



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01820922. X

[43] 公开日 2004 年 3 月 10 日

[11] 公开号 CN 1481391A

[22] 申请日 2001.12.19 [21] 申请号 01820922. X

[30] 优先权

[32] 2000.12.20 [33] KR [31] 2000/78972

[86] 国际申请 PCT/KR01/02204 2001.12.19

[87] 国际公布 WO02/50110 英 2002.6.27

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.19

[71] 申请人 基诺麦因有限公司

地址 韩国庆尚北道浦项市

共同申请人 浦项工科大学校

[72] 发明人 南洪吉 禹惠莲

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司

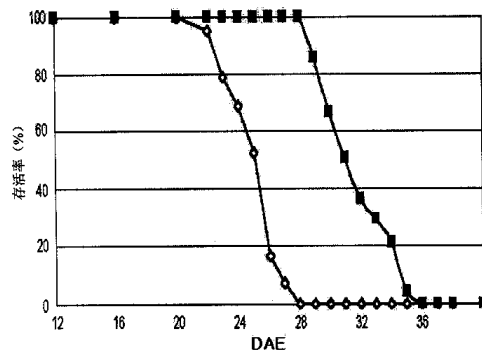
代理人 王宏伟

权利要求书 3 页 说明书 26 页 序列表 14 页
附图 13 页

[54] 发明名称 编码一种可调控拟南芥叶子寿命的 F-盒蛋白的新基因及其突变基因

[57] 摘要

本发明涉及一种调控拟南芥叶子寿命的 ORE9 基因；一种通过抑制与叶子衰老有关的生理和生化改变来延长植物寿命的 ORE9 基因；以及所述基因的利用。根据本发明，可将叶子寿命调控基因 ORE9 及其突变基因 ORE9 用于实际目的，如增加植物的产量和收割前、后的储藏效率，以及进行生物探针来研究植物中的叶子寿命-相关基因和叶子寿命抑制物质。



-
- 1.一种调控植物寿命的蛋白质 ORE9,其氨基酸序列表示为:SEQ ID NO:
2。
5
- 2.根据权利要求1所述的蛋白质 ORE9,其中该蛋白质从拟南芥中分离。
3. 根据权利要求1所述的蛋白质 ORE9, 该蛋白质有一个位于 N-端的
F-盒结构, 并有 18 个富含亮氨酸的重复序列 (LRRs)。
10
- 4.一种编码权利要求1所述蛋白质的基因。
5. 根据权利要求4所述的基因, 该基因的核苷酸序列表示为 SEQ ID
NO: 1。
15
- 6.一种重组载体,该重组载体包含权利要求4所述的延长植物寿命的基
因。
7. 根据权利要求6所述的重组载体, 该重组载体是包含 ORE9 基因的
20 pGTE-ORE9 (登记号: KCTC 0881BP)。

8.一种延长植物寿命的突变型基因 *ore9*, 该基因的核苷酸序列是核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 上第 979 个碱基处的胞嘧啶 (C) 被胸腺嘧啶 (T) 取代后形成的。

5 9.一种由权利要求 8 所述 *ore9* 基因表达的 *ore9* 蛋白, 该蛋白有一个 F-盒结构和 8 个富含亮氨酸的重复序列。

10.一种利用 *ORE9* 基因、*ORE9* 蛋白、*ore9* 基因、*ore9* 蛋白以及它们的片段或衍生物来研究植物中的衰老调控基因或蛋白的方法。

10

11.根据权利要求 10 所述的方法, 该方法通过 DNA 碎片法、蛋白质碎片法、聚合酶联反应 (PCR)、Northern 印渍分析、Southern 印渍分析、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 以及 2-D 凝胶分析等方法来检测基因的序列同源性、杂交反应或蛋白质结合反应。

15

12.一种可增加植物产量和储藏效率的方法, 该方法包括用 *ORE9* 基因的突变型基因来转化植物, 从而延长植物的寿命。

13.根据权利要求 12 所述的方法, 该方法中突变型基因是一种 *ore9* 基因, 该基因的核苷酸序列是核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 上第 979 个碱基处的胞嘧啶 (C) 被胸腺嘧啶 (T) 取代后形成的。

20

14. 根据权利要求 12 所述的方法，该方法中的植物可从粮食作物，包括水稻、小麦、大麦、玉米、大豆、马铃薯、美国木豆树、燕麦和黑黍；蔬菜作物，包括拟南芥、大白菜、萝卜、红辣椒、草莓、西红柿、西瓜、黄瓜、卷心菜、甜瓜、南瓜、韭菜 (stone-leek)、洋葱和胡萝卜；特殊作物，包括人参、烟草植物、棉树、芝麻、甘蔗、甜菜、紫苏、花生和油菜；果树，包括苹果树、梨树、枣树、桃树、猕猴桃树、葡萄树、柑橘果树、柿树、李子树、杏树和香蕉树；花作物，包括玫瑰花、剑兰、大丁草、康乃馨、菊花、百合和郁金香；饲料作物，包括黑麦草、红三叶草、果园草(orchardgrass)、紫花苜蓿、高牛毛草和多年生黑麦草等中选取。

编码一种可调控拟南芥叶子寿命的 F-盒蛋白的新基因及其突变基因

5 技术领域

本发明涉及一种从拟南芥中分离出的叶子寿命调控基因 *ORE9*；一种突变型基因 *ore9*，该基因是 *ORE9* 基因的一种突变型，能通过抑制与叶子衰老有关的生理和生化变化来延长叶子的寿命；以及所述基因的利用。

10 背景技术

抑制植物衰老不仅有其自身重要的科学价值，而且在提高农作物的产量或增进收割后的储藏效率方面有重要的产业价值。所以，为确定植物衰老现象，积极进行了遗传学、分子生物学、生理学、生物化学方面的研究。尤其是利用寿命延长突变体对基因的识别和功能的研究，不仅在确定影响衰老进展速度的信号转移途径上，而且在解决实际问题上，如提高植物的产量和增进果实收获前、后的储藏效率等，都提供了初步的步骤。

在植物的生命过程中，衰老是植物经受的最后一个阶段。衰老的启动可以说是植物生长的一个快速转变点。该期间中，细胞在新陈代谢和细胞结构上经受了巨大变化。在植物的这些变化中，一个典型的可视现象是秋季叶子的颜色变化：秋色，其在叶绿素遭到破坏而其它色素产生时呈现。在秋色期间发生的叶绿素分解导致了叶绿体的破坏、以及合成代谢（如光合作用和蛋白质合成）活性的降低。相反，该期间中，大量的水解酶被诱

导，而分解代谢如核酸裂解或蛋白质水解被激活。(Matile P. *et al.*, In *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinant*, Elsevier 413-440, 1992; Nooden L.D. *et al.*, *Senescence and aging in plant*, *Academic press*, 1988; and Thiman K. V. *et al.*, *The senescence of leaves*, *CRC press*, 85-115, 1980) 。但是，植物衰老可以看作是一个细胞变性的过程，同时可以看作是一个遗传特征，该遗传特征是植物在生长过程中为适应环境而积极获取的，包括冬季里营养物质从生长器官向生殖器官的迁移。衰老包括一系列连续的生化

5 和生理现象，并导致细胞、器官以及整个个体的死亡。(Matile P. *et al.*, In *Crop Photosynthesis: Spatial and temporal Determinant*, Elsevier 413-440, 1992; Nooden L.D. *et al.*, *Senescence and aging in Plant*, *Academic press*, 1988; and Thiman K. V. *et al.*, *The senescence of leaves*, *CRC press*, 85-115, 1980; and Thomas H. *et al.*, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 123:193-219, 1993) 。基因理论解释了衰老的原因，该理论认为基因依据固定的程序引发衰老，而错误堆积理论认为，衰老是由于重复发生在体内的信息传递错误或者蛋白质合成过

15 程中的错误堆积引起的。后来一直认为基因理论（认为衰老由基因决定）是有说服力的。因此，在衰老过程的研究和调控上，有关植物衰老的基因克隆以及所述基因的功能识别是非常重要的。但是，尽管有其科学和实践的重要性，有关植物衰老的大量细节还不清楚。在有关植物衰老的研究中，有关植物生长激素的报告至今一直是研究兴趣的主要领域，分子生物学研

20 究最近也已经开始。

植物生长激素（细胞分裂素）是一类已知能够在生理上延缓衰老的激素。所以，正在进行大量研究，通过调控衰老相关基因来控制细胞分裂素

的分泌，从而延缓衰老。然而，存在的问题是激素使其它生理功能受到了影响。最近，为解决这个问题，将 *IPT* 基因连接在衰老-特异性基因 *SAG12* 的启动子上，从而在一定的衰老阶段调控生长激素，以延缓衰老进程，结果产量增加了 50%以上，而开花时间及其它生理功能等发生了较小或没有发生变化。 (Gan S *et al.*, *Science* 22:1986-1988, 1995) 。另外，对已经延缓了衰老的植物的发育，试验了一种方法，该方法可抑制乙烯（一种在衰老过程中发挥了重要作用的物质）的合成，或者降低细胞（主要在成熟的番茄中）中乙烯的数量， (Klee *et al.*, *Plant Cell*, 3(11):1187-93, 1991; Oeller *et al.*, *Science*, 18:254(5030):437-9, 1991; and Picton *et al.*, *Plant Physiol* 103(4): 1471-1472, 1993) 。

有关延缓衰老的分子生物学研究主要聚焦于相关基因的调控，所述基因具有与衰老过程中发生的生化变化有关的活性，或参与了信号转导系统。对番茄而言，有方法报道，利用反义 DNA 可防止某些基因的表达，所述基因参与了细胞壁的变性，从而预防了番茄的软化，结果提高了番茄的运输和储藏品质。(Giovannoni *et al.*, *Plant Cell* 1(1):53-63, 1989) 。另有报道说，反义 DNA 阻碍了磷脂酶 D 的表达，从而延缓了由植物生长激素引起的衰老 (Fan *et al.*, *Plant Cell* 9(12):2183-96, 1997) 。

但是，能直接控制植物衰老的方法可以通过分子生物学研究获得，所述分子生物学研究对基因（其表达随衰老而改变）进行了分析；还可以通过遗传学研究获得，所述遗传学研究对衰老-相关突变体进行了分离和分析。

根据现有的报道，已知在拟南芥中，乙烯受体的表达在果实成熟期或花朵衰老期中受到控制， (Payton S. *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 31(6):1227-1231,

1996), 而 *clp* 基因的表达在叶子衰老期中受到控制(Nakabayashi K. *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 40(5):504-514, 1999)。最近有报道已利用拟南芥突变株识别出了与叶子衰老过程有关的基因 (Oh S.A. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 30(4):739-54, 1996), 和与其相关的三个基因位点(Oh S.A. *et al.*, *The Plant Journal*, 12(3):527-535, 1997), 以及 *sen1* (一种衰老-相关基因) 的启动子活性(Oh S.A., *et al.*, *Journal of Plant Physiology* 151:339-345, 1997)。但是, 有关直接调控衰老的基因及其功能的分子生物学研究还不充分。

因此, 本发明致力于寻找某些突变体, 该突变体参与了拟南芥中叶子寿命的延长, 并具有许多遗传学优势; 同时本发明致力于识别某些基因, 该基因参与了突变体中寿命的延长。结果本发明发现了一种突变体, 其平均叶子寿命比野生株长大约 27%; 而且本发明以遗传图为基础, 识别出了所述突变体中的相关基因。结果, 发现衰老-相关基因是一种位于拟南芥 2 号染色体的 m429 至 4.8 ± 0.5 cM 位点、尤其是 BAC F14N22 位点的基因, 该基因包含了 2082 个核苷酸, 该 2082 个核苷酸在一个 cDNA 序列上编码了 693 个氨基酸。所述基因被命名为 *ORE9*。另外, 已发现 *ORE9* 蛋白 (由所述 *ORE9* 基因编码) 有一个被修饰的 F-盒结构和 18 个富含亮氨酸的重复序列, 同时能在某些蛋白质 (与其它现存的含 F-盒的蛋白质相似) 之间进行受控结合, 关于 *ore9* (*ORE9* 基因的一种突变体), 其能够大大延长拟南芥的寿命。基于上述要点, 本发明得以实现。

20

发明内容

本发明提供了一种 *ORE9* 基因, 该基因参与了衰老调控, 并表达为 *ORE9*

蛋白质。与野生株相比，从突变株*拟南芥*中识别出的 *ORE9* 基因明显延长了叶子寿命。另外，本发明提供了一种方法，该方法用于识别衰老-相关基因或者一种物质，该物质能够借助衰老调控基因或蛋白来抑制衰老。

另外，本发明提供了一种突变型基因 *ore9*，由于 *ORE9* 基因的第 979
5 个碱基处的 C 被 T 代替，基因 *ore9* 的翻译被提早终止。另外，本发明还提供了一种蛋白质 *ore9*，该蛋白质由基因 *ore9* 表达。突变型基因 *ore9* 有延长植物寿命的能力，一种通过用所述突变型基因 *ore9* 来转化植物从而延长植物寿命的方法也在本发明范围之内。

此处所使用的术语“*ore*”在本发明中取其“长时间生存”的含义，以
10 同样的含义命名有关植物寿命调控的基因、或其表达的蛋白质或衍生物。

“*ORE9* 基因”或“*ORE9* 蛋白”在本发明中分别特定指寿命调控基因或蛋白。术语“*ore9* 基因”或“*ore9* 蛋白”分别指*拟南芥*的突变型基因或由该基因表达的突变型蛋白，所述*拟南芥*通过 *ORE9* 核苷酸序列上的点突变、
15 或者由其表达的突变型蛋白分别传代后生成。

下面将详细描述本发明。

本发明中，为识别与寿命调控有关的基因，首先选取了具有延长寿命特性的突变体。为此，将*拟南芥*作为试验植物，所述*拟南芥*是一种经常被用作植物遗传学和分子学研究的试验对象。*拟南芥*的 5 条染色体已完全
20 被解码为 130-140 Mbp 大小的小基因组，其详尽的遗传学和物理学图谱也已存在。同时，*拟南芥*的寿命很短，并具有产出大量种子、易于栽培和转化的优势。因为上述原因，经常将该植物作为一种遗传模型用以研究植物。

(<http://www.arabidopsis.org>)。

本发明中，为选取其叶子寿命延长了的突变体，以拟南芥为试验对象，将其进行乙甲基磺酸 (EMS)处理以诱导突变。然后，从成年个体中选取叶子发黄速度缓慢的个体，并检测这些个体的叶子存活率、叶绿素含量、光
5 合作用效率以及离子流出速度，从而验证其寿命延长的特性。将选取的上述个体命名为“*ore9* 突变体”，并将其特性与野生株进行比较。结果发现，突变体的平均叶子寿命为 31.4 DAE（叶子突出表面后的天数），比野生株的平均寿命增加了 27.1%，后者的平均叶子寿命大约为 24.7 DAE。另外，关于衰老的进展速度，在野生株中，50%的叶绿素丢失，而在 *ore9* 突变体
10 中，黄化现象直到 24 DAE 后才开始。同时，作为衰老进展的其它测量手段，光合作用活性和膜离子流出量的降低表明衰老在 *ore9* 突变体中的进展慢于野生株。

尽管总的说来叶子的衰老受基因控制，但现已知植物生长激素如脱落酸(ABA)、茉莉酮酸甲酯(MeJA)以及乙烯可改变衰老的启动和进展 (Hensel
15 *et al.*, *Plant Cell* 5:553, 1993)。因此，为检测在上述植物生长激素处理后 *ore9* 突变体中叶子寿命的变化，分别用 ABA、MeJA 和乙烯处理 *ore9* 突变体和野生株后，通过检测叶绿素含量和光合作用活性，测量其衰老的进展。结果证实，野生株中，由于植物生长激素的影响，叶绿素含量和光合作用活性都明显降低，从而加速了衰老。而在 *ore9* 突变体中，植物生长激素的影响
20 明显降低。该结果表明，即使进行了衰老-相关激素处理，*ore9* 突变体的寿命仍可延长。

同时，在本发明的一个实施例中，为验证 *ore9* 突变体寿命的延长不仅

在生理水平上受到影响，还在分子水平上受到影响，借助 Northern 印渍分析检测了不同衰老-相关基因的表达情况。例如，合成代谢活性（如光合作用）和自我-修复基因活性在叶子生长阶段增加，而在衰老阶段降低 (Nam *et al. Curr. Opin. Biotech.* 8:200, 1997)。在野生株中，光合作用-相关基因的表达（如叶绿素 a/b 结合蛋白、叶绿体核糖蛋白 S17）及其它一些基因的表达（如小亚单位的核酮糖二磷酸羧化酶）随衰老的进展按比例下降。而在本发明的 *ore9* 突变体中，上述基因的表达很少发生或没有发生改变。另一方面，在野生株中，不同衰老相关基因（如 *SAG12*、*SEN4* 以及 *SEN5*）的表达随衰老进展而增加。而在 *ore9* 突变体中，发现其衰老相关基因的表达不随衰老进展而大量增加。上述事实表明，*ore9* 突变体寿命延长的影响不仅在生理水平上，还在分子水平上。

为识别与植物寿命调控有关的基因，使用了遗传图。结果发现在遗传图上，*ORE9* 定位在与 m429 相距 4.8 ± 0.5 厘摩 (cM) 的位点，特别是 2 号染色体上的 BAC F14N22 位点。以此结果为基础，构建两个定位在 0.05 cM 和 0.1 cM 位点的分裂扩增多态性序列 (CAPS) 标记物，从而识别出一个大小为 10 kb 的区域，该区域包括三个开放阅读框架 (ORFs)。由此，亚克隆出了一个只包含 *ORE9* 基因的大小为 4.5 kb 的片段。已证实该片段足以互补 *ore9* 突变体。

根据本发明，所提供的 *ORE9* 基因的核苷酸序列和 *ORE9* 蛋白的氨基酸序列分别表示为 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。在 *ore9* 基因（*ORE9* 的一种突变型基因）的核苷酸序列中，*ORE9* 基因的核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 中第 979 个碱基处的胞嘧啶 (C) 被胸腺嘧啶 (T) 代替。在上述 *ore9* 基因

表达为 ore9 蛋白时，翻译提前终止。因此，ore9 蛋白的氨基酸序列只含 8 个 LRRs，短于含 18 个 LRRs 的正常 ORE9 蛋白。该 ore9 蛋白的氨基酸序列表示为 SEQ ID NO: 3。

基因组 DNA 的印渍分析结果显示，在拟南芥的基因组中，*ORE9* 基因以单拷贝数存在，而且当比较 cDNA 和 gDNA 时，发现 *ORE9* 基因含 6 个外显子。由该 *ORE9* 基因所表达的 ORE9 蛋白包含 693 个氨基酸。而且，该 ORE9 蛋白包含一个位于 N-端的 F-盒结构，并有 18 个 LRRs。利用数据库鉴别上述氨基酸序列，结果显示该氨基酸序列与拟南芥 TIR1（参与植物生长激素反应）有 48.4% 的同源性，与人类 CUL1 和 FBL2 分别有 46.6% 和 37.8% 的同源性，并与酵母 CDC4 有 47.8% 的同源性，因此与含 LRRs 的 F-盒蛋白质是同源的。

F-盒结构是一种高度变性的疏水序列，是一个含 40 个氨基酸的区域。F-盒结构存在于某些蛋白质中，这些蛋白质都能够聚集酶作用物，从而成为泛素连接酶复合体的核心，以进行泛素化和蛋白质水解作用 (Craig *et al.*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72:299, 1999)。通过泛素-蛋白体途径，F-盒蛋白与 Skp1 和 Cdc53 蛋白特异性地相互作用，从而形成了一个 E3 泛素连接酶复合体，称之为 SCF (Skp1-Cdc53-F-box)。在脊椎动物和酵母的调控蛋白中都可发现上述 F-盒蛋白质，例如酵母 Cdc4 和 Grr1、人类 Skp2 和 CUL1-假蛋白等等。最近发现在植物中也有 F-盒蛋白质，有报道说这些蛋白质同样影响花器官性质 (UFO)、JA-调控抵抗 (Coll)、植物生长激素反应 (TIR1) 的调控以及生物钟的调控 (ZTL 和 FKF1) (see Xin *et al.*, *Science* 280:1091, 1998; Ruegger *et al.*, *Genes dev.* 12:198; 1998; Samach *et al.*, *Plant J.* 20:433, 1999; Sommers *et al.*, *Cell* 101:319, 2000; and Nelson *et al.*, *Cell* 101:331,

2000)。

为证实 ORE9 蛋白实际上显示了 F-盒蛋白的活性，利用酵母双-杂交测定法，对 ORE9 蛋白能否与 ASK1、ASK2 相互作用进行了检测，所述 ORE9 蛋白的序列与上文各种 F-盒蛋白有同源性，所述 ASK1 和 ASK2 是与 Skp1
5 (能与 F-盒蛋白结合)相似的蛋白质。通过构建质粒，以结合在 GAL4 DNA 结合区 (GAL4-BD) 的结合蛋白的形式，分别表达一个仅包含 F-盒区的片段 (1-49 a. a.) 和一个切除了 F-盒部分的片段 (50-693 a. a.)，同样通过构建质粒，以结合在 GAL4 转录活性区(GAL4-AD) 的结合蛋白的形式，分别表达 ASK1 和 ASK2。然后，用不同结合对子的载体转化酵母，并进行培养。
10 结果显示，只有包含 ASK1 质粒和 ORE9 (有 F-盒区) 的酵母在缺乏组氨酸的培养基上存活，且有 β -半乳糖活性。相反，切除了 F-盒区的 ORE9 衍生物无法与 ASK1 结合。同样，发现 ASK2 和 ORE9 互相结合。该结果说明，ORE9 的 F-盒区与 ASK 蛋白之间的结合是特异性的。结果可以断定，对 ORE9 和 ASK1 的结合而言，ORE9 的 F-盒区是必需的，ORE9 具有与一般
15 F-盒蛋白相近的功能。

同时，通过 *in vitro* 实验，也验证了 ORE9 蛋白能与 ASK1 结合。放射性-标记的 ORE9 及其衍生物与 GST-ASK1 结合蛋白的 *In vitro* 结合测定结果显示，*ore9* 突变蛋白以及 ORE9 衍生物 (包含 F-盒区) 与 GSK-ASK1 共同沉淀。这说明这些蛋白直接与 ASK1 结合。

20 ORE9 蛋白影响拟南芥叶子寿命的机制有下面两个可能。一个可能是 ORE9 蛋白在叶子衰老的启动中充当了一种负面调节因子，所以能够聚集转录抑制因子，该转录抑制因子抑制了衰老启动所必需的基因。另一个可能

是 ORE9 充当了一种受体,该受体是自我-调控蛋白的选择性变性所必需的。换而言之,因为 F-盒蛋白借助泛素途径在蛋白质变性过程中发挥了重要作用,所以 ORE9 蛋白在蛋白质(如其它 F-盒蛋白)之间的结合上发挥了重要作用。因此,可以说借助泛素途径,ORE9 通过蛋白质的变性导致了衰老现象。在这一点上可以说, *ore9* 突变体表达了其寿命延长特性的原因是相比野生型 ORE9,从 *ore9* 蛋白的 C-端切除了 WD 重复序列或 LRRs,所以蛋白质之间的结合力减弱。

但是,根据本发明,尽管用上述原理描述了其机制,但 ORE9 基因和其蛋白质、以及 *ore9* 基因和其蛋白质对寿命调控或寿命延长的影响不受上述原理限制、或不局限于上述原理。

另外,本发明中的 ORE9 基因和 ORE9 蛋白有助于研究植物中的衰老-相关基因或衰老抑制物质。例如,可通过与 ORE9 基因核苷酸序列的比较,研究与 ORE9 基因有高同源性序列的基因,或者可通过杂交反应来研究假-基因,所述杂交反应以 ORE9 基因片段为探针,使用一个模板 RNA 或从植物(经过衰老-相关物质处理)中提取的 mRNA,以产生 cDNA。另外,本发明中的基因可用于研究能直接与本发明基因结合的物质;或者用于研究能抑制或激活本发明基因的表达的物质;或者通过对衰老抑制物质与 ORE9 蛋白结合情况的分析,用于识别衰老抑制物质。这种分析可以通过不同的传统方法特异性地实现,如 DNA 碎片法、聚合酶链反应(PCR)、Northern 印渍分析和 Southern 印渍分析等。

另外,当使用 ORE9 蛋白时,可以利用某种方法对 ORE9 蛋白的表达

情况进行分析，该方法可选自一组方法，包括酶联免疫吸收测定(ELISA)、蛋白质碎片测定或 2-D 凝胶分析等。

另外，本发明提供了一种方法，该方法通过用突变型基因 *ore9* 转化植物来延长植物的寿命。关于用突变型基因转化植物的方法，技术上有多种方法可用以转化植物。例如，可使用 *拟南芥*-介导的转化方法，该方法利用一个二元载体来转化植物，从而引入突变型基因 *ore9*。另外，当使用不含 T-DNA 区域的载体时，有电泳、微粒子轰击、聚乙二醇-介导摄取等方法。

可以用本发明中的方法延长其寿命的植物包括双子叶植物（如莴苣、大白菜、马铃薯和萝卜）以及单子叶植物（如水稻、大麦、香蕉等）。当将本发明中的方法用于可食用青菜或果实如番茄（有薄的果皮，因此衰老可使其品质快速恶化）、以及主要出售其叶子的植物时，本发明中的方法可有效增加其储藏效率。

附图简述

图 1 中图示了 *拟南芥* 野生株及其寿命延长突变体 *ore9* 中，叶子在不同时间的存活率，其中，当叶子丢失了其叶绿素总数的 80% 时，认为该叶子死亡，每一个总体包括 100 个独立的叶子。

□：野生株

■： *ore9*

图 2a 中图示了 *拟南芥* 野生株和 *ore9*（野生株的一种寿命延长突变体）中，不同时间时叶绿素含量的变化。

图 2b 中示出了不同时间时光合作用活性的变化，其中光合作用活性用

PSII 的光化学效率(Fv/Fm)表示。

□: 野生株

■: *ore9*

Fv: 最大可变荧光

5 Fm: 最大荧光强度

图 2c 中图示了拟南芥野生株及其寿命延长突变体 *ore9* 中, 不同时间时膜离子流出量的变化, 其中膜离子流出量用初始传导率和总传导率的比值(百分比)表示。

图 3 中示出了拟南芥野生株及其寿命延长突变体 *ore9* 中, 不同时间下
10 衰老-相关基因(SAGs)和其它光合作用-相关基因表达模式的 Northern 印渍分析结果。

CAB: 一种叶绿素 a/b 结合蛋白

RPS17: 一种叶绿体核糖蛋白 S17

RBCS: 一种小亚单位的核酮糖二磷酸羧化酶

15 SEN4: 一种衰老-相关基因 4

SEN5: 一种衰老-相关基因 5

图 4a 中图示了分别进行脱落酸 (ABA)、茉莉酮酸甲酯 (MeJA) 和乙烯处理后的叶子寿命变化, 以光合作用效率表示, 所处理的三种物质是对衰老的启动和进展有影响的植物生长激素。

20 黑条: 未进行植物生长激素处理的叶子

白条: 经过植物生长激素处理后的叶子

图 4b 中图示了分别进行脱落酸 (ABA)、茉莉酮酸甲酯 (MeJA) 和乙

烯处理后的叶子寿命变化，以叶绿素含量表示，所处理的三种物质是对衰老的启动和进展有影响的植物生长激素。

黑条：未进行植物生长激素处理的叶子

白条：经过植物生长激素处理后的叶子

5 图 5a 是 *ORE9* 基因在拟南芥基因组上的定位的基因图谱。

斜条：用以对 *ore9* 突变体进行互补测定的部分

图 5b 是 *ORE9* 和 *ore9* 蛋白的预期结构的示意图。

F：F-盒区

白框：LRRs

10 图 6 中示出了 *ORE9* 和含 F-盒结构的蛋白质之间，F-盒区上的氨基酸序列同源性和共同序列。

a：脂肪族氨基酸残基

图 7a 是 *ORE9*、*ORE9* 衍生物、以及 *ASK1* 和 *ASK* 蛋白（用于酵母双-杂交测定）的结构示意图。

15 黑框：GAL4-BD

阴影框：GAL4-AD

图 7b 是利用 *ORE9* 或其衍生物、以及 *ASK1* 或 *ASK2* 蛋白，进行酵母双-杂交测定后的结果的照片。

左上部分：用于杂交测定的质粒的配对和位置

20 右上部分：在缺乏色氨酸、亮氨酸的培养盘中培养的结果

左下部分：在含 2Mm 3-氨基-1,2,4-三唑（3-AT）的缺乏色氨酸、亮氨酸、组氨酸的 SD 培养盘中培养的结果

右下部分：转化体的 β -半乳糖活性

图 8 是利用 ORE9 或其衍生物、以及 GSK 或 GSK-ASK1 结合蛋白，进行 *in vitro* 结合测定的结果的凝胶照片。

5 实现发明的最佳方式

下面将通过实施例进一步详细介绍本发明。但请注意，本发明不局限于本实施例、或不受本实施例的限制。

例 1：在拟南芥中选取寿命-延长突变体

10 取 Col-O（野生株拟南芥）的大约 40,000 个种子(M1)，在 0.33% 乙甲基磺酸 (EMS)溶液中处理 8 小时，并进行自身-授粉以获取其第二代种子 (M2)。在温室（温度控制在 23 °C）中培养该植物，并用肉眼观察叶子的黄化，该黄化是由于植物随年龄而衰老，从而引起了叶绿素的降低而造成的。对比野生株，选取 6 个黄化速度较慢的个体。将选出的突变体命名为

15 “oresara”，其在韩语的意思为“存活时间长”（*ore1*、*ore2*、*ore3*、*ore9*、*ore10* 以及 *ore11*）。根据对这些突变体的生化分析结果（叶绿素含量分析、光化学效率分析、以及核糖核酸酶和过氧化物酶分析），发现实际上所述突变植物是功能持久的绿色植物。以生化分析为生物指标来检测叶子的衰老。

20 在 22 °C、16 小时光照/8 小时暗室条件下的培植房（韩国器具公司）中，培养上面选出的寿命延长突变体和作为对照组的野生株个体，以用于后续的实验。本实验中选用第 3 个玫瑰花形叶子和第 4 个玫瑰形叶子。

例 2: 对寿命延长突变体 *ore9* 特性的表达研究

为验证突变体 *ore9* 的寿命-延长特性,测量了突变体 *ore9* 叶子的叶绿素含量、光合作用活性和膜离子流出量,并与野生株 *拟南芥* 的上述指标进行对比。

5 2-1) 测量叶子的存活率和叶绿素含量

通过测量叶子突出表面后的天数(DAE)来确定叶子的寿命, DAE 期间叶子保持 50%的存活率。还可通过叶子的叶绿素含量来确定叶子的寿命,叶绿素含量在 12 DAE 后每隔 4 天进行测量,12 DAE 时第 3 个和第 4 个玫瑰形叶子已经生长完全。当叶子丢失了其全部叶绿素的 80%以上时,确认
10 该叶子已死亡。本发明中所用的标本组是取自独立个体的 100 个互相独立的叶子。

为测量叶绿素含量, 80°C 下将独立的叶子标本在 95%的乙醇中煮沸,然后提取叶绿素。以 648 nm 和 664 nm 下的吸光率来测量叶绿素的含量,并表示为每单位重量新鲜叶子中的叶绿素浓度(Vermon *et al.*, *Anal. Chem.*
15 32:1142-1150, 1960)。结果如图 1 所示,野生株的平均寿命大约为 24.7 DAE,而寿命-延长突变体 *ore9* 的平均寿命为 31.4 DAE,该结果显示, *ore9* 突变体的叶子寿命比野生株增加了 27.1%。同样,如图 2a 所示, 24 DAE 时野生株丢失了其叶绿素的 50%,而在 *ore9* 突变体中, 24 DAE 时黄化现象刚开始出现,直到 32 DAE 时仍保持了 50%的叶绿素。

20 2-2) 光合作用活性

为测量光合作用活性,使用了 Oh S.A 等的方法(Oh S.A. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 30: 939, 1996)。首先,分别将独立的叶子进行暗室处理 15 分钟,并借

助植物效率分析器测量叶绿素的荧光。利用叶绿素的荧光性质，将光合作用活性表示为光系统 II (PSII) 的光化学效率。用最大可变荧光(Fv)与最大荧光强度(Fm)的比率(Fv/Fm)来表示光化学效率。光合作用效率随着该比率的增大而提高。

- 5 结果显示，光合作用活性的变化与叶绿素含量的变化相似。换言之，野生株中的光合作用活性在 20 DAE 后快速下降，而 *ore9* 突变体中的光合作用活性在 28 DAE 后才开始下降（见图 2b）。

2-3) 检测膜离子流出量

通过测量从叶子中流出的电解液来确定膜离子流出量。从每个拟南芥
10 个体中收集两个叶子，并浸入 3 ml 400 mM 的甘露醇中，22°C 下轻轻震荡 3 小时，然后用传导率测量仪 SC-170 测量初始传导率。将标本煮沸 10 分钟，并测量总传导率。用初始传导率与总传导率的比值 (%) 表示传导率。

野生株中，膜离子流出量在 24 DAE 后迅速增加，而 *ore9* 突变体中，膜离子流出量在 36 DAE 后迅速增加（见图 2c）。

15

考虑上述结果，可以发现相比野生株，*ore9* 突变体具有叶子寿命延长的显型。该寿命延长的影响可通过下面的事实得到证实：*ore9* 突变体中，由于衰老造成的叶绿素含量降低、光合作用活性降低、膜离子流出等生化改变迟于野生株。

20

例 3: *ore9* 突变体中衰老-相关基因的表达

为证实 *ore9* 对衰老-相关基因(SAGs)的表达有影响，借助 Northern 印渍

分析,分别检测了 SAG 蛋白在叶子发展过程的不同时间阶段上的表达情况。在 12、20、24 DAE 时分别从叶子中提取总 RNA,在野生株中,该 3 个时间上叶子分别完全生长、叶绿素损失低于 10%、叶绿素损失高于 50%。在每个加样槽中加入 10 μg RNA,并用全长 *ORE9* 基因作为探针。

5 现已知合成代谢活性(如光合作用和自我-修复活性)随植物的生长而增加,而在植物衰老阶段降低(H.G. Nam, *Curr. Opin. Biotech.* 8:200, 1997)。本实施例的结果与该报道完全一致。在野生株中,光合作用-相关基因的表达(如叶绿素 a/b 结合蛋白、叶绿体核糖蛋白 S17)以及一些基因的表达(如小亚单位核酮糖二磷酸羧化酶)

10 突变体中,上述基因的表达很少发生或没有发生变化。同时,在野生株中,不同衰老-相关基因(如 *SAG12*, *SEN4* 和 *SEN5*)的表达随时间阶段的进行而增加。但现已证实,在 *ore9* 突变体中,衰老-相关基因的表达在同一时间内没有大量增加。该事实说明, *ore9* 突变体不仅在生理水平上、也在分子水平上延缓了衰老的启动,从而延长了叶子的寿命。

15

例 4: 用植物生长激素处理后, *ore9* 突变体叶子寿命的改变

尽管叶子的衰老是一个受基因控制的过程,但衰老的启动和进展可以被植物生长激素如脱落酸(ABA)、茉莉酮酸甲酯(MeJA)和乙烯改变,该三种物质是抑制植物生长的物质(Hensel *et al.*, *Plant Cell* 5:553, 1993;

20 Weidhase *et al.*, *Physiol. Plant* 69:161, 1987; and Zeevaart *et al.*, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:439, 1998)。因此,本实验中,通过测量光合作用活性和叶绿素含量的变化,检测了植物生长激素处理后 *ore9* 突变体

中叶子寿命的变化。将分离的叶子漂浮在 pH5.8、含 50 μ M ABA 或 50 μ M MeJA 的 3 mM 2-[N-吗啉]-乙甲基磺酸 (MES) 缓冲液中, 并持续暴露在日光下。通过在含 4.5 μ M 乙烯气体的玻璃瓶中培养植物, 进行了乙烯处理。22 $^{\circ}$ C 下将上述植物生长激素处理持续 3 天, 并持续暴露在日光下。这时, 5 取 12 DAE 时的独立叶子为标本, 并按例 2 中同样的方式测量叶绿素含量和光合作用活性。

结果发现, 在进行了 ABA、MeJA 和乙烯处理后, 野生株的光合作用活性分别降低了 65%、38%和 54%, 而 *ore9* 突变体的光合作用活性分别保持在 93%、70%和 82% (见图 4a)。另外, 与光合作用活性相似, 叶绿素含 10 量的降低在 *ore9* 突变体中变弱了 (见图 4b)。上述结果表明, *ore9* 突变体对衰老-加速激素的敏感性较低, 并抑制了由所述激素引起的衰老过程, 所以可以延长植物的寿命。

例 5: 以基因图谱为基础, 对 ORE9 基因的克隆和序列分析

15 为获取有关 *ORE9* 的准确遗传学信息, 利用分裂扩增多态性序列测定物, 绘制了基因图谱。

从该图谱中可以发现, *ORE9* 定位在与 m429 相距 4.8 ± 0.5 厘摩 (cM) 的位点, 特别是 2 号染色体上的 BAC F14N22 位点 (见图 5a)。

构建两个 CAPS 标记物 (F14N22.6 和 F14N22.13), 其分别定位在 0.05 20 cM 和 0.1cM 位点, 在该两个位点处, 可以分别从 *ORE9* 获取一个重组体和两个重组体 (984 个个体中)。CAPS 标记物中的 F14N22.6 是一种大小为 1.2 kb 的 PCR 扩增产品, 进行 PCR 扩增时, 以寡核苷酸 (其核苷酸序列表

示为 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5) 为引物。同时, 该标记物包含 2 个来自 Col 的 *Dra*I 位点和 3 个来自 Ler 的 *Dra*I 位点。F14N22.13 是一种大小为 1.2 kb 的 PCR 扩增产品, 进行 PCR 扩增时, 以寡核苷酸 (其核苷酸序列表示为 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7) 为引物。同时, F14N22.13 5 包含 1 个来自 Col 的 *Hinf*I 位点和 2 个来自 Ler 的 *Hinf*I 位点。上述 CAPS 标记物的图谱显示, 一个预料包含 *ORE9* 基因的大小为 10 kb 的区域有三个开放阅读框架 (ORFs)。将上述三个开放阅读框架的核苷酸序列与 *ore9* 突变体进行对比, 结果显示, 在 *ore9* 突变体中, 开放阅读框架一个位点上的一个 C 碱基被 T 代替, 所以其翻译提前终止, 结果产生的蛋白质比野生 10 株中的短 (见图 5b)。

将一个只包含 *ORE9* 基因的大小为 4.5 kb 的片段进行 PCR 扩增, 并通过 PCR 亚克隆到 GEM T 简易载体(Promega, USA)中, 进行 PCR 扩增时, 以寡核苷酸 (核苷酸序列表示为 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9) 为引物。将上述重组载体 pGTE-*ORE9* 转化的 *Escherichia coli* 于 2000 年 10 月 31 日 15 存放在韩国培养类型收集库 (KCTC)、韩国生物科学和生物技术研究协会 (KRIBB), 登记号为 KCTC 0881BP。

为检测 *ORE9* 基因与 *ore9* 突变体中控制寿命的物质互补的可能性, 将插入到重组载体中的 *ORE9* 基因 (包含大小为 4.5 kb 的片段) 亚克隆到 pCAMBIA1300 的一个 *Bam*HI 位点(MRC, USA), 然后用该亚克隆载体转化 20 *ore9* 个体。观察该转化个体的抗生素抗性和 T2 代显型, 结果显示, *ORE9* 基因 (包含大小为 4.5 kb 的片段) 能够与 *ore9* 突变体互补, 如下列表 1 所示。

表 1: 转基因后 *ore9* 突变体的互补实验

基因型	潮霉素抗性		X ²	显型		X ²
	Hyg ^R	Hyg ^S		+	-	
野生型	-	-	-	25	0	-
<i>ore9</i>	-	-	-	0	25	-
<i>ore9/ORE9-a</i>	215	68	0.143 (p>0.5)	56	19	0.004 (p>0.9)
<i>ore9/ORE9-b</i>	231	73	0.158 (p>0.5)	53	18	0.005 (p>0.9)
<i>ore9/ORE9-c</i>	276	14	1.001 (p>0.1)	67	6	0.483 (p>0.1)

注: X² 值指与 3:1 或 5:1 (Hyg^R:Hyg^S 或 +:-) 对比后的统计值, 该两个比值是后代的预期显型比;

Hyg^R : 潮霉素抗性;

5 Hyg^S : 潮霉素敏感;

+ : 野生株;

- : 寿命延长株;

ore9/ORE9-a,b,c: 三个独立的 T2 植物, 其中 *ore9* 个体被大小为 4.5 kb 的片段转化。

10

另外, 基因组 DNA 的印渍分析结果显示, *ORE9* 在拟南芥基因组中以单拷贝数存在 (数据未示出)。同时, 将 *ORE9* 的 cDNA 序列与基因组序列

进行对比,结果显示 *ORE9* 包含 6 个外显子。*ORE9* 的 cDNA 序列包含 2082 个碱基 (编码了 693 个氨基酸), 并有一个表示为 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。*ORE9* 基因所编码的 *ORE9* 蛋白有一个变性的 F-盒结构和 18 个不完全的 LRRs (见图 5b)。

5

例 6: 在 SCF 复合体中识别 *ORE9* 的 F-蛋白功能

从 *ORE9* 基因(在例 5 中鉴别出)的核苷酸序列中类推出一个多肽序列, 并借助数据库进行识别。结果显示, *ORE9* 蛋白与拟南芥的 TIR1 (参与了植物生长激素反应) 有 48.4%的同源性; 与含 LRRs 的 F-盒蛋白质如人类
10 CUL1、FBL2 及酵母 CDC4 分别有 46.6%、37.8%、47.8%的同源性。通过泛素-蛋白体途径, F-盒蛋白与 Skp1 和 Cdc53 蛋白相互作用, 从而形成了一个 E3 泛素连接酶复合体, 称之为 SCF (Skp1-Cdc53-F-box) (Craig *et al.*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72:299, 1999)。因此, 为验证 *ORE9* 蛋白具有 F-盒蛋白的功能 (能形成 SCF 复合体), 通过酵母双-杂交测定和 *in vitro* 结合测
15 定, 检测了 *ORE9* 蛋白是否与 Skp1-类蛋白相互作用。作为 Skp1-类蛋白质, 拟南芥 SKP1 的同构体 1 (ASK1)和拟南芥 SKP1 的同构体 2 (ASK2)是最适宜选用的。

6-1) 构建用于酵母双-杂交测定的表达载体

20 作为表达 GAL4 DNA 结合域(GAL4-BD)和 *ORE9* 结合蛋白的表达载体, 构建了质粒 pGBT9-*ORE9* (1-49) [1] 和 pGBT9-*ORE9* (50-693) [2]。质粒 pGBT9-*ORE9* (1-49) 表达了一个 *ORE9* 片段, 该片段包含与 *ORE9* 的 F-盒

区相对应的 N-端第 1-49 氨基酸；质粒 pGBT9-ORE9 (50-693)表达了另一个 ORE9 片段，该片段包含 ORE9 中切除了 F-盒区后的第 50-693 氨基酸。

首先，借助引物（核苷酸序列表示为 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11），对编码 ORE9 (1-49)片段的基因进行 PCR 扩增，然后将其插入到 pGBT9 的 *Bam*HI 和 *Pst*I 限制酶位点(Clontech, USA)，所述 pGBT9 包含一个 4-BD 基因和一个色氨酸缺陷型选择标记基因(TRP1)，从而构建了一个 pGBT9-ORE9 (1-49)质粒。同样，构建了 pGBT 9-ORE9 (50-693) 质粒，该质粒表达了一个 ORE9 (50-693)片段和一个 GAL4-BD 结合蛋白。此处，以寡核苷酸（核苷酸序列表示为 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13）为 PCR 的引物，对编码 ORE9 (50-693)片段的基因进行了 PCR 扩增。

同时，关于 ASK1(1-160) 和 ASK2(1-172)（用于识别某种结合），可将其表达为与 GAL4-BD 结合的结合蛋白形式，通过这种方式，构建了 pGAD424-ASK1(1-160) 和 pGAD424-ASK2(1-172)。用 *Bam*HI 和 *Pst*I 消化含一个 ASK1(1-160)基因的 pGTE-ASK1(1-160)，并将其插入到 pGAD424 中(Clontech, USA)，所述 pGAD424 包含一个 GAL4-AD 基因和一个亮氨酸缺陷型选择标记基因(LEU2)，从而构建了一个 pGAD424-ASK1(1-160)[3]质粒，该质粒表达了 ASK1 和 GAL4-4AD 的结合蛋白。同样，通过将一个 pGTE-ASK2(1-172)的 *Bam*HI/*Pst*I 片段插入到 pGAD424 中，构建了 pGAD424-ASK2(1-172)[4]质粒。

图 7a 示意了如上构建的质粒所表达的结合蛋白的结构。

6-2) 酵母双-杂交测定

在一种 YPD（酵母提取物，蛋白胨，葡萄糖）培养基或含 2%葡萄糖的基本合成培养基（SD）中培养酵母品系 HF7c。

借助醋酸锂方法(Feilotter *et al.*, 1994), 分别用上述例 6-1 中构建的载体的不同组合（[1+3]、[2+3]、[1+4]；见图 7b 的左上部分）转化酵母品系 HF7c
5 （在上述培养基中培养）。在含 2%葡萄糖的基本合成培养基中选取转化体。在不含色氨酸、亮氨酸的 SD 培养基（见图 7b 的右上部分）以及不含色氨酸、亮氨酸、组氨酸的 SD 培养基（含 2Mm 3-氨基-1,2,4-三唑）（见图 7b 的左下部分）中培养该转化体。结果显示，只有用载体 pGBT-ORE9(1-49)[1] 和 pGAD-ASK1(1-160)[3]转化的酵母能够在缺乏组氨酸的培养基中生长，
10 所述载体 pGBT-ORE9(1-49)[1]包含 F-盒区，所述载体 pGAD-ASK1(1-160)[3]能表达 ASK1(1-160)。

但是，发现切除 F-盒区后的 ORE9 衍生物[ORE9(50-693)]无法与 ASK1 结合（见图 7b）。该事实说明，对 ORE9 与 ASK1 的结合而言，F-盒区是必要的和充分的条件。

15 同时，酵母双-杂交测定反映出，ASK2 和 ORE9 不能互相结合。该事实说明，ORE9 的 F-盒区与 ASK 蛋白的结合是特异性的。但是，完整的 ORE9(1-693)未显示出与 ASK1 结合的正信号（数据未示出）。考虑这是由于结合蛋白错误折叠或蛋白从胞核中分离等原因造成的。

在基本合成培养基中培养上述转化体，并把生成的酵母克隆置于滤纸
20 片上，以检测其 β -半乳糖活性。将该滤纸片在液氮中放置 30 秒，并在含 0.83mM 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷（X-gal）的 Z 缓冲液（60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM MgSO_4 ）中培养。30 °C 下保存

该滤纸片，并观察其颜色变化，该颜色的变化可指示 β -半乳糖活性。

结果显示，只有包含 ASK1(1-160)质粒和 ORE9 [ORE9(1-49)]（有 F-盒区）的酵母能够在缺乏组氨酸的培养基中生长，并具有 β -半乳糖活性。

5 6-3) *In vitro* 结合测定

为检验 ORE9 蛋白及其衍生物能与 ASK1 直接结合，对 GST-ASK1 结合蛋白和标记了³⁵S 的 ORE9 蛋白（通过 *in vitro* 翻译生成）进行了 *in vitro* 结合测定。为获取谷胱甘肽 S-转移酶（GST）蛋白和 GST-ASK1 结合蛋白，构建了一个 pGEX 载体 (APBiotech, Co.) 和一个 pGEX-ASK1 载体，该两个载体分别表达了上述两种蛋白。以人造序列 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 为 PCR 引物，对编码 ASK1 片段的基因进行扩增。用 *Eco*RI 和 *Nco*I 限制酶对生成的 PCR 产物进行消化，并将其插入到 pGEX 载体的限制酶位点。用生成的两个载体转化 *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS，从而表达 GST 和 GST-ASK1 结合蛋白。利用谷胱甘肽-琼脂糖 4B 珠进行层析，从而提纯 GST 和 GST-ASK1 结合蛋白。利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶，将提纯后的蛋白进行电泳，用考马斯蓝染色，并测量其数量。往谷胱甘肽珠中加入同样数量的 GST 和 GST-ASK1 结合蛋白，该谷胱甘肽珠先用 10 倍体积的 B 缓冲液 (20mM 氯化磷酸盐, pH 7.6, 150mM 氯化钠, 10% 甘油, 0.5% NP-40, 1 mM DTT) 洗涤三次。然后利用旋涡混合器将上面生成的蛋白质在 4 °C 下吸附 1 小时。用 1 ml B 缓冲液洗涤谷胱甘肽珠三次，并保存在一种浆液相对 B 缓冲液的比例为 50% 的状态。

同时，利用 *in vitro* 转录/翻译系统(Promega, USA)和 [³⁵S]-蛋氨酸(DuPont

NEN, USA), 制备放射性-标记 ORE9 (1-693)、突变型 *ore9* 和 ORE9 衍生物 (1-327 和 50-693)。利用 SDS-PAGE 和放射分析显影系统 (日本), 对所述蛋白质进行定量分析。然后, 分别将同样数量的标记了 ^{35}S 的翻译产物与 60 μl GST-吸附珠或 GST-ASK1 结合蛋白-吸附珠混合, 所述吸附珠溶于 1 ml GB 缓冲液中 (最终浓度为: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15% NP-40, 150mM NaCl, 1mM EDTA)。4 $^{\circ}\text{C}$ 下将上述生成的吸附珠在旋涡混合器中培养 2 小时, 然后用 1 ml GB 缓冲液洗涤 4 次。往洗涤后的吸附珠中加 30 μl 2 \times SDS 样品溶液, 煮沸 3 分钟, 然后分离出 SDS-PAGE。将上述生成的凝胶烘干, 然后曝光于 X 光胶片。

结果显示, 与酵母双-杂交测定不同, 完整的 ORE9 (1-693) 直接与 ASK1 结合。另外, 突变型 *ore9* 和含 F-盒区的部分 ORE9 (1-327) 与 GST-ASK1 结合蛋白共同沉淀, 但不能与 GST 蛋白 (一个阴性对照组) 共同沉淀 (见图 8)。同时, 发现切除了 F-盒区的 ORE9 (50-693) 不能与 GST-ASK1 结合。上述结果说明, ORE9 直接与 ASK1 结合。

15

工业应用性

本发明中新的衰老调控基因 *ORE9* 及其所表达的 *ORE9* 蛋白有助于研究衰老机制、有助于识别植物中的衰老-相关基因或抑制物质。另外, 可以用 *ore9* 基因 (*ORE9* 基因的一种突变体) 来转化植物, 从而延长植物的寿命, 以增加植物的产量和储藏效率。

20

国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约

国际表

原始保藏存单

5

至：基诺麦因有限公司 (GENOMINE, INC.)
 (Environmental Eng. Bldg. 226, Pohang University of Science & Technology,
 #San31, Hyoja-dong, Nam-ku, Pohang 790-784, Republic of Korea)

10

I 微生物确认	
保藏人给出的确认编号： 大肠埃希杆菌pGTE-ORE9 (<i>Escherichia coli</i> pGTE-ORE9)	国际保藏单位给出的保藏号： KCTC 0881BP
II. 科学描述和/或建议分类学的名称	
I 确认的微生物带有： [x] 科学描述 [] 建议分类学的名称	
III. 接收和存单	
国际保藏单位于 <u>2000年10月31日</u> 收到并接受 I 确认的微生物。	
IV. 收到转移的请求	
本国际保藏单位于 收到 I 确认的微生物和转移原始保藏到根据布达佩斯条约接受它的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：韩国培养类型收集库 地址：(略)	日期：2000年11月2日



- <110> 基诺麦因有限公司
浦项工科大学校
- <120> 编码一种可调控拟南芥叶子寿命的F-盒蛋白
的新基因及其突变基因
- <130> OP01-1009
- <150> KR 2000-78972
<151> 2000-12-20
- <160> 15
- <170> KOPATIN 1.5
- <210> 1
<211> 2082
<212> DNA
<213> 拟南芥
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2082)
<223> ORE9基因
- <400> 1
- atg gct tcc act act ctc tcc gac ctc cct gac gtc atc tta tcc acc 48
Met Ala Ser Thr Thr Leu Ser Asp Leu Pro Asp Val Ile Leu Ser Thr
1 5 10 15
- att tcc tct ctc gta tcc gat tcc cga gct cgc aac tct ctc tcc ctc 96
Ile Ser Ser Leu Val Ser Asp Ser Arg Ala Arg Asn Ser Leu Ser Leu
20 25 30
- gtc tct cac aaa ttc ctc gct ctc gaa cga tcc act cgc tct cac ctc 144
Val Ser His Lys Phe Leu Ala Leu Glu Arg Ser Thr Arg Ser His Leu
35 40 45

act atc cgt ggc aac gct cgt gat ctc tcc ctc gtc ccc gac tgt ttc	192
Thr Ile Arg Gly Asn Ala Arg Asp Leu Ser Leu Val Pro Asp Cys Phe	
50 55 60	
cga tca atc tca cat ctc gat ctc tct ttc ctc tcc cca tgg ggt cac	240
Arg Ser Ile Ser His Leu Asp Leu Ser Phe Leu Ser Pro Trp Gly His	
65 70 75 80	
act ctt ctc gct tct ctc cca atc gat cac cag aac ctt ctc gct ctc	288
Thr Leu Leu Ala Ser Leu Pro Ile Asp His Gln Asn Leu Leu Ala Leu	
85 90 95	
cgt ctc aaa ttc tgt ttc cct ttc gtc gag tct cta aac gtc tac aca	336
Arg Leu Lys Phe Cys Phe Pro Phe Val Glu Ser Leu Asn Val Tyr Thr	
100 105 110	
cga tct ccg agc tct ctc gag ctt cta ctt cct caa tgg ccg aga att	384
Arg Ser Pro Ser Ser Leu Glu Leu Leu Leu Pro Gln Trp Pro Arg Ile	
115 120 125	
cgc cac atc aag ctc ctc cga tgg cat caa cga gct tct cag atc cct	432
Arg His Ile Lys Leu Leu Arg Trp His Gln Arg Ala Ser Gln Ile Pro	
130 135 140	
acc ggt ggc gat ttt gtt cct att ttt gaa cac tgt ggt ggt ttc ctt	480
Thr Gly Gly Asp Phe Val Pro Ile Phe Glu His Cys Gly Gly Phe Leu	
145 150 155 160	
gag tct tta gat ctc tcc aac ttc tat cac tgg act gaa gac tta cct	528
Glu Ser Leu Asp Leu Ser Asn Phe Tyr His Trp Thr Glu Asp Leu Pro	
165 170 175	
cct gtg ctt ctc cgc tat gct gac gtg gcg gcg agg ctt aca cgg tta	576
Pro Val Leu Leu Arg Tyr Ala Asp Val Ala Ala Arg Leu Thr Arg Leu	
180 185 190	
gat ctc ttg acg gcg tcg ttc acc gag gga tac aaa tca agc gaa atc	624
Asp Leu Leu Thr Ala Ser Phe Thr Glu Gly Tyr Lys Ser Ser Glu Ile	
195 200 205	

ggt agt atc acc aaa tct tgc cct aat ttg aag act ttt cgt gta gct Val Ser Ile Thr Lys Ser Cys Pro Asn Leu Lys Thr Phe Arg Val Ala 210 215 220	672
tgt acg ttt gat ccg aga tac ttt gaa ttc gtc gga gac gag act ctc Cys Thr Phe Asp Pro Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Asp Glu Thr Leu 225 230 235 240	720
tcc gcc gta gct acc agt tcc cct aag tta acg ctt cta cac atg gtg Ser Ala Val Ala Thr Ser Ser Pro Lys Leu Thr Leu Leu His Met Val 245 250 255	768
gac aca gct tcg ttg gcg aat cct aga gct att cca ggt acg gaa gct Asp Thr Ala Ser Leu Ala Asn Pro Arg Ala Ile Pro Gly Thr Glu Ala 260 265 270	816
gga gat tca gct gtc acg gcg ggg acg cta att gaa gtt ttc tca ggt Gly Asp Ser Ala Val Thr Ala Gly Thr Leu Ile Glu Val Phe Ser Gly 275 280 285	864
tta ccg aat cta gag gag ctg gtt ctt gac gta gga aag gat gtg aag Leu Pro Asn Leu Glu Glu Leu Val Leu Asp Val Gly Lys Asp Val Lys 290 295 300	912
cat agt ggt gta gct tta gag gca ttg aat tct aaa tgc aag aag tta His Ser Gly Val Ala Leu Glu Ala Leu Asn Ser Lys Cys Lys Lys Leu 305 310 315 320	960
aga gta ttg aag cta gga cag ttc caa ggt gtt tgc tct gct aca gaa Arg Val Leu Lys Leu Gly Gln Phe Gln Gly Val Cys Ser Ala Thr Glu 325 330 335	1008
tgg agg agg ctc gac ggt gtg gct tta tgt gga gga ttg cag tcg ttg Trp Arg Arg Leu Asp Gly Val Ala Leu Cys Gly Gly Leu Gln Ser Leu 340 345 350	1056
tcg att aag aat tcc ggc gat ttg act gat atg ggt ttg gtg gct ata Ser Ile Lys Asn Ser Gly Asp Leu Thr Asp Met Gly Leu Val Ala Ile 355 360 365	1104

ggg aga gga tgt tgt aag ttg act acg ttt gag att caa ggg tgt gag Gly Arg Gly Cys Cys Lys Leu Thr Thr Phe Glu Ile Gln Gly Cys Glu	1152
370 375 380	
aat gta aca gtg gat gga cta aga aca atg gtt agt ctt cgg agt aag Asn Val Thr Val Asp Gly Leu Arg Thr Met Val Ser Leu Arg Ser Lys	1200
385 390 395 400	
act ttg act gat gtg aga atc tct tgc tgc aag aat ctt gac aca gct Thr Leu Thr Asp Val Arg Ile Ser Cys Cys Lys Asn Leu Asp Thr Ala	1248
405 410 415	
gct tct tta aag gca att gag ccg att tgt gat cgg atc aag aga ctg Ala Ser Leu Lys Ala Ile Glu Pro Ile Cys Asp Arg Ile Lys Arg Leu	1296
420 425 430	
cat ata gac tgt gtg tgg tct ggt tca gag gac gag gag gta gaa gga His Ile Asp Cys Val Trp Ser Gly Ser Glu Asp Glu Glu Val Glu Gly	1344
435 440 445	
aga gtg gaa act agt gag gct gac cac gaa gag gag gat gat ggt tac Arg Val Glu Thr Ser Glu Ala Asp His Glu Glu Glu Asp Asp Gly Tyr	1392
450 455 460	
gag agg agc cag aag agg tgc aag tat tca ttc gag gaa gaa cac tgc Glu Arg Ser Gln Lys Arg Cys Lys Tyr Ser Phe Glu Glu Glu His Cys	1440
465 470 475 480	
tca act agt gat gtg aat gga ttc tgt tct gaa gat aga gta tgg gag Ser Thr Ser Asp Val Asn Gly Phe Cys Ser Glu Asp Arg Val Trp Glu	1488
485 490 495	
aaa ctg gag tat cta tct tta tgg atc aat gtt gga gaa ttt ttg acg Lys Leu Glu Tyr Leu Ser Leu Trp Ile Asn Val Gly Glu Phe Leu Thr	1536
500 505 510	
cca tta cct atg aca gga cta gat gac tgt ccg aat ttg gaa gag att Pro Leu Pro Met Thr Gly Leu Asp Asp Cys Pro Asn Leu Glu Glu Ile	1584
515 520 525	

agg atc aag ata gaa gga gat tgc aga ggt aaa cgc agg cca gcc gag	1632
Arg Ile Lys Ile Glu Gly Asp Cys Arg Gly Lys Arg Arg Pro Ala Glu	
530 535 540	
cca gag ttt ggg tta agt tgt ctc gct ctc tac cca aag ctc tca aag	1680
Pro Glu Phe Gly Leu Ser Cys Leu Ala Leu Tyr Pro Lys Leu Ser Lys	
545 550 555 560	
atg cag tta gat tgc ggg gac aca atc ggt ttc gca ctg acc gca ccg	1728
Met Gln Leu Asp Cys Gly Asp Thr Ile Gly Phe Ala Leu Thr Ala Pro	
565 570 575	
cca atg cag atg gat ttg agt tta tgg gaa aga ttc ttc ttg acc gga	1776
Pro Met Gln Met Asp Leu Ser Leu Trp Glu Arg Phe Phe Leu Thr Gly	
580 585 590	
att gga agc ttg agc ttg agc gag ctt gat tat tgg cca cca cag gat	1824
Ile Gly Ser Leu Ser Leu Ser Glu Leu Asp Tyr Trp Pro Pro Gln Asp	
595 600 605	
aga gat gtt aac cag agg agt ctc tcg ctt cct gga gca ggt ctg tta	1872
Arg Asp Val Asn Gln Arg Ser Leu Ser Leu Pro Gly Ala Gly Leu Leu	
610 615 620	
caa gag tgc ctg act ttg agg aag ctg ttc atc cat gga aca gct cat	1920
Gln Glu Cys Leu Thr Leu Arg Lys Leu Phe Ile His Gly Thr Ala His	
625 630 635 640	
gag cat ttc atg aac ttt ttg ttg aga atc cca aac tta agg gat gta	1968
Glu His Phe Met Asn Phe Leu Leu Arg Ile Pro Asn Leu Arg Asp Val	
645 650 655	
cag ctt aga gca gac tat tat ccg gcg ccg gag aac gat atg agc aca	2016
Gln Leu Arg Ala Asp Tyr Tyr Pro Ala Pro Glu Asn Asp Met Ser Thr	
660 665 670	
gag atg aga gtt ggt tcg tgt agc cga ttc gag gac caa ttg aac agc	2064
Glu Met Arg Val Gly Ser Cys Ser Arg Phe Glu Asp Gln Leu Asn Ser	
675 680 685	

cgc aac atc att gac tga 2082
 Arg Asn Ile Ile Asp ***
 690

<210> 2
 <211> 693
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 2
 Met Ala Ser Thr Thr Leu Ser Asp Leu Pro Asp Val Ile Leu Ser Thr
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Val Ser Asp Ser Arg Ala Arg Asn Ser Leu Ser Leu
 20 25 30

Val Ser His Lys Phe Leu Ala Leu Glu Arg Ser Thr Arg Ser His Leu
 35 40 45

Thr Ile Arg Gly Asn Ala Arg Asp Leu Ser Leu Val Pro Asp Cys Phe
 50 55 60

Arg Ser Ile Ser His Leu Asp Leu Ser Phe Leu Ser Pro Trp Gly His
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Ala Ser Leu Pro Ile Asp His Gln Asn Leu Leu Ala Leu
 85 90 95

Arg Leu Lys Phe Cys Phe Pro Phe Val Glu Ser Leu Asn Val Tyr Thr
 100 105 110

Arg Ser Pro Ser Ser Leu Glu Leu Leu Leu Pro Gln Trp Pro Arg Ile
 115 120 125

Arg His Ile Lys Leu Leu Arg Trp His Gln Arg Ala Ser Gln Ile Pro
 130 135 140

Thr Gly Gly Asp Phe Val Pro Ile Phe Glu His Cys Gly Gly Phe Leu
 145 150 155 160

Glu Ser Leu Asp Leu Ser Asn Phe Tyr His Trp Thr Glu Asp Leu Pro
 165 170 175

Pro Val Leu Leu Arg Tyr Ala Asp Val Ala Ala Arg Leu Thr Arg Leu
 180 185 190

Asp Leu Leu Thr Ala Ser Phe Thr Glu Gly Tyr Lys Ser Ser Glu Ile
 195 200 205

Val Ser Ile Thr Lys Ser Cys Pro Asn Leu Lys Thr Phe Arg Val Ala
 210 215 220

Cys Thr Phe Asp Pro Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Asp Glu Thr Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Val Ala Thr Ser Ser Pro Lys Leu Thr Leu Leu His Met Val
 245 250 255

Asp Thr Ala Ser Leu Ala Asn Pro Arg Ala Ile Pro Gly Thr Glu Ala
 260 265 270

Gly Asp Ser Ala Val Thr Ala Gly Thr Leu Ile Glu Val Phe Ser Gly
 275 280 285

Leu Pro Asn Leu Glu Glu Leu Val Leu Asp Val Gly Lys Asp Val Lys
 290 295 300

His Ser Gly Val Ala Leu Glu Ala Leu Asn Ser Lys Cys Lys Lys Leu
 305 310 315 320

Arg Val Leu Lys Leu Gly Gln Phe Gln Gly Val Cys Ser Ala Thr Glu
 325 330 335

Trp Arg Arg Leu Asp Gly Val Ala Leu Cys Gly Gly Leu Gln Ser Leu
 340 345 350

Ser Ile Lys Asn Ser Gly Asp Leu Thr Asp Met Gly Leu Val Ala Ile
 355 360 365

Gly Arg Gly Cys Cys Lys Leu Thr Thr Phe Glu Ile Gln Gly Cys Glu
 370 375 380

Asn Val Thr Val Asp Gly Leu Arg Thr Met Val Ser Leu Arg Ser Lys
 385 390 395 400

Thr Leu Thr Asp Val Arg Ile Ser Cys Cys Lys Asn Leu Asp Thr Ala
 405 410 415

Ala Ser Leu Lys Ala Ile Glu Pro Ile Cys Asp Arg Ile Lys Arg Leu
 420 425 430

His Ile Asp Cys Val Trp Ser Gly Ser Glu Asp Glu Glu Val Glu Gly
 435 440 445

Arg Val Glu Thr Ser Glu Ala Asp His Glu Glu Glu Asp Asp Gly Tyr
 450 455 460

Glu Arg Ser Gln Lys Arg Cys Lys Tyr Ser Phe Glu Glu Glu His Cys
 465 470 475 480

Ser Thr Ser Asp Val Asn Gly Phe Cys Ser Glu Asp Arg Val Trp Glu
 485 490 495

Lys Leu Glu Tyr Leu Ser Leu Trp Ile Asn Val Gly Glu Phe Leu Thr
 500 505 510

Pro Leu Pro Met Thr Gly Leu Asp Asp Cys Pro Asn Leu Glu Glu Ile
 515 520 525

Arg Ile Lys Ile Glu Gly Asp Cys Arg Gly Lys Arg Arg Pro Ala Glu
 530 535 540

Pro Glu Phe Gly Leu Ser Cys Leu Ala Leu Tyr Pro Lys Leu Ser Lys
 545 550 555 560

Met Gln Leu Asp Cys Gly Asp Thr Ile Gly Phe Ala Leu Thr Ala Pro
 565 570 575

Pro Met Gln Met Asp Leu Ser Leu Trp Glu Arg Phe Phe Leu Thr Gly

580 585 590
 Ile Gly Ser Leu Ser Leu Ser Glu Leu Asp Tyr Trp Pro Pro Gln Asp
 595 600 605
 Arg Asp Val Asn Gln Arg Ser Leu Ser Leu Pro Gly Ala Gly Leu Leu
 610 615 620
 Gln Glu Cys Leu Thr Leu Arg Lys Leu Phe Ile His Gly Thr Ala His
 625 630 635 640
 Glu His Phe Met Asn Phe Leu Leu Arg Ile Pro Asn Leu Arg Asp Val
 645 650 655
 Gln Leu Arg Ala Asp Tyr Tyr Pro Ala Pro Glu Asn Asp Met Ser Thr
 660 665 670
 Glu Met Arg Val Gly Ser Cys Ser Arg Phe Glu Asp Gln Leu Asn Ser
 675 680 685
 Arg Asn Ile Ile Asp ***
 690

<210> 3
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 3
 Met Ala Ser Thr Thr Leu Ser Asp Leu Pro Asp Val Ile Leu Ser Thr
 1 5 10 15
 Ile Ser Ser Leu Val Ser Asp Ser Arg Ala Arg Asn Ser Leu Ser Leu
 20 25 30
 Val Ser His Lys Phe Leu Ala Leu Glu Arg Ser Thr Arg Ser His Leu
 35 40 45
 Thr Ile Arg Gly Asn Ala Arg Asp Leu Ser Leu Val Pro Asp Cys Phe

50	55	60	
Arg Ser Ile Ser His Leu Asp Leu Ser Phe Leu Ser Pro Trp Gly His			
65	70	75	80
Thr Leu Leu Ala Ser Leu Pro Ile Asp His Gln Asn Leu Leu Ala Leu			
	85	90	95
Arg Leu Lys Phe Cys Phe Pro Phe Val Glu Ser Leu Asn Val Tyr Thr			
100	105	110	
Arg Ser Pro Ser Ser Leu Glu Leu Leu Leu Pro Gln Trp Pro Arg Ile			
115	120	125	
Arg His Ile Lys Leu Leu Arg Trp His Gln Arg Ala Ser Gln Ile Pro			
130	135	140	
Thr Gly Gly Asp Phe Val Pro Ile Phe Glu His Cys Gly Gly Phe Leu			
145	150	155	160
Glu Ser Leu Asp Leu Ser Asn Phe Tyr His Trp Thr Glu Asp Leu Pro			
165	170	175	
Pro Val Leu Leu Arg Tyr Ala Asp Val Ala Ala Arg Leu Thr Arg Leu			
180	185	190	
Asp Leu Leu Thr Ala Ser Phe Thr Glu Gly Tyr Lys Ser Ser Glu Ile			
195	200	205	
Val Ser Ile Thr Lys Ser Cys Pro Asn Leu Lys Thr Phe Arg Val Ala			
210	215	220	
Cys Thr Phe Asp Pro Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Asp Glu Thr Leu			
225	230	235	240
Ser Ala Val Ala Thr Ser Ser Pro Lys Leu Thr Leu Leu His Met Val			
	245	250	255
Asp Thr Ala Ser Leu Ala Asn Pro Arg Ala Ile Pro Gly Thr Glu Ala			
260	265	270	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增CAPS标记物F14N22.13的5'引物	
<400>	6	
	gatgatgatc gtcattttat gg	22
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增CAPS标记物F14N22.13的3'引物	
<400>	7	
	gatttctatt cgtgatcgaa ag	22
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增ORE9的5'引物	
<400>	8	
	attgagtttg tactccggat	20
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>

<223> 用于PCR扩增ORE9的3'引物

<400> 9

tctaaatagt ttgaaacgg

19

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR扩增ORE9(1-49)片断的5'引物

<400> 10

ctacgcgat cctaaccatg gcttccacta ctctctc

37

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR扩增ORE9(1-49)片断的3'引物

<400> 11

gatgcctgca ggattgatcg gaaacagtcg g

31

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR扩增ORE9(50-693)片断的5'引物

<400>	12	
ctacgcggat cctaggcaac gctcgtgatc t		31
<210>	13	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增ORE9(50-693)片断的3'引物	
<400>	13	
gatgcctgca ggattgatcg gaaacagtcg g		31
<210>	14	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增编码ASK1片断基因的5'引物	
<400>	14	
ctacgcgaat tctaaccatg tctgcaaga ag		32
<210>	15	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增编码ASK1片断基因的3'引物	
<400>	15	
gatgcccatg gtcattcaaa agcccattgg t		31

FIG. 1

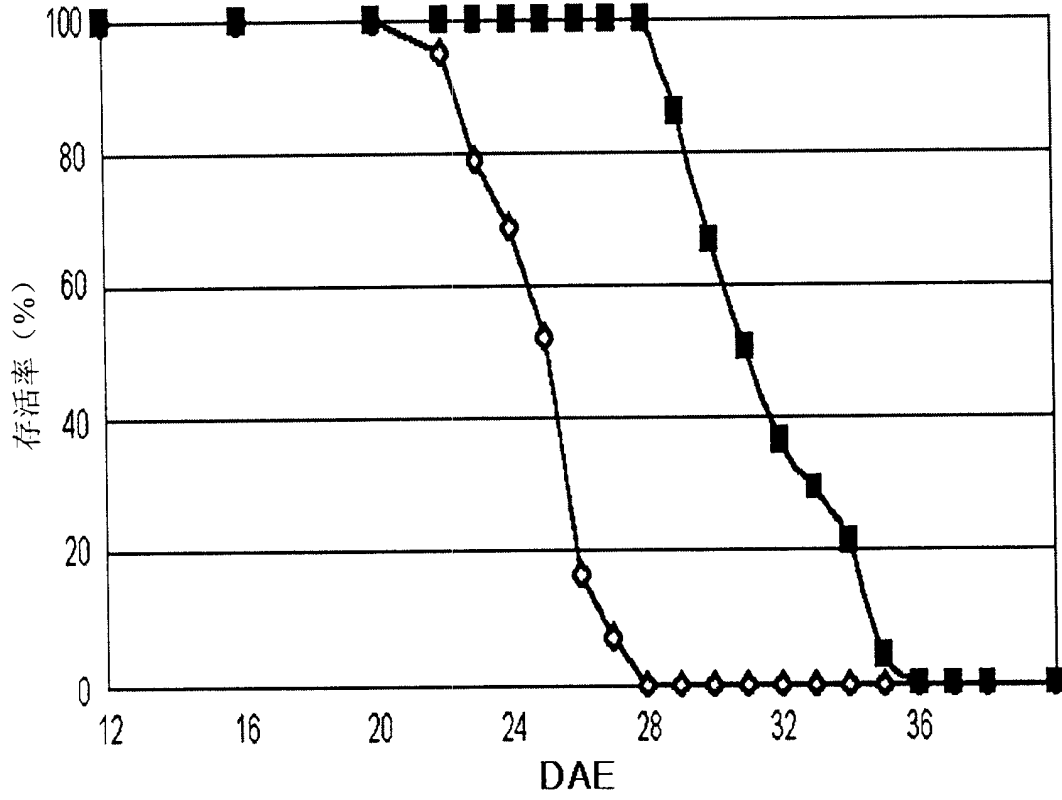


FIG. 2a

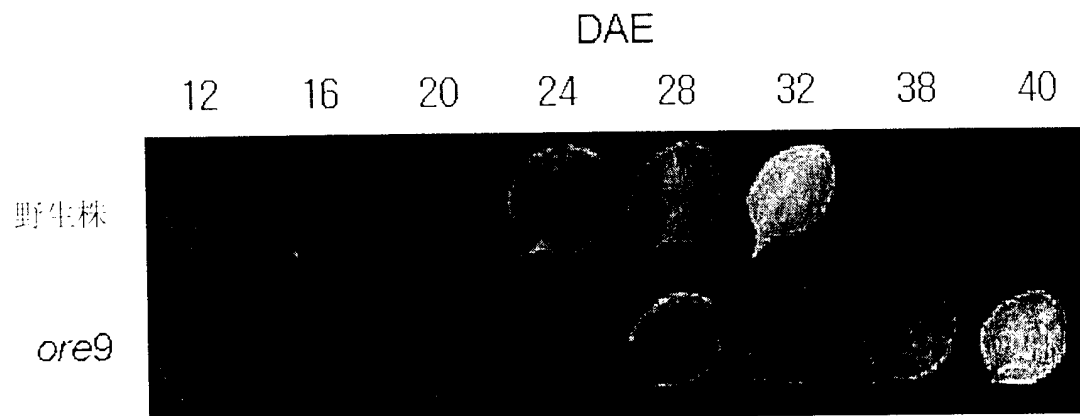


FIG. 2b

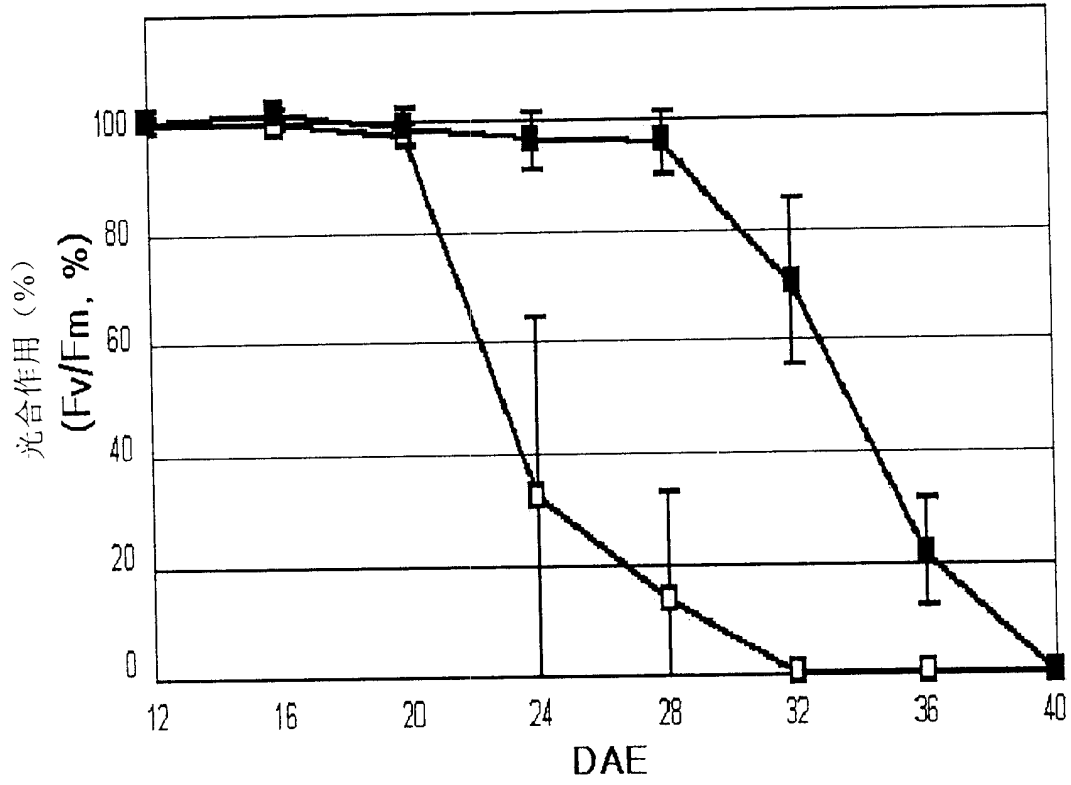


FIG. 2c

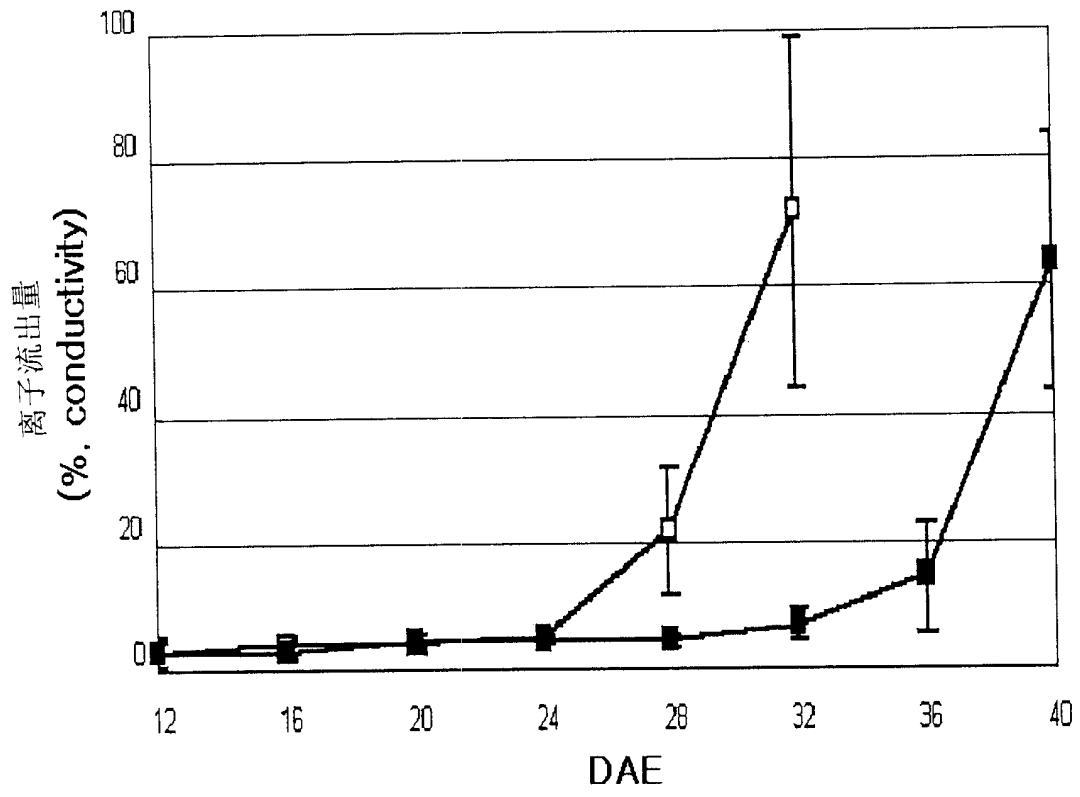


FIG. 3

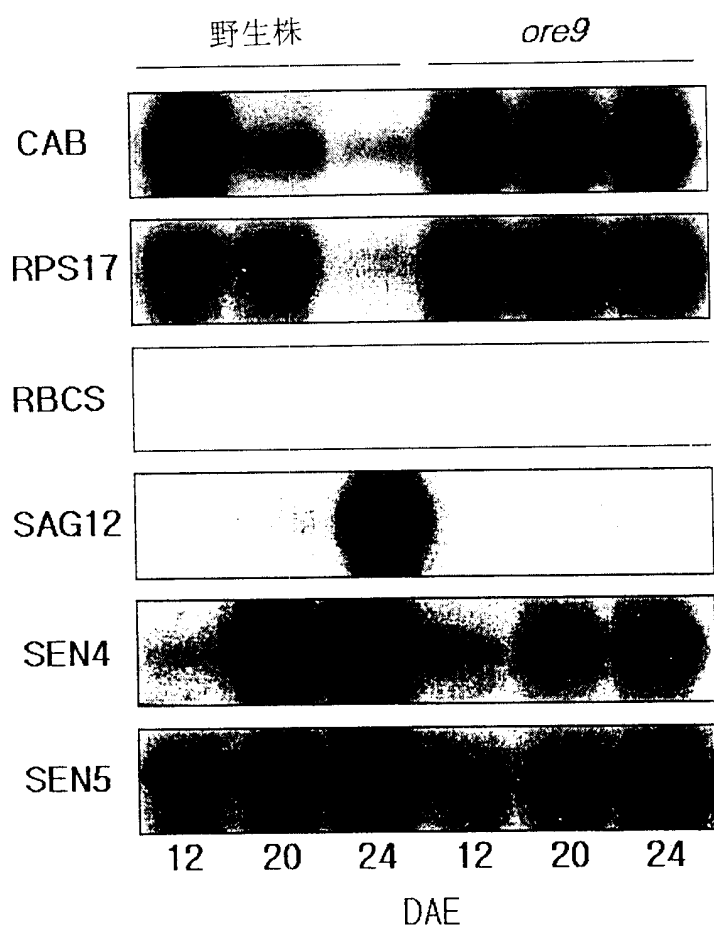


FIG. 4a

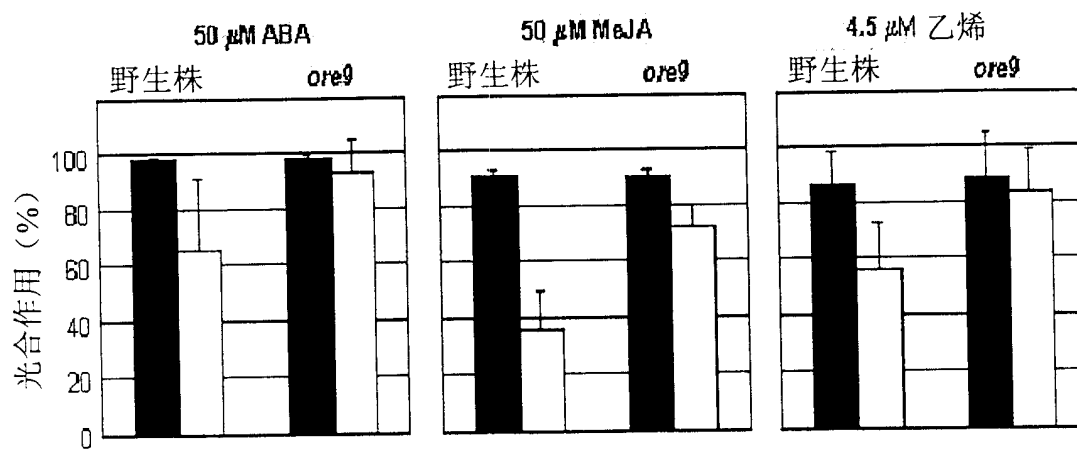


FIG. 4b

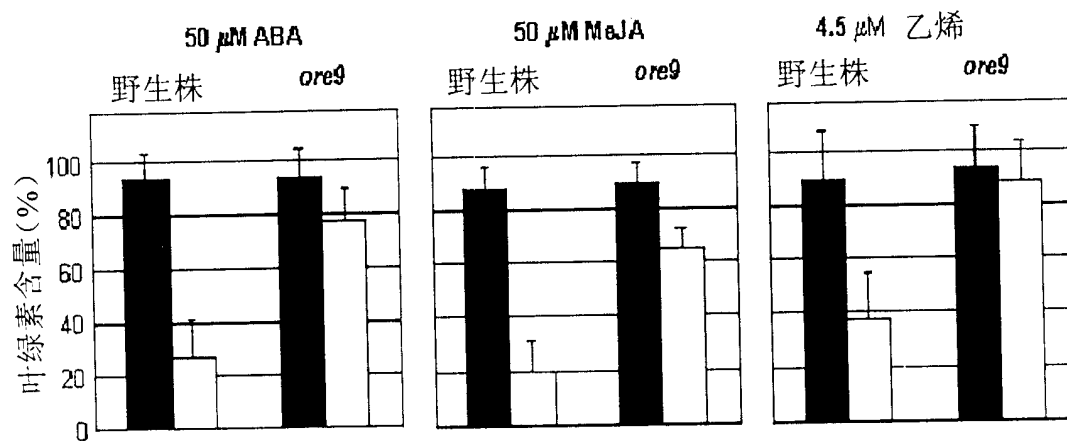


FIG. 5a

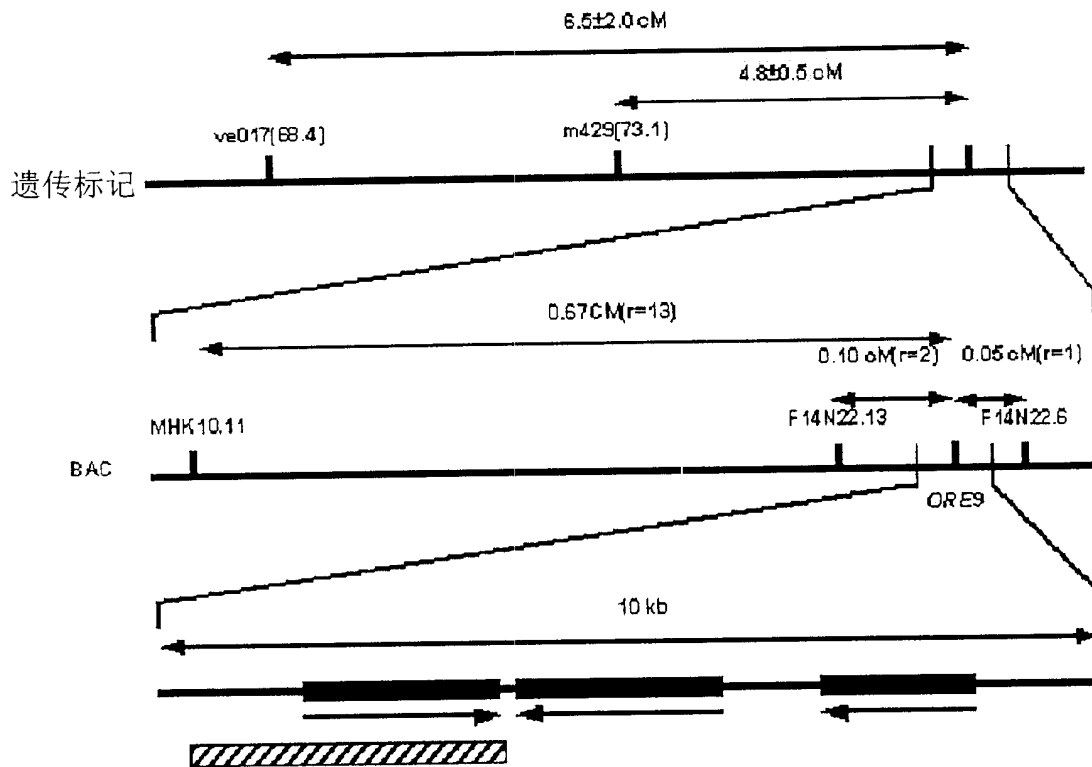


FIG. 5b

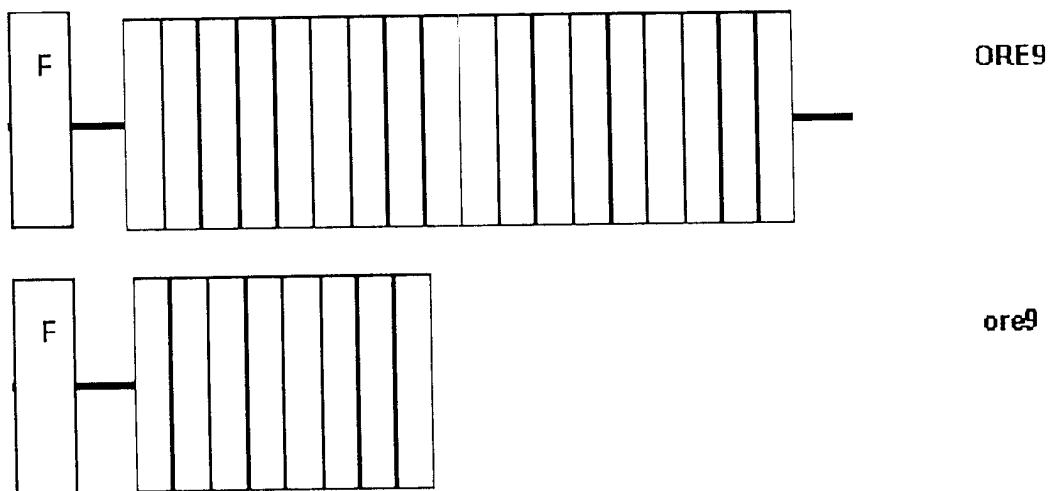


FIG. 6

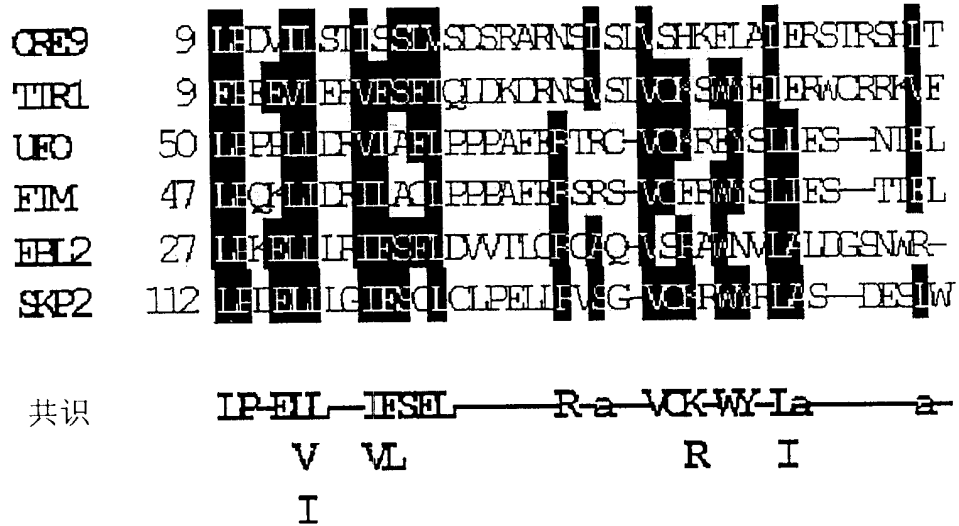


FIG. 7a

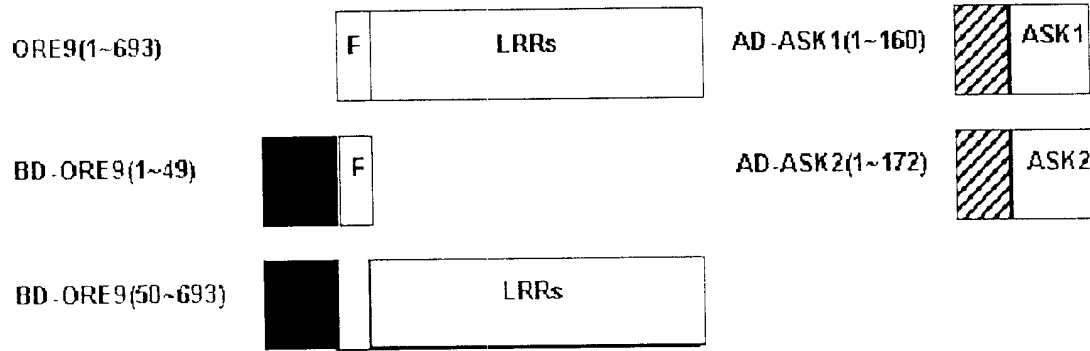


FIG. 7b

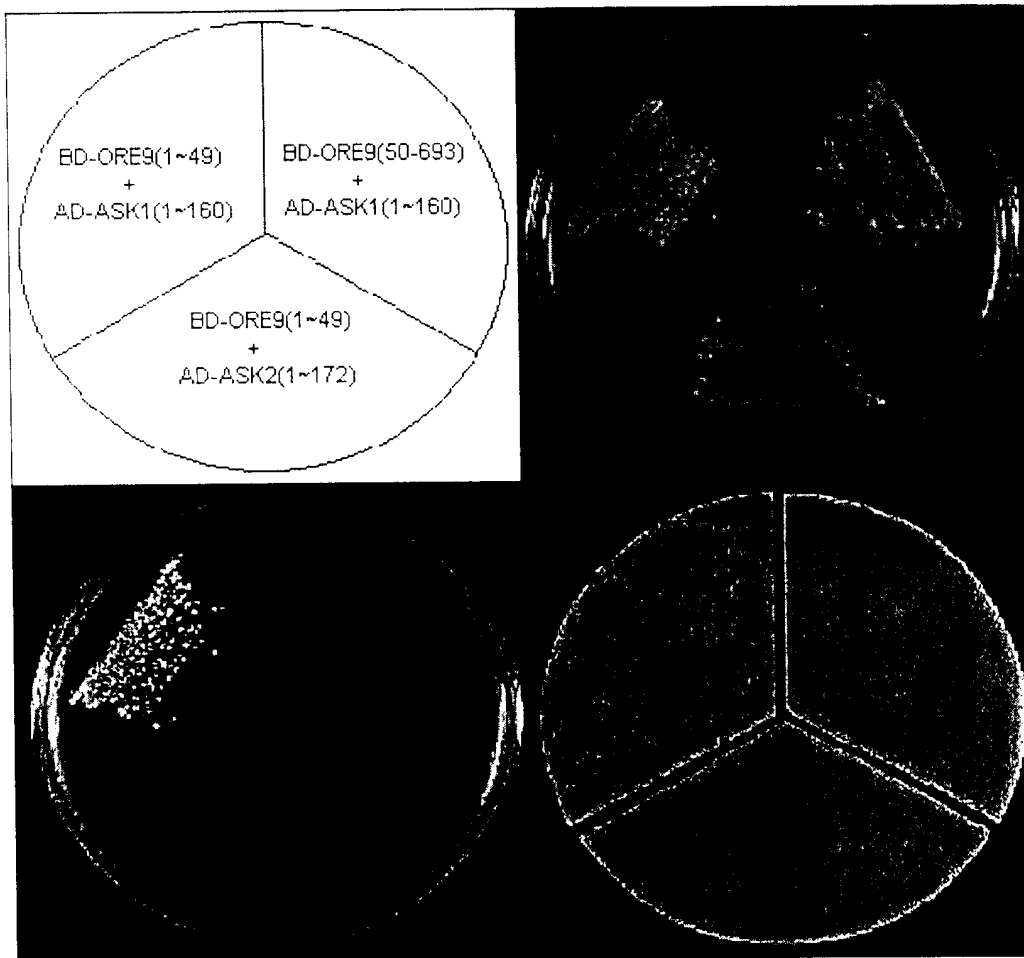


FIG. 8

