

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93121262.6

[45] 授权公告日 2002 年 1 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1078042C

[22] 申请日 1993.11.16 [24] 颁证日 2002.1.23 [21] 申请号 93121262.6 [30] 优先权 [32] 1992.11.17 [33] GB [31] 9224118.1 [73] 专利权人 马来西亚橡胶研究所委员会 地址 马来西亚吉隆坡 共同专利权人 赫特福德大学 [72] 发明人 P·阿罗加来 K·F·程 W·Y·万阿部都来哈曼 H·Y·杨 S·A·布菲 H·琼斯 R·J·斯莱特 [56] 参考文献 CN87104202A 1988. 3. 9 C12N15/00 ACTA HORTICULTURAE NO.289 1991. 1. 1 YU - HUA SONG NAM - HAI CHUA TISSUE CULTURE AND GENETIC TRANS- FORM - ATION OF DAN DELION	审查员 李金光 [74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 代理人 汪 洋 权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图页数 6 页
--	--

[54] 发明名称 在植物汁液中产生蛋白质的方法

[57] 摘要

一种产生遗传上转化过的产汁液植物的方法,包括:

i) 向植物组织插入控制靶产物表达的基因或基因片断,和

ii) 从所说组织再生一种植物,该遗传上转化过的植物能够在其 所产生的汁液中表达靶产物。

本发明也提供了遗传上转化过的产汁液植物的克隆,所说植物在 其细胞中含有染色体插入物,以便在该植物所产生的汁液中表达靶产 物。本发明还描述了一种产生蛋白质或其它靶产物的方法,该方法包 括:

i) 从遗传上转化的产汁液树或植物或其克隆收获汁液,和

ii) 从所说汁液中回收靶蛋白质或其它产物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种产生遗传上转化过的三叶橡胶属植物的方法，包括：
 - i) 向植物组织插入控制靶蛋白产物表达的启动子和编码靶蛋白产物的基因或其片段，和
 - ii) 从所说组织再生一种植物，该遗传上转化过的植物在其所产生的胶乳中表达靶蛋白产物。
2. 如权利要求 1 的方法，其中的植物是 *Hevea brasiliensis*。
3. 如权利要求 1 或 2 的方法，其中启动子和基因或基因片段的插入是用土壤杆菌属微生物载体系统完成的。
4. 如权利要求 1 或 2 的方法，其中启动子和基因或基因片段的插入是用生物排列或粒子枪法完成的。
5. 如权利要求 1 的方法，其中的启动子和/或基因或基因片段对该植物来说是外源性的。
6. 如权利要求 1 的方法，其中的启动子和/或基因或基因片段对该植物来说是自身性的。
7. 如权利要求 1 的方法，其包括适当遗传转化过的三叶橡胶属植物的芽接、扦插或其他营养繁殖。
8. 一种产生蛋白质的方法，包括：
 - i) 从遗传上转化过的含有编码所述蛋白的基因或基因片段的三叶橡胶属树或植物或其克隆收获胶乳，和
 - ii) 从所说的胶乳中回收靶蛋白质。

说明书

在植物汁液中产生蛋白质的方法

本发明涉及产生能表达所需基因产物的遗传上转化过的植物的方法，也涉及具有相同能力的所说遗传上转化过的植物的克隆。具体的说，所涉及的植物是一类产生丰富汁液（fluid）的植物，并且，靶基因产物在所说汁液中被表达。更优选的，所说植物是橡胶（三叶橡胶属）植物，所说的基因是编码有药用价值蛋白质产物的外源基因，所说的蛋白质产物能从植物产生的胶乳中获得并能从中回收。

以通过表达“外源”基因产生特异蛋白质为目的的各种微生物（如酵母、真菌和细菌）的遗传转化技术是众所周知的。然而，微生物需要维治其生存和繁殖的合适条件，例如，通常需要小心控制环境温度、pH值和通气量，同时营养物必须以小心校准过的剂量加入到培养基中，并要移去废产物。必须有严格的灭菌步骤以避免外来微生物的污染。因而，微生物通常在复杂的发酵罐或生物反应器中培养，而且这些发酵罐或生物反应器被设置在昂贵维持的工厂中。上述费用被蛋白质终产物的高价格反映出来。

最近，人们的注意力已转向将外源基因引入到植物（例如烟草）中。本申请的基因转化技术使得改进作物和可提取的、有价值的外源蛋白质（例如抗体）生物技术产物的各种重要的遗

传特征相结合。与微生物不同，植物倾向于满足自身的需要，仅需要阳光、水和基本的园艺投入，并且很容易在高效益的条件下培育。已开发出了几种不同的技术能使外源基因引入到各种植物的品种中，这些技术包括：

——土壤杆菌属微生物载体系统，该系统涉及用已插入外源基因的细菌（土壤杆菌属）感染植物组织。用土壤杆菌属微生物转化植物细胞的许多方法是公知的（Vancanneyt et al., 1990; Horsch et al., 1985; Bevan, 1984 和 Herrera-Estrella et al., 1983）；

——生物排列（biolistic）或粒子枪方法。这一方法通过用包衣 DNA 微粒轰击（bombarding）可再生组织（例如分生组织或胚胎形成愈伤组织）使遗传物质直接传送到完整细胞或组织中。微粒透过植物细胞，作为被引入遗传物质的惰性载体（Gordon - Kamm et al., 1990 和 Sanford et al., 1987）。胚形成悬浮培养物微弹轰击被证实能成功地产生黄杨属植物（Dayton et al., 1992），棉花（Finer 和 McMullen, 1990）、玉米（Gordon - Kamm et al., 1990）和大豆（McMullen 和 Finer, 1990）的转基因植物。影响经粒子轰击的 DNA 传送的各种参数已被限定（Klein et al., 1988; Wang et al., 1988）；

——通过将外源基因吸入到植物组织中（Simon,

1974) ; 和

— electroporation

然而, 当采用这一方法时, 靶产物的回收涉及到整个植物或至少植物的主要部分收获和破裂。即使植物不是整体被采收, 在可以进行下一次收获之前它也需要长的恢复期再生长。此外, 从植物例如烟草中 (实际上也从大多数通常用于这些目的的微生物中) 提取蛋白质产物涉及到组织固体的匀化作用。这会是相对困难和低效率的操作。

巴西橡胶树 Hevea brasiliensis Muell - Arg 属于 Euphorbiaceae 家族, 已被商业性开发用于产生天然橡胶约一个世纪。事实上在三叶橡胶属中有九个品种, 但 Hevea brasiliensis 被最广泛地种植并获得商业价值, 因它给出最高的胶乳产量。

胶乳传统地用称作 “割胶” 的方法从橡胶树抽取。这可以两种技术进行, 其一是树皮切除技术, 其中一块树皮从树上割下以便胶乳流出 (后续的割浆通过在相同切割处切除树皮的一薄层进行), 其二是树皮切入技术, 按照这一技术在树皮上钻一个或多个孔使胶乳流出。因此, 割胶是胶乳回收的非破坏性方法, 它可重复性地并在有规律的间隙 (通常是每隔一天) 进行。天然橡胶构成胶乳的约 $1/3$, 并且很容易用各种分离技术 (如离心) 抽提。

产生丰富的树液或流出物, 即胶乳, 橡胶树是最重要的, 胶乳可连续收获而无有害影响, 本发明利用橡胶树的这一性质以及遗传工程技术, 提供了一种产生有药用价值的蛋白质和其它靶产物的

新的和有利的路线。

按照本发明，这里提供了一种产生遗传上转化过的产汁液植物的方法，该方法包括：

- i) 向植物组织插入控制靶产物表达的基因或基因片断，和
- ii) 从所说组织再生一种植物，该遗传上转化过的植物能够在其所产生的汁液中表达靶产物。

按照本发明的另一个实施方案，这里提供了一种植物克隆，该克隆在其细胞中含有包括控制靶产物表达的一个启动子和一个基因或基因片断的染色体插入物，以便所说靶产物在其所产生的汁液中被表达或能够被表达。

在一个特别优选的实施方案中，本发明提供了一种三叶橡胶属植物克隆，该克隆在其细胞中含有包括控制靶产物表达的一个启动子和一个基因或基因片断的染色体插入物，以便所说靶产物在其胶乳中被表达或能够被表达。

本发明还提供了产生前面提到类型的克隆的方法，该方法包括芽的稼接法种植、取出一个切条(**taking a cutting**)或另外进行一种适合遗传上转化的植物的营养繁殖。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种产生蛋白质或其它产物的方法，该方法包括：

- i) 从遗传上转化过的产汁液树或植物或其克隆收获汁液，和
- ii) 从所说汁液中回收靶蛋白质或其它产物。

该方法可用于三叶橡胶属的所有品种，本文所提及的三叶橡胶属植物和树将相应地被理解，但 Hevea brasiliensis 是特别

优选的。

三叶橡胶属植物很适合用于本发明中，因为它们产生的汁液（即胶乳）易于非破坏性的采收，易于处理，并且是天然蛋白质丰富的（而且因此可在转基因植物中控制外源蛋白质产生）。

然而，将会理解到其它产生（即保留或排出）丰富汁液或树液的植物也适用于本发明，例子包括：

——龙舌兰属植物。一些品种能从它们挖空的树心(hollowed-out pith) 每天产生高达一升的流出物。

——椰子树。其花朵可被采收，导致流水物的大量流出。

——植物器官，它们不排出但保留相当体积的汁液，例如，未成熟的椰子汁液（即“水”或“奶”）的液体胚乳可被大量收获。

本发明范围内的方法分成三个主要阶段：

i) 植物的遗传转化过程，其中代表编码靶蛋白质或其它产物的基因的 DNA 分子被插入到植物组织的遗传补体中。所述基因也需要启动子的伴随是合意的。只要所谓的“通用”启动子（它们是非组织特异性的，通常在所有植物组织包括树液或汁液中启动基因表达）可被使用，该启动子就是更优选的汁液特异性的。就橡胶植物来说，该启动子是最优选的胶乳特异性的。

各种向植物引入基因的技术是已知的，如上述所提到的，这些技术中的任何一种均可被使用。特别优选的是土壤杆菌属微生物载体系统，这一系统涉及用一种已插入所需基因进行生物排列或粒子枪轰击的土壤杆菌属微生物感染植物组织，按这一方法，所需基因以一种微粒形式被推进到植物组织中。带有插入基因或基因片

断的植物组织被称作转化过的或转基因组织。就橡胶植物来说，转化在花药派生的愈伤组织上完成，所说愈伤组织是从三叶橡胶属植物上花的雄蕊柱状物取得的。

被转化技术引入的启动子和基因或基因片断对所涉及的植物来说可以是自生的或外源的。通过修饰启动子或插入自身基因的多重复制体来提高该基因的表达是可能的。外源基因可被导入，这些基因编码多种以蛋白质为基体的产物，最优选的是具有药用价值的蛋白质产物。

i i) 从转化过的组织再生植物，种植并养护至成熟。例如，通过组织培养技术，三叶橡胶属的转化过的愈伤组织被再生，经胚胎阶段到小植株，该植株是转基因的，在其遗传补体中带有被插入的基因。以后，小植株成熟至完全发育的转基因橡胶树，由被插入基因表达的靶蛋白质和其它产物存在于其胶乳中。

i i i) 在由植物或树产生的汁液中的靶蛋白质或其它产物的采集及回收。就三叶橡胶属植物来说，收获的汁液理所当然的将是胶乳。一旦转基因橡胶植物生长至足够成熟（通常是在 2 - 5 年之后），就采割它们，在有规律的时间间隔收获胶乳。然后，离心胶乳，以分离出天然橡胶，含水 C - 浆液和所谓的“底组分”。靶蛋白或其它产物可以包含在胶乳的任何部分，并且能经一般方法（例如制备型柱层析）提取和纯化，较好情况下它们存在于 C - 浆液或底组分（bottom fraction）中，后者主要包括黄色体，黄色体是含有其自身浆液（B - 浆液）的膜结合泡囊。可通过使用洗涤剂（如 Triton X - 100）裂开它们的膜或通过

交替冷冻或解冻使 B - 浆液从黄色体释放。胶乳中可以结合到生物膜上的任何靶蛋白质或其它产物都可通过用洗涤剂（例如十二烷基硫酸钠）加溶的方法收回。

本发明提供了一种合成许多蛋白质产物和非蛋白质产物的新的和有利的路线。它特别适合于有药用价值的蛋白质产品的制备，从原理上讲，倘若编码其表达的基因是已知的，该技术应能应用于实质上任何以蛋白质为基质的产物的合成。由被插入基因直接编码的蛋白质产物能在植物体由自身催化不同终产物的产生是所期望的。然后，后面的（蛋白质的或非蛋白质的）产物作为有商业价值的终产物被收获。可以由转基因植物或树产生的产物的例子如下：

（ a ） 治疗糖尿病的胰岛素

（ b ） 治疗血友病（ haemophilia ）的血凝块因子

（ c ） 治疗心脏病的血块溶解激活剂

（ d ） 治疗肿瘤的肿瘤坏死因子

（ e ） 治疗贫血的红细胞生成素

（ f ） 生产疫苗的病毒包衣蛋白

（ g ） “ PHB ”，一种类似于聚丙烯的塑料，用于制造瓶子，包装材料等。

本发明中的特异橡胶树的使用具有许多明显的优点，其中，下列特别值得注意：

—— 生产是连续的，因为含有靶蛋白或其它产物的胶乳在有规律的间隙收获，并且产物回收简单，因胶乳是一种汁液，靶产

物的回收不涉及组织匀化。

—— 该方法与环境协调，过程由太阳所驱动，因而是能量效率高的，并且基本上无污染。

—— 橡胶树除要日常的园艺学养护外，不需要任何特别关注，因而它们的使用是低耗费的。

—— 该技术能用于许多靶产物

—— 从橡胶树流出的乳胶完全没有细菌和动物病毒，这一点与在使用遗传上转化过的微生物和动物时需采用的严格的灭菌操作正好相反。

—— 橡胶树易于克隆或营养繁殖，大多数通常是经芽的嫁接种植。其它方法包括取出一个切条，压条繁殖或组织培养。这样，无数的遗传性相同的植物（克隆）可从单个转基因植物产生——所有这些都将它们在它们的胶乳中表达所需产物。

—— 橡胶树有实用的生命期，约 30 年，在此其间，除产生靶产物外，遗传上转化过的树当然在其胶乳中连续产生天然橡胶，天然橡胶自身是有价值的商品。当其最终被砍伐时，该树也产出了有价值的热带木材（橡胶木），它是出口和制造家具非常需要的。

适用于本发明的其它产汁液植物具有这些优点中的一些。

附图说明

附图 1，用色素底物 X - gluc 处理后三叶橡胶属植物组织中的 GUS 活性。（A）对照愈伤组织。（B）从 3 周龄轰击过的花药愈伤组织取得的细胞。（C）对照胚状体。（D）粒子轰击后的胚状体。所有照片放大倍数是 25 倍。

附图 2，显示与对照值（U. T. E）相比，在经轰击

过的三叶橡胶属植物胚状体 (T. E) 中 GUS 活性的杆状图。以平均值 $\pm s$, d 给出结果; $n = 20$ 个胚状体。

附图 3, 与对照值相比在轰击过的愈伤组织中的 NPT II 蛋白质水平。给出了含有 NPT II 基因的三种不同质粒 (参见前述方法) 的结果, 以平均值 $\pm s$, d. 给出值; $n = x$ 次重复。

附图 4, 显示预先经质粒 pDE 10 轰击过的三叶橡胶属植物组织中 CAT 活性的放射自显影。

表示了 [^{14}C] 氯霉素 (CAP), [^{14}C] 1 - 乙酰基氯霉素 (1 - CAP) 和 [^{14}C] 3 - 乙酰基氯霉素 (3 - CAP) 的位置。第 1 道: 用作阳性对照的商品 CAT (Sigma); 第二道阴性对照 (仅含缓冲液); 第 3 道: 对照 (未经轰击的) 花药愈伤组织, 第 4 - 6 道: 用硫酸卡那霉素选择 3 周后的不同转化过的花药愈伤组织; 第 7 道: 从在硫酸卡那霉素存在下经轰击的愈伤组织再生的胚状物组织。

附图 5, 由 X 周龄抗菌选择性的三叶橡胶属植物愈伤组织中分离的 DNA 的 gus 基因的扩增。第 1 道: 1Kb 梯。第 2 道: 500ng DNA, 第 3 道: 100ng DNA. 第 4 道: 20ng DNA. 第 5 道: 4ng DNA. 第 6 道: 0.8ng DNA.

附图 6, (E) 从附图 1 所示的经粒子轰击过的组织生长出的三叶橡胶属植物的小植株, 用色素底物 X - gluc 处理后的 GUS 活性。 (F) 对照根。 (G) 从转化的

胚状体再生的根，所有照片放大 25 倍。

附图 7，用从再生 Hevea brasiliensis 植物分离的基因组 DNA 的 PCR 进行的 *gus* 基因检测。

第 1 道：1Kb 梯，第 2 道：从对照（未经轰击的）植物获得的 4.0ng DNA；第 3 道：从转化的愈伤组织获得的 4.0ng DNA；第 4 道：从转化的胚状体获得的 4.0ng DNA。第 5 道：从转化的三叶橡胶属小植株的单叶分离出的 4.0ng DNA。

附图 8，（H）在 X - gluc 中培养的叶样品的表面。未转化的样品端部未被染色，而转化的样品（下部）

被染成蓝色，照片放大倍数为 10 倍。（I）在 X - gluc 中培养的叶样的截面，未转化的样品（端部）未被染色，而转化的样品（下部）被染成兰色。照片放大倍数为 31 倍。

现在以下列实施例进一步说明本发明，实施例 1 涉及用粒子枪法的 Hevea brasiliensis 的遗传转化，而实施例 2 和 3 分别说明了土壤杆菌属微生物载体系统和吸入技术的用途，葡萄糖醛酸酶用作靶蛋白质的一个例子，但相同的步骤可通用于其它产物，只是用靶蛋白质的合适基因代替控制葡萄糖

醛酸酶产生的基因。 实施例中引用了下列缩写词:

MB = 三叶橡胶属花药培养起始培养基

GUS / *gus* = β - 葡萄糖醛酸酶

NPTII / *nptII* = 新霉素磷酸转移酶

CAT / *cat* = 氯霉素乙酰转移酶

PCR = 聚合酶链反应

ELISA = 酶联免疫吸附试验

CaMV = 花椰菜花叶病毒

实施例 1

植物材料的组织培养

从雄蕊柱状物的单个花药取出胚发生三叶橡胶属植物花药愈伤组织, 将该愈伤组织在 25°C 置入并保持在 MB 培养基 (Chen et al, 1984) 中, 并在四周后用于在该培养基中的转化, 所有组织培养步骤基本上按照 Chen et al, (1984) 所描述的方案。

植物表达载体

下列质粒用于转化: 含有 β - 葡萄糖醛酸酶 (*gus*) 基因的 pBI 22 I. I (Jefferson, 1987), 含有 *gus* 和 *nptII* 基因的 pMON 9793 (Gasser, Monsanto Company, 未出版), 含有 *Cat* 和 *nptII* 基因的 pDE 10 (Rhodes, Norwich, UK) 和含有 *nptII* 基因的 pHP_{za} (Paszkowski 和 Saul, 1988)。 这些基

因在强 CaMV 35S 启动子控制下。重组质粒在大肠杆菌中生长，所说大肠杆菌是经碱解 (alkali lysis) 分离并经氯化铯 / 溴化 3.8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶鎓密度梯度离心 (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989) 纯化的。质粒 DNA 由其在 260nm 的吸收和凝胶电泳定量。

微弹轰击

质粒 DNA 如现有技术 (Gordon - Kamm et al, 1990) 所描述的沉淀在钨粒子上。该沉淀混合物包括在总体积 575 μ L 中的 1.30mg 钨粒子、25 μ g 质粒 DNA, 1.1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 8.7 mM 亚精胺。在以上述顺序加入各组分后，混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋涡搅拌 10 分钟，在 500xg 下离心 5 分钟，然后弃掉 550 μ L 上清液，底部沉淀重新悬浮在剩下的 25 μ L 上清液中，并且其中的 1 μ L 钨悬浮物被装入微弹，用生物排列粒子枪 (spearline precision Engineering Ltd, UK) 朝靶加速。花药愈伤组织放置在 Whatman 1 号滤纸片 (7cm) 的中央，该滤纸片在轰击之前再放到含有 MB 培养基的塑料佩特里细菌培养皿 (9cm 直径) 的中央。将愈伤组织培养物放置在微弹终止板下 5cm，且在终止板和组织之间的中途设置一个 100 - μ m 网眼不锈钢筛以帮助钨粒子分散。每块板轰击一次，然后将愈伤组织在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下的生长室中避光培养一会儿。

转化体的挑选

在轰击后 25°C 的避光培养后, 从滤纸上轻轻移去愈伤组织并放置在含有 MB 培养基的新鲜的板上, 在 25°C 避光继续培养 10 天。将轰击过的愈伤组织转移到含有 $100\mu\text{g}$ 硫酸卡那霉素 / ml 的 MB 选择培养基上。在轰击并转移到含 $100\mu\text{g}$ 硫酸卡那霉素 / ml 的分化培养基上以及在 25°C 有光 ($250\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 培养四周后分离抗菌抑制性克隆。这刺激了芽和根的生长, 然而, 即使没有抗菌选择, 仅有小部分 (3%) 的体细胞胚胎分化成小植株 (Chen at al., 1981b)。

酶试验

NPTII: 转化组织的 NPTII 活性用 ELISA 试剂盒 (5 Prime - 3 Prime, Inc., 由 CP Laboratories, UK 获得) 测定, 每个试验使用约 $400\mu\text{g}$ 的提取蛋白质。

GUS: 三叶橡胶属的转化花药愈伤组织、胚状体和根中。
 β - 葡萄糖苷酸酶活性的组织化学分析按 Jefferson (1987) 的方案使用底物 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚基葡萄糖苷酸 (X - gluc) 来完成。在加入 X - gluc 18 - 36 小时后测定组织被染成蓝色的细胞, 使用 Nikon SZM - U1:10 倍双筒显微镜用 Kodacolor Tungsten 160 T 胶片显微照相, 用底物 4 - 甲基 - umbelliferyl - β - D - 葡萄糖苷酸完成 GUS 活性的荧光测定试验 (Jefferson

et al., 1987)。

CAT: 按 Gorman et al., 1982 所述的方法测定 CAT 活性。使用 1 单位的细菌 CAT 酶 (Sigma) 用轰击过的组织样品平行作阳性对照。阴性对照包括 CAT 缓冲液和未经轰击的胚状体的提取物样品。

DNA 分离和 PCR

DAN 分离 基因组 DNA 使用如 Draper et al., (1988) 描述的蛋白酶方法分离。50mg 冻干的三叶橡胶属植物组织用碾槌和研钵磨成极细的粉末。然后, 粉末状组织与 400 μ L 蛋白酶缓冲液 (100mM Tris-HCl PH 8.5, 100mM NaCl, 50mM EDTA pH 8.0, 2.0% SDS, 0.1mg 蛋白酶 K mL^{-1}) 充分混合并且以偶然轻轻转动在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 - 2 小时。用 80 μ L 苯酚和 80 μ L 24:1 (V/V) 氯仿 / 异戊醇提取组织 / 缓冲液匀浆。离心分离水相并重复提取步骤。第二次提取后合并的水相用 0.54 体积的异丙醇在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下沉淀过夜。第二天, 沉淀用 70% 乙醇洗涤并重新悬浮在 50 μ L TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl PH 8.0, 1.0mM EDTA PH 8.0) 中。为三叶橡胶属植物基因组 DNA 的限制性, 在限制性缓冲液中经常包括 2 μ L 10 $\times$ BSA / 亚精胺) 2.5mg BSA mL^{-1} , 40mM 亚精胺以克服杂质出现引起的问题。

PCR: 每一个 PCR 反应在含有 10 mM Tris

U11523

-HCl PH 8.8, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 50 μL 矿物油, 200 μM dATP, 200 μM dTTP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP, Taq 聚合酶 (0.5 - 1.0U), DNA (2 - 10ng) 和寡核苷酸引物 5' GGTGGGAAAGCGCG TTACAAG 3' 和 5' GTTTACGCGTTGCTT CCGCCA3' (分别在 GUS 基因的 400 - 420 和 1599-1579 位, Jefferson et al, 1986) 的 50μL 溶液中进行。在 PCR 反应中每个引物使用 100ng, Taq 聚合酶从 Amersham International plc 获得。变性温度是 92°C (持续 1 分钟), 退火温度是 55°C (持续 1.5 分钟), 伸展温度是 72°C (持续 2.0 分钟), 反应设定为 30 个循环, 使用可程序化的热控器 (The Hybaid Thermal Reactor)。经使用 TBE (0.9M Tris-HCl, 25mM EDTA, 0.9mM H₃BO₃) 作为显层缓冲液 (running buffer) 将样品在 1.0% 琼脂糖 / 溴化 3.8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶鎓胶上显层 (running) 后检测 DNA。

结果

转化和再生

在为研究过渡基因表达所建立的将基因引入到大麦胚胎的方法 (M. G. K. Jones, Rothamsted, UK) 之后采用了生物排列方案。供粒子轰击的新使用的花药愈伤组织是

高度胚形成三叶橡胶属植物克隆派生的（克隆登记号 11）。一段将轰击过的愈伤组织转移到选择培养基中，卡那霉素抗性的微愈伤组织表现出生长缓慢，然而，这些转化过的愈伤组织显得健壮并在黑色和正在死亡的未经轰击的愈伤组织中间呈白色

（附图 1）。使用质粒 pMON 9793 轰击后一旦加入 X - gluc，呈现蓝色的抗菌选择性的愈伤组织和胚胎的百分率在愈伤组织中达 90%，胚胎中达 80%。使用 pBI 221.2 但未用卡那霉素选择时，呈蓝色的百分率愈伤组织达 60%，胚胎达 70%（表 2），使用质粒 pMON 9793 时在轰击过的愈伤组织和胚胎中所表现出的高转移效率很可能是由于卡那霉素选择。

表 2：表达 GUS 活性的愈伤组织和胚胎的百分率

质粒	10
转化体	10
愈伤组织数	9
表达 GUS 愈伤组织数	8
百分率	90
pMON 9793	10
花药愈伤组织	10
胚胎	6
pBI 221.2	7
花药愈伤组织	60
胚胎	70

GUS的组织化学试验常说明在保持未经卡那霉素选择的愈伤组织中的酶活性的异型，但是在经卡那霉素选择后的细胞中表现出同型。当使用 X - gluc 时，没有对照（未经轰击的）花药愈伤组织、胚胎或根染成兰色。这些实验的结果总结在示于附图 1 的显微照片中。

使用荧光活性试验（附图 2）证实了从 GUS 活性的组织化学染色所获得的结果。90% 被分析的转化过的胚胎中被证实有 GUS 荧光活性，与未经轰击的对照值相比转化过的胚胎中的 GUS 活性总共增加 4 倍。

使用 ELISA 技术（附图 3）对转化过的愈伤组织中的 NPTII 水平定量。总的来说，NPTII 蛋白质水平高出本底对照值约 4 倍，范围从每 mg 总蛋白质 28 到 32 ng NPTII。

除了使用 gus 作为报告基因（reporter gene）外，我们还使用 cat 基因控制基因向三叶橡胶植物的传递。这些实验的结果总结在附图 4 所示的放射自显影照片中。很明显含有 cat 基因的质粒能通过轰击传递并在三叶橡胶属植物愈伤组织和胚胎组织中有效地被表达。在未经轰击的对照组织（附图 4 第 3 道）中仅观察到 CAT 活性的很低水平。

用 PCR 技术完成三叶橡胶属植物愈伤组织中转移的报告基因出现的直接检测。Hamill et al., (1991) 的方法被用于扩增 gus 的内序列。使用至少 0.8 ng 模板 DNA 经 30 个扩增循环后在琼脂糖 / 溴化 3.8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶鎓胶上可见单个带（附图 5），

该扩增带大小与 gus 基因相同。

最后，在粒子轰击后，我们设法再生两个三叶橡胶属小植株（无菌生长）（附图 6）。该小植株表现得很正常，以 **X - gluc** 处理后其根染成兰色。用在源于愈伤组织的 DNA 上完成的相同的 PCR 方案证实了在这些小植株的一个中出现 gus 基因。如附图 7 所示，用少至 4.0ng 三叶橡胶属植物叶片 DNA 达到了 gus 基因的成功扩增。我们不能使用以上描述的相同的 PCR 条件在任何对照（未经轰击的）愈伤组织、胚胎或小植株中扩增 gus 基因。

这些结果说明，如由报告基因试验、卡那霉素抗性转化体回收和 PCR 技术使用所测定的，微弹 / 微粒能将外源 DNA 转入到 *Hevea brasiliensis* 细胞中。被带到细胞中的 DNA 明显地从微弹表面释放并经某些被动或主动机制转送到其基因可被表达的核中去。

实施例 2

I 愈伤组织转化

经选择的三叶橡胶属栽培品种的雄性花用 **Chlorox**（5.25% a. i. 次氯酸钠）消毒 5 分钟，接着用无菌蒸馏水洗涤几次。花药从雄蕊柱状物切下并接种到 MB 培养基（20 花药 / 陪氏盘）中。培养物在 25°C 下避光培养。

经土壤杆菌属微生物遗传转化

4 周龄的三叶橡胶属植物花药愈伤组织用带有葡萄糖苷酸酶和

新霉素磷酸转移酶基因的根瘤病土壤杆菌感染。后者具有对抗生素卡那霉素的抗性。愈伤组织浸在根瘤病土壤杆菌的经一夜培养的PH值为5.8的悬浮物中1分钟，用含有7%蔗糖但没有补充激素的MB培养基稀释，以给出最终估计为 3.7×10^5 细胞 / ml 的细菌密度。菌群密度的估计通过测定培养一夜的培养物对在600nm的吸收来进行。过量的细菌悬浮物用无菌Whatman 1号滤纸从愈伤组织吸收，该滤纸转移到佩德里平碟供2天的共培植。

将上述愈伤组织转移到含有抗生素氨噻头孢菌素 (250 ug / ml) 和铁卡霉素 (500ug / ml) 的MB培养基中以杀灭其中土壤杆菌属微生物。

一周以后，上述愈伤组织置于选择性平碟MB, Km100 ug / ml) 上，但仍保留氨噻头孢菌素和铁卡霉素。在一周间隙的后续继代培养中，氨噻头孢菌素和铁卡霉素的浓度逐渐减低。

II. 转化小植株的再生

上述愈伤组织培养物置入MB培养基中并培养一周，然后每7天再移于到新鲜培养基 (MB) 中，3周后，培养物转移到选择分化培养基上。这一阶段持续约2个月，其中包括30天后转移到新鲜培养基中。培养物再在25°C避光培养。起始培养基 (MB) 和分化培养基两者均含有硫酸卡那霉素 (100ug / ml) 以选择转化过的细胞。

在分化培养基中大约60天后，发育的胚状体转移至发育培养基中以形成茎干和根。该小植株种植在土壤中，然后养护至成

熟。

在用土壤杆菌属微生物媒介插入 GUS 基因后，Hevea brasiliensis 小植株成功地再生，该小植株表现得正常，且叶子的样品经用 X - gluc 处理后染成兰色，表明 GUS 基因的表达。当用 X - gluc 进行相似的处理时，从体外培养的未转化过的三叶橡胶属植物得来的叶子样品不被染色。这些结果示于附图 8 中。

实施例 3

除了以如下的吸入方法，而不用土壤杆菌属微生物载体系统完成遗传转化外，基本上按照实施例 2 的方法。

4 周龄的三叶橡胶属花药愈伤组织以将该组织置于 37°C 恒温箱中 30 分钟的方法脱水，该愈伤组织在含有编码葡萄糖苷酸酶基因的 DNA 溶液（在无菌水中的 100ug pBI 221.1 DNA）中吸涨 30 分钟。该培养物转移到 MB 培养基中，接着转移到分化培养基中，然而与实施例 2 不同，培养基中不包含硫酸卡那霉素。

参考文献

- Chen Z (1984). Rubber (Hevea) In: Sharp W R, Evans D A, Ammirato P V and Yamada Y (eds). Handbook of plant cell culture, Vol 2: Crop species, Macmillan, New York: 546-571.
- 5 Dayton W H, Richard B M and Scott A M (1992). Expression of foreign genes in transgenic Yellow-Poplar plants. Plant Physiol. 98: 114-120.
- Draper D, Scott R, Armitage P and Walden R (1988). In: Plant Genetic Transformation and
10 Gene Expression - A Laboratory Manual.
- Finer J J and McMullen M D (1990). Transformation of cotton (Gossypium hirsutum L.) via particle bombardment. Plant Cell Rep. 8: 586-589.
- 15 Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, Adams T R, Daines R J, Start W G, O'Brien J V, Chambers S A, Adams W R, Willets N G, Rice T B, Mackey C J, Krueger R W, Kausch A P and Lemaux P G (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2: 603-618.
- 20 Gormon C M, Moffat L F and Howard B H (1982). Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051.
- Hamill J D, Rounsley S, Spencer A, Todd G and Rhodes M J C (1991). The use of polymerase chain reaction in plant transformation studies. Plant Cell Reports 10: 221-224.
- 25 Harris R R, DeRobertis G A, Pierce D A, Moynihan M R and Everett N P (1990). Heterogeneity of x-gluc staining in transgenic maize callus (abstract). In Vitro Cell Dev. Biol. 26 (part II): 69.
- Jefferson R A (1987). Assaying chimaeric genes in plants: The GUS gene fusion system.
30 Plant Molec. Biol. Reporter 5: 389-405.
- Jefferson R A, Burgess S M and Hirsh D (1986). Beta glucuronidase from E. coli as a gene fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8447-8451.

Jefferson R A, Kavanagh T A and Bevan M W (1987). GUS fusions: beta glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3902.

Klein T M, Fromm M E, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Sietten M and Sanford J C
5 (1987). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles.
Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 4305-4309.

Klein T M, Gradziel T, Fromm M E and Sanford J C (1988). Factor influencing gene delivery
into Zea mays cells by high-velocity microprojectile. *Bio/technology* 6: 559-573.

Klein T M, Kornstein L, Sanford J C and Fromm M E (1989). Genetic transformation of
maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* 91: 440-444.

McMullen M D and Finer J J (1990). Stable transformation of cotton and soybean
15 embryogenic cultures via microprojectile bombardment (abstract). *J. Cell Biochem.* 14E: 285.

Meijer E G M, Schilperoort R A, Rueb S, van Os-Ruygrok P E and Hensgens L A M (1991).
Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimaeric genes. *Plan Mol.*
Biol. 16: 807-820.

Paszkowski J and Saul M (1988). Direct gene transfer to plants. In: Weissbach A, Weissbach
(eds). *Methods in Enzymology*, vol 188: 668-685. New York: Academic Press.

Platt S G and Yang N-S (1987). Dot assay for neomycin phosphotransferase activity in crude
25 cell extracts. *Anal. Biochem.* 162: 529-535.

Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Sanford J C, Klein T M, Wolf E D and Allen N (1987). Delivery of substances into cells and
30 tissues using a particle bombardment process. *Particle Science and Technology* 5: 27-37.

Wang Y-C, Klein T M, Fromm M E, Cao J, Sanford J C and Wu R (1988). Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. Plant Mol. Biol. 11: 433-

- 5 Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor, A., Sanchez, Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. Mol. Gen Genet, 220, 245-250.

10

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley, RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plant. Science 227, 1229-1231.

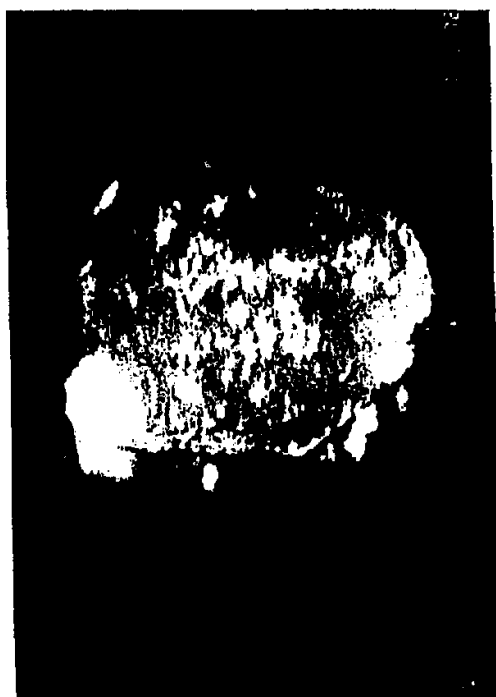
- 15 Bevan M (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721.

- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti
20 plasmid derived vector. Nature 303, 209-213.

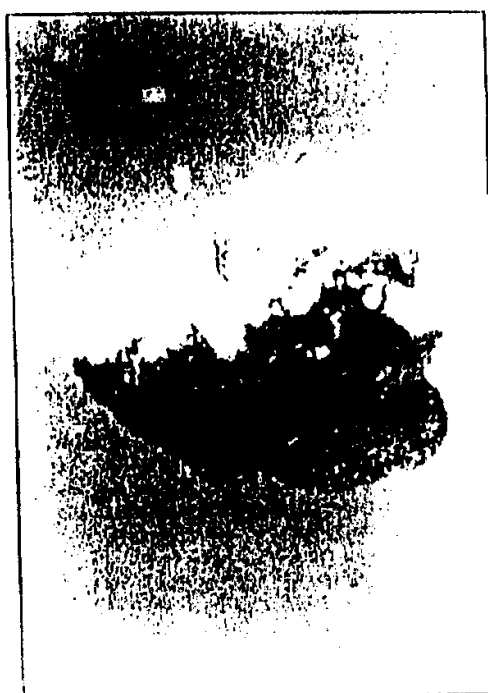
Simon, E.W. (1974). Phospholipid and plant membrane permeability. New Phytol, 73, 377-420.

- 25 Chen, Z., Qian, C., Qin, M., Xu, X., Xiao, Y., Lin, M.D.Z., Wu, S. and Huan, N. (1981 b). Recent advances in anther culture of rubber tree and sugarcane. In: Ann. Rep. Inst. Genetics Academia Sinica, Beijing, China, p. 103.

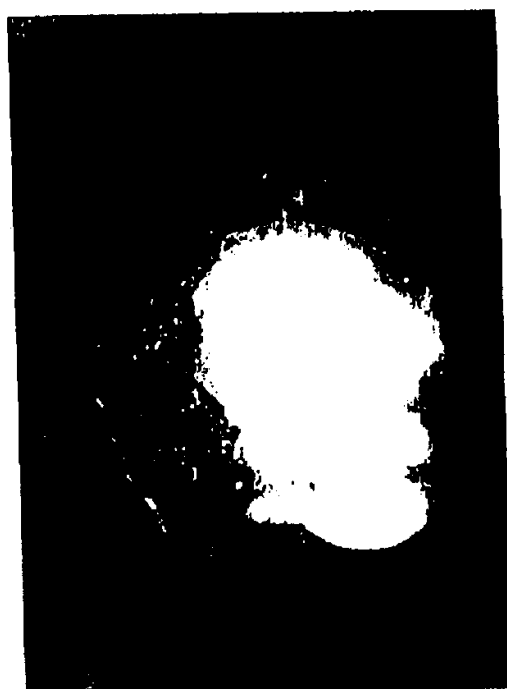
说明书附图



A.



B.



C.



D.

图

HEVEA 胚状体中GUS 活性

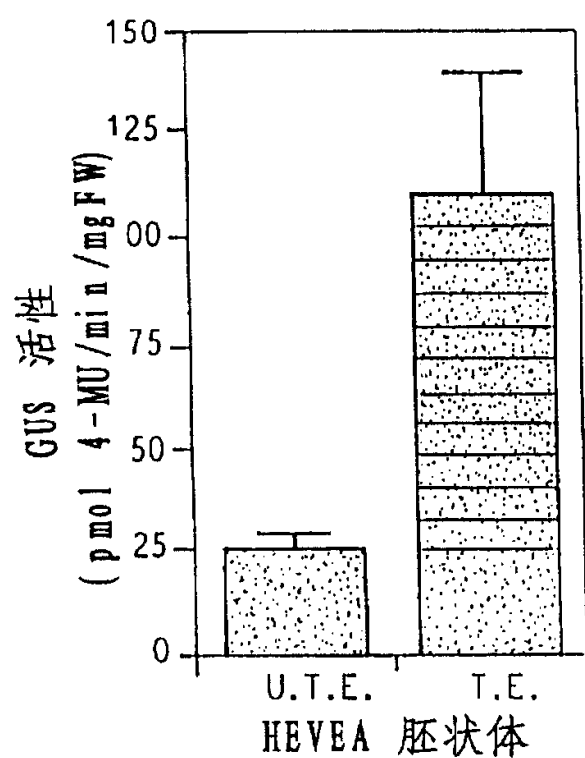


图 2

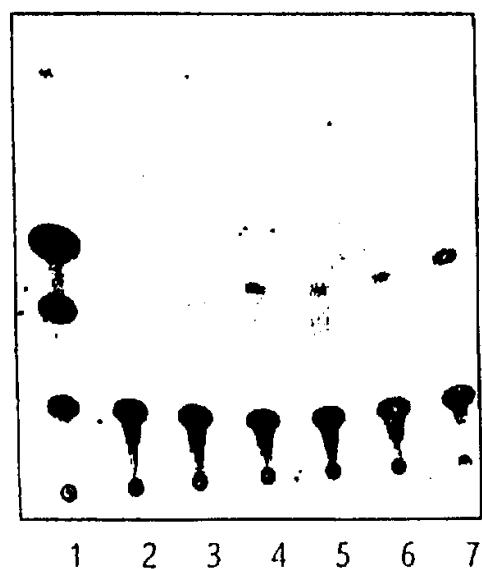


图 4

HEVEA 组织中NPT II 活性

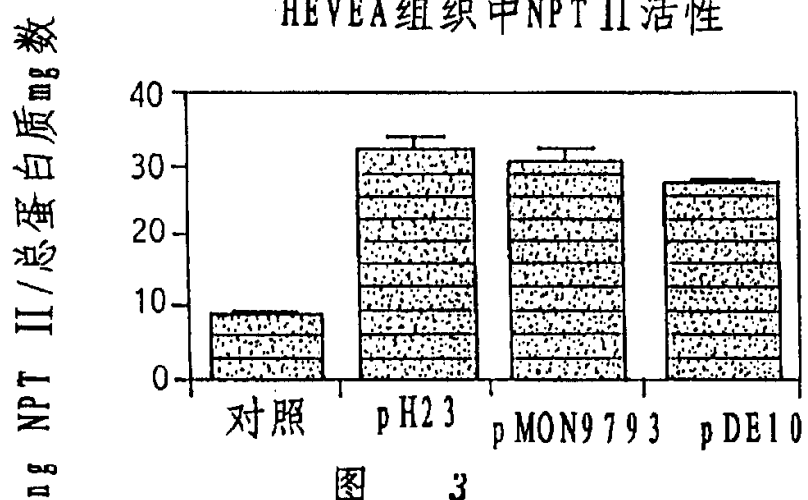


图 3



图 5

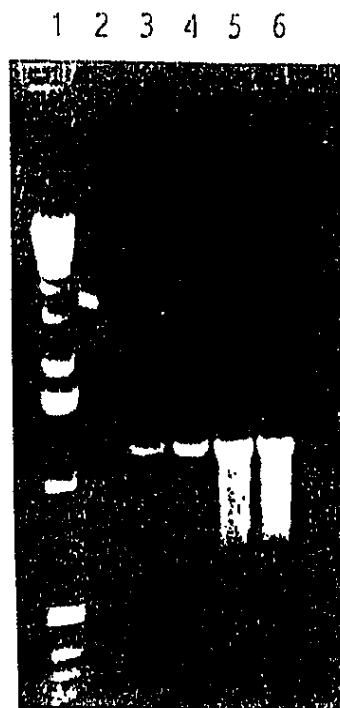
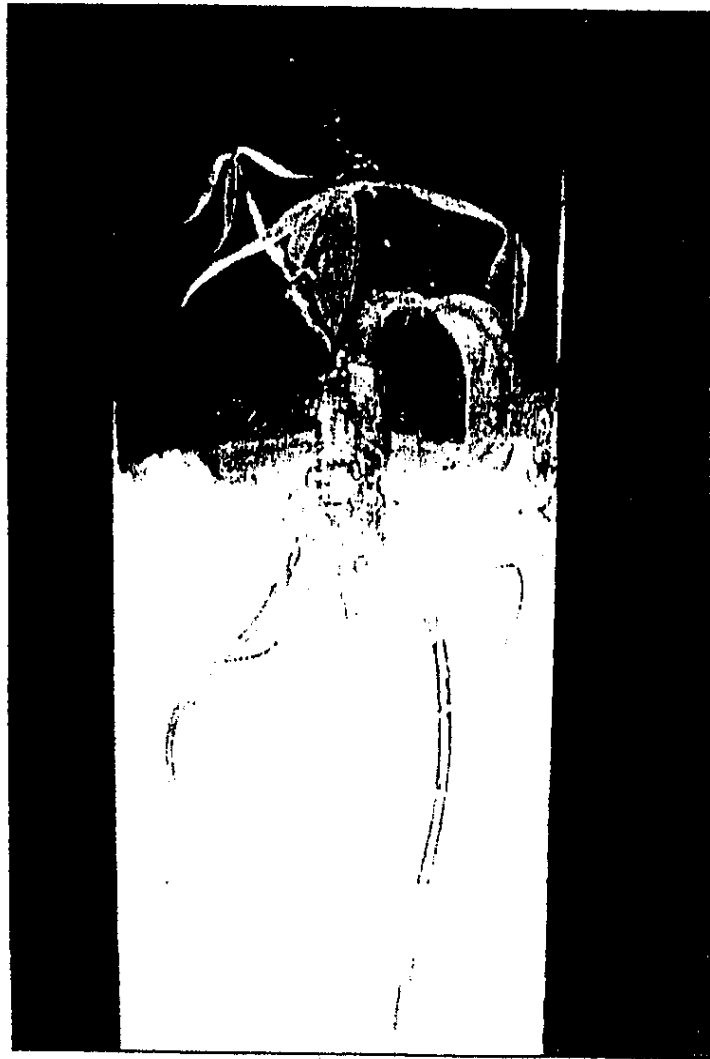


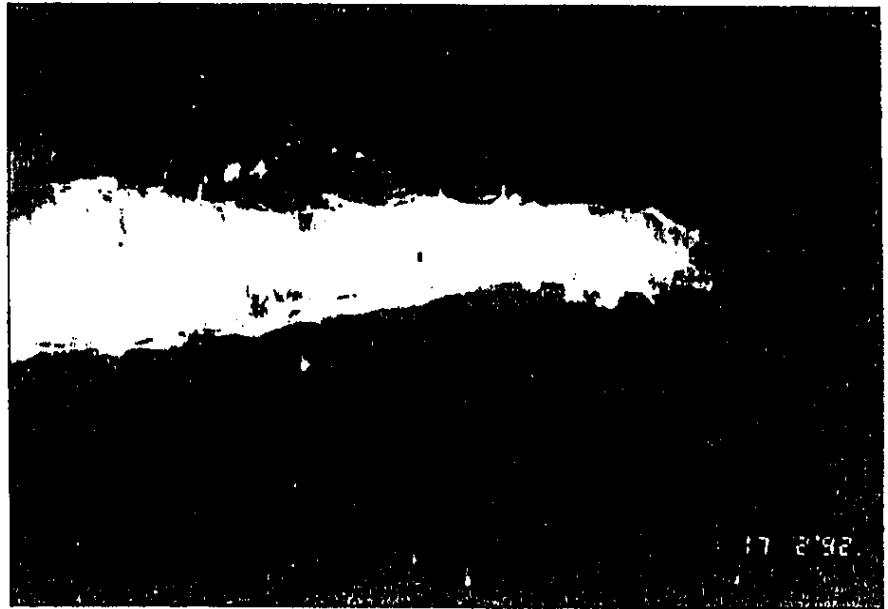
图 7



E.

图

6

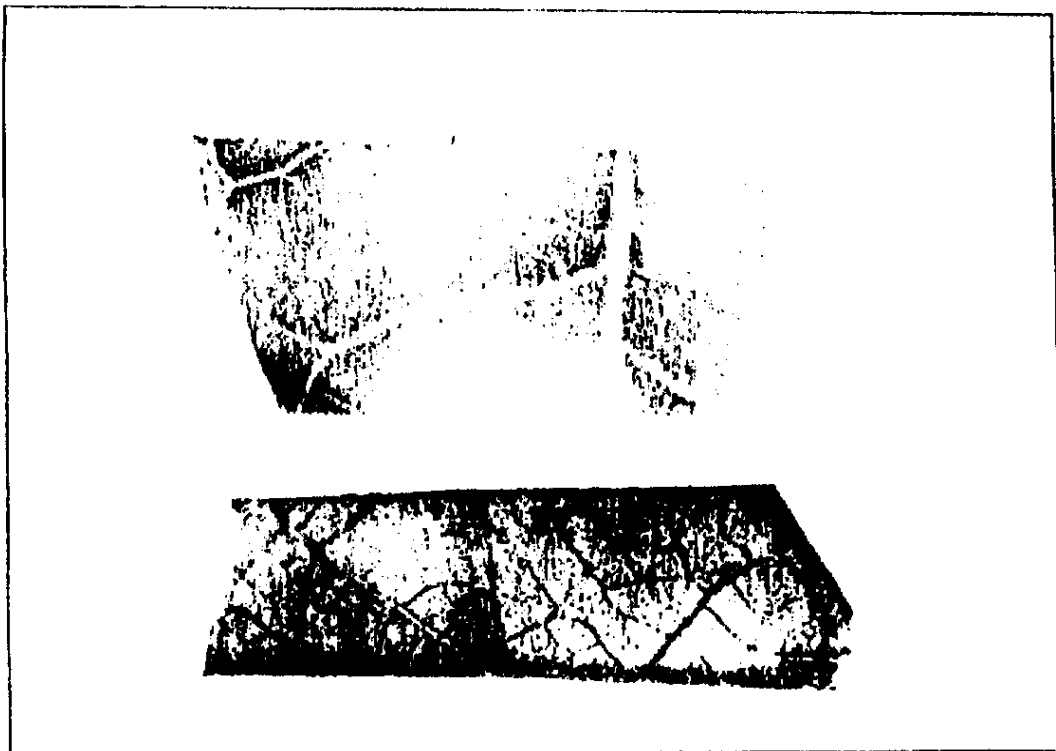


F.

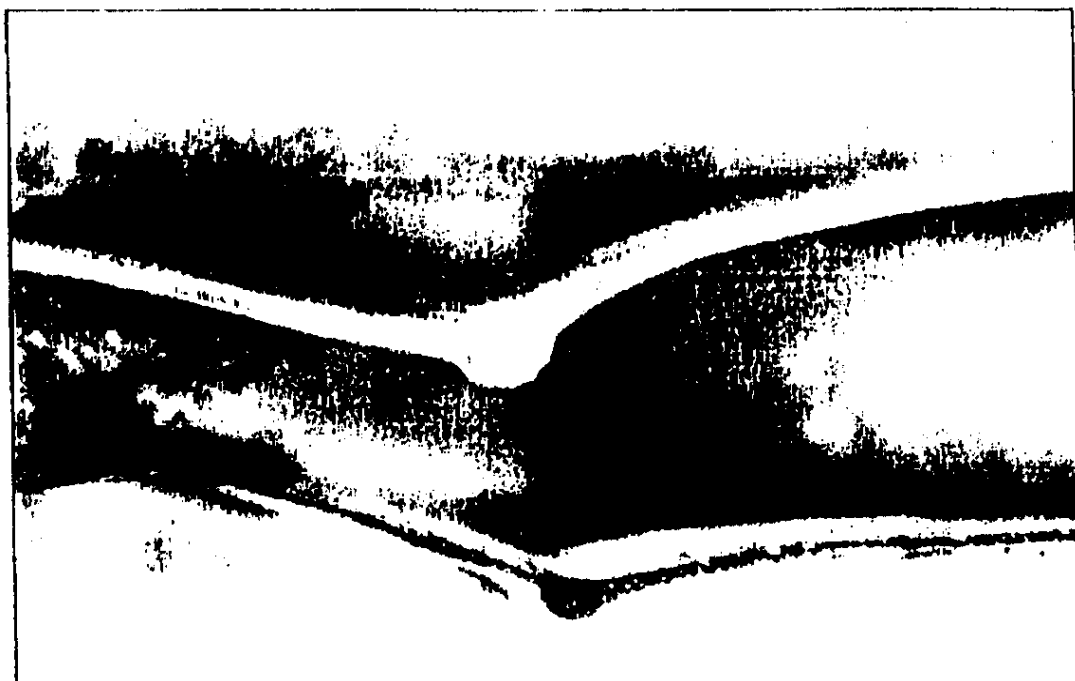


G.

图 6 (续)



II.



I.

图 8