

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817739.8

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1297666C

[22] 申请日 2002.6.27 [21] 申请号 02817739.8

[30] 优先权

[32] 2001.7.10 [33] US [31] 60/303,780

[86] 国际申请 PCT/CA2002/000985 2002.6.27

[87] 国际公布 WO2003/006659 英 2003.1.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.10

[73] 专利权人 造值研究有限公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 诺曼德·布里森 博伊尔·布里安

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公

司

代理人 程金山

权利要求书 3 页 说明书 81 页 附图 7 页

[54] 发明名称

植物转录阻遏物, 结合其的蛋白质核因子, 及它们的应用

[57] 摘要

本申请描述了植物基因调控元件及其应用。更具体地, 描述了用于调节植物应答病原体、生长素和乙烯的沉默元件。本发明还描述了特异结合于本发明的沉默元件的转录阻遏物。提供了一种新的、被称为“SEBF”的转录阻遏物的核苷酸以及氨基酸序列。

```

1  GTTTTCTTTTCTCTCAGCAATTTCTTCTGCAAAAAGCTATCTTCAACCCCTTCTCGAATGGCTCTCTT
      H A S S S
81  CTCTTCCCTCCACTTCCCTTCCCTCAGTCAAGCAAAAGCTCCCAAAAGCCACTTCCCAAGCAACTCAATTCCTTCTT
      B S L H F L E L T F Q T L P E P T S O T Y S I S F F
161  TCATTCCTCCCTCTCTCTTAAACCTTCTTFAACATCTCTCAACCCAGAAAGCTCGAATCTCTCTCTCTCTCTCT
      S L P P E S L E L D S L E F S S B T P R S F E S S R F V R
241  TAAAGTAAACCTTCTCTCTTTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAAT
      K V S L S P F D Q I E E V E A G D D D D X E E G L E D
321  ATCAGGCTCTCATATAGAGAGCTAATGCAATCTGACCTTAAATCTTGTGGTAAATTCCTTCACTGCTGAC
      E G A S Y E E R N A M P D L K I F V G H L P F S V D
401  AGTCGGCTCTCTGAGCTTTTTCAGCTCTCTGAGATCTTGAATGCTTGAATCTTATCTATCAAGCTTACAGGAG
      S A A L A E L F E R A G D V E H S V E I Y D K L T G R
481  AAGCAGAGCTTCTGCTTCTGAGCAATCTTCCAAAGAGCACTGAGAGCCCTCAACAAATTAATGCTATGAAA
      X R G F G F V T H S S R E A V E A R C Q Q F N G Y E I
561  TTGCGAGAGGCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
      D G R A L E V E S G F A P P E E E N S I T G D N S S Y
641  CAGGAGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
      Q G G R G G G S H D S S R V Y V G W L A M S V D Q Q
721  GCACTTGAACCTTCTTCACTGAGCAAGAGCTCTGATGCCAAGTAGTCTATATAGATAGAGCTGAGCTGAGCT
      Q L E T L F S E Q G K V V D A K V V Y D R D S G R E R
801  GGGCTTGGATTTGTAACATACACTTCCCTGAGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
      G F G F V T Y S S A R E V W D A I E S L D G V D L G
881  GCGAGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
      G R A I R V E P A R S P S R S O F
961  ACCGAGAGAGCTTGAAGCTCAGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
1041  AACTGCGCGCAAACTACTCTCTCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
1121  GAAATTCCTCAGGAGAAATCTGATCTTGTAAATGATCTTCACTCACTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
1201  TGTACTCTCGAAAAG

```

1. 一种转化或转染的细胞,其包含核酸序列,所述核酸序列选自与 SEQ ID NO: 21 具有至少 96%核苷酸序列同一性的核酸序列; 和与编码 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的核酸具有至少 75%核苷酸序列同一性的核酸序列。
2. 一种转化或转染的细胞,其包含分离的或纯化的包含氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列选自与由 SEQ ID NO: 21 的核苷酸 68—937 编码的氨基酸序列具有至少 85%序列相似性的序列; 和与 SEQ ID NO: 22 具有至少 85%相似性的序列。
3. 一种克隆或表达载体,其包含与 SEQ ID NO: 21 具有至少 96%核苷酸序列同一性的核酸序列,或与编码 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的核酸具有至少 75%核苷酸序列同一性的核酸序列。
4. 权利要求 3 的克隆表达载体,其中它还包含一种诱导型或组成型启动子。
5. 一种在植物中获得一种结果的方法,其中所述结果是调节对病原体的抗性或耐受性,所述方法包含调节 SEBF (沉默元件结合因子) 蛋白或 SEBF 功能同系物在所述植物中的表达或生物活性。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述结果是增加对病原体的抗性或耐受性,所述方法包含降低 SEBF (沉默元件结合因子) 蛋白或 SEBF 功能同系物在所述植物中的表达或生物活性。
7. 权利要求 5 的方法,其中所述 SEBF 蛋白或所述 SEBF 功能同系物在所述植物中的表达或生物活性通过下述方式被降低: 在所述植物中表达 SEBF 反义分子,表达诱导 SEBF 水平共抑制的蛋白,表达诱导 SEBF 活性共抑制的蛋白,敲除编码 SEBF 蛋白的基因,化学突变编码 SEBF 蛋白的基因,表达切割 SEBF mRNA 的核酶或导入 RNAi 分子。
8. 权利要求 6 的方法,其中化学突变包含 TILLING (在基因组中的靶向诱导的局部损伤)。
9. 权利要求 5 的方法,其中所述结果是降低对病原体的抗性或耐受性,

- 所述方法包含通过在所述植物中导入 SEBF 编码序列增加所述 SEBF 蛋白或 SEBF 功能同系物的表达或生物活性。
10. 权利要求 9 的方法，其包含过表达 SEBF 蛋白或其功能同系物。
 11. 权利要求 9 的方法，其包含通过突变 SEBF 编码序列增加 SEBF 蛋白或其功能同系物对启动子区的结合亲和力。
 12. 权利要求 5-11 任一项所述的方法，其中 SEBF 蛋白是内源 SEBF 蛋白。
 13. 一种分离或纯化的基因调节元件，其包含核酸，所述核酸选自核酸序列 GACTGTAC (SEQ ID NO:26) 和核酸序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23)。
 14. 权利要求 13 的调节元件，其中所述调节元件组成一种沉默。
 15. 权利要求 13 的调节元件，其中在序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 中，B 是嘧啶。
 16. 权利要求 13 的调节元件，其中在序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 中，B 是 C 和 N 是 A。
 17. 一种在植物中获得一种结果的方法，其中所述结果是调节对病原体的抗性或耐受性，所述植物在基因的启动子区包含核酸序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23)，所述方法包含在所述植物中改变内源核 DNA-结合蛋白对序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 的结合。
 18. 权利要求 17 的方法，其中所述结果是增加对病原体的抗性或耐受性，所述植物在基因的启动子区具有序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23)，所述方法包含在所述植物中降低或防止内源核 DNA-结合蛋白对序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 的结合。
 19. 权利要求 18 的方法，其包含突变或缺失序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23)。
 20. 权利要求 18 的方法，其中序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 位于防御基因的启动子区。
 21. 权利要求 20 的方法，其中所述防御基因选自由 Pr-10, Pr-10(ypr10a), Pr10(ypr10b), Pr-10a, Pr-10b, 壳多糖酶, 葡聚糖酶, PR-1, 渗透蛋白 (PR-5), 过氧化物酶, 交替氧化酶和抗真菌蛋白组成的表 5 中

所列的基因。

22. 权利要求 17 的方法,其中所述结果是降低对病原体的抗性或耐受性,所述方法包含在所述植物中增加内源核 DNA-结合蛋白对包括序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 的基因的启动子区的结合。
23. 权利要求 17 的方法,其中所述植物选自蔬菜,豆科植物,树木和谷类。
24. 权利要求 17 的方法,其中所述植物选自马铃薯,番茄,烟草,棉花,水稻,小麦,玉米,大麦,燕麦,油菜,大豆,豌豆,甘蔗,甜菜,草莓和香蕉。
25. 一种获得植物宿主的方法,所述植物宿主被遗传修饰以显示对 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23) 具有特异结合活性的蛋白核因子的改变的表达或生物活性,其中将所述改变的水平与内源水平进行比较,所述内源水平在相应未遗传修饰的植物宿主中未被改变,所述方法包含下述步骤:
 - a) 提供如权利要求 1 或 2 所要求的转化或转染的细胞;
 - b) 在合适的生长条件下,在合适的生长培养基中培养步骤 a)的转化或转染的细胞合适的时间,以获得转染或转化的胚;
 - c) 选自所述转染或转化的胚;
 - d) 在合适的生长条件下,在合适的生长培养基中培养在步骤 c)中选择的胚合适的时间,以获得小植株;和
 - e) 在合适的生长条件下生长所述小植株,以获得转化或转染的植物。

植物转录阻遏物，结合其的蛋白质核因子，及它们的应用

相关申请

本申请要求 2001 年 7 月 10 日提交的、美国临时申请 60/303,780 的优先权，其全部内容结合于此作为参考。

发明背景

A) 发明领域

本发明涉及一种植物基因调控元件及其应用，更具体地，涉及一种用于调节植物对病原体、生长素和乙烯应答的沉默元件。本发明还涉及特异结合于本发明的沉默元件的转录阻遏物，其包括以下被称为“SEBF”的一种蛋白质。

B) 现有技术简述

作为对病原体感染的应答，植物会被引发多种防御特异性事件。尽管正在发现信号级联放大的主要成分，但是迄今为止，只鉴定出了极少的在转录水平整合这些信号的转录因子。

PR 基因是病原体侵入诱导的植物基因。这些基因被细划分为 11 类。由于 *PR* 基因已经被很好的表征，因而它们提供了用于研究防御基因转录调控的优异模型。

PR-10 基因家族是 *PR* 基因类别中的一种。对基因表达进行的研究已经鉴定出了在 *PR-10a* 基因调控中涉及的顺式作用元件，其中所述的 *PR-10a* 基因是 *PR-10* 基因家族中的成员。位于核苷酸-135--105 之间的诱导子(elicitor)应答元件(ERE)对于诱导子诱导的 *PR-10a* 表达是必要且充分的。PBF-2，一种单链 DNA 结合因子，其可能在从 ERE 的 *PR-10a* 活化中发挥作用。已经显示，ERE 的存在对 *PR-10a* 活化是充分的，去除位于-52--27 之间的沉默元件(SE)会引起进一步的活

化作用，这一情况提示：SE 和 ERE 一起，参与了 *PR-10a* 的调控(Matton 等, 1993; Després 等., 1995)。但是，全部 SE 活性所需的正确核酸序列尚未被提出。此外，特异结合于 *PR-10a* 的沉默元件 (SE) 的转录阻遏物的鉴定也并不知晓。

因此，需要这样的分离或纯化的核酸，该核酸包含编码全部 SE 活性的序列，并且其用于调节基因的活性、更具体是在植物应答病原体中涉及的基因，如 *PR-10a* 基因的活性。同样需要这样的方法和这样的遗传修饰植物：在其中已经引入了本发明的核酸，或者其中编码全部 SE 活性的序列已经被突变、删除、或者沉默，从而调节了植物防御机制和对病原体的抗性。

同样长期感觉需要这样的转录阻遏物，其能够调节植物防御机制和对病原体的抗性，更具体地需要这样的转录阻遏物，其能够特异结合到本发明的分离或纯化的核酸上。同样需要这样的方法和遗传修饰植物，其中本发明转录阻遏物的水平已经得到了调节。

同样还需要这样的有效方法和组合物，以调节植物对病原体的抗性或者耐受性，和/或调节植物对生长素和/或对乙醇的应答。

本发明满足了这些需要，本发明还满足了其它的需要，所述的其它需要在本领域技术人员阅读本发明说明书时将是显而易见的。

发明简述

依照第一方面，本发明涉及分离或者纯化的核酸分子，其包含选自下面的序列：

- a) 在 SEQ ID NO: 21 中列出的序列；
- b) 与 SEQ ID NO: 21 具有至少 96%核苷酸序列同一性的核苷酸序列；和
- c) 与编码 SEQ ID NO: 22 氨基酸序列的核酸具有至少 75%核苷酸序列同一性的核苷酸序列。

本发明还涉及转化或者转染的细胞，以及含有这样的核酸的克隆或表达载体。优选地，所述的细胞和载体表达或者能够指导由所述核酸编码的肽的表达。

在相关方面，本发明涉及包含选自下列氨基酸序列的分离或者纯化

的蛋白:

- a) 由先前定义的核酸所编码的序列;
- b) 与 SEQ ID NO: 22 具有至少 85% 同一性的序列;
- c) 与 SEQ ID NO: 22 具有至少 87% 相似性的序列;
- d) SEQ ID NO: 22 中列出的序列;
- e) 与由 SEQ ID NO: 21 的核苷酸 68—937 所编码的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列; 和
- f) 与由 SEQ ID NO: 21 的核苷酸 68—937 所编码的氨基酸序列具有至少 87% 序列相似性的序列。

本发明还涉及包含先前定义的任何核酸或者蛋白质的组合物。

在另一方面, 本发明涉及植物蛋白质核因子, 其特别能够介导对涉及植物防御机制的沉默元件的抑制。优选地, 所述的蛋白质核因子是特异结合到 BTGTCNC 或者 YTGTCNC 序列上的植物转录阻遏物。最优选的转录阻遏物由此后被称为“SEBF”的蛋白质组成, 其中“SEBF”代表沉默元件结合因子的缩写。在一个实施方案中, 描述了含有分离或者纯化的 SEBF 蛋白或其功能性同系物的一种组合物。优选地, 所述的 SEBF 蛋白或同系物包含选自下面的氨基酸序列:

- a) 由具有与 SEQ ID NO: 21 的核苷酸 68—937 至少 85% 同一性的序列的核酸编码的序列;
- b) 与 SEQ ID NO: 22 具有至少 85% 同一性的序列;
- c) 与 SEQ ID NO: 22 具有至少 87% 相似性的序列; 和
- d) SEQ ID NO: 2 中提供的序列。

更优选地, 所述的 SEBF 蛋白纯化自马铃薯, 并且其具有的纯化系数 (purification factor) 为大约 90—大约 20,700 倍。

依照另一方面, 本发明涉及分离或者纯化的核酸, 其含有这样的结合序列, 蛋白质核因子如 *PR-10a* 的沉默元件 (SE) 的转录阻遏物特异结合于所述的结合序列。优选地, 所述的结合序列含有序列 BTGTCNC (SEQ ID NO: 23), 更优选为序列 YTGTCNC (SEQ ID NO: 24)。本发明还涉及分离或者纯化的基因调控元件, 其包含对于 *PR-10a* 的沉默元件 (SE) 在植物中的全部活性必需的核酸序列。优选地, 所述的基因调控元件由沉默

元件组成，并且其包含序列GACTGTCAC (SEQ ID NO:26) 或者序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，更优选为序列YTGTCNC (SEQ ID NO:24)。本发明还涉及包含所述基因调控元件的DNA构建体，和包含所述基因调控元件或所述DNA构建体的遗传修饰的植物实体。

依照相关方面，本发明涉及用于改变植物中基因表达的方法。该方法包含这样的步骤：在植物中改变核DNA结合蛋白结合到序列BTGTCNC。优选的内源性DNA结合蛋白的非限制性实例包括那些与SEBF具有至少48%同一性或者相似性的蛋白。更优选地，所述的DNA结合蛋白由SEBF或具有与SEBF至少90%同一性或者相似性的功能性同系物组成。

在另一个优选的实施方案中，描述了一种用于增加目的基因表达的方法，该基因具有包含序列BTGTCNC的启动子区域。所述的方法包含这样的步骤：调节该基因的启动子区域以突变或删除序列BTGTCNC。该基因可以是PR基因。

在另一个优选的实施方案中，描述了一种降低目的基因表达的方法，该基因具有缺乏序列BTGTCNC的启动子区域。所述的方法包含这样的步骤：以可操作连接的方式将序列BTGTCNC导入到启动子区域。

在更具体的实施方案中，描述了一种植物性宿主（例如藻类，植物），所述的植物性宿主被进行了遗传修饰，以使其表现出蛋白质核因子的表达或者生物学活性发生改变，所述的蛋白质核因子对序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、优选为YTGTCNC (SEQ ID NO:24)具有特异的结合活性，将变化的水平与相应的未被遗传修饰的植物性宿主进行比较，所述的未被遗传修饰的植物性宿主的内源性水平未有变化。优选的蛋白质核因子是那些与SEBF具有至少48%同一性或者相似性的蛋白质核因子。更优选地，所述的蛋白质核因子由SEBF或与SEBF具有至少90%的同一性或者相似性的功能性同系物组成。

在一个甚至更具体的实施方案中，SEBF或同系物在植物性宿主中的表达或者生物学活性已经被提高，使其显示出选自下面的表型：

- 对病原体的降低的抗性或者耐受性；
- 降低的生长、生根和/或果实生产；

- 对生长素除草剂（auxinic herbicide）的增加的抗性；
- 降低的乙烯生产；和
- 其果实成熟延迟和/或其果实受到保护而使其避免过成熟。

在另一个具体的实施方案中，SEBF或同系物在植物性宿主中的表达或者生物学活性已经被降低，使其显示出选自下面的表型：

- 对病原体的增加的抗性或者耐受性；
- 增加的生长、生根和/或果实生产；
- 对生长素除草剂的增加的敏感性；
- 增加的乙烯生产；和
- 早期的果实成熟。

本发明还包含用来获得具有先前描述表型的植物性宿主的方法。典型地，这些方法包含在植物中调节（典型地，降低或者增加）SEBF或SEBF功能性同系物的表达或生物学活性这一步骤。

本发明的另一相关方面涉及含有基因组的遗传修饰的植物性宿主，其中的一种与在启动子区域存在或不存在序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、优选YTGTCNC (SEQ ID NO:24)相关的基因的转录活性已经被改变了。当然，要将改变的生物学活性与相应的未被遗传修饰的植物性宿主进行比较，所述的未被遗传修饰的植物性宿主的内源性生物学活性未有改变。

在一个实施方案中，所述基因的启动子区域包含序列BTGTCNC，并且所述的启动子区域已经被遗传修饰（例如突变、删除）以使与序列BTGTCNC存在相关的抑制转录活性失活。

在另一个实施方案中，所述的启动子区域没有序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，而且此区域已经被遗传修饰以在其中以可操作的连接方式插入序列BTGTCNC。

在另一方面，本发明涉及在植物中、特别是应用于农业的植物和具有园艺价值的植物中获得特殊表型的方法。在一个实施方案中，描述了用于下述目的的方法：

- 调节植物对病原体的抗性或者耐受性；
- 调节由生长素控制的植物基因的诱导；

- 调节由植物生长素控制的基因诱导;
- 增加植物的生长、生根和/或果实生产;
- 调节生长素诱导的ACC合酶基因;
- 调节植物乙烯生产; 和
- 调节植物质体mRNAs的稳定性、表达或活性。

所有这些方法都包含这样的步骤: 在植物中调节内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或生物学活性。

在一个优选的实施方案中, 描述了一种用于获得表现出选自下列表型的遗传修饰植物的方法:

- 对病原体的增加的抗性或者耐受性;
- 增加的生长、生根和/或果实生产;
- 对生长素除草剂的增加的敏感性;
- 增加的乙烯生产;
- 早期的果实成熟; 和
- 改变的质体mRNAs的稳定性、表达或活性。

涉及所述表型的基因的启动子区域包含序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23), 将所述植物的表型与相应的未被遗传修饰的植物相比较。

所述的方法包含这样的步骤: 对所述植物的基因组进行遗传修饰, 以使与序列BTGTCNC存在相关的内源性生物学活性失活。

在一个优选的实施方案中, 描述了一种用于获得表现出选自下列表型的遗传修饰植物的方法:

- 对病原体的降低的抗性或者耐受性;
- 降低的生长、生根和/或果实生产;
- 对生长素除草剂的增加的抗性;
- 降低的乙烯生产;
- 其果实成熟延迟和/或其果实受到保护而使其避免过成熟; 和
- 改变的质体mRNAs的稳定性、表达或活性。

涉及所述表型的基因的启动子区域没有序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23), 将所述植物的表型与相应的未被遗传修饰的植物相比较。

所述的方法包含这样的步骤: 对所述植物的基因组进行遗传修饰,

以在其中以可操作的连接方式插入序列BTGTCNC。

在本发明的另外的实施方案中，描述了植物以及用来获得所述植物的方法，表现出对病原体增加的（或者降低的）抗性或者耐受性的植物；对其防御应答的加快的（或者减缓的）诱导作用；对内源性生长素增加的（或者降低的）敏感性；和/或延迟的果实成熟或者提前的果实成熟。

在一个具体的实施方案中，提供了一种用来调节植物对病原体的抗性或者耐受性的方法，其包含在植物中调节内源性SEBF蛋白的表达或者生物学活性。更具体地，描述了一种用来增加植物对病原体的抗性或者耐受性的方法，其包含在植物中降低内源性SEBF蛋白的表达或者生物学活性。减少内源性SEBF蛋白的表达或者生物学活性可以通过下列方法来进行，例如，通过在植物中表达SEBF的反义分子；通过表达诱导SEBF水平或者活性的共抑制的蛋白；通过敲除或者化学突变编码SEBF蛋白的基因；或者通过表达切割SEBF mRNA的核酶。该实施方案还描述了一种用来降低植物对病原体抗性或者耐受性的方法，其包含在植物中增加SEBF蛋白的表达或者生物学活性。增加内源性SEBF蛋白的表达或者生物学活性可以通过例如在植物中引入可表达的SEBF编码序列来实现。可以将该SEBF编码序列处于可诱导的或者组成型表达的启动子控制之下。本发明还包含这样的植物，所述的植物被遗传修饰以使其在与相应的未被遗传学修饰的植物相比较时，具有对病原体增加的（或者降低的）抗性或者耐受性，其中，当与相对应的未被遗传修饰植物相比，在所述遗传修饰的植物中的内源性SEBF蛋白的表达或者生物学活性被降低（或者增加）。

在另一个具体实施方案中，提供了一种用来调节植物对病原体抗性或者耐受性的方法，所述的植物在基因的启动子区域具有序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，所述的方法包含在所述的植物中改变内源性核DNA结合蛋白对序列BTGTCNC的结合。更具体地说，该实施方案描述了一种用来增加植物对病原体抗性或者耐受性的方法，所述的植物在基因的启动子区域具有序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，所述的方法包含在所述的植物中降低或者阻止内源性核DNA结合蛋白对序列BTGTCNC的结合。该实施方案还描述了一种用来降低植物对病原体抗性或者耐受性的

方法，该方法包含在所述的植物中，允许或者增加内源性核DNA结合蛋白对包括序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)的基因的启动子区域的结合。本发明还包含这样的植物，所述的植物被这些方法进行了遗传修饰，以使其具有对病原体增加的（或者降低的）抗性或者耐受性。

在一个更具体的实施方案中，提供了这样一种方法，该方法用来在植物中调节由生长素控制的基因的诱导，所述的方法包含在植物中调节内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。更具体地说，描述了一种用来增加植物生长、生根和/或果实生产的方法，所述的方法包含在植物中降低内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。该实施方案还描述了一种用来增加植物对生长素除草剂抗性的方法，此方法包含在植物中降低内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。本发明还包含被这些方法遗传修饰的植物。

在另一个具体实施方案中，提供了一种用来调节植物乙烯生产的方法，该方法包含在植物中调节内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。更具体地说，描述了一种通过植物增加乙烯生产的方法，该方法包含在植物中降低内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。该实施方案还描述了一种通过植物降低乙烯生产的方法，该方法包含在植物中增加内源性SEBF蛋白或者SEBF功能性同系物的表达或者生物学活性。本发明还包含被这些方法进行了遗传修饰以具有增加的（或者降低的）乙烯生产的植物。

在上文中使用的植物性宿主，优选由植物（单子叶植物或者双子叶植物）组成、更优选由蔬菜（vegetable）、豆科植物、树、果树、禾本科植物、谷类组成，甚至更优选由马铃薯、番茄、烟草、棉花、稻属、小麦、谷物、大麦、燕麦、油菜（canola）、大豆、豌豆、甘蔗、甜菜、草莓和香蕉。

参照附图，在对以下几个优选实施方案的非限制性描述进行阅读以后，本发明的其它目的和优点将会显而易见。

附图简述

图1是显示SEBF结合于单链沉默元件的凝胶图片。用10 μg 粗核制备物和20,000 CPM的 ^{32}P 标记的 SE 编码链 (泳道 1; CS) 或者非编码链 (泳道 3; NCS)进行EMSA。通过退火放射性标记的非编码和非标记的(cold)编码链来得到双链探针 (DS)。CS:NCS的比率从4-6泳道分别为0.75:1, 1.5:1和3:1。在泳道2中没有加入提取物。箭头表明了CS, NCS和DS探针的位置以及SEBF在凝胶中的位移。

图 2A, 2B, 2C 和 2D 显示了对马铃薯沉默元件 (SE) 的突变分析。图 2A: 本研究使用的报告基因构建体 (reporter construct) 和突变寡核苷酸的示意图。报告基因构建体含有来自从-135 到 +136 与编码 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS)的细菌基因 *uidA* 融合的 *PR-10a* 启动子区域。显示了诱导子应答元件(ERE), 沉默元件 (SE)和 TATA 盒的位置。转录起始位点用箭头表示。野生型(WT; SEQ ID NO:45)和突变寡核苷酸 m1-m5 (SEQ ID NOS:1-5)之间的共同序列用虚线表示, 突变的核苷酸用小写字母表示。图 2B: 使用 10 μg 的粗马铃薯块茎核制备物和和在图 2A 中给出的、20,000 CPM ^{32}P 标记的单链 CS 寡核苷酸所进行的 EMSA 研究。图 2C: 使用 10 ng 的纯化的重组体 SEBF 和在图 2A 中给出的 20,000 CPM ^{32}P 标记的单链 CS 寡核苷酸所进行的 EMSA 研究。图 2D: 融合到 *uidA* 基因的 *PR-10a* 启动子的从-52 到-27 的序列被图 2A 中给出的序列所取代。将所得到的质粒经电穿导入马铃薯叶原生质体中, 测定 GUS 活性。柱状图代表相对于野生型(WT=1)的活性倍数。通过共电穿荧光素酶报告基因来校正转染效率。结果代表了来自 6 个单独电穿孔最小值的平均值。误差条线 (error bar) 代表所述平均值的标准偏差。

图 3A, 3B 和 3C 所显示的结果确定了共有 SEBF 结合位点。图 3A: 列出了用来精确描绘 SEBF 结合位点的寡核苷酸。用虚线表示野生型(SEQ ID NO:46)和突变体寡核苷酸 m6-m20 (SEQ ID NOS:6 to 20)之间的共同序列。突变的寡核苷酸用小写字母表示。图 3B: 显示 SEBF 结合到包含两个突变核苷酸的寡核苷酸的 EMSA。图 3C: 与图 3B 一样, 只是寡核苷酸含有一个突变。使用 10 μg 的粗核制备物和和在图 3A 中给出的 20,000 CPM ^{32}P 标记的单链寡核苷酸进行研究。

图 4 是显示 SEBF 纯化的凝胶图片。对来自每个 SEBF 纯化步骤中

的蛋白进行考马斯染色(泳道 1-4)。将粗核提取物(粗;泳道 1)加载到 Q-琼脂糖™ 柱上。在两轮亲和纯化(Aff.1, Aff.2;泳道 3, 泳道 4)之前,在 400 mM NaCl (Q-seph;泳道 2)洗脱 SEBF。泳道 5 显示了通过使用亲和 2 纯化的 SEBF 并将野生型编码链作为放射性标记的探针所进行的 southwestern (SW)实验。箭头显示了两个纯化的条带。在左侧显示了分子量标记。

图 5 显示了 SEBF 的氨基酸序列(SEQ ID NO:22; GenBank™ 登记号 No AF38431)。用箭头表示转运肽切割的预测位点。两个共有序列类型 RNA 结合结构域(cs-RBD)被加上了下划线。用黑体显示了通过氨基末端测序得到的氨基酸序列。

图 6 显示了 SEBF 的细胞定位。将马铃薯叶分成胞质、核和叶绿体。用 12%的 SDS-PAGE 分离 10 μg 的每个部分。将蛋白转移到硝化纤维素上并用抗 SEBF 抗体来显示 SEBF 的存在。第一泳道(10ng 的重组体 SEBF)显示了用来免疫家兔的蛋白。将叶绿素(CHL)用作叶绿体标记(数据用 μg 叶绿素表示[mg 蛋白]⁻¹)并将醇脱氢酶(ADH)作为胞质标记(数据表示为增加的 OD[mg 蛋白]⁻¹[分]⁻¹)。N.D 不可检测。

图 7A, 7B 和 7C 显示了 SEBF 的基因组结构。图 7A: SEBF 的 DNA 印迹。在每个泳道上加载 5 μg 消化的基因组 DNA,并用图 7C 中所示的来自 SEBF cDNA 的随机标记的 *XmnI* 片段进行探查。在右侧显示了分子量标记。图 7B: 对基因组 DNA 进行的 PCR 分析。在图 7C 中显示了所述 cDNA 上寡核苷酸的位置(T-Z;泳道 1-6)。泳道 5 和 6,泳道 3 和 4,以及泳道 2 和 4 的扩增产物之间的大小差别,分别限定了内含子 1, 2 和 3 的大小。在右侧显示了分子量标记。图 7C: 推导的 SEBF 基因组结构。cDNA 用线表示,编码区用盒表示。氨基末端转运序列显示成黑色。内含子被显示成从 cDNA 出现的三角。用字母命名在 PCR 反应中使用的寡核苷酸(T, U, V, W, X, Y, Z; 相应于 SEQ ID NOS: 38-44)。从 PCR 分析图 7B 推断内含子的位置和大小。用箭头显示限制性内切酶位点: *HinDIII* (H), *EcoRI* (E), *XmnI* (Xn)。

图 8 显示: SEBF 过表达抑制了 PR-10a 的表达。将前体 SEBF 的编码序列(含有推定的转运肽)和对照蛋白的编码序列每个插入质粒

pBI223D (效应物质粒(effector plasmid))。将这些质粒与图 2D 中所述的报告基因质粒 (报告基因质粒) 共电穿孔到马铃薯叶原生质体中。柱状图表示: 与过表达对照蛋白相比 (对照=100), SEBF 过表达对报告基因活性的影响。为了更容易参考图 2D 给出了相对于野生型 SE (WT = 1) 的活性倍数。通过共电穿孔荧光素酶报告基因来校正转染效率。结果代表了来自 3 个单独电穿孔最小值的平均值。误差条线代表所述平均值的标准偏差。

图 9A 和 9B 显示了 SEBF 结合其它防御基因的启动子。图 9A: 列出了在此实验中使用的寡核苷酸。用小写字母表示与 PR-10a 不同的核苷酸 (SEQ ID NO: 25 和 47; 相应于 Genbank™ acc. No. M29041 的核苷酸 1426-1450)。在 SEBF 结合位点处加上了下划线。ChtC2 是来自马铃薯的几丁质酶基因 (SEQ ID NO:48, 相应于 Genbank™ acc. No. AF153195 的核苷酸 1264-1288), CHN50 是来自烟草的几丁质酶基因 (SEQ ID NO:49, 相对于 Genbank™ acc. No. X51599 的核苷酸 1215-1239)。图 9B: 使用 0.5 μ g 的 400mM Q-琼脂糖凝胶部分和在图 9A 中给出的 20,000 CPM 32 P 标记的单链寡核苷酸所进行的 EMSA 研究。

图 10 显示了 SEBF (GenBank™ acc. No. AF38431) 的 DNA 序列 (SEQ ID NO:21) 和蛋白序列 (SEQ ID NO:22)。在 DNA 序列下面显示了被翻译的蛋白序列 (见图 5; SEQ ID NO:22)。每个氨基酸都被显示在密码子的第一个核苷酸下面。

图 11A, 11B 和 11C 显示了 SEBF 结合到出现在大豆 *GH3* 启动子中的 AuxRE 序列。图 11A: AuxRE (SEQ ID NO:55) 与 SEBF 结合位点 (SEQ ID NO:23) 之间的比较。图 11B: 本研究中使用的寡核苷酸 (SEQ ID NOS:50 和 51)。图 11C: 使用 0.5 μ g 的 400mM Q-琼脂糖™ 部分和在图 11B 中给出的 20,000 CPM 32 P 标记的寡核苷酸所进行的 EMSA 研究。

图 12A, 12B 和 12C 显示了防御基因 *CHN50* 启动子中 SE 序列的功能性。图 12A: 使用 0.5 μ g 的 400mM Q-琼脂糖™ 部分和在图 12C 中给出的 20,000 CPM 32 P 标记的寡核苷酸所进行的 EMSA 研究。图 12B: 将 *CHN50* 启动子或者其在图 12C 中所示的突变版融合到 *uidA* 基因。将所得到的质粒电穿孔入烟草叶原生质体, 测定 GUS 活性。通过共电穿孔荧

光素酶报告基因来校正转染效率。结果代表了 3 个单独电穿孔的最小值。误差条线代表所述平均值的标准偏差。图 12C：本研究中使用的寡核苷酸(WT = SEQ ID NO:52; M1 = SEQ ID NO:53; M2 = SEQ ID NO:54)。突变用小写字母表示并且在下面加上了下划线。用粗体字字符显示 SEBF 结合位点。

发明详述

A) 定义

为了更清楚更一致的理解本说明书及权利要求书，包括这里给出的这些术语的范围，在此提供了下列定义：

反义：指的是能够在植物中调控相应基因表达的核酸分子。此处使用的反义分子还可以包括基因构建体，该基因构建体以与相对于它的或另一个启动子相反方向含有结构基因组基因、cDNA 基因或其部分。典型地，反义核酸序列不是蛋白合成的模板，但是其与其它分子（如基因或者 RNA）中的互补序列相互作用，从而使那些分子的功能受到影响。

化学衍生物：如在这里使用的那样，当蛋白/多肽包含额外的、通常并非该蛋白/多肽的一部分的化学“部分”时，该蛋白/多肽被称为另一蛋白/多肽的“化学衍生物”，可以使用本领域熟知的技术加入所述的“部分”。这些“部分”可以提高蛋白/多肽的溶解性、吸收性、生物利用度、生物半寿期等等。通过使用这些“部分”，可以减少甚至消除任何不合需要的毒性和副作用。例如，可以将蛋白/多肽共价偶联到生物相容的聚合物（聚乙烯醇，聚乙二醇等）上以提高稳定性或者减少/增加其抗原性。

防御基因：应答于病原体的挑战而在植物中被诱导和/或涉及的一种基因。

片段：指的是分子如蛋白/多肽或者核酸的一部分，并且还指氨基酸或者核苷酸序列的任何部分。

功能性同系物：如通常理解和在此使用的那样，指的是非天然的多肽或者核酸分子，该分子具有与天然多肽或者核酸分子的生物学活性实质上相似的功能性生物学活性。优选的功能性同系物是具有与天然多肽或者核酸分子“实质上等同”（见后）序列的多肽或者核酸分子。所述的

功能性同系物可以是天然存在的，或者可以通过使用本领域熟知的方法及原理，涉及天然存在的酶进行一个或者多个氨基酸取代、删除和/或添加而得到。蛋白的功能性同系物可以含有也可以不含有翻译后修饰如共价连接的糖类，只要这样的修饰对特定功能的实施并不是必需的。但是，应该注意到，具有低于上面给出的相似性百分比的核苷酸或者氨基酸序列仍然能够编码具有所需活性的蛋白分子，这样的蛋白分子可以仍然被认为属于本发明所包括的范围内，因为它们具有序列保守区域。术语“功能性同系物”指的是多肽或者核酸分子的“片段”、“区段”、“变体”、“类似物”或者“化学衍生物”。

融合蛋白：由杂交基因表达形成蛋白，所述的杂交基因由两个基因序列组合而成。典型地，这是通过将 cDNA 克隆入其框架中具有一个已有基因的表达载体而实现的。

遗传修饰：当与术语“植物性宿主”或者“植物”一起使用的时候，其指的是将外源核酸引入一个或者多个植物性宿主（植物）细胞以产生遗传修饰的植物性宿主或者植物。用于遗传修饰植物性宿主如植物的方法在本领域为人所熟知。在一些情况中，可以优选永久的遗传修饰，因为这样，被遗传修饰的植物可以被再生为完整的、有性能力的、能存活的遗传修饰植物。被以永久方式遗传修饰的植物优选能够自花授粉或者与其它同种植物之间进行异花授粉，这样，可以将被携带于种系的外源核酸插入或者殖入农业上有用的植物变体中。

内源性或者内源性水平：指一种特定物质或者一种特定物质的浓度，所述的特定物质通常在特定生长时间和生长阶段被发现于植物中（内在的）。该术语还包括可因突变产生的特定物质或者蛋白的功能性同系物。在这里对化合物内源性水平或者酶活性水平变化作出参照，所述改变涉及：在正常的内源性或已有水平之上或之下，所述的化合物水平或者酶活性升高或降低达 30%、或者更优选 30, 35, 40, 45 或 50%、或者甚至更优选 55, 60, 65, 70 或 75%，或者还更优选 80, 85, 90, 95%或更高。可以使用已知的方法和技术来测定化合物的水平或者酶的活性水平。

表达：指的是这样过程，通过该过程，编码信息的基因被转化成在细胞中呈现并运作的结构。在 cDNAs、cDNA 片段和基因组 DNA 片段

的情况下，转录的核酸随后被翻译成肽或蛋白以行使其功能，若有的话。术语“过表达”指的是与基准表达水平相比，所测得的表达水平分别向上偏差，所述的基准表达水平是建立于正常条件和正常功能水平下的表达水平。类似地，术语“过低表达（underpression）”指的是向下的偏差。“定位表达”的意思是使 DNA 分子被放置于这样一段 DNA 序列的附近，所述的序列指导该序列的转录和翻译（即：有利于其产生，例如，NAIP 多肽、重组体蛋白或者 RNA 分子）。

分离的或者纯化的或者实质上纯净的：指的是“人工”改变其天然状态，即：如果其天然存在，则其已经发生改变或者已经被从原始环境中移出，或者两种情况都发生。例如，天然存在于活有机体中的多核苷酸或者蛋白/多肽不是“分离的”；从其天然状态的共存物质中分离的、通过克隆，扩增和/或化学合成而得到的相同的多核苷酸则如在此所用的术语那样是“分离的”。另外，通过转化、遗传操作或者通过任何其它重组方法被引入到有机体中的多核苷酸或蛋白/多肽是“分离的”，即使它仍然存在于所述的有机体中。

调节：指的是这样的过程；通过此过程，特定的变量被调节成确定的比例。

核酸：任何 DNA、RNA 序列或者具有一个或更多核苷酸的分子，包括编码一个完全基因的核苷酸序列。该术语用来包括所有的核酸，无论是天然存在还是非天然存在于特定细胞、组织或者有机体中的核酸。其包括 DNA 及其片段、RNA 及其片段、cDNAs 及其片段、表达的序列标记、包括随机化人工序列在内的人工序列。

植物或者植物实体：指的是全部植物或者植物的一部分，其包含，例如，植物的细胞、植物的组织、外植体、或者植物的种子。该术语还将包括悬浮培养或者组织培养形式的植物，包括但不限于 calli 的培养物、原生质体、胚、器官、细胞器等等。

多肽：指任何超过两个氨基酸的链，不管其有没有翻译后修饰如糖基化作用或磷酸化作用。

启动子区域：指的是一段在特定基因调控中涉及的核苷酸序列。通常位于转录起始位点的 5' 位置。典型地，所述的启动子区域包括 TATA

盒和所有的调控元件（例如：为了对特定基因进行正确调控而对基因表达进行负调控的沉默元件）。

抗性或者耐受性：抗性指的细胞或者有机体（如植物）由于病原体（如病毒、真菌、昆虫等）侵袭，显示出基本上没有表型改变。耐受性指的是细胞或者有机体，尽管由于病原体的侵袭，可能呈现出一些表型改变，但是并不具有本质上减少的生殖能力或者本质上改变的新陈代谢。

SEBF 核酸：指的是任何编码这样的植物多肽的核酸（见上），在其它事情中，所述的植物多肽能够介导对涉及植物防御机制的沉默元件的抑制并且能够特异地结合到序列 BTGTCNC 或者 YTGTCNC 上，所述的植物多肽与 SEQ. ID. NO:23 中所示的氨基酸序列具有至少 90%、优选至少 95%、特别优选 100% 的同一性或者相似性。当涉及植物 SEBF 核酸的时候，更特别地涉及编码 SEQ. ID. NO: 23 的 SEQ. ID. NO: 22 中阐述的核酸。

SEBF 蛋白或者 SEBF 多肽：指的是由前述 SEBF 核酸编码的多肽、其片段、或者功能性 SEBF 同系物。

相似性/互补性：在核酸序列的语境中，这些术语指的是在低等的、选择地并且优选中等的、和选则地并且最优选高等严格（如下所定义）的条件下的可杂交相似性。

特异结合：指的是识别并结合蛋白的抗体，但是该抗体基本上不识别并结合样品如生物学样品中的其它分子，所述的样品天然包含蛋白质。

实质上相同：指的是多肽或者核酸表现出与参照氨基酸或者核酸序列具有至少 50, 55, 60, 65, 70, 75%、优选 80 或 85%、更优选 90, 95%、最优选 97% 或 99% 同一性或相似性。对于多肽而言，对照序列的长度通常为至少 20 个氨基酸，优选至少 25, 30 或 40 个氨基酸，更优选至少 50 或 75 个氨基酸，最优选至少 100 个氨基酸。对于核酸而言，对照序列的长度通常为至少 50 个核苷酸，优选至少 60 个核苷酸，更优选至少 75 个核苷酸，最优选 100 个核苷酸。典型地，使用具有其中指定的默认参数的序列分析软件(例如., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Owl 53705)来测定序列同一性。该软件程序

通过给各种取代、删除和其它修饰分配相似度来配比类似序列。保守的取代典型包括下列的取代：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸和苯丙氨酸、酪氨酸。

严格：为了定义严格的水平，便利地参照 Maniatis 等.(1982)第 387-389 页、尤其是第 11 段。低等的严格在此被定义为在 37-45℃ 处于 4-6X SSC/1% (w/v) SDS 中 2-3 小时。取决于杂交所涉及的核酸的来源及浓度，也可以使用选择的严格条件如中等的严格条件或者高等的严格条件，中等的严格条件在此被认为在大于或等于 45℃ 处于 1-4X SSC/0.5-1% (w/v) SDS 中 2-3 小时；高等的严格条件在此被认为在大于或等于 60℃ 处于 0.1-1X SSC/0.1-1.0% SDS 中 1-3 小时。

转化的或者转染的或者转基因细胞：指的是将外源的核酸、典型为基因或者基因调控序列，引入到整个植物或其一部分中。“转化”指的是用于将外源分子引入细胞的任何方法。农杆菌属转化、PEG 处理、脂转染、磷酸钙沉淀、电穿孔、和冲击式转染 (ballistic transformation) 不过是可以使用的几种教导而已。

转基因植物：任何具有包含这样的 DNA 序列的细胞的植物，所述的 DNA 序列已经通过特定的方法被插入到细胞中，并且成为了由此细胞发育而成的植物基因组的一部分，优选的转基因植物是那些用外源核酸转化的转基因植物，通过使用遗传工程的方法，所述的外源核酸被引入到个体植物细胞的基因组中。

载体：一种自我复制的 RNA 或者 DNA 分子，其可被用来将 RNA 或者 DNA 片段从一个有机体转移到另一个有机体。载体对于操纵遗传构建体特别有用，而且不同的载体在克隆步骤中可以具有特别适于在接受体中表达蛋白的特性，而且不同的载体可以含有不同的选择性标记。细菌质粒是常用的载体。优选地，本发明的载体能够促进核酸转移到植物细胞和/或促进其整合入植物基因组。

植物性宿主：指的是包含叶绿体并且能够进行光合作用的细胞、组织、器官或者有机体。该术语意图还将包括被加以修饰以得到这些功能的宿主。藻类和植物是植物性宿主的实例。

创伤和应激可诱导的基因：由创伤或者非生物的应激如紫外光、干旱、盐度诱导的植物基因。

B) 发明概述

本发明的发明者现已发现，只有 9 个核苷酸是 *PR-10a* 基因的沉默元件(SE)的全部活性所必需的，即：序列 GACTGTCAC (SEQ ID NO:26)。

本发明的发明者还鉴定了一种核因子（此后确定为“SEBF”），该核因子显示出与序列 BTGTCNC (SEQ ID NO:23)特异结合的序列。资料库检索显示：许多 *PR* 基因的启动子中存在此结合序列。

本发明的发明者还发现序列 BTGTCNC 与生长素应答元件的序列显示出高度的序列相似性，这强烈提示该序列与 SEBF 在由植物激素生长素及其功能类似物所诱导基因的调控中起作用。另外，本发明者已经证明：SEBF 可以识别并结合相应于大豆 *GH3* 基因的 AuxRE 的序列。

本发明的发明者还发现 SEBF 可以通过生长素的作用参与乙烯合成的调控，这是因为 SEBF 结合元件出现在 ACC 合酶基因的启动子中，该基因被生长素所诱导并且编码乙烯生物合成中的一种关键的酶—另一种植物激素。

本发明的发明者还已经对 SEBF 进行了分子表征。SEBF 蛋白被纯化均匀、被部分化学测序，而且编码 SEBF 的 cDNA 被分离并被测序。推导得到的 SEBF 氨基酸序列显示出与叶绿体 RNA 结合蛋白具有高度的序列相似性。

叶细胞的亚细胞划分证实：SEBF 位于叶绿体和核，提示其在这两个细胞区室中均发挥功能。

重组体 SEBF 在瞬时表达系统中的过表达，引起 *PR-10a-uidA* 报告基因融合体出现 SE-依赖性转录抑制，证实了 SEBF 作为转录阻遏物的作用。

通过使用酵母双杂交系统，本发明的发明者进一步鉴定出了与 SEBF 相互作用的蛋白。其中的一种蛋白是 Pti4，它是在植物病原体诱导的防御应答过程中 *PR* 基因的转录调控子。有趣的是，已知 Pti4 与胍水解酶相互作用，胍水解酶是一种涉及生长素生物合成的酶。此外，Pti4 是乙

烯应答元件结合蛋白 (ERE BP) 中的一员, 已知 ERE BP 涉及植物对乙烯的应答。另外, 在双杂交研究中发现, SEBF 与 Pti4 的 ERF 结构域相互作用。ERF 结构域特别令人感兴趣, 因为它在所有乙烯应答因子中都是保守的。

本发明的发明者还已经证明: 存在于烟草几丁质酶防御基因 *CHN50* 启动子中的 SE 元件能够结合 SEBF, 而且在此元件中发生的防止 SEBF 结合的突变使转录被去阻遏 (unblock)。这一结果特别令人感兴趣, 因为该启动子含有作为 Pti4 结合位点的 GCC 盒, 而且乙烯可能通过与乙烯应答因子如 Pti4 的结合来调控该启动子。

C) 含有特异结合序列的核酸

本发明的第一方面提供了分离或纯化的核酸, 所述核酸包含蛋白质核因子特异结合于上面的结合序列。根据优选的实施方案, 本发明的结合序列为 BTGTCNC (SEQ ID NO:23), B 相应于任何除了 A 之外的核苷酸 (即: T, C 或者 G), N 相应于 A, T, C 或者 G。更优选地, 本发明的结合序列是 YTGTCNC (SEQ ID NO:24), Y 相应于嘧啶(pyridine) (即: T 或者 C)。确切的结合序列可以取决于特定的基因和有机体而变化, 如后文表 5 中所例举。

依照本发明的相关方面, 提供了这样的分离或纯化的核酸, 该核酸包含一段由含有对于 *PR-10a* 沉默元件的全部活性必需的核酸序列的基因调控元件组成的序列。根据一个优选的实施方案, 所述的基因调控元件由沉默元件组成, 而且其包含序列 BTGTCNC (SEQ ID NO:23), 更优选为序列 YTGTCNC (SEQ ID NO:24)。根据另一个优选的实施方案, 所述的植物是马铃薯, 而且所述的 *PR-10a* 沉默元件 (SE) 的必需序列是 CTGTCAC (SEQ ID NO:25 或 47)。

本发明还涉及包含上述基因调控元件和/或结合序列的 DNA 构建体, 和包含所述基因调控元件、所述结合序列和/或所述 DNA 构建体的遗传修饰的植物实体。在一个优选的实施方案中, 将所述的调控元件有效连接到可诱导的启动子上。

如下文中实施例中所示, 序列 BTGTCNC 被发现是称为 SEBF 的 *PR*

-10a 沉默元件 (SE) 的转录阻遏物的特异结合序列。因此, 序列 BTGTCNC 是涉及基因活性调节的重要序列, 所述的基因将序列 BTGTCNC 整合到了它们的启动子区域。

因此, 本发明还涉及遗传修饰的植物性宿主, 其中与在该基因的启动子区域中存在或不存在序列 BTGTCNC 相关的基因的转录活性已经被改变了。

因此, 本发明的一个相关方面涉及用于在植物中改变基因表达的方法。所述的方法包含在所述植物中改变核 DNA 结合蛋白对序列 BTGTCNC 的结合这一步骤。尽管核 DNA 结合蛋白优选由 SEBF 组成, 但是, 本领域地技术人员应当理解: SEBF 并不是能够结合到序列 BTGTCNC 的唯一蛋白质核因子, 因为其它蛋白质核因子也可能如此。优选的核 DNA 结合蛋白的非限制性列表包括与 SEBF 具有至少 48% 的同一性或相似性的蛋白, 更特别地那些列在下文表 6 中的蛋白。本发明还包括在低等的、优选中等的、更优选高等严格的条件下, 与核酸序列 BTGTCNC 或与其互补序列杂交的序列。

D) SEBF 和其它结合到序列 BTGTCNC 上的多肽

根据本发明的另一方面, 提供了分离或纯化的核酸分子, 该核酸分子编码能够特异结合到序列 BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、更优选为序列 YTGTCNC (SEQ ID NO:24)上的多肽。本发明还提供了能够特异结合到序列 BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、更优选为序列 YTGTCNC (SEQ ID NO:24)上的、分离或纯化的多肽。

所述多肽以及所述结合序列 (见表 5) 的同一性可以依赖于有机体而变化, 而且可以依赖于活性将进行调节的特定基因而变化。根据优选的实施方案, 本发明的多肽与图 5 中所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO:22) 及其功能类似物具有至少 80 或 85%、更优选至少 90 或 95% 和甚至更优选 97%, 99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。根据另一个实施方案, 所述的多肽具有由这样的核酸编码的氨基酸序列, 所述的核酸与图 10 中所示的核酸序列 (SEQ ID NO:21)、与其可读框 (核苷酸 68-973)、或与其片段具有至少 80 或 85%、更优选至少 90, 95% 和甚至更优选 97%, 99

%或100%的同一性。更优选地，本发明的多肽还能够调节将序列BTGTCNC或者YTGTCNC整合到其启动子区域的基因的活性。不需要做过多的实验，本领域的技术人员就应该能够确定编码本发明多肽的准确的核苷酸序列。

根据本发明最优选的实施方案，本发明多肽是被称为“SEBF”的转录阻遏物。该SEBF的cDNA序列和预测的氨基酸序列显示在图10和“序列列表”部分中。SEQ ID NO:21相应于马铃薯的SEBF cDNA, SEQ ID NO:22相应于所述蛋白的预测的氨基酸序列。

马铃薯的SEBF基因编码一种289个氨基酸长度的蛋白。In silico分析显示，马铃薯SEBF蛋白具有以下特征：其分子量为大约30810 g/mol，等电点为大约4.6；不稳定指数为大约49；脂肪族指数为大约66.8；总平均的亲水性(grand average of hydropathicity) (GRAVY)为大约-0.5。其还包含很多潜在的磷酸化位点(18丝氨酸, 3苏氨酸, 和5酪氨酸)；还有10个潜在的N-糖基化位点。在变性条件下，在SDS PAGE上，其具有明显的、约为28—约29kDa的分子量。其还具有转录阻遏物的生物学活性。

进行胚细胞研究来鉴定SEBF和其它已有序列的序列同一性。下文中的表1提供了显示与SEBF相似的序列的列表(核苷酸对核苷酸)。表2提供了与SEBF同源的蛋白的列表(蛋白对蛋白)，表3提供了显示与SEBF相似的预测蛋白的列表(蛋白对翻译的核苷酸)。

可以通过任何适当的方法来制备本发明的多肽和核酸分子、更具体是SEBF和/或是结合序列。例如当条件合适的时候，它们可以通过化学合成来得到。也可以通过使用涉及克隆或者表达载体的生物学方法来制备它们。这些载体应该包含整合目的核酸分子的多核苷酸序列，例如和/或包含编码目的肽的多核苷酸序列。因此，本发明包括这样的克隆或者表达载体，更具体地包括编码SEQ ID NO:22的那些和包含SEQ ID NO:21的核苷酸68—937的那些。另外，可以使用诸如聚合酶链式反应(PCR)和DNA杂交这样的标准技术来将额外的SEBF同系物克隆到其它植物物种中。

因此，在一个相关的方面，本发明涉及用来体外生产多肽的方法，所述的多肽能够特异结合序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、更优选为序

列 YTGTCNC (SEQ ID NO:24), 并且优选具有转录阻遏物的生物学活性。该方法包括以下步骤 1) 在合适的培养基中体外培养整合了前述表达载体的细胞, 和任选地 2) 在培养基中收集由这些细胞产生的多肽。用来生产这样的遗传修饰的细胞的方法和用来在蛋白/肽生产中使用这些细胞的方法在本领域为人所熟知, 此处将不再进行详述。

表 1: 显示与 SEBF 相似性 (核苷酸对核苷酸) 的核苷酸序列

序列	NCBI acc. 号	同一性		期望值 ¹
		原始的	百分比	
cpRBP30 的 mRNA, 烟草	GI: 19707	777/885	87	0,00E+00
cp29A 的 mRNA, 烟草	GI: 19753	481/544	88	1,00E-54
cp31 的 mRNA, 烟草	GI: 19709	434/456	95	2,00E-58
cp29B 的 mRNA, 烟草	GI: 14134	345/380	91	1,00E-44
At2g37220 基因 鼠耳芥属(Arabidopsis)	GI: 13877808	130/154	84	1,00E-22
cp29(At3g53460)的 mRNA, 鼠耳芥属	GI: 18409841	126/155	81	3,00E-11
24kDa RBP 的 mRNA, 菠菜	GI: 1015369	93/107	87	9,00E-05

1: 期望值代表随机选择一段特定序列的概率

表 2: 与 SEBF 相似的蛋白

蛋白	NCBI acc. 号	同一性		相似性		期望值 ¹
		原始的	%	原始的 ⁴	%	
cp29A, 烟草	GI: 12230584	191/230	83	198/230	86	1,00E-118
30 kDa 核糖核蛋白, 烟草	GI: 1350820	186/232	80	193/232	83	4,00E-88
cp29B, 烟草	GI: 12230585	173/245	70	188/245	76	3,00E-83
31 kDa 核糖核蛋白, 烟草	GI: 1350821	172/245	70	189/245	76	2,00E-73
推定的 RNA 结合蛋白, 鼠耳芥属	GI: 15228102	148/219	67	173/219	78	2,00E-73
推定的 RNA 结合蛋白, 水稻	GI: 18921322	137/221	61	166/221	74	8,00E-68
RNA 结合蛋白, 菠菜	GI: 7446360	142/224	63	162/224	71	1,00E-60
cp29, 鼠耳芥属	GI: 681904	144/265	54	167/265	62	2,00E-59
RNA 结合蛋白, 鳄梨	GI: 19032260	113/225	50	147/225	65	2,00E-48
cp31, 鼠耳芥属	GI: 1076305	112/226	49	146/226	64	3,00E-48
RNP-D, 鼠耳芥属	GI: 629557	112/222	50	144/222	64	5,00E-47
RNP-T, 鼠耳芥属	GI: 15233980	112/222	50	144/222	64	1,00E-46
28 kDa 核糖核蛋白, 烟草	GI: 133246	102/219	46	142/219	64	1,00E-46
RNA 结合蛋白, 豌豆	GI: 7446357	110/213	51	138/213	64	2,00E-46
RNA 结合蛋白 2, 鼠耳芥属	GI: 475719	112/222	50	144/222	64	2,00E-46
cp31, 大麦	GI: 7446358	114/220	51	145/220	65	6,00E-46

蛋白	NCBI acc. 号	同一性		相似性		期望值 ¹
Ps16, 小麦	GI: 7446356	113/221	51	146/221	65	5,00E-45
DNA 结合蛋白, 鼠耳芥属	GI: 99684	112/222	50	144/222	64	9,00E-45
RNA 结合蛋白, 冰叶日中花(ice plant)	GI: 1076251	112/228	49	140/228	61	2,00E-44
RNA 蛋白一样, 鼠耳芥属	GI: 15240641	110/225	48	141/225	61	5,00E-44
28kDa 核糖核蛋白, 菠菜	GI: 133247	116/217	53	140/217	64	1,00E-43
核酸-结合蛋白, 玉米	GI: 100903	112/221	50	143/221	64	7,00E-42
CEBP-1, 康乃馨	GI: 7446355	107/245	43	140/245	56	5,00E-41
RNA 结合蛋白 3, 鼠耳芥属	GI: 475720	93/172	54	117/172	67	3,00E-40
RNP1, 菜豆	GI: 1076509	89/222	40	128/222	57	1,00E-34
cp33, 鼠耳芥属	GI: 681912	87/222	39	138/222	61	1,00E-34
核糖体蛋白 CEP52, 鼠耳芥属	GI: 17064758	87/222	39	137/222	61	3,00E-34
cp33, 烟草	GI: 133249	90/228	39	140/228	60	3,00E-34
cp33, 大麦	GI: 7446339	89/226	39	130/226	57	1,00E-33
RNA 结合蛋白, 蚕豆	GI: 7446361	87/226	38	132/226	57	2,00E-32
核糖体蛋白 2, 菠菜	GI: 7578881	76/203	37	118/203	57	3,00E-27
NSR1, 酵母	GI: 253181	60/188	31	103/188	53	6,00E-21

1: 期望值代表随机选择一段特定序列的概率

表 3: 显示与 SEBF 相似性 (蛋白对翻译的核苷酸) 的预测蛋白

蛋白	NCBI acc. 号	同一性		相似性		期望值 ¹
		原始的	%	原始的	%	
cpRBP30 的 mRNA, 烟草	GI: 19707	210/293	71	220/293	74	1,00E-102
cp29A 的 mRNA, 烟草	GI: 19753	208/292	71	216/292	73	1,00E-101
cp31 的 mRNA, 烟草	GI: 19709	173/254	68	191/254	75	3,00E-181
At2g37220, 鼠耳芥属	GI: 16323481	152/248	61	181/248	72	2,00E-76
cp29 (At353460) 的 mRNA, 鼠耳芥属	GI: 681903	151/282	53	173/282	60	6,00E-68
PCO130298 的 mRNA, 玉米	GI: 21206992	134/203	66	159/203	78	1,00E-67
PCO127552 的 mRNA, 玉米	GI: 21208658	129/192	67	153/192	79	3,00E-65
24 kDa RBP 的 mRNA, 菠菜	GI: 1015369	133/193	68	148/193	75	5,00E-63
cp31AHv 的 mRNA, 大麦	GI: 3550466	106/191	55	135/191	70	1,00E-48
cp31 的 mRNA, 鼠耳芥属	GI: 681907	104/192	54	132/192	68	5,00E-48
RNP-T 的 mRNA, 鼠耳芥属	GI: 18416422	104/192	54	132/192	68	5,00E-48
Ps16 的 mRNA, 小麦	GI: 2443389	105/191	54	134/191	69	5,00E-48
rbp33 的 mRNA, 鳄梨	GI: 19032259	103/192	53	132/192	68	2,00E-47
核糖核蛋白的 mRNA, 豌豆	GI: 2330646	106/195	54	130/195	66	6,00E-47
CL2457_1 的 mRNA, 玉米	GI: 21216451	103/189	54	132/189	69	4,00E-46
cp28 的 mRNA, 烟草	GI: 19749	96/199	48	131/199	65	2,00E-45

1: 期望值代表随机选择一段特定序列的概率

E) SEBF 抗体

本发明的多肽和多核苷酸也可以用来生产能够识别并结合其的多克隆或者单克隆抗体。因此，能够特异结合 SEBF 蛋白和/或其功能性同系物，如其它植物物种中的 SEBF 同源蛋白的纯化的抗体（单克隆或多克隆）也是本发明的特征。

本发明的实施例部分描述了 SEBF 抗体的制备。该抗体还被用来测试烟草叶提取物，显现出了 28 和 29kDa 的两条浓条带（可能分别相应于 cp29A 和 cp29B）。初步测试还表明：所制备的 SEBF 抗体还识别鼠耳芥（*Arabidopsis thaliana*）中的同源蛋白。

通过使用上述的 SEBF 蛋白或多肽，许多方法都可以用来制备本发明的抗体。例如，可以将所述的 SEBF 多肽或其片段给予动物以诱导多克隆抗体的产生。或者，这里使用的抗体可以是通过使用杂交瘤技术（见例如 Hammerling 等., In *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981)制备的单克隆抗体。

SEBF 抗体可以用于在植物中阻止 SEBF 的作用。例如，可以制造表达 SEBF 抗体（单链抗体除外）的转基因植物。该抗体与 SEBF 的结合将会抑制其活性，从而导致处于 SEBF 控制下的基因去抑制。因此，优选的抗体是“中和的”抗体。“中和的”抗体指的是能够干扰 SEBF 多肽一切生物学活性的抗体，特别是能够干扰 SEBF 抑制基因活性能力的抗体。优选地，所述的中和抗体可以使 SEBF 多肽的能力降低 50, 55, 60 或者 65%，更优选为 70, 75, 80 或者 85%，最优选为 90, 95, 99%或更多。可以使用包括那些在此描述的在内的任何标准测试来评价可能中和的抗体。一旦产生，单克隆的和多克隆的抗体优选通过蛋白印迹、免疫沉淀分析或者任何其它合适的方法来测试特异的 SEBF 识别。

或者，可以将所述的抗体通过与质体转运肽翻译融合而将其特异地靶向质体，从而引起对 SEBF 的质体功能的特异抑制。可以通过将所述抗体的表达处于可诱导启动子的控制之下来控制其表达的时间，所述的可诱导启动子例如可以通过雌激素处理诱导的启动子。本发明因此还包括这样的抗体和使用其的方法。用来生产抗体的方法在本领域为人所熟知。

F) 遗传修饰的细胞和植物

本发明还涉及植物性宿主，特别是植物，其被遗传修饰以降低（或者增加）与在植物基因的调控/启动子区域存在（或不存在）序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、更优选为序列YTGTCNC (SEQ ID NO:24)相关的常规生物学活性。取决于将在下文中加以描述的具体用途，这样的植物是有利的：在该植物中，至少有一些细胞已经被遗传修饰而使序列BTGTCNC失活（突变、删除等等）。在其它情况下，优选将序列BTGTCNC或者YTGTCNC插入到所述植物的特定基因中。

本发明还涉及被遗传修饰以用来表达较高（或者较低）水平多肽的细胞和有机体，所述的多肽能够特异结合序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，更优选为序列YTGTCNC (SEQ ID NO:24)（即：细胞或者有机体内源水平的调节）。取决于将在下文中加以描述的具体用途，这样的细胞、特别是植物细胞是有利的：所述的细胞已经被遗传修饰而增加了至少一种能够特异结合序列BTGTCNC或者YTGTCNC的多肽的水平，例如SEBF蛋白或功能性SEBF同系物。在其它情况下，可以优选降低这些多肽的水平。

在H部分中，描述了如何制备和/或使用这些遗传修饰植物的具体实例。

G) 组合物

本发明还涉及用于下列用途的组合物：1) 在植物中调节与存在（或不存在）序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、更优选为序列YTGTCNC (SEQ ID NO:24)相关的常规生物学活性，和/或 2) 在植物中调节能够特异结合序列BTGTCNC (SEQ ID NO:23)，和更优选为序列YTGTCNC (SEQ ID NO:24)的多肽的表达水平（即：所述植物内源性水平的调节）。

这样的组合物应包含有效数量的、与稀释剂或载体相结合的、至少一种能够直接或间接实现一种或者全部上述所需效果的化合物。除草剂是能够通过结合和抑制特定植物蛋白的功能来影响植物生理和发育的小分子的实例。在施用本发明的组合物之后，对所述的化合物及其数量进

行选择，这样以致当与不存在该组合物的相应植物相比较时，在本发明中所用的植物中至少有一些细胞发生了所需的调节作用。依照本发明合适组合物的更具体的但非限制性实例将在下文的 H 部分给出。

被适当组合物处理过的植物可以表现出对病原体的诱导的抗性。取决于处理的时间，也可以将所述的组合物用于增加果实成熟和数量，或者用来诱导衰老。

所述的载体或者稀释剂可以是溶剂如水、油或者醇。所述的组合物还可以包含其它的活性制剂如肥料和生长调节剂。如果需要，也可以在存在或不存在杀真菌剂或杀虫剂的情况下，用乳化剂配制所述的诱导组合物。本发明实践中使用的化合物的精确数量将取决于所需的应答类型、所用的制剂和所处理的植物的类型。

H) 本发明用途的具体实例

以下的实例是对本发明应用的广泛范围进行的描述，不是意图限制了本发明的范围。

I-植物对病原体的增加的抗性或耐受性

由于 SEBF 是防御应答的转录阻遏物，而且已经在大量的防御基因中发现了其结合位点，已显示所述防御基因的表达引起或者参与植物中的防御应答，因此，抑制或者减少 SEBF 累积（和/或功能性 SEBF 同系物累积）和/或抑制或者减少常规的蛋白生物学活性能够增加植物对病原体的抗性或者能够更快地诱导植物的防御机制。

许多方法可以用来在所有植物物种中实现这种 SEBF 内源水平的降低和/或 SEBF 生物学活性（和/或功能性 SEBF 同系物的活性或水平）的降低，这些方法包括：通过在转基因植物中表达 SEBF 基因或其部分基因的反义拷贝；通过表达诱导 SEBF 共抑制机制的正义拷贝（sense copy）；通过在其中插入外源 DNA 分子来形成 SEBF 基因敲除；通过 SEBF 基因的化学诱变；通过表达切割 SEBF mRNA 的核酶；或者通过任何其它引起 SEBF 基因表达降低、SEBF mRNA 累积的方法，和其它合适的方法。

类似地，也可以遗传修饰 SEBF 结合位点，使序列 BTGTCNC（或者 YTGTCNC）失活（移除、突变、删除等）。

将序列 BTGTCNC (或者 YTGTCNC)加入到目的基因的启动子中,会降低该特定基因的表达水平。在一些情况下,例如在内源性 SEBF 活性非常弱的情况下,除了插入 SE 序列,可能还需要 SEBF 的过表达来使 SE 进行正确的基因调控。另一方面,移除序列 BTGTCNC (或者 YTGTCNC)将会得到更高的序列表达。这样的启动子改变在 SEBF (和/或功能性 SEBF 同系物)水平无法改变的植物中是非常有用的。例如,从防御基因中移除该序列并在转基因植物中引入该修饰基因,会引起该基因的组成型表达和引起对病原体更高的抗性。

SEBF (和/或功能性 SEBF 同系物)的过表达会导致植物对感染的抗性降低。这一性质对于控制转基因植物传播也可以是有用的。例如,可以进一步遗传修饰已经被设计成表达药用化合物的转基因植物以使其对病原体高度敏感。通过使用已知不会感染野生型植物的病原体来处理这些植物,将会很容易将它们从耕地中除去。

II. 修饰的植物对生长素和乙烯的应答

i) 生长素

生长素是扩散性生长促进植物激素。存在于大多数植物中的主要生长素是吲哚-3-乙酸 (IAA)。生长素在低浓度下有活性,合成类似物 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)和萘-1-乙酸(naphtalene-1-acetic acid) (NAA)被应用于农业以诱导生根和促进果实的固定和发育。在高浓度下,生长素抑制植物生长并且通常被用作除草剂。吲哚-3-乙酸主要由 L-色氨酸合成,但选择的途径涉及通过腓水解酶的作用来转换吲哚-3-乙腓。由于生长素活化控制乙烯生产的 ACC 合酶基因,所以高浓度的生长素通常伴随着乙烯生物合成速度的增加。

如下文中实施例 1 中所示,生长素应答元件与 SEBF 的重叠。这说明 SEBF (和/或功能性 SEBF 同系物)能够结合到生长素应答元件上。因此 SEBF 及其功能性同系物可以参与由生长素控制的基因抑制。因此,可以通过调节 SEBF (和/或功能性 SEBF 同系物的水平)的内源水平来增加或者降低由生长素控制的基因的诱导。可以通过在上文 I 部分中描述的一种策略来降低 SEBF 水平。与其它植物相比,具有较低水平 SEBF

或者具有较低 SEBF 活性的植物可能具有对内源性生长素增加的敏感性，并且表现出增加的生长、生根和果实数量，反之亦然。

具有较低 SEBF（和/或功能性 SEBF 同系物）内源性水平或者具有较低 SEBF 活性的植物也可能变得更加敏感于用生长素及其类似物对其进行的外源处理。因此，与其它植物相比，可以使用更少的基于生长素的除草剂来去除这些植物。这一性质对于控制转基因植物传播也是有用的。例如，可以进一步遗传修饰已经被设计成表达药用化合物的转基因植物，以使其对生长素除草剂高度敏感。通过喷雾低剂量的生长素除草剂，将会很容易从耕地中将这些植物去除。或者，具有较高内源性 SEBF 水平的植物如过表达 SEBF 基因的转基因植物，可能对生长素及其类似物的敏感性较低，从而给这些植物赋予了生长素除草剂抗性。

当然，也可以考虑插入、删除、突变 SEBF 结合位点序列以增加/降低 SEBF 的生物学活性并且相应地调节植物生长素应答。

ii) 乙烯

乙烯影响种子萌芽、生根和苗生长、花发育、衰老和花与叶的脱落、和果实成熟。乙烯是引起果实过成熟的原因而且这是在果实收获以后导致果实腐烂的重要原因。生长素诱导的 ACC 合酶，催化乙烯生物合成过程中的限速步骤。

如下文中实施例 1 中所示，SEBF 结合位点存在于马铃薯和许多植物物种的 ACC 合酶基因的启动子中（见表 5）。这强烈提示：SEBF 调控 ACC 合酶基因的生长素诱导。如下文实施例中所示，SEBF 与 Pti4 之间的相互作用同样支持该假说，Pti4 是乙烯应答元件结合蛋白家族中的一员。

因此具有较高内源性 SEBF（和/或功能性 SEBF 同系物）水平的植物，如过表达 SEBF 的转基因植物应该能够下调 ACC 合酶并能够降低乙烯生产。乙烯生产的下降又会延迟果实成熟并防止果实过成熟。

另一方面，具有较低内源性 SEBF 水平或者较低 SEBF 活性的植物，如表达 SEBF 基因或其部分的反义拷贝的植物，可能表现出果实早熟。

将序列 BTGTCNC（或者 YTGTCNC）加入目的基因的启动子中将会

降低该特定基因的表达水平。相反，去除序列 BTGTCNC (或者 YTGTCNC)将会得到较高的序列表达。这样的启动子改变在那些 SEBF 水平无法被改变的植物中是有用的。例如，从 ACC 合酶基因的启动子移除 BTGTCNC (或者 YTGTCNC)序列会增加乙烯产量。在经过修饰作用以后，被修饰的启动子和编码序列将被引入植物以生成转基因植物。

III. 叶绿体功能

降低 SEBF 在叶绿体中的浓度或者降低该细胞器中 SEBF 的生物学活性会导致该植物明显的表型改变。如下文实施例 1 中所示，已经显示 SEBF 同系物在质体中与 RNA 相互作用并稳定 RNA。因此，通过调节 SEBF 水平 (和/或功能性 SEBF 同系物水平) 来调节 SEBF 结合于其上的质体 mRNAs 的表达应该是可能的。这可能会使植物具有更好的光合速度或固碳速度，或者使植物能够更好地适应其环境。

IV. 蛋白模块和其它研究手段

如下文实施例中所示的那样，SEBF 可以被定位于两个不同的区室中：核和质体。这说明 SEBF 氨基酸序列包含含有定位信息的第一“标记”(SEQ ID NO:22 的氨基酸 1-59)，该标记可以指导 SEBF 到达质体，和指导 SEBF 到达核的第二“标记”。通过在所述的标记和要被靶向这些细胞区室中的蛋白之间制造翻译融合体，这些标记可以被用来指导其它蛋白到达质体或者核。

初步证据还提示：在植物受到创伤或者病原体激发的时候，SEBF 从其 DNA 结合元件上释放下来。可以利用这一特征来产生在不存在诱导事件的情况下严格调控的启动子系统。这可以通过将 SEBF 结合序列插入到已知的可诱导启动子中来实现。然后这样的遗传修饰的启动子就会需要两个诱发事件 (其中一个是新引入的 SEBF 结合序列) 来活化相关基因的表达。

V. 筛选调节SEBF结合分子

由于 SEBF 是一种结合分子，可以利用这一特征来筛查和/或鉴定这样的新化合物：该化合物抑制 SEBF 结合到其 DNA 元件（序列 BTGTCNC）上；抑制 SEBF 结合到质体或核 mRNA 上；抑制 SEBF 与另一蛋白的相互作用；和/或负面影响 SEBF 三维结构（例如：翻译后修饰）。

可以通过电泳迁移率变动试验、可以通过使用各种化学制剂处理植物的原位分析、或者可以通过任何其它本领域的已知技术来体外测定对 SEBF 结合活性的抑制。

如前所述，能够抑制 SEBF 结合活性的化合物具有许多用途，特别是用来增加植物对病原体的抗性或者诱导其防御应答机制；用来增加植物对内源生长素的敏感性并因此增加该植物的生长、生根和果实数量；用来增加植物对基于生长素的除草剂的敏感性；和用来诱导果实成熟。

类似地，如前所述，能够增加 SEBF 结合活性的化合物具有许多用途，特别是用来降低植物对生长素及其类似物的敏感性（从而给这些植物赋予生长素除草剂抗性）；用来延迟果实成熟并防止因乙烯产生而导致的果实过成熟。

实施例 1

以下的实施例描述了本发明应用的广阔范围，不是意图限制本发明的范围。在未脱离本发明的主旨和范围的条件下可以进行修改和改变。尽管可以在实践中使用任何类似或等同于此处所描述的那些的方法和材料来检验本发明，但在此处仅描述优选的方法和材料。

a) 引言

作为对病原体感染的响应，植物会被引发多种防御特异性事件，包括活性氧种类产生、G蛋白活化、细胞壁加固和诱导引起防御基因转录活化的信号传导级联(Dixon 等., 1994; Blumwald 等. 1998)。尽管正在发

现信号级联的主要成分，但是只鉴定出了极少的在转录水平整合这些信号的转录因子。

已经被很好表征的、由病原体侵入诱导的PR基因提供了用于研究防御基因转录调控的良好模型。基于序列相似性，PR基因被细划分为11类(Van Loon 等., 1994)。PR-10基因家族被细划分为两组而且PR-10基因家族编码小的、酸性的、15-18kD的细胞内蛋白(Osmark 等, 1997)。尽管已经证实PR-10蛋白具有RNA酶活性，但是它们与典型的RNA酶并不具有任何序列相似性(Moiseyev 等., 1994; Swoboda 等., 1996)。在马铃薯中，已经鉴定出该家族中的三个成员，其中PR-10a是被表征得最好的。

对表达进行的研究已经鉴定出了涉及PR-10a基因调控的顺式作用元件。位于核苷酸-135--105之间的诱导子应答元件(ERE)对于诱导子诱导的基因表达是必要且充分的(Matton 等, 1993; Després 等., 1995; Desveaux 等, 2000)。PBF-2是一种单链DNA结合因子，其似乎在从ERE的PR-10a活化中发挥作用(Després 等., 1995; Desveaux 等, 2000)。尽管ERE的存在对于PR-10a活化是充分的，但是去除位于-52--27之间的沉默元件(SE)，会引起进一步的活化作用，这一情况提示：该元件和ERE一起，参与了PR-10a的调控(Matton 等, 1993; Després 等., 1995)。

在本发明中，我们利用瞬时表达研究证实：只有包含序列GACTGTCAC的这9个核苷酸对于全部SE活性是必需的。我们还鉴定出了一种核因子(SEBF)，该因子显示出特异结合到序列BTGTCNC的序列。数据库检索显示：此序列存在于许多PR基因的启动子中。该序列还显示出与生长素应答元件的序列有高度序列相似性，提示该序列与SEBF在由植物激素生长素及其功能性类似物所诱导基因的调控中起作用。特别是，SEBF元件存在于ACC合酶基因的启动子中，该基因被生长素所诱导并且编码乙烯生物合成中的一种关键的酶——另一种植物激素。因此，SEBF可能通过生长素的作用参与乙烯合成的调控。

已经从马铃薯块茎中将SEBF纯化均匀，对该蛋白的N-末端测序分离出了编码SEBF的cDNA。推导得到的氨基酸序列显示出与叶绿体RNA结合蛋白具有高度的序列相似性。叶细胞的亚细胞划分证实：SEBF同时位于叶绿体和核中，提示其在这两个细胞区室中均发挥功能。重组体SEBF

在瞬时表达系统中的过表达，引起*PR-10a-uidA*报告基因融合体出现SE-依赖性转录抑制，证实了SEBF作为转录阻遏物的作用。通过使用酵母双杂交系统，我们鉴定出了与SEBF相互作用的蛋白。其中的一种蛋白是Pti4，它是在植物病原体诱导的防御应答过程中*PR*基因的转录调控子。已知Pti4与胍水解酶相互作用，胍水解酶是一种涉及生长素生物合成的酶。此外，Pti4是乙烯应答元件结合蛋白(EREBP)中的一员，已知EREBP涉及植物对乙烯的应答。

b) 材料与方法

所有标准的分子生物学操作均依照 Sambrook 等.(1989)进行。

植物材料

马铃薯块茎 (*Solanum tuberosum*, 肯纳贝克河品种) 来自魁北克农业部研究站 (the Quebec Ministry of Agriculture “Les Buissons” Research Station) (Pointe-aux-Outardes, Canada)。将块茎储存在 4°C 的黑暗条件下，使用前 24 小时将其至于室温下。如 Magnien 等.(1980)所述，从培育在培育箱中的 4—5 周龄的马铃薯植物中分离叶肉原生质体。在长日照光周期条件下，从培育在环境培养箱(Conviron, Winnipeg, Canada)中的植物中分离马铃薯叶。

GUS 报告基因构建体和分析

用 PCR 寡核苷酸 1 (GCCAAGCTTTAGATAAAAATGACACAAATGTCAAAAATGG; SEQ ID NO:27) 和寡核苷酸 2 (CCACCCGGGGATCCAGCTTTGAAC; SEQ ID NO:28)来将-135 位的 *Xba*I 位点替换成 *Hin*DIII 位点，通过 PCR 扩增质粒 p-135 (Matton 等., 1993)的 *PR-10a* 启动子片段来产生野生型 (WT) 构建体。在用 *Hin*DIII 和 *Bam*HI 消化以后，将片段插入 pBI201 中。突变体 m1 先前已经被描述过(pLP9, Desveaux 等., 2000)。突变体 m3, m4 和 m5 是通过使用突变的寡核苷酸(图 2A)和 PCR 寡核苷酸 2、用 PCR 产生的。用 *Xba*I 和 *Bam*HI 切割 PCR 片段并将其插入上述的野生型质粒。对于突变体 m2，使用寡核苷酸 1 和寡核苷酸 3

(CAGTCCATGGTTAAATCAAC; SEQ ID NO:29)合成 *HinDIII*/*NcoI* PCR 片段。而后，使用寡核苷酸 2 和寡核苷酸 4 (TAACCATGGACTGTCACTTG; SEQ ID NO:30)合成 *NcoI*/*BamHI* PCR 片段。将这些片段连接到用 *HinDIII* 和 *BamHI* 切割的 pBI201 中以产生突变体 m2(SEQ ID NO:2)。使用下面的引物从烟草中扩增 CHN50 启动子：5'-GCCGCAAGTTTTCTGCAGTGTTTTTGCTC-3' (SEQ ID NO:31) 和 5'-GGTTTGGATCCAGTAGTAAAGTGGCGA-3' (SEQ ID NO:32)。用 *PstI* 和 *BamHI* 消化扩增的 DNA，随后将其插入质粒 pBI201 的相同位点。使用图 12C 中所示的寡核苷酸和寡核苷酸 CHN50R 5'-ATGTCTACTCCTGCGCTCATT-3' (SEQ ID NO:33)，用 ExSite™ 基于 PCR 的定点诱变试剂盒 (Stratagene) 在启动子中产生突变。在 Whatman/Biomera Tgradient™ 热循环装置仪中进行扩增。对所有的构建体进行测序以确保没有被 PCR 插入的突变。先前已经描述了瞬时表达系统 (Matton 等., 1993)。使用由共电穿孔 1μg 质粒 pWB216 (Barnes, 1990) 产生的荧光素酶活性，对电穿孔效率校准所有的数值。

将编码全长 SEBF 的序列插入到包含双重 CaMV 35S 增强子的 pBI223D 中。将 5 μg 表达载体加入到测试中以用于反式阻抑研究。对照载体表达处于相同启动子控制下的、含有 FK506-结合蛋白 (FKBP; Pelletier 等., 1998) 的人融合蛋白。

提取物的制备

粗核提取物制备如下：将 250ml 冷 NEBH (10 mM PIPES-KOH, pH 6.0, 1 M 2-甲基-2,4 戊二醇, 0.15 mM 精胺, 0.5 mM 亚精胺, 10 mM MgCl₂, 14.3 mM β-巯基乙醇, 0.1 mM PMSF) 中的 200g 马铃薯块茎或者 75g 叶在混和器中以最大速度匀浆 1 分钟。在 4℃ 下倾析 5 分钟后，在真空下用 5 层 Miracloth™ 过滤匀浆。将过滤物在 Sorval GSA 转子中以 5,000 RPM 的速度离心 5 分钟以沉淀核。上清液作为胞质部分。在 NP-40 缓冲液 (10 mM MES-NaOH pH 6.0, 260 mM 蔗糖, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.15 mM 精胺, 0.5 mM 亚精胺, 14.3 mM β-巯基乙醇, 0.1% BSA 和 1% NP-40) 中将核清洗三遍以去除细胞器和细胞骨架污染。将最终的沉淀重新悬

于 5ml 的 200 mM NaCl SEBF 结合缓冲液(SBB: 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 14.3 mM β -巯基乙醇, 可变的 NaCl 浓度)中。通过超声处理将核破裂, 将裂解物在 15,000 RPM 下离心 45 分钟。将上清液或者立刻用于 SEBF 纯化或者在 -70°C 贮存在 10% 的甘油中。在此条件下, SEBF 结合活性可以几个月保持稳定。叶绿体依照 Gegenheimer (1990) 的方法来制备。

确定提取物中的酶活性

按照 Arnon (1949) 测定叶绿素含量。分别按照 Gross 和 ap Rees (1986)、Hucklesby 等. (1972)、和 Smith 与 ap Rees (1979) 测定碱性焦磷酸酶、亚硝酸还原酶和醇脱氢酶。

电泳迁移率变动试验 (EMSA)

将蛋白提取物(200 mM NaCl SBB 中)与 20,000 CPM 的 ^{32}P 末端标记的探针混和。结合反应体系(40 μl)含有 100 ng 的 poly(dI-dC)以消除非特异性结合。将该反应体系置于冰上 15 分钟。通过将混合物加载到 5.7% 的、在 Tris-甘氨酸缓冲液(25 mM Tris, 195 mM 甘氨酸)中制备的聚丙烯酰胺凝胶上, 在 4°C 下施加 200V 的电压 2.5 个小时来实现混合物的电泳分离。将凝胶置于柯达 X-omat AR 胶片上, 在 -70°C 曝光过夜。

从核提取物中纯化 SEBF

将粗核提取物加载到在 200 mM NaCl SBB 中平衡的 3 ml Q-琼脂糖TM FPLCTM (Amersham-Pharmacia Biotech)柱上。先用 10 体积的 200 mM NaCl SBB、随后用 15 体积的 300 mM NaCl SBB 清洗柱。SEBF 被洗脱在 4ml 的 400 mM NaCl SBB 中。随后对洗脱液进行两轮亲和纯化。亲和珠的制备按照 Desveaux 等. (2000), 通过将生物素化的 WT SE 寡核苷酸与链霉抗生物素包被的顺磁珠(Sigma)偶联来制备。在使用前用 400 mM NaCl SBB 将珠子清洗两遍。将 20 μl 的 EDTA 500 mM pH 8.0、10 μg 的 poly(dI-dC) 和 5 μl 的 NP-40 加入 1ml 的洗脱液中。将混合物加到亲和珠上并置于冰上 15 分钟, 期间不时地混和一下。在利用磁铁将珠子从溶

液中分离出来以后, 先将珠子在 1 ml 的 200 mM NaCl SBB 中清洗, 随后将珠子在 1 ml 的 1 M NaCl SBB 洗液中清洗。通过随后两次 0.1ml 的 2 M NaCl SBB 清洗, SEBF 从珠子上被洗脱下来, 并在 37°C 温育 5 分钟。用 Ultrafree 4™ 离心滤器 10 K BioMax™ (Millipore, Bedford, USA) 将含有 SEBF 的洗脱液脱盐。将 1kg 块茎的等价物集中并用丙酮沉淀。将沉淀重悬于 Laemmli 溶解缓冲液(Laemmli 1970)中, 并加载到 12%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。将蛋白转移到 PVDF 膜 (BIO-RAD) 上并用考马斯亮蓝染色。切出条带并用 Eastern Quebec Proteomics Core Facility (Ste-Foy, Canada) 对其进行 N-末端分析。通过对 29kD 条带的 N-末端分析, 得到了序列 VTLSDFDQIEEVEAGDDDEEEGGLSDEAGASYEERN?NPDL; SEQ ID NO:34)。Southwestern 分析按照 Vinson 等.(1988) 进行操作。

SEBF 的克隆

使用相应于 SEBF 的 N-末端序列的简并寡核苷酸 (GTKACWYTITCIGATTTYGAYCA; SEQ ID NO:35) 和 cs-RBD 特定引物 (ARRTTWCCIA CRAARATYTT; SEQ ID NO:36; Mieszczak 等., 1992) (I 对应于肌苷) 来生成 141 bp 的 SEBF 的基因组 PCR 片段。特定引物 GTTTGAGTGATGAAGGTGC (SEQ ID NO:37) 衍生于该 141bp 片段的序列, 使用 Israel (1993) 提出的方法将其用来探察马铃薯 cDNA 库 (Matton 和 Brisson, 1989)。在使用基因特异引物和 M13 通用引物的 PCR 反应中使用 18,000 个噬菌体的 23 个库。两个库得到了大约 1,000 bp 的 PCR 片段。对这些库作进一步的稀释并重复操作, 直到能够分离出一个单一的噬菌斑。按照制造商的说明书, 通过使用 ExAssist™ 系统 (Stratagene) 来切出阳性克隆。用 Thermosequenase™ (Amerham-Pharmacia Biothech) 在循环测序反应中对该克隆的双链均进行测序, 所述反应随后在 LICOR™ 自动测序仪 (LI-COR, Lincoln, USA) 中进行。本发明的发明者已经于 2001 年 12 月 10 日在 GenBank™ 中公开了 SEBF 的核苷酸和氨基酸序列 (SEQ ID NOs:21 和 22), 登记号为 No. AF389431。

Southern 分析和基因组分析

Ausubel 等(2001)描述了用来提取基因组 DNA 和 DNA 印迹的步骤。下面的引物是根据烟草和鼠耳芥属 SEBF 同系物(Ye 等., 1991; Ohta 等., 1995)中内含子的预测位置设计的, 并将其用于基因组 DNA 的 PCR 分析:

T: GCCGTTCTGTCTTCACAATTCTTTTGCTTC (SEQ ID NO:38);
U: CAACATCTCCAGCACGCTCAAAAAGCTCAG (SEQ ID NO:39);
V: CCTCTGCTTCTTCCTGTAAGCTTGTCATAG (SEQ ID NO:40);
W: CAGTTGAAGCCGCCTGTCAACAATTTAATG (SEQ ID NO:41);
X: TTGACGGGAGGGCACTGAGGGTGAATTCTG (SEQ ID NO:42);
Y: GCTTTCAATTGCAT-CGTTGACCTCCTTAG (SEQ ID NO:43); 和
Z: GCTTCAGCAGGACTTACACGGATGGCCCTG (SEQ ID NO:44).

抗体生产和蛋白印迹

在质粒 pGEX-4T1™ (Amersham-Pharmacia Biotech)中将编码 SEBF 的 cDNA 与谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 基因融合。在 BL21 细胞中表达融合蛋白(GST-SEBF)。裂解细胞以后, 在谷胱甘肽柱上纯化该融合蛋白 (Smith 和 Johnson, 1988)。用凝血酶(Amersham-Pharmacia Biotech)切割 GST 标记并通过二次过谷胱甘肽柱将其从提出物中移除。依照 Harlow 和 Lane (1988)进行兔免疫。简单地说: 使用 50 μg 重组 SEBF 来免疫家兔, 30 天后二次注射 150 μg 来增强免疫反应。在二次注射后的第 14 天处死兔。对于蛋白印迹研究, 使用 1:5000 稀释的 SEBF 抗血清, 并根据制造商的说明书用 ECL™ 检测试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech)来揭示抗体-抗原的相互作用。

酵母双杂交筛选

使用 DupLEX-A™ 酵母双杂交系统 (OriGene, Rockville, MD, USA) 进行双杂交筛选。将编码成熟 SEBF 的序列和 LEX-A DNA 结合结构域插入饵载体 pEG202 的框架中。在靶载体 pJG4-5 中制得的番茄 cDNA 文库获自美国农业部的 B. Baker(Zhang 等., 1999)。依照制造商的说明书, 在株系 EGY48 中筛查 5 百万个克隆。重新转化每个阳性克隆以证实相

互作用的真实性。随后使用 T7 测序试剂盒(Amersham-Pharmacia Biotech)对这些阳性克隆的双链均进行测序。通过 NCBI™的 BLASTX™程序鉴定翻译的蛋白。

c) 结论

SEBF 的鉴定

以前的研究在马铃薯 *PR-10a* 基因的启动子中鉴定出了一种负调控序列 (SE) (Matton 等.,1993; Després 等., 1995)。因此, 我们力求鉴定出一种能够通过结合到该序列来调控 *PR-10a* 表达的核蛋白。由于 *PR-10a* 似乎在 ERE 被一种单链 DNA(ssDNA)结合蛋白正调控(Desveaux 等., 2000), 所以我们寻找能够结合单链或者双链形式 SE 的蛋白。将马铃薯块茎的粗核提取物与单链或双链放射性标记的 SE 共培养, 并通过电泳迁移率变动试验 (EMSA) 来对其进行分析。图 1 证实: 一种叫做 SEBF (代表 SE 结合因子) 的核因子结合 SE 编码链 (泳道 1)。SEBF 不能结合非编码链 (泳道 3) 或者双链 DNA (泳道 4-6)。这些结果表明: SEBF 是一种只能识别沉默元件一条链的 ssDNA 结合蛋白。

我们先前已经证明: 另一个 *PR-10a* 启动子的顺式元件同样与 ssDNA 结合蛋白相互作用。该元件位于-135--105 之间、与 ssDNA 结合因子 PBF-2 相互作用(Després 等., 1995; Desveaux 等., 2000), PBF-2 已经显示在原生质体中活化 *PR-10a-uidA* 报告基因构建体的转录(Desveaux 和 Brisson, in preparation)。因此。我们的资料提示: 单链 DNA 结合蛋白与 *PR-10a* 启动子的一个大的区域接触。据报道, 动物中的几种基因具有相似的情况(Rothman-Denes 等的综述 1998), 并且通过对 *c-myc* 原癌基因启动子的研究阐明了这种情况, 其中几种类别的单链顺式元件在体内出现并且被不同的特异 ssDNA 结合因子所结合(Michelotti 等., 1996)。

SEBF 对 SE 的结合与 *PR-10a* 的转录抑制相关

对 SE 进行突变分析以确定 SEBF 结合位点由哪些核苷酸组成、这些核苷酸在体内是否对于 *PR-10a* 表达的调控是重要的。合成 SE 编码

链的突变型(图 2A)并在 EMSA 研究中将其用作探针(图 2B)。将同样的突变也引入与编码 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUS)的 *uidA* 报告基因融合的 *PR-10a* 启动子中,并在瞬时表达系统测定所得到的转录活性(图 2D)。如图 2B 所示,与 WT(SEQ ID NO:45)相比,SEBF 与突变体 m3(SEQ ID NO:3)和 m4(SEQ ID NO:4)的结合明显下降。相反,将这些突变引入 *PR-10a* 的启动子中会引起瞬时研究中的报告基因活性增加(图 2D, m3 和 m4)。在结合中表现出轻度增加(图 2B, m2 (SEQ ID NO:2))或者降低(图 2B, m5 (SEQ ID NO:5))的突变没有显示出改变的转录活性(图 2D, m2 和 m5)。使用其中 80%的序列被改变的突变体 m1 (SEQ ID NO:1),彻底破坏 SEBF 的结合(图 2B, m1)。这种结合的缺失与在瞬时研究中观察到的最高的转录活性相关(图 2D, m1)。因此, *PR-10a* 启动子的转录活性与体外 SEBF 与 SE 的结合是反向相关的。这提示 SEBF 是担负 SE 介导的 *PR-10a* 抑制的反式作用因子。

序列 BTGTCNC 定义了 SEBF 的 DNA 结合位点

图 2 中的结果显示, SEBF 结合位点位于序列 GACTGTCAC (SEQ ID NO:26)中。为了进一步描绘该元件,将额外的突变引入此区域并通过 EMSA 监测其对 SEBF 结合的影响。如图 3 所示,影响序列 CTGTCAC (SEQ ID NO:25)的突变显著降低了 SEBF 的结合(图 3B 和 3C,突变体 m8 (SEQ ID NO:8), m9 (SEQ ID NO:8), m11 (SEQ ID NO:11), m13 (SEQ ID NO:13), m14 (SEQ ID NO:14), m15 (SEQ ID NO:15), m16 (SEQ ID NO:16), m17 (SEQ ID NO:17), m18 (SEQ ID NO:18)),而此区域之外的突变则不影响结合(图 3B 和 3C 突变体 m6 (SEQ ID NO:6), m7 (SEQ ID NO:7), m12 (SEQ ID NO:12), m20 (SEQ ID NO:20))。在所述序列中只突变 A 不影响结合(图 3B 和 3C;突变体 m12 (SEQ ID NO:12)和 m19 (SEQ ID NO:19))。实际上,任何核苷酸都可以取代 A 而不影响 SEBF 结合(未显示)。对 SEBF 结合位点的进一步研究表明,可以用 G 或者 T 取代第一个 C。在该特定位置唯一降低 SEBF 结合的核苷酸是 A(图 3, m13 (SEQ ID NO:13))。因此,共有 SEBF 结合位点是 BTGTCNC (SEQ ID NO:23)、优选为 YTGTCNC (SEQ ID NO:24),其中 N 是所有核苷酸, B

是 C, G 或者 T, Y 是 C 或者 T。

SEBF 结合位点存在于其它防御基因中

表 5 列出了 DNA 数据库的检索结果, 其揭示: SEBF 结合位点存在于许多已知被病原体诱导的基因的启动子中。这些包括: 来自番茄和水稻的葡聚糖酶(GenBank™ acc. Nos AF077340 和 X58877); 来自鼠耳芥属, 百慕大草(bermudagrass), 马铃薯, 水稻和烟草的几丁质酶(GenBank™ acc. Nos Y14590, AF105426, AF153195, AF013581, X16938); 来自大麦和烟草的 PR-1 (GenBank™ acc. Nos Z48728 和 X66942) 以及来自苹果, 桦, 欧芹和豌豆的 PR-10 (GenBank™ acc. Nos AF020542, AJ289771, U48862 和 U31669)。

以前鉴定的 CHN50 基因的阻遏物元件含有 SEBF 结合位点。在 EMSA 中对该元件进行测试以确定其是否可以被 SEBF 识别。图 9 和 12A 证实了 SEBF 可以结合 CHN50 基因的阻遏物元件, 这表明 SEBF 在此其它防御基因的调控中发挥作用。另外, 图 12B 证实: 对 SEBF 的结合重要的残基对 CHN50 基因的抑制起非常大的作用。另外, 破坏 SEBF 结合的突变(M2, 图 12A)引起 CHN50 基因的去抑制(M2, 图 12B)。表 5 还显示: 在许多创伤或者应激反应可诱导的基因中发现了 SEBF 结合位点。将所有这些结果综合在一起, 提示 SEBF 及其元件在植物防御应答中、特别是在植物防御基因的调控中起作用。

SEBF 结合位点与 AuxRE 相似

如表 5 所示, 将 SEBF 结合位点(BTGTCNC)与其它调控序列进行比较, 结果发现其与存在于组合物 AuxRE 中的生长素应答元件(TGTCTC; SEQ ID NO:55)具有很强的相似性。对公开的 AuxRE 的 5'到 TGTCTC 的核苷酸进行分析, 结果揭示了其富集嘌呤 (C 或者 T); 这提示 SEBF 可能结合大多数的 AuxRE。另外, 已经显示 AuxRE 在不存在生长素的情况下抑制组成型增强子元件的作用(Ulmasov 等., 1995), 而且不管有没有生长素存在, 它们都似乎被一种尚未鉴定出来的、能够与 ARF 因子相互作用的因子所占据(Ulmasov 等., 1999)。SEBF 最有可能对应于这一因

子的原因是：1) 其存在于叶和块茎的核中；2) 其作为转录阻遏物发挥作用（见下）；和 3) 其应该结合大多数 Aux-RE，作为例证：SEBF 结合到一种被最好表征的 AuxRE 上，该 AuxRE 是大豆 *GH3* 基因的 D4 元件（图 11；Ulmasov 等., 1995）。

同样已知生长素负调控几种防御基因(Grosset 等., 1989; Jouanneau 等., 1991)。近来，分离出了一种鼠耳芥属多效性突变体，其同时显示出增加的病原体的易感性和生长素不敏感性，这表明了在引起这些表型的通路之间复杂的相互作用(Mayda 等., 2000)。这些结果，以及 SEBF 结合位点与 AuxRE 之间的很强的相似性，增加了 SEBF 可能还参与基因表达的激素调控的可能性。

SEBF 的纯化

使用由纯化蛋白的氨基酸序列推导得出的信息，克隆出了 SEBF 的 cDNA。利用阴离子交换层析和亲和纯化的结合，从块茎核中纯化出了 SEBF。下面的表 4 显示：得到了纯化了 20,700 倍的 SEBF。

表 4: 从马铃薯块茎中纯化 SEBF

馏分	全部蛋白 (mg)	全部活性 ^a (pg DNA)	特异活性 (pg DNA/ mg)	纯化 (倍数)	产率 (%)
粗核	112	3.3×10^6	2.9×10^4	1	100
Q-Seph ^b	1.15	3.0×10^6	2.6×10^6	90	91
Aff.1 ^c	4.0×10^{-3d}	2.3×10^6	5.8×10^8	20,000	70
Aff.2 ^e	3.5×10^{-3d}	2.1×10^6	6.0×10^8	20,700	64

^a 全部活性，通过测定在 EMSA 中 SEBF 结合的标记探针和通过计算结合在每个馏分中的 DNA pg 数来确定

^b Q-Seph., Q-琼脂糖 Fast-Flow™ 阴离子交换层析

^c Aff.1, 第一轮 DNA 亲和层析

^d 从着色的胶来估计

^e Aff.2, 第二轮 DNA 亲和层析

用 SDS-PAGE 和考马斯染色对色谱馏分进行分析, 结果揭示了在多数纯化馏分中的两种不同的条带 29kD 和 28kD (图 4, 泳道 4)。为了确定这两种条带究竟哪一种具有 DNA 结合活性, 将来自第二亲和纯化(Aff.2) 的蛋白转移到硝化纤维素膜上并用野生型 SE 寡核苷酸探查。结果显示两种纯化的蛋白可以独立地与所述沉默元件相互作用 (图 4, 泳道 5)。对两种蛋白均进行 N-末端序列分析。

SEBF 的克隆

由 29kD 蛋白的 N-末端序列分析得到一段 40 个氨基酸的序列。对 28kD 蛋白的氨基末端测序显示每个循环有不只一个氨基酸。但是, 可以观察到 28kD 蛋白与 29kD 蛋白有明显的序列相似性, 这表明 28kD 条带含有降解形式的 29kD 蛋白。使用获自 29kD 蛋白的氨基酸序列, 精心设计 PCR 策略来克隆 cDNA (见材料与方法)。图 10 显示了 SEBF cDNA 的序列(SEQ ID NO:21), 而其衍生于 cDNA 克隆的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)显示在图 10 和图 5 中。具有转运肽特性的 59 个氨基酸序列位于通过 N-末端测序而确定的 40 个残基 (见图 5 中的黑体部分) 之前。出现在成熟蛋白 N-末端区域的一个酸性区域位于两个共有序列型 RNA 结合结构域(cs-RBD, 图 5 中的下划线部分)之前。这些结构域, 也已知为 RNA 识别基序(RRM), RNP 共有序列(RNP-CS)或者 RNA 基序(Burd 和 Dreyfuss, 1994), 它们被一个甘氨酸富集区分开。前已提及, 数据库检索显示了其与一个核编码的叶绿体 RNA 结合蛋白家族具有高度序列相似性 (见上文的表 1—表 3)。

在 SEBF 中 RNA 结合结构域的存在以及与此结构域相关联的多种功能, 提示 SEBF 也可能在 RNA 加工中起作用。已经显示, SEBF 的烟草叶绿体同系物结合 mRNA 和含有内含子的 pre-tRNAs (Nakamura 等., 1999)。同样已经显示, 它们给叶绿体中的 mRNA 赋予了稳定性和核糖核酸酶保护(Nakamura 等., 2001)。另外, 象哺乳动物的核编辑一样, 叶绿体中的 RNA 编辑也涉及 hnRNPs 的存在(Lau 等., 1997; Hirose 和 Sugiura, 2001)。因此, SEBF 代表这样的单链 DNA 结合因子: 它们能够参与核基因转录调控并且能够通过 RNA 的结合在质体中控制基因表达。

为了确证 cDNA 编码的蛋白在功能上与 SEBF 相对应, 在大肠杆菌中将该蛋白表达为 GST 融合体、纯化并测试其与 SE 的结合。图 2C 显示: 重组体蛋白与 SE 寡核苷酸结合的结合特异性与天然 SEBF 相似(图 2B)。

SEBF 的细胞分布

从分离的核中纯化 SEBF(表 4)表明: SEBF 是一种核蛋白。然而, 在重组体 SEBF 中的推定转运序列的存在提示, 该蛋白也可能存在于质体中。这使我们对 SEBF 的亚细胞定位进行了研究。培养针对重组体 SEBF 的抗体, 亚细胞部分来自马铃薯叶。通过酶测定确证每个部分的完整性。图 6 显示: 如预计的那样, 醇脱氢酶活性局限于胞质部分。核没有叶绿体的标记—叶绿素, 而且在胞质部分只观察到很少的污染。在核制备物中没有发现可以检测得到的碱性焦磷酸酶或者亚硝酸还原酶活性。已知这两种酶完全位于质体中(Miflin, 1974; Gross 和 ap Rees, 1986)。对这些部分进行的蛋白印迹分析表明, 一种与 SEBF 免疫相关的蛋白出现在叶绿体和核中(图 6)。相应于成熟型 SEBF(图 6 重组体 SEBF)分子量的单一 29kD 条带同时出现在这两个细胞区室中。在任何部分中都没有检测到更高分子量的蛋白, 提示: 即使 SEBF 以前体形式合成, 它也会在核输入前被肽酶有效地加工。

SEBF 的双重定位

在叶绿体中存在与 SEBF 大小相似、免疫相关的蛋白, 这提示此蛋白被有效地靶向了这个细胞区室。这一观点得到了以下证据的支持: 存在 SEBF cDNA 中编码的推定的转运肽; 对其它物种的研究已经显示 SEBF 同系物存在于叶绿体中(Ye 等., 1991; Mieszczyk 等., 1992; Ohta 等., 1995)。

SEBF 是单拷贝基因

为了排除核和叶绿体 SEBF 可能是不同基因的产物的可能性, 使用限制性内切酶消化基因组 DNA, 并将其用于 DNA 印迹分析。如图 7A

所示,用 SEBF cDNA 片段探查基因组 DNA 产生了单个 *EcoRI* 条带和两个 *HinDIII* 条带。这是单拷贝基因所能产生的预期结果,因为在探针内没有发现 *EcoRI* 位点和单个 *HinDIII* 位点。存在两个 *XbaI* 片段是因为有一个 *XbaI* 位点存在于基因的第三个内含子(未显示)。用 PCR 对马铃薯基因组 DNA 进行分析导致在编码 SEBF 的基因中鉴定出了三个内含子(图 7B)。内含子 1、2 和 3 分别位于 SEQ ID:21 的核苷酸 454—455、核苷酸 556—557、和核苷酸 869—870 之间。在鼠耳芥属和烟草中,这三个内含子存在于 SEBF 同系物的相同位置(Ye 等., 1991; Ohta 等., 1995)。这些结果清楚地表明:在马铃薯基因组中只有一个拷贝的 SEBF 基因。由于在基因的 5'端没有内含子存在(图 7C),纯化蛋白中不存在转运肽不能归因于选择性剪接。通过对 5'RACE 产物进行测序可以证明这一点,测序结果全都显示其序列与 SEBF 序列相同(未显示)。在烟草和鼠耳芥属中该基因的基因组结构的保守性同样支持这些结论。

综合在一起,所得到的结果表明:核定位的 SEBF 是由单拷贝基因编码的,而且转运肽不会被不同的剪接所消除。这提示:核 SEBF 和叶绿体蛋白衍生于相同的前体。由于在核中只能检测到成熟类型的 SEBF,这还提示蛋白前体可能在叶绿体外被加工。在马铃薯中发现了类似的结果:淀粉磷酸化酶,其被作为前体合成,其在初期块茎中被靶向造粉体但是却以被加工的形式累积在年长块茎的胞质中(Brisson 等., 1989)。符合这些数据, Dahlin 和 Cline (1991)报道:蛋白输入质体是被发育所调控的,在成熟的过程中伴随着质体丧失了其输入前体的能力。通过转运肽的磷酸化作用可以控制蛋白的差别输入,已经显示:转运肽的磷酸化作用降低了叶绿体输入速度(Waagemann 和 Soll, 1996)。在将来,确定 SEBF 在发育过程中的亚细胞定位是否改变将是很有意义的。不过,SEBF 在叶绿体和核中的双重定位,使这种蛋白成为在防御应答过程中用于在这两个亚细胞区室中调控代谢作用的理想候选物质。以下的观点已经被很好地确立:感染除了能够活化核防御基因,还导致植物初级代谢中的主要变化,包括光合作用和 RuBisCO 合成的速率的降低(Tang 等., 1996; Somssich 和 Hahlbrock, 1998)。因此,在上述的两个区室中,SEBF 可能在协调由防御诱导的改变中发挥作用。

SEBF 能够抑制转录

SEBF 对 SE 突变型的结合以及在原生质体中作为负调控元件的它们的活性这两者之间的关联提示: SEBF 是介导 SE 依赖性抑制的因子。这一观点通过在马铃薯原生质体中共表达 SEBF 和各种报告基因构建体而得到证实。尽管通过使用野生型启动子构建体观察到了抑制作用,但是报告基因的活性太弱了而且结果在统计学上没有意义(图 8·WT)。这一结果是可以预料得到的,因为具有野生型 SE 的启动子活性早已被完全抑制了。为了避免这一问题,我们过表达 SEBF 和一种携带部分去抑制的突变体 m4(见图 2D)的构建体,重组体和纯化的 SEBF(图 2B 和 2C)对 WT 具有较低的亲和力。我们预计:过表达的 SEBF 将会补偿其对所述突变体的较低的结合亲和力。图 8 证实,确实,与过表达对照蛋白 FKBP 观察到的活性相比,当 SEBF 过表达的时候,启动子活性下降了 68%(图 8, m4)。当过表达 SEBF 和不能结合 SEBF 的突变体 m1(图 8, m1)的时候,观察不到抑制作用,这证实:所观察到的抑制作用需要被 SEBF 结合的顺式元件,而且这种抑制作用并不是因为激活剂受限或者翻译阻断而造成的。这些结果证实:SEBF 参与 SE 介导的 *PR-10a* 抑制,而且 SEBF 前体的表达导致核定位的活性。

hnRNP 属于被最好表征的、在真核生物的基因表达调控中起作用的 ssDNA 结合蛋白。例如,已经显示 hnRNP D 及其同系物激活(Tay 等., 1992; Tolnay 等., 2000; Lau 等., 2000)或者抑制从多种启动子的转录(Kamada 和 Miwa, 1992; Smidt 等., 1995; Chen 等., 1998)。另一种含有蛋白,人 hnRNP A1 的 cs-RBD 也已经显示抑制胸苷激酶基因的转录(Lau 等., 2000)。因此,含有 cs-RBDs 的植物蛋白 SEBF 能够充当转录阻遏物就不奇怪了。其它含有两个 cs-RBDs 的植物蛋白如鼠耳芥属 FMV-3b, 康乃馨 CEBP-1, 和烟草 ACBF 同样能够结合特异的调控顺式元件(Didier 和 Klee, 1992; Maxson 和 Woodson, 1996; Séguin 等., 1997)并因此代表潜在的转录调控子。

与 Pti4 相互作用的 SEBF

使用酵母双杂交系统来确定 SEBF 与哪些蛋白相互作用。在 5 种鉴定出来的相互作用因子中，两种与 SEBF 相对应，这表明该蛋白能够形成多聚体；一种对应于与 DEAD 盒样 RNA 解旋酶具有相似性的蛋白 (Itadani 等., 1994)；和两种相互作用因子对应于番茄转录因子 Pti4 (Zhou 等., 1997)。已知 Pti4 与在番茄中控制针对细菌病原体的防御应答的 *Pto* 抗性基因之间相互作用。这些结果提示：SEBF 可能涉及被 Pti4 和 *Pto* 所调控的防御基因的调控。

通过双杂交筛选，还鉴定出了其它的相互作用因子（列在表 6 中）。SEBF 可能对这些蛋白的调控和涉及这些相互作用因子的过程发挥作用。

表 5: SEBF 结合位点的出现

基因	有机体	GenBank™ acc. No.	序列
防御基因			
PR-10a	马铃薯	M29041	CTGTCAC
PR-10b	马铃薯	M29042	CTGTCAC
PR-10 (ypr10b)	桦	AJ289770	CTGTCTC
PR-10 (ypr10a)	桦	AJ289771	CTGTCAC
PR-10	苹果	AF020542	CTGTCAC
PR-10	欧芹	U48862	TTGTCTC
几丁质酶	烟草	X51599	ATGTCTC
几丁质酶	马铃薯	AF153195	TTGTCAC
几丁质酶	百慕大草	AF105426	TTGTCTC
几丁质酶	鼠耳芥属	Y14590	TTGTCTC
葡聚糖酶	水稻	X58877	CTGTCAC
葡聚糖酶	番茄	AF077340	CTGTCAC
PR-1	烟草	X66942	TTGTCAC
			CTGTCAC
PR-1	大麦	Z48728	TTGTCAC
渗透蛋白 (PR-5)	烟草	S68111	TTGTCAC
渗透蛋白 (PR-5)	烟草	D76437	GTGTCAC
过氧化物酶	小麦	X85230	CTGTCAC
交替氧化酶(Alternative oxidase)	伏都百合花 (Voodoo lily)	Z15117	CTGTCAC
抗真菌蛋白	天麻 (Gastrodia elata)	AF334813	CTGTCTC
乙烯产生			
ACC 合酶	番茄	AF043122	GTGTCAC
ACC 合酶	绿豆	AB018355	CTGTCAC
ACC 合酶	马铃薯 3	Z27235	TTGTCAC
	马铃薯 2	Z27234	ATGTCCC
			ATGTCTC
	马铃薯 1	Z27233	TTGTCCC
			(2x)

基因	有机体	GenBank™ acc. No.	序列
			TTGTCTC
			GTGTCAC
			ATGTCTC
ACC 氧化酶	香蕉	AF030411	TTGTCTC
纤维素酶乙烯诱导的	大豆	U34754	CTGTCTC
创伤和应激反应诱导的			
黑芥子酶相关的蛋白	<i>B. napus</i>	AJ223307	CTGTCAC
wun-1	甜马铃薯	X17554	CTGTCAC
osr40g2 (盐应激)	水稻	Y08987	CTGTCAC
代谢			
小核酮糖二磷酸羧化	玉米	U09743	CTGTCAC
酶 - 加氧酶 (rubisco small)			
小核酮糖二磷酸羧化	莱因哈德衣藻 (<i>C.</i>	X04472	CTGTCAC
酶-加氧酶	<i>reinhardtii</i>)		
淀粉分支酶	玉米	AF072724	CTGTCAC
ADP-葡萄糖焦磷酸化	大麦	AJ239130	CTGTCAC
酶			
ADP-葡萄糖焦磷酸化	马铃薯	X96771	CTGTCAC
酶			(2x)
硝酸盐转运蛋白	大麦	AF189727	CTGTCAC
硫酸盐转运蛋白	大麦	AF075270	CTGTCAC
叶绿素 a/b-结合蛋白	小麦	X05823	CTGTCAC
其它			
CDPK	水稻	Y13658	TTGTCTC
			CTGTCAC
LAP (花 sp.)	番茄	Y08305	CTGTCAC
MADS 盒蛋白	水稻	AF204063	CTGTCAC
GEG (水果 sp.)	非洲菊种间杂交	AJ006273	CTGTCAC
	(<i>Gerbera hybrida</i>)		

表 6: 通过双杂交筛选鉴定的蛋白

核苷酸 BLAST ^a	C.C. ^b	蛋白 BLAST ^a	C.C. ^b	相互作用强度
Pti4 mRNA, 番茄	3,00E-93	Pti4, 番茄	5,00E-26	强
Pti4 mRNA, 番茄	0	Pti4, 番茄	4,00E-39	强
Pti4 mRNA, 番茄	1,00E-101	Pti4, 番茄	6,00E-25	强
cp29A mRNA, 烟草	9,00E-72	cp29 A, 烟草	1,00E-33	中
cp33 mRNA, 烟草	5,00E-67	cp33, 烟草	2E-28	强
B2 mRNA, 胡萝卜	3,00E-13	B2, 胡萝卜	4,00E-09	中
B2 mRNA, 胡萝卜	2,00E-46	B2, 胡萝卜	1,00E-57	强
B2 mRNA, 胡萝卜	5,00E-37	B2, 胡萝卜	3,00E-28	强
B2 mRNA, 胡萝卜	1,00E-25	B2, 胡萝卜	9,00E-31	中
B2 mRNA, 胡萝卜	2,00E-37	B2, 胡萝卜	4,00E-29	中
B2 mRNA, 胡萝卜	2,00E-15	B2, 胡萝卜	8,00E-17	强
B2 mRNA, 胡萝卜	7,00E-49	B2, 胡萝卜	7,00E-52	中
B2 mRNA, 胡萝卜	4,00E-13	B2, 胡萝卜	3,00E-10	中
B2 mRNA, 胡萝卜	9,00E-11	B2, 胡萝卜	2,00E-06	强
B2 mRNA, 胡萝卜	1,00E-16	B2, 胡萝卜	2,00E-11	中
无	-	B2-样	0,44	弱
无	-	B2-样	3,00E-09	弱
无	-	B2-样	2,00E-28	弱
无	-	B2-样	4,00E-25	中
无	-	B2-样	2,00E-15	弱
无	-	B2-样	2,00E-05	中

DB10 mRNA, 烟草

DB10 mRNA, 烟草	0,73	无		强
DB10 mRNA, 烟草	0	RNA 解旋酶, 烟草	2,00E-90	强
RZ-1 mRNA, 烟草	1,00E-12	RZ-1 RNA 结合蛋白, 烟草	0,075	强

^a 在非冗余 (nr) GenBank™数据库上对核苷酸 BLAST™使用 BLASTN™程序并对蛋白 BLAST™使用 BlastX™所得的结果。

^b C.C :确定性系数(Certainty Coefficient), 其显示此特定序列被随机选择的概率。

^c 通过在含有 X-gal 的培养基上显色来定性评价相互作用的强度。

d) 参考文献:

- Arnon D.I. (1949). *Plant Physiol* 24: 1-15.
- Ausubel F.M. et al. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Wiley.
- Barnes, W.M. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9183-9187.
- Blumwald E. et al. (1998). *Trends Plant Sci.* 3: 342-346.
- Brisson N. et al. (1989).. *Plant Cell* 1: 559-566.
- Burd C.G., Dreyfuss G. (1994). *Science* 265: 615-621.
- Chen H. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 31352-31357.
- Dahlin C., Cline K. (1991). *Plant Cell* 3: 1131-1140.
- Després C., et al. (1995) *Plant Cell* 7: 589-598.
- Desveaux D., et al. (2000) *Plant Cell* 12: 1477-1490.
- Didier D.K., Klee H.J. (1992). *Plant Mol. Biol.* 18:977-979.
- Dixon R.A., et al. (1994). 32: 479-501.
- Gegenheimer P. (1990). *Methods Enzymol.* 182: 174-193.
- Gross P., ap Rees, T. (1986). *Planta* 167: 140-145.
- Grosset J., et al. (1990). *Plant Physiol.* 92: 520-527.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hirose, T., Sugiura, M. (2001). *EMBO J.* 20: 1144-1152.
- Hucklesby D.P., et al. (1972). *Planta* 104: 220-233.
- Israel, D.I. (1993). *Nucl. Ac. Res.* 21: 2627-2631.
- Itadani, H., et al. (1994). *Plant Mol Biol.* 24: 249-252.
- Jouanneau, J.-P., et al. (1991). *Plant Physiol.* 96: 459-466.
- Kamada, S. and Miwa, T. (1992). *Gene* 119: 229-236.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685.
- Lau, P.P., et al. (1997). *J. Biol. Chem.* 272: 1452-1455.
- Lau, J.S., et al. (2000). *J. Cell. Biochem.* 79: 395-406.
- Magnien, E., et al. (1980). *Plant Sci. Letters* 19: 231-241.
- Matton, D.P., Brisson, N. (1989). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 325-331.

- Matton, D.P., et al. (1993). *Plant Mol. Biol.* 22: 279-291.
- Maxson, J.M., Woodson, W.R. (1996). *Plant Mol. Biol.* 31: 751-759.
- Mayda, E., et al. (2000). *Plant Cell* 12: 2119-2128.
- Michelotti, G.A. et al. (1996). *Mol. Cell. Biol.* 16: 2656-2669.
- Mieszczak, M., et al. (1992). *Mol. Gen. Genet.* 234: 390-400.
- Mifflin, B.J. (1974). *Plant Physiol.* 54: 550-555.
- Moiseyev, G.P., et al. (1994). *Planta* 193: 470-472.
- Nakamura, T. et al. (1999). *FEBS lett.* 460: 437-441.
- Nakamura, T., et al. (2001). *J. Biol. Chem.* 276: 147-152.
- Ohta, M., et al. (1995). *Plant. Mol. Bio.* 27: 529-539.
- Osmark, P., et al. (1998). *Plant Mol. Biol.* 38: 1243-1246.
- Pelletier, J.N. et al. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12141-12146.
- Rothman-Denes, L.B., et al. (1998). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LXIII*: 63-73.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Séguin, A., et al. (1997). *Plant Mol. Biol.* 35: 281-291.
- Smidt, M.P., et al. (1995). *Nucl. Acids Res.* 23: 2389-2395.
- Smith, A.M., ap Rees T. (1979). *Planta* 146: 327-334.
- Smith, D.B., Johnson, K.S. (1988). *Gene* 67: 31-40.
- Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1998). *Trends Plant Sci.* 3: 86-90.
- Swoboda, I., et al. (1996). *Physiol. Plant.* 96: 433-438.
- Tang, X., Rolfe, S.A., Scholes, S.D. (1996). *Plant Cell Env.* 19: 967-975.
- Tay, N., et al. (1992). *J. Virol.* 66: 6841-6848.
- Tolnay, M., et al. (2000). *Biochem. J.* 348: 151-158.
- Ulmasov, T., et al. (1995). *Plant Cell* 7: 1611-1623.
- Ulmasov, T., et al. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5844-5849.
- Van Loon, L.C., et al. (1994). *Plant Mol. Bio. Rep.* 12: 245-264.
- Vinson, C.R., et al. (1988). *Genes Dev.* 2: 801-806.

Waegemann, K., Soll, J. (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 6545-6554.

Ye L., et al. (1991). *Nucl Acids Res.* 19: 6485-6490.

Zhang, Y., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6523-6528

Zhou, J., et al. (1997). *EMBO J.* 16: 3207-3218.

尽管已经描述了本发明的几个实施方案，但是应当理解，还能够对本发明作进一步的修饰，并且本申请意图涵盖本发明的任何变体、用途和改变，遵循本发明的通常原则，并包括来自本公开内容的这样的偏差，如在本领域中的知识或习惯性实践内，和如可适用于此前阐明的必要特征并在本发明的范围内和在后附的权利要求的范围内。

序 列 表

<110> 蒙特利尔大学

<120> 植物转录阻遏物, 结合其的蛋白质核因子, 及它们的应用

<130> 000711-0042

<150> PCT/CA02/00985

<151> 2002-06-27

<150> U. S. 60/303,780

<151> 2001-07-10

<160> 55

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 1

tctagatcga attccgctcg accgg 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 2

catggactgt cacttgtttt ttta 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 3

tctagaagat cacttgtttt ttta 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 4

tctagactgt cgagtgtttt tttta

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 5

tctagactgt cacaactttt tttta

25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 6

tcgcgactgt cactgtttt tttt

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 7

tctatcctgt cacttgtttt tttt

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 8

tctagaaggt cacttgtttt tttt

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 9

tctagactac cacttgtttt tttt

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 10

tctagactgt cttttgtttt tttt

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 11

tctagactgt caagtgtttt tttt

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 12
tctagactgt cactgttttt tttt 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 13
tctagaatgt cacttgtttt tttt 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 14
tctagacggg cacttgtttt tttt 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 15

tctagactat cacttgtttt tttt

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 16

tctagactga cacttgtttt tttt

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 17

tctagactgt gacttgtttt tttt

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 18

tctagactgt cgcttgtttt tttt

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 19

tctagactgt caattgtttt tttt

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 20

tctagactgt cacgtgtttt tttt

24

<210> 21

<211> 1219

<212> DNA

<213> 马铃薯

<220>

<221> CDS

<222> (68).. (937)

<223>

<400> 21

gtttttcttt ttctgtcttc acaattcttt tgcttcaata aaaaccttat cttcaacccc 60

ttctcca atg gct tct tct tct tct tcc ctc cat ttc ctt tca ctt aca 109
 Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu His Phe Leu Ser Leu Thr
 1 5 10

cca caa aca ctc cca aaa ccc act tcc caa aca act tca att tcc ttc 157
 Pro Gln Thr Leu Pro Lys Pro Thr Ser Gln Thr Thr Ser Ile Ser Phe
 15 20 25 30

ttt tca ctt cct cct tcc tct tta aac ctt tct tta tca tct tct tca 205
 Phe Ser Leu Pro Pro Ser Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Ser Ser Ser
 35 40 45

acc cca aga aac ttc gaa tct tct cgt ttt gtt cgt aaa gta acc ctt 253
 Thr Pro Arg Asn Phe Glu Ser Ser Arg Phe Val Arg Lys Val Thr Leu
 50 55 60

tct gat ttt gac caa att gag gaa gtt gag gct ggt gat gat gat gag 301
 Ser Asp Phe Asp Gln Ile Glu Glu Val Glu Ala Gly Asp Asp Asp Glu
 65 70 75

gag gag ggg ggt ttg agt gat gaa ggt gct tca tat gaa gaa cgt aat 349
 Glu Glu Gly Gly Leu Ser Asp Glu Gly Ala Ser Tyr Glu Glu Arg Asn
 80 85 90

gcc aat cct gac ctt aaa atc ttt gtt ggt aat ttg cct ttc agt gtt Ala Asn Pro Asp Leu Lys Ile Phe Val Gly Asn Leu Pro Phe Ser Val 95 100 105 110	397
gac agt gcg gct ctt gct gag ctt ttt gag cgt gct gga gat gtt gaa Asp Ser Ala Ala Leu Ala Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gly Asp Val Glu 115 120 125	445
atg gtt gag gtt atc tat gac aag ctt aca gga aga agc aga ggt ttt Met Val Glu Val Ile Tyr Asp Lys Leu Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe 130 135 140	493
ggc ttt gtg aca atg tcc tcc aaa gag gca gtt gaa gcc gcc tgt caa Gly Phe Val Thr Met Ser Ser Lys Glu Ala Val Glu Ala Ala Cys Gln 145 150 155	541
caa ttt aat ggc tat gaa att gac ggg agg gca ctg agg gtg aat tct Gln Phe Asn Gly Tyr Glu Ile Asp Gly Arg Ala Leu Arg Val Asn Ser 160 165 170	589
ggg cca gca cca ccc aaa agg gag aat tct ttc ggg gac aat tct tct Gly Pro Ala Pro Pro Lys Arg Glu Asn Ser Phe Gly Asp Asn Ser Ser 175 180 185 190	637
tac cag gga ggt agg ggt gga ggg agt atg gac agt tcc aac aga gtc Tyr Gln Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ser Met Asp Ser Ser Asn Arg Val 195 200 205	685
tac gta gga aac ctt gca tgg agt gtt gac caa cag caa ctt gag acc Tyr Val Gly Asn Leu Ala Trp Ser Val Asp Gln Gln Gln Leu Glu Thr 210 215 220	733
ttg ttc agt gag caa gga aag gtc gtg gat gcc aaa gta gtc tat gat Leu Phe Ser Glu Gln Gly Lys Val Val Asp Ala Lys Val Val Tyr Asp 225 230 235	781
aga gat agc ggt aga tca agg ggc ttt gga ttt gta aca tac agt tcc Arg Asp Ser Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ser Ser 240 245 250	829
gct aag gag gtc aac gat gca att gaa agc ttg gat ggt gtt gac cta Ala Lys Glu Val Asn Asp Ala Ile Glu Ser Leu Asp Gly Val Asp Leu 255 260 265 270	877
ggt ggc agg gcc atc cgt gta agt cct gct gaa gct cgt cca ccc aga Gly Gly Arg Ala Ile Arg Val Ser Pro Ala Glu Ala Arg Pro Pro Arg 275 280 285	925
cgt caa ttc tga agattgtagc caacatcttt ttgaccgaga aaaggcttga	977

Arg Gln Phe

gggtccagga ggtgacgata gttgcagaaa tgaatgagtt atgaactttg caacagctat 1037
 cttaaacttg cgcgacaaaa ctactctcta cttctggact aactagagct ctcaagtaaa 1097
 ttagttttcg taatgtatgt tctgaaattg cctcaggaag aaattctgat cttgtaatat 1157
 gattctatcc atcacttgit gacagacaag acaatgaaaa agtttgatac tcttcgaaaa 1217
 ag 1219

<210> 22

<211> 289

<212> PRT

<213> 马铃薯

<400> 22

Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Leu His Phe Leu Ser Leu Thr Pro Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Pro Lys Pro Thr Ser Gln Thr Thr Ser Ile Ser Phe Phe Ser
 20 25 30

Leu Pro Pro Ser Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Ser Ser Ser Thr Pro
 35 40 45

Arg Asn Phe Glu Ser Ser Arg Phe Val Arg Lys Val Thr Leu Ser Asp
 50 55 60

Phe Asp Gln Ile Glu Glu Val Glu Ala Gly Asp Asp Asp Glu Glu Glu
 65 70 75 80

Gly Gly Leu Ser Asp Glu Gly Ala Ser Tyr Glu Glu Arg Asn Ala Asn
 85 90 95

Pro Asp Leu Lys Ile Phe Val Gly Asn Leu Pro Phe Ser Val Asp Ser
 100 105 110

Ala Ala Leu Ala Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gly Asp Val Glu Met Val
 115 120 125

Glu Val Ile Tyr Asp Lys Leu Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe
 130 135 140

Val Thr Met Ser Ser Lys Glu Ala Val Glu Ala Ala Cys Gln Gln Phe
 145 150 155 160

Asn Gly Tyr Glu Ile Asp Gly Arg Ala Leu Arg Val Asn Ser Gly Pro
 165 170 175

Ala Pro Pro Lys Arg Glu Asn Ser Phe Gly Asp Asn Ser Ser Tyr Gln
 180 185 190

Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ser Met Asp Ser Ser Asn Arg Val Tyr Val
 195 200 205

Gly Asn Leu Ala Trp Ser Val Asp Gln Gln Gln Leu Glu Thr Leu Phe
 210 215 220

Ser Glu Gln Gly Lys Val Val Asp Ala Lys Val Val Tyr Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ser Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ser Ser Ala Lys
 245 250 255

Glu Val Asn Asp Ala Ile Glu Ser Leu Asp Gly Val Asp Leu Gly Gly
 260 265 270

Arg Ala Ile Arg Val Ser Pro Ala Glu Ala Arg Pro Pro Arg Arg Gln
 275 280 285

Phe

<210> 23

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<220>

<221> misc-feature

<222> (1)..(1)

<223> "B" 表示 "T", "C" 或 "G"

<220>

<221> misc-feature

<222> (6)..(6)

<223> "N" 表示 "A", "T", "C" 或 "G"

<400> 23
btgtcnc

<210> 24

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<220>

<221> misc-feature

<222> (1).. (1)

<223> "Y" 表示 "T" 或 "C"

<220>

<221> misc-feature

<222> (6).. (6)

<223> "N" 表示 "A", "G", "T" 或 "C"

<400> 24
ytgtcnc

7

<210> 25

<211> 7

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 25
ctgtcac

7

<210> 26

<211> 9

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 26
gactgtcac

9

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 27
gccaaagcttt agataaaatg acacaaatgt caaaaatgg

39

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 28
ccacccgggg atccagcttt gaac

24

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 29

cagtccatgg ttaaatacaac

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 30

taaccatgga ctgtcacttg

20

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 31

gccgcaagtt ttctgcagtg tttttgctc

29

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 32

ggtttgatc cagtagtaaa gtggcga

27

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 33

atgtctactc ctgcgctcat t

21

<210> 34

<211> 41

<212> PRT

<213> 马铃薯

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37).. (37)

<223> "Xaa" 是未知的

<400> 34

Val Thr Leu Ser Asp Phe Asp Gln Ile Glu Glu Val Glu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Asp Asp Glu Glu Glu Gly Gly Leu Ser Asp Glu Ala Gly Ala Ser Tyr
 20 25 30

Glu Glu Arg Asn Xaa Asn Pro Asp Leu
 35 40

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<220>

<221> misc-feature

<222> (9).. (9)

<223> "n" 相当于一个修饰的碱基: 肌苷

<220>

<221> misc-feature

<222> (12).. (12)

<223> "n" 相当于一个修饰的碱基: 肌苷

<400> 35

gtkacwytnt cngatttyga yca

23

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<220>

<221> misc-feature

<222> (9).. (9)

<223> "n" 相当于一个修饰的碱基: 肌苷

<400> 36

arrttwccna craaratytt

20

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 37

gtttgagtga tgaaggtgc

19

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 38

gccgttctgt cttcacaatt cttttgcttc

30

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 39

caacatctcc agcagctca aaaagctcag

30

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 40

cctctgcttc ttctgtaag cttgcatag

30

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 41

cagttgaagc cgcctgtcaa caatttaatg

30

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 42

ttgacgggag ggcactgagg gtgaattctg

30

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 43

gctttcaatt gcatcgttga cctccitag

29

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 44

gcttcagcag gacttacacg gatggccctg

30

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 45

tctagactgt cacttgtttt tttta

25

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 46

tctagactgt cacttgtttt tttt

24

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 47

tctagactgt cacttgtttt tttta

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 48

aacatctgct ttgtcacctt ccttg

25

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 49

attaagccat gtcctcatca tcttc

25

<210> 50

<211> 7

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 50

ctgtcac

7

<210> 51

<211> 7

<212> DNA

<213> 甘氨酸 max

<400> 51

ttgtctc

7

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 52

taagccatgt ctccatcatc t

21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 53

taagccctgt ctccatcatc t

21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<400> 54

taagccatat ctccatcatc t

21

<210> 55

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列被完整地合成

<220>

<221> misc-feature

<222> (5)..(5)

<223> n 表示 "A", "T", "C" 或 "G"

<400> 55

tgtcnc

6

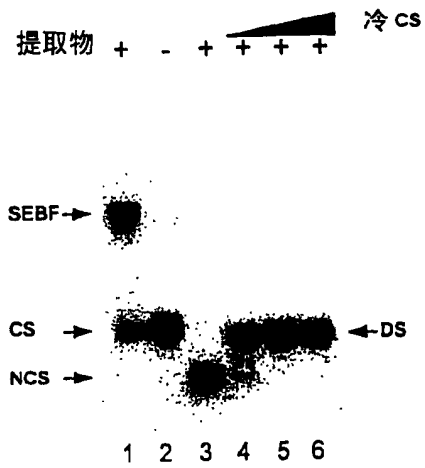


图 1

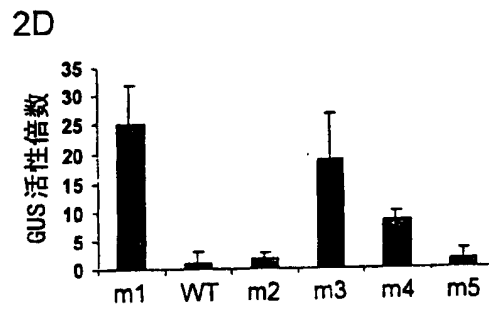
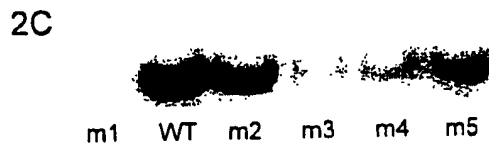
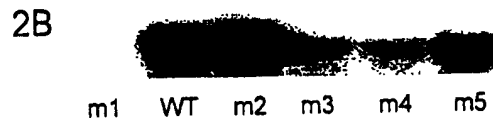
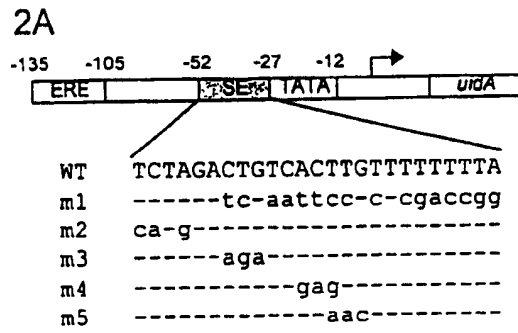


图 2

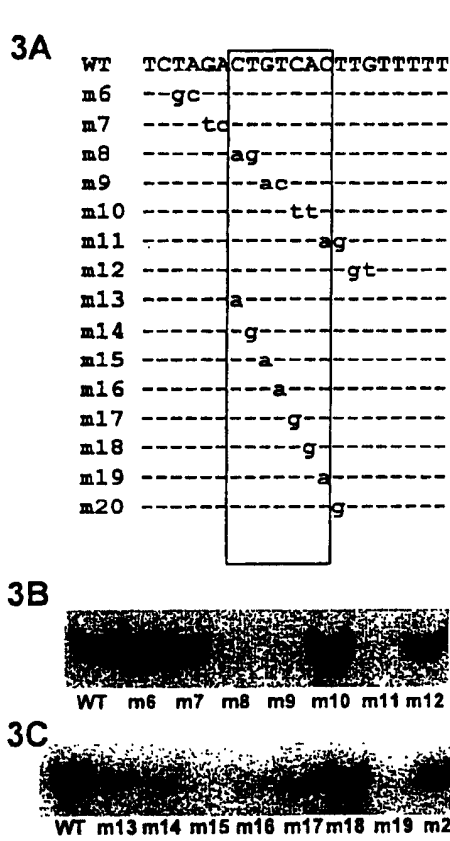


图 3

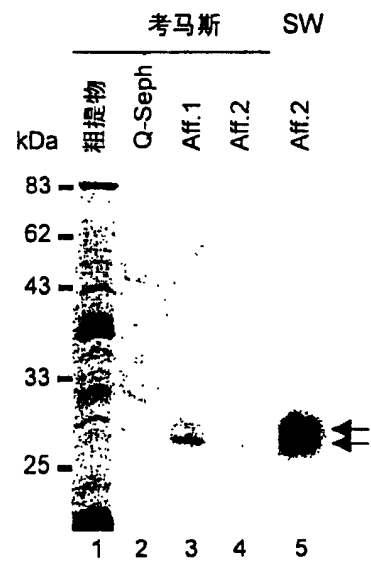


图 4

MASSSSSLHFLSLTPQTLPKPTSQTTSISFFSLPPSSLNL
 SLSSSSTPRNFESSRFVRKVTLSDFDQIEEVEAGDDDEE
 GGLSDEGASYEERNANPDLKIFVGNLPFSVDSAALAELE
RAGDVEMVEVIYDKLTGRSRGFGFVTMSSKEAVEAACQOF
NGYEIDGRALRVNSGPAPPKRENSFGDNSSYQGGGGSM
DSSNRVYVGNLAWSVDOOOLETLFSEOGKVVDKVVYDRD
SGRSRGFGFVTYSSAKEVNDAIESLDGVDLGGRAIRVSPA
 EARPPRRQF

图 5

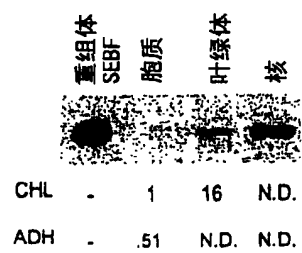


图 6

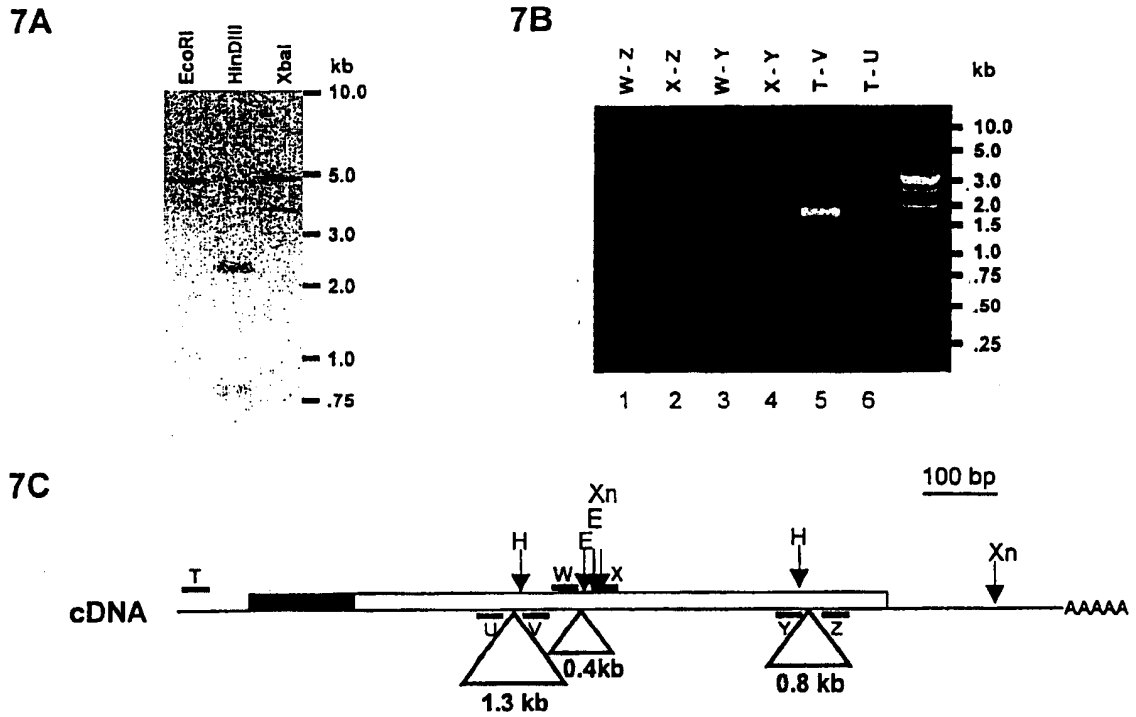


图 7

报告基 因质粒	效应物	对照的相对 GUS 活性 %	相对于 WT 的 GUS 活性倍数
WT	对照	100 %	1.00 ± 0.14
	SEBF	83 %	0.83 ± 0.16
m4	对照	100 %	4.53 ± 0.77
	SEBF	32 %	1.45 ± 0.83
m1	对照	100 %	27.54 ± 4.17
	SEBF	102 %	27.95 ± 9.46

图 8

9A

PR-10a TCTAGACTGTCACCTGTTTTTTTA
 ChtC2 aacaTCtgctTGTCACcctccTTg
 CHN50 atTaagccaTGTCCcatcaTcTTC

9B

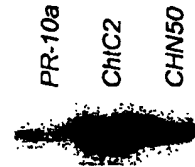


图 9

1 GTTTTCTTTTTCTGTCTTCACAATTCCTTTGCTTCAATAAAAACCTTATCTTCAACCCCTTCTCCAATGGCTTCTTCTT
 M A S S S
 81 CTTCTCCCTCCATTTCTTTTCACTTACACCACAACACTCCCAAACCCACTTCCCAAACAACCTCAATTTCTTCTTTT
 S S L H F L S L T P Q T L P K P T S Q T T S I S F F
 161 TCACTTCCCTCCTTCTCTTTAAACCTTTCTTTATCATCTTCTTCAACCCCAAGAACTTCGAATCTTCTCGTTTTGTTCG
 S L P P S S L N L S L S S S S T P R N F E S S R F V R
 241 TAAAGTAACCCTTTCTGATTTTGACCAAATTGAGGAAGTTGAGGCTGGTGATGATGATGAGGAGGAGGGGGTTGAGTG
 K V T L S D F D Q I E E V E A G D D D E E E G G L S D
 321 ATGAAGGTGCTTCATATGAAGAACGTAATGCCAATCTGACCTTAAATCTTTGTTGGTAATTTGCCTTTTCAGTGTGAC
 E G A S Y E E R N A N P D L K I F V G N L P F S V D
 401 AGTGCGGCTCTTGCTGAGCTTTTGTGACGCTGGAGATGTTGAAATGGTTGAGGTTATCTATGACAAGCTTACAGGAAG
 S A A L A E L F E R A G D V E M V E V I Y D K L T G R
 481 AAGCAGAGGTTTTGGCTTTGTGCAATGTCTCCAAAGAGGCAAGTTGAAGCCGCTGTCAACAATTTAATGGCTATGAAA
 S R G F G F V T M S S K E A V E A A C Q Q F N G Y E I
 561 TTGACGGGAGGGCACTGAGGGTGAATTTCTGGGCCAGCACCCCAAAGGGAGAATTTCTTGGGGACAATTTCTTCTTAC
 D G R A L R V N S G P A P P K R E N S F G D N S S Y
 641 CAGGGAGGTAGGGGTGGAGGGAGTATGGACAGTTCCAACAGAGTCTACGTAGGAAACCTTGCATGGAGTGTGACCAACA
 Q G G R G G G S M D S S N R V Y V G N L A W S V D Q Q
 721 GCAACTTGAGACCTTGTTCAGTGAGCAAGGAAAGGTCGTGGATGCCAAAGTAGTCTATGATAGAGATAGCGGTAGATCAA
 Q L E T L F S E Q G K V V D A K V V Y D R D S G R S R
 801 GGGCTTTGGATTTGTAACATACAGTCCGCTAAGGAGGTCAACGATGCAATTGAAAGCTTGGATGGTGTGACCTAGGT
 G F G F V T Y S S A K E V N D A I E S L D G V D L G
 881 GGCAGGGCCATCCGTGTAAGTCTGCTGAAGCTCGTCCACCAGAGCTCAATTTCTGAAGATTGTAGCCAACATCTTTTTG
 G R A I R V S P A E A R P P R R Q F
 961 ACCGAGAAAAGGCTTGAGGGTCCAGGAGGTGACGATAGTTGCAGAAATGAATGAGTTATGAACTTTGCAACAGCTATCTT
 1041 AAACCTTGCGCGGACAACTACTCTCTACTTCTGGACTAAGTAGACTCTCAAGTAAATAGTTTTTCGTAATGTATGTTCT
 1121 GAAATTGCCTCAGGAAGAAATTTCTGATCTTGTAAATATGATTCTATCCATCACTTGTGACAGACAAGACAATGAAAAAGT
 1201 TTGATACTCTTCGAAAAAG

图 10

11A
SEBF BTGTCNC
AuxRE TGTCNC

11B
SE (PR-10a) CTGTCAC
D4 (GH3) TTGTCTC

11C
SE D4


图 11



图 12A

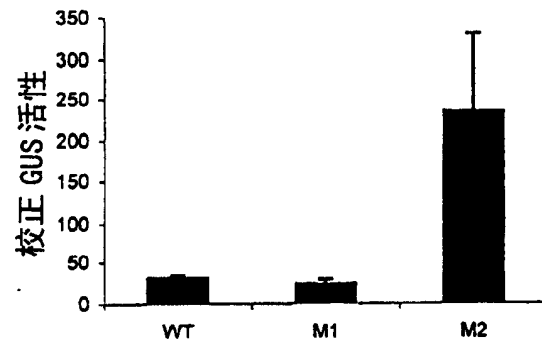


图 12B

WT	TAAGCCATGTCTCCATCATCT
M1	TAAGCC <u>c</u> TGTCTCCATCATCT
M2	TAAGCCAT <u>a</u> TCTCCATCATCT

图 12C