



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101896609 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 200880119861. 4

(22) 申请日 2008. 12. 03

(30) 优先权数据

60/992, 273 2007. 12. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/085426 2008. 12. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/073738 EN 2009. 06. 11

(73) 专利权人 陶氏环球技术有限责任公司

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 保罗·G·罗斯勒 拉达·拉索乔瓦

文森特·D·李

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6171864 B1, 2001. 01. 09,

J. F. Todd 等. Structure of the genes encoding the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of castor pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. 《Gene》. 1995, 第 152 卷 181-186.

马三梅等. 种子特异性启动子的研究进展. 《种子》. 2007, 第 26 卷 (第 1 期), 50-53.

审查员 张丽华

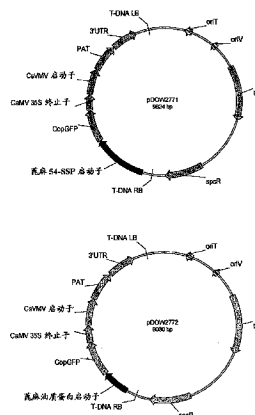
权利要求书1页 说明书10页  
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

来自蓖麻植物的种子优选性基因启动子

(57) 摘要

包含与 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :10 的序列具有至少约 90% 同源性的核苷酸序列的核苷酸序列。公开了与如下核苷酸序列可操作连接的感兴趣核苷酸序列, 所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :10 的序列具有至少约 90% 的同源性。还公开了载体、调节靶物表达的方法、提供包含所述核苷酸序列的细胞、植物、和种子的方法。



1. 一种分离的核苷酸序列,其由 SEQ ID NO :9 组成。
2. 一种植物二元表达载体,其包含权利要求 1 的分离的核苷酸序列。
3. 依照权利要求 2 的载体,其进一步包含感兴趣的核苷酸序列。
4. 权利要求 3 的载体,其中所述感兴趣核苷酸序列编码选自下组的分子:蛋白质、反义寡核苷酸、和 siRNA。
5. 依照权利要求 3 的载体,其进一步包含选择标志。
6. 依照权利要求 5 的载体,其中所述选择标志是膦丝菌素乙酰转移酶基因。
7. 一种促进植物种子细胞中由感兴趣的核苷酸序列编码的分子表达的方法,该方法包括:将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列。
8. 依照权利要求 7 的方法,其中以种子优选性方式促进所述由感兴趣的核苷酸序列编码的分子表达。
9. 权利要求 7 的方法,其中所述由感兴趣的核苷酸序列编码的分子选自下组:蛋白质、反义寡核苷酸、和 siRNA。
10. 一种在植物种子细胞中生成由感兴趣核苷酸序列编码的分子的方法,该方法包括:将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列;向所述植物种子细胞提供所述可操作连接的核苷酸序列;和在植物种子细胞中表达所述感兴趣的核苷酸序列。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述由感兴趣的核苷酸序列编码的分子选自下组:蛋白质、反义寡核苷酸、和 siRNA。
12. 一种在植物种子细胞中调控靶物表达的方法,该方法包括:提供感兴趣的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列编码能够在细胞中调控所述靶物表达的反义寡核苷酸或 siRNA;将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列;向所述植物种子细胞提供所述可操作连接的核苷酸序列;并在植物种子细胞中表达所述感兴趣的核苷酸序列。
13. 依照权利要求 12 的方法,其中所述细胞选自下组:蓖麻属、拟南芥属、向日葵、棉、油菜籽、玉蜀黍、棕榈、烟草、花生和大豆细胞。
14. 依照权利要求 12 的方法,其中所述靶物是基因、寡核苷酸序列、和 / 或蛋白质。
15. 依照权利要求 12 的方法,其中所述靶物选自牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质。
16. 依照权利要求 12 的方法,其中所述靶物选自下组:ACC 酶、FAS、KAS I、KAS II、KAS III、Fad2、和 Fad3。
17. 依照权利要求 10 的方法,其中所述细胞是拟南芥 (*Arabidopsis* sp.) 或蓖麻 (*Ricinus* sp.) 的细胞。
18. 依照权利要求 10 的方法,其中所述感兴趣的核苷酸序列编码 Fad2、Fad3 和 KASII 中的至少一种。
19. 依照权利要求 10 的方法,其中所述细胞是拟南芥或蓖麻的细胞并且其中所述感兴趣的核苷酸序列编码 Fad2、Fad3 和 KASII 中的至少一种。
20. 依照权利要求 12 的方法,其中上述细胞是拟南芥或蓖麻的细胞。

## 来自蓖麻植物的种子优选性基因启动子

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2007 年 12 月 4 日提交的关于“Seed-Preferred Gene Promoters From the Castor Plant”的美国临时专利申请流水号 No. 60/992, 273 的提交日期的权益。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本文中所描述的工作部分得到来自能源部的奖金的支持；奖金号 DE-FC07-01 ID14213。美国政府在发明中可以具有某些权利。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及能够驱动其它核苷酸序列表达的核苷酸序列。

[0006] 发明背景

[0007] 关于产生重组植物的一项重要考虑是使用在驱动转基因表达方面展现出合适活性的基因启动子。启动子不仅能控制基因表达的水平，而且还能控制表达的时机和组织特异性。

[0008] 有兴趣开发可以用于生产具有特定工业效用的脂肪酸的工业含油种子作物。蓖麻植物（蓖麻 (*Ricinus communis*)) 由于其在蓖麻油方面的长期种植历史而成为在这点上特别感兴趣的。因此，在产生蓖麻和其它植物的转基因品种中使用的来自蓖麻的启动子会是本领域中的一项进步。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的例示性实施方案包括包含如下的分离的核苷酸序列的核苷酸序列、载体、细胞、植物、和 / 或种子，所述分离的核苷酸序列包含与 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :10 的序列具有至少约 90% 同源性的核苷酸序列。

[0011] 本发明的别的例示性实施方案包括包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣核苷酸序列的核苷酸序列、载体、细胞、植物、和 / 或种子，所述分离的核苷酸序列包含与 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :10 的序列具有至少约 90% 同源性的核苷酸序列。

[0012] 本发明的别的例示性实施方案包括一种促进由感兴趣的核苷酸序列编码的分子表达的方法，该方法包括：将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列。

[0013] 本发明的别的例示性实施方案包括一种在细胞中生成由感兴趣核苷酸序列编码的分子的方法，该方法包括：将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列；向所述细胞提供所述可操作连接的核苷酸序列；并表达所述感兴趣的核苷酸序列。

[0014] 本发明的别的例示性实施方案包括一种在细胞中调控靶物表达的方法，该方法包括：提供感兴趣的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列编码能够在细胞中调控所述靶物表达的反义寡核苷酸或 siRNA；将权利要求 1 的分离的核苷酸序列可操作连接至所述感兴趣的核苷酸序列；向所述细胞提供所述可操作连接的核苷酸序列；并表达所述感兴趣的核苷酸序列。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 图示性描绘了用于在全植物中测试蓖麻油质蛋白和 54-SSP 启动子的植物二元表达载体。

[0017] 图 2A、图 2B、和图 2C 是 CopGFP 在来自多种组织的提取物中的表达的图示,所述多种组织自用 pDOW2771 (54-SSP 启动子) 转化的 T2 拟南芥植物分离。图 2A 描述了自 6 种不同 T1 系产生的 T2 植物的 CopGFP 表达结果均值 (+/- 标准偏差)。对于每种 T2 系,左侧柱形对应于叶表达,中间柱形对应于发育中的长角果表达,而右侧柱形对应于成熟的种子表达。图 2B 相对于叶中的 GFP 表达描绘了多种组织中的 CopGFP 表达。对于每种 T2 系,左侧柱形对应于叶:叶表达,中间柱形对应于发育中的长角果:叶表达,而右侧柱形对应于成熟的种子:叶表达。图 2C 描绘了各个 T2 系中的 CopGF 表达。RFU = 相对荧光单位;n = 自每种 T1 系检查的 T2 植株的数目。

[0018] 图 3A、图 3B、和图 3C 是 CopGFP 在来自多种组织的提取物中的表达的图示,所述多种组织自用 pDOW2772 (油质蛋白启动子) 转化的 T2 拟南芥植物分离。图 3A 描述了自 7 种不同 T1 系产生的 T2 植物的 CopGFP 表达结果均值 (+/- 标准偏差)。对于每种 T2 系,左侧柱形对应于叶表达,中间柱形对应于发育中的长角果表达,而右侧柱形对应于成熟的种子表达。图 3B 相对于叶中的 GFP 表达描绘了多种组织中的 CopGFP 表达。对于每种 T2 系,左侧柱形对应于叶:叶表达,中间柱形对应于发育中的长角果:叶表达,而右侧柱形对应于成熟的种子:叶表达。图 3C 描绘了各个 T2 系中的 CopGF 表达。RFU = 相对荧光单位;n = 自每种 T1 系检查的 T2 植株的数目。

[0019] 图 4 是拟南芥中的脂肪酸生成的示意图。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明涉及能够驱动其它核苷酸序列表达的核苷酸序列。本发明的一个方面提供了一种分离的核苷酸序列,其包含与选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性的核苷酸序列。在本发明的进一步的方面,此类序列能够充当启动子。

[0022] 本发明的别的方面提供了包含如下的分离的核苷酸序列的载体,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。

[0023] 本发明的别的方面提供了包含如下的分离的核苷酸序列的细胞,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。

[0024] 本发明的别的方面提供了含有包含如下的分离的核苷酸序列的载体的细胞,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。正如本领域普通技术人员会显而易见的是,细胞可以是能够包含核苷酸序列和 / 或载体的任何种类的细胞。依照本发明有用的细胞的例子包括但不限于真核细胞、原核细胞、动物细胞、植物细胞、细菌细胞、种系细胞、种子细胞、拟南芥 (*Arabidopsis sp.*) 细胞、向日葵细胞、棉细胞、油菜籽细胞、玉蜀黍细胞、棕榈细胞、烟草细胞、花生细胞、大豆细胞、和蓖麻 (*Ricinus sp.*) 细胞。

[0025] 本发明的别的方面提供了包含如下的分离的核苷酸序列的植物,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。依照本发明有用的植物的例子包括但不限于向日葵、棉、油菜籽、玉蜀黍、棕榈、烟草、花生、大豆、拟南芥、和蓖麻。

[0026] 本发明的别的方面提供了包含如下的分离的核苷酸序列的种子,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。依照本发明有用的种子的例子包括但不限于来自向日葵、棉、油菜籽、玉蜀黍、棕榈、烟草、花生、大豆、拟南芥、和蓖麻的种子。

[0027] 本发明的别的方面提供了与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣的核苷酸序列,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。

[0028] 本发明的别的方面提供了包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣的核苷酸序列的载体,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。

[0029] 本发明的别的方面提供了包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣的核苷酸序列的细胞,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。

[0030] 本发明的别的方面提供了含有包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣核苷酸序列的载体的细胞,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。正如本领域普通技术人员会显而易见的是,细胞可以是能够包含核苷酸序列和 / 或载体的任何种类的细胞。依照本发明有用的细胞的例子包括但不限于真核细胞、原核细胞、动物细胞、植物细胞、细菌细胞、种系细胞、种子细胞、向日葵细胞、棉细胞、油菜籽细胞、玉蜀黍细胞、棕榈细胞、烟草细胞、花生细胞、大豆细胞、拟南芥细胞、和蓖麻细胞。

[0031] 本发明的别的方面提供了包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣的核苷酸序列的植物,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。依照本发明有用的植物的例子包括但不限于向日葵、棉、油菜籽、玉蜀黍、棕榈、烟草、花生、大豆、拟南芥、和蓖麻。

[0032] 本发明的别的方面提供了包含与如下的分离的核苷酸序列可操作连接的感兴趣核苷酸序列的种子,所述分离的核苷酸序列与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性。依照本发明有用的种子的例子包括但不限于来自向日葵、棉、油

菜籽、玉蜀黍、棕榈、烟草、花生、大豆、拟南芥、和蓖麻的种子。

[0033] 正如本领域普通技术人员会显而易见的是,感兴趣的核苷酸序列可以是希望表达的任何核苷酸序列。感兴趣的核苷酸序列的例子包括但不限于编码蛋白质、核酶、反义 RNA、siRNA、RNAi 分子、标志物、报告物、酶、信号传导分子、牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质、靶向编码牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质的 RNA 的反义 RNA、和靶向编码牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质的 RNA 的 siRNA 和 / 或 RNAi 分子的核苷酸序列。

[0034] 本发明的别的方面提供了表达感兴趣的核苷酸序列的方法。此类方法的一个例子包括将感兴趣的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列,其与选自 SEQ ID NO : 9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性;并容许感兴趣的核苷酸序列进行表达。正如本领域普通技术人员会显而易见的是,容许感兴趣的核苷酸序列进行表达一般涉及给可操作连接的核苷酸序列提供或将可操作连接的核苷酸序列提供至容许感兴趣的核苷酸序列表达的环境。容许感兴趣的核苷酸序列表达的环境的例子一般是本领域已知的,包括但不限于至少一种 dNTP 和聚合酶的任何环境,诸如但不限于体外转录试剂盒、PCR 反应、细胞、真核细胞、原核细胞、动物细胞、植物细胞、细菌细胞、种系细胞、种子细胞、向日葵细胞、棉细胞、油菜籽细胞、玉蜀黍细胞、棕榈细胞、烟草细胞、花生细胞、大豆细胞、拟南芥细胞、和蓖麻细胞。

[0035] 正如本领域普通技术人员应当领会的,可以使用本领域已知的任何规程将可操作连接的核苷酸序列提供至容许表达的环境。此类方法的例子包括但不限于使用例如 Lipofectin 或 Lipofectamine 进行的转染、土壤杆菌介导的导入(参见例如 Chistou(1996), Trends Plant Sci., 1:423-432; 及 Hooykaas 和 Schilperoot(1992), Plant Mol. Bio., 19:15-38)、浸花(floral dip)(参见例如 Clough 和 Bent(1998), Plant J., 16(6)735-743)、电穿孔(参见例如 Shigekawa 和 Dower(1988), Biotechniques, 6:742; Miller 等(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:856-860; 及 Powell 等(1988), Appl. Environ. Microbiol., 54:655-660);直接的 DNA 摄取机制(参见例如 Mandel 和 Higa(1972), J. Mol. Biol., 53:159-162; Dityatkin 等(1972), Biochimica et Biophysica Acta, 281:319-323; Wigler 等(1979), Cell, 16:77; 及 Uchimiya 等(1982), 于: Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, A. Fujiwara(编), Jap. Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo, 第 507 页 - 第 508 页);融合机制(参见例如 Uchidaz 等(1980), 于: Introduction of Macromolecules Into Viable Mammalian Cells, Baserga 等(编) Wistar Symposium Series, 1:169-185);感染剂(参见 Fraley 等(1986), CRC Crit. Rev. Plant Sci., 4:1-46);和 Anderson(1984), Science, 226:401-409);显微注射机制(参见例如 Crossway 等(1986), Mol. Gen. Genet., 202:179-185);和高速度射弹机制(参见例如 Miller, Schuchardt, Skokut 和 Gould(Dow Chemical Company)的 EP0 0405 696)。

[0036] 本发明的具体的实施方案提供了以种子优选性方式表达感兴趣的核苷酸序列的方法。此类方法的一个例子包括:将感兴趣的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列,其与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性;向种子细

胞直接或间接提供所述可操作连接的核苷酸序列；并容许感兴趣的核苷酸序列表达。

[0037] 本发明的其它实施方案提供了降低靶蛋白质水平的方法。此类方法的一个例子包括：提供编码能够结合编码靶蛋白质的 RNA 的反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列；将编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列，其与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性；并容许编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列表达。

[0038] 本发明的其它方面提供了以种子优选性方式降低靶蛋白质的水平的方法。此类方法的一个例子包括：提供编码能够结合编码靶蛋白质的 RNA 的反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列；将编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列，其与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性；向种子细胞直接或间接提供所述可操作连接的核苷酸序列；并容许编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列表达。

[0039] 本发明的别的方面提供了改变种子的脂肪酸含量的方法。此类方法的一个例子包括：将编码牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列，其与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性；向种子细胞直接或间接提供所述可操作连接的核苷酸序列；并容许感兴趣的核苷酸序列表达。牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质的例子包括但不限于 ACC 酶、FAS、KAS I、KAS II、KAS III、Fad2、和 Fad3。

[0040] 改变种子的脂肪酸含量的方法的别的例子包括：提供编码能够结合编码牵涉脂肪酸合成、降解、贮存、和 / 或调节的蛋白质的 RNA 的反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列；将编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列可操作连接至如下的分离的核苷酸序列，其与选自 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列具有至少约 60% 同一性、至少约 70% 同一性、至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性、或至少约 95% 同一性；向种子细胞直接或间接提供所述可操作连接的核苷酸序列；并容许编码反义 RNA 和 / 或 siRNA 的核苷酸序列表达。

[0041] 如本文中所使用的，“启动子”指牵涉 RNA 聚合酶和其它蛋白质识别和结合以启动转录的 DNA 区域，一般在转录起始位点上游。启动子可以包括增强子和阻抑物。

[0042] 如本文中所使用的，“可操作连接的”指核苷酸序列被连接以使得以其预期方式发挥功能。“可操作连接的”序列可以或者不可以是直接邻接的。例如，与感兴趣的核苷酸序列可操作连接的启动子可以以如下方式连接和定位，所述方式使得其能够驱动感兴趣的核苷酸序列表达。

## 实施例

[0043] 本发明在以下实施例中进一步的描述，所述实施例作为例示提供，而并不意图以任何方式限制本发明。

[0044] 实施例 1

[0045] 启动子分离

[0046] 经由随机 cDNA 测序方案来鉴定编码豆球蛋白样 (“54-SSP”) 和油质蛋白蛋白质的基因, 其中使用基于序列的与已知基因的同源性来实现基因注解。经由基于 PCR 的“基因组步行”使用基因组 Walker™ 试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc.) 依照制造商的指令来分离这些选定基因的启动子。在此技术中, 首先将具有已知序列的短寡核苷酸接头分子连接至已经用数种不同平端切割限制性酶消化过的蓖麻基因组 DNA 的末端上。使用退火至接头分子的正向 PCR 引物和特异性退火至 54-SSP 或油质蛋白基因编码区内的 DNA 的反向 PCR 引物来实施初次 PCR 反应。然后实施使用巢式引物进行的第二轮 PCR, 其也基于已知的接头和基因特异性序列。使用此策略, 分离选定编码序列上游的 DNA 序列, 将其插入克隆载体 pCR2.1 (Invitrogen Corp.) 中, 并对其测序。下文显示了此方法中所使用的引物。

[0047] 54-SSP 引物

[0048] 初次 PCR 反应引物:

[0049] 接头引物 1 (正向引物): 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3' (SEQ ID NO :1)

[0050] 54-SSP 引物 B (反向引物): 5' GAG AGC AGC GAA GAA GGC TGA ACCATA G 3' (SEQ ID NO :2)

[0051] 巢式 PCR 反应引物:

[0052] 巢式接头 (adaptor) 引物 2 (正向引物): 5' ACT ATA GGG CAC GCG TGGT 3' (SEQ ID NO :3)

[0053] 54-SSP 引物 A (反向引物): 5' GAG AGC CAT GGA AGA GAA CAA GTAGGAA 3' (SEQ ID NO :4)

[0054] 油质蛋白引物

[0055] 初次 PCR 反应引物:

[0056] 接头引物 1 (正向引物): 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3' (SEQ ID NO :5)

[0057] 油质蛋白引物 B (反向引物): 5' ATA GGC TTG CAG AAT CAG AGC TTCTGG TTA 3' (SEQ ID NO :6)

[0058] 巢式 PCR 反应引物:

[0059] 巢式接头引物 2 (正向引物): 5' ACT ATA GGG CAC GCG TGG T 3' (SEQ ID NO :7)

[0060] 油质蛋白引物 A (反向引物): 5' GGT GAC TAA CAA CCG GTG ATTGTT GAT GCT 3' (SEQ ID NO :8)

[0061] 一旦测定以此方式获得的启动子片段的序列, 便有可能生成别的 PCR 产物, 其中将特定的克隆位点建造入引物序列中以便于表达载体构建。

[0062] 54-SSP 启动子的共有核苷酸序列 (就在 54-SSP 起始密码子前的 1124 个碱基对) 可参见 SEQ ID NO :9。

[0063] 油质蛋白启动子的共有核苷酸序列 (就在油质蛋白起始密码子前的 528 个碱基对) 可参见 SEQ ID NO :10。应当注意, 用于油质蛋白启动子测试的克隆具有 PCR 产生的序列错误, 其中第 234 位的 T 被 A 替换。

[0064] 实施例 2

[0065] 启动子的测试

[0066] 经由使用报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 在全植物 (拟南芥 (Arabidopsis thaliana)) 中测试油质蛋白和 54-SSP 基因启动子的活性。构建供拟南

芥转化用的二元载体,其具有的表达盒具有 CopGFP 基因 (Evrogen) 上游的油质蛋白或 54-SSP 启动子,接着有花椰菜花叶病毒 35S 终止子区。图 1 中显示了下列载体的图谱: pDOW2771-54-SSP 启动子可操作连接至 CopGFP 报告基因;和 pDOW2772-油质蛋白启动子可操作连接至 CopGFP 报告基因。

[0067] 通过浸花法转化拟南芥植物 (Clough 和 Bent (1998) Plant Journal 16 :735-743)。二元载体含有膦丝菌素乙酰转移酶 (PAT) 基因,其容许在除草剂草丁磷上选择转化体。为了测定启动子是否主要在种子中有活性,自第一代 (T1) 转化体收集某些组织,包括叶、发育中的长角果、和成熟的种子。对这些组织测试 CopGFP 荧光,如下文所描述的。种植来自 T1 植株的种子以产生 T2 植株,也自其采集叶、发育中的长角果、和成熟的种子样品,并进行分析。通过如下 CopGFP 测定法规程来分析组织样品:

[0068] CopGFP 测定法:在组织匀浆器中将组织样品在 1X CCLR 缓冲液 (细胞培养物溶胞缓冲液 5X 试剂 (Promega Corp., 产品目录编号 E153A), 其含有 125mM 具有  $H_3PO_4$  的 Tris (pH 7.8)、10mM CDTA、10mM DTT、50% 甘油和 5% Triton X-100) 中碾碎 1 分钟。将样品放置在干冰上,直至进一步使用。于 4°C 以 14K x g 将提取物离心 15 分钟。将上清液流体转移入另一管中,并用于进一步分析。将 200  $\mu$ l 每种上清液放置在 Costar 96 孔平底微量滴定板 (Corning, Inc., 产品目录编号 3915) 中,并使用 SpectraMax Gemini XS 微板读板仪 (MolecularDevices, Inc.) 来测量荧光。使用含有表达 CopGFP 的大肠杆菌菌株的培养物作为标准。用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (Pierce Biotechnology, Inc.; 产品目录编号 23225) 来测定组织提取物的蛋白质浓度。荧光表示为每 mg 蛋白质的荧光。一式两份实施所有实验。

[0069] 图 2 和图 3 中呈现了这些研究的结果。对于 54-SSP 启动子和油质蛋白启动子两者,在种子中比在营养叶材料中有多得多的活性。发育中的长角果含有营养组织和发育中的种子两者,并且这些组织中的启动子活性介于叶组织和成熟种子的启动子活性之间。

[0070] 使用荧光素酶基因作为报告基因在拟南芥植物中实施对油质蛋白启动子的别的测试。这些实验的结果也指明油质蛋白启动子在种子中的活性较高。

[0071] 实施例 3

[0072] 用于调控脂肪酸合成基因的载体

[0073] 如实施例 2 中所概述的那样创建用于调控脂肪酸合成蛋白的载体。创建 54-SSP 启动子控制下的编码脂肪酸合成蛋白的下列载体:

[0074] pSSP:Fad2-54-SSP 启动子可操作连接至 Fad2 基因;

[0075] pSSP:Fad3-54-SSP 启动子可操作连接至 Fad3 基因;和

[0076] pSSP:KASII-54-SSP 启动子可操作连接至 KASII 基因。

[0077] 创建油质蛋白启动子控制下的编码脂肪酸合成蛋白的下列载体:

[0078] p0leo:Fad2-油质蛋白启动子可操作连接至 Fad2 基因;

[0079] p0leo:Fad3-油质蛋白启动子可操作连接至 Fad3 基因;和

[0080] p0leo:KASII-油质蛋白启动子可操作连接至 KASII 基因。

[0081] 创建 54-SSP 启动子控制下的编码针对脂肪酸合成蛋白的反义分子的下列载体:

[0082] pSSP:Fad2:AS-54-SSP 启动子可操作连接至针对 Fad2 RNA 的反义物;

[0083] pSSP:Fad3:AS-54-SSP 启动子可操作连接至针对 Fad3 RNA 的反义物;

- [0084] pSSP:KASII:AS-54-SSP 启动子可操作连接至针对 KASII RNA 的反义物。
- [0085] 创建油质蛋白启动子控制下的编码针对脂肪酸合成蛋白的反义分子的下列载体：
- [0086] p0leo:Fad2:AS- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 Fad2 RNA 的反义物；
- [0087] p0leo:Fad3:AS- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 Fad3 RNA 的反义物；和
- [0088] p0leo:KASII:AS- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 KASII RNA 的反义物。
- [0089] 创建编码针对脂肪酸合成蛋白的 siRNA 分子的载体。可以设计 siRNA 分子以表达如下的 RNA 分子,所述 RNA 分子与自身杂交以形成包含单链环区和碱基配对茎的发夹结构。碱基配对的茎区包含对应于整个或部分编码就是要抑制其表达的基因的内源信使 RNA 的有义序列,和与有义序列完全或部分互补的反义序列。如此,分子的碱基配对茎区一般决定 RNA 干扰的特异性。这些发夹 RNA 分子在抑制内源基因表达方面是高度有效的,而且它们诱导的 RNA 干扰被后续世代继承。参见例如,Chuang 和 Meyerowitz (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 :5985-5990 ;Stoutjesdijk 等 (2002)Plant Physiol.129 :1723-1731 ;及 Waterhouse 和 Helliwell (2003)Nat. Rev. Genet. 5 :29-38。用于使用 hpRNA 干扰来抑制或沉默基因表达的方法记载于例如 Chuang 和 Meyerowitz (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 :5985-5990 ;Stoutjesdijk 等 (2002)Plant Physiol. 129 :1723-1731 ;Waterhouse 和 Helliwell (2003)Nat. Rev. Genet. 5 :29-38 ;Pandolfini 等 BMC Biotechnology 3 :7,及美国专利公开文本 No. 20030175965。关于发夹 RNA 构建体在体内沉默基因表达的功绩的瞬时测定法已经记载于 Panstruga 等 (2003)Mol. Biol. Rep. 30 :135-150。
- [0090] 创建在 54-SSP 启动子控制下的编码针对脂肪酸合成蛋白的 siRNA 分子的下列载体：
- [0091] pSSP:Fad2:si-54-SSP 启动子可操作连接至针对 Fad2 RNA 的 siRNA ；
- [0092] pSSP:Fad3:si-54-SSP 启动子可操作连接至针对 Fad3 RNA 的 siRNA ；和
- [0093] pSSP:KASII:si-54-SSP 启动子可操作连接至针对 KASII RNA 的 siRNA。
- [0094] 创建在油质蛋白启动子控制下的编码针对脂肪酸合成蛋白的反义分子的下列载体：
- [0095] p0leo:Fad2:si- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 Fad2 RNA 的 siRNA ；
- [0096] p0leo:Fad3:si- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 Fad3 RNA 的 siRNA ；和
- [0097] p0leo:KASII:si- 油质蛋白启动子可操作连接至针对 KASII RNA 的 siRNA。
- [0098] 实施例 4
- [0099] 拟南芥和蓖麻种植和转化
- [0100] 在正常的条件下种植拟南芥和蓖麻。通过电穿孔将载体导入根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 pMP90 中,并用于通过浸花法转化拟南芥和蓖麻植物 (N. Bechtold, J. Ellis, 和 G. Pelletier (1993)C. R. Acad. Sci. Paris 316, 1194-1198)。还使用高速度颗粒来导入载体,并在初始开花后约 5 天实施感染原转化 (infectious agent transformation)。
- [0101] 实施例 5
- [0102] 测定拟南芥和蓖麻种子中的脂肪酸含量
- [0103] 脂肪酸分析:使种子甲基化 (1ml 1N HCl、甲醇, Supelco, 80°C 达 1 小时),用己烷

提取,并进行三甲基硅烷化(trimethylsilylate)(100  $\mu$ l BSTFA-TMCS(二(三甲硅烷基)三氟乙酰胺三甲基硅烷), Supelco, 90°C达45分钟)。通过蒸发来除去BSTFA-TMCS,并将样品在乙烷中重悬。在装备有5973质量选择检测器(GC/MS)和Supelco SP-2340氰基毛细管柱(60m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m)的Hewlett-Packard 6890气体层析仪上分析样品。将注射器保持在225°C,炉温度有所变化(以15°C/分钟的100-240°C,接着是240°C达5分钟),并且氢流速为1.1ml/分钟。基于洗脱时间对真实标准品来实施峰身份的分配,并基于其质谱来确认。使用Hewlett-Packard Chemstation软件来实施定量。

#### [0104] 实施例6

##### [0105] 调控拟南芥和蓖麻中的脂肪酸合成

[0106] 比较三种调控经由Fad2进行脂肪酸合成的方法(基因表达、反义表达、siRNA表达)。选择三种基因来比较基因阻抑的三种方法(12-去饱和酶FAD2和15-去饱和酶FAD3,因为它们容易进行评分;而且FAD2由于其之前在评估基因表达降低方面已经使用过),以及 $\beta$ -酮脂酰-ACP合酶(KAS)II。图4中描绘了这些酶与脂肪酸合成之间的关系。

[0107] 选择种子进行分析,因为它们容许通过气相层析对其组成进行可再现的定量分析,而且因为它们容许对峰进行质谱分析以定性确认峰作为特定脂肪酸的分配。使用学生(Student)T检验将显著性归入均值间的差额(基于每个均值10个或更多个样品)。

#### [0108] 实施例7

##### [0109] 对KASII表达的调控

[0110] KASII在质体中将16C延长至18C脂肪酸。对于KASII,比较16:0加16:1脂肪酸(KASII的底物)的水平与其产物18:0和18:1加上代谢物18:2和18:3的水平。

[0111] 将野生型拟南芥和蓖麻与用pSSP:KASII、p01eo:KASII、pSSP:KASII:AS、p01eo:KASII:AS、pSSP:KASII:si、或p01eo:KASII:si转化的品系进行比较。那些包含pSSP:KASII和p01eo:KASII载体的植物显示16:0脂肪酸的显著降低及C18和高级脂肪酸的相应升高。那些包含pSSP:KASII:AS、p01eo:KASII:AS、pSSP:KASII:si、和p01eo:KASII:si载体的植物显示16:0脂肪酸的显著升高及C18和高级脂肪酸的相应降低。

#### [0112] 实施例8

##### [0113] 对FAD2表达的调控

[0114] 对于FAD2,比较18:1脂肪酸(FAD2的底物)的水平与其产物18:2和代谢物18:3的水平。为了分析,总计18:2与18:3以获得已经被FAD2去饱和的总脂肪酸比例。

[0115] 将野生型拟南芥和蓖麻与用pSSP:FAD2、p01eo:FAD2、pSSP:FAD2:AS、p01eo:FAD2:AS、pSSP:FAD2:si、或p01eo:FAD2:si转化的品系进行比较。那些包含pSSP:FAD2和p01eo:FAD2载体的植物显示18:2和18:3脂肪酸的显著升高。那些包含pSSP:FAD2:AS、p01eo:FAD2:AS、pSSP:FAD2:si、和p01eo:FAD2:si载体的植物显示18:2和18:3脂肪酸的显著降低及低级脂肪酸的相应升高。

#### [0116] 实施例9

##### [0117] 对FAD3表达的调控

[0118] 对于FAD3,比较18:1加上18:2脂肪酸(18:2是FAD3的底物)的水平与其产物18:3的水平。

[0119] 将野生型拟南芥和蓖麻与用pSSP:FAD3、p01eo:FAD3、pSSP:FAD3:AS、

p0leo:FAD3:AS、pSSP:FAD3:si、或 p0leo:FAD3:si 转化的品系进行比较。那些包含 pSSP:FAD3 和 p0leo:FAD3 载体的植物显示 18:3 脂肪酸的显著升高。那些包含 pSSP:FAD3:AS、p0leo:FAD3:AS、pSSP:FAD3:si、和 p0leo:FAD3:si 载体的植物显示 18:3 脂肪酸的显著降低及低级脂肪酸的相应升高。

[0120] 虽然本发明已经在某些例示性实施方案中进行过描述,本发明可以在本公开内容的精神和范围内进一步进行修饰。因此,本申请意图覆盖使用其一般原理的本发明的任何变型、用途、或改编。此外,本申请意图覆盖诸如在本发明所属技术领域的已知或习惯实践内,而且落入所附权利要求书的限制内的本公开内容的偏离。

## 序列表

<110> 陶氏环球技术公司 (DOW GLOBAL TECHNOLOGIES INC.)

Roes sler, Paul G.

Ra sochova, Lada

<120> 来自蓖麻植物的种子优选性基因启动子

<130>2971-8224

<160>10

<170>PatentIn ver sion 3.3

<210>1

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>1

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210>2

<211>28

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>2

gagagcagcg aagaaggctg aaccatag 28

<210>3

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>3

actatagggc acgcgtggt 19

<210>4

<211>28

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>4

gagagccatg gaagagaaca agtaggaa 28

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>5

gtaatagcgc tcactatagg gc 22

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>6

ataggcttgc agaatcagag cttctggta 30

<210>7

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>7

actatagggc acgcgtggt 19

<210>8

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>8

ggtgactaac aaccggtgat tgttgatgct 30

<210>9

<211>1124

<212>DNA

<213> 蓖麻 (*Ricinus communi s*)

<400>9

aactactgcc gctgcgtcaa ttaattctca tagtcctgaa atgacagagg atcaatactt 60

gcatttacta atcttaattt ctttctaage catgcaccaa ataaattcaa agctaaacaa 120

aagaactaca tatttttttt aaaaagagaa aaaatattag aggataagga ggtggtaga 180

ttgaagaaat cttatgaagg accaacagtg atacttacta taaacagaac aaagattatg 240

agggtttaac accattaat gttgaagctt agacagactt ggtacctgaa gggacattta 300

ggggacgatg gtcattaatt gccctccagg ctggcttita tttgttggca tctatgtggt 360

tgtaactctg gttacaacta gctagggtta tttgagcaag tgtatatctt ttcgaattaa 420

taagagtttt aagtgtatat atataggatt ggtgttctta aagtattact agtaaagtat 480

catacagttt gaattatagt atgagatttg ttttaagtaaa tattatagac aacaaaatat 540

gtttaagtaa agtatattaa attatcaate tgtaaataa acgaaataga tcaaacattg 600  
 actccactgg atagatcate ttctgtatgt gtgatttaaa caattgggca tggagatgca 660  
 aaagagecgtt atattaaatg caaaagaaga aaagaaatct aacatttgtc ctaaacctct 720  
 ctttacttgg acgttaaaga tcaaacatcg agttaaagta ctaaatacaac catagttatg 780  
 ctacatgac acttcaattg ctaaatttca accatagtta ttagacactt gatcactttt 840  
 tgggtgttgg gtaatggttt ttgcaatcca atgttgtctt cttctttttt ctttttcccc 900  
 attcacaac ttttgtatc ttctatggag ttttgataca cctgccctat ctgactttat 960  
 taggtgtaag aagttaagat gaagtagcca tgcaaatcaa agagagtgc caaagaacc 1020  
 ttacgatcat ctttcttttg catctcttc ttcctctata aataccaacc cttccattc 1080  
 gccacttcca tcccagaacc acctateccc tctctctgca cact 1124

<210>10

<211>528

<212>DNA

<213> 蓖麻 (*Ricinus communis*)

<400>10

acttgaccc ttgatgcegc attaatttat tacattagtg aggagaagtt ttaaactggtg 60  
 agatcatatg ttgatacta ctgtttttgc caaaagtctt tttattgtat aaagagaatt 120  
 ggtgatatag tgtggtaatg aatttgatga atcaacacat agttgtagcc agaaagaacc 180  
 ctgcaatcga cgccaacttt gcttgtcgtt gtgcagtctt ttggagtcca tttatcaca 240  
 attcacagct cttttttgaa caaactcgaa atcaaacaaa aacaaactg tcttaaatg 300  
 gaaccacctc gtttgcacgc aacccttgca tggcaacctc ctcaacacgt gcctcttctc 360  
 tcttcaacac gtgccaatcc tcttgcgacc tatcttccac tctctctcta taaatcacac 420  
 cgtcccgtcc cccaaaatct tgcategctc ccttactccg caaaaaagca atcatctcca 480  
 tatattttat tatatattaa ccagaagctc tgattctgca agcctatt 528

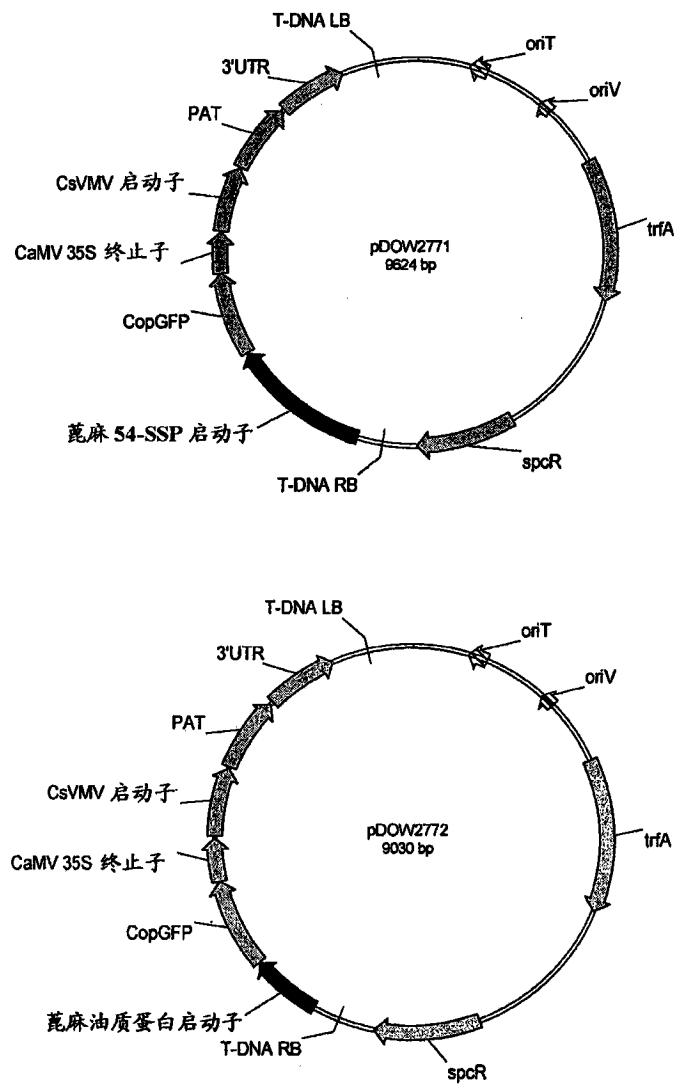


图 1

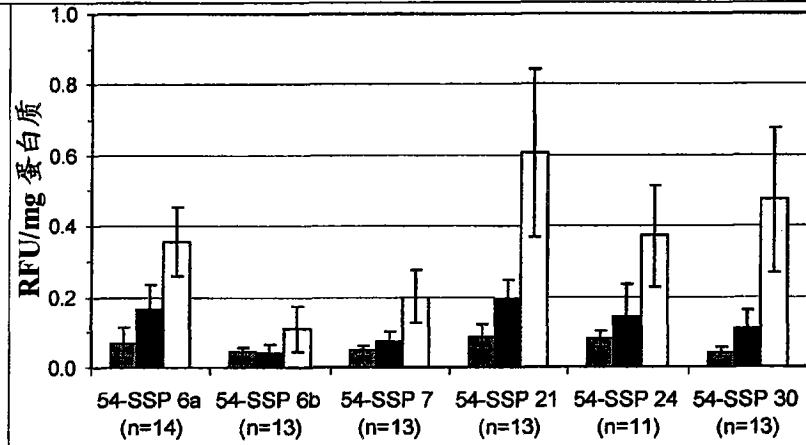


图 2A

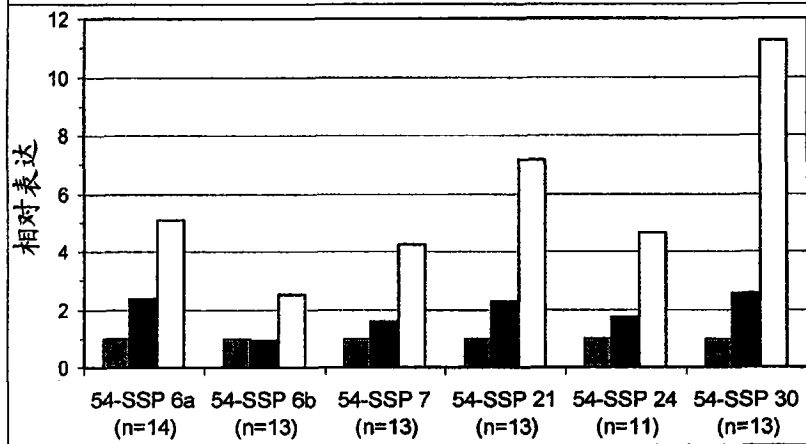
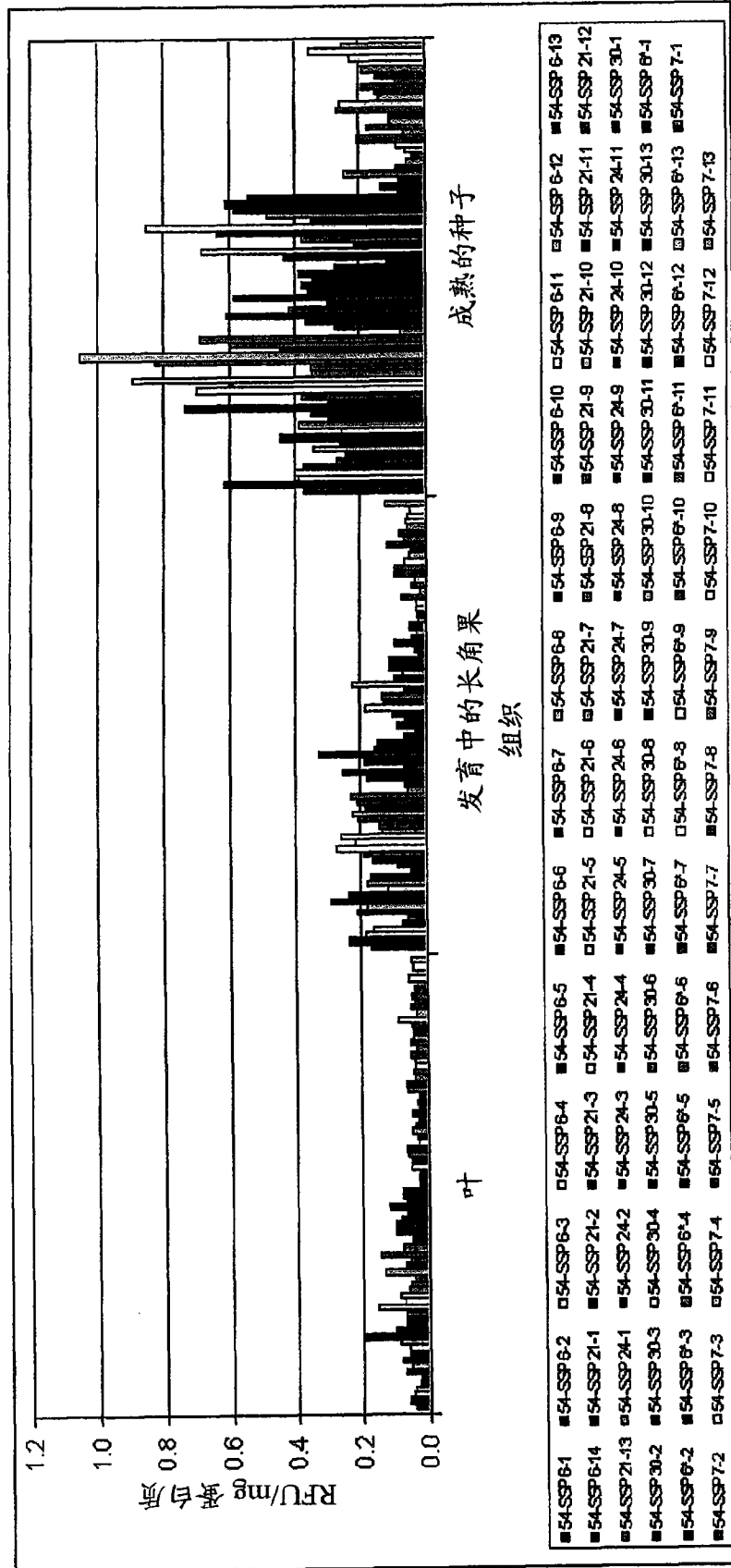


图 2B



C

图 2C

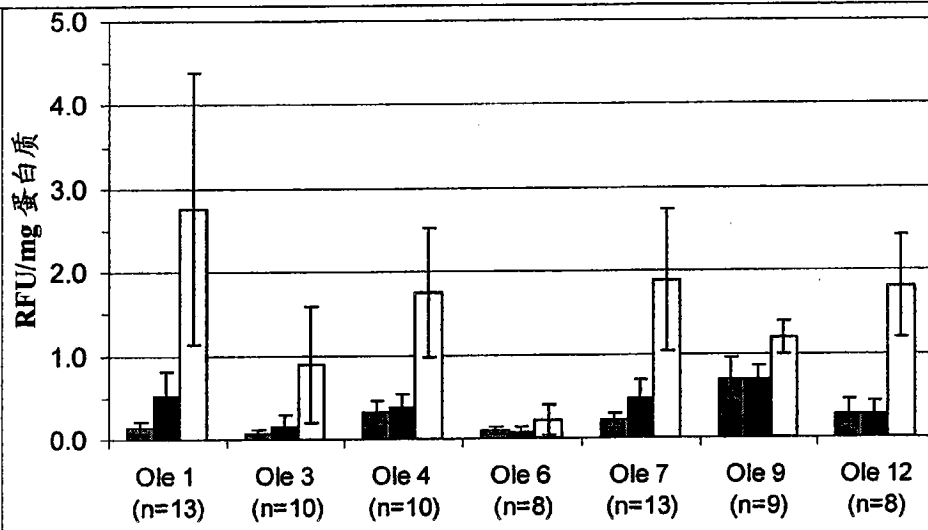


图 3A

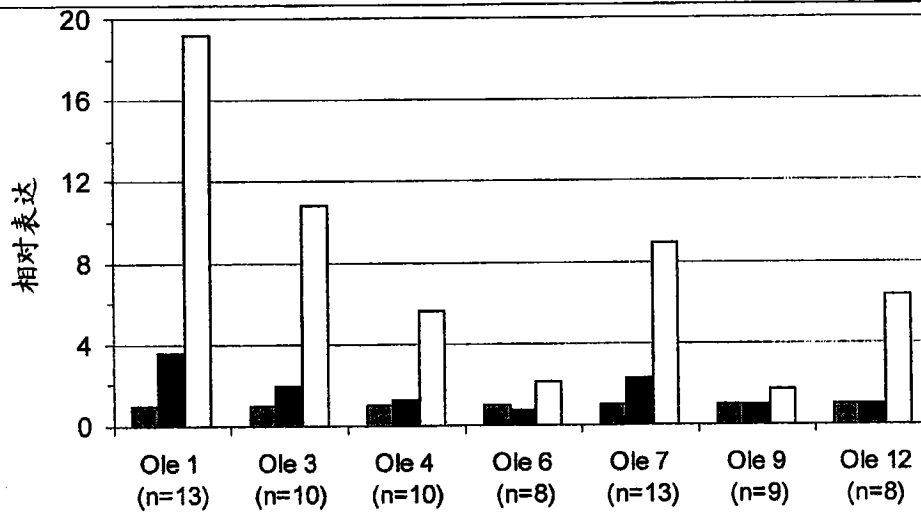
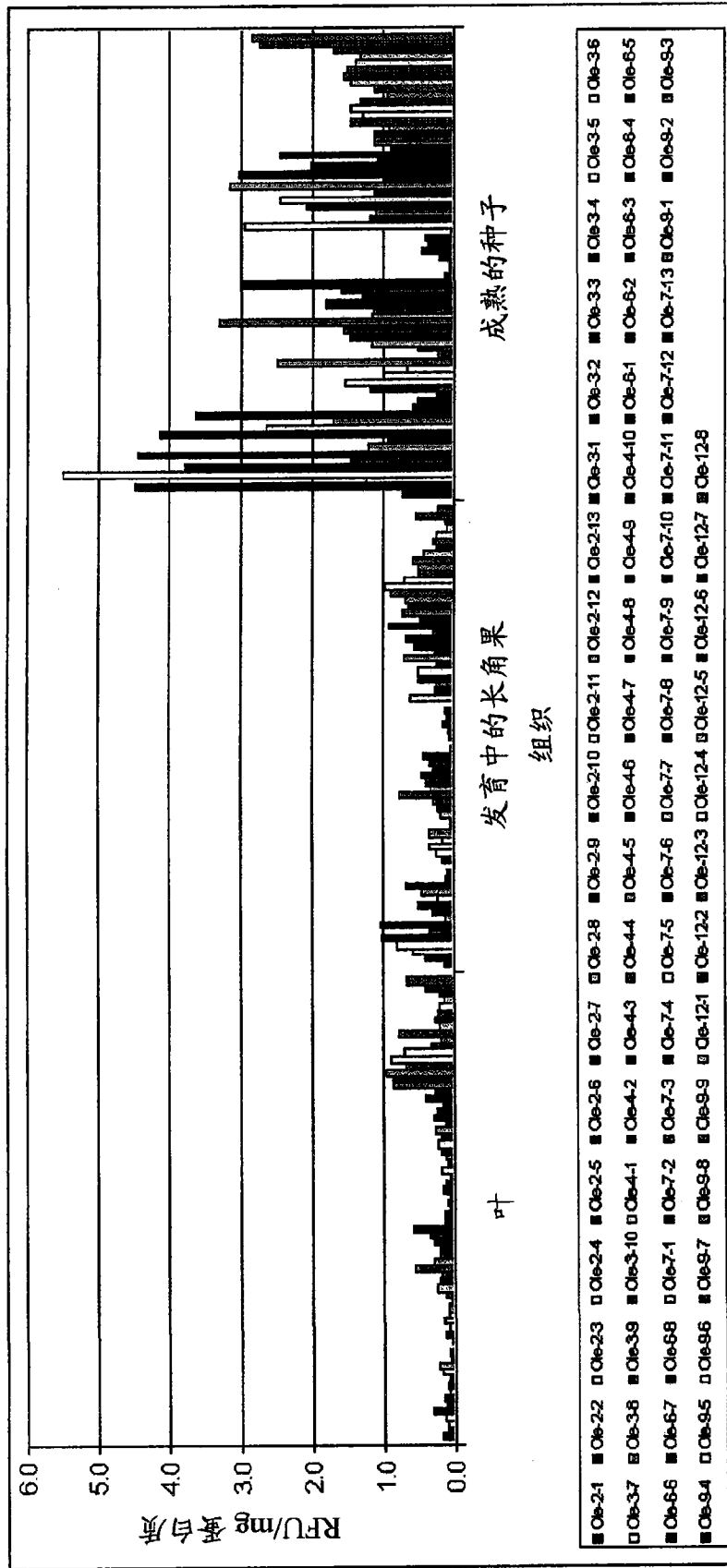


图 3B



C

图 3C

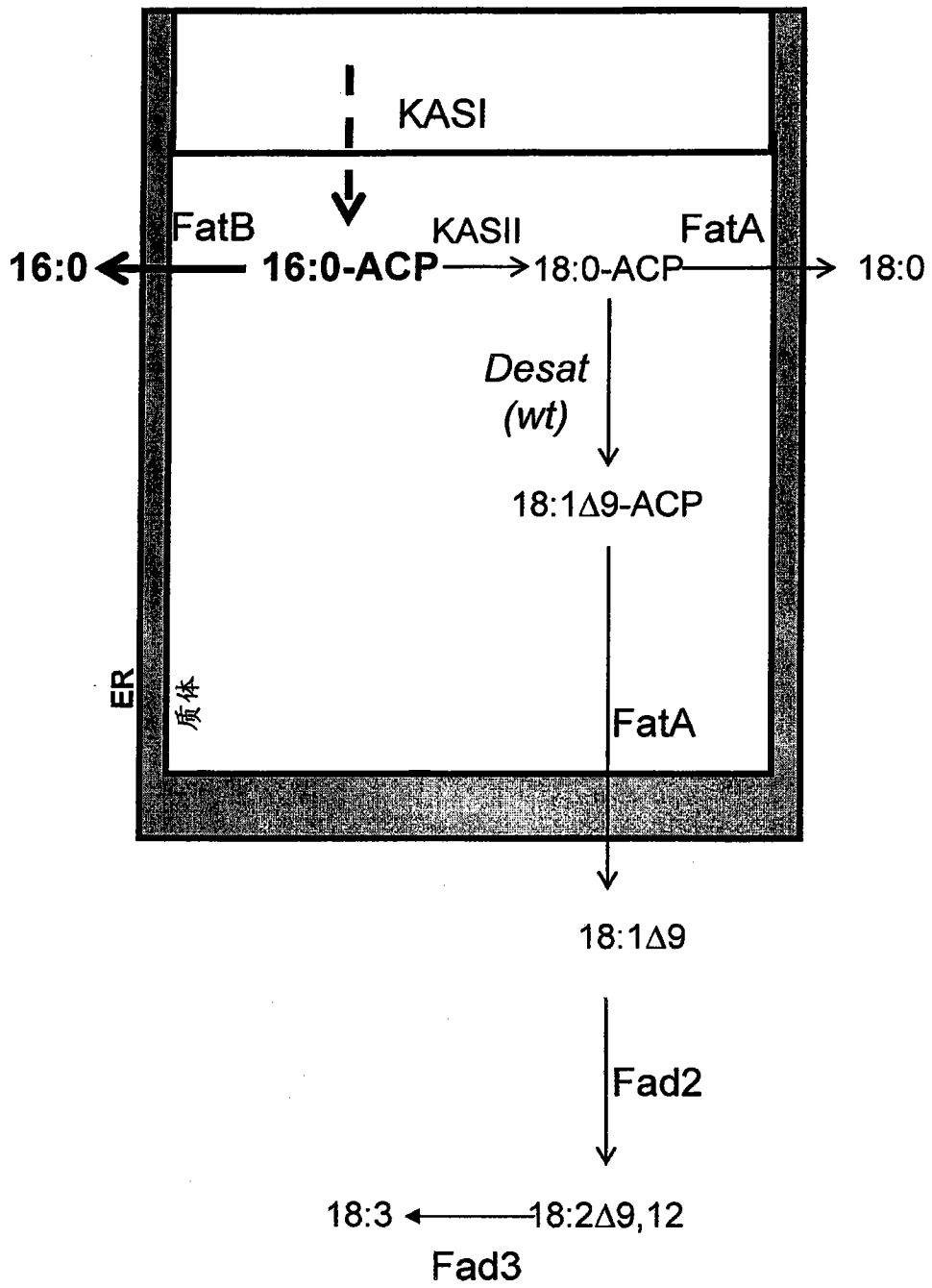


图 4