

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/52

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/53 C12N 15/82

C12N 5/10 A01H 5/00

[21] 申请号 00804609.3

[43] 公开日 2002 年 5 月 1 日

[11] 公开号 CN 1347454A

[22] 申请日 2000.3.3 [21] 申请号 00804609.3

[30] 优先权

[32]1999.3.5 [33]DE [31]19909637.6

[86] 国际申请 PCT/EP00/01850 2000.3.3

[87] 国际公布 WO00/53768 英 2000.9.14

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.4

[71] 申请人 格林诺瓦森植物生物技术股份有限公司

地址 德国弗莱堡

[72] 发明人 P·贝耶 I·波特赖库斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

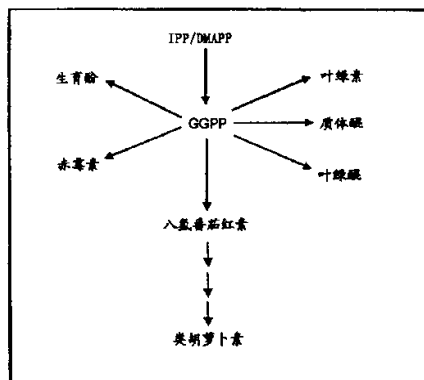
代理人 张广育 钟守期

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 改善植物的农艺和营养价值的方法

[57] 摘要

本发明提供了转化植物细胞、种子、组织或全植株以便产生能够表达类胡萝卜素生物合成途径的所有酶的转化体的装置和方法,这些酶是目标宿主植物积累感兴趣的胡萝卜素和/或叶黄素所必需的。本发明还提供了为了适用于实施本发明方法而设计的 DNA 分子,以及包括所述分子的质粒和载体系统。另外,本发明提供了具有改善了的营养品质、并含有所述 DNA 分子的和/或用本发明方法产生的转基因植物细胞、种子、组织和全植株。



ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

## 权 利 要 求 书

1.一种分离的 DNA 分子, 包括具有一个或多个表达框的核苷酸序列, 所述表达框能够指导选自下列一组的类胡萝卜素生物合成途径所特有的一种或多种酶产生: -源于植物、真菌、或细菌的八氢番茄红素合成酶,

-源于植物、真菌、或细菌的八氢番茄红素脱饱和酶,

-源于植物的  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶, 和

-源于植物、真菌、或细菌的番茄红素环化酶,

其前提是, 排除了仅能指导八氢番茄红素合成酶产生的表达框。

2.如权利要求 1 的 DNA 分子, 其中, 所述表达框包括一个或多个编码植物、真菌或细菌八氢番茄红素合成酶, 植物、真菌或细菌八氢番茄红素脱饱和酶, 植物  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶, 或植物、真菌、或细菌的番茄红素环化酶的基因或 cDNA, 所述基因各自可操作地与合适的组成型、诱导型、或组织专一型启动子连接, 使其能在植物细胞、种子、组织或全植株中表达, 其前提是, 排除了仅包括编码八氢番茄红素合成酶的基因或 cDNA 的表达框。

3.如权利要求 1 或 2 的 DNA 分子, 还包括至少一个可操作地连接于能使其在植物细胞、种子、组织或全植株中表达的组成型、诱导型或组织专一型启动子上的选择标记基因或 cDNA。

4.如权利要求 1-3 中任一项的 DNA 分子, 其中, 所述编码八氢番茄红素合成酶的核苷酸序列源于植物, 优选在组织专一型启动子的控制下表达。

5.如权利要求 1-4 中任一项的 DNA 分子, 其中, 所述编码八氢番茄红素脱氢酶的核苷酸序列源于细菌并且与合适的质体转运肽编码序列融合, 这两个序列优选在组织专一型或组成型启动子的控制下表达。

6.如权利要求 1-5 中任一项的 DNA 分子, 其中, 所述编码源于植物的番茄红素环化酶的核苷酸序列优选是在组织专一型或组成型启动子的控制下表达。

7.如权利要求 2-6 中任一项的 DNA 分子, 其中, 所述选择标记基因或 cDNA 是受组成型启动子控制的潮霉素磷酸转移酶。

8.如权利要求 1-7 中任一项的 DNA 分子, 其中, 所述核苷酸序列包括编码八氢番茄红素合成酶和细菌或真菌八氢番茄红素脱饱和酶的





# 说明书

## 改善植物的农艺和营养价值的方法

5 本发明涉及植物细胞、种子、组织和全植株的转化领域。更具体地讲，本发明涉及将编码类胡萝卜素生物合成途径所特有的一种或多种酶的重组核苷酸序列插入植物材料，以便改善其农艺和营养价值。

### 发明背景

10 前维生素 A ( $\beta$ -胡萝卜素) 缺陷是一种非常严重的健康问题，它会在以诸如大米之类的谷物作为几乎唯一的主要食物的世界人群中导致严重的临床症状。仅在东南亚，估计每年就有 500 万儿童发生眼睛疾病——干眼病，其中有 2.5 万人最终会失明 (Sommer, 1988; Grant, 1991)。另外，尽管维生素 A 缺陷不是直接的死亡决定因素，但它与增加了的易患潜在的致命性疾病相关，如腹泻、呼吸道疾病和儿童疾病，如麻疹 (Grant, 1991)。根据 UNICEF 的统计数字，改善前维生素营养，每年能够预防 1-4 岁儿童中 1-200 万人的死亡，并能预防 15 0.25-0.5 百万儿童在以后时间死亡 (Humphrey 等, 1992)。因此，非常需要提高主要食物中的类胡萝卜素含量。另外，已知类胡萝卜素有助于预防几种类型的癌症，并且证实了视网膜中的叶黄素和玉米黄素在预防黄斑变性方面的作用 (例如，参见 Brown 等, 1998; Schalch, 1992)。

另外，类胡萝卜素作为人类食品和动物饲料以及在制药行业中作为着色剂具有广泛用途。另外，类胡萝卜素在“功能食品”中作为营养化合物的价值也在增加。这是因为某些类胡萝卜素，例如， $\beta$ -胡萝卜素在哺乳动物体内具有前维生素-A 特征。

25 类胡萝卜素是由 8 个异戊二烯单位缩合而产生的 40 个碳原子 (C<sub>40</sub>) 的类异戊二烯，所述异戊二烯单位是由生物合成前体——异戊二烯二磷酸酯产生的 (参见图 1)。在命名时，类胡萝卜素分成两种类型，即包括烃的胡萝卜素，和被称作叶黄素的加氧衍生物。它们在植物中的主要作用是，防止对质体的光合装置造成光氧化损伤。另外，它们在光合作用中参与集光，并且是光合反应中心的组成成分。类胡萝卜素 30 是植物激素脱落酸的直接前体。

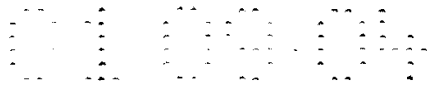
业已研究了图 1 所示的类胡萝卜素生物合成，并且业已在细菌、真

菌、和植物中阐明了其途径（例如，参见 Britton, 1998）。在植物中，类胡萝卜素是在质体中形成的。

类胡萝卜素生物合成的早期中间体是香叶基香叶基二磷酸酯（GGPP），它是通过香叶基香叶基二磷酸酯合成酶的作用由异戊烯二磷酸酯（IPP）和二甲基烯丙基二磷酸酯（DMAPP）形成的（参见图 1）。随后的酶促步骤代表第一个类胡萝卜素专一性反应，是由八氢番茄红素合成酶催化的。该反应包括一个两步反应，导致两个 GGPP 分子的头对头的缩合，以便形成第一种尚未着色的胡萝卜素产物八氢番茄红素（Dogbo 等, 1988; Chamovitz 等, 1991; Linden 等, 1991; Pecker 等, 1992）。八氢番茄红素合成酶以两种形式存在：可溶的无活性形式和膜结合的/活性形式，并且它需要连位的羟基官能团以便在含有质体半乳糖脂的膜表面具有活性（Schledz 等, 1996）。

尽管在细菌和植物中八氢番茄红素的形成相似，但八氢番茄红素的代谢明显不同。在植物中，有两种基因产物按顺序起作用，以便产生着色的胡萝卜素番茄红素（Beyer 等, 1989）。这两种酶是八氢番茄红素脱饱和酶（PDS, 例如, 参见 Hgueney 等, 1992）和  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶（ZDS, 参见 Albrecht 等, 1996）。每引入两个双键都能分别通过六氢番茄红素产生  $\zeta$ -胡萝卜素和通过链孢红素产生番茄红素。据信 PDS 通过质体醌（Mayer 等, 1990; Schulz 等, 1993; Norris 等, 1995）与一种膜结合氧化还原链机械连接（Nievalstein 等, 1995），而 ZDS 以不同的方式机械地起作用（Albrecht 等, 1996）。在植物中，所述整个途径似乎与顺式结构的中间体相关（Bartley 等, 1996）。相反，在诸如欧文氏菌属的许多细菌中，产生所有 4 个双键的整个脱饱和序列是由一种基因产物（CrtI）完成的，将八氢番茄红素直接转化成番茄红素（例如, 参见 Miawa 等, 1990; Armstrong 等, 1990; Hundle 等, 1994）。已知这种类型的细菌脱饱和酶不容易受漂白型除草剂的影响，这些除草剂能有效抑制植物类型的八氢番茄红素脱饱和酶。

在植物中，有两种基因产物催化番茄红素的环化，即  $\alpha$  ( $\epsilon$ )-和  $\beta$ -番茄红素环化酶，分别形成  $\alpha$  ( $\epsilon$ )-和  $\beta$ -紫罗酮端基（例如, 参见 Cunningham 等, 1993; Scolnik 和 Bartley, 1995, Cunningham 等, 1996）。在植物中，正常情况下生成具有两个  $\beta$ -紫罗酮端基的  $\beta$ -胡萝卜素和具有一个  $\alpha$  ( $\epsilon$ ) 和一个  $\beta$ -紫罗酮端基的  $\alpha$ -胡萝卜素。



植物叶黄素的形成首先是由两种基因产物介导的， $\alpha$ -和 $\beta$ -羟化酶（Masamoto 等，1998），它们分别作用于 $\alpha$ -和 $\beta$ -胡萝卜素的胡萝卜素主链的 C3 和 C3' 位置。产生的叶黄素被称为黄体素和玉米黄质。

5 进一步的加氧反应是由玉米黄质环氧酶催化的，这种酶能催化环氧官能团导入玉米黄质主链的 C5、C6、和 C5'、C6'（Marin 等，1996）。这会导致花药黄质和紫黄质的形成。在不同基因产物紫黄质脱环氧酶的作用下可以逆转该反应（Bugos 和 Yamamoto，1996）。

导致新黄质形成的基因产物尚有待鉴定。

10 业已从包括细菌到植物的生物中克隆了编码类胡萝卜素生物合成基因的基因和 cDNA。细菌和蓝细菌基因包括草生欧文氏菌（申请号 WO91/13078，Armstrong 等，1990），噬夏孢欧文氏菌（Misawa 等，1990），*R.capsulatus*（Armstrong 等，1989），嗜热栖热菌（Hoshino 等，1993），蓝细菌属聚球蓝细菌（Genbank 保藏号 X63873），黄杆菌菌株 R1534（Pasamontes 等，1997）。业已从各种来源克隆了编码高  
15 等植物类胡萝卜素生物合成途径的酶的基因和 cDNA，所述来源包括拟南芥、白芥、辣椒、黄水仙、番茄等，正如可以从公共数据库中推导的。

20 目前对所述克隆基因在高等植物转化及所产生的效果的了解还比较少。来自番茄的八氢番茄红素合成酶的表达，可以影响果实中类胡萝卜素的含量（Bird 等，1991；Bramley 等，1992；Fay 和 Grierson，1993）。业已报导了八氢番茄红素合成酶在转化的番茄植物中的组成型表达会导致矮化，这是因为改变了赤霉素生物合成途径中代谢产物 GGPP 的方向（Fray 等，1995）。当来自黄水仙的八氢番茄红素合成酶在水稻胚乳中进行组成型表达时没有出现上述问题（Burhardt 等，1997）。已知  
25 作为细菌脱饱和酶的噬夏孢欧文氏菌 *CrtI* 能在植物中起作用，并能产生对漂白性除草剂的抗性（Misawa 等，1993）。

30 在过去几年里，为了改变或增强诸如营养组织或种子的各种植物组织中或细菌中类胡萝卜素生物合成途径，业已进行了许多尝试。例如，参见 WO96/13149，WO98/06862，WO98/24300，WO96/28014，和 US5618988。以上所有尝试都局限于对细胞中现有类胡萝卜素生物合成反应的操作。致力于改变富含油种子的类胡萝卜素生物合成的其他用途是不同的，因为它们提供了能容纳由于转化而产生的增产刺激所形成的过多的类胡萝卜素的库。

很显然，需要一种转化植物材料的方法，以便得到能够表达产生感兴趣的胡萝卜素和叶黄素所必需的类胡萝卜素生物合成途径的所有酶。

5

### 发明概述

本发明提供了转化植物细胞、种子、组织或全植株以便产生能够表达类胡萝卜素生物合成途径的所有酶的转化体的装置和方法，这些酶是目标宿主植物积累感兴趣的胡萝卜素和/或叶黄素所必需的。本发明还提供了为了适用于实施本发明方法而设计的 DNA，以及包括所述分子的质粒和载体系统。另外，本发明提供了具有改善了的营养品质并含有所述 DNA 分子的和/或用本发明方法产生的转基因植物细胞、种子、组织和全植株。

因此，本发明提供了类胡萝卜素生物合成的从头导入和表达，它对于诸如水稻胚乳和许多其他谷类种子的、已知基本上不含类胡萝卜素的植物材料来说是特别重要的，以及对现有的类胡萝卜素生物合成进行修饰，以便上调或下调某些感兴趣的中间体或产物的积累。

15

### 附图简述

图 1 表示植物类胡萝卜素生物合成的总体途径。酶的名称用黑体表示。还示出了由细菌 CrtI 型胡萝卜素脱饱和酶催化的反应。

20

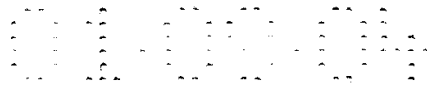
图 2 表示中间体香叶基香叶基二磷酸酯 (GGPP) 不仅参与类胡萝卜素的生物合成，而且是通过异戊二烯化反应 (例如，生育酚、醌、叶绿素) 或通过不利用非异戊烯受体分子 (例如，赤霉素、芳香剂和香味物质) 的不同反应通向不同化合物的途径中起着建筑组件的作用。

25

图 3 表示对来自未转化过的 (图 3A) 和转化过的 (图 3B, 用质粒 A; 图 3C, 用质粒 A+B) 水稻植物的抛光的水稻种子 (胚乳) 的 HPLC 分析。在表示转化种子的图样中证实了类胡萝卜素、环状胡萝卜素和叶黄素的出现。

图 4 表示用于“质粒 A”和“质粒 B”中的表达框。LB, 左臂; RB, 右臂; psy, 八氢番茄素合成酶, cDNA 来自黄水仙; crtI 来自噬夏孢欧文氏菌的胡萝卜素脱饱和酶基因; cyc 番茄红素环化酶, cDNA 来自黄水仙; aph IV, 潮霉素磷酸转移酶; Gtl, 水稻谷蛋白 1 启动子;

30



35S, CaMV35S 启动子; nos, 胭脂氨酸合成酶终止子; NptII, 卡那霉素抗性基因。

5 图 5: A, 用未处理过的 (泳道 1) 和 CPTA-处理过的 (泳道 2) 黄水仙花 RNA 进行的 Northern 印迹。对固定的 RNA 进行反复划线, 以便让标记过的探针杂交; B, 八氢番茄红素脱饱和酶; C,  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶; E, 番茄红素环化酶。B, 用未处理过的 (泳道 1) 和处理过的 (泳道 2) 黄水仙花的蛋白提取物进行的 Western 印迹。用抗 A, 八氢番茄红素合成酶; B, 八氢番茄红素脱氢酶; C,  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶; D, 番茄红素环化酶的抗体检测所述印迹。

10

#### 本说明书所用缩略语

本文所提到的相关类胡萝卜素的系统名称为:

八氢番茄红素: 7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-八氢- $\psi$ ,  $\psi$ -胡萝卜素

15 六氢番茄红素: 7, 8, 11, 12, 7', 8'-六氢- $\psi$ ,  $\psi$ -胡萝卜素

$\zeta$ -胡萝卜素: 7, 8, 7', 8'-四氢- $\psi$ ,  $\psi$ -胡萝卜素

链孢红素: 7, 8-二氢- $\psi$ ,  $\psi$ -胡萝卜素

番茄红素:  $\psi$ ,  $\psi$ -胡萝卜素

$\beta$ -胡萝卜素:  $\beta$ ,  $\beta$ -胡萝卜素

20  $\alpha$ -胡萝卜素:  $\beta$ ,  $\epsilon$ -胡萝卜素

玉米黄质:  $\beta$ ,  $\beta$ -胡萝卜素-3, 3'-二醇

叶黄素:  $\beta$ ,  $\epsilon$ -胡萝卜素-3, 3'-二醇

花药黄质: 5, 6-环氧-5, 6-二氢- $\beta$ ,  $\beta$ -胡萝卜素-3, 3'-二醇

25 紫黄质: 5, 6, 5', 6', 双环氧-5, 6, 5', 6', 四氢- $\beta$ ,  $\beta$ -胡萝卜素-3, 3'-二醇

新黄质: 5', 6'-环氧-6, 7-二脱氢-5, 6, 5', 6'-四氢- $\beta$ ,  $\beta$ -胡萝卜素-3, 5, 3'-三醇

酶:

PSY: 八氢番茄红素合成酶

30 PDS: 八氢番茄红素脱饱和酶

CrtI: 细菌胡萝卜素脱饱和酶

ZDS:  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶

CYC: 番茄红素 $\beta$ -环化酶

非胡萝卜素中间体:

IPP: 异戊烯二磷酸酯

DMAPP: 二甲基烯丙基-二磷酸酯

5 GGPP: 香叶基香叶基二磷酸酯

在本文中，术语“植物”一般包括真核藻类，有胚植物，包括苔藓植物、蕨类植物、和种子植物，如裸子植物和被子植物，后者包括 Magnoliopsida, Rosopsida (真-“双子叶植物”)、Liliopsida (单子叶植物)。代表性的和优选的例子包括谷类种子，例如水稻、小麦、大麦、燕麦、苋、亚麻、黑小麦、黑麦、玉米和其他禾本科植物；油用种子，如油用芸薹种子、棉籽、大豆、红花、向日葵、椰子果、和棕榈等；其他食用种子或具有可食用部分的种子，包括南瓜、西葫芦、芝麻、粟、葡萄、绿豆、花生、豌豆、菜豆、萝卜、苜蓿、可可、咖啡、大麻、树木坚果，如胡桃、杏、大胡桃、鹰嘴豆等。另外，还有马铃薯、胡萝卜、甘薯、番茄、辣椒、木薯、柳树、橡树、榆树、枫树、苹果、香蕉；观赏花卉，如百合、兰花、芦苇、蔷薇、毛茛、矮牵牛、草夹竹桃、紫罗兰、和向日葵等。一般，本发明可应用于观赏类植物以及为了获得食物、纤维、木材、鞣料、燃料、色素、树胶、树脂、胶乳产品、脂肪、油、药物、和饮料等而栽培的植物。被选择用于转化的目标植物优选是为了获得食物而栽培的，例如，谷物、根、豆、坚果、蔬菜、块茎、果实、和调料等。

### 发明详述

根据本发明，提供了转化植物细胞、种子、组织或全植株以便产生能够表达类胡萝卜素生物合成途径的所有酶的转化体的装置和方法，所述酶是目标宿主植物积累感兴趣的胡萝卜素和/或叶黄素所必需的。按照本发明的另一方面，所述方法还可用于修饰现有的类胡萝卜素生物合成，以便上调或下调某些感兴趣的中间体或产物的积累。另外，提供了特殊的 DNA 分子，该分子包括具有能够指导类胡萝卜素生物合成途径所特有的一种或多种酶产生的一个或多个表达框的核苷酸序列，所述酶选自下列一组：

-源于植物、真菌、或细菌的八氢番茄红素合成酶，

- 源于植物、真菌、或细菌的八氢番茄红素脱饱和酶,
- 源于植物或蓝细菌的 $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶, 和
- 源于植物、真菌、或细菌的番茄红素环化酶。

5 根据一种优选实施方案, 上述表达框包括一个或多个编码植物、真菌或细菌八氢番茄红素合成酶, 植物、真菌或细菌八氢番茄红素脱饱和酶, 植物 $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶, 或植物、真菌、或细菌的番茄红素环化酶的基因或 cDNA, 所述基因各自可操作地与合适的组成型、诱导型、或组织专一型启动子连接, 使其能在植物细胞、种子、组织或全植株中表达。特别优选的基因或 cDNA 编码植物八氢番茄红素合成酶, 10 细菌八氢番茄红素脱饱和酶或植物番茄红素环化酶。业已分离了大量的、数量仍在增加的编码八氢番茄红素合成酶(植物和细菌)、CrtI-型胡萝卜素脱饱和酶(细菌)和番茄红素环化酶(植物和细菌)的基因, 并可以从数据库中获得该基因。这些基因来自各种来源, 并且都可用于本发明的方法中。

15 优选的是, 所述 DNA 分子还包括至少一个可操作地连接于合适的组成型、诱导型或组织专一型启动子上的选择标记基因或 cDNA, 最优选的是受组成型启动子控制的潮霉素磷酸转移酶选择标记。尽管本领域技术人员可以选择能在植物材料中起作用的现有启动子中的任一种, 但在设计本发明的合适表达框时, 优选将编码八氢番茄红素脱饱和酶、 $\zeta$  20 -胡萝卜素脱饱和酶、或番茄红素环化酶的相应的核苷酸序列可操作地连接于组织专一型或组成型启动子上, 而编码八氢番茄红素合成酶的核苷酸序列优选是在组织专一型启动子的控制下表达, 以便避免赤霉素形成的干扰。

可以理解的是, 作为本发明 DNA 分子的功能元件的核苷酸序列可以包括上述一种或多种基因或 cDNA 任意组合。在本发明的一种特别 25 优选的实施方案中, 所述核苷酸序列包括八氢番茄红素合成酶和细菌或真菌八氢番茄红素脱饱和酶的功能性表达框, 可以在整合到合适的质粒或载体系统(质粒 A)上之后导入目标植物材料, 可以单独导入或者与包括编码番茄红素环化酶的核苷酸序列的第二种质粒(质粒 B)一起导入。 30 入。

本发明还提供了包括上述 DNA 分子或核酸序列的一种或多种的质粒或载体系统, 所述质粒或载体系统源于根癌农杆菌。

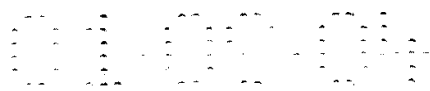
本发明还提供了转基因植物细胞、种子、组织和全植株，它具有改善了的营养品质，并含有上述 DNA 分子、质粒或载体中的一种或多种，和/或它是用本发明的方法生产的。

5 本发明基于以下事实：早期中间体香叶基香叶基二磷酸酯 (GGPP) 不仅用于胡萝卜素生成，而且是用于若干不同生物合成途径的分支点 (图 2)。因此，可以得出这样的结论：这种前体存在于含有或不含类胡萝卜素的所有植物组织的质体中，如水稻胚乳中。因此，GGPP 的来源可用于实现本发明的目的，即部分或整个导入类胡萝卜素生物合成途径，和/或增强或加速现有的类胡萝卜素生物合成途径。

10 在本说明书中术语“不含类胡萝卜素”在用于区分某些目标植物细胞或组织时，是指已知未按照本发明转化的相应的植物材料正常情况下是基本上不含类胡萝卜素的，例如，对于储存器官来说就是这样，例如，水稻胚乳等。不含类胡萝卜素并不表示排除了能积累几乎不可检测的量的类胡萝卜素的细胞或组织。优选的是，所述术语限定的是类胡萝卜素含量为 0.001%w/w 或更低的植物材料。

在选择产生类胡萝卜素途径酶的合适来源时，可以理解的是，与相应植物序列同源的源于蓝细菌的编码序列也可用于本发明。

在本发明的一种优选实施方案中，将高等植物八氢番茄红素合成酶可操作地连接于能进行组织专一性表达的启动子上。该结构与细菌  
20 (Crt-E-型) 八氢番茄红素脱饱和酶统一在相同质粒 (质粒 A) 上，后者与编码转运肽的 DNA 序列融合，并可操作地连接于能进行组成型表达的启动子上。用存在于合适载体上的该结构转化植物能指导番茄红素在特定组织中的形成，例如，通过控制八氢番茄红素合成酶的启动子可以在不含类胡萝卜素的谷类种子中产生番茄红素。令人惊奇的是，仅是  
25 所述转化除了能产生番茄红素之外，还能启动类胡萝卜素合成向下游叶黄素发展，如叶黄素、玉米黄质、花药黄质、紫黄质，和新黄质，即使是在诸如水稻胚乳的不含类胡萝卜素的组织中也是这样。另外，还观察到了  $\alpha$ -胡萝卜素的形成。因此，形成了类似于存在于绿色叶子中的类胡萝卜素补体。这种出人意料的现象 (本文又称为“超越”机制) 可能是由于相应的晚期基因 (番茄红素环化酶、 $\beta$ -胡萝卜素羟化酶、环氧化酶)  
30 的组成型表达，所述晚期基因是由转化介导的底物供应激活的，或者是通过转化诱导类胡萝卜素生物合成基因的表达而激活的。在所述



“超越”机制不起作用的情况下，与编码番茄红素环化酶的基因或 cDNA 共转化（质粒 B）可以克服这一问题，并且至少能形成  $\alpha$ -或  $\beta$ -胡萝卜素（前维生素 A）。在所述“超越”机制能起作用的情况下，这种共转化能够增强由八氢番茄红素合成酶和 CrtI 型胡萝卜素脱饱和酶所产生的效果。因此，本发明包括通过用质粒 A 或 A+B 转化以遗传学

5 以外的方式导入类胡萝卜素生物合成途径。

质粒 A 还能提高含有类胡萝卜素的组织的类胡萝卜素产量。所述转化可以增强人类食品和动物饲料的营养价值。将 crtI 型细菌八氢番茄红素脱饱和酶用于转化的另一个优点是，所述酶也能在叶片叶绿素中表达，因此，产生对针对植物八氢番茄红素脱饱和酶的漂白性除草剂的抗性。因此，本发明还包括将漂白性除草剂抗性一起应用于至少携带质粒 A 的转基因植物中。

10

可以使用可能具有编码植物番茄红素环化酶的第二种质粒 B；或者该质粒具有与转运序列连接的细菌番茄红素环化酶。将其可操作地连接于一种启动子上，优选能产生与质粒 A 上的八氢番茄红素合成酶相同的组织专一性表达。质粒 A 和 B 的共转化，能导致全面形成补充目标组织，如根、果实、块茎、和种子，以便实现从香叶基香叶基二磷酸酯产生  $\beta$ -胡萝卜素的类胡萝卜素生物合成途径。对于现有途径或该途径的诱导的晚期反应来说，这种共转化（参见上文）能够提高类胡萝卜素含量并增强  $\beta$ -胡萝卜素-衍生的叶黄素的形成。

15

20

所使用的所有基因都可操作地装配有编码能够输入质体的转运序列的 DNA 序列。这一目的是通过重组 DNA 技术实现的，或者所述转运序列存在于使用中的植物 cDNA 上。然后，所述转化作用能够利用存在于质体中的前体香叶基香叶基二磷酸酯库形成类胡萝卜素。这种中心化合物既不是类胡萝卜素，也不是专门仅用于类胡萝卜素生物合成的前体（参见图 2）。

25

所述植物应当表达导入的基因，并且优选进行纯合表达。一般，所述基因应当可操作地连接于能在特别植物的目标宿主细胞中起作用的启动子上。所述表达的水平应当能够获得所述基因的所需特征。例如，选择标记基因的表达应当提供按照本发明方法所产生的转化体的合适选择。类似的，类胡萝卜素和叶黄素生物合成途径上的编码增强的营养品质的一个或多个基因的表达应当得到与不按照本发明的方法进行转

30

化的同一物种相比具有较高含量的一种或多种所述途径的中间体或产物的植物。另一方面，通常需要限制所述感兴趣的基因的过度表达，以避免对该植物的正常生理学造成明显的负面影响，即避免达到使其栽培变得困难的程度。

5 编码感兴趣的酶的基因可用于表达框中，以便在转化的植物组织中表达。为了实现本发明的目的，即在感兴趣的目标植物中导入或补充类胡萝卜素生物合成途径，用至少一个包括一个连接于感兴趣的基因上的转录起始区的表达框转化所述植物。

10 所述转录起始可以是宿主所固有的或类似于该宿主或对该宿主来说是外源的或异源的。外源是指所述转录起始区不存在于导入了该转录起始区的野生型宿主中。

特别感兴趣的是与储存蛋白相关的转录起始区，如谷蛋白、patatin、napin、ciferin、 $\beta$ -conglycinin、或菜豆蛋白等。

15 所述转录框沿转录的5'-3'方向包括一个转录和翻译起始区，一个感兴趣的DNA序列，以及一个能在植物中起作用的转录和翻译终止区。所述终止区可以是所述转录起始区所固有的，可以是所述感兴趣的DNA序列所固有的，或者可源于其他来源。常见的终止区来自根癌农杆菌的Ti质粒，如章鱼氨酸合成酶和胭脂氨酸合成酶终止区（同样参见 Guerineau 等，1991；Proudfoot，1991；Sanfacon 等，1991；Mogen  
20 等，1990；Munroe 等，1990；Ballas 等，1989；Joshi 等，1987）。

在多数情况下，本发明感兴趣的基因是针对质体，如叶绿体表达的。这样，如果感兴趣的基因不是直接插入质体中的话，所述表达框应当额外包括一个编码转运肽的序列，以便引导感兴趣的基因进入质体。所述转运肽为本领域技术人员所公知（例如，参见 Von Heijne 等，1991；  
25 Clark 等，1989；Della-Cioppa，1987；Romer 等，1993；和 Shah 等，1986）。可用于本发明的所有类胡萝卜素途径基因都可使用天然或异源转运肽。

所述结构还可以包括任何其他必需调节子，如植物翻译共有序列（Joshi，1987），和内含子（Luehrsen 和 Walbot，1991）等，它们可  
30 操作地连接于感兴趣的核苷酸序列上。需要导入的基因上的内含子序列能够通过稳定转录物，并使其能够有效转运到细胞核外面，并增强其表达。已知的所述内含子序列包括植物遍在蛋白基因的内含子（Cornejo，



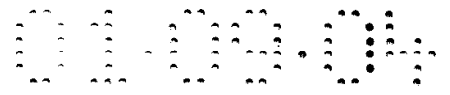
选基因的构建可以参见 USPN5545817。

在制备所述转录框时，可以对各种 DNA 片段进行操作，以便提供正确方向的 DNA 序列，并且适应于正确的读框。为此，可以用接头连接所述 DNA 片段或者进行其他操作，以便提供常见的限制位点，除去  
5 多余的 DNA，或除去限制位点等。为此，可以进行体外诱变、引物修复、限制、退火、切除、或连接等，其中，可以进行插入、缺失、或取代，例如，转换和颠换。

用标准方法将具有感兴趣的基因的表达框置入表达载体中。合适表达载体的选择取决于将该表达载体导入宿主细胞的方法。一种典型的表  
10 达载体包括：编码细菌复制起点的原核 DNA 元件，和在细菌宿主中生长并选择表达载体的抗生素抗性基因；一个用于插入外源 DNA 序列的克隆位点，在本发明中，所述外源 DNA 序列编码类胡萝卜素生物合成途径的一种或多种特定的酶；控制所述外源基因转录起始的真核 DNA 元件，如启动子；和控制转录物加工的 DNA 元件，如转录终止/聚腺苷  
15 酸化序列。它还可以包括最终将该载体整合到染色体上所需的序列。

在一种优选实施方案中，所述表达载体还包括一个编码诸如潮霉素磷酸转移酶的选择标记的基因（van den Elzen 等，1985），它与一个启动子呈功能性连接。能产生抗生素抗性、并因此适合作为选择标记的其他基因的例子，包括编码新霉素磷酸转移酶卡那霉素抗性的基因  
20 （Velten 等，1984）；源于 Tn5 的卡那霉素抗性（NPTII）基因（Bevan 等，1983）；由 Thompson 等（1987）所披露的 PAT 基因；以及氯霉素乙酰转移酶基因。适用于本发明的植物表达载体和选择标记基因的一般性描述可以参见 Gruber 等（1993）的著述。如上文所述，还可以从包括细菌 crtI 的表达框中省略其他选择标记，业已证实该基因产物能产  
25 生对漂白性除草剂的抗性。在这种特定实施方案中，crtI 优选是受组成型或组织专一型启动子的控制。在一种高度优选的实施方案中，crtI 是由绿色光合活性组织或细胞中所特有并且在其中起作用的启动子控制。

用于分别控制感兴趣的基因和标记基因表达的启动子元件可以是  
30 任何植物相容的启动子。所述启动子可以是植物基因启动子，如核酮糖-1, 5-二磷酸酯羧化酶小亚基（RUBISCO）的启动子，或来自根癌农杆菌的 Ti 质粒的启动子，如胭脂氨酸和章鱼氨酸合成酶启动子或病毒启



动子，如花椰菜花叶病毒（CaMV）19S 和 35S 启动子或玄参花叶病毒 35S 启动子。例如，适用于本发明的已知植物启动子的综述可以参见国际专利申请号 WO91/19806。

“组织专一性”启动子能够使要表达类胡萝卜素或叶黄素生物合成途径产物的组织中的所述一种或多种基因产物的积累量特别高；某些表达可能出现在植物的其他部分。已知组织专一性启动子的例子包括谷蛋白 1 启动子（Kim 等，1993；Okita 等，1989；Zheng 等，1993），块茎定向的 I 型 patatin 启动子（Bevan 等，1986）；与马铃薯块茎 ADPGPP 基因相关的启动子（Muller 等，1990）；大豆  $\beta$ -conglycinin 的启动子，又被称作 7S 蛋白，它能启动种子定向的转录（Bray，1987）；和来自玉米胚乳的玉米醇溶蛋白基因的种子定向启动子（Pedersen 等，1982）。可用于本发明的另一种类型的启动子是植物遍在蛋白启动子。植物遍在蛋白启动子为本领域所熟知，正如由 Kay 等（1987）和 EP-A0342926 所证实的。同样适用于本发明的有肌动蛋白启动子、组蛋白启动子和微管蛋白启动子。优选的化学诱导型启动子的例子，如烟草 PR-1a 启动子详细披露于 EP-A0332104 中。另一类优选的启动子是创伤诱导型的。这种类型的优选启动子包括披露于以下文献中的启动子：Stanford 等（1989），Xu 等（1993），Lozemann 等，（1989），Rohrmeier&Lehle（1993），Firek 等（1993），和 Warner 等（1993）。

本发明所涉及的植物细胞、种子、组织和全植株可以通过若干种方法中的任一种获得。本领域技术人员可以理解的是，方法的选择取决于用于转化的植物的类型，即单子叶或双子叶植物。所述方法通常包括直接基因转移、化学诱导的基因转移、电穿孔、显微注射（Crossway 等，1986；Neuhaus 等，1987），农杆菌属介导的基因转移，ballistic 粒子加速，例如，使用 Agracetus 公司出售的装置（Madison, Wisconsin）和杜邦公司（Wilmington, Delaware）出售的装置（例如，参见 Sanford 等，US4945050；和 McCabe 等，1988）。

用于获得本发明转化的植物或其部分的一种方法是直接基因转移，其中，在合适的条件下培养或以其他方式生长植物细胞，所述培养是在有包括需要导入所述植物或其部分中的核苷酸序列的 DNA 寡核苷酸的条件下去进行的。供体 DNA 来源通常是包括所需基因的质粒或其他合适载体。为方便起见，这里专指质粒，但要理解的是，也包括所需基

因的其他合适启动子。

能够摄入所述质粒的任何合适的植物组织都可以通过直接基因转移处理。例如，所述植物组织包括发育早期，特别是在减数分裂之前，特别是减数分裂之前的 1-2 周的生殖结构，一般，将减数分裂之前的生殖器官浸泡在质粒溶液中，例如，通过将质粒溶液直接注射到植物的生殖器官中或靠近生殖器官的地方。然后让所述植物自花授粉，或者与用同样方法处理过的另一个植株异花授粉。在每一个花结构中，所述质粒溶液通过在大约 0.1-10 毫升体积中含有大约 10-50 微克 DNA，但可以根据特定花结构的大小高于或低于这一用量。所述溶剂通常是无菌水、盐水、或缓冲过的盐水、或常规植物培养基，如果需要，所述质粒溶液可以含有能化学诱导或增强质粒摄取的试剂，如 PEG、或  $Ca^{2+}$  等。

所述生殖器官在接触所述质粒之后，让所述花结构生长到成熟，并收获种子。根据质粒标记，可以通过在标记敏感性或优选在标记抗性培养基中发芽或生长植株选择具有所述标记基因的转化植物。例如，从用具有卡那霉素抗性基因的质粒处理过的植株上获得的种子仍然保持绿色，而没有该标记基因的植株会白化。还可以通过常规 Southern、Northern 和 Western 印迹技术证实所需 mRNA 基因转录和肽表达的存在。

在适用于完成本发明的另一种方法中，对植物原生质体进行处理，以便诱导所述质粒的摄入。原生质体制备为本领域所熟知，并且通常包括用纤维素酶或其他酶消化植物细胞足够长的时间，以便除去细胞壁。通常通过筛分和洗涤将原生质体与消化混合物分离。然后将原生质体悬浮在合适培养基中，如培养基 F，CC 培养基等，通常为  $10^4$ - $10^7$  细胞/毫升。然后向该悬浮液添加上述质粒溶液和诸如聚乙二醇、 $Ca^{2+}$ 、或仙台病毒之类的诱导物。另外，所述质粒可以胶囊化于脂质体中。然后将所述质粒溶液和原生质体培养一段合适的时间，通常是在大约  $25^{\circ}C$  下培养大约 1 小时。在某些场合下，可能需要热激所述混合物，通过加热到大约  $45^{\circ}C$ ，保持 2-5 分钟，并迅速冷却到所述培养温度而实现。然后对处理过的原生质体进行克隆，并选择所需基因的表达，例如，通过表达所述标记基因和常规吸印技术。然后按常规方法由所述克隆再生全植株。

电穿孔技术是类似的，所不同的是，通常在电穿孔室中，在没有或



有聚乙二醇或  $\text{Ca}^{2+}$  的条件下对裸露的质粒和原生质体的混合物施加电流。典型的电穿孔包括用 40-10000DC 伏特的电压进行 1-10 次脉冲，脉冲时间为 1-2000 微秒，脉冲的时间间隔通常为 0.2 秒。还可以采用相似程度的交流电脉冲。更具体地讲，让一个充电的电容器通过含有所述质粒原生质体悬浮液的电穿孔室放电。该处理会导致生物膜可渗透性的可逆的增加，并因此能够插入本发明的 DNA。电穿孔的植物原生质体可以再生其细胞壁，分裂并形成愈伤组织（例如，参见 Riggs 等，1986）。

适用于转化目标细胞的另一种方法包括使用农杆菌。在该方法中，用包括具有所需基因或基因框的质粒的农杆菌感染植物细胞，并将所述质粒插入靶细胞的基因组中。然后按上述方法筛选并克隆能表达所需基因的细胞。例如，通过质粒，如 Ri 质粒和农杆菌，如发根或根癌农杆菌将感兴趣的基因导入目标组织，如块茎、根、谷粒或豆中的一种方法，是利用适用于克隆到大肠杆菌中的小的重组质粒，在该质粒中业已剪接了 T-DNA 片段，在所述 T-DNA 内的一个位点上将该重组质粒切开，将一段“乘客”DNA 剪接到该切口上。所述乘客 DNA 包括要整合到所述植物 DNA 中的本发明的基因和一个选择标记，如编码对抗生素抗性的基因。然后将该质粒再次克隆到较大的质粒上，然后导入具有未修饰过的 Ri 质粒的农杆菌菌株中。在所述细菌生长期间，有时会发生罕见的双重组，会产生 T-DNA 获得了插入片段-即所述乘客 DNA 的细菌。然后根据其能在含有所述抗生素的培养基存活鉴定并选择所述细菌。将所述细菌用于将其 T-DNA（用乘客 DNA 修饰过）插入植物基因组。该方法采用发根农杆菌或根癌农杆菌，产生了能再生成健康的，有活力的植株的转化植物细胞（例如，参见 Hinchee 等，1988）。

另一种合适的方法是用所述转化的 DNA 包衣的微粒轰击所述细胞（Wang 等，1988），或通过压力冲击沿待转化细胞方向对含有 DNA 的溶液进行加速，在所述压力冲击的作用下将该溶液分散成很细的烟雾（WP-A0434616）。

微粒轰击被作为包括植物细胞在内的细胞的有效转化技术。在 Sanford 等（1987）的著述中，报导了微粒轰击能将核酸有效输送到洋葱的植物细胞细胞质中。Chrisstou 等（1988）报导了通过微粒轰击用卡那霉素抗性基因稳定地转化大豆愈伤组织。同一位作者还报导了能穿透至少大约 0.1-5% 的细胞，并发现了转化的愈伤组织在可观察水平的



NPTII 酶活性和高达 400 毫克/升卡那霉素中具有抗性。McCabe 等 (1988) 报导了用微粒轰击稳定转化大豆。McCabe 等还报导了从 R0 嵌合植株中回收转化的 R1 植株(还可以参见 Weissinger 等, 1988; Datta 等, 1990 (水稻); Klein 等, 1988a (玉米); Klein 等, 1988b (玉米); Fromm 等, 1990; 和 Gordon-Kamm 等, 1990 (玉米))。

另外, 可以直接转化植物质体。业已报导了在高等植物中对叶绿体的稳定转化, 例如, 参见 Svab 等, 1990; Svab 和 Maliga, 1993; Staub 和 Maliga, 1993。该方法依赖于含有选择标记的 DNA 的粒子枪输送, 并通过同源重组让该 DNA 定向到质体基因组中。在所述方法中, 质体基因表达可以用质体基因启动子完成, 或者通过反式激活沉默的质体所具有的转基因而实现, 所述转基因是用于由选择性的启动子序列进行表达的, 如由 T7 RNA 聚合酶识别。所述沉默的质体基因是通过以下方式激活的: 由细胞核表达结构表达特定的 RNA 聚合酶, 并利用转运肽将该聚合酶定向到所述质体中。组织专一性表达可以用以下方法获得: 利用由合适的植物组织专一性启动子表达的细胞核编码的、并且是质体定向的特定 RNA 聚合酶。所述系统业已披露于 McBride 等的著述中 (1994)。

上文通过举例的方式所列举的可行的转化方法并不完全, 并且并非要以任何方式限定本发明的主题。

因此, 本发明还包括选自原生质体、细胞、愈伤组织、组织、器官、种子、胚胎、胚珠、合子等的转基因植物材料, 特别是全植株, 所述转基因植物材料通过本发明的方法转化过, 并且包括可表达形式的本发明的重组 DNA。并且, 本发明还包括用于生产所述转基因植物材料的方法。

用本领域众所周知的方法将阳性转化体再生成植株 (例如, 参见 McCormick 等, 1986)。然后可以让所述植株生长, 并用相同的转化株系或不同的株系授粉, 然后评估其后代中所需特性的存在和/或所需特性表达的程度, 并鉴定所得到的具有所需表型特征的杂种。例如, 第一次评估可以包括转化植株的细菌/真菌抗性水平。可以生长两代或两代以上, 以便证实目标表型特征得到稳定地保持和遗传, 然后收获种子, 以确保业已获得所需的表型或其他特性。

本发明的范围还包括转基因植物, 特别是用本发明方法转化过的转



基因可育植物及其由于转化母本而仍然具有新的或所需特性的无性和/或有性后代。

5 术语‘后代’被理解为包括转基因植株的“无性”和“有性”繁殖后代。该定义还意味着包括可以通过诸如细胞融合或突变体筛选的已知方法获得的所有突变体和变体，所述突变体仍然具有原始转化植株所具有的特有特征，还包括所述转化植物材料的所有杂交和融合产物。

本发明的目的还包括植株部分，如事先用本发明方法转化过的转基因植物或其后代的花、茎、果实、叶、根，因此它至少包括部分转基因细胞。

10 下面的实施例是说明性的，而不是要限定本发明。

### 生物学材料的保藏

携带有本发明表达框的大肠杆菌菌株业已按照布达佩斯条约规定交由德意志微生物和细胞培养物保藏中心（DSMZ）保藏，

15 Braunschweig, 德国，保藏号如下：

<u>菌株</u>	<u>保藏号</u>
PRiceCYC TOP10（质粒 B 的框）	DSM12714
Pbaa142TOP10（质粒 A 的框）	DSM12713

### 实施例

20 将前维生素 A（ $\beta$ 胡萝卜素）和叶黄素生物合成导入不含类胡萝卜素的水稻胚乳。

#### 八氢番茄红素形成（Burkhardt 等，1997）

25 以前用放射性标记过的异戊烯二磷酸酯进行的生物化学研究业已证实，水稻胚乳具有酶促活性的 GGPP 合成酶，因此，提供了类胡萝卜素生物合成的重要前体。因此，通过微粒轰击方法，用来自黄水仙的、受组成型控制并受胚乳专一性启动子控制的编码八氢番茄红素合成酶 cDNA，转化日本水稻模型品种 Taipei309（黄水仙；保藏号 X78814，Schledz 和 Beyer，1996）。在转基因水稻植物中，证实了黄水仙酶通过无色胡萝卜素八氢番茄红素在水稻胚乳中的体内积累而被激活。因此，首次证实了原则上可以在非光合的、缺乏类胡萝卜素的组织中通过工程方法实现类胡萝卜素生物合成的第一个类胡萝卜素专一的酶促步骤。

30



将通向番茄红素、 $\beta$ 胡萝卜素（前维生素 A）和叶黄素类胡萝卜素生物合成途径导入水稻胚乳。

### 质粒构建

5 有关标准分子生物学技术参见 Sambrook 等，1989（有关结构的示意性说明参见图 4）。有关类胡萝卜素生物合成酶的结构基因为：

Psy: 源于黄水仙的八氢番茄红素合成酶（保藏号 X78814）。

CrtI: 源于噬夏孢欧文氏菌的与豌豆 Rubisco 的转运序列融合的胡萝卜素脱饱和酶（Misawa 等，1993）。

Cyc: 源于黄水仙的番茄红素环化酶（保藏号 X98796）。

10

### 构建 pB19hpc（在本文中被称为“质粒 A”）：

Misawa 等（1993）业已构建了具有源于噬夏孢欧文氏菌的完整的八氢番茄红素脱饱和酶（crtI）基因和位于 CaMC35S-启动子下游和 nos3' 聚腺苷化信号上游的豌豆 Rubisco 小亚基（tp）的转运肽序列的 DNA  
15 片段，并将其连接到 HindIII/EcoRI 消化过的 pUC19 上，以便获得质粒 pUCET4。以 HindIII/EcoRI 片段形式将 crtI 表达框从 pUCET4 上切除，并连接到 HindIII/EcoRI 消化过的 pBluescriptKS 上，得到质粒 pBaal1。用 SacII 消化具有 psy 表达框的质粒 pGt1PsyH（Burckhardt 等，1997），它包括受水稻谷蛋白 1 启动子（Gte；Kim 等，1993；Okita 等，1989；  
20 Zheng 等，1993）控制的源于黄水仙的八氢番茄红素合成酶 cDNA（保藏号 X78814）和 nos3' 聚腺苷化信号。并用 T4-DNA 聚合酶补平末端。为了获得 psi 表达框，用 KpnI 进行再次消化。然后将 SacII（补平的）/KpnI 片段连接到用 pBaal1 消化过的 XhoI（补平的）/KpnI 上，以便获得具有 crtI 和 psy 表达框的质粒 pBaal2。

25 取代 pUC18 上的多接头位点，以便按以下顺序包括以下限制位点：HindIII、I-SceI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRI。用 KpnI 和 NotI 消化所得到的质粒 pUC18M。用 KpnI 和 NotI 将具有 crtI 和 psy 表达框的 DNA 片段从 pBaal2 上切除，并连接到上述消化过的 pUC18M 上。所得到的质粒 pBaal3 含有双表达框，其旁侧为大范围核酸酶限制位点  
30 （I-SceI）。

以 KpnI 片段形式将含有在 CaMV35S 启动子和 CaMV35S 聚腺苷酸化控制之下的 aph IV 的潮霉素磷酸转移酶 aph IV 表达框从 pRice 上切



除（参见质粒 B 的结构），并连接到 KpnI 消化过的 pBaal3 上。所得到的 pBaal42 和 pBaal41 沿相同的方向包括潮霉素抗性框，类似于 psy 表达框（pBaal42），或者呈相反方向（pBaal41）。

5 用 EcoRI 和 HindIII 消化载体 pBin19（Bevan, 1984），并用标准方法导入含有以下顺序的下列限制位点的合成寡核苷酸序列：

HandIII、I-SaeI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRI，由此产生 pBin19M。

通过大范围核酸酶位点 I-sceI 将 crtI、psy 和 aph IV 的表达框从 pBaal42 上切除，并连接到用 I-sceI 消化过的 pBin19M 上。然后将所得到的质粒 pB19hpc 用于转化。

10

构建 pZCycH（在本文中被称为“质粒 B”）：

用 EcoRI/BglII 切除 pKS1 上的谷蛋白 1 启动子 Gt1（Okita 等，1989）。并连接到用 BamHI/MunI 消化过的 pV34（Futtere 和 Potrykus，未发表）上，位于两个 I-SceI 大范围核酸酶位点之间，以便获得质粒 pV34Gt1。在用 Sall 和 SacI 从 pCIB900（Wunn 等，1996）上切除之后，  
15 所述潮霉素磷酸转移酶基因 aph IV 表达框含有 CaMV 35S 聚腺苷酸化信号，其后是 CaMV35S 启动子控制下的 aph IV，以及另一个 CaMV35S 聚腺苷酸化信号。将 XhoI 接头连接到所获得的片段的 Sall 位点上，然后将该框连接到 pV34Gt1 上，以便获得所述质粒（pRice）。用 Ecl136II  
20 和 BamHI 将源于黄水仙的番茄红素环化酶 cyc（保藏号 X99796）从质粒 pGEM4CYC 上切除（Bonk 等，1997）。在用 Klenow 片段处理之后，将 cyc 连接到 Ecl136II 消化过的 pRice 上，以便获得 pRiceCYC。

用 EcoRI 和 HindIII 消化载体 pPZP100（Hajdukiewicz 等，1994），并用标准方法导入一个含有以下顺序的限制位点的合成寡核苷酸序  
25 列：HindIII、I-SceI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRI，以便形成 pPZP100M。

用 IsceI 大范围核酸酶将 cyc aph IV 双框从 pRiceCYC 上切除，并连接到 IsceI 消化过的 pPZP100M 上，以便获得转化质粒 pZCycH。

### 30 愈伤组织诱导和转化

愈伤组织诱导：从温室生长的植株上采集日本水稻栽培种 TP309 的乳熟期的未成熟的种子，在 70%乙醇（v/v）中表面消毒 1 分钟，在



摇床上，在 6%次氯酸钙中培养 1 小时，然后用无菌蒸馏水漂洗 3-5 次。然后在超净工作台上，在双目显微镜下从消毒组织上分离未成熟的胚胎，并在 NB 培养基（N6 盐和 B5 维生素，补充了 30 克/升麦芽糖，500 毫克/升脯氨酸，300 毫克/升酪蛋白水解产物，500 毫克/升谷氨酰胺，  
5 和 2 毫克/升 2,4-D, pH5.8）上培养。4-5 天除去胚芽鞘，并在新的 NB 培养基上对膨大的盾片进行继代培养 3-5 天，直到接种农杆菌。

农杆菌介导的转化：按公开方法（Uze 等，1997）将 1 周龄预先培养的未成熟胚胎浸泡在根癌农杆菌 LBA4404 细胞悬浮液中。为了共转化两种独立的载体——pZPsC 和 pZCycH，将 LBA4404/pZPsC  
10 （OD<sub>600</sub>=2.0）与等体积的 LBA4404/pZCycH（OD<sub>600</sub>=1.0）混合，在用丙酮丁香酮诱导之后用于接种。在补充了 200mM 丙酮丁香酮的 NB 培养基上共培养接种过的预培养的胚胎 3 天，在回收培养基（含有 250 毫克/升头孢氨噻的 NB）上继代培养 1 周，然后转移到含有 30 毫克/升潮霉素和 250 毫克/升头孢氨噻的 NB 选择培养基上培养 4-6 周。在补  
15 充了 0.5 毫克/升 NAA 和 3 毫克/升 BAP 的 NB 培养基上，用 4 周时间由回收的抗性愈伤组织再生植株，长根并转移到温室中。

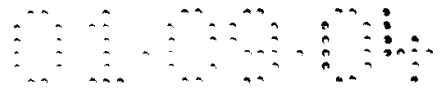
### Southern 印迹

为了证实所述转基因的存在，按照标准方法（Sambrook 等，1989），  
20 用源于八氢番茄红素合成酶、CrtI 和环化酶的同源标记的探针实施 Southern 印迹。

### 类胡萝卜素色素分析

将来自 R0 植株的种子（1 克）去皮，并在摇床上用金刚砂纸处理 8  
25 小时，以便除去种子包衣。目测检查转化的品系，发现了由于类胡萝卜素的存在而出现的明显可检测的黄色。另外，在某些场合下的分离形式是可检测的，非常接近预期的 3（黄色）：1（白色）的比例。

用微量粉碎机（Bruan, Melsungen）将来自单个品系的种子各 50  
30 粒）一起磨成细粉。用丙酮对所述细粉进行反复萃取，以便彻底脱色。在氮气流下让合并的提取物干燥。将残余物溶解在氯仿中，并用装有光学二极管排列的检测器的 Waters HPLC 系统和 C30 反相柱（YMC Europe GmbH）进行定量 HPLC 分析。用溶剂系统 A: MeOH: 叔丁基



甲基乙醚 (1: 1, v/v), B: MeOH: 叔丁基甲基乙醚: H<sub>2</sub>O (6: 1.2: 1.2, v/v/v) 进行分离, 在 25 分钟内使用 100%B-43%B 的梯度, 然后再用 75 分钟时间达到 0%B。将该最终条件再维持 10 分钟, 然后再重新平衡。在图 3A 中给出了用未转化对照所获得的结果的例子, 在图 3B 中给出了用仅具有质粒 A 的品系所获得的结果, 而在图 3C 中给出了用具有质粒 A 和 B 的品系获得的结果。很明显, 在转化体中积累了类胡萝卜素。所述对照有时表现出微量的类胡萝卜素, 它可能在最大程度上是由于种子包衣所造成的, 种子包衣难于彻底清除。在转化种子中所检测到的类胡萝卜素,  $\beta$  胡萝卜素(前维生素 A)是主要产物(高达 60%)。另外, 成叶黄素途径是有效的, 导致叶黄素和玉米黄质的形成, 以及某些数量的环氧化类胡萝卜素的形成。所得到的结论是, 所述途径的后一部分要么是由转化诱导的, 要么是由源于该转化的产物诱导的。另外, 所述成叶黄素途径在水稻胚乳中是以组成型形式表达的, 导致叶黄素玉米黄质和叶黄素加上代表环氧化叶黄素的某些其他微量成分的形成。

原则上讲, 仅用质粒 A 转化过的品系表现出相同的类胡萝卜素特征, 不过, 类胡萝卜素的含量一般较低, 因此, 上述结论可以延伸到水稻胚乳中的番茄红素环化酶上。

特别是叶黄素和玉米黄质的存在, 被视为具有出人意料的额外价值, 因为它具有正面效果, 例如, 在视觉方面的效果(参见 Brown 等, 1998; Schalch, 1992)。

很显然, 根据以上说明, 可以对本发明作出多种改进和改变。因此, 应当理解的是, 在所附权利要求书的范围之内, 可以除上述具体说明以外的方式实施本发明。

## 25 普遍存在于植物材料中的前体香叶基香叶基二磷酸酯

为了证实 GGPP 在除水稻以外的其他组织中的存在, 以类似于上述水稻胚乳的方法用从小麦的两种实验室品种, 大麦的两种品种和 Cavendish 香蕉果实进行培养实验。将未成熟的小麦和大麦谷粒去皮, 取出胚乳, 并除去胚胎。培养实验是在存在 0.5  $\mu$  Ci[1-<sup>14</sup>C]异戊烯二磷酸酯的条件下在 100mM Tris/HCl 缓冲液 pH7.4, 10mM 氯化镁、1mM 氯化锰、3mM ATP 中, 在 25 $^{\circ}$ C 下进行 6 小时。在每一个实验中添加碱性磷酸酶, 以便所形成的异戊烯二磷酸酯进行脱磷酸化。在 3-6 小时之



后，通过用氯仿/甲醇（2/1，v/v）萃取，分离包括相应的异戊二烯醇的脂溶性材料。然后按上述方法进行 HPLC 分析。

5 在来自检验过的小麦品种的胚乳中（两个品种基本上都不含类胡萝卜素），用真实的脱磷酸化 GGPP（用来自白芥的重组 GGPP 合成酶产生的）观察到了非常显著的信号，证明它是香叶基香叶醇。因此，通过将前维生素 A 生物合成转化到小麦中进行安装，与在水稻上一样可行。在大麦中也观察到了相应醇形式的较少的，但是可检测数量的 GGPP。这是由于表达所产生的，即大麦胚乳表现出稍小背景的类胡萝卜素形成。类似地，Cavendish 香蕉产生了类胡萝卜素，因此，特别是在成熟  
10 状态下观察到形成 GGPP 活性的存在并不意外。

### CPTA 诱导类胡萝卜素生物合成基因

很早以前就已知的番茄红素环化酶抑制剂 CPTA（2-（4-氯苯基硫代）氯化三乙胺）及相关化合物（例如，参见 El-Sayed Osman 等，1984；  
15 Fosket 和 Radin 1982）模拟物与用质粒 A 进行转化的番茄红素积累相关。为了证实类胡萝卜素生物合成基因的上调，我们按照 Scheutz 和 Baldwin（1957）披露的方法合成了 CPTA，将该化合物的浓度为 1mM 水溶液施加到黄水仙花上。这种没有光合作用活性的组织象预期的那样产生了积累番茄红素的反应。不过，用 CPTA（一种抑制剂）的主要作用  
20 无法解释的是，类胡萝卜素的含量几乎翻番。因此，进行了 Northern 和 Western 印迹分析，以便证实对编码类胡萝卜素生物合成酶的转录物的丰裕量或酶丰裕量的诱导。

图 5A 提供了 Northern 印迹的结果。从未处理过的（泳道 1）和 CPTA 处理过的花中分离总 RNA。反复划擦固定的 RNA，以便随后能  
25 与八氢番茄红素合成酶（B）、八氢番茄红素脱饱和酶（C）、 $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶和番茄红素环化酶的探针杂交。很显然，除了  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶之外，包括番茄红素环化酶在内的所有特定胡萝卜素发生 RNA 的含量都增加了。

为了进行 Western 印迹分析（参见图 5B），从未处理过的和用 CPTA  
30 处理过的花中分离总蛋白，并在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳（每个泳道 30 微克蛋白）之后转移到硝酸纤维素膜上。让所述印迹与抗八氢番茄红素合成酶（A）、八氢番茄红素脱饱和酶（B）、 $\zeta$ -胡萝卜素脱饱



和酶（C）和番茄红素环化酶的抗体一起培养。显然，在蛋白水平上，在 CPTA 处理中出现了酶丰度的增加。

通过上面所提供的水稻的数据我们可以得出结论，类胡萝卜素（或其衍生产物）能够以遗传学方式，以反馈机制形式诱导类胡萝卜素的形成。

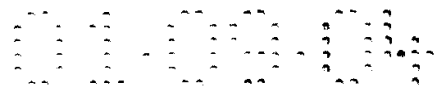
因此，本发明提供了通过遗传工程将类胡萝卜素生物合成途径导入不含类胡萝卜素的组织中，或提高现有类胡萝卜素生物合成途径产量的方法。该方法可用于改善营养价值、改善种子、果实、块茎、花或叶子的药理学价值和外观。

本发明主要用于改善营养要求，其中，并非特别与产生大量类胡萝卜素相关。例如，磨过的稻米包括胚乳，它不含有可检测的有色类胡萝卜素。存在于种子包衣中的类胡萝卜素在加工期间被除去了。该工艺是长期储存稻米谷物所必需的。

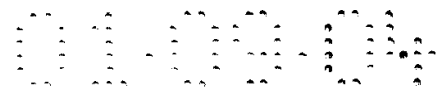
本发明是从头工程产生类胡萝卜素生物合成途径的第一个例子，并可应用于在农艺上有重要价值的不含类胡萝卜素的农作物的其他组织上。例如，不含有色的或无色的类胡萝卜素的其他谷类种子，根组织。它并不排除该方法在增加或改变现有类胡萝卜素方面的潜在用途。

#### 引用的参考文献：

- Albrecht 等（1996）欧洲生物化学杂志 236, 115-120  
Allison 等（1986）病毒学 154, 9-20  
Armstrong 等（1989）分子和普通遗传学 216, 254-268  
Armstrong 等（1990）美国国家科学院院刊 87,9975-9979  
Bartley 等（1999）欧洲生物化学杂志 259, 396-403  
Ballas 等（1989）核酸研究 17, 7891-7903  
Bevan 等（1983）自然 304, 184-187  
Bevan（1984）核酸研究 3, 138-140  
Bevan 等（1986）核酸研究 14, 4625-4638  
Beyer 等（1989）欧洲生物化学杂志 184, 141-150  
Bird 等（1991）生物技术 9, 635-639  
Bonk 等（1997）欧洲生物化学杂志 247, 942-950  
Bouvier 等（1989）生物化学生物物理学学报 1391: 320-328  
Bouvier 等（1996）生物学化学杂志 271, 28861-28867  
Bramley 等（1992）植物杂志 2, 343-349



- Bray (1987) 植物学 172, 364-370
- Britton, G.(1988)类胡萝卜素生物合成 133-182 页, T.W.Goodwin(著)  
植物色素, 1988. 学术出版社, Inc. (伦敦)
- Brown 等 (1998) Eye 12,127-33
- 5 Bugos 和 Yamamoto (1996) 美国国家科学院院刊 93, 6320-6325
- Burkhardt 等 (1997) 植物杂志 11, 1071-1078
- Chamovitz 等 (1991) 植物分子生物学 16, 967-974
- Christou 等 (1988) 植物生理学 87, 671-674
- Clark 等 (1989) 生物学化学杂志 264, 17544-17550
- 10 Cornejo 灯光 (1993) 植物分子生物学 23, 567-581
- Crossway 等 (1986) 生物技术 4, 320-334
- Cunningham 等 (1996) 植物细胞 8, 1613-26
- Cunningham 等 FEBS Lett.238, 130-138
- Datta 等 (1990) 生物技术 8, 736-740
- 15 Della-Cioppa 等 (1987) 植物生理学 84, 965-968
- Dogbo 等 (1988) 美国国家科学院院刊, 85: 7054-7058
- Elroy-Stein 等 (1989) 美国国家科学院院刊 86, 6126-6130
- El-Sayed 等 (1984) Ann.Bot.53, 21-27
- Firek 等 (1993) 植物分子生物学 22, 192-142
- 20 Fosket 和 Radin, (1983) 植物科学 Lett.30, 165-175
- Fray 和 Grierson (1993) 植物分子生物学 22, 589-602
- Fray 等 (1995) 植物杂志 8, 693-701
- Fromm 等 (1990) 生物技术 8, 833-839
- Gallie 等 (1989) RNA 分子生物学, 237-256
- 25 Gordon-Kamm 等 (1990) 植物细胞 2, 603-618
- Grant (1991) 世界儿童状况. 牛津大学出版社, 牛津
- Gruber 等 (1993) 见: 植物分子生物学和生物技术方法 89-119 (CRC  
出版社)
- Guerineau 等 (1991) 分子和普通遗传学 262, 141-144
- 30 Hajdukiewicz 等 (1994) 植物分子生物学 25, 989-994
- Hinchee 等 (1988) 生物技术 6, 915-921
- Hoekemenn 等 (1983) 自然 303, 179-180
- Hoever 等 (1994) 转基因研究 3, 159-166
- Hoshino 等 (1993) 应用环境微生物学 59, 3150-3153
- 35 Hugueneey 等, 欧洲生物化学杂志 209, 39-407



- Humphrey 等 (1992) WHO 公报 70: 225-232  
Hundle 等 (1994) 分子和普通遗传学 214, 374-385  
Jobling 和 Gehrke (1987) 自然 325, 622-625  
Joshi 等 (1987) 核酸研究 15, 9627-9639  
5 Kay 等 (1987) 科学 236, 1299  
Kim 等 (1993) 植物细胞生理学 34, 595-603  
Klein 等 (1988a) 美国国家科学院院刊 85, 4305-4309  
Klein 等 (1988b) 植物生理学 91, 440-444  
Linden 等 (1991) Z.Naturforsch46c, 1045-1051  
10 Logemann 等 (1989) 植物细胞 1, 151-158  
Lommel 等 (1991) 病毒学 81, 382-385  
Luehrsen 和 Walbot (1991) 分子和普通遗传学 225, 81-93  
Macejak 和 Sarnow (1991) 自然 353, 90-94  
Marin 等 (1996) EMBO 杂志 15, 2331-2342  
15 Masamoto 等 (1998) 植物细胞生理学 39, 560-4  
Mayer 等 (1990) 欧洲生物化学杂志 191, 359-363  
McBride 等 (1994) 美国国家科学院院刊 97, 7301-7305  
McCabe 等 (1988) 生物技术 6, 923-926  
McCormick 等 (1986) 植物细胞报导 5, 81-84  
20 Misawa 等 1990, 细菌学杂志 172, 6704-6712  
Misawa 等 (1993) 植物杂志 4, 833-840  
Mogen 等 (1990) 植物细胞 2, 1261-1272  
Muller 等 (1990) 基因 91, 151-158  
Murray 等 (1989) 核酸研究 17, 477-498  
25 Neuhaus 等 (1987) 理论应用遗传学 75, 30-36  
Nievelstein 等 (1995) 欧洲生物化学杂志 233, 864-872  
Norris 灯光 (1995) 植物细胞 7, 2139-2149  
Okita 等 (1989) 生物化学杂志 264, 12573-12581  
Pasamontes 等 (1997) 基因 185, 35-41  
30 Pecker 等 (1992) 美国国家科学院院刊 89, 4966-4966  
Pedersen 等 (1982) 细胞 29, 1015-1026  
Perlak 等 (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.88, 3324-3328  
Proudfoot (1991) 细胞 64, 671-674  
Riggs 等 (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.83, 5602-5606  
35 Rohrmeier 和 Lehle (1993) 植物分子生物学 22, 783-792



- Romer 等 (1993) 生物化学生物物理学研究通讯 196, 1414-1421  
Sambrook 等 (1989) 分子克隆: 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港。
- Sanford 等 (1987) 颗粒科学技术 5, 27-37
- 5 Sanford 等, 美国专利 4,945,050
- Sanfacon 等 (1991) 基因发育 5, 141-149
- Schalch (1992) EXS62, 280-298
- Scheutz 和 Baldwin (1957) Proc.Acad.Chem.USA80, 162-164
- Schledz M.和 Beyer P. (1996) 植物生理学 110, 336
- 10 Schledz 等 (1996) 植物杂志 10, 781-792
- Schulz 等 (1993) FEBS Lett.318, 162-166
- Scolnik 和 Bartley (1995) 植物生理学 108, 1342
- Shah 等 (1986) 科学 233, 478-481
- Stanford 等 (1989) 分子和普通遗传学 215, 200-208
- 15 Staub 和 Maliga (1993) EMBO 杂志 12, 601-606
- Sommer (1988) 自然杂志 119, 96-100
- Sun 等 (1996) 生物化学杂志 271, 24349-52
- Svab 等 (1990) 美国国家科学院院刊 87, 8526-8530
- Svab 和 Maliga (1993) 美国国家科学院院刊 90, 913-917
- 20 Thompson 等 (1987) EMBO 杂志 6, 2519-2523
- Uze 等 (1997) 植物科学 130, 87-95
- Van den Elzen 等 (1985) 植物分子生物学 5, 299-392
- Velten 等 (1984) EMBO 杂志 3, 2723-2730
- Von Heijne 等 (1991) 植物分子生物学报道 9, 104-126
- 25 Wang 等 (1988) 植物分子生物学 11, 433-439
- Warner 等 (1993) 植物杂志 3, 191-201
- Weissinger 等 (1988) 遗传学年度综述 22, 421-477
- Wuenn 等 (1996) 生物技术 14, 171-176
- Yanish-Perron 等 (1985) 基因 33, 103-109
- 30 Xu 等(1993)植物分子生物学 22, 573-588
- Zheng 等 (1993) 植物杂志 4, 357-366

# 说明书附图

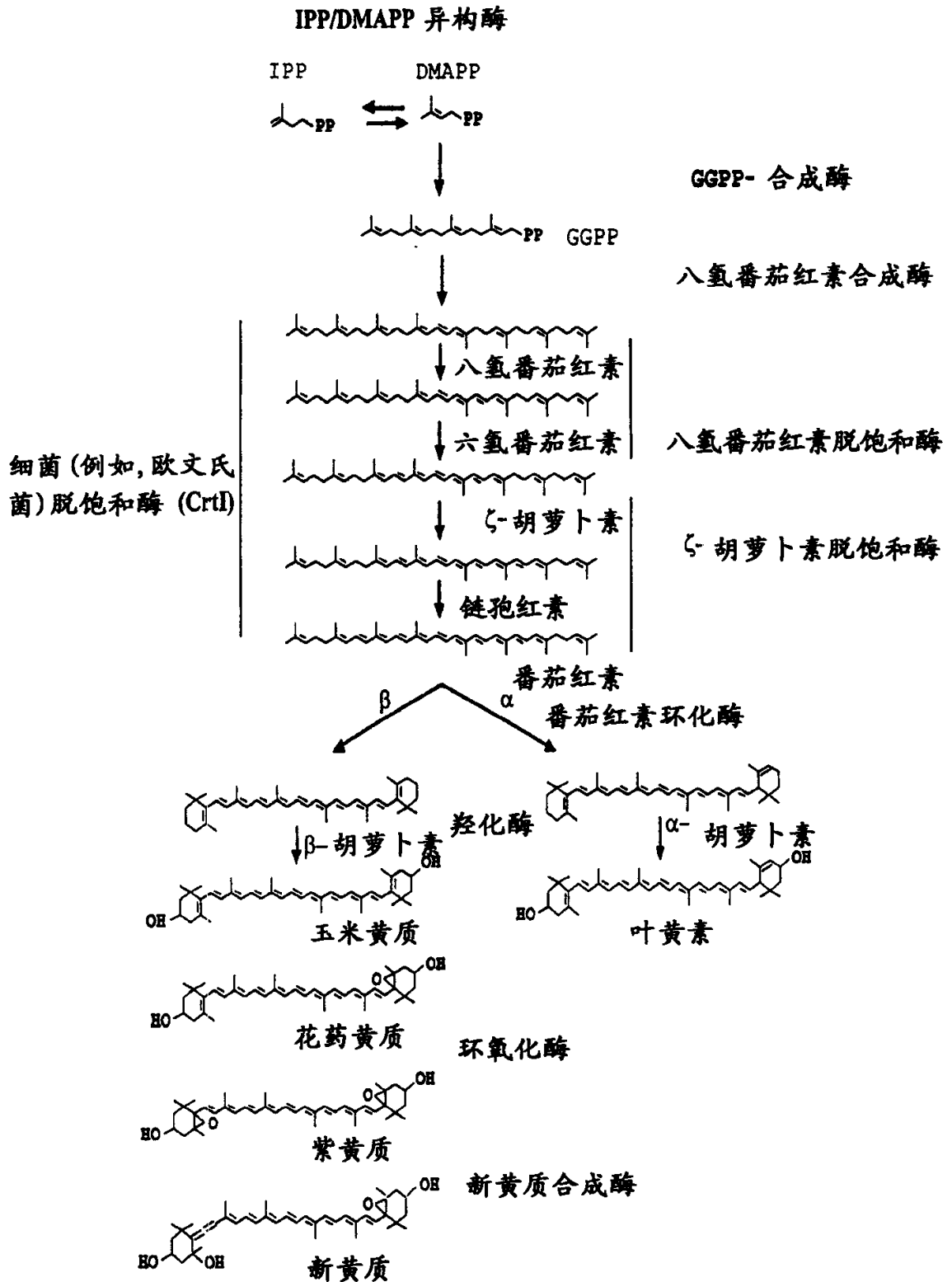


图 1

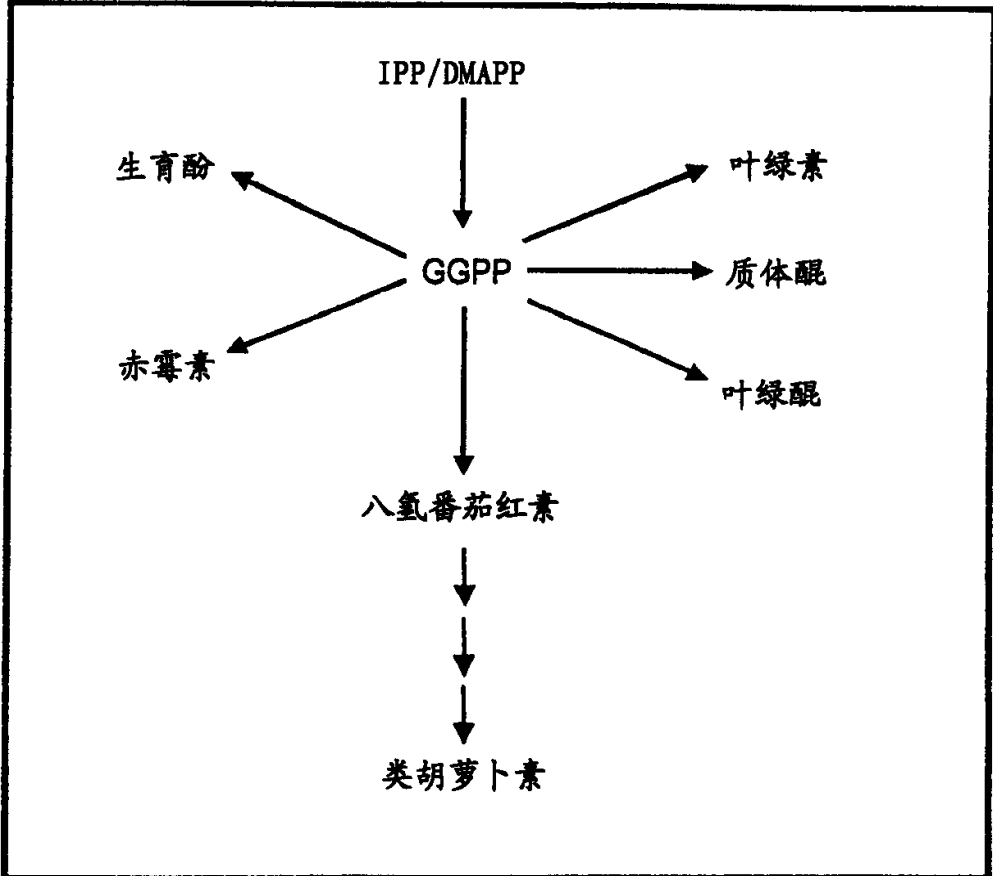


图 2





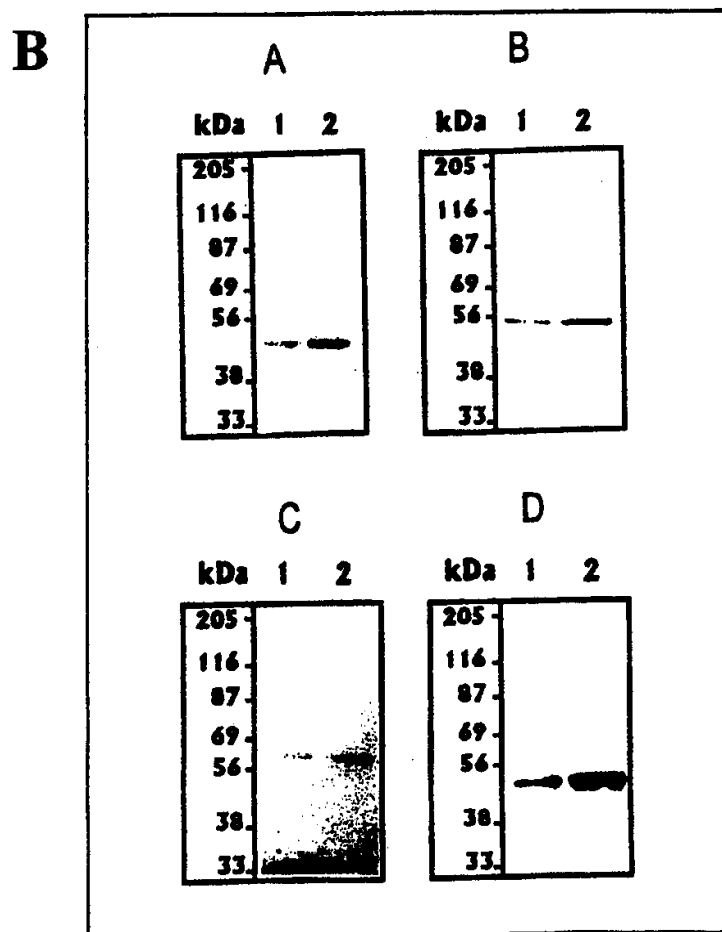
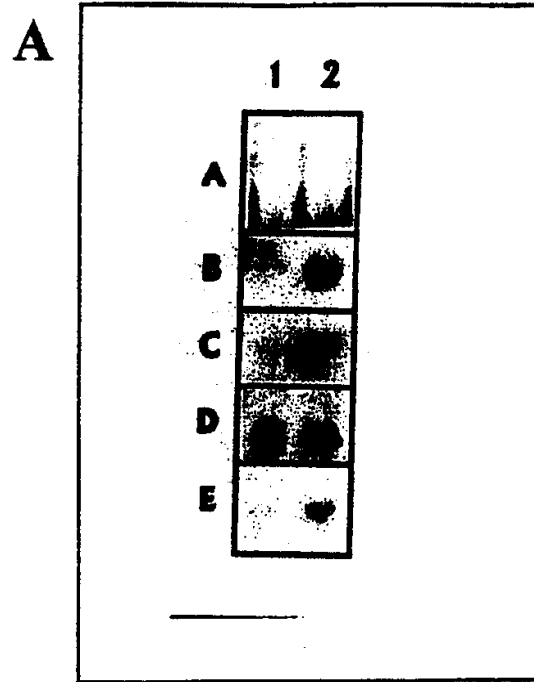


图 5