



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1552849 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200410059235.4

C12N 15/56 (2006.01)

(22) 申请日 1997.09.12

C12N 15/63 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/31 (2006.01)

60/025,985 1996.09.12 US

A01H 5/00 (2006.01)

60/054,528 1997.08.04 US

C12P 7/06 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

97197884.0 1997.09.12

WO 9116440 A, 全文.

WO 9201042 A, 说明书第4、6、7.

(73) 专利权人 辛根塔参与股份公司

审查员 李美宣

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 E·G·莱贝尔 P·B·海费茨

E·R·沃德 S·J·尤内斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

权利要求书1页 说明书30页 附图2页

(54) 发明名称

表达纤维素分解酶的转基因植物

(57) 摘要

本发明提供了在质体中控制基因表达的新方法,它使用可诱导的、反式激活蛋白介导的系统,以及包含新型表达系统的植物。本发明进一步描述了通过使用基因工程技术在植物中产生纤维素降解酶。纤维素酶编码序列与在植物中有活性的启动子融合,并转化至核基因组和叶绿体基因组。由于纤维素酶可能对植物有毒性,优选的启动子是化学诱导型启动子。以此方法,转化入植物的纤维素酶基因的表达可在适当的时间经化学性诱导。另外,表达的纤维素酶可被定向至液泡或其它细胞器以减轻毒性问题。本发明发现在任何需要纤维素酶的充足供应的工业方法中的用途,尤其是发现在将纤维素生物质转化为乙醇中的用途。

1. 一种含有编码微生物纤维素酶的核酸的转基因植物细胞,其中所述核酸有效地与用于定向至植物的细胞器或细胞区室的定向序列连接,且其中所述核酸稳定整合入植物的核或质体基因组且在植物中有活性的启动子的控制下,且所述微生物纤维素酶是微生物内切葡聚糖酶。

2. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述定向序列将所述微生物纤维素酶定向于选自下列的区室:液泡、叶绿体、线粒体、过氧化物酶体、质外体和内质网。

3. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述定向序列将所述微生物纤维素酶定向于液泡。

4. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述内切葡聚糖酶是 β -1,4- 内切葡聚糖酶。

5. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述微生物纤维素酶由分离自细菌的编码区编码。

6. 权利要求 5 的转基因植物细胞,其中所述细菌为热单孢菌属 (genus *Thermomonospora*)。

7. 权利要求 5 的转基因植物细胞,其中所述细菌为褐色热单孢菌 (*Thermomonospora fusca*)。

8. 在转基因植物中表达微生物纤维素酶的方法,包括将编码所述纤维素酶的核酸和用于定向至植物的细胞器或细胞区室的定向序列稳定整合到所述植物的核基因组或质体基因组中,且所述微生物纤维素酶是微生物内切葡聚糖酶。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述定向序列将所述微生物纤维素酶定向选自下列的区室:液泡、叶绿体、线粒体、过氧化物酶体、质外体和内质网。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述定向序列将所述纤维素酶定向于液泡。

11. 权利要求 8 的方法,其中所述内切葡聚糖酶是 β -1,4- 内切葡聚糖酶。

12. 权利要求 8 的方法,其中所述微生物纤维素酶由分离自细菌的编码区编码。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述细菌为热单孢菌属。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述细菌为褐色热单孢菌。

表达纤维素分解酶的转基因植物

[0001] 本申请是 1997 年 9 月 12 日的提交的中国专利申请 97197884.0, 发明名称为“表达纤维素分解酶的转基因植物”的申请的分案申请。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及转基因质体中基因表达的控制以及能表达纤维素降解酶的转基因植物。

[0004] 发明背景

[0005] 纤维素降解酶的工业用途

[0006] 1. 将生物质转化为乙醇

[0007] 作为辛烷的增进剂、燃料的增量剂或者清洁的液体燃料, 乙醇的生产多年来一直受到相当的注意。例如, 在巴西, 高达 90% 的新汽车以清洁的乙醇为燃料, 而其余的则以乙醇 / 汽油混合物为燃料。在美国, 当前出售的所有汽油中大约 7% 包含乙醇, 通常是 90% 汽油 : 10% 乙醇的混合物。在巴西, 燃料用乙醇当前主要从甘蔗中生产 ; 然而, 在美国, 糖价通常太高, 无法使甘蔗成为生产乙醇的有吸引力的原料。在美国, 燃料用乙醇当前主要从玉米和其它富含淀粉的谷物中生产。然而, 每年十亿加仑乙醇的生产对应于每年四亿蒲氏耳的玉米, 这意味着现存的玉米乙醇工业不足以供应当前的燃料市场。另外, 玉米乙醇当前太贵, 在成本上无法与汽油有效竞争。为对运输燃料市场形成足够的影响, 乙醇需要比当前工业所使用的更广和更便宜的资源基础。应用纤维素生物质如木头、草和多种商业过程的废生物质作为原料的技术可扩展资源基础, 以提供美国燃料市场的大部分需要, 因为纤维素生物质便宜而且丰富。

[0008] 陆生植物的主要成分是糖聚合物的两个家族, 纤维素和半纤维素。纤维素纤维包括茎、根和叶总干重的 4% -50%。这些纤维包埋于半纤维素和酚醛聚合物的基质中。纤维素是由六碳糖主要是葡萄糖通过 β -1,4 键连接构成的聚合物。半纤维素是糖的聚合物, 但糖的类型随生物质来源不同而不同。除软木外, 五碳糖木糖是半纤维素中的主要成分。

[0009] 尽管所有乙醇生产最终涉及来自于糖的发酵方法, 但从纤维素生物质中生产乙醇的技术根本不同于从含淀粉的食品作物中生产乙醇。虽然两者都需要将原料 (淀粉或纤维素) 水解为可发酵的糖, 但淀粉更容易水解, 并且降解淀粉的酶淀粉酶相对便宜。相反, 目前纤维素降解酶或“纤维素酶”效果不好并且较贵。纤维素生物质水解为可发酵的糖也可通过酸水解方法发生, 此处不对其详细讨论。纤维素酶类是酶的一个家族, 它们在比酸水解更温和的条件下协同作用, 将纤维素断裂为简单的糖成分。另外, 这些酶催化高特异性的反应, 并比酸水解反应需要的量大大减少。

[0010] 纤维素和淀粉的水解产生葡萄糖是通过以下反应 :

[0011] $n\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

[0012] 葡萄糖形成以后, 其通过以下反应发酵为乙醇 :

[0013] $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

[0014] 对于木质纤维素生物质如硬木, 也必须考虑半纤维素组分。对于半纤维素中的生物质主要包含五碳糖木糖, 水解反应如下进行 :

[0015] $n\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$

[0016] 而产生的木糖通过以下化学计量式发酵为乙醇：

[0017] $3\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5 \rightarrow 5\text{CO}_2 + 5\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

[0018] 2. 纤维素降解酶的其他潜在用途

[0019] 除用于将生物质转化为乙醇外，纤维素酶在其它工业方法中具有潜在的用途，如依赖于可发酵糖供应的任何工业方法。纤维素酶在纸浆和造纸工业中以及纺织工业中也具有潜在的用途，以减少当前对水污染的主要原因酸水解的依赖。

[0020] 在动物饲料工业中，纤维素酶可应用为饲料添加剂，以帮助消化纤维素材料。例如青贮饲料可通过添加纤维素酶或表达纤维素酶的植物使其更易消化。

[0021] 纤维素降解酶的特性

[0022] 如上所述，在木质纤维素原料中纤维素和半纤维素是可发酵糖的主要来源；然而，大自然设计了木本组织以有效耐受微生物的攻击。包括细菌和真菌的众多种类的生物具有纤维素分解活性。为更有效，纤维素降解微生物一般产生纤维素酶系统，其特征在于协同作用的多酶活性使纤维素还原为纤维二糖，然后成为葡萄糖。完成此任务最少需要三种不同的酶活性。 β -1,4-内切葡聚糖酶 (EC3.2.1.4, 也称内纤维素酶) 沿纤维素链随机切割 β -1,4 糖苷键。 β -1,4-外切葡聚糖酶 (EC3.2.1.91, 也称纤维二糖水解酶, CBH) 从纤维素链的还原端或非还原端切割纤维二糖。 $1,4-\beta$ -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21, 也称纤维二糖) 水解芳基-和烷基- β -D-葡萄糖苷。

[0023] 已众所周知丝状真菌是工业纤维素酶的来源。然而，一般认为这种资源对于大规模工业乙醇生产来说太贵。胞外纤维素酶最多产的一些产生者是 *Trichoderma reesei* 的不同株。相反，纤维素酶一般由分解纤维素细菌如褐色热单孢菌 (*Thermomonospora fusca*) 以比丝状真菌大大降低的水平产生。然而，来自褐色热单孢菌和其它细菌的纤维素酶已显示在宽 pH 范围内具有很高的特异活性，并且也具有希望的热稳定性质。编码纤维素降解酶的褐色热单孢菌基因已被克隆并充分表征。(见，如，Collmer 等人，(1983) 生物技术 (Bio/Technology) 1:594-601, 在此引入作为参考；Ghangas 等人 (1988) 应用环境微生物 (Appl. Environ. Microbiol.) 54:2521-2526, 在此引入作为参考；以及 Wilson (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:45-63, 在此引入作为参考)。另外，褐色热单孢菌纤维二糖水解酶基因和内切葡聚糖酶基因的 DNA 序列已被测定 (Jung 等人 (1993) 应用环境微生物 59:3032-3043, 在此引入作为参考)；并且褐色热单孢菌的三种内切葡聚糖酶基因的 DNA 序列也已确定 (Lao 等人 (1991) 细菌学杂志 (J. Bacteriol) 173:3397-3407, 在此引入作为参考)。

[0024] 当前正致力于应用产生重组纤维素酶的细菌或真菌宿主产生各种纤维素酶以用于将生物质转化为乙醇的方法。选择用于这些重组系统的候选纤维素酶是根据如动力学、温度和 pH 耐受、对终产物抑制的耐受以及它们的协同作用等因素。(见，如，Thomas 等人，“用于将生物质转化为乙醇的人工纤维素酶系统的最初方法”；不可溶碳水化合物酶法降解，J. N. Saddler 和 M. H. Penner 编，ACS 专题论文集系列 618:208-36, 1995, 美国化学会，Washington, D. C., 在此全文引入作为参考)。已有实例报道内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -D-葡萄糖苷酶在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中的异源表达 (Lejeune 等人，纤维素的生物合成和生物降解；Haigler, C. H. ; Weimer, P. J. 编，Marcel Dekker: New York, NY, 1990:623-671 页)。另外，

在大肠杆菌中枯草芽孢杆菌内切葡聚糖酶和粪肥棒杆菌 (*C. fimi*) β -D- 葡萄糖苷酶的表达已被证实 (Yoo 等人 (1992) 生物技术通讯 (Biotechnol. Lett.) 14:77-82)。

[0025] 现正进行研究以开发合适宿主中的多基因表达系统,它以降解纤维素生物质的最佳比率产生高水平的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -D- 葡萄糖苷酶活性,此研究的最终结果将简单地成为一个改进的生物反应器,用来产生大量的高活性纤维素酶以用于常规的生物质转化为乙醇方法以及其它的工业应用。因此,该研究被所有这些发酵方法固有的常规问题所局限,包括生物质对外部酶攻击天然耐受的事实。

[0026] 当前解决此问题的方法局限于使用其自身基因工程生产的纤维素降解酶对宿主本身无害的重组宿主。例如,认为仅有本身不包括纤维素的宿主适用于这种生物反应器。因此,认为植物不是重组纤维素酶基因的合适宿主。转化植物以产生高水平的纤维素酶是反直觉的并且具有特殊的技术困难。为克服这些困难,有必要开发新的允许很高水平表达的表达式,优选地将其置于严紧型调节下,以防止其发育过程中对植物的伤害。这些新型表达式也将具有纤维素酶生产之外的应用。

[0027] 发明概述

[0028] 在第一个实施方案中,本发明提出对纤维素降解酶的丰富、便宜的来源的需求,其可用于如燃料用乙醇生产工业、家畜饲料工业和造纸及纺织工业等工业。因此,本发明准备通过应用基因工程技术在植物中产生纤维素降解酶。高等植物是用作纤维素酶生产的体内生物反应器的有前途的候选者。它们具有高生物质产量,生产易于放大,不需要无菌条件,并常可对植物合成的蛋白质进行复杂的翻译后修饰。而且,植物中转基因编码蛋白质的水平可超过总蛋白质含量的 1%。然而,由于植物依赖纤维素保持结构完整,故认为纤维素降解酶对植物有毒。因此,纤维素酶基因代表一种理想的靶,用于涉及基因表达的化学诱导技术以及基因产物向细胞贮存结构的定向的研究。

[0029] 本发明中,纤维素酶编码序列与植物中有活性的启动子融合,并转化至核基因组或质体基因组。根据本发明可在植物中表达的纤维素酶包括但不限于内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -D- 葡萄糖苷酶,优选地是从非植物来源如微生物(如细菌或真菌)衍生来的。一种优选的启动子是化学诱导型烟草 PR-1a 启动子;然而,在一定情况下,也可使用组成型启动子如 CaMV 35S 启动子。具有化学诱导型启动子的转化入植物的纤维素酶基因的表达可于合适的时间通过对叶子施用化学诱导剂来激活。

[0030] 应用质体转化时,使用噬菌体启动子如噬菌体 T7 基因 10 启动子合适地构建载体,它的转录激活依赖于 RNA 聚合酶如噬菌体 T7 RNA 聚合酶。在一个例子中,包含与纤维素酶基因融合的噬菌体启动子的质体转化载体被转化入叶绿体基因组。产生的株系与包含一个噬菌体 RNA 聚合酶的核编码区的转基因株系杂交,该编码区添加了叶绿体定向序列,并且有效地与一种组成型启动子如 CaMV 35S 启动子连接,导致杂交产生的植物的叶绿体中组成型表达纤维素酶。叶绿体表达具有纤维素酶很少损害几乎不含或不含纤维素的质体的优点。

[0031] 除使用化学诱导型启动子外,表达的纤维素酶可被定向至一定的细胞器如液泡以缓和毒性问题。为了纤维素酶的液泡定向表达,用包含如来自烟草壳多糖酶基因的液泡定向序列的载体转化植物。此例中,表达的纤维素酶贮存于不能降解纤维素及伤害植物的液泡中。

[0032] 本发明因此提供：

[0033] 表达例如不在植物中天然表达的纤维素降解酶的一种纤维素降解酶的一种植物，例如一种包含异源 DNA 序列的植物，此序列编码稳定地整合于其核或质体 DNA 的纤维素降解酶，该序列优选地位于可诱导的启动子如创伤诱导型或化学诱导型启动子的控制之下，例如有效地与可诱导的启动子连接或位于反式激活蛋白调节的启动子控制之下，其中相应的反式激活蛋白位于可诱导的启动子控制之下；

[0034] 也包括这种植物的种子，其种子被任选地处理（如装填或包被）和 / 或包装，如与使用说明一起放于袋子中。

[0035] 本发明进一步提供：

[0036] 一种制备纤维素降解酶的方法，包括培育表达纤维素酶的植物；

[0037] 一种制备乙醇的方法，包括发酵表达纤维素酶的植物；以及

[0038] 一种增强动物饲料如青贮饲料可消化性的方法，包括向饲料混合物中添加表达纤维素酶的植物。

[0039] 这些方法可进一步包括通过结合两种或更多不同的纤维素降解酶增强纤维素的降解，如使用在纤维素生物降解途径中不同阶段作用的酶，如以协同激活结合方式，通过在单个植物中表达所述的酶，或结合表达不同纤维素降解酶的两个或多个植物。

[0040] 本发明进一步提供：

[0041] 一种植物可表达的表达盒，它包含纤维素降解酶的编码区，其优选地位于可诱导的启动子如创伤诱导型或化学诱导型的启动子的控制之下；例如，一种质体可表达的表达盒，它包含一种启动子，如由核反式激活蛋白调节的反式激活蛋白介导的启动子（如 T7 启动子，当反式激活蛋白是 T7 RNA 聚合酶时，它的表达任选地位于可诱导的启动子的控制之下），并且有效地与纤维素降解酶的编码区连接；

[0042] 一种包含这种植物可表达的表达盒的载体；以及

[0043] 一种用这种载体转化的植物，或在其基因组如质体基因组中包含这种植物可表达的表达盒的转基因植物。

[0044] 在另一实施方案中，本发明包括质体表达的一个新型系统，其中在质体中表达的基因位于反式激活蛋白调节的启动子控制之下，并且反式激活蛋白基因在核 DNA 中，位于可诱导的启动子的控制下。例如，质体转化载体一般应用噬菌体启动子如噬菌体 T7 基因 10 启动子构建，其转录激活依赖于 RNA 聚合酶如噬菌体 T7 RNA 聚合酶。产生的株系与包含噬菌体 RNA 聚合酶的核编码区的转基因系杂交，该编码区添加了叶绿体定向序列，并且有效地与化学诱导型启动子如烟草 PR-1a 启动子连接。通过对叶子施用化学诱导剂激活在杂交产生的植物叶绿体中的目的基因表达。在此描述的新型、可诱导的反式激活蛋白介导的质体表达系统显示是严紧型调节的，在诱导之前无可检测到的表达，无异常的高表达和诱导后蛋白质的积累。

[0045] 本发明因此另外提供了：

[0046] 一种包含可诱导的启动子的植物可表达的表达盒，如创伤诱导型或化学诱导型启动子，例如烟草 PR-1a 启动子，有效地与编码反式激活蛋白（优选的是不在植物中自然发生的反式激活蛋白，优选的是 RNA 聚合酶或 DNA 结合蛋白，如 T7 RNA 聚合酶）的 DNA 序列连接，所述反式激活蛋白与质体定向序列如叶绿体定向序列融合；

[0047] 一种包含这种植物表达盒的载体 ; 以及

[0048] 一种用这种载体转化的植物或基因组中包含这种植物可表达的表达盒的转基因植物。

[0049] 此外本发明提供了 :

[0050] 一种植物, 其包含

[0051] 一种异源核表达盒, 它包含可诱导的启动子, 如创伤诱导型或化学诱导型启动子, 例如烟草 PR-1a 启动子, 且其有效地与编码反式激活蛋白 (优选的是不在植物中天然发生的反式激活蛋白, 优选的是 RNA 聚合酶或 DNA 结合蛋白, 如 T7 RNA 聚合酶) 的 DNA 序列连接, 所述反式激活蛋白任选地与质体定向序列如叶绿体定向序列融合 (如以上所述的植物可表达的表达盒); 以及

[0052] 一种异源质体表达盒, 它包含反式激活蛋白调节的反式激活蛋白介导的启动子 (如 T7 启动子, 当反式激活蛋白是 T7 RNA 聚合酶时) 并且有效地与目的 DNA 序列连接, 如编码目的蛋白质 (如酶、碳水化合物降解酶, 例如 GUS 或纤维素降解酶) 或编码目的功能性 RNA (如反义 RNA) 的序列 ;

[0053] 也包括这种植物的种子, 其被任选地处理 (如装填或包被) 和 / 或包装, 如与使用说明一起放于袋子或其它容器中。

[0054] 本发明也包括 :

[0055] 一种产生如上述的植物的方法, 包括

[0056] 用来自包含异源核表达盒的植物的花粉给包含异源质体表达盒的植物授粉, 其中异源核表达盒包含一种与编码能调节该反式激活蛋白介导启动子的反式激活蛋白的 DNA 序列有效地连接的可诱导的启动子, 异源质体表达盒包含一种反式激活蛋白调节并且与编码目的蛋白质的 DNA 序列有效地连接的反式激活蛋白介导的启动子。

[0057] 从如此授粉的植物中回收种子 ; 以及

[0058] 从所述的种子培育以上描述的植物。

[0059] 定义

[0060] “纤维素降解酶”在此描述, 包括纤维素酶、纤维二糖水解酶、纤维二糖酶和其它参与将纤维素和半纤维素断裂为简单糖如葡萄糖和木糖的酶。优选的, 本发明中使用的纤维素降解酶是非植物来源的, 如微生物来源, 优选的是细菌来源, 例如来自热单孢菌属的细菌, 如褐色热单孢菌。

[0061] 在此使用的“表达盒”意思是能在植物细胞中引导基因表达的 DNA 序列, 包括有效地与目的编码区连接的启动子, 此编码区有效地与终止区连接。编码区通常编码目的蛋白但也可编码目的功能性 RNA, 例如在有义或反义方向抑制了特定基因如反义 RNA 的表达的反义 RNA 或非翻译 RNA。基因可以是嵌合的, 意思是基因的至少一种成分对于基因的至少另一种成分是异源的。基因也可能是天然发生的, 但已以重组形式获得, 可用于植物的基因转化。然而一般而言表达盒对于宿主是异源的, 即表达盒的特定 DNA 序列不在宿主细胞中天然发生, 并且必须通过转化事件被引入宿主细胞或宿主细胞的祖先。“核表达盒”是整合入宿主核 DNA 的表达盒。“质体表达盒”是整合入宿主质体 DNA 的表达盒。在此描述的质体表达盒可任选地包含一个多顺反子操纵子, 此操纵子包括位于单个启动子如反式激活蛋白介导的启动子的控制之下的两个或更多的目的顺反子编码序列, 例如, 其中一个目的编码序

列编码抑制 c1pP 或其它质体蛋白酶表达的反义 mRNA, 以此增强其它编码序列或目的序列表达的蛋白质的积累。

[0062] 在此使用的“异源的”意思是“不同自然来源的”。例如, 如果用从其它生物尤其是从另一个种的生物衍生的基因转化植物, 该基因对于该植物是异源的, 并且对于该植物的携带该基因的后代也是异源的。

[0063] “同质体的”指一种植物、植物组织或植物细胞其中所有的质体遗传学上是相同的。当质体未被转化、突变或其它的基因改变时, 这在植物中是正常状态。在不同的组织或发育的不同阶段, 质体可有不同的形式, 如叶绿体、前质体、黄化质体、造粉体、色质体等等。

[0064] “可诱导的启动子”是仅当植物接触某些特定的外部刺激物时才起始转录的启动子, 这不同于组成型启动子或对特定组织或器官或发育阶段特异的启动子。对于本发明特别优选的是化学诱导型启动子和创伤诱导型启动子。化学诱导型启动子包括植物衍生的启动子, 如系统获得的耐受途径中的启动子, 例如 PR 启动子, 如 PR-1、PR-2、PR-3、PR-4 和 PR-5 启动子, 尤其是烟草 PR-1a 启动子和拟南芥 (*Arabidopsis*) PR-1 启动子, 当植物接触 BTH 和相关化学物时它们起始转录。见美国专利 5, 614, 395, 在此引入作为参考, 以及美国临时申请 60/027, 228 号, 在此引入作为参考。化学诱导型的启动子也包括受体介导的系统, 如由其它生物衍生来的系统, 如类固醇依赖的基因表达、铜依赖的基因表达、四环素依赖的基因表达, 以及尤其是应用保幼生长激素及其拮抗剂介导的果蝇 (*Drosophila*) USP 受体的表达系统, 这在 PCT/EP96/04224 中有描述, 在此引入作为参考, 以及联合使用受体的系统, 如 PCT/EP96/00686 中描述的, 在此引入作为参考。创伤诱导型启动子包括蛋白酶抑制剂的启动子, 如马铃薯的蛋白酶抑制剂 II 启动子, 及其它参与创伤应答途径的植物衍生的启动子, 如多酚氧化酶、LAP 和 TD 的启动子。总的见 C. Gatz, “基因表达的化学控制”, 植物生理植物分子生物学年报, (*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*) (1997) 48 :89-108, 其内容在此引入作为参考。

[0065] “植物”指在任何发育阶段的任何植物或植物的部分。在本发明的某些实施方案中, 植物可为致死性创伤的以诱导表达, 或可诱导表达致死水平的希望蛋白, 因此在此使用的名词“植物”特别意在包括被严重损伤或杀死的植物和植物材料, 以及存活的植物、切下的部分、细胞或组织培养物和种子。

[0066] “反式激活蛋白”是一种蛋白质, 通过其本身或与一种或多种其它蛋白质的联合能导致位于相应反式激活蛋白介导的启动子控制下的编码区转录。反式激活蛋白系统的实例包括噬菌体 T7 基因 10 启动子, 其转录的激活依赖于特异的 RNA 聚合酶如噬菌体 T7 RNA 聚合酶。反式激活蛋白一般是 RNA 聚合酶或 DNA 结合蛋白, 它能与特定的启动子相互作用以起始转录, 方法是直接激活该启动子或灭活阻遏基因, 如抑制阻遏蛋白的表达或积累。DNA 结合蛋白可以是包含一个与适当转录激活蛋白结构域连接的结合区 (如 GAL4 结合区) 的嵌合蛋白。某些反式激活蛋白系统可具有多重反式激活蛋白, 例如对于启动子识别、DNA 结合、或转录激活不仅需要聚合酶而且需要特定亚单位 (sigma 因子) 的启动子。反式激活蛋白优选地对于植物是异源的。

[0067] 附图的描述

[0068] 图 1 是植物中纤维素酶表达的实施例中描述的嵌合基因构建体的示意图。有影线的方框代表 E5 基因信号序列, 封闭方框代表烟草壳多糖酶基因的液泡定向序列。Tn 编码

nos 终止序列, Ttml 编码 tml 终止序列。

[0069] 图 2 表示实施例的 C 部分中描述的质体转化载体。

[0070] 发明详述

[0071] 本发明提出了对纤维素降解酶的丰富、便宜的来源的需求,通过用在植物中产生的纤维素酶替代常规的真菌产生的工业纤维素酶以用于燃料乙醇生产工业、家畜饲料工业以及纸和纺织工业等工业。对于产生自身纤维素酶的基因工程植物,外部施用用于纤维素降解的纤维素酶是不必要的。例如,目的是变为乙醇的木质纤维素生物质可通过应用本发明用作其自身纤维素酶的原料来源。实际上,根据本发明的转基因植物不必包括生物反应器中的所有原料;而且,它们可与非转化的纤维素原料结合使用,由此转基因植物产生的纤维素酶可降解所有原料包括非转基因原料的纤维素。应用根据本发明产生的转基因生物物质的纤维素降解方法比常规方法更便宜、更容易并且对环境更安全地进行。

[0072] 原料可以是任何类型的木质纤维素物质,如特别用作生物质来源而生长的高生物质植物或主要用于其它目的而生长的植物的废弃部分,如作物植物的茎和叶。如果该特定植物能耐受自己的纤维素酶产生,用纤维素酶基因转化的植物可用提供组成型表达纤维素酶的构建体转化。如果特定类型的植物不能经受纤维素酶的组成型表达引起的过度毒性,优选地用仅在希望时才允许产生纤维素酶的构建体来转化该植物。例如,对于化学诱导型纤维素酶构建体,恰好在收获植物之前化学诱导纤维素酶表达以使植物被其自身产生的纤维素酶杀死,它们能以任何方式收获。然后将植物组织压碎、磨碎或切细以释放纤维素酶,然后加入生物反应器中,通过转基因植物中表达的纤维素酶的作用,木质纤维素生物质将被降解为简单糖。

[0073] 根据本发明构建的嵌合基因可以转化入任何适合的植物组织。与本发明联合使用时,名词“植物组织”包括但不限于,整个植物、植物细胞、植物器官、植物种子、原生质体、愈伤组织、细胞培养物、和组成结构和/或功能单位的任何植物细胞群。按照本发明转化的植物可以是单子叶植物或双子叶植物,包括但不限于玉米、小麦、大麦、黑麦、甘薯、菜豆、豌豆、菊苣、莴苣、洋白菜、花椰菜、硬花球花椰菜、萝卜、小萝卜、菠菜、芦笋、洋葱、大蒜、胡椒、芹菜、笋瓜、南瓜、大麻、夏季南瓜、苹果、梨、温柏、甜瓜、李子、樱桃、桃、油桃、杏、草莓、葡萄、木莓、黑莓、菠萝、鳄梨、番木瓜、芒果、香蕉、大豆、番茄、高粱、甘蔗、甜菜、向日葵、油菜子、三叶草、烟草、胡萝卜、棉花、苜蓿、水稻、马铃薯、茄子、黄瓜、拟南芥,以及木本植物如松柏类和落叶类树。

[0074] 一旦希望的基因转化入特定的植物种,可应用传统的繁殖技术使其在该种中增殖或移至相同种的其它变种,尤其包括商业变种。另外,希望的蛋白如纤维素降解酶的编码序列可被分离、经基因工程改造用于最佳表达,然后转化入希望的变种。

[0075] 根据本发明转化入植物的优选的纤维素酶基因包括但不限于,褐色热单孢菌 E1 基因 (GenBank 保藏号 L20094) (Jung 等人 (1993) 应用环境微生物 59:3032-3043); 褐色热单孢菌 E2 基因 (GenBank 保藏号 M73321) (Ghangas) 等人 (1988) 应用环境微生物 54,2521-2526;Lao 等人 (1991) 细菌学杂志 (J.Bacteriol.) 173,3397-3407;以及褐色热单孢菌 E5 基因 (GenBank 保藏号 L01577) (Collmer 和 Wilson(1983) 生物技术 (Biotechnology) 1,594-601;Lao 等人 (1991) 细菌学杂志 173,3397-3407)。然而,其它纤维素酶基因也可转化入根据本发明的植物,包括以下参考文献中公开的所有纤维素酶

基因:Collmer 等人(1983) 生物技术 1:594-601;Ghangas 等人(1988) 应用环境微生物 54:2521-2526;Wilson(1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:45-63;Jung 等人(1993) 应用环境微生物 59:3032-3043;Lao 等人(1991) 细菌学杂志 173:3397-3407;以及 Thomas 等人“将生物质转化为乙醇的人工纤维素酶系统的最初方法”;不可溶碳水化合物化合物的酶降解, J. N. Saddler 和 M. H. Penner 编 ACS 专题论文系列 618:208-36, 1995, 美国化学学会, Washington, D. C.。这些包括但不限于由微生物如细菌和真菌衍生的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -D- 葡萄糖苷酶。

[0076] 微生物基因的修饰以优化在植物中的核表达

[0077] 如果希望,本申请中描述的克隆纤维素酶基因可被修饰以用于在转基因植物宿主中表达。例如,衍生自微生物来源的基因在植物中的转基因表达需要对这些基因加以修饰以实现并且优化其在植物中的表达。特别是,编码分隔的酶但其在天然微生物中被同一转录物编码的细菌开放阅读框,其在植物中在分隔的转录物上可被最好地表达。为达到这一点,个别分离每个微生物开放阅读框,并在提供了开放阅读框 5' 末端的植物启动子序列和开放阅读框 3' 末端的植物转录终止子的表达盒内克隆。分离的开放阅读框序列优选地包括起始 ATG 密码子和终止 STOP 密码子,但可包括除起始 ATG 和 STOP 密码子之外的其它序列。另外,开放阅读框可被截短,但仍保留需要的活性;对特别长的开放阅读框,保留活性的截短形式可优选地用于在转基因生物中表达。“植物启动子”和“植物转录终止子”意思是在植物细胞内有作用的启动子和转录终止子。这包括可从非植物来源如病毒(一个例子是花椰菜花叶病毒)衍生的启动子和转录终止子。

[0078] 在某些情况中,开放阅读框编码序列和相邻序列的修饰是不需要的,在这些情况中,足以分离包含目的开放阅读框的片段并将其插入植物启动子的下游。然而优选的,应尽可能少地留有相邻微生物序列连接于 ATG 的上游和 STOP 密码子的下游。实际中,这种结构依赖于限制位点的可用性。

[0079] 其它情况中,衍生自微生物来源基因的表达可引起表达中的问题。这些问题在本领域中已经很好地表征,对特定来源如芽孢杆菌衍生的基因尤为常见。这些基因的修饰可用本领域中众所周知的技术进行。以下问题是可能遇到的典型情况:

[0080] 1. 密码子使用

[0081] 植物中优选的密码子使用不同于特定微生物中优选的密码子使用。对比克隆的微生物开放阅读框内的密码子使用与植物基因中的使用(尤其是靶植物的基因),将能鉴定开放阅读框内应优选地改变的密码子。一般植物进化趋向于单子叶植物的第三个碱基位置是核苷酸 C 和 G 的强烈偏好性,而双子叶植物在此位置经常使用核苷酸 A 或 T。通过修饰基因以引入对特定靶转基因物种优选的密码子使用,可以克服许多以下描述的 GC/AT 含量和非常规剪接的问题。

[0082] 2. GC/AT 含量

[0083] 植物基因一般具有多于 35% 的 GC 含量。富含 A 和 T 核苷酸的开放阅读框序列在植物中能引起一些问题。首先,ATTTA 的基元被认为导致信息的去稳定作用,并在许多短寿 mRNA 的 3' 末端被发现。其次,认为信息内不恰当的位置处聚腺苷酸化信号如 AATAAA 的出现引起转录的提前截短。另外,单子叶植物可识别富含 AT 的序列作为剪接位点(见下)。

[0084] 3. 与起始甲硫氨酸相邻的序列

[0085] 植物不同于微生物之处在于它们的信息没有确定的核糖体结合位点。更确切地, 据信核糖体附着于信息的 5' 末端, 并且扫描第一个可得到的 ATG, 在此开始翻译。然而, 据信与 ATG 相邻的一定核苷酸有偏好性, 并且可通过在 ATG 处包含真核共有翻译起始子增强微生物基因的表达。Clontech(1993/1994 目录, 210 页) 建议序列 GTCGACCATGGTC 作为在植物中表达大肠杆菌 uidA 基因的共有翻译起始子。另外, Joshi (NAR 15 :6643-6653(1987)) 对比了许多与 ATG 相邻的植物序列, 建议共有序列 TAAACAATGGCT。在植物中表达微生物开放阅读框中遇到困难的情况下, 在起始 ATG 处包含这些序列之一可改善翻译。在这些情况中, 共有序列的最后三个核苷酸可能不适合包含在由于第二个 AA 残基的修饰引起的修饰过的序列中。与起始甲硫氨酸相邻的优选的序列在不同的植物种之间可以不同。对位于 GenBank 数据库中的 14 个玉米基因的调查提供了以下结果:

[0086] 14 个玉米基因中起始 ATG 之前的位点

[0087]		-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
[0088]	C	3	8	4	6	2	5	6	0	10	7
[0089]	T	3	0	3	4	3	2	1	1	1	0
[0090]	A	2	3	1	4	3	2	3	7	2	3
[0091]	G	6	3	6	0	6	5	4	6	1	5

[0092] 可对希望的待引入纤维素酶基因的植物物种进行这种分析, 并且修饰与 ATG 相邻的序列以引入优选的核苷酸。

[0093] 4. 非常规剪接位点的去除

[0094] 从非植物来源克隆的基因和未对在植物中表达进行优化的基因也可能包含植物中识别为 5' 或 3' 剪接位点的基元, 并被切割, 因此产生截短的或缺失的信息。这些位点的去除可应用申请 07/961, 944 中描述的技术, 在此引入作为参考。

[0095] 编码序列和相邻序列的修饰技术为本领域周知。假使微生物开放阅读框的起始表达很低并且认为适合进行对上述序列的修饰, 可根据本领域中众所周知的方法完成合成基因的构建。例如, 描述于发表的专利公开 EP 0 385 962(Monsanto), EP 0 359 472(Lubrizol) 和 WO 93/07278(Ciba-Geigy)。在大多数例子中, 优选地应用瞬时测定方案(在本领域中众所周知)测定基因构建体在转移至转基因植物之前的表达。

[0096] 质体转化的主要优点是质体普遍能表达基本无修饰的细菌基因。不需要如上描述的密码子适应性改造等, 并且质体能表达在单个启动子控制下的多个开放阅读框架。

[0097] 植物转化载体的构建

[0098] 许多转化载体可用于植物转化, 并且本发明的基因可与任何这些载体结合使用。使用载体的选择将依赖于优选的转化技术和用于转化的目标物种。对于一定的目标物种, 优选不同的抗生素或除草剂选择标记。转化中常规应用的选择标记包括赋予卡那霉素和相关抗生素抗性的 nptII 基因 (Messing 和 Vierra, 基因 (Gene) 19 :259-268(1982); Benven 等人, 自然 (Nature) 304 :184-187(1983))、赋予除草剂膦丝菌素抗性的 bar 基因 (White 等人, 核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 18 :1062(1990), Spencer 等人, 理论应用遗传学 (Theor Appl Genet) 79 :625-631(1990))、赋予抗生素潮霉素抗性的 hpt 基因 (Blochinger 和 Diggelmann, 分子细胞生物学 (Mol Cell Biol) 4 :2929-2931)、以及赋予氨甲喋呤抗性的 dhfr 基因 (Bourouis 等人, 欧洲分子生物学会杂志 (EMBO J.) 2(7) :1099-1104(1983))。

[0099] 1. 适合农杆菌 (*Agrobacterium*) 转化的载体的构建

[0100] 许多载体可用于应用根瘤农杆菌的转化。它们一般携带至少一个 T-DNA 边界序列, 并且包括如 pBIN19 (Bevan, 核酸研究 (1984)) 和 pXYZ 的载体。以下描述了两种典型载体的构建。

[0101] pCIB200 和 pCIB2001 的构建: 二元载体 pCIB200 和 pCIB2001 用于构建农杆菌使用的重组载体, 按以下方法构建。pTJS75kan 通过用 NarI 消化 pTJS75 产生 (Schmidhauser 和 Helinski, 细菌学杂志 164 :446-455 (1985)), 它允许切割四环素抗性基因, 随后插入一个来自 pUC4K 的携带 NPTII 的 AccI 片段 (Messing 和 Vierra, 基因 19 :259-268 (1982) ;Bevan 等人, 自然 304 :184-187 (1983) ;McBride 等人, 植物分子生物学 14 :266-276 (1990))。XhoI 接头与 pCIB7 的 EcoRV 片段连接, 此片段包含左和右 T-DNA 边界、植物选择性 nos/nptII 嵌合基因和 pUC 多接头 (Rothstein 等人, 基因 53 :153-161 (1987)), XhoI 消化片段克隆入 SalI 消化的 pTJS75kan 产生 pCIB200 (也见 EP 0 332 104, 实施例 19)。pCIB200 包含以下的单一多接头限制位点: EcoRI、SstI、KpnI、BglII、XbaI 和 SalI。pCIB2001 是 pCIB200 的衍生物, 它是通过插入多接头中其它限制位点而产生的。pCIB2001 多接头的单一限制位点是 EcoRI、SstI、KpnI、BglII、XbaI、SalI、MluI、BclI、AvrII、ApaI、HpaI 和 StuI。除包含这些单一限制位点外, pCIB2001 也有植物和细菌卡那霉素的选择性、用于农杆菌介导的转化的左和右 T-DNA 边界、在大肠杆菌和其它宿主之间转移的 RK2 衍生的 trfA 功能以及也从 RK2 来的 OriT 和 OriV 功能。pCIB2001 多接头适用于包含其自身调节信号的植物表达盒的克隆。

[0102] pCIB10 及其潮霉素筛选衍生物的构建: 二元载体 pCIB10 包含用于在植物中筛选的编码卡那霉素抗性的基因、T-DNA 右和左边界序列, 并且引入宽宿主范围的质粒 pRK252 的序列, 使其可在大肠杆菌和农杆菌中复制。其构建由 Rothstein 等人描述 (基因 53 :153-161 (1987))。pCIB10 的各种衍生物已被构建, 它们引入了 Gritz 等人描述的潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (基因 25 :179-188 (1983))。这些衍生物能使转基因植物细胞在仅有潮霉素 (pCIB743) 或同时有潮霉素和卡那霉素 (pCIB715、pCIB717) 时筛选。

[0103] 2. 适于非农杆菌转化的载体的构建

[0104] 不使用根瘤农杆菌的转化避免了对所选的转化载体中 T-DNA 序列的需要, 所以除如上描述的包含 T-DNA 序列的载体外, 可应用缺少这些序列的载体。不依赖于农杆菌的转化技术包括通过粒子轰击、原生质体摄取 (如 PEG 和电穿孔) 和显微注射的转化。载体的选择主要依赖于待转化的所选的优选的种。下面, 描述了某些典型载体的构建。

[0105] pCIB3064 的构建: pCIB3064 是 pUC 衍生载体, 适用于与除草剂 basta (或膦丝菌素) 筛选结合的直接基因转移技术。质粒 pCIB246 包含与大肠杆菌 GUS 基因有效地融合的 CaMV 35S 启动子和 CaMV 35S 转录终止子, 在 PCT 公开的申请 WO 93/07278 中有描述。此载体的 35S 启动子包含两个 ATG 序列的起始位点 5' 端。这些位点应用标准 PCR 技术突变以去除 ATG, 产生 SspI 和 PvuII 限制位点。新限制位点距唯一的 SalI 位点 96 和 36bp, 距实际起始位点 101 和 42bp。产生的 pCIB246 的衍生物称为 pCIB3025。然后用 SalI 和 SacI 消化从 pCIB3025 上切下 GUS 基因, 末端变为平端且再连接产生质粒 pCIB3060。质粒 pJIT82 从 John Innes Centre, Norwich 获得, 切下包含产绿色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) bar 基因的 400bp 的 SmaI 片段, 插入 pCIB3060 的 HpaI 位点 (Thompson 等人, 欧洲分子生

物学会杂志 6 :2519-2523(1987))。这产生了 pCIB3060,它包含位于 CaMV 35S 启动子控制下的 bar 基因和用于除草剂筛选的终止子、氨苄青霉素抗性的基因(用于在大肠杆菌中筛选)和具有单一 SphI、PstI、HindIII、BamHI 位点的多接头。此载体适用于包含自身调节信号的植物表达盒的克隆。

[0106] pSOG19 和 pSOG35 的构建:pSOG35 是一个转化载体,它应用大肠杆菌基因二氢叶酸还原酶 (DHFR) 作为提供氨甲喋呤抗性的选择标记。使用 PCR 扩增 35S 启动子 (~800bp)、玉米 Adh1 基因的内含子 6 (~550bp) 和 pSOG10 的 18bp 的 GUS 非翻译前导序列。编码大肠杆菌二氢叶酸还原酶 II 型基因的 250bp 片段也用 PCR 扩增,这两个 PCR 片段与 pBI221(Clontech) 包含 pUC19 载体骨架和胭脂氨酸合成酶终止子的 SacI-PstI 片段装配。这些片段的装配产生了 pSOG19,它包含与内含子 6 序列融合的 35S 启动子、GUS 前导序列、DHFR 基因和胭脂氨酸合成酶终止子。用玉米萎黄病斑点病毒 (MCMV) 的前导序列替换 pSOG19 中的 GUS 前导序列产生载体 pSOG35。pSOG19 和 pSOG35 携带氨苄青霉素抗性的 pUC 基因,并且具有用于外源序列克隆的 HindIII、SphI、PstI 和 EcoRI 位点。

[0107] 构建植物表达盒的要求

[0108] 准备在转基因植物中表达的基因序列首先装配于位于合适的启动子之后并位于合适的转录终止子上游的表达盒中。这些表达盒然后可被容易地转移至上述的植物转化载体中。

[0109] 1. 启动子选择

[0110] 在表达盒中使用的启动子的选择将决定转基因植物中转基因的空间和时间表达模式。选择的启动子将在特定的细胞型(如叶表皮细胞、mesophyll 细胞、根皮细胞)或在特定组织或器官(如根、叶或花)中表达转基因,此选择将反映纤维素酶生物合成的希望的定位。另外,所选的启动子可在光诱导的或其它时间调节启动子之下驱动基因的表达。进一步的(和优选的)选择是所选的启动子可被外部刺激物,如应用特异的化学诱导剂或创伤诱导。这将提供仅当希望时才诱导纤维素酶转录的可能性。

[0111] 2. 转录终止子

[0112] 多种转录终止子均可在表达盒中使用。它们负责转基因和其正确的聚腺苷酸化之外的转录终止。合适的和已知在植物中起作用的转录终止子包括 CaMV 35S 终止子、tml 终止子、胭脂氨酸合成酶终止子、豌豆 rbcS E9 终止子。这些可用于单子叶植物和双子叶植物。

[0113] 3. 增强或调节表达的序列

[0114] 已发现许多序列能增强转录单位内的基因表达,这些序列可与本发明的基因结合使用以增强其在转基因植物中的表达。

[0115] 已发现多种内含子序列能增强表达,尤其在单子叶植物细胞中。例如,发现当引入玉米细胞时,玉米 Adh1 基因的内含子显著增强位于同源启动子之下的野生型基因的表达。发现内含子 1 特别有效,且增强在与氯霉素乙酰转移酶基因的融合构建体中的表达(Callis 等人,基因发育 (Genes Devel) 1:1183-1200(1987))。在相同的实验系统中,玉米 bronze1 基因的内含子在增强表达上具有相似的效果。内含子序列已被常规引入植物转化载体,一般在非翻译前导序列中。

[0116] 已知一定数量的由病毒衍生的非翻译前导序列也可增强表达,且其在双子叶植物细胞中尤其有效。特别是,烟草花叶病毒 (TMV,“Ω-序列”)、玉米萎黄病斑点病毒 (MCMV)

和苜蓿花叶病毒 (AMV) 的前导序列在增强表达上已证明有效 (如 Gallie 等人, 核酸研究 15 :8693-8711(1987) ;Skuzeski 等人, 植物分子生物学 15 :65-79(1990))。

[0117] 4. 细胞内基因产物的定向

[0118] 已知植物中存在定向基因产物的多种机制, 也已表征了控制这些机制作用的序列的一些细节。例如, 基因产物向叶绿体的定向由在多种蛋白质氨基末端发现的信号序列控制, 其在叶绿体输入期间被切除产生成熟蛋白 (如, Comai 等人, 生物化学杂志 263 :15104-15109(1988))。这些信号序列可与异源基因产物融合, 实现异源产物向叶绿体的输入 (van den Broeck 等人, 自然 313 :358-363(1985))。可从编码 RUBISCO 蛋白、CAB 蛋白、EPSP 合成酶、GS2 蛋白和许多已知定位于叶绿体的其它蛋白质的 cDNA 的 5' 末端分离编码合适信号序列的 DNA。

[0119] 其它基因产物定位于其它细胞器如线粒体和过氧化物酶体 (如 Unger 等人, 植物分子生物学 13 :411-418(1989))。也可使用编码这些产物的 cDNA 完成异源基因产物向这些细胞器的定向。这些序列的实例是核编码的 ATP 酶和线粒体特异的天冬氨酸氨基转移酶同工酶。对细胞蛋白质体的定向已由 Rogers 等人描述 (美国国家科学院学报 82 :6512-6516(1985))。

[0120] 另外, 导致基因产物定向于其它细胞区室的序列已被表征。氨基端序列负责定向于内质网、质外体以及从糊粉细胞的胞外分泌 (Koehler 和 Ho, 植物细胞 2 :769-783(1990))。另外, 氨基端序列联合羧基端序列负责基因产物的液泡导向 (Shinshi 等人, 植物分子生物学 14 :357-368(1990))。

[0121] 通过将以上描述的合适的定向序列与目的转基因序列融合, 可以引导转基因产物至任何细胞器或细胞区室。例如, 为了定向于叶绿体, RUBISCO 基因、CAB 基因、EPSP 合成酶基因或 GS2 基因的叶绿体信号序列与转基因的氨基端 ATG 在框架内融合。所选的信号序列应该包含已知的切割位点, 构建的融合体应考虑切割所需的切割位点之后的任何氨基酸。在某些情况中, 可通过在切割位点与转基因 ATG 之间添加少量的氨基酸或替换转基因序列内的某些氨基酸来满足这一需要。可测试用于叶绿体输入所构建的融合基因的叶绿体摄取的功效, 方法是体外转录结构的体外翻译, 随后是体外叶绿体摄取, 使用由 (Bartlett 等人, 在 :Edelmann 等人 (编) 《叶绿体分子生物学中的方法》, Elsevier, 1081-1091 页 (1982) ;Wasmann 等人, 分子基因遗传学 205 :446-453(1986)) 描述的技术。这些构建技术在本领域众所周知, 并且可同样用于线粒体和过氧化物酶体。纤维素酶基因需要的定向的选择将取决于作为给定途径的开始点所需的前体的细胞定位。这通常是胞质的或叶绿体的, 尽管某些情况是线粒体的或过氧化物酶体的。

[0122] 以上描述的细胞定向的机制不仅可与其同源启动子结合使用, 而且可与异源启动子结合使用, 从而实现启动子转录调节下的特异的细胞定向目的, 此启动子具有与衍生定向信号的启动子不同的表达模式。

[0123] 表达盒构建的实施例

[0124] 本发明包括任何在植物中可表达的启动子调节之下的纤维素酶基因的表达, 而不论启动子的来源如何。

[0125] 此外本发明包括任何植物可表达的启动子与任何纤维素酶基因表达所需要或选择的其它序列的联合使用。这些序列包括但不限于, 转录终止子、增强表达的外部序列 (如

内含子 [如 Adh 内含子 1]、病毒序列 [如 TMV- Ω])、以及意在将基因产物定向于特定细胞器和细胞区室的序列。

[0126] 1. 组成型表达 :CaMV 35S 启动子

[0127] 质粒 pCGN1761 的构建在公开的专利申请 EP 0 392 225 (实施例 23) 中描述。pCGN1761 包含“双”35S 启动子和在启动子与终止子之间具有唯一 EcoRI 位点的 tml 转录终止子,并且具有 pUC 型骨架。构建了 pCGN1761 的一个衍生物,它具有一个除存在的 EcoRI 位点外还包含 NotI 和 XhoI 位点的修饰过的多接头。此衍生物被称为 pCGN1761ENX。pCGN1761ENX 用于其多接头内 cDNA 序列或基因序列 (包括微生物开放阅读框序列) 的克隆,其目的是在转基因植物中在 35S 启动子控制下表达。此结构的完整的 35S 启动子 - 基因序列 - tml 终止子盒可被从启动子 5' 侧的 HindIII、SphI、SalI 和 XbaI 位点以及终止子 3' 侧的 XbaI、BamHI 和 BglI 位点切除,用于转移至如上描述的转化载体。此外,双 35S 启动子片段的去除方法可以用 HindIII、SphI、SalI、XbaI 或 PstI 进行 5' 切除,及用任何多接头限制位点 (EcoRI、NotI 或 XhoI) 进行 3' 切除以用另外的启动子替换。

[0128] 2. 通过优化翻译起始位点修饰 pCGN1761ENX

[0129] 对于本部分描述的任何结构,可通过引入增强翻译的序列进行克隆位点周围的修饰。当将微生物衍生的基因引入植物表达盒时这种修饰特别有用,因为这些基因可能不包含适于植物中翻译起始的与起始甲硫氨酸相邻的序列。将微生物衍生的基因在 ATG 处克隆入植物表达盒的情况中,可能需要修饰其插入的位点以优化表达。pCGN1761ENX 的修饰以实施例的形式描述,引入几个用于植物表达的优化序列之一 (如 Joshi, 出处同前)。

[0130] 用 SphI 酶切 pCGN1761ENX,用 T4DNA 聚合酶处理和再连接,于是破坏了位于双 35S 启动子 5' 的 SphI 位点。这产生了载体 pCGN1761ENX/Sph-。用 EcoRI 酶切 pCGN1761ENX/Sph-,连接至序列 5' -AATTCTAAAGCATGCCGATCGG-3' /5' -AATTCCGATCGGCATGCTTTA-3' 的退火的分子接头。这产生了载体 pCGNSENX,它引入了准优化的植物翻译起始序列 TAAA-C,此序列与为 SphI 位点的一部分的 ATG 相邻,此位点适于在其起始甲硫氨酸处克隆异源基因。SphI 位点的下游保留了 EcoRI、NotI 和 XhoI 位点。

[0131] 构建了另一个在起始 ATG 处使用了一个 NcoI 位点的载体。此载体称为 pCGN1761NENX,构建方法是在 pCGN1761ENX 的 EcoRI 位点插入一个序列 5' -AATTCTAAACC ATGGCGATCGG-3' /5' -AATTCCGATCGCCATGGTTTA-3' 的退火的分子接头。因此,此载体包含准优化的序列 TAAACC,此序列与 NcoI 位点内的起始 ATG 相邻。下游位点是 EcoRI、NotI 和 XhoI。然而,在此操作之前,pCGN1761ENX 载体的两个 NcoI 位点 (在 5' 35S 启动子单位的上游位置) 已被破坏,使用的是与以上描述的对 SphI 相似的技术或使用“inside-outside”PCR (Innes 等人,《PCR 方案:方法和应用的指导》,学院出版社,New York (1990))。可测定此操作对表达的任何可能的不利影响,方法是插入任何植物 cDNA 或受体基因序列至克隆位点,随后在植物中进行常规的表达分析。

[0132] 3. 化学调节启动子下的表达

[0133] 本部分描述了用所选的任何启动子替换 pCGN1761ENX 中的双 35S 启动子;化学调节 PR-1a 启动子用实施例的形式在美国专利 5,614,395 中描述,由此全面引入作为参考,化学调节的拟南芥 PR-1 启动子在美国临时申请 60/027,228 号中有描述,在此引入作为参考。选择的启动子优选地用限制酶从其来源切下,但另外可用携带合适末端限制位点的引物进

行 PCR 扩增。如果进行 PCR 扩增,在靶载体中克隆扩增的启动子之后,应该对启动子重新测序以检查扩增错误。从质粒 pCIB1004(见 EP 0 332 104,用于构建的实施例 21)上切下化学调节的烟草 PR-1a 启动子,转移至质粒 pCGN1761ENX。用 NcoI 酶切 pCIB1004,产生的线性片段的 3' 突出端通过 T4 DNA 聚合酶处理提供平端。然后用 HindIII 酶切该片段,所得的包含该片段的 PR-1a 启动子用凝胶纯化,且克隆至已去除双 35S 启动子的 pCGN1761ENX。进行的方法是用 XhoI 酶切,用 T4 DNA 聚合酶产生平端,随后用 HindIII 酶切,分离较大的包含其中克隆有 pCIB1004 启动子片段的载体终止子片段。这产生了一个 pCGN1761ENX 衍生物,它具有 PR-1a 启动子和 tml 终止子以及一个有唯一 EcoRI 和 NotI 位点的间隔多接头。选择的纤维素酶基因可插入此载体,并且融合产物(即启动子-基因-终止子)随后可被转移至任何选择的转化载体中,包括本申请中描述的转化载体。

[0134] 可使用多种化学调节剂以诱导在根据本发明转化的植物中表达纤维素酶编码序列。在本公开内容的上下文中,“化学调节剂”包括已知在植物中是 PR-1a 启动子的诱导物的化学试剂,或其相关的衍生物。用于本发明的化学可诱导纤维素酶基因的一组优选的调节剂基于苯并-1,2,3-噻二唑(BTH)结构,包括但不限于以下类型的化合物:苯并-1,2,3-噻二唑羧酸、苯并-1,2,3-噻二唑硫代羧酸、氰苯并-1,2,3-噻二唑、苯并-1,2,3-羧酸胺、苯并-1,2,3-噻二唑羧酸酞肼、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸、苯并-1,2,3-噻二唑-7-硫代羧酸、7-氰苯并-1,2,3-噻二唑、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸胺、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸酞肼、苯并-1,2,3-噻二唑羧酸烷基酯,其中烷基包含一至六个碳原子、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸甲酯、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸正丙基酯、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸苄基酯、苯并-1,2,3-噻二唑-7-羧酸仲丁基酞肼,及其合适的衍生物。其它化学诱导型物包括,例如,苯甲酸、水杨酸(SA)、聚丙烯酸及其取代的衍生物;合适的取代物包括低级烷基、低级烷氧基、低级硫代烷基和卤素。用于本发明的化学可诱导 DNA 序列的另一组调节剂基于吡啶羧酸结构,如异烟酸结构,优选地是卤代异烟酸结构。优选的是二氯异烟酸及其衍生物,如低级烷基酯。此类化合物的合适的调节剂是如,2,6-二氯异烟酸(INA)及其低级烷基酯,尤其是甲酯。

[0135] 4. 组成型表达:肌动蛋白启动子

[0136] 已知肌动蛋白的几个同种型在大多数细胞型中表达,因此肌动蛋白启动子是用作组成型启动子适当选择。尤其是,水稻 Act1 基因的启动子已被克隆和表征(McElroy 等人,植物细胞 2:163-171(1990))。发现此启动子的 1.3kb 片段包含水稻原生质体中表达所需的所有调节元件。此外,已构建了许多基于 Act1 启动子特异地用于单子叶植物的表达载体(McElroy 等人,分子基因遗传学(Mol. Gen. Genet.) 231:150-160(1991))。它们引入了 Act1-内含子 1、Adh1 5' 侧翼序列和(玉米乙醇脱氢酶基因的)Adh1-内含子 1 和 CaMV 35S 启动子的序列。显示最高表达的载体是 35S 和 Act1 内含子或 Act1 5' 侧翼序列和 Act1 内含子的融合体。(GUS 报告基因的)起始 ATG 附近序列的优化也增强表达。McElroy 等人(分子基因遗传学 231:150-160(1991))描述的启动子表达盒可被方便地修饰以用于纤维素酶基因的表达,并且尤其适用于单子叶植物宿主中。例如,包含该片段的启动子可从 McElroy 结构中去除,用来替换 pCGN1761ENX 中的双 35S 启动子,然后该载体可用于特异基因序列的插入。然后可将构建的融合基因转移至合适的转化载体。在单独的报道中,也发现带有第一个内含子的水稻 Act1 启动子引导了在培养的大麦细胞中的高表达(Chibbar 等人,植物

细胞报道 (Plant Cell Rep.) 12 :506-509(1993))。

[0137] 5. 组成型表达:遍在蛋白启动子

[0138] 遍在蛋白是已知在许多细胞型中积累的另一种基因产物,它的启动子已从几个种克隆,在转基因植物中使用(如向日葵-Binet 等人,植物科学 79 :87-94(1991),玉米-Christensen 等人,植物分子生物学 12 :619-632(1989))。玉米遍在蛋白已在转基因单子叶系统中加以研究,并且其序列和为单子叶植物转化构建的载体公开于专利公开文本 EP 0 342 926(Lubrizol) 中。进一步,Taylor 等人(植物细胞报道 12 :491-495(1993))描述了一种载体(pAHC25),它包含玉米遍在蛋白启动子和第一个内含子,以及经微粒轰击引入时其在许多单子叶植物细胞悬液中的高活性。遍在蛋白启动子适于在转基因植物尤其是单子叶植物中表达纤维素酶基因。合适的载体是 pAHC25 的衍生物或本申请中描述的通过引入合适的遍在蛋白启动子和/或内含子序列被修饰的任何转化载体。

[0139] 6. 根特异的表达

[0140] 本发明的表达纤维素酶的另一个模式是根表达。一种合适的根启动子由 de Framond 所描述(FEBS 290 :103-106(1991)),也在公开的专利申请 EP 0 452 269(Ciba-Geigy) 中描述。此启动子被转移至合适的载体如 pCGN1761ENX,以用于插入纤维素酶基因及随后将完整的启动子-基因-终止子盒转移至目的转化载体。

[0141] 7. 创伤诱导型启动子

[0142] 创伤诱导型启动子也适用于纤维素酶基因的表达。许多这种启动子已被描述(如 Xu 等人,植物分子生物学 22 :573-588(1993),Logemann 等人,植物细胞 1 :151-158(1989),Rohrmeier 和 Lehle,植物分子生物学 22 :783-792(1993),Firek 等人,植物分子生物学 22 :129-142(1993),Warner 等人,植物杂志 (Plant J.) 3 :191-201(1993)),并且均都适用于本发明。Logemann 等人描述了双子叶马铃薯 Wun1 基因的 5' 上游序列。Xu 等人显示双子叶植物马铃薯的创伤诱导型启动子(pin2)在单子叶植物水稻中有活性。进一步,Rohrmeier 和 Lehle 描述了创伤诱导型的且可用于使用标准技术分离同源启动子的玉米 Wipl cDNA 的克隆。相似地,Firek 等人和 Warner 等人描述了单子叶植物药用芦笋(Asparagus officinalis)的创伤诱导型基因,它在局部创伤和病原体侵入部位表达。使用本领域众所周知的克隆技术,可将这些启动子转移至合适的载体,与本发明的纤维素酶基因融合,并用来在植物创伤部位表达这些基因。

[0143] 8. 木髓偏好的表达

[0144] 专利申请 W0 93/07278(Ciba-Geigy) 描述了玉米 trpA 基因的分离,它优先在木髓细胞中表达。介绍了该基因序列和从转录起始延伸至 -1726 的启动子。应用标准分子生物学技术,可将此启动子或其部分转移至载体如 pCGN1761,替换 35S 启动子用来以木髓偏好的方式进行外源基因的表达。实际上,包含木髓偏好的启动子或其部分的片段可被转移至任何载体和为应用于转基因植物而修饰的载体。

[0145] 9. 叶特异的表达

[0146] 一个编码磷酸烯醇羧化酶(PEPC)的玉米基因已由 Hudspeth 和 Grula(植物分子生物学 12 :579-589(1989))描述。应用标准分子生物学技术,此基因的启动子可用来在转基因植物中以叶特异的方式表达任何基因。

[0147] 10. 叶绿体定向的表达

[0148] Chen 和 Jagendorf 开放阅读框 (生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 268 : 2363-2367 (1993)) 已描述了成功应用叶绿体转运肽来输入异源转基因。所使用的肽是烟草 *Nicotiana plumbaginifolia* 的 *rbcS* 基因的转运肽 (Poulsen 等人, 分子基因遗传学 205 : 193-200 (1986))。使用限制酶 *DraI* 和 *SphI*, 或 *Tsp509I* 和 *SphI*, 编码此转运肽的 DNA 序列可被从质粒 *prbcS-8B* 上切下并经操作以与如上描述的任何结构一起使用。*DraI-SphI* 片段从相对于起始 *rbcS* ATG 的 -58 延伸至, 并且包括, 紧接输入切割位点之后的成熟肽的第一个氨基酸 (也是甲硫氨酸), 而 *Tsp509I-SphI* 片段从相对于起始 *rbcS* ATG 的 -8 延伸至, 并且包括, 成熟肽的第一个氨基酸。因此, 可将这些片段适当地插入任何所选的表达盒的多接头, 产生与所选启动子 (如 35S, PR-1a、肌动蛋白、遍在蛋白等) 的非翻译前导序列融合的转录融合基因, 而能使纤维素酶基因插入转运肽下游的正确的融合基因。这种构建在本领域是常规的。例如, *DraI* 末端是平端, 可经 T4 聚合酶处理使 5' *Tsp509I* 位点提供平端, 或另外可与接头或衔接头序列连接, 以方便它与选择的启动子的融合。可照此保留 3' *SphI* 位点, 或另外可与接头序列的衔接头连接, 以方便它插入选择的载体, 以这种方法使可得的合适的限制位点可用于随后所选的纤维素酶基因的插入。理想地是保留 *SphI* 位点的 ATG, 并包含所选的纤维素酶基因的第二个 ATG。Chen 和 Jagendorf 为用于叶绿体输入的理想切割提供了共有序列, 在每个情况中甲硫氨酸优选地位于成熟蛋白的第一个位点。在随后的位点上有更多的变化, 并且氨基酸可能不如此关键。在任何情况中, 可评估融合体结构的体外输入的效率, 使用的方法由 Bartlett 等人 (在: Edelman 等人 (编) 《叶绿体分子生物学方法》, Elsevier, 1081-1091 页 (1982)) 和 Wasmann 等人 (分子基因遗传学 205 : 446-453 (1986)) 描述。一般最好的方法是用在氨基端未修饰的所选纤维素酶基因产生融合基因, 并仅当融合基因显然不以高效率输入叶绿体时才引入修饰, 在这种情况下可根据已有的文献 (Chen 和 Jagendorf ; Wasmann 等人 ; Ko 和 Ko, 生物化学杂志 267 : 13910-13916 (1992)) 进行修饰。

[0149] 通过将 *prbcS-8B* 的 *DraI-SphI* 转运肽编码片段转移至克隆载体 *pCGN1761ENX/Sph-* 构建一种优选的载体。此质粒用 *EcoRI* 酶切, 经 T4DNA 聚合酶处理使末端变为平端。用 *SphI* 酶切质粒 *prbc-8B*, 连接至序列 5' -CCAGCTGGAATTCCG-3' / 5' -CGGAATTCCAGCTGG CATG-3' 的退火的分子衔接头。通过 T4 激酶处理使所得产物 5' 端磷酸化。随后用 *DraI* 酶切释放连接至以上描述的经修饰的载体的平端 *ex-EcoRI* 位点的转运肽编码片段。通过测序鉴定带有方向为插入片段 5' 端的与 35S 启动子 3' 端相邻的克隆。这些克隆携带 35S 前导序列与 *rbcS-8A* 启动子 - 转运肽序列的 DNA 融合基因, 其从相对于 *rbcS* ATG 的 -58 延伸至成熟蛋白的 ATG, 并且在此位点包含唯一的 *SphI* 位点、一个新产生的 *EcoRI* 位点以及 *pCGN1761ENX* 已有的 *NotI* 和 *XhoI* 位点。这个新载体称为 *pCGN1761/CT*。将 DNA 序列转移至 *pCGN1761/CT* 框架内, 方法是应用 PCR 技术扩增和在扩增的 ATG 处引入 *SphI*、*NSphI* 或 *NlaIII* 位点, 随后用合适的酶进行限制性酶切, 连接至 *SphI* 切的 *pCGN1761/CT*。为方便构建, 需要改变克隆基因的第二个氨基酸, 然而在几乎所有情况中, 与标准定点诱变一起使用 PCR, 能构建任何希望的在成熟蛋白的酶切位点和第一个甲硫氨酸附近的序列。

[0150] 另一种优选的载体的构建是用 *prbcS-8A* 的 *BamHI-SphI* 片段替换 *pCGN1761ENX* 的双 35S 启动子, 前者包含全长的光调节的 *rbcS-8A* 启动子, 它从 -1038 (相对于转录开始位点) 直到成熟蛋白的第一个甲硫氨酸。用 *PstI* 和 *EcoRI* 酶切带有破坏的 *SphI* 位点的经修

饰的 pCGN1761,并用 T4 DNA 聚合酶处理以提供平端。用 SphI 酶切 prbcS-8A,连接至上述序列的退火的分子衔接头。所得产物经 T4 激酶处理使 5' - 端磷酸化。随后用 BamHI 酶切释放启动子 - 转运肽,它包含经 T4 DNA 聚合酶处理、提供 BamHI 平端的片段。将如此产生的启动子 - 转运肽片段克隆至制备的 pCGN1761ENX 载体,产生包含 rbcS-8A 启动子和转运肽并有一个位于切割位点用来插入异源基因的 SphI 位点的结构。此外, SphI 位点下游有 EcoRI (重新产生的)、NotI 和 XhoI 克隆位点。这个结构称为 pCGN1761rbcS/CT。

[0151] 可以应用其它来源(单子叶和双子叶的)和其它基因的其它 GS2 叶绿体转运肽编码序列进行相似的操作。另外,随后可按相似的方法来完成对其它亚细胞区室如线粒体的定向。

[0152] 双子叶植物的转化

[0153] 用于双子叶植物的转化技术在本领域中众所周知,包括基于农杆菌的技术和不需要农杆菌的技术。非农杆菌的技术包括原生质体或细胞直接摄取外源遗传物质。这可通过 PEG 或电穿孔介导的摄取、粒子轰击介导的运输、或显微注射来完成。这些技术的实例描述于 Paszkowski 等人,欧洲分子生物学学会杂志 EMBO J 3 :2717-2722(1984), Potrykus 等人,分子基因遗传学 199 :169-177(1985), Reich 等人,生物技术 4 :1001-1004(1986),以及 Klein 等人,自然 327 :70-73(1987)。在每个例子中,应用本领域中已知的标准技术将转化的细胞再生为整个植物。

[0154] 以其高转化效率和对许多不同种的广泛应用,农杆菌介导的转化是用于转化双子叶植物的优选的技术。用农杆菌常规转化的许多作物品种包括烟草、西红柿、向日葵、棉花、油籽油菜、葡萄、马铃薯、大豆、苜蓿和白杨(EP 0 317 511(棉花 [1313]), EP 0 249 432(西红柿, Calgene), WO 87/07299(Brassica, Calgene), US 4, 795, 855(白杨))。农杆菌转化一般包括将携带目的外源 DNA 的二元载体(如 pCIB200 或 pCIB2001)转移至合适的农杆菌菌株,这依赖于在共生 Ti 质粒上或染色体上由宿主农杆菌菌株携带的 vir 基因的完整性(如用于 pCIB200 和 pCIB2001 的 CIB542 株(Uknes 等人,植物细胞 5 :159-169(1993))。重组二元载体向农杆菌的转移通过三亲本交配方法完成,使用携带重组二元载体的大肠杆菌、携带质粒如 pRK2013 并能将重组二元载体转移至靶农杆菌株的辅助大肠杆菌菌株。另外,可通过 DNA 转化将重组二元载体转移至农杆菌(Hofgen 和 Willmitzer,核酸研究 16 :9877(1988))。

[0155] 通过重组农杆菌转化靶植物种通常包括农杆菌与植物外植体的共培育,且依照在本领域众所周知的方案。转化的组织在带有在二元质粒 T-DNA 边界之间存在的抗生素或除草剂抗性标记的选择培养基上再生。

[0156] 单子叶植物的转化

[0157] 大多数单子叶植物种类的转化现也已成为常规。优选的技术包括使用 PEG 或电穿孔技术直接将基因转移至原生质体,以及使用粒子轰击转移至愈伤组织。可用单种 DNA 或多种 DNA(即共转化)进行转化,这些方法都适用于本发明。共转化的优点是避免了复杂的载体构建,以及产生具有目的基因和选择性标记的非连锁基因座的转基因植物,如果希望能在随后的子代中去除选择性标记的话。然而,使用共转化的一个缺点是分开的 DNA 种类整合入基因组的频率低于 100% (Schocher 等人,生物技术 4 :1093-1096(1986))。

[0158] 专利申请 EP 0 292 435([1280/1281], Ciba-Geigy)、EP 0 392 225(Ciba

Geigy) 和 WO 93/07278(Ciba-Geigy) 描述了从玉米的一个优良近交系制备愈伤组织和原生质体、使用 PEG 或电穿孔转化原生质体、以及从转化的原生质体再生玉米植物的技术。Gordon-Kamm 等人(植物细胞 2:603-618(1990)) 和 Fromm 等人(生物技术 8:833-839(1990)) 发表了使用粒子轰击转化 A188- 衍生的玉米株系的技术。此外,申请 WO 93/07278(Ciba-Geigy) 和 Koziel 等人(生物技术 11:194-200(1993)) 描述了经粒子轰击转化玉米的优良近交系的技术。此技术使用 1.5-2.5mm 长的未成熟的玉米胚,它是传粉后 14-15 天从玉米穗上切下的,并且使用 PDS-1000He Biolistics 装置用于轰击。

[0159] 进行水稻的转化也可使用应用原生质体和粒子轰击的直接基因转移技术。用于 Japonica- 型和 Indica- 型的原生质体介导的转化已有描述(Zhang 等人,植物细胞报道 7:379-384(1988);Shimamoto 等人,自然 338:274-277(1989);Datta 等人,生物技术 8:736-740(1990))。使用粒子轰击均可常规转化这两个类型(Christou 等人,生物技术 9:957-962(1991))。

[0160] 专利申请 EP 0 332 581(Ciba-Geigy) 描述了 Pooideae 原生质体的产生、转化和再生的技术。这些技术允许 Dactylis 和小麦的转化。而且,Vasil 等人(生物技术 10:667-674(1992)) 描述了应用粒子轰击转入 C 型长期可再生愈伤组织细胞的小麦转化,Vasil 等人(生物技术 11:1553-1558(1993)) 和 Weeks 等人(植物生理 102:1077-1084(1993)) 也描述了应用粒子轰击未成熟胚和未成熟胚衍生的愈伤组织的小麦转化。然而,一个优选的用于小麦转化的技术,包括通过粒子轰击未成熟胚转化小麦,并包括基因输运前的高蔗糖或高麦芽糖步骤。轰击前,任何数量的胚(长 0.75-1mm)置于含 3% 蔗糖和 3mg/l 2,4-D 的 MS 培养基上(Murashiga 和 Skoog, Physiologia Plantarum 15:473-497(1962)),用于可在暗处进行的体细胞胚的诱导。在选定的轰击日,从诱导培养基上移出胚,将其置于渗透剂上(即以希望的浓度一般是 15%,添加了蔗糖或麦芽糖的诱导培养基)。将胚质壁分离 2-3 小时,然后轰击。一般是每个靶平板二十个胚,尽管不是关键的。用标准方法沉淀合适的携带基因的质粒(如 pCIB3064 或 pSG35)于微米尺寸的金粒子上。每个胚平板用 DuPont Biolistics 氦装置轰击且用约 1000psi 的爆发压力,使用标准的 80 目的筛子。轰击后,将胚放回暗处回复约 24 小时(仍在渗透剂上)。24 小时后,从渗透剂中移出胚,将其放回诱导培养基,在再生之前放置约一个月。大约一个月后,将含发育的胚发生愈伤组织的胚外植体转移至再生培养基(MS+1mg/l NAA,5mg/l GA),它另外包含适当的选择试剂(在 pCIB3064 的情况中是 10mg/l basta,在 pSG35 的情况中是 2mg/l 氨基嘌呤)。约一个月后,将发育的苗转移至更大的被称为“GA7s”无菌容器中,它含有半强度的 MS、2% 蔗糖和相同浓度的选择试剂。专利申请 08/147,161 描述了小麦转化的方法,在此引入作为参考。

[0161] 叶绿体转化

[0162] 质体转化技术在美国专利 5,451,513、5,545,817 和 5,545,818 中有广泛的描述,它们都由此明确地全面引入作为参考;在 PCT 申请 WO 95/16783 号中有描述,由此全面引入作为参考;并在 McBride 等人(1994)美国国家科学院学报 91:7301-7305 中有描述,也在此全面引入作为参考。叶绿体转化的基本技术包括将侧翼为选择性标记的克隆的质体 DNA 区与目的基因一起引入合适的靶组织,如使用 biolistics 或原生质体转化(如氯化钙或 PEG 介导的转化)。1 到 1.5kb 的侧翼区,称为定向序列,方便了与质体基因组的同源

重组,并且因此允许质体基因组特定区的替换或修饰。最初,叶绿体 16S rRNA 和赋予壮观霉素和 / 或链霉素的抗性的 rps12 基因中的点突变被用作转化的选择性标记 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., 和 Maliga, P. (1990) 美国国家科学院学报 87 :8526-8530, 在此引入作为参考 ;Staub, J. M. 和 Maliga, P. (1992) 植物细胞 4, 39-45, 在此引入作为参考)。这导致了稳定的同胞质转化体,其频率是每 100 次轰击靶叶大约产生一个转化体。这些标记间克隆位点的存在允许用于引入外源基因质体定向载体的产生 (Staub, J. M. 和 Maliga, P. (1993) 欧洲分子生物学会杂志 12, 601-606, 在此引入作为参考)。获得转化频率的实质增加的方法是将隐性 rRNA 或 r- 蛋白抗生素抗性基因替换为显性选择标记,编码壮观霉素解毒酶氨基糖苷 -3' 腺苷转移酶的细菌 aadA 基因 (Svab, Z. 和 Maliga, P. (1993) 美国国家科学院学报 90, 913-917, 在此引入作为参考)。以前,这个标记已成功用于绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 衣藻质体基因组的高频率转化 (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) 核酸研究 19, 4083-4089, 在此引入作为参考)。用于质体转化的其它选择性标记在本领域中已知,并包括于本发明的范围中。一般,转化后需要大约 15-20 个细胞分裂周期来达到同质体状态。

[0163] 通过同源重组,将基因插入每个植物细胞存在的环形质体基因组的所有几千个拷贝中的质体表达,利用优于核表达的基因的许多拷贝数使表达水平能轻易超过总可溶植物蛋白的 10%。然而,这种高表达水平可造成潜在的存活问题,尤其是在植物生长和发育早期。表达对转基因植物的生存高度有害的生物活性酶或某些蛋白质也造成相似的问题,因为如果组成型地表达可能使其无法成功引入植物基因组。因此,一个方面,本发明把化学诱导型的烟草 PR-1a 启动子 (US 5, 614, 395 引入作为参考) 控制下在核基因组中叶绿体定向噬菌体 T7 RNA 聚合酶的表达与 T7 基因 10 启动子 / 终止子序列调节的叶绿体报告转基因结合在一起。例如,当对于母体遗传的编码 β - 葡糖醛酸酶 (GUS) 报告基因的 uidA 基因同胞质的质体转化体被在细胞核中表达 T7 聚合酶的株系传粉时,获得携带两个转基因构建体但不表达 GUS 蛋白的 F1 植物。仅在对叶使用 PR-1a 诱导化合物苯并 (1,2,3) 噻二唑 -7- 硫代羧酸 S- 甲酯 (BTH) 以后,才在这些植物的质体中引发大量酶活化的 GUS 的合成。

[0164] 如以下在实施例的 C 部分中阐述,本发明也包括应用叶绿体定向的 T7RNA 聚合酶表达系统合成大量纤维素降解酶。

[0165] 本发明将参照以下详细的实施例进一步描述。提供这些实施例的目的仅仅是说明,除非另外指明而不意在限制。

[0166] 实施例

[0167] 在此使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术在本领域众所周知,并被描述于 J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis 的《分子克隆 :实验室手册》,冷泉港实验室,冷泉港, NY (1989), 和 T. J. Silhavy, M. L. Berman, 和 L. W. Enquist 的《基因融合实验》,冷泉港实验室,冷泉港, NY (1984), 以及 Ausubel, F. M. 等人的《现代分子生物学方法》,由 Greene Publishing Assoc. 和 Wiley-Interscience 出版 (1987)。

[0168] A. 在植物胞质溶胶中纤维素酶的表达

[0169] 实施例 A1 :包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0170] 包含褐色热单孢菌 E1 基因 (GenBank 保藏号 L20094) 的质粒 pGFE1 (Jung 等人 (1993) 应用环境微生物 (Appl. Environ. Microbiol.) 59, 3032-304

[0171] 3) 编码有内切葡聚糖酶活性的蛋白,其用作 PCR 模板,使用一个左至右“顶链 (top strand)”引物,它包含成熟 E1 蛋白第一个密码子之前的 ATG、成熟蛋白的前 21 个碱基对和新产生的 ATG 处的 NcoI 限制位点 (引物 E1 1:GCG CCC ATG GAC GAA GTC AAC CAG ATT CGC),以及一个与 E1 基因的新产生的 ATG 的位点 322 至 346 同源的右至左“底链 (bottom strand)”引物 (引物 E1 2:CCA GTC GAC GTT GGAGGT GAA GAC)。PCR 反应使用 AmpliTaq DNA 聚合酶根据厂商推荐进行 (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ),于 94℃ (30s), 40℃ (60s) 和 72℃ (30s) 五个循环,随后 94℃ (30s),55℃ (60s) 和 72℃ (30s) 25 个循环。这产生一个 352bp 的产物,它在左端包含一个 NcoI 位点、在右端包含一个 EcoRI 位点,并且包含无信号序列的 E1 基因 5' 端。使用标准方法凝胶纯化此片段,用 NcoI 和 EcoRI 酶切 (所有限制酶购自 Promega, Madison, WI 或 New England Biolabs, Beverly, MA),并连接至 pTC191 (De La Fuente 等人, (1994) 基因 139,83-86) 的 NcoI 和 EcoRI 位点,获得 pE1。

[0172] 然后用 EcoRI 和 ScaI 消化质粒 pGFE1。用凝胶纯化包含 E1 基因 3' 端的 3.0kb 长 EcoRI 片段,其与之前用 EcoRI 消化的 pE1 连接,获得包含无信号序列的完整 E1 基因的 pCTE1。用 NcoI 和 SacI 消化质粒 pCTE1。用凝胶纯化包含 E1 基因的 3.3kb 长片段,并连接至 pJG203 的在 903bp 长烟草 PR-1a 启动子和 nos 基因终止信号之间的 NcoI 和 SacI 位点 (Uknes 等人 (1993), 植物细胞 5,159-169,通过去除另外的 SacI 位点而修饰, (Joern Goerlach, 笔记本 2941 号,4-9 页和 13-15 页),产生包含与烟草 PR-1a 启动子融合的 E1 基因的 pTPR1E1 (图 1)。

[0173] 用 XhoI 和 XbaI 消化质粒 pTPR1E1,用凝胶纯化包含嵌合 E1 基因构建体的 4.5kb 长片段,并连接至 pBHYGM 的 XhoI 和 XbaI 位点,获得二元载体 pEGL101。pBHYGM 是修饰的 pGPTV-Hyg 载体 (Becker 等人 (1992) 植物分子生物学 20,1195-1197),产生方法是将包含 BfrI/ApaI/ClaI/SmaI/BfrI/XbaI/SalI/PstI/SphI/HindIII 限制位点的多接头插入 pGPTV-Hyg 的 EcoRI 和 XbaI 位点。

[0174] 实施例 A2:包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0175] 包含褐色热单孢菌 E2 基因的质粒 pJT17 (Ghangas 等人 (1988) 应用环境微生物 54,2521-2526;Lao 等人 (1991) 细菌学杂志 173,3397-3407) (GenBank 保藏号 M73321),编码有纤维二糖水解酶活性的蛋白质,其用作 PCR 模板,使用一个左至右“顶链”引物,它包含 E2 信号序列最后一个密码子之前的 ATG、成熟蛋白的前 18 个碱基对和新产生的 ATG 处的 NcoI 限制位点 (引物 E21:GCG CGC CAT GGC CAA TGA TTC TCCGTT CTA C),以及一个与 E2 基因的新产生的 ATG 的位点 310 到 334 同源的右至左“底链”引物 (引物 E22:GGG ACG GTT CTT CAG TCC GGC AGC)。PCR 反应使用 AmpliTaq DNA 聚合酶根据厂商推荐进行,于 94℃ (30s), 40℃ (60s) 和 72℃ (30s) 五个循环,随后 94℃ (30s),55℃ (60s) 和 72℃ (30s) 25 个循环。产生一个 341bp 的产物,它在左端包含一个 NcoI 位点、在右端包含一个 EcoRI 位点且包含无信号序列的 E2 基因的 5' 端。应用标准方法凝胶纯化此片段,用 NcoI 和 EcoRI 酶切,并连接至 pTC191 的 NcoI 和 EcoRI 位点,获得 pE2。

[0176] 然后用 EcoRI 和 ScaI 消化质粒 pJT17。用凝胶纯化包含 E2 基因 3' 端的 1.7kb 长片段,与之前用 EcoRI 和 SacI 消化的 pE2 连接,获得包含无信号序列的完整 E2 基因的 pCTE2。用 NcoI 和 SacI 消化质粒 pCTE2,用凝胶纯化包含 E2 基因的 2.0kb 长片段,并连接

至 pJG203 的 NcoI 和 SacI 位点,产生包含与 903bp 长烟草 PR-1a 启动子片段融合的 E2 基因的 pTPR1E2(图 1)。

[0177] 用 XhoI 和 XbaI 消化质粒 pTPR1E2,用凝胶纯化包含嵌合 E2 基因结构的 2.9kb 长片段,并连接至 pBHYGM 的 XhoI 和 XbaI 位点,构建 pEGL102。

[0178] 实施例 A3:包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0179] 质粒 pD374, pD370 的修饰形式 (Collmer 和 Wilson(1983) 生物技术 1,594-601; Lao 等人 (1991) 细菌学杂志 173,3397-3407) 包含褐色热单孢菌 E5 基因 (GenBank 保藏号 L01577),编码有内切葡聚糖酶活性的蛋白,其用作 PCR 模板,使用左至右“顶链”引物,它包含成熟 E5 蛋白第一个密码子之前的 ATG、成熟蛋白的前 21 个碱基对和新产生的 ATG 处的 NcoI 限制位点(引物 E51:CGC CCA TGG CCG GTC TCA CCG CCA CAG TC),以及右至左“底链”引物,它与 E5 基因的新产生的 ATG 的位点 89 到 114 同源(引物 E52:GAC GAC CTC CCA CTG GGA GAC GGTG)。根据厂商推荐 AmpliTaq DNA 聚合酶用于 PCR,于 94℃ (30s),40℃ (60s) 和 72℃ (30s) 五个循环,随后 94℃ (30s),55℃ (60s) 和 72℃ (30s) 25 个循环。这产生一个 119bp 的产物,它在左端包含一个 NcoI 位点、在右端包含一个 XhoI 位点,并且包含无信号序列的 E5 基因 5' 端。凝胶纯化此片段,用 NcoI 和 XhoI 酶切,并连接至 pCIB4247 的 NcoI 和 XhoI 位点以获得 pCE5。pCIB4247 是 pUC19 衍生物 (Yanisch-Perron 等人 (1985) 基因 33,103-119),包含具有 NcoI, XhoI 和 EcoRI 限制位点的多接头。

[0180] 为重建完整的 E5 基因,包含 E5 基因 3' 端的 pD374 的 1.4kb 长 XhoI/PvuII 片段被亚克隆至 pICEM19R+ 的 XhoI 和 EcoRV 位点,pICEM19R+ 是 pUC19 衍生物,包含具有 XhoI、EcoRV 和 EcoRI 限制位点的多接头,长片段作为 XhoI/EcoRI 片段切下,连接至 pCE5 的 XhoI 和 EcoRI 位点,形成包含完整 E5 基因的 pCTE5。pCTE5 用 EcoRI 消化,EcoRI 位点的突出端用 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 (Promega, Madison, WI) 补平,质粒 DNA 用 NcoI 进一步消化。用凝胶纯化包含 E5 基因的 1.5kb 长片段,并连接至 pJG203 的 NcoI 和 EcoICRI 位点,产生包含与 903bp 长烟草 PR-1a 启动子融合的 E5 基因的 pTPR1E5(图 1)。

[0181] 用 ApaI, XbaI 和 SacI 消化质粒 pTPR1E5,用凝胶纯化包含嵌合 E5 基因结构的 2.7kb 长 ApaI/XbaI 片段,并连接至 pBHYGM 的 ApaI 和 XbaI 位点,构建 pEGL105。

[0182] 实施例 A4:包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0183] 包含 E5 基因的 pCTE5 的 1.5kb 长 NcoI/EcoRI 片段,将其突出端预先用 Klenow DNA 聚合酶补平,且凝胶纯化,连接至 pCGN1761 的在复制 CaMV 35S 启动子 (Kay 等人 (1987) 科学 236,1299-1302) 和 tm1 基因终止信号 (Ream 等人 (1983) 美国国家科学院学报 80, 1660-1664) 之间的补平的 EcoRI 位点,产生 p35SE5(图 1)。将包含嵌合基因的 p35SE5 的 4.6kb 长片段插入 pBHYGM 的 XbaI 位点,获得 pEGL355。

[0184] 实施例 A5:包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0185] 将包含 E1 基因的 pCTE1 的 3.3kb 长 NcoI(补平的)/SacI 片段凝胶纯化,连接至 pCGN1761 的补平的 EcoRI 位点。将包含与 CaMV 35S 启动子融合的 E1 编码序列的嵌合基因插入 pBHYGM 的 XbaI 位点。

[0186] 实施例 A6 :包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0187] 将包含 E2 基因的 pCTE2 的 2.0kb 长 NcoI (补平的)/SacI 片段凝胶纯化,连接至 pCGN1761 的补平的 EcoRI 位点。将包含与 CaMV 35S 启动子融合的 E2 编码序列的嵌合基因插入 pBHYGM 的 XbaI 位点。

[0188] 实施例 A7 :用根瘤农杆菌转化烟草叶盘

[0189] 通过电穿孔 (Dower, W. J. (1987), 植物分子生物学报告 (Plant Mol.Biol. Reporter) 1 :5) 将二元载体构建体 pEGL101、pEGL102、pEGL105 和 pEGL355 转化至根瘤农杆菌菌株 GV3101 (Bechtold, N. 等人 (1993), CR Acad. Sci. Paris, Science de la vie, 316 : 1194-1199)。相同的方法用于以包含嵌合纤维素酶基因的其它构建体转化烟草。

[0190] 烟草 (*Nicotiana tabacum* cv' Xanthi nc') 和转基因系“NahG”的叶盘过量表达水杨酸羟化酶基因 (Gaffney 等人 (1993) 科学 261 :754-756), 将其与包含上述构建体的农杆菌克隆共培育 (Horsch 等人 (1985) 科学 227 :1229-1231), 转化体用对 50 μ g/ml 潮霉素 B 的抗性来筛选。每个构建体筛选出大约 50 个独立的潮霉素系 (T0 系), 在不含激素的培养基上生根。

[0191] 实施例 A8 :玉米的转化

[0192] 通过粒子轰击未成熟胚的玉米转化, 按 Koziel 等人 (生物技术 11 :194-200, 1993) 所描述的进行。

[0193] 实施例 A9 :小麦的转化

[0194] 使用粒子轰击转化未成熟的小麦胚和未成熟的胚衍生的愈伤组织, 按 Vasil 等人 (生物技术 11 :1553-1558, 1993) 和 Weeks 等人 (植物生理 102 :1077-1084, 1993) 所描述的进行。

[0195] 实施例 A10 :具有可诱导纤维素酶基因表达的转基因系的筛选

[0196] 对于每个转基因系, 大约 2-3cm² 的双叶钻孔在 3ml 苯并 (1,2,3) 噻二唑 -7- 硫代羧酸 S- 甲酯 (BTH, 5.6mg/10ml) 或无菌蒸馏水中, 于约 300 μ mol/m²/s 照射下温育 2 天。收获叶物质, 速冻并在液氮中磨碎。提取总 RNA (Verwoerd 等人 (1989) NAR 17, 2362), 使用对各个纤维素酶基因特异的放射性标记探针如所述 (Ward 等人 (1991) 植物细胞 Cell 3, 1085-1094) 进行 Northern 印迹分析。

[0197] 具有高水平可诱导转基因表达的转基因系开花并自花传粉, 产生 T1 种子。每个转基因系的十个 T1 种子在土壤中萌发, 产生的植物自花传粉。这些植物的 T2 种子在包含 50 μ g/ml 潮霉素 B 的 T 琼脂培养基 (Nitsch 和 Nitsch (1969) 科学 163, 85-87) 上萌发, 以鉴定对于选择性标记和连锁转基因纯合的株系。

[0198] 实施例 A11 :在转基因植物中纤维素酶表达的诱导

[0199] 纯合核转化株系的种子在 T 琼脂培养基上无菌萌发, 于 300 μ mol/m²/s 照射下温育大约 4-6 周。另外, 种子在土壤中萌发, 在温室中生长大约两个月。收获在组成型表达 (CaMV 35S 启动子) 下表达纤维素酶基因的株系的物质, 立即直接在液氮中骤冻, 而包含与化学诱导型 PR-1a 启动子融合的纤维素酶基因的株系首先喷施 1mg/ml BTH 或水后, 温育 1-7 天, 然后收获物质并且骤冻。

[0200] 实施例 A12 :转基因植物纤维素酶含量的测定

[0201] 为测定转基因植物组织中存在的纤维素酶的量进行化学发光 (Amersham) Western 印迹分析, 根据厂商说明及 Harlow 和 Lane (1988) 《抗体: 实验室手册》, 冷泉港实验室, 冷泉港, 使用抗 E1、E2 和 E5 蛋白的抗血清以及纯化的 E1、E2 和 E5 蛋白标准 (由 D. Wilson, Cornell University, Ithaca, N. Y. 提供) 进行。

[0202] 实施例 A13: 转基因植物中纤维素酶活性的测定

[0203] 如上所述收获叶物质, 在 PC 缓冲液 (50mM 磷酸盐, 12mM 柠檬酸, pH6.5) 中匀浆。通过在 PC 缓冲液中稀释适量的 4-甲基伞形酮 (MU, Sigma 目录 M1381 号) 制备标准曲线 (10 纳摩尔至 10 微摩尔)。将每个标准的双份 100 μ l 等份和每个样本的双份 50 μ l 等份分配于 96-孔微量滴定板的各个孔中。然后将 50 μ l 在 PC 缓冲液中制备的 2mM 4-甲基伞形酮- β -D-纤维二糖吡喃糖苷 (MUC, Sigma 目录 M6018 号) 加入每个样本孔, 将板密封以防止蒸发, 于 55°C 或 37-65°C 的其它温度温育 30 分钟。加入 100 μ l 0.15M 甘氨酸 / NaOH (pH10.3) 终止反应, 用微板荧光计测量纤维素酶活性引起的 460nm 处的 MU 荧光发射 (激发波长 = 355nm)。

[0204] B. 纤维素酶的液泡定向表达

[0205] 实施例 B1: 包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0206] 包含褐色热单孢菌 E5 基因的质粒 pD374 (见实施例 A3) 被用作 PCR 模板, 使用左至右“顶链”引物, 它在 E5 基因中相对于内源 ATG 从位点 1,135 延伸到 1,156, 并在左端包含一个另外的 NcoI 位点 (引物 VAC1: CAT GCC ATG GGT GAG GCC TCC GAG CTG TTC C), 以及右至左“底链”引物, 它的序列与 E5 基因的最后 21bp 同源, 并包含 21bp 的由烟草壳多糖酶基因衍生的液泡定向序列 (Shishi 等人 (1990) 植物分子生物学 14, 357-368, Neuhaus 等人 (1991) 美国国家科学院学报 88, 10362-10366)、相同烟草壳多糖酶基因的终止密码子以及一个 SacI 限制位点 (引物 VAC2: TGC GAG CTC TTA CAT AGT ATC GAC TAA AAG TCC GGA CTG GAG CTT GCT CCG CAC)。根据厂商推荐使用 AmpliTaq DNA 聚合酶进行 PCR, 94°C (30s), 40°C (60s) 和 72°C (30s) 五个循环, 随后 94°C (30s), 55°C (60s) 和 72°C (30s) 25 个循环。这产生一个包含与液泡定向序列融合的 E5 基因的 3' 端的 283bp 的产物。凝胶纯化此片段, 用 NcoI 和 SacI 酶切, 并连接至 pJG203 的 NcoI 和 SacI 位点, 获得 pJGDE5。

[0207] 然后用 NcoI 和 SacI 消化质粒 pD374, 凝胶纯化包含有信号序列的 E5 基因 5' 端的 1.1kb 长片段, 将其连接至 pJGDE5 的 NcoI 和 SacI 位点, 获得 pVACE5, 它包含带有信号序列的完整 E5 基因和与 903bp 长烟草 PR-1a 启动子融合的液泡定向序列 (图 1)。

[0208] 质粒 pVACE5 用 ApaI, XbaI 和 SacI 消化, 用凝胶纯化产生的包含嵌合 E5 基因的 2.8kb 片段, 连接至 pBHYGM 的 ApaI 和 XbaI 位点, 获得 pEGL115。

[0209] 实施例 B2: 包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0210] 一种二元农杆菌转化载体, 它包含褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列、信号序列和与烟草 PR-1a 启动子融合的液泡定向序列, 按实施例 B1 中对褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列所描述的方法构建此载体。

[0211] 实施例 B3: 包含与烟草 PR-1a 启动子融合的褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0212] 一种二元农杆菌转化载体,它包含褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列、信号序列和与烟草 PR-1a 启动子融合的液泡定向序列,按实施例 B1 中对褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列所描述的方法构建此载体。

[0213] 实施例 B4 :包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0214] 用 NcoI 和 EcoRI 消化质粒 pVACE5。产生的 1.6kb 片段其突出 NcoI 端预先已用 Klenow DNA 聚合酶补平,将其凝胶纯化,连接至 pCGN1761 的补平的 EcoRI 位点,获得包含带信号序列的 E5 基因和与 CaMV 35S 启动子融合的液泡定向序列的 p35SVACE5(图 1)。将包含嵌合 E5 基因的 p35SE5 的 4.7kb 长片段插入 pBHYGM 的 XbaI 位点,构建 pEGL315。

[0215] 实施例 B5 :包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0216] 一种二元农杆菌转化载体,它包含褐色热单孢菌 E1 纤维素酶编码序列、信号序列和与 CaMV 35S 启动子融合的液泡定向序列,按实施例 B4 中对于褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列所描述的方法构建此载体。

[0217] 实施例 B6 :包含与 CaMV 35S 启动子融合的褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列的嵌合基因的制备

[0218] 一种二元农杆菌转化载体,它包含褐色热单孢菌 E2 纤维素酶编码序列、信号序列和与 CaMV 35S 启动子融合的液泡定向序列,按实施例 B4 中对于褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列所描述的方法构建此载体。

[0219] 实施例 B7 :用根瘤农杆菌转化烟草叶盘

[0220] 通过电穿孔 (Dower, W. J. (1987), 植物分子生物学报告 1 :5) 将二元载体构建体 pEGL115 和 pEGL315 转化至根瘤农杆菌株 GV3101 (Bechtold, N. 等人 (1993), CR Acad. Sci. Paris, Science de la vie, 316 :1194-1199)。相同的方法用于以包含嵌合纤维素酶基因的其它构建体转化烟草。

[0221] *Nicotiana tabacum* cv' Xanthi nc' 和转基因系“NahG”的叶盘过量表达水杨酸羟化酶基因 (Gaffney 等人 (1993) 科学 261 :754-756), 将其与包含上述构建体的农杆菌克隆共培育 (Horsch 等人 (1985) 科学 227 :1229-1231), 转化体用对 50 μ g/ml 潮霉素 B 的抗性来选择。每个构建体选出大约 50 个独立的潮霉素系 (T0 系), 在不含激素的培养基上生根。

[0222] 实施例 B8 :玉米的转化

[0223] 通过粒子轰击未成熟胚的玉米转化,按 Koziel 等人 (生物技术 11, 194-200, 1993) 所述进行。

[0224] 实施例 B9 :小麦的转化

[0225] 使用粒子轰击转化未成熟的小麦胚和未成熟胚衍生的愈伤组织,按 Vasil 等人 (生物技术 11 :1553-1558, 1993) 和 Weeks 等人 (植物生理 102 :1077-1084, 1993) 所述进行。

[0226] 实施例 B10 :具有可诱导纤维素酶基因表达的转基因系的筛选

[0227] 对于每个转基因系,大约 2-3cm² 的双叶钻孔在 3ml 苯并 (1,2,3) 噻二唑 -7- 硫代羧酸 S- 甲酯 (BTH, 5.6mg/10ml) 或无菌蒸馏水中,于约 300 μ mol/m²/s 照射下温育 2 天。

收获叶物质,骤冻,并在液氮中磨碎。提取总 RNA(Verwoerd 等人 (1989) NAR 17,2362),使用对各个纤维素酶基因特异的放射性标记探针如所述(Ward 等人 (1991) 植物细胞 3,1085-1094) 进行 Northern 印迹分析。

[0228] 具有高水平可诱导转基因表达的转基因系开花并自花传粉,产生 T1 种子。每个转基因系的十个 T1 种子在土壤中萌发,产生的植物自花传粉。这些植物的 T2 种子在包含 50 μ g/ml 潮霉素 B 的 T 琼脂培养基(Nitsch 和 Nitsch(1969) 科学 163,85-87) 上萌发,以鉴定对选择性标记和连锁转基因纯合的系。

[0229] 实施例 B11:在转基因植物中纤维素酶表达的诱导

[0230] 纯合核转化株系的种子在 T 琼脂培养基上无菌萌发,于 300 μ mol/m²/s 照射下温育大约 4-6 周。另外,种子在土壤中萌发,在温室中生长大约两个月。收获在组成型表达(CaMV 35S 启动子)下表达纤维素酶基因的株系的物质,立即直接在液氮中骤冻,而包含与化学诱导型 PR-1a 启动子融合的纤维素酶基因的株系首先喷施 1mg/ml BTH 或水,温育 1-7 天,收获物质并且骤冻。

[0231] 实施例 B12:转基因植物纤维素酶含量的测定

[0232] 为测定转基因植物组织中存在的纤维素酶的量,进行化学发光(Amersham) Western blot 分析,根据厂商说明及 Harlow 和 Lane(1988)《抗体:实验室手册》,冷泉港实验室,冷泉港,使用抗 E1、E2 和 E5 蛋白的抗血清以及纯化的 E1、E2 和 E5 蛋白标准(由 D. Wilson, Cornell University, Ithaca, N. Y. 提供)进行分析。

[0233] 实施例 B13:转基因植物中纤维素酶活性的测定

[0234] 1. 荧光测定

[0235] 如上所述收获叶物质,在 PC 缓冲液(50mM 磷酸盐,12mM 柠檬酸,pH6.5)中匀浆。通过在 PC 缓冲液中稀释适量的 4-甲基伞形酮(MU, Sigma 目录号 M1381)制备标准曲线(10 纳摩尔至 10 微摩尔)。将每个标准的双份 100 μ l 等份和每个样本的双份 50 μ l 等份分配于 96-孔微量滴定板的各个孔中。然后将 50 μ l 在 PC 缓冲液中制备的 2mM 4-甲基伞形酮- β -D-纤维二糖吡喃糖苷(MUC, Sigma 目录号 M6018)加入每个孔,将板密封以防止蒸发,然后于希望的温度(55°C -60°C 对褐色热单孢菌纤维素酶是最优的)温育 30 分钟。加入 100 μ l 0.15M 甘氨酸/NaOH(pH10.3)终止反应,用微板荧光计测量 460nm 处的荧光发射(激发波长=355nm)。为计算纤维素酶特异活性(pmol MU/mg 蛋白/分钟),根据厂商推荐使用 BCA 方法(Pierce, Rockford, IL)测定每个提取物中蛋白的量。2. CMC 酶活性(根据 Wilson(1988) 酶学方法(Methods in Enzymology) 160:314-315)

[0236] 叶物质在 0.3ml 0.05M 磷酸钾缓冲液(pH6.5)中匀浆,与 0.1ml 羧甲基纤维素(CMC, Sigma, 目录号 C-5678)在希望的温度(55°C -60°C 对褐色热单孢菌纤维素酶是最优的)温育 15-60 分钟。加入 0.75ml DNS 试剂(200g/l 酒石酸钾钠,10g/l 二硝基水杨酸,2g/l 苯酚,0.5g/l 亚硫酸钠,10g/l 氢氧化钠)之后将样本煮沸 15 分钟。冷却样本并测定 600nm 处的光密度。CMC 释放的还原糖的量用葡萄糖标准曲线测定,纤维素酶活性表示为每分钟等同于葡萄糖的 mmole 还原糖。为了计算特定的纤维素酶活性,根据厂商推荐用 BCA 测定方法(Pierce, Rockford, IL)测定每个提取物中蛋白的量。

[0237] 另外,CMC 上的纤维素酶活性用粘度法测定,如 Durbin 和 Lewis(1988) 酶学方法 160:314-315 所描述。

[0238] 3. 滤纸测定(根据 Wilson(1988) 酶学方法 160 :314-315,在此引入作为参考)

[0239] 叶物质在 0.05M 磷酸钾缓冲液 (pH6.5) 中匀浆,将产生的提取物加至滤纸(Whatman 1 号)盘。在希望的温度(55℃-60℃对褐色热单孢菌纤维素酶是最优的)温育 4-24 小时后,终止反应,测定还原糖含量。另外,CMC 上的纤维素酶活性用粘度法测定,如 Durbin 和 Lewis(1988) 酶学方法 160 :314-315 所描述。

[0240] C. 烟草叶绿体内纤维素酶基因的表达

[0241] 实施例 C1:包含与修饰的噬菌体 T7 基因 10 启动子融合的褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列和烟草质体转化载体 pC8 中终止子的嵌合基因的制备

[0242] 用 EcoRI 消化质粒 pCTE5,用 Klenow DNA 聚合酶处理以补平 3' 凹端,用 NcoI 消化,凝胶纯化产生的 1.5kb DNA 片段,连接至质体转化载体 pC8 的 7.5kb NcoI(粘端)/XbaI(补平的)DNA 片段,产生质粒 pC8E5(图 2)。pC8(Pal Maliga 博士, Rutgers University,未发表)是质体转化载体 pPRV111A(Zoubenko, O. V., Allison, L. A., Svab, Z., 和 Maliga, P. (1994) 核酸研究 22,3819-3824,在此全面引入作为参考;GenBank 保藏号 U12812)的衍生物,pPRV111A 携带提供壮观霉素抗性的细菌氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶(aadA)基因和 psbA5' 和 3' 非翻译的 RNA(UTR)序列,aadA 基因位于组成型烟草质体 psbA 基因启动子控制之下。pPRV111A 中 aadA 盒的 3' 端侧翼是包含完整 trnV 基因和 16S rDNA 基因 5' 部分的 1.8kb 的烟草质体 DNA,而 5' 端与多克隆位点(EcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamHI、XbaI、SalI、PstI、SphI、HindIII)直接相邻,多克隆位点的侧翼是包含开放阅读框 70B 基因和部分 rps 7/12 操纵子的 1.2kb 的质体 DNA。这些侧翼同源区用于将间隔异源 DNA 定向整合入烟草质体基因组的反向重复区,位置在公开的 *Nicotiana tabacum* 质体基因组序列(Shinozaki, K. 等人(1986) 欧洲分子生物学会杂志 EMBO J. 5,2043-2049)的核苷酸位点 102,309 和 140,219。获得 pC8 的方法是将嵌合大肠杆菌 uidA 基因和 pET21d 表达载体衍生的终止子序列克隆入 pPRV111A 多接头的 EcoRI 和 HindIII 位点(Novagen, Inc., Madison, WI),uidA 基因编码 β -半乳糖醛酶(GUS),由噬菌体 T7 基因 10 启动子控制。

[0243] 实施例 C2:包含褐色热单孢菌 E5 纤维素酶编码序列和终止子的修饰烟草质体转化载体的制备,其中该序列与修饰过的噬菌体 T7 基因 10 启动子融合而终止子经改造以用于减少的连续转录(read-through transcription)。

[0244] 用 SpeI 和 NcoI 消化质粒 pC8,通过凝胶纯化分离包含 T7 基因 10 启动子和部分趋异 psbA 基因启动子和 5' UTR 的 235bp 片段,克隆至载体 pGEM5Zf+(Promega, Madison WI)的 NcoI 和 SpeI 限制位点,构建质粒 pPH118。用 StuI 消化 pPH118,凝胶纯化 3210bp 载体片段,再连接以构建缺少重复 10bp 序列 CGAGGCCTCG(StuI 位点用下划线标出)的质粒 pPH119,测序分析发现此序列存在于质粒 pC8 中。使用通用的 M13 正向和反向引物进行测序证实了 pPH119 中 10bp StuI/StuI 片段的消除。

[0245] 为了获得一个非质体 DNA 片段,以用作 pC8 中嵌合 psbA/aadA 选择性标记基因和 pET21d T7 基因 10 启动子之间的间隔区,酵母穿梭载体 pRS305(Sikorski, R. S. 和 Hieter, P. (1989) 遗传学 (Genetics) 122,19-27;GenBank 保藏号 U03437)用 EcoRI 和 HincII 消化,分离和凝胶纯化酿酒酵母 LEU2 基因编码序列的 256bp 片段。质粒 pPH119 用 EcoRI 和 DraIII 消化,分离和凝胶纯化 2645bp 片段。pPH119 用 EcoRI 消化,KlenowDNA 聚合酶处理补平突出的 3' 端,用 DraIII 消化并凝胶纯化 569bp 片段。连接三个片段产生质粒 pPH120,

其中 LEU2 基因片段插入 pPH119 的趋异 T7 基因 10 和 psbA 启动子之间。

[0246] 质体转化载体 pC+E5(图 2) 的构建方法是,用 NcoI/EcoRI 消化质粒 pPH120 并凝胶纯化 386bp 片段,用 NcoI/HindIII 消化质粒 pC8E5 并凝胶纯化 1595bp 片段,用 HindIII/EcoRI 消化质粒 pC8 并凝胶纯化 7287bp 片段,以三路 (3-way) 反应连接这些片段。

[0247] 实施例 C3:与烟草 PR-1a 启动子融合的质体导向的噬菌体 T7 RNA 聚合酶基因的制备

[0248] 一种合成的寡核苷酸接头,它包含一个 NcoI 限制位点和 ATG 起始密码子,随后是 rbcS 基因(编码核酮糖二磷酸羧化酶的小亚单位)的前七个质体转运肽密码子和内源 PstI 限制位点(顶链:5' -CAT GGC TTC CTC AGT TCT TTC CTC TGC A-3';底链:5' -GAG GAA AGA ACT GAG GAA GC-3'); pCGN4205(McBride, K. E. 等人(1994) 美国国家科学院学报 91, 7301-7305) 的一个 2.8kb PstI/SacI DNA 片段,它包含与 rbcS 基因转运肽编码序列的 3' 部分在框架内融合的噬菌体 T7 RNA 聚合酶基因(T7 Pol); pCIB296 的一个 0.9kb NcoI/KpnI DNA 片段,它包含烟草 PR-1a 启动子和在起始密码子处引入的 NcoI 限制位点(Uknes 等人(1993) 植物细胞 5, 159-169); 以及二元农杆菌转化载体 pSGCGC1(pGPTV-Hyg 的衍生物,包含克隆至 SacI/HindIII 位点的 pGEM4(Promega, Madison, WI) 的多接头) 的 4.9kb SfiI/KpnI 和 6.6kb SacI/SfiI 片段;将它们连接构建 pPH110。

[0249] 实施例 C4:烟草质体基因组的 Biolistic 转化

[0250] 使 *Nicotiana tabacum* c.v. 'Xanthi nc' 的种子萌发,每板七个,以 1" 环形排列于 T 琼脂培养基上,播种后用质粒 pC8E5 和 pC+E5 的 DNA 包被的 1 μ m 钨颗粒(M10, Biorad, Hercules, CA) 原位轰击 12-14 天,方法基本如所述(Svab, Z. 和 Maliga, P. (1993) 美国国家科学院学报 90, 913-917)。剪切叶子后经轰击的秧苗在 T 培养基上温育两天,远轴侧朝上置于亮光下(350-500 μ mol 光子/ m^2/s),于包含 500 μ g/ml 二氢氯化壮观霉素(Sigma, St. Louis, MO) 的 RMOP 培养基板上(Svab, Z., Hajdukiewicz, P. 和 Maliga, P. (1990) 美国国家科学院学报 87, 8526-8530)。轰击后三至八周在漂白叶下出现的抗性苗被亚克隆至相同的选择培养基,用来形成愈伤组织,分离和亚克隆第二批苗。独立亚克隆中完全分离为同质体状态的转化的质体基因组拷贝,是用 Southern 印迹标准技术(Sambrook 等人(1989)《分子克隆:实验室手册》,冷泉港实验室,冷泉港)评价。BamHI/EcoRI 消化的总细胞 DNA(Mettler, I. J. (1987) 植物分子生物学报告 5, 346-349) 在 1% Tris-硼酸(TBE) 琼脂糖凝胶上分离,转移至尼龙膜(Amersham),用 ^{32}P -标记的随机引物 DNA 序列探查,此序列对应于包含一部分 rps7/12 质体定向序列的 pC8 的 0.7kb BamHI/HindIII 片段。同质体苗在包含壮观霉素的 MS/IBA 培养基(McBride, K. E. 等人(1994) 美国国家科学院学报 91, 7301-7305) 上无菌生根,并转移至温室。

[0251] 实施例 C5:通过农杆菌介导的叶盘转化将嵌合 PR-1a/T7 Pol 基因引入烟草核基因组

[0252] 潮霉素抗性的 NT-pPH110 烟草植物如所述从获得的苗再生,该苗是将 *N. tabacum* 'Xanthi' 和 "NahG" 的叶盘与携带 pPH110 二元载体的 GV3101 农杆菌共培育后获得的。对每个转基因系,大约 2-3cm² 的双份叶钻孔在 3ml BTH(5.6mg/10ml) 或无菌蒸馏水中于约 300 μ mol/ m^2/s 照射下温育 2 天。收获叶物质,骤冻,在液氮中磨碎。提取总 RNA(Verwoerd 等人(1989) NAR 17, 2362),如所述(Ward 等人(1991) 植物细胞 3,

1085-1094) 使用放射性标记的 T7 RNA 聚合酶基因探针进行 Northern 印迹分析。将显示一定程度 T7 Po1 表达的十九个 NT-110X(Xanthi 遗传背景) 和七个 NT-110N(NahG 遗传背景) 的 T1 系植物转移至温室, 自花传粉。连锁的潮霉素抗性标记 3 : 1 分离的子代自体受精, 选择纯合的 T2 系。

[0253] 实施例 C6 :转基因植物质体中纤维素酶表达的诱导

[0254] 包含 PR-1a-T7 RNA Po1 构建体纯合 NT-110X 和 NT-110N 植物, 用于对同质体的携带母体遗传的 pC8E5 和 pC+E5 纤维素酶构建体的 Nt_pC8E5 和 Nt_pC+E5 质体转化系传粉。Nt_pC+E5 X NT-110X 或 NT-110N, 和 Nt_pC8E5 X NT-110X 或 NT-110N 的 F1 子代(它们对 PR-1/T7 聚合酶核表达盒是杂合的, 并对 T7/ 纤维素酶质体表达盒同质) 在土壤中萌发。达到 20-40cm 高度后, 对植物喷施诱导化合物 BTH 以引起 T7 Po1 调节的定位于质体的 E5 纤维素酶基因的表达。刚好于诱导前及诱导后 8 小时和 1、2、3、7 及 14 或 28 天收获植物物质, 并如上所述骤冻。

[0255] 实施例 C7 :转基因植物 E5 纤维素酶 mRNA 含量的测定

[0256] 从 BTH 和湿粉喷施的对照及 PR-1a/T7 聚合酶 X 质体 T7/ 纤维素酶植物的冷冻组织中提取总 RNA, 使用包含 E5 纤维素酶编码序列的放射性标记 DNA 片段作为探针, 如所述(Ward 等人(1991) 植物细胞 3, 1085-1094) 对 5 μ g RNA 样本进行 Northern 印迹分析。通过定量与放射性标记的 E5 纤维素酶探针杂交的带中的放射性, 评价在每个时间点的相对 E5 纤维素酶 mRNA 的积累, 以测定倍数(fold)mRNA 诱导的时间进程。在测定中实施例 C6 的转基因植物物质诱导后显示显著的纤维素酶 mRNA 积累, 峰值在诱导后 14 天。诱导前, 检测不到纤维素酶 mRNA。

[0257] 实施例 C8 :转基因植物纤维素酶含量的测定

[0258] 为测定转基因植物组织中存在的纤维素酶的量, 进行化学发光(Amersham) Western 印迹分析, 根据厂商说明及 Harlow 和 Lane(1988)《抗体:实验室手册》, 冷泉港实验室, 冷泉港, 使用抗 E5 蛋白的抗血清和纯化的 E5 蛋白标准(由 D. Wilson, Cornell University, Ithaca, N. Y. 提供) 进行分析。在测定中实施例 C6 的转基因植物物质诱导后显示显著的纤维素酶表达和积累(诱导后 14 天总可溶蛋白的约 3%; 诱导前无可检测到的蛋白)。

[0259] 实施例 C9 :转基因植物中纤维素酶活性的测定

[0260] 如上所述收获叶物质, 在 PC 缓冲液(50mM 磷酸盐, 12mM 柠檬酸, pH6.5) 中匀浆。通过在 PC 缓冲液中稀释适量的 4- 甲基伞形酮(MU, Sigma 目录号 M1381) 制备标准曲线(10 纳摩尔至 10 微摩尔)。将每个标准的双份 100 μ l 等份和每个样本的双份 50 μ l 等份分配于 96- 孔微量滴定板的各个孔中。然后将 50 μ l 在 PC 缓冲液中制备的 2mM 4- 甲基伞形酮- β -D- 纤维二糖吡喃糖苷(MUC, Sigma 目录号 M6018) 加入每个孔, 将板密封以防止蒸发, 于 55°C 或 37-65°C 的其它温度温育 30 分钟。加入 100 μ l 0.15M 甘氨酸/NaOH(pH10.3) 终止反应, 用微板荧光计测量 460nm 处的荧光发射(激发波长= 355nm)。

[0261] 实施例 C10 :转基因植物质体中 GUS 表达的诱导

[0262] 由 McBride 等人((1994) 美国国家科学院院报 91 :7301-7305) 描述的 N. tabacum' Xanthi' 质体转化系 4276P, 被包含 PR-1a/T7 RNA 聚合酶的纯合 NT-110X6b-5 植物传粉。4276P 不同于 pC8, 仅仅在于(a) 用于表达 aadA 选择性标记的启动子(它有 16S

核糖体 RNA 基因启动子,而不是在 pC8 中使用的 psbA 因启动子), (b) 在 GUS 基因和 T7 终止子之间存在 psbA 基因 3' 非翻译区,以及 (c) 在 T7 启动子中缺乏 lac 操纵子和复制的 StuI 限制位点序列。在土壤中萌发此杂交的 F1 植物,它们对于 PR-1a/T7 聚合酶核表达盒是纯合的、对于 T7/GUS 质体表达盒是同质体的。达到 20-40cm 高度后,向植物喷施惰性湿粉悬液或诱导化合物 BTH 与湿粉的制剂。同时在土壤中萌发的未转化 *N. tabacum* 'Xanthi'、NT-110X6b-5 和 4276P 的对照植物,经以相似方法喷施。刚好于喷施前及喷施后 8 小时和 1、2、3、7 和 28 天收获植物物质(每个基因型的三个独立的植物,其中每一个的一片叶子),并如上所述骤冻。

[0263] 实施例 C11 :转基因植物 GUS mRNA 含量的测定

[0264] 从 BTH 和湿粉喷施的对照及 PR-1a/T7 聚合酶 X 质体 T7/GUS 植物的冷冻组织中提取总 RNA,使用 500bp 放射性标记的 GUS 基因的 5' 片段作为探针,如所述(Ward 等人(1991)植物细胞 3,1085-1094)对 5 μ g RNA 样本进行 Northern 印迹分析。对在每个时间点的 GUS mRNA 积累的评价方法是,对与放射性标记的 GUS 探针杂交的带中的放射性定量,以及扫描在显著的 RNA 带中出现的溴化乙锭荧光,此带于喷施三天后的时间点上开始变为可见,并观察到它在 Northern 印迹上与杂交的 GUSRNA 带共迁移。发现在质体中化学可诱导的 GUS RNA 在用 BTH 诱导后 7-28 天达到峰值水平,为总乙锭可染色 RNA 的 14% (包括植物中存在的所有 RNA 种类,包括构成了可染色植物 RNA 的大多数的非蛋白编码核糖体 RNA)(见表 1),并大大高于(超过 1000 倍)核 PR-1a/GUS 转化体的化学可诱导 GUS mRNA 累积的峰值。

[0265] 实施例 C12 :转基因植物 GUS 蛋白含量的测定

[0266] 为测定转基因植物组织中存在的 GUS 的量,进行化学发光(Amersham)Western 印迹分析,根据厂商说明及 Harlow 和 Lane(1988)《抗体:实验室手册》,冷泉港实验室,冷泉港,使用从 Molecular Probes 购买的 GUS 抗血清和纯化的 GUS 蛋白标准(Sigma)进行分析。来自如上收获并冷冻、磨碎的叶物质的蛋白质的溶解方法是在 50mM Tris pH8.0,1mM EDTA,1mM PTT,1mM AEBSF 和 1mM DTT 中萃取,每泳道 5 到 25 μ g 蛋白质进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。质体转化的植物中 GUS 蛋白的积累持续 7-28 天以上,并且特别高(大大高于核 PR-1a/GUS 的峰值 GUS 积累),到 28 天超过总蛋白质的 20%。与此对比,在核 PR-1a/GUS 转化体中 GUS 蛋白积累稍早达到峰值(从诱导开始大约 3 天,不是 7-28 天),并且蛋白质积累不持久,至 28 天下降至检测的限值。

[0267] 实施例 C13 :转基因植物中 GUS 活性的测定

[0268] 在液氮存在下将冷冻叶组织在研钵中用研杵磨碎,产生细粉。在 GUS 提取缓冲液(50mM 磷酸钠 pH7.0,0.1% Triton-X 100,0.1% sarkosyl,10mM β -巯基乙醇)中制备叶提取物,如 Jefferson R. A. 等人(1986)美国国家科学院学报 83,8447-8451 描述。反应在不透明的微量滴定板孔中进行,方法是将 10 μ l 提取物与 65 μ l GUS 测定缓冲液(50mM 磷酸钠 pH7.0,10mM EDTA,0.1% Triton X-100,10mM β -巯基乙醇)混和,缓冲液中包含 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MU),终浓度为总体积 75 μ l 中 2mM。板于 37°C 温育 30 分钟,加入 225 μ l 0.2M 碳酸钠终止反应。在 Flow Labs Fluoroskan II ELISA 读板机上读板测定释放的荧光指示剂的浓度。平均每个样本的双份荧光值,减去背景荧光(没有 MUG 的反应)获得每个样本的 MU 浓度。每个提取物中的蛋白量使用双金鸡宁酸技术(BCA,Pierce Biochemicals)测定,除蛋白提取物用碘乙酰胺(Sigma)预处理以消除提取缓冲液中存在的还原剂(β -巯

基乙醇)引起的背景信号外,其它根据厂商推荐进行。对每个样本测定特异活性,表示为 pmol MU/mg 蛋白 / 分钟。对于使用 BTH 后一定时间点测定的每个组织样本, BTH 诱导的样本的特异活性除以 BTH 预处理的对照样本的特异活性,于是产生 GUS 表达的诱导(见表 1)。

[0269] 表 1 pPH110X6b X 4276p :喷施 BTH 后 GUS RNA 的诱导和 GUS 活性

[0270]		GUS 活性	诱导倍数	%总 RNA	诱导倍数
[0271]	天数 +BTH	(pmol MU/mg 分钟)	(GUS 活性)		(GUS RNA)
[0272]	0.0	598	1	< 0.013	1
[0273]	0.3	434	0.7	< 0.013	24
[0274]	1.0	14,516	24	0.108	959
[0275]	2.0	230,031	380	0.873	1,897
[0276]	3.0	456,486	749	2.663	2,396
[0277]	7.0	2,424,725	3,999	7.745	2,875
[0278]	28.0	1,922,466	3,106	24.596	3,392

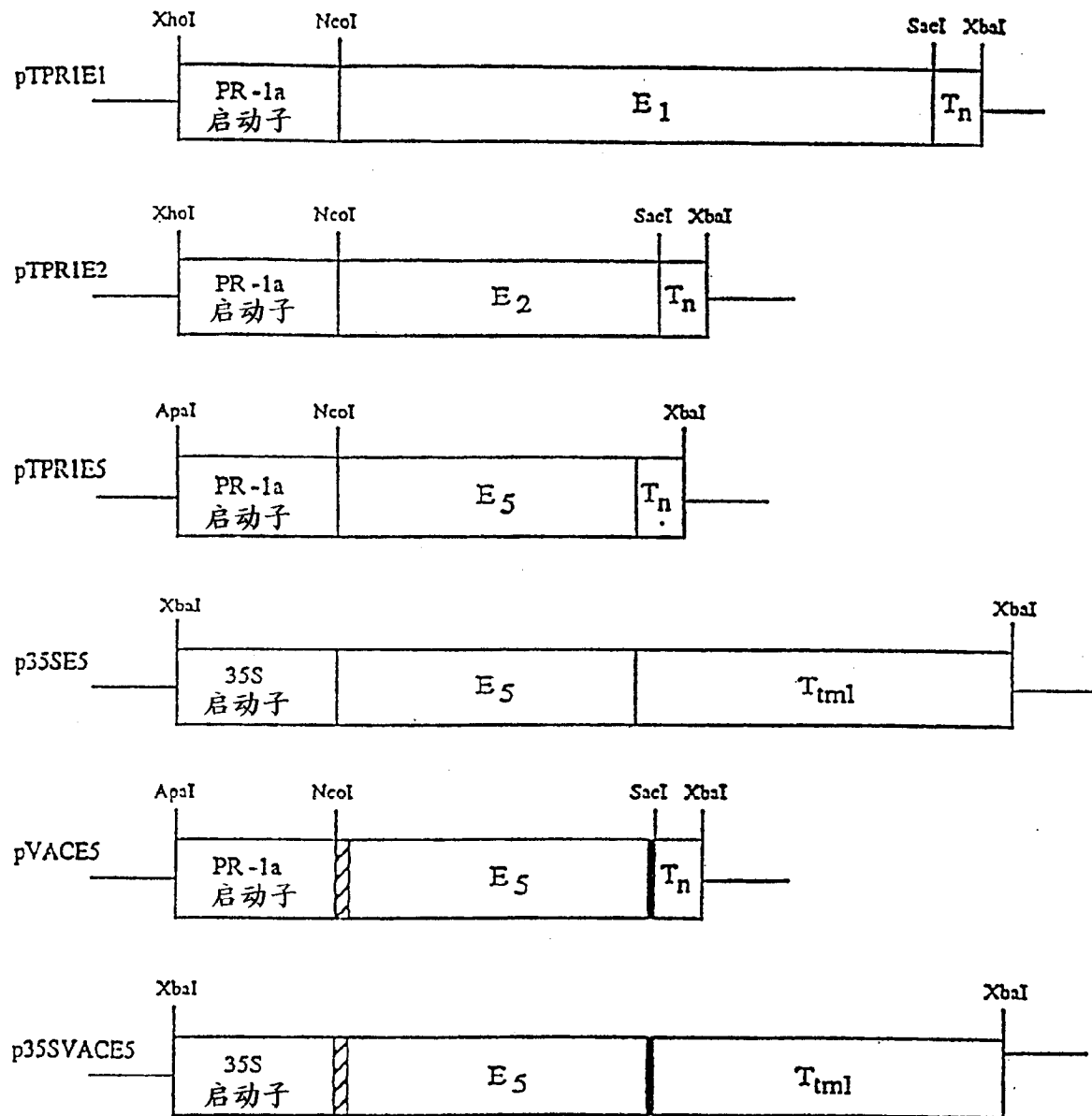


图 1

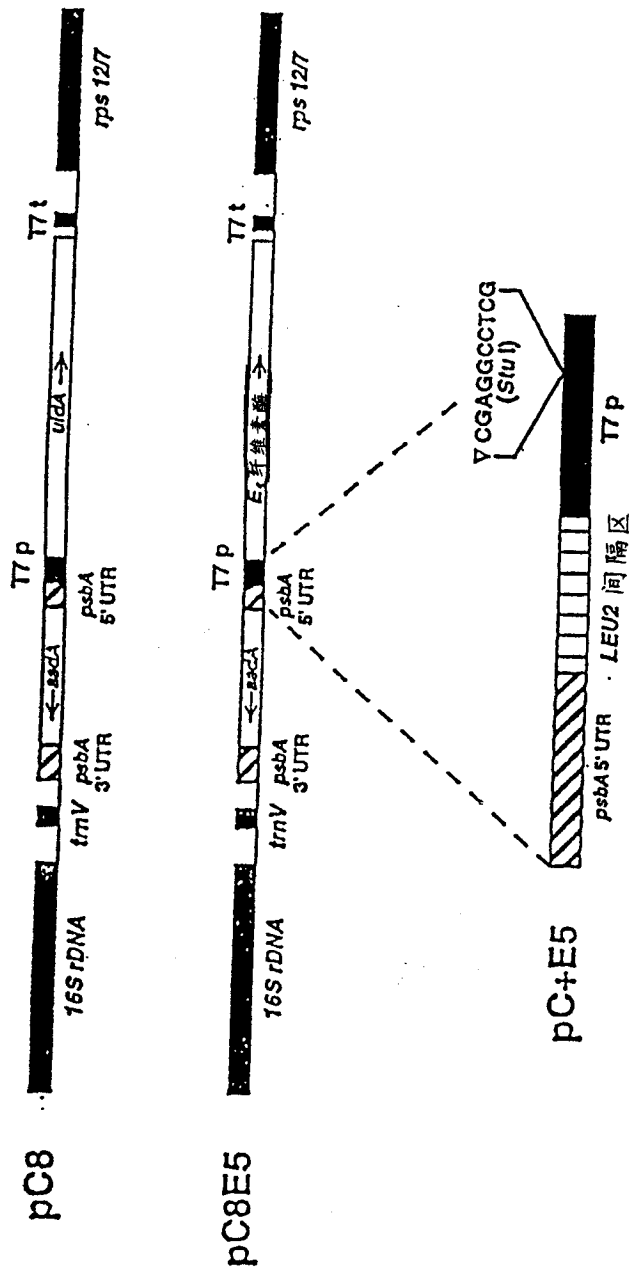


图 2