

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

C12N 15/70 C12N 15/74

C12N 1/21 C12N 15/29

A01H 1/06



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97121439.5

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1133744C

[22] 申请日 1997. 9. 26 [21] 申请号 97121439. 5

[30] 优先权

[32] 1996. 9. 26 [33] JP [31] 255184/1996

[71] 专利权人 独立行政法人农业生物资源研究所
地址 日本筑波市

[72] 发明人 川崎信二

[56] 参考文献

US - 5447858 - A 1995. 09. 05 C12N5/14

PLANTJOURNAL, BLACKWELLSCEINTIFICPUBLICATIONS, OXFORD, GB, VO 1994 - 01 - 01 hiei, yukoh, et, al, : " efficient, transformation, of, rice, (oryza, sativa, l.), mediated, by, agrobacterium, and

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

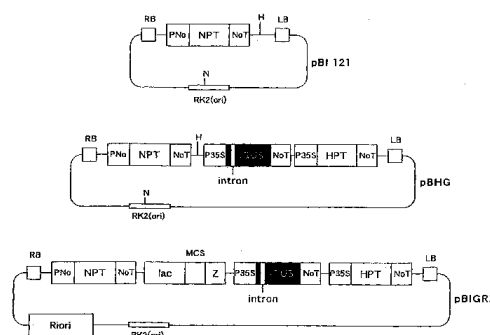
代理人 张志醒 王忠忠

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称 新的高容量二元穿梭载体

[57] 摘要

有 T-DNA 区和 Ri ori 并能在其中整合大基因组片段的高容量二元穿梭载体; 有转化植物(具体说是单子叶植物)能力的基因组文库; 用所述载体转化的植物; 使用该载体寻找有用基因的方法。还提供源自 Ri ori 驱动载体的其它载体, 载体可整合到有 lox 位点的环形基因组文库质粒中, 或可用任意表达性质的基因有效地转化植物。还包括用互补测定评价插入载体的基因组片段功能的方法。此外, 有用基因或其复合物可有效被检查, 因此也易于分离。



1. 一种二元穿梭载体, 该载体包含 T-DNA 区和含有 *Ri ori* 及 *RK2 ori* 的复制起点。
- 5 2. 权利要求 1 的穿梭载体, 其中所说的载体以 pBI 系统载体为基础。
3. 权利要求 1 或 2 的二元穿梭载体, 其中所说的载体包含导入了具有多克隆位点的基因的 T-DNA 区。
4. 权利要求 3 的二元穿梭载体, 其中所说的具有多克隆位点的基因是 *lacZ* 基因。
- 10 5. 权利要求 1 或 2 的二元穿梭载体, 其中所说的载体包含在 T-DNA 区导入的 *lacZ* 基因和 T-DNA 的边缘序列之间导入的抗生素抗性基因。
6. 权利要求 5 的二元穿梭载体, 其中所说的抗生素是潮霉素。
7. 权利要求 1 或 2 的二元穿梭载体, 其中所说的载体能够在其中整合大小达至多 40kb 的基因组片段。
- 15 8. 一种包含在 T-DNA 区的 *lox* 位点、*par C* 基因和作为复制起点的 *Ri ori* 的二元载体, 其中所说的载体能够在宿主大肠杆菌或土壤杆菌中通过 *cre* 酶整合具有 *lox* 位点的环形基因组文库的克隆质粒。
9. 一种用于植物转化的二元载体, 该载体包含在 T-DNA 区中的植物启动子和终止子之间夹入的多克隆位点和作为复制起点的 *Ri ori*。
- 20 10. 一种用于评价插入在基因组文库克隆中的基因组片段中的基因的功能的互补方法, 该方法包括:
 整合构成文库的质粒克隆与权利要求 1 的二元载体, 其中所说的文库通过使用具有 *lox* 位点的环形载体构建的, 并用大肠杆菌作为宿主,
 把所说的整合载体导入土壤杆菌属细胞,
25 把所说的土壤杆菌属细胞转移进植物。
11. 一种用于评价插入在基因组文库克隆中的基因组片段中的基因的功能的互补方法, 该方法包括:
 整合构成文库的质粒克隆与权利要求 8 的二元载体, 其中所说的文库通过使用具有 *lox* 位点的环形载体构建的, 并用大肠杆菌作为宿主,
30 把所说的整合载体导入土壤杆菌属细胞,

把所说的土壤杆菌属细胞转移进植物。

12. 一种用于评价插入在基因组文库克隆中的基因组片段中的基因的功能的互补方法，该方法包括：

整合构成文库的质粒克隆与权利要求 9 的二元载体，其中所说的文库通
5 过使用具有 *lox* 位点的环形载体构建的，并用大肠杆菌作为宿主，

把所说的整合载体导入土壤杆菌属细胞，

把所说的土壤杆菌属细胞转移进植物。

13. 一种用于筛选有用基因的方法，该方法包括使用权利要求 1 的二元穿梭载体。

10 14. 一种用于筛选有用基因的方法，该方法包括使用权利要求 8 的二元穿梭载体。

15. 一种用于筛选有用基因的方法，该方法包括使用权利要求 9 的二元穿梭载体。

新的高容量二元穿梭载体

5 本发明涉及用于植物转化等的高容量二元穿梭载体。具体地说,本发明涉及用于种子植物(特别是有其经济重要性但却难于转化的单子叶植物)转化的高容量二元穿梭载体,该载体用于基因组功能的互补试验分析以及基因组功能分析之基因组文库的构建也十分有效。

单子叶植物尽管有其农业重要性,但比双子叶植物难于转化。这些植物的
10 常规转化通过各种被动的导入方法进行,如使用用于完整细胞的基因枪或电穿孔或用于原生质体的 PEG (聚乙二醇) 方法。

然而,电穿孔方法或 PEG 方法都有问题,即从原生质体到正常植物的再生是困难的,在基因枪的情况下,问题是需要昂贵的设备,而且大量的样品不能同时进行。而且,还没有把 10kb 或更大的基因片段没有重排地导入单子叶植
15 物。

最近, Hiei 等报道水稻(一种典型的单子叶作物)可用 pBI 系统载体和土壤杆菌属转化(Hiei 等, 植物杂志, 6: 271-282 (1994))。这使水稻的转化变得非常容易。

然而, Hiei 等使用的载体仅可把大约 10kb 的 DNA 稳定地导入水稻中。
20 如果把更大的 DNA 整合进这样的穿梭载体中,载体甚至不能在大肠杆菌中稳定保持。

通过最近的基因组研究进展,分离基因的定位克隆方法(基于其在染色体图上位置信息)作为一种分离确定农业品质的有用基因的有前途的方法成为兴趣的焦点。为了把这种技术用于从通过使用其图谱信息选择的候选基因中鉴别
25 造成这些品质的基因,通过在基因组片段中的基因的品质表达必须通过把片段转化进植物确认。在这种情况下,大基因组片段的导入使基因的筛选更为有效。因此,导入尽可能大的基因组片段是合乎需要的。

虽然已知二元粘粒方法和 PEG 方法可把 10kb 或更大的基因组片段导入植物,两种方法的缺陷如下:

30 (1) 对于二元粘粒方法,要导入的基因组片段的上限是大约 20kb, pBI

系统 RK2 用作复制起点。因此,即使在具有染色体片段的质粒首先导入的大肠杆菌中要稳定地保持质粒也常常是困难的。

(2) 对于 PEG 方法,从原生质体的再生需要很高的技术熟练程度,导入的片段常常严重地重排,这使通过片段的正常互补相当困难。因此,这样的方法
5 不十分适于测定大基因组片段的功能。

本发明是在考虑到上述情况下实施的。本发明的目的是把 10kb 或更大的基因组 DNA 片段导入植物,具体来说是高等植物。它也可用于有其农业上的重要性但难于转化的单子叶植物。

本发明的另一个目的是建立用于 10kb 或更大的基因组区(通过常规方法
10 导入植物是十分困难的)的有效和稳定的互补分析方法。通过把这样的大基因组片段有效地导入植物,可以更有效地分离控制各种农业品质的基因。本发明的另一个目的是把大的基因复合物作为块导入植物以使其能在植物中表达复杂的品质。有时这样的基因复合物定位于操纵子组中。

也就是说,本发明涉及包含 T-DNA 区和 Ri 复制起点的高容量二元穿梭载体
15 体。

本发明的高容量二元穿梭载体是一种二元穿梭载体。

所说的高容量穿梭载体还包含在 T-DNA 区具有多克隆位点的基因,具体来说是 *lacZ* 基因。

所说的高容量二元穿梭载体还包含在 T-DNA 区导入的 *lacZ* 基因和 T-DNA
20 的边缘区之间导入的几个或一个抗生素抗性基因。所说的边缘区优选地是左边缘区,所说的抗生素抗性基因优选地是潮霉素抗性基因。

另一个选择标记抗生素抗性可以是在大肠杆菌和双子叶植物中用作选择标记的卡那霉素抗性基因。

所说的高容量穿梭载体可以在其中整合从小 DNA 片段到大基因组片段的
25 具有不同大小的片段。已证实大小达至少 40kb 的基因组片段可有效地整合进水稻,更大的片段也有可能整合。

本发明是包含在 T-DNA 区中的 *lox* 位点、*par C* 基因以及作为复制起点的 *Ri ori* 的二元载体。所述载体能够在宿主大肠杆菌或土壤杆菌中通过 *cre* 酶整合具有 *lox* 位点的环形基因组文库的克隆质粒。

30 本发明也是用于植物转化的二元载体,该二元载体包含在 T-DNA 区的植物

启动子和终止子之间夹入的多克隆位点和作为复制起点的 *Ri ori*。

本发明还是具有转化植物能力的基因组文库。构成具有转化植物能力的基因组文库构成的每克隆在本发明的高容量二元穿梭载体的 T-DNA 区具有插入片段。

- 5 本发明是用于评价在插入到基因组文库的克隆中的基因组片段上的基因功能的互补方法。这种方法包括：把所说的具有基因组插入片段的质粒导入土壤杆菌属细胞，并把所说的质粒转移进植物。本发明还是另一种评价在插入到基因组文库的克隆中的基因组片段上的基因功能的互补方法。该方法包括：整合具有基因组插入片段和一种二元载体的文库的组分质粒(其中所说的文库通过
- 10 通过使用具有 *lox* 位点的环形载体构建，以大肠杆菌作为宿主)，其中所述的二元载体包含在 T-DNA 区的 *lox* 位点、*par C* 基因和作为复制起点的 *Ri ori*，其中所说的载体能够在宿主大肠杆菌或土壤杆菌中通过 *cre* 酶整合具有 *lox* 位点的环形基因组文库的克隆质粒；把所说的整合载体导入土壤杆菌属细胞，然后把所说的整合载体转移进植物。

- 15 本发明是通过以上所述的互补方法获得的基因。

本发明是一种筛选方法，该方法通过使用上述的高容量二元穿梭载体或文库整合载体用于有用基因的筛选。

本发明还是具有所说的高容量二元穿梭载体的转化植物。要转化的植物包括所有植物，主要是种子植物，具体来说是单子叶植物。

- 20 本发明是为了稳定地保持具有大插入片段的二元载体产生具有 *recA*⁻ 的高效土壤杆菌属菌株的方法。这种方法包括：通过在所说的菌株 *recA* 基因上的定点突变产生高转化效率的菌株以转化成 *recA*⁻ 菌株，在细胞中转化的 *recA*⁻ 载体和 *recA*⁺ 基因之间将同源重组引入到具有 *recA*⁺ 基因的菌株中，通过涂布菌株的平板复制选择重组体，照射平板以筛选不能在 UV 照射下生长的克隆。或者，
- 25 这样的 *recA*⁻ 菌株可以通过 UV 照射下正常诱变和选择之后的复制选择。

本发明是具有 *recA* 的高转化效率的土壤杆菌属菌株，其中所说的菌株可以稳定地保持所说的具有大插入片段的高容量二元载体，并可以转化各种用于转化的普通 *recultitrait* 植物。

- 图 1 显示了具有 *Ri ori* 的高容量穿梭载体 pBIGRZ 和没有 *Ri ori* 的类似
- 30 载体 pBIGZ 的构建体。高容量二元载体 pBIGRZ 的构建体。*Ri ori* 的箭头表明基因的方向和相应的质粒的编号。在图中指明了具有单一克隆位点的限制酶。RB: T-DNA 的右边缘，LB: T-DNA 的左边缘，NPTII: 新霉素新霉素基因，NP 和 NT: 胭脂氨酸合成酶的启动子和终止子，*lacZ*: β -半乳糖苷酶基因，

MCS: 多克隆位点, P35S: 35S 启动子, iGUS: 具有内含子的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因, HPT: 潮霉素抗性基因, Ri ori: Ri 质粒的复制子起点。

图 2 显示了 pBGRZ 从 pBI121 和 pBIHG 的构建过程。

图 3A 和 3B 显示了通过 pBGRZ 导入水稻植物的两种大约 40kb 的基因组片段的 Southern 印迹分析。A: 在转化期间主要的转化体(R_0)与对照相比没有发生缺失, 几乎没有发生重排。该结果显示基因组片段完整地转移进植物细胞并可以稳定地保持。B: 在后代(R_1)的第一代中, 也没有观察到片段的缺失和重排。结果表明: 整合进植物基因组的基因组片段稳定地遗传给其后代。

图 4 显示了通过 pBGRZ 把大约 40kb 的人基因组片段导入到水稻植物的花和圆锥花序。水稻植物具有极好的生产力, 由于种子的重量其花序弯曲。

图 5 显示了使用 pBGRZ 产生的水稻基因组文库。它们经限制酶 NotI 消化。A 显示了其中导入了 45kb 或更大的基因组片段的文库。B 显示了其中导入 30 至 50kb 的片段的文库。在 A 和 B 中, 所导入的片段的平均大小分别是 51kb 和 39kb。

这表明: 用于互补试验的基因组文库实际上使用该载体构建。插入片段大小的平均值通过从泳道上的每个带的大小减去载体大小(它大约是 20kb)获得。在凝胶右侧的两条泳道是大小标记物。

图 6A 和 6B 显示了使用本发明的高容量二元穿梭载体性质的各种可诱导载体。

A: 通过基于在 *lox* 位点 cre 酶的短暂表达的定点重组产生的单一载体。为了产生这种载体, 通过 cre 基因在宿主细胞中的短暂表达整合 pBRC (进行互补试验的载体的例子) 与具有基因组插入片段和 *lox* 位点的 BAC 载体。当 par C 序列存在于其中时, 把具有 BAC 的未整合的 pBRC 快速除去。

B: 载体 pBRPT 的例子。该载体用于具有引入从启动子与终止子的表达性质并具有本发明的高容量载体的高转化效率的单个基因。

在下文中详细地描述了本发明。

按照下列的步骤构建本发明的高容量二元穿梭载体。

(1) 能稳定地保持大基因组片段作为插入片段的二元载体的策略(参见图 1 和 2)。

符合下列要求的二元载体系统用作基础:

(i) 具有各种导入其中作为插入片段的基因组片段的含 T-DNA 区载体。该 T-DNA 区可以有效地导入各种植物细胞。

(ii) 基因组文库易于并稳定地构建。

(iii) 质粒 DNA 也易于制备，大肠杆菌可以用作宿主细胞。

5 (iv) 构建的质粒易于转导进土壤杆菌属并稳定地保持以使植物高效转化成为可能。

如上所述，本发明的高容量二元穿梭载体符合转导进土壤杆菌属的要求。

根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是具有大约 200kb 大小的 Ti 质粒的土壤细菌，在 Ti 质粒上具有称为 T-DNA 的 10 至 20kb 区。当植物受到
10 土壤杆菌属的感染时，T-DNA 区通过在土壤杆菌属的 Ti 质粒上的 *vir* (毒性) 区的基因产物切除。已知这样切除的 T-DNA 被转移进植物细胞，最后整合进它们的核 DNA。

在这种情况下，T-DNA 区和 *vir* 区可以包含在分离的载体中。因此，有可能构建仅由 T-DNA 区、至少一个可以在大肠杆菌和土壤杆菌属中起作用的复制
15 起点以及标记基因组成的二元载体。

T-DNA 的转移和整合需要位于 T-DNA 两端的仅 25-bp 的边缘序列，位于 T-DNA 的其它基因小组都不需要。定位于 T-DNA 两端的边缘序列分别称为左边缘 (LB) 和右边缘 (RB)。

符合上述要求的各种二元穿梭载体可以用作构建的基础 (只要当它具有适
20 当的复制起点和作为二元载体的功能时它甚至可以在两个或其它微生物中使用)。例如，pBI 系统载体 (如 pBI101 和 pBI121) 有市售并可以方便地使用。

用于 pBI 二元载体的复制起点通常是 RK2。然而，如果 RK2 用作复制起点时，10kb 或更大的插入片段常常不能在大肠杆菌或土壤杆菌属中稳定地保持。同时它的高的拷贝数量可以导致使质粒不稳定的互相重组。因此，应该设
25 计载体以使其在任何宿主中具有高的大插入片段容量和稳定性。通过作为得自 *Rizobium bacteria* 的低拷贝数复制起点导入 *Ri*，我们可以探查载体是否具有高容量和稳定性。在这种情况下，*Ri ori* 可以单独或与 RK2 一起包含在载体中。

载体质粒的选择标记包括各种抗生素抗性基因，具体来说使用了潮霉素抗
30 性基因 (HPT) 和卡那霉素抗性基因 (NPT) 等。这些标记可以在必需时按照已知的

方法导入质粒。

虽然在 pBI 系统中的基本载体质粒仅具有在宿主植物中作为选择标记的卡那霉素基因，但也另外导入了潮霉素抗性基因。这是因为在水稻中卡那霉素作为选择标记作用不充分。

- 5 除去或修饰某些妨碍多克隆位点的限制位点。例如，在所说的潮霉素抗性基因中修饰了 *EcoRI* 位点以使其不被限制酶消化。

可以通过使用已知方法从包括各种微生物、丝状真菌、原生动物、动物和植物的任何有机体获得导入所说的二元载体的基因组或 DNA 片段。

- 10 可以把至少大约 40kb 或更大的任何 DNA 或基因组片段导入二元载体并依赖于目的选择。当水稻用 40kb 基因组片段转化与用几 kb 的基因转化没有任何效率区别时，就可能不困难地导入更大的片段。

优选地在标记基因中导入克隆位点以检查基因组片段的导入。作为标记基因，可以使用具有克隆位点(如 *HindIII*、*SpeI* 和 *NotI*)的 *lacZ*(β -半乳糖苷酶)基因。

- 15 下列基因还可以导入载体，即，监测 T-DNA 在具有二元穿梭载体转化植物中的导入和表达的基因。

- 20 NPT 或 HPT 基因可以用作这样的标记基因。 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)基因尤其适用于使定位的表达位点可视化。包含内含子的 GUS (iGUS) 仅在真核细胞(包括植物细胞)但不在原核生物细胞(如土壤杆菌属)中表达。因此通过使用包含内含子的 GUS 作为表达标记，可以消除得自污染的土壤杆菌属的噪音。

然而，许多标记的导入可以可逆地影响兴趣基因的表达，在载体中这样的标记应尽可能地不保持。

(2) 基因组片段导入载体与大肠杆菌的转化

(i) 把合乎需要的 DNA 片段导入载体

- 25 把在上述(1) 中获得的载体和具有适当大小的片段 DNA(基因组片段)使用市售的连接酶等和载体相连接，把形成的反应产物通过电穿孔导入大肠杆菌 DH10B 细胞中。然后把细胞平板接种于包含卡那霉素或潮霉素 B(50 μ g/ml)、X-gal 和 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)的 LB 琼脂平板上。平板在通常的条件下培养过夜。选择在 LB 琼脂平板上形成的和白色菌落作为转化体，其中上述 DNA
- 30 片段作为插入片段整合在其中。

(ii) 通过转化载体制备基因组文库

可有可无地使用适当的限制酶(在大多数情况下为 HindIII)部分或完全消化得自植物细胞或其它材料的基因组 DNA。基于其大小通过 CHEF(钳位均匀电场电泳)凝胶电泳分离这样获得的片段。把这样获得的 DNA 片段连接到上述(1)中的载体中。形成的产物通过电穿孔导入大肠杆菌 DH10B 细胞,把具有作为插入片段的上述 DNA 片段的细胞平板接种于含卡那霉素(25 μ g/ml)或潮霉素 B(50 μ g/ml)、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上并按照与(i)中相同的方法选择。

(3) 载体从大肠杆菌转移进土壤杆菌属

具有插入片段的载体可以从大肠杆菌制备,并可以通过电穿孔方法或三亲(triparent)方法(三亲交配方法)转移到土壤杆菌属中。

(i) 电穿孔方法

通过使用常规的小规模制备方法以碱从大肠杆菌回收具有插入片段的二元载体。如果有自动质粒提取物可以供使用,可以有效而十分容易地提取大量载体。

作为载体的受体 EHA101 土壤杆菌属菌株由于其高效性是优选的。具体来说,当把大片段插入到这些细胞中时,合适地使用无从高转化效率菌株诱导的重组能力的 recA⁻菌株。电感受态细胞通过已知的方法从土壤杆菌属制备。

把通过小规模制备方法从大肠杆菌中回收的具有插入片段的二元载体通过电穿孔导入土壤杆菌属的感受态细胞。具有导入的载体的感受态细胞在与正常相同的条件下培养,但在培养基中包含潮霉素 B(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)以选择转化体。

(ii) 三亲方法

把如上述(2)描述的具有二元载体的大肠杆菌细胞、携带辅助质粒的大肠杆菌细胞以及土壤杆菌属细胞混合并共培养以从大肠杆菌把所需的二元载体转移进土壤杆菌属。

把携带辅助质粒的大肠杆菌细胞和具有导入的二元载体的大肠杆菌细胞混合并在适当的培养基上和土壤杆菌属细胞于 28 $^{\circ}$ C 下共培养 12 至 24 小时。

适合的培养基包括 YEP 培养基等。

本文所使用的辅助质粒是辅助质粒从细菌转移进兴趣微生物的限定质

粒。作为例子的是 pRK2013 等。如果携带辅助质粒的大肠杆菌在共培养时使用，在共培养期间把载体有效地从包含二元载体的细菌转移至土壤杆菌属中。

转化体通过卡那霉素、四环素和潮霉素的组合从如上所述的这样共培养的土壤杆菌属中选择并用于如下所述地转化植物。

5 (4) 通过携带二元穿梭载体的土壤杆菌属转化植物

如下所述通过携带二元载体的土壤杆菌属转化植物。把具有如上所述导入的载体的土壤杆菌属菌株(大约 3×10^8 至 3×10^9 细胞/ml)在培养基(如 2N6-AS 或 N6C0)中和植物愈伤组织或组织切片于 25 至 28 °C 下共培养大约 3 天。

10 作为共培养的植物，可以使用种子植物，尽管在转化困难上有差异 (divergence)。具体来说是在迄今为止难于转化的单子叶植物，即水稻、小麦、大麦、玉米等作为受体的候选者包括在内。在它们中间，最优选地使用水稻，因为它易于再生植物。

在与土壤杆菌属共培养之后，在包含适合的抗生素的培养基中选择愈伤组织或组织切片。如果如上所述把潮霉素抗性基因作为选择标记导入二元穿梭载体中，通过在包含潮霉素(10 至 100 μ g/ml)和头孢噻肟(250 μ /ml)或羧苄青霉素(500 μ g/ml)的 2N6-CH 或 N6Se 培养基中培养 1 至 3 周选择转化的愈伤组织以除去土壤杆菌属。

通过在适合的再分化培养基(如 N6S3-CH、MSre 等)上诱导潮霉素选择的愈伤组织的再分化以产生再生植物。

20 如上所述，如果植物细胞通过使用包含在 T-DNA 中的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因的载体转化，当 x-gluc(x-葡萄糖醛酸化物)添加到它们的培养基中时，愈伤组织或再生植物变蓝。通过这种蓝颜色可以确认成功的转化。

如上所述，本发明的高容量二元穿梭载体可以用于把大基因组片段导入植物并转化它。

25 因此，如上所述地按照标准的方法从适合植物或其它生物中获得并以适合的限制酶消化的基因组 DNA 可以如上述制备基因组 DNA 文库整合进本发明的高容量二元穿梭载体中。

因为本发明的载体是高容量的二元穿梭载体，这样制备的基因组 DNA 文库具有转化各种细胞的能力。因此，该基因组 DNA 文库可以用于转化具有包含在 30 构成该文库的每个克隆中的植物 DNA 片段的其它植物细胞。

具体地说, 本发明的高容量二元穿梭载体可以作为大于 40kb 的大 DNA 或基因组片段整合以有效地筛选有用的基因。也就是说, 可以进行品种 (cultivar) 或缺陷突变体 (其缺乏某些功能) 的互补转化并恢复兴趣基因功能的克隆是否必须存在于克隆中 (互补试验)。

5 按照本发明, 建立了用于把 10kb 或更大的基因组片段易于、有效、稳定而在无基因的重排或缺失等的条件下导入高等植物中 (具体地说是包括水稻的单子叶农作物) 的方法。此外, 本发明的高容量二元穿梭载体也可以用于制备能转化兴趣植物的、插入片段大于 40kb 的基因组文库。因此, 该载体通过使用阳性克隆方法等用于分离有用的基因。

10 而且, 因为本发明的高容量二元穿梭载体可以整合这样的大基因组片段, 与常规的二元载体相比, 本发明的高容量二元穿梭载体也可以用于把更大的基因或基因复合物有效地导入植物。

按照本发明, 建立了用于水稻 (作为代表高等植物 (具体来说是单子叶植物) 的农作物) 的通过互补试验有效地测定基因组功能的方法。这样, 生物学重要的但以更少的量表达的一组基因 (例如, 调节基因和参与信号识别/转导的基因
15 或参与农业重要性品质表达的基因) 可以相当容易地分离。

高容量通过仅使用 *Ri ori* 作为载体的复制起点完成。

而且, 用于有用基因筛选的效率可以通过使用本发明的高容量二元穿梭载体剧烈提高。

20 可以把该载体修饰成用于植物的可以转化形式以使具有改变质粒的容量, 改质粒具有带 *lox* 位点的常规环状基因组文库的插入片段 (如 BAC 文库的成分)。

至此, 产生了许多基因组文库, 如果这些文库可以用于植物的互补试验, 它就是十分有用的。仅具有 *Ri ori* 或具有 *Ri ori* 和 *RK2 ori* 作为其复制起点的载体 (例如上述的高容量载体在大肠杆菌和土壤杆菌属中十分稳定, 并具有
25 用于植物的极好的可以转化性。基于具有这样的性质的载体, 可以产生在 T-DNA 区具有作为复制起点的 *Ri ori*、*lox* 位点和 *par C* 位点的本发明的载体。然后, 载体可以与环形质粒 (它构成具有 *lox* 位点的基因组文库的克隆, 如 BAC 文库) 一起导入大肠杆菌菌株 (该菌株通过基因工程操作以在特异性条件下暂时
30 表达 *cre* 酶)。然后形成的转化体通过文库载体和二元载体的抗生素先后进行

选择。这样,获得了这样的载体,其中把具有 *lox* 位点的文库组分载体(如 BAC)整合进另一个载体的 T-DNA 区中的 *lox* 位点中(图 6A)。

在上文获得的整合载体中,以和上述的高容量二元穿梭载体基本相同的方式插入了大基因组插入片段。因此,通过使用上述的方法把整合载体导入土壤杆菌属使在表 I 中所示的高转化效率使插入片段导入植物成为可能。为了除去不与文库质粒整合的具有 *Ri ori* 的二元载体,把 *par C* 序列插入 *lox* 位点的附近。

因此,通过载体制作的已知构建的基因组文库(如具有 *lox* 位点的 BAC 或 P1)可以有效地使用本发明的高容量二元载体用于互补试验而不须重建文库。

如表 1 所示,与仅 *RK2 ori* 具有相比,具有 *Ri ori* 和 *RK2 ori* 的载体可以显著有效地转化植物。基于这个结果,可以预期:高容量的二元载体可以用于转化难于导入基因的植物。

在载体 pBRGRZ 中,基因仅以基因组片段的形式或带有某些启动子和终止子导入。使载体具有在适合的启动子和终止子之间的多克隆位点以导入一种基因(除去该基因中的固有启动子)或全长 cDNA (赋予其任意基因的所需的表达性质(图 6B))是方便的。在插入基因或 cDNA 之后,可以把这样的载体导入转化的植物。通常,肌动蛋白启动子和肌动蛋白终止子的组合对强烈地表达基因是优选的。可以避免相同的启动子或终止子在载体中的重复使用,因为这可以在宿主细胞中造成同源重组。

产生具有 *rec A⁻* 的高转化效率的土壤杆菌属菌株以保持得自本发明的高容量二元载体的大质粒。

通常,这种大质粒稳定地保持在大肠杆菌和土壤杆菌属中,因为它作为单一或低拷贝的质粒保持。在大肠杆菌中,易于获得不能遗传重组的具有 *rec A⁻* 的菌株,例如, DH10B。在土壤杆菌属中,某些 *rec A⁻* 菌株也是已知的。然而,对于难于转化的植物的转化所必需的高转化效率菌株,没有对于大质粒的稳定保持和转化所需的 *rec A⁻* 菌株的报道。

因此,通过在 EHA101 菌株中 *rec A* 基因的定点突变产生这样的高转化效率的 *rec A⁻* 菌株。通过与染色体 *rec A* 基因和具有 *rec A⁻* 基因的转化质粒的同源重组把突变导入土壤杆菌属。把通过定点诱变产生的具有 *rec A⁻* 基因的质粒转化进高转化效率的土壤杆菌属菌株中,然后涂布在平板上。在形成复制平板

之后,用UV照射复制平板,然后在平板上培养土壤杆菌属细胞。因为具有 *recA* 的突变体不能在UV下生长,选择这样的菌落。当使用突变体时,包含大基因组片段的克隆在土壤杆菌属细胞中更稳定地保持。也可以通过在正常的诱变之后经如上所述在UV照射下的阴性选择来选择这样的突变体。

- 5 在下文中,本发明通过参考显示本发明的高容量二元穿梭载体的构建及其用于把人基因组DNA导入水稻的实施例更详细地描述。然而,本发明不限于下列实施例。

实施例1

本发明的高容量二元穿梭载体 pBIGRZ (在图2中显示)按照下列步骤(1)至

10 (3) 构建:

(1) pBH 的构建

- 采用连接进在二元载体 pBI121 的 T-DNA 中的左边缘侧面的 EcoRI 位点 (在图中作为 LB) 的方法导入具有 35S 启动子、胭脂氨酸终止子但无 EcoRI 裂解位点的潮霉素磷酸转移酶基因 (HPT, Dr. Hatsuyama 所赠, 北海道大学) 以构建
- 15 PBH。在图2中, 35S 启动子和胭脂氨酸终止子分别称作 P35S 和 NPT。

(2) pBHG 的构建

通过使用标准方法把包含内含子的β-葡萄糖醛酸糖苷酶 (iGUS) 导入在上述 (1) 中获得的 pBH 中的 T-DNA 内的 HPT 和 NPT 之间以构建 pBHG。

(3) Ri 质粒复制起点的插入

- 20 *Ri ori* 是克隆自 *Rizobium* 细菌的 Ri 质粒的复制起点, 通过使用连接将其插入到 T-DNA 外部的 NotI 位点中。

(4) 从在 pBluescript 中的 *lacZ* 区制备具有多克隆位点 (包括 HindIII、SpeI 和 NotI) 的 *lacZ* 基因, 并将此基因导入 NPT 和 iGUS 之间以构建定名为 pBIGRZ 的质粒。

- 25 如上所述, 因为 pBIGRZ 在 *lacZ* 中具有克隆位点, 可以确认得自基因组等的片段是否在包含 X-gal 和 IPTG 的培养基中插入质粒中。

实施例2

- 本实施例显示了把大约 40kb 的人基因组导入水稻中以检查在实施例1中获得的二元载体 pBIGRZ 是否能把 10kb 或更大的基因组片段实际上有效而稳定
- 30 地导入单子叶植物中。

(1) 使用限制酶消化 *lacZ* 中 pBGRZ 内的 NotI 位点, 去磷酸化形成的末端。然后把插入 2 个粘粒中的人基因组 NotI 片段 DNA (大约 40kb) 通过连接插入到二元载体中。把具有插入片段的载体导入大肠杆菌。

(2) 采用如下方法使具有导入的人基因组片段的 pBGRZ 载体从大肠杆菌电穿孔到土壤杆菌属:

使用碱从大肠杆菌中通过最小制备方法回收二元载体。把制备的二元载体电穿孔进土壤杆菌属 (EHA101) 携带无 T-DNA 的辅助质粒的感受态细胞中, 在包含潮霉素 (50 μ g/ml) 和卡那霉素 (50 μ g/ml) 的培养基上选择转化体。

(3) 按如下方法把具有稳定地导入土壤杆菌属的人基因组片段的 pBGRZ 载体导入水稻盾片愈伤组织: 使导入了二元载体的土壤杆菌属在 25 $^{\circ}$ C 下和愈伤组织共培养 3 天, 将转化的愈伤组织在潮霉素培养基 (30–50 μ g/ml) 中选择性培养。此后, 在再生培养基中使它们再生为植物, 然后在无激素培养基中进行加强形成以给出再分化的植物。在植物适应水土之后, 将它们于温室中的罐中生长。

使用 pBGRZ1 和 pBGRZ2 (具有相反方向的 *Ri ori*) 来检查 *Ri ori* 的方向是否影响土壤杆菌属 (EHA101) 中质粒的稳定性、在与水稻愈伤组织共培养之后 GUS 的形成以及在上述方法中再分化植物的再生速率。

结果如表 1 所示。

表 1. Ri ori 对在细菌保持和用质粒转化水稻 (cv. Nipponbare) 的影响

质粒	插入片段	在 EHA101*中 保持	GUS 表达	植物/共培养的愈伤组织 (cali)	植物再生速率
pBIGZ	人基因组粘粒 78C10				
	Eco RI 10kb 片段	+	10/12 (83%)		N. T.
	Eco RI 30kb	±	0/17 (0%)		0/60 (0%)
	Not I 40kb	-	N. T.		N. T.
	人基因组粘粒 605				
	Eco RI 15kb	+	6/11 (55%)		0/52 (0%)
	Not I 40kb	-	N. T.		N. T.
	λDNA				
	HindIII 27kb	+	13/17 (76%)		N. T.
	稻 BL-1 基因组粘粒				
	Not I 7kb	+	10/14 (71%)		N. T.
	Not I 7.5kb	+	16/19 (84%)		N. T.
	Not I 25kb	-	N. T		—

pBICRZ1	人基因组粘粒 78C10			
	Not I 40kb	+	6/9 (67%)	11/83 (13%)
	人基因组粘粒 605			
	Not I 40kb	+	12/13 (92%)	60/74 (81%)
	稻 BL-1 基因组粘粒			
pBICRZ2	Not I 7.5kb	+	11/14 (79%)	N. T.
	Not I 25kb	+	7/17 (41%)	N. T.
	人基因组粘粒			
	Not I 40kb	+	8/11 (73%)	35/78 (45%)
	人基因组粘粒			
	Not I 40kb	+	5/8 (63%)	15/81 (19%)

* +, ±指由制备自 2ml EH101 培养物的 DNA 转化的 DH10B 的 ca. 10⁶, 10⁴ 个克隆。

(4) 同时把相同的人基因组片段导入 pBIGZ (图 1), 把该基因组片段导入水稻愈伤组织细胞在与上述相同的方法中进行了尝试。除了 pBI121 仅具有 RK2 ori 而没有 *Ri ori* 之外, pBIGZ 是具有与 pBIGRZ 相同的结构的载体。

质粒在土壤杆菌属中的保持和植物再生的程度如表 1 所示。

5 (5) 通过比较具有 *Ri* 起点的 pBIGRZ 与没有它的 pBIGZ, 显示出质粒在土壤杆菌属中的稳定性和植物再生速率在具有 pBIGRZ 的植物中显著地增加。具体来说, 在具有 pBIGRZ 的植物中观察到了植物再生速率的明显增加。

(6) 因为在质粒中 *Ri ori* 的方向而观察到的质粒在土壤杆菌属中的保持和植物的再生速率没有明显差别。

10 (7) 基因组 DNA 从转化的植物的绿叶中提取并以 HindIII 消化。通过用作探针的粘粒 (H78C10, H605) 中的人基因 NotI 插入片段的 Southern 印迹分析消化的片段。结果如图 3A 和 3B 中所示。

在图 3 中, 图 A 是用 H605 (大约 44kb) 或用 H78C10 (大约 38kb) 转化的再生 R_0 植物的 Southern 杂交结果。在每个图的参比泳道中, 把从用 HindIII 从起初的人基因组片段消化的片段在单拷贝等价物上电泳。每个克隆的泳道 1 至 15 10 显示了 HindIII-消化 DNA (从再生植物之一的叶子中提取) 的 Southern 杂交的结果。通过从每种转化体获得的 DNA 片段的 Southern 杂交结果显示了和参比几乎完全相同的方式。图 B 显示了从相同亲本植物获得的 3 种植物体的 Southern 印迹 (brot) 分析。在任何植物中, 包含了作为对照的相同片段的单一 20 拷贝。以点标识的带是和随机标记杂交的带。

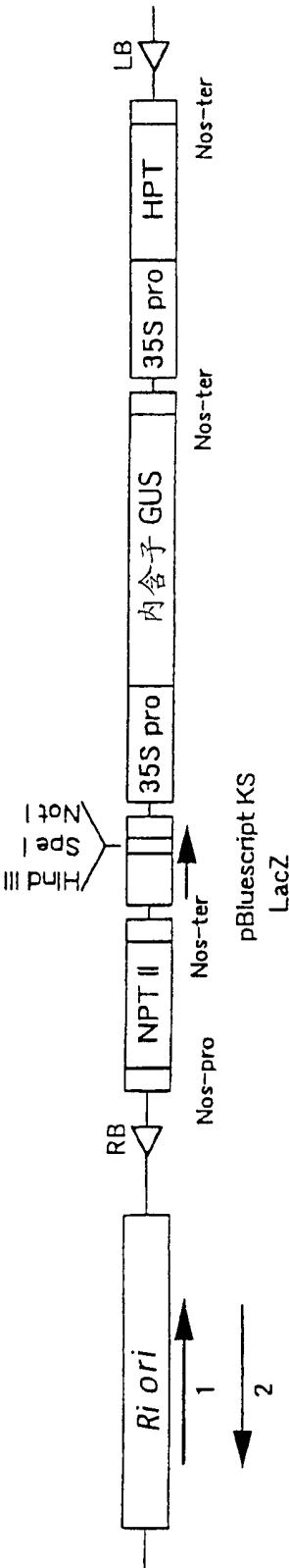
如图 3A 和 3B 所示, 证明了一个或多个拷贝的基因组片段被无重排地导入到水稻基因组中, 对人粘粒片段 H78C10 为 6/10 的植物, 对片段 H605 为 5/10 的植物。这同时也证明了这样的基因组片段可以被后代稳定地遗传。

如上所述, 当把大基因组 DNA 片段插入到本发明的载体中并用于植物的转 25 化时, 插入的 DNA 片段在本发明的载体中稳定地保持而没有缺失或重排, 并可以有效地导入植物细胞中。因此, 这也证明本发明的高容量二元穿梭载体可以用于通过用尽可能大的基因组 DNA 片段互补兴趣基因的功能来筛选基因组中的靶区。

在本实施例中, 显示了水稻转化的结果。然而, 基于以前的研究结果, 双 30 子叶植物一般比水稻容易通过土壤杆菌属转化, 因此预期本发明的高容量二元

载体可以通过稍微修改试验条件运用于各种双子叶植物，预期它也可以在包括其它重要的单子叶作物的农作物的更宽的范围中应用。

1.pBIGRZ 1
2.pBIGRZ 2



pBIGZ

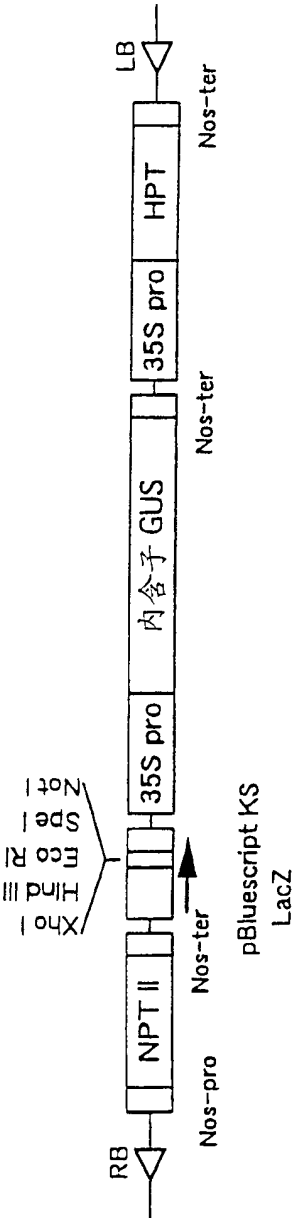


图 1

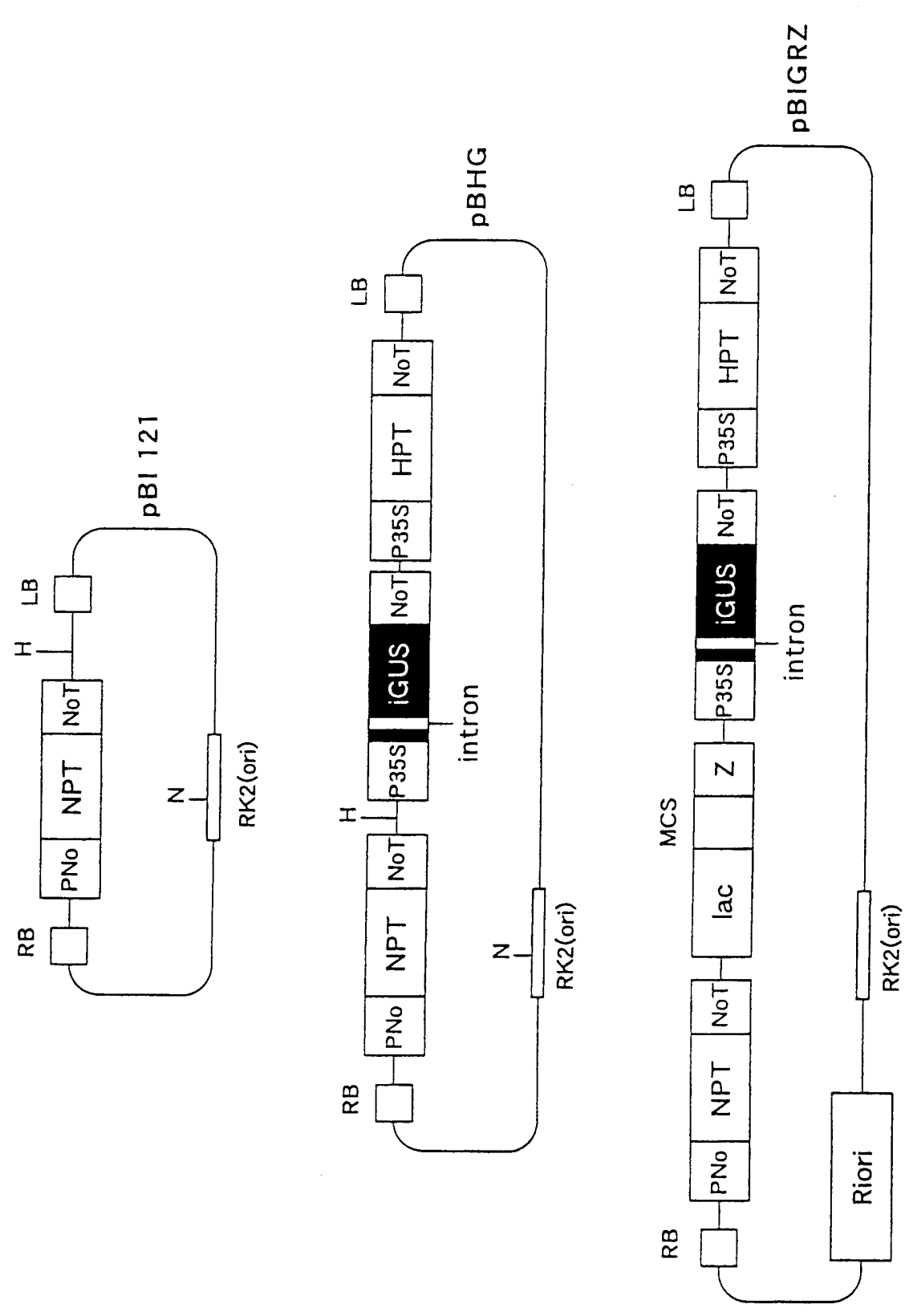
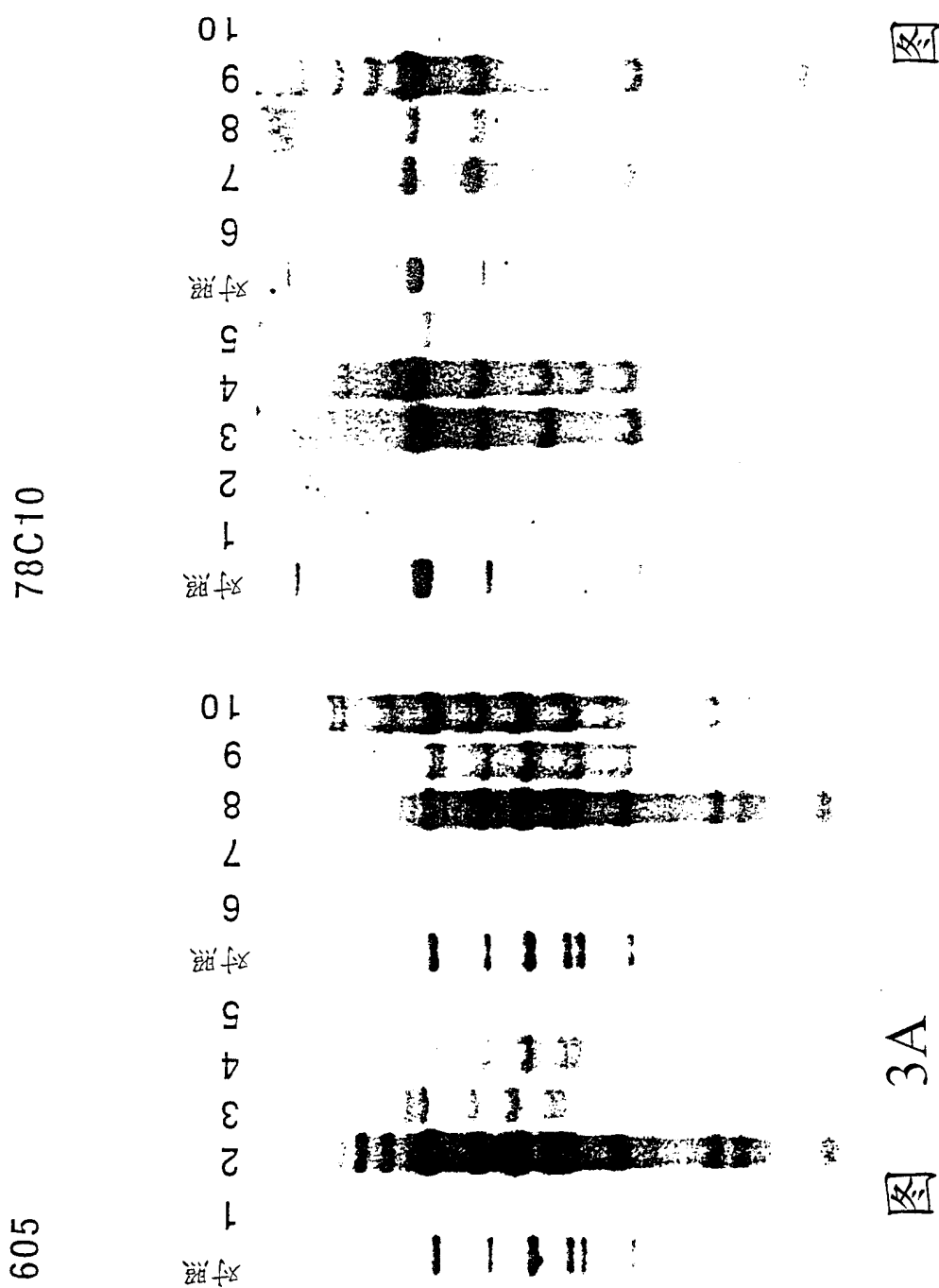
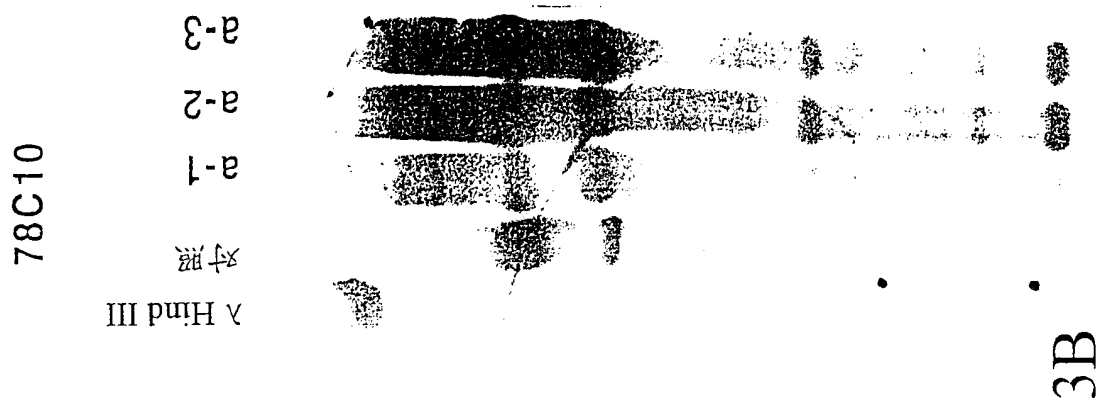


图 2





4
图

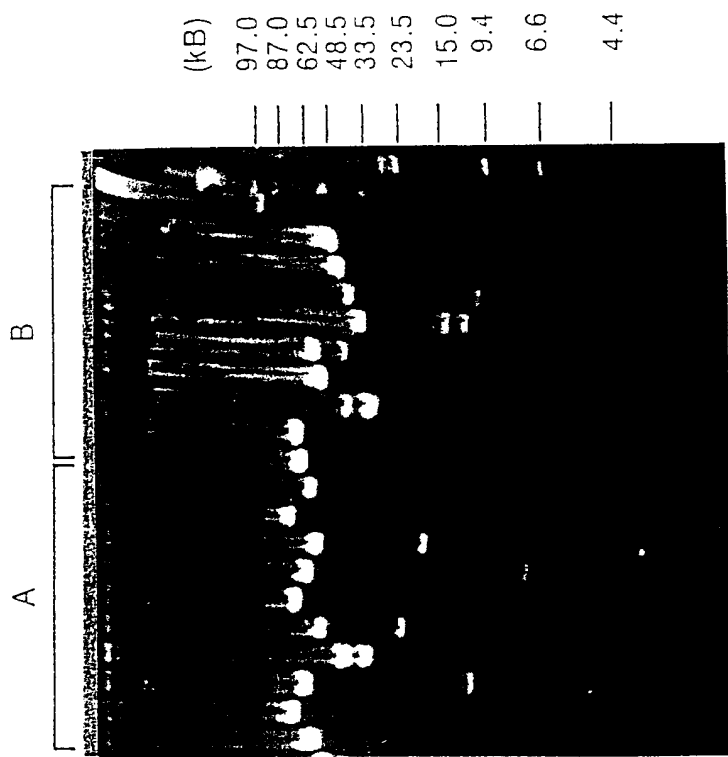


图 5

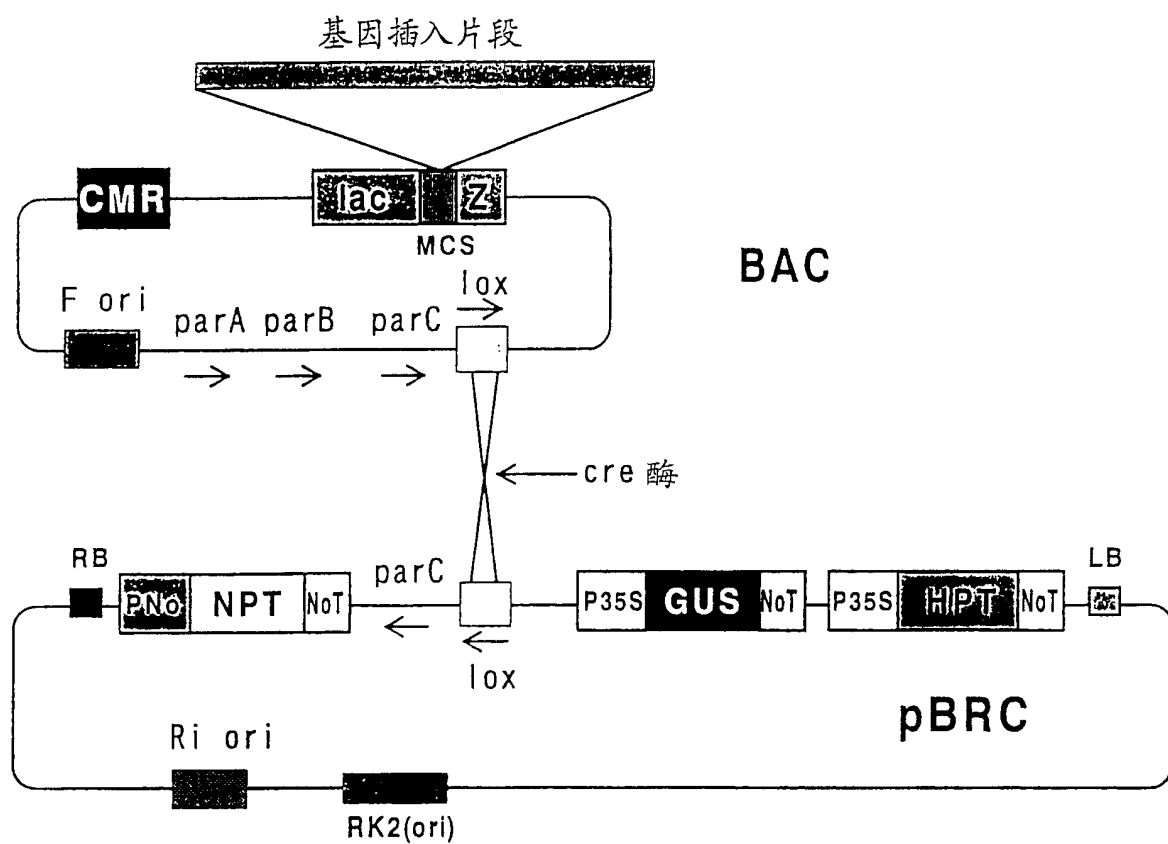


图 6A

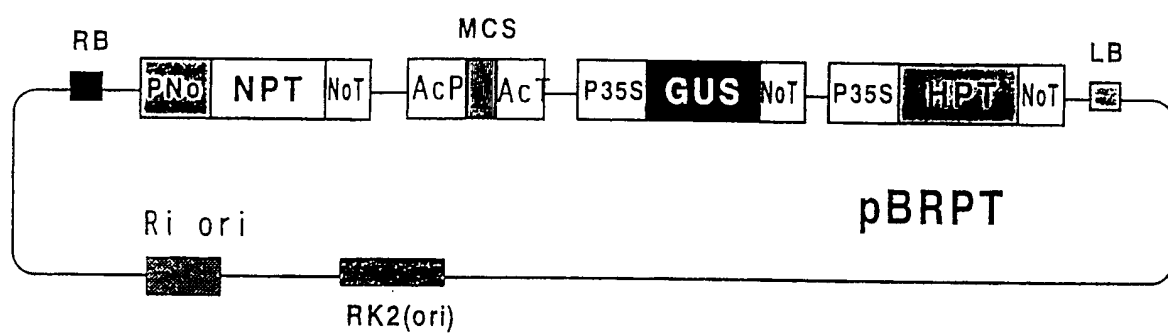


图 6B