



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102146396 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201010616044. 9

A01H 4/00(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 30

A01H 5/00(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/19(2006. 01)

CCTCC No :P201017 2010. 11. 12

C12R 1/01(2006. 01)

(73) 专利权人 深圳华大基因科技有限公司

(56) 对比文件

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山路
146 号北山工业区综合楼 11F-3

CN 1494594 A, 2004. 05. 05,

WO 2007075925 A, 2007. 07. 05,

CN 1063506 A, 1992. 08. 12,

(72) 发明人 张耕耘 孙红正 李宁 倪雪梅

审查员 刘树柏

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 罗瑶

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 19 页

序列表 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

启动子 BgIosP552、制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种启动子 BgIosP552、制备方法及应用。所述启动子含有选自以下任意一组并具有启动子功能的核苷酸序列 ;a、Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列 ;b、与 Seq ID No. 1 互补的核苷酸序列 ;c、在高等严紧条件下能够与上述 a 或 b 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列 ;d、对上述 a 或 b 所示核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列 ;e、与上述 a 或 b 所示核苷酸序列具有至少 90% 同一性的核苷酸序列。

本发明启动子能够在单子叶和双子叶植物中调控基因表达, 从而为研究植物中目的基因的表达提供了一种新的工具和选择。

1. 一种启动子,所述启动子为选自以下任意一组并具有启动子功能的核苷酸序列:
 - a、Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列;
 - b、与 Seq ID No. 1 互补的核苷酸序列。
2. 一种核酸构建体,包含权利要求 1 所述的启动子,与启动子可操作连接的基因序列,其中所述启动子与所述基因序列来源相同或者不同。
3. 一种载体,其特征在于:所述载体含有权利要求 1 所述的启动子或权利要求 2 所述的核酸构建体。
4. 根据权利要求 3 所述的载体,其特征在于:所述载体为权利要求 1 所述的启动子或权利要求 2 所述的核酸构建体与 pMD18-T 或 p8 质粒经重组得到的重组载体。
5. 一种重组细胞,其特征在于:所述细胞含有权利要求 1 所述的启动子或权利要求 2 所述的核酸构建体或权利要求 3 或 4 所述的载体,所述重组细胞为重组大肠杆菌细胞或重组农杆菌细胞。
6. 一组引物对,所述引物对用于扩增得到权利要求 1 所述的启动子,其特征在于:所述引物对的两条引物分别为 Seq ID No :2 和 Seq ID No :3 所示的序列。
7. 一组引物对,所述引物对用于扩增得到权利要求 1 所述的启动子,其特征在于:所述引物对的两条引物是在 Seq ID No :2 和 Seq ID No :3 的 5' 端还分别连接有限制性酶切位点和 / 或保护碱基的引物对。
8. 根据权利要求 7 所述的一组引物对,其特征在于:所述引物对的两条引物分别为 Seq ID No :4 和 Seq ID No :5 所示的序列。
9. 制备 SEQ ID NO :1 所示的启动子的方法,包括
以水稻日本晴基因组 DNA 为模板,使用一对扩增引物进行扩增,所述扩增引物根据 SEQ ID NO :1 在水稻日本晴基因组 DNA 中的序列分别针对首尾进行设计。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述扩增引物为权利要求 6-8 任一所述的引物对。
11. 一种调控植物中基因表达的方法,所述方法包括,将权利要求 1 所述的启动子或权利要求 2 的核酸构建体或权利要求 3 或 4 的载体或权利要求 5 的重组细胞导入植物,所述重组细胞为重组农杆菌细胞。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于:所述植物为单子叶植物或双子叶植物。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于:所述植物为稻属或烟草属。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于:所述植物为水稻或烟草。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于:所述植物为水稻日本晴或烟草 NC89。
16. 根据权利要求 11 ~ 15 任意一项所述的方法,其特征在于:所述导入植物是指导入植物愈伤组织。
17. 一种制备转基因植物的方法,包括在有效产生植物的条件下培养权利要求 5 的重组细胞或植物愈伤组织或植物外植体或植物,所述植物愈伤组织或植物外植体或植物含有权利要求 1 的启动子或权利要求 2 的核酸构建体或权利要求 3 或 4 的载体或权利要求 5 的重组细胞,所述重组细胞为重组农杆菌细胞。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其特征在于:所述植物为单子叶植物或双子叶植物。
19. 根据权利要求 18 所述的方法,其特征在于:所述植物为稻属或烟草属。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其特征在于:所述植物为水稻或烟草。
21. 根据权利要求 20 所述的方法,其特征在于:所述植物为水稻日本晴或烟草 NC89。
22. 权利要求 1 所述的启动子或权利要求 2 的核酸构建体或者权利要求 3 或 4 的载体或权利要求 5 的重组细胞或植物愈伤组织或植物外植体或植物在调控植物中目的基因表达或植物育种中的用途,其中,所述植物愈伤组织或植物外植体或植物含有权利要求 1 的启动子或者权利要求 2 的核酸构建体或者权利要求 3 或 4 的载体或者权利要求 5 的重组细胞,所述重组细胞为重组农杆菌细胞。
23. 根据权利要求 22 所述的用途,其特征在于:所述植物是单子叶植物或双子叶植物。
24. 根据权利要求 23 所述的用途,其他特征在于:植物为稻属或烟草属。
25. 根据权利要求 24 所述的用途,其特征在于:植物为水稻或烟草。
26. 根据权利要求 25 所述的用途,其特征在于:植物为水稻日本晴或烟草 NC89。

启动子 BgIosP552、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,特别是涉及一种启动子 BgIosP552,含有该启动子的核酸构建体、载体、重组细胞、植物愈伤组织,该启动子的制备方法以及利用该启动子来调控植物中基因表达的方法。

背景技术

[0002] 启动子是基因的一个组成部分,通常位于结构基因 5' 端上游,是 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列。启动子能够指导全酶 (holoenzyme) 同模板正确结合,活化 RNA 聚合酶,启动基因转录,从而控制基因表达 (转录) 的起始时间和表达的程度。在转基因植物中,启动子是影响转基因表达效率的重要因素之一,选择高效率的启动子是高效率表达外源基因的关键。

[0003] 根据启动子的转录模式可将其分为 3 类:组成型启动子、组织或器官特异性启动子和诱导型启动子。所谓组成型启动子是指在组成型启动子调控下,不同组织器官和发育阶段的基因表达没有明显差异,因而称之为组成型启动子。双子叶植物中最常使用的组成型启动子是花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子。另一种高效的组成型启动子 CsVMV 是从木薯叶脉花叶病毒 (cassava vein mosaic virus) 中分离的。

[0004] 人们高度重视从植物本身克隆组成型启动子。例如肌动蛋白 (actin) 和泛素 (ubiquitin) 等基因的启动子已被克隆。用这些启动子代替 CaMV 35S 启动子,可以更有效地在单子叶植物中驱动外源基因的转录。Naomi 等分别从拟南芥的色氨酸合酶 β 亚基基因和植物光敏色素基因中克隆了相应启动子,用其代替 CaMV 35S 启动子,在转基因烟草中也取得了很好的表达效果 (Plant biotechnology, 2002, 19(1):19-26)。

[0005] 单子叶植物基因中常见的启动子有:Ubi 启动子 (Plant ubiquitin promoter)、Actin 启动子 (Plant Actin promoter) 和 Adh-1 启动子 (Maize alcohol dehydrogenase promoter)。

[0006] Ubi 启动子以其启动效率高、甲基化程度低、遗传性状稳定等因素而倍受青睐。目前,已经从很多泛素基因中分离得到启动子序列,包括玉米基因组中的 Ubi-1 启动子、水稻泛素 RUBQ2 启动子、拟南芥泛素启动子、向日葵泛素 UbB1 启动子、烟草泛素 Ubi. U4 启动子、马铃薯泛素 Ubi7 启动子、番茄泛素 Ubi1-1 启动子,大麦泛素 Mub1 启动子。玉米泛素 Ubi-1 启动子已经广泛地应用于玉米、小麦、水稻等单子叶植物中,水稻泛素 RUBQ2 启动子在水稻和甘蔗中也有较多的应用。

[0007] Actin 启动子 1990 年由康奈尔大学的 McElroy 等首次在水稻中发现,属于强组成型启动子。Actin 启动子在单子叶禾本科中作用显著,但是邻近科属的植物中的基因调控功能却十分不理想。因此,许多相关研究通过其他单子叶植物寻找 Actin 启动子,并成功在香蕉、甜瓜、玉米和拟南芥中陆续发现。Actin 启动子由于对基因表达的强调控作用,在单子叶植物优良性状的转基因中已经得到越来越广泛的应用。

[0008] Adh-1 启动子调控乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase) 基因,对植物在缺氧环

境下乙醇脱氢酶的表达至关重要。Adh-1 启动子对单子叶植物特别是谷类植物如水稻、燕麦和大麦,和少部分双子叶植物如烟草,基因的调控功能比花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子提高 10-50 倍。Adh-1 启动子主要应用于单子叶植物,对绝大部分双子叶植物基因表达的调控效果都很有有限。

[0009] 单子叶植物是被子植物的主要类群,单子叶植物中的禾本科、百合科、棕榈科和天南星等,是非常重要的农业作物。单子叶植物基因的强效启动子,能够调控植物高效率表达具有特殊性状的外源基因,对优良作物的分子育种研究意义重大。

[0010] 在强效启动子相关研究领域,发现并验证了许多单子叶植物的启动子。此外,双子叶植物中的一些强效启动子如 CsVMV 启动子、番茄 E8 启动子、白藜芦醇合酶基因 Vst1 启动子等高效启动子,在单子叶植物中也有很强的基因调控作用。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种新的启动子,能够在植物中调控基因的表达。

[0012] 本发明的另一目的在于提供含有上述启动子的核酸构建体、载体、重组细胞、植物愈伤组织、植物外植体及植物。

[0013] 本发明的再一目的在于提供一种制备上述启动子的引物、方法,以及一种利用该启动子来调控植物中基因表达的方法。

[0014] 本发明的再一目的在于提供一种制备转基因植物的方法,以及上述启动子在调控植物中目的基因表达或植物育种中的用途。

[0015] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0016] 本发明公开了一种启动子,所述启动子含有选自以下任意一组并具有启动子功能的核苷酸序列:

[0017] a、Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列;

[0018] b、与 Seq ID No. 1 互补的核苷酸序列;

[0019] c、在高等严紧条件下能够与上述 a 或 b 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0020] d、对上述 a 或 b 所示核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列;

[0021] e、与上述 a 或 b 所示核苷酸序列具有至少 90% 同一性的核苷酸序列。

[0022] 本发明还公开了一种核酸构建体,包含上述启动子,以及与启动子可操作连接的基因序列,其中所述启动子与所述基因序列来源相同或者不同。

[0023] 本发明还公开了一种载体,所述载体含有上述启动子或上述核酸构建体,优选的,所述载体为上述启动子与 pMD18-T 或 p8 质粒经重组得到的重组载体。

[0024] 本发明进一步公开了一种重组细胞,所述细胞含有上述启动子、上述核酸构建体或上述载体,优选的,所述重组细胞为重组大肠杆菌细胞或重组农杆菌细胞。

[0025] 本发明进一步公开了含有上述启动子、核酸构建体、载体或重组细胞的植物愈伤组织、植物外植体或植物,优选的,所述植物为单子叶植物或双子叶植物,再优选的,所述植物为稻属或烟草属,更优选的,所述植物为水稻或烟草,进一步优选的,所述植物为水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare) 或烟草 NC89。

[0026] 本发明进一步公开了一组引物对,用于扩增得到上述启动子,所述引物对的两条

引物分别含有 Seq ID No :2 和 Seq ID No :3 所示的序列,优选的,所述引物对的两条引物在 5' 端还分别连接有限制性酶切位点和 / 或保护碱基,更优选的,所述引物对的两条引物分别具有 Seq ID No :4 和 Seq ID No :5 所示的序列。

[0027] 本发明还公开了制备 SEQ ID No :1 所示启动子的方法,包括:以水稻日本晴基因组 DNA 为模板,使用一对扩增引物进行扩增,所述扩增引物根据 SEQ ID NO :1 在水稻日本晴 gDNA 中的序列分别针对首尾进行设计,优选是上述的引物对。

[0028] 本发明进一步公开了一种调控植物中基因表达的方法,所述方法包括,将上述启动子、核酸构建体、载体或重组细胞导入植物细胞。优选导入植物愈伤组织。进一步优选的,启动子或核酸构建体导入植物细胞是利用农杆菌转化植物愈伤组织,所述植物优选为单子叶植物或双子叶植物,所述植物再优选为稻属或烟草属,所述植物更优选为水稻或烟草,所述植物进一步优选为水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare) 或烟草 NC89。本发明还公开了一种制备转基因植物的方法,包括在有效产生植物的条件下培养上述的重组细胞或植物愈伤组织或植物外植体或植物。

[0029] 本发明还公开了上述启动子、核酸构建体、载体、重组细胞或植物愈伤组织或植物外植体或植物在调控植物中目的基因表达或植物育种中的用途,优选植物是单子叶植物或双子叶植物,再优选的植物为稻属或烟草属,更优选植物为水稻或烟草,进一步优选植物为水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare) 或烟草 NC89。

[0030] 由于采用了以上技术方案,使本发明具备的有益效果在于:

[0031] 本发明提供的新的启动子能够在植物中调控基因表达,并且,在单子叶植物如水稻和双子叶植物如模式植物 - 烟草的根和叶中均具有启动子功能,能够调控外源基因的表达,从而为研究植物(包括单子叶植物和双子叶植物)中目的基因的表达提供了一种新的工具和选择。

[0032] 保藏信息

[0033] 培养物名称:烟草 NC89 种子

[0034] 保藏日期:2010 年 11 月 12 日

[0035] 保藏单位:湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心,即中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)

[0036] 保藏编号:CCTCC No :P201017

附图说明

[0037] 图 1 为用于构建 p8 质粒的 pCAMBIA-1301 质粒示意图。

[0038] 图 2 为 p8 质粒示意图。

[0039] 图 3 为经转化的水稻愈伤组织的 GUS 染色结果。其中,由带有本发明所述启动子 P552 序列的重组根癌农杆菌 p8+P552 转化的水稻愈伤组织(右)经 GUS 染色后呈现蓝色;不带有本发明启动子序列的重组根癌农杆菌 p8 质粒的水稻愈伤组织(对照,左)经 GUS 染色后颜色未发生变化。

[0040] 图 4 和图 5 分别为经转化的水稻苗根和叶的 GUS 染色结果。经含有启动子的 p8+P552 重组载体的重组根癌农杆菌介导转化的水稻苗的根(图 4 右)和叶(图 5 右)经染色后呈现蓝色,经不含有启动子的 p8 质粒重组根癌农杆菌介导转化的水稻苗的根(作为

对照,图 4 左)和叶(图 5 左)经 GUS 染色后颜色未发生变化。

[0041] 图 6 和图 7 分别为经转化的烟草苗根和叶的 GUS 染色结果(三倍光学显微镜下拍照)。经含有启动子的 p8+P552 重组载体的重组根癌农杆菌介导转化的烟草苗的根(图 6 右)和叶(图 7 右)经染色后呈现蓝色,经不含有启动子的 p8 质粒重组根癌农杆菌介导转化的烟草苗的根(作为对照,图 6 左)和叶(图 7 左)经 GUS 染色后颜色未发生变化。

具体实施方式

[0042] 本发明涉及一种能够在植物中调控基因表达的启动子序列,本发明的启动子含有选自以下任意一组并具有启动子功能的核苷酸序列:

[0043] a、序列表中 Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列;

[0044] b、与 Seq ID No. 1 互补的核苷酸序列;

[0045] c、在高等严紧条件下能够与上述 a 或 b 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0046] d、对上述 a 或 b 所示核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列;

[0047] e、与上述 a 或 b 所示核苷酸序列具有至少 90% 同一性的核苷酸序列。

[0048] 在本发明一个具体的实施方式中,本发明的启动子优选具有 Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列,并在本发明中被称为启动子 BgIosP552,或者简称为 P552 启动子。

[0049] 在本发明中,典型地,“杂交条件”根据测量杂交时所用条件的“严紧性”程度来分类。严紧性程度可以以例如核酸结合复合物或探针的解链温度(T_m)为依据。例如,“最大严紧性”典型地发生在约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ (低于探针 $T_m 5^\circ\text{C}$);“高等严紧性”发生在 T_m 以下约 $5-10^\circ\text{C}$;“中等严紧性”发生在探针 T_m 以下约 $10-20^\circ\text{C}$;“低严紧性”发生在 T_m 以下约 $20-25^\circ\text{C}$ 。作为替代,或者进一步地,杂交条件可以以杂交的盐或离子强度条件和 / 或一或多次的严紧性洗涤为依据。例如, $6\times\text{SSC}$ = 极低严紧性; $3\times\text{SSC}$ = 低至中等严紧性; $1\times\text{SSC}$ = 中等严紧性; $0.5\times\text{SSC}$ = 高等严紧性。从功能上说,可以采用最大严紧性条件确定与杂交探针严紧同一或近严紧同一的核酸序列;或采用高等严紧性条件确定与该探针有约 80% 或更多序列同一性的核酸序列。

[0050] 对于要求高选择性的应用,典型地期望采用相对严紧的条件来形成杂交体,例如选择相对低的盐和 / 或高温条件。Sambrook 等 (Sambrook, J. 等 (1989) 分子克隆,实验室手册, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.) 提供了包括中等严紧性和高等严紧性在内的杂交条件。

[0051] 为了便于说明,用于检测本发明的杂交的合适的中等严紧条件包括:用 $5\times\text{SSC}$ 、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0) 溶液预洗;在 $50-65^\circ\text{C}$ 下在 $5\times\text{SSC}$ 中杂交过夜;随后用含 0.1% SDS 的 $2\times$ 、 $0.5\times$ 和 $0.2\times\text{SSC}$ 在 65°C 下各洗涤两次 20 分钟。本领域技术人员应当理解,能容易地操作杂交严紧性,如改变杂交溶液的含盐量和 / 或杂交温度。例如,合适的高等严紧杂交条件包括上述条件,不同之处在于杂交温度升高到例如 $60-65^\circ\text{C}$ 或 $65-70^\circ\text{C}$ 。

[0052] 在本发明中,所述在高等严紧条件下与 Seq ID No. 1 所示或与其互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,其具有与 Seq ID No. 1 所示核苷酸序列相同或相似的启动子活性。

[0053] 在本发明中,所述对 Seq ID No. 1 或与其互补的核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列,是指分别或同时在所述核苷酸序列的 5' 端和 / 或 3'

端,和 / 或序列内部进行例如不超过 2-45 个,或者不超过 3-20 个,或者不超过 3-20 个,或者不超过 4-15 个,或者不超过 5-10 个,或者不超过 6-8 个的分别用逐个连续整数表示的碱基的取代、缺失、添加修饰。

[0054] 在本发明中,所述对 Seq ID No. 1 或与其互补的核苷酸序列进行如上述一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列,具有与 Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列相同或相似的启动子活性。

[0055] 通过一种多核苷酸进行说明,其所具有的核苷酸序列例如与 Seq ID No. 1 的参考核苷酸序列至少 90% “同一性”是指:在 Seq ID No. 1 的参考核苷酸序列之每 100 个核苷酸中,该多核苷酸的核苷酸序列除了含有多达 10 个核苷酸的不同外,该多核苷酸之核苷酸序列与参考序列相同。换句话说,为了获得核苷酸序列与参考核苷酸序列至少 90% 相同的多核苷酸,参考序列中多达 10% 的核苷酸可以被删除或被另一核苷酸替代;或可将一些核苷酸插入参考序列中,其中插入的核苷酸可多达参考序列之总核苷酸的 10%;或在一些核苷酸中,存在删除、插入和替换的组合,其中所述核苷酸多达参考序列之总核苷酸的 10%。参考序列的这些突变可发生在参考核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置,或在这些末端位置之间的任意地方,它们或单独散在于参考序列的核苷酸中,或以一个或多个相邻的组存在于参考序列中。

[0056] 在本发明中,用于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法是例如 BLAST 和 BLAST2.0 算法,它们分别描述在 Altschul 等 (1977) Nucl. Acid. Res. 25 :3389-3402 和 Altschul 等 (1990) J. Mol. Bio. 215 :403-410。采用例如文献中所述或默认参数, BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的核苷酸序列同一性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

[0057] 在本发明中,所述与 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列具有至少 90% 的序列同一性的核苷酸序列包括与 SEQ ID NO :1 所公开序列基本同一的多核苷酸序列,例如当采用本文所述方法(例如采用标准参数的 BLAST 分析)时,与本发明多核苷酸序列相比含有至少 90% 序列同一性、优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高的序列同一性的那些序列。在本发明中,所述与 SEQ ID No. 1 或其互补的核苷酸序列具有至少 90% 的序列同一性的核苷酸序列具有与 Seq ID No. 1 所示的核苷酸序列相同或相似的启动子活性。

[0058] 本发明还涉及一种核酸构建体,包括基因以及与该基因可操作地连接的上述启动子。在本发明中,“可操作地连接”是指两个或多个核苷酸区域或核酸序列的功能性的空间排列。在本发明的核酸构建体中,例如,启动子被置于所述基因的核酸序列的特定位置,例如启动子位于所述基因核酸序列的上游位置,使得核酸序列的转录受到该启动子区域的引导,从而,启动子区域被“可操作地连接”到该基因的核酸序列上。所述基因一般是需要提高转录水平的任何核酸序列,或者,可设计本发明所述启动子和基因以便下调特定核酸序列。也就是通过将启动子与反义方向的基因相连来实现。在本发明一个具体的实施方式中,所述基因优选为 GUS 基因。

[0059] 本发明还涉及一种含有上述启动子或上述核酸构建体的载体。本发明的载体可以是通过将上述启动子或上述核酸构建体插入到克隆载体或表达载体而得到的重组载体。适于构建本发明所述重组载体的克隆载体包括但不限于,例如 :pUC18、pUC19、pUC118、

pUC119、pMD19-T、pMD20-T、pMD18-T Simple Vector、pMD19-T Simple Vector 等。适于构建本发明所述重组载体的表达载体包括但不限于,例如:pMI121、p13W4、pGEM 等。在本发明具体的实施方式中,本发明含有所述启动子的载体为上述启动子与 pMD18-T 或 p8 质粒经重组得到的重组载体,优选的,本发明的重组载体为 pMD18-T+P552 重组载体或者 p8+P552 重组载体。

[0060] 本发明的又一方面,还涉及含有本发明所述启动子的重组细胞。本发明的重组细胞可以通过将上述含有本发明启动子的重组载体转化宿主细胞而得到。适于构建本发明所述重组细胞的宿主细胞包括但不限于,例如:大肠杆菌细胞 DH5 α ,根癌农杆菌细胞 LBA4404、EHA105、GV3101 等。在本发明一个具体的实施方式中,所述重组细胞为重组根癌农杆菌 EHA105-P552。

[0061] 本发明的再一方面,还涉及一种植物愈伤组织或植物外植体或植物,所述愈伤组织、植物外植体或植物含有有本发明的上述启动子。本发明的植物愈伤组织可以是单子叶植物愈伤组织例如水稻愈伤组织,或者双子叶植物愈伤组织例如烟草愈伤组织。

[0062] 本发明的再一方面,还涉及用于 PCR 扩增得到本发明所述启动子的一组引物对,该组引物对含有序列中 Seq ID No. 2 及 Seq No. 3 所示的序列。为了便于操作,通常优选在引物的 5' 端含设计连接有限制性酶切位点和 / 或保护碱基,在本发明具体的实施方式中,所述引物对的两条引物分别具有 Seq ID No :4 和 Seq ID No :5 所示的序列。

[0063] 采用上述引物,以水稻日本晴 (*Oryza sativa*L. ssp. japonica cv. Nipponbare) 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,能够制备得到本发明的启动子。

[0064] 本发明进一步公开了一种调控植物中基因表达的方法,所述方法包括,将上述启动子导入植物细胞。优选的是通过将同时含有外源基因以及本发明启动子的核酸构建体导入植物细胞来达到调控基因表达的目的。所述核酸构建体中,外源基因与本发明的启动子可操作地连接。在本发明优选的实施方式中,可以利用含有目的外源基因与本发明启动子的重组载体转化农杆菌,再将得到的重组农杆菌转化植物愈伤组织,从而实现将所述外源基因与本发明启动子一起导入植物细胞的目的。在本发明一个具体的实施方式中,外源基因优选为 GUS 基因。本发明的植物可以是单子叶植物,例如水稻、小麦、玉米、小米、甘蔗、高粱、大麦等,也可以是双子叶植物,例如烟草,大豆,马铃薯、蚕豆、萝卜、花生等。

[0065] 烟草是典型的基因工程模式植物。故本发明选择烟草进行转基因研究,以研究本发明的启动子在双子叶植物中的效果。实验结果表明,该启动子能在转基因烟草中起作用。

[0066] 在本发明中,可采用植物基因转化技术将目的基因及所述启动子插入到植物基因组中,包括农杆菌介导转化、病毒介导转化、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电穿孔等。本领域周知,农杆菌介导的基因转化常被用于单子叶植物和双子叶植物的基因转化,但其它转化技术也可用于本发明启动子及外源基因的导入。当然,适于本发明的启动子及外源基因导入的另一种方法是粒子轰击(显微金或钨粒子包覆转化的 DNA) 胚性愈伤组织或胚胎开发。另外,还可以采用的转化植物细胞的方法是原生质体转化。基因转化后,采用通用的方法来筛选和再生整合有表达单元的植株。

[0067] 为实现上述调控基因表达的目的,本发明所述启动子可以以单拷贝和 / 或多拷贝的形式应用,可以与现有技术中已知的启动子联用。

[0068] 本发明的启动子以及调控植物中基因表达的方法,可以应用于植物品种的选育。

比如,可以用于水稻或烟草的育种。所述水稻可以为日本晴、中花 9、中花 10、中花 11、台北 309、丹江 8 号、云稻 2 号、汕优 63、汕优 608、丰优 22、黔优 88、II 优 416、II 优 107、II 优 128、II 优 718、淮两优 527、川农 1 号、杂 0152、皖稻 88、皖稻 90、皖稻 92、皖稻 94、皖稻 96、皖稻 185、皖稻 187、皖稻 189、皖稻 191、皖稻 193、皖稻 195、皖稻 197、皖稻 199、皖稻 201、皖稻 203、皖稻 205、皖稻 207,以及津原 101 等。在本发明一个具体的实施方式中,所述水稻为日本晴。所述的烟草可以为 K326、K346、K394、NC82、NC89、G140、G28、G80、中烟 90、Coker176,以及 CV87 等。在本发明另一个具体的实施方式中,所述烟草为烟草 NC89。

[0069] 本发明的启动子可成为一种新的启动子,作为植物(包括单子叶植物和双子叶植物,尤其是水稻和烟草)转基因的工具启动子,为开展低表达基因转化苗筛选、植物花器官败育等分子育种研究提供便利,从而极大地缩短优良品种的选育时间。本发明的启动子可广泛用于培育水稻、烟草、小麦、玉米、小米、甘蔗、高粱、大麦、大豆,马铃薯、蚕豆、萝卜、花生等。

[0070] 在本发明中,术语“单子叶植物”,具体地,可以为禾本科植物,更具体地,可以为稻属植物例如水稻,包括但不限于日本晴、中花 9、中花 10、中花 11、台北 309、丹江 8 号、云稻 2 号、汕优 63、汕优 608、丰优 22、黔优 88、II 优 416、II 优 107、II 优 128、II 优 718、淮两优 527、川农 1 号、杂 0152、皖稻 88、皖稻 90、皖稻 92、皖稻 94、皖稻 96、皖稻 185、皖稻 187、皖稻 189、皖稻 191、皖稻 193、皖稻 195、皖稻 197、皖稻 199、皖稻 201、皖稻 203、皖稻 205、皖稻 207,以及津原 101 等。

[0071] 在本发明中,术语“双子叶植物”,具体地,可以为茄科植物,更具体地,可以为烟草属植物(烟草),包括但不限于烟草 K326、K346、K394、NC82、NC89、G140、G28、G80、中烟 90、Coker176,以及 CV87 等。

[0072] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。但本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0073] 实施例 1 :P552 启动子片段的 PCR 扩增和 pMD18-T+P552 重组载体的构建 PCR 扩增

[0074] 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒,目录号 :DP320-02)提取水稻日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare)(已在申请号为 200910238992.0、发明名称为“一种启动子 BgIosP587、其制备方法及其用途”的发明申请中保藏,并于 2010 年 9 月 22 日公开,保藏编号为 CCTCC NO :P200910)的基因组 DNA,根据该启动子在水稻日本晴 gDNA 中的序列,分别在首尾设计一对 PCR 特异性扩增引物(上游引物 F1,加限制性酶切位点 EcoRI 和保护碱基,下游引物 R1,加限制性酶切位点 SbfI 和保护碱基)。以上述提取的水稻日本晴的 gDNA 为模板,使用高保真 Ex Taq(TaKaRa, DRR100B)聚合酶进行 PCR 扩增。如表 1 所示。

[0075] 表 1 基因启动子扩增的 PCR 体系

组 成	体 积 (μ l)
基因组 DNA	0.2
dNTPs (2.5 mM)	2
[0076] 10 \times Ex Buffer (含镁离子)	2.5
引物 F1 (50 μ M)	1
引物 R1 (50 μ M)	1
Ex taq	0.2
ddH ₂ O	补满至总体积 25 μ l

[0077] PCR 扩增程序为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 55 $^{\circ}$ C 退火 50s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 进行 35 个反应循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

[0078] 其中, 上游引物 F1 (SEQ ID NO :4) :GGAATTC AAAGATTGGGGCTGGCAGGAC, 其中下划线代表 EcoR1 酶切位点, 方框内为 SEQ ID No :2。

[0079] 下游引物 R1 (SEQ ID NO :5) :TGCCTGCAGG CAATCAATCAATCCCCAACTC, 其中下划线代表 SbfI 酶切位点, 方框内为 SEQ ID No :3。

[0080] PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 得到大小为 3095bp 左右的条带, 使用 TIANGEN 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (目录号 :DP209-03) 进行纯化回收。

[0081] pMD18-T+P552 重组载体的构建

[0082] 将如上述得到的 PCR 扩增产物进行 T/A 克隆 (pMD18-T 质粒, TaKaRa, D103A), 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆测序, 证明准确。

[0083] 其中, T/A 克隆的连接条件如下 :

[0084] T/A 连接体系 : 10 μ l

[0085] pMD18-T 1 μ l

[0086] 2*solution I 5 μ l

[0087] PCR 扩增产物 (回收插入片段) 10ng ~ 20ng, 根据其浓度定

[0088] ddH₂O 补齐至 10 μ l

[0089] 于 16 $^{\circ}$ C 在节能型智能恒温槽 (宁波新芝, SDC-6) 中连接 8h 以上, 得到 pMD18-T+P552 重组载体。将经过上述连接后的产物按照如下方法转化大肠杆菌 :

[0090] 从超低温冰箱中取出按照《分子克隆实验指南》(第三版, 科学出版社) 所示氯化钙法制备的感受态细胞 100 μ l DH5 α (中国科学院昆明动物研究所董杨提供 ; 或者可从例如 : 上海生工购得), 冰上融化后, 加入 10 μ l 如上所得的连接产物, 即 pMD18-T+P552 重组载体, 轻轻搅匀, 冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 60s, 冰浴 5min, 加入 600 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的 SOC 培养基 (具体配方详见《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社), 37 $^{\circ}$ C 220rpm 复苏 45min, 8000rpm 离心 30s, 去上清, 留取 150 μ l, 用剩下的 150 μ l 上清重悬沉淀后的混合物, 轻轻吹匀, 玻璃珠涂布 LB (卡那霉素) 平板 (具体配方详见《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社), 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16h ~ 24h。获得含有 pMD18-T+P552 克隆载体的重组大肠杆菌, 命名为 DH5 α -P552。深圳华大基因科技有限公司对 pMD18-T+P552 克隆载体中的 P552 进行测

序。

[0091] 测序结果表明,获得的 pMD18-T+P552 克隆载体中 P552 启动子序列正确。P552 启动子的序列如序列表中 Seq ID No :1 所示。

[0092] AAAGATTGGGGCTGGCAGGACTTTCAAAAAAAAAATGAAAAAGAAAAGCCTTGACAACAATAAGATTTGACTTTTTTTTAGCAAAATACTCTCTTCGGTTCGTAAAAAAATTAATCGAAGTCACCTGTGCTAGGTTTATTTTTTATGGGACATATGGTTTGGTAACTTGAGGGAAGACGATTTGACGAGAGAATTGACGGTGAGATTAACATGAGAATTAAATTATTTTTTAAGTTTCAATCTCTTGTGTTGGTAGAGGTGGTAGAAAAACAATAAGGAGTTTAGTTTAGGCAAAATAAGGAGGACAATTACCACCCCTTATCTATGTGTTAGAAAAATTTCCATTTCCATCCCACCGAAATTCATGTCTCCTAACCAATCCCAACCAAAACAGAATAAGTAATAGTCTAATCCCTCTAAACCCAACCCCTCCTAAAACCTTTACCCAACCAAAACGGATCCAGAGGGAATAGACAATGAGGGAGAGTCGACATGATAGTTGTTTGCACCTTATAGGGGGGTTTAGAGGAAAGGAAGCCACACGTTCTTTCTGGCTACTTCATTGGATTATTAGTACAATATATTGGCTCCCATCGGATGGCCTAA TCAGCCAAAGAAAAAGCCAAATTTTAAATTTTCAAGCTTAATTTTGAGATTGATTTTGAAATATTTTCAACATAGTTCTTTTTTCAACATTGGCTTTTAAAGTCACCAAGAACATATTTATAAAAAGTTTACCTACAAATTTATTTTTATTTCTAATAAGCCGTTTTGGCTTATTAGGAAAAAAGCCAAACGATGGGGACCATTGTTTTCTCCACGTCTCTAAAAATATGTATTCTTAAAAGAACTTTTTGTACCAAAACCATGTGCTGTAAAATTATTTGATTTATCAAGTAATTATTTTAATAATAATTTGCTGAATAAAAAACTGTTTCAAACCGGGGCATATGAGTCATGGAAGAGCCTATTCTTTTTAAGTAGATTAAGG GCCTGTTTAGTTTCGCAAAATGAAAAATTTTGAGTGTACATCAGATGTTTGATCGGATGTCGGAAGGTGTTTATGGGAGAATAGCTAATTTAGTCCCTAAAGTTTCTTTGTAGAAA TCAGTTTAGTCACTAACCTTTTAAATAGTCTAAAGAAA TCCTTAAACTTTGTACATAAGGTCTAGAATAACTTGGGTCCACCAAAATTCATATGGATATACCATGTCCATCATTCATGCAAAATCTATGATGAAATGTCCAATTTACCCTTGCGTATATCATAGAAAAATAAATAAAGGTTGAATTAGACATAACCATAGGAAAAAATACATCTCTTTTTTTTCAACCTTTTGAGGTATATTTTTTGCTCTTACATTTTTTCTTTTTGT TTTTTGTTTTTCTATGATATATGTAAGGGTAAATTTGGACAAATCATATATATTTTTGCATAGTAAGGTGACATGGCATATCTATGTGGTGATTTTGGTGGGACCAAGGACTATATCAGCCCACATGACAAATTTAAAGGACTTGTGGGACAATA TGAAAGATTAAGGACTAAAAATGACCTAGGAGCGAACTTTAGGGACCATATTGGCTATTCTCCCTTTTTGACACGAA TGAAAAATCCAATTTCAATACTTGTCTGGAAACCGGAGACGAATCTTTTGAGCCTAATTAATCCGTCATTAGCACA TGCGAATTACTGTAGCACTTATGGTTAATTATGGACTAATTAAGCTCAAAGATTTCGTCTTGCATTTCCCTTTTTAA CTGTGTAATTAGTTTTTCTTTTACTCTATATTTAATGCTCCATGCATATGTCTAAAGATTTGATTTAATGTTTTTTCGAAAAACTTTTTGGAGGACTAACCGGGCCTAACGTGACTTGAAGAGCTGTGACAGCGCAAAATCGTGAAACGCGGATGG ACCTAGCATTATGGTGATGTAGGAAGTGCCTTGCTGGCAGTGGCAGGTACCGTGCAAGTGAATACCATAGATCCGT TGGCTTATCTGATTACATGATGATGATTACTCCCTCCGTTTCAAAAATAAAGTCATTTTAGCATTTTTTACATTTA TATTGATGTTATGTCTAGATTCATTAACATCAATATGAAATGTTGGGAAATGCTAGAATGACTTACATTGTGAAACGGA TCATTAACATCAATATGAATGTGGAAAAATGCTAGAATGACTTACACTGTGAAACGGAGGGAGTATACGATTATGTAA TGAAAAAAGGAGTACAATACTAGTCGCGTCTCCCGCAAAAAAAGTACTAGTTGTCGTCAAGTAGGGGAGTAATAA TAATAATAATAAAGGGATAATATACAGGCTGTGTTTAGTTTCGTGTGCCAAATTTTTTTAAAGTATACGGACAAAT ATTTAAATATTTAAACATAGACTAATAACAAAACAAATTTACAGATTCATCTGTAAACTGCGAGACGAATCTATTTAA CCTAATTAATTCGTTATTAGCAAAATGTTTACTGTAGCACCCACATTATCAAAATCATGGCGTAATTAGCTCAAAGATT CGTCTCGGATTTACATGCAAAACCATGCAATTTGATTTTTTTTTTTCATCTACGTTTAGTTCTATGCATGTGTCCAAATA TTCGATGTGATGAAAAAATTTGAAAAATTCGAGGAAAAAATTTAAATCTAAACACGGCCACAGTATAAAAAAATAGT AGCGTTGTTGTTTATGAAAGAGGATGGTAAAGTAAGACAAGACAAGCAAGGGCCTAAAAAAGTGGAGACGAAGAAG

AAGACGGAATATATTGCATTGGAAAAGTGAGCGCTTGGACGAGAGAAAACTCGGATTCAAGCGTCCATATCAGTGG
 ACACCACCAATGGGAGGTGGCCACGTGGGCAGGTCCCGGGTGGAAATCTGGCGCGTTCACACGGGAGGTTCCGAAATT
 ACGGCAACGCCACTGGAGTGCAGGCGCAGGATGTGAGATCCACGGCGGGGGCTCCGCTACTAGAACTTCTTCTG
 GTCGTGGGTGGTACGCACCCTCGCGCTCGCCTTTATATTACTAGTAAGAAGATCTCATCCCTCCTTGGTGAGGTGA
 GGTGAGTTGGGGATTGATTGATTG(上述整段序列为 SEQ ID NO :1)

[0093] 实施例 2 :载体 -p8+P552 重组载体的构建

[0094] 按照 TIANGEN 普通质粒小提试剂盒(目录号 :DP103-03)的操作手册,从实施例 1 构建的转化有启动子 P552 的大肠杆菌 DH5 α -P552 中提取带有本发明 P552 启动子序列的克隆载体 pMD18-T+P552 ;纯化后用相应的限制性内切酶 EcoR1 和 SbfI 进行酶切,回收相应的启动子插入片段,并分别与 p8 质粒用相同的限制性内切酶酶切后回收的载体大片段进行连接。

[0095] 将所得连接产物 p8+P552 重组载体转化按照《分子克隆实验指南》(第三版,科学出版社)所示氯化钙法制备的感受态细胞 DH5 α ,37°C 倒置培养 16 ~ 24h,待转化子长出菌落后,挑取单克隆进行 PCR 检测和酶切鉴定。

[0096] p8 质粒构建

[0097] 本发明中所使用的 p8 质粒是由 pCAMBIA-1301 质粒(中国科学院昆明动物研究所董杨提供 ;或者可从例如上海国瑞基因科技有限公司购得,该公司的 pCAMBIA-1301 质粒的原始来源是 The CAMBIA Bios(biological open source)Licensee, Australia)按照如下方式改造并构建的,具体说明如下 :

[0098] 用 Kpn I/Nco I(NEB)双酶切质粒 pCAMBIA-1301(参见图 1),回收大片段。根据所采用的限制性内切酶位点合成如下序列 :GGTACCAAGCTTACTAGTCCTGCAGGTCTAGAGGATCCGTCGACCATGG(SEQ ID NO :6)(包含的酶切位点是 Kpn I/HindIII/Spe I/Sbf I/Pst I/Xba I/BamH I/Sal I/Nco I),用 Kpn I/Nco I 双酶切后回收,与上述所回收的大片段连接后转化 top10 细胞(中国科学院昆明动物研究所董杨提供 ;或者可从例如 :北京索莱宝科技有限公司购得)。用引物 GCTTCGGCTCGTATGTTGT(SEQ ID NO :7)/GAGTCGTCGTTCTGTAAAC(SEQ ID NO :8)筛选转化子,通过 PCR 检测方法,带有扩增片段为 350bp 的转化子即为含有需要构建的多克隆位点及 GUS 序列的 p8 质粒的转化子。P8 质粒图谱见图 2

[0099] 所述 p8 质粒中的多克隆位点和 GUS 序列的长度 2353 碱基,如 SEQ ID NO :9 所示 :

[0100] GTTGGCAAGCTGCTCTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTC
 ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAT
 GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACTACTTTAT GCTTCCGGCTCGTATGTTGT
 GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC GAATTC
 G A G C T C GGTACC A A G C T T ACTAGT C CTGCAG G TCTAGA G G A T C C GTCGAC
C ATGGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTTCTCCTTCATTTTCTTGTTAGGACCCTTTTCT

CTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTTCTTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATA
 TTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGTGTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCG
ACGACTCGTCCGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCACTCTG
 GATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGC
 CAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGA
 AGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTCGATGCGGTCACTCATTACGGCAAA
 GTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGT
 ATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTATCCCGCC
 GGGAAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTATGCCGGA
 ATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCCG
 CGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAAATGGTGA TGTCAGCGTTGAACTGCGTGA
 TGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGG
 CAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTCGAAGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTCTGATATCTACCCGC
 TTCGCGTCCGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCCAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTAC
 TGGCTTTGGTCGTATGAAGATGCGGACTTACGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCAC
 GCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACT
 GGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGCTCGGCTTTCAGCTGTCTTTAGGCATTGG
 TTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCAC
 TTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACG
 AACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATA TTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCC
 GACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTTGAT
 GTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGG
 AAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTT
 AGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCAC
 CGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTCCCGATTTTGGACCTCGCAAG
 GCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCT
 GCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAAGCTAGCCACCAC
 CACCACCACCGTGTGA (SEQ ID NO :9)

[0101] 如上序列所示本发明中所构建的 p8 质粒,其多克隆位点中的 EcoR I/Sac I/Kpn I/HindIII/Spe I/Sbf I/Pst I/Xba I/BamH I/SalI/Nco I 限制性酶切位点分别用加框和下划线表示,筛选转化子所用的引物 GCTTCCGGCTCGTATGTTGT/GAGTCGTCGGTTCTGTAAC (即 SEQ ID NO :7 和 8) 用双下划线表示,GUS 序列用斜体表示,其内含子序列分别用斜体加底纹示出。

[0102] 重组载体 p8+P552 的构建

[0103] 根据限制性内切酶 EcoRI 和 SbfI 操作说明,按照如下条件处理实施例 1 中所得到的克隆载体 pMD18-T+P552,以及如上所述构建的 p8 质粒。

[0104] 其中,克隆载体 pMD18-T+P552 及 p8 质粒的酶切条件如下:

[0105]	酶切体系:	50 μ l
[0106]	无菌水	34.8 μ l
[0107]	10*buffer H	5 μ l
[0108]	EcoRI	0.1 μ l (10U)
[0109]	SbfI	0.1 μ l (10U)

[0110] 克隆载体 pMD18-T+P552 或 p8 质粒 10 μ l (< 1000ng)

[0111] 使用 TIANGEN 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (目录号:DP209-03) 分别回收经酶切的 p8 质粒,以及启动子 P552 插入片段,根据 T4 连接酶 (TaKaRa, D2011A) 操作说明,按照如下条件进行连接:

[0112]	连接体系:	10 μ l
[0113]	10*T4buffer	1 μ l
[0114]	酶切后的 p8 质粒	1 μ l (20ng)
[0115]	回收的启动子 P552 插入片段	10 ~ 20ng, 根据其浓度确定
[0116]	无菌水	补齐至 9.5 μ l
[0117]	T4ligase (TaKaRa, D2011A)	0.5 μ l

[0118] T4buffer 冰上融化,酶切后的 p8 质粒载体加入量约 20ng,本发明中的 P552 片段加 10ng。于 16 $^{\circ}$ C 在节能型智能恒温槽 (宁波新芝, SDC-6) 中连接 8h 以上。

[0119] 将 100 μ l 氯化钙法制得的感受态细胞 DH5 α 从超低温冰箱取出,冰上融化后,加入 10 μ l 上面的连接产物,轻轻搅匀,冰浴 30min,42 $^{\circ}$ C 热激 60s,冰浴 5min,加入 600 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的 SOC,37 度 220rpm 复苏 45min,8000rpm 离心 30s,去上清,留取 150 μ l,轻轻吹匀,玻璃珠涂布 LB(kan),37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 ~ 24h。得到重组载体 p8+P552。

[0120] 分别以 F1 (即 SEQ ID NO:4) 和 R1 (即 SEQ ID NO:5) 为引物对所得重组载体 p8+P552 进行 PCR 检测,以确证所得重组载体 p8+P552 中含有所需启动子 P552。通过 EcoRI 和 SbfI 酶切筛选含有重组载体 p8+P552 转化子。

[0121] 实施例 3 重组根癌农杆菌 EHA105-P552 细胞的制备

[0122] 将如实施例 2 所述方法构建的 p8+P552 重组载体和作为对照的 p8 质粒分别转化按照《分子克隆实验指南》(第三版,科学出版社)中所述氯化钙方法制备的根癌农杆菌 EHA105 (已在申请号为 200910238992.0、发明名称为“一种启动子 BgIosP587、其制备方法及其用途”的发明申请中保藏,并于 2010 年 9 月 22 日公开,保藏编号为 CCTCC NO:M 209315) 的感受态细胞,具体方法如下:

[0123] 将根癌农杆菌感受态细胞 EHA105 于超低温冰箱中取出,至于冰上解冻。融化后,分别加入 5 μ l 的 p8+P552 重组载体和 p8 质粒以及作为对照的 p8 空载体,轻轻混匀,冰浴 10min,放入液氮中冷冻 5min,37 $^{\circ}$ C 解冻 5min,加入 800 μ l 常温的 LB 液体培养基,28 $^{\circ}$ C 160rpm 复苏 3h,8000rpm 离心 30s,吸去上清,留下 200 μ l 吹匀,涂布于加有 kan-rif (卡那霉素-利福平) 双抗的 YM 培养基平板上 (50mg/l Kan, 10mg/l Rif, 具体配方参见下文说明)。28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2-3 天。

[0124] 以 F1 (即 SEQ ID NO :4) 和 R1 (即 SEQ ID NO :5) 为引物进行 PCR 检测和通过 EcoRI/SbfI 酶切筛选转化子。

[0125] PCR 扩增出约 3095bp 左右条带和酶切出约 3095bp 左右条带的为重组载体 p8+P552 的重组根癌农杆菌。

[0126] 本发明中,按照如上述方法得到的带有重组载体 p8+P552 的重组农杆菌,命名为重组根癌农杆菌 EHA105-P552。

[0127] 按照本发明所述方法,得到的带有 p8 质粒的对照重组农杆菌,命名为重组根癌农杆菌 EHA105-p8。

[0128] 实施例 4:水稻愈伤组织的诱导和转化

[0129] 按照如下步骤诱导水稻愈伤组织,并分别用重组根癌农杆菌 EHA105-P552 和重组根癌农杆菌 EHA105-p8 转化所述愈伤组织。

[0130] 1) 将水稻日本晴种子去壳,70%乙醇表面消毒 30s,然后用有效氯 1.5%的次氯酸钠消毒 30min,期间剧烈摇动,消毒后用灭菌水清洗 5 次;将消毒后的种子置于 N6D 培养基(具体配方参见下文说明)上,用封口膜封口;29.5℃光照培养 3~4 周;

[0131] 2) 选取活跃生长的愈伤组织(黄白色,干燥,直径 1~3mm),在新 N6D 培养基上 29.5℃光照培养 3 天;

[0132] 3) 分别挑取如实施例 3 所构建的重组根癌农杆菌单菌落(重组根癌农杆菌 EHA105-P552 或重组根癌农杆菌 EHA105-p8),于添加抗生素(50mg/l Kan,10mg/lRif)的 YM 培养基(具体配方参见下文说明)上划线培养 3 天,培养温度 28℃;分别刮取上述重组根癌农杆菌置于添加了 30 μl 100mM 的 AS(Acetosyringone,乙酰丁香酮)的 30ml AAM 培养基(具体配方参见下文说明)中,温和重悬所述重组根癌农杆菌细胞(重组根癌农杆菌 EHA105-P552 或重组根癌农杆菌 EHA105-p8);

[0133] 4) 将继代培养的愈伤组织置于灭菌培养皿中;将如步骤 3 制备的重组根癌农杆菌悬液倒入培养皿中,将愈伤组织浸入其中 15min;

[0134] 5) 倒掉重组根癌农杆菌悬液,将愈伤组织用灭菌吸水纸吸掉多余的液体;于 N6-AS 培养基(配方参见下文说明)上放一张灭菌滤纸,加 1ml 如上述含 AS 的 AAM 培养基,将愈伤组织转移至滤纸上;密封培养皿,28℃暗培养 48~60h;

[0135] 6) 将受感染的愈伤组织置于 50ml 灭菌管中,用灭菌水摇动清洗,直至上清液变澄清;将愈伤组织浸泡于含 500mg/l 羧苄青霉素(Carb)的无菌水中以杀死重组根癌农杆菌;用灭菌吸水纸除去愈伤组织上多余的水分,然后将其转移至含 1mg/l 潮霉素 B(HmB) 和 50mg/l Carb 的 N6-AS 培养基上;用封口膜密封培养皿,29.5℃光照培养 3~4 周。

[0136] 实施例 5:水稻愈伤组织中的 GUS 的表达

[0137] 为检测经过实施例 4 所述转化的水稻愈伤组织中目的基因 GUS 的表达情况,按照 Chen S Y 等在 Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(6):742-751 所述的方法,对分别用重组根癌农杆菌 EHA105-P552 或重组农杆菌 EHA105-p8 转化的水稻愈伤组织进行染色。

[0138] GUS 染色液的配方(1ml):610 μl 0.2M Na₂HPO₄ 溶液(pH = 7.0);390 μl 0.2M NaH₂PO₄ 溶液和 10 μl 0.1M X-gluc。

[0139] 将分别用重组根癌农杆菌 EHA105-P552 或重组根癌农杆菌 EHA105-p8 转化的水稻

愈伤组织浸泡在 GUS 染色液中, 37℃ 保温至出现蓝色, 拍照, 结果如图 3 所示, 经含有启动子的 p8+P552 重组载体的重组根癌农杆菌介导转化的水稻愈伤组织 (图 3 右) 经染色后呈现蓝色, 经不含有启动子的 p8 质粒重组根癌农杆菌介导转化的水稻愈伤组织 (作为对照, 图 3 左) 经 GUS 染色后颜色未发生变化。结果显示, 本发明的 P552 启动子对 GUS 基因表达具有调控作用。

[0140] 实施例 6: 转基因水稻苗中 GUS 的表达

[0141] 将实施例 4 中得到的愈伤组织转移至含 50mg/1 潮霉素 B (HmB) 的 MS-R 分化培养基 (具体配方见表 2) 分化苗; 用封口膜密封培养皿, 29.5℃ 光照培养 3-4 周; 待幼苗长至 3-4cm 时转移到含 50mg/1 潮霉素 B (HmB) 的 1/2MS 生根培养基 (具体配方参见表 3) 进行生根筛选。

[0142] 转基因水稻苗的 GUS 染色过程同实施例 5 中愈伤组织的染色过程。结果如图 4 及图 5 所示, 经含有启动子的 p8+P552 重组载体的重组根癌农杆菌介导转化的水稻苗的根 (图 4 右) 和叶 (图 5 右) 经染色后呈现蓝色, 经不含有启动子的 p8 质粒重组根癌农杆菌介导转化的水稻苗的根和叶 (作为对照, 图 4 左和图 5 左) 经 GUS 染色后颜色未发生变化。结果显示, 本发明的 P552 启动子对 GUS 基因表达具有调控作用。

[0143] 实施例 7: 转基因烟草小苗中 GUS 表达

[0144] 1. 烟草无菌苗获得:

[0145] ●烟草种子浸泡: 将烟草 NC89 种子 (2010 年 11 月 12 日保藏于湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心, 即中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC No.: P201017) 装入 1.5ml 的离心管中 (< 50 粒 / 管), 加入 1ml 无菌水, 用移液器吸打几次, 更换无菌水后, 在常温下浸泡 24 小时;

[0146] ●烟草种子消毒: 用移液器吸出浸泡种子的水, 加入 1ml 75% 的酒精浸泡 30 秒, 用移液器吸出酒精; 加入 1ml 10% H₂O₂ 浸泡 10 分钟后, 用移液器吸出 H₂O₂;

[0147] ●洗涤: 用无菌水清洗五次, 每次加入 1ml 无菌水摇动 1min;

[0148] ●接种: 无菌滤纸吸干种子表面的水分, 再用吸头或无菌牙签接种于 MS 固体培养基 (配方参见表 4) 上萌发, 每皿约 10 粒, 置于 28℃ 光照培养室 (16h 光 / 8h 暗) 培养一周, 光照强度为 2000lx (本实验所有的光照培养材料均在此光照强度下培养);

[0149] ●转接: 待长出幼苗后, 转入新鲜 MS 固体培养基, 每瓶 (Φ6cm, H 9cm, 30ml 培养基 / 瓶) 3 株烟草小苗, 28℃ 光照培养室 (16h 光 / 8h 暗) 培养约 5 周, 获得烟草无菌苗。

[0150] 2. 烟草无菌苗的继代和扩繁

[0151] ●剪去烟草无菌苗的叶片和根, 将茎秆剪成带有腋芽的茎段 (2cm-3cm), 然后将其形态学下端垂直插入到新鲜 MS 固体培养基 (腋芽不能插入培养基里);

[0152] ●每瓶接种一个带有腋芽的茎段外植体, 置于 28℃ 光照培养室培养约 5 周, 作为待转化材料使用。

[0153] 3. 侵染前菌液的制备:

[0154] ●挑取含潮霉素抗性目的质粒的农杆菌菌株 EHA105 单菌落 (实施例 3 所得的重组根癌农杆菌 EHA105-P552 或重组根癌农杆菌 EHA105-p8), 接种到 10ml YM (含 Kan 50mg/L, Rif 30mg/L) 液体培养基, 28℃, 250rpm 振荡过夜, 待菌液混浊, 还未出现沉淀时, 将此菌液置 4℃ 保存;

[0155] ●取保存于4℃的菌液20 μl,接种于10ml YM(含Kan 50mg/L,Rif 30mg/L)液体培养基于50ml离心管中28℃,250rpm振荡过夜,待菌液混浊,还未出现沉淀时,停止培养;

[0156] ●取上述菌液3ml加入到50ml YM(不含抗生素)液体培养基于三角瓶中28℃,250rpm摇床震荡培养约2h,OD₆₀₀ = 0.5左右时,作为侵染菌液使用。

[0157] 4. 侵染:

[0158] ●从培养5周的烟草无菌苗上剪取较大的叶片,保存在一个装有YM(不含抗生素)液体培养基的培养皿中;

[0159] ●用直径6mm的打孔机将烟草叶片打成叶圆盘,保存在另一个装有YM(不含抗生素)液体培养基的培养皿中;

[0160] ●将烟草叶圆盘转移到装有侵染菌液的培养皿中;

[0161] ●轻轻摇动培养皿,确保农杆菌接触到叶盘边缘,浸泡10min;

[0162] ●将已侵染的烟草叶盘从农杆菌悬浮液中转移至干燥的无菌滤纸上,吸干菌液直至烟草叶盘不滴菌液为止;

[0163] ●将烟草叶盘接种到RMOP固体培养基(配方参见表5)上,叶面朝上,每皿约10块;

[0164] ●倒置培养皿,28℃暗培养3天。

[0165] 5. 筛选:

[0166] ●将步骤4的叶圆盘转移到RMOP-TCH(10mg/L Hyg)培养基(配方参见表6)上,每皿10块,叶面朝上,28℃光照培养2周;

[0167] ●每2周继代一次,大约4周出现丛生芽。

[0168] 6. 生根:

[0169] ●当再生芽长至约1-2cm时,切下芽接种到MST-TCH(10mg/L Hyg)培养基(配方参见表7),每瓶1株烟草苗;

[0170] ●28℃光照培养室培养2周;

[0171] 除去幼苗基部的小叶子,转移到新鲜的MST-TCH培养基,每瓶1株烟草苗,培养2周。之后分别取叶片和根进行GUS染色实验,GUS染色液的配方和方法同水稻。

[0172] GUS染色液的配方(1ml):610 μl 0.2M Na₂HPO₄溶液(pH = 7.0);390 μl 0.2M NaH₂PO₄溶液和10 μl 0.1M X-gal。

[0173] 将转基因和对照(没有转入目的基因的空载体)分别浸泡在GUS染色液中,37℃保温至出现蓝色,拍照记录,结果如图6和7所示。

[0174] 本发明实施例中所使用的相关培养基配方说明如下:

[0175] 以下有关培养基中所称的“常规灭菌”是指如下条件的灭菌:121℃下蒸气灭菌20分钟。

[0176] N6D培养基、YM液体培养基、YM固体培养基、AAM培养基及N6-AS共培养基参见中国专利申请《一种启动子BgIosP587、其制备方法及应用》(申请号200910238992.0,公布号CN101838647A)说明书中表2至表6。

[0177] 表2MS-R分化培养基:

[0178]

	1 L	0.5 L	2 L
MS macro (20X)	50 ml	25 ml	100 ml
MS micro (1000X)	1 ml	0.5 ml	2 ml
Fe ₂ EDTA 贮存液 (100X)	10 ml	5 ml	20 ml
肌醇 (500X)	2 ml	1 ml	4 ml
蔗糖 (Sucrose)	30 g	15 g	60 g
山梨醇 (Sorbitol)	30 g	15 g	60 g
植物凝胶 (phytagel)	4 g	2 g	8 g
常规灭菌后加入			
MS 维生素 (1000X) 过滤除菌	1 ml	0.5 ml	2 ml
激动素 (1 mg/ml) 过滤除菌	2 ml	1 ml	4 ml
萘乙酸 (1 mg/ml) 过滤除菌	0.02 ml	0.01 ml	0.04 ml
羧苄青霉素 (500 mg/ml)	0.5 ml	0.25 ml	1 ml
潮霉素 (50 mg/ml)	1 ml	0.5 ml	2 ml

[0179] 调 PH 值至 5.8, 常规方式灭菌。

[0180] 注: MS macro (20X): 硝酸铵 33.0g, 硝酸钾 38.0g, 磷酸二氢钾 3.4g, 硫酸镁 7.4g, 氯化钙 8.8g 逐一溶解, 然后室温下用蒸馏水定容至 1L, 4℃ 保存。

[0181] MS micro (1000X): 硫酸锰 16.90g, 硫酸锌 8.60g, 硼酸 6.20g, 碘化钾 0.83g, 钼酸钠 0.25g, 硫酸铜 0.025g, 氯化钴 0.025g, 上述试剂在室温下溶解并用蒸馏水定容至 1L, 4℃ 保存。

[0182] MS 维生素贮存液 (1000X): 维生素 B₁ 0.010g, 维生素 B₆ 0.050g, 烟酸 0.050g, 甘氨酸 0.200g, 加蒸馏水定容至 100ml, 过滤除菌, 4℃ 保存不超过 1 周。

[0183] 铁盐 (Fe₂EDTA) 贮存液 (100X): 见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。

[0184] 表 31/2MS 生根培养基

	1 L	0.5 L	2 L
[0185] MS macro 母液 (20X)	25 ml	12.5 ml	50 ml
Fe ₂ EDTA 贮存液 (100X)	5 ml	2.5 ml	10 ml
MS micro 母液 (1000X)	0.5 ml	0.25 ml	1 ml
肌醇 (500X)	1 ml	0.5 ml	2 ml
蔗糖 (sucrose)	15 g	7.5 g	30 g
植物凝胶 (Phytigel)	3 g	1.5 g	6 g
常规灭菌后加入			
MS 维生素 (1000X) 过滤除菌	0.5 ml	0.25 ml	1 ml
潮霉素 (50mg/ml)	1 ml	0.5 ml	2 ml

[0186] 调 PH 值至 5.8。

[0187] 注 :MS macro (20X) 见表 2。

[0188] MS micro (1000X)MS 维生素贮存液 (1000X) 见表 2。

[0189] 铁盐 (Fe₂EDTA) 贮存液 (100X) :见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。

[0190] 表 4MS 固体培养基 :

	1L
[0191] MS Macro (20x)	50ml
MS Micro (1000x)	1ml
Fe ₂ EDTA 贮存液 (100x)	10ml
MS 有机 (1000x)	1ml
Myo-inositol (500 x)	2ml
CH (水解酪蛋白)	1g
蔗糖	30g
琼脂粉	8g

[0192] pH 5.8121℃下灭菌 20 分钟

[0193] 注 :MS macro (20X) 见表 2。

[0194] MS micro (1000X)MS 维生素贮存液 (1000X) 见表 2。

[0195] 铁盐 (Fe₂EDTA) 贮存液 (100X) :见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。

[0196] MS 有机 (1000x) :维生素 B1,0.01g, 维生素 B6,0.05g, 烟酸 B1,0.05g, 甘氨酸, 0.2g, 加蒸馏水定容至 100ml, 过滤除菌, 4℃保存不超过 1 周。

[0197] 表 5RMOP 固体培养基 :

		1L
	MS Macro (20x)	50ml
	MS Micro (1000x)	1ml
	Fe ₂ EDTA 贮存液 (100x)	10ml
[0198]	Myo-inositol (500 x)	2ml
	VB1 (10mg/ml)	100u1
	NAA (α-萘乙酸) (1mg/ml)	100u1
	6-BA(6-苄氨基嘌呤)(1mg/ml)	1ml
	蔗糖	30g
	琼脂粉	8g
[0199]	pH 5.8 121℃下灭菌 20 分钟	
[0200]	注:MS macro(20X) 见表 2。	
[0201]	MS micro(1000X)MS 维生素贮存液 (1000X) 见表 2。	
[0202]	铁盐 (Fe ₂ EDTA) 贮存液 (100X) :见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。	
[0203]	Myo-inositol(500x) :5g 肌醇溶解于 H ₂ O 后,定容至 100ml,4℃保存表 6RMOP-TCH 培养基	
		1L
	MS Macro (20x)	50ml
	MS Micro (1000x)	1ml
	Fe ₂ EDTA 贮存液 (100x)	10ml
[0204]	Myo-inositol (500 x)	2ml
	VB1 (10mg/ml)	100u1
	NAA (1mg/mL)	100u1
	6-BA (1mg/mL)	1ml
	蔗糖	30g
	琼脂粉	8g
	115℃灭菌 15min 后加入:	
[0205]	Claforan (250 mg/ml)	2ml
	潮霉素 (50 mg/ml)	0.2ml
	pH 5.8	
[0206]	pH 5.8 121℃下灭菌 20 分钟	

- [0207] 注:MS macro(20X) 见表 2。
 [0208] MS micro(1000X)MS 维生素贮存液(1000X) 见表 2。
 [0209] 铁盐(Fe₂EDTA) 贮存液(100X):见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。
 [0210] Myo-inositol(500x):见表 5。
 [0211] 表 7MST-TCH 培养基:

		1L
	MS Macro (20x)	50ml
	MS Micro (1000x)	1ml
	Fe ₂ EDTA 贮存液 (100x)	10ml
[0212]	蔗糖	30g
	琼脂粉	8g
	115℃灭菌 15min 后加入:	
	Claforan (头孢噻肟钠) (250 mg/ml)	1ml
	潮霉素 (50 mg/ml)	0.2ml
	pH 5.8	

- [0213] 注:MS macro(20X) 见表 2。
 [0214] MS micro(1000X)MS 维生素贮存液(1000X) 见表 2。
 [0215] 铁盐(Fe₂EDTA) 贮存液(100X):见中国专利申请 CN101838647A 说明书中表 2。以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

[0001]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳华大基因科技有限公司

<120> 启动子 BgIosP552、制备方法及应用

<130> DHC1010480

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3095

<212> DNA

<213> 水稻日本晴 (*Oryza sativa L.ssp.japonica cv. Nipponbare*)

<400> 1

aaagattggg gctggcagga cttcaaaaa aaaatgaaaa agaaaagcct tgacaacaat 60

aagattlgac tttttttag caaaatactc tcttcggttc gtaaaaaaat taaatcgaag 120

tcacctgagc taggtttatt tttatggga catatggttt gtttggtaac ttgagggaag 180

acgatttgac gagagaattg acggtgagat taacatgaga atttaattat ttttttaagt 240

ttcaatcctc tgtttgtag aggtggtaga aaacaataag gagtttagtt taggcaaaa 300

aaaggaggac aattaccacc cttatctat gtgttagaaa attttcatt tccatccac 360

cgaaatttca tgtctcctaa ccaateccaa ccaaacagaa taagtaatag tctaatecct 420

ctaaaccaa cccctcctaa aactttacc aaccaaacgg atccagaggg aatagacaat 480

gaggagagt cgacatgata gttgtttgca ctttataggg gggtttagag gaaaggaagc 540

cacacgttct ttctggctac ttcattggat tattagtaca atatattggc tccatcgga 600

tggcctaate agccaaagaa aaagccaaat tttaaatfff caagcttaat tttgagattg 660

atfffgaat atffcaaca tagtttcttt ttcaacattg gctfftaagt caccaagaac 720

atatttataa aagttttacc tacaatttta tttttatttc ctaataagcc gttttggett 780

attagaaat aagccaaacg atggggacca ttgtttctc cacgtctcta aaaatatgta 840

[0002]

ttctttaaag aaacttttgt accaaacat gtgctgtaa ttatatttga tttatcaagt	900
aattatttta ataataattt gctgaataaa aaactgtttc aaaccggggc atatgagtca	960
tggaagagcc tattcttttt aagtagatta agggcctggt tagttcgcaa aatgaaaatt	1020
tttgagtgtc acatcagatg tttgatcgga tgctggaagg tgtttatggg agaatagcta	1080
atthagtccc taaagtttct ttgtagaaat cagtttagtc actaaccttt taaatagtct	1140
aaagaaatcc ttaaactttg tcataaggtc tagaataata cttgggtcca ccaaaattat	1200
calaig gala laccalglca lcallicalgc aaaalclalgl algaalglc caalllacc	1260
ttgcgtatat catagaaaaa taaatataag gttgaattag acataacat aggaaaaaat	1320
acatctcttt tttcaccct tttgaggtat atttttgctc ttacattttt ctttttgttt	1380
tttgtttttc tatgatatat gtaagggtaa attggacaaa tcatatatat tttgcatagt	1440
aaggtgacat ggcatatcta tgtggtgatt ttggtgggac caaggactat atcagcccac	1500
atgacaaatt taaaggactt gtttggacaa tatgaaagat taaggactaa aatgacctag	1560
gagcgaaact ttagggacca tattggctat tctccctttt tgacacgaat gaaaaatcca	1620
atllcataac ttgtctggaa accgcgagac gaatcttttg agcctaatta atccgtcatt	1680
agcacatgeg aattaactgta gcacttatgg ttaattatgg actaattaag ctcaaaagat	1740
tegtcttgeg atttctttt taactgtgta attagttttt cttttactct atatttaatg	1800
ctccatgcat atgtctaaag atttgattta atgtttttcg aaaaaacttt tggaggacta	1860
accgggccta acgtgacttg aagagctgtg acagcgcaaa tcgtgaaacg cggatggacc	1920
tagcattatg gtgatgtagg aagtgccttg ctggcagtgg caggtaccgt gcaagtgtaa	1980
taccatagat cegtggctt atctgattac atgatgatga ttactcctc cgtttcacia	2040
alalaaglca llllagcalt llcacaattt alattgalgt talglclaga llcaltaaca	2100
tcaatatgaa tgtgggaaat gctagaatga cttacattgt gaaacggatc attaacatca	2160

[0003]

atatgaatgt ggaaaatgct agaatgactt acactgtgaa acggagggag tatacgatta	2220
lglaalgaaa aaaggaglac aataclagtc gccgtctccc cgcaaaaaaa glaclagttg	2280
tctcaagta ggggagtaat aataataata ataataaggg ataataataca ggctgtgttt	2340
agttcgtgtg ccaaattttt ttaaagtata cggacaaata tttaaattatt aaacatagac	2400
taataacaaa acaaattaca gattccatct gtaaactgcg agacgaatct attaaaccta	2460
attaattcgt tattagcaaa tgtttactgt agcaccacat tatcaaatca tggcgtaatt	2520
agctcaaaag attcgtctcg cgatttacct gcaaacatg caattgattt tttttctac	2580
tacgtttagt tctatgcatg tgtccaaata ttcgatgtga tgaaaaaatt ggaattcga	2640
ggaaaaaat ttaaattctaa acacggccac agtataaaaa aaatagtagc gttgttggtt	2700
atgaaagagg algglaaagt aagacaagac aacgcaaggg cclaaaaaag lggagacgaa	2760
gaagaagacg gaatatattg cattggaaaa gtgagcgctt ggacgagaga aaaactcgga	2820
ttcaagcgtc catatcagtg gacaccacca atgggaggtg gccacgtggg caggtcccgg	2880
gtggaatctg gcgcgtcac acgggaggtt ccgaaattac ggcaacgcca ctggagtgcg	2940
aggcgcagga tgtgagatcc acggcggggg ctccgctact agaaacttct tctggtcgtg	3000
ggtggtacgc accctcgcgc ctgccttta tattactagt aagaagatct catccctct	3060
tggtgaggtg aggtgagttg gggattgatt gattg	3095

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

aaagattggg getgacagga c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

[0004]

<400> 3		
caatcaatca atccccaact c		21
<210> 4		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 4		
ggaattcaaa gattggggct ggcaggac		28
<210> 5		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 5		
tgctgcagg caatcaatca atccccaact c		31
<210> 6		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 6		
ggtaccaagc ttactagtcc tgcaggteta gaggatccgt cgaccatgg		49
<210> 7		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 7		
gcttccggct cgtatgttgt		20
<210> 8		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

[0005]

<400> 8	
gagtcgtcgg ttctgtaac	19
<210> 9	
<211> 2353	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
gttggcaagc tgctctagcc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcggtg gccgattcat	60
taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagegg gcagtgagcg caacgcaatt	120
aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt	180
atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat	240
tacgaattcg agctcggtag caagettact agtcctgeag gtctagagga tccgtagacc	300
atggtagatc tgagggtaaa tttctagttt ttctcttca ttttcttgg taggaccctt	360
ttctcttttt attttttga gctttgatct ttctttaac tgatctattt ttttaattgat	420
tggttatggt glaaatalla catagcttca actgataate tgallactll alllcgtgig	480
tctatgatga tgatgatagt tacagaaccg acgactcgtc cgtcctgtag aaacccaac	540
ccgtgaaatc aaaaaactcg acggcctgtg ggcattcagt ctggatcgcg aaaactgtgg	600
aattgatcag cgttggtggg aaagecgtt acaagaaagc cgggcaattg ctgtgccagg	660
cagttttaac gatcagttcg ccgatgcaga tattcgtaat tatgcgggca acgtctggta	720
tcagecgeaa gtctttatac cgaaagggtg ggcaggccag cgtatcgtgc tgcgtttcga	780
tcgggtcact cattacggca aagtgtgggt caataatcag gaagtgatgg agcatcaggg	840
cgctatacgc ceatttgaag ccgatgtcac gccgtatggt attgcccggg aaagtgtacg	900
tatcacggtt tgttgaaca acgaactgaa ctggcagaact atcccgcggg gaatggtgat	960
taccgacgaa aacggcaaga aaaagcagtc ttacttccat gattttctta actatgccgg	1020
aatccatcgc agcgtaatgc tetacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcacctg	1080

[0006]

ggtgacgcat gtcgcaag actgtaacca cgcgtctgtt gactggcagg tggaggccaa	1140
tggatgatgc agcgttgaac tgcgtgatgc ggatcaacag gtggttgcaa ctggacaagg	1200
cactagcggg actttgcaag tggatgaatcc gcacctctgg caaccgggtg aaggttatct	1260
ctatgaactc gaagtcacag ccaaaagcca gacagagtct gatattacc cgcttcgct	1320
cggcatccgg tcagtggcag tgaaggcca acagttcctg attaaccaca aaccgttcta	1380
ctttactggc tttggctgct atgaagatgc ggaattacgt ggcaaaggat tcgataacgt	1440
gctgatggtg cagcaccag cattaatgga ctggattggg gccaaactct accgtacctc	1500
gcattacctt tacgctgaag agatgctcga ctgggcagat gaacatggca tcgtggtgat	1560
tgatgaaact gctgctgctg gctttcagct gtcttttaggc attggtttcg aagcgggcaa	1620
caagccgaaa gaactgtaca gcgaagagcc agtcaacggg gaaactcagc aagcgcactt	1680
acaggcgatt aaagagctga tagcgcgtga caaaaaccac ccaagcgtgg tgatgtggag	1740
tattgccaac gaaccggata cccgtccgca aggtgcacgg gaatatttcg cgccactggc	1800
ggaagcaacg cgtaaacctg acccgacgcg tccgatcacc tgcgtcaatg taatgttctg	1860
cgacgctcac accgatacca tcagcgatct ctttgatgtg ctgtgectga accgttatta	1920
cggatggtat gtccaaagcg gcgatttggg aacggcagag aaggtaactgg aaaaagaact	1980
tctggcctgg caggagaaac tgcatcagcc gattatcacc accgaatacg gcgtggatac	2040
gtagccggg ctgcactcaa tgtacaccga catgtggagt gaagagtacc agtgtgcatg	2100
gctggatatg taccaccgct tctttgatcg cgtcagcggc gtcgtcgggtg aacaggtatg	2160
gaatttcgcc gattttgca cctcgcaagg catattgcgc gttggcggtg acaagaaagg	2220
gatcttcaact cgcgaccgca aaccgaagtc ggcggctttt ctgctgcaaa aacgctggac	2280
tggcatgaac ttcggtgaaa aaccgcagca gggaggcaaa caagctagcc accaccacca	2340
ccaccacgtg tga	2353

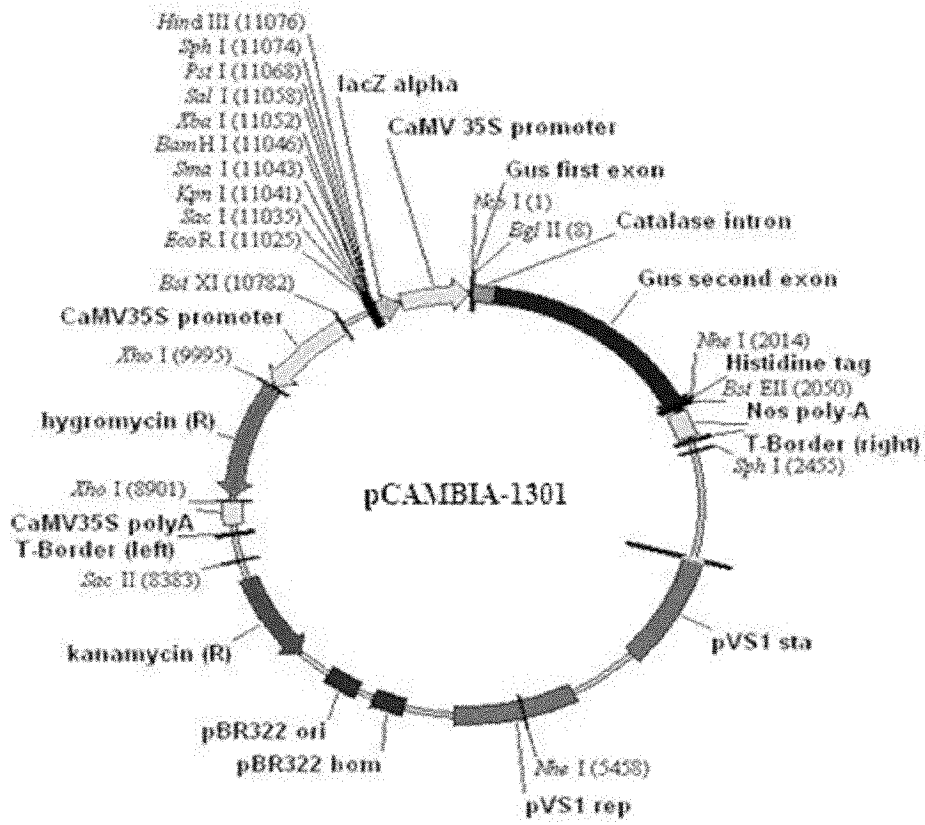


图 1

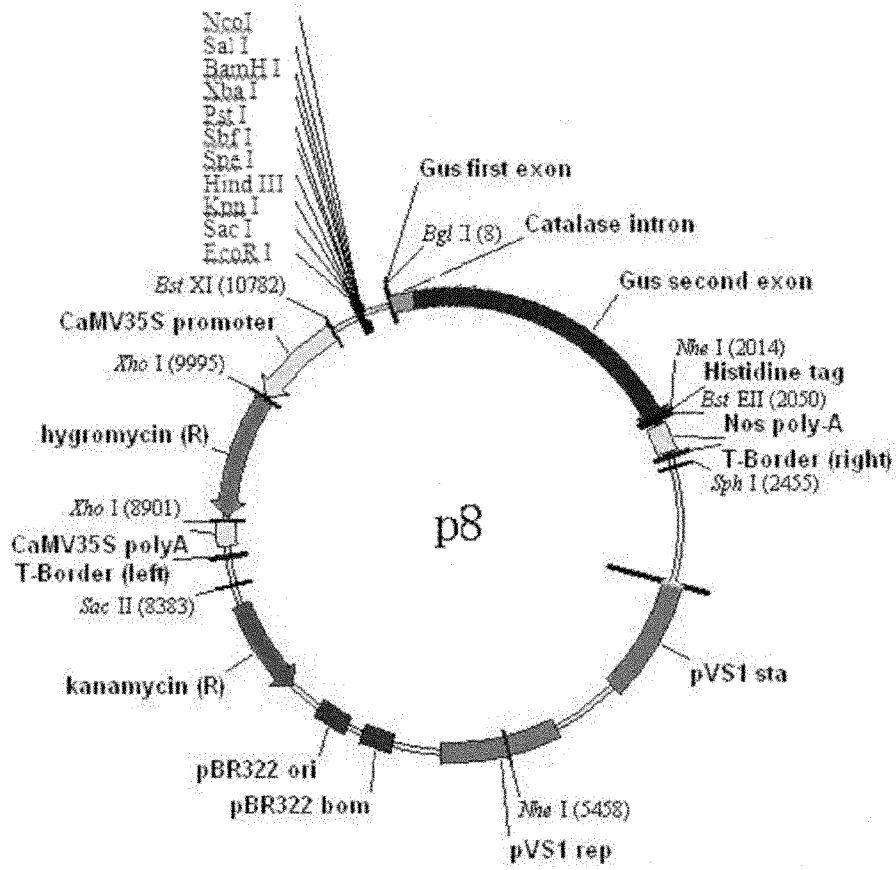


图 2

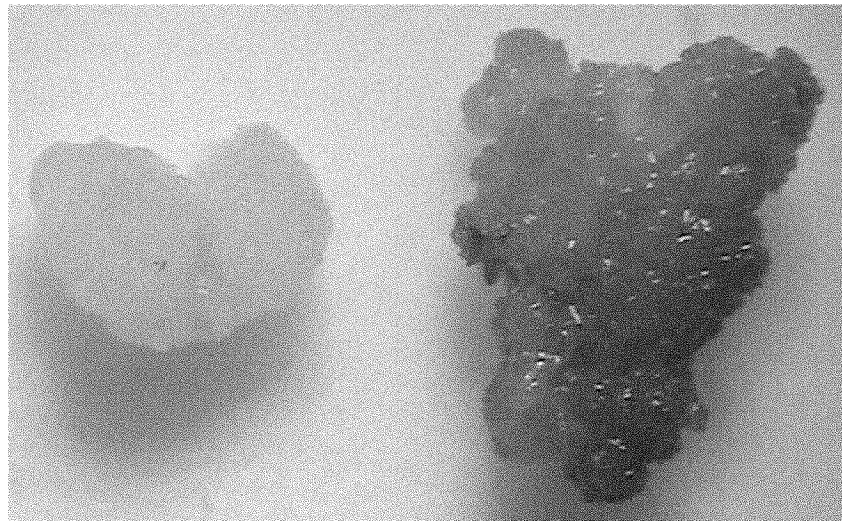


图 3



图 4



图 5

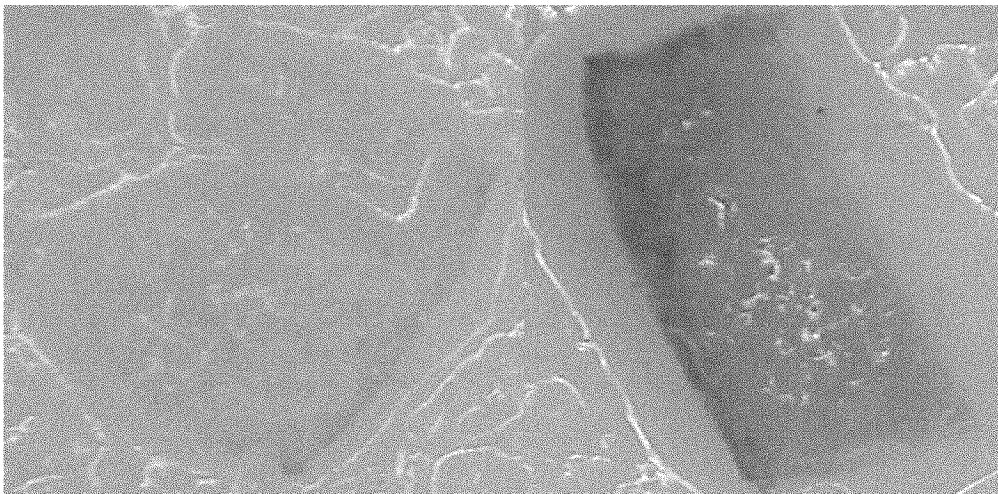


图 6

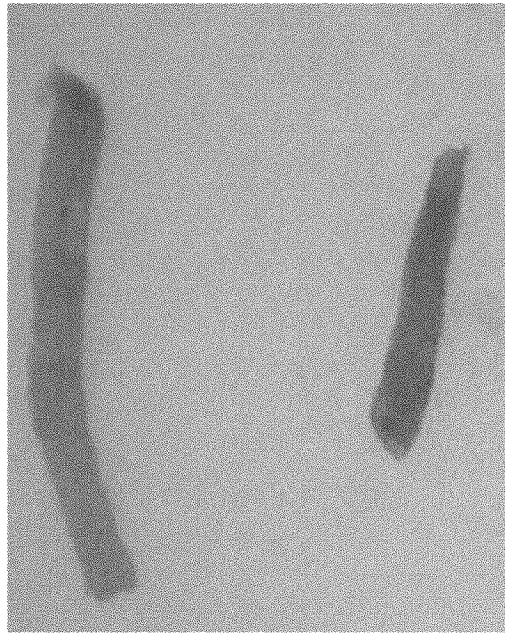


图 7