

一种简单有效的 T7 RNA 聚合酶调控的植物 基因表达系统*

路子显 魏晓丽 伍晓丽 常团结 朱 祯**

中国科学院遗传研究所, 北京 100101

摘要 T7 RNA 聚合酶在原核系统的基因表达与调控中起重要作用。将 T7 RNA 聚合酶基因的 5' 端与来自 SV40 大 T 抗原基因的核定位信号编码序列融合在一起, 利用 *rolC* 启动子控制修饰的 T7 RNA 聚合酶基因, 与 $\phi 10$ 启动子控制的 β -葡萄糖醛酸酶基因串联在一起, 构建了植物表达载体, 通过基因枪介导法转化了烟草叶片。结果表明, 这一表达系统能够增加 β -葡萄糖醛酸酶基因的瞬时表达。这为提高外源基因在转基因植物中的高效表达提供了新的工具。

关键词 修饰的 T7 RNA 聚合酶基因 $\phi 10$ 启动子 β -葡萄糖醛酸酶基因 串联表达载体

T7 RNA 聚合酶在原核基因表达与调控中起重要作用。近年来, 在分子生物学和基因工程研究中, 对 T7 RNA 聚合酶的研究和应用越来越受到重视。噬菌体 T7 RNA 聚合酶是一个分子质量为 98 ku 的单体酶^[1], 而细菌和真核生物的 RNA 聚合酶由多个亚基组成^[2]。噬菌体 T7 基因组由 3 类基因组成, 早期基因(I 类基因)由大肠杆菌 RNA 聚合酶负责转录, T7 RNA 聚合酶是早期基因表达的主要产物之一, 它负责转录噬菌体 T7 基因组中晚期基因(II 和 III 类基因)^[3]。

T7 RNA 聚合酶识别的启动子由高度保守的 23 个碱基序列组成。保守序列跨越转录起点(+1)并从 -17 延伸至 +6。众所周知, 在体外, T7 II 类和 III 类启动子的相对强度不仅依赖于启动子序列, 而且取决于反应条件, 特别是离子强度、温度、DNA 模板的超螺旋, 以及影响超螺旋稳定性的因素; 在体内, 由于 II 类启动子和 III 类启动子 23 个碱基的共同序列中个别核苷酸存在差异, 使 II 类启动子的转录一般比绝对保守的 III 类启动子的转录更弱。在 III 类启动子中, $\phi 10$ 启动子比其他启动子更强^[3]。

由于 T7 RNA 聚合酶专一性结合 T7 启动子,

其中 $\phi 10$ 启动子是活性最强的启动子, 激活其下游基因的表达。这使 T7 RNA 聚合酶- $\phi 10$ 启动子系统被广泛应用于外源基因的表达与调控研究。迄今为止, 使用这一表达系统已在大肠杆菌^[4]、假单胞杆菌^[5]、幼仓鼠肾细胞^[6]、和烟草质体^[7]等宿主中表达了多种外源蛋白。这些研究一般把 T7 RNA 聚合酶和 $\phi 10$ 启动子构建在不同的表达载体上转化宿主细胞。本文将修饰的 T7 RNA 聚合酶基因和 $\phi 10$ 启动子控制下的 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)基因(*uidA*)构建在同一表达载体上, 用基因枪转化烟草叶片。通过化学染色表明, 这一串联转化系统可以增强 *uidA* 的瞬时表达。

1 材料与方法

1.1 材料

所用菌株有大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 和 BL21(DE3)。植物材料有烟草(*Nicotiana tabacum* L.)无菌苗(NC89)。质粒 pSProlC 和 pDMC202 由李忠谊教授惠赠, 质粒 pCNPT-II 由本实验室构建^[8]。限制性内切酶、修饰酶和化学试剂购自华美生物工程公司、宝生物工程公司、Sangon-NSBC 和 Biolab 等。

2001-10-25 收稿, 2001-11-29 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39880023, 39989001 和 39980024)

** 联系人, E-mail: zzhu@genetics.ac.cn

1.2 克隆和修饰 T7 RNA 聚合酶基因

从大肠杆菌 BL21(DE3)提取基因组 DNA, 应用 PCR 方法修饰 T7 RNA 聚合酶基因, 按 Pfu DNA 聚合酶基因试剂盒要求进行反应, 引物序列为:

5'端引物: 5'-G CTC TAG AGC ATG GCT CCA AAA AAG AAG AGA AAG GTT GAG AAC ACG ATT AAC ATC GCT AAG AAC G-3' (划线部分为 *Xba* I 位点).

3'端引物: 5'-CAG ATA TCA TTA CGC GAA CGC GAA GTC CGC C-3' (划线部分为 *Eco*R V 位点).

取 BL21(DE3)基因组 DNA 0.1 μg 进行 PCR 扩增. PCR 程序为: (1) 94℃, 3 min; (2) 94℃ 变性 30 s, 65℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 循环 10 次; (3) 94℃ 变性 30 s, 65℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 每循环加 10 s, 循环 20 次; (4) 72℃ 延伸 8 min. 取少量 PCR 产物电泳检查证明与 T7 RNA 聚合酶基因长度吻合, 并用 *Hpa* I 酶切, 证明与 T7 RNA 聚合酶基因的 *Hpa* I 所处位置一致, *Xba* I/*Eco*R V 双酶切 PCR 产物, 克隆到测序载体 pBluescriptKS (+) 的 *Xba* I/*Eco*R V 位点, 构建成含有修饰 T7 RNA 聚合酶基因的质粒 pBlueT7.

1.3 T7 RNA 聚合酶基因序列测定

由宝生物工程公司完成. 测序引物为, T7 启动子引物 5'-TAATA C GACT CACTA TAGGG-3'; T3 启动子引物 5'-ATTAA CCCTC ACTAA AGGGA A-3'.

1.4 植物表达载体构建

重组质粒 pSProlCT7 由 *Xba* I/*Eco*R V 双酶切质粒 pBlueT7 获得修饰的 T7 RNA 聚合酶基因后插入到 pSProlC 的 *Xba* I/*Sma* I 双酶切位点而形成. 用 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切质粒 pSProlCT7, 获得 *rolC*-T7-T-nos 的表达结构, 插入 pCNPT-II 的 *Bam* HI/*Hind* III 双酶切位点, 构建成植物表达载体 pCNPT-II *rolC*T7.

重组质粒 pphi10GUSA 由 *Nco* I/*Bgl* II 双酶切质粒 pDMC202 获得 *uidA*-Tnos 片段, 插入 pET-8C 而形成. 用 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切质粒 pphi10GUSA, 获得 phi10-*uidA*-T-nos-T-phi 表达结构, 插入 pCNPT-II 的 *Bam* HI/*Hind* III 双酶切位点, 构建成植物表达载体 pCNPT-II phi10GUSA.

重组质粒 pSProlCGUSA 由 *Bgl* II/*Pst* I 双酶切质粒 pDMC202 获得 *uidA*-T-nos 片段, 及 *Bgl* II/*Pst* I 双酶切质粒 pSProlC, 去除 T-nos, 保留 *rolC* 启动子, 用 T4 连接酶将两者结合而成. 用 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切质粒 pSProlCGUSA 获得 *rolC*-*uidA*-T-nos 表达结构, 插入 pCNPT-II 的 *Bam* HI/*Hind* III 双酶切位点, 构建成植物表达载体 pCNPT-II *rolC*GUSA.

重组质粒 pET-CT7P10G 由 *Xho* I/*Bgl* II 双酶切质粒 pSProlCT7, 获得 *rolC*-T7-T-nos 的表达结构, 插入 pphi10GUSA 的 *Sal* I/*Bgl* II 双酶切位点而形成. 用 *Hind* III 单酶切质粒 pET-CT7P10G 获得 *rolC*-T7-T-nos-phi10-*uidA*-T-nos-T-phi 串联表达结构, 插入 pCNPT-II 的 *Hind* III 位点, 构建成植物表达载体 pCNPT-II T7GUSA.

1.5 基因枪转化

取 60 mg 的金粉 (直径 1.0 μm) 置于 Eppendorf 管中, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 在漩涡振荡器上振荡 1~2 min 后静置, 重复振荡 3 次, 10000 g 离心 1 min, 去上清液. 加入 1 mL 的无菌水将其重新悬浮, 取 50 μL 金粉悬浮液置灭菌的 Eppendorf 管中, 依次加入 5 μL 供体质粒 (1.0 μg/μL) 溶液, 50 μL 2.5 mol/L 的 CaCl₂ 溶液, 以及 20 μL 0.1 mol/L 抽滤灭菌的亚精胺溶液. 充分振荡 3 min, 静置 10 min 后, 10000 g 离心 10 s, 尽可能去除上清液. 加 250 μL 无水乙醇, 短暂振荡后, 10000 g 离心 10 s, 去除上清后加 60 μL 无水乙醇, 并重新悬浮.

选用 7.6 MPa 的可裂膜, 按照 Bio-Rad DuPont PDS1000/He 型说明书操作. 烟草叶片经轰击后, 在光照 16 h/黑暗 8 h 条件下, 恢复培养 3 d.

1.6 β-葡萄糖醛酸酶活性染色

用 β-葡萄糖醛酸酶反应液 (0.1 mol/L Na₃PO₄ 缓冲液, pH 7.0; 10 mmol/L EDTA, pH 7.0; 5 mmol/L 铁氰化钾; 5 mmol/L 亚铁氰化钾; 1.0 mmol/L X-gluc; 0.1% Triton X-100) 浸泡经轰击后的烟草叶片, 抽真空后, 37℃ 温育 16 h, 经固定和乙醇逐级脱色脱水后, 显微镜下观察.

2 结果

2.1 T7 RNA 聚合酶基因的修饰和克隆

在通过 PCR 克隆 T7 RNA 聚合酶基因时, 首先对该基因进行修饰. 设计的 5' 端引物长 65 bp, 在

T7 RNA 聚合酶基因第一个氨基酸(Met)和第二个氨基酸(Asn)密码子编码序列之间插入了 27 bp 的 SV40 大 T 抗原的核定位信号(NLS)编码序列, 其中前 10 bp 为 *Xba* I 酶切位点及保护碱基, 接着是起始密码子 ATG, 后面是 27 bp 的 SV40 大 T 抗原核定位信号密码子, 最后 25 bp 为 T7 RNA 聚合酶第二个氨基酸密码子及其以后的序列. 设计的 3' 端引物长 31 bp, 该引物 5' 端的 9 bp 为 *EcoR* V 酶切位点及保护碱基, 接着是终止密码子互补序列, 最后 19 bp 为 T7 RNA 聚合酶基因密码子的互补序列. 在 5' 端引物和 3' 端引物中分别设计的 *Xba* I 和 *EcoR* V 酶切位点, 为基因鉴定和后期重组打下了基础.

以大肠杆菌 BL21(DE3)基因组 DNA 为模板, 用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 获得修饰的 T7 RNA 聚合酶基因, 通过琼脂糖电泳, 证明相对分子质量为 2.69 kb. 用基因内部特有的限制性内切酶 *Hpa* I 消化 PCR 产物, 产生预期的 1.69 和 1.0 kb 的两条带, 证明 PCR 产物与预期结果一致.

将 PCR 产物用 *Xba* I/*EcoR* V 双酶切后, 插入 pBluescriptKS(+)后, 电击转化 *E. coli* DH5 α , 挑选阳性克隆, 酶切分析鉴定, 获得含有修饰的 T7 RNA 聚合酶基因的质粒 pBlueT7(图 1).

2.2 修饰的 T7 RNA 聚合酶基因部分序列测定

将 pBlueT7 测序, 证明核定位信号编码序列成功地融合在基因的 5' 端, 居于原 T7 RNA 聚合酶的

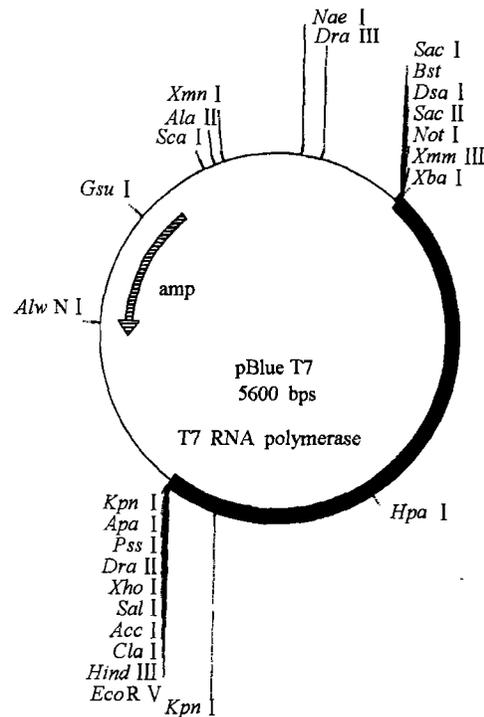


图 1 含有修饰的 T7 RNA 聚合酶基因的质粒结构

第一氨基酸 Met 密码子和第二氨基酸 Asn 密码子之间. 根据修饰的 T7 RNA 聚合酶基因部分序列测序结果推导出的部分氨基酸序列见图 2, 与已发表的 T7 RNA 聚合酶氨基酸序列^[9]比较, 除加入的核定位信号编码序列外, PCR 克隆之序列与已报道序列一致.

1	TC TAG AGC ATG GCT CCA AAA AAG AAG AGA AAG GTT GAG AAC ACG ATT AAC ATC GCT AAG AAC GAC TTC TCT GAC ATC	77
1	M A P K K K R K V E N T I N I A K N D F S D I	23
78	GAA CTG GCT GCT ATC CCG TTC AAC ACT CTG GCT GAC CAT TAC GCT GAG CGT TTA GCT CGC GAA CAG TTG GCC CTT	152
24	E L A A I P F N T L A D H Y A E R L A R E Q L A L	48
153	GAG CAT GAG TCT TAC GAG ATG GGT GAA GCA CGC TTC CGC AAG ATG TTT GAG CGT CAA CTT AAA GCT GGT GAG GTT	227
49	E H E S Y E M G E A R F R K M F E R Q L K A G E V	73
228	GCG GAT AAG GCT GCC GCC AAG CCT CTC ATC ACT ACC CTA CTC CCT AAG ATG ATT GCA CGC ATC AAC GAC TGG TTT	302
74	A D N A A A K P L I T T L L P K M I A R I N D W F	98
303	GAG GAA GTG AAA GCT AAG CGC GGC AAG CGC CCG ACA GCC TTC CAG TTC CAG GAA GAA ATC AAG CCG GAA GCC GTA	377
99	E E V K A K R G K R P T A F Q F L Q E I K P E A V	123
378	GCG TAC ATC ACC ATT AAG ACC ACT CTG GCT TGC CTA ACC AGT GCT GAC AAT ACA ACC GTT CAG GCT GTA GCA AGC	452
124	A Y I T I K T T L A C L T S A D N T T V Q A V A S	148
453	GCA ATC GGT CGG GCC ATT GAG GAC GAG GCT CGC TTC GGT CGT ATC CGT GAC CTT GAA GCT AAG CTC TTC AAG AAA	527
149	A I G R A I E D E A R F G R I R D L E A K L F K K	173
528	AAC GTT GAG GAA CAA CTT AAC AAG CGC GTA GGC CAC GTC TAC AAG AAA GCA TTT ATG CAA GTT GTC GAG GCT GAC	602
174	N V E E Q L N K R V G H V Y K K A F M Q V V E A D	198
603	ATG CTC TCT AAG GGT CTA CTC GGT GGC GAG	632
199	M L S K G L L G G E	208

图 2 修饰的 T7 RNA 聚合酶基因 5' 端编码的氨基酸序列

阴影部分为内切酶 *Xba* I 位点, 划线部分为核定位信号编码序列; 虚线为未测序部分. 因 3' 端测序结果及推导的氨基酸序列与报道的序列一样, 未在图中列出

2.3 植物表达载体构建

利用 *rolC*-T7-T-nos, *phi10-uidA*-T-nos-T-phi 和 *rolC-uidA*-T-nos 3个表达结构与 pCNPT-II 构建了 3个植物表达载体, 它们是 pCNPT-II rolCT7 , pCNPT-I- Iphi10GUSA 和 pCNPT-II rolCGUSA (图 3(a), (b) 和 (c)), 作为本试验的对照. 利用串联的 *rolC*-T7-T-nos-*phi10-uidA*-T-nos-T-phi 表达结构, 与 pCNPT-II 构建了植物表达载体 pCNPT-II T7GUSA (图 3(d)).

2.4 植物表达载体在烟草叶片中的瞬时表达

用 GUS 染色法表明, 含有植物表达载体 pCNPT-II T7GUSA 的烟草叶片瞬时表达的效果为不但蓝斑的数目比含有 pCNPT-II rolCGUSA 的烟草叶片更多, 而且颜色更深 (图版 I (a) 和 (b)); 而在含有植物表达载体 pCNPT-II rolCT7 和 pCNPT II phi10GUSA 的烟草叶片中未发现蓝斑, (见图 4(c) 和 (d)).

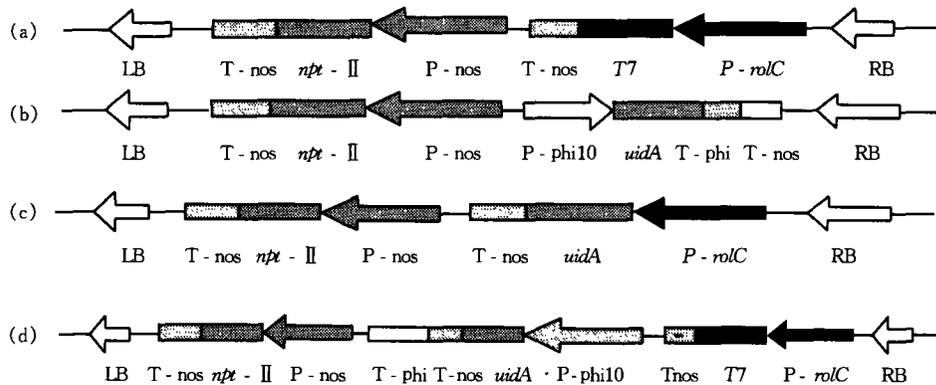


图 3 植物表达载体 T-DNA 结构示意图

(a) pCNPT-II rolCT7 ; (b) pCNPT-II phi10GUSA ; (c) pCNPT-II rolCGUSA ; (d) pCNPT-II T7GUSA.

P-nos, P-nos 启动子; P-*rolC*, *rolC* 启动子; P-*phi10*, *phi10* 启动子; *npt-II*, 植物选择标记新霉素磷酸转移酶基因; *uidA*, β -葡萄糖醛酸酶基因; T7, 修饰的 T7 RNA 聚合酶基因, T-nos, 烟脂碱合成酶基因终止子; T-*phi*, T7 噬菌体终止子; LB 和 RB 分别为 T-DNA 左右边界

3 讨论

T7 RNA 聚合酶-T7 启动子系统最先应用于微生物中. 许多研究者已成功地在 大肠杆菌中分别表达了豇豆花叶病毒编码的 24 ku 的蛋白^[4]、人碱性纤维细胞生长因子^[10]、大鼠 *rab1B* 蛋白^[11]、I 型单纯疱疹病毒核苷酸还原酶大亚基(R1)^[12]、酵母丙酮酸脱氢酶^[13]、水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂^[14]以及醋酸杆菌的葡糖磷酸变位酶^[15]. 此外, Seidel^[16]从四膜虫中克隆了磷酸烯醇式丙酮酸变位酶基因, 并在大肠杆菌中过量表达, 使其含量达到细胞可溶性蛋白总量的 25%. Davison 等^[5]在假单胞杆菌中表达了半乳糖激酶.

20 世纪 90 年代以来, T7 RNA 聚合酶-T7 启动子系统开始应用于转基因动物细胞系研究中. Pattnaik 等先后在幼仓鼠肾细胞系(BHK-1)中表达了疱疹口腔炎病毒(VSV)蛋白^[6]和布尼奥罗病毒(*Bunyamwera Virus*) L 蛋白^[17]. 这一系统应用在植物研究中报道较少. Holt 等构建了烟草花叶病毒

(TMV)U1 株系的全长 cDNA 克隆, 利用噬菌体 T7 RNA 聚合酶在体外生产了大量感染性转录物. 他们设计了引起翻译成熟前终止的移码突变, 并引入 30 ku 运动蛋白(MP)基因或外壳蛋白(CP)基因. MP 的移码突变体不能局部或系统地感染接种的烟草, 然而, 对表达野生型 TMV MP 基因的转基因烟草造成了局部和系统病毒感染. 虽然 CP-移码突变体不能在未转化烟草中系统地移动, 但在表达野生型 TMV CP 基因的转基因植株中显示系统地移动^[18]. McBride 用 CaMV35S 启动子和 T7 RNA 聚合酶基因构建成融合基因, 转化烟草细胞核, 用 T7 启动子和 β -葡萄糖醛酸酶基因构建表达载体转化具有 T7 RNA 聚合酶活性的烟草质体, 结果在所有组织中测出 GUS mRNA 及酶活性, 并证明在成熟叶片中 GUS 活性极高, 在幼叶和花瓣中活性中等, 在茎、根和发育中的种子活性较低^[7]. 我们利用修饰的 T7 RNA 聚合酶基因与 CaMV35S 启动子构建植物表达载体, 利用 T7 启动子和 β -葡萄糖醛酸酶基因构建植物表达载体, 通过根农杆菌共转化烟草, 也

证明了 T7 RNA 聚合酶能够调控 T7 启动子及其下游报道基因的有效表达(结果另文发表)。

综上所述,采取 T7 RNA 聚合酶基因和 T7 启动子控制的外源基因分别转化宿主细胞,已经在微生物和动植物中取得了一定的效果,但是,将两者串联在一个表达载体中,转化宿主细胞,尚未见到报道。由于 T7 RNA 聚合酶为原核类型蛋白,分子质量达 98 ku,不具备核定位功能,而真核生物 RNA 合成的场所位于细胞核内,真核生物细胞核是一个相对封闭的区域,分子质量大于 60 ku 的蛋白质不能自由通过核孔^[19],一些大分子量蛋白质进入细胞核的过程将主要依赖于多肽链氨基酸序列所携带的核定位信号(NLS)^[20,21],因此 T7 RNA 聚合酶首先应定位于细胞核内^[22],才能在真核生物细胞核内作用于 T7 启动子。若要进行 T7 RNA 聚合酶的核定位,必须对其编码序列加以修饰,将核定位信号插入 T7 RNA 聚合酶的氨基酸序列中。来源于 SV40 大 T 抗原的核定位信号^[23,24]已用于几种较大蛋白质的核定位研究^[25]。目前,基于 T7 RNA 聚合酶和 T7 启动子建立起来的偶联表达系统虽然在大肠杆菌中已有广泛的应用^[26],将该系统应用于动物细胞外源基因表达的研究也是近年来一个热点^[27,28]。但是,有关此表达系统成功应用于植物的报道较少。我们利用修饰的 T7 RNA 聚合酶基因构建的串联表达系统,首先通过基因枪介导转化烟草叶片,显著增加了外源基因的瞬时表达,说明该串联系统行之有效。今后,将进一步深入研究这一串联表达系统对外源基因稳定表达的作用,为植物基因工程研究中提高外源基因表达量提供理论依据,这种串联的外源基因表达系统在抗虫、抗病和抗逆等植物基因工程中有一定的应用潜力。

参 考 文 献

- 1 Tunitskaya V L, et al. Inactivation of bacteriophage T7 DNA-dependent RNA polymerase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenosine. *Eur J Biochem*, 1990, 191: 99
- 2 Ikeda R A, et al. Interactions of the RNA polymerase bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 3614
- 3 Ikeda R A, et al. Initiation of transcription by T7 RNA polymerase at its natural promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 2640
- 4 Garcia J A, et al. Proteolytic activity of the cowpea mosaic virus encoded 24K protein synthesized in *Escherichia coli*. *Virology*, 1987, 159: 67
- 5 Davison J, et al. Bacteriophage T7 RNA polymerase-controlled specific gene expression in *Pseudomonas*. *Gene*, 1989, 83: 371
- 6 Pattnaik A K, et al. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *Journal of Virology*, 1990, 64(6): 2948
- 7 McBride K E, et al. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7301
- 8 李旭刚,等. 一个新的用于植物转化的双元质粒载体的构建及应用. *自然科学进展*, 2001, 11(4): 368
- 9 Dunn J J, et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA. *J Mol Biol*, 1983, 166: 477
- 10 Squires C H, et al. Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(31): 16297
- 11 Touchot N, et al. Biochemical properties of the YPT-related rab1B protein comparison with rab1A. *FEBS Letters*, 1989, 256(1-2): 79
- 12 Furlong J, et al. The large subunit of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase: Expression in *Escherichia coli* and purification. *Virology*, 1991, 182: 846
- 13 Candy J M, et al. Expression of active yeast pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137: 2811
- 14 Chen M S, et al. Rice cystatin: Bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity, and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expression and Purification*, 1992, 3: 41
- 15 Brautaset T, et al. Nucleotide sequence and expression analysis of *Acetobacter xylinum* phosphoglucomutase gene. *Microbiology*, 1994, 140: 1183
- 16 Seidel H M, et al. Phosphonate biosynthesis: Molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of gene product in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1992, 31: 2598
- 17 Jin H, et al. Expression of functional bunyamwera virus L protein by recombinant vaccinia viruses. *Journal of Virology*, 1991, 65: 4182
- 18 Holt C A, et al. *In vivo* complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology*, 1991, 181: 109
- 19 Gerace L, et al. Functional organization of the nuclear envelope. *Ann Rev Cell Biol*, 1988, 4: 335
- 20 Silver P A. How proteins enter the nucleus. *Cell*, 1991, 64: 489
- 21 朱 祯. 植物基因转译产物的定位与加工. *生物工程进展*, 1994, 14(2): 51
- 22 Lassner M W, et al. Targeting of T7 RNA polymerase in tobacco nuclei mediated by an SV40 nuclear location signal. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 229
- 23 Goldfarb D S, et al. Synthetic peptides as nuclear localization signals, and anti-peptide antibodies for signal recognition. *Nature*,

- 1986, 322: 641
- 24 Lanford R E, et al. Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell*, 1986, 46: 575
- 25 van der Krol AR, et al. The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell*, 1991, 3: 667
- 26 Rosenberg A H, et al. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 1987, 56: 125
- 27 Polkinghome I, et al. Transient expression in insect cells using a recombinant baculovirus synthesizing bacteriophage T7 RNA polymerase. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 188
- 28 Lieber A. High level gene expression in mammalian cells by a nuclear T7-phage RNA polymerase. *Nucl Acids Res*, 1989, 17: 8485

法国高级科技代表团来国家自然科学基金委员会访问

2002年4月10日,法国研技部办公厅主任夏特里尔先生率领法国研技部、外交部和国家科研中心等法国科技管理和组织部门的主要领导13人访问了国家自然科学基金委员会。法国驻华使馆文化科技参赞等官员陪同来访。

国家自然科学基金委周炳琨副主任主持了科学基金专家与法国代表团的会谈。国家自然科学基金委合作局及有关科学部的领导向来宾介绍了基金委机构和科学基金国际合作以及我国自然科学的基金资助工作的情况;部分杰出青年基金专家介绍了在基金资助下开展科研工作和国际合作研究的情况。

会谈后,国家自然科学基金委李主其副主任主持了欢迎招待会。在致辞中李副主任说,中法两国都有着悠久的历史 and 灿烂的文化,都为人类的文明和发展做出过巨大的贡献。中法两国人民和科学家之间的友谊源远流长。基金委成立以来,一直致力于推进中外科学家之间的合作与交流,包括促进中法两国在基础科学各领域中的合作关系。

国家自然科学基金委迄今为止,已与法国的4个国家科研组织机构建立了科学合作协议关系。在“双边科学合作协议”框架下,每年都有一批中法科学家的合作与交流项目顺利实施。国家自然科学基金委还支持并负责评审和实施“中法先进研究计划”(PRA)。我们坚信,多年来我们共同资助的中法双边学术研讨会、合作研究仍将是继续促进中法两国科学家相互了解和友好交流的良好合作形式。另外,我们也会不断地探索新的合作形式,如优秀研究群体之间的合作,尤其是鼓励中法年轻科学家们加强联系,深入合作,使他们能创造出更多更出色的科研合作成果。

随着中法关系不断深入发展,两国科技界的交往日益频繁,各个领域的合作不断取得新的成果。

李主其副主任表示相信,中法高级科技代表团的互访必定会为进一步加强两国科学合作研究及学术交流做出积极的贡献。

国家自然科学基金委副主任周炳琨、朱道本、朱作言院士,北京大学校长许智宏院士、中国医学科学院院长刘德培院士、中国农业科学院院长翟虎渠教授、中国科学院过程工程研究所所长李静海院士、军事医学科学院贺福初院士、科技部基础司司长王葆青教授、科协国际部部长朱进宁教授、中国科学院化学研究所所长王梅祥教授、中国科学院地质与地球物理研究所郭正堂教授及有关单位和委内有关部门领导等50余人参加了招待会。

会后,法国高级科技代表团的成员们多次表示,对于中国国家自然科学基金委和科学家富有成效的工作及其诚挚友好的态度均留下了非常深刻美好的印象;尤其是对中国科学基金机制的活力及中国年轻一代科学家的朝气,科研队伍的迅速成长现状表示特别赞赏。来访的法方科技界领导人还认为,今后中法两国应加强科学基金方面的合作与交流,为推进两国科学家之间基础研究方面的深入学术合作研究,我们要努力创造更加有利的学术环境和交流条件。发展传统友谊,探索、建立新的“朋友—合作伙伴”式的长期科学协作关系。

(供稿:吕蓓蕾、郑永和)