

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/82

C12N 5/10 A01H 5/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99804665.5

[43] 公开日 2001 年 5 月 16 日

[11] 公开号 CN 1295621A

[22] 申请日 1999.3.25 [21] 申请号 99804665.5

[30] 优先权

[32] 1998.4.1 [33] EP [31] 98201024.1

[86] 国际申请 PCT/EP99/02178 1999.3.25

[87] 国际公布 WO99/50428 英 1999.10.7

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.29

[71] 申请人 杰尼克莫根有限公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 M·H·斯退弗

J·H·H·V·库斯特斯

L·H·希蒙斯

[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

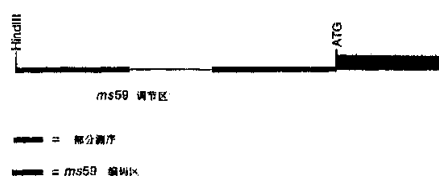
代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图页数 1 页

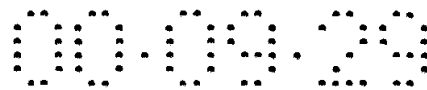
[54] 发明名称 病原体诱导型启动子

[57] 摘要

本发明描述了正常驱动植物己糖氧化酶表达的病原体诱导型启动子,特别是可从向日葵(*Helianthus annuus*)和莴苣(*Lactuca sativa*)中分离的启动子,更特别地是天然地是分别驱动己糖氧化酶表达的调节区的启动子 MS59 和 W L64。这些病原体诱导型启动子驱动抗病原体蛋白质表达或驱动能引发过敏反应的蛋白质表达的嵌合构建体也要求保护。

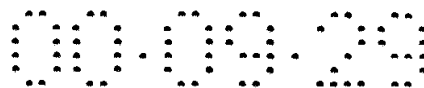


I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



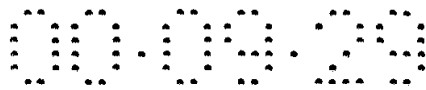
权利要求书

1. 一种天然驱动编码己糖氧化酶的植物基因表达的 DNA 片段, 当再引入植物中时, 它能促进相关 DNA 序列的病原体诱导型转录。
2. 根据权利要求 1 的 DNA 片段, 其特征在於它可从向日葵中获得。
3. 根据权利要求 1 的 DNA 片段, 其特征在於它可从莴苣中获得。
4. 根据权利要求 2 的 DNA 片段, 其特征在於它是编码己糖氧化酶的基因的上游调节区, 被称为 MS59。
5. 根据权利要求 3 的 DNA 片段, 其特征在於它是编码己糖氧化酶的基因的上游调节区, 被称为 WL64。
6. 一种根据权利要求 4 的 DNA 片段, 其特征在於它包含 SEQ ID NO: 15 所示的核苷酸序列 1-1889。
7. 根据权利要求 4-6 任一项的 DNA 片段的一部分或变体, 当再引入植物中时, 它能促进相关 DNA 序列的病原体诱导型转录。
8. 一种嵌合 DNA 序列, 其以转录方向含有根据权利要求 1-7 任一项的 DNA 片段, 和在其转录控制下表达的 DNA 序列, 并且该 DNA 序列不是天然处于该 DNA 片段的转录控制之下。
9. 根据权利要求 8 的嵌合 DNA 序列, 其中待表达的 DNA 序列导致一种抗病原蛋白质的产生。
10. 根据权利要求 9 的嵌合 DNA 序列, 其中所述抗病原蛋白质选自壳多糖酶、葡聚糖酶、渗透蛋白、爪蟾抗菌肽、凝集素、糖氧化酶、草酸氧化酶、苏云金芽孢杆菌毒素、从紫茉莉、苋属、萝卜属、芸苔属、芥属、拟南芥属、大丽花属、Cnicus、山豆属、蝶豆属、葱属种子、葱木属和凤仙花属中分离的抗真菌蛋白质, 和白蛋白型蛋白质, 如硫堇、napin、大麦胰蛋白酶抑制剂、谷类麦醇溶蛋白和小麦 α -淀粉酶。
11. 根据权利要求 8 的嵌合 DNA 序列, 其中欲表达的 DNA 序列导致能诱导过敏反应的蛋白质的产生, 该蛋白质优选地选自番茄的 Cf、Bs3 和 Pto 蛋白, 拟南芥的 Rpm1 和 Rps2, 烟草的 N-蛋白, 黄枝孢的 avr 蛋白, 欧文氏菌属的 harpin 和假单胞菌属或黄单胞菌属的引发蛋白 (avrBs3、



avrRpm1、avrRpt2)。

12. 一种包含根据权利要求 8-11 任一项的嵌合 DNA 序列的复制子。
13. 一种复制子，其以转录方向包含根据权利要求 1-7 任一项的 DNA 片段，和至少一个限制性内切核酸酶的识别位点，用于在该 DNA 片段控制下表达的 DNA 序列的插入。
14. 一种含有根据权利要求 12 或 13 任一项的复制子的微生物。
15. 一种植物细胞，它在基因组中掺入了根据权利要求 8-11 任一项的嵌合 DNA 序列。
16. 一种基本上由根据权利要求 15 的细胞组成的植物。
17. 根据权利要求 16 的植物，它是一种双子叶植物。
18. 从根据权利要求 16 或 17 的植物中获得的植物的一部分，其选自种子、花、块茎、根、叶、果实、花粉和木材。
19. 根据权利要求 1-7 任一项的 DNA 序列在鉴定能促进植物中病原体诱导转录的同源物中的应用。
20. 根据权利要求 8-11 任一项的嵌合 DNA 序列在转化植物中的应用。
21. 根据权利要求 7 的部分或变体在制备杂合调节 DNA 序列中的应用。
22. 根据权利要求 9-11 任一项的嵌合 DNA 序列在赋予植物病原体抗性中的应用。



说明书

病原体诱导型启动子

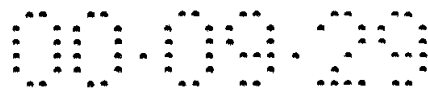
发明领域

本发明涉及病原体诱导型启动子领域，和含有该启动子的嵌合 DNA 序列，特别是在植物生物工程领域。

背景技术

诱导型启动子包括在接触诱导物后，能够提高特定基因产生的基因产物的量之任一启动子。在无诱导物时，DNA 序列不被转录。一般而言，能与诱导型启动子特异结合而激活转录的因子以失活形式存在，然后被诱导物直接或间接地转化为活性形式。诱导物可以是化学试剂，如蛋白质、代谢物（糖、醇等）、生长调节剂、除草剂或酚类化合物，或者通过热、盐、创伤、有毒成分等直接施加的生理压力，或通过病原体或致病因素如病毒的作用间接施加的生理应力。可通过对细胞外部施用诱导物如通过喷施、浇水、加热或类似方法使含有诱导型启动子的植物细胞接触诱导物。诱导型启动子为技术人员所知，并存在能用来驱动目的基因表达的几种启动子。诱导型启动子的实例包括果蝇（*Drosophila melanogaster*）的诱导型 70kD 热休克启动子（Freeling, M.等人，遗传学年述（*Ann. Rev. Genet.*）19, 297-323）和乙醇诱导的醇脱氢酶启动子（Nagao, R.T.等人，于：Miflin, B.J.（编）《植物分子与细胞生物学牛津概论》（*Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*），第 3 卷，384-438 页，牛津大学出版社，1986）。可由简单化学试剂诱导的启动子的实例是 WO 90/08826、WO 93/21334、WO 93/031294 和 WO 96/37609 中描述的启动子。

诱导型启动子的一个重要亚类是在病原体感染后在植物中诱导的启动子。作为病原体诱导型启动子的实例，可提到可从马铃薯中获得的 PRP1 启动子（也称为 *gst1* 启动子）（Martini N.等人（1993），分子普通遗传学



263, 179-186)、Fis1 启动子 (WO 96/34949)、Bet v 1 启动子 (Swoboda, I.等人, 植物、细胞与环境 (Plant, Cell and Env.) 18, 865-874, 1995)、Vst1 启动子 (Fischer, R., 学位论文, Hohenheim 大学, 1994; Schubert, R.等人, 植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 34, 417-426, 1997)、倍半萜环化酶启动子 (Yin, S.等人, 植物生理学 (Plant Physiol.) 115, 437-451, 1997) 和 *gstA1* 启动子 (Mauch, F.和 Dudler, R., 植物生理学 102, 1193-1201, 1993)。这些启动子中某些的缺点是, 它们也是组成性活性的, 或者它们不能与某些类型的病原体反应。此外, 含有在病原体感染后很快 (即以尽可能短的诱导时间) 调节表达的启动子是有利的。

因此, 仍需要能克服现有技术缺陷的病原体诱导型启动子。

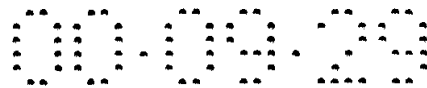
发明概述

现在我们已经发现了编码己糖氧化酶的植物基因的上游调节区之 DNA 片段, 当再引入植物中时它们能促进相关 DNA 序列的病原体诱导型转录。优选地该片段可从向日葵 (*Helianthus annuus*) 中获得。该 DNA 片段特别是编码己糖氧化酶的基因的上游调节区, 被称为 MS59, 更特别地, 其特征在于它包含 SEQ ID NO: 15 所示的核苷酸序列 1-1889。

本发明的另一部分是可从莴苣 (*Lactuca sativa*) 中获得的 DNA 片段, 当再引入植物中时, 它能促进相关 DNA 序列的病原体诱导型转录, 所述 DNA 片段尤其是编码己糖氧化酶基因的上游调节区的 DNA 片段, 被称为 WL64 (SEQ ID NO: 18)。

本发明也包括根据上述任一的 DNA 片段的部分或变体, 当再引入植物中时它能促进相关 DNA 序列的病原体诱导型转录。

本发明的一个实施方案是嵌合 DNA 序列, 其以转录方向含有根据上述任一种 DNA 片段的 DNA 片段, 和在其转录控制下表达的 DNA 序列, 它不是天然地位于该 DNA 片段的转录控制之下。一个优选实施方案是这样一种嵌合 DNA 序列, 其中欲表达的 DNA 序列导致一种抗病原蛋白质的产生, 该蛋白质优选地选自壳多糖酶、葡聚糖酶、渗透蛋白、爪蟾抗菌肽、凝集素、糖氧化酶、草酸氧化酶、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus*



thuringiensis) 毒素、从紫茉莉 (*mirabilis jalapa*)、苋属 (*Amaranthus*)、萝卜属 (*Raphanus*)、芸苔属 (*Brassica*)、芥属 (*Sinapis*)、拟南芥属 (*Arabidopsis*)、大丽花属 (*Dahlia*)、Cnicus、山豆属 (*Lathyrus*)、蝶豆属 (*Clitoria*)、葱属 (*Allium*) 种子、葱木属 (*Aralia*) 和凤仙花属 (*Impatiens*) 中分离的抗真菌蛋白质, 和白蛋白型蛋白质, 如硫堇、napin、大麦胰蛋白酶抑制剂、谷类麦醇溶蛋白和小麦 α -淀粉酶。

本发明的嵌合 DNA 序列的另一个实施方案是一种嵌合 DNA 序列, 其中欲表达的 DNA 序列导致一种能诱导过敏反应的蛋白质的产生, 该蛋白质优选地选自番茄的 CF 和 Pto 蛋白、黄枝孢 (*Cladosporium fulvum*) 的 avr 蛋白、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 或黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 的引发蛋白。

本发明的另一部分是含有上述嵌合 DNA 序列的复制子, 其优选地具有至少一个限制性内切核酸酶的识别位点, 用于将在该 DNA 片段控制下表达的 DNA 序列的插入。本发明也包括含有这种复制子的微生物、在基因组中掺入了根据上述的嵌合 DNA 序列的植物细胞、和基本上由该细胞组成的植物。该植物优选地是双子叶植物。选自种子、花、块茎、根、叶、果实、花粉和木材的该植物的部分也形成了本发明的一部分。

本发明的再另一个实施方案是上述 DNA 片段在鉴定能促进植物中病原体诱导型转录的同源物中的应用。

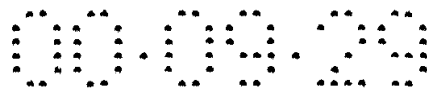
根据本发明的嵌合 DNA 序列在转化植物中的进一步应用, 根据本发明的 DNA 片段的部分或变体在制备杂合调节 DNA 序列中的应用, 也是本发明的一部分。

本发明的另一个目的是上述嵌合 DNA 序列在赋予植物病原体抗性中的应用。

附图描述

图 1: (基因组) ms59 基因和启动子区的示意图。

发明详述

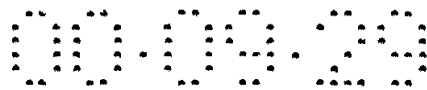


本发明的主要方面是天然存在于植物中并驱动编码己糖氧化酶的基因表达的调节序列。特别是在向日葵和/或莴苣中存在的区域，尤其分别是 MS59 基因 (SEQ ID NO: 15) 或 WL64 基因 (SEQ ID NO: 17) 的 5' (上游) 区。这些基因编码发现对 (真菌) 病原体有毒的己糖氧化酶，在 WO 98/13478 中公开，由此引入作为参考。发现在病原体感染后，这些基因高度表达，表明病原体诱导性。病原体诱导型启动子在生物技术抗性工程中很有价值。

尽管特别用驱动己糖氧化酶在向日葵中表达的启动子，称为“ms59”，来说明本发明，但认为驱动与 ms59 同源的基因的所有启动子都具有与 ms59 启动子或多或少相同的性质，即，由病原体感染优选地真菌感染诱导的表达活性。通常认为同源基因的启动子共有相似的性质，尤其是与病原体诱导相关的性质。其实例是驱动发病相关蛋白质渗透蛋白在马铃薯 (Zhu 等人, 植物生理学 (Plant Physiol.) 108, 929-937, 1995)、烟草 (Liu 等人, 植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 29, 1015-1026, 1995) 和番茄 (Ruiz-Medrano 等人, 植物分子生物学 20, 1199-1202, 1992) 中表达的启动子，病原体的诱导性已经明确；驱动 PR-10 组的基因表达的启动子，马铃薯中的 pSTH-2 启动子 (Matton, D.P. 和 Brisson, N., 分子植物微生物相互作用 (Mol. Plant-Microbe Interac.) 2, 325-331, 1989)、*Asparagus officinalis* 的 AoPR-1 启动子 (Warner 等人, 植物杂志 (The Plant J.) 3, 191-201, 1993) 和 *Betula verrucosa* 的 Bet v 1 启动子 (Swoboda 等人, 植物、细胞与环境 (Plant, Cell and Env.) 18, 865-874, 1995) 显示是病原体可诱导的。

在本说明书中，术语“调节序列”和“启动子”可交换使用。

本发明尤其提供包含根据本发明的调节序列的嵌合 DNA 序列。表达嵌合 DNA 序列是指包括包含未在自然界天然发现的 DNA 序列的任一 DNA 序列。例如，嵌合 DNA 是指包括包含调节区的 DNA，该调节区在植物基因组的非天然位置中是病原体可诱导的，虽然事实是该植物基因组通常在其天然染色体位置中含有一个拷贝的该调节区。类似地，该调节区可掺入未天然发现它的植物基因组中，或者掺入未天然发现它的复



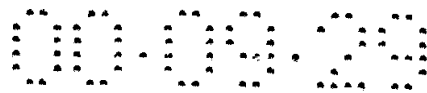
制子或载体中，如细菌质粒或病毒载体。嵌合 DNA 不限于可在宿主中复制的 DNA 分子，但也是指包括能连接到复制子中的 DNA，例如通过特异的连接体序列，与根据本发明的调节区物理连接。该调节区可以与或者可以不与其天然下游开放阅读框连接。

表达受本发明的病原体诱导型调节区驱动的基因的开放阅读框可以来源于一种基因组文库。在后者中，它可含有一个或多个内含子，内含子分隔组成编码根据本发明的蛋白质的开放阅读框的外显子。开放阅读框也可由一种非间断的外显子编码，或由编码根据本发明的蛋白质 mRNA 的 cDNA 编码。根据本发明的嵌合 DNA 序列也包括人工去除或添加了一个或多个内含子的序列。本发明包括这些变体中的每一种。

为了能够在宿主细胞中表达，根据本发明的调节区通常具有可能适当地来源于能够在所选宿主细胞中表达的任一基因的转录起始区，以及用于核糖体识别和附着的翻译起始区。在真核细胞中，表达盒通常另外包含位于该开放阅读框下游的转录终止区，其使得转录终止并发生初级转录物的聚腺苷酸化。另外，密码子使用可能适合所选宿主的公认的密码子使用。此外，常常可编码一种信号序列，其担负基因表达产物向亚细胞区室的导向。控制嵌合 DNA 构建体在所选宿主细胞中表达的原理通常为本领域的技术人员所了解，可表达的嵌合 DNA 构建体的构建现在对于任一种类的宿主细胞，无论原核的或真核的，都是常规。

嵌合 DNA 序列为了能在宿主细胞中保留，通常以复制子的形式提供，其包含与 DNA 连接的根据本发明的嵌合 DNA 序列，可由所选宿主细胞识别并复制。因此，复制子的选择主要取决于选择的宿主细胞。为所选特定宿主选择适当复制子的原则处于本领域技术人员的理解范围之内。

一种特殊类型的复制子是能够将其自身或其一部分转移到另一种宿主细胞如植物细胞中，由此将根据本发明的开放阅读框共转移到该植物细胞中的复制子。具有这种能力的复制子在此被称为载体。这种载体的一个实例是 Ti 质粒载体，当存在于适当的宿主如根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中时，它能够将其部分，即所谓的 T 区，



转移到植物细胞中。不同类型的 Ti 质粒载体（参见：EP 0 116 718 B1）现在已常规用于向植物细胞或原生质体中转移嵌合 DNA 序列，由此可产生在基因组中稳定地掺入了该嵌合 DNA 的新植物。Ti 质粒载体的一种特别优选的形式是（EP 0 120 516 B1 和 US 4,940,838）中要求保护的所谓二元载体。可用于向植物宿主中引入根据本发明的 DNA 的其他适当载体可选自病毒载体，例如非整合型植物病毒载体，如可来源于双链植物病毒（例如 CaMV）和单链病毒、双生病毒等。这些载体的应用可能是有利的，特别是在难以稳定地转化植物宿主时。当是木本种特别是树和藤本植物时尤其如此。

表述“在其基因组中掺入根据本发明的嵌合 DNA 序列的宿主细胞”是指包括细胞，以及包含这些细胞或基本上由这些细胞组成的多细胞生物，它们在其基因组中稳定地掺入了所述嵌合 DNA，由此保留该嵌合 DNA，并且优选地通过有丝分裂或减数分裂将一个拷贝的这种嵌合 DNA 传递给子代细胞。根据本发明的一个优选实施方案，提供了这样的植物，其基本上由在基因组中掺入了一个或多个拷贝的所述嵌合 DNA 的细胞组成，并且能够优选地以孟德尔方式将一个或多个拷贝传递给子代。由于根据本发明的嵌合 DNA 在某些或所有植物细胞中的转录和翻译，含有该调节区的细胞可应答病原体攻击，从而产生由该调节区控制下的开放阅读框编码的蛋白质。在本发明的具体实施方案中，该蛋白质是能够提供对病原体感染抗性的抗病原蛋白质。

本领域的技术人员众所周知，植物基因的调节区由具有令人关注的基因表达特性的不同亚区组成。此处所指亚区的实例是转录的增强子以及沉默子。这些元件能以普通（组成型）的方式或者以组织特异的方式起作用。可以在根据本发明的调节 DNA 序列中进行缺失，并且可以测试亚片段的相关 DNA 的表达模式。这样获得的不同亚片段，乃至其组合，可用于工程化改造病原体抗性的方法，或者与异源 DNA 在植物中表达相关的其他应用。本发明也包括根据本发明的 DNA 序列鉴定功能亚区的应用，和随后其促进或抑制植物中基因表达的应用。

关于转录终止区的必要性，通常认为该区域增强了植物细胞中转录

的可靠性和效率。因此其应用在本发明的说明书中是特别优选的。

可与根据本发明的 ICS 调节区结合使用的蛋白质的实例包括但不限于，可从大麦 (Swegle M.等人, 植物分子生物学 12, 403-412, 1989; Balance G.M.等人, 加拿大植物科学杂志 (Can. J. Plant Sci.) 56, 459-466, 1976; Hoj P.B.等人, FEBS Lett. 230, 67-71, 1988; Hoj P.B.等人, 植物分子生物学 13, 31-42, 1989)、菜豆 (Boller T.等人, 植物 (Planta) 157, 22-31, 1983; Broglie K.E.等人, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 83, 6820-6824, 1986; Vogeli U.等人, 植物 174, 364-372, 1988; Mauch F.和 Staehelin L.A., 植物细胞 1, 447-457, 1989)、黄瓜 (Metraux J.P.和 Boller T., 生理学与分子植物病理学 (Phsiol. Mol. Plant Pathol.) 28, 161-169, 1986)、韭菜 (Spanu P.等人, 植物 177, 447-455, 1989)、玉米 (Nasser W.等人, 植物分子生物学 11, 529-538, 1988)、燕麦 (Fink W.等人, 植物生理学 88, 270-275, 1988)、豌豆 (Mauch F.等人, 植物生理学 76, 607-611, 1984; Mauch F.等人, 植物生理学 87, 325-333, 1988)、白杨 (Parsons T.J.等人, 美国国家科学院院报 86, 7895-7899, 1989)、马铃薯 (Gaynor J.J., 核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 16,5210,1988; Kombrink E.等人, 美国国家科学院院报 85, 782-786, 1988; Laflamme D.和 Roxby R., 植物分子生物学 13, 249-250, 1989)、烟草 (例如, Legrand M.等人, 美国国家科学院院报 84, 6750-6754, 1987; Shinshi H.等人, 美国国家科学院院报 84, 89-93, 1987)、番茄 (Joosten M.H.A.和 De Wit P.J.G.M., 植物生理学 89, 945-951, 1989)、小麦 (Molano J.等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 254, 4901-4907, 1979) 中获得的 β -1,3-葡聚糖酶和壳多糖酶、爪蟾抗菌肽、凝集素、从苏云金芽孢杆菌中分离的毒素、从紫茉莉 (EP 0 576 483) 和菟属 (EP 0 593 501 和 US 5,514,779) 中分离的抗真菌蛋白质、白蛋白型蛋白质 (如硫堇、napin、大麦胰蛋白酶抑制剂、谷类麦醇溶蛋白和小麦 α -淀粉酶, EP 0 602 098)、从萝卜属、芸苔属、芥属、拟南芥属、大丽花属、Cnicus、山黧豆属和蝶豆属中分离的蛋白质 (EP 0 603 216)、从辣椒属 (Capsicum)、凌风草属 (Briza)、翠雀属 (Delphinium)、Catapodium、贛靛属 (Baptisia)

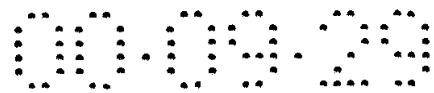
和 *Microsensis* 中分离的蛋白质 (PCT/GB93/02179)、草酸氧化酶 (EP 0 636 181 和 EP 0 673 416)、糖氧化酶 (PCT/EP 97/04923)、从葱属种子分离的抗微生物蛋白质 (PCT/GB94/01636)、葱木属和凤仙花属的蛋白质 (PCT/GB95/00509)、矾根属 (*Heuchera*) 和七叶树属 (*Aesculus*) 的蛋白质 (PCT/GB94/02766)、上述蛋白质的突变肽 (PCT/GB96/03065 和 PCT/GB96/03068) 等等。

诱导型启动子的另一个用途是驱动在基因-基因抗性相互作用中起作用的蛋白质 (如 WO 91/15585 所述)。这些蛋白质是, 例如, 如 Karrer, E.E. 等人 (植物分子生物学 36, 681-690, 1998) 所公开的植物蛋白质、激活的 *ndr1*、激活的 *eds1* 和激活的 *Xa21*、番茄的 *Cf* 蛋白、BS3 蛋白和 *Pto* 蛋白、拟南芥的 *Rpm1* 和 *Rps2* 蛋白、烟草的 *N*-基因、黄枝孢的 *avr* 引发蛋白、黄单胞菌属的 *avrBs3*、欧文氏菌属 (*Erwinia*) 的 *harpin* 和假单胞菌属的 *avrPto* 蛋白。

本发明的实际适用性不限于特定的植物种。经受某种形式病原体攻击的任何植物种都可用根据本发明的嵌合 DNA 序列转化, 使调节区被病原体感染诱导, 由此引发将在某些或所有植物细胞中产生的抗病原蛋白质的产生。

尽管本发明的某些实施方案目前尚不可行, 例如, 因为某些植物种至今尚且不能进行基因转化, 但本发明在这些植物种中的实施只是时间问题而不是原则问题, 因为基因转化的适用性与本发明的下列实施方案无关。

植物种的转化现在对于大量植物种包括双子叶植物和单子叶植物而言都是常规。原则上任何转化方法都可用来向适当的祖细胞中引入根据本发明的嵌合 DNA, 只要这些细胞能够再生为完整的植物。方法可适当地选自原生质体的钙/聚乙二醇法 (Krens, F.A. 等人, 自然 296, 72-74, 1982; Negrutiu I. 等人, 植物分子生物学 8, 363-373, 1987)、原生质体的电穿孔 (Shillito R.D. 等人, 生物技术 (Bio/Technol.) 3, 1099-1102, 1985)、向植物物质中的显微注射 (Crossway A. 等人, 分子普通遗传学 202, 179-185, 1986)、对不同植物物质的 DNA (或 RNA 包被的) 颗粒



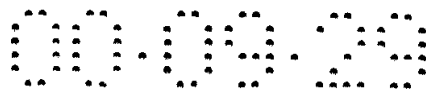
轰击 (Klein T.M.等人, 自然 327, 70, 1987)、(非整合型)病毒感染等。根据本发明的一种优选方法包括农杆菌介导的 DNA 转移。特别优选的是如 EP A 120 516 和美国专利 4,940,838 中公开的所谓的二元载体技术的应用。

番茄转化优选地基本如 Van Roekel 等人 (植物细胞报道 (Plant Cell Rep.) 12, 644-647, 1993) 所述进行。马铃薯转化优选地基本如 Hoekema 等人 (Hoekema A.等人, 生物技术 7, 273-278, 1989) 所述进行。通常, 转化后, 针对一种或多种标记的存在筛选植物细胞或细胞组, 该标记由与编码根据本发明的蛋白质的核酸序列共转移的植物表达基因编码, 之后转化的材料再生为完整的植物。

尽管认为更不适于基因转化, 但单子叶植物可进行转化, 并且能从转化的细胞或胚或其他植物材料再生为可育的转基因植物。目前, 单子叶植物转化的优选方法是对胚、外植体或悬浮细胞的微粒轰击, 和直接 DNA 摄取或电穿孔 (Shimamoto 等人, 自然 338, 274-276, 1989)。已经获得转基因玉米植物, 方法是通过微粒轰击 (Gordon-Kamm, 植物细胞, 2, 603-618, 1990) 将编码 phosphinothricin 乙酰转移酶 (一种灭活除草剂 phosphinothricin 的酶) 的吸水链霉菌 (Streptomyces hygroscopicus) bar 基因引入玉米悬浮培养物的胚发生细胞中。曾经报道过遗传物质向其他单子叶作物如小麦和大麦的糊粉原生质体中的引入 (Lee, 植物分子生物学 13, 21-30, 1989)。已由胚发生悬浮培养液再生为小麦植物, 方法是只选择老龄、致密的和结状的胚发生愈伤组织用于胚发生悬浮培养液的形成 (Vasil, 生物技术 8, 429-434, 1990)。与用于这些作物的转化系统的组合能使本发明应用于单子叶植物。

单子叶植物, 包括重要的商业作物如稻和玉米, 也适于用农杆菌株进行 DNA 转移 (参见 WO 94/00977; EP 0 159 418 B1; Gould J.等人, 植物生理学 95, 426-434, 1991)。

DNA 转移和再生后, 可评估推定转化的植物, 例如应用 Southern 分析, 评估根据本发明的嵌合 DNA 的存在, 拷贝数和/或基因组组成。另外, 用 Northern 和/或 Western 分析一本领域技术人员众所周知的技



术，可以估计新引入的 DNA 的表达水平。任选的，在最初的分析后，可以对显示希望的拷贝数和根据本发明的新引入嵌合 DNA 表达水平的转化植物检测病原体抗性水平。此外，选择的植物可进行另一轮转化，例如引入其他基因，以增强抗性水平，或扩大抗性谱。

其他评价可能包括现场条件下病原体抗性的检测、核实生育力、产量和其他特征。这些检测现在可由本领域的技术人员常规进行。

在这些评价后，转化的植物可以直接生长，但通常它们可作为亲本系用于新品种的培育或杂种的建立等。

为了获得能组成型表达多于一种嵌合基因的转基因植物，多种选择是可利用的，包括下列方法：

A. DNA 例如二元质粒上的 T-DNA 的应用，其含有与选择性标记基因物理偶联的多个修饰基因。该方法的优点是，嵌合基因是物理偶联的，因此作为单一的孟德尔基因座迁移。

B. 用含有一种或多种与另一种选择性标记结合的嵌合基因之转基因植物的花粉，对每一种均已能表达一种或多种（优选地与一种选择性标记基因偶联的）嵌合基因的转基因植物异花传粉。之后，可以根据两种选择性标记的存在，或者根据嵌合基因本身的存在来筛选这种杂交获得的种子。由筛选的种子获得的植物随后能用于进一步的杂交。通常，嵌合基因不是位于单一基因座上，因此基因可能以独立的基因座分离。

C. 许多多重嵌合 DNA 分子如质粒的应用，其中每一个都含有一种或多种嵌合基因和选择性标记。如果共转化的频率高，则只根据一种标记的筛选就足够了。在其他情况中，根据多于一种标记的筛选是优选的。

D. 含有第一种、第二种（等）嵌合基因和新嵌合 DNA，任选地含有一种选择性标记基因的转基因植物的连续转化。如方法 B 所述，嵌合基因通常不是位于单一基因座上，因此嵌合基因可能以独立的基因座分离。

E. 上述策略的组合。

实际策略可能取决于易于确定的几种考虑，如亲本系的目的（直接生长、在培育过程中的应用、产生杂种的应用），但对于所述的本发明不



是关键。

在本说明书中，应当强调，含有嵌合 DNA 的植物可形成适当的遗传背景，用于引入根据本发明的其他嵌合 DNA，例如增强抗病原物质的产生，由此增强抗性水平。相应于能与调节 DNA 片段一起适当使用的蛋白质的其他基因的克隆，能相对过量表达该基因的转基因植物的获得，以及对植物病原体抗性的影响的评价，现在都处于本领域技术人员的范围之内。

具有提高的病原体抗性的植物可以在田地、温室中或在室内或别处生长。植物或其可食用部分可用作动物饲料或用于人类消费，或者可加工为食物、饲料或任何形式的农业或工业中的其他用途。农业是指包括园艺、树木栽培、花栽培等。可从根据本发明的植物材料中获益的工业包括但不限于制药工业、造纸纸浆工业、制糖工业、饲料与食品工业、酶制造等。

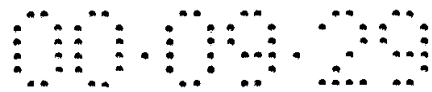
根据本发明的植物或其部分的优点是对杀生物剂处理的需求降低，从而降低了原料成本、劳动力和环境污染，或者延长了这些植物的产物（例如果实、种子等）的储存期限。用于本发明的植物是指能进行光合作用并且经受某种形式的病原体攻击的多细胞生物。它们至少包括被子植物以及裸子植物、单子叶植物以及双子叶植物。

实施例 1

ms59 信使在向日葵植物中的诱导

通过喷施 5 次 5 mM 水杨酸 (SA)，喷施 1 次 1 mM 水杨酸，1 次 0.1 mM 茉莉酸 (JA)，1 次 1 mM ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸，植物激素乙烯的前体)，或者创伤，诱导 7-8 周龄向日葵植物 (*Helianthus annuus* cv Zebulon) 的叶。24 小时后 (1 mM SA、0.1 mM JA、1 mM ACC 和创伤) 和 5 天后 (5 mM SA) 从诱导的叶中收集叶样品。诱导 24 小时后在非诱导植物中采取对照样品。

实施例 2



向日葵叶组织的 RNA 提取和 cDNA 合成

用热酚法从 10 g 叶物质中提取总 RNA, 并用 Qiagen RNA 缓冲液系列和 tip-100 柱(Qiagen GmbH, 德国)纯化。通过 Dnase I(Gibco BRL) 处理降解污染的 DNA。

如制造商所述, 用 1 μ g 总 RNA、1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物(500 μ g/ml, Gibco BRL) 和 200 单位 Superscript II RT RNase H⁻ 反转录酶(Gibco BRL) 制备 cDNA。

实施例 3

ms59 PCR MIMIC 的构建和利用竞争性 RT-PCR 对样品的分析

利用竞争性 RT-PCR 技术测定 ms59 的转录水平。在该技术中, cDNA 靶与人工 PCR MIMIC 之间的竞争使转录物水平的定量成为可能(Paul D. Siebert 和 James W. Larrick (1992), 自然 359, 557-558)。

为了 PCR MIMIC 的构建, 制备下列引物: FR-pUC-208 (SEQ ID NO: 1) 5' GTT CCG GAG GTT GTG ACC GTG GGA TGT GCT GCA AGG CG 3', FR-pUC-209(SEQ ID NO:2) 5' CTG GGG AAG CCC GTG TAG TAA AGC CCC CGC GCG TTG GCC GAT TC 3', FR-MS59-47 (SEQ ID NO: 3) 5' CTG GGG AAG CCC GTG TAG TAA AGC 3' 和 FR-MS59-77 (SEQ ID NO: 4) 5' GTT CCG GAG GTT GTG ACC GTG 3'。引物 FR-pUC-208 和 FR-pUC-209 用来通过 PCR(95 $^{\circ}$ C 1', 55 $^{\circ}$ C 1', 72 $^{\circ}$ C 2', 10 个循环) 从质粒 pUC18 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. 和 Messing, J. (1985) 基因 33, 103-119) 扩增 387bp 的片段。利用引物 FR-MS59-47 和 FR-MS59-77 通过 PCR 扩增 1 μ l 该 PCR 产物, 产生大量的 PCR MIMIC (95 $^{\circ}$ C 1', 55 $^{\circ}$ C 1', 72 $^{\circ}$ C 2', 30 个循环)。

引物 FR-MS59-47 和 FR-MS59-77 将从 ms59 cDNA 扩增出一条 312bp 的带, 因此当在 2% 琼脂糖凝胶中分离时它能与 387bp MIMIC 轻易地区分开来。在含有 0.2 μ g/ μ l 糖原作为载体的 H₂O 中以 100 ng/ μ l - 0.1 ag/ μ l 的范围进行 PCR MIMIC 稀释。

表 1: 不同应激处理后, 与对照相比, ms59 信使在向日葵叶中的诱导水平

诱导方法	诱导倍数
对照	1 ^a
5 mM 水杨酸	1000
1 mM 水杨酸	1 ^a
1 mM ACC	10
0.1 mM 茉莉酸	10
创伤	10

注意: a: 不可检测, 人为设为 1.

通过竞争性 RT-PCR 分析 cDNA 样品。因此在 0.5ml 试管中将 2 μ l 样品与 1 μ l 稀释的 PCR MIMIC (量: 0.1 pg、10 fg、1.0 fg、0.1 fg、10 ag 和 1.0 ag) 合并。用 10 μ M 引物 FR-MS59-47 和 FR-MS59-77、0.5 μ l 20 mM dNTP's、1 \times PCR 缓冲液、MgCl₂ 和 2.5 单位重组 Taq DNA 聚合酶 (Gibco BRL) 进行 cDNA 和 MIMIC 的扩增, 95 $^{\circ}$ C 1'、55 $^{\circ}$ C 1'、72 $^{\circ}$ C 2' 进行 35 个循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离, 并通过溴化乙锭染色和 UV 照明装置显示。

实施例 4

用不同真菌对向日葵植物的感染试验

对 7-8 周龄的植物进行真菌感染。通过将小滴 (15-20 μ l) 的灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 孢子悬液、*Diaporthe helianthi* (PH9905) 菌丝片段悬液或核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌丝片段悬液置于在叶上形成的小切口上, 使真菌能够渗入植物, 来接种叶子。真菌感染在 18 $^{\circ}$ C 和高相对湿度 (\pm 90%) 下进行。接种大约 4 天后收获具有感染部位的叶 (直径=13 mm)。在第一个小叶盘的孔周围, 收集 25 mm 的另一个环。也在未感染的叶子的叶切口周围收集叶盘作为对照。

实施例 5

从向日葵叶组织中的 PolyA⁺-RNA 提取和 cDNA 合成

用 Quickprep Micro mRNA 纯化试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, 瑞典) 从 100 mg 叶组织中收获 Poly-A⁺ RNA。通过在 UV 照明装置上用 4 μ l 1 μ g/ml 溴化乙锭加于 10 μ l 样品, 通过核酸显示测定 mRNA 的相对量。

如制造商所述, 使用 200 单位 Superscript II RT RNase H 反转录酶 (Gibco BRL) 和 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物 (500 μ g/ml, Gibco BRL), 用等量 Poly-A⁺ RNA (\pm 100 ng) 合成 cDNA。

实施例 6

通过竞争性 RT-PCR 对样品的分析

如实施例 3 所述分析不同的 cDNA 样品。

表 2: 用不同真菌感染向日葵叶后, ms59 信使的诱导水平

样品	诱导倍数	诱导倍数
	叶盘 ^b	外部感染区域 ^c
对照	1 ^a	1 ^a
<i>Diaporthe helianthi</i>	1000	1000
灰葡萄孢	1000	1 ^a
核盘菌	1000	1 ^a

注意: ^a: 人为设为 1。

^b: 真菌感染部位周围 13mm 的叶片。

^c: 真菌感染部位周围第 13mm 至第 25mm 的叶环。

实施例 7

向日葵 gapC PCR MIMIC 的构建及通过竞争性 RT-PCR 对样品的分析

我们使用与实施例 4、5、6 所述相同的样品对管家基因 GapC 进行竞争性 RT-PCR, 作为对 mRNA 质量和 cDNA 制备的内部对照。

为了 PCR MIMIC 的构建, 制备下列引物: FR-pUC-224 (SEQ ID

NO: 5) 5' CCA TGG GCT CAA ACT GGA GCC GGC CGG GAG CAG ACA AGC CCG 3'、FR-pUC-225 (SEQ ID NO:6) 5' CGA GAC GTC AAC AGT CGG GAC CCA CTC ATT AGG CAC CCC AGG C 3'、FR-gapC-211 (SEQ ID NO: 7) 5' CCA TGG GCT CAA ACT GGA GCC G 3'和 FR-gapC-212 (SEQ ID NO: 8) 5' CGA GAC GTC AAC AGT CGG GAC C 3'。引物 FR-pUC-224 和 FR-pUC-225 用来通过 PCR (95°C 1', 55°C 1', 72°C 2', 10 个循环) 从质粒 pUC18 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. 和 Messing, J. (1985) 基因 33, 103-119) 扩增 527bp 的片段。用引物 FR-gapC-211 和 FR-gapC-212 通过 PCR 扩增 1 μl 该 PCR 产物, 产生大量的 PCR MIMIC (95°C 1', 55°C 1', 72°C 2', 30 个循环)。

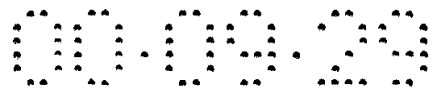
引物 FR-gapC-211 和 FR-gapC-212 将从 gapC cDNA 扩增一条 470bp 的带, 因此当在 2% 琼脂糖凝胶上分离时它能与 527bp MIMIC 轻易地区分开来。在含有 0.2 μg/μl 糖原作为载体的 H₂O 中以 100 ng/μl - 0.01 ag/μl 的范围进行 PCR MIMIC 稀释。

以竞争性 PCR 分析 cDNA 样品。因此在 0.5ml 试管中将 2 μl 样品与 1 μl 稀释的 PCR MIMIC (量: 0.1 pg、10 fg、1.0 fg、0.1 fg、10 ag 和 1.0 ag) 合并。用 10 μM 引物 FR-gapC-211 和 FR-gapC-212、0.5 μl 20 mM dNTP's、1×PCR 缓冲液、MgCl₂ 和 2.5 单位重组 Taq DNA 聚合酶 (Gibco BRL) 进行 cDNA 和 MIMIC 的扩增, 95°C 1'、55°C 1'、72°C 2' 进行 35 个循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离, 并通过溴化乙锭染色和 UV 照明装置显示。

表 3: 用不同真菌感染向日葵叶后, 对照 GapC 信使的诱导水平

样品	在 13mm 叶盘中的诱导倍数
对照	1 ^a
Diaporthe helianthi	10
灰葡萄孢	10
核盘菌	10

注意: ^a: 人为设为 1.



结果表明, RNA 质量和 cDNA 制备不受这些真菌感染的影响。植物病原体和环境压力因素对 GapC 信使的诱导以前在 Laxalt 等人 (1996) 植物分子生物学 30: 961-972 中有述。

实施例 8

ms59 启动子从向日葵基因组中的分离

为了 ms59 启动子的分离, 用 CTAB 提取法从向日葵叶中分离基因组 DNA。大约 10 μ g 基因组 DNA 用限制酶 BspH I、EcoR V、Nla IV、Hph I、Rsa I、Ssp I 和 Hind III 在 37 $^{\circ}$ C 下消化 16 小时。这些限制位点都位于 ms59 cDNA 的第一部分内。消化混合物用 1 倍体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, v/v, Gibco BRL) 抽提, 并用 0.1 倍体积的 3 M NaAc (pH=5.2) 和 2.5 倍体积的 96%乙醇沉淀。DNA 沉淀用 70%乙醇洗涤, 然后将沉淀溶解于 50 μ l 蒸馏水中。

25 μ l 每种样品于 40 伏特下在 0.7%琼脂糖凝胶中分离 16 小时。通过应用 0.4 M NaOH 的 Southern 印迹将 DNA 转移到尼龙膜 (Hybond-N⁺, Amersham Life Science) 上。用 ³²P-dCTP 标记的 320 bp 片段 (从 ATG 起始密码子到 BspH I 位点) 作为探针杂交 (16 小时, 65 $^{\circ}$ C) 该印迹。然后在 65 $^{\circ}$ C 下用 0.2 \times SSC 的严格条件洗涤该印迹。Southern 印迹的结果列于表 4 中。

连接剩下的 25 μ l 消化混合物, 使得 DNA 片段的环化受到刺激。实现方法是以 300 μ l 的(大)体积在 1 \times T4 连接缓冲液和 5 weiss 单位 T4 DNA 连接酶 (Gibco BRL) 中将 DNA 16 $^{\circ}$ C 连接 16 小时。再次用酚:氯仿:异戊醇抽提该混合物, 用乙醇沉淀, 并将 DNA 沉淀溶解于 50 μ l 水中。

在 cDNA 的第一部分中 (ATG 起始密码子与使用的第一个限制位点 (BspH I) 之间) 设计引物, 并向外延伸。引物 FR-MS59-11 (SEQ ID NO: 9) 5' CAG GCA GCT GTG GTT TGT GGC 3' 和 FR-MS59-49 (SEQ ID NO: 10) 5' CGG GAA GTT GCA GAA GAT TGG GTT G 3' 在对 1 μ l 连接混合物的 PCR 反应中使用, 其中使用 Advantage KlenTaq 聚合酶混合物 (Clontech laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 200 μ M dNTP 和 10 μ M

每种引物。该聚合酶混合物于 94℃ 激活 1 分钟，随后在 94℃ 30 秒、55℃ 1 分钟、68℃ 3 分钟条件下扩增 35 个循环。在 1% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物，未检测到特异带。因此如上所述使用第一轮 PCR 的 1 μl PCR 产物进行巢式 PCR，但其中使用巢式引物 FR-MS59-34 (SEQ ID NO: 11) 5' ACG TAG ATA TCG AAC AAG AAA CCG C 3' 和 FR-MS59-50 (SEQ ID NO: 12) 5' GAG CAA GAG AAG AAG GAG AC 3'。在 1% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物后，检测到非常特异的单一带。反向 PCR 的结果列于表 4 中。

表 4: 反向 PCR 的结果和 Southern 印迹带的大小 (nd=未测定)

反向 PCR 限制酶	带大小 Southern 印迹	带大小 巢式 PCR
BspH I	> 7 kb	nd
EcoR V	> 7 kb	nd
Nla IV	1.0 kb	0.6 kb
Hph I	1.2 kb	0.8 kb
Rsa I	0.5 kb	0.2 kb
Ssp I	1.3 kb	0.9 kb
Hind III	2.3 kb	1.9 kb

从凝胶中分离 1.9 kb Hind III iPCR 带，并在自动 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 上用引物 FR-MS59-34 和 FR-MS59-50 测定末端的 DNA 序列。

根据该 DNA 序列，为从向日葵基因组中扩增 ms59 启动子区设计新的引物。引物 FR-MS59-226 (SEQ ID NO: 13) 5' GCA AGC TTT ATA GTT TAC GAT CC 3' 向下游延伸，位于与 Hind III 限制位点重叠的 ms59 启动子区的上游部分。引物 FR-MS59-227 (SEQ ID NO: 14) 5' TTG CCA TGG TGC ATG GTT TAG CG 3' 能在与 ATG 翻译起点重叠的 ms59 启动子/前导区的最下游部分退火，引入一个横跨 ATG 起始密码子的 Nco I 限制位点。应用自动 DNA 序列分析 (Applied Biosystems) 测定从上游



Hind III 到 Nco I 位点的完整启动子片段的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 15, 核苷酸 1-1889)。

应用 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene) 和两种引物, 从向日葵基因组 DNA 扩增 ms59 启动子区。1.9 kb PCR 产物用 Hind III 和 Nco I 消化, 并连接到也用 Hind III 和 Nco I 消化的多拷贝克隆载体中。利用限制位点 Nco I 和 EcoR I, 使该启动子与 GUS 内含子报道基因 (Jefferson 等人 (1987) EMBO J 6: 3901-3907) 融合, 其后为含有聚腺苷酸化所需序列 (An 等人, 1989, 植物细胞 1, 115-122) 的马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因 (Thornburg 等人, 1987, 美国国家科学院院报 84, 744-748) 的 3' 非翻译区, 产生 pMOG1367。然后将侧翼为限制位点 EcoR I 和 Hind III 的完整嵌合基因转移到用 EcoR I 和 Hind III 消化的 pMOG800 (相关该质粒的描述参见例如 WO 97/42326) 中。

将得到的二元载体 pMOG1368 引入根癌农杆菌株 EHA105 中用于目标作物马铃薯和番茄的转化, 引入菌株 MOG101 中用于烟草和拟南芥的转化, 引入 MOG301 中用于 Brassica napus 的转化。

实施例 9

pMOG1368 对马铃薯 cv Kardal 的转化

基本如 Hoekema 等人 (Hoekema, A. 等人, 生物技术 7, 273-278, 1989) 所述向马铃薯中转化 pMOG1368。简言之, 马铃薯 (*Solanum tuberosum* cv. Kardal) 用农杆菌株 EHA 105 pMOG 1368 转化。基本培养基是由 MS 盐 (Murashige 和 Skoog (1962) 植物生理学 (Physiol. Plant) 14, 473)、R3 维生素 (Ooms 等人 (1987) 理论与应用遗传学 (Theor. Appl. Genet.) 73,744)、30 g/l 蔗糖、0.5 g/l MES 组成的 MS30R3 培养基, 终 pH 5.8 (用 KOH 调节), 必要时用 8 g/l Daichin 琼脂凝固。将马铃薯 cv. Kardal 的块茎去皮, 通过在 96% 乙醇中燃烧 5 秒种消毒表面。用无菌水熄灭火焰, 并切下大约 2 mm 厚的切片。将片从维管组织切开一个孔, 在含有含二元载体的 $1-5 \times 10^8$ 细菌/ml 农杆菌 EHA 105 之 MS30R3 培养基中温育 20 分钟。块茎片用 MS30R3 培养基洗涤, 转移到凝固的后培养



基 (PM) 中。PM 由补充了 3.5mg/l 玉米素核糖核苷和 0.03mg/l 吲哚乙酸 (IAA) 的 MS30R3 培养基组成。两天后, 将片转移到含有 200mg/l 头孢噻肟和 100mg/l 万古霉素的新鲜 PM 培养基中。三天后, 将块茎片转移到含有 250mg/l 羧苄青霉素和 100mg/l 卡那霉素的 PM 培养基组成的幼苗诱导培养基 (SIM) 中。4-8 周后, 切下从片上长出的幼苗, 置于生根培养基 (含有 100mg/l 头孢噻肟、50mg/l 万古霉素和 50mg/l 卡那霉素的 MS30R3 培养基) 中。通过分生组织插条无菌繁殖幼苗。

实施例 10

转基因马铃薯植物中启动子功能的检测

在试管中体外培养含有 pMOG1368 ms59 启动子-GUS 构建体的转基因马铃薯植物, 测定 GUS 基因的表达。为此采取并染色叶、茎和根样品 (表 5 中的结果)。按 0-5 的等级目测 GUS 表达水平, 0 是没有可检测的表达, 5 是在转基因植物的叶中观察到的最高水平的 GUS, 该植物是罕见的烟草 35S-GUS-转基因植物 (系 96306)。在全部实验中包括该植物的叶样品作为内部参考。

表 5: ms59 启动子驱动的 GUS 基因在体外小植物的叶、茎和根中的表达

植物编号	叶	茎	根
1368-1	0	0	0
1368-2	0	0	0
1368-3	0	0	0
1368-4	0	0	0
1368-5	0	0	0
1368-6	0	0	0
1368-7	0	0	0
1368-8	0	0	0
1368-9	0	0	0
1368-10	0	0	0
1368-11	0	0	0

1368-12	0	0	1
1368-13	0	0	0
1368-14	0	0	0
1368-15	0	0	0
1368-16	0	0	0
1368-17	0	0	0
1368-18	0	0	1
1368-19	0	0	0
1368-20	0	0	0
1368-21	0	0	0
1368-22	0	0	0
1368-23	0	0	0
1368-24	0	1	0
1368-25	0	0	0
1368-26	0	0	0
1368-27	0	0	0
1368-28	0	0	0
1368-29	0	0	0
1368-30	0	0	0

用引起马铃薯晚期枯萎病的真菌致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 感染选择的相同年龄的体外小植物。将含有高浓度真菌孢子的小滴水施加于叶表面。感染在室温下进行 96 小时。从小植物中取下表现病害特征的叶, 并通过组织化学 GUS 分析 (Goddijn 等人, 植物杂志 (*The Plant Journal*) (1993) 4 (5): 863-873) 对 GUS 基因的表达染色。在真菌感染引起的病斑处, 在原发区 (感染部位周围的区域), 在叶的未感染部分 (背景), 监测表达。

表 6: ms59 启动子驱动的 GUS 基因在致病疫霉感染的马铃薯体外小植物叶中的表达

植物编号	感染前	病斑	原发区	背景
1368-1	0	0	0	0
1368-3	0	0	0	0
1368-4	0	0	1	0
1368-5	0	0	1	0
1368-6	0	0	0	0
1368-7	0	0	0	0
1368-8	0	0	0	0
1368-9	0	0	1	0

也在致病疫霉感染之前及之后检测完全生长的马铃薯植物叶中的启动子表现。接种前，分离叶，并对 GUS 的表达染色。然后对植物喷施 5×10^5 孢子/ml 的孢子悬液，感染进行 4 天（96 小时）。再次分离叶，并对 GUS 的表达染色。结果列于表 7 中。在病斑、原发区和背景区域中监测表达。

表 7: 致病疫霉感染之前及之后，ms59 启动子驱动 GUS 基因在转基因马铃薯植物叶中的表达

植物编号	感染前	病斑	原发区	背景
1368-1	0	0	0	1
1368-2	0	0	0	1
1368-3	0	0	0	0
1368-4	0	0	0	0
1368-5	0	0	0	0
1368-6	0	0	0	0
1368-7	0	0	0	0
1368-9	0	0	0	0
1368-10	0	0	0	0
1368-11	0	0	0	0
1368-12	2	0	2	2
1368-13	0	0	0	0

1368-14	0	0	0	0
1368-15	0	0	0	0
1368-16	0	0	0	0
1368-17	0	0	0	0
1368-18	0	0	2	0
1368-19	0	0	0	0
1368-20	0	0	0	0
1368-21	0	0	0	0
1368-22	0	0	0	0
1368-23	0	0	0	0
1368-24	0	0	0	0
1368-25	0	0	0	0
1368-26	0	0	3	0

结果表明，ms59 启动子可应答真菌感染。诱导表达的水平相当低，在某些情况中可能低于检测水平。这可解释可检测到的诱导型 GUS 表达的低频率。

序列表

<110> MOGEN International nv

<120> New pathogen-inducible promoter.

<130> 46062 PCT

<140>

<141>

<150> EP 98201024.1

<151> 1998-04-01

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 1

gttccggagg ttgtgaccgt gggatgtgct gcaaggcg

38

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 2

ctggggaagc ccgtgtagta aagccccgc gcgttgccg attc

44

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 3

ctggggaagc ccgtgtagta aagc

24

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 4
 gttccggagg ttgtgaccgt g 21

 <210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 5
 ccatgggctc aaactggagc cggccgggag cagacaagcc cg 42

 <210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 6
 cgagacgtca acagtcggga cccactcatt aggcacccca ggc 43

 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 7
 ccatgggctc aaactggagc cg 22

 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 8
 cgagacgtca acagtcggga cc 22

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 9
 caggcagctg tggtttgtgg c 21

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 10
 cgggaagtgt cagaagattg ggttg 25

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 11
 acgtagatat cgaacaagaa accgc 25

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 12
 gagcaagaga agaaggagac 20

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 13
 gcaagcttta tagtttacga tcc 23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 14

ttgccatggt gcatggttta gcg

23

<210> 15

<211> 3680

<212> DNA

<213> 向日葵

<220>

<221> 启动子

<222> (1)..(1889)

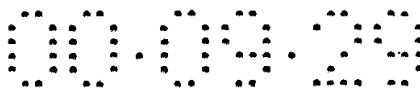
<220>

<221> CDS

<222> (1890)..(3503)

<400> 15

aagctttata gtttacgac caaggttcga tgtgttagtt ccaacaacgt tggagtcgaa 60
gttcttttta ggagtttttt ttttttttc aaactagtgt tggtagaaaa agtatttact 120
aaagtgggtg tccttgaaaa atatttacca aaataatggt tttgtctcct ttctcatctt 180
aatgaatata aactaaatta ctaattctat tattttattc tgtaaacact ttatttacta 240
ttatttttta gaaacccaat aaaactaat tagtaatttt attatttatt atattgacac 300
tttattttct ttttgaaact cagacttgag gttctccatt atgtcaccta atattatctt 360
atctaataat ttatacatga ttaacataat ttactcaatt tataattata tctaaattca 420
ctttaacata tattttggtt ttttagttg taacaataaa agtggttaagt tagttagtta 480
taaaaaaggt cagaaagtaa aatagtttag tatgtttggt aatataagat tacaaaaaag 540
taaaaaaagt aagccataaa aataaaattt gggagttcgt tttctatgac ttgacaacac 600
tttaaagtag tttaatcgat caaaaataca tgatatatta tttatctagt aaaaaataaa 660
aataaaacaa tattagcgta gataagagtg ataaataatt tttttattaa ataattgaaa 720
tttttaaaaa agatcatttt ctaaaaatcc gtagcgagta aagttatgat gtttgtctaa 780
cttttttatg tttcttattt catactgttt aatatataaa aagataagga gttggtaaaa 840
caaaatataa agagttgggt aaaggtaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaacc 900
tataatggat tgattggagc aaaacaaaat attttattga ttgaataaaa aaatataaca 960
aaaacataat gaataagaag tattacatta cattggcttt aaaaaataat caagtattaa 1020



ggc ctt tcc tac ctt aca aac aca aac caa ccc ttc ttc att gtg gac 2297
Gly Leu Ser Tyr Leu Thr Asn Thr Asn Gln Pro Phe Phe Ile Val Asp
125 130 135

atg ttc aat tta agg tcc ata aac gta gat atc gaa caa gaa acc gca 2345
Met Phe Asn Leu Arg Ser Ile Asn Val Asp Ile Glu Gln Glu Thr Ala
140 145 150

tgg gtc caa gcc ggt gcg act ctt ggt gaa gtg tac tat cga ata gcg 2393
Trp Val Gln Ala Gly Ala Thr Leu Gly Glu Val Tyr Tyr Arg Ile Ala
155 160 165

gag aaa agt aac aag cat ggt ttt ccg gca ggg gtt tgt cca acg gtt 2441
Glu Lys Ser Asn Lys His Gly Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Val
170 175 180

ggc gtt ggt ggg cat ttt agt ggt ggt ggg tat ggt aat ttg atg aga 2489
Gly Val Gly Gly His Phe Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Met Arg
185 190 195 200

aaa tat ggt ttg tcg gtt gat aat att gtt gat gct caa ata ata gat 2537
Lys Tyr Gly Leu Ser Val Asp Asn Ile Val Asp Ala Gln Ile Ile Asp
205 210 215

gtg aat ggc aag ctt ttg gat cga aag agt atg ggt gag gat ttg ttt 2585
Val Asn Gly Lys Leu Leu Asp Arg Lys Ser Met Gly Glu Asp Leu Phe
220 225 230

tgg gcg atc acc ggc ggt ggt ggt gtt agt ttt ggt gtg gtt cta gcc 2633
Trp Ala Ile Thr Gly Gly Gly Gly Val Ser Phe Gly Val Val Leu Ala
235 240 245

tac aaa atc aaa cta gtt cgt gtt ccg gag gtt gtg acc gtg ttt acc 2681
Tyr Lys Ile Lys Leu Val Arg Val Pro Glu Val Val Thr Val Phe Thr
250 255 260

att gaa aga aga gag gaa caa aac ctc agc acc atc gcg gaa cga tgg 2729
Ile Glu Arg Arg Glu Glu Gln Asn Leu Ser Thr Ile Ala Glu Arg Trp
265 270 275 280

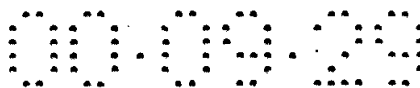
gta caa gtt gct gat aag cta gat aga gat ctt ttc ctt cga atg acc 2777
Val Gln Val Ala Asp Lys Leu Asp Arg Asp Leu Phe Leu Arg Met Thr
285 290 295

ttt agt gtc ata aac gat acc aac ggt gga aag aca gtc cgt gct atc 2825
Phe Ser Val Ile Asn Asp Thr Asn Gly Gly Lys Thr Val Arg Ala Ile
300 305 310

ttt cca acg ttg tac ctt gga aac tcg agg aat ctt gtt aca ctt ttg 2873
Phe Pro Thr Leu Tyr Leu Gly Asn Ser Arg Asn Leu Val Thr Leu Leu
315 320 325

aat aaa gat ttc ccc gag tta ggg ttg caa gaa tcg gat tgt act gaa 2921
Asn Lys Asp Phe Pro Glu Leu Gly Leu Gln Glu Ser Asp Cys Thr Glu
330 335 340

atg agt tgg gtt gag tct gtg ctt tac tac acg ggc ttc ccc agt ggt 2969
Met Ser Trp Val Glu Ser Val Leu Tyr Tyr Thr Gly Phe Pro Ser Gly
345 350 355 360



act cca acc acg gcg ctc tta agc cgt act cct caa aga ctc aac cca 3017
Thr Pro Thr Thr Ala Leu Leu Ser Arg Thr Pro Gln Arg Leu Asn Pro
365 370 375

ttc aag atc aaa tcc gat tat gtg caa aat cct att tct aaa cga cag 3065
Phe Lys Ile Lys Ser Asp Tyr Val Gln Asn Pro Ile Ser Lys Arg Gln
380 385 390

ttc gag ttc atc ttc gaa agg ctg aaa gaa ctt gaa aac caa atg ttg 3113
Phe Glu Phe Ile Phe Glu Arg Leu Lys Glu Leu Glu Asn Gln Met Leu
395 400 405

gct ttc aac cca tat ggt ggt aga atg agt gaa ata tcc gaa ttc gca 3161
Ala Phe Asn Pro Tyr Gly Gly Arg Met Ser Glu Ile Ser Glu Phe Ala
410 415 420

aag cct ttc cca cat aga tcg ggt aac ata gcg aaa att caa tac gaa 3209
Lys Pro Phe Pro His Arg Ser Gly Asn Ile Ala Lys Ile Gln Tyr Glu
425 430 435 440

gta aac tgg gag gat ctt agc gat gaa gcc gaa aat cgt tac ttg aat 3257
Val Asn Trp Glu Asp Leu Ser Asp Glu Ala Glu Asn Arg Tyr Leu Asn
445 450 455

ttc aca agg ctg atg tat gat tac atg acc cca ttt gtg tcg aaa aac 3305
Phe Thr Arg Leu Met Tyr Asp Tyr Met Thr Pro Phe Val Ser Lys Asn
460 465 470

cct aga aaa gca ttt ttg aac tat agg gat ttg gat att ggt atc aac 3353
Pro Arg Lys Ala Phe Leu Asn Tyr Arg Asp Leu Asp Ile Gly Ile Asn
475 480 485

agc cat ggc agg aat gct tat act gaa gga atg gtt tat ggg cac aag 3401
Ser His Gly Arg Asn Ala Tyr Thr Glu Gly Met Val Tyr Gly His Lys
490 495 500

tat ttc aaa gag aca aat tac aag agg cta gta agt gtg aag act aaa 3449
Tyr Phe Lys Glu Thr Asn Tyr Lys Arg Leu Val Ser Val Lys Thr Lys
505 510 515 520

gtt gat cct gac aac ttc ttt agg aat gag caa agc atc cca act ttg 3497
Val Asp Pro Asp Asn Phe Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Thr Leu
525 530 535

tca tct tgaagaacgt acatatataa ataaatacct ttgtgcatgg tattttcagg 3553
Ser Ser

gtgttaaagt gatattcaga tatttatgat agaattttga cttgtatttt atacaatcaa 3613

aattgtatgg ttctccgaat ttctcttttt aattctgaaa aatacatatt agtattgtca 3673

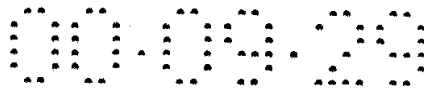
aaaaaaaa 3680

<210> 16

<211> 538

<212> PRT

<213> 向日葵



<400> 16
Met Ala Asn Ile Thr Ser Ser Phe Asn Met Gln Thr Ser Ile Leu Thr
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Thr Gln Ser Ser Ala Thr Ser Arg Ser
20 25 30
Ile Thr Asp Arg Phe Ile Gln Cys Leu His Asp Arg Ala Asp Pro Ser
35 40 45
Phe Pro Ile Thr Gly Glu Val Tyr Thr Pro Gly Asn Ser Ser Phe Pro
50 55 60
Thr Val Leu Gln Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Arg Phe Asn Glu Thr Thr
65 70 75 80
Thr Pro Lys Pro Phe Leu Ile Ile Thr Ala Glu His Val Ser His Ile
85 90 95
Gln Ala Ala Val Val Cys Gly Lys Gln Asn Arg Leu Leu Leu Lys Thr
100 105 110
Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Leu Thr Asn Thr
115 120 125
Asn Gln Pro Phe Phe Ile Val Asp Met Phe Asn Leu Arg Ser Ile Asn
130 135 140
Val Asp Ile Glu Gln Glu Thr Ala Trp Val Gln Ala Gly Ala Thr Leu
145 150 155 160
Gly Glu Val Tyr Tyr Arg Ile Ala Glu Lys Ser Asn Lys His Gly Phe
165 170 175
Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Val Gly Val Gly Gly His Phe Ser Gly
180 185 190
Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Met Arg Lys Tyr Gly Leu Ser Val Asp Asn
195 200 205
Ile Val Asp Ala Gln Ile Ile Asp Val Asn Gly Lys Leu Leu Asp Arg
210 215 220
Lys Ser Met Gly Glu Asp Leu Phe Trp Ala Ile Thr Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240
Val Ser Phe Gly Val Val Leu Ala Tyr Lys Ile Lys Leu Val Arg Val
245 250 255
Pro Glu Val Val Thr Val Phe Thr Ile Glu Arg Arg Glu Glu Gln Asn
260 265 270
Leu Ser Thr Ile Ala Glu Arg Trp Val Gln Val Ala Asp Lys Leu Asp
275 280 285
Arg Asp Leu Phe Leu Arg Met Thr Phe Ser Val Ile Asn Asp Thr Asn
290 295 300
Gly Gly Lys Thr Val Arg Ala Ile Phe Pro Thr Leu Tyr Leu Gly Asn
305 310 315 320



Ser Arg Asn Leu Val Thr Leu Leu Asn Lys Asp Phe Pro Glu Leu Gly
325 330 335

Leu Gln Glu Ser Asp Cys Thr Glu Met Ser Trp Val Glu Ser Val Leu
340 345 350

Tyr Tyr Thr Gly Phe Pro Ser Gly Thr Pro Thr Thr Ala Leu Leu Ser
355 360 365

Arg Thr Pro Gln Arg Leu Asn Pro Phe Lys Ile Lys Ser Asp Tyr Val
370 375 380

Gln Asn Pro Ile Ser Lys Arg Gln Phe Glu Phe Ile Phe Glu Arg Leu
385 390 395 400

Lys Glu Leu Glu Asn Gln Met Leu Ala Phe Asn Pro Tyr Gly Gly Arg
405 410 415

Met Ser Glu Ile Ser Glu Phe Ala Lys Pro Phe Pro His Arg Ser Gly
420 425 430

Asn Ile Ala Lys Ile Gln Tyr Glu Val Asn Trp Glu Asp Leu Ser Asp
435 440 445

Glu Ala Glu Asn Arg Tyr Leu Asn Phe Thr Arg Leu Met Tyr Asp Tyr
450 455 460

Met Thr Pro Phe Val Ser Lys Asn Pro Arg Lys Ala Phe Leu Asn Tyr
465 470 475 480

Arg Asp Leu Asp Ile Gly Ile Asn Ser His Gly Arg Asn Ala Tyr Thr
485 490 495

Glu Gly Met Val Tyr Gly His Lys Tyr Phe Lys Glu Thr Asn Tyr Lys
500 505 510

Arg Leu Val Ser Val Lys Thr Lys Val Asp Pro Asp Asn Phe Phe Arg
515 520 525

Asn Glu Gln Ser Ile Pro Thr Leu Ser Ser
530 535 538

<210> 17

<211> 1981

<212> DNA

<213> 莴苣

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(1626)

<220>

<221> 未定

<222> (372)

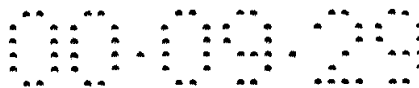
<223> 替换 (372, "g")

<220>
 <221> 未定
 <222> (379)
 <223> 替换 (379, "g")

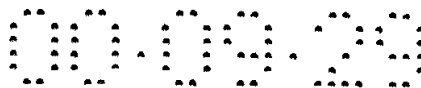
<220>
 <221> 未定
 <222> (786)
 <223> 替换 (786, "t")

<220>
 <221> 未定
 <222> (1105)..(1106)
 <223> 替换 (1105..1106, "ga" 或 "gg" 或 "aa")

<400> 17
 acaaaa atg gca att acc tat tct ttc aac ttc aaa tct tat att ttt 48
 Met Ala Ile Thr Tyr Ser Phe Asn Phe Lys Ser Tyr Ile Phe
 1 5 10
 cct ctc ctc ctt gtc ttg ctc tct acc cat tca tca gcg act tca act 96
 Pro Leu Leu Leu Val Leu Leu Ser Thr His Ser Ser Ala Thr Ser Thr
 15 20 25 30
 tcc att ata gat cgc ttc acc caa tgt cta aac aac cga gct gac cct 144
 Ser Ile Ile Asp Arg Phe Thr Gln Cys Leu Asn Asn Arg Ala Asp Pro
 35 40 45
 tct ttc ccg ctc agt gga caa ctt tac act ccc gat aac tcc tct ttt 192
 Ser Phe Pro Leu Ser Gly Gln Leu Tyr Thr Pro Asp Asn Ser Ser Phe
 50 55 60
 cca tcc gtc ttg caa gct tac atc cgg aac ctc cga ttc aat gaa tcc 240
 Pro Ser Val Leu Gln Ala Tyr Ile Arg Asn Leu Arg Phe Asn Glu Ser
 65 70 75
 acg act ccc aaa ccc atc tta atc atc acc gcc tta cac cct tca cac 288
 Thr Thr Pro Lys Pro Ile Leu Ile Ile Thr Ala Leu His Pro Ser His
 80 85 90
 att caa gca gct gtt gtg tgc gcc aaa aca cac cgc ctg cta atg aaa 336
 Ile Gln Ala Ala Val Val Cys Ala Lys Thr His Arg Leu Leu Met Lys
 95 100 105 110
 acc aga agc gga ggc cat gat tat gag ggg ctt tcc tat gtg acc aat 384
 Thr Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Val Thr Asn
 115 120 125
 tcg aac caa ccc ttt ttt gtt gtt gac atg ttc aac tta cgc tcc ata 432
 Ser Asn Gln Pro Phe Phe Val Val Asp Met Phe Asn Leu Arg Ser Ile
 130 135 140
 aac gtg agt att gaa gat gaa act gca tgg gtc caa gct ggt gcg act 480
 Asn Val Ser Ile Glu Asp Glu Thr Ala Trp Val Gln Ala Gly Ala Thr
 145 150 155
 ctt ggt gaa gtc tac tac cga ata gca gag aaa agc aac agt cat gct 528
 Leu Gly Glu Val Tyr Tyr Arg Ile Ala Glu Lys Ser Asn Ser His Ala
 160 165 170



ttt ccg gct ggc gtt tgc cct act gtt gga gtt ggt ggc cat ttt agt	576
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Val Gly Val Gly Gly His Phe Ser	
175 180 185 190	
ggg ggt ggt tat ggt aac ttg atg gga aaa tac ggc ctt tct gtt gac	624
Gly Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Met Gly Lys Tyr Gly Leu Ser Val Asp	
195 200 205	
aat att gtc gat gct cag tta atc gat gtg aat ggt aaa ctt ctg aac	672
Asn Ile Val Asp Ala Gln Leu Ile Asp Val Asn Gly Lys Leu Leu Asn	
210 215 220	
cgg aaa tca atg ggt gaa gat ctt ttt tgg gcc atc aca ggt ggt ggt	720
Arg Lys Ser Met Gly Glu Asp Leu Phe Trp Ala Ile Thr Gly Gly Gly	
225 230 235	
ggg gtc agc ttt ggt gtg gtt gta gcg tac aag atc aaa ctg gtt cgt	768
Gly Val Ser Phe Gly Val Val Val Ala Tyr Lys Ile Lys Leu Val Arg	
240 245 250	
ggt cct acc act gtg acc gtt ttt aac gta caa aga aca tcc gag cag	816
Val Pro Thr Thr Val Thr Val Phe Asn Val Gln Arg Thr Ser Glu Gln	
255 260 265 270	
aac cta agc acc ata gcc cac cga tgg ata caa gtt gcg gat aag ctc	864
Asn Leu Ser Thr Ile Ala His Arg Trp Ile Gln Val Ala Asp Lys Leu	
275 280 285	
gat aat gac ctt ttc ctt cga atg acc ttt aac gtg ata aac aac aca	912
Asp Asn Asp Leu Phe Leu Arg Met Thr Phe Asn Val Ile Asn Asn Thr	
290 295 300	
aat ggc gaa aag acg ata cgt ggt ttg ttt cca aca ctg tac ctc gga	960
Asn Gly Glu Lys Thr Ile Arg Gly Leu Phe Pro Thr Leu Tyr Leu Gly	
305 310 315	
aac tct acc gct ctt gtt gcc ctc ctg aac aag gat ttc cct gaa tta	1008
Asn Ser Thr Ala Leu Val Ala Leu Leu Asn Lys Asp Phe Pro Glu Leu	
320 325 330	
ggg gta gaa att tca gat tgt att gaa atg agt tgg atc gag tct gtt	1056
Gly Val Glu Ile Ser Asp Cys Ile Glu Met Ser Trp Ile Glu Ser Val	
335 340 345 350	
ctt ttc tac aca aac ttc ccc att ggt act ccg acc act gct ctt cta	1104
Leu Phe Tyr Thr Asn Phe Pro Ile Gly Thr Pro Thr Thr Ala Leu Leu	
355 360 365	
agc cgt aca cct caa aga cta aac cca ttc aaa atc aaa tct gat tac	1152
Ser Arg Thr Pro Gln Arg Leu Asn Pro Phe Lys Ile Lys Ser Asp Tyr	
370 375 380	
gta aaa aac act att tcc aaa cag gga ttc gaa tcc ata ttt gaa agg	1200
Val Lys Asn Thr Ile Ser Lys Gln Gly Phe Glu Ser Ile Phe Glu Arg	
385 390 395	
atg aaa gaa ctc gaa aac caa atg cta gct ttc aac cct tat ggt gga	1248
Met Lys Glu Leu Glu Asn Gln Met Leu Ala Phe Asn Pro Tyr Gly Gly	
400 405 410	



aga atg agc gaa att tcc gaa ttt gca aag cct ttt ccc cat cga tca 1296
 Arg Met Ser Glu Ile Ser Glu Phe Ala Lys Pro Phe Pro His Arg Ser
 415 420 425 430

ggg aat ata gcg aag atc caa tac gaa gta aac tgg gat gaa ctt ggc 1344
 Gly Asn Ile Ala Lys Ile Gln Tyr Glu Val Asn Trp Asp Glu Leu Gly
 435 440 445

ggt gaa gca gcc aat cgg tac ttg aac ttc aca agg gtg atg tat gat 1392
 Val Glu Ala Ala Asn Arg Tyr Leu Asn Phe Thr Arg Val Met Tyr Asp
 450 455 460

tat atg act ccg ttt gtt tct aag aac ccc agg gaa gca ttt ctg aac 1440
 Tyr Met Thr Pro Phe Val Ser Lys Asn Pro Arg Glu Ala Phe Leu Asn
 465 470 475

tac agg gat tta gat att ggt gtc aac agt cat ggc aag aat gct tac 1488
 Tyr Arg Asp Leu Asp Ile Gly Val Asn Ser His Gly Lys Asn Ala Tyr
 480 485 490

ggg gaa gga atg gtt tat ggg cac aag tat ttc aaa gag acg aat tat 1536
 Gly Glu Gly Met Val Tyr Gly His Lys Tyr Phe Lys Glu Thr Asn Tyr
 495 500 505 510

aag agg cta acg atg gtg aag acg agg gtt gat cct agc aat ttt ttt 1584
 Lys Arg Leu Thr Met Val Lys Thr Arg Val Asp Pro Ser Asn Phe Phe
 515 520 525

agg aat gag caa agt atc cca act ttg tca tct tca tgg aag 1626
 Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Thr Leu Ser Ser Ser Trp Lys
 530 535 540

taaattctaa attcacttgt gaaattgaat aaaagtatgg ctttttcaag gtcattggtat 1686

ccagattcag atgatattga tataattttg acttgtattt atacaaacaa aattatatta 1746

tatttttctg aatttagatt ttccattctt tggaaaaata tacgaacatt gatggtgata 1806

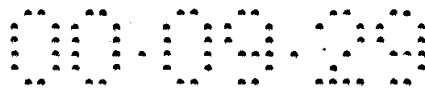
tttttaagaa ttatagattt tgaacattgt gaacaatgaa taaaccgagg acttcccttg 1866

ggtttttttt ataagtatgt aatagcatgt ctttaaatcaa gataaccgat cattggatgc 1926

aatttattat tataaacctt atttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1981

<210> 18
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> 莴苣

<400> 18
 Met Ala Ile Thr Tyr Ser Phe Asn Phe Lys Ser Tyr Ile Phe Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Leu Leu Ser Thr His Ser Ser Ala Thr Ser Thr Ser Ile
 20 25 30
 Ile Asp Arg Phe Thr Gln Cys Leu Asn Asn Arg Ala Asp Pro Ser Phe
 35 40 45



Pro Leu Ser Gly Gln Leu Tyr Thr Pro Asp Asn Ser Ser Phe Pro Ser
50 55 60

Val Leu Gln Ala Tyr Ile Arg Asn Leu Arg Phe Asn Glu Ser Thr Thr
65 70 75 80

Pro Lys Pro Ile Leu Ile Ile Thr Ala Leu His Pro Ser His Ile Gln
85 90 95

Ala Ala Val Val Cys Ala Lys Thr His Arg Leu Leu Met Lys Thr Arg
100 105 110

Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Val Thr Asn Ser Asn
115 120 125

Gln Pro Phe Phe Val Val Asp Met Phe Asn Leu Arg Ser Ile Asn Val
130 135 140

Ser Ile Glu Asp Glu Thr Ala Trp Val Gln Ala Gly Ala Thr Leu Gly
145 150 155 160

Glu Val Tyr Tyr Arg Ile Ala Glu Lys Ser Asn Ser His Ala Phe Pro
165 170 175

Ala Gly Val Cys Pro Thr Val Gly Val Gly Gly His Phe Ser Gly Gly
180 185 190

Gly Tyr Gly Asn Leu Met Gly Lys Tyr Gly Leu Ser Val Asp Asn Ile
195 200 205

Val Asp Ala Gln Leu Ile Asp Val Asn Gly Lys Leu Leu Asn Arg Lys
210 215 220

Ser Met Gly Glu Asp Leu Phe Trp Ala Ile Thr Gly Gly Gly Gly Val
225 230 235 240

Ser Phe Gly Val Val Val Ala Tyr Lys Ile Lys Leu Val Arg Val Pro
245 250 255

Thr Thr Val Thr Val Phe Asn Val Gln Arg Thr Ser Glu Gln Asn Leu
260 265 270

Ser Thr Ile Ala His Arg Trp Ile Gln Val Ala Asp Lys Leu Asp Asn
275 280 285

Asp Leu Phe Leu Arg Met Thr Phe Asn Val Ile Asn Asn Thr Asn Gly
290 295 300

Glu Lys Thr Ile Arg Gly Leu Phe Pro Thr Leu Tyr Leu Gly Asn Ser
305 310 315 320

Thr Ala Leu Val Ala Leu Leu Asn Lys Asp Phe Pro Glu Leu Gly Val
325 330 335

Glu Ile Ser Asp Cys Ile Glu Met Ser Trp Ile Glu Ser Val Leu Phe
340 345 350

Tyr Thr Asn Phe Pro Ile Gly Thr Pro Thr Thr Ala Leu Leu Ser Arg
355 360 365

Thr Pro Gln Arg Leu Asn Pro Phe Lys Ile Lys Ser Asp Tyr Val Lys
 370 375 380

Asn Thr Ile Ser Lys Gln Gly Phe Glu Ser Ile Phe Glu Arg Met Lys
 385 390 395 400

Glu Leu Glu Asn Gln Met Leu Ala Phe Asn Pro Tyr Gly Gly Arg Met
 405 410 415

Ser Glu Ile Ser Glu Phe Ala Lys Pro Phe Pro His Arg Ser Gly Asn
 420 425 430

Ile Ala Lys Ile Gln Tyr Glu Val Asn Trp Asp Glu Leu Gly Val Glu
 435 440 445

Ala Ala Asn Arg Tyr Leu Asn Phe Thr Arg Val Met Tyr Asp Tyr Met
 450 455 460

Thr Pro Phe Val Ser Lys Asn Pro Arg Glu Ala Phe Leu Asn Tyr Arg
 465 470 475 480

Asp Leu Asp Ile Gly Val Asn Ser His Gly Lys Asn Ala Tyr Gly Glu
 485 490 495

Gly Met Val Tyr Gly His Lys Tyr Phe Lys Glu Thr Asn Tyr Lys Arg
 500 505 510

Leu Thr Met Val Lys Thr Arg Val Asp Pro Ser Asn Phe Phe Arg Asn
 515 520 525

Glu Gln Ser Ile Pro Thr Leu Ser Ser Ser Trp Lys
 530 535 540

说明书附图

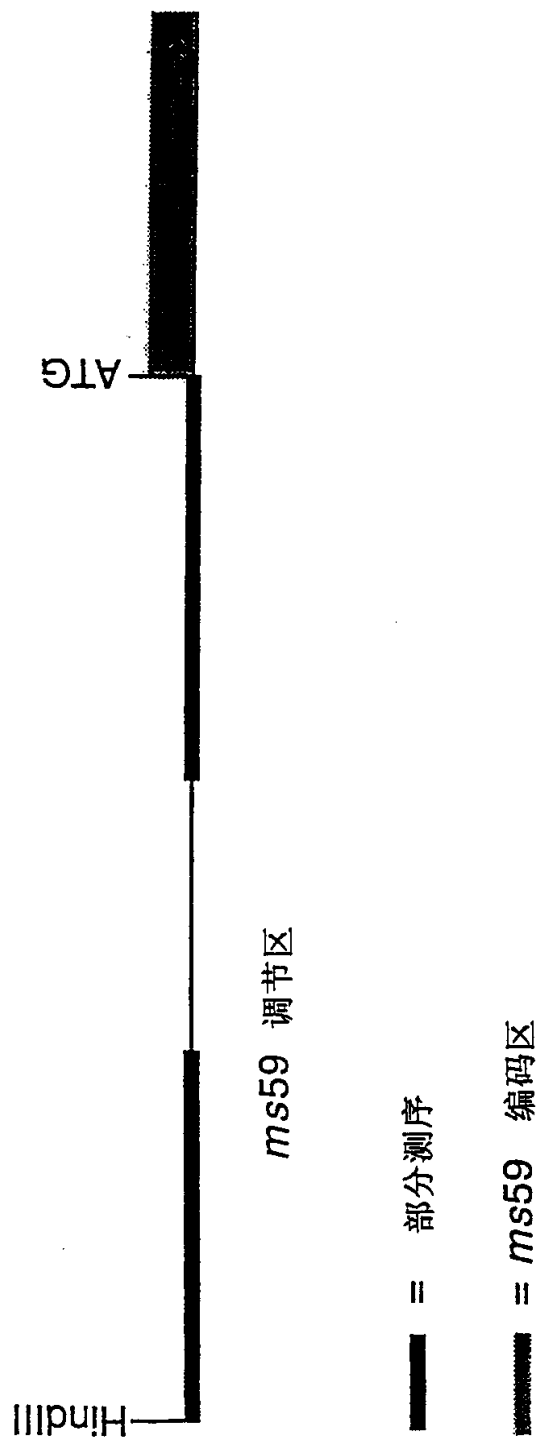


图1