[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 5/14
C12N 15/11 C12N 15/29
C12N 15/82 A01N 4/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96195657.7

[43]公开日 1998 年 8 月 26 日

[11] 公开号 CN 1191565A

[22]申请日 96.5.7

[30]优先权

[32]95.5.18 [33]US[31]08/443,639

[32]95.6.6 [33]US[31]08/471,983

[32]95.12.22[33]US[31]08/577,483

[86]国际申请 PCT/US96/06452 96.5.7

[87]国际公布 WO96/36697 英 96.11.21

[85]进入国家阶段日期 98.1.19

[71]申请人 肯塔基州州立大学托管委员会

地址 美国肯塔基州

[72]发明人 J·查佩尔 C·A·G·科尔内特

殷绍辉

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 51 页 附图页数 12 页

[54]发明名称 转录控制序列和方法

[57]摘要

本发明公开了定性和定量的转录调控序列，前者在植物、植物组织和植物细胞的可诱导基因表达中发挥功能，后者在植物、植物组织和植物细胞中增加下游遗传信息的转录表达。本发明也公开了提高转基因植物抗病性的方法和重组 DNA 分子，尤其是一种控制能够引发植物超敏反应的蛋白质表达的可诱导启动子。

# 权　利　要　求　书

1.一种含有可诱导的植物抗病调节元件的重组核酸分子。

2.权利要求 1 的核酸分子，其中调节元件来源于一种编码萜烯环化酶的基因。

3.权利要求 2 的核酸分子，其中萜烯环化酶是一种倍半萜环化酶。

4.权利要求 3 的核酸分子，其中调节元件指导表－ 5 －马兜铃烯(aristolochene)合酶（ EAS ）的表达。

5.权利要求 4 的核酸分子，该核酸分子包括图 3A 所示的核苷酸序列（ SEQ ID NO： 14 ），或由此产生的一个可诱导的植物抗病片段。

6.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子具有图 3A 所示的核苷酸序列（ SEQ ID NO： 14 ）。

7.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子包括 SEQ ID NO： 2 中核苷酸 463 － 473 。

8.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子包括 SEQ ID NO： 2 中核苷酸 406 － 486 。

9.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子包括 SEQ ID NO： 2 中核苷酸 463 － 572 。

10.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子包括 SEQ ID NO： 2 中核苷酸 371 － 463 。

11.权利要求 5 的核酸分子，其中该核酸分子包括 SEQ ID NO： 2 中核苷酸 411 － 457 。

12.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子来源于双子叶植物。

13.权利要求 12 的核酸分子，其中双子叶植物是茄科的一个成员。

14.权利要求 13 的核酸分子，其中茄科植物是烟草属的一个成员。

15.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子来源于单子叶植物。

16.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子来源于裸子植物。

17.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子来源于松柏类植物。

18.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子为基因组 DNA 。

19.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子为化学合成 DNA 。

20.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子为基因组 DNA 和化学合成 DNA 的组合。

21.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子为基因组 DNA 和 cDNA

的组合或基因组 DNA， cDNA 和化学合成 DNA 的组合。

22.权利要求 1 的核酸分子，其中所说的诱导由植物病原菌介导。

23.权利要求 22 的核酸分子，其中植物病原菌是一种真菌。

24.权利要求 23 的核酸分子，其中病原真菌是疫霉属的一个成员。

25.权利要求 22 的核酸分子，其中所说的诱导由病原细菌介导。

26.权利要求 25 的核酸分子，其中病原细菌是假单胞菌属的一个成员。

27.权利要求 22 的核酸分子，其中所说的诱导由病原病毒介导。

28.权利要求 27 的核酸分子，其中病原病毒为烟草花叶病毒。

29.权利要求 1 的核酸分子，其中所说的诱导由释放素介导。

30.权利要求 29 的核酸分子，其中所说的诱导由真菌释放素介导。

31.权利要求 29 的核酸分子，其中所说的诱导由细菌释放素介导。

32.权利要求 1 的核酸分子，其中该核酸分子可操纵地与编码异源多肽的核苷酸序列连接。

33.权利要求 32 的核酸分子，其中异源多肽能使植物具有抗病性。

34.权利要求 33 的核酸分子，其中异源多肽是一种释放蛋白。

35.权利要求 33 的核酸分子，其中释放蛋白是一种真菌释放蛋白。

36.权利要求 35 的核酸分子，其中真菌释放蛋白来源于疫霉属。

37.权利要求 36 的核酸分子，其中释放蛋白包括 ParA1 多肽。

38.权利要求 33 的核酸分子，其中释放蛋白是一种细菌释放蛋白。

39.权利要求 38 的核酸分子，其中细菌释放蛋白是肝素。

40.权利要求 32 的核酸分子，其中所说的诱导由一种或多种外源介质介导。

41.权利要求 32 的核酸分子，其中该核酸分子能以细胞特异性方式表达所说的异源多肽。

42.权利要求 32 的核酸分子，其中所说的异源多肽是一种药用蛋白质。

43.一种包括权利要求 1 的 DNA 的载体。

44.权利要求 43 的载体，该载体能在含载体的细胞中可诱导地调节核苷酸序列的表达。

45.权利要求 44 的载体，所说的核苷酸序列编码一种异源多肽。

46.一种含有整合至其基因组中的权利要求 1 的核酸分子的转基因植物。

47.一种含有整合至其基因组中的权利要求 32 的核酸分子的转基因植

物。

48.一种来自权利要求 46 的转基因植物的种子。

49.一种来自权利要求 47 的转基因植物的种子。

50.一种来自权利要求 46 的转基因植物的细胞。

51.一种来自权利要求 47 的转基因植物的细胞。

52.一种向转基因植物提供抗病性的方法，该方法包含下列步骤:

（ a ）产生含有整合至其基因组中的权利要求 32 的核酸分子的转基因植物细胞；以及

（ b ）从所说的植物细胞培养转基因植物，其中权利要求 32 的核酸分子的表达使转基因植物具有抗病性。

53.权利要求 52 的转基因植物，其中该转基因植物是一种双子叶植物。

54.权利要求 53 的转基因植物，其中双子叶植物是茄科的一个成员。

55.权利要求 54 的转基因植物，其中茄科植物是烟草属的一个成员。

56.权利要求 52 的转基因植物，其中该转基因植物是一种单子叶植物。

57.权利要求 52 的转基因植物，其中该转基因植物是一种裸子植物。

58.权利要求 52 的转基因植物，其中该转基因植物是一种松柏类植物。

59.一种增加转基因植物细胞中下游 DNA 序列转录表达的方法，该方法包括下列步骤:

（ a ）产生含有权利要求 1 的核酸分子的转基因植物细胞，该核酸分子整合到转基因植物细胞基因组中，并且位于增加下游 DNA 序列转录的位置;

（ b ）从所说的植物细胞培养转基因植物。

# 说　明　书

## 转录控制序列和方法

发明领域

本发明属于植物分子生物学领域，尤其涉及到转录调节元件：植物组织中定性的调节元件和定量的调节元件，前者正调节其下游基因对于侵入病原微生物，释放素和其它诱导性化学信号物质等的胁迫的反应；后者增加相应基因的转录表达。

发明背景

植物体对于病原性真菌，细菌和病毒的抗病性和一种叫超敏反应（HR）的植物反应相联系。超敏反应的结果，被潜在的植物病原菌侵入的部位发生定点细胞死亡，据推测 HR 带来的定点植物细胞死亡包含入侵的微生物或病毒，这样使得其邻近组织细胞免于感染。另外一些植物防御反应包括产生能阻止病原菌侵入的植物抗毒素(抗生素）和/或溶菌酶和/或修饰细胞壁，修饰细胞壁可增强其抵抗病原菌产生的物理性和/或酶的破坏。

植物包括烟草的超敏反应能产生植物抗毒素作为抵抗病原微生物侵染的反应之一。抗微生物倍半萜是烟草(*Nicotiana tabacum*)对病原微生物入侵反应过程中形成的一类化合物。

细胞悬浮培养提供了关于萜烯生物合成调节的有用信息。类异戊二烯在自然界广泛存在，它们和其它类异戊二烯化合物如甾醇，类胡萝卜素，多萜醇，泛醌和植物生长调节物质（如赤霉素）等具有共同的早期生物合成途径，植物生长调节物质被称为初生代谢物质，被称为次生代谢物质的类异戊二烯化合物不为生长所必需，它们包括单萜，倍半萜，二萜。这些次生代谢物－类异戊二烯是植物和其环境相互作用过程中的重要介导者。

许多化合物可以作为释放素诱导植物抗毒素合成。他们包括但不限于：一种或多种毒性离子，如汞离子，其它化学上明确的成分，代谢抑制剂，细胞壁聚糖，一些糖蛋白，一些酶，真菌孢子，脱乙酰几丁质，一些脂肪酸，一些来自植物细胞壁的寡糖[参看 Sequeira L., (1983)微生物学年评(Annu. Rev. Microbiol.) 37： 51 － 79，以及所引用的参考文

献]。一些疫霉的细胞壁碎片和绿色木霉纤维素酶能增强表－ 5 －马兜铃烯(aristolochene)合酶活性，但日本曲霉果胶酶却不能[Chappell 等，(1991)，植物生理学 (Plant Phyiol.) 97： 693 － 698]。受到其它植物病原菌或相似的无毒菌株的攻击，烟草也会诱导合成植物抗毒素，例如，流泪假单胞菌诱导烟草倍半萜的生物合成[Guedes 等，(1982) 植物化学 (Phytochemistry) 21： 2987 － 2988]。

释放蛋白是由植物病原菌或潜在的植物病原菌产生的一种蛋白质，该蛋白能诱发烟草的超敏反应。寄生疫霉释放蛋白的氨基酸和核苷酸编码序列已经公布[Kamoun 等，(1993) 植物－微生物相互作用分子生物学(Mol. Plant-Microbe Interactions)， 6： 573 － 581]。植物病原病毒，包括但不限于烟草花叶病毒（ TMV ），诱导被感染植物超敏反应。感染植物的细菌也能诱导超敏反应，从而诱导抗病性；刺激超敏反应形成的代表性细菌包括但不限于：土壤杆菌属的种类，黄单胞菌属的种类，丁香假单胞菌等。植物病原真菌（也包括一些无毒菌株）也能诱导植物超敏反应，这些真菌包括但不限于寄生疫霉和烟草霜霉。

用一种释放素处理烟草悬浮培养细胞，鲨烯合成酶就受到抑制，于是阻止了正常途径中生物合成的前体物质形成甾醇，同时伴随着倍半萜环化酶基因的表达，导致这些前体物质合成倍半萜。释放素处理烟草组织中，从法呢醇二磷酸合成倍半萜植物抗毒素 Capsidiol 的第一步反应是由 5 －表－马兜铃烯(aristolochene)合酶（ EAS ）所催化的， EAS 是一种倍半萜环化酶。烟草 EAS 基因家族中的一种已被克隆，其基因序列和推测的氨基酸序列已经公布[Facchini and Chappell, (1992)，美国科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89： 11088 － 11092]。释放素诱导 EAS 家族的一个或几个成员的转录表达。

本领域长期以来一直想得到保护植物，尤其是农作物免于受植物病原菌侵害的方法，这些病原菌包括但不限于植物病原性病毒，真菌和细菌。从经济学和环境保护的角度来看，生物防治或自然防治显得尤其重要的，而不是靠给农作物施加化学药品的化学防治。本领域长期以来也一直想得到用于控制转基因植物中异源 DNA 表达的植物转录调节序列。

发明概述

总的来说，本发明的特色是一种包含可诱导的植物抗病调节元件的重组核酸分子。总的说来，这种重组的核酸分子和天然存在的可诱导的植物抗病调节元件至少有 80 % 的同源性，即是说，标准 DNA 序列中高达 20 % 的碱基对可以被其它碱基对替换（如 G - C 替换成 A - T，T - A 或 C - G），只要改造的序列促进转录的活性和标准序列相同或更高即可。在优选实施方案中，本发明的重组核酸分子来源于一种编码萜环化酶（如一种倍半萜环化酶）的基因，例如，本发明的重组调节元件来源于一种表 - 5 - 马兜铃烯(aristolochene)合酶（ EAS ）基因，该基因包含一段如图 3A 所示的核苷酸序列（ SEQ ID NO:14 ）或由此产生的一种可诱导的植物抗病片段。在优选实施方案中，本发明的重组核酸分子的核苷酸序列如图 3A 所示（ SEQ ID NO:14 ）。

在其它的优选实施方案中，本发明的核酸分子包含下列任何序列：SEQ ID NO:2 中核苷酸 463 - 473； SEQ ID NO:2 中核苷酸 406 - 486；SEQ ID NO:2 中核苷酸 463 - 572； SEQ ID NO:2 中核苷酸 371 - 463；SEQ ID NO:2 中核苷酸 411 - 457 。

在优选实施方案中，本发明的重组核酸分子来源于一种双子叶植物（如茄科植物的一个成员，如烟草属）。在其它的优选实施方案中，本发明的核酸分子来源于一种单子叶植物，裸子植物，或松柏类植物。

在另外的其它优选实施方案中，本发明的核酸分子是基因组 DNA，化学合成 DNA，或者是基因组 DNA 和化学合成 DNA 的组合；基因组 DNA 和 cDNA 的组合；化学合成 DNA 和 cDNA 的组合；或者基因组 DNA， cDNA 和化学合成 DNA 的组合。

在优选实施方案中，本发明的核酸分子的诱导受植物病原菌的介导，这些植物病原菌如本文所述的真菌（如疫霉属），细菌（如假单胞菌属）或者病毒（如烟草花叶病毒）。在其它的优选实施方案中，这种诱导是由释放素（如真菌或细菌释放素）介导的。

在另一方面，本发明的核酸分子与编码异源多肽的核苷酸序列可操纵地连接并调节其可诱导的转录。优选该异源多肽能使植物具有抗病性。例如，异源多肽可以是释放蛋白（如疫霉属 ParA1 多肽等真菌释放蛋白， harpin 等细菌释放蛋白或者是纤溶酶原激活物等药物多肽）。这种异源多肽的表达受一种或几种外源介质（如乙烯或甲基茉莉酮酸酯）的介导。在另外的一些实施方案中，本发明的核酸分子能以细胞特异性

方式表达异源多肽。

在另一方面，本发明的特色是一种含本发明的核酸分子的载体，一种通过将该载体导入细胞（如一种转基因植物细胞）而指导多肽表达的方法，一种含该载体的细胞。

在另一方面，本发明的特色是一种向转基因植物提供抗病性的方法，这种方法的步骤包括：(a) 产生本发明的核酸整合到其基因组中的转基因植物细胞；及(b)由该植物细胞培养转基因植物，其中本发明的核酸分子的表达使转基因植物具有抗病性。

在优选实施方案中，根据本发明的方法的转基因植物是双子叶植物（如茄科的一个成员，如烟草属），单子叶植物，裸子植物，或松柏类植物。

在另一方面，本发明的特色是一种增加转基因植物细胞中位于下游的 DNA 序列的转录表达的方法，这种方法的步骤包括：(a) 产生包含本发明核酸分子的转基因植物细胞，其中核酸整合到转基因植物细胞的基因组上，其插入的位置能增加下游 DNA 序列的转录；及(b) 培养转基因植物细胞得到转基因植株。

除了上述特色之外，本发明还提供了定性的转录调节序列（可诱导的转录调节序列），在植物组织中调节其下游基因对下列因子发生反应的表达：一种或多种释放素，其它明确的诱导化合物，或者入侵的植物病原菌的胁迫，和定量的转录调节序列（转录增强序列），它能增加其下游序列的转录。正如本文举例具体说明的，这些转录调节序列在自然界中被发现位于烟草表－5－马兜铃烯(aristolochene)合酶（EAS4）基因的上游，并操纵性地和该基因连接；当和一段编码序列（并且存在操纵性连接的启动子元件，该启动子元件来源于EAS4基因或一个异源的可以在植物中表达的基因）操纵性地连接时，植物体或植物组织受到潜在植物病原菌（如病毒，真菌或细菌）的入侵，或者受到绿色木霉纤维素酶等释放素刺激，或者植物，植物组织和/或植物悬浮培养细胞受到植物或真菌细胞壁碎片刺激，这些序列介导该编码序列可诱导地转录表达。这种潜在的植物病原菌可以是病毒，包括但不限于烟草花叶病毒或烟草叶脉斑驳病毒；细菌，包括但不限于丁香假单胞菌，野油菜黄单胞菌或根癌农杆菌；真菌，包括但不限于疫霉属之一种（如寄生疫霉）或霜霉之一种（如烟草霜霉）。EAS4 启动子包含可诱导的转录调节元件

和转录增强序列，它们在本文 SEQ ID NO:2 中列出。在 SEQ ID NO:2 中，EAS4 启动子的 CAAT 同源序列位于第 513 到 516 核苷酸，TATA - 序列基元位于第 540 到 543 核苷酸。

烟草 EAS4 基因上游区可诱导转录调节元件的实例是 SEQ ID NO:2 中 458 位到 473 位核苷酸，454 位到 473 位核苷酸和 413 位到 473 位核苷酸。

本发明的另一方面是来自 EAS4 启动子和启动子相关序列的转录增强元件。该序列操纵性地连接到一个起始序列和需要表达的异源 DNA 序列的上游。

本发明的另一方面是经过遗传改造含有并表达目的核苷酸序列的转基因植物细胞，植物组织，植株，优选编码序列，反义序列，及其它在可诱导的转录调节元件调节之下的序列。本发明的目的之一是提供一些核苷酸序列，它们能在植物受到释放素刺激，潜在植物病原菌侵入或一些其它的外源诱导信号如甲基茉莉酮酸酯和乙烯作用时介导其下游编码序列的诱导表达。释放素可诱导的转录调节元件的实例之一来自烟草 EAS4 基因的 5'侧翼序列；正如本文举例具体说明的，这段序列在 SEQ ID NO:2 的第 410 位核苷酸到 473 位核苷酸列出。和这段示例的核苷酸序列等价的序列是那些能类似指导其下游核苷酸序列诱导表达的序列。优选该可诱导转录调节元件和 EAS4 启动子和启动子相关序列（如两者的组合如 SEQ ID NO:2 中 410 位到 573 位核苷酸所示，优选 SEQ ID NO:2 中 361 位到 573 位核苷酸，更优选 SEQ ID NO:2 中 1 位到 573 位核苷酸）相关联。

“抗病调节元件”指的是一种能调节与植物防御反应（如超敏反应）相关的基因产物表达的 DNA 序列，对于自然界中的植物体而言，这种植物的防御反应用来对付病原菌。该术语也包括足以开启疾病相关的外源信号或介质（如本文所述的病原菌或释放素诱导信号或介质）诱导的基因表达的调节元件（以及如下文所述的，调节元件的片段）。总的来说，抗病调节元件位于一个基因的 5'区，但并不仅限于此。

“可诱导”指一种调节元件在植物细胞和病原菌或释放素相互作用时能介导提高的基因表达（如 mRNA 或多肽形成）。本发明也包括以细胞或组织特异性方式指导可诱导基因表达的抗病调节元件。

“来源于一个基因”是指调节元件的核苷酸序列基于天然存在的植

物基因（如烟草EAS4基因）中包括的序列信息。一旦确定，本发明的调节元件既可以从天然资源中取得，也可以通过任何标准方法（如通过重组方法或化学合成方法）制备。总的来讲，这种重组的核酸分子与天然存在的可诱导植物抗病调节元件至少有80％的同源性，即是说，标准DNA序列中高达20％的碱基对可以被其它碱基对置换（如G－C可用T－A，A－T或C－G代替），只要改造后的序列促进转录的活性和标准序列相同或更高即可。

“可诱导的植物抗病片段”是指任何长度的核苷酸，在植物细胞和病原菌或释放素相互作用中足以指导增高的基因表达（如mRNA或蛋白质形成）。“片段”优选长度为6－10核苷酸。然而，本发明的DNA调节元件长度范围在10－100核苷酸，100－300核苷酸，甚至超过300核苷酸。这种片段通过常规方法制备（如适当的限制性内切酶消化或化学合成得到该片段）。基因中可诱导的植物抗病DNA片段的鉴定可以采用本领域的标准方法进行（如本文所述的方法）。在一个具体实例中，可诱导的植物抗病片段的鉴定可以采用标准的启动子缺失分析完成。含与报导基因可操纵地连接并使报导基因病原菌诱导转录的抗病启动子的构建体可以自5’，3’逐步缺失和/或巢式缺失，直到病原菌对于报导基因的作用减弱或消失。为了确证这种病原菌诱导性元件的鉴定，可以向该元件中引入点突变。测定转录变化的另一种方法是将推测的基因调节元件连接到报导基因上。检测完整启动子，可将该DNA片段直接置于缺少内源启动子活性的报导基因之前。通过上述技术，可鉴定任何可诱导的植物抗病调节元件片段。

“组织特异性的”指相对于另外的组织（如韧皮部），在一种组织（如木质部）中能优先增加某种基因产物（如mRNA或多肽）的表达。

“细胞特异性的”是指相对于其它细胞（如表皮细胞），在一种细胞（如薄壁细胞）中能优先增加某种基因产物（mRNA或多肽）的表达。

“表－5－马兜铃烯(aristocholene)合酶”或“EAS”是一种催化反，反法尼基二磷酸环化成二环中间物表－5－马兜铃烯(aristocholene)的酶。

“病原菌”是指一种侵染活的植物组织细胞，刺激该组织产生抗病反应的生物。

"释放素"指任何一种能引发植物防御反应的分子。释放素的实例包括但不限于一种或多种毒性离子如汞离子，其它化学上明确的成分，代谢抑制剂，细胞壁聚糖，某些糖蛋白，某些酶，真菌孢子，脱乙酰壳多糖，某些脂肪酸，某些植物细胞壁来源的寡糖和释放蛋白（如 harpin，cryptogein， pariscein）。

"释放蛋白"是指一种蛋白质释放素。

"可操纵地连接"是指调节序列和基因以这样一种方式连接，在这种方式下，当适当的分子（如转录活化蛋白）结合到调节序列上时，调节序列允许基因表达。

"异源多肽"指任何在转基因植物细胞中由相对于转基因植物细胞部分或全部是外源的（即不是天然存在的）基因表达的多肽。

"多肽"指任何氨基酸链，可以是任意长度，可以经过翻译后修饰（如糖基化或磷酸化）。

"转化的植物细胞"指通过重组 DNA 技术（如本文所述的技术）已向其中（或其上代细胞中）导入重组的核苷酸序列（如 EAS4 启动子（-1147 到 + 67）： GUS 报导基因或 $gEAS4_{600}$（环化酶）启动子： parA1 成熟释放蛋白基因）的细胞。

"植物细胞"指任一由半透膜包围自我增殖并含有质体的细胞。其进一步增殖也需要细胞壁。本文中植物细胞包括但不限于藻类，蓝细菌，种子，悬浮培养物，胚胎，分生区，愈伤组织，叶片，根，芽，配子体，孢子体，花粉和小孢子。

"转基因的"指任何含有人工插入其中并且成为由其发育成的机体基因组一部分的一段 DNA 序列的细胞。在本文中，转基因有机体一般指转基因植物，人工导入 DNA 到有机体的基因组中。

"基本上纯的 DNA"是指没有在提供本发明 DNA 的有机体的天然基因组中位于该基因或调节元件侧翼的基因或辅助核苷酸的 DNA。该术语因而包括如插入载体的重组 DNA；插入自主复制的质粒或病毒的重组 DNA；或插入原核或真核生物基因组的重组 DNA；或作为独立的分子（如由 PCR 扩增的或限制性内切酶切割得到的 cDNA，基因组 DNA 片段或 cDNA 片段）不依赖于其它序列存在的重组 DNA。它也包括作为编码另外的多肽序列的杂合基因或调节元件的一部分的重组 DNA。

本发明的其它特色和优点由下面的优选实施方案和权利要求的叙述中可以体现出来。

## 附图简述

图 1 所示为受 EAS3 和 EAS4 启动子区序列调节的 GUS 的瞬时表达数据，对照为 CaMV 35S-GUS 构建体 (花椰菜花叶病毒 35S 启动子-β-葡糖醛酸酶报导基因)。。通过电击法将 DNA 构建体导入烟草原生质体进行以上实验。“没有诱导的” EAS-GUS 构建体的表达水平相对较高，这是因为在制备原生质体时用到了消化植物细胞壁的真菌酶。 y 轴表示 GUS 活性单位， EAS 上游 5’端中止的位置列在图中每一条块的下面。其上，标有相对于 EAS4 的自然转录起点（或相对应的 EAS3 碱基）的数目； EAS4 （ SEQ ID NO:2 )起点在核苷酸 573， EAS3 （ SEQ ID NO:2 ）可能的起点在核苷酸 489 处。

图 2A － B 所示为本发明的瞬时可诱导转录调节元件控制报导基因表达的信息。图 2A 图解说明 EAS4 启动子区控制 GUS 报导基因在稳定转化的转基因植物中表达的实验。图 2B 所示为 EAS4 启动子相关序列通过 CaMV 35S 最小化启动子控制 GUS 报导基因表达的“功能获得”方法分析结果，。在图 2A 和 2B 中， EAS4 上游区核苷酸位置序数为相对于 EAS4 基因天然转录起始位点（也可参看 SEQ ID NO： 2，其中转录起点对应于核苷酸 573 ）的数目。 2A 和 2B 两图中， GUS 表达活性用每毫克蛋白质的荧光单位表示。

图 3A － B 图解 EAS4 基因 5’上游区 DNA 序列和带有 EAS4 启动子（－ 1148 到 + 67 ）的 GUS 报导基因的结构。图 3A 所示为为 EAS4 启动子（－ 1148 到 + 67 ） 5’上游区核苷酸序列。 CAAT 和 TATA 盒用粗体表示，+ 1 标记为转录起点。图 3B 图解说明 EAS4 启动子（－ 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因的结构。双元载体 pBI101.1 中 EAS4 启动子（－ 1148 到 + 67 ） 5’侧翼序列和 GUS 报导基因按正确的阅读框连接。

图 4A － B 所示为在含 EAS4 启动子（－ 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因的转基因烟草植株根，茎，叶中释放素诱导的 GUS 报导基因表达的数据。图 4A 曲线图所示为释放素诱导烟草叶片 GUS 报导基因在 18 个小时中的表达。 06i， 08r 和 09p 分别代表不同的含 EAS4 启动子

（－1148 到＋67）：GUS 报导基因的转基因烟草转化系。水（作为对照）和 25 nM cryptogein 同时对称地渗入叶片（远轴部位），然后在 18 个小时内取下叶片渗透区测定 GUS 活性。给出的实验数据为两个独立实验的平均结果。图 4B 是一条形图，所示为在含 EAS4 启动子（－1148 到＋67）：GUS 报导基因的转基因烟草茎和根中释放素诱导的 GUS 活性。03f 和 09p 代表两个独立的转基因烟草转化系。C－0（空框）代表没有释放素处理的根段和茎段 GUS 活性；C－18（阴影框）和 E－18（实框）分别表示用水或 100 nM 释放素 cryptogein 温育 18 小时后的根段和茎段的 GUS 活性。每个转基因系取 5 个独立的植株计算。

图 5 条形图所示为转基因烟草中寄生疫霉烟草变种的生理小种 0 和生理小种 1 的病原菌诱导的 GUS 活性。一个含 EAS4 启动子（－1148 到＋67）：GUS 报导基因的转基因烟草系（09p）离体叶片以培养 2 天的寄生疫霉烟草变种菌丝药栓接种，在 27 ℃，24 小时连续荧光下培养。对照叶片以无菌的燕麦片琼脂药栓接种。测定叶片组织感染区 GUS 活性。每条的数值是三次独立实验的平均值和标准误（n=5）。

图 6 是一条形图，所示为病原菌和释放素诱导的转基因植物 GUS 活性的比较，病原菌是丁香假单胞菌丁香致病变种 61 和它的 hrpH 突变体，释放素是纯化的细菌释放素 harpin。含有 EAS4 启动子（－1148 到＋67）：GUS 报导基因的转基因烟草系（09－P）叶片，渗透 50 ug/mL 纯化的解淀粉欧文氏菌释放素 harpin，或丁香假单胞菌丁香致病变种 61 野生型或它的 hrpH 突变体的细胞悬液（$A_{600}$ = 0.05）。温育 12 个小时，随后检测叶片渗透区 GUS 活性。对照值为观测到的用水渗透处理的叶组织样品 GUS 活性。图中每条上的数值为 5 株植物所得结果的平均值。

图 7A－B 所示为烟草植物组织中 5－表－马兜铃烯(aristolochene)合酶（EAS）诱导的 Western 印迹分析。蛋白样品分别从对照和释放素处理的烟草叶片，茎和根中提取。等量蛋白样品（每泳道取叶片和茎的样品 25 ug，取根的样品 15 ug）经 SDS－PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜。转移条带和 EAS 抗血清反应，然后用偶联于碱性磷酸酶的羊抗小鼠抗体显色。图 7A 所示为叶和茎组织样品 Western 印迹分析。图 7B 所示为根组织样品 Western 印迹分析。

图 8A - L 的彩图所示为含 EAS4 启动子（ - 1147 到 + 67 ）： GUS 报导基因的转基因烟草中释放素诱导的 GUS 活性的组织化学定位。一个典型转基因烟草系叶片组织经 25 或 50 nM cryptogein 释放素渗透。经过大约 8 小时温育后，组织切片用 1 mM X-gluc （ 5-溴 4-氯 3-吲哚 β-葡糖苷酸）染色分析 GUS 活性。茎和根段经水或 100 nM 释放素 cryptogein 渗透约 12 小时后显色。图 8A 彩图为含 EAS4 启动子（ - 1147 到 + 67 ）： GUS 报导基因的转基因烟草叶片中释放素诱导的 GUS 活性，诱导剂为两种释放素制品： cryptogein 和 parasicein ，两者作用浓度为 25 nM 和 50 nM （图中分别表示为 $C_{25}$， $C_{50}$， $P_{25}$ 和 $P_{50}$ ）。图 8B 彩图为叶片横切片图，显示 cryptogein 处理后释放素诱导的 GUS 活性（放大 75X ）。图 8C 彩图为茎横切片图，显示用 cryptogein 处理后释放素诱导的 GUS 活性（放大 7.5X ）。图 8D - F 三个彩图所示为图 8C 茎 GUS 染色的横切片逐步放大（分别放大 15X， 60X 和 75X ）。图 8G 彩图所示为根尖经水处理并染色的 GUS 活性（放大 60X ）。图 8H 彩图为根尖纵切片，显示经 cryptogein 处理后释放素诱导的 GUS 活性（放大 60X ）。图 8I 彩图为根纵切片，显示经水处理并染色的 GUS 活性（放大 75X ）。图 8J 彩图所示为根经 cryptogein 处理后 GUS 活性染色的纵切片（放大 75X ）。图 8K 彩图所示为根经水处理后 GUS 活性染色横切片（放大 95X ）。图 8L 彩图所示为根经 cryptogein 处理后 GUS 活性染色横切片（放大 95X ）。 C 代表 cryptogein ， P 代表 parasicein ， c 代表皮层， ca 代表形成层， e 代表表皮， p 代表栅栏薄壁组织， pe 代表周皮， ph 代表韧皮部， pi 代表髓薄壁组织， s 代表海绵薄壁组织， t 代表表皮毛， x 代表木质部, vc 代表维管柱。

图 9 图示说明得到抗病植株的遗传工程操作过程。用 PCR 技术分离 ParA1 释放蛋白的编码序列，得到具有 BamHI 和 SstI 末端的序列。$gEAS4_{600}$-GUS-pBI101 在 EAS 启动子的调控下指导 GUS 报导基因的表达，将其用 BamHI 和 SstI 双酶切后，释放 GUS 片段。然后将 BamHI/SstI 酶切的 parA1 扩增引物连接到 $gEAS4_{600}$-GUS-pBI101 消化后产生的大片段上形成 $gEAS4_{600}$-parA1-pBI101 。经适当的释放素诱导后，植物细胞或组织通过 $gEAS4_{600}$-parA1-pBI101 合成 ParA1 释放蛋白。

图 10 是一条形图，说明含有 $gEAS4_{600}$（环化酶）启动子控制的 parA1 成熟释放蛋白基因的转基因烟草（ *Nicotiana tabacum* cv.KY160 ）的不

同转基因系经离体叶片接种寄生疫霉烟草变种生理小种0或生理小种1的发病率。y轴为72小时后叶片坏死斑数目（每片叶坏死斑点数）。x轴为用于检测抗病能力的对照和不同的转基因烟草系。KY160代表没有转基因的 *Nicotiana tabacum* cv.KY160，G代表独立的 *Nicotiana tabacum* cv.KY160 转基因系，以含 $gEAS4_{600}$（环化酶）启动子与GUS融合的构建体转化；M代表独立的 *Nicotiana tabacum* cv.KY160 转基因系，以含 $gEAS4_{600}$（环化酶）启动子与成熟 parA1 释放蛋白编码序列融合的构建体转化；S代表独立的 *Nicotiana tabacum* cv.KY160 转基因系，以含 $gEAS4_{600}$（环化酶）启动子与含有一段信号肽序列的成熟 parA1 释放蛋白编码序列融合的构建体转化。阴影框表示以寄生疫霉烟草变种生理小种0接种离体叶片，实框表示以寄生疫霉烟草变种生理小种1接种离体叶片。

发明详述

5－表－马兜铃烯(aristolochene)合酶（EAS）是诸如茄科植物中倍半萜植物抗毒素合成途径中的一个关键酶，这些植物包括但不限于烟草属的种类（如烟草），辣椒和钝天仙子。EAS催化法呢基二磷酸形成（+）gemacrene A，生成桉叶烷碳正离子，最后形成5－表－马兜铃烯(aristolochene)，其它一些植物如松柏类植物体内也有倍半萜环化酶。

诱导植物组织或植物细胞合成植物抗毒素的宿主防御反应的物质包括疫霉属细胞壁碎片和绿色木霉纤维素酶。然而日本曲霉果胶酶不能作为烟草细胞培养物的释放素。诱导倍半萜植物抗毒素合成的释放素是在控制生物合成的关键酶转录水平上起作用的〔Vogeli 和 Chappell（1990）. 植物生理学 94:1860－1866〕。类似的情况在其它植物中也观察到了，但是一直没有这种介导对植物病原菌胁迫的基因诱导的转录控制序列的描述。

烟草*(N.tabacum)*EAS家族有12－15个成员，EAS4的编码序列已经发表〔Facchini 和 Chappell（1992）同上〕。然而，从那时起，发明人注意到EAS3的表达似乎并不受释放素的诱导，让人感到奇怪的是，在转基因细胞培养物中EAS3上游核苷酸序列似乎不能介导嵌合基因构建体的GUS报导基因对释放素的诱导反应。要说明的是1992年Facchini和Chappell发表的文章中对于转录起点的指定并不正确。如同

Facchini 和 Chappell（ 1992 ）上文中出现的一样， EAS4 基因组克隆的核苷酸序列列出在 SEQ ID NO:7，推断的氨基酸序列列出在 SEQ ID NO:8。

植物对植物病原微生物的侵入和感染的防御的其它方面包括超敏反应，其标志是组织坏死，即植物病原菌感染处的植物细胞发生程序性细胞死亡。上面所描述的释放素处理也能诱导坏死反应。

释放蛋白是植物病原真菌产生的一种蛋白质，能诱导被侵染的植物发生超敏反应。通常，但并不是必然地，定点细胞死亡是在被感染（或胁迫）的植物组织中释放蛋白诱导反应的结果。这些反应介导对入侵的，潜在植物病原微生物破坏性感染的完全或部分抗性。从本发明的目的来看，在入侵植物组织或在植物组织中表达其编码序列后诱导超敏反应的植物病原菌或潜在植物病原菌的蛋白质，属于释放蛋白的广义定义之列。

了解相对清楚的植物病原真菌释放蛋白是寄生疫霉的 ParA1 蛋白。parA1 基因座是一种基因家族中的一员[Ricci 等，1989 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) 183:555-563]。parA1 基因产物的核苷酸序列和氨基酸序列由 Kamoun 等人（ 1993 ）在植物－微生物相互作用分子生物学 (Mol. Plant-Microbe Interact.) 4: 423 － 432 上公布，在本文 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO: 13 中列出。

其它具有潜在释放蛋白活性的植物病原菌蛋白的氨基酸序列和其它性质已经鉴定[参见，如 Nespoulous 等（ 1992 ） 植物(Planta) 186: 551 － 557； Huet 等（ 1992 )植物化学 (Phytochemistry) 31: 1471 － 1476； Huet 和 Pernollet（ 1992 ） FEBS 通讯 (FEBS Lett) 257: 302 － 306； Kamoun 等 （ 1993 ）植物－微生物相互作用分子生物学 (Mol. Plant-Microbe Interact.) 5: 22 － 33]。一些具有释放蛋白反应活性的病原细菌的无毒基因也被鉴定，例如 Keen N. T. （ 1990 ）在植物病理学年评[(Annu.Rev. Phytopathol.) 24: 447 － 463]中描述了 Fulva fulvia 的一个无毒基因。 Hammond-Kosack 等（ 1994 ）在美国科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91:10445 － 10449 中报导了暗黄枝霉的 avr 基因，其功能与寄生疫霉释放蛋白相同。

一些细菌性植物病原菌也表达对超敏反应的效应类似于寄生疫霉 ParA1 释放蛋白的蛋白质。从本发明的目的来看，这些蛋白质属于“释

放蛋白”范围。野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种无毒基因 avr Bs3 的多个同源物也存在于其它的野油菜黄单胞菌致病变种[Bonas 等（1989）分子发生遗传学(Mol. Gen. Genet.) 218:127 - 136；Knoop 等（1991）细菌学杂志(J. Bacteriol.) 173:7142 - 7150]和黄单胞菌属的其它种类中[De Feyter 和 Gabriel（1991）植物 - 微生物相互作用分子生物学 (Mol. Plant-Microbe Interact.) 4:423 - 432；Hopkins 等（1992）植物 - 微生物相互作用分子生物学 (Mol. Plant-Microbe Interact.) 5:451 - 459]。丁香假单胞菌番茄致病变种的 avrD 具有无毒基因作用；丁香假单胞菌大豆致病变种表达一个改变的 avrD 产物[Kobayashi 等（1990）植物 - 微生物相互作用分子生物学 (Mol. Plant-Microbe Interact.) 3:103 - 111]。

可以理解，使用病原菌反应性转录调节元件（并具有在这些植物中有功能的最小化启动子）调控之下表达的释放蛋白编码序列产生具有提高的抗病性的转基因植物时，释放蛋白必须能够促进这些植物中防御基因（包括但不限于那些控制植物抗毒素合成的基因，控制超敏反应的基因和/或控制定点组织坏死的基因）的表达才对本发明有用。本领域中已发现植物和植物病原菌的许多功能性组合，本领域的技术人员知道如何检测特定释放蛋白在特定的植物组织（或细胞）中启动程序性细胞死亡或植物抗毒素合成或类似过程中的功能。也可以理解，用某些真菌纤维素酶或植物多糖片段等成分处理植物细胞或组织能诱导宿主防御反应（即超敏反应）。这些处理已经作为研究实际病原菌攻击或入侵的模型。

非自然产生的重组核酸分子，如重组 DNA 分子，是一种自然界没有的分子，即是说，它是经过本领域已知的方法由天然过程产生的，但是在人为控制之下以产生所需结果或其是由来源于异源体的部分人工产生的，这些部分可以是自然产生的，或是化学合成的分子或由此产生的分子的一部分，并且这些部分通过连接或本领域中已知的其它方法组合。

转基因植物是一种被遗传改造的植物，它含有并表达异源 DNA 分子，或者作为调节 RNA 分子或者作为蛋白质分子。正如本文举例说明的，转基因植物经过遗传工程改造，含有并表达异源 DNA 分子，该异源 DNA 分子可操纵地连接到正常情况下不调节该异源 DNA 分子的转

录调控序列的下面并受其调控，即处于烟草 EAS4 基因的可诱导转录控制序列的调节控制下。在本文中，转基因植物也指由原始转基因植物产生的后代，原始转基因植物带有异源编码序列并能在本文所描述的定性的和/或定量的转录调节序列的调节控制下表达该序列。带有转基因胚胎的种子也包括在该定义之中。

当目的异源基因或编码序列需要在可能的病原菌入侵或诱导剂（如释放素）处理时表达，这种编码序列就要以有义方向可操纵地连上适合的启动子，同时由与启动子作用方向相同的可诱导调节序列调控，有义（即具有翻译功能） mRNA 才能产生。在植物细胞内作用的转录终止信号可以置于编码序列的下游，在植物中表达的选择性标记可共价连接于可诱导的表达单元，使得该 DNA 分子转化到植物细胞或组织，其存在可以被筛选出来，没有转化外源 DNA 的植物细胞或组织就会被杀死或出现生长障碍。同样地，转基因植物细胞悬浮培养物中，异源编码序列可以在可诱导的转录调节元件或转录增强元件的调控下表达，加入释放素到细胞培养基中会诱导这种表达。。

要在植物受到微生物病原菌，如植物病原真菌，入侵时抑制一个基因的表达，可以将该基因部分或全部编码序列或 cDNA 序列可操纵地连接于能在植物细胞中作用的启动子，其方向和启动子方向相反（即按反义方向连接），这样转录 RNA 序列和 mRNA 互补，病原菌入侵诱导表达反义分子。另外，可在指导反义 RNA 合成的核苷酸序列下游处加上转录终止信号。

发明人已分离到一段 DNA 序列，在植物细胞受到潜在植物病原菌入侵和/或释放素或其它化学信号处理时，介导其下游基因的诱导表达。例如，乙烯和甲基茉莉酮酸酯联合作用可以通过定性的转录调节元件诱导其下游基因表达。现在已经很清楚，在该调节序列中可能存在多个序列基元，每个基元对应于一个或几个不同的环境信号。如本文举例具体说明的，该转录控制序列来源于烟草 EAS4 基因座，在 SEQ ID NO:7 中列出。推测的 EAS 蛋白氨基酸序列在 SEQ ID NO:8 中列出。 EAS4 基因的开放阅读框在 SEQ ID NO:7 中列出，它包含有 6 个内含子 。

用计算机在 Genbank 中检索，没有发现和 SEQ ID NO:2 明显同源的序列。

Facchini 和 Chappell(1992，同上)用 EAS 探针和 Southern 杂交实验

鉴定了烟草 EAS 基因的组织结构。在严格杂交条件下，出现了多个杂交片段，显示出烟草基因组中 EAS 是有 12 - 16 个成员的家族。但是，在这些实验中，用作探针的片段包括 EAS 编码序列，而不包括启动子或启动子相关序列。

用判断核苷酸序列同源性显著程度的方法，能在烟草以外的植物中鉴定并分离 EAS 同源基因，即是说，在中等至严格杂交条件下，和烟草 EAS 编码序列探针进行 DNA： DNA 杂交即可鉴定其它植物种类中的相应基因。对杂交条件的讨论见 Hames 和 Higgins(1985)核酸杂交（ Nucleic Acid Hybrdization, IRL Press, Oxford U.K.）。一般来说，在中等杂交条件下能检测到的杂交，说明两序列之间至少有 70 % 的核苷酸同源性。在这些情况下，一般优选至少 100 个碱基的序列作为探针。本实验条件下，最优选探针来源于 EAS4 编码序列的一部分。对于杂交探针的标记可包括但不限于：同位素基团，萤光基团，结合有特异结合的配偶体（其也被标记）的配体如生物素。正是通过标记可以检测到结合到靶核酸分子上的探针。或者，熟知的广泛采用的聚合酶链反应(PCR)技术可以方便地扩增和靶序列有高度同源性的序列。

现在已经知道，除 SEQ ID NO:7 中列出的 EAS 编码序列以外，还存在其它的核酸序列，其编码序列和 EAS4 编码序列是功能上同义的。如果核酸序列编码的蛋白质氨基酸序列相同，这两个核酸序列是同义序列。遗传密码的简并性是本领域所熟知的，即许多氨基酸，不止有一个编码它的核苷酸三联体。在蛋白质序列中一些氨基酸的替换并不影响该蛋白质的功能，这也是生物学领域所熟知的。总的来说，保守氨基酸替换或相似氨基酸替换在不影响蛋白质功能时是可以忍受的。相似氨基酸指氨基酸具有相近的大小和/或电荷性质，如，天冬氨酸和谷氨酸，异亮氨酸和缬氨酸都是相似的氨基酸对。本领域中两个氨基酸之间的相似性可以用多种方法进行分析。例如，在此引作参考的 Dayhoff 等(1978)的《蛋白质序列和结构图谱》（ Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5 Suppl., 3 pp 345-352）中提供了一个氨基酸替换频率表，利用表中数据可以判断氨基酸之间的相似性。 Dayhoff 等的频率表是通过比较多种不同进化来源的相同功能的蛋白质的氨基酸序列得到的。

萜烯环化酶基因存在于茄科植物，包括本文公开的烟草和钝天仙子，也存在于唇形科(Labitaceae)和大戟科植物，包括但不限于那些被证

明含有高度同源序列的植物，也存在于绝大多数植物。优选 EAS4 同源物选自茄科。这些序列的鉴定可以通过下列方法进行：核酸分子杂交，或在待测序列克隆到表达载体中时，通过与烟草 EAS 特异抗体交叉反应，或采用本领域已知的其它方法，包括使用相应于 SEQ ID NO:7 中的寡核苷酸序列进行 PCR，优选采用 EAS 编码序列。采用 Vogeli 等[1990，植物生理学(Plant Physiol). 93:182 - 187]的方法纯化出 EAS 免疫实验动物可以制备抗体，或使用肽结合物制备抗体，其中该肽的氨基酸序列来自 EAS 氨基酸序列（ SEQ ID NO:8 ）的亲水部分。在本领域中单克隆抗体和多克隆抗体制备技术方便可行[参见 Campbell(1994)，单克隆抗体技术，生物化学和分子生物学的实验室技术(Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)，第十三卷. Burdon 和 Knippenberg 编 Elsevier， Amsterdam; Harlow 和 Lane (1988)，抗体：实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual)，冷泉港实验室，冷泉港（纽约）]。

或者， cDNA 文库（在表达载体中）可以用 EAS 特异性抗体筛选，或者 EAS 肽特异性抗体可使用 EAS 蛋白的亲水区的肽序列（ SEQ ID NO:8 ）和本领域中相关的成熟技术制备。

专业技术人员知道可诱导的转录调节序列可以可操纵地连接于任何能在植物中作用的启动子；其中调节元件和启动子偶联，通常所用启动子为截短的(或最小化)启动子，例如截短的花椰菜花叶病毒（ CaMV ）35S 启动子。截短形式的其它组成性启动子也用来提供 CAAT 和 TATA 同源区；这些启动子序列可由一些基因衍生而来，如根癌农杆菌 T - DNA 基因（如 nos， ocs 和 mas ）和植物病毒基因如 CaMV 19S 基因。可以理解专业技术人员的目的是确定用于可诱导转录调节序列的特定启动子。也可以理解当一个能诱导细胞死亡反应的蛋白的要表达时，优选在没有诱导因子存在时，没有基本转录（和翻译）表达。可诱导基因产物对于产生它的植物细胞没有明显的毒性时，在应用这种基因表达时，尽量减少基本表达量就不是很重要。

最小化启动子含有 RNA 聚合酶结合和转录起始必需的 DNA 序列信号。对于 RNA 聚合酶 II 启动子，它有一个 TATA 同源序列基元位于转录起点上游约 20 - 50bp 处，一个 CAAT 同源序列基元位于转录起点上游约 50 - 120bp 处。专业人员习惯于用核苷酸数目表示位置，即从转

录起点开始向上游（5'方向）逐渐增加。通常，最小化启动子控制的转录水平比较低，对于植物组织受到的环境信号或发育信息没有正的或负的反应。一个适合于植物的最小化启动子的实例是截短的 CaMV 35S 启动子，它由 35S 基因的 - 90 到 + 8 区段组成。

可诱导转录调节序列（定性的转录调节序列）位于 EAS4 基因相对于转录起点的 - 167 到 - 100 区段（在 SEQ ID NO:2 中的核苷酸 406 - 473，转录起点位于 573 核苷酸处）。可以理解，可能有多个序列基元能对特定的刺激发生反应。将该序列可操纵地置于在植物细胞中有功能的最小化启动子的上游，就可使可操纵地融合于启动子下游的编码序列，如异源编码序列可诱导地表达。专业技术人员懂得编码序列翻译表达必要的空间及其它条件。这种异源编码序列优选是植物病原微生物（如病毒，细菌或真菌）释放蛋白样的蛋白质编码序列，如寄生疫霉 parA1 基因产物（释放蛋白）的编码序列，其中需要通过对入侵的潜在植物病原菌的超敏反应的抗病性。一些植物病原细菌的 harpin 蛋白也能作为 EAS4 衍生的可诱导转录调节序列介导的表达的诱导物，加入 EAS4 基因另外的 5'侧翼序列能增加下游基因的表达水平。优选使用 EAS4 序列 - 266 到 + 1 区（SEQ ID NO:2 核苷酸 307 到 573），更优选的序列包括 - 567 到 + 1（SEQ ID NO:2 核苷酸 1 到 573）。

和融合 EAS4 转录调节序列和异源最小化启动子等效的方法是使用与上游的启动子相关调节元件结合的 EAS4 启动子区。这样应用时，可用核苷酸 307 到 463，为更大程度地调节下游序列的转录，更优选 SEQ ID NO:2 中核苷酸 371 到 463， 311 到 462， 10 到 573。

象烟草这样的植物中，瞬时的可诱导转录调节元件在植物病原菌入侵或一些成分如真菌纤维素酶和一些植物和真菌细胞壁碎片处理时介导下游基因表达的诱导。能开启这种表达的植物病原菌包括但不限于：黄单胞菌属，丁香假单胞菌，疫霉属的种类包括寄生疫霉，和霜霉属的种类（如烟草霜霉）。

将适合于植物中表达的编码序列可操纵地置于调节启动子构建体下游。可用嵌合基因构建转基因植株，嵌合基因基本上由调节启动子，任何其它的转录增强序列，带有翻译必需信号序列的所需编码序列。其中抗病性最好在转基因植物组织受到潜在植物病原菌侵害或用释放素或其它能诱导 EAS4 基因表达的化学信号处理时诱生。编码序列优选编码

植物病原微生物的释放蛋白，如寄生疫霉的 parA1 基因产物[如同 Kamoun 等所述 (1993), 同上]。其它释放蛋白样蛋白在普通科学文献中有报导，包括来源于疫霉属，霜霉属和黄单胞菌属的种类以及其它种类的蛋白。

其它可以在目前的可诱导转录序列调控下表达从而增强（转基因）植物或植物组织对于植物病原病毒，细菌和真菌的抗性的编码序列包括但不限于：几丁质酶， TMV 壳蛋白或其它植物病毒壳蛋白， NIa 病毒基因等。

另外，或可选择地，调节性构建体的诱导性可以被诱导，例如用释放蛋白或病毒，细菌或真菌（优选不是宿主植物病原菌）处理转基因植物或组织，这些处理物质能通过不能开启 HR 的编码序列的可诱导转录调节元件诱导表达，或者直接获得抗病性状。这些可以优先表达的编码序列包括：杀虫蛋白如苏云金芽胞杆菌晶体蛋白之一种，其表达能使植物免于有害昆虫的伤害。

由天然EAS4基因合成植物抗毒素或由本发明的调节性EAS4启动子或可诱导转录调节元件与至少一种外源最小化启动子结合介导的基因表达诱导合成植物抗毒素，可通过使用多种明确的化学品、粗真菌培养物滤液、真菌细胞壁提取物和来自植物或真菌细胞壁的寡糖处理植物组织或细胞来诱导〔 Albersheim 和 Valent(1978)细胞生物学杂志 78：627 - 643 〕。能够诱导 HR 的其它化合物包括某些纤维素酶，如绿色木霉纤维素酶和某些植物或真菌细胞壁的碎片等。

转基因植物可以由本领域已知的任何方法得到，这些方法包括但不限于根癌农杆菌介导的 DNA 转移，优选用没有攻击力的 T - DNA 载体，电击法， DNA 直接转移和粒子轰击法[参见 Davey 等 (1989), 植物分子生物学(Plant Mol. Biol.), 13:275， Walden 和 Schell (1990)， 欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.), 192:563， Joersbo 和 Burnstedt (1991), 植物生理学(Physiol. Plant), 81:256; Potrykus (1991), 植物生理学及植物分子生物学年评(Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.), 42:205; Gasser 和 Fraley (1989), 科学(Sci.), 244:1293; Leemans (1993),生物技术(Bio/Technology), 11:522; Beck 等 (1993), 生物技术(Bio/Technology ) 11:1524; Koziel 等 (1993) 生物技术 (Bio/Technology), 11:194; 和 Vasil 等 (1993) 生物技术 (Bio/Technology), 11:1533]。将 DNA 导入双子叶和

单子叶植物的技术在本领域中已经比较成熟，同样培养和再生这些植物组织的技术也十分成熟。包括小麦，玉米，大麦，水稻和天门冬属植物的单子叶植物已经成功地转化和再生。例如美国专利号 5,350,689（1994，Shillito 等）描述了转基因玉米由原生质体和原生质体衍生细胞的再生。为了有效地产生转基因植物，用具有较高再生能力的植物组织来转化是十分重要的。转基因山杨组织已经获得并再生出转基因植株（Devellard 等 (1992) C.R.Acad. Sci. Ser. VIE 314:291-298K; Nilsson 等 (1992) 转基因研究（Transgenic Res.） 1:209-220; Tsai 等 (1994) 植物细胞报告（Plant Cell Rep.） 14:94-97）。杨树也已经转化成功 [Wilde 等 (1992), 植物生理学 (Plant Physiol.) 98:114-120]。实验室操作，转化和再生裸子植物的技术也已成功。例如美国专利号 5,122,466(1992, Stomp 等)描述了松柏类植物的生物导弹法转化，优选的靶组织为分生组织，子叶和下胚轴。美国专利号 5,041,382(1991, Gupta 等)描述了松树胚性细胞的富集方法。

转化外源 DNA 到植物细胞和/或组织和筛选阳性群体的技术及试剂已广为人知。筛选植物细胞中外源 DNA 的遗传标记已众所周知，如带有抗生素抗性的基因，抗生素如卡那霉素，潮霉素，庆大霉素或博来霉素等。这些标记使得筛选在含有适当抗生素的培养基上正常生长的转化植物细胞成为可能，因为它们带有相应的抗性基因。

其它采用表达盒的植物细胞和/或组织遗传操作方法包括以下步骤：先融合可诱导启动子或嵌合启动子和异源编码序列以及转录终止序列，将融合基因通过农杆菌介导，电击，微注射，粒子轰击法或其它本领域中已知的方法转化到植物细胞或组织。表达盒最好还包括在植物细胞中选择异源 DNA 的标记，如带有抗生素抗性的基因，抗生素如卡那霉素，潮霉素，庆大霉素或博来霉素。

转录调节序列，尤其是可诱导的转录调节序列（或具有可诱导的和优选转录增强序列的 EAS4 启动子）对于控制悬浮培养的转基因植物细胞基因表达是十分有用的，植物细胞悬浮培养物表达作为转基因植物体表达的替代物。例如，含有转录起始信号，可诱导的转录调节元件和转录增强元件的EAS4启动子可用于介导一个或几个异源编码序列在悬浮培养的转基因植物细胞中的表达。需要时，可以加入释放素或其它诱导性化学信号物质到培养物中诱导目的编码序列表达。悬浮培养细胞对于

释放素的反应确实可以同完整植株相比较。异源编码序列编码的蛋白质能介导药物化合物的合成，如聚β －羟基丁酸合成或其它次生代谢物，纤维素，淀粉，糖，油脂，或者该异源序列也编码药物蛋白，杀虫毒蛋白，抗真菌蛋白，抗病毒蛋白（如调节抗病毒感染的壳蛋白），Nla 蛋白，几丁质酶，葡聚糖酶，雄性不育蛋白或序列，改善营养成分质量或含量的蛋白，或涉及发育和/或组织特异程序或型式的蛋白。可以理解，转基因植物和转基因植物细胞一样可以用于表达异源编码序列。

转基因植物被诱导合成植物抗毒素或表达处于 EAS4 启动子或由 EAS4 启动子衍生而来的可诱导转录调节元件和/或 EAS4 启动子衍生的转录增强序列调控之下的异源编码序列时，释放素必须穿过植物角质层才能发挥作用。或者使植物组织形成伤口，从而易于或允许吸收释放素到其内部。各种各样的诱导成分，包括释放素和其它化学信号，如乙烯和甲基茉莉酮酸酯组合，都能有效地吸收到转基因植物悬浮细胞培养物内，这种培养物对于释放素的吸收和/或感受很少有障碍。乙烯和甲基茉莉酮酸酯诱导基因表达时，乙烯的使用浓度为约 1-50 ppm，甲基茉莉酮酸酯使用浓度为约 0.1 mM 到 1 mM。

下述实施例运用了多种技术，这些技术对分子生物学，在植物组织中进行重组 DNA 操作和转基因植株再生培养领域的技术人员是熟知易行的。所用的酶均是商业化产品，根据生产者的说明或作一些本领域所熟知的修改后使用。试剂，缓冲液和培养条件均是本领域已知的。提供标准的分子生物学操作指南的参考书有：Sambrook 等（1989）分子克隆(Molecular Cloning), 第二版, 冷泉港实验室, Plainview; NY; R. Wu 编辑 (1993) 酶学方法(Methods in Enzymology), 218; Wu 等 编辑 酶学方法(Methods in Enzymology), 100 和 101; Glover 编辑(1985) DNA 克隆(DNA Cloning), 卷 I 和 II, IRL 出版社 Oxford, UK; Hames 和 Higgins 编辑(1985) 核酸杂交(Nuceic Acid Hybridization), IRL 出版社 Oxford, UK。有关操作，转化植物组织的参考资料有：R.A. Dixon(1985）编辑植物细胞培养实践方法(Plant Cell Culture: A Practical Approach), IRL 出版社, Oxford, UK, Schuler and Zielinski (1989) 植物分子生物学方法(Methods in Plant Molecular Biology), Academic 出版社, San Diego, CA; Weissbach and Weissbach（1988）编辑 植物分子生物学方法 (Methods in Plant Molecular Biology), Academic 出版社, San Diego,

CA; I. Potrykus（ 1991 ）植物生理学及植物分子生物学年评(Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.), 42:205; Weising 等(1988 ) 遗传学年评(Annu. Rev.Genet.) 22:421； van Wordragen 等 （ 1992 ）植物分子生物学报告(Plant Mol. Biol. Rep.) 19:12； Davey 等(1989) 植物分子生物学(Plant Mol. Biol.) 13:273; Walden and Schell (1990)欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.) 192:563; Joersbo and Brunstedt (1991)植物生理学(Physiol. Plant.) 81:256 和其它前面所提到的文献。所采用缩写和名称均被本领域视为标准用法并普遍地用于所引用的专业期刊上。

本申请所有引用的文献在此引作参考。

下述的实施例只是对本发明加以说明，并非有意限制本发明的权利要求范围。专业技术人员对列举的成分和方法的任何变动都在本发明的范围之列。

实施例

实施例 1　EAS 特异抗体

烟草 EAS 特异性单克隆和多克隆抗体按 Vogeli 等（ 1990 ）[植物生理学(Plant Physiol.)93： 182 - 187 ]所述方法制备。另一种制备多克隆抗体的方法是利用纯化的 EAS 作为抗原或用众所周知的方法将多肽序列接上一个载体蛋白作为抗原。用于抗体制备的氨基酸序列选自蛋白质上一段特异的亲水区( 关于抗体制备技术, 可以参看 Campbell(1994), 单克隆抗体技术， 生物化学及分子生物学实验室技术(Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) ， Vol.13 Burdon 和 Rnippenberg 编辑 Elsevier,Amsterdam;Harlow 和 Lane （ 1988 ） 抗 体: 实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual.)， 冷泉港实验室，冷泉港 NY ）。

实施例 2　DNA 和蛋白质序列测定

单链和双链 DNA 序列测定使用双脱氧链中止法[Sanger 等（ 1977 ）美国科学院院刊（ Proc. Natl. Acad. Sci. USA ） 74:8073 - 8077]， 采用美国生物化学公司（ Cleveland, OH ）测序试剂盒或荧光自动测序系统（ Applied Biosystems, Foster City, CA ）。

实施例 3 全长 EAS 克隆的构建

终浓度 0.5 ug/mL 的绿色木霉纤维素酶（ Type RS, Onozuka ）处理处于快速生长期的 *N.tabacum*L.cv.KY14 细胞悬浮培养物，诱导 EAS 表达。设置同样的细胞悬浮培养物，不加纤维素酶作为对照。加入纤维素酶释放素到诱导的培养物中 4 小时后，用温和真空过滤法收集细胞。

由释放素处理 4 小时后的烟草细胞提取 PolyA$^+$ RNA，用 pcDNAII（ Invitrogen, San Diego, CA ）构建 cDNA 文库。采用示差杂交法使用由诱导和对照材料提取的 PolyA+ RNA 筛选文库。进一步用筛选杂交选择－体外翻译－免疫沉淀法分析所得阳性克隆，该方法见 Alwine 等（ 1979 ）酶学方法(Methods in Enzymol)， 68： 220 － 242 。

推测的阳性 EAS cDNA 克隆作为杂交探针分离其它 cDNA 和基因组克隆。所筛选的基因组文库是用 *N.tabacum*L.cv.NK326 下胚轴 DNA 经 MboI 部分酶切后在λEMBL3 中构建（ Clonetech Palo Alto, CA ）。这样筛选出 8 个独立克隆，每个分别代表一个不同的染色体基因座。EAS4 和 EAS3 基因组克隆由 Facchini 和 Chappell （ 1992, 同上）发表，现在知道它并不是完整序列。

Facchini 和 Chappell （ 1992, 同上）当时错误地鉴定此处所述的基因组克隆中 EAS3 和 EAS4 编码序列的起点。 EAS3 和 EAS4 编码序列正确的翻译起点被确定为位于原先鉴定的起点 ATG 上游 165bp 处的蛋氨酸密码子。 EAS4 的正确起点是用鉴定转录起点的引物延伸法和如上述的纯化酶的额外 N － 端氨基酸序列信息共同得到的。

通过聚合酶链反应制备 110bp 扩增引物，以提供对应于 EAS4 蛋白 56 － 92 位氨基酸 [见 SEQ ID NO:12 和 Facchini 和 Chappell （ 1992 ）同上 ] 的 DNA 序列。此扩增引物作为杂交探针在 pcdNAII（ Invitrogen,San Diego,CA ）中筛选 cDNA 文库，该文库来自于释放素（绿色木霉纤维素酶）处理 4 小时的烟草细胞培养物的 PolyA+ RNA 。获得该扩增引物所用的引物为： 有义引物（ ATGCTGTTAGCAACCGGAAGG， SEQ ID NO:3)； 反向引物（ ATCCAAAATCTCATCAATTTC； SEQ ID NO:4 ）；扩增模板为基因组 EAS4，进行标准 PCR 扩增 [Saiki 等 （ 1988 ）科学（ Science ）239:487-491], 110bp 扩增引物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后用 DE － 81 滤纸（ Whatman International, Inc. Clifton, NJ ）分离。分离的片段随后采用

随机引物标记试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)以[α-$^{32}$P]- dCTP 标记，作为杂交探针筛选上述 cDNA 文库粗筛克隆[Hanahan 和 Meselson(1980), 基因 (Gene) 10:63-67]。这些实验所得的最长的片段似乎也缺少 5'端编码区的 80 bp。

为了得到全长的克隆，采用 RT/ PCR 方法。由经释放素诱导后的烟草细胞制备的 PolyA+ RNA 合成第一链 cDNA[Facchini 和 Chappell(1992), 同上]，采用的反向引物为 ATGAGTCCTTACATGTGA（SEQ ID NO： 5）。该序列对应于翻译起点下游的 459 - 477 核苷酸。逆转录反应体积为 10ul（1ug PolyA+ RNA, 25 pmol 反向引物， 10 mM DTT， dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2.5 mM, 8 单位 RNase Block I(Stratagene, La Jolla, CA)，根据商家(Stratagene)提供的说明使用第一链合成缓冲液， 37 ℃反应 1 小时。 99 ℃处理 5 分钟终止反应。加入 40 ul 主 PCR 混合物到第一链反应中，主 PCR 混合物含有 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% Tween-20, 0.01%(W/V)明胶, 0.01% NP-40, 2.5 mM 各种 dNTP， 1 单位 TaqI 聚合酶， 25 pmol 正向引物（GGGAGCTCGAATTCC**ATG**GCCTCAGCAGCAGCAGTTGCAAACTAT， SEQ ID NO:6， EcoRI 和 NcoI 识别位点用下划线标出， ATG 转录起点用粗体标出）。PCR 反应在标准条件下进行[Back 等 (1994), 生物化学和生物物理杂志(Arch. Biochem. Biophys.) 315:523-532]。

492 bp 扩增产物用 EcoRI 和 HindIII 消化后，亚克隆到同样消化的载体 pBluescript SK(Stratagene)上。来自另一个部分消化的 cDNA 克隆的 HindIII/XhoI 片段克隆到 5'端序列克隆的相应位点，形成一个全长 cDNA 克隆，命名为 pBSK-TEAS 。用 pBSK-TEAS DNA 使用 $CaCl_2$ 法〔Sambrook 等 (1989) 同上〕转化大肠杆菌 TB1 。插入片段的序列分析证实该质粒具有预期和期望的结构（双脱氧链终止法，美国生物化学公司， Cleveland, OH）。

实施例 4 EAS 同源序列的鉴定。

按 Murray 和 Thompson （1980）所述的方法[核酸研究（Nucleic Acids Research） 8:4321-4325]分离烟叶基因组 DNA。用适当限制酶消化样品后，消化的 DNA 样品采用 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳，按大小分离

的 DNA 分子转移至尼龙膜上。用随机引物放射标记的 cEAS1 对 DNA 印迹进行杂交，cEAS1 在编码序列的 5'端截断[按 Sambrook 等（1989，同上）方法制备]，杂交在 60 ℃下进行，杂交体系为 0.25M 磷酸钠缓冲液 pH 8.0，0.7 % SDS，1 % 牛血清白蛋白，1mM EDTA。杂交膜在 45 ℃下以 2 X SSC，0.1 % SDS 洗两次，；在 0.2XSSC,0.1%SDS 中洗两次，（1 X SSC 为 0.15M 氯化钠，0.015M 柠檬酸钠 pH7.0）。相对杂交水平用图像测密计（MilliGen/Biosearch, Ann Arbor，MI）测定放射自显影图确定。

Facchini 和 Chappell（1992, 同上）曾报导 Southern 杂交显示烟草基因组 EAS 同源体有 12 - 16 拷贝。为了证实大量的烟草 EAS 同源序列的存在，和这些序列在每个基因组的表观数目，使用从其它植物中分离的 DNA 进行 Southern 杂交分析。

经限制性内切酶消化后基因组 DNA 经琼脂糖电泳（0.8 % 琼脂糖）分离后，转移至 Hybond-$N^+$ 膜(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)上。含 EAS 编码序列的探针经同位素标记，杂交基本上按 Sambrook 等 (1989, 同上)方法进行。采用中等强度杂交条件（4 × SSC，65 ℃），最后一次漂洗用 1 × SSC，65 ℃。

或者，采用熟知的方法进行 PCR，用靶 DNA 作为模板，反应引物来自 EAS4 编码序列中高度保守区（见 SEQ ID NO:7）。

实施例 5　EAS 蛋白的检测

采用　Facchini 和 Chappell（1992, 同上）和 Back 等（1994）[生物化学和生物物理杂志(Arch. Biochem. Biophys.) 315：527 - 532]的方法可以鉴定表达产物是否有酶的活性。

检测 EAS 交叉反应蛋白的存在，先提取总蛋白质，100 ul 细菌培养物于微量离心机上离心 2 分钟收获并浓缩。去掉上清液，菌体沉淀重新悬浮于 100ul 50mM Tris-HCl, pH6.8, 10 mM 二硫苏糖醇, 2% 十二烷基硫酸钠, 0.01%溴酚兰，10%甘油，取 15 ul 样品经 11.5 % SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行免疫测定。35ul 样品同样电泳后用于考马斯亮蓝染色。对可溶性蛋白样品分析，细胞如测定酶活性的方法同样处理（见 Back 等（1995），同上或 Facchini 和 Chappell(1992) 同上）。取 10ul 按上述方法电泳后作免疫测定，10 - 50ul 样品电泳后进行考马斯亮蓝

染色。

样品电泳后蛋白以考马斯亮蓝色，或如文献〔见 Towbin 和 Gordon（1984）免疫方法杂志 72：313 - 340〕所述将蛋白转移至硝酸纤维素膜，进行免疫测定。5 %低脂牛奶（用 1XTBS 配制，TBS：20 mM Tris - HCl，pH7.5，500 mM 氯化钠）温育 30 分钟，硝酸纤维素膜在含抗烟草 EAS 的单克隆抗体[1：1000 稀释，Vogeli 等（1990）植物生理学 93：182 - 187]的同样缓冲液中温育过夜，羊抗小鼠抗体连接于碱性磷酸酶，专门的显色剂随后进行温育以显示 EAS 特异抗体与固定在硝酸纤维素膜上的蛋白的结合[Leary 等，1983，美国科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 80：4045 - 4049]。

实施例 6 基因组 EAS4 克隆。

Facchini 和 Chappell (1992，同上)所述的 5'截短的 cDNA 克隆 cEAS1 作为杂交探针，筛选用λEMBL3 载体（Clontech，Palo Alto, CA）构建的 *N.tabacum*cv.NK326 基因组文库，采用常规亚克隆和 DNA 序列分析方法测定 DNA 序列。

EAS4 基因组克隆 DNA 序列和由此推出的氨基酸序列列于 SEQ ID NO:7 - 8。

实施例 7 转基因植物的产生

为了分析 EAS4 基因上游非翻译区部分的功能，DNA 上游 HindIII/BamHI 片段克隆到质粒 pBI101（Clontech，Palo Alto, CA）中，这样能监视转基因植物细胞中β - 葡糖醛酸酶（GUS）报导基因的表达。EAS3 基因的 5'侧翼序列列出在 SEQ ID NO:1 中，EAS4 基因的 5'侧翼序列列出在 SEQ ID NO:2 中。上述这些序列中翻译起始位点（ATG）是最后三个核苷酸。通过引物延伸技术，EAS4 转录起点估计在 SEQ ID NO:2 的 573 核苷酸处，CAAT 盒和 TATA 盒基元分别标记在 SEQ ID NO:1 的 429 到 432 和 456 到 459 核苷酸处（EAS3），在 SEQ ID NO:2 的 513 到 516 和 540 到 543 核苷酸处（EAS4）。

采用修改的根癌农杆菌转化技术转化得到转基因植物细胞系。含有待导入植物组织的 DNA 的重组质粒通过和大肠杆菌 TB1（pBK2013）进行三亲交配，转移至根癌农杆菌菌株 GV3850。处于不同生长阶段的

烟草叶片切成 $1cm^2$ 大小，浸入农杆菌悬液中（大约 $10^4$ 到 $10^5$ 细菌/ml）。3-10 分钟后，用无菌水漂洗小叶片，除去多余的农杆菌，以减少在处理叶片中由于多余细菌生长带来的问题。经过短暂干燥（30 - 60 秒）后，处理叶片放在没有加抗生素的植物组织培养基上，促进叶片感染和 DNA 从细菌到植物组织的转移。每升植物组织培养基含有：4.31g Murashige 和 Skoog 基础盐混合物(Sigma Chemical Company, St.Louis, MO)，2.5 mg 苄胺基嘌呤（溶于 1N NaOH），10ml 0.1 mg/mL 吲哚乙酸溶液，30g 蔗糖，2 mL Gamborg's 维生素溶液(Sigma Chemical Co., St. Lousis, MO)和 8g 琼脂。pH 用 NaOH 调节在 5.5 到 5.9 之间，两天后，叶片转移至含有 300ug/mL 卡那霉素，500 ug/mL 噻吩甲氧头孢菌素(Merck, Rahway, NJ)的植物组织培养基上，卡那霉素用于筛选转化植物组织，噻吩甲氧头孢菌素用于抑制农杆菌生长。

转化过程中尽量减少外植物接触农杆菌的时间，从而避免在产生转基因植物细胞过程中调节性 parA1 编码序列诱导表达，一旦 ParA1 表达，会导致细胞死亡反应。相应地，将含可诱导的转录调节元件控制下的细胞自杀基因的异源 DNA 导入到植物细胞的生物导弹法，是另一种很实用的转化技术，因为它不需要用农杆菌细胞或真菌细胞壁降解酶（它们用于产生原生质体，供电击转化），这两者可以诱导在调节元件控制下的编码序列。

转基因植物的再生基本上按 Horsch 等（1985）[科学(Science) 227：1229 - 1231] 所述方法进行。

得到的转基因植株在没有诱导（对照）和诱导处理条件下，如 Jefferson 等 [1987,EMBO J. 6： 3901 - 3907]所述，用 5-溴 4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖醛酸来检测β - 葡糖醛酸酶（GUS）报导基因的表达。诱导条件是在转基因烟草组织胞外施用绿色木霉纤维素酶[用自动加样器加入 50 - 100 ul 或 10 - 100 nM 蛋白（如 cryptogein）诱导成分至间质组织]，对照不用纤维酶释放素，但要进行同样操作。在一些实验中，用刀片划开烟草组织，以利于诱导化合物进入细胞。

实施例 8 启动子和启动子相关区的缺失分析

在其它反应中，包含于相对于转录起点 - 567 到 + 67 序列（SEQ ID NO： 2 EAS4 核苷酸 6 到 642）的 EAS4 衍生 DNA 序列替换 GUS 报

导基因载体 pBI221（ Clonetech, Palo Alto, CA ）中的花椰菜花叶病毒（ CaMV ）35S 启动子〔 Benfey 等（ 1990 EMBO Journal), 9： 1677 - 1684 〕。 EAS4 上游区的缺失突变体用限制性内切酶处理后分离。在电转移的烟草细胞原生质体（ 图 1 ）和稳定的烟草转化系（ 图 2A 和表 1 ）中对 gEAS 启动子 - GUS 构建体进行了分析。瞬时表达的初步数据表明 SEQ ID NO： 1 对释放素诱导性没有作用， SEQ ID NO： 2 在调节基因表达中起作用。

各种 EAS3 和 EAD4 启动子 - GUS 报导基因构建体导入烟草原生质体，基因瞬时表达数据列出在图 1 。从 EAS4 启动子 5'端逐步缺失导致表达水平的降低，但 - 262 ， - 202 和 - 110 构建体（相对于 SEQ ID NO： 2 转录起点 573 核苷酸处)保持诱导性。这些数据表明用两种 EAS3 启动子区构建体， GUS 表达水平很低。同样，只用 CaMV 35S 启动子时，释放素处理没有诱导效果。

图 2A - 2B 的数据显示，缺失 - 567 到 - 160 区段遗传物质能降低下游基因表达水平，但并不能破坏表达的诱导性。因此， - 567 到 - 160 之间 DNA 片段似乎有转录增强活性。大多数转录增强活性表现在 - 567 到 - 212 区段，但也有一些增强活性受相对于转录起点 - 212 到 - 160 区段介导（ 在 SEQ ID NO： 2 中，转录起点是核苷酸 573 ， - 567 是核苷酸 1 ， - 212 是核苷酸 361 ， - 160 是核苷酸 413 ）

图 2B 所示的功能获得试验数据显示，介导对释放素处理的诱导反应必需的 DNA 序列在相对于 EAS4 转录起点 - 160 到 - 87 之间，（即 SEQ ID NO： 2 中，核苷酸 413 和 486 之间）。在这些实验中， EAS4 衍生序列置于一个截短的 CaMV 35S 启动子之前〔 Benfey 等（ 1990 ） EMBO J., 9： 1677 - 1684 〕。此图也说明 EAS4 衍生转录调节区与异源最小化启动子融合时也能起作用。

在对其它转化体的更广泛分析中，或者是整个 EAS4 上游序列 - 567 到 + 67 或者是其 5 '缺失片段插入载体 pBI101 （ Clonetech, Palo Alto, CA ）中 GUS（ β - 葡糖醛酸酶）报导基因的上游位置，然后分析在诱导和非诱导条件下 GUS 报导基因的表达水平。虽然其它上游序列的存在可以介导表达活性增强，但 EAS4 基因转录起点上游 160bp 序列足以指导调节 GUS 报导基因的调节性表达。在电击转移原生质体中，含 EAS4 转录起点上游最少 167bp 的构建体能提供瞬时基因表达，并且使

GUS 报导基因表达受释放素诱导（基因表达提高至少 2.5 倍）。相反，EAS3 上游序列（ SEQ ID NO:1)在瞬时表达系统中，似乎不能支持报导基因高水平表达，也不能使下游基因受释放素诱导。

有时，可以预期释放素诱导的 GUS 报导基因表达出现在原生质体系统中，因为产生原生质体时用到了真菌细胞壁降解酶，已经证实这些酶在植物体中能诱导植物抗毒素合成和倍半萜环化酶基因的表达〔 Chappell （ 1991 ）植物生理学( Plant Physiol.) 97： 693 - 698 〕。这些原生质体能对第二次释放素处理发生反应，可能的解释是细胞在第二次诱导处理之前有 6 - 8 小时恢复期。这种恢复期使得细胞恢复对释放素的反应。

pBI101 是 Clontech （ Palo Alto, CA ）公司商业化产品。它包含在 pUC19 载体上的 GUS 报导基因上游的 CaMV 35S 启动子；这样它能作为瞬时表达实验的载体，在瞬时表达实验中重组载体被导入植物原生质体中。该质粒及其衍生质粒的存在可以通过在含卡那霉素的培养基上生长来选择。在农杆菌双元质粒载体 pBIN19〔 Bevan M. （ 1984 ）核酸研究(Nucl.Acids Res.) 12： 8711 〕中一个“启动子减弱” GUS 盒同样带有一个在植物中表达的卡那霉素抗性决定子。

实施例 9 可诱导转录调节元件的鉴定

用 S1 核酸酶保护试验和引物延伸实验〔 Sambrook 等 （ 1989 ）,同上〕对 EAS3 和 EAS4 基因组克隆 5′侧翼区作图。含有从转录起点 5′端 1kb 片段的亚克隆进行序列分析并与 pBI101 质粒中的β - 葡糖醛酸酶（ GUS ）报导基因融合，以便在转基因植物组织中研究。得到的重组质粒用电击法转化烟草原生质体。采用瞬时表达法测量 GUS 活性，稳定的转基因烟草细胞系分离出来，测定 GUS 报导基因的诱导和表达水平。

制备含修饰的 pBI101 载体中 EAS4 转录起点上游最少约 200bp 序列的构建体，获得β - 葡糖醛酸酶（ GUS ）报导基因，用于分析驱动调节性 GUS 报导基因表达的能力。 200bp 侧翼序列似乎足以驱动电转化原生质体基因瞬时表达，并且提供 GUS 报导基因的释放素诱导表达特性（诱导至少 2.5 倍）。类似地用 EAS3 侧翼序列实验，结果表明来自 EAS3 基因座的 200bp 序列不支持 GUS 报导基因在转基因植物细胞中高

水平瞬时表达或对释放素诱导的反应。疫霉属纤维素酶和释放蛋白〔Ricci 等 (1989) 欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.) 183: 555 - 563〕有助于诱导 EAS4 衍生调节序列介导的基因表达。

推断出来的 EAS4 调节区经过寡核苷酸定点突变〔Kunkel (1985) 美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.USA) 82: 488 - 492〕，进一步对介导病原菌入侵时（如纤维素酶或释放素）诱导基因表达的重要序列进行鉴定。将 EAS4 转录起点第 - 233 到 - 234 位（相当于 SEQ ID NO: 2 核苷酸 334 - 335）野生型核苷酸 CA 换成 GT，用释放素（纤维素酶）处理 20 小时，似乎并没有改变测量到的 GUS 报导基因表达水平。

基本上如 Sambrook 等(1989) 所述进行的初步甲基化干涉试验和凝胶阻滞试验表明，以翻译起点 - 233 附近为中心（以 SEQ ID NO: 2 的 334 核苷酸为中心）有一个八聚体结合植物细胞核蛋白质。甲基化干涉试验表明如果先和核提取物作用后，位于 - 233 位处的 G 被优先保护对抗 DMS（硫酸二甲酯）的甲基化。凝胶阻滞试验结果和甲基化保护试验结果一致，当含有 - 343 到 - 140 区（相对于转录起点）（相当于 SEQ ID NO: 2 的核苷酸 230 到 433 区段）的 DNA 片段和核提取物作用后，在非变性凝胶电泳中的运动受到阻滞。如果将 - 234 到 - 233 处 GT 换成 CA，其结合蛋白性质消失。在对照和释放素诱导的细胞提取物中得到相似的结果，报导基因表达活性不受这种 2bp 核苷酸突变的影响。这样，可以得出结论，- 233 附近区域并不直接涉及对于病原菌入侵或释放素处理发生反应的基因表达的诱导。

初步实验结果表明 EAS4 相对于转录起点位置 - 253 到 - 48（SEQ ID NO: 2 中在 320 到 525 核苷酸之间）的 DNA 序列对其下游报导基因表达具有定性和定量的影响。EAS4 相对于转录起点 - 110 到 - 1（SEQ ID NO: 2 中从 463 到 572 核苷酸处）的序列介导诱导反应，而相对于转录起点 - 202 到 - 110（SEQ ID NO: 2 中 371 到 463）的序列能增强诱导和非诱导细胞中报导基因的表达水平。

实施例 10 嵌合 EAS4 启动子（- 1148 到 + 68）：GUS 报导基因的构建

在另一系列实验中，我们检测 EAS4 启动子（- 1148 到 + 67）在转

基因烟草中的活化。要得到烟草 EAS4 基因启动子（ - 1148 到 + 67 ）的 5'侧翼序列，首先从上述 gEAS4 基因组克隆中分离出包含 EAS4 5' 端部分序列的大约 1.9 kb HindIII - HindIII 片段，将该片段克隆到 pBluescript KS （ + ）质粒载体（ Stratagene ）的多克隆位点。以含有 EAS4 HindIII - HindIII 片段的 pKS （ + ）质粒 DNA 作为模板，用标准 PCR 方法扩增出大约 1.2 kb EAS4 启动子片段（ - 1148 到 + 67 ），该片段含有 EAS4 转录起点上游 1148 核苷酸序列和下游 67 bp 序列。该片段的核苷酸序列见图 3A 。这段含有 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）的 1215 bp HindIII - BamHI 片段随后与双元载体 pBI101.1 中 GUS 编码序列按正确的阅读框连接。图 3B 图示说明得到的 EAS4 启动子( - 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因结构。

实施例 11 释放素和病原菌诱导转基因烟草嵌合基因 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因的表达

为了分析烟草 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）的功能，用释放素或病原菌处理含有如图 3B 所示的 GUS 报导基因构建体的转基因烟草，按下述方法测定 GUS 报导基因表达。

通过三亲交配方法[Schardl 等 基因(Gene), 61： 1 - 11， 1987]将如图 3B 所示 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因转移到没有攻击力的根癌农杆菌菌株 GV3850 中。用 Horsch 等[科学(Science), 227： 1229 - 1231， 1985]叶盘转化法将带有 GUS 构建体的没有攻击力的农杆菌转化烟草(*Nicotiana tabacum* cv *Xanthi*)。在花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子控制下表达 GUS 报导基因的转基因烟草也被得到再生植株作为对照。得到的再生转基因烟草植株的种子在含 100 mg/L 卡那霉素的培养基上萌发，得到的抗卡那霉素幼苗移栽到温室土壤中生长。按如上的方法，在没有处理（水对照）和诱导（释放素或病原菌处理）条件下，测定这些植株 GUS 报导基因表达水平。

为了测定 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）驱动 GUS 表达的释放素诱导特性，如下所述，用真菌释放蛋白 crypogein 或水处理转基因烟草植株叶片，测定 GUS 活性。取生长 2 个月的转基因烟草全展叶（从植株下部往上数第八片叶）之一半，在远轴端用微量加样器加大约 50 ul 25 nM crypogein[根据 Ricci 等 欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.)

183:555 - 563， 1989 方法制备]对叶片进行渗透；另一半叶片同样地用约 50 ul 水处理。渗透开始后在不同时间从完整植株叶片分别取水和 crypogein 渗透处理区的叶片，分析 GUS 活性。

如图 4A 所示，来自三个独立转基因烟草系的叶片经 25 nM crypogein 渗透处理后，以释放素处理大约 4 小时后，诱导 GUS 报导基因表达。相形之下，释放素处理不能诱导 35S CaMV 启动子: GUS 报导基因（数据未示出）。另外，用水处理含有 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）: GUS 报导基因的转基因植物叶片后， GUS 报导基因活性不能被诱导（图 4 ）。从显微镜中观察， GUS 活性限制在用释放素处理的叶片组织，表明 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）没有被其它信号所诱导（图 8A ）。

按下述方法用释放素 crypogein 处理转基因烟草植株根和茎，测定 GUS 活性，从而确定 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）控制的 GUS 表达的器官特异性。从转基因烟草植株取下的根放在无菌 Murashige 和 Skoog培养基上备用。茎取自在温室中生长两个月的转基因烟草植株（从顶端而下 1 到 1.5 英寸左右取样）。用释放素处理前，根和茎切成大约 15 - 30 um 片段。置于用 100 nM crypogein 或水润湿的滤纸上，在室温下处理 18 个小时。接着按上述方法测定根段和茎段的 GUS 活性。

图 4B 为两个独立转基因烟草系的根和茎 crypogein 处理 18 个小时后诱导的 GUS 表达活性。在根和茎中分别可见 GUS 活性相对于用水处理（对照）的样品增加 15 倍。根中 GUS 活性高于茎。这些结果表明在根和茎中释放素处理可诱导 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）。

为了确定病原真菌是否能诱导 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）: GUS 报导基因的表达，按如下方法用寄生疫霉烟草变种的两个不同生理小种处理转基因植物叶片，测定 GUS 表达活性。取生长约 45 天的转基因烟草植株顶端幼叶，如 Tedford 等[Tedford 等 植物病(Plant Disease), 74:313 - 316， 1990]所述，用在燕麦片琼脂培养基上培养两天的寄生疫霉烟草变种生理小种 0 和生理小种 1 菌丝体药栓（直径约 1cm ）感染。感染叶片置于培养箱中用蒸馏水润湿的滤纸上，于 25 ℃ 用连续荧光处理 24 小时。对照叶片用空白燕麦片琼脂药栓接种。收集接种叶片，按上述方法测定 GUS 活性。

如图 5 所示，用寄生疫霉烟草变种生理小种 0 或生理小种 1 处理，

均诱导转基因烟草叶片 GUS 活性。虽然寄生疫霉烟草变种生理小种 0 和生理小种 1 一般诱导不同的病症，但是它们处理转基因 *N.tabacum*cv. *Xanthi* 时，没有看到明显的病症上的差别。另外，我们观察到寄生疫霉生理小种 0 和 1 诱导 GUS 报导基因表达的能力相同。

为了确定病原细菌或释放素是否诱导 GUS 报导基因表达，按下述方法用丁香假单胞菌丁香致病变种 61 和它的 hrpH 突变体以及解淀粉欧文氏菌释放素 harpin 处理转基因烟草叶片，测定 GUS 活性。取生长约 45 天的转基因烟草顶端幼叶，用丁香假单胞菌丁香致病变种 61 或它的 hrpH 突变体细胞悬浮液($A_{600}$ = 0.05)， harpin 释放素（ 50 ug/mL)渗透，渗透按前面所述用加样器进行。对照为用水同样渗透的叶片。大约 12 个小时，收集叶片按上述方法测定 GUS 活性。

如图 6 所示，用假单胞菌，hrpH 突变体，或 harpin 释放素处理转基因烟草叶片 12 小时，均能诱导 GUS 活性。相形之下，水处理的叶片只能检测到低 GUS 活性。另外不论是用野生型丁香假单胞菌丁香致病变种 61 还是用纯化的 harpin 释放素渗透处理组织区 12 - 15 小时后，均能观察到超敏反应。这些结果表明无论病原细菌还是细菌来源的释放素均能活化 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）。

实施例 12 免疫印迹分析

如下所述，用标准 Western 印迹方法分析 crypogein 处理转基因植物后不同组织中 EAS 表达情况。用 Vogeli 和 Chappell （同上）所述方法从对照和 crypogein 释放素处理的烟草组织中提取蛋白质，烟草组织用含 20 %（ w/v ）甘油， 10 mM 偏亚硫酸氢钠， 10 mM 抗坏血酸钠， 15 mM 氯化镁和 5 mM β - 巯基乙醇的 80 mM 磷酸钾缓冲液（ pH7.0 ）匀浆。用 Bio - Rad 法测定蛋白质浓度。取等量的蛋白进行 SDS-PAGE 分离，转移至硝酸纤维素膜上，按 Voegeli 和 Chappell （同上）所述方法进行免疫检测。

如图 7A - B 所示，用 Western 印迹实验在烟草叶片中没有检测到 EAS 蛋白质。相形之下，用释放素处理转基因烟草后叶片中诱导出现 EAS 蛋白质。茎段和根段在没有释放素处理时也能检测到 EAS 蛋白质，表明其中存在 EAS 多基因家族的一个或几个成员，但根据上述组织化学定位数据可确定不是 EAS4，它们在植物受伤时活化。

实施例 13 转基因烟草中 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因的 细胞特异性表达型式

图 8A - K 所示为用释放蛋白处理烟草不同转基因系组织后 GUS 活性染色结果。图 8A - K 数据表示图 3B 中表达 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）： GUS 报导基因的转基因烟草几个独立转基因系一系列不同时间的观察结果。转基因组织中 GUS 活性染色按下面方法进行: 组织切片用含 50 mM 磷酸钠, pH7.0, 0.05% Triton X-100, 0.1% β - 巯基乙醇的 1 mM X-gluc （ 5-溴-4-氯-3-吲哚 β-葡糖苷酸 ）溶液于 37 ℃保温 12 - 16 小时，然后用 50 % 乙醇， 5 % 冰乙酸， 10 % 甲醛固定 2 小时。切片在 70 % 乙醇中温育以除去适当组织中的叶绿素，在 Zeiss IIIRS 显微镜下观察染色的植物组织，用 MC63 显微成像仪照相。

图 8B - F 显示，除了表皮细胞层 GUS 活性极微弱外， GUS 活性存在于转基因叶片的释放素渗透区，表明在全部叶片组织中 crypogein 和 parasicein 渗透能活化 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）。在茎和根的表皮细胞中也看到类似的微弱染色（图 8G 和 8L ）。尽管极微弱 GUS 活性出现在转基因叶片的表皮细胞，但转基因植物叶和根的表皮毛中也能观察到 GUS 活性（图 8 B 和 8L ）。

另外，如图 8C - F 和 8L 所示，释放素诱导的 GUS 活性出现在茎和根切片的不同亚表皮层（图 8 C - F 和 8L ）。图 8F 显示茎组织中 GUS 活性也存在于形成层，韧皮层，和初生木质部组织层；极微弱 GUS 活性也存在于茎的皮层区。并且，类似于茎，根中 GUS 活性也定位于维管系统（图 8L ）。

cryptogein 处理前后均未发现 GUS 活性存在于花瓣中，包括有色素和无色素的组织。

实施例 14 转基因烟草植株中 EAS4 启动子（ - 1147 到 + 67 ） 5′ 缺失分析。

另外一系列实验用标准 PCR 技术得到 EAS4 启动子（ - 1147 到 + 67 ）的几个 5′缺失构建体。这些缺失的启动子随按上述方法与 pBI101.1 和 pBI221 载体中 GUS 报导基因融合并转化烟草。

表 1

| 5′ 缺失 | Gus 活性 (MU/mg 蛋白/分钟) | | 诱导倍数 | 检测的独立转基因系个数 |
|---|---|---|---|---|
| | 对照(水渗透) | 释放素处理 | | |
| - 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，和植物中存在完整 EAS4 启动子（ - 1148 到 + 67 ）相比，缺失 - 1148 到 - 567 区段的 EAS4 启动子使可诱导 GUS 活性降低 50 %。进一步缺失到 - 212，使可诱导 GUS 活性平均降低 90 %，缺失到 - 160， GUS 活性降低至具有完整启动子（ - 1148 到 + 67 ）的植物的 2 %，缺失至 - 63，启动子仍然含有推测的 CAAT 盒和 TATA 盒，完全不能诱导对照和释放素处理叶片中嵌合基因的表达。这些数据表明烟草中控制 EAS4 的定量表达水平的多个正调节元件位于 - 1148 到 - 160 区段。

比较缺失至 - 567 和缺失至 - 212 区段的结果也可以看出， - 567 到 - 212 区段影响表达水平，因为该区段缺失导致表达水平降低 4 倍，大部分 GUS 活性丧失。虽然缺失到 - 160 可诱导 GUS 活性大部分丧失，但发现 - 160 下游序列足以指导叶片组织中可诱导的基因表达。如图 9B 所示，用释放素处理叶片，可以观察到 17 倍的诱导。这些数据说明释放素诱导性的定性控制元件位于 - 160 到 - 115 之间。

实施例 15 转基因植物抗病性

按下述方法分离寄生疫霉生理小种 0 的 parA1 编码序列：分离基因组 DNA，将其作为 PCR 模板， SIG 正向引物为（ CGTTGGATCCCCACCTCATCCGAAATGAAC; SEQ ID NO:9; BamHI

位点用下划线标出）； 25 - 27 位核苷酸相当于翻译起点，反向引物为（ GGCTGAGCTCCTGGACGFCAGAGATCAAACC ； SEQ ID NO:10 SstI 位点用下划线标出），以扩增 ParA1 释放蛋白包括信号肽序列的编码区。为了分离相应于 ParA1 释放蛋白编码序列的扩增引物，使用 MAT 正向引物（ GCCGGATCCTTATGACTAGTTGCACCACCACGCAGCAAACTG ，SEQ ID NO:11， BamHI 位点 GGATCC， SpeI 位点 ACTAGT 均用下划线标出；翻译起点在核苷酸 12 - 14 处），反向引物同前（ SEQ ID NO:10 ），以基因组 DNA 作为模板。

扩增引物 DNA 用 BamHI 和 SstI 消化后，亚克隆到 pBluescript(Stratagene, La Jolla, CA)或 pEAS4 构建体。使用成熟蛋白的编码序列时，用 SpeI 消化成熟释放素/pEAS4 构建体，以便在开放阅读框的 5′端插入植物信号肽序列。 pEAS4 - GUS 载体用 BamHI 和 SstI 消化，大片段 DNA 用琼脂糖凝胶电泳纯化。

图 9 说明构建抗病植株的分子操作过程。用 PCR 方法得到 ParA1 释放蛋白编码序列，使其具有 BamHI 和 SstI 末端。 $gEAS4_{600(环化酶)}$ - GUS - pBI101 在 EAS 启动子调控之下指导 GUS 报导基因的表达，将其用 BamHI 和 SstI 消化，释放出 GUS 报导基因。将 $gEAS4_{600(环化酶)}$ - GUS - pBI101 消化后的大片段和 BamHI/ SstI 消化的 parA1 扩增引物连接，得到 $gEAS4_{600(环化酶)}$ - parA1 - pBI101，植物细胞或组织以该质粒转化后，用适当的释放素诱导， ParA1 释放蛋白就能合成。

为了分析对于植物病原菌的抗性，用上述通过农杆菌介导的基因转移方法重新产生含有 $gEAS4_{600(环化酶)}$启动子控制的 parA1 成熟释放蛋白基因（ SEQ ID NO:12 中氨基酸 21 - 118 ）或带有信号序列的 parA1 释放蛋白基因（ SEQ ID NO:12 中氨基酸 1 - 118 ）的转基因烟草植株（ *Nicotiana tabacum* cv.KY160 ）。得到的转基因植株用于分析对寄生疫霉烟草变种生理小种 0 和 1 分离株的抗性，分析方法采用 Tedford 等（同上）的标准离体叶片法。

如图 10 所示，和对照相比（即与没有转化的 *Nicotiana tabacum* cv.KY160 或含有 $gEAS4_{600(环化酶)}$启动子： GUS 报导基因的转基因 *Nicotiana tabacum* cv.KY160 相比），几个含有 $gEAS4_{600(环化酶)}$启动子控制之下的 parA1 成熟释放蛋白基因的独立烟草转基因系具有提高的对寄生疫霉烟草变种生理小种 0 和 1 的抗性。

尽管已经对本发明的一些实施方案作了详细说明，但显然本领域的技术人员能够对它进行修饰，扩充，修改和优化。正如在权利要求中列出的，必须清楚地认识到这些修饰和修改等都在本发明的精神和范围之内。

# 序列表

(1)一般信息:

(i)申请人: Board of Trustees of the University of Kentucky

(ii)发明名称: 转录控制序列和方法

(iii)序列数: 14

(iv)通讯地址:

(A)联系人: Fish & Richardson,P.C.

(B)街道: 225 Franklin Street

(C)城市: Boston

(D)州: MA

(E)国家: US

(F)邮政编码: 02110-2804

(G)电话:

(H)传真:

(v)计算机可读形式

(A)介质类型: 软盘

(B)计算机: IBM PC 兼容

(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软件: PatentIn Rekease #1.0 版本#1.30

(vi)现申请数据:

(A)申请号: US

(B)申请日:

(C) 分类:

(vii)在先申请数据:

(A) 申请号: US 08/577,483

(B) 申请日: 1995 年 12 月 22 日

(C) 分类:

(vii)在先申请数据:

(A) 申请号: US 08/471,983

(B) 申请日: 1995 年 6 月 6 日

(C) 分类:

(vii)在先申请数据:

(A) 申请号: US 08/443,639

(B) 申请日: 1995 年 5 月 18 日

(C) 分类:

(viii)代理人/代理机构信息:

(A)姓名: Paul T.Clark

(B)登记号: 32,164

(C) 参考/备案号码: 07678/003BR1

(ix)电讯信息:

(A)电话: (617)542-5070

(B)传真: (617)542-8906

(A)电传: 200154

(2)SEQ ID NO:1 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 512 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)初始来源:

(A)生物: 烟草

(xi)序列表述: 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 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 642 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)初始来源:

(A)生物: 烟草

(xi)序列表述: 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
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 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(xi)序列表述: SEQ ID NO:3:

ATGCTGTTAG CAACCGGAAG G

(2)SEQ ID NO:4 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(xi)序列表述: SEQ ID NO:4:

ATCCAAAATC TCATCAATTT C

(2)SEQ ID NO:5 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 18 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(xi)序列表述: SEQ ID NO:5:

ATGAGTCCTT ACATGTGA

(2)SEQ ID NO:6 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 45 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 有

(xi)序列表述: SEQ ID NO:6:

GGGAGCTCGA ATTCCATGGC CTCAGCAGCA GCAGTTGCAA ACTAT

(2)SEQ ID NO:7 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 4253 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)初始来源:

(A)生物: 烟草

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 1216..1327

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 1454..1718

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 1805..2182

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 2259..2477

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 2609..2747

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 2902..3148

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 3261..3555

(xi)序列表述: 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
```

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
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 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 550 氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列表述: 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
```

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



```
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 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(xi)序列表述: SEQ ID NO:9:

CGTTGGATCC CCACCTCATC CGAAATGAAC

(2)SEQ ID NO:10 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 有

(xi)序列表述: SEQ ID NO:10:

GGCTGAGCTC CTGGACGCAG AGATCAAACC

(2)SEQ ID NO:11 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 42 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)表述: /desc=“ PCR 寡核苷酸引物（反向）”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 有

(xi)序列表述: SEQ ID NO:11:

GCCGGATCCT TATGACTAGT TGCACCACCA CGCAGCAAAC TG

(2)SEQ ID NO:12 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 593 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)初始来源:

(A)生物: 寄生疫霉

(ix)特征:

(A)名称/键: CDS

(B)位置: 207..563

(xi)序列表述: 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
```

(2)SEQ ID NO:13 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 118 氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列表述: 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 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1368 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 两种

(D)拓扑构型: 两种

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列表述: 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
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
```

# 说 明 书 附 图

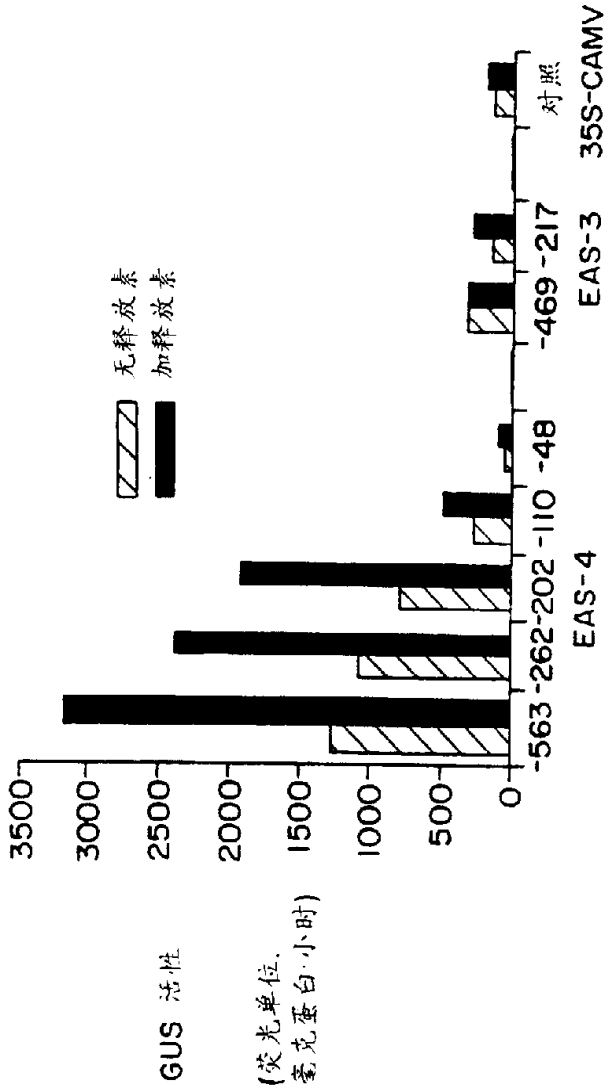
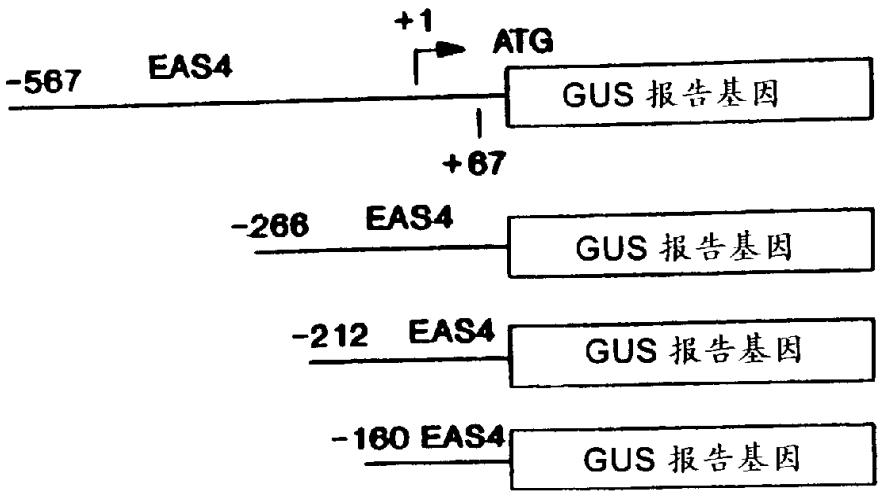
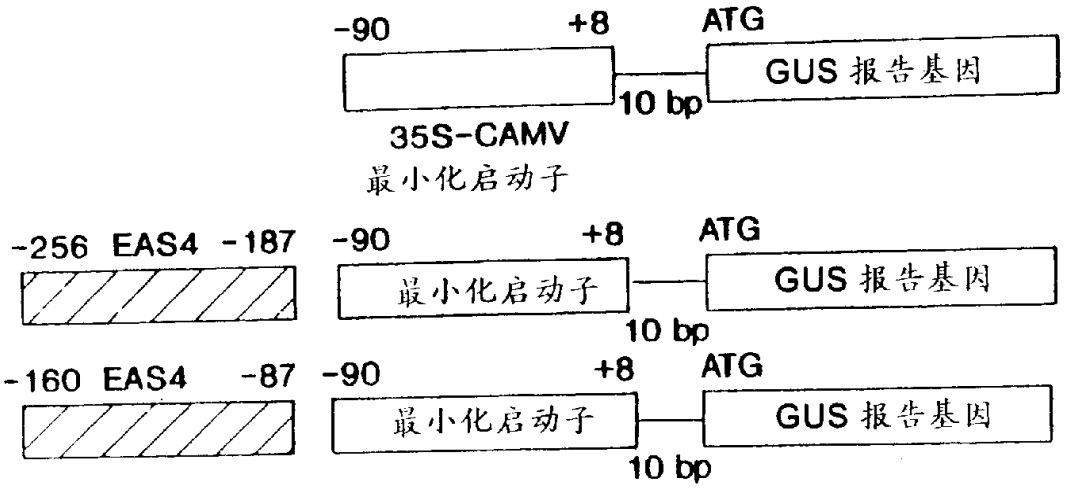

无释放素
加释放素
GUS 活性
(荧光单位.
毫克蛋白·小时)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-563
-262
-202
-110
-48
-469
-217
EAS-4
EAS-3
35S-CAMV
对照

图 1




| | GUS 表达 | |
|---|---|---|
| | 对照 | 诱导 |
| | GUS 活性 (荧光单位/毫克蛋白·小时) | |
| | 234 | 1803 |
| | 没有测定 | 没有测定 |
| | 65 | 492 |
| | 23 | 256 |

图 2A




| | GUS 表达 | |
|---|---|---|
| | 对照 | 诱导 |
| | 活性 (荧光单位/毫克蛋白·小时) | |
| 35S-CAMV 最小化启动子 | 14 | 14 |
| -256 EAS4 -187 + 最小化启动子 | 10 | 14 |
| -160 EAS4 -87 + 最小化启动子 | 12 | 527 |

图 2 B

-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

图 3 A

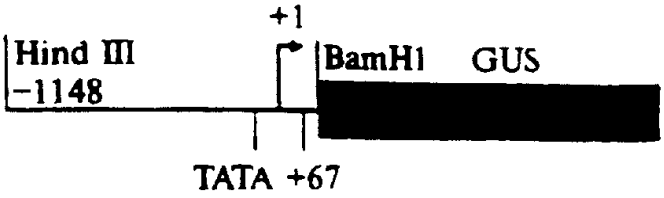



图 3 B

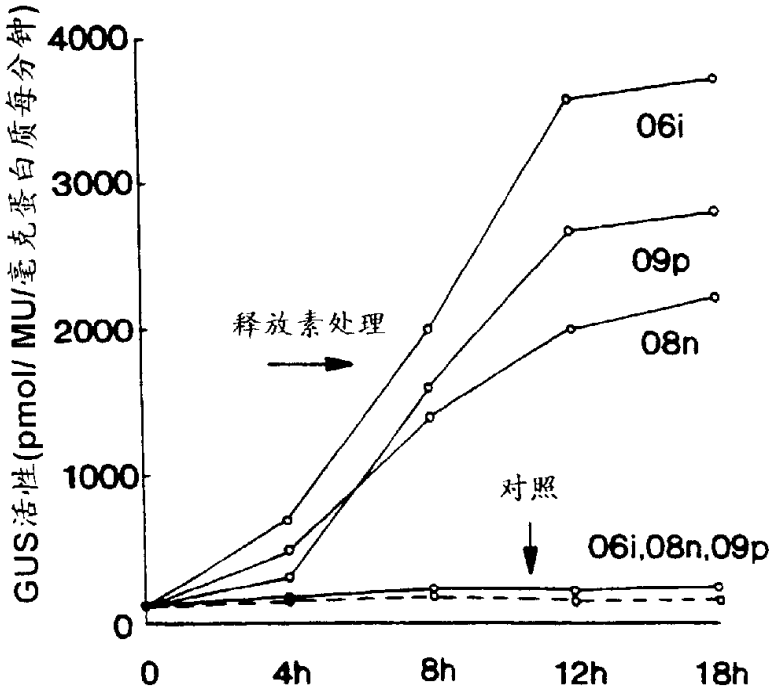

GUS活性(pmol/ MU/毫克蛋白质每分钟)
4000
3000
2000
1000
0
0
4h
8h
12h
18h
06i
09p
08n
释放素处理
对照
06i,08n,09p

图 4 A

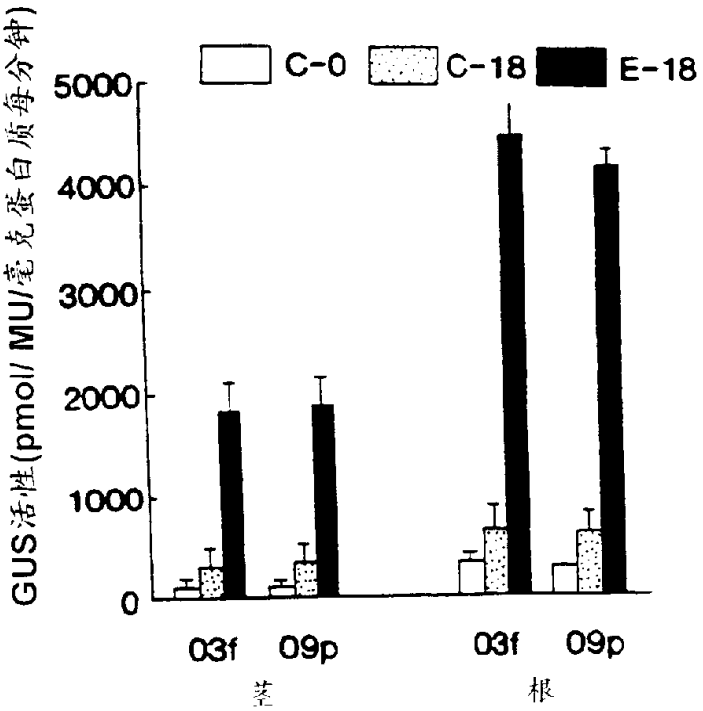

GUS活性(pmol/ MU/毫克蛋白质每分钟)
5000
4000
3000
2000
1000
0
C-0
C-18
E-18
03f
09p
03f
09p
茎
根

图 4 B

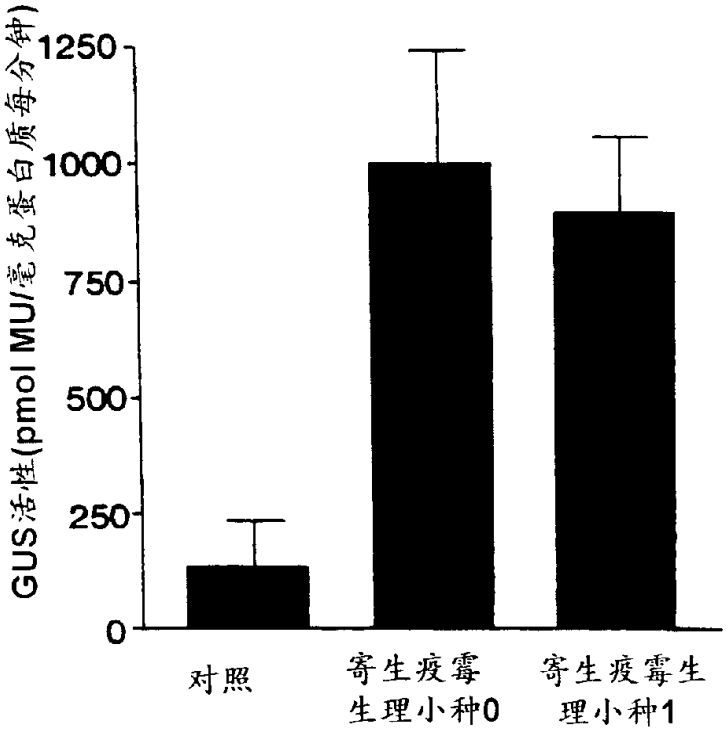

GUS活性(pmol MU/毫克蛋白质每分钟)
1250
1000
750
500
250
0
对照
寄生疫霉生理小种0
寄生疫霉生理小种1

图 5

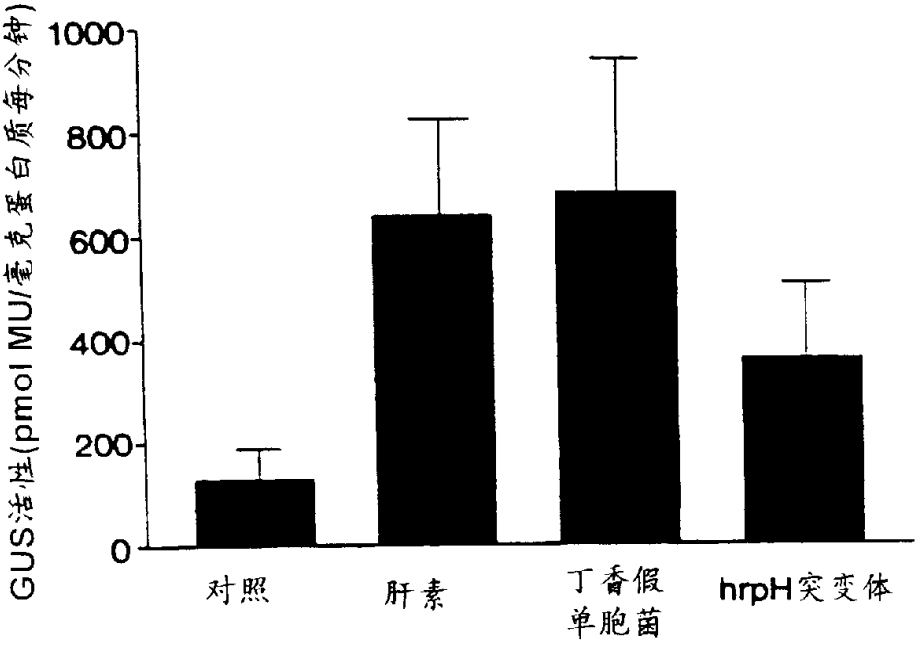

GUS活性(pmol MU/毫克蛋白质每分钟)
1000
800
600
400
200
0
对照
肝素
丁香假单胞菌
hrpH突变体

图 6

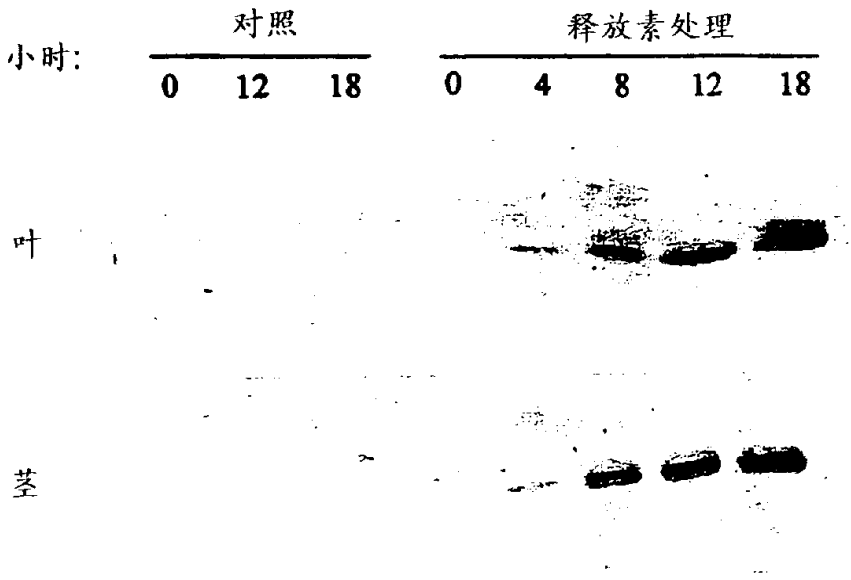



图 7 A

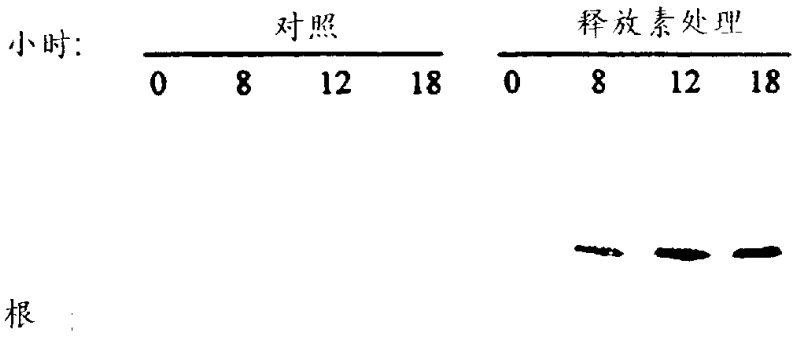



图 7 B



图 8 A

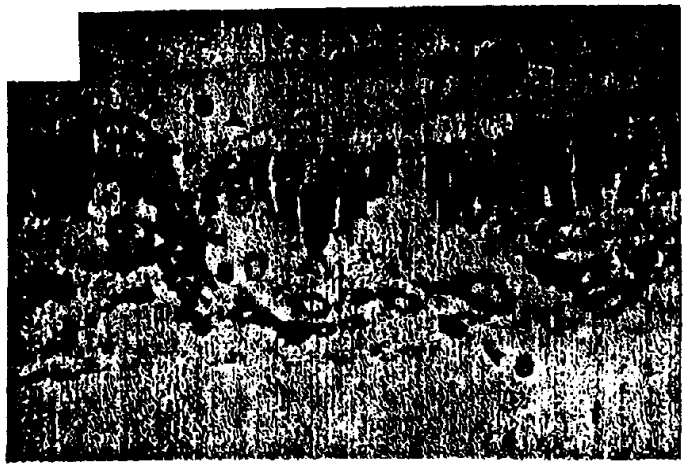


图 8 B

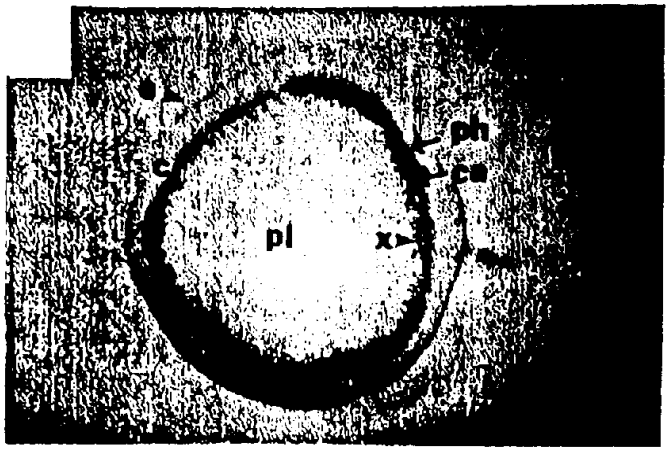



图 8 C

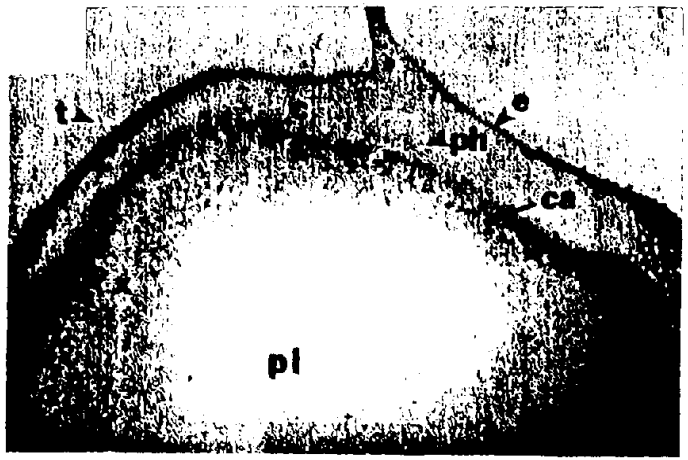



图 8 D

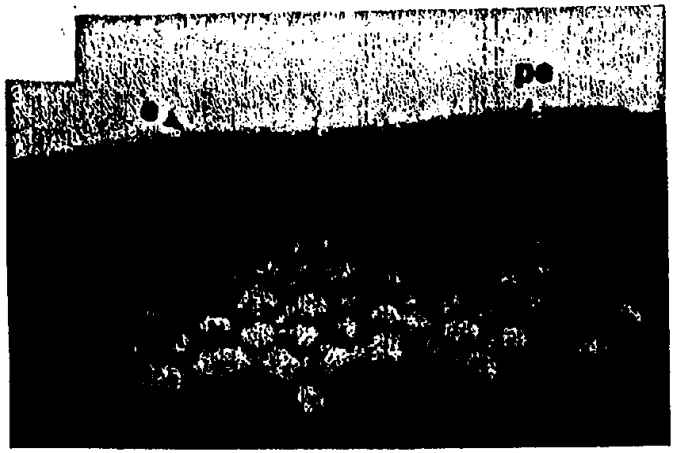



图 8 E




图 8 F

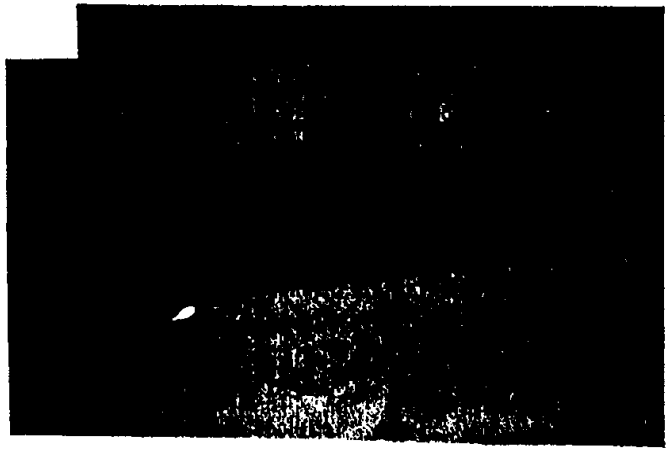


图 8 G

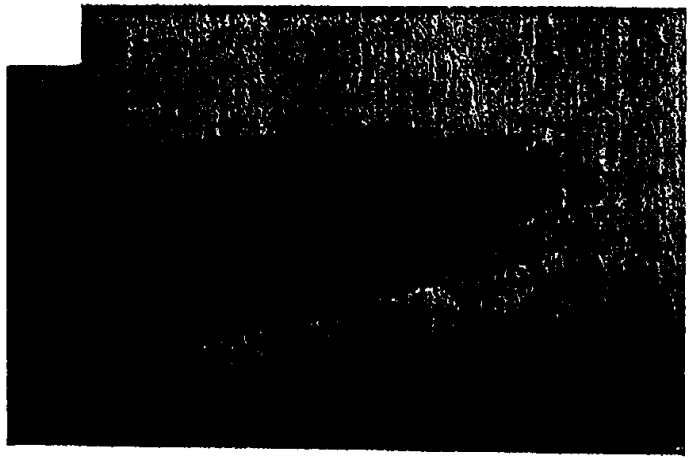


图 8 H

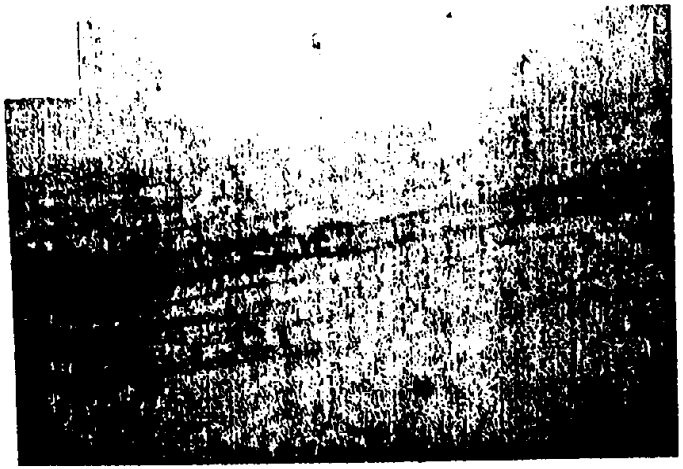


图 8 I



图 8 J

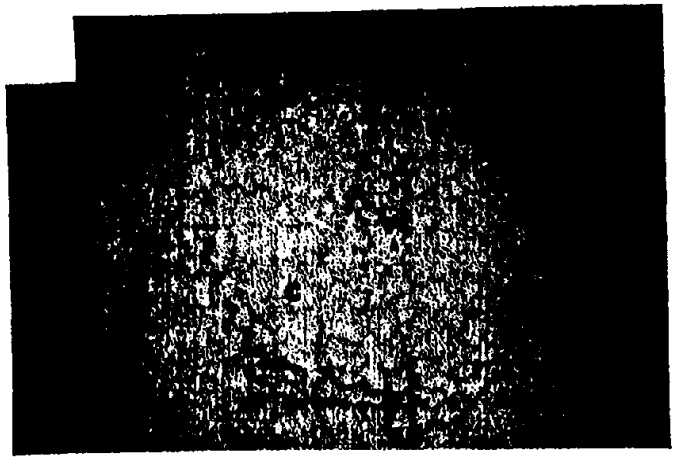


图 8 K



图 8 L

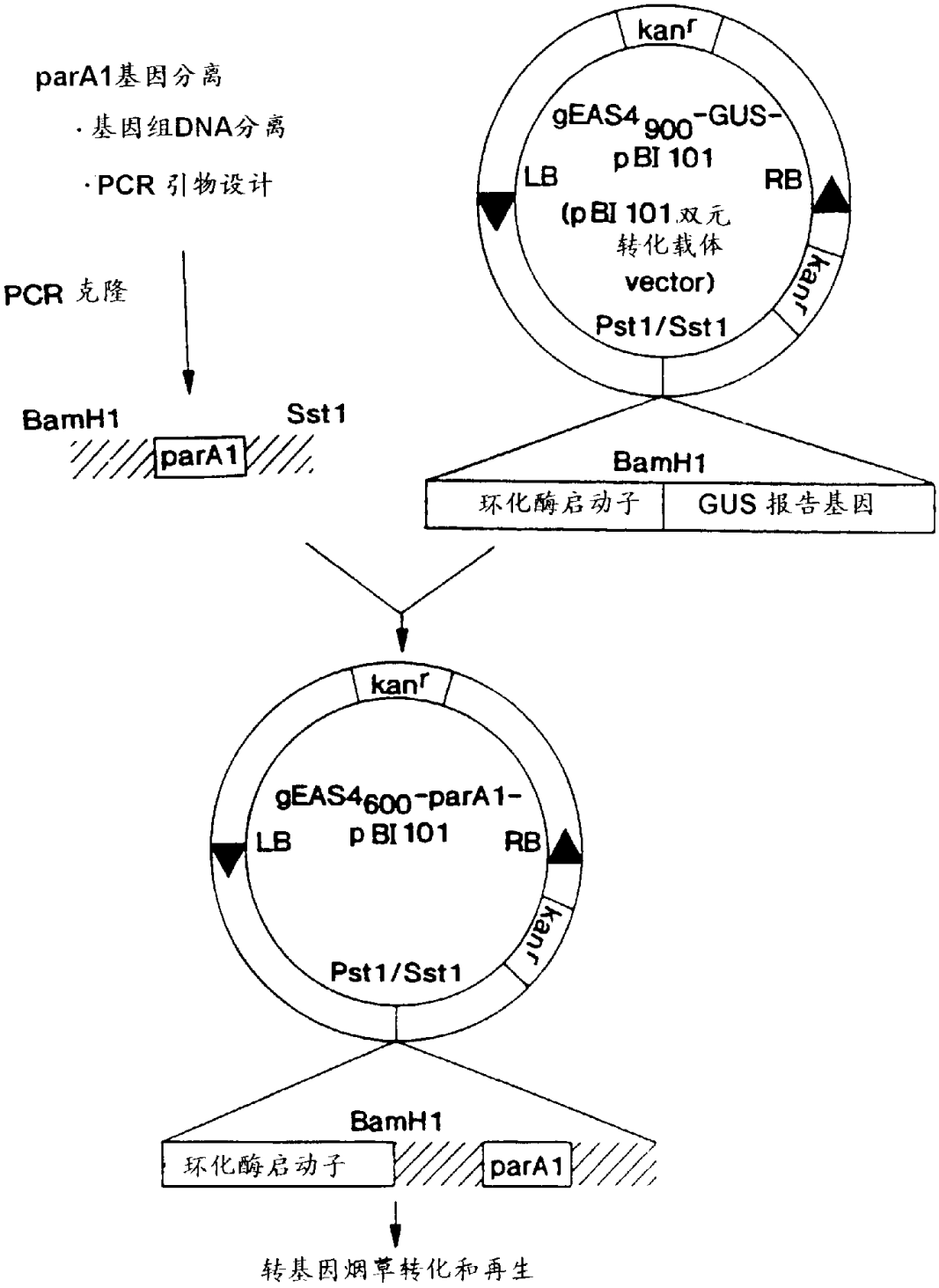

parA1基因分离
·基因组DNA分离
·PCR 引物设计
PCR 克隆
BamH1
Sst1
parA1
kanr
gEAS4900-GUS-
pBI 101
LB
RB
(pBI 101双元
转化载体
vector)
Pst1/Sst1
kanr
BamH1
环化酶启动子
GUS 报告基因
kanr
gEAS4600-parA1-
pBI 101
LB
RB
kanr
Pst1/Sst1
BamH1
环化酶启动子
parA1
转基因烟草转化和再生

图 9

S115
S114
S9
S5
S118
S117
S9
S6
M64
M58
M54
M56
M77
M73
M59
M59
G89
G85
G81
G78
G89
G89
G79
G78
KY160
KY160
0
1
2
3
4
5
坏死指数
植物
■生理小种0
□生理小种1

图 10