

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/62

C12N 15/56 C12N 15/29

C12N 15/82 A01H 5/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02822987.8

[43] 公开日 2005年3月2日

[11] 公开号 CN 1589326A

[22] 申请日 2002.11.18 [21] 申请号 02822987.8

[30] 优先权

[32] 2001.11.20 [33] US [31] 60/331,749

[86] 国际申请 PCT/CN2002/000822 2002.11.18

[87] 国际公布 WO2003/044201 英 2003.5.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.19

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港

[72] 发明人 蔡美莲 赵开军

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 38 页 序列表 7 页  
附图 16 页

[54] 发明名称 具有增强的对真菌疾病的抗性的遗传修饰过的植物及其生产方法

[57] 摘要

本发明披露了遗传修饰过的植物，如马铃薯植物。在用包括壳多糖酶基因和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的嵌合基因转化植物细胞之后，所述植物对感兴趣的病原体的抗性更高。本发明还提供了一种提高植物对病原体抗性的方法，该方法包括导入编码两种或两种以上壳多糖-结合结构域的芸蓼属壳多糖酶基因和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因，并且表达所述壳多糖酶基因和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因。

Table of amino acid sequences (Seq. ID Nos. 1-10) with corresponding nucleotide sequences. The sequences are presented in a grid format with labels for each sequence.

1. 一种重组载体, 包括: (a) SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列或编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的核苷酸; 和 (b) SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列或编码 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的核苷酸序列。
- 5 2. 一种重组载体, 包括: (a) 能在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的互补体杂交的第一核苷酸序列; 和 (b) 能在严格条件下与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列的互补体杂交的第二核苷酸序列; 其中, 所述严格条件包括在 42℃ 下, 在 50% 去离子化甲酰胺, 6xSSC, 5x Denhardt's, 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100 μg/ml 变性的 50% 去离子化甲酰胺, 6xSSC, 5x Denhardt's, 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100 μg/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中杂交, 并且在 65℃ 下用 0.1xSSC/0.1% SDS 洗涤; 并且, 其中, 所述第一核苷酸序列编码功能性壳多糖酶; 而所述第二核苷酸序列编码功能性 β-1, 3-葡聚糖酶。
- 10 3. 一种重组载体, 包括: (a) 编码包括一个以上壳多糖-结合结构域的壳多糖酶的第一核苷酸序列; 和 (b) 编码 β-1, 3-葡聚糖酶的第二核苷酸序列。
4. 如权利要求 1, 2 或 3 的重组载体, 还包括可操作地与所述第一核苷酸序列和第二核苷酸序列连接的一个或多个调控核酸。
5. 如权利要求 4 的重组载体, 其中, 所述调控核酸是花椰菜花叶病毒 35S 启动子。
- 20 6. 包括权利要求 1, 2 或 3 的载体的重组细胞。
7. 包括权利要求 4 的载体的重组细胞。
8. 如权利要求 6 的重组细胞, 其中, 所述细胞是植物细胞。
9. 如权利要求 7 的重组细胞, 其中, 所述细胞是植物细胞。
- 25 10. 如权利要求 8 的重组细胞, 其中, 所述植物选自下组: 小麦, 玉米, 水稻, 大麦, 番茄, 苹果, 梨, 草莓, 胡萝卜, 马铃薯, 甜菜, 山药, 莴苣和菠菜。
11. 如权利要求 9 的重组细胞, 其中, 所述植物选自下组: 小麦, 玉米, 水稻, 大麦, 番茄, 苹果, 梨, 草莓, 胡萝卜, 马铃薯, 甜菜, 30 山药, 莴苣和菠菜。
12. 如权利要求 10 的重组细胞, 其中, 所述植物是马铃薯。
13. 如权利要求 11 的重组细胞, 其中, 所述植物是马铃薯。

14. 一种重组细胞, 包括: (a) 包括编码包括一个以上壳多糖-结合结构域的壳多糖酶的第一核苷酸序列的第一重组载体; 和 (b) 包括编码  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的第二核苷酸序列的第二重组载体。

15. 一种重组细胞, 包括: (a) 包括能在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的互补体杂交的第一核苷酸序列的第一重组载体; 和 (b) 包括能在严格条件下与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列的互补体杂交的第二核苷酸序列的第二重组载体; 其中, 所述严格条件包括在 42°C 下, 在 50% 去离子化甲酰胺, 6xSSC, 5x Denhardt's, 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中杂交, 并且在 65°C 下用 0.1xSSC/0.1% SDS 洗涤; 并且, 其中, 所述第一核苷酸序列编码功能性壳多糖酶, 而所述第二核苷酸序列编码功能性  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶。

16. 一种生产抗病原体的转化过的植物的方法, 包括: (a) 用一种重组载体转化植物, 该载体包括: (i) 能在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的互补体杂交的第一核苷酸序列; 和 (ii) 能在严格条件下与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列的互补体杂交的第二核苷酸序列, 其中, 所述严格条件包括在 42°C 下, 在 50% 去离子化甲酰胺, 6xSSC, 5x Denhardt's, 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中杂交, 并且在 65°C 下用 0.1xSSC/0.1% SDS 洗涤; 并且, 其中, 所述第一核苷酸序列编码功能性壳多糖酶, 而所述第二核苷酸序列编码功能性  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶; 和 (b) 选择其中表达了第一和第二核苷酸序列的转化过的植物。

17. 一种用于生产抗病原体的转化过的植物的方法, 包括: (a) 用第一种重组载体转化植物, 该载体包括能在严格条件下 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的互补体杂交的第一核苷酸序列; (b) 用第二种重组载体转化植物, 该载体包括能在严格条件下与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列的互补体杂交的第二核苷酸序列; 其中, 所述严格条件包括在 42°C 下, 在 50% 去离子化甲酰胺, 6xSSC, 5x Denhardt's, 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中杂交, 并且在 65°C 下用 0.1xSSC/0.1% SDS 洗涤; 并且, 其中, 所述第一核苷酸序列编码功能性壳多糖酶, 而所述第二核苷酸序列编码功能性  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶; 和 (c) 选择其中表达了第一和第二核苷酸序列的转化过的植物。

18. 如权利要求 16 或 17 的方法, 其中, 所述病原体是真菌。

19. 如权利要求 18 的方法，其中，所述真菌是茄属丝核菌。

## 具有增强的对真菌疾病的抗性的遗传修饰过的植物及其生产方法

本申请享有并且要求被以全文形式收作本文参考的申请日为 2001 年 11 月 20 日的美国临时申请流水号 60/331, 749 的优先权。

### 1. 本发明领域

本发明涉及遗传修饰过的植物，更具体地讲，涉及遗传修饰过的马铃薯植物。在用包括具有两个或两个以上壳多糖-结合结构域的壳多糖酶基因和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因，特别是具有两个壳多糖结合结构域的芸蓼属壳多糖酶基因和三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的载体转化所述植物之后，所述遗传修饰过的植物具有增强的对病原体的抗性。本发明还涉及能转化马铃薯植物，以便赋予所述马铃薯植物对病原体的免疫力的重组载体。所述载体包括具有两个或两个以上壳多糖结合结构域的壳多糖酶基因；和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因。本发明还涉及通过表达壳多糖酶基因和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产生高病原体抗性植物的方法。

### 2. 本发明背景

植物在作为包括人类在内的动物的营养物质方面，以及用于生产可用作药品，化妆品等的物质方面起着重要作用。世界人口的稳定增长，导致了对植物作物的不断增长的需求。这种增长的需求，必须通过可供农业使用的减少了的土地资源来满足。通过能够更好地生长并且对植物病原体的抗性更强的工程生产的植物物种，可以用现有的土地资源，提供较高的作物产量。

植物受到多种病原体的威胁，例如，真菌，细菌，病毒，昆虫和线虫。一小部分病原体能成功地侵入植物组织，并因此导致疾病。具体地讲，马铃薯是高度易受真菌感染的主要粮食作物。应对真菌疾病的一种方法包括使用化学杀真菌剂。不过，杀真菌剂的使用会导致较高的成本和环境破坏。以前提高植物病原体抗性的方法，包括在易感线虫的马铃薯品系中表达马铃薯 Mi-1.2 抗线虫基因。所得到的转基因马铃薯植物在大部分转基因植物中表现出对根瘤线虫 *M. javanica* 株

VW4 和 *M. incognita* 株 VW6 的抗性，但是不抗 *M. javanica* 株 VW5，因此与 Mi 基因在野生型植物中的特异性类似 (Milligan 等, 1998, *The Plant Cell* 10:1307-1319)。

在另一项研究中，通过从能表达 Avr9，一种 Cf-9 诱导物的植物  
5 中的编码 Cf-9 抗性基因产物的转基因上的可转座元件，激活失活的编码 Cf-9 抗性基因产物的转基因而诱导植物抗性 (WO 95/31564)。另外，植物 Prf 抗性基因在马铃薯植物中的超量表达，导致了对 *P. s. pathovar tomato* 株 DC3000, *X. c. pv. vesicatoria* 株 56, *R. solanacearum* 株 82 细菌病原体和 TMV 病毒病原体的抗性的增强  
10 (Oldroyd 等, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10300-10305)。

在提高植物抗性的另一种尝试中，在马铃薯植物中表达葡萄糖氧化酶，以便产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，即在植物防御反应期间，通过葡萄糖氧化产生的一种试剂。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在转基因马铃薯植物中的增加，被证实增强了对 *E. carotovora* 亚种 *carotovora* 和 *P. infestans* 的抗性 (Wu 等, 1995,  
15 *The Plant Cell* 7:1357-1368)。生产出了能表达马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的转基因水稻植物，使得所述植物更抗大螟的粉红蛀心螟幼虫 (Duan 等, 1996, *Nature Biotechnology* 14:494-498)。另外，能表达豇豆胰蛋白酶抑制剂的转基因马铃薯植物对 *G. pallida* 的抗性增强了 (美国专利号 5, 494, 813)。在美国专利号 5, 866, 777 中披露了能破坏植物线虫病原体的采食结构的蛋白的表达，并且在美国专利号 5, 824, 861 中披露了裂解蛋白在苹果树植物中的表达。  
20

包括壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶在内的与发病相关的 (PR) 蛋白是由植物针对病原体感染的反应而产生的。壳多糖酶能水解壳多糖，它是真菌细胞壁的一种主要成分，而  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶能水解葡聚糖成分 (Boller 等, 1985, In: J.L. Key 等著, *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Alan R. Liss, New York, pp. 247-262; Boller, 1992, In: S. J. Gurr 等 (著), *Molecular Plant Pathology Volume II, A Practical Approach*, IRL press, Oxford, pp. 23-30)。Schlumbaum 等 (1986, *Nature* 324:365-367) 业已证实了纯化的植物  
25 壳多糖酶在体外具有抗真菌活性，并且具有一个壳多糖结合结构域的壳多糖酶在转基因植物中的表达，增强了它们对真菌病原体的抗性 (Broglie 等, 1991, *Science* 254:1194-1197; Lin 等, 1995,  
30

Bio/Technology 13: 686-691)。在抗病的欧洲油菜栽培变种中，通过 Phoma lingam 感染，诱导了具有一种壳多糖结合蛋白的壳多糖酶 ChB4 的 mRNA，并且通过 northern 印迹分析，在一天内就可以检测到 (Rasmussen 等, 1992, Plant Mol. Biol. 20: 277-287)。另外，在抑制真菌生长方面，壳多糖酶与  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶协同发挥作用 (Mauch 等, 1988, Plant Physiol. 88: 936-942; Zhu 等, 1994, Bio/Technology 12: 807-812; Jach 等, 1995, Plant J. 8: 97-109)。

仍然需要具有较高的对真菌的抗性的植物，如马铃薯植物。具体地讲，具有增强的对土壤真菌的抗性的马铃薯植物。

10 在本说明书的这一部分或任何部分中对参考文献的引用，不应当被理解成承认所述参考文献是本发明的现有技术。

### 3. 本发明概述

本发明基于本发明人的以下发现：在受到真菌感染时，诱导了编码具有双壳多糖结合结构域的壳多糖酶的 BjCH11 的转录和翻译。壳多糖酶和  $\beta$ -葡聚糖酶是作用于真菌细胞壁的一种主要糖类成分壳多糖和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖的水解酶。本发明试图提供植物对真菌的抗性，包括用与分解病原体相关的糖类成分，特别是真菌细胞壁相关的酶转化植物，如作物，特别是马铃薯植物。在一种具体实施方案中，本发明提供了具有增强的抗土壤真菌茄属丝核菌的抗性的转基因马铃薯植物，包括共同表达具有两个壳多糖结合结构域的芥菜 (*Brassica juncea*) 壳多糖酶和三叶橡胶属 (*Hevea*)  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶。

本发明提供了转基因植物，它具有包括可操作地与包括两个或两个以上壳多糖-结合结构域的壳多糖酶的编码序列结合的启动子和终止子的基因。在具体实施方案中，所述壳多糖酶分别包括两个，三个，四个或五个壳多糖结合结构域。包括含有编码壳多糖酶的核酸序列的基因的植物细胞以及其他植物部分也是本发明的一个方面，例如，含有本发明基因的转化植物的种子。

30 在一种具体实施方案中，本发明提供了转基因马铃薯植物，它具有包括可操作地与芥菜壳多糖酶的编码序列结合的启动子和终止子的基因。含有包括编码芥菜壳多糖酶的核酸序列的基因的马铃薯植物细胞以及其他植物部分也是本发明的一个方面，例如，含有本发明基因

的转化植物的种子。

在一种具体实施方案中，本发明还提供了转基因马铃薯植物，它具有包括可操作地与 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的编码序列结合的启动子和终止子的基因。含有包括编码 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的核酸序列的嵌合基因的马铃薯植物细胞以及其他植物部分也是本发明的一个方面，例如，含有本发明基因的转化植物的种子。

在一种具体实施方案中，本发明还提供了转基因马铃薯植物，它具有包括可操作地与三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的编码序列结合的启动子和终止子的基因。含有包括编码三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的核酸序列的嵌合基因的马铃薯植物细胞以及其他植物部分也是本发明的一个方面，例如，含有本发明基因的转化植物的种子。

在一种具体实施方案中，本发明还提供了包括壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的转基因植物。在一种具体实施方案中，所述壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶是由独立的载体编码的。在另一种具体实施方案中，所述壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶是由相同的载体编码的。在一种具体实施方案中，所述壳多糖酶具有两个或两个以上壳多糖结合结构域。在另一种具体实施方案中，所述壳多糖酶是BjCHI1，而 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶是HbGLU。

在一种具体实施方案中，本发明还提供了转基因植物，它具有包括可操作地与芥菜壳多糖酶的编码序列结合的第一启动子和终止子，可操作地与三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的编码序列结合的第二启动子和第二终止子的嵌合基因。在一种具体实施方案中，所述遗传修饰过的植物在通过重组DNA技术导入芥菜壳多糖酶三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的编码序列之后，具有增强的真菌抗性。在一种具体实施方案中，利用同时具有BjCHI1和HbGLU cDNAs的pBI121-衍生的植物转化质粒，通过农杆菌属介导的转化，转化马铃薯(*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree)。

在另一种实施方案中，除了壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的编码酶之外，可以将编码植物防御蛋白的其他基因序列导入所述植物。所述基因序列包括，但不局限于编码核糖体失活蛋白，外源凝集素(lectins)和凝集素(agglutinins)的基因。在一种具体实施方案中，可以使用丝氨酸蛋白抑制剂。在另一种具体实施方案中，可以使用SaPINIIa(Xu



Z. F. . 等, 2001, *Plant Molecular Biology* 47:727-738)。

在一种具体实施方案中, 本发明提供了包括嵌合基因的植物细胞。所述嵌合基因包括编码具有两个或两个以上壳多糖结合结构域的壳多糖酶的核酸序列和编码  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核酸序列。在一种具体  
5 实施方案中, 所述嵌合基因包括编码具有四个壳多糖结合结构域的壳多糖酶的核酸序列。在一种具体实施方案中, 所述植物细胞能抗昆虫或细菌或这两者。在一种具体实施方案中, 所述核酸序列编码芥菜壳多糖酶和三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶。

在一种具体实施方案中, 本发明还提供了一种增强植物对病原体的抗性的方法, 该方法包括以下步骤: 将编码包括两个或两个以上壳  
10 多糖结合结构域的壳多糖酶的核酸序列导入所述植物基因组, 并且再生具有改变了的基因组的植物。在一种具体实施方案中, 所述壳多糖酶是受合适的启动子和合适的终止子控制的芥菜壳多糖酶。

在一种具体实施方案中, 本发明还提供了一种增强植物对病原体的抗性的方法, 该方法包括以下步骤: 将编码受合适的启动子和合适的  
15 终止子控制的三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核酸序列导入所述植物基因组, 并且再生具有改变了的基因组的植物。在一种具体实施方案中, 所述葡聚糖酶是受合适的启动子和合适的终止子控制的三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶。

在一种具体实施方案中, 本发明还提供了一种增强植物对病原体的抗性的方法, 该方法包括以下步骤: 将编码受合适的启动子和合适的  
20 终止子控制的芥菜壳多糖酶和受合适的启动子和合适的终止子控制的三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核酸序列导入所述植物基因组, 并且再生具有改变了的基因组的植物。

25

#### 4. 附图说明

为了更好地理解和更方便地实施本发明, 下面将通过举例形式提供了以下附图, 其中:

图 1 表示芥菜 (*B. juncea*) BjCHI1 的核苷酸序列和 BjCHI1 的结  
30 构。A. BjCHI1 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1), 在核苷酸序列下面示出了推测的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)。在壳多糖结合结构域下面划线。用点划线在铰链区下面划线。在推测的聚腺苷酸化信号下面加双线。

N-末端信号肽和 C-末端液泡导向肽的推测的裂解位点标有(↓)。壳多糖-结合结构域是具有两个氨基酸差别的串联重复。BjCHI1 的 25 号位置上的氨基酸残基“S”和 30 号位置上的“E”在第一个壳多糖-结合结构域上，而 76 号位置上的氨基酸残基“R”和 81 号位置上的“A”在第二个结构域上。引物的位置(P1 至 P4)用方框圈出来；对于 P2 和 P4 来说，所述核苷酸相当于它们的互补序列。示出了 HindIII 限制位点。B. BjCHI1 的示意图。N-末端信号肽(黑色方框 SP)在两个壳多糖结合结构域(CBD1, 22-61 号氨基酸；CBD2, 73-112 号氨基酸)前面，这两个结构域是由一个间隔区(灰色方框 S)隔离的。CBD2 和壳多糖酶催化结构域(146-393 号氨基酸)是通过一个铰链区(加交叉斜线的方框 H)连接的。液泡导向序列用加斜线的方框 v 表示。

图 2 是 BjCHI1 与其他类型的植物壳多糖酶的比较。A. 烟草 Chia1(Shinshi 等, 1990, Plant Mol. Biol. 14:357-368)和 Chia2(Payne 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:98-102), 菜豆 Chia4(Margis-Pinheiro 等, 1991, Plant Mol. Biol. 17:243-253), 小苎麻 Chia5(Lerner 和 Raikhel, 1992, J. Biol. Chem. 267:11085-11091)和甜菜 Chia6(Berglund 等 1995, Plant Mol. Biol. 27:211-216)。加点的空位被用于优化比对。星号表示同一性的位置。信号肽和液泡导向序列的推测的裂解位点标有(↓)。在 BjCHI1 的壳多糖-结合结构域下面划线。BjCHI1 的铰链区下面加点划线。所述间隔区和铰链区中的 PPTP 重复标有箭头。用方框圈出了被用于产生多克隆抗体的合成肽(YKEEIDKSDPHC)，它相当于 BjCHI1 的 231-242 号氨基酸残基。用方框圈出了相当于 BjCHI1 的 268-272 号氨基酸残基的序列 NYNYG。在 Chia 类型中保守的 8 个氨基酸残基标有(◆)。在序列的末端示出了与 BjCHI1 的同一性(%), 在括号中示出了在壳多糖酶催化结构域内的比较。B. BjCHI1 的示意图, Chia1 和 UDA1 表示参与二硫键(通过条上方的连线表示)形成的半胱氨酸残基(C)的位置。黑色方框表示信号肽(SP); 灰色方框表示间隔区(S); 划交叉线的方框表示铰链区(H); 而加斜线的方框表示液泡导向序列(V)。

图 3 表示 BjCHI1, BjCHI2, 和 BjCHI3 的凝集活性分析结果。BjCHI2 和 BjCHI3 是 BjCHI1 的衍生物, 它们分别包括一个和没有壳多糖-结合结构域。凝集分析是按照 Does 等披露的方法, 用 HPLC-纯化的毕赤酵

母属表达的壳多糖酶进行的(1999, *Plant Physiol.* 120:421-431)。将来自毕赤酵母属表达培养物的不同数量的(0.12, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 16 或 24  $\mu\text{g}$ )的 FPLC-纯化的蛋白(BjCHI1, BjCHI2 和 BjCHI3)添加到微量滴定板上的每一个孔中的 30 微升胰蛋白酶处理过的兔红细胞  
5 中。加入 5 倍浓度的磷酸盐水, 使一个孔的最终体积为 60 微升。在对照孔中(即“con”; 每一排的最后一个孔), 用磷酸缓冲的盐溶液取代蛋白。

图 4 是芥菜基因组中 BjCHI1-相关基因的分析。A. Southern 印迹分析。用 EcoRI(泳道 1), HindII(泳道 2), HindIII(泳道 3)和  
10 XbaI(泳道 4)消化 DNA, 与  $^{32}\text{P}$ -标记过的 BjCHI1 cDNA 杂交, 在室温下用 0.1 x SSC, 0.1% SDS 洗涤。泳道 5-8 表示在 65 $^{\circ}\text{C}$  下洗涤的相同的印迹。B. 使用引物 P1 和 P2(泳道 1)或 P2 和 P3(泳道 2)的 PCR 产物, 在 2%琼脂糖凝胶中电泳, 用溴化乙锭染色。C. 在(b)中示出的琼脂糖凝胶与  $^{32}\text{P}$ -标记的 BjCHII cDNA 杂交的 Southern 印迹。

15 图 5 三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核苷酸序列。A. 三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核苷酸序列(SEQ ID NO: 3)。B. 三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的推测的氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。C. 三叶橡胶属(Hb) $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的推测的氨基酸序列与 *N. plumbaginifolia* (Np) gnl(De Loose 等, 1988, *Gene* 70:12-23),  
20 II 型(CII), III 型(CIII)和 IV 型(CIV) $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的氨基酸序列的比较。通过点表示相同的位点。三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶上的推测的 N-糖基化位点用星号标明。分别在三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的预测的 N-末端延伸部分和 C-末端延伸部分上面和下面划线。

图 6 表示基因组 Southern 分析。用 BamHI (B), EcoRI (E), HindII (H)  
25 和 XbaI (X) 消化三叶橡胶属基因组 DNA (20 $\mu\text{g}$ ), 通过凝胶电泳分离, 吸印到 Hybond N (Amersham) 膜上, 并且与  $^{32}\text{P}$ -标记的三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 探针杂交。

图 7 表示质粒 pBj17, pHEV43 和 pBj47 和 pBj48 的构建。质粒 pHEV43 是通过将完整长度 HbGLU cDNA 的 1.2 kb 的 SmaI-HindII 片  
30 段克隆到质粒 pBI121 的 SmaI 位点上, 位于 CaMV 35S 启动子下游而制备的。质粒 pBj17 是通过将完整长度的 BjCHI1 cDNA 的 1.3 kb SmaI 片段克隆到 pBI121 的 SmaI 位点上而制备的。在 pBj17 上, 由 CaMV 35S

启动子驱动 BjCHI1 cDNA 的表达。然后将来自 pHEV43 的平端处理的 2.04 kb 的 HindIII 片段克隆到 pBj17 的 SnaBI 位点上。由于这种平端片段可以以两种可能的方向插入, 获得了质粒 pBj47 和 pBj48, 它们各自包括位于单一质粒上的 HbGLU cDNA 和 BjCHI1 cDNA。在 pBj47 上, 壳多糖酶和葡聚糖酶 cDNAs 分别是沿相反的方向由 CaMV 35S 启动子转录的, 而在 pBj48 上, 这两种 DNAs 是沿相同方向转录的。RB, T-DNA 的右缘; LB, T-DNA 的左缘; nptII, 编码由 Nos 启动子转录的用于卡那霉素选择的新霉素磷酸转移酶的基因; 35S pro, CaMV 35S 启动子; GUS; 编码  $\beta$ -葡糖醛酸酶的无启动子基因; H, HindIII; E, EcoRI; S, SnaBI。在质粒 pBj47 和 pBj48 的图谱的 HbGLU cDNA 上方的箭头表示该 cDNA 从它的 5'-末端 (5') 至它的 3'-末端 (3') 的转录方向。附图不是按比例绘制的。

图 8 表示在芥菜受到茄属丝核菌感染之后诱导了 BjCHI1 的表达: (a) 使用  $^{32}\text{P}$ -标记过的总 RNA 的 BjCHI1 cDNA 进行的 Northern 印迹分析, 所述总 RNA 是从在茄属丝核菌感染的土壤中生长 0 天 (泳道 1), 1 天 (泳道 2), 2 天 (泳道 3), 3 天 (泳道 4), 4 天 (泳道 5), 5 天 (泳道 6), 6 天 (泳道 7), 7 天 (泳道 8), 8 天 (泳道 9) 和 9 天 (泳道 10) 之后收获的芥菜叶片中分离的。在下面示出了用  $^{32}\text{P}$ -标记的 18S rDNA 探针再次检测的相同的印迹。箭表示 1.3 kb BjCHI1 mRNA, 而箭头表示 18S rRNA; (b) 使用抗-BjCHI1 抗体的 Western 印迹分析。总蛋白是从在茄属丝核菌感染的土壤中生长 0 天 (泳道 1), 1 天 (泳道 2), 2 天 (泳道 3), 3 天 (泳道 4), 4 天 (泳道 5), 5 天 (泳道 6), 6 天 (泳道 7), 7 天 (泳道 8), 8 天 (泳道 9) 和 9 天 (泳道 10) 之后收获的芥菜叶片中分离的。用箭头标出了交叉反应性 37 kDa BjCHI1 的带。位于该带上方的弱的带很可能是前体蛋白; (c) 与 (b) 加样相同的考马斯染色的蛋白凝胶, 以表明在每一个孔中加载了相同数量的蛋白。

图 9 表示  $R_0$  转基因马铃薯植物的 Northern 印迹分析: A. 用  $^{32}\text{P}$ -标记的 HbGLU cDNA 探针检测到的 1.2 kb 杂交 HbGLU mRNA (用箭头表示) 在未转化过的马铃薯 (泳道 1) 和转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 2), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 4) 和 pHEV-P<sub>14</sub> (泳道 5) 中的表达; B. 用  $^{32}\text{P}$ -标记的 BjCHI1 cDNA 探针检测到的 1.3 kb BjCHI1 杂交 mRNA (用箭头表示) 在未转化过的马铃薯 (泳道 1) 和转基因马铃薯品

系 pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 2), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 4), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 5) 和 pBj17-P<sub>6</sub> (泳道 6) 中的表达。

图 10 表示 R<sub>0</sub> 转基因马铃薯植物的 Southern 印迹分析: A. 用 <sup>32</sup>P-标记的 HbGLU cDNA 探针和来自未转化过的马铃薯 (泳道 1), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 2), 和转基因马铃薯品系 pHEV43-P<sub>14</sub> (泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 4), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 5), 和 pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 6) 的 EcoRI 消化过的 DNA。箭头表示 1.2 kb 的 EcoRI 杂交带; B. 用 <sup>32</sup>P-标记的 BjCHI1 cDNA 探针和来自未转化过的马铃薯 (泳道 1), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 2) 和转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 3), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 4), pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 5) 和 pBj17-P<sub>6</sub> (泳道 6) 的 HindIII 消化过的 DNA。箭头表示 0.9 kb 的 HindIII 杂交带; C. 用 <sup>32</sup>P-标记的 BjCHI1 cDNA 探针和来自未转化过的马铃薯 (泳道 1), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 2) 和转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 3), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 4) 和 pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 5) 的 EcoRI 消化过的 DNA。

图 11 表示 R<sub>0</sub> 转基因马铃薯植物的 Western 印迹分析: A. 使用抗 HbGLU 抗体对来自转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 1), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 2), pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 3), pHEV43-P<sub>14</sub> (泳道 4), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 5) 和未转化过的马铃薯 (泳道 6) 粗制蛋白进行的 Western 印迹分析。用一个箭头标明相当于 HbGLU 的带 (35 kDa)。使用抗-BjCHI1 抗体对来自转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub> (泳道 1), pBj47-P<sub>8</sub> (泳道 2), pBj47-P<sub>10</sub> (泳道 3), pHEV43-P<sub>14</sub> (泳道 4), pBI121 转化过的马铃薯 (泳道 5), 未转化过的马铃薯 (泳道 6) 和转基因马铃薯品系 pBj17-P<sub>6</sub> (泳道 7) 的粗制蛋白进行的 Western 印迹分析。用箭头标明相当于 BjCHI1 的带 (52 kDa)。

图 12 表示对转基因马铃薯品系进行的葡聚糖酶和壳多糖酶分析: A. 使来自 pBI121-转化体和用 pBj47 转化的转基因 R<sub>0</sub> 品系的粗制蛋白, 以 500 nm 波长下的光密度测量的葡聚糖酶分析; B. 使用 pBI121-转化体和用 pBj47 转化的转基因 R<sub>0</sub> 品系的粗制蛋白, 以 550 nm 波长下的光密度测量的壳多糖酶分析。误差线条表示 3 次独立实验的标准差。

图 13 表示使用 *T. viride* 进行的体外菌丝抑制分析: A. 将每一种马铃薯品系的 50 μg 蛋白提取物添加到孔中 16 小时之后真菌的生长情

况。1号孔：共表达 BjCHI1 和 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub>；  
2号孔：仅有缓冲液的对照；3号孔：野生型马铃薯 Desiree；4号孔：  
马铃薯 pBI121 转化体；5号孔：能表达 BjCHI1 的转基因马铃薯品系  
pBj17-P<sub>6</sub>；6号孔：能表达 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pHEV43-P<sub>14</sub>；B.  
5 在添加 50 μg 蛋白提取物 24 小时之后，图 13A 中所示平板的真菌生长  
情况。位于左下方的条表示 0.9 cm。

图 14 表示使用茄属丝核菌进行的体内真菌生物测定。将马铃薯植  
物移栽到预先接种了茄属丝核菌的土壤中。在移栽 2 周之后，检查所  
述植物，并且照相：A. 共表达 BjCHI1 和 HbGLU 的转基因马铃薯品系  
10 pBj47-P<sub>10</sub>；B. 能表达 BjCHI1 的转基因马铃薯品系 pBj17-P<sub>6</sub>；C. 能表  
达 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pHEV43-P<sub>14</sub>；和 D. 未转化过的马铃薯。

## 5. 本发明的详细说明

病原体抗性是植物的一个重要特征，并且是植物保护，特别是农  
作物保护的有用工具。本文所使用的术语“植物”包括完整的植株，  
15 植物部分，单个植物细胞，植物细胞团（例如，培养的植物细胞）及其  
后代。在本文中，当术语“增强”被用于表示植物对病原体的抗性提  
高时，包括提高对病原体可能没有抗性，或具有某些抗性或显著抗性  
的植物的抗性，以便实现所述抗性的提高。

20 植物病原体包括，但不局限于细菌，病毒，真菌，线虫和昆虫。  
病原体可以感染植物，并且导致对所述植物的严重损伤，包括死亡。  
在感染时，植物可能启动对所述病原体的保护性反应，例如过敏反应，  
这取决于所述植物是否能识别所述病原体。

各种类型的病原体可能改变，例如，通过诱变改变。另外，可能  
25 产生植物物种以前没有遇到过的新的病原体。例如，当一种植物（例  
如，作物，果树，蔬菜等）被引入一个国家（例如，通过进口）时，植物  
物种有可能接触它以前没有遇到过的病原体。

### 5.1 编码芥菜壳多糖酶和三叶橡胶属 β-1, 3-葡聚糖酶基因的多 核苷酸的克隆

30 5.1.1. 编码具有两个壳多糖酶结合结构域的芥菜壳多糖酶的  
cDNA 的分离

在使用通过 PCR 制备的 <sup>32</sup>P-标记过的拟南芥属碱性壳多糖酶探针

(Samac 等, 1990, *Plant Physiol* 93: 907-914) 筛选扩增的芥菜 cDNA 文库中的壳多糖酶克隆时, 获得了 5 个推测的阳性克隆。核苷酸序列分析表明, 3 个克隆具有 1.3 kb 的 cDNA, 它被命名为 BjCHI1, 而其他 2 个是不完整长度的 cDNAs。BjCHI1 cDNA 由 3 bp 的 5'-非翻译区, 1200 bp 的翻译区, 86 bp 的 3'-非翻译区和 poly(A)+尾组成(图 1a)。具有 400 个氨基酸的开放读框, 编码与植物 Chia1 壳多糖酶具有同源性的推测的  $M_r$  42, 774 (等电点 4.7) 的蛋白。有趣的是, 该 cDNA 包括两个 120 bp 的重复(67-186 号核苷酸和 220-339 号核苷酸, 图 1a), 它们编码通过 11 个氨基酸的间隔区连接的两个壳多糖-结合结构域; 它们存在七个核苷酸的差别, 导致了两个氨基酸的改变。具有 33 个氨基酸的铰链区, 将第二个壳多糖-结合结构域连接在所述壳多糖酶催化结构域上(图 1b)。所有其他以前表征过的壳多糖酶仅包括一个壳多糖-结合结构域。所述壳多糖-结合结构域是壳多糖结合所必需的(Iseli 等, 1993, *Plant Physiol.* 103: 221-226), 并且细胞凝集需要至少两个这样的结构域(Peumans 等, 1995, *Plant Physiol.* 109: 347-352)。壳多糖-结合结构域的存在并不局限于壳多糖酶。该结构域还存在于植物凝集素中, 例如, 橡胶蛋白(hevein)——来自橡胶乳液中的 4.7 kDa 的蛋白(Van Parijs 等, 1991, *Planta* 183: 258-264) 具有一个壳多糖-结合结构域。BjCHI1 是具有两个壳多糖-结合结构域的特殊壳多糖酶, 并且, 本发明利用毕赤酵母属表达的 BjCHI1 证实了这两个壳多糖-结合结构域赋予了凝集特性(参见下文的 5.1.2 节)。以前没有报导过具有凝集特性的壳多糖酶。

### 5.1.2. BjCHI1 与其他壳多糖酶的比较

图 2A 表示 BjCHI1 与不同类型的壳多糖酶的代表性的比对: 来自烟草的 Chia1(Shinshi 等, 1990, *Plant Mol Biol* 14: 357-368), 来自烟草的 Chia2(Payne 等, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 98-102), 来自 *P. vulgaris* 的 Chia4(Margis-Pinheiro 等, 1991, *Plant Mol Biol* 17: 243-253), 来自小苎麻的 Chia5(Lerner 等, 1992, *J Biol Chem* 267: 11085-11091) 和来自 *B. vulgaris* 的 Chia6(Berglund 等, 1995, *Plant Mol Biol* 27: 211-216)。Chia1 和 Chia2 壳多糖酶的代表是来自烟草的与 BjCHI1 具有最高同一性的壳多糖酶。对 86 种植物壳多糖酶进行的分析, 业已证实了在 Chia 类型

中有 8 个氨基酸是保守的 (Levorson 等, 1997, *Plant Mol Biol Repr* 15:122-133)。其中的 7 个氨基酸在 BjCHI1 中是保守的 (E-201, A-203, T-213, C-230, N-270, P-286 和 G-377, 图 2A)。在 BjCHI1 中第 8 个残基 (Q) 被 M-264 所取代 (图 2A)。尽管 BjCHI1 与烟草 Chia1 (62.0%) 和 Chia2 (54.8%) 具有高的同一性, 但是它具有两个壳多糖-结合结构域, 而 Chia1 具有一个壳多糖-结合结构域, 而 Chia2 没有这种结构域。

在与来自其他植物的 Chia1 壳多糖酶进行比较时, BjCHI1 与欧洲油菜具有 72.7% 的同一性 (Hamel 等, 1993, *Plant Physiol* 101:1403), 与拟南芥具有 70.2% 的同一性 (Samac 等, 1990, *Plant Physiol* 93:907-914), 与 *P. vulgaris* 具有 60.9% 的同一性 (Broglie 等, 1986, *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6820-6824), 而与水稻具有 51.8% 的同一性 (Zhu 等, 1994, *BioTechnology* 12:807-812)。BjCHI1 还包括在 Chia1 壳多糖酶中高度保守的序列“NYNYG” (268-272 号氨基酸, 图 2) (Verburg 等, 1992, *J Biol Chem* 267:3886-3893)。对玉米壳多糖酶的催化位点进行的研究业已证实了该序列“NYNYG”上的第一个 Y 被 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺修饰过, 导致了活性的丧失 (Verburg 等, 1992)。

两个壳多糖-结合结构域的存在可以识别具有 Chia5 的 BjCHI1, 其中只有一种例子, 好小荨麻 UDA1 凝集素是已知的 (Levorson 等, 1997)。UDA1 是小荨麻 (*U. dioica*) 凝集素的具有 372 个氨基酸的前体 (Lerner 和 Raikhel, 1992, *J Biol Chem* 267:11085-11091), 并且表现出昆虫抗营养活性 (Chrispeels 等, 1991, *Plant Cell* 3:1-9)。该前体由一个信号肽, 两个壳多糖-结合结构域和一个壳多糖酶催化结构域组成。8.5kD 的成熟的凝集素仅由 86 个氨基酸组成, 具有两个壳多糖-结合结构域, 因为所述壳多糖酶结构域通过翻译后裂解被切除了 (Lerner 和 Raikhel, 1992)。尽管 BjCHI1 和 UDA1 具有结构相似性, 但是它们仅具有 36.9% 的同一性 (图 2A)。按照 Beintema (Beintema, 1994, *FEBS Letters* 350:159-163) 的方法比较壳多糖酶中的二硫键, 发现了 BjCHI1, Chia1 和 UDA1 之间的相似性 (图 2B); Chia1 的 C-末端二硫键在 UDA1 中不存在, 但存在于 BjCHI1 中。与 UDA1 不同, BjCHI1 的铰链区和间隔区是富含脯氨酸的, 分别具有 63.6% 和 54.5% 的脯氨酸



残基。Chia6 壳多糖酶的唯一成员 (Levorson 等, 1997) *B. vulgaris* Ch1, 包括一个具有 128 个残基的铰链结构域, 其中, 70.3%的残基是脯氨酸 (Berglund 等, 1995, *Plant Mol Biol* 27:211-216)。BjCHI1 和 Ch1 都含有“PPTP”重复 (图 2A)。相反, Ch1 仅具有 1/2 个壳多糖-结合结构域, 并且在它们之间仅存在 45.2%的同一性。

两个壳多糖-结合结构域在 BjCHI1 中的存在, 促使本发明人探索 BjCHI1 具有凝集特性的可能性。因此, 按照 Does 等的方法 (1999, *Plant Physiol.* 120:421-431) 用 FPLC-纯化的毕赤酵母属表达的 BjCHI1 进行了凝集分析。作为对照, 分别采用了含有一个和不含壳多糖-结合结构域的 BjCHI2 和 BjCHI3。简单地讲, 利用酵母表达载体 pPIC9K (Invitrogen) 在巴斯德毕赤酵母中表达 BjCHI1, BjCHI2 和 BjCHI3。将 BjCHI1, BjCHI2 和 BjCHI3 框内克隆到 pPIC9K 上的分泌信号肽上, 以便所述融合蛋白能够分泌到生长培养基中。BjCHI1 包括存在于天然蛋白的 18-393 号氨基酸残基上的两个壳多糖-结合结构域 (Zhao 和 Chye, 1999, *Plant Mol. Biol.* 40:1009-1018), 它与 pPIC9K 上的分泌信号肽融合; BjCHI2 仅包括一个壳多糖-结合结构域, 而 BjCHI3 缺乏这两个壳多糖-结合结构域。将 BjCHI1, BjCHI2 和 BjCHI3 DNAs 克隆到载体 pPIC9K 的 EcoRI 和 NotI 位点上。为此, 将以下引物用于 PCR 中: C1 (正向) 引物 5' CTGAATTCTCCTCC GGTGAGCAATGCG 3' (SEQ ID NO: 5); C21 (正向) 引物 5' CTGAATTCGGGATCTTTCTGGCATC 3' (SEQ ID NO: 6) ; 和 C2 (反向) 引物 5' GCGACTGCGCCGCGTTACTACCTTCATTAACG 3' (SEQ ID NO: 7)。将正向引物设计成具有一个 EcoRI 位点, 而将反向引物设计成具有一个 NotI 位点。通过 PCR 扩增编码 BjCHI1 的 1.1 kb 的 DNA, 在 PCR 中使用 C1 和 C2 引物, 并且用 pBj17 作模板。通过 PCR 扩增编码 BjCHI2 的 0.95 kb 的 DNA 片段 (具有一个壳多糖-结合结构域), 使用 C1 和 C2 引物, 并且用 pBj28 作模板。Fung 等以前业已披露了质粒 pBj28 (2002, *Plant Molecular Biology* 50:283-294)。通过 PCR 获得编码 BjCHI3 (缺乏两个壳多糖-结合结构域) 的 0.74 kb 的 DNA, 使用 C21 和 C2 引物, 并且用 pBj17 作模板。用 EcoRI 和 NotI 消化 PCR 扩增的片段, 并且克隆到 pPIC9K 的 EcoRI 和 NotI 位点上。在用于酵母转化之前, 通过 DNA 序列分析, 分析 pPIC9K 上的插入片段。毕赤酵母属表达的蛋白被分泌

到生长培养基中，并且按照 Invitrogen 提供的说明，用 65% 的硫酸铵沉淀。然后通过 FPLC 纯化粗制提取物，并且使用抗 BjCHI1 的抗体通过 Western 印迹分析检查 HPLC-纯化的蛋白，然后用于凝集分析。由于用于制备抗 BjCHI1 的多克隆抗体的肽保留在 BjCHI2 和 BjCHI3 肽内，所述 BjCHI1 衍生物能够与所述抗体发生交叉反应。

在凝集分析中，将来自毕赤酵母属表达培养物的不同用量的 (0.12, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 16 或 24  $\mu\text{g}$ ) 的 FPLC-纯化的蛋白 (BjCHI1, BjCHI2 和 BjCHI3) 添加到微量滴定板上的每一个孔中的 30  $\mu\text{l}$  胰蛋白酶处理过的兔红细胞中 (参见图 3)。将五倍浓度的磷酸盐水添加到每一个孔中，使最终体积为 60  $\mu\text{l}$ 。在对照孔中，用磷酸缓冲的盐溶液取代了所述蛋白。

所述结果表明 BjCHI1 的凝集特性与包括至少两个壳多糖-结合结构域的杀昆虫蛋白，包括小麦胚乳凝集素，小荨麻凝集素和来自番茄，水稻和曼佗罗属的凝集素的特性相似 (Chrispeels 等, 1991, 同上)。由于业已证实了具有两个或两个以上壳多糖-结合结构域的植物凝集素，能够通过结合细菌和真菌表面上的以及食草性昆虫的外骨骼和肠腔上的糖缀合物而凝集细胞 (Peumans 等, 1995, 同上)，BjCHI1 的抗微生物和抗昆虫作用提供了作进一步研究的前景和理由。

### 5.1.3. 芥菜中的 BjCHI1 的基因组结构

利用 Southern 印迹分析，研究芥菜中与 BjCHI1-相关的基因的存在。用 EcoRI, HindII, HindIII 和 XbaI 消化过的基因组 DNA 与 BjCHI1 cDNA 杂交。只有 HindIII 能在所述 cDNA 的内部进行裂解 (图 1A)。检查 6-9 个杂交带 (图 4A, 泳道 1-4)，发现了存在于 *B. nigra* 和芸薹的杂交种——异源四倍体芥菜中的相关基因；这些带可能是由于编码壳多糖酶或具有壳多糖-结合结构域的蛋白的基因产生的。在 65°C 下进一步洗涤所述印迹，发现了较少的带；泳道 6-8 中的带 (图 4A) 可能是 BjCHI1-特异性的。为了研究具有一个壳多糖-结合结构域的壳多糖酶的存在，利用策略定位的引物进行 PCR 分析。引物 P1 靠近编码第一个壳多糖-结合结构域的区域，而 P2 位于编码表现出与其他壳多糖酶的同源性的壳多糖酶结构域的区域 (图 1A, 图 2)。如果在它们之间不存在内含子的话，用这些引物对 BjCHI1 进行 PCR 扩增，能得到 0.5 kb 的产物；拟南芥属壳多糖酶基因的 第一个内含子 (Samac 等, 1990) 位

于 P2 后面的相应区。在琼脂糖凝胶电泳上的预期的 0.5 kb 的产物(图 4B)能与 Southern 印迹分析上的 BjCHI1 cDNA 杂交,同时能与一个较弱的 0.35 kb 的带杂交(图 4C)。这种较小的带,暗示了具有一个壳多糖-结合结构域的相关壳多糖酶的存在,并且由于所述引物对 BjCHI1 5 的特异性而显得较弱。相反,用引物 P2 和 P3 对 BjCHI1 进行 PCR 扩增,发现了一条 0.35kb 的带(图 4B 和 C,泳道 2)。位于编码间隔区的区域内的 P3(图 1A)是 BjCHI1-特异性的,并且被认为适合测定在 RT-PCR 中表达的 BjCHI1-特异性 mRNA。

#### 5.1.4. 三叶橡胶属 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的分离

10 将编码  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的 *N. plumbaginifolia* cDNA, gnl cDNA (De Loose 等, 1988, Gene 70:12-23) 用作异源杂交的探针,从三叶橡胶属中分离相应的 cDNA 克隆。通过在 42°C 下,在含有 30% 的甲酰胺的溶液中进行原位噬斑杂交,筛选用三叶橡胶属乳液制备的 cDNA 文库。分离了编码  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的若干推测的三叶橡胶属 cDNA 克隆。对 1.2 和 1.1kb 的两个最长的克隆进行的核苷酸序列分析,证实了它们属于相同的类型。完整长度的 1.2kb 的 cDNA 由一个 40bp 的 5'-非翻译区,一个 1125 bp 的编码区,一个 76 bp 3'-非翻译区,和一个 poly(A) 尾组成。所述编码区编码一种具有 374 个氨基酸的碱性蛋白,推测的  $M_r$  为 41,305。

20 三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核苷酸序列与 *N. plumbaginifolia* gnl cDNA 的核苷酸序列具有 68% 的核苷酸序列同一性。比较三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的推测的氨基酸序列和由 gnl 编码的 I 型  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的氨基酸序列,发现了 66% 的氨基酸同源性(图 5C)。三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶与 II 型(烟草 PR-N (Linthorst 25 等, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87:8756-8760)), III 型(烟草 ec321391 (Payne 等, 1990, Plant Mol Biol 15:797-808)) 和 IV 型(烟草 sp41a (Ori 等, EMBO J, 1990, 9:3429-3436))  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶分别具有 54%, 60% 和 51% 的氨基酸同一性(图 5C)。

#### 5.1.5 三叶橡胶属 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶

30 I 型  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶是作为蛋白前体合成的,并且在蛋白转运到液泡期间或之后裂解它的 N-末端延伸部分和 C-末端延伸部分 (Shinshi 等, 1988, Proc Natl Acad Sci USA 85:5541-5545)。N-

末端延伸部分(1-36号氨基酸残基)和C-末端延伸部分(353-374号氨基酸残基)在三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的推测的氨基酸序列上的存在进一步表明,它属于I型 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(图5C)。三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的N-末端延伸部分,包括富含丝氨酸和苏氨酸残基的区(4-19号氨基酸残基),随后是一个疏水区(22-29号氨基酸残基)(图5C)。尽管在三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的N-末端和gn1-编码的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶之间不存在显著的氨基酸序列同源性,但是它们都包括信号肽所特有的疏水区(Von Heijne等,1985,J. Mol. Biol. 184:99-105),并且被认为与蛋白向液泡中的导向相关。有趣的是,业已被证实负责将所述蛋白导向液泡的大麦aleurain的前肽的N-末端序列同样富含丝氨酸残基(Holwerda等,1992,Plant Cell 4:307-318)。比较三叶橡胶属的C-末端延伸部分和*N. plumbaginifolia*的C-末端延伸部分发现了在氨基酸序列和推测的N-糖基化位点上(三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶中的364号氨基酸)上存在某些保守性。C-末端延伸部分,特别是三叶橡胶属中的365-370号氨基酸残基富含疏水性氨基酸。业已表明,是疏水性/酸性基序结构,而不是特殊的氨基酸序列形成了羧基延伸前肽的分选信号(Nakamura等,1993,Plant Physiol 101:1-5)。业已证实了 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的I型同I型的C-末端延伸部分和N-聚糖在加工期间被去掉(Shinshi等,1988)。

#### 20 5.1.6. 三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的基因组组构

将本发明人分离的乳汁器特异性cDNA用于基因组Southern印迹分析,以便研究三叶橡胶属中 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因家族的存在。按照Dellaporta等,1983,Plant Mol Biol Rep 1:19-21的方法,从小叶片中获得基因组DNA。用BamHI, EcoRI, HindII和XbaI限制总基因组DNA,电泳并且印迹。用1.2kb的三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶探针进行的Southern印迹分析,发现了每一种消化产物具有2-4条杂交带(图6)。以上结果表明,在三叶橡胶属中存在 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的低拷贝基因家族。

可以利用本领域已知的技术分离并且表征其他壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。可以克隆芥菜壳多糖酶和三叶橡胶属 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶蛋白或核酸所特有的cDNA或基因组DNA,并且用多种方法进行测序,例如双脱氧链终止测序方法,例如,参见Sambrook等,同上。

可用于本发明中的多核苷酸包括具有本发明提供的 DNA 序列的多核苷酸，并且还包含编码能在高严格条件下与本文所提供的 DNA 序列的互补体杂交的连续的和功能性壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶编码开放读框(ORF)的任何核苷酸序列。例如，而不是限定，高严格杂交条件  
5 可以定义如下：滤膜结合的 DNA 在含有 50%去离子化甲酰胺，6xSSC，5x Denhardt's，1% SDS，100  $\mu$ g/ml 变性鲑鱼精子 DNA 的溶液中，在 42 $^{\circ}$ C 下杂交过夜(大约 4-16 小时)，并且在 65 $^{\circ}$ C 下用 0.1xSSC, 0.1% SDS 洗涤(Ausubel F.M. 等著，1989，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John  
10 Wiley & Sons, Inc., New York)，并且编码一种功能等同的基因产物。

对于寡核苷酸探针来说，例如，而不是限定，高严格条件可以表示，例如，在 6XSSC/0.05%焦磷酸钠中，在 37 $^{\circ}$ C (用于 14-碱基的寡聚体)，48 $^{\circ}$ C (用于 17-碱基的寡聚体)，55 $^{\circ}$ C (用于 20-碱基的寡聚体)，  
15 和 60 $^{\circ}$ C (用于 23-碱基的寡聚体)下洗涤。

可用于本发明中其他相关的多核苷酸，包括能够在中等严格条件下与编码壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的 DNA 序列的互补体杂交的任何核苷酸序列。例如，而不是限定，所述中等严格条件可以包括，例如，在 0.2XSSC/0.1% SDS 中，在 42 $^{\circ}$ C 下洗涤(Ausubel 等，1989，  
20 同上)。

可用于本发明中的其他考虑的多核苷酸包括能够在低严格条件下与编码壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的 DNA 序列杂交的任何核苷酸序列。例如，而不是限定，使用所述低严格条件性条件的方法披露于以下文献中：Shilo 和 Weinberg，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
25 78: 6789-6792。

另外，还可以将壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的变体用于本发明中。与野生型酶相比，变体可以包括所述酶的氨基酸序列上的一个或多个变化，例如，通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸所产生的变化。任何改变都不应当破坏所述酶发挥其功能的能力。不过，它可能根据所述改变的性质，增强或减弱这种能力。所述氨基酸改变优选是保守性的。  
30

在各种实施方案中，所述壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶，片段，变

体, 类似物, 或衍生物可以作为融合体或嵌合蛋白产物表达(包括酶, 片段, 类似物, 或通过肽键与异源(不同蛋白的)蛋白序列连接的衍生物)。所述嵌合基因产物可以通过本领域已知方法, 以正确的编码读框将编码需要的氨基酸序列的合适的核酸序列彼此连接, 并且通过本领域公知的方法表达所述嵌合产物而制备的。另外, 所述嵌合产物可以通过蛋白合成技术制备, 例如, 通过使用肽合成仪而制备。所述融合蛋白中的所述酶的片段, 类似物和衍生物优选保留了发挥所述酶的功能的能力。

可以通过筛选 cDNA 或基因组 DNA 文库, 克隆对植物壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶特异的 cDNA 或基因组 DNA。例如, 所述文库可以用来自所述植物的 mRNA 或基因组 DNA 制备。有关分子生物学技术的一般背景以及如何制备 cDNA 文库或基因组文库, 可以参见, 例如, Ausubel F.M. 等, 同上; Sambrook 等, 1989, 同上; 和美国专利号 5, 650, 148。

所述文库可以用对芥菜壳多糖酶和三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的一部分特异的核苷酸片段筛选。例如, 可以用本领域技术人员所熟知的技术确定壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的蛋白序列, 如通过 Edman 降解技术(例如, 参见 Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W.H. Freeman & Co., New York, pp. 34-49)。所获得的氨基酸序列可以被用作制备可用于筛选编码壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的 cDNA 序列的 cDNA 文库的寡核苷酸混合物的指导。

或者, 举例来说, 可以确定对壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶特异的两段蛋白序列。制备了对每一段特异的一套简并寡核苷酸, 并且将所述寡核苷酸用于聚合酶链式反应("PCR")扩增。寡核苷酸的长度至少为大约 6 个核苷酸, 更优选至少大约 10 个, 更优选至少大约 15 个, 更优选至少大约 20 个, 更优选至少大约 30 个, 更优选至少大约 40 个核苷酸。例如, 所述 PCR 反应中的模板, 可以是已知含有或推测含有对感兴趣的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶特异的 DNA 多核苷酸的 cDNA 或基因组 DNA 混合物。可以用多种方法获得 cDNA 模板, 例如, 从 cDNA 文库中分离不同类型 cDNA 的混合物, 或者例如, 逆转录来自已知(或推测)能表达壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的细胞或生物的总 mRNA。例

如, 有关 PCR 的背景可以参见 Ausubel, 同上, 和 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis, M. 等著, Academic Press, Inc., New York.

5 为了克隆来自任何物种的完整长度的 cDNA 或基因组 DNA 序列, 或克隆壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的变体或异源形式, 可以用相当于本文所披露的任何多核苷酸的核酸片段制备或用本发明的方法制备的标记过的 DNA 探针筛选 cDNA 文库或基因组 DNA 文库(例如, 噬菌体文库), 正如在以下文献中所披露的: 例如 Ausubel F.M. 等, 同上; Sambrook 等, 1989, 同上。

## 10 5.2 抗体的生产

为了生产抗体, 可以通过注射壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶(例如, 相当于壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的功能结构域), 截短的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶多肽(业已去掉了其中的一个或多个结构域的壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶), 壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的功能性等  
15 同物, 壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的突变体, 或壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的短肽(或片段), 对各种宿主动物进行免疫。所述宿主动物可以包括, 但不局限于兔、小鼠、山羊、和大鼠等等。根据宿主的物种, 可以用各种佐剂增强免疫学反应, 所述佐剂包括, 但不局限于弗氏(完全和不完全)佐剂, 矿物凝胶, 如氢氧化铝, 表面活性物质, 如  
20 溶血卵磷脂, 多元醇, 聚阴离子, 肽, 油类乳化液, 匙孔血蓝蛋白, 二硝基苯酚, 以及潜在有用的人类佐剂, 如 BCG(bacille Calmette-Guerin)和小棒杆菌。多克隆抗体, 是来自所述免疫动物血清的抗体分子的异源群体。

可用于本发明的抗体包括单克隆抗体(例如, 参见 Kohler 等,  
25 1975, Nature 256:495-497; 和美国专利号 4, 376, 110), 嵌合抗体(例如, 参见 Morrison 等, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger 等, 1984, Nature, 312:604-608; Takeda 等, 1985, Nature, 314:452-454), 单链抗体(例如, 参见美国专利 4, 946, 778; Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston 等, 1988,  
30 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 和 Ward 等, 1989, Nature 341:544-546), 抗体片段(例如, 参见 Huse 等, 1989, Science, 246:1275-1281), 抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的 Fab 片段(例

如, 参见 Greenspan & Bona, 1993, FASEB J 7(5):437-444; 和 Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438)。

### 5.3 利用重组 DNA 技术表达壳多糖酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶

壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶, 它们的片段或它们的融合蛋白有利地是采用本领域众所周知的技术, 通过重组 DNA 技术生产的。可以利用所述方法构建含有壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的核苷酸和合适的转录和翻译控制信号的嵌合基因或表达载体。例如, 所述方法包括体外重组 DNA 技术, 合成技术, 和体内遗传重组。例如, 参见披露于以下文献中的技术: Sambrook 等, 1989, 同上, 和 Ausubel 等, 1989, 10 同上。在本文中, 术语嵌合基因表示所述嵌合基因的每一部分的核酸序列的组合, 业已通过重组 DNA 技术将所述序列功能改造成相关的, 所述序列还处于对于要导入所述嵌合基因的植物来说的内源或外源独立部分。

另外, 举例来说, 可以利用合成仪化学合成相当于由壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶核苷酸序列编码的转录物的全部或一部分的 RNA。例如, 参见披露于以下文献中的技术: "Oligonucleotide Synthesis", 15 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford, 该文献以它的全文形式被收作本文参考。

生物技术领域已知的宿主表达载体系统都可用于表达壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶核苷酸序列, 包括, 但不局限于在细菌, 酵母, 昆虫细胞, 哺乳动物细胞, 真核细胞和植物细胞中表达。在所述表达系统中, 可以使用任何筛选系统。所述筛选系统可以包括在选择培养基上生长(例如抗生素, 基本培养基等), 或使用一种指示剂(例如染料, 荧光试剂等)。

25 在使用植物表达载体时, 壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶编码序列的表达, 可以通过多种调控元件中的任意一种驱动。例如, 可以使用病毒启动子, 如 CaMV 的 35S RNA 和 19S RNA 启动子(Brisson 等, 1984, Nature 310:511-514), 或 TMV 的外被蛋白启动子(Takamatsu 等, 1987, EMBO J. 6:307-311); 另外, 可以使用植物启动子, 如 RUBISCO 的小亚基(Coruzzi 等, 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie 等, 1984, Science 224:838-843); 或热激启动子, 例如, 大豆 hsp17.5-E 30 或 hsp17.3-B(Gurley 等, 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565)。



可以通过使用 Ti 质粒, Ri 质粒, 植物病毒载体, 定向 DNA 转化, biolistics/粒子轰击, 显微注射, 电穿孔等将所述构建体导入植物细胞。有关所述技术的综述可以参见, 例如, Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, New York, Section VIII, pp. 421-463; 和 Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9。在本文中, 调控元件包括, 但不局限于诱导型和非诱导型启动子, 增强子, 操纵子和本领域技术人员已知的能驱动并且调控表达的其他元件。

10 所述启动子优选能够指导在植物的特定组织和/或植物发育的特定阶段的表达。所述启动子对所述植物来说可以是异源的或同源的。所述启动子优选指导在植物种子的胚乳或植物的根或块茎中的表达。优选的启动子是小麦的高分子量麦谷蛋白(HMWG)启动子。其他合适的启动子为本领域技术人员所熟知, 如麦醇溶蛋白, 分支酶, ADPG 焦磷酸化酶, 淀粉合成酶和肌动蛋白的启动子。

#### 5.4 表达壳多糖酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的转基因植物

可以通过用包括编码植物壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶蛋白或多肽的序列的基因构建体转化植物细胞, 工程生产具有能表达植物壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶多肽的转基因植物。在一种实施方案中, 植物启动子可操作地与编码需要的植物壳多糖酶或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶蛋白或多肽的序列结合。在本文中, 术语“可操作地结合”或“可操作地连接”表示这样一种结合, 其中, 调控区(例如启动子, 增强子)和要表达的核酸序列是共价连接的, 并且是以允许在合适的条件下转录, 翻译的方式定位的。在本发明的一种优选实施方案中, 所述结合的启动子是强效的和非组织或发育特异性植物启动子(例如, 能够在很多或所有植物组织类型中强表达的启动子)。所述强效“组成型”启动子的例子包括, 但不局限于 CaMV 35S 启动子(Odell 等, 1985, *Nature* 313:810-812), T-DNA 甘露碱合成酶启动子, 和它们的各种衍生物。在另一种优选实施方案中, 将一种诱导型或阻抑型启动子用于在植物中表达感兴趣的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶, 例如, 披露于 Weinmann 等, 1994, *The Plant Journal* 5:559-569 中的操纵基因启动子; 或披露于 McNellis 等, 1998, *The Plant Journal* 14:247-257 中的

糖皮质激素诱导型启动子；或披露于 Caddick 等，1998，*Nature Biotechnology* 16:177-180 中的乙醇诱导型启动子。还可参见 Gatz, 1995, *Methods In Cell Biology* 50:411-424, 该文献披露了用于植物的诱导型和阻抑型基因表达系统。

5            在本发明的一种实施方案中，在植物中表达壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶，以便所述壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶多肽定位于质外体间隙中。当在植物中表达时，可以将壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶导向质外体间隙，包括以与起着信号或转运蛋白作用的肽形成的融合蛋白形式，表达壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶多肽，以便将壳  
10 多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶定位于转基因植物的质外体间隙中。可以使用多种信号或转运肽，例如，Lund 等，1992, *Plant Molecular Biology* 18:47-53 所披露的 PR1b 信号序列；或 Pfitzner 等，1987, *Nucleic Acids Research* 15:4449-4465 中所披露的 PR-1a, b 和 c 信号序列。通过彼此连接对每一种成分特异的多核苷酸（例如，框内连接多核苷酸），可以构建包括信号或转运肽和壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-  
15 葡聚糖酶多肽的融合蛋白，以便当所述融合多核苷酸在转基因植物中表达时，产生需要的融合蛋白。本领域人员了解如何构建可用于在转基因植物的质外体间隙中表达壳多糖酶和/或  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的多核苷酸。

20            在本发明的另一种实施方案中，通过工程方法制备一种具有这样一种基因构建体的植物可能是有利的，所述基因构建体包括可操作地与组织或发育特异性启动子结合的编码植物壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶蛋白或多肽的序列，所述启动子例如，但不局限于 CHS 启动子，PATATIN 启动子等。

25            在本发明的另一种实施方案中，用包括可操作地与一种修饰过的或人工启动子结合的编码植物壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶蛋白或多肽的基因构建体转化植物可能是有利的。通常，通过重组不同启动子的结构元件构建的所述启动子，具有在天然启动子中不存在的独特的表达模式和/或水平。例如，参见 Salina 等，1992, *Plant Cell*  
30 4:1485-1493, 例如，通过组合顺式调控元件和启动子核心构建的人工启动子。

在本发明的另一种实施方案中，可以通过工程方法实现壳多糖酶

和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶多核苷酸的表达,包括利用本领域已知的技术增加编码需要的蛋白或多肽的基因的拷贝数量。

### 5.5 植物和植物细胞的转化

可以用本领域已知的任何方法转化植物和植物细胞。在本发明的一种实施方案中,利用农杆菌属将所述基因构建体导入植物。所述转化优选使用二元农杆菌属 T-DNA 载体 (Bevan, 1984, Nuc. Acid Res. 12:8711-8721), 和共培养方法 (Horsch 等, 1985, Science 227:1229-1231)。一般,利用农杆菌属转化系统对双子叶植物进行工程改造 (Bevan 等, 1982, Ann. Rev. Genet 16:357-384; Rogers 等, 1986, Methods Enzymol. 118:627-641)。还可以利用农杆菌属转化系统,将 DNA 转化和转移到单子叶植物和植物细胞中 (参见 Hernalsteen 等, 1984, EMBO J 3:3039-3041; Hooykass-Van Slogteren 等, 1984, Nature 311:763-764; Grimsley 等, 1987, Nature 325:1677-179; Boulton 等, 1989, Plant Mol. Biol. 12:31-40.; 和 Gould 等, 1991, Plant Physiol. 95:426-434)。

在其它实施方案中,可以采用各种其他方法将重组核酸构建体导入植物和植物细胞。当目标是单子叶植物或植物细胞时,所述其他方法是特别适用的。其他基因转移和转化方法包括,但不局限于粒子枪轰击 (biolistics), 通过钙-, 聚乙二醇 (PEG)-或电穿孔-介导的裸露 DNA 摄取而实现的原生质体转化 (参见 Paszkowski 等, 1984, EMBO J 3:2717-2722, Potrykus 等 1985, Molec. Gen. Genet. 199:169-177; Fromm 等, 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5824-5828; 和 Shimamoto, 1989, Nature 338:274-276) 以及植物组织的电穿孔 (D'Halluin 等, 1992, Plant Cell 4:1495-1505)。用于植物细胞转化的其他方法包括显微注射, 碳化硅介导的 DNA 摄取 (Kaeppler 等, 1990, Plant Cell Reporter 9:415-418), 和显微粒子轰击 (参见 Klein 等, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309; 和 Gordon-Kamm 等, 1990, Plant Cell 2:603-618)。在任何一种方法中,可以使用可选择标记,至少在开始使用这种标记,以便确定是否确实发生了转化。有用的可选择标记包括能赋予对一种抗生素的抗性的酶,如对庆大霉素,潮霉素,卡那霉素等的抗性。另外,可以使用具有通过颜色改变识别的化合物的标记,如 GUS, 或通过发光识别,如

荧光素酶。

在所述嵌合基因中还可以包括一个基因开关机制，由它决定在何种条件下或在何时表达所述编码序列。例如，所述基因开关可以是化学诱导的启动子或温度控制的启动子。

- 5 根据本发明，可以利用本发明的核酸构建体和上面所提到的各种转化方法，工程制备具有本文所披露的需要的生理学和农学特性的多种植物和植物细胞系统。在优选实施方案中，用于工程改造的目标植物和植物细胞包括，但不局限于单子叶植物和双子叶植物，如农作物，包括谷类作物(例如，小麦，玉米，水稻，小米，大麦)，果实类作物(例如，番茄，苹果，梨，草莓，橙子)，饲料类作物(例如苜蓿)，根类蔬菜作物(例如胡萝卜，马铃薯，甜菜，山药)，叶类蔬菜作物(例如，莴苣，菠菜)；开花植物(例如，矮牵牛，玫瑰，菊花)，针叶树和松树(例如，松树，冷杉，云杉)；用于植物补救(phytoremediation)的植物(例如，重金属积累植物)；油类作物(例如向日葵，油菜籽)和用于实验目的的植物(例如，拟南芥属)。

#### 5.6 转化过的植物和植物细胞的筛选

- 根据本发明，可以通过以下方法获得需要的植物：通过工程方法将能表达壳多糖酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的一种或多种基因构建体导入多种植物细胞类型，包括，但不局限于原生质体，组织培养细胞，组织和器官外植体，花粉，胚胎，以及完整植株。在本发明的一种实施方案中，按照下文所披露的途径和方法从工程改造的植物材料中选择或筛选转化体(业已导入或整合了所导入的基因构建体的植物)。然后，可以将分离的转化体再生成植株。另外，可以先将工程改造的植物材料再生成植株，然后再选择或筛选所产生植株的标记基因性状。在选择或筛选标记基因之前或之后，由植物细胞，组织或器官再生植株的方法为本领域技术人员所熟知。

- 可以通过选择或筛选所述工程改造的植物材料的由存在于转化DNA上的标记基因编码的性状，可以鉴定并且分离转化过的植物细胞，愈伤组织，组织或植物。例如，选择可以通过在含有抑制量的抗生素或除草剂的培养基上生长工程改造的植物材料而进行，转化基因构建体产生对所述抗生素或除草剂的抗性。另外，还可以通过筛选可能存在于本发明重组核酸构建体上的任何可见标记基因(例如， $\beta$ -葡糖醛

酸酶, 荧光素酶, B 或 C1 基因) 的活性, 鉴定转化过的植物和植物细胞。所述选择和筛选方法为本领域技术人员所熟知。

还可以用物理和生物化学方法鉴定含有本发明基因构建体的植物或植物细胞转化体。所述方法包括, 但不局限于: 1) 用于检测和确定重组 DNA 插入片段结构的 Southern 分析或 PCR 扩增; 2) 用于检测和检查所述基因构建体的 RNA 转录物的 Northern 印迹, S1 RNase 保护, 引物-延伸或逆转录酶-PCR 扩增; 3) 用于检测酶活性的酶促分析, 其中, 所述基因产物是由所述基因构建体编码的; 4) 蛋白凝胶电泳 (PAGE), Western 印迹技术, 免疫沉淀, 或酶联免疫测定, 其中的基因构建体产物是蛋白。还可以使用诸如原位杂交, 酶染色, 和免疫染色的其他技术, 检测所述重组构建体在特定植物器官和组织中的存在或表达。用于完成所有上述测定的方法, 为本领域技术人员所熟知。

#### 5.7 能表达工程改造过的壳多糖酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶多核苷酸的转基因植物

15 制备了能表达工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的转基因植物。能表达壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的转基因植物不太容易受感兴趣的病原体的致病作用。转基因植物可以通过本领域已知的任何技术制备, 例如用于上文所披露的能表达植物壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的转基因植物的技术。

20 能表达一个或多个壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因多核苷酸的转基因植物, 能够使得所述植物对感兴趣的病原体的抗性更高, 所述转基因植物可以来自植物界的任何植物种, 植物属, 植物科, 植物目, 植物纲, 植物门。例如, 参见美国专利号 5, 889, 189; 5, 869, 720; 5, 850, 015; 5, 824, 842; PP10, 742; PP10, 704; PP10, 682, 25 它引用了其中可以使用壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的植物种、属、科、目、纲和门。

植物的例子有单子叶植物, 双子叶植物, 作物类植物 (即用于包括人类在内的动物的农业, 食品生产目的而种植的任何植物物种, 通常以超过大约 10 个植株的群体形式种植的植物, 以便由于任何原因收获 30 所述植物的完整植株或一部分, 例如, 水果, 花卉或作物, 例如所述植物所长出的谷粒等), 树木 (即果树, 为了生产木材而种植的树木, 为了装饰而种植的树木等), 任何类型的花卉 (即为了装饰而种植的植

物，例如，在它们收获之后种植)，仙人掌等。

可以在其中表达壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的植物的其他例子包括 Viridiplantae, Streptophyta, Embryophyta, Tracheophyta, Euphyllophytes, Spermatophyta, Magnoliophyta, Liliopsida, Commelinidae, Poales, Poaceae, 稻属, 水稻, 玉米属, 玉米, 大麦属, 大麦, 小麦属, 小麦, Eudicotyledons, Core eudicots, Asteridae, Euasterids, Rosidae, Eurosids II, Brassicales, Brassicaceae, 拟南芥属, Magnoliopsida, Solananae, Solanales, 茄科, 茄属, 烟草属。

例如，所述植物还包括特别感兴趣的作物，包括茄科作物，包括加工过的和新上市的番茄，辣椒和茄子；叶类植物，包括莴苣和菠菜；芸薹属，包括花椰菜，抱子甘蓝，花茎甘蓝，羽衣甘蓝，花椰菜，红甘蓝和白甘蓝；葫芦科，包括黄瓜，甜瓜，西瓜，zucchini 和南瓜；大型有籽植物，包括豌豆，菜豆和甜玉米；根类植物，包括胡萝卜和洋葱；营养繁殖的植物，包括草莓，葡萄，香蕉，菠萝和蔷薇科果实和坚果类作物；以及热带作物，包括芒果和番木瓜。

因此，本发明业已利用了多种植物，包括，但不局限于来自下列属的种：腰果属，落花生属，天门冬属，颠茄属，燕麦属，芸薹属，柑橘属，西瓜属，辣椒属，红蓝花属，椰子属，咖啡属，甜瓜属，南瓜属，Daucus，油棕属，草莓属，大豆属，棉属，向日葵属，Heterocallis，大麦属，天仙子属，莴苣属，亚麻属，黑麦草属，羽扇豆属，番茄属，苹果属，木薯属，Majorana，苜蓿属，烟草属，木犀榄属，稻属，Panicum, Panneserum, 鳄梨属，菜豆属，Pistachia, 豌豆属，梨属，李属，萝卜属，蓖麻属，黑麦属，千里光属，白芥属，茄属，高粱属，可可树属，胡卢巴属，小麦属，野豌豆属，葡萄属，豇豆属和玉米属。

#### 5.8 用于在转基因植物中表达工程改造过的基因的多核苷酸构建体

用生物技术领域已知的普通重组 DNA 和克隆技术，构建能够指导工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因产物在感兴趣的转基因植物中表达的多核苷酸构建体，例如，参见 Sambrook 等，同上；Ausubel 等，同上。所述多核苷酸构建体通常包括编码工程改造的壳多糖酶和

$\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物的多核苷酸序列和一个或多个调控多核苷酸序列。可用于本发明多核苷酸构建体的调控序列包括, 但不局限于启动子, 增强子, 内含子, 剪接供体, 剪接受体, 聚腺苷化序列, RNA 稳定性调控序列或上述任意一种的元件(例如, 启动子元件, 包括, 但不局限于 TATA 盒)。

多核苷酸构建体包括一个或多个调控元件, 所述元件能够指导本发明工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物的表达。在一个优选方面, 所述调控元件能够指导在植物物种中的表达, 其中, 工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物的表达是需要的。在另一个优选方面, 所述调控元件能够指导在一种细胞类型中的表达, 其中, 工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物在感兴趣的植物物种中的表达是需要的。

可用于本发明的多核苷酸构建体的调控元件为本领域技术人员所公知, 例如, 已知能够在感兴趣的细胞类型和植物物种中表达的基因的启动子和增强子元件。还可以通过常规实验, 分离可用于在感兴趣的植物物种的细胞类型中表达工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物的启动子, 例如, 通过分离已知能够以需要的方式表达的基因的启动子区。例如, 人们可以利用对已知能在感兴趣的植物物种的感兴趣的细胞类型中表达的 mRNA 的 5'末端特异的 cDNA 探针筛选基因组文库。所述 5'末端 cDNA 探针优选仅为大约 100 个-大约 300 个碱基对, 以便在所述基因组文库中鉴定的克隆有可能包括所述基因的 5'末端, 它可能包括对所述探针特异的基因的启动子区。所述启动子区通常包括位于转录起始位点上游的大约 1000-大约 2000 个碱基对。因此, 可用于表达本发明工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的启动子, 是从已知能够在感兴趣植物物种的感兴趣细胞类型中表达的基因的转录起始位点上游大约 2000 个碱基对到下游的大约 50 个碱基对的多核苷酸, 或者是所述多核苷酸的一部分。

为了有利于工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物的正确加工, 可能需要包括编码所述加工所必须的肽序列的核苷酸片段。例如, 可能需要例如能够由转基因宿主植物识别并且能在所述植物中起作用的肽序列, 即信号序列, 以便促进壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因产物进入内质网。

### 5.9 用于检测工程产生的抗性植物品系的分析

与不能表达工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因产物的相同物种的植物品系(即野生型植物)相比,用本发明方法制备的能表达工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因产物的植物品系对感兴趣的病原体的致病作用的抗性更大。用本发明方法制备的植物品系的较高的抗性,可以用本发明领域技术人员已知的任何技术分析。例如,人们可以用感兴趣的病原体感染所制备的植物品系的植物,和野生型植物品系的植物。在进行所述感染之后,所制备的植物品系的植物与野生型植物相比具有高出至少大约 20% 的从感染中存活下来的可能性,这种可能性更优选至少大约 40%,更优选至少大约 60%,最优选至少大约 80%。

测试用本发明方法生产的转基因植物的另一种方法,是测试坏死诱导活性,例如,在以下文献中所披露的:Mahe 等,1998, J. Peptide Res. 52: 482-494。因此,人们可以在转基因植物中表达工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因,并且用感兴趣的病原体感染所述转基因植物。例如,当将一种病原体涂在能表达所述工程改造过的壳多糖酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的转基因植物上时,人们能够在野生型植物上看到明确的坏死或严重扩散的坏死,但是在产生所述转基因植物的植物品系的转基因植物上看不到这种坏死。

除了肉眼检查之外,通过组织化学染色反应还可以观察到坏死性的细胞死亡。

提供以下实施例是为了进一步说明本发明,而不是要以任何方式限定本发明的范围。

## 25 6. 实施例

### 6.1 材料和方法

#### 植物材料

让芥菜植物在 22-24℃ 下,在 12 小时光照/12 小时黑暗周期的生长箱中生长。

30 从芥菜 cDNA 文库中筛选壳多糖酶克隆

合成了一对寡核苷酸引物,5'GGTGGATGGGCTACAGCACCAGAC3'和 5'GCCACGTCCACACTCCAA3',用于 PCR 扩增拟南芥属壳多糖酶基因的 414



bp 片段(1625-2038 号核苷酸)(Samac 等, 1990, *Plant Physiol* 93:907-914)。在用于筛选芥菜 cDNA 文库之前(Pua 等, 1992, *Plant Mol Biol* 19:541-544), 通过在 42 °C 下, 在含有 30%去离子化甲酰胺的溶液中进行原位噬斑杂交, 证实相当于保守壳多糖酶结构域的该  
5 片段的核苷酸序列(Sambrook 等, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。在室温下, 在 0.1 x SSC, 0.1% SDS 中洗涤印迹。

#### DNA 序列分析

10 使用 DNA 测序试剂盒, 采用 Sequenase Version 2.0(UBS, Amersham Life Science)和 GCG 序列分析程序(Genetics Computer Group)分析 M13mp18 中含有感兴趣的序列的 DNA 片段(Yanisch-Perron 等, 1985, *Gene* 33:103-119)。

#### 基因组 DNA 分离和 Southern 印迹分析

15 为了进行 Southern 印迹分析, 用各种限制性内切酶消化从芥菜中分离的 20 µg DNA(Dellaporta 等, 1983, *Plant Mol Biol Reprtr* 1:19-21), 通过在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳进行分离, 并且吸印到 Hybond-N(Amersham)上(Sambrook 等, 1989)。在 42 °C 下, 在含有 30% 去离子化甲酰胺, 6x SSC, 5x Denhardt's, 1% SDS 和 500 µg/ml  
20 变性的超声处理过的鲑鱼精子 DNA 的溶液中, 让所述印迹与 <sup>32</sup>P-标记过的 BjCHI1 cDNA 探针杂交过夜。在室温下以及在 65 °C 下用 0.1 x SSC, 0.1% SDS 洗涤所述印迹。

#### Northern 印迹分析

25 在 50 °C 下, 在存在乙二醛的条件下, 使 20µg 从幼苗的叶片中提取的 RNA 变性(Nagy 等, 1988, *Plant Molecular Biology Manual* p. B4:1-29. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht), 通过在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳进行分离, 并且吸印到 Hybond-N(Amersham)膜上。在 42 °C 下, 在 50%甲酰胺, 1x Denhardt's, 6xSSPE, 1% SDS, 100 µg/ml  
30 变性的超声处理过的鲑鱼精子 DNA 和 10%硫酸葡聚糖中, 让印迹与 <sup>32</sup>P-标记过的 BjCHI1 cDNA 一起培养过夜。在 65 °C 下用 0.1 x SSC, 0.1% SDS 洗涤所述印迹。

#### 聚合酶链式反应

利用 GeneAmp PCR Reagent 试剂盒 (Perkin Elmer), 用引物 P1 和 P2 或 P2 和 P3 进行 PCR。图 1A 表示所述引物的定位: P1 (5'CCTCCGGTGAGCAATGCG3') 相当于 56-73 号核苷酸, P2 (5'TTAGCGGCGGTGATGAAGG3') 互补于 554-536 号核苷酸, 而

5 P3 (5'TCCTCCAACCCCGCAGTGT3') 相当于 207-225 号核苷酸。用引物使在 94 °C 下变性 5 分钟的芥菜 DNA 进行 35 轮 PCR: 94 °C 1 分钟, 68 °C 1 分钟, 和 72 °C 3 分钟。最终的延伸是在 72 °C 下进行 7 分钟。将在 2% 琼脂糖凝胶中电泳的 PCR 产物吸印到 Hybond-N (Amersham) 膜上, 以便与 <sup>32</sup>P 标记过的 BjCHI1 cDNA 杂交。

10 按照 Lasserre 等, 1996, Mol Gen Genet 251: 81-90 的方法 (Nagy 等, 1988), 使用利用硫氰酸胍从幼苗的叶片中提取的总 RNA 进行逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)。让引物 P4, 5'CCACTCGAGGTTGTTGC3' (互补于 750-734 号核苷酸; 图 1A) 与 50 µg 总 RNA 退火。在使用引物 P2 和 P3 的 PCR 中, 用第一条 cDNA 链作模板 (图 1A)。所有 RT-PCR 反应  
15 都重复进行三次。

#### 抗 HbGLU 和 BjCHI1 的多克隆抗体的制备

相当于 HbGLU (SEQ ID NO: 4) 的 94-107 号氨基酸的合成肽 (SDLQSLTNPSNAKS) (Chye 和 Cheung, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 397-402) 是从 Chiron Technologies (Australia) 购买的, 并且用于按照 Sambrook 等, 1989 中披露的方法, 在兔子体内制备多克隆抗体。将相当于 BjCHI1 (SEQ ID NO: 1) 的 231-242 号氨基酸的合成肽 (YKEEIDKSDPHC) (Zhao 和 Chye, 1999, 同上) 用于对兔进行免疫, 以便制备多克隆抗体, 并且所述抗-BjCHI1 抗体是从 Chiron Technologies (Australia) 购买的。将每一种肽与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 结合, 并且与弗氏完全佐剂混合, 用于制备抗体。采集血液, 并且利用蛋白 A Sepharose CL-4B (Pharmacia) 和 CNBr-激活的 Sepharose 4B (Pharmacia) 柱纯化抗 HbGLU 的抗体, 而抗 BjCHI1 的抗体是利用 Thiopropyl-Sepharose 6B (Pharmacia) 柱纯化的。  
25

#### 用茄属丝核菌感染芥菜

30 将芥菜种子播种到高压灭菌的土壤中, 并且在 24 °C 的生长箱中培养, 采用 12 小时光照 (08:00-20:00) 和 12 小时黑暗 (20:00-08:00) 的昼夜循环。将两周龄的幼苗小心移栽到用 1 周龄的茄属丝核菌培养

物接种过的土壤中。让所述真菌在室温下在马铃薯葡萄糖营养液中生长 1 周时间，并且在移栽所述幼苗之前 3 天添加到所述土壤中。在移栽到感染过的土壤中之后，从第 0 天到第 9 天，每天从幼苗上采集叶片。从所述叶片中提取总 RNA 和总蛋白，分别进行 northern 印迹分析  
5 和 western 印迹分析。

同时具有三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶 和 芸蓼属壳多糖酶 BjCHI1 的质粒构建体

将被命名为 HbGLU 的完整长度的 *H. brasiliensis*  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 的 1.2 kb 的 SmaI-HindII 片段 (Chye 和 Cheung, 1995,  
10 Plant Mol. Biol. 29:397-402) 克隆到二元质粒载体 pBI121 (Clontech) 的 CaMV 35S 启动子下游的 SmaI 位点上，以便制备质粒 pHEV43 (图 7)。而将编码芥菜壳多糖酶的完整长度 cDNA 的 1.3 kb SmaI 片段 BjCHI1 (Zhao 和 Chye, 同上) 克隆到 pBI121 (Clontech) 的 CaMV 35S 启动子下游的 SmaI 位点上，以便制备质粒 pBj17。然后  
15 将来自 pHEV43 的一个含有 CaMV 35S 启动子和 HbGLU cDNA 的 2.04 kb HindIII 片段用 Klenow 平端化，并且连接到 pBj17 的 GUS 基因内的 SnaBI 位点上，制备两种质粒 pBj47 和 pBj48 (图 7)。pBj47 中的 CaMV 35S 启动子是颠倒的，而 pBj48 中的该启动子是串联，并且质粒 pBj47 和 pBj48 中的每一个都携带有位于单一质粒上的 HbGLU cDNA 和 BjCHI1  
20 cDNA (图 7)。将质粒 pBj17, pBj47 和 pHEV43 用于马铃薯转化。

6.2 制备具有三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶和芸蓼属壳多糖酶 BjCHI1 构建体的转基因马铃薯植物

#### 植物转化

通过利用辅助菌株 HB101 (pRK2013) 进行三亲交配，将每一种质粒  
25 pHEV43, pBj17, pBj47 和 pBI121 从大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  转移到根癌农杆菌菌株 LBA4404 中。通过携带所述质粒之一的根癌农杆菌衍生物进行的马铃薯植物品种 Desiree (*Solanum tuberosum* L.) 的转化是按照以下文献中的方法进行的: Dietze 等, 1995, In Potrykus I, Sprangenberg G (eds), Gene Transfer to Plants, New York, Cold  
30 Spring Harbor Laboratory, p. 24-29. 在补充了卡那霉素 (100  $\mu$ g/ml) 的 Murashige 和 Skoog 培养基上筛选转化体。在 20-25  $^{\circ}$ C 的温度和 16 小时光照/18 小时黑暗方案下，将马铃薯组织培养物保持在生长箱中。

在 24 °C 下让转基因 R<sub>0</sub> 马铃薯植物生长在生长箱中的土壤里，采用 12 小时光照/12 小时黑暗的昼/夜方案。

6.3 测定三叶橡胶属  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶和芸薹属壳多糖酶 BjCHI1 产物在稳定转化的马铃薯植物中的功能

#### 5 Northern 印迹分析

按照以下文献中所披露的方法从完整植株中提取总 RNA: Nagy 等, 1988, In: SV Gelvin, RA Schilperoort, (eds), Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. B4:1-29)。在存在乙二醇的条件下，在 50°C 下让 20  $\mu$ g RNA 变性  
10 30 分钟。通过在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳进行分离，并且转移到 Hybond-N 膜 (Amersham) 上。让印迹预杂交 4-6 小时，然后与通过随机引发标记而制备的 <sup>32</sup>P-标记过的 BjCHI1 cDNA 或 HbGLU cDNA 在 42°C 下，在含有 50% 甲酰胺，1 x Denhardt's, 6 x SSPE, 0.1% SDS, 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 和 10% 硫酸葡聚糖溶液中杂交过夜。在 65  
15 °C 下，用 0.1 x SSC, 0.1% SDS 洗涤印迹。

#### Southern 印迹分析

为了进行 Southern 印迹分析，用限制性内切酶消化按照 Dellaporta 等, 1983, Plant Mol Biol Rep. 1:19-21 中所披露的方法分离的 20  $\mu$ g 基因组 DNA，通过在 0.7% 的琼脂糖凝胶中电泳进行分离，并且吸印到 Hybond-N (Amersham) 膜上 (Sambrook 等, 1989)。  
20 在 42°C 下让所述膜在含有 50% 去离子化甲酰胺，6 x SSC, 5 x Denhardt's, 1% SDS, 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 的溶液中预杂交 4-6 小时，添加 <sup>32</sup>P-标记过的 BjCHI1 cDNA 探针或 <sup>32</sup>P-标记过的 HbGLU cDNA 探针，并且杂交过夜。在 65°C 下用 0.1 x SSC, 0.1% SDS 洗涤  
25 膜。

#### Western 印迹分析

按照以下文献中所披露的方法制备总植物蛋白: Kush 等, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87:1787-1790。通过 SDS-PAGE 分离 20  $\mu$ g 的总蛋白，并且按照 Sambrook 等, 1989 所披露的方法转移到  
30 Hybond-C (Amersham) 膜上。在 western 印迹分析中，按照扩增的碱性磷酸酶山羊抗兔免疫印迹分析试剂盒 (BioRad) 中披露的方法，使用抗 BjCHI1 的多克隆抗体或抗 HbGLU 的多克隆抗体检测交叉反应带。

### 制备用于酶分析的植物蛋白提取物

按照 Boller 等, 1983, *Planta* 157:22-31 中所披露的方法制备植物蛋白提取物。在液氮中将植物研磨成细粉, 转移到含有 1% (v/v)  $\beta$ -巯基乙醇的 0.1M 柠檬酸钠 (pH 5.0) 的缓冲液中, 并且涡旋搅拌。在离心 (14, 000 rpm, 5 分钟, 4°C) 之后将上清液转移到另一个试管中, 在 50°C 下培养 10 分钟, 并且在冰上冷却 10 分钟。然后对所述样品进行离心 (14, 000 rpm, 4 分钟, 4°C), 并且将所述上清液用作粗制蛋白用于分析壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性。按照 Bradford 的方法测定蛋白浓度 (1976, *Anal. Biochem*, 72:248-254)。

### 10 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶分析

按照以下文献中所披露的方法进行  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的比色分析: Abeles 和 Forrence, 1970, *Plant Physiol* 45:395-400。在 50°C 下, 将 100  $\mu$ l (25  $\mu$ g) 植物蛋白提取物和 100  $\mu$ l 的 2% (w/v) 昆布多糖 (Sigma) 的反应混合物温育 2 小时。通过添加 600  $\mu$ l 的二硝基水杨酸试剂, 并且在 100°C 下加热 5 分钟, 终止该反应。在冷却到室温之后, 以 1:20 的比例用水稀释内含物, 并且在 500 nm 下测定吸光度。

### 壳多糖酶分析

按照以下文献中所披露的方法进行比色壳多糖酶分析: Wirth 和 Wolf, 1990, *J. Microbiol Meth* 12:197-205。在 37°C 下, 将 150  $\mu$ l 的底物羧甲基/壳多糖/Remazol 亮紫 (Loewe Biochemica; 2 mg/ml 母液), 150  $\mu$ l 的 0.2 M 乙酸钠 (pH 5.0) 和 300  $\mu$ l (15 $\mu$ g) 植物蛋白提取物反应混合物培养 0.5 小时。通过添加 150  $\mu$ l 的 1N HCl 终止反应, 然后在冰上培养 5-10 分钟, 然后离心 (14, 000 rpm, 3 分钟, 4°C)。将上清液用于在 550 nm 下读取吸光度。作为空白对照, 用 300  $\mu$ l 的 0.1 M 乙酸钠, pH 5.0 缓冲液取代蛋白样品。

### 利用 *Tricoderma viride* 进行的体外真菌生物分析

在马铃薯葡萄糖 (Difco) 琼脂 (PDA) 平板上培养 *T. viride* Persoon (ATCC 12582)。按照以下文献中披露的方法用它进行体外菌丝抑制测试: Schlumbaum 等, 1986, *Nature* 324:365-367。将 PDA 上的生长中的 *T. viride* 培养物的一个栓转移到一个新的 PDA 平板的中央。在 25°C 下培养 24 小时, 在此期间, 菌丝从所述中央向外生长。然后在 PDA 外表面上钻孔, 与所述栓的距离相等。将植物蛋白提取物

(50  $\mu\text{g}$ ) 添加到每一个孔中, 并且在 25 $^{\circ}\text{C}$  下, 在黑暗中继续培养所述平板, 然后观察 *T. viride* 的生长抑制作用。在 16 小时和 24 小时拍照。

#### 使用茄属丝核菌的体内生物分析

5 在以前的 northern 印迹分析中证实了 BjCHI1 mRNA 是通过创伤或 MeJA 处理诱导的 (Zhao 等, 1999, 同上)。随后还证实了通过黑曲霉感染和毛虫采食也能诱导 BjCHI1 (Fung 等, 2002, 同上)。在这里, 体内生物分析是按照以下文献中披露的方法用幼小的马铃薯植物进行的: Jach 等, 1995, *Plant J.* 8: 97-109。将在 25 $^{\circ}\text{C}$  下, 在固体 PDA  
10 培养基上培养 5-6 天的茄属丝核菌接种到 100 ml 马铃薯葡萄糖营养液 (PDB) 中, 并且在室温下振荡培养 (100 rpm) 1-2 周。然后将该培养物转移到装有 500 ml 新鲜 PDB 的锥形烧瓶中, 并且再培养 3-4 天。然后在装有消毒的 8 升无菌土壤的植物生长盘中, 将该培养物与 6L 无菌土壤 (Bio-Mix Super, The Netherlands) 充分混合, 10 天之后, 对  
15 该土壤进行均匀混合, 然后将来自组织培养物的在无菌土壤中事先生长了 2 周的马铃薯植物移栽到感染过的土壤中, 并且在 24 $^{\circ}\text{C}$  下, 在生长箱中再进行培养, 采用 12 小时光照/12 小时黑暗的方案。在移栽到感染过的土壤中 2 周之后, 对马铃薯植物进行拍照。将在没有真菌的无菌土壤中生长的植物用作对照。

#### 20 6.4 结果

##### BjCHI1 表达是受茄属丝核菌感染诱导的

为了研究真菌诱导对 BjCHI1 表达的影响, 让芥菜幼苗在预先接种了土壤真菌——茄属丝核菌的土壤中生长。在图 8a 上的我们的结果, 证实了在感染过的土壤中生长 1 天之后, 1.3 kb BjCHI1 mRNA 的表达  
25 增强。图 8b 表示具有 37 kDa 的表观分子量的交叉反应带, 它是从在感染过的土壤中生长 3 天之后开始积累的预期的成熟 BjCHI1 蛋白。位于该带上面的 42-kDa 的微弱的带有可能是前体蛋白 (图 8b)。计算分子量为 42, 774 kDa 的 BjCHI1 前体进行了翻译后裂解, 以便除去 N-末端信号肽和 C-末端液泡导向肽 (Zhao 和 Chye, 同上)。我们的结果  
30 表明, BjCHI1 mRNA 及其相应的蛋白在茄属丝核菌感染之后积累, 暗示了它在真菌防御方面的作用。

##### BjCHI1 和 HbGLU 在转基因马铃薯植物中的表达

BjCHI1 表达是通过茄属丝核菌诱导的这一发现, 导致我们研究了它们在转基因马铃薯植物中的异源表达是否能赋予对茄属丝核菌的保护作用。通过根癌农杆菌介导的转化, 将含有 BjCHI1 cDNA 的质粒 pBj17 和 pBj47 分别导入马铃薯品种 Desiree。质粒 pBj47 还含有 HbGLU cDNA, 有利于我们研究 HbGLU 在增强 BjCHI1 作用方面的功能(如果有这种功能的话)。同样将仅含有 HbGLU cDNA 的质粒 pHEV43 和载体对照 pBI121 用于马铃薯转化。通过 northern, Southern 和 western 印迹分析, 检查了来自每一种转化的大约 20 个独立的卡那霉素抗性推测的转基因植物。在图 9, 10 和 11 中, 示出了来自被最终选择用于茄属丝核菌感染实验的每一种转化的代表性品系的分析结果。图 9A 表示共表达 HbGLU 和 BjCHI1 的转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 2), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 4) 和仅表达 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pHEV-P<sub>14</sub>(泳道 5) 的 northern 印迹分析中, 用 <sup>32</sup>P-标记过的 HbGLU cDNA 检测的 1.2 kb 杂交 HbGLU mRNA 的存在。这条带不存在于未转化过的马铃薯中(图 9A, 泳道 1)。图 9B 表示用 <sup>32</sup>P-标记的 BjCHI1 cDNA 探针检测的 1.3kb BjCHI1 杂交 mRNA 在转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 2), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 4) 和 pBj17-P<sub>6</sub>(泳道 6) 中的表达。这条带在未转化过的马铃薯(图 9B, 泳道 1) 和 pBI121 转化过的马铃薯(图 9B, 泳道 5) 中不存在。

#### 20 转基因马铃薯品系的 Southern 印迹分析

然后, 将来自所述转基因马铃薯品系的 DNA 用于利用由 BjCHI1 或 HbGLU cDNA 制备的 <sup>32</sup>P-标记过的探针进行 Southern 印迹分析。图 10A 中的结果表明在转基因马铃薯品系 pHEV43-P<sub>14</sub>(泳道 3), pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 4), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 5) 和 pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 6) 中存在 1.2 kb HbGLU EcoRI-杂交带, 而在未转化过的马铃薯(泳道 1) 和 pBI121 转化过的马铃薯(泳道 2) 中不存在。所述 1.2 kb 的 EcoRI-杂交带相当于在 pHEV43 的图谱中所示出的带(图 7), 并且包括完整长度的 HbGLU cDNA。在 Southern 印迹分析中使用 <sup>32</sup>P-标记过的 BjCHI1 cDNA 探针和 HindIII-消化过的 DNA(图 10B), 在转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 3), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 4), pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 5) 和 pBj17-P<sub>6</sub>(泳道 6) 中, 检测到了一个 0.9 kb 的 HindIII-杂交带。该 0.9 kb 的带相当于在 pBj17 的图谱中所示出的位于 Bj CHI1 内第二和第三个内部 HindIII 位点之

间的片段(图 7)。在未转化过的马铃薯(图 10B, 泳道 1)和 pBI121 转化过的马铃薯(泳道 2)中不存在所述 0.9kb 的杂交带。在 Southern 印迹分析中, 当用  $^{32}\text{P}$ -标记过的 BjCHI1 cDNA 探针检测 EcoRI-消化过的 DNA 时(图 10C), 在转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 3), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 4)和 pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 5)中出现了各种大小的杂交带, 这表明它们是独立的转基因品系。在未转化过的马铃薯(泳道 1)和 pBI121 转化过的马铃薯(泳道 2)中不存在所述杂交带。

#### 转基因马铃薯中 BjCHI1 和 HbGLU 的蛋白检测

使用抗-HbGLU 抗体和抗-BjCHI1 抗体, 通过 Western 印迹分析进一步分析转基因植物。使用抗-HbGLU 抗体对来自转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 1), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 2), pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 3)和 pHEV43-P<sub>14</sub>(泳道 4)的粗制蛋白进行的 Western 印迹分析(图 11A), 发现了一个表观分子量为 35 kDa 的相当于 HbGLU 的交叉反应带。在 pBI121 转化过的马铃薯(图 11A, 泳道 5)和未转化过的马铃薯(泳道 6)中不存在这条带。使用抗-BjCHI1 抗体对来自转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 1), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 2), pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 3)和 pHEV43-P<sub>14</sub>(泳道 4), pBI121 转化过的马铃薯(泳道 5), 未转化过的马铃薯(泳道 6)和转基因马铃薯品系 pBj17-P<sub>6</sub>(泳道 7)的粗制蛋白进行的 Western 印迹分析, 在转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>(泳道 1), pBj47-P<sub>8</sub>(泳道 2), pBj47-P<sub>10</sub>(泳道 3)和 pBj17-P<sub>6</sub>(泳道 7)中发现了表观分子量为 52 kDa 的交叉反应 BjCHI1 带。在只能表达 HbGLU 的转基因品系 pHEV43-P<sub>14</sub>(图 11B, 泳道 4), pBI121 转化过的马铃薯(图 11B, 泳道 5)和未转化过的马铃薯(图 11B, 泳道 6)中不存在这条带。马铃薯表达的 BjCHI1 的表观分子量(52 kDa), 类似于观察到的烟草表达的 BjCHI1 的分子量(Fung 等, 2002, 同上), 并且大于天然 BjCHI1 的分子量(37 kDa), 这有可能是由于在异源宿主烟草和马铃薯中不能进行正确的翻译后加工。

#### 壳多糖酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性分析

将进行壳多糖酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶分析的转基因马铃薯品系与 pBI121 转化过的马铃薯进行比较(图 12)。利用来自 pBI121-转化体和转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>, pBj47-P<sub>8</sub>和 pBj47-P<sub>10</sub> 的粗制蛋白进行的葡聚糖酶分析(图 12A)表明, 转基因品系比 pBI121 转化体具有更高



的 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性水平。利用粗制蛋白进行的壳多糖酶分析(图12B)表明, 转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>7</sub>, pBj47-P<sub>8</sub> 和 pBj47-P<sub>10</sub> 具有比 pBI121 转化体更高的壳多糖酶活性。在 pBI121 转化体中检测到的活性是由于内源马铃薯 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶和壳多糖酶的存在。

5 用 *T. viride* 进行体外生物分析

然后, 对来自转基因马铃薯品系的粗制提取物进行体外 *T. viride* 生长抑制实验。在所述生物分析中, 用来自未转化过的马铃薯和用 pBI121 转化过的转基因品系的提取物作对照, 用缓冲液作空白对照。在添加蛋白提取物 16 小时(图 13A)和 24 小时(图 13B)之后拍摄的照片  
10 表明, *T. viride* 的生长受到了来自能共表达 BjCHI1 和 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub> 的提取物的抑制, 而在仅有缓冲液的对照(2号孔), 来自野生型马铃薯的提取物(3号孔)和 pBI121 转化过的马铃薯(4号孔)中缺乏抑制作用。仅表达 BjCHI1 的转基因马铃薯品系 pBj17-P<sub>6</sub>(5号孔), 和仅表达 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的 pHEV43-P<sub>14</sub>(6号孔)  
15 表现出比 pBj47-P<sub>10</sub>(1号孔)弱的抑制作用。

用茄属丝核菌进行的体内生物分析

体内生物分析是用在用茄属丝核菌预先接种的土壤上生长的幼小植物进行的。在转移到受感染的土壤中之后两周所获得的结果表明, 能共表达 BjCHI1 和 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub>(图 14A)具有比只能表达 BjCHI1 的转基因马铃薯品系 pBj17-P<sub>6</sub>(图 14B)略好一些  
20 的生长。转基因马铃薯品系 pBj47-P<sub>10</sub> 和 pBj17-P<sub>6</sub> 的根发育要比只能表达 HbGLU 的转基因马铃薯品系 pHEV43-P<sub>14</sub>(图 14C)好的多。然而转基因品系 pHEV43-P<sub>14</sub> 的根发育比未转化过的马铃薯好(图 14D), 这表明 HbGLU 本身的表达产生了某种保护作用。在无菌土壤(未用茄属丝  
25 核菌接种)中生长的对照植物, 表现出类似于 pBj47-P<sub>10</sub> 转基因植物的根发育(数据未示出)。用茄属丝核菌进行的这种体内生物分析重复产生了一致的结果。

本发明的范围并不局限于所披露的具体实施方案, 这些实施方案只是作为对本发明某一方面的具体说明, 并且功能等同方案和要素都  
30 属于本发明的范围。实际上, 除了在本文中所示出的和所披露的之外, 本领域技术人员通过以上说明和附图, 可以理解本发明的各种改进。这些改进被认为属于所附权利要求书的范围。在本文中引用了多份参

---

考文献，这些文献的内容被以它的全文形式收作本文参考。

- <110> Chye, Mee Len  
Zhao, Kai Jun
- <120> 具有增强的对真菌疾病的抗性的遗传修饰过的植物及其生产方法
- 5 <130> 9661-025-999
- <140>
- <141>
- <150> 60/331, 749
- <151> 2001-11-20
- 10 <160> 7
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 1297
- <212> DNA
- 15 <213> 芥菜 (*B. juncea*)
- <220>
- <223> 芥菜壳多糖酶 (BjCHI1)
- <400> 1
- aacatgaaga cttatctect tctccttctc atcttctcac ttctcttate attttctctc 60
- 20 ggtgagcaat gcggtagtca atccataccc gagggagcac tctgcccaca eggtctatgc 120
- tgcagcgagg ctggatgggtg cggcaccacc gaagcttact gcgggcatgg ttgtcaaagc 180
- cagtgcate ctggtccta tctcctctct ccaacccgcg agtgtggctg tcaatccata 240
- cccgcgggag ccctctgccc caacgggteta tgetgtagcg aggetggatg gtgcggcacc 300
- accgaagett actgcgggca tggttgcca agccagtga ctcccattcc cactctctct 360
- 25 gteccactc ccaactctcc tactccact cctcctagtc ctaccctcc tggtcccact 420
- cctcttggtc ccagcgggga tctttctggtc atcatttcaa gagatcagtt ctataaaatg 480
- cttaagcaca tgaacgaca tgattgtcat gctgttggtt tcttactta cgacgccttc 540
- atcaccgceg ctaagtcttt cccaagtttc gggaacaccg gagaccttgc catgaggaag 600

aaggagatag cagccttctt eggccagaact tcccacgaaa ccaccggtgg gtggtcgggt 660  
 gcaccgatg gagcaaatac atggggctac tgttacaagg aagaaattga caaaagcgat 720  
 ccccactgtg atagcaacaa cctcgagtgg ccatgcgcac caggcaaatt ttactacgga 780  
 cgaggaccaa tgatgtgtc ttggaactat aattacggac cgtgcgggag agacctagga 840  
 5 ctcgagttac tcaagaacce agatgttgcg tccagcgacc cagtgatagc tttcaaaacc 900  
 gccatttggg tctggatgac tctcaaget cctaaacct cgtgccacga cgtgatcacc 960  
 gaccagtggg agccgtcggc tgccgacatt tctgccgaa ggttaccagg ttatggagtg 1020  
 attaccaata tcatcaacgg tggattagag tgtgtgtgtc gcgacgtcgc aaaggtccaa 1080  
 gatcggatat cgttttatac aaggtactgt ggcatgtttg gtgttgatcc tggaagtaat 1140  
 10 attgactgtg acaatcaaag gccgtttaat gaaggtagta acgttttctt ggatgtgca 1200  
 atttaataag tactgttaat gaagctttgt tgtatccaag caataagaga gtatcaaatt 1260  
 aaattaaata aaactccttt ttattaagta aaaaaaa 1297

<210> 2

<211> 400

15 <212> PRT

<213> 芥菜

<220>

<223>芥菜壳多糖酶推测的氨基酸序列 (BjCHI1)

<400> 2

20 Met Lys Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Ile Phe Ser Leu Leu Leu Ser  
     1                  5                  10                  15  
 Phe Ser Ser Gly Glu Gln Cys Gly Ser Gln Ser Ile Pro Glu Gly Ala  
                   20                  25                  30  
 Leu Cys Pro Asn Gly Leu Cys Cys Ser Glu Ala Gly Trp Cys Gly Thr  
 25                  35                  40                  45  
 Thr Glu Ala Tyr Cys Gly His Gly Cys Gln Ser Gln Cys Asn Pro Gly  
                   50                  55                  60  
 Pro Tyr Pro Pro Pro Pro Thr Pro Gln Cys Gly Arg Gln Ser Ile Pro  
 65                  70                  75                  80  
 30 Ala Gly Ala Leu Cys Pro Asn Gly Leu Cys Cys Ser Glu Ala Gly Trp  
                   85                  90                  95

Cys Gly Thr Thr Glu Ala Tyr Cys Gly His Gly Cys Gln Ser Gln Cys  
                           100                          105                          110  
 Thr Pro Ile Pro Thr Pro Pro Ala Pro Thr Pro Thr Pro Pro Thr Pro  
                           115                          120                          125  
 5 Thr Pro Pro Ser Pro Thr Pro Pro Gly Pro Thr Pro Pro Gly Pro Ser  
                           130                          135                          140  
 Gly Asp Leu Ser Gly Ile Ile Ser Arg Asp Gln Phe Tyr Lys Met Leu  
 145                          150                          155                          160  
 Lys His Met Asn Asp Asn Asp Cys His Ala Val Gly Phe Phe Thr Tyr  
 10                          165                          170                          175  
 Asp Ala Phe Ile Thr Ala Ala Lys Ser Phe Pro Ser Phe Gly Asn Thr  
                           180                          185                          190  
 Gly Asp Leu Ala Met Arg Lys Lys Glu Ile Ala Ala Phe Phe Gly Gln  
                           195                          200                          205  
 15 Thr Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Ser Gly Ala Pro Asp Gly Ala  
                           210                          215                          220  
 Asn Thr Trp Gly Tyr Cys Tyr Lys Glu Glu Ile Asp Lys Ser Asp Pro  
 225                          230                          235                          240  
 His Cys Asp Ser Asn Asn Leu Glu Trp Pro Cys Ala Pro Gly Lys Phe  
 20                          245                          250                          255  
 Tyr Tyr Gly Arg Gly Pro Met Met Leu Ser Trp Asn Tyr Asn Tyr Gly  
                           260                          265                          270  
 Pro Cys Gly Arg Asp Leu Gly Leu Glu Leu Leu Lys Asn Pro Asp Val  
                           275                          280                          285  
 25 Ala Ser Ser Asp Pro Val Ile Ala Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp  
                           290                          295                          300  
 Met Thr Pro Gln Ala Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Thr Asp  
 305                          310                          315                          320  
 Gln Trp Glu Pro Ser Ala Ala Asp Ile Ser Ala Gly Arg Leu Pro Gly  
 30                          325                          330                          335  
 Tyr Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Ala Gly  
                           340                          345                          350

Arg Asp Val Ala Lys Val Gln Asp Arg Ile Ser Phe Tyr Thr Arg Tyr  
                   355                          360                          365  
 Cys Gly Met Phe Gly Val Asp Pro Gly Ser Asn Ile Asp Cys Asp Asn  
                   370                          375                          380  
 5 Gln Arg Pro Phe Asn Glu Gly Ser Asn Val Phe Leu Asp Ala Ala Ile  
    385                          390                          395                          400  
  
 <210> 3  
 <211> 1242  
 <212> DNA  
 10 <213> 三叶橡胶属 (Hevea)  
     <220>  
     <223> 三叶橡胶属 1, 3-葡聚糖酶 (HbGLU)  
     <400> 3  
  
 aaattataag caacttttett ctaatttccc ccctttettaa tggetatctc ctcttcaact 60  
 15 tcaggaacta gtagttcett ccctcaaga actactgtea tgcttcttct gtttttcttt 120  
 gcagcaagcg ttggtataac agatgccag gtaggtgttt gctatggaat gcaaggcaac 180  
 aacettccac ctgtttcaga ggcatagct ctctataaaa aatctaacat cagagaaatg 240  
 agaatttatg atccaaatcg agcagtattg gaagccetta gaggctcaaa cattgaaactc 300  
 atactaggtg ttccaaacte agatctccaa agccttacea atccttccaa tgcaaaatca 360  
 20 tgggtacaaa aaaatgtteg tggcttctgg tcaagtgtcc tgttcagata tatagcagtt 420  
 ggcaacgaaa ttagtctctg caatagagge acagcttggg tggetcaatt tgttttgect 480  
 gccatgagaa atatacatga tgctataaga tcagctgggc ttcaagatca aatcaaggtc 540  
 tcaactgcaa ttgacttgac cctggtagga aattcctacc ctcttctgc aggtgctttc 600  
 agggatgatg ttagatcata cttggacca attattggat ttctatctc taccaggtca 660  
 25 cetttacttg ccaatattta tcttacttt acttatgctt ataatccaag ggatatttcc 720  
 ctccctatg ctttgttcac ttcaccatca gttgttgtgt gggatggtca gcgaggttat 780  
 aagaaccttt ttgatgcaac gttggatgca ttgtactctg ctcttgagag ggctagtggg 840  
 ggttctctgg aggtggttgt ttcggaaagt ggctggccgt ctgccggagc atttgctgcc 900  
 acatttgaca atgggectac ttatctctca aatttgatcc aacatgttaa aggaggtact 960  
 30 cetaagagge ctaacagagc tatagagact tacttatttg ccatgtttga tgaaaataag 1020  
 aagcaaccag aggttgagaa acactttgga cttttcttcc ctgataaacg gccaaaatat 1080

aatctcaatt ttggtgcaga aaagaactgg gatatttcta ctgaacacaa tgcaacaata 1140  
 cttttcetta agagtgatat gtgagattgt gagaatttaa gtactatata tatttccaat 1200  
 gtatgcatgt atccatgtat taaataagag aaccttttct ca 1242

<210> 4

5 <211> 374

<212> PRT

<213> 三叶橡胶属

<220>

<223> 三叶橡胶属 1, 3-葡聚糖酶的推测的氨基酸序列 (HbGLU)

10 <400> 4

Met Ala Ile Ser Ser Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ser Ser Phe Pro Ser  
 1 5 10 15

Arg Thr Thr Val Met Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ala Ala Ser Val Gly  
 20 25 30

15 Ile Thr Asp Ala Gln Val Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Gly Asn Asn  
 35 40 45

Leu Pro Pro Val Ser Glu Val Ile Ala Leu Tyr Lys Lys Ser Asn Ile  
 50 55 60

Thr Arg Met Arg Ile Tyr Asp Pro Asn Arg Ala Val Leu Glu Ala Leu

20 65 70 75 80

Arg Gly Ser Asn Ile Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu  
 85 90 95

Gln Ser Leu Thr Asn Pro Ser Asn Ala Lys Ser Trp Val Gln Lys Asn  
 100 105 110

25 Val Arg Gly Phe Trp Ser Ser Val Leu Phe Arg Tyr Ile Ala Val Gly  
 115 120 125

Asn Glu Ile Ser Pro Val Asn Arg Gly Thr Ala Trp Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140

Val Leu Pro Ala Met Arg Asn Ile His Asp Ala Ile Arg Ser Ala Gly

30 145 150 155 160

Leu Gln Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Thr Leu Val





	<220>	
	<223> 人工序列说明: C1(正向)引物	
	<400> 5	
	ctgaattctc ctccggtgag caatgcg	27
5	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
10	<223>人工序列说明: C21(正向)引物	
	<400> 6	
	ctgaattcgg ggatctttct ggcac	26
	<210> 7	
	<211> 34	
15	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223>人工序列说明: C2(反向)引物	
	<400> 7	
20	gcgactgagg ccgcgttact accttcatta aacg	34





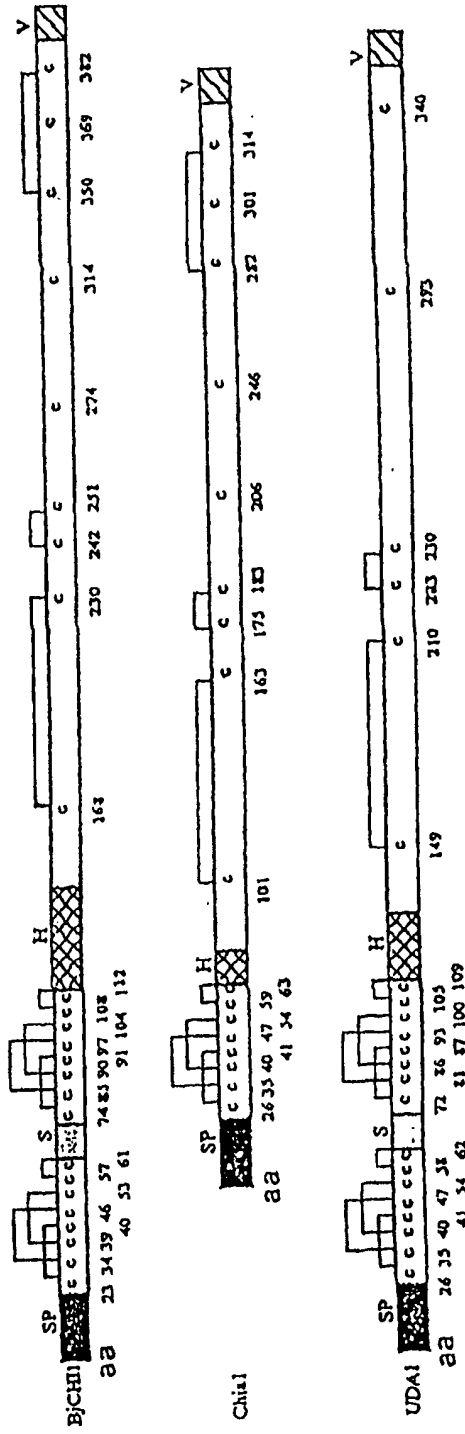


图 2B

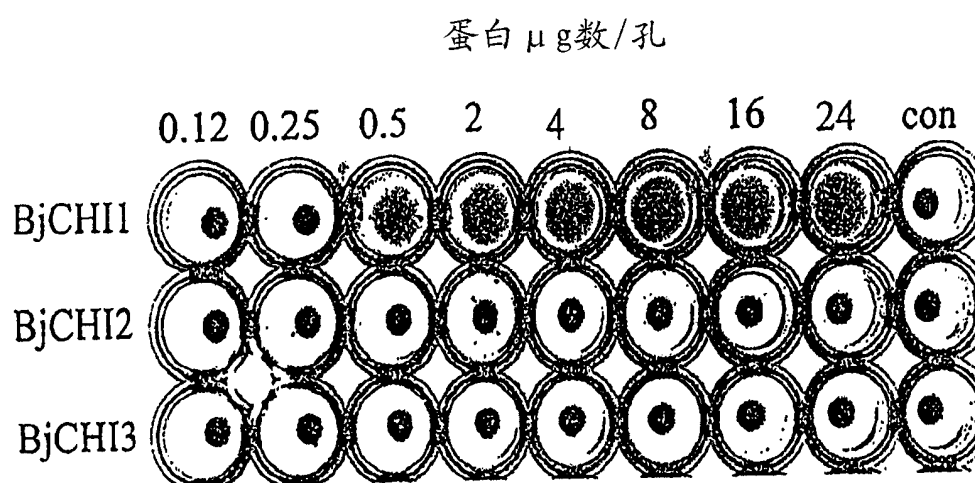


图 3

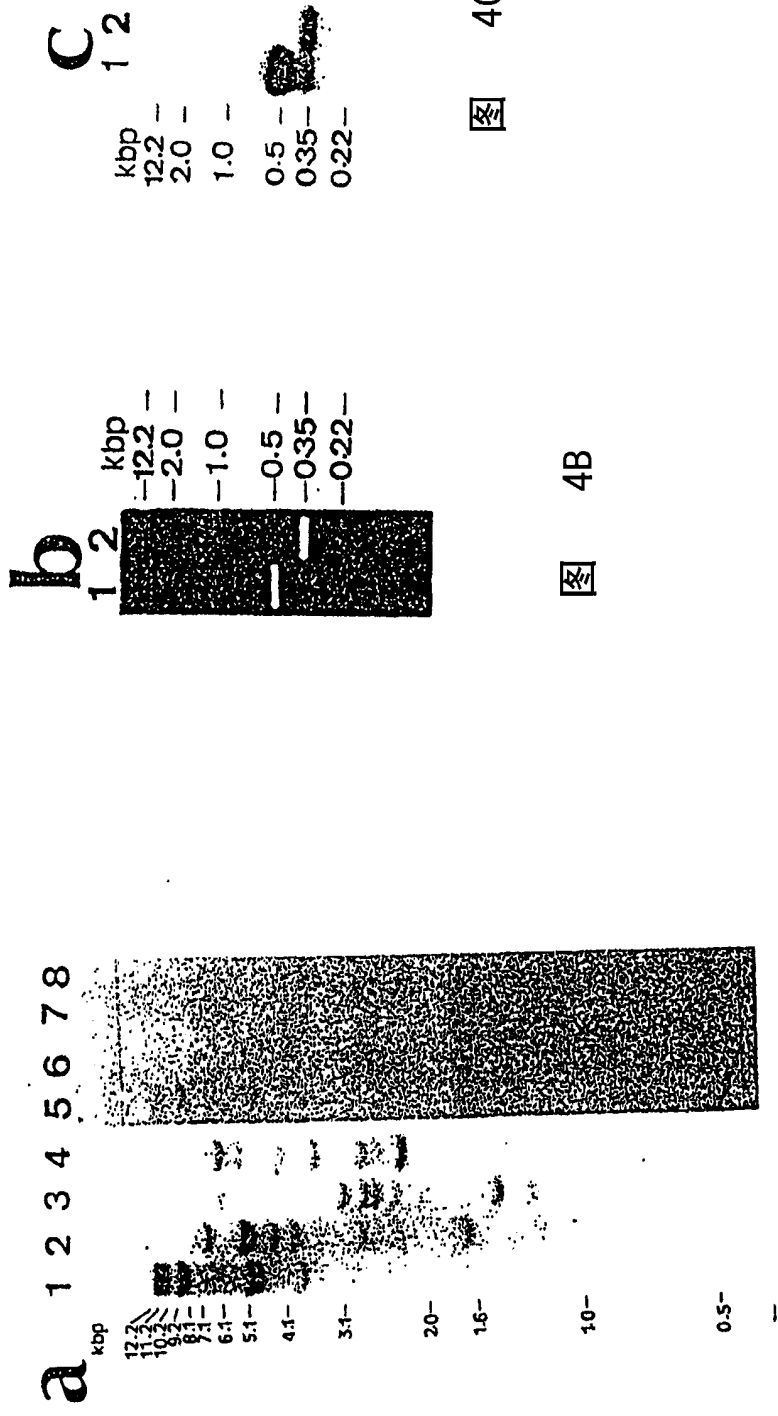


图 4A

图 4B

图 4C

```

AAATTATAAG CAACTTTCTT CTAATTTCCC CCCTTCTTAA TGGCTATCTC CTCTTCAACT
TCAGGAACTA GTAGTTCCTT CCCCTCAAGA ACTACTGTCA TGCTTCTTCT GTTTTTCTTT
GCAGCAAGCG TTGGTATAAC AGATGCCAG GTAGGTGTTT GCTATGGAAT GCAAGGCAAC
AACCTTCCAC CTGTTTCAGA GGTCATAGCT CTCTATAAAA AATCTAACAT CACGAGAATG
AGAATTTATG ATCCAAATCG AGCAGTATTG GAAGCCCTTA GAGGCTCAA CATTTGAATC
ATACTAGGTG TTCCAAACTC AGATCTCCAA AGCCTTACCA ATCCTTCCAA TGCAAAATCA
TGGGTACAAA AAAATGTTTCG TGGCTTCTGG TCAAGTGTCC TGTTTCAGATA TATAGCAGTT
GGCAACGAAA TTAGTCCTGT CAATAGAGGC ACAGCTTGGT TGGCTCAATT TGTTTTGCCT
GCCATGAGAA ATATACATGA TGCTATAAGA TCAGCTGGTC TTCAAGATCA AATCAAGGTC
TCCACTGCAA TTGACTTGAC CCTGGTAGGA AATTCCTACC CTCCTTCTGC AGGTGCTTTC
AGGGATGATG TTAGATCATA CTTGGACCCA ATTATTGGAT TTCTATCCTC TATCAGGTCA
CCTTTACTTG CCAATATTTA TCCTTACTTT ACTTATGCTT ATAATCCAAG GGATATTTCC
CTTCCCTATG CTTTGTTCAC TTCACCATCA GTTGTGTGT GGGATGGTCA GCGAGGTAT
AAGAACCCTT TTGATGCAAC GTTGGATGCA TTGTA CTCTGAGAG GGCTAGTGGT
GGTTCTCTGG AGGTGGTTGT TTCGGAAAGT GGCTGGCCGT CTGCCGGAGC ATTTGCTGCC
ACATTTGACA ATGGGCGTAC TTATCTCTCA AATTTGATCC AACATGTTAA AGGAGGTACT
CCTAAGAGGC CTAACAGAGC TATAGAGACT TACTTATTTG CCATGTTTGA TGAAAATAAG
AAGCAACCAG AGGTGAGAA ACACTTTGG CTTTTCTTTC CTGATAAACG GCCAAAATAT
AATCTCAATT TTGGTGCAGA AAAGA ACTGG GATATTTCTA CTGAACACAA TGCAACAATA
CTTTTCCTTA AGAGTGATAT GTGAGATTGT GAGAATTTAA GTACTATATA TATTTCCAAT
GTATGCATGT ATCCATGTAT TAAATAAGAG AACCTTTTCT CA

```

图 5A

```

MAISSSTSGT SSSFPSRTTV MLLLFFFAAS VGITDAQVGV CYGMOGNNLP PVSEVIALYK
KSNITRMRIY DPNRAVLEAL RGSNIELLIG VPNSDLQSLT NPSNAKSWVQ KNVRGFWSV
LFRYIAVGNE ISPVNRGTAW LAQFVLPAMR NIHDAIRSAG LQDQIKVSTA IDLTLVGNSY
PPSAGAFRDD VRSYLDPIIG FLSSIRSPLL ANIYPYFTYA YNPRDISLPY ALFTSPSVVV
WDGQRGYKNL FDATELDALYS ALERASGGSL EVVSESGWP SAGAFATFD NGRTYLSNLI
QHVKGGTPKR PNRAIETYLF AMFDENKKQP EVEKHFGLFF PDKRPKYNLN FGAEKNDWIS
TEHNATILFL KSDM

```

图 5B

Hb MAISSSTSGTS-SSFPSRTVMLLLEFFFAASVGI TDAQ--VGVCYGMQGN<sup>47</sup>  
Np MD, HKHIALQMAAII .GLLVS.TE.VG.S-.....L..  
CII M.LCIK-NG.L--AAALV.VGLLIC.IQMIG.S-I.....KHA.  
CIII MAHLIV.LL.SVLTL.TLDF.G.--A.....R..  
CIV MALWYLFNKR.LGA--A.LI.VGLLMCNIQM.G..SNI.....KIA.

Hb NLPPVSEVIALYKKSNI TRMRIYDFNRAVLEALRGSNIEILIGVPSNDLQ<sup>97</sup>  
Np ....A.Q.VQ...SK..R...L....Q.A.Q.....VM.....  
CII ...SQD..N..NANG.RK...N.DTN.FN.....I..D..LQ...  
CIII G..SPAD.VS.CNRN..R.....DQPT.....M.....P..E  
CIV ...SEQD..N...ANG.RK...NSDTNIEKS.N.....I..D...Q..E

Hb SL-TNPSNAKSWVQKNVRGFWSSVLFRIYAVGNEISFVNRGTAWLAQFVL<sup>146</sup>  
Np NLAA.....NN...R...N..PA.K.....V...T...SS.TRYL.  
CII ..-.D..R.NG...D.IINHFPD.K.K.....V..G.N.Q--Y.P..A  
CIII NVAASQA..DT...N...NY-GN.K.....V..I. ENSKYVP-VL.  
CIV A.-A.S.I.NG...D.I.SHPY.K.K..SI...V..S.N.Q--YS..L.

Hb PAMRNHDAIRSAGLQDQIKVSTAI DLTLVGN SYPPSAGAFRDDVRSYLD<sup>196</sup>  
Np .....RN..S.....NN....SSV.M..I..F...Q.S.N...FI.  
CII ..Q.VYN.LAA.....TYSGILA.T...KDSI..GEFN.FIN  
CIII N....QT..SG...GN.....ETG.TTDS...N.R.K...QFIE  
CIV H..E.VYN.LAA....K...T..TYSG.LA.T...KDSI..EEFK.FIN

Hb PIIGFLSSIRSPLLANIYPYFTYAYNPRDISLPVALFTSPSVVWDGQRG<sup>246</sup>  
Np .....VRR.N....V.....S.G.....A.N...Q'.SL.  
CII ...Q..VQHNL....V...GHIF.TA.VP.S....QQE---ANPA.  
CIII ...N..VTN.A...V.L,..AI.N.A-.K.E.....SE...N.NG..  
CIV ...E..ARNNL.....GHI..TV.VP.S....NQQG---TNST.

Hb YKNLFDATLDALYSALERASGGSLEVVVSESGWPSAGAFAT-FDNGRTY<sup>295</sup>  
Np .R.....MS..V.A..S..G...I.I.....-TN.AA..  
CII .Q....L..SM.F.V.K.G.QNV.II.....E.NS..T-IE.AQ..  
CIII .R.....I..T....K...S...I.....GQL.SI..A...  
CIV .Q....L..SI.F.V.K.G.ENV.II.....E.NS...-IE.AQ..

Hb LSNLIQHVK--GGTPKRPNRAIETYLEAMFDENKKQPEV-EKHFGLEFPD<sup>342</sup>  
Np .YK.....-R.S.R...KV.....N.N..L-.....S.N  
CII YE...N...SGA...K.GK.....N.EGDIT.....S..  
CIII NN...S...--S...SGP...V..L...DQ.D..I.....SAN  
CIV YR..VN...GGA...K.G.IV.....E.NG..T.....Y.N

Hb KRPKYNLNFG-AEKNWDISTEHNATILFLKSDM<sup>374</sup>  
Np .Q...P.S..FSDRY....A.N...AAS.I.E.  
CII Q.A..Q...N  
CIII MQ...QIS.N  
CIV RTA..Q...MYS

图 5C



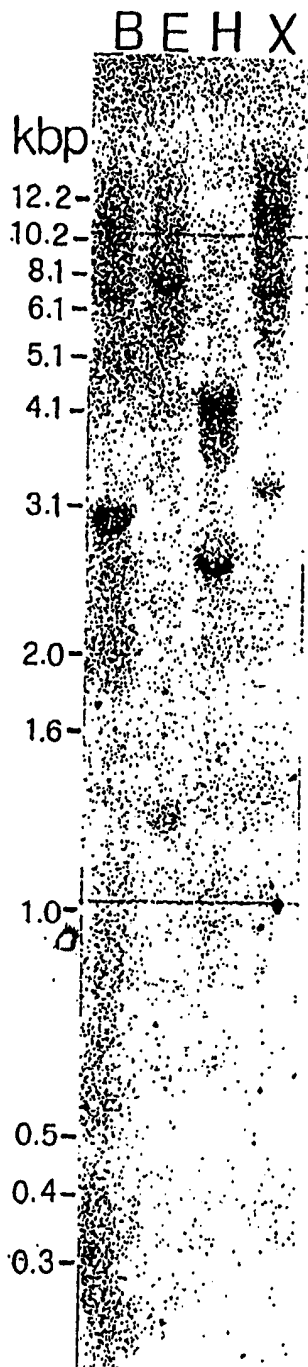


图 6

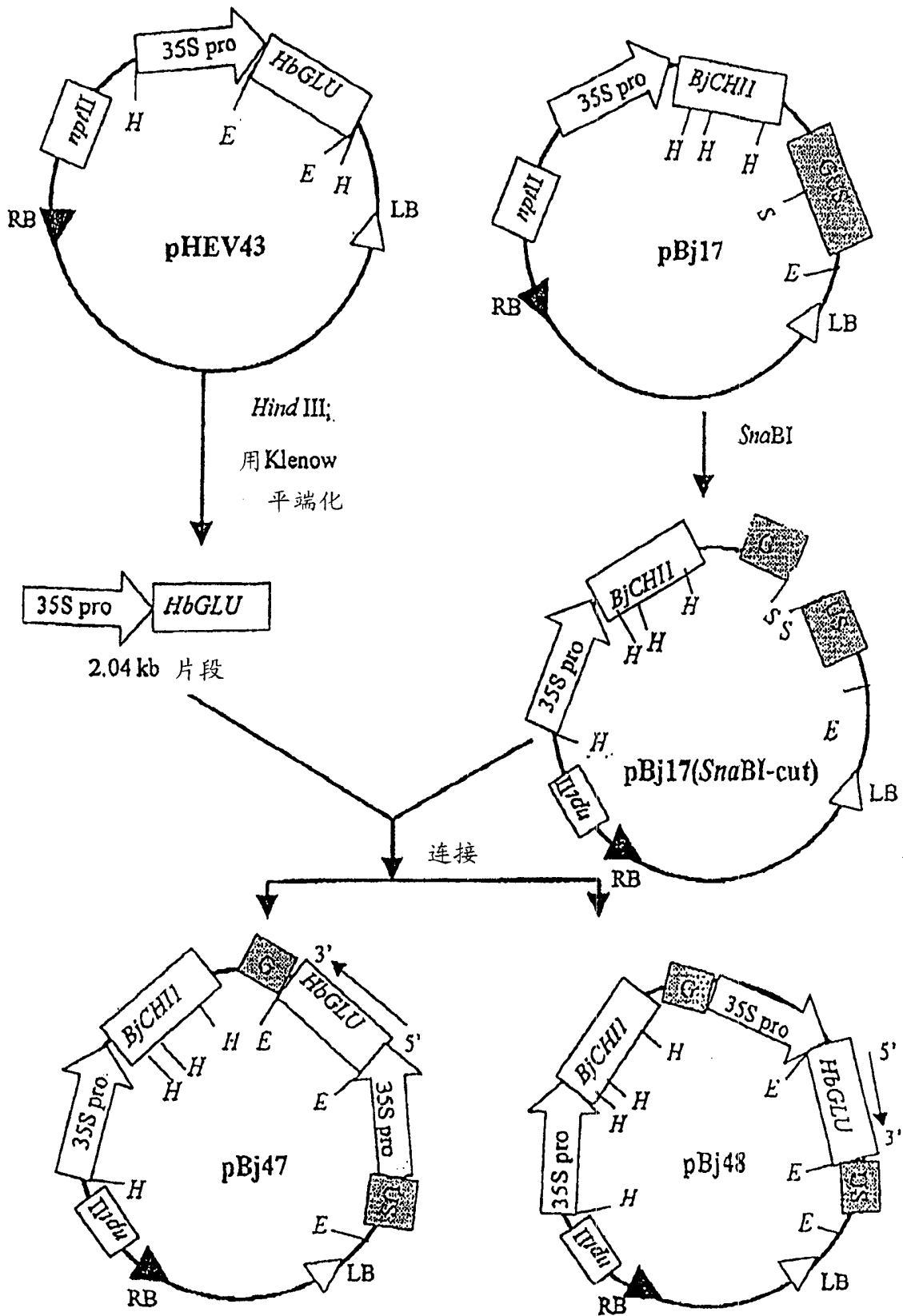


图 7



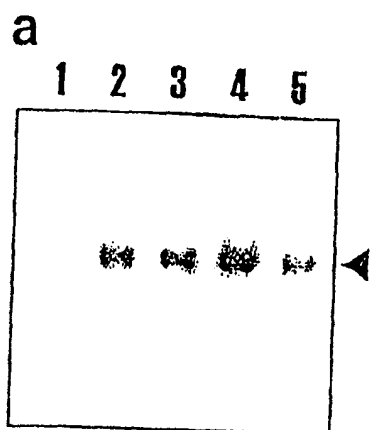


图 9A

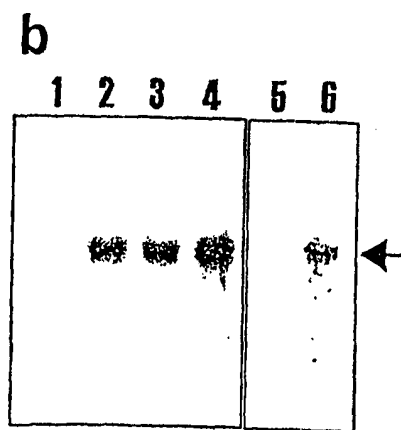


图 9B

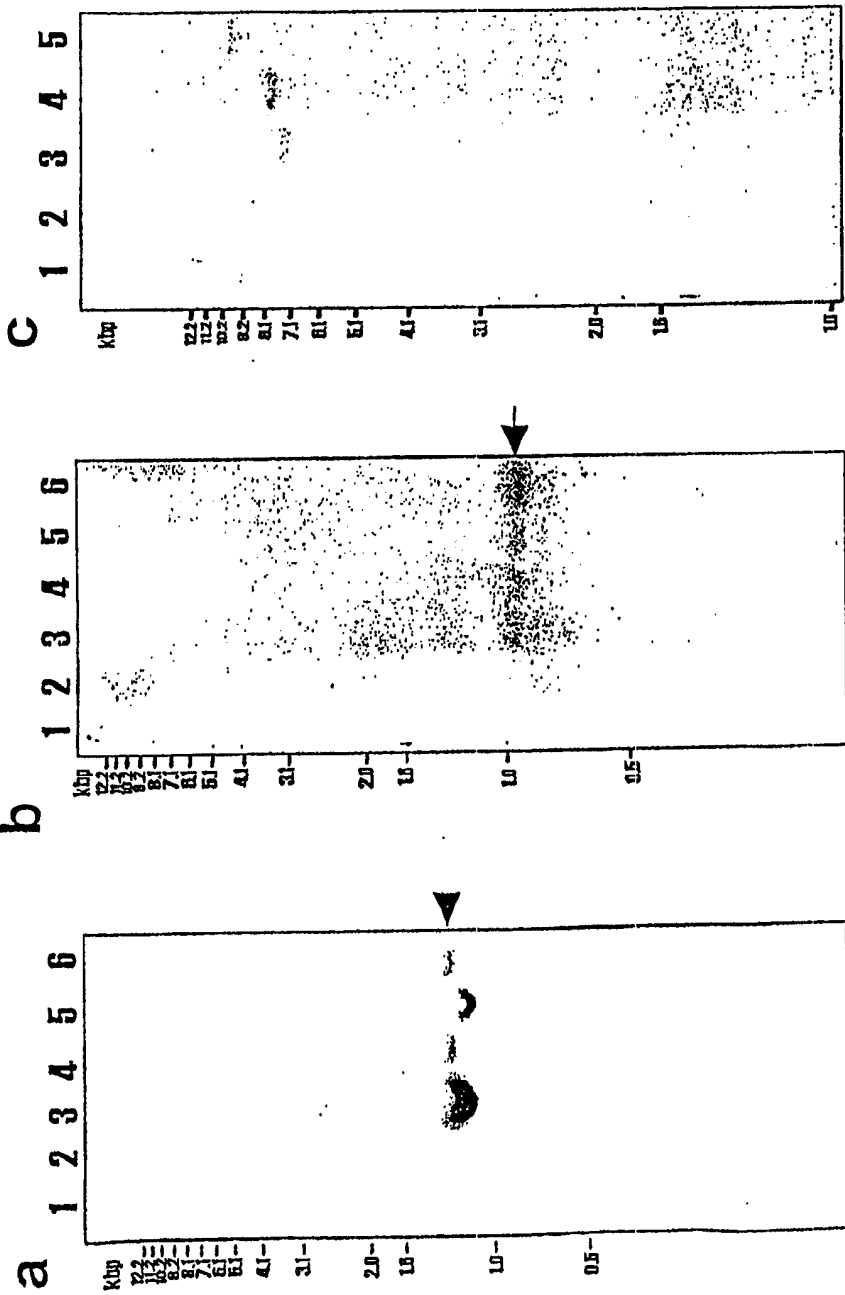


图 10A

图 10B

图 10C

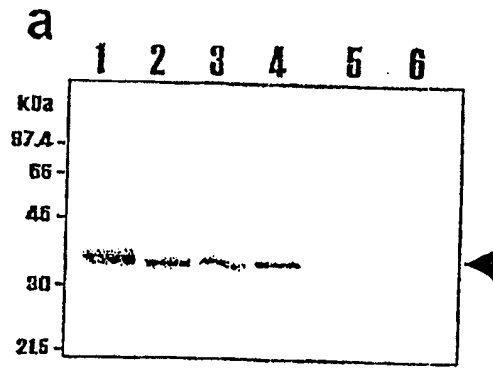


图 11A

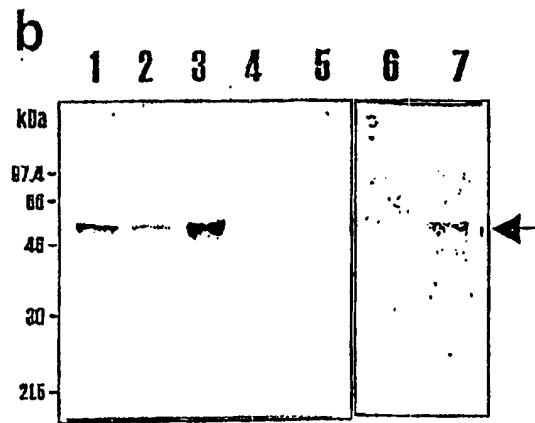


图 11B

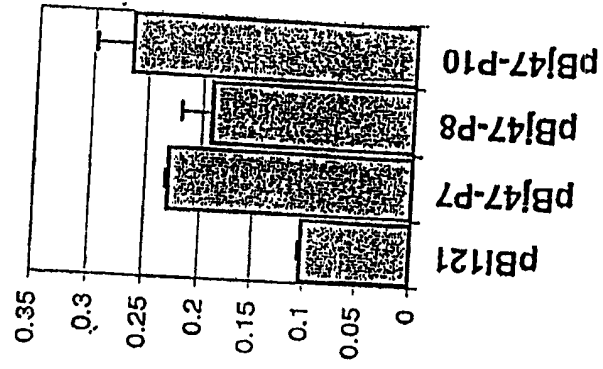


图 12B

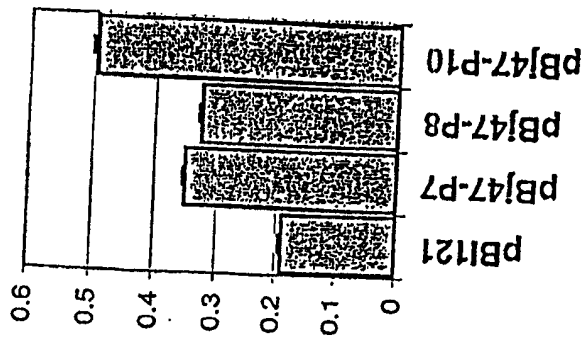


图 12A

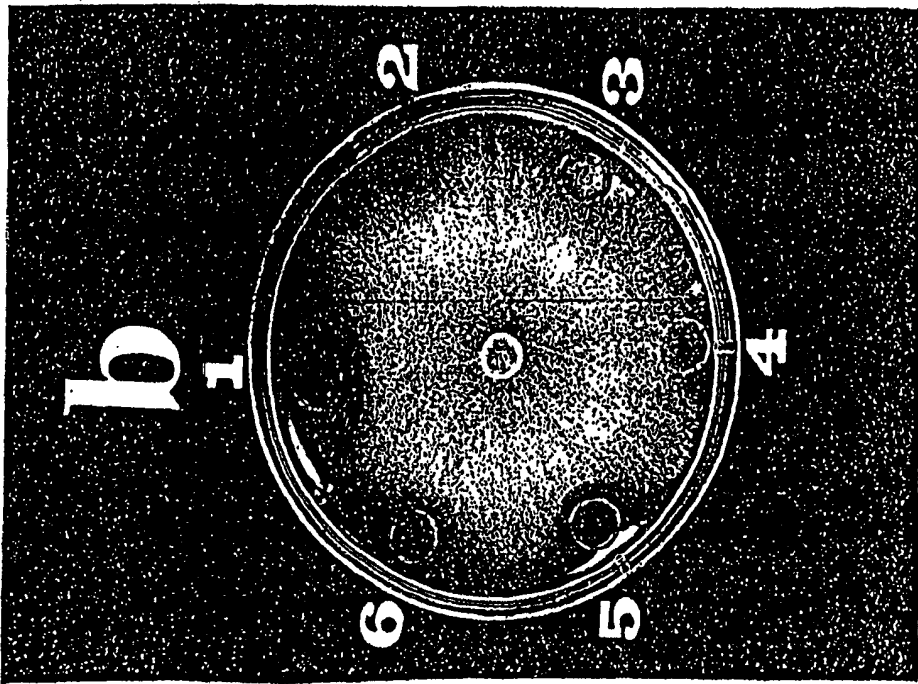


图 13B

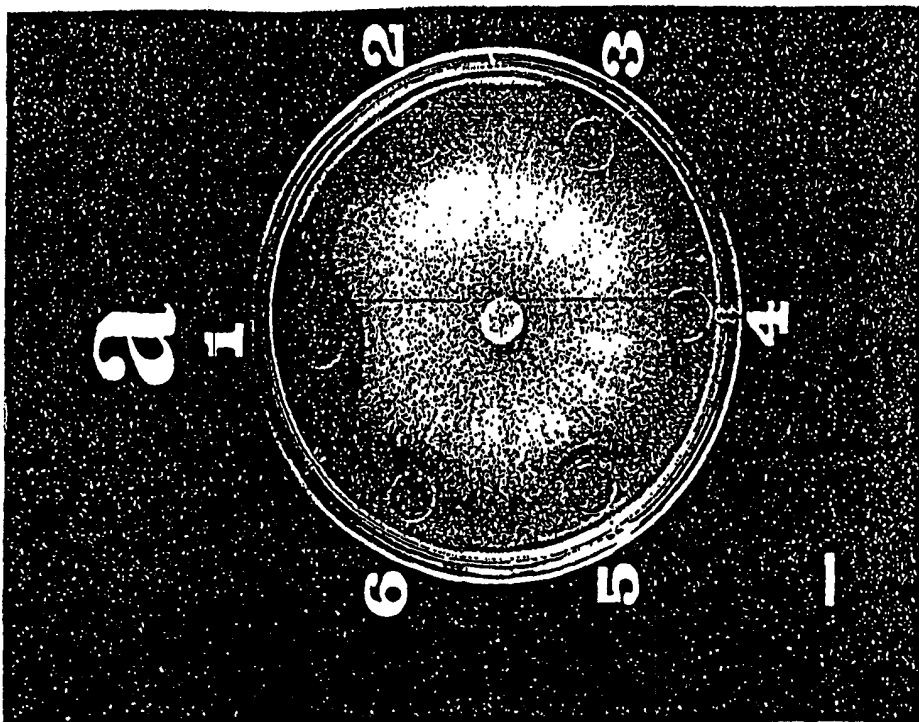


图 13A



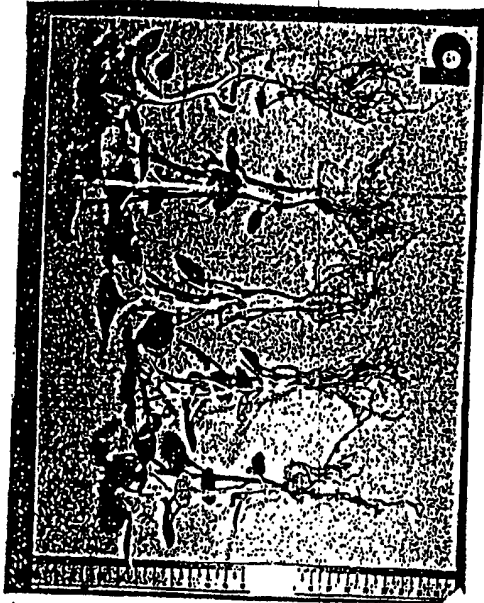


图 14B

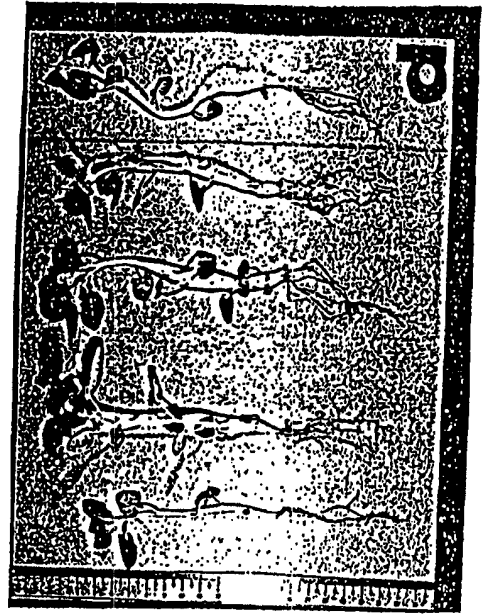


图 14D

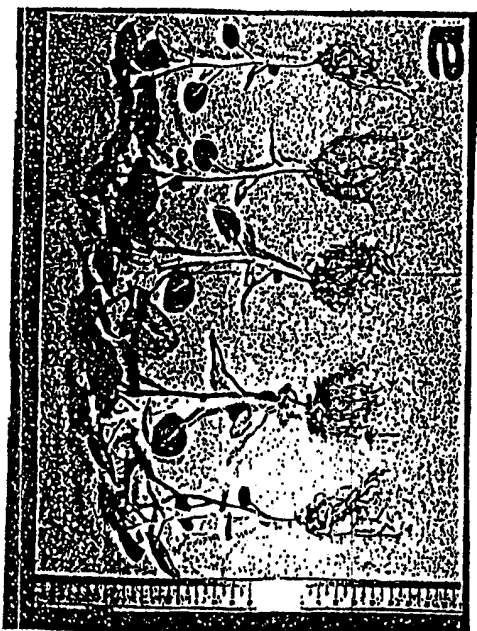


图 14A



图 14C