

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101553569 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200780033289.5

1-5.

(22) 申请日 2007.09.11

US 2005/0251879 A1, 2005.11.10, 摘要, 附图 1-3.

(30) 优先权数据

CN 1477118 A, 2004.02.25, 全文.

60/843,943 2006.09.11 US

Norihiro Futamura et al. Expression of

(85) PCT申请进入国家阶段日

DnaJ homologs and Hsp70 in the Japanese Willow (*Salix gilgiana* Seemen). 《Plant Cell Physiology》. 1999, 第40卷(第5期), 524-531.

2009.03.09

(86) PCT申请的申请数据

Regina Preisig-Muller et al. Plant dnaJ homologue: Molecular cloning, bacterial expression, and expression analysis in

PCT/CN2007/002678 2007.09.11

(87) PCT申请的公布数据

tissues of cucumber seedlings. 《Archives of Biochemistry and Biophysics》. 1993, 第305卷(第1期), 30-37.

W02008/043245 EN 2008.04.17

(73) 专利权人 香港中文大学

审查员 朱晓乐

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

司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件

权利要求书1页 说明书11页

WO 2006/067236 A1, 2006.06.29, 摘要, 附图

序列表7页 附图10页

(54) 发明名称

含 J- 结构域蛋白质赋予的非生物应激耐受

(57) 摘要

本发明公开了增强编码包含至少 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质的核苷酸序列表达的方法和构建物, 以提供对非生物应激, 特别是脱水和盐度应激有耐受性的植物或植物细胞。

1. 一种保护植物或植物细胞免遭盐度、渗透性和脱水应激的方法,该方法包括:  
修饰所述植物或植物细胞以产生含 DnaJ 型 J 结构域的蛋白质,所述修饰是通过:  
修饰所述植物或植物细胞使之含有控制序列,该控制序列在植物或植物细胞中实现高水平表达并与编码所述 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的 GmDNJ1 的核苷酸序列操作性连接,其中该编码核苷酸序列是所述控制序列的异源序列,而所述蛋白质是该植物或植物细胞的异源蛋白质。
2. 如权利要求 1 所述方法,其特征在于,还包括向所述植物施以节水培养方法。
3. 一种选择成功转化的植物细胞或植物的方法,该方法包括将盐度、渗透性和脱水应激施加于用重组载体处理的植物细胞或植物,所述重组载体包含含 DnaJ 型 J 结构域的蛋白质作为可选择标记的表达系统,从而选择耐受所述应激的细胞,所述蛋白质是氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 的 GmDNJ1。

## 含 J- 结构域蛋白质赋予的非生物应激耐受

[0001] 通过 EFS-WEB 提交的序列表的引用

[0002] 如 MPEP § 1730II. B. 2(a) (C) 所授权并列出的,以下通过 USPTO EFS-WEB 服务器电子提交的序列表出于所有目的通过引用全文纳入本文。序列表的电子提交.txt 文件如下所示:

[0003]

文件名	产生日期	大小(字节)
549072000400Seqlist.txt	2007年11月20日	23,509(字节)

### 技术领域

[0004] 本发明涉及植物遗传工程领域。更具体说,本发明涉及通过增强含 J- 结构域的蛋白质,特别是 DnaJ- 型蛋白质的表达而赋予对非生物应激条件 (abiotic stress condition),例如盐度、渗透性和脱水应激耐受性的方法。

### 背景技术

[0005] 种子成熟蛋白,或晚期胚胎发生丰富 (late embryogenesis abundant) (LEA) 蛋白在种子发育的晚期干燥阶段大量产生。大多数 LEA 蛋白累积在接触外源性脱落酸或经历盐度或脱水所致的非生物应激的种子或植物性组织中。一些 LEA 蛋白可能通过使大分子水合、螯合离子并使去折叠蛋白质复性而赋予转基因植物对盐和脱水的耐受性。

[0006] 采用抑制消减技术 (suppression subtractive technique),发现 9 种基因在非生物应激条件下的表达高于正常条件。它们中的一种 (GmDNJ1) 与作为 DnaJ 同源物并由 GenBank 保藏为 AF 169022 的栽培大豆 (*Glycine max*) 种子成熟蛋白 PM37 (GmPM37) 有 99% 核苷酸序列同源性。如图 11a 所示,其含有 DnaJ 的特征性组分,包括保守性 N- 末端 J- 结构域,富甘氨酸/苯丙氨酸结构域,包含 (CXXCXGXG)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:1) 锌指型基序的结构域和非特征性的 C- 末端结构域 (Cyr, D. M. 等, *J. Biol. Chem.* (1994) 269 :9798-9804, Hennessy, F. 等, *Cell Stress & Chaperones* (2000) 4 :347-358)。GmDNJ1 与任何 LEA 蛋白不相似。

[0007] 据信,DnaJ- 样蛋白主要通过辅助 Hsp70s 的陪伴分子功能来用作陪伴分子或辅助陪伴分子蛋白。Hsp70 是最初在果蝇幼虫上发现的对温度升高起反应的许多热激蛋白之一。虽然热激蛋白可以组成型产生或在应激条件下产生,但据信它们主要起陪伴分子的作用。

[0008] DnaJ- 样蛋白定义为约 73 个氨基酸的保守性“J”区域(依据原始公开的大肠杆菌蛋白,通常对着蛋白质的 N- 末端产生 (Hennessy, F. 等,同上)。在真核生物蛋白中该结构域略短。如 Hennessy 等所述, DnaJ- 样蛋白可分为:在包括 J- 结构域、富甘氨酸-苯丙氨酸结构域和 (CXXCXGXG)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:1) 基序在内的所有结构域上与 DnaJ 相似的 I 型;含 J- 结构域和富甘氨酸-苯丙氨酸区域的 II 型;和只含 J- 结构域的 III 型。这些组别重新命名为 A、B 和 C。

[0009] J- 结构域需要包含三联组氨酸-脯氨酸-天冬氨酸 (HPD) 并且还含有许多其它高度保守的区域。Hennessy 等,(同上)详细比较了许多 DnaJ- 样蛋白的 J- 结构域,表明 I 型和 II 型蛋白中这些区域的相同性高于 III 型。

[0010] Miernyk, J. A., *Cell Stress & Chaperones* (2001) 6 :209-218 分析了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的基因组和 EST 分布,显示该基因组编码 89 种含 J- 结构域的蛋白质,它们对应于不同的 EST 水平。这些蛋白中只有一种高度表达;即 III 型 DnaJ- 样蛋白。未分析实际蛋白质水平。

[0011] 现已有报道说 DnaJ 表达与植物耐受盐和脱水有关。Zhu 等, *Cell* (1993) 5 :341-349 显示盐度应激下植物细胞培养物中诱导高等植物钱币状滨藜 (*Atriplex nummularia*) 的 DnaJ 同系物 (ANJ1) 表达。最近,Nguyen 等, *Mol. Gen. Genomics* (2004) 272 :35-46 开发了用于绘制水稻中耐受脱水的数量性状基因座 (QTL) 区域的标记物,其显示与玉蜀黍 (*Zea mays*) DnaJ- 相关蛋白 (ZMDJ1) 相似并由热应激诱导 (Baszczynski 等, *Maydica* (1997) 42 :189-201)。虽然这些研究报道了在盐和脱水应激下对 DnaJ 同系物的诱导,但未表征 ANJ1 和 ZMDJ1 对盐或脱水耐受性的作用。

[0012] 一组种子成熟蛋白包括小热激蛋白 (sHsps),但不包括 DnaJ 或 Hsp40 (Wise, *BMC Bioinformatics* (2003) 29 :52-70)。只有 GmPM37 (GmDNJ1) 报道是 DnaJ- 样种子成熟蛋白。推测的蛋白质序列显示 GmDNJ1 含有 DnaJ 的保守基序,预计的分子量类似于普通 DnaJ 蛋白 (Hdj1 :38kDa ;Ydj1 :45kDa ; Hsp40 :41kDa)。

[0013] 迄今为止,没有记载 DnaJ 蛋白在植物中赋予非生物应激 (除热激外) 耐受性的功能作用的任何报道。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供通过利用蛋白质的表达系统赋予高等植物非生物应激,例如盐度、渗透性和脱水应激耐受性的方法,所述蛋白质含有 J- 结构域共有序列,优选还含有 DnaJ 蛋白的特征性甘氨酸 / 苯丙氨酸结构域和 (CXXCXGXG)<sub>4</sub> (SEQ IDNO :1) 序列。

[0016] 因此,在一方面,本发明涉及通过修饰植物或植物细胞以产生含有保守性 J- 结构域的异源蛋白而保护植物或植物细胞免遭非生物应激,例如盐度、渗透性和脱水应激的方法,其中该方法包括用编码该蛋白质的核苷酸序列或与其基本上相同的核苷酸序列,或下述本发明重组核酸构建物转化植物或植物细胞。

[0017] 在另一方面,本发明提供保护植物或植物细胞免遭非生物应激,例如盐度、渗透性和脱水应激的方法,该方法通过修饰植物或植物细胞使之包含含有编码蛋白质的内源性核苷酸序列的表达系统或构建物,所述蛋白质包含 DnaJ- 型 J- 结构域,而所述核苷酸序列连接于就该序列而言异源的并可在所述植物中操作的启动子。

[0018] 在还有另一方面,本发明涉及实施上述方法的核酸构建物。这些构建物可包含含有核苷酸序列的核酸转化载体,所述核苷酸序列编码包含 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质并操作性连接于可在植物细胞中操作的启动子。这种构建物还包含含有用于以同源重组或其它方式将高度表达水平启动子插入植物或植物细胞基因组的序列的转化载体。

[0019] 在还有另一方面,本发明涉及编码含有 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质的核苷酸序列或含有所述序列作为可选择标记物的构建物的应用。

[0020] 在还有另一方面,本发明涉及通过增强作为选择标记的含 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质表达来鉴定成功转化体的方法。

[0021] 在还有另一方面,本发明涉及转基因植物和植物细胞,其包含本发明的含 DnaJ- 型 J- 结构域的核苷酸序列或构建物。

[0022] 在还有另一方面,本发明涉及制备或产生耐受非生物应激的植物或植物细胞的方法,包括修饰植物或植物细胞以产生含有 DnaJ- 型 J 结构域的蛋白质。因此,按照本发明方法可获得耐受非生物应激的植物或植物细胞。

[0023] 当本发明方法与节水技术联用来培养经修饰具有耐受力的植物时,其赋予盐度、渗透性和脱水应激耐受性的能力特别有帮助。因此,可能联用本发明方法与减少灌溉或其它方法来降低作物培养中的用水量。

[0024] 在还有另一方面,本发明涉及编码含 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质的核酸序列或该蛋白在制备含有该蛋白的构建物或者植物或植物细胞中的应用。

[0025] 在还有另一方面,本发明涉及编码含 DnaJ- 型 J- 结构域的蛋白质的核酸序列或该蛋白在制备试剂或试剂盒中的应用,所述试剂或试剂盒可用于制备含有该蛋白的构建物或者植物或植物细胞。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1a-1d 显示 Northern 印迹分析,该分析设计用于检测盐度应激下在盐耐受 (Wenfeng7) 和盐敏感 (Union) 大豆栽培品种中编码 GmDNJ1 的 mRNA,其中图 1a 显示 Union 叶片的 Northern 印迹;图 1b 显示 Wenfeng7 叶片的 Northern 印迹;图 1c 显示 Union 根的 Northern 印迹;图 1d 显示 Wenfeng7 根的 Northern 印迹:CK:未处理的对照;T0.3:0.3% NaCl;T0.6:0.6% NaCl;T0.9:0.9% NaCl;T1.2:1.2% NaCl。

[0028] 图 2a 显示开花后不同时间点的 GmDNJ1 表达水平的 Northern 印迹分析;图 2b 显示在这些时间点豆荚的外观:显示了 Northern 印迹 (a) 和种子成熟期间豆荚的典型外观 (b) 的结果。

[0029] 图 3 显示与对照相比 4 种拟南芥转基因品系中 GmDNJ1 表达的 Northern 印迹:Co1-0:野生型;V7:含空载体的转化体;A-3-4、M-3-1、D-3-2 和 P-3-6:GmDNJ1 转基因品系。

[0030] 图 4a 和 4b 显示脱水应激 (图 4a) 和盐度应激 (图 4b) 对野生型和转基因拟南芥品系的作用。图 4a 和 4b 显示渗透应激 (图 4a) 和盐度应激 (图 4b) 对表达拟南芥 ASN1 cDNA (作为阴性转基因对照) 或 GmDNJ1 的野生型和转基因拟南芥品系的表型的作用。

[0031] 图 5 显示盐度和渗透应激对表达拟南芥 ASN1cDNA (作为阴性转基因对照) 或 GmDNJ1 的野生型和转基因拟南芥品系的鲜重 (fresh weight) 的作用:Co1-0:野生型;ASN1:表达拟南芥 ASN1cDNA 的转基因品系 (作为阴性转基因对照);A-3-4、M-3-1:表达 GmDNJ1 的转基因品系。N = 20。

[0032] 图 6 显示水稻转基因品系中 GmDNJ1 的 Northern 印迹:WT:野生型;其它数字:GmDNJ1 转基因品系。

[0033] 图 7a 和 7b 是比较 GmDNJ1 转基因品系 (分离群体) 和野生型水稻对盐度应激的反映的照片。

[0034] 图 8a 和 8b 显示脱水应激 (图 8a) 和盐度应激 (图 8b) 对表达栽培大豆 (G. max) AS2 cDNA (作为阴性转基因对照) 或 GmDNJ1 的未转化野生型和转基因水稻品系的表型的作用:除去水然后补充 (a) 和盐度应激 (200mM NaCl) (b)。WT:野生型;AS2:AS2 转基因品系;其它数字:GmDNJ1 转基因品系。

[0035] 图 9a 和 9b 显示脱水应激和盐度应激对表达栽培大豆 AS2 cDNA (作为阴性转基因对照) 或 GmDNJ1 的野生型和转基因水稻品系的存活率的作用:除去水然后补充 (a) 和盐度

应激 (200mM NaCl) (b)。WT :野生型 ;AS2 :AS2 转基因品系 ;其它数字 :GmDNJ1 转基因品系。N = 12。

[0036] 图 10a 和 10b 显示脱水应激和盐度应激对表达栽培大豆 AS2 cDNA (作为阴性转基因对照) 或 GmDNJ1 的野生型和转基因水稻品系的鲜重的作用 :除去水然后补充 (a) 和盐度应激 (200mM NaCl) (b)。WT :野生型 ;AS2 :AS2 转基因品系 ;其它数字 :GmDNJ1 转基因品系。N = 12。

[0037] 图 11a 和 11b 比较了 GmDNJ1 蛋白与已知的 DnaJ 蛋白的氨基酸序列 (图 11a), 和大肠杆菌 (E. coli) 细胞中产生的 GST-GmDNJ1 融合蛋白形式的纯化 GmDNJ1 的辅助陪伴分子活性 (图 11b) :显示了至少三次测定的平均值和标准差。将有大肠杆菌同源系统存在下的萤光素酶活性 (第 3 道) 设置为 100%。

[0038] 发明详述

[0039] 定义

[0040] 举出以下定义是为了有助于解释本发明。

[0041] 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。

[0042] 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<sub>2</sub>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、NaHCO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)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。

[0043] 术语“异源蛋白质”指具有不同来源,例如不同物种、不同组织或不同基因的那些蛋白质。例如,认为拟南芥的 DnaJ 蛋白对于大豆是异源的。“异源核酸序列”指天然彼此不操作性相连或毗连的那些序列。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。

[0044] 本文所用的术语“内源性”表示在获得其的生物中使用的蛋白质和核酸序列。

[0045] 本文所用的术语“偶联”表示所涉及的诸部分,例如启动子和编码序列操作性相连。

[0046] 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)。

[0047] 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。

[0048] 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正常功能和 / 或调节紧邻其下游的编码序列表达,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。

[0049] 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。可选择标记基因赋予可根据对选择因子（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”的性状。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， $\beta$ -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。

[0050] 本文所用的术语“构建物”是描述可通过重组 DNA 技术修饰的核酸序列。构建物可以是依据插入其中的元件而用于转化或表达的载体。例如，具有 T-DNA 边界的构建物可以是用于转化植物的二元载体。构建物还可以是下述表达系统。

[0051] 本文所用的术语“转化载体”指可将待转化的核酸序列插入或克隆入其中的核酸分子，优选衍生自，例如质粒、噬菌体或植物病毒的 DNA 分子。载体优选含有一个或多个独特的限制性位点，在特定的宿主细胞，包括靶细胞或组织或祖细胞或其组织中能自主复制，或者可与特定宿主的基因组整合，从而可复制克隆的序列。因此，载体可以是自主复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制不依赖于染色体复制，例如线形或封闭的环状质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可含有确保自身复制的任何元件。或者，载体可以在引入细胞时整合入接受细胞的基因组并与其所整合入的染色体一起复制。载体系统可包含一种载体或质粒、两种或更多种载体或质粒，它们一起含有待引入宿主细胞基因组或转座子的总 DNA。载体的选择通常取决于载体与载体所引入的细胞的相容性。载体还可包括选择标记，例如可用于选择合适转化体的抗生素抗性基因。本领域技术人员熟知这种抗性基因的例子。在本发明中，术语“构建物”和“载体”可互换使用。

[0052] 本文所用的术语“表达系统”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和水平。可将一种或多种表达系统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。

[0053] 本发明的实施方式

[0054] 在本发明中，发现包含 DnaJ 保守性 J-结构域基序的蛋白质能成功地赋予植物细胞和植物对盐度、低渗透势和脱水等应激因素的耐受性。植物和植物细胞借助转基因修饰以包含产生这种蛋白质的表达系统从而显示这种耐受性。下文以水稻和拟南芥植物为例作了说明，但绝非限制于这些实例。任何高等植物或高等植物的细胞均是本发明方法和材料的合适对象。

[0055] 本发明的方法适用于任何植物，优选属于被子植物和裸子植物纲的高等植物。双子叶植物亚纲和单子叶植物亚纲的植物特别合适。双子叶植物包括以下目：木兰目 (Magnoliales)、八角目 (Illiciales)、樟目 (Laurales)、胡椒目 (Piperiales)、马兜铃目 (Aristolochiales)、睡莲目 (Nymphaeales)、毛茛目 (Ranunculales)、罂粟目 (Papaverales)、瓶子草科 (Sarraceniaceae)、昆蓝树目 (Trochodendrales)、金缕梅目 (Hamamelidales)、杜仲目 (Eucomiales)、塞子木目 (Leitneriales)、杨梅目 (Myricales)、山毛榉目 (Fagales)、木麻黄目 (Casuarinales)、石竹目 (Caryophyllales)、肉穗果目 (Batales)、蓼目 (Polygonales)、蓝雪目 (Plumbaginales)、五桠果目 (Dilleniales)、山茶目 (Theales)、锦葵目 (Malvales)、荨麻目 (Urticales)、玉蕊目 (Lecythidales)、紫堇

目 (Violales)、杨柳目 (Salicales)、白花菜目 (Capparales)、杜鹃花目 (Ericales)、岩梅目 (Diapensales)、柿树目 (Ebenales)、报春花目 (Primulales)、蔷薇目 (Rosales)、豆目 (Fabales)、川草目 (Podostemales)、小二仙草目 (Haloragales)、桃金娘目 (Myrtales)、山茱萸目 (Cornales)、山龙眼目 (Proteales)、檀香目 (Santales)、大花草目 (Rafflesiales)、卫矛目 (Celastrales)、大戟目 (Euphorbiales)、鼠李目 (Rhamnales)、无患子目 (Sapindales)、胡桃目 (Juglandales)、牻牛儿苗目 (Geraniales)、远志目 (Polygalales)、伞形目 (Umbellales)、龙胆目 (Gentianales)、花葱目 (Polemoniales)、唇形目 (Lamiales)、车前草目 (Plantaginales)、玄参目 (Scrophulariales)、桔梗目 (Campanulales)、茜草目 (Rubiales)、川绿断目 (Dipsacales) 和菊目 (Asterales)。单子叶植物包括以下目: 泽泻目 (Alismatales)、天南星目 (Arales)、棕榈目 (Arecales)、凤梨目 (Bromeliales)、鸭跖草目 (Commelinales)、巴拿马草目 (Cyclanthales)、莎草目 (Cyperales)、谷精草目 (Eriocaulales)、水鳖目 (Hydrocharitales)、灯芯草目 (Juncales)、茨藻目 (Najadales)、帚灯草目 (Restionales)、禾本目 (Poales)、霉草目 (Triuridales)、香蒲目 (Typhales)、姜目 (Zingiberales)、露兜树目 (Pandanales)、百合目 (Lilliales) 和蓝目 (Orchidales)。属于裸子植物纲的植物是苏铁目 (Cycadales)、松目 (Pinales)、银杏目 (Ginkgoales) 和买麻藤目 (Gnetales)。

[0056] 本发明方法优选用于对于农业、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植物。例子是烟草、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、桉树和针叶树。

[0057] 为提供必需的蛋白质, 修饰植物细胞以含有编码相关蛋白质的核苷酸序列, 其任选操作性连接于可在植物中操作的控制序列, 或整合入基因组, 从而能在内源性控制序列的控制下表达。

[0058] 在本发明的一个实施方式中, 用本发明的核酸构建物或载体感染或转化植物细胞或植物。核酸构建物优选含有可在植物中操作的控制序列, 其操作性连接于 J- 结构域蛋白质编码序列, 可选择控制序列以实现组成型、组织特异性或非组织特异性或诱导性表达。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并且实际上可商品化购得。

[0059] 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 可选用



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。

[0060] 类似地,如今本领域熟知实施植物细胞的遗传修饰和重建完整植物的技术。该方面现有技术状态的总结,包括能构成本发明对象的植物和植物细胞类型的相当广泛的清单可见 2004 年 1 月 14 日公布的美国专利公布 2004/0009476,该份文献关于植物的遗传操作的合适技术与可施加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。

[0061] 此外,因为本发明的修饰细胞和植物耐受脱水所致应激和 / 或高盐度应激,所以包含编码含 J- 结构域蛋白质的核苷酸序列的表达系统可用作成功转化细胞的可选择标记,该序列操作性连接于在植物中可操作的控制序列。成功转化体耐受性更高,可经历施加的应激(标记赋予耐受性)而存活。因此,可借助转化体经历这种应激条件而存活的能力鉴定成功的转化体。

[0062] 从以上背景章节的讨论中可知,其表达能实现对非生物应激,例如盐度、渗透性和脱水应激的耐受性的蛋白质必须至少含有 DnaJ- 型 J- 结构域。该结构域约 60 个氨基酸,其与 I(或 A) 型 DnaJ- 样蛋白的保守性 J- 结构域同源。为明确起见,如图 11a 所示,所需的同源性(相同性)程度是与大豆 GmDNJ1 的 13-77 位氨基酸序列有至少 80%、85%、90% 或 95% 相同性,且必须含有序列组氨酸 - 脯氨酸 - 天冬氨酸 (HPD)。(从图 11a 可以知道,如果 GmDNJ1 独立编号,该区域是 12-77 位)。

[0063] 在一个实施方式中,除 DnaJ- 型 J- 保守性结构域外,该蛋白还含有类似于 DnaJ-I(A) 型蛋白的特征性序列的富甘氨酸 / 苯丙氨酸序列和 / 或也是 I(A) 型 DnaJ 蛋白特征性的 (CXXCXGXG)<sub>4</sub> (SEQ ID NO :1) 结构域。

[0064] 为在植物或植物细胞中产生所需的 DnaJ- 样蛋白,可利用含有编码 DnaJ- 样蛋白的异源核酸序列的重组表达载体修饰这些细胞或植物,或者可通过增强含 DnaJ- 型 J- 结构域蛋白质的内源性编码基因的表达来修饰这些细胞或植物。可通过将代表 DnaJ- 型 J- 结构域的内源性编码序列的核苷酸序列置于编码序列 操作性连接于控制序列的载体上以实现这种增强,所述控制序列是所述编码序列的异源序列,所述编码序列能在它们的控制下在植物或植物细胞中实现高水平表达。或者,可修饰植物或植物细胞使之含有转化载体,所述转化载体包含这种强效控制序列以及实现控制序列与植物中所含的所需 DnaJ 样蛋白的内源性编码序列操作性连接的额外核苷酸序列。这些序列包括,例如与编码序列附近的内源性 DNA 同源(基本上相同)的序列。还可利用 Cre-lox 系统。普通技术人员知道可利用各种方法获得至少包含 DnaJ- 型 J- 结构域的所需蛋白质的表达水平。

[0065] 编码序列可包括,例如与其同源(基本上相同的)的序列。本文用于描述两条核苷酸序列之间相似性程度的术语“基本上相同”指两条或更多条序列比较和比对最大一致性时,有至少约 60%、优选至少约 70%、更优选至少约 80%、更优选约 90% - 约 99%、还要更优选约 95% - 约 99%,最优选约 99% 核苷酸相同性。本发明的核苷酸序列优选包含与编码大豆 GmDNJ1 的序列基本上相同的核苷酸序列或序列。

[0066] 两条核苷酸序列基本相同的另一指标是这两个分子在严格条件下彼此特异性或实质性地杂交。

[0067] 就核酸杂交实验,例如 Southern 和 Northern 印迹分析而言,“严格杂交条件”和“严格杂交洗涤条件”同时依赖于序列和环境。较长的序列在较高温度发生特异性杂

交。核酸杂交的广泛指南见 Tijssen(1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* (生物化学和分子生物学的实验室技术-用核酸探针杂交), 第 I 部分第 2 章, 埃尔西维公司 (Elsevier), 纽约, 纽约州。通常选择的高度严格的杂交和洗涤条件比特定序列在指定离子强度和 pH 时的热解链温度 ( $T_m$ ) 低约  $5^{\circ}\text{C}$ 。

[0068] 当本发明方法与节水技术联用来培养经修饰具有耐受力的植物时, 其赋予盐度、渗透性和脱水应激耐受性的能力特别有帮助。因此, 可能联用本发明方法与减少灌溉或其它方法来降低作物培养中的用水量。

[0069] 以下实施例和结果证实并说明了本发明方法和构建物是成功的。在以下实施例中, 利用 SPSS(12.0 版) 统计学软件包分析数据。标出了显示显著差异 ( $p < 0.01$  或  $p < 0.05$ ) 的样品。

#### [0070] 实施例 1

##### [0071] 对盐度和脱水应激起反应而表达 GmDNJ1

[0072] 在本实施例中, 研究了对盐度应激起反应的两种大豆栽培品种叶片和根中 GmDNJ1 的表达。用改进的 Hoagland 溶液 ( $4.5\text{mM KNO}_3$ ,  $3.6\text{mM Ca(NO}_3)_2$ ,  $1.2\text{mM NH}_4\text{NO}_3$ ,  $3.0\text{mM MgSO}_4$ ,  $1.2\text{mM (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0.25\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $4.5\ \mu\text{M MnSO}_4$ ,  $4.5\ \mu\text{M ZnSO}_4$ ,  $1.5\ \mu\text{M CuSO}_4$ ,  $0.4\ \mu\text{M (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ,  $0.09\text{mM Fe-EDTA}$  和  $1.5\ \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ ) 灌溉两种大豆种质, Wenfeng7 (盐耐受性) 和 Union (盐敏感性), 用  $125\text{mM NaCl}$  处理。处理后 0-144 小时收集叶片和根样品。

[0073] 如前所述 (Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册), 第 3 版, 冷泉港实验室出版社, 纽约, 纽约州, (2001)) 对根和叶片的提取物进行 Northern 印迹分析。用德国曼海姆罗氏公司的洋地黄毒苷 (DIG) (Roche, Mannheim, Germany) 标记反义单链 DNA 探针 (Finckh, U. 等, *Biotechniques* (1991) 10 :35-38)。

[0074] 结果见图 1a-1d。在图 1 中, CK 所标注的泳道代表未处理的对照, T0.3 代表  $0.3\%$  NaCl, T0.6 代表用  $0.6\%$  NaCl 处理, T0.9 代表用  $0.9\%$  NaCl 处理, T1.2 代表用  $1.2\%$  NaCl 处理。盐度应激导致两种栽培品种的叶片中 GmDNJ1 的稳态 mRNA 水平升高, 在 Union 中显示更显著, 从而证实盐度应激诱导 GmDNJ1 基因表达。对于 Wenfeng7, 叶片中也诱导了 GmDNJ1 表达, 但程度较低。非应激条件下, Wenfeng7 叶片中的 GmDNJ1 表达通常高于 Union 中。根的结果见图 1c 和 1d, 与叶片的结果类似。

[0075] 还利用提取物并通过 Northern 印迹分析再次研究了种子成熟和吸涨的相关性。就种子成熟而言, 在环境受控温室中, 用补加了改进的 Hoagland 溶液的土壤培养 1,300 个 Union 个体。在开花后的第一天用不同颜色的丝线给约 1,500 朵花作标记。开花后第 17、22、27、32、37、42、47 和 52 天收集大豆豆荚。

[0076] 结果示于图 2。Northern 印迹分析显示开花后 17-37 天诱导 GmDNJ1 表达, 然后略微降低, 如图 2a 所示。图 2b 显示开花后豆荚的典型外观。

#### [0077] 实施例 2

##### [0078] 转基因拟南芥

[0079] GmDNJ1 编码序列 (SEQ ID NO :2) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :3) 如下所示 :

[0080] GmDNJ1 序列 (SEQ ID NO :2)

[0081] 1 ATGTTTGGGA GGCACCGAA GAAGAGCGAT AATACGAGGT ACTACGAAAT

[0082] 51 CCTCGGCGTC TCCAAGAACG CTTCGCAGGA TGATCTGAAG AAGGCTTACA  
 [0083] 101 AGAAAGCCGC CATTAAAGAAT CACCCCGACA AGGGCGGTGA TCCCGAGAAG  
 [0084] 151 TTTAAAGAGC TGGCGCAAGC TTATGAGGTT CTGAGTGACC CTGAGAAGCG  
 [0085] 201 TGAGATATAT GATCAGTATG GTGAAAGATGC GCTTAAGGAA GGAATGGGTG  
 [0086] 251 GTGGCGGTGG CCATGATCCA TTTGATATCT TTTCATCTTT CTTTGGCGGT  
 [0087] 301 GGGAGTCCCT TTGGATCAGG TGGAAAGTAGT CGAGGTAGGA GGCAGAGGCG  
 [0088] 351 CGGAGAAGAC GTGGTTCACC CTCTCAAGGT CTCTTTGGAG GACCTTTATC  
 [0089] 401 TTGGAActTC CAAGAAGCTC TCCCTCTCCA GAAATGTTAT ATGCTCCAAG  
 [0090] 451 TGCAGTGGCA AGGGTTCTAA GTCTGGTGCT TCGATGAAGT GTGCTGGTTG  
 [0091] 501 TCAAGGAACT GGTATGAAGG TTTCTATAAG ACATCTTGGC CCATCCATGA  
 [0092] 551 TTCAGCAAAT GCAGCATGCC TGCAATGAAT GTAAGGGTAC TGGAGAAACT  
 [0093] 601 ATCAATGACA GAGATCGCTG CCCACAGTGC AAGGGAGAGA AGGTTGTGCA  
 [0094] 651 GGAGAAGAAA GTCCTTGAAG TTATTGTAGA AAAGGGGATG CAGAAATGGGC  
 [0095] 701 AGAAGATAAC ATTCCCTGGC GAAGCTGATG AAGCGCCGGA CACAATTACT  
 [0096] 751 GGGGATATCG TCTTTGTCTT TCAGCAGAAG GAACATCCCA AATTCAAAA  
 [0097] 801 AAAGGCTGAA GATCTTTTTG TAGAGCACAC TTTGTCCCTT ACCGAGGCCT  
 [0098] 851 TGTGTGGCTT CCAATTTGTG CTGACTCACT TGGATAGCCG TCAGCTTCTT  
 [0099] 901 ATTAAATCAA ATCCCGGGGA AGTTGTGAAG CCTGATTCAT ACAAGGCTAT  
 [0100] 951 AAATGATGAG GGAATGCCCA TGTATCAGAG GCCATTTATG AAGGGGAAA  
 [0101] 1001 TTTACATTCA CTTCACTGTG GAGTTTCCAG ATTCTCTAAA CCCTGATCAA  
 [0102] 1051 GTTAAGGCCT TGGAGGCTGT TCTGCCACCA AAGCCTTCTT CACAATTGAC  
 [0103] 1101 AGACATGGAG CTGGATGAAT GTGAGGAAAC TACACTCCAT GATGTCAACA  
 [0104] 1151 TGGAGGAGGA GACTAGGAGG AAGCAGCAAC AAGCTCAGGA GGCATATGAT  
 [0105] 1201 GAGGATGATG ACATGCCTGG TGGTGCACAG AGGGTACAGT GCGCCCAGCA  
 [0106] 1251 GTAA  
 [0107] MFGRAPKKS DNTRYEILGVSKNASQDDLKAYKKA AIKNHPDKGGDPEKFKELAQA YEVLSDPEKREI  
 [0108] YDQYGEDALKEGMGGGGHDPFDIFSSFFGGGSPFGSGGSSRRRQRRGEDVVHPLKVSLEDLYLGTSK  
 K  
 [0109] LSLSRNVICSKCSGKSGKSGASMKCAGCQGTGMKVSIRHLGPSMIQQMQHACNECKGTGETINDRDRCP  
 Q  
 [0110] CKGEKVVQEKKVLEVIVEKGMQNGQKITFPGEADEAPDTITGDIVFVLQQKEHPKFKRKAEDLFVEHTL  
 SL  
 [0111] TEALCGFQFVLTHLDSRQLLIKSNPGEVVKPDSYKAINDEGMPMYQRPFMKGLYIHFTVEFPDSLNDP  
 QV  
 [0112] KALEAVLPPKPSSQLTDMELDECEETTLHDVNMEETRRKQQQAQEAYDEDDDDMPGGAQRVQCAQQ-  
 [0113] 采用真空渗入方案 (Bechtold, N. 等, Arabidopsis Protocols(拟南芥方案), 休  
 玛娜出版公司 (Humana Press Inc.), 托托瓦 (Totowa), 新泽西州, (1993) 259-266), 将含有  
 组成型花椰菜花叶病毒 35S 启动子控制下的 GmDNJ1 的重组核酸克隆入二元载体 (Brears,  
 T. 等, Plant Physiol. (1993) 103 :1285-1290) 中, 引入土壤杆菌并转化入拟南芥。用含抗

生素的培养基选择转化体后,利用基因特异性引物通过 PCR 验证转基因成功整合入基因组的个体;进行 Northern 印迹分析以证实转基因植物品系中的转基因表达。获得了含单插入体的 T<sub>3</sub> 纯合品系种子,将其用于后续生理研究。构建了 4 种拟南芥的 GmDNJ1 纯合转基因品系。选择 GmDNJ1 表达水平较高的 A-3-4 和 M-3-1 用于功能分析。图 3 显示了 4 种转化体与表达水平检测不到的未转化对照 (Co1-0) 和含空载体 (V7) 的转化体相比的相对表达水平。

#### [0114] 实施例 3

##### [0115] 转基因拟南芥的应激耐受

[0116] 本实施例研究了渗透性和盐度应激对拟南芥的植物性生长的影响。

[0117] 将野生型 Co1-0、一种 ASN1 转基因品系(利用与 GmDNJ1 构建物相同的载体表达 ASN1 克隆的转基因拟南芥 (Lam 等, Plant Physiol (2003) 132 :926-935)) 和两种 GmDNJ1 转基因品系 (A-3-4 和 M-3-1) 在 MS 琼脂平板上培养 14 天,然后转移至砂基培养。在维持于约 22°C 的生长室中,以 16 小时白天(强度约 130 μ E)-8 小时黑夜为周期,将植物砂基培养 12 天并用 1/8MS 培养基灌溉,然后加入 15% PEG 或 500mM NaCl (1/8MS 培养基配制) 培养 6 天。

[0118] 用 15% PEG (渗透应激) 处理显著减缓了 Co1-0 和 ASN1 转基因品系生长,而 GmDNJ1 转基因品系生长得更好(图 4a 和 5)。

[0119] 在与上述相同的实验中,用 15% PEG (渗透应激) 处理显著降低了 Co1-0 和 ASN1 转基因品系的鲜重,而 GmDNJ1 转基因品系生长得更好(图 4b 和 5)。

#### [0120] 实施例 4

##### [0121] 转基因稻 (Oryza sativa)

[0122] 将 GmDNJ1 克隆到双 T-DNA 质粒 pSB130 (从香港中文大学的 QiaoquanLiu 博士和 Samuel Sun 教授处获得) 中。该质粒具有两个 T-DNA,一个含有潮霉素抗性基因(可选择标记),另一个具有用于靶基因克隆的多克隆位点。通过土壤杆菌介导的转化方法将该构建物引入亲代水稻品系日本裸稻 (Nipponbare) 中。构建了水稻的 GmDNJ1 纯合转基因品系。图 6 显示了 5 种独立的转基因水稻品系中 GmDNJ1 的表达水平,而在亲代日本裸稻中,检测不到表达。

#### [0123] 实施例 5

##### [0124] 转基因稻的应激耐受

[0125] 本实施例研究了渗透和盐度应激对水稻(稻)的植物性生长的影响。

[0126] 避光萌发 10 天后,在维持于约 28°C 的生长室中,以 16 小时白天(强度约 120 μ E)-8 小时黑夜为周期,将各含野生型亲代、AS2 转基因品系(利用与 GmDNJ1 构建物相同的载体表达 AS2 克隆的转基因稻)和 5 种独立 GmDNJ1 转基因水稻品系的一式三份的小组在 1/2MS 液体培养基中再培养 9 天。用补加了 200mM NaCl 的 1/2MS 液体培养基处理第一组 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,维持 16 小时将脱水应激引入另一组,然后补充 1/2MS 液体培养基,维持 3 天。在整个测试期间用 1/2MS 液体培养基灌溉对照组。

[0127] 除去液体生长培养基(脱水应激)首先导致野生型和转基因水稻的叶片均卷起。补充 1/2MS 液体培养基可拯救 GmDNJ1 转基因品系,但无法拯救未转化的亲代和 AS2 转基因

品系（图 8a）。在这种处理下 GmDNJ1 转基因品系的恢复率明显高于未转化的亲代和 AS2 转基因品系（图 9a）。在这种处理下，GmDNJ1 转基因品系的所得鲜重也明显高于未转化的亲代和 AS2 转基因品系（图 10a）。

[0128] 200mM NaCl 处理（盐度应激）导致野生型和转基因水稻的叶片均下垂并出现盐害症状。用 1/2MS 液体培养基恢复可拯救 GmDNJ1 转基因品系，但不能拯救未转化的亲代和 AS2 转基因品系（图 8b）。在这种处理下 GmDNJ1 转基因品系的恢复率明显高于未转化的亲代和 AS2 转基因品系（图 9b）。在这种处理下，GmDNJ1 转基因品系的所得鲜重也明显高于未转化的亲代和 AS2 转基因品系（图 10b）。

[0129] 还在高盐含量的试验田中培养 GmDNJ1 转基因品系和未转化的植物。转基因品系中的一些个别植物（分离群体）存活，而未转化的植物均枯萎和死亡（图 7）。

[0130] 实施例 6

[0131] GmDNJ1 蛋白的辅助陪伴分子活性

[0132] 通过监测热变性萤光素酶的活性进行辅助陪伴分子活性试验 (Zmijewski 等, J. Mol. Biol. (2004) 336 :539-549)。

[0133] 将 GmDNJ1 cDNA 序列克隆入表达载体 pGEX-4T-1 (GE 保健公司 (GEHealthcare)) 以形成嵌合构建物，从而在大肠杆菌细胞（所用的细菌菌株：BL23 (DE3)）中产生谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)-GmDNJ1 融合蛋白。

[0134] 25°C，在有 DnaK、DnaJ、GrpE、GST-GmDNJ1 融合蛋白、GST 和牛血清白蛋白 (BSA) 的不同组合存在下，温育萤火虫萤光素酶（普洛麦格公司 (Promega)）10 分钟。42°C 使萤光素酶变性 10 分钟，通过加入 5mM ATP 再于 25°C 温育 30 分钟使之复性。利用普洛麦格公司的萤光素酶测定系统检测萤光素酶活性。将 DnaK、DnaJ 和 GrpE（大肠杆菌同源性陪伴分子系统）存在下的萤光素酶活性设定为 100% 用于参比。

[0135] GST-GmDNJ1 融合蛋白具有类似大肠杆菌 DnaJ 蛋白活性的明显辅助陪伴分子活性。另一方面，GST 或 BSA 未显示相同类型的活性（图 11b）。

[0001]

## 序列表

<110> 林汉明(LAM, Hon-Ming)  
 辛世文(SUN, Samuel Sai Ming)  
 邵桂花(SHAO, Gui Hua)

<120> 含 J-结构域蛋白质赋予的非生物应激耐受

<130> 549072000400

<140> US 11/852, 992  
 <141> 2007-09-10

<150> US 60/843, 943  
 <151> 2006-09-11

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 种子成熟 DnaJ 蛋白

<220>  
 <221> ZN\_FING  
 <222> (1)... (32)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 21, 23, 26, 27, 29, 31  
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 1  
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Gly Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Gly Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Gly  
                   20                    25                    30

<210> 2  
 <211> 1254  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 转基因拟南芥(Arabidopsis thaliana)

<220>  
 <223> GmDNJ1 编码序列

<400> 2  
 atgtttggga gggcaccgaa gaagagcgat aatacagggt actacgaaat cctcggcgtc 60  
 tccaagaacg cttcgcagga tgatctgaag aaggcttaca agaaagccgc cattaagaat 120

[0002]

```

caccocgaca agggcgggtga tcccgagaag tttaaagagc tggcgcaagc ttatgaggtt 180
ctgagtgacc ctgagaagcg tgagatataat gatcagtagt gtgaagatgc gcttaagгаа 240
ggaatgggtg gtggcgggtg ccatgatcca tttgatatct tttcatcttt ctttggcggg 300
gggagtcctt ttggatcagg tggaaagtagt cgaggtagga ggcagagcgg cggagaagac 360
gtggttcacc ctctcaaggt ctctttggag gacctttatc ttggaacttc caagaagctc 420
tcctctcca gaaatgttat atgctccaag tgcagtggca agggttctaa gtctggtgct 480
tcgatgaagt gtgctggttg tcaaggaact ggtatgaagg tttctataag acatcttggc 540
ccatccatga ttcagcaaat gcagcatgcc tgcaatgaat gtaagggtac tggagaaact 600
atcaatgaca gagatcgctg cccacagtgc aaggagaga aggttgigca ggagaagaaa 660
gtccttgaag ttattgtaga aaaggggatg cagaatgggc agaagataac attccctggc 720
gaagctgatg aagcgcggga cacaattact ggggatatcg tctttgtcct tcagcagaag 780
gaacatccca aattcaaaag aaaggctgaa gatcttttg tagagcacac tttgtccctt 840
accgagcctt tgtgtgctt ccaatttgg ctgactcact tggatagcgg tcagcttctt 900
attaatacaa atccccggga agttgtgaa cctgattcat acaaggctat aaatgatgag 960
ggaatgcca tgatcagag gccatttatg aagggaaac ttacattca cttcactgtg 1020
gagttccag attctctaaa ccctgatcaa gttaaggcct tggaggctgt tctgccacca 1080
aagccttctt cacaattgac agacatggag ctggatgaat gtgaggaaac tacactccat 1140
gatgtcaaca tggaggagga gactaggagg aagcagcaac aagctcagga ggcatatgat 1200
gaggatgatg acatgcctgg tggtcacag aggstacagt gcgccagca gtaa 1254

```

<210> 3

<211> 417

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

<220>

<223> GmDNJ1 推导的氨基酸序列

<400> 3

```

Met Phe Gly Arg Ala Pro Lys Lys Ser Asp Asn Thr Arg Tyr Tyr Glu
 1           5           10          15
Ile Leu Gly Val Ser Lys Asn Ala Ser Gln Asp Asp Leu Lys Lys Ala
           20           25           30
Tyr Lys Lys Ala Ala Ile Lys Asn His Pro Asp Lys Gly Gly Asp Pro
           35           40           45
Glu Lys Phe Lys Glu Leu Ala Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro
           50           55           60
Glu Lys Arg Glu Ile Tyr Asp Gln Tyr Gly Glu Asp Ala Leu Lys Glu
           65           70           75           80
Gly Met Gly Gly Gly Gly Gly His Asp Pro Phe Asp Ile Phe Ser Ser
           85           90           95
Phe Phe Gly Gly Gly Ser Pro Phe Gly Ser Gly Gly Ser Ser Arg Gly
           100          105          110
Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Asp Val Val His Pro Leu Lys Val Ser
           115          120          125
Leu Glu Asp Leu Tyr Leu Gly Thr Ser Lys Lys Leu Ser Leu Ser Arg
           130          135          140
Asn Val Ile Cys Ser Lys Cys Ser Gly Lys Gly Ser Lys Ser Gly Ala
           145          150          155          160
Ser Met Lys Cys Ala Gly Cys Gln Gly Thr Gly Met Lys Val Ser Ile
           165          170          175
Arg His Leu Gly Pro Ser Met Ile Gln Gln Met Gln His Ala Cys Asn
           180          185          190
Glu Cys Lys Gly Thr Gly Glu Thr Ile Asn Asp Arg Asp Arg Cys Pro
           195          200          205
Gln Cys Lys Gly Glu Lys Val Val Gln Glu Lys Lys Val Leu Glu Val

```

[0003]

```

210                215                220
Ile Val Glu Lys Gly Met Gln Asn Gly Gln Lys Ile Thr Phe Pro Gly
225                230                235                240
Glu Ala Asp Glu Ala Pro Asp Thr Ile Thr Gly Asp Ile Val Phe Val
                245                250                255
Leu Gln Gln Lys Glu His Pro Lys Phe Lys Arg Lys Ala Glu Asp Leu
                260                265                270
Phe Val Glu His Thr Leu Ser Leu Thr Glu Ala Leu Cys Gly Phe Gln
                275                280                285
Phe Val Leu Thr His Leu Asp Ser Arg Gln Leu Leu Ile Lys Ser Asn
                290                295                300
Pro Gly Glu Val Val Lys Pro Asp Ser Tyr Lys Ala Ile Asn Asp Glu
305                310                315                320
Gly Met Pro Met Tyr Gln Arg Pro Phe Met Lys Gly Lys Leu Tyr Ile
                325                330                335
His Phe Thr Val Glu Phe Pro Asp Ser Leu Asn Pro Asp Gln Val Lys
                340                345                350
Ala Leu Glu Ala Val Leu Pro Pro Lys Pro Ser Ser Gln Leu Thr Asp
                355                360                365
Met Glu Leu Asp Glu Cys Glu Glu Thr Thr Leu His Asp Val Asn Met
                370                375                380
Glu Glu Glu Thr Arg Arg Lys Gln Gln Gln Ala Gln Glu Ala Tyr Asp
385                390                395                400
Glu Asp Asp Asp Met Pro Gly Gly Ala Gln Arg Val Gln Cys Ala Gln
                405                410                415
Gln

```

<210> 4

<211> 409

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DnaJ 蛋白 ScP25491

<400> 4

```

Met Val Lys Glu Thr Lys Phe Tyr Asp Ile Leu Gly Val Pro Val Thr
 1                5                10                15
Ala Thr Asp Val Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Cys Ala Leu Lys
                20                25                30
Tyr His Pro Asp Lys Asn Pro Ser Glu Glu Ala Ala Glu Lys Phe Lys
                35                40                45
Glu Ala Ser Ala Ala Tyr Glu Ile Leu Ser Asp Pro Glu Lys Arg Asp
 50                55                60
Ile Tyr Asp Gln Phe Gly Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Gly Ala
 65                70                75                80
Gly Gly Phe Pro Gly Gly Phe Gly Phe Gly Asp Asp Ile Phe Ser
                85                90                95
Gln Phe Phe Gly Ala Gly Gly Ala Gln Arg Pro Arg Gly Pro Gln Arg
                100                105                110
Gly Lys Asp Ile Lys His Glu Ile Ser Ala Ser Leu Glu Glu Leu Tyr
                115                120                125
Lys Gly Arg Thr Ala Lys Leu Ala Leu Asn Lys Gln Ile Leu Cys Lys
                130                135                140
Glu Cys Glu Gly Arg Gly Gly Lys Lys Gly Ala Val Lys Lys Cys Thr

```

[0004]



```

145          150          155          160
Ser Cys Asn Gly Gln Gly Ile Lys Phe Val Thr Arg Gln Met Gly Pro
          165          170          175
Met Ile Gln Arg Phe Gln Thr Glu Cys Asp Val Cys His Gly Thr Gly
          180          185          190
Asp Ile Ile Asp Pro Lys Asp Arg Cys Lys Ser Cys Asn Gly Lys Lys
          195          200          205
Val Glu Asn Glu Arg Lys Ile Leu Glu Val His Val Glu Pro Gly Met
          210          215          220
Lys Asp Gly Gln Arg Ile Val Phe Lys Gly Glu Ala Asp Gln Ala Pro
225          230          235          240
Asp Val Ile Pro Gly Asp Val Val Phe Ile Val Ser Glu Arg Pro His
          245          250          255
Lys Ser Phe Lys Arg Asp Gly Asp Asp Leu Val Tyr Glu Ala Glu Ile
          260          265          270
Asp Leu Leu Thr Ala Ile Ala Gly Gly Glu Phe Ala Leu Glu His Val
          275          280          285
Ser Gly Asp Trp Leu Lys Val Gly Ile Val Pro Gly Glu Val Ile Ala
          290          295          300
Pro Gly Met Arg Lys Val Ile Glu Gly Lys Gly Met Pro Ile Pro Lys
305          310          315          320
Tyr Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Lys Phe Thr Ile Lys Phe Pro
          325          330          335
Glu Asn His Phe Thr Ser Glu Glu Asn Leu Lys Lys Leu Glu Glu Ile
          340          345          350
Leu Pro Pro Arg Ile Val Pro Ala Ile Pro Lys Lys Ala Thr Val Asp
          355          360          365
Glu Cys Val Leu Ala Asp Phe Asp Pro Ala Lys Tyr Asn Arg Thr Arg
          370          375          380
Ala Ser Arg Gly Gly Ala Asn Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Glu Gln Gly
385          390          395          400
Gly Glu Gly Val Gln Cys Ala Ser Gln
          405

```

<210> 5  
<211> 397  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> DnaJ 蛋白 HsP31689

<400> 5  
Met Val Lys Glu Thr Thr Tyr Tyr Asp Val Leu Gly Val Lys Pro Asn  
1 5 10 15  
Ala Thr Gln Glu Glu Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys  
 20 25 30  
Tyr His Pro Asp Lys Asn Pro Asn Glu Gly Glu Lys Phe Lys Gln Ile  
 35 40 45  
Ser Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ala Lys Lys Arg Glu Leu Tyr  
 50 55 60  
Asp Lys Gly Gly Glu Gln Ala Ile Lys Glu Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
65 70 75 80  
Phe Gly Ser Pro Met Asp Ile Phe Asp Met Phe Phe Gly Gly Gly Gly  
 85 90 95  
Arg Met Gln Arg Glu Arg Arg Gly Lys Asn Val Val His Gln Leu Ser  
 100 105 110  
Val Thr Leu Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Ala Thr Arg Lys Leu Ala Leu

[0005]

```

      115              120              125
Gln Lys Asn Val Ile Cys Asp Lys Cys Glu Gly Arg Gly Gly Lys Lys
  130              135              140
Gly Ala Val Glu Cys Cys Pro Asn Cys Arg Gly Thr Gly Met Gln Ile
  145              150              155              160
Arg Ile His Gln Ile Gly Pro Gly Met Val Gln Gln Ile Gln Ser Val
      165              170              175
Cys Met Glu Cys Gln Gly His Gly Glu Arg Ile Ser Pro Lys Asp Arg
      180              185              190
Cys Lys Ser Cys Asn Gly Arg Lys Ile Val Arg Glu Lys Lys Ile Leu
      195              200              205
Glu Val His Ile Asp Lys Gly Met Lys Asp Gly Gln Lys Ile Thr Phe
      210              215              220
His Gly Glu Gly Asp Gln Glu Pro Gly Leu Glu Pro Gly Asp Ile Ile
  225              230              235              240
Ile Val Leu Asp Gln Lys Asp His Ala Val Phe Thr Arg Arg Gly Glu
      245              250              255
Asp Leu Phe Met Cys Met Asp Ile Gln Leu Val Glu Ala Leu Cys Gly
      260              265              270
Phe Gln Lys Pro Ile Ser Thr Leu Asp Asn Arg Thr Ile Val Ile Thr
      275              280              285
Ser His Pro Gly Gln Ile Val Lys His Gly Asp Ile Lys Cys Val Leu
      290              295              300
Asn Glu Gly Met Pro Ile Tyr Arg Arg Pro Tyr Glu Lys Gly Arg Leu
  305              310              315              320
Ile Ile Glu Phe Lys Val Asn Phe Pro Glu Asn Gly Phe Leu Ser Pro
      325              330              335
Asp Lys Leu Ser Leu Leu Glu Lys Leu Leu Pro Glu Arg Lys Glu Val
      340              345              350
Glu Glu Thr Asp Glu Met Asp Gln Val Glu Leu Val Asp Phe Asp Pro
      355              360              365
Asn Gln Glu Arg Arg Arg His Tyr Asn Gly Glu Ala Tyr Glu Asp Asp
      370              375              380
Glu His His Pro Arg Gly Gly Val Gln Cys Gln Thr Ser
  385              390              395

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 415

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DnaJ 蛋白 HbAAD12055

&lt;400&gt; 6

```

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

```

[0006]

```

          100              105              110
Arg Arg Lys Glu Gly Glu Asp Val Ile His Pro Leu Lys Val Ser Leu
          115              120              125
Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Lys Leu Ser Leu Ser Arg Asn
          130              135              140
Val Ile Cys Ser Lys Cys Lys Gly Lys Gly Ser Gly Ser Lys Ser Gly
          145              150              155              160
Ala Ser Met Lys Cys Ser Gly Cys Gln Gly Ser Gly Met Lys Val Ser
          165              170              175
Ile Arg Gln Leu Gly Pro Ser Met Ile Gln Gln Met Gln His Pro Cys
          180              185              190
Asn Glu Cys Lys Gly Thr Gly Glu Thr Ile Asn Asp Lys Asp Arg Cys
          195              200              205
Pro Gln Cys Lys Gly Glu Lys Val Val Gln Glu Lys Lys Val Leu Glu
          210              215              220
Leu Ile Val Glu Lys Phe Met Gln Asn Arg Ile Thr Phe Pro Gly Glu
          225              230              235              240
Ala Asp Glu Ala Pro Asp Thr Ile Thr Gly Asp Ile Val Phe Val Leu
          245              250              255
Gln Gln Lys Glu His Pro Lys Phe Lys Arg Lys Gly Asp Asp Leu Ile
          260              265              270
Val Asp His Thr Leu Ser Leu Thr Glu Ala Leu Cys Ala Ser Gln Phe
          275              280              285
Ile Leu Tyr His Leu Asp Gly Asp Leu Leu Ile Lys Ser Gln Pro Gly
          290              295              300
Glu Val Val Lys Pro Asp Gln Phe Lys Ala Ile Asn Asp Glu Gly Met
          305              310              315              320
Pro Met Tyr Gln Arg Pro Phe Met Arg Gly Lys Leu Tyr Ile His Phe
          325              330              335
Ser Val Asp Phe Pro Asp Ser Leu Pro Pro Asp Gln Cys Lys Ala Leu
          340              345              350
Glu Ala Val Leu Pro Ser Arg Thr Ser Val Gln Leu Ser Asp Met Glu
          355              360              365
Leu Asp Glu Cys Glu Glu Thr Thr Leu His Asp Val Asn Phe Asp Glu
          370              375              380
Glu Met Arg Arg Lys Gln Gln Gln Ala Gln Glu Ala Tyr Asp Glu Asp
          385              390              395              400
Asp Asp Met His Gly Gly Gly Gln Arg Val Gln Cys Ala Gln Gln
          405              410              415

```

<210> 7

<211> 416

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DnaJ 蛋白 SgBAA35121

<400> 7

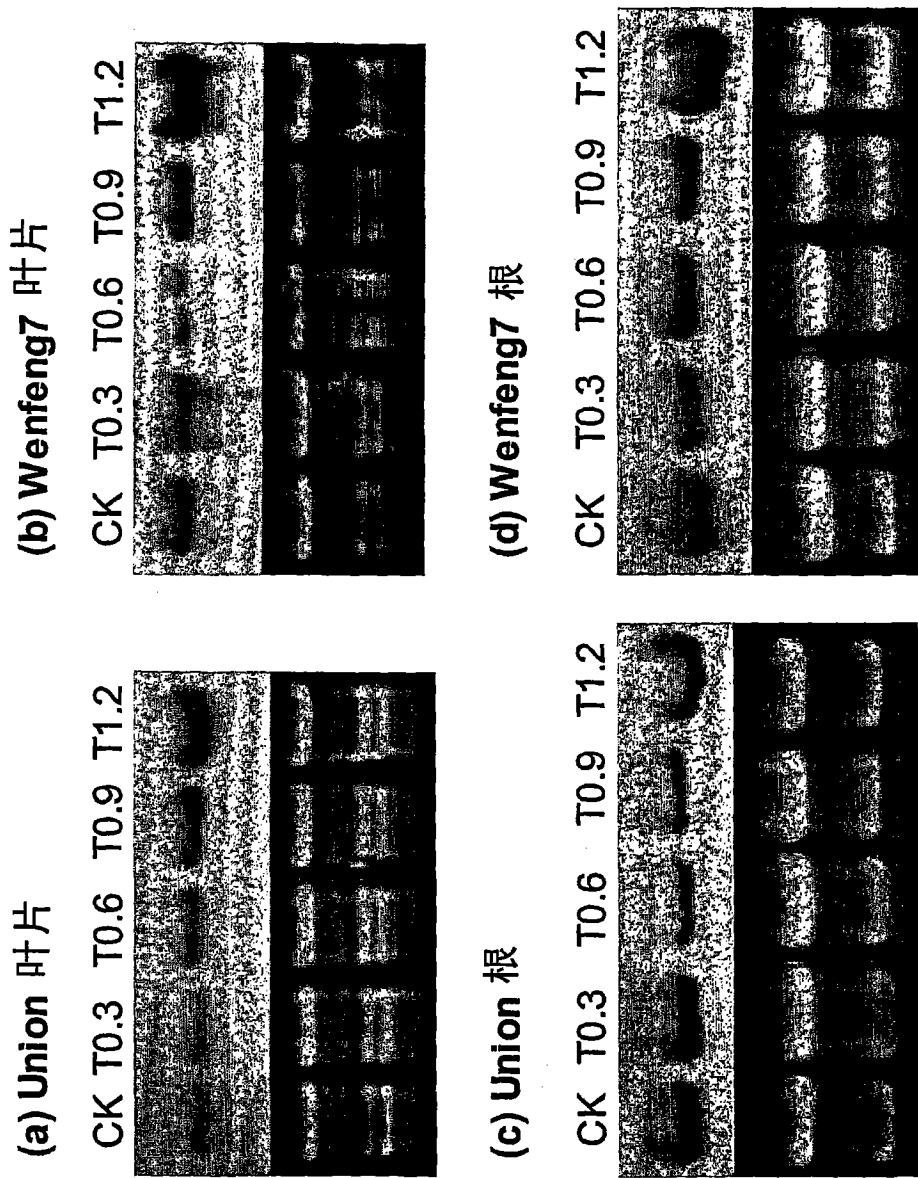
```

Met Phe Gly Arg Ala Pro Lys Lys Ser Asp Asn Thr Lys Tyr Tyr Glu
  1              5              10              15
Val Leu Gly Val Ser Lys Ser Ala Ser Gln Asp Asp Leu Lys Lys Ala
          20              25              30
Tyr Arg Lys Ala Ala Ile Lys Asn His Pro Asp Lys Gly Gly Asp Pro
          35              40              45
Glu Lys Phe Lys Glu Leu Ala Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro
          50              55              60
Glu Lys Arg Glu Ile Tyr Gly Gln Tyr Gly Glu Asp Ala Leu Lys Glu

```

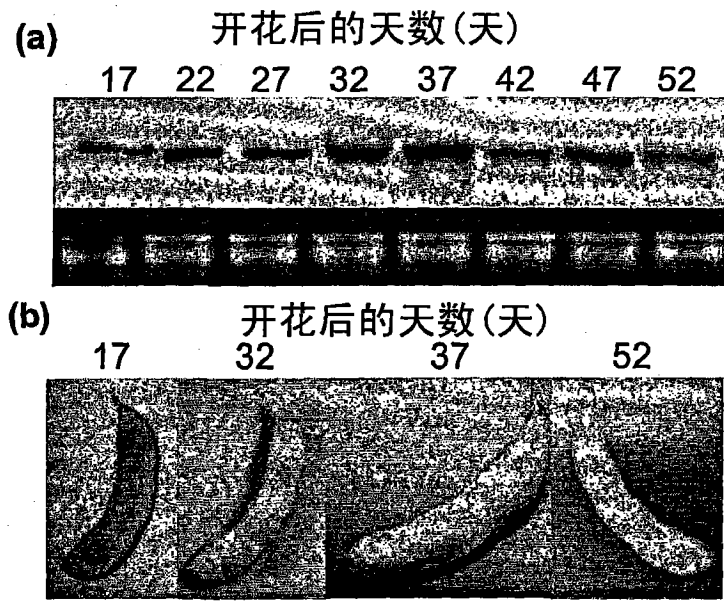
[0007]

65		70		75		80
Gly Met Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ala His Asp Pro Phe Asp Ile Phe						
		85		90		95
Gln Ser Phe Phe Gly Gly Gly Asn Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Ser						
		100		105		110
Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Asp Val Ile His Pro Leu Lys						
		115		120		125
Val Ser Phe Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Lys Leu Ser Leu						
		130		135		140
Ser Arg Asn Val Ile Cys Ser Lys Cys Lys Gly Lys Gly Lys Gly Ser						
		145		150		155
Gly Ala Ser Ser Lys Cys Ala Gly Cys Gln Gly Ser Gly Met Lys Val						
		165		170		175
Ser Ile Arg His Leu Gly Pro Ser Met Ile Gln Gln Met Gln His Ala						
		180		185		190
Cys Asn Glu Cys Lys Gly Thr Gly Glu Thr Ile Asn Asp Lys Asp Arg						
		195		200		205
Cys Pro Gln Cys Lys Gly Glu Lys Val Val Gln Glu Lys Lys Val Leu						
		210		215		220
Glu Val Val Val Glu Lys Gly Met Gln Asn Gly Gln Lys Val Thr Phe						
		225		230		235
Pro Gly Glu Ala Asp Glu Ala Pro Asp Thr Val Thr Gly Asp Ile Val						
		245		250		255
Phe Val Leu Gln Gln Lys Asp His Pro Lys Phe Lys Arg Lys Gly Asp						
		260		265		270
Asp Leu Phe Val Glu His Thr Leu Ser Leu Thr Glu Ala Leu Cys Gly						
		275		280		285
Phe Gln Phe Val Leu Thr His Leu Asp Gly Arg Gln Leu Leu Ile Lys						
		290		295		300
Ser Gln Pro Gly Glu Val Val Lys Pro Asp Gln Phe Lys Ala Ile Asn						
		305		310		315
Asp Glu Gly Met Pro Met Tyr Gln Arg Pro Phe Met Arg Gly Lys Leu						
		325		330		335
Tyr Ile His Phe Ser Val Glu Phe Pro Asp Ser Leu Ser Pro Asp Met						
		340		345		350
Cys Lys Ala Leu Glu Ala Val Leu Pro Pro Arg Ala Ser Val Gln Leu						
		355		360		365
Thr Asp Met Glu Leu Asp Glu Cys Glu Glu Thr Thr Leu His Asp Val						
		370		375		380
Asn Ile Asp Glu Glu Met Arg Arg Lys Gln Gln Gln Gln Ala Gln Glu						
		385		390		395
Ala Tyr Asp Glu Asp Asp Glu Met Pro Gly Gly Ala Gln Arg Val Gln						
		405		410		415
Cys Ala Gln Gln						
		420				



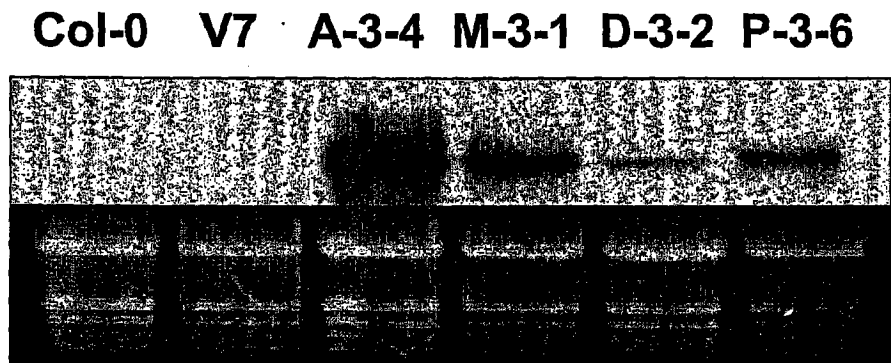
盐应激下GmDNJ1的Northern印迹分析。

图 1



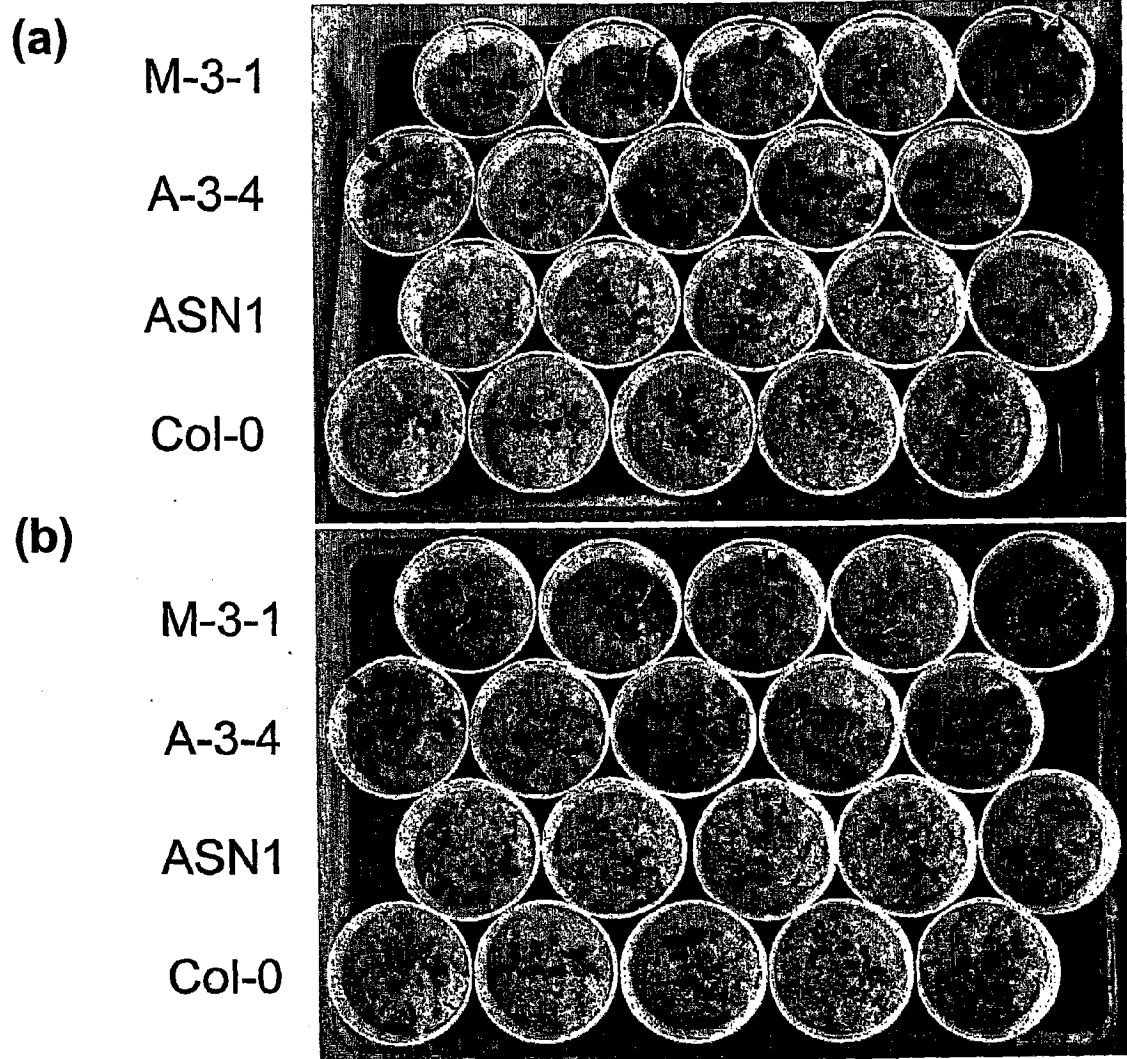
种子成熟期间GmDNJ1的Northern印迹分析。

图 2



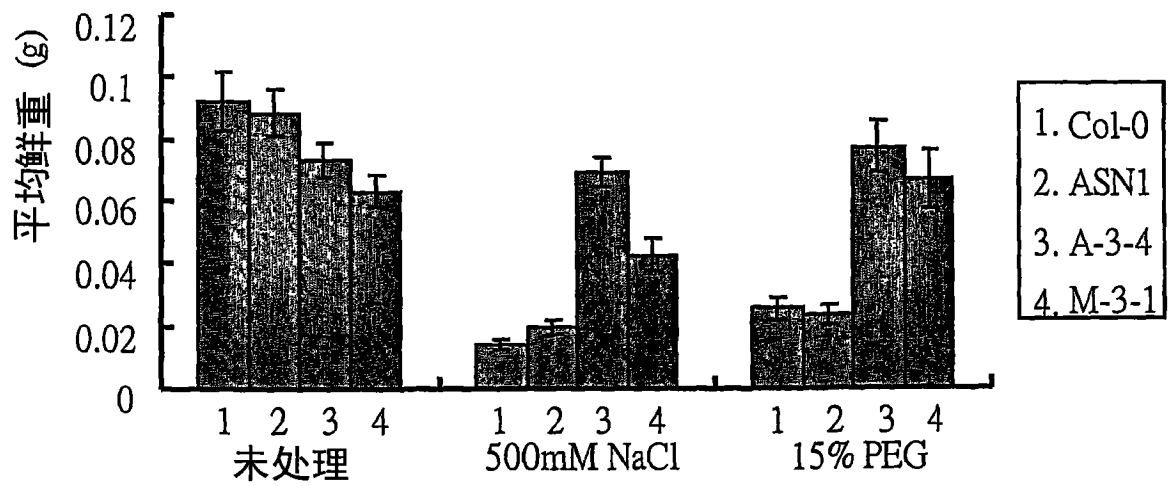
4种拟南芥转基因品系中GmDNJ1转基因的Northern印迹分析。

图 3



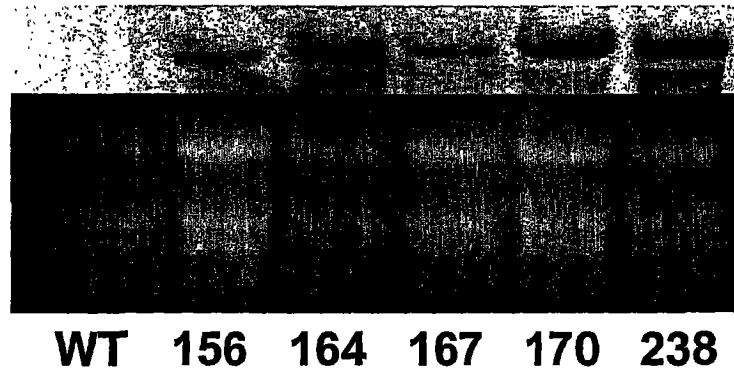
用(a) 15%PEG和(b) 500 mM NaCl处理的Col-0、ASN1 (作为阴性转基因对照) 和两种GmDNJ1转基因品系的外观。

图 4



用500 mM NaCl或15%PEG处理的野生型和转基因拟南芥品系的鲜重。

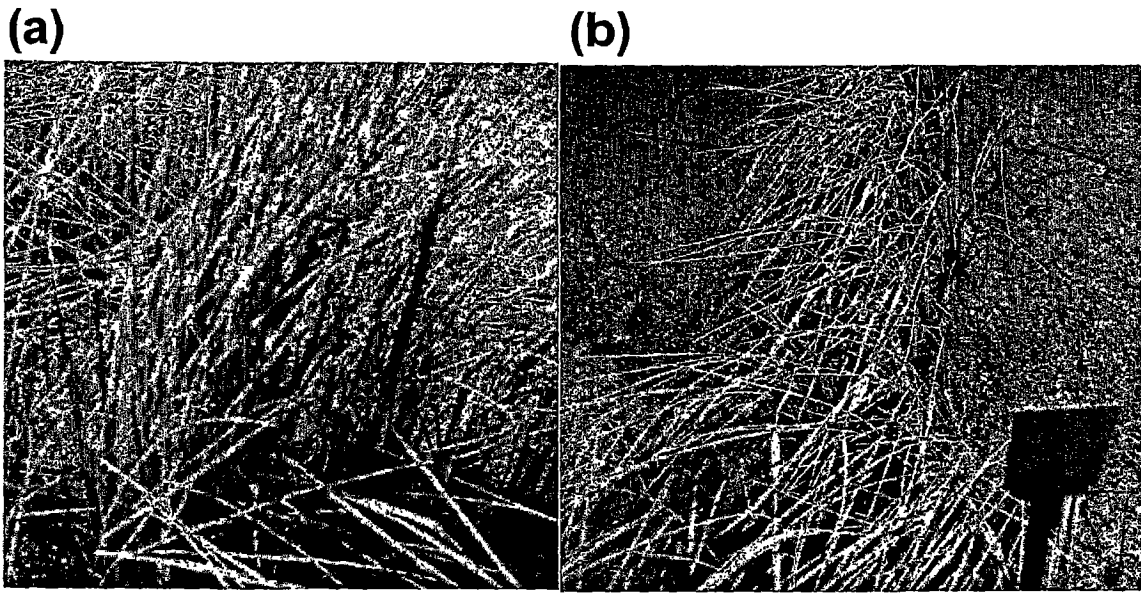
图 5



转基因水稻中GmDNJ1转基因的Northern印迹分析。

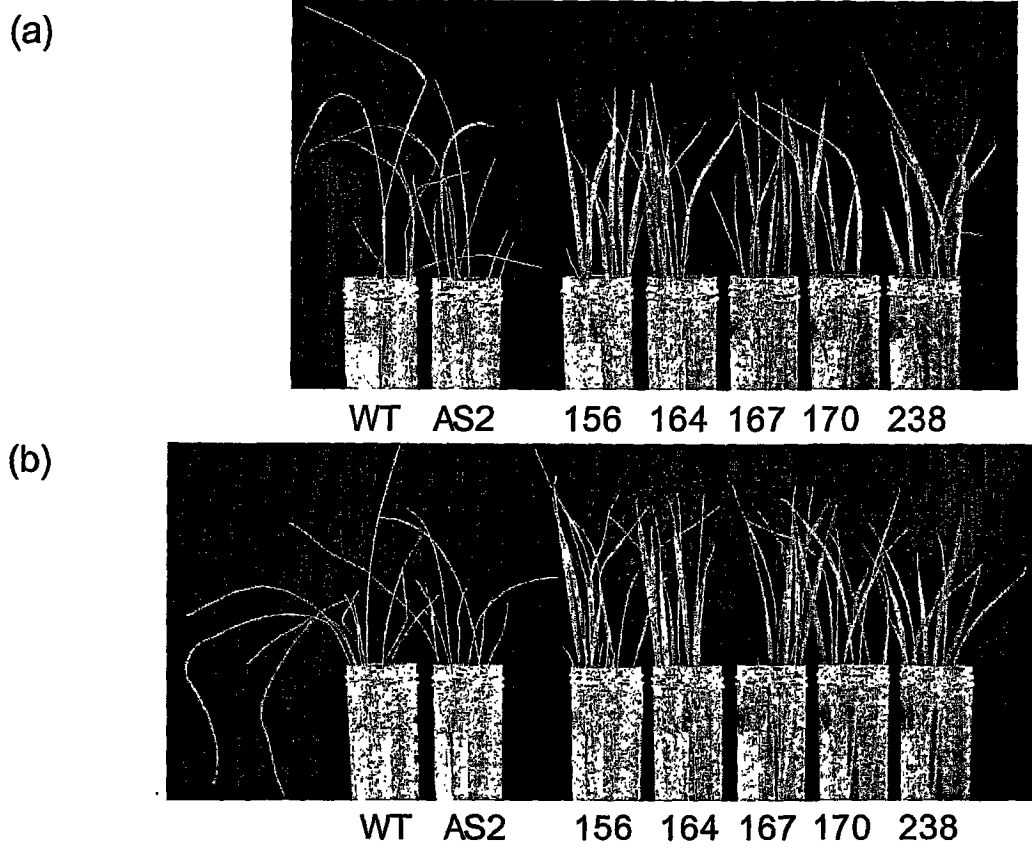
图 6





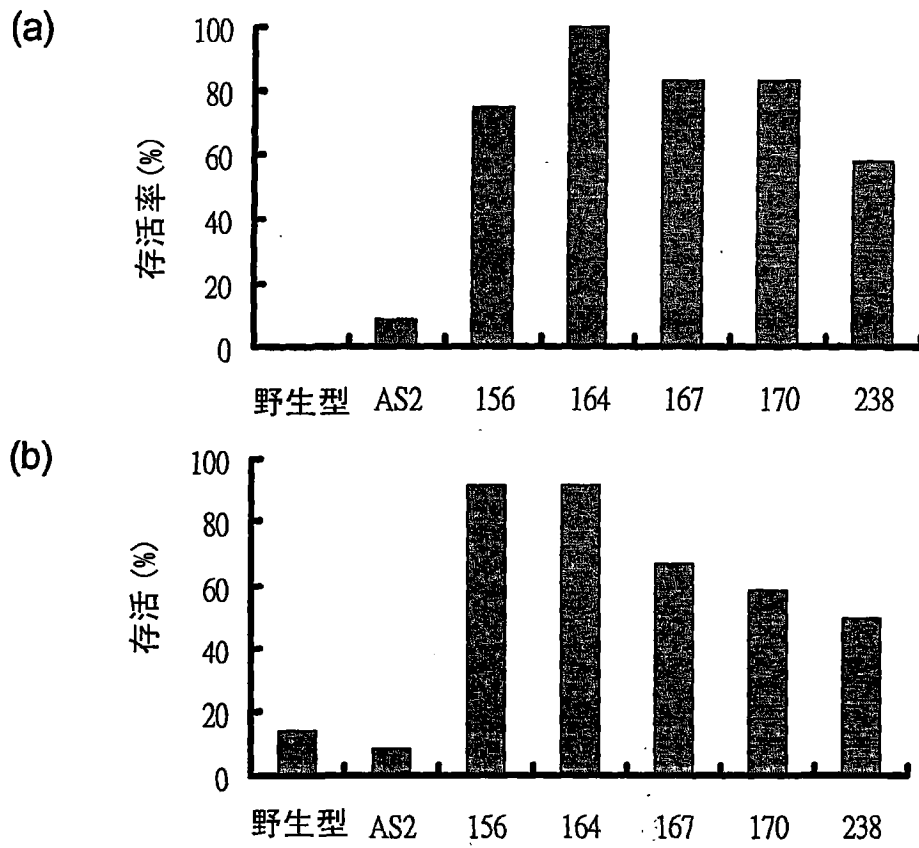
高盐含量田中GmDNJ1转基因品系(分离群体)(a)  
和野生型水稻(b)的外观。

图 7



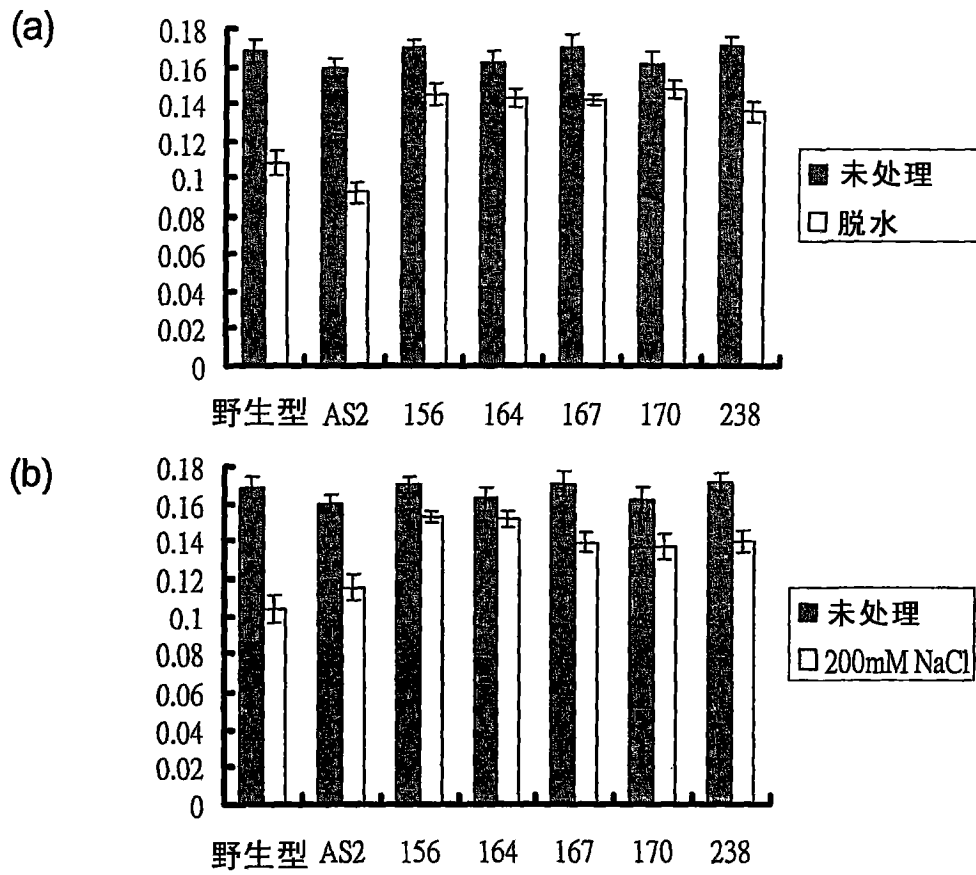
脱水应激下未转化和转基因水稻品系的外观。

图 8



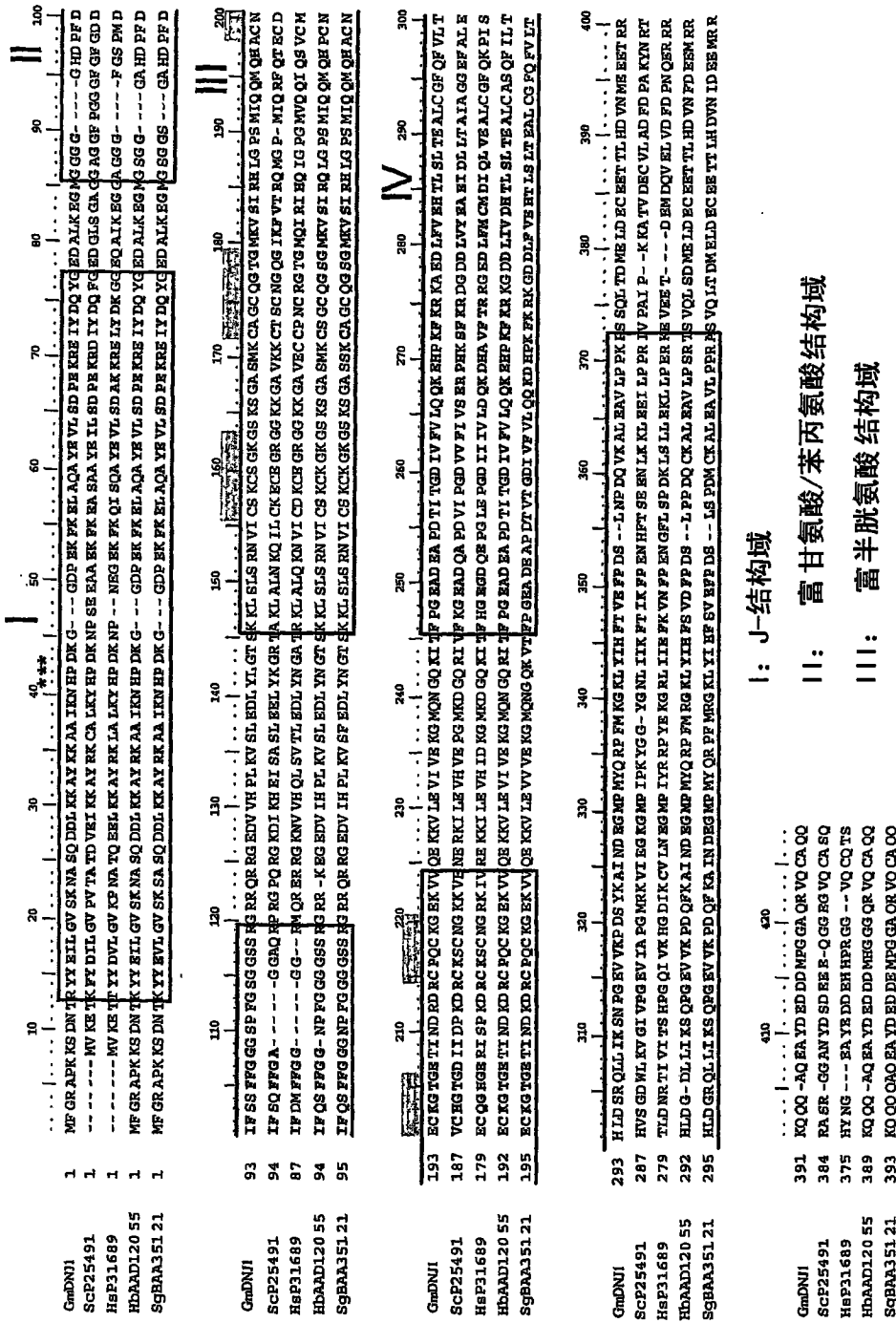
脱水应激下未转化和转基因水稻品系的存活率。

图 9



脱水应激下未转化和转基因水稻品系的鲜重。

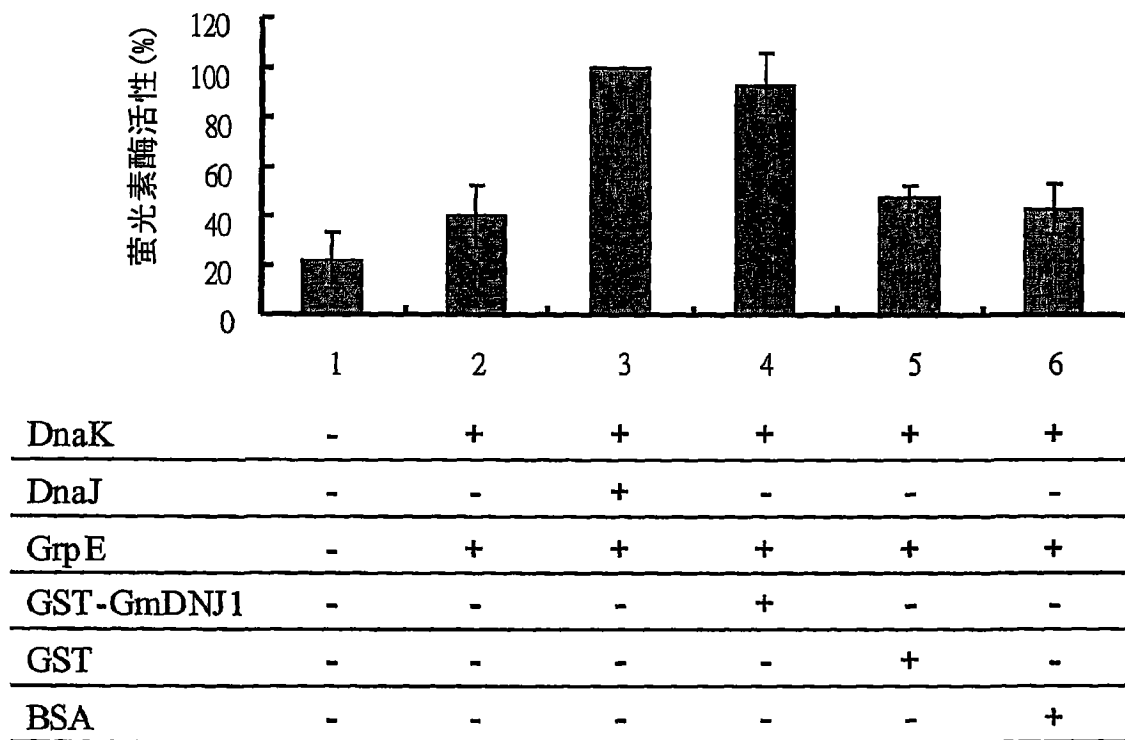
图 10



- I: J-结构域
  - II: 富甘氨酸/苯丙氨酸结构域
  - III: 富半胱氨酸结构域
  - IV: 非特征性的C-末端结构域
- \*\*\*J结构域的HDP基序
- 富半胱氨酸结构域的CXXCXGXG基序**

GmDNJ1与已知DnaJ蛋白质的氨基酸序列比较

图 11a



以热变性荧光素酶相对活性表示的GmDNJ1的陪伴分子活性。

图 11b