



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101686642 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200880021080. 1

(22) 申请日 2008. 06. 19

(30) 优先权数据

60/945, 887 2007. 06. 22 US

61/040, 354 2008. 03. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 12. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/067549 2008. 06. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/123653 EN 2009. 10. 08

(73) 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田碧秋楼 226 室

(72) 发明人 林汉明 辛世文

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 张静

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006. 01)

A01H 1/00 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2002/0049993 A1, 2002. 04. 25, 全文.

Jae Bok Heo et al..OsGAP1 Functions as a Positive Regulator of OsRab11-mediated TGN to PM or Vacuole Trafficking. 《Plant Cell Physiol. 》.2005, 第 46 卷 (第 12 期), 2005-2018.

Shaojun Dai et al..Proteomic analyses ofOryza sativamature pollen reveal novel proteins associatedwith pollen germination and tube growth. 《Proteomics》.2005, 第 6 卷 2504-2529.

审查员 王瑶

权利要求书1页 说明书13页

序列表18页 附图21页

(54) 发明名称

增强植物外伤耐受性的方法

(57) 摘要

利用能在植物中产生 GTP 酶活化蛋白的表达系统修饰植物以增强它们耐受外伤的能力。

1. 一种赋予植物增强的耐受外伤能力的方法,该方法包括修饰所述植物使之含有重组表达系统,所述重组表达系统含有编码 OsGAP1 蛋白的核苷酸序列,所述 OsGAP1 蛋白由 SEQ ID NO :32 组成,所述核苷酸序列操作性连接于在植物细胞中实现表达的控制系统。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述外伤由病原体感染或物理创伤造成。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述植物是双子叶植物。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述植物是单子叶植物。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述单子叶植物是水稻。

增强植物外伤耐受性的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 6 月 22 日提交的临时申请 US60/945,887 和 2008 年 3 月 28 日提交的 US61/040,354 的优先权。这些申请的内容通过引用纳入本文。

[0003] 通过 EFS-WEB 提交的序列表的引用

[0004] 以下通过 USPTO EFS-WEB 服务器电子提交（由 MPEP § 1730 II. B. 2(a) (C) 批准并列出的）的序列表的全部内容出于所有目的通过引用全文纳入本文。根据以下电子提交的文本文件识别序列表：

[0005]

文件名称	产生日期	大小（字节）
549072000600Seqlist.txt	2008 年 6 月 16 日	22,491 字节

技术领域

[0006] 本发明涉及能增强植物对包括病原体所致感染和创伤在内的外伤的耐受性的蛋白质。本发明还涉及通过表达编码该蛋白质的基因来增强植物对外伤耐受性的方法。

背景技术

[0007] 已知植物含有识别病原体的相应无毒力蛋白并造成受感染植物细胞改变以限制病原体扩散的耐受性蛋白，所述改变包括产生活性氧中间体、乙烯和发病机理相关蛋白，加速木质化以及启动程序性细胞死亡。

[0008] 许多外伤因素，包括坏死性病原体和创伤（昆虫、风等造成）可诱导针对外伤的全身反应，所述反应可与以上段落讨论的信号有关，而所述信号由耐受性蛋白与外来蛋白相互作用以及通过对植物激素信号起反应而产生。

[0009] 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，有人提出水杨酸 (SA) 和 / 或乙烯 (ET) 可能调节一条全身耐受性途径，另一条全身耐受性途径可能利用茉莉酸 (JA) 和乙烯 (ET)。两种途径均需要有 NPR1 蛋白存在。也了解了这些耐受性途径的其它细节 - 例如，现已证明 SA 信号改变 NPR1 和转录因子 TGA1 的氧化还原状态。在它们的还原状态，NPR1 和 TGA1 蛋白均位于核中，相互作用并导致 SA 诱导型基因的表达。诱导型全身耐受性 (ISR) 是一类根瘤杆菌相关耐受性。在 ISR 中，NPR1 还介导 JA/ET 途径的信号。

[0010] 与拟南芥相比，稻 (*Oryza sativa*) (大米) 中防御反应的信号转导途径尚不很清楚。稻中内源性 SA 水平非常高，而病原体接种并未提高该水平。然而，现已在稻中发现了 NPR1 的同源物 (NH1)。NH1 的过表达增加稻对水稻黄单孢菌水稻致病变种 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) (Xoo) 的耐受性，NH1 结合上述转录因子 TGA 家族的成员。

[0011] 本发明人还试图阐明稻中的耐受性系统，现已发现当通过外伤攻击时，稻的耐受性品系中称为 OsGAP1 (稻 GTP 酶活化蛋白 -1) 的蛋白质增多，该蛋白质能赋予各种植物对外伤的耐受性。

发明内容

[0012] 已知植物中编码耐受性蛋白的各种基因,并且已尝试利用经修饰而产生这些蛋白的各种转基因植物来赋予针对感染或外伤的耐受性。然而,就成功起反应的植物类型而言,这些耐受性蛋白看来活性谱较窄,并且许多还导致不利的副作用。本发明提供的材料可用来赋予各种植物针对外伤的耐受性,而没有明显的不利副作用。本发明提供用来产生称为 OsGAP1 的蛋白质的重组材料,该蛋白是赋予广谱植物对外伤耐受性的 GTP 酶活化蛋白。

[0013] 在一方面,本发明涉及产生结合 G- 蛋白并能增强植物对外伤耐受性的 OsGAP1 蛋白及其密切相关蛋白的表达系统。用本发明表达系统修饰的转基因植物耐受病原性生物或创伤所致外伤的能力得到增强。

[0014] 因此,在另一方面,本发明涉及经修饰而含有产生这种 GTP 酶活化蛋白的表达系统的植物细胞或植物。所述植物可以对于 OsGAP1 起源是异源的或是经修饰而过表达该蛋白的水稻植物。

[0015] 在还有另一方面,该表达系统产生的蛋白质可用于实施筛选试验以鉴定在植物中调节针对应激或外伤的耐受性的化合物或化合物组合。

[0016] 本发明还涉及 OsGAP1 蛋白的免疫特异性抗体。这些抗体可用于检测和纯化该蛋白。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1A 显示 OsGAP1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 和编码它的核苷酸序列 (SEQ ID NO :31)。

[0019] 图 1B 显示由保藏序列 EF584506 编码的 OsGAP1 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 与衍生自拟南芥的 GTP 酶活化蛋白的氨基酸序列 (BAB02719) (SEQ ID NO :33) 的比较。下划线标出高度同源的 C2 结构域。

[0020] 图 2A 显示 OsYchF1 的编码区序列 (SEQ ID NO :34-35)。图 2B 显示 OsYchF1 (SEQ ID NO :35) 与拟南芥同源物 (SEQ ID NO :36) 的比对。分别利用 ClustalW 程序比对 OsYchF1 的氨基酸残基与 NP_174346。“*”:保守性残基;“:”:保守性取代;和“.”:半保守性取代。下划线标出了在保守性结构域数据库 (Conserved Domain Database) (CDD) 中鉴定的 OsYchF1 中 YchF 结构域的推定位置。OsYchF1 的理论 pI/MW 值分别是 6.29/44.33kD。

[0021] 图 3A 显示成功产生与 HA 标签融合的 OsGAP1 的相互作用 G- 蛋白伴侣 HA-BAD03576 以及成功产生与 HA 标签融合的无关蛋白质的化学发光试验结果,它们用于图 3B 所示蛋白质印迹实验。

[0022] 图 3B 显示在 OsGAP1 和某蛋白质 (BAD03576) 之间形成复合体的蛋白质印迹结果,所述蛋白质在酵母 2- 杂交体试验中显示与 OsGAP1 相互作用。BAD03576 偶联于血凝素 (HA),HA 的抗体用于免疫沉淀该复合体。针对 OsGAP1 的抗体用作蛋白质印迹的检测抗体。当 HA 与无关蛋白质偶联时,这些抗体检测不到抗体与 HA 形成的沉淀物。

[0023] 图 4 显示作为 GST 融合蛋白,OsYchF1 (OsGAP1 的相互作用伴侣, BAD03576) 与 OsGAP1 相互作用导致的 GTP 酶活性。OsYchF1 和 OsGAP1 通过细菌表达系统表达为 GST 融合蛋白。利用 200 μ M GTP 作为起始底物,通过追踪无机磷酸 (Pi) 的释放监测 GTP 酶活性。误差线表明标准误差 (N = 3)。a、b 和 c 代表根据单向 ANOVA 然后通过图氏后验检验

(Tukey' s posthoc test) 显示平均值具有统计学差异 ($p < 0.01$) 的各组。

[0024] 图 5 显示利用 mRNA 作为标记,采用实时 PCR 扩增的 OsGAP1 表达。检验了耐受性品系 CBB14 及其亲本敏感性品系 SN1033,二者接种了病原体或作模拟接种。如图所示,只有 CBB14 品系显示 OsGAP1 明显表达。

[0025] 图 6A 和 6B 显示创伤对 OsGAP1 表达的影响。在 A 图中,测定采用实时 PCR 的 mRNA 产量与时间的函数关系;在 B 图中,测定对蛋白质表达的影响。如图所示,CBB14 中的表达超过其敏感的亲本。

[0026] 图 7A 和 7B 显示了拟南芥中 OsGAP1 或防御标记基因的表达。图 7A 显示在 4 种不同转基因拟南芥植物中通过实时 PCR 测定的 mRNA 产量。图 7B 显示在这些转基因植物中 4 种防御基因的产量。

[0027] 图 8A-8D 显示未转化拟南芥和两种转基因品系中 SA 处理对 4 种防御基因表达的影响。图 8A 显示 PR1 的表达;图 8B 显示 PR2 的表达;图 8C 显示 PDF1.2 的表达;图 8D 显示 Thi2.1 的表达。

[0028] 图 9A-9D 显示了未转化拟南芥和转基因植物品系中茉莉酸处理对与图 8A-8D 所示相同的 4 种防御基因表达的影响。如图 8A-8D 所示,不同的图表示各个基因。

[0029] 图 10A 和 10B 显示了用病原体,丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) DC3000 (Pst DC3000) 接种拟南芥的结果。图 10A 是显示 3 天后植物外观的照片。图 10B 显示与野生型 (Col-0) 和含空白载体的转基因植物 (V7) 相比,这些植物品系中病原体滴度的结果。

[0030] 图 11 显示了在拟南芥转基因植物和亲本品系中,用 Pst DC3000 感染后 4 种防御标记基因的表达。

[0031] 图 12 显示对照和转基因拟南芥中 4 种防御标记基因的表达,其中亲本品系是 npr1-3 突变株。

[0032] 图 13A 和 13B 显示了用 Pst DC3000 接种时,各种拟南芥植物品系的结果。图 13A 显示了经修饰含有 OsGAP1 蛋白的表达系统的 npr1-3 拟南芥突变植物、未用该表达系统修饰的背景品系和 npr1 阳性的对照品系的照片。图 13B 显示了相应的病原体滴度。

[0033] 图 14 显示了各种稻品系的 PCR 筛选结果,所述品系经修饰含有与玉米泛素启动子操作性连接的编码 OsGAP1 蛋白的核苷酸序列。该转基因品系中是否存在转基因见泳道 1-10,泳道 11 是对照。

[0034] 图 15A 和 15B 显示通过实时 PCR 测得的 RNA 水平 (图示) (15A),以及通过蛋白质印迹显示的相应的蛋白质产量 (15B)。

[0035] 图 16A-16C 显示在各种转化株中各种防御标记 (分别是 PR1、PBZ1 和 GRCWP) 的表达。

[0036] 图 17A 显示在转基因稻的叶片中 OsGAP1 基因的表达;图 17B 显示与野生型相比,这些品系中防御标记蛋白 PR1、GRCWP 和 PBZ1 的表达水平。图 17C 显示用 Xoo 菌株 LN44、T1 和 P6 攻击时,转基因植物中病损的降低。收集 8 周龄转基因稻品系 (1496-1 和 1496-9) 和野生型 (爱知旭 (Aichi Asahi)) 的叶片以制备逆转录所用的总 RNA。采用实时 PCR 分析 OsGAP1 (A) 和稻防御标记基因 (B) 的相对基因表达。敏感亲本 (爱知旭) 中内源性 OsGAP1 和防御基因的表达用作比较的参照 (表达水平设为 1)。研究的防御基因包括 PR1、GRCWP 和

PBZ1. OsAc1D 基因 (肌动蛋白) 的表达用于标准化。接种测试 (C) 利用 3 种 Xoo 菌株 / 品种, LN44、T1 和 P6。通过评估接种叶片上的病损面积 % 定量测定疾病症状。各数据点分析 10 株以上的植物。误差线表明标准误差。a 和 b 代表根据单向 ANOVA 然后通过盖 - 荷二氏后验检验 (Games-Howell posthoc test) 显示平均值具有统计学差异 ($p < 0.05$) 的各组。

[0037] 图 18 包括用于获得图 17C 所示结果的病损的照片。用 Xoo 菌株 LN44、T1 和 P6 接种 OsGAP1 转基因品系和未转化亲本 (爱知旭) 的 8 周龄幼苗。如实施例 10 所述进行接种测试。平均病损面积 (%) 的统计学分析示于图 17。

[0038] 本发明的实施方式

[0039] 称为稻 GTP 酶活化蛋白 -1 (OsGAP1) 的蛋白质是外伤情况下在稻中过表达的 165 个氨基酸的蛋白质。当所述植物经修饰产生这些蛋白质时 (通常为 OsGAP1 蛋白), 该蛋白质及其变体能赋予各种植物对外伤的不利作用的耐受性, 所述变体在该 165- 氨基酸序列的全长上有至少 90%、优选 95%、更优选 98% 或 99% 的序列相同性。本发明提供可用于修饰各种植物 (单子叶植物和双子叶植物) 以增强它们的耐受外伤能力的表达系统。以下实施例证实这些表达系统赋予耐受性的总体能力, 这些实施例证明源自单子叶植物稻的该蛋白质能赋予双子叶植物拟南芥这些特性。

[0040] 本申请所用的“外伤”指病原体或物理创伤或二者造成的切口。实际上, 机械方式造成的创伤有助于这种病原体感染。

[0041] 目前, 构建在植物中可操作的表达载体, 修饰植物细胞, 使植物细胞再生成完整的植物以及植物的重组操作等技术是众所周知的。这些技术总结于, 例如美国专利 7, 109, 033, 其关于这些技术的内容通过引用纳入本文。

[0042] 如本专利所示, 用于植物表达的启动子可以是组成型、诱导型和 / 或组织特异性的。转化技术包括利用土壤杆菌 (Agrobacterium)、脂质转染、电穿孔等。从转化的植物细胞再生植物的技术也是熟知的。

[0043] 因此, 一旦有编码 OsGAP1 蛋白质的核苷酸序列可用, 本领域普通技术人员即熟知制备产生这些蛋白质的转基因植物的方法。天然产生该蛋白质的核苷酸序列以登录号 EF584506 保藏在 GenBank, 并且密码子选择有差异的合成替代物是可能的。然而, 由于植物喜爱的密码子已存在于保藏的序列中, 简单地利用合成形式的该核苷酸序列更方便。构建含该长度的核苷酸序列的 DNA 的合成方法也为本领域熟知并可商品化购得。

[0044] 因此, 按照本发明, 构建在植物中可操作的合适表达系统, 其中编码本发明蛋白质的核苷酸序列与在植物中可操作的合适控制序列操作性相连。该表达系统用于修饰植物细胞或植物, 从而该蛋白质可以在植物组织中普遍地或专门在植物的所需位置产生, 这取决于控制系统和转化方法的选择。然后得到的植物 (无论单子叶植物或双子叶植物) 对病原体或创伤诱导的外伤起反应而产生该蛋白质, 从而增强它们抵御这些外伤事件所致损伤的能力。

[0045] 此外, 以足量产生并分离和纯化至合适程度 (以重量计, 纯度至少 50%、优选 75%、更优选 90% 或 95%) 的该蛋白质本身可用作筛选工具。能结合该蛋白质的化合物或化合物组合是调节植物抵御外伤能力的候选对象。通过结合该蛋白质而能刺激其活性的化合物或化合物组合会增强能产生该蛋白质的植物的外伤 - 抵御能力。可通过评估化合物或化合物组合促进本发明蛋白质与合适 G- 蛋白结合来确定化合物刺激该活性的能力。合

适 G- 蛋白包括作为 GTP 酶的那些蛋白,本领域已知各种这样的蛋白。然而,特别优选在下文已显示与本发明蛋白质相互作用的源自稻的 G- 蛋白 - 即,其编码序列在 GenBank 保藏为 BAD03576 的 G- 蛋白。因此,增强结合的化合物或化合物组合可用于进一步增强天然产生 OsGAP1 蛋白或因修饰而过表达或普遍表达其编码基因的任何植物的耐受性。

[0046] 在另一方面,在该试验中干扰这种结合的化合物是拮抗剂。这种拮抗剂可以用于降低产生 OsGAP1 蛋白的植物的耐受性,从而产生人工敏感性。具有这些人工敏感性的植物是检验能逆转敏感性的方法或化合物的有用底物。

[0047] 对所述蛋白质具有特异免疫活性的抗体也可用于纯化本发明蛋白质和检测它们。术语“抗体”应理解为表示完整的抗体(多克隆或单克隆),其免疫特异性片段,例如 Fab 片段,及其重组产生的形式,例如单链 F_v 抗体。因此,术语“抗体”指任何形式的抗体以及保留其免疫特异性特征的任何部分。这些抗体可用在,例如纯化用的亲和柱上。

[0048] 在以下实施例中,从稻回收图 1A 所示编码 OsGAP1 蛋白的核苷酸序列并保藏。采用酵母 2- 杂交体试验显示编码的蛋白质与稻的 G- 蛋白(其序列以 BAD03576 保藏于 GenBank) 相互作用,这可采用蛋白质印迹在体外证实,其中用 HA 的抗体处理后,HA 标记的 BAD03576 与 OsGAP1 共沉淀,用 OsGAP1 产生的抗体可检测该沉淀复合体。此外,证明了可以在对病原体起反应和对创伤起反应而表现出耐受性的稻品系中在 mRNA 水平和蛋白质水平诱导 OsGAP1 表达。

[0049] 利用 OsGAP1 蛋白的表达构建物获得转基因拟南芥植物,这些转基因植物显示在空白条件下和加入水杨酸时,4 种防御标记基因的表达均增强。OsGAP1 转基因拟南芥还显示 OsGAP1- 编码 DNA 的组成型表达,当用假单胞菌(Pseudomonas) 攻击时,会因这种表达而得到保护。类似地,稻中该 DNA 过表达导致几种防御标记基因的表达。

[0050] 提供以下实施例是为了说明而非限制本发明。

[0051] 实施例 1

[0052] OsGAP1- 编码 cDNA 的鉴定和克隆

[0053] 在 Xa14 基因座存在下,仅仅病原体接种和创伤均诱导 cDNA 克隆(OsGAP1) 以赋予含有该基因座的稻以耐受性(但在其敏感亲本中不诱导)。

[0054] 将抑制消减杂交法(SSH) 应用于接触 Xoo 的一对近等同基因(near-isogenic) 稻品系的 RNA 样品 - 一种含有耐受性蛋白编码基因 Xa14(CBB14),另一种是敏感性回归亲本(SN1033)。Xa14 赋予一些菌株对稻病原体 Xoo 的耐受性。在 CBB14 品系中差异表达的部分克隆涵盖开放读框的 3' 区。采用 5'-cDNA 末端快速扩增(5'-RACE) 技术,然后利用特异性引物进行 PCR 扩增,得到包含编码 OsGAP1 蛋白的 165 个氨基酸残基的完整开放读框的起始和终止密码子的 cDNA。该 DNA 序列信息保藏在 GenBank 公共数据库(登录号:EF584506)。编码 OsGAP1 蛋白的核苷酸序列和推导的氨基酸序列见图 1A。

[0055] 更详细地说,用 Xoo 菌株 LN44 接种 6-8 周龄的稻植物。接种 4 天后收集叶片组织用于制备总 RNA。利用克隆技术公司的 PCR- 选择 cDNA 消减试剂盒(Clontech 637401) 进行抑制消减杂交法(SSH) 以获得候选克隆。利用市售试剂盒(Clontech K 1811-1) 对含有 OsGAP1 的部分编码序列的候选克隆实施 5' cDNA 末端快速扩增(5' RACE)。5' RACE 反应中利用基因特异性引物 HMOL2068(5' ACATATTGTACAACCTTTGCTCTGCC 3') (SEQ ID NO :1)、HMOL2069(5' CCTCAAGGACAGTAAA AGAATCTC 3') (SEQ ID NO :2)、MOL2070(5' TTGTCCACTGA

TAAACTTAGAGTTG 3') (SEQ ID NO :3) 和 HMOL2071 (5' AGCTATGCAAGACTGTAAGCAATAGG 3') (SEQ IDNO :4)。为扩增全长编码区,利用引物对 HMOL2273 (5' ATGTTGGGGCATCTGGTTGG 3') (SEQ ID NO :5) 和 HMOL2071 (5' AGCTATGCAAGACTGTAAGC AATAGG 3') (SEQ ID NO :4) 进行 PCR。所有克隆保存在质粒载体 pBluescript KSII(+) 中,在大肠杆菌 (E. coli) 菌株 DH5 α 中增殖。

[0056] DNA EF584506 开放读框序列与作为 cDNA 序列直接保藏的稻 cDNA 克隆 (登录号: NM_001053244) 有 99% 相同。稻基因组中的相应基因可能是位于 2 号染色体上的单拷贝基因。BlastP 程序显示我们的克隆 EF584506 的编码蛋白质与稻基因组序列标注的含有钙结合基序 (C2- 结构域) 的蛋白质样克隆 (登录号 BAD15699) 相同。

[0057] 含 C2- 结构域的蛋白质通常参与信号转导过程,一些成员可结合 G- 蛋白。我们的克隆 EF584506 编码的蛋白质的预测氨基酸序列显示与拟南芥中标注为也含有 C2- 结构域的 GTP 酶活化蛋白的克隆有 59% 相同。EF584506 也称为 OsGAP1 以暗示其对 G- 蛋白的推定结合能力。图 1B 显示 OsGAP1 和 BAB02719 编码的氨基酸残基的比对。突出显示推导的 C2- 结构域的位置,星号表明高度保守性氨基酸残基。

[0058] 生物信息学工具提示 OsGAP1 蛋白不具有信号肽、导向信号或跨膜结构域,因此估计其存在于可溶性蛋白质部分。如下所示,生物信息学工具提示了这点。

[0059] 表 1. OsGAP1 的亚细胞定位预测的结果

	分析工具	亚细胞定位预测	万维网上的位置
	PSORT	细胞质 (确定性: 0.45)	psort.org/
	MITOPROT	靶向线粒体的概率: 0.1269	ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html
[0060]	PTS1 预测器	未靶向过氧化物酶体	mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp
	SignalP	非分泌型蛋白质	cbs.dtu.dk/services/SignalP/
	TMpred	无跨膜区	ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

[0061] 如下所示采用分部分离方法分离膜 - 结合和可溶性蛋白质组分以及蛋白质印迹来证实。

[0062] 通过 Jiang, L. 等, J. Cell Biol. (1998) 143 :1183-1199 的改进分部分离方法分离膜 - 结合和可溶性蛋白质。对于蛋白质印迹检测,通过商业服务 (英杰公司, 定制抗体 (Invitrogen, Custom antibody)) 将合成肽 ('N' -CRVIKKTNPENDE- 'C') (SEQ ID NO : 30) 注射入家兔来产生靶向 OsGAP1 蛋白的第一抗体 (多克隆)。使用前利用亲和柱纯化抗体。利用偶联于碱性磷酸酶的抗 - 家兔第二抗体 (在 Western Breeze™ 免疫检测试剂盒中提供, 英杰公司 WB7106) 识别该第一抗体。

[0063] 对于蛋白质印迹分析,先用聚丙烯酰胺凝胶 (堆积率 4%; 分辨率 10%) 电泳分离蛋白质,再利用 Trans-Blot® SD 半 - 干电泳转移元件 (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) 转移至活化的 (在无水甲醇中预处理 20 分钟,然后在蛋白质转移缓冲液中处理 15 分钟) PVDF 膜。转移、封闭 (利用 WesternBreeze™ 封闭溶液) 和检测 (利用 Western Breeze™ 免疫检测试剂盒) 步骤按照生产商的手册进行。结果显示 OsGAP1 蛋白包含在可溶性组分

中。

[0064] 实施例 2

[0065] 证明 OsGAP1 蛋白与推定的 G- 蛋白相互作用

[0066] 进行酵母 -2- 杂交体实验以找寻与 OsGAP1 相互作用的蛋白质。利用商品化试剂盒 BD Matchmaker™ 文库构建和筛选试剂盒 (Clontech K1615-1)。利用以下引物对从 pBluescript KSII(+) 载体中的克隆扩增 OsGAP1 :HMOL2610 (5' CCGAATTCATGTTGGGGCATCTG GTTG 3') (SEQ ID NO :6) 和 HMOL2611 (5' CGTGCAGGTCATACACCCCTTAGAACC 3') (SEQ IDNO : 7)。亚克隆入载体 pGBKT7 (在 BD Matchmaker™ 文库构建和筛选试剂盒中提供) 与 GAL4 的 DNA 结合结构域和 c-Myc 表位标签形成框内融合后, 将重组构建物转移至酵母菌株 Y187。利用抗 -c-Myc 抗体 (商业购得) 通过蛋白质印迹分析证实酵母细胞中成功产生 OsGAP1 蛋白。

[0067] 利用酵母表达载体 pGADT7-Rec 产生 cDNA 文库。从已接种了相应的不相容病原体的几种稻品系 (各自含有 Xa 或 Pi 耐受性基因) 的逆转录 RNA 样品获得的合并 cDNA 与 GAL4 的活化结构域融合, 将重组构建物转化入酵母菌株 AH109。

[0068] 通过在 pGBKT7-OsGAP1 转化的 Y187 与 AH109 酵母文库之间配对开始文库筛选。用不含 Trp、Leu 和 His 的 SD 培养基 (SD/-3) 选择酵母配对产物。只有生长至大小最多为 2-3mm 直径的菌落进一步接种到不含 Trp、Leu、His 和 Ade 的 SD 培养基 (SD/-4) 上。随后进行菌落转移过滤试验 (colony-liftfilter assay) 来检验 lacZ 报道基因活性。

[0069] 根据选择性培养基上的生长情况和菌落转移试验中阳性蓝色的产生情况, 我们鉴定了编码蛋白质的部分 cDNA 克隆。回收该部分 cDNA 克隆并用于和 pGBKT7-OsGAP1 共同转化 AH109。观察到阳性代谢选择和菌落转移试验结果一致 (数据未显示)。

[0070] 在公共基因组数据库中采用 BlastX 检索得到以上回收的相互作用蛋白质伴侣的身份。发现保藏于 GenBank 的标注蛋白质 BAD03576。BAD03576 是含有在原核生物的 GTP- 依赖性翻译因子中发现的 YchF 结构域的推定 G- 蛋白。在稻基因组数据库中发现位于 8 号染色体上编码与 BAD03576 相同的蛋白质的基因组克隆 (登录号 :AP005416), 提示 BAD03576 可能是核编码的蛋白质。OsGAP1 蛋白和 BAD03576 之间的相互作用支持将 OsGAP1 鉴定为 GTP 酶活化蛋白。

[0071] 编码 BAD03576 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列见图 2A。BAD03576 的预测氨基酸序列显示与拟南芥中也标注为 G- 蛋白的克隆 (登录号 :NP_174346) 有 85% 相同。比对 BAD03576 和 NP_174346 编码的氨基酸残基 (图 2B)。在两种蛋白质中均发现 YchF 结构域, 提示 OsGAP1 的相互作用伴侣是 YchF- 型非常规 G- 蛋白。该稻 G- 蛋白克隆称为 OsYchF1。OsYchF1 的基因组克隆位于 8 号染色体上。利用公共数据库的进一步检索未揭示稻基因组中有该基因的另一拷贝。

[0072] 为验证酵母 -2- 杂交体实验的结果, 进行了共 - 免疫沉淀试验。将编码完整 BAD03576 蛋白的 cDNA 插入 pGADT7-Rec 以产生含框内 HA 标签的融合蛋白 (BAD03576-HA)。利用 Ribomix 大规模 RNA 产生系统 -T7 (普罗麦加 (Promega) P1300) 体外转录线形化的重组质粒。成功转录得到验证之后, 联用胚芽提取物 (普罗麦加 L4330) 和 Transcend™ 生物素 - 赖氨酰 -tRNA 系统 (普罗麦加 L5061) 体外翻译 mRNA。通过 Transcend™ 化学发光翻译检测系统 (普罗麦加 5080) 证实成功产生体外翻译产物。结果见图 3A。

[0073] 从过表达 OsGAP1 的稻品系获得蛋白质提取物。混合约 100 μ g 蛋白质样品与 40 μ l 体外翻译的 BAD03576-HA 融合蛋白。利用 BD Matchmaker™Co-IP 试剂盒 (Clontech 630449), 利用抗-HA 表位标签抗体使含有 BAD03576-HA 及其相互作用蛋白质伴侣的蛋白复合体沉淀。

[0074] 将体外翻译产物与包含 OsGAP1 蛋白的稻蛋白质提取物温育, 利用抗-HA 表位标签抗体 (商业购得) 使该蛋白复合体 (含有 BAD03576-HA 及其相互作用蛋白质) 沉淀 (pull down)。将约 20 μ l 体积的 100 μ g 稻总蛋白提取物与 40 μ l 体外翻译的 HA- 标记产物混合。利用针对 OsGAP1 蛋白的抗体对得到的蛋白质复合体进行蛋白质印迹分析证实 BAD03576 和 OsGAP1 蛋白之间的相互作用。利用与 HA 融合的无关蛋白质的阴性对照未导致 OsGAP1 的共沉淀。这些结果示于图 3B。

[0075] 通过检测 G- 蛋白的 GTP 酶活性得到进一步证实。制备了纯化的 OsYchF1 和 OsGAP1 GST 融合蛋白。OsYchF1 或 OsGAP1 的全长编码区框内融合, 位于 pGEX-4T-1 载体中 GST 的下游。GTP 用作底物, 在利用 GST-OsYchF1 融合蛋白的体外试验中检测 Pi 的释放量。结果示于图 4。单用 GST-OsYchF 的 Pi 释放量明显高于单用 GST 或 GST-OsGA01 得到的背景信号。混合 GST-OsGAP1 和 GST-OsYchF1 融合蛋白可进一步增强 Pi 释放。当用 GST 蛋白替代 GST-OsGAP1 时, 未观察到该现象。

[0076] 实施例 3

[0077] 在 Xa14 稻品系 (CBB14) 中 OsGAP1 是创伤诱导的

[0078] 评估了 OsGAP1 在细菌枯萎病耐受性 NIL CBB14 (携带 Xa14 基因座) 及其敏感性回归亲本 (SN1033) 中的表达。通过 Zhang, Q. 等, Acta Agr. Sin. (1996) 22 :135-141 所述的剪切方法, 用水稻黄单孢菌水稻致病变种菌株 LN44 或水 (模拟) 接种 8 周龄的植物。收集接种前第 0 天的叶片样品。接种后第 2、4 和 6 天收集离接种部位约 6-8mm 的叶片组织。10 天后, 在 SN1033 中明显观察到疾病症状, 而 CBB14 具有耐受性 (数据未显示)。从收集的叶片组织制备总 RNA 样品, 逆转录和进行实时 PCR。利用稻肌动蛋白基因表达作标准化, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法 (Livak, K. J. 等, Methods (2001) 25 :402-408) 计算相对基因表达。通过检测相应 mRNA 以及检测蛋白质来证实 OsGAP1 的表达。

[0079] 在以下几个实施例以及本实施例中, 对于 mRNA 检测, 利用逆转录的 RNA 样品进行实时 PCR 分析。利用应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 的 ABIPRISM 7700 序列检测系统在有圆盖 (dome cap) 的 96- 孔 PCR 平板中进行 cDNA 的实时 PCR 扩增。在含 10 μ l SYBR 绿色 PCR 主混合物 (应用生物系统公司 4309155) 以及 0.3 μ M 各正向和反向引物的 20 μ l 反应体系中进行反应。通过应用生物系统公司的引物快车 (Primer Express) 程序设计实时 PCR 的引物。所有反应至少独立进行 4 次, 其中至少 3 组一致的数据用于分析。

[0080] 作为标准化标准品的稻 OsAc1D 的表达水平 (稻肌动蛋白, Wasaki, J. 等, New Phytol. (2003) 158 :239-248) 利用以下引物组: HMOL2723 (5' CTT CATAGGAATGGAAGCTGCGGGT A 3') (SEQ ID NO :8) 和 HMOL2724 (5' GACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA 3') (SEQ ID NO :9)。

[0081] 用于检测 OsGAP1- 编码 RNA 的引物是 HMOL2703 (5' TCCGGAGTGAACGATGAAC 3') (SEQ ID NO :10) 和 HMOL2704 (5' GATGTCCAGCTCCGCATTG 3') (SEQ ID NO :11)。

[0082] 当用不相容的 Xoo 菌株, LN44 接种 CBB14 植物时, 观察到 OsGAP1 表达的诱导, 在剪切叶片但不接种病原体的模拟接种实验中也发现类似诱导。这提示 OsGAP1 的表达可能

是创伤可诱导的。在另一方面,敏感性回归亲本 SN1033 未显示 OsGAP1 的这种诱导。结果示于图 5,各实验中 OsGAP1 表达的改变倍数与第 0 天的表达作比较。在图 5 中,实心菱形:CBB14- 病原体接种;空心菱形:CBB14- 模拟接种;实心三角形:SN1033- 病原体接种;空心三角形:SN1033- 模拟接种。

[0083] 为进一步研究 CBB14 中创伤对 OsGAP1 表达的作用,收集接种前第 0 天和创伤后第 2、4 和 6 天的 RNA 和蛋白质样品。在 CBB14 中观察到 OsGAP1 转录物(通过逆转录 RNA 样品的实时 PCR;图 6A)和 OsGAP1 蛋白(通过蛋白质印迹分析;图 6B)稳态水平的平行诱导,但在 SN1033 中未观察到,证实存在耐受性基因座 Xa14 对于 OsGAP1 的创伤诱导至关重要。

[0084] 利用抗-OsGAP1 抗体进行蛋白质印迹分析,显示 OsGAP1 的基因表达与其基因产物产生之间有平行变化。图 6B 还标出了 21kDa 和 15.7kDa 分子量标记的位置。空心菱形:CBB14;空心三角形:SN1033。

[0085] 实施例 4

[0086] 转基因拟南芥品系的产生

[0087] 将 OsGAP1 编码序列插入花椰菜花叶病毒 35S 启动子控制下的二元载体 (Brears, T. 等, Plant Physiol. (1993) 103 :1285-1290)。采用土壤杆菌介导的真空侵入辅助方法 (Bechtold, N. 等, Methods Mol. Biol. (1998) 82 :259-266) 进行转化。通过后代表现出的卡那霉素耐受性(由二元载体的选择标记基因编码)表型的统计学(卡方检验)分析检验单插入事件。T1 代中 3 : 1(耐受性:敏感性)的比例提示有单插入事件。

[0088] 通过土壤杆菌介导的转化将重组构建物转移入拟南芥生态型 Col-0。筛选阳性转化体后,只繁殖含有单插入基因座的那些以获得纯合品系用于进一步实验。如实施例 3 所述,为验证转基因的表达,对 4 个独立纯合转化体的逆转录 RNA 样品进行实时 PCR(图 7A)。用于标准化结果的 tub4 的引物对应于拟南芥 β -微管蛋白 4(登录号:M21415), 其为 HMOL2530(5' GAAGGTGCT GAGTTGATTG 3')(SEQ ID NO:12)和 HMOL2531(5' GGACTTGACGTTGTTTGG 3')(SEQ ID NO:13)。来自 B-6-7 品系的信号最低,将其设置为 1 以便比较基因表达水平。延长 PCR 扩增未获得 Col-0 的信号。

[0089] 具体地说,收集含有 OsGAP1 的 6 周龄拟南芥品系 (B-6-7 ;C-9-4 ;D-2-9 ;和 J-7-5) 和未转化 Col-0 的叶片组织以制备总 RNA, 然后进行逆转录。利用用于标准化的 β -微管蛋白基因的表达水平,通过 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 方法计算相对基因表达。扩增 40 轮后在未转化 Col-0 中测不到 OsGAP1 的表达。将转基因品系 B-6-7(转基因表达最低的品系)的 OsGAP1 表达设置为 1 作为参比,以比较不同转基因品系中的 OsGAP1 表达。

[0090] 实施例 5

[0091] 转基因拟南芥中 OsGAP1 的表达增强防御标记基因的表达

[0092] 测试了 4 种防御标记基因的表达。

[0093] PR1 通常由水杨酸 (SA) 途径诱导,由茉莉酸 / 乙烯 (JA/ET) 途径抑制。

[0094] PR2 通常也由 SA 途径诱导,但该基因还受多种因素调节。

[0095] PDF1.2 由茉莉酸 / 乙烯 (JA/ET) 途径诱导,由 SA 途径抑制。

[0096] Thi2.1 由 JA 途径诱导,由 SA 和 ET 途径抑制。

[0097] 如实施例 3 所述,利用以下引物通过实时 PCR 测定表达:

[0098] PR1 :HMOL2265(5' TCAAGATAGCCCACAAGATTATC 3')(SEQ IDNO:14) 和 HMOL2266(5

' CTTCTCGTTCACATAATTCCCAC 3') (SEQ IDNO :15) ;

[0099] PR2 :HMOL2257 (5' ACCACCACTGATACGTCTCCTC 3') (SEQ IDNO :16) 和 HMOL2258 (5' AACTTCATACTTAGACTGTCGATC 3') (SEQ IDNO :17) ;

[0100] PDF1.2 :HMOL2911 (5' CCTTATCTTCGCTGCTCTTGT 3') (SEQ IDNO :18) 和 HMOL2912 (5' CCCTGACCATGTCCCACTTG 3') (SEQ IDNO :19) ;

[0101] Thi2.1 :HMOL2909 (5' AGCACTGCAAGTTAGGGTGTGA 3') (SEQ IDNO :20) 和 HMOL2910 (5' ACATTGTTCCGACGCTCCAT 3') (SEQ IDNO :21) 。

[0102] 在常规生长条件下的 6 周龄幼苗中,所有 4 种防御标记基因显示与野生型 Co1-0 相比表达增强 (图 7B)。将各转基因品系中 PR1 (实心)、PR2 (空心)、PDF1.2 (阴影线) 和 Thi2.1 (划点的) 的表达与 Co1-0 的表达 (表达水平设置为 1) 作比较。属于两种不同信号传导途径的 PR1 和 PDF1.2 的诱导倍数尤其高。这些结果表明 OsGAP1 蛋白可能参与多种信号传导途径。防御标记基因表达的增加程度与 OsGAP1 表达水平正相关。例如,显示 OsGAP1 表达水平较高的转基因品系 C-9-4 和 J-7-5 也较大程度地诱导 4 种防御标记基因的表达 (比较图 7A 和 7B)。

[0103] 为进一步阐明 OsGAP1 与 SA 和 JA 途径之间的关系,对显示 OsGAP1 高表达的转基因品系 C-9-4 和 J-7-5 进行 SA 和 JA 处理。这种激素处理不会改变由花椰菜花叶病毒 35S 启动子驱动的 OsGAP1 表达 (数据未显示)。另一方面,防御标记基因的表达模式受到影响。

[0104] 将含有 OsGAP1 的 6 周龄拟南芥转基因品系 (C-9-4 和 J-7-5) 和未转化的 Co1-0 浸入 (Pieterse, C. M. J. 等, Plant Cell (1998) 10 :1571-1580 ; Ton, J. 等, Mol. Plant-Microbe Interact. (2002) 15 :27-34) 含有 0.01% (v/v) SilwetL-77, 含 (实心柱) 或不含 (空心柱) 5mM SA 的 1/2 MS 培养基 (pH 6.0) 中 10 秒 (如图 8 所示)。经处理的植物进一步生长 2 天。如上所述进行样品制备和实时 PCR 实验。模拟处理的 Co1-0 用作比较的参比品 (表达水平设置为 1)。

[0105] 加入 SA 时,在 Co1-0 中发现强烈诱导 PR1 和 PR2 基因表达 (图 8A 和 8B)。尽管在 Co1-0 中有这种诱导,但 OsGAP1 转基因品系中 PR1 和 PR2 转录物的水平仍比野生型高数倍。相同处理条件下,观察到 PDF1.2 和 Thi2.1 基因表达受抑制 (图 8C 和 8D),特别是在转基因品系中。

[0106] 如上文 SA 所述,测试了补加 100 μ M JA 的影响,其与 SA 的结果截然不同。在图 9 中,实心柱表明有 JA 存在,空心柱表明没有 JA 存在。即使在转基因品系中,JA 亦强烈抑制 PR1 表达 (图 9A)。JA 对 PR2 基因表达的作用不明显 (图 9B)。该结果与以前发现单个因素可能不能抑制 PR2 表达相一致。虽然 JA 在 Co1-0 中略微诱导 PDF1.2 和 Thi2.1 表达,但 JA 不能进一步增强 OsGAP1 转基因品系中这些基因的表达 (略微高于未加 JA 的 Co1-0) (图 9C 和 9D)。

[0107] 实施例 6

[0108] OsGAP1 克隆在转基因拟南芥中的表达增强对细菌病原体丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 (Pst DC3000) 的耐受性

[0109] Pst DC3000 是可用于测试拟南芥中防御反应的常规病原体。

[0110] 拟南芥在生长室中生长 (温度 22-24 $^{\circ}$ C ;RH 70-80% ;光照强度 80-120 μ E, 16 小时白天 -8 小时黑夜周期)。如以前所述 (由 Falk, A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA(1999)96 :3292-3297 ;Kim, H. S. 等, Plant Cell(2002)14 :1469-1482 ;Uknes, S. 等, Plant Cell(1992)4 :645-656 改进) 进行丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 (Pst DC3000) 培养液的制备、接种 (通过浸渍方法) 和随后的滴度测定。对于植物激素处理相关的实验也采用浸渍方法 (由 Pieterse, C. M. J. 等, 同上 (1998) ;Ton, J. 等, 同上 (2002) 改进)。

[0111] 利用含有 OsGAP1 或空白载体 (V7) 的 6 周龄拟南芥转基因品系 (B-6-7 ;C-9-4 ;D-2-9 ;和 J-7-5) 以及未转化的 Col-0。通过浸渍方法将补加了 0.02% (v/v) Silwet L-77 的 10mM MgSO₄ 配制的浓度为 10⁸ 菌落形成单位 / 毫升的 Pst DC3000 接种入叶片组织。再培养 3 天后, 记录整株植物的表型, 收集莲座丛 (rosette) 叶片 (不是在感染的部位), 如上所述估计其中病原体的滴度 (每克新鲜重量的菌落形成单位)。

[0112] 当 Pst DC3000 接种入 Col-0 或用空白载体转化的拟南芥时, 疾病症状 (发黄和坏死) 逐渐显现。测试的所有转基因品系中, 这些疾病症状均得到减轻。红色箭头标出具有疾病症状的叶片 (图 10A)。还估计了莲座丛叶片内的细菌滴度 (图 10B)。所有转基因品系显示的菌落计数低于野生型 Col-0 或用空白载体转化的拟南芥。此外, 显示 OsGAP1 表达较高的转基因品系 C-9-4 和 J-7-5 (图 7A) 还得到较低的细菌滴度 (图 10B)。

[0113] 还检测了实施例 5 的 4 种防御标记基因的表达。接种 Pst DC3000 后, Col-0 中 PR1 和 PR2 转录物的水平增加 (数据未显示), 而该转基因品系中这些基因的表达水平甚至更高 (图 11)。该观察结果提示 OsGAP1 诱导信号可增加病原体接种引发的信号。虽然病原体接种未明显改变 Col-0 中 Thi2.1 的水平 (数据未显示), 但转基因品系中该基因的表达进一步增强 (图 11)。相比之下, 病原体接种后在 Col-0 中观察到 PDF1.2 的强烈抑制 (数据未显示), OsGAP1 的表达不能逆转这种抑制 (图 11)。该结果提示 PDF1.2 在转基因品系显示对 Pst DC3000 的耐受性增强中不起明显作用 (图 10)。

[0114] 实施例 7

[0115] 转基因拟南芥中 OsGAP1 的保护功能由 NPR1 介导

[0116] 在拟南芥中, NPR1 蛋白质是防御反应信号传导途径的关键成员。在稻中已见 NPR1 同源物 (NH1) 的报道, 但可用信息极少。NPR1 的功能可能涉及 SA 和 JA/ET 途径。利用拟南芥中丰富的突变株集合, 我们测试了 OsGAP1 与 NPR1 相关的作用。

[0117] 将含有 OsGAP1 基因的病毒载体转化入缺失 NPR1 的 npr1-3 突变株。收集在 npr1-3 (NPR1-缺乏的) 背景中含有 OsGAP1 的 8 周龄拟南芥转基因品系 (D-1、F-1、F-2、F-5、F-6、F-10 和 G-5)、未转化的 npr1-3 突变株和野生型 Col-0 的叶片组织。Col-0 用作比较的参比物 (表达水平设置为 1)。选择含单个插入基因座的阳性转化株用于进一步实验。

[0118] 验证与 Col-0 遗传背景的转基因表达相当的转基因拟南芥中的转基因表达之后 (数据未显示), 研究 4 种防御标记基因的表达水平。在 Col-0 背景中观察到转基因 OsGAP1 对 PR1 和 PDF1.2 表达的诱导作用 (图 7B) 未在 npr1-3 突变株 (图 12) 中观察到。事实上, 与 npr1-3 亲本相比, 在转基因品系中观察到 4 种防御标记基因中任一种的水平没有显著增加 (图 12)。

[0119] 随后, 转基因品系连同 npr1-3 突变株和野生型 Col-0 经受 Pst DC3000 攻击。利用在 npr1-3 背景中含有 OsGAP1 的 8 周龄拟南芥转基因品系 (D-1、F-1、F-2、F-5、F-6、F-10 和 G-5)、未转化的 npr1-3 突变株和野生型 Col-0。图 13A 中仅显示 F-2 品系、未转化的 npr1-3 突变株和 Col-0 的表型。所有转基因品系显示的表型类似于未转化的 npr1-3 突变株 (数

据未显示)。在 npr1-3 突变株中表达 OsGAP1 克隆未赋予明显的保护作用(比较图 10A 和 13A)。还估计了接种植物的莲座丛叶片中细菌病原体的滴度(图 13B)。与表型相一致,未观察到 OsGAP1 的保护作用。事实上,与 Col-0 相比,npr1-3 背景(含或不含 OsGAP1)的所有植株累积更多病原体。

[0120] 实施例 8

[0121] 构建 OsGAP1 转基因稻

[0122] 将编码本发明蛋白质的 OsGAP1(图 1A)亚克隆入双 T-DNA 二元载体 pSB130,并置于玉米泛素启动子的控制下。载体 pSB130 携带两个 T-DNA,其中一个含有潮霉素耐受性基因作为可选择标记,另一个在玉米泛素启动子的下游具有多克隆位点。然后将该构建物转化入根瘤土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)菌株 EHA105 以供随后转化入稻。图 14 显示利用基于玉米泛素启动子(正向引物),HMOL1333 :5' CTGATGCATATACATGATGG3'(SEQ ID NO :22) 和 OsGAP1(反向引物),HMOL2069 :5' CCTCAAGGACAGTAAAAGAATCTC3'(SEQ ID NO :23) 设计的引物对,通过 PCR 筛选 T2 转基因稻品系的结果。获得了总共 10 种 OsGAP1 转基因稻品系。泳道 1-11 分别代表 A1、A4、A6、A7、A9、A14、A15、A16、A17、A19、A25 转基因品系和野生型(爱知旭)。

[0123] 实施例 9

[0124] 稻中 OsGAP1 的过表达和增强的稻防御标记基因表达

[0125] 采用实时 PCR 研究转基因和稻防御标记基因的表达。从含单插入基因座的 8 周龄 T3 转基因稻品系和它们相同发育阶段的野生型植株(爱知旭)提取 RNA。图 15 显示 OsGAP1 过表达,因而转基因品系中 OsGAP1 蛋白累积增加。

[0126] 收集 8 周龄稻品系和野生型(爱知旭)的叶片组织以供 RNA 和蛋白质提取。在图 15A 中,野生型(爱知旭)的内源性 OsGAP1 表达用作比较的参照品(表达水平设置为 1)。在图 15B 中,利用抗-OsGAP1 抗体的蛋白质印迹分析显示了 OsGAP1 基因表达及其基因产物产生之间的平行改变。

[0127] 还采用实时 PCR 研究了 3 种稻防御标记基因(PR1、GRCWP 和 PBZ1)的表达,结果示于图 16A-16C。PR1 是熟知的 PR 蛋白,而富含甘氨酸的细胞壁蛋白(GRCWP 编码)是帮助增强细胞壁以阻止病原体攻击的结构蛋白。PBZ1 是因噻菌灵(probenazole)(PBZ)的诱导作用而鉴定的克隆。该基因也可由 N-氰基甲基-2-氯-异烟酰胺(已知诱导疾病耐受性的另一组化合物)和接种稻瘟菌(M. grisea)诱导。在不相容的稻中,稻瘟菌诱导 PBZ1 更快。此外,防御信号转导基因 NH1 的过表达诱导 PR1 和 PBZ1。对于实时 PCR,引物如下所示:

[0128] 稻 PR1 (BF889437) 实时 PCR 正向引物 ;HMOL5364 :5' CGGACAGAGGCCTTACTAAGTTATT3' (SEQ ID NO :24) ;

[0129] 稻 PR1 (BF889437) 实时 PCR 反向引物 ;HMOL5365 :5' GACCTGTTTACATTTTCACGTCTTTATT3' (SEQ ID NO :25) ;

[0130] 稻富含甘氨酸的细胞壁蛋白 (BF889438) 实时 PCR 正向引物 ;HMOL5376 :5' GAGGCAACGGACACCACTAAG3" (SEQ ID NO :26) ;

[0131] 稻富含甘氨酸的细胞壁蛋白 (BF889438) 实时 PCR 反向引物 ;HMOL5377 :5' TGTAAGCAGAGAGAGAGGCTCATT3" (SEQ ID NO :27) ;

[0132] 稻 PBZ1 (D38170) 实时 PCR 正向引物 ;HMOL5409 :5' AAGCTCAAGTCACACTCGAC3" (SEQ

ID NO :28) ;

[0133] 稻 PBZ1 (D38170) 实时 PCR 反向引物 ;HMOL5410 :5' GATGTCCTTCTCCTTCTCC3" (SEQ ID NO :29)。

[0134] 总之,这三种防御标记基因的诱导程度与 OsGAP1 表达水平正相关。例如,显示 OsGAP1 表达水平最高的转基因品系 A7 也最大程度地诱导 3 种防御标记基因的表达(比较图 15 和 16A-16C)。

[0135] 实施例 10

[0136] 证实稻中 OsGAP1 增强的防御标记并增强的防御作用

[0137] 在类似于实施例 9 的另一组转化株中,测试了 OsGAP 表达对防御标记基因表达和通过减轻病损而赋予的实际防御作用的影响。

[0138] 如实施例 9 所述,将玉米泛素启动子控制下的 OsGAP1 表达构建物转化入对 Xoo 不显示耐受性的稻栽培品种爱知旭。筛选 T4 代的各植株中是否存在该转基因。OsGAP1 转录物水平的增加表明该转基因成功表达(图 17A)。还检测了参与不同信号传导途径的防御标记基因的表达,包括,(i) 编码发病机理相关 1 蛋白的 PR1 ;(ii) 编码富含甘氨酸细胞壁蛋白的 GRCWP,和 (iii) 噻菌灵和 N- 氰基甲基 -2- 氯 - 异烟酰胺(已知诱导疾病耐受性的另一组化合物)以及真菌枯萎病病原体(fungal blast pathogen) 稻瘟菌(Magnaporthe grisea) 诱导的 PBZ1。在未接种任何病原体的转基因品系中选择的所有 3 种防御标记基因的表达升高(图 17B)。用 Xoo 菌株 LN44、T1 和 P6 攻击 T2 植物。通过检测平均病损区域%作为定量参数,转基因品系(T4 代)显示明显的保护作用(图 17C 和 18)。

序列表

<110> 香港中文大学 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG)

林汉明 (LAM, Hon-Ming)

辛世文 (SUN, Sai-Ming Samuel)

<120> 增强植物外伤耐受性的方法

<130>549072000640

<140> 未指定

<141>2008-06-19

<150>US 60/945, 887

<151>2007-06-22

<150>US 61/040, 354

<151>2008-03-28

<160>36

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>1

acatattgta caactttgct ctgccc

26

<210>2

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>2

cctcaaggac agtaaaagaa tctc

24

<210>3

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>3

ttgtccactg ataaacttag agttg

25

<210>4

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>4

agctatgcaa gactgtaagc aatagg

26

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>5

atgttggggc atctggttgg

20

<210>6

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>6

ccgaattcat gttggggcat ctggttg

27

<210>7

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>7

cgctgcaggt catacacct tagaacc

27

<210>8

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>8

cttcatagga atggaagctg cgggta

26

<210>9

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>9 gaccaccttg atcttcatgc tgcta	25
<210>10 <211>20 <212>DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400>10 tccggagtgg aacgatgaac	20
<210>11 <211>19 <212>DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400>11 gatgtccagc tccgattg	19
<210>12 <211>19 <212>DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400>12 gaaggtgctg agttgattg	19
<210>13 <211>18 <212>DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>13

ggacttgacg ttgtttgg

18

<210>14

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>14

tcaagatagc ccacaagatt atc

23

<210>15

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>15

cttctcgttc acataattcc cac

23

<210>16

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>16

accaccactg atacgtctcc tc

22

<210>17

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>17

aacttcatac ttagactgtc gate

24

<210>18

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>18

ccttatcttc gctgctcttg t

21

<210>19

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>19

ccctgacat gtcccacttg

20

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>20

agcactgcaa gttagggtgt ga

22

<210>21

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>21

acattgttcc gacgctccat

20

<210>22

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>22

ctgatgcata tacatgatgg

20

<210>23

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>23

cctcaaggac agtaaaagaa tctc

24

<210>24

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>24

cggacagagg ccttactaag ttattt

26

<210>25

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>25

gacctgttta cattttcag tctttatt

28

<210>26

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>26

gaggcaacgg acaccactaa g

21

<210>27

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>27

tgtaaagcag agagagaggc tcatt 25

<210>28

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>28

aagctcaagt cacactcgac 20

<210>29

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>29

gatgtccttc tccttctcc 19

<210>30

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400>30

Asn Cys Arg Val Ile Lys Lys Thr Thr Asn Pro Glu Trp Asn Asp Glu

1

5

10

15

Cys

<210>31

<211>498

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (498)

<400>31

```

atg ttg ggg cat ctg gtt ggg ctg gtg aag gtg cgg gtg gtg agg ggc 48
Met Leu Gly His Leu Val Gly Leu Val Lys Val Arg Val Val Arg Gly
  1           5           10          15
gtc aac ctc gcc gtc cgc gac ctc cgc tcc agc gac ccc tac gtc atc 96
Val Asn Leu Ala Val Arg Asp Leu Arg Ser Ser Asp Pro Tyr Val Ile
          20           25           30
gtc cgc atg ggc aag cag aag ttg aag aca cga gtc ata aaa aag act 144
Val Arg Met Gly Lys Gln Lys Leu Lys Thr Arg Val Ile Lys Lys Thr
          35           40           45
acc aat ccg gag tgg aac gat gaa ctc acc ctc tcg atc gaa gat cca 192
Thr Asn Pro Glu Trp Asn Asp Glu Leu Thr Leu Ser Ile Glu Asp Pro
          50           55           60
gca gtt cct gtt aga ctg gaa gtg tat gac aaa gac aca ttc atc gat 240
Ala Val Pro Val Arg Leu Glu Val Tyr Asp Lys Asp Thr Phe Ile Asp
          65           70           75           80
gat gca atg ggc aat gcg gag ctg gac atc cgc cca ttg gtg gag gtt 288
Asp Ala Met Gly Asn Ala Glu Leu Asp Ile Arg Pro Leu Val Glu Val
          85           90           95
gtc aag atg aag att gag ggt gtt gct gac aac acg gtt gtg aag aaa 336
Val Lys Met Lys Ile Glu Gly Val Ala Asp Asn Thr Val Val Lys Lys
          100          105          110
gtg gta ccc aat aga cag aac tgc cta gct gaa gag agc acg ata tat 384
Val Val Pro Asn Arg Gln Asn Cys Leu Ala Glu Glu Ser Thr Ile Tyr
          115          120          125
atc tct gag ggg aag gtg aag caa gac gtg gtt ctc aga cta agg gat 432
Ile Ser Glu Gly Lys Val Lys Gln Asp Val Val Leu Arg Leu Arg Asp
          130          135          140
gtg gaa tgc ggg gaa att gag ctc cag ctt cag tgg gtc gac atc cca 480

```

```

Val Glu Cys Gly Glu Ile Glu Leu Gln Leu Gln Trp Val Asp Ile Pro
145              150              155              160
ggt tct aag ggt gta tga
Gly Ser Lys Gly Val *
              165

```

<210>32

<211>165

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>合成构建物

<400>32

```

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

```

<210>33

<211>177

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 拟南芥 OsGAP1 同源合成构建物

<400>33

```

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

```

Leu

<210>34

<211>1185

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (1185)

<400>34

```

atg ccg ccc aag gcg tcc aag aag gac gcc gcc ccc gcc gag cgc ccc 48
Met Pro Pro Lys Ala Ser Lys Lys Asp Ala Ala Pro Ala Glu Arg Pro
1          5          10          15

atc ctc ggc cgc ttc tcc tcc cac ctc aag atc ggg atc gtt ggg tta 96
Ile Leu Gly Arg Phe Ser Ser His Leu Lys Ile Gly Ile Val Gly Leu
          20          25          30

cca aat gtt ggc aaa tcc act ttc ttt aac ata gta aca aag ctg tct 144
Pro Asn Val Gly Lys Ser Thr Phe Phe Asn Ile Val Thr Lys Leu Ser
          35          40          45

atc cca gct gag aac ttc cct ttc tgt acc atc gac cca aat gag gca 192
Ile Pro Ala Glu Asn Phe Pro Phe Cys Thr Ile Asp Pro Asn Glu Ala
          50          55          60

cgg gta tat gtt cca gat gag aga ttt gat tgg ctt tgt caa ctt tac 240
Arg Val Tyr Val Pro Asp Glu Arg Phe Asp Trp Leu Cys Gln Leu Tyr
          65          70          75          80

aag cca aag agt gag gtg tct gca tat cta gaa atc aat gac ata gcc 288
Lys Pro Lys Ser Glu Val Ser Ala Tyr Leu Glu Ile Asn Asp Ile Ala
          85          90          95

ggg ctt gtt aga gga gcc cat gct ggg gag ggt ttg ggc aat gcc ttc 336
Gly Leu Val Arg Gly Ala His Ala Gly Glu Gly Leu Gly Asn Ala Phe
          100          105          110

cta tcc cat ata cgc gct gtt gat gga att ttt cat gta ttg aga gca 384
Leu Ser His Ile Arg Ala Val Asp Gly Ile Phe His Val Leu Arg Ala
          115          120          125

ttt gaa gac aaa gaa gtt act cat att gat gat tca gtg gat cct gtt 432
Phe Glu Asp Lys Glu Val Thr His Ile Asp Asp Ser Val Asp Pro Val
          130          135          140

aga gat ttg gaa act att ggt gaa gag ctg aga ctc aag gac att gag 480
Arg Asp Leu Glu Thr Ile Gly Glu Glu Leu Arg Leu Lys Asp Ile Glu
          145          150          155          160

ttt gtg cag aac aaa att gat gac ctt gag aaa tca atg aag aga agc 528
Phe Val Gln Asn Lys Ile Asp Asp Leu Glu Lys Ser Met Lys Arg Ser
          165          170          175

```

aat gat aag cag ctg aaa ctc gag cat gaa tta tgt gag aag gtc aaa	576
Asn Asp Lys Gln Leu Lys Leu Glu His Glu Leu Cys Glu Lys Val Lys	
180 185 190	
gcc cat ctt gaa gat gga aag gat gtc cgc ttt gga gat tgg aaa agt	624
Ala His Leu Glu Asp Gly Lys Asp Val Arg Phe Gly Asp Trp Lys Ser	
195 200 205	
gct gac att gag atc ttg aat acc ttc cag cta ctt aca gct aag cca	672
Ala Asp Ile Glu Ile Leu Asn Thr Phe Gln Leu Leu Thr Ala Lys Pro	
210 215 220	
gtt gtc tat ttg gtg aac atg agt gag aag gac tac cag agg aaa aag	720
Val Val Tyr Leu Val Asn Met Ser Glu Lys Asp Tyr Gln Arg Lys Lys	
225 230 235 240	
aac aag ttc cta cct aag ata cat gcc tgg gtt cag gaa cat ggt ggt	768
Asn Lys Phe Leu Pro Lys Ile His Ala Trp Val Gln Glu His Gly Gly	
245 250 255	
gaa act att att cct ttt agc tgt gct ttt gaa agg ttg cta gcg gat	816
Glu Thr Ile Ile Pro Phe Ser Cys Ala Phe Glu Arg Leu Leu Ala Asp	
260 265 270	
atg ccc ccg gat gaa gct gct aaa tat tgt gct gaa aac cag att gca	864
Met Pro Pro Asp Glu Ala Ala Lys Tyr Cys Ala Glu Asn Gln Ile Ala	
275 280 285	
agt gtg atc cca aaa att atc aag act ggt ttt gca gca atc cat ctt	912
Ser Val Ile Pro Lys Ile Ile Lys Thr Gly Phe Ala Ala Ile His Leu	
290 295 300	
ata tac ttt ttc act gct ggc cct gac gag gta aag tgt tgg cag atc	960
Ile Tyr Phe Phe Thr Ala Gly Pro Asp Glu Val Lys Cys Trp Gln Ile	
305 310 315 320	
aga cgt caa act aaa gca cct caa gct gct ggt aca att cac act gat	1008
Arg Arg Gln Thr Lys Ala Pro Gln Ala Ala Gly Thr Ile His Thr Asp	
325 330 335	
ttt gag aga ggc ttc ata tgc gct gag gta atg aag ttc gac gat cta	1056
Phe Glu Arg Gly Phe Ile Cys Ala Glu Val Met Lys Phe Asp Asp Leu	
340 345 350	
aaa gaa ctg ggt agt gaa tct gct gtg aag gct gct gga aaa tac agg	1104
Lys Glu Leu Gly Ser Glu Ser Ala Val Lys Ala Ala Gly Lys Tyr Arg	
355 360 365	
cag gaa ggg aag acc tac gtg gta cag gac ggg gat atc atc ttc ttt	1152
Gln Glu Gly Lys Thr Tyr Val Val Gln Asp Gly Asp Ile Ile Phe Phe	
370 375 380	

aaa ttt aac gtg tct gga ggt gga aag aag tga 1185
 Lys Phe Asn Val Ser Gly Gly Gly Lys Lys *
 385 390

<210>35

<211>394

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>合成构建物

<400>35

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

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

<210>36

<211>394

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 拟南芥 OsYchF1 同源合成构建物

<400>36

Met Pro Pro Lys Ala Lys Ala Lys Asp Ala Gly Pro Val Glu Arg Pro
 1 5 10 15
 Ile Leu Gly Arg Phe Ser Ser His Leu Lys Ile Gly Ile Val Gly Leu
 20 25 30
 Pro Asn Val Gly Lys Ser Thr Leu Phe Asn Thr Leu Thr Lys Leu Ser

35	40	45
Ile Pro Ala Glu Asn Phe	Pro Phe Cys Thr	Ile Glu Pro Asn Glu Ala
50	55	60
Arg Val Asn Ile Pro Asp	Glu Arg Phe Asp	Trp Leu Cys Gln Thr Tyr
65	70	75
Lys Pro Lys Ser Glu Ile	Pro Ala Phe Leu	Glu Ile His Asp Ile Ala
85	90	95
Gly Leu Val Arg Gly Ala	His Glu Gly Gln	Gly Leu Gly Asn Asn Phe
100	105	110
Leu Ser His Ile Arg Ala	Val Asp Gly Ile	Phe His Val Leu Arg Ala
115	120	125
Phe Glu Asp Ala Asp Ile	Ile Ile His Val	Asp Asp Ile Val Asp Pro Val
130	135	140
Arg Asp Leu Glu Thr Ile	Thr Glu Glu Leu	Arg Leu Lys Asp Ile Glu
145	150	155
Phe Val Gly Lys Lys Ile	Asp Asp Val Glu	Lys Ser Met Lys Arg Ser
165	170	175
Asn Asp Lys Gln Leu Lys	Ile Glu Leu Glu	Leu Leu Gln Lys Val Lys
180	185	190
Ala Trp Leu Glu Asp Gly	Lys Asp Val Arg	Phe Gly Asp Trp Lys Thr
195	200	205
Ala Asp Ile Glu Ile Leu	Asn Thr Phe Gln	Leu Leu Ser Ala Lys Pro
210	215	220
Val Val Tyr Leu Ile Asn	Leu Asn Glu Arg	Asp Tyr Gln Arg Lys Lys
225	230	235
Asn Lys Phe Leu Pro Lys	Ile His Ala Trp	Val Gln Glu His Gly Gly
245	250	255
Asp Thr Met Ile Pro Phe	Ser Gly Val Phe	Glu Arg Ser Leu Ala Asp
260	265	270
Met Ala Pro Asp Glu Ala	Ala Lys Tyr Cys	Glu Glu Asn Lys Leu Gln
275	280	285
Ser Ala Leu Pro Arg Ile	Ile Lys Thr Gly	Phe Ser Ala Ile Asn Leu
290	295	300
Ile Tyr Phe Phe Thr Ala	Gly Pro Asp Glu	Val Lys Cys Trp Gln Ile
305	310	315
Arg Arg Gln Ser Lys Ala	Pro Gln Ala Ala	Gly Ala Ile His Thr Asp
325	330	335
Phe Glu Arg Gly Phe Ile	Cys Ala Glu Val	Met Lys Phe Glu Asp Leu
340	345	350

Lys Glu Leu Gly Asn Glu Pro Ala Val Lys Ala Ala Gly Lys Tyr Arg
355 360 365

Gln Glu Gly Lys Thr Tyr Val Val Gln Asp Gly Asp Ile Ile Phe Phe
370 375 380

Lys Phe Asn Val Ser Gly Gly Gly Lys Lys
385 390

```

atgttggggcatctggttgggctggtgaaggtgcgggtggtgagggggcgtcaacctcgcc
M L G H L V G L V K V R V V R G V N L A
gtccgcacctccgctccagcgaccctacgcatcgccgatgggcaagcagaagttg
V R D L R S S D P Y V I V R M G K Q K L
aagacacgagtcataaaaaagactaccaatccggagtggaacgatgaactcaccctctcg
K T R V I K K T T N P E W N D E L T L S
atcgaagatccagcagttcctgttagactggaagtgtatgacaaagacacattcatcgat
I E D P A V P V R L E V Y D K D T F I D
gatgcaatgggcaatgctggagctggacatccgccattggtggaggttgtcaagatgaag
D A M G N A E L D I R P L V E V V K M K
attgagggtgttctgacaacacggttgtgaagaaagtggtacccaatagacagaactgc
I E G V A D N T V V K K V V P N R Q N C
ctagctgaagagagcagcatatatactctgaggggaaggtgaagcaagacgtggttctc
L A E E S T I Y I S E G K V K Q D V V L
agactaagggtatgtggaatgcggggaaattgagctccagcttcagtgggtcgacatccca
R L R D V E C G E I E L Q L Q W V D I P
ggttctaagggtgtatga
G S K G V -
    
```

覆盖OsGAP1编码区的DNA序列

图 1A

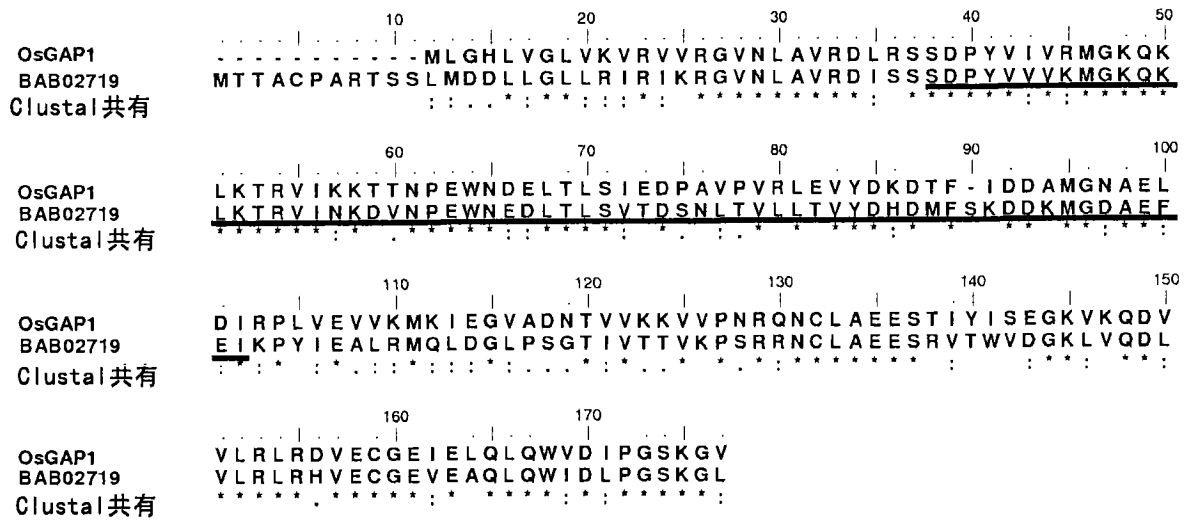
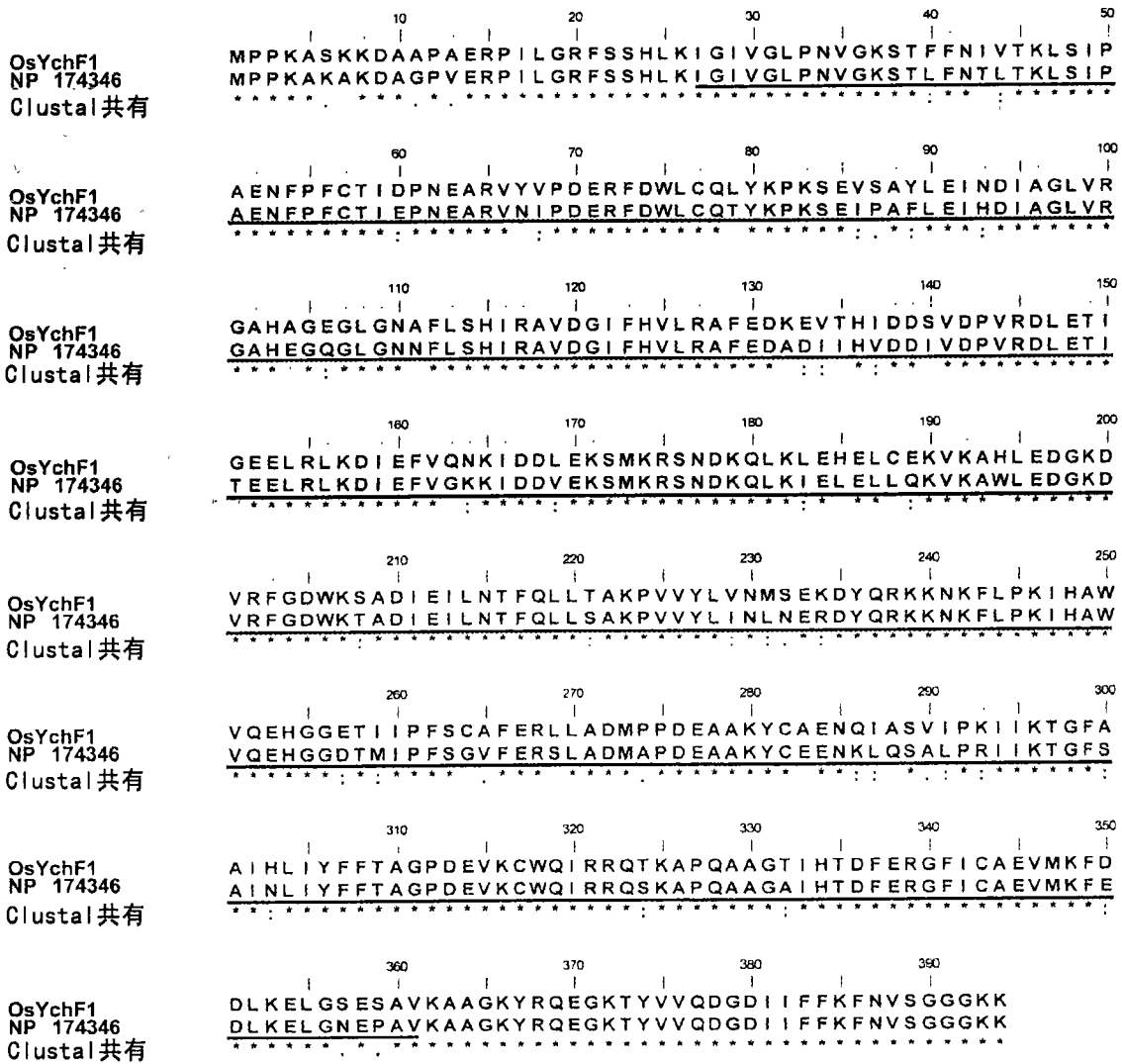


图 1B

atgccgccaagcgtccaagaaggacgcgccccgcgagcgccccatcctcgccgc
 M P P K A S K K D A A P A E R P I L G R
 ttctctcccacctaagatcgggatcgttgggttaccaaatgttgcaaatccacttc
 F S S H L K I G I V G L P N V G K S T F
 tttaacatagtaacaaaagctgtctatcccagctgagaacttcctttctgtaccatcgac
 F N I V T K L S I P A E N F P F C T I D
 ccaaataaggcaccgggtatatgttccagatgagagatttgattggctttgtcaactttac
 P N E A R V Y V P D E R F D W L C Q L Y
 aagccaaagagtgggtgtctgcatactagaaatcaatgacatagccgggcttggtaga
 K P K S E V S A Y L E I N D I A G L V R
 ggagcccatgctgggagggttgggcaatgccttcctatcccatatacgcgctgttgat
 G A H A G E G L G N A F L S H I R A V D
 ggaatttttcatgtatgagagcatttgaagacaagaagttactcatattgatgattca
 G I F H V L R A F E D K E V T H I D D S
 gtggatcctgttagagatttggaaactattggtgaagagctgagactcaaggacattgag
 V D P V R D L E T I G E E L R L K D I E
 tttgtgcagaacaaaattgatgaccttgagaaatcaatgaagagaagcaatgataagcag
 F V Q N K I D D L E K S M K R S N D K Q
 ctgaaactcgagcatgaattatgtgagaaggtcaaagcccatcttgaagatggaaggat
 L K L E H E L C E K V K A H L E D G K D
 gtcgctttggagattggaaaagtgtgacattgagatcttgaataccttccagctactt
 V R F G D W K S A D I E I L N T F Q L L
 acagctaagccagttgtctatttgggtgaacatgagtgagaaggactaccagaggaaaaag
 T A K P V V Y L V N M S E K D Y Q R K K
 aacaagttcctacctaagatacatgcctgggtcaggaacatggtggtgaaactattatt
 N K F L P K I H A W V Q E H G G E T I I
 ccttttagctgtgcttttgaagggttgcctagcggatagccccggatgaagctgctaaa
 P F S C A F E R L L A D M P P D E A A K
 tattgtgctgaaaaccagattgcaagtgtgatcccaaaaattatcaagactggttttgca
 Y C A E N Q I A S V I P K I I K T G F A
 gcaatccatcttatatacttttccactgctggccctgacgaggtaaagtgttggcagatc
 A I H L I Y F F T A G P D E V K C W Q I
 agacgtcaaactaaagcacctcaagctgctggtacaattcacactgattttgagagggc
 R R Q T K A P Q A A G T I H T D F E R G
 ttcatatgcgctgaggtaatgaagttcgacgatctaaaagaactgggtagtgaatctgct
 F I C A E V M K F D D L K E L G S E S A
 gtgaaggctgctggaaaatacaggcaggaagggaagacctacgtggtacaggacggggat
 V K A A G K Y R Q E G K T Y V V Q D G D
 atcatcttctttaaatttaacgtgtctggaggtggaagaagtga
 I I F F K F N V S G G G K K -

覆盖OsYchF1编码区的DNA序列

图 2A



OsYchF1与其拟南芥同源物的比对

图 2B

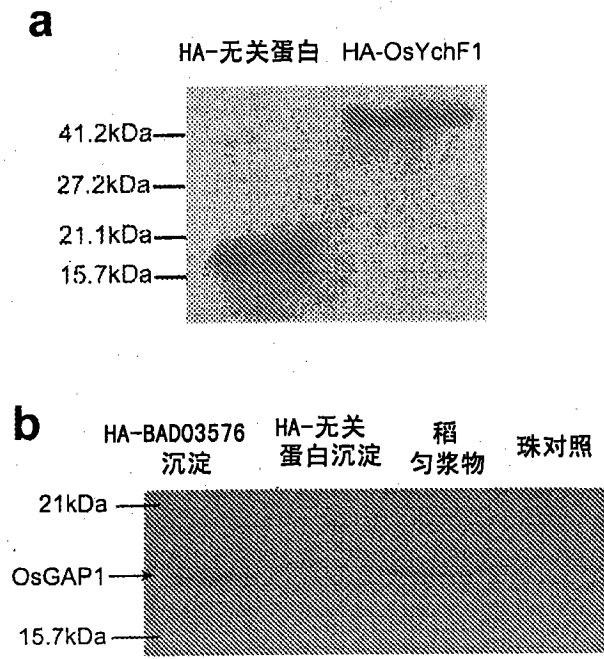


图 3

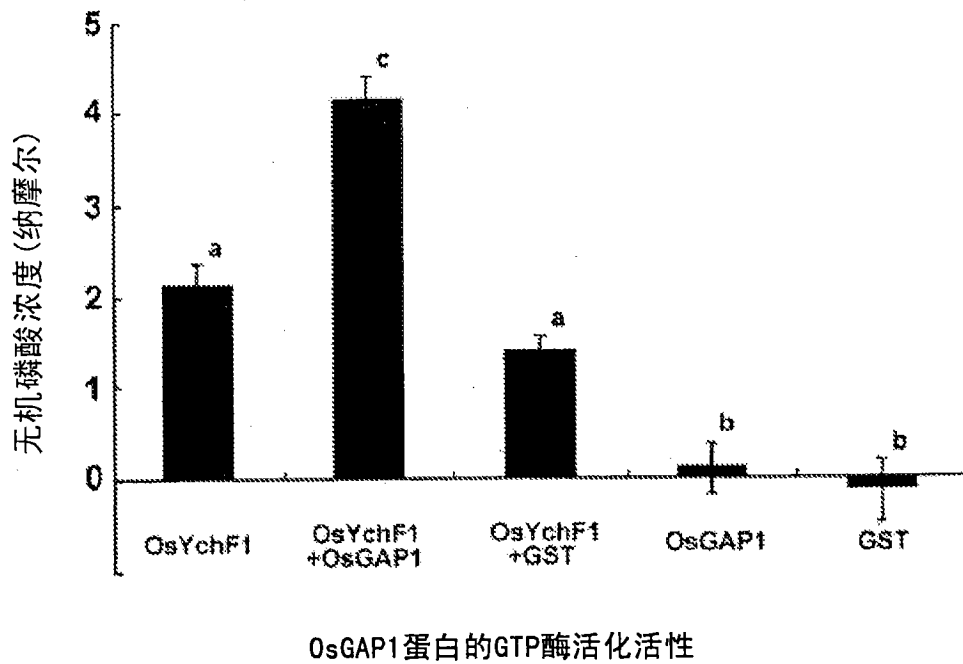


图 4

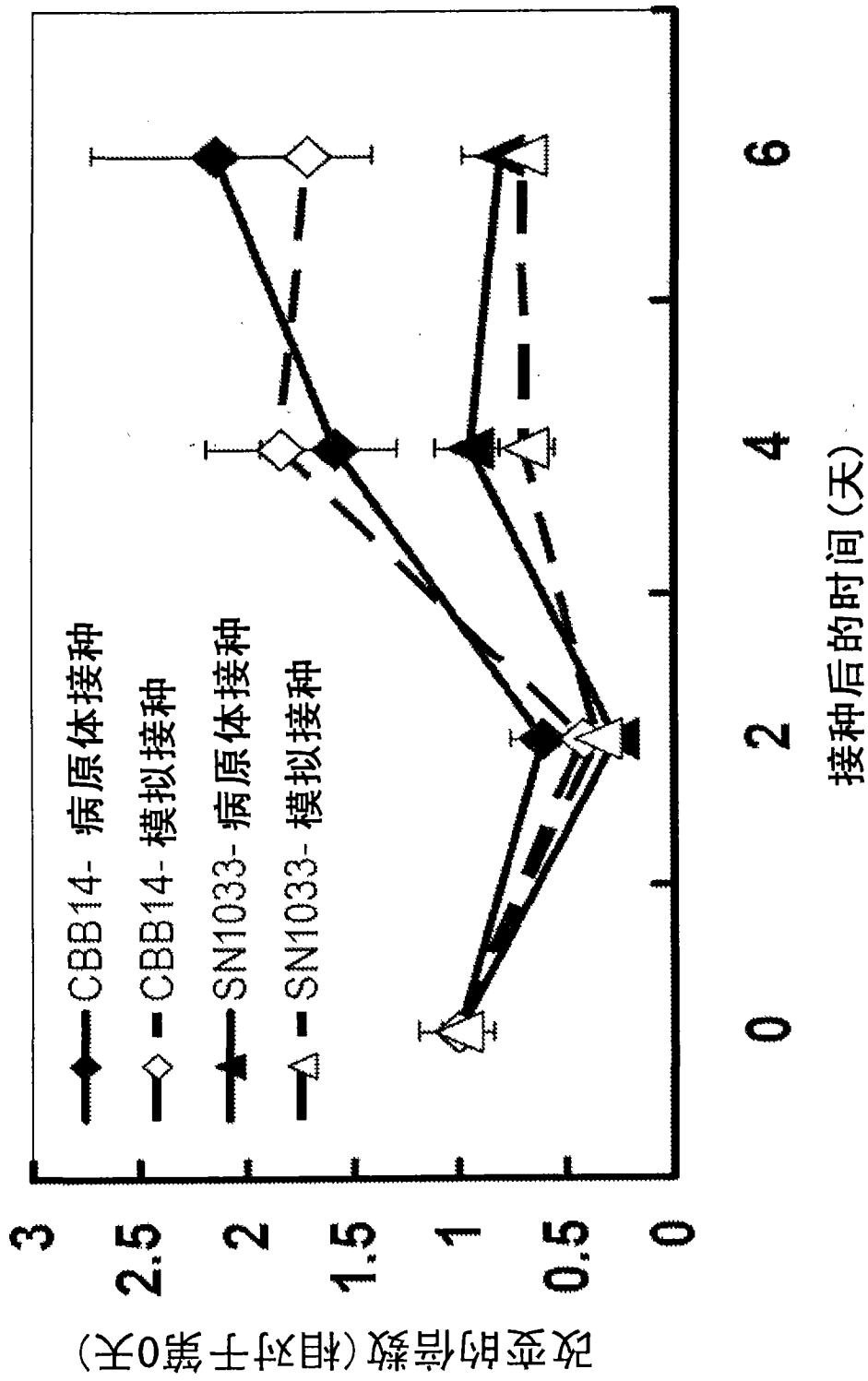


图 5

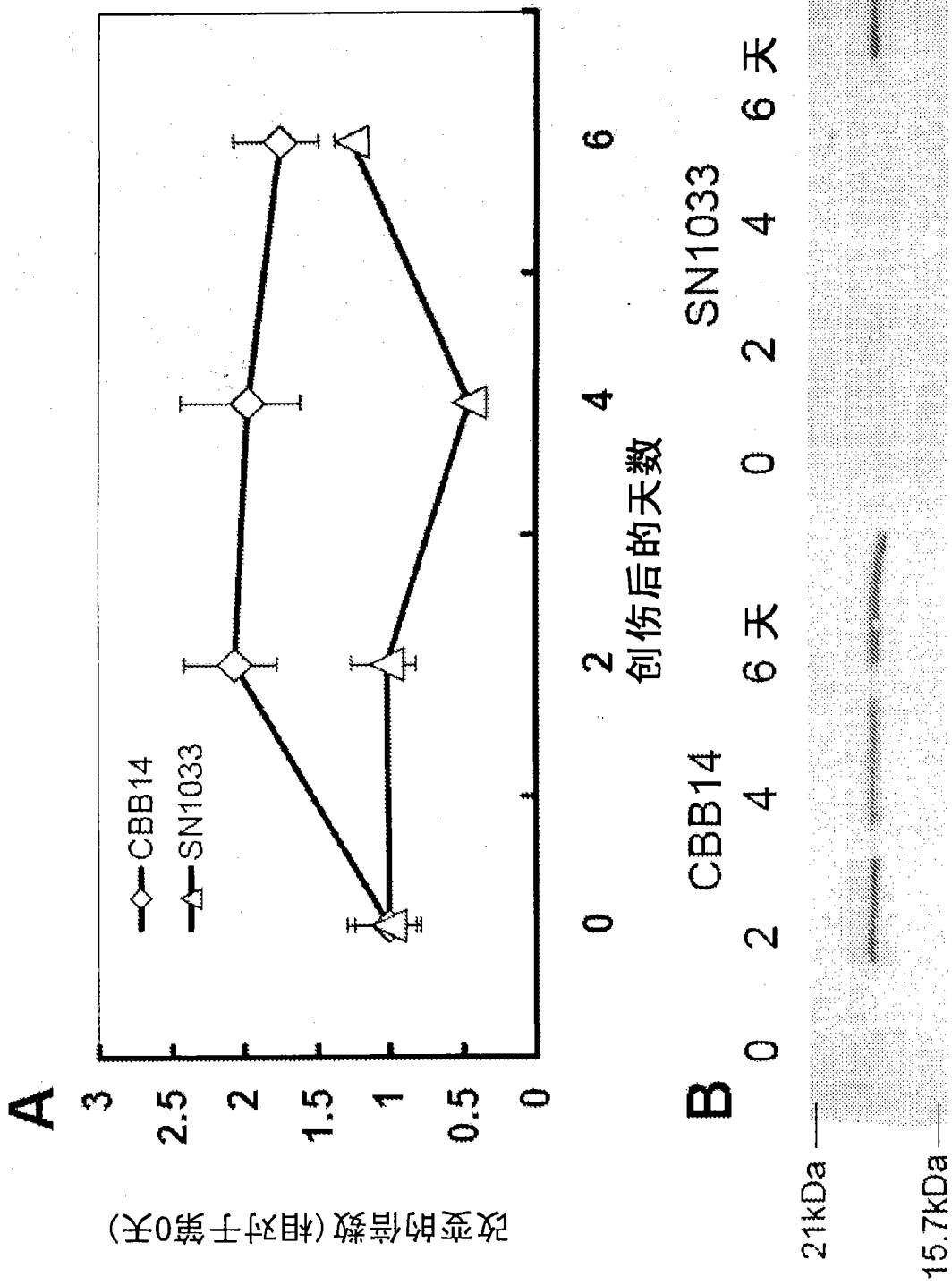


图 6

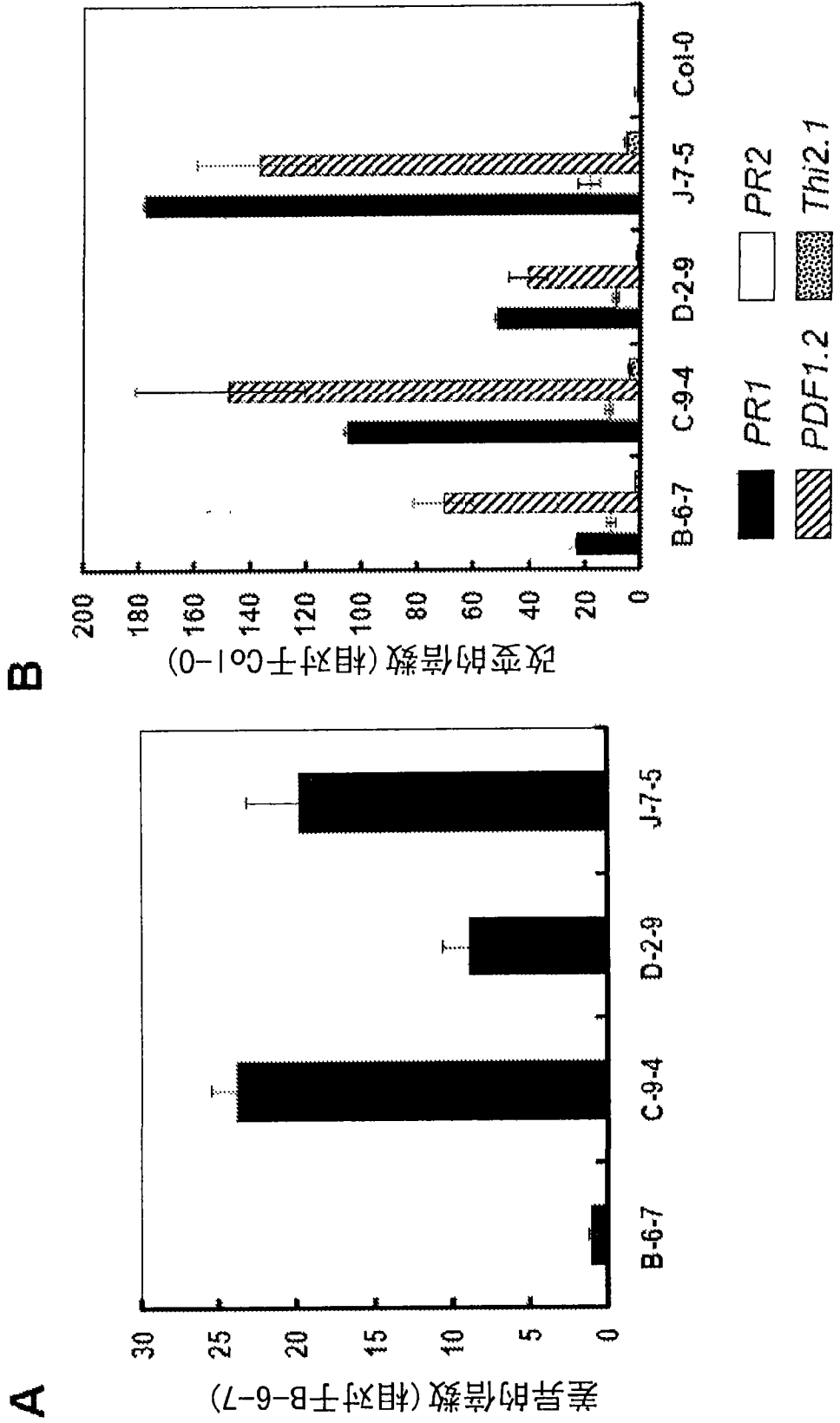


图 7

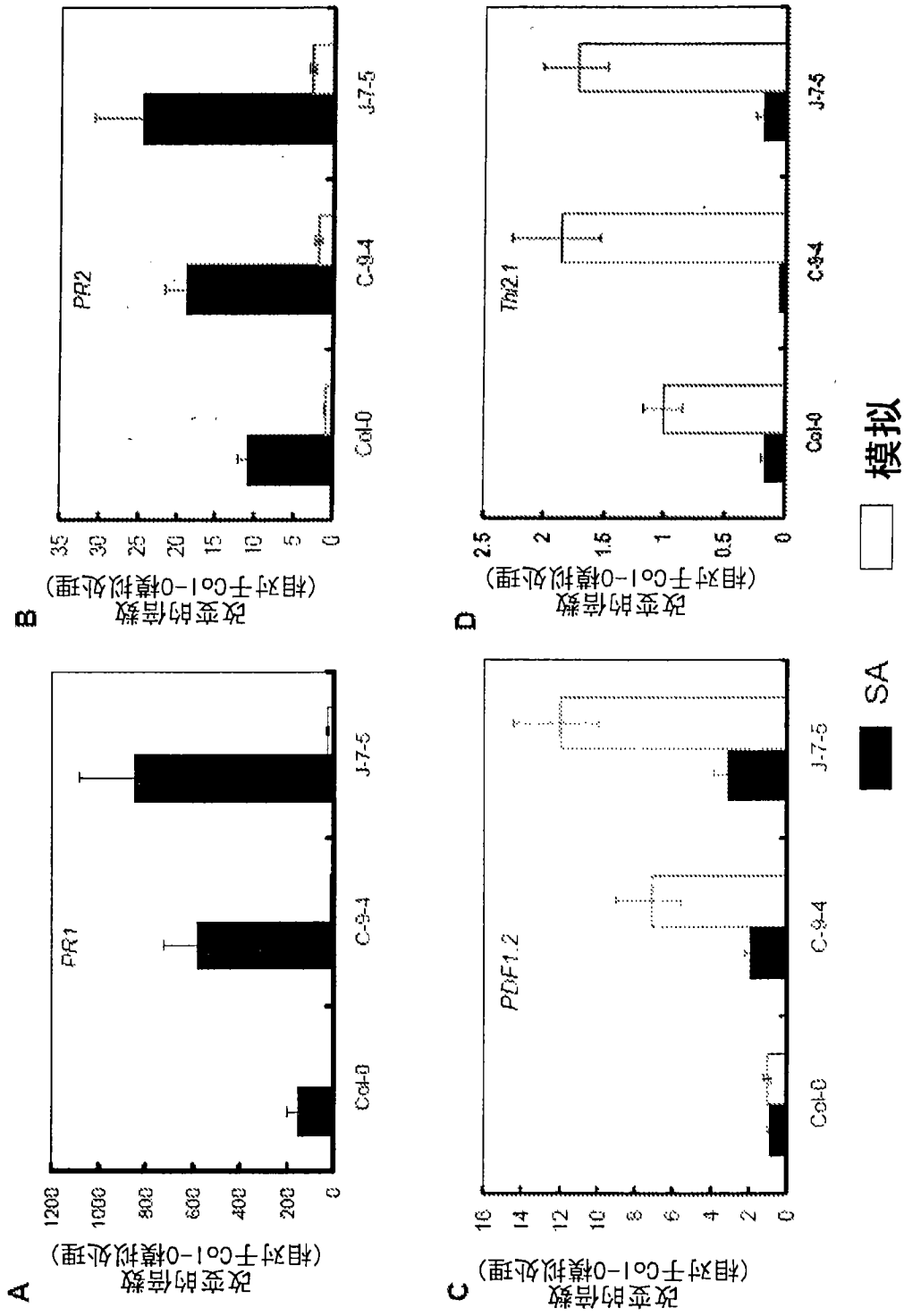


图 8

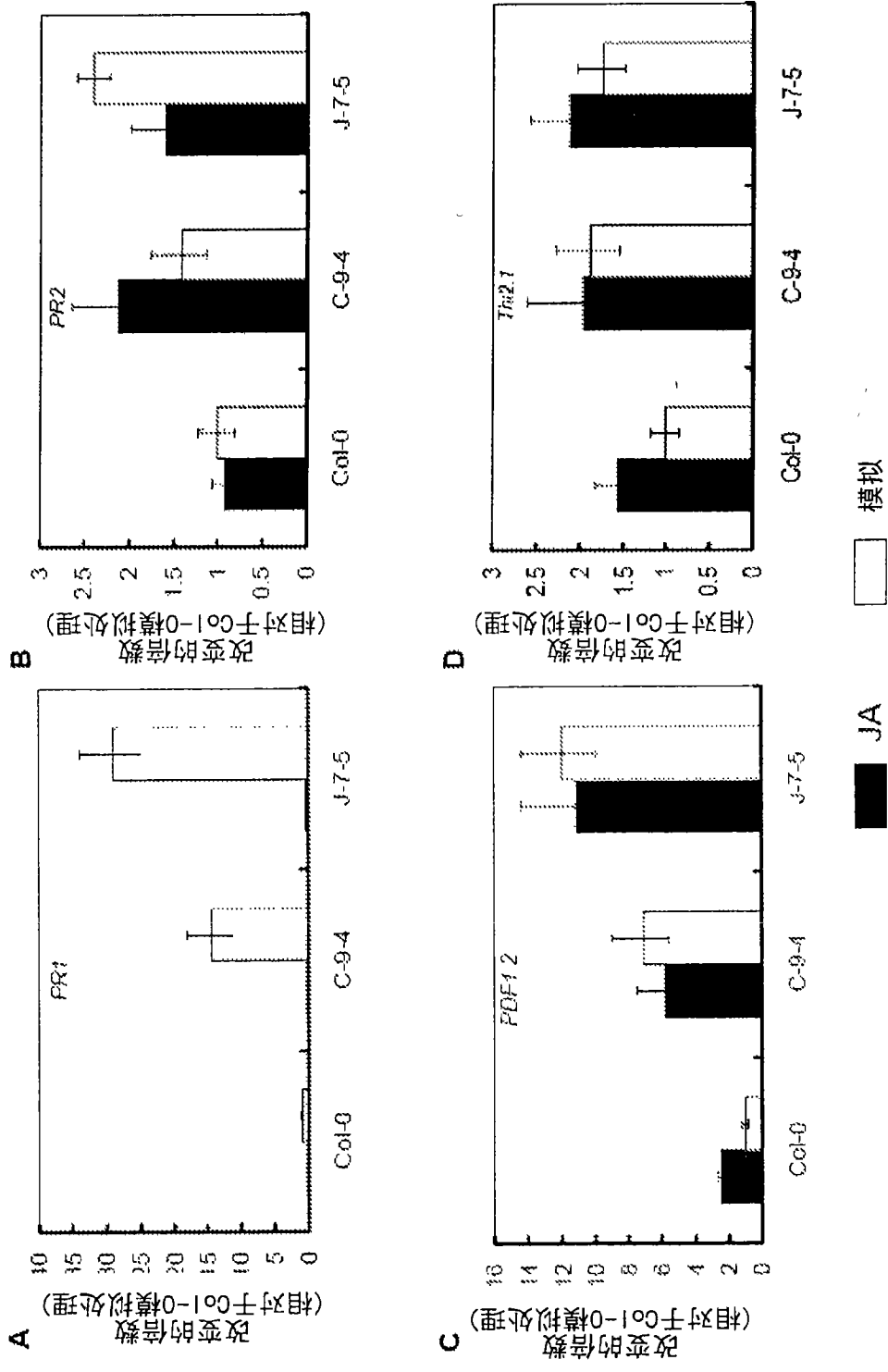


图 9

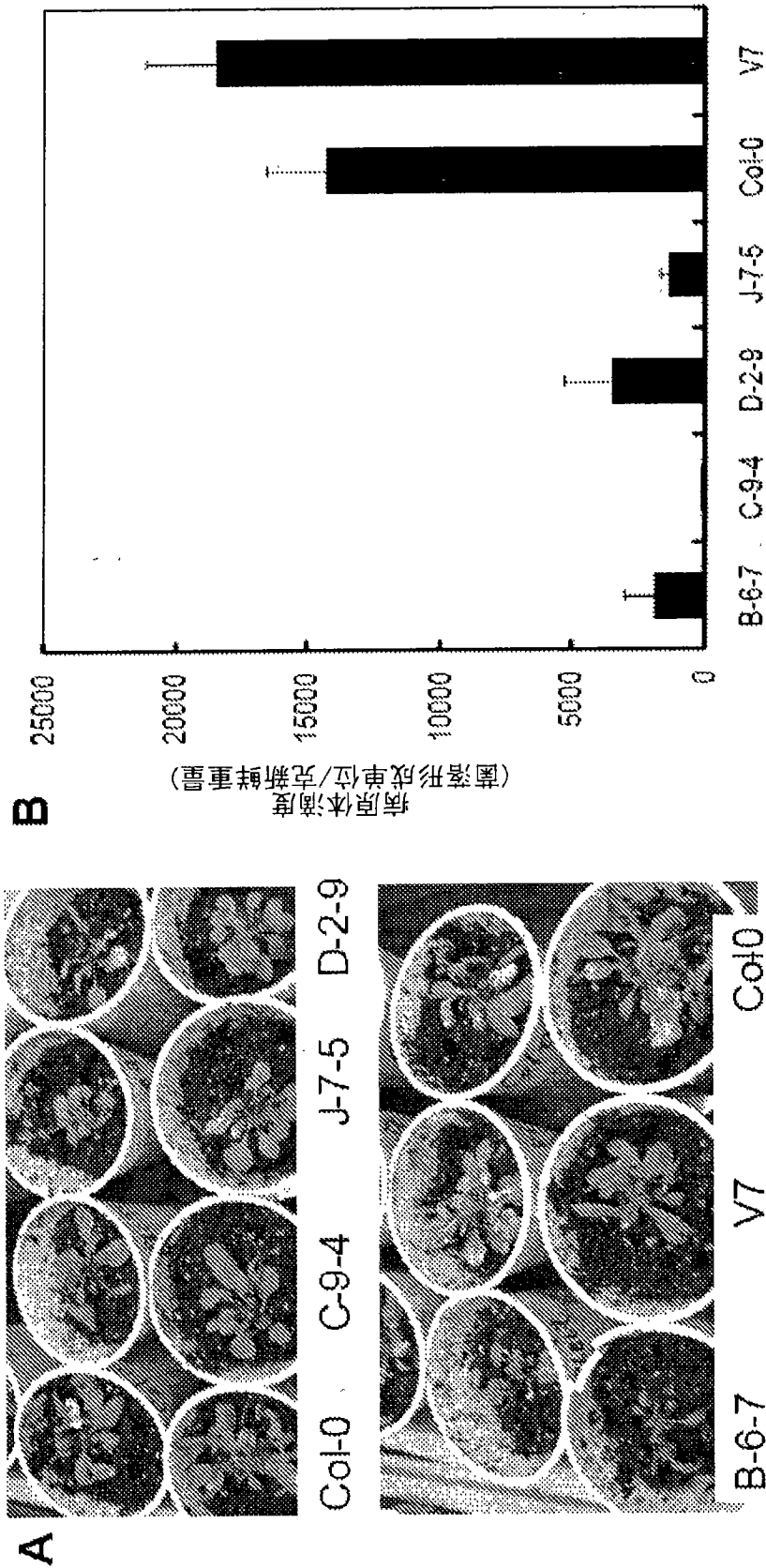


图 10

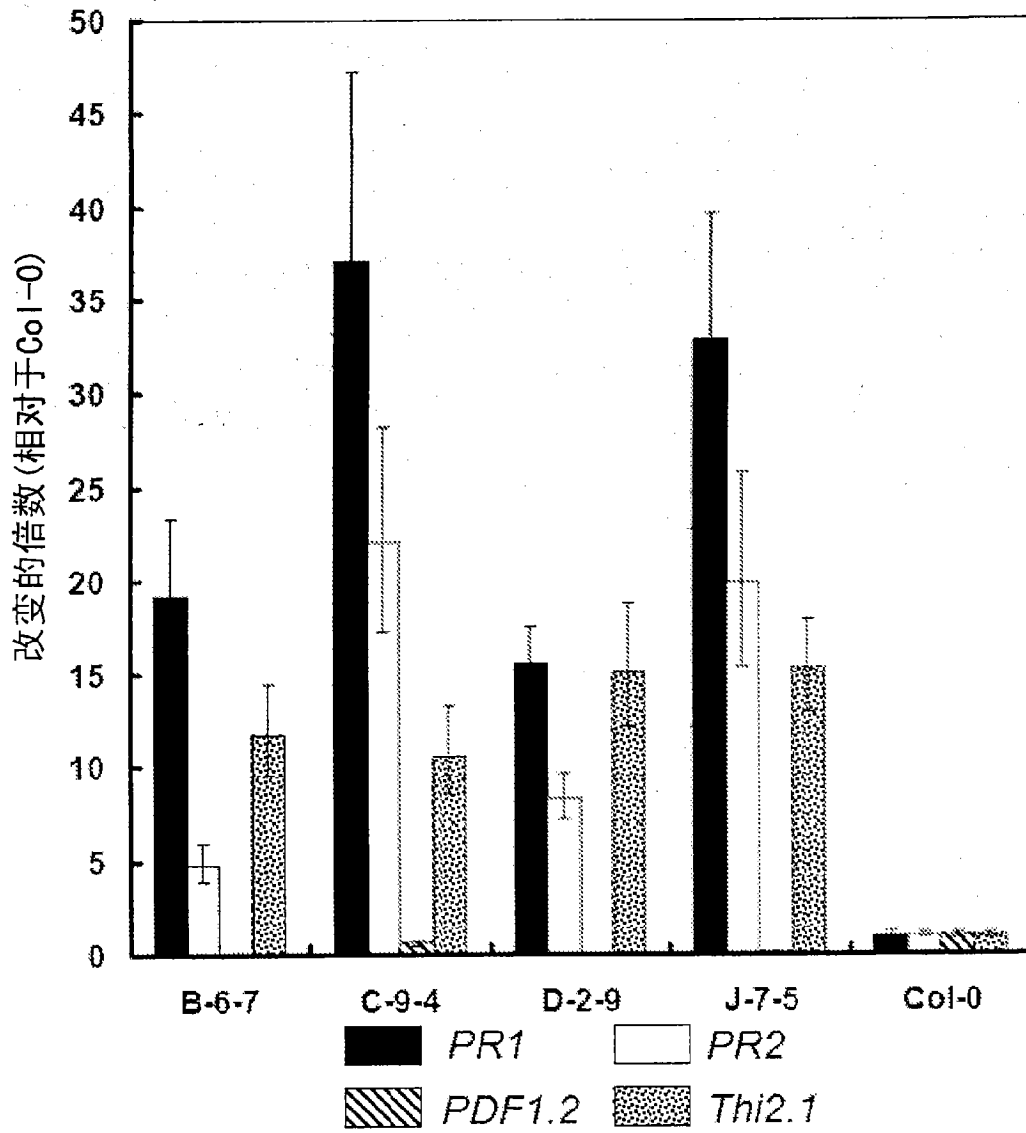


图 11

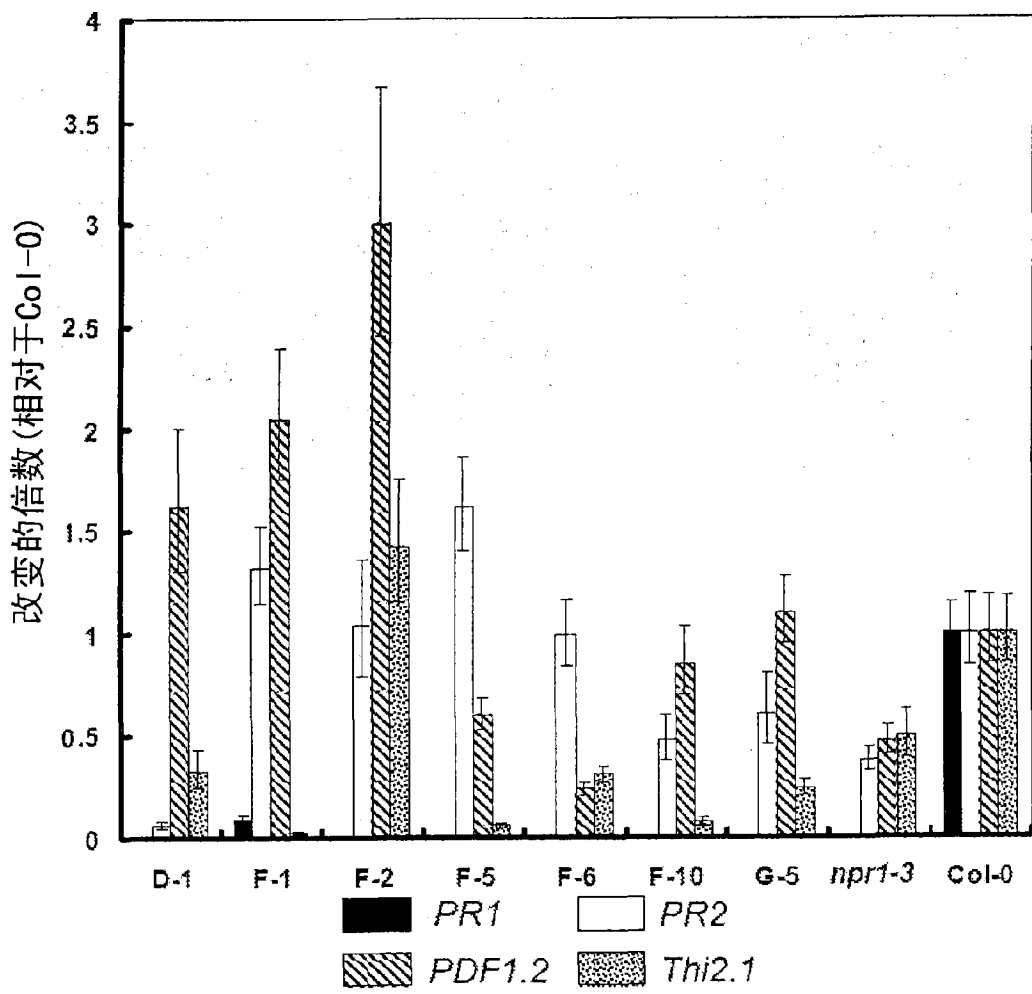


图 12

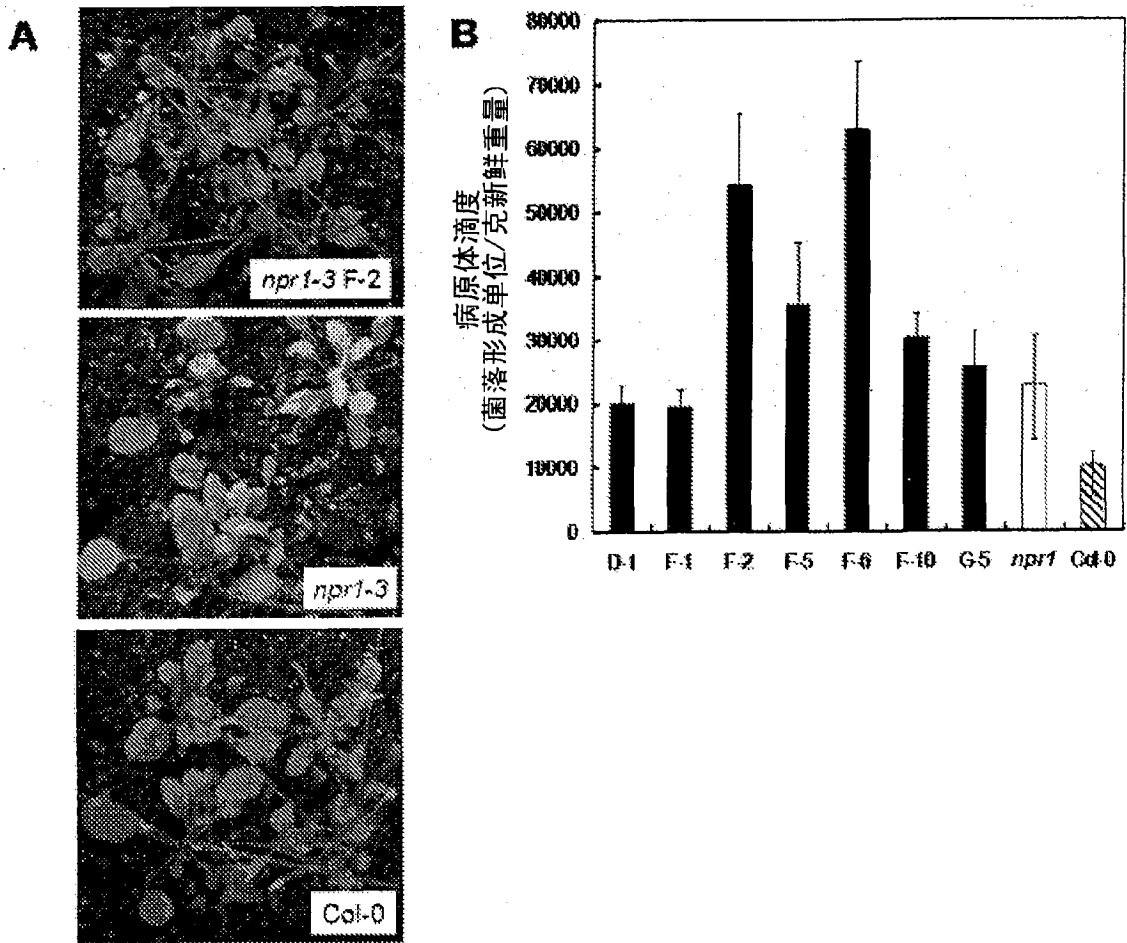


图 13

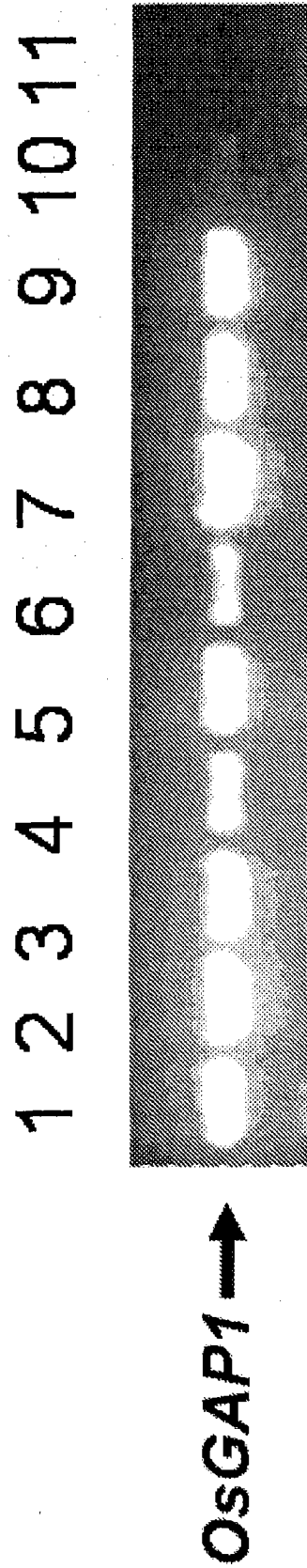


图 14

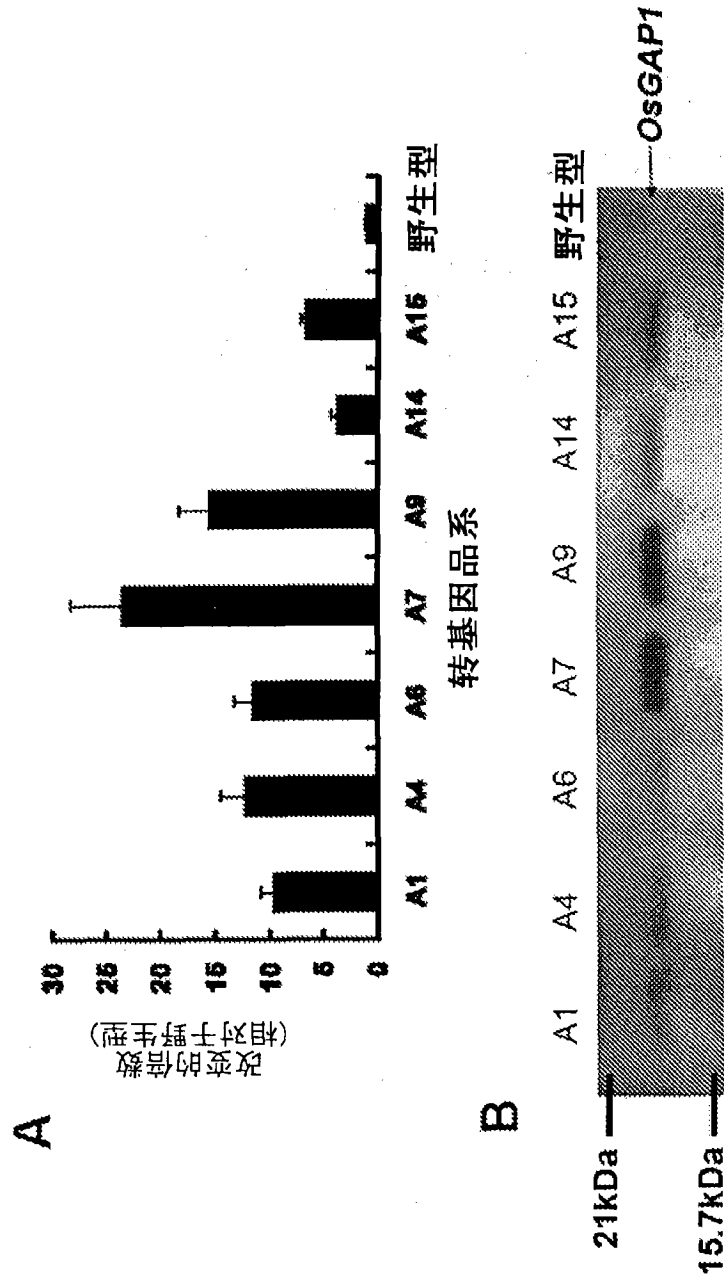


图 15

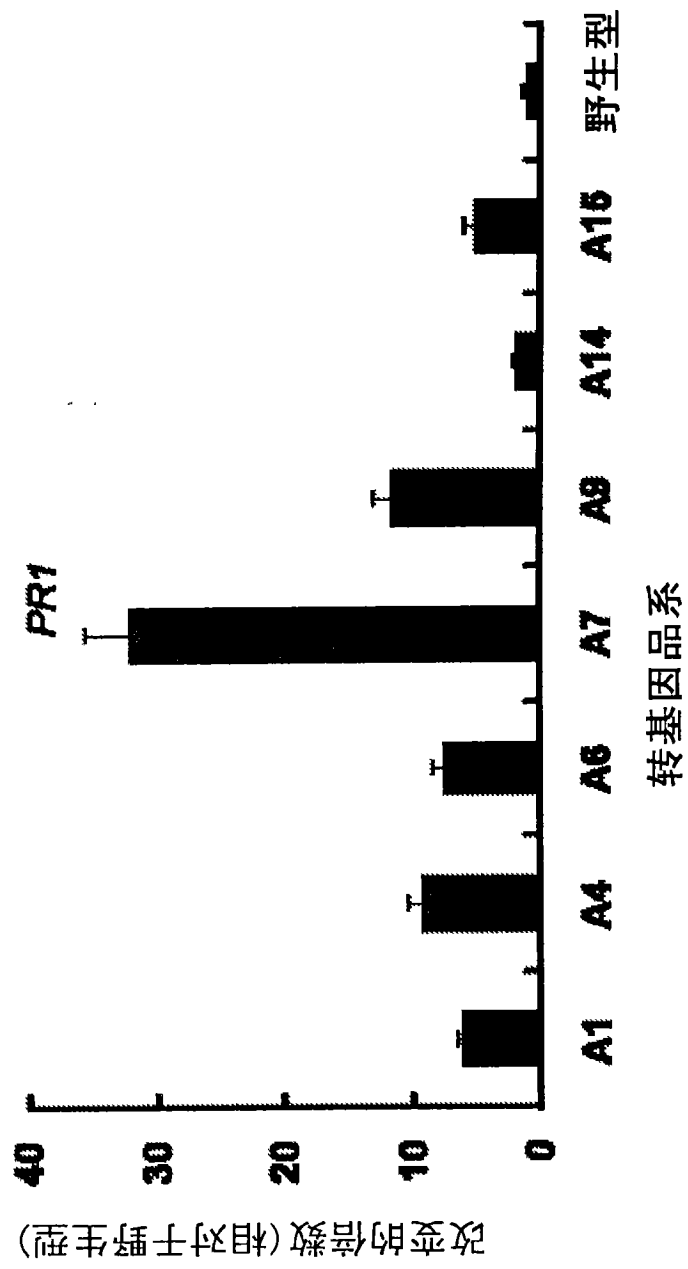


图 16A

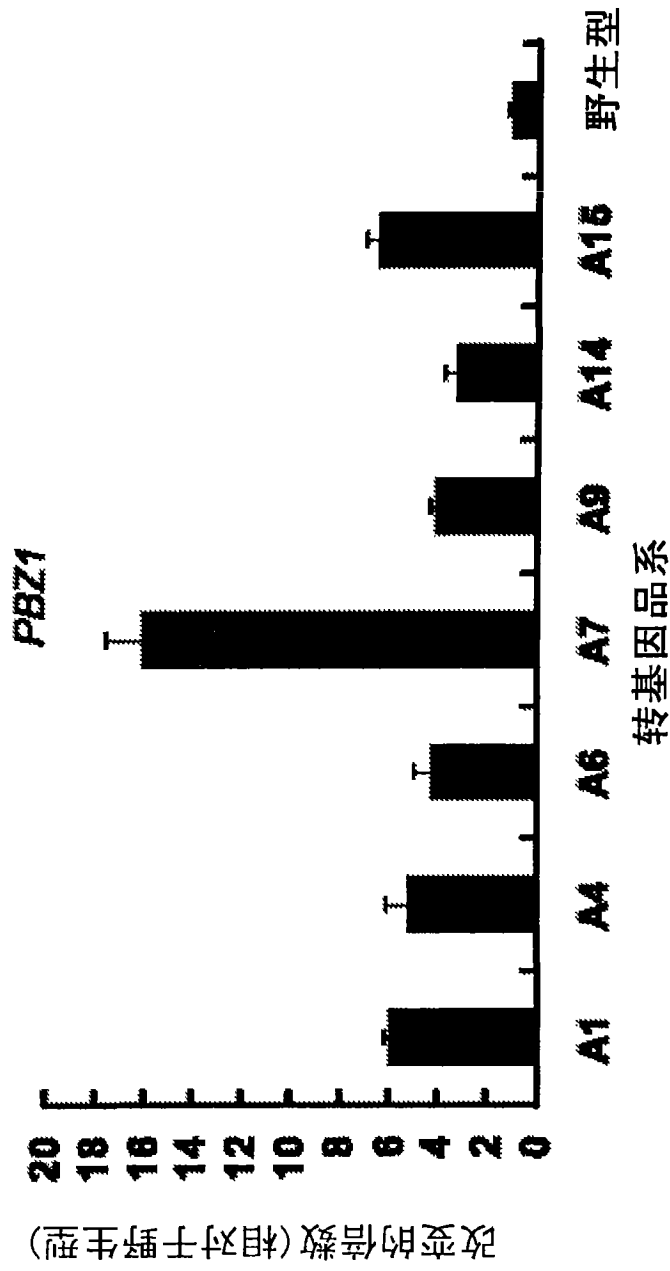


图 16B

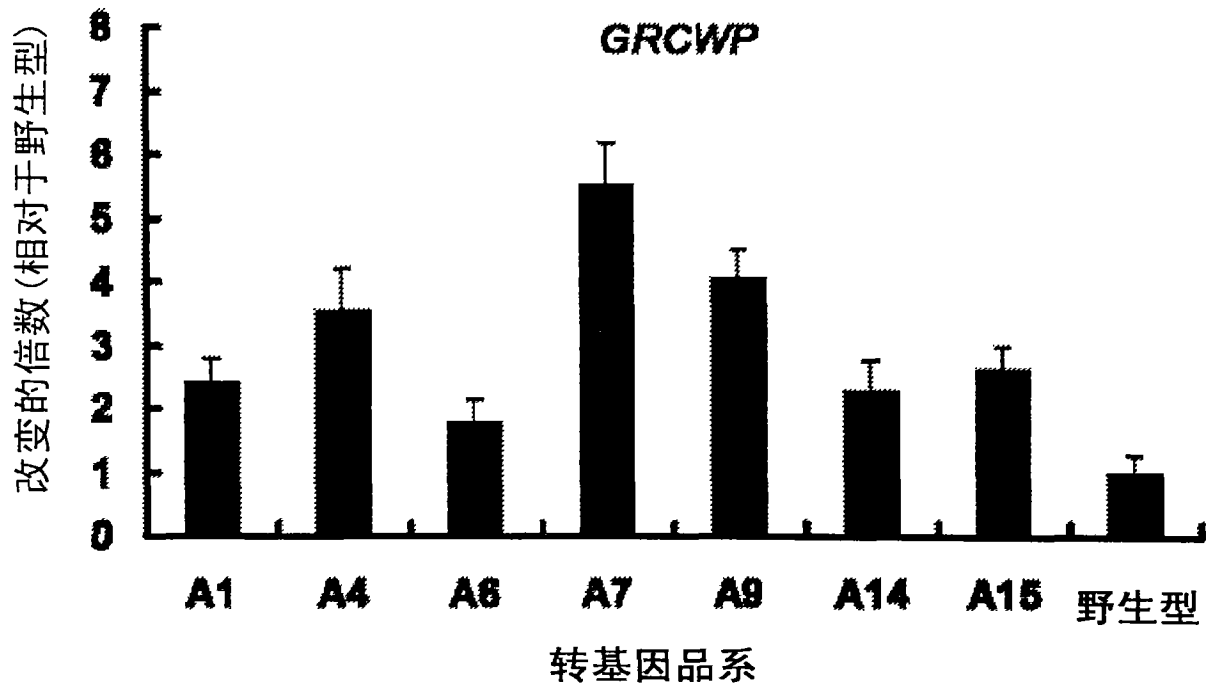


图 16C

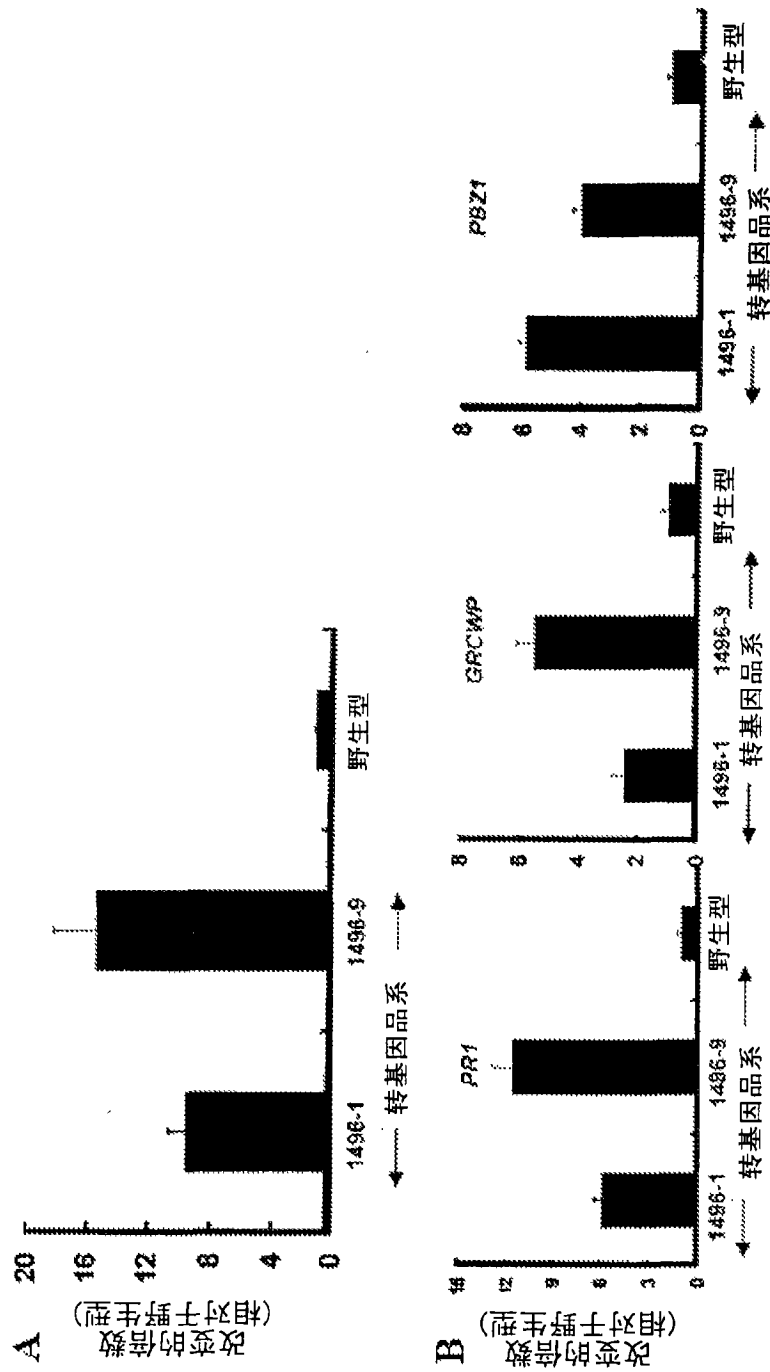
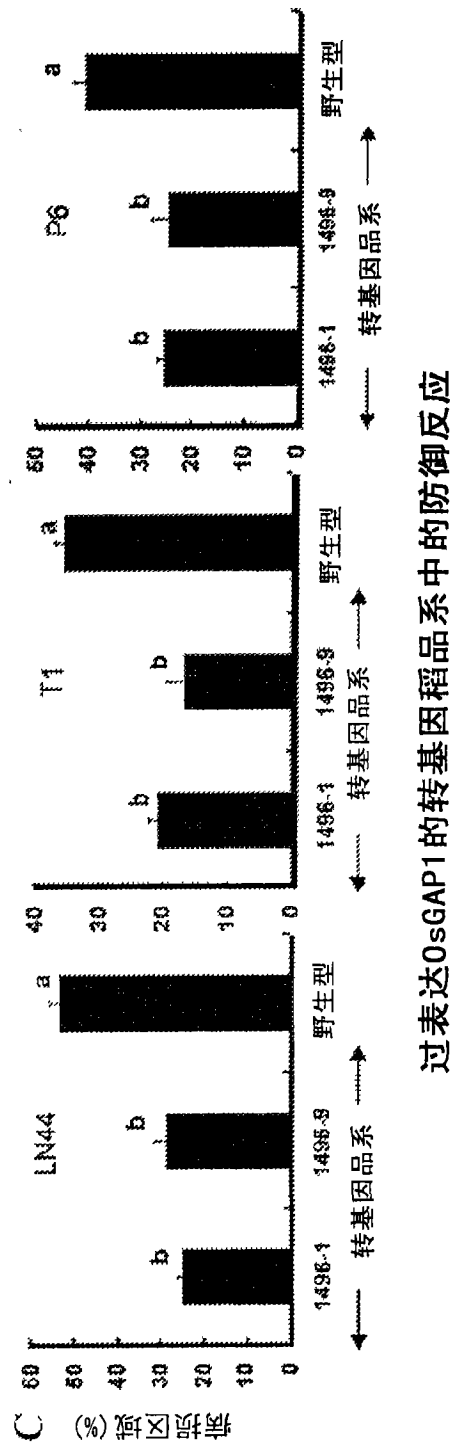


图 17A-B



过表达OsGAP1的转基因稻品系中的防御反应

图 17C

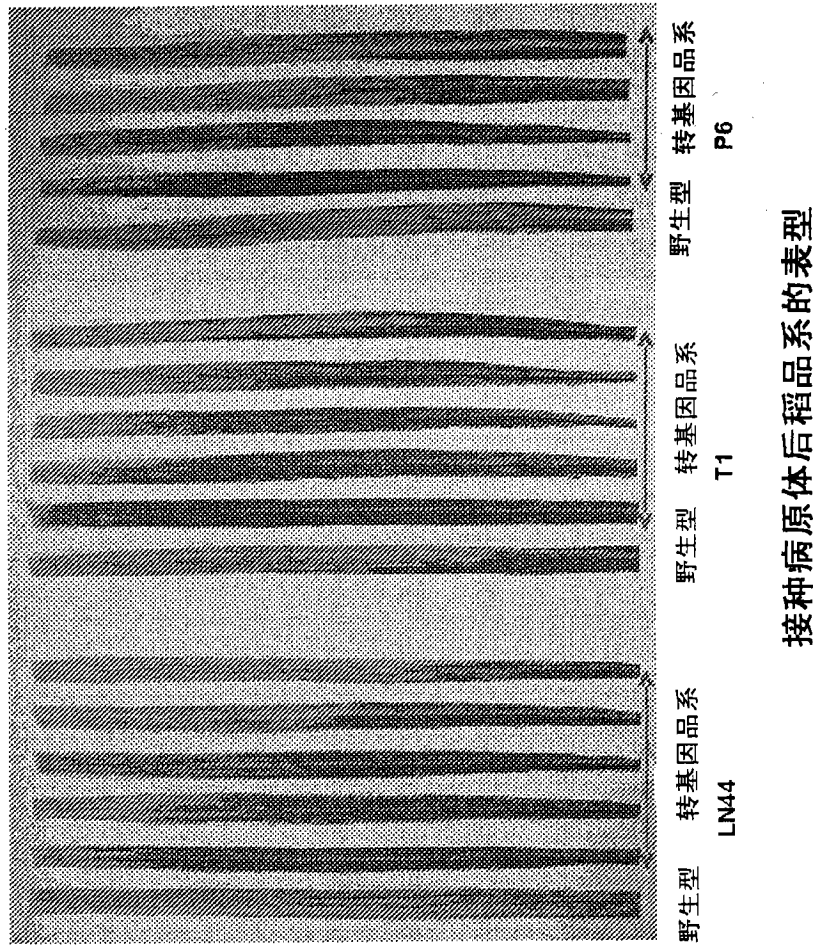


图 18