



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105002207 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201510378265. X

(22) 申请日 2007. 05. 09

(30) 优先权数据

60/798830 2006. 05. 09 US

60/862733 2006. 10. 24 US

(62) 分案原申请数据

200780025280. X 2007. 05. 09

(71) 申请人 密苏里大学学监

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 W. 于 J. M. 维加 J. 伯奇勒

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 罗文锋 彭昶

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006. 01)

权利要求书1页 说明书28页

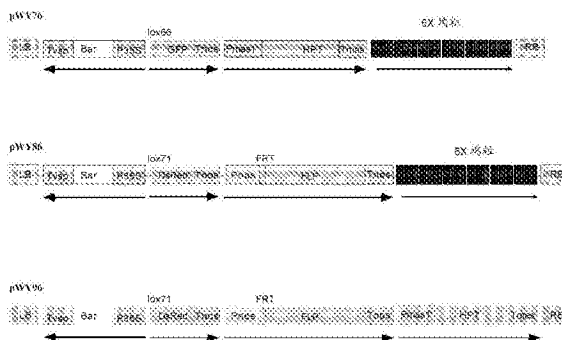
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

通过端粒截短的植物人工染色体平台

(57) 摘要

本发明提供由天然染色体经端粒介导的截短产生的工程植物微染色体。这些微染色体从一代如实传递到下一代,本发明还提供一个理想的平台,用于通过育种使基因进入所需植物变种而又无与标准育种方法有关的问题,例如连锁拖曳。



1. 一种通过端粒介导截短起始天然植物染色体的一个或两个臂所产生的植物微染色体,其中所述微染色体包含天然植物着丝粒和得自相对于天然植物染色体序列是不同的植物种的工程端粒序列,并且在包含该微染色体、与从中获得起始天然植物染色体的植物种相同的植物的有丝分裂和减数分裂中稳定传递。

2. 权利要求 1 的植物微染色体,其中约 25% 至约 99.9% 的起始天然植物染色体被截短。

3. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述工程端粒序列包含约 2-100 个端粒重复序列。

4. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述工程端粒序列包含约 6 个端粒重复序列。

5. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述工程端粒序列得自拟南芥属 (*Arabidopsis*)。

6. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体的两个臂都被截短。

7. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述微染色体的大小为约 1 Mb 至约 100 Mb。

8. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体是 A 染色体。

9. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体是 B 染色体。

10. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体得自双子叶植物。

11. 权利要求 1 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体得自单子叶植物。

12. 权利要求 11 的植物微染色体,其中所述起始天然植物染色体得自玉米。

13. 权利要求 1 的植物微染色体,其还包含位点专一重组位点。

14. 权利要求 13 的植物微染色体,其中所述位点专一重组位点是 *FRT* 或 *lox* 位点。

15. 权利要求 1 的植物微染色体,其还包含转基因。

16. 权利要求 15 的植物微染色体,其中所述转基因赋予选自以下的性状:抗虫性、除草剂耐受性、糖代谢改变、脂肪酸代谢改变、抗病性、雄性育性恢复和有害物抗性。

17. 权利要求 16 的植物微染色体,其中所述赋予雄性育性恢复的编码序列是 *Rf3* 基因。

18. 一种产生植物微染色体的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 用包含至少两个端粒重复序列的异源核酸转化起始天然植物染色体;和

(b) 使起始天然植物染色体发生截短以产生植物微染色体。

19. 权利要求 18 的方法,该方法还包括用位点专一重组位点转化起始天然植物染色体。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述位点专一重组位点是 *FRT* 或 *lox* 位点。

通过端粒截短的植物人工染色体平台

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2007年5月9日,申请号为200780025280.X(PCT/US2007/068589),发明名称为“通过端粒截短的植物人工染色体平台”。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求2006年5月9日申请的美国临时专利申请顺序号60/798,830和2006年10月24日申请的美国临时专利申请顺序号60/862,733的优先权,所述专利申请的全部公开内容都通过引用特别结合到本文中。

[0004] 1. 发明领域

[0005] 本发明涉及分子生物学和植物遗传学领域。更准确地讲,本发明涉及植物人工微染色体平台及其生产和使用方法。

[0006] 2. 相关领域的描述

[0007] 生物中染色体的维持和遗传通常需要三个必需元件:复制起点、着丝粒和端粒,如之前用酵母人工染色体所鉴定的一样。例如,Murray和Szostak(1983)描述了基于体外构建的线性酵母人工染色体的克隆系统。然而,在多细胞真核系统中,已鉴定出的核酸元件中没有一个是能够维持人工染色体。

[0008] 产生人工染色体的一种方法是通过从头构建,即将着丝粒、端粒和选择标记组装起来并且重新导入植物中(美国专利第7,015,372号)。然而,已知对于通过减数分裂的有效传递,染色体具有最小尺寸限制(Schubert,2001)。虽然大多数从头构建的哺乳动物微染色体可以在有丝分裂期间传递,但是还没有这类微染色体在种系中传递的报道。迄今为止,真核生物中仅通过减数分裂传递的从头构建的人工染色体是酵母人工染色体(Murray和Szostak,1983;Murray和Szostak,1986)。另外,研究表明对于正常传递而言,植物着丝粒大小必须超过大约1兆碱基(Kaszas和Birchler,1998),这个大小超过了目前可以体外组装的大小。

[0009] 相比之下,一些具有天然着丝粒的截短的染色体可通过减数分裂传递(Shinohara等,2000;Tomizuka等,1997,2000;Voet等,2001;Shen等,1997,2000;Schubert,2001;Zheng等,1999;Kato等,2005;McClintock,1938;Brock和Pryor,1996;Nasuda等,2005)。已应用于哺乳动物系统的截短染色体的一种方法是端粒介导的截短(telomere mediated truncation)(Farr等,1991,1992,1995;Barnett等,1993;Itzhaki等,1992;Heller等,1996;Mills等,1999;Saffery等,2001)。然而,迄今为止还没有研究披露用于植物染色体端粒介导的截短的方法。

[0010] 染色体缺失的其它方法已应用于植物系统。例如,通过X射线或 γ 射线照射玉米花粉(McClintock,1938;Brock和Pryor,1996)或通过B-9与复制9S的易位(Zheng等,1999;Kato等,2005)所产生的玉米染色体发生了改变。然而,通过这些方法产生的染色体改变在减数分裂或有丝分裂期间缺乏稳定传递,无法携带位点专一重组位点,不能使异源序列进行有效的表达,或者染色体改变难以产生。因此,本领域非常需要用于植物微染色体的产生和使用方法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明通过提供可经有丝分裂和减数分裂有效传递的植物微染色体,从而克服了本领域的局限性。术语“微染色体 (minichromosome)”是指通过缺失部分天然染色体而制备的工程染色体。因此,微染色体与通过重组 DNA 技术从头制备的人工染色体截然不同。在具体实施方案中,本发明提供本文所述的植物微染色体,所述植物微染色体通过插入端粒重复序列使起始天然植物染色体截短而获得。因此,本发明的植物微染色体可以限定为包含至少一个被截短的染色体臂。在一些其它的实施方案中,植物微染色体的两个臂均被截短。在一些方面,植物微染色体可在植物有丝分裂和减数分裂期间有效传递,所述植物与起始染色体 (starting chromosome) 的植物品种相同。本领域技术人员应当了解的是,这类微染色体通常包含功能性着丝粒和复制起点,这两者可供如实保持。

[0013] 在本发明的一个方面,植物微染色体包含天然着丝粒。天然着丝粒存在于内源染色体中,并由着丝粒重复序列组成 (Jiang 等,2003)。这些序列在细胞分裂 (例如有丝分裂和减数分裂) 期间供染色体有效分离。因此,在本发明某些方面,植物微染色体限定为包含天然植物着丝粒序列。在其它实施方案中,本发明的微染色体可限定为不包含新着丝粒。

[0014] 微染色体还可包含工程端粒序列 (engineered telomere sequence)。本文所用术语“工程端粒序列”是指比起存在于天然染色体的端粒序列有所不同的端粒序列。例如,工程端粒序列位于相对于着丝粒的位置可不同于存在于天然染色体的端粒的位置。具体地讲,与天然端粒相比,本发明微染色体上的工程端粒序列可能更接近微染色体的着丝粒。例如,在本发明的植物微染色体中,工程端粒序列可限定为距天然染色体序列的着丝粒约 10kb 至约 10Mb。在更具体的实施方案中,工程端粒可距天然染色体序列的着丝粒约 10kb 至约 5Mb 或者约 100kb 至约 1Mb、2Mb、3Mb、4Mb 或 5Mb。本发明的植物微染色体还可包含两个工程端粒序列,它们距微染色体着丝粒的距离可以不同。

[0015] 工程端粒序列可得自多种来源。例如,工程端粒序列可得自与天然染色体序列相同的植物种或品种,或者得自相对于天然染色体序列是不同的植物种。例如,端粒序列可以是由 pAtT4 克隆的端粒序列,所述 pAtT4 包含拟南芥型 (Arabidopsis-type) 端粒基序 TTTAGGG (SEQ ID NO :1) 的同向重复序列或其衍生物 (Richards 和 Ausubel,1988)。在这种情况下,每个重复序列包含端粒序列的 430 个碱基对。工程端粒重复序列可得自玉米、小麦、燕麦、水稻、拟南芥或大豆。本领域技术人员应当了解的是,工程端粒可包含多个端粒重复序列。例如,在某些实施方案中,本发明的工程端粒可包含介于 2 个和 100 个之间、2 个和 50 个之间或者 2 个和 10 个之间的重复序列,包括 6 个重复序列。在本发明一些实施方案中,提供端粒截短载体 (telomere truncation vector) 上的端粒序列,例如本文所示端粒截短载体 (例如 pWY76、pWY86 和 pJV21)。在本发明一个实施方案中,可采用端粒截短载体来产生截短的微染色体。端粒截短载体可包含在微染色体中,或者可从中分离出来。在本发明一个实施方案中,在产生微染色体期间端粒截短载体可缺失。例如,转基因然后可被导入微染色体中以产生包含一个或多个添加转基因的微染色体。通过这种方法形成的微染色体构成本发明的一个实施方案。

[0016] 植物微染色体的一个方面是它们的大小。本文所述的微染色体优选编码最低数目的可对包含微染色体的植物表型产生有害影响的内源基因。因此,优选制备缺失了大部分内源染色体,而同时又保持足够大小以稳定传递的微染色体。当天然染色体是 A 染色体时,这一点可能非常重要。B 染色体通常不编码必需功能,因此不太可能产生有害表型。然

而,还是观察到微染色体太小以致于不能经有丝分裂和减数分裂如实保持下来。因此,在本发明的某些实施方案中,植物微染色体包含天然植物染色体序列,其中约 1% 至约 99.9% 的天然染色体序列缺失。在一些实施方案中,微染色体中约 10%、20%、25%、35%、50%、75%、85%、90%、93%、95%、97%、99%、99.5% 或 99.9% 或从其中可派生的任何范围的天然染色体序列缺失。

[0017] 在本发明的某些其它方面,植物微染色体可根据其大小来限定。例如,植物微染色体大小可限定为约 0.1Mb 至约 20Mb 或 30Mb。在其它的实施方案中,植物微染色体大小可为约 1Mb、1.5Mb、2Mb、2.5Mb、3Mb、4Mb、5Mb、7.0Mb、9Mb、10Mb、20Mb、50Mb 或 100Mb 或者其中可派生的任何范围。例如,在某些情况下,本文所述的植物微染色体大小介于约 1Mb 和 10Mb 之间,或者介于约 5Mb 和 10Mb 之间。

[0018] 在本发明的某些方面,植物微染色体可限定为通过有丝分裂以 100% 频率进行传递。在更多情况下,植物染色体通过其在减数分裂期间传递的频率来限定。例如,植物微染色体在减数分裂期间可按大于约 10%、20%、25% 或 30% 的频率进行传递(50% 为理想的传递)。因此,本发明的植物染色体可包含截短的 A 染色体或 B 染色体,当微染色体在与起始染色体品种相同的植物中传递时,所述截短的 A 染色体或 B 染色体在减数分裂期间传递的频率大于 35%。

[0019] 可以使用多种植物来制备本发明的植物微染色体。在一些实施方案中,该植物可限定为双子叶植物或单子叶植物。例如,植物可为苜蓿、磨擦禾属 (*Tripsacum*)、玉米、油菜 (*canola*)、水稻、大豆、烟草、草坪草、燕麦、黑麦、拟南芥或小麦。在本发明的某些方面,微染色体可限定为得自玉米植物。

[0020] 在其它实施方案中,本发明的植物微染色体可得自植物 A 染色体。例如,微染色体可包含得自 A 染色体的天然染色体序列,例如在玉米微染色体的情况下,它可包含得自玉米 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 号染色体的天然序列。在一个实施方案中,本发明的植物微染色体得自玉米 7 号染色体。

[0021] 在又一些实施方案中,本发明的植物微染色体包含植物 B 染色体的天然染色体序列。对于某些应用,端粒截短的 B 染色体可提供益处,因为它们包含非必需基因,预期这些非必需基因不会干扰植物表型或者不会干扰染色体的转基因的表达。本文所述的端粒截短方法导致从 B 染色体中缺失天然染色体序列,特别是远离着丝粒的区。通过端粒截短来缺失控制不分离的 B 染色体区,从而基于 B 染色体的微染色体将正常分离。实际上,可以按照本文所述方法,利用任何类型的植物 B 染色体来制备植物微染色体。例如,植物微染色体可包含天然 B 染色体序列,这些 B 染色体序列得自玉米、黑麦或高粱,或者得自具有 B 染色体的任何其它植物品种,或者得自包含已导入 B 染色体的任何植物品种 (Jones 和 Rees, 1982)。在一些实施方案中,染色体的截短在包含多个 B 染色体的植物细胞中进行,例如包含至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 个或更多个 B 染色体拷贝的细胞。

[0022] 在本发明的某些方面,可优选缺乏 B 染色体的含微染色体植物,因为完整 B 染色体的存在可能引起 B 染色体衍生的微染色体不分离。因此,在一些实施方案中,本发明提供通过导入完整 B 染色体或部分 B 染色体来操纵包含 B 染色体序列的植物微染色体的含量的方法。例如,可通过导入调控 B 着丝粒不分离的 B 染色体序列来调节植物微染色体的含量。

[0023] 本发明的植物微染色体可包含选择标记,该选择标记为携带标记的植物细胞在特

定生长条件下提供生长优势,从而能够鉴定包含微染色体的植物、植物细胞或植物部分。选择标记可在细菌细胞中起作用。微染色体还可包含提供抗生素、除草剂或其它药剂敏感性的“阴性”选择标记,从而能够对包含特定微染色体的植物、植物细胞或任何其它目标生物的细胞进行选择。此外,在某些方面,植物微染色体可包含雄性育性恢复基因,例如 Rf3 基因。

[0024] 植物微染色体还可包含位点专一重组序列。例如,本发明的微染色体可包含 lox 或 FRT 位点。位点专一重组为基因移进移出人工染色体(例如本发明的植物微染色体)提供了简便的方法。还可以这个方式提供随机诱变。应用位点专一重组以体内介导基因转移的方法是本领域众所周知的。可以应用位点专一重组将基因序贯添加到微染色体上,以便提供用于完整生化途径或一套农艺优良性状的基因。在本发明的某些方面,被插入起始植物染色体的端粒序列包含位点专一重组序列。在这个方面,可以快速产生包含位点专一重组序列的植物微染色体。

[0025] 在某些其它实施方案中,植物微染色体可包含控制细胞内微染色体拷贝数的基因。这种基因的一个实例是介导上述不分离的 B 染色体的元件。一个或多个结构基因也可包含在微染色体内。尤其预期有用的是与可插入微染色体内的基因一样多的且同时又保持功能和如实传递人工染色体的结构基因。这可包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 个或更多个结构基因。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明提供用于在植物、植物细胞或任何其它目标生物的细胞中表达一个或多个外源基因的方法。外源基因可得自任何生物,包括植物、动物和细菌。在一个实施方案中,外源基因赋予指定植物改进的农艺性状。例如,转基因可赋予抗虫性(insect resistance)、除草剂耐受性、糖代谢改变、脂肪酸代谢改变、抗病性和有害物抗性(pest resistance)等性状。本发明还包括可使用微染色体同时转移多个外源基因到包含完整生化或调节途径的植物中。在又一个实施方案中,本发明包括可用作 DNA 克隆载体的植物微染色体。这种载体可用于植物和动物测序计划。在一些具体情况下,转基因可随端粒重复序列一起导入起始染色体,从而产生包含转基因的植物微染色体。

[0027] 在又一个实施方案中,提供包含植物微染色体的植物细胞。该植物细胞的品种可与起始植物染色体的品种相同,然而在某些情况下,可以是不同品种。因此,包含植物微染色体的植物或植物种子也构成本发明的组成部分。在某些方面,包含微染色体的植物是玉米植物。

[0028] 一般而言,本发明的方法和组合物包括端粒介导的染色体截短(物)。例如,包含植物端粒的载体被导入植物细胞中。这类载体可通过本领域众所周知的方法导入植物细胞中,例如 DNA 轰击或土壤杆菌(Agrobacterium)介导的转化。例如,在某些实施方案中,可应用土壤杆菌介导的转化产生由 A 染色体衍生的植物微染色体。相反地,在一些情况下,可应用 DNA 轰击产生由 B 染色体衍生的植物微染色体。在将端粒序列整合到植物染色体的一个或多个位置上后,可在整合点将染色体截短。因此,本发明的方法可包括用包含至少两个端粒重复序列的异源核酸转化起始植物染色体,并使起始植物染色体截短以便产生植物微染色体。可通过端粒整合来截短染色体的一个或两个臂。然后,可通过例如 DNA 印迹法或 FISH,对所得植物微染色体进行筛选以确定其大小和来源。

[0029] 在本发明的另一些方法中,起始植物染色体用包含端粒重复序列和额外序列(例

如位点专一重组序列、转基因或其它选定序列)的异源核酸序列转化。或者,起始植物染色体可用包含端粒重复序列的异源核酸序列转化以产生植物微染色体。随后,植物微染色体可用包含额外序列(例如转基因)的第二异源核酸序列转化。例如,额外序列可包含FRT或lox位点。在一些情况下,额外序列还可包含赋予抗虫性、除草剂耐受性、糖代谢改变、脂肪酸代谢改变、抗病性、雄性育性恢复或有害物抗性的基因。因此,在某些实施方案中,额外基因可以是雄性育性恢复基因,例如Rf3基因。本发明这个方面可能特别有利,因为恢复雄性育性的植物微染色体可以非常高效地传递到子代细胞。

[0030] 至于本文所述任何其它方法或组合物,都可采用本发明这个方法和/或组合物方面论述的实施方案。因此,有关一种方法或组合物的实施方案同样可应用于本发明的其它方法和组合物。

[0031] 本文所用的术语前未加数词修饰时包括其复数形式。正如本文所附权利要求书一样,当与术语“包含”联用时,术语前未加数词修饰时可指一个或一个以上。

[0032] 权利要求书中使用的术语“或”是用来指“和/或”,除非明确说明仅指二者之一,或者二者相互排斥,虽然本公开内容支持仅指二者之一和“和/或”的定义。本文所用“其它”可指至少两种或以上。

[0033] 本申请全文中,术语“约”用来指包括仪器误差、测定数值所采用方法的固有偏差,或研究对象中存在的偏差。

[0034] 本发明的其它目的、特征和优势从以下详述来看将是显而易见的。然而,应当了解的是,表示本发明优选实施方案的发明详述和具体实施例只是通过实例的方式给出,因为从本发明详述来看,本发明精神和范围内的各种改动和修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0035] 附图简述

[0036] 以下附图构成本说明书的部分,并被用来进一步说明本发明的某些方面。参照这些附图中的一幅或多幅并结合本文所述具体实施方案细节可更好地理解本发明。

[0037] 图1:染色体截短构建体的实例。图中表示构建体pWY76和pWY86以及对照构建体pWY96。图中字母标识的含义如下:LB, T-DNA左边界;RB, T-DNA右边界;Tvsp,大豆营养贮藏蛋白基因的终止子;Bar,双丙氨膦抗性基因作为选择标记基因;TEV,烟草蚀斑病毒5'非翻译区;P35S,花椰菜花叶病毒(CaMV)的2X35S启动子;Tnos,根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的Nos终止子;Tmas,根癌土壤杆菌的Mas终止子;Pnos,根癌土壤杆菌的Nos启动子;Pmas1',根癌土壤杆菌的Mas启动子;lox和FRT,位点专一重组位点;HPT,潮霉素B抗性基因;GFP,绿色荧光蛋白基因;DsRed,红色荧光蛋白;FLP,位点专一重组酶基因;端粒,由拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)分离的pAtT4的端粒单元(Richards和Ausubel,1988)。箭头表示转录的方向,或者在端粒重复序列的情况下表示染色体取向。

[0038] 图2:pJV21的结构。四个功能部分用方框表示并标注。LB,左边界;RB,右边界;lox,lox66位点;Cre,Cre重组酶基因;bar,双丙氨膦抗性基因;35S,CaMV 35S启动子;ubi,玉米泛蛋白启动子;n3',胭脂氨酸合成酶基因的终止子序列;telo,400bp拟南芥端粒重复序列;NotI和AscI,限制酶位点。

[0039] 发明详述

[0040] 植物育种的一个目的是选出所需要的性状,例如抗病性、抗虫性、生长率、营养需求和产量。遗憾的是,在许多植物品种中,不同变种对于地理区和气候区是最佳的。然而,将所需性状或基因培育成各个变种可能要花数年时间,因为必需选出任何特定性状,同时又保持特定变种的特殊优势。某些性状的改变或性状的积累还可能多个转基因,这就使渐渗变得复杂起来。因此,赋予农艺优良性状理想的基因可由不同的染色体提供,因而可能不与其它基因连锁,并且在子代植株中易于选择。然而,直至目前为止,还没有能够编码基因的植物微染色体的记载。

[0041] 本发明通过提供可用于掺入所需转基因的植物微染色体克服了本领域的局限性。在某些情况下,微染色体可以渐渗入植物的任何特定变种中,因为它不会与其它染色体上编码的任何背景基因连锁。这些微染色体还可包含位点专一重组位点,这使得基因能够快速移进或移出包含微染色体的任何植物变种。因此,这些新的植物微染色体通过提供遗传上分离的表达平台,从而减少了与连锁拖曳(linkage drag)有关的问题。

[0042] I. 重组系统

[0043] 在本发明的某些实施方案中,植物微染色体包含至少一个位点专一重组酶位点。已在若干种生物中鉴定出位点专一整合酶重组酶系统,包括但不限于噬菌体 P1 的 Cre/lox 系统 (Abremski 等,1983 ;美国专利第 4,959,317 号 ;美国专利第 5,658,772 号)、酵母的 FLP/FRT 系统 (Golic 和 Lindquist,1989)、大肠杆菌 (*E. coli*) 的 Pin 重组酶 (Enomoto 等,1983)、噬菌体 μ 的 Gin/gix 重组酶 (Maeser 等,1991)、鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) pSR1 质粒的 R/RS 系统 (Onouchi 等,1991 ;Araki 等,1992) 和鲁氏接合酵母的 R 重组酶 (Onouchi 等,1995)。研究表明,所有这些系统都在植物中起作用 (O'Gorman 等,1991 ;Maeser 等,1991 ;Onouchi 等,1991 ;Dale 和 Ow,1991)。一般认为位点定向整合系统如 Cre/lox 或 FLP/FRT 需要环状 DNA 中间体。就这些系统而言,Cre/lox 和 FLP/FRT 已得到广泛应用。

[0044] FLP/FRT 系统是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 原有的 (Golic 和 Lindquist,1989 ;有关综述参见 Futcher,1988)。酵母中,重组酶 (FLP) 存在于 2 μ 质粒中,识别作为靶位点的 599 碱基对 (bp) 的反向重复序列 (FRT)。599bp 重复序列内的最小功能序列单元仅包括 34bp ;被 1 个不对称的 8bp 间隔区分隔开的 2 个 13bp 反向重复序列,尽管通常存在第 3 个 13bp 序列的非必需重复序列 (Sauer,1994)。两侧邻接反向重复序列的 FRT 序列的 FLP 介导的 DNA 重排通常导致 FRT 靶位点之间 DNA 发生倒位。在这种情况下,两个 FRT 位点均被保留下来。FLP 重组酶还可识别正向重复的 FRT 靶位点。两侧邻接正向重复的 FRT 位点的 FLP 介导的 DNA 重排通常导致位于 FRT 靶位点之间的 DNA 被切下。在这种情况下,切下的 DNA 以包含一个 FRT 位点的环状形式释放出来,而第二 FRT 位点仍保留在模板 DNA 分子上。FLP 重组酶还可介导不同 DNA 分子上 FRT 位点之间的重组,例如,FLP 重组酶可介导不同染色体上 FRT 位点之间的重组。Sadowski (1995) 指出,由 FLP/FRT 催化的重组在性质上是可逆的。

[0045] 由 FLP/FRT 催化的 DNA 交换可以在体外进行,因为研究表明纯的 FLP 重组酶介导 FRT 位点之间的重组 (Meyer-Leon 等,1984)。酵母 FLP/FRT 组合也已用来指导位点专一重组,在大肠杆菌 (Cox,1983) 和果蝇 (*Drosophila*) 基因组中,两者都切下并扩增两侧邻接 FRT 位点的序列 (Golic 和 Lindquist,1989 ;Golic,1994)。已采用 FLP/FRT 指导位点

专一性切割部分转基因,所述转基因得自同源重组的玉米和水稻原生质体的质粒 DNA(参见例如美国专利第 5,527,695 号)。在稳定转化的玉米中,已利用 FLP/FRT 位点定向切割插入玉米基因组的两侧邻接 FRT 位点的序列(美国专利号 5,929,301 和 6,175,058)。外源 DNA 的染色体位点专一性靶向细菌和哺乳动物染色体也可受 FLP/FRT 影响(Huang 等,1991;O’Gorman 等,1991),已经表明在非酵母基因组中,这种通过 FLP 插入 FRT 位点是可逆的(Huang 等,1997)。可以充分改变 FRT 位点以便发生重组但又是不可逆的(美国专利第 6,187,994 号),或者相对于逆向反应更有利于正向反应(Senecoff 等,1988)。

[0046] 第二个已充分表征的重组系统是噬菌体 P1 的 Cre/lox(Abremski 等,1983;有关综述参见 Craig,1988;Sauer,1994;Ow,1996)。Cre 重组酶(causing recombination(缩写用英文“引起重组”中有下划线的字母表示)识别 lox(缩写用 locus of crossing over(x)(交换基因座(x))下划线字母表示)靶序列,介导相容性 lox 位点间的位点专一重组。相容性位点(Compatible site)可包含或不包含相同的序列。Lox 位点的长度为 34 碱基对,包含被 8bp 的其它间隔区核苷酸分隔开的 2 个 13bp 反向重复序列。Lox 序列包括噬菌体 P1 的 loxP(Albert 等,1995)和从大肠杆菌分离的核苷酸序列的 loxB、loxL 和 loxR 位点(Hoess 等,1982)。已报道的 loxP 位点的功能变异体包括但不限于 lox66、lox71 和 lox72(Albert 等,1995;Langer 等,2002)。还可以通过本领域已知的多种合成技术产生 Lox 序列。用于产生功能性 lox 位点的合成技术的实例参见 Ogilvie 等(1981)和 Ito 等(1982)。

[0047] lox 位点是一种不对称的核苷酸序列,因此,同一 DNA 分子上的 lox 位点彼此之间可能具有相同或相反的方向。相同方向的 lox 位点间的重组导致位于两个 lox 位点之间的 DNA 区段发生缺失。在这种情况下,所得的最初 DNA 分子末端之间产生连接,lox 位点被保留下来。缺失的 DNA 区段形成仍含有单一 lox 位点的环状 DNA 分子。同一 DNA 分子上相反方向的 lox 位点间的重组导致位于两个 lox 位点之间 DNA 区段的核苷酸序列发生倒位。另外,紧邻位于两个不同 DNA 分子上的 lox 位点的 DNA 区段可能发生彼此交换。所有这些重组事件都是由 Cre 编码区的产物催化的,并且是可逆的。然而,可以充分改变 lox 位点,以便重组事件发生但又是抗反向重组反应的(Albert 等,1995;Araki 等,1997;PCT 公布号 WO 01/11058),或者使得两个位点是重组酶的“不相容的”重组底物(Hoess 等,1986;Trinh 和 Morrison,2000;Lee 和 Saito,1988;EP 1 035 208)。还可以通过排除重组酶来源,例如通过育种或使用特定的调节启动子,来防止发生反向反应。

[0048] Cre 重组酶还可实现位点定向整合。例如,采用 Cre 重组酶将 lacZ 报道基因整合到中国仓鼠卵巢(CHO)细胞基因组中,一个 lox 位点在 lacZ 打靶载体上,一个 lox 位点已先位于 CHO 基因组 DNA 内(Fukushige 和 Sauer,1992)。已经表明,Cre 重组酶在以下生物中介导 lox 位点之间的重组:酵母(Sauer,1987)和植物,例如烟草和拟南芥(参见例如美国专利第 5,658,772 号;Medberry 等,1995;Albert 等,1995)以及哺乳动物细胞,例如小鼠(Sauer 和 Henderson,1988;Fukushige 和 Sauer,1992;Sauer,1998)。还有研究报道了利用 Cre/lox 重组系统将大的 BAC(细菌微染色体)片段位点专一性整合到植物和真菌基因组中(Choi 等,2000)。一般认为,为了实现将位点定向整合到单个基因组 lox 位点中,必须将包含单个 lox 位点的环状 DNA 分子导入细胞。因此,本发明的方法可使缺乏辅助序列的 DNA 分子实现位点定向整合,所述辅助序列的存在通常是为了在细菌宿主细胞中复制和保持环状分子。Wallace 等人(2000)和 Day 等人(2000)论述了分别在胚胎干细胞或烟草中

应用位点定向整合作为在基因组中预选择可重复表达转基因的位点的方法。

[0049] 利用多个 lox 位点, Cre 重组酶可发起并实现重组, 所述位点包括但不限于 loxP 和多个野生型 loxP 位点的变异体, 例如 lox66 (Albert 等, 1995)。由 lox 位点指导的 DNA 交换发生在 8bp 间隔区, 基本上使所涉及的两个 lox 位点的 13bp 反向重复序列发生交换。例如, 位点定向重组, 其中一个 DNA 分子上的单一 lox 位点与第二 DNA 分子上的第二单个 lox 位点重组, 产生其中整合的 DNA 两侧各邻接 lox 位点的序列。如果所涉及的不同分子上的单一 lox 位点相同, 则所得到的邻接插入 DNA 的两个 lox 位点也相同。然而, 如果 13bp 反向重复序列上起始分子的两个单一 lox 位点不相同, 则所得到的邻接插入 DNA 的两个 lox 位点不同于起始 lox 位点。例如, 如果第一单一 lox66 位点与第二单一 lox71 位点一起参与位点定向整合, 则所得到的邻接插入 DNA 两侧的 lox 位点包含 loxP 和 lox72 位点序列 (Albert 等, 1995)。

[0050] 在两个重组分子上, 采用相同的 lox 或 FRT 位点的位点定向整合导致插入的 DNA 两侧邻接相同的重组位点, 这是一种易通过重组酶逆转的反应。为了防止插入序列的缺失, 通常需要排除重组酶的酶来源, 例如, 通过分离或通过重组酶基因置于诱导型启动子的控制下并排除诱导源。或者, 本领域技术人员可采用这样设计的位点专一重组序列, 以便在整合反应后, 所得位点与反向反应不相容或者减速进行重组。

[0051] 本领域技术人员应当了解的是, 可通过本领域已知的任何方法, 向一个或多个靶位点 (例如 lox 或 FRT) 提供整合酶, 例如 Cre 或 FLP 重组酶。例如, 可通过基因和留存在宿主细胞内单独保持的质粒中的合适调控序列的表达而瞬时供应重组酶。重组酶基因和合适的调控序列可插到生物基因组中, 并在宿主细胞中稳定表达。或者, 可应用有性杂交或育种将重组酶导入含有一个或多个靶 lox 或 FRT 位点的细胞中; 在这种情况下, 含有重组酶基因的生物 (例如植物) 可与含有 lox 或 FRT 靶位点的植物杂交, 得自这种杂交的子代可能含有重组酶和一个或多个靶位点。在一些情况下, 可将编码所需重组酶的 mRNA 导入宿主细胞以编码和提供重组酶蛋白。在其它情况下, 可将分离的重组酶蛋白导入包含靶重组位点的宿主细胞内。在这些情况的任一种情况下, 指导重组酶表达的启动子可以是但不限于组成型或诱导型的方式。本领域技术人员还应当了解的是, 重组酶基因 (例如 Cre 或 FLP) 的基因可以分别从噬菌体 P1 或酿酒酵母中分离出来, 并直接用于新的宿主系统, 或者对于转基因宿主中密码子选择的表达, 可以使基因序列最优化。本领域技术人员应当了解的是, 可用合适的重组酶按类似方式识别天然存在的和合成的靶位点并介导重组。

[0052] 重组酶介导的基因置换或基因切除的实例通常利用邻接将被置换或切除的序列的两个靶位点。例如, Ode11 等人 (美国专利第 5, 658, 772 号) 公开了在烟草中使用两个 loxP 位点和 Cre 重组酶产生特异性基因置换。还使用 Cre/lox 系统在转基因植物中以诱导型方式激活并去除转基因 (PCT 公布号 WO 01/40492)。Baszczynski 等人 (美国专利第 6, 187, 994 号) 公开了在玉米中使用多个不相同的 FRT 位点和 FLP 重组酶以产生多种基因变化。Baszczynski 等人 (美国专利第 6, 262, 341 号) 还公开了使用具有双靶位点特异性的嵌合 Cre/FLP 重组酶来实现一侧邻接 lox 序列、另一侧邻接 FRT 序列的 DNA 序列的重组。在这些情况的各种情况中, 序列的整合或切除产生了作为部分重组方案的外源 DNA 片段。然而, 位点定向整合只可利用受体基因组中的一个靶位点。本发明提供了非复制性的、体外产生的、易转化的环状分子的 Cre 介导靶向整合, 该环状分子含有将进入之前已导入靶基

因组的第二单一 lox 位点的第一单一 lox 位点。

[0053] II. 用于本发明的基因

[0054] 本领域技术人员应当了解的是,本发明的微染色体可用于表达多种基因。在一些优选的实施方案中,这些基因赋予包含本发明微染色体的植物农艺上优良的性状。下面提供了一些用于本发明的非限制性基因实例。

[0055] A. 除草剂抗性

[0056] 已知多种除草剂抗性基因,这些基因可用于本发明。一个实例是赋予咪唑啉酮(imidazalinone)或磺酰脲等除草剂抗性的基因,所述除草剂抑制生长点或分生组织。这类编码突变型 ALS 和 AHAS 酶的示例性基因参见例如 Lee 等(1988)、Gleen 等(1992)和 Miki 等(1990)。

[0057] 可以使用草甘膦的抗性基因(分别由突变型 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合酶(5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase, EPSP)和 aroA 基因赋予的抗性)和其它膦化合物的抗性基因,例如草铵膦(膦丝菌素乙酰基转移酶(phosphinothricin acetyl transferase, PAT)基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)膦丝菌素乙酰基转移酶(bar)基因)。参见例如 Shah 等人的美国专利第 4,940,835 号,它公开了可以赋予草甘膦抗性的 EPSPS 形式的核苷酸序列。可按 ATCC 保藏号 39256 获得编码突变型 aroA 基因的 DNA 分子,Comai 的美国专利第 4,769,061 号中公开了该突变型基因的核苷酸序列。Kumada 等人的欧洲专利申请号 0 333 033 和 Goodman 等人的美国专利第 4,975,374 号公开了赋予除草剂(例如 L-膦丝菌素)抗性的谷氨酰胺合成酶基因的核苷酸序列。膦丝菌素乙酰基转移酶基因的核苷酸序列参见 Leemans 等人、DeGreef 等人(1989)的欧洲申请第 0 242 246 号,它记载了表达编码膦丝菌素乙酰基转移酶的嵌合 bar 基因活性的转基因植物的产生。示例性的赋予苯氧基丙酸和环己烷二酮类(例如拿捕净和吡氟氯禾灵)抗性的基因是 Marshall 等人(1992)披露的 Acct-S1、Accl-S2 和 Acct-S3 基因。

[0058] 赋予抑制光合作用的除草剂抗性的基因也是已知的,例如三嗪(psbA 和 gs+ 基因)和苯甲腈(腈水解酶基因)。Przibilla 等人(1991)描述了用编码突变型 psbA 基因的质粒转化衣藻(*Chlamydomonas*)。Stalker 的美国专利第 4,810,648 号公开了腈水解酶基因的核苷酸序列,可按 ATCC 保藏号 53435、67441 和 67442 获得含有这些基因的 DNA 分子。谷胱甘肽 S-转移酶编码 DNA 的克隆和表达参见 Hayes 等(1992)。

[0059] B. 雄性不育和雄性育性的恢复

[0060] 赋予雄性不育的基因和雄性育性的恢复系的实例是本领域已知的,包括以下专利所公开的基因和恢复系:美国专利第 3,861,709 号、美国专利第 3,710,511 号、美国专利第 4,654,465 号、美国专利第 4,727,219 号、美国专利第 5,530,191 号、美国专利第 5,625,132 号和美国专利第 5,689,041 号,所述专利的公开内容均通过引用全部特别结合到本文中。

[0061] 雄性不育基因可增加用其产生杂种的效率,因为它们排除了在指定杂交中给用作母本的玉米植株物理去雄的需要。

[0062] 如果需要采用本发明的雄性不育性系统与玉米植物时,同样利用一个或多个雄性育性恢复系基因可能是有益的。例如,如果使用胞质雄性不育(CMS),则产生杂种种子需要 3 个近交系:(1)具有 CMS 胞质的胞质雄性不育系;(2)具有正常胞质的能育性近交系,这对于核基因而言是与 CMS 系等基因的(“保持系”);和(3)不同的具有正常胞质的能育性近

交系,它携带育性恢复基因(“恢复”系)。CMS 系通过用保持系授粉而进行繁殖,其所有子代均是雄性不育,因为 CMS 胞质得自母本。在与恢复系杂交的杂种中,这些雄性不育植物于是可有效地用作母本,而无需给母本的雄性生殖部分进行物理去雄。

[0063] 雄性育性恢复系基因的存在导致产生完全能育的 F_1 杂种后代。如果父本中不存在恢复基因,则得到雄性不育杂种。当使用玉米植物营养组织(例如用于青贮饲料),这类杂种是有益的,但是在大多数情况下,种子仍被认为是最有价值的作物部分,所以必需恢复这些作物杂种的育性。因此,本发明的一个方面涉及杂交玉米植物 CH389090,该玉米植物包含能够在其它雄性不育植物中恢复雄性育性的遗传基因座。可应用于本发明植物的雄性不育性基因和相应恢复系的实例为植物育种领域技术人员所熟知,可参见例如美国专利第 5,530,191 号、美国专利第 5,689,041 号、美国专利第 5,741,684 号和美国专利第 5,684,242 号,所述专利的公开内容通过引用全部特别结合到本文中。例如,恢复系基因可以是 Rf3 基因(Duvick,1965;Chase 和 Gabay-Laughnan 2004;Gabay-Laughnan 等,2004)或用于 Barnase/Barstar 恢复系统的基因(Mariani 等,1990;Mariani 等,1992)。

[0064] C. 抗病性

[0065] 植物防御通常由植物中的抗病性基因(R)产物与病原体中的相应无毒(Avr)基因产物之间特异性相互作用激活。植物系可用克隆的抗性基因转化以改造成抗特定病原体毒株的植物。参见例如 Jones 等(1994)(黄枝孢(*Cladosporium fulvum*)抗性的番茄 Cf-9 基因的克隆);Martin 等(1993)(丁香假单胞菌致病变种(*Pseudomonas syringae* pv.)抗性的番茄 Pto 基因)和 Mindrinos 等(1994)(丁香假单胞菌抗性的拟南芥 RSP2 基因)。

[0066] 病毒侵袭蛋白或由其衍生的复合毒素也可用于病毒病抗性。例如,转化植物细胞中,病毒外壳蛋白蓄积赋予了对产生该外壳蛋白基因的病毒以及相关病毒引起的病毒感染和/或病害发展的抗性,参见 Beachy 等(1990)。外壳蛋白介导的抗性被赋予转化植物以对抗苜蓿花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草线条病毒、马铃薯 X 病毒、马铃薯 Y 病毒、烟草蚀斑病毒、烟草脆裂病毒和烟草花叶病毒。

[0067] 还可使用病毒特异性抗体。参见例如 Tavladoraki 等(1993),他们指出表达重组抗体基因的转基因植物受到保护而免于病毒侵染。

[0068] 例如,Logemann 等人(1992)公开了表达大麦核糖体失活基因的转基因植物增加了真菌病抗性。

[0069] D. 糯性谷物淀粉

[0070] 糯性特征是隐性性状的实例。在这个实例中,由第一回交代(BC1)得到的子代必须生长和自交。然后对得自 BC1 植物的自交种子进行检验以确定 BC1 植物携带糯性性状的隐性基因。在其它隐性性状中,需要进行额外子代的检验,例如使额外子代(例如 BC1S1)生长,以确定植物携带的隐性基因。

[0071] E. 抗虫性

[0072] 抗虫性基因的一个实例包括苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)蛋白、其衍生物或其合成的模式多肽。参见例如 Geiser 等(1986),他们公开了 Bt δ -内毒素基因的克隆和核苷酸序列。此外,编码 δ -内毒素基因的 DNA 分子可按例如 ATCC 保藏号 40098、67136、31995 和 31998,购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas, Virginia)。另一个实例是凝集素。参见例如 Van Damme 等(1994),

他们公开了君子兰 (*Clivia miniata*) 甘露糖结合凝集素基因的若干核苷酸序列。也可采用维生素结合蛋白,例如抗生物素蛋白。参见 PCT 申请 US93/06487,所述申请的内容通过引用结合到本文中。这个申请教导了抗生物素蛋白和抗生物素蛋白同源物作为针对害虫的杀幼虫剂的用途。

[0073] 而另一个抗虫性基因是酶抑制物,例如蛋白酶 (protease) 或蛋白水解酶 (proteinase) 抑制物或淀粉酶抑制物。参见例如 Abe 等 (1987) (水稻半胱氨酸蛋白酶抑制物的核苷酸序列)、Huub 等 (1993) (编码烟草蛋白酶抑制物 I 的 cDNA 核苷酸序列) 和 Sumitani 等 (1993) (硝孢链霉菌 (*Streptomyces nitrosporeus*) α -淀粉酶抑制物的核苷酸序列)。还可采用昆虫特异性激素或信息素。参见例如 Hammock 等人 (1990) 有关杆状病毒表达的克隆保幼激素酯酶 (一种保幼激素的钝化物) 的公开内容。

[0074] 还有的其它实例包括昆虫特异性抗体或其衍生的免疫毒素和发育停顿蛋白。参见 Taylor 等 (1994),他们指出转基因烟草中通过产生单链抗体片段使酶失活。

[0075] F. 改进的脂肪酸代谢、肌醇六磷酸代谢和糖代谢

[0076] 可以采用赋予改进脂肪酸代谢的基因。例如,可以采用硬脂酰 ACP 去饱和酶基因 (参见 Knutzon 等 (1992))。还披露了各种脂肪酸去饱和酶 (基因),例如酿酒酵母 OLE1 基因,其编码 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶,这是一种由棕榈酰 (16:0) 辅酶 A 或硬脂酰 (18:0) 辅酶 A 形成单不饱和棕榈油酸 (16:1) 和油酸 (18:1) 脂肪酸的酶 (McDonough 等,1992);编码蓖麻硬脂酰酰基载体蛋白 $\Delta -9$ 去饱和酶的基因 (Fox 等 1993);蓝细菌集胞藻 (*Synechocystis*) 负责将亚油酸 (18:2) 转化成 γ -亚麻酸 (18:3 γ) 的 $\Delta 6$ -去饱和酶和 $\Delta 12$ -去饱和酶 (Reddy 等 1993);得自拟南芥的编码 $\omega -3$ 去饱和酶的基因 (Aronde1 等 1992);植物 $\Delta 9$ -去饱和酶 (PCT 申请公布号 W091/13972) 及大豆和芸苔 (*Brassica*) $\Delta 15$ 去饱和酶 (欧洲专利申请公布号 EP 0616644)。

[0077] 还可通过导入肌醇六磷酸酶编码基因以提高肌醇六磷酸的分解,将更多游离磷酸加到转化植物中,从而改进肌醇六磷酸代谢。例如,有关黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 肌醇六磷酸酶基因的核苷酸序列的公开内容可参见 Van Hartingsveldt 等 (1993)。例如,在玉米中,这可通过克隆然后再导入与单一等位基因有关的 DNA 来完成,所述单一等位基因是造成以低水平肌醇六磷酸为特征的玉米突变型的原因 (参见 Raboy 等 (1990))。

[0078] 已知可用来改变糖代谢的多种基因。例如,植物可用编码改变淀粉分支模式的酶的基因转化。参见 Shiroza 等 (1988) (变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 果糖基转移酶基因的核苷酸序列)、Steinmetz 等 (1985) (枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖酶 (蔗糖 6-果糖基转移酶) 基因的核苷酸序列)、Pen 等 (1992) (表达地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶的转基因植物的产生)、Elliot 等 (1993) (番茄转化酶基因的核苷酸序列)、Sergaard 等 (1993) (大麦 α -淀粉酶基因的位点定向诱变) 和 Fisher 等 (1993) (玉米胚乳淀粉分支酶 II)。得自玉米并编码 10kD 玉米醇溶蛋白贮藏蛋白的 Z10 基因还可用来改变细胞中 10kD 玉米醇溶蛋白相对于其它组分的含量 (Kirihara 等,1988)。

[0079] III. 植物及其用途

[0080] 本发明提供包含本发明的植物微染色体的转基因植物,其中包括但不限于苜蓿、玉米、油菜、水稻、大豆、烟草、草坪草、燕麦、黑麦和小麦。还包括植物的种子,所述种子包含

本发明的微染色体。

[0081] 例如,在某些实施方案中,包含本发明的微染色体的种子可表达赋予除草剂耐受性的基因。除草剂耐受性基因的一个有益实例提供草甘膦(N-(膦酰基甲基)甘氨酸)抗性,包括这类除草剂的异丙胺盐形式。

[0082] 在实施本发明时可与植物的其它病害防治性状组合以获得用于提高防治植物病害所需的性状。将应用截然不同的作用方式的病害防治性状组合在一起,可以为转基因植物提供比带有单一防治性状的植物更一致并更持久的保护,因为田间发生抗性的概率降低。

[0083] 本发明还涉及含有一个或多个本发明微染色体的商品以及由含有一个或多个微染色体的重组植物或种子生产的商品。含有一个或多个本发明序列的商品往往包括但不限于碾碎谷物、油品、压碎谷物、整粒谷物或植物种子,或者包含含有一个或多个本发明序列的重组植物或种子的任何碾碎谷物、油品、压碎谷物、整粒谷物的任何食品。在一种或多种商品或本文所包括的产品中检测出一个或多个本发明的序列实际上是商品或产品包含本发明微染色体的证据。

[0084] 本发明又一方面涉及包含微染色体的植物的组织培养物。本文所用术语“组织培养物”是指包含相同或不同类型的分离细胞的组合物或者构成植物部分的这类细胞的集合体。示例性的组织培养物的类型为原生质体、愈伤组织和在植物或植物部分是完整的植物细胞,例如胚、花粉、花、种仁、穗、穗轴、叶、苞叶(husk)、柄、根、根尖、花药、玉米长须,等等。在一个优选的实施方案中,组织培养物包括从这些植物部分未成熟组织中得到的胚、原生质体、分生组织细胞、花粉、叶或花药。植物组织培养物的制备和保持方法是本领域众所周知的(美国专利第5,538,880号和美国专利第5,550,318号,所述各专利都通过引用全部结合到本文中)。举例来说,包含器官(例如雄花穗或花药)的组织培养物已被用来产生再生植物(美国专利第5,445,961号和美国专利第5,322,789号;所述专利的公开内容都通过引用结合到本文中)。

[0085] 一种玉米组织培养物类型是雄花穗/花药培养物。雄花穗含有花药,花药进而包住小孢子。小孢子发育成花粉。对于花药/小孢子培养物,如果雄花穗是植物组成部分,则优选在当小孢子为单核时的阶段挑选出,也就是说只包括1个而不是2个或3个核。确定正确阶段的方法为本领域技术人员所熟知,包括卡普霉素(mitramycin)荧光染色法、锥虫蓝(优选)和乙酸洋红压片法。已观察到单核小孢子阶段中期是对本文随后公开的最终产生植物的方法作出最大反应的发育阶段。

[0086] 尽管含有小孢子的植物器官(例如雄花穗)一般可在大约25℃以下的任何低温下进行预处理,但是优选4-25℃的范围,特别优选8-14℃的范围。尽管其它温度也产生胚状体并再生出植物,但是比起优选范围之外温度预处理,低温处理产生最佳反应速度(response rate)。反应速度用培养物中激发的胚状体数或者每小孢子数再生的植株数表示。小孢子培养的示例性方法参见例如美国专利第5,322,789号和美国专利第5,445,961号,所述专利的公开内容通过引用特别结合到本文中。

[0087] 此外,在本发明的某些实施方案中,起始植物或植物细胞用核酸(例如端粒截短载体)转化。用核酸转化植物细胞的方法为本领域技术人员所熟知。例如,该方法可采用本文列举的土壤杆菌介导的转化或DNA粒子轰击。已经开发出某些用于转化高分子量核酸

的专门方法。例如, Hamilton 及其同事设计的 BIBAC 系统 (Hamilton, 1997 ; Hamilton 等, 1996 ; 专利号 5, 733, 744), 用于大的 T-DNA 插入片段转化至植物基因组。BIBAC 结合了 Ti 质粒的 T-DNA 转移功能和保持细菌人工染色体 (BAC) 大的 DNA 片段的能力。至于 BAC, 它具有单拷贝的大肠杆菌 F 质粒的复制起点, 用于将质粒稳定保持在大肠杆菌中。它还具有单拷贝的土壤杆菌 Ri 质粒的复制起点和用于 T-DNA 转化的 T-DNA 边界。一个类似系统, 具有大肠杆菌噬菌体 P1 起点的可转化人工染色体 (TAC), 也已用于大的 DNA 的转化 (Liu 等, 1999)。

[0088] IV. 包含微染色体的植物的育种

[0089] 如上文所述, 可按照本发明使用起始天然植物染色体产生植物微染色体。在一些实施方案中, 用于本发明的天然染色体可为玉米染色体, 例如玉米 B 染色体或玉米 A 染色体。例如, 可使用表 1 中所列的任何玉米 (*Zea mays*) 染色体作为制备本发明微染色体的起始染色体。

[0090] 表 1 表示玉米 A 染色体的大小, 单位为兆碱基对 (Mb) 或厘摩 (cM)。单位为 cM 的大小可通过 Sharopova 等人 (2002) 介绍的两种不同的方法测定。

[0091] 表 1 : 玉米 A 染色体大小

[0092]

染色体	大小		
	兆碱基对(Mb)	IBM v2 (cM)	UMC98 (cM)
1	337	975	248
2	278	612	207
3	259	685	166
4	271	684	175
5	250	607	174
6	208	492	168
7	199	566	147
8	202	567	183
9	191	581	150
10	170	472	134

[0093] 还应当了解的是在一些情况下, 微染色体包含位点专一重组位点。因此, 包含微染色体的任何植物变种均可用能够通过位点专一重组将转基因导入微染色体的载体进行转化。植物微染色体一旦产生, 则通过本领域众所周知的植物育种技术可容易地渐渗到所需遗传背景中。

[0094] 因此, 本发明提供用于包含微染色体的植物的育种方法。按照这一方法, 可将第一亲本植物与第二亲本植物杂交, 其中第一植物和第二植物包含微染色体, 或者其中至少一种植物包含微染色体。例如, 包含微染色体的玉米植物 (夏玉米 (*Zea mays* L.)) 可通过自然或机械技术进行杂交。

[0095] 有花植物当风或昆虫从植物中传播出花粉时, 便产生天然授粉。然而, 可通过控制传入花粉的类型或者通过人工授粉进行机械授粉。在一个实施方案中, 杂交包含以下步骤:

[0096] (a) 以传粉接近的方式播种第一亲本植物和第二亲本植物的种子, 优选为第一近交植物的种子和不同的第二近交植物的种子;

- [0097] (b) 将第一亲本植物和第二亲本植物的种子培育或生长成为开花植物；
- [0098] (c) 将第一亲本植物或第二亲本植物的花去雄，即对花进行处理从而防止花粉产生，或者用作母本雄性不育植物，从而提供去雄亲本植物；
- [0099] (d) 允许在第一亲本植物和第二亲本植物之间发生天然异花传粉；
- [0100] (e) 收获去雄亲本植物所产生的种子；并且如果需要，
- [0101] (f) 将收获的种子栽培成植物，优选杂交植物。

[0102] 通常通过以交替行、小区或者以任何其它方便的种植模式种植亲本植物，来以彼此传粉接近的方式种植亲本植物。如果亲本植物性成熟的时间不同，则可能需要先种植成熟较慢的植物，从而确保在母本可接纳花粉期间可获得父本的花粉。栽培两个亲本的植物，并允许生长到开花时。最好在这个生长阶段，根据栽培人员的适当考虑，用肥料和 / 或其它农药对植物进行一般处理。

[0103] 开花时，如果包含微染色体的植物是父本，则从用作母本植物的所有植物上摘除这些亲本植物的产花粉器官以避免自花传粉。这可以手工进行，但是如有需要也可以用机器进行。或者，当母本植株包含赋予雄性不育的胞质基因或核基因时，则可能不需要摘除产花粉的器官。另外，可以使用化学去雄剂使雌株的雄性花不育。在这种情况下，用作雄株的亲本植物可不用化学药剂处理，或者可包含引起化学药剂去雄作用抗性的遗传因子。去雄剂影响参与发育、成熟或花粉释放的过程或细胞。经这类去雄剂处理的植物呈雄性不育，但是通常保持雌性育性。化学去雄剂的应用参见例如美国专利第 4, 936, 904 号，其公开内容通过引用全部结合到本文中。此外，PCT 公布号 WO 98/44140 公开了将草甘膦耐药性玉米植物与 ROUNDUP 除草剂 (Monsanto, St. Louis, MO) 配合使用，以产生雄性不育玉米植物。

[0104] 去雄后，通常再使植物继续生长，由于风的作用而发生天然异花传粉，这在禾本科（例如玉米）授粉中是常见的。由于母本植物被去雄，父本植物的所有花粉都可用于授粉，因为之前已从杂交中用作雌株的所有植物上摘除了带有花粉的开花部分。当然，在这个杂交过程期间，使亲本变种如此生长，即与其它田间植物隔离，从而将外部来源花粉的任何意外污染减到最小，或者防止外部来源花粉的任何意外污染。这些隔离技术均在本领域技术人员掌握之中。

[0105] 可使杂交的两个亲本植物继续生长直到成熟，或者开花结束后可毁掉雄性行。仅收获母本植物的种子以得到新的 F_1 杂交种子。然后，可在随后的生长季节，将所产生的新的 F_1 杂种种子播种在商业化田间，又或者继续育种方案以便开发新的近交系。

[0106] 或者，在本发明另一个实施方案中，第一亲本植物和第二亲本植物的一种或两种可包含植物微染色体。因此，包含本发明的微染色体的任何植物均构成本发明的组成部分。本文所用杂交可指自交、回交、与其它变种或同一变种杂交、与种群杂交等。因此，采用包含微染色体的植物作为亲本所产生的所有玉米植物均在本发明范围内。

实施例

[0107] 下面实施例用于进一步说明本发明的各个方面。本领域技术人员应当理解的是，以下实施例中所公开的技术代表本发明的发明人在实施本发明中操作良好的技术和 / 或组合物，因此可被视为构成其实施的优选方式。然而，本领域技术人员应当了解的是，根据本公开内容，在已公开的具体实施方案中进行多种修改，依然可得到相同或类似结果而不

会偏离本发明的精神和范围。

[0108] 实施例 1

[0109] 截短端粒的通用方法

[0110] 端粒介导的染色体的截短通过将 6 拷贝的端粒重复序列由转化质粒导入内源植物染色体中来实现。在这个特殊情况下,由 Richards 和 Ausubel (1988) 之前克隆的拟南芥端粒制备了端粒重复序列。玉米 Hi II (Armstrong 和 Green, 1985) 未成熟胚根据土壤杆菌介导的转化方案用标准双元载体进行了转化 (Frame 等, 2002)。在土壤杆菌介导的转化期间, T-DNA 用土壤杆菌 VirD2 和 VirE 蛋白进行保护, 并且通过异常重组机制整合到植物基因组内。可能发生少量缺失, 大多数发生在左边界区, 有时发生在右边界区。然而, 这些缺失不会破坏端粒序列。端粒重复序列的存在使得在整合时将染色体截短。已经证实端粒相关染色体截短的发生, 并且在哺乳动物细胞内已被用来产生微染色体 (Farr 等, 1991、1992、1995; Barnett 等, 1993; Itzhaki 等, 1992; Heller 等, 1996; Mills 等, 1999; Saffery 等, 2001)。采用两个端粒介导的染色体截短构建体, 证实了 6 拷贝的同向拟南芥端粒单元可在玉米中使染色体截短。

[0111] 构建了两种染色体截短的双元构建体用于玉米 Hi II 未成熟胚的土壤杆菌介导的基因转化 (pWY76 和 pWY86; 参见图 1)。对于 pWY76 和 pWY86, 分别使 93 个和 83 个转基因系恢复。应用荧光原位杂交 (FISH) 方法 (Kato 等, 2004) 检测了 T0 转基因植物中期染色体的转基因。对于 pWY76 观测到共 123 个转基因整合位点, 对于 pWY86 观测到 107 个位点, 分别有 54 个和 55 个整合位点位于染色体末端。在其中发生了染色体截短的转基因系中, 还观察到花粉败育。此外, 通过核型分析探针混合物, 在若干转基因系中检测到远端 FISH 标记的缺失。例如, 在一个 pWY76 转基因系中, 3 号染色体短臂被截短。DNA 印迹法分析表明杂交条带图不清晰, 这是异源基因新接入到端粒的典型特征 (Farr 等, 1991)。这些研究表明, 在这些转基因系中发生了染色体截短。为了与 pWY76 和 pWY86 转基因相比较, 还同时将另外两种无端粒重复序列的构建体进行了转化; 然而, 没有观察到染色体的截短。这些结果表明, 端粒重复序列是染色体截短的原因。

[0112] 通过 FISH 筛选, 在一个 pWY86 系中观察到 A 染色体衍生的微染色体。发现这个微染色体起源于 7 号染色体, 其长臂的大部分缺失。最初是在无 B 染色体的四倍体系中观察到这个微染色体。由于它发生在多倍体中, 由染色体的截短引起的缺陷被其二倍体配子体的同源物补偿。实际上, 在其中一个染色体缺陷的二倍体系中, 没有观察到通常所观察到的 50% 花粉败育, 在与由二倍体植物恢复的转化体杂交后, 含有这种微染色体的子代得到恢复, 这使倍性水平降低至三倍体。倍性水平被进一步降低至二倍体并加上 Hi II 和 Mo17 背景下的微染色体。进一步的研究表明这个微染色体不会引起任何异常的表型。作为雄株当与二倍体植物杂交时, 该微染色体以 38.5% (10/26) 的比率传递。

[0113] 用于植物端粒截短的核酸构建体

[0114] 采用双元载体 pTF101.1 构建了两个截短构建体和无端粒对照 (Paz 等, 2004), 被用来产生微染色体 (参见图 1 构建体图谱)。这些构建体上的组分按顺序排列如下: pWY76: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-lox66-GFP-Tnos-Pmas-HPT-Tmas-6x 端粒 -RB, pWY86: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-lox71-DsRed-Tnos-Pnos-FRT-FLP-Tnos-6x 端粒 -RB 和 pWY96: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-lox71-DsRed-Tnos-Pnos-FRT-FLP-Tnos-Pmas-HPT-Tmas-RB。

[0115] pWY76 和 pWY86 中分别包括无启动子的 lox66-GFP 或 lox71-DsRed 融合基因, 允许其它基因专一性整合到 lox 位点上。另外, pWY86 上包括的 Pnos-FRT-FLP-Tnos 盒, 允许在 FRT 位点上进行位点专一重组以进行进一步基因整合。

[0116] 实施例 2

[0117] B 染色体的端粒截短

[0118] 为了通过端粒介导的染色体的截短来产生微 B 染色体, 将得自墨西哥黑甜玉米 (Black Mexican Sweet, BMS) 的玉米细胞的 B 染色体导入玉米 HiII 亲本 A 系, 并使之积蓄至多拷贝。通过基因枪转化 (biolistic transformation) (Frame 等, 2000), 将两个端粒相关染色体的截短构建体与 pACH25 构建体 (Christensen 和 Quail, 1996) 混合以靶向具有多个 B 染色体的 HiII 杂种未成熟胚或 HiII 亲本 A 未成熟胚。由 pACH25 构建体的玉米泛蛋白启动子驱动的 bar 基因能够有效地选出补充了双丙氨酸的培养基中的转基因事件。B 染色体和 A 染色体构建体截短物的端粒序列一旦整合到染色体上, 便可从截短的 B 染色体和 A 染色体产生微染色体。通过 FISH, 由再生的除草剂抗性植物 (T0) 获得的根尖中期染色体中筛选出微染色体。采用 pACH25 质粒和 pWY96 构建体 (参见实施例 1) 作为 FISH 筛选的探针, 这具有除端粒序列以外几乎所有 pWY76 和 pWY86 两者的序列 (参见下文)。pWY96 探针可与 pWY76 和 pWY86 转基因两者进行有效杂交。使用 B 重复序列探针以鉴定 B 染色体的截短 (Alfenito 和 Birchler, 1993)。鉴定了 48 个微染色体; 其中 41 个来自 B 染色体, 7 个来自 A 染色体。得自 B 染色体的所有微染色体是可传递的, 其大多数在 T1 代恢复。在 3 个截短的 A 微染色体上进行 A 染色体加倍处理 (Kato 和 Birchler, 2006) 以保存微染色体, 否则如果保存在二倍体的话, 它们将在减数分裂中丢失。

[0119] 实施例 3

[0120] 用 BIBAC 载体系统通过土壤杆菌介导的基因转化表达 Cre 基因

[0121] 对于具有包括除草剂抗性标记基因、作为荧光原位杂交 (FISH) 标记的 30kb 酵母基因组 DNA 和 35S-lox-Cre 重组表达盒在内的大量遗传物质的玉米转化, 采用了 BIBAC™ 载体系统。简单地讲, 如下构建了 BIBAC 基因转化质粒 pJV21。对 pCH20 载体 (Hamilton, 1997) 进行了改进以使 BamHI 至 SmaI 片段缺失。通过在 SmaI 位点上添加 BamHI 接头, 随后用 BamHI 消化并再连接, 重新构建了 BamHI 位点。所得质粒称为 pJV06。通过平端连接, 将得自 pED97 的含有 35S-loxP-Cre 基因表达盒的 3.4kb HindIII/SaI 片段克隆到 BamHI 位点来制备 pJV08。接着, 将得自 pAHC25 (Christensen 等, 1992) 的 400bp 端粒序列和 ubi-bar 基因表达盒装配到 pBLUESCRIPT™ (Stratagene, La Jolla, California) 中, 然后通过平端连接克隆到 pJV08 的 SrfI 位点以制备 pJV15, 其中端粒序列被置于双元载体的左边界。对于这些研究, ubi-bar 基因被用作选择标记。端粒序列 TTTAGGG (SEQ ID NO:1) 指向左边界。通过平端连接将另一个 400bp 端粒序列克隆到 PacI 位点以制备 LB 上的 800bp 端粒序列的同向重复序列。对克隆进行了测序以证实端粒重复序列的方向。然后, 将得自 BIBAC1 (Hamilton, 1997; Hamilton 等, 1996) 的 30kb 酵母 DNA 克隆到 NotI 位点以制备 pJV21 (图 2)。按照生产商的说明书 (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, California), 对感受态细胞进行电穿孔, 将构建体转移到土壤杆菌菌株 LBA4404 中。在这个构建体中, 在邻近右边界处克隆 35S-lox66-Cre 表达盒, 以便通过基因转化将 Cre/lox 位点专一重组系统置入基因组。

[0122] 遗传转化

[0123] 土壤杆菌介导的基因转化用 pJV21 构建体进行以转化具有 0-12 个 B 染色体的 HiII 植物的未成熟胚。75 个转化系得到恢复。转基因通过 DNA 杂交和 FISH 得到证实 (Kato 等, 2004)。在以 DNA 杂交为特征的 60 个系中, 45 个系具有单拷贝转基因。75 个转基因系中的 63 个具有单一转基因, 由 FISH 得到证实。分别用 bar 基因和 Cre 基因探针, 通过在 T-DNA 区的左端和右端的 DNA 印迹杂交, 对转基因完整性进行了分析。在已分析的 75 个系中, 观察到 52 个转基因系在左边界和右边界具有相同的拷贝数, 这就表明了在这些情况下转基因是完整的。

[0124] 转基因整合到端粒区

[0125] 与具有分离条带的转基因事件相比, 一个转基因事件 J11-9 的 DNA 杂交条带图不清晰。不清晰的杂交条带图是由天然端粒活性或者在端粒介导的染色体的截短期间接入新端粒所产生的端粒特点, 因为端粒末端转移酶在不同细胞中添加了不同数目的端粒基序 TTTAGGG ; (SEQ ID NO :1) (Fart 等, 1991 ; Richards 和 Ausubel, 1988)。为了证明这个转基因的末端性质, 使用切割正好在 800bp 端粒重复序列之前的转基因远端区的多个限制酶来消化 J11-9 基因组 DNA, 并按有关方法 (Yu 等, 2006b) 用 ³²P 标记的 bar 基因探针进行 DNA 杂交。不清晰杂交条带图根据 3 个限制酶切割位点 (xbaI, XhoI 和 DraI) 和染色体端粒末端之间的距离发生了位移。例如, 最近端的酶 DraI 形成范围超过 6kb 的最大尺寸的不清晰条带图, 而最远端的一个 XbaI 形成范围为 3.2-4.6kb 的不清晰条带图, XhoI 形成的不清晰图介于 5-6kb。相比之下, 在较近端的 HindIII 位点上的切割形成了分离条带。如果 HindIII 位点在 bar 基因探针远端, 则可形成分离条带。这个 HindIII 位点很可能存在于天然端粒中, 因为在我们的 pJV21 构建体的序列数据没有观察到该位点。因此, J11-9 中转基因的末端位置可能是端粒内整合事件的结果而不是端粒从头形成的结果。另外, 在 J11-9 植物中没有观察到生长异常、配子体不育或传递减弱, 这就表明没有由该转基因引起的功能遗传物质的丢失, 这种现象常常在具有染色体的截短的转基因植物中观察到 (Yu 等, 2006b)。

[0126] 通过细胞学分析也显示了这个转基因的末端定位。使得自 J11-9 根尖的染色体与荧光素-dUTP 标记的 30kb DNA 探针杂交, 该探针与核型分析混合物相混合 (Kato 等, 2004)。用该混合物产生出 HiII 转化受体的核型 (Yu 等, 2006a)。鉴定出该转基因在 3L 染色体臂的末端。

[0127] 转基因的位置和分布

[0128] 为了制作转基因位置和分布谱, 将 FISH 分析扩大到所有转基因系。通过 FISH, 在每个染色体核型 (表 2) 中观察到转基因, 且整合位点存在于或接近端粒、着丝粒、常染色质区、异染色质染色体 (knob) 和 NOR 区。除 8S 和 10S 外, 所有染色体臂都包括在内。转基因随机分布在 10 个 A 染色体上, 其中大染色体上的数目较多, 小染色体上的数目较少, 正如预期一样。然而, 在任何 B 染色体上均未观察到转基因, 尽管转化植物中存在多达 12 个 B 染色体 (“B”) (平均 3.9)。

[0129] 表 2 :转基因事件与由土壤杆菌介导的转化的玉米 pJV21 构建体

[0130]

转基因系	B	DNA 印迹		FISH	Cre 活性	染色体定位
		<i>bar</i>	Cre	Y30		
10-1	4	1	1	1	+	1L, 随体
10-2	5	1	1	1	+	1S
10-3	1	1	1	1	+	1S, 远端
10-4	3	1	1	1	+	1S
10-5	3	1	2	1	+	5S, 远端
10-6	4	1	0	1	+	6L
10-7	2	1	0	1	-	10L, 极远端
11-1	4	1	1	1	+	7L, 着丝粒-染色组-Y30
11-2	0	1	1	2	+	2L+7L, 2L=随体-Y30-5SRNA, 7L=远端
11-3	6	3	3	3	+	2C+4S+5L, 2C=着丝粒, 4S=随 体, 5L=中部
11-5	3	1	1	1	+	5L, 随体-Y30-染色组
11-6	4	1	2	1	+	2S, 着丝粒-Y30-随体
11-7	6	1	1	1	+	1L
11-8	3	2	3	1	+	1S, 着丝粒-Y30-染色组
11-9	5	1	1	2	+	3L+5L, 3L=极远端, 5L=远端
11-10	8	1	0	1	-	10L, 远端
11-11	3	2	1	1	+	7L, 染色组
11-12	1	1	1	1	+	1L, 远端
11-13	2	1	1	1	+	7L, 远端
11-14	4	1	1	1	+	1L
11-15	3	3	1	1	+	1S, 中部
11-16	4	3	1	1	+	6L, 中部
11-17	6	2	2	2	+	7L+7S, 7L=着丝粒-Y30-染色组
11-18	6	1	2	1	+	3S, 远端
11-19	2	1	1	1	+	7L
11-20	5	1	1	1	+	9S, 着丝粒-Y30-染色组
11-21	5	3	0	1	-	2C, 着丝粒
11-22	3	2	0	1	-	

[0131]

转基因系	B	DNA 印迹		FISH	Cre 活性	染色体定位
		<i>bar</i>	Cre	Y30		
11-23	8	1	2	1	+	1L, 随体
11-24	7	1	1	1	+	7L
11-25	7	1	1	1	+	3L, 远端
11-26	2	2	2	2	+	2L+9L, 2L=中部, 9L=远端
11-27	6	1	1	1	+	10L, 远端
11-28	4	1	1	1	+	5L, 远端
11-29	9	1	2	1	+	3S, 远端
11-30	1	1	1	1	+	5L, 染色纽
11-31	4	1	1	2	+	7L+10L, 7L=染色纽, 10L=极远端
11-32	2	1	1	1	+	4L, 远端
12-1	6	1	1	2	+	2L+7S
12-2	3	3	3	1	-	3S
12-3	11	2	2	2	+	4L, 中部
12-4	6	1	1	1	+	9L, 远端
12-5	5	1	2	1	+	7L, 远端
12-6	0	1	1	1	+	8L, 极远端
12-7	2	1	1	1	+	5L
12-8	0	1	2	1	+	1L+3L+6S, 1L=随体远端
12-9	2	1	1	1	+	4S, 接近随体
12-10	1	1	1	1	+	2S, 远端
12-11	5	1	1	1	+	9L, 中部
12-12	0	1	1	1	+	5L, 远端
12-13	2	1	1	1	+	4S, 着丝粒-Y30-随体
12-14	2	1	1	1	+	8L, 染色纽
12-15	2	1	0	1	+	4L, 中部
12-16	11	1	1	1	+	3L, 中部
12-17	6	1	1	1	+	4L, 中部
12-18	6	1	1	1	+	5L, 中部
12-19	4	3	3	1	+	6L, 远端
12-20	6	4	2	2	+	1L+10L, 1L=随体中, 10L=远端
12-21	0	2	1	1	+	2L, 中部

[0132]

转基因系	B	DNA 印迹		FISH	Cre 活性	染色体定位
		<i>bar</i>	Cre	Y30		
12-22	3	2	1	1	+	3L, 中部
12-23	1	1	0	0	-	
12-24	7	1	1	1	+	8L, 染色组
12-25	4	1	2	1	+	2L, 着丝粒-随体-Y30
12-26	5	1	1	1	+	10L, 远端
12-27	9	1	1	1	+	1S, 中部
12-28	3	1	1	1	+	
12-29	2	1	1	1	+	3L, 中部
12-30	5	1	0	1	+	1L
12-31	4	1	1	1	+	6S, NOR
12-32	4	1	1	1	+	3S, 远端
12-33	2	1	1	1	+	3L, 中部
12-34	3	1	1	1	+	2S, 远端
12-35	4	1	1	1	-	8L, 着丝粒-Y30-染色组
12-36	0	1	1	1	+	8L
12-37	2	1	1	2	+	1S+6L, 1S=染色组, 6L=远端

[0133] Cre/lox 位点专一重组系统

[0134] 用BIBAC构建体转化将84个转基因随机置入玉米基因组。这些转基因大多是完整的,如DNA杂交所示。用Cre基因探针通过DNA杂交在75个转基因系检测出91个转基因位点(表2)。为了证实这些Cre转基因的表达和功能,报道构建体pHK52(Srivastava等,1999)经基因枪递送到转基因植物子代的未成熟胚中。pHK52构建体含有处于玉米泛蛋白启动子之下的反义取向的 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUS)基因。反义GUS基因两侧邻接loxP位点的反向重复序列。反义GUS基因可逆转为有义取向,并在Cre重组酶存在下进行表达,该酶催化两侧邻接lox位点反向重复序列的遗传元件的倒位。对所有转基因系的轰击胚进行了瞬时GUS测定。这项研究证实,在68个系中Cre基因具有功能(表2)。对于J11-9与HiII系远交,分离出转基因的胚群体。在总共50个胚的30个中(比率约为1:1),其GUS表达被激活。

[0135] 实施例4

[0136] B染色体通过粒子轰击转化的端粒截短

[0137] 由于B染色体具有使其成为优选微染色体的许多性质,因此进行了进一步的研究以确定是否可以有效形成由B染色体衍生的植物微染色体。在这些研究中采用了端粒截短构建体pWY76和pWY86(图1)。另外,通过用PmlI/AvrII消化Y86并且自身连接以缺失35S-*bar*基因表达盒来制备质粒pWY86-*bar*。Christensen和Quail(1996)之前就描述了用于研究的质粒pAHC25。

[0138] 简单地讲,在层流罩超静台 (flow hood) 中,在无菌条件下解剖 1.2-2.0mm 之间的未成熟胚。按照 Songstad 等人 (1996) 和 Frame 等人 (2000) 所述方法,进行了玉米未成熟胚的基因枪介导的基因转化。将未成熟胚面朝下放置在含有 N6 盐和和维生素的愈伤组织诱导培养基 (pH 5.8) (Chu 等, 1975) 中,培养基补充了 2.0mg/L 2,4-D、100.0mg/L 肌醇、2.8g/L 脯氨酸、30.0g/L 蔗糖、100.0mg/L 酪蛋白水解物、3.0g/L GELRITE、25 μ M 硝酸银。将胚在 28°C 下诱导 2-4 天,然后转移到含有 N6 盐和和维生素的渗透培养基 (pH 5.8) 中,培养基补充了 2.0mg/L 2,4-D、100.0mg/L 肌醇、0.7g/L 脯氨酸、30.0g/L 蔗糖、100.0mg/L 酪蛋白水解物、36.4g/L 山梨醇、36.4g/L 甘露醇、3.0g/L GELRITE、25 μ M 硝酸银,在轰击前进行 4 小时渗透处理。

[0139] 质粒用 Qiagen 小量制备盒 (miniprep kit) (Qiagen, Valencia, California) 制备。将 3 毫克的 0.6 μ 金粒子 (BIO-RAD, Hercules, California) 涂上 1 μ g 端粒截短质粒 (pWY76、pWY86 或 pWY86-bar) 和 0.25 μ g pAHC25 的混合物。使用以下参数,用 PDS 1000/He 基因枪 (BIO-RAD) 进行轰击:650psi 破裂盘 (rupture disk) 压力,6cm 靶距,6mm 缝隙 (gap),1.2cm 从大载体 (macro-carrier) 至阻挡板 (stopping plate),破裂时 28Torr 真空。

[0140] 渗透培养基中经轰击的胚用 PARAFILM 包起来,在 28°C 下培育过夜后,次日转移至愈伤组织诱导培养基中。

[0141] 转基因植物微染色体的 FISH 分析

[0142] 通过上述 FISH,筛选出 T0 转基因植物的微染色体。pWY96 和 pAHC25 的探针通过切口平移用德克萨斯红 (Texas red) dCTP 标记 (Kato 等, 2004),与转基因杂交。B 重复序列 (Alfenito 和 Birchler 1993) 用 Alexa Fluor-488 dCTP 标记,并且分别与 pWY96 或 pAHC25 转基因探针混合以筛选通过基因枪介导的转化而转化的 B 染色体。CentC (Ananiev 等, 1998) 和 NOR (Stein 等, 1998) 探针用 Alexa Fluor-488 dCTP (Invitrogen) 标记;CRM (Zhong 等, 2000) 用 Cy5-dCTP 标记。微染色体根据它们与正常 A 型染色体或 B 型染色体相比较的大小来鉴定。按照 Gao 等人 (1999) 和 Yu 等人 (2006) 所述方法进行了减数分裂细胞的 FISH。B 重复序列用德克萨斯红 dCTP 标记,染色组序列 (14) 用 Alexa Fluor-488 dCTP 标记。

[0143] 从双丙氨磷抗性愈伤组织中再生出 281 个转基因事件 (67 个具有 pWY76, 87 个具有 pWY86, 127 个具有 pWY86-bar)。FISH 表明,41 个事件在 B 染色体上具有转基因,它包括 24 个具有远端转基因的微染色体和 20 个具有内部转基因的完整 B 染色体。另外,鉴定出 5 个 A-B 和 1 个 B-A 易位以及 7 个得自 A 染色体的片段。最后,还鉴定出 10 个无转基因信号的截短的 B 染色体衍生物。当端粒介导的染色体的截短出现在这样的定位即转基因保留在无着丝粒片段上,并且在有丝分裂期间丢失时,很可能发生这些事件。如果这些微染色体没有得到同一事件额外转基因的支持,则它们在转化过程的选择期间便可能丢失。因此,这些微染色体在数量上少于具有转基因的微染色体。

[0144] 微染色体大小的测量

[0145] 为了测量 86823 的 B 着丝粒重复序列的大小,将 B 重复序列被标记成绿色的绿色通道 (green channel) 的 10 个中期染色体图像输入 Fujifilm Image Gauge V3.3 程序 (Fuji, Tokyo, Japan)。对微染色体着丝粒的量和正常 B 染色体着丝粒的量进行了测定,计算出每个细胞微染色体着丝粒与正常 B 着丝粒的比率。计算出平均比率和标准差。为了测量 86B23 的染色体大小,粗线期染色体用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色,用 Zeiss

荧光显微镜 (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany) 拍摄图像, 并且输入 Fujifilm Image Gauge 程序 (Fuji)。测量了微染色体和正常 B 染色体的长度, 计算得出它们的比率。将其它微染色体与同一细胞正常 B 染色体进行比较, 根据其外观从直观上估计其它微染色体的大小。若干截短的 B 染色体的大小比较结果见表 3。

[0146] 微染色体的传递试验

[0147] 这些研究的结果表明, 减数分裂期间微染色体的传递各不相同 (表 3)。单价 R2 (34.8% 来自自花传粉) 的传递可与之前报道的等臂染色体 8S·8S (37.5%) (Yu 等, 2006) 相当。B 型微染色体通过父本的传递从 12% (86-74) 到 39% (76-15a) 不等 (表 3)。微染色体的传递受多种因素的影响, 例如染色体大小极限值 (Schubert, 2001; Spence 等, 2006)。另已知 B 着丝粒大小和结构可影响 B 染色体衍生物的传递 (Kaszas 和 Birchler 1998)。大多数 B 染色体衍生的微染色体在正常 B 染色体存在下不分离。B 染色体长臂远端区和着丝粒是造成 B 染色体不分离的原因 (Carlson 1978)。例如, 在正常 B 染色体存在下, 父本将 2 拷贝微染色体传递给子代 (表 3)。B 型微染色体的这个性质提供了机制, 以产生一系列用于增加目标基因表达的微染色体。

[0148] 表 3 :B 微染色体大小和传递比率

[0149]

事件	76-15a	86-74	86B23	86B155	R2
染色体大小	1/2B	1/5B	1/20B	3/4B	NM
转基因定位	远端	远端	远端	远端	远端
杂交	作为父本	作为父本	作为父本	自交	自交
传递	14/36	3/25	7/29	9/18	15/46
传递 *	30/36	6/25	8/29	16/18	16/46

[0150] NM 表示未测量。* 具有微染色体的子代数 / 所测试子代的数目。** 微染色体传递数 / 所测试的子代数。

[0151] B 染色体和衍生物的转基因个体的组织化学 GUS 测定法

[0152] 如同其它生物的超数 B 染色体一样, 玉米的 B 染色体也是惰性的, 没有任何测得出的活性基因 (Jones, 1995)。然而, 尚不清楚 B 染色体缺乏基因活性是由缺乏基因引起的, 还是因为 B 染色体由其异染色质性质所致的基因转录抑制引起的。玉米 B 染色体的转化被用来确定是否存在转基因表达的抑制。在本项研究中, 记录了 17 个在 B 染色体上只具有转基因的转基因事件。这就表明它们可能受来自 B 染色体的转基因 bar 基因表达的支持, 尽管有可能在 A 染色体上存在转基因, 但是因太小以致于不能通过 FISH 方法检测出。通过对抗性愈伤组织进行分析, 测定了这些事件中 9 个有 GUS 基因表达。其它事件缺乏 GUS 表达可能是在转化过程中 GUS 基因沉默或者是缺乏完整 GUS 基因表达盒造成的。然而, 在至少 6 个事件中, GUS 基因表达是由 B 染色体或衍生物上的转基因造成的 (表 4)。在这些情况下, 测定了由分离的子代发育的主根的 GUS 表达。例如, 在 76-15a、76-15b 和 86-74 与受体

品系植株远交的子代中,在B染色体或截短的衍生物上具有转基因的所有子代(分别为14、11和3株个体)均表达GUS,但是在B染色体或衍生物不具有转基因的子代(分别为22、19和22株个体)无一表达GUS。在具有最小微染色体的自花传粉的86B23子代中,在微染色体上具有转基因的25株个体中有23株表达GUS,但是不具有微染色体的26株个体中无一显示GUS表达。B染色体和衍生物上缺乏转基因的子代中不存在GUS表达,证实了GUS表达来自B染色体或衍生物上的转基因,没有未被检测的A染色体事件。因此,插入B染色体的转基因至少在所测试的位点上进行了表达。这些位点似乎沿B染色体着丝粒直到B染色体长臂的末端随机分布。

[0153] 表4:B微染色体中的转基因表达

[0154]

事件	76-15a	76-15b	86-74	86B23	86B155	76-10	86-14
染色体大小	1/2B	1B	1/5B	1/20B	3/4B	1B	1B
转基因定位	远端	内部	远端	远端	远端	远端	着丝粒
GUS+	14	11	3	23	7	2	16
合计	14	11	3	25	9	12	23
%	100.0	100.0	100.0	92.0	77.8	16.7	69.6

[0155] 按照 Jefferson 等 (1987),通过 GUS 染色试剂盒 (Sigma, St.Louis, MO) 进行了 GUS 基因表达的组织化学测定。将愈伤组织或长 2-5mm 的切根直接放入 50 μ l 装在 96 孔 PCR 板的 GUS 染色溶液中。将板用 PARAFILM 包起来,在 37 $^{\circ}$ C 下培育 1 小时。

[0156] J11-9 和 R2 之间的重组

[0157] 为了说明微染色体作为人工染色体平台的用途,测定了 R2 微染色体上 lox 位点的 Cre 催化交换。将具有远端转基因 35S-lox66-Cre 表达盒的转基因植株 J11-9 作为母本与 R2 杂交,R2 含有无启动子的 lox71-DsRed(Clontech, Mountain View, California) 基因。Lox66 和 lox71 是突变的 lox 重组位点,该位点按如上所述的最利于正向反应的方式重组。两个转基因的成功重组导致了两个转基因远端区的交换,并将 J11-9 的遗传物质添加到 R2 微染色体上。可通过可逆反应来监测重组,该反应将无启动子 DsRed 基因置于 35S 启动子控制下,从而产生可识别的红色荧光蛋白。采用具有德克萨斯红滤光片的荧光立体显微镜,在发芽幼苗的主根中对重组事件进行了筛选。根据荧光分析,从杂合 J11-9 与杂合 R2 杂交的总共 44 株 F1 子代中鉴定出 4 株植株。大约 8.7% 的子代(约 4 株植株)应具有基于 R2 和 J11-9 传递的两种转基因(表 4)。

[0158] 为了确定红色荧光是否是位点专一重组的结果,从表达红色荧光的 4 株植株的每一株中分离出基因组 DNA,并用作模板用于 PCR 扩增两个预期的重组产物。对扩增产物进行了测序,各种情况下 lox 位点上的重组得到证实。测序区的构型与预期模式相匹配。因此,证实了该微染色体适于通过位点专一重组系统用于遗传操作,并且能够用作微染色体型人工染色体 (AC) 的原型。

[0159] 参考文献

[0160] 下列参考文献通过参照其以下方面而结合到本文中：补充、说明、提供本文所采用方法、技术和 / 或组合物的背景或者教导本文所采用的方法、技术和 / 或组合物。

- [0161] 美国专利 3,710,511
- [0162] 美国专利 3,861,709
- [0163] 美国专利 4,654,465
- [0164] 美国专利 4,727,219
- [0165] 美国专利 4,769,061
- [0166] 美国专利 4,810,648
- [0167] 美国专利 4,940,835
- [0168] 美国专利 4,959,317
- [0169] 美国专利 4,975,374
- [0170] 美国专利 5,270,201
- [0171] 美国专利 5,322,789
- [0172] 美国专利 5,445,961
- [0173] 美国专利 6,262,341
- [0174] 美国专利 5,527,695
- [0175] 美国专利 5,530,191
- [0176] 美国专利 5,538,880
- [0177] 美国专利 5,550,318
- [0178] 美国专利 5,625,132
- [0179] 美国专利 5,658,772
- [0180] 美国专利 5,684,242
- [0181] 美国专利 5,689,041
- [0182] 美国专利 5,733,744
- [0183] 美国专利 5,736,369
- [0184] 美国专利 5,741,684
- [0185] 美国专利 5,929,301
- [0186] 美国专利 6,175,058
- [0187] 美国专利 6,187,994
- [0188] 美国专利 7,015,372
- [0189] Abe 等, *J. Biol. Chem.*, 262 :16793, 1987。
- [0190] Abremski 等, *Cell*, 32(4) :1301-1311, 1983。
- [0191] Albert 等, *Plant J.*, 7 :649-659, 1995。
- [0192] Alfenito 和 Birchler, *Genetics*, 135 :589-597, 1993。
- [0193] Ananiev 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 :13073, 1998。
- [0194] Araki 等, *J. Mol. Biol.*, 225(1) :25-37, 1992。
- [0195] Araki 等, *Nucleic Acids Res.*, 25(4) :868-872, 1997。
- [0196] Armstrong 和 Green, *Planta*, 164 :207-214, 1985。

- [0197] Arondel 等, *Science*, 258 (5086) :1353-1355, 1992。
- [0198] Barnett 等, *Nucleic Acids Res.*, 21 :27-36, 1993。
- [0199] Beachy 等, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28 :451, 1990。
- [0200] Brock 和 Pryor, *Chromosoma*, 104 :575-584, 1996。
- [0201] Chang, 载于 *Plant Breeding in the 1990s*, Stalker 和 Murphy(主编), Wallingford, U. K., CAB International, 17-35, 1992。
- [0202] Chase 和 Gabay-Laughnan, 载于 *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, Daniell 和 Chase(主编), 第 593-621 页, 2004。
- [0203] Christensen 等, *Plant Molecular Biology*, 18 :675-689, 1992。
- [0204] Choi 等, *Nucleic Acids Res.*, 28(7) :E19, 2000。
- [0205] Christensen 和 Quail, *Transgenic Res.*, 5 :213-218, 1996。
- [0206] Chu 等, *Sci. Sin.*, 18 :659, 1975。
- [0207] Conger 等, *Plant Cell Reports*, 6 :345-347, 1987。
- [0208] Cox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (14) :4223-4227, 1983。
- [0209] Craig, *Ann. Rev. Genetics*, 22 :77-105, 1988。
- [0210] Dale 和 Ow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (23) :10558-10562, 1991。
- [0211] Day 等, *Genes Dev.*, 14(22) :2869-2880, 2000。
- [0212] DeGreef 等, *Bio/Technology*, 7 :61, 1989。
- [0213] Duncan 等, *Planta*, 165 :322-332, 1985。
- [0214] Duvick, *Adv. Genet*, 13 :1-56, 1965。
- [0215] Elliot 等, *PlantMolec. Biol.*, 21 :515, 1993。
- [0216] Enomoto 等, *J. Bacteriol.*, 6(2) :663-668, 1983。
- [0217] 欧洲申请 0 160 390
- [0218] 欧洲申请 0 242 246
- [0219] 欧洲申请 0 333 033
- [0220] 欧洲申请 0 616644
- [0221] 欧洲申请 1 035 208
- [0222] Farr 等, *Embo J.*, 14 :5444-5454, 1995。
- [0223] Farr 等, *Nat. Genet.*, 2 :275-282, 1992。
- [0224] Farr 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :7006-7010, 1991。
- [0225] Fisher 等, *Plant Physiol.*, 102(3) :1045-1046, 1993。
- [0226] Fox 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(6) :2486-2490, 1993。
- [0227] Frame 等, *Dev. Biol. -Plant*, 36 :21-29, 2000。
- [0228] Frame 等, *Plant Physiol.*, 129 :13-22, 2002。
- [0229] Fukushige 和 Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(17) :7905-7909, 1992。
- [0230] Futcher, *Yeast*, 4(1) :27-40, 1988。
- [0231] Gabay-Laughnan 等, *Genetics*, 166 :959-970, 2004。
- [0232] Gao 等, *Acta Botanica Sinica*, 41, 1999。
- [0233] Geiser 等, *Gene*, 48 :109, 1986。

- [0234] Gleen 等, *Plant Molec. Biology*, 18 :1185-1187, 1992。
- [0235] Golic 和 Lindquist, *Cell*, 59 (3) :499-509, 1989。
- [0236] Golic, *Genetics*, 137 (2) :551-563, 1994。
- [0237] Gordon-Kamm 等, *The Plant Cell*, 2 :603-618, 1990。
- [0238] Green 和 Rhodes, *Maize for Biological Research*, 367-372, 1982。
- [0239] Hamilton 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :9975-9979, 1996。
- [0240] Hamilton, *Gene*, 200 :107-116, 1997。
- [0241] Hammock 等, *Nature*, 344 :458-461, 1990。
- [0242] Hayes 等, *Biochem. J.*, 285 (Pt 1) :173-180, 1992。
- [0243] Heller 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :7125-7130, 1996。
- [0244] Hoess 等, *Nucleic Acids Res.*, 14 (5) :2287-2300, 1986。
- [0245] Hoess 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 :3398, 1982。
- [0246] Huang 等, *J. Bacteriol.*, 179 (19) :6076-6083, 1997。
- [0247] Huang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :5292-5296, 1991。
- [0248] Huub 等, *Plant Molec. Biol.*, 21 :985, 1993。
- [0249] Ito 等, *Nuc. Acid Res.* 10 :1755, 1982。
- [0250] Itzhaki 等, *Nat. Genet.*, 2 :283-287, 1992。
- [0251] Jefferson 等, *EMBO J.*, 6 :3901, 1987。
- [0252] Jiang 等, *Trends in Plant Sci.*, 8 :570-575, 2003。
- [0253] Jones 和 Rees, *B Chromosomes*, Academic Press, NY, 1982。
- [0254] Jones 等, *Science*, 266 :7891, 1994。
- [0255] Jones, *New Phytol.*, 131 :411, 1995。
- [0256] Kaszas 和 Birchler, *Genetics*, 150 :1683, 1998。
- [0257] Kato 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :13554-13559, 2004。
- [0258] Kato 等, *Cytogenet Genome Res*, 109 :156-165, 2005。
- [0259] Kato 和 Birchler, *J. Hered.*, 97 :39-44, 2006。
- [0260] Kirihara 等, *Gene*, 71 (2) :359-370, 1988。
- [0261] Knutzon 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (7) :2624-2628, 1992。
- [0262] Langer 等, *Nucleic Acids Res.*, 30 (14) :3067-3077, 2002。
- [0263] Lee 和 Saito, *Gene*, 216 (1) :55-65, 1988。
- [0264] Lee 等, *EMBO J.*, 7 (5) :1241-1248, 1988。
- [0265] Liu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :6535-6540, 1999。
- [0266] Logemann 等, *Bio/technology*, 10 :305, 1992。
- [0267] Maeser 和 Kahmann, *Mol. Gen. Genet.*, 230 (1-2) :170-176, 1991。
- [0268] Mariani 等, *Nature*, 347 :737-741, 1990。
- [0269] Mariani 等, *Nature*, 357 :384-387, 1992。
- [0270] Marshall 等, *Theor. App. Genet.*, 83 :435, 1992。
- [0271] Martin 等, *Science*, 262 :1432, 1993。
- [0272] McClintock, *Genetics*, 23 :215-376, 1938。

- [0273] McDonough 等, *J. Biol. Chem.*, 267(9) :5931-5936, 1992。
- [0274] Medberry 等, *Nucleic Acids Res.*, 23(3) :485-490, 1995。
- [0275] Meyer-Leon 等, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 49 :797-804, 1984。
- [0276] Miki 等, *Theor. App. Genet.*, 80 :449, 1990。
- [0277] Mills 等, *Hum. Mol. Genet.*, 8 :751-761, 1999。
- [0278] Mindrinos 等, *Cell*, 23 ;78(6) :1089-1099, 1994。
- [0279] Murray 和 Szostak, *Nature*, 305 :189-193, 1983。
- [0280] Murray 和 Szostak, *Mol Cell Biol*, 6 :3166-3172, 1986。
- [0281] Nasuda 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 :9842-9847, 2005。
- [0282] O' Gorman 等, *Science*, 251(4999) :1351-1355, 1991。
- [0283] Ogilvie 等, *Science* 214 :270, 1981。
- [0284] Onouchi 等, *Nucleic Acids Res.*, 19(23) :6373-6378, 1991。
- [0285] Onouchi 等, *Mol. Gen. Genetics*, 247 :653-660, 1995。
- [0286] Ow, *Curr. Op. Biotech.*, 7 :181-186, 1996。
- [0287] Page 等, *Genetics*, 159 :291-302, 2001。
- [0288] Paz 等, *Euphytica*, 136 :167-179, 2004。
- [0289] PCT 申请 US93/06487
- [0290] PCT 申请 WO 01/11058
- [0291] PCT 申请 WO 01/40492
- [0292] PCT 申请 WO 91/13972
- [0293] PCT 申请 WO 98/44140
- [0294] PCT 申请 WO 95/06128
- [0295] Pen 等, *BioTechnology*, 10 :292, 1992。
- [0296] Przibilla 等, *Plant Cell*, 3 :169, 1991。
- [0297] Raboy 等, *Maydica*, 35 :383, 1990。
- [0298] Rao 等, 载于: *Somatic Embryogenesis in Glume Callus Cultures*, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*#60, 1986。
- [0299] Reddy 等, *Plant Mol. Biol.*, 22(2) :293-300, 1993。
- [0300] Richards 和 Ausubel, *Cell*, 53(1) :127-136, 1988。
- [0301] Rieder, *Int. Rev. Cytol.*, 79 :1-58, 1982。
- [0302] Sadowski, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 51 :53-91, 1995。
- [0303] Saffery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 :5705-5710, 2001。
- [0304] Sauer 和 Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(14) :5166-5170, 1988。
- [0305] Sauer, *Biotechniques*, 16(6) :1086-1088, 1994。
- [0306] Sauer, *Methods*, 14(4) :381-392, 1998。
- [0307] Sauer, *Mol. Cell Biol.*, 7(6) :2087-2096, 1987。
- [0308] Schubert, *Cytogenet Cell Genet*, 93 :175, 2001。
- [0309] Senecoff 等, *J. Mol. Biol.*, 201(2) :405-421, 1988。
- [0310] Sergaard 等, *J. Biol. Chem.*, 268 :22480, 1993。

- [0311] Sharopova 等, *Plant Mol Biol* 48 :463-81, 2002。
- [0312] Shen 等, *Hum Mol Genet*, 6 :1375-1382, 1997。
- [0313] Shen 等, *Curr Biol*, 10 :31-34, 2000。
- [0314] Shinohara 等, *Chromosome Res*, 8 :713-725, 2000。
- [0315] Shiroza 等, *J. Bacteol.*, 170 :810, 1988。
- [0316] Songstad 等, *Plant Cell Reports*, 7 :262-265, 1988。
- [0317] Songstad 等, *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 32 :179, 1996。
- [0318] Spence 等, *Chromosoma*, 115 :60, 2006。
- [0319] Srivastava 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96 :11117-11121, 1999。
- [0320] Stein 等, *The Plant Journal* 13 :281, 1998。
- [0321] Steinmetz 等, *Mol. Gen. Genet.*, 20 :220, 1985。
- [0322] Sumitani 等, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 :1243, 1993。
- [0323] Tavladoraki 等, *Nature*, 366 :469, 1993。
- [0324] Taylor 等, *Seventh Int' l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions* (第七届国际分子植物 - 微生物相互作用研讨会) (Edinburgh, Scotland) 摘要 #497, 1994。
- [0325] Trinh 和 Morrison, *J. Immunol. Methods*, 244 (1-2) :185-193, 2000。
- [0326] Tomizuka 等, *Nat Genet*, 16 :133-143, 1997。
- [0327] Tomizuka 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 :722-727, 2000。
- [0328] Van Damme 等, *Plant Molec. Biol.*, 24 :25, 1994。
- [0329] Van Hartingsveldt 等, *Gene*, 127 :87, 1993。
- [0330] Voet 等, *Genome Res*, 11 :124-136, 2001。
- [0331] Wallace 等, *Nuc. Acids Res.*, 28 (6) :1455-1464, 2000。
- [0332] Yu 等, *Genome*, 49 :700, 2006。
- [0333] Zheng 等, *Genetics*, 153 :1435-1444, 1999。
- [0334] Zhong 等, *Plant Cell*, 14 :2825, 2002。

[0001]

<110> 密苏里大学学监 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI)

BIRCHLER, JAMES

VEGA, JUAN M.

YU, WEICHANG

<120> 通过端粒截短的植物人工染色体平台

<130> UVM0:042US

<140> 未知

<141> 2007-05-09

<150> 60/862, 733

<151> 2006-10-24

<150> 60/798, 830

<151> 2006-05-09

<160> 1

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> DNA

<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 1

ttaggg

7

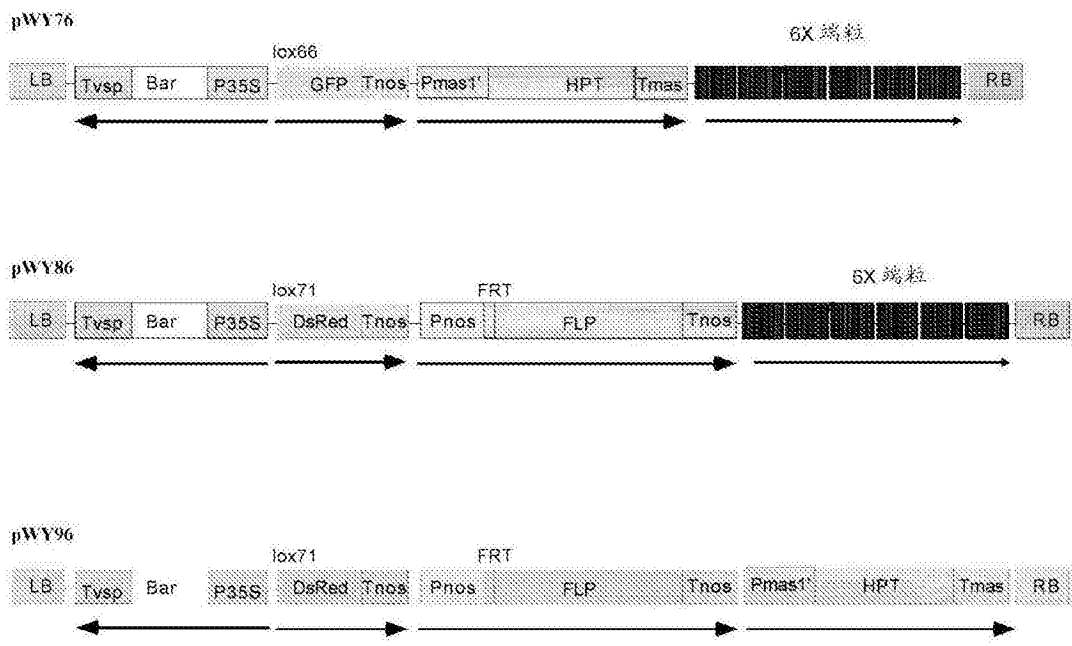


图 1

pJV21 T-DNA

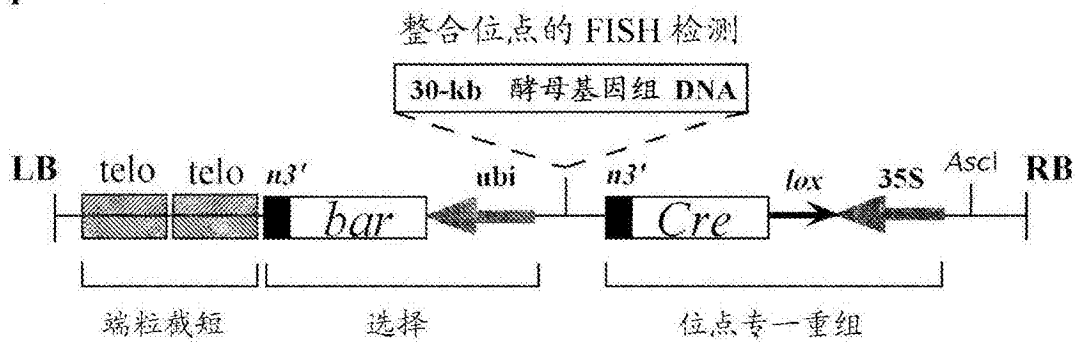


图 2