

圖 3

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 CATTGAACTC
 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 ATTATGGAT TTCTATCCTC TATCAGGTCA
 CCTTTACTTG CCAATATTTA TCCTTACTTT ACTTATGCTT ATAATCCAAG GGATATTTCC
 CTTCCCTATG CTTTGTTTAC TTCACCATCA GTTGTTGTGT GGGATGGTCA GCGAGGTAT
 AAGAACCCTT TTGATGCAAC GTTGGATGCA TTGTA CTCTGAGAG GGCTAGTGGT
 GGTTCCTCTGG AGGTGGTTGT TTCGGAAAGT GGCTGGCCGT CTGCCGGAGC ATTTGCTGCC
 ACATTTGACA ATGGGCGTAC TTATCTCTCA AATTTGATCC AACATGTTAA AGGAGGTACT
 CCTAAGAGGC CTAACAGAGC TATAGAGACT TACTTATTTG CCATGTTTGA TGAAAAAAG
 AAGCAACCAG AGGTTGAGAA ACACTTTGGA CTTTCTTTC CTGATAAACG GCCAAAATAT
 AATCTCAATT TTGGTGCAGA AAAGA ACTGG GATATTTCTA CTGAACACAA TGCAACAATA
 CTTTTCTTA AGAGTGATAT GTGAGATTGT GAGAATTTAA GTACTATATA TATTTCCAAT
 GTATGCATGT ATCCATGTAT TAAATAAGAG AACCTTTTCT CA

圖 5A

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

圖 5B

Hb MAISSSTSGTS-SSFPSRTTVMLLFFFAASVGIITDAQ--VGVICYGMQGN⁴¹
 Np MD..HKHIALQMAALI..GLLYS.TE.VG..S.....L..
 CII M.LCIK-NG.L--AAALV.VGLLIC.IQMIG..S-I.....KHA.
 CIII MAHLIV.LL..SVLTL.TLDF.G.--A.....R..
 CIV MALWYLENKR.LGA--A.LI.VGLLMCNIQM.G..SNI.....KIA.

Hb NLPPVSEVIALYKKSNIITRMRIYDPRRAVLEALRGSNIELILGVPNSDLQ⁹⁷
 NpA.Q.VQ...SK..R...L...Q.A.Q.....VM.....
 CII ...SDQD..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-TNPSNAKSWVQKNVRGFWSSVLFYLAVGNIESEVNRGTAWLAQFVL¹⁴⁶
 Np NIAA.....NN...R...N..PA.K.....V...T...SS.TRYL.
 CII ...D..R.NG...D.IINHFD.K.K.....V..G.N.Q--Y.P..A
 CIII NVAASQA..DT...N...NY-GN.K.....V..L.ENSQVVP-VL.
 CIV A.-A.S.I.NG...D.I.SHEPY.K.K..SI...V..S.N.Q--YS..L.

Hb PAMRNHDAIRSAGLQDQIKVSTAIIDLTLVGNISYPPSAGAFRODVRSYLD¹⁹⁶
 NpRN..S.....NN...SSV.M..I...F...Q.S..N...FI.
 CII ..Q.VYN.LAA.....TYSGILA.T...KDSI..GEEN.FIN
 CIII N...QT..SG...GN.....ETG.TTOTS...N.R.K...QFIE
 CIV H..E.VYN.LAA.....K...T..TYSG.LA.T...KDSI..EERK.FIN

Hb PIIGFLSSIRSPLLANIYPYFTYAYNPRDISLPYALFTSPSVVWVWGGQRG²⁴⁶
 Np ...VRR.N...V.....S..G.....A.N...Q..SL.
 CII ...Q..VQHNL...V...GHIF.TA.VP.S.....QOR---ANPA.
 CIII ...N..VTN.A...V.L...AI.N.A-.K.E.....SE...N.NG..
 CIV ...E..ARNNL.....GHI..TV.VP.S...NQOG---TNST.

Hb YKNLEFDATLDALYSALERASGGSLEVVVSESGWPSAGAFAT-EDNGRTY²⁹⁵
 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.FNV.II.....E.NS...-IE.AQ.

Hb LSNLIQHVK--GGTPKRPENRAIETYLFAFEDENKKQPEV-EKHFLFFPD³⁴²
 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 KRPKYNLNEG-AEKNWDISTERNATILFLKSDM³⁷⁴
 Np .Q...P.S..FSORY...A.N...AAS.I.E.
 CII Q.A..Q...N
 CIII MQ...QIS.N
 CIV RTA..Q...MYS

圖 5C

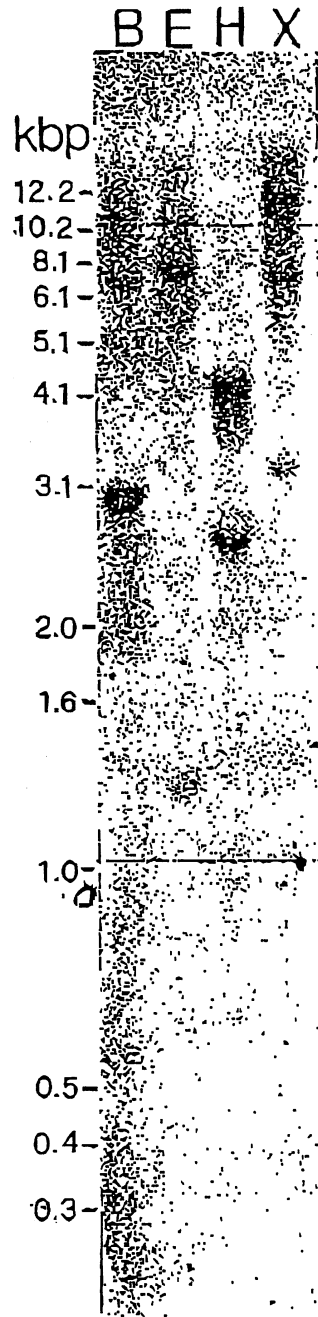


圖 6

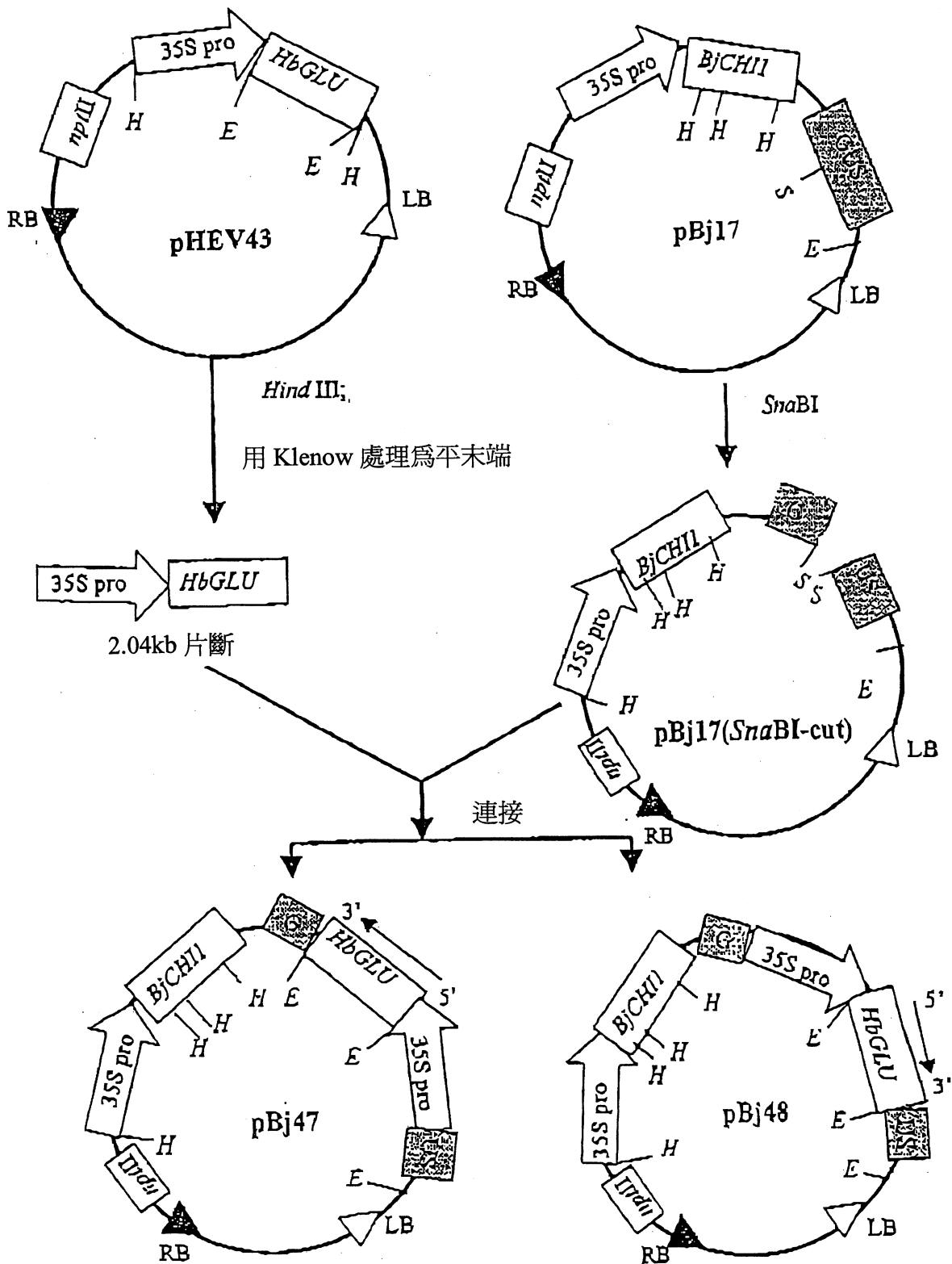


圖 7

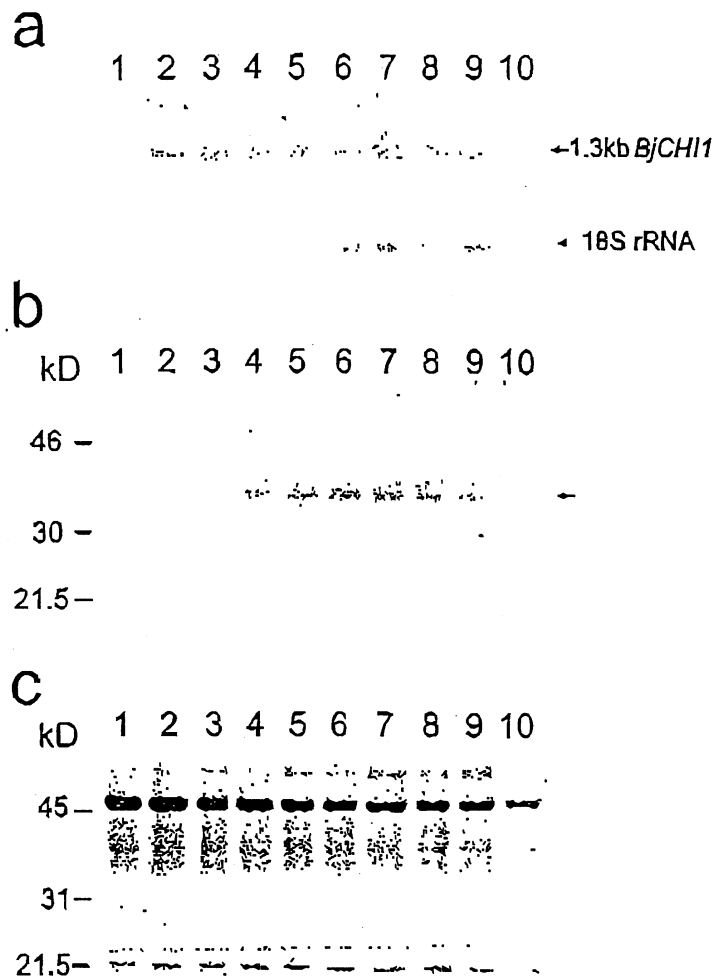


圖 8

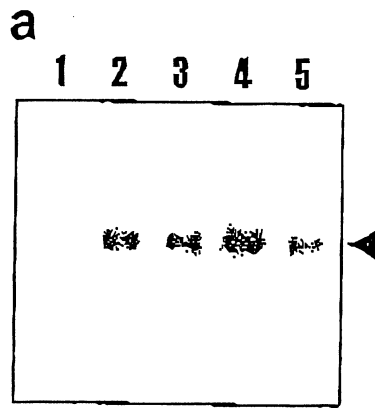


圖 9A

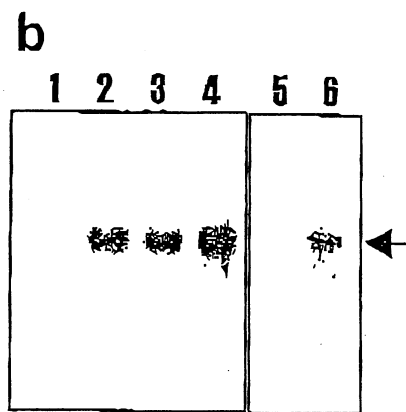


圖 9B

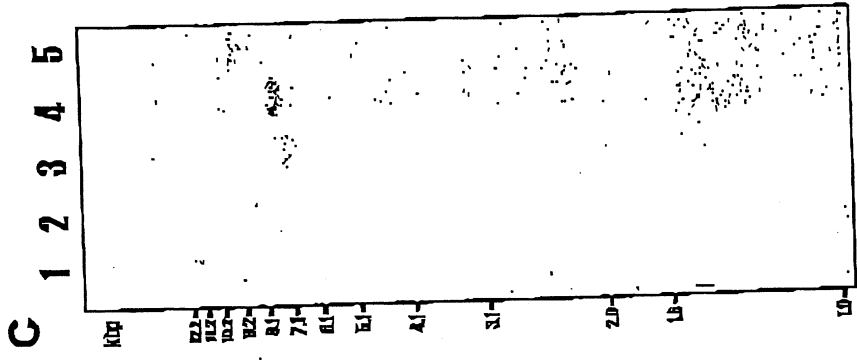


圖 10C

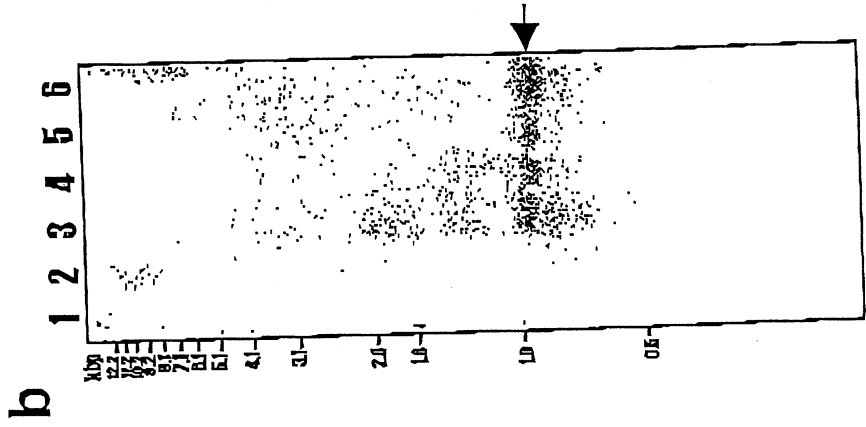


圖 10B

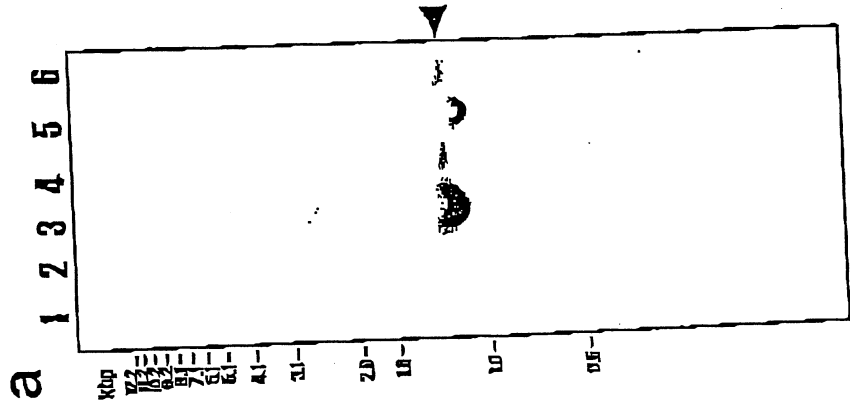


圖 10A

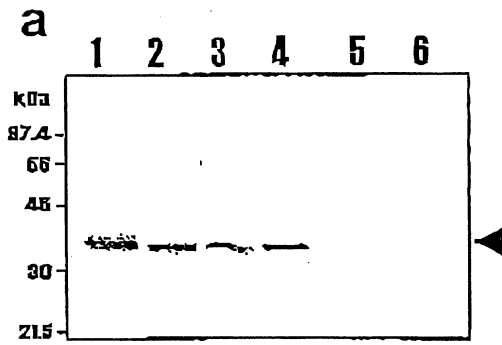


圖 11A

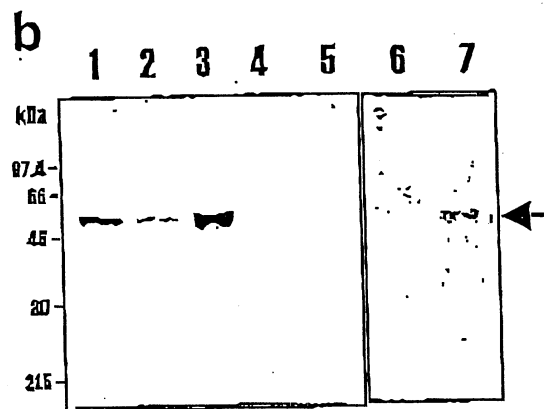


圖 11B

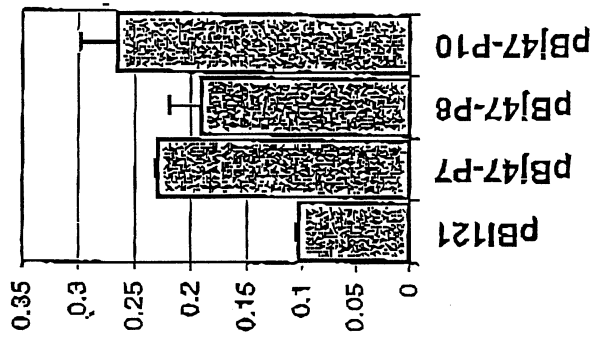


圖 12B

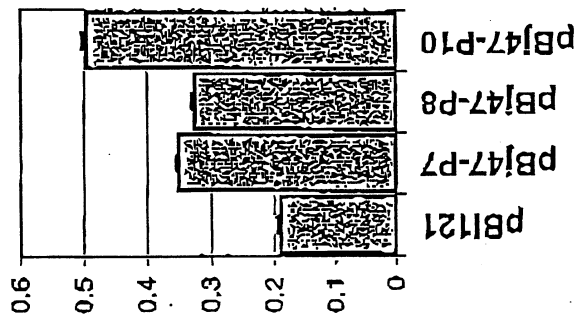


圖 12A

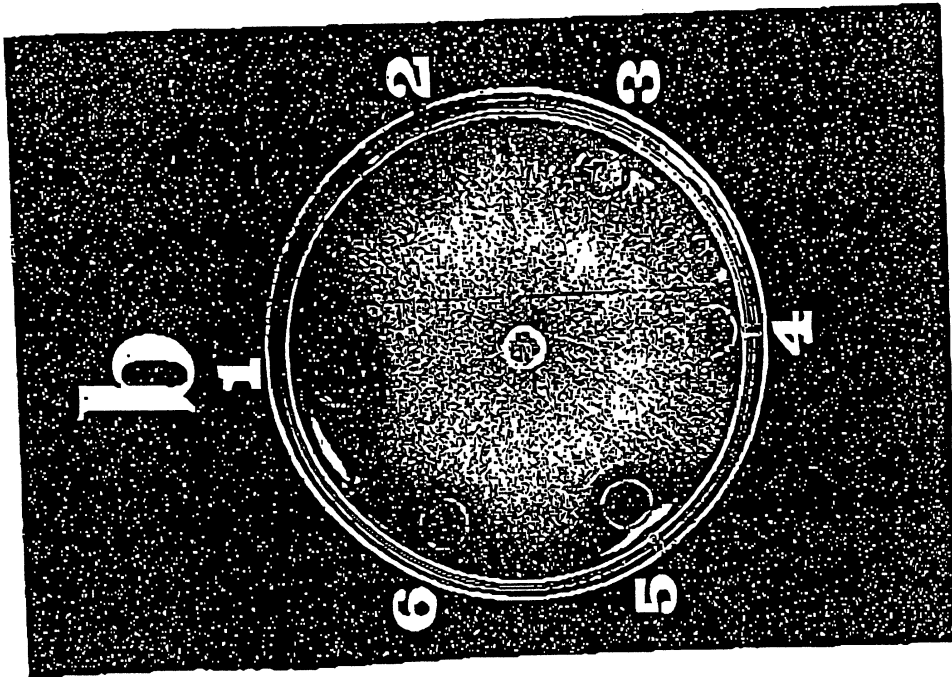


圖 13B

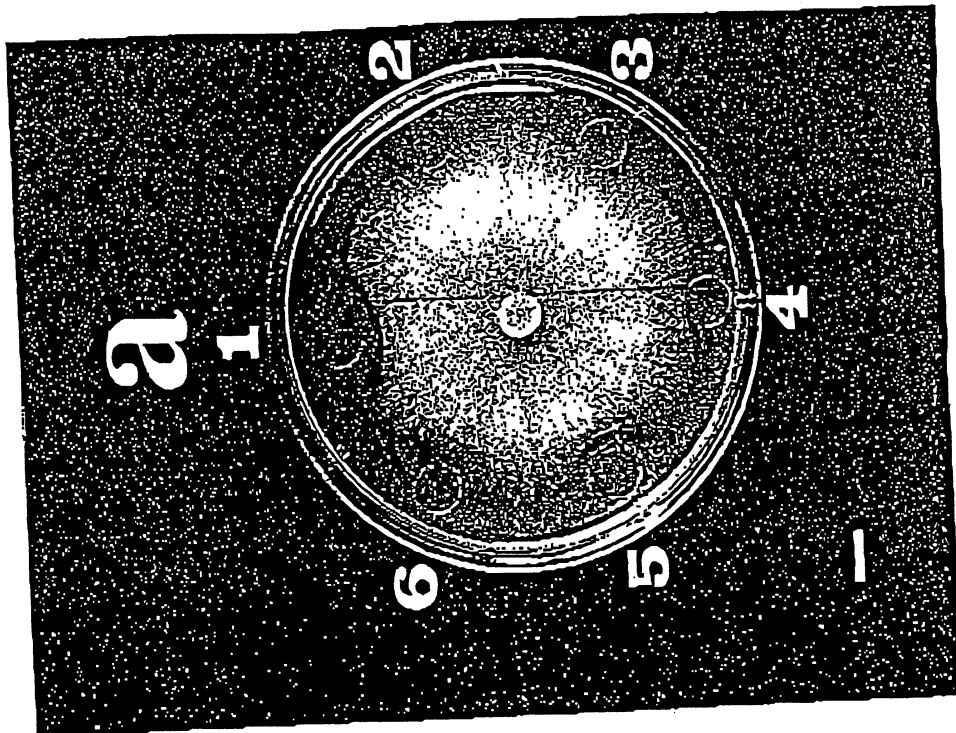


圖 13A



I265974

p2311

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：P1133086 ※IPC分類：C12N 5/00, 15/04

※ 申請日期：9/11/11

壹、發明名稱

(中文) 對真菌性疾病抗性提高的基因修飾植物及其製備方法
(英文) Genetically Modified Plants with Enhanced Resistance to Fungal Diseases and A Method of Production Thereof

貳、發明人 (共 2 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 蔡美蓮

(英文) Meelen CHYE

住居所地址：(中文) 中國香港沙灣徑 25 號譚益芳樓 1 座 2 樓 A2 室

(英文)

國籍：(中文) 中國

(英文) CHINA

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1 (如發明人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 香港大學

(英文) The University of Hong Kong

住居所或營業所地址：(中文) 中國香港特別行政區薄扶林道

(英文) Pokfulam Road, Hong Kong Special

Administrative Region, P.R. of China

國籍：(中文) 中國

(英文) CHINA

代表人：(中文) 林炳麟

簽章

(英文) P.B.L. LAM

續發明人或申請人續頁 (發明人或申請人欄位不敷使用時，請註記並使用續頁)

發明人 2

姓名：(中文) 趙開軍

(英文) Kaijun ZHAO

住居所地址：(中文) 中國北京中關村南火街 12 號中國農業科學院高層 2
號樓 2205

(英文)

國籍：(中文) 中國 (英文) CHINA

發明人 3

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

發明人 4

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

發明人 5

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

捌、聲明事項

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為：_____

本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 美國；2001/11/20；60/331,749
2. _____
3. _____

主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. 美國；2001/11/20；60/331,749
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____

主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____
2. _____
3. _____

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____
2. _____
3. _____

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____
2. _____
3. _____

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

發明所屬之技術領域

本申請涉及到基因修飾植物，特別是基因修飾馬鈴薯，通過利用載體轉形植物而使基因修飾植物對病原體的抗性增強，該載體含有一個具有兩個或多個幾丁質結合區的幾丁質酶基因和一個 β -1,3-葡聚糖酶基因，更具體的說，該載體含有一個具有兩個幾丁質結合區的蕓薹屬 (Brassica) 幾丁質酶基因和一個三葉膠樹 (Hevea) β -1,3-葡聚糖酶基因。本發明還涉及到轉形馬鈴薯植株而使馬鈴薯植株具有病原體免疫性的載體。該載體含有一個具有兩個或多個幾丁質結合區的幾丁質酶基因和一個 β -1,3-葡聚糖酶基因。本發明還涉及通過表達幾丁質酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因而製備對病原體抗性增強的植物的方法。

先前技術

作為動物，包括人的營養素以及用於生產藥品、化妝品等的原料，植物扮演著重要角色。世界人口的穩定增長導致對農作物需求的增長。該不斷增長的需求必須滿足減少的可用於耕種的土地資源，構建生長更好且對植物病原體具有更強抗性的植物品種，能夠提高現有土地資源的農作物產量。

植物受各種病原體的威脅，如真菌、細菌、病毒、昆蟲和線蟲。其中的一小部分病原體能夠成功入侵植物組織而導致疾病。特別地，馬鈴薯是一種主要的食用農作物，

其對真菌感染具有高度易感性。治療真菌疾病的一個方法是利用化學殺真菌劑，但是，該方法的費用高且會造成環境污染。以前爲了提高植物對病原體的抗性所作的嘗試是在線蟲易感性馬鈴薯株系中表達馬鈴薯 Mi-1.2 線蟲抗性基因。通過這種方法獲得的轉基因馬鈴薯株系大多數對根結線蟲 *M.javanica* strain VW4 和 *M.incognita* strain VW6 表現出抗性，但對 *M.javanica* strain VW5 不表現出抗性，因此，和野生型植株的 Mi 基因的特異性相似 (Milligan 等,1998, 植物細胞 10: 1307-1319)。

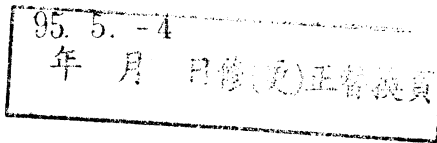
在另一個研究中，通過從表達 Avr9，即 Cf-9 誘導子的植物的基因中去除可移動元件從而啓動無活性的編碼 Cf-9 抗性基因產物的轉基因，可以誘導植物的抗性

(WO95/31564)。另外，Prf 抗性基因在馬鈴薯植株中過量表達，可以使植株對 *P.s.pathovar* tomato strain DC3000、*X.c.pv.vesicatoria* strain 56,*R.solanacearum* strain 82 細菌性病原體和 TMV 病毒性病原體的抗性增強 (Oldroyd 等.,1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 10300-10305)。

在增強植物抗性的另一個嘗試中，在馬鈴薯植株中表達葡萄糖氧化酶而產生 H_2O_2 ， H_2O_2 是植株在防禦反應的過程中通過葡萄糖氧化而產生的物質。馬鈴薯植株中 H_2O_2 含量提高顯示出對 *E.carotovora* subspecies *carotovora* 和 *P.infestans* 的抗性增強 (Wu 等,1995, The Plant Cell 7: 1357-1368)。在轉基因稻植株中表達馬鈴薯蛋白酶抑制劑 II 基因，可以使植株對大螟 (*Sesamia inferens*) 的粉紅天

牛 (pink stem borer) 幼蟲的抗性增強 (Duan 等, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 494-498)。另外, 表達豇豆胰島素抑制劑的轉基因馬鈴薯植株對 *G.pallida* 的抗性增強 (美國專利號 5,494,813)。美國專利 5,866,777 闡述了能夠破壞植物線蟲病原體進食結構的蛋白的表達, 美國專利 5,824,861 討論了在蘋果樹植株中表達溶解的蛋白。

致病相關 (PR) 蛋白包括幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶, 是由植物在感染病原體時產生。幾丁質酶水解真菌細胞細胞壁的主要成分幾丁質, 而 β -1,3-葡聚糖酶水解葡聚糖組分 (Boller 等, 1985, In: J.L. Key 等編, *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Alan R. Liss, New York, 247-262 頁; Boller, 1992, In: S.J. Gurr 等(編), *Molecular Plant Pathology Volume II, A Practical Approach*, IRL press, Oxford, 23-30 頁)。Schlumbaum 等 (1986, *Nature* 324: 365-367) 已經證實了純化的植物幾丁質酶在體外具有抗真菌的活性, 在轉基因植物中表達帶有一個幾丁質結合區的幾丁質酶可以提高它們對真菌性病原體的抗性 (Broglie 等, 1991, *Science* 254: 1194-1197; Lin 等, 1995, *Bio/Technology* 13: 686-691)。在歐洲油菜 (*Brassica napus*) 抗性栽培變種中, 通過用黑脛莖點黴 (*Phoma lingam*) 感染而誘導 ChB4 mRNA 產生, 並可在感染一天之內用 Northern 印跡分析法檢測出來, 所述 ChB4 是帶有一個幾丁質結合蛋白的幾丁質酶 (Rasmussen 等, 1992, *Plant Mol. Biol.* 20: 277-287)。而且, 幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶在



抑制真菌生長上具有協同作用 (Mauch 等., 1988, *Plant Physiol.* 88: 936-942; Zhu 等., 1994, *Bio/Technology* 12: 807-812; Jach 等., 1995, *Plant J.* 8: 97-109)。

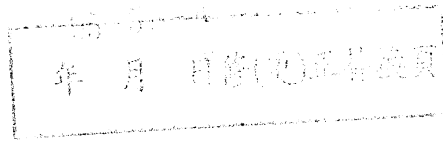
仍然需要提高植物，比如馬鈴薯，對真菌的抗性，具體的來說，需要提高馬鈴薯對土生 (soil-borne) 真菌的抗性。

在此處或說明書中其他任何部分引用參考文獻不應解釋為該文獻即相當於本發明的現有技術。

發明內容

本發明是基於本發明的發明人發現：真菌感染能夠誘導 BjCHI1 的轉錄和翻譯，所述 BjCHI1 編碼帶有雙-幾丁質結合區的幾丁質酶。幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶是裂解酶，對真菌細胞細胞壁的兩種主要碳水化合物組份——幾丁質和 β -1,3-葡聚糖具有活性。本發明的目的是通過用酶轉形植物，如農作物，特別是馬鈴薯，而使植物能夠防禦真菌，其中牽涉的酶與病原體相關碳水化合物組分的裂解，特別是與真菌細胞細胞壁的裂解有關。在本發明的一個具體實施方式中，通過共表達帶有兩個幾丁質結合區的芥菜 (*Brassica juncea*) 幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶，提供了對茄屬絲核菌 (*Rhizoctania solani*) 抗性增強的轉基因馬鈴薯植株。

本發明提供了轉基因植物，該植物含有一個基因，該基因包含啓動子，和與該啓動子可操作連接的包含有兩

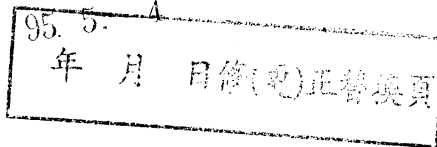


個或多個幾丁質結合區的幾丁質酶編碼序列，以及一個終止子。在具體實施方式中，幾丁質酶可以分別含有兩個、三個、四個或五個幾丁質結合區。本發明的另一個方面是含有包含編碼幾丁質酶核苷酸序列的基因的植物細胞以及其他植物部分，如含有本發明基因的轉形植物的種子。

在一個具體實施方式中，本發明提供了轉基因馬鈴薯植株，該植株含有一個包括啓動子和終止子的基因，所述啓動子可操作性地連接芥菜 (*Brassica juncea*) 幾丁質酶的編碼序列。本發明的另一個方面是含有包含編碼芥菜 (*Brassica juncea*) 幾丁質酶核苷酸序列的基因的馬鈴薯植物細胞以及其他植物部分，如含有本發明基因的轉形植物的種子。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了轉基因馬鈴薯植株，該植株含有一個包括啓動子和終止子的基因，所述啓動子可操作性地連接 β -1,3-葡聚糖酶的編碼序列。本發明的另一個方面是含有包含編碼 β -1,3-葡聚糖酶核苷酸序列的嵌合基因的馬鈴薯植物細胞以及其他植物部分，如含有本發明的基因的轉形植物的種子。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了轉基因馬鈴薯植株，該植株含有一個包含啓動子和終止子的基因，所述啓動子可操作性地連接三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的編碼序列。本發明的另一個方面是含有包含編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶核苷酸序列的嵌合基因的馬鈴薯植物細胞以及其他植物部分，如含有本發明的基因的轉形植物的種

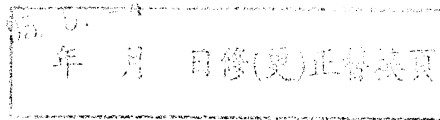


子。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了含有幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的轉基因植物。在本發明的一個具體實施方式中，幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶由不同的載體編碼。在另一個具體實施方式中，幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶由同一載體編碼。在一個具體實施方式中，幾丁質酶具有兩個或多個幾丁質結合區。在另一個具體實施方式中，幾丁質酶是 BjCHI1， β -1,3-葡聚糖酶是 HbGLU。

在本發明的具體實施方式中，本發明還提供了含有一個嵌合基因的轉基因植物，該嵌合基因包含第一啓動子，終止子，第二啓動子，和第二終止子，其中所述第一啓動子可操作性地連接芥菜 (*Brassica juncea*) 幾丁質酶編碼序列，第二啓動子可操作性地連接三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶編碼序列。在一個具體實施方式中，通過利用重組 DNA 技術導入芥菜 (*Brassica juncea*) 幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶編碼序列，提高了這種基因修飾的植物對真菌的抗性。在一個具體實施方式中，馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.cv.Desiree) 被轉形，該轉形是利用 pBI121 衍生的攜帶有 BjCHI1 和 HbGLU cDNA 的植物轉形質體，通過土壤桿菌介導而進行。

在另一個具體實施方式中，除了編碼幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的基因序列外，其他的編碼植物保護蛋白的基因序列也可以被導入到植物中。這些基因序列包括但不限於：編碼核糖體失活蛋白，植物凝血素和凝集素的基因。

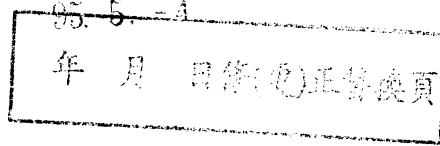


在一個具體實施方式中，可以使用絲胺酸蛋白酶抑制劑。在另一個具體實施方式中，可以使用 SaPINIIa (Xu Z.F 等，2001，Plant Molecular Biology 47: 727-738)。

在一個具體實施方式中，本發明提供了含有嵌合基因的植物細胞。該嵌合基因含有編碼幾丁質酶的核苷酸序列和編碼 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列，所述幾丁質酶含有兩個或多個幾丁質結合區。在一個具體實施方式中，該嵌合基因含有編碼幾丁質酶的核苷酸序列，其中的幾丁質酶含有四個幾丁質結合區。在一個具體實施方式中，植物細胞對昆蟲或對細菌或對兩者都有抗性。在一個具體實施方式中，核苷酸序列編碼芥菜幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了一種提高植物對病原體抗性的方法，該方法包括以下步驟：向植物基因組中導入編碼含有兩個或多個幾丁質結合區的幾丁質酶的核苷酸序列，然後使植物再生，從而得到基因組發生改變的植株。在一個具體實施方式中，幾丁質酶是在合適的啟動子和合適的終止子指導之下的芥菜幾丁質酶。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了一種提高植物對病原體抗性的方法，該方法包括以下步驟：向植物基因組中導入在適當啟動子和適當終止子指導之下的編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列，然後使植物再生，從而得到基因組發生改變的植株。在一個具體實施方式中，葡聚糖酶是在合適的啟動子和合適的終止子指導之下



的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶。

在一個具體實施方式中，本發明還提供了一種提高植物對病原體抗性的方法，該方法包括以下步驟：向植物基因組中導入在適當啓動子和終止子指導之下的編碼芥菜幾丁質酶和在合適的啓動子和終止子指導之下編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列，然後使之再生從而得到基因組發生改變的植物。

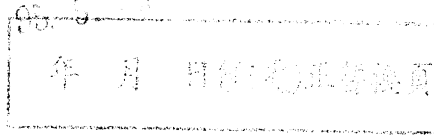
爲了更好地理解 and 實施本發明，下面示例性地列附圖作爲參考。

實施方式

病原體抗性是植物的一個重要的屬性，也是植物特別是農作物保護的一個有用工具。本發明中，術語“植物”包括整個植物體、植物的部分、單個的植物細胞、植物細胞群（如培養的植物細胞）及其後代。在本發明中，術語“增強”用來描述植物對病原體抗性的增加，其包括對病原體沒有抗性或有部分抗性或基本有抗性的植株的抗性的增加。

植物病原體包括，但不限於細菌、病毒、真菌、線蟲和昆蟲。病原體可以感染植株並使其受到嚴重的傷害，甚至死亡。感染後，植物可以針對病原體起始保護反應，如過敏反應，但這要依賴於該植物能否識別病原體而定。

各種種類的病原體會發生改變，例如，發生突變。而且，可能會產生植物種以前沒有遇到過的新病原體。例如，

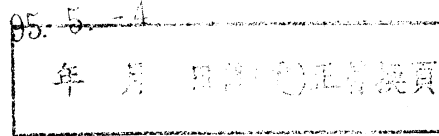


當一個植株（例如農作物、水果、蔬菜等）被引入到一個大陸（例如通過進口），該植株就可能易受到其以前不曾遇到過的病原體感染。

選殖編碼芥菜幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶基因的核苷酸

編碼含有兩個幾丁質結合區的幾丁質酶的芥菜 cDNA 的分離

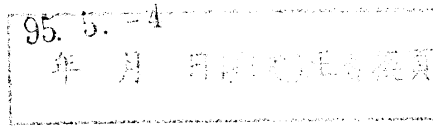
用 ^{32}P 標記的 PCR 製備的鼠耳芥屬 (*Arabidopsis*) 鹼性幾丁質酶探針，在擴增了的芥菜 cDNA 文庫中篩選幾丁質酶選殖株 (Samac 等, 1990, *Plant Physiol* 93: 907-914)，得到 5 個假定的陽性。核酸序列分析表明其中的三個有 1.3kb 的 cDNA，稱之為 BjCHI1，另外的兩個是非全長 cDNA。BjCHI1 cDNA 由 3bp 的 5'非翻譯區、1200bp 的翻譯區、86bp 3'非翻譯區和 poly(A)+尾構成 (圖 1a)。一個含有 400 個胺基酸的開放閱讀框編碼與植物 Chia1 幾丁質酶同源的預測的 M_r 42774 蛋白。有趣的是，該 cDNA 含有兩個 120bp 的重複序列 (核苷 67-186 和 220-339，圖 1a)，編碼兩個幾丁質結合區，這兩個結合區由 11 個胺基酸の間隔子連接，這兩個重複序列有 7 個核苷不同，因此有兩個胺基酸發生改變。33 個胺基酸的連接區將第二個幾丁質結合區與幾丁質酶催化區連接起來 (圖 1b)。所有其他以前鑑定的幾丁質酶都只含有一個幾丁質結合區。該幾丁質結合區對於幾丁質的結合是必需的 (Iseli 等, 1993, *Plant*



Physiol. 103: 221-226), 細胞凝集需要至少兩個這樣的結合區 (Peumans 等, 1995, Plant Physiol. 109: 347-352)。幾丁質結合區的產生並不限於幾丁質酶。在植物凝集素中也存在這種區域, 如橡膠蛋白, 一種來源於橡膠乳汁的 4.7kDa 的蛋白 (Van Parijs 等., 1991, Planta 183: 258-264), 也含有一個幾丁質結合區。BjCHI1 是唯一一個含有兩個幾丁質結合區的幾丁質酶, 本發明已經使用畢赤氏酵母表達的 BjCHI1 證明, 含有兩個結合區可以賦予凝集的屬性 (見下文部分)。以前沒有報導過具有凝集屬性的幾丁質酶。

BjCHI1 和其他幾丁質酶的比較

圖 2A 顯示了 BjCHI1 和其他有代表性的不同幾丁質酶種類的序列圖, 這些不同種類包括: 來源於煙草 (*Nicotiana tabacum*) 的 Chia1 (Shinshi 等., 1990, Plant Mol Biol 14: 357-368)、來源於煙草 (*N. tabacum*) 的 Chia2 (Payne 等., 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87: 98-102)、來源於 *P. vulgaris* 的 Chia4 (Margis-Pinheiro 等., 1991, Plant Mol Biol 17: 243-253)、來源於 *U. dioica* (Lerner 等., 1992, J Biol Chem 267: 11085-11091) 和來源於 *B. vulgaris* 的 Chia6 (Berglund 等., 1995, Plant Mol Biol 27: 211-216)。來源於煙草 (*N. tabacum*) 的幾丁質酶代表 Chia1 和 Chia2 與 BjCHI1 具有最高的同源性。對 86 種植物幾丁質酶進行分析表明在 Chia 類中有 8 個胺基酸是保守的 (Levorson 等., 1997, Plant Mol Biol Repr 15: 122-133)。其中有 7 個



胺基酸在 BjCHI1 中是保守的 (E-201、A-203、T-213、C-230、N-270、P-286、G-377, 圖 2A)。第 8 個胺基酸殘基 (Q) 在 BjCHI1 中被 M-264 取代 (圖 2A)。雖然 BjCHI1 與煙草 Chia1 (62.0%) 和 Chia2 (54.8%) 具有高度的同源性, 但是 BjCHI1 含有兩個幾丁質結合區, 而 Chia1 只有一個幾丁質結合區, Chia2 沒有幾丁質結合區。

與來自其他植物的 Chia1 幾丁質酶進行比較, BjCHI1 與歐洲油菜 (*B.napus*) 具有 72.7% 的同源性 (Hamel 等, 1993, *Plant Physiol* 101: 1403), 與 *A.thaliana* 具有 70.2% 的同源性 (Samac 等, 1990, *Plant Physiol* 93: 907-914), 與 *P.vulgaris* 具有 60.9% 的同源性 (Broglie 等, 1986, *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6820-6824), 與稻 (*Oryza sativa*) 有 51.8% 的同源性 (Zhu 等., 1994, *Bio Technology* 12:807-812)。BjCHI1 也含有在 Chia1 幾丁質酶中高度保守的序列 “NYNYG” (胺基酸 268-272, 圖 2) (Verburg 等, 1992, *J Biol Chem* 267: 3886-3893)。研究玉蜀黍 (*Zea mays*) 幾丁質酶的催化位點表明, 用 1-乙烷基-3-(3-二甲胺丙基) 碳化二亞胺 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 修飾 “NYNYG” 序列中的第一個 Y 可以使酶活性喪失。 (verburg 等, 1992)。

兩個幾丁質結合區的存在可以將 BjCHI1 與 Chia5 視為一類物質, 已知的 Chia5 唯一實例是大蕁麻 (*Urtica dioica*) 凝集素, 即 UDA1 (Levorson 等, 1997)。UDA1 是具有 327 個胺基酸的大蕁麻 (*U.dioica*) 凝集素的前體 (Lerner 和

Raikhel, 1992, J Biol Chem 267: 11085-11091), 具有昆蟲阻營養活性 (Chrispeels 等, 1991, Plant Cell 3: 1-9)。該前體由一個信號肽、兩個幾丁質結合區和一個幾丁質催化區組成。成熟的凝集素為 8.5kD, 由於幾丁質酶區被翻譯後切除, 因此僅由含有兩個幾丁質結合區的 86 個胺基酸構成 (Lerner 和 Raikhel, 1992)。雖然 BjCHI1 和 UDA1 結構相似, 但它們僅只有 36.9% 的同一性 (圖 2A)。根據 Beintema 的方法 (Beintema, 1994, FEBS letters 350: 159-163) 比較幾丁質酶中的二硫鍵, 表明 BjCHI1、Chia1 和 UDA1 之間的相似性 (圖 2B): Chia1 的 C 末端二硫鍵在 UDA1 中不存在, 在 BjCHI1 中存在。和 UDA1 不同, BjCHI1 的連接部位和間隔子中富含脯胺酸, 分別有 63.6% 和 54.5% 的脯胺酸殘基。Chia6 幾丁質酶 (Levorson 等., 1997) 的唯一成員, *B.vulgaris* Ch1 含有有 128 個參基的連接區, 其中 70.3% 是脯胺酸 (Berglund 等., 1995, Plant Mol Biol 27: 211-216)。BjCHI1 和 Ch1 都含有 “PPTP” 重複序列 (圖 2A)。但是, Ch1 只有半個幾丁質結合區, 它們只有 45.2% 的同一性。

在 BjCH1 中兩個幾丁質結合區的存在促使本發明的發明人探究 BjCHI1 具有凝集屬性的可能性。相應地, 根據 Does 等的方法 (1999, Plant Physiol. 120: 421-431) 用 FPLC 純化的畢赤氏酵母 (*Pichia*) 表達的 BjCHJI1 進行凝集試驗。分別使用含有一個和不含有幾丁質結合區的 BjCHI2 和 BjCHI3 作為對照。簡單地說, 利用酵母表達載體 pPIC9K

(invetrogen)在 *Pichia pastoris* 中表達 BjCHI1、BjCHI2 和 BjCHI3。將 BjCHI1、BjCHI2 和 BjCHI3 選殖到 pPIC9K 的分泌信號肽框內，以使融合蛋白能被分泌到生長培養基中。BjCHI1 含有位於天然蛋白胺基酸位點 18–393 處的兩個幾丁質結合區 (Zhao 和 Chye, 1999, *Plant Mol Biol*, 40: 1009-1018)，在 pPIC9K 中與分泌信號肽融合。BjCHI2 僅含有一個幾丁質結合區，而 BjCHI3 不含有幾丁質結合區。將 BjCHI1、BjCHI2 和 BjCHI3 的 DNA 選殖到載體 pPIC9K 的 EcoRI 和 NotI 位點，針對此目的，在 PCR 中使用下列引子：C1 (正向) 引子 5'CTGAATTCTCCTCCGGTGAGCAATGCG3' (SEQ ID NO:5)；C21(正向)引子 5'CTGAATTCGGGGATCTTTCTGGCATC3' (SEQ ID NO:6)；和 C2 (反向) 引子 5'GCGACTGCGGCCGCGTTACTACCTTCATTAACG3' (SEQ ID NO:7)。正向引子上設計了一個 EcoRI 位點，反向引子上設計了一個 NotI 位點，用 C1 和 C2 引子以 pBj17 作為模板進行 PCR 擴增編碼 BjCHI1 的 1.1kb 的 DNA，用 C1 和 C2 引子以 pBj28 作為模板進行 PCR 擴增編碼 BjCHI2 的 0.95kb 的 DNA，質體 pBj28 在 Fung 等的文章中已經被描述 (2002, *Plant Molecular Biology* 50: 283–294)。用 C21 和 C2 引子以 pBj17 作為模板進行 PCR 擴增獲得編碼 BjCHI3 的 0.74kb 的 DNA。將 PCR 擴增片段用 EcoRI 和 NotI 消化，選殖到 pPIC9K 的 EcoRI 和 NotI 位點。在用於酵母轉形前 DNA 測序分析 pPIC9K 中的插入片段。畢赤氏

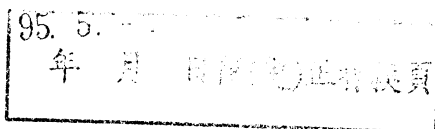
95. 5.
年 月 日 (電) 頁

酵母 (*Pichia*) 表達的蛋白被分泌到生長培養基中，根據 Invitrogen 介紹的方法用 65% 的硫化銨沈澱，接著用 FPLC 純化粗提取物，在進行凝集分析前，利用抗 BjCHI1 的抗體通過 Western 印跡分析檢測 FPLC 純化蛋白。由於在製備抗 BjCHI1 多株抗體中所使用的肽能被 BjCHI2 和 BjCHI3 滯留，因此 BjCHI1 的這些衍生物會可這些抗體發生交叉反應。

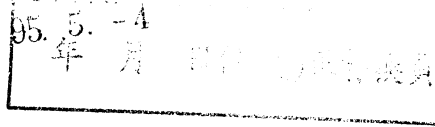
在凝集反應分析過程中，不同量 (0.12、0.25、0.5、2、4、8、16、24 μ g) 的畢赤氏酵母表達培養的 FPLC 純化蛋白 (BjCHI 1、BjCHI2 和 BjCHI3) 被加到微量滴定板的各個孔的 30ul 的胰島素處理過的兔血球蛋白中 (見圖 3)，在每個孔中加入 5 倍濃度的磷酸鹽使其終濃度為 60ul，在對照孔中，用磷酸鹽緩衝溶液代替蛋白質。

根據其凝集屬性，結果表明 BjCHI1 與含有至少兩個幾丁質結合區的殺蟲蛋白相似，該殺蟲蛋白包括小麥胚芽凝集素、大蓴麻 (*Urtica dioica*) 凝集素和來源於馬鈴薯、稻和曼陀羅 (*Datura*) 的外源凝集素 (Chrispeels 等，1991，見上文)。因為已經證明帶有兩個或多個幾丁質結合區的植物外源凝集素可以通過與細菌及真菌表面和食草昆蟲的外殼和腸內腔的複合糖結合而使細胞凝集 (Peumans 等，1995，見上文)。因此，BjCHI1 的抗微生物和抗昆蟲功能是有可能的，可以作進一步的研究。

芥菜中 BjCHI1 的基因組結構



Southern 印跡分析被用來檢測芥菜中 BjCHI1 相關基因的存在。將 EcoRI、HindII、HindIII 和 XbaI 消化的基因組 DNA 與 BjCHI1cDNA 雜交，僅僅 HindIII 在 cDNA 內剪切（圖 1A）。檢測 6-9 各雜交帶（圖 4A，第 1-4 道）顯示了在異四倍體芥菜、*B.nigra* 和 薹 薹（*B.campestris*）雜交體中的相關基因，這些帶應該是編碼幾丁質酶或含有幾丁質結合區的蛋白質的基因。進一步在 65°C 下洗脫印跡又顯現了一些帶，第 6-8 道中的帶（圖 4A），這些帶可能是 BjCHI1 特異性的。為了研究帶有一個幾丁質結合區的幾丁質酶的存在，利用定位引子進行 PCR，引子 P1 和編碼第一幾丁質結合區的區域相鄰，而 P2 在編碼幾丁質酶的區域中，該編碼幾丁質酶的區域顯示了與其他幾丁質酶的同源性（圖 1A，圖 2）。利用這些引子進行的 BjCHI1 PCR 擴增得到的產物如果在其中沒有內含子為 0.5kb。鼠耳芥屬（*Arabidopsis*）幾丁質酶基因（Samac 等，1990）的第一個內含子位於 P2 後的相應區域，將瓊脂糖凝膠電泳得到的 0.5kb 的產物（圖 4B）和 0.35kb 的弱勢帶（圖 4C）與 BjCHI1 的 cDNA 雜交以進行 Southern 印跡分析。其中的這個較小的帶表明含有一個幾丁質結合區的相關幾丁質酶的存在，由於引子的 BjCHI1 特異性，因此該帶較弱。相反地，用引子 P2 和 P3 PCR 擴增 BjCHI1，產生一個單一的 0.35kb 的帶（圖 4B 和 C，第 2 道），P3，位於編碼間隔子的區域（圖 1A），是 BjCHI1 特異性的，適合於在 RT-PCR 中檢測 BjCHI1 特異性 mRNA。



三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶基因的分離

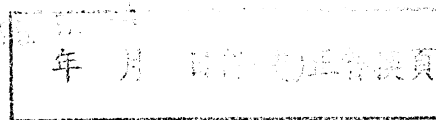
編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的白花丹葉煙草 (*N. plumbaginifolia*) cDNA、*gnl* Cdna (De Loose 等, 1998, *Gene* 70: 12-23) 被作為異源雜交探針以從三葉膠樹中分離相應的 cDNA 選殖株, 42°C 下在含有 30% 的甲醯胺的溶液中利用原位平板雜交來檢測三葉膠樹乳汁的 cDNA 文庫, 分離出幾種編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的三葉膠樹 cDNA。對 1.2kb 和 1.1kb 的最長的兩個選殖株進行核酸序列分析表明他們屬於同一個類別, 1.2kb 的全長 cDNA 含有一個 40bp 的 5'非轉錄區、一個 1125bp 的編碼區、一個 76bp 的 3'非轉錄區和一個 poly(A) 尾巴。其中的編碼區編碼一個 374 各胺基酸的鹼性蛋白, 即為預期的 Mr41305。

三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列與白花丹葉煙草 (*N. plumbaginifolia*) *gnl* cDNA 的核苷酸序列表現出 68% 的核酸序列同源性, 比較三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的預測胺基酸序列和由 *gnl* 編碼的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的胺基酸序列, 有 66% 的胺基酸是一致的 (圖 5C)。三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶與 II 型 (煙草 PR-N(Linthorst 等., 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8756-8760)), III 型 (煙草 ec321391 (Payne 等., 1990, *Plant Mol Biol* 15: 797-808)), IV 型 (煙草 sp41a (Ori 等. Membo J, 1990, 9: 3429-3426)) 分別有 54%、60%、51% 的胺基酸同一性 (圖

5C)。

三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶

分析 I 型 三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的前蛋白，在蛋白質轉移到液泡的過程中或之後，其 N 末端延伸區和 C 末端延伸區被切除 (Shinshi 等，1988, Proc Natl Acad Sci USA 85:5541-5545)。在三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的胺基酸序列中存在 N 末端延伸區 (胺基酸位點 1-36) 和 C 末端延伸區 (胺基酸位點 353-374) 進一步證明其屬於 I 型 三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶 (圖 5C)。三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 N 末端延伸區含有一個富含絲胺酸和蘇胺酸的區域 (胺基酸位元點 4-19)，接著是疏水性區域 (胺基酸位元點 22-29) (圖 5C)。雖然三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 N 末端和編碼三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 gn1 之間的胺基酸序列同源性不高，但是他們都含有一個疏水性區域 (Von Heijine 等，1985, J. Mol. Biol. 184: 99-105)，該疏水性區域是典型的信號肽，與蛋白質定位到液泡有關。令人感興趣的是，負責將蛋白定位到液泡的 barley aleurain 前肽的 N 末端序列液富含絲胺酸位點 (Holwerda 等，1992, Plant Cell 4: 307-318)。比較三葉膠樹和白話丹葉煙草的 C 末端延伸區表明在胺基酸序列和 N 糖基化位點 (三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的胺基酸位點 364) 處是保守的，三葉膠樹的 C 末端延伸區，特別是胺基酸位點 365-370 處富含疏水性胺基酸。已經證明，在羧基延伸前體碳中疏水/酸性基團結構在



形成一種信號方面優於特定的胺基酸序列 (Nakamura 等 , 1993, *Plant Physiol* 101: 1-5) , 已經證明在處理過程中三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 I 型異構體的 C 末端延伸區和 N-糖基被除去 (Shinshi 等 , 1998) 。

三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的基因組的結構

本發明的發明人分離的產乳菌絲特異性 cDNA 被用於基因組的 Southern 印跡分析以研究三葉膠樹中的 β -1,3-葡聚糖酶家族基因的存在。根據 Dellaporta 等 , 1983, *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21 中的方法從幼葉中分離得到基因組 DNA , 整個基因組用 BamHI、EcoRI、HindII 和 XbaI 酶切 , 凝膠電泳和印跡分析。利用 1.2kb 的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶基因探針進行的 Southern 已經分析表明有 2-4 各消化的雜交帶(圖 6) , 這個結果表明在三葉膠樹中存在 β -1,3-葡聚糖酶的低拷貝家族基因。

用已知的技術也可以分離其他的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶 , 選殖芥菜幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶蛋白特異性的 cDNA 或基因組 DNA 或核酸 , 用不同的方法測序 , 如雙脫氧鏈中止法測序 , 參見 Sambrook 等的方法。

用於本發明的核苷酸包括含有本發明的 DNA 的多核苷酸 , 還包括任何編碼相連接的功能性幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的核酸序列以及編碼開發讀框 (ORF) 的核酸序列 , 該開放讀框在高度嚴謹條件下可以和本發明的 DNA 的互補序列雜交。例如 , 但不限於這些例子 , 高度嚴格的雜交

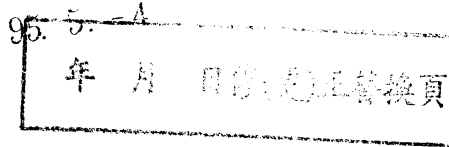
條件如下：與濾紙結合的 DNA 在含有 50% 的去離子甲醯胺、6×SSC、5×Denhardt、1% SDS、100 μ g/ml 變性鮭魚精子 DNA 的溶液中進行，42°C 過夜（大約 4–16 小時），在 65°C 下用 0.1×SSC、0.1% SDS 清洗（Ausubel F.M. 等編，1989，*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc, 和 John Wiley & Sons, Inc., New York），得到一個功能上等同的基因產物。

對於核苷酸探針，例如但不限於，高度嚴謹條件是：在 37°C（針對 14 個鹼基的核苷）、48°C（針對 17 個鹼基的核苷）、55°C（針對 20 個鹼基的核苷）、60°C（針對 23 個鹼基的核苷）下用 6×SSC/0.05% 磷酸鈉清洗。

其他的可用於本發明的核苷酸包括在中度嚴謹條件下可以與編碼幾丁質酶或 β -1,3-葡聚糖酶的 DNA 序列的互補序列雜交的任何核苷酸序列。例如，但不限於，該中度嚴謹條件包括在 42°C 下用 0.2×SSC/0.1% SDS 清洗（ausubeldeng, 1989, 見上文）。

其他的可用於本發明的核苷酸包括在低嚴謹條件下可以與編碼幾丁質酶或 β -1,3-葡聚糖酶的 DNA 序列的互補序列雜交的任何核苷酸序列。例如，但不限於，在 Shilo 和 Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6789-6792 中描述的嚴謹條件的方法。

另外，本發明還可以使用幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的變體，該變體可以包括一個或多個酶胺基酸序列的改變，例如，與野生型酶比較，通過插入、替換或刪除一個



或多個胺基酸的方式。任何改變都不會使酶的功能喪失，雖然根據改變的性質不同，該改變可能會增強或減弱其能力。優選的，該胺基酸的改變是保守的。

在各個實施方式中，幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶、其片段、變體、類似物或衍生物可以作為一個融合蛋白或嵌合蛋白產物（包括通過一個肽鍵與異源蛋白序列（不同蛋白的）相連接的酶、其片段、類似物或衍生物）而表達。可以利用本領域已知的方法將編碼目標胺基酸序列的適當核苷酸序列彼此連接到合適的編碼框中，並通過本領域已知的常用方法表達該嵌合產物，從而得到嵌合基因產物。或者，該嵌合產物可以用蛋白質合成技術來製備，如利用多肽合成儀。優選地，在融合蛋白中的酶的片段、類似物和衍生物仍保持其酶的功能。

植物幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白特異性的 cDNA 或基因組 DNA 可以通過篩選 cDNA 或基因組 DNA 文庫來選殖。例如，可以利用植物的信使 RNA 或基因組 DNA 製備這種文庫。關於分子生物學技術和怎樣去製備 cDNA 文庫和基因組文庫的背景技術，參見 Ausubel F.M.等，見上文；Sambrook 等，1989,見上文；和美國專利 No.5,650,148。

可以用對芥菜幾丁質酶和三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶具有特異性的核酸片段來檢測文庫，例如，可以利用本領域普通技術人員已知技術測定幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白質序列（參見 Creighton, 1983, “Proteins: Structures and Molecular Principles”, W.H. Freeman & Co., New York,

34-49 頁)。其獲得的胺基酸序列可以被用作一種引導物來生產寡核苷酸混合物，該混合物可以用於篩選編碼幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 序列的 cDNA 文庫。

或者，可以檢測幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶特異性的延展蛋白質序列。製備一系列各延展序列特異性的簡並寡核苷酸，用於多聚酶鏈反應(“PCR”)擴增。該寡核苷酸至少含有 6 個核苷酸，優選的含有至少 10 個，更優選的含有至少 15 個，更優選的含有至少 20 個，更優選的含有至少 30 個，更優選的含有至少 40 個核苷酸。PCR 反應的模板是 cDNA 或基因組 DNA 混合物，該混合物是已知含有或可能含有對目標幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶具有特異性的 DNA 多聚核苷酸。cDNA 模板可以通過不同的方法獲得，例如，從 cDNA 文庫的不同種 cDNA 混合物中分離，或者逆轉錄來自已知(或可能)表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的細胞或器官的可轉錄總 mRNA。關於 PCR 的背景技術，參見 Ausubel，見上文，和 PCR Protocols: A guide to Methods and Applications 1990, Innis, M 等編，Academic Press, Inc., New York。

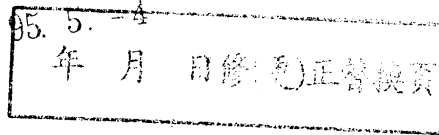
爲了選殖來自不同種的全長 cDNA 或基因組 DNA 序列，或者選殖幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的變體或異源體，使用標記的 DNA 探針來篩選 cDNA 文庫或基因組 DNA 文庫，其中的探針相應於本發明提到的或通過使用本發明方法製備的任何多核苷酸相應的核酸片段。參見 Ausubel F.M 等，見上文； Sambrook 等，1989，見上文。



抗體的製備

爲了製備抗體，可以通過注射幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶（例如，相應於幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的功能區的酶）、截短的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶（一個或多個區域被去除的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶）、幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的功能性等同物、幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的突變體或幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的短肽（或片段）而使不同的宿主動物免疫。這種可以免疫的宿主動物包括但不限於兔、小鼠、山羊和大鼠等。根據宿主的物種，可以使用不同的輔助劑來增強免疫反應，輔助劑包括但不限於 Freund's（完全或不完全的），礦物膠，如氫氧化鋁，表面活性劑，如溶血卵磷脂、多聚醇（pluronic polyols）、聚陰離子、肽、油乳化液、匙孔血藍蛋白、二硝基酚和潛在的有用的人輔助劑，如 BCG (bacille Calmette-guerin) 和小棒桿菌（Corynebacterium parvum）。多株抗體是衍生自免疫動物血清的不同種抗體分子。

用於本發明的抗體包括單株抗體（參見 Kohler 等，1975，Nature 256: 495-497；和美國專利 No. 4,376,110）、嵌合抗體（參見 Morrison 等，1984，Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855；Neugerger 等., 1984, Nature, 312: 604-608；Takeda 等, 1985, Nature, 315: 452-454）、單鏈抗體（參見美國專利 4,946,778；Bird, 1998, Scienc 242: 423-426；Huston 等，1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883；和



Ward 等, 1989, Nature 341: 544-546)、抗體片段(參見 Huse 等, 1989, Science, 246: 1275-1281)、抗遺傳型抗體或抗遺傳型抗體的 Fab 片段(參見 Greenspan & Bona, 1993, FASEBJ 7 (5): 437-444; 和 Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147 (8): 2429-2438)。

利用重組 DNA 技術表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶

利用本領域公知的重組 DNA 技術可以方便地製備幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶、其片段或其融合蛋白，這種方法可以用於構建含有幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶核苷酸序列以及合適的轉錄和翻譯調控信號的嵌合基因或表達載體。例如，這些方法包括：體外 DNA 重組技術、合成技術和體外基因重組技術。參見上文 Sambrook 等, 1989 和上文 Ausubel 等, 1989 的描述。在本文中，所使用的術語嵌合基因是指嵌合基因的各個部分是組合在一起的，通過重組 DNA 技術將各序列操作成相互關聯，該嵌合基因的各個核酸序列可以是被導入嵌合基因植株的內源性或外源性的獨立組分。

可選擇的，相應於幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶核酸序列編碼的整個或部分轉錄體的 RNA 可以被化學合成，如使用合成儀。參見 "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M.J. 編, EIL Press, Oxford 中描述的技術，該文章全文引入作為參考。

任何生物技術領域已知的宿主表達載體系統都可以用

來在包括但不限於細菌、酵母、昆蟲細胞、哺乳動物細胞、真核細胞和植物細胞中，表達幾丁質酶或 β -1,3-葡聚糖酶

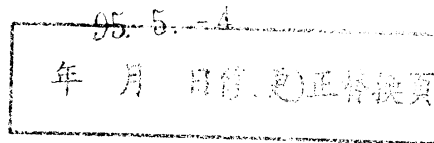
核苷酸序列。在這些表達系統中，可以使用任何可選擇系統。這種選擇可包括在選擇性培養基中生長（如抗生素、最小培養基等）或使用指示劑（如染料、熒光試劑等）。

當使用植物表達載體時，幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的編碼序列可以在任何數目的調控元件的驅動下進行表達，例如可以使用病毒啓動子，如 CaMV 的 35S RNA 和 19S RNA 啓動子（Brisson 等，1984, *Nature* 310: 511-514），或者 TMV 的外殼蛋白啓動子（Takamatsu 等，1987, *EMBO J.* 6: 307-311），或者，也可以使用植物啓動子，如 RUBISCO 的小亞基（Coruzzi 等，1984, *ENBO J.* 3:1671-1680; Broglie 等，1984, *Science* 224: 838-843），或熱休克啓動子，如大豆 hsp17.5-E 或 hsp17.3-B（Gurley 等，1986, *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565）。這些結構可以利用 Ti 質體、Ri 質體、植物病毒載體、DNA 直接轉形、生物粒子轟擊、顯微注射、電穿孔等方法而被導入到植物細胞中。這些技術的介紹參見：Weissbach & Weissbach，1988，*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, New York, Section VIII, 421-463 頁；和 Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed, Blackie, London, 7-9 章。在本發明中，調控元件包括但不限於誘導型和非誘導型的啓動子、增強子、操縱子和本領域技術人員公知的可以驅動和調節表達的其他元件。

優選的，啓動子能在植物的特定組織和/或植物發育的特定階段指導表達，啓動子可以是植物同源的或異源的。優選的，植物啓動子指導植物種子胚乳或植物根或塊莖中的表達。啓動子優選爲小麥的高分子量麥骨蛋白(HMWG)基因。其他合適的啓動子是本領域的技術人員已知的，如麥醇溶蛋白啓動子、分支酶啓動子、ADPG 焦磷酸化酶啓動子、澱粉合成酶和肌動蛋白啓動子。

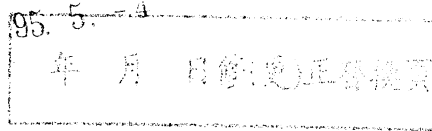
表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的轉基因植物

通過用含有編碼植物幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽編碼序列的基因構建體轉形植物細胞，可以構建一種能夠表達植物幾丁質酶或 β -1,3-葡聚糖酶多肽的轉基因植物。在一個實施方式中，植物啓動子與目的植物幾丁質酶或 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽的編碼序列可操作地連接。在本發明中，“可操作地連接” “可操作地相連”是指一種連接，在該連接中調控區（如啓動子、增強子）與要表達的核酸序列是以能夠使其轉錄並在合適的條件下翻譯的方式，共價連接和定位。在本發明優選的實施方式中，其連接的啓動子是強有力的且無組織或發育特異性的植物啓動子（如：在許多或所有植物組織中都能強烈表達的啓動子）。這種強的、“組成型”啓動子包括，但不限於 CaMV 35S 啓動子（Odell 等，1985，Nature 313: 810-812）、T-DNA 甘露鹼合成酶啓動子及其各種衍生物。在本發明的另一優選實施方式中，是用誘導型或抑制性啓動子在植物



中表達目標幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶，例如，Weinmann 等，1994，*The Plant Journal* 5: 559-569 中描述的破傷風 (tet) 操縱子啓動子；或在 McNellis 等，1998，*The Plant Journal* 14: 247-257 中描述的糖皮質激素誘導型啓動子；或在 Caddick 等，1998，*Nature Biotechnology* 16: 177-180 中描述的乙醇誘導型啓動子。還可參見 Gatz, 1995, *Methods In Cell Biology* 50: 411-424，其中描述植物誘導型和抑制型基因表達系統。

在本發明的一個實施方式中，在植物中表達幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶，以使幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶多肽定位到質體外空間。當在植物中表達時，通過將幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶與作為信號或轉運體的肽一起作為融合蛋白進行表達，這樣可以使幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶多肽定位到轉基因植物的質體外空間，幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶可以被分泌到原生質體外空間。可以使用各種信號或轉運多肽，例如，Lund 等，1992，*Plant Molecular Biology* 18: 47-53 中描述的 PR1b 信號序列，或 Pfitzner 等，1987，*Nucleic Acids Research* 15: 4449-4465 中描述的 PR-1a、b 和 c 信號序列。含有信號或轉運體多肽和幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶多肽的融合蛋白可以通過將每個組份特定的核苷酸相互連接來構建（如在閱讀框中連接各多核苷酸），使融合核酸在轉基因植物中表達時產生期望的融合蛋白。本領域普通技術人員應該知道怎樣去構建一個能有效將幾丁質酶和/或 β -1,3-葡聚糖酶表達到轉基



因植物的質體外空間的多核苷酸。

在本發明的另一個實施方式中，用一個含有植物幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽的編碼序列的基因構建體來構建一個植株是有利的，其中的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽的編碼序列與組織或發育特異性啓動子可操作連接，所述啓動子可例如，但不限於 CHS 啓動子、PATATIN 啓動子等。

在本發明的另一個實施方式中，用一個含有植物幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽的編碼序列的基因構建體來轉形一個植株是有利的，其中的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白或多肽的編碼序列與修飾過的或人工啓動子可操作連接。這些啓動子典型地是通過重組不同啓動子的結構元件來構建的，具有天然啓動子所沒有的獨特的表達模式和/或水平。參見 Salina 等，1992，Plant Cell 4: 1485-1493，如將反式-調節元件和啓動子核心區域相連接而構建的人工啓動子。

在本發明的另一實施方式中，可以利用本領域已知的技術增加編碼目的蛋白或多肽的基因的拷貝數來表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶多肽。

植物和植物細胞的轉形

可以使用本領域公知的方法來轉形植物和植物細胞。在本發明的一個實施方式中，土壤桿菌 (Agrobacterium) 被用來將基因構建體導入植物中。該轉形優選使用二元土

壤桿菌 T-DNA 載體 (Bevan, 1984, *Nuc. Acid Res.* 12: 8711-8721) 和共培養方法 (Horsch 等, 1985, *Science* 227: 1229-1231)。土壤桿菌轉形系統一般用於雙子葉植物 (Bevan 等, 1982, *Ann.Rev.Genet* 16: 357-384; Rogers 等, 1986, *Methods Enzymol.* 118: 627-641)。土壤桿菌轉形系統也可以用於將 DNA 轉形或轉移到單子葉植物和植物細胞中 (參見 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)。

在另一個實施方式中, 可以使用可替換的方法將重組核酸構建體導入到植物和植物細胞中。這些方法對於單子葉植物或植物細胞是特別適用的。可選擇的基因轉移和轉形方法包括, 但不限於: 微粒槍轟擊 (biolistics)、通過鈣-、聚乙二醇 (PEG) -進行的原生質體轉形或電穿孔介導的裸露 DNA 的吸收 (參見 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* 38: 274-276) 和植物組織的電穿孔 (D'Halluin 等, 1992, *Plant Cell* 4: 1495-1505)。用於植物細胞轉形的其他方法包括顯微注射、碳化矽介導的 DNA 吸收 (Kaeppler 等, 1990, *Plant Cell Reporter* 9: 415-418)、顯微投影轟擊 (見 Klein 等, 1988,

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 4305-4309; 和 Gordon-Kamm 等, 1990, Plant Cell 2: 603-618)。爲了檢測轉形是否確實發生，在任何方法中都可以至少是在最初使用選擇性標記。有用的可選擇性標記包括能夠賦予抗生素抗性的酶，如慶大黴素、勻黴素、卡那黴素等等。或者，可以使用那些能夠通過顏色變化而提供可鑑定化合物的標記，如 GUS 或發光物質，如熒光素酶。

嵌合基因也可以含有一個基因開關機制，其決定在什麼條件下或在什麼時候編碼序列會表達。基因開關結構可以是化學誘導的啓動子或溫度控制的啓動子。

根據本發明，利用本發明的核酸構建體和上述的各種轉形方法，可以構建大量植物和植物細胞系統以改變植物的生理和農業特徵。在優選實施方式中，用於構建的靶植物和植物細胞包括，但不限於那些單子葉植物和雙子葉植物，如包括穀類（如小麥、玉米、稻、大麥）的農作物、水果作物（如番茄，蘋果、梨、草莓、桔）、飼料作物（如紫花苜蓿）、根菜類農作物（如胡蘿蔔、馬鈴薯、甜菜、山藥）、葉菜類農作物（如萵苣、菠菜）、開花類植物（如矮牽牛花、玫瑰、菊花）、針葉類和松樹（如松樹、杉木、雲杉）、用於植物補救（phytoremediation）的植物（如重金屬凝集植物）、油類作物（如向日葵、油菜籽）和用於試驗目的的植物（如鼠耳芥屬（*Arabidopsis*））。

轉形的植物和植物細胞的篩選

根據本發明，通過將一個或多個如上所述的表達了質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的基因構建體轉形到各種植物細胞類型中，可以獲得期望的植物，這些植物細胞類型包括但不限於：原生質體、組織培養細胞、組織和器官外植體、花粉、胚和整個植株。在本發明的一個優選實施方式中，根據下文所述方法選擇或篩選構建的植物材料以鑑定轉形體（並入或整合了導入的基因構建體的那些植株）。然後可以使分離的轉形體再生成植株。可選擇地，可以使構建的植物材料再生成一個植株。或者，在得到的植株經受標記基因特徵的選擇或篩選之前，將構建的植物材料再生為植株。在標記基因的選擇和篩選之前或之後，將植物細胞、組織或器官再生成植株的方法是本領域技術人員公知的。

可以通過選擇或篩選構建的植物材料中由轉形 DNA 中的標記基因所編碼的特徵來鑑定和分離一個轉形的植物細胞、愈傷組織、組織或植株。例如，可以通過在含有抑制劑量的抗生素或除草劑的培養基中培養構建的植物材料來進行選擇，而轉形的基因構建體對所述抗生素和除草劑具有抗性。另外，還可以通過篩選可能存在於本發明的重組核酸構建體中的可見標記基因（例如 β -葡糖苷酸酶、熒光素酶、B 或 C1 基因）的活性來鑑定轉形的植物和植物細胞。這些篩選和檢測方法是本領域的技術人員公知的。

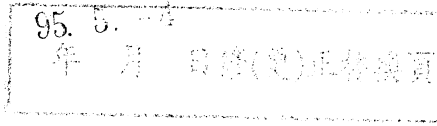
也可以使用物理和生物化學方法來鑑定含有本發明的基因構建體的植物或植物細胞轉形體。這些方法包括但不限於：1) Southern 分析或 PCR 擴增以檢測和測定重組 DNA

插入子的結構；2) Northern 印跡、S1 核糖核酸酶保護、引子延伸或逆轉錄酶-PCR 擴增以檢測和測定基因構建體的 RNA 轉錄產物；3) 酶學分析以檢測酶的活性，其中的基因產物是由基因構建體編碼的；4) 蛋白質凝膠電泳 (PAGE)、Western 印跡技術、免疫沈澱、或酶聯免疫試驗，其中的基因構建體產物是蛋白質。還有其他技術，如原位雜交、酶染色、免疫染色也可以用於檢測特定植物組織和器官中重組構建體的存在和表達。用於所有這些檢測的方法是本領域技術人員公知的。

表達構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶多肽的轉基因植物

產生了能夠表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的轉基因植物。表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的轉基因植物對目的病原體的致病影響易感性降低。轉基因植物可以利用本領域技術人員公知的技術來製備，這些技術如上文中關於製備表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的轉基因植物所描述的。

表達一個或多個幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因多核苷酸的轉基因植物可以來源於植物王國中的任何植物種、植物屬、植物科、植物目、植物綱，植物門，其中的多核苷酸能使所說的植物對目的病原體的抗性增強。參見美國專利 No. 5,889,189、5,869,720、5,850,015、5,824,842；PP 10,742、PP10,704；PP10,682，在這些文章中敘述了可使用幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的植物種、屬、科、



目，綱和門。

植物的例子包括單子葉植物、雙子葉植物和農作物（即用於農業、動物包括人的食物目的而生長的任何植物種，為達目的典型地以超過 10 株的群體生長的植物，來收穫其整個植株或植株的一部分，如水果，花，或農作物，如植物生長出的穀物等）、樹（即，水果樹、用作木材而生長的樹、用作裝飾而生長的樹等）、各種花（如收穫後用作裝飾而生長的植物）、仙人掌等。

可以表達幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的其他植物的例子進一步包括：Viridiplantae、Streptophyta、有胚植物、維管植物、Euphyllophytes、種子植物、木蘭門植物、Liliopsida、Commelinidae、Poales、Poaceae、稻屬植物（*Oryza*）、稻（*Oryza sativa*）、玉蜀黍屬植物、玉蜀黍、大麥屬植物、大麥芽、小麥屬植物、普通小麥（*Triticum aestivum*）、Eudicotyledons、Core eudicots、Asteridae、Euasterids、Rosidae、Eurosids II、蕓薹屬植物（brassicales）、十字花科植物、阿布屬植物、Magnoliopsida、Solananae、Solanales、茄科植物、茄屬植物、煙草屬植物。

還包括，例如，特殊目的的農作物，如茄科，包括加工的新鮮市售番茄、胡椒粉和茄子；葉類植物，包括萵苣和菠菜；蕓薹，包括椰菜、抱子甘藍、花莖甘藍、羽衣甘藍、花椰菜、紅球甘藍和白球甘藍；葫蘆科植物，包括黃瓜、甜瓜、西瓜、夏季南瓜和南瓜；大種子植物，包括豌豆、菜豆和甜玉米；根類植物，包括胡蘿蔔、和洋蔥；生

長繁殖類植物，包括漿果、葡萄、香蕉、鳳梨、薔薇科水果和堅果作物，包括芒果和南瓜。

因此，本發明可以使用大範圍的植物，其包括但不限於：來自腰果屬 (Anacardium)、花生、蘆筍、顛茄屬

(Atropa)、燕麥屬 (Avena)、藝薹、柑橘、西瓜、辣椒、紅花、椰子樹、咖啡、香瓜屬 (Cucumis)、南瓜、胡蘿蔔、

油棕 (Elaeis)、草莓、大豆屬 (Glycine)、棉、Helianthus、Heterocallis、大麥、天仙子、萵苣屬 (Lactuca)、亞麻、

黑麥草、羽扇豆、番茄屬 (Lycopersicon)、蘋果、木薯、Majorana、苜蓿屬 (Medicago)、煙草、洋橄欖、稻屬

(Oryza)、Panicum、Panicum、鱷梨屬 (Persea)、菜豆、黃連木屬 (Pistachia)、豌豆屬 (Pisum)、梨屬 (Pyrus)、

李、蘿蔔屬 (Raphanus)、蓖麻、黑麥屬 (Secale)、千里光、芥子、茄、高粱、Theobromus、胡蘆巴、Triticum、巢

菜、葡萄、豇豆和玉蜀黍。

在轉基因植物中表達構建基因的多核苷酸構建體

利用本領域公知的常規 DNA 重組和選殖技術構建一個多核苷酸構建體，該構建體能指導目的轉基因植物中構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物表達，參見

Sambrook 等，見上文；Ausubel 等，見上文。該多核苷酸構建體典型的包括一個編碼構建幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的多核苷酸序列和一個或多個調控多核苷酸序列。可用於本發明多核苷酸構建體的調控序列包括但不限

於：啓動子、增強子、內含子、拼接供體、拼接受體、多聚腺苷酸序列、RNA 穩定調控序列或上述任一的一個元件（如啓動子元件包括，但不限於一個 TATA 盒）。

多核苷酸構建體含有一個或多個調控元件，該調控元件能指導本發明中構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的表達。在一個優選的方面，調控元件具有在一個期望表達構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的植物中指導表達的能力。在另一個優選的方面，調控序列具有在一個在期望表達構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的細胞類型中指導表達的能力。

用於本發明的多核苷酸構建體的調控序列是本領域的技術人員公知的，例如，在目的細胞類型和植物物種中表達的已知基因的啓動子和增強子。利用常規的實驗也可以分離出用於在目的植物細胞類型中表達構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的基因產物的啓動子，例如，分離已知以期望的方式表達的基因的啓動子區。舉例來說，使用已知可在目的細胞類型或目的植物物種中表達的 mRNA 的 5' 末端特異性 cDNA 探針，可以篩選基因組文庫。這種 5' 末端 cDNA 探針優選地僅含有約 100—約 300 個鹼基對，這樣，在基因組文庫中鑑定的選殖株可能含有基因 5' 末端，該末端可能包括探針特異性的基因啓動子區域。啓動子區域典型地包括轉錄起始位點上游大約 1000—約 2000 個鹼基對。這樣，用於表達本發明構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的基因的啓動子是在目的植物物種的目的細胞類型

中已知將要表達的基因的轉錄起始位點上游 2000 個鹼基到下游 50 個鹼基的多核苷酸，或者是該多核苷酸的一部分。

爲了使構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶能被正確的加工，還可能必須含有一個編碼這種加工所必需的肽序列的核苷酸片段。舉例來說，還可能必需一段在宿主植物中用於識別並且具有功能的肽序列，如使構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的基因產物進入內質網，即信號序列。

構建的抗性植株檢測分析

用本發明的方法構建的表達構建幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的植株與不表達構建幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因產物的相同物种植株(即野生型植株)相比較，其對目的病原體的致病性影響的抗性增強。用本發明方法生產的抗性增強的植株可以通過本領域的公知技術進行分析。例如，用目的病原體感染本發明製備的植株和野生型植株。感染之後，本發明產生的植株比野生型植株成活率至少高約 20%，優選至少高約 40%，更優選的至少高約 60%，更優選的至少高約 80%。

檢測用本發明的方法製備的轉基因植物的另一個方法是檢測壞死誘導活性，例如，如同 Mahe 等，1998, *J. Peptide Res.* 52: 482-494 中的描述。這樣，可以在轉基因植株中表達構建的幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶，並用目的病原體感染轉基因植株。舉例來說，當用病原體感染表達構建的幾

丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的轉基因植物時，在野生型植株中就會發現明顯的壞死或嚴重的壞死擴散，而在來源於該野生型植株的轉基因植株中卻沒有發現。

除了用目測外，壞死細胞的死亡也可以用組織化學染色反應來觀測。

下文提供的實施例用於進一步解釋本發明，但對本發明的範圍不起任何限制作用。

實施例

材料和方法

植物材料

在 22 – 24°C 的培養室中 12h 光照/12h 黑暗迴圈培養芥菜。

篩選芥菜 cDNA 文庫以獲得幾丁質酶選殖株

合成一對寡核苷酸引子

5'GGTGGATGGGCTACAGCACCCAGAC3' (SEQ ID NO. 8)和
5'GCCACGTCCACACTCCAA3' (SEQ ID NO. 9)，用於 PCR 擴增鼠耳芥 (Arabidopsis) 幾丁質酶基因的 414bp 的片段 (核苷酸 1625 – 2038) (Samac 等, 1990, Plant Physiol 93: 907-914)。在用於篩選芥菜 cDNA 文庫 (Pua 等, 1992, Plant Mol Biol 19: 541-544) 前，在含有 30% 去離子甲醯胺的溶液中，42°C 下進行原位平板雜交 (Sambrook 等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)，來確認相應於保守幾丁質酶區域的該片段核苷酸序列。在室溫下在 0.1×SSC、0.1% SDS 中清洗印跡。

DNA 序列分析

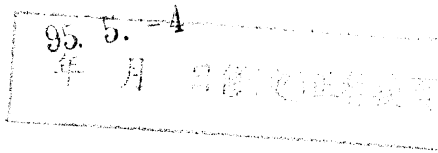
用 DNA 測序試劑盒和 Sequenase Version 2.0 (UBS, Amersham Life Science) 以及 GCG 序列分析程式 (Genetics Computer Group) 分析 M13mp18 中包含目的序列的 DNA 片段 (Yanisch-Perron 等, 1985, Gene 33: 103-119)。

基因組 DNA 的分離和 Southern 印跡分析

爲了進行 Southern 印跡分析，用不同的限制核酸內切酶消化 20μg 分離 (Dellaporta et al., 1983, Plant Mol Biol Reprtr 1: 19-21) 自 *B.juncea* 的 DNA，在 0.8% 的瓊脂糖凝膠中電泳分離，並印跡到 Hybond-N (Amersham) (Sambrook 等, 1989) 上。使該印記與 ³²P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針在含有 30% 去離子甲醯胺、6×SSC、5×Denhardt's、1% SDS 和 500μg/ml 變性的超聲波處理過的鮭魚精子 DNA 的溶液中 42°C 過夜雜交，在室溫和 65°C 下在 0.1×SSC、0.1% SDS 中清洗印跡。

Northern 印跡分析

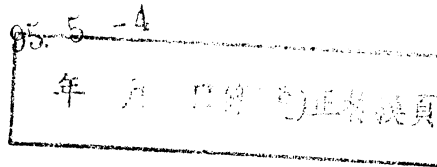
將從幼苗葉中抽提出的 20μg RNA (Nagy 等, 1988, Plant Molecular Biology Manual B4:1-29 頁。Kluwer Academic



Publisher, Dordrecht) 在含有乙二醛的溶液中 50°C 下進行變性處理，在 1.5% 的瓊脂糖凝膠中電泳分離，印跡到 Hybond-N (Amersham) 膜上。將該印記與 ^{32}P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針在含有 50% 去離子甲醯胺、1xDenhardt's、6xSSPE、0.1% SDS 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 變性的超聲波處理過的鮭魚精子 DNA 及 10% 硫酸葡聚糖的溶液中 42°C 過夜雜交，在 65°C 下在 0.1xSSC、0.1% SDS 中清洗印跡。

多聚酶鏈反應

使用引子 P1 和 P2 或 P2 和 P3 和 GeneAmp PCR 試劑盒 (Perkin Elmer) 進行 PCR。圖 1A 表明了引子的位置：相應於核苷酸 56-73 的 P1 (5'CCTCCGGTGAGCAATGCG3') (SEQ ID NO. 10)，互補於核苷酸 554-536 的 P2 (5'TTAGCGGCGGTGATGAAGG3') (SEQ ID NO. 11)，相應於核苷酸 207-225 的 P3 (5'TCCTCCAACCCCGCAGTGT3') (SEQ ID NO. 12)。B.junceaDNA 在 94°C 變性 5 分鐘，利用引子進行 35 個 PCR 迴圈，每個迴圈為 94°C 1 分鐘，68°C 1 分鐘和 72°C 3 分鐘。最後的延伸階段為 72°C 7 分鐘。PCR 產物在 2% 的瓊脂糖凝膠中電泳，並印跡到 Hybond-N (Amersham) 膜上與 ^{32}P 標記的 BjCHI1 cDNA 雜交。依照 Lasserre 等，1996，Mol Gen Genet 251 "81-90 的方法，對利用硫氰酸胍 (guanidine thiocyanate) 從幼苗葉中抽提出的總 RNA (Nagy 等，1988) 進行逆轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)。序列為 5'CCACTCGAGGTTGTTGC3' 的引子 P4



(SEQ ID NO. 13) (與核苷酸 750-734 互補, 圖 1A) 和 50 μ g 總 RNA 退火。在使用 P2 和 P3 作為引子的 PCR 中, 以第一鏈 cDNA 作為模板 (圖 1A)。所有的 RT-PCR 反應都進行 3 次。

抗 HbGLU 和 BjCHI1 的多株抗體的製備

從 Chiron Technologies (Australia) 購得相應於 HbGLU 的胺基酸 94-107 (SEQ ID NO:4) 的合成肽

(SDLQSLTNPSNAKS), 按照 Sambrook 等, 1989 的方法將其用於在兔中製備多株抗體。使用相應於 BjCHI1 胺基酸序列 231-242 (SEQ ID NO:2) (Zhao 和 Chye, 1999, 見上文) 的合成肽 (YKEEIDKSDPHC) 免疫兔以製備多株抗體, 這些抗 BjCHI1 的抗體從 Chiron Technologies

(Australia) 購得。將每一種肽與鑰孔血藍蛋白 (KLH) 一起, 與 Freund's 完全輔劑混合以製備抗體。收集血液, 利用蛋白 A 瓊脂糖 CL-4B (Pharmacia) 和 CNBr-啟動的瓊脂糖 4B (Pharmacia) 柱純化抗 HbGLU 抗體, 用硫代丙基-瓊脂糖 6B (Pharmacia) 柱純化抗 BjCHI1 抗體。

用茄屬絲核菌 (R.solani) 感染芥菜 (B.juncea)

將芥菜 (B.juncea) 種子種植在高壓滅菌過的土壤中, 在 24°C 的生長室中, 以 12h 光照 (08:00-20:00) 和 12h 黑暗 (20:00-08:00) 的日夜條件進行培養。將兩星期齡的幼苗小心地轉移到已培養茄屬絲核菌 (R.solani) 一周的土壤

中。其中的真菌在馬鈴薯葡萄糖漿中室溫下培養了 1 個星期，並在幼苗種植到土壤前 3 天被加到土壤中。在幼苗被轉移到感染的土壤中後的 0-9 天，每天收集幼苗葉，從這些葉中提取總 RNA 和總蛋白，分別進行 Northern 印跡分析和 Western 印跡分析。

攜帶有三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶和三葉膠樹幾丁質酶 BjCHI1 的質體構建體

將 *H. brasiliensis* β -1,3-葡聚糖酶的全長 cDNA 1.2kb 的 SmaI-HindII 片段命名為 HbGLU (Chye 和 Cheung, 1995, *Plant Mol. Bio.* 29: 397-402)，將其選殖到二元質體載體 pBI121 (Clontech) 的 CaMV 35S 啟動子下游的 SmaI 位點，從而產生質體 pHEV43 (圖 7)，而將編碼芥菜幾丁質酶的全長 cDNA 1.3kb 的 SmaI 片段，即 HjCHI1 (Zhao 和 Chye, 見上文) 選殖到 pBI121 (Clontech) 的 CaMV 35S 啟動子下游的 SmaI 位點，從而產生質體 pBj17。然後，用 Klenow 將來自 pHEV43 的含有 CaMV 35S 啟動子的 2.04kb 的 HindIII 片段和 HbGLU cDNA 剪切成平末端，連接到 pBj17 的 GUS 基因內的 SnaBI 位點，產生質體 pBj47 和 pBj48 (圖 7)。在 pBj47 中的 CaMV 35S 啟動子是反向的，而在 pBj48 中 CaMV 35S 啟動子是串聯的，每個 pBj47 質體和 pBj48 的單個質體都含有 HbGLU cDNA 和 BjCHI1 cDNA (圖 7)。質體 pBj17、pBj47 和 pHEV43 用於馬鈴薯的轉形。

攜帶有三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶和三葉膠樹幾丁質酶
BjCHI1 構建體的轉基因馬鈴薯植株的製備

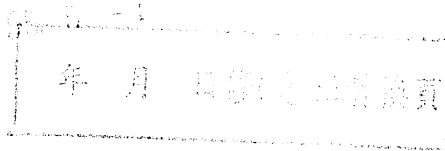
植株的轉形

通過三親代雜交，利用輔助菌株 HB101 (Prk2013) 分別將 pHEV43、pBj17、pBj47、pBI121 質體從 E.coli 菌株 DH5 α 中固定到根瘤土壤桿菌 (Agrobacterium tumefaciens) 菌株 LBA4404 中。根據 Dietze 等，1995, In Potrykus I, Sprangenberg G (編), Gene Transfer to Plants, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 24-29 頁的方法利用含有這些質體的根瘤土壤桿菌轉形馬鈴薯植株變體 (Solanum tuberosum L)。在含有卡那黴素 (100 μ g/ml) 的 Murashige 和 Skoog 培養基中篩選轉形體。在生長培養箱中，16h 光照/8h 黑暗的條件下，20-25 $^{\circ}$ C 維持馬鈴薯組織培養物。轉基因 R₀ 馬鈴薯植株在白天/黑夜條件為 12 h 光照/12h 黑暗、溫度為 24 $^{\circ}$ C 的條件下在生長室的土壤中生長。

在穩定轉形的馬鈴薯植株中檢測三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖
酶和三葉膠樹幾丁質酶 BjCHI1 產物的功能

Northern 印跡分析

根據 Nagy 等，1988, In: SV Gelvin, RA Schilperoort, (編) Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, B4: 1-29 頁中描述的方法從植物中



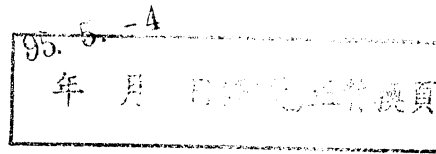
抽提總 RNA，在乙二醛存在的情況下將 $20 \mu\text{g}$ RNA 在 50°C 下變性處理 30 分鐘，在 1.5% 的瓊脂糖凝膠中電泳分離，並轉移到 Hybond-N (Amersham) 膜上。預雜交印跡 4—6h，然後將該印跡與用隨機引導標記製備的 ^{32}P 標記 BjCHI1 cDNA 或 HbGLU cDNA 在含有 50% 去離子甲醯胺、 $1\times$ Denhardt's、 $6\times$ SSPE、0.1% SDS 和 $100 \mu\text{g/ml}$ 變性的超聲波處理過的鮭魚精子 DNA 及 10% 硫酸葡聚糖的溶液中 42°C 過夜雜交，在 65°C 下在 $0.1\times$ SSC、0.1% SDS 中清洗印跡。

Southern 印跡雜交

爲了進行 Southern 印跡分析，根據 Dellaporta 等，1983，Plant Mol Bio Rep. 1: 19-21 中的方法分離的 $20 \mu\text{g}$ DNA 用限制核酸內切酶消化，在 0.7% 的瓊脂糖凝膠中電泳分離，印跡到 Hybond-N (Amersham) (Sambrook 等，1989) 膜上。該膜在含有 50% 去離子甲醯胺、 $6\times$ SSC、 $5\times$ Denhardt's、1% SDS 和 $100 \mu\text{g/ml}$ 變性的超聲波處理過的鮭魚精子 DNA 的溶液中預雜交 4—6 小時。加入 ^{32}P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針或 ^{32}P 標記的 HbGLU cDNA，雜交過夜，在 65°C 下在 $0.1\times$ SSC、0.1% SDS 中清洗膜。

Western 印跡分析

根據 Kush 等，1990，Proc Natl Acad Sci USA 87: 1787-1790 的方法製備總植物蛋白。根據 Sambrook 等，1989



中所描述的方法利用 SDS-PAGE 分離出 $20 \mu\text{g}$ 總蛋白，然後將其轉到 Hybond-C (Amersham) 膜上。在 Western 印跡分析中，根據擴增的鹼性磷酸酶山羊抗兔免疫印跡分析試劑盒 (Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immunoblot Assay Kit) 中的描述 (BioRad)，利用抗 GjCHI1 的多株抗體或抗 HbGLU 的多株抗體檢測交叉反應帶。

製備植物蛋白提取物用於進行酶學分析

根據 Boller 等，1983，Planta 157: 22-31 中的方法製備植物蛋白抽提物。在液氮中將植物磨成粉末，轉移到含有 1% (v/v) β -巰基乙醇的 0.1M 的檸檬酸鈉 (pH5.0) 緩衝液中，渦旋。離心 (4°C ，14000rpm，5 分鐘) 後，將上清液移到另一個試管中，在 50°C 下培養 10 分鐘，在冰上冷卻 10 分鐘。然後離心樣品 (4°C ，14000rpm，5 分鐘)，其上清液作為粗蛋白用於幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性分析。根據 Bradford (1976，Anal. Biochem, 72: 248-254) 的方法測定蛋白質濃度。

β -1,3-葡聚糖酶的分析

根據 Abeles 和 Forrence，1970，Plant Physiol 45: 395-400 的方法對 β -1,3-葡聚糖酶進行比色分析。將 $100 \mu\text{l}$ ($25 \mu\text{g}$) 植物蛋白抽提物和 $100 \mu\text{l}$ 2% (w/v) 海帶多糖的反應混合物在 50°C 下孵育 2h。通過加入 $600 \mu\text{l}$ 的二硝基水楊酸 (dinitrosalicylic) 試劑並在 100°C 加熱 5 分鐘來中止

反應。冷卻到室溫後，用水以 1:20 的比例稀釋，在 500nm 下測定其吸收值。

幾丁質酶的分析

根據 Wirth 和 Wolf, 1990, J. Microbiol Meth 12: 197-205 中的方法對幾丁質酶進行比色分析。將 150 μ l 羧甲基/幾丁質/Remazol Brilliant Violet (Loewe Biochemica; 2mg/ml 儲備溶液) 的底物和 150 μ l 0.2M 的乙酸鈉 (pH5.0) 及 300 μ l (15 μ g) 的植物蛋白抽提物的反應混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 0.5h。通過加入 150 μ l 1N HCl 中止反應，接著在冰上孵育 5-10 分鐘，離心 (4 $^{\circ}$ C, 14000rpm, 3 分鐘)。在 550nm 下測定其上清液的吸收值。用 300 μ l pH5.0 的 0.1M 檸檬酸鈉緩衝液代替蛋白質樣品作為對照。

利用綠色木黴 (*Trichoderma viride*) 在體外進行真菌的生物檢測

在馬鈴薯葡萄糖 (Difco) 瓊脂 (PDA) 平皿上培養綠色木黴 (*T.viride*) Persoon (ATTC 12582)。根據 Schlumbaum 等, 1986, Nature 324: 365-367 的方法將其用於體外菌絲抑制測定。將帶有在 PDA 上生長的綠色木黴 (*T.viride*) 培養物的塞子轉移到新鮮 PDA 平皿的中央。25 $^{\circ}$ C 下保溫 24h，在這個過程中菌絲從中央向外生長，在 PDA 的外表面生成孔，這些孔距離塞子是等距離的，向每個孔中加入植物蛋白抽提物 (50 μ g)，將平皿在 25 $^{\circ}$ C 的黑

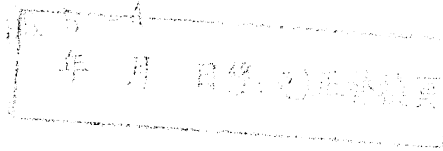
暗條件下進一步培養，之後可觀察到綠色木黴 (*T.viride*) 的生長被抑制。在第 16h 和 24h 小時拍照。

利用茄屬絲核菌 (*R.solani*) 進行體內生物檢測

在 Northern 印跡分析中已經表明：受創傷或 MeJA 處理能夠誘導 BjCHI1 mRNA (Zhao 等, 1999, 見上文)。接下來還表明了黑色麴黴 (*Aspergillus niger*) 感染和毛蟲侵擾液可以誘導 BjCHI1 (Fung 等, 2002, 見上文)。在本發明中，根據 Jach 等, 1995, *Plant J.* 8: 97-109 的方法對幼馬鈴薯植株進行體內生物檢測，25°C 下在固體 PDA 培養基中培養 5-6 天的 *R.solani* 被接種到 100ml 液體馬鈴薯葡萄糖漿 (PDB) 中，並在室溫下搖床 (100rpm) 培養 1-2 周。然後，將培養物轉移到含有 500ml 的新鮮 PDB 的錐形燒瓶中，再培養 3-4 天。接著，將培養物與 6L 的滅菌土 (Bio-Mix Super, The Netherlands) 在盛有 8L 滅菌土的植物生長槽中徹底混合。10 天後土已完全混合，先前由組織培養物在滅菌土中生長 2 個星期後而得到的馬鈴薯植株被轉移到感染過的土壤中，在 24°C，12h 光照/12h 黑暗的條件下繼續在生長室中培養。轉移到感染過的土壤中之後兩個星期，對馬鈴薯植株拍照。在沒有真菌的滅菌土中生長的植株作為對照。

結果

茄屬絲核菌 (*R.solani*) 感染能夠誘導 BjCHI1 的表達



爲了研究真菌對 BjCHI1 表達的誘導，將芥菜 (*B.juncea*) 幼苗種植在預先接種有土壤真菌，茄屬絲核菌 (*R.solani*) 的土壤中。圖 8a 的結果表明了感染的土壤中生長一天後，1.3kb BjCHI1 mRNA 的表達增加。圖 8b 表明了感染的土壤中生長 3 天後，表觀分子量爲 37kDa 的期望的成熟 BjCHI1 蛋白的交叉反應帶有所積累。在這條帶上面的 42kDa 的弱勢帶可能是前體蛋白 (圖 8b)。計算得到的 BjCHI1 前體分子量爲 42774kDa，該前體經過翻譯後剪切，N 末端信號肽和 C 末端液泡導向肽被切除 (Zhao 和 Chye, 見上文)。我們得到的結果表明，在茄屬絲核菌 (*R.solani*) 感染後 BjCHI1 mRNA 及其相應的蛋白發生積累，這說明它在真菌預防方面的作用。

在轉基因馬鈴薯植株中 BjCHI1 和 HbGLU 的表達

BjCHI1 的表達受茄屬絲核菌 (*R.solani*) 感染的誘導，這個發現啓發我們開始研究：在轉基因馬鈴薯中其異源表達是否能夠賦予抗茄屬絲核菌 (*R.solani*) 的特性。含有 BjCHI1 的質體 pBj17 和 pBj47 通過根瘤土壤桿菌介導轉形而分別導入馬鈴薯變體中。pBj47 還含有 HbGLU cDNA，這便於我們研究 HbGLU 在提高 BjCHI1 活性方面是否會有影響。含有 HbGLU cDNA 選殖株的質體 pHEV43 和對照載體 pGI121 也用於轉形馬鈴薯。通過 Northern、Southern 和 Western 印跡分析檢測每種轉形得到的大約 20 株推定的抗卡那黴素轉基因獨立植株。對最終選用於茄屬絲核菌

(*R.solani*) 感染試驗的每種轉形代表植株進行分析，其結果如圖 9、10、11 所示。圖 9A 顯示：在對共表達 HbGLU 和 BjCHI1 的轉基因馬鈴薯植株、pBj47-P₁₀(第 2 道)、pBj47-P₈(第 3 道)、pBj47-P₇(第 4 道)和只表達 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pHEV-P₁₄(第 5 道)進行 Northern 印跡的分析中，使用 ³²P 標記的 HbGLU cDNA 檢測到的 1.2kb 的雜交 HbGLU mRNA 的存在。該帶在未轉形馬鈴薯中不存在(圖 9A，第 1 道)。圖 9B 顯示：在轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀(第 2 道)、pBj47-P₈(第 3 道)、pBj47-P₇(第 4 道)和 pBj17-P₆(第 6 道)中用 ³²P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針檢測到的 1.3kb 的雜交 BjCHI1 mRNA(用箭頭表示)的表達。這個帶在未轉形馬鈴薯(圖 9B，第 1 道)和 pBI121 轉形馬鈴薯中(圖 9B，第 5 道)中不存在。

對轉基因馬鈴薯植株進行 Southern 印跡分析

接著，利用由 BjCHI1 或 HbGLU cDNA 制得的 ³²P 標記的探針對來自於這些轉基因馬鈴薯植株的 DNA 進行 Southern 印跡分析。圖 10A 的結果表明 1.2kb 的 HbGLU EcoRI 雜交帶存在於轉基因馬鈴薯植株 pBj43-P₁₄(第 3 道)、pBj47-P₇(第 4 道)、pBj47-P₈(第 5 道)和 pBj47-P₁₀(第 6 道)，在未轉形的馬鈴薯(第 1 道)、pBI121 轉形馬鈴薯(第 2 道)中不存在。1.2kb 的 EcoRI 雜交帶與 pHEV43 圖譜(圖 7)所示一致，含有全長的 HbGLU cDNA。利用 ³²P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針和 HindIII 消化的 DNA 進行

Southern 印跡分析(圖 10B), 在轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 3 道)、pBj47-P₈ (第 4 道)、pBj47-P₁₀ (第 5 道) 和 pBj17-P₆ (第 6 道) 中檢測到 0.9kb 的 HindIII 雜交帶。該 0.9kb 的帶與 pBj17 圖譜(圖 7) 中所示的 BjCHI1 cDNA 內第二和第三內部 HindIII 位點間的片段一致。該 0.9kb 的帶在未轉形的馬鈴薯(圖 10B, 第 1 道)、pBI121 轉形馬鈴薯(第 2 道) 中不存在。當用 ³²P 標記的 BjCHI1HbGLU cDNA 探針進行當在 Southern 印跡分析(圖 10C) 以檢測 EcoRI 消化的 DNA 時, 在轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀ (第 3 道)、pBj47-P₈ (第 4 道)、pBj47-P₇ (第 5 道) 中就會看到不同大小的雜交帶, 這表明這些植株是獨立的轉基因植株。在未轉形的馬鈴薯(第 1 道) 和 pBI121 轉形的馬鈴薯(第 2 道) 中不存在這些帶。

在轉基因馬鈴薯中檢測 BjCHI1 和 HbGLU 蛋白質
利用抗 HbGLU 抗體和抗 BjCHI1 抗體進一步進行 Western 印跡分析轉基因植物。利用抗 HbGLU 抗體(圖 11A) 對來源於轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 1 道)、pBj47-P₈ (第 2 道)、pBj47-P₁₀ (第 3 道)、pHEV43-P₁₄ (第 4 道) 的粗蛋白進行 Western 印跡分析表明, 表觀分子量為 35kDa 的交叉反應帶相應於 HbGLU。該帶在 pBI121 轉形馬鈴薯(圖 11A, 第 5 道) 和未轉形的馬鈴薯(第 6 道) 中不存在。利用抗 BjCHI1 抗體(圖 11B) 對來源於轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 1 道)、pBj47-P₈ (第 2 道)、pBj47-P₁₀ (第 3 道)、

pHEV43-P₁₄ (第 4 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (第 5 道)、未轉形的馬鈴薯 (第 6 道) 和轉基因馬鈴薯植株 pBj17-P₆ (第 7 道) 的粗蛋白進行 Western 印跡分析表明，在轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 1 道)、pBj47-P₈ (第 2 道)、pBj47-P₁₀ (第 3 道) 和 pBj17-P₆ (第 7 道) 中存在表觀分子量為 52kDa 的 BjCHI1 交叉反應帶。該帶在只表達 HbGLU 的轉基因植株 pHEV43-P₁₄ (圖 11B, 第 4 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (圖 11B, 第 5 道) 和未轉形的馬鈴薯 (圖 11B, 第 6 道) 中不存在。馬鈴薯表達的表觀分子量為 52kDa 的 BjCHI1 類似於觀察到的煙草表達的 BjCHI1 (Fung 等, 2002, 見上文), 且比天然 BjCHI1 (37kDa) 更大, 這可能是由於在異源宿主, 煙草和馬鈴薯中不能正確的進行翻譯後加工的緣故。

幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性分析

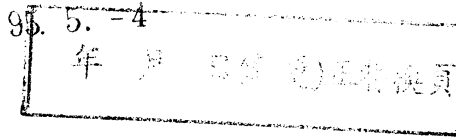
檢測轉基因馬鈴薯植株以進行幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性分析並與 pBI121 轉形的馬鈴薯進行比較 (圖 12)。利用來自 pBI121-轉形體和轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇、pBj47-P₈、pBj47-P₁₀ 的粗蛋白進行葡聚糖酶分析 (圖 12A) 表明, 轉基因植株的 β -1,3-葡聚糖酶的活性比 pBI121-轉形體高。利用粗蛋白進行幾丁質酶分析 (圖 12B) 表明: 轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇、pBj47-P₈、pBj47-P₁₀ 中的幾丁質酶比 pBI121-轉形體中的幾丁質酶表現出更高水準的活性。在 pBI121-轉形體能檢測到活性是因為存在內源性馬鈴薯幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶。

利用綠色木黴 (*T.viride*) 進行的體外生物檢測

接著，檢測轉基因馬鈴薯植株的粗抽提物對綠色木黴 (*T.viride*) 生長的體外抑制。在這些生物分析過程中，來自未轉形的馬鈴薯植株和 pBI121 轉形的轉形植株的抽提物作為對照，緩衝液作為空白。在向孔中加入蛋白質抽提物 16h (圖 13A) 和 24h (圖 13B) 後進行拍照，照片表明綠色木黴 (*T.viride*) 的生長被來源於共表達 BjCHI1 和 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀ 的抽提物抑制，而在只有緩衝液作為對照情況下 (孔 2)、來自野生型馬鈴薯的抽提物 (孔 3) 和來自 pBI121 轉形的馬鈴薯抽提物 (孔 4) 中不存在抑制。只表達 GjCHI1 的轉基因馬鈴薯植株 pBj17-P₆ (孔 5) 和只表達 β -1,3-葡聚糖酶的 pHE43-P₁₄ (孔 6) 比 pBj47-P₁₀ 表現出較弱的抑制 (孔 1)。

用茄屬絲核菌 (*R.solani*) 進行的體內生物檢測

利用生長在預接種有茄屬絲核菌 (*R.solani*) 的土壤中的幼苗進行體內生物檢測。在轉移到感染過的土壤 2 個星期後收集的結果表明：共表達 BjCHI1 和 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀ (圖 14A) 比只表達 GjCHI1 的轉基因馬鈴薯植株 pBj17-P₆ (圖 14B) 生長的稍微好一些。轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀ 和 pBj17-P₆ 的根發育比只表達 β -1,3-葡聚糖酶的轉基因馬鈴薯植株 pHE43-P₁₄ (圖 14C) 要好得多。但是轉基因馬鈴薯植株 pHE43-P₁₄ 根的發育比未轉形馬鈴薯 (圖 14D) 要好，這表明 HbGLU 的表達本身



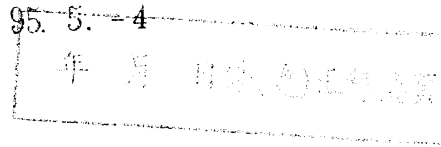
賦予了一些保護作用。生長在滅菌土壤中的對照植株（未接種茄屬絲核菌（*R.solani*））的根發育和轉基因植株 pBj47-P₁₀ 的相似（資料未列出）。該利用茄屬絲核菌（*R.solani*）的體內生物檢測試驗重複進行，獲得了一致的結果。

本發明所述的具體實施方式只證明本發明的各方面，不對本發明的範圍有所限制，本發明的功能性等同方法和產品也在本發明的包含範圍之內。事實上，除了本發明所描述的修飾外，根據上文的說明和附圖而進行各種修飾對於本領域的技術人員來說是顯而易見的，因此，這些修飾也落在本發明要求保護的範圍之內。

本發明引用的不同參考文獻，其公開的內容全文引作參考。

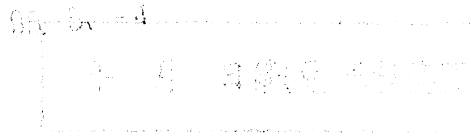
圖式簡單說明

圖 1 表明了芥菜（*B.juncea*） BjCHI1 的核苷酸序列和 BjCHI1 的結構。A 是 BjCHI1 的核苷酸序列（SEQ ID NO:1）和根據該序列推導出的在其下顯示的胺基酸序列（SEQ ID NO:2）。幾丁質結合區被劃上了下劃線。連接區被劃上點線。推斷出的多聚腺苷化信號被劃上雙線。推斷出的 N-末端信號肽和 C-末端液泡導向肽的分裂位元點被標記上（↓）。該幾丁質結合區是具有兩個胺基酸差別的串聯重複序列。這些差別胺基酸在第一幾丁質結合區中位於 BjCHI1 位點 25 處的“S”和位點 30 處的“E”，而在第二結合區



中是位於位點 76 處的 “R” 和位點 81 處的 “A”。引子的位置 (P1 到 P4) 用方框標出；對於 P2 和 P4，它們的序列相應於其互補序列。HindIII 限制酶位點被標出。示意圖 B 代表了 BjCHI1。N 末端信號肽 (黑色方框 SP) 位於被一個間隔子 (灰色方框 S) 間隔開的兩個幾丁質結合區 (CBD1, 胺基酸 22-61; CBD2, 胺基酸 73-112) 的前面。CBD2 通過一個連接區 (交叉方框 H) 和幾丁質催化區 (胺基酸 146-393) 連接。陰影方框 V 表示液泡導向序列。

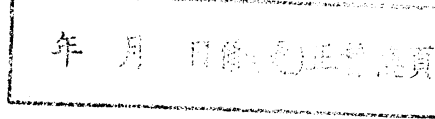
圖 2 是 BjCHI1 與其他種類的植物幾丁質酶進行的比較。A 是煙草 Chia1 (Shinshi 等., 1990, *Plant Mol. Biol.* 14: 357-368) 和 Chia2 (Payne 等., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 98-102)、菜豆 (bean) Chia4 (Margis-Pinheiro 等., 1991, *Plant Mol. Biol.* 17: 243-253)、大蕁麻 (stinging nettle) Chia5 (Lerner 和 Raikhel, 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 11085-11091) 和甜菜 (sugar beat) Chia6 (Berglund 等., 1995, *Plant Mol. Biol.* 27: 211-216)。虛線間隔是優化區域。星號表示一致的位置。推斷出的信號肽的分裂位元點和液泡導向序列用 (↓) 標記。BjCHI1 的幾丁質結合區用下劃線標記。BjCHI1 的連接區用虛下劃線標記。間隔子中的 PPTP 重複序列和連接區用箭頭標記。用方框標記出了相應於 BjCHI1 胺基酸位點 231-242 的合成肽 (YKEEIDKSDPHC), 所述 BjCHI1 是用於產生多株抗體。相應於 BjCHI1 胺基酸位點 268-272 的序列 NYNYG 用方



框標記。Chia 綱中的 8 個保守胺基酸位點用 (★) 標記。對比各序列的幾丁質催化區，在各序列末端用圓括號表明其與 BjCHI1 的同一性。示意圖 B 表明了 BjCHI1、Chia1 和 UDA1 中與二硫鍵橋（用條形圖上的連線表示）的形成有關的半胱胺酸（C）的位置。黑色框代表信號肽（SP）；灰色框代表間隔子（S）；交叉框表示連接區（H）；陰影框表示液泡導向序列（V）。

圖 3 顯示了對 BjCHI1、BjCHI2、BjCHI3 進行凝集反應檢測的結果。其中 BjCHI2 和 BjCHI3 分別衍生自含有一個和不含有幾丁質結合區的 BjCHI1。凝集檢測根據 Does 等（1999, *Plant Physiol.* 120: 421-431）的方法，用 FPLC 純化的畢赤氏酵母屬（*Pichia*）-表達的幾丁質酶進行。微量滴定板的每一個孔中含有 30 微升用胰蛋白酶處理的兔紅血球，向其中加入不同量（0.12、0.25、0.5、2、4、8、16、24 μg ）的 FPLC 純化蛋白（BjCHI1、BjCHI2 和 BjCHI3）。最後在每個孔中加入五倍濃縮的磷酸鹽使其終體積為 60 μl 。在對照孔（即，“con”，每一排的最後一個孔）中，用磷酸鹽緩衝液代替蛋白。

圖 4 是對芥菜基因組中的 BjCHI1 相關基因進行分析的結果。A 是 Southern 印跡分析的結果。用 EcoRI（第 1 道）、HindII（第 2 道）、HindIII（第 3 道）和 XbaI（第 4 道）消化 DNA，與 ^{32}P 標記的 BjCHI1 cDNA 雜交，在室溫下用 0.1 \times SSC、0.1% SDS 清洗。第 5—8 道代表了在 65 $^{\circ}\text{C}$ 進行清洗的相同印跡。B 是用引子進行 PCR 的產物，P1



和 P2 (第 1 道) 或 P2 和 P3 (第 2 道) 在 2% 的瓊脂糖凝膠上電泳, 用溴乙啶染色。C 顯示了 (b) 中與 ^{32}P 標記的 BjCHII 的 cDNA 雜交的瓊脂糖凝膠的 Southern 印跡。

圖 5 顯示了三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列, A 是三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3)。B 是推導出的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的胺基酸序列 (SEQ ID NO:4)。C 是推導出的三葉膠樹 (Hb) β -1,3-葡聚糖酶的胺基酸序列和白花丹葉煙草

(*N.plumbaginifolia*) (Np) gnl 的胺基酸序列 (De Loose 等., 1988, Gene 70: 12-23)、II 型 (CII)、III 型 (CIII) 和 IV 型 (CIV) 三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶進行的比較。相一致的位點用點標出。推導出的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 N-糖基位點用星號標出。預測的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶的 N 末端和 C 末端延伸區分別用上劃線和下劃線標出。

圖 6 顯示了基因組的 Southern 分析。用 BamHI (B)、EcoRI (E)、HindII (H) 和 XbaI (X) 消化三葉膠樹基因組 DNA (20 μg), 凝膠電泳分離, 印跡在 Hybond N (Amersham) 膜上, 再與 ^{32}P 標記的三葉膠樹 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 探針雜交。

圖 7 顯示了質體 pBj17、pHEV43、pBj47 和 pBj48 的構建。將全長 HbGLU cDNA 的 1.2kb SmaI-HindII 片段選殖到質體 pBI121 的 Sma I 位點, 位於 CaMV 35S 啓動子的下游, 形成質體 pHEV43。通過在質體 pBI121 的 Sma I 位點選殖全長 BjCHI1 cDNA 的 1.3kb 的 SmaI 片段形成質體

pBj47。CaM V 35S 啓動子指導著 BjCHI1 cDNA 在 pBj17 中的表達。接著將來自 pHEV43 的 2.04kb 的被處理爲平頭末端的 HindIII 片段選殖到 pBj17 的 SnaBI 位點。由於這種平頭末端片段可以以兩種可能的方向插入，因此，得到質體 pBj47 和 pBj48，這兩個質體都單獨含有 HbGLU cDNA 和 BjCHI1 cDNA。在 pBj47 中，幾丁質酶和葡聚糖酶 cDNA 分別從 CaM V 35S 啓動子開始以不同方向進行轉錄，而在 pBj48 中，這兩個 DNA 以相同的方向進行轉錄。RB 是 T-DNA 的右邊界，LB 是 T-DNA 的左邊界；nptII 是使卡那黴素從 Nos 啓動子開始選擇性轉錄的新黴素磷酸轉移酶編碼基因；35S pro 表示 CaMV 35S 啓動子；GUS 表示編碼 β -1,3-葡聚糖酶的不含啓動子的基因，H 表示 HindIII，E 表示 EcoRI，S 表示 SnaBI。在質體 pBj47 和 pBj48 圖譜中的 HbGLU cDNA 上的箭頭表示該 cDNA 從其 5' 到 3' 進行轉錄的方向。附圖不按比例。

圖 8 顯示了茄屬絲核菌 (*R. solani*) 感染後在芥菜中誘導了 BjCHI1 表達：(a) 是在茄屬絲核菌感染的土壤中生長 0 天 (第 1 道)、1 天 (第 2 道)、2 天 (第 3 道)、3 天 (第 4 道)、4 天 (第 5 道)、5 天 (第 6 道)、6 天 (第 7 道)、7 天 (第 8 道)、8 天 (第 9 道)、9 天 (第 10 道) 後收穫芥菜葉，用 ^{32}P 標記來自該葉的總 RNA 中 BjCHI1 cDNA，進行 Northern 印跡分析。在下面顯示的是與 ^{32}P 標記的 18S rDNA 探針雜交的相同印記。箭頭表示 1.3kb 的 BjCHI1 mRNA 而箭頭表示 18s rRNA；(b) 是使用抗

95.5.-4

BjCHI1 抗體進行的 Western 印跡分析。在茄屬絲核菌感染的土壤中生長 0 天（第 1 道）、1 天（第 2 道）、2 天（第 3 道）、3 天（第 4 道）、4 天（第 5 道）、5 天（第 6 道）、6 天（第 7 道）、7 天（第 8 道）、8 天（第 9 道）、9 天（第 10 道）後收穫芥菜葉，收集來自該葉的總蛋白。交叉反應的 37kDa BjCHI1 帶用箭頭表示。在該帶之上的弱勢帶可能是前體蛋白（precursor protein）；（c）Coomassie 染色的蛋白質凝膠，其上樣量與（b）相同，以證明每個孔中的蛋白質含量是相等的。

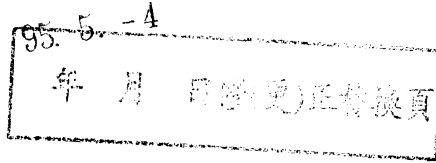
圖 9 是對 R₀ 轉基因馬鈴薯植株進行的 Northern 印跡分析：A 表示在未轉形的馬鈴薯（第 1 道）和轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀（第 2 道）、pBj47-P₈（第 3 道）、pBj47-P₇（第 4 道）和 pHEV-P₁₄（第 5 道）中，用 ³²P 標記的 HbGLU cDNA 探針檢測到的 1.2kb 的雜交 HbGLU mRNA 的表達（用箭頭表示）。B 表示在未轉形的馬鈴薯（第 1 道）和轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀（第 2 道）、pBj47-P₈（第 3 道）、pBj47-P₇（第 4 道）和 pBI121 轉形的馬鈴薯（第 5 道）和 pBj17-P₆（第 6 道）中，用 ³²P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針檢測到的 1.3kb 的 BjCHI1 雜交 mRNA 的表達（用箭表示）。

圖 10 是對 R₀ 轉基因馬鈴薯植株進行的 Southern 印跡分析：A 表示使用 ³²P 標記的 HbGLU cDNA 探針和 EcoRI 消化的 DNA，該 EcoRI 消化的 DNA 是來自未轉形的馬鈴薯（第 1 道）、pBI121 轉形的馬鈴薯（第 2 道）和轉基因馬鈴薯植株 pHEV43-P₁₄（第 3 道）、pBj47-P₇（第 4 道）、

pBj47-P₈ (第 5 道)和 pBj47-P₁₀ (第 6 道)。箭頭表示 1.2kb 的 EcoRI 雜交帶；B 表示用 ³²P 標記的 BjCHI1 cDNA 探針和 HindIII 消化的 DNA，該 HindIII 消化的 DNA 是來自未轉形的馬鈴薯 (第 1 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (第 2 道) 和轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇(第 3 道)、pBj47-P₈(第 4 道)、pBj47-P₁₀(第 5 道)和 pBj17-P₆(第 6 道)。箭表示 0.9kb 的 HindIII 雜交帶；C 表示用 ³²P 標記的 BjCHI1cDNA 探針和 EcoRI 消化的 DNA，所述 EcoRI 消化的 DNA 是來自未轉形的馬鈴薯 (第 1 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (第 2 道) 和轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀ (第 3 道)、pBj47-P₈ (第 4 道)、pBj47-P₇ (第 5 道)。

圖 11 表示是對 R₀ 轉基因馬鈴薯植株進行的 Western 印跡分析：A 表示使用抗 HbGLU 抗體對來自轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 1 道)、pBj47-P₈(第 2 道)、pBj47-P₁₀(第 3 道)、pHEV43- P₁₄ (第 4 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (第 5 道) 和未轉形的馬鈴薯 (第 6 道) 的粗提蛋白進行 Western 印跡分析。與 HbGLU (35kDa) 相應的帶用箭頭標出；B 表示使用抗 BjCHI1 抗體對來自轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₇ (第 1 道)、pBj47-P₈ (第 2 道)、pBj47-P₁₀ (第 3 道)、pHEV43- P₁₄ (第 4 道)、pBI121 轉形馬鈴薯 (第 5 道)、未轉形的馬鈴薯 (第 6 道) 和轉基因馬鈴薯植株 pBj17-P₆ (第 7 道) 的粗提蛋白進行 Western 印跡分析。與 BjCHI1 (52kDa) 相應的帶用箭標出。

圖 12 顯示了對轉基因馬鈴薯植株進行的葡聚糖酶和幾



丁質酶分析。A 是用來自 pBI121-轉形植株和 pBj47 轉形的轉基因 R₀ 植株的粗提蛋白在光密度為 500nm 的條件下進行的葡聚糖酶檢測；B 是用來自 pBI121-轉形體和 pBj47 轉形的轉基因 R₀ 植株的粗提蛋白在光密度為 500nm 的條件下進行的幾丁質酶檢測。誤差條形圖代表了這三個獨立試驗的標準偏差。

圖 13 是利用綠色木黴 (*T.viride*) 進行的體外菌絲抑制分析。A 是向各孔中加入 50 μ g 來自各馬鈴薯植株的蛋白質後，16 小時真菌的生長情況。孔 1：共表達 BjCHI1 和 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀；孔 2：僅僅有緩衝液的對照；孔 3：野生型馬鈴薯植株；孔 4：馬鈴薯 pBI121 轉形植株；孔 5：表達 BjCHI1 的轉基因馬鈴薯植株 pBj17-P₆ 和孔 6：表達 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pHE43-P₁₄；B 是在加入 50 μ g 蛋白質抽提物 24h 後，圖 13A 中所示的滴定板中真菌的生長情況。左下方的條形圖表示 0.9cm。

圖 14 表示用茄屬絲核菌在體外進行的真菌生物試驗。將馬鈴薯植株轉移到預先接種茄屬絲核菌的土壤中，移植兩個星期後對植株進行測定並照相。A 是共表達 BjCHI1 和 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₀；B 表達 BjCHI1 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₆；C 是表達 HbGLU 的轉基因馬鈴薯植株 pBj47-P₁₄；D 是未轉形馬鈴薯。

序列表

- <110> 蔡美蓮
趙開軍
- <120> 對真菌性疾病抗性提高的基因修飾植物及其製備方法

<130> 9661-025-999

<140> TW 91133086

<141> 2002-11-11

<150> 60/331,749

<151> 2001-11-20

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1297

<212> DNA

<213> 芥菜

<220>

<223> 芥菜幾丁質酶 (BjCHI1)

<400> 1

```

aacatgaaga cttatctcct tctccttctc atctttctc ac ttctcttato attttctctc 60
ggtgagcaat gcggtagtca atccataccc gagggagcac tctgccccaa cggctctatgc 120
tgcagcgagg ctggatggtg cggcaccacc gaagcttact gcgggcatgg ttgtcaaagc 180
cagtgcaatc ctggtcccta tcctcctcct ccaaccccg c agtgtggtcg tcaatccata 240
cccgcgggag ccctctgccc caacggctta tgctgtagcg aggctggatg gtgcggcacc 300
accgaagctt actgcgggca tggttgccaa agccagtgca ctcccattcc cactcctcct 360
gctcccactc ccactcctcc tactcccact cctcctagtc ctaccctcc tggcccact 420
cctcctggtc ccagcgggga tctttctggc atcatttcaa gagatcagtt ctataaaatg 480
cttaagcaca tgaacgacaa tgattgtcat gctgttggtt tcttcaacta cgacgccttc 540
atcaccgccg ctaagtcttt cccaagtttc gggaacaccg gagaccttgc catgaggaag 600
aaggagatag cagccttctt cggccagact tcccacgaaa ccaccggtgg gtggtcgggt 660
gcacccgatg gagcaaatc atggggctac tgttacaagg aagaaattga caaaagcgat 720
ccccactgtg atagcaacaa cctcgagtgg ccatgcgcac caggcaaatt ttactacgga 780
cgaggaccaa tgatgctgtc ttggaactat aattacggac cgtgcgggag agacctagga 840
ctcgagttac tcaagaacct agatgttgcg tccagcgacc cagtgatagc tttcaaaacc 900
gccatttggg tctggatgac tcctcaagct cctaaacct cgtgccacga cgtgatcacc 960
gaccagtggg agccgtcggc tgccgacatt tctgccggaa ggttaccagg ttatggagtg 1020
attaccaata tcatcaacgg tggattagag tgtgctggtc gcgacgtcgc aaaggtccaa 1080
gatcggatat cgttttatac aaggtagctg ggcatgtttg gtgttgatcc tggaagtaat 1140
attgactgtg acaatcaaag gccgtttaat gaaggtagta acgttttctt ggatgctgca 1200
atthaataag tactgttaat gaagctttgt tgtatccaag caataagaga gtatcaaatt 1260
aaattaaata aaactccttt ttattaagta aaaaaaa 1297

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> 芥菜

<220>

<223> 推導的芥菜幾丁質酶 (BjCHI1) 的胺基酸序列

<400> 2

Met Lys Thr Tyr 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
 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
 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
 Thr Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly Pro Thr 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

<213> Hevea

<220>

<223> Hevea 1,3- 葡聚糖酶 (HbGLU)

<400> 3

```

aaattataag caactttcct ctaatttccc cccttcttaa tggctatctc ctcttcaact 60
tcaggaacta gtagttcctt cccctcaaga actactgtca tgcttcttct gtttttcttt 120
gcagcaagcg ttggtataac agatgccagc gtaggtgttt gctatggaat gcaaggcaac 180
aaccttccac ctgtttcaga ggtcatagct ctctataaaa aatctaacat cacgagaatg 240
agaatttatg atccaaatcg agcagtattg gaagccctta gaggctcaaa cattgaactc 300
atactagtg ttcxaaactc agatctccaa agccttacca atccttccaa tgcaaaatca 360
tgggtacaaa aaaatgttcg tggcttctgg tcaagtgtcc tgttcagata tatagcagtt 420
ggcaacgaaa ttagtcctgt caatagaggc acagcttggt tggctcaatt tgtttgcct 480
gccatgagaa atatacatga tgctataaga tcagctggtc ttcaagatca aatcaaggtc 540
tccactgcaa ttgacttgac cctggtagga aattcctacc ctcttctgac aggtgctttc 600
agggatgatg ttagatcata ctggaccaca attattggat ttctatcctc tatcagggtca 660
cctttacttg ccaatattta tccttacttt acttatgctt ataattccaag ggatatttcc 720
cttcctatg ctttgttcac ttcacatca gttgttgggt gggatgggtca gcgaggttat 780
aagaaccttt ttgatgcaac gttggatgca ttgtactctg ctcttgagag ggctagtggg 840
ggttctctgg aggtggttgt ttcgaaagt ggctggccgt ctgccggagc atttgcctgc 900
acatttgaca atgggcgtac ttatctctca aatttgatcc aacatgttaa aggaggtact 960
cctaagaggc ctaacagagc tatagagact tacttatttg ccatgtttga tgaaaataag 1020
aagcaaccag aggttgagaa acactttgga cttttctttc ctgataaacg gccaaaatat 1080
aatctcaatt ttggtgcaga aaagaactgg gatatttcta ctgaacacaa tgcaacaata 1140
cttttcctta agagtgatat gtgagattgt gagaatttaa gtactatata tatttccaat 1200
gtatgcatgt atccatgtat taaataagag aaccttttct ca 1242

```

<210> 4
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Hevea

<220>
 <223> 推導的 Hevea 1,3-葡聚糖酶的胺基酸序列 (HbGLU)

```

<400> 4
Met Ala Ile Ser Ser Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ser Ser Phe Pro Ser
1          5          10
Arg Thr Thr Val Met Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ala Ser Val Gly
20          25          30
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
65          70          75
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
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
145         150         155
Leu Gln Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Thr Leu Val
165         170         175
Gly Asn Ser Tyr Pro Pro Ser Ala Gly Ala Phe Arg Asp Asp Val Arg
180         185         190
Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Phe Leu Ser Ser Ile Arg Ser Pro
195         200         205
Leu Leu Ala Asn Ile Tyr Pro Tyr Phe Thr Tyr Ala Tyr Asn Pro Arg
210         215         220
Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ser Pro Ser Val Val Val
225         230         235
Trp Asp Gly Gln Arg Gly Tyr Lys Asn Leu Phe Asp Ala Thr Leu Asp

```

95.5-4
 年 月 日 修(更)正 替換頁

	245	250	255
Ala Leu Tyr Ser	Ala Leu Glu Arg	Ala Ser Gly Gly Ser	Leu Glu Val
	260	265	270
Val Val Ser Glu	Ser Gly Trp Pro	Ser Ala Gly Ala Phe	Ala Ala Thr
	275	280	285
Phe Asp Asn Gly	Arg Thr Tyr Leu	Ser Asn Leu Ile	Gln His Val Lys
	290	295	300
Gly Gly Thr Pro	Lys Arg Pro Asn	Arg Ala Ile Glu	Thr Tyr Leu Phe
	305	310	315
Ala Met Phe Asp	Glu Asn Lys Lys	Gln Pro Glu Val	Glu Lys His Phe
	325	330	335
Gly Leu Phe Phe	Pro Asp Lys Arg	Pro Lys Tyr Asn	Leu Asn Phe Gly
	340	345	350
Ala Glu Lys Asn	Trp Asp Ile Ser	Thr Glu His Asn	Ala Thr Ile Leu
	355	360	365
Phe Leu Lys Ser	Asp Met		
	370		

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列的描述：C1(正向)引子

<400> 5
 ctgaattctc ctccggtgag caatgcg 27

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列的描述：C21(正向)引子

<400> 6
 ctgaattcgg ggatctttct ggcatac 26

<210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列的描述：C2(反向)引子

<400> 7
 gcgactgagg ccggttact accttcatta aacg 34

95.5.14
年 月 日 () 正替换页

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：引子
<400> 8
ggtggatggg ctacagcacc agac

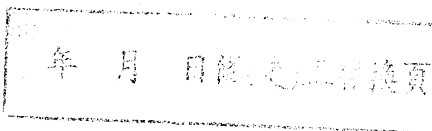
<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：引子
<400> 9
gccacgtcca cactccaa

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：P1(正向)引子
<400> 10
cctccggtga gcaatgcg

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：P2(反向)引子
<400> 11
ttagcggcgg tgatgaagg

<210> 12

I265974



<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：P3(正向)引子
<400> 12
tcctccaacc ccgcagtgt

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工序列的描述：P4(反向)引子
<400> 13
ccactcgagg ttgttgc

肆、中文發明摘要

本發明公開了一種基因修飾植株，如馬鈴薯植株。通過用含有幾丁質酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的嵌合基因轉形植株細胞後，該植株對有關病原體的抗性增強。本發明還提供了通過導入編碼兩個或多個幾丁質結合區的三葉膠樹幾丁質酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因並使三葉膠樹幾丁質酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶表達，從而製備對病原體抗性增強的植物的方法。

伍、英文發明摘要

The present invention discloses genetically modified plants, such as potato plants. The plants are more resistant to a pathogen of interest following transformation of plant cells with a chimeric gene comprising a chitinase gene and β -1,3-glucanase gene. The invention also provides a method of enhancing the resistance of plants to pathogens by introducing a Brassica chitinase gene encoding two or more chitin-binding domains and β -1,3-glucanase gene and expressing the chitinase gene and β -1,3-glucanase gene.

拾、申請專利範圍

1、一種重組載體，其包括：(a) SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列或編碼 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列的核苷酸序列；和(b) SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列或編碼 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列的核苷酸序列。

2、一種重組載體，其包括：(a)編碼含有二至五個幾丁質結合區的幾丁質酶的第一核苷酸序列；和(b)第二核苷酸序列，其為 SEQ ID NO:3 或可編碼出 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之核苷酸序列。

3、如申請專利範圍第 1 或 2 項的重組載體，還包括與第一核苷酸序列和第二核苷酸序列可操作連接的一個或多個調控核酸。

4、如申請專利範圍第 3 項的重組載體，其中的調控核酸是花椰菜花葉病毒的 35S 啓動子。

5、一種重組細胞，其含有如申請專利範圍第 1 或 2 項的重組載體。

6、一種重組細胞，其含有如申請專利範圍第 3 項的重組載體。

7、如申請專利範圍第 5 項的重組細胞，該細胞是植物細胞。

8、如申請專利範圍第 6 項的重組細胞，該細胞是植物細胞。

9、如申請專利範圍第 7 項的重組細胞，其中的植物

細胞係衍生自選自：小麥、玉米、稻、大麥、番茄、蘋果、梨、草莓、胡蘿蔔、馬鈴薯、甜菜、山藥、萵苣和菠菜所組成群之植物。

10、 如申請專利範圍第 8 項的重組細胞，其中的植物細胞係衍生自選自：小麥、玉米、稻、大麥、番茄、蘋果、梨、草莓、胡蘿蔔、馬鈴薯、甜菜、山藥、萵苣和菠菜所組成群之植物。

11、 如申請專利範圍第 9 項的重組細胞，其中該植物細胞係得自馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)。

12、 如申請專利範圍第 10 項的重組細胞，其中該植物細胞係得自馬鈴薯。

13、 一種重組細胞，包括：(a) 含有編碼幾丁質酶的第一核苷酸序列的第一重組載體，其中的幾丁質酶含二至五個的幾丁質結合區；和 (b) 第二重組載體，其包括為 SEQ ID NO: 3 或可編碼出 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之核苷酸序列的第二核苷酸序列。

14、 一種重組細胞，包括：(a) 含有 SEQ ID NO: 1 之第一核苷酸序列的第一重組載體；和 (b) 含有 SEQ ID NO: 3 之第二核苷酸序列的第二重組載體。

15、 一種製備對真菌病原體具有抗性的轉形植株的方法，包括：(a) 將植物以重組載體轉形，該重組載體包括：(i) SEQ ID NO: 1 之第一核苷酸序列；和 (ii) SEQ ID NO: 3 之第二核苷酸序列；和 (b) 選擇可表達第一和第二核苷酸序列的轉形植株。

16、 一種製備對真菌病原體具有抗性的轉形植株的方法，包括：(a) 將植物以第一重組載體轉形，該第一重組載體包括 SEQ ID NO: 1 之第一核苷酸序列；(b) 將植物以第二重組載體轉形，該第二重組載體包括 SEQ ID NO: 3 之第二核苷酸序列；和 (c) 選擇可表達第一和第二核苷酸序列的轉形植株。

17、 如申請專利範圍第 15 或 16 項的方法，其中的真菌是茄屬絲核菌 (*R. solani*)。

年 月 日 修(更)正 替換頁

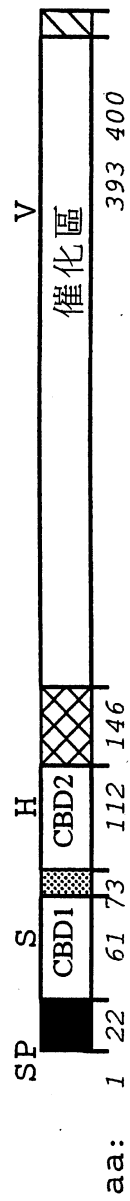


圖 1B

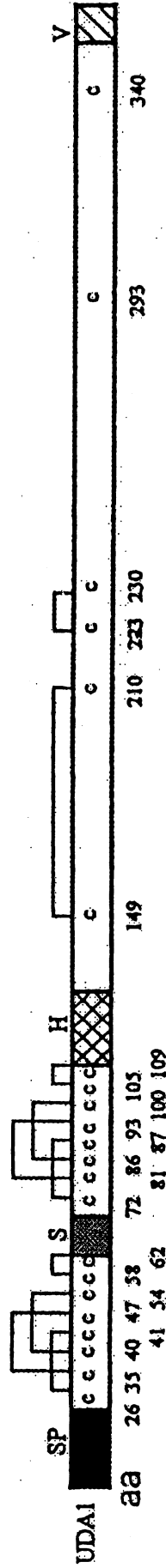
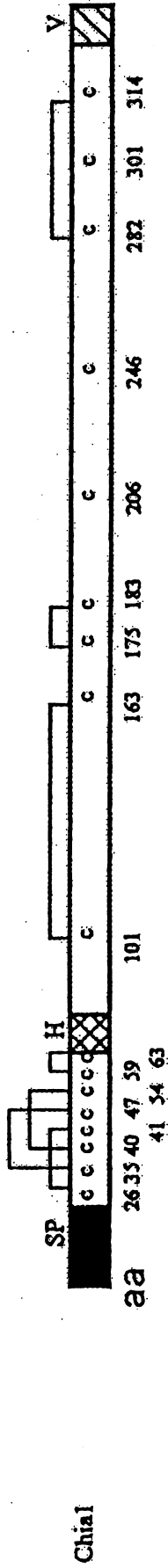
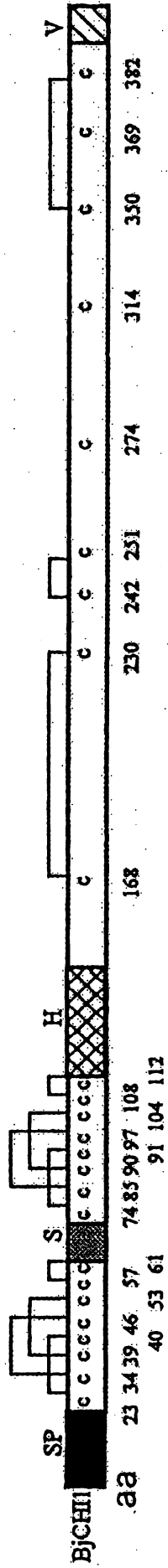


圖 2B

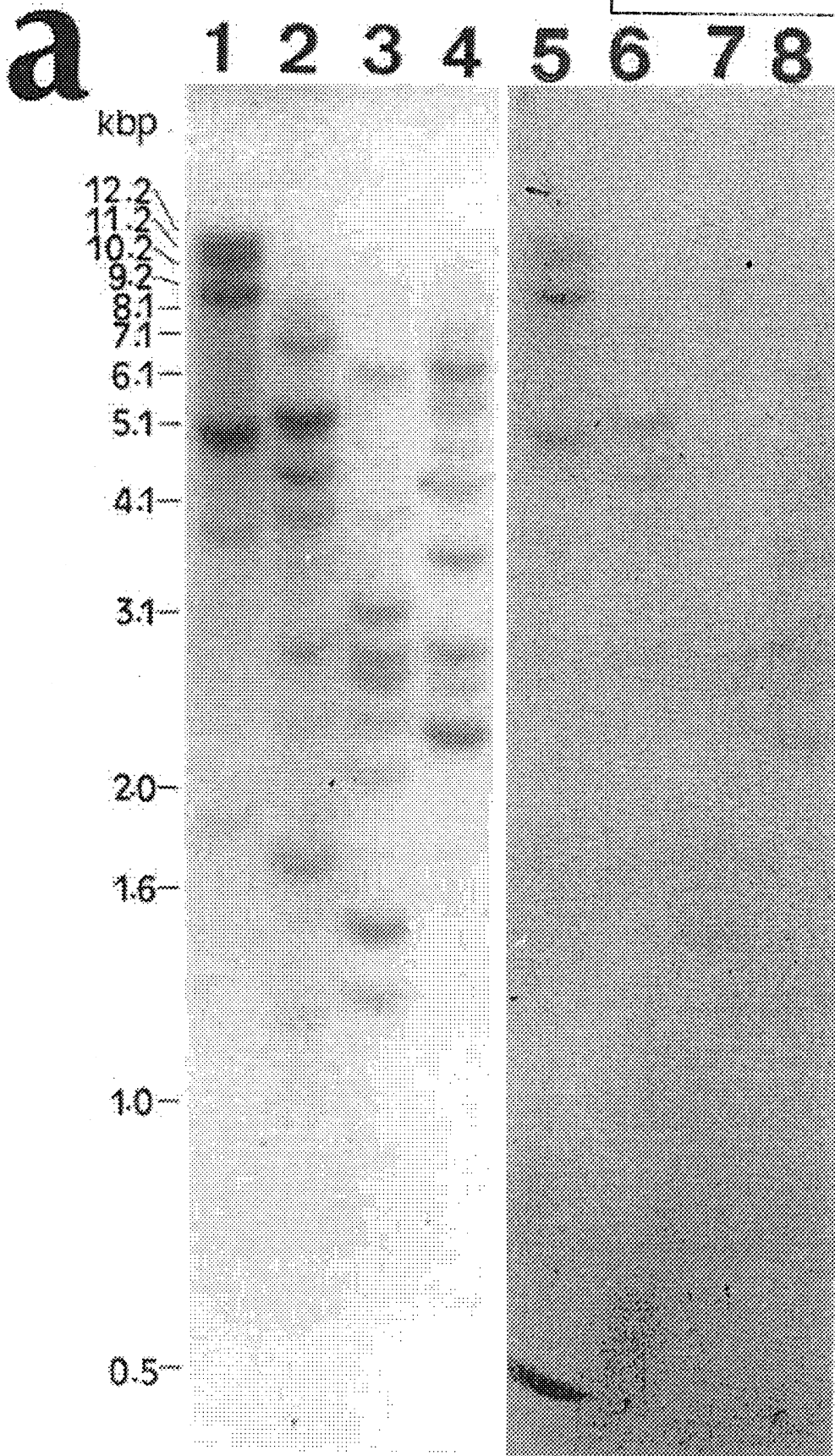


圖 4A

年 月 日修(更)正替換頁

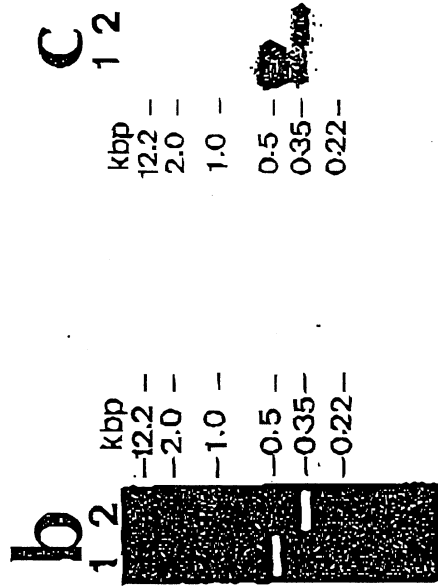


FIG. 4C

FIG. 4B

陸、(一)、本案指定代表圖為：第 1A 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：