

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 9 日 (09.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/007760 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/100713

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 21 日 (21.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310809776.7 2023年7月3日 (03.07.2023) CN

(71) 申请人: 中国科学院分子植物科学卓越
创新中心 (**CAS CENTER FOR EXCELLENCE IN
MOLECULAR PLANT SCIENCES**) [CN/CN]; 中国上
海市徐汇区枫林路300号, Shanghai 200032 (CN)。

(72) 发明人: 王勇 (**WANG, Yong**); 中国上海市徐汇区
枫林路 300 号, Shanghai 200032 (CN)。田晨菲
(**TIAN, Chenfei**); 中国上海市徐汇区枫林路 300
号, Shanghai 200032 (CN)。李建华 (**LI, Jianhua**);
中国上海市徐汇区枫林路300号, Shanghai 200032
(CN)。孙雨伟 (**SUN, Yuwei**); 中国上海市徐汇区
枫林路300号, Shanghai 200032 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限
公司 (**SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW
OFFICE, LLC**); 中国上海市徐汇区桂平路
435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** CONSTRUCTION AND USE OF PLANT CELL EXPRESSION TOOL

(54) 发明名称: 一种植物细胞表达工具的构建及其应用

(57) **Abstract:** Construction and a use of a plant cell expression tool. Specifically, provided is a nucleic acid construct, comprising a chimeric promoter and a coding sequence of a fusion protein, wherein the chimeric promoter comprises a protein binding region and a core promoter sequence, and the fusion protein comprises a nucleic acid binding domain and a transcriptional activation domain. The expression tool can improve the expression of target proteins in plant cells.

(57) 摘要: 一种植物细胞表达工具的构建及其应用。具体地, 提供一种核酸构建物, 包含嵌合启动子和融合蛋白的编码序列; 其中嵌合启动子包含蛋白结合区域以及核心启动子序列, 融合蛋白包含核酸结合结构域以及转录激活结构域, 该表达工具能提高植物细胞中目的蛋白的表达。



WO 2025/007760 A1

一种植物细胞表达工具的构建及其应用

5 技术领域

本发明涉及合成生物学领域，尤其涉及植物细胞中表达工具的创建及应用。

背景技术

植物利用二氧化碳作为碳源，能够进行光合自养。植物细胞具有丰富的次
10 生代谢合成途径，可以产生多种前体用于复杂化合物的合成。除此以外，植物
作为合成生物学底盘还具有安全性高、易于大规模培养和生产等优势。随着植
物合成生物学技术的发展，越来越多的功能性治疗蛋白和活性小分子在植物底
盘中成功实现了合成。合成应用中最广泛的植物底盘是烟草。它具有生长周期
15 短，生物量大的优势。2014 年，在烟草中生产了用于治疗埃博拉病毒的特效抗
体药物 ZMapp，在临床试验中能够治好埃博拉的重病患者；2022 年，Medicago
公司利用烟草生产的新冠疫苗对新冠变异毒株的有效性高达 71.6%，现已被加
拿大卫生部批准上市。此外，bxn 的转基因烟草在英国被批准可以进行商业化
种植；NtQPT1 的转基因烟草在美国也通过了安全行验证，被商业化种植。

在植物细胞中以特定的模式或特定的强度控制目的基因的表达仍然具有
20 挑战性。一个很有效的解决方案就是引入人工基因表达调控工具来实现对目的
基因表达模式和表达强度的调控。合成生物学基于理性的设计，通过对元件的
集成和装配，从而构建出具有特定功能的人工核酸/蛋白序列工具。人工合成的
表达调控工具在微生物细胞中已经表现出了比天然基因序列更优越、更可控的
功能性状。一个高活性的基因表达工具有助于提高植物细胞中生产功能活性蛋
25 白的经济效益，促进植物底盘的商业化应用。

植物较长的生长周期是这些遗传工具难以广泛应用的一个重要原因。如果
需要根据输出结果再回来调整序列结构和活性更是会耗费很长的时间。因此，
本领域仍需要使用方便的烟草叶片中农杆菌介导的瞬时转化法以便定量分析。

发明内容

基于上述缺陷，本发明提供一种人工转录激活表达工具，能提高植物细胞中目的蛋白的表达。

本发明第一方面提供一种嵌合启动子，包含蛋白结合区域以及核心启动子
5 序列。

在一个或多个实施方案中，所述蛋白结合区域是结合激活蛋白的核苷酸区域。

在一个或多个实施方案中，所述蛋白结合区域包含 1-8 个串联重复的 SEQ ID NO:1 第 1-36 位所示的序列。优选地，重复个数为 5 和/或 6。

10 在一个或多个实施方案中，所述核心启动子序列包含 Act2 核心启动子序列，优选包含拟南芥的 Act2 核心启动子序列。在一个或多个实施方案中，所述核心启动子元件如是拟南芥的 Act2 启动子的包含 SEQ ID NO:1 第 43-243 位所示序列的片段。所述片段为 200-1000bp，优选 200-500bp。

15 在一个或多个实施方案中，所述蛋白结合区域和核心启动子序列直接连接或通过接头操作性连接。

在一个或多个实施方案中，所述蛋白结合区域位于核心启动子序列上游。

在一个或多个实施方案中，所述蛋白结合区域与核心启动子序列距离为 0-300nt，优选为 0-216nt。

20 在一个或多个实施方案中，所述嵌合启动子序列具有 SEQ ID NO:1-8 任一所示的序列或与其有至少 90%序列相同性并保留 SEQ ID NO:1-8 的蛋白结合功能的变体。

25 本发明第二方面提供一种融合蛋白，包含核酸结合结构域以及转录激活结构域，所述核酸结合结构域是能与核酸结合的蛋白或结构域，包括 LexA 结合蛋白或其含有 LexA 识别结构域的肽段。

在一个或多个实施方案中，所述核酸结合结构域具有 SEQ ID NO:9 第 1-87 位氨基酸序列或与其有至少 90%序列相同性并保留核酸识别功能的同源序列。所述同源序列来自肠杆菌科，或来自埃希氏菌属。

在一个或多个实施方案中，所述转录激活结构域选自 VP16、DELL、ERF2、

Med2、P300、TV、VP64、VPR 中的一种或多种；优选为 VPR 或 TV；更优选为 VPR。

在一个或多个实施方案中，所述核酸结合结构域和转录激活结构域直接连接或通过接头肽连接。所述接头肽是由 1-5 个氨基酸 G 和 1-5 个氨基酸 S 组成的单元的重复序列，优选为 $GGGGS_n$ ， $n=1-4$ ，优选 n 为 1。

在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白还包括核定位信号（NLS），优选为植物细胞核定位信号氨基酸序列。在一个或多个实施方案中，所述核定位信号的序列如 SEQ ID NO:10 第 1-8 位所示。

在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:9-17 任一所示的序列或与其有至少 90% 序列相同性并保留 SEQ ID NO:9-17 的功能的变体。

本发明还提供一种核酸构建物，包含（1）本文任一实施方案所述嵌合启动子和（2）本文任一实施方案所述融合蛋白的编码序列。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物是载体，优选非病毒载体，更优选适于在植物中复制、转录和/或表达的载体。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物是克隆载体、表达载体或重组载体。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物包含第一表达框和第二表达框，第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，第二表达框包含所述嵌合启动子。

在一个或多个实施方案中，所述第一表达框和第二表达框位于同一载体上或不同载体上。

在一个或多个实施方案中，所述第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，位于融合蛋白上游的启动子，及位于融合蛋白下游的终止子。

在一个或多个实施方案中，所述第一表达框中融合蛋白的启动子是适合在植物中启动表达的启动子，例如选自 P_StUbi、P_MAS、P_AtRbcS1、P-CsVMV、P_Ocs、P_rbc。所述启动子的序列分别如 SEQ ID NO:18-23 所示。

在一个或多个实施方案中，所述第一表达框中的终止子是能在植物中终止表达的终止子。所述终止子选自 T_AtHsp、T_RbcS1、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S。优选地，所述终止子序列如 SEQ ID NO:29 所示。

在一个或多个实施方案中，所述第二表达框还包含位于嵌合启动子下游的用于插入外源序列的区域，例如克隆位点。

在一个或多个实施方案中，所述第二表达框还包含位于嵌合启动子下游的终止子。所述终止子选自 T_AtHsp、T_RbcS1、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S。优选地，所述终止子序列如 SEQ ID NO:24 所示。

在一个或多个实施方案中，所述第二表达框还包含目标蛋白的编码序列，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达。所述目标蛋白的编码序列位于嵌合启动子下游。

在一个或多个实施方案中，所述目标蛋白的编码序列位于克隆位点中。优选地，所述目标蛋白的编码序列包含选自 EGFP 蛋白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白（Miraculin）中的一种或多种蛋白的编码序列。

在一个或多个实施方案中，所述第二表达框包含所述嵌合启动子，克隆位点，及位于克隆位点下游的终止子序列。

在一个或多个实施方案中，所述第二表达框包含所述嵌合启动子，目标蛋白编码序列，及位于目标蛋白下游的终止子序列。

本发明还提供一种宿主细胞，包含：

（1）本文任一实施方案融合蛋白和具有本文任一实施方案嵌合启动子的表达框，或，

（2）本文任一实施方案所述的核酸构建物。

在一个或多个实施方案中，所述宿主细胞包括大肠杆菌、农杆菌。

在一个或多个实施方案中，所述宿主细胞不是植物细胞。

本发明还提供一种试剂盒，包含本文任一实施方案所述的嵌合启动子、融合蛋白、核酸构建物、和/或宿主细胞。

本发明还提供一种在细胞中表达目标蛋白的方法，所述细胞包含：（1）本文任一实施方案融合蛋白和（2）具有本文任一实施方案嵌合启动子的表达

框，所述目标蛋白的编码序列与所述嵌合启动子操作性连接，所述方法包括在所述融合蛋白诱导嵌合启动子启动表达的条件下孵育所述细胞的步骤。在一个或多个实施方案中，所述条件是适合所述细胞生长的条件。

在一个或多个实施方案中，所述细胞包含本文所述的核酸构建物。

- 5 在一个或多个实施方案中，所述方法包括：（1）将目标蛋白的编码序列导入本文所述核酸构建物中，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达；（2）将所述核酸构建物转移到细胞中；（3）在适合所述核酸构建物表达的条件下孵育所述细胞。在一个或多个实施方案中，所述目标蛋白的编码序列导入第二表达框中的嵌合启动子下游，优选地，导入嵌合启动子下游的克隆
- 10 位点中。在一个或多个实施方案中，所述适合所述核酸构建物表达的条件是第一表达框表达并且所表达的融合蛋白能诱导嵌合启动子启动目标核酸表达的条件。在一个或多个实施方案中，所述条件是适合细胞生长的条件。

- 在一个或多个实施方案中，所述方法包括：（1）将目标蛋白的编码序列导入包含本文任一实施方案所述的嵌合启动子的第二表达框中，位于嵌合启动
- 15 子的下游，（2）将第二表达框导入细胞中，所述细胞包含本文任一实施方案的融合蛋白或含有第一表达框，所述第一表达框包含本文任一实施方案所述的融合蛋白的编码序列；（3）在适合第二表达框表达的条件下孵育所述细胞。在一个或多个实施方案中，所述第二表达框还包含终止子和任选的克隆位点。在一个或多个实施方案中，所述目标蛋白的编码序列位于克隆位点中。在一个或多
- 20 个实施方案中，所述适合第二表达框表达的条件是融合蛋白能诱导嵌合启动子启动表达的条件，或者，是第一表达框表达并且所表达的融合蛋白能诱导嵌合启动子启动目标蛋白的编码序列表达的条件。在一个或多个实施方案中，所述条件是适合细胞生长的条件。

- 在一个或多个实施方案中，所述目标蛋白的编码序列包含选自 EGFP 蛋
- 25 白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白（Miraculin）中的一种或多种蛋白的编码序列。

在一个或多个实施方案中，所述细胞是植物细胞。

本发明还提供一种获取表达目标蛋白的植物的方法，包括：

(1) 将包含目标蛋白的编码序列的本文所述的核酸构建物转入植物器官或组织，获得转化有所述核酸构建物的植物组织或器官，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达；和

5 (2) 将步骤(1)获得的转入了本文所述核酸构建物的植物组织或器官再生成植物植株。

在一个或多个实施方案中，所述目标蛋白的编码序列位于所述第二表达框中，由所述嵌合启动子启动表达。

优选地，所述的方法包括步骤：

10 (1) 提供携带表达载体的农杆菌，所述的表达载体含有本发明所述核酸构建物；

(2) 将植物组织或器官与步骤(1)中的农杆菌接触，从而使所述目标蛋白的编码序列转入并且整合到植物细胞的染色体上；

(3) 选择出转入所述目标蛋白的编码序列的植物组织或器官；以及

(4) 将步骤(3)中的植物组织或器官再生成植物。

15

本发明通过在植物细胞中引入人工启动子核苷酸序列以及人工激活融合蛋白，利用激活转录回路提高了植物细胞中内源、外源蛋白的表达，实现了天然启动子不能实现的目标基因的表达模式和强度，有助于提高植物细胞中生产功能活性蛋白的经济效益，促进植物底盘的商业化应用。

20

附图说明

图 1 为 EGFP 蛋白表达质粒结构图。

图 2 为西尼罗河病毒 NS1 蛋白表达质粒结构图。

图 3 为寨卡病毒 NS1 蛋白表达质粒结构图。

25 图 4 为奇果蛋白 (Miraculin) 表达质粒结构图。

图 5 为酶标仪检测不同 APBD 拷贝数下 EGFP/mCherry 产生的表达强度，数据显示 EGFP 和 mCherry 的数值比值。

图 6 为酶标仪检测不同转录激活蛋白下 EGFP/mCherry 产生的表达强度。

图 7 为酶标仪检测基于 VPR 转录激活系统表达出来的 EGFP/mCherry 的

表达强度。

图 8 为基于 VPR 转录激活系统，检测 EGFP 蛋白表达情况。

图 9 为 Westernblot 检测利用转录激活系统获得的西尼罗河病毒 NS1 蛋白表达情况。

5 图 10 为 Westernblot 检测利用转录激活系统获得的寨卡病毒 NS1 蛋白表达情况。

图 11 为 Westernblot 检测利用转录激活系统获得的奇果蛋白（Miraculin）表达情况。

10 具体实施方式

除非另有定义，本发明的实施将采用分子生物学（包括重组技术）、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，这些都在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分解释，诸如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版（Sambrook 等，1989）；Oligonucleotide Synthesis（M.J.Gait 编辑，1984）；Animal Cell Culture（R.I.Freshney 编辑，1987）；Methods in Enzymology（Academic Press, Inc.）；Current Protocols in Molecular Biology（F.M.Ausubel 等编辑，1987 版及其定期更新版本）；PCR: The Polymerase Chain Reaction（Mullis 等编辑，1994）；A Practical Guide to Molecular Cloning（Perbal Bernard V., 1988）；Phage Display: A Laboratory Manual（Barbas 等，2001）。

20 发明人提供了一种嵌合启动子，包含蛋白结合区域以及核心启动子序列。所述蛋白结合区域包含 1-8 个重复的 SEQ ID NO:1 第 1-36 位所示的序列。优选地，重复个数为 5 和/或 6。所述核心启动子序列是 Act2 启动子。优选拟南芥的 Act2 启动子。

25 在一个或多个实施方案中，所述转录激活结构域结合核苷酸序列和核心启动子序列核苷酸序列可直接连接或通过接头连接。在一个或多个实施方案中，所述接头是便于遗传操作的酶切位点。例如，所述“接头”可包含 GTCGAG 或 GTCGAGAAGGG。

所述蛋白结合区域通常位于核心启动子序列上游，与核心启动子序列距离为 0-300nt，优选为 0-216nt。发明人发现，当蛋白结合区域的重复超过 6 个时，

对表达强度的提升作用与 6 个重复时相当。由此可知，当蛋白结合区域与核心启动子序列的距离在 $6 \times 36 = 216$ nt 之内时，嵌合启动子均可以实现提高表达的效果。

在一个或多个实施方案中，所述嵌合启动子具有 SEQ ID NO:1-8 任一所示的序列或与其有至少 90% 序列相同性并保留 SEQ ID NO:1-8 的功能的变体。

本发明还提供一种融合蛋白，包含与特定核苷酸序列结合的核酸结合结构域以及发挥转录激活的转录激活结构域。所用术语“结构域”是位于超二级结构和三级结构间的一个层次，是在蛋白质的三级结构内的独立折叠单元，通常都是几个超二级结构单元的组合。在一个或多个实施方案中，所述核酸结合结构域是 LexA 识别序列结构域。“转录激活结构域”是能招募 RNA 聚合酶 II 启动基因转录的蛋白质分子。在一个或多个实施方案中，所述转录激活结构域选自 VP16, DELL, ERF2, Med2, P300, TV, VP64, VPR。

VP16 的序列可如 SEQ ID NO:9 第 93-215 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。DELL 的序列可如 SEQ ID NO:11 第 100-123 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。ERF2 的序列可如 SEQ ID NO:12 第 100-130 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。Med2 的序列可如 SEQ ID NO:13 第 100-529 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。P300 的序列可如 SEQ ID NO:14 第 100-732 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。TV 的序列可如 SEQ ID NO:15 第 100-549 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。VP64 的序列可如 SEQ ID NO:16 第 100-149 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变体。VPR 的序列可如 SEQ ID NO:17 第 100-481 位氨基酸所示或与其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列相同性的具有转录激活功能的同源序列或变

体。

本文中，“同源序列”指来自与来源序列的物种同一目、科、属、种的物种并具有所述序列相同性的序列。例如，VP16 来源于人疱疹病毒，其同源序列来自疱疹病毒科；DELL、p300 来源于人，其同源序列来自灵长目；ERF2 来源于拟南芥，其同源序列来自十字花目、十字花科、或拟南芥属；Med2 来源于酿酒酵母，其同源序列来自酵母目、酵母菌科、酵母菌属。

所述核酸结合结构域和转录激活结构域可直接连接或通过多肽序列操作性连接。优选地，所述多肽序列是 GGGS 多肽序列。

在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白还包括核定位信号氨基酸序列（NLS），用于引导蛋白质通过核孔复合体进入细胞核。优选植物细胞核定位信号氨基酸序列。在一个或多个实施方案中，所述核定位信号的序列如 SEQ ID NO:10 第 1-8 位所示。

在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:9-17 任一所示的序列或与其有至少 90% 序列相同性并保留 SEQ ID NO:9-17 的功能的变体。

本发明还提供一种核酸构建物，用于克隆或表达基因等遗传功能，包含（1）本文任一实施方案所述嵌合启动子和（2）本文任一实施方案所述融合蛋白的编码序列。所述核酸构建物是载体，优选非病毒载体，更优选适于在植物中复制、转录和/或表达的载体。在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物是克隆载体、表达载体或重组载体。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物包含第一表达框和第二表达框，第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，第二表达框包含所述嵌合启动子。

在一些实施方案中，所述第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，位于融合蛋白上游的启动子序列，及位于融合蛋白下游的终止子序列。所述融合蛋白的启动子是适合在植物中启动表达的启动子，例如选自 P_StUbi（SEQ ID NO:18）、P_MAS（SEQ ID NO:19）、P_AtRbcS1（SEQ ID NO:20）、P_CsVMV（SEQ ID NO:21）、P_Ocs（SEQ ID NO:22）、P_rbc（SEQ ID NO:23）。所述融合蛋白的终止子是适合在植物中终止表达的终止子，包括但不限于 T_RbcS1（SEQ ID NO:29）、T_AtHsp、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S 等终止子。

所述第二表达框还包含克隆位点。克隆位点 (cloning site) 是包含一个或多个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20 个) 限制性酶切位点 (restriction site) 的一段 DNA 序列, 是外源基因插入的位置。例如, 克隆位点可以是包含一对 II s 型限制性酶切位点 (例如 *Bsa* I 和 *BsmB* I) 的一段 DNA 序列。本领域技术人员知晓限制性酶切位点的名称及其序列。

所述第二表达框还包含终止子, 所述终止子是适合在植物中终止表达的终止子, 包括但不限于 T_RbcS1 (SEQ ID NO:29)、T_AtHsp、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S 等终止子。

在一个或多个实施方案中, 所述第二表达框包含所述嵌合启动子和其下游的终止子。在一个或多个实施方案中, 所述第二表达框从 5' 至 3' 包含所述嵌合启动子、克隆位点和终止子。在一个或多个实施方案中, 所述第二表达框从 5' 至 3' 包含所述嵌合启动子、目标蛋白编码序列和终止子。

为了表达感兴趣的蛋白或多肽, 所述第二表达框还包含目标蛋白的编码序列 (目标核酸), 所述目标核酸由所述嵌合启动子启动表达。所述目标核酸位于嵌合启动子下游。在一个或多个实施方案中, 所述目标核酸位于克隆位点中。在本发明的一些实施方案中, 所述目标核酸包含选自 EGFP 蛋白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白 (Miraculin) 的编码序列。EGFP 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示, 西尼罗河病毒 NS1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 第 31-382 位所示。寨卡病毒 NS1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:26 第 31-382 位所示。奇果蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:27 第 1-220 位所示。

本文所述多肽或蛋白还可具有信号肽或内质网滞留序列以便于表达和/或分泌。信号肽的序列本领域熟知, 例如 SEQ ID NO:25 第 1-30 位所示的序列或 KDEL 序列。多肽或蛋白还可具有便于鉴定或纯化的标签, 例如 Flag 标签。含有信号肽、Flag 标签和 KDEL 序列的西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白和奇果蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25-27 所示。

可采用本领域常规的技术手段构建同时表达嵌合启动子和融合蛋白编码序列的表达载体。典型的表达载体包含可用于调节期望核酸序列表达的表达控制序列, 与本发明所述的核酸序列或其互补序列操作性连接。在重组表达载体

中，“操作性连接”是指目的的核苷酸序列与调节序列以允许核苷酸序列表达的方式连接。本领域的技术人员熟知能用于构建含本发明融合蛋白编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体的方法。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。只要能在宿主(尤其是植物细胞)体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有调控序列，包括但不限于复制起点、启动子、标记基因、翻译控制元件、翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子等。本文中，“核酸分子”、“多核苷酸”、“核酸”可互换使用。

代表性的启动子有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子； λ 噬菌体 PL 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其它一些已知的可控制基因在原核或真核细胞（尤其是植物细胞）或其病毒中表达的启动子。在一个或多个实施方案中，融合蛋白的启动子选自 P_StUbi、P_MAS、P_AtRbcsl、P_CsVMV、P_Ocs、P_rbc。

表达载体中，各种核酸和调控序列可被连接在一起，以产生可能包括一个或多个容许在这种位点插入或取代该编码多肽的核苷酸序列的方便限制性位点的重组表达载体。在制备本发明的表达载体时，本文所述的多种不同的转录激活结构域的编码序列位于载体中以使得该编码序列可操作地连接用于表达适当调控序列。

表达载体可以是能够方便地经受重组 DNA 方法并且可导致本文所述的转录激活结构域的编码序列表达的任何载体(如质粒或病毒)。载体的选择一般取决于载体与其中被导入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性或闭合的环形质粒。载体可以是自主复制的载体，即作为染色体外实体存在，其复制不依赖于染色体复制的载体，例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可包含用于保证自我复制的任何方式。或者，载体可以是当被导入宿主细胞时，整合到基因组中并且与其已经被整合进入的染色体一起复制的载体。

此外，可使用一起包含将被导入宿主细胞基因组的总 DNA 的单个载体或

质粒或两个或多个载体或质粒，或转座子。表达载体优选包含一个或多个容许容易选择转化、转染、转导等细胞的可选择标记。可选择的标记是基因，其产物提供对抗生素或病毒的抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型等。优选地，表达载体包含容许该载体整合进入宿主细胞基因组或该载体在细胞中独立于基因组自主个复制的元件。

一个以上拷贝的本发明的编码序列可被插入宿主细胞以增加该基因产物的产量。多核苷酸拷贝数的增加可通过将至少一个附加拷贝的序列整合进入宿主细胞基因组或通过包括可扩增的选择标记基因和该多核苷酸来获得，其中包含扩增拷贝的选择标记基因并且由此包含附加拷贝多核苷酸的细胞可通过在存在适当的选择剂时培养该细胞来筛选。

在一些实施方案中，本文所述的核酸构建物包含第一表达框和第二表达框，第一表达框从 5' 至 3' 包含 SEQ ID NO:18-23 中任一所示的启动子以及 SEQ ID NO:9-17 中任一所示的多肽的编码序列和 SEQ ID NO:29 所示的终止子。第二表达框从 5' 至 3' 包含 SEQ ID NO:1-8 任一所示的嵌合启动子和 SEQ ID NO:24 所示的终止子、嵌合启动子和终止子之间任选包含克隆位点和/或 SEQ ID NO:25-28 所示的目标蛋白编码序列。

在具体实施方案中，本文所述的核酸构建物包含第一表达框和第二表达框，第一表达框从 5' 至 3' 包含 SEQ ID NO: 1-8 任一（优选 SEQ ID NO:6）所示嵌合启动子、SEQ ID NO:25-28 中任一所示蛋白的编码序列和 SEQ ID NO:24 所示的终止子，第二表达框从 5' 至 3' 包含 SEQ ID NO:18-23 中任一所示启动子（优选 SEQ ID NO:18）以及 SEQ ID NO:9-17 中任一（优选 SEQ ID NO:17）所示多肽的编码序列和 SEQ ID NO:29 所示的终止子。如图 1-4 所示。

本发明还提供一种宿主细胞，其包含或基因组整合有（1）本文任一实施方案所述融合蛋白和（2）具有本文任一实施方案嵌合启动子的表达框，或，包含本文任一实施方案所述的核酸构建物。

宿主细胞可用作载体的受主。宿主细胞可以是“转染的”或“转化的”，其指外源性核酸转染或转导到宿主细胞中的过程。转化的细胞包括原代对象细胞及其后代。本文所用的术语“工程改造的”和“重组的”细胞或宿主细胞往往指其中已经导入外源性核酸序列，例如载体的细胞。因此，重组细胞可与不

含导入的重组核酸的天然存在的细胞相区分。

本发明中所述的融合蛋白编码序列可采用本领域周知的 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得，对于 PCR 扩增法，可采用本文所公开的引物序列和模板进行扩增。

- 5 在获得重组表达载体后，将该载体转化到宿主细胞中，以产生包括融合蛋白的蛋白或肽。此种转移过程可用转化或转染等本领域技术人员熟知的常规技术进行。本发明所述的宿主细胞是指能够接收和容纳重组 DNA 分子的细胞，是重组基因扩增的场所，理想的受体细胞应该满足易于获取和增殖两个条件。本发明的“宿主细胞”可包括原核细胞和真核细胞，示例性地，本发明所述宿主细胞包括大肠杆菌、农杆菌。在一个或多个实施方案中，所述宿主细胞不是植物细胞。
- 10

- 本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞等。获得本本文的表达载体后，可采用本领域熟知的方法将其转化宿主细胞。例如，当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。
- 15

- 本发明还提供一种试剂盒，包含本文任一实施方案所述的嵌合启动子、融合蛋白、核酸构建物、和/或宿主细胞。
- 20

- 本发明还提供一种在细胞（例如植物细胞）中表达目标核酸的方法，所述细胞包括：（1）本文任一实施方案融合蛋白和（2）具有本文任一实施方案嵌合启动子的表达框，所述目标核酸与所述嵌合启动子操作性连接，所述方法包括在所述融合蛋白诱导嵌合启动子启动表达的条件下孵育所述细胞的步骤。通常，所述条件是适合所述细胞生长的条件。所述细胞包含本文所述的核酸构建物。
- 25

在一些实施方案中，所述细胞通过本文的核酸构建物表达所述融合蛋白。因此，所述表达目标核酸的方法包括：（1）将目标核酸导入本文所述核酸构建物中，所述目标核酸由所述嵌合启动子启动表达；（2）将所述核

酸构建物转移到细胞中；（3）在适合所述核酸构建物表达的条件下孵育所述细胞。在一个或多个实施方案中，所述目标核酸导入第二表达框中的嵌合启动子下游，优选地，导入克隆位点中。在一个或多个实施方案中，所述适合所述核酸构建物表达的条件是第一表达框表达并且所表达的融合蛋白能诱导嵌合启动子启动目标核酸表达的条件。在一个或多个实施方案中，所述条件是适合细胞生长的条件。

在另一些实施方案中，所述细胞已经组成型表达所述融合蛋白，或者已经转化有表达所述融合蛋白的表达框或载体。因此，所述表达目标核酸的方法包括：（1）将目标核酸导入包含本文任一实施方案所述的嵌合启动子的第二表达框中；（2）将第二表达框导入细胞中，所述细胞包含本文任一实施方案的融合蛋白或含有第一表达框，所述第一表达框包含本文任一实施方案所述的融合蛋白的编码序列；（3）在适合第二表达框表达的条件下孵育所述细胞。

所述第二表达框的特征如本文上述核酸构建物中所述。例如，所述第二表达框还包含克隆位点和终止子，所述目标核酸位于克隆位点中。所述克隆位点和终止子如本文他处所述。所述目标核酸包含选自 EGFP 蛋白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白中的一种或多种蛋白的编码序列。所述适合第二表达框表达的条件是本文所述的融合蛋白能诱导嵌合启动子启动表达的条件，或者，是第一表达框表达并且所表达的融合蛋白能诱导嵌合启动子启动目标核酸表达的条件。通常，所述条件是适合细胞生长的条件。

本发明还提供一种在植物中表达目标核酸的方法，包括：（1）将包含目标核酸的本文所述的核酸构建物转入植物器官或组织，获得转化有所述核酸构建物的植物组织或器官；所述目标核酸由所述嵌合启动子启动表达；和（2）将步骤（1）获得的转入了本文所述核酸构建物的植物组织或器官再生成植物植株。在一个或多个实施方案中，所述目标核酸位于所述第二表达框中，由所述嵌合启动子启动表达。优选地，所述的方法包括步骤：（a）提供携带表达载体的农杆菌，所述的表达载体含有本发明所述核酸构建物；（b）将植物组织或器官与步骤（a）中的农杆菌接触，从而使所述目标核酸转入并且整合到植物细胞的染色体上；（c）选择出转入所述目标核酸的植物组织或器官；以及（d）将步骤（c）中的植物组织或器官再生成植物。

实施例

下文将以具体实施例的方式阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等，《分子克隆：实验室指南》(美国纽约州：冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，1989)所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件进行。

所用的多聚酶链式反应(PCR)胶回收试剂盒，质粒抽提试剂盒均为美国 Axygen 产品；PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 聚合酶试剂盒，聚合酶链式反应(PCR)高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 为日本宝生物公司(TAKARA)产品；限制性内切酶均为 NEB 产品。T4 连接酶为 Thermo Scientific 的产品。同源重组酶使用的是诺唯赞的 Vazyme ClonExpress II One Step Cloning Kit。

大肠杆菌 DH10B 用于基因克隆，农杆菌 GV3101 菌株用于烟草叶片瞬时转化。构建中间基因片段使用 Transgen 公司的 pEASY-Blunt 克隆载体质粒保存。pCF001、pCF161 载体为实验室保存，用于转录激活系统装配。

PCR 使用 Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)；恒温培养使用 ZXGP-A2050 恒温培养箱(智城)和 ZWY-211G 恒温培养振荡器(智城)；离心使用 5418R 高速冷冻式离心机和 5418 小型离心机(Eppendorf)；OD600 使用 UV-1200 紫外可见分光光度计检测(上海美谱达仪器有限公司)；EGFP 和 mCherry 检测使用多功能酶标仪(Thermo Scientific)。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。基因委托上海生物工程有限公司合成。

实施例 1，携带 LexA 识别位点的人工启动子报告质粒的构建

设计表 1 所示的引物。利用引物 Act2-SX-F/200-AtAct2-R，以 PBS100 质粒为模版，PCR 扩增出 5' 端带 BsaI、SacI 和 XhoI，3' 端带 BsaI 的 cpAct 启动子序列。将序列装入载体 pEASY 载体中，获得 pEASY-cpAct2 质粒。构建不同 LexA 蛋白识别位点拷贝数的启动子采用的是引物退火连接的方法。利用含有 LexA 识别序列(APBD)的引物对 LexAPBD-F/LexAPEB-R，通过引物互

补配对 (TE buffer, 95°C 反应 5min) 可形成两端带有 SacI 和 XhoI 酶切粘性末端的 APBD 双链片段。将 APBD 双链片段以连接的方式装入 SacI 和 XhoI 酶切后的质粒 pEASY-cpAct2 片段中获得 pEASY-A1cpAct2。通过 SacI 和 XhoI 继续酶切 pEASY-A1cpAct2 质粒, 可以再装入 APBD 双链片段获得 pEASY-A2cpAct2。按照重复上述方法依次构建出含有 3-8 个 APBD 的人工启动子。APBD1-AtAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示; APBD2-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示; APBD3-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示; APBD4-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示; APBD5-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示; APBD6-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:6 所示; APBD7-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示; APBD8-cpAct2 核苷酸序列如 SEQ ID NO:8 所示;

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF161、上述构建出的人工启动子质粒、报告基因 EGFP 质粒 PBS70、终止子质粒 PBS43 进行酶切, 回收目的片段后进行 T4 连接获得带有 0-8 个 LexA 识别位点的报告质粒 pCF189-pCF197。

PCR 反应条件: 98°C 预变性 2 min, 然后 98°C 变性 10s, 55°C 退火 15s, 72°C 延伸 20s, 25 个循环, 琼脂糖电泳检测, 切胶回收目的片段。酶切反应条件: 37°C 反应 1h, 切胶回收目的片段。T4 连接条件: 22°C 反应 1h。

组装序列如下, 其中, 单横线表示 2 型限制性内切酶 BsaI 的识别序列, 曲线表示酶切后产生的粘性末端序列, 双横线虚指实施方案中所使用到的对应功能的核酸序列

启动子装配酶切序列:

TTCGGTCTCAGGAGNNNNNAATGTGAGACCGGA

蛋白编码核酸序列装配酶切序列:

TTCGGTCTCAAATGNNNNNNGCTTTGAGACCGGA

终止子装配酶切序列:

TTCGGTCTCAGCTTNNNNNCGCTTGAGACCGGA

载体装配酶切序列: (克隆位点)

GGAGAGAGACCCCGATGGAAACGTTTAAGCAGGTCTCCCGCT

表 1

引物	序列
Act2-SX-F	CCCTTTTCGGTCTCAGGAGCGAGCTCCGCTCGAGAAGGGGCTGAGA TGATTAATTAG
200-AtAct2-R	TCCGGTCTCACATTTTCAAAGCGGAGAGGAAAATATATG
LexAPBD-F	CCGCTCGAGTACTGTACATATAACCACTGGTTTTATATACAGCAGT G
LexAPBD-R	TCGACACTGCTGTATATAAAACCAGTGGTTATATGTACAGTACTC GAGCGGAGCT

实施例 2，携带不同转录激活结构域的人工转录因子表达质粒的构建。

通过基因合成，直接合成多个转录激活模块序列，包括 VP16, TV, DELL, VP64, VPR, p300, ERF2 和 Med2；直接合成识别 DNA 序列的 LexA 蛋白序

列。

设计表 2 中的引物。以 LexA-F/LexA-VP16-R 为引物，以 LexA 为模版进行 PCR；以 LexA-VP16-F/BsaI-VP16-R 为引物，以 VP16 为模版进行 PCR；对上述两种 PCR 片段以 LexA-F/ BsaI-VP16-R 为引物，进行 overlap PCR，获得

片段 A-VP16，目的片段装进 pEASY 载体中获得质粒 pEASY-A-VP16。携带核定位信号 nls 的 NA-VP16 片段是使用 Bsa I -NLS-LexA-F/LexA-VP16-R 和 LexA-VP16-F/BsaI-VP16-R 分别克隆出目的片段后使用 overlap PCR 获得，装入 pEASY 载体得到 pEASY-NA-VP16；

在 NA-VP16 转录因子序列的基础上替换不同的转录激活模块。以 pEASY-NA-VP16 为模版，使用引物对 LexA-N-F/ LexA-N-R 扩增出带有同源序列适配不同转录激活结构域的 NA 片段。分别使用不同的转录因子引物对，以合成的序列为模版，扩增出带有同源序列适配 NA 片段的

不同转录激活结构域序列。利用 overlapPCR 克隆出两端带有 BsaI 位点的人工转录因子基因，装入 pEASY 载体中，获得 pAESY-NA-DELL, pAESY-NA-ERF2, pAESY-NA-Med2, pAESY-NA-P300, pAESY-NA-TV, pAESY-NA-VP64, pAESY-NA-VPR。

LexA-VP16 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，其中 VP16 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 第 93-215 位氨基酸序列所示；

Nls-LexA-VP16 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示，其中 NLS 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 第 1-8 位氨基酸序列所示；

Nls-LexA-DELL 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，其中 DELL 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 第 100-123 位氨基酸序列所示；

5 Nls-LexA-ERF2 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，其中 ERF2 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 第 100-130 位氨基酸序列所示；

Nls-LexA-Med2 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，其中 Med2 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 第 100-529 位氨基酸序列所示；

10 Nls-LexA-P300 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，其中 P300 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 第 100-732 位氨基酸序列所示；

Nls-LexA-TV 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示，其中 TV 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 第 100-549 位氨基酸序列所示；

Nls-LexA-VP64 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示，其中 VP64 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 第 100-149 位氨基酸序列所示；

15 Nls-LexA-VPR 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示，其中 VPR 转录激活结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 第 100-481 位氨基酸序列所示；

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF001、启动子质粒 PBS90、装有各种转录因子基因的 pEASY 质粒、终止子质粒 PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4 连接获得带有不同人工转录因子的表达质粒 pCF206, pCF208, pCF215, pCF216, 20 pCF217, pCF218, pCF219, pCF220, pCF221。

表 2

引物	序列
LexA-F	ATTGGTCTCGAATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAAC
BsaI-NLS-LexA-F	ATTGGTCTCGAATGCCTAAAAAGAAAAGGAAGGTTAA AGCGTTAACGGCCAGGCAAC
LexA-VP16-R	CTTAGTCCTAGAGCCGCCGCCACCCGGTTCACCGGCA GCCACACGACCTACCAGC
LexA-VP16-F	GAACCGGGTGGCGGCGGCTCTAGGACTAAGAATAATT ACGGATCTAC
BsaI-VP16-R	ATTGGTCTCAAAGCTCAACCACCGTACTCATCAATTCC

	AAG
LexA-N-F	ATTGGTCTCGAATGCCTAAAAAGAAAAGGAAGGTTAA AGCGTTAACGGCCAGGCAAC
LexA-N-R	AGAGCCGCCGCCACCCGGTTCACCGGCAGCCACACGA CCTACC
Med2-F	CCGGTGAACCGGGTGGCGGCGGCTCTGTAGTACAAAA TAGCCCAGTTTCGTC
Med2-R	ATTGGTCTCAAAGCTCATATATTGAAGCCGCTGAGGT CTAATTC
NADELL-F	CCGGTGAACCGGGTGGCGGCGGCTCTGAAGTGTTTG
NADELL-R	ATTGGTCTCAAAGCTCAGCGTTTGCGTTCTTCGC
NAERF2-F	CGGTGAACCGGGTGGCGGCGGCTCTTCAGAGGACATG T
NAERF2-R	ATTGGTCTCAAAGCTCACGCCGAAAATCAAAAAGAC AG
NAP300-F	CCGGGTGGCGGCGGCTCTGAGGCCAGC
NAP300-R	ATTGGTCTCAAAGCTCAAGAAGCGTAGTCCGGAACGT CG
NATV-F	GGTGAACCGGGTGGCGGCGGCTCTCTGTTGGAT
NATV-R	ATTGGTCTCAAAGCTCATAACATATCCAGATCAAAGT CGTCG
NAVP64-F	AACCGGGTGGCGGCGGCTCTGACGCATTGGATGAC
NAVP64-R	ATTGGTCTCAAAGCTCATAACATGTCCAGATCAAAGT CG
NAVPR-F	AACCGGGTGGCGGCGGCTCTGACGCATTGGATGAC
NAVPR-R	ATTGGTCTCAAAGCTCAAAACAGAGATGTGTCGAAGA TGG

实施例 3，不同 APBD 拷贝数的人工启动子用于表达 EGFP 蛋白

将基于 VP16 的转录激活因子表达质粒 pCF206，pCF208 和携带 0-8 个 APBD 拷贝的报告质粒 pCF189-197 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 3）。LB 固体培养基（卡那霉素 50μg/mL，庆大霉素 2550μg/mL，利福平 50μg/mL）
5 30℃培养 36h。挑取单个克隆到 2 mL LB 液体培养基（卡那霉素 50μg/mL，庆

大霉素 2550μg/mL，利福平 50μg/mL），30℃过夜培养。转接菌液到新的 10 mL LB 液体 LB 抗性培养基中 30℃，200rpm 培养至 OD600=1。8000rpm 离心 5min 收菌体，用 MES 重悬液（10mM MgCl₂，10mM MES，150μM 乙酰丁香酮，pH5.7）洗两遍。用适量 MES 重悬液调整 OD600=1，将转录激活因子和不同启动子的报告质粒 1:1 混合，室温静置 2h。使用 1mL 注射器将菌液打入 4 周大的烟草叶片中。侵染 3 天后收取烟草样品，打孔器取样，将剪下的叶片装入酶标板孔中（采用 96 孔板），使用酶标仪检测 EGFP 和 mCherry 表达强度，检测使用激发光和接收光如下所述：Ex：488 nm，Em：520 nm；mCherry 检测条件：558 nm，Em：620 nm。检测结果如图 5 所示，启动子上不同的 APBD 拷贝数产生不同的激活表达强度，在 5 个和 6 个拷贝数的时候最高。

表 3

质粒	组成	功能
pCF189	pCF161-cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF190	pCF161-APBD1_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF191	pCF161-APBD2_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF192	pCF161-APBD3_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF193	pCF161-APBD4_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF194	pCF161-APBD5_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF195	pCF161-APBD6_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF196	pCF161-APBD7_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF197	pCF161-APBD8_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF206	pCF001-P_90-A-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF208	pCF001-P_90-NA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒

实施例 4，不同转录激活因子对人工启动子的效果

将基于 VP16 等转录激活因子表达质粒 pCF206, pCF208, pCF215, pCF216, pCF217, pCF218, pCF219, pCF220, pCF221 和携带 5/6 个 APBD 拷贝的报告质粒 pCF194, pCF195 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 4），按照实施例 3 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片，3 天后收取烟草样品，检测 EGFP 和 mCherry 表达强度。检测结果如图 6 所示，不同的转录因子激活因子获得不同

的激活表达强度，其中 VPR 最高，其次是 TV。

表 4

质粒	组成	功能
pCF194	pCF161-APBD5_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF195	pCF161-APBD6_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF206	pCF001-P_90-A-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF208	pCF001-P_90-NA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF215	pCF001-P_90-NATV-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF216	pCF001-P_90-NADELL-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF217	pCF001-P_90-NAVP64-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF218	pCF001-P_90-NAVPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF219	pCF001-P_90-NAp300-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF220	pCF001-P_90-NAERF2-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF221	pCF001-P_90-NAMed2-T_78	人工转录因子表达质粒

实施例 5，不同输入启动子表达转录激活因子的质粒构建

5 使用内切酶 BsaI 对载体 pCF001、启动子质粒（表 5）、装有转录因子 N 基因（NAVP16、NAVPR、NATV）的 pEASY 质粒、终止子质粒 PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4 连接获得带有不同表达强度的人工转录因子的表达质粒 pCF210-214，pCF222-231。

表 5

质粒	携带启动子
PBS90	P_StUbi
PBS70	EGFP
PBS78	T_rbc
PBS43	T_AtHsp
PBS100	cP_AtAct2
PBS5	P_MAS-1
PBS7	P_AtRbcs1A
PBS15	P_CsVMV
PBS21	P_Ocs-1
PBS77	P_rbc

实施例 6，不同输入启动子启动转录激活系统用于 EGFP 表达

将基于 VP16 等转录激活因子表达质粒 pCF206, pCF208, pCF210-214, pCF222-231 和携带 5/6 个 APBD 拷贝的报告质粒 pCF194, pCF195 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 6），按照实施例 3 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片，3 天后收取烟草样品，检测 EGFP 和 mCherry 表达强度。检测结果如图 7 所示。基于转录激活系统表达出来的 EGFP 强度普遍高于直接用天然启动子表达的 EGFP 强度。

表 6

质粒	组成	功能
pCF194	pCF161-APBD5_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF195	pCF161-APBD6_cpAct2-GFP-T_43	人工启动子报告质粒
pCF206	pCF001-P_90-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF208	pCF001-P_90-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF210	pCF001-P_5-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF211	pCF001-P_7-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF212	pCF001-P_15-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF213	pCF001-P_21-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF214	pCF001-P_77-nls-LexA-VP16-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF222	pCF001-P_5-nls-LexA-VPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF223	pCF001-P_7-nls-LexA-VPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF224	pCF001-P_15-nls-LexA-VPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF225	pCF001-P_21-nls-LexA-VPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF226	pCF001-P_77-nls-LexA-VPR-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF227	pCF001-P_5-nls-LexA-TV-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF228	pCF001-P_7-nls-LexA-TV-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF229	pCF001-P_15-nls-LexA-TV-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF230	pCF001-P_21-nls-LexA-TV-T_78	人工转录因子表达质粒
pCF231	pCF001-P_77-nls-LexA-TV-T_78	人工转录因子表达质粒

10

实施例 7，VPR 激活的人工转录激活表达单质粒载体的构建

设计表 7 中的引物，以质粒 pCF218（pCF001-P_90-NAVPR-T_78）为模

版，使用两对引物 232-inter-F/232-B-R 和 232-B-F/232-inter-F 进行 PCR 反应。通过将整个质粒分为两个序列片段，并通过引物引入对应的 BsaI 酶切位点。将 PCR 获得的两个基因片段进行同源重组获得质粒 pCF232（pCF218-BsaI）。同源重组反应条件：37℃反应 30min。

5

表 7

引物	序列
232-B-F	agacctgcttaaacgtttccatcggggtctctctcccgtaatcatggtcatagctgtt
232-B-R	ccgatggaaacgtttaagcagggtctcccgctagcgtccactatagacaattaatgcgtc
232-inter-F	gtgggaaaagacaagttctcttcgggctttcc
232-inter-R	ggaaaagcccgaagaggaactgtcttttcccacg

实施例 8 VPR 激活的人工转录激活表达质粒载体用于表达 EGFP 蛋白

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF232、人工启动子质粒 pEASY-A6cpAct2、EGFP 蛋白质粒 PBS70、终止子质粒 PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4
10 连接获得人工转录系统表达 EGFP 的表达质粒 pCF235。使用启动子 PBS90 表达 EGFP 的质粒 pCF233（pCF001-P_90-GFP-T_43）作为对照进行比较。

将空白对照 pCF232、人工转录表达质粒 pCF235 和带有天然启动子最强表达活性的 pCF233 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 8），按照实施例 3 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片，3 天后收取烟草样品 0.2g，液氮速冻后
15 研磨仪研磨成粉末，使用蛋白提取 Buffer（100mM Tris-HCl pH8.0，150mM NaCl，10% Glycerol，1mM EDTA，使用前加 1mM PMSF）提取蛋白，12000rpm 离心后吸取 100μL 上清液，加入 20μL 蛋白 loading buffer（250mM Tris-HCl pH6.8，10% SDS，0.5% BPB，50% Glycerol），沸水煮 10min。跑 10%的 SDS PAGE 胶查看蛋白表达情况。表达结果如图 8 所示，基于 VPR 转录激活系统
20 表达出来的 EGFP 蛋白浓度要高于天然启动子 P_StUbi 表达的 EGFP 浓度，转录系统的引入不会影响蛋白的表达速率。

15

20

表 8

质粒	组成	功能
pCF232	pCF218（pCF001-P_90-NAVPR-T_78）-BsaI	人工转录激活载体
pCF233	pCF001-P_90-GFP-T_43	天然元件表达 EGFP 质粒

pCF235	pCF232-A6cpAct2-GFP-T_43	人工转录系统表达 EGFP 质粒
--------	--------------------------	---------------------

实施例 9 VPR 激活的人工转录激活表达质粒载体用于表西尼罗河病毒 NS1 蛋白

两头携带 BsaI 酶切位点 West Nile virus_NS1 的基因（SWFK）质粒由捷瑞公司直接合成得到。为了便于植物中的表达，我们设计的时候给西尼罗河病毒的 NS1 前端带上了一个 PR1a 的信号肽，末端带上了 3×Flag 标签和 KDEL 序列。

SWFK 序列如 SEQ ID NO:25 所示，其中 PR1a 的信号肽序列如 SEQ ID NO:25 第 1-30 位氨基酸序列所示；3×Flag 标签和 KDEL 序列如 SEQ ID NO:25 第 390-414 位氨基酸序列所示。

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF232、人工启动子质粒 pEASY-A6cpAct2、合成的 SWFK、终止子质粒 PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4 连接获得人工转录系统表达 SWFK 的表达质粒 pCFP7。使用启动子 PBS90 表达 SWFK 的质粒 pCFP2（pCF001-P_90-SWFK-T_43）和载体 pEAQ-HT 表达 SWFK 的质粒 pCFP001（pCF001-P_83-SWFK-T_98）作为蛋白表达的对照进行比较。

将人工转录表达质粒 pCFP7 和带有天然启动子高表达活性的 pCFP1、pCFP2 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 9），按照实施例 3 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片，按照实施例 8 中的方法提取蛋白，制备蛋白样品。跑完 SDS-PAGE 胶后利用 Westernblot（Flag 抗体采购于 Sigma 公司）检测蛋白表达情况。表达结果如图 9 所示，利用转录激活系统获得的 NS1 蛋白浓度要远远高于使用天然启动子表达的 NS1 蛋白。

表 9

质粒	组成	功能
pCFP001	pCF001-P_83-SWFK-T_98	pEAQ-HT 表达 SWFK
pCFP002	pCF001-P_90-SWFK-T_43	天然强启动子表达 SWFK
pCFP007	pCF232-A6-cpAct2-SWFK-T_43	人工转录系统载体中表达 SWFK

实施例 10 VPR 激活的人工转录激活表达质粒载体用于表达寨卡病毒 NS1 蛋白

两头携带 BsaI 酶切位点 Zika_NS1 的基因 (SZFK) 质粒由捷瑞公司直接合成得到。为了便于植物中的表达,我们设计的时候给 Zika_NS1 前端带上了一个 PR1a 的信号肽,末端带上了 3×Flag 标签和 KDEL 序列。

SZFK 序列如 SEQ ID NO:26 所示,其中 PR1a 的信号肽序列如 SEQ ID NO:26 第 1-30 位氨基酸序列所示;3×Flag 信号肽和 KDEL 信号肽序列如 SEQ ID NO:26 第 390-414 位氨基酸序列所示。

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF232、人工启动子质粒 pEASY-A6cpAct2、合成的 SZFK、终止子质粒 PBS78 进行酶切,回收目的片段后进行 T4 连接获得人工转录系统表达 SZFK 的表达质粒 pCFP8。使用启动子 PBS90 表达 SZFK 的质粒 pCFP5 (pCF001-P_90-SZFK-T_43) 和载体 pEAQ-HT 表达 SZFK 的质粒 pCFP4 (pCF001-P_83-SZFK-T_98) 作为高表达的对照进行比较。

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF001、pEASY-A6cpAct2、SZFK、PBS78 进行酶切,回收目的片段后进行 T4 连接获得不带人工转录因子的 SZFK 的表达质粒 pCFP006 作为阴性对照

将空白对照 pCF001 和 pCFP006 (pCF001-A6-cpAct2-SZFK-T_43)、人工转录表达质粒 pCFP8 和带有天然启动子高表达活性的 pCFP4、pCFP5 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中(见表 10),按照实施例 3 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片,按照实施例 8 中的方法提取蛋白,制备蛋白样品。跑完 SDS-PAGE 胶后利用 Westernblot 检测蛋白表达情况(抗体来自 SIGMA 公司的 Flag 抗体,货号为: A8592)。表达结果如图 10 所示,利用转录激活系统获得的 NS1 蛋白浓度要远远高于使用天然启动子表达的 NS1 蛋白。

表 10

质粒	组成	功能
pCFP004	pCF001-P_83-SZFK-T_98	pEAQ-HT 表达 SZFK
pCFP005	pCF001-P_90-SZFK-T_43	天然强启动子表达 SZFK 无人工转录因子载体中表达
pCFP006	pCF001-A6-cpAct2-SZFK-T_43	SZFK
pCFP008	pCF232-A6-cpAct2-SZFK-T_43	人工转录系统载体中表达 SZFK

实施例 11 VPR 激活的人工转录激活表达质粒载体用于表达奇果蛋白

两头携带 BsaI 酶切位点奇果蛋白（Miraculin）的基因（MIRF）质粒由捷瑞公司直接合成得到。为了便于植物中的表达，我们设计的时候给 miraculin 末端带上了 3×Flag 标签。

MIRF 序列如 SEQ ID NO:27 所示，其中 3×Flag 标签和 KDEL 序列如 SEQ ID NO:26 第 228-249 位氨基酸序列所示。

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF232、人工启动子质粒 pEASY-A6cpAct2、合成的 MIRF、终止子质粒 PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4 连接获得人工转录系统表达 SZFK 的表达质粒 pCFP12。使用启动子 PBS90 表达 MIRF 的质粒 pCFP10（pCF001-P_90-MIRF-T_43）和载体 pEAQ-HT 表达 MIRF 的质粒 pCFP9（pCF001-P_83-MIRF-T_98）作为高表达的对照进行比较。

使用内切酶 BsaI 对载体 pCF001、pEASY-A6cpAct2、MIRF、PBS78 进行酶切，回收目的片段后进行 T4 连接获得不带人工转录因子的 MIRF 的表达质粒 pCFP011 作为阴性对照。

将空白对照 pCF001 和 pCFP011（pCF001-A6-cpAct2-MIRF-T_43）、人工转录表达质粒 pCFP012 和带有天然启动子高表达活性的 pCFP009、pCFP010 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中（见表 11），按照实施例 2 中的方法侵染 4 周大的烟草叶片，按照实施例 8 中的方法提取蛋白，制备蛋白样品。跑完 SDS-PAGE 胶后利用 Westernblot 检测蛋白表达情况（抗体来自 SIGMA 公司的 Flag 抗体，货号为：A8592）。表达结果如图 11 所示，利用转录激活系统获得的 miraculin 蛋白浓度要远远高于使用天然启动子表达的 miraculin 蛋白。

表 11

质粒	组成	功能
pCFP009	pCF001-P_83-MIRF-T_98	pEAQ-HT 表达 MIRF
pCFP010	pCF001-P_90-MIRF-T_43	天然强启动子表达 MIRF
pCFP011	pCF001-A6-cpAct2-MIRF-T_43	无人工转录因子载体中表达 MIRF
pCFP012	pCF232-A6-cpAct2-MIRF-T_43	人工转录系统载体中表达 MIRF

本文序列

SEQ ID NO:1: APBD1-AtAct2
actgtacatataaccactggttttatatacagcagtgctgagaagggtgagatgattaattgtttaaaaattagttaacacgagggaaggctgtctgacagccaggtcacgttatctttacctgt
ggtcgaaatgattcgtgtctgtcgattttaattattttttgaaaggccgaaaataaagttgtaagagataaacccgcctatataaattcatatattttcctctccgctttgaa
SEQ ID NO:2: APBD2-cpAct2

SEQ ID NO:4>APBD4-cpAct2

SEQ ID NO:5>APBD5-cpAct2

SEQ ID NO:6>APBD6-cpAct2

SEQ ID NO:7>APBD7-cpAct2

SEQ ID NO:8>APBD8-cpAct2

SEQ ID NO:9: LexA-VP16

SEQ ID NO:10: Nls-LexA-VP16

SEQ ID NO:11: Nls-LexA-DELL

SEQ ID NO:12: Nls-LexA-ERF2

SEQ ID NO:13: Nls-LexA-Med2

SEQ ID NO:14: Nls-LexA-P300

SEQ ID NO:15: Nls-LexA-TV

SEQ ID NO:16: Nls-LexA-VP64

MPKKKRKVKALTARQQEVFDLIRDHISQTMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEGPLVGRVAAGEPGGGGSDALD
DFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLML*

SEQ ID NO:17: Nls-LexA-VPR

MPKKKRKVKALTARQQEVFDLIRDHISQTMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEGPLVGRVAAGEPGGGGSDALD
DFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLPKKKRKVDPPKKRKVPVQAEGTLLSEALLQLQFDDDLGALLGNSTDPVFTDL
ASVDNSEFQQLNQIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVGAQRPPDPAPAPLGPPLNGLSGDEDFSSIADMDFALLINSRSSGSRDSREGMFLPKPEA
GSAISDVFEGRVCCQPKRIRPFPPGSPWANRPLASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLEDPEETSQAVKALREMADTVIPQKEE
AaicGQMDLSHPHPRGHLDELTTLESMTEDNLNDSPLTPELNEILDFTLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF*

SEQ ID NO:18 P_StUbi

ggagggaatctaatacttaccctcttagaataaagaaaggtgtttctaataagaccctcaatttacataaattttcaatcaaatataaatacaaatatcaatagaggtaacaataatcaaaa
ataatagaaaaagagcaatacataataaagaagaagatttaagtcgattatcaaggtagtattatctcaatttctaataatttaactcttatattaaggctatgttcataaactga
aatgcgctatattagagcatatataaaataaaaaaacctaaaaataaagttatttttagtatattttttacatgacctacattttctgggtttttctaaaggagcgtgaagtgtcgacct
cattctcctaattttccaccacataaaaataaaaggaaaggtagcttttgcgtgtgttttggtacactacacctcattattacagtgctcctcatataattggttaacccttagaggcggttcgct
tagagtcggccatgccatctataaaatgaagcttttcgacaccttttttctatctctatctgatttctattataatttctcctaattgcctcaaatctctttaagggtagaatcttctctatgtt
ttttgtctgttagattctgaattagctaatcaggtgctgttatagcccttaattttgagtttttttgcgtgtgttttgatggaaaaggcctaaaattgagttttttacgttggtttgatggaaaaggcct
acaattggagttttcccggtgttttgatgaaaaagccctagtttgagatttttttctgcgttcgattctaaagggttaaaattagagttttacattttgttgatgaaaaaggcctaaattgagtt
ttccggttgattgatgaaaaagccctagaattgtgtttttcgcgtgttgattcgaaggcctaaaattgagttttcgcgtgttttgatgaaaaagccctaaattgagttttcgcgtgttttgat
tgaaaaagccctaaattgagttttcccggtgttttagattgtttggttttaattctcgaatcagctaatcaggagtgtaaaaagccctaaattgagtttttctgtgttcgattgtgttttag
aatttcag

SEQ ID NO:19 P_MAS

ttttcaaatcagtcgcaagcgtgacgtaagatccgagtcagtttttttctactaatttggctgtttatttcggcgtgtaggacatggcaaccgggctgaatttcggggtattctgtttctattc
caactttttctgacccgagcattaaacgacttttgaatagatagctgacacgcaagcctcgctagtcaaaagtgtaccaacaacgctttacagcaagaacggaatcgcgtagcgtcgcg
tgacgccatttcgcttttcagaaatggataaataagccttctctattatcttcccaattaccaatacattacactgacatcgaatttcataaccaatctcgatacaccaaatcg

SEQ ID NO:20 P_AtRbcs1

ggagaacattcatagtttcttgaatatctctataattatattgaatttggcacataataagaacctaatttgggtattttttactagtaaaatttctggtgatgggctttctactagaagcctc
cggaataatctggacacaaatccatatttccatgacttcgattgttaacccctattagttttcacaaacataactatcaatcattgcaacggaaaagggtacaagtaaaacattcaatccgatagggaagt
gatgtaggaggttgggaagcagggccagaaagagatttatcgaactgtttgtgtatgttttcaatgttcataaaggaaagatggagacttgagaagttttttggactttgttagctttgttgggc
gtttttttttttgatcaataacttgggtgcttatgattgtaatatttctgagactctttagtttttagacgtgctaaacttgggtgcttatgacttgttgtaacatatgttaacagatgacttgatgt
gcgactaatctttacataaatacatagttctgtttttgaaagtcttattttctattttttgaatgttatattttttctatatttataattctagtaaaaggcaaatttgtcttttaaatgaaaaaata
tatattccacagtttccactaatcttatgacatttagcagtaacaaatccaaatttccattttattcatgaatcataccattatataataactaaatccaaggtaaaaaaaggatgaaagctctata
gtaagtaaaataaattccccataaggaaaggcccaagtcaccaggcaagtaaaatgagcaagcaccactccaccatcacacaatttcaactcatagataagcagaatgattcatggaattatctt
cacgtggcattttccagcggttcaagccgataagggtctcaacacctctccttaggcctttgtggcgttaccagtaaaattacactcacacataccacactcaaaatccaacggtgtgagatcct
agtccactgaatctatgtatctagaccctcgatcatcctaaagcgtgttctctattgttttatcattatataatagatgaccaaaagcactagaccaaacctcagtcacacaagagtaaaagaaga
aca

SEQ ID NO:21 P_CsVMV

ccagaaggtatattccaagatgtagcatcaagaatccaatttaccgggaaaaactatggaagtattatgtgagctcagcaagaagcagatcaatatcgggcacatatgcaacctatgttcaaaa
atgaagaatgtacagatacaagaatctctactgcccagaatacgaagaagaatcagtagaaattgaaaagaagaaccaggcgaagaaagaatcttgaagacgtgaagcctgacgacaacaat
gaaaagaagaagataaggtcgggtattgtgaaagagacatagaggacacatgaagggtgaaatgtaaggcggaagtaacctatcaaaaggaatcttccccactactatcttttat
atttttccgtgctatttttccctgagtttttctatataaggaaccaagttcggcatttgtgaaaacaagaaaaatttgggtgaagctatttttcttgaagtactgaggatacaactcagagaaattt
gtaagtttgt

SEQ ID NO:22 P_Ocs

atcataatttccaccttccactcagatggggggcgtcgaccgggtgagtaattgtacggctaagagcgaatttggcctgaagatccttttaccgacaactcatccattgatggttaggcagaa
agttaaaggattatcgcaagtaatacttcccattcattgatctatttaaagggtggcctcaaggataatcgcaaacattatatttgaatctacca

SEQ ID NO:23 P_rbc

Ctagacaaacacccctgttatcaaaagaatttgcctttcaaaaatcaaaatcgagaaaataatataatgactaaataagatcattcggtatctaatctaaccaattacgatacgctttgggtacactt
gatttttgttcagtggttacatatatctgttttatatgctatcttaaggatctgcacaaagattatttggatgttcttgatggggtcagaagatttgatagatacacttaactttaggagatac
cagccaggattatattcagtaagacaatacaaatttacgtgttcaaacctgcttcttttcatcacaaggatgagccagaatctttatagaatgattgcaatcgagaatattgttcggcgatagctctt
gttggctcaatattctacatacacaagaatcgacgtattgtaccccttccataaaggaaacacataatgcagatgctttttccacatgcagtaacataaggtattcacaataatggctaa
aagaagttggatacaaaatgacaactatttccatttctgttatataaaatttcacacacacaaaagccgtaataagagctctgccatgtacgaataacttctattttgttattgggcttaagc
cagctcagagtagctgtgggggtaccacatataggaaggtaacaaaatactgcaagatagccccataacgtaccagcctctcttaccaggaagagataagataagaccacccctgccagtg
cacatcgtcatggtgtaataagataaggattacatcttctatgttttgacatgatcatgtaatgtcatgagccacaagatccaatggccacaggaacgtaagaatgtgatatagatttgg
tcggttagatgacaaacattataaaagggtgttatcaataggaactaattcactcattggattcatagaagtcattctctctaagtatctagaaa

SEQ ID NO:24 T_AtHsp:

ATATGAAGATGAAGATGAAATATTTGGTGTGTCAAATAAAAAAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTGTTTTTTCTTGGCTTGTGTGTTATGAATTTGTGGCT
TTTTCTAATATTAATGAATGTAAGATCTCATTATAATGAATAAACAAATGTTTCTAATATCCATTGTGAATGTTTTGTGGATCTCTCTGCAGCATATA
ACTACTGTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAA

SEQ ID NO:25: SWFK

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLFLVISHSCRADTGCAIDISRQLRCGSGVFIHNDVEAWMDRYKYYPETPQGLAKIIQKAHKEGVCGLSRVSRLHEQMWAEVKD
ELNTLLKENGVDLSVVVEKQEGMYKSAPKRLTATTEKLEIGWKAWGKSILFAPELANNTFVVDGPETKECPTQNRANSLEVEDFGFLTSTRMFLKVRNSN
TTECDSKIIGTAVKNNLAHSDLSYWIESRLNDTWKLERAVLGEVKSCTWPETHLWGDGILESLLIIPVTLAGPRSNHNRPPGYKTQNGQPWDEGRVEIDFD
YCPGTTVTLSESCGHRGPATRTTTESGKLITDWCCRSTLPLRYQTDGSCWYGMIEIRPQRHDEKTLVQSQVNAENLYFQGDYKDHGDYKDHIDIDYKDD
DDKDEL*

SEQ ID NO:26: SZFK

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLFLVISHSCRADVGSVDFSKRETRCGTVFIYNDVEAWRDRYKYPDPRLAAAVKQAWEEGICGIVSVSRMENIMWKSVE
GELNAILEENGVLTVVVGSKNPMWRGPQRLPVPVNGLPHGWKAWGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECPLKHAWSNLSLVEDHGFVFTSVWL
KVREDSYLEDPAVIGTAVKGREAAHSDLYWIESEKNDTWLKRALHIEKMTCEWPKSHTLWTDGVEESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQVKGPWHS
EELEIRFEPCPGTKVHVEETCGTRGPSRLSTASGRVIEEWCCRECTMPLSFRAKDCGWYGMIEIRPRKEPESNLVSRMVTAENLYFQGDYKDHGDYKDH
DIDYKDDDDKDEL*

SEQ ID NO:27: MIRF

MKELTMLSLSFFVSALLAAANPLLSAADSAPNPVLDIDGELRTGTNYIYVPLRDHGGGLTVSATTPNGTFVCPPRVVQTRKEVDHDRPLAFFPENPKED

VVRVSTDNLNINFSAFMPCRWTSSSTVWRLDKYDESTGQYFVTIGGVKGNPGPETISSWFKIEEFCGSGFYKLVFCPTVCGSCKVKCGDVGIVIDQKGRRLALS
DKPFAFEFNKTVYFENLYFQGDYKDHDGDYKDHIDYKDDDDK*

SEQ ID NO:28:EGFP

5

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK
DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYST
QSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

SEQ ID NO:29:T_RbcS1

10

TCATAAGCCCGATGGCTACTAAGTTTACTATTTACCAAGACTTTTGAATATTAACCTTCTTGTAACGAGTCGGTTAAATTTGATTGTTTAGGGTTTTGT
ATTATTTTTTTTTGGTCTTTTAATTCATCACTTTAATCCCTAATTGTCTGTTCATTTCTGTTGTTTCCGGATCGATAATGAAATGTAAGAGATATCAT
ATATAAATAATAAATTGTCGTTTCATATTTGCAATCTTTTTTTACAAACCTTTAATCGTTGTATGTATGACATTTTCTTCTGTTATATTAGGGGGAAATA
ATGTTAAATAAAAGTACAAATAAACTACAGTACATCGTACTGAATAAATTACCTAGCCAAAAAGTACACCTTCCATATACCTCTACATGAAGGCAT
TTTCAACATTTTCAAATAAGGAATGCTACAACCGCATAATAACATCCACAAATTTTTTATAAAATAACATGTCAGACAGTGATTGAAAGATTTTATTAT
AGTTTCGTTATCTTCTTTCTCATTAAAGCGAATCACTACCTAACACGTCATTTTGTGAAATATTTTTGAATGTTTTATATAGTTGTAGCATTCTCTTTT

15

CAAATTAGGGTTTGTGAGATAGCATTTAGCCGGTTCATACAACCTTAAAGCATACTCTAATGCTGGAAAAAGACTAAAAATCTTGTAAGTTAGC
GCAGAATATTGACCCAAATTATACACACATGACCCCATATAGAGACTAATTACACTTTTAACCACTAATAATTATTACTGTATTATAACATCTACTAA
TTAAACTTGTGAGTTTTTGCTAGAATTATTATCATATATACTAAAAGGCAGGAACGCAACATTGCCCGGTACTGTAGCAACTACGGTAGACGCATTA
ATTGTCTATAGTGA

权 利 要 求 书

1.一种嵌合启动子，包含蛋白结合区域以及核心启动子序列，所述蛋白结合区域包含 1-8 个串联重复的 SEQ ID NO:1 第 1-36 位所示的序列，

5 优选地，重复个数为 5 和/或 6。

2.如权利要求 1 所述的嵌合启动子，其特征在于，所述核心启动子序列包含 Act2 核心启动子序列，优选包含拟南芥的 Act2 核心启动子序列，

更优选地，所述核心启动子序列是拟南芥的 Act2 启动子的包含 SEQ ID
10 NO:1 第 43-243 位所示序列的片段。

3.如权利要求 1 或 2 所述的嵌合启动子，其特征在于，
所述蛋白结合区域和核心启动子序列直接连接或通过接头操作性连接，和
/或

15 所述蛋白结合区域位于核心启动子序列上游，和/或
所述蛋白结合区域与核心启动子序列距离为 0-300nt，优选为 0-216nt，
优选地，所述嵌合启动子序列具有 SEQ ID NO:1-8 任一所示的序列或与其
有至少 90%序列相同性并保留 SEQ ID NO:1-8 的蛋白结合功能的变体。

20 4.一种融合蛋白，包含核酸结合结构域以及转录激活结构域，所述核酸结合结构域包括 LexA 结合蛋白或其含有 LexA 识别结构域的肽段；

优选地，所述融和蛋白具有选自以下的一项或多项特征：

所述核酸结合结构域具有 SEQ ID NO:9 第 1-87 位氨基酸序列或与其有至少 90%序列相同性并保留核酸识别功能的同源序列；优选地，所述同源序列来
25 自肠杆菌科，或来自埃希氏菌属，

所述转录激活结构域选自 VP16、DELL、ERF2、Med2、P300、TV、VP64、VPR 中的一种或多种，

所述核酸结合结构域和转录激活结构域直接连接或通过接头肽连接；优选地，所述接头肽是由 1-5 个氨基酸 G 和/或 1-5 个氨基酸 S 组成的单元的重复

序列，

所述融合蛋白还包括核定位信号；

更优选地，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:9-17 任一所示的序列或与其有至少 90% 序列相同性并保留 SEQ ID NO:9-17 的功能的变体。

5

5. 一种核酸构建物，包含 (1) 权利要求 1-3 中任一项所述嵌合启动子和 (2) 权利要求 4 所述融合蛋白的编码序列；

优选地，所述核酸构建物具有选自以下的一项或多项特征：

10 所述核酸构建物包含第一表达框和第二表达框，第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，第二表达框包含所述嵌合启动子，

所述第一表达框和第二表达框位于同一载体上或不同载体上，

所述第一表达框包含所述融合蛋白的编码序列，位于融合蛋白上游的启动子，及位于融合蛋白下游的终止子，

15 所述第一表达框中融合蛋白的启动子是适合在植物中启动表达的启动子，优选选自 P_StUbi、P_MAS、P_AtRbcs1、P_CsVMV、P_Ocs、P_rbc，

所述第一表达框中的终止子是能在植物中终止表达的终止子，所述终止子优选选自 T_AtHsp、T_RbcS1、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S，

所述第二表达框还包含位于嵌合启动子下游的用于插入外源序列的克隆位点，

20 所述第二表达框还包含位于嵌合启动子下游的终止子，所述终止子优选选自 T_AtHsp、T_RbcS1、T_MAS、T_AtAct2、T_Ubq 和 T_35S，

所述第二表达框还包含目标蛋白的编码序列，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达；优选地，所述目标蛋白的编码序列包含选自 EGFP 蛋白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白 (Miraculin)

25 中的一种或多种蛋白的编码序列；

更优选地，所述第二表达框包含所述嵌合启动子和其下游的终止子；进一步优选地，所述第二表达框从 5' 至 3' 包含所述嵌合启动子、克隆位点和终止子，或者，所述第二表达框从 5' 至 3' 包含所述嵌合启动子、目标蛋白编码序列和终止子。

6. 如权利要求 5 所述的核酸构建物，其特征在于，

第一表达框从 5'至 3'包含 SEQ ID NO:18-23 中任一所示的启动子以及 SEQ ID NO:9-17 中任一所述的多肽的编码序列和 SEQ ID NO:29 所示的终止子，和

5 第二表达框从 5'至 3'包含 SEQ ID NO:1-8 任一所示的嵌合启动子和 SEQ ID NO:24 所示的终止子，并且嵌合启动子和终止子之间任选包含克隆位点和/或 SEQ ID NO:25-28 所示的目标蛋白编码序列。

7. 一种宿主细胞，包含：

10 (1) 权利要求 4 所述的融合蛋白和具有权利要求 1-3 中任一项所述的嵌合启动子的表达框，或，

(2) 权利要求 5 或 6 所述的核酸构建物，
所述宿主细胞不是植物细胞。

15 8. 一种试剂盒，包含权利要求 1-3 中任一项所述的嵌合启动子、权利要求 4 所述的融合蛋白、权利要求 5 或 6 所述的核酸构建物、和/或权利要求 7 所述的宿主细胞。

9. 一种在细胞中表达目标蛋白的方法，所述细胞包含：(1) 权利要求 4 20 所述的融合蛋白和 (2) 具有权利要求 1-3 中任一项所述的嵌合启动子的表达框，所述目标蛋白的编码序列与所述嵌合启动子操作性连接，所述方法包括在所述融合蛋白诱导嵌合启动子启动表达的条件下孵育所述细胞的步骤，

优选地，所述细胞包含权利要求 5 或 6 所述的核酸构建物，

更优选地，所述方法包括：(1) 将目标蛋白的编码序列导入权利要求 5 或 25 6 所述核酸构建物中，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达；

(2) 将所述核酸构建物转移到细胞中；(3) 在适合所述核酸构建物表达的条件下孵育所述细胞，和/或

所述方法包括：(1) 将目标蛋白的编码序列导入包含权利要求 1-3 中任一项所述的嵌合启动子的第二表达框中，位于嵌合启动子的下游，(2) 将第二

表达框导入细胞中，所述细胞包含权利要求 4 所述的融合蛋白；（3）在适合第二表达框表达的条件下孵育所述细胞，和/或

所述目标蛋白的编码序列包含选自 EGFP 蛋白、西尼罗河病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、奇果蛋白（Miraculin）中的一种或多种蛋白的编码序列，
5 和/或

所述细胞是植物细胞。

10.一种获取表达目标蛋白的植物的方法，包括：

（1）将包含目标蛋白的编码序列的权利要求 5 或 6 所述的核酸构建物转入植物器官或组织，获得转化有所述核酸构建物的植物组织或器官，所述目标蛋白的编码序列由所述嵌合启动子启动表达；和

（2）将步骤（1）获得的植物组织或器官再生成植物植株，

所述目标蛋白的编码序列位于所述第二表达框中，由所述嵌合启动子启动表达，

15 优选地，所述的方法包括步骤：

（1）提供携带表达载体的农杆菌，所述的表达载体含有所述包含目标蛋白的编码序列的权利要求 5 或 6 所述的核酸构建物；

（2）将植物组织或器官与步骤（1）中的农杆菌接触，从而使所述目标蛋白的编码序列转入并且整合到植物细胞的染色体上；

20 （3）选择出转入所述目标蛋白的编码序列的植物组织或器官；以及

（4）将步骤（3）中的植物组织或器官再生成植物。

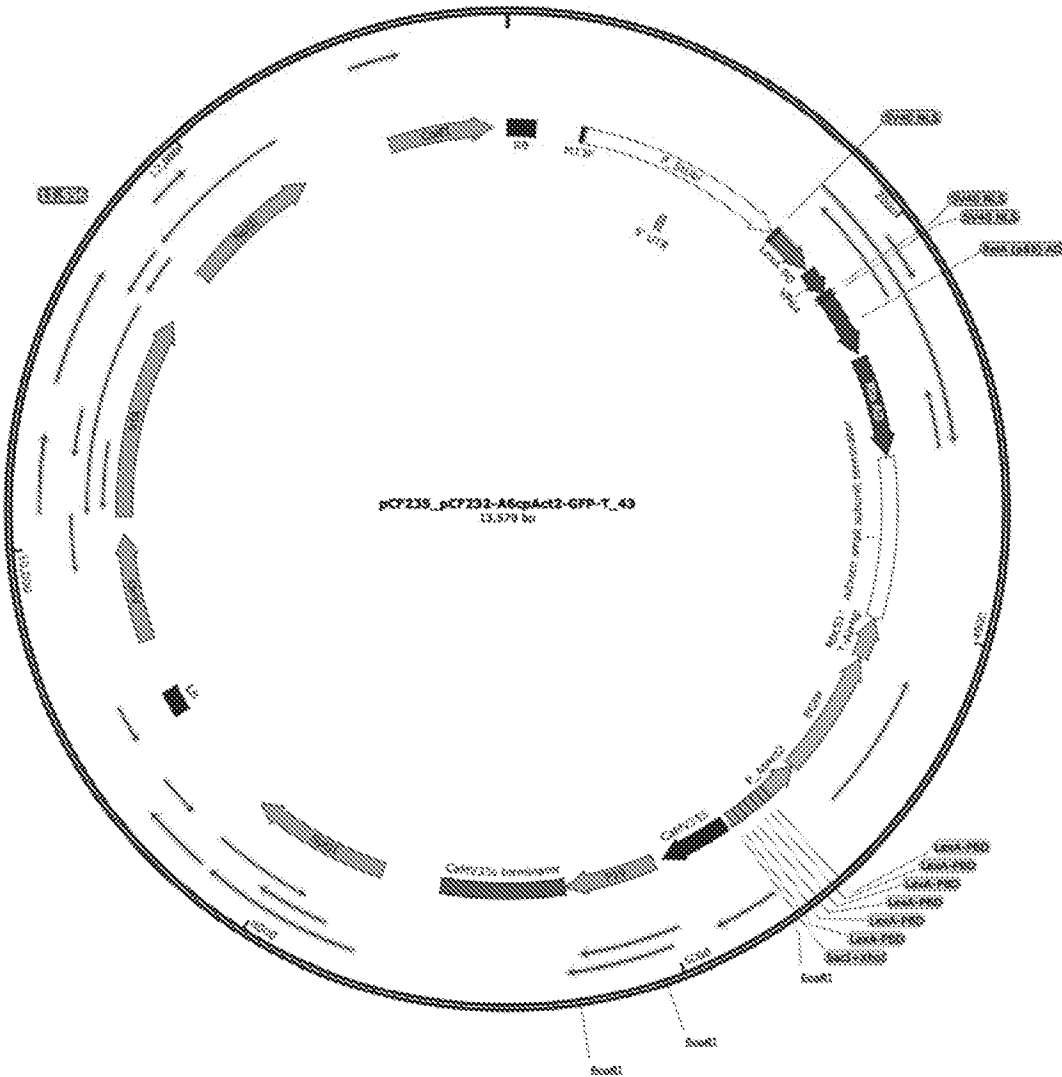


图 1

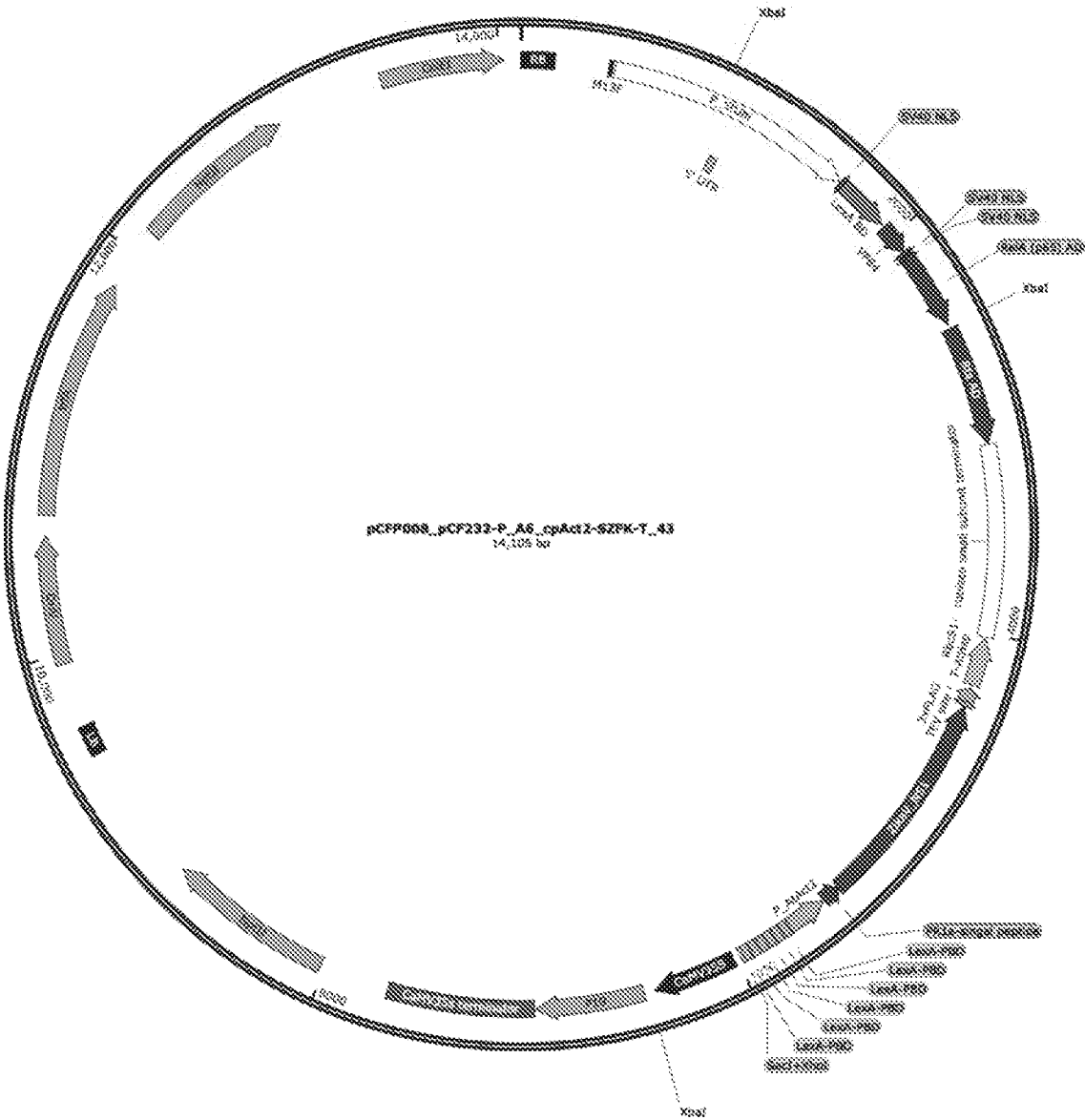


图 3



图 4

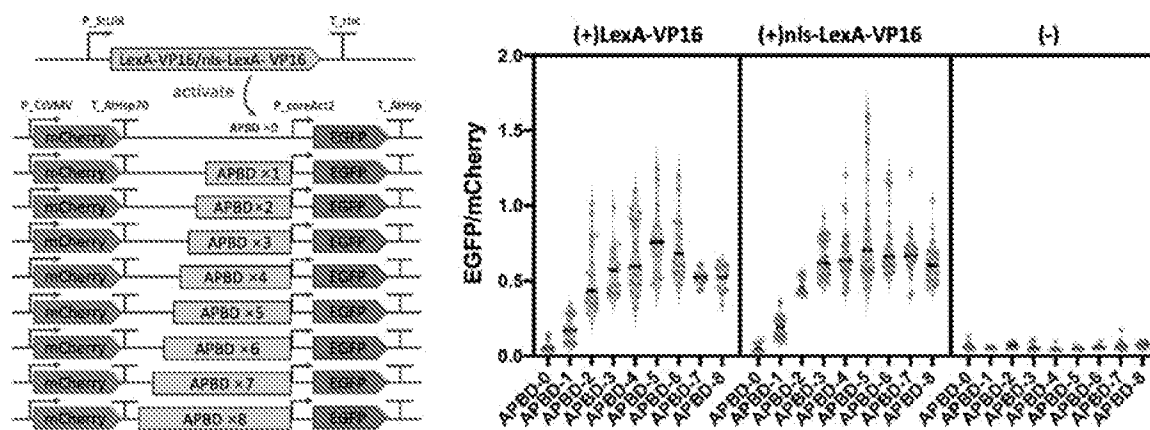


图 5

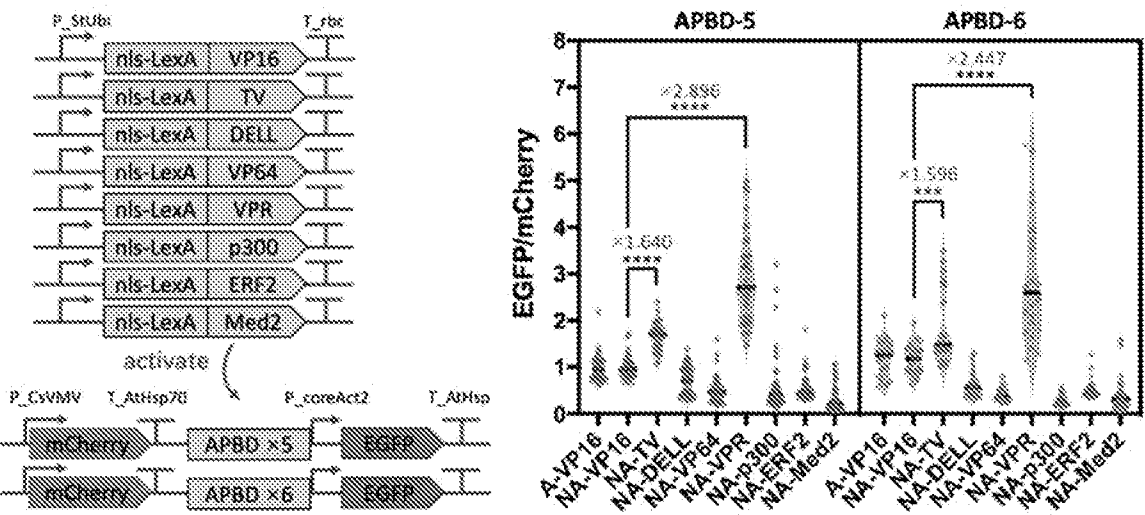


图 6

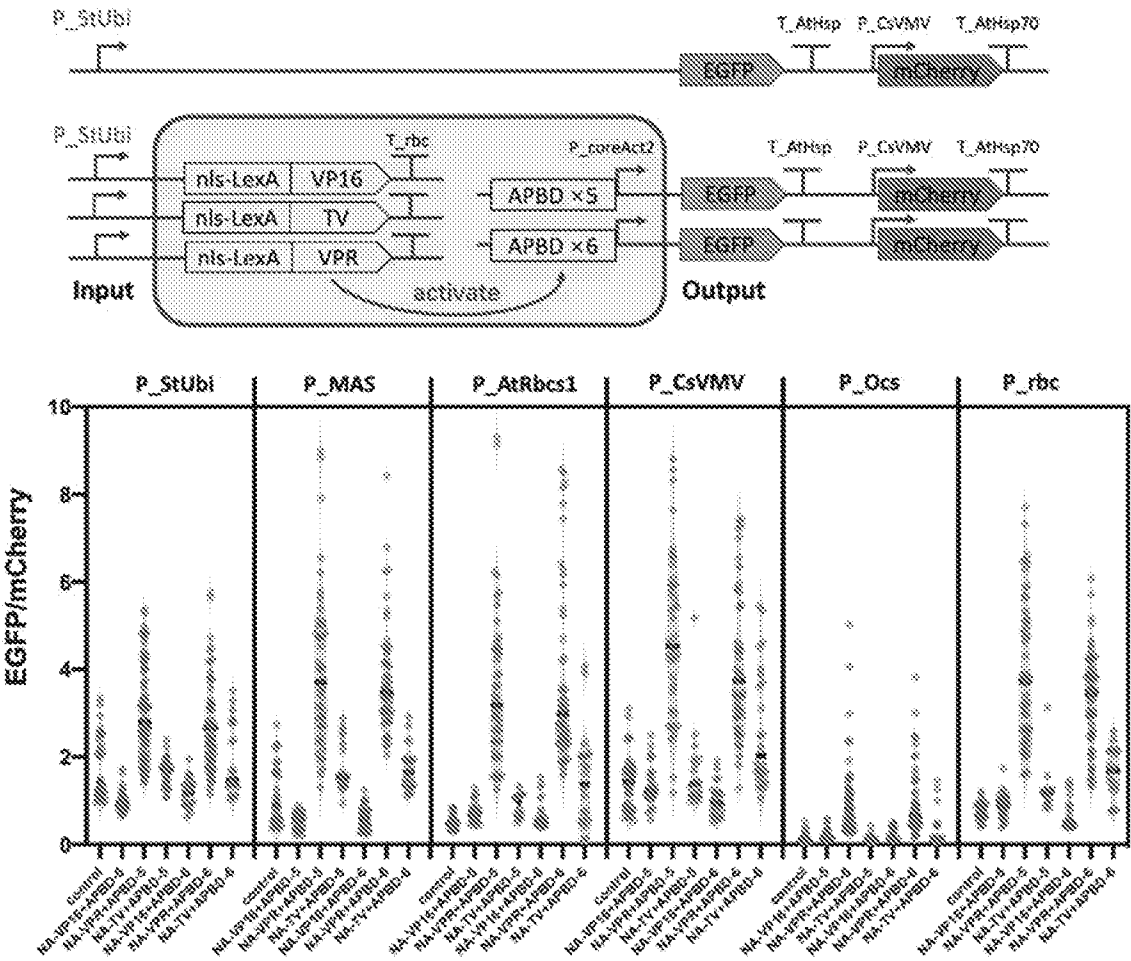


图 7

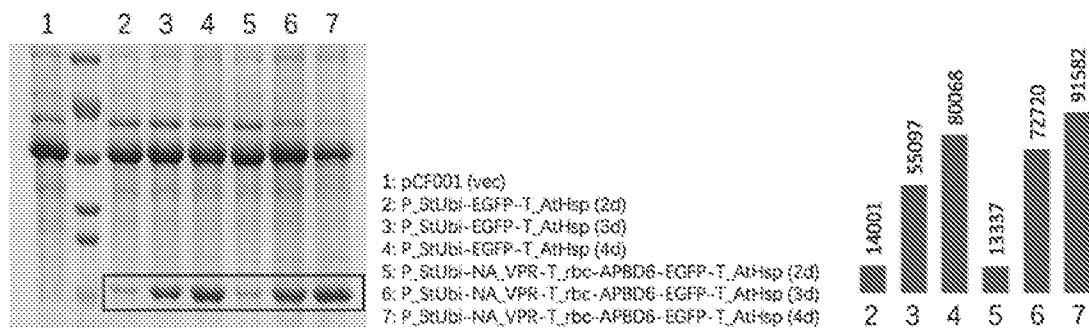


图 8

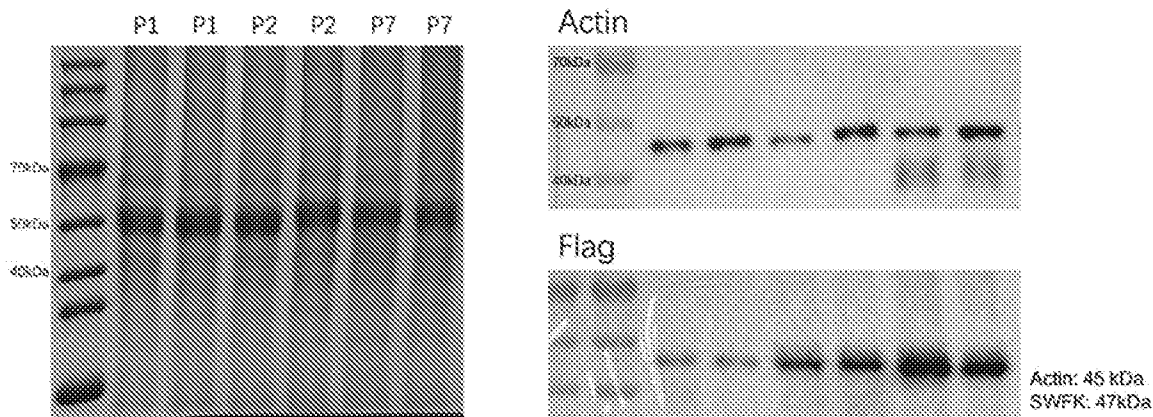


图 9

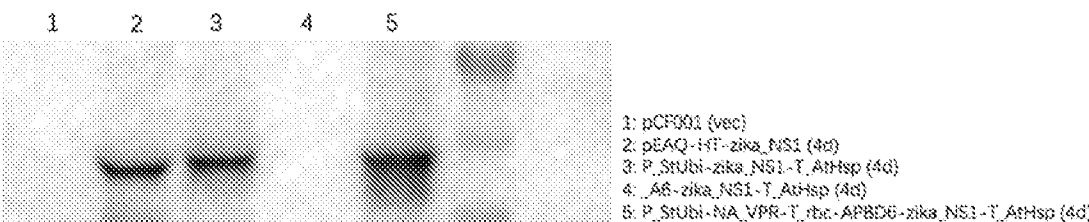


图 10

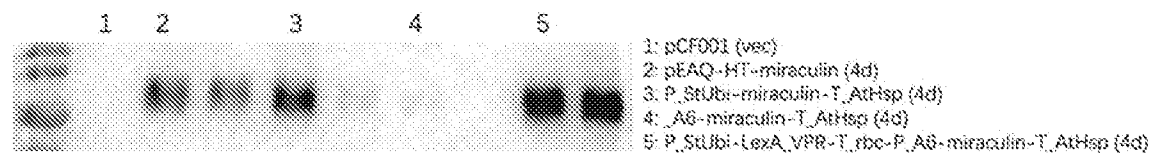


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/113(2010.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N; A01H Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, STN: 嵌合启动子, embedment promoter, LexA识别位点, 启动子, promoter, act2, artificial transcription factor, LexA结合蛋白, LexA结合区, 转录激活结构域, transcriptional activator, VP16, DELL, ERF2, Med2, P300, TV, VP64, VPR, SEQ ID NOs: 1-29		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010071086 A1 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 18 March 2010 (2010-03-18) claims 1-21, and SEQ ID NO: 1	4
Y	US 2010071086 A1 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 18 March 2010 (2010-03-18) claims 1-21, and SEQ ID NO: 1	1-10
Y	CN 110172477 A (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 27 August 2019 (2019-08-27) claim 5, and SEQ ID NO: 1	1-3, 5-10
Y	CN 104531702 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 22 April 2015 (2015-04-22) abstract, and description, paragraph 0046	2-3, 5-10
Y	CN 102643852 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 22 August 2012 (2012-08-22) claims 1-14, and description, paragraph 0048, and page 53 sequence 6	4-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 September 2024		Date of mailing of the international search report 12 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100713

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102190731 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 21 September 2011 (2011-09-21) claims 1-18	1-10
A	US 2019203214 A1 (ALGENTECH SAS) 04 July 2019 (2019-07-04) claims 45-64	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100713

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/100713

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
US	2010071086	A1	18 March 2010	None		
CN	110172477	A	27 August 2019	None		
CN	104531702	A	22 April 2015	ZA	200204773 B	19 September 2003
				CA	2640686 A1	21 June 2001
				AR	070335 A2	31 March 2010
				US	2003199682 A1	23 October 2003
				US	6949696 B2	27 September 2005
				BR	0016460 A	27 August 2002
				BR	0016460 B1	02 October 2012
				AR	072168 A2	11 August 2010
				AR	053273 A2	25 April 2007
				US	2007022494 A1	25 January 2007
				JP	2003516753 A	20 May 2003
				JP	5111706 B2	09 January 2013
				BRPI	0017613 B1	04 April 2017
				WO	0144457 A2	21 June 2001
				WO	0144457 A3	10 January 2002
				US	2015057155 A1	26 February 2015
				US	9347069 B2	24 May 2016
				US	2013157859 A1	20 June 2013
				US	8822666 B2	02 September 2014
				US	2003199681 A1	23 October 2003
				US	6919495 B2	19 July 2005
				US	6462258 B1	08 October 2002
				EP	2339006 A2	29 June 2011
				EP	2339006 A3	19 October 2011
				CA	2641218 A1	21 June 2001
				CA	2641218 C	25 February 2014
				CA	2635905 A1	21 June 2001
				CA	2635905 C	13 March 2012
				AR	110594 A2	17 April 2019
				EP	1632576 A2	08 March 2006
				EP	1632576 A3	22 March 2006
				EP	1632576 B1	31 May 2017
				US	2005005332 A1	06 January 2005
				US	7112725 B2	26 September 2006
				ES	2638112 T3	18 October 2017
				CA	2839066 A1	21 June 2001
				ID	28665 A	21 June 2001
				ES	2386771 T3	30 August 2012
				ES	2624689 T3	17 July 2017
				AR	026994 A1	05 March 2003
				TR	200702139 T2	21 June 2007
				EP	2944695 A1	18 November 2015
				EP	2944695 B1	15 February 2017
				EP	1240340 A2	18 September 2002
				EP	1240340 B1	25 April 2012
				US	2002144304 A1	03 October 2002
				US	6660911 B2	09 December 2003
				US	2013338005 A1	19 December 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/100713

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				US	8987434 B2	24 March 2015
				ATE	555206 T1	15 May 2012
				AR	053383 A2	02 May 2007
				US	2007094746 A1	26 April 2007
				EP	2339005 A2	29 June 2011
				EP	2339005 A3	12 October 2011
				DK	2944695 T3	15 May 2017
				SI	1240340 T1	28 September 2012
				DK	1240340 T3	06 August 2012
				PT	2944695 T	26 May 2017
				PT	1240340 E	01 August 2012
				US	2005022261 A1	27 January 2005
				US	7141722 B2	28 November 2006
				US	2016244781 A1	25 August 2016
				US	9856491 B2	02 January 2018
				CA	2394984 A1	21 June 2001
				CA	2394984 C	18 November 2008
				MXPA	02006021 A	05 December 2002
				TR	200201588 T2	21 October 2002
				AU	2088901 A	25 June 2001
				AU	782697 B2	18 August 2005
CN	102643852	A	22 August 2012	EP	2682469 A1	08 January 2014
				EP	2682469 A4	14 January 2015
				EP	2682469 B1	26 December 2018
				WO	2012116621 A1	07 September 2012
				JP	2014509196 A	17 April 2014
				JP	6140615 B2	31 May 2017
				US	2013345294 A1	26 December 2013
				US	9839698 B2	12 December 2017
CN	102190731	A	21 September 2011	US	2013065814 A1	14 March 2013
				WO	2011110051 A1	15 September 2011
US	2019203214	A1	04 July 2019	IL	297123 A	01 December 2022
				WO	2017220539 A1	28 December 2017
				AU	2017283158 A1	17 January 2019
				AU	2017283158 B2	21 December 2023
				EP	3260542 A1	27 December 2017
				CA	3027812 A1	28 December 2017
				IL	263779 A	28 February 2019
				EP	3472324 A1	24 April 2019
				US	2022267784 A1	25 August 2022

A. 主题的分类

C12N15/113(2010.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N; A01H

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, 万方, 百度, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, STN: 嵌合启动子, embedment promoter, LexA识别位点, 启动子, promoter, act2, artificial transcription factor, LexA结合蛋白, LexA结合区, 转录激活结构域, transcriptional activator, VP16, DELL, ERF2, Med2, P300, TV, VP64, VPR, SEQ ID NOs: 1-29

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2010071086 A1 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 2010年3月18日 (2010 - 03 - 18) 权利要求1-21, SEQ ID NO: 1	4
Y	US 2010071086 A1 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 2010年3月18日 (2010 - 03 - 18) 权利要求1-21, SEQ ID NO: 1	1-10
Y	CN 110172477 A (中国科学院遗传与发育生物学研究所) 2019年8月27日 (2019 - 08 - 27) 权利要求5, SEQ ID NO: 1	1-3,5-10
Y	CN 104531702 A (孟山都技术有限公司) 2015年4月22日 (2015 - 04 - 22) 说明书摘要, 说明书第0046段	2-3,5-10
Y	CN 102643852 A (华东理工大学) 2012年8月22日 (2012 - 08 - 22) 权利要求1-14, 说明书第0048段, 第53页序列6	4-10
A	CN 102190731 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年9月21日 (2011 - 09 - 21) 权利要求1-18	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月6日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张蕾

电话号码 (+86) 010-53962037

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2019203214 A1 (ALGENTECH SAS) 2019年7月4日 (2019 - 07 - 04) 权利要求45-64	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/100713

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2010071086	A1	2010年3月18日	无			
CN	110172477	A	2019年8月27日	无			
CN	104531702	A	2015年4月22日	ZA	200204773	B	2003年9月19日
				CA	2640686	A1	2001年6月21日
				AR	070335	A2	2010年3月31日
				US	2003199682	A1	2003年10月23日
				US	6949696	B2	2005年9月27日
				BR	0016460	A	2002年8月27日
				BR	0016460	B1	2012年10月2日
				AR	072168	A2	2010年8月11日
				AR	053273	A2	2007年4月25日
				US	2007022494	A1	2007年1月25日
				JP	2003516753	A	2003年5月20日
				JP	5111706	B2	2013年1月9日
				BR-PI	0017613	B1	2017年4月4日
				WO	0144457	A2	2001年6月21日
				WO	0144457	A3	2002年1月10日
				US	2015057155	A1	2015年2月26日
				US	9347069	B2	2016年5月24日
				US	2013157859	A1	2013年6月20日
				US	8822666	B2	2014年9月2日
				US	2003199681	A1	2003年10月23日
				US	6919495	B2	2005年7月19日
				US	6462258	B1	2002年10月8日
				EP	2339006	A2	2011年6月29日
				EP	2339006	A3	2011年10月19日
				CA	2641218	A1	2001年6月21日
				CA	2641218	C	2014年2月25日
				CA	2635905	A1	2001年6月21日
				CA	2635905	C	2012年3月13日
				AR	110594	A2	2019年4月17日
				EP	1632576	A2	2006年3月8日
				EP	1632576	A3	2006年3月22日
				EP	1632576	B1	2017年5月31日
				US	2005005332	A1	2005年1月6日
				US	7112725	B2	2006年9月26日
				ES	2638112	T3	2017年10月18日
				CA	2839066	A1	2001年6月21日
				ID	28665	A	2001年6月21日
				ES	2386771	T3	2012年8月30日
				ES	2624689	T3	2017年7月17日
				AR	026994	A1	2003年3月5日
				TR	200702139	T2	2007年6月21日
				EP	2944695	A1	2015年11月18日
				EP	2944695	B1	2017年2月15日
				EP	1240340	A2	2002年9月18日
				EP	1240340	B1	2012年4月25日
				US	2002144304	A1	2002年10月3日
				US	6660911	B2	2003年12月9日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/100713

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
				US	2013338005	A1	2013年12月19日		
				US	8987434	B2	2015年3月24日		
				ATE	555206	T1	2012年5月15日		
				AR	053383	A2	2007年5月2日		
				US	2007094746	A1	2007年4月26日		
				EP	2339005	A2	2011年6月29日		
				EP	2339005	A3	2011年10月12日		
				DK	2944695	T3	2017年5月15日		
				SI	1240340	T1	2012年9月28日		
				DK	1240340	T3	2012年8月6日		
				PT	2944695	T	2017年5月26日		
				PT	1240340	E	2012年8月1日		
				US	2005022261	A1	2005年1月27日		
				US	7141722	B2	2006年11月28日		
				US	2016244781	A1	2016年8月25日		
				US	9856491	B2	2018年1月2日		
				CA	2394984	A1	2001年6月21日		
				CA	2394984	C	2008年11月18日		
				MXPA	02006021	A	2002年12月5日		
				TR	200201588	T2	2002年10月21日		
				AU	2088901	A	2001年6月25日		
				AU	782697	B2	2005年8月18日		
CN	102643852	A	2012年8月22日	EP	2682469	A1	2014年1月8日		
				EP	2682469	A4	2015年1月14日		
				EP	2682469	B1	2018年12月26日		
				WO	2012116621	A1	2012年9月7日		
				JP	2014509196	A	2014年4月17日		
				JP	6140615	B2	2017年5月31日		
				US	2013345294	A1	2013年12月26日		
				US	9839698	B2	2017年12月12日		
CN	102190731	A	2011年9月21日	US	2013065814	A1	2013年3月14日		
				WO	2011110051	A1	2011年9月15日		
				US	2019203214	A1	2019年7月4日	IL	297123
				WO	2017220539	A1	2017年12月28日		
				AU	2017283158	A1	2019年1月17日		
				AU	2017283158	B2	2023年12月21日		
				EP	3260542	A1	2017年12月27日		
				CA	3027812	A1	2017年12月28日		
				IL	263779	A	2019年2月28日		
				EP	3472324	A1	2019年4月24日		
				US	2022267784	A1	2022年8月25日		