

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/82

C12N 15/29

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813866.4

[43]公开日 2002年10月30日

[11]公开号 CN 1377418A

[22]申请日 2000.10.2 [21]申请号 00813866.4

[30]优先权

[32]1999.10.4 [33]US [31]60/157,129

[86]国际申请 PCT/CA00/01144 2000.10.2

[87]国际公布 WO01/25455 英 2001.4.12

[85]进入国家阶段日期 2002.4.4

[71]申请人 麦迪卡格公司

地址 加拿大魁北克

[72]发明人 L-P·维吉纳

M-A·德奥斯特

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 樊卫民

权利要求书1页 说明书6页 附图页数0页

[54]发明名称 用于调控外源基因表达的启动子

[57]摘要

本发明涉及用于调控外源基因在转基因生物中表达的启动子,其中包括含有选自 SEQ ID NOS:1-3 所示序列的启动子的鉴别特征的启动子,和功能片段或其衍生物,其中所述启动子经修饰与所述外源基因可操作地定位,以表达所述基因。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种用于调控外源基因在转基因生物中表达的启动子，它包括具有如下启动子鉴别特征的启动子，所述启动子具有选自 SEQ ID NOS:1-3 所示序列的序列和其功能片段或其衍生物，其中所述启动子经改造与所述外源基因可操作地定位，用于表达所述基因。

2. 权利要求 1 的启动子，其中为了该基因的转录表达，以光的有无调节启动子。

3. 权利要求 1 的启动子，其中启动子具有选自 SEQ ID NOS:1-3 中所示序列的序列。

4. 权利要求 1 的启动子，其中所述生物是植物。

5. 权利要求 4 的启动子，其所述植物是双子叶植物、单子叶植物或裸子植物

6. 一种调控外源基因在转基因生物中表达的方法，由以下步骤组成：

a) 使用表达构建体制备转基因生物，其中该构建体至少由权利要求 1 的启动子和基因的可读框组成，其中所述启动子与所述基因可操作地定位，用于表达所述基因。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述生物是植物。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述植物是双子叶植物、单子叶植物或裸子植物。

说明书

用于调控外源基因表达的启动子

发明背景

(a) 发明领域

本发明涉及用于调控外源基因在转基因生物中，特别是在转基因植物中以叶特异性方式表达的启动子。

(b) 现有技术描述

近 15 年来遗传转化的微生物被用于生产有用的重组分子，目前正应用于制药、化妆品和护肤品工业。在过去 10 年里随着将这一普通概念应用到复杂真核生物所需技术的发展，该技术已经从微生物扩展到植物和动物。基本上，编码目的蛋白的基因或者编码用于导致目的分子代谢途径改变的酶的基因，以适当的方式与顺式和反式作用调控序列相连，并传递给靶细胞，其中以暂时的或稳定的方式掺入其分子机制。转基因细胞或从转基因细胞再生的组织或生物接着进行转基因的转录和翻译，从而能够积累目的蛋白，或通过目的酶的活性进行新的代谢反应。

正在出现的分子农业工业是即将到来的下一世纪最有前景的产业之一。其前景是为工业提供安全和再生分子工厂。目前发展的应用有：生产供治疗和诊断用的低成本单克隆抗体；生产用于治疗慢性或致死性疾病的大量激素、细胞因子和其它生物活性分子；生产多种血液成分的生物安全替代品；生产用于食品和造纸工业的大量加工酶；生产用于废物处理的低成本酶；以及生产用于化妆品工业的安全的生物活性分子。

这项技术应用的局限常常是由于转基因生物不能积累足够量的重组产品，其原因是由于低的转录效率、信使不恰当的剪接、外源 mRNA 的不稳定、低的翻译效率、重组蛋白对内源性蛋白酶的超敏感性、或者是重组生物对外源蛋白的超敏感性导致不恰当的和有限的生长，或最坏时对宿主生物产生强的有害效应。当利润率低、或当处理或处置残余物质导致生物安全或环境问题时，生产水平的不足直接影响应用发展。所需

重组产品积累水平的提高是保证分子农业许多应用商业化的一个关键因素。

光合作用在生物界中是极其重要的代谢反应。它在大多数植物、藻类和某些细菌中进行。整个反应涉及空间排列于叶细胞叶绿体的内囊体膜系统内电子传递蛋白的复合装配体。该电子传递链在一端与光合作用天线偶连，其包含许多大分子(包括所有光合作用生物所共有的一种分子即叶绿素)，另一端与涉及 NADPH 和 ATP 合成的酶及卡尔文循环偶连，后者涉及从 NADPH 和 ATP 释放能量与固定气态二氧化碳到有机分子的偶联。在涉及全部光合反应的蛋白中，事实上核酮糖二磷酸羧化酶 (Rubisco) 是最丰富的蛋白。

光合作用专门在叶细胞中进行。当为植物生物技术应用而构建强的叶特异性表达盒时，对利用有如此显著组织特异性代谢活性基因的启动子发生兴趣是显而易见的。

光合作用装置的许多肽成份是由叶绿体基因组中的基因编码，例如，Rubisco 的大亚单位(带有固定 CO₂ 的催化位点)由叶绿体基因编码。然而该酶的小亚单位是由核基因编码。因此 Rubisco 全蛋白是由两种不同基因组编码的亚单位组成。很明显，使用 Rubisco 启动子控制转基因植物叶中转移基因的转录受到关注。该启动子特性已被充分阐明，并且它在表达载体中的使用受美国专利 NO.4,962,028 保护。

提供该启动子用于调控外源基因在转基因生物中，特别是转基因植物中的表达是非常希望的。

发明概述

本发明目的之一是提供用于调节外源基因在转基因生物，特别是在转基因植物中表达的启动子。

按照本发明的一个实施方案，提供了涉及用于调控外源基因在转基因生物中表达的启动子，其含有具有如下启动子的鉴别特征的启动子，所述启动子具有选自 SEQ ID NOS:1-3 所示序列的序列和其功能性片段或其衍生物，其中所述启动子经改造与所述外源基因可操作地定位，以

达所述基因。

本发明优选的启动子具有选自 SEQ ID NOS:1-3 所示序列的序列。

优选地，生物是植物。

优选地，本发明启动子可通过光的有无来调控。

优选的植物是双子叶植物、单子叶植物或裸子植物。

按照本发明的另一实施方案，提供了一种调控外源基因在转基因生物中表达的方法，由以下步骤组成：

(a)使用表达构建体制备转基因生物，其中所述的构建体至少包含本发明的启动子以及基因的可读框（ORF），其中所述启动子与所述外源基因可操作地定位以表达所述基因。

用于本发明的下列术语定义如下。

“功能片段或其衍生物”的表述意为序列 SEQ ID NOS:1-3 的任何衍生物或片段，其可使外源基因得到与 SEQ ID NOS:1-3 所示本发明序列中的启动子相当的表达水平。

发明详述

以下是用于产生转基因苜蓿系方法的详细描述，其可调控其中报告基因的表达。

在该实施方案中，具有如 SEQ ID NOS:1-3 所示序列的启动子与报告基因和终止子相连，该构建体插到植物表达载体中，载体适于用 DNA 轰击到苜蓿系的叶中，以及适于按照 Desgagnes (1995, 植物细胞组织器官培养(Plant Cell Tissue Organ Cult.)42:129-140) 用做土壤杆菌介导的 DNA 转移。这两种 DNA 转移方法用以证明报告基因的表达可受光调控。

材料和方法

DNA 测序

DNA 测序按照 Sanger 等所述方法进行 (1997, 美国国家科学院院报, (P.N.A.S, USA,)74:5643-5647)。

本发明所得启动子具有如 SEQ ID NOS:1-3 所示的序列

表达盒与载体的构建

使用 GUS 报告基因的表达分析盒构建如下。用 HindIII 和 EcoRI 从 pBI101 消化无启动子的 GUS 盒，插到 pUC19 多克隆位点的 HindIII 与 EcoRI 位点中。所得质粒命名为 pBI201 并用于进一步构建。各种 pGPlas3-2 缺失片段在 pBI201 中 GUS 报告基因的 5'端转录性地和瞬时性地融合，用于利用 DNA 轰击作瞬时表达研究。在鉴定了足够多的缺失片段后，将其亚克隆到二元植物表达载体如 pBI101(Clontech)中。这些重组质粒用于如下述的通过根癌土壤杆菌(*A.tumefaciens*)感染的稳定整合。

土壤杆菌介导的 DNA 转移和转基因系的产生

按照 Khoudi 等(1999, 生物技术与生物工程(*Biotechnol.Bioeng*), 64:135-143)所述, 用电穿孔将重组质粒导入根癌土壤杆菌株 LBA4404。选出的土壤杆菌株在无选择压力(卡那霉素)下与基因型为 C5-1 的叶盘共培养 4 天。孵育后, 清洗和营养叶片, 再在 B5H 培养基上形成愈伤组织。愈伤组织再转移至 SH 培养基 21 天用于胚诱导, 转移至 BOi2Y 28 天用于胚发育。从 BOi2Y 上取下鱼雷状的胚置于 MS 培养基以再生。除了 MS 上的共培养及再生, 在所有培养基中都有卡那霉素。Desgages 等对该方法有详细描述(1995, 植物细胞组织器官培养 42:129-140)。含根的小苗在温室中长到成熟。

尽管本发明与其特定的实施方案一起被描述, 应该理解, 其能作进一步修改。本申请意在包括一般地参考本发明原则的任何改变、运用或调整, 还包括在本发明所属领域内已知的或惯例的实践中对本发明的偏离, 只要其中涉及了本发明以及应用了以上阐明的重要特性, 和如下所附权利要求的范围。

序列表

- <110> VÉZINA, Louis-Philippe
D'AOUST, Marc-André
MEDICAGO Inc.
- <120> 用于调控外源基因表达的启动子
- <130> 14149-4"PCT"
- <150> US 60/157,129
<151> 1999-10-04
- <160> 3
- <170> FastSEQ for Windows Version 3.0
- <210> 1
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 待用作启动子用于调控外源基因表达的序列

<400> 1

```
cgacggcccg ggctggtata tttatatgtt gtcaaataac tcaaaaacca taaaagtta 60
agttagcaag tgtgtacatt tttatttgaa caaaaatatt cacctactac tgttataaat 120
cattattaaa cattagagta aagaaatag gatgataaga acaagagtag tgatattttg 180
acaacaattt tgttgcaaca tttgagaaaa ttttgttggt ctctcttttc attggcaaa 240
aacaatagag agagaaaaag gaagaggag aataaaaaaca taatgtgagt atgagagaga 300
aagttgtaca aaagttgtac caaaatagtt gtacaaatat cattgaggaa tttgacaaa 360
gctacacaaa taaggggttaa ttgctgtaaa taataagga tgacgcatta gagagatgta 420
ccattagaga atttttggca agtcattaaa aagaaagaat aaattathtt taaaattaaa 480
agttgagtca tttgattaaa catgtgatta tttaatgaat tgatgaaaga gttggattaa 540
agttgtatta gtaattagaa tttgggtgtca aatttaattt gacatttgat cttttcctat 600
atattgccc atagagtcag ttaactcatt tttatatttc atagatcaaa taagagaaat 660
aacggtatat taatccctcc aaaaaaaaaa aacgggtatat ttactaaaa atctaagcca 720
cgtaggagga taacatccaa tccaaccaat cacaacaatc ctgatgagat aaccacttt 780
aagcccacgc actctgtggc acatctacat tatctaaatc acacattttt cacactttgt 840
gagccacaca aaaaccaatc cacatcttta tcaccattc tataaaaaat cacactttgt 900
gagtctacac tttgattccc ttcaaacaca tacaagaga agagactaat taattaatta 960
atcatcttga gagaaaatgg ccaccgttac ttccaccacc gttgctattc catcattcac 1020
aggccttaag gcaaacgcaa gcaaagttaa tgccatagct aaggttccaa cttcaacttc 1080
tcaattgcca aggctttgtg tcagagcttc cctcaaagac tttggagttg ctgctggtgc 1140
cactgctgca agtgctattgt tagctagcaa tgccttgca gttgaagtgt tgcttgggtc 1200
tagtgatggg ggtttggctt ttgttccaaa caatttcaca gtgaacgctg gagacaccat 1260
tacattcaag aacaatgctg gtttctctca caacgttatc ttcgatgaag acgagattcc 1320
aagcgggggt gatgctgcaa tcgaattccc 1350
```

<210> 2
 <211> 971
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 待用作启动子用于调控外源基因表达的序列

<400> 2

cgggctggta	tatttatatg	ttgtcaaata	actcaaaaac	cataaaagtt	taagttagca	60
agtgtgtaca	tttttatttg	aacaaaaata	ttcacctact	actgttataa	atcattatta	120
aacattagag	taaagaaata	tggatgataa	gaacaagagt	agtgatattt	tgacaacaat	180
tttgttgcaa	catttgagaa	aatthttgtg	ttctctcttt	tcattgggtca	aaaacaatag	240
agagagaaaa	aggaagaggg	agaataaaaa	cataatgtga	gtatgagaga	gaaagttgta	300
caaaagttgt	acccaaatag	ttgtacaaat	atcattgagg	aatttgacaa	aagctacaca	360
aataaggggt	aattgctgta	aataaataag	gatgacgcat	tagagagatg	taccattaga	420
gaatthttgg	caagtcatta	aaaagaaaga	ataaattatt	tttaaaatta	aaagttgagt	480
catttgatta	aacatgtgat	tatttaatga	attgatgaaa	gagttggatt	aaagttgatt	540
tagtaattag	aatttggtgt	caaatttaat	ttgacatttg	atctthttcct	atatattgcc	600
ccatagagtc	agtttaactca	tttttatatt	tcatagatca	aataagagaa	ataacgggat	660
attaatccct	ccaaaaaaa	aaaacgggat	atttactaaa	aaatctaagc	cacgtaggag	720
gataacatcc	aatccaacca	atcacaacaa	tcctgatgag	ataaccact	ttaagcccac	780
gcactctgtg	gcacatctac	attatctaaa	tcacacattc	ttccacacat	ctgagccaca	840
caaaaaccaa	tccacatctt	tatcacccat	tctataaaaa	atcacacttt	gtgagctctac	900
actttgattc	ccttcaaaca	catacaaaga	gaagagacta	attaattaat	taatcatctt	960
gagagaaaat	g					971

<210> 3
 <211> 731
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 待用作启动子用于调控外源基因表达的序列

<400> 3

agagagaaaa	aggaagaggg	agaataaaaa	cataatgtga	gtatgagaga	gaaagttgta	60
caaaagttgt	acccaaatag	ttgtacaaat	atcattgagg	aatttgacaa	aagctacaca	120
aataaggggt	aattgctgta	aataaataag	gatgacgcat	tagagagatg	taccattaga	180
gaatthttgg	caagtcatta	aaaagaaaga	ataaattatt	tttaaaatta	aaagttgagt	240
catttgatta	aacatgtgat	tatttaatga	attgatgaaa	gagttggatt	aaagttgatt	300
tagtaattag	aatttggtgt	caaatttaat	ttgacatttg	atctthttcct	atatattgcc	360
ccatagagtc	agtttaactca	tttttatatt	tcatagatca	aataagagaa	ataacgggat	420
attaatccct	ccaaaaaaa	aaaacgggat	atttactaaa	aaatctaagc	cacgtaggag	480
gataacatcc	aatccaacca	atcacaacaa	tcctgatgag	ataaccact	ttaagcccac	540
gcactctgtg	gcacatctac	attatctaaa	tcacacattc	ttccacacat	ctgagccaca	600
caaaaaccaa	tccacatctt	tatcacccat	tctataaaaa	atcacacttt	gtgagctctac	660
actttgattc	ccttcaaaca	catacaaaga	gaagagacta	attaattaat	taatcatctt	720
gagagaaaat	g					731