年 月 日 修正 90.7.17 補充

申請日期	85、5、17
案　　號	85105864
類　　別	C12N 15/31. 15/64. 15/67

公告本

A4
C4

（以上各欄由本局填註）　第85105864號專利說明書修正頁　修正日期:90/07/17

發明 新型 專利說明書　475945

一、發明新型名稱	中　文	植物病原體-可誘發的核苷酸序列以及產生抗病的基因轉殖植物方法
	英　文	Plant pathogen-inducible nucleotide sequences and the method of producing disease-resistant transgenic plants.
二、發明創作人	姓　名	1.約瑟 查佩爾 2.加德琳 A.G. 葛奈特 3.殷紹輝
	國　籍	美　國
	住、居所	1.美國肯塔基州40502，勒星頓市，大特斯浯大道607 2.美國肯塔基州40502，勒星頓市，里奇蒙德路2150 59號公寓 3.美國肯塔基州40508-3422，勒星頓市，伍藍德大道700G324公寓
三、申請人	姓　名（名稱）	肯塔基大學信託董事會
	國　籍	美　國
	住、居所（事務所）	美國肯塔基州40502，勒星頓市，肯塔基大學中央行政大樓
	代表人姓　名	費茲哲羅 布蘭威

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

裝 訂 線

（由本局填寫）

承辦人代碼：	A6 B6
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

本案已向：

國（地區）	申請專利，申請日期：	案號：	，□有　□無主張優先權
美國	1995/05/18	08/443,639	
	1995/06/06	08/471,983	
	1995/12/22	08/577,483	

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 1 ）

本發明的範圍爲植物分子生物，係特別有關於轉錄調節物質：定性調節序列確實地調節植物組織中下游基因表現，反應在一入侵微生物的病原體、一誘導子及其他誘導的化學徵象的壓力下，還有定量調節序列增加結合序列之轉錄表現。

在植物中，對黴菌、細菌及病毒病原體的抗病性結合至名爲過敏性反應(the hypersensitivity response,HR)之植物反應。在該 HR ，潛在植物病原體侵入的位置，使局部細胞死亡，且假設 HR 的局部植物細胞死亡抑制入侵微生物或病毒，因此可保護剩餘部分。其他植物防衛，包含產生植物補體(phytoalexins)(抗體)且/或可防止病原體進入的溶解性酵素，且/或修改細胞壁以強化細胞壁對抗物理性或酵素的攻擊。

植物中包括煙草在內的過敏性反應(HR)，產生補體爲微生物入侵反應的一部分。在微生物物侵入時有一種由煙草(*Nicotiana tabacum*)所製的化合物，爲抗微生物的二三松油精(sesquiterpenes)。

細胞懸浮培養已提供一與合成薄荷烷(terpene)之調節的有關訊息。異戊間二烯化合物(isoprenoids)爲自然界無所不在，生合成途徑早期部分與生合成途徑的其他異戊間二烯化合物共用，異戊間二烯化合物如固醇、類胡蘿蔔素、多醇，與輔酶Q 及生長調節劑(例如吉貝酸)，這些都被分類爲一次代謝產物。異戊間二烯化合物分類爲二次代謝產物，並非生長所必需，且包括一(mono)、二分之三(sequi-)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 2 ）

與雙類萜(diterpenoids)。這些二次新陳代謝異戊間二烯化合物爲植物與環境間的重要調節者。

各種不同的化合物可以作爲合成植物補體的誘導子。這些包括但不受限於一或更多有毒離子，例汞離子、其他化學定義化合物、代謝抑制物、細胞壁聚糖、某糖蛋白、某酵素、黴菌孢子、聚甲殼糖、某脂肪酸、及由植物細胞壁所衍生的某寡糖[見例 sequeira, L.(1983) Annu. Rev. Microbiol. 37:51-79 並參考引用其中]。煙草植物中表-5-馬兜鈴合成酶(EAS)的活性可由某一馬鈴薯疫病菌屬(*Phytophthora species*)之細胞壁片段及由 *Trichoderma viride* 纖維素酶來誘導，但無法由 *Aspergillus japonicum* 膠質酶來誘導[Chappell 等(1991)Plant Physiol. 97:693-698]。由其他植物病原體或無毒之有關菌株也能誘導補體的合成；例如， *Pseudomonas lachrymas* 誘導二二萜烯化合物(sesquiterpenoid)於煙草中合成[Guedes 等人(1982)Phytochemistry 21:2987-2988]。

抽出物(elicitin)爲蛋白質，其由植物病原體與潛在植物病原體所產生，抽出物蛋白質誘導煙草植物之 HR 。一 *Phytophthora parasitica* 的抽出物之胺基酸及核苷酸編碼序列已經公開[Kamoun 等(1993)Mol. Plant-Microbe Interactions 6:573-581]。植物病原體病毒包括但不受限於煙草鑲嵌病素(TMV)在受感染植物中誘導此 HR 。細菌感染植物也能誘導 HR 與抗病性；誘使 HR 的代表性細菌包括但不受限於土壤桿菌屬(*Agrobacterium* species)、黃單孢菌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 3 ）

屬(*Xanthomonas* speccies)及丁香假單孢菌(*Pseudomonas syringae*)。植物病原體之黴菌(與某一無毒的菌株相同)也能誘導此 HR 反應，其中包括但不受限於 *Phytophthora parasitica* 與 *Peronospora tabaci* 。

當用一誘導子處理煙草細胞懸浮培養，則鯊烯合成酶(squalene synthetase)受到抑制，因而生合成之前驅物停止流入固醇內。二三萜烯環化酶基因現所伴隨的誘導造成前驅物流入二三萜烯中。在誘導子所誘發的煙草組織，途徑中第一步由法呢基雙磷酸(farnesyl diphosphate)至二三萜烯植物補體殼體(sesquiterpere phytoalexin casidiol)，是由EAS所催化，一個二三萜烯環化酶。在一煙草的EAS基因家族中，該密碼序列及推論的胺基酸序列已被發表[Facchini 及 Chappell(1992)Proc. Natl. Acad. USA 89:11088-11092]EAS基因家族的一個或更多個成員的錄表現是由誘導子所誘導之反應。

此爲業者所企盼於保護植物，特別是農作物，免於受植物病原體感染的方法，病原體包括但不受限於植物病原病毒、黴菌且/或細菌。從經濟與環境利害關係的觀點，特別重要的爲生物的或"自然的"方法，而不是依靠化學藥劑應用於農作物。另一業者所企盼的方法，在基因轉殖植物中利用控制異種 DNA 序列之表現，作爲植物轉錄調節序列。

通常，此發明強調一包含誘導植物的抗病調節物質之重組核酸分子。此重組核酸分子通常至少有80%與自然發

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 4 ）

生的誘導植物抗病調節物質相同；亦即 20%以上的參考 DNA 序列鹼基對可用一替代性鹼基對替換(例，G-C 用 A-T、T-A 或 C-G 替換)，所供給該替代序列的轉錄啓動活性與該參考序列相同或更大。在較佳的實施例中，根據此發明之重組核酸分子是由茄烯環化酶基因密碼所得。例如，該發明之重組調節物質是由 EAS 基因獲得，此基因包括圖 3A(SEQ ID NO:14)的核苷酸序列或一誘發植物抗病片段。在較佳實施例中，根據該發明之重組核酸分子在圖 3A(SEQ ID NO:14)表示出其核苷酸序列。

在另一較佳實施例，根據該發明之核酸分子包括下列序列：SEQ ID NO:2 的核苷酸 463-473；SEQ ID NO:2 的核苷酸 406-486；SEQ ID NO:2 的核苷酸 463-572；SEQ ID NO:2 的核苷酸 371-463；及 SEQ ID NO:2 的核苷酸 411-457。

在較佳實施例中，根據該發明之重組核酸分子由雙子葉(例茄科之一員如煙草屬)獲得。

在另一較佳實施例中，根據該發明之核酸分子由單子葉；裸子植物；或毬果植物獲得。

在另一較佳實施例中，該發明之核酸分子是整組基因的 DNA；化學合成的 DNA；或爲基因組 DNA 與化學合成 DNA 的 DNA 之組合；基因組 DNA 及 cDNA；化學合成 DNA 與 cDNA；或基因組 DNA，cDNA 與化學合成 DNA。

在較佳實施例中，該發明中經由植物病原菌，其中所述例如黴菌(例 *Phytophthora*)、細菌(例，假單胞菌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 5 ）

(*Pseudomonas*))或病毒(例煙草花葉病素(*tobaco mosaic virus*))來誘發核酸分子。在另一較佳實施例中，此誘發是經由誘導子(例經由黴菌或細菌誘導子)所引起。

在另一方面，此發明的核酸分子對編有一異源胜肽密碼之核苷酸序列之調節誘導轉錄有連接關係及功能。更佳的是，該異源多胜肽能夠使一植株具抗病性。例如，該多胜可以爲一抽出物。(例一黴菌抽出物，如由馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora*)來的 ParAI 多胜，一細菌抽出物，如 harpin 或一藥學多胜如組織纖維蛋白溶酶原活化劑)。此異源多胜肽的表現，是藉由一或多個外來試劑(例乙烯或甲基茉莉酯)而促成。在另一實施例，本發明之核酸分子有以特定細胞行爲來表現異種多胜的能力。

又另一方面，本發明的特徵爲一包括本發明的核酸分子之載體(vector)，即一種藉由將載體導入細胞中(例一基因轉殖植物細胞)表現多胜肽的方法，且此細胞包含該載體。

另一方面，本發明以提供基因轉殖植物抗病性之方法爲其特徵，此方法包括下列步驟：(a)產生一基因轉殖植物細胞，此細胞包括本發明之核酸分子，並將此核酸分子整合至基因轉殖植物細胞之基因組；及(b)由植物細胞使基因轉殖植物生長，其中本發明之核酸分子賦與基因轉殖植物抗病性。

在較佳實施例，依本發明的方法，該基因轉殖植物爲一雙子葉植物(爲茄科之一員如菸草)；單子葉植物；裸子

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 6 ）

植物；或毬果植物。

在另一方面，該發明的特徵是在一基因轉殖植物細胞中增加下游DNA序列的轉錄表現的方法，此方法包括下列步驟：(a)產生一基因轉殖植物的細胞，此細胞包括本發明之核酸分子並增加下游DNA序列之轉錄，且整合至該基因轉殖植物細胞的整個基因組，與(b)由植物細胞使基因轉殖植物生長。

除了上述特徵，在一或多個誘導子、其他的誘導化合物，或入侵的植物病原體(比誘導性轉錄調節序列)影響結果下，本發明提供定性轉錄調節序列，其調節了植物組織中下游基因的表現，及本發明提供定量轉錄調節序列，該定量轉錄調節序列增加下游序列(促進轉錄序列)的轉錄作用。在特別例子當中，於自然狀態上游位置發現這些轉錄調節序列且有效地連接於菸草的EAS基因(EAS4)；當植物或植物組織及/或植物懸浮培養細胞中，受到一潛在之植物病原體侵入(例病毒、黴菌、或細菌)時，或對於誘導子如*Trichoderma viride*纖維素酶或植物或黴菌細胞壁片段反應時，轉錄調節序列有效地與編碼序列連接(且連接在啓動子物質之前，此啓動子由EAS4基因或一異源植物可表現基因而來)這些序列促使編碼序列之誘導轉錄表現。那個潛在植物致原可能爲病毒，其包括但不受限於*tobacco vein mottle virus*；爲細菌，包括但不受限於丁香假單胞菌、野油菜黃單胞菌或根癌土壤桿菌；或爲黴菌，包括但不受限於*Phytophthora*種(例*P. parasitica*)或*Peronospora*(例*P.*

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 7 ）

tabaci)。該 EAS4 啓動子包括此誘導轉錄調節物質及此轉錄促進序列並揭露於 SEQ ID NO:2。在 SEQ ID NO:2，該 EAS4 啓動子的 CAAT 一同種序列是位於核苷酸 513 至 516，及 TATA 一序列是位於核苷酸 540 至 543。

煙草 EAS4 上游序列的例子中誘導轉錄調節物質是從 SEQ ID NO:2 的核苷酸 458 至核苷酸 473；由核苷酸 454 至 473；或由 SEQ ID NO:2 的核苷酸 413 至核苷酸 473。

另一方面本發明的特徵中，此加強轉錄物質是由該 EAS4 啓動子及與啓動子結合之序列得到。並有效地與上游連接，則一異種 DNA 序列可表現出來。

本發明的另一方面爲基因轉殖植物細胞、植物組織及植物，該植物已經經由基因工程使之包含及表現一重要的核苷酸序列、較佳的編碼序列、一無意義序列(Antisense sequence)，或在該誘導轉錄調節物質的調節控制下的其他序列。本發明的目的是對於誘導子暴露、植物中潛在植物致病原侵犯時，或某外源誘導信號如暴露於甲基茉莉酯與乙烯時提供一核苷酸序列，此序列誘導下游編碼序列的表現。由菸草的 EAS4 基因中 5'側翼區域爲一典型的誘導子誘導轉錄調節要素；當作此處一特別例證，這序列出現在 SEQ ID NO:2 由核苷酸 410 至核苷酸 473。此例證之核苷酸序列相同物爲相似地引導出下游核苷酸序列之誘導表現。較佳情況下，該誘導轉錄調節物質與 EAS4 啓動子及啓動子結合序列相結合(例結合物有此核苷酸序列，在 SEQ ID NO:2 由核苷酸 410 至 SEQ ID NO:2 的核苷酸 573，較佳的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 8 ）

是 SEQ ID NO:2 的核苷酸 361 至 573 及更佳爲 SEQ ID NO:2 的核苷酸 1 到 573)。

抗病調節物質意即指一 DNA 序列，此 DNA 序列可以調節與植物抗病反應(例一過敏性反應)結合的基因產物之表現，在本土植物中，此 DNA 序列被用來作爲一對抗病原體的生物體。調節物質也包含在這項目(如下面定義，此調節物質的片段)經由疾病結合的外來訊息或試劑(例病原或誘導子誘導的訊號或試劑如此處所述)足以造成誘導基因表現。通常，抗病性調節物質位於基因的 5'區，但並不受限於此。“可誘導”的意思即對於植物細胞與病原體或與誘導子之間的反應，一調節物質具有增加基因表現的能力(例， mRNA 或多胜肽的產生)。抗病性調節物質在細胞或特定組織型式引導誘導基因，此也包含在本發明中。

“由一基因中獲得”意即一調節物質的核苷酸序列是基於包含在一自然發生植物基因中之序列訊息(例煙草 EAS4。一經確定，由一自然來源或可經由任何標準方法(例由重組方法或化學合成製備來獲得該調節物質。此一重組核酸分子，通常，至少有 80%與一自然發生誘導植物抗病性調節物質相同；即 20%以上的參考 DNA 序列鹼基對可用一替代性鹼基對替換(例， G-C 用 A-T 、 T-A 或 C-G 替換)，所供給該替代序列的轉錄啓動活性與該參考序列相同或更大。

“一誘導性植物抗病片段”意即對於一植物細胞與一病原體或與誘導子間之作用反應，不管核苷酸長度的任一延

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 9 ）

伸，此足以引導增加基因表現(例， mRNA 或多胜肽的產生)。該項“片段”較佳意思是指在長度上約 6-10 個核苷酸。然而，根據本發明之 DNA 調節物質的片段大小範圍爲 10-100 核苷酸，長度上 100~300 核苷酸或長度上甚至比 300 核苷酸更大。這片段可用例行的方法製備(例由適當限制分解或由該片段的化學合成)。在基因中一誘導植物抗病性 DNA 片段之相同性利用習知的標準方法(這些方法在此有有敘述)來實施。在一特例中，一誘導植物抗病性片段的相同處，可利用標準啓動刪除分析(standard promoter deletion analysis)來證實。在包含抗病性啓動子構造中，此啓動子賦予一報告基因(reporter gene)誘導病原體之轉錄作用，在此啓動子上可由 5'， 3' 端逐步地切除，且/或一端固定由另一端切除，直到病原體在報告基因的影響變爲很小或完全消除。爲了確認該病原體誘導要素之一致性，以點突變導入該要素中。另一方法爲由此基因的調節要素接到報告基因並推測出轉錄作用的改變量。爲測試完全啓動子，該 DNA 片段直接置於缺乏內生性啓動子活性的報告基因之前。利用該技術，在誘導植物抗病性調節物質之任何片斷可能一樣的。

“特定組織”意即在一組織(例木質部組織)如同比擬作另一組織(例韌皮組織)時能夠優先地增加基因產物的表現。

“特定細胞”意即在一細胞(例柔膜細胞(parenchyma cell))如同比擬作另一細胞(例表皮細胞)能夠優先地增加基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10）

因產物的表現。

“表-5-馬兜鈴合成酶(epi-5-aristocholene synthase)”或“EAS”意即爲一酵素，其能夠催化轉法呢基雙磷酸(trans-farnesyl diphosphate)，產生該雙循環之中間產物表-5-馬兜鈴。

“病原體”意即一生物體，其能感染活植物組織的細胞，在植物組織中誘發一疾病反應。

“誘導子”意即能夠引起一植物防衛反應的任一分子。例子中之誘導子包括但不受限於一或多個有毒的離子，例汞離子，其他界定組合物、代謝抑制劑、細胞壁聚糖、聚甲殼糖(Chitosans)、某脂肪酸、及某由植物細胞壁衍生寡糖，與抽出物(例 harpin 、 cryptogein 、及 pariscein)。

“抽出物(elicitin)”意即一蛋白誘導子。

“可實行地連接”意即一調節序列與一基因以一方式連接而准許基因表現的方式，如適當分子(例轉譯活化蛋白質)與該調節序列結合。

“異源多胜肽”意即從一部分或完全外來的基因(即並不是自然地發生)至該轉形植物細胞，表現在轉形植物細胞的任一多胜肽。

“多胜肽”意即不論長度或轉譯後修飾(例糖苷化作用(glycosylation)或磷酸酯化作用)之胺基酸之任一鏈。

“轉形植物細胞”意即一重組核苷酸序列(例該 EAS4 啓動子(−1147 至+67):GUS 報告基因或gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子： parA1 成熟抽出物基因)藉由重組 DNA 的技術(例這些

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (11)

技術在此有敘述)被導入的一細胞。

“植物細胞”意即受一半透膜限制與包含一質體(plastid)之任何自體繁殖的細胞。此細胞若希望進一步繁殖，也需要一細胞壁。植物細胞，在此使用到的包括但不受限於，藻類、氰細菌(cyanobacteria)、種子、懸浮培養、胚、分生組織區(meristematic region)、癒合組織、葉、根、嫩枝、配子體、孢子體、花粉、小孢子。

“基因轉殖”意即任何細胞包含一DNA序列，將此DNA序列經人工化地插入細胞中並成爲該生物體基因組之一部分，該生物體從該細胞發展。如此處所使用，該基因轉殖生物體通常爲基因轉殖植物，且該DNA巧妙被插入該生物體的基因組中。

“眞正純的DNA”意即此DNA沒有位於基因或調節物質側翼之基因或附屬的核苷酸，本發明DNA是由生物體自然發生的基因組中衍生出來的。是故該項包括，例如，一重組DNA併入至一載體(vector)中；進入一自主地複製質體(plasmid)或病毒；或至一原核生物或眞核生物的基因組DNA；或存在作爲一分離分子(例由PCR或限制內核酸酶分解之一cDNA或一基因組或cDNA片段)獨立於其他序列。該項也包括一重組DNA，其爲一混種基因編有一額外多胜肽序列或一調節物質的密碼之一部分。

本發明之其他特徵和優點可由下例敘述之較佳實施例當中或申請專利範圍中更爲明顯。

圖式之簡單說明：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

圖一表示在過渡表現實驗中由 EAS3 與 EAS4 啓動子區域序列調節的 GUS(β-glucuronidase)，與一 CaMV 35 S-GUS(花椰菜鑲嵌病毒 35S 啓動子-β-葡糖苷酸酶報告基因)結構作比較。這些實驗在煙草的原生質體中進行，並將 DNA 構造經電穿孔而打入原生質體中。因使用黴菌酵素分解植物細胞壁來製備原生質體，所以 EAS-GUS 結構"未誘導"表現量相當高。此 y 軸爲 GUS 活性的單位，而在圖中此 EAS 5'延伸之上游序列寫在條狀圖之下。如上述，這些數目是相對應於 EAS4 的自然轉錄起始位置(或相對應於 EAS3 的鹼基)； EAS4(SEQ ID NO:2)的起始位置是在核酸 573 ； EAS3(SEQ ID NO:1)之一潛在轉錄起始位置是在核苷酸 489 。

圖 2A-B 表示有關本發明之誘導轉錄調節物質引導報告基因表現的資料。圖 2A 表示在穩定轉形基因轉殖植物中，該 EAS4 啓動子區域控制該 GUS 報告基因表現實驗之說明圖。

圖 2B 表示出藉由該 CaMV 35 最小啓動子，使 EAS4 與啓動子結合的序列調節 GUS 報告基因的表現之"獲得功能性"分析的結果。在圖 2A 及 2B 中，數個 EAS4 上游區域表達數個相對於該 EAS4 基因之自然轉錄起始位置(見 SEQ ID NO:2)，其中該轉錄起始位置在核苷酸 573)。圖 2A 及 2B 中，以每毫克蛋白質之螢光單位來測量 GUS 之表現。

圖 3A-B 爲圖解說明圖表示該 EAS4 基因 5'上游區域之 DNA 序列及帶有該 EAS4 啓動子(−1148 至+67)。 CAAT 及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（13）

TATA 盒以粗體標記。而轉錄起始位置以+1 標記。圖 3B 爲一圖解說明表示該EAS4 啓動子(−1148 至+67):GUS 報告基因之構造。該 EAS4 啓動子(−1148 至+67)之側翼序列嵌入至二分載體 pBI 101.1 之 GUS 報告基因的正確解讀結構中。

圖 4A-B 表示有關基因轉殖煙草植物之葉、莖及根中包含該 EAS(−11148 至+67):GUS 報告基因之誘導子誘導 GUS 基因表現的資料。圖 4A 爲 18 小時期間煙草葉中誘導子一誘導 GUS 之活性說明圖。06i，08r ，09p 每個代表基因轉殖煙草之獨立轉形系包含 EAS4 啓動子(−1148 至+67):GUS 報告基因結構。其水(爲控制組)及 25nM 的 cryptogein 對稱並同時滲透至葉片中(離軸的)，然後收集葉片組織經滲透的區域進行 18 小時之 GUS 活性分析。該數據爲兩分開的實平均之結果。圖 4B 爲一長條圖表示包含該EAS4 啓動子(−1148 至+67):GUS 報告基因之基因轉殖煙草中莖與根之誘導子-誘導 GUS 活性。03f 及 09p 表示二種基因轉殖煙草之獨立轉形系。 C-0(空心盒)代表沒有經誘導子處理之根及莖片段所表現之 GUS 活性。C-18(陰影盒)及 E-18(實心盒)表示根及莖片段分別在水中或 100nM 之誘導子 cryptogein 中培養 18 小時後所表現之 GUS 活性。每個基因轉殖系以 5 個獨立植物作評估。

圖 5 爲一長條圖說明在基因轉殖煙草中由 *Phytophthora parasitica var. Nicotianae* 之種 0 及種 1 病原體-誘導之 GUS 活性。由基因轉殖煙草(09p)的一系，摘下

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（14）

其葉子包含該EAS4啓動子(−1148至+67):GUS報告基因，並注入2天大之*P. p. var. Nicotianae*之菌絲填充液，並培養於27℃生長室並用螢光照射24小時。控制組葉片以殺菌過之燕麥粉凝膠填充劑注入。組織感染區用來檢查GUS的活性。這三個分開的實驗(n=5)中每個長條圖之數值表示該平均及標準誤差。

圖6爲一長條圖說明由病原體-及誘導子-誘導GUS活性之比較，即在基因轉殖植物中以*Pseudomonus syringae pv. Syringae* 61及其hrpH突變株，及此純化的細菌誘導子蛋白harpin處理。包含該EAS4啓動子(−1148至+67):GUS報告基因之基因轉殖煙草之一系(09-P)葉片以50μg/ml的純化過*Erwinia amylovora* harpin誘導子，廣泛型*P. syringae pv. Syringae* 61之細胞懸浮液或前者hrpH突變株(A_{600}=0.05)進行滲透。在一12小時的培養後，經滲透的區域隨後進行GUS活性分析。在葉片組織樣品中以水進行滲透，所觀測之控制組數值則代表GUS的活性。該數值表示每個長條圖爲五種植物平均的結果。

圖7A-B表示煙草植物組織中，誘導5-表-馬兜鈴合成酶(EAS)之西方吸印(Western blot)分析結果。蛋白質是由控制組或經誘導子處理的煙草葉、莖、及根所萃取出。每個等量的蛋白質(若爲葉或莖，每道25μg，若是根則每道15μg)經SDS-PAGE而分離並移轉至硝酸纖維素膜。這些墨跡(blots)與EAS抗血清反應，及使用山羊的抗老鼠抗體(anti-mouse antibodies)與鹼性磷酸酶結合在一起則可看到

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（15）

免疫反應的色帶。圖 7A 表示葉及莖組織樣品作西方吸印分析之圖形。

圖 8A-L 爲彩色圖形，圖形表示在包含該 EAS4 啓動子(−1148 至+67):GUS 報告基因之基因轉殖煙草中，誘導子-誘導之 GUS 活性之組織化學的位置。基因轉殖煙草之一典型系之葉片組織，在 25 或以 50mM 的 Cryptogein 誘導子進行滲透。在大約 8 小時培養後，用 1mM X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚基β-葡糖醛酸)將組織部分染色以作爲 GUS 活性的分析。在染色前，莖及根片段以水或 100nM 的誘導子 cryptogein 培養大約 12 小時。圖 8A 爲一彩色照片表示一包含 EAS4 啓動子(−1148 至+67):GUS 報告基因之基因轉殖煙草葉片，在兩種誘導子處理:crytogein 與 parasicein，濃度爲 25nM 及 50nM 的處理後，表現誘導子-誘導 GUS 活性的圖形(C_{25}、C_{50}、P_{25}及P_{50}分別在圖 8A 中指出)。圖 8B 爲葉片橫切面之彩色圖；表示以 cryptogein(放大倍率，75X)。圖 8D-F 爲彩色圖相繼地表示出在圖 8C 中 GUS-染色莖橫切面之較大倍率(分別爲 15X，60X，及 75X)。圖 8G 爲一彩色圖表示一根尖端以水及染料處理所表現之 GUS 活性(放大倍率，60X)。圖 8H 爲一彩色圖表示一根尖端縱切面經 cryptogein 處理所表現誘導子-誘導 GUS 活性(放大倍率，60X)。圖 8I 爲一根縱切面在水及染料處理後表示 GUS 活性之彩色圖(放大倍率，75X)。圖 8J 爲根縱切面以 cryptogein 處理後所表示 GUS 活性之彩色圖(放大倍率，75X)。圖 8K 爲根據橫切面以水與染料處理測試 GUS

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(16)

活性之彩色圖(放大倍率，95X)。圖 8L 爲根橫切面以 cryptogein 處理後所表現 GUS 活性之彩色圖(重組核酸分子，95X)。

C，表示 cryptogein；P，表示 parasicein；C，表示皮層；ca，表示形成層；e，表示表皮層；p，表示柵狀薄壁；pe，表示周皮；ph，表示韌皮部；pi，表示髓薄壁；s，表示海綿薄壁；t，表示毛狀體；x，表示木質部；vc，表示維管束圓柱體。

圖 9 爲基因操作的圖解，致使產生抵抗疾病的植物。該 Par A1 之編碼序列已分離出，並以 PCR 使之有 BamHI 與 SstI 之兩端。gEAS$_{600(cyclase)}$-GUS-pBI 101 在 EAS 啓動子之調節控制下引導該 GUS 報告基因之表現，並以 BamHI 與 SstI 分解而釋放出 GUS 報告基因。然後此 BamHI/SstI 經分解之 ParA1 增殖物連接至在 gEAS$_{600(cyclase)}$-GUS-pBI 101 分解後產生之大片段上，而產生 gEAS$_{600(cyclase)}$-parA1-pBI 101，因此在一適宜誘導子誘導後，該 ParA1 抽出物在植物細胞或植物組織可從 gEAS$_{600(cyclase)}$-parA1-pBI 101 中合成。

圖 10 爲一長條圖說明基因轉殖煙草(*Nicotiana tabacum cv.* Ky 160)之獨立系中疾病的比例，煙草包含在 gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子基因控制下的 parA1 成熟抽出物基因，並在 *Phytophthora parasitica var. micotianae* 之種 0 或種 1 接種至摘下的葉子之後。此 Y 軸爲 72 小時後損害程度(每片葉子損害的數目)。此 X-軸爲控制組植物與經疾病抵

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

抗測試之基因轉殖煙草之獨立系。KY 160 表示不經轉形的 *N. tabacum cv.* KY 160；G 表示以一包含此 gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子嵌入於 GUS 之結構而被轉形至基因轉殖 *N. tabacum cv.* KY 160 之獨立系；M 表示以一包含該 gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子嵌入成熟的抽出物編碼序列的結構被轉形至基因轉殖 *N. tabacum cv.* KY 160 之獨立系；以一包含該 gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子嵌入至編有一成熟 parA1 抽出物序列之構造，此抽出物並包含一訊號序列，而 S 表示將此構造轉形至基因轉殖 *N. tabacum cv.* KY 160 之獨立有系。有陰影部分表示以種 0 的 *P. p. var nicotianae* 注入摘除的葉子中。實心部分表示以種 1 的 *P. p. var nicotianae* 注入摘除的葉子中。

5-表-馬兜鈴合成酶(EAS)爲合成二三類萜植物補體(sesquiterpenoid phytoalexin)的主要酵素，例如在茄科植物，C 包括但不受限於 *Nicotiana* 屬(例煙草)、*Capsicum annum* 與 *Hyoscyamus muticus*。EAS 催化由法呢基雙磷酸(farnesyl diphosphate)經(+)gemacrene A 至桉烷(eudesmane)碳化爲 5-表-馬兜鈴的反應。其他植物，例如十字花科，也有二三萜烯環化酶(sesquiterpene cyclase)酵素。

在植物組織或植物細胞中經處理而引發宿主防衛反應，如補體的合成，包括馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora*)種的細胞壁片段及 *Trichoderma viride* 纖維素酶。然而由 *Asperyillus japonicum* 所得果膠酶(pectolyase)在煙草細胞培養中並沒有一誘導子的功能。誘導子誘導二三類萜補體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（18）

合成已經顯示出主要生合成酵素之控制轉錄的功能[Vogeli及Chappell C1990)Plant Physiol. 94:1860-1866]。類似的型式已經在其他種植物中觀測到，但是對於植物病原體挑戰而促使基因誘導作用之轉錄控制序列並沒被發表。

煙草(*N. tabacum*)包含一 EAS 基因家族，其有 12-15 個成員，該 EAS4 的編碼序列已經公佈[Facchini 及 Chappell(1992)supra]。然而，從那時候起，本發明者已經發現經由誘導子處理後，該 EAS3 似乎沒有表現出來，並令人意外地，EAS3 的上游核苷酸序列似乎沒有促成報告基因的誘導作用，此報告基因位誘導子-誘導的基因轉殖細胞培養物之嵌合體基因構造中。已知轉譯起始點並沒有與於 1992 Facchini 及 Chappell 之公告相同。當 EAS4 的一純系基因組之核苷酸序列出現在(1992)Facchini 與 Chappell 參照前文並列於 SEQ ID NO:7，其所推演出之胺基酸序列在 SEQ ID NO:8。

由植物病原體微生物的侵入作用或感染作用所引起的植物反應，包括過敏反應，其以壞死(necrosis)爲其特徵，即在受到植物病原體的攻擊，使在本區之發育中細胞死亡。如上述誘導子處理也能誘導此壞死反應。

抽出物(elicitin)爲蛋白質，由黴菌植物病原體所產生，此蛋白質在一受感染的植物中誘發過敏反應。通常，但並非必需，在受感染植物組織中，抽出物-誘導反應的結果造成局部細胞死亡。由於潛在性植物病原體微生物的侵入所造成破壞性感染，這些反應參與全程或部分的抵抗。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（19）

本發明之目的爲一植物病原體或植物組織中誘發過敏反應之潛在植物病原體的一蛋白質，在該植物組織受到攻擊之後或植物組織中該編碼序列表現之後，被認爲變成一抽出物的廣泛定義。

一黴菌的植物病原體中較廣爲人知的抽出物爲 *Phytophthora parasitica* 的 *par*A1 蛋白。該 ParA1 位置在一基因家族的一員。[Ricci 等 (1989) Eur. J. Biochem. 183:555-563]。該 *par*A1 基因產物的密碼及胺基酸序列已有敘述在 Kamoun 等 (1993) Mol. Plant-Micro Interact. 4:423-423，及在 SEQ ID NO:12 及 13 當中。

其他有潛在抽出物活性的植物病原體蛋白質，其胺基酸序列與其他性質已被描繪[見例 Nespoulous 等 (1992) Planta 186:551-557；Huet 等 (1992) Phytochemistry 31:1471-1476；Huet 等 Pernollet(1992) FEBS Lett. 257:302-306；Kamoun 等 (1993) Mol. Plant-Microbe Interaot.5:22-33]。具有抽出物活性之細菌病原體之數個無毒性基因的特性已被描繪。例如，Keen, N. T. (1990) Annu. Rev. Phytopathol. 24:447-463 已述及 Fulva fulvia 的一無毒性基因。Hammond-Kosack 等 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10445-10449 已有述及 Clodosporium fulvum，其功能如 *P. parasitica* 抽出物之相同方式。

某一細菌的植物病原體所表現蛋白質，與 *P. parasitica* ParA1 病原體在過敏性反應上有相同效應。爲了本發明的目的，這些蛋白質歸於此"抽出物"項的範圍中。在其他 *X.*

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（20）

campestrix pathovars 中[Bonas 等人(1989) Mol. Gen. Genet. 218:127-136 ； Knoop 等人(1991) J. Bacteriol. 173:7142-7150]及其他 *X. anthomonas* 種之中[De Feyter 及 Gabriel (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. 5:451-459]有數個同源之 *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* 的無毒基因 *arv* Bs3 已經偵測到。該 *P. syrignal pv. tomato* 的 *avr*D 基因爲無毒性； *P. syringl pv. glycinea* 表現一替 *ave*D 基因產物[Kobayashi et al.(1990) Mol. Plant-Microbe Interact. 3:103-111]。

在本發明中製造具有增進疾病抵抗特性之基因轉殖植物是很有用的，此疾病抗病特性可在一病原體-反應轉錄調節物質的調節控制下(及在這些植物中有一最小的啓動子功能)利用一抽出物編碼序列來表現，而在這些植物中之抽出物蛋白必須能夠促使防衛基因表現(包括但不受限於掌管植物補體的合成、過敏反應、且/或局部區域壞死的序列)。植物和植物病原體的許多功能結合爲習知技術，且熟習該項技術者知道如何去測試一特定抽出物的功能，此抽出物在特定植物組織(或細胞)中的過程中細胞死亡、或植物補體合成或類似物。我們已了解以某黴菌木纖維質酵素或某植物多醣片段的化合物處理植物細胞或組織，也能誘導宿主防衛(例過敏反應)反應。此處理用來做爲現在植物病原體攻擊或侵入的模式。

一非自然發生的重組核酸分子，例如在自然中不會發生一重組 DNA 分子，即一非自然發生之重組核酸分子可利

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

用習知技術方法的自然過程而產生，或直接由人類來產生一想要的結果或此非自然發生之重組核酸分子已從異種來源衍生的部份人工地產生，此異種來源部分可能是自然地發生或化學合成分子或其中的部分，該處這些部分已經由結合作用或其他習知技術連接。

一基因轉殖植物經遺傳修飾而包含及表現出異源DNA序列，可做爲調節RNA分子或做爲蛋白質。在此一特殊的例子，一基因轉殖植物經遺傳修飾而包含及表現一外源DNA序列，該DNA序列可實行地連接在轉錄控制序列，並在此轉錄控制序列的調節控制之下即在 *Nicotiana tabacum* 之 EAS4 基因的誘導轉錄控制序列之調節控制之下，該DNA序列受不正常地調節。如當中所使用，一基因轉殖植物也適用於初基因轉殖植物的子代，其在定性且/或定量轉錄控制序列的調節控制之下，能夠表現該異源編碼序列。包含基因轉殖胚的種子被包含在這界限內。

當潛在病原體侵入或以誘導物(例誘導子)處理之情況下，產生重要的異源基因或編碼序列是令人期盼的，該密碼序列以一正確的方向可實行地連接於一適合的啓動子及在該誘導調節序列的調節控制之下，當該報告基因在相同的方向時，則一有意義(即轉譯表現的功能)mRNA將產生。在植細胞中一轉錄終止訊號功能可放置在編碼序列的下游，及可表現在植物中之可選擇性標幟並且能共價地與該誘導表現單位連結，因此在這DNA分子被誘導入一植物細胞或組織中之後，DNA分子的出現可被選擇及植物細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（22）

或組織若不轉形，則此植物將被殺死或防礙生長。相同地，在該透導轉錄調節物質的調節控制之下，或基因轉殖植物細胞懸浮培養中之加強轉錄物質，影響之下則異源編碼序列能夠被表現對於將一誘導子添加到細胞培養培養基基中則有誘導發生的反應。

當一植物受一微生物病原體侵犯時，基因表現的抑制作用令人期盼，如一植物病原體黴菌，其編碼序列或 cDNA 序列的部分或全部可實行地連接到植物細胞中一啓動子功能，但該編碼序列的方向與啓動子的方向相反(亦即在無意義的方向)，如此該轉錄的 RNA 與 mRNA 在序列上爲互補的，且致使該無意義分子的表現對病原體侵入而受到誘導。除此之外，可能有該核苷酸下游之一種錄終止訊號引導該無意義 RNA(antisense RNA)的合成。

本發明人已經分離出一 DNA 序列，該 DNA 序列對於一潛在植物病原體且/或用一誘導子或其他化學信號的處理而促使植物細胞中下游基因之誘導表現。例如經由定性轉錄調節序列乙烯與甲基茉莉酯(methyl jasmonate)結合可誘導下游基因表現。在此調節序列內有數個序列結構，而每個結構對一個或多個個別的環境訊息反應。在一特別例子中，這轉錄調節序列是由 *N.tabacum* 的 EAS4 位置衍生而來，其在 SEQ ID NO:7。該 EAS 蛋白質之誘導胺基酸序列在 SEQ ID NO:8。EAS4 基因之開啓的閱讀架構(the open reading frame)被 6 個介入子(introns)插入，在 SEQ ID NO:7 中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(23)

在基因銀行中(Genbank)用電腦搜尋該SEQ ID NO:2序列之同源核苷酸序列，顯示沒有已知核苷酸序列有顯著的同種性。

在*N.tabacum*基因組中，該EAS基因的結構在Facchini及Chappell(1992)supra中已有敘述，使用一EAS探針及南方雜交的實驗。在高度嚴格的狀態下，多片段雜交伴著分析顯示出在煙草基因組中有12~16個成員之基因家庭。然而，在這些實驗中，這探針包括EAS密碼序列而不是該啓動子及與啓動子結合的調節序列。

基於核苷酸序列同源性之不同程度，除煙草以外的植物種類，EAS同源基因都能被確認及分離；亦即在高度嚴格的適度情況下以煙草EAS編碼序列探針於DNA:DNA雜交中以確認其他植物之相對應的基因。雜交狀況的探討在例子中可發現，在Hames及Higgius(1995)Nucleic Acid Hybridization,IRL Press,Oxford,U. K.。通常序列有至少約70%核苷酸序列同源性，可由適當嚴格的狀況下的雜交來確認。在此狀況下，通常較喜歡用至少有100個鹼基的探針。在本案中較喜歡的探針是由該EAS4編碼序列的密碼部分衍生而來。雜交探針的標幟可包括但不受限於放射群，螢光群及接合子例如生物素(biotin)(對特定結合物質)結合。該標幟允許該雜交探針對標的核酸分子偵測。另外，使用已知及廣爲接受的聚合酶鏈反應(PCR)技術來增殖序列，但該序列對標序列有重要的核苷酸序列之同源性。

除了揭露於SEQ ID NO:7之EAS編碼序列，核酸序列

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

功用與例子中 EAS4 的編碼序列同義。若是編有這些核酸序列的胺基酸是相同的，則核酸序列也同義。。該基因密碼的簡并爲習知技術；亦即對許多胺基酸酸而言，有多於一個三聯核苷酸即做爲胺基酸的密碼子。某胺基酸在蛋白質序列中可被取代，而沒有影響此蛋白質功能此爲習知的生物技術。通常容許保有胺基酸的取代作用或類似胺基酸的取代作用且沒有影響蛋白質的功能。相似的胺基酸可能他們在大小且/或電荷性質上都相似，例如天門冬胺酸鹽(aspartate)、麩胺酸鹽(glutamate)、異白胺酸(isolieucine)、纈胺酸(valine)爲兩對相似的胺基酸。在胺基酸對之間的相似性在習知已經用許多方法來評定。例如 Dayhoff 等(1978)in Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol.5, Suppl. 3, pp.345-352，此併入參考文獻中，提供頻率表植物給胺基酸取代作用，使其能用來測量胺基酸之相似性。Dayhoff 等人的頻率表是以相似的胺基酸序列爲根據，蛋白質由各種不同的演化來源而有相同的功能。

萜烯環化酶基因可在茄科植物中發現，包括 *N. tabacum* 與 *Hyoscyamus mutiws*，如其中所揭露，在薄荷家族(*Labitaceae*)及 *Euphorbiaceae*，包括但不受限於這些已證明包含有顯著同種性的序列，及眞正地在全部植物中。較佳地，EAS4 的同種性將由茄科植物中選出。此序列的確認可經核酸雜交實驗或在表現載體中作純系化，經由對煙草 EAS-專一抗體之雜交反應，或習知技術之任何其他方法，包括使用 PCR 技術使得所用的低聚核苷酸(oli-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（25）

gonucleotides)與 SEQ ID NO:7 的部分一致，較佳地爲 EAS 編碼區域。抗體的製備如 Vogeli 等(1990)Plant Physiology 93:182-187 中所述，用純化 EAS 使一實驗動物免疫之後，或使用一胜肽結合物，此胜肽的胺基酸序列是由該 EAS 胺基酸序列(SEQ ID NO:8)的親水性部分取得。單株及多株抗體產生的技術在習知技術中讀取容易(參例 Campbell (1994)Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biolody,Vol. 13, Burdon and Knippenberg,eds,Elsevier,Amsterdam;Harlow and Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Monual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)

另外，一 cDNA 庫(cDNA library)(在一表現載體)可用 EAS-專一抗體來篩選，或利用從 EAS 蛋白質(SEQ ID NO:8)之親水性區域的胜肽序列及習知之技術來製備 EAS 專一胜肽抗體。

經由熟悉此技藝者將一可誘導轉錄調節序列與植物中任一啓動子序列功能作可實行地連接；其中一調節物質與一啓動子接連，通常使用一縮短(或最小)的啓動子，例如，花椰菜鑲嵌病毒(Ca MV)縮短的 35S 啓動子。其他結構的啓動子的縮短版本也可用來提供 CAAT 與 TATA 同源區域；此啓動子序列是由這些 *A. tumefaiens T*-DNA 基因衍生而來，如 *nos* 、 *ocs* 及 *mas* 與植物病毒基因如 CaMV 195 基因。熟習此技藝者的目標是選擇特定的啓動子作爲誘導轉錄調節序列。近一步了解當一蛋白質能夠使一細胞死亡

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（26）

反應被表現，則在誘導子缺乏下並沒有基本轉錄(及轉譯)表現。基本表現的最低限度在誘導基因表現的應用上較不重要，在此該基因的產生對該植物細胞產生該基因沒有顯著的毒性。

一最小的啓動子包含該DNA序列訊號，爲RNA聚合結合酶及轉錄的起始所需。經由在該轉錄起始位置上游約20-50鹼基對的-TATA-同源序列結構及該轉錄起始位置上游約50至120鹼基對的-CAAT-同源序列，而確認RNA聚合 II啓動子。藉由傳統，熟悉此技藝者經常由轉錄起始位置的上游數出一段核苷酸，從起始位置上游之5'端延伸增加一大段。通常，藉由最小的啓動子來引導轉錄作用是很低的，且在植物組織中對環境或發育的訊號，不論正或負的都不反應。在植物中所使用一典型最小合適的啓動子爲該縮短CaMV 35S啓動子，此包含35S基因中由-90至+8的區域。

該誘導轉錄調節序列(定性轉錄調節序列)是位於相對於此EAS4轉錄起始位置(核苷酸406至473，起始於核苷酸573位SEQ ID NO:2)-167至-100之間區域。可能有數個序列結構對特定的刺激產生反應。將這序列直接連接於最小啓動子的上游，其功能是賦予植物細胞編碼序列的誘導表現，此編碼序列並嵌入到該啓動子的下游，例一異源編碼序列，及熟習此技藝者了解爲了該編碼序列的轉譯表現之空間需要與其他需要。此異源編碼序列若爲一植物病原體微生物(例如病毒、細菌或黴菌)之類似抽出物之蛋白質

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（27）

爲較佳的，例如馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora parasitica*)之編有該 parA1 基因產物(elictin)之序列，此異源編碼序列對一入侵潛在植物病原體過敏反應的抗病性，最令人期望的。該 EAS-衍生的誘導轉錄調節序列可促使誘導者的表現，某植物病原體細菌之 Harpin 蛋白也可做爲誘導者。由該 EAS4 基因包含添加 5'端側翼序列作爲增加下游基因表現的量之準備。較佳的是使用一包括 EAS 之-266 至+1 序列(SEQ ID NO:2 之核苷酸 307 至 573)，及更佳的序列包括-567 至+1(SEQ ID NO:2 之核苷酸 1 至 573)。

使用 EAS4 轉錄調節序列融入至一異源最小啓動子之另一融合方法是使用 EAS4 連同上游與啓動子結合之調節物質之啓動子區域。在此應用中利用核苷酸 307 至 463 或較佳地下游表現之更大量，SEQ ID NO:2 的核苷酸 371 至 463，311 至 462 及 10 至 573。

在植物中如 *N.tabacum*，對入侵植物病原體與某組成如某黴菌纖維素酶及某植物及黴菌細胞壁片段，而產生該立即誘導轉錄調節物質引導下游基因表現的誘導作用的反應。能啓動這表現的植物病原體包括但不受限於黃單孢菌(*Xanthomonas*)、丁香假單孢菌(*Pseudomonas syringae*)、馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora*)包括疫病菌(*parasitica*)及露菌病菌屬(*Peronospora*)(例煙草)。

在一植物中適合表現的編碼序列可與調節啓動子結構之下游連結。利用此嵌合型基因主要包括該調節啓動子、任何附加的加強轉錄序列，及含有供轉譯之必要序列訊號

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(28)

之所想要編碼序列，可建造基因轉殖植物。經由一潛在的植物病原體侵入一基因轉殖植物組織或用一誘導子或其他誘導 EAS4 基因表現的化學訊號處理，則有效地誘導出抗病性，該 EAS4 編碼序列爲一較佳地植物病原體微生物的抽出物，例馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora*)疫病菌之 parA1 基因產物(如 Kamoun 等(1993)誘導子所述)。其他抽出物蛋白質已在可讀取的科學文獻中敘述，且包括馬鈴薯疫病菌屬(*phytophthora*)、露菌病菌屬(*Peronospora*)及黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)，及其他。

另外編碼序列可在該誘導輔錄調節物質的調節控制下表現，以增加一(基因轉殖)植物或植物組織暴露於病毒、細菌或黴菌的植物病原體中之抵抗性，而病原體包括但不受限於，幾丁質酶、 TMV 外殼蛋白或其他植物病毒之外殼蛋白、 NIa 病毒基因或其他物質。

附加地或另外地，該調節結構之誘導作用可被誘導，例如一誘導子或用一細菌、病毒或黴菌(最好不是宿主植物的病原體)處理該基因轉殖植物或組織，能夠藉由一編碼序列的誘導轉錄調節物質來誘導表現，而不能啓動該 HR 或抗病性直接無法獲得。編碼序列可有利地表現，包括一殺蟲蛋白，如蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)結晶蛋白，該蛋白表現時將使植物免於蟲害。

以一廣泛各種明確化學物質、粗糙黴菌培養過濾液、黴菌細胞壁萃取液、及由植物或黴菌細胞壁之寡糖處理該植物組織或細胞而誘導植物補體從本身 EAS4 基因合成，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (29)

或由該調節 EAS4 啓動子或該誘導轉錄調節物質與至少一異源最小啓動子結合而促使的基因表現之誘導作用[(Albersheim 及 Valent(1978)J.Cell.Biol.78:627-643]。其他可以誘導該 HR 的化合物包括某纖維素酶，例如木黴屬綠纖維素酶(*Trichoderma viride cellulases*)及某植物或黴菌細胞壁片段，在其他之中。

一基因轉殖植物可經由習知技術產生，包括但不受限於根癌土壤桿菌(*Agrobacterium tumefacieus*)一促使 DNA 轉移，較佳地用一解除製備的(disarmed)T-DNA 載體、電穿孔、引導 DNA 轉移，及微粒照射(particle bombardment)(見 Davey 等人(1989)Plant Mol。Biol。13：275；Walden 及 Schell(1990)Eur. J. Biochem. 192:563;Joersbo 及 Burnstedt(1991)Physiol. Plant. 81:256; Pltrytus(1991)Annu. Rev. Plont Physiol. Plant Mol. biol. 42:205;Gasser 及 Fraley(1989) Sci. 244:1293;Leemans(1993) Bio/Technology.11:522;Beck 等 (1993)Bio/Technology. 11:1524; Koziel 等(1993)Bio/Technology.11:194:及 Vasil 等(1993)Bio/Technology. 11:1553)。習知技術將 DNA 導入單子葉植物如同雙子葉植物一樣，以培養此植物組織及使這些組織再生的技術。單子葉植物已成功地被轉形及再生，包括小麥、玉米、黑麥、稻及蘆筍。例如，美國專利第 5,350,689 號(1994,Shillito 等人)描述基因轉殖玉蜀黍植物由原生質體與原生質體衍生細胞而再生。爲有效產生基因轉殖植物，期望所用來轉形的植物組織具有高包容性適於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（30 ）

再生。白楊樹的基因轉殖組織已經製備與基因轉殖植物已再生[Devellard 等人(1992)C.R. Ac ad. Sci. Ser. VIE 314:291-298;Nilsson 等(1992)Transgenic Res. 1:209-220;Tsai 等人(1994)Plant cell Rep. 14:94-97]。楊屬植物(poplars)已被轉形[Wilde 等(1992)Plant Physiol 98:114-120]。在實驗室中技術也可用來做裸子植物的操作、轉形及再生。例如，美國專利第 5,122,466 號(1992,stomp 等人)描述毬果植物的生物導向(bio-ballistic)之性狀轉換，較佳地標的組織爲分生組織、子葉與下胚軸組織。美國專利第 5,041,382(1991,Gupta 等人)描述富含毬果植物胚細胞。

在植物細胞且/或組織中，導入及選取該異源 DNA 的技術及原動力爲習知。遺傳標記(genetic marker)在植物細胞中以做爲異源 DNA 的選取爲習知的，例如基因對抗體帶有抵抗性例如康黴素、潮霉素、慶大黴素或博萊黴素。因爲該標記可作爲性狀轉換成功細胞之選取，並培養於含有適宜抗生素之培養基中，因此這些細胞將帶有相似的抗性基因。

經由土壤桿菌參與性狀轉換、電穿孔、微注射、微粒照射，或其他習知技術而將一包括一誘導的啓動子或嵌合型啓動子嵌入一異源編碼序列及一轉錄終止序列的表現套組(expression cassette)導入該植物細胞或組織中爲遺傳工程植物細胞且/或組織的技術。表現套組進一步包含准允在該植物細胞中選取異源 DNA 的標記，例如，一基因對抗生素帶有抵抗性例康黴素、潮霉素、慶大黴素、博萊黴素。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(31)

該轉錄調節序列，特別是該誘導轉錄調節物質(或該EAS4啓動子帶有誘導及較佳地加強轉錄物質)在懸浮細胞培養之基因轉殖植物細胞中，控制基因表現是有用的，也做爲基因轉殖植物另一表現。例如，該EAS4啓動子包括該轉錄起始訊號、該誘導轉錄調節物質及加強轉錄物質，可用來促使在懸浮細胞培養之基因轉殖植物細胞中之該誘導表現。當需要時，經由添加一誘導子或其他誘導化學訊號至該培養中，則該重要之編碼序列表現被誘導。與完整的植物比較起來，懸浮培養細胞對可讀取地誘導子反應。該異源編碼序列能編碼蛋白質，該蛋白質促使藥學化合物合成、聚-β-羥基丁酸鹽合成或其他二級代謝產物、纖維素、澱粉、糖、油或該異源序列能編碼藥學蛋白質、殺蟲毒性蛋白、抗黴菌蛋白、抗病毒蛋白(如對病毒感染具有抗性的外殼蛋白)，該N1a蛋白、幾丁質酶、葡聚糖酶、男性不孕蛋白或序列、用來改善營養品質或含量的蛋白、或發育且/或特一組織過程或型式。基因轉殖植物能類似地用來表現異源編碼序列，基因轉殖植物細胞也一樣。

在此基因轉殖植物受誘導而合成植物補體或表現一異源編碼序列時，其在該EAS4啓動子之調節控制或從那得到該誘導轉錄調節物質且/或起源於該EAS4啓動子的轉錄加強序列，該誘導子必須穿過植物表皮才有誘導效應。另外，植物組織受傷有利於或准允誘導子攝入植物組織。各種廣泛的誘導物質，包括誘導子及其他化學訊號，如乙烯與甲基茉莉酯(methyl jasmonate)的結合物能有效地誘導進

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（32）

入該基因轉殖植物懸浮細胞培養中，所以對於誘導子的攝入且/或阻礙有顯著地減少。當乙烯與甲基茉莉酯用來做誘導基因表現時，該乙烯使用濃度在約1及約50ppm之間，及該甲基茉莉酯使用濃度約在0.1mM與約1mM之間。

下列例子用了許多習知及熟習分子生物之技藝者易取得之技術，使用重組DNA的方法於植物組織及基因轉殖植物之培養與再生上。酵素由商品來源獲得，且依販賣者的推薦或其他習知的變化。試劑、緩衝液及培養狀況也爲習知技術。文獻中提供標準分子生物過程包括 Sambrock 等人 (1989)Molecular cloning, second edition, cold Spring Harbor Laboratory, Plainview; NY; R. Wu(ed.) (1993) Methods in Enzymology 218; Wu et al. (eds.) Methods in Enzymology 100 and 101; Golver (ed.) (1985) DNA Cloning, Vols. I and II, IRL Press, Oxford, UK; and Hames and Higgins (eds.) (1985) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK. 有關植物組織操作及轉形的文獻包括 R. A. Dixon (ed.) (1985) Plant Cell Culture: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, UK; Schuler and Zielinski (1989) Methods in Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, CA; Weissbach and Weissbach (eds.) (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, CA; I. Potrykus (1991) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:205; Weishing et al. (1988) Annu. Rev. Genet. 22:421;van Wordragen et al. (1992) Plant Mol. Biol. Rep. 19:12; Davey et al. (1989) Plant Mol. biol.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (33)

13:273; Walden 與 Schell (1990) Eur. J. Biochem. 192:563; Joersbo 與 Brunstedt (1991)Physiol. Plant. 81:256 及其他著作引用前述文獻。這裡所用的縮寫及專有名詞，在此範圍中被認爲是標準且共同使用於專業期刊中例如當中所引用的。

在申請書中引證的所有參考文獻清楚地併入當中文獻。

下列例子是用來做爲說明的目的並沒有限制當中之申請專利的範圍。對於熟習此技藝者在例子中之組合物及方法之任何變化皆於本發明的範圍中。

實施例 1 特定的 EAS 抗體

煙草 EAS 之單株及多株特一抗體可由下列敘述來製備由 Vogeli 等人(1990)Plant Physiology 93:182-187 。附加抗體的製備可由多株抗體來製作，其習知利用純化的 EAS 作爲抗原或用一胜肽序列結合至一攜帶蛋白(carrier protein)中。供抗體生產之胜肽的胺基酸序列是由該蛋白的一特定親水性區域中選取。(抗體產生技術見例子 Campbell(1994)Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Vol 13,Burdor 及 Rnipperiberg,eds, Elsevier,Amsteradm; Harlow 及 Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

實施例 2 確定 DNA 與蛋白質序列

由雙去氧核苷酸鏈終止方法確定單股及雙股 DNA 的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(34)

序列[Sanger 等人(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:8073-8077]用美國生化公司的一定序套組(sequenase)工具，(Cleveland,OH)或一螢光自動定序系統(Applied Biosystems, FosterCity,CA)。

實施例3 建造一全長EAS純系

煙草(*Nicotiana tabacum*)L. cv. KY14細胞懸浮培養以木黴屬綠纖維素酶(*Trichoderma viride* cellulase)(Type RS, Onozuka)之最終濃度0.5μg/mℓ處理，在快速生長期時誘導EAS表現。同時懸浮細胞培養不加纖維素酶作爲控制組。細胞在添加纖維素酶誘導子至誘導培養基之後，經溫和真空過濾4小時才收集到。

一cDNA庫由煙草細胞以誘導子處理4小時後，從polA$^+$ RNA萃取出之pcDNA II(Invitrogen,San Diego,CA)中製備。該基因庫利用由誘導及控制培養的polyA$^+$ RNA中取得，經不同的雜交作用而篩選出。純系(clones)顯示爲正，則進一步利用體外轉譯免疫沈澱分析進行雜交選取而篩選出，如Alwine等(1979)Methods Enzymol. 68:220-242所述。

推測爲正的EAS cDNA純系用來做爲一雜交的探針，以作爲分離額外的cDNA及基因組純系。所篩選的基因庫是建構在λEMBL3的構造，其中DNA是使用MboI部分地分解*N. tabacum L.* CV. Nk32b中之胚軸DNA而來。該篩選產生8個獨立的純系，每一個純系顯示表現出一不同染色體部位。EAS 4及EAS基因組純系在Facchini及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (35)

Chappell(1992)參照前文中有敘述，但現已知爲不完全。

Facchini 及 Chappell(1992)參照前文誤認該 EAS3 與 EAS4 在基因組純系中 EAS3 與 EAS4 編碼序列之轉譯起始位置爲同一，此在其中有提及。EAS3 與 EAS4 編碼序列之正確轉譯起始位置已經確認，是在先前所確認爲起始位置之 ATG 密碼上游的甲硫氨酸(methionine)密碼 165 鹼基對處。該 EAS4 正確啓始位置是利用引發物(primer)延長分析來確認轉錄起始位置與上述所提純化酵素的附加 N-端胺基酸序列資料結合而繪出的。

經由聚合酶鏈反應所提供的一 DNA 序列，其相對應於該 EAS4 蛋白(見 SEQ ID NO:12)之胺基酸 56-92 ，製備一 110 個鹼基對的擴大子 Facchini 及 Chappell(1992)參照前文。這擴大子用來做爲一混種探針篩選在 pcdNA II (Invitrogen, San Diego,CA)的一 cDNA 庫，而 pcdNA II 由 poly A^+ RNA 所製備，在誘導子處理之後(*Trichoderma viride* cellulase)由煙草細胞培養細胞 4 小時。這擴大子用一有意義引發物(ATGCTGTTAGCAACCGGAAGG;SEQ ID NO:3)及一反向引發物(ATCCAAAATCTCATCAATTTC;SEQ ID NO:4)，及在標準 PCR 反應的遺傳 EAS4 模板中製造。[Saiki 等(1988)Science 239:487-491]。此 110 鹼基對擴大子使用 DE-81 紙(Whatmon International,Inc., Clifton,NJ)進行聚丙烯酰胺凝膠電泳(Polyacrylamide gel electrophoresis)後分離。該分離之片段使用一從 Stratagene(La Jolla,CA)之任意發起物工具，以[α-^{32}P]-dCTP 進行放射標的，作爲在該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (36)

cDNA 庫之菌落之混種探針，如前述[Hanahan 與 Meselson(1980)Gene10:63-67]。在這些實驗中所獲得的純系似乎缺少 5'編碼序列的 80 個鹼基對。

使用一 PT/PCR 方法來獲得一全長的純系。第一股 cDNA 由 poly A^+ RNA 獲得，poly A^+ RNA 由煙草細胞在誘導子誘導後所產生如[Facchini 及 Chappell(1992)supra]所述，使用具有 ATGAGTCCTTACATGTGA(SEQ ID NO:5)的反向引發物。此序列與轉譯起始位置之下游核苷酸 459-477 一致。這反向轉錄酶反應在一 10μm 反應中實行(1μg polyA^+ RNA,25pmol 反向引發物，10mM DTT，分別 2.5mM dATP，dGTP,dCTP,dTTP，8 單位 RNase Block I (Stratagene,La Jolla,CA)，第一股合成緩衝液依製造者製法(Stratagene)在 37 ℃下使用 1 小時。此反應於 99 ℃下反應 5 分鐘而終止。然後將 40μℓ 的 PCR master mix 加至第一股反應中；PCR master mix 包含 10mM Tris-HCl,pH 8.3,50mM KCl,1.5mM MGCl2,0.01% Tween-20,0.01%(W/V) 動物膠(gelatin)，0.01% NP-40，每個去氧核苷酸三磷酸 2.5mM，1 單位的 TaqI 聚合酶，及 25pmol 向前引發物 (GGGAGCTCGAATTCC**ATG**GCCTCAGCAGCAGCA GTTGCAAACTAT,SEQ ID NO:6,EcoRI 與 NcoI 辨識位置畫有底線及 ATG 轉譯起始位置用粗體)。PCR 在標準狀況下實行[Back 等人(1994)Arch.Biochem. Biophys. 315:523-532]。

此 492 鹼基對反應產物以 EcoRI 與 HindIII 分解及次選

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (37)

殖至同樣被切的 pBluescript SK(Stratagene)。由另一部分 cDNA 純系的一 HindIII/XhoI 片段選殖至 5'終止序列純系之相對位置，並產生一全長 cDNA 且名爲 pBSK-TEAS 。pBSK-TEAS DNA 利用一氯化鈣方法經性狀轉移進入大腸桿菌 TB1(Escherichia coli TB1)[Sambrook 等(1989)參照前文]。確認所插入的 DNA 序列來證實這個質體如我們所期待及需要的結構(雙去氧核苷酸鏈終止過程，United States Biochemical Corp., Cleveland,OH)

實施例 4 確認 EAS 同源序列

分離煙草葉遺傳 DNA 如 Murray 與 Thompson (1980)Nucleic Research 8:4321-4325 所述。用所需限制酶等分試樣分解之後，該分解 DNA 樣品在 0.8%瓊質糖凝膠跑電泳，及此大小分離後的 DNA 被轉移至尼龍膜中。DNA 斑點以任意引發物放射標的之 cEAS1 混種，其編碼區之 5'端被縮短，(如 Sambrook 等(1989)參照前文所配製)於 60℃，0.25M 磷酸鈉緩衝溶液，pH8.0,0.7% SDS,1%牛血清蛋白，1mM EDTA。該斑點以 2X SSC 及 0.1% SDS 於 45℃下沖洗兩次(1 X SSC 爲 0.15M 氯化鈉，0.015M 檸檬酸鈉，pH7.0)。有關混種的是，可使用一顯示光密度計，由自體射線照片測得混種的量。(MilliGen/Biosearch,Ann Arbor,MI)。

Facchini 與 Chappell(1992)supra 報告南方混種結果顯示出在煙草(*N.tabacum*)基因組中有 12-16 個 EAS 同源複製品。爲了提出該煙草 EAS 之重要同源序列，及複製每個基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（38）

因組序列的明顯數目，南方混種實驗使用由其他種類植物分離出的DNA來實行。

經由瓊質糖凝膠電泳(0.8%的瓊脂糖)使限制內核酸酶-分解的基因組DNAs分開，然後轉移至一Hybord-H+膜(Amersham Corp., Arlington Heights,IL)。包括EAS的編碼序列及混種的放射線標的探針，如Sambrook等人C1989)參照前文所述來實行。使用適當嚴格狀況，(以4X SSC，在65℃進行混種)最後以1X SSC，於65℃清洗。

另外，利用標的DNA爲模板及位高度保存區(見SEQ ID NO:7)中EAS4編碼序列衍生而來的引發物以習知技術可進行PCR。

實施例5 EAS蛋白質的偵測

利用如Facchini及Chappell(1992)參照前文及在Back等(1994)Arch. Biochem,Biophys. 315:527-532所述之技術，可確定一表現產物之酵素活性。

爲了測定EAS雜交反應蛋白質量，所有蛋白質部分由細菌培養收取之100μℓ等分試劑經微量離心機中離心兩分鐘後，濃縮後製備。丟棄細胞懸浮液之後，片狀沈澱物再經懸浮於50mM的Tris-HCl 100μℓ,pH 6.8,10mM二硫內消旋丁糖醇(dithiothreitol)，2%十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate),0.01%溴酚藍(bromophenol blue)，10%甘油。將15μℓ等分試樣於11.5% SDS-聚丙烯醯胺凝膠上跑電泳進行免疫偵測；爲了進行此蛋白質科麥西藍-染色(Coomassie blue-staining),35μℓ等分試樣也同樣跑電泳。在

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(39)

可溶性蛋白之EAS樣品，這些細胞經處理並作爲酵素活性的確認(見 Back 等(1995)參照前文或 Facchini 與 Cjappell(1992)參照前文。爲了進行免疫偵測取 10μℓ 等分試樣如上述跑電泳；爲了進行科麥西藍-染色，10-15μℓ 等分試樣用來跑電泳。

跑電泳之後，蛋白質用科麥西藍染色，而該蛋白質則轉移到硝化纖維素膜(nitrocellulose membrane)如[Towbin 及 Gordon(1984)Journal of Immunological Methods 72:213-340]所述進行免疫偵測。在 1X TBS(20 mMTris-HCl,pH 7.5, 500mM 氯化鈉)與低脂牛奶中培養 30 分鐘後，該硝化纖維素斑點經過夜培養於包含煙草 EAS 之特一單株抗體相同溶液中(1:1000 稀釋； Vogeli 等(1990)Plant Physiology 93:182-187)。山羊的抗鼠抗體連接至鹼性磷酸 (alkaline phosphatase)及特別色原質的染料上，然後經培養而可看見 EAS 特一抗體結合至固定於硝化纖維素膜之蛋白質上[Leary 等(1983)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-4049]。

實施例 6EAS4 基因組的純系

該 5'-縮短 cDNA 細胞純群 cEAS1 在 Facchini 與 Chappell(1992)參照前文中使如一混種探針用來篩選該 λEMBL3 載體的一 N. tabacum CV. NK326 基因庫(Clontech, Palo Alto,CA)。使用次純群化(subcloning)及 DNA 定序方法確定 DNA 序列。

該 DNA 與該 EAS4 基因組純群落所推論出之胺基酸序列於 SEQ ID NO:7-8 中提出。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(40)

實施例 7

爲了研究該 EAS4 基因上游未轉譯區域部分的功能，此上游 DNA 之 Hind III/BamHI 末端片段被純群化至 pBI 101(Clontech,Palo Alto,CA)使得該β-葡糖苷酸酶(GUS) 報告基因可顯示於性狀轉換的植物細胞中，該 EAS3 基因的 5'-側翼序列位於 SEQ ID NO:1 及該 EAS4 基因的 5'側翼基因位於 SEQ ID NO:2。這些序列的每一轉譯起始位置(ATG)是在最後三個核苷酸。藉由引發物擴增技術，該 EAS4 轉錄起始位置估計是在 SEQ ID NO:2 之核苷酸 573。CAAT 與 TATA 盒結構確認在 SEQ ID NO:1(EAS3)之核苷酸 429 至 432 與核苷酸 456 至 459 位置及位核苷酸 513 至 516 與位核苷酸 540 至 543 位 SEQ ID NO:2(EAS4)。

使用一修飾過的根癌土壤桿菌性狀轉換方法產生該性狀轉換植物細胞系。該重組質體包含被導入植物組織的序列，並移轉入根癌土壤桿菌菌株 GV3850，經由三親代交配(Triparental mating)由 *E.coli* TB1(PRK 2013)及各種不同生長期之煙草葉被切成 1 平方公分片段，並浸在土壤桿菌細胞懸浮液中(約 10^4 至 10^5 細胞/毫升)在 3-10 分鐘後，該葉子片段用消毒水沖洗，除去過多的細菌細胞及降低過多細菌在處理過葉片上生長的問題。在一短時間乾燥後(30 至 60 秒)，此處理過葉子片段置於無抗體植物的植物組織培養培養基中，該培養基促使組織受感染，及 DNA 由細菌移轉至該植物組織中。植物組織培養培養基每公升包含：Murashige and Skoog Basal Salt Mixture(Sigma Chemical

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(41)

Company, St. Louis, Mo)4.31克，苄胺基 (溶於1N氫氧化鈉)2.5毫克，0.1mg/mℓ的吲哚基醋酸溶液10mℓ，30克蔗糖，2mℓ的Gamborg's Vitamin Solution(Sigma Chemical Co., St. Louis,Mo)及8克的瓊脂(agar)。該pH用氫氧化鈉調至pH 5.5與5.9之間。兩天後，此葉片片段移轉至植物組織培養的培養基，其包含300μg/mℓ的康黴素，500μg/mℓ的mefoxin(Merck,Rahway,NJ)。該康黴素選取性狀轉換植物組織，及該mefoxin選取抗土壤桿菌屬細胞。

爲了限制在該基因轉殖植物細胞產生過程中，可能導入該調節parA1編碼序列，所以必須在性狀轉換過程使移出物組織於土壤桿菌細胞中暴露至最少，否則將造成細胞死亡反應。因此，在該誘導轉錄調節物質的調節控制之下，誘導包含細胞自殺基因之異源DNA導入之生物導向(bio-ballistic)技術，爲一有用另一性狀轉換技術，因爲此技術不需要使用到土壤桿菌細胞或黴菌細胞壁分解酵素(如產生原生質體作爲電穿孔所需)，兩者在調節物質的控制下使該編碼序列產生誘導作用。

基因轉殖植物的再生主要如Horsch等(1985)Science 227:1229-1231.所述。

如Jefferson等(1987)EMBO Journal 6:3901-3907所述，利用5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-葡糖醛酸(5-bromo-4-chloro-3-β-D-glucuronic acid)在所產生的基因轉殖植物來測試此β-葡糖苷酸酶(GUS)報告基因的表現，使用於處理(控制)狀況及誘導狀況下。誘導狀況爲將T.viride纖維素酶敷用於基因

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(42)

轉殖植物的煙草組織(用一機械微量滴管取 50-100μℓ 或 10-100nm 的蛋白質(例如 cryptogein)來誘導間質組織之組成物)；控制組爲模擬條件但沒有纖維素酶誘導子的處理。在某些實驗中使用解剖刀使煙草組織受傷有助於暴露至該誘導物質中。

實施例 8 啓動子與啓動子結合區域的刪除分析

在分離反應，此 EAS4 所衍生的 DNA 序列被相對於轉錄起始位置(核苷酸 6 至 642，SEQ ID NO:2，EAS4)的-567至+67 包圍，於此 GUS-報告者載體 pBI 221(Ciontoch, Palo Alto, CA)中，EAS4 所衍生的 DNA 取代花椰菜鑲嵌病毒(CaMV)35 S 啓動子。在該 EAS4 上游區域中的刪除突變者，在限制內核酸酶作用之後被分離。分析此gEAS-啓動子-GUS結構於經電穿孔煙草細胞的原生質體(圖 1)及穩定性狀轉換煙草系(圖 2A，表 1)中實行。過渡表現之先前資料證明在 SEQ ID NO:1 沒有誘導子誘導的功能，但在 SEQ ID NO:2 功能爲調節基因表現。

該過渡表現(transient expression)資料由煙草原生質體中得知，各種 EAS3 及 EAS4 啓動子-GUS 結構已導入原生質體中，見圖 1，由該 EAS4 啓動子區域的 5'端逐步刪除來減少表現的量，誘導性維持在該-262，-202 及-110 範圍(相對於該轉錄起始位置，在 SEQ ID NO:2 之核苷酸 573)。這些資料顯示出經由 EAS3 啓動子區域構造，只有非常少量的 GUS 被表現出來。相同地，該 CaMV 35S 啓動子受誘導子處理而沒有被誘導。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（43）

在圖 2A-2B 資料顯示刪除-567 與-160 之間基因物質降低了下游基因表現的量，但並不破壞表現的誘導性。然而，於-567 與-160 之間的 DNA 序列似乎包含加強轉錄的活性。大部分該增加-轉錄活性似乎位於-567 與-212 之間，但是額外的增加似乎由相對於轉錄起始位置-212 與-160 之間的序列訊息所調節(轉錄起始位置在核苷酸 573；-567 爲核苷酸 1，-212 爲核苷酸 361，及-160 爲核苷酸 413，全在 SEQ ID NO:2)。

於圖 2B 功能分析資料中，該 DNA 序列訊息對於以誘導子處理而促使誘導作用是位在相對於該EAS4轉錄起始位置之-160 與-87 之間(即位 SEQ ID NO:2 之核苷酸 413 與 486 之間)。在這些實驗中，該 EAS 衍生序列置於一縮短的 CaMV 35S 啓動子之前[Benfey 等(1990)EMBO J.9:1667-1684]。該圖也顯示當一異源的最小啓動子嵌入時之該 EAS4-衍生的轉錄調節區域的功能。

在一獨立的性狀轉換之更廣泛的分析，在 EAS4 上游區域整個由-567 至+67 或當中 5'端刪除被插入載體 pBI101 中 GUS(β-glucuronidase)報告基因之上游中(Clontech, Palo Alto, CA)，及該 GUS 報告者之表現量在誘導及非誘導狀況下分析。雖然額外的上游序列增加表現，但 EAS4 轉錄起始位置上游之 160 鹼基對也足以引導此 GUS 報告基因之調節表現。包含該 EAS4 轉錄起始位置之上游 167 鹼基對之最小構造，使經電穿孔的原生質體有過渡的基因表現並賦予 GUS 報告基因表現之誘導子-誘導性(在基因表現上最少增加 2.5

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (44)

倍)。相對地，該 EAS3 上游區域(SEQ ID NO:1)似乎在過渡表現系統中沒有多量的報告基因表現，似乎也沒有對下游報告基因賦予誘導子誘導性。

因利用黴菌細胞壁的分解酵素而產生這些原生質體，因而希望在此原生質體系統有誘導子-誘導 GUS 報告基因的表現，及這些酵素已證明爲誘導植物補體產生及植物中二三烯環合酶基因的表現[Chappell 等(1991)Plant Physiology 97:693-698]對於此原生質體爲什麼對第二次誘導子處理產生反應，可能解釋爲這些細胞在第二次處理之 6-8 小時前即可以恢復。此恢復期使此細胞回復到一對誘導子反應的狀態。

pBI101 是由 Clontech (Palo Alto, CA)商業上可獲得的。在一 pUC19 載體 pBI101 包含該 GUS 報告基因之上游 CaMV 35S 啓動子；然而 pBI 101 作爲過渡表現實驗的一載體，此重組載體被導入植物原生質體中。本質體及其衍生物由生長中的康黴菌選取。一在土壤桿菌雙層質體載體 pBI19(Bevan, M.(1984)Nucl. Acids Res. 12:8711)之一“沒有啓動子”GUS 匣，相同地帶有一植物-可表現的康黴菌抵抗決定因素。

實施例 9 確定誘導轉錄調節物質

經由 S1 核酸酶保護作用及引發物延伸實驗[Sambrook 等(1989)誘導子]，EAS3 及 EAS4 純系基因組之 5'側翼區已被描繪出。對此轉譯起始位置之 5'延伸至 1 Kb 之次純系(subclones)經定序並嵌入 pBI 101 中β-葡糖苷酸酶(GUS)報告基因，做爲基因轉殖植物組織研究用。此產生的重組質

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(45)

體，經電穿孔進入煙草原生質體中。GUS 活性以過渡表現方法測定，及穩定性狀轉換的煙草細胞系也經分離，作爲 GUS 誘導作用及表現作用之研究。

製備一位於修飾過 pBI101 載體中 EAS 轉錄起始位置之上游最小爲 200 鹼基對的核苷酸序列之構造，及製備一β-葡糖苷酸酶(GUS)，並分析調節 GUS 表現之能力。側翼的 200 個鹼基對顯示足以控制過渡基因在經電穿孔之原生質體上的表現，並對 GUS 表現賦予誘導子誘導性(最少 2.5 倍誘導作用)。該 EAS3 側翼序列的類似實驗顯示於 EAS3 位置的 200 鹼基對並沒有 GUS 高量的表現，並且在性狀轉換植物細胞中也沒有誘導子的反應。由馬鈴薯疫病菌屬(*Phytophthora*)的纖維酶與抽出物[Ricci 等(1989)Eur, J. Biochem. 183:555-563]其來自 EAS4 衍生的調節序列作爲誘導基因表現。

進一步我們來研究對於病原體侵入，或用纖維素酶或抽出物對調節誘導基因表現的重要序列的確認，可在寡核苷酸(Oligonucleotide)點突變之後完成[Kunkel (1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492]。在相對於該 EAS4 轉錄起始位置-233 及-234(SEQ ID NO:2 的核苷酸 334-335)以 GT 取代廣泛型 CA 於誘導子(纖維素酶)中培養 20 小時後偵測，似乎並沒有改變該 GUS 報告基因的表現。

先前甲基化干擾及凝膠阻滯研究主要施行如[Sambrook 等(1989)參照前文]所述顯示八聚體序列集中在相對於轉譯起始位置-233 周圍(集中於 SEQ ID NO:2 之 334 周圍)，與植

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(46)

物細胞核之蛋白質結合。甲基化干擾資料顯示若先前准許與核的萃取物反應，則位-233 位置的 G 可受 DMS(dimethyl sulfate)較佳的保護而免於甲基化。凝膠停滯研究結果與由甲基化保護實驗所獲得結果符合。當含此-343 至-140 區域(相對該轉譯起始位置)(SEQ ID NO:2 的核苷酸 230 至 433)的 DNA 片段於對細胞核萃取液反應後測試，在丙烯醯胺凝膠電泳中的移動性似乎受阻滯。在位置-234 及-233 ，以 GT 替代 CA 則蛋白質結合現象就消失。在控制及誘導子-誘導細胞萃取液觀察到相似的結果，及報告基因表現沒有因這 2 個鹼基對突變而改變。因此，對於病原體侵入或誘導子治療，在-233 周圍區域並沒有直接在基因表現的誘導作用之中。

先前實驗顯示該 EAS4 DNA 序列相對於該 EAS4 轉錄起始位置之-253 至-48 之間(在 SEQ ID NO:2 的核苷酸 320 及 325 之間)對下游報告基因表現有定量及定性效應。在相對於 EAS4 轉錄起始位置之-110 及-1 之間的序列(SEQ ID NO:2 之核苷酸 463 至 572)促使該可誘導反應，而相對於該 EAS4 轉錄起始位置-202 至-110 之間的序列(SEQ ID NO:2 的核苷酸 371 至 463)增強誘導與非誘導二者報告基因的表現量。

實施例 10 一嵌合型 EAS4 啓動子(-1148 至+68)：GUS 報告基因的構造

在另一系列的實驗中，我們確認在基因轉殖煙草植物中該 EAS4 啓動子(-1148 至+67)的活化作用。由上述該 EAS4 基因組純系中分離出一包含該 EAS4 5'序列部分之一約

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(47)

1.9kb 的 HindIII-HindIII 片段，以便獲得煙草 EAS4 基因啓動子之 5'側翼序列。然後此分離的片段被選殖至此 pBluescript KS (+)質體載體(Stratagene)的聚連接子(polylinker)中。使用標準的 PCR 方法論，包含此 EAS4 HindIII-HindIII 片段的 PKS (+)質體被用來做爲-DNA 的模板來產生一大約 1.2kb EAS4 啓動子次片段(-1148 至+67)，這片段有此 EAS4 轉錄起始位置上游 1148 個鹼基對及下游 67 個鹼基對的序列。該片斷之核苷酸序列於圖 3A 中。該二分載體(binary vector) pBI 101.1 中，此包含該 EAS4 啓動子(-1148 至+67)之 1215 個鹼基對 HindIII-Bam HI 片段被連接於正確讀序且帶有 GUS 的密碼區中。圖 3B 爲 EAS 啓動子(-1148 至+67)：GUS 報告基因嵌入構造之圖解說明圖。

實施例 11 基因轉殖煙草中一嵌入型 EAS4 啓動子(-1148 至+67)：GUS 基因的誘導子-與病原體-誘導之表現

爲了評估煙草 EAS4 啓動子(-1148 至+67)的功能，圖 3B 爲 GUS 報告者基因表現構造，在基因轉殖煙草植物中用誘導子或不用誘導子處理之表現如下。

使用如 Schardl 等人(Gene 61:1-11,1987)所述三親代交配程序，將於圖 3B 的 EAS4 啓動子(-1148 至+67)：GUS 報告基因移轉動至解除裝備(disarmed)的根癌土壤桿菌株 GV3850 中。利用如 Horsch 等人(Science 227:1229-1231, 1985)，所述之葉盤(leaf disc)性狀轉移方法，於煙草植物中(*Nicotiona tabacum cv Xanthi*)以包含該報告者結構之解除裝備的土壤桿菌進行性狀轉換。在控制組植物中，花椰菜鑲嵌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(48)

病毒(CaMV)35S 啓動子控制下，基因轉殖煙草系所表現該 GUS 報告基因也可再生。再生的基因轉殖煙草植物的種子於包含 100 mg/ℓ 之康黴素的培養基中發芽。該抗康黴素植株後來移入土壤中並在溫室中生長。這些植物利用上述分析方法測試該 GUS 報告基因之表現，有未處理(水控制)組及誘導(誘導子-及病原體-處理)組。

如上述方法用黴菌誘導子蛋白 cryptogein 或水處理之基因轉殖煙草植物葉子所表現出 GUS 活性，來確認經 EAS4 啓動子(-1148 至+67)促使 GUS 基因表現之誘導子誘導性。一株兩個月大的基因轉殖煙草植物中全部展開的葉子(由植株底部之第 8 葉)之一半葉子，將軸外的一邊經使用一吸量管取大約 50μℓ 之 25nM. cryptogein 作爲滲透[製備方法根據 Ricci 等人 Eur. J. Biochem. 183:555-563, 1989)；另一半葉子也取大約 50μℓ 水以同樣方式進行滲透。在經滲透後各種不同的時間，由完整植株中收集到葉片上經 cryptogein 與水滲透的區域，並分析 GUS 活性。

如圖 4A 表示，基因轉殖煙草的三個獨立系的葉子經 25nM 的 cryptogein 滲透作用顯示出經誘導子處理後約 4 個小時，才誘導出 GUS 基因表現。另一方面，該 35S CaMV 啓動子：GUS報告基因經誘導子處理後沒有被誘導(資料中沒有顯示)。除此之外，在含有該EAS4啓動子(-1148至+67)：GUS 報告基因之基因轉殖植物葉片上，經水處理後 GUS 活性沒有被誘導(圖 4A)。在微量之下，以誘導子處理入侵過之葉片組織區域，唯一發現 GUS 活性受限制，顯示此 EAS

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (49)

啓動子(-1148 至+67)沒有被第二次訊號誘導。

基因轉殖煙草植物的根與莖同 cryptogein 誘導子處理並作 GUS 活性分析如下，是爲了描寫由該 EAS4 啓動子(-1148 至+67) 促使 GUS 基因表現之器官-專一性。基因轉殖煙草植物的根一直放在殺菌過的 Murashige 及 Skoog 培養基直到被分析。由兩個月大溫室中生長之基因轉殖煙草植物中得到莖(頂端以下，切一吋至一吋半)。在誘導子處理之前，根和莖切成約 15-30μM 片段。切成片段的根和莖培養於濾紙上，濾紙上用 100nM 的 cryptogein 或水弄濕，於室溫下培養 18 小時。於根和莖片段中之 GUS 活性隨後利用上述之分析方法分析。

圖 4B 表示基因轉殖煙草之兩個獨立系，即根與莖兩者在 cryptogein 處理及 18 小時培養後， GUS 活性的誘導情況。分別在莖與根中觀測到相對於用水處理樣品(控制組)，GUS 活性增加 15 倍。根的 GUS 活性比莖還要高。這些結果顯示在莖與根的組織中對誘導子處理， EAS4 報告基因(-1148 至+67)是可誘導的。

爲確定該EAS4啓動子(-1148至+67)：GUS報告基因是否可受黴菌病原體之誘導，以兩種不同的 *Phytophthora parasitica var. Nicotianae* 處理基因轉殖煙草葉，並如下述方法分析 GUS 活性。從 45 天大的基因轉殖煙草植物摘下頂部嫩葉，並注入菌絲充填劑(直徑約 1 公分)，此充填劑由生長於燕粉瓊脂之兩天大的 *Phytophthora parasitica var. Nicotianae* 種 0 及種 1 培養物，方法如 Tedford 等人所述(plant

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（50）

Disease 74:313-316, 1990)。接種過之葉片培養於以蒸餾水浸濕之濾紙上，並於25℃之生長室中照光24小時。控制組葉片則以無菌絲充填劑注入。隨後收集經注入的組織並如上所述作GUS活性分析。

如圖5所示基因轉殖煙草葉經由 *Phytophthora parasitica var. Nicotianae* 之種0或種1處理時，GUS活性則被誘導出。雖然 *P. p. var Nicotianae* 之種0及種1典型地誘導出不同地疾病症狀，於 *N. tabacum cv. Xanthi.* 之基因轉殖葉子上觀察得知，這兩個種所造成之疾病症狀並沒有顯著不同。進一步，我們觀測 *P. parasitica* 之種0及種1兩種所誘導之該GUS報告基因的表現也一樣。

爲了確定是否GUS基因表現是由細菌病原體或誘導子所誘導，基因轉殖煙草葉經 *Pseudomonas syringae pv. Syringae* 61及它 *hrpH* 突變株及 *Erwinia amylovora harpin* 誘導子處理過後，分析GUS的活性。基因轉殖煙草植物大約45天大則摘掉頂端嫩葉，並使之滲透於 *Pseudomonus syringae pv. Syringae* 61或其 *hrp*H 突變株之細胞懸浮液(A_{600}=0.05)，或使用定量吸管取harpin誘導子(50μg/mℓ)如上述方法。控制組葉子使用水進行滲透。在大約12小時後，收集組織並如上述方法分析GUS活性。

如圖6所示，當以 *Pseudomonas, hrp*H 突變株或以harpin處理基因轉殖煙草葉12小時後，GUS活性受到誘導。另一方面，用水處理之基因轉殖葉片所偵測到GUS活性則較低。進一步，在該組織區經廣泛型 *P. syringae Pv. Syringae* 61

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(51)

或純化的harpin蛋白的滲透處理12-15個小時後，則有過敏反應發生。這結果顯示該EAS4啓動子(-1148至+67)受細菌病原體或細菌-衍生的誘導子的活化。

實施例12 免疫斑點(Immunblot)的分析

基因轉殖植物的不同組織經 cryptogein 處理而產生之EAS 表現經由下述之標準西方印染方法(Standard Western blotting methods)來分析。由控制組及 cryptogein 誘導子-處理之煙草組織的蛋白質經萃取後，用 80mM 的磷酸鈉緩衝液(PH 7.0)將之均質化，緩衝液包含 20%(W/V)甘油， 10mM 偏亞硫酸鈉， 10mM 檸檬酸鈉， 15mM $Mgc\ell_2$， 5mM β-巯基乙醇如 Vogeli 及 Chappell 所述(參照前文)。蛋白質濃度用 Bio-Rad 分析法確定。等量蛋白質經 SDS-PAGE 分離後，移轉至硝化纖維素膜(nitrocellulose membrane)，並依 Voegeli 及 Chappell 所述進行免疫偵測(參照前文)。

如圖 7A-B 所示，以西方印染實驗在煙草葉片並沒有偵測到 EAS 蛋白。另一方面，以誘導子處理後之基因轉殖植物葉片中，有 EAS 蛋白被誘導出來。在莖和根的片段中，不經誘導子處理而偵測 EAS 蛋白，顯示出有一或多個成員的 EAS 多基因家族，但 EAS4 藉由上述組織化學局部化資料(histochemical localization data)，確認只有在傷口上才被活化。

實施例13 EAS4 啓動子(-1148 至+67)： GUS 報告基因在基因轉殖煙草中特定的細胞表現型式

圖 8A-K 顯示煙草的不同基因轉殖系於抽出物處理之後

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (52)

經由染色來測試GUS活性之結果。該資料顯示圖8A-K代表一系列不同時間的觀察，有好幾個基因轉殖煙獨立系之該EAS啓動子(-1148至+67)：GUS報告基因之表現顯示於圖3B。使用1 mM X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚基β-葡糖醛酸)染劑對基因轉殖組織染色，GUS活性爲局部性，染劑包括50 mM NaPO4，pH 7，0.05% Triton X-100，與0.1% β-巯基乙醇於37℃進行12-16小時，然後以50%的酒精，5%的冰醋酸及10%甲醛固定2小時。一適宜組織移除葉綠素後培養於70%酒精中。使用一Zeiss IIIRS顯微鏡觀察植物組織染色部分並用一MC63顯微照像照相機照像。

如圖8B-F所示，在基因轉殖葉片之誘導子-滲透地區有GUS活性，表示經由葉片組織cryptogein或parasicein的滲透作用，則該EAS4啓動子(-1148至+67)被活化，通常在表皮細胞層有最小量GUS活性被觀測到。同樣微弱染色型式在根及莖的表皮細胞也可觀測到(圖8G及8L)。當在該基因轉殖葉片之表皮細胞發現少量GUS活性時，基因轉殖植株之葉和根二者之毛樣結構(trichomes)中也觀測得GUS活性(圖8B及8L)。

除此之外，如圖8C-F及圖8L，分別於莖及根部分三次表皮層可觀測到誘導子-誘導GUS活性(圖8C-F及8L)。圖8F顯示在莖組織中GUS活性也出現在該形成層、韌皮部及初生木質部組織層；有少量的GUS活性可在莖之皮質區域觀測到。進一步，與莖組織一樣，GUS活性局限於根部之管狀系統(圖8L)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（53）

在花瓣中包括色素與無色素組織，不論經 cryptogein 處理之前或處理之後，都沒有觀測到 GUS 的活性。

實施例 14 基因轉殖煙草植株中該 EAS4 啓動子(-1148 至+67)之 5'刪除分析

在另一系列的實驗中，使用標準 PCR 方法論產生好幾個 EAS4 啓動子(-1148 至+67)之 5'刪除結構。這些啓動子刪除部分則嵌入該 GUS 報告基因於 pBI 101.1 或 pBI 221 載體中，隨後並如上所述轉形至煙草中。

表 1

刪除 5'端	GUS 活性 (MU/mg 蛋白質 /min)		誘導倍數	所測試之獨立基因轉殖系的數目
	控制組 (水-滲透)	經誘導子處理		
-1148	173	1889	10.9	11
-567	120	921	7.7	12
-212	23	187	8.1	11
-160	2	34	17.0	9
-115	3	3	1	12
-63	0	0	0	13

如表 1 所示，刪除該 EAS4 啓動子由-1148 至-567，則誘導 GUS 活性則減少爲使用一全長 EAS4 啓動子(-1148 至+67)植物中所發現 GUS 活性量之 50%。該啓動子進一步刪除至-212，則誘導 GUS 活性平均減少 90%，若刪至-160，則 GUS 活性降至有一全長 EAS4 啓動子(-1148 至+67)植物所表現活性之 2%。若刪至-63，則啓動子仍保有一般認爲 CAAT 及 TATA 盒，在控制組及誘導子一處理的葉片中完全廢除該嵌入基因的表現。這些資料顯示出煙草中控制 EAS4 定量表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(54)

現量之數個正調節物質是包含在-1148至-160區域。

比較刪除至-567與至-212所得結果顯示，在-567至-212之間的序列有助於表現，因爲由-567刪除至-212結果顯示表現量上減少4倍，即失去大量的GUS活性。雖然刪除至-160也大量地移去GUS的活性，並發現-160下游序列足以引導葉片組織之誘導基因表現。如圖9B所示，葉片組織經誘導子處理可觀測一17倍的誘導作用。這些資料顯示-控制該誘導子誘導性之定量物質是位於-160至-115。

實施例15抗抵疾病之基因轉殖植物

如下由*Phytophthora parasitica*種0分離出此*par*A1編碼序列：DNA基因組分離後，並在PCR中做爲一模板並帶有SIG向前啓動子(CGTTGGATCCCCACCTCATCCGAAATGAAC；SEQ ID NO:9；BamHI的位置底下有畫線)；根據轉譯起始位置核苷酸25-27及反向引發物(GGCTGAGCTCCTGGACGFCAGAGATCAAACC; SEQ ID NO:10; SstI位置下有畫線)來延伸該*par*A1抽出物之編碼區域，其包括此單一胜肽編碼序列。爲了分離與該*par*A1抽出物之編碼序列對應之擴大子(amplimer)，該MAT向前引發物(GCCGGATCCTTATGACTAGTTGCACCCCACGCAGCAAACTG，SEQ ID NO:11; BamHI位置，GGATCC, 及SpeI位置，ACTAGT，底下畫有底線；轉譯起始位置在核苷酸12-14)及使用反向引發物如前面(SEQ ID NO:10)及以基因組DNA爲模板。

爲次選殖至pBluercript (Stratagene, La, Jolla, CA)或至

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(55)

pEAS4結構，此擴大子DNA以BamHI及SstI分解。當使用成熟蛋白質的編碼序列時，此成熟抽出物/pEAS4結構可被分解，並以SpeI嵌入一植物訊號序列之開啓讀序(open reading frame)的5'端。此pEAS4-GUS載體以BamHI及SstI分解，及DNA大片段在跑瓊脂凝膠電泳後被純化。

圖9說明此分子經操作過程而產生抗病性植物。該*par*A1抽出物之編碼序列經分離後，藉由PCR使兩端有BamHI及SstI。$_{g}EAS4_{600(cyclase)}$-GUS-pBI101在EAS啓動子之調節控制之下引導該GUS報告基因之表現，$_{g}EAS_{600(cyclase)}$-GUS-pBI101被BamHI及SstI分解並釋放出GUS報告基因。然後此BamHI/Sst-分解的*par*A1擴大子接連至由$_{g}EAS_{600(cyclase)}$-GUS-pBI101分解產生$_{g}EAS_{600(cyclase)}$-parA1-pBI101之後所產生的大片段上，因而合成*Par*A1抽出物，接下來以一合適的誘導子使轉形的植物細胞或組織受誘導作用。

爲評估對植物病原體的抵抗性，使用土壤桿菌-參與基因移轉技術如上所述，在該$_{g}EAS_{600(cyclase)}$啓動子再生的控制之下，基因轉殖煙草植物(*Nicotiana tabacum cv.* KY160)包含*par*A1成熟抽出物基因(SEQ ID NO:12之胺基酸21-118)或*par*A1抽出物-帶有訊號序列基因(SEQ ID NO:12之胺基酸1-118)。所產生基因轉殖植物測試其對種0及種1之疾病抵抗性，利用標準分離葉片方法如Tedford等人(參照前文)所述將*Phythopthora parasitica var. Nicotianae*析出。

如圖10所示，在$_{g}EAS_{600(cyclase)}$啓動子控制下，包含該*par*A1成熟抽出物基因之數個基因轉殖煙草獨立系，相對於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (56)

控制組植物對 *P. p. var. Nicotianae* 之種 0 及種 1 兩種表現出疾病高抵抗性(亦即，相對於非轉形的 *N. tabacum cv.* KY160 或包含此gEAS$_{600(cyclase)}$啓動子： GUS 報告基因之基因轉殖的 *N. tabacum cv.* KY160)。

當本發明之各種實施例經詳細說明後，很明顯地修飾、延伸、改編及最佳化都可能在習知技術發生。如申請專利範圍中所引出很清楚地了解此修飾及改編等都在本發明之精神內。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

序列資料

(1)一般資訊：

(i)申請人：Board of Trustees of the University of Kentucky

(ii)發明名稱：轉錄控制序列及方法

(iii)序列數目：14

(iv)相關住址：

(A)住址：Fish & Richardson, P.C.

(B)街道：225 Franklin Street

(C)城市：Boston

(D)州：MA

(E)國家：US

(F)郵遞區號：02110-2804

(v)電腦可讀形式：

(A)介質型式：Floppy disk

(B)電腦：IBM PC Compatible

(C)操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D)軟體：PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi)目前申請數據：

(A)申請號碼：US

(B)申請日：

(C)分類：

(vii)先前申請數據：

(A)申請號碼：US 08/577,483

(B)申請日：22 December 1995

(C)分類：

(vii)先前申請數據：

(A)申請號碼：US 08/471,983

(B)申請日：06 June 1995

(C)分類：

(vii)先前申請數據：

(A)申請號碼：US 08/443,639

(B)申請日：18 May 1995

(C)分類：

(viii)代理人資料：

(A)姓名：Paul T. Clark

(B)註冊號碼：32,164

(C)參考/檔案號碼：07678/003BR1

(ix)電通訊資料

(A)電話：(617)542-5070

(B)傳眞：(617)542-8906

(C)電報：200154

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（58）

(2)SEQ ID NO：1的資料

(i)序列特性：

(A)長度：512個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：雙股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：DNA

(iii)假設：無

(iv)反義：無

(vi)起始來源：

(A)生物體：Nicotiana tabacum

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：1：

```
CCGCGATTGG AGGATGTTGT ACGTCGAGCT ACGCGGCACC GCGCTTAATT TTACTCGGTC     60
AAGAAGGAAC GGGGATGGTG GTCAACGAAA CACGACGGGC CCGACATCAT GCCTGACAAC    120
CCGCCGTGGG TGAAGAAGTC GACGTTGGAA AAGAGCTACA GCCTGCTCCA CGCGGATGCG    180
GGGATGGCCG CTGACTACAG AAAGTGCGTT TCCCGCCACC CGGGGCGAGC CCGGGTTTTG    240
AAGATCAATG CTGACCGAAC CAGACGGCGG TACGTCATCC GCTTGAGGGT AGAGACGGAT    300
CAGTTCTTGT TGTCGTGTGT CGAACTCGGG ACGTTTGTCA CATGGCTGGA CGGGTTATTC    360
GCCGCCATCA ACGTGTCGCC GCCAATCGAC GAGCGCGACT TTCCCAGAGA CTTTAGCGTG    420
CCACGGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC    480
ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT AA                                  512
```

(2)SEQ ID NO：2的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：642個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：雙股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：DNA

(iii)假設：無

(iv)反義：無

(vi)起始來源：

(A)生物體：Nicotiana tabacum

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：2：

```
TAGGTGAATG TCAGGGCTTA TGCTCCACGA TACTTATGCC CTGCCAGTAC ACCTCGCAGT     60
GGGACTCGCT GAAAAAACGT CTTTGTTGTG AGAAATTGCA ATTTTGAACC TCTACAATTT    120
CGACAAAACC TTGGTTCGTG AAAACTGTTT GATTAACTTT TAGACCATCC AGTCAATTTA    180
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（59）

```
ACTCTAAACT GACCTAAATA AATACTACGT ACACTAGTCT TTAAGTTCAT CAAAGTGGAC    240
TCTGCATTAA TAATTGAAAT TTATGCCGCA ACAATGACAT TAGGTTTTAT AAATAAAGTA    300
ATAGGAATTT GATAGTTCCA GGAAACAACT CTACAGTACT CCCTTATTTT GTGCCTTTTT    360
AAATAATATT ATTCAGTTGA CGAAACAAAT AAATAAAATA TTTGGGAAAC TGGATCAATA    420
GACCCCAGAC GCCAACAATG AATCAAAAGG CTGCTAGCTA GTGTAAAGTC TAGTAAGGCA    480
ACTGGGAAAT TAAATGATTA GGTGCTTTTG ATCAATTACA TTAACTAGTC TCTCACCACT    540
ATATATACTT GTCCCTTCTC TTCCATTTAA GTAGAGTTCC TTTCTTTCTT CCTTAAAACT    600
TAAAAGAACA AGTAAAAATA CACTCATCTT TAATTAGCAA TG                       642
```

(2)SEQ ID NO：3 的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：21 個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：單股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：其他核酸

(A)敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."

(iii)假設：無

(iv)反義：無

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：3：

```
ATGCTGTTAG CAACCGGAAG G                                              21
```

(2)SEQ ID NO：4 的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：21 個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：單股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：其他核酸

(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."

(iii)假設：無

(iv)反義：有

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：4：

```
ATCCAAAATC TCATCAATTT C                                              21
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（60）

(2)SEQ ID NO：5的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：18個鹼基對
(B)型式：核酸
(C)股的形式：單股
(D)局部解剖學：線性
(ii)分子型式：其他核酸
(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."
(iii)假設：無
(iv)反義：有
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：5：

ATGAGTCCTT ACATGTGA 18

(2)SEQ ID NO：6的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：45個鹼基對
(B)型式：核酸
(C)股的形式：單股
(D)局部解剖學：線性
(ii)分子型式：其他核酸
(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."
(iii)假設：無
(iv)反義：有
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：6：

GGGAGCTCGA ATTCCATGGC CTCAGCAGCA GCAGTTGCAA ACTAT 45

(2)SEQ ID NO：7的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：4253個鹼基對
(B)型式：核酸
(C)股的形式：雙股
(D)局部解剖學：線性
(ii)分子型式：DNA
(iii)假設：無
(iv)反義：無
(vi)起始來源：
(A)生物體：Nicotiana tabacum
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（61）

(B)位置：1216..1327
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：1454..1718
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：1805..2182
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：2259..2477
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：2609..2747
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：2902..3148
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：3261..3555
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：7：

```
AAGCTTTACG AATTAGATGT AAAAAGACGC AAACTACTTA TATATATTAC CAAAGTAACT      60
TGAAAGTTTA AAATTTCAAT TAGAACTATA GTAGGGTAAA ACTGTCTATT TAAAATCAGT     120
ATTTAAAAAG GCATGAGCGA AAGATGAGGC GTTTTATCTA ACACGAAGCG AGGTGTAAGC     180
CCCATGGTGT TTTATTTTTA TATTTTATAA ATTTATAAAA TCATTATATA AATCAGAAAA     240
ATACACTAAA ATTGTGAAAA GTTAAAGAAA ATTATAGAAT TAATATATAT ATATATATAT     300
ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAA ATGTATGTGT GTGTGTGTGT     360
GTATCGCATG CGCGCGACCA TGCAACTTTT TTTTCTTGAA AAAATAAAAG GCGTAAAGAT     420
ACATTATACC TATGTCATCA AAACAATATA AAAACTAGAG CGATACCAAA GGAAATTTTA     480
AATTCAAAAA CTAACTTGAA ATTAATATAT TTAAAATTTC ATTTTTTTTT GTGTGGAGAA     540
AACAAAGCAT AACACTTTGC TTTGTAACAC TTTGCCTAGG TGAATGTCAG GGCTTATGCT     600
CCACGATACT TATGCCCTGC CAGTACACCT CGCAGTGGGA CTCGCTGAAA AAACGTCTTT     660
GTTGTGAGAA ATTGCAATTT TGAACCTCTA CAATTTCGAC AAAACCTTGG TTCGTGAAAA     720
CTGTTTGATT AACTTTTAGA CCATCCAGTC AATTTAACTC TAAACTGACC TAAATAAATA     780
CTACGTACAC TAGTCTTTAA GTTCATCAAA GTGGACTCTG CATTAATAAT TGAAATTTAT     840
GCCGCAACAA TGACATTAGG TTTTATAAAT AAAGTAATAG GAATTTGATA GTTCCAGGAA     900
ACAACTCTAC AGTACTCCCT TATTTTGTGC CTTTTTAAAT AATATTATTC AGTTGACGAA     960
ACAAATAAAT AAAATATTTG GGAAACTGGA TCAATAGACC CCAGACGCCA ACAATGAATC    1020
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (62)

```
AAAAGGCTGC TAGCTAGTGT AAAGTCTAGT AAGGCAACTG GGAAATTAAA TGATTAGGTG    1080

CTTTTGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC    1140

ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT AAAACTTAAA AGAACAAGTA AAAATACACT    1200

CATCTTTAAT TAGCA ATG GCC TCA GCA GCA GTT GCA AAC TAT GAA GAA GAG      1251
                 Met Ala Ser Ala Ala Val Ala Asn Tyr Glu Glu Glu
                   1               5                  10

ATT GTT CGC CCC GTC GCC GAC TTC TCC CCT AGT CTC TGG GGT GAT CAG      1299
Ile Val Arg Pro Val Ala Asp Phe Ser Pro Ser Leu Trp Gly Asp Gln
         15                  20                  25

TTC CTT TCA TTC TCC ATT GAT AAT CAG G TAATTTAACT AATACTAGTA          1347
Phe Leu Ser Phe Ser Ile Asp Asn Gln
     30                  35

TTCTTTATTT ATATTTATAG TTTGTTCTCC ATTGATAATC AGGTAGTTTA TTTATGTTGA    1407

ACAACATTAA TTTTGCTAAT TTCAGTTTAA TGTACATTAC ATATAG GTT GCG GAA       1462
                                                    Val Ala Glu
                                                      1

AAG TAT ATA TAT GCT CAA GAG ATT GAA GCA TTG AAG GAA CAA ACG AGG      1510
Lys Tyr Ile Tyr Ala Gln Glu Ile Glu Ala Leu Lys Glu Gln Thr Arg
       5                  10                  15

AGT ATG CTG TTA GCA ACC GGA AGG AAA TTG GCC GAT ACA TTG AAT TTG      1558
Ser Met Leu Leu Ala Thr Gly Arg Lys Leu Ala Asp Thr Leu Asn Leu
 20                  25                  30                  35

ATT GAC ATT ATT GAA CGC CTT GGT ATA TCC TAC CAC TTT GAG AAA GAA      1606
Ile Asp Ile Ile Glu Arg Leu Gly Ile Ser Tyr His Phe Glu Lys Glu
                 40                  45                  50

ATT GAT GAG ATT TTG GAT CAG ATT TAC AAC CAA AAC TCA AAC TGC AAT      1654
Ile Asp Glu Ile Leu Asp Gln Ile Tyr Asn Gln Asn Ser Asn Cys Asn
            55                  60                  65

GAT TTG TGC ACC TCT GCA CTT CAA TTT CGA TTG CTC AGG CAA CAC GGT      1702
Asp Leu Cys Thr Ser Ala Leu Gln Phe Arg Leu Leu Arg Gln His Gly
         70                  75                  80

TTC AAC ATC TCT CCT G GTAAGTTCAT CATGAAGTTG TTAAAATTAT              1748
Phe Asn Ile Ser Pro
     85

TATCCATTTA TTGGAAGAAG GCTAATTCAT CTTGAGTTTT CTTTCTTGAA ATACCA       1804

GAA ATT TTC AGC AAA TTC CAA GAT GAA AAT GGC AAA TTC AAG GAG TCT      1852
Glu Ile Phe Ser Lys Phe Gln Asp Glu Asn Gly Lys Phe Lys Glu Ser
  1               5                  10                  15

CTT GCT AGT GAT GTC TTA GGA TTA TTA AAC TTG TAT GAA GCT TCA CAT      1900
Leu Ala Ser Asp Val Leu Gly Leu Leu Asn Leu Tyr Glu Ala Ser His
            20                  25                  30

GTA AGG ACT CAT GCT GAC GAT ATC TTA GAA GAC GCA CTT GCT TTC TCC      1948
Val Arg Thr His Ala Asp Asp Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ala Phe Ser
         35                  40                  45
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（63）

```
ACT ATC CAT CTT GAA TCT GCA GCT CCA CAT TTG AAA TCT CCA CTT AGG      1996
Thr Ile His Leu Glu Ser Ala Ala Pro His Leu Lys Ser Pro Leu Arg
     50                  55                  60

GAG CAA GTG ACA CAT GCC CTT GAG CAA TGT TTG CAC AAG GGT GTT CCT      2044
Glu Gln Val Thr His Ala Leu Glu Gln Cys Leu His Lys Gly Val Pro
 65                  70                  75                  80

AGA GTC GAG ACC CGA TTC TTC ATC TCA TCA ATC TAT GAC AAG GAA CAA      2092
Arg Val Glu Thr Arg Phe Phe Ile Ser Ser Ile Tyr Asp Lys Glu Gln
                85                  90                  95

TCG AAG AAT AAT GTG TTA CTT CGA TTT GCC AAA TTG GAT TTC AAC TTG      2140
Ser Lys Asn Asn Val Leu Leu Arg Phe Ala Lys Leu Asp Phe Asn Leu
            100                 105                 110

CTC CAG ATG TTG CAC AAA CAA GAA CTT GCT CAA GTA TCA AGG              2182
Leu Gln Met Leu His Lys Gln Glu Leu Ala Gln Val Ser Arg
        115                 120                 125

TGCGATATAT AAAAACGATG AACCCTTTTT GATTCATCAT ATCTCAAGTA CTCATGTTAA    2242

TTTCTTATGC TGCAGG TGG TGG AAA GAT TTG GAT TTT GTA ACA ACA CTT        2291
                  Trp Trp Lys Asp Leu Asp Phe Val Thr Thr Leu
                    1               5                  10

CCA TAT GCT AGA GAT CGA GTA GTT GAA TGC TAC TTT TGG GCA TTA GGA      2339
Pro Tyr Ala Arg Asp Arg Val Val Glu Cys Tyr Phe Trp Ala Leu Gly
            15                  20                  25

GTT TAT TTT GAG CCT CAA TAC TCT CAA GCT CGC GTC ATG CTC GTT AAG      2387
Val Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Gln Ala Arg Val Met Leu Val Lys
        30                  35                  40

ACC ATA TCA ATG ATT TCG ATT GTC GAT GAC ACC TTT GAT GCT TAC GGT      2435
Thr Ile Ser Met Ile Ser Ile Val Asp Asp Thr Phe Asp Ala Tyr Gly
     45                  50                  55

ACA GTT AAA GAA CTT GAG GCA TAC ACA GAT GCC ATA CAA AGG              2477
Thr Val Lys Glu Leu Glu Ala Tyr Thr Asp Ala Ile Gln Arg
 60                  65                  70

TATGAACTTC ATCAATTCAC TTATTCCTTG ATAGTGAATG TCGTCGTGAA AAGATTAAGA    2537

CGAATTTCTA CTCATTATAG TTGTGCTCTT TCAAAATGCA TGAATTCACC TTAATTTTGT    2597

CATCCTGCAG A TGG GAT ATC AAC GAA ATT GAT CGG CTT CCT GAT TAC ATG      2647
            Trp Asp Ile Asn Glu Ile Asp Arg Leu Pro Asp Tyr Met
              1               5                  10

AAA ATC AGT TAT AAA GCT ATT CTA GAT CTC TAC AAG GAT TAT GAA AAG      2695
Lys Ile Ser Tyr Lys Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Lys Asp Tyr Glu Lys
     15                  20                  25

GAA TTG TCT AGT GCC GGA AGA TCT CAT ATT GTC TGC CAT GCA ATA GAA      2743
Glu Leu Ser Ser Ala Gly Arg Ser His Ile Val Cys His Ala Ile Glu
 30                  35                  40                  45

AGA G TATGTTCGAG CAACTTAACT ATCGAAATAC ATTTTTTCCT TAATCCATTT        2797
Arg

CTCACTTTGG TTTACCTTGT GTTCGTCTTT TAGTGATTAG AAACTTGATA CAGTTCAATC    2857
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（64）

```
AATATTTTCT AACACTTGAA CACATATATG TTTTGTATTC ACAG ATG AAA GAA GTA      2913
                                                  Met Lys Glu Val
                                                    1

GTA AGA AAT TAT AAT GTC GAG TCA ACA TGG TTT ATT GAA GGA TAT ATG      2961
Val Arg Asn Tyr Asn Val Glu Ser Thr Trp Phe Ile Glu Gly Tyr Met
  5                  10                  15                  20

CCA CCT GTT TCT GAA TAC CTA AGC AAT GCA CTA GCA ACT ACC ACA TAT      3009
Pro Pro Val Ser Glu Tyr Leu Ser Asn Ala Leu Ala Thr Thr Thr Tyr
                 25                  30                  35

TAC TAC CTC GCG ACA ACA TCG TAT TTG GGC ATG AAG TCT GCC ACG GAG      3057
Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Ser Tyr Leu Gly Met Lys Ser Ala Thr Glu
             40                  45                  50

CAA GAT TTT GAG TGG TTG TCA AAG AAT CCA AAA ATT CTT GAA GCT AGT      3105
Gln Asp Phe Glu Trp Leu Ser Lys Asn Pro Lys Ile Leu Glu Ala Ser
         55                  60                  65

GTA ATT ATA TGT CGA GTT ATC GAT GAC ACA GCC ACG TAC GAG G            3148
Val Ile Ile Cys Arg Val Ile Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Glu
     70                  75                  80

TATGATTTGC ATCTCAAGAA ATTATATCAT TATATGGGAT TTGGACAAAC AAAGTGTTGC    3208

GACGACAATT AAGGCAATAT AAAAGCTAAC CTTTAATTTA TCTGCTTTCT AG GTT        3263
                                                            Val
                                                              1

GAG AAA AGC AGG GGA CAA ATT GCA ACT GGA ATT GAG TGC TGC ATG AGA      3311
Glu Lys Ser Arg Gly Gln Ile Ala Thr Gly Ile Glu Cys Cys Met Arg
             5                  10                  15

GAT TAT GGT ATA TCA ACA AAA GAG GCA ATG GCT AAA TTT CAA AAT ATG      3359
Asp Tyr Gly Ile Ser Thr Lys Glu Ala Met Ala Lys Phe Gln Asn Met
         20                  25                  30

GCT GAG ACA GCA TGG AAA GAT ATT AAT GAA GGA CTT CTT AGG CCC ACT      3407
Ala Glu Thr Ala Trp Lys Asp Ile Asn Glu Gly Leu Leu Arg Pro Thr
     35                  40                  45

CCC GTC TCT ACA GAA TTT TTA ACT CCT ATT CTC AAT CTT GCT CGT ATT      3455
Pro Val Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Ile Leu Asn Leu Ala Arg Ile
 50                  55                  60                  65

GTT GAG GTT ACA TAT ATA CAC AAT CTA GAT GGA TAC ACT CAT CCG GAG      3503
Val Glu Val Thr Tyr Ile His Asn Leu Asp Gly Tyr Thr His Pro Glu
                 70                  75                  80

AAA GTC TTA AAA CCT CAC ATT ATT AAC CTA CTT GTG GAC TCC ATC AAA      3551
Lys Val Leu Lys Pro His Ile Ile Asn Leu Leu Val Asp Ser Ile Lys
             85                  90                  95

ATT T GAGCTGCCAT TTGTTGCTCA TCTCAAGGAA ACTTCATTCT TCTTTGTGCA         3605
Ile

GTTGTGCAGT AGACTTCCTA ACTAGGAGCT TCTTAAGATC CTTGTAAGAA ATAATCTTCA    3665

AGTGTTATGA ATCCGCATTG TGGAGAAATC TTTTTATATG ACAATAAGTT ATGTTATGAA    3725

GAATGTTATG GGGGTCTCTT ATGACCTATT TGTCAGTGTA TGAAGTAATC TGAGCCTGTC    3785
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（65）

```
GAAAAAAAAG GTAATCTGAG CCTTTTGCTC GTCCTTCCTT TAGTATTTCT TTTTATCATA   3845

CTTGGTCTCA CAAAAATTAG TTTTTGGCAC CTTTGTTTTT CCTTGTGGCG CATGTGTATA   3905

TACATCTGAA ACATATACTT AAAGGTTAAG AGGACATTGA CATATTGAAT CAACACTAGT   3965

GTTATTGGCA TACAGGAGAG AATCTATGTG TAAAGGACGG GGTGGAACCC CACCCACAAG   4025

ACTTGGTCGA GACTATTGTT TATCGAAAAA ACGGTACAGT TGAATTTATA CGTGGTTTAT   4085

AGACAAGTGA ATTAATTTGA TCCTAAAATA ATAGGCGAAT TAGATAAAAA TGTAATTCTT   4145

AGCCTTGAGT TGGAGACGAA ATAGCAGAAA TAGTGATTCC AGGAGAAAGG CTTTCGGGTA   4205

CCACAACAAT GATATCAAAA AATAAAAAGA TAAAATTGTA TTAAGCTT                4253
```

(2)SEQ ID NO：8 的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：550 個胺基酸

(B)型式：胺基酸

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：蛋白質

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：8：

```
Met Ala Ser Ala Ala Val Ala Asn Tyr Glu Glu Glu Ile Val Arg Pro
 1               5                  10                  15

Val Ala Asp Phe Ser Pro Ser Leu Trp Gly Asp Gln Phe Leu Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ile Asp Asn Gln Val Ala Glu Lys Tyr Ile Tyr Ala Gln Glu Ile
        35                  40                  45

Glu Ala Leu Lys Glu Gln Thr Arg Ser Met Leu Leu Ala Thr Gly Arg
    50                  55                  60

Lys Leu Ala Asp Thr Leu Asn Leu Ile Asp Ile Ile Glu Arg Leu Gly
65                  70                  75                  80

Ile Ser Tyr His Phe Glu Lys Glu Ile Asp Glu Ile Leu Asp Gln Ile
                85                  90                  95

Tyr Asn Gln Asn Ser Asn Cys Asn Asp Leu Cys Thr Ser Ala Leu Gln
            100                 105                 110

Phe Arg Leu Leu Arg Gln His Gly Phe Asn Ile Ser Pro Glu Ile Phe
        115                 120                 125

Ser Lys Phe Gln Asp Glu Asn Gly Lys Phe Lys Glu Ser Leu Ala Ser
    130                 135                 140

Asp Val Leu Gly Leu Leu Asn Leu Tyr Glu Ala Ser His Val Arg Thr
145                 150                 155                 160

His Ala Asp Asp Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ala Phe Ser Thr Ile His
                165                 170                 175
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（66）

```
Leu Glu Ser Ala Ala Pro His Leu Lys Ser Pro Leu Arg Glu Gln Val
            180                 185                 190

Thr His Ala Leu Glu Gln Cys Leu His Lys Gly Val Pro Arg Val Glu
        195                 200                 205

Thr Arg Phe Phe Ile Ser Ser Ile Tyr Asp Lys Glu Gln Ser Lys Asn
    210                 215                 220

Asn Val Leu Leu Arg Phe Ala Lys Leu Asp Phe Asn Leu Leu Gln Met
225                 230                 235                 240

Leu His Lys Gln Glu Leu Ala Gln Val Ser Arg Trp Trp Lys Asp Leu
                245                 250                 255

Asp Phe Val Thr Thr Leu Pro Tyr Ala Arg Asp Arg Val Val Glu Cys
            260                 265                 270

Tyr Phe Trp Ala Leu Gly Val Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Gln Ala
        275                 280                 285

Arg Val Met Leu Val Lys Thr Ile Ser Met Ile Ser Ile Val Asp Asp
    290                 295                 300

Thr Phe Asp Ala Tyr Gly Thr Val Lys Glu Leu Glu Ala Tyr Thr Asp
305                 310                 315                 320

Ala Ile Gln Arg Trp Asp Ile Asn Glu Ile Asp Arg Leu Pro Asp Tyr
                325                 330                 335

Met Lys Ile Ser Tyr Lys Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Lys Asp Tyr Glu
            340                 345                 350

Lys Glu Leu Ser Ser Ala Gly Arg Ser His Ile Val Cys His Ala Ile
        355                 360                 365

Glu Arg Met Lys Glu Val Val Arg Asn Tyr Asn Val Glu Ser Thr Trp
    370                 375                 380

Phe Ile Glu Gly Tyr Met Pro Pro Val Ser Glu Tyr Leu Ser Asn Ala
385                 390                 395                 400

Leu Ala Thr Thr Thr Tyr Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Ser Tyr Leu Gly
                405                 410                 415

Met Lys Ser Ala Thr Glu Gln Asp Phe Glu Trp Leu Ser Lys Asn Pro
            420                 425                 430

Lys Ile Leu Glu Ala Ser Val Ile Ile Cys Arg Val Ile Asp Asp Thr
        435                 440                 445

Ala Thr Tyr Glu Val Glu Lys Ser Arg Gly Gln Ile Ala Thr Gly Ile
    450                 455                 460

Glu Cys Cys Met Arg Asp Tyr Gly Ile Ser Thr Lys Glu Ala Met Ala
465                 470                 475                 480

Lys Phe Gln Asn Met Ala Glu Thr Ala Trp Lys Asp Ile Asn Glu Gly
                485                 490                 495

Leu Leu Arg Pro Thr Pro Val Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Ile Leu
            500                 505                 510
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

```
Asn Leu Ala Arg Ile Val Glu Val Thr Tyr Ile His Asn Leu Asp Gly
        515                 520                 525

Tyr Thr His Pro Glu Lys Val Leu Lys Pro His Ile Ile Asn Leu Leu
    530                 535                 540

Val Asp Ser Ile Lys Ile
545                 550
```

(2)SEQ ID NO：9的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：30個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：單股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：其他核酸

(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."

(iii)假設：無

(iv)反義：無

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：9：

```
CGTTGGATCC CCACCTCATC CGAAATGAAC                                30
```

(2)SEQ ID NO：10的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：30個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：單股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：其他核酸

(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR."

(iii)假設：無

(iv)反義：有

(xi)序列敘述：SEQ ID NO：10：

```
GGCTGAGCTC CTGGACGCAG AGATCAAACC                                30
```

(2)SEQ ID NO：11的資料：

(i)序列特性：

(A)長度：42個鹼基對

(B)型式：核酸

(C)股的形式：單股

(D)局部解剖學：線性

(ii)分子型式：其他核酸

(A)：敘述：/desc="Oligonucleotide primer for PCR (reverse)."

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（68）

(iii)假設：無
(iv)反義：有
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：11：

```
GCCGGATCCT TATGACTAGT TGCACCACCA CGCAGCAAAC TG                          42
```

(2)SEQ ID NO：12的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：593個鹼基對
(B)型式：核酸
(C)股的形式：雙股
(D)局部解剖學：線性
(ii)分子型式：DNA
(iii)假設：無
(iv)反義：無
(vi)起始來源：
(A)生物體：Phytophthora parasitica
(ix)特徵：
(A)名字/關鍵：CDS
(B)位置：207..563
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：12：

```
GTCGACGAAA GCCGAAGTGC GTGGCAGATC TTGCCGTTCG AATGCTACGC GCCACGGCAA      60

AACCTACACG GTACAACAGC TTCAAATAAA CCTGCAAGCG AGCCGCCAGC CCAACTCCAG     120

CTAGTCAAGC CTAGTTTGCC TCCAACTGCC ATTGTGCAAT TTGCTCTCAT CCACACCCAC     180

CCCACTTCTC CCCCACCTCA TCCGAA ATG AAC TTC CGC GCT CTG TTC GCC GCC       233
                              Met Asn Phe Arg Ala Leu Phe Ala Ala
                                          555                 560

ACC GTC GCC GCC CTC GTC GGC TCC ACC TCC GCC ACC ACG TGC ACC ACC       281
Thr Val Ala Ala Leu Val Gly Ser Thr Ser Ala Thr Thr Cys Thr Thr
                565                 570                 575

ACG CAG CAA ACT GCG GCG TAC GTG GCG CTC GTA AGC ATC CTC TCG GAC       329
Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr Val Ala Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp
            580                 585                 590

ACG TCG TTC AAC CAG TGC TCG ACG GAC TCT GGC TAC TCA ATG CTG ACG       377
Thr Ser Phe Asn Gln Cys Ser Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr
        595                 600                 605

GCC ACC TCG TTG CCC ACG ACG GAG CAG TAC AAG CTC ATG TGC GCG TCG       425
Ala Thr Ser Leu Pro Thr Thr Glu Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser
    610                 615                 620

ACG GCG TGC AAG ACG ATG ATC AAC AAG ATC GTG ACG CTG AAC CCG CCC       473
Thr Ala Cys Lys Thr Met Ile Asn Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro
625                 630                 635                 640

GAC TGC GAG TTG ACG GTG CCT ACG AGC GGC CTG GTA CTC AAC GTG TTC       521
Asp Cys Glu Leu Thr Val Pro Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Phe
                645                 650                 655

ACG TAC GCG AAC GGG TTC TCG TCT ACG TGC GCG TCA CTG TAA               563
Thr Tyr Ala Asn Gly Phe Ser Ser Thr Cys Ala Ser Leu
            660                 665

GCGGGTTTGA TCTCTGCGTC CAGAATCGAT                                      593
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69）

(2)SEQ ID NO：13的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：118個胺基酸
(B)型式：胺基酸
(D)局部解剖學：線性
(ii)分子型式：蛋白質
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：13：

```
Met Asn Phe Arg Ala Leu Phe Ala Ala Thr Val Ala Ala Leu Val Gly
 1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Ala Thr Thr Cys Thr Thr Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr
            20                  25                  30

Val Ala Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp Thr Ser Phe Asn Gln Cys Ser
        35                  40                  45

Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr Ala Thr Ser Leu Pro Thr Thr
    50                  55                  60

Glu Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Lys Thr Met Ile
65                  70                  75                  80

Asn Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asp Cys Glu Leu Thr Val Pro
                85                  90                  95

Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Phe Thr Tyr Ala Asn Gly Phe Ser
            100                 105                 110

Ser Thr Cys Ala Ser Leu
        115
```

(2)SEQ ID NO：14的資料：
(i)序列特性：
(A)長度：1368個鹼基對
(B)型式：核酸
(C)股的形式：雙股
(D)局部解剖學：皆有
(ii)分子型式：cDNA
(xi)序列敘述：SEQ ID NO：14：

```
AAGCTTTACG AATTAGATGT AAAAAGACAC AAACTACTTA TATATATTAC CAAAGTAACT      60
TGAAAGTTTA AAATTTCAAT TAGAACTATA GTAGGGTAAA ACTGTCTATT TAAAATCAGT     120
ATTTAAAAAG GCATGAGCGA AAGATGAGGC GTTTTATCTA ACACGAAGCG AGGTGTAAGC     180
CCCATGGTGT TTTATTTTTA TATTTTATAA ATTTATAAAA TCATTATATA AATCAGAAAA     240
ATACACTAAA ATTGTGAAAA GTTAAAGAAA ATTATAGAAT TAATATATAT ATATATATAT     300
ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAA ATGTATGTGT GTGTGTGTGT     360
GTATCGCATG CGCGCGACCA TGCAACTTTT TTTTCTTGAA AAAATAAAAG GCGTAAAGAT     420
ACATTATACC TATGTCATCA AAACAATATA ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT     480
ATATATATAA ATGTATGTGT GTGTGTGTGT GTATCGCATG CGCGCGACCA TGCAACTTTT     540
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（70）

```
TTTTCTTGAA AAAATAAAAG GCGTAAAGAT ACATTATACC TATGTCATCA AAACAATATA     600
AAAACTAGAG CGATACCAAA GGAAATTTTA AATTCAAAAA CTAACTTGAA ATTAATATAT     660
TTAAAATTTC ATTTTTTTTT GTGTGGAGAA AACAAAGCAT AACACTTTGC TTTGTAACAC     720
TTTGCCTAGG TGAATGTCAG GGCTTATGCT CCACGATACT TATGCCCTGC CAGTACACCT     780
CGCAGTGGGA CTCGCTGAAA AAACGTCTTT GTTGTGAGAA ATTGCAATTT TGAACCTCTA     840
CAATTTCGAC AAAACCTTGG TTCGTGAAAA CTGTTTGATT AACTTTTAGA CCATCCAGTC     900
AATTTAACTC TAAACTGACC TAAATAAATA CTACGTACAC TAGTCTTTAA GTTCATCAAA     960
GTGGACTCTG CATTAATAAT TGAAATTTAT GCCGCAACAA TGACATTAGG TTTTATAAAT    1020
AAAGTAATAG GAATTTGATA GTTCCAGGAA ACAACTCTAC AGTACTCCCT TATTTTGTGC    1080
CTTTTTAAAT AATATTATTC AGTTGACGAA ACAAATAAAT AAAATATTTG GGAAACTGGA    1140
TCAATAGACC CCAGACGCCA ACAATGAATC AAAAGGCTGC TAGCTAGTGT AAAGTCTAGT    1200
AAGGCAACTG GGAAATTAAA TGATTAGGTG CTTTTGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC    1260
ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT    1320
AAAACTTAAA AGAACAAGTA AAAATACACT CATCTTTAAT TAGCAATG                 1368
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

修正補充
年 月 日
90. 7. 17

C5
D5

四、中文發明摘要（發明之名稱：植物病原體-可誘發的核苷酸序列以及產生抗病的基因轉殖植物方法）

本發明揭露植物、植物組織與植物細胞中，定性轉錄調節序列功能作為誘發基因表現，以及在植物、植物組織及植物細胞中，定量轉錄調節序列作為增加下游基因信息的轉錄表現。本發明也要揭露了重組 DNA 分子的方法，來改善基因轉殖植物的抗病性，特別是其中一誘發啟動子(promoter)控制一個能夠引起植物過敏性反應的蛋白質。

英文發明摘要（發明之名稱：Plant pathogen-inducible nucleotide sequences and the method of producing disease-resistant transgenic plants.）

Qualitative transcriptional regulatory sequences functional in plants, plant tissue and in plant cells for inducible gene expression and quantitative transcriptional regulatory sequences for increasing the transcriptional expression of downstream genetic information in plants, plant tissue and plant cells are disclosed. Also disclosed are methods and recombinant DNA molecules for improving the disease resistance of transgenic plants, especially wherein an inducible promoter controls the expression of a protein capable of evoking the hypersensitive response in a plant.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

公六告

申請專利範圍

年 月 日 修正 90. 7. 17 補充

1.一重組的核酸分子包括一可誘導的植物抗病性轉錄調節單元，其係由序列編號NO.2的核苷酸463至473，序列編號NO.2的核苷酸406至486，序列編號NO.2的核苷酸463至572，序列編號NO.2的核苷酸371至463，或者序列編號NO.2的核苷酸411至457所組成；

其中，序列編號NO.2之核苷酸序列如下：

```
TAGGTGAATG TCAGGGCTTA TGCTCCACGA TACTTATGCC CTGCCAGTAC ACCTCGCAGT      60
GGGACTCGCT GAAAAAACGT CTTTGTTGTG AGAAATTGCA ATTTTGAACC TCTACAATTT     120
CGACAAAACC TTGGTTCGTG AAAACTGTTT GATTAACTTT TAGACCATCC AGTCAATTTA     180
ACTCTAAACT GACCTAAATA AATACTACGT ACACTAGTCT TTAAGTTCAT CAAAGTGGAC     240
TCTGCATTAA TAATTGAAAT TTATGCCGCA ACAATGACAT TAGGTTTTAT AAATAAAGTA     300
ATAGGAATTT GATAGTTCCA GGAAACAACT CTACAGTACT CCCTTATTTT GTGCCTTTTT     360
AAATAATATT ATTCAGTTGA CGAAACAAAT AAATAAAATA TTTGGGAAAC TGGATCAATA     420
GACCCCAGAC GCCAACAATG AATCAAAAGG CTGCTAGCTA GTGTAAAGTC TAGTAAGGCA     480
ACTGGGAAAT TAAATGATTA GGTGCTTTTG ATCAATTACA TTAACTAGTC TCTCACCACT     540
ATATATACTT GTCCCTTCTC TTCCATTTAA GTAGAGTTCC TTTCTTTCTT CCTTAAAACT     600
TAAAAGAACA AGTAAAAATA CACTCATCTT TAATTAGCAA TG                        642
```

;

其中該核酸分子可誘導植物組織內之基因表現，以感應誘導子、化合物或植物病原體，以及該核酸分子可操作性地與一異源多胜肽密碼之核苷酸編碼序列連接。

2.如申請專利範圍第1項之核酸分子，其中該植物病原體為一黴菌病原體。

3.如申請專利範圍第2項之核酸分子，其中該植物病原體為馬鈴薯疫病菌屬(*Phytophthora*)屬之一員。

4.如申請專利範圍第1項之核酸分子，其中該植物病原體為一細菌病原體。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

5.如申請專利範圍第 4 項之核酸分子，其中該細菌病原體為假單孢菌屬(*Pseudomonas*)屬之一員。

6.如申請專利範圍第 1 項之核酸分子，其中該植物病原體為一病毒病原體。

7.如申請專利範圍第 1 項之核酸分子，其中該誘導子為黴菌誘導子。

8.如申請專利範圍第 1 項之核酸分子，其中該誘導子為細菌誘導子。

9.如申請專利範圍第 1 項之核酸分子，其中該異源多胜肽能夠給予植物抗病性。

10.如申請專利範圍第 9 項之核酸分子，其中該異源多胜肽為一抽出物(elicitin)，其中該抽出物為一黴菌抽出物或一細菌抽出物。

11.如申請專利範圍第 10 項之核酸分子，該黴菌抽出物是由馬鈴薯疫病菌屬來的。

12.如申請專利範圍第 11 項之核酸分子，該抽出物包含一 parA1 多胜肽。

13.如申請專利範圍第 10 項之核酸分子，其中該細菌抽出物為 harpin。

14.一種嵌合基因，包括一可被病原體誘導的轉錄調節單元以及一與該可誘導的轉錄調節單元連接的非天然的編碼續序列，該編碼序列可在該可誘導的轉錄調節單元調節控制下被表現；其中該可被病原體誘導的轉錄調節單元係由序列編號 NO.2 的核苷酸 463 至 473，序列編號 NO.2

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

的核苷酸 406 至 486，序列編號 NO.2 的核苷酸 463 至 572，序列編號 NO.2 的核苷酸 371 至 463，或者序列編號 NO.2 的核苷酸 411 至 457 所組成；以及

其中，序列編號 NO.2 之核苷酸序列如下：

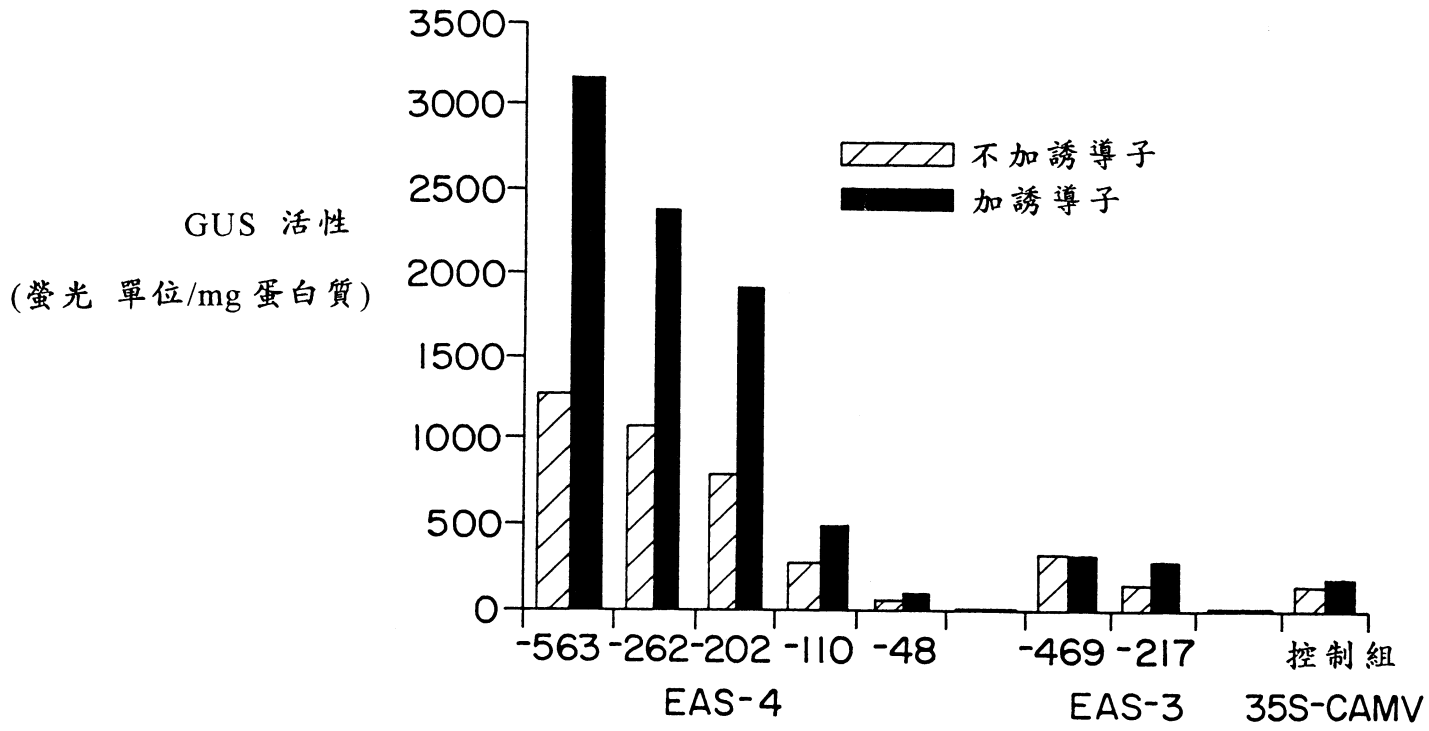
```
TAGGTGAATG TCAGGGCTTA TGCTCCACGA TACTTATGCC CTGCCAGTAC ACCTCGCAGT     60
GGGACTCGCT GAAAAAACGT CTTTGTTGTG AGAAATTGCA ATTTTGAACC TCTACAATTT    120
CGACAAAACC TTGGTTCGTG AAAACTGTTT GATTAACTTT TAGACCATCC AGTCAATTTA    180
ACTCTAAACT GACCTAAATA AATACTACGT ACACTAGTCT TTAAGTTCAT CAAAGTGGAC    240
TCTGCATTAA TAATTGAAAT TTATGCCGCA ACAATGACAT TAGGTTTTAT AAATAAAGTA    300
ATAGGAATTT GATAGTTCCA GGAAACAACT CTACAGTACT CCCTTATTTT GTGCCTTTTT    360
AAATAATATT ATTCAGTTGA CGAAACAAAT AAATAAAATA TTTGGGAAAC TGGATCAATA    420
GACCCCAGAC GCCAACAATG AATCAAAAGG CTGCTAGCTA GTGTAAAGTC TAGTAAGGCA    480
ACTGGGAAAT TAAATGATTA GGTGCTTTTG ATCAATTACA TTAACTAGTC TCTCACCACT    540
ATATATACTT GTCCCTTCTC TTCCATTTAA GTAGAGTTCC TTTCTTTCTT CCTTAAAACT    600
TAAAAGAACA AGTAAAAATA CACTCATCTT TAATTAGCAA TG                       642
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

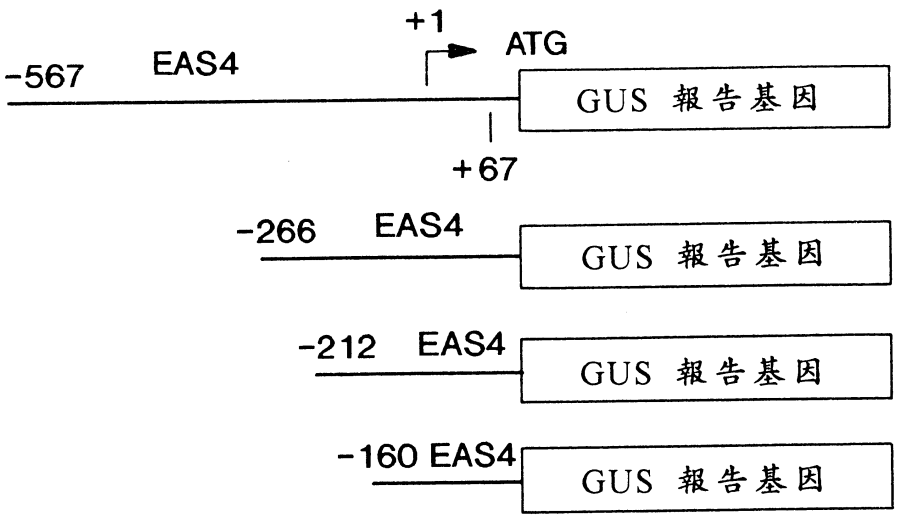
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4 規格（210 × 297 公釐）


GUS 活性
(螢光 單位/mg 蛋白質)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
不加誘導子
加誘導子
-563
-262
-202
-110
-48
-469
-217
控制組
EAS-4
EAS-3
35S-CAMV

第 1 圖

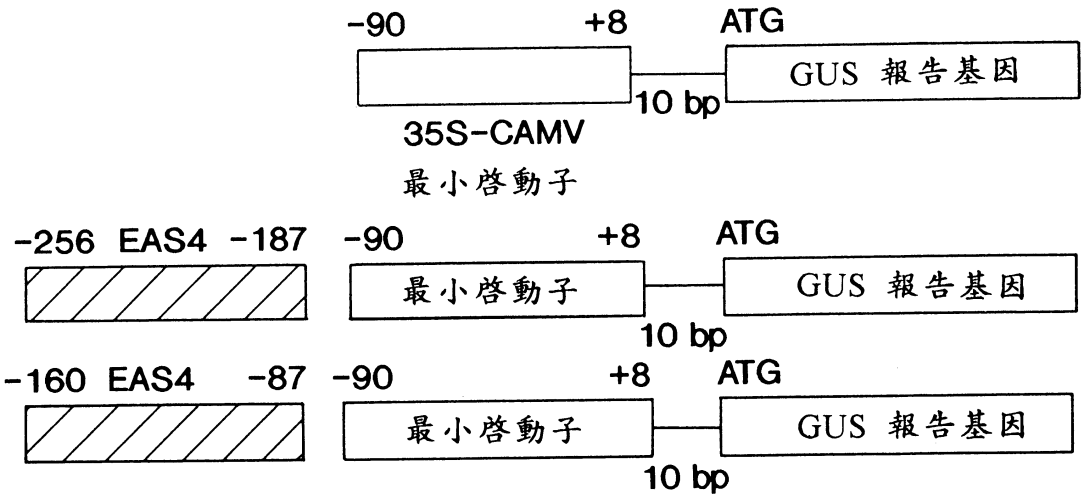
475945



	GUS 表現量	
	控制組	誘導組
GUS 活性 (螢光 單位/mg 蛋白質)		
	234	1803
	不確定	不確定
	65	492
	23	256

第2A圖

475945



	GUS 表現量	
	控制組	誘導組
GUS 活性 (螢光 單位/mg 蛋白質)		
	14	14
	10	14
	12	527

第2B圖

475945

(A) EAS4 啓動子的 DNA 序列

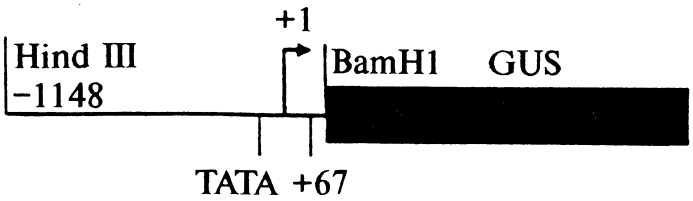
-1148

AAGCTTTACGAATTAGATGTAAAAAGACACAAACTACTTATATATATTAC
CAAAGTAACTTGAAAGTTTAAAATTTCAATTAGAACTATAGTAGGGTAAA
ACTGTCTATTTAAAATCAGTATTTAAAAAGGCATGAGCGAAAGATGAGGC
GTTTTATCTAACACGAAGCGAGGTGTAAGCCCCATGGTGTTTTATTTTTA
TATTTTATAAATTTATAAAATCATTATATAAATCAGAAAAATACACTAAA
ATTGTGAAAAGTTAAAGAAAATTATAGAATTAATATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAAATGTATGTGT
GTGTGTGTGTGTATCGCATGCGCGCGACCATGCAACTTTTTTTTCTTGAA
AAAATAAAAGGCGTAAAGATACATTATACCTATGTCATCAAAACAATATA
AAAACTAGAGCGATACCAAAGGAAATTTTAAATTCAAAAACTAACTTGAA
ATTAATATATTTAAAATTTCATTTTTTTTTGTGTGGAGAAAACAAAGCAT
AACACTTTGCTTTGTAACACTTTGCCTAGGTGAATGTCAGGGCTTATGCT
CCACGATACTTATGCCCTGCCAGTACACCTCGCAGTGGGACTCGCTGAAA
AAACGTCTTTGTTGTGAGAAATTGCAATTTTGAACCTCTACAATTTCGAC
AAAACCTTGGTTCGTGAAAACTGTTTGATTAACTTTTAGACCATCCAGTC
AATTTAACTCTAAACTGACCTAAATAAATACTACGTACACTAGTCTTTAA
GTTCATCAAAGTGGACTCTGCATTAATAATTGAAATTTATGCCGCAACAA
TGACATTAGGTTTTATAAATAAAGTAATAGGAATTTGATAGTTCCAGGAA
ACAACTCTACAGTACTCCCTTATTTTGTGCCTTTTTAAATAATATTATTC
AGTTGACGAAACAAATAAATAAAATATTTGGGAAACTGGATCAATAGACC
CCAGACGCCAACAATGAATCAAAAGGCTGCTAGCTAGTGTAAAGTCTAGT
AAGGCAACTGGGAAATTAAATGATTAGGTGCTTTTGATCAATTACATTAA
CTAGTCTCTCACCACTATATATACTTGTCCCTTCTCTTCCATTTAAGTA^{+1}G
AGTTCCTTTCTTTCTTCCTTAAAACTTAAAAGAACAAGTAAAAATACACT
CATCTTTAATTAGCA

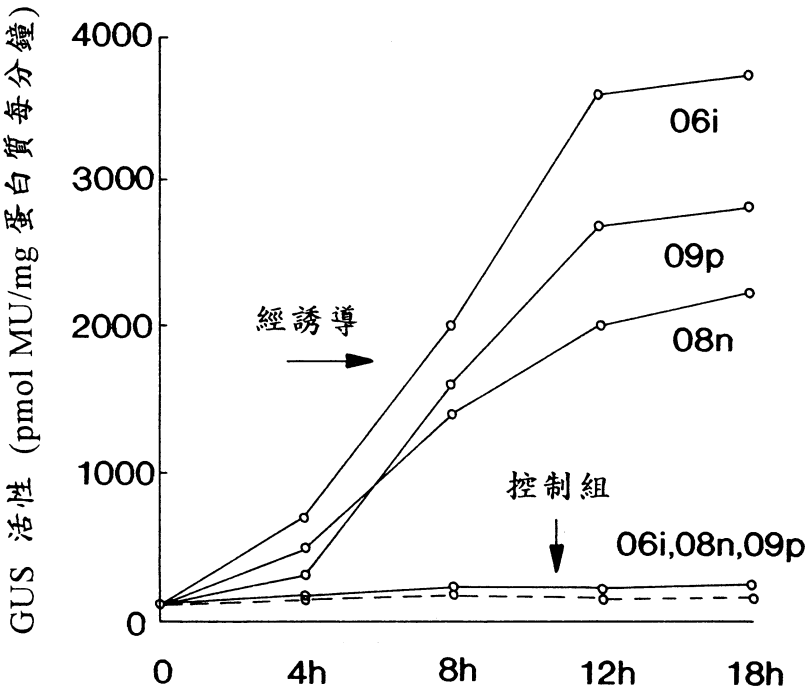
+67

第3A圖

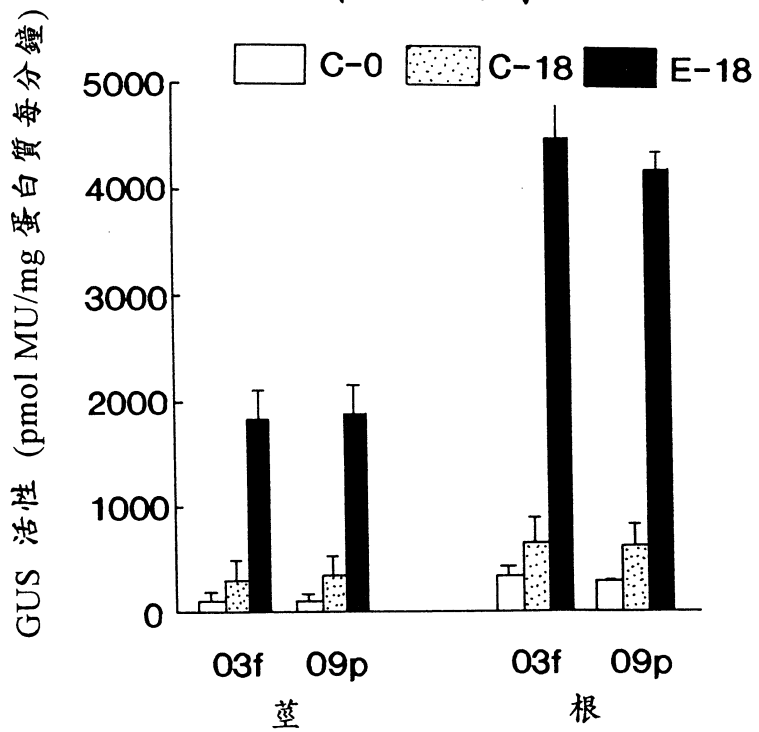
(B) EAS 啓動子－ GUS 基因融合



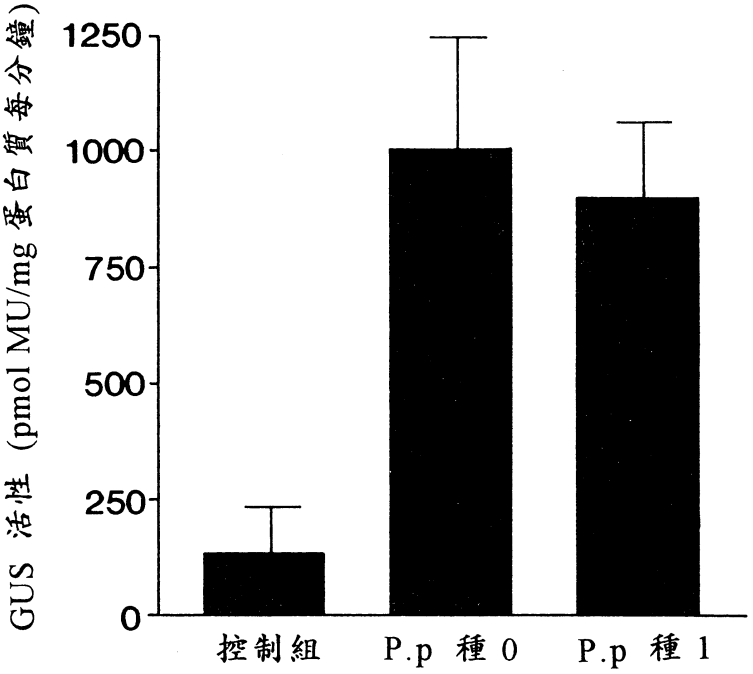
第3B圖


GUS 活性 (pmol MU/mg 蛋白質每分鐘)
4000
3000
2000
1000
0
0
4h
8h
12h
18h
06i
09p
08n
經誘導
控制組
06i,08n,09p

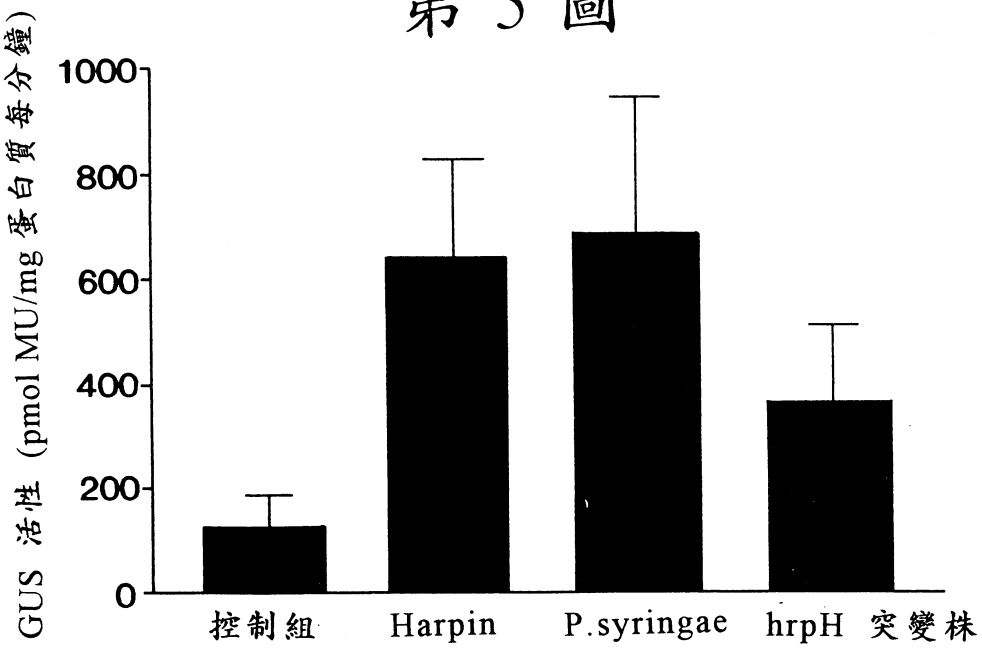
第4A圖


GUS 活性 (pmol MU/mg 蛋白質每分鐘)
C-0
C-18
E-18
5000
4000
3000
2000
1000
0
03f
09p
03f
09p
莖
根

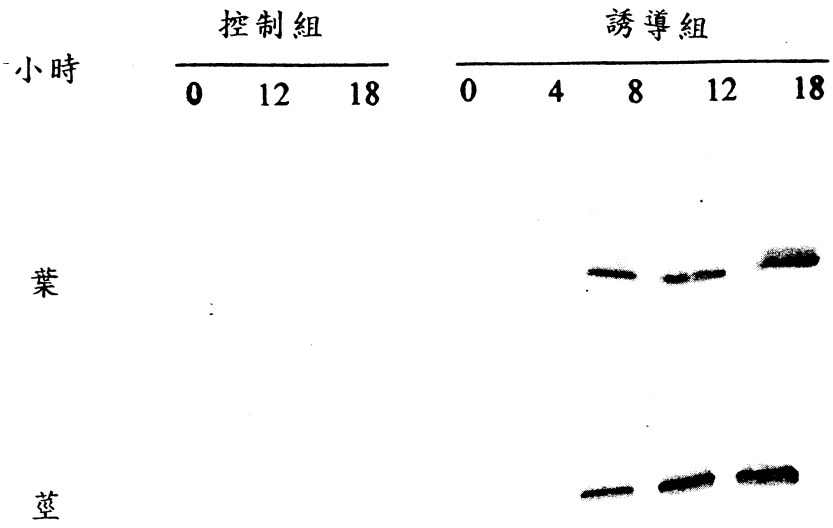
第4B圖


GUS 活性 (pmol MU/mg 蛋白質每分鐘)
1250
1000
750
500
250
0
控制組
P.p 種 0
P.p 種 1

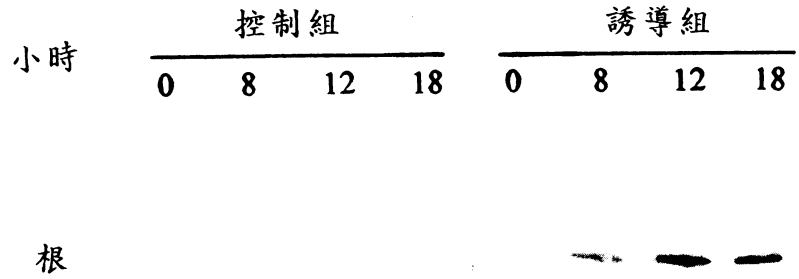
第 5 圖


GUS 活性 (pmol MU/mg 蛋白質每分鐘)
1000
800
600
400
200
0
控制組
Harpin
P.syringae
hrpH 突變株

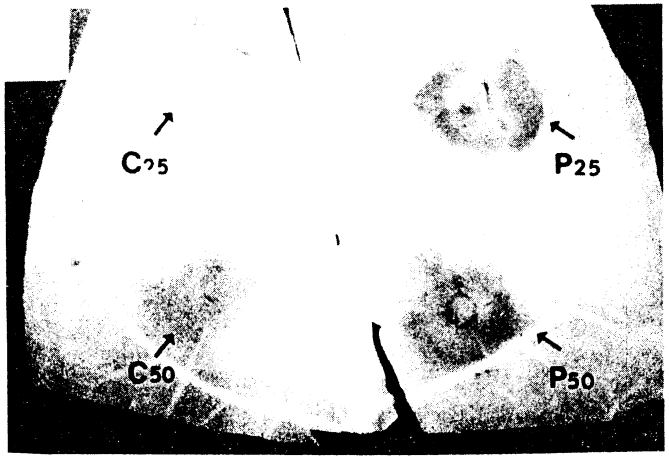
第 6 圖



第7A圖



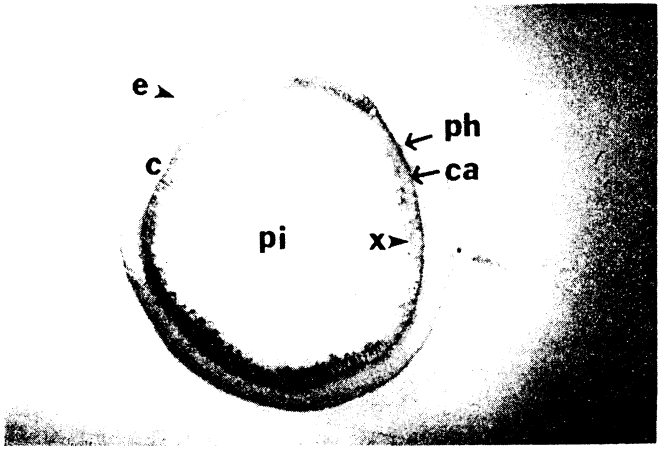
第7B圖



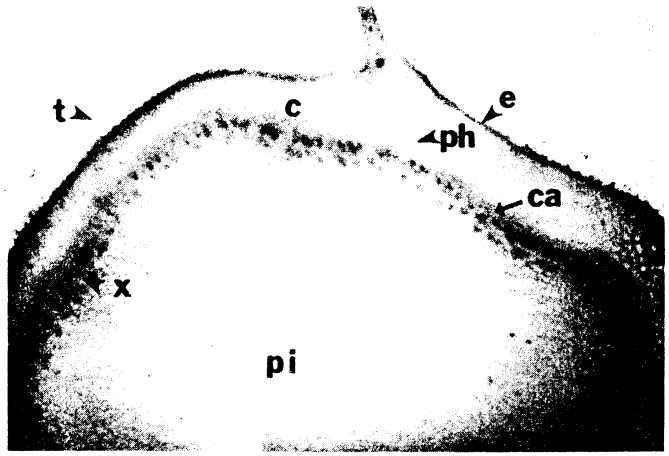
第8A圖



第8B圖

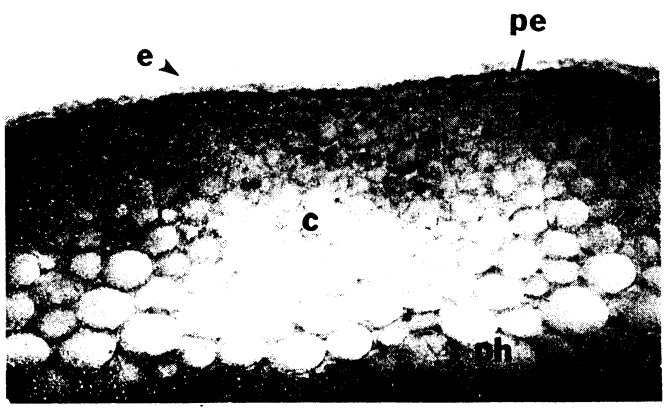


第8C圖

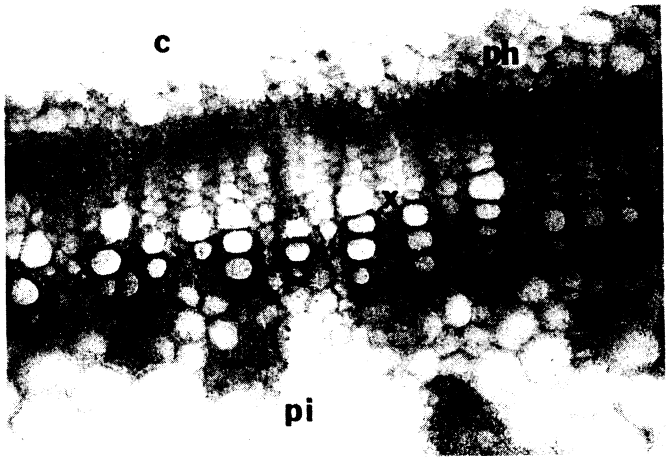


第8D圖

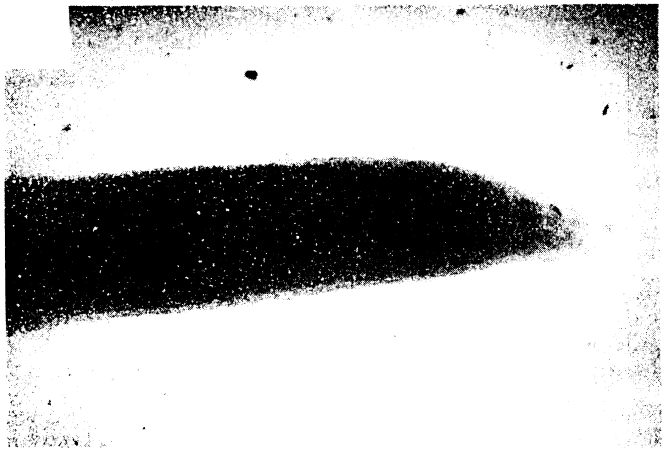
475945



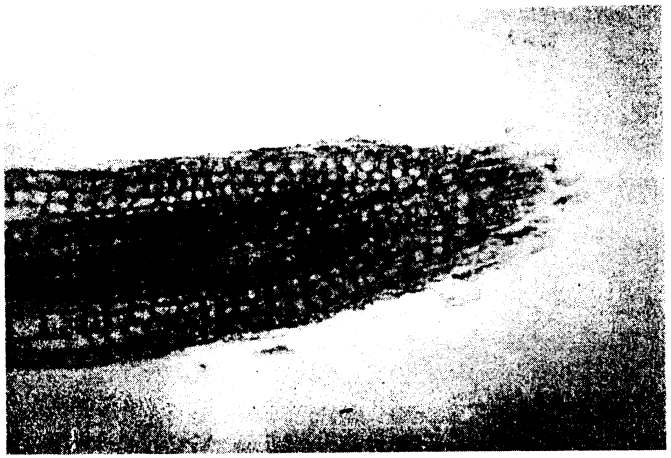
第8E圖



第8F圖

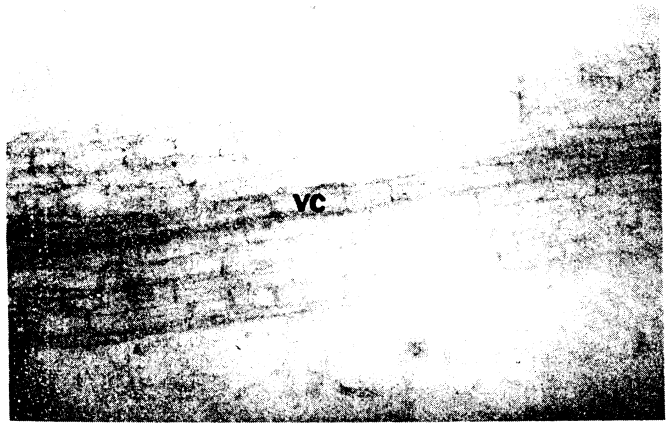


第8G圖



第8H圖

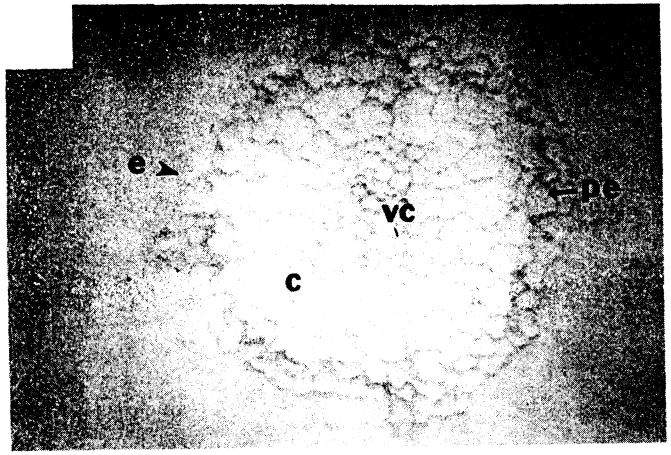
475945



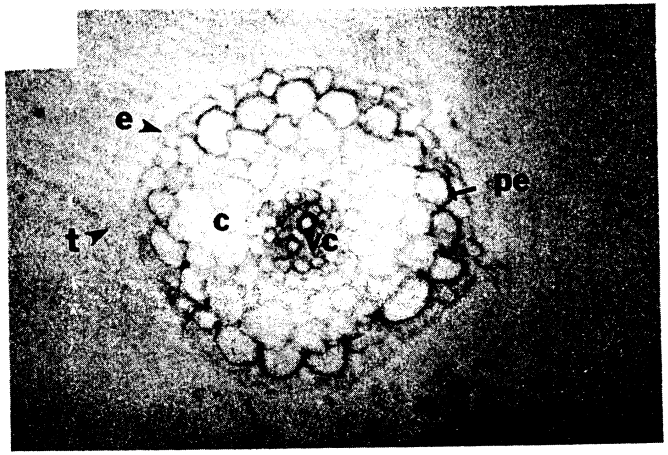
第8I圖



第8J圖

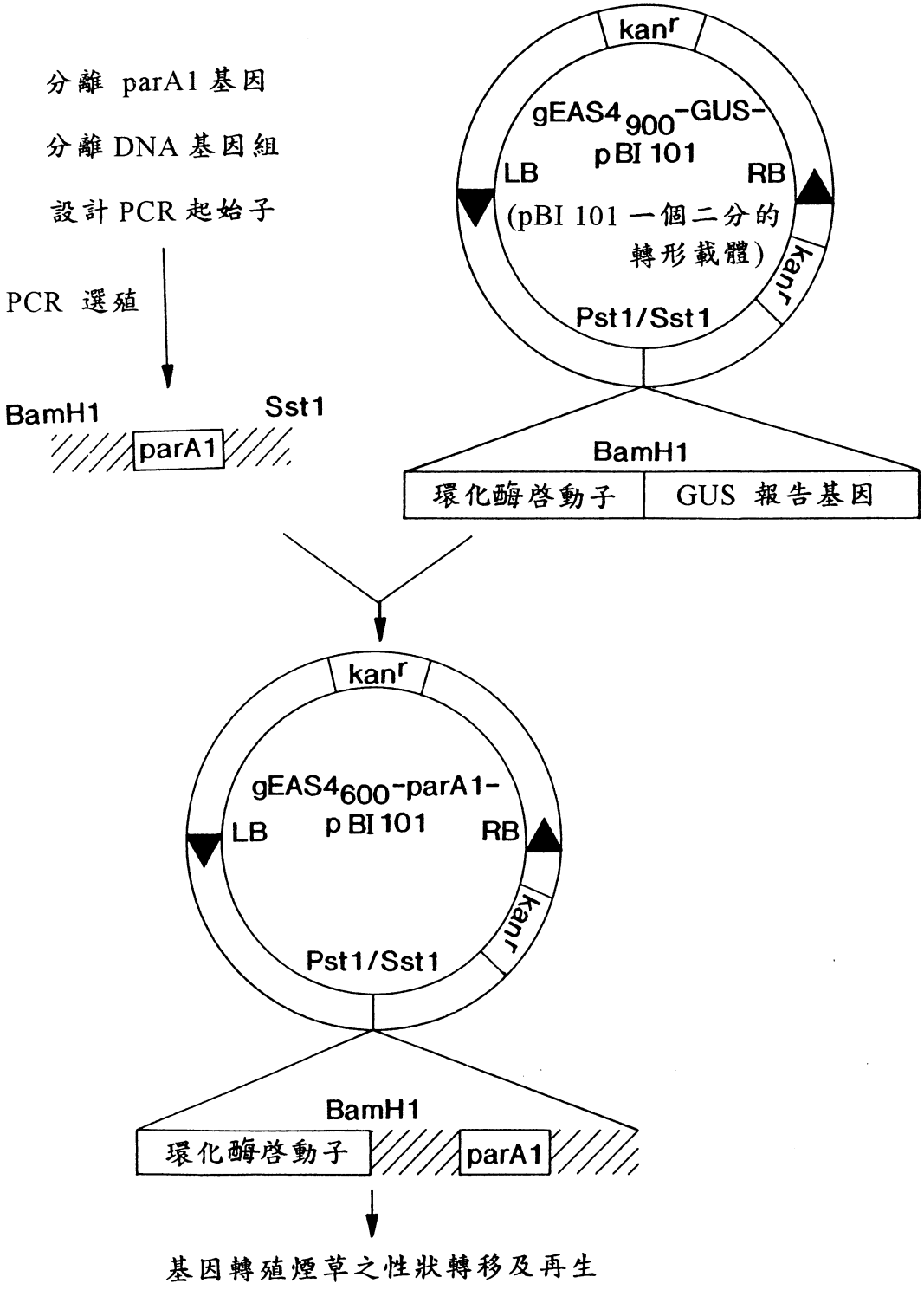


第8K圖

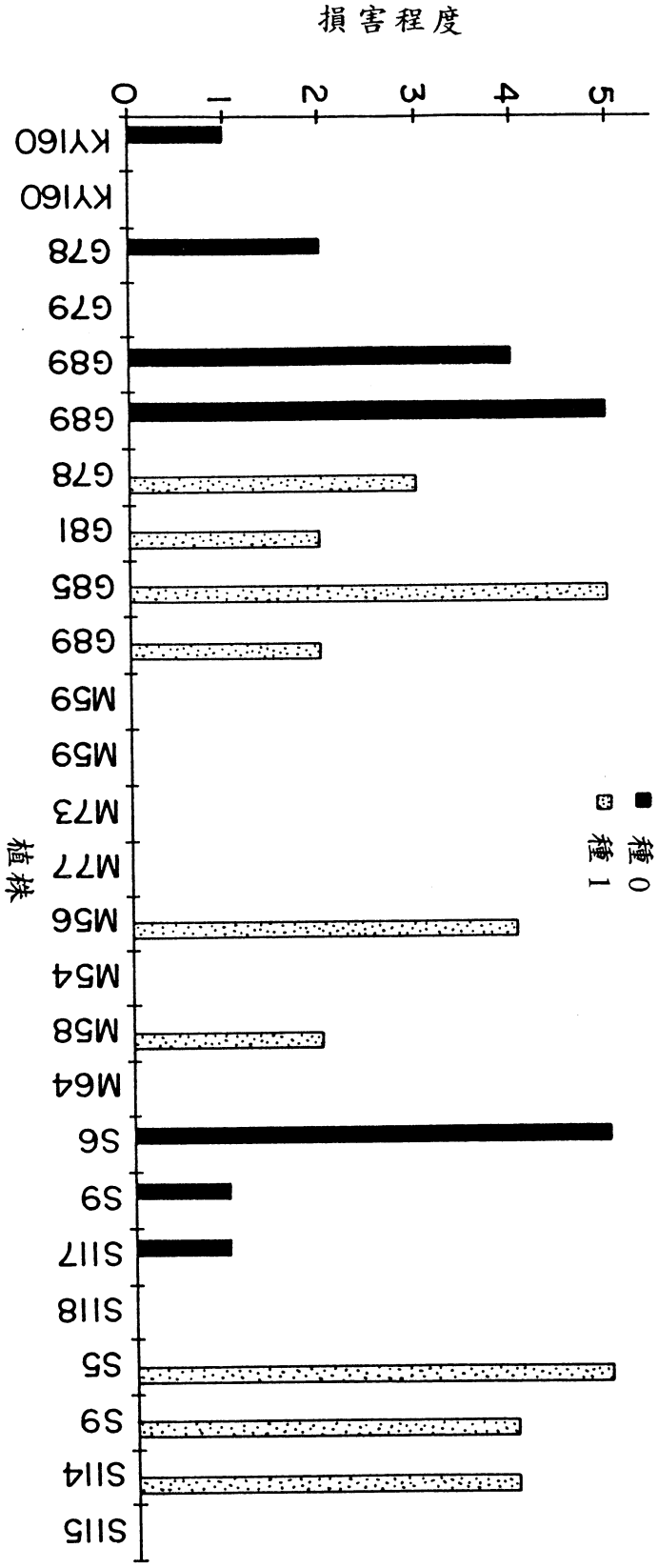


第8L圖

475945


分離 parA1 基因
分離 DNA 基因組
設計 PCR 起始子
PCR 選殖
BamH1
Sst1
parA1
kanr
gEAS4 900-GUS-
pBI 101
LB
RB
(pBI 101 一個二分的
轉形載體)
kanr
Pst1/Sst1
BamH1
環化酶啓動子
GUS 報告基因
kanr
gEAS4600-parA1-
pBI 101
LB
RB
kanr
Pst1/Sst1
BamH1
環化酶啓動子
parA1
基因轉殖煙草之性狀轉移及再生

第 9 圖


損害程度
0
1
2
3
4
5
KY160
KY160
G78
G79
G89
G89
G78
G81
G85
G89
M59
M59
M73
M77
M56
M54
M58
M64
S6
S9
S117
S118
S5
S9
S114
S115
植株
種 0
種 1

第 10 圖