

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 94107655.5

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1253570C

[22] 申请日 1994.6.27 [21] 申请号 94107655.5

[71] 专利权人 罗纳-普朗克农业化学公司

地址 法国里昂

[72] 发明人 R·阿塔纳索夫 R·德罗斯

G·弗雷西内 C·吉戈

M·勒布伦

审查员 孙广秀

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 林蕴和

权利要求书 3 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

分离的在植物转化中可作为嵌合基因终止区的 DNA 顺序

[57] 摘要

本发明涉及一种分离的 DNA 顺序，它能够作为用于植物转化的嵌合基因中的终止子区域。本发明还涉及(1)用于植物转化的嵌合基因。(2)在沿转录方向上，它含有至少一个启动子区域，一个转基因和一个终止子区域，其特征在于，终止子区域至少含有一个来源于组蛋白的基因的终止子区域，从而使其在植物的快速生长区域中表达蛋白质。(3)转基因植物的产生。

1. 一种分离的 DNA 顺序，它可以作为在转化植物中的嵌合基因的终止子区域，其特征在于，在嵌合基因的转录方向上，它含有至少一个植物组蛋白基因的终止子区域，从而使嵌合基因的翻译产物能够表达，尤其是在植物的快速生长的部位能够表达。

2. 如权利要求 1 所述的 DNA 顺序，其特征在于，在嵌合基因的转录方向上，该终止子区域是定向的，与分离出该终止子区域的基因的转录方向上的起始定向相比，此 DNA 是正向或反向的。

3. 如权利要求 1 所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于双子叶植物。

4. 如权利要求 3 所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于拟南芥。

5. 如权利要求 1 所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于单子叶植物。

6. 如权利要求 5 所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于玉米。

7. 如权利要求 1—6 中所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于 H4 植物组蛋白基因。

8. 如权利要求 1—6 中任一权利要求所述的 DNA 顺序，其特征在于，组蛋白的终止子区域来源于 H3 植物组蛋白的基因。

9. 如权利要求 1—6 中任一权利要求所述的 DNA 顺序，其特征在于，终止子区域包含有几个相联系的终止子区域因子。

10. 如权利要求 1—6 中任一权利要求所述的 DNA 顺序，其特征在于，终止子区域包含有一个与能在植物中天然表达的基因的终止子区域相联系的组蛋白的终止子区域。

11. 如权利要求 1—6 中任一权利要求所述的 DNA 顺序，其特

征在于，它使具除草剂抗性的基因产物能在该除草剂在植物中积累的区域进行表达。

12. 转化植物的嵌合基因，在其转录方向上至少含有一个启动子区域，一个编码除草剂抗性的基因顺序和一个终止子区域，其特征在于，该终止子区域含有如权利要求 1 所述的 DNA 顺序。

13. 如权利要求 12 所述的嵌合基因，其特征在于，其启动子区域来源于植物组蛋白基因。

14. 如权利要求 12 中所述的嵌合基因，其特征在于，其启动子区域和终止子区域来源于同样的植物组蛋白基因。

15. 如权利要求 12 — 14 中任一权利要求所述的嵌合基因，其特征在于，其启动子区域含有双重的植物组蛋白启动子。

16. 如权利要求 12 — 14 中任一权利要求所述的嵌合基因，其特征在于，启动子区域含有与来源于在植物中天然表达的基因的另一不同的启动子相联系的至少一个植物组蛋白基因的启动子。

17. 如权利要求 12 — 14 中任一权利要求所述的嵌合基因，其特征在于，编码基因能赋予植物提高的针对除草剂的抗性。

18. 如权利要求 17 所述的嵌合基因，其特征在于，具除草剂抗性的基因与编码转运肽区域的 DNA 顺序融合，从而使具除草剂抗性的基因的翻译产物能够在亚细胞结构中积累。

19. 如权利要求 18 所述的嵌合基因，其特征在于，转运肽区域能够使具除草剂抗性的基因的翻译产物在质体结构中积累。

20. 如权利要求 18 所述的嵌合基因，其特征在于，转运肽区域在沿转录方向上，包含有至少一个来源于编码质体定位的酶的植物基因的转运肽，任意的编码质体定位的酶的植物基因的 N-末端成熟部分的一段顺序，和任意的来源于编码质体定位的酶的植物基因的第二转运肽。

21. 如权利要求 13 — 14 中任一权利要求中所述的嵌合基

因，其特征在于，具除草剂抗性的基因所编码的酶对于那些以 EPSPS 为靶目标的除草剂是有活力的。

22. 如权利要求 21 所述的嵌合基因，其特征在于，具除草剂抗性的基因所编码的酶对草甘膦有活力。

23. 如权利要求 21 所述的嵌合基因，其特征在于，具除草剂抗性的基因可以是任一系统发育的起源。

24. 一种转化植物的载体，其特征在于，它含有如权利要求 13 — 14 中任一权利要求中所述的嵌合基因。

25. 一种根癌农杆菌菌株，其特征在于，它含有如权利要求 23 中所述的载体。

26. 一种转化的植物细胞，其特征在于，它含有如权利要求 12 所述的嵌合基因。

27. 如权利要求 12 所述的嵌合基因的构建方法，其特征在于，分别分离如权利要求 1 所述的来源于植物组蛋白基因的终止子区域，至少一个转运肽区域，以及至少一个转基因和一个启动子区域，然后按照转基因的转录方向来装配这些顺序。

分离的在植物转化中可作为嵌合基因 终止区的 DNA 顺序

本发明涉及从植物转录基因中分离得到的终止区的用途，以及含该区域的新的嵌合基因的用途，和它们在植物转化方面的用途。

很多的表型特征与一个或少数几个基因的表达有关，这些基因可以被整合入植物的基因组，从而赋予这些转基因植物有利的农业性状。在一定程度上，这些性状包括有：对作物病原物的抗性，对具有植物毒性的植物保护产物的抗性，生产具有食物或药物价值的物质。除了对编码这些不同特性的基因进行分离和定性之外，还必须提供适当的表达。这合适的表达包括定性和定量两种水平。在定性水平上，例如在空间水平：在特定组织中的优先表达，或者在时间水平上：诱导表达。在定量水平，通过导入基因表达产物的数量的积累。很大程度上，这种合适的表达取决于与转移基因 (transgene) 相关的调节基因的存在，尤其与定量和定性的因素有关。在提供这种合适的调节的原始因素中，使用同源的或异源的，单一的或组合的启动子区域在科学文献中已有大量描述。对于转移基因下游的终止区的使用仅仅是为了设定一个边界，使转移基因的转录过程停止，而没有考虑到它们在转移基因的定性或定量表达方面的作用。

本发明涉及从植物转录基因中分离得到的终止区的用途，以及含该区域的新的嵌合基因的用途，以及它们在植物转化方面的用途。尤其涉及到同时使用从同一植物转录基因中分离得到的终止区和启动子的同时效用。它使转移基因的合适表达，无论是定性的还是定量的，可以在这些基因调节因子的控制下进行。通过使用本发

明而获得的合适的表达涉及诸如对作物病原物的抗性、对具有植物毒性的植物保护产物的抗性以及生产具有食物或药物价值的物质之类的特征。尤其，通过在植物的快速生长区域优先地、定性和定量地表达嵌合基因的表达产物，可以将提高的除草剂耐受性赋予转基因植物。这种特定的耐除草剂基因的适当表达，是通过同时使用拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 的 H4A748 组蛋白基因的启动子和终止区调控因子的同时效用而实现的。正如上面所提到的，通过使用调节因子赋予植物提高的耐除草剂性，这种表达模式可用于所有有价值的性状。本发明也涉及到用这些基因转化的植物细胞，以及这些细胞再生而得的转化植物，以及用这些转化植物通过杂交而得到的植物。

在用来保护作物的植物保护产物中，系统的特征在于它们被使用后转移进入植物，而且对于有效作物，在生长的部分，尤其是茎和根尖积累，因此在除草剂存在的情况下会造成敏感植物的损伤，直至死亡。对于某些表现这种类型的除草剂，其主要的作用方式是已知的，它能使与靶植物中正常生长发育所必需的化合物的生物合成途径中有关的特征酶失活。这些产物的靶酶可以位于不同的亚细胞结构中，而且对已知产物的作用方式的观察表明在大多数情况下其常常位于质体结构中。

对该组除草剂中的物质敏感、且其主要靶酶已知的植物的耐受性，可以通过将编码靶酶的基因稳定地导入其基因组中而实现，该基因可以来自于任一系统发育 (phylogenetic) 的起源，至于通过除草剂该基因表达产物的抑制特性可以改变，也可以不发生变化。另一种方法是在敏感植物的基因组中稳定地导入任一遗传性起源、能编码将除草剂代谢成为对于植物的生长发育无活性或者无毒的化合物的酶的基因。在后一种情况下，并不需要确定除草剂的靶目标的特性。

如果已知这种的除草剂在所防治的植物中的积累和分布模式，那么表达这些基因的翻译产物，从而使之在这些除草剂积累的地方，即植物快速生长的区域优先表达和积累是有利的。此外，当这些产物的靶目标位于除细胞质之外的其他细胞结构中时，以前体形式表达这些基因的翻译产物是有利的，该前体含有一段多肽顺序，这段多肽顺序使具有耐受性的蛋白质可被定位于适当的细胞结构中，尤其是质体结构。

为了阐明该方法，可以例举的除草剂有草甘膦，sulphosate 和 fosametin 它们都是膦酰基甲基甘氨酸家族的广谱系统的除草剂。相对于 PEP（磷酸烯醇式丙酮酸），这些除草剂主要是作为 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶（EPSPS，EC2.5.1.19）的竞争性抑制物（PEP 为 EPSPS 的底物）。在它们施用于植物后，它们被输送入植物中快速生长的部位，尤其是在茎和根尖积累，从而使敏感植物受到损伤，直至死亡。

这些除草剂的主要靶目标，EPSPS 是芳香族氨基酸生物合成途径中的一个酶，它位于质体结构中。该酶由一个或多个核基因编码并以细胞质前体的形式合成，然后被输送入质体并在此以其成熟形式积累。

植物对草甘膦以及该族除草剂的耐受性可以通过将植物或细菌来源的 EPSPS 基因稳定地导入其基因组中而实现，至于草甘膦抑制该基因产物的特性，可以改变也可以不发生变化。如果已知草甘膦的作用方式，那么表达这种基因的释放产物从而使它在质体中高积累，并且在这些除草剂积累的植物的快速生长区域积累是有利的。

通过在植物基因组中导入能够编码 EPSPS 的基因，该 EPSPS 至少携带有一个突变，从而使该酶对其竞争性抑制物（草甘膦）有更大的抗性，在将该酶定位于质体结构中后，可以赋予植物对上述

类型的除草剂的耐受性，尤其是对 N-膦酰基甲基甘氨酸或草甘膦的耐受性。但是，为了在农业条件下用这些除草剂处理植物时更具可靠性，有必要对这些技术加以改进。

在本发明的描述中，“植物”意指能进行光合作用的任何分化的多细胞有机体，“植物细胞”意指来自植物的，能够形成脱分化组织如愈伤组织，或者分化的组织如胚或植物部分或植物或者种子的任何细胞。“终止子区域”是指分离得到的位于编码区的下游并且对应于转录基因的结构区的长度不同的一段 DNA 顺序。对除草剂有耐受性的基因是指任何经系统发育的起源，或者编码除草剂的靶酶，该酶具有或不具有一个或多个相对于除草剂抑制的特性方面的突变；或者编码能将除草剂代谢成对植物无活性或无毒的组合物的酶的任何基因。植物的快速生长区域是指大致上的细胞分裂繁殖的位点所在的区域，尤其是指顶端区域。

本发明涉及通过用含有对这些除草剂产品有耐受性的基因的新的嵌合基因转化植物细胞，并且再生后，生产对防治植物时积累于快速生长区域的除草剂具有提高的更大耐受性的转化植物。本发明的主旨还在于，通过用含有对这些除草剂有耐性的基因的新的嵌合基因转化植物细胞并且再生后，生产出对膦酰基甲基甘氨酸家族的除草剂具更大耐受性的转化植物。本发明还涉及这些新的嵌合基因，以及因为在这些植物的快速生长部位的耐受性更佳，从而更具耐受性的转化植物，和用这些转化植物杂交而得的植物。本发明的主旨还在于用于构建上述嵌合基因的新的终止子区域。

更具体地，本发明的主旨是一种能赋予植物尤其是针对以 EPSPS 为靶目标的除草剂的更大的耐受性的嵌合基因，它包括，在转录方向上，一个启动子区域，一转运肽区域，一个编码对膦酰基甲基甘氨酸家族的除草剂有抗性的酶的序列和一个终止子区域，其特征在于，该终止子区域由植物组蛋白基因的终止子区域的一个片段

构成，该片段与其在衍生出该片段的基因中的最初定向相比处于任何定向，从而允许对除草剂具有抗性的蛋白质能够在该除草剂所积累的区域优先表达和积累。

本发明中的终止子区域来自于组蛋白基因，该组蛋白基因来自于单子叶植物，如小麦、玉米或水稻，或者更好的可以来自于双子叶植物，如苜蓿、向日葵、大豆、菜子或者更佳的是拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*)。最好使用 H3 或更好的 H4 组蛋白基因。

转运肽区域包括，在转录方向上，至少一个来自编码酶的质体定位的植物基因的转运肽，一部分编码酶的质体定位的植物基因的 N-末端成熟部分的顺序，和来自编码酶的质体定位的植物基因的另一段转运肽，较好的是根据欧洲专利申请/PCT 508,909 的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶小亚基基因。该特征区域的作用是能够最高效率地将成熟的多肽，最好是天然形式的，释放进入质体结构。

能用于本发明的嵌合基因的编码顺序来自于任何系统发育起源的具除草剂抗性的基因。该顺序尤其可以是具有一定程度耐草甘磷的突变的 EPSPS 的顺序。

根据欧洲专利申请/PCT 507,698，启动子区域可以是任何来源的，可以是单一或双重形式，或者是在植物中与天然表达的基因相结合的形式，即，例如可以是细菌来源的，如胭脂碱合成酶基因的启动子，或是病毒来源的，如花椰菜花叶病毒的 35s 转录的启动子，或者更佳的是植物来源的，例如核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶小亚基的启动子或者更佳的是植物组蛋白基因的启动子，而且最好来自于拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*)。最好使用 H3 或更佳为 H4 组蛋白基因的启动子。

除了上述所提及的基本部分之外，本发明的嵌合基因还可以包括，位于启动子区域和编码区域之间的不翻译的中间区域（连接区

域),它也可位于编码区域和终止子区域之间且来源于任何系统发育。

实施例 1:嵌合基因的构建

根据本发明,嵌合基因的构建由下列因子开始进行:

1)组蛋白基因启动子:该启动子是从拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)的 Strasboury 的品种的 H4A748 克隆中分离得到的(M. E. Chaboute, Strasbourg 大学,论文,1987 和 M. E. Chaboute 等人(1987) *Plant Mol. Biol.* 8, 179—191)。该启动子,在用来分离它的 *Ava* I 位点之间含有约 900 bp。在用 Klenow 聚合酶填平 *Sal* I 和 *Ava* I 的突出末端后,将该启动子亚克隆入 pUC 18 的 *Sal* I 位点。pUc 18 可从目录中得到(pharmacia # 27-4949 -01)。在所获得的一个亚克隆中,启动子的 5'端接近 pUC 18 中,多连接物的 *Hind* III 酶切位点,而启动子的 3'端接近 pUC 18 中多连接物的 *Xba* I 酶切位点,此克隆随后被使用,并且称之为:prom H4A 748/*Ava* I/*Sal* I—pUC 18。

2)转运肽区域:两个转运肽以及所用的成熟蛋白质因子,和它们的装配方式已有描述(M. Lebrun 等人,欧洲专利申请/PCT 508,909)。该区域包含约 350 bp 并被称多为优化的转运肽(Optimized Transit Peptides OTP)。

3)抗除草剂的 CT7 基因:它是由 *Salmonella thyphimurium* 中的 EPSPS 的突变的 CT7 基因分离得到的。(Pro 101 至 Ser),由 Stalker 等人分离而得(1985) *J. Biol. Chem.*, 260,4724—4728。由 Calgene 提供的 pGM34—2 克隆,在用 *Xba* I 酶线性化后,再用 *Vigna radiata* (豇豆属)核酸酶处理。再用 *Sma* I 重新酶切后,连接两个钝末端。所获得的克隆在翻译起始子 ATG 处有一个 *Nco* I 位点,并且在密码终止子下游区域 17 bp 处有一个 *Sal* I 位点。该克隆被称为 pRPA-BL-104。

4) OTP/CT7 的融合：含有按照阅读框架将 CT7 基因与优化转运肽(OTP)相融合的表达片段(B. Leroux 等人, 欧洲专利申请/PCT 507, 608)被克隆入 pBSII SK (—)载体(Stratagens 目录# 212206)。该 5'-OTP/CT7-3' 片段在其 5'端含有一个 XbaI 位点, 在 3'端有一个 SstI 位点。

5) GUS 报告基因：它是一个编码 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)的基因, 存在于质粒 pBI 101-I 上, 该质粒可从目录(Clontech # 6017—1)上得到。

6) 组蛋白终止子区域：它从拟南芥菜中的 H4A748 组蛋白基因分离得到(M. E. Chaboute, Strasbourg 大学, 论文, 1987 年和 M. E. Chaboute 等人(1987) Plant Mol. Biol., 8, 179—191)。分离出的一个 661 bp 的 Sau 3AI 片段, 用 Klenow 聚合酶处理后产生平头末端, 然后被亚克隆入 phagemide pBluescript® II KS (+) 的 Sma I 位点(Stratagene 目录 # 212207)。该片段的 DNA 顺序列于下达的“顺序清单”部分。通过 S1 谱图法(mapping)表明, 该分离的 DNA 片段在其内部的 5'端处的 200 bp 区域, 沿起始的转录方向, 含有对应于分离得到的从该基因转录而来的 mRNA 的聚合腺嘌呤化位点前的顺序。位于 661 bp 顺序中的 165 位置处的核苷酸 A (腺嘌呤)对应于转录中存在的增加聚合腺嘌呤化的位点(Chaboute M. E. 等人, (1988) Gene, 71, 217—223)。所保存的两个亚克隆中, 其中一个的插入是按照 H4A 748 基因的起始的转录方向排列的, 处于 SstI—EcoRI 片段的形式, 被称为 t—正向(转录正向) H4A748 / Sau 3AI / SmaI—pKS, 另一个克隆的插入处于相反方向, 并处于 Sst I-EcoRI 片段的形式, 被称为 t—反向(转录反向) H4A748 / Sau 3AI/ SmaI-pKS。

沿基团的起始转录方向的拟南芥菜 H4A748 组蛋白基因的 661 bp 的终止子区域的顺序如下：

```

GATCCGCGTT TGTGTTTTCT GGGTTTCTCA CTTAAGCGTC TGC GTTTTAC TTTGTATTG      60
GGTTTGGCGT TTAGTAGTTT GCGGTAGCGT TCTTGTTATG TGTAAATTACG CTTTTTCTTC      120
TTGCTTCAGC AGTTTCGGTT GAAATATAAA TCGAATCAAG TTTCACTTTA TCAGCGTTGT      180
TTTAAATTTT GGCATTAAAT TGGTGAAAAT TGCTTCAATT TTGTATCTAA ATAGAAGAGA      240
CAACATGAAA TTCGACTTTT GACCTCAAAT CTTCGAACAT TTATTTCTTG ATTTACGAT      300
GGATGAGGAT AACGAAAGGG CGGTTCTTAT GTCCGGGAAA GTTCCCGTAG AAGACAATGA      360
GCAAAGCTAC TGAACGCGG ACACGACGTC GCATTGGTAC GGATATGAGT TAAACCGACT      420
CAATTCCTTT ATTAAGACAT AAACCGATTT TGGTTAAAGT GTAACAGTGA GCTGATATAA      480
AACCGAACA AACC GGTTACA AGTTTGATTG AGCAACTTGA TGACA AACTT CAG AATTTTG      540
GTTATTGAAT GAAATCATA GTCTAATCGT AAAAAATGTA CAG AAGAAA GCTAGAGCAG      600
AACAAAGATT CTATATTCTG GTTCCAATTT ATCATCGCTT TACGTCCCT CAGATTTGAT      660
C

```

7) 终止子区域“nos”：该片段含有 pTi37 中胭脂碱合成酶(nopaline synthase, nos)基因的终止子区域的信号 (Bevan M. 等人(1983) Nucl. Acids. Res., 11, 369—385), 它位于质粒 pBI101—1 上 (Clontech # 6017-I), 该质粒可由目录上可得。

所有这些因子的装配, 以通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 转化植物的二元载体, pBI 101—1 的骨架结构为基础, 按以下方式进行 (pBI 101—1 见: Clontech 目录 # 6017—1):

pRA-1 的构建:

来自拟南芥菜的 H4A748 组蛋白的启动子, 以约 900 bp 的 Hind III/XbaI 片段的形式从质粒 prom. H4A748/AvaI/SalI — pUC 18 上切下。通过连接将该片段插入用 Hind III/XbaI 消化后的质粒 pBI 101 — 1 中。所获得的重组质粒, 在嵌合基因的转录方向上, 含有 H4A748 启动子/GUS/nos 终止子区域, 并被称为 pRA-1。

pRA—4 的构建

来自拟南芥菜的 H4A748 的终止子区域, 以约 670 bp 的 Sst I/

EcoRI 片段形式从质粒 t-正向（转录正向）H4A748 /Sau 3AI / SmaI-pKS 上切下。在用 SstI/ EcoRI 消化质粒 pRA-1 后，通过连接，将 H4A748 终止子区域片段插入替代 nos 终止子区域。所获得的重组质粒，在嵌合基因的转录方向上，含有 H4A748 启动子/ GUS/H4A748 沿正向起始的终止子（引导方向）区域，并被称为 pRA-2。

pRA—3 的构建：

来自拟南芥菜的 H4A748 终止子区域，以约 670 bp 的 SstI/ EcoR I 片段的形式，从质粒(t-反向) 转录反向 H4A748/Sau 3AI/ SmaI-pKS 上切下。在用 SstI/EcoRI 消化质粒 pRA-1 后，通过连接将该片段插入替代 nos 终止子区域。所获得的重组质粒，在嵌合基因的转录方向上，含有 H4A748 启动子/GUS/H4A748 终止子（反向）区域，并被称为 pRA-3。

pRPA—RD—146 的构建

在用 Xba I/Sst I 消化质粒 PRA-1 后，通过连接，将含有 OTP/CT7 的约 1.75 kbp 的 XbaI/ Sst I DNA 片段插入替代 GUS 基因。所获得的重组质粒，在嵌合基因的转录方向上，含有：H4A748 启动子/OTP/CT7/nos 终止子区域，并被称为 pRPA—RD—146。

pRAA—RD—147 的构建

在用 XbaI/ SstI 消化质粒 pRA—2 后，通过连接将含 OTP/CT7 的约 1.75 Kbp 的 XbaI/Sst I 片段插入替代 GUS 基因。所获得的重组质粒，在嵌合基因的转录方向上，含有：H4A748 启动子/OTP/CT7/ H4A748 沿正向起始的终止子区域，并被称为 pRPA—RD—147。

pRPA—RD—148 的构建：

在用 Xba I/Sst I 消化质粒 pRA3 后，通过连接将含 OTP/CT7

的约 1.75 kbp 的 Xba I/ Sst I 片段插入替代 GUS 基因。所获得的重组质粒，在嵌合基团的转录方向上，含有：H4A748 启动子 / CTP/CT7/H4A748 终止子区域（反向），并被称为 pRPA—RD—148。

实施例 2: 报告基因活性的表达

1) 转化和再生

按照 Bevan M. (1984) Nucl. Acids Res., 12, 8711—8721 所述的程序，用大肠杆菌 HB101 中的帮助质粒 pRK2013，通过三亲结合法将载体引入根癌农杆菌的非致癌性菌株 LBA 4404 (clontech 目录 # 6027—1) 中。

按照 Valvekens D. 等人 (1988) Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5536—5540 中所述的转化程序，用来自拟南芥菜 L-生态型 C24 的根外植体，进行转化。简而言之，有 3 个步骤是必须的：在补充了 2,4-D 和激动素的 Gambory B5 培养基上诱导愈伤组织的形成；在补充了 2iP 和 IAA 的 Gambory B5 培养基上形成芽；在无激素的 MS 培养基上生根和产生种子。

2) 测量植物中的 GUS 酶活性

a — 组织化学观察

在大量的转基因植物器官中 GUS 酶活性的显示 (Jefferson R. A. 等人, (1987) EMBO J., 6, 3901—3907) 表明, GUS 酶活性在分生组织区域内优先表达是由载体 pRA—2 和 3 所维持的。此外，载体 pRA—2 使得有可能在成熟组织（叶，根，穗状花序）中观察到 GUS 酶活性而对于载体 pRA—1 则不出现此情况。

b — 荧光检测

对于每个载体 PRA—1, 2 和 3, 通过荧光法测量来自 12 株植物的花芽和小玫瑰的叶子的提取物来确定 GUS 酶活性 (Jefferson R. A. 等人 (1987) EMBO J., 6, 3901—3907)。这 12 株植物分别对应

于各自的转化过程。

积累数据的平均值，以 pmol MU/min. mg prot. 为单位表示，列于下表。

载体	叶(L)	芽(B)	B/L 比
pRA—1	850.25	3965.33	4.66
pRA—2	4890.67	33683.75	6.89
pRA—3	4211.73	27752.45	6.59

这些测量值清楚地表明，H4A748 终止子区域，无论是正向或是反向，都能够诱导嵌合基因表达活性的增加，尤其是在植物快速生长的部位。

实施例 3:转基因植物对除草剂的抗性

1)转化和再生

按照 Bevan M. (1984) Nucl. Acids Res., 12, 8711—8721 所述的转化程序，用大肠杆菌 HB101 中的“帮助”质粒 pRK2013，通过三亲结合此将载体导入根癌农杆菌的非致癌性菌株 LBA 4404 (Clontech 目录 #6027—1)中。

对烟草叶外植体的转化是以 Horsh R. 等人(1985), Science, 227, 1229—1231 所描述的程序为基础进行的。从叶外植体再生的 PBD6 烟草(来源 SEITA—法国)是在含有 30 g/l 蔗糖以及 200 μ g/ml 卡那霉素的 Murashige 和 Skong (MS)基础培养基上，通过三个连续步骤进行的：第一步是在附加有 30 g/l 蔗糖并含有 0.05 mg/L 萘乙酸(NAA)和 2 mg/l 6-苄基嘌呤(BAP)的 MS 培养基上诱导出芽，时间为 15 天。在第一步中有芽的形成，接着在附加有 30 g/l 蔗糖但不含激素的 MS 培养基上培养生长 10 天。然后收集分化生长的芽，将其在 1/2 MS 培养基中生根(含有 1/2 原含量的盐、维生素和糖但不含激素)。约 15 天之后，生根的芽被称栽于土壤中。

2)对草甘膦抗性的测量

对于每个载体即 pRPA—R—A,B 和 C 有 20 株转化植物再生, 它们被移入温室继续生长。当这些植物在温室中长至 5 叶龄时, 用 Roundup 的水悬浮液, 相当于每公顷 0.8 kg 草甘膦的活性物质, 处理温室中的这些植物。结果对应于处理 3 周后所记录的对植物毒性值的观察。在这些条件下, 可以观察到, 用载体的转化的植物均表现出可接受的抗性 (pRPA—RD—146), 或者较好的抗性 (pRPA—RD—147 和 148), 而非转化的对照植物却完全死亡。这些结果清楚地表明了对于同样的编码具草甘膦抗性的基因通过使用本发明的基因, 所带来的抗性的提高。

按照本发明所得的转化植物可以作为父本用于生产具有与导入的嵌合基因所表达的表型特征相当的品系和杂交种。