〔19〕中华人民共和国专利局

〔11〕公开号 CN 1030442A

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 88102354.X

〔51〕 Int.Cl⁴
C12N 15/00

〔43〕公开日 1989年1月18日

〔22〕申请日 88.5.4

〔30〕优先权

〔32〕87.5.5 〔33〕US 〔31〕27712

〔71〕申请人 山道士有限公司

地址 瑞士巴塞尔

〔72〕发明人 沙伦·克拉丽斯·哈维·阿尔菲尼托
保罗·沙泽·迪特里希
林·艾伦·默里
拉尔夫·迈克尔·辛尼巴尔迪

〔74〕专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨九昌

C12N 5/00 A01H 1/02

说明书页数: 22 附图页数:

〔54〕发明名称 植物组织转化

〔57〕摘要

本发明提供一种转化植物材料的方法，该方法包括在电流存在下，使材料与含有DNA和膜通透剂的转化溶液接触足以进行转化的一段时间，本发明还提供如此获得的植物材料和可育植株。本发明还提供新的转化的植物材料，特别是玉米。

权　利　要　求　书

1、一种转化植物细胞材料的方法，包括在电流存在下，将该细胞材料与含有DNA和一种膜通透剂的转化溶液接触足以使DNA转运至植物材料并产生转化的一段时间。

2、权利要求1的方法，其中的DNA为载体DNA。

3、权利要求2的方法，其中的DNA为质粒DNA。

4、权利要求1－3的方法，其中的DNA来自非寄主或受体物种来源。

5、权利要求4的方法，其中的DNA含有一个编码除草剂和/或昆虫抗性的基因。

6、权利要求1－5的方法，其中，将待转化的植物细胞和DNA材料置于水平凝胶电泳系统的样品孔中，使电流能从DNA流向植物细胞。

7、权利要求6的方法，其中的膜通透剂为一种极性膜通透剂，选自二甲亚砜、溶血卵磷脂、十二烷基硫酸钠及其他去污剂。

8、权利要求7的方法，其中的膜通透剂为二甲亚砜。

9、权利要求8的方法，其中的转化溶液含有1－4%（重量）的二甲亚砜。

10、权利要求1－9的方法，其中的电流电压在约40V－140V的范围内。

11、权利要求10的方法，其中的电压在约50V－110V的范围内。

12、权利要求1－11的方法，其中通电流的最短时间为转化

溶液中的ＤＮＡ流入含有植物细胞样品的凝胶区所需的时间。

１３、权利要求１２的方法，其中的通电时间至少为５分钟。

１４、权利要求１３的方法，其中的通电时间为５－２５分钟。

１５、权利要求１４的方法，其中的通电时间为１０－２０分钟。

１６、权利要求１－１５的方法，其中的植物材料为植物组织、植物胚胎、分生组织、腋芽、茎条或愈伤组织。

１７、权利要求１６的方法，其中的植物材料为单子叶植物材料。

１８、权利要求１７的方法，其中的植物材料来自禾本科作物。

１９、权利要求１８的方法，其中的植物材料来自谷类作物。

２０、权利要求１９的方法，其中的植物材料来自小麦、谷子、大麦、高粱、黑麦、燕麦、黑小麦或玉米。

２１、权利要求２０的方法，其中的植物材料为玉米植物材料。

２２、权利要求１６的方法，其中的植物材料为双子叶植物材料。

２３、权利要求２２的方法，其中的植物材料来自卷心菜。

２４、权利要求２２的方法，其中的植物材料为蕃茄植物材料。

２５、一种产生转化的可育植株的方法，包括按权利要求１－24的方法转化植物细胞材料，并在培养条件下培养如此转化的植物细胞。

２６、一种根据权利要求１－２５的方法，基本上如本文的实例所述。

２７、用根据权利要求１－２４或２６的方法获得的植物材料。

２８、用根据权利要求２５或２６的方法获得的转化的可育植株。

２９、单子叶植物细胞材料，该材料在其植物基因组中含有来自非寄主或受体物种来源的ＤＮＡ，并能再生出健康的可育植株。

３０、根据权利要求２９的植物细胞材料，它来自禾本科作物。

３１、根据权利要求３０的植物细胞材料，它是一种谷类作物。

３２、根据权利要求３１的植物细胞材料，选自小麦、谷子、大麦、高粱、黑麦、燕麦、黑小麦和玉米。

３３、根据权利要求３２的植物细胞材料，它是玉米。

３４、健康的可育单子叶植物，在其植物基因组中含有来自非寄主或受体物种来源的ＤＮＡ。

３５、一种根据权利要求３４的植物，它是一种禾本科作物。

３６、一种根据权利要求３５的植物，它是一种谷类作物。

３７、一种根据权利要求３６的植物，选自小麦、谷子、大麦、高粱、黑麦、燕麦、黑小麦和玉米。

３８、一种根据权利要求３７的植物，它是玉米。

３９、根据权利要求３８的玉米，该玉米对害虫或除草剂的敏感性降低。

４０、根据权利要求３９的玉米，该玉米对害虫的敏感性降低。

４１、根据权利要求４０的玉米，该玉米对昆虫的敏感性降低。

４２、根据权利要求４１的玉米，该玉米对鳞翅目害虫的敏感性降低。

４３、根据权利要求４１的玉米，该玉米对鞘翅目害虫的敏感性降低。

４４、根据权利要求３４－４３的植物的种子。

说　　明　　书

植 物 组 织 转 化

本发明涉及利用ＤＮＡ转运电流将ＤＮＡ导入单子叶植物和双子叶植物细胞的方法。该方法将质粒ＤＮＡ直接转移到完整的单子叶和双子叶组织中。

植物的遗传转化一直采用两种不同的方法进行。但是在应用于单子叶植物，尤其是有商业价值的作物如谷类作物时，这两种方法都受到限制。

第一种方法依赖于农杆菌属（Agrobacterium）的土壤微生物中诱瘤（Ｔｉ）质粒的一个区域在该细菌感染寄主后与寄主细胞基因组融合的能力。因而该质粒的遗传操作可使外源ＤＮＡ导入寄主细胞。但因为单子叶植物一般对这种微生物不敏感，所以该方法仅限于双子叶植物的转化。尽管用这种方法进行天门冬属（Asparagus）的遗传转化已经公开（ＷＯ 86/03776），并已有通过农杆菌将ＤＮＡ转移到谷类作物中的报导（Grimsley et al.，Nature，325(1987)，177），但还未证实确实可以发生转化，即寄主细胞基因组吸收并整合了外源ＤＮＡ或表达了所期望的新性状。

第二种方法是通过植物原生质体直接吸收核酸。这种吸收可以采用化学方法，即用聚乙二醇促进吸收（Paszkowski et al.，Meth．Enzym．118(1986)，668），或采用微秒持续高压电脉冲来完成。后一项技术称为电穿孔或电注射，它的作用可能是通过在植物细胞膜上穿出暂时的缝隙，使外来核酸能顺利通过细胞膜。参见例如Fromm et al.，PNAS 82(1985)，5824；Fromm

et al.，Nature 319(1986)，791 和 WO 87/06614 。但这种方法成功与否取决于原生质体再生成熟可育植株的能力。目前证明谷类作物中仅有水稻有这种能力。有人试图将玉米原生质体再生为可育植株(Graves et al.，Theor. Appl. Genet. 54(1979)，209)，但这些努力尚未取得成功。

用电穿孔方法将裸露的RNA转移到双子叶植物细胞中也已进行了研究。已证实烟草花叶病毒(TMV)的RNA可被烟草属(Nicotiana)双子叶植物的完整叶肉细胞吸收(Morikawa et al.，Gene 41(1986)，121)。但据述该方法用于个体细胞时，所产生的细胞成活率很低，并且尚未清楚地证实寄主细胞是被转化而不是被感染。进一步，即使将来能成功地进行个体单子叶细胞的电穿孔，也仍将存在从个体细胞再生完整植株的问题，尤其是再生可育的玉米植株。

叙述本发明时欲采用的术语是根据其本领域内通用的含意。对于没有通用含意或含意不清的，可对照下列定义：

“电转化”是利用一种持久的、连续的直流电流诱导寄主或受体细胞吸收DNA并随后将该遗传物质整合到寄主细胞基因组中；

“植物组织”指细胞群体；

“胚胎”是指特定器官或器官系统如根和茎进行不可见分化，但存在将产生各种器官的细胞层这样一个发育阶段；

“愈伤组织”是指由单个植物细胞或组织经组织培养产生的植物细胞群；

“CM(30)”是一种人工玉米培养基，其成分示于表A；

“MTM”是一种用于培养玉米雄花穗的人工液体培养基，其成

分如文献所述（Pareddy，Greyson and Walden ;Planta 170(1987)，141）；

“BSS”是一种用于芸苔属茎条（stem strips）的人工液体培养基，其成分示于表B。

“TMM”是一种培养蕃茄胚胎的人工培养基，其成分示于表B。

“原生质体”是指除去了细胞壁（通常是用酶消化），但仍包有细胞膜的植物细胞；

“分生组织”由能够充分地进一步分裂的细胞组成，转而产生胚性的初生组织或次生组织；

“基因组”在此用来指一个细胞内所存在的全部遗传物质，包括染色体和染色体外的遗传物质；

被DNA“转化的”细胞是指含有该DNA的细胞，或其通过有丝分裂或减数分裂产生的、在其基因组中仍保留该DNA顺序的子代细胞。

“膜通透”剂指用于哺乳动物细胞的膜通透剂。

本发明涉及一种转化植物细胞材料的方法，包括在电流存在下，使该细胞材料与含有DNA和细胞膜通透剂的转化溶液接触足以进行转化的一段时间。

本发明的方法具有许多优点。它能够穿透多层细胞，因而可以采用整个组织而非单个细胞。细胞不受损伤，它们保留其生活力并能用来产生成熟可育植株。该方法还能够转化以前尚未成功转化的植物。本发明还涉及产生转化的可育植株的方法，包括在电流存在下，使植物细胞与含有DNA和细胞膜通透剂的转化溶液接触足以进行转化的一段时间，并在培养条件下培养如此转化的植物细胞。

为了区别本发明的转化方法与利用短脉冲（一般为几微秒至约４００毫秒的数量级）电流的所谓电穿孔或电注射技术，将这种转化方法定义为电转化。

这样，本发明利用更恒定、施加时间更长的电动势（电压），将ＤＮＡ运载或转运至细胞膜并通过细胞膜。利用膜通透剂可有效地增强细胞膜的通透性。

任何植物材料都可用于本发明的电转化。例如，本发明可设想植物组织、植物胚胎、分生组织如雄花穗或穗分生组织、腋芽、茎条、愈伤组织或细胞悬浮液的转化。如果用玉米胚胎组织，该胚胎最好已到达Abbe和Stein(Am．J．Botany，41(1954)，286—287)所定义的发育阶段3，即处在授粉后２２至２８天之间的一个阶段。处在阶段3的玉米胚一般约为３ｍｍ长，盾片节组织可由两个将其分开的缢痕而从外部分辨。在胚根鞘内，初生根已可辨认；在胚芽鞘内，第一叶片和第二叶片已显著增大。这个时期的特征是第三叶原基刚刚出现。所用的植物材料处于便于操作的离体形式。

本发明的方法便于在水平凝胶电泳系统例如琼脂糖凝胶电泳系统中实施，在该系统中，将所要转化的植物材料和ＤＮＡ置于样品孔内，使电流能从ＤＮＡ流向植物材料。

如用胚胎组织，该胚胎置于样品孔内时，最好使含有分生组织的一侧对着含有转化溶液的样品孔。然后将含有ＤＮＡ（为便于后期选择，该ＤＮＡ可含有，例如一段编码特定抗生素抗性的ＤＮＡ顺序）和膜通透剂的溶液置于含有植物细胞材料的样品孔附近的样品孔内。膜通透剂最好是极性的，以便施加电压时可将其与ＤＮＡ一起运载至细胞膜并穿过细胞膜。合适的极性膜通透剂的例子包括DMSO、溶血

卵磷脂、去污剂如十二烷基硫酸钠和去利通－X，最好是DMSO。所用的这种膜通透剂的浓度应足以使细胞膜具有暂时的通透性但不破坏细胞内细胞器膜的完整性。这种浓度可在很大范围内变化，并将取决于所涉及的植物材料。较坚硬的植物细胞材料如双子叶细胞材料，可承受例如浓度为10%的DMSO。一般来说，按转化溶液的重量计算，膜通透剂的浓度为约1%—4%，最好约2%时，能得到良好的结果。转化溶液中可任意地含有一种示踪染料以便能监测载体的进程。合适的示踪染料的例子可以是溴酚蓝、溴甲酚绿或二甲苯苯胺（xylene cyanol）。这些染料及它们在这方面的应用在本领域内是熟知的。施加低压电流，使其流动的方向从含有载体的样品孔流向含有植物材料的样品孔。此后，将该组织用无菌液洗涤并放于固体培养基上，以便使其在电转化过程中所致的所有损伤得到恢复。在固体培养基上放置时间的长短取决于所处理的组织的年龄和大小，较年幼的和／或较小的组织在选择步骤之前可能需要较长的恢复期。通常将组织在培养基上保持2－3天，然后对成功转化的组织进行选择。如果转化载体上含有编码特定抗生素抗性的DNA顺序，则可通过将该组织与这种特定抗生素接触来进行选择。有些组织在选择培养基上萌发（对于胚胎来说是生根发芽）或生长，并产生叶绿素，这些组织已经由于吸收并掺入了转化DNA而获得了抗生素抗性。

所施加的电压应足以有助于DNA的转运而不超过能明显损伤细胞的电压。所利用的电压可在很大范围内变化，并将取决于各种因素，如所采用的植物材料的类型和形式，以及所施加电压的持续时间。这样，如实例1所述，如果在凝胶电泳系统中将玉米胚置于200V电压下5分钟，则将有50%的玉米胚成活。（玉米可能是最坚硬的单

子叶植物，一般双子叶植物比单子叶植物的成活更好。）可采用高达１１０Ｖ的电压而对胚胎没有严重伤害，尽管可能推迟萌发。一般应避免２００Ｖ以上的电压。另一方面，低至８Ｖ的电压仍可获得转化。一般如果所施加的电压为４０－１４０Ｖ，则可获得满意的结果，例如５０Ｖ－１４０Ｖ，更好是约５０Ｖ－１１０Ｖ，最好是５２Ｖ－８０Ｖ。在实例中所采用的凝胶电泳系统中,电极距离为１８ｃｍ。因此在这样一个系统中施加例如５０Ｖ的电压将产生５０Ｖ／１８ｃｍ或2·78Ｖ／ｃｍ的电场强度。这就给出了一个所施加的电场强度的数量级的概念。这种系统中产生的电流强度将取决于转化溶液（凝胶等）和所施加的电压。在实例1所用的电泳系统中，在５２Ｖ电压下产生约２５ｍＡ的电流。

接触电流的时间取决于各种因素，如含有组织的样品孔和含有转化溶液的样品孔之间的距离，还取决于组织样品的大小。因此，最短的时间是转化溶液中的ＤＮＡ在电场影响下流入含有植物材料样品的凝胶区所需的时间。例如，如果这两套样品孔之间的距离在以５２Ｖ电压启动电流时为１ｍｍ，则转化溶液穿过玉米胚将需要约１３－１５分钟，该溶液穿过较大的组织如初期雄花穗（tassel initial）将需要约２０分钟。一般在接触电压５－２５分钟，尤其是１０－２５分钟之后，可获得良好的转化率。

含有组织样品和含有转化溶液样品的两套样品孔之间的距离，取决于转化溶液的强度和载体凝胶的浓度，如果凝胶较稀，此距离最好大一些。

所要采用的ＤＮＡ以载体形式较为方便，最好以质粒的形式，该质粒用本领域专业人员熟知的标准ＤＮＡ重组技术进行遗传操作，使

其含有转化植物组织所需的ＤＮＡ。

适用于本发明的ＤＮＡ应包括所有来自寄主或受体细胞以外的来源的ＤＮＡ。因此，可用于本发明电转化方法的这种有用的ＤＮＡ的实例可包括编码玉米醇溶蛋白（玉米贮藏蛋白）的ＤＮＡ，或组织特异性启动子，如玉米基因的启动子，这些启动子可用于嵌合构建体。这样一个启动子的例子可以是可在根系中诱导的醇脱氢酶（ＡＤＨ）启动子。

用于本发明的较好的一类ＤＮＡ可归为外源ＤＮＡ。这里所用的外源ＤＮＡ一词指所有来自寄主或受体物种以外来源的ＤＮＡ。外源ＤＮＡ包括，例如非寄主植物ＤＮＡ、合成ＤＮＡ顺序、通过ＤＮＡ重组技术产生的顺序，以及细菌、真菌、病毒、动物的ＤＮＡ顺序等等。

合适的外源ＤＮＡ可包括非寄主植物启动子，例如Ｔｉ和Ｒｉ质粒的Ｔ－ＤＮＡ启动子、植物病毒启动子如C_aMV、TMV、BMV等。有用的外源ＤＮＡ也可包括来自下列基因的外源结构顺序，例如氯霉素乙酰转移酶（ＣＡＴ）、新霉素磷酸转移酶Ⅱ（ｎｐｔ－Ⅱ）、胭脂碱合酶（ｎｏｓ）、β－半乳糖苷酶（β－ｇａｌ）、草甘膦抗性基因（EPSP，赋予对草甘膦－5－烯醇式丙酮酰莽草酸－3－磷酸合酶抗性的酶）和编码一种晶体蛋白昆虫毒素的苏云金芽孢杆菌（Bacillus thuringiensis）型基因。参见例如，Adang et al.，Gene，36(1985)，289；Wong et al.，Proc 9th Int. Spore Cong.（Hoch and Setlow Eds，1985）。编码一种晶体蛋白昆虫毒素的苏云金芽孢杆菌型基因的例子包括苏云金芽孢杆菌戈尔斯德变种（B. t. var. kurstaki）编码一种

蛋白毒素的基因和苏云金芽孢杆菌黄粉蚜变种（B. t. var. tenebrionis）编码一种蛋白毒素的基因，前一种蛋白毒素对鳞翅目幼虫有毒，特别是对夜蛾科昆虫（Noctuidea），尤其是对谷实夜蛾（Heliothis zea）和烟芽夜蛾（Heliothis virescens），以及灰翅夜蛾属昆虫（Spodoptera）如甜菜夜蛾（Spodoptera exigua）和草地夜蛾（Spodoptera frugiperda）；后一种蛋白毒素对鞘翅目害虫(Coleoptera)有毒，特别是叶甲科昆虫（Chrysomelidae），尤其是叶甲属昆虫（Diabrotica）如长角叶甲（D. longicornis）、黄瓜十一星叶甲（D. undecimpunctata）和玉米根叶甲（D. virgifera），以及马铃薯叶甲属昆虫（Leptinotarsa）如马铃薯叶甲（L. decemlineata）。前面提到的夜蛾属、灰翅夜蛾属、叶甲属昆虫都是侵染玉米等作物的害虫。外源ＤＮＡ还包括合成基因，如根据天然寄主植物基因合成的ＤＮＡ顺序，例如一种改变的玉米醇溶蛋白基因，它改变了这种玉米贮藏蛋白的氨基酸组成。本发明的外源ＤＮＡ最好包含嵌合构建体，如异源启动子／结构顺序的结合。这种异源构建体的例子包括ＡＤＨ启动子控制下的苏云金芽孢杆菌毒素基因和某些可选择的标记，如Ｔ－ＤＮＡ启动子或CaMV启动子控制下的ＣＡＴ或ｎｐｔ－Ⅱ结构顺序。这样的结合可以按标准重组技术进行构建（如Maniatis et al.，Molecular Cloning：A Laboratory Manual(1982)和DNA Cloning VolⅠ andⅡ（D. Glober，Ed 1985））。可用于本发明的其他ＤＮＡ顺序或其结合，对本领域普通技术人员来说将是显而易见的。

在一个较好的实施方案中，用一个可选择的标记基因转化植物材料，以便于鉴定成功转化的组织。这样的标记基因的例子有，例如编码抗生素（如卡那霉素、潮霉素、新霉素和氯霉素）抗性的基因、除草剂抗性基因和颜色基因（例如花色素苷基因）。编码抗生素的基因的存在将（例如）使转化了的植物细胞在含有这种选择性抗生素的培养基上成活和生长。

在另一个较好的实施方案中，转化植物材料所用的基因编码具有很高的商业或农业价值的性状，例如昆虫抗性、除草剂抗性、病毒抗性、真菌抗性，或编码干扰特定的生化途径（如导致必需氨基酸合成的途径）的酶。

在一个特别好的实施方案中，转化植物材料所用的ＤＮＡ含有一个可选择的标记基因和一个或多个编码其他所期望的性状的ＤＮＡ顺序。使用标记基因意在使成功转化的材料易于与未转化的材料区分，从而有利于对材料进行后续的筛选，选出那些已在其基因组中掺入了共转移基因或那些本身可能并不易于选择的基因的材料。

按照本发明的方法转化的植物材料可进行培养并再生出可育的植株。

遗传转化的健康可育的单子叶植物是新颖的。因此，本发明提供的单子叶植物材料在其基因组中含有来自非寄主或受体物种来源的ＤＮＡ，并能再生出健康可育的植株。

这里所用的健康一词是要把本发明的植物与受病毒等天然感染的植物区别开。

本发明进一步提供健康可育的、其基因组中含有来自非寄主或受体物种来源的ＤＮＡ的单子叶植物，或这种植物的某些部分，特别是

这种植物的种子。

根据本发明的较好的单子叶植物材料或植物是禾本科（Gramineae）作物，特别是谷类作物，包括水稻、小麦、谷子、大麦、高粱、燕麦、黑麦、黑小麦和玉米，更特别的是选自小麦、谷子、大麦、高粱、黑麦、燕麦、黑小麦和玉米的谷类作物，最特别的是玉米。

但是应当清楚，本发明的方法也是另一种方便的转化双子叶植物的方法，这些双子叶植物包括卷心菜（Brassica oleracea）、蕃茄、向日葵、胡萝卜、葫芦、马铃薯、大豆、棉花等。

下列实例说明本发明，但并不限制其范围。

温度以摄氏度（℃）给出，百分数（%）是指重量百分数。电转化基本上在室温下进行，但在电压影响下电泳系统的温度可能升高。

表 A

CM（30）培养基（液体或固体）

MS主要盐	
NH_4NO_3	1.65 g/l
KNO_3	1.90 g/l
$CaCl_2.2H_2O$	0.44 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.37 g/l
KH_2PO_4	0.17 g/l
MS次要盐	
H_3BO_3	6.20 mg/l
$MnSO_4.H_2O$	16.80 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60 mg/l
KI	0.83 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25 mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.025 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	0.025 mg/l

维生素

盐酸硫胺	0·25mg/l
L－天门冬酰胺	13·2mg/l
甘氨酸	7·7mg/l
碳源	
蔗糖	20g/l
琼脂（固体）	8 g/l

加蒸馏水至一升

表 B

BSS培养基

4×Difco 盐混合物[1]	500ml/l
烟酸	0·5mg/l
盐酸吡哆醇	0·5mg/l
盐酸硫胺	1·0mg/l
肌醇	100mg/l
萘乙酸	0·2mg/l
苄基腺嘌呤磷酸盐	1·0mg/l
蔗糖	30 g/l
琼脂（固体）	16 g/l

加蒸馏水至1升

调pH至5·8

TMM培养基

4×Difco 盐混合物[1]	250ml
烟酸（0·5mg/ml）	1ml

盐酸吡哆醇	（0·5mg/ml）	1ml
盐酸硫胺	（0·5mg/ml）	2ml
肌醇	（100mg/ml）	1ml
IAA	（0·1mg/ml）	5ml
蔗糖		20g
琼脂（固体）		8g

加蒸馏水至490ml

调pH至6·0

[1] Difco盐混合物是Murashige和Skoogs（"MS"）主要盐和次要盐的市售混合物，4×是指贮液的浓度。

实例 3

在0.7%琼脂糖凝胶的8个样品孔中，每孔放一个阶段3离体玉米（P3780）胚（已在冰箱中放置7天使其同步化）。在另外8个样品孔中，每孔加15μl（10μg）质粒DNA（H83E或H83R）、2μl溴酚蓝染料和2% DMSO，其余为蒸馏水。这8个孔与前8个孔相距1mm并平行进行电泳。胚胎在样品孔中的位置是使胚胎的含分生组织的一侧朝向含有转化溶液的样品孔。质粒H83E和H83R均含有pUC8质粒，该质粒带有一个花椰菜花叶病毒（CaMV）35S启动子〔核苷酸7013—7436，见Hohn et al.，Curr. Top. Microbiol. Immunol.，96（1982），193〕、一个潮霉素磷酸转移酶（HPT）编码顺序〔pLG83的BamHI片段，见Gritz and Davies，Gene，25(1983)，179〕、和一个胭脂碱合酶（NOS）终止区〔核苷酸682—437，见Bevan et al.，Nucleic Acids

Res．，11(1983)，369〕。在质粒H83E中，HPT顺序相对于启动子和终止区顺序处于有义方向，而在质粒H83R中处于反义方向。

将每块凝胶置于加有450ml无菌Tris－乙酸－EDTA电泳缓冲液（pH8·0）的水平凝胶电泳系统（BRLH6）中。给凝胶通52V的电流，电泳方向为从DNA至胚胎，电泳时间为10，12·5或15分钟。通电后，将胚胎用无菌CM（30）冲洗并在固体CM（30）培养基上放置3天。然后将胚胎转移至含有100μg／ml潮霉素的CM（30）培养基中。电转化处理11和14天后，对胚胎进行计数，结果如下：

11天时，所有胚胎均已萌发（已发育出根和芽）。11天和14天时，表C中的幼植体为绿色，表明由于掺入了pLC83基因而获得了对潮霉素的抗性。对照（a）对应于在该试验中进行了电转化，但而后在没有潮霉素存在下生长的组织；对照（b）对应于通过电流但没有转化溶液的存在，并且而后在潮霉素存在下生长的组织。非转化的经潮霉素选择的对照变为粉笔白色并停止生长

表 C

	对照		H83E			H83R		
日期	(a)	(b)	10	12.5	15分	10	12.5	15分
11	8	0	4	4	4	6	3	3
14	8	0	4	4	4	6	3	3

实例 2

用质粒DNA处理14天后，收集实例1的每个试验组中的绿色

幼殖体（籽苗）并研碎，按十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法提取核酸〔Rogers et al.，Plant Mol. Biol.，5(1985)，69〕。

将所收集的每组幼植体组织在液氮或干冰中研碎成细粉末，置于一试管中。将该混合物缓慢加热至65℃，以1μl／mg加入CTAB溶液〔2% CTAB(W/V)，100mM Tris（pH8·0），20mM EDTA（pH8·0），1·4M NaCl 和 1% PVP（聚乙烯吡咯烷酮）〕，然后于65℃加热3分钟。加入等体积的 sevag（CH_3Cl_3：异戊醇＝24：1）并混合。将该混合物以11Kx离心30秒，将上相移入一个新试管，加入CTAB(10% W／V)和0·7M NaCl。重复离心，再次分离上相并用CTAB和NaCl稀释。将1体积的CTAB沉淀缓冲液〔1% CTAB，50mM Tris（pH8·0）和10mM EDTA(pH8·0)和1M NaCl〕加热至65℃10分钟。完全再水化后，用2体积的乙醇再沉淀核酸，然后在冷室中离心13－15分钟进行沉降。将所有样品在微凝胶上进行电泳，表明存在有DNA。

将提取出的DNA加热至100℃，加入20×SSPE(3·6M NaCl，200mM NaH_2PO_4，pH7·4，20mM EDTA，pH7·4)，将该溶液冷却并转移到硝酸纤维素膜上，进行点吸印分析。将其与缺刻翻译的DNA（BRL药盒批号＃5210和H83E）杂交（Rigby et al.，J. Mol. Biol.，113(1977)，237)。用2×SSPE和0·1%SDS冲洗硝酸纤维素，然后于50℃加热1小时，接着于室温下在1×SSPE和0·1%SDS中搅拌1小时，然后对X－光胶片曝光（Maniatis et al.，Molecular

Cloning：A Laboratory Manual（1983））。结果有10%经点吸印处理的样品出现了强杂交，因此表明产生了转化。

实例 3

在无菌条件下将玉米（cvx．Oh43 和 Se60）初期雄花穗（长1·0—1·5cm）切碎（Pareddy and Greyson，Plant Cell Tissue Organ Cult．，5(1985)，119），并保持在MTM培养基上直至进行电转化处理。按实例1的方法将雄花穗和转化溶液置于电泳装置中的0·7%琼脂糖凝胶中，通52V的电流13分钟。转化溶液含有或者a）8μl（10μg)H83E 质粒、2%DMSO和29μl蒸馏水，或者b）15μl(10μg)H83R质粒、2%DMSO和22μl蒸馏水。通电后，将雄花穗移入加有50μg/ml庆大霉素的无菌CM（30）培养基中，小心地冲洗一小段时间。庆大霉素起抗菌素的作用。然后将它们置于含50ml MTM培养基的无菌培养瓶中，将这些培养瓶置于窗槛上。处理两天后，每瓶加入5μg/ml潮霉素。

加入潮霉素6天后，3个经H83R处理的雄花穗中已有一个死亡（已停止生长并变白）。加入10天后，15个经H83E处理的雄花穗中已有2个死亡。加入13天后，又有2个经H83E处理的雄花穗死亡。其余雄花穗继续生长，直至加潮霉素25天后一直保持绿色。进而，有1个用H83E处理的雄花穗产生了花粉。

实例 4

按实例1的方法，将取自卷心菜〔意大利栽培品种，CrGC—9（Crucifer Genetics Co—operative—9)〕芽茎上部二节间的茎条（约1×3×4mm）与转化溶液一起置于电泳装置中的

0·7%琼脂糖凝胶中，通52V的电流15分钟。转化溶液含有15μl（10μg）pZO25质粒DNA、2μl溴酚蓝染料和2% DMSO。

通电后，将茎条移入无菌BSS培养基中一小段时间，然后移入含20μg／ml潮霉素的选择培养基中1星期，最后移入含5μg／ml潮霉素的培养基中1星期。转移至未加潮霉素的BSS培养基时，有24个茎条产生了愈伤组织。2个月后，它们生出芽，将它们移入雾室（mist chamber）的土壤中，使其生根。

将两种经潮霉素选择的芸苔属植物的叶片切成小片，在含有25μg／ml潮霉素的BSS培养基上进行次级选择。这些小片维持绿色并生成芽。它们移入具有一半盐浓度而且没有潮霉素的BSS时还生出根。对这两种同样的初级转化体的叶片也进行了分析，看是否存在潮霉素基因。在液氮中冷冻每种叶片（约0·2g），在研钵中将其研碎成粉末。至此，向研钵内的组织中加入15ml冰冷的蔗糖缓冲液（含15%蔗糖、50mM Tris pH8·0、50mM EDTA）及0·25M NaCl，并继续研磨。将浆液倾入5ml Wheaton毛玻璃匀浆器中，用手研磨5－10次。然后将浆液移入1·5ml Eppendorf 管中，以6500 rpm 离心3分钟。然后将粗制的细胞核沉淀再悬浮于0·5ml冰冷的蔗糖缓冲液（如上，但无NaCl）。加入1μl焦碳酸二乙酯，于室温下搅拌该悬浮液。下一步，加入5μl 20%SDS并搅拌，然后于70℃加热10分钟。加入50μl 5M乙酸钾并搅拌该溶液。然后将该管在冰上冷却30分钟。

沉淀出钾－SDS组分并于4℃离心15分钟。将上清液移入一个洁净的1·5ml小管中，用苯酚：氯仿反复萃取，直至颜色消失

且界面清晰。用乙醇进行沉淀，将溶液于室温下离心5分钟以回收DNA。

分析转化体是否引入了潮霉素基因。对全DNA进行定量并用限制性酶TaqI切割。用水平凝胶（0·7%琼脂糖）以70V电泳约3小时分离DNA片段，如Biorad Zeta Probe 吸印膜说明书所述，用DNA毛细管转移碱吸印法，将DNA片段转移至Biorad Zeta Probe膜上。预杂交后，仍按上述说明书进行杂交和洗涤，吸印的膜即用来做放射自显影。

按照Amersham Multiprime DNA Labeling Systems Manual 第1－28页给出的低熔琼脂糖法，用^{32}P－CTP标记所分离的潮霉素基因的1kb片段。在转化的DNA中存在特征性的1·4和0·7kb片段，而在对照DNA中没有。

质粒pZO25 与H83E（来自实例1）基本相同，只是其HPT编码顺序由核苷酸197－1251 组成，并且被修饰。206位的鸟嘌呤被腺嘌呤所置换。

实例 5

按实例1的方法，将阶段3离体玉米胚和转化溶液置于电泳装置中的0·7%琼脂糖凝胶中，通52V的电流13分钟。转化溶液含有15μl（10μg）pZO33 质粒DNA、2%DMSO和22μl 蒸馏水。

通电后，用无菌液体CM（30）培养基冲洗胚胎，将其置于固体CM（30）培养基上。未进行质粒DNA的选择。以通常的方式将所得到的籽苗培育成成年玉米植株，然后进行异花传粉得到F_1植株。使F_1植株穗轴上的种子萌发并生长1星期，以进行CAT试验，从而确定这

些穗轴含有转化体。种植所得到的可能为阳性穗轴上的另一些种子，收集所得植株的根，以CAT试验进行测试。在头8个可能为转化的穗轴中，有2个表现出转化。

分析CAT阳性F_1转化体的叶片中是否引入了CAT基因顺序。DNA的萃取、切割、分离、吸印及探测等方法均与实例4所给出的方法一致。当pZO33（35S—CAT—NOS）质粒或用该质粒转化的基因组DNA用限制性酶Hind Ⅲ和EcoRI切割时，释放出特征性的1·2kb片段，用CAT基因进行探测。在这个子代群中，1·2kb片段总是与一个1·4kb片段相连。从用来产生此F_1代的雄花穗中提取的DNA，和从所有阳性个体提取的DNA，都含有1·2kb和1·4kb片段。相反，所有的对照（3780的核DNA、3780和F_1杂交3780的全DNA）则没有这些片段。

质粒pZO33在pTZ19R（可购自Pharmacia和US Biochemical）的SacI位点含有一个C_aMV35S启动子（核苷酸7069—7569）；在PstI位点含有来自Tu9（Alton and Vapnek，Nature，282(1979)，864)的773bp氯霉素乙酰转移酶（CAT）基因，该基因的两个TaqI端变为PstI；在PstI和HindⅢ位点之间含有一个NOS终止区（核苷酸682—437）。

CAT试验如下：

CAT试验

1．提取籽苗或其他组织

A．将籽苗或其他组织在150μl（或其倍数）0·25M Tris—HCl pH7·8中研碎。

B．样品在冰上进行声处理（２档３次脉冲）。

C．将样品以１２Ｋｇ离心３分钟，将上清液移入一洁净试管中。

D．将样品在水浴中加热至６５℃１２分钟，然后冷却至室温。

E．将样品离心３０秒，收集上清液用于ＣＡＴ试验。

2．每个反应准备一支管。另外为大肠杆菌（E. Coli）CAT准备一支对照管（１３×１００ｃｍ管）。

	阴性对照	可能的转化体	阳性CAT对照
上清液	100μl	100μl	-
10mM Tris pH 7.8	-	-	99μl
CAT (0.5 单位/μl)	-	-	1μl
^{14}C 氯霉素	3μl	3μl	3μl
H_2O	57μl	57μl	57μl
*			
4mM乙酰辅酶A	20μl	20μl	20μl
总计	180μl	180μl	180μl

* 于３７℃保温５分钟，使反应混合液处于室温。

3．于３７℃保温样品１－２小时。

4．用２ｍｌ冷的水饱和的乙酸乙酯终止反应。加１ml H_2O 使界面更清晰。

5．用帕拉胶膜（Parafilm）盖住试管，置＃１档旋涡振荡约１分钟。

6．在ＩＥＣ中置＃５档离心３－５分钟。

7．将上层转移至小试管（１３×７５）。

8．在通风橱中于N_2下干燥至干（约45分钟—避免过分干燥）。

9．干燥样品的同时，准备TLC层析缸和溶剂，溶剂为100ml氯仿：甲醇（95：5）。在层析缸的所有侧壁上放一根灯芯。

10．准备一块20×20cm硅胶60TLC板。用铅笔在距底部1·5cm处画一条线。用交叉线标明样品位置。用上行层析进行分离。

11．样品干燥后，再悬浮于30μl乙酸乙酯（未经水饱和）中。

12．用10μl微量吸移管将样品点在很小的面积内。点样时用一个吹风机吹层析板。

13．将层析板置于层析缸内。使溶剂前沿到达距层析板顶部约3mm处（40-50分钟）。

14．在通风橱中使层析板在空气中干燥15或20分钟，然后与一片胶片（经预闪光）一起放进暗盒中、室温下过夜。

15．第二天显影此胶片。

实例 6

按实例1的方法，将蕃茄胚胎（Burpees Super Beefsteak VFN）置于水平电泳系统的0·7%琼脂糖凝胶的样品孔中，这些样品孔邻近那些含有转化溶液的样品孔。转化溶液中含有10μg pZO60或pZO67质粒DNA、2% DMSO和溴酚蓝示踪染料。给胚胎通52V的电流约15分钟。

电转化后，将胚胎移入TMM培养基进行2－3天的恢复。然后将胚胎在含有25μg／ml潮霉素的选择性蕃茄培养基上放置10天。未处理的对照籽苗在这一选择中无一成活。然后将转化体移至含

有0·5mg IAA的培养基中，在移栽至土壤中之前生根。

分析这些初级转化体的叶片中是否存在所引入的DNA，具体说来就是潮霉素基因。如实例4所述从植物组织中分离全DNA，用限制性酶TaqI切割并分离，吸印后进行杂交。转化的DNA中存在有特征性的潮霉素片段（1·4，0·7和0·4kb），而对照DNA中则没有。

质粒pZO60是从pUC8质粒构建的，该pUC8质粒带有pZO25的35S启动子、HPT编码顺序及NOS终止区（见实例4），后面紧接第二个NOS终止区的拷贝。

质粒pZO67是从pUC8质粒构建的，该pUC8质粒带有H83E的35S启动子（见实例1）、RAJ－260的PstI片段上的β－葡糖苷酸（GUS）编码区（Jefferson et al.，PNAS，83（1986），8447）、以及NOS终止区，后面紧接pZO25的35S启动子、HPT顺序及NOS终止区（见实例4）。

实例 7

按实例1的方法，将阶段3玉米胚置于水平凝胶系统的0·7%琼脂糖凝胶的样品孔中，这些样品孔邻近含有转化溶液的样品孔。转化溶液含有10μg苏云金芽孢杆菌戈尔斯德变种（Btk）／HPT质粒（pZO85－BTK／HPT）DNA、2%DMSO和溴酚蓝示踪染料。给胚胎通52V的连续电流约15分钟，然后将胚胎转移至CM（30）培养基中进行选择，看是否获得了潮霉素抗性。将那些表现出潮霉素抗性的幼殖体培育成较大的籽苗。用标准生物检测法，测试这些幼殖体对实夜蛾属昆虫（如烟芽夜蛾）和灰翅夜蛾属昆虫等害虫的抗性。转化的籽苗与未处理的标准物相比，表现出对实夜蛾属

和灰翅夜蛾属昆虫的敏感性降低。

质粒pZ085是如下构建的。将含有来自pRAJ275（可从Clontech Laboratories 购得）的β—葡糖苷酸酶（GUS）编码顺序的SalI—EcoRI片段进行修饰，使3'端的EcoRI 位点变为pstI位点。此GUS基因的特点是，有一个NcoI位点跨过编码顺序的起始密码子（ATG）。pZ085由pZ033（见实例5）中存在的35S启动子和NOS顺序，以及上述Sal—Pst片段（代替CAT基因）组成。

通过用含有修饰的Btk顺序的pAMVBTS（Barton et al.，Plant Physiol.，85(1987)，1103）的Nco—Pst片段取代pZ085的NcoI—PstI 片段，制备pZ085—BTK—HPT。此顺序后面紧接pZ033的35S启动子和NOS终止区（见实例5）及pZ025的HPT顺序（见实例4）。

实例 8

以与实例7类似的方式，用一种质粒处理阶段3玉米胚。该质粒含有苏云金芽孢杆菌黄粉虫变种（DSM 2803）编码一种对鞘翅目昆虫（如黄瓜十一星叶甲）有毒的蛋白的基因，以及一个编码潮霉素抗性的标记基因。使如此转化的胚胎进行恢复，培养于实例7中所用的培养基中。如此获得的转化的籽苗表现出对黄瓜十一星叶甲的敏感性降低（与未处理的标准物相比）。