



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101548013 B

(45) 授权公告日 2012.03.21

(21) 申请号 200780035881.9

A01H 5/00 (2006.01)

(22) 申请日 2007.09.29

A01H 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/848,113 2006.09.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.03.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2007/002857 2007.09.29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/043268 EN 2008.04.17

(73) 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田

(72) 发明人 林汉明 辛世文 邵桂花

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉

(56) 对比文件

CN 1624131 A, 2005.06.08, 全文.

CN 1489631 A, 2004.04.14, 全文.

Batchelor AK 等. SCB1, a BURP-domain protein gene, from developing soybean seed coats. 《Planta》. 2002, 第 215 卷 523-532.

张海燕 等. 大豆耐盐基因标记的开发. 《新疆农业大学学报》. 2005, 第 28 卷 (第 2 期), 22-24.

审查员 刘树柏

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 13 页

(54) 发明名称

GMRD22-样基因及其保护抵御非生物应激的应用

(57) 摘要

本文提供了 GmRD22 的蛋白质和核酸序列。本文还提供通过在植物细胞中引入或表达编码 GmRD22 蛋白的分离多核苷酸来赋予所述植物细胞或植物非生物应激耐受性的方法。还提供了用编码 GmRD22 蛋白的分离多核苷酸转化的转基因植物以及衍生自这些植物的种子和后代。

1. 一种多肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。
2. 一种分离的多核苷酸,其核苷酸序列是 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列或其互补序列。
3. 一种编码权利要求 1 所述多肽的分离多核苷酸。
4. 一种包含权利要求 2 或 3 所述多核苷酸的重组核酸构建物。
5. 如权利要求 4 所述的重组核酸构建物,其特征在于,所述多核苷酸操作性连接于在植物细胞中可操作的控制序列。
6. 如权利要求 5 所述的重组核酸构建物,其特征在于,所述控制序列对于所述多核苷酸是异源的。
7. 如权利要求 5 所述的重组核酸构建物,其特征在于,所述控制序列还实现将所述重组核酸构建物插入细胞染色体 DNA。
8. 一种产生权利要求 1 所述多肽的方法,包括在允许编码所述多肽的多核苷酸表达的条件下培养包含权利要求 4-7 中任一项所述重组核酸构建物的修饰植物宿主细胞,并分离所述多肽。
9. 一种保护植物免遭非生物应激的方法,所述非生物应激选自下组:盐度应激、干旱或脱水和它们的组合,其特征在于,该方法包括 a) 用权利要求 2 或 3 所述的分离多核苷酸,或权利要求 4-7 中任一项所述重组核酸构建物转化植物细胞;b) 从所述植物细胞产生表达所述多核苷酸编码的多肽的转基因植物,所述植物是拟南芥或水稻。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述多核苷酸对于所述植物或植物细胞是异源的。
11. 如权利要求 9 或 10 所述的方法,其特征在于,所述多核苷酸操作性连接于在所述植物细胞中可操作的控制序列。
12. 一种选择成功转化的植物细胞或植物的方法,包括将一种或多种非生物应激施加于权利要求 4-7 中任一项所述重组核酸构建物转化的植物细胞或植物,藉此选出对所述非生物应激的耐受性增加的细胞,所述非生物应激选自下组:盐度应激、干旱和它们的组合,所述植物是拟南芥或水稻。

GMRD22- 样基因及其保护抵御非生物应激的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及农业生物技术领域。更具体说,本发明涉及增强对非生物应激耐受性的新型基因和其同系物及其应用,特别是产生基本上耐受非生物应激的转基因植物、种子及其后代。

背景技术

[0002] 提高产率以增加农作物产量是满足我们持续增长的人群对食物需求的基本方案之一。非生物应激通过,例如降低总农作物产率或降低农作物质量而明显限制农作物产量。非生物应激是诸如干旱、盐、极端温度和疾风等环境因子。虽然设计了许多农业实践通过降低或避免这种非生物应激以优化农作物生长,但仍需要提高。

[0003] 大豆是最重要的经济农作物之一,其分类为中等 NaCl- 耐受性植物 (Maas 和 Hoffman, 1977)。理解该农作物植物的 NaCl 耐受机制最终可有助于提高其在盐地上的产率,大豆中的 NaCl 耐受赋予基因也可适用于对 NaCl 更敏感的农作物 (例如,胡萝卜、橙子和水稻)。盐度 (例如 NaCl 累积) 是影响植物生长的严重非生物环境应激。不利影响是多层面的,包括离子应激、生理干旱、特定离子毒性 (specific ion toxicity) 和盐诱导的氧化应激。长期以来认为盐应激和脱水应激密切相关,因为外部环境中存在的盐 (主要是 NaCl) 累积会导致外部水势降低,然后变得低于植物细胞中的水势。因此,净水流会从植物细胞内部流向其外部。这在植物中导致渗透干燥 (Ashraf, 1994), 也称为生理干燥 (Jain 等, 1997)。

[0004] RD22 最早在拟南芥 (*Arabidopsis*) 中发现,其由盐应激但不由冷或热应激两导 (Yarnaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki, 1993)。发现植物激素脱落酸 (ABA) 对于脱水和盐应激下诱导 RD22 至关重要,虽然 RD22 缺乏 ABA- 效应元件 (ABRE) (Xiong 等, 2001)。脱水看来能触发 ABA 产生,进而诱导各种基因顺和反-作用因子的表达。根据 Abe, H. 和同事 (1997) 提出的 RD22 诱导最新模型,在渗透应激 (包括盐和脱水应激) 下,ABA 合成并触发 RD22BP1 和 ATMYB2 蛋白产生,其用作转录激活物以结合位于 RD22 启动子的 67bp 片段上的 MYC 和 MYB 位点,从而激活 RD22 表达。然而,虽然充分研究了脱水和盐应激相关 RD22 基因表达的调节作用,但其在适应盐和脱水应激的植物中的精确作用尚不了解。

[0005] 总之,虽然基因表达与非生物应激有关,但仍未证明这种基因有赋予抵御这些应激的耐受性或抗性的能力。鉴定能显著改变针对非生物应激的耐受性的基因代表遗传工程改造农作物和其它植物的显著优点。

[0006] 发明概述

[0007] 本文提供了赋予针对非生物应激耐受性的新型克隆 GmRD22 及其相关蛋白。采用抑制扣除技术 (Diatchenko 等, 1998), 本文提供最初从盐应激大豆中鉴定的新型 RD22 克隆 (GmRD22)。盐和渗透应激可诱导性连同其在盐应激下在表达 GmRD22 的转基因水稻和拟南芥中的保护性作用提示 GmRD22 在针对盐和渗透 (和脱水) 应激的植物适应机制中起关键作用。因此, GmRD22 和相关蛋白可用于遗传工程改造农作物以赋予盐和脱水 (或干燥) 应

激耐受性。

[0008] 更具体地说,本文提供了包含 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列和其互补序列的分离多核苷酸序列。还提供包含与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%序列相同性的核苷酸序列和其互补序列的分离多核苷酸序列。

[0009] 还提供了一种重组核酸,其包含编码 GmRD22 蛋白或 GmRD22 样蛋白的多核苷酸序列,或本文提供的多核苷酸序列中任何一种,其中所述多核苷酸序列操作性连接于控制序列,所述控制序列可在植物细胞中操作以实现可检测的表达。在一些实施方式中,异源多核苷酸的表达水平高。控制序列通常是本发明多核苷酸序列的异源序列。在一些实施方式中,控制序列还实现将本发明重组核酸序列插入宿主细胞染色体 DNA 中。

[0010] 提供了包含重组核酸构建物的宿主细胞。在一个实施方式中,所述宿主细胞是植物细胞。还包括含有本文提供的 GmRD22 蛋白或 GmRD22- 样蛋白,或多核苷酸序列、重组核酸构建物的转基因植物或植物部分或植物细胞。

[0011] 本文提供具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的基本上纯的多肽,与 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%序列相同性的基本上纯的多肽,或本文提供任一种多核苷酸编码的分离多肽。

[0012] 本文提供产生多肽的方法,包括在允许和 / 或诱导异源多核苷酸表达的条件下培养宿主细胞并分离该多核苷酸编码的多肽。

[0013] 本文提供通过诱导或提高对非生物应激的耐受性而保护植物或植物细胞免遭非生物应激的方法,包括修饰所述植物或植物细胞使之表达 GmRD22 蛋白,其中该 GmRD22 蛋白是与 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多肽,或由与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多核苷酸序列编码的多肽。在一些实施方式中,本文提供的方法包括修饰所述植物或植物细胞使之含有表达载体,所述表达载体包含编码异源 GmRD22 蛋白并与在植物细胞中可操作的控制序列操作性相连的多核苷酸序列。在其它实施方式中,GmRD22 蛋白是与 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多肽,或由与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多核苷酸序列编码的多肽。所述非生物应激是盐度应激或干旱。

[0014] 本文提供了选择成功转化的植物细胞或植物的方法,该方法包括将非生物应激施加于用作为可选择标记的本发明重组核酸构建物转化的植物细胞或植物,藉此选择对非生物应激的耐受性或抗性增加的细胞。

[0015] 本文提供了 GmRD22 核酸序列或该核酸序列编码的蛋白质在节水农业实践中的应用。这种节水农业实践可单用或与现有技术节水农业实践联用提高含盐土地和 / 或干燥 / 半干燥地区的农业 (水平)。因此,本文提供了减少农业用水的方法,该方法包括在植物或其一部分中转化并表达本发明多核苷酸或构建物。

[0016] 本文提供了表达 GmRD22 蛋白的植物或植物部分,或通过本发明方法产生的植物或植物部分,其中所述 GmRD22 蛋白是与 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多肽,或由与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、99%或 100%序列相同性的多核苷酸序列编码的多肽。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 显示 GmRD22 的序列,其中图 A 显示其核苷酸序列 (SEQ ID NO :1);图 B 显示其氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0019] 图 2 显示在各种栽培的 (栽培大豆 (*G. max*))(图 A) 和野生型 (野生大豆 (*G. soja*))(图 B) 大豆品种中 NaCl 对 GmRD22 表达的影响。+ 和 - 分别表明用和不用 NaCl 处理。

[0020] 图 3 显示 GmRD22 与其它 RD22 或含 BURP- 结构域的蛋白质的比对,其中黑体显示的氨基酸残基表明在 RD22- 样蛋白质中的保守性 BURP- 结构域。除了 GmRD22,各蛋白质标记的前两个字母代表缩写的种名,其后是 GenBank 登录号,其中 At 表示拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*);Bn 表示甘蓝型油菜 (*Brassica napus*);Gm 表示栽培大豆 (*Glycine max*);Le 表示番茄 (*Lycopersicon esculentum*);Os 表示稻 (*Oryza sativa*)。

[0021] 图 4 显示 RD22 蛋白和其它含 BURP 结构域的蛋白的系统发生分析法。除了 GmRD22,各蛋白质标记的前两个字母代表缩写的种名,其后是 GenBank 登录号。At 表示拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*);Bn 表示甘蓝型油菜 (*Brassica napus*);Gm 表示栽培大豆 (*Glycine max*);Le 表示番茄 (*Lycopersicon esculentum*);Os 表示稻 (*Oryza sativa*);Pp 表示桃 (*Prunus persica*);Vr 表示 (绿豆 (*Vigna radiata*));Vv 表示葡萄 (*Vitis vinifera*)。

[0022] 图 5 显示 NaCl 应激下大豆叶片中的 GmRD22 表达。rRNA 的溴化乙锭染色用作 RNA 样品的加载参比品。

[0023] 图 6 显示盐和 PEG 处理下 GmRD22 的 Northern 印迹分析,其中 CT 表示对照;NaCl 表示 125mM NaCl 处理 48 小时;PEG 表示 5% PEG 处理 48 小时,其模拟脱水的影响。

[0024] 图 7 显示在盐应激 (图 (a)) 和渗透应激 (图 (b)) 下具有相反盐耐受能力的 2 种大豆栽培品种中不同的 GmRD22 表达模式,其中 WF 表示盐耐受栽培品种 Wenfeng 7;UN 表示盐敏感栽培品种 Union。

[0025] 图 8 显示采用 Northern 印迹分析转基因水稻中 GmRD22 的表达。所有 3 种独立的转基因品系显示 GmRD22 表达,而未转化的亲代没有信号。

[0026] 图 9 显示 GmRD22 转基因水稻的田间测试。

[0027] 图 10 显示在干旱应激 (图 (a)) 和 (b) 盐度应激 (图 (b)) 下几种纯合 GmRD22 转基因水稻品系和未转化野生型的性能,其中 WT 表示野生型;137、141、153 表示 GmRD22 转基因品系。无标记的幼苗是表达我们实验室获得的另一种专有克隆 (也赋予盐和干旱耐受性) 的转基因水稻。

[0028] 图 11 显示在干旱应激 (图 (a)) 和盐度应激 (图 (b)) 下 GmRD22 转基因水稻和未转化野生型的存活率,其中 WT 表示野生型;137、141、153 表示 GmRD22 转基因品系。GmRD22 转基因水稻显示存活率高于未转化的野生型。

[0029] 图 12 显示采用 Northern 印迹分析转基因拟南芥中 GmRD22 的表达,其中 Co1-0 表示野生型亲代;V7 表示空载体转基因对照。1-1-2、2-2-7、4-4-1 表示 3 种独立的 GmRD22 转基因品系。在所有独立的转基因品系中可观察到强烈的信号。Co1-0 和 V7 中的信号非常弱可能是因为内源性拟南芥 RD22 转录物。

[0030] 图 13 显示渗透应激对 GmRD22 转基因拟南芥的根部生长的影响。用 20% PEG 处理后,比较野生型 Co1-0、空载体转基因对照 (V7) 和两种独立的 GmRD22 转基因品系 (4-4-1

和 1-1-2) 的根部生长百分比。该图左右的 Y- 轴分别表明未处理 (棒状) 和受应激 (线) 的植物的根部生长%。误差棒是棒状误差, N = 16。按照图基氏检验, 通过单向方差分析法 (单向 ANOVA) 分析所得数据。 ** 表明 $p < 0.01$ 水平的平均差异 (与野生型相比) 显著。

[0031] 发明详述

[0032] 定义

[0033] 举出以下定义是为了有助于解释本发明。除非另有表明, 本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所述技术领域的普通技术人员理解相同意义。

[0034] 术语“多核苷酸”和“核酸”可互换使用, 指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。出于本文的目的, 这些术语不应理解成对聚合物的长度有限制。这些术语可包括天然核苷酸的已知类似物以及在碱基、糖和 / 或磷酸部分作了修饰的核苷酸。特定核苷酸的类似物通常具有相同的碱基配对特异性, 即 A 的类似物与 T 碱基配对。

[0035] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用, 指氨基酸残基的聚合物。该术语还适用于其中一个或多个氨基酸是相应天然氨基酸的化学类似物或修饰衍生物, 例如硒代半胱氨酸 (Bock 等, (1991) Trends Biochem. Sci. 16 :463-467 ; Nasim 等, (2000) J. Biol. Chem. 275 : 14, 846-14, 852) 等的氨基酸聚合物。

[0036] 本文所用的“序列相同性”表示比对两条序列以尽可能匹配亚单位, 即考虑空位与插入时, 该两条序列中相应位置的相同亚单位的百分比。当该两条序列中的亚单位位置同时被相同的单体亚单位占据时, 例如, 如果两 DNA 分子各自的某给定位置被腺嘌呤占据, 则该两分子在该位置是相同的。例如, 如果 10 个核苷酸长的序列中有 7 个位置与第二条 10- 核苷酸序列的相应位置相同, 则该两条序列有 70% 序列相同性。所比较的序列的长度优选至少 60 个核苷酸, 更优选至少 75 个核苷酸, 最优选至少 100 个核苷酸。通常采用序列分析软件 (例如, 威斯康星州, 麦迪逊, 大学大道 1710, 53705, 威斯康星大学生物技术中心, 遗传学计算机组的序列分析软件包 (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)) 检测序列相同性。

[0037] 本文所用的“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物学活性部分在通过重组技术产生时基本上不含其它细胞材料或培养基, 或者化学合成时基本上不含化学前体。基本上不含细胞材料的蛋白质包括非 -GmRD22 蛋白含量低于约 30%、20%、10%、5% (以干重计) 的蛋白质制品。当 GmRD22 蛋白或其生物学活性部分是重组产生的, 培养基通常代表约 30%、20%、10% 或 5% (以干重计) 不到的化学前体或非感兴趣蛋白质的化学品。本文用于核酸或多肽的术语“分离的”表明该核酸或多肽与其天然环境相分离并且不是天然产物。分离的核酸或多肽可以纯化形式存在或可存在于非天然环境, 例如转基因宿主细胞。

[0038] 本文所用的术语“非生物应激”指对植物或植物细胞施加不利影响的无生命环境因素。在大多数情形中, 依据与总体生长相关的植物存活、作物产量、生长 (生物量累积) 或基础同化过程 (CO_2 和矿物质摄取) 检测应激。非生物应激的例子包括但不限于: 盐度、脱水、氧化应激和极端冷或热。盐度应激表示生长基质 (包括但不限于土壤和水耕系统) 含有盐 (包括但不限于 NaCl 、 MgSO_4 、 NaSO_4 、 NaHCO_3 、 Na_2CO_3 、 MgCO_3) 的水平限制目标植物生长。渗透应激表示生长基质含有能降低生长基质中水势的物质 (包括但不限于盐)。脱水应激表示生长基质含有的水低于目标植物最佳生长所需。

[0039] 术语“高等植物”指具有维管系统的植物,即维管植物。具体地说,高等植物包括蕨类植物、裸子植物和被子植物。

[0040] 术语“异源”指不同来源的物质,例如不同物种、不同组织或不同基因。例如,认为大豆的 GmRD22 蛋白对于拟南芥是异源的。“异源核酸序列”还指天然彼此不毗连的那些序列。例如,当启动子和其操作性相连的编码序列衍生自不同物种或基因时,二者是异源的。

[0041] 本文所用的术语“外源性 (exogenous)”表示在蛋白质或核酸序列的来源生物之外的生物中使用该蛋白质或核酸序列。

[0042] 本文所用的术语“启动子”和“控制序列”指离基因的 5' 端不远的调控区,其用作 RNA 聚合酶的结合位点。这种序列具有指导或调节紧邻其下游的核酸序列转录的功能。启动子的类型各种各样,包括组成型启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子和特定生理条件,例如脱水触发的那些启动子。本发明可用的启动子的例子包括但不限于:CaMV35S、Ubi、SAG12 启动子等。更合适的启动子见 PlantProm 数据库 (Shahmuradov 等, Nucleic Acids Research, 2003, 第 31 卷, 第 1 号 114-117)。

[0043] 本文所用的术语“操作性连接于”指启动子相对于编码多肽的多核苷酸的定位方式使得该多核苷酸在调节核酸的控制下转录并任选翻译成多肽。

[0044] 本文所用的短语“在植物细胞中可操作”表示启动子或控制序列在植物细胞中能行使其指导和 / 或调节紧邻其下游的编码序列表达的正常功能,其中所述植物细胞可以是活的植物或细胞培养物的一部分。

[0045] 可互换的术语“可选择标记”和“选择标记”指某种基因,其赋予表达该标记基因的细胞独特的表型,因此可区分这种转化细胞与不具有该标记的细胞。可选择标记基因所赋予的性状可根据对选择因子(例如,除草剂、抗生素、射线、热或破坏未转化细胞的其它处理,包括非生物应激)的耐受性而“选出”。可筛选标记基因(或报道基因)赋予可通过观察或测试,即通过“筛选”(例如,β-葡糖醛酸糖苷酶、萤光素酶或未转化细胞中不存在的其它酶活性)鉴定的性状或表型。

[0046] 本文所用的术语“表达盒”指核酸序列,特别是含有基因和与所述基因操作性相连的控制序列的 DNA 序列。利用各种控制序列可调节基因的表达模式利水平。可将一种或多种表达盒插入本发明构建物或转化载体,再引入所需宿主,从而在其中表达基因。

[0047] 本发明的实施方式

[0048] 应该知道本发明不限于所述的具体方法、方案和试剂,因为它们可以改变。

[0049] 出于描述和公开可能与本发明联用的组合物和方法的目的,本文引用的所有出版物专门通过引用纳入本文。

[0050] 在本发明中,现已证明当异源表达时, GmRD22 或 GmRD22- 样蛋白表达成功赋予植物细胞和植物对非生物应激的耐受性或抵抗力,特别是对盐度和脱水的耐受性或抵抗力。下文用水稻和拟南芥说明了这点,但并不表示局限于该实例。因此,本文提供的是新型基因 GmRD22, SEQ ID NO :1 所示或与 SEQ IDNO :1 有至少 80% 序列相同性的核酸序列,和其互补序列。还提供了 SEQ ID NO :2 所示 GmRD22 的氨基酸序列,以及与 SEQ ID NO :2 有至少 80% 序列相同性的氨基酸序列。可在整合载体或表达载体中组合提供 GmRD22 的多核苷酸与各种启动子以在合适的宿主植物或植物细胞中表达编码区。

[0051] 在一方面,本发明提供具有 SEQ ID NO :1 所示核酸序列或与其基本相似序列的分

离或基本上纯化的多核苷酸。在另一方面,本发明还提供编码具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列或与其基本相似序列的多肽的分离多核苷酸。本发明的优选多核苷酸是图 1a 所示天然 GmRD22 多核苷酸 (SEQ ID NO :1),其编码图 1b 所示天然 GmRD22 蛋白 (SEQ ID NO :2)。由于天然 GmRD22 多核苷酸是在大豆 cDNA 文库中发现,可从大豆植物 (例如,栽培大豆品种 Wenfeng 7) 中获得本发明多核苷酸。

[0052] 本发明多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 形式 (例如,cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA)。DNA 可以是环状或线形、双链或单链,如果是单链的,其可以是编码 (有义) 链或非编码 (反义) 链。

[0053] 编码天然 GmRD22 蛋白的多核苷酸可以与图 1a 所示核苷酸序列 (SEQ ID NO :1) 相同。其还可以是因遗传密码冗余或简并所致的不同多核苷酸,但该多核苷酸与 SEQ ID NO :1 所示多核苷酸一样编码相同的多肽。本发明的其它多核苷酸分子是 GmRD22 多核苷酸的变体,例如编码天然 GmRD22 蛋白的片段、类似物和衍生物的那些多核苷酸。这种变体可以是,例如天然 GmRD22 的天然剪接变体,或天然 GmRD22 的非天然变体。这些变体的核苷酸序列中有一个或多个碱基不同于天然 GmRD22 多核苷酸。例如,这种变体的核苷酸序列的特征在于天然 GmRD22 的一个或多个核苷酸的缺失、添加或取代。这些改变优选是沉默或保守性核苷酸改变。

[0054] 考虑了公开的多核苷酸或核酸序列的片段和变体。本文还提供公开的核苷酸序列所编码蛋白质的片段和变体。片段是核苷酸序列的一部分或氨基酸序列的一部分。核苷酸序列的片段可编码保留天然蛋白质生物学活性的蛋白质片段,由此通过保留至少一种 GmRD22 活性而诱导或增强对非生物应激的耐受性。或者,可用作杂交探针的核苷酸序列片段通常不编码保留生物学活性的片段蛋白质。因此,核苷酸序列的片段可以有编码本文提供的蛋白质的核苷酸序列的至少约 20 个核苷酸、约 50 个核苷酸、约 100 个核苷酸和最多全长。

[0055] 编码本发明 GmRD22 蛋白的生物学活性部分的 GmRD22 核苷酸序列的片段可编码本发明全长 GmRD22 蛋白中至少 12、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、125、135、150、165、175、185、200、215、225、235、250、260、275、285、300、315、325、335 或 340 个毗连氨基酸或最多全部氨基酸 (例如,SEQ ID NO :2 所示 343 个氨基酸)。

[0056] 因此,本文提供的多核苷酸序列包括天然序列以及变体形式。类似地,本文提供的 GmRD22 蛋白包括天然蛋白质及其改变和修饰形式。这些变体仍具有至少一种所需的 GmRD22-样活性。估计本文的蛋白质序列的缺失、插入和取代不会对蛋白质的特征产生实质性改变。然而,当在进行取代、删除或插入之前难以预测它们的确切影响时,本领域技术人员应知道可通过常规筛选试验评估该影响。即,可通过 GmRD22 蛋白序列的表达被诱导或增加时针对应激的耐受性增强来评估活性。例如,可采用本文所述试验在中将活性评估为表达异源 GmRD22 蛋白的植物对高盐度的耐受性增加。

[0057] 本文提供的 GmRD22 多核苷酸序列可用于从其它植物分离相应序列。以此方式,可依据这些序列与本文所述序列的同源性,采用诸如 PCR、杂交等方法鉴定它们。本发明包括依据与本文所述完整序列或其片段的序列相同性分离的序列。这种序列包括作为所公开序列的直向同源物的序列。“直向同源物”指衍生自共同祖先基因的基因,它们因物种形成而在不同物种中发现。物种之间直向同源物的功能常高度保守。以此,还提供了编码 GmRD22

蛋白并在严格条件下能与本文公开的 GmRD22 序列, SEQ ID NO :1 所示核酸或其片段, SEQ ID NO :1 的互补序列杂交的分离序列。

[0058] 在杂交技术中, 已知核苷酸序列的全部或部分用作与所选生物的克隆基因组 DNA 片段或 cDNA 片段群体 (即, 基因组或 cDNA 文库) 中存在的其它相应核苷酸序列选择性杂交的探针。杂交探针可以是基因组 DNA 片段、cDNA 片段、RNA 片段或其它寡核苷酸, 可用可检测基团, 例如 ^{32}P 或任何其它可检测标记物作标记。

[0059] 本发明也包括在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示核酸或 SEQ ID NO :1 的互补序列杂交的核酸。例如, 这种核酸可以是在严格条件下与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :1 的互补序列杂交的那些核酸, 本发明包括低严格条件、中等严格条件或高严格条件。优选的这种核酸是其核苷酸序列与 SEQ ID NO :1 的全部或部分互补的那些核酸。严格条件通常是盐浓度低于约 1.5M Na 离子, 通常约 0.01-1.0M Na 离子浓度 (或其它盐), pH7.0-8.3, 短探针 (例如, 10-50 个核苷酸) 的温度至少约 30°C, 长探针 (例如, 50 个核苷酸以上) 的温度至少约 60°C。还可加入失稳剂, 例如甲酰胺来获得严格条件。示范性低严格条件包括 37°C, 用 30-35% 甲酰胺、1M NaCl, 1% SDS (十二烷基硫酸钠) 的缓冲溶液杂交, 50-55°C, 用 1X 到 2X SSC (20X SSC = 3.0M NaCl/0.3M 柠檬酸钠) 洗涤。示范性中等严格条件包括 37°C, 在 40-45% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 中杂交, 55-60°C, 用 0.5X 到 1X SSC 洗涤。示范性高严格条件包括 37°C, 在 50% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 中杂交, 60-65°C, 用 0.1X SSC 洗涤。洗涤缓冲液可任选包含约 0.1% - 约 1% SDS。杂交持续试剂常少于约 24 小时, 通常约 4- 约 12 小时。

[0060] 特异性通常与杂交后洗涤有函数关系, 关键因素是最终洗涤溶液的离子强度和温度。对于 DNA-DNA 杂交体, 可从 Meinkoth 和 Wahi ((1984) Anal. Biochem. 138 :267284) 的方程估算 T_m : $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\% \text{GC}) - 0.61(\% \text{甲酰胺}) - 500/L$; 其中 M 是单价阳离子的摩尔浓度, % GC 是 DNA 中鸟苷和胞嘧啶核苷酸的百分比, % 形式是杂交溶液中甲酰胺的百分比, L 是以碱基对计的杂交体长度。 T_m 是 50% 互补靶序列与完美匹配探针杂交时的温度 (在限定的离子强度和 pH 下)。每 1% 的错配, T_m 降低约 1°C; 因此, 为与所需相同性的序列杂交, 可调节 T_m 、杂交和 / 或洗涤条件。例如, 如果发现序列相同性 > 90%, T_m 可降低 10°C。限定的离子强度和 pH 下, 选择的严格条件通常比特异性序列及其互补序列的热解链温度 (T_m) 约低 5°C。然而, 极其严格的条件可采用比热解链温度 (T_m) 低 1、2、3 或 4°C 的温度下杂交和 / 或洗涤; 中等严格条件可采用比热解链温度 (T_m) 低 6、7、8、9 或 10°C 的温度下杂交和 / 或洗涤; 低严格条件可采用比热解链温度 (T_m) 低 11、12、13、14、15 或 20°C 的温度下杂交和 / 或洗涤。利用该方程, 杂交和洗涤组合物及所需 T_m , 普通技术人员不难知道可改变杂交和 / 或洗涤溶液的严格性。如果所需的错配程度导致 T_m 低于 45°C (水溶液) 或 32°C (甲酰胺溶液), 可以增加 SSC 浓度从而可采用较高浓度。

[0061] 通常, 编码 GmRD22 蛋白或其生物学活性部分以及与本文公开的 GmRD22 序列杂交的多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1 有约 40% -50%、约 60% -70% 或 75%, 和甚至约 80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%, 或更高的序列相同性, 因此这些序列可只差 1 个核苷酸或者在翻译时只差 1 个氨基酸。

[0062] 可用作杂交探针或 PCR 引物的 GmRD22 核苷酸序列的片段通常无需编码 GmRD22 蛋白的生物学活性部分。作为 GmRD22 核苷酸序列的片段的核酸分子包含本文公开的全

长 GmRD22 核苷酸序列中存在的至少 16、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000 或 1025 个核苷酸,或最多全部核苷酸。

[0063] 本发明的 GmRD22 其它变体是与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :1 的互补序列有至少 70% (例如,70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 和 99%) 序列相同性的多核苷酸。可通过本领域已知的技术,例如通过在天然 GmRD22 中产生突变,从表达这种核酸(例如,表达天然 GmRD22 变体的大豆植物,或表达天然 GmRD22 同源物的非大豆植物(例如水稻植物))的生物分离而获得与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :1 的互补序列在严格条件下杂交或有至少 70% 序列相同性的核酸。

[0064] 本文还提供具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列或其基本相似序列的分离多肽。“基本相似”表示该多肽与 SEQ ID NO :2 有至少 70%、80%、85%、90%、95% 或更高的序列相同性。这些 GmRD22 蛋白变体的特征在于使得它们能保留 GmRD22 功能的氨基酸改变。GmRD22 蛋白变体可以是天然产生的,例如 GmRD22 同源物编码的。它们也可以是合成蛋白质,例如融合蛋白或经修饰以在宿主细胞中水平表达较高的那些蛋白质。

[0065] 变体 GmRD22 蛋白是通过在天然蛋白质的 N- 末端和 / 或 C- 末端删除(所谓的截短)或加入一个或多个氨基酸;在天然蛋白质的一个或多个位点删除或加入一个或多个氨基酸;或取代天然蛋白质(如 SEQ ID NO :2 所示)中一个或多个位点的一个或多个氨基酸而衍生自天然蛋白质的蛋白质。变体蛋白通常具有生物学活性,即它们仍具有全长 GmRD22 蛋白的至少一种所需生物学活性。例如,遗传学多态性或采用重组分子生物学方法的人工操作可获得这种变体。通过序列比对程序利用默认参数测定到,本发明的 GmRD22 天然蛋白的生物学活性变体与天然蛋白质的氨基酸序列有至少 40%、50%、60%、70%,通常是至少 75%、80%、85%,优选约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列相同性。本发明蛋白质的生物学活性变体可与该蛋白质有最少 1-15 个氨基酸残基,最少 1-10 个,例如 6-10 个,最少 5 个、最少 4、3、2 或者甚至 1 个氨基酸残基不同。

[0066] 可以各种方式改变本文提供的 GmRD22 蛋白,包括氨基酸取代、缺失、截短和插入。本领域通常知道这些操作的方法。例如,可通过 DNA 中的突变制备 GmRD22 蛋白的氨基酸序列变体。不影响感兴趣蛋白质生物学活性的合适氨基酸取代的指导可见 Dayhoff 等((1979)ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE(蛋白质序列和结构图集)(Nati. Biomed. Res. Found., 华盛顿,哥伦比亚特区))的模型。可进行保守性取代,例如将一种氨基酸替换成具有相似特性的另一种。

[0067] 本发明还提供产生 GmRD22 蛋白及其变体的方法,保护植物或植物细胞免遭非生物应激的方法和选择成功转化的植物细胞或植物的方法,所有这些均涉及植物或植物细胞的转化。

[0068] 对于农业、园艺、能源工业、用于生物转化的生物质和 / 或林业重要或感兴趣的任何高等植物或高等植物细胞是本发明方法的合适对象,包括但不限于:烟草、玉米、莴苣、油料种子、油菜、甜菜、土豆、西红柿、黄瓜、胡椒、豆类、豌豆、柑橘水果、鳄梨、桃、苹果、梨、浆果、李子(plumbs)、瓜、茄子、棉花、大豆、葵花籽、玫瑰、猩猩木(poinsettia)、牵牛花、银胶菊、甘蓝、菠菜、苜蓿、洋蓟、玉米、小麦、水稻、黑麦、大麦、禾本植物,例如柳枝稷(switch grass)或草坪草(turf grass)、小米、大麻、香蕉、白杨、桉树、针叶树、装饰性植物(例如,

较大的花、较大的叶片)和豆类植物。因此,本文还提供通过本发明方法产生的植物或高等植物的细胞。

[0069] 这种植物不具有内源性 GmRD22 表达,而是外源性表达 GmRD22 蛋白。因此,转化植物的细胞可包含天然 GmRD22 多核苷酸序列和编码外源性或异源 GmRD22 蛋白的重组核酸构建物或者只具有编码异源 GmRD22 蛋白的重组核酸构建物。异源核酸是来自除其所引入的植物细胞,或产生转基因部分的植物或植物部分以外来源的那些核酸。用于转化的异源核酸可以是 RNA 或 DNA(例如,cDNA、基因组 DNA)。此外,异源核酸可以是环状或线形、双链或单链分子。单链核酸可以是有义链或反义链。

[0070] 可利用任何合适的表达载体系统或构建物以修饰易感的植物细胞使之含有和表达 GmRD22 编码多核苷酸。例如,可修饰植物细胞使之含有编码相关蛋白的核苷酸序列,这些序列任选与在植物中可操作的控制序列操作性相连,或者整合入基因组从而能在内源性控制序列的控制下表达。

[0071] 操作性相连的序列是在启动子或启动子样序列与第二序列之间功能性连接的那些序列,其中所述启动子或启动子-样序列启动并介导对应于所述第二序列的 DNA 序列转录。操作性相连通常表示相连的核酸序列是毗连的,如果需要连接两个蛋白质编码区,相连的核酸序列毗连并在同一读框中。

[0072] 按 5'-3' 转录方向,表达载体系统可包含在植物中起作用的转录和翻译起始区、本文提供的 GmRD22DNA 序列和转录及翻译终止区。对于植物宿主,转录起始区,即启动子可以是天然的或异源的。此外,启动子可以是分离的序列,或者合成或重组序列。

[0073] 重组核酸构建物可含有在植物中可操作并与 GmRD22 蛋白-编码序列操作性相连的控制序列,其控制导致瞬时、组成型或诱导性表达的序列。表达可以是组织特异性或非组织特异性的。在本发明中,术语“构建物”和“载体”可互换使用。

[0074] 在一些实施方式中,可单用启动子或启动子片段或与其它序列组合以产生合成启动子构建物。在这种实施方式中,这些片段赋予合成启动子构建物所需的特性,例如使得操作性相连的序列对于干旱应激或高盐度起反应而增强转录。

[0075] 如果合适,可优化 GmRD22 多核苷酸以增强转化植物表达。即,可利用植物优选密码子合成基因以增强表达。本领域有合成植物优选基因的方法可用。参见,例如美国专利号 5,380,831 和 5,436,391。

[0076] 本领域有各种这样的控制序列可用,遗传修饰的合适载体也是熟知的,实际上可商业购得。重组核酸构建物还可包含,例如多腺苷酸化位点、报道基因和/或内含子序列等,其存在可能不是核酸功能或表达所需,但能通过影响,例如转录和/或稳定性(例如,mRNA 的稳定性)来增强核酸的表达和/或功能。可将这种元件纳入重组核酸构建物以获得核酸的最优整合和/或表达。

[0077] 在一些实施方式中,编码 GmRD22 蛋白的多核苷酸与应激诱导型启动子操作性相连并稳定整合入合适宿主,例如水稻的基因组。其它实施方式中包括 GmRD22 与发育控制的启动子或组织特异性启动子操作性相连。这些启动子包括叶片特异性、根特异性或种子特异性启动子。

[0078] 在本发明的其它实施方式中,编码 GmRD22 蛋白的多核苷酸与化学诱导型启动子操作性相连并稳定整合入合适宿主植物的基因组或在合适宿主植物中稳定表达。在这

些实施方式中,可用合适的化学试剂处理经历非生物应激或有接触非生物应激危险的植物以诱导 GmRD22 蛋白表达,从而缓解应激对植物的影响并提高农作物产量。本领域已知化学诱导型启动子,包括但不限于:玉米 In2-2 启动子,其由苯磺酰胺除草剂安全剂激活;玉米 GST 启动子,其由用作出土前除草剂的疏水性亲电性化合物激活;和烟草 PR-1a 启动子,其由水杨酸激活。其它感兴趣的化学试剂调节启动子包括类固醇反应性启动子(steroid-responsive promoter),例如糖皮质激素诱导型启动子和四环素诱导型及四环素阻抑启动子。

[0079] 在本发明的一个实施方式中,衍生自土壤杆菌(Agrobacteria)的 Ti 质粒的二元系统特别适合于本发明。二元系统通常包含大小不同的两种载体。较大的载体是辅助载体,其含有将较小载体所携带的 T-DNA 整合入植物细胞基因组的必需基因。较小的载体通常称为二元载体,其携带要插入或克隆的基因。辅助载体通常预先转化合适的土壤杆菌菌株。本领域熟知许多这种土壤杆菌菌株,例如 LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105、ABI 等(Plant Molecular Biology Manual(植物分子生物学手册),S. B. Gelvin 和 R. A. Schilperoort 编,第 2 版,斯普林格公司(Springer),1994)。类似地,可用许多二元载体实施本发明,例如 pBR322、pUC 系列、pBI 系列、pMON 系列、pCambia 系列、pGreen 系列,等等。二元载体的选择可取决于待转化的植物物种。例如, LBA4404 适合于转化双子叶植物,而 EHA105 可适用于单子叶植物。本领域普通技术人员具有选择合适载体的知识,这些知识可参见,例如植物分子生物学手册, S. B. Gelvin 和 R. A. Schilperoort 编,第 2 版,斯普林格公司,1994。

[0080] 本领域熟知遗传修饰植物细胞并重建完整的植物的技术。参见,例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING: LABORATORY MANUAL(分子克隆实验室手册)冷泉港,纽约(1989); Gelvin 等, PLANT MOLECULAR BIOLOGY ANNUAL(植物分子生物学年鉴)(1990); Dashek, METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY(植物生物化学和分子生物学方法)CRC 出版社(CRC Press)1997。在一个实施方式中,启动子可以是 35s CaMV、水稻肌动蛋白启动子、泛素启动子或蓝曙红合酶(NOS)启动子。现有技术在这方面的有用总结,包括可用作本发明对象的植物和植物细胞类型的相当全面的清单见 2004 年 1 月 14 日公布的美国专利公布 2004/0009476,该公布关于植物遗传操作的合适技术和适用这些技术的植物和植物细胞范围的内容通过引用纳入本文。

[0081] 在一些实施方式中,表达系统或重组核酸构建物可包含用于选择转化细胞的可选择标记基因。利用可选择标记基因选择转化的细胞或组织,可利用任何合适的标记基因。标记基因包括但不限于编码抗生素抗性的基因,例如编码新霉素磷酸转移酶 II(NEO)和潮霉素磷酸转移酶(HPT)的那些基因以及赋予对除草剂化合物,例如草铵膦(glufosinate ammonium)、溴草腈、咪唑啉酮和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)抗性的基因。在其它实施方式中,GmRD22 可用作可选择标记。

[0082] 一旦获得了显示耐受性的转化植物细胞,然后看从其再生转基因植物并评估抗性或耐受性性状遗传的稳定性,即该抗性 or 耐受性性状释放传递给后代。因此,提供的是对非生物应激,特别是盐和干旱应激或脱水应激实质性耐受或抵抗的转化植物。例如,植物可在有一种或多种非生物应激存在下存活和/或茁壮生长。转化植物的细胞可包含天然 GmRD22 多核苷酸和编码异源 GmRD22 蛋白的重组核酸构建物,或者只包含编码异源 GmRD22 蛋白的重组核酸构建物。

[0083] 可通过以下方法在分子水平评估非生物应激耐受性状的遗传,例如 Southern 或 Northern 印迹分析、PCR 方法或生物化学或免疫学检测 GmRD22,或通过表型分析,即转化的后代是否能在有抑制未转化植物生长的盐或干旱(或脱水)存在下生长。还提供了转化植物种子和由转化植物产生的其它后代。

[0084] 此外,由于本发明的修饰细胞和植物耐受脱水和/或盐度应激的应激,包含编码含 GmRD22 的蛋白质并与在植物中可操作的控制序列操作性相连的核苷酸序列的表达盒可用作成功转化细胞的可选择标记。成功的转化体有更高的抵抗力并能在标记赋予耐受性的所施加应激下存活。因此,可通过在这种应激条件下存活和/或茁壮成长的能力来鉴定成功转化体。可亚培养这些应激耐受性“细胞系”数次以除去非耐受性细胞。

[0085] 产生含有 GmRD22 或其同源物的转基因作物作为节水农业植物或其一部分可用于节水农业实践。本发明的植物或其一部分还可用于增产以提高作物产量。

[0086] 本文提供的 GmRD22 转基因植物、后代和种子还可单用或与其它节水农业实践联用以降低或限制用水,但仍能维持植物产量和质量。例如,可以用 GmRD22 和另一种应激相关基因,例如 GmPAP3 共同转化(co-transfer)作物植物,从而更耐干旱。

[0087] 具体地说,这些植物、后代和种子在盐地和干燥/半干燥地区特别有用,因为诱导或增强的非生物应激耐受性使得这些转基因植物能在不可用或不利于农业开发的土地上茁壮成长。

[0088] 提供以下实施例是为了说明而不是限制本发明。

[0089] 实施例

[0090] 材料与方法

[0091] 植物材料. 本研究利用不同遗传背景构成的 10 种栽培 (*Glycine max* L. Merr.) 和 10 种野生型 (*Glycine soja*) 大豆品种。栽培品种 Union (UN)、Hark (HK) 和 Nebsoy (NS) 来自美国。其它栽培的品种 Wenfeng 7 (WF)、Tiefeng 8 (TF)、Jindou 5 (JD5)、Jindou 6 (JD6)、Dandou 5 (DD)、85-140 和 Zaoshu 6 (ZS) 来自中国。包括 Beijing 4 (BJ)、Donggou 16 (DG)、Wuhai 4 (WH)、Yinjin 3 (YJ)、Mengjin 1 (MJ)、Jidong 5 (JO)、Fengcheng 20 (FC)、Jixian 11 (JX)、Kaiyuan 21 (KY) 和 Shuangcheng 4 (SC) 在内的所有野生型源自中国。水稻转化亲代是稻、日本亚种 (*japonica*)、日本品种。拟南芥转化亲代是生态型 Col-0。

[0092] 大豆的 RD22- 样基因的分子克隆、系统发生分析和基因表达研究. 为制备用于构建扣除文库 (subtractive library) 的样品,使品种 Wenfeng 7 (WF) 的种子发芽并生长在装有彻底清洗的硅沙 (silicon sand) 的带孔塑料盆中,用改进的 Hoagland 营养溶液 (Hoagland 和 Arnon, 1938) 灌溉 14 天,然后用 0.3% (w/v) NaCl 处理,以 3 天为间隔。然后将盐处理逐渐增加至 0.6%、0.9%、1.2%,最终增加至 1.5% (w/v) NaCl, 3 天,采用改进的苯酚/氯仿/异戊醇 (P : C : I = 25 : 24 : 1, v/v) 介导的提取方法 (Jackson 和 Larkins, 1976) 从 NaCl- 处理和对照幼苗的叶片中提取总 RNA。利用 CLONTECH PCR-Select™ cDNA 扣除试剂盒 (Clontech K1804-1) 构建 WF 扣除文库。根据生产商的建议实施所有方法。检验 (tester) 和驱动 (driver) cDNA 分别源自 NaCl- 处理的和对照 WF 植物的叶片。按照 T-A 克隆方法 (Sambrook 和 Russell, 2001) 将选择的扣除片段克隆入 pBluescript II KS(+). 然后采用 CaCl₂ 方法 (Sambrook 和 Russell, 2001) 将连接产物转化入大肠杆菌菌株 DH5 α 。利用 ABI PRISM™ dRhodamine 终止子循环测序即用反应试剂盒 (dRhodamine Terminator

CycleSequencing Ready Reaction Kit)(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer),402078)测序各成功转化体中的cDNA克隆。将制备的测序样品应用于遗传分析仪ABIprism 310来分辨循环测序产物。所有测序数据通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)网址提供的Blastn、Blastx和PSI-Blast程序分析。根据扣除片段与其它已知的RD22和RD22-样基因的高度同源性将一种扣除片段(GmRD22)鉴定为RD22-样基因(见结果)。首先利用SMART™ RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech K1811-1),通过5'和3'快速扩增cDNA末端(RACE)技术获得覆盖GmRD22完整编码区的cDNA序列。对于5'RACE,基因特异性引物如下所示:GSP1(5'-GCTAGCGCGGTATATCGTCATTGTC);嵌套-GSP1(5'-CCGCTTTTCGACAATCCTTCCTATC);和嵌套-GSP2(5'-CGTAACTTTTGCCCTTCCGCTAATC)。对于3'RACE,基因特异性引物如下所示:GSP1(5'-CCTGGGCGTTTAACTTTTCAATAC)和嵌套-GSP1(5'-GGCTGTTCTATCTACCGCTTCC)。按照生产商的使用说明书进行用于RACE的降落聚合酶链式反应(PCR),其中退火温度修改如下:用5'和3'GSP1扩增(第1、第2和第3轮PCR分别为70℃、68℃和66℃);用5'嵌套-GSP1、5'嵌套-GSP2和3'嵌套-GSP1再扩增(第1和第2轮PCR分别为70℃和67℃)。随后利用侧接GmRD22的全长编码区的引物(5'-AGCTTGCTTACAGTTCC和5'-AAGTTATTCAAGMCAGG),通过直接测序从WF cDNA制品产生的PCR产物来验证GmRD22的DNA序列。

[0093] 分析GmRD22与其它RD22-样蛋白/含BURP结构域的蛋白质的系统发生关系。采用ClustalW程序进行多序列比对(Thompson等,1994)。利用MEGA程序(2.1版)计算自引值并构建系统发生树(Kumar等,2001)。所有可能的树形布局计算(tree topology calculation)采用1000份复制品。

[0094] 为制备用于NaCl诱导性测试的RNA样品,使不同大豆品种的种子发芽并生长,如上所述。通过Northern印迹分析,利用标准方法在42℃,含50%甲酰胺的杂交溶液中分析基因表达(Sambrook和Russell,2001)。除非另有表述,Northern印迹分析中将10pg总RNA加载到各泳道。单链DIG(洋地黄毒苷)-标记的PCR产物用作探针(Finch等,1991)。利用侧接原始扣除GmRD22克隆的T3和T7引物(5'-AATTAACCCTCACTMAGGG和5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC)产生GmRD22的探针。

[0095] NaCl 应激和脱水应激的生长条件。对于NaCl处理,使表面灭菌的种子在含有改进Hoagland溶液的滤纸中发芽。发芽后,将均匀生长期(uniform growthstage)的1-周龄幼苗转移至含有相同培养基的水栽培系统。第一个三叶展开后,用补加了125mM NaCl的Hoagland溶液处理幼苗。处理0-、8-、72-和144-小时后,收集处理植物的最新的完全展开三叶以提取总RNA(图5)。对于聚乙二醇(PEG)处理,类似地使大豆植物发芽和生长,除了用Hoagland溶液(对照)或补加5%PEG 6000或125mM NaCl的Hoagland溶液处理得到的幼苗(图6)。处理48-小时后,收集最新的完全展开三叶以提取总RNA。处理8-、12-和24-小时后,收集最新的完全展开三叶以提取总RNA(图7)。通过Northern印迹分析,利用标准方法在50℃,含50%甲酰胺的杂交溶液中分析基因表达(Sambrook和Russell,2001)。单链DIG(洋地黄毒苷)-标记的PCR产物用作探针(Finch等,1991)。利用侧接原始扣除GmRD22克隆的T3和T7引物(5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG和5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC)产生GmRD22的探针。

[0096] 建立转基因水稻品系。与中国国家水稻研究院(China National RiceInstitute)

协作构建转基因水稻。将转基因克隆入泛素启动子驱动的双重 T-DNA 二元载体 pSB 130 的多克隆位点 (MCS)。利用稻日本亚种日本栽培品种日本晴 (*Oryza sativa* ssp *japonica* cultivar *Nipponbare*) 诱导愈伤组织进行转化。通过共同培养将含有靶基因的构建物转化入愈伤组织。后续亚培养后,将转化的愈伤组织在含有潮霉素作为选择剂的再生培养基上再生。利用基因特异性引物,通过 PCR 筛选转化体中是否存在转基因。筛选转基因品系并培养直至获得纯合品系。实施 Northern 印迹分析以证实转基因表达。

[0097] 在开放田野中在转基因水稻中实现盐应激的生长条件。发芽后,将水稻幼苗(转基因水稻连同野生型)播种入开放田,用 2% 盐水(海水的形式)处理 1 个月。

[0098] 在环境受控生长室中在转基因水稻中实现干旱应激和盐应激的生长条件。避光发芽 10 天后,将各包括野生型亲代和 3 种独立 GmRD22 转基因水稻品系的一式三份组在维持于约 28°C 的生长室中,使用 1/2MS 液体培养基,以 16 小时白天(强度约 120E)-8 小时黑夜的周期再培养 9 天。第一组用补加了 200mM NaCl 的 1/2MS 液体培养基处理 2 天,然后用 1/2MS 液体培养基灌溉 2 天。通过除去液体生长培养基 16 小时而将干旱应激引入另一组,然后补充 1/2MS 液体培养基,3 天。在整个测试期间用 1/2MS 液体培养基灌溉对照组。记录代表性幼苗的性能,计算存活率。

[0099] 建立转基因拟南芥系。将转基因克隆入 CaMV 35S 组成型启动子驱动的二元载体 V7 的多克隆位点 (MCS) (Brears 等,1993)。通过真空渗入辅助的土壤杆菌介导方法 (Bechtold 和 Pelletier,1993) 进行转化。利用卡那霉素选择阳性转化体,利用 GmRD22 特异性引物,通过 PCR 证实是否存在转基因。筛选含单插入基因座 (single insertion locus) 的转基因品系并繁殖直至获得纯合品系。实施 Northern 印迹分析以证实转基因表达。

[0100] 测试干旱应激对转基因拟南芥根部生长的影响。将野生型亲代 (Col-0)、空载体转基因对照 (V7) 和两种独立的 GmRD22 转基因品系 (4-4-1 和 1-1-2) 的种子播种在含 3% 蔗糖和 0.9% (w/v) 琼脂的 MS 平板上。将幼苗(发芽后 7 天)转移至对照 MS 琼脂平板或补加了 20% 聚乙二醇 6000 (PEG) 的 MS 琼脂平板上。记录处理前和处理后 7 天的各幼苗的根部长度,计算根部生长百分比。

[0101] 实施例 1

[0102] 在盐耐受性大豆种质中鉴定盐应激反应基因

[0103] 采用抑制扣除杂交 (SSH) 技术(参见材料与方法)鉴定大豆品种 Wenfeng 7 的盐诱导型基因。通过材料与方法章节所述的 5' 和 3' RACE 可获得以下大豆栽培品种的 GmRD22 的全长编码区:Wenfeng 7、Tiefeng 8、Union、Zaoshu6、Mengjin 1 和 Jixian 11。利用瑞士生物信息学研究院 (Swiss Institute of Bioinformatics) (SIB) 的专业蛋白质分析系统蛋白质组学服务器提供的翻译工具预测氨基酸序列(图 1)。

[0104] 如材料与方法所述,使不同大豆品种的种子发芽并生长。以 3 天为间隔,对 20 日年龄的幼苗进行 0.3%、0.6% 和 0.9% (w/v) 的逐步 NaCl 处理。NaCl 处理后,提供 Northern 印迹分析分析 GmRD22 基因表达(细节见材料与方法)。在测试的所有 10 种栽培的和野生型大豆品种中发现一个候选基因 (GmRD22) 为 NaCl 应激所强烈诱导(图 2)。DNA 序列分析表明 GmRD22 是 RD22-样基因,因为其基因产物与其它鉴定的植物 RD22 基因产物以及一些含 BURP 结构域的蛋白质的同源性高。BURP 结构域是在包括 RD22 蛋白在内的几种植物蛋白的 C-末端发现的保守性结构域。GmRD22 的推定肽与葡萄的 RD22-样蛋白有 66% 相同性(同

源性),与棉花 (*Gossypium hirsutum*) 的脱水诱导蛋白 RD22-样蛋白有 65% 相同性,与苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 BURP 蛋白有 63% 相同性。此外, GmRD22 的全长氨基酸序列与鉴定的 RD22 蛋白,包括拟南芥、大豆、水稻、番茄和芸苔 (甘蓝型油菜 (*Brassica napus*)) 的那些蛋白比对。在其它鉴定的 RD22 蛋白中发现的 BURP 结构域在 GmRD22 中是保守性的 (图 3)。

[0105] 采用 ClustalW 程序 (Thompson 等, 1994) 和 MEGA (2.1 版) 程序 (Kumar 等, 2001) 分析 GmRD22 多肽与其它 RD22-样蛋白 / 含 BURP 结构域的蛋白质的系统发生关系。拟南芥 RD29A 的 RD29 (登录号 BAA02376) 用作外类群。将分析的多肽分成主要的三组,包括:植物 RD22 蛋白 (组 I)、含 BURP 结构域的耐受性相关蛋白和植物多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase) (含 BURP 结构域)。以主要分支的百分比表示自引值。所有可能的树形布局计算采用 1000 份复制品。在 RD22 蛋白的邻接树 (Neighbor-joining tree) 中, GmRD22 与其它公布的植物 RD22 蛋白构成紧密类群 (tight group) (图 4)。

[0106] 实施例 2

[0107] NaCl 和脱水应激诱导 GmRD22 表达

[0108] 通过 Northern 印迹分析 (参见材料与方法) 研究 NaCl 处理对大豆叶片中 GmRD22 表达的短期和长期影响。当大豆植物经历短期 NaCl 处理时 (最多 8 小时), 处理后 8 小时观察到 GmRD22 mRNA 水平的初始升高 (图 5)。同时, 处理后的第一个 8 小时期间叶片中 Na^+ 累积极少。因此, GmRD22 mRNA 水平的初始升高是脱水响应所致。当大豆植物经历长期 NaCl 处理时 (72 小时以上), GmRD22 维持高的稳态 mRNA 水平 (图 5)。为进一步研究脱水作用对 GmRD22 基因表达可能的调节作用, 对大豆植物进行 PEG 处理以模拟脱水应激 (Jia 等, 2001)。当大豆植物经历长期盐或脱水处理时, GmRD22 的稳态 mRNA 水平升高 (图 6)。

[0109] 实施例 3

[0110] 盐、脱水和 ABA 处理下盐耐受能力相反的两种大豆栽培品种差异表达 GmRD22

[0111] 为进一步表征 GmRD22 对盐和脱水应激起反应的功能, 利用 2 种遗传学不同的大豆品种 WF (盐耐受性品种) 和 UN (盐敏感性品种) 测定可影响 GmRD22 表达的应激条件。采用 Northern 印迹分析研究不同时间点时 GmRD22 对盐、脱水和 ABA 处理起反应的基因表达分布。有趣的是, 与盐、脱水和 ABA 处理下的盐敏感性品种 (UN) 相比, 盐处理 8 小时后, GmRD22 显示在盐耐受性栽培品种 (WF) 中差异诱导。该现象还在长期处理 (12 和 24 小时) 中观察至 (图 7)。

[0112] 实施例 4

[0113] GmRD22 的异位表达赋予盐耐受性

[0114] 构建表达 GmRD22 的转基因水稻。进行 Northern 印迹分析以证实 GmRD22 的表达, 测试的所有转基因品系显示转基因表达 (图 8)。处理 1 个月后, 含有 GmRD22 或在我们实验室中获得的一种其它专有克隆的转基因水稻仍能存活, 而大多数其它水稻 (包括亲代品系日本晴 (Nipponbare)) 未能在这种严苛的环境中存活。在测试的含盐田地中, 转基因赋予水稻盐耐受性, 发现在 2% 盐处理下能存活 (图 9)。对于干旱应激实验 (图 10), 除去液体培养基 16 小时后, 通过补充液体培养基能恢复 GmRD22 转基因水稻。在这种条件下, 野生型不能存活。对于盐度应激实验, GmRD22 转基因水稻而不是野生型能在 200mM NaCl 中存活 (图 10)。因此, 在生长室装置中, 纯合 GmRD22 转基因水稻品系能赋予针对干旱应激和盐度

应激的耐受性（图 10）。通过除去液体生长培养基 16 小时来实现干旱应激，然后补充液体培养基。通过在液体生长培养基中加入 200mMNaCl 来实现盐度应激。在干旱应激或盐度应激下，表达 GmRD22 的转基因水稻显示更好的存活率（图 11）。

[0115] 构建表达 GmRD22 的转基因拟南芥。进行 Northern 印迹分析以证实 GmRD22 表达，测试的所有转基因品系显示该转基因表达（图 12）。当经历渗透应激（20% PEG）时，GmRD22 转基因拟南芥品系显示根部生长好于未转化的野生型（Co1-0）和空载体转基因对照（V7）（图 13）。

[0116] 讨论

[0117] 在采用扣除杂交技术找寻大豆中的盐诱导型基因时，克隆了新型 RD22-样基因，即 GmRD22。几条证据提示其确实是 RD22 家族的一元：(1) 其与其它鉴定的 RD22 蛋白显示高度同源性；(2) 通过系统发生分析，其与其它鉴定的植物-RD22 样蛋白一起现成紧密类群。

[0118] GmRD22 在适应 NaCl 和脱水应激中起作用。当用 NaCl 处理大豆植物时，生理干旱是立即应激 (immediate stress)。NaCl 处理后，生理干旱导致叶片在 1 小时内枯萎，气孔导度在 10 分钟内下跌至基线值的 50% 以下（数据未显示）。叶片中 GmRD22 mRNA 水平的大量表达开始于 NaCl 处理的 8 小时内（图 5），此时叶片中没有明显的 Na⁺ 累积。经历长期 NaCl 处理时，GmRD22 表达维持高表达水平（图 5）。因为在经历这种长期处理的大豆植物的叶片中也观察到脱水症状，我们不能区分 NaCl 本身是否导致明显的 NaCl 诱导作用或者应激是否导致了后续的干旱。PEG 诱导 GmRD22 进一步支持脱水至少部分调节 GmRD22 基因表达这一观念（图 6）。

[0119] 在利用盐耐受能力相反的 2 种大豆种质的比较研究中，盐度应激和渗透应激下，与盐敏感性 (UN) 品种相比，GmRD22 显示在盐耐受性栽培品种 (WF) 中的诱导不同（图 7a 和 7b）。

[0120] 转基因水稻用于进行增益-功能检验 (gain-of-function test) 来研究 GmRD22 在应激-耐受性作物工程改造中可能的应用价值。表达 GmRD22 的转基因水稻而不是表达 GmRD22 的那些能在 2% 盐（海水形式）处理下存活（图 8 和 9）。该发现证明 GmRD22 能保护植物免遭盐和盐诱导的干旱应激伤害。

[0121] 转基因水稻和拟南芥用于进行增益-功能检验以研究 GmRD22 在应激-耐受性作物工程改造中可能的应用价值。在田间试验中（图 9），表达 GmRD22 的转基因水稻（图 8）而不是未转化的亲代能在 2% 盐处理（海水形式）下存活。当在环境受控生长室中生长时，GmRD22 转基因水稻显示在干旱应激和盐应激下的恢复和存活率较高（图 10 和 11）。在表达 GmRD22 的转基因拟南芥中也观察到类似保护作用（图 12）。与未转化的野生型 (Co1-0) 和空载体转基因对照 (V7) 相比，转基因 GmRD22 拟南芥显示干旱应激下的根部生长速度较高（图 13）。该发现证明 GmRD22 能保护植物免遭盐度、盐度诱导的脱水和干旱应激伤害。

[0122] 总之，GmRD22 的 NaCl 和 PEG 诱导性显示其生理作用与对盐度、盐度诱导脱水和干旱应激的适应性有关。水稻和拟南芥中表达 GmRD22 提供了异源表达能保护植物免遭盐度和干旱应激伤害的确定证据，从而提示该克隆可用于耐盐和耐旱作物工程改造。

[0123] 可对上文作出改进而不脱离本发明的基本。虽然参考一个或多个具体实施方式描述了本发明的实质性细节，但本领域技术人员应知道可对本申请专门公开的实施方式作出改变，而这些改进和提高属于以下权利要求书所示的本发明范围和构思。

[0124] 引用以上出版物或文件并非承认上述任何文件属于现有技术,亦非承认这些出版物或文件的内容或日期。本文述及的美国专利和其它出版物通过引用纳入本文。

[0125] 参考文献

[0126] Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. 和 Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression (拟南芥 MYC 和 MYB 同源物在干旱和脱落酸调节的基因表达中的作用). *Plant Cell* 9, 1859-68

[0127] Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants (植物的耐盐育种). *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 17-42

[0128] Bechtold, N. 和 Pelletier, G. (1993). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration (在植物中通过真空渗入的土壤杆菌介导转化成年拟南芥植物). 刊于 Martinez-Zapater, J., Salinas, J. (编), ARABIDOPSIS PROTOCOLS (拟南芥方案). 休玛娜出版社公司 (Humana Press Inc.), 托托瓦 (Totowa), 第 259-266 页.

[0129] Brears, T., Liu, C., Knight, T. J. 和 Coruzzi, G. M. (1993). Ectopic overexpression of asparagine synthetase in transgenic tobacco (转基因烟草中天冬酰胺合成酶的异位过表达). *Plant Physiol.* 103 :1285-90.

[0130] Diatchenko, L., Chenchik, A. 和 Siebert, P. (1998). Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly(A+) or total RNA (抑制扣除杂交: 从多聚(A+) 或总 RNA 开始产生扣除 cDNA 文库的方法). 刊于 Siebert, P., Larrick, J. (编), RTPCR METHOD FOR GENE CLONING AND ANALYSIS (基因克隆和分析的 RTPCR 方法). 伊顿出版公司 (Eaton Publishing), 内蒂克 (Natick), 马萨诸塞州, 第 213-39 页.

[0131] Finckh, U., Lingenfelter, P. A., Myerson, D. (1991). Producing single-stranded DNA probes with the Taq DNA polymerase: a high yield protocol (用 Taq DNA 聚合酶产生单链 DNA 探针: 高产量方法). *Biotechniques* 10 :35-38

[0132] Hoagland, D. R. 和 Arnon, D. I. (1938). The water-culture method for growing plants without soil (不用土壤培养植物的水耕法). *Calif Agric. Expt. Circ.* 347, 1-39

[0133] Jackson, A. O. 和 Larkins, B. A. (1976). Influence of ionic strength, pH, and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves (离子强度、pH 和二价金属离子螯合对从烟草叶片中分离多核糖体的影响). *Plant Physiol.* 57, 5-10.

[0134] Jain, R. L. 和 Selvaraj, G. (1997). Molecular genetic improvement of salt tolerance in plants (分子遗传提高植物的盐耐受性). 刊于 *Biotechnology Annual Review* (生物技术年鉴) (E1-Gewely, M. R. 编) 第 3 卷, 第 245-67 页, ES 公司 (Elsevier Science B. V.)

[0135] Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. 和 Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software (MEGA2: 分子进化遗传分析软件). *Bioinformatics* 17, 1244-45.

- [0136] Maas, E. V. 和 Hoffman, J. G. (1977). Crop salt tolerance-current assessment (作物盐耐受性 - 最新评估). *J Irrig. Drain. Eng.* 103: 115-34.
- [0137] Sambrook, J. 和 Russell, D. W. (2001). *MOLECULAR CLONING: LABORATORY MANUAL* (分子克隆实验室手册), 第3版, 冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽约
- [0138] Thompson, J. D., Higgins, D. G. 和 Gibson, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice (CLUSTALW: 通过序列权重、位置特异性空位罚分和权重矩阵选择提高累进多序列比对的灵敏度). *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-680
- [0139] Xiong, L. M., Ishitani, M., Lee, H. J. 和 Zhu, J. K. (2001). The Arabidopsis L0351ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulated cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression (拟南芥 L0351ABA3 基因座编码钼辅因子硫化酶并调节冷应激和渗透应激 - 响应性基因表达). *Plant Cell* 13, 2063-83
- [0140] Yamaguchi-Shinozaki, K. 和 Shinozaki, K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediated the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana* (植物激素脱落酸在拟南芥中介导 rd22, 对脱水应激起反应的一种基因的干旱诱导表达而不是种子特异性表达). *Mol. Gen. Genet.* 238, 17-25

GmRD22的核苷酸序列

```

1  atggagatc gtctctacc catttttact ttactcaatc ttgcactggg
51  ggcaatccat gctgctttac ctctgaaagt ttactggaag tcggtgcttc
101 ctactacgcc aatgccaaaa gccatcacig atatcclita ccccgattgg
151 gtggaagaga aaagtacctc agtgaatgtt ggaggcaagg gogtaaacgt
201 gcatgcagga aaaggaggag gtggcaccaa tgtcaacgtt ggtggaaaa
251 gatcaggcgg aggcgtgaac gtgcatgcag gtcacaaggg aaagccagtg
301 catgtttctg ttggctcaaa gctccattc aattacatct acgcttcaac
351 ggagactcaa ttacacgatg accccaagt cgcactcttc ttcttggaaa
401 aggaattgca tcccggaaac aagttgaact tgcacttccac caccagttcc
451 aatattcaag ccacattctt gccacgcaa gttgcggtt ctataccctt
501 ttcatccagc aagtgaggg ttgtattcaa caagttttcc gtaaaacccc
551 ggtcagagga gggccagatc atgaagaata ctctcagtga gtgtgaagag
601 ggtggcatca aaggagagga aaagtactgt gccacttcgc ttgaatccat
651 gattgattc agcacttcca agcttggaaa aaatgttgag gttgtgtcca
701 cggaagtgtg ggaggacaag gaaacggat tgcagaaata caccglagca
751 ccgggagtga acaagttatc aggggacaag gctgttgtgt gccacaagca
801 gaactaccct tatgtgtttt ttactgtca caaaactgag accacaagag
851 cttactctgt gcctttggag ggtgctaata gggttagggt taaagcggta
901 gcagtgtgcc acactcacac gtcggaatgg aaccctaaac atttggcctt
951 tcaagtgtc aaagtttaagc caggaaccgt tcctgtctgc cacttcctac
1001 ctgaggatca tgttgtttgg gttcccaagt ag

```

(a)

GmRD22的氨基酸序列

```

M E Y R L L P I F T L L N L A L V A I H A A L P P E V Y W K S V L P T T P
M P K A I T D I L Y P D W V E K S T S V N V G G K G V N V H A G K G G G
G T N V N V G K G S G G V N V H A G H K G K P V S V G S K S P F T T
Y I Y A S T E T Q L H D D P N V A L F F L E K D L H P G T K L N L H F T T
S S N I Q A T F L P R Q V A D S I P F S S S K V E V F F N K F S V K P G S
E E A Q I M K N T L S E C E E G G I K G E E K Y C A T S L E S M I D F S T
S K L G K N V E V V S T E V V E D K E T G L Q K Y T V A P G V N K L S G D
K A V V C H K K Q N Y P Y A V F Y C H K K T E T T R A Y S V P L E G A N G V R
V K A V A V C H T H T S E W N P K H L A F Q V L K V K P G T V P V C H F L
P E D H V V V W V P K

```

(b)



1

A. 栽培的大豆品种



B. 野生型大豆品种



图 2

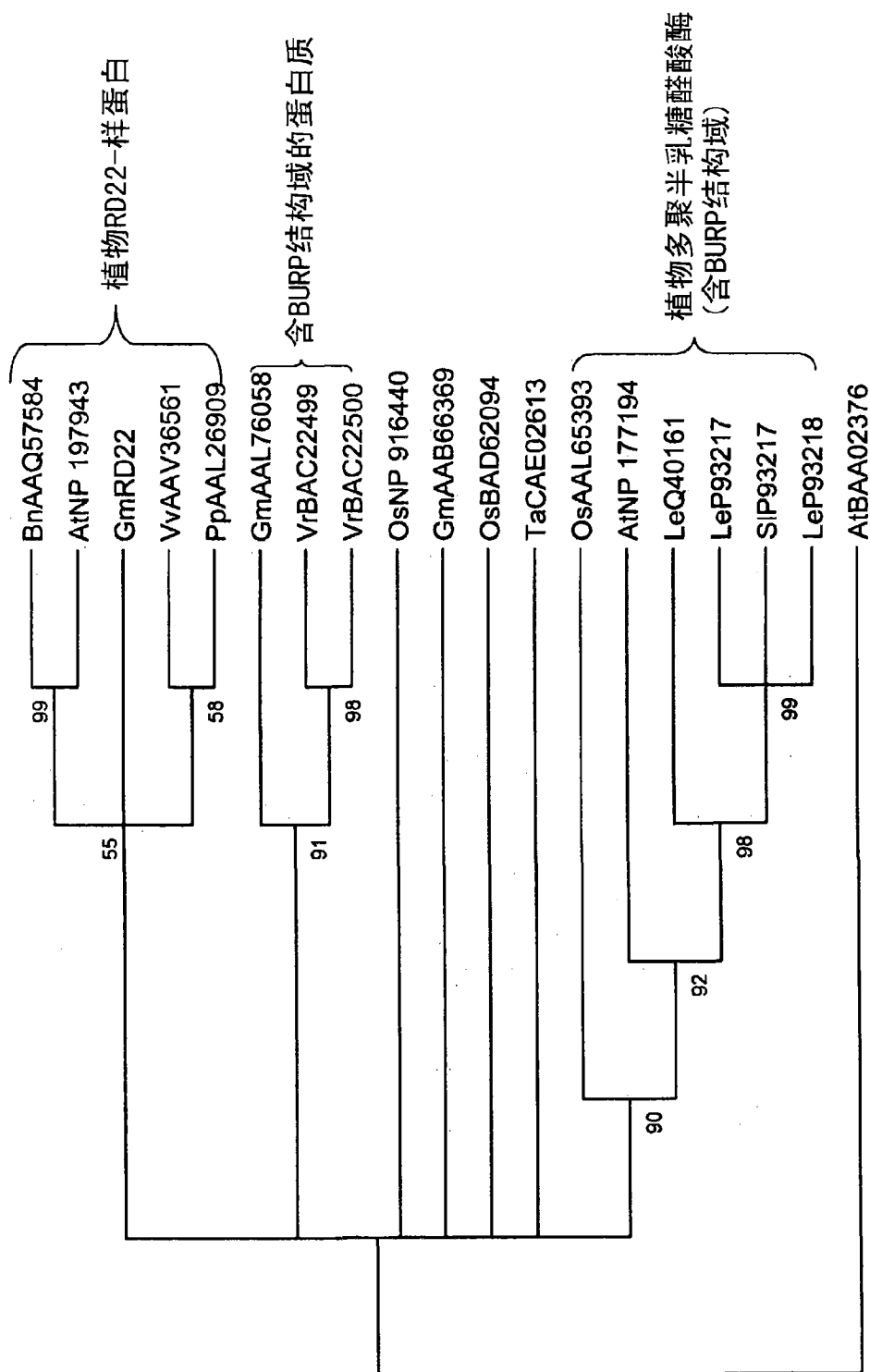
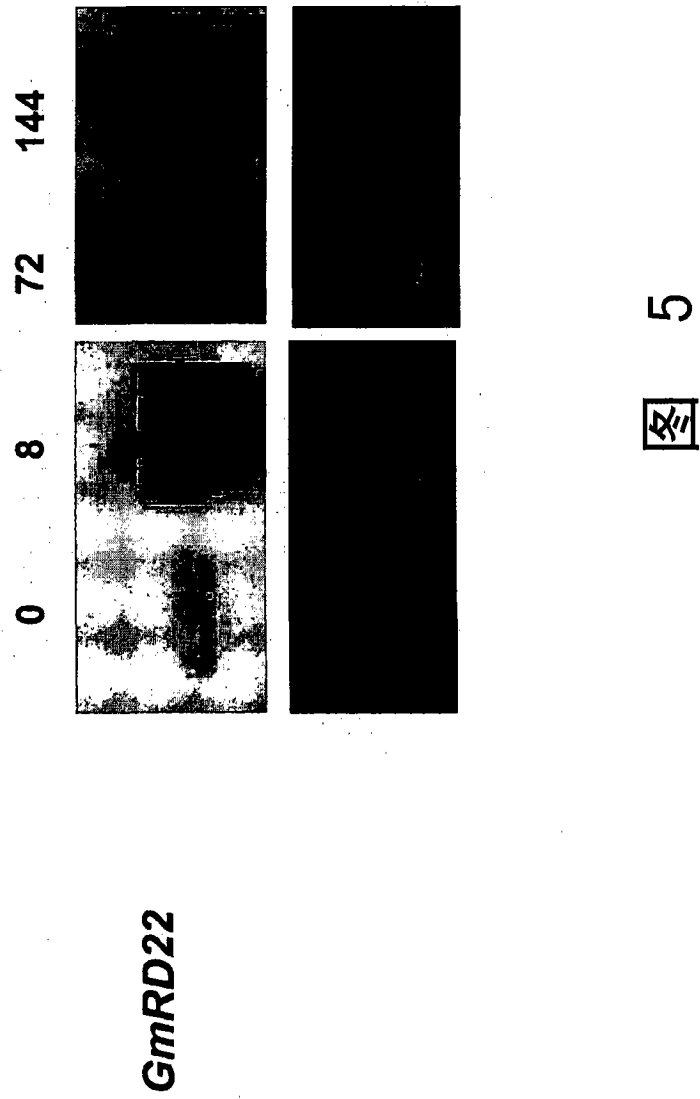
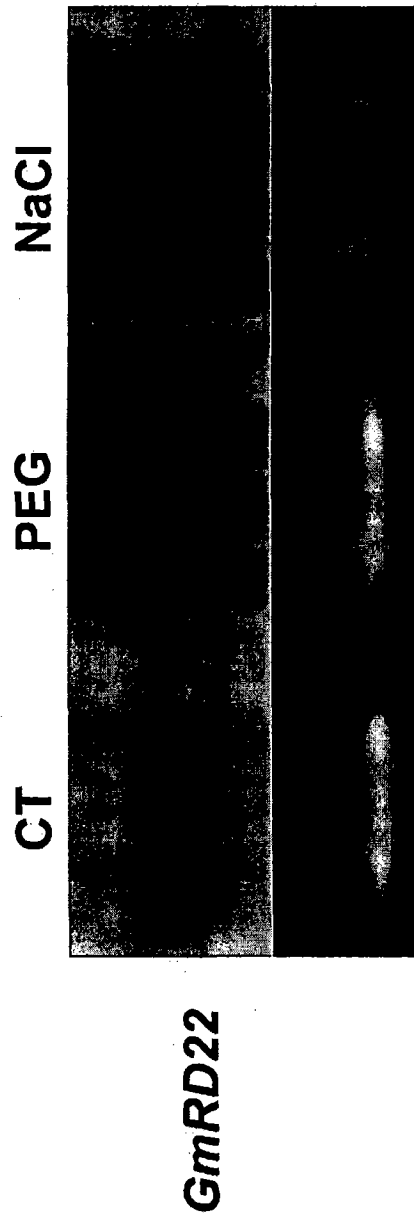


图 4





 6

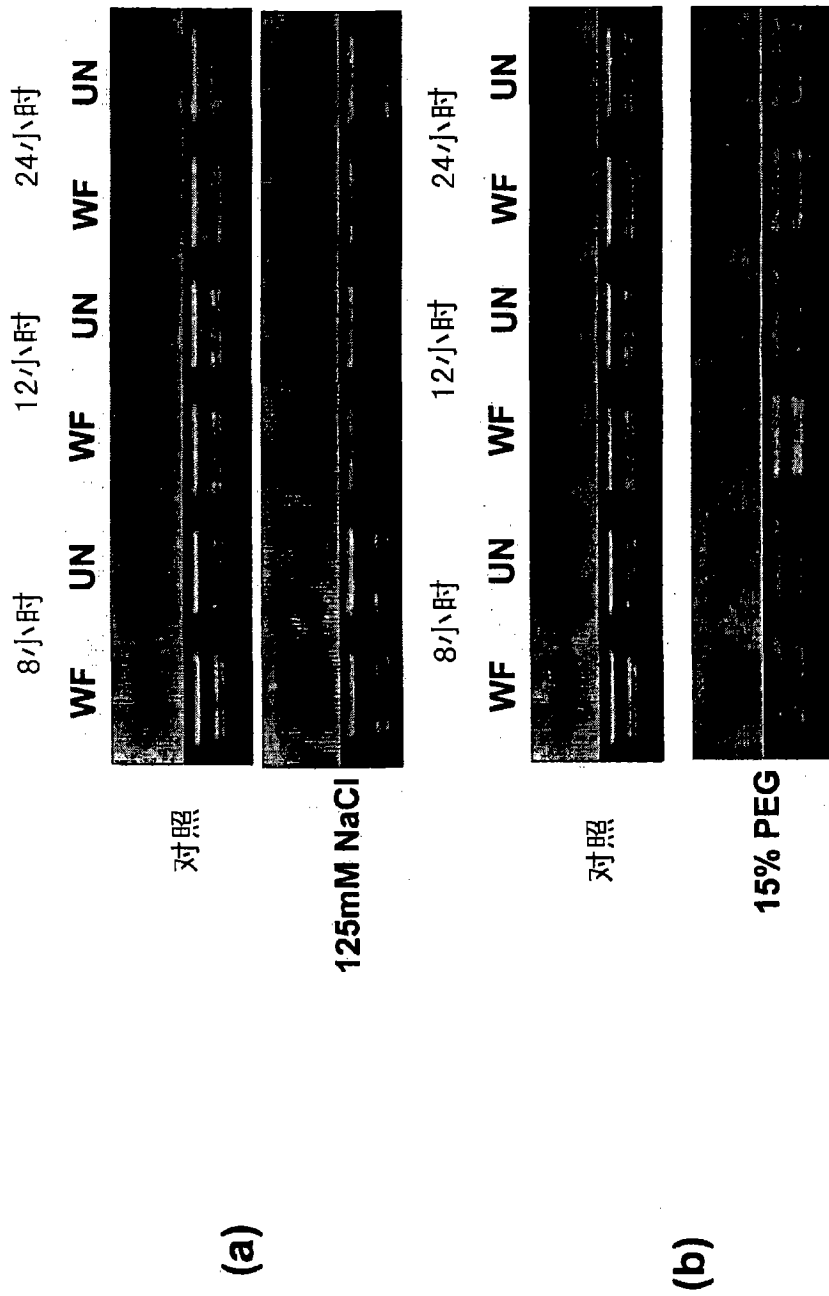
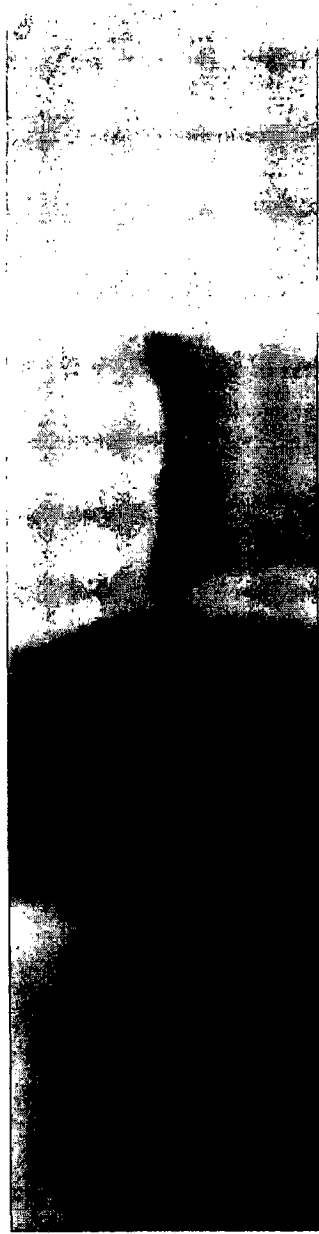


图 7

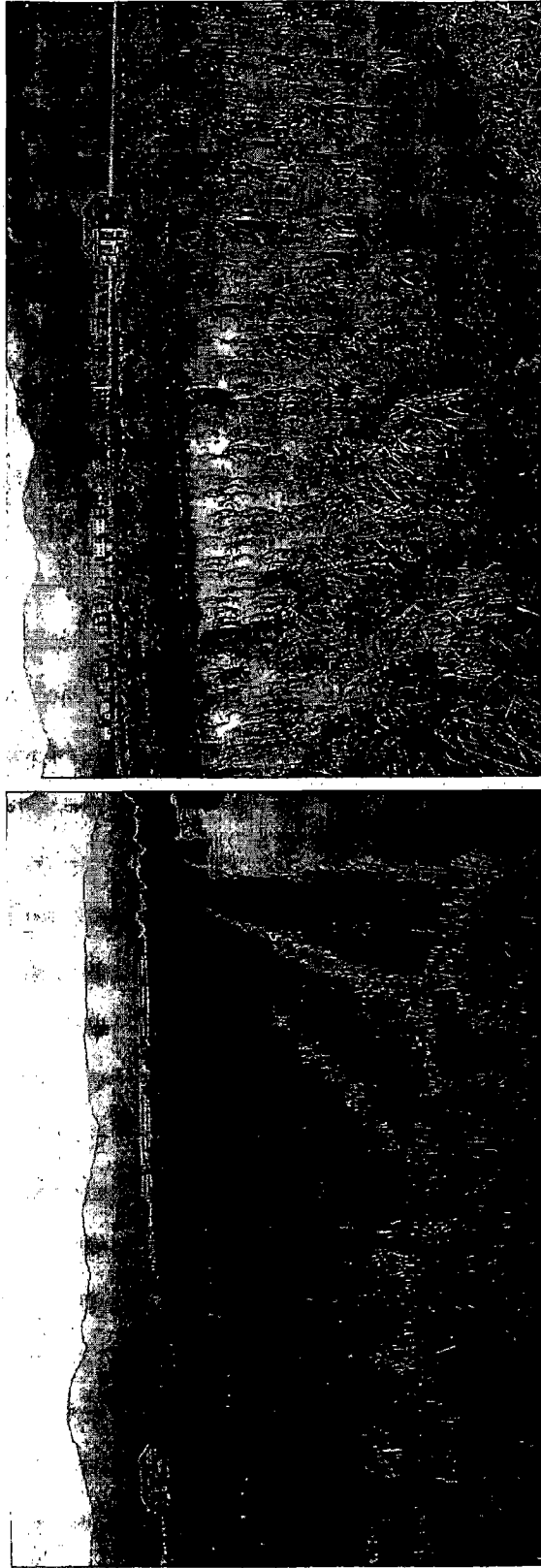
未转化的亲代

GmRD22转基因品系



8





用海水(等于2%盐)处理1个月的
野生型和转基因水稻

处理前开放田中的野生型和转基因水稻

图 9

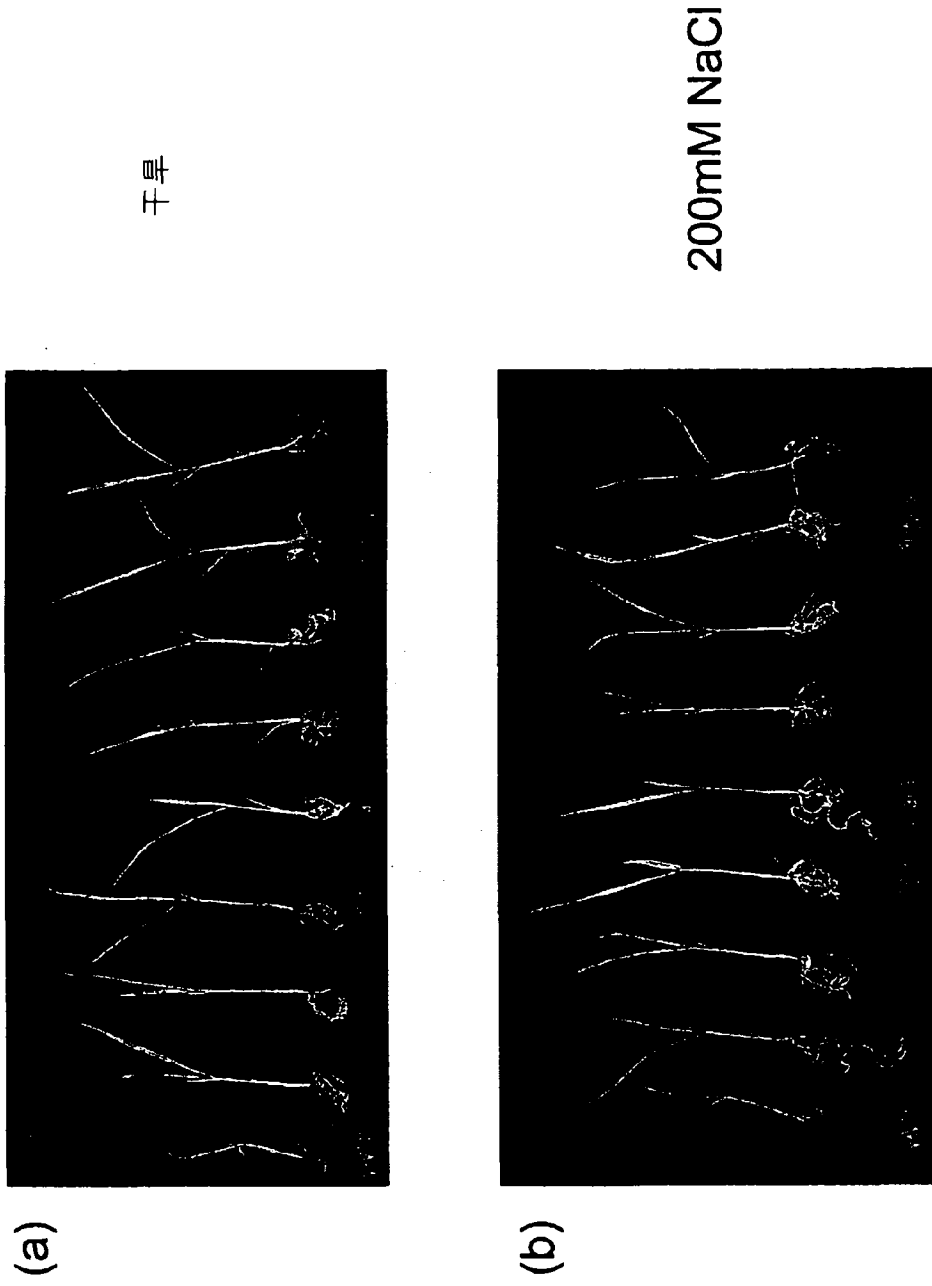


图 10

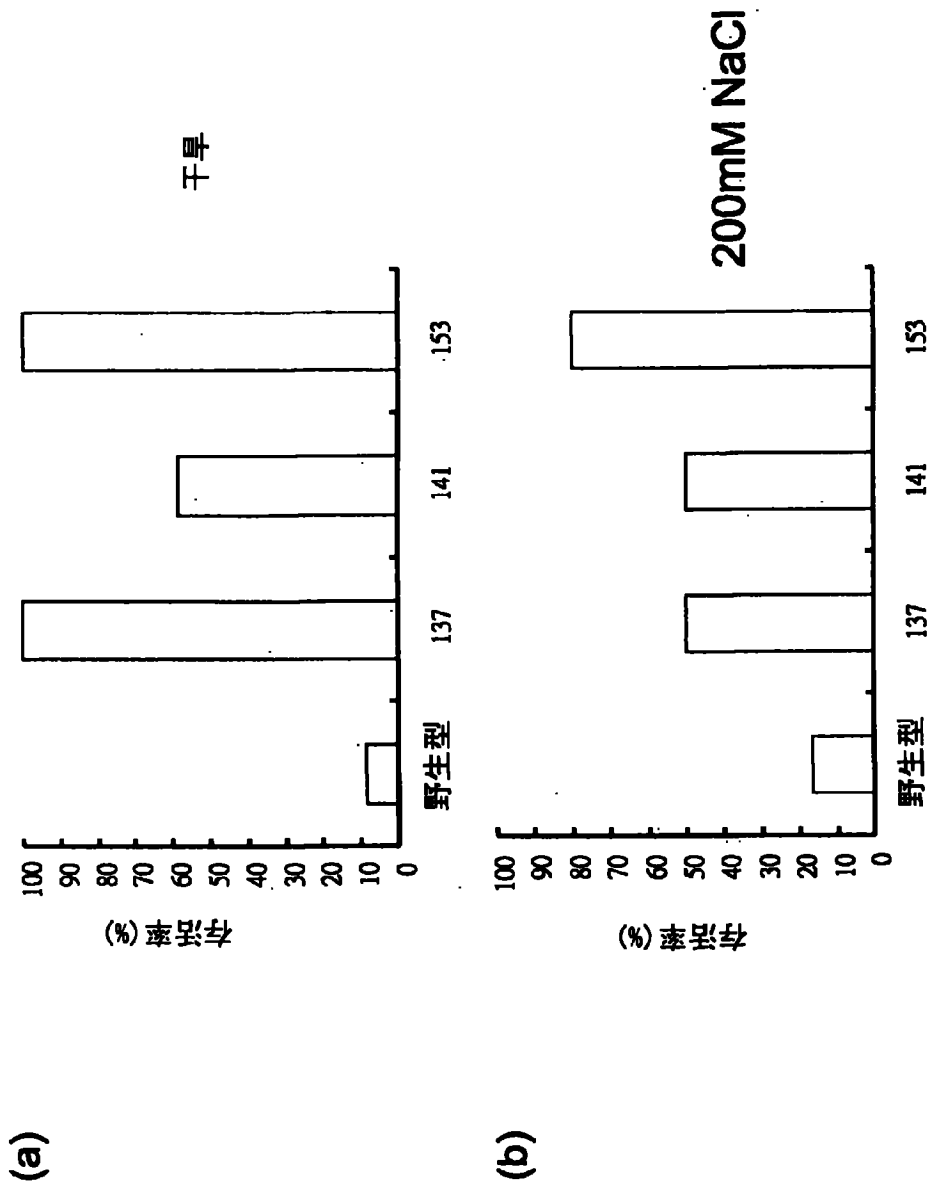


图 11

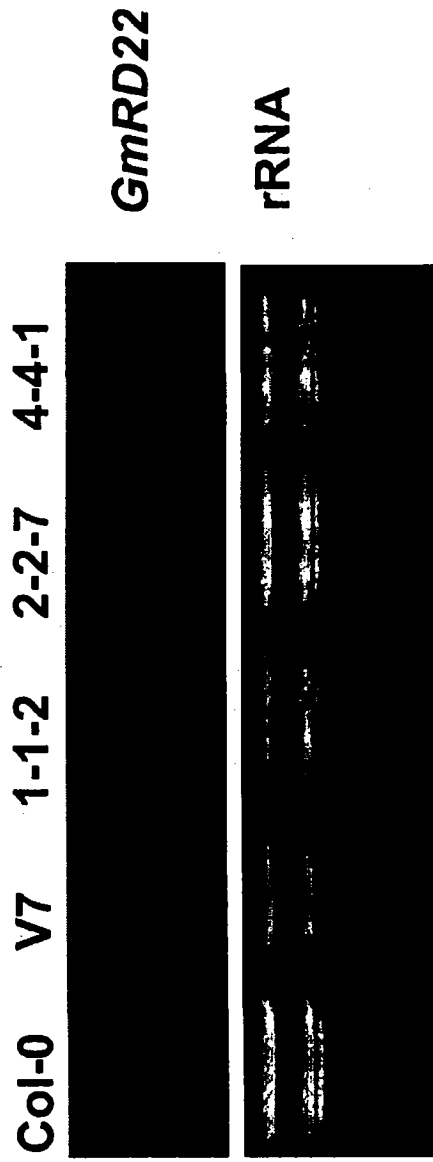


图 12

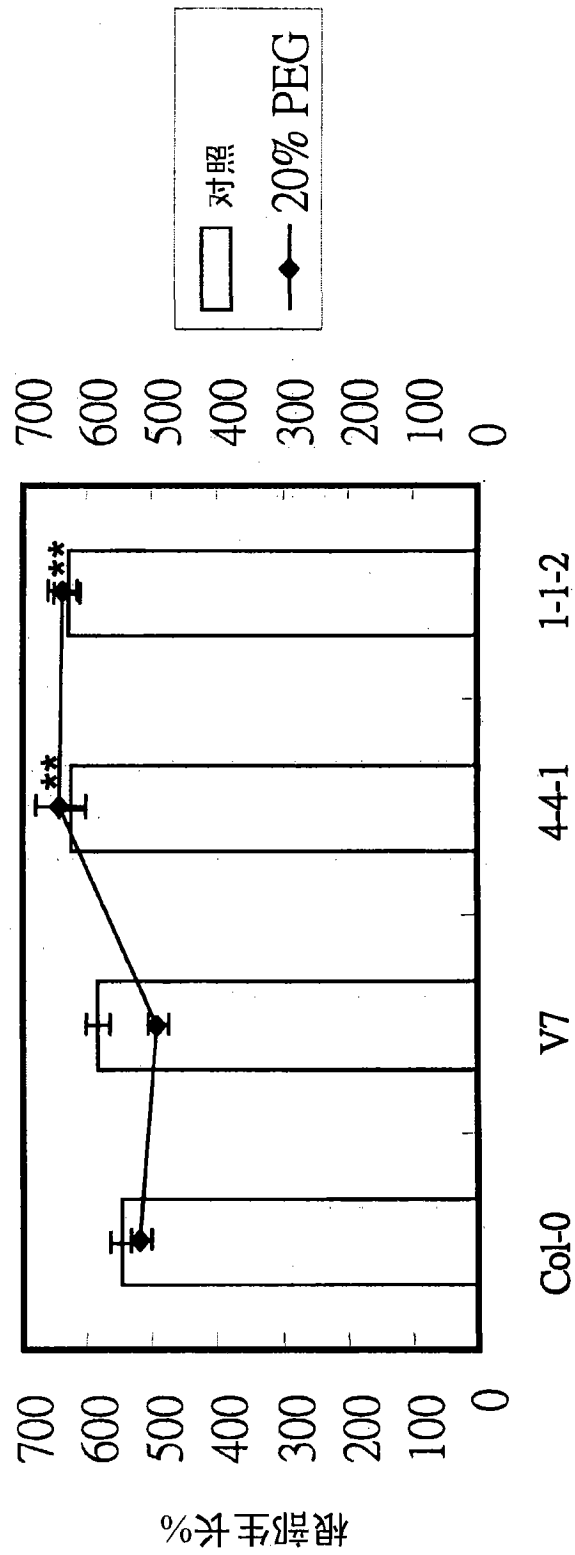


图 13