

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 1/00
C12N 15/11 C12N 15/29
C12N 15/70 C12N 15/81
C12N 15/82 A01H 5/00
C07K 14/415

[21] 申请号 96195379.9

[43]公开日 1998年8月12日

[11] 公开号 CN 1190433A

[22]申请日 96.7.11

[30]优先权

[32]95.7.11 [33]US[31]08 / 500,611

[32]95.7.11 [33]US[31]08 / 500,694

[86]国际申请 PCT / US96 / 11546 96.7.11

[87]国际公布 WO97 / 03183 英 97.1.30

[85]进入国家阶段日期 98.1.8

[71]申请人 拉脱格斯州立大学

地址 美国新泽西州

[72]发明人 N·E·蒂默

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 在植株内表现出抗病毒和 / 或抗真菌活性的 PAP 突变蛋白

[57]摘要

本发明公开的是具有与野生型 PAP 相比, 植物毒性被降低的 PAP 突变蛋白, 而且它们能够在植物内赋予对病毒和 / 或真菌的广谱抗性。一类 PAP 突变蛋白的特征在于在成熟 PAP 的 N 末端至少有一处氨基酸取代, 例如 75 位的甘氨酸残基或 97 位的谷氨酸残基; 另两类 PAP 突变蛋白的特征分别在于成熟 PAP 的 N 末端被截短, 和成熟 PAP 的 C 末端被截短或有氨基酸取代。另一类没有酶活性但是仍然保留了抗真菌特性。本发明同时还公开了编码 PAP 突变蛋白的 DNA 分子、突变型 PAP 的 DNA 构建物、转基因种子和包含以上 DNA 的植物。而且, 本发明公开了用于鉴定降低了植物毒性的 PAP 突变蛋白的方法, 以及分离和纯化的用以上方法鉴定的 PAP 突变蛋白。

权 利 要 求 书

- 1.一种 PAP 突变蛋白,它具有降低的植物毒性,而且在植物内表现出抗病毒或抗真菌活性。
- 5 2.根据权利要求1所述的 PAP 突变蛋白,它与野生型 PAP 的区别主要在于它在体内的区室化作用被改变。
- 3.根据权利要求2所述的 PAP 突变蛋白,它在 Gly75 处具有保守性氨基酸取代。
- 4.根据权利要求3所述的 PAP 突变蛋白,它包括 PAP(1-262, Gly75Val)。
- 10 5.根据权利要求2所述的 PAP 突变蛋白,它在 Glu97 处具有非保守性氨基酸取代。
- 6.根据权利要求5所述的 PAP 突变蛋白,它是 PAP(1-262, Glu97Lys)。
- 7.根据权利要求1所述的 PAP 突变蛋白,它与野生型 PAP 的区别主要在于它在 C 末端被截短了至少约 26 至 76 个成熟 PAP 的氨基酸。
- 15 8.根据权利要求7所述的 PAP 突变蛋白,它选自以下一组 PAP 突变蛋白:
PAP(1-236), PAP(1-235), PAP(1-234), PAP(1-233), PAP(1-232), PAP(1-231), PAP(1-230), PAP(1-229), PAP(1-228), PAP(1-227), PAP(1-226), PAP(1-225), PAP(1-224), PAP(1-223), PAP(1-222), PAP(1-221), PAP(1-220), PAP(1-219), PAP(1-218), PAP(1-217), PAP(1-216), PAP(1-215),
20 PAP(1-214), PAP(1-213), PAP(1-212), PAP(1-211), PAP(1-210), PAP(1-209), PAP(1-208), PAP(1-207), PAP(1-206), PAP(1-205), PAP(1-204), PAP(1-203), PAP(1-202), PAP(1-201), PAP(1-200), PAP(1-199), PAP(1-198), PAP(1-197), PAP(1-196), PAP(1-195), PAP(1-194), PAP(1-193), PAP(1-192), PAP(1-191), PAP(1-190), PAP(1-189), PAP(1-188), PAP(1-25 187), PAP(1-186), PAP(1-185)和 PAP(1-184)。
- 9.根据权利要求8所述的 PAP 突变蛋白,它包括 PAP(1-206Glu)。
- 10.根据权利要求8所述的 PAP 突变蛋白,它包括 PAP(1-236Lys)。
- 11.根据权利要求8所述的 PAP 突变蛋白,它包括 PAP(1-184Glu)。
- 12.根据权利要求8所述的 PAP 突变蛋白,它包括 PAP(1-188Lys)。
- 30 13.根据权利要求1所述的 PAP 突变蛋白,它与野生型 PAP 的区别主要在于它在 N 末端截短了至少约 1 至 38 个氨基酸残基。
- 14.根据权利要求13所述的 PAP 突变蛋白,它选自以下一组 PAP 突变蛋白:
PAP(2-262), PAP(3-262), PAP(4-262), PAP(5-262), PAP(6-262), PAP(7-262), PAP(8-262), PAP(9-262), PAP(10-262), PAP(11-262), PAP(12-262),
35 PAP(13-262), PAP(14-262), PAP(15-262), PAP(16-262), PAP(17-262),



PAP(18-262), PAP(19-262), PAP(20-262), PAP(21-262), PAP(22-262),
PAP(23-262), PAP(24-262), PAP(25-262), PAP(26-262), PAP(27-262),
PAP(28-262), PAP(29-262), PAP(30-262), PAP(31-262), PAP(32-262),
PAP(33-262), PAP(34-262), PAP(35-262), PAP(36-262), PAP(37-262),

5 PAP(38-262)和 PAP(39-262).

15.根据权利要求 1 所述的 PAP 突变蛋白,它在植物内表现出抗真菌活性。

16.根据权利要求 15 所述的 PAP 突变蛋白,它没有酶活性。

17.根据权利要求 16 所述的 PAP 突变蛋白,其中包括 PAP(1-262, Glu176Val)。

10 18.根据权利要求 1 所述的 PAP 突变蛋白,它包含野生型 PAP 的 N 末端信号
序列。

19.根据权利要求 1 所述的 PAP 突变蛋白,它包含野生型 PAP 的 C 末端延伸序
列。

20.一种 DNA 分子,它编码权利要求 1 至 19 中任一项所述的 PAP 突变蛋白。

15 21.一种重组 DNA 分子,它包含与能够在细胞内起作用的启动子可操作地连接
的权利要求 20 所述的 DNA 分子。

22.根据权利要求 21 所述的重组 DNA 分子,所述的启动子能够在酵母细胞内
起作用。

23.根据权利要求 21 所述的重组 DNA 分子,所述的启动子能够在植物细胞内
起作用。

20 24.根据权利要求 21 所述的重组 DNA 分子,所述的启动子是诱导型或组成型
调控的。

25.一种载体,它能够用权利要求 24 所述的重组 DNA 分子进行稳定转化。

26.一种原生质体,它能够被权利要求 24 所述的重组 DNA 分子稳定转化。

25 27.一种宿主,它能够被权利要求 24 所述的重组 DNA 分子稳定转化,而且能
够表达所述的重组 DNA 分子。

28.根据权利要求 27 所述的宿主,它是大肠杆菌细胞。

29.根据权利要求 27 所述的宿主,它是酵母细胞。

30.根据权利要求 29 所述的宿主,所述的酵母细胞是酿酒酵母细胞。

30 31.根据权利要求 27 所述的宿主,所述的重组 DNA 分子与在所述宿主内功能
性的诱导型启动子可操作地连接。

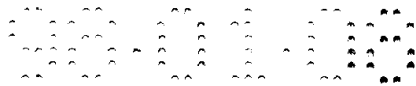
32.根据权利要求 27 所述的宿主,所述的宿主是植物细胞。

33.一种种子,它包含权利要求 27 所述的重组 DNA 分子,所述的种子能够生
长成其细胞能够表达所述 DNA 分子的植物。

34.一种转基因植物,它是由权利要求 33 所述的种子生成的。

35 35.一种转基因植物,它是由权利要求 26 所述的原生质体生成的。

36.一种转基因植物,它包含权利要求 20 所述的 DNA 分子,而且能够表达所



述的 DNA 分子。

37.根据权利要求 36 所述的转基因植物，它是单子叶植物。

38 根据权利要求 37 所述的转基因植物，它是谷类作物。

39.根据权利要求 36 所述的转基因植物，它是双子叶植物。

5 40.一种鉴定具有降低的植物毒性的 PAP 突变蛋白的方法，它包括：

(a)提供稳定转化的真核细胞，所述的真核细胞用与在真核细胞内功能性的诱导型启动子可操作地连接的、经诱变的编码 PAP 的 DNA 分子稳定转化，或者先用非诱变的编码 PAP 的 DNA 分子稳定转化后再诱变转化后的细胞；

(b)在合适的培养基中培养所述的转化细胞；

10 (c)在培养基中加入诱导物引起 DNA 分子的表达；

(d)确定所述的被培养的细胞是否在所述的编码 PAP 的 DNA 分子被表达后存活，由此确定由诱变 DNA 分子编码的 PAP 的生物活性。

41.根据权利要求 40 所述的方法，所述的提供步骤包括用随机诱变的编码 PAP 的 DNA 分子转化大量真核细胞，所述的确定步骤包括确定那些转化的细胞在所述 DNA 分子的诱导表达后存活，由此确定 DNA 分子编码的 PAP 各自的生物活
15 性。

42.根据权利要求 40 所述的方法，它还包括通过分析由 DNA 分子编码的 PAP 来确定它是否保留了 PAP 的抗真菌或抗病毒活性。

43.根据权利要求 42 所述的方法，所述的分析步骤还包括在一定量的由 DNA
20 分子编码的 PAP 存在下，在真核翻译系统中翻译病毒核酸。

44.根据权利要求 43 所述的方法，所述的翻译系统包括网织红细胞裂解物系统。

45.根据权利要求 44 所述的方法，所述的翻译系统包括兔网织红细胞裂解物系统。

25 46.根据权利要求 40 所述的方法，所述的真核细胞是酵母细胞。

47.根据权利要求 46 所述的方法，所述的酵母是酿酒酵母。

48.一种经分离和纯化的 PAP 突变蛋白，它是用权利要求 40 所述的方法鉴定的。



说 明 书

在植株内表现出抗病毒和/或
抗真菌活性的 PAP 突变蛋白

5

技术领域

本发明涉及农业生物技术，具体涉及赋予植株对真菌和/或病毒的抗性的方法和遗传材料。

10 技术背景

保护植株免受病原体的侵害一直是农业上最重要的研究课题。许多商业上有价值的农作物易受植物病毒和真菌的感染，这些病毒和真菌能够在特定的季节对作物造成严重的侵害，由此极大地降低了其经济价值。对农民造成的经济价值的降低继而造成购买者商品消费的增高。已公开了一些研究，为了赋予植株抗病毒性，对植物病毒衣壳蛋白在植株内的表达进行了研究。例如参见 Abel 等，《科学》(Science)232:738-43(1986)；Guozzo 等，《生物技术》(Bio/Technology)6:549-57(1988)；Hemenway 等，《欧洲分子生物学协会杂志》(EMBO J.)7:1273-80(1988)；Stark 等，《生物技术》7:1257-62(1989)和 Lawson 等，《生物技术》8:127-34(1990)。但是，转基因植株只表现出对同源病毒和相关病毒的抗性，而没有对非相关病毒的抗性。Kawchuk 等在《分子和植物微生物相互作用》(Mol. Plant-Microbe Interactions)3(5):301-07(1990)中描述了野生型马铃薯卷叶病病毒(PLRV)外被蛋白基因在马铃薯植株内的表达。虽然被感染的植株表现出对 PLRV 抗性，但是用 PLRV 接种的全部转基因植株都被病毒感染，这样就十分不利地允许了病毒的继续传播，因而不可能获得高水平的抗性。参见美国专利 No.5,304,730。

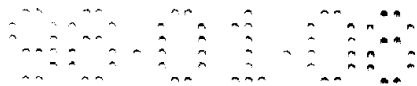
Lodge 等，《美国科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:7089-93(1993)报道了用编码野生型商陆抗病毒蛋白(PAP)的 cDNA 经根瘤土壤杆菌介导转化烟草，以及转基因烟草植株对非相关病毒的抗性。PAP，存在于美洲商陆细胞壁内的一种 I 型核糖体抑制蛋白(RIP)是一单条多肽链，催化性去除真核核糖体的 28S rRNA 内高度保守的茎-环结构中一特定的腺嘌呤残基，干扰延长因子 2 的结合，由此抑制细胞的蛋白质合成。参见例如 Irvin 等，Pharmac. Ther.55:279-302(1992)；Endo 等，《生物物理学研究通讯》(Biophys. Res. Comm.)150:1032-



36(1988)和 Hartley 等, FEBS Lett. 290:65-68(1991)。Lodge 的结果与过去的研究截然相反,即前文所述:表达病毒基因的转基因植株只对该病毒和与之密切相关的病毒具有抗性。参见 Beachy 等,《植物病理学年鉴》(Ann. Rev. Phytopathol.) 28:451-74(1990)和 Golemboski 等,《美国科学院院报》87:6311-15(1990)。但是, 5 Lodge 还报道,表达 PAP 的烟草植株(即表达蛋白超过 10ng/mg)倾向于矮化、带斑点的表型,而其它积聚了最高水平 PAP 的转基因烟草植株是无繁殖能力的。已经证明了 RIP 在诸如靶特异性等其它方面的性能是不可预测的。与上文 Lodge 所证明的 PAP(上文 Lodge 所述)不同,自蓖麻籽中分离得到的蓖麻毒蛋白对哺乳动物核糖体的作用比对植物核糖体强 1000 倍。参见 Harley 等,《美国科学院院报》 10 79:5935-5938(1982)。大麦胚乳 RIP 对植物核糖体的活性也很低。参见例如 Endo 等,《生物化学和生物物理学学报》(Biochem. Biophys. Acta)994:224-226(1988)和 Taylor 等,《植物杂志》(Plant J.)5:827-835(1984)。

真菌病原体是植株中病原体严重爆发的重要原因。植物已经发展出了自然防御系统,其中包括细胞壁的形态修饰和各种抗病原化合物的合成。参见, Boller 15 等,《植物生理学》(Plant Physiol)74:442-444(1984); Bowles,《生物化学年鉴》59:873-907(1990); Joosten 等,《植物生理学》89:945-951(1989); Legrand 等,《美国科学院院报》84:6750-6754(1987)和 Roby 等,《植物细胞》(Plant Cell)2:999-1007(1990)。几种病理相关性(PR)蛋白已被证明具有抗真菌性能,并可在被病原体感染后被诱导产生。这些是不同形式的水解酶,例如在体外通过破坏 20 真菌细胞壁来抑制真菌生长的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶。参见 Boller 等,同上; Grenier 等,《植物生理学》103:1277-1283(1993); Leah 等,《生物化学杂志》266:1464-1573(1991); Mauch 等,《植物生理学》87:325-333(1988)和 Sela-Buurlage Buurlage 等,《植物生理学》101:857-863(1993)。

人们已经进行了一些努力,试图用编码对真菌细胞壁具有显著裂解活性的病理 25 相关蛋白(例如几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶)的基因通过重组法来加强植株的抗病性。参见例如 Broglie 等,《科学》254:1194-1197(1991); Vierheilig 等,《分子和植物微生物相互作用》6:261-264(1993)和 Zhu 等,《生物技术》12:807-812(1994)。最近,发现了另外两类基因具有在植株内产生抗病性的潜力。Wu 等在《植物细胞》7:1357-1368(1995)中报道,表达黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的转基因 30 因马铃薯对胡萝卜欧文氏杆菌(*Erwinia carotovora*)和蔓延疫霉的抗性加强。对此的假设是,由葡萄糖氧化酶催化的葡萄糖的氧化产生了过氧化氢,当它在植株内积聚时导致活性氧类物质的积累,继而引发产生各种抗病原和抗真菌机制,例如



植物抗毒素(参见 Apostol 等,《植物生理学》 90:109-116(1989)和 Degousee,《植物生理学》 104:945-952(1994)), 病理相关蛋白(Klessig 等,《植物分子生物学》(Plant Mol. Biol.)26:1439-1458(1994)), 植物细胞壁的加强(Brisson 等,《植物细胞》 6:1703-1712(1994)), 水杨酸诱导的系统获得性抗性(Chen 等,《科学》 5 162:1883-1886(1993))和超敏防御反应(Levine 等,《细胞》(Cell)79:583-593(1994)).

除了对植株内抗病毒性的研究之外, 还结合抗真菌性对 RIP 进行了研究。例如, Logeman 等在《生物技术》 10:305-308(1992)中报道, 分离自大麦胚乳的一种 RIP 能够保护转基因烟草植株免受真菌的感染。大麦胚乳 RIP 和大麦 II 类几丁质酶的重组在体外和体内都具有对茄属丝核菌抗性的协同加强作用。参见 Lea 10 等, 同上; Mauch 等, 同上; Zhu 等, 同上和 Jach 等,《植物杂志》(The Plant Journal)8:97-109(1995)。但是, 没有证明 PAP 具有体外抗真菌活性。参见 Chen 等,《植物生理学》 40:612-620(1991), 其中报道了 PAP 在体外对真菌蔓延疫霉、*Colletotrichum coccodes*、腐皮镰孢、硫色镰孢、*Phoma foreata* 和茄属丝核菌没有作用。

15 所以, 一直以来需要有一种赋予植株广谱抗病毒和/或真菌的方法, 该方法不会导致细胞的死亡或不育、而且只需要很少量的转基因。

本发明综述

本发明涉及植物毒性被降低而且在植株内表现出 PAP 生物活性的 PAP 突变蛋白。 “PAP 生物活性”指 PAP 抗病毒活性和/或 PAP 抗真菌活性。一类较好的 20 PAP 突变蛋白其特征在于在成熟 PAP 的 N 末端至少有一个氨基酸取代, 例如 75 位的甘氨酸残基被取代或 97 位的谷氨酸残基被取代。另一类 PAP 突变蛋白的特征在于在成熟 PAP 的 N 末端被截短达 38 个氨基酸。另一类较好的 PAP 突变蛋白其特征在于具有在成熟 PAP 的 C 末端区域被截短之类的突变。更好的是 C 末端 25 截短至少约 26 至约 76 个成熟 PAP 氨基酸的 PAP 突变蛋白(不包括野生型 PAP C 末端 29 个氨基酸的延伸)。还有一类 PAP 突变蛋白是无酶活性的, 在体外或植株内不表现 PAP 抗病毒性, 但在植株内表现 PAP 抗真菌性。本发明的 PAP 突变蛋白还包括 22 个氨基酸的 N 末端信号序列和/或野生型 PAP 的 C 末端延伸。

30 本发明还提供了编码 PAP 突变蛋白的 DNA 分子, 这些分子可以同时还编码或不编码成熟 PAP 22 个氨基酸的 N 末端信号序列和/或野生型 PAP 29 个氨基酸的 C 末端延伸。这些 DNA 可以与在原核细胞(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如植物)内具有功能的启动子可操作地连接, 然后稳定地转化到在所述细胞内具有功能的载



体中。本发明还提供了用编码突变型 PAP 的 DNA 稳定转化的宿主例如原核或真核细胞(例如酵母或植物), 以及用这些 DNA 转化的原生质体。本发明还提供了含有 DNA 的转基因植物和种子。以上 DNA 在转基因植物内的表达为植株提供了广谱的抗病毒和/或抗真菌性, 但并不象野生型 PAP 那样对植物具有植物毒性。本
5 发明范围内的植物包括单子叶植物例如谷物类和双子叶植物。

本发明还提供了鉴定植物毒性降低、而且在植株内表现出 PAP 生物活性的 PAP 突变蛋白的方法。该方法的步骤包括提供一种经转化的真核细胞, 例如包含与真核细胞内功能性诱导型操纵子可操作性连接的、编码 PAP 的 DNA 分子的酵母。在转化前诱变编码 PAP 的 DNA, 或对转化后细胞进行诱变(即在用 PAP 构
10 建物转化细胞后进行诱变)。将如此转化的细胞培养在合适的培养基中, 在规定的
15 的时间后, 在培养基中加入诱导物诱导 DNA 分子的表达。然后确定培养细胞的存活是否是由于突变型 PAP 的表达。对宿主基本上没有毒性的突变 PAP 型被认为是表现为植物毒性降低的 PAP 突变蛋白。由此鉴定出的 PAP 突变蛋白经体外(例如使用外源病毒或真菌)或体内(例如通过转基因植物内的表达)测定表现出广谱
15 抗病毒和/或抗真菌性的同时被认为是保留了 PAP 在植物内生物活性的 PAP 突变蛋白。本发明还提供了用上述方法鉴定的经分离和纯化的 PAP 突变蛋白。

本发明的最佳实施方式

本发明表达编码 PAP 突变蛋白的 DNA 的转基因植物与产生成熟、野生型
20 PAP(“PAP”)或变异 PAP 即 PAP-v 的转基因植物相比, 表现出被降低的植物毒
性, 但表现出抗病毒性和/或抗真菌性。“降低的植物毒性”指表达编码突变型
PAP 的 DNA 的转基因植物表现出正常和有繁殖能力的表型, 而不是产生成熟 PAP
的转基因植物所特有的矮化、带斑点的表型(例如 Lodge 在前文文献中所述)。“野
25 生型 PAP”指 PAP 氨基酸序列 1-262, 22 个氨基酸的 N 末端信号肽(“野生型
PAP 的 N 末端信号序列”)和 29 个氨基酸的 C 末端延伸(第 263 至 291 位氨基酸),
以上序列均显示在下表 I 中作为 SEQ ID NO:2。对应的核苷酸序列为 SEQ ID
NO:1。所以, “野生型、成熟 PAP”或“成熟 PAP”指表 I 所示的 PAP 氨基酸
序列 1-262。



表 I

5' CTATGAAGTCGGGTCAAAGCATATACAGGCTATGCATTGTTAGAAACATTGATGCCTCTGA
TCCCGATAAACAATAACAAATTAGACAATAAGATGACATACAAGTACCTAAACTGTGTATGGGG
GAGTGAACCTCAGCTGCTAAAAAACGTTGTAAGAAAAAAGAAAGTTGTGAG

5 TTA ACTACAGGGCGAAAGTATTGGA ACTAGCTAGTAGGAAGGGAAG ATG AAG TCG ATG
Met Lys Ser Met

10 CTT GTG GTG ACA ATA TCA ATA TGG CTC ATT CTT GCA CCA ACT TCA ACT
Leu Val Val Thr Ile Ser Ile Trp Leu Ile Leu Ala Pro Thr Ser Thr
(67) (100)

TGG GCT GTG AAT ACA ATC ATC TAC AAT GTT GGA AGT ACC ACC ATT AGC
Trp Ala Val Asn Thr Ile Ile Tyr Asn Val Gly Ser Thr Thr Ile Ser
(1) (10)

15 AAA TAC GCC ACT TTT CTG AAT GAT CTT CGT AAT GAA GCG AAA GAT CCA
Lys Tyr Ala Thr Phe Leu Asn Asp Leu Arg Asn Glu Ala Lys Asp Pro
(20) (30)

20 AGT TTA AAA TGC TAT GGA ATA CCA ATG CTG CCC AAT ACA AAT ACA AAT
Ser Leu Lys Cys Tyr Gly Ile Pro Met Leu Pro Asn Thr Asn Thr Asn
(40)

25 CCA AAG TAC GTG TTG GTT GAG CTC CAA GGT TCA AAT AAA AAA ACC ATC
Pro Lys Tyr Val Leu Val Glu Leu Gln Gly Ser Asn Lys Lys Thr Ile
(50) (60)

30 ACA CTA ATG CTG AGA CGA AAC AAT TTG TAT GTG ATG GGT TAT TCT GAT
Thr Leu Met Leu Arg Arg Asn Asn Leu Tyr Val Met Gly Tyr Ser Asp
(70)

CCC TTT GAA ACC AAT AAA TGT CGT TAC CAT ATC TTT AAT GAT ATC TCA
Pro Phe Glu Thr Asn Lys Cys Arg Tyr His Ile Phe Asn Asp Ile Ser
(80) (90)

35 GGT ACT GAA CGC CAA GAT GTA GAG ACT ACT CTT TGC CCA AAT GCC AAT
Gly Thr Glu Arg Gln Asp Val Glu Thr Thr Leu Cys Pro Asn Ala Asn
(100) (110)

TCT CGT GTT AGT AAA AAC ATA AAC TTT GAT AGT CGA TAT CCA ACA TTG
Ser Arg Val Ser Lys Asn Ile Asn Phe Asp Ser Arg Tyr Pro Thr Leu
(120)

40 GAA TCA AAA GCG GGA GTA AAA TCA AGA AGT CAG GTC CAA CTG GGA ATT
Glu Ser Lys Ala Gly Val Lys Ser Arg Ser Gln Val Gln Leu Gly Ile
(130) (140)

CAA ATA CTC GAC AGT AAT ATT GGA AAG ATT TCT GGA GTG ATG TCA TTC
Gln Ile Leu Asp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Ser Gly Val Met Ser Phe

45 ACT GAG AAA ACC GAA GCC GAA TTC CTA TTG GTA GCC ATA CAA ATG GTA
Thr Glu Lys Thr Glu Ala Glu Phe Leu Leu Val Ala Ile Gln Met Val
(160) (170)

TCA GAG GCA GCA AGA TTC AAG TAC ATA GAG AAT CAG GTG AAA ACT AAT
Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Gln Val Lys Thr Asn
(180) (190)

50 TTT AAC AGA GCA TTC AAC CCT AAT CCC AAA GTA CTT AAT TTG CAA GAG
Phe Asn Arg Ala Phe Asn Pro Asn Pro Lys Val Leu Asn Leu Gln Glu
(200)

ACA TGG GGT AAG ATT TCA ACA GCA ATT CAT GAT GCC AAG AAT GGA GTT
Thr Trp Gly Lys Ile Ser Thr Ala Ile His Asp Ala Lys Asn Gly Val
(210) (220)

55 TTA CCC AAA CCT CTC GAG CTA GTG GAT GCC AGT GGT GCC AAG TGG ATA
Leu Pro Lys Pro Leu Glu Leu Val Asp Ala Ser Gly Ala Lys Trp Ile
(230)

GTG TTG AGA GTG GAT GAA ATC AAG CCT GAT GTA GCA CTC TTA AAC TAC
Val Leu Arg Val Asp Glu Ile Lys Pro Asp Val Ala Leu Leu Asn Tyr



(240) (250)
 GTT GGT GGG AGC TGT CAG ACA ACT TAT AAC CAA AAT GCC ATG TTT CCT
 Val Gly Gly Ser Cys Gln Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Ala Met Phe Pro
 (260) (262) (270)
 5 CAA CTT ATA ATG TCT ACT TAT TAT AAT TAC ATG GTT AAT CTT GGT GAT
 Gln Leu Ile Met Ser Thr Tyr Tyr Asn Tyr Met Val Asn Leu Gly Asp
 (280)
 CTA TTT GAA GGA TTC TGATCATAAACA
 Leu Phe Glu Gly Phe
 10 (290)
 TAATAAGGAGTATATATATATTACTCCAACCTATATTATAAAGCTTAAATAAGAGGCCGTGTTA
 ATTAGTACTTGTTCCTTTTGCTTTATGGTGTGTTTATTATGCCTTGATGCTTGAATATT
 ATCTAGAGAACAAGATGTACTGTGTAATAGTCTTGTGTTGAAATAAACTTCCAATTATGATGC
 15 AAAAAAAAAAAAAAAAAA3'

表 I 还以与野生型 PAP 对齐的方式显示了 PAP-v 氨基酸和对应的核苷酸。PAP-v 的氨基酸序列与野生型 PAP 的差别主要在于 Leu20Arg(即成熟 PAP 20 位的精氨酸对亮氨酸)和 Tyr49His 取代。PAP-v 核苷酸序列中的第三处改变对氨基酸序列没有影响(对应于信号序列中第一个 Ser 的密码子 TCG→TCA)。表 I 还显示了 5'端和 3'端的非编码、侧翼序列。在真核细胞内表达后,野生型 PAP 其 N 末端的 22 氨基酸序列被共翻译地切除,生成分子量约 32KD 的多肽,该多肽经进一步加工即切除 C 末端的 29 个氨基酸(“野生型 PAP 的 C 末端延伸”或“PAP(263-292)”)后生成分子量约 29KD 的成熟、野生型 PAP(后文称为“PAP(1-262)”)(即分离自美洲商陆的叶中的 PAP)。参见 Irvin 等, *Pharmac. Ther.* 25 55:279-302(1992); Dore 等,《核酸研究》(*Nuc. Acids Res.*)21(18):4200-05(1993); Monzingo 等,《分子生物学杂志》(*J. Mol. Biol.*)233:705-15(1993); Tumer 等,《美国科学院院报》92:8448-8452(1995)。

“PAP 抗病毒活性”指本发明突变型 PAP 在转基因植物内的表达产生了广谱的抗病毒性,即对大量非相关病毒引起的感染的抗性或抑制能力,这些病毒包括但不限于 RNA 病毒例如马铃薯 X 病毒组(PVX, 马铃薯病毒 X)、马铃薯 Y 病毒组(PVY)、黄瓜花叶病毒(CMV)、烟草花叶病毒(TMV)、大麦黄矮病毒(BYDV)、小麦条斑花叶病毒、马铃薯卷叶病病毒(PLRV)、洋李痘病毒、西瓜花叶病毒、南瓜黄色花叶病毒、木瓜环斑病毒、甜菜西方黄化病毒、大豆矮化病毒、胡萝卜 read 叶病毒,和 DNA 植物病毒例如西红柿黄叶卷曲病毒。参见 Lodge 等,同上; 35 Tomlinson 等,《普通病毒学杂志》(*J. Gen. Virol.*)22:225-32(1974); 和 Chen 等,《植物生理学》40:612-20(1991)。

“PAP 抗真菌活性”指本发明的突变型 PAP 使植株具有广谱抗真菌性。本发明的突变型 PAP 提高了对植物真菌引起的病害的抗性,这些真菌例如腐霉(烂种、枯苗和根烂的原因之一)、疫霉(造成马铃薯的晚疫以及许多其它植物的根烂和疫



病)、盘梗霉、霜霉、单轴霉、假霜霉和指梗霉(造成绒毛霉)、禾白粉菌(造成谷类和草类的粉状霉变)、轮枝孢(造成蔬菜、花卉、农作物和树木维管的枯萎)、丝核菌(造成许多植物的枯萎病和草皮的褐斑病)、镰孢(造成大豆的根烂、马铃薯干枯)、旋孢腔菌(造成根茎腐烂和谷类及草类的疫病)、赤霉(造成苗疫病和玉米以及小谷类的根茎腐烂)、顶囊壳菌(造成谷类的全部顶囊枯黄病)、核盘菌(造成花卉和蔬菜花冠腐烂和枯萎, 以及草皮的银元疹)、柄锈菌(造成小麦和其它小谷类的茎锈)、黑粉菌(造成玉米的黑穗病)、Magnaporthae(造成草皮的夏季斑病)和小核菌(Schlerotium) (造成草皮的北方枯萎病)。其它重要的真菌类病害包括由尾孢、壳针孢、球腔菌、病霉、刺盘孢、长蠕孢、链格孢、葡萄孢、枝孢和曲霉引起的病害。

申请人还认为, 本发明的突变型 PAP 还提高植物对害虫、细菌和线虫的抗性。重要的细菌类病害包括由假单孢菌、黄单孢菌、欧文氏菌、Clavibacter 和链霉菌造成的病害。

本发明的 PAP 突变蛋白与野生型 PAP 的不同主要在于: (1)体内区室化改变; (2)C 末端突变, 包括但不限于缺失或移码突变; (3)N 末端突变; 和(4)活性位点突变。第一类 PAP 突变蛋白可能具有被改变的体内区室化特性; 即, 它们可能与野生型定位在相同的亚细胞区室。虽然不想局限于特定的作用理论, 申请人确信在酵母中, 这些 PAP 突变蛋白不能经受共翻译加工(去除 22 个氨基酸的信号肽)和/或翻译后加工(去除 29 个氨基酸的 C 末端片段), 由此造成细胞毒性完全或基本上被消除。这些突变蛋白同时也是非植物毒性的。有关这些突变型 PAP 体内功能的尤其令人惊奇或出乎意料的是, 突变作用定位于编码成熟 PAP(1-262)的序列内, 而不在 N 末端信号肽或 29 氨基酸的 C 末端延伸内。此外, 突变型 PAP 具有体外抑制翻译的酶活性, 这表明植物毒性不完全是酶活性的作用。较好的 PAP 突变蛋白包括一个保守性点突变, 在野生型 PAP 的氨基酸残基 75 甘氨酸(Gly75)变成缬氨酸、丙氨酸、异亮氨酸或亮氨酸, 或者(2)在野生型 PAP 氨基酸残基 97 谷氨酸(Glu97)处的保守性或非保守性点突变。更好的 PAP 突变蛋白是 PAP(1-262, Gly75Val)和 PAP(1-262, Glu97Lys), 各自的 DNA 可以方便地通过将野生型甘氨酸 75 的密码子 GGT 改为 GTT(缬氨酸)和将谷氨酸 97 的密码子 GAA 改为 AAA(赖氨酸)来制备。其它区室化特性被改变的 PAP 突变蛋白可以通过后文的选择方法来鉴定。Dore 等在前文文献中描述了一种 Arg67Gly PAP 突变蛋白(在 Dore 的论文中由于存在一个 N 末端的甲硫氨酸残基而编号为 Arg68Gly), 但它对真核细胞有毒而对原核细胞例如大肠杆菌无毒。该突变蛋白不包括在本发明的范围之内。



本发明的第二类 PAP 突变蛋白在 PAP 的 C 末端区域内有缺失或氨基酸取代。申请人意外发现, 这些突变蛋白虽然在体外抑制翻译但在体内是无毒性的(即非植物毒性的)。较好的突变蛋白缺失了成熟 PAP 的约 26 至约 76 个氨基酸, 更好的 PAP 突变蛋白是突变型 PAP(1-236)-PAP(1-184), 包括端值。所以, 开始于野生型成熟 PAP 第 237 位氨基酸残基的截短形式属于本发明范围之内, 其中例如

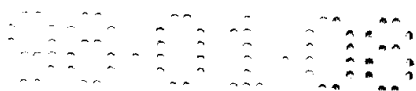
5 PAP(1-236), PAP(1-235), PAP(1-234), PAP(1-233), PAP(1-232), PAP(1-231), PAP(1-230), PAP(1-229), PAP(1-228), PAP(1-227), PAP(1-226), PAP(1-225), PAP(1-224), PAP(1-223), PAP(1-222), PAP(1-221), PAP(1-220), PAP(1-219), PAP(1-218), PAP(1-217), PAP(1-216), PAP(1-215),

10 PAP(1-214), PAP(1-213), PAP(1-212), PAP(1-211), PAP(1-210), PAP(1-209), PAP(1-208), PAP(1-207), PAP(1-206), PAP(1-205), PAP(1-204), PAP(1-203), PAP(1-202), PAP(1-201), PAP(1-200), PAP(1-199), PAP(1-198), PAP(1-197), PAP(1-196), PAP(1-195), PAP(1-194), PAP(1-193), PAP(1-192), PAP(1-191), PAP(1-190), PAP(1-189), PAP(1-188), PAP(1-187), PAP(1-186), PAP(1-185)和 PAP(1-184)。更好的突变蛋白包括 PAP(1-184Glu)、PAP(1-188Lys)、PAP(1-206Glu)、PAP(1-209)和 PAP(1-236Lys)。只要对植物细胞无毒, 这可以用后文的选择方法进行确定, 而且在植物内产生抗真菌性和/或抗病毒性, 少于 26(即 1 至 25 个氨基酸, 包括端值)或超过 76 个成熟 PAP 的氨基酸的缺失也属于本发明范围之内。后一种特性可以如下测定, 即通过例如

20 在病毒或真菌存在下用 PAP 突变蛋白体外接种植物器官例如叶, 或通过体内分别测定, 即用真菌或病毒接种用编码突变型 PAP 的 DNA 转化的转基因植株。一种较好的 C 末端取代突变蛋白是 PAP(1-262, Leu202Phe)。同样, 不想局限于任何特定的作用理论, 申请人认为 PAP 氨基酸序列 244Glu 至 259Cys(表 I 所示)涉及 PAP 与内质网(ER)膜上磷脂的结合, 这种结合促进 PAP 向细胞的胞质溶胶转移并在此

25 抑制蛋白质的合成, 所述的氨基酸序列与原核细胞膜脂蛋白的脂结合位点的共有序列同源(参见 Hayashi 等, 《生物能和生物膜杂志》(J. Bioenerg. Biomem)22: 451-71(1990)), 而且在上述 PAP 突变蛋白中都缺失。例如因缺失或移码突变失去了这一功能, 使 PAP 突变蛋白具有本文所述的特性。

Dore 等(同上), 同时还公开了一种 Phe195Tyr, Lys211Arg PAP 突变蛋白(由于在大肠杆菌内表达时必需有 N 末端 Met 残基, 所以编号与本文所用的编号差相地加 1), 它对真核细胞(例如植物)有毒但对原核细胞例如大肠杆菌无毒。所以, Dore 的文献中公开的这种 PAP 突变蛋白不在本发明的范围之内。

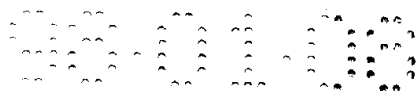


第三类 PAP 突变蛋白的特征在于截短了成熟 PAP 内 1 至至少约 38 个 N 末端氨基酸残基。这些突变蛋白包括 PAP(2-262), PAP(3-262), PAP(4-262), PAP(5-262), PAP(6-262), PAP(7-262), PAP(8-262), PAP(9-262), PAP(10-262), PAP(11-262), PAP(12-262), PAP(13-262), PAP(14-262), PAP(15-262), PAP(16-262), PAP(17-262), PAP(18-262), PAP(19-262), PAP(20-262), PAP(21-262), PAP(22-262), PAP(23-262), PAP(24-262), PAP(25-262), PAP(26-262), PAP(27-262), PAP(28-262), PAP(29-262), PAP(30-262), PAP(31-262), PAP(32-262), PAP(33-262), PAP(34-262), PAP(35-262), PAP(36-262), PAP(37-262), PAP(38-262)和 PAP(39-262)。如果在体内表现出 PAP 的生物活性和降低的植物毒性, 大于 38 个成熟 PAP N 末端氨基酸残基的截短形式也在本发明范围之内。这些特性可以通过后文实施例中的方法来测定。

第四类 PAP 突变蛋白包含使得 PAP 分子失去酶活性(根据其在体外和/或真核细胞核糖体内抑制翻译的能力的丧失来确定)的活性位点突变。申请人意外发现, 当这些突变蛋白在植株内表达时表现出广谱抗真菌活性, 但是几乎没有抗病毒活性。推定的 PAP 活性位点包括氨基酸残基 Tyr72、Tyr123、Glu176、Arg179 和 Trp208。所以, 失去了酶活性但保留抗真菌活性的 PAP 活性位点突变蛋白, 例如在 PAP 活性位点内包含一个保守或甚至非保守取代, 或者至少一个活性位点氨基酸缺失或被其它氨基酸取代的突变蛋白属于本发明范围之内。PAP 突变蛋白的酶活性和抗真菌活性可以用后文实施例中的测试方法来测定。一种较好的 PAP 活性位点突变蛋白是 PAP(1-262, Glu176Val)。

至于所述的 PAP 突变蛋白, “与野生型 PAP 的区别主要在于…”指除了赋予降低的植物毒性和抗病毒和/或抗真菌活性所必需的氨基酸改变(上述)之外, 突变型 PAP 的氨基酸序列与成熟 PAP 基本一致。“基本一致”指只要生成的 PAP 突变蛋白保留上述降低的植物毒性和 PAP 生物活性, 本发明的 PAP 突变蛋白还可以通过另外的取代、插入或缺失进一步被修饰。例如, 可以通过取代或插入将突变型 PAP 的 N 末端变为甲硫氨酸残基, 以便允许编码突变型 PAP 的 DNA 在各种宿主细胞, 特别是大肠杆菌中表达。本发明的 PAP 突变蛋白还可以包含野生型 PAP 的 N 末端的 22 氨基酸信号肽和/或 29 氨基酸的 C 末端延伸, 两者都表示在表 I 中。

可以利用已知的 PAP 基因来制备本发明编码突变型 PAP 的 DNA。参见 Ausubel 等编辑, 《分子生物学中的最新方法》(Current Protocols in Molecular Biology)第



1 卷, 第 8 章, Wiley, NY(1990)。也可以利用 PCR 技术来制备 DNA。参见《PCR 方法》(PCR Protocols), Innis 等编辑, Academic Press, San Diego, CA(1990)。编码突变型 PAP 的 DNA(例如 cDNA)最好以一个表达盒的形式插入在植物转化载体中, 该表达盒包含转化植物细胞的全部必需元件。该表达盒按照正确的读码框通常包含植物细胞内功能性的启动子, 5'端的非翻译前导序列, 突变型 PAP DNA, 和 3'端非翻译区, 该区能够在植物内引起 RNA 序列 3'末端的聚腺苷酸化核苷酸的加成。植物细胞内功能性的启动子可以从多种来源获得, 例如植物或植物 DNA 病毒。表达盒内启动子的选用将决定构建物在转基因植物内的空间和时间表达方式。被选用的启动子可能具有组成型活性, 其中包括 CaMV 35S 启动子、肌动蛋白启动子(McElroy 等, 《植物细胞》 2:163-71(1990); McElroy 等, 《分子和普通遗传学》 231:150-160 (1991); Chibbar 等, 《植物细胞报道》 12:506-509(1993)), 和遍在蛋白启动子(Binet 等,《植物科学》(Plant Science)79:87-94(1991), Christensen 等, 《植物分子生物学》 12:619-623(1993); Taylor 等, 《植物细胞报道》 12:491-495(1993))。或者, 它们可以经创伤诱导(Xu 等, 《植物分子生物学》 22:573-588(1993); Logemann 等,《植物细胞》 1:151-158(1989); Rohrmeier & Lehle, 《植物分子生物学》 22:783-792(1993); Firek 等,《植物分子生物学》 22:129-142(1993); Warener 等,《植物杂志》 3:191-201(1993)), 它们由此在创伤或病原感染位置驱动突变型 PAP 基因的表达。其它有用的启动子在特定的细胞(例如叶上皮细胞、叶肉细胞、根皮层细胞)或特定组织或器官(例如根、叶或花)内表达。专利申请 WO93/07278 说明了在髓细胞内优选表达的玉米 trpA 基因的分
20 离。Hudspeth & Grula 在《植物分子生物学》 12:579-589(1989)中说明了一种启动子, 它来自编码烯醇式丙酮酸磷酸羧酶(PEPC)的玉米基因, 并指导叶特异性方式的表达。或者, 选用的启动子可以在光诱导性或其它时序调控启动子下驱动基因的表达。又或者, 选用的启动子是化学调控的。DNA 还可以编码野生型 PAP 的 N 末
25 端信号序列和/或 C 末端延伸。

有许多可用在表达盒中的转录剪切及聚腺苷酸化位点。这些位点负责正确加工(形成)mRNA 的 3'末端。已知在植物内起作用的合适的转录剪切及聚腺苷酸化位点包括 CaMV 35S 剪切和聚腺苷酸化位点、tml 剪切和聚腺苷酸化位点、胭脂氨酸合成酶剪切和聚腺苷酸化位点、豌豆 rbcS E9 剪切和聚腺苷酸化位点。这些
30 位点在单子叶及双子叶植物中均可使用。

许多序列被发现能够增强转录单元内基因的表达, 可将这些序列与本发明的基因结合使用来提高它们在转基因植物内的表达。许多内含子序列被证明能够增



强表达，尤其在单子叶细胞内。例如，已经证明在转入玉米细胞后，在同源启动子下，玉米 *Adhl* 基因的内含子显著增强野生型基因的表达。内含子 1 被发现特别有效，并以与氯霉素乙酰转移酶基因融合的形式增强表达(Callis 等, 《遗传学进展》(Genes Develop)1:1183-1200(1987))。在相同的实验系统中，来自玉米
5 *bronze-1* 基因的内含子在增强表达方面具有类似的效果(Callis 等, 同上)。一般总将内含子序列结合到植物转化载体中，通常位于非翻译前导序列内。

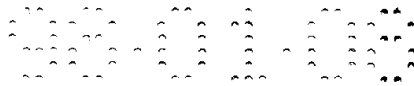
已知大量来自病毒的非翻译前导序列也增强表达，这些序列在双子叶细胞内尤其有效。具体地说，来自烟草花叶病毒的前导序列(TMV, “ Ω -序列”)、玉米褪绿斑点病毒(MCMV)、和苜蓿花叶病毒(AMV)的前导序列已被证明能够增强
10 表达(Gallie 等, 《核酸研究》15:8693-8711(1987); Skuzeski 等, 《植物分子生物学》15:65-79(1990))。

许多转化载体可用于植物的转化，而本发明的基因可以与这些载体中任何一种结合使用。载体的选用取决于选用的转化技术和转化目标的种类。对于某些目标种类，宜使用不同的抗菌素或除草剂选择标记。转化中的常用选择标记包括提供卡那霉素抗性的 *nptII* 基因(Messing & Vierra, 《基因》19:259-268(1982);
15 Bevan 等,《自然》304:184-187(1983)), 提供对除草剂草胺磷抗性的 *bar* 基因(White 等, 《核酸研究》18:1062(1990); Spencer 等, 《理论及应用遗传学》79:626-631(1990)), 提供潮霉素抗性的 *hph* 基因(Blochinger & Diggelmann, 《分子细胞生物学》4:2929-2931)和提供氨甲喋呤抗性的 *dhfr* 基因(Fling & Elwell, 1980)。适用于土壤杆菌转化的载体通常带有至少一个 T-DNA 边界序列。这些载体包括例如
20 pBIN19(Bevan, 《核酸研究》(1984))和 pCIB200(EP 0 332 104)。

不用根瘤土壤杆菌进行的转化不需要在选用的转化载体中含有 T-DNA 序列，因此除了上述含有 T-DNA 序列的载体之外，没有该序列的载体也可以使用。不靠土壤杆菌的转化技术包括通过粒子轰击转化、原生质体吸收(例如 PEG 和电穿孔)和微注射法。载体的选择很大程度上取决于对被转化种类的选择。例如，
25 pCIB3064 是 pUC 衍生的载体，适用于直接基因转移技术，并结合以用除草剂草胺磷进行选择。WO93/07278 和 Koziel 等, (《生物技术》11:194-200(1993))对此进行了说明。

包含上述各种元件的含有编码突变型 PAP 的 DNA 的表达盒可以利用标准重组
30 DNA 技术插入植物转化载体内。或者，载体中可以存在表达盒的部分或全部元件，其余元件则视需要加入载体。

双子叶植物的转化技术在本领域是众所周知的，包括基于土壤杆菌的技术和



不需要土壤杆菌的技术。非土壤杆菌类技术包括异源遗传物质直接被原生质体或细胞吸收。这可以利用 PEG 或电穿孔介导的吸收、粒子轰击介导的传递或微注射来进行。这些技术的实例的说明可参见 Paszkowski 等,《欧洲分子生物学协会杂志》 3:2717-2722(1984), Potrykis 等,《分子和普通遗传学》 199 : 169-177(1985), Reich 等,《生物技术》 4:1001-1004(1986)和 Klein 等,《自然》 327:70-73(1987)。在所有情况中,都使用标准方法将细胞再生为完整的植株。

转化双子叶植物,土壤杆菌介导的转化是一种较好的技术,因为它转化效率高,而且适用于多个不同的种。通常可用土壤杆菌转化的许多作物种类包括烟草、西红柿、向日葵、棉花、油籽菜、马铃薯、大豆、苜蓿和杨树(EP0 317 511(棉花), EP0 249 432(西红柿), WO87/07299(芥蓝), 美国专利 4,795,511(杨树))。土壤杆菌转化通常包括将携有目标外源 DNA 的二元载体(例如 pCIB200 或 pCIB2001)转移到合适的土壤杆菌菌株内,该菌株依赖于宿主土壤杆菌携带在共存质粒或染色体上的 vir 基因的互补(例如适合 pCIB200 的菌株 CIB542(Uknes 等,《植物细胞》 5:159-169(1993)))。利用三亲本交配法进行重组二元载体向土壤杆菌的转移,即使用带有重组二元载体的大肠杆菌,带有能够使重组二元载体向靶土壤杆菌菌株移动的质粒例如 pRK2013 的辅助大肠杆菌。或者,可以通过 DNA 转化法将重组二元载体向土壤杆菌转移(Hofgen & Willmitzer,《核酸研究》 16:9877(1988))。

用重组土壤杆菌转化靶植株通常将土壤杆菌与取自植株的外植体共培养,并遵循本领域已知的方法。将带有位于二元质粒 T-DNA 边界之间的抗菌素或除草剂抗性标记的转化组织在可选择培养基上再生。

较好的用于单子叶植物的转化技术包括利用 PEG 或电穿孔技术将基因直接转移到原生质体中,以及利用粒子轰击法转移到愈伤组织中。转化可以利用一种 DNA 或多种 DNA(共转化)进行,这两种方法都适用于本发明。共转化的优点在于不需要构建复杂的载体,而且可以产生带有非连锁基因座的目的基因和可选择标记基因的转基因植物,这样可以在需要时在后代中去除可选择标记。但是,共转化的缺点在于各 DNA 整合到基因组中的机率低于 100%(Schocher 等,《生物技术》 4:1093-1096(1986))。

已公开的专利申请 EP O 292 435、EP O 392 225 和 WO93/07278 描述了制备玉米的愈伤组织和原生质体、用 PEG 或电穿孔法转化原生质体和由转化后原生质体再生玉米植株的方法。Gordeon-Kamm 等,《植物细胞》 2:603-618(1990)和 Fromm 等,《生物技术》 11:194-200(1993)描述了利用粒子轰击术转化玉米良种



近交系的方法。

水稻的转化也可以通过利用原生质体或粒子轰击法的直接基因转移来进行。日本型和印度型的原生质体介导的转化已经有所记述(Zhange 等,《植物细胞报道》7:739-384(1988); Shimamoto 等,《自然》338:274-277(1989); Datta 等,《生物技术》8:736-740(1990))。以上两种植株通常也可用粒子轰击法转化(Christou 等,《生物技术》9:957-962(1991))。

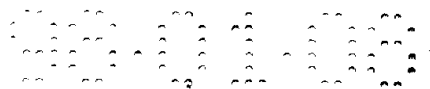
5 专利申请 EP 0 332 581 描述了生成、转化和再生早熟禾亚科(Pooidea)原生质体的方法。而且, Vasil 等(《生物技术》10:667-674(1992))描述了小麦的转化,即用粒子轰击法转化到 C 类长期可再生愈伤组织的细胞内,以及同样是 Vasil 等(《生物技术》11:1533-1558(1993))和 Weeks 等(《植物生理学》102:1077-1084(1993))所述的未成熟胚和未成熟胚衍生愈伤组织的粒子轰击法。

转化单子叶植物细胞例如玉米(Zea mays)可以将单子叶植物细胞与许多可能刺穿细胞的针状体接触,造成细胞壁破裂,由此允许转化 DNA 进入细胞。参见美国专利 5,302,523。以下美国专利中还公开了对单子叶植物和双子叶植物都适合的转化技术:美国专利 5,240,855(粒子枪), 5,204,253(气体冷激的加速微粒)、15 5,179,022(粒子轰击装置)、4,743,548 和 5,114,854(微注射); 5,149,65 和 5,120,657(加速粒子介导的转化); 5,066,587(气体驱动的微粒加速器); 5,015,580(粒子介导的大豆植株的转化); 5,013,660(激光束介导的转化); 和 4,849,355 和 4,663,292。

20 然后,将如上所述转化的植物细胞或植物组织按照标准方法培养成完整的植株。可以根据标准方法由转基因的花期植株获得转基因的种子。同样,可以利用各种已知技术来繁殖马铃薯和甜菜之类非花期的植物。参见 Newell 等,《植物细胞报道》10:30-34(1991)(其中描述了用茎培养的马铃薯转化)。

25 本发明编码突变型 PAP 的 DNA 可使任何能够表达该 DNA 的植物具有广谱的抗真菌性和抗病毒性,其中包括单子叶植物(例如谷类)和双子叶植物。特定的实例包括玉米、西红柿、草皮、芦笋、木瓜、向日葵、黑麦、菜豆、生姜、荷花、竹子、马铃薯、水稻、花生、大麦、麦芽、小麦、苜蓿、大豆、燕麦、茄子、南瓜、洋葱、花茎甘蓝、甘蔗、甜菜、甜菜根、苹果、橘子、葡萄柚、梨、李子、桃、菠萝、葡萄、玫瑰、香石竹、雏菊、郁金香、黄杉、雪松、白松、欧洲赤松、30 云杉、豌豆、棉花、亚麻和咖啡。

除前文所述之外的 PAP 突变蛋白可以利用真核细胞内的选择系统来鉴定。在一优选实施例中,按照标准技术,随机诱变与一真核细胞内功能性的启动子可操



作性连接的一编码 PAP 的 DNA 分子。然后用诱变后的 PAP 构建物转化细胞。然后将如此转化的细胞在合适的培养基中培养规定的时间，例如足够使细胞进行一定程度生长的时间，然后在此时在培养基中加入诱导物引起诱变 DNA 分子的表达。如果培养的细胞能够在诱导诱变 PAP DNA 分子的表达后存活，这表明诱变引起了非毒性 PAP 突变蛋白的表达，然后可以对该 PAP 突变蛋白进行体外或体内实验以确定它是否保留了 PAP 的生物活性。较好的体外实验包括真核细胞翻译系统，例如测定 PAP 突变蛋白引起的对蛋白质合成的抑制程度的网织红细胞裂解物系统。较好的宿主细胞是酵母细胞，例如酿酒酵母，在后文实施例 1 中对此有详细说明。也可以用许多随机诱变的编码 PAP 的 DNA 分子实施该方法。然后可按照标准方法将经以后的实验证实植物毒性降低且保留 PAP 抗病毒性和/或抗真菌活性的 PAP 突变蛋白分离出来，纯化并测序。

在其它实施例中，诱变在转化真核细胞之后进行。转化之后诱变 DNA 的缺点在于宿主的染色体 DNA 也会被诱变。为了确定存活细胞中的突变在染色体上还是在质粒上，该实施方式需要用诱导型启动子调控下的野生型编码 PAP 的 DNA 取代进行转化的编码 PAP 的 DNA，并在诱导物存在下培养该细胞。保留生长能力的突变体是染色体突变体，而不能生长的突变体是质粒上突变的突变体(即 PAP)。

参照以下实施例将进一步说明本发明。给出这些实施例的目的只是为了说明，而不是为了限定，除非另作说明。

20

实施例 1

A. 酵母表达载体的构建，以及在酵母中的 PAP 表达分析。将 Lodge 等所述、表 1 所示的 PAP 和 PAP-v 的相应全长 cDNA 克隆到酵母表达载体中，位于半乳糖诱导型启动子 GAL1 的调控之下。选择酿酒酵母作为表达系统，因为酵母的优点在于可提供真核细胞特异性翻译后修饰作用。因为酵母的核糖体对 PAP 敏感，所以使用一个可调型启动子驱动 PAP 的表达。编码 PAP 和 PAP-v 的 cDNA 被以在半乳糖诱导型启动子 pGal 1 调控下的 BgIII/SmaI 片段形式克隆在酵母表达载体 pAC55 中，该质粒包含可选择标记 URA3。按照 Ito 等在《细菌学杂志》153:163-68(1983)中所述的方法将包含 PAP 和 PAP-v 的载体(NT123 和 NT124)转化到酵母株 W303(Mat a, ade2-1 trp1-1 ura3-1 leu2-3, 112his3-11, 15can1-100)(Bossie 等, 《细胞的分子生物学》 3:875-93(1992))中，在 30 °C，在含有葡萄糖的尿嘧啶缺陷培养基上选择转化子。

30

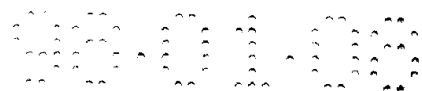


含有 NT123(野生型 PAP)或 NT124(PAP-v)的酵母细胞在含有 2%棉籽糖的尿嘧啶缺陷培养基上在 30 ℃ 培养 48 小时,使密度达到 5×10^7 细胞/ml。取一半培养物,其中加入 2%半乳糖诱导 PAP 蛋白质的表达,另一半用作不诱导的对照。使细胞再生长 4 小时,然后 10,000g 离心 5 分钟收集细胞。将细胞重悬在含有蛋白酶抑制剂(各 0.1 μ g/ml 抗蛋白酶、抑蛋白酶肽、胰凝乳蛋白酶抑制剂、亮抑蛋白酶肽、胃蛋白酶抑制剂)的 RIPA 缓冲液(9150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1%SDS, 50mM Tris-HCl, pH8)中,并用玻璃微珠(0.5mm)裂解。按照 Tomlinson, 《普通病毒学杂志》(J. Gen. Virol., 同上)所述的方法,将提取物上样在 10% SDS-PAGE 凝胶上。利用增强的化学发光(ECL)法(Amersham),使用抗纯化 PAP 的抗体进行免疫印迹分析。

在半乳糖诱导后, PAP 和 PAP-v 都在酵母中表达。根据与 PAP 蛋白标准物的比较,含有 PAP 质粒(NT123)的酵母细胞同时表达成熟 PAP 和一种较大形式 PAP,而含有 PAP-v(NT124)的酵母细胞主要表达较大的 PAP 和很少的成熟 PAP。在培养基中没有发现 PAP。不限于任何特定的作用理论,申请人认为该结果表明:(1)在酵母中, PAP 被表达为前体形式,然后被加工成成熟形式;(2)除了共翻译地切除 N 末端信号肽之外, PAP 还经受其它加工(Lodge 等, 同上),因为成熟 PAP 和酵母中表达的 PAP 其大小小于预计的切除信号序列后的大小。

B. PAP 和 PAP-v 的体外翻译和加工。为了在体外检查 PAP 的加工,在 35 S-甲硫氨酸存在下,用 T7 偶联的带有或不带犬微粒体膜(Promega)的网织红细胞裂解物翻译系统转录和翻译实施例 1A 中所述的两种构建物。PAP 和 PAP-v 的 cDNA 被克隆在 pGem3Z 载体(Promega)T7 启动子的下游。在 35 S-甲硫氨酸存在下,用 T7 偶联的带有或不带犬胰腺微粒体膜(Promega)的网织红细胞裂解物翻译系统(Promega)体外转录和翻译等量的两种构建物(1 μ g)。在 5mM EDTA 和 125mM 蔗糖存在下,翻译产物与 0.2mg/ml 蛋白酶 K 孵育 90 分钟。加入 4mM PMSF 激活蛋白酶 K,在室温下孵育 2 小时。然后在 0.1%SDS 和 0.1M 柠檬酸钠, pH5.5 存在下,在 37 ℃ 用 Endo-H(内-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶)(1mU/10 μ l)处理翻译产物 12 小时。按照 Laemmli 等在《自然》(London)227:680-5(1970)中所述的方法在 10%SDS-PAGE 上分析等量的蛋白质(3.5 μ l)。

PAP 和 PAP-v 分别编码 33 和 34KD 的前体蛋白,在与微粒体膜孵育后,两种前体都被加工成 32KD 的形式。加工后的蛋白质仍然大于成熟形式(29KD),这表明 PAP 前体还经受了其它翻译后加工。PAP 不包含任何 N 连接的糖基化位点,所以体外翻译的蛋白质在接受去糖的内-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo-H)处理



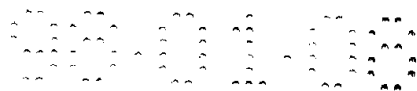
PAP 抗体交叉反应的蛋白质。4 个突变体(HMNT123-1、124-6、124-7 和 124-1)产生比成熟 PAP(29KD)大的蛋白质,这表明将 PAP 加工成成熟形式的过程在这些突变体中被抑制。2 个突变体(HMNT123-2 和 123-3)产生与 PAP 成熟形式共迁移的蛋白质,其它几种突变体(HMNT123-4、123-5、123-6、124-2 和 124-3)产生较小的蛋白质。突变体内蛋白质的表达水平在 0.005 至 0.08%总可溶蛋白之间。

F. PAP 突变蛋白的核苷酸序列分析。通过对回收自酵母的质粒的序列分析鉴定 PAP 突变蛋白中的氨基酸改变位置。从突变体中分离出质粒,按照前文 Rose 等所述的方法将其转化到大肠杆菌中,然后用 Sequenase 2.0 DNA 测序试剂盒(USB)测序。参见 Robzyk 等,《核酸研究》20:3790(1992)。对 HMNT123 - 2 的测序分析揭示,它包含单个点突变,该突变在推定活性位点将 176 位的谷氨酸变为缬氨酸(E176V)(表 II)。HMNT123 - 2 产生与野生型 PAP 一样大小的蛋白质。176 位的谷氨酸(E176)在至今测序过的所有 RIP 中是高度保守的,并被认为位于 PAP 的活性位点裂隙中(4)。参见 Stevens 等,《实验》(Experientia)37:257-9(1981)。HMNT123-6、HMNT124-2 和 HMNT124-3 都有一个靠近 C 末端的点突变,该突变在 237 位引入一个终止密码子取代了色氨酸(W237)(表 II)。该突变的结果是,突变型 PAP 的 C 末端缺失了 26 个氨基酸,由此产生了一个截短的蛋白质。HMNT123-5 包含一个移码突变,该突变在大约为 Glu184 的密码子(GAG)处缺失了 2 个核苷酸(GA),读码框由此被改变,Asn190 的密码子因为读码框移动了-1 个位置而变成了 TAA,由此导致截短蛋白质的表达。HMNT124-1 内的一个点突变将 97 位的谷氨酸变成了赖氨酸(E97K)(表 I)。HMNT123-1 内也含有一个点突变,在 75 位将甘氨酸变成缬氨酸(G75V)。以上两种突变体都表达比纯化的成熟 PAP 大的蛋白质,这表明 PAP 的加工在这些突变体中被抑制。

为了证实观察到的突变体的表型是由经鉴定的 PAP 序列中的突变而不是染色体突变引起的,分离出各种突变型 PAP 质粒并重新转化宿主株 W303,然后选择 URA+转化子。这些转化子在半乳糖培养基上的生长速度与野生型相同,这表明转化子经 PAP 表达诱导作用后存活的能力是质粒连锁的。

表 II. 消除 PAP 对真核细胞毒性的突变

HMNT123-1	Gly-75(GGT)→Val(GTT)
HMNT123-2	Glu-176(GAG)→Val(GTG)
HMNT123-4	Trp-208(TGG)→终止子(TAG)
HMNT123-5	Glu-184(GAG)→Glu(GAA)

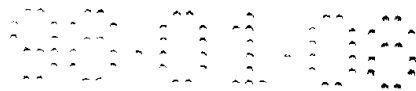


HMNT123-6	Trp-237(TGG)→终止子(TAG)
HMNT124-1	Glu-97(GAA)→Lys(AAA)
HMNT124-2	Trp-237(TGG)→终止子(TAG)
HMNT124-3	Trp-237(TGG)→终止子(TAG)
HMNT124-13	Leu-202(CTT)→Phe(TTT)

G. PAP 突变蛋白的酶活性: 使用体外翻译测定来比较 PAP 突变蛋白的酶活性。如前文 Lodge 等所述, 在含有不同量 PAP 的酵母提取物存在下, 在兔网织红细胞裂解物系统(Promega)中翻译雀麦草花叶病毒(BMV)RNA, 利用 ELISA 定量酵母中的 PAP 水平(Lodge 等, 同上)。在 0.1 至 1ng PAP/ml 之间, 抑制曲线是线性的。表 III 显示在 0.2ng/ml 提取自酵母的 PAP 存在下进行的蛋白质合成抑制实验的结果。通过添加野生型酵母提取物或 RIPA 缓冲液, 将总蛋白和 PAP 分别调节至 87ng/ml 和 0.2ng/ml。在过去的实验中, 当在 0.2ng/ml BSA 存在下进行体外翻译时, 没有对翻译的抑制。加入 0.2ng/ml 提取自非转化酵母(WT)的蛋白质时, 可以观察到轻微的翻译抑制。在存在 0.2ng/ml 以下物质时, 翻译被抑制: (1) 加入至野生型酵母提取物的纯化 PAP(WT+PAP); (2)含有 NT123 或 NT124 的酵母的蛋白质提取物和(3)含有羟基胺产生的突变蛋白 HMNT123-3、HMNT124-1、HMNT124-3 和 HMNT124-13 的酵母的蛋白质提取物。相反, 提取自 HMNT123-2 的蛋白质在网织红细胞裂解物系统中不抑制蛋白质的合成。在用 0.1ng/ml PAP 进行体外翻译实验时也获得相似的结果。

15 表 III. PAP 突变蛋白对蛋白质合成的抑制

<u>加入翻译培养基中的蛋白质</u>	蛋白质的合成(掺入的 cpm)
无 RNA	2,246+/-204
BSA	244,956
WT	176,723±713
PAP+WT	146,660±2474
NT123	110,007±445
HMNT123-2	213,952±767
HMNT123-3	134,202±5522
HMNT124	84,959±661
HMNT124-1	119,529±2049
HMNT124-3	132,955±3739
HMNT124-13	145,899±4457



实施例 2

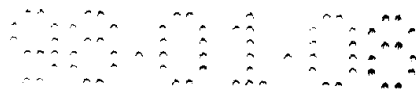
转基因烟草中 PAP 突变蛋白的表达

将突变型 PAP 改造成在植物内呈组成型表达，用以确定它们是否对植物无毒，以及是否保留 PAP 的抗病毒特性。

5 为了将 PAP 基因插入植物表达载体，如实施例 1 所述，从酵母中分离编码突变型 PAP 的质粒 DNA，转化到大肠杆菌中。从用 HindIII 消化的大肠杆菌中分离编码突变型 PAP 的质粒 DNA，用 Klenow DNA 聚合酶补平 HindIII 位点，用 SacI 消化质粒，分离出编码突变型 PAP 的 772bp 的 SacI/HindIII 片段。将编码突变型 PAP 的 SacI/HindIII 片段在用 SacI 和 SmaI 消化去除野生型 PAP 的 cDNA 插入片
10 段后克隆到 pMON8443 中(Lodge 等，《美国科学院院报》90:7089-7093(1993))。将来自 HMNT123-2 的 SacI/HindIII 片段克隆到 SacI/SmaI 消化的 pMON8443 中形成 NT144，将来自 HMNT124-3 的 SacI/HindIII 片段克隆到 SacI/SmaI 消化的 pMON8443 中形成 NT145。分别用 HMNT123-2 和 HMNT124-3 的 772bp 的 SacI/HindIII 片段取代 pMON8443 中 772bp 野生型 PAP cDNA 插入片段的
15 SacI/HindIII 片段来形成 NT146 和 NT147。

将质粒 NT144、NT145、NT146 和 NT147 迁移到根瘤土壤杆菌 ABI 株中用于转化烟草和马铃薯(Lodge 等，1993)。为了转化红花烟草(*N. tabacum*)，用水将 1 月龄烟草植株的幼叶覆盖 20 至 30 分钟。待水流干，用 10% chlorox 和 0.04% 吐温 20 将叶覆盖 15 分钟，然后用水漂洗 3 次。用蒸汽灭菌的单孔打孔机切取叶盘，
20 将它正面朝下在 MS104 培养基(4.4g/l MS 盐，30g/l 蔗糖，维生素 B5，1.0mg/l NAA 和 0.1mg/l BA)上放置一天，以进行预培养。将预培养后的叶盘放在 50ml 试管内，接种按 1:5 稀释的土壤杆菌通宵培养物。将试管颠倒数次。然后取出叶盘在无菌滤纸上拍干，然后面朝下放在带有过滤片的 MS104 培养板上共培养 2 天。然后将叶盘转移到 MS104 选择培养基(含 100μg/ml 卡那霉素和 300μg/ml
25 cefataxime)上，并放置在培养箱中。在约 3 周后出现愈伤组织和枝条。将枝条转移到带选择的 MSO 培养基(4.4g/l MS 盐，30g/l 蔗糖和维生素 B5)plantcon 上。2 周后形成根，生根后的枝条被转移到土壤中并保持在高湿环境中。然后用 ELISA 在再生植株中筛选新霉素磷酸转移酶(NPTII)以鉴定表达子。

30 红花烟草(*N. tabacum* cv Samsun)的转化频率通常在 10 至 12% 之间(即由每片叶盘获得的转基因植株数量)。如同以前的报道，当转化中使用含野生型 PAP 或变异 PAP 的载体(pMON8443 或 pMON8442)时，红花烟草转化的频率显著下降(Lodge 等，1993)。相反，如表 IV 所示，当转化中使用含有非毒性突变型 PAP



的载体时，没有观察到转化频率的下降。

表 IV

<u>质粒</u>	<u>转化频率</u>
NT144	13%
NT145	11%
NT147	12%

如同以前的报道，表达野生型 PAP 或变异 PAP 的转基因植物表现出生长减少、缺氮症和叶斑(Lodge 等， 1993)。相反，表达突变型 PAP 的转基因植物表型正常。它们的生长速度与野生型植物相同，而且不表现出缺氮症或叶斑，这表明突变型 PAP 的表达对转基因植物无毒。突变型 PAP 在大肠杆菌中也被表达，而且其表达不影响大肠杆菌的生长速度，这表明它们对大肠杆菌无毒。

实施例 3

10 转基因烟草中表达的突变型 PAP 的抗病毒活性

用 ELISA(Lodge 等， 1993)测试转基因烟草(*N. tabacum* cv Samsun)植株以测定突变型 PAP 的表达水平。在表 V 中，将转基因植物内表达的突变型 PAP 的表达水平与变异 PAP(pMON8442)(Lodge 等， 1993)的表达水平进行了比较。

表 V：转基因烟草中表达的 PAP 水平

<u>植株编号</u>	<u>表达水平</u>
NT144 - 12	1.5 μ g/mg
NT144 - 13	0.9 μ g/mg
NT145 - 13	4.4ng/mg
pMON8442(26139-11)	9.6ng/mg

15 如表 V 所示，包含 C 末端缺失突变体的转基因植株(NT145 - 13)表达突变型 PAP 的水平与表达变异 PAP 的植株(pMON8442)相似(Lodge 等， 1993)。相反，含有活性位点突变体的转基因植物(NT144)表达突变型 PAP 的水平明显较高。

20 为了体外测试 PAP 突变蛋白(NT144 和 NT145 构建物)是否具有抗病毒活性，在取自表达突变型 PAP、PAP-v(pMON8442)和非转化(野生型)烟草植株的蛋白质提取物存在下，用马铃薯 X 病毒接种野生型烟草。用 ELISA 定量转基因植物内的 PAP 水平。植株系 145 - 13 内的 PAP 表达水平为 4.4ng/mg，植株系 144 - 12 内的 PAP 表达水平为 1.5 μ g/mg。用每片叶含 5ng PAP 和 1.1mg 总蛋白的转基因植物的提取物接种植株。由非转化烟草(WT)的叶制备蛋白质提取物。在 6.7 μ g

至 1.1mg 不等量的来自非转化烟草的蛋白质存在下，将 50 μ l 1 μ g/ml 的 PVX 接种到烟草叶上。20 株烟草植株在 6.7 μ g 至 1.1mg 不等量的来自非转化植株的蛋白质存在下接种了 50 μ l 1 μ g/ml 的 PVX。如表 VI 所示，全部 WT 植株都被 PVX 感染，表现出局部损伤、系统性症状和接种叶之上的叶(系统叶)内的病毒积累。这些结果证明，来自非转化烟草的蛋白质提取物对 PVX 感染没有作用。当在 5 至 10ng 纯化 PAP(WT+PAP)存在下使用来自非转化烟草植株的蛋白质提取物时，在接种叶上观察到数量较少的 PVX 损伤，这表明在纯化 PAP 存在下，烟草植株得到免受 PVX 感染的保护。但是，虽然在这些植株的接种叶上观察到较少的损伤，但是它们表现出了系统症状，而且其 PVX 抗原的表达水平与在来自非转化烟草植株(WT)的蛋白质提取物存在下用 PVX 接种的植株相似。

表 VI
PAP 突变蛋白对烟草叶的 PVX 感染的作用¹

<u>植物提取物^a水平</u> (ng/mg) ^c	<u>PAP ng/叶</u>	<u>平均损伤数^b</u>	<u>PVX 抗原</u>
WT ^d	0	66.6 \pm 10.1	4.4 \pm 1.4
WT+PAP ^e	5	9.0 \pm 2.0	3.1 \pm 1.9
	10	1.5 \pm 2.0	2.8 \pm 2.6
26139	5	1.8 \pm 2.9	NA
145-13	5	12.5 \pm 7.4	0.2 \pm 0.3
144-12	5	57.8 \pm 7.4	3.2 \pm 2.5
	10	56.1 \pm 4.9	2.5 \pm 1.4
	20	55.5 \pm 13.8	4.3 \pm 1.4
	50	53.3 \pm 14.9	2.8 \pm 0.3
	100	68.0 \pm 11.7	3.0 \pm 0.9

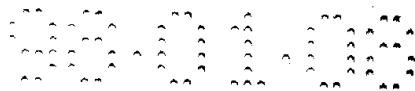
a 从非转化或带植物表达载体(pMON8442, NT145 和 NT144)的转化烟草叶制备植物提取物。

15 b 在接种后第 9 天计数损伤数量。

c 在接种后第 12 天，从第 1，2 和 3 片系统叶取样三片叶盘放在一个试管内，然后均质化在 ELISA 缓冲液中。用 ELISA 定量 PVX 抗原的平均水平。用 BCA 试剂(Pierce)定量各提取物中的总蛋白。

d 从非转化烟草叶中提取蛋白质提取物。

20 e 将 PAP(Calbiochem)加到取自非转化烟草叶的蛋白质提取物中。



1. 20 株用于野生型(wt), 10 株用于 wt+PAP, 5 株用于各种转基因蛋白质提取物。在不同量的 PAP 或 PAP 突变蛋白存在下, 用 50 μ l PVX(1 μ g/ml)接种每株的 2 片叶。

5 在 5ng 表达变异 PAP(pMON8442)的转基因植物(26139)的蛋白质存在下接种 PVX 时, 在接种叶上可以观察到明显较少的损伤, 这些植株避免了系统性的感染。同样, 在 5ng 表达 C 末端缺失突变蛋白的转基因植物(145-13)的蛋白质存在下接种 PVX 时, 损伤数量明显较少。这些植株不表现出系统症状, 而且接种叶上的 PVX 抗原水平显著降低。相反, 在 5 至 100ng 表达活性位点突变蛋白的植株(144-12)的蛋白质存在下接种 PVX 时, 接种叶上观察到的损伤数与在非转化烟草植株(wt)的蛋白质存在下接种的相近。在这些植株上观察到了系统性症状, 系统叶中 PVX 抗原的水平与在非转化烟草植物提取物存在下接种 PVX 的植株中相当。以上结果证明, 在体外具有酶活性的 C 末端缺失突变蛋白在体外保留了其抗病毒活性。相反, 在体外不具有酶活性的活性位点突变蛋白在体外失去了其抗病毒活性, 这表明 PAP 的酶活性对其体外抗病毒活性来说是决定性的。

15

实施例 4

转基因马铃薯中 PAP 突变蛋白的表达

将马铃薯的茎切成 3mm 厚的片, 放在无菌水中。将含有 NT144, NT145, NT146 和 NT147 的土壤杆菌培养通宵。离心沉淀细胞, 然后重悬在 10ml 水中。

20 将土壤杆菌按 1:10 稀释在水中。去除马铃薯茎外植体上的水, 加入稀释过的土壤杆菌。将茎外植体与土壤杆菌一起孵育 15 分钟。去除细菌, 将外植体放在覆盖有 Whatman #1 无菌滤纸的 1/10 MSO 培养板上。MSO 在 1L 体积中含有 4.4g MS 盐, 30g 蔗糖和 1ml 维生素 B5(500X), pH5.7。在暗环境中共培养 2 天后, 将外植体放置在 PC 培养基上培养 4 周, 每升该培养基含有 MSO 加 0.5mg/l 玉米素核糖核苷(zeatin riboside)(ZR), 5mg/l AgNO₃ 和 0.1mg/l NAA(萘乙酸), 100mg 卡那霉素和 300mg cefataxime。4 周后, 将外植体置于 PS 培养基上, 该培养基中含有 MSO 加 5mg/l ZR, 0.3mg/l 赤霉酸, 每升 100mg 卡那霉素和 300mg cefataxime。4 至 8 周后开始抽枝。然后将枝条摘取后放在含有 PM 培养基的 plantcons 中(每升含 4.4g MS 盐, 30g 蔗糖, 0.17g NaH₂PO₄H₂O, 1ml 盐酸硫胺素和 0.1g 肌醇, pH6.0, 以及 0.2%Gelrite 琼脂)。将植株植入土壤, 使其耐寒,

30 并利用 NPTII ELISA 分析鉴定出转基因植物。然后用 ELISA 分析转基因马铃薯中的 PAP 表达。利用 ELISA 鉴定出了表达 NT144, NT145 和 NT146 的转基因马



铃薯。用含有突变型 PAP 的构建物对转化频率没有影响，而且表达突变型 PAP 的转基因植物表型正常，这表明突变型 PAP 的表达对马铃薯没有毒性。

实施例 5

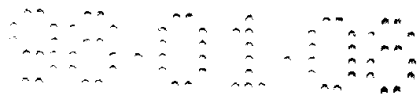
5

转基因草皮中 PAP 突变蛋白的表达

将 PAP 突变蛋白改造成在单子叶植物中组成型地表达。苇草(*Agrostis plustris*, Huds.)是一种草皮，用在高尔夫球场、航路、球场和草坪，并被用作用于转化的单子叶植物。为了构建单子叶植物的表达载体，将玉米遍在蛋白基因(Toki 等, 《植物生理学》 100:1503-1507(1992))的启动子和第一个内含子克隆到 pMON969 中构建成 NT168。pMON969 用 HindIII 和 BglII 消化去除 CaMV 35S 启动子区。用 HindIII 和 BamHI 消化含有遍在蛋白启动子和第一个内含子的质粒 pAHC20(Toki 等, 1992), 分离出 2016bp 的 HindIII/BamHI 片段, 将其与 pMON969 的 HindIII/BglII 片段连接成 NT168。用 BglII 和 BamHI 消化 NT144 和 NT145, 分离出编码突变型 PAP 的 cDNA 片段, 将其克隆到 NT168 的 BamHI 位置。然后, 将含有突变型 PAP 的 cDNA 的单子叶表达载体和含有可选择标记 bar 基因的 pSLI2011(Hartmann 等, 1994 《生物技术》 12:919-923)一起用于转化。用两种不同的方法转化草皮, 使用粒子枪的粒子轰击转化法和前文所述的原生质体转化法。

由 7 种苇草栽培品种经表面灭菌的种子开始成胚发生愈伤组织培养物:
“Cobra”、“Emerald”、“PennLinks”、“Providence”、“Putter”、“Southshore”和“SR1020”, 按照 Hartmann 等在《生物技术》 12:919-923(1994)中所述将其用于粒子轰击(biolytic)转化。愈伤组织起始培养基是 MS 基本培养基和 MS 维生素类, 其中补充以 100mg/L 肌-肌醇, 3%蔗糖, 以及用于 MSA2D 的 150mg/L 天冬酰胺和 2mg/L 2,4-D 或者用于 MMS 的 500mg/L 酪蛋白水解物, 6.6mg/L 麦草畏(dicamba)和 0.5mg/L 6-BA。用 0.2% Phytigel^R(Sigma)固化培养基。在暗环境中于 25 °C 培养 4 至 6 周后, 挑选出胚发生愈伤组织转移到新鲜培养基上。将 1 至 2g 愈伤组织加到含有 50ml 液体培养基的 250ml 烧瓶中制备成悬浮液, 在暗环境中于 25 °C 以 120rpm 的速度振荡培养, 并且每周传代 2 次。

将 1ml 细胞悬浮液放在含加了 0.4M 甘露醇的 MSA2D 培养基的培养板中的 5.5cm 滤片上, 制备成用于粒子轰击的培养板。在粒子轰击前 20 小时制备培养板并保存在暗环境中。金颗粒(Gold particles)的制备为在 100%乙醇中于 95 °C 加热 30 分钟, 粗略离心, 然后重悬在新鲜乙醇中。颗粒在水浴中经超声波处理 10 至



30 分钟，用无菌蒸馏水洗涤 3 次，然后重悬在水中。含有 50 μ l(5mg)金颗粒悬浮液，10 μ g 靶 DNA、50 μ l 2.5M CaCl₂ 和 20 μ l 0.1M 亚精胺的 DNA 样品经涡流搅拌、离心并重悬在乙醇中。乙醇洗涤总共重复 3 次。最后将沉淀重悬在 30 μ l 乙醇中，每次射击使用 5 μ l DNA 溶液。使用 Bio-Rad PDS-1000, He Biolistic Delivery System，在 1100psi 进行轰击。轰击实验后的愈伤组织在含有 2 或 4mg/l 用于选择的双丙氨酰磷(bialaphos)的 MSA2D 培养板上培养 3 至 4 天以进行轰击后的选择，然后不转移，继续培养 8 周。8 周的平板选择后，将愈伤组织转移到不含激素的 MS 培养基上进行再生。在 2 至 8 周内开始再生。将枝条转移到含有 MS 培养基的 plantcon 中，在 2 至 4 周后开始生根。

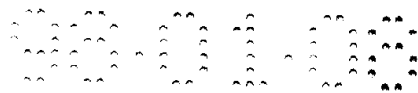
10 至于原生质体转化，在传代 4 天后分离原生质体。与培养基(加有 5%甘露醇的 MSA2D 或 MMS)中过滤灭菌的酶溶液，于 28 $^{\circ}$ C，以 50rpm 振荡培养细胞 4 小时，酶溶液中含有 1%纤维素酶 Onozuka RA(Yakult Pharmaceutical Co. LTD)，0.1%溶果胶酶 Y-23(Seishin Pharmaceutical Co. LTD)，和 0.1%MES(2-[N-吗啉基]乙烷-磺酸)(Sigma)。约每 1g 新鲜重量的悬浮培养物用 10ml 酶溶液处理。使原生质体

15 滤过 Miracloth 并用含有 5%甘露醇的培养基洗涤两次。甘露醇被用作渗透压稳定剂。使用饲养层系统培养原生质体(Rhodes 等，1988)。洗涤、过滤后的原生质体被移液到放置在已分散于 5%甘露醇培养基中的一悬浮细胞饲养层上的黑色硝酸纤维素薄膜上(Lee 等，1989)。1 周后，将有原生质体的薄膜转移到 3%甘露醇培养板上的新鲜饲养层上。在分离后 2 周从饲养层取下原生质体。将分离后 3 周时

20 的可见集落数除以平板培养的原生质体的总数，如此计算出平板培养效率。将愈伤组织衍生的原生质体放在不含激素或含有 1mg/L 6-BA 或细胞分裂素的 MS 培养基上进行植物的再生。4 至 5 周后，将枝条转移到不含有激素的 MS 培养基的 Plantcon^R 上生根。按照 Negrutiu 等(1987)所述的方法利用 PEG 法，或使用 Gene-Pulster(Bio-Rad)在 170V/cm 利用电穿孔转化原生质体。在 PEG 实验中，将新鲜

25 分离的原生质体以 1 \times 10⁷ 原生质体/ml 的密度重悬在含有 15mM MgCl₂ 和 0.1% MES 的 5%甘露醇溶液中。取约 0.3ml 原生质体与 20 至 40 μ g 质粒 DNA 和 13%PEG 孵育 10 至 15 分钟，离心后逐步稀释并重悬在含有 5%甘露醇的培养基(pH5.8)中。在电穿孔实验中，原生质体以 5 \times 10⁶/ml 的密度重悬在冷的过滤灭菌的电穿孔缓冲液中，其中含有 5.2g/L KCl，0.835g/L CaCl₂，0.976g/L MES 和 5%甘露醇，

30 pH5.8。将约 0.8ml 原生质体与 20 μ g DNA 通过倒转混合，在 170V/cm 进行电穿孔，并在冰上放置 15 分钟，然后用含有 5%甘露醇的培养基稀释至 3ml 总体积。在分离和转化原生质体 16 天后，用 4mg/L bialaphos 进行选择。在无激素、含 6-



BA 或细胞分裂素的 MS 培养基上的抗性集落如前文所述。将枝条转移到 Plantcon^R 上生根。用商品名为 Herbiace^R(Meiji Seika Kaishya, LTD.)的市售 bialapho 制剂用于暖房内的除草剂实验。Herbiace^R 的除草剂比率使用对照植株, 并以市售品的 0.75 磅 AI/公顷(1 倍于大田比率)为基准确定 Herbiace^R 的除草剂比率。以每片地
5 块 120ml 的比率用画笔对所有露出地面的分蘖都施以除草剂。地块的面积为 0.1431m², 其上有 96 或 24 株植物。

实施例 6

转基因烟草植株内 PAP 突变蛋白的表达和对病毒感染的抗性

A. 转基因烟草中 PAP 突变蛋白的表达

10 为了确定 PAP 的酶活性是否是其抗病毒活性所必需的, 如实施例 2 所述, 将编码活性位点突变蛋白 NT123-2 的 cDNA 克隆到去除了野生型 PAP 插入片段的 pMON8443 植物表达载体中, 形成 NT144。同样, 如实施例 2 所述, 将编码 C 末端缺失突变蛋白的 NT124-3 克隆到 pMON8443 形成 NT145 和 NT147。突变型
15 PAP 的表达由增强的 CaMV35S 启动子驱动。将质粒 NT144、NT145 和 NT147 迁移到根瘤土壤杆菌中用于转化到烟草中。根据每片叶盘获得的转基因植株数, 红花烟草的转化频率通常在 10 至 12%之间(Lodge 等, 1993)。用 NT144 的转化频率为 13%, 使用 NT145 为 11%。表达活性位点突变蛋白或 C 末端缺失突变蛋白的转基因植株表型正常。它们与野生型的生长速度相同, 不表现出缺氮症或叶斑, 这表明突变型 PAP 的表达对转基因烟草是无毒的。这些结果与以前的报道
20 (Lodge 等, 1993)相反, 其中报道用含有 PAP 的载体(pMON8443)时, 红花烟草的转化频率下降至 0.7%, 使用含 PAP-v 的载体(pMON8442)时, 下降至 3.7%, 两种突变蛋白都具有酶活性(Lodge 等, 1993)。Lodge 等没有回收到表达高水平 PAP 的转基因植物, 而且, 表达高水平 PAP-v 的转基因植物表现出生长抑制、缺氮症和叶斑。

25 先用 ELISA 对再生的转基因植物进行新霉素磷酸转移酶(NPTII)表达的分析。然后用 ELISA 和免疫印迹对 NPTII 阳性植株进行 PAP 表达的分析。利用 ELISA 测定, 11 种不同的转基因植物表达可测水平的活性位点突变蛋白。表达活性位点突变型 PAP 的植株产生一种与成熟 PAP 共迁移的 29KD 蛋白质, 这表明在转基因植物中, 活性位点突变型 PAP 被完全加工成了成熟形式(数据未显示)。转基因
30 植物表达活性位点突变蛋白的水平明显高于表达 PAP 或 PAP-v 的植株。在野生型烟草或表达 β -葡糖醛酸酶的烟草中检测不到对应于 PAP 的条带。C 末端缺失突变蛋白的表达水平明显低于活性位点突变蛋白。



B. 转基因烟草内活性位点突变蛋白的抗病毒活性

为了确定表达活性位点突变型 PAP 的转基因系是否抗病毒感染, 用 PVX 接种转化的植株系的后代。用 ELISA 在自体受精的后代中筛选 PAP 的存在。转基因植株系后代中 PAP 水平随植株年龄和生长条件而不同。 PAP 水平的差异程度与以前表达 PAP 或 PAP-v 的转基因系的有关报道相近(Lodge 等, 1993)。各取表达活性位点突变型 PAP(144-1 和 144-7)、 PAP-v(26139-19)、 PAP(33617-11)的 10 株转基因系后代和 10 株非转化烟草植株用 1 μ g/ml PVX 接种。在接种后 21 天内每天观察接种叶和系统叶上症状的发展。此外, 为了定量病毒的复制与传播, 在接种后第 12 天取样每棵植株的接种叶和第 1, 2 和 3 片系统叶的叶盘。

10 如表 VII 所示, 表达 PAP-v 或野生型 PAP 的转基因植物在接种后第 9 天在接种叶上不形成任何损伤。相反, 表达活性位点突变蛋白的转基因植物其接种叶上的损伤与对照植株的一样多。对系统叶的 ELISA 显示, 在接种后 12 天, 90%的野生型烟草植株被 PVX 系统性地感染, 但分别只有 30%和 40%表达 PAP 或 PAP-v 的转基因植物表现出系统性 PVX 感染。相反, 表达活性位点突变蛋白的植株 100%地表现出 PVX 感染(表 VII)。在接种后 21 天评价植株时, 获得的结果相近。

表 VII

植株系	表达的 PAP	PAP 水平 (ng/mg) ^a	损伤数 ^b	表现出系统性感染的植株% ^c
WT		0	77+/-12	90
26139-19	PAP-v	5.6+/-2.6	0**	30**
33617-11	PAP	0.6+/-0.02	0**	40*
144-1	E176V	43.8+/-4.8	78+/-16	100
144-7	E176V	46.2+/-5.6	72+/-11	100

a 从每系 20 株植株上各取 4 片叶盘, 用 ELISA 定量 PAP 水平。给出平均值+/-标准偏差。

20 b 每系 10 棵植株, 每株在 2 片叶上接种 50 μ l 1 μ g/ml PVX。在接种后第 9 天计数损伤数。给出平均值+/-标准偏差。

c 在接种后第 12 天从第 1, 2 和 3 系统叶上取样 3 片叶盘, 利用 ELISA 定量病毒抗原水平。用 BCA 试剂盒(Pierce)定量每份提取物中的总蛋白量。

**与野生型 1%的水平有显著不同

*与野生型 5%的水平有显著不同。

25 为了确定表达高水平的活性位点突变蛋白的转基因植物是否也易被 PVX 感



染, 用 0.5 μ g/ml PVX 接种表达高水平活性位点突变型 PAP 的转基因系 144-12 的纯合后代(R2 代)。如以下表 VIII 所示, 产生高水平活性位点突变蛋白的转基因系在其接种叶上的损伤数与野生型烟草植株的相同, 但是表达 PAP-v 或 PAP 的转基因植株后代其损伤数明显较低。对系统叶的 ELISA 分析显示, 接种 21 天后, 90%野生型烟草植株和 100%表达活性位点突变蛋白的转基因植株被 PVX 感染。相反, 表达 PAP-v 或 PAP 的转基因植株在其接种叶上的损伤较少, 而且植株中被 PVX 系统性感染的百分比较低。

在其它实验中, 对 7 个表达活性位点突变蛋白的不同转基因系的后代分析了其对 PVX 感染的易感性; 其中对 PVX 都没有抗性(数据未显示)。

10

表 VIII

表达 C 末端缺失突变蛋白(W237 终止子)的转基因烟草植株对 PVX 感染的易感性

植株系	表达的 PAP	PAP 水平 (ng/mg) ^a	损伤数 ^b	表现出系统性感染的植株% ^c	
				12 天后	21 天后
WT		0	24+/-15	90	90
26139-19	PAP-v	9.6	1+/-2**	10**	30**
33617-11	PAP	1.6	11+/-4**	10*	40*
147-12	E176V	1500	23+/-13	100	100
145-19	W237 终止子	4.5	12+/-10**	20**	60
144-13	W237 终止子	4.4	6+/-4**	30**	60

a 在原代转基因植株中利用 ELISA 定量 PAP 水平

b 在每 8 至 10 棵各转基因系纯合后代(R2 代)的植株中, 每株在两片叶上接种以 0.5 μ g/ml PVX 50 μ l。在接种后第 12 天计数损伤数。显示平均值+/-标准偏差。

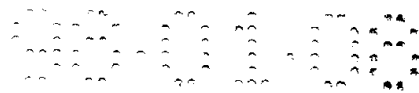
c 在接种后第 12 天, 从各植株的第 1 和第 2 系统感染叶上取两片叶片, 并在接种后第 21 从第 3 和第 4 系统感染叶上取两片叶盘。用 ELISA 定量病毒抗原的水平。用 BCA 试剂盒(Pierce)定量每份提取物中的总蛋白量。

**与野生型 1%的水平有显著不同

*与野生型 5%的水平有显著不同。

C. 转基因烟草内 C 末端缺失突变蛋白的抗病毒活性

为了确定表达 C 末端缺失突变蛋白的转基因系是否抗病毒感染, 用 0.5 μ g/ml PVX 接种表达 C 末端缺失突变蛋白(W237 终止子)的转基因系 145-13 和 147-19



的纯合后代(R₂代), 在接种后第 12 天计数损伤数。如以上表 VIII 所示, 来自 145-13 和 147-19 转基因系的植株在其接种叶上的损伤数明显少于野生型植株。在接种后第 12 天, 分别只有 20%和 30%来自转基因系 147-19 和 145-13 的植株表现出系统性症状以及经 ELISA 检测含有 PVX 抗原, 但是 90%对照植株被 PVX 感染。接种后 21 天, 来自 147-19 和 145-13 系的植株中表现出系统性症状的百分比有所上升。正如以前实验中的观察结果, 表达 PAP-v 和 PAP 的转基因系的后代能免受 PVX 感染。表达 C 末端缺失突变蛋白(W237 终止子)、 PAP 或 PAP-v 的被感染植株与被感染的野生型或表达活性位点突变蛋白(E176V)的转基因植株相比, 表现出较轻的症状。在接种后第 21 天, 使用 ELISA 来定量转基因植株和野生型植株中的病毒抗原水平。来自 147-19、 145-13 和 33617-11 系的植株中的 PVX 抗原水平低于野生型植株。在接种后 4 周进行评价时, 被感染植株的百分比没有改变。

在其它实验中, 总共分析了 6 个不同的表达 C 末端缺失突变蛋白的转基因系对 PVX 感染的易感性, 其中 4 个系表现出对 PVX 感染的抗性(数据未显示)。

实施例 7

15 表达 PAP 和 PAP 突变蛋白的转基因植物内的抗真菌性的分析

使用的是表达 PAP、 PAP 突变蛋白的转基因烟草系的苗和野生型烟草的苗。在出苗 4 周后, 将苗转移到培育室中, 于 25 °C、 80%相对湿度和 16 小时光照周期下种植在无菌土中。利用三亲本交配法将含有嵌合 PAP 基因的重组构建物引入根瘤土壤杆菌。含有经修饰 PAP 基因的土壤杆菌被用于转化红花烟草。使耐卡那霉素的 R₂ 代转基因植株自体授粉, 并在实验中使用 R₃ 代的苗。使用的是来自 33617(表达野生型 PAP)、 NT144(表达活性位点突变型 PAP)、 NT145 和 NT147(都表达 C 末端缺失突变型 PAP)系的转基因植物。

将 4 周龄的转基因苗和对照苗移植到无菌土中, 用由土壤携带的真菌病原体茄属丝核菌接种。对病害症状的发展进行 2 周的观察, 计算苗死亡的比率。将在真菌感染后存活的植株移植到单个盆中, 并组织取样以进行以后的分析。

在用茄属丝核菌接种后, 对照烟草苗迅速被真菌病原体侵害。病害发展迅速, 在接种后 6 天中感染了 30%以上的对照苗。相反, 转基因系¹对感染的易感性明显较低。接种后 6 天, 只有 9.5%来自野生型 PAP 系的苗、约 20%来自 C 末端截短的 PAP 系的苗和 23%来自活性位点突变蛋白系的苗被感染。在以下表 IX 中列出了在不同时刻的存活苗数量。全部转基因系均表现出延迟了病症的出现以及较低的死亡率。

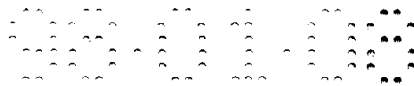


表 IX

被茄属丝核菌感染的转基因烟草 PAP 系内的病害进展

烟草系	接种后存活的苗数			
	第 0 天(%)	第 6 天(%)	第 10 天(%)	第 14 天(%)
野生型	40(100)	27(67.5)	25(62.5)	25(62.5)
33617-11	42(100)	38(90.5)	35(83.3)	34(81.0)
145-15-3	37(100)	29(78.4)	26(70.3)	23(62.2)
147-19-25	39(100)	32(82.1)	29(74.4)	28(71.8)
144-12-3	39(100)	30(76.9)	29(74.4)	29(74.4)

在使用不同的另一茄属丝核菌菌株的实验中，病害发展迅速，在 5 天内杀死了大部分幼苗。以下表 X 列出了在感染土壤中种植 2 周后存活的苗数。值得注意的是，虽然对照植物在评价的时候并没有死亡，但是它们被极度矮化，而且表现出十分严重的病症。相反，表达截短的 PAP 的转基因系的幼苗表现出的组织损伤少得多。

表 X

在茄属丝核菌抗性测试中具有不同的

PAP 基因的转基因烟草系的存活

烟草系(Samsun)	种植的苗数	接种 14 天后 存活苗的数量	接种 14 天后 存活苗的%
对照(n)	20	2	10
对照(N)	20	0	0
33617-11	20	8	40
144-12	20	5	25
145-15	20	1	5
147-19	20	5	25

对存活植株的分析

进行转基因系的总细胞蛋白分析，即用 MiniPROTEAN II 电泳槽(Bio-Rad)在 10%SDS-PAGE 上分离蛋白质样品，按制造商的说明使用 Bio-Rad 半干电泳转移器将蛋白质转移到硝酸纤维素薄膜上。使用 PAP IgG 或 PR1a 单克隆抗体进行 Western 印迹分析。使用 DuPont Renaissance 试剂盒通过增强化学发光进行检测。

对转基因植株细胞提取物的 Western 印迹分析显示，PAP 基因在全部经真菌感染后存活的植株中都表达。各植株产生的 PAP 的量不同。此外，由同一植株分



离质外体液，通过硝酸银染色非变性凝胶来分析胞外蛋白。在表达商陆抗病毒蛋白基因的植株中检测到了病理相关蛋白(PR)的表达。Western 印迹分析还显示，在存活植株内，PR1a 的表达水平增高。

在表达商陆抗病毒蛋白的转基因烟草系中观察到真菌病症的明显减少。如表 IX 和 X 所示，PAP 转基因系在被茄属丝核菌感染后表现出较高的存活苗百分比。此外，在转基因 PAP 系中，以幼苗死亡率为代表的病害进程明显较慢。表达野生型 PAP 的转基因系 33617 以及含有 PAP 突变形式即 NT144-12(表达活性位点突变型 PAP)、NT145-15 和 NT147 - 19(表达缺失了 25 个 C 末端氨基酸的 PAP 截短形式)的转基因烟草系都表现出对真菌感染的抗性。

突变型 PAP 基因在烟草内的表达被证明绝对没有可测的表型影响，但却意外可造成了几种病理相关蛋白的组成型表达。已知在被诱导的基因中有些具有抗真菌活性。基于这一发现，而且不限于任何特定的作用理论，申请人认为表达本发明突变型 PAP 基因的烟草系对茄属丝核菌感染的抗性可以用宿主防御基因的作用来解释，而表达 PAP 的植株内对真菌感染的抗性可能是由于在转基因烟草中组成型表达的 PAP 转基因和许多宿主基因的双重作用。申请人还认为，对这些植物防御基因的诱导还具有保护转基因植株抗其它病原体例如细菌性病原体的作用。

实施例 8

通过在酵母中的染色体诱变和选择分离新的 PAP 突变蛋白

A. PAP 突变蛋白的分离

利用染色体诱变和选择来分离允许细胞在 PAP 存在下生长的酵母突变株。酿酒酵母内 PAP 的组成型表达一般是致死性的。所以，将 PAP 基因置于半乳糖诱导型 GAL1 启动子的调控下。这能够使得携带了含 PAP 基因的质粒的细胞在 PAP 表达被抑制的葡萄糖上正常生长，但在 PAP 被表达的半乳糖上杀死已生长的细胞。我们还首次利用诱导型 PAP 表达系统和 PAP 对正常酵母细胞的毒性来分离了能够在 PAP 存在下生长的突变株。带有含野生型 PAP 基因质粒(NT123)的酵母细胞被培养到对数期早期，pH7.0，密度为 1×10^8 细胞/ml。取 3 份 1ml 的培养物用于诱变。用 5 μ l 或 25 μ l 乙基甲磺酸(EMS)进行诱变。保留一份不诱变的作为检测自发突变频率的对照。加入 EMS 后，细胞在 30 $^{\circ}$ C 培养 1 小时，加以轻微的振荡。加入 5% 硫代硫酸钠终止诱变。然后在 30 $^{\circ}$ C 将细胞平板培养在含有 2% 葡萄糖的尿嘧啶缺陷培养基上。根据平板上由诱变细胞生长出的集落数与非诱变的



对照之比，5 μ l 和 25 μ l EMS 分别杀死了 35%和 98%细胞。这些集落被影印到含有 2%半乳糖的尿嘧啶缺陷培养基上平板培养，并筛选出在 PAP 存在下能够生长的集落。筛选了约 13,500 个集落，获得 9 个能够在半乳糖培养基上生长的集落。

对突变株进行了测试，以检验突变是染色体连锁的还是质粒连锁的。在突变株上进行质粒的分离，即在非选择性培养基(YEPD)上将细胞传代约 50 代，将它们平板培养在 YEPD 上，然后影印平板培养这些因丢失了质粒而不能在尿嘧啶缺陷培养基上生长的细胞。用新鲜的 NT123 质粒转化这些经质粒分离的细胞，并检测它们在含有 2%半乳糖的尿嘧啶缺陷培养基上生长的能力。保留了在半乳糖培养基上生长能力的突变株是染色体突变株，而不能在半乳糖上生长的突变株带有质粒携带的突变。

进一步定性这些质粒携带的突变体，即对取自表达这些质粒的细胞的全部细胞提取物进行免疫印迹分析。该分析揭示，7 个质粒突变株中有 2 个表达截短的 PAP。另外 5 个不表达任何 PAP 蛋白。对表达截短的 PAP 的 2 个突变株进行测序，以确定突变的位置。一个突变株，NT185 在 C 末端具有一个点突变，即将 Lys210(AAG)变成了终止密码子(TAG)，造成约 3.5KD 的缺失。另一突变株，NT187 在 N 末端将 Try16(TAC)变成了终止密码子(TAG)，从而能在 Met39 处重新起始，由此形成一个 24.8KD 的蛋白质。

B. 大肠杆菌表达载体的构建

为了在大肠杆菌细胞内表达 N 末端缺失的成熟 PAP，用 BstYI 和 HindIII 限制酶消化 NT187 质粒 DNA，并用 Gene Clean 试剂盒(Bio 101)纯化该 830bp 的片段。将纯化的片段连接到经 BamHI 和 HindIII 消化后用碱性磷酸酶处理过的大肠杆菌表达载体 pQE31(QIAGEN Inc.)上。形成的质粒 NT190 在大肠杆菌表达载体 pQE31 内含有 N 末端缺失突变型 PAP。

C. 大肠杆菌内 PAP 突变蛋白的表达

从大肠杆菌 DH5 α 细胞中分离 NT190，并转化到表达宿主，大肠杆菌 M15(pREP4)中。含有 NT190 的 M15 细胞在 50ml 含有 2%葡萄糖、100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中于 35 $^{\circ}$ C 通宵剧烈振荡培养。第二天，接种大量培养物(500ml LB 培养基，其中含 2%葡萄糖、100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素)，并在 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养，直至 A₆₀₀ 达 0.9。加入最终浓度为 2mM 的 IPTG，培养物在 37 $^{\circ}$ C 培养 5 小时。在 4,000Xg 离心 10 分钟以收集细胞，保存在-70 $^{\circ}$ C。

D. N 末端缺失的 PAP 的纯化



融解 1g 大肠杆菌细胞重悬在 5ml 缓冲液 A(6M 盐酸胍, 0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl, pH8.0)中, 并在室温下搅拌 1 小时。大肠杆菌裂解物在 4 °C 以 10,000xg 离心 15 分钟, 并收集上清液。加入预先在缓冲液 A 中平衡过的 50 % Ni-琼脂糖树脂浆(QIAGEN Inc.)2ml。在室温下搅拌 45 分钟后, 将树脂小心地上样在 poly-prep 色谱柱(Bio-Rad)上。柱用 20 倍柱体积的缓冲液 A 和 10 倍柱体积的缓冲液 B(8M 尿素、0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl, pH8.0)洗涤。用 20 倍柱体积的缓冲液 C(8M 尿素、0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl, pH6.3)洗出不与树脂结合的蛋白质。最后, 用含有 250mM 咪唑的缓冲液 C 洗脱结合蛋白, 并用 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析进行分析。

10 E. N 末端缺失的 PAP 的抗病毒活性

为了确定 N 末端缺失的 PAP 是否具有抗病毒活性, 在有或无纯化自大肠杆菌的 N 末端缺失突变蛋白存在下, 用 1µg/ml PVX 接种野生型烟草植株。利用 ELISA 和 SDS-PAGE 测定 PAP 浓度。在有或无 1µg/ml PVX 存在下用 15ng/µl 和 1.5ng/µl 突变型 PAP 涂在烟草叶上。如表 XI 所示, 在 1.5 或 15ng/µl N 末端缺失的 PAP 存在下接种 PVX 的烟草植株与无突变型 PAP 存在下接种 PVX 的烟草植株相比, 在其接种叶上表现出较少的损伤。而且, 如表 XII 所示, 在 15ng/µl 突变型 PAP 存在下接种 PVX 的植株都不表现出 PVX 系统性症状, 在 1.5ng/µl 突变型 PAP 存在下接种 PVX 的植株只有 13%表现出系统性 PVX 症状, 而在单纯缓冲液存在下接种 PVX 的植株 100%地表现出系统性 PVX 症状。以上结果表明, 外源地施用 N 末端缺失的 PAP 可保护烟草抗 PVX 感染, 因而是抗病毒的。

表 XI

外源性施用了 N 末端缺失的 PAP 的烟草植株对 PVX 的易感性

施用的蛋白质 ^a (ng/µl)	PVX(µg/ml)	平均损伤数 ^b
无	1	20+/-16
PAP(1.5)	1	2+/-2
PAP(15)	1	2+/-2

a 在 1.5 或 15ng/µl N 末端缺失的 PAP 存在下用 50µl(1µg/ml)PVX 接种每棵植株的 2 片叶。在仅有缓冲液存在下(“无”)用 PVX 接种 12 棵植株, 在 50µl 1.5 或 15ng/µl 突变型 PAP 存在下用 PVX 接种 8 棵植株。

b 在接种后第 7 天计数损伤数。给出平均值+/-标准偏差。

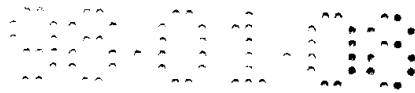


表 XII

在外源性施用的 N 末端缺失的 PAP 存在下，
表现出系统性病症的植株的百分比

施用的蛋白质 ^a (ng/μl)	PVX (μg/ml)	表现出系统性病症的植株 的百分比 ^b
无	1	100
PAP(1.5)	1	13
PAP(15)	1	0

5 a 在 1.5 或 15ng/μl N 末端缺失的 PAP 存在下用 50μl(1μg/ml)PVX 接种每棵植株的
2 片叶。在仅有缓冲液存在下(“无”)用 PVX 接种 12 棵植株，在 50μl 1.5 或 15ng/μl
突变型 PAP 存在下用 PVX 接种 8 棵植株。

b 在接种后第 11 天评价系统性症状。

在此将申请人于 1995，7，11 申请的未审定的专利申请 08/500,611 和
500,694 全文作为参考。


10

工业实用性

当本发明的突变型 PAP 在植物内被表达时可提供对病毒和真菌的广谱抗性。
它们只需要很少数量的转基因就可以有效地提供这种抗性。而且，突变型 PAP 基
15 本上没有植物毒性和细胞毒性，因而与使用野生型 PAP 相比具有突出而且超乎意
料的优越性。能够表达本发明突变型 PAP 的转基因植物对多种病原体具有明显更
强的抗性，其中包括病毒、真菌、细菌、线虫和害虫，所以具有相当高的作物产
量。

20 说明书中提及的所有文献和专利申请都代表本发明所属领域技术人员的研究
水平。所有文献和专利申请都作了相同程度的引用，都具体、单独进行了参考性
引述。

对本领域技术人员来说，本发明的多种修改形式是显而易见的。这些修改都
在后文权利要求的范围之内。



序列表

(1) 一般信息:

5

(i) 申请人: Rutgers, The State University
Piscataway, NJ 08855

(ii) 发明名称: 商陆抗病毒蛋白突变体

10

(iii) 序列数量: 2

(iv) 通讯地址:

15

(A) 地址: Lerner, David, Littenberg, Krumholz & Mentlik

(B) 街道: 600 South Avenue West

(C) 城市: Westfield

(D) 州: NJ

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 07090-1497

20

(v) 计算机可读形式:

(A) 记录介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

25

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, #1.25 版

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号: PCT

(B) 申请日: 11-7-1996

30

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: US 08/500,611

(B) 申请日: 11-7-1995

35

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: US 08/500,694



(B) 申请日: 11-7-1995

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: Foley, Shawn P.

5

(C) 参考/卷宗号: OCIRS 3.4-034CIP

(ix) 电讯信息:

(A) 电话: 908-654-5000

(B) 传真: 908-654-7866

(C) 电传: 139-125

10

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

15

(A)长度: 1379 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构:线性

20

(ix) 特征:

(A)名称/符号: CDS

(B)位置: 225..1163

25

(ix) 特征:

(A)名称/符号: 突变

(B)位置: 置换(233, "a")

30

(ix) 特征:

(A)名称/符号: 突变

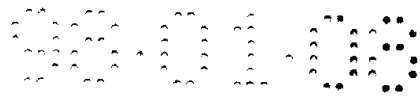
(B)位置: 置换(349, "g")

35

(ix) 特征:

(A)名称/符号: 突变

(B)位置: 置换(435, "c")



(xi) SEQ ID NO:1 的序列描述:

CTATGAAGTC GGGTCAAAGC ATATACAGGC TATGCATTGT TAGAAACATT GATGCCTCTG 60
ATCCCGATAA ACAATACAAA TTAGACAATA AGATGACATA CAAGTACCTA AACTGTGTAT 120
5 GGGGGAGTGA AACCTCAGCT GCTAAAAAAA CGTTGTAAGA AAAAAAGAAA GTTGTGAGTT 180
AACTACAGGG CGAAAGTATT GGAAGTAGCT AGTAGGAAGG GAAG ATG AAG TCG ATG 236
Met Lys Ser Met
1
CTT GTG GTG ACA ATA TCA ATA TGG CTC ATT CTT GCA CCA ACT TCA ACT 284
10 Leu Val Val Thr Ile Ser Ile Trp Leu Ile Leu Ala Pro Thr Ser Thr
5 10 15 20
TGG GCT GTG AAT ACA ATC ATC TAC AAT GTT GGA AGT ACC ACC ATT AGC 332
Trp Ala Val Asn Thr Ile Ile Tyr Asn Val Gly Ser Thr Thr Ile Ser
25 30 35
15 AAA TAC GCC ACT TTT CTG AAT GAT CTT CGT AAT GAA GCG AAA GAT CCA 380
Lys Tyr Ala Thr Phe Leu Asn Asp Leu Arg Asn Glu Ala Lys Asp Pro
40 45 50
AGT TTA AAA TGC TAT GGA ATA CCA ATG CTG CCC AAT ACA AAT ACA AAT 428
20 Ser Leu Lys Cys Tyr Gly Ile Pro Met Leu Pro Asn Thr Asn Thr Asn
55 60 65
CCA AAG TAC GTG TTG GTT GAG CTC CAA GGT TCA AAT AAA AAA ACC ATC 476
Pro Lys Tyr Val Leu Val Glu Leu Gln Gly Ser Asn Lys Lys Thr Ile
70 75 80
25 ACA CTA ATG CTG AGA CGA AAC AAT TTG TAT GTG ATG GGT TAT TCT GAT 524
Thr Leu Met Leu Arg Arg Asn Asn Leu Tyr Val Met Gly Tyr Ser Asp
85 90 95 100
CCC TTT GAA ACC AAT AAA TGT CGT TAC CAT ATC TTT AAT GAT ATC TCA 572
Pro Phe Glu Thr Asn Lys Cys Arg Tyr His Ile Phe Asn Asp Ile Ser
30 105 110 115
GGT ACT GAA CGC CAA GAT GTA GAG ACT ACT CTT TGC CCA AAT GCC AAT 620
Gly Thr Glu Arg Gln Asp Val Glu Thr Thr Leu Cys Pro Asn Ala Asn
120 125 130
TCT CGT GTT AGT AAA AAC ATA AAC TTT GAT AGT CGA TAT CCA ACA TTG 668
35 Ser Arg Val Ser Lys Asn Ile Asn Phe Asp Ser Arg Tyr Pro Thr Leu
135 140 145



GAA TCA AAA GCG GGA GTA AAA TCA AGA AGT CAG GTC CAA CTG GGA ATT 716
Glu Ser Lys Ala Gty Val Lys Ser Arg Ser Gln Val Gln Leu Gly Ile
150 155 160

CAA ATA CTC GAC AGT AAT ATT GGA AAG ATT TCT GGA GTG ATG TCA TTC 764
5 Gln Ile Leu Asp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Ser Gly Val Met Ser Phe
165 170 175 180

ACT GAG AAA ACC GAA GCC GAA TTC CTA TTG GTA GCC ATA CAA ATG GTA 812
Thr Glu Lys Thr Glu Ala Glu Phe Leu Leu Val Ala Ile Gln Met Val
185 190 195

10 TCA GAG GCA GCA AGA TTC AAG TAC ATA GAG AAT CAG GTG AAA ACT AAT 860
Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Gln Val Lys Thr Asn
200 205 210

TTT AAC AGA GCA TTC AAC CCT AAT CCC AAA GTA CTT AAT TTG CAA GAG 908
Phe Asn Arg Ala Phe Asn Pro Asn Pro Lys Val Leu Asn Leu Gln Glu
15 215 220 225

ACA TGG GGT AAG ATT TCA ACA GCA ATT CAT GAT GCC AAG AAT GGA GTT 956
Thr Trp Gly Lys Ile Ser Thr Ala Ile His Asp Ala Lys Asn Gly Val
230 235 240

20 TTA CCC AAA CCT CTC GAG CTA GTG GAT GCC AGT GGT GCC AAG TGG ATA 1004
Leu Pro Lys Pro Leu Glu Leu Val Asp Ala Ser Gly Ala Lys Trp Ile
245 250 255 260

25 GTG TTG AGA GTG GAT GAA ATC AAG CCT GAT GTA GCA CTC TTA AAC TAC 1052
Val Leu Arg Val Asp Glu Ile Lys Pro Asp Val Ala Leu Leu Asn Tyr
265 270 275

GTT GGT GGG AGC TGT CAG ACA ACT TAT AAC CAA AAT GCC ATG TTT CCT 1100
Val Gly Gly Ser Cys Gln Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Ala Met Phe Pro
30 280 285 290

CAA CTT ATA ATG TCT ACT TAT TAT AAT TAC ATG GTT AAT CTT GGT GAT 1148
Gln Leu Ile Met Ser Thr Tyr Tyr Asn Tyr Met Val Asn Leu Gly Asp
295 300 305

CTA TTT GAA GGA TTC TGATCATAAA CATAATAAGG AGTATATATA TATTACTCCA 1203
35 Leu Phe Glu Gly Phe
310



ACTATATTAT AAAGCTTAAA TAAGAGGCCG TGTTAATTAG TACTTGTTGC CTTTGGCTTT 1263
ATGGTGTTGT TTATTATGCC TTGTATGCTT GTAATATTAT CTAGAGAACA AGATGTACTG 1323
TGTAATAGTC TTGTTTGAAA TAAACTTCC AATTATGATG CAAAAAAAAA AAAAAA 1379

5

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

10

(A) 长度: 313 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

15

(xi) SEQ ID NO:2 的序列描述:

Met Lys Ser Met Leu Val Val Thr Ile Ser Ile Trp Leu Ile Leu Ala
1 5 10 15
Pro Thr Ser Thr Trp Ala Val Asn Thr Ile Ile Tyr Asn Val Gly Ser
20 25 30
Thr Thr Ile Ser Lys Tyr Ala Thr Phe Leu Asn Asp Leu Arg Asn Glu
35 40 45
Ala Lys Asp Pro Ser Leu Lys Cys Tyr Gly Ile Pro Met Leu Pro Asn
50 55 60
25 Thr Asn Thr Asn Pro Lys Tyr Val Leu Val Glu Leu Gln Gly Ser Asn
65 70 75 80
Lys Lys Thr Ile Thr Leu Met Leu Arg Arg Asn Asn Leu Tyr Val Met
85 90 95
Gly Tyr Ser Asp Pro Phe Glu Thr Asn Lys Cys Arg Tyr His Ile Phe
30 100 105 110
Asn Asp Ile Ser Gly Thr Glu Arg Gln Asp Val Glu Thr Thr Leu Cys
115 120 125
Pro Asn Ala Asn Ser Arg Val Ser Lys Asn Ile Asn Phe Asp Ser Arg
130 135 140
35 Tyr Pro Thr Leu Glu Ser Lys Ala Gly Val Lys Ser Arg Ser Gln Val
145 150 155 160



Gln Leu Gly Ile Gln Ile Leu Asp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Ser Gly
165 170 175
Val Met Ser Phe Thr Glu Lys Thr Glu Ala Glu Phe Leu Leu Val Ala
180 185 190
5 Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Gln
195 200 205
Val Lys Thr Asn Phe Asn Arg Ala Phe Asn Pro Asn Pro Lys Val Leu
210 215 220
10 Asn Leu Gln Glu Thr Trp Gly Lys Ile Ser Thr Ala Ile His Asp Ala
225 230 235 240
Lys Asn Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Glu Leu Val Asp Ala Ser Gly
245 250 255
Ala Lys Trp Ile Val Leu Arg Val Asp Glu Ile Lys Pro Asp Val Ala
260 265 270
15 Leu Leu Asn Tyr Val Gly Gly Ser Cys Gln Thr Thr Tyr Asn Gln Asn
275 280 285
Ala Met Phe Pro Gln Leu Ile Met Ser Thr Tyr Tyr Asn Tyr Met Val
290 295 300
Asn Leu Gly Asp Leu Phe Glu Gly Phe
20 305 310