

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810142835.5

[51] Int. Cl.

A62D 3/02 (2006.01)

B09C 1/00 (2006.01)

C02F 3/32 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101367001A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/82 (2006.01)

A62D 101/43 (2007.01)

[22] 申请日 2008.4.11

[21] 申请号 200810142835.5

[30] 优先权

[32] 2007.4.11 [33] US [31] 60/922847

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 蔡美莲 肖仕高 威

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 黄可峻

权利要求书 2 页 说明书 41 页

[54] 发明名称

在植物修复中使用表达源自植物酰基辅酶 A 结合蛋白的转化植物的方法

[57] 摘要

本发明描述了使用遗传转化的植物对铅进行植物修复的方法。在许多生物中，只有 10kDa 的 ACBPs 被鉴定，与此不同的是，模式植物拟南芥中存在一个含六个 ACBPs 的家族。除了在植物脂代谢中介导酰基辅酶 A 酯转运的功能外，所有六个拟南芥 ACBPs 都能够结合重金属铅，因此可应用于植物修复。通过在被污染的环境中种植过表达 ACBP 的遗传转化植物，这些植物修复方法提供了去除土壤/水/环境中铅污染的廉价、简单且有效的方法。同时也提供了从受污染的水中去除铅的方法。

1. 一种对重金属污染的环境进行植物修复的方法, 包括:
选择被重金属污染的环境, 以及,
在所述环境中栽培转化的生物体, 该生物体表达编码源自植物的酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBP) 或源自植物的 ACBP 变体的核酸, 从而一定量的重金属从环境中除去。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述转化的生物体是转化的植物。
3. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述核酸是在转化的植物的核内。
4. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述核酸是在转化的植物的质体内。
5. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述重金属是铅, 铜, 镉, 镍, 汞, 砷, 硒, 锑和锌中的一种或几种。
6. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述 ACBP 是拟南芥 ACBP 或其变体。
7. 根据权利要求 6 的方法, 其中所述 ACBP 选自 ACBP1, ACBP2, ACBP3, ACBP4, ACBP5 和 ACBP6。
8. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述转化的植物是拟南芥。
9. 根据权利要求 2 的方法, 其中重组载体包含将 ACBP 靶向至植物内的特定组织的核酸, 该组织可以被切除以除去重金属污染物而不会损害整个植物。
10. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述转化的生物体是转化的微生物。
11. 一种监控/检测环境中污染金属存在的方法, 包括:
选择待检测或监控污染金属存在的环境,
在所述环境中栽培被转化以表达结合至少一种重金属的源自植物的 ACBP 或其变体的植物, 以及,
在所述植物的至少一部分中检测污染金属的存在,
由此显示环境中存在或不存在所述污染金属。
12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所述 ACBP 是拟南芥 ACBP 或其变体。
13. 一种被转化以表达源自植物的酰基辅酶 A 结合蛋白的细胞。
14. 根据权利要求 13 的细胞, 其中所述细胞是转化的微生物。
15. 根据权利要求 14 的细胞, 其中所述细胞是 *E.coli*。
16. 根据权利要求 13 的细胞, 其中所述细胞是转化的植物细胞。

-
17. 根据权利要求16的细胞, 其中所述植物细胞是拟南芥。
 18. 一种包含权利要求16所述细胞的植物。
 19. 根据权利要求18的植物, 其中所述植物是拟南芥。
 20. 根据权利要求13的细胞, 其中所述源自植物的酰基辅酶A结合蛋白是拟南芥ACBP或其变体。
 21. 根据权利要求20的细胞, 其中所述ACBP选自ACBP1, ACBP2, ACBP3, ACBP4, ACBP5和ACBP6。

在植物修复中使用表达源自植物酰基 辅酶A 结合蛋白的转化植物的方法

相关申请的交叉参考

本申请要求 2007 年 4 月 11 日提交的系列号为 60/922,847 的美国临时申请的权益。

技术领域

本发明一般地涉及生物修复的方法，更具体地，涉及使用遗传转化的植物对铅和其它金属污染物进行植物修复（phytoremediation）的方法。

背景技术

植物修复是使用植物从环境中去除污染物如重金属的过程。植物的根从环境中“吸收”污染物，这些污染物可以被储存在植物体内。植物依靠光合作用生长，因此植物修复是一种太阳驱动、环境友好、低成本和原地发生修复的过程。

重金属，采矿业和制造业等工业以及农业产生的不想要的产物，通过污染河流、泥沙、淤泥、地下水和土壤造成环境污染。转基因植物已被成功地用于使土壤中的一些重金属，如汞、镉、砷和硒解毒（Kramer, Curr. Opin. Biotech. **16**: 133-141, 2005）。这些对人和动物都具有毒性的重金属对人神经系统有很坏的影响，并能诱发癌症。已知这些污染物也胁迫生长在污染土壤中的野生型植物的生长和发育。含有能够使污染物“解毒”的异源基因（1 个或多个）的转基因植物可以耐受这种重金属胁迫，同时清理环境。毒素将被吸收并聚集在植物组织内，例如叶和茎。随后，这些植物（如果毒素还没有被降解）可以被收获然后安全地烧毁。这特别适用于难于降解的金属污染物，包括砷、镉和汞（Powell, Nature doi: 10.1038/news021001-14, 2002）。

基因工程使得将非源自植物的基因转移到植物中表达成为可能。在植物修复中，表达非植物基因的遗传转化植物的例子包括表达在转基因拟南芥（*Arabidopsis*）植物中分解砷化合物的细菌酶的那些植物（Dhankher 等, Nature Biotech. **20**: 1140-1146, 2002）以及其它使汞解毒的植物（Kramer, Curr. Opin. Biotech. **16**: 133-141, 2005）。使硒解毒的转基因拟南芥和芸苔（*Brassica*）植物

的产生也有相关报道 (Kramer, Curr. Opin. Biotech. 16: 133-141, 2005)。

编码能够结合铅的蛋白的植物基因明显缺乏。通过表达酵母菌 YCF1 蛋白已经产生能够潜在地对铅进行植物修复的转基因植物 (Song 等, Nature Biotech. 21: 914-919, 2003)。因为能够去除铅的细菌 P 型 ATP 酶在植物细胞内铅的积聚方面不能达到顶点 (culminate), 所以它们被视为不适合用于植物修复 (Song 等, Nature Biotech. 21: 914-919, 2003)。铅的毒性与人体健康极其相关, 特别是儿童的健康 (<http://www.epa.gov/seahome/leadenv.html>), 所以植物修复将提供一个有用的策略用以消除铅积聚以及其在食物链中的浓缩。因此, 在铅的生物修复中, 该方法对人类健康及全世界的环境保护来讲其价值是无法估计的。

先前已经报导, 从人体肾脏组织中分离的两个低分子量的细胞质蛋白被观察到在体内以高亲和力结合生理铅。这两个人类蛋白已被鉴定为分子量为 5kDa 的胸腺素 beta-4 和分子量为 9kDa 的酰基辅酶 A 结合蛋白 (Smith 等, Chemico-Biological Interactions 115: 39-52, 1998)。这些已知在哺乳动物中高度保守的小分子蛋白被认为是暴露于环境的人的铅特异性分子靶点 (Smith 等, Chemico-Biological Interactions 115: 39-52, 1998)。

9kDa 的人 ACBP 与牛的 10kDa 细胞质 ACBP (地西洋结合抑制剂/enzepine) 同源。这些 10kDa 的 ACBPs 在许多生物体 (Kragelund 等, Biochim Biophys Acta 1441: 150-161, 1999 中综述) 包括人 (Swinnen 等, DNA Cell Biol. 15: 197-208, 1996) 中被很好地鉴定。已经证实 10kDa 的牛 ACBP 和 10kDa 的大鼠 ACBP 可以结合棕榈酰辅酶 A 和油酰辅酶 A (Rasmussen 等, Biochem. J. 265: 849-855, 1990)。10kDa 的 ACBP 涉及通过结合长链酰基辅酶 A 酯介导细胞内的酰基辅酶 A 的转运 (Kragelund 等, Biochim Biophys Acta 1441: 150-161, 1999 综述)。这些长链酰基辅酶 A 酯不仅是脂类代谢的中间产物, 而且也涉及蛋白运输、小泡运输和基因调节 (Faergman 和 Knudsen, Biochem. J. 323: 1-12, 1997 综述)。

Engeseth 等已报导在模式植物拟南芥中的 10kDa 的 ACBP (GenBank 登记号码为 NP_174462) 与先前鉴定的人和牛的 ACBPs 同源 (Arch. Biochem. Biophys. 331: 55-62, 1996)。然而, 我们最近的工作显示在拟南芥中存在着其他形式的 ACBPs (Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004)。拟南芥完整 ACBP 基因家族中六个成员编码具有 92-668 个氨基酸的蛋白, 每个含有保守的酰基辅酶 A 结合结构域 (Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004)。具体而言, 它们是

拟南芥 ACBP6 (10kDa 的 ACBP, GenBank 登记号码为 NP_174462, Engeseth 等, Arch. Biochem. Biophys. 331: 55-62, 1996)、膜相关的 ACBP1 (GenBank 登记号码为 AAD03482, Chye 等, Plant J. 18: 205-214, 1999)、膜相关的 ACBP2 (GenBank 登记号码为 NP_194507, Chye 等, Plant Mol. Biol. 44: 711-721, 2000; Li 和 Chye, Plant Mol. Biol. 51: 483-492, 2003)、ACBP3 (GenBank 登记号码为 NP_194154, Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006) 以及两个含有 kelch 基序的 ACBPs: ACBP4 (GenBank 登记号码为 NP_187193, Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004) 和 ACBP5 (GenBank 登记号码为 NP_198115, Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004)。

其它生物中鉴定的许多 ACBPs 是 10kDa 的牛 ACBP 的 10kDa 同源物, 由 86-104 个氨基酸组成, 或者是由第一外显子的选择性使用产生的变体 (Nitz 等, Int. J. Biochem. Cell Biol. 37: 2395-2405, 2005)。拟南芥 ACBP1 (338 个氨基酸组成) 和 ACBP2 (354 个氨基酸组成) 的膜结合结构域定位在 N 末端, 并且都含有 C 末端的锚蛋白重复序列。ACBP1 与 ACBP2 具有 76.9% 的氨基酸同一性。高度保守 (81.4% 同一性) 的 ACBP4 和 ACBP5 都含有 C 末端的 kelch 基序。锚蛋白重复序列和 kelch 基序是能够潜在地介导蛋白-蛋白相互作用的区域, 这表明这些拟南芥 ACBPs 能够与蛋白配偶体发生作用 (Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004)。

因此, 根据结构域的存在, 拟南芥 ACBP 家族可以被分为四类: (1) 92 个氨基酸的较小 10kDa 的 ACBP6; (2) 含有 N 末端膜结合结构域和 C 末端锚蛋白重复序列的 ACBP1 (338 个氨基酸) 和 ACBP2 (354 个氨基酸); (3) 362 个氨基酸的 ACBP3; 以及 (4) 含有 kelch 基序 (motif) 的较大 ACBP4 (668 个氨基酸) 和 ACBP5 (648 个氨基酸)。为了研究每一个酰基辅酶 A 结合结构域在结合酰基辅酶 A 酯中的重要性, 以重组 (His) -标记蛋白形式在大肠杆菌中表达拟南芥 ACBPs 用于进行体外结合分析, 并且在酰基辅酶 A 结合结构域中对结合所必需的氨基酸残基通过点突变将其鉴定出来 (Chye 等, Plant Mol. Biol. 44: 711-721, 2000; Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004; Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006)。拟南芥 ACBPs 对不同酰基辅酶 A 酯的不同结合亲和力表明它们可能有着不同的细胞功能。

因为转化植物中表达植物来源的基因可能通常更容易被公众所接受, 所以

我们在此提供了一种通过在转化植物中表达或过表达源自植物的酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBPs) 对铅及其它金属进行植物修复的方法。

发明内容

本发明的一个方面是基于如下发现：表达酰基辅酶 A 结合蛋白 (acyl-CoA-binding proteins (ACBP)) 的基因修饰植物及其后代能够被应用于对例如铅 (Pb(II)) 的重金属的植物修复。本发明提供的是含有编码 ACBP 的核酸序列的植物转化载体，这些载体可以通过细胞核转化或者质体转化用于产生基因转化的植物。由此产生的过表达 ACBPs 的植物，本文以拟南芥 ACBPs 示例，被赋予了在含有重金属污染物，例如铅、铜和镉的环境中生长的能力。这些植物可以吸收这些金属并将它们储存于植物的组织内，因此，它们可以用于铅及其它金属的植物修复。

因为拟南芥的所有六个酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBPs) 都能够结合重金属铅以及其它以二价阳离子存在的金属污染物 (例如铜和镉)，因此过量表达这些 ACBPs 的基因转化植物在生长中将从环境中吸收这些污染物。随后，这些植物可以被收获，这样就去除了污染。在特定的实施方案中，介绍了使用植物转化载体产生过量表达拟南芥 ACBPs 的转基因植物。

本发明的另一个方面提供了含有编码 ACBP 多肽的片段、衍生物、类似物或者变体的多核苷酸的植物转化载体。在特定的实施方案中，本发明提供了转化植物，例如转基因拟南芥和转质体 (transplastomic) 的烟草植物。本发明提供了含有 ACBP 多肽、或其具有与 ACBP 多肽类似活性的片段、衍生物、类似物或变体的修饰植物。本发明还提供了产生该修饰植物的方法，包括用含有至少一个编码 ACBP 的多核苷酸，或其片段、衍生物、类似物或变体的质体和/或核转化载体转化植物。

在另一个特定的实施方案中，植物转化载体被工程化以生产植物，该植物能够用于植物修复源自污染土壤/水环境中的重金属，特别是以二价阳离子存在的重金属例如铅。本发明的一个方面涉及通过种植拟南芥测试植物并检测铅 Pb(II) (通过观察编码 ACBP1 至 ACBP5 的 mRNAs 的 mRNA 诱导来检测铅) 来检测样品中铅 (Pb(II)) 的方法。样品可以是来自环境中的液体或固体 (例如土壤)。

在一个特定的实施方案中，本发明提供了含有至少一个编码 ACBP、或编

码 ACBP 的片段、衍生物、类似物、或变体的多核苷酸的质体转化载体。在另一个具体实施方案中，本发明提供了含有至少一个编码 ACBP、或编码 ACBP 的片段、衍生物、类似物、或变体的多核苷酸的核转化载体。在另一个实施方案中，本发明提供了表达至少一个 ACBP 多肽、或其具有与 ACBP 多肽类似铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体的核转化载体。在一个特定的实施方案中，本发明提供了通过示例性核转化载体 pAT31 和 pAT314 产生转基因植物的方法。

含有包括编码具有 ACBP 活性的多肽的多核苷酸的载体的植物细胞也是本发明的一个方面。本发明提供了含有表达 ACBP 多肽、其衍生物、类似物、或其变体的细胞的修饰植物的植物部分，例如果实，叶子，块茎，种子，花，茎或根。所述植物部分包括从完整植物上分离的或相连于完整植物上的部分。

在特定的实施方案中，核转化载体用于引起一种或多种 ACBPs 的表达，包括 ACBP 多肽、或其与拟南芥 ACBP 多肽具有类似铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体。在特定的实施方案中，质体转化载体用于引起一种或多种 ACBPs 的表达，包括 ACBP 多肽、或其与拟南芥 ACBP 多肽具有类似铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体。在一个特定的实施方案中，本发明提供了通过示范性的质体转化载体 pAT385 产生转基因植物的方法。在特定的实施方案中，质体转化载体和核转化载体用于表达一种或多种 ACBPs，包括 ACBP 多肽、或其与 ACBP 多肽具有类似铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体。这些核和质体转化载体可以单独使用或者与其它能够增强用其转化的植物的植物修复能力的重组载体联合使用。

本发明提供了在植物中产生 ACBPs、或其具有与 ACBP 多肽类似铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体的方法。所述方法包括用含编码一个或多个 ACBP 多肽的多核苷酸的载体转化植物。此载体也可以任选地包括与编码序列可操作连接的启动子和终止子以及其它调控元件。此载体也可被设计以引入异源多肽，这样其表达将受控于植物自己的内源启动子，例如 Hahn 和 Kuehnle 教导的假基因技术 (US2003-003362641)。可选择的，或额外的，载体可以包含与编码 ACBP 的多核苷酸可操作地连接的组成型和/或诱导型和/或组织特异性的启动子。包含载体的植物细胞也是本发明的一个方面，其中载体包含一个或多个核酸序列，该核酸序列编码 ACBPs，包括多肽或其与 ACBP 多肽具有类似

铅结合活性的片段、衍生物、类似物、或变体。可选择地，植物细胞可以包含本发明的一个或多个载体。每个载体也可以包含编码一个具有 ACBP 铅结合活性多肽的外源序列，或者任选地可以包含编码多于一个该 ACBP 多肽的操纵子。本发明提供了植物部分，例如修饰植物的果实、叶片、块茎、种子、花、茎、根和所有其它的解剖部分。

因为从拟南芥中分离天然形式的 ACBPs 更难实现和更难于大量积累用于体外分析，所以首先测试了拟南芥 ACBP 蛋白的铅结合，使用了大肠杆菌表达的重组 His-标记蛋白，以达到高产量，并辅助纯化组氨酸标记的 ACBPs 用于体外铅结合分析。随后，我们证明体外翻译的 ACBP2 也结合铜与镉，因此期望在这里所述的 ACBPs 不仅用于结合铅、铜和镉，还可以结合其它二价阳离子形式的金属。

在使用铅结合分析证明所有六个拟南芥 ACBPs 能够结合铅的基础上，我们进一步研究在转基因植物中过量表达 ACBP 是否赋予对植物生长培养基中的铅的耐受性。构建包含编码 ACBPs 的核酸的质体构建体用于植物转化。随后，我们比较了过量表达 ACBP 的转基因株系和野生型拟南芥的生长。在含有铅的培养基中，过量表达 ACBP 的株系比野生型生长得更好，这表明 ACBP 赋予结合铅和耐受生长环境中铅存在的能力。在转化植物中引入 ACBP 转基因提供了植物对生长环境中铅胁迫更高的耐受性。

为了确定这些过量表达 ACBP 的植物可以植物修复环境中的铅，测定了这些植物的枝条与根中铅的浓度，并与在含铅的培养基上生长的野生型进行了比较。结果证明过量表达 ACBP 的植物在枝条 (shoots) 中聚集铅，因此表明它们可以对环境中的铅进行植物修复，并且期望它们也能够对环境中的其它二价阳离子金属进行植物修复。

附图说明

图 1 显示根中拟南芥 ACBP (*ACBP1-5* 而非 *ACBP6*) 转录物的铅 Pb(II)-诱导的增加了的反转录聚合酶链式反应分析 (RT-PCR)。在存在 (+) 或不存在 (-) 1mM Pb(NO₃)₂ 处理的情况下，从连续光照 24 小时的 3 周大 Col-0 拟南芥幼苗的根中提取总 RNA。使用 18S rDNA 的转录物用作加样对照 (图底部)。

用于 *ACBP6* 的 RT-PCR 分析的引物是 ML750 (SEQ ID NO: 1) 和 ML751 (SEQ ID NO: 2); *ACBP1*, ML179 (SEQ ID NO: 3) 和 ML759 (SEQ ID NO:

4); *ACBP2*, ML194 (SEQ ID NO: 5) 和 ML205 (SEQ ID NO: 6); *ACBP3*, ML783 (SEQ ID NO: 7) 和 ML784 (SEQ ID NO: 8); *ACBP4*, ML849 (SEQ ID NO: 9) 和 ML850 (SEQ ID NO: 10); *ACBP5*, ML352 (SEQ ID NO: 11) 和 ML353 (SEQ ID NO: 12); *18S*, 18S-F (SEQ ID NO: 13) 和 18S-R (SEQ ID NO: 14)。

图2A-2D比较了(His)₆-ACBPs和体外翻译的ACBPs对Pb(II)、Cd(II)和Cu(II)的结合。(A)荧光分析下的(His)₆-ACBPs与Pb(II)的结合。丹酰化的(His)₆-ACBP在缺少和存在不同浓度(1, 2, 3, 4, 5, 7和9μM)的Pb(II)及在激发波长是360/40nm和发射波长是530/25nm下测定荧光强度。在减去自身的空白后得到每一个ACBP的相对荧光。相对荧光的最高值被设定为1, 其它荧光值与最高值比较之后得到相对荧光百分比。每一点表示的是三次独立试验的平均值和标准误差。柱代表SE(n=3)。(B)用金属螯合亲和层析法测定的体外翻译ACBPs与Pb(II)的结合。左板(Input)显示等量的加入了[³⁵S]甲硫氨酸标记的ACBP1, ACBP2, ACBP6蛋白。右板显示了放射标记的蛋白与Pb(II)的体外结合。Pb(II)平衡基质与[³⁵S]甲硫氨酸标记的蛋白培养后, 洗三次, 用2%SDS, 50mM DTT溶液提取前用咪唑洗提缓冲液洗脱。洗脱下的蛋白放射自显影后用SDS-PAGE分析。(C)用金属螯合亲和层析测定的体外翻译的ACBPs与Pb(II)、Cd(II)和Cu(II)的结合。左面第一板(Input)显示等量加入了[³⁵S]甲硫氨酸标记的ACBP2和ACBP6。相邻板显示了所示放射标记的蛋白与重金属的体外结合。Pb(II)、Cd(II)或Cu(II)平衡基质与[³⁵S]甲硫氨酸标记的蛋白培养后, 洗三次, 用2%SDS, 50mM DTT溶液提取前用咪唑洗提缓冲液洗脱结合的蛋白。洗脱下的蛋白放射自显影前用SDS-PAGE分析。ACBP2与Pb(II)、Cd(II)和Cu(II)的结合可以被金属螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA, 终浓度50mM)抑制, 这表明其结合依赖于二价阳离子。(D)拟南芥ACBPs的酰基辅酶A结合域的比较。点表示与ACBP6一致。“Con”(Conserved, 保守的), 代表拟南芥ACBPs中高度保守的氨基酸残基。所有拟南芥ACBPs(ACBP1-6)显示了在13个氨基酸残基(图2D的“Con”序列中用星号标记)上的100%保守。在酰基辅酶A结合域中, 10个其它氨基酸残基(图2D的“Con”序列中用下划线标记的氨基酸)在ACBP1-5中保守, 但是不在ACBP6中保守。这10个氨基酸残基(“Con”中下划线标记的氨基酸)当中, 在9kDa人类ACBP(GenBank登记号码为NM_020548)中进一步保守的

三个氨基酸残基被用圆圈标记; 在人类 ACBP 以及 ACBP1-5 中保守的这三个氨基酸残基可能在结合 Pb(II) 中起到重要的作用。在“Con”下面, 显示了在 ACBPs 中相同的“Com” (Common, 共有) 氨基酸。“Com”列出了在 ACBP1-5 中的酰基辅酶 A 结合域内的氨基酸, 它们在这五个 ACBPs (ACBP1-5) 中的至少两个中是相同的 (common)。在两个或者更多 ACBPs 内有两个不同的残基出现的位置, 两个残基都被显示, 其中一个被放于另一个的下面。

图 3A-3B 显示植物转化载体 pAT31 (35S:: ACBP1) 和 pAT314 (35S:: ACBP3-GFP) 的构建。(A) 质粒 pAT31 中 35S: ACBP1 构建体, 在这里 ACBP1 cDNA 通过花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子表达。ACBP1 全长 cDNA 被克隆到二元载体 pBI121 (Clontech) 的 *Sma*I 位点。此 pBI121 衍生物被用于建立过量表达 ACBP1 的拟南芥植株。(B) 质粒 pAT314 中 35S: ACBP3-GFP 构建体。ACBP3 全长 cDNA 被克隆到二元载体 pBI-GFP 的 *Bam*HI 位点, pBI-GFP 是通过用 *eGFP* 基因替换掉 pBI121 中的 *GUS* 基因而得到的 pBI121 的衍生物 (Shi 等, *Plant Cell* 17: 2340-2354, 2005)。ACBP3 与 GFP 移位融合 (translationally fused), 并由花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子表达。用于对转化植物进行基因分型的引物 35SB (SEQ ID NO: 15) 位于 *CaMV*35S 启动子区域内部。

图 4A-4E 显示过量表达 ACBP1 的拟南芥植物以及它们对 Pb(II) 胁迫改进的耐受性的分析。(A) 使用 ACBP1 cDNA 探针对野生型拟南芥 (Col-0) 和 3 个独立的过量表达 ACBP1 的拟南芥转基因株系 ACBP1 *ox-2*, *ox-3* 和 *ox-5* 中 ACBP1 转录物水平的 RNA 胶印迹分析。在印迹下面的用溴化乙锭染色的 rRNA 显示加样的总 RNA 的相对量。(B) 使用 ACBP1 特异性抗体对野生型拟南芥 (Col-0) 和过量表达 ACBP1 的拟南芥转基因株系 ACBP1 *ox-3* 和 ACBP1 *ox-5* 中 ACBP1 蛋白水平的 Western 印迹分析 (Chye, *Plant Mol. Biol.* 38: 827-838, 1998)。底部, 考马斯亮蓝染色的等量加样的胶显示了 RuBisCO 大亚基 (星号) 的 54kDa 的条带。(C) 在 MS 培养基和含有 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基中生长的两周的野生型 (Col-0), ACBP1 *ox-3* 和 ACBP1 *ox-5* 幼苗的表型。(D) 图 4C 中显示在含有 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基中生长的拟南芥植物相对根长的比较。柱 (bars) 代表 SE (n=10)。由 Student's *t* 检验得 * *P*<0.05。(E) 图 4C 中显示在含有 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基中生长的拟南芥植物枝条和根相对鲜重的比较。柱代表 SE (n=10)。根长与鲜重被表达为获自生长在 MS 培养基 (100%)

的幼苗的相对值。*Student's *t* 检验得* $P < 0.05$ 。

图 5A-5E 显示过量表达 *ACBP3* 的拟南芥植物以及它们对 Pb(II)处理的增强耐受性的分析。(A) 野生型拟南芥 (Col-0) 和 3 个独立的过量表达 *ACBP3* 的拟南芥转基因株系 *ACBP3 ox-2*, *ox-9* 和 *ox-11* 中 *ACBP3-GFP* 转录物水平的 RNA 胶印迹分析。在印迹下面用溴化乙锭染色的 rRNA 显示了加样的总 RNA 的相对量。(B) 使用 GFP 特异性抗体对野生型拟南芥 (Col-0) 和过量表达 *ACBP3* 的拟南芥转基因株系 *ACBP3 ox-2*, *ACBP3 ox-9* 和 *ACBP3 ox-11* 中 *ACBP3-GFP* 融合蛋白水平的 Western 印迹分析。底部, 考马斯蓝染色的等量加样的胶显示了 54kDa 的 RuBisCO 大亚基 (星号) 的条带。(C) 生长在 MS 培养基和含 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基中的三周龄的野生型 (Col-0) 和转基因 (*ACBP3 ox-2*, *ACBP3 ox-9* 和 *ACBP3 ox-11*) 幼苗。(D) 图 5C 中显示的生长在含和不含 Pb(II) 的 MS 培养基中的植物根长分析。(E) 图 5C 中显示的生长在含和不含 Pb(II) 的 MS 培养基中的植物鲜重分析。柱代表 SE (n>10)。Student's *t* 检验得* $P < 0.05$ 。

图 6A 和 6B 显示野生型拟南芥 (Col-0) 和转基因拟南芥 *ACBP1 ox-3* 和 *ACBP1 ox-5* 中 Pb(II)的含量。拟南芥植物在 MS 培养基上生长 2 到 3 周后被转移到 1 mM Pb(NO₃)₂ 溶液中 48h。分别收集枝条和根用于 Pb(II)含量测定。样品用 11N HNO₃ 在 200°C 消化过夜。在依据 Lee 等的描述 (Plant Physiol. 138: 827-836, 2005)用 0.5N HNO₃ 稀释后, 样品用原子吸收光谱 (PERKIN ELMER-AA Spectrometer 3110) 进行分析。每一个植物株系, 测定六个重复, 每一个重复含有 5 株植物。Pb(II)含量以每株植物 (图 6A) 或每个鲜重 (图 6B) 为基础标准化, *ACBP1 ox-3* 和 *ACBP1 ox-5* 与野生型之间的显著性差异用 Student's *t* 检验确定 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)。柱代表 SE (n=30)。

图 7A 和 7B 显示野生型拟南芥 (Col-0) 和拟南芥转基因株系 *ACBP3 ox-11* 中 Pb(II)含量的比较。每一个植物株系, 测定六个重复, 每一个重复含有 5 株植物。Pb(II)含量以每株植物 (图 7A) 或每个鲜重 (图 7B) 为基础标准化。*ACBP3 ox-11* 与野生型之间的显著性差异用 Student's *t* 检验确定 (* $P < 0.05$)。柱代表 SE (n=30)。

图 8 显示质体转化载体 pAT385 的限制性图谱。以 ML916 (SEQ ID NO: 16)和 ML917 (SEQ ID NO: 17)为引物对通过 RT-PCR 产生了 1.1kb *ACBP1* cDNA 片断, 然后将其克隆到 pGEM-T EASY 载体 (Promega)。然后经限制性内切酶

ApaI 和 *SacI* 酶切后获得 *ACBP1* 片断, 然后将其插入到质体转化载体 (plastid transformation vector) pMLV-HisA (图 8A; Li 等 Exp. Biol. Med. 231: 1346-1352, 2006) 的 *ApaI-SacI* 位点生成 pAT385 (图 8B)。 *rbcLT*, 编码叶绿体 RuBisCO 大亚基的烟草基因; *psbARPro*, 光系统 (PSII) 反应中心的除草剂结合 D1 蛋白的水稻启动子; *psbARTer*, 光系统 (PSII) 反应中心的除草剂结合 D1 蛋白的烟草终止子; *rrnRPro*, rRNA 操纵子的水稻启动子; *aadA*, 氨基糖苷 3'-腺苷酰基转移酶 (aminoglycoside 3'-adenylyltransferase); *rbcLRTer*, 叶绿体 RuBisCO 大亚基的水稻终止子; *accDT*, 编码叶绿体乙酰辅酶 A 羧化酶亚基的烟草基因。

图 9A-9D 显示质体转化以及用质粒 pAT385 转化的烟草的鉴定。(A) 轰击一个月后, 质体转化烟草后在含有 500mg/l 奇霉素二盐酸化物的诱导枝条培养基 (RMOP 培养基) 中枝条的再生。(B) 在含有 500mg/l 奇霉素的 MS 培养基中培养了一个月的生长了根的转质体烟草 (Transplastomic tobacco)。(C) 显示 pAT385 驱动 DNA 通过同源重组整合进入烟草叶绿体基因组的示意图。在质体转化后, 使用 PCR 扩增所用的引物 ML347 (SEQ ID NO: 18)、ML916 (SEQ ID NO: 16)、ML917 (SEQ ID NO: 17) 检测重组 DNA 的插入物。(D) pAT385 转质体株系的 PCR 分析。使用引物对 ML347/ML917 和 ML916/ML917 扩增从野生型 (图 9D, 泳道 1), pMLV-HisA 株系 (图 9D, 泳道 2) 以及 pAT385 转质体株系 (图 9D, 泳道 3) 中提取的总 DNA 样品。从 pAT385 转质体株系中得到了预期的 1.3kb 和 1.1kb 的条带。

序列简述

- SEQ ID NO:1 5'- ATATGGATCCCACGCGTTGTCCTCGTCTTCT -3'
- SEQ ID NO:2 5'- AATATATCATCTTGAATTCAACTG -3'
- SEQ ID NO:3 5'- CGGGATCCGAAAATGTCAATCTTTGGTTTGATCTTCGC -3'
- SEQ ID NO:4 5'- GTCTACAATTGGAATCCTTCTTCTC -3'
- SEQ ID NO:5 5'- TCAAGGGGAGAGTTTCC -3'
- SEQ ID NO:6 5'- CGTCACCCAGAGGAGTC -3'
- SEQ ID NO:7 5'- CTCTCGAGATGGTGGAGAACGATTTGAGT -3'
- SEQ ID NO:8 5'- ACGAGCTCACATCATACTCTTAGGGAATACCA -3'
- SEQ ID NO:9 5'- AGCTCGAGATGGCTATGCCTAGGGCAAC -3'
- SEQ ID NO:10 5'- CGGAGCTCAATGGCATTACCGACCAAA -3'
- SEQ ID NO:11 5'- CGGATCCAATGGCTCACATGGTGAGAGCAG -3'
- SEQ ID NO:12 5'- CGAATTCTCATGGGCACTCATGTTTTAGGC -3'
- SEQ ID NO:13 5'- GCTCGAAGACGATCAGATACC -3'
- SEQ ID NO:14 5'- AGAAAGAGCTCTCAGCTCGTC -3'
- SEQ ID NO:15 5'- CAATCCCACTATCCTTCGCAAGACC -3'
- SEQ ID NO:16 5'- TGGGGCCCATGGCTGATTGGTATCAGC -3'
- SEQ ID NO:17 5'- GCATCGATCTTTGACACACAATTTTAAAG -3'
- SEQ ID NO:18 5'- CACACAAATCGGTAGAGCTTAT -3'
- SEQ ID NO:19 Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly
Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Ile Arg Pro Arg Asp Leu
Gln Leu Val Pro Trp Asn Ser Arg
- SEQ ID NO:20 5'- CGGGATCCGAAAATGTCGCTAATCTCTATCCTCCTCG -3'
- SEQ ID NO:21 5'- ATGGGTGATTGGGCTCAACT -3'
- SEQ ID NO:22 5'- TTAGTCTGCCTGCTTTGCAG -3'
- SEQ ID NO:23 5'- TTCTCCGTCTTACACCGATT -3'
- SEQ ID NO:24 5'- CTTGATGAGGCATTTAGTGC -3'
- SEQ ID NO:25 5'- TGGGTAAAGCTGAGTAACAAG -3

发明详述

本文所用的术语“修饰的植物或植物部分”指植物或植物部分，无论其与完整植物相连还是分离。它还包括通过有性或无性繁殖产生的所述修饰植物或植物部分的后代。

术语“多核苷酸”和“核酸”在本文可互相转换使用，是指任何长度的核苷酸，核糖核苷酸或者脱氧核糖核苷酸的聚合形式。因此，此术语包括但不局限于单链、双链或者多链的DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体、或者包含嘌呤和嘧啶碱基、或者其它天然的、化学或生化修饰的、非天然的、或者衍生的核苷酸碱基的聚合物。

本文所用的术语“操纵子”和“单一转录单元”在本文可互相转换使用，是指一个或多个控制元件（例如启动子）协同调节的两个或者更多连续编码区域（编码基因产物，例如RNA或蛋白的核苷酸序列）。本文所用的术语“基因产物”指由DNA编码的RNA（反之亦然）或由RNA或DNA编码的蛋白，其中基因通常包含编码蛋白的一个或多个核苷酸序列，并且也可能包括内含子和其它非编码的核苷酸序列。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白”在本文可互相转换使用，是指任何长度的氨基酸的聚合形式，可包括编码的和非编码的氨基酸，化学或生化修饰或衍生的氨基酸，以及含有修饰肽骨架的多肽。

本文所用的术语“天然存在的”当用于核酸、细胞或生物时，指在自然界中被发现的核酸、细胞或生物。例如，可以从自然界的来源中分离的，没有在实验室里被人为修饰的，存在于生物（包括病毒）中的多肽或多核苷酸序列，是自然存在的。

本文所用的术语“异源核酸”指以下至少一处是正确的核酸：(a)这个核酸对于给定的宿主微生物或宿主细胞而言是外来的（“外源的”，也就是说在其中没有天然发现）；(b)这个核酸包含在给定的（例如“内源于”）宿主微生物或宿主细胞中发现的核苷酸序列（例如这个核酸包含内源于宿主微生物或宿主细胞的核苷酸序列），然而，在异源核酸的上下文中，与内源发现的相同的核苷酸序列在细胞中以非天然的数量（例如比预期的多或者比自然发现的要多）产生，或者包含了与内源核苷酸序列在序列上不同但编码的蛋白与内源发现的蛋白相同

(有相同或基本相同的氨基酸序列)的核苷酸序列的核酸在细胞中以非天然的数量(例如比预期的或者自然发现的要多)产生;(c)这个核酸包含了两个或更多不以在自然中相同的相互关系存在的核苷酸序列,例如这个核酸是重组的。异源核酸的一个例子是编码 ACBP 的核苷酸序列,其可操作地连接到内源(自然存在)ACBP 编码序列正常不会与之可操作连接的转录控制元件(例如,启动子)。异源核酸的另一个例子是包含编码 ACBP 的核苷酸序列的高拷贝数质粒。异源核酸的另一个例子是编码 ACBP 的核酸序列,其中用编码 ACBP 的核酸遗传修饰正常不会生成 ACBP 的宿主细胞;因为编码 ACBP 的核酸在宿主细胞中不是自然发现的,因此这个核酸对于遗传修饰了的宿主细胞是异源的。

本文所用的术语“重组”指特定的核酸(DNA 或者 RNA)是克隆、限制和/或连接步骤的各种组合的产物,产生了具有与在天然系统中发现的内源核酸不同的结构性编码或非编码序列的构建体。通常,编码结构编码序列的 DNA 序列可以由 cDNA 片段和短的寡核苷酸接头或者一系列合成的寡核苷酸组装以提供能够由包含于细胞或者无细胞的转录和翻译系统的重组转录单元表达的合成核酸。这样的序列可以不被内部非翻译序列或内含子打断的开放读码框形式提供,内含子一般存在于真核基因中。包含这些相关序列的基因组 DNA 也可以用于形成重组基因或者转录单元。非翻译的 DNA 序列可能存在于开放读码框的 5' 末端或 3' 末端,在那里,这些序列不干扰编码区的操作或表达,并且可能通过不同的机制(请见下面的“DNA 调节序列”)作用以调节所需产物的生产。

因此,例如,术语“重组”多核苷酸或核酸是指一种不是自然存在的,例如通过人的干扰人工地组合两个本来分开的序列节段从而产生的多核苷酸或核酸。这个人工重组经常通过化学合成的方法,或者通过对分离的核酸节段进行人工操作,例如基因工程技术而实现。经常进行这种操作以使用编码相同或保守氨基酸的冗余密码子代替一个密码子,同时典型地引入或去除序列识别位点。可选择的,也可以进行这种操作以将具有所需功能的核酸节段连接起来生成所需功能的组合。该人工组合经常通过化学合成的方法,或者通过对分离的核酸节段进行人工操作,例如基因工程技术而得以实现。

术语“构建体”指重组的核酸,通常是重组 DNA,其产生是为了表达特定的核苷酸序列,或者是用于构建其它重组核苷酸序列。

本文所用的术语“外源核酸”指不会常规或自然地给定细菌、生物体或细

胞中天然发现和/或产生的核酸。本文所用的术语“内源核酸”指通常在给定的细菌、生物体或细胞中天然发现和/或产生的核酸。“内源核酸”也指作为“天然的核酸”或者对于给定细菌、生物体或细胞是“天然的”核酸。例如，在实施例3中编码ACBPs的核酸代表对于大肠杆菌的外源核酸。这些核酸是从拟南芥中克隆到的。在拟南芥中，位于染色体上它们的天然位置的编码那些ACBPs的基因序列是“内源”核酸。

术语“DNA 调节序列”、“控制元件”和“调节元件”在本文可互相转换使用，是指在宿主细胞中提供和/或调节编码序列表达和/或编码的多肽产生的转录和翻译控制序列，例如启动子、增强子、多聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白降解信号等。

在本文术语“转化”或“转化的”可与“遗传修饰”或“遗传修饰的”互相转换使用，是指在导入新的核酸（也就是说外源于细胞的DNA）后，在细胞内诱导产生的永久或瞬时的基因改变。基因改变（“修饰”）可通过将新DNA并入宿主细胞的基因组或者瞬时或稳定地作为游离元件保持新DNA而实现。当细胞是真核细胞时，永久的基因改变通常通过将新DNA并入宿主细胞的基因组而实现。在原核细胞中，永久的改变可以引入到染色体中或通过染色体外元件引入，例如质粒或表达载体，它们可以包含一个或多个帮助它们在重组宿主细胞中保持的选择性标记。

“可操作地连接”是指并列，其中所描述的成分处于允许它们以预期的方式行使功能的关系。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，那么这个启动子就是可操作地连接到编码序列。本文所用的术语“异源启动子”和“异源控制区”是指在一般不与自然中特定的核酸序列相关联的启动子和其它控制区。例如，“异源于编码区的转录控制区”是在自然中通常不与编码区相结合的转录控制区。

本文所用的术语“宿主细胞”指在体内或者体外的真核细胞、原核细胞或者作为单细胞实体培养的来源于多细胞生物（例如细胞株系）的细胞，这些真核或原核细胞可以被或已经被作为核酸（例如，包含编码一个或多个基因产物如ACBPs的核苷酸序列的表达载体）的接受体，且包括已经被该核酸基因修饰的原始细胞的后代。可以理解，由于天然的、偶然的或故意的突变，一个单细胞的后代在形态、基因组或总DNA互补等方面可能并不一定与起始亲代完全相

同。“重组宿主细胞”（也称为“基因修饰的宿主细胞”）是指已经引进异源核酸、如表达载体的宿主细胞。例如，通过在合适的原核宿主细胞中引进异源核酸，例如外源于（在自然中一般不会被发现的）原核宿主细胞的外源核酸或者在原核宿主细胞中一般不会被发现的重组核酸，使得主题原核宿主细胞（a subject prokaryotic host cell）成为遗传修饰的原核宿主细胞（例如细菌）；通过在合适的真核宿主细胞中引进异源核酸，例如外源于该真核宿主细胞的外源核酸或者在原核宿主细胞中一般不会被发现的重组核酸，使得主题真核宿主细胞成为遗传修饰的真核宿主细胞。

本文所用的术语“分离的”用于描述存在于不同于其天然发生的环境中的核酸、多肽或细胞。一个分离的遗传修饰的宿主细胞可能存在于遗传修饰的宿主细胞的混合群体中。

可以制备表达盒，包含转录起始或转录控制区（例如启动子），目的蛋白的编码区以及转录终止区。转录控制区包含在遗传修饰的宿主细胞中提供目的蛋白过量表达的那些区域；以及提供可诱导表达的区域，从而当在培养基中加入诱导试剂时，目的蛋白的编码区的转录被诱导或被提高到比诱导前更高的水平。

当单链形式的核酸在适当的温度和溶液离子强度条件下能够与其它的核酸退火时，这个核酸与另一个核酸例如cDNA，基因组DNA或RNA是“可杂交的”。杂交和洗涤条件是众所周知的，例如参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)，特别其中的章节 11 和表格 11.1；以及 Sambrook, J.和 Russell, W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)。温度和离子强度条件决定了杂交的“严格度”。严格度条件可以被调节用以筛选中等相似片段，例如来源于种间距离较远的生物体的同源序列，到高度相似片段，例如来源于种间距离较近的生物体的复制功能性酶的基因。杂交条件和杂交后的洗涤对于获得预期的杂交严格度条件是有用的。一套示例性杂交后洗涤是一系列的洗涤，从用 6 x SSC (SSC 是 0.15M 氯化钠和 15mM 柠檬酸盐缓冲溶液)，0.5%SDS 于室温下洗涤 15 分钟开始，接着用 2 x SSC, 0.5%SDS 在 45°C 下重复 30 分钟，接着用 0.2 x SSC, 0.5%SDS 在 50°C 下重复两次，每次 30 分钟。其它严格条件通过使用更高的温度而获得，在这种条件下，除了用 0.2 x SSC，

0.5%SDS 进行的最后两个 30 分钟洗涤的温度提高到了 60°C外, 其它条件与上面相同。另一套高严格条件用 0.1 x SSC, 0.1%SDS 在 65°C下洗涤两次。另一个严格杂交条件的例子是在 50°C或更高温度下, 在 0.1 x SSC (15mM 氯化钠/1.5M 柠檬酸钠) 中进行杂交。另一个严格杂交条件的例子是在含有 50%甲酰胺, 5 x SSC (150mMNaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5 x Denhardt's 溶液、10%硫酸右旋糖苷、20 μ g/ml 变性平端鲑鱼精子 DNA 的溶液在 42°C 孵育过夜, 接着在 0.1 x SSC 中在约 65°C洗涤滤器。严格杂交条件和杂交后洗涤条件是和上面表示的条件至少同样严格的杂交条件和杂交后洗涤条件。

杂交要求两个核酸含有互补序列, 尽管依赖于杂交的严格度, 但是碱基间的错配是可能的。核酸杂交的适合严格度决定于核酸的长度和互补的程度, 这是众所周知的变量。两个核酸序列之间的相似度或同源性越高, 含有这些序列的核酸的杂交体的熔化温度 (T_m) 越高。核酸杂交的相对稳定性 (对应更高的 T_m) 依照下面的顺序下降: RNA: RNA, DNA: RNA, DNA: DNA。对于长度超过 100 个核苷酸的杂交体, 已经有计算 T_m 的公式 (参照 Sambrook 等, 同上, 9.50 9.51)。对于长度更短核酸的杂交, 也就是寡核苷酸, 错配的位置变得更加重要, 并且寡核苷酸的长度决定了它的特异性 (参照 Sambrook 等, 同上, 11.7 11.8)。通常, 可杂交核酸的长度至少是 10 个核苷酸。例举的可杂交核酸的最小长度是: 至少约 15 个核苷酸, 至少约 20 个核苷酸和至少约 30 个核苷酸。并且, 熟练的技术人员将认识到必要时可以根据如探针的长度的一些因素调整温度和洗涤溶液盐浓度。

术语“保守氨基酸置换”指蛋白中含有相似侧链的氨基酸残基的可置换性。例如, 含有脂肪族侧链的氨基酸组由甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸构成; 含有脂肪族羟基侧链的氨基酸组由丝氨酸和苏氨酸构成; 具有含酰胺侧链的氨基酸由天冬酰胺和谷氨酰胺构成; 含有芳香族侧链的氨基酸组由苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸构成; 含有碱性侧链的氨基酸组由赖氨酸、精氨酸和组氨酸构成; 以及含有含硫侧链的氨基酸组由半胱氨酸和甲硫氨酸构成。例举的保守氨基酸置换组是: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

“合成核酸”可以由用本领域技术人员公知的方法化学合成的寡核苷酸构建块装配。这些构建块被连接和退火形成基因片段, 然后酶促组装以构建完整基

因。涉及 DNA 序列的“化学合成”是指组成核苷酸是体外装配。可通过建立好的方法完成 DNA 的手工化学合成，或者使用一些商业可得机器中的一种进行 DNA 的自动化学合成。根据优化核苷酸序列以反映宿主细胞密码子偏爱的原则可以修饰核酸的核苷酸序列以获得最佳的表达。如果密码子的使用偏向于宿主喜爱的密码子，那么熟练的技术人员将知道成功表达的可能性。优选密码子的确定可依据源自宿主细胞的基因的考察，宿主细胞的序列信息是可获得的。全长蛋白的片段可由众所周知的技术制备，这些技术例如创建编码所需部分的合成核酸；或者使用 Bal 31 核酸外切酶制备较长核酸的片段。

多核苷酸或多肽与另一个多核苷酸或多肽有一定百分比的“序列同一性”，这是指当比较这两个序列并对准时，在相同的相对位置上相同碱基或氨基酸所占的百分数。有许多不同的方式用于确定序列的相似性。为确定序列同一性，可用包括可在互联网 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST 上得到的 BLAST 等方法和计算机程序对序列进行排列，参照例如 Altschul 等 (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410。另一个排列算法是 FASTA，可以从来源于美国威斯康星麦迪逊的 Genetics Computing Group (GCG) 包中得到，它是 Oxford Molecular Group, Inc. 完全拥有的附属物。其它的排列技术在 *Methods in Enzymology*, vol. 266 中有所描述：Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA。特别感兴趣的是那些允许序列中的缺口存在的排列程序。Smith-Waterman 是一种允许在序列排列中出现缺口的排列程序。参见 *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997)。另外，使用 Needleman 和 Wunsch 排列方法的 GAP 程序也可被用于排列序列。参见 *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970)。

本文所用的术语“变体”指自然存在的 ACBP 的遗传突变体或重组制备的 ACBP 变异体，其中每一个含有一个或多个 DNA 突变。术语“变体”还指给定多肽的自然存在的变异体，或给定多肽或蛋白质的重组制备的变异体，其中一个或多个氨基酸残基通过氨基酸的取代，添加，或缺失而被修饰。优选所述变体包括相对于所述拟南芥 ACBPs 少于 25 个，少于 20 个，少于 15 个，少于 10 个，少于 5 个，少于 4 个，少于 3 个，或少于 2 个氨基酸的取代，重排，插入，和/或缺失。在这方面，术语“变体”可包括拟南芥 ACBPs 的片段、衍生物和类似物。

为了产生主题遗传修饰的宿主细胞，使用已成熟的技术，包括但不局限于

电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖苷介导的转染、脂质体介导的转染、粒子轰击等方法，将一个或多个核酸稳定或暂时转入亲本宿主细胞，其中所述核酸包含编码一个或多个可以减轻铅富集诱导的生长抑制的 ACBP 多肽的核苷酸序列。对稳定的转化而言，核酸通常还需要含有选择标记，例如几个众所周知的选择标记，如新霉素抗性、氨苄青霉素抗性、四环素抗性、氯霉素抗性、卡那霉素抗性等之一。

当亲本宿主细胞被遗传修饰以产生两个或多个 ACBPs 时，编码两个或多个 ACBPs 的每一个核苷酸序列在一些实施方案中可以位于分开的表达载体上。在遗传修饰宿主细胞以产生一个或多个 ACBPs 时，编码一个或多个 ACBPs 的核苷酸序列在一些实施方案可以位于单个表达载体上。在一些实施方案中，编码一个或多个 ACBPs 的核苷酸序列包含在单个表达载体中，该核苷酸序列将可操作地连接于共同的控制元件（例如启动子）上，因此这个共同的控制元件控制该单个表达载体中所有 ACBP 编码核苷酸序列的表达。

在一些实施方案中，编码 ACBP 的核苷酸序列包含在单个表达载体中，该核苷酸序列将可操作地连接于不同的控制元件（例如启动子），因此不同的控制元件控制该单个表达载体中每一个 ACBP 编码核苷酸序列的表达。

主题筛选方法可以包括导入外源核酸进入宿主细胞以产生测试细胞，其中当铅（或者另一个二价阳离子金属，例如铜或镉等）以生长抑制量存在于生长培养基中时，宿主细胞表现出生长抑制。当包含编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸导入宿主细胞时，测试细胞的生长抑制被减轻。因此，生长抑制的减轻表明外源核酸编码 ACBP，其中编码的 ACBP 以一定水平产生和/或者具有减轻铅聚集诱导的生长抑制的活性。生长抑制的减轻包括至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或者更多的生长抑制的减轻。在一些实施方案中，外源核酸编码的 ACBP 减轻了生长抑制，这样，细胞的生长速度还原到了没有生长抑制量的铅存在的条件下生长的宿主细胞的细胞生长速度。

在一些实施方案中，例如外源核酸是多个外源核酸（例如 cDNA 文库、基因组文库、或每个编码具有不同氨基酸序列的 ACBP 的核酸的群体，等），这些外源核酸导入到多个宿主细胞，形成多个测试细胞。在一些实施方案中，这些测试细胞在铅以生长抑制和/或死亡诱导量存在的培养条件下生长；那些包含有

编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸的测试细胞比不包含含有编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸的测试细胞生长的快，或者那些包含含有编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸的测试细胞将生存，然而不包含含有编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸的测试细胞将死亡或受到不利地影响。

在一些实施方案中，方法进一步包括从测试细胞中分离外源核酸，其中外源核酸在主题筛选方法中减轻生长抑制。从测试细胞中分离外源核酸的方法是众所周知的。适用的方法包括但并不局限于该领域标准的许多碱裂解法。

在一些实施方案中，主题筛选方法还包括进一步表征候选基因产物。在这些实施方案中，含编码 ACBP 的核苷酸序列的外源核酸从测试细胞中分离；在细胞和/或体外的无细胞转录/翻译系统中表达基因产物。在一些实施方案中，对外源核酸进行核苷酸序列分析，并且从核苷酸序列推导基因产物的氨基酸序列。在一些实施方案中，基因产物的氨基酸序列同公开的氨基酸序列数据库中的其它氨基酸序列进行了比较，以确定是否存在任何与已知蛋白的氨基酸序列的显著氨基酸序列同一性。另外，在细胞中和/或体外无细胞的转录/翻译系统中表达基因产物；并分析基因产物对代谢途径中间体或其它代谢产物的影响。

适合于导入宿主细胞以产生测试细胞的外源核酸包括但不限于从细胞中分离的自然存在的核酸；在从细胞中分离之前或之后被修饰（例如突变）的自然存在的核酸；合成的核酸，例如在实验室中用核酸化学合成标准方法合成的核酸，或者是用重组方法产生的核酸；在体外、细胞内或无细胞系统中扩增的合成或自然存在的核酸；等等。

适合于被导入宿主细胞的外源核酸包括但不限于基因组 DNA；RNA；分离自细胞的 mRNA 的互补 DNA (cDNA) 拷贝；重组 DNA；体外合成的 DNA，例如使用标准的无细胞体外 DNA 合成方法合成的 DNA。在一些实施方案中，外源核酸是从细胞，原核生物细胞或真核生物细胞中制备的 cDNA 文库。在一些实施方案中，外源核酸是由细胞原核生物细胞或真核生物细胞制备的基因组 DNA 文库。

在一些实施方案中，核酸在被导入宿主细胞前被突变。突变核酸的方法是众所周知的，包括良好建立的化学突变方法、辐射诱导的突变，和在合成中突变核酸的方法等。突变 DNA 的化学方法包括暴露 DNA 于化学诱变剂，例如甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸甲酯 (MMS)、N-亚硝基脲 (ENU)、N-甲基-N-硝基

-N-亚硝基胍, 4-硝基喹啉 N-氧化物, 硫酸二乙酯、苯并芘、环磷酰胺、博来霉素、三乙基蜜胺, 丙烯酰胺单体、氮芥、长春新碱、双环氧烷烃 (例如双环氧丁烷)、ICR-170、甲醛、盐酸甲基苄肼、环氧乙烷、二甲基亚硝胺, 7, 12-二甲基苯并蒽、苯丁酸氮芥、六甲基磷酸酰胺、双硫酸酐, 等。辐射突变诱导试剂包括紫外线、 γ -射线、X-射线和快中子轰击。使用例如三甲基补骨脂素和紫外线也可向核酸中导入突变。随机地或靶向地插入可移动的 DNA 元件, 例如转座子, 是产生突变的另一个适合的方法。例如使用聚合酶链反应 (PCR) 技术, 如易错 PCR 可以在无细胞系统中在扩增中向核酸中引入突变。可使用 DNA 重排 (shuffling) 技术 (例如外显子重排、区域交换等) 在体外将突变引入核酸。突变也可以由于细胞中 DNA 修复酶的缺少而被引入核酸, 例如, 细胞中编码突变 DNA 修复酶的突变基因的存在可期望在细胞基因组内产生高频率的突变 (即约 1 个突变/100 个基因至 1 个突变/10,000 个基因)。编码 DNA 修复酶的基因的例子包括但不局限于 Mut H、Mut S、Mut L 和 Mut U, 以及其它物种内的同源物 (例如 MSH 16、PMS 12、MLH 1、GTBP、ERCC-1 等)。核酸突变的方法是众所周知的, 并且任何一个已知的方法都将适用。参见如 [Stemple \(2004\) Nature 5: 1-7](#); [Chiang 等 \(1993\) PCR Methods Appl 2 \(3\): 210-217](#); [Stemmer \(1994\) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751](#) 和美国专利号 6,033,861 和 6,773,900。

在许多实施方案中, 外源核酸被插入到表达载体中。适合原核生物和真核生物宿主细胞的表达载体在本领域是已知的, 并且可以使用任何适当的表达载体。适合的表达载体如上文所述。

如上所述, 在一些实施方案中, 外源核酸从其自然环境中的细胞或生物体中分离。在一些实施方案中, 细胞或生物体中的核酸在被从细胞或生物体中分离之前被突变。在其它的实施方案中, 外源核酸在体外无细胞系统中合成。

在一些实施方案中, 外源核酸是合成的核酸。在一些实施方案中, 合成的核酸包含编码变体 ACBP 的核苷酸序列, 例如, 在氨基酸序列上与自然存在的 ACBP 或其它亲本 ACBP 有一个或多个氨基酸不同的 ACBP。在一些实施方案中, 变体 ACBP 与自然存在的亲本 ACBP 在氨基酸序列上有 1 个氨基酸、2 个氨基酸、3 个氨基酸、4 个氨基酸、5 个氨基酸、6 个氨基酸、7 个氨基酸、8 个氨基酸、9 个氨基酸、或更多氨基酸不同。在一些实施方案中, 变体 ACBP 与自然存在的亲本 ACBP 在氨基酸序列上有约 10-约 15 个氨基酸、约 15-约 20 个

氨基酸、约 20-约 25 个氨基酸、约 25-约 30 个氨基酸、约 30-约 35 个氨基酸、约 35-约 40 个氨基酸、约 40-约 50 个氨基酸、约 50-约 60 个氨基酸不同。

在一些实施方案中，变体 ACBP 由在严格杂交条件下与编码已知 ACBP 的核酸杂交的核酸编码。在另外一些实施方案中，变体 ACBP 由在温和杂交条件下与编码已知 ACBP 的核酸杂交的核酸编码。

在一些实施方案中，包含编码自然存在的 ACBP 的核苷酸序列的核酸通过任何良好建立的方法突变来产生包含编码 ACBP 变体的核苷酸序列的核酸。适当的突变生成方法包括但不限于以上所述的化学突变方法、辐射诱导的突变成和合成中突变核酸的方法。因此，例如，将包含编码自然存在的 ACBP 的核苷酸序列的核酸暴露于以上所述的化学诱变剂，或经受辐射突变，或经受易错 PCR，并且将突变的核酸导入如上述基因修饰的宿主细胞中。使用“增变”（mutator）细菌株产生随机突变的方法在本领域是众所周知的，可用于产生变体 ACBP。参见例如 Greener 等，“An Efficient Random Mutagenesis Technique Using an *E.coli* Mutator Strain”，*Methods in Molecular Biology*, 57: 375-385 (1995)。使用 PCR 的饱和突变技术也是众所周知的并且也可使用。参见例如美国专利号 6,171,820。包含编码变体 ACBP 的核苷酸序列的核酸由减轻铅导致的生长抑制的能力鉴别。

编码 ACBPs 的核苷酸序列在本领域是已知的，并且任何已知的编码 ACBP 的核苷酸序列可以被改变以产生在主题方法中使用的合成核酸。

本发明的一个实施方案提供了含发明的载体的宿主细胞。其它实施方案包括含有编码拟南芥 ACBPs 的核苷酸序列的植物质体转化载体或核转化载体，例如含有全长 ACBPs、或其变体、或其片段用以表达 ACBPs、ACBP 多肽或与全长 ACBPs 具有相似铅结合活性的变体。这些植物载体可以含有产生嵌合 ACBP 多肽的其他序列，其可能包含 ACBP 多肽的突变、缺失或插入。

在进一步描述本发明之前，应该理解的是本发明并不局限于所描述的特定的实施方案，当然也有可能不同。还应该理解的是，这里使用的术语仅仅为了描述特定的实施方案，并不是想限制，因为本发明的范围将仅由附加的权利要求书所限定。

在提供数值范围时，应该理解的是除非上下文另外有清楚的相反规定，每一个居间数值，至下限单位的十分之一，在该范围的上限和下限之间的及任何

其他的在该规定范围内的说明的或居间数值都包含于发明中。这些更小范围的上下限可以独立地被包含于该更小的范围内，也被包含于本发明内，服从于所规定的范围内任何特别地被排除的端值。当规定的范围包括端值中的一个或两个时，排除那些被包括的端值中的一个或两个的范围也包含于发明中。

除非另外有定义，这里所使用的所有技术和科学术语同本发明所属的技术领域中普通的技术人员通常理解的意思相同。尽管任何与在这里描述的材料和方法相同或相似的材料和方法也可用于本发明的实施或测试，但下文描述了优选的材料和方法。这里提及的所有出版物通过援引并入本文用来揭示和描述与被引用出版物相关的材料和/或方法。

需要注意的是，除非上下文中另有清楚的相反规定，在这里和随附的权利要求书中使用的单数形式“a”、“an”和“the”包括复数的对象。因此，例如提及“遗传修饰的宿主细胞”包括许多此类宿主细胞，又如提及“该 ACBP”包括一个或多个拟南芥 ACBPs 和本领域技术人员阅读本文后会知道的它的等同物，等等。尤其需要注意的是，权利要求书可被草拟用以排除任何任选的 (optional) 元素。因此，本陈述意欲作为在述及权利要求的元素时，使用排除性术语如“唯一的”、“仅仅”等，或使用“否定性”限定时的在先基础。

实施例

下面的实施例在这里提出用来提供给本领域普通的技术人员关于如何制备和使用本发明的完整的公开和描述，但并不是为了限制本发明人认为是他们发明的范围，也不表示以下的实验是所进行的全部或仅有的实验。我们已经努力去保证所用数字（如数量、温度等）的准确性，但一些实验误差和偏差也应当予以考虑。除非另有说明，份数是重量份数，分子量是重均分子量，温度是摄氏度，压力是或者接近是大气压。可使用标准简称如 bp，碱基对；kb，千个碱基对；pl，皮升；s 或 sec，秒；min，分钟；h 或 hr，小时；aa，氨基酸；kb，千个碱基对；bp，碱基对；nt，核苷酸；i.m.，肌肉内的（地）；i.p.，腹膜内的（地）；s.c.，皮下的（地）；等。

实施例 1-植物材料、生长条件和处理方法

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 野生型 Columbia (生态型 (ecotype) Col-0)、过量表达 ACBP1 和 ACBP3 的转基因植物 (生态型 Col-0) 在 21°C、黑暗下 8h 和 23°C、光照下 16h 循环下生长。为了对 Pb(II)可诱导的基因表达进行分析，

将在连续光照下生长3周的拟南芥幼苗用1 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 或水（对照）处理，处理24个小时后分别收集根和枝条样品。为了对Pb(II)敏感性进行测试，将拟南芥幼苗表面灭菌并种植于含2%蔗糖、含或不含0.75mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich, St. Louis) 的Murashige and Skoog培养基 (Physiol. Plant. 15: 473-497, 1962)中生长2-3周。

实施例2-铅(II)处理诱导ACBP转录物

为了测定拟南芥ACBPmRNAs的调节是否对Pb(II)胁迫有反应，我们在1mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 处理后用根组织RNA进行了逆转录PCR (RT-PCR)。为进行RT-PCR，依据厂商提供的方法，使用TRIzol (Invitrogen) 试剂在1 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 存在或不存在下（以水为对照）从3周龄的野生型拟南芥 (Col-0) 幼苗的根中提出总RNA。参照厂商 (Invitrogen Cat No.12371-019) 的方法进行RT-PCR分析。根据mRNA的序列设计了特异性的引物。用于ACBP6的RT-PCR分析的引物有ML750 (SEQ ID NO: 1) 和ML751 (SEQ ID NO: 2); ACBP1, ML179 (SEQ ID NO: 3) 和ML759 (SEQ ID NO: 4); ACBP2, ML194 (SEQ ID NO: 5) 和ML205 (SEQ ID NO: 6); ACBP3, ML783 (SEQ ID NO: 7) 和ML784 (SEQ ID NO: 8); ACBP4, ML849 (SEQ ID NO: 9) 和ML850 (SEQ ID NO: 10); ACBP5, ML352 (SEQ ID NO: 11) 和ML353 (SEQ ID NO: 12); 18S, 18S-F (SEQ ID NO: 13) 和18S-R (SEQ ID NO: 14)。

RT-PCR分析(图1)中观察到ACBP1-5的mRNA表达在Pb(II)处理后24h的根中有增加。令人吃惊的是编码人9kDaACBP的同源物的ACBP6的转录物被暗示是体内Pb(II)的分子靶点 (Smith等, Chemico-Biological Interactions 115: 39-52, 1998) 对铅处理显示极小的变化(图1)。这些结果表明拟南芥ACBP1-5比ACBP6在Pb(II)胁迫中起到更大的作用。

实施例3-在大肠杆菌BL21DE3细胞中重组ACBPs的表达

依据Invitrogen设定的方法，编码拟南芥ACBPs的六个cDNA的每一个被克隆到质粒pRSET (Invitrogen) 中用于在大肠杆菌中表达为(His)₆标记的ACBP重组蛋白，该蛋白随后被用于证明这些(His)₆-ACBPs在体外是否结合Pb(II)。使ACBP-pRSET的衍生物在细菌细胞中(大肠杆菌BL21DE3)表达和随后依据Leung等 (Planta 223: 871-881, 2006) 描述的方法收获用于纯化(His)₆标记蛋白。

然后使用 Pb(II)结合试验测试这些纯化的 ACBP 重组蛋白的铅结合能力 (Funaba 和 Mathews, Mol. Endocrinol. 14: 1583-1591, 2000)。

用表达重组 ACBP6(10-kDa ACBP)和 ACBP1-5 的六个质粒每一个转化大肠杆菌 BL21(DE3) Star pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。转化细胞被培养至 $OD_{600nm}=0.4$, 由紫外分光光度计测定 (Shimadzu Model UV-1206, Japan), 然后用 1mM IPTG 诱导。在 IPTG 诱导后 3 个小时, 收获每一个 (His)₆-ACBP, 依据 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 描述的方法提取可溶和不可溶的蛋白。每个重组 ACBP 的纯化的详细方法先前已经针对 ACBP1 描述 (Chye, Plant Mol. Biol.38: 827-838, 1998), ACBP2 (Chye 等, Plant Mol. Biol.44: 711-721, 2000), ACBP3 (Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006) 以及 ACBP4 和 ACBP5 (Leung 等, Plant Mol. Biol.55: 297-309, 2004) 并且在以下被简单的描述。依据 Laemmli (Nature227: 680-685, 1970) 的方法在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上分析收集的蛋白样品。

如 (Chye, Plant Mol. Biol. 38: 827-838, 1998) 所描述, 使用质粒 pAT 61 在大肠杆菌中表达重组 (His)₆-ACBP1 融合蛋白。质粒 pAT 61 是通过将 1.1kb *EcoRI* 片段上的 *ACBP1* cDNA 的 *ExoIII* 缺失衍生物框内克隆到 pRSET B 载体的 *EcoRI* 位点而产生 (Chye, Plant Mol. Biol. 38: 827-838, 1998)。重组 (His)₆-ACBP1 融合蛋白缺少 ACBP1 的 N 末端的前 40 个氨基酸 (Chye, Plant Mol. Biol. 38: 827-838, 1998)。

通过将 *EcoRI* 片段上的 1.3kb *ACBP2* cDNA 符合框架结构地克隆到 pRSET C 载体 (Invitrogen Xpress 系统) 的 *EcoRI* 位点产生质粒 pACBP2, 从而实现重组 (His)₆-ACBP2 融合蛋白在大肠杆菌中表达。这个 1.3kb 的 cDNA 在 5' 末端是不完全的, 缺少 0.19kb 的 5' 非翻译区和甲硫氨酸起始密码子。为确定这个 1.3kb 的 cDNA 被符合框架结构地 (in-frame) 与 (His)₆ 标记融合, 跨越 *EcoRI* 位点的 pACBP2 DNA 序列被随后验证。pRSET C 载体中 *EcoRI* 位点位于驱动重组 (His)₆-ACBP2 融合蛋白表达的 T7 启动子的下游。在该重组蛋白的 N 末端, 由 pRSET C 编码的被命名为 SEQ ID NO: 19 的肽序列 (MRGSHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWIRPRDLQLVPWNSR) 融合到了 ACBP2 肽的氨基酸残基 Gly-2 上。使用 GCG 分析包 (Genetics Computer Group) 预测这个重组蛋白的预期分子量。培养由 pACBP2 转化的大肠杆菌细胞,

且通过 1mM IPTG 诱导 (His)₆-ACBP2 融合蛋白的表达; 根据 Invitrogen 所描述的方法提取可溶和不可溶的蛋白。依据 Bradford (Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976) 的方法来测定这些蛋白提取物的蛋白浓度。依据 Invitrogen 描述的方法, 蛋白诱导的最适时间是 IPTG 诱导后 4h。在加入 1mM IPTG 后不同时间点取出的可溶蛋白提取物和不可溶蛋白提取物的蛋白样品 (10 μ g) 依据 Laemmli (Nature 227: 680-685, 1970) 的方法在 SDS-PAGE 上进行分析。

在源于 pRSET B (Invitrogen) 的载体 pAT223 中克隆的重组(His)₆-ACBP3 依据 Leung 等(Planta 223: 871-881, 2006)描述的方法由大肠杆菌 BL21(DE3)Starp Lys (Invitrogen) 转化体制备。将转化细胞培养至 OD_{600nm}=0.4, 通过紫外分光光度计测定 (Shimadzu Model UV-1206, Japan), 然后用 1mM IPTG 诱导。在 IPTG 诱导后 3 个小时, 收获(His)₆-ACBP3, 依据 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 描述的方法提取可溶和不可溶蛋白。

如 Leung 等 (Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004) 所述, 分别由 pRSETB (Invitrogen) 衍生的载体 pAT184 和 pAT185 表达的重组(His)₆-ACBP4 和 (His)₆-ACBP5 通过大肠杆菌 BL21(DE3)Starp Lys (Invitrogen) 转化体制备。

在 pRSETB (Invitrogen) 衍生的载体 pAT335 中克隆的重组(His)₆-ACBP6 (包含 His 标记的重组蛋白的大小是 18.9kDa) 通过大肠杆菌 BL21(DE3)Starp Lys (Invitrogen) 转化体制备。使用命名为 SEQ ID NO: 1 的引物 ML750 (5'-ATATGGATCCCACGCGTTGTCCTCGTCTTCT-3') 和命名为 SEQ ID NO: 2 的引物 ML751 (5'-AATATATCATCTTGAATTCAACTG-3'), 通过 RT-PCR 得到由编码拟南芥 ACBP6 的全长 cDNA 构成的 0.65kb 的 PCR 片段。这个 0.65kb 的片段被克隆到 pGEM-T EASY 载体 (Promega)。通过 DNA 测序分析验证插入后, 对应于编码区域的 *SacI-EcoRI* 片段被符合框架结构地克隆到 pRSETB (Invitrogen) 载体中产生质粒 pAT335。使用 GCG 程序 (Genetics Computer Group, Wisconsin Software Version 10.2) 预测, 这个质粒表达的(His)₆ 标记的 ACBP 的分子量为 18.9kDa。将质粒 pAT335 导入大肠杆菌 BL21(DE3)Star pLys (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 然后培养至 OD_{600nm}=0.4, 由紫外分光光度计测定 (Shimadzu Model UV-1206, Japan), 随后用 1mM IPTG 诱导。IPTG 诱导 3 个小时后, 收获表达(His)₆-标记的 ACBP 的细胞, 依据 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 描述的方法提取不可溶蛋白。使用 Bradford (Anal Biochem 72: 248-254,

1976) 的方法测定细菌粗提物中的蛋白浓度。随后, 用 15%的聚丙烯酰胺凝胶分离 10 μ g 的每种蛋白样品并使用 Trans-Blot cell (Bio-Rad) 电转移到 ECL 膜上 (Amersham, Buckinghamshire, UK) 或者用考马斯亮兰染色。

细菌粗提物的蛋白浓度依据 Bradford (Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976) 的方法测定, 依据 Laemmli (Nature 227: 680-685, 1970) 的方法在 SDS-PAGE 上分析在不同时间点收获的样品 (10 μ g)。随后用考马斯亮兰对 10%的聚丙烯酰胺凝胶染色或依据厂商的说明书、使用 Trans-Blot@cell (Bio-Rad) 将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶电转移到 ECL 膜上 (Amersham, Buckinghamshire, UK) 用于 western 印迹分析 (Sambrook 等: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 18.60-18.73, 1989)。依据厂商的说明书, 使用 QIAexpress Ni-NTA 共轭物 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 检测 (His)₆ 标记的 ACBP 蛋白的表达。

实施例 4-从大肠杆菌转化体中纯化重组的 (His)₆ 标记的 ACBPs

如先前描述 (Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004; Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006) 以及根据厂商提供的说明书, 重组 (His)₆ 标记的 ACBPs 通过 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 的亲合柱纯化。

(His)₆-ACBP1 表达于大肠杆菌提取物的可溶部分并且依据生产商的说明书, 通过 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 亲和柱纯化。

在变性的条件下进行 (His)₆-ACBP6、(His)₆-ACBP2、(His)₆-ACBP3、(His)₆-ACBP4 和 (His)₆-ACBP5 的批量提取。(His)₆-ACBP2 融合蛋白在缓冲溶液 E (8M 尿素、0.1M 磷酸二氢钠、0.01M Tris, pH4.5、5%甘油) 中被洗脱出来。(His)₆-ACBP3、(His)₆-ACBP4 和 (His)₆-ACBP5 融合蛋白在缓冲溶液 D (8M 尿素、0.1M 磷酸二氢钠、0.01M Tris, pH5.9、5%甘油) 和缓冲溶液 E (8M 尿素、0.1M 磷酸二氢钠、0.01M Tris, pH4.5、5%甘油) 中被洗脱出来。在含有 50mM HEPES 钠盐、200mM NaCl、2mM MgCl₂、5mM EDTA、10%甘油、0.005%(v/v) Tween-20、pH7.9 的溶液中、4 $^{\circ}$ C 下透析和重折叠后, 依据生产商的说明书, 通过 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 亲和柱纯化每一个重组蛋白。

每一个纯化的 (His)₆ 标记的重组融合蛋白使用 Centricon-10 (Amicon) 离心柱浓缩并随后用于体外结合分析。纯化的 (His)₆-ACBPs 的浓度通过称量冷冻干燥的重组蛋白和测量 280nm 下的吸收来测定 (Layne, Meth. Enzymol. 3: 447-454,

1957)。

实施例 5-铅结合分析

铅结合分析和荧光测定依据经过小修改后的 Funaba 和 Mathews (Mol. Endocrinol. 14: 1583-1591, 2000) 的方法进行。简单的说, 3.2 μ M 的每一个纯化的、平衡于含 200mM NaCl 的 20mM 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.2) 的(His)₆-ACBP 蛋白用 8 μ l 200mM 的丹酰环乙亚胺(dansyl aziridine) (Molecular Probes, Cat. No. D151) 标记, 并在 1.5ml 的 Eppendorf 管中、在室温下反应 2h。丹酰化的 (His)₆-ACBP 蛋白被分到 96 孔微滴定板 (Nunc Cat. No. 236105) 的 8 个孔中。加入不同浓度 (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 和 9.0 μ M) 的 Pb(NO₃)₂ (Aldrich, Cat. No. 203580) 溶液, 然后在室温下孵育反应 1h。

使用 BIO-TEK FL600 荧光平板读数仪 (BIO-TEK Instrument, INC, USA), 在激发波长 360/40nm 和发射波长 530/25nm 的条件下测定荧光值。在结合铅之前, 丹酰环乙亚胺偶合的(His)₆-ACBP 重组蛋白易于发生构象上的改变。结合 Pb(II)分子后, 丹酰化的(His)₆-ACBP 重组蛋白将改变它们的构象并且染料将显示荧光激发的增加。因此, 存在和不存在铅分子时荧光的不同表明(His)₆-ACBP 重组蛋白与 Pb(II)的结合。每一个实验被重复三次以确认结果。

我们的结果显示重组 ACBPs 可以在体外结合 Pb(II)。在存在 1-9 μ M 的 Pb(II) 时以剂量依赖的模式增加的(His)₆-ACBPs 的相对荧光强度表明了与 Pb(II)的结合 (图 2A)。观察到(His)₆-ACBP4 和(His)₆-ACBP1 的相对荧光强度比其它重组 ACBPs 的高许多。

实施例 6-使用金属螯合亲和层析的重金属结合分析

为构建用于体外转录/翻译中使用的 pGEM-T EASY (Promega) 衍生物, 由 RT-PCR 产生 ACBP1、ACBP2 和 ACBP6 的编码区域。RT-PCR 中所用的引物如下: ACBP1 (ML190 (SEQ ID NO: 20) 和 ML917 (SEQ ID NO: 17)), ACBP2 (ML902 (SEQ ID NO: 21) 和 ML903 (SEQ ID NO: 22)) 和 ACBP6 (ML812 (SEQ ID NO: 23) 和 ML751 (SEQ ID NO: 2))。依据厂商的说明书, 为了使用 TNT[®]T7/SP6 偶联的小麦胚提取系统 (Promega) 进行体外转录/翻译, 将 PCR 产物随后克隆到 pGEM-T EASY 载体 (Promega)。为进行金属结合分析, 通过除掉 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen) 中的镍然后用 0.1M Pb(NO₃)₂ (Aldrich)、CdCl₂ (Aldrich) 或 CuCl₂ (Aldrich) 重新平衡来制备 Pb(II)、Cd(II)、Cu(II)平衡基质。

将 20 μ l Pb(II)、Cd(II)、Cu(II)平衡基质, 545 μ l 的 50mM KH₂PO₄、300mM NaCl、pH7.4 以及 [³⁵S]甲硫氨酸标记的蛋白加入到微离心管中 (Dykema 等, Plant Mol. Biol. 41: 139-150, 1999) 并且在 4°C 下轮子上旋转培养 1h。随后, 用 1.0ml 的 50mM KH₂PO₄、300mM NaCl、pH7.5 的溶液洗基质 3 次。用 200 μ l 的 50mM KH₂PO₄、300mM NaCl、500mM 的咪唑、pH4.5 下洗脱结合的蛋白, 随后用 200 μ l 的 2%SDS、50mM DTT 提取, 在 85°C 下加热 3min, 然后 SDS-PAGE 分析, 然后进行放射自显影。

我们的结果表明体外翻译的 ACBP1 和 ACBP2 比 ACBP6 (图 2B) 更好地结合 Pb(II)。而 ACBP1 比 ACBP2 稍好一点的结合 (图 2B)。我们的结果 (图 2C) 进一步显示体外翻译的 ACBP2 比 ACBP6 结合 Cd(II)和 Cu(II)要好。ACBP2 和 Pb(II)、Cd(II)和 Cu(II)的结合被金属螯合剂 EDTA 抑制, 表明结合依赖二价阳离子 (图 2C)。

体外翻译的 ACBP2 (图 2B) 和(His)₆-ACBP2 (图 2A) 之间在铅结合上的不同可能是由于不同的蛋白制备方法造成的。与体外翻译的 ACBP2 不同, (His)₆-ACBP2 是从大肠杆菌的不可溶提取物在变性条件下制备并随后被再折叠 (Chye 等, Plant Mol. Biol. 44: 711-721, 2000)。与此相对照, (His)₆-ACBP1 直接从大肠杆菌的可溶性提取物中制备 (Chye, Plant Mol. Biol. 38: 827-838, 1998)。尽管是人 ACBP, 体内 Pb(II)的分子靶点 (Smith 等, Chemico-Biological Interactions 15: 39-52, 1998), 的更近的同源蛋白, 但是(His)₆-ACBP6 (图 2A) 和体外翻译的 ACBP6 (图 2B) 结合 Pb(II)似乎不如 ACBP1 好。由于拟南芥 ACBPs 的更大同源蛋白在人类中没有被鉴定, 因此更小的 ACBP 可能是在人类中唯一可得的结合 Pb(II)的 ACBP。与拟南芥 ACBPs 酰基辅酶 A 结合区域的比较显示在图 2D 中。在酰基辅酶 A 结合区域中, 在 ACBP1-5 中保守, 但是不在 ACBP6 中保守 10 个氨基酸残基被鉴定 (图 2D“Con”序列中用下划线标记)。在人类 9kDa ACBP (GenBank 登记号码为 NM_020548) 中进一步保守的三个保守氨基酸残基被用圆圈标记; 在人类 ACBP 以及 ACBP1-5 中保守的这三个氨基酸残基可能在结合铅中起到重要的作用。

其它源自植物衍生的 ACBPs 可通过使用本领域技术人员公知的技术搜索已知数据库中的与拟南芥 ACBPs1-6 中的任何一个有同源性的序列而被鉴定。可选择地, 为了获得其它源自植物衍生的 ACBPs, 本技术领域中的普通技术的人

员可以获得并用常规的技术和探针基于拟南芥 ACBPs1-6 之一来获得和探测感兴趣植物物种的 DNA 文库来鉴定随后可以被分离和表达的同源序列。这些蛋白表达产物可以随后被检测来确认它们是否能结合酰基辅酶 A 酯。

所有拟南芥 ACBPs (ACBP1-6) 显示了另外 13 个氨基酸残基 (图 2D 中“Con”序列中用星号标记) 的 100% 保守。在这些残基上保守的源自植物的 ACBPs 和 ACBP 变体, 在推定的酰基辅酶 A 结合区域中, 应当保留这 13 个保守残基中的至少 7 个残基。虽然前两个保守残基 (用星号标记) “F”和“V”可以以不同方式隔开 (3-6 个残基的间隔), 但是后 11 个保守残基是特别的 **LxxLxxxAxGxxxxxxPxxxxxxxxKWxxWxxxxxxxxEAM**, 在这里 x 代表任何氨基酸残基。在 ACBP 变体或其它源自植物的 ACBPs 中, 保留这 13 个保守残基中的至少 7 个残基, 这个区域的存在可以进一步被检测来确认它是否提供结合酰基辅酶 A 酯的能力。

图 2D 还显示了在“Con” (Conserved, 保守的) 氨基酸下面、在酰基辅酶 A 结合区域中出现的“Com” (Common, 共同的) 氨基酸残基。通过定义, “Com”列出了在 ACBP1-5 的酰基辅酶 A 结合区域内、在这五个 ACBPs (ACBP1-5) 任一个至少出现两次的氨基酸残基。图 2D 显示在 ACBP1-5 的酰基辅酶 A 结合区域中氨基酸高度保守; 因此编码这个区域的核苷酸序列可以用 PCR 扩增并用作杂交探针来鉴定其它生物体中拟南芥 ACBP1-5 的同源物。

例如, 在 ACBP1 中编码酰基辅酶 A 结合区域的核苷酸序列 (氨基酸 94-180) 可以通过使用正向引物 5'-CTTGATGAGGCATTTAGTGC-3' (被命名为 SEQ ID NO: 24) 和反向引物 5'-TGGGTAAAGCTGAGTAACAAG-3' (被命名为 SEQ ID NO: 25) 来制备, 以生成一个 0.26-kb 的 DNA 片段, 当这个 DNA 片段被用作杂交探针来筛选 DNA 文库时, 它应当可以检测其它源自植物的编码酰基辅酶 A 结合区域的核苷酸序列。对于 ACBP1 内酰基辅酶 A 结合区域的 PCR 扩增, 每个 25 μ l 的 PCR 反应包括 25ng 质粒 pAT31 DNA、10pmol 的每种引物 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25、1U 的 Taq 聚合酶 (Perkin Elmer)、2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲溶液、1.5 μ l 的 25mM MgCl₂ 和 0.5 μ l 的 10mM 每种 dATP、dGTP、dTTP 和 ³²P 标记的 dCTP。PCR 扩增以 95 $^{\circ}$ C 变性 3min 起始, 然后是 94 $^{\circ}$ C 1min、55 $^{\circ}$ C 1min 和 68 $^{\circ}$ C 4min 的 40 个循环, 以及在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

这个 0.26kb 的 PCR 产生的放射标记探针可用来筛选 DNA 文库来鉴定编码

ACBP 同源物的杂交克隆。杂交和洗涤条件被大家所熟知并举例于 Sambrook, J., Fritsch, E.F.和 Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), 特别是里面章节 11 和表格 11.1; 以及 Sambrook, J.和 Russell, W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)。使用这个 0.26kb 的编码 ACBP1 酰基辅酶 A 结合区域的核苷酸序列作为询问序列对 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) 进行的 BLAST 搜索产生了 56 个从其它物种得到的“Blast 命中”, 这证明了它作为杂交探针筛选 DNA 文库的可行性。这些“Blast 命中”(%DNA 同一性显示在括号内) 包括 GenBank 登记号: AM476905 (葡萄 (*Vitis vinifera*); 75%同一性); AC189237 (芜菁 (*Brassica rapa*); 75%); CT831642 (水稻 (*Oryza sativa*); 73%); NM_001060827 (水稻; 73%); DQ908250 (棉花 (*Gossypium hirsutum*); 81%) 和 EF086012 (云杉 (*Picea sitchensis*); 69%)。我们先前使用 ACBP1 抗体对来源于芥菜型油菜 (*Brassica juncea*)、茄子 (*Solanum melongena*)、莴苣、胡萝卜和西红柿的总植物蛋白进行的 Western 印迹分析表明存在分子量与拟南芥 ACBP1 相似的交叉反应条带, 这表明 ACBP1 同源蛋白在许多不同的植物物种中存在 (Chye 等, Plant J.18: 205-214, 1999)。

在分离其它源自植物的 ACBPs 时, 这些 ACBPs 中功能性酰基辅酶 A 结合区域的存在可以使用 His 标记的 ACBPs 和放射标记的酰基辅酶 A 酯在体外通过 Lipidex 分析检测, 其中 His 标记的 ACBPs 和放射标记的酰基辅酶 A 酯包括但并不局限于先前所描述的 ¹⁴[C]油酰辅酶 A、¹⁴[C]棕榈酰辅酶 A、¹⁴[C]花生烯酰辅酶 A (Chye 等, Plant Mol. Biol.44: 711-721, 2000; Leung 等, Plant Mol. Biol.55: 297-309, 2004; Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006)。非放射标记的酰基辅酶 A 酯可以和放射标记的酰基辅酶 A 酯联合起来使用来测定结合, 如 Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006 所述。His 标记的蛋白可以依据实施例 3 和 4 所述制备。在 Lipidex 分析中使用这些 His 标记的 ACBPs 的方法已经针对拟南芥 ACBP1-5 进行详细的描述 (Chye 等, Plant Mol. Biol. 44: 711-721, 2000; Leung 等, Plant Mol. Biol. 55: 297-309, 2004; Leung 等, Planta 223: 871-881, 2006)。

实施例 7-过表达 ACBP1 和 ACBP3 的转基因拟南芥的制备

将图 3A-3B 中所示的植物转化载体 pAT31(35S:ACBP1) 和 pAT314(35S:ACBP3)通过三亲杂交方法从 *E.coli* 引入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404 中(Roger 等, Plant Molecular Biology Manual pp.A2:1-12,1988), 随后使用植物浸渍 (floral dip) 方法将其导入野生型拟南芥植物 (ecotype Columbia) 中(Clough 和 Bent, Plant J. 16:735-743, 1998)。转化的 T₀ 代种子在含有 50mg/mL 卡那霉素的植物生长培养基上进行筛选, 然后将得到的阳性转化体转移到土壤中获得 T₁ 群体。利用 35S 启动子特异的正向引物 35SB(SEQ ID NO:15)和基因特异的反向引物 ML759(SEQ ID NO:4;用于 35S:ACBP1)和 ML784(SEQ ID NO:8;用于 35S:ACBP3), 通过 PCR 扩增进一步确证阳性转化体。根据生产商提供的方案使用 Digoxigenin Northern 印迹试剂盒 (Roche)进行的 RNA 凝胶印迹分析如 Xiao 等所述(PlantCell16:1132-1142,2004)。简言之, 从 T₂ 转化体中提取总 RNA, 在含 6%甲醛的 1.5 %琼脂糖凝胶上分离 30 μ g 总 RNA, 然后转移到 Hybond N 膜(Amersham)上。使用 ACBP1-和 ACBP3-特异性 cDNA 探针进行 Northern(RNA)印迹分析以检测 35S:ACBP1 和 35S:ACBP3 转录物。为制备 Northern(RNA)印迹分析所用的探针, 将特异性的引物 ACBP1(ML179, SEQ ID NO:3 和 ML759, SEQ ID NO:4)及 ACBP3(ML783, SEQ ID NO:7 和 ML784, SEQ ID NO:8)用于 PCR 扩增。参照生产商的说明书 (Roche, 德国), 使用 PCR Digoxigenin 探针合成试剂盒标记这些片段。杂交和检测均按照生产商(Roche)建议的标准步骤进行。Western 印迹分析按照 Chye(Plant Mol. Biol. 38:827-838, 1998)的描述进行。从已有果荚的成熟植物中提取植物总蛋白。用 Bio-Rad 蛋白分析试剂盒(Bradford, 1976)测定蛋白浓度。每个孔上样 10 μ 总蛋白于 SDS-PAGE 凝胶。用 Trans-Blot cell(Bio-Rad)将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶电转移到 Hybond-C 膜(Amersham)上。Western 印迹分析中使用亲和柱纯化的 ACBP1 特异性抗体(Chye,Plant Mol. Biol. 38:827-838, 1998)或 GFP 特异性抗体 (Invitrogen)。参照生产商的说明使用 ECL Western 印迹检测试剂盒(Amersham)检测交叉反应条带。

测试 T₃ 稳定转化体对 Pb(II)的敏感性以及 Pb(II)含量。为了测定过表达 ACBP1 的转基因拟南芥中 Pb(II)的含量, 将植物生长在 MS 培养基中 2 到 3 周, 然后转移到含有 1mM Pb(NO₃)₂ 的溶液中 48 小时。称重和收获用于测定 Pb(II)含量的植物枝条和根。为测定过表达 ACBP3 的转基因拟南芥中 Pb(II)的含量,

从萌发并生长在含 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的培养基中的幼苗收集 2 周的拟南芥枝条。根据文献 (Lee 等, *Plant Physiol.* 138:827-836, 2005) 的描述, 样品在 11 N HNO₃ 中 200 °C 消化过夜。样品用 0.5 N HNO₃ 稀释后, 用原子吸收光谱仪 (PERKIN ELMER-AA Spectrometer 3110) 分析。从 30 株独立的植株, 分作 6 组 (每组包括 5 株植物) 收获枝条样品测定每个植物株系, 即每个植物株系包含 6 个重复, 每个重复包含 5 株植物。从三次独立实验中得到每个植物株系的平均值。

实施例 8-过表达 ACBP1 的转基因植物比野生型具有更强的 Pb(II)胁迫耐性

为证实 ACBP1 是否赋予 Pb(II) 抗性, 通过农杆菌 (*Agrobacterium*) 转化制备过表达 ACBP1 的转基因植物 (Clough 和 Bent, *Plant J.* 16:735-743, 1998)。为此, ACBP1 全长的 cDNA 序列被克隆到二元载体 pBI121 中, 从而使 ACBP1 由 *CaMV* 35S 启动子表达。使用农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的转化方法, 通过植物浸渍途径将得到的植物转化载体 pAT31 (图 3A) 导入野生型拟南芥植物 (Col-0) 中 (Clough 和 Bent, *Plant J.* 16:735-743, 1998)。RNA 凝胶印迹分析中鉴定三个独立的 T₂ 转基因株系中过量生产 ACBP1 mRNA (图 4A)。其中, 生长在含选择性抗生素卡那霉素的生长培养基的 T₂ 群体中的两个株系 (分别命名为 ACBP1 ox-3 和 ACBP1 ox-5) 显示了 3: 1 (抗性/敏感) 分离比, 这显示它们仅含有一个拷贝的 35S::ACBP1 转基因。使用 ACBP1 特异性的抗体 (图 4B), Western 印迹分析进一步证实野生型, ACBP1 ox-3 和 ACBP1 ox-5 中的 ACBP1 蛋白质水平, 这样选择了用于 Pb(II) 处理的所得到的 T₃ 代稳定转基因植物。

野生型 (Col-0) 和 T₃ 35S::ACBP1 转基因植物 (ACBP1 ox-3 和 ACBP1 ox-5) 萌发后生长在 MS 培养基上 3 天, 然后转移到 MS 培养基及含有 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基垂直生长。如图 4C 所示, 尽管萌发后 17 天生长在 MS (Murashige 和 Skoog, *Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) 培养基上的野生型和 T₃ 代转基因植物生长速率相似 (图 4C), 但在添加了 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基上, 野生型的生长落后于 ACBP1 转化株系的生长。数据 (图 4D) 表明在含有 Pb(II) 的培养基中生长的两个转基因株系 (ACBP1 ox-3 和 ACBP1 ox-5) 的相对根长度分别是生长在 MS 培养基上的相似植物的 40.0±2.0% 和 36.2±2.3%。这些值显著性地 ($P < 0.05$) 高于野生型 (23.7±2.1%) 的值。同时, 生长在含有 Pb(II) 的培养基中的 ACBP1 ox-3 和 ACBP1 ox-5 转基因株系的相对鲜重 (图 4E) 相对于野生型分别为枝条中 1.6, 1.5 倍及根中 1.8, 1.4 倍。表示为生长在没有 Pb(II) 的培养基中

的植株的百分比的鲜重改变是显著的 ($P < 0.05$)。

实施例 9-过表达 ACBP3 的转基因植物比野生型具有更强的 Pb(II)胁迫耐性

为证实 ACBP3 是否赋予 Pb(II)抗性, 通过农杆菌 (*Agrobacterium*) 转化制备过表达 ACBP3 的转基因植物 (Clough 和 Bent, *Plant J.*16:735-743, 1998)。为此, ACBP3 全长 cDNA 被克隆到二元载体 pBI-GFP 中得到质粒 pAT314 (图 3B), pBI-GFP 是通过将 GUS 基因替换为 eGFP 基因获得的 pBI121 衍生物, 质粒 pAT314 中 ACBP3 由 *CaMV 35S* 启动子表达 (Shi 等, *Plant Cell* 17:2340-2354, 2005)。然后, 使用农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的转化方法, 通过植物浸渍途径将植物转化载体 pAT314 (图 3B) 导入野生型拟南芥植物 (Col-0) 中 (Clough 和 Bent, *Plant J.*16:735-743, 1998)。利用 RNA 凝胶印迹分析鉴定三个独立的 T₂ 转基因株系中过量生产 ACBP3-GFP mRNA (图 5A)。其中, 生长在含选择性抗生素卡那霉素的生长培养基上的 T₂ 群体中所有三个株系 (分别命名为 ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11) 显示 3: 1 (抗性/敏感) 的分离比, 这显示它们仅含有一个拷贝的 35S::ACBP3 转基因。使用 GFP 特异性的抗体进行的 Western 印迹分析进一步证实野生型, ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11 中的 ACBP3-GFP 融合蛋白水平 (图 5B), 这样选择了用于 Pb(II)处理的它们产生的 T₃ 代稳定转基因植物。

尽管生长在 MS 培养基上的野生型 (Col-0) 和 T₃ 35S::ACBP3 转基因植物 (ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11) 的生长相似, 但在含有 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的培养基上培养 3 周后, 只有野生型的生长受到了抑制 (图 5C)。在经过 Pb(NO₃)₂ 处理后, ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11 转化植物明显表现比野生型更好的生长 (图 5C)。定量分析也表明在 MS 培养基中, 野生型, ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11 转化植物的根长 (图 5D) 及鲜重 (图 5E) 没有显示显著性的差异, 但是三个独立的转基因株系的根长 (分别是 16.8±0.12, 17.8±0.12 和 14.8±0.12mm) 都比野生型 (7.2±0.08mm) 的要长。而且在含有 Pb(II)的培养基中 ACBP3 ox-2, ACBP3 ox-9 和 ACBP3 ox-11 转化株系的鲜重与野生型相比, 分别为 1.1, 1.2 及 1.27 倍 (图 5E)。

实施例 10-过表达 ACBP 的转基因植物中更多地富集铅

我们进一步探究 ACBP 介导的对 Pb(II)的抗性是由于像过表达 *AtPDR12* 拟南芥植物一样将 Pb(II)排出体外 (Lee 等, *Plant Physiol.* 138:827-836, 2005), 还是

像转基因植物中过表达 *AtATM3* 和 *YCF1* 那样, 转移位置而导致 Pb(II) 在植物细胞内富集 (Kim 等, *Plant Physiol.* 140:922-932, 2006; Song 等, *Nat. Biotech.* 21:914-919, 2003)。

为了检测过表达 *ACBP1* 转基因植物中 Pb(II) 的含量, 野生型 (Col-0), *ACBP1 ox-3* 和 *ACBP1 ox-5* 株系在 MS 培养基上生长 3 周后, 将幼苗转移使根浸渍到 1mM Pb(NO₃)₂ 中 48 小时。植物用蒸馏水洗 3 次后用滤纸吸干。称重根和枝条样品, 随后用 11 N HNO₃ 在 200°C 消化过夜。样品用 0.5 N HNO₃ 稀释后, 用原子吸收光谱仪 (PERKIN ELMER-AA Spectrometer 3110) 分析。如图 6A 所示, 当野生型和转基因株系内 Pb(II) 的含量以每株植物为基础标准化后, *ACBP1 ox-3* 和 *ACBP1 ox-5* 株系显示枝条 Pb(II) 含量分别增加为野生型的 3.4 和 2.9 倍 ($P < 0.001$), 而根部含量差异很小。当野生型和转基因拟南芥内 Pb(II) 的含量以每个鲜重为基础比较后, 显示 *ACBP1 ox-3* 和 *ACBP1 ox-5* 株系枝条 Pb(II) 含量分别增加到 1.9 和 2.2 倍 ($P < 0.05$, 图 6B), 证实过表达 *ACBP1* 导致枝条中富集 Pb(II)。

还检测了过表达 *ACBP3* 的转基因植物内 Pb(II) 的含量。野生型 (Col-0) 和 *ACBP3 ox-11* 株系萌发并在含 0.75mM Pb(NO₃)₂ 的 MS 培养基上生长 2 周后, 收获其枝条用于 Pb(II) 含量检测。图 7A 显示过表达 *ACBP3* 的 *ACBP3 ox-11* 株系 (39.1±0.68ppm/1 植物) 比野生型 (36.1±0.6ppm/1 植物) 内富集更多的 Pb(II)。当野生型和转基因拟南芥内 Pb(II) 的含量以每个鲜重为基础进行比较时, 显示 *ACBP3 ox-11* 枝条 Pb(II) 含量相比野生型增加到 1.4 倍 ($P < 0.05$, 图 7B), 证实过表达 *ACBP3* 也可导致植物枝条富集 Pb(II)。

实施例 11 - ACBP 构建体应用于质体转化

用于质体转化的启动子包括质体表达中的强的和组成型启动子, 包括增强表达的 *psbA* 启动子 (*psbA* 基因编码光系统 II 32kD 蛋白质) 和 16S rRNA 操纵子 (*rrn*) 启动子, 或这些启动子的修饰体 (Suzuki 等, 2003, *Plant Cell* 15: 195-205)。在特定的实施方案中, 每一个含 ACBP 编码序列的质体转化构建体被克隆到图 8A 显示的质粒转化载体 pMLV-HisA 中 (Li 等 *Exp. Biol. Med.* 231:1346-1352, 2006), 得到比如 pAT385 的质体转化载体 (图 8B), 用于通过微粒枪轰击 (particle gun bombardment) 导入植物细胞 (Staub 和 Maliga, *Plant J.* 6:547-553, 1994)。图 9A-9B 所示的是利用载体 pAT385 进行烟草质体转化的一个例子, 图 9C-9D 所示的是对转化后的植物的分子分析。

实施例 12 - 表达 ACBP 植物的制备

根据本发明的一个实施方案，用本发明的核酸构建体，通过本领域已知的多种转化方法，包括农杆菌介导的转化（Horsch 等, *Science* 227:1227-1231, 1985）或质体转化（Staub 和 Maliga, *Plant J.* 6:547-553, 1994），可以将多种植物和植物细胞系统工程化以获得本文所述的需要的生理学和农学特性。在优选的实施方案中，用于工程化的靶植物和植物细胞包括，但不限于，那些单子叶和双子叶植物，例如农作物包括谷类作物（例如小麦，玉米，稻，小米，大麦），烟草，水果作物（例如番茄，苹果，梨，草莓，橙），饲料作物（例如苜蓿），根菜作物（例如胡萝卜，马铃薯，甜菜，薯蓣），叶菜作物（例如莴苣，菠菜），开花植物（例如矮牵牛花，玫瑰，菊花），针叶树和松树（例如冷杉，云杉）；用于植物修复的植物（例如重金属积聚植物）；油料作物（例如向日葵，油菜籽）；和用于实验目的的植物（例如拟南芥（*Arabidopsis*））。

根据本发明另一个实施方案，需要的植物可以通过将一个或多个表达本文所述的 ACBP 的载体工程化到多种植物细胞类型中获得，植物细胞类型包括但不限于原生质体，组织培养细胞，组织和器官外植体，花粉，胚胎，以及完整植物。在本发明的一个实施方案中，用下述步骤和方法选择或筛选工程化的植物材料以获得转化体（那些掺入或整合了引入基因构建体的转化体）。通过有性或无性繁殖或生长将分离的转化体再生成植物及其后代（包括直接世代和后续世代）。或者，可将工程化的植物材料再生成植物后对衍生出的植物选择或筛选标记基因性状。在选择或筛选标记基因之前或之后，从植物细胞、组织或器官再生植物的步骤是本领域技术人员公知的。

根据本发明另一个实施方案，组织特异性的启动子可用于将 ACBPs 的表达靶向到植物的根或叶，使得植物可食用部分没有重金属积累。例如，组织特异性的启动子包括编码叶特异性表达的 *rbsC*（Coruzzi 等, *EMBO J.* 3:1671-1697, 1984）和根特异性表达的 SAHH 或 SHMT（Sivanandan 等, *Biochimica et Biophysica Acta* 1731: 202-208, 2005）的那些。Ekramoddoullah 等在美国专利号 7,285,656B2 教导了另一个示例性根特异性启动子。而且，也有报道花椰菜花叶病毒（CaMV）35S 启动子在其启动子区域也具有根特异性和叶特异性的组件（modules）（Benfey 等, *EMBO J.* 8:2195-2202, 1989）。其他组织特异性启动子是本领域技术人员公知和广泛可利用的。并且，很多组成型或诱导型启动子也是本领域技术

人员公知和广泛可利用的。

转化的植物细胞，愈伤组织，组织或植物可以通过选择或筛选工程化的植物材料中由转化 DNA 上存在的标记基因编码的性状而被鉴别和分离。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培养工程化的植物材料来进行，植物中的转化基因对所述抗生素或除草剂提供了抗性。进一步，转化的植物和植物细胞还可以通过筛选本发明的载体中可能存在的任何可见标记基因（例如 β -葡糖醛酸酶，荧光素酶，B 或 C1 基因）的活性被鉴别。这种选择和筛选方法是本领域技术人员公知的。

物理和生化方法还可以用于鉴别含有本发明的基因构建体的植物或植物细胞转化体。这些方法包括但不限于：1) 用于检测和确定重组 DNA 插入物结构的 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，引物延伸或反转录酶-PCR 扩增；3) 用于检测酶活性的酶检测，其中该基因产物由所述基因构建体编码；4) 蛋白质凝胶电泳 (PAGE)，Western 印迹技术，免疫沉淀，或酶联免疫检测，其中所述基因构建体产物是蛋白质。其它技术，例如原位杂交，酶染色，和免疫染色，也可以用于检测在特定植物器官和组织中所述重组构建体的存在或表达。进行所有这些检测的方法是本领域技术人员公知的。在一个特定的实施方案中，指定卡那霉素抗性的选择标记基因 *nptII* 在核转化中被使用。

植物的实例是单子叶植物，双子叶植物，作物植物（即为农业目的，为动物包括人的食物生产目的而培养的任何植物种，典型地以超过大约 10 株植物成群种植以收获完整植物或所述植物具有的植物部分，例如果实，花或作物的植物，例如烟草，谷物等），树（即果树，为木材生产培养的树，为装饰培养的树等），任何种类的花（即为装饰目的培养的植物，例如在收获之后），仙人掌。其它 ACBP 可以被表达的植物的更多实例包括植物界 (Viridiplantae)，链形植物 (Streptophyta)，有胚植物 (Embryophyta)，维管植物 (Tracheophyta)，真叶植物 (Euphyllophytes)，种子植物门 (Spermatophyta)，木兰门 (Magnoliophyta)，百合纲 (Liliopsida)，鸭跖草亚纲 (Commelinidae)，禾本目 (Poales)，禾本科 (Poaceae)，稻属 (*Oryza*)，水稻 (*Oryza sativa*)，玉蜀黍属 (*Zea*)，玉米 (*Zea mays*)，大麦属 (*Hordeum*)，大麦 (*Hordeum vulgare*)，小麦属，小麦 (*Triticum aestivum*)，真双子叶植物 (Eudicotyledons)，核心真双子叶分支 (Core eudicots)，菊亚纲

(Asteridae), 真菊分支(Euasterids), 蔷薇亚纲(Rosidae), II类真蔷薇分支(Eurosids II), 十字花目(Brassicales), 十字花科(Brassicaceae), 阿扁属(*Arabidopsis*), 木兰纲(Magnoliopsida), Solananae, 茄目(Solanales), 茄科, 茄属(*Solanum*), 和烟草属(*Nicotiana*)。因此本发明的实施方案可应用于很多种植物中, 包括, 但不限于下述属的种: 腰果(*Anacardium*), 花生(*Arachis*), 芦笋(*Asparagus*), 颠茄(*Atropa*), 燕麦(*Avena*), 芸苔(*Brassica*), 柑橘(*Citrus*), 西瓜(*Citrullus*), 辣椒(*Capsicum*), 红花(*Carthamus*), 椰子(*Cocos*), 咖啡(*Coffea*), 甜瓜(*Cucumis*), 南瓜(*Cucurbita*), 胡萝卜(*Daucus*), 油棕(*Elaeis*), 草莓(*Fragaria*), 大豆(*Glycine*), 棉(*Gossypium*), 向日葵(*Helianthus*), *Heterocallis*, 大麦(*Hordeum*), 天仙子(*Hyoscyamus*), 莴苣(*Lactuca*), 亚麻(*Linum*), 黑麦草(*Lolium*), 羽扇豆属(*Lupinus*), 番茄属(*Lycopersicon*), 苹果属(*Malus*), 木薯属(*Manihot*), *Majorana*, 苜蓿属(*Medicago*), 烟草属(*Nicotiana*), 木樨榄属(*Olea*), 稻属(*Oryza*), 稷属(*Panicum*), *Pannaserum*, 鳄梨属(*Persea*), 菜豆属(*Phaseolus*), *Pistachia*, 豌豆属(*Pisum*), 梨属(*Pyrus*), 李属(*Prunus*), 萝卜属(*Raphanus*), 蓖麻属(*Ricinus*), 黑麦属(*Secale*), 千里光属(*Senecio*), 白芥(*Sinapis*), 茄属(*Solanum*), 高粱属(*Sorghum*), *Theobromus*, 葫芦巴属(*Trigonella*), 小麦属(*Triticum*), 蚕豆属(*Vicia*), 葡萄属(*Vitis*), 豇豆属(*Vigna*), 和玉蜀黍属(*Zea*)。

本说明书中提及的所有的专利, 专利申请, 临时申请和出版物在此以引用教导不符的程度。

虽然已经结合具体实施方式对本发明进行了描述, 但本领域技术人员应当理解, 在不脱离本发明的精神和范围的情况下, 可以进行各种改变和等同物的替换。此外, 可以进行许多修改以使特定的情形、材料、物质组合物、方法、一个或多个方法步骤适应于本发明的目的、精神和范围。所有这样的修改意欲包括在所附权利要求的范围内。。

参考文献

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
2. Batzer MA. 1997. *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis. Methods in Enzymology*, vol. 266. ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA.
3. Benfey PN, Ren L and Chua NH. 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domain which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* 8:2195-2202.
4. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
5. Chiang LW, Kovari I, Howe MM. 1993. Mutagenic oligonucleotide-directed PCR amplification (Mod-PCR): an efficient method for generating random base substitution mutations in a DNA sequence element. *PCR Methods Appl.* 2: 210-217.
6. Chye ML. 1998. Arabidopsis cDNA encoding a membrane-associated protein with an acyl-CoA-binding domain. *Plant Mol. Biol.* 38: 827-838.
7. Chye ML, Huang BQ and Zee SY. 1999. Isolation of a gene encoding Arabidopsis membrane-associated acyl-CoA-binding protein and immunolocalization of its gene product. *Plant J.* 18: 205-214.
8. Chye ML, Li HY and Yung MH. 2000. Single amino acid substitutions at the acyl-CoA-binding domain interrupt ¹⁴[C]palmitoyl-CoA binding of ACBP2, an Arabidopsis acyl-CoA-binding protein with ankyrin repeats. *Plant Mol. Biol.* 44: 711-721.
9. Clough SJ and Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16: 735-743.
10. Coruzzi G, Broglie R, Edwards C and Chua NH. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3:1671-1679.

11. Dhankher OP, Li Y, Rosen BO, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA and Meagher RB. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotech.* 20: 1140-1146.
12. Dykema PE, Sipes PR, Marie A, Biermann BJ, Crowell DN and Randall SK. 1999. A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol. Biol.* 41: 139-150.
13. Engeseth NJ, Pacovsky RS, Newman T and Ohlrogge JB. 1996. Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 331: 55-62.
14. Faergeman NJ and Knudsen J. 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem. J.* 323: 1-12.
15. Funaba M and Mathews LS. 2000. Identification and characterization of constitutively active Smad2 mutants: evaluation of formation of Smad complex and subcellular distribution. *Mol. Endocrinol.* 14: 1583-1591.
16. Greener et al. 1995. An Efficient Random Mutagenesis Technique Using an *E. coli* Mutator Strain. *Methods in Molecular Biology*, 57:375-385.
17. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT. 1985. A Simple and General-Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227: 1229-1231.
18. Kim DY, Bovey L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E and Lee Y. 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 922-932.
19. Kragelund BB, Knudsen J and Poulsen FM. 1999. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 150-161.
20. Kramer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotech.* 16: 133-141.
21. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
22. Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring protein. *Methods in Enzymology* 3: 447-454.
23. Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW and Lee Y. 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 827-836.

24. Leung KC, Li HY, Mishra G and Chye ML. 2004. ACBP4 and ACBP5, novel Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Mol. Biol.* 55: 297-309.
25. Leung KC, Li HY, Xiao S, Tse MH and Chye ML. 2006. Arabidopsis ACBP3 is an extracellularly targeted acyl-CoA-binding protein. *Planta* 223: 871-881.
26. Li HY and Chye ML. 2003. Membrane localization of Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACBP2. *Plant Mol. Biol.* 51: 483-492.
27. Li HY, Ramalingam S and Chye ML. 2006. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp. Biol. Med.* 231: 1346-1352.
28. Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
29. Needleman SB and Wunsch CD. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48: 443-453.
30. Nitz I, Doring F, Schreznmeir J and Burwinkel B. 2005. Identification of new acyl-CoA-binding protein transcripts in human and mouse. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 2395-2405.
31. Powell K. 2002. Genes improve green cleaning. *Nature* doi: 10.1038/news021001-14.
32. Rasmussen JT, Borchers T and Knudsen J. 1990. Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters. *Biochem. J.* 265: 849-855.
33. Rogers GS, Klee H, Horsch RB and Fraley RT. 1988. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. In Gelvin SB, Schilperoort RA and Verma DPS. (eds.) *Plant Molecular Biology Manual* pp A2: 1-12. Kluwer Academic Publishers.
34. Sambrook J, Fritsch EE and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
35. Sambrook, J. and Russell, W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

36. Shi DQ, Liu J, Xiang YH, Ye D, Sundaresan V, and Yang WC. 2005. SLOW WALKER1, essential for gametogenesis in Arabidopsis, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. *Plant Cell* 17:2340-2354.
37. Shpaer EG. 1997. GeneAssist. Smith-Waterman and other database similarity searches and identification of motifs. *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187.
38. Sivanandan C, Sujatha TP, Prasad AM, Resminath R, Thakare DR, Bhat TAR and Srinivasan R. 2005. T-DNA tagging and characterization of a cryptic root-specific promoter in Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1731:202-208.
39. Smith DR, Kahng MW, Quintanilla-Vega B and Fowler BA. 1998. High-affinity renal lead-binding proteins in environmentally-exposed humans. *Chem. Biol. Interact.* 115: 39-52.
40. Song WY, Ju Sohn E, Martinoia E, Jik Lee Y, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang, I and Lee Y. 2003. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat. Biotech.* 21: 914-919.
41. Staub JM, and Maliga P. 1994. Translation of Psba Messenger-Rna Is Regulated by Light Via the 5'-Untranslated Region in Tobacco Plastids. *Plant J.* 6: 547-553.
42. Stemmer WP. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10747-10751.
43. Suzuki JY, Sriraman P, Svab Z and Maliga P. 2003. Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell* 15: 195-205.
44. Swinnen JV, Esquenet M, Rosseels J, Claessens F, Rombauts W, Heyns W and Verhoeven G. 1996. A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein:transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *DNA Cell Biol.* 15: 197-208.
45. Stemple DL. 2004. TILLING-a high-throughput harvest for functional genomics. *Nature Reviews*, 5: 1-7.
46. Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W and Xie D. 2004. COS1: an Arabidopsis coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16: 1132-1142.