方式,具有 IS1 的 5' 末端被插入到 pBluescript SK 质粒多克隆位点的 KpnI 端的质粒被选择并被
20 命名为 IS1/SK。而且,用 HindIII 和 SmaI 酶切 pBI221 (Clontech Inc.) 所得的花椰菜花叶病毒 35S 启动子(35S)片段用琼脂糖凝胶电泳回收亚克隆到经 HindIII 和 SmaI 酶切并经 CIP 处理过的 pBluescript SK 质粒,所得的质粒命名为 35S/SK。从 IS1/SK 中,用 KpnI 和 HindIII 酶切,随后用琼脂糖凝胶电泳得到插入的 DNA 片段,并被亚克隆到经
25 KpnI 和 HindIII 酶切并经 CIP 处理的 35S/SK 中,得到在 35S 启动子

区的上游区域有 IS1 区的 IS1-35S/SK。

(ii) IS2 的克隆(图 8)

从来源于如实施例 1 所述的制备用于核酸序列测定的 gDCPAL3 启动子区的 3'终点具有缺失 DNA 片段的质粒中，选择具有缺失到-389 的质粒 gDCPAL3-IS12/SK，用 Kpn I 酶切质粒，并用 T4DNA 聚合酶使其末端补平并用 DdeI 酶切随后用琼脂凝胶电泳得到 797 bp DNA 片段。该片段被亚克隆到用 HincII 酶切并经 CIP 处理过的 pBluescript SK 质粒。从含有上述亚克隆的大肠杆菌中提取质粒，并测定核酸序列来表明每个插入 DNA 片段的方向。通过这种方式，具有 IS2 的 5' 末端被插入到 pBluescript SK 质粒多克隆位点的 KpnI 端的质粒被选择并被命名为 IS2/SK-1。具有 IS2 的 3' 末端被插入到 KpnI 端，也即反方向，被选择并被命名为 IS2/SK-2（反向）。

IS2/SK-1 用 KpnI 和 HindIII 酶切并用琼脂糖凝胶电泳回收插入的 DNA 片段，该片段被亚克隆到经 KpnI 和 HindIII 酶切并经 CIP 处理过的 35S/SK 质粒，所得的质粒命名为 IS2-35S/SK，其在 35S 启动子区域的上游具有 IS2 区域（正向链）。

(iii) IS12 的克隆(IS1-IS2 串联产物)(图 9)

如上(ii)描述所得到的 IS2/SK-2（反向）用 Kpn I 酶切质粒，并用 T4DNA 聚合酶使其末端补平，用 HindIII 酶切随后用琼脂凝胶电泳回收插入 DNA 片段。该片段经 PstI 酶切，并用 T4DNA 聚合酶使其末端补平，然后被亚克隆到用 HindIII 酶切并经 CIP 处理过的 IS1-35S/SK 质粒，得到具有 IS1 区和 IS2 区以串联形式在 35S 启动子区的上游区域的 IS12-35S/SK。

(iv) MU3 的克隆(图 10)

关于 MU3，gDCPAL3-IS12/SK 用 KpnI 酶切，并用 T4DNA 聚合酶使其末端补平，用 ScaI 酶切随后用琼脂凝胶电泳回收得到 1,514bp

DNA 片段。该片段被亚克隆到用 HincII 酶切并经 CIP 处理过的 pBluescript SK 质粒。从含有上述亚克隆的大肠杆菌中提取质粒，并测定核酸序列来检查每个插入 DNA 片段的方向。具有 IS1 的 5' 末端被插入到 pBluescript SK 质粒多克隆位点的 KpnI 端的质粒被选择并被命名为 MU3/SK。用 KpnI 和 HindIII 酶切 MU3/SK 所得的插入 DNA 片段用琼脂糖凝胶电泳回收。并被亚克隆到经 KpnI 和 HindIII 酶切并经 CIP 处理过的 35S/SK 质粒，得到 MU3-35S/SK，其经由 gDCPAL3 来源的区域序列(441 bp)，在 35S 启动子区域的上游区域有 IS1 区和 IS2 区。

(2) IS1, IS2, IS12 和 MU3 插入到植物基因表达载体 (图 11)

pABN-Hm1 (Mita, S., Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. Sugar-inducible expression of a gene for β -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 107: 895-904 (1995); gift from Dr. Kenzo Nakamura at Nagoya Univeristy)用 HindIII 酶切得到 β -淀粉酶启动子(1.7 kb)，其用 T4 DNA 聚合酶补平末端，然后用 XbaI 酶切，CIP 处理，并用琼脂糖凝胶电泳分离得到的 10kbp DNA 片段包含 Ti 质粒区和卡那霉素抗性基因[nos 启动子/新霉素磷酸转移酶 II 的编码区基因 (nptII)/nos 终止子]， β -葡萄糖苷酸酶基因的编码区(GUS)/nos 终止子，潮霉素抗性基因[35S 启动子/潮霉素磷酸转移酶的编码区基因(HPT) /nos 终止子]。在其上亚克隆 35S 片段，其通过用 HindIII 酶切，T4DNA 聚合酶补平并用 XbaI 酶切得到，构建 pAB35S。

所得质粒用 XhoI 和 XbaI 酶切并用 CIP 处理，然后通过切去 35SDNA 片段用琼脂糖凝胶电泳制备载体。按照前述方法所制备的 IS1-35S/SK, IS2-35S/SK, IS12-35S/SK 和 MU3-35S/SK 分别用 XhoI 和 XbaI 酶切，用琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段用于插入（外源基因表达盒）。这些 DNA 片段被连接到上述的载体上并用来转化 *E. coli* DH5 α 。用所得的每种大肠杆菌转化子接种于包含 25 μ g/L 卡那霉素的 LB 琼脂培养基中(1% 酪蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% 氯化钠, 1.5% 用

于细菌培养基的琼脂粉), 用快速质粒 DNA 抽提法从克隆中抽提质粒, 所得到的质粒用限制性酶切图谱来检查, 构建得到 pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35S 和 pMU3-35S/AB35S, 也即将上面的转基因表达盒分别插入到负责卡那霉素抗性的 nptII 基因和为结构基因的 GUS 基因中, 构建物的证实如图 11 所示。

(3) 根癌农杆菌感受态细胞的制备

YEP 固体培养基 (通过在包含 1% 酵母提取物, 1% 细菌蛋白胨和 0.5%氯化钠的 YEP 培养基中加入用于细菌培养基的琼脂粉到达浓度为 1.5%, 随后用高压灭菌固化制备) 上, 用取自甘油保藏的根癌农杆菌 EHA 101 在其上划线涂板, 并在 28°C 避光培养 2 天。长出的根癌农杆菌单克隆被分别用牙签挑取接种到 1.5ml 的 YEP 培养基中并于 28°C 振荡培养过夜。80ml 的 YEP 培养基被放于 500-ml 的烧瓶中, 加入 0.8ml 的根癌农杆菌培养液, 于 28°C 振荡培养直到 $OD_{600} = 0.4$ 。并用冰冷却, 转移到预先用冰冷却过的离心管中, 在 4°C 以 6,000 rpm 离心 5 分钟, 除去上清液, 并加入 20ml 10%的甘油来悬浮沉淀。该过程被重复三次, 培养基被充分的去除来得到根癌农杆菌的感受态细胞。为了保存, 细胞悬浮于 400 μ l 10%甘油中, 悬浮液按照每管 40 μ l 分配到管中, 随后用液氮进行快速冷冻。

(4) 将质粒转入到根癌农杆菌中

如上面 (2) 所得到的构建物 (质粒 pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35S 和 pMU3-35S/AB35S)用电穿孔 (使用 Shimadzu GTE-10)被分别转入到根癌农杆菌的感受态细胞中。具体的, 如上(2)所述制备的每种质粒各约 100ng, 也即 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2), pIS12-35S/AB35S (IS12) 和 pMU3-35S/AB35S (MU3), 以及质粒 pAB35S (35S)作为没有转录活化元件(IS1 和/或 IS2)插入的对照, 分别和 40 μ l 按照上述(3)制备的感受态细胞, 每种混合物被转入到电穿孔池中。给予电脉冲(1.2 kV, 35 μ F, 550 Ω), 并立即加入 1mlYEP 培养基, 并在 28°C 孵育 1 小时。取出约 50 μ l 并涂板

于包含 50 $\mu\text{g/L}$ 潮霉素的 YEP 固体培养基, 然后在 28°C 下避光孵育 2 天。用铂环将已经生长的单一克隆再涂于包含 50 $\mu\text{g/L}$ 潮霉素的 YEP 固体培养基的其它部分之上并于 28°C 孵育 24 小时。取出一部分细胞于 5ml 包含 50 $\mu\text{g/L}$ 潮霉素的 YEP 培养基中在 28°C 振荡培养过夜。

5

实施例 3

(1) 将包含转录活化元件的构建物转入到烟草培养细胞中

用根癌农杆菌, 其中转入有实施例 2 中制备的构建物, 也即 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2) 或 pIS12-35S/AB35S (IS12) (下文中命名为“根癌农杆菌转化子”), 构建物 IS1, IS2 和 IS12 被分别转入到烟草培养细胞中。对照试验中, 转入有 pAB35S (35S) 的根癌农杆菌被使用并按照同样的程序。

首先, 上述的培养于 5ml YEP 液体培养基的根癌农杆菌转化子被转入到 50ml 离心管并在 3,000 rpm 离心 10 分钟。弃去上清液, 25ml 的 Linsmaier & Skoog 培养基(Linsmaier, E. M. and Skoog, F.; Physiol. Plantarum 18, 100-127 (1965); 下文中命名为“Lins 培养基”)被加入到沉淀物中, 经过重新悬浮, 室温下 3,000 rpm 再次离心 10 分钟, 弃去上清液。这个过程被重复 4 次。收集根癌农杆菌的细胞, Lins 培养基被加入用于悬浮使 $\text{OD}_{600} = 0.2$, 加入乙酰丁香酮使其达到 10 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度, 然后重新悬浮。

被用来转入每种构建物的培养的烟草细胞 BY-2(由东京大学 Dr. Toshiyuki Nagata 惠赠)预先培养于 45ml 包含 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)Lins 培养基中, 每隔一周, 1ml 包含细胞的培养液的悬浮液被加入到新鲜的 Lins 培养基中, 使用转入后经过约 100 小时的潜伏期并已经进入对数生长期的细胞。

无菌的 90-mm 培养皿被接种所述烟草培养细胞 BY-2(4ml), 经上述程序清洗的 100 μl 根癌农杆菌转化子细胞被均一的加入到烟草培

养细胞中。经过轻微混合，在 22°C 避光共培养 3 天。

5 然后，12mlLins 培养基被加入到培养细胞液中进行悬浮，悬浮物
被转入到 50-ml 离心管中并以 1,000 rpm 离心 1 分钟，弃去上清。该
程序被重复 4 次。然后，12ml 包含 250 μ g/ml claforan 的 Lins 培养基
被加入并将上述程序重复一次。弃去上清液后，约 25mlLins 培养基被
加入到沉淀细胞中来将其悬浮，取 0.25 μ l 培养基，用血球计对其中的
10 细胞进行计数。细胞被均一的接种于包含 100 μ g/ml 或 300 μ g/ml
卡那霉素（进一步包含 250 μ g/ml 的 claforan）的 Lins 固体选择性培
养基使得每个培养皿中的细胞数目达到 4×10^5 , 6×10^5 , 8×10^5 , $10 \times$
 10^5 或 15×10^5 。它们在 28°C 避光培养。培养后 1 个月，转基因的培
养烟草细胞数目（愈伤组织转化子）在每个皿中形成并且测定其形成
率或产量。所得到的结构出示在表 1 和图 12 中。

表 1

培养于包含卡那霉素的培养基上烟草培养细胞 BY-2 形成的愈伤组织转化子的数目以及愈伤组织转化子的形成率

5

卡那霉素 100 μ g/ml				
细胞数目 ($\times 10^5$)	4	6	8	10
IS1	4 $\pm$ 0 (0.10)	20 $\pm$ 4 (0.33)	43 $\pm$ 3 (0.54)	99 $\pm$ 10 (0.99)
IS2	10 $\pm$ 7 (0.25)	72 $\pm$ 13 (1.20)	84 $\pm$ 4 (1.05)	137 $\pm$ 12 (1.37)
IS12	16 $\pm$ 3 (0.40)	70 $\pm$ 6 (1.67)	124 $\pm$ 16 (1.55)	220 $\pm$ 4 (2.20)
35S (对照)	3 $\pm$ 2 (0.08)	40 $\pm$ 8 (0.67)	47 $\pm$ 2 (0.59)	83 $\pm$ 13 (0.83)

卡那霉素 300 μ g/ml				
细胞数目 ($\times 10^5$)	4	6	8	10
IS1	0 (0.00)	3 $\pm$ 0 (0.05)	10 $\pm$ 3 (0.13)	20 $\pm$ 5 (0.20)
IS2	0 (0.00)	4 $\pm$ 2 (0.07)	36 $\pm$ 4 (0.45)	72 $\pm$ 11 (0.72)
IS12	2 $\pm$ 1 (0.05)	15 $\pm$ 1 (0.25)	41 $\pm$ 2 (0.51)	89 $\pm$ 5 (0.89)
35S (对照)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 $\pm$ 2 (0.04)	37 $\pm$ 16 (0.37)

上：形成的愈伤组织的数目

下：产率 ($\times 10^{-2}$ %)

从上述结果，发现构建物 IS2 或 IS1 的插入到烟草培养细胞中能够增强在包含卡那霉素的培养基中愈伤组织转化子的产量并且其产量高于没有这种元件插入的培养烟草细胞（35S）形成的愈伤组织转化子。具体的，其中引入构建物 IS2 或 IS12 的愈伤组织转化子的产量（转基因的烟草培养细胞）与没有引入这种元件的对照（35S）相比高 1.6 到 2.6 倍。

特别当培养基中卡那霉素的浓度达到 $300\ \mu\text{g/ml}$ 时，可以观察到通过引入构建物 IS2 或 IS12，愈伤组织转化子的产量与对照（35S）相比增加到 10 倍或更高。这表明构建物 IS2 或 IS12 的插入导致了负责卡那霉素抗性的 *ntpII* 基因的表达水平和在所述构建物的附近或边缘区出现的上升。

(2) 烟草愈伤组织转化子的 GUS 活性的测定

基于上述结果，作为报道基因的 GUS 基因的表达被用上述构建物 pIS12-35S/ AB35S(IS12)来检查，以检查上述插入的构建物是否能够增强结构基因的表达。

检查 GUS 基因的表达：首先通过从多个烟草愈伤组织转化子中随机独立的选择愈伤组织，从每个愈伤组织中提取核 DNA，并且经过 Southern 分析证实了基因的转入后，从愈伤组织中提取蛋白并测量 GUS 活性。具体的，取 0.75g 烟草愈伤组织转化子并用 GUS-Light (Tropix, Inc.)抽提蛋白。用 Bio-Rad 的蛋白试剂盒来测定蛋白浓度，然后用 GUS-Light (Tropix)和发光计 Lumat LB905 (Bertold Japan)，GUS 活性测定 5 秒。所得结果出示在图 13 中。在图中，所示的 GUS 活性（纵座标）的按照光度值比每单位重量的蛋白，其通过从光度计所得的光度值除以蛋白重量来计算。

图 13 中很明显的表明：与没有元件插入 pAB35S (35S)所形成的对照相比，转入 IS12 构建物的烟草愈伤组织转化子平均具有超过 2.6

倍的 GUS 活性。从这点，发现通过构建物 IS12 的插入能够显著增加 GUS 基因的表达。

5 这表明上述构建物中包含的每种元件（IS1 元件，IS2 元件，其连接产物（如 IS12 元件））为转录活化元件。

实施例 4 将包含转录活化元件的构建物转入到烟草植物中（叶盘法）

所用的根癌农杆菌带有实施例 2 中制备的构建物，也即将 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2) 或 pIS12-35S/AB35S (IS12)转入其中（下文中命名为“根癌农杆菌转化子”），利用叶盘法将构建物 IS1, IS2 和 IS12 分别转入到烟草叶中。对照试验中，使用转入不含构建物的 pAB35S (35S)的 根癌农杆菌并采用如下所述同样的程序。

15 具体的，每个烟草(SR 1)叶浸入到 10%次氯酸溶液，用药匙作为搅拌器轻柔搅拌 2 分钟以除去气泡，更新溶液并重复同样的程序 5 次。叶子被取出并浸入到灭菌水中，并进行轻柔搅拌。当用新的次氯酸溶液置换原有的溶液时，同样的过程被重复三次。用灭菌的纸巾除去水分后，用软木塞钻孔器在叶子上打孔产生叶盘（叶脉被除去）。然后浸入到 10ml 的灭菌水中。所制备的叶盘浸入到上述培养于 5mlYEP 培养基的根癌农杆菌转化子中（用灭菌水调整 $OD_{600} = 0.25$ ）。然后，细菌悬浮物和叶盘共同倒入灭菌的纸巾中并用另一块灭菌的纸巾除去水分。

25 叶子里面朝外的放置于 MS 感染培养基中，通过补加含 40 mg/L 乙酰丁香酮和 0.2%植物凝胶的 MS 培养基来制备(Murashige, T. and Skoog, F.; *Physiol. Plantarum* 15, 473-497 (1962))，将其于 25°C 避光培养 2 天。然后，每个叶盘通过用 MS 区别培养基（MS 培养基补充有 0.1 mg/L α -萘乙酸, 1 mg/L 苄基腺嘌呤, 150 mg/L 卡那霉素, 500 mg/L claforan 和 0.2%植物凝胶）擦拭除去细菌细胞，然后里面朝外的放置于 MS 区别培养基中在 25°C 进行培养。每隔 2 周用新鲜的 MS 区别培养基置换原来培养基，一个月的潜伏期后，对新生的芽进行计数。所得的结

30

果出示在表 2 中。

表 2
在烟草叶盘上新生芽的数目对照

每个盘芽的数目	35S	IS1	IS2	IS12
0	73	49	56	50
1	26	21	20	23
2	13	17	11	14
3	10	14	8	5
4	3	6	9	8
5	2	1	2	1
6	1	3	3	2
7	0	1	2	5
8	1	0	0	3
9	0	0	0	1
10	0	0	2	1
11	0	0	0	1
12	0	0	0	1
13	0	0	0	0
14	0	0	0	2
全部盘的数目	129	112	113	117
全部芽的数目	118	151	164	244
平均每盘中芽的数目	0.91	1.35	1.45	2.09

5

从上述结果很清楚的表明，与不含元件的对照相比(35S)，当烟草植物包含构建物 IS1 或 IS2 时，其芽的新生率为对照的 1.4 倍，而且特别当其包含 IS1 和 IS2 的串联形式时 (IS12)，所得的芽为对照的两倍。这表明本发明的元件 (IS1 元件，IS2 元件以及两者连接所得产物 (IS12 或者类似物)) 能够增加出现在烟草植物内所述元件附近或边缘区的卡那霉素基因 (nptII 基因) 的活性。这些结果支持了实施例 3 中所得的论断，即本发明中的元件为转录活化元件。

10

实施例 5 将包含转录活化元件的构建物转入到胡萝卜体细胞胚中

15

用根癌农杆菌，其中转入有实施例 2 中制备的构建物，也即 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2), pIS12-35S/AB35S (IS12) 或 pMU3-35S/AB35S (MU3) (下文中命名为“根癌农杆菌转化子”)，构建物 IS1, IS2, IS12 和 MU3 被分别转入到胡萝卜体细胞胚中。对

照试验中，转入有 pAB35S (35S)的根癌农杆菌被使用并按照下述同样的程序。

5 首先，胡萝卜发芽的胚轴在无菌条件下被切成约 1cm 的长度，然后放置于包含 4.5×10^{-6} M 2,4-D (2,4-二氯苯氧基乙酸) 的 MS 培养基中避光培养 24 小时，然后放置于不含 2,4-D 的 MS 培养基中避光培养 3 天。培养基被置换并按照同样的方式培养 7 天使得胡萝卜体细胞胚开始在胚轴上产生。

10 上述的培养于 5ml YEP 液体培养基的根癌农杆菌转化子在 3,000 rpm 离心 10 分钟，弃去上清液，约 30ml MS 培养基被加入到沉淀物中去悬浮细胞。这个过程被重复两次并充分除去 YEP 培养基。然后，在 3,000 rpm 离心 10 分钟，弃去上清液，加入包含 10 mg/L 乙酰丁香酮的 MS 培养基到沉淀中并调整 OD_{600} = 约 0.3。

15 将上面用网收集的胡萝卜胚轴加入到其中，并将混合物轻柔振荡 5 分钟。用灭菌的纸巾擦拭除去胚轴的水分，并将其浸入到包含 10 mg/L 乙酰丁香酮的 MS 培养基中于 22°C 避光培养 3 天。用灭菌的纸巾擦拭除去胚轴的水分，并将其浸入到包含 500 μ g/L 羧苄青霉素的 MS
20 培养基中并用此培养基通过轻柔振荡进行清洗。用同样的方式除去水分，胚轴避光培养于包含 500 μ g/L 羧苄青霉素和 100 μ g/L 卡那霉素的 MS 琼脂培养基上（包含 0.8%琼脂）。经过 1.5 到 3 个月，有新生愈伤组织的胚轴被计数。所得的结果出示在表 3 中。

表 3
含新生愈伤组织的胚轴数目对照

		35S	IS1	IS2	IS12	MU 3
+ 2,4-D	愈伤组织新生的胚轴数目	5	6	10	9	8
	全部胚轴的数目	78	56	60	61	63
	再生百分比(%)	6.4	11	17	15	13
- 2,4-D	愈伤组织新生的胚轴数目	3	9	12	6	4
	全部胚轴的数目	77	62	62	64	58
	再生百分比(%)	3.9	13	19	9.4	6.9

表 3 很清楚的表明，胡萝卜体细胞胚和烟草愈伤组织的例子一样，在包含 2,4-D 培养基(+ 2,4-D)的去分化生长条件和不包含 2,4-D 培养基(- 2,4-D)的分化生长条件下当插入构建物 IS1, IS2, IS12 和 MU3 时能够增强再生的效率。所观察到再生效率增加最大的为插入 IS2 构建物的例子中。

10 实施例 6 将包含转录活化元件的构建物转入到水稻中

用根癌农杆菌，其中转入有实施例 2 中制备的构建物，也即 pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2) 或 pIS12-35S/AB35S (IS12) (下文中命名为“根癌农杆菌转化子”)，构建物 IS1, IS2 和 IS12 被分别转入到水稻的种子中。对照试验中，转入有 pAB35S (35S)的根癌农杆菌被使用并按照同样的程序。

具体的，从充分成熟的水稻种子中(Nihonbare)，首先选择那些外形和颜色都正常的，然后在钵中轻柔去壳。去壳的种子被放置于 50ml Falcon 试管中，加入 2.5%的次氯酸钠，混合物在 100-120 rpm 振荡 20 分钟。然后，弃去上清液，加入灭菌水并轻柔振荡混合物。重复该过程 3 次，种子放置于愈伤组织诱导培养基上并于 28°C 避光培养。

经过 3 到 4 周，愈伤组织从盾片上形成并长出黄色的胚芽，只有那些直径为 2-3mm 并且看上去分散的被放置于新鲜的愈伤组织诱导培养基上并于 28°C 避光培养 7 天。

5 将上述的根癌农杆菌转化子种植于 YEP 固体培养基并于 28°C 避光培养 3 天。用药匙将根癌农杆菌的细胞刮下并加入到 AAI 培养基中 (Toriyama, K. and Hirata, K.; Plant Science 41, 179-183 (1985)), 并补加有乙酰丁香酮, OD₆₀₀ 调整到 0.18 到 0.2。于 25°C 避光振荡培养 1 小时。

10

按照上述方式培养的水稻愈伤组织被放置于灭菌的滤茶器中，并加入上面培养的根癌农杆菌所形成的悬浮液。滤茶器被振荡 3 分钟并间隔的摇晃以保证整个愈伤组织的浸入，然后将滤茶器和其内容物整个放置于灭菌的纸巾上，除去多余的细菌培养液。愈伤组织被放置于共培养培养基中并于 25°C 避光培养 3 天。

15

共培养的愈伤组织被收集到滤茶器中，浸入到补加有 500 mg/l claforan 的灭菌水中，滤茶器被振荡以除去根癌农杆菌，滤茶器和其内容物被共同放置于灭菌的纸巾上除去水分。愈伤组织被放置于选择性培养基中并于 28°C 避光培养。3 到 4 周后，从大量的愈伤组织中随机挑选愈伤组织，取被选定的愈伤组织的一部分并放置于 GUS 染色溶液中(0.75 mM X-Gulc (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡萄糖醛酸), 0.5 mM 高铁氰化钾, 0.5 mM 亚铁氰化钾, 0.3% Triton X-100, 20%甲醇, 50 mM 磷酸缓冲液(pH 7.0))。在 37°C 反应过夜以检测 GUS 的活性。愈伤组织被染成蓝色并且表现出 GUS 活性的为转基因的转化水稻愈伤组织。所得结果出示在表 4 中。

20

25

表 4

水稻愈伤组织用于 GUS 的染色结果

	35S	IS1	IS2
染色的愈伤组织	27	38	44
全部愈伤组织	275	244	228
转化的愈伤组织百分比 (%)	9.8	15.6	19.3

表 4 结果清楚的表明：与对照相比(35S)，转入有构建物 IS1 和 IS2 的转化效率为对照的 1.5 倍和约 2 倍。

上述实施例 1 到 6 表明通过用本发明的转录活化元件(IS1, IS2, IS12, MU3)，再生效率（转化效率）能够被增强。下述的三种可能性被认为是其原因：

- (1) Ti 质粒转入植物细胞的效率被增强的可能性；
- (2) 由于 IS1 和/或 IS2 元件使得 nos 启动子活性增强以及随后 nptII 基因转录起始活性增强使得基因产物数量的增加，并且导致能够在用于选择的包含卡那霉素的培养基中生长的细胞数目增加，共同导致细胞再生的效率被增强的可能性；
- (3) IS1 和/或 IS2 元件活化其附近或边缘区基因或阻止所述基因区被灭活的可能性。

通过 Ti 质粒方式转入的基因不导致在植物染色体的预定位点上的插入，其插入位点是不确定的。所以，所讨论的基因能否插入到活性位点是偶然的，其是由染色体的结构或在隐藏位点的附近通过基因组 DNA 甲基化或其它原因导致基因去活化所决定的。认为如果转基因被转入到隐藏位点，其会被染色体的“场”所影响导致转基因被灭活。

用于上述实施例的构建物中，发现转录活化元件（IS1 或/和 IS2）插入到 nptII 基因（卡那霉素抗性基因）的终止子端，也即卡那霉素

抗性基因的 nos 启动子的相反端。所以，不可能是这些元件对于卡那霉素抗性基因的顺式作用。

5 但是，上述例子中的结果表明即使在本发明中的转录活化元件插入到的位置不能够直接作用于 nos 启动子的情况下，在培养的烟草细胞中卡那霉素抗性细胞（转化的烟草愈伤组织）的数目增加，特别是即使当培养基中的卡那霉素的含量高达 300 mM 时，卡那霉素抗性细胞（转化的烟草愈伤组织）的数目增加(实施例 3 (1))，并且通过将上述的构建物转入到不同植物的植物细胞中时，卡那霉素抗性植物的再生效率增加（实施例 4 到 6）。这些结果表明 IS1 或/和 IS2 元件作用于出现在所述元件附近的卡那霉素抗性基因，不是通过直接导致 nos 启动子顺式活化的模式来起作用，结果细胞保持所述的卡那霉素抗性基因的活性（包括活化和阻止灭活）。因此，这表明可能和传统的作为增强子出现在特定基因启动子附近的转录活化元件（因子）并通过顺式作用于所述启动子来活化转录不同，本发明的转录活化元件当其插入到基因组基因中时，能够活化出现在其附近或边缘的一组基因或多组基因（不论其作用的基因启动子的位置和方向）并且促进转录活性，也即通过上述(3)的机制来起作用。

20 在上述实施例使用的构建物中，IS1 或/和 IS2 元件被插入到 GUS 基因的 35S 启动子端。实施例 3 (2)中插入所述构建物的烟草培养细胞所表现出的 GUS 活性清楚的表明本发明的转录活化元件也能够作用于出现在下游附近的 35S 启动子从而增强 GUS 基因的转录活性。这个结果支持了上面所作的论断并表明本发明的转录活化元件表现出上述(3)中的活性，也即“IS1 或/和 IS2 元件活化其邻近基因区或阻止基因区被灭活”。

30 在上述实施例中，已知不仅在培养细胞（实施例 3）而且在植物组织中，在烟草叶盘试验（实施例 4）中烟草植物胚芽的再生效率被确实的提高，作为从胡萝卜胚轴进行植株再生基础的胚性愈伤的形成

效率增加（实施例 5），并且作为水稻植株再生基础的愈伤组织的形成效率增加（实施例 6），都是通过用本发明中的转录活化元件。这些结果表明本发明的转录活化元件作用于由于位置效应使所讨论的转入植物基因组的外源基因产生基因沉默（灭活）而导致植物细胞变得不能进行植物再生或形成愈伤组织，使得植物再生或形成的效率增加，因此特别有用。

考虑到最近的发现 MITE 如 MAR 一样能够结合核基质(Tikhonov et al., Plant Cell 12: 249-264 (2000))，认为 MITE 能够在核内起和 MAR 相同的作用。基于这点，可以预期本发明中的转录活化元件，MITE 能够单独或和如 MAR 的元件联合使用来产生经遗传修饰的植物来进一步增加植物再生或形成的效率

工业适用性

在产生遗传修饰的植物中要克服的最重要的问题是导致外源基因表达失活的基因沉默现象。在发展遗传修饰植物中为避免基因沉默现象，必须从大量植物个体中选择出那些所讨论的外源基因插入到尽可能少的导致基因沉默的位点的植物个体。

本发明提供新型植物来源的 MITE 类似元件，当所述 MITE 类似元件插入到植物基因组中，非常可能造成基因组结构的变化，基于此，对基因组结构的动态变化有作用，例如能够促进基因组 DNA 的展开或造成核小体结构的变化，通过与常规的增强子元件不同的机制来起作用。

因此，通过使用本发明的 MITE 类似元件的特征，利用不同于以前的技术使调控出现在其附近的基因表达变得可能。也就是，用具有上述特征的本发明的 MITE 类似元件，可以增加或活化转基因技术转入的外源基因降低的表达能力。在这一方面，本发明的 MITE 类似元件可用于构建转基因表达盒和包含所述表达盒的质粒来产生遗传修饰

的生物体并进一步用于稳定的产生能够表达转基因的经遗传修饰的生物体。

5 本发明的转录活化元件包括转座元件例如如上所述的 MITE 类似元件中的一种（优选的为 IS1 元件或/和 IS2 元件），具有抑制和解决植物中进行基因转移由于位置效应造成的基因表达失活现象（基因沉默现象）的活性。因此，可以预期通过本发明的转录活化元件单独使用或和其它参与核 DNA 结构中的元件例如 MAR（基质结合元件）联合使用，可能使基因稳定的表达并显著的减少通常在基因转移后进行的筛选步骤以及用于传种和生长的重组植物数量。

15 基因组大小巨大的植物如百合，菊花和小麦在其基因组内具有大量的隐藏位点，因此外源基因大都被插入到隐藏位点。对于这些植物，用先前技术很难或几乎不可能产生重组植物。相反，用本发明的转录活化元件，可以显著的抑制被引入到植物基因组中的外源基因的基因沉默并可以预期所述元件能够有效的将外源基因转入到如上所述那些被认为很难来产生基因重组的植物中来产生重组植物。

20 本发明的转录活化元件也被认为是能够活化（包括转录活化）被发现出现在其插入位点的附近或边缘区的基因的元件。因此，本发明的转录活化元件被预期不仅使转基因技术能够实用变得可能，即使对于那些如上所述由于基因组过大使基因沉默频繁出现而难于产生遗传修饰的植物而言；而且对于即使已经用于遗传工程的植物种类如大豆，棉花，马铃薯和西红柿而言，也可能增加基因传递的效率，同时，
25 增加有用特性的基因转录的活性，例如除草剂抗性基因和杀虫剂蛋白基因，通过用这些转录活化元件插入到这些有用特性基因的启动子的上游位点或其附近位点。而且与常规的产生遗传修饰植物的方法相比，它们被预期可以产生具有高产量和高质量的遗传修饰植物。

序列表

<110> 小关良宏

<110> 三荣源有限公司

<120> 新的类似微型反向重复转座元件 (MITE) 的转座元件和转录活化元件

<130> P00-14

<150> JP 1999/206316

<151> 1999-07-21

<150> JP 1999/206320

<151> 1999-07-21

<150> JP 2000/175825

<151> 2000-06-12

<160> 14

<210> 1

<211> 769

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 1

```
gggatctttt taaaaatacc catctgtaaa attatttttt taaaaatact accatctttt 60
tcattgtttt taaaaatacc ttttcataaa tttttttttt caaaaatacg atttgcaact 120
tttgcaacct catttgcaac cttgggcggc gcagccgtaa aagttgccag tgaggttgca 180
aaagttgcaa atgagtttgt aaaagttgca aatgaggttg caaaagttgc aaataaaaaat 240
ggaaagttgc aacagttgca actgcaattg caactagttc aactgaaaac tgtaagttgc 300
aaaagttgca aatgaggttg caactaaatg caactgaaaa ctgtaagtaa caacagatgt 360
atggtgtgcc cctggcgggg ccgttagatt acaatagaat caactgaatg caatcatatg 420
```

caactgaata caactatatg caatcatata tgcaattaca aatcctgatt tcaagttcca 480
 gttttcgaat gtcattttcg aaatcgatat atatatatat atatatatat cgatttcgaa 540
 aatgacattc gaaaactgga acttgaaatc aggaattcag ctgcatatga agttgcaaaa 600
 gaggttgcaa cacggctggc gccgcctgta gttgcaaag aggttgcaaa agttgcaaac 660
 agtatTTTTg aaaaaaagat tttatgaaaa ggtattttta aaaataattc tggaaggtag 720
 tatttttgaa aacaataaaa gaaaaggtag gtagttttgt agatttccc 769

<210> 2

<211> 299

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 2

ctccctacgt cccattttat gtgacctcat tttctttttg ggacgtctca aaaaaataa 60
 cctagaatac ttactatttt ttaacactat ttttactat tacaccacc aactctatat 120
 tttatactat tttattatta aataaacact attacacca ctacttttct ccactatctc 180
 aaatctatta ttaaattattg ataggtccac cactttacc acttttcaac tacatttact 240
 acatttttct taatctccgt gaaagtcaaa ctcatcaca taaaatggga cagagggag 299

<210> 3

<211> 1192

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 3

ggtaccgggc cccccctcga ggtcactccc tacgtcccat tttatgtgac ctcatTTTct 60
 ttttgggacg tctcaaaaaa aataacctag aatacttact attttttaac actatttttc 120

```

actattacac ccaccaactc tatatTTTTat actatTTTTat tattaataaa acactattac 180
accactact tttctccact atctcaaadc tattattaaa tattgatagg tccaccactt 240
taccactttt tcaactacat ttactacatt tttcttaadc tccgtgaaag tcaaactcat 300
tcacataaaa tgggacagag ggagtaatta ttaatTTTTaa tagacggtat cgataagctt 360
atcgataccg tctcagattc gcaaacataa aaagaaaagg gatctTTTTa aaaataccca 420
tctgtaaaat tattTTTTta aaaatactac catctTTTTc attgtTTTTa aaaatacctt 480
ttcataaatt tttTTTTtca aaaatacgat ttgcaacttt tgcaacctca tttgcaacct 540
tgggcgggcg agccgtaaaa gttgccagtg aggttgcaaa agttgcaaat gagtttgtaa 600
aagttgcaaa tgaggttgca aaagttgcaa ataaaaatgg aaagttgcaa cagttgcaac 660
tgcaattgca actagttcaa ctgaaaactg taagttgcaa aagttgcaaa tgaggttgca 720
actaaatgca actgaaaact gtaagtaaca acagatgtat ggtgtgcccc tggcggggcc 780
gtagattac aatagaatca actgaatgca atcatatgca actgaataca actatatgca 840
atcatatatg caattacaaa tcttgatttc aagttccagt tttcgaaatgt cattttcgaa 900
atcgatatat atatatatat atatatatcg atttcgaaaa tgacattcga aaactggaac 960
ttgaaatcag gaattcagct gcatatgaag ttgcaaaaaga ggttgcaaca cggctggcg 1020
cgctgtagt tgcaaatgag gttgcaaaaag ttgcaaacag tatttttgaa aaaaagattt 1080
tatgaaaagg tattttttaa aataattctg gaaggtagta tttttgaaaa caataaaaga 1140
aaaggtaggt agttttgtag atttcccaga cctcgagggg gggcccggtta cc 1192

```

<210> 4

<211> 8

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 4

gttgcaaa

8

<210> 5

<211> 8

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 5

gttgcaac

8

<210> 6

<211> 8

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 6

tttgcaaa

8

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 7

tttgcaac

8

<210> 8

<211> 7

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 8

tatgcaa 7

<210> 9

<211> 7

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 9

aatgcaa 7

<210> 10

<211> 158

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 10

gggatctttt taaaaatacc catctgtaaa attatTTTTT taaaaatact accatctttt 60

tcattgtttt taaaaatacc ttttcataaa tttttttttt caaaaatacg atttgcaact 120

tttgcaacct catttgcaac cttgggcggc gcagccgt 158

<210> 11

<211> 158

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 11

acggctggcg ccgcctgtag ttgcaaatga ggttgcaaaa gttgcaaaca gtatttttga 60
aaaaagatt ttatgaaaag gtatttttaa aaataattct ggaaggtagt atttttgaaa 120
acaataaaaag aaaaggtagg tagttttgta gatttccc 158

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 12

ctccctacgt cccattttat gtgacctcat tt 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 13

aaactcattc acataaaatg ggacagaggg ag 32

<210> 14

<211> 1553

<212> DNA

<213> 胡萝卜 (Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 14

ggtaccgggc cccccctcga ggtcactccc tacgtcccat tttatgtgac ctcattttct 60
ttttgggacg tctcaaaaaa aataacctag aatacttact attttttaac actatttttc 120

actattacac ccaccaactc tatatTTTTat actatTTTTat tattaataaa acactattac 180
 acccactact tttctccact atctcaaadc tattattaaa tattgatagg tccaccactt 240
 taccactttt tcaactacat ttactacatt tttcttaadc tccgtgaaag tcaaactcat 300
 tcacataaaa tgggacagag ggagtaatta ttaatTTTaa taaattatat gtgattttga 360
 ttatgtgtgg attcttgata aaatatcaca gagttgatat aaattctaaa gatttaacca 420
 caatgtttca aaatctcata gatttttagta ggattcaaaa aatttaaaat acgttcaaaa 480
 atctcataaa attcatcatt ttattaaadc caaaaaadc cagtaatatt tgacaatcag 540
 attttaatga attttaaatt gaacaatctc agttgaatac catgagattt taaaatataa 600
 tttaaaattc taattgaata ccaccagatt ttgtaaaata atttaaaatt ttaattgaat 660
 attcaagatt ttaatatatt ttaaataadc tcgatctgaa ttacaaaaaa tgcttaaaat 720
 ctgaatccca tacgtcctct cagattcgca aacataaaaa gaaaagggat ctttttaaaa 780
 ataccatctt gtaaaattat ttttttaaaa atactaccat ctttttcatt gtttttaaaa 840
 ataccttttc ataaattttt tttttcaaaa atacgatttg caacttttgc aacctcattt 900
 gcaaccttgg gcggcgcagc cgtaaaagtt gccagtgagg ttgcaaaagt tgcaaatgag 960
 tttgtaaaag ttgcaaatga ggttgcaaaa gttgcaata aaaatggaaa gttgcaacag 1020
 ttgcaactgc aattgcaact agttcaactg aaaactgtaa gttgcaaaag ttgcaaatga 1080
 ggttgcaact aaatgcaact gaaaactgta agtaacaaca gatgtatggt gtgcccctgg 1140
 cggggccggt agattacaat agaatcaact gaatgcaatc atatgcaact gaatacaact 1200
 atatgcaatc atatatgcaa ttacaaatcc tgatttcaag ttccagtttt cgaatgtcat 1260
 tttcgaaatc gatatatata tatatatata tatatcgatt tcgaaaatga cattcgaaaa 1320
 ctggaacttg aaatcaggaa ttcagctgca tatgaagttg caaaagaggc tgcaacacgg 1380
 ctggcgccgc ctgtagttgc aaatgagggt gcaaaagttg caaacagtat tttgaaaaa 1440
 aagattttat gaaaaggat ttttaaaaat aattctggaa ggtagtattt ttgaaaacaa 1500
 taaaagaaaa ggtaggtagt tttgtagatt tcccagacgg tatcgataag ctt 1553

图 1

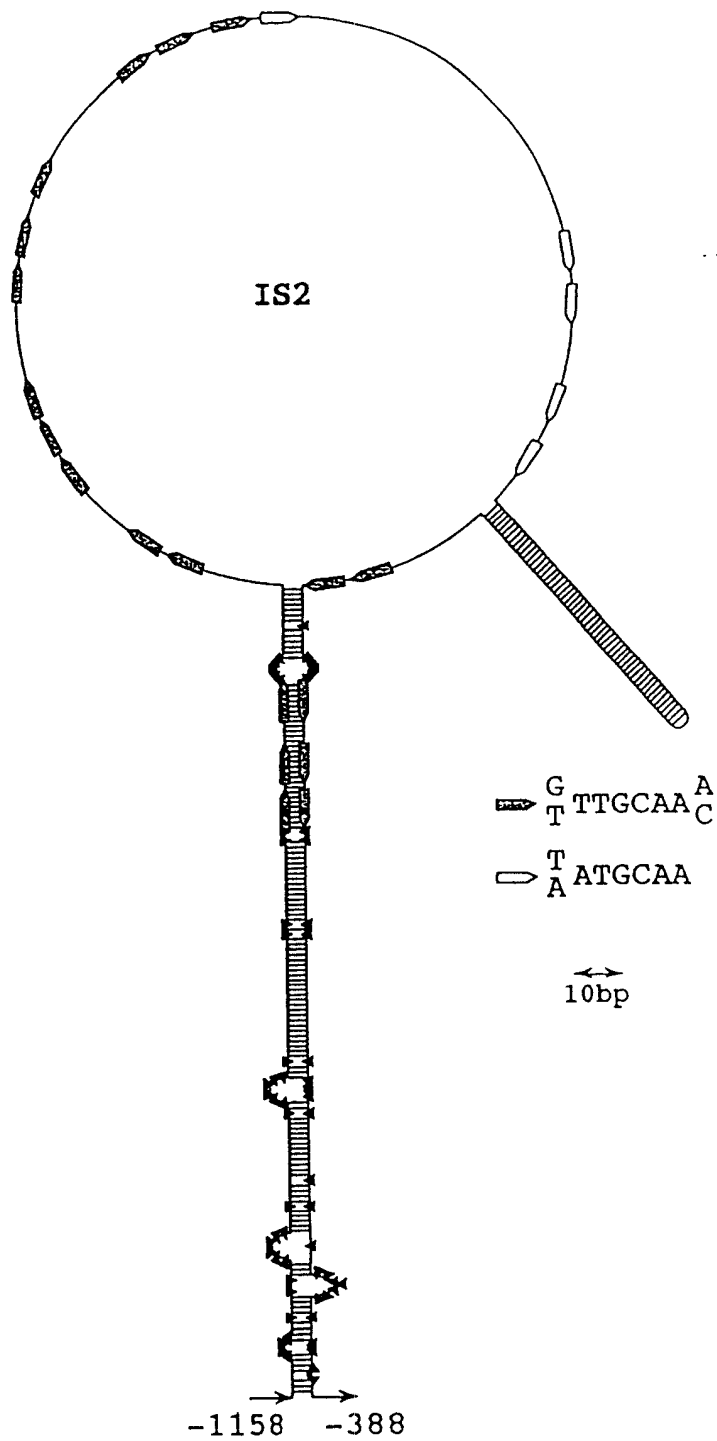


图 2

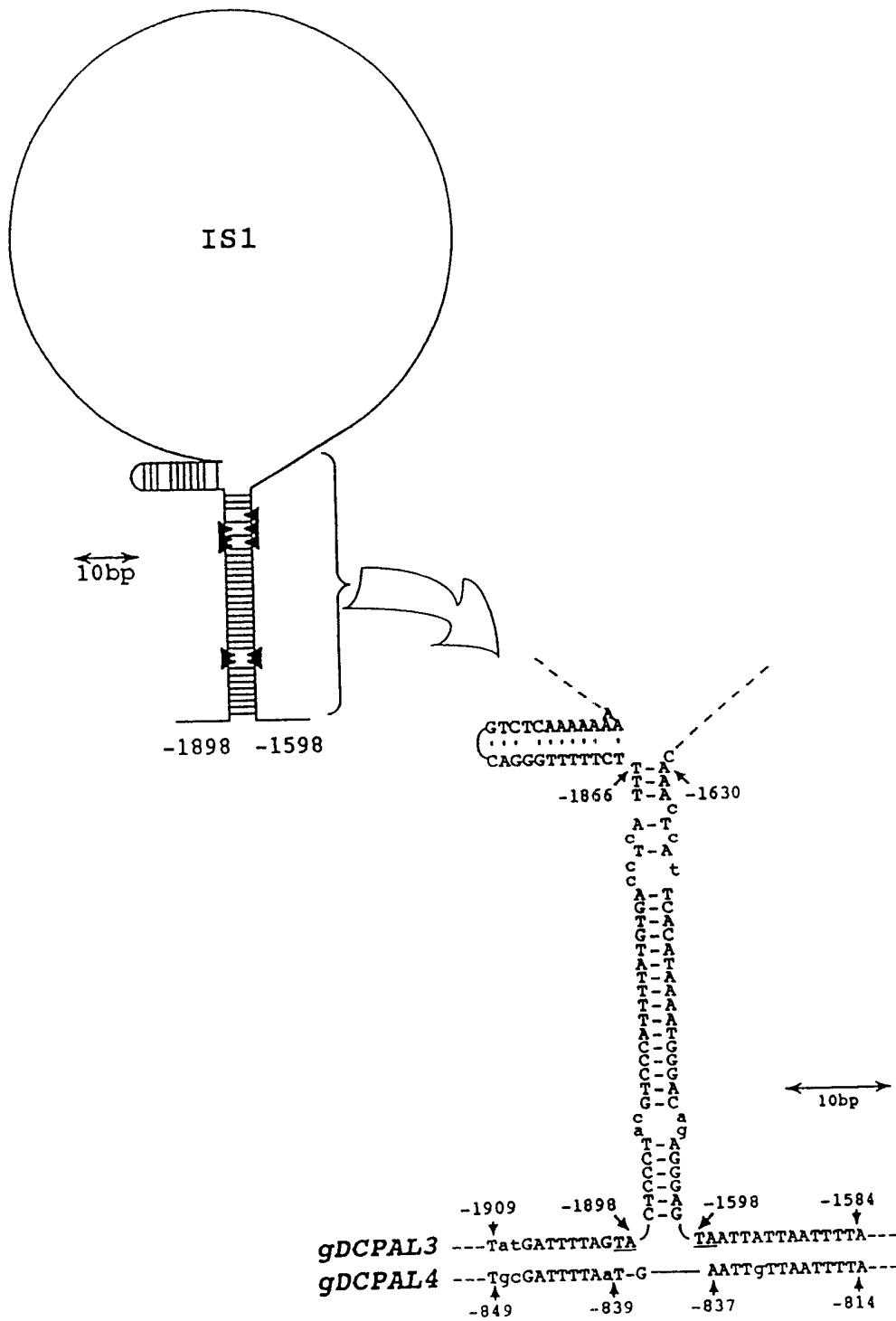


图 3

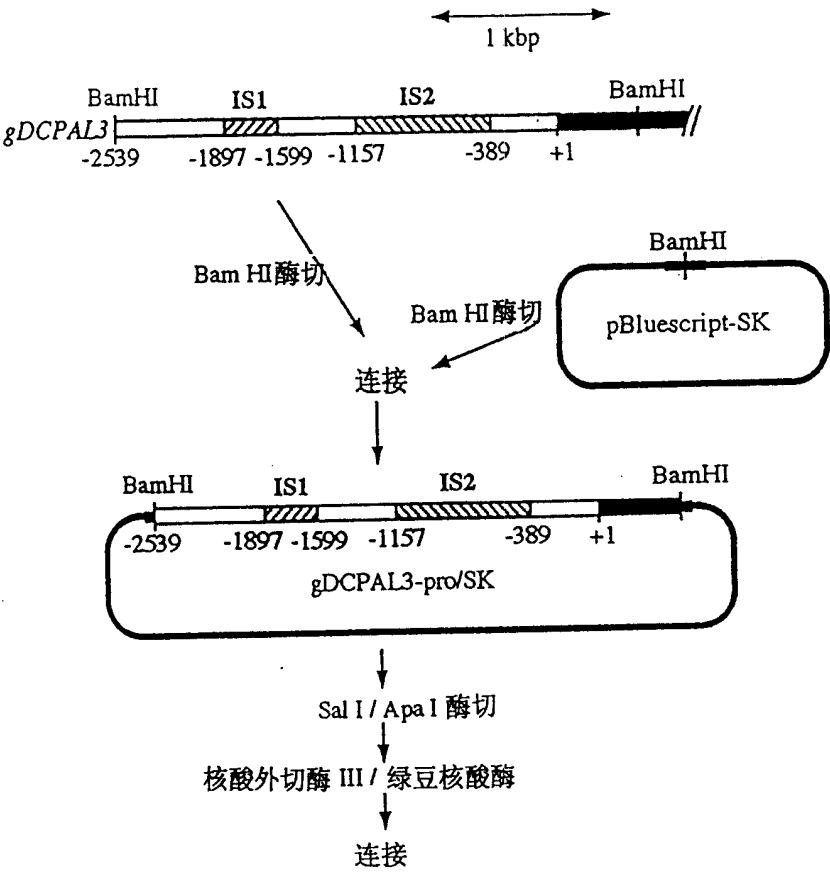


图 4

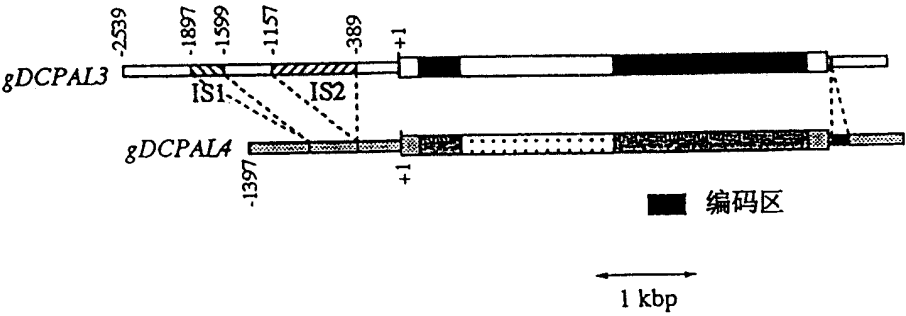


图 5

Stowaway

基因	位置	大小 (bp)
Is1 因子	(5'-1597)	303
胡萝卜 DC8	(5'-514)	253
胡萝卜 DC59	(5'-409)	249
矮牵牛花 CH8	(in1 884)	122
番茄 PAL	(5'-494)	248
欧芹 PR2	(5'-415)	243
烟草 CHM	(5'-209)	244
烟草	(5'-1296)	275
豌豆凝集素	(in5 1835)	220
油菜 KP8P	(in2 922)	259
马铃薯 patatin		
稻 PCNA	(5'-432)	122
玉米蛋白 (3' UTR)		163
小麦 AMY	(5'-458)	100
大麦 RGA1	(in3 839)	159
甘蔗 PIPC	(in6 2675)	267
高粱 PIPC	(5'-469)	255

图 6

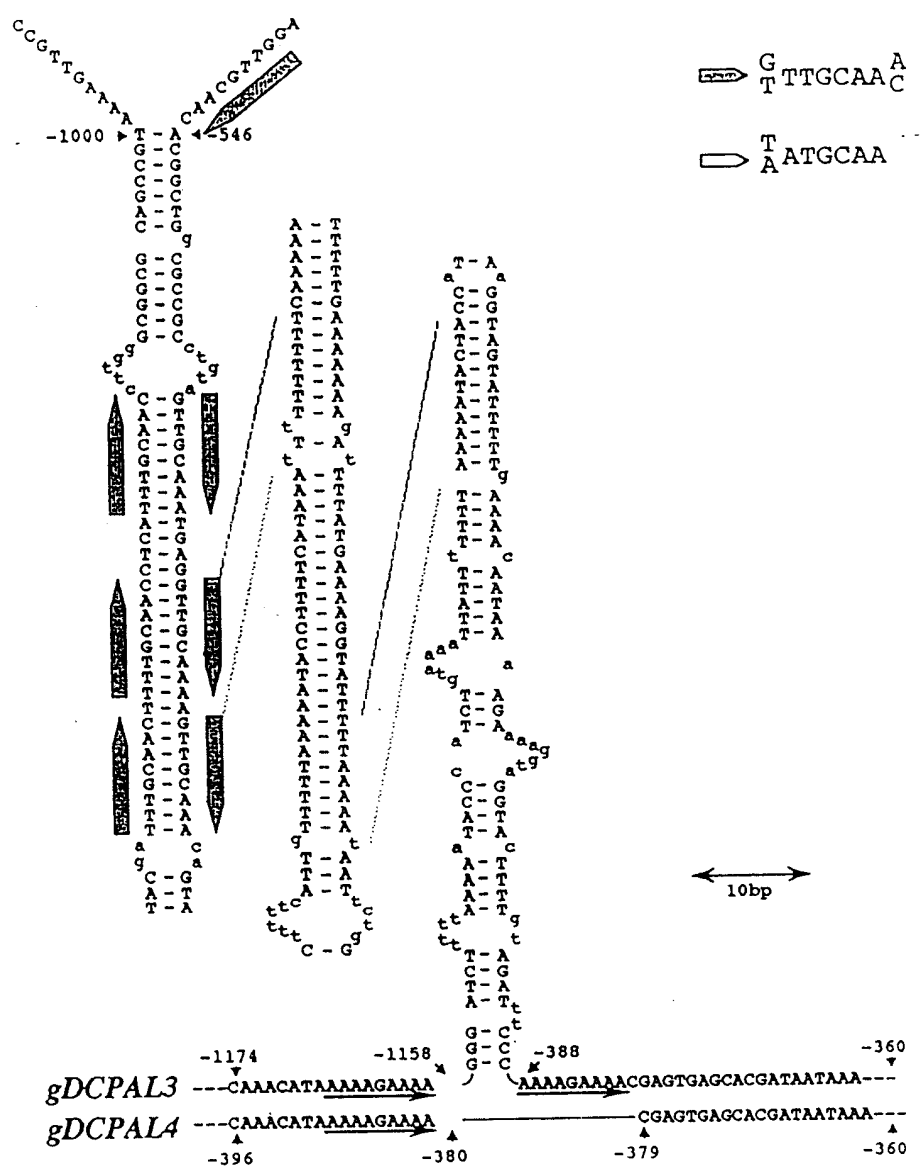


图 7

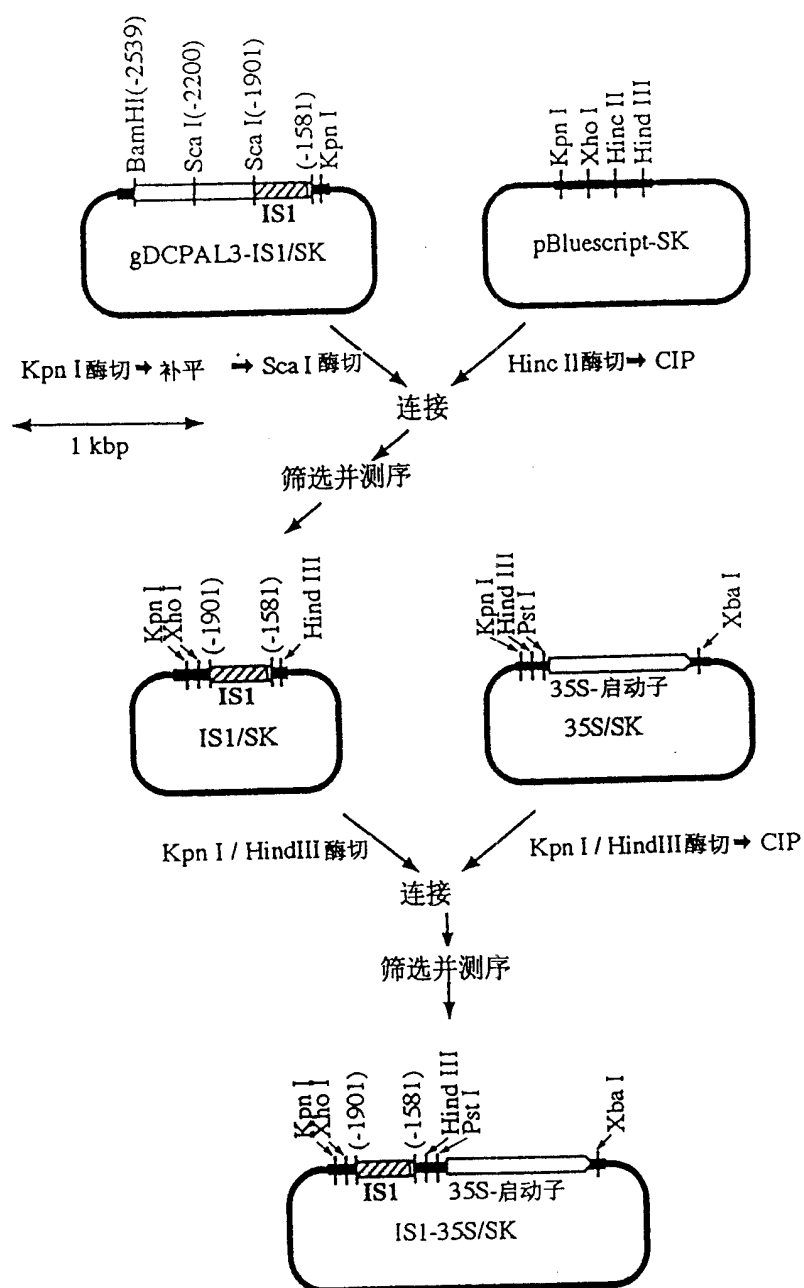


图 8

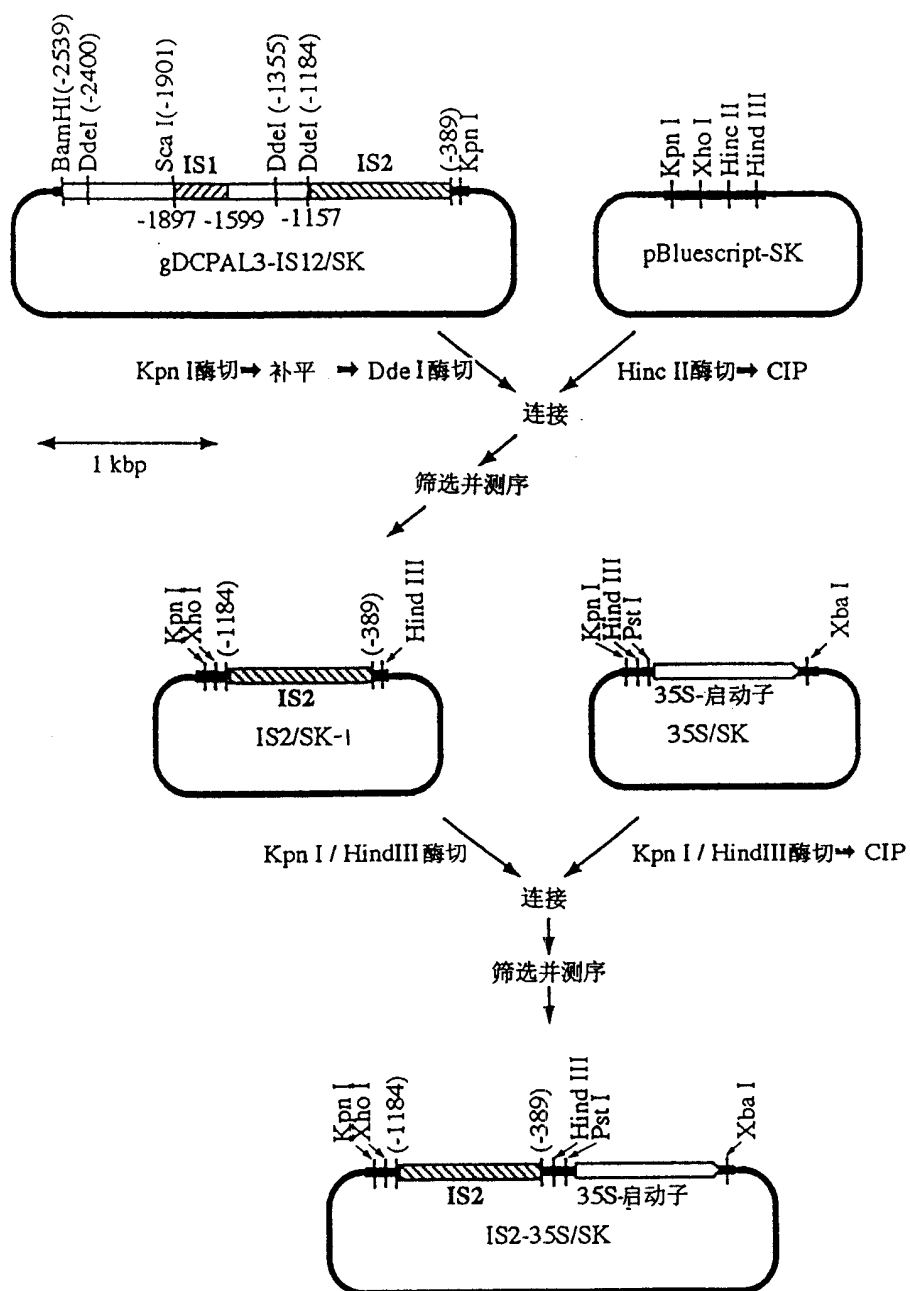


图 9

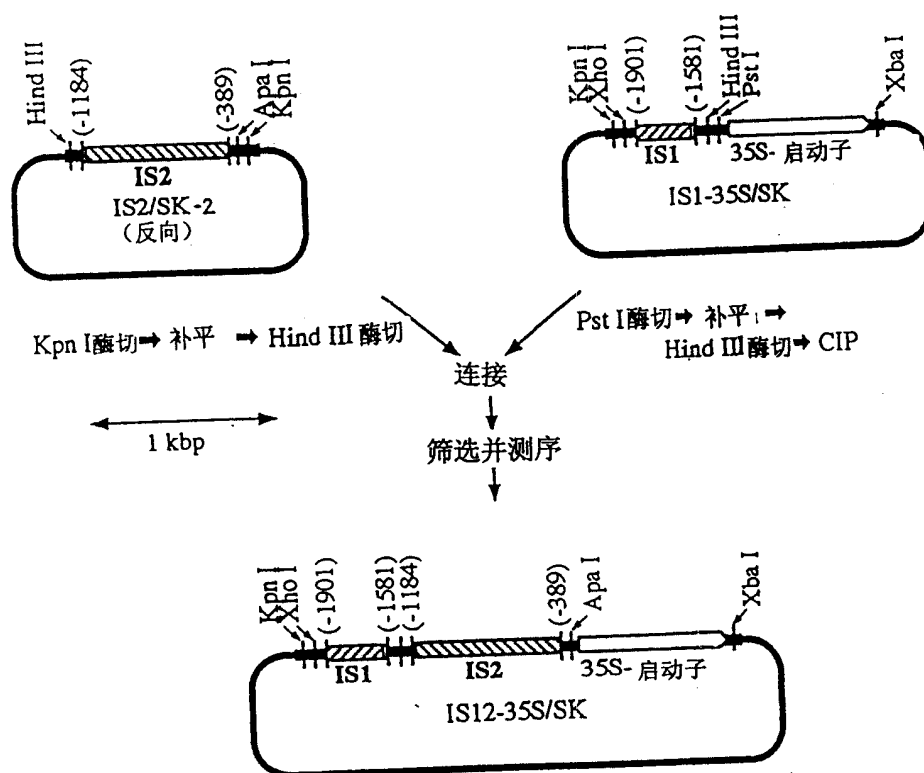


图 10

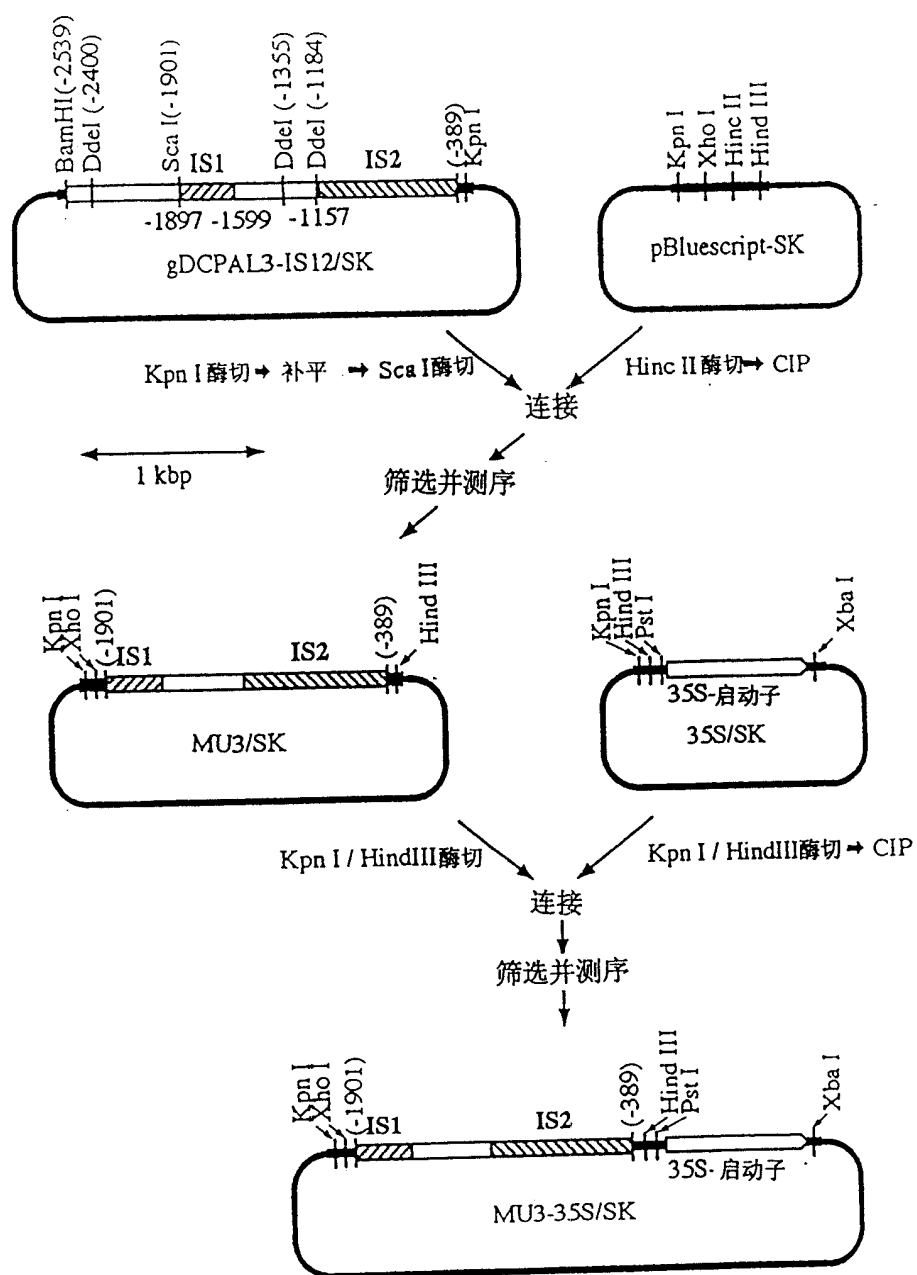


图 11

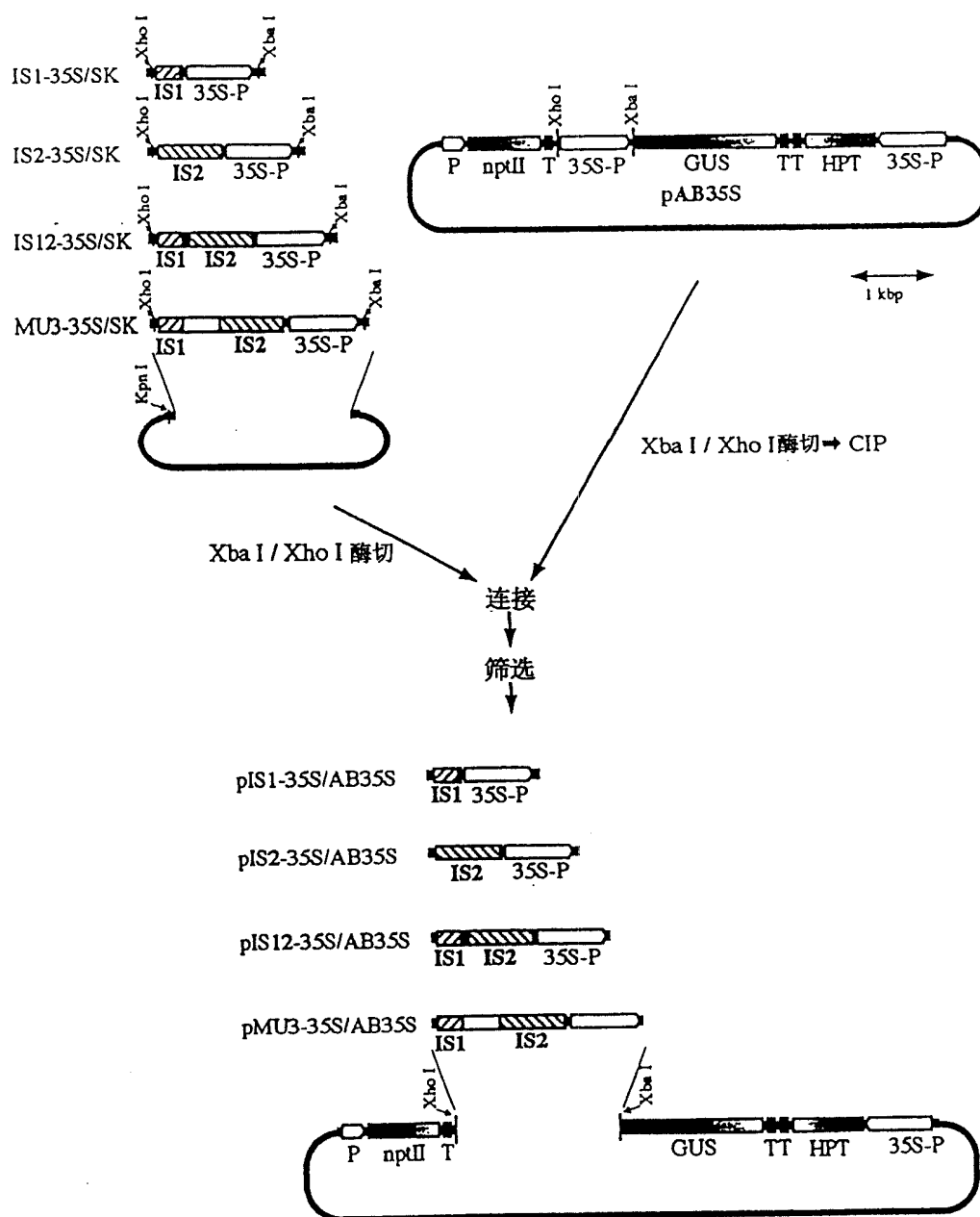


图 12

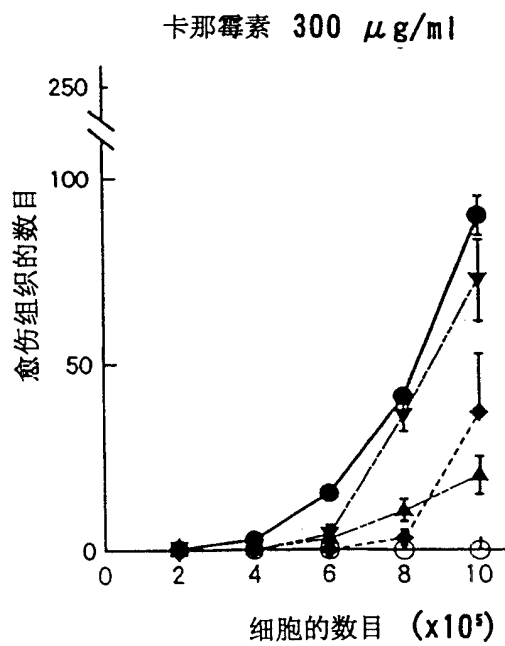
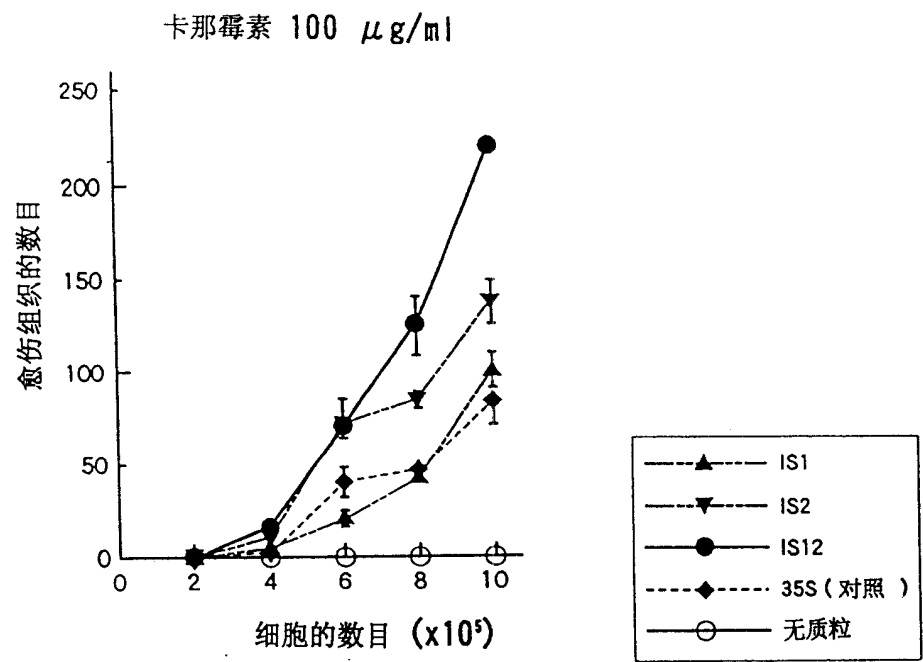


图 13

