

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410083659.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年9月12日

[11] 授权公告号 CN 100336909C

[22] 申请日 2004.10.15

[21] 申请号 200410083659.4

[30] 优先权

[32] 2003.10.16 [33] CN [31] 200310100451.4

[73] 专利权人 北京未名凯拓农业生物技术有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地西路39号北大生物城凯拓公司

[72] 发明人 邓兴旺 薛永彪 王喜萍 夏勉
苏宁

[56] 参考文献

US2003/0017593A1 2003.1.23

role of a cop1 interactive protein in mediating light regulated gene expression in arabidopsis Yoshiharu Y. Yamamoto et al, The plant cell, Vol. 10 1998

审查员 邹吉承

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称

一种植物双元杂交表达载体及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种植物双元杂交表达载体及其应用。该植物双元杂交表达载体，由启动子载体和功能基因表达载体组成；所述启动子载体包括目的启动子与转录激活因子编码基因的融合序列；所述功能基因表达载体包括所述目的基因与所述转录激活因子的调控元件的融合序列。本发明还提供了利用该植物双元杂交表达载体进行植物转基因杂交育种的方法。该植物双元杂交表达载体还可用于筛选启动子和鉴定目的基因功能。本发明可用于定向改造和设计植物的性状，可缩短植物杂交育种和改良品种的周期，保证了杂交良种的纯度。

1、一种植物双元杂交表达载体，由启动子载体和功能基因表达载体组成，其特征在于，所述启动子载体包含启动子与转录激活因子编码基因的融合序列；所述功能基因表达载体包含目的基因与所述转录激活因子的调控元件的融合序列；所述的目的基因为序列1所示的RDG基因。

2、根据权利要求1所述的植物双元杂交表达载体，其特征在于：所述的转录激活因子为Gal4、HAP1、Gal4(DBD)-VP16或HAP1-VP16。

3、根据权利要求1、2所述的植物双元杂交表达载体，其特征在于：所述功能基因表达载体和所述启动子载体分别选用不同筛选标记基因。

4、一种利用权利要求1-3中任一所述的植物双元杂交表达载体进行植物杂交育种的方法，包括以下步骤：

1) 将功能基因表达载体和启动子载体分别转化植物，获得独立的父本和母本转基因植株；

2) 将所述父本和母本转基因植株进行杂交，得到转基因杂交后代。

5、根据权利要求4所述的方法，其特征在于：所述父本为被所述启动子载体转化的植株，所述母本为被所述功能基因表达载体转化的植株。

6、根据权利要求4、5所述的方法，其特征在于：所述植物为水稻。

7、根据权利要求6所述的方法，其特征在于：所述转基因杂交后代为矮化水稻。

一种植物双元杂交表达载体及其应用

技术领域

本发明涉及植物基因工程领域中一种植物双元杂交表达载体及其应用，特别涉及一种植物双元杂交表达载体，利用该植物双元杂交表达载体进行植物转基因杂交育种的方法和该植物双元杂交表达载体在筛选启动子和鉴定目的基因功能中的应用。

背景技术

在酵母、昆虫、植物以及哺乳动物等生物中，均存在一类转录激活因子（transcriptional activator），能够激活基因的转录。这类激活因子的结构都基本相似，由一个 DNA 结合区（结构域）（DNA-binding domain, DBD）和一个转录激活区（结构域）（transcriptional activation domain, AD）组成，可以同转录组分的操纵子结合并激活转录反应。其中酵母蛋白 Gal4 (Allen, L. & Raymond F. (1984). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Gal4 gene. *Molecular and Cellular Biology* 4, 260-267; Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulation mechanism: the Gal4 genes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 1987, 51, 458-476) 就是一个典型的转录激活因子，它由 881 个氨基酸组成，N 端 1-147 位氨基酸含细胞核定位序列和与酵母启动子上游激活序列结合的结构域，它与酵母细胞启动子上游激活区序列结合；C 端 768-881 位氨基酸含转录激活结构域，可激活起始转录。为增强转录激活因子激活转录的能力，常在 DNA 结合区加入一段负电荷蛋白 (Giniger, E., Varnum, S.M. & Ptashne M. (1985). Specific DNA binding of Gal4, appositive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774)。按照 Ivan Sadowski (1988) 的方法，可将从疱疹病毒中克隆的高酸性蛋白 VP16 (Dalrymple, M. A., McGeoch, D. J., Davison, A. J. & Preston C. M., DNA sequence of the herpes simplex virus type I gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters. *Nucleic Acids Research*, 1984, 13(21), 7865-7879) 的基因与 Gal4 的 DNA 特异结合区 (Gal4 DBD) 构建成融合基因。在疱疹病毒中，VP16 通过其末端氨基酸序列结合宿主编码蛋白，该蛋白可以识别启动子 DNA 序列，从而快速激活转录病毒早期表达基因 (Triezenberg, S. J., LaMarco, K.L. & McKnight, S.L., (1988). Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Development*. 2, 730-742; Preston, C.M., Frame, M.C. & Campbell, M. E. M., (1988).

A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence. Cell 52, 425-434)。研究表明, Gal4(DBD)-VP16 融合蛋白可以高效地激活目的基因的转录 (Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M., (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. Nature. 335, 563-4)。

多年来人们对这类转录因子做了大量深入的研究, 并广泛应用到酵母、昆虫、动物细胞(Fischer, J.A., Iniger, E., Maniatis, T. & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. Nature 332, 853-856; Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M., (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. Nature. 335, 563-564) 以及植物体系(Wilde R.J. Cooke S.E., Brammar W.J., et al, (1994). Control of gene expression in plant cells using a VP16 chimeric protein. Plant Molecular Biology 24, 381-388; Guyer, D., Tuttle, A., Rouse, S., Volrath, S., Johnson, M., Potter, S., Grollach, J., Goff, S., Crossland, L. and Ward, E., (1998). Activation of Latent Transgenes in Arabidopsis Using a Hybrid Transcription Factor. Genetics, 149, 633-639) 的研究中。利用转录激活因子的特点, 人们建立了各种双元杂交表达系统, 比如现在广泛应用的酵母双杂交系统、动物细胞培养系统中的双元表达体系等, 能够有效地在转录水平调节基因表达, 研究目标基因的特性和功能。

在以往的研究中, 人们更侧重于将双元表达系统用于理论研究, 常常利用转录激活因子双元杂交系统调控基因的特异性表达或表达水平, 从而更容易地研究目的基因尤其是致死基因在生物体中的功能。

酵母HAP1 (Heme Activator Protein 1) 是另一个Gal4转录因子家族的成员, 它有保守的Zn₂Cys₆ 集团。HAP1 能够结合许多基因的UASs (upstream activation sequences) 区, 并激活这些基因的转录。利用HAP1的DNA结合区和VP16构建融合蛋白(HAP1-VP16) 同样也能提高它在植物中表达效率和与UAS的结合能力(Hach A, Hon T, Zhang L. The coiled coil dimerization element of the yeast transcriptional activator Hap1, a Gal4 family member, is dispensable for DNA binding but differentially affects transcriptional activation. Biol Chem 2000 Jan 7;275(1):248-54.)。许多实验证明它在植物中可以高效地激活与其调控元件UAS融合的目的基因的转录(Fred Berger, Jim Haseloff, John Schiefelbein and Liam Dolan, Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. Current Biology

8:421-430, 1998; G Cnops, X Wang, P Linstead, M Van Montagu, M Van Lijsebettens, and L Dolan, *Tornadol* and *tornado2* are required for the specification of radial and circumferential pattern in the Arabidopsis root. *Development* 127:3385-3394, 2000)。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种植物双元杂交表达载体。

本发明所提供的植物双元杂交表达载体，由启动子载体和功能基因表达载体组成；所述启动子载体包括目的启动子与转录激活因子编码基因的融合序列；所述功能基因表达载体包括所述目的基因与所述转录激活因子的调控元件的融合序列。

所述目的启动子可为组成型、诱导型或组织特异性表达启动子。

所述转录激活因子可为具有与 Gal4 相同或相似功能的所有具有 DNA 结合结构域和转录激活结构域的转录激活因子如酵母的 HAP1，酵母的 GCN4, E. coli 的 LexA, HIV 的 tat 等，以及其它具有相似转录激活活性功能的基因；优选为 Gal4 和 HAP1 转录激活因子，尤其优选为 Gal4(DBD)-VP16 和 HAP1-VP16。

所述功能基因表达载体可包括一个目的基因或多个目的基因；在多基因表达载体中，串联的每个基因的上游都有 Gal4 的调控元件(Gal40P)或 HAP1 的调控元件(UAS)。

所述目的基因可以是任何可以利用的基因，如 RDG 基因。RDG 基因具有序列中序列 1 的核苷酸序列。序列 1 由 1631 个碱基组成。

所述功能基因表达载体和所述启动子载体可含有相同或不同的筛选标记。

本发明的第二个目的是提供一种建立在植物双元杂交表达载体之上，有效的植物转基因杂交育种方法。

本发明所提供的植物转基因杂交育种方法，包括以下步骤：

1) 将所述功能基因表达载体和所述启动子载体分别转化植物，获得独立的父本和母本转基因植株；

2) 所述父本和母本转基因植株进行杂交，得到杂交后代。

父本既可以是被启动子表达载体转化的植株，也可以是被功能基因表达载体转化的植株，母本也同样，但优选为父本为被所述启动子表达载体转化的植株，母本为被所述功能基因表达载体转化的植株。

所述功能基因表达载体和所述启动子载体分别选用不同筛选标记基因（分别用于父本和母本），在杂交后代中，通过筛选与母本不同的父本选择标记即可快速选出杂交后代种子。

本发明的第三个目的是提供一种建立在植物双元杂交表达载体基础上的，较方便

地筛选启动子和鉴定目的基因功能的方法。

本发明提供的筛选启动子的方法包括以下步骤：

1) 将待鉴定启动子及报告基因克隆到植物双元杂交表达载体的启动子载体中，得到启动子检测载体；

2) 利用启动子检测载体转化植物或瞬间表达系统，并通过报告基因的表达来鉴定启动子的功能。

pSGF 和 pSGG (物理图谱如图 2) 是有代表性的启动子检测载体。启动子检测载体可按照如下方法构建：将转录因子相应的调控元件与报告基因 (GUS 或 GFP) 融合后与转录因子构建在同一载体中，在转录因子的上游引入多克隆位点 (HindIII, SpeI, KpnI)，将新克隆的启动子插入到多克隆位点，在转化植物或瞬间表达系统中通过检测报告基因的表达鉴定启动子功能。

本发明所提供的鉴定目的基因功能的方法，包括以下步骤：

1) 将所述功能基因表达载体和所述启动子载体分别转化植物，获得独立的父本和母本转基因植株；所述功能基因表达载体中的功能基因为待检测基因；

2) 所述父本和母本转基因植株进行杂交，得到转基因杂交后代，观察杂交后代，判定待检测基因的功能。

为了更高效地研究不同启动子和功能基因，可在所述启动子检测载体和所述功能基因表达载体中分别引入 LR 重组位点得到植物高效启动子检测载体，如 pSGAF、pSGAG (如图 4)，和植物高效单基因表达载体，如 pSZC, pSZN, pHUG-1, pKUG-1 (如图 5) 以及植物高效多基因表达载体，如 pYLVS-LR、pYLSV-LR、pYLVUS-1, pYLSUV-1 (如图 6)。这样，将所有目的启动子和功能基因分别克隆到含有 LR 重组位点的中间载体后，可以很容易地通过 LR 重组反应，将目的启动子和基因分别克隆到所述双元杂交表达载体中，从而提高了克隆效率，可以高通量地对启动子和功能基因进行研究。

本发明的原理如图 1 所示，双元杂交表达载体由启动子载体和功能基因表达载体组成：将所述功能基因与转录因子 Gal4/HAP1 的调控元件 (Gal40P/UAS) 融合，构建成植物功能基因表达载体；将克隆的启动子与转录激活因子的 DNA 结合区及转录激活区 Gal4(DBD)-VP16/HAP1-VP16 的基因片段融合构建成启动子载体，为了能够快速高效地检测启动子功能，在上述基本结构后面，加上了与 Gal4 调控元件融合的报告基因 GUS 或 GFP 序列。将启动子载体和目的基因载体分别转化植物，获得转基因亲本，所转入的目的基因在亲本中不表达，不影响亲本性状。分别以获得的启动子和功能基因转化植株为亲本进行杂交，在杂交后代中，转录激活因子的 DNA 结合区与相应的调控元件结合，该转录因子的激活区便激活目的基因的转录，使目的基因在杂交后代中

表达，从而确定目的基因的功能，最终获得所需目的转基因植物。

本发明在转录因子双元表达调控思想的基础上，巧妙地设计了相关的载体系统和选择标记，将启动子系统和功能基因分别克隆到双元系统的两个载体上，并分别转化植物，然后，通过不同组合的杂交，高效率地研究目的启动子和目的基因的功能，并通过父本选择标记有效地筛选出杂交后代，使双元杂交体系在作物育种和改良中的应用成为可能。

本发明利用双元杂交表达载体分别转化植物，以获得独立的父本和母本转基因植物。分别以两个不同转化植株为亲本进行杂交，在杂交后代中，转录因子的 DNA 结合区与调控元件(Gal40P 或 UAS)结合，该转录因子活性区能够激活目的基因的转录，使目的基因在杂交后代中表达，从而表现目的基因的功能。在多基因表达载体中，串联的每个基因的上游都有 Gal4/OP 或 UAS，因此，当杂交后转录因子可同时激活多个基因的表达，可以同时观察不同目的基因在植物体内的相互作用。利用本方法对作物品种进行改良和育种，可以大大提高育种效率和成功率。

同时，将目的启动子和功能基因分别转入父本和母本植株中，启动子和功能基因通过不同组合进行杂交，可高效快速地研究植物启动子和基因的功能，避免重复转化植物，缩短植物育种和改良品种的周期。

另外，双元杂交表达载体选用不同筛选基因（分别用于父本和母本），在杂交后代中，通过筛选与母本不同的父本选择标记即可快速选出杂交后代种子，有效地选出具有优良性状的杂交后代，完全去除来自母本自交的非杂交种子的污染，有效地保证了杂交良种的纯度，从而大大提高育种效率，很好地解决了杂交育种中非杂交种子混杂影响种子质量与纯度的问题。

本发明首次将水稻矮化基因（水稻赤霉素突变基因）转化拟南芥或水稻，与启动子转化的拟南芥或水稻株系杂交后，后代出现了矮化现象（图 9），证明了该双元杂交系统在植物体系中是可以应用的；而且，通过该双元杂交表达载体，可以对植物的品质和特性定向地进行改良。利用本发明的技术，水稻矮化基因使杂交后代植株株高变矮，在分子水平上克服了植物杂种优势中植株过高而易倒伏的缺点，将促进杂交育种技术的应用。

本发明的双元杂交表达载体可应用于水稻杂交育种的研究及水稻启动子和功能基因的研究。特别是随着水稻全基因组芯片研究的展开，使在短期内克隆一系列可诱导或可特异表达的启动子以及重要基因成为可能，结合双元杂交表达系统将这些新克隆的启动子和功能基因引入目前普遍应用的水稻母本和父本中，不仅可以快速研究启动子和基因的功能，而且还可以将已鉴定的启动子和功能基因通过不同的组合直接应

用到杂交水稻中，结合大田杂交育种技术，对作物进行定向改造，加快改良水稻品种速度，缩短育种周期。

通过本发明的方法，可以实现在分子水平上对植物的性状进行设计，即基于杂交技术的植物性状的分子设计；可以充分利用功能基因资源，跨越普通杂交育种的种间障碍，体现分子水平上育种的优点。该方法在植物功能基因组研究以及作物分子育种等方面有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为使用双元杂交表达载体进行植物转基因杂交育种方法的原理示意图

图 2 为启动子检测载体 pSGF 和 pSGG 的物理图谱

图 3 为玉米 Ubiquitin 启动子 (UP) 检测载体 pSGPG 及其报告基因 GFP 或 GUS 在 UP 的调控下在洋葱表皮细胞中的表达。

图 4 为植物高效启动子检测载体 pSGAG 和 pSGAF

图 5 为植物高效单基因表达载体 pSZC、pSZN、pHUG-1 和 pKUG-1 的结构图谱

图 6 为植物高效多基因表达载体 pYLVSRLR、pYLSVR-LR、pYLVUS-1 和 pYLSUV-1 的结构图谱

图 7 为 RDG 部分氨基酸序列及 5' 端突变示意图

图 8 为含 RDG 基因的双元杂交表达载体 pSBR23 和 pSHR6 的结构图谱

图 9A 为转化植株杂交得到的后代—拟南芥

图 9B 为转化植株杂交得到的后代—水稻

图 10 为拟南芥杂交后代 Northern-blotting 检测结果

图 11 为 Gal4 DBD-VP16 转化拟南芥(父本)Western 检测结果

图 12 为 RT-PCR 法检测水稻杂交后代的基因表达

具体实施方式

实施例 1、几种植物表达载体的构建

1、启动子检测载体的构建

以穿梭载体 pBI121 为基本载体，按常规方法在转基因区 RB 和 LB 之间加入：启动子 Pnos，潮霉素基因 aphIV 和基因的终止子 Tnos，随后的 *HindIII*、*SpeI*、*KpnI* 位点是被检测的启动子的插入位点，在该启动子插入位点下游是 Gal4 (DBD) 和 VP16 的融合基因序列 GVP16 及其终止子 Tnos，再下游则是报告基因的表达区，包括 Gal4 的调控元件，报告基因 GUS 或 GFP 序列及其终止子 Tnos，结果如图 2 所示，构建了含报告基因 GUS 序列的启动子检测载体 pSGG 和含 GFP 序列的启动子检测载体 pSGF。其中，载体的选择标记基因为潮霉素基因 aphIV (植物) 和卡那霉素基因 (细菌)。

该结构转入植物后，在被检测启动子的作用下表达的 GVP16 转录因子与其调控元件结合调控报告基因的表达（图 3），通过观察报告基因的表达，可推测出启动子的功能。

为了高效率地检测不同的启动子，通过 PCR 扩增载体 pDEST14（Invitrogen 公司产品）上含有 LR 重组位点的片段（attR1-Cm^r-ccdB-attR2）并在两端分别引入酶切位点 HindIII 和 KpnI，酶切回收后，插入到上述启动子检测载体 pSGG 和 pSGF 的多克隆位点 HindIII 和 KpnI 之间，构建成植物高效启动子检测载体 pSGAG 和 pSGAF，如图 4 所示，其中，Cm^r 为氯霉素筛选基因。该载体可以方便快捷地利用 LR 重组反应将克隆在中间载体的启动子转入到启动子检测载体中。

2、植物单基因高效表达系统载体的构建

利用穿梭载体 pZP222，通过 HindIII 和 XbaI 位点将 Gal40P/TATA 顺序插入到多克隆位点，再利用 KpnI 和 EcoI 将 Tnos 插入。TMV Ω -attR1-Cm^r-ccdB-attR2-9xMyc-6xHis-2xIgG binding domain 片段（见序列 2）则是通过 KpnI 位点和钝化的 XbaI 位点克隆到该载体中，构建成 C 端有多肽及抗原标记的载体 pSZC（如图 5）。其中 9xMyc, 6xHis 为多肽标签，表达后的 Myc 或 His 多肽可与相应的抗体结合，用于鉴定表达的目的基因，而 2xIgG binding domain 可与抗体 IgG 结合，更便于蛋白质的分离。TMV Ω 为转录增强子，ccdB 基因的表达会使普通的大肠杆菌致死，而大肠杆菌 DB3.1 则可正常存活。该基因的加入可以将未发生 LR 重组反应的载体在普通大肠杆菌中筛除。pSZN 的构建与 pSZC 相似，除了以 TMV Ω -2xIgG binding domain-6xHis-9xMyc-attR1-Cm^r-ccdB-attR2 片段替换 TMV Ω -attR1-Cm^r-ccdB-attR2-9xMyc-6xHis-2xIgG binding domain（参考序列 2，两个片段元件序列相同，元件顺序变化）片段外，其它方法相同（如图 5）。

通过 PCR 方法从 pBHG 载体中扩增 UAS-1 片段（pBHG 载体中包含 HAP1 和 UAS-1 元件，该载体的母体为 pPZP200。Hajdukiewicz P. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994; Kim KS, Guarente L. *Nature* 342(6246):200-203），并在两端引入 SacI 和 SpeI 位点，插入到 pKOS 和 pHOS（pKOS 和 pHOS 是以 pPZP200 为母体改造而成）上相应酶切位点，构建成 pHUG-1, pKUG-1 载体（如图 5）。

3、植物多基因高效表达载体的构建

利用 ClaI 和 KpnI 位点，将 pSZC 的 Gal4/OP 和 TMV Ω -attR1-Cm^r-ccdB-attR2-9xMyc-6xHis-2xIgG binding domain 片段克隆到 Li Lin 等构建的植物多基因表达载体系统中的供体载体 pYLVS 和 pYLSV(Lin, L., Liu, YG., Xu, XP. & Li, BJ. (2003). Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and

transformation vector system. PNAS, 100 (10): 5962-5967) 中, 如图 6 所示, 得到植物多基因高效表达载体 pYLVS-LR 和 pYLSV-LR。通过 *LoxP* 位点重组反应, 逐一将不同的功能基因克隆到受体载体 pYLAC747 (Lin, L., Liu, YG., Xu, XP. & Li, BJ.

(2003). Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. PNAS, 100 (10): 5962-5967) 上, 然后可同时转入植物体, 观察不同基因的相互作用。利用该载体, 可以同时将串连的多个功能基因同时转入植物体内, 不必作多次转入便可以观察到植物体内不同基因的相互作用。

利用同样的原理, 以 pYLVS 为母体, 在 *SacI* 和 *EcoRI* 位点间插入 UAS-1, 在 *KpnI* 和 *ApaI* 位点间插入 attR1-CmR-ccdB-attR2-T35S, 得到 pYLVSU-1; 同时, 以 pYLSV 为母体, 在 *SacI* 和 *EcoRI* 位点间插入 UAS-1, 在 *KpnI* 和 *ApaI* 位点间插入 attR1-CmR-ccdB-attR2-T35S, 得到 pYLSUV-1。UAS-1 来源于 pBHG, 长 160 bp; attR1-CmR-ccdB-attR2-T35S 来源于 pHOS。由此, 我们将 HAP1 的调控元件 UAS 和 LR 重组位点分别构建到载体 pYLVS 和 pYLSV 中, 构建成多基因表达载体 pYLVSU-1 和 pYLSUV-1 载体 (如图 6)。

实施例 2、Ubiquitin 启动子检测载体的构建及其功能检测

将玉米 Ubiquitin 启动子克隆到含报告基因 GUS 序列的启动子检测载体 pSGG 或含 GFP 序列的启动子检测载体 pSGF 中, 得到载体 pSGPG (图 3)。载体 pSGPG 包含有 Gal4 OP/TATA 和报告基因 (GUS 或 GFP) 以及 Gal4 DBD-VP16 融合基因。利用 BIO-RAD 公司 Model PDS-1000/ He Biolistic particle delivery system 将载体 pSGPG 转化洋葱表皮细胞。转化所采用的参数为: 真空度为 28 inches · Hg、轰击距离 9cm、氦气压力为 1, 100psi、金粉颗粒直径 1.0 μm。轰击后的洋葱表皮于 22°C 培养过夜, 进行 GUS 染色 (Kim MK, Choi JW, Jeon JH, et al. (2002). Specimen block counter-staining for localization of GUS expression in transgenic arabidopsis and tobacco. Plant Cell Rep. 21(1), 35-9)。

培养 24 小时后进行 GUS 染色观察 GUS 的表达或用荧光显微镜观察 GFP 的表达。结果如图 3 所示, 观察到 GUS 和 GFP 基因的表达, 表明利用启动子检测载体分析新克隆启动子是可行的。

实施例 3、转基因杂交法培育矮化拟南芥和矮化杂交水稻

1、植物材料及生长条件

野生型拟南芥菜品种 (*Arabidopsis thaliana*,) 为哥伦比亚生态型 (Columbia ecotype)。拟南芥菜种子经表面消毒 (Ang, L. H. and Deng, X. W. (1994). Regulatory

hierarchy of photomorphogenic loci:allele-specific and light-dependent interaction between the HY5 and COP1 loci. *Plant Cell*, 6, 613-628)后, 放于MS(1%蔗糖)培养基上(Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497), 于4℃放置4天, 移至长日照生长箱中在22℃条件下培养8天后, 幼苗被转入土中, 在长日照生长室中生长。

用于分离基因的水稻品种为9311, 种子经表面消毒后放于MS(3%蔗糖)培养基上, 取生长10天的幼苗为材料提取总RNA。

用于转基因的水稻栽培品种为龙特甫(*Japonica rice variety Longtefu*)和华恢7号(*Japonica rice variety Huahui7*)。经消毒后诱导愈伤组织(Y. Hiei, T. Komari, T. Kubo, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.* 35 (1997) 205-218), 用于基因转化。

2、水稻矮化基因(RDG)的克隆及其载体构建

(1) 水稻矮化基因(RDG)的克隆

为进一步检测该植物转基因杂交育种方法在植物系统中的可行性, 根据拟南芥菜和小麦等植物基因序列(Peng, J. (1997). The arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Development*, 11, 3194-3205; Peng, J. Richards, D. et al, (1999). 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400, 256-261; Fujioka, S. et al. (1988). The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9031-9035), 在水稻数据库中找到与赤霉素代谢相关RGA基因, 该基因编码520个氨基酸。根据该序列, 将包括5'非编码区到V84为止的330bp核苷酸敲除, 获得突变基因, 突变后的基因以M106为起始密码子, 将此突变基因命名为RDG(具有序列表中序列1的核苷酸序列)。

提取水稻总RNA(参见Qiagen公司RNA提取方法), 进行反转录, 以反转录cDNA为模板, 以引物1:CTAGATCGTGTGCGCACCTGGCCACGG, 引物2:CACGTGGACTAGT GTCCCAAAAAC为引物进行PCR扩增, PCR产物被克隆到TOPO载体中(Invitrogen, Carlsbad, CA), 进行序列测定, 结果表明得到RDG基因片段。

(2) 二元杂交表达载体的构建

该RDG基因片段中含有*Xba*I和*Spe*I位点, 酶切消化后与Gal40P/TATA连接构建到pBI121载体(美国Clonetech公司产品)中, 得到RDG功能基因表达载体pSBR23(图

8)。将玉米 Ubiquitin 启动子通过 *Hind*III 和 *Bam*HI 位点与 Gal4 DBD-VP16 连接构建到 pBI121 载体（美国 Clontech 公司产品）中，得到启动子载体 pSHR6（图 8）。载体 pSBR23 包含有 Gal4OP/TATA 和 RDG，转化植物以除草剂(PPT 15mg/L)为筛选标记。载体 pSHR6 包含有 Ubiquitin 启动子调控的 Gal4DBD-VP16 融合基因，转化植物以潮霉素(Hyg 20mg/L)为筛选标记。

3、植物转化

载体 pSBR23 和 pSHR6 参照拟南芥转化方法(Wang, X., Kang, D., Feng S. et al, (2002). CSN1 N-terminal-dependent activity is required for Arabidopsis development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: A structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. Mol. Biol. Cell 13, 646-655) 分别转化拟南芥；参照水稻转化方法(Y. Hiei, T. Komari, T. Kubo, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol. Biol. 35 (1997) 205 - 218) 分别转化水稻栽培品种龙特甫和华恢7号；转化植株分别以潮霉素(20mg/L)和除草剂(15mg/L)筛选，获得第一代转化植株。

4、Gal4 DBD-VP16 转化拟南芥植株蛋白提取及 Western 检测

取 pSHR6 转化的第一代拟南芥植株组织研磨后加入蛋白提取液(50mM Tris-HCl, pH7.4、10mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EDTA、10%甘油、1mM DTT、1mM PMSF、1×蛋白酶抑制剂(Roche, Basel, Switzerland)，提取物在 4℃离心 10min，吸取上清，再重复离心一次。利用 Bradford assay (Bio-Rad) 进行蛋白浓度定量。取 15% SDS-PAGE 胶浓度电泳，转膜，Gal4 DBD 抗血清(Santa Cruz 生物技术公司)和二抗抗鼠 IgG(Sigma 公司)分别按照 1:2000 和 1:5000 稀释，进行 Western 检测。检测结果如图 11 所示，表明 pSHR6（含有 Gal4 DBD-VP16 融合基因）转化植株在 18KDa 处有特异蛋白的表达，而野生型植株没有特异条带出现，取检测阳性植株进行植物杂交。图 11 中，1 为蛋白分子量标准，2 为野生型负对照，3-6 为 Gal4 DBD-VP16 转化植株。

5、杂交

取 51 株 pSBR23 转化的第一代拟南芥植株为母本，以步骤 4 鉴定的 45 株 pSHR6 转化的第一代拟南芥阳性植株为父本进行植物杂交，获得 51 组杂交后代种子。杂交种子在含有潮霉素平板上筛选，10 天后将抗性幼苗移入土中，22℃长日照生长室生长至成熟植株。结果如图 9A 所示，表明抗性杂交后代植株明显比母本和父本表型矮化，图 9A 中，左侧植株为母本，右侧植株为父本，中间植株为拟南芥杂交后代。

将两载体 pSBR23 和 pSHR6 分别转化水稻栽培品种龙特甫和华恢 7 号，获得第一代转化植株，以转化 pSHR6 的龙特甫为母本，以转化 pSBR23 的华恢 7 号为父本进行

杂交，获得一组杂交后代种子。杂交水稻种子在田间生长至抽穗期，根据水稻不同品种的麦芒特征去除非杂交后代（因杂交种子在常规田间发芽时不适合用抗生素筛选，而且该实验所选择的水稻品种麦芒特征明显），待水稻抽穗后测量株高，同时以未转入基因的龙特甫和华恢7号杂交后代作参照。结果如图9B所示，转基因杂交后代明显比非转基因的杂交后代植株矮。图9B中从左至右的顺序为：龙特甫，转基因水稻的杂交后代，非转基因水稻的杂交后代，华恢7号。分别转入RDG和启动子的父本和母本的生长状况同非转基因的水稻相似，且所有统计及拍照植株样品均生长在同一田块中。

按照上述步骤1-4的方法进行的其它水稻品种（秀水，中花11，龙特甫）之间相互杂交的杂交结果也证明了该技术方法的可行性。

6、杂交拟南芥植株 Northern 检测

杂交后代拟南芥植株叶片在液氮中研磨，参照RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA)方法提取RNA。电泳后转膜，以杂交母本为对照，RDG为探针，取抗性植株叶片进行Northern检测，检测结果如图10所示，表明杂交后代有RDG转录。图10中，1-4为杂交后代，5为RDG转化植株(母本)。

7、杂交水稻植株的 RT-PCR 检测

杂交后代水稻植株叶片在液氮中研磨，参照RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA)方法提取RNA。以5' CCACTTCTACGAGTCCTGCC 3' 和 5' CTGTTTGTAGGCATTGGAGC 3' 为突变的水稻矮化基因(RDG)的引物，以RT-PCR法检测杂交后代中RDG基因的表达，检测结果如图12，表明矮化的杂交后代(2号，5号)中RDG的表达可以被检测到，而高的杂交后代(1号，3号，4号)中没有检测到RDG基因，4号样品中扩增出的小片段为非特异性条带。图12中，1-5为杂交后代植株，6为非转基因水稻龙特甫(阴性对照)，7为RDG基因的PCR产物(阳性对照)。

8、植物杂交结果的分析

在杂交拟南芥的51组杂交后代种子中，经筛选，有2组未获得抗性植株，在49组抗性植株中，杂交后代表型矮化率为0%有4组；矮化率在20-59%有9组；矮化率在60-79%有19组；矮化率在80-99%有16组；矮化率在100%有1组(见表1)。出现杂交后代表型不均一的原因是在植物转化时，基因随机插入，基因插入位点不同表达不同，由于母本中的矮化基因处于未转录状态，因此无法在RNA和蛋白水平检测其表达情况，杂交时只能采取随机抽取的方法，杂交结果中出现的杂交无矮化表型，可能是因为母本基因插入位点不同产生基因沉默，所以在杂交结果中会出现0矮化率；矮化率为20-99%是因为为尽快检测双元杂交体系的可行性，在实验中，选用了第一代转

化植株分别为母本和父本，由于未得到纯合子，若转化植株外源基因拷贝数不同时，在杂交后代中会出现后代分离，所以使在同一母本和父本杂交后代中出现有的表现矮化，有的无矮化表型。

水稻不同品种的杂交后代出现明显的杂种优势，杂交后代的株高明显高于亲本，这种株高过高的现象将影响作物的抗逆性。本发明将水稻矮化基因载体和启动子载体分别转化龙特甫、中花 11、秀水、华恢 7 号等水稻栽培品种，应用第一代转基因植物进行不同组合的杂交，杂交后代中出现一些矮化植株。根据杂交组合的特点和杂种后代麦芒的表型特征分辨出是否杂交稻，然后测量株高，统计杂交后代中的矮化植株的比例约为 18.6%（表 2）。由于用于杂交的亲本是转基因水稻的 T1 代，为杂合体，杂交后代会出现分离，所以同时包含两个转化基因的植株比例应为 25%，实际比例低于 25% 的理论值，是由于转入的外源基因并非都有表达，有些因在植物基因组中的插入位点或其它调控因素不能表达。在分子水平上检测转化基因的表达结果也证明这个问题（图 12）。

以上结果证明了将双元杂交系统引入植物杂交体系是切实可行，而且可在短期内快速且大量地检测新克隆的启动子和基因的功能。而且利用这个系统和水稻矮化基因可以改变杂交后代的株高，使杂交水稻的株高同亲本相似，从而在保证其它杂种优势的同时，减低株高，增强抗倒伏能力。这个特性在农业生产实践中很有应用价值。

表 1. 以第一代转基因拟南芥植物为亲本杂交结果统计

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
杂交种子	14	21	13	10	28	30	23	25	9	11	21	16	25	21	19	23	15
再生植株	12	18	0	6	23	25	18	6	4	0	12	11	16	16	15	16	10
矮化植株	7	15	0	4	19	19	8	6	1	0	9	3	15	14	0	13	7
矮化率(%)	58	83	0	66	83	76	44	10	25	0	75	27	94	88	0	81	70
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
杂交种子	19	16	23	13	31	15	15	23	13	22	6	17	22	30	20	18	10
再生植株	13	14	17	7	21	10	13	15	9	14	0	12	18	19	17	14	7
矮化植株	12	9	13	5	18	9	8	11	0	13	0	10	13	11	13	11	0
矮化率(%)	92	64	76	71	85	90	62	73	0	93	0	83	72	58	62	79	0

	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
杂交种子	8	17	11	9	16	22	15	10	13	19	21	13	12	15	16	17	9
再生植株	5	11	7	5	13	17	11	7	8	15	12	7	7	10	12	13	7
矮化植株	3	9	6	0	10	13	10	4	3	11	9	2	5	9	4	8	6
矮化率(%)	60	81	86	0	77	76	91	57	38	73	75	29	71	90	33	62	86

表 2. 杂交水稻（龙特甫×华恢 7 号）后代植株的株高

植株编号	82	83	84	85	86	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335
株高(cm)	126	127	127	128	126	131	123	126	131	122	130	118	63	133	131
植株编号	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
植株株高	133	133	118	125	128	123	80	136	62	132	126	124	128	121	129
植株编号	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	矮化率	
植株株高	116	81	126	130	74	116	121	136	90	129	132	83	63	18.6%	

序列表

<160> 1

<210> 1

<211> 1631

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

tcgtgtcgca cctggccacg gacaccgtgc actacaacc ctcggacctc tcctcctggg	60
tcgagagcat gctttccgag ctcaacgcgc cgtgceccc tatcccgcca gcgccgccgg	120
ctgcccgcca tgcttccacc tcgtccactg tcaccggcgg cggtagtagc ggcttctttg	180
aactcccagc cgctgccgac tcgtcgagta gcacctacgc cctcaggccg atctccttac	240
cggtagtagc gacggctgac ccgtcggctg ctgactcggc gagggacacc aagcggatgc	300
gcaactggcg cggcagcacg tcgtcgtcct catcgtcgtc ttctctctg ggcggtaggg	360
cctcgcgggg ctctgtggtg gaggtgctc cgccggcgac gcaaggggcc gcggcggcga	420
atgcccgcgc cgtgccggtt gtggtggttg acacgcagga ggctgggatc cggctggtgc	480
acgcggttgc ggcgtgcgcg gaggccgtgc agcaggagaa cttcgcggcc gcggaggcgc	540
tggtaagca gatccccacg ctggccgcgt cccagggcgg cgccatgcgc aaggtcgtg	600
cctaattcgg cgaggccctc gcccgccgcg tgtaccgctt ccgccccgcg gacagcacc	660
tcctcgacgc cgccttcgcc gaccttctgc acgcccactt ctacgagtcc tgcccctacc	720
tcaagttcgc ccacttcacc gcaaatacaag ccatacctcga ggctttcgcg ggctgccacc	780
ggtccacgt cgtcgacttc ggcatcaagc aggggatgca atggccagct ctctccagg	840
ccctcgcct tcgtcccggc ggccccccat cgttccgctt caccggcgtc ggccccccgc	900
agccggacga gaccgacgcc ttgcagcagg tgggttgaa gcttgcccag ttcgcgcaca	960
ccattcgcgt cgacttcag taccggggac tcgtcgccgc cactctcgcg gacttgagc	1020
cgttcatgct gcagccggag ggcgaggcgg acgcgaacga ggagcctgag gtgatcgccg	1080
tcaactcggg gttcgagctg caccggctgc tcgcgcagcc cggcgcgctg gagaaggctc	1140
tgggcacggt gcacgcggtg cggccaagga tcgtcaccgt ggtagagcag gaggccaacc	1200
acaactccgg ctattcctc gaccggttca ccgagtcgct gcaactactac tccaccatgt	1260
tcgattccct cgagggcggc agctccggcc aggcagagct ctctccgccg gctgccgggg	1320
gcggcgggtg cacggaccag gtcatgtccg aggtgtacct cggccggcag atctgcaacg	1380
tcgtggcgtg cgagggcgcg gagcgcacgg agcgcacga gacgctgggg cagtggcgca	1440

accgcctcgg	ccgcgccggc	ttcgagcccc	tgcacctggg	ctccaatgcc	tacaaacagg	1500
cgagcacgct	cctcgcgctt	ttcgccggcg	gcgacggcta	ccgggtggag	gagaaggagg	1560
gctgcctcac	gctgggctgg	cacacgcgcc	cgctcatcgc	cacctcggca	tggcgcgtcg	1620
ccgcggcgtg	a					1631

<210> 2

<211> 3405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

cgaatccaag	cttcgtaccc	tccgctcggg	ggacagtact	ccgctcggag	gacagtactc	60
cgctcggagg	acagtactcc	gctcggagga	cagtactccg	ctcgaggaca	gtactccgct	120
cggaggacag	tactccgctc	ggaggacagt	actccggggg	atcctctagc	ccactatcct	180
tcgcaagacc	cttcctctat	ataaggaagt	tcatttcatt	tggagaggac	acgcttctag	240
acgcggtacc	ggtctagagt	atTTTTTaca	caattaccaa	caacaacaaa	caacaacaaa	300
cattacaatt	actatttaca	attacaagtt	tgtacaaaaa	agctgaacga	gaaacgtaaa	360
atgatataaa	tatcaatata	ttaaattaga	TTTTgcataa	aaaacagact	acataatact	420
gtaaaacaca	acatatccag	tcactatggc	ggccgcgggt	gatgctgcca	acttagcggc	480
cgctaagttg	gcagcatcac	ccgacgcact	ttgcgccgaa	taaataacctg	tgacggaaga	540
tcacttcgca	gaataaataa	atcctgggtg	ccctgttgat	accgggaagc	cctgggccaa	600
cttttggcga	aatgagacg	ttgatcggca	cgtaagaggt	tccaactttc	accataatga	660
aataagatca	ctaccgggcg	tatTTTTTga	gttatcgaga	TTTTcaggag	ctaaggaagc	720
taaaatggag	aaaaaatca	ctggatatac	caccgttgat	atatcccaat	ggcatcgtaa	780
agaacatttt	gaggcatttc	agtcagttgc	tcaatgtacc	tataaccaga	ccgttcagct	840
ggatattacg	gcTTTTTaa	agaccgtaaa	gaaaaataag	cacaagtttt	atccggcctt	900
tattcacatt	cttgcccgcc	tgatgaatgc	tcatccggaa	ttccgtatgg	caatgaaaga	960
cggtgagctg	gtgatatggg	atagtgttca	cccttgttac	accgttttcc	atgagcaaac	1020
tgaaacgttt	tcatcgtctt	ggagtgaata	ccacgacgat	ttccggcagt	ttctacacat	1080
atattcgcaa	gatgtggcgt	gttacggtga	aaacctggcc	tatttcccta	aagggtttat	1140
tgagaatatg	TTTTcgtct	cagccaatcc	ctgggtgagt	ttcaccagtt	ttgatttaaa	1200
cgtggccaat	atggacaact	tcttcgcccc	cgTTTTcacc	atgggcaaat	attatacgca	1260
aggcgacaag	gtgctgatgc	cgctggcgat	tcaggttcat	catgccgtct	gtgatggcctt	1320
ccatgtcggc	agaatgctta	atgaattaca	acagtactgc	gatgagtggc	agggcggggc	1380

gtaatctaga	ggatccggct	tactaaaagc	cagataacag	tatgcgtatt	tgcgcgctga	1440
tttttgcggt	ataagaatat	atactgatat	gtatacccga	agtatgtcaa	aaagagggtg	1500
gctatgaagc	agcgtattac	agtgacagtt	gacagcgaca	gctatcagtt	gctcaaggca	1560
tatatgatgt	caatatctcc	ggtctggtaa	gcacaacccat	gcagaatgaa	gcccgtcgtc	1620
tgcgtgccga	acgctggaaa	gcggaaaatc	aggaagggat	ggctgaggtc	gcccggttta	1680
ttgaaatgaa	cggctctttt	gctgacgaga	acagggactg	gtgaaatgca	gtttaagggtt	1740
tacacctata	aaagagagag	ccgttatcgt	ctgtttgtgg	atgtacagag	tgatattatt	1800
gacacgcccg	ggcgacggat	ggtgatcccc	ctggccagtg	cacgtctgct	gtcagataaa	1860
gtctcccgtg	aactttaccc	ggtggtgcat	atcggggatg	aaagctggcg	catgatgacc	1920
accgatatgg	ccagtggtcc	ggtctccggt	atcgggggaag	aagtggctga	tctcagccac	1980
cgcgaaaatg	acatcaaaaa	cgccattaac	ctgatgttct	ggggaatata	aatgtcaggc	2040
tccgttatac	acagccagtc	tgcaggtcga	ccatagtgac	tggatatggt	gtgttttaca	2100
gtattatgta	gtctgttttt	tatgcaaaat	ctaatttaat	atattgatat	ttatatcatt	2160
ttacgtttct	cgttcagctt	tcttgtacaa	agtggttgag	ctcaagcttg	cgggccgctc	2220
tagaactagt	ggtgaacaaa	agttgatattc	tgaagaagat	ttgaacggtg	aacaaaagct	2280
aatctccgag	gaagacttga	acggtgaaca	aaaattaatc	tcagaagaag	acttgaacgg	2340
atcctctaga	ggtgaacaaa	agttgatattc	tgaagaagat	ttgaacggtg	aacaaaagct	2400
aatctccgag	gaagacttga	acggtgaaca	aaaattaatc	tcagaagaag	acttgaacgg	2460
atcctctaga	ggtgaacaaa	agttgatattc	tgaagaagat	ttgaacggtg	aacaaaagct	2520
aatctccgag	gaagacttga	acggtgaaca	aaaattaatc	tcagaagaag	acttgaacgg	2580
atccactagt	ggatcccccg	ggctgcagcc	tagggattac	gatatcccaa	cgaccgccag	2640
tcataccat	caccatcacc	tggaagttct	gttcaggggg	cccagctta	agacggccgc	2700
cctagcgcaa	cacgatgaag	ccgtagacaa	caaattcaac	aaagaacaac	aaaacgcggt	2760
ctatgagatc	ttacatttac	ctaacttaa	cgaagaacaa	cgaaacgcct	tcatccaaag	2820
tttaaagat	gaccaagcc	aaagcgctaa	ccttttagca	gaagctaaaa	agctaaatga	2880
tgctcaggcg	ccgaaagtag	acaacaaatt	caacaaagaa	caacaaaacg	cgttctatga	2940
gatcttacat	ttacctaaact	taaacgaaga	acaacgaaac	gccttcatcc	aaagtttaa	3000
agatgacca	agccaaagcg	ctaacctttt	agcagaagct	aaaaagctaa	atgatgctca	3060
ggcgccgaaa	gtagacgca	attcgagctc	ggtatgatcc	tagaggacgt	ctcgaggctac	3120
cgcccgggcg	agctcggaax	xxgatcgttc	aacattttgg	caataaagtt	tcttaagatt	3180
gaatcctggt	gccggtcttg	cgatgattat	catataattt	ctgttgaatt	acgttaagca	3240
tgtaataatt	aacatgtaat	gcatgacggt	atztatgaga	tgggttttta	tgattagagt	3300
cccgaatta	tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	actaggataa	3360
attatcgcg	gcggtgtcat	ctatgttact	agatcxxxxg	aattc		3405

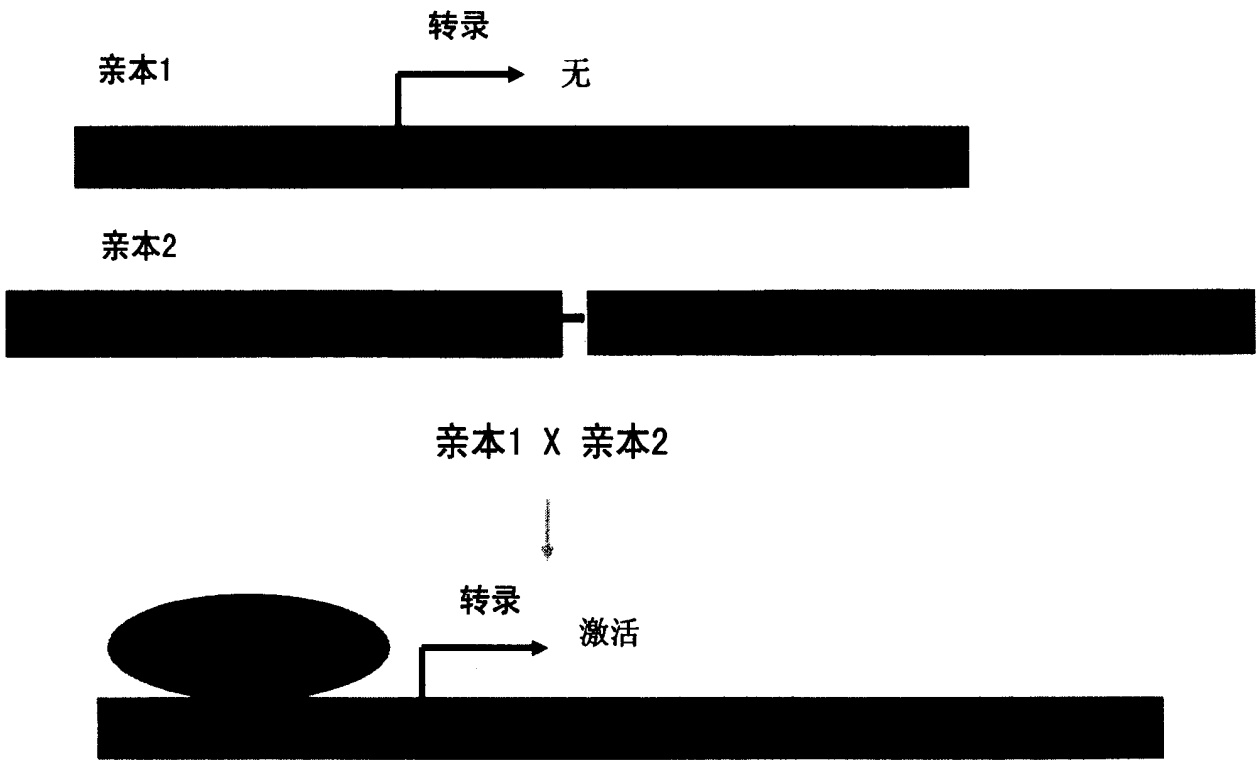


图 1

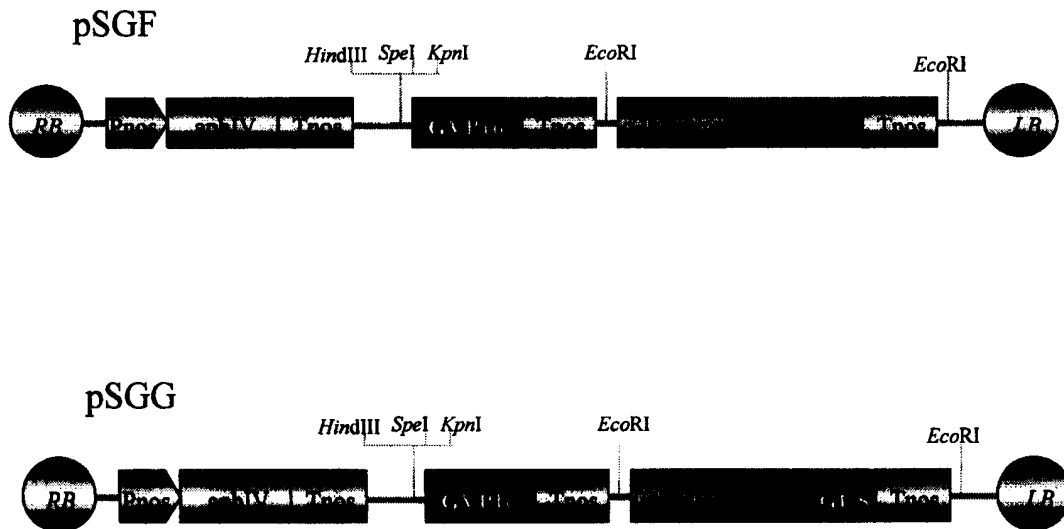


图 2

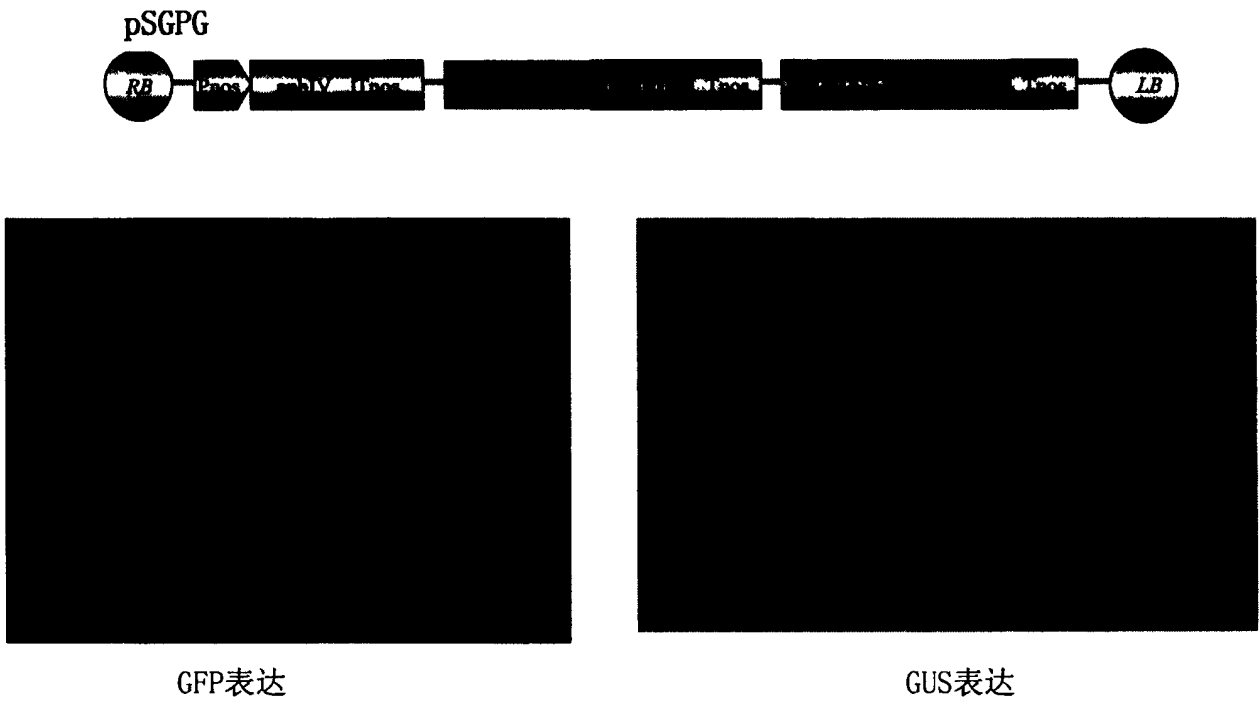


图 3

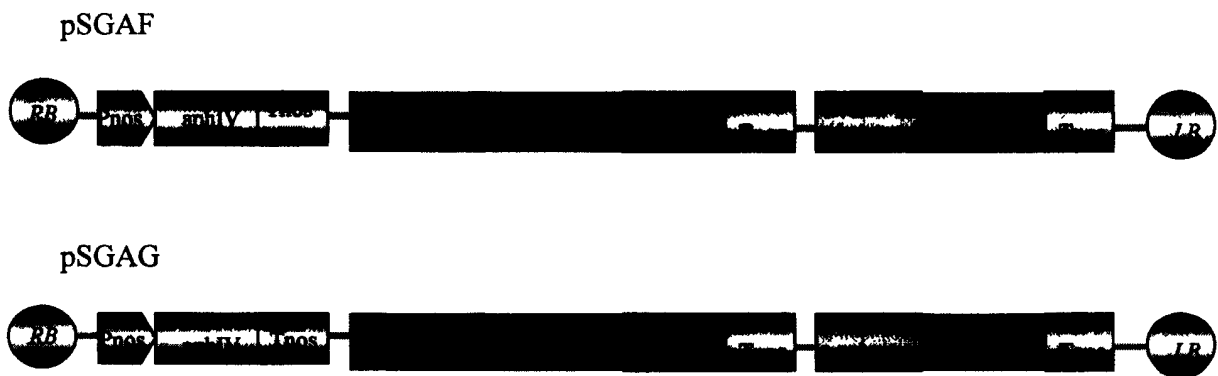


图 4

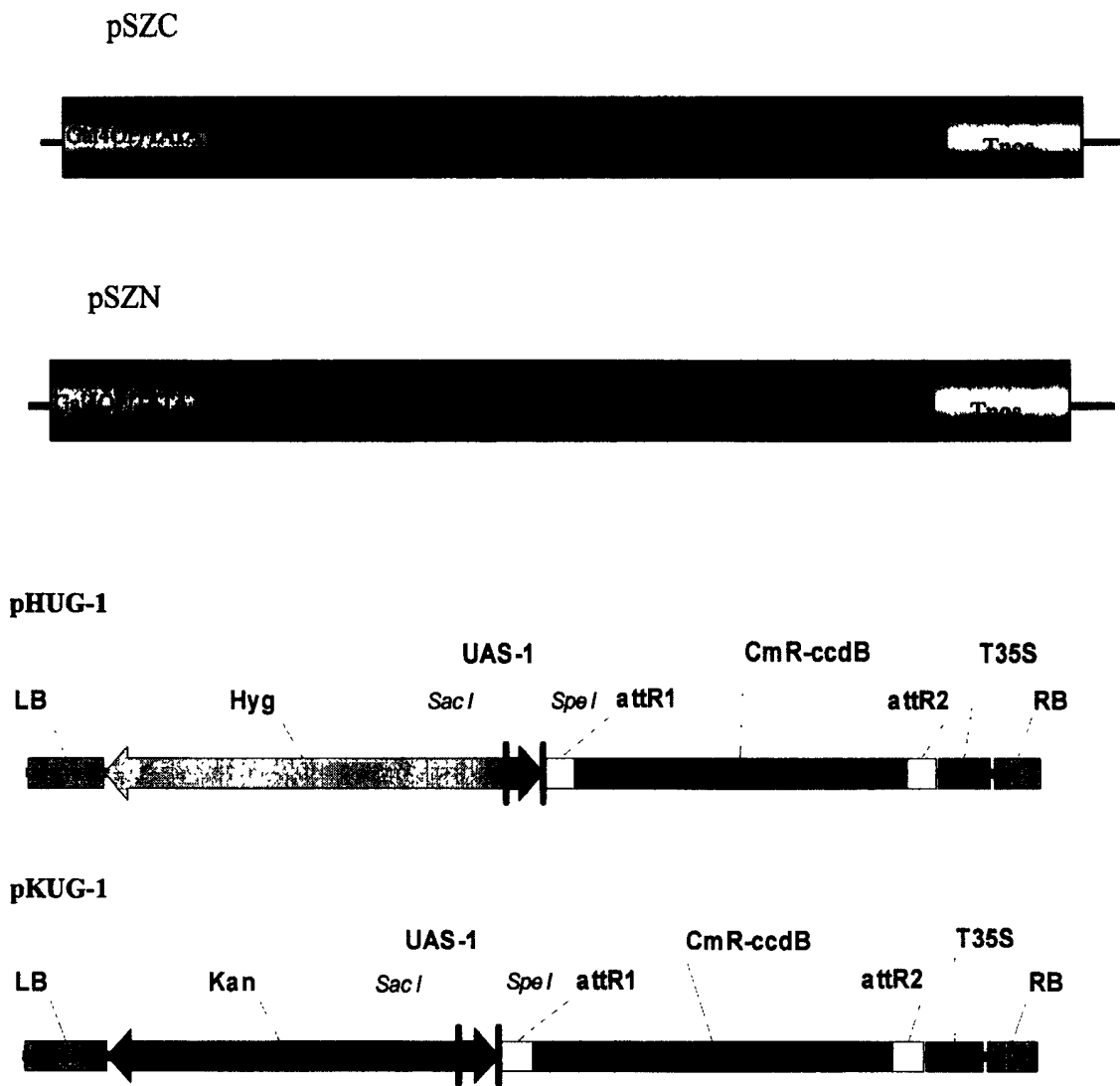


图 5

A. pYLVS-LR (5kb)

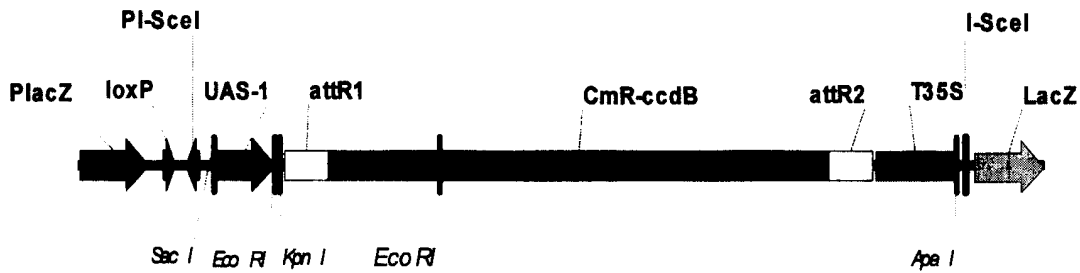


B. pYLSV-LR (5kb)



* Tags & LR site: TMV Ω -2xIgG binding domain-6xHis-9xMyc-attR1-Cm^r-ccdB-attR2

pYLVUS-1



pYLSUV-1

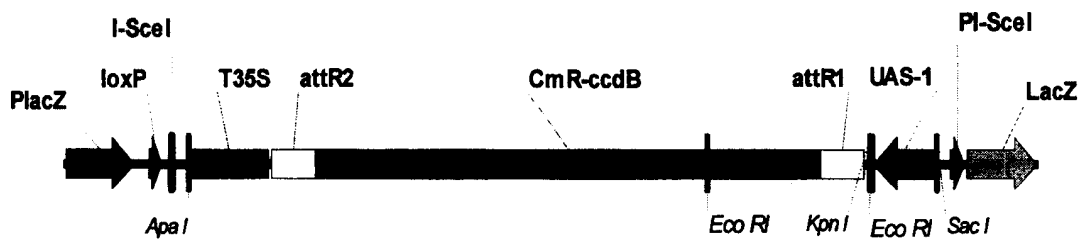


图 6

MKREYQEAGGSSGGSSADMGSCKDKVMAGAAGEEEDVDELLAA
LGYKVRSSDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVSAPGAADDGFVSHLA
I 84
TDTVHYNPSDLSSWVESMLSELNAPLPPIPPAPPAARHASTSSTVTGG
II 106
GGSGFFELPAAADSSSSTYALRPISLPGVVATADPSAADSARDTKRMR
TGGGSTSS

图 7

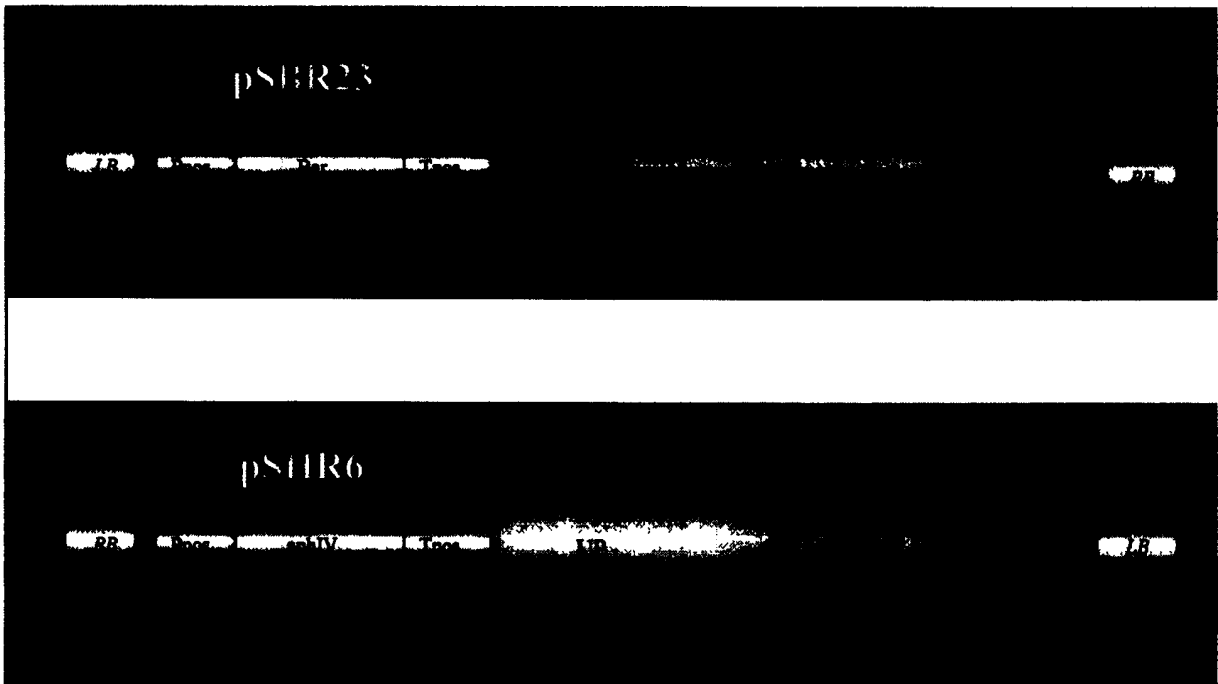


图 8



图 9A

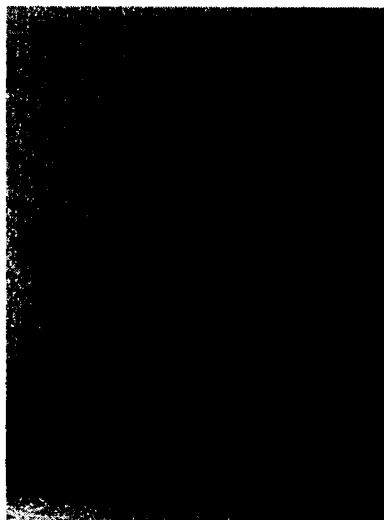


图 9B

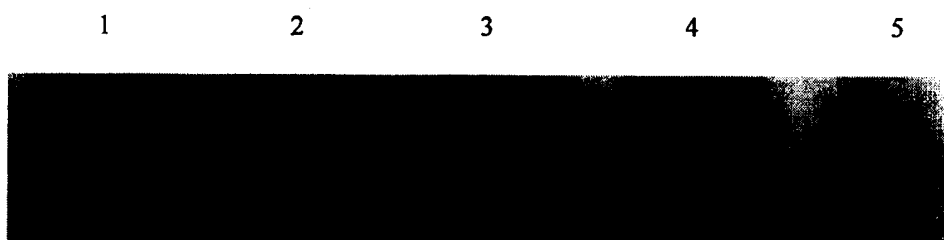


图 10



图 11

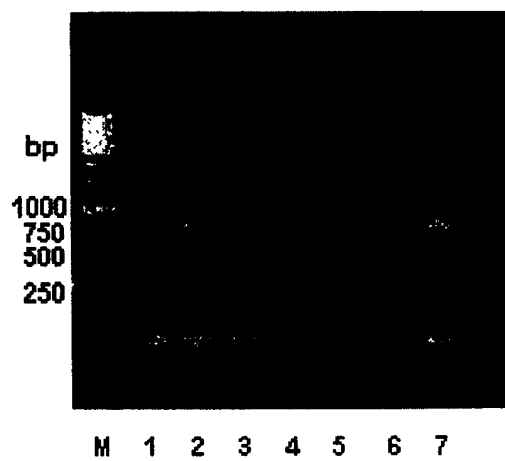


图 12