



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107904238 B

(45)授权公告日 2019.05.17

(21)申请号 201711192230.2

C12N 15/10(2006.01)

(22)申请日 2017.11.24

C12N 15/82(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A01H 5/10(2018.01)

申请公布号 CN 107904238 A

A01H 6/20(2018.01)

(43)申请公布日 2018.04.13

审查员 靳春鹏

(73)专利权人 中国科学院华南植物园

地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号(72)发明人 郑洁旋 张会 张美 简曙光
夏快飞(74)专利代理机构 广州广典知识产权代理事务
所(普通合伙) 44365

代理人 谢伟

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

权利要求书1页 说明书6页

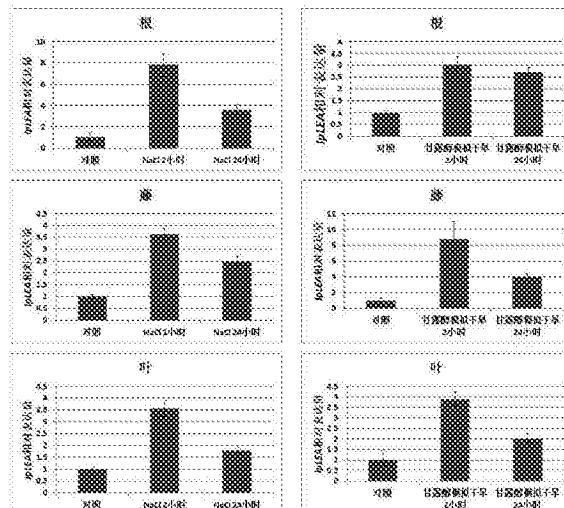
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

厚藤高盐、干旱诱导型启动子IpLEA-PRO及
其应用

(57)摘要

本发明涉及一种厚藤LEA蛋白IpLEA基因的启动子(简写为IpLEA-PRO)，其具有SEQ ID No.1所示的核苷酸序列。本发明提供通过检测GUS的表达结果证明，该多核苷酸具有启动子的活性，并受高盐和干旱胁迫诱导活性增强，由此显示了该LEA蛋白基因在厚藤中响应高盐/干旱逆境的作用。本发明为进一步研究和应用于调控厚藤相关耐盐基因的表达，提高和改良厚藤及其他植物的耐盐性，以植物作为生物反应器表达盐/旱胁迫相关的目标蛋白提供了理论基础。



1. 一种高盐、干旱诱导型启动子DNA序列，其特征在于：所述的启动子DNA序列为含有SEQ ID No.1所示的核苷酸序列。
2. 一种植物表达载体，其特征在于：含有权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列。
3. 根据权利要求2所述的植物表达载体，其特征在于：所述的植物表达载体为BamHI酶切后连接权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列的pBI101.2载体。
4. 权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列，或权利要求2所述的植物表达载体在高盐、干旱胁迫的植物基因表达调控中的应用。
5. 权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列，或权利要求2所述的植物表达载体在高盐、干旱胁迫的植物转基因育种中的应用。
6. 根据权利要求4或5所述的应用，所述植物为拟南芥或农作物。
7. 一种提高拟南芥或农作物对高盐、干旱逆境适应性的方法，其特征在于，包括将权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列，或将权利要求2或3所述的植物表达载体转化到拟南芥或农作物中。
8. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于，通过GV3101农杆菌介导转化拟南芥或农作物中，获得拟南芥或农作物的转基因种子。

厚藤高盐、干旱诱导型启动子IpLEA-PRO及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程领域,具体涉及一个厚藤高盐、干旱诱导型启动子IpLEA-PRO及其应用。

背景技术

[0002] 厚藤(*Ipomoea pes-caprae* L.),又名马鞍藤(福建、广东、广西),沙灯心(广东),马蹄草、鲎藤(福建),海薯、走马风、马六藤、白花藤(海南),沙藤(浙江),为旋花科番薯属多年生匍匐蔓生草本植物,在全世界热带亚热带的滨海沙滩或岛屿地区有广泛分布。厚藤抗逆性极强,而耐盐和抗旱性尤为显著。同时,厚藤作为一种常绿藤本植物,具有较高的园林绿化价值。此外,在世界上多个地区,如澳大利亚、巴西、东南亚及我国岭南地区,厚藤也是一种常见的民间草药。由此可见,厚藤作为一种优异的野生植物资源,具有较大的开发潜力及应用价值,同时也可作为一种植物抗逆分子机理、发掘抗逆基因的研究对象进行深入研究。

[0003] LEA蛋白为晚期胚胎发生丰富蛋白家族(*Late Embryogenesis Abundant proteins II*,LEA-II家族),是植物体内的一种具有高度热稳定性、亲水性的小分子蛋白,能够在植物胚胎发育后期以及脱水逆境胁迫下大量表达,广泛存在于植物界。植物LEA蛋白具有广泛的生物学功能,如防止细胞脱水、稳定细胞膜、结合金属离子、清除羟基自由基防止膜脂过氧化、保护冷敏感性酶活性、作为分子伴侣和结合DNA/RNA的特性等。研究表明,很多植物的LEA蛋白基因的表达都受到高盐/干旱以及低温冷冻等失水胁迫的影响,并通过提高LEA蛋白基因的表达来提高植物对失水胁迫的抗逆性。而这种受逆境胁迫而提高基因表达量的现象称之为基因的诱导表达,由基因的启动子特征决定。

[0004] 启动子(promoter)是位于结构基因5'-端上游的一段非编码DNA序列,能够被RNA聚合酶识别、结合,并准确控制转录(基因表达)的起始时间和表达强度,是基因转录调控的中心。基因的表达与启动子的结构密切相关,基因启动子中顺式作用元件的种类决定基因表达特征。当启动子中含有某种特殊的顺式作用元件时,该基因的表达可能受与之相关的因素的影响。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种具有植物高盐、干旱胁迫诱导型的启动子。

[0006] 本发明的另一目的在于提供该启动子,在制备转基因植物以及针对提高植物对高盐和干旱抗逆性时降低外源基因超量表达的负效应中的应用。

[0007] 为了完成上述目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一种高盐、干旱诱导型启动子DNA序列,所述的启动子DNA序列为含有SEQ ID No.1所示的核苷酸序列;或为含有SEQ ID No.1所示的序列且序列中有一个或几个核苷酸的替换、缺失或增加,但具有相同功能的核苷酸序列;或为与SEQ ID NO.1完全互补配对的核苷酸序列;或为由SEQ ID No.2,SEQ ID No.3和SEQ ID No.4经过染色体步移克隆扩增得到的

核苷酸序列。

[0009] 本发明还提供了上述一种高盐、干旱诱导型启动子DNA序列的制备方法,以野生厚藤的基因组DNA为模板,由SEQ ID No.2,SEQ ID No.3和SEQ ID No.4经过染色体步移克隆扩增得到。

[0010] 本发明还提供了一种植物表达载体,含有上述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列。

[0011] 优选地,所述的植物表达载体为BamHI酶切后连接权利要求1所述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列的pBI101.2载体。

[0012] 本发明还提供了上述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列,或上述的植物表达载体在调控植物基因表达中的应用。

[0013] 本发明还提供了上述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列,或权利要求3所述的植物表达载体在高盐、干旱胁迫的植物转基因育种中的应用。

[0014] 优选地,所述植物为拟南芥或农作物。

[0015] 本发明还提供了一种提高拟南芥或农作物对高盐、干旱逆境适应性的方法,包括将含有上述的高盐、干旱诱导型启动子DNA序列,或上述的植物表达载体转化到拟南芥或农作物中。

[0016] 优选地,通过GV3101农杆菌介导转化拟南芥或农作物中,获得拟南芥或农作物的转基因种子。

[0017] 本发明的优点和有益效果如下:

[0018] 本发明通过长期的经验和大量的实验,发现厚藤LEA蛋白IpLEA基因启动子IpLEA-PRO,其除了含有启动子核心元件TATA-BOX之外,还含有多个应答逆境胁迫的顺式作用元件,包括脱落酸应答元件ABRE,干旱诱导和胁迫相关的Myb因子结合位点MBS,以及胁迫相关的TC-rich repeats顺式作用元件。此外,该启动子序列中还发现了胚乳表达必需的顺式作用元件Skn-1_Motif。该启动子在厚藤和拟南芥中均可以调控基因受到高盐/干旱胁迫的诱导表达,可将该基因应用于针对高盐/干旱胁迫的植物转基因育种,用于培养提高高盐/干旱抗逆能力的转基因植物,同时降低正常培养条件下外源基因的表达,以期减少外源基因对转基因植物生长和发育的负效应。

[0019] 本发明所述IpLEA-PRO启动子为高盐和干旱胁迫诱导型启动子,可用于植物基因工程中改变植物对高盐和干旱的应答方式和调整转基因植物中外源基因在正常生长条件下表达方式,克服了常用的采用组成型表达启动子(如35S启动子、玉米泛素启动子、水稻肌动蛋白启动子等)进行转基因工作中的负面效应,以获得符合提高植物耐受高盐和干旱胁迫要求的转基因植物新品种。特别是,所述IpLEA-PRO启动子片段在异源植物,例如拟南芥中,也具有在高盐和干旱胁迫条件下诱导外源基因表达的特征,同时降低正常培养条件下外源基因的表达,以期减少外源基因对转基因植物生长和发育的负效应。

附图说明

[0020] 图1根据Genome Walking Kit的方法,电泳检测厚藤LEA蛋白IpLEA基因的启动子IpLEA-PRO扩增的PCR片段。M示DNA分子量标准,1号泳道示第一轮巢式PCR电泳结果,2号泳道示第二轮巢式PCR电泳结果,3号泳道示第三轮巢式PCR电泳结果。

[0021] 图2厚藤LEA蛋白基因的启动子IpLEA-PRO序列结构图。ATG示IpLEA基因的翻译起始密码子,其余的特殊标记均为不同的顺式作用元件。

[0022] 图3 Real time RT-PCR检测厚藤LEA蛋白IpLEA基因在厚藤植物不同部位的表达情况。

[0023] 图4 Real time RT-PCR检测厚藤LEA蛋白IpLEA基因在厚藤体内中的表达受到高盐和干旱胁迫的诱导。

[0024] 图5厚藤启动子IpLEA-PRO插入至植物转基因双元表达载体pBI101.2的物理图谱,该载体含有卡那霉素抗性筛选基因,启动子被融合到GUS基因5'端区域。

[0025] 图6厚藤启动子IpLEA-PRO启动转基因拟南芥中GUS基因表达示意图。

具体实施方式

[0026] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施事例。相反地,提供这些实施事例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0027] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0028] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0029] 本发明首次找到一段1495碱基的DNA序列,该段序列在厚藤基因组上的位置紧靠厚藤LEA基因IpLEA的阅读框翻译起始密码子ATG的上游,为厚藤LEA蛋白基因IpLEA的启动子,命名为IpLEA-PRO。

[0030] 本发明IpLEA-PRO启动子的核苷酸序列如SEQ. ID.N01所示,序列全长1495个碱基。根据植物顺式调控元件数据库(PlantCARE,<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)的搜索,本发明所提供的启动子区域除含有启动子所必须的TATA Box、CAAT Box之外,还含有多个逆境胁迫诱导的顺式作用元件,该基因为该启动子为逆境胁迫诱导型启动子。

[0031] 本发明首先检测了厚藤植物体内IpLEA基因的表达情况,Real time RT-PCR分析结果表明,在正常生长的条件下,IpLEA基因在厚藤不同部位及发育时期均有广泛表达,但其表达量相对于内参基因IpUBQ来讲,表达量很低。在高盐和干旱胁迫处理条件下,厚藤IpLEA基因的表达受到诱导,表明在厚藤体内,IpLEA基因的启动子是一个高盐/干旱胁迫的启动子。

[0032] 之后,采用染色体步移法PCR扩增IpLEA-PRO的DNA片段,然后用In-Fusion技术(In-Fusion HD Cloning Kit,TaKaRa Code:PT5162-1),将该段DNA序列插入至植物转基因双元表达载体pBI101.2上,通过农杆菌介导的转基因方法,对拟南芥进行转基因工作,检测IpLEA-PRO在异源植物拟南芥中调控GUS基因的表达情况,表明该启动子能够在拟南芥中启

动外源基因GUS基因表达。对转基因拟南芥进行高盐和干旱胁迫处理,检测到在转基因拟南芥植株中,GUS基因的表达也受到诱导,表明该启动子片段在异源植物拟南芥中,也具有在高盐和干旱胁迫条件下诱导外源基因表达的特征。

[0033] 本发明技术人员应当理解根据SEQ ID No.1所示的核苷酸序列,对其替换、缺失或增加一个或几个核苷酸,获得具有相同功能的核苷酸序列,例如,在应答元件或作用元件,替换一个或几个碱基。因此,本发明所述的还包括SEQ ID No.1所示的核苷酸序列经替换、缺失或增加一个或几个核苷酸,且具有相同功能的核苷酸序列,这段DNA序列可以是能够受到高盐和干旱胁迫诱导,增强基因表达。

[0034] 实施例1:厚藤LEA蛋白IpLEA基因的启动子IpLEA-PRO的克隆及序列分析

[0035] 本发明中所用的厚藤植株栽培于华南植物园温室群(23°18'75.91"N,113°37'02.38"E)中;厚藤种子收集于珠海海滩(22°16'25.37"N,113°34'18.00"E)。厚藤组织取材后,迅速置于液氮中速冻后保存于-80℃冰箱备用。取100粒左右的饱满厚藤种子,采用10%硫酸浸泡12小时,之后用自来水清洗20遍,采用蛭石萌发厚藤种子(28℃,每天16小时光照/8小时黑暗),约一个月后长成小苗。取健康生长的厚藤小苗叶片0.1g,放入研钵中加入液氮研磨至粉末,采用北京天恩泽基因科技有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒One-Tube Plant DNAOUT(货号:60705)提取厚藤叶片的基因组DNA。采用电泳检测和紫外分光光度计的方法检测厚藤基因组DNA的纯度和浓度,并采用ddH₂O将DNA的浓度调整至100ng/μL。

[0036] 设计三个特异性引物SP1:5'-GGGATCAGCCCCGAGATCAG-3'(SEQ ID NO.2),SP2:5'-ACAGGATTGGATTCTTCAC-3'(SEQ ID NO.3)和SP3:5'-AATCTCGGACACATCTGCAG-3'(SEQ ID NO.4)。

[0037] 以上述厚藤基因组DNA为模板,用SP1、SP2和SP3对应染色体步移的第1、2、3轮随机引物(AP1)进行染色体步移克隆启动子序列。三轮PCR结束后,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,挑选明亮的条带PCR产物(如图1所示),依照Magen公司HiPure Gel Pure DNA Kits说明书进行琼脂糖凝胶电泳回收,并连接于Promega公司的pGEM T载体上。按照说明书的方法将反应产物转化大肠杆菌JM109感受态菌株。挑取单克隆,提取质粒,送生物公司进行测序,并保存正确质粒(命名为IpLEA-PRO-pGEMT)备用。测序显示克隆到的厚藤LEA蛋白基因启动子IpLEA-PRO全长序列为1495个碱基,标记为SEQ ID NO.1。

[0038] 对启动子IpLEA-PRO序列进行分析,发现TATA-box,CAAT-box及其他可能存在的顺式作用元件(如图2所示)。

[0039] 实施例2:厚藤LEA蛋白IpLEA基因的表达受到高盐/干旱胁迫的诱导

[0040] 本发明首先公布了通过厚藤LEA蛋白IpLEA基因在自身启动子调控下在厚藤体内的表达情况,采用的检测方法为Real time RT-PCR技术。通过本实验室克隆获得的IpLEA基因的cDNA序列及网站NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线设计Real time RT-PCR引物。用于检测IpLEA基因表达模式的引物为IpLEA-RTF:5'-AAGGAGGGTGGTACCACCCG-3'(SEQ ID NO.5)和IpLEA-RTR:5'-CTTAAAGTCTGAAACACCAAACGC-3'(SEQ ID NO.6)。内参基因为厚藤泛素蛋白基因IpUBQ,引物为IpUBQ-RTF:5'-TCGACAATGTGAAGGCAAAG-3'(SEQ ID NO.7)和IpUBQ-RTR:5'-CTTGATCTTCGGCTTGG-3'(SEQ ID NO.8)。参考BIO-RAD公司iTaq™ Universal SYBR Green Supermix的说明书配制real time RT-PCR反应体系(冰上操作)。采用罗氏荧光定量PCR LightCycler480使用方法进行检测。

[0041] 所有检测均采用两个生物学样本重复,每个生物学样本进行三次重复检测反应。引物第一次使用时添加程序Stage3检测溶解曲线,确认引物的特异性。

[0042] 从华南植物园温室及园区分别选取厚藤幼苗及成年开花植株的不同组织部位,检测厚藤LEA蛋白IpLEA基因在自身启动子调控下未受到外界胁迫条件下的表达情况。如图3所示,在正常生长的条件下,IpLEA基因在厚藤的不同部位均有表达,但表达量相对于组成型启动子调控下IpUBQ基因而言,其表达量均较低,最大表达量(成年植株根中)仅为IpUBQ基因表达量的0.04倍,表明在正常培养条件下,厚藤LEA蛋白IpLEA启动子为低水平表达启动子。

[0043] 取种子萌发后健康生长一个月的厚藤小苗,将厚藤幼苗转移1/2MS液体培养基继续培养3天。然后用含有NaCl(300mM,模拟高盐胁迫)和甘露醇(300mM,模拟干旱胁迫)的1/2MS液体培养基处理厚藤幼苗,收集胁迫处理0h(对照)、2小时和24小时后的厚藤幼叶和幼根各0.5g,用于提取总RNA。RNA的提取依照Magen公司HiPure Plant RNA Kits(R4151)的说明书进行。采用两步法以总RNA为模板逆转录cDNA。cDNA链的合成依照全式金公司TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix的说明书进行。

[0044] 如图4所示,在300mM NaCl胁迫处理下,无论在厚藤幼苗的根、藤或叶中,IpLEA基因的表达都受到盐胁迫的强烈诱导,其最大诱导量可达到7倍以上。而在干旱(300mM的甘露醇处理能够造成植物脱水)胁迫处理下,无论在厚藤幼苗的根、藤或叶中,IpLEA基因的表达也均被强烈诱导,其最大诱导量可达到8倍以上。以上公开的内容表明了IpLEA基因是一个高盐和干旱胁迫诱导基因,该基因启动子IpLEA-PRO具有启动目标基因厚藤LEA基因在盐旱胁迫下诱导表达,提高厚藤对高盐干旱胁迫适应性的能力。

[0045] 实施例3:构建厚藤LEA蛋白IpLEA基因的启动子IpLEA-PRO调控下的GUS转基因拟南芥材料的构建

[0046] 以插入有厚藤IpLEA基因启动子的IpLEA-PRO-pGEMT质粒DNA为模板,设计下列引物IpLEAProF:5'-CGACTCTAGAGGATCCAATCTCGGACACATCTGCAG-3'(SEQ ID NO.9)和IpLEAProR:5'-ACCTACCCGGGGATCCACCTTCTCACAAGCTGAGAT-3'(SEQ ID NO.10)对厚藤LEA蛋白IpLEA基因的启动子IpLEA-PRO进行PCR扩增。PCR产物依照Magen公司HiPure Gel Pure DNA Kits说明书进行琼脂糖凝胶电泳回收。同时采用BamHI单酶切处理拟南芥转基因双元表达载体pBI101.2,回收线性化质粒。回收后IpLEA-PRO启动子PCR片段和线性化pBI101.2质粒经Nanodrop公司紫外分光光度计测定浓度,采用TaKaRa公司的In-Fusion®HD Cloning Kit进行DNA片段和载体的同源重组连接。按照说明书的方法将反应产物转化大肠杆菌JM109感受态菌株。挑取单克隆,提取质粒,经测序鉴定为正确的阳性克隆后,命名为IpLEA-PRO-pBI101.2(结构示意图如图5所示),保存质粒备用。经测序分析正确后,IpLEA-PRO-pBI101.2重组质粒采用冻融法转入GV3101农杆菌中,加50%甘油放-80℃保存备用。

[0047] 以Clombia野生型拟南芥作为转基因材料,采用花序侵染的方法,将构建好的IpLEA-PRO-pBI101.2植物表达载体通过GV3101农杆菌介导转化拟南芥。将所获得的拟南芥转基因T3代种子放于含有50ug/mL卡那霉素的MS培养基上进行筛选。

[0048] 取生长10天的转基因拟南芥T3代植株,置于GUS染色反应液中处理3小时,采用组织化学法进行检测,之后用95%的乙醇退色48小时后利用LEICA DM2500体式显微镜拍照。如图6所示,转基因拟南芥小苗的真叶中出现蓝色斑点,表明GUS染色反应出现阳性,证明了

GUS基因在厚藤LEA基因启动子IpLEA-PRO的调控下起始了转录,表明本发明所述的厚藤LEA基因启动子序列(SEQ ID NO.1)具备在异源植物(拟南芥)中启动基因转录的功能,是一个可在植物转基因工作中进行应用的启动子。

[0049] 实施例4:IpLEA-PRO调控下的GUS基因在拟南芥中的表达受高盐和干旱胁迫的诱导

[0050] 将获得的转基因阳性植株拟南芥的种子萌发以后,置于1/2MS培养基平板中于22℃(16小时光照/8小时黑暗)的培养条件下培养两个星期得到拟南芥幼苗,之后进行高盐(300mM的NaCl)和模拟干旱(300mM的甘露醇)胁迫处理,处理方法同实施事例2,在处理时间为24h时收获拟南芥幼苗,以未处理的拟南芥幼苗作为对照。之后进行Real time RT-PCR技术检测GUS基因在拟南芥体内受厚藤启动子IpLEA-PRO的调控下的表达情况。RNA的提取及逆转录的程序均参见实施例2。拟南芥中的内参基因采用拟南芥泛素基因AtUBQ10(At4g05320),设计的引物序列分别为:AtUBQF:5'-GATCTTGCCGGAAACAAATTGGAGGATGGT-3'(SEQ ID NO.11)和AtUBQR:5'-CGACTTGTTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG-3'(SEQ ID NO.12)。GUS基因检测的特异引物如下:GUS-F:5'-ATGTTACGTCTGTAGAAAGGAAG-3'(SEQ ID NO.13)和GUS-R:5'-TCATTGTTGCCTCCCTGCTGC-3'(SEQ ID NO.14)。参考BIO-RAD公司iTaq™ Universal SYBR Green Supermix的说明书配制real time RT-PCR反应体系(冰上操作)。采用罗氏荧光定量PCR LightCycler480使用方法进行检测。

[0051] 所有检测均采用两个生物学样本重复,每个生物学样本进行三次重复检测反应。引物第一次使用时添加程序Stage3检测溶解曲线,确认引物的特异性。

[0052] 经检测发现,拟南芥的GUS基因在厚藤LEA蛋白基因启动子IpLEA-PRO的调控下,无论是在盐胁迫(300mM的NaCl)处理下,还是在模拟干旱(300mM的甘露醇)胁迫下,GUS基因在拟南芥中的表达均受到了强烈地诱导,表明本发明公布的厚藤LEA蛋白基因启动子IpLEA-PRO在异源植物(拟南芥)转基因试验中确实为高盐干旱诱导型启动子。

[0053] 本实施例仅公布了在拟南芥中外源GUS基因受启动子IpLEA-PRO在高盐干旱胁迫下诱导表达,本发明也可延伸至其他功能基因和其他植物或农作物,并应用于植物基因工程中应对高盐干旱胁迫条件下目标基因的诱导表达。由于该启动子在植物正常生长条件下启动基因的表达水平较低,因此,对于某些可能在正常条件下对植物生长和发育有潜在毒性的基因来讲,能够降低转基因工作外源基因潜在的副作用,从而培育特异性适应高盐干旱逆境的改良型转基因植物。本发明也可应用于改造适应于高盐干旱逆境的植物生物反应器,以期获得在高盐干旱胁迫条件下目标蛋白高产量的转基因植物生物反应器。

[0054] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 中国科学院华南植物园
[0003] <120> 厚藤高盐、干旱诱导型启动子IpLEA-PRO及其应用
[0004] <160> 14
[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006] <210> 1
[0007] <211> 1495
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010] <400> 1
[0011] aatctcgac acatctgcag ttggtttcc aaacccgatt gtctcctcta tcttcctccc 60
[0012] tacatcatgg ataaaatctt tcaccttgtc caagaaccca cccttttctt cctccttgta 120
[0013] ttccctgtcc ttgatacccc ttccactat ctctggatta tcagacgatg ccataccttc 180
[0014] tcacaagctg agatcaataa atattgaact aattactcac tcaatattgc aagcaaatac 240
[0015] ttacttacta ttcatgaaca cagatttatt tttttttttt atcaatgcat agaaatgaca 300
[0016] cattgatttg tttaatttaa attttaaaaa gttcatacgt ttaatttagct tgttagtataa 360
[0017] agttcaggtg tgtatttaaa cttttatttc aaataaaaaa aagttatggg ccaaaatcta 420
[0018] atgaggtatt tacacaggac aaaaatttgt gtgagatatt tcacggatct taatttgtaa 480
[0019] gacggatcaa atatttgatt aataagatca aaatttctac tcattaataa atattcgact 540
[0020] tgtcttactg attgaaactc gtaaaccagt gttaccctta cacgggtggt ttccgttaga 600
[0021] ttttgaagt gtttgagatg aaatcaaatg ataatttggc ccacaaatta ggcgacacgt 660
[0022] acaaaaacag ctgaataaac tacccgtat taaaatgatg atgatgattt ggccgtgtgt 720
[0023] ggtcggctgg tcgggtgcattc aaataatgag tcgggtccgc gtgaaccgat aaccaacccg 780
[0024] aacccactta cgccaccagtc accccagtca tcgactcgat catttcttct gtatttattta 840
[0025] caccaaaaat ttatagcgtc tatcgctctg tgtccggaca acctcttcgt ctccaccatt 900
[0026] tgccggat tatctctcgat tagttaaatc ttcatgttt cgttttgtat tgatcatccc 960
[0027] ccatattatt ggagtttggc gattctgatc gtttagctt gcttttgaa taatgatgat 1020
[0028] gcatctgat ctaggttgac ttgatcggtt gatttttta atttctgaa atgaatggtg 1080
[0029] gtctttgtat gtcttgcgt tcactctcac tccactcaaa ccgctaattc ctccattgtat 1140
[0030] gattgatgat taccgctttt gaaccttagct tagtactact tctagtaatc taggcaaatac 1200
[0031] ctataattcc gatcggtgt gtgtttgtat ttcatgttt ttaagttcat tgtatatgtg 1260
[0032] ggaattgatg ttcttgagat aattacacag gcattaattt cttcttaggt ctagtgaatt 1320
[0033] gctccttcta atactatgtact tagtactatt agtgtgatca cgaaagaaat ggaaaataaa 1380
[0034] tgcttttaa aaaaaaaaaa ataaatctgt gttcatgaat agtaagtaag attttgcttg 1440
[0035] caatatttgat tgatgtatcattt tattgatctc agctgtgag aaggt 1495
[0036] <210> 2
[0037] <211> 20
[0038] <212> DNA
[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040] <400> 2
[0041] gggatcagcc ccgagatcag 20

- [0042] <210> 3
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0046] <400> 3
[0047] acaggatttg gattcttcac 20
[0048] <210> 4
[0049] <211> 20
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0052] <400> 4
[0053] aatctcgac acatctgcag 20
[0054] <210> 5
[0055] <211> 20
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058] <400> 5
[0059] aaggagggtg gtaccacccg 20
[0060] <210> 6
[0061] <211> 24
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064] <400> 6
[0065] cttaagtct gaaacaccaa acgc 24
[0066] <210> 7
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0070] <400> 7
[0071] tcgacaatgt gaaggcaag 20
[0072] <210> 8
[0073] <211> 20
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0076] <400> 8
[0077] cttgatctc ttggcttgg 20
[0078] <210> 9
[0079] <211> 36
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082] <400> 9
[0083] cgactctaga ggatccaatc tcggacacat ctgcag 36

- [0084] <210> 10
[0085] <211> 36
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088] <400> 10
[0089] acctaccgg gatatccacct ttcataaggc tgatgt 36
[0090] <210> 11
[0091] <211> 31
[0092] <212> DNA
[0093] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0094] <400> 11
[0095] gatctttgcc ggaaaacaat tggaggatgg t 31
[0096] <210> 12
[0097] <211> 32
[0098] <212> DNA
[0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0100] <400> 12
[0101] cgacttgtca tttagaaagaa agatataaca gg 32
[0102] <210> 13
[0103] <211> 24
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0106] <400> 13
[0107] atgttacgtc ctgttagaaag gaag 24
[0108] <210> 14
[0109] <211> 22
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112] <400> 14
[0113] tcattgttg cttccctgct gc 22

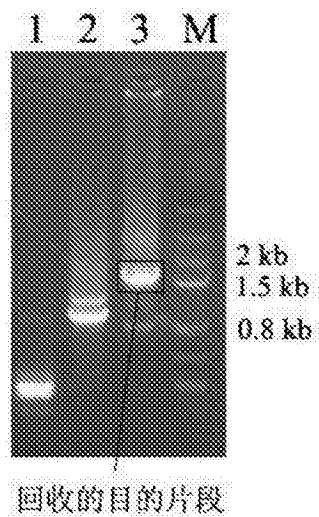


图1

+端 (5'端到3'端)

-1495 bp AATCTCGGACACAGTC [REPEAT] GTTTTCCAAACCGGATTGTCTCTCTATCTTC
MBS (拟南芥)

-1440 bp TCCCCCTACATCA [REPEAT] CTTCACCTTGTCGAAGAACCCACCCCTTTCTTCCTCC
TC-rich repeats (烟草)

-1380 bp TTGTCTTCTTGTCTTGATAACCCCTTTCACACTATCTCTGGATTATCAGACGATGCCATA
-1320 bp CCTTCCTACAAGCTGAGATCAATAATAATTGAACTAATTACTCACTAAATTGCAAGCA
-1260 bp AAACTTTACTTAATTGAAACACAGATTATTTTTTTATCAATGCATAGAA [REPEAT]
-1200 bp [REPEAT] TTGATTTGTTAATTAAATTAAAGTTCAACGTTAATTAGCTTGAG
Skn-1 motif (水稻) GCN4_motif (水稻)

-1140 bp TATAAAAGTTCAAGTTGTTATTAAACTTTT [REPEAT] TAAAAAAAGTTATGGGCCAAA
ERE (康乃馨)

-1080 bp ATCTTATGAGGTATTACACAGGACAAAAATTGTGTGAGATATTCAOGGATCTTAATT
-1020 bp TGTAAAGACGGATCAAATAATTGATTATAAGATCAAAATTCTACTCTTTAATAAAATT
-960 bp CGACTTGTCTACTGATTGAAACTCGTAAACCAGCTTACACGGGTGGGTTCCG
-900 bp TTAGATTTTGAAGTGTGAGATGAAATCAAATGATAATTGGACACAAATTAGGCG
-840 bp [REPEAT] CAAAAACAGCTGAATAACTACCCCGTATTAAATGATGATGATGATTGGGCCG
ABRE (拟南芥)

-780 bp TGTGTGGTCGGCTGGTGGCGATCAAAATAATTGACTCCCGTCCGGTGAACCGATAACCA
-720 bp ACCCGAACCCACTTACGGACCCAGTCACCCCA [REPEAT] GACTCGATOR [REPEAT] ATT

Skn-1 motif(水稻) 5' UTR Py-rich stretch(番茄)

-660 bp TATTACACCAAAATTATAGCGCTATCGCTCTGTGTCCTGACAACTCTTCGTCCTCA
-600 bp CCATTTGGAGCCGATTATCTCTCGTTAGGTAATCTCATGGTTGGTTTTGATTGATC
-540 bp ATCCCCCTATATTATTGGAGTTGGAGATTCTGATCGTTAGCTTGTCTTTGAATAATG
-480 bp ATGATGGATGATGATCTAGGTTGACTTGATGGTTGATTTTTAAATTCTGAAATGAA
-420 bp TGCTGGCTCTCTGTAGTCAGTCACCTCACTCCACTCAAACCGCTAATTCTCCA
-360 bp TTGATGATTGATGATTACCGCTTTGAACTTAGCTAGTACTACTCTAGTAATTAGGC
-300 bp AAATGCTATAATTCCGATCGTGTGTGTTGTATTCACTCTGTTAAAGTTCAATTGTAT
-240 bp ATGTGGGAATTGATGTTCTGAGATAATTACACAGGATTAAATTGCTCTTAGGCTAGT
-180 bp GAATTGCTCTTAAATTACTAGTAGACTAGTAATTAGTGTGATCACGAAAGAAATGGAAA
-120 bp ATAATGCTTTTAAAGAAAAAAATAATCTGTGTTCAAGTAAAGTAAGGATTTT
-60 bp GCTTG [REPEAT] AGTCACTTAATTAGTT [REPEAT] TCTCAGCTTGAAAGGT

CAAT-Box CAAT-Box TATA-Box

+1 bp ATG

Start codon

图2

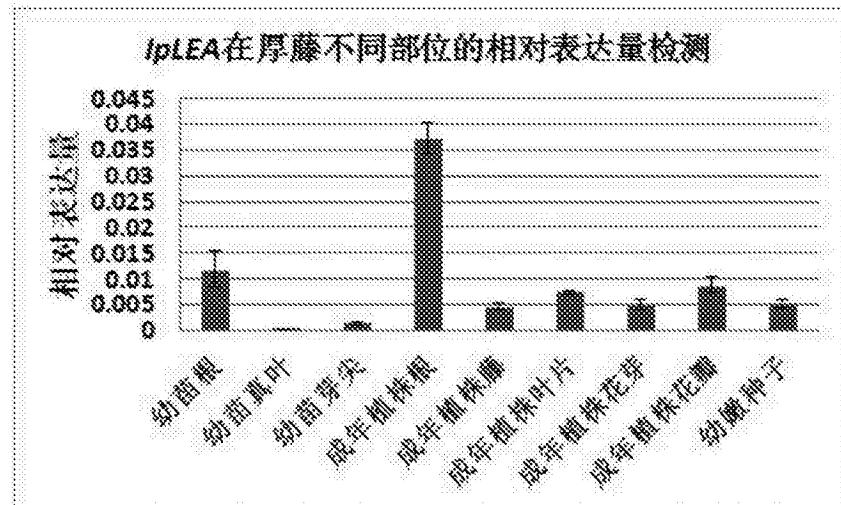


图3

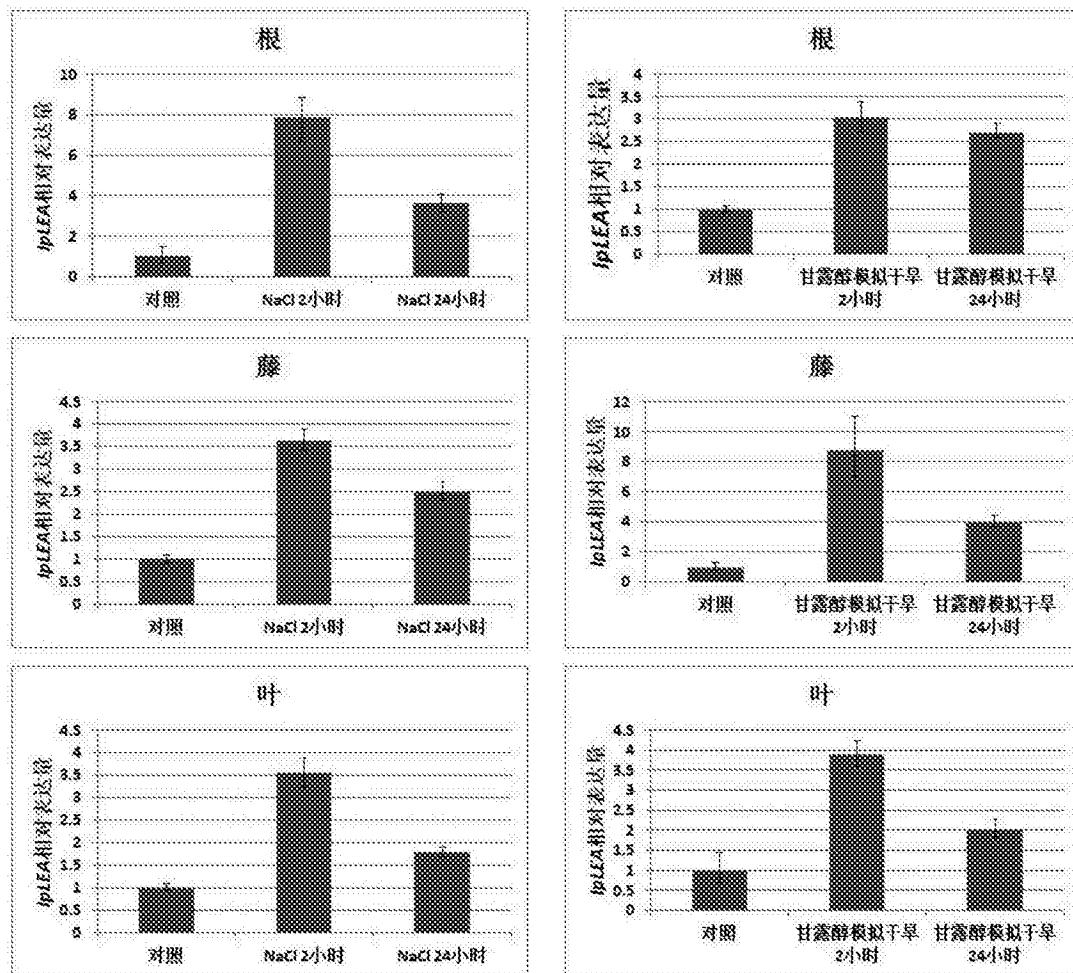


图4

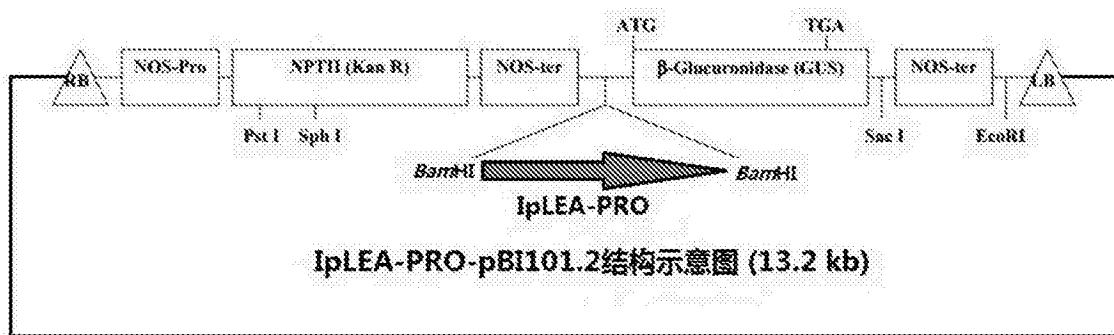


图5



图6