



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1876819 B

(45) 授权公告日 2010.06.23

(21) 申请号 200610084123.3  
 (22) 申请日 1998.08.11  
 (30) 优先权数据  
 60/055474 1997.08.12 US  
 (62) 分案原申请数据  
 98806897.4 1998.08.11  
 (73) 专利权人 北卡罗莱纳州立大学  
 地址 美国北卡罗莱纳州罗利  
 (72) 发明人 A·-M·斯托普 N·拉汉达里  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
 72001  
 代理人 谭明胜

Spmoter in a transient assay system.  
 PNAS88. 1991, 882683-2686.  
 张正光. 浮萍的培养与利用. 科学养鱼  
 7. 1994, 722.  
 Patricia A 等人. Analysis of  
 genes negatively regulated by  
 phytochromeactionin Lemna gibba and  
 identification of a promoterregionrequired  
 for phytochrome responsiveness. Plant  
 Physiol1101. 1993, 101915-924.

审查员 邢云龙

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/82* (2006.01)  
*C12N 15/87* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A01H 4/00* (2006.01)  
*C12P 21/02* (2006.01)  
*A01H 5/00* (2006.01)

(56) 对比文件  
 STEPHEN A. 等人. Deletion analysis  
 of a phytochrome-regulated monocot RBC-

权利要求书 2 页 说明书 50 页 附图 1 页

(54) 发明名称  
 基因工程浮萍

(57) 摘要  
 提供用于有效转化浮萍的方法和组合物。最好是所述方法包括通过或者弹道轰击或农杆菌进行的转化。以该方式,可以将任何目的基因或核酸引入浮萍植株并在其中表达。亦提供转化的浮萍植株、细胞、组织。亦公开了转化的浮萍植物组织培养物和由转化的浮萍植株生产重组蛋白和肽的方法。

1. 用异源目的核苷酸序列稳定转化浮萍细胞的方法,其中所述核苷酸序列包含至少一种含基因的表达盒,所述基因提供对选择剂的抗性,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供浮萍组织靶,所述浮萍组织的细胞包括细胞壁;

(b) 以足以穿透细胞壁并将所述异源核苷酸序列沉积在所述组织的细胞内的速度,将所述异源目的核苷酸序列发射至所述浮萍组织靶,

其中所述异源核苷酸序列由微弹携带;且

其中通过将所述微弹发射至所述组织,而将所述异源核苷酸序列发射至所述组织;

(c) 在包含所述选择剂的培养基中培养所述浮萍组织;和

(d) 产生稳定转化的浮萍组织。

2. 按照权利要求 1 的方法,还包括再生稳定转化的浮萍植株的步骤。

3. 按照权利要求 1 的方法,其中所述稳定转化组织是愈伤组织。

4. 按照权利要求 1 的方法,其中所述稳定转化组织是分生组织。

5. 按照权利要求 1 的方法,其中所述稳定转化组织是叶组织。

6. 按照权利要求 1 的方法,其中所述浮萍组织选自 *Spirodela*、*Wolffia*、*Wolffiella* 和浮萍属 (*Lemna*) 的浮萍组织。

7. 按照权利要求 1 的方法,其中所述浮萍组织选自青萍 (*Lemnaminor*)、*Lemna miniscula* 和 *Lemna gibba* 的浮萍组织。

8. 按照权利要求 1 的方法,其中所述异源核苷酸序列编码选自以下的一种蛋白或肽:胰岛素、生长激素、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -葡萄糖脑苷脂酶、成视网膜细胞瘤蛋白、p53 蛋白、制管张素、leptin 和血清白蛋白。

9. 按照权利要求 1 的方法,其中所述异源核苷酸序列编码一种多体蛋白的至少一个蛋白亚基或肽亚基。

10. 生产重组蛋白或肽的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 培养用权利要求 2 的方法制备的、表达至少一种异源蛋白或肽的稳定转化浮萍植株,其中所述异源目的核苷酸序列还编码所述至少一种异源蛋白或肽;和

(b) 从浮萍培养物中收集所述至少一种异源蛋白或肽。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述稳定转化浮萍植株在废水中生长。

12. 权利要求 10 的方法,其中所述稳定转化浮萍植株表达和装配一种多体蛋白的所有亚基。

13. 权利要求 10 的方法,其中所述稳定转化浮萍植株在生物反应器容器中生长。

14. 权利要求 10 的方法,其中所述至少一种异源蛋白或肽从所述转化浮萍植株分泌。

15. 权利要求 10 的方法,其中所述稳定转化浮萍植株选自 *Spirodela*、*Wolffia*、*Wolffiella* 和浮萍属。

16. 权利要求 10 的方法,其中所述稳定转化浮萍植株选自青萍、*Lemna miniscula* 和 *Lemna gibba*。

17. 按照权利要求 1 的方法制备的稳定转化的组织培养物,其中所述组织培养物不包括单个植株及其繁殖材料。

18. 生产重组蛋白或肽的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 培养来自用权利要求 1 的方法制备的稳定转化浮萍组织的、表达至少一种异源蛋

白或肽的稳定转化浮萍细胞,其中所述异源目的核苷酸序列还编码所述至少一种异源蛋白或肽;和

(b) 从所述浮萍细胞中收集所述至少一种异源蛋白或肽。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述稳定转化浮萍细胞在废水中生长。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述稳定转化浮萍细胞表达和装配一种多体蛋白的所有亚基。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述多体蛋白选自:胶原蛋白、血红蛋白、P450 氧化酶和单克隆抗体。

22. 权利要求 18 的方法,其中所述稳定转化浮萍细胞在生物反应器容器中生长。

23. 权利要求 18 的方法,其中生产一种重组蛋白或肽。

24. 权利要求 18 的方法,其中所述至少一种异源蛋白或肽是治疗蛋白或肽。

25. 权利要求 18 的方法,其中所述至少一种蛋白或肽选自胰岛素、生长激素、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -葡萄糖脑苷脂酶、成视网膜细胞瘤蛋白、p53 蛋白、制管张素、leptin 和血清白蛋白。

26. 权利要求 18 的方法,其中所述至少一种异源蛋白或肽是酶。

27. 权利要求 18 的方法,其中所述至少一种异源蛋白或肽从所述稳定转化浮萍细胞分泌。

28. 权利要求 18 的方法,其中所述浮萍细胞选自 Spirodela、Wolffia、Wolffiella 和浮萍属的浮萍细胞。

29. 权利要求 18 的方法,其中所述浮萍细胞选自青萍、Lemnaminiscula 和 Lemna gibba 的浮萍细胞。

30. 用嵌合目的核苷酸序列稳定转化浮萍细胞的方法,所述嵌合核苷酸序列包含:(1) 编码序列,该编码序列操作性地连接于对于该编码序列为异源的转录起始区,和(2) 至少一种含基因的表达盒,所述基因提供对选择剂的抗性,所述方法包括下述步骤:

(a) 提供浮萍组织靶,所述浮萍组织的细胞包括细胞壁;

(b) 以足以穿透细胞壁并将所述嵌合核苷酸序列沉积在所述组织的细胞内的速度,将所述嵌合目的核苷酸序列发射至所述浮萍组织靶,

其中所述嵌合核苷酸序列由微弹携带;

并且其中通过将所述微弹发射至所述组织,而将所述嵌合核苷酸序列发射至所述组织;

(c) 在包含所述选择剂的培养基中培养所述浮萍组织;和

(d) 产生稳定转化的浮萍组织。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述嵌合核苷酸序列包含浮萍编码序列,该浮萍编码序列操作性地连接于对于该编码序列为异源的转录起始区。

## 基因工程浮萍

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请号为 98806897.4(PCT/US98/16683),申请日为 1998 年 8 月 11 日,发明名称为“基因工程浮萍”。

[0002] 本发明在政府资助下进行,美国环境保护局的资助号为 R823570-01-1。政府在本发明中享有一定权利。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及用于转化浮萍的方法和组合物,具体涉及利用弹道轰击和农杆菌的转化方法。

### [0004] 发明背景

[0005] 浮萍是单子叶植物浮萍科(Lemnaceae)仅有的成员。4 个属和 34 个种均是小的、自由漂浮的淡水植物,其地理范围跨越整个地球。Landolt, Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae—A Monograph Study. Geobotanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich(1986)。尽管是已知的形态最小的植物,但大多数浮萍物种具有大得多的植物的所有组织和器官,包括根、茎、花、种子和叶。已经广泛研究了浮萍物种,有大量文献详细说明它们的生态学、分类学、生活周期、代谢、病虫害易感性、生殖生物学、遗传结构和细胞生物学。Hillman, Bot. Review 27, 221(1971); Landolt, Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae—A Monograph Study. Geobotanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich(1986)。

[0006] 浮萍的生长习性对于微生物培养方法是理想的。这种植物容易通过新叶的营养出芽而快速增殖,其肉眼可见的方式与酵母中的无性繁殖相似。浮萍通过从分生细胞营养出芽而增殖。所述分生组织区小,发现在叶的下表面上。分生组织细胞位于两个袋中,叶中脉每端各一个袋。这个小的中脉区也是根起源和产生茎的位点,它将每片叶连接至其母叶。分生组织袋受一个组织瓣的保护。交替从这些袋中出芽。倍增时间随物种而变,短至 20-24 小时。Landolt, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 67, 271(1957); Chang 等, Bull. Inst. Chem. Acad. Sin. 24, 19(1977); Datko 和 Mudd., Plant Physiol. 65, 16(1980); Venkataraman 等, Z. Pflanzenphysiol. 62, 316(1970)。

[0007] 浮萍的密集培养导致每单位时间最高速率的生物量的积累(Landolt 和 Kandeler, The family of Lemnaceae—A Monographic Study. 第 2 卷: Phytochemistry, Physiology, Application, Bibliography, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rubel, Zurich(1986), 干重积累范围为鲜重的 6-10% (Tillerg 等, Physiol. Plant. 46, 5, (1979); Landolt, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 67, 271(1957); Stomp, 未发表的数据)。已经报道,在不同条件下生长的一些浮萍物种的蛋白含量范围为 15-45% 干重 (Chang 等, Bull. Inst. Chem. Acad. Sin. 24, 19(1977); Chang 和 Chui, Z. Pflanzenphysiol. 89, 91(1978); Porath 等, Aquatic Botany 7, 272(1979); Appenroth 等, Biochem. Physiol. Pflanz. 177, 251(1982))。采用这些数值,每升培养基的浮萍蛋白生

产水萍与酵母基因表达系统的数量级相同。迄今为止,尚未对于特定浮萍品系的最大生长和最大蛋白含量进行培养基组分和培养条件的系统优化。

[0008] 浮萍的有性繁殖受培养基组分和培养条件的控制,包括光周期和培养密度。对于某些物种,花的诱导是常规实验方法。植物通常自花授粉,在实验室中,可以通过温和振荡培养物完成自交。通过该方法,已经开发了 *Lemma gibba* 自交系。已经鉴定了自发突变 (Slovin 和 Cohen, *Plant Physiol.* 86, 522 (1988)), 已经用化学诱变和  $\gamma$  射线诱变 (采用 EMS 或 NMU), 产生具有特定特征的突变体。L. *gobba* 的远交是很慢的,但可以通过受控的人工授粉来进行。浮萍的基因组大小为 0.25-1.63pg DNA/2C 不等,染色体数范围为 20-80 条,在整个浮萍属平均约为 40 条 (Landolt, *Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae—A Monograph Study.* Geobotanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich (1986))。估计倍性水平范围为 2-12 (出处同上)。已经用次级产物-同工酶和 DNA 序列,研究了浮萍属内的遗传多样性。McClure 和 Alston, *Nature* 4916, 311 (1964); McClure 和 Alston, *Amer. J. Bot.* 53, 849 (1966); Vasseur 等, *Pl. Syst. Evol.* 177, 139 (1991); Crawford 和 Landolt, *Syst. Bot.* 10, 389 (1993)。

[0009] 因此,上述特性使得浮萍成为开发有效的基于植物的基因表达系统的理想选择。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及用于有效转化浮萍的方法和组合物。所述方法涉及使用弹道轰击、农杆菌或电穿孔来稳定地将目的核苷酸序列引入转化的浮萍植株中并将其表达。以该方式,可以将任何目的基因或核酸引入浮萍植株中。也提供转化的浮萍细胞、组织、植株和种子。

[0012] 作为第一方面,本发明提供用目的核苷酸序列转化浮萍的方法,其中所述核苷酸序列包含至少一种含基因的的表达盒,所述基因提供对选择剂的抗性,所述方法包括以下步骤:(a) 提供浮萍组织靶,所述浮萍组织的细胞包括细胞壁;和 (b) 以足以刺入细胞壁的速度将所述核苷酸序列发射入浮萍组织靶,并在该组织的细胞中留存所述核苷酸序列,由此产生转化的组织,其中所述核苷酸序列由微弹携带;并且其中通过将所述微弹发射到该组织,将所述核苷酸序列发射到该组织。

[0013] 作为第二方面,本发明提供用目的核苷酸序列转化浮萍的方法,该方法包括以下步骤:(a) 将浮萍植物组织用农杆菌接种,所述农杆菌包含一个包含所述核苷酸序列的载体,其中所述核苷酸序列包含至少一个表达盒,该表达盒含有提供对选择剂抗性的基因;和 (b) 将该组织与该农杆菌共同培育,以产生转化的组织。

[0014] 作为第三方面,本发明提供通过电穿孔转化浮萍的方法。

[0015] 作为第四方面本发明通过上述方法提供转化的浮萍植株和转化的浮萍组织培养物。

[0016] 作为第五方面,本发明提供转化的浮萍植株和采用转化的浮萍植株生产重组蛋白或肽的方法。

[0017] 浮萍提供理想的基于植物的基因表达系统。浮萍基因表达系统提供可用于许多研究和商业应用的关键技术。对于植物分子生物学研究,总体上说,可以以酵母那样的实验室便利操作的分化的植物系统,提供分析所分离基因的发育和生理学作用的非常快速的系统。为此,植物分子生物学家使用诸如烟草和拟南芥属 (*Arabidopsis*) 的模型植物。这些植物需要用于生长的温室或大田设备 (对于植物分子生物学家通常难以获得)。替代的基

因表达系统基于微生物或细胞培养物,其中丧失了组织和发育调节的基因表达效应。异源基因表达系统也需要在插入之前重新构建目的基因,这是昂贵并且费时的方法。浮萍系统克服了这两个问题,并且在实验室环境中非常易于生长和维持。如果希望收获所表达的蛋白或肽(或藉此产生的分子),可以通过本领域已知的任何合适的技术(诸如机械研磨或裂解细胞)来完成这一点。

[0018] 对于工业生产有价值的蛋白,基于浮萍的系统具有优于现有微生物或细胞培养系统的许多优点。在哺乳动物蛋白生产领域中,植株表达出与哺乳动物细胞相似的翻译后加工,克服了与微生物细胞生产哺乳动物蛋白有关的一个主要问题。浮萍的生产也较哺乳动物细胞培养物便宜得多。其它人已经表明(Hiatt, Nature 334, 469(1990)),植物系统具有装配多亚基蛋白的能力,这是微生物系统通常缺乏的能力。植物生产治疗蛋白也限制了来自哺乳动物细胞培养和微生物系统中生产的污染物质(包括动物病毒)的风险。污染物是治疗蛋白生产中主要关心的问题。与例如大豆和烟草的其它建议的植物生产系统不同,浮萍可以在发酵罐/生物反应器中生长,使得非常易于将该系统整合进入现有的蛋白生产工业结构之中。

[0019] 作为较低成本的工业用酶和小分子的生产平台,浮萍提供的优点在于,生产易于扩大至几乎任何量,因为它可以采用富含营养物的废水在大田条件下生长。在废水中生长的基因工程浮萍系统可以产生有价值的产物,而同时净化废水用于重新使用。这种系统将净资本的损失(排放废水的治理)转为具有积极的经济平衡的化学生产系统或酶生产系统。浮萍优于大田作物中化学合成的优点在于,生产不需要因世界日益增加的人口而提高食品产量所需的耕地或灌溉用水。

[0020] 在以下本发明的描述中更详细地公开本发明的这些方面和其它方面。

[0021] 附图简述

[0022] 图1显示了未转化的浮萍DNA和D系的转化浮萍DNA的DNA杂交产生的放射自显影照片,有一个来自pBI121的含GUS基因的放射标记的3.2kb片段。道1)分离的未消化的pBI121DNA。预期的主带为12.8kb。较低分子量的条带可能代表超螺旋质粒。道2)HindIII消化的pBI121DNA。该消化使该质粒线性化,显示出预期的12.8kb的条带。较低分子量的条带表明不完全的消化。道3)用HindIII和EcoRI消化的pBI121DNA。消化是不完全的,但产生预期的条带:12.8kb(不完全消化物的左边)、约9kb的条带和弱的超螺旋条带。在这种曝光中3.2kb条带不产生可见的杂交。道4)来自未转化浮萍的DNA,相当于产生预期的9kb和3.2kb的条带、1拷贝双重消化的pBI121DNA。道5)未转化的浮萍DNA。道6)来自转化浮萍D系的未消化的DNA。道7)来自转化浮萍D系的HindIII消化的DNA。道8)来自转化浮萍D系的HindIII和EcoRI消化的DNA。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明涉及转化浮萍的方法。在优选的实施方案中,所述方法利用弹道轰击或农杆菌,来稳定地转化所述浮萍细胞。或者,所述方法使用电穿孔来转化浮萍。发现本发明的方法和转化植物可用作具有许多酵母的优点的基于植物的基因表达系统。

[0025] 就本发明人所知,先前没有稳定的浮萍基因转移的报道,也没有转化浮萍植株再生的报道。在本发明的研究中,使用两种策略来生产转基因浮萍植株:(1)通过将外源DNA直接转移和插入分生叶细胞中,然后无性繁殖并自交,以产生转基因浮萍(一种植物到植

物系统),和(2)转化未分化的愈伤组织细胞,然后选择增生的愈伤组织,并进行叶再生(一种愈伤组织到植物的系统)。Chang 研究小组(Chang 和 Chui,Bot. Bull. Academia Sinica 17,106(1976);Chang 和 Chui, Z. Pflanzenphysiol. Bd. 89. S,91(1978))和 Frick(Frick, J. Plant Physiology137,397(1991)) 早先已经分别报道了从 *L. gibba* 和 *L. minor* 产生愈伤组织的有限的组织培养系统。本研究已经通过开发再生叶和结构化的愈伤组织系统,显著扩展了该领域的工作。

[0026] 最好是,本发明利用两种系统之一稳定转化浮萍:采用微弹攻击的弹道转化或农杆菌介导的转化。尽管因为浮萍是单子叶植物,预期它们难以被农杆菌转化,但我们意外地发现可以用农杆菌转化浮萍。按照本发明的转化的浮萍植株也可以通过电穿孔产生。参见例如 Dekeyser 等,Plant Cell 2,591(1990);D' Halluin 等,Plant Cell 4,1495(1992);D' Halluin 等的美国专利第 5,712,135 号。电穿孔的一个优点是,包括人造染色体在内的大片段 DNA 可以通过该方法转化入浮萍。可以按照本发明转换任何合适的浮萍细胞或组织类型。例如,可以将核酸引入组织培养物的浮萍细胞中。或者,浮萍植株小及其水生生长习性允许将核酸引入完整胚、叶、根或其它结构化组织(诸如分生组织)的浮萍细胞中。作为另一种选择方法,可以将核酸引入浮萍愈伤组织中。

[0027] 最好是,通过要求保护的方法产生的转化浮萍植株表现出正常的形态,并且通过有性繁殖是可育的。最好是,本发明的转化植株含有单拷贝的所转移的核酸,所述所转移的核酸中没有显著的重排。也优选的浮萍植株是,其中所转移的核酸以低拷贝数存在(即每个转化的细胞的该核酸不多于 5 个拷贝,或者不多于 3 个拷贝,作为另一选择方法,少于 3 个拷贝)。

[0028] 本文所用的术语“浮萍”是指浮萍科的成员。已知有如下 4 个属和 34 个种的浮萍:浮萍属(*Lemna*)(*L. aequinoctialis*, *L. disperma*, *L. ecuadoriensis*, *L. gibba*, *L. japonica*, 青萍(*L. minor*), *L. miniscula*, *L. obscura*, *L. perpusilla*, *L. tenera*, *L. trisulca*, *L. turionifera*, *L. valdiviana*);紫萍属(*Spirodela*)(*S. intermedia*, 紫萍(*S. polyrrhiza*), *S. punctata*);无根萍属(*Wolffia*)(*Wa. angusta*, 无根萍(*Wa. arrhiza*), *Wa. australina*, *Wa. borealis*, *Wa. brasiliensis*, *Wa. columbiana*, *Wa. elongata*, *Wa. globosa*, *Wa. microscopica*, *Wa. neglecta*)和 *Wloffliella*(*Wl. caudata*, *Wl. denticulata*, *Wl. gladiata*, *Wl. hyalina*, *Wl. lingulata*, *Wl. repunda*, *Wl. rotunda* 和 *Wl. neotropica*)。浮萍科的任何其它属或种(如果存在)也是本发明的方面。优选 *Lemna gibba*、青萍和 *Lemna miniscula*,最优选青萍和 *Lemna miniscula*。可以采用 Landolt(*Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The Family of Lemnaceae—A Monograph Study. Geobotanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich*(1986))所述的分类方案将浮萍属物种分类。

[0029] 正如本领域技术人员明显看出的,既然已经提供了浮萍的有效转化,则可以将任何目的核酸用于本发明方法中。例如,可以工程改造浮萍植株,以表达抗病性和抗虫基因、提供营养价值的基因、抗真菌、抗细菌或抗病毒基因等。或者,可以采用按照本发明的转化浮萍,表达治疗(例如兽医用或医用)或免疫原性(例如用于疫苗接种)肽和蛋白。

[0030] 同样,该方法可以用来转移任何控制基因表达的核酸。例如,待转移的核酸可以编码反义寡核苷酸。或者,可以用一种或多种基因转化浮萍,以复制用于化学合成的酶途径

(例如用于塑料合成)或其它工业生产(例如角蛋白酶)。所述核酸可以源自浮萍或另一生物体(即异源的)。此外,可以从原核细胞或真核细胞(例如细菌、真菌、酵母、病毒、植物、哺乳动物)获得目的核酸,或可以全合成或部分合成该核酸序列。在特优选的实施方案中,该核酸编码分泌蛋白或肽。

[0031] 优选在转化浮萍中待表达的转移核酸编码蛋白激素、生长因子或细胞因子,更优选的是,编码胰岛素、生长激素(特别是人生长激素)和 $\alpha$ -干扰素。或者,也优选该核酸表达 $\beta$ -葡糖脑苷脂酶。

[0032] 也优选的核酸编码一些肽或蛋白,所述肽或蛋白因成本或逻辑的限制或这两种原因,用现有的基因表达系统不能有效地工业生产。例如,某些蛋白不能在哺乳动物系统中表达,因为该蛋白干扰细胞的生存力、细胞增殖、细胞分化或在哺乳动物细胞中的蛋白装配。这类蛋白包括(但不限于)成视网膜瘤蛋白、p53、制管张素和 leptin。本发明可以有利地用来生产哺乳动物调节蛋白;已知高等植物和哺乳动物之间的进化距离大,所以这些蛋白不可能干扰浮萍的调节过程。转基因浮萍也可以用来生产大量的蛋白,诸如血清白蛋白(特别是人血清白蛋白)、血红蛋白和胶原蛋白,这些大量的蛋白挑战现有表达系统的生产能力。

[0033] 最后,如以下更详细描述,可以将高等植物系统工程改造,以比哺乳动物系统更容易得多地产生(例如合成、表达、装配)生物活性多体蛋白(例如单克隆抗体、血红蛋白、p450 氧化酶和胶原蛋白等)。本领域技术人员会认识到,术语“生物活性的”包括与天然蛋白相比其生物活性被改变(例如被抑制的或增强的)的多体蛋白,只要该蛋白具有足够的目的活性,以用于工业生产或化学加工中。或作为治疗剂、疫苗或诊断试剂。

[0034] 用于在浮萍中生产生物活性多体蛋白的一个典型方法,使用含有编码所有多肽亚基的基因的表达载体。参见例如 During 等(1990)Plant Molecular Biology 15:281;van Engelen 等(1994)Plant Molecular Biology 26:1701。然后,使用任何已知的转化方法(例如基因枪或农杆菌介导的转化)将该载体引入浮萍细胞。该方法产生表达装配该多体蛋白所需的所有多肽的克隆细胞系。作为一个替代方法,制备编码每种多肽亚基的独立的载体构成物。使用每个这些载体,产生单独的仅表达其中一个必需多肽的转基因植物的克隆系。然后,使这些基因组植物杂交,创造在单个植株中表达所有必需多肽的子代。参见 Hiatt 等,(1989)Nature 342:76;Hiatt 等的美国专利第 5,202,422 号和第 5,639,947 号。该方法的一个变化形式是制备单个的基因构成物,将来自这些构成物的 DNA 混合在一起,然后,采用弹道轰击或农杆菌介导的转化,最好采用弹道轰击,将该 DNA 混合物传递入植物细胞中。作为再一变化形式,某些或所有所述载体可以编码多于一个的该多体蛋白的亚基(即杂交浮萍克隆数少于该多体蛋白亚基数)。最后,在某些情况下,可能最好在一种转化的浮萍植株中产生少于多体蛋白的全部亚基,或甚至产生单一的蛋白,例如用于工业生产或化学生产或用于诊断、治疗或疫苗目的。

#### [0035] A. 表达盒

[0036] 按照本发明,待转移的核酸包含于表达盒内。该表达盒包含一个连接至目的核酸或基因的转录起始区。这种表达盒提供有多个限制性位点,用于插入在调节区的转录调节下控制的一个或多个目的基因(例如一个目的基因,两个目的基因等)。最好是,该表达盒编码单个目的基因。在本发明的具体实施方案中,待转移的核酸含有两个或两个以上的表

达盒,每个表达盒编码至少一个目的基因(最好是一个目的基因)。

[0037] 该转录起始区(例如启动子)对于该宿主可以是天然的或同源的或为外来的或异源的。外来的是指在引入该转录起始区的野生型宿主中没有发现该转录起始区。本文使用的“嵌合基因”包括操作性地连接至对于该编码序列为异源的转录起始区的编码序列。

[0038] 本领域已知的任何合适的启动子均可以按照本发明使用(包括细菌、酵母、真菌、昆虫、哺乳动物和植物的启动子)。优选植物启动子,最优选浮萍的启动子。典型的启动子包括但不限于花椰菜花叶病毒 35S 启动子、冠瘿碱合成酶启动子(例如 nos、mas、ocs 等)、遍在蛋白启动子、肌动蛋白启动子、核酮糖二磷酸(RubP)羧化酶小亚基启动子和醇脱氢酶启动子。浮萍的 RubP 羧化酶小亚基启动子是本领域已知的。Silverthorne 等,(1990)Plant Mol. Biol. 15:49。来自感染植物(最好是浮萍)的病毒的其它启动子也是合适的,包括但不限于从以下病毒分离出的启动子:芋花叶病毒、小球藻病毒(例如小球藻腺嘌呤甲基转移酶启动子;Mitra 等,(1994)Plant Molecular Biology 26:85)、番茄斑萎病毒、烟草脆裂病毒、烟草坏死病毒、烟草环斑病毒、番茄环斑病毒、黄瓜花叶病毒、花生 stump 病毒、亚麻花叶病毒等。

[0039] 最后,可以选择启动子,以给出所需水平的调节。例如,在某些情况下,可能最好使用赋予组成型表达的启动子(例如遍在蛋白启动子、RubP 羧化酶基因家族启动子和肌动蛋白基因家族启动子)。或者,在其它情况下,可能最好使用对特定环境刺激(例如热激基因启动子、干旱诱导型基因启动子、病原体诱导型基因启动子、伤口诱导型基因启动子和光/暗诱导型基因启动子)或植物生产调节剂(例如来自脱落酸、生长素、细胞分裂素和赤霉素诱导的启动子)应答时被激活的启动子。作为再一选择方法,可以选择给出组织特异性表达的启动子(例如根、叶和花特异性启动子)。

[0040] 转录盒以 5' -3' 转录方向包括一个转录和翻译起始区、一个目的核苷酸序列和一个在植物中有功能的转录和翻译终止区。本领域已知的任何合适的终止序列均可以按照本发明使用。终止区对于转录起始区可以是天然的,可以对于目的核苷酸序列是天然的,或可以得自另一来源。方便的终止区可得自根癌农杆菌的 Ti 质粒,诸如章鱼碱合成酶和胭脂碱合成酶的终止区。也参见 Guerineau 等, Mol. Gen. Genet. 262, 141 (1991); Proudfoot, Cell 64, 671 (1991); Sanfacon 等, Genes Dev. 5, 141 (1991); Mogen 等, Plant Cell 2, 1261 (1990); Munroe 等, Gene 91, 151 (1990); Ballas 等, Nucleic Acids Res. 17, 7891 (1989); 和 Joshi 等, Nucleic Acids Res. 15, 9627 (1987)。其它典型的终止序列是豌豆 RubP 羧化酶小亚基终止序列和花椰菜花叶病毒 35S 终止序列。其它合适的终止序列对于本领域技术人员是显而易见的。

[0041] 或者,可以在本领域已知的任何其它合适的表达盒上提供目的基因。合适时,为在转化的植物中增强表达,可以优化所述基因。当在本发明中使用哺乳动物、酵母或细菌或双子叶植物基因时,可以采用单子叶植物或浮萍的优选密码子合成这些基因,以增强表达。在本领域中可得到合成植物优选基因的方法。参见例如美国专利第 5,380,831 号;第 5,436,391 号;和 Murray 等, Nucleic Acids Res. 17, 477 (1989); 这些文献通过引用结合到本文中。

[0042] 该表达盒可以还含有 5' 前导序列。这类前导序列可以作用以增强翻译。翻译前导序列是本领域已知的,包括:小核糖核酸病毒前导序列,例如 EMCV 前导序列(脑炎心

肌炎病毒 5' 非编码区;Elroy-Stein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6126 (1989)); 马铃薯 Y 病毒前导序列, 例如 TEV 前导序列 (烟草蚀纹病毒; Alloson 等, Virology, 154, 9 (1986)); 人类免疫球蛋白重链结合蛋白 (Bip; Macajak 和 Sarnow, Nature 353, 90 (1991)); 来自亚麻花叶病毒的包膜蛋白 mRNA 的非翻译前导序列 (AMV RNA 4; Jobling 和 Gehrke, Nature 325, 622 (1987)); 烟草花叶病毒前导序列 (TMV; Gallie, MOLECULAR BIOLOGY OF RNA, 237-56 (1989)); 和玉米缺绿病斑点病毒前导序列 (MCMV; Lommel 等, Virology 81, 382 (1991))。也参见 Della-Cippa 等, Plant Physiology 84, 965 (1987)。已知增强翻译的其它方法也可以利用, 例如内含子等。

[0043] 可以将目的外源核酸另外与编码转运肽的一种核酸序列操作性地连接, 所述转运肽将所编码的目的肽或蛋白的表达导向特定的细胞区室。将高级植物细胞中蛋白积累导向叶绿体、线粒体、液泡、核和内质网 (用于分泌到细胞外) 的转运肽是本领域已知的。最好是, 该转运肽将由外源核酸表达的蛋白导向叶绿体或内质网。对于分泌蛋白的正确加工, 需要将蛋白导向内质网的转运肽。将蛋白表达导向叶绿体 (例如采用来自 RubP 羧化酶小亚基基因的转运肽), 已经表明导致在该细胞器中非常高浓度的重组蛋白的积累。已经克隆了编码 RubP 羧化酶转运肽的浮萍核酸。Stiekma 等, (1983) Nucl. Acids Res. 11: 8051-61; 也参见例如 Herrera-Estrella 等的美国专利第 5, 717, 084 号和第 5, 728, 925 号。已经用豌豆 RubP 羧化酶小亚基转运肽序列, 在植物中表达哺乳动物基因并将其定向。Herrera-Estrella 等的美国专利第 5, 717, 084 号和 5, 728, 925 号。或者, 可以用哺乳动物转运肽将重组蛋白表达导向例如线粒体和内质网。已经证明, 植物细胞识别哺乳动物导向内质网的转运肽。Hiatt 等的美国专利第 5, 202, 422 号和第 5, 639, 947 号。

[0044] 该表达盒可以含有一个以上的待转移并在转化植物中表达的基因或核酸序列。因此, 每种核酸序列将与 5' 和 3' 调节序列操作性地连接。或者, 可以提供多个表达盒。

[0045] 一般而言, 该表达盒将包含一个用于选择转化细胞的选择标记基因。选择标记基因用来选择转化的细胞或组织。选择标记基因包括编码抗生素抗性的基因, 诸如编码新霉素磷酸转移酶 II (NEO) 和潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 的基因以及赋予对除草剂化合物抗性的基因。除草剂抗性基因一般编码经修饰的对该除草剂不敏感的靶蛋白, 或编码将在植物中在该除草剂作用之前将其降解或解毒的酶。参见 DeBlock 等, EMBO J. 6, 2513 (1987); DeBlock 等, Plant Physiol. 91, 691 (1989); Fromm 等, BioTechnology 8, 833 (1990); Gordon-Kamm 等, Plant Cell 2, 603 (1990)。例如, 采用编码突变靶酶 5'-烯醇丙酮酰 (enolpyruvyl) 莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 和乙酰乳酸合酶 (ALS) 的基因, 已经获得的对 glyphosphate 或磺酰脲除草剂的抗性。采用编码将相应除草剂解毒的膦丝菌素乙酰转移酶、腈水解酶或 2,4-二氯苯氧基乙酸单加氧酶的细菌基因, 已经获得了对草铵膦 (glufosinate ammonium)、溴苯腈 (bromoxynil) 和 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 的抗性。

[0046] 对于本发明的目的, 选择标记基因包括但不限于编码以下的基因: 新霉素磷酸转移酶 II (Fraley 等, CRC Critical Reviews in Plant Science 4, 1 (1986)); 氨基胍水合酶 (Maier-Greiner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4250 (1991)); 天冬氨酸激酶; 二氢吡啶二羧酸合酶 (Perl 等, BioTechnology 11, 715 (1993)); bar 基因 (Toki 等, Plant Physiol. 100, 1503 (1992); Meagher 等, Crop Sci. 36, 1367 (1996)); 色氨酸脱羧酶 (Goddijn 等, Plant Mol. Biol. 22, 907 (1993)); 新霉素磷酸转移酶 (NEO; Southern 等,

J. Mol. Appl. Gen. 1, 327(1982)) ;潮霉素磷酸转移酶 (HPT 或 HYG ;Shimizu 等, Mol. Cell. Biol. 6, 1074(1986)) ;二氢叶酸还原酶 (DHFR ;Kwok 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol, 4552(1986)) ;膦丝菌素乙酰转移酶 (DeBlock 等, EMBO J. 6, 2513(1987)) ;2,2-二氯丙酸脱卤素酶 (Buchanan-Wollatton 等, J. Cell. Biochem. 13D, 330(1989)) ;乙酰羟酸合酶 (Anderson 等的美国专利第 4, 761, 373 号 ;Haughn 等, Mol. Gen. Genet. 221, 266(1988)) ;5-烯醇丙酮酰-莽草酸-磷酸合酶 (aroA ;Comai 等, Nature 317, 741(1985)) ;卤代芳基腈水解酶 (Stalker 等的 WO 87/04181) ;乙酰辅酶 A 羧化酶 (Parker 等, Plant Physiol. 92, 1220(1990)) ;二氢蝶酸合酶 (sulI ;Guerineau 等, Plant Mol. Biol. 15, 127(1990)) ;和 32kDa 光合系统 II 多肽 (psbA ;Hirschberg 等, Science 222, 1346(1983))。

[0047] 也包括编码的对以下物质抗性的基因:氯霉素 (Herrera-Estrella 等, EMBO J. 2, 987(1983)) ;氨甲蝶呤 (Herrera-Estrella 等, Nature 303, 209(1983) ;Meijer 等, Plant Mol. Biol. 16, 807(1991)) ;潮霉素 (Waldrón 等, Plant Mol. Biol. 5, 103(1985) ;Zhijian 等, Plant Science 108, 219(1995) ;Meijer 等, Plant Mol. Bio. 16, 807(1991)) ;链霉素 (Jones 等, Mol. Gen. Genet. 210, 86(1987)) ;壮观霉素 (Bretagne-Sagnard 等, Transgenic Res. 5, 131(1996)) ;博来霉素 (Hille 等, Plant Mol. Biol. 7, 171(1986)) ;氨磺酰 (Guerineau 等, Plant Mol. Bio. 15, 127(1990) ;溴苯腈 (Stalker 等, Science 242, 419(1988)) ;2,4-D (Streber 等, Bio/Technology 7, 811(1989)) ;膦丝菌素 (DeBlock 等, EMBO. J. 6, 2513(1987)) ;壮观霉素 (Bretagne-Sagnard 和 Chupeau, Transgenic Research 5, 131(1996))。

[0048] bar 基因赋予对草铵膦型除草剂的除草剂抗性,所述除草剂诸如膦丝菌素 (PPT) 或双丙氨膦等。如上所述,可以用于载体构成物中的其它选择标记包括但不限于也赋予双丙氨膦和膦丝菌素抗性的 pat 基因、赋予咪唑啉酮抗性的 ALS 基因、赋予潮霉素抗性的 HPH 或 HYG 基因、赋予草甘膦抗性的 EPSP 合酶基因、赋予对 Hc- 毒素抗性的 Hm1 基因和本领域常规使用和已知的其它选择剂。一般参见 Yarranton, Curr. Opin. Biotech. 3, 506(1992) ;Christopherson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6314(1992) ;Yao 等, Cell 71, 63(1992) ;Reznikoff, Mol. Microbiol. 6, 2419(1992) ;BARKLEY 等, THE OPERON 177-220(1980) ;Hu 等, Cell 48, 555(1987) ;Brown 等, Cell 49, 603(1987) ;Figge 等, Cell 52, 713(1988) ;Deuschle 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5400(1989) ;Fuerst 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2549(1989) ;Deuschle 等, Science 248, 480(1990) ;Labow 等, Mol. Cell. Biol. 10, 3343(1990) ;Zambretti 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3952(1992) ;Baim 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5072(1991) ;Wyborski 等, Nuc. Acids Res. 19, 4647(1991) ;Hillenand-Wissman, Topics in Mol And Struc. Biol. 10, 143(1989) ;Degenkolb 等, Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1591(1991) ;Kleinschmidt 等, Biochemistry 27, 1094(1988) ;Gatz 等, Plant J. 2, 397(1992) ;Gossen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547(1992) ;Oliva 等, Antimicrob. Agents Chemother. 36, 913(1992) ;HLAVKA 等, HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY 78(1985) ;和 Gill 等, Nature 334, 721(1988)。这类说明书通过引用结合到本文中。

[0049] 以上列出的选择标记基因不意味着为限制性的。任何选择标记基因均可以用于本发明中。

[0050] 合适时,可以合成选择标记基因和其它待转移的目的基因和核酸,以优化在浮萍中的表达。也就是说,可以修饰所述基因的编码序列,以增强在浮萍中的表达。设计合成的核酸,以在转化组织和植物中较高水平地表达。优化的选择标记基因的使用可能导致较高的转化效率。

[0051] 本领域中可得到基因合成优化的方法。可以优化核苷酸序列,以在浮萍中表达,或者可以将其修饰,以优化在单子叶植物中的表达。可以根据在浮萍中表达的蛋白中的最高频率的密码子,确定植物的优选密码子。人们认识到,已经优化用于浮萍和其它单子叶植物中表达的基因可以用于本发明方法中。参见例如 EP 0359472、EP 0385962、WO 91/16432; Perlak 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3324(1991) 和 Murray 等, Nuc. Acids Res. 17, 477(1989) 等,所述文献通过引用结合到本文中。人们还认识到,可以优化或合成该基因序列的全部或部分。换句话说,也可以采用全优化的或部分优化的序列。

[0052] 已知其它序列修饰增强在细胞宿主中的表达。这些序列修饰包括消除编码假的多腺苷酸化信号的序列、外显子-内含子剪接位点信号、转座子样重复序列和其它这类充分特征鉴定的、可能对基因表达有害的序列。可以将该序列的 G-C 含量调节至给定细胞宿主的平均水平,该水平根据在该宿主细胞中表达的已知基因计算。可能时,修饰该序列,以避免预定的发夹二级 mRNA 结构。

#### [0053] B. 靶组织和愈伤组织

[0054] 本发明的方法可用来转化浮萍植株的细胞,最好是叶细胞和分生细胞。这类细胞也包括来源于浮萍植株的任何组织的愈伤组织。用于起始愈伤组织的组织最好是分生组织。或者,该愈伤组织可以来源于任何其它叶细胞,或主要来源于能够形成愈伤组织的任何其它浮萍组织。换句话说,能够进行后续克隆繁殖的任何组织,无论它是通过器官发生还是胚胎发生进行克隆繁殖,均可以用来按照本发明转化浮萍。本文所用的术语“器官发生”是指由分生中心(meristematic center)顺序发育叶和根的过程。本文所用的术语“胚胎发生”是指叶和根一起以协同方式(不是顺序地)发育,无论它来自体细胞还是来自配子。

[0055] 该方法也可以用来转化细胞悬液。这类细胞悬液可以由任何浮萍组织形成。

[0056] 所述浮萍产生三类愈伤组织:(a) 致密的半结构化(organized)的愈伤组织(命名为 I 型);(b) 脆性的白色未分化愈伤组织(命名为 II 型);和(c) 绿色的分化的愈伤组织(命名为 III 型)。在组织培养中,愈伤组织仅以两种方式再生植株:通过胚胎和通过苗形成(在浮萍中,叶是苗)。愈伤组织诱导的方法是本领域已知的,对于每个浮萍物种和所需类型的愈伤组织,可以优化待使用的具体条件,如在以下实施例中证明的。最好使用 I 型或 III 型愈伤组织,更优选使用 I 型愈伤组织,以按照本发明转化浮萍。

[0057] 通过在含有植物生长调节剂(即细胞分裂素和生长素)的培养基中培养浮萍组织,可以诱导愈伤组织。优选用于从浮萍组织诱导愈伤组织的生长素包括 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)和萘乙酸(NAA)。优选的生长素浓度为 1-30  $\mu$ M,更优选为 5-20  $\mu$ M,再更优选为 5-10  $\mu$ M。优选的细胞分裂素是苄基腺嘌呤(BA)或噻苯隆(TDZ)。优选的细胞分裂素的浓度为 0.1-10  $\mu$ M,更优选为 0.5-5  $\mu$ M,再更优选为 0.5-1  $\mu$ M。在其它更优选的实施方案中,通过在含有 BA 或 TDZ 之一和或者 2,4-D 或 NAA 之一的培养基中培养浮萍组织,诱导愈伤组织。一般而言,低浓度的生长素或“弱”生长素(例如吲哚乙酸)促进叶的增殖,而非愈伤组织的形成,而高浓度的生长素或“强”生长素(例如 2,4-D)促进愈伤组织形成。优

选的愈伤组织形成基础培养基包括N6培养基(Chu等, *Scientia Sinica* 18, 659(1975))和Murashige和Skoog培养基(Murashige和Skoog, *Physiol. Plant.* 15, 473(1962)),更优选Murashige和Skoog培养基。一般而言,愈伤组织诱导的频率是可变的。在这些物种中,培养2-3周时肉眼看不到愈伤组织,在愈伤组织的大小足以用于转化之前,可能需要4-8周的培养。愈伤组织的诱导最好进行1-10周,更优选进行2-8周,再更优选进行3-5周。对于愈伤组织的生长,优选的培养基如同用于愈伤组织诱导的培养基,但生长素的浓度降低。

#### [0058] C. 通过弹道攻击转化浮萍

[0059] 本发明的一个实施方案是用目的核苷酸序列转化浮萍,其中该核苷酸序列含有至少一个表达盒,所述表达盒携带一种赋予对选择剂抗性的基因。该核苷酸序列由微弹携带。就本发明人所知,先前没有报道,通过弹道转化产生稳定转化的浮萍。

[0060] 按照本发明的优选实施方案,该弹道转化法包括以下步骤:(a) 提供作为靶的浮萍组织;(b) 以足以穿刺该组织内细胞的细胞壁并将该核苷酸序列沉积在该组织细胞内的速率,将携带该核苷酸序列的微弹发射到该浮萍组织,藉此提供转化的组织。在本发明的具体实施方案中,该方法还包括用选择剂培养转化的组织,如下所述。在再一可选择的实施方案中,进行选择步骤后,进行从该转化组织再生转化浮萍的步骤。如下所述,该技术可以用作单独的沉淀(湿或冻干)的核苷酸序列实施,以取代含有该核苷酸序列的水溶液。

[0061] 任何弹道细胞转化装置均可以用于实施本发明。Sandford等(*Particulate Science and Technology* 5, 27(1988))、Klein等(*Nature* 327, 70(1987))和在EP 0270356中公开了典型的装置。这类装置已经用来转化玉米细胞(Klein等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4305(1988))、大豆愈伤组织(Christou等, *Plant Physiol.* 87, 671(1988))、McCabe等, *BioTechnology* 6, 923(1988))、酵母线粒体(Johnston等, *Science* 240, 1538(1988))和衣藻属(*Chlamydomonas*)叶绿体(Boynton等, *Science* 240, 1534(1988))。

[0062] 在本文提出的研究中,使用DuPont生产的市售氦基因枪(PDS-100/He)。或者,可以利用如Klein等描述配置的装置(*Nature* 70, 327(1987))。该装置包括一个轰击室,该轰击室被高度可调的终止板(stopping plate)分为两个独立的区室,加速室安装于轰击室的上面。宏观弹因枪粉电荷而被沿着加速室发射到终止板。终止板中有一形成的膛孔(bore hole),其直径小于微弹的直径。宏观弹(macroprojectile)携带微弹,将宏观弹瞄准膛孔,并对着膛孔射出。当宏观弹被终止板终止时,微弹通过膛孔发射。将靶组织定位在轰击室中,使得通过膛孔发射的微弹透过靶组织细胞的细胞壁,并将其上携带的目的核苷酸序列沉积在靶组织细胞中。轰击室在使用之前部分抽空,以防止大气摩擦力减慢微弹。该室仅被部分抽空,使得靶组织在轰击期间不被干燥。约400至约800毫米汞的真空是合适的。

[0063] 在可选择的实施方案中,不用微弹而达到弹道转化。例如,可以由宏观弹携带含有作为沉淀的目的核苷酸序列的水溶液(例如通过将水溶液直接置于宏观弹的板接触端,而不用微弹,其中通过表面张力保持水溶液)。将该溶液单独发射到植物组织靶上(例如通过将宏观弹以上述相同方式沿加速管发射)。其它方法包括将该核酸沉淀本身(“湿”沉淀)或冷冻干燥的核苷酸沉淀直接置于宏观弹的板接触端,而不用微弹。在没有微弹时,确信该核苷酸序列必须或者以大于由微弹携带所需的速度发射到组织靶上,或者使得该核苷酸序列移动较短的距离而到达靶组织(或这两者)。

[0064] 目前最好是在微弹上携带该核苷酸序列。已知该粒子的速度和该粒子必须移动的距离,所以可以由具有足够密度和粘结性的任何材料形成微弹,以发射透过细胞壁,用于制造微弹的材料非限制性实例包括金属、玻璃、二氧化硅、冰、聚乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯和碳化合物(例如石墨、钻石)。目前优选金属粒子。合适金属的非限制性实例包括钨、金和铱。粒子的大小应该足够小,以避免过度破坏它们在靶组织中接触到的细胞,而粒子的大小应该足够大,以提供透过靶组织中目的细胞所需的惯性。直径范围为约 0.5 微米至约 3 微米的粒子是合适的。粒子不必是球形,因为粒子表面不规则可以增加其 DNA 的容纳量。

[0065] 可以通过沉淀将该核苷酸序列固定在该粒子上。所用的精确的沉淀参数如本领域已知的,将根据诸如所用的粒子加速方法而变化。载体粒子可以可任选地用诸如聚赖氨酸的包囊剂包被,以提高固定其上的核苷酸序列的稳定性,如在 EP 0270356(第 8 栏)中所述。

[0066] 在弹道轰击靶组织后,如以下 E 小节所述可以选择转化子和再生转化的浮萍植株。

#### [0067] D. 农杆菌介导的转化

[0068] 在本发明的一个实施方案中,用根癌农杆菌或毛根农杆菌,最好用根癌农杆菌,转化浮萍。农杆菌介导的基因转移利用根癌农杆菌或毛根农杆菌将 DNA 转移入植物染色体中的天然能力。农杆菌是一种植物病原体,它将分别在根癌农杆菌或毛根农杆菌的 Ti 质粒和 Ri 质粒中称为 T-DNA 的区内编码的一组基因转移入植物细胞中。Ti 质粒转移的典型结果是称为根癌的肿瘤生长,其中 T-DNA 稳定整合入宿主染色体中。Ri 质粒整合入宿主染色体 DNA,产生称为“发根病”的疾病。通过在 T-DNA 中取出该基因,而不丧失 DNA 转移和整合,可以除去在宿主植物中引起疾病的能力。将待转移的 DNA 连接至限定整合的 T-DNA 终点的边界序列。

[0069] 利用工程改造的农杆菌菌株进行的基因转移,已经成为许多双子叶作物的常规技术。然而,在使用农杆菌转化单子叶植物中,特别是在谷类植物中,已经经历了相当大的困难。就本发明人所知,迄今没有报道利用农杆菌介导的转化产生稳定转化的浮萍。

[0070] 尽管以下的讨论集中于使用根癌农杆菌以达到浮萍中的基因转移,但本领域技术人员会认识到,这一讨论同样适用于毛根农杆菌。与根癌农杆菌的开发相似,已经开发了用毛根农杆菌的转化,并且已经成功地用来转化例如亚麻、龙葵(*Solanum nigrum* L.)和白杨。Ryals 等的美国专利第 5,777,200 号。如 Burgess 等的美国专利第 5,773,693 号所述,最好使用解除武装的根癌农杆菌菌株(如下所述),然而,可以使用野生型毛根农杆菌。一个说明性的毛根农杆菌的菌株是菌株 15834。

[0071] 修饰用于本发明方法中的农杆菌菌株,以使其含有一种或多种目的基因、或在转化细胞中待表达的核酸。将待转移的核酸加入 T 区,其侧翼为 T-DNA 边界序列。本领域已知多种农杆菌菌株,特别是用于双子叶植物转化的菌株。这种农杆菌可以用于本发明方法中。参见例如 Hooykass, *Plant Mol. Biol.* 13,327(1989);Smith 等, *Crop Science* 35,301(1995);Chilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,3119(1993);Mollony 等, *Monograph Theor. Appl. Genet NY* 19,148(1993);Ishida 等, *Nature Biotechnol.* 14,745(1996);和 Komari 等, *The Plant Journal* 10,165(1996),这些文献的说明书通过引用结合到本文中。

[0072] 除 T 区外, Ti(或 Ri) 质粒还含有一个 vir 区。vir 区对于有效的转化的重要的,

并且看来是物种特异性的。已经开发了双载体系统,其中受操作的解除武装、携带外源 DNA 的 T-DNA 和 *vir* 功能存在于不同的质粒上。以该方式,在一个在大肠杆菌中复制的小质粒中,构建包含外源 DNA(待转移的核酸)的修饰的 T-DNA 区。该质粒以三亲本交配接合转移或通过电穿孔,转移入含有毒性基因序列的匹配质粒的根癌农杆菌中。*vir* 功能以反式供应,以将 T-DNA 转移入植物基因组中。这类双载体可用来实施本发明。

[0073] 在本发明的优选实施方案中,C58 衍生载体用来转化根癌农杆菌。或者在其它实施方案中,使用超双载体。参见例如美国专利第 5,591,615 号和 EP 0604662,它们通过引用结合到本文中。已经构建了这种超双载体,它含有来源于 Ti 质粒 pTiBo542 的超毒性区的 DNA 区(Jin 等, *J. Bacteriol.* 169,4417(1987)),所述 Ti 质粒是表现出极高转化效率的超毒性根癌农杆菌 A281 中含有的(Hood 等, *Biotechnol.* 2,702(1984); Hood 等, *J. Bacteriol.* 168,1283(1986);Komari 等, *J. Bacteriol.* 166,88(1986);Jin 等, *J. Bacteriol.* 169,4417(1987);Komari, *Plant Science* 60,223(1987);ATCC 保藏号为 37394。

[0074] 本领域技术人员已知的典型超双载体包括 pTOK162(日本专利申请(Kokai)第 4-222527 号、EP 504,869、EP 604,662 和美国专利第 5,591,616 号,这些文献通过引用结合到本文中)和 pTOK233(Komari, *Plant Cell Reports* 9,303(1990);Ishida 等, *Nature Biotechnology* 14,745(1996);这些文献通过引用结合到本文中)。可以用以上文献中提出的方法构建其它超双载体。超双载体 pTOK162 能够在大肠杆菌和根癌农杆菌中复制。另外,该载体含有来自 pTiBo542 侵入区(virulence region)的 *virB*、*virC* 和 *virG* 基因。该质粒也含有一个抗生素抗性基因、一个选择标记基因和待转化入该植物的目的核酸。待插入浮萍基因组的核酸位于 T 区两个边界序列之间。可以构建具有 pTOK162 上述特征的本发明的超双载体。构建所述超双载体和用于本发明的其它载体的 T 区,以具有插入待传递的基因的限制性位点。或者,通过利用体内同源重组,可以将待转化的 DNA 插入该载体的 T-DNA 区。参见 Herrera-Esterella 等, *EMBO J.* 2,987(1983);Horch 等, *Science* 223,496(1984)。这种同源重组依赖于这样一个事实:该超双载体具有一个与 pBR322 或其它相似质粒一个区同源的区。因此,当两种质粒在一起时,所需基因通过同源区的遗传重组,插入该超双载体。

[0075] 任何适用于转化浮萍的载体均可以按照本发明使用。例如,可以由缺乏 *vir* 区的双载体携带异源目的核酸序列和侧翼的 T-DNA。然后,在解除武装的 Ti 质粒或在第二双质粒上提供 *vir* 区。作为另一选择方法,通过新 T-DNA 取代原始 Ti 质粒 T-DNA 的双重重组事件,可以将异源核酸序列和 T-DNA 边界序列置于 Ti 质粒的 T-DNA 位点。*vir* 区可以由该 Ti 质粒供应,或在一个双质粒上供应。作为再一选择方法,可以如 Schilperoort 等的美国专利第 4,940,838 号所述,将异源核酸序列和侧翼的 T-DNA 整合入细菌染色体中,*vir* 区则可以在一个 Ti 质粒或一个双质粒上供应。

[0076] 本发明的农杆菌介导的转化法可以被认为包括几个步骤。基本步骤包括感染步骤和协同培养步骤。在某些实施方案中,在这些步骤后进行一个选择步骤,在其它实施方案中,在这些步骤后进行一个选择和一个再生步骤。

[0077] 在感染步骤之前,可以包括一个可选的预培养步骤。该预培养步骤包括在感染步骤之前,在合适的培养基中培养愈伤组织、叶或其它靶组织。预培养的时间可以为约 1-21

天不等,最好为7-14天。发现这种预培养步骤防止玉米培养物转化。参见例如EP 0672752。

[0078] 在感染步骤中,使待转化的细胞暴露于农杆菌。将细胞与农杆菌接触,通常在液体培养基中接触。如上所述,该农杆菌已被修饰以含有一个目的基因或核酸。将该核酸插入该载体的T-DNA区。本领域技术人员熟知用于本发明的一般分子生物学技术。参见例如SAMBROOK等,MOLECULAR CLONING :A LABORATORYMANUAL(1989)。

[0079] 含有目的质粒的农杆菌最好在农杆菌主平板上维持,于约-80℃冷冻贮存。主平板可以用来接种琼脂平板,以获得农杆菌,然后将农杆菌悬浮于培养基中,用于感染过程。或者,在转化之前,来自主平板的细菌可以用来接种液体培养物,该液体培养物在转化之前生长至对数期。

[0080] 用于感染步骤和协同培养步骤的农杆菌的浓度,可以影响转化效率。同样,非常高浓度的农杆菌可能损害待转化组织,并导致愈伤组织应答降低。因此,用于本发明方法中的农杆菌的浓度,可以根据所用的农杆菌菌株、待转化的组织、待转化的浮萍物种等而变化。为了优化具体浮萍物种或组织的转化方案,可以用不同浓度的农杆菌接种待转化的组织。同样,可以评估各种农杆菌浓度的标记基因表达的水平 and 转化效率。尽管农杆菌的浓度可以变化,但一般使用的浓度范围为约 $1 \times 10^3$ cfu/ml至约 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml,范围优选为 $1 \times 10^3$ cfu/ml至约 $1 \times 10^9$ cfu/ml,再更优选利用约 $1 \times 10^8$ cfu/ml至约 $1 \times 10^9$ cfu/ml。

[0081] 一般将待转化组织加入液体接触相的农杆菌悬液中,该悬液含有优化转化效率的浓度的农杆菌。该接触相促进使待转化组织与农杆菌悬液的最大接触。一般在协同培养步骤之前,让感染进行1-30分钟,优选进行1-20分钟,更优选进行2-10分钟,再更优选进行3-5分钟。

[0082] 本领域技术人员会认识到,可以优选所述条件,以达到最高水平的农杆菌感染和转化。例如,在本发明的优选实施方案中,在感染和协同培养步骤期间,使细胞经受渗透压(例如0.6M甘露醇)。另外,为了提高转化效率,可以在含有生长素(诸如IAA)的培养基中培养组织,以促进细胞增殖(即,人们认为农杆菌在有丝分裂期间整合入基因组中)。作为再一选择方法,可以使用组织创伤、真空压力或在含有乙酰丁香酮的培养基中培养,以提高转化效率。

[0083] 在协同培养步骤中,将该转化的细胞与农杆菌协同培养。通常,协同培养在固体培养基上进行。可以使用任何合适的培养基,诸如含有1%蔗糖和0.6%琼脂的Schenk和Hildebrandt培养基(Schenk和Hildebrandt, Can. J. Bot. 50, 199(1972))。最佳协同培养时间随具体的组织而变化。叶与农杆菌协同培养约2-7天,优选2-5天,更优选3-5天,更优选4天。相比之下,愈伤组织与农杆菌协同培养0.5-4天,更优选1-3天,更优选2天。可以在黑暗中或在减弱的光照条件下进行协同培养,以提高转化效率。另外,如以上接种步骤所述,可以在含有IAA或乙酰丁香酮的培养基上进行协同培养,以提高转化效率。最后,在细胞分裂素存在下进行协同培养步骤,细胞分裂素用来增强细胞增殖。

[0084] 在协同培养步骤后,可以使转化的组织经过可选的静息和去污染步骤。对于静息/去污染步骤,将转化细胞转移至含有能够抑制农杆菌生长的抗生素的第二培养基上。在缺乏任何选择压力的情况下进行该静息期,以允许含有该异源核酸的转化细胞恢复和增殖。加入抗生素以抑制农杆菌的生长。这类抑制农杆菌的抗生素是本领域已知的,包括头孢噻肟、timetin、万古霉素、羧苄青霉素等。抗生素的浓度将根据每种抗生素的标准而变化。例

如,在固体培养基中,羧苄青霉素的浓度范围为约 50mg/l 至约 250mg/l,优选约 75mg/l 至源 200mg/l,更优选约 100-125mg/l。单子叶植物转化领域的技术人员会认识到,对于特定的转化方案可以优化抗生素的浓度,而不用过多的试验。

[0085] 优选让静息期培养物在黑暗或在减弱的光下静息,最好在减弱的光下静息。本领域已知的任何培养基均可以用于静息期。静息 / 去污染步骤进行的时间可以是抑制农杆菌生长并在选择之前提高转化细胞数目所需的时间长度。通常,在选择步骤之前,静息 / 去污染步骤进行 1-6 周,优选 2-4 周,更优选 2-3 周。在更优选的实施方案中,选择时间在协同培养后的 3 周内开始。某些农杆菌菌株的抗生素抗性强于其它菌株。对于抗性较低的菌株,通常通过每 5 天等将新的去污染培养基加入愈伤组织中,进行去污染。对于抗性较强的菌株,可以每隔一天将较强的抗生素(例如万古霉素)加入愈伤组织中。

[0086] 在协同培养步骤或静息 / 去污染步骤后,可以按以下 E 小节中所述选择转化子并再生浮萍植株。

#### [0087] E. 转化子的选择和转化浮萍植株的再生

[0088] 按照本发明转化浮萍组织或愈伤组织,例如通过弹道轰击或农杆菌介导的转化来进行转化,每种方法分别在 C 和 D 小节中更详细地描述。转化步骤后,将转化组织暴露于选择压力,以选择那些接受来自表达盒引入的异源核酸并正在表达该核酸编码的多肽的细胞。根据含有至少一个选择标记插入片段的细胞的优先生长,选择用来选择转化子的试剂,所述选择标记插入片段位于表达盒内并通过弹道轰击或农杆菌传递。

[0089] 一般而言,进行选择转化子(来自任何组织类型或愈伤组织)的条件是本文公开的方法的最重要的方面。转化过程使细胞经受胁迫,而选择过程甚至对转化子有毒。通常,针对这种顾虑,转化组织最初经受弱选择,利用低浓度的选择剂和减弱的光(例如  $1-5 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ , 通过提高该选择剂的浓度和 / 或提高光强,以应用的选择梯度逐渐增加)。如果该组织看上去经受胁迫,则可以完全解除选择压力一段时间,然后重新施加选择压力。另外,可以给予转化的组织一段“静息”时间,如以上在 D 小节中所述,然后再真正施加任何选择压力。选择培养基一般含有一种简单的糖,诸如 1% -3% 的蔗糖,使得细胞不进行光合作用。另外,最初在减弱的光条件下进行选择,或甚至在完全黑暗中进行选择,以便将细胞的代谢活性保持在相对低的水平。本领域技术人员会认识到,对于每种浮萍物种或品系和对于待转化的组织类型,可以优化进行选择的具体条件,而不用过多的试验。

[0090] 对于选择步骤没有具体的时间限制。一般而言,进行选择的时间长度足以杀伤非转化子,并允许转化细胞以类似于非转化细胞的速率进行增殖,以在再生步骤之前产生足够的愈伤组织(callus)块。因此,对于以较慢速率增殖的细胞,选择的时间较长。例如, I 型浮萍愈伤组织增殖相对缓慢,在再生之前进行 8-10 周的选择。

[0091] 从转化细胞和愈伤组织再生某些植株的方法是本领域已知的。参见例如 Kamo 等, Bot. Gaz. 146, 37(1985); West 等, The Plant Cell 5, 1361(1993); 和 Duncan 等, Planta 165, 322(1985)。对于再生浮萍,推荐几种这些方法的改进方法。用 I 型和 III 型愈伤组织,可以最可靠地获得转化和选择后的叶再生。例如,可以根据淡黄色愈伤组织表面上出现的绿色中心(形成叶的位点),鉴别 I 型愈伤组织的再生。通常,在支持愈伤组织增殖的相同培养基条件下不发生浮萍的再生。最好使用贫乏的固体培养基(lean solid medium)(例如水-琼脂或半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基(含有 0.5% 蔗糖和 0.8% 琼脂))。然

而,通常需要在全强度培养基上间断地短期培养再生浮萍愈伤组织,以维持再生细胞中的营养平衡。在某些情况下,对于缓慢再生的品系或物种,在叶再生之前,该方法可能必须重复数次。通常,不在叶再生培养基中加入植物生长调节剂(因为它们抑制叶的形成),然而,诸如 BA 和硫酸腺嘌呤的细胞分裂素,对于某些物种而言可以提高叶的再生。愈伤组织培养物在延长的愈伤组织培养期间不丧失其再生叶的能力。

[0092] 在再生过程中,本领域已知的任何方法均可以用来证实再生的植株事实上是用所转移的目的核酸转化的。例如,组织化学染色、ELISA 测定、DNA 杂交、RNA 杂交、蛋白质杂交、PCR 等可以用来检测愈伤组织和再生植株中所转移的核酸或蛋白。

[0093] 由于已经证明浮萍可以用弹道轰击和农杆菌转化,因此可以使用对本文所述通用方法的改变方法,以提高效率,或以转化对转化可能表现出一定抗拒的品系。影响转化效率的因素包括浮萍的物种、感染的组织、组织培养的培养基的组成、选择标记基因、任何上述步骤的时间长度、载体的种类和光/黑暗条件。具体对于农杆菌介导的转化,根癌农杆菌或毛根农杆菌的浓度和菌株也必须考虑。因此,可以改变这些因素和其它因素,以确定任何特定浮萍物种或品系的最佳转化方案。人们会认识到,不是每个物种和品系都对转化条件有同样反应,对于本文公开的方案可能需要略微不同的修改。然而,通过改变每个变量,对于任何浮萍系均可以得到最佳方案。

[0094] 提供以下实施例是为了进行说明,而不是为了限制。实施例中所用的“hr”是指小时,“sec”是指秒,“g”是指克,“mg”是指毫克,“l”是指升,“ml”是指毫升,“mmol”是指毫摩尔,“mM”是指毫摩尔浓度,“ $\mu$ M”是指微摩尔浓度,“m”是指米,“mm”是指毫米,“BA”是指苄基腺嘌呤,“2,4-D”是指 2,4-二氯苯氧基乙酸,“NAA”是指萘乙酸,而“IAA”是指吲哚乙酸。

## 实施例

[0095] 组织培养:

[0096] 该小节提出涉及浮萍愈伤组织制备方法的实验。许多实施例使用 *Lemna gibba* G3 作为浮萍品系,是用来优化培养参数的品系:(1) 基础培养基的配制,(2) 植物生长调节剂的类型和浓度,和 (3) 转移方案。随着对愈伤组织形成的了解的增加,这适用于其它浮萍物种。浮萍产生三种类型的愈伤组织:(a) 致密的半结构化愈伤组织(命名为 I 型);(b) 脆性的白色未分化的愈伤组织(命名为 II 型);和 (c) 绿色的分化的愈伤组织(命名为 III 型)。在组织培养中,愈伤组织仅以两种方式再生植株:通过胚胎和通过苗形成(在浮萍中,叶是苗)。以下提出的数据证明可以从所有已知的愈伤组织再生叶的途径,再生转化的浮萍植株。

[0097] 实施例 1

[0098] 对于生长素 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 和细胞分裂素苄基腺嘌呤 (BA) 的 18 种组合,测试其对浮萍物种 *Lemna gibba* G3 中愈伤组织诱导的作用。

[0099] 在实验之前,使浮萍叶在含有 3% 蔗糖的液体 Hoagland 培养基 (Hoagland 和 Snyder, Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30, 288 (1933)) 中于 23°C 培养 2 周,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,制备 18 等份含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂的 100ml Murashige 和 Skoog 基础培养基,

其 2,4-D 的浓度为 10、20 和 50  $\mu\text{M}$ , 而 BA 的浓度为 0、0.01、0.1、1.0、2.0 和 10.0  $\mu\text{M}$ 。所有培养基的 pH 均调至 5.8, 于 121 $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 分钟, 冷却, 将每 100ml 注入 4 个 100mm $\times$ 15mm 培养皿中。

[0100] 使用 3 个 2,4-D 浓度  $\times$  6 个 BA 浓度的全阶乘实验设计 ( 总共 18 种处理 ), 每种处理有 4 个重复测定, 每个重复测定 1 个培养皿, 每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织, 将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将 72 个平板于 23 $^{\circ}\text{C}$  培养 27 天, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。27 天后, 将浮萍组织转移至相同类型的新鲜培养基, 再于相同的温度和光培养条件下继续培养 35 天。

[0101] 以愈伤组织诱导频率 ( 制备任何愈伤组织的叶数 / 总叶数 ) 测量的结果显示培养出培养 62 天后三种类型的愈伤组织增生。(1) 致密的白色 - 黄色愈伤组织鉴定并命名为“ I 型”。低频率的叶, 即约 5% 增生该类型的愈伤组织。(2) 脆性的白色愈伤组织鉴定并命名为“ II 型”。20-40% 的叶增生该类型的愈伤组织。(3) 以其细胞结构化程度归类的绿色的愈伤组织鉴定并命名为“ III 型”。所有增生的 50% 以上的叶在培养期间产生该愈伤组织类型。所有三种类型的愈伤组织均证明, 在所有 18 种 2,4-D 和 BA 的组合下以不同的频率增生。愈伤组织增生在 20-50  $\mu\text{M}$  的范围广泛的 2,4-D 浓度和 0.01-0.1  $\mu\text{M}$  的 BA 浓度内最强烈。

[0102] 实施例 2

[0103] 测试生长素 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 和细胞分裂素苄基腺嘌呤 (BA) 的 40 种浓度, 以更优化该生长素和细胞分裂素浓度, 以由 Lemnagibba G3 的浮萍叶诱导愈伤组织。

[0104] 在实验之前, 使浮萍叶在含有 3% 蔗糖的液体 Hoagland 培养基中于 23 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织, 制备 40 等份含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂的 100ml Murashige 和 Skoog 培养基, 其 2,4-D 的浓度为 20、30、40、50、60、70、80、100  $\mu\text{M}$ , 而 BA 的浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5 和 1.0  $\mu\text{M}$ 。所有培养基的 pH 均调至 5.8, 于 121 $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 分钟, 冷却, 将每 100ml 注入 4 个 100mm $\times$ 15mm 培养皿中。

[0105] 使用 8 个 2,4-D 浓度  $\times$  5 个 BA 浓度的全阶乘实验设计 ( 总共 40 种处理 ), 每种处理有 4 个重复测定, 每个重复测定 1 个培养皿, 每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织, 将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将平板于 23 $^{\circ}\text{C}$  培养 27 天, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。27 天后, 将浮萍组织转移至相同类型的新鲜培养基, 再于相同的温度和光培养条件下继续培养 35 天。

[0106] 培养 63 天后得到的结果表明, 已经增生出三种类型的愈伤组织: (1) I 型愈伤组织, (2) II 型愈伤组织, 和 (3) III 型愈伤组织。数值频率数据 ( 制备任何愈伤组织的叶数 / 总叶数 ) 的回归分析 ( 二次反应曲面 ) 揭示出对于不同类型的愈伤组织诱导的叶反应。II 型和 III 型愈伤组织类型的频率显著受 2,4-D 和 BA 浓度的影响, 然而, I 型愈伤组织的频率仅显著受 2,4-D 的影响。没有具体的 2,4-D 或 BA 的浓度证明为最佳的, 在范围广泛的两种植物生长调节剂的浓度下都发生愈伤组织诱导。约 50% 的叶产生 III 型愈伤组织, 约 25% 的叶产生 II 型愈伤组织, 而低于 5% 的叶产生 I 型愈伤组织。

[0107] 实施例 3

[0108] 测试生长素麦草畏和细胞分裂素苄基腺嘌呤 (BA) 的 40 种组合, 以比较麦草畏相对于 2,4-D 对于浮萍种 Lemna gibba G3 的愈伤组织诱导的相对效力。

[0109] 在实验之前,使浮萍叶在含有 3%蔗糖的液体 Hoagland 培养基中于 23℃培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,制备 40 等份含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂的 100ml Murashige 和 Skoog 培养基,其麦草畏的浓度为 10、20、30、40、50、60、80、100  $\mu\text{M}$ ,而 BA 的浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5 和 1.0  $\mu\text{M}$ 。所有培养基的 pH 均调至 5.8,于 121℃高压灭菌 20 分钟,冷却,将每 100ml 注入 4 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0110] 使用 8 个麦草畏浓度 ×5 个 BA 浓度的全阶乘实验设计(总共 40 种处理),每种处理有 4 个重复测定,每个重复测定 1 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将平板于 23℃培养 27 天,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。28 天后,将浮萍组织转移至相同类型的新鲜培养基,再于相同的温度和光培养条件下继续培养 45 天。

[0111] 培养 73 天后,观察到三种类型的愈伤组织增生:(1)I 型愈伤组织,(2)II 型愈伤组织,和 (3)III 型愈伤组织。总之,愈伤组织的增生差,并在 10 和 20  $\mu\text{M}$  的麦草畏浓度上发生;高于 30  $\mu\text{M}$ ,不发生愈伤组织的增生。II 型和 III 型愈伤组织类型对麦草畏反应而增生;极少 I 型愈伤组织增生。

[0112] 实施例 4

[0113] 使用两种浓度的 2,4-D 结合 BA,以确定是否维持愈伤组织的生长,以及是否由以 *Lemna gibba* G3 观察到的三种类型建立愈伤组织系。

[0114] 在实验之前,使浮萍叶在含有 1%蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基(Schenk 和 Hildebrandt, Can. J. Bot. 50,199(1972))中于 23℃培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,制备含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、0.01  $\mu\text{M}$  BA 的 400ml Murashige 和 Skoog 培养基,其 2,4-D 的浓度为 10 和 40  $\mu\text{M}$ 。所有培养基的 pH 均调至 5.8,于 121℃高压灭菌 20 分钟,冷却,将每 200ml 等份注入 8 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0115] 使用 2 种处理的随机区组实验设计,每种处理有 4 个重复测定,每个重复测定 1 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将这些平板于 23℃培养 27 天,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。4 周后,将浮萍组织转移至相同类型的新鲜培养基,再于相同的温度和光培养条件下继续培养 4 周。

[0116] 培养 8 周后,观察到三种类型的愈伤组织增生:(1)I 型愈伤组织,(2)II 型愈伤组织,和 (3)III 型愈伤组织。将所有三种愈伤组织类型均转移至与它们已经在其上培养的培养基组成相同的新鲜培养基上,在相同的培养条件下继续培养 4 周以进行传代培养。培养 2 个月以上后,在 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 和 0.01  $\mu\text{M}$  BA 上的 I 型和 III 型愈伤组织建立了健康的增殖愈伤组织培养物。II 型愈伤组织没有增生。尽管以 4 周的传代培养时间表可以维持愈伤组织的增生,但在传代培养期间的第三周和第四周期间,注意到愈伤组织衰退。

[0117] 实施例 5

[0118] 用 *Lemna gibba* G3 测试维持愈伤组织增生的传代培养时间表。在实验之前,使浮萍叶在含有 1%蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23℃培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,制备含有 3%

蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $30\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.02\ \mu\text{M}$  BA 的 500ml Murashige 和 Skoog 培养基,将 pH 均调至 5.8,于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 30 分钟,冷却,注入 20 个  $100\text{mm}\times 15\text{mm}$  培养皿中。

[0119] 使用 2 种处理的随机区组实验设计,每种处理有 2 个重复测定,每个重复测定 5 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将这些平板于  $23^\circ\text{C}$  培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ 。2 周后,将一半平板(10 个平板)上的浮萍组织转移至相同组成的新鲜培养基,再于同未转移组织相同的条件下继续培养。4 周后,评估该组织的愈伤组织增生。三种类型的愈伤组织增生:I 型愈伤组织、II 型愈伤组织和 III 型愈伤组织。与没有转移培养 4 周的浮萍组织相比,在 2 周时转移的浮萍组织之间没有观察到愈伤组织类型或增生的差异。

[0120] 从原始叶传代培养 I 型和 III 型愈伤组织,并在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $10\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.01\ \mu\text{M}$  MBA 的 Murashige 和 Skoog 培养基中继续培养。将增生愈伤组织以 2 周的间隔继续传代培养至组成相同的新鲜培养基。转移之间较长的间隔导致 2-3 周之间愈伤组织健康状况的突然衰退。当维持 2 周传代培养时间表时,愈伤组织继续增生,而不丧失活力。

[0121] 实施例 6

[0122] 测试两种不同的基础培养基 -Murashige 和 Skoog 基础培养基以及 Nitsch 和 Nitsch 基础培养基 (Science 163,85(1969)),以比较其对于 *Lemna gibba* G3 愈伤组织诱导的相对效率。

[0123] 在实验之前,使浮萍叶在含有 1%蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于  $23^\circ\text{C}$  培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,制备每种含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $30\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.01\ \mu\text{M}$  BA 的 500ml 的 Murashige 和 Skoog 培养基以及 Nitsch 和 Nitsch 培养基,将 pH 均调至 5.8,于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 30 分钟,冷却,每种培养基用来注入 20 个  $100\text{mm}\times 15\text{mm}$  培养皿中。

[0124] 使用 2 种处理的随机区组实验设计,每种处理有 2 个重复测定,每个重复测定 5 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将这些平板于  $23^\circ\text{C}$  培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ 。2 周后,将浮萍组织转移至相同组成的新鲜培养基,再于相同的条件下继续培养。

[0125] 4 周后,评估所有平板上组织的愈伤组织增生。Nitsch 和 Nitsch 培养基上培养的叶不能增生显著量的愈伤组织。该培养基上的浮萍组织是苍白的并且已经变黄。Murashige 和 Skoog 培养基上培养的浮萍叶增生出通常的三种类型的愈伤组织:I 型、II 型和 III 型愈伤组织。

[0126] 从原始叶传代培养 I 型和 III 型愈伤组织,并在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $10\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.01\ \mu\text{M}$  MBA 的 Murashige 和 Skoog 培养基中继续培养。将增生愈伤组织以 2 周的间隔继续传代培养至组成相同的新鲜培养基。转移之间较长的间隔导致 2-3 周之间愈伤组织健康状况的突然衰退。愈伤组织继续增生,而不丧失

活力。

#### [0127] 实施例 7

[0128] 测试三种不同的基础培养基 -Murashige 和 Skoog 培养基、Schenk 和 Hildebrandt 培养基和 Gamborg B5 培养基 (Gamborg 等, InVitro 12,473(1976)), 以比较其对于 Lemna gibba G3 愈伤组织诱导和生长的相对效力。

[0129] 在实验之前, 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23°C 培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织, 制备每种含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $30 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.02 \mu\text{M}$  BA 的 500ml 的三种培养基, 将 pH 均调至 5.8, 于 121°C 高压灭菌 30 分钟, 冷却, 将每个部分注入 20 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0130] 使用 3 种处理的随机区组实验设计, 每种处理有 2 个重复测定, 每个重复测定 5 个培养皿, 每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织, 将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将这些平板于 23°C 培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。2 周后, 将浮萍组织转移至相同组成的新鲜培养基, 再于相同的条件下继续培养。

[0131] 4 周后, 评估所有平板上组织的愈伤组织增生。Gamborg B5 培养基上培养的叶苍白, 并且存在黄色衰退的叶。没有发生可察觉的愈伤组织增生。Schenk 和 Hildebrandt 培养基上培养的叶为深绿色, 增生出异常的叶, 没有发生可察觉的愈伤组织增生。Murashige 和 Skoog 培养基上培养的浮萍叶增生出通常的三种类型的愈伤组织: I 型、II 型和 III 型愈伤组织。

[0132] 从原始叶传代培养 I 型和 III 型愈伤组织, 并在含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $10 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.01 \mu\text{M}$  MBA 的 Murashige 和 Skoog 培养基中继续培养。将增生愈伤组织以 2 周的间隔继续传代培养至组成相同的新鲜培养基。转移之间较长的间隔导致 2-3 周之间愈伤组织健康状况的突然衰退。愈伤组织继续增生, 而不丧失活力。

#### [0133] 实施例 8

[0134] 用四种不同的基础培养基 -Murashige 和 Skoog 培养基 (MS)、Schenk 和 Hildebrandt 培养基 (SH)、Nitsch 和 Nitsch 培养基 (NN) 和 Gamborg B5 培养基 (B5), 以比较其支持 Lemna gibba G3 II 型愈伤组织在液体培养基中增生的效力。

[0135] 在实验之前, 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23°C 培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织, 制备含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $30 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.02 \mu\text{M}$  MBA 的 500ml Murashige 和 Skoog 培养基, 将 pH 均调至 5.8, 于 121°C 高压灭菌 30 分钟, 冷却, 并注入 20 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0136] 为了诱导愈伤组织, 将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将 20 个平板于 23°C 培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。2 周后, 将浮萍组织转移至组成相同的新鲜培养基, 再于相同的条件下继续培养。

[0137] 4 周后, 用 II 型愈伤组织接种用于愈伤组织悬浮培养的液体培养基。对于悬浮愈伤组织的建立, 制备每种含有 3% 蔗糖、 $10 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.01 \mu\text{M}$  BA 的 100ml 的四种基础培

培养基 MS、SH、NN 和 B5。将培养基的 pH 均调至 5.8, 将 4 个 25ml 的等份置于 125ml 烧瓶中, 将所有 16 个烧瓶的培养基于 121℃ 高压灭菌 18 分钟。冷却后, 每个烧瓶用 1-2 小片 II 型脆性白色愈伤组织接种。将烧瓶用铝箔包裹, 于 23℃ 培养 2 周, 同时在黑暗中以 100rpm 恒定振荡。

[0138] 2 周后, 评估烧瓶的愈伤组织增生。用 Murashige 和 Skoog 培养基和 Nitsch 和 Nitsch 培养基, 注意到微量的生长。将烧瓶再培养 2 周, 不更换培养基, 注意到没有进一步的愈伤组织增生。

[0139] 实施例 9

[0140] 用广泛代表浮萍科的跨 15 个种的 32 个浮萍品系, 以确定用 Lemnagibba G3 开发的用于愈伤组织诱导的方法和培养基, 是否外推至整个科。表 I 列出了所测试的品系。

[0141] 在实验之前, 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23℃ 培养 2 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织, 使用 6 种基础培养基: Murashige 和 Skoog、Schenk 和 Hildebrandt (Schenk 和 Hildebrandt, Can. J. Bot. 50, 199 (1972))、Nitsch 和 Nitsch、N6 (Chu 等, Scientia Sinica 18, 659 (1975))、Gamborg B5 和 Hoagland 的培养基。使用已知引发 L. gibba G3 愈伤组织增生的两种植物生长调节剂的组合:  $30 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.02 \mu\text{M}$  BA、以及  $5 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  BA。对于每个品系, 制备含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂的 200ml 每种基础培养基。将这 200ml 分为 2 个 100ml 的等份, 用每等份制备两种植物生产调节剂浓度。将所有培养基的 pH 均调至 5.8, 培养基于 121℃ 高压灭菌 30 分钟, 冷却, 并且每个 100ml 的等份注入 4 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0142] 对于每个测试的浮萍品系, 使用 6 种培养基 × 2 种植物生长调节剂的组合、12 种处理的随机区组实验设计。设计重复 4 次, 每个重复测定 1 个培养皿, 每个培养皿 6 片叶。对于浮萍属、(Spirodela) 和 (Wolffiella) 种的较大的叶, 将 6 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上, 以诱导愈伤组织。对于无根萍属内的品系, 小叶从技术上讲不能将单独的叶置于平板, 将小丛的叶用作实验单位。将平板于 23℃ 培养 4-5 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。此时, 评价这些叶的一般健康状况 (通过颜色 (绿色至黄色) 和增生活力来判断) 和三种类型愈伤组织起始的频率: I 型、II 型和 III 型。

[0143] 结果表明不同浮萍种对愈伤组织诱导培养基的反应性的变化。一般而言, 浮萍属和无根萍属内的种和品系的反应性最强。Lemna gibba 的所有 5 个品系均显示出在含有  $5 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  BA 的 MS、B5 和 N6 培养基上不同程度的愈伤组织诱导。青萍的两个品系遵循相同的型式, 相对于 Lemna gibba 品系愈伤组织诱导程度更大。Lemnaminiscula 的两个品系表现出高频率的愈伤组织诱导, 白色愈伤组织的增生与青萍或 Lemna gibba 有些不同。Lemna aequinoctialis 在最高生长素浓度下显示出卷叶和膨胀 (swelling), 但没有观察到真正的愈伤组织培养物的增生, 表明所用的生长素浓度不够高。Lemna valdiviana 未显示愈伤组织诱导。在无根萍属的种中, 无根萍在含有  $5 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  BA 的 B5 培养基上显示出少量愈伤组织增生。Woffiabrasiliensis 和 Wollfia columbinana 在补充  $5 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  BA 的 Hoaglands 培养基上显示出愈伤组织的诱导。无根萍属的其余种 Woffiiaustralinana 没有显示出愈伤组织诱导, 尽管叶表现出膨胀和略微异常的生长。Wolffiella 和紫萍属的种没有显示出愈伤组织诱导。紫萍属种的叶在较高浓度的 2,4-D 上

不存活,而在较低浓度下生长不好。该型式的反应与以下解释一致:紫萍属对生长素比浮萍属和无根萍属的种更敏感,并且较低的生长素浓度应该用于后续的实验,以诱导愈伤组织形成。

[0144] 表 I

属	种	品系名称	来源的国家
Spirodela	polyrrhiza	7970	美国
		4240	中国
		8652	中国
		8683	肯尼亚
Spirodela	punctata	7488	美国
		7776	澳大利亚
Spirodela	intermedia	7178	
Wolffia	arrhiza	7246	南非
Wolffia	austrliana	9006	日本
		7267	塔斯马尼亚
Wolffia	brasiliensis	7317	澳大利亚
		7397	委内瑞拉
Wolffia	columbiana	7581	委内瑞拉
		8919	委内瑞拉
		7153	美国
[0145] Wolffella	lingulata	7918	美国
		8742	阿根廷
Wolffella	neotropica	9137	巴西
		7279	巴西
Wolffella	oblongata	8848	巴西
		8031	美国
Lemna	aequinoctialis	8751	阿根廷
		7758	美国
Lemna	gibba	G3	美国
		6861	意大利
Lemna	minor	7784	
		8405	法国
		8678	喀什米尔
		8744	阿尔巴尼亚
Lemna	miniscula	8627	丹麦
		6600	加利福尼亚
Lemna	valdiviana	6747	加利福尼亚
		8821	阿根廷
		8829	阿根廷

[0146] 实施例 10

[0147] 对 4 种生长素 - 萘乙酸 (NAA)、2,4-D、吲哚乙酸 (IBA) 和麦草畏,测试它们在 SH、MS 和 N6 三种不同的基础培养基上由 L. gibbaG3 叶诱导愈伤组织形成的能力。

[0148] 在实验之前,使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于

23℃培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,测试 3 种基础培养基:Murashige 和 Skoog、Schenk 和 Hildebrandt 和 N6。使用苄基腺嘌呤作为细胞分裂素,其浓度为  $1 \mu\text{M}$ 。生长素的浓度随生长素的类型而变。对于相对强的生长素-2,4-D 和麦草畏,浓度为 0、1、5、10 和  $20 \mu\text{M}$ 。对于弱的生长素 NAA 和 IBA,浓度为 0、5、10、20 和  $50 \mu\text{M}$ 。对于每种培养基的剂量反应实验,制备含有 BA 的 2 升基础培养基,并将 pH 调至 5.8。将体积等分为 20 个 100ml 的等份。向每个这些等份,加入适量的生长素,并将培养基调至 0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂。将培养基于 121℃ 高压灭菌 30 分钟,冷却,并且每个 100ml 的等份注入 4 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0149] 使用 3 种培养基 × 4 种生长素 × 5 个浓度组合的 60 种处理的随机剂量反应实验设计。设计重复 2 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将平板于 23℃ 培养 5 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。5 周后,测量由每种原始叶产生的浮萍组织的鲜重,并且目视检查这些组织群体的诱导的愈伤组织数和产生的愈伤组织类型。

[0150] 在结果中见到许多倾向。首先,低生长素浓度和弱生长素促进叶的增生。这种增生大于生长素不存在时观察到的增生。当叶增生时,愈伤组织诱导的频率低。在高生长素浓度下或用较强的生长素,观察到叶卷曲并且增生大大降低。愈伤组织的形成与叶卷曲有关。生长素类型的排名(从最大卷曲至最小卷曲)如下:2,4-D、麦草畏、NAA 和 IBA。B6 和 MS 均支持愈伤组织形成,而 SH 不支持愈伤组织形成。N6 支持的增殖大于 MS。在 N6 上需要比 MS 培养基更高浓度的生长素,以引发愈伤组织形成。对于致密的 I 型愈伤组织的诱导,2,4-D、麦草畏和 NAA 在 MS 培养基上均表现出某种程度的愈伤组织诱导,在 N6 培养基上,仅 2,4-D 和麦草畏产生愈伤组织。在含有  $10 \mu\text{M}$  NAA 的 MS 培养基上观察到最大程度的愈伤组织诱导。

[0151] 实施例 11

[0152] 对 4 种细胞分裂素:苄基腺嘌呤(BA)、细胞分裂素(kinetin)、噻苯隆(TDZ)和 2-iP,测试它们在 SH、MS 和 N6 三种不同的基础培养基上由 *L. gibba* G3 叶诱导愈伤组织形成的能力。

[0153] 在实验之前,使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23℃ 培养 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。为了诱导愈伤组织,测试 3 种基础培养基:Murashige 和 Skoog、Schenk 和 Hildebrandt 和 N6。使用 2,4-D 作为生长素,其浓度为  $20 \mu\text{M}$ 。所用的细胞分裂素的浓度为 0、0.05、0.1、0.5、1 和  $5 \mu\text{M}$ 。对于每种培养基的剂量反应实验,制备含有 2,4-D 的 2400ml 基础培养基,并将 pH 调至 5.8。将体积等分为 24 个 100ml 的等份。向每个这些等份,加入适量的细胞分裂素,并将培养基调至 0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂。将培养基于 121℃ 高压灭菌 30 分钟,冷却,并且每个 100ml 的等份注入 4 个 100mm×15mm 培养皿中。

[0154] 使用 3 种培养基 × 4 种细胞分裂素 × 6 个浓度组合的 72 种处理的随机剂量反应实验设计。设计重复 2 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 5 片叶。为了诱导愈伤组织,将 5 个单独的浮萍叶背轴面向下置于每个培养基平板上。将平板于 23℃ 培养 5 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。5 周后,测量由每种原始叶产生的浮萍组织的鲜重,并且目视检查这些组织群体的诱导的愈伤组织数和产生的愈伤组织类型。

[0155] 在结果中见到许多倾向。在所有处理中,由于  $20 \mu\text{M}$  2,4-D 的浓度太高,所以没有发生叶的增生。在所有处理中叶卷曲均明显。MS 和 N6 显示出愈伤组织诱导,而 MS 明显更出色。在 SH 培养基上没有发生愈伤组织诱导。在范围广泛的浓度下,TDZ 在 MS 培养基上产生最大频率的愈伤组织诱导。在 I 型和 II 型愈伤组织诱导之间存在消长关系。当 I 型愈伤组织诱导高时,II 型愈伤组织的诱导低。

[0156] 实施例 12

[0157] 因为青萍的品系 8744 和 8627 比 *L. gibbba* 品系表现出更大的愈伤组织诱导和更快的愈伤组织增生(参见实施例 9 和表 I),所以对于青萍进行了培养条件的进一步优化。所测试的用于愈伤组诱导的变量包括:a) 筛选基础培养基的组成,b) 生长素类型和浓度的筛选,和 c) 细胞分裂素的类型和浓度筛选。

[0158] 在基础培养基的筛选中,测试三种培养基:Schenk 和 Hildebrandt、Murashige 和 Skoog 以及 Frick 开发的 F 培养基(Frick, (1991) *J. Plant Physiol.* 137:397-401)。用于这些实验的原种叶在使用之前,在补充  $24 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  2iP 的 F 培养基上培养 2 周。按实施例 8 制备愈伤组织诱导培养基。分离叶,切除根,在置于愈伤组织诱导培养基之前,将迫使一半叶通过过滤器(按照 Frick 的方法),将一半叶整个放置。这些叶在实施例 8 中给出的条件下培养 6 周,此时评价培养物愈伤组织诱导的存在与否、愈伤组织增生的程度和愈伤组织的基本形态。

[0159] Murashige 和 Skoog 培养基表现出对青萍的愈伤组织诱导最好。Schenk 和 Hildebrandt 培养基不能产生愈伤组织,而在 F 培养基上愈伤组织的诱导最小。在放置之前迫使叶通过筛网,对愈伤组织诱导没有作用。

[0160] 在生长素类型和浓度的实验中,测试了 2,4-D、NAA、IBA 和麦草畏四种生长素,每种生长素四种浓度:2、5、10 和  $20 \mu\text{M}$ ,测试它们由青萍品系 8744 和 8627 诱导愈伤组织形成的能力。所用的基础培养基是 MS,培养基和实验方案是基本上按照实施例 10 的培养基和方案。将该实验中所用的叶在置于愈伤组织诱导培养基之前,在 3 种不同的培养条件下培养 2 周:1) 无植物生长调节剂的 SH 培养基,2) 含有  $24 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  2-iP 的 F 培养基,和 3) 含有  $24 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  2-iP 的 SH 培养基。分离叶,切除根,然后置于诱导培养基上。这些叶在实施例 8 中给出的条件下培养 6 周,此时评价培养物愈伤组织诱导的存在与否、愈伤组织增生的程度和存在的愈伤组织的基本形态。

[0161] 在诱导生长素或者是 NAA 或者是 IBA 的任何处理中,均未观察到愈伤组织诱导。对于品系 8744,在或者  $5 \mu\text{M}$  或者  $10 \mu\text{M}$  浓度的 2,4-D 处理中,观察到大量的愈伤组织诱导, $5 \mu\text{M}$  2,4-D 产生的诱导最好。在最高的麦草畏浓度  $20 \mu\text{M}$  下,也观察到愈伤组织诱导。对于青萍品系 8627,在 2,4-D 和麦草畏上也观察的愈伤组织诱导,但是浓度较低。对于 2,4-D,最大量的愈伤组织诱导在 1 和  $5 \mu\text{M}$  下观察到, $5 \mu\text{M}$  下产生的诱导最好。麦草畏对于愈伤组织诱导的有用的浓度是 5 和  $10 \mu\text{M}$ 。愈伤组织的形成仅来自先前在无植物生产调节剂的 Shenk 和 Hildebrandt 培养基上培养的叶,与愈伤组织诱导处理无关。

[0162] 在细胞分裂素类型和浓度的实验中,测试了 BA、细胞分裂素、2-iP 和噻苯隆四种细胞分裂素,每种测试 5 种浓度:0.05、0.1、0.5、1 和  $5 \mu\text{M}$ ,测试它们由青萍品系 8744 和 8627 诱导愈伤组织形成的能力。所用的基础培养基是 MS,培养基和实验方案是基本上按照实施例 11 的培养基和方案。将该实验中所用的叶在置于愈伤组织诱导培养基之前,在 3 种

不同的培养条件下培养 2 周:1) 无植物生长调节剂的 SH 培养基,2) 含有  $24\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  2-iP 的 F 培养基,和 3) 含有  $24\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  2-iP 的 SH 培养基。分离叶,切除根,然后置于诱导培养基上。这些叶在实施例 8 中给出的条件下培养 6 周,此时评价培养物愈伤组织诱导的存在与否、愈伤组织增生的程度和愈伤组织的基本形态。

[0163] 对于品系 8744,用或者  $0.5\mu\text{M}$  或者  $1\mu\text{M}$  的或者 2-iP 或者噻苯隆,观察到大量的愈伤组织诱导。只有在放置于愈伤组织诱导培养基之前在 F 培养基上培养的叶,才观察到愈伤组织诱导。对于青萍品系 8627,用或者 2-iP 或者噻苯隆观察到愈伤组织诱导,但其浓度较低,为或者  $0.1\mu\text{M}$  或者  $0.5\mu\text{M}$ 。在该品系中,用  $0.5\mu\text{M}$  和  $1\mu\text{M}$  的 BA,也观察到愈伤组织诱导。

[0164] 实施例 13

[0165] 用青萍的品系 8627 和 8744,测试基础培养基组成对愈伤组织增生和长期建立的作用。

[0166] 测试 MS、F 培养基和半强度 SH 三种基础培养基组成维持健康的愈伤组织生长的能力。所有培养基均含有 3% 蔗糖,并用 0.4% Didco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 凝胶化。MS 培养基补充  $1\mu\text{M}$  2,4-D、 $2\mu\text{M}$  BA;半强度 SH 培养基补充  $1\mu\text{M}$  BA;而 F 培养基补充  $9\mu\text{M}$  2,4-D 和  $1\mu\text{M}$  2-iP。在如实施例 12 中的先前的愈伤组织诱导培养基上来自增生的品系 8744 和品系 8627 的愈伤组织培养物,均用于该实验。将愈伤组织培养 2 周的传代培养时期,并记录其生长、颜色和一般健康状况。

[0167] 对于青萍品系 8744,补充  $1\mu\text{M}$  BA 的半强度 SH 证明对于维持愈伤组织生长和健康状况最好,产生的愈伤组织显示出多个区的组构化和异常的叶再生。在该培养基上也存在颜色由绿色至淡黄色的多个区域。在 MS 或 F 培养基上培养愈伤组织,导致非常快的增生,鲜重每 6 天增加 1 倍。在这两种培养基上增生的愈伤组织表现出相当少的组构化和叶再生。对于品系 8627,基础培养基几乎没有影响,在所有 3 种培养基上愈伤组织的增生同样好。关于品系 8744,当在补充  $1\mu\text{M}$  的半强度 SH 培养基上生长时,愈伤组织表现出更多的组构化。

[0168] 实施例 14

[0169] 因为青萍比 *Lemna gibbba* 表现出更大的愈伤组织诱导,对另外三种青萍品系进行另一筛选(它们的叶生长速率和蛋白含量均优越),以确定用于由青萍品系 8744 和 8627 诱导愈伤组织的方案否可外推至这些新的品系。所述品系命名为青萍品系 7501、8626 和 8745。

[0170] 按照前述实施例中开发的愈伤组织诱导系统:补充 3% 蔗糖、 $5\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  BA 并用 0.4% Didco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 凝胶化的 Murashige 和 Skoog 基础培养基,用于愈伤组织诱导。在置于愈伤组织诱导培养基之前,在缺乏植株生长调节剂并补充 1% 蔗糖的液体 SH 培养基上培养叶。将叶置于愈伤组织诱导培养基上,并记录 5 周后愈伤组织诱导的相对频率和愈伤组织增生的相对速率。

[0171] 对于品系 8626 和 8745,在 5 周诱导期间没有发生愈伤组织诱导,然而,后续的培养确实产生低频率的愈伤组织增生。来自品系 8626 和 8745 的愈伤组织的形态和颜色,与由 8744 和 8627 增生的愈伤组织相当相似,并且当转移至愈伤组织维持培养基时增生相当好。品系 7501 显示出低频率的愈伤组织诱导,在形态方面愈伤组织与由品系 8626 和 8745 产生的愈伤组织的相似。

**[0172] 实施例 15**

**[0173]** 因为在第一次筛选中, *Lemna minuscula* 表现出相当大的愈伤组织诱导(参见实施例 9), 所以用 *Lemna minuscula* 品系 6600 和 6747 重复愈伤组织诱导。制备愈伤组织诱导培养基, 并按实施例 14 中所述培养叶。

**[0174]** *Lemna minuscula* 品系 6600 和 6747 均显示出非常高频率的愈伤组织诱导, 事实上从每片叶均增生愈伤组织。在这些品系中愈伤组织起始快速, 在平板接种后 2-3 周第一次观察到愈伤组织。愈伤组织的颜色为苍白色, 增殖比由青萍品系 8744 或 8626 产生的愈伤组织慢(参见实施例 14)。

**[0175] 实施例 16**

**[0176]** 根据前述实施例中所述的研究, 用于浮萍属中愈伤组织诱导和生产的优选方法如下。

**[0177]** 通过在合适培养基上培养, 并在特定的发育阶段操纵植物生长调节剂类型和浓度, 以促进愈伤组织形成、生长和再生为完全分化的植株, 完成了由浮萍植株进行的愈伤组织诱导、生长和叶再生。通常, 对于浮萍属内的种, 用于愈伤组织诱导的优选培养基是 N6 和 MS, 更优选 MS。在一种生长素和一种细胞分裂素存在下培养叶, 优选的生长素是 NAA 和 2, 4-D, 优选的细胞分裂素是 BA 和 TDZ。这些植物生长调节剂的浓度的变化范围宽。对于生长素, 优选的浓度为 5-20  $\mu\text{M}$ , 最优选 5-10  $\mu\text{M}$ , 对于细胞分裂素, 优选的浓度为 0.5-5  $\mu\text{M}$ , 最优选 0.5-1  $\mu\text{M}$ 。在含有两种植物生长调节剂的培养基上将叶培养 3-5 周的诱导时间, 在此期间愈伤组织增生。

**[0178]** 对于愈伤组织的生长, 优选的培养基如用于愈伤组织诱导的培养基, 但所述生长素的浓度降低。对于生长素, 优选的浓度为 1-5  $\mu\text{M}$ , 对于细胞分裂素, 优选的浓度为 0.5-1  $\mu\text{M}$ 。对于愈伤组织诱导, 传代培养时间也从愈伤组织诱导的 4-5 周减少至长期愈伤组织生长的 2 周。可以在或者用琼脂、Gelrite、或这两者的组合(优选的组合为 0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite) 凝胶化的固体培养基或者在液体培养基上维持愈伤组织的生长。采用该方法, 可以在无限时期内将愈伤组织培养物维持在健康状态。

**[0179] 实施例 17**

**[0180]** 无根萍属内的品系对诱导愈伤组织的植物生长调节剂的浓度反应方式与浮萍属内品系的反应方式相似。因此, 选择无根萍属品系, 进一步研究其增生愈伤组织的能力。

**[0181]** 对于 7246、8853、9000、9006 四个无根萍品系和 7393、7581、7591 和 8319 四个 *Wolffia brasiliensis* 品系, 测试其对植株生长调节剂反应增生愈伤组织的能力。所用的基础培养基是补充 3% 蔗糖、5  $\mu\text{M}$  2, 4-D、BA 和细胞分裂素(kinetin) 各 5  $\mu\text{M}$  和 65  $\mu\text{M}$  苯基硼酸的 MS。平板接种培养物, 并在愈伤组织诱导培养基上培养 5 周, 然后记录愈伤组织的增生。

**[0182]** 在 5 周培养期间, 由任何测试的品系均未获得愈伤组织增生。然而, 愈伤组织诱导前的形态容易出现在几个品系中, 包括无根萍 8853、9000、9006 和 *Wolffia brasiliensis* 7581。这些品系的叶增厚明显, 这是在愈伤组织形成明显之前在叶中常常观察到的一种反应, 表明所用的生长素浓度不足以支持愈伤组织增生。

**[0183]** 转化: 该小节包括涉及用于实际的基因转移方法的实验。有三个部分:(1) 用基因枪转化叶, (2) 用浮萍叶进行农杆菌介导的转化, 和 (3) 用浮萍愈伤组织进行的农杆菌介导

的转化。叶转化实验用来优化影响实际基因转移的参数:(a) 细菌的生长,(b) 乙酰丁香酮的包含,(c) 细菌浓度,(d) 重新悬浮细菌的溶液和渗透压休克的作用,(e) 用于叶和愈伤组织的协同培养培养基,(f) 接种的时间长短,(g) 叶和愈伤组织的协同培养时间,和(h) 协同培养期间的条件。用叶开发的方案适用于转化采用优化组织培养步骤获得的愈伤组织培养物。正是采用这种转化的愈伤组织,来进行选择,然后通过再生以获得转化的叶。

[0184] 基因枪介导的转化:

[0185] 实施例 18

[0186] 使 *Lemna gibba* G3 的叶经过微载体轰击,以测试其表达外源基因构成物的能力。

[0187] 对于叶的增生,制备 60ml 补充 3%蔗糖和 0.8%琼脂的高盐培养基(De Fossard, TISSUE CULTURE FOR PLANT PROPAGATORS 132-52(1976)),将其 pH 调至 5.8,于 121°C 高压灭菌 20 分钟,冷却,用来倒 6 个 60mm×15mm 培养皿。每个培养皿接种一片叶。于 23°C 将叶培养 2 周,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。

[0188] 对于轰击,制备 1.6  $\mu\text{m}$  金微载体,按照生产商(Bio-Rad)的基因枪方案,在该微载体上沉淀来自质粒 pRT99 的 DNA。质粒 pRT99(Topfer 等, Nucleic Acid Res. 16, 8725(1988)) 编码新霉素磷酸转移酶基因和  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因(GUS; Jefferson 等, EMBO J. 6, 3901(1987)),这两种基因均在 CaMV35S 启动子的控制之下。

[0189] 将浮萍叶背轴面向上,用 DNA 包被的微载体以四个氦压力水平轰击:800、600 和 400lbs/平方英寸。轰击后 24 小时,按照 Stomp 的方法(Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114(S. R. Gallagher 编辑 1991)),用 5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\beta$ -D-葡糖醛酸(X-gluc)作为底物,进行 GUS 活性的组织化学染色。GUS 阳性染色中心的频率与用于轰击的压力成正比,在 800psi 处理中发现最大数目的表达 GUS 的细胞,频率范围为 4-20 个染色细胞/叶。在所有处理中,轰击导致一半以上的叶破坏。

[0190] 实施例 19

[0191] 使 *Lemna gibba* G3 的叶经过微弹轰击,以测试微载体大小对外源基因表达频率的影响。

[0192] 对于叶的增生,制备 200ml 补充 3%蔗糖和 0.8%琼脂的高盐培养基,将其 pH 调至 5.8,于 121°C 高压灭菌 20 分钟,冷却,用来倒 20 个 60mm×15mm 培养皿。每个培养皿接种一片叶。所有叶均于 23°C 培养 2 周,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。在 400、800 和 1200psi 3 个氦压力下,用 DuPont 制造的 PDS-100/He 基因枪,测试 1.0 和 1.6  $\mu\text{m}$  两种微载体大小。制备金微载体,按照生产商(Bio-Rad)提供的方法,在该微载体上沉淀 pRT99DNA。

[0193] 轰击后 24 小时,按照 Stomp 的组织化学染色方法(Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114(S. R. Gallagher 编辑 1991)),分析轰击的浮萍叶的 GUS 表达。在用 1.6  $\mu\text{m}$  微载体和 800psi 氦压力下,发现 GUS 表达频率最大。GUS 阳性事件的数目范围为每片叶 1-21 个。

[0194] 实施例 20

[0195] 由通过弹道轰击转化的浮萍愈伤组织,再生转基因浮萍植株。如以下实施例 42 中所述,培养 I 型愈伤组织培养物。通常,在 MS 培养基(实施例 42 中所述的 MS 培养基)上的

轰击面上,均匀铺上 20-30 个直径约 2-4mm 的浮萍愈伤组织块。使用实施例 18 和实施例 19 所述的金粒子(直径为 1.6  $\mu$ M)和轰击(800psi 的氩压力)。用于轰击的 DNA 由一种表达质粒组成,该表达质粒含有目的基因(例如 GUS、另一标记基因、编码哺乳动物蛋白的一种基因或编码细菌、真菌、植物或哺乳动物酶的一种基因)和编码一种选择标记基因的基因(例如 nptII(卡那霉素抗性)、hptII(潮霉素抗性)、sh ble(zoecin 抗性)和 bar(膦丝菌素抗性))以及基因表达所必需的其它序列(例如启动子序列、终止序列)。在 800lbs/平方英寸下轰击后,愈伤组织在黑暗中培养 2 周(或如果需要,使用较长时间),然后在 3-5  $\mu$ mol/ $m^2 \cdot sec$  的光强下培养 4-6 周。每 2 周将愈伤组织转移至新鲜培养基上,轰击 2-4 周后,向培养基加入选择剂。抗性愈伤组织的选择继续进行 8-16 周,直至产生完全抗性的愈伤组织。按实施例 42 中所述,进行转基因叶和植株的再生。用浮萍叶以农杆菌进行转化:

[0196] 实施例 21

[0197] 采用两种不同的协同培养的培养基 -Schenk 和 Hildebrandt 培养基和 Murashige 和 Skoog 培养基,用 *Lemna gibba* G3 的浮萍叶测试浮萍对根癌农杆菌的敏感性。

[0198] 使用根癌农杆菌菌株 AT656 和无毒力的根癌农杆菌菌株 A136,接种浮萍叶。菌株 AT656 由菌株 EHA105(Hood 等, Transgenic Res. 2, 208(1993)) 构建,菌株 AT656 在解除武装的 pTiBo542 质粒上含有 pTiBo542 vir 区。在双质粒 pCNL56(Li 等, Pl. Mol. Biol. 20B, 1037(1992)) 携带该 T-DNA。该双质粒衍生自 pBIN19 并经修饰,携带在胭脂碱合成酶启动子和胭脂碱合成酶终止子控制下的新霉素磷酸转移酶基因和在 mas2' -CaMV35S 启动子和章鱼碱合成酶终止子控制下的  $\beta$ -葡糖醛酸酶(GUS)基因(Janssen 和 Gardner, Plant Mol. Biol. 14, 61(1989))。GUS 编码区在该基因的编码序列内含有一个内含子,以防止 GUS 的细菌表达(Vancanneyt 等, Mol. Gen. Genet. 220, 245(1990))。菌株 A136 衍生自广泛宿主范围的菌株 C58。当 C58 在高于 30°C 的温度下生长时,丧失其 Ti 质粒,变为无毒力的 A136。这两种菌株 AT656 和 A136 于 28°C 在 AB 基本培养基(Chilton 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3672(1974)) 上生长过夜,该基本培养基用 1.6% 琼脂固化,并补充 100  $\mu$ M 乙酰丁香酮。

[0199] 在实验之前,使浮萍叶在含有 3% 蔗糖的液体 Hoagland 培养基中于 23°C 生长 2 周,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/ $m^2 \cdot sec$ 。对于协同培养,制备 500ml 含有 1% 蔗糖和 0.6% 琼脂的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。也制备含有 3% 蔗糖和 0.6% 琼脂的 Murashige 和 Skoog 培养基,将 pH 调至 5.8,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。向这两种培养基中,加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,使最终的培养基浓度为 20mg/L。每种冷却的培养基倒 20 个 100mm $\times$ 15mm 培养皿。对于每种细菌菌株,在使用之前至少 1 小时,将来自一个 100mm $\times$ 15mm 培养皿的细菌在 100ml 以下溶液(Hiei 等, The Plant J. 6, 271(1994)) 中重新悬浮:Gamborg B5 盐、Murashige 和 Skoog 维生素、甘氨酸(8mg/L)、天冬氨酸(266mg/L)、精氨酸(174mg/L)、谷氨酰胺(876mg/L)、酪蛋白氨基酸(500mg/L)、蔗糖(6.85%)、葡萄糖(3.6%)和乙酰丁香酮(20mg/L)。制备该溶液,将 pH 调至 5.8,在加入细菌之前过滤除菌。

[0200] 使用 2 种细菌菌株  $\times$  2 种协同培养培养基的全阶乘实验设计(总共 4 种处理),每个设计重复 5 次,每次重复有 2 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。对于接种,将浮萍叶浮于细菌溶液中数分钟。对于协同培养,将叶转移至如上所述的或者 Schenk 和 Hildebrandt 培养基或者 Murashige 和 Skoog 培养基上。将叶于 23°C 下培养 4 天,光周期为 16hr 光/8hr 黑

暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。然后将叶转移至新鲜培养基上,该新鲜培养基除缺乏乙酰丁香酮并且向该培养基中加入  $500\text{mg}/\text{L}$  替卡西林-克拉维酸和  $50\text{mg}/\text{L}$  硫酸卡那霉素外,组成相同。

[0201] 用按照 Stomp 等的方法 (Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114 (S. R. Gallagher 编辑 1991)) 的 GUS 活性的组织化学染色,证实叶中的基因转移。进行接种 A136 的叶的染色,作为测试细菌接种的叶的内源 GUS 活性的对照。在接种后 10 天进行的染色表明,在 A136 接种的对照中无 GUS 染色,而在接种 AT656 的叶中染色频率高,与用于协同培养的哪种基础培养基 -MS 或 SH 无关。观察到转化频率高于原始接种叶的 70%,表明在这些叶中某处有 GUS 阳性细胞。

[0202] 实施例 22

[0203] 采用 *Lemna gibba* G3 的叶,测定创伤对协同培养后 GUS 表达频率的影响。

[0204] 在实验之前,使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于  $23^\circ\text{C}$  生长 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养,制备 1 升含有 3% 蔗糖、0.6% 琼脂、 $20 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA 和  $20\text{mg}/\text{L}$  乙酰丁香酮的 Murashige 和 Skoog 培养基,将 pH 调至 5.8,于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,最终的培养基浓度为  $20\text{mg}/\text{L}$ 。由该冷却的培养基倒 40 个  $100\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿。

[0205] 对于接种,使用根癌农杆菌菌株 AT656,将其于  $28^\circ\text{C}$  在含有  $50\text{mg}/\text{L}$  硫酸卡那霉素和  $20\text{mg}/\text{L}$  乙酰丁香酮的 AB 基本培养基 (Chilton 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3672 (1974)) 上生长过夜。按实施例 21 中所述,重新悬浮来自一个  $100\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿的细菌,用于接种。

[0206] 使用 2 种创伤处理  $\times$  2 种细菌接种的全阶乘实验设计 (总共 4 种处理),每个设计重复 5 次,每次重复有 2 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。对于创伤处理,从 SH 培养基上取出数丛浮萍叶,置于潮湿的无菌滤纸上。将各丛浮萍叶分为单片叶,将叶背轴面向上,以两种方式之一对叶制造创伤:1) 横向跨叶中心切割,由此切口从左至右通过相邻的分生组织区,或 2) 在中心的二边切割,由此切口纵向通过每个分生组织区。对于细菌处理,将两类创伤的叶浮于:1) 重新悬浮的 AT656 中或 2) 无细菌的重新悬浮流体中。对于接种,将叶保持飘浮 10-30 分钟。

[0207] 对于协同培养,将叶转移至如上所述的含有 3% 蔗糖、 $20 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA 和  $100 \mu\text{M}$  乙酰丁香酮和 0.6% 琼脂的 Murashige 和 Skoog 培养基上。将叶于  $23^\circ\text{C}$  下培养 4 天,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。按照 Stomp 等的方法 (Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114 (S. R. Gallagher 编辑 1991)),将叶亚样品染色检测 GUS。接种后 4 天协同培养的叶的染色表明,创伤的方向不影响叶的 GUS 染色频率,其平均值为约 70%。用无细菌的细菌重悬浮溶液接种的创伤的叶,即对照,没有显示出 GUS 染色。分生组织区内染色的叶数平均约为 40%。

[0208] 实施例 23

[0209] 采用 *Lemna gibba* G3 的叶,测定创伤叶在细菌悬浮培养基中接种的时间对协同培养后 GUS 表达频率的影响。

[0210] 在实验之前,在 125ml 烧瓶中的 25ml 培养基中,使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体

Hoagland 培养基中于 23℃ 生长至叶密度约为 120 片叶, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养, 制备 1500ml 含有 1% 蔗糖和 0.6% 琼脂的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基, 将 pH 调至 5.6, 于 121℃ 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液, 最终的培养基浓度为 20mg/L。由该冷却的培养基倒 60 个 100mm×15mm 培养皿。

[0211] 使用具有 4 种接种时间处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 3 次, 每次重复有 5 个培养皿, 每个培养皿 25 片叶。对于接种, 使用根癌农杆菌菌株 AT656, 将其于 28℃ 在含有 50mg/L 硫酸卡那霉素和 20mg/L 乙酰丁香酮的 AB 基本培养基上生长过夜。按实施例 21 中所述, 重新悬浮来自一个 100mm×15mm 培养皿的细菌, 用于接种。

[0212] 为了接种, 从丛中分离出单片叶, 将每片叶背轴面向上, 用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤, 然后转移至细菌悬液, 温育 15、30、45 或 60 分钟。对于协同培养, 将叶转移至如上所述的 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上。将所有 60 个平板均于 23℃ 下培养 6 天, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。在 4 天时间内进行 3 次重复。在协同培养后 2、3 和 6 天, 取来自每个接种时间 (15、30、45 或 60 分钟) 的协同培养叶的亚样品。按照 Stomp 等的方法 (Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUSPROTOCOLS 103-114 (S. R. Gallagher 编辑 1991)), 将亚样品叶染色检测 GUS 表达。在表 II 中给出了结果。

[0213] 表 II

[0214] 协同培养时间	接种时间	重复次数	总叶数	染色数
[0215] 2天	15	1	27	27
[0216]	30	1	27	27
[0217]	45	1	28	26
[0218]	60	1	28	26
[0219] 3天	15	2	30	29
[0220]	30	2	28	28
[0221]	45	2	25	24
[0222]	60	2	27	26
[0223] 6天	15	3	27	24
[0224]	30	3	26	22
[0225]	45	3	23	21
[0226]	60	3	30	28

[0227] 尽管在 2 天时创伤的茎端上明显有 GUS 染色, 但分生组织区内的染色在协同培养 2 天时不明显。在 3 天的协同培养时分生组织染色最大, 至协同培养 6 天时下降。浮萍叶在细菌重悬浮溶液中的接种时间确实对协同培养后总的 GUS 表达频率无显著影响。

[0228] 实施例 24

[0229] 采用 *Lemna gibba* G3 的叶, 测定农杆菌菌株和外源基因构成物对协同培养后 GUS 表达频率的影响。

[0230] 使用两种根癌农杆菌菌株: AT656 和 C58sZ707pBI121。C58sZ707pBI121 是一种解除武装的广泛宿主范围的、其中已经转移了 pBI121 的 C58 菌株 (Hepburn 等, J. Gen. Microbiol. 131, 2961 (1985))。双质粒 pBI121 衍生自 pBIN19, 其 T-DNA 编码在胭脂碱合成酶启动子和胭脂碱合成酶终止子控制下的新霉素磷酸转移酶基因和在 CaMV35S 启动子和

章鱼碱合成酶终止子控制下的  $\beta$ -葡糖醛酸酶 (GUS) 基因。将 AT656 在含有 50mg/L 硫酸卡那霉素的 AB 基本培养基上划线接种, 将 C58sZ707pBI121 在含有 500mg/L 链霉素、50mg/L 壮观霉素和 50mg/L 硫酸卡那霉素的 AB 基本培养基上划线接种。这两种细菌菌株均于 28°C 下培养过夜。

[0231] 在实验之前, 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖的液体 Hoagland 培养基中于 23°C 生长 4 周, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养, 制备 500ml 含有 1% 蔗糖和 0.6% 琼脂的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基, 将 pH 调至 5.6, 于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液, 最终的培养基浓度为 20mg/L。由该冷却的培养基倒 20 个 100mm×15mm 培养皿。

[0232] 使用 2 种细菌菌株处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 2 次, 每次重复有 5 个培养皿, 每个培养皿 25 片叶。按实施例 21 所述, 每个菌种都重新悬浮来自一个 AB 平板的细菌, 用于接种。

[0233] 为了接种, 从丛中分离出单片叶, 将每片叶背轴面向上, 用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤, 然后转移至细菌悬液, 温育 15-30 分钟。对于协同培养, 将叶转移至如上所述的 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上。将所有 20 个平板均于 23°C 下培养 6 天, 光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗, 光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。在协同培养后 6 天时, 取叶的亚样品, 并染色检测 GUS 表达。用 AT656, 在取样的 13 个浮萍叶丛中的 12 个显示出 GUS 染色, 然而在分生组织区中没有观察到染色。用 C58sZ707pBI121, 所有的浮萍叶丛均显示出广泛的染色。

[0234] 对于所有其余叶, 在转移至含有硫酸那霉素的新鲜培养基后, 继续培养 1 周。对于协同培养后的转移, 制备含有 1% 蔗糖和 0.6% 琼脂的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基, 将 pH 调至 5.6, 于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。将替卡西林克拉维酸和硫酸卡那霉素两种抗生素以过滤除菌溶液, 加入冷却的培养基中, 最终的培养基浓度分别为 500mg/L 和 2mg/L。用冷却的培养基倒 60 个 100mm×15mm 培养皿。

[0235] 1 周后, 记录叶在卡那霉素上的生长和 GUS 表达。增生的叶表现出对卡那霉素的 3 类反应: (1) 由原始的与细菌菌株 AT656 协同培养产生的叶的约 20%, 在卡那霉素存在下表现出旺盛的生长, 而由原始的与细菌菌株 C58sZ707pBI121 协同培养产生的叶的约 30%, 在卡那霉素存在下表现出旺盛的生长, (2) 另一组叶明显地没有增生, 叶绿素褪色并趋于死亡, (3) 中间一组叶在卡那霉素存在下表现出一些增生, 但叶半褪色, 表明对卡那霉素敏感。GUS 染色的结果表明, 在原始的协同培养叶中, 活性酶仍以高频率存在。

[0236] 实施例 25

[0237] 采用 *Lemna gibba* G3 的叶, 测定农杆菌菌株、外源基因构成物和叶的预处理对协同培养后 GUS 表达频率的影响。

[0238] 使用两种根癌农杆菌菌株: AT656 和 EHA101pJR1。EHA101pJR1 是一种二元根癌农杆菌菌株, 它含有一种解除武装的 pTiBo542 质粒和一种小双质粒, pTiBo542 质粒含有野生型菌株 Bo542 的超毒性区, 而所述小双质粒具有在醇脱氢酶 1 增强的 CaMV35S 启动子控制下的潮霉素磷酸转移酶基因和如在 AT656 中构建的一个  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因。将这两种菌株在含有 50mg/L 卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上划线接种, 并于 28°C 培养过夜。

[0239] 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖、含有或不含有  $10 \mu\text{M}$  吲哚乙酸 (IAA) 的液体 Schenk 和

Hildebrandt 培养基中生长,该浓度的吲哚乙酸足以提高增生速率。使叶在 125ml 烧瓶中 25ml 等份的培养基中于 23℃ 生长,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养,制备 500ml 含有 1% 蔗糖、0.8% 琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮以及含有或不含有  $10 \mu\text{M}$  吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121℃ 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液以及乙酰丁香酮和吲哚乙酸的溶液,至合适的终浓度。由该冷却的培养基倒 20 个 100mm×15mm 培养皿。

[0240] 使用 2 种细菌菌株处理 ×2 种叶生长培养基的随机区组实验设计,每个设计重复 5 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。按实施例 21 所述,分别重新悬浮每种菌株的细菌,用于接种。为了接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤,然后转移至或者 AT656 或者 EHA101pJR1d 细菌悬液,温育 10-15 分钟。对于协同培养,将叶背轴面向下转移至如上所述含有 1% 蔗糖、0.8% 琼脂和  $100 \mu\text{M}$  乙酰丁香酮以及含有或不含有  $10 \mu\text{M}$  吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基。

[0241] 将叶于 23℃ 下协同培养 4 天,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。将来自 4 种处理中每种的两个平板的叶染色以检查 GUS 表达。表 III 显示了 GUS 染色的结果。

[0242] 表 III

[0243] 培养基	菌株	总叶数	总染色数
[0244] SH	AT656	61	12
[0245] SH	EHA101pJR1	62	4
[0246] SH+IAA	AT656	66	32
[0247] SH+IAA	EHA101pJR1	68	2

[0248] 无论 IAA 存在与否,与 EHA101pJR1 协同培养的叶中显示 GUS 表达的叶频率低得多。用含有 IAA 的培养基检测 IAA 在温育培养基中的作用,得到 48% 的协同培养叶显示出 GUS 表达,相比之下在无 IAA 的培养基上协同培养叶的 20% 显示出 GUS 表达。

[0249] 实施例 26

[0250] 采用 *Lemna gibba* G3 的叶与细菌菌株 AT656 协同培养 5 个不同的时间:12.5、18.5、40.5、82 和 112 小时,以测定协同培养时间对协同培养后 GUS 表达的影响。

[0251] 使浮萍叶在含有 1% 蔗糖和  $10 \mu\text{M}$  吲哚乙酸的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23℃ 生长 2 周,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养,制备 750ml 含有 1% 蔗糖、0.8% 琼脂、 $10 \mu\text{M}$  吲哚乙酸和 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121℃ 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮和吲哚乙酸的溶液,至最终的培养基浓度。由该冷却的培养基倒 30 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用细菌菌株 AT656 划线接种,并于 28℃ 生长过夜。

[0252] 使用 5 种培养时间处理的随机区组实验设计,每个设计重复 6 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 60 片叶。按实施例 21 所述重新悬浮细菌,用于接种。为了接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤。然后将叶转移至细菌重悬浮溶液,温育约 10-15 分钟。对于协同培养,将叶背轴面向下转移至如上所述的固体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基。协同培养这些叶,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。

[0253] 在适当的时间,从每个培养皿(6个样品)取出10片叶,进行GUS表达的组织化学染色。表 III 给出了 GUS 染色的结果:

[0254] 表 IV

[0255] 时间(hr)	总叶数	总染色数
[0256] 12.5	61	0
[0257] 18.5	61	0
[0258] 40	61	0
[0259] 82	75	24
[0260] 112	67	25

[0261] 协同培养时间对具有 GUS 表达的叶频率具有显著作用。在 40 小时之前,检测不到 GUS 表达。至 3.5 天(82 小时)时,容易检测到 GUS 表达。较长时间的协同培养不显著提高在浮萍叶中 GUS 表达的频率、强度或组织相关模式。结论是,3.5-4 天是在浮萍叶中得到最大基因转移频率的最短协同培养时间。

[0262] 实施例 27

[0263] 使用在 AB 基本培养基、马铃薯葡萄糖培养基和甘露醇谷氨酰胺 Luria 液体培养基这三种不同的细菌培养基上生长的菌株 AT656 的细菌,来协同培养 *Lemna gibba* G3 的叶,*Lemna gibba* G3 的叶在协同培养之前已经用或不用吲哚乙酸、在光中和黑暗中进行了生长,以测定这些处理对协同培养后 GUS 表达的影响。

[0264] 在 125ml 烧瓶中,使 *Lemna gibba* G3 的叶在 25ml 等份的含有 1%蔗糖和含有或不含有 10  $\mu$ M 吲哚乙酸的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23 $^{\circ}$ C 生长 2 周,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec。对于协同培养,制备 900ml 含有 1%蔗糖、0.8%琼脂、含有或不含有 10  $\mu$ M 吲哚乙酸以及 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮和吲哚乙酸的溶液,至合适的最终培养基浓度。由所述冷却的培养基倒 36 个 100mm $\times$ 15mm 培养皿。制备三种细菌培养基:1) 含有 1.6%琼脂的 AB 基本培养基(AB)、含有 1.6%琼脂的 Difco 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)和含有 1.6%琼脂的甘露醇谷氨酰胺(Roberts 和 Kerr, *Physiol. Plant Path.* 4,81(1974) Luria 液体培养基(MGL;Miller, *EXPERIMENTS IN MOLECULAR GENETICS*433(1972)),于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的硫酸卡那霉素和乙酰丁香酮的溶液,分别至 50mg/L 和 20mg/L 的最终培养基浓度。在这三种培养基上用 AT656 划线接种,并于 28 $^{\circ}$ C 生长过夜。

[0265] 使用 3 种细菌培养基  $\times$  2 种植物培养基  $\times$  2 种光条件处理的全阶乘实验设计(总共 12 种处理),每个设计重复 3 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20-25 片叶。按实施例 21 所述,分别重新悬浮每种培养基的细菌,用于接种。

[0266] 为了接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤。然后将叶转移至细菌重悬浮溶液,温育约 10-15 分钟。接种后,将叶转移至如上所述的固体 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上。协同培养这些叶 4 天,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗、光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec 进行光处理,或者置于完全黑暗中进行黑暗处理。协同培养后,按照 Stomp 等的方法(*Histochemical localization of beta-glucuronidase*,载于 GUS PROTOCOLS 103-114(S. R. Gallagher 编辑 1991)),将所有叶染色以分析 GUS 表达。表 V 给出了 GUS 染色的结果:

[0267] 表 V

[0268]

细菌培养基	植物培养基	光或黑暗	总叶数	总染色数	染色的分生组织数
DPA	SH	D	63	60	5
PDA	SH	L	67	66	8
MGL	SH	D	66	65	7
MGL	SH	L	70	65	9
AB	SH	D	58	58	7
AB	SH	L	62	60	6
DPA	SH + IAA	D	61	61	14
PDA	SH + IAA	L	68	63	14
MGL	SH + IAA	D	62	61	11
MGL	SH + IAA	L	46	39	2
AB	SH + IAA	D	62	61	6
AB	SH + IAA	L	58	53	3

[0269] 细菌培养基对协同培养 4 天后 GUS 表达频率有显著的作用。AB 培养基产生的 GUS 表达频率最低, 而 PDA 产生的 GUS 表达频率最高。在培养之前使叶在吲哚乙酸上生长, 提高了协同培养后 GUS 表达的频率。在未用吲哚乙酸进行生长的叶的处理中, 在协同培养期间存在光不显著影响协同培养后 GUS 表达的频率, 然而, 在所用的叶在吲哚乙酸存在下生长的处理中, 在黑暗中协同培养确实提高 GUS 表达的频率。在含有吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上生长的所有浮萍叶中, 来自 PDA 和 MGL 的平均频率得到在分生组织中约 17% 的 GUS 表达频率。

[0270] 实施例 28

[0271] 检查 6 种协同培养时间和在协同培养期间存在或缺乏光对协同培养后 GUS 表达的影响。

[0272] 使 *Lemna gibba* G3 的叶在含有 1% 蔗糖和 10  $\mu$ M 吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上于 23°C 生长 17 天, 光周期为 16hr 光 / 8hr 黑暗, 光强约为 40  $\mu$  mol / m<sup>2</sup> · sec。对于协同培养, 制备 150ml 含有 1% 蔗糖、1% 琼脂、10  $\mu$  M 吲哚乙酸和 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基, 将 pH 调至 5.6, 于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮和吲哚乙酸的溶液, 至最终培养基浓度。所述培养基用来倒 6 个 100mm × 15mm 培养皿。在含有 50mg/L 硫酸卡那霉素和 200mg/L 乙酰丁香酮的 AB 基本培养基上用根癌农杆菌菌株 AT656 划线接种, 并于 23°C 生长过夜。

[0273] 使用 6 种协同培养时间处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 6 次, 每次重复有 1 个培养皿, 每个培养皿 30 片叶。按实施例 21 所述, 重新悬浮来自一个培养皿的细菌, 用于接种。

[0274] 为了接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤。然后将叶转移至细菌重悬浮溶液温育 10 分钟。为了协同培养,将叶转移至如上所述的 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上。以铝箔包裹三个平板,以实现全黑暗,将平板于 23°C 培养 6 种时间:13、23、36、49、73.5 和 93 小时,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。协同培养合适的时间后,从 6 个平板(3 个样品黑暗和 3 个样品光照)中的每个取 5 片叶,并按照 Stomp 等的方法(Histochemical localization of beta-glucuronidase,载于 GUS PROTOCOLS 103-114(S. R. Gallagher 编辑 1991))进行染色以分析 GUS 表达。

[0275] 结果表明,至协同培养后 23 小时时,GUS 表达变为明显,仅在茎的受损端检测到表达。至 36 小时时,在创伤周围和茎受损端的细胞中检测到染色。总体来说染色更强,然而在黑暗中培养的叶中染色强度的水平更高。至 49 小时时,在黑暗与光处理中,染色强度和染色模式的差异明显。在黑暗中培养的叶染色更强,然而,在光处理和黑暗处理之间,显示 GUS 表达的叶频率和表达 GUS 的分生组织区的频率的差异不显著。至 73.5 小时时,在黑暗处理和光处理之间,染色模式和染色频率没有显著差异,只是在黑暗处理中受伤组织的染色更普遍。至 93 小时(约 4 天)时,检测到表达 GUS 的分生组织区数更多,黑暗处理一定优于光处理。在受伤细胞中仍存在强染色。

[0276] 实施例 29

[0277] 使用 *Lemna gibba* G3 的叶,以测定细菌重悬浮溶液、这些溶液的渗透势和叶创伤对协同培养后 GUS 表达频率的影响。

[0278] 使叶在含有 1%蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23°C 生长,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。对于协同培养,制备 1800ml 含有 1%蔗糖、0.8%未洗涤的琼脂和 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt (SH) 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。向高压灭菌的冷却的培养基加入过滤除菌的热不稳定的乙酰丁香酮溶液。所述冷却的培养基用来倒 72 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的 AB 基本培养基上用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28°C 生长过夜。

[0279] 使用 12 种细菌重悬浮溶液 ×2 种创伤处理的全阶乘实验设计(总共 24 种处理),每个设计重复 3 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。对于 2 种不同的细菌重悬浮溶液:1)Gamborg B5 盐、Murashige 和 Skoog 维生素、甘氨酸(8mg/L)、天冬氨酸(266mg/L)、精氨酸(174mg/L)、谷氨酰胺(876mg/L)、酪蛋白氨基酸(500mg/L)、蔗糖(6.85%)、葡萄糖(3.6%)和乙酰丁香酮(20mg/L),和 2)含有 1%蔗糖的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,每种溶液各具有 5 种不同的甘露醇浓度:0、0.2、0.4、0.6 和 0.8M;测试这 2 种溶液的 10 种组合的基因转移的效力。另外,测试其它两种溶液:3)Gamborg B5 盐、Murashige 和 Skoog 维生素、甘氨酸(8mg/L)、天冬氨酸(266mg/L)、精氨酸(174mg/L)、谷氨酰胺(876mg/L)、酪蛋白氨基酸(500mg/L)和乙酰丁香酮(20mg/L),和 4)含有蔗糖(6.85%)、葡萄糖(3.6%)和乙酰丁香酮(20mg/L)的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基。所有细菌重悬浮溶液在使用之前均过滤除菌。在使用之前至少 1 小时,将来自一个 AB 平板的细菌重悬浮于 100ml 12 种重悬浮溶液中的每一种中。

[0280] 测试在接种之前受伤叶的重要性。对于或者受伤或者未受伤的叶,从丛中分离出

单片叶。对于受伤叶,将叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织区内刺伤。未受伤的叶在分离为单片叶后未接受进一步的处理。

[0281] 对于接种,将 120 片叶,即 60 片受伤叶和 60 片未受伤叶,浮于 12 种细菌重悬浮溶液的每一种上 10 分钟,受伤叶与未受伤叶分别接种。对于协同培养,将叶转移至如上所述的固体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上。所有处理均在黑暗中协同培养 4 天。协同培养 4 天后,随机挑出每种处理的 2 个平板,染色分析 GUS 表达。

[0282] 结果表明,无论是何种培养基,0.6M 甘露醇均产生协同培养后 GUS 表达的最高频率。较简单的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基的配方效果很好,使用 Gamborg B5 盐的更复杂的培养基配方效果也很好。创伤产生显示 GUS 表达的叶频率的可测量、但统计学上不显著的提高,不提高分生组织区中染色的频率。

[0283] 实施例 30

[0284] 使用 *Lemna gibba* G3 的叶,以测定接种期间细菌浓度对协同培养后 GUS 表达的影响。

[0285] 在使用之前,在 125ml 烧瓶中,使浮萍叶在 25ml 等份含有 1%蔗糖和 10  $\mu$  M 吲哚乙酸的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23°C 生长,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$  mol/m<sup>2</sup> · sec。对于协同培养,制备 750ml 含有 1%蔗糖、1%琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮和 10  $\mu$  M 吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮和吲哚乙酸的溶液,以获得最终的培养基浓度。用所述冷却的培养基倒 30 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 1.6% Difco 细菌培养用琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的半强度马铃薯葡萄糖琼脂-甘露醇谷氨酰胺 Luria 肉汤培养基上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28°C 生长过夜。

[0286] 使用 10 种细菌浓度处理的随机区组实验设计,每个设计重复 3 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。按实施例 21 所述重新悬浮来自一个培养皿的细菌,用于接种。该细菌溶液构成“未稀释的”样品,并作为连续稀释制备以下稀释液的起始溶液:1/3、10<sup>-1</sup>、1/33、10<sup>-2</sup>、1/333、10<sup>-3</sup>、1/3333、10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup>。1/3 稀释液的 OD<sub>540nm</sub> 为 1.006,这相当于 1.6×10<sup>9</sup> 细菌/ml。

[0287] 为了接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,并用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤。然后转移至 10 种不同的细菌重悬浮溶液浓度中的每一种,温育约 10-15 分钟。对于协同培养,将叶背轴面向下转移至如上所述的 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基。将叶于 23°C 在黑暗中协同培养 4 天。协同培养后,按照 Stomp 等的方法 (Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114 (S. R. Gallagher 编辑 1991)) 对所有叶进行染色以分析 GUS 表达。

[0288] 结果表明,在所有细菌浓度中,GUS 表达频率变化为 10 倍。在测试的最高细菌浓度下观察到最高的 GUS 表达频率。在高于 10<sup>-3</sup> 的稀释度下,没有检测到 GUS 表达。

[0289] 实施例 31

[0290] 使用 *Lemna gibba* G3 的叶,以采用优化的转化方案测试 4 种协同培养基对 GUS 表达的影响。

[0291] 使叶在含有 1%蔗糖和 10  $\mu$  M 吲哚乙酸的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中于 23°C 生长,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$  mol/m<sup>2</sup> · sec。对于协同培养,使用 4

种培养基:1) 含有  $20 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.1 \mu\text{M}$  BA 的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS) (MS1), 2) 含有  $20 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $1 \mu\text{M}$  BA 的 MS 培养基 (MS2), 3) 含有  $1 \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2 \mu\text{M}$  BA 的 MS 培养基 (MS3), 和 4) Schenk 和 Hilderbrandt 培养基 (SH)。对于每种培养基, 制备 100ml 含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂、含适当植物生长调节剂的培养基, 将 pH 调至 5.6, 于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却。向每种冷却的培养基中加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液, 至 20mg/L 的终浓度。用每种培养基倒 4 个  $100\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上, 用细菌菌株 AT656 划线接种, 并于  $28^\circ\text{C}$  生长过夜。

[0292] 使用 4 种培养基处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 4 次, 每次重复有 1 个培养皿, 每个培养皿 20 片叶。对于接种, 在使用之前 1 小时, 将来自一个培养皿的细菌重悬浮于 100ml 过滤除菌的含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮的 pH5.6SH 培养基中。为了接种, 从丛中分离出单片叶, 将其浮于重悬浮的细菌中 8-10 分钟。对于协同培养, 将叶背轴面向下转移至如上所述的协同培养基 (MS1、MS2、MS3、SH) 上。将叶于  $23^\circ\text{C}$  在黑暗中协同培养 4 天。协同培养后, 对所有叶进行染色以分析 GUS 表达。

[0293] 在所有处理中, 显示 GUS 表达的叶频率范围为 80-90%。协同培养基对该频率没有显著影响。GUS 染色的强度由弱至强。染色与根尖、茎、茎受损端和伤口、分生组织区和叶缘相联系。

[0294] 实施例 32

[0295] 通过操作接种前的叶细胞分裂速率、农杆菌生长的培养基、协同培养参数的优化, 完成用农杆菌的叶转化, 所述协同培养参数包括诸如乙酰丁香酮的次级代谢物、农杆菌的浓度、接种流体的重量摩尔渗透压浓度、协同培养时期的长短和协同培养时期的光强。

[0296] 根据前述实施例中所所述的研究, 叶转化和选择的优选方法如下。通常, 使叶在含有提高叶增生速率的生长素的培养基上生长, 所述生长素优选 NAA、IBA 和 IAA, 优选浓度范围为  $0.2-1 \mu\text{M}$ 。使农杆菌在无丰富营养补充物且包含诸如乙酰丁香酮的次级代谢物的培养基上生长, 优选的培养基是马铃薯葡萄糖琼脂和甘露醇谷氨酰胺 Luria 肉汤。用接种流体的组合物测定转化频率, 优选的流体是补充 0.6M 甘露醇和  $100 \mu\text{M}$  乙酰丁香酮的 MS 或 SH 基础盐。农杆菌悬浮于该接种流体中的浓度, 也影响转化频率, 优选的浓度约为  $1 \times 10^9$  细菌/ml。接种时间可以变化, 优选的时间范围为 2-20 分钟。协同培养时间也影响转化频率, 优选的时间为 3-4 天。在光或黑暗条件下进行协同培养, 优选在黑暗 (例如减弱的光) 中进行。

[0297] 转化叶的生长也取决于优选的条件。MS 和 SH 是优选的培养基。用合适的高浓度 (通常为 100-500mg/L) 的合适抗生素、感染组织的频繁转移、每 2-4 天转移至含有抗生素的新鲜培养基的优选方法, 进行叶的感染农杆菌的去污染。对于 3-6 周的初始静息 / 恢复期, 最好是在低光强下培养, 优选光强范围为  $1-5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。

[0298] 在可变的时间, 最好是在接种后 1-3 周, 可以开始根据在选择剂的存在下生长进行选择。也优选在降低的光水平和低选择剂浓度下的初次选择, 光水平为  $1-5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ , 根据特定选择剂的毒性研究确定适于选择剂的低浓度范围。对于硫酸卡那霉素, 通常的范围为 2-10mg/L。

[0299] 实施例 33

[0300] 用以 *Lemna gibba* G3 开发的转化方案,对来自 10 个浮萍种内的品系的叶:*Lemna trisulca* 7315、青萍 7101、*Lemna japonica* 7427、*Lemna turionifera* 6601、*Lemna gibba* G3、*Lemna valdiviana* 7002、*Lemna aequicitalis* 7001、*Lemna miniscula* 6711、*Lemna obscura* 7325 和 *Spirodela punctata* 7273,测试其在协同培养后得到 GUS 表达的能力。

[0301] 在 125ml 烧瓶中,使 *Lemna gibba* G3 以外的所有浮萍品系在 25ml 等份含有 1% 蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上生长。使 *Lemna gibba* G3 在含有 1% 蔗糖和 10  $\mu$ M 吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上生长。所有浮萍培养物均于 23°C 下培养,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec。对于协同培养,制备 400ml 含有 1% 蔗糖、0.9% 琼脂和 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。向冷却的培养基中加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,以获得最终的培养基浓度。用冷却的培养基倒 10 个 100mm×15mm 培养皿。在与半强度甘露醇谷氨酰胺 Luria 肉汤培养基的半强度马铃薯葡萄糖琼脂(这两种培养基均含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素)上,用根癌农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28°C 生长过夜。

[0302] 使用 10 种浮萍品系处理的随机区组实验设计,每个设计重复 1 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20-25 片叶。按实施例 21 所述,重悬浮来自一个培养皿的细菌。

[0303] 对于接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,用无菌解剖刀在分生组织内制造创伤,将叶转移至细菌悬浮液,温育约 10 分钟。为了协同培养,将叶转移至如上所述的 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上,于 23°C 在黑暗中培养 4 天。

[0304] 协同培养后,将叶染色以分析 GUS 表达。在测试的 10 个品系中,8 个品系显示出 GUS 表达,其模式与 *L. gibba* G3 的模式相同,频率范围为 14-80%。

[0305] 实施例 34

[0306] 采用以 *L. gibba* G3 开发的转化方案,对来自浮萍科 4 个属的 20 个浮萍品系,测试其在与农杆菌菌株 AT656 协同培养后得到 GUS 表达的能力。这 20 个品系是:*Wolffiella lingulata* 品系 8742 和 9137、*Wl. neotropica* 品系 7279 和 8848、*Wl. oblongata* 品系 8031 和 8751、无根萍品系 7246 和 9006、*Wa. australiana* 7317、*Wa. brasiliensis* 品系 7397、7581 和 8919、*Wa. columbiana* 品系 7121 和 7918、*Spirodela intermedia* 7178、紫萍品系 7960 和 8652、*S. punctata* 品系 7488 和 7776 以及 *L. gibba* G3。

[0307] 在实验之前,所有品系均在含有 1% 蔗糖的 pH5.6 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上生长 2 周。对于协同培养,制备 1500ml 含有 1% 蔗糖、0.8% 琼脂和 20mg/L 乙酰丁香酮的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 30 分钟并冷却。向冷却的培养基中加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,以获得最终的培养基浓度。用冷却的培养基倒 60 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用细菌菌株 AT656 划线接种,并于 28°C 生长过夜。为了接种,在使用前至少 1 小时,将来自一个培养皿的细菌重悬浮于在使用前过滤除菌、含有 0.6M 甘露醇、20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。

[0308] 使用 20 种浮萍品系处理的随机区组实验设计,每个设计重复 3 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。对于接种,从丛中分离出紫萍属和 *Wolffiella* 品系和 *L. gibba* G3 的单片叶。对于无根萍属品系,叶以丛进行接种,因为它们的尺寸小,使得单片

叶分离困难。为了进行接种,将每个浮萍品系的叶浮于细菌悬浮溶液中 2-5 分钟。对于协同培养,将叶从细菌溶液转移至如上所述的固体 Schenk 和 Hildebrandt 协同培养基上。对于紫萍属和 *Wolffiella* 品系和 *L. gibba*G3,将 20 片单独的叶转移至 3 个重复培养皿的每个中;对于无根萍属品系,将 20 丛小叶转移至 3 个重复平板的每个上。所有品系均于 23°C 在黑暗中协同培养 4 天。

[0309] 协同培养后,将来自每个品系的 2 个平板染色以分析 GUS 表达。染色结果表明,除一个种外的所有测试种和这些种内的大多数浮萍品系,在协同培养 4 天后均得到某些 GUS 表达。在测试的 4 个无根萍属种中,全部显示出不同频率的 GUS 表达。*Wolffia brasiliensis* 的 3 个品系表现出最高频率的 GUS 表达,范围为 50-75%。在 *Wolffiella* 属内的 6 个品系中,GUS 表达的频率较低,范围为 5-12%。3 个紫萍属种的 2 个种得到 10% 和 35% 的 GUS 表达;第三个没有显示出 GUS 表达。用作阳性对照的 *Lemna gibba* G3 的 GUS 表达频率约为 50%。

[0310] 用愈伤组织培养物进行农杆菌的转化:

[0311] 实施例 35

[0312] 用以 *L. gibba* G3 叶开发的优化转化方案,由 *Lemna gibba* G3 叶产生的 I 型愈伤组织用来测试其产生 GUS 表达的能力,并测试真空渗滤的作用。

[0313] 通过在含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、5  $\mu$ M 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 和 2  $\mu$ M 苄基腺嘌呤 (BA) 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养叶,产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于 23°C 下进行,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup> · sec。愈伤组织诱导 4 周后,在含有浓度减至 1  $\mu$ M 的 2,4-D 的相同培养基上,分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0314] 对于协同培养,制备 400ml 含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、1  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的最终培养基浓度。将冷却的培养基用来倒 16 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28°C 生长过夜。

[0315] 使用 2 种真空渗滤处理的随机区组实验设计,每个设计重复 4 次,每次重复有 2 个培养皿,每个培养皿 10 个愈伤组织块。为了接种,在使用前至少 1 小时,将细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。用和不用真空渗滤进行细菌接种。不用真空渗滤时,将小块的 I 型愈伤组织置于细菌溶液中 10 分钟,然后吸干并转移至如上所述的 MS 协同培养基。用真空渗滤时,将愈伤组织置于细菌溶液中,施加 10 英寸汞的真空 10 分钟,然后将愈伤组织吸干并转移至 MS 协同培养基。所有培养皿在黑暗中于 23°C 进行协同培养。

[0316] 协同培养 4、6 和 9 天后,分别对约 40、20 和 20 块愈伤组织染色以分析 GUS 表达。结果表明,愈伤组织块显示 GUS 表达的频率不随真空渗滤处理而变化,该频率也不随协同培养的时间而变化。在所有时间点不用真空渗滤时,GUS 染色范围为 25-78%,用真空渗滤时,该频率范围为 25-74%。GUS 染色的强度从深蓝色变为浅蓝色,与处理无关。

[0317] 实施例 36

[0318] 测试 4 种不同的协同培养基对与农杆菌菌株 AT656 协同培养后 I 型愈伤组织的 GUS 表达频率的影响。

[0319] 通过在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $5\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶,产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于  $23^{\circ}\text{C}$  下进行,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。愈伤组织诱导 4 周后,在含有浓度减至  $1\mu\text{M}$  的 2,4-D 的相同培养基上,分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0320] 对于协同培养,测试 4 种培养基:含有  $20\mu\text{M}$  2,4-D 和  $0.1\mu\text{M}$  BA 的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS) (MS1)、含有  $20\mu\text{M}$  2,4-D 和  $1\mu\text{M}$  BA 的 MS 培养基 (MS2)、含有  $1\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  BA 的 MS 培养基 (MS2) 和无植物生长调节剂的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基 (SH)。制备 50ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂的每种培养基,将 pH 调至 5.6,于  $121^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却,向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的终浓度。将所述培养基用来倒 24 个  $100\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于  $28^{\circ}\text{C}$  生长过夜。

[0321] 使用 4 种协同培养基处理的随机区组实验设计,每个设计重复 2 次,每次重复有 1 个培养皿,每个培养皿 20 个愈伤组织块。为了接种,在使用前至少 1 小时,将来自一个培养皿细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 SH 培养基中。对于接种,I 型愈伤组织块置于细菌溶液中 8 分钟,吸干,然后转移至 4 种不同的协同培养基上。所有平板均在黑暗于  $23^{\circ}\text{C}$  进行协同培养 4 天。协同培养后,按照 Stomp 等的方法 (Histochemical localization of beta-glucuronidase, 载于 GUS PROTOCOLS 103-114 (S. R. Gallagher 编辑 1991)),将所有愈伤组织染色以分析 GUS 表达。

[0322] 协同培养基对显示出 GUS 表达的愈伤组织块频率没有显著影响。在所有处理中,GUS 表达频率的范围为 70-85%。GUS 表达的强度有变化,染色范围由深蓝色至浅蓝色。

[0323] 实施例 37

[0324] 测试 2 天和 4 天这两种不同的协同培养时间对与农杆菌菌株 AT656 协同培养后 I 型愈伤组织的 GUS 表达频率的影响。

[0325] 通过在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $5\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶,产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于  $23^{\circ}\text{C}$  下进行,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为  $40\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。愈伤组织诱导 4 周后,在含有浓度减至  $1\mu\text{M}$  的 2,4-D 的相同培养基上,分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0326] 对于协同培养,制备 400ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、 $1\mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\mu\text{M}$  BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS),将 pH 调至 5.6,于  $121^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的终浓度。将冷却的培养基用来倒 16 个  $100\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于  $28^{\circ}\text{C}$

生长过夜。

[0327] 使用 2 种协同培养时间处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 2 次, 每次重复有 4 个培养皿, 每个培养皿 10 个愈伤组织块。为了接种, 在使用前至少 1 小时, 将细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。对于接种, I 型愈伤组织块置于细菌溶液中。对于协同培养, 将愈伤组织块吸干, 然后转移至如上所述的 MS 协同培养基。所有平板均在黑暗于 23°C 协同培养或者 2 天或者 4 天。协同培养或者 2 天或者 4 天后, 将所有愈伤组织染色以分析 GUS 表达。

[0328] 结果表明, GUS 表达的频率不随协同培养时间而变化。在所有处理中, GUS 表达频率的范围为 50-70%。GUS 染色的强度的范围由深蓝色至浅蓝色。然而, 在协同培养 4 天后, 存在严重的细菌过度生长, 发现该细菌覆盖物抑制 GUS 染色。

[0329] 实施例 38

[0330] 用不同的基因构成物, 以用另一种农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 测试 I 型愈伤组织协同培养方案的效力。

[0331] 通过在含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、5  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶, 产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于 23°C 下进行, 光周期为 16hr 光 / 8hr 黑暗, 光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup> · sec。愈伤组织诱导 4 周后, 在含有浓度减至 1  $\mu$ M 的 2,4-D 的相同培养基上, 分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上, 直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0332] 对于协同培养, 制备 400ml 含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、1  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS), 将 pH 调至 5.6, 于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液, 至 20mg/L 的终浓度。将冷却的培养基用来倒 16 个 100mm × 15mm 培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮、500mg/L 硫酸链霉素、50mg/L 壮观霉素和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上, 用农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 划线接种, 并于 28°C 生长过夜。

[0333] 使用 1 种细菌菌株处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 4 次, 每次重复有 4 个培养皿, 每个培养皿 10 个愈伤组织块。为了接种, 在使用前至少 1 小时, 将来自一个培养皿的细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。对于接种, I 型愈伤组织块置于细菌溶液中 8-10 分钟。对于协同培养, 将愈伤组织块吸干, 然后转移至如上所述的 MS 协同培养基。所有平板均在黑暗于 23°C 协同培养 2 天。协同培养后, 从每个重复的一个平板选择 2 个愈伤组织块 (总共 8 块), 将其染色以分析 GUS 表达。

[0334] 所有愈伤组织块均显示出 GUS 表达, 范围由深蓝色至浅蓝色。前 2 周将其余的愈伤组织从 MS 协同培养基转移至含有 500mg/L 头孢噻肟的相同 MS 培养基, 此后将这些愈伤组织转移至含有头孢噻肟和羧苄青霉素各 500mg/L 的相同 MS 培养基, 以根除组织的细菌污染物。将所有愈伤组织以 2 周的间隔, 转移至含有头孢噻肟和羧苄青霉素的新鲜 MS 培养基。每次转移时, 将愈伤组织块的亚样品染色以分析 GUS 表达。GUS 表达的频率略有下降, 但仍很高, 70-95% 的愈伤组织块表现出某些 GUS 表达。目视检查抗生素培养基上的愈伤组织, 表明培养 4 周后没有显示出细菌污染物。

**[0335] 实施例 39**

**[0336]** 测试 II 型愈伤组织和 III 型愈伤组织在农杆菌菌株 AT656 存在下协同培养后得到 GUS 表达的能力。

**[0337]** 通过于 23℃ 在含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、30 μM 2,4-D 和 0.02 μM BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶,产生两种愈伤组织类型,培养的光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40 μmol/m<sup>2</sup>·sec。4 周后,从原始叶分离出 II 型愈伤组织和 III 型愈伤组织,并将其转移至含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、10 μM 2,4-D 和 0.01 μM BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基,用于在相同的温度和光条件下维持愈伤组织。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

**[0338]** 在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28℃ 生长过夜。对于协同培养,制备 200ml 含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、10 μM 2,4-D 和 0.02 μM BA 的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS),将 pH 调至 5.6,于 121℃ 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的终浓度。将冷却的培养基用来倒 8 个 100mm×15mm 培养皿。

**[0339]** 使用 2 种愈伤组织类型处理的随机区组实验设计。接种 40 块绿色愈伤组织,均匀转移至 4 个培养皿,也接种 9 块白色愈伤组织,均匀转移至 4 个培养皿。为了接种,在使用前至少 1 小时,将细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。对于接种,将绿色愈伤组织块和白色愈伤组织块浸入细菌溶液中 2-5 分钟。对于协同培养,将愈伤组织块吸干,然后以块转移至如上所述的 MS 协同培养基上。所有愈伤组织均在黑暗中于 23℃ 协同培养 2 天。

**[0340]** 协同培养后,随机挑出所有白色愈伤组织和每个平板的 3 个绿色愈伤组织块,将其染色以分析 GUS 表达。在 9 个白色愈伤组织块中,7 块表现出不同强度的 GUS 表达。在 12 块绿色愈伤组织中,6 块表现出不同强度的 GUS 表达。

**[0341] 实施例 40**

**[0342]** 将从 *Lemna gibba* 的两个不同的快速生长品系 (品系 6861 和 7784) 和青萍的一个品系建立的 I 型愈伤组织与 AT656 协同培养,以测定用 *Lemna gibba* G3 所建立的方法的转化频率。

**[0343]** 在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 AT656 划线接种,并于 28℃ 生长过夜。对于协同培养,制备 200ml 含有 3% 蔗糖、0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂、10 μM 2,4-D 和 0.02 μM BA 的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS),将 pH 调至 5.6,于 121℃ 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的终浓度。将冷却的培养基用来倒 8 个 100mm×15mm 培养皿。

**[0344]** 为了接种,在接种前至少 1 小时,将细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。对于接种,将来自 3 个不同浮萍品系和来自 *L. gibba* G3 (阳性对照) 的约 10-15 块 I 型愈伤组织浸入细菌溶液中 2-5 分钟。对于协同培养,将愈伤组织块吸干,然后以块转移至如上所述的 MS 协同培养基的两

个平板（对于每个浮萍品系）。所有愈伤组织均在黑暗中于 23℃ 协同培养 2 天。

[0345] 协同培养后,随机挑出 2 个 *Lemna gibba* 品系的所有愈伤组织块和来自青萍品系的 3 块愈伤组织,将其染色以分析 GUS 表达。在协同培养后 2 周,所有愈伤组织块均显示出 GUS 染色细胞的多个小点,这与成功转化一致。

[0346] 用叶的选择:

[0347] 实施例 41

[0348] 用 *Lemna gibba* G3 的叶,测试三种协同培养基对表达 GUS 并在卡那霉素选择培养基上生长的叶的拯救的影响。

[0349] 使用前,将叶在含有 1% 蔗糖和 10  $\mu$  M 吲哚乙酸的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基培养。细菌菌株 AT656 于 28℃ 在含有 20mg/L 乙酰丁香酮和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上生长过夜。使用 3 种固体培养基用于协同培养:1) 含有 1% 蔗糖、1% 琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮和 10  $\mu$  M 吲哚乙酸的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基 (SH), 2) 含有 3% 蔗糖、1% 琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮和 50  $\mu$  M 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS), 和 3) 含有 3% 蔗糖、1% 琼脂、20mg/L 乙酰丁香酮、5  $\mu$  M 2,4-D、10  $\mu$  M 萘乙酸、10  $\mu$  M 赤霉素和 2  $\mu$  M 苄基腺嘌呤的 Murashige 和 Skoog 培养基。制备所述培养基,将 pH 调至 5.6 (SH) 或 5.8 (两种 MS 类型),高压灭菌,冷却,加入作为过滤除菌溶液的热不稳定组分乙酰丁香酮、吲哚乙酸和赤霉素,将所述培养基注入 100mm $\times$ 15mm 培养皿。每种培养基制备 20 个培养皿 (500ml)。

[0350] 使用 3 种协同培养基处理的随机区组实验设计,每个设计重复 4 次,每次重复有 5 个培养皿,每个培养皿 20 片叶。为了接种,按实施例 21 所述,重悬浮来自一个培养皿的细菌。

[0351] 对于接种,从丛中分离出单片叶,将每片叶背轴面向上,并用无菌解剖刀在分生组织区内制造创伤。将叶转移至细菌悬浮溶液中,温育 10 分钟。对于协同培养,将叶转移至如上所述的三种协同培养基上。将所有平板在黑暗中于 23℃ 协同培养 5.5 天。

[0352] 协同培养 5.5 天后,将每种培养基 2 个平板的叶染色,以分析 GUS 表达。结果表明,GUS 表达在很大程度上存在于在 Schenk 和 Hildebrandt 培养基协同培养的叶上。将来自每种培养基的其它 18 个平板 (18 个平板  $\times$  3 种培养基 = 54 个平板) 的其余叶,转移至组成相同、但无乙酰丁香酮、含有 500mg/L 替卡西林-克拉维酸的固体和液体培养基。将来自 3 个平板的叶转移到含有 25ml 液体培养基的 3 个烧瓶中,并于 23℃ 生长,光周期为 16hr 光 / 8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>  $\cdot$  sec。将 15 个固体培养基平板上的叶分为 2 组:1) 将来自 10 个原始平板的叶转移至 12 个新平板上,并在黑暗中温育 (12 个平板),2) 将来自 5 个原始平板的叶转移至 6 个新平板,并在低于 5  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>  $\cdot$  sec 的减弱光条件下培养。

[0353] 生长 11 天后,取叶的亚样品,染色以分析 GUS 表达。结果表明,仍存在 GUS 表达,该表达与光处理或培养基处理无关。无论是何种培养基,在减弱光下培养的所有叶均显示出最高强度的 GUS 表达。在黑暗中培养的叶显示出中等水平的 GUS 表达,在光下培养的叶显示出非常低的水平。在 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上培养的叶表现出最高频率的 GUS 阳性组织,然而,GUS 表达与新扩增的叶无关。

[0354] 在配制用于诱导愈伤组织的 Murashige 和 Skoog 培养基上,染色模式限于单个细胞和非常小的区域。含有 2,4-D、NAA、GA3 和 BA 的 MS 培养基上叶表现出比在仅含有 2,4-D

的 MS 培养基上培养的叶的染色强。在黑暗中,在含有调节以诱导愈伤组织的植物生长调节剂的两种基于 MS 的培养基上,不发生愈伤组织形成,但在减弱光下,在含有 2,4-D、NAA、GA3 和 BA 的 MS 培养基上已经开始形成愈伤组织。根据这些结果,从实验中停止使用 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上的叶。将在黑暗中 MS 培养基的所有剩余叶转移至减弱光条件下,继续培养。将所有组织保持在相同培养基制剂上,但转移至含有替卡西林克拉维酸的新鲜培养基上,并在减弱光条件下继续培养约 5 周。

[0355] 协同培养后 7 周,将所有其余组织再次转移至新鲜培养基上,并在该新鲜培养基中加入或者 10mg/L(约 25%的组织)或者 2mg/L(约 75%的其余组织)的硫酸卡那霉素。1 周后,将来自两种卡那霉素处理的组织亚样品染色,以分析 GUS 表达。存在三种类型的染色:1) 与原始协同培养的叶相关的染色,2) 与 I 型愈伤组织相关的染色,和 3) 与 III 型愈伤组织相关的染色。愈伤组织染色频率不高,估评每 100 个协同培养的叶中 5-8 片叶产生卡那霉素抗性培养物。在减弱光下,再继续培养和传代培养所述组织 5 周。

[0356] 12 周后,所有其余组织均来自含有 2,4-D、NAA、GA3 和 BA 的 MS 培养基上的培养物。将组织转移至含有 1  $\mu$ M 2,4-D、2  $\mu$ M BA、0.15g/L Gelrite、0.4g/L Difco 细菌培养用琼脂、500mg/L 替卡西林-克拉维酸和 10mg/L 硫酸卡那霉素的 Murashige 和 Skoog 培养基。将热不稳定的组分过滤除菌,并加入高压灭菌的冷却的培养基中。将由每片原始协同培养的叶增生的健康组织转移至单个培养皿中。将所有组织于 23°C 下培养,从减弱的光强变为约 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec 的全光强,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗。此时,将组织的小亚样品染色,以分析 GUS 表达,结果显示与 III 型愈伤组织相关的低 GUS 染色频率。2 周后,目视观察明显看出,向全光的转移已经增强了卡那霉素抗性愈伤组织与卡那霉素敏感性愈伤组织的分离。通过将所有活组织转移至新鲜培养基上,将愈伤组织在卡那霉素上的生长再继续进行 4 周(总共 16 周)。

[0357] 在协同培养后 16 周和 20 周之间,建立了卡那霉素抗性愈伤组织系。通过在光下 10mg/L 卡那霉素上生长,特征鉴定这些致密的 I 型愈伤组织和 III 型愈伤组织培养物。由 360 个原始协同培养叶,增生了 8 个卡那霉素抗性愈伤组织系。由于研制出这 8 个系,将该愈伤组织的亚样品转移至含有 0.5%蔗糖的半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基上,以再生叶。在这 8 个系中,在缺乏卡那霉素的情况下,有 3 个再生的叶,在卡那霉素存在下不发生叶的再生。染色时,这些叶中没有一个显示出 GUS 表达。

[0358] 愈伤组织培养物的选择和转化叶的再生:

[0359] 实施例 42

[0360] 测试 I 型愈伤组织在农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 存在下协同培养后得到 GUS 表达和硫酸卡那霉素抗性培养物的能力。

[0361] 通过在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、5  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶,产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于 23°C 下进行,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec。愈伤组织诱导 4 周后,在含有浓度减至 1  $\mu$ M 的 2,4-D 的相同培养基上,分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0362] 对于协同培养,制备 400ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养

用琼脂、 $1\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\ \mu\text{M}$  BA 的固体 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS), 将 pH 调至 5.6, 于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液, 至  $20\text{mg}/\text{L}$  的终浓度。将冷却的培养基用来倒 20 个  $100\text{mm}\times 15\text{mm}$  培养皿。在含有  $20\text{mg}/\text{L}$  乙酰丁香酮、 $500\text{mg}/\text{L}$  链霉素、 $50\text{mg}/\text{L}$  壮观霉素和  $50\text{mg}/\text{L}$  硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上, 用农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 划线接种, 并于  $28^\circ\text{C}$  生长过夜。

[0363] 使用 1 种细菌菌株处理的随机区组实验设计, 每个设计重复 1 次, 每次重复有 20 个培养皿, 每个培养皿约 10 个愈伤组织块。为了接种, 在使用前至少 1 小时, 将细菌重悬浮于含有  $0.6\text{M}$  甘露醇和  $20\text{mg}/\text{L}$  乙酰丁香酮 pH5.6 的过滤除菌的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中。为了接种, I 型愈伤组织块置于细菌溶液中。对于协同培养, 将愈伤组织块吸干, 然后转移至如上所述的 MS 协同培养基。所有愈伤组织块均在黑暗中于  $23^\circ\text{C}$  协同培养 2 天。协同培养后, 将一个愈伤组织块亚样品进行组织化学染色以分析 GUS 表达。结果显示出不同强度的高频率的 GUS 表达。

[0364] 将约 200 个其余愈伤组织块转移至去污染培养基。为了进行去污染, 制备  $500\text{ml}$  含有  $3\%$  蔗糖、 $0.15\%$  Gelrite、 $0.4\%$  Difco 细菌培养用琼脂、 $1\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\ \mu\text{M}$  BA 的固体 MS 培养基, 将 pH 调至 5.6, 于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的含头孢噻肟的溶液, 至  $500\text{mg}/\text{L}$  的最终培养基浓度。用冷却的培养基倒 20 个平板。将每个平皿约 10 个愈伤组织块转移至 20 个去污染培养基的培养皿上。所有培养皿均在黑暗中于  $23^\circ\text{C}$  培养。每周将愈伤组织块传代培养至相同的新鲜培养基上, 在相同条件下培养愈伤组织。第 5 周时, 将愈伤组织的小亚样品染色, 以分析 GUS 表达。存在高频率和不同强度的表达。

[0365] 第 5 周时, 将其余愈伤组织块转移至选择培养基上。为了进行选择, 制备  $500\text{ml}$  含有  $3\%$  蔗糖、 $0.15\%$  Gelrite 和  $0.4\%$  Difco 细菌培养用琼脂、补充  $1\ \mu\text{M}$  2,4-D 和  $2\ \mu\text{M}$  BA 的 MS, 将 pH 调至 5.6, 于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的含头孢噻肟、羧苄青霉素和硫酸卡那霉素的溶液, 分别至  $500$ 、 $500$  和  $2\text{mg}/\text{L}$  的最终培养基浓度。用冷却的培养基倒 20 个培养皿。将约 9-10 个愈伤组织块转移至选择培养基的 20 个培养皿。所有愈伤组织均于  $23^\circ\text{C}$  培养, 光周期为  $16\text{hr}$  光 /  $8\text{hr}$  黑暗, 减弱的光强约为  $3-5\ \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。培养 1 周后, 将愈伤组织转移至相同的培养基上, 只是卡那霉素浓度增加至  $10\text{mg}/\text{L}$ 。在相同培养条件下再继续愈伤组织培养 1 周, 传代培养至相同组成的新鲜培养基上一次。在该 2 周的卡那霉素选择期结束时, 约  $25\%$  的原始愈伤组织块显示出健康的愈伤组织生长, 其余的生长下降。

[0366] 第 7 周时, 将其中最健康的 64 个愈伤组织块转移至固体 MS, 该固体 MS 含有  $3\%$  蔗糖、 $0.15\%$  Gelrite、 $0.4\%$  Difco 细菌培养用琼脂、 $1\ \mu\text{M}$  2,4-D、 $2\ \mu\text{M}$  BA、羧苄青霉素和头孢噻肟各  $500\text{mg}/\text{L}$ 、以及  $10$ 、 $20$ 、 $40$  和  $80\text{mg}/\text{L}$  四种不同浓度的硫酸卡那霉素, 制备  $160\text{ml}$  的所述培养基, 其 pH 调至 5.6, 高压灭菌并冷却。加入过滤除菌的所述热不稳定抗生素的溶液至合适的浓度。用冷却的培养基倒 16 个  $60\text{mm}\times 15\text{mm}$  培养皿。将约 4 个愈伤组织块转移至每个平板上, 制备具有每种卡那霉素浓度的 4 个平板 (每个卡那霉素浓度 16 个愈伤组织块)。在减弱的光下于  $23^\circ\text{C}$  继续培养。以每周 1 次的间隔, 将 4 个平板, 即每种卡那霉素浓度一个平板, 转移至  $40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的较高光强下。第 9 周时, 无论是何种光条件, 将所有愈伤组织转移至组成与先前的传代培养相同的新鲜培养基。至第 12 周时, 将所有愈伤组

织置于  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的较高光强下。继续进行愈伤组织培养 4 周（至第 16 周），以 2 周的间隔传代培养至新鲜培养基。

[0367] 第 16 周时，将其余健康愈伤组织的小亚样品染色以分析 GUS 表达。所有健康的愈伤组织块均显示出 GUS 表达，整个愈伤组织块显示出均匀的染色，表明表达 GUS 的愈伤组织与非表达的愈伤组织分离。至此大多数愈伤组织死亡，但超过 10% 的愈伤组织显示出不同程度的健康愈伤组织增生。鉴定出 A、B 和 C 三个愈伤组织系，将其转移至促进叶再生的培养基上。在选择培养基上进一步传代培养生长中的愈伤组织块时，又鉴定出 6 个愈伤组织系 D-I，将其转移至再生培养基上。在含有 10mg/L 卡那霉素的培养基上发现 9 个系中的 8 个系。例外是 D 系，它在 40mg/L 卡那霉素上生长良好。在后续的传代培养时，A、B、D、F、H 和 I 这 6 个愈伤组织系继续生长。

[0368] 鉴定的 9 个系中的 2 个系继续再生叶，染色时它们为 GUS 表达阳性，并且在存在或缺乏卡那霉素时容易增生。为了再生，由 100ml 蒸馏水与 0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 制备水琼脂 (water agar)，将 pH 调至 5.6，于  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 18 分钟。用该培养基倒 10 个  $60\text{mm} \times 15\text{mm}$  培养皿。将来自 A、D、F、H 和 I 系的小块愈伤组织转移至每种培养基的 2 个培养皿上。将愈伤组织于  $23^\circ\text{C}$  培养，光周期为 16hr 光 / 8hr 黑暗，光强为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。在水琼脂上继续进行愈伤组织培养 6 周，以 2 周的间隔传代培养至新鲜的水琼脂上。至第 6 周时，来自所有系的愈伤组织均转为黄色和褐色。在第 6 周结束时，将愈伤组织转移至或者固体或者液体、含有 0.5% 蔗糖和 0.8% Difco 细菌培养用琼脂（仅固体培养基用）的半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基。4-6 周后，愈伤组织已经形成绿色的结节，这些结节分化为厚的叶样结构。由于叶可以脱离愈伤组织块，因此将它们转移至含有 1% 蔗糖的全强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基，于  $23^\circ\text{C}$  下培养，光周期为 16hr 光 / 8hr 黑暗，光强为  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。这些叶在液体 SH 培养基上无限增生。这些叶在含有或不含有卡那霉素的 SH 培养基上增生同样好。在卡那霉素存在下未观察到叶的褪色。定期取叶亚样品，染色以分析 GUS 表达。所有的叶均显示出 GUS 表达。

[0369] 为了证实转化，对从 A 系和 D 系分离的 DNA 进行 DNA 杂交分析。采用 Doyle 和 Doyle 的 CTAB 法 (Amer. J. of Botany 75, 1238 (1988))，从未转化的 *L. gibba* G3 和从转化的 A 系和 D 系制备浮萍 DNA 制备物。用限制性酶 EcoRI 和 Hind III 分别消化以及用这两种酶一起消化分离的 DNA，在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳分离片段。按照 Sambrook 的方法将该凝胶印迹至尼龙膜上。SAMBROOK 等, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (1989)。对于探针，用 Sambrook 的碱 SDS 法（同上），分离来自 pBI121 的质粒 DNA。用限制性酶 EcoRI 和 Hind III 消化 12.8kb 的质粒 DNA，产生包含  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶基因的 3.2kb 片段和含新霉素磷酸转移酶基因的一个约 9kb 片段。从琼脂糖凝胶上分离这两个片段，采用 Prime-a-Gene 试剂盒 (Promega)，通过随机引物进行放射标记。采用这些探针，将携带未转化浮萍 DNA 和或者来自转化系 A 或者来自转化系 D 的 DNA 的印迹，进行杂交。在杂交箱中，于  $65^\circ\text{C}$  过夜进行杂交反应。在 0.1X SSC、0.1% SDS 的严格条件下洗涤膜。然后将印迹与 BIOMAX MS 胶片 (Kodak) 接触，并于  $-70^\circ\text{C}$  放射自显影曝光 2 天。

[0370] 杂交实验的结果表明，GUS 和 NPTII 杂交 DNA 存在于浮萍 A 系和 D 系中，但在来自未转化浮萍的 DNA 中不存在（图 1 显示 D 系的结果）。转化浮萍 DNA 的双重消化于预期的分子量处产生杂交。单消化表明，杂交与预料之外分子量的 DNA 片段相关，表明，该杂交 DNA

不来自细菌,而是整合入植物 DNA 中。用标记的毒性区探针探测相同的印迹显示缺乏杂交,表明所述阳性 GUS 和 NPTII 信号来自植物,而非来自细菌。

[0371] 实施例 43

[0372] 测试 I 型愈伤组织在农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 存在下协同培养后得到 GUS 表达和硫酸卡那霉素抗性培养物的能力。

[0373] 通过在含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、5  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skook 培养基培养 *Lemna gibba* G3 的叶,产生 I 型愈伤组织。愈伤组织的诱导和所有后续培养均于 23°C 下进行,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强约为 40  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·sec。愈伤组织诱导 4 周后,在含有浓度减至 1  $\mu$ M 的 2,4-D 的相同培养基上,分别培养 I 型愈伤组织块。将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上,直至增生足够的愈伤组织用于实验。

[0374] 对于协同培养,制备 750ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、1  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 Murashige 和 Skook 培养基 (MS),将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至 20mg/L 的终浓度。用冷却的培养基倒 30 个 100mm×15mm 培养皿。在含有 20mg/L 乙酰丁香酮、500mg/L 链霉素、50mg/L 壮观霉素和 50mg/L 硫酸卡那霉素的马铃薯葡萄糖琼脂上,用农杆菌菌株 C58sZ707pBI121 划线接种,并于 28°C 生长过夜。

[0375] 使用 1 种细菌菌株处理的随机区组实验设计,每个设计重复 1 次,每次重复有 30 个培养皿,每个培养皿约 5 个愈伤组织块。为了接种,在使用前至少 1 小时,将细菌重悬浮于含有 0.6M 甘露醇和 20mg/L 乙酰丁香酮 pH5.8 的过滤除菌的 MS 培养基中。为了接种,将 I 型愈伤组织块置于细菌溶液中。对于协同培养,将愈伤组织块吸干,然后转移至如上所述的 MS 协同培养基。所有愈伤组织块均在黑暗中于 23°C 协同培养 2 天。协同培养后,将一个愈伤组织块亚样品进行组织化学染色以分析 GUS 表达。结果显示出高频率的 GUS 表达。

[0376] 将约 150 个其余愈伤组织块转移至去污染培养基。为了进行去污染,制备 750ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、1  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 MS 培养基,将 pH 调至 5.8,于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的含头孢噻肟和羧苄青霉素的溶液,每种至 500mg/L 的最终培养基浓度。用冷却的培养基倒 30 个平板。将约 5 个愈伤组织块转移至 30 个去污染培养基培养皿的每个平板上。愈伤组织在黑暗中于 23°C 培养。每周将愈伤组织块传代培养至相同的新鲜培养基上,在相同条件下培养愈伤组织。

[0377] 第 5 周时,开始选择卡那霉素抗性愈伤组织系。为了进行选择,制备 750ml 含有 3%蔗糖、0.15% Gelrite、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、1  $\mu$ M 2,4-D 和 2  $\mu$ M BA 的固体 MS 培养基,将 pH 调至 5.8,于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。加入过滤除菌的含头孢噻肟、羧苄青霉素和卡那霉素的溶液,分别至 500mg/L、500mg/L 和 2mg/L 的最终培养基浓度。用冷却的培养基倒 30 个平板。将约 5 个愈伤组织块转移至 30 个去污染培养基培养皿的每个平板上。愈伤组织在黑暗中于 23°C 培养。

[0378] 第 6 周和第 7 周时,将愈伤组织转移至含有浓度增至 10mg/L 的卡那霉素的相同新鲜培养基上。于 23°C 在黑暗中继续培养。第 8 周开始时,提高卡那霉素浓度。制备组成与先前的传代培养的培养基组成相同的 Murashige 和 Skook 培养基,一半的培养基含有 10mg/L

L 的卡那霉素,而另一半含有 40mg/L 的卡那霉素。将约一半的其余愈伤组织转移至每种卡那霉素浓度上。也改变培养的光条件。所有愈伤组织均于 23°C 培养,光周期为 16hr 光/8hr 黑暗,光强为约  $3-5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。愈伤组织在这些培养基和培养条件下维持 2 周。在减弱光的水平下 2 周后,将愈伤组织转移至含有或者 10mg/L 或者 40mg/L 卡那霉素的组成相同的新鲜培养基上,将光强升至  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。以 2 周传代培养制度,将愈伤组织在相同的培养基和培养条件下维持。

[0379] 至第 12 周时,约 10% 的愈伤组织保持健康和生长。在余下的 15 个增生愈伤组织系中,一半在 10mg/L 卡那霉素上生长,其余一半在 40mg/L 上生长。对 6 个系的愈伤组织小亚样品进行组织化学染色,表明在愈伤组织的数个区中有 GUS 表达。

[0380] 按照实施例 42 的步骤进行叶再生。当在存在或缺乏硫酸卡那霉素的情况下生长时,叶的增生正常,没有观察到叶的褪色。叶也显示出强的 GUS 组织化学染色。DNA 杂交分析表明存在预期片段大小的 GUS 基因和新霉素磷酸转移酶基因的 DNA 序列,而不存在来自 vir 区的 DNA 序列。按实施例 42 所述,进行合适的限制性酶分析,结果与外源基因整合入植物基因组中的发现一致。

[0381] 实施例 44

[0382] 根据前述实施例,优选以下方法,用于用农杆菌转化浮萍愈伤组织,然后进行选择 and 再生转化植株。整体来说,青萍具有特别有活力愈伤组织系统,这使得易于由该物种再生植株。

[0383] 通常,愈伤组织转化、选择和叶再生依赖于一个建立的很好的愈伤组织系统和许多对于该方法每个步骤优化的参数。按实施例 16 中所述,维持旺盛生长的愈伤组织培养物。按实施例 32 中所述,培养(在含有合适抗生素和  $100 \mu\text{M}$  乙酰丁香酮的马铃薯葡萄糖琼脂上)和重悬浮农杆菌,只是优选的重悬浮培养基是 MS,而非 SH。通过将愈伤组织块浸入重悬浮的细菌溶液中最少 3-5 分钟,接种愈伤组织块,将其吸干以去除过多的流体,将其植于由 MS 组成的协同培养基上,该培养基补充了为促进愈伤组织生长而优化的生长素和细胞分裂素和  $100 \mu\text{M}$  乙酰丁香酮。接种的愈伤组织在黑暗中培养 2 天。

[0384] 协同培养后,将愈伤组织转移至含有抗生素的新鲜培养基上,以给培养物去除感染的农杆菌的污染。优选的培养基是含有 3% 蔗糖、 $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA、用 0.15% Gelrite 和 0.4% Difco 细菌培养用琼脂凝胶化以及抗生素的 MS。愈伤组织在  $3-5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的减弱光下培养。每 2-5 天,最好是每 3 天,将愈伤组织转移至组成相同的新鲜培养基上。总的恢复期持续 2-3 周,3-6 次传代培养。

[0385] 在恢复期后进行愈伤组织选择。将愈伤组织转移至补充  $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA、3% 蔗糖、0.4% Difco 细菌培养用琼脂、0.15% Gelrite 和 10mg/L 硫酸卡那霉素的 MS 培养基上。愈伤组织在  $3-5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的减弱光下培养,每 2 周转移至组成相同的新鲜培养基上。愈伤组织以该方式维持 4-6 周。然后愈伤组织在  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的全光下在相同培养基上培养。当愈伤组织在选择剂上表现出旺盛的生长,则认为选择是完全的。

[0386] 将在选择剂存在下在愈伤组织维持培养基显示出旺盛生长的愈伤组织,转移至再生培养基上,以形成器官和产生植株。一般而言,浮萍在贫乏的培养基上再生。对于青萍,该培养基是含有 1% 蔗糖的半强度 SH 培养基;对于 *L. gibba*,该培养基是水琼脂。通常,选择剂不存在于再生培养基中。愈伤组织在全光下在再生培养基上培养 2-4 周直至出现叶。

将完全器官发生的叶转移至含有 1-3%蔗糖、无植物生长调节剂的液体 SH 培养基中,在全光下培养,以进一步进行克隆增殖。

[0387] 实施例 45

[0388] 测试光强和硫酸卡那霉素浓度对青萍愈伤组织培养物转化频率的影响。

[0389] 在愈伤组织诱导之前,在含有 1%蔗糖的液体 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中培养青萍的叶,光周期为 16hr 光 /8hr 黑暗,光强为约  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 。用青萍品系 8744 的叶,按实施例 14 中所述完成愈伤组织的诱导。在协同培养之前,愈伤组织在含有 3%蔗糖、 $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA、0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 的 MS 培养基上维持 13 周。在此 13 周的协同培养期间,将愈伤组织每 2 周传代培养至新鲜培养基上。

[0390] 带有来自如实施例 21 中所述的菌株 AT656 的含 T-DNA 双质粒的农杆菌菌株 C58sz707,在含有 50mg/L 硫酸卡那霉素、50mg/L 壮观霉素和 500mg/L 链霉素的 PDA 上于 28°C 培养 2 天。对于协同培养,制备含有 3%蔗糖、 $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA、0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 的固体 MS 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 20 分钟并冷却。向冷却的培养基加入过滤除菌的乙酰丁香酮溶液,至  $100 \mu\text{M}$  的终浓度。用冷却的培养基倒 8 个 100mm×15mm 培养皿。

[0391] 在接种之前至少 1 小时,将农杆菌重悬浮于过滤除菌的含有 0.6M 甘露醇和 100mg/L 乙酰丁香酮的 pH5.6 MS 培养基中,以用于接种。为了接种,将约 160 块 I 型愈伤组织浸入细菌溶液中 2-5 分钟,每批 20 块愈伤组织。对于协同培养,将愈伤组织块吸干,然后作为块转移至协同培养基,每个 100mm×15mm 培养皿 20 个愈伤组织块。所有接种的愈伤组织均在 23°C 于黑暗中培养 2 天。

[0392] 对于选择,制备 200ml 含有  $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $1 \mu\text{M}$  MBA、3%蔗糖、500mg/L 羧苄青霉素、500mg/L 头孢噻肟、10mg/L 硫酸卡那霉素、0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 的 MS 培养基,将 pH 调至 5.6,于 121°C 高压灭菌 20 分钟,倒 8 个 100mm×15mm 培养皿。在倒平板之前,将抗生素作为过滤除菌的溶液加入冷却的高压灭菌的培养基中。将协同培养的愈伤组织块转移至新鲜的选择培养基,每个培养皿 20 个愈伤组织块。在低于  $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的减弱光下培养 80 个愈伤组织块 (4 个平板),将其它 80 个愈伤组织块 (4 个平板)转移至  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的较高光强下。每周将愈伤组织传代培养至新鲜的含抗生素的培养基上,进行 3 周。第 4 周时,将来自每种光处理的一半 (40 个愈伤组织块) 愈伤组织转移至新鲜培养基,在该培养基中,卡那霉素浓度从 10mg/L 升至 40mg/L。将其余 40 个愈伤组织块转移至维持 10mg/L 原始卡那霉素浓度的新鲜培养基。在相同的减弱光或全光条件下和低或高卡那霉素浓度下的培养,继续进行 2 周,每周进行传代培养。接种后 6 周时,将所有样品转移至新鲜培养基,并在全光强下培养。从此时开始,以 2 周的间隔进行传代培养。

[0393] 在卡那霉素上培养 12 周后,将旺盛生长的愈伤组织转移至新鲜的再生培养基上。叶再生培养基由含有 1%蔗糖、0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite 的半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基组成。每 2 周将愈伤组织块转移至组成相同的新鲜培养基上。转移至再生培养基后 3-6 周,从愈伤组织块再生出叶。

[0394] 由该实验再生出两个转化的克隆叶系。这两个系均显示出 GUS 组织化学染色,用甲基伞形酮-葡糖醛酸 (MUG) 作为底物,在溶液测定 (soluble assay) 中,具有不同水平的 GUS 酶活性 (可提取蛋白的 0.31% 和 0.14%),用 ELISA 测定测量,具有可检测水平的新霉

素磷酸转移酶。DNA 杂交分析证实,在分子量 DNA 中存在外源 DNA 序列,该分子量 DNA 用合适的限制性酶消化时,产生预期的片段大小。用代表原始农杆菌毒性区的 DNA 序列重新探测剥离的印迹 (stripped blot),不能得到可检测的杂交。

[0395] 实施例 46

[0396] 用来自品系 8627 的青萍愈伤组织培养物,测试青萍基因型对转化叶拯救频率的影响。

[0397] 按实施例 45 所述,进行接种之前的愈伤组织维持、用于接种的细菌菌株、细菌生长、细菌重悬浮、愈伤组织接种步骤和在黑暗中协同培养 2 天。

[0398] 对于卡那霉素选择,在协同培养后,将 180 个愈伤组织块转移至含有  $1 \mu\text{M}$  2,4-D、 $2 \mu\text{M}$  BA、500mg/L 羧苄青霉素、500mg/L 头孢噻肟和 10mg/L 硫酸卡那霉素的 MS 培养基。所有愈伤组织均在低于  $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  的减弱光水平下培养。接种后第 2 周时,一半的愈伤组织块转移至新鲜的选择培养基,在该培养基中,卡那霉素浓度从 10mg/L 升至 40mg/L,将其余一半愈伤组织块转移至含有 10mg/L 硫酸卡那霉素的新鲜选择培养基。继续每周进行传代培养至接种后第 5 周,此时,每 2 周进行传代培养。

[0399] 为了再生转化叶,将在卡那霉素上生长旺盛、且于 12 周后用组织化学染色显示出 GUS 表达的愈伤组织系,转移至含有半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基的叶再生培养基,所述半强度 Schenk 和 Hildebrandt 培养基含有 1% 蔗糖、0.4% Difco 细菌培养用琼脂和 0.15% Gelrite。3-4 周后,在再生培养基上再生出叶。再生的叶在含有 1% 蔗糖的 SH 培养基上维持。

[0400] 在该实验中再生出 3 个转化的克隆叶系。所有 3 个系均显示出 GUS 组织化学染色,通过 MUG 测定测量,显示出可变水平的 GUS 活性 (可提取蛋白的 0.2-0.3%),而在 ELISA 测定中测量,显示出可检测水平的新霉素磷酸转移酶。用 DNA 杂交分析证实,外源 DNA 序列转化并整合入浮萍 DNA 中。

[0401] 实施例 47

[0402] 也测试培养基组成对由青萍愈伤组织培养物再生叶的影响。测试了 7 种培养基配方:(1) 水琼脂,(2) 含有  $100 \mu\text{M}$  硫酸腺嘌呤的水琼脂,(3) 含有  $10 \mu\text{M}$  BA 的水琼脂,(4) 含有  $10 \mu\text{M}$  BA 和  $1 \mu\text{M}$  IBA 的水琼脂,(5) 半强度 SH,(6) 含有  $10 \mu\text{M}$  BA 的半强度 SH,和 (7) 含有  $10 \mu\text{M}$  MBA 和  $1 \mu\text{M}$  IBA 的半强度 SH。该实验使用来自按实施例 12 的先前愈伤组织诱导培养基中增生的品系 8744 和品系 8627 的愈伤组织培养物。愈伤组织在 7 种不同培养基上培养 8 周,持续观察叶的发育。

[0403] 仅在半强度 SH 处理上得到叶再生。当半强度 SH 仅补充  $10 \mu\text{M}$  MBA 时,愈伤组织的生长比植于无植物生长调节剂的半强度 SH 上的愈伤组织生长快,然而,再生的时间比在半强度 SH 上的时间长。将 IBA 加入培养基中,对愈伤组织再生叶的时间和能力没有影响。

[0404] 实施例 48

[0405] 用人类  $\beta$ -血红蛋白基因构成物和一种 P450 氧化酶构成物,测试用于哺乳动物基因表达的浮萍系统的效率。

[0406] 使用两种农杆菌菌株,接种青萍品系 8627 的 I 型愈伤组织。对于  $\beta$ -血红蛋白转化,使用携带 pGV3850、pTVK291、pSLD343 种质粒的菌株 C58C1。pTKV291 含有来自 pTiBo542 的超毒性 G 基因。pSLD34 是一种农杆菌双质粒,衍生自 pBIN19,包含 CaMV35S 启动子控制

下的新霉素磷酸转移酶基因和由超级 mac 启动子驱动的人类  $\beta$ -血红蛋白基因。

[0407] 对于 P450 氧化酶转化, 使用携带 pGV3850、pTVK291 和 pSLD34 三种质粒的菌株 C58 C1。所述 T-DNA 载于双质粒 pSLD35 上, 该质粒与 pSLD34 结构类似, 除了 pSLD35 不具有  $\beta$ -血红蛋白基因, 却具有编码人 P450 氧化酶、氧化还原酶和细胞色素 B5 三种蛋白的 DNA 序列。每个基因都由一个超级 mac 启动子驱动。pSLD35 质粒包含潮霉素和卡那霉素选择标记基因。

[0408] 使用具有 2 种细菌菌株  $\times$  2 种早期选择期间的光强  $\times$  2 种选择期间的卡那霉素浓度的基本实验设计 ( 总共 8 种处理 ) 的 7 个实验, 每个设计重复 3 次, 每次重复有 2 个培养皿, 每个培养皿 10 个愈伤组织块。在这些实验中, 使用由青萍品系 8627 和 8744 和 *Lemna gibba* 品系 G3 产生的愈伤组织培养物。按实施例 45 所述, 进行接种之前的愈伤组织维持、用于接种的细菌菌株、细菌生长、细菌重悬浮、愈伤组织接种步骤和在黑暗中协同培养 2 天, 只是在接种之前, 细菌在含有 50mg/L 卡那霉素、50mg/L 庆大霉素、100mg/L 羧苄青霉素和 100  $\mu$  M 乙酰丁香酮的 PDA 上生长。

[0409] 对于卡那霉素选择, 在协同培养后, 将愈伤组织块转移至含有 1  $\mu$  M 2,4-D、2  $\mu$  M BA、500mg/L 羧苄青霉素、500mg/L 头孢噻肟和 10mg/L 和 40mg/L 两种浓度的卡那霉素的 MS 培养基。在培养期间, 将愈伤组织培养物再分为, 在每种卡那霉素浓度上, 一半的愈伤组织块在减弱光下培养, 而另一半在全光下培养。在协同培养后前 4 周内, 以 1 周间隔, 将愈伤组织传代培养至组成相同的新鲜培养基。第 5 周时, 所有培养物均在全光强下再培养 6 周, 每 2 周传代培养至新鲜培养基。

[0410] 按实施例 42 和实施例 47 中所述, 用适于由 *L. gibba* G3 或青萍品系再生叶的培养基, 完成叶再生。3-4 周后, 在再生培养基上再生出叶。再生的叶在含有 1% 蔗糖的 SH 培养基上维持。

[0411] 在所有实验中, 拯救了超过 20% 的转化克隆叶系。与 40mg/L 相反, 用 10mg/L 卡那霉素作为选择浓度, 发现更多的系。在选择期间减弱的光强证明是有利的。所有系均显示出在卡那霉素上的旺盛的愈伤组织生长, 通过 ELISA 实验测定, 具有可检测水平和可变水平的新霉素磷酸转移酶蛋白。通过本领域已知的方法, 例如分别用 DNA 杂交、RNA 杂交和蛋白杂交, 在稳定转化的浮萍植株中检测出存在 P450 氧化酶和  $\beta$ -血红蛋白 DNA、RNA 和 / 或蛋白。

[0412] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请均代表本发明所涉及领域技术人员的水平。所有出版物和专利申请均通过引用结合到本文中, 其程度与单个出版物或专利申请具体和单独地表示结合到本文中中的程度相同。

[0413] 尽管为了清楚除地理解, 通过说明和实施例在某些细节中描述了前述的发明, 但很明显, 可以在所附的权利要求书的范围内实施某些改变和修改。

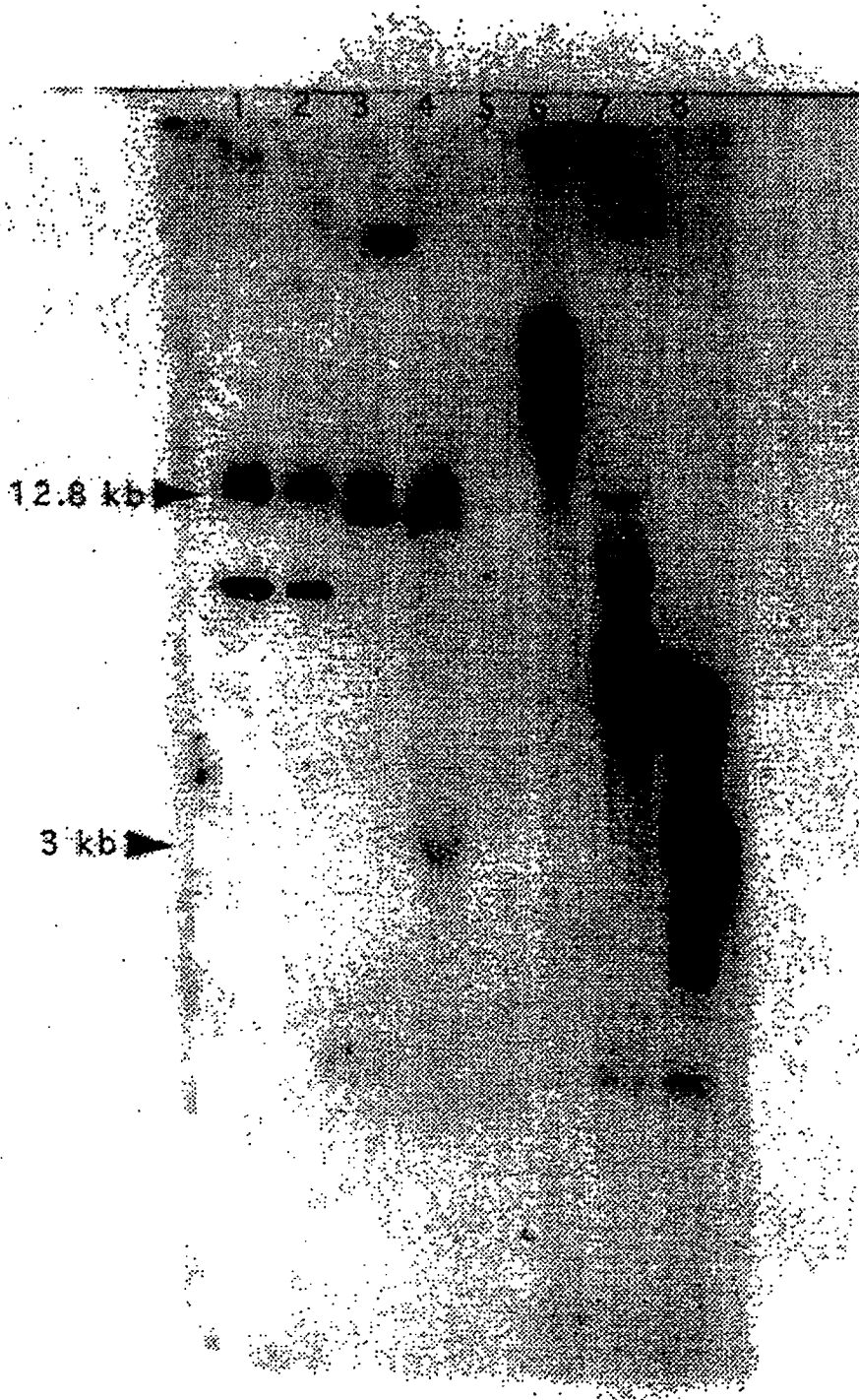


图 1