

[19]中华人民共和国国家知识产权局

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

C12N 15/82

A01H 5/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806271.4

[43]公开日 2002年5月1日

[11]公开号 CN 1347457A

[22]申请日 2000.4.19 [21]申请号 00806271.4

[30]优先权

[32]1999.4.19 [33]EP [31]99420097.0

[86]国际申请 PCT/EP00/04177 2000.4.19

[87]国际公布 WO00/63398 英 2000.10.26

[85]进入国家阶段日期 2001.10.15

[71]申请人 罗拜奥公司

地址 法国里昂

[72]发明人 T·里萨奇 M·格雷兹

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 余颖

权利要求书2页 说明书20页 附图页数11页

[54]发明名称 植物转化方法

[57]摘要

一种转化方法,包括:当靶组织仍处于其天然植株环境中时,将农杆菌接种到靶植株的靶组织并共培养;然后通过靶组织的去分化和再生形成转基因植物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版



## 权 利 要 求 书

---

1. 一种转化方法，包括：当靶组织仍处于其天然植株环境中时，将农杆菌接种到靶植株的靶组织并共培养；然后通过靶组织的去分化和再生形成转基因植物。  
5
2. 根据权利要求 1 所述的转化方法，所述的转基因植物是能育植物。
3. 一种转化方法，包括：当靶组织仍处于其天然植株环境中时，将农杆菌接种到靶植株的靶组织并共培养；然后由该靶组织生成去分化组织。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的转化方法，其中将靶组织内靶细胞的损伤保持在最低水平，或完全没有损失。  
10
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的转化方法，其中靶组织的去分化至少部分在体外进行。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的转化方法，所述的靶植株属双子叶或单子叶植物。
7. 根据权利要求 6 所述的转化方法，所述的靶植株属于禾本科。  
15
8. 根据权利要求 6 所述的转化方法，所述的靶植株是葡萄、胡椒、大豆、向日葵、甜菜或葫芦。
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的转化方法，所述的靶组织是胚、花序、子房、叶基或花药。
10. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的转化方法，所述的靶组织是未成熟胚，未成熟花序，未成熟子房，或未成熟花药。  
20
11. 根据权利要求 10 所述的转化方法，其中的接种目标区域是紧密接触的两层细胞之间的界面。
12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的转化方法，其中，在接种前后不加任何 *Agrobacterium vir* 诱导剂。  
25
13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的转化方法，其中，在共培养前后不加任何 *Agrobacterium vir* 诱导剂。
14. 农杆菌在转化中的用途，该方法包括：当靶组织仍处于其天然植株环境中时，将农杆菌接种到靶植株的靶组织并共培养；然后通过靶组织的去分化形成转基因植物。  
30
15. 根据权利要求 14 所述农杆菌的用途，所述的转基因植物材料去分化，并可通过再生形成愈伤组织、根、茎或植物材料(能育为佳)。

16. 用权利要求 1 至 13 中任一项所述方法获得的转化植物组织。

17. 根据权利要求 16 所述的转化植物组织，它是愈伤组织，根，茎或完整植株(能育为佳)。

18. 由权利要求 16 或 17 所述植物组织获得的转化植物组织。

5 19. 根据权利要求 18 所述的转化植物组织，它是种子或其它繁殖材料。

# 说明书

## 植物转化方法

5 本发明提供一种以农杆菌介导转化植物尤其是转化单子叶植物的方法。

本发明涉及植物转化，尤其是谷类的转化，具体地说，涉及根癌农杆菌或其它农杆菌(在此都称为“农杆菌”)的用途。至今，只能用直接转化法来生成转基因谷类植物。为此，最普遍认可的是粒子枪轰击法。最近，有报道称，某些谷类可用农杆菌进行基因改造(Hiei 等，植物分子生物学(1997)35: 205-218); Ishida  
10 等，自然生物技术(1996)14: 745-750; Cheng 等，植物生理学(1997)115: 971-980; Tingay 等，植物杂志 11: 1369-1376(1997))。

文献中报道的转化率对不同的谷类变化很大。典型的如高度依赖于基因型的玉米系统，其转化率很低。对于稻米的转化率据报道也较低，对小麦的转化率尤其低。在以上系统中，都是将农杆菌体外用于正在去分化或已经去分化的分离组  
15 织。

如上所述，已经有了对用于稻米(Hiei, 1997)，玉米(Ishida, 1996)，小麦(Cheng, 1997)和大麦(Tingay, 1997)的农杆菌转化系统的报道。这些方法的一项共同特征是从供体植株分离获得外植体(以未成熟的胚或胚形成性愈伤组织为佳)，并用农杆菌体外接种。

20 Hess 及其同事(植物科学 72: 233-244, 1990)曾尝试将农杆菌接种到小麦的小穗来转化小麦。其目的是通过花粉的转化来传递基因，然后通过正常授粉获得转化的种子。其中没有或没有提及从接种后的小穗分离出组织然后在培养基中筛选并再生。

另有报道通过苗端接种进行玉米和稻米的农杆菌转化(Gould J(1991)植物生理学 95: 426-434; Park SH(1996)植物分子生物学 32: 1135-1158)。同样，其目的仍是通过转化繁殖细胞获得转化的种子。这种再生途径不同于本发明方法：实际上，此类方法的一项特殊目的是避开所有经历组织去分化和偶然性再生的植物再生方法。

美国专利 5,177,010 和 5,187,073(Goldman 等)描述了一种转化玉米和禾本科  
30 的方法，包括造成新出籽苗创伤，用农杆菌接种。同样，该方法的目的是转化籽苗中的繁殖细胞，从而在天然植株中形成繁殖器官，并由此回收转化的花粉。

另一种方法是试用农杆菌转染法来转化谷类。美国专利 5,569,597(Grimsley

等)描述了一种用农杆菌将病毒 DNA 导入植株的方法。将玉米斑纹病毒的 DNA 插入农杆菌的 T-DNA，然后用此携带病毒 DNA 的农杆菌接种玉米的籽苗，如果出现疾病症状，则表明病毒在植物细胞内繁殖。因此，农杆菌在此作为将病毒 DNA 引入植物的载体，病毒可由此引起系统性感染。然而，没有证据表明农杆菌转染能获得病毒 DNA 进入植物基因组的植物转化。该专利的转化仍以分生组织为目标，以获得转化的繁殖细胞为目的。

在本发明的新方法中，靶组织在其天然植株环境中被接种以农杆菌并共培养。如此，靶组织仍可按照正常的生理和时序途径发育。然后，从其正常环境中分离出靶组织，由去分化和再生途径形成转基因植物。所示转基因植物以能育的为佳。

本发明中，“处于其天然植株环境”包括靶组织能够按照基本正常的生理和时序途径发育的所有情形。这些情形包括靶组织处于体内，靶组织仍在植株之内、之上或与之相连(例如，靶组织是半裂分蘖上种子内的胚)，或靶组织仍处于与其在植株上时相同的细胞环境中(例如，靶组织是分离的种子或其部分中的胚)。其它例子包括仍在叶鞘内或至少仍与植株相连的未成熟花序，或仍在未开花蕾中的未成熟花药。

去分化指细胞簇，例如愈伤组织表现出无序生长。

除靶组织处于与其在植株上时相当的环境之外，农杆菌也处于更似其天然环境的环境中。因此，农杆菌转化靶组织的效率很可能高于现有技术培养皿中所进行的。

以上两因素的结果之一是将所需转基因导入靶组织的转化率更高，因此生成转基因植物的转化率也更高。

大多数转化方法中的基本步骤之一是造成靶组织创伤。就农杆菌而言，这可能出于两个理由：暴露出对转化产生应答并能够再生的细胞，(尤其对禾本植物来说)和诱导农杆菌传递其 T-DNA。一种已公开的用于小麦的无创伤方法仍用到一种润湿剂(Silwet 或普卢兰尼克酸)或真空抽滤(WO97/48814)。所有以上方法都不可避免地有组织损伤，并因而降低再生能力。

在本发明的优选实施方式中，靶组织内表现的创伤被保持在最低水平，或完全没有——虽然可能用到润湿剂，但这并不是必须的。在传递过程中可能出现组织的潜表损伤，但即使此时，作为农杆菌作用目标的大部分可再生细胞仍是完好的，其再生能力不受影响。

根据本发明，农杆菌接种最好能用合适的传递工具(例如 Hamilton 注射器等)



将农杆菌悬浮液施于靶组织。

根据本发明，形成了一个涉及对靶组织感染的，用农杆菌转化植物(以谷类为佳)的系统。已证明，该系统效率高，而且重复性好。

5 靶组织可以是任何组织，这些组织然后可使之处于组织培养期并再生成植株。根据本发明，特别适合的靶组织包括胚、花序、子房、叶基或花药。这些胚、花序、子房或花药最好是未成熟的。

10 在另一优选实施方式中，当靶组织是胚时，接种的目标区域是紧密接触的两层细胞之间的界面，即胚乳的发育盾片表面和连接性淀粉薄壁组织。将农杆菌向该界面传递时必须尽可能避免损伤靶组织，使其再生能力不受影响。根据本领域目前所知，如此高效且具有再现性的技术是不可预见的。

15 在本发明的转化方法中，靶组织用农杆菌接种，并与之共培养。然后，通过靶组织的去分化和再生形成转基因植物。因此，在接种和共培养后，应使靶组织去分化。然后可按照本领域已知的标准方法，由该去分化组织获得植株。在接种和共培养后，宜将靶组织转移到一个更适于去分化和再生的环境中。因此，靶组织的去分化至少部分(继接种和培养之后)在体外进行的。植株再生也以体外进行为宜。

20 本发明方法出人意料的特征之一在于由同一分离的外植体常能产生多转化结果。现有技术中(Gheng 等, 1997)，来自同一外植体的所有植株通常被认为是同一特定结果的克隆。在本发明方法中，这一假设不成立，一个外植体常会产生数种植株，根据 Southern 印迹分析，各自具有不同的整合方式。对此，一种解释(但不应将此理解成对本发明的限定)可能是因为大多数可再生细胞在接种农杆菌之前没有创伤。能够继续发育的细胞内发生 T-DNA 转移的几率更高。

25 通常被认为是关键的谷类转化特征之一是在接种和/或共培养培养基中加入 *Agrobacterium vir* 诱导剂进行农杆菌诱导(Hiei 等, 1997, Cheng 等, 1997)。此类诱导剂包括乙酰丁香酮，香草醛，阿魏酸，儿茶酚和丁香酸。本发明展示的是在谷类中不需要诱导剂的成功农杆菌转化。具体地说，不用诱导剂而获得了农杆菌转化小麦的成功，证明诱导剂并非有效 T-DNA 传递所必需。当本发明的靶组织是未成熟胚而提供其天然植物环境的是未成熟种子时，本发明认为农杆菌似乎被未成熟胚细胞充分地自然诱导。对此，一种可能的解释(不应将此理解成对本发明的限定)是：是靶组织附件或周围形成“天然植物环境”的细胞引起了农杆菌诱导。将胚从其天然植株环境中分离出来使得靶组织无法获得有助于农杆菌诱导的物质。

30

本发明能够将所需转基因或异源核酸导入植物组织，并能够获得能育转基因植物。这对于生成转基因单子叶植物来说特别有用，因为已知方法难以用于单子叶植物，而且转化率低。合适的单子叶植物包括芦笋，洋葱，油椰，山药，香蕉，尤其是各种禾本科植物，特别是谷类(即果实被用作人类食物的禾本科植物)，例如小麦，大麦，玉米，稻米，黑麦，高粱和粟。

本发明方法也可用于双子叶植物，尤其是已有或可形成组织培养系统，包括愈伤组织期的那些。合适的双子叶植物包括葡萄，豌豆，胡椒，大豆，向日葵，甜菜和葫芦，以及橡胶、松树和桉树等树木。

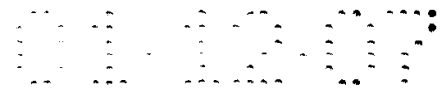
本发明的异源核酸指一般不存在于农杆菌 T-DNA 或待转化植株中的核酸。在此，异源核酸一词包括所有可通过基因工程导入植物的化学合成及生物衍生的基因，包括但不限于非植物基因，改造基因，合成基因，部分基因，以及各种植物的基因。所示异源基因最好含有某种蛋白质或多肽的编码区或感兴趣的反义分子，并在其两侧含有一段促进其在所得单子叶植物中表达的调控序列。

构建可成功转化植物的异源核酸的方法是本领域所公知的，这些方法也可用于产生本发明的异源核酸。本发明参考的 Weising 等(1988)(遗传学年报 22: 241)描述了合适的组件，包括启动子、聚腺苷酸化序列、选择标记基因、报道基因、增强子、内含子等，并提供了以上组件合适的组合。Sambrook 等(1989)(分子克隆：实验室手册，Cold Spring Harbor, NY)提供了合适的构建方法。

通常，含异源基因的质粒较小，即小于 30kb，为的是尽可能降低对物理、化学或酶降解的易感性，这种易感性会随基因增大而提高。

本发明适用的转基因或异源核酸包括所有可提供或改善所得转基因植物有利特征的核酸。例如，所示核酸可能编码蛋白质或反义 RNA 转录产物，为的是提高食用价值、产量、抗虫性、抗病性等。代表性核酸包括，例如，增加赖氨酸的细菌跳跃 A 基因；抗虫害的 Bt-内毒素基因或蛋白酶抑制剂；提供抗病性的溶胞肽基因，抗草甘膦(glyphosate)除草剂的细菌或植物 EPSPS(美国专利 4,940,835, 5,188,642, 4,971,908, 5,145,783, 5,312,910, 5,633,435, 5,627,061, 5,310,667, WO97/04103)；抗 HPPD-抑制剂除草剂的细菌或植物 HPPD(WO96/38567, WO98/02562)，抗真菌的抗草胺膦(glufosiate)、几丁质酶或内切葡聚糖 1,3-葡糖苷酶的 bar 或 pat 基因。而且，可将核酸导入作为产生突变株的基因工具，和/或协助对植物基因节段的鉴定、标记或分离。

适用于改善品质的基因例如：淀粉生物合成基因或降解基因，如淀粉合成酶、淀粉分支酶(如小麦的 SEBI, SEBII, SSSI 和 DBEI, 参见 WO99/14314)，和稻米



储存蛋白基因，如麦谷蛋白亚基(参见 WO97/25419)，麦醇溶蛋白，大麦醇溶蛋白的基因。人造雄性不育基因(参见 EP-A-0344029)和 PR-葡聚糖酶(WO92/11379)在合适启动子的调控下也可用于产生杂交种子。还可以导入基因用于在植物内生成药理学活性化合物，或提高植物的营养价值(生物制药和功能性食品)。

5 其它例子可参见前述 Weising 的论文。

含有待导入植物的异源核酸的质粒一般含选择标记或报道基因或两者都有，以便于鉴定和选择被转化的细胞。也可以由另一载体携带选择标记，并用共转化方法。选择标记和报道基因的两侧都可以是用于实现植物内表达的合适调控序列。有用的选择标记是本领域所熟知的，例如抗生素或除草剂抗性基因。具体例子可参见前述 Weising 的论文。优选选择标记之一是提供磺酰胺抗性的 *sul* 基因(EP-B-0369637)。其它已知选择标记包括大肠杆菌的潮霉素 B 磷酸转移酶(*hpt*)编码序列，转座子 Tn5(AphII)的氨基葡萄糖苷磷酸转移酶，它编码对卡那霉素、新霉素和 G418 的抗性，以及编码对草甘膦、双丙氨酰膦(bialaphos)、氨基蝶啉、咪唑啉酮、磺酰脲、溴苯腈(bromoxynil)、dalapon 等抗性的基因。提供除草剂抗性的基因也具有生成转化植物的商业用途。

编码易于分析的标记蛋白质的报道基因是本领域所熟知的。通常，报道基因是受体生物或组织没有或不表达的基因，它所编码蛋白质的表达可表现为表型变化或酶活性等易于测得的特性。此类基因的例子参见前述 Weising 的论文。优选的包括大肠杆菌 Tn9 的氯霉素乙酰转移酶(*cat*)基因，大肠杆菌 *uidA* 基因座的 $\beta$ -gluronidase(*gus*)基因，维多利亚多管水母(*Aequoria victoria*)的绿荧光蛋白(GFP)基因，和 *photinus pyralis* 的萤光素酶(*luc*)基因。

有用的调控序列包括能在特定植物细胞内表达的各种组成型、诱导型、组织或器官特异性、或发育节段特异性启动子。合适的此类启动子参见前文 Weising 等的论文。以下是一系列本发明适用的启动子：根癌农杆菌 T-DNA 的调控序列，包括甘露氨酸合成酶，胭脂氨酸合成酶，和章鱼氨酸合成酶的调控序列；玉米醇脱氢酶启动子；光诱导启动子，例如多种物种的核酮糖二磷酸羧化酶小亚基基因和主要叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子；组蛋白启动子(EP507 698)，肌动蛋白启动子；玉米遍在蛋白 1 启动子(Christensen 等(1996)转基因研究 5: 213)；烟草花叶病毒的 35S 和 19S 启动子；发育调节启动子，例如玉米的蜡质(*waxy*)、玉米醇溶蛋白或铜启动子；以及其它诱导型或组成型合成或其它天然启动子，包括表现为器官特异性表达或在植物特定发育节段表达的启动子，如美国专利 5,635,618 所述的 $\alpha$ -微管蛋白启动子。



分化组织(组织本身, 或由其再生而成的非完整植株)。这样的使用包括: 将去分化组织保存一段时间以备后用; 和回收有用的植物产品, 例如由细胞培养物回收植物次级代谢产物。本发明第一项内容的优点同样存在于第二方面的内容。

5 根据本发明第一和第二方面的内容, 转化的去分化组织可用于再生。可以用它再生成例如愈伤组织、完整植株、能育完整植株、茎、种子或其它繁殖材料。

本发明第三项内容提供农杆菌在转化方法中的用途, 包括在靶组织处于其天然植物环境中是用农杆菌接种靶组织并共培养, 然后由靶组织经去分化和可选的再生, 形成转基因植物材料。

10 根据本发明第三项内容所得的转基因植物材料可以是愈伤组织、完整植株(以能育为佳)、根或茎、种子等其它繁殖器官。

第一和第二项内容的优点都适用于第三项内容。

本发明第四项内容提供用本发明第一或第二项内容获得的转化植物组织。这样的转化植物组织包括愈伤组织, 完整植株(以能育为佳), 根或茎, 种子或其它繁殖器官。所述植物最好是能育植物。

15 有许多原因可解释为何本发明是成功的, 以及为何当靶组织处于其天然植物环境中时更容易被农杆菌转化。以下是本发明之所以成功的可能原因, 但并不想以此对本发明构成任何限定:

1. 当靶细胞处于其天然植物环境中时, 其分裂速度可能比在组织培养物中时快。

20 2. 取消分离后处理(即接种并共培养)提高了愈伤组织形成能力, 以及再生能力。

3. 与农杆菌接触的发育中靶组织的细胞不同(与现有技术相比), 尤其是表皮下、更能再生的细胞。

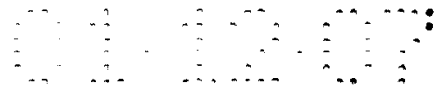
25 4. 没有创伤(大多数其它转化方法的前体条件)使得转化细胞几乎都能够继续发育。

5. 将接种和共培养步骤合并降低了通常由这两个步骤施加于靶组织的压力。

6. 在农杆菌存在下, 种子的天然环境比分离后的组织培养环境更适合正常细胞的发育。

30 7. 与曾经暴露于空气中的相比, 处于任何靶组织内的表面细胞都更软, 因而对农杆菌的屏障较少。

本发明的转化方法可按照以下“一般”方法来描述。更详细的方法参见实施例。



以下就(种子内)胚的接种来描述一般方法。本领域熟练技术人员知道,所述一般方法也适用于其它靶组织。

### 构建物的制备和向农杆菌的传递

5 选用各种已知方法,例如三亲本杂交,电穿孔,将含有合适基因和选择标记和/或报道基因的双元(Binary),超级双元(Superbinary),pGreen 或共整合载体转移到农杆菌中。所用的可以是各种标准的、通常已脱毒的根癌农杆菌或毛根农杆菌菌株,包括但不限于:

LBA4404(Hoekma 等,自然(1983)303: 179-180);

10 EHA101(Hood 等,细菌学杂志(1986)168: 1291-1301);

脱毒 C58,例如 pMP90(Koncz 和 Schell, M.G.G.(1986)204, 383-396;

含 pTOK233 的 LBA4404(Hiei 等,植物杂志(1994)6: 271-282)。

### 制备实验用的农杆菌

15 农杆菌在加有合适选择性抗生素的培养液或培养基上 25-30°C 培养 2-3 天。然后,收集菌体,重悬于 TSIM1(MS 培养基含 100mg/l 肌醇,10g/l 葡萄糖,50mg/l MES 缓冲液 pH5.5)或另一种可能另含乙酰丁香酮的类似培养基中。培养基中还可以加有润湿剂,例如普卢兰尼克酸 F68,也可以使用其它农杆菌诱导剂,例如章鱼氨酸或其它植物次级代谢产物。

20

### 植物材料的制备

本方法的起始材料是某种单子叶植物(通常为禾本科)花开后一段时间的花序。接种和共培养的所有节段都在花序仍在完整植株上是进行。然而,出于简便和防范扩散的考虑,宜将带有花序的部分从植株上分离。但是,即使带有花序的部分与植株分离,花序仍处于其天然植物环境中。

25 例如,收集暖房或 Conviron(环境控制室)中开花后 8-16 天的小麦或其它谷类的分蘖。然后暴露出未成熟的种子,但必须让其仍连在植株上。例如,在小麦中,小心地去除各小穗的颖片和头两朵花的外稃,暴露出未成熟的种子。通常只暴露各小穗中的这两粒种子。对花序全长进行该过程。

30

### 未成熟种子的接种

用合适的传递工具,例如 Hamilton 注射器,将农杆菌悬浮液在大致盾片位置



的 BamHI, SstI GUS 片段, 得到 pBBB。将 pWP258(WO98/49316)中含  $Sul^R$  的 XhoI, XbaI 片段引入 SalI, XbaI 切的 pSCV1(Firek 等, 植物分子生物学(1993)22: 129-142)中, 得到 pEEE。将 pBBB 中的 pUbi-GUSint 片段克隆到 HindIII 切的 pEEE 中, 得到 pSCVSSulugi(图 2)。

- 5 用电穿孔法, 将该构建物引入含 pEHA101(Hood 等, 细菌学杂志(1986)168: 1291-1301)的脱毒(disarmed)超毒根癌农杆菌 EHA101 中, 然后在含 50mg/l 卡那霉素和 70mg/l 庆大霉素培养基上选择。

### 实验用农杆菌的制备

- 10 将农杆菌培养在含 20mg/l 硫酸卡那霉素的固化 YEP 培养基上 27°C 培养 2 天。然后收集菌体, 重悬于含 400 $\mu$ M 乙酰丁香酮的 TSIM1(MS 培养基含 100mg/l 肌醇, 10g/l 葡萄糖, 50mg/l MES 缓冲液 pH5.5), 培养至 650nm 光密度达 2.4。

### 植物材料的制备

- 15 收集暖房培养(日/夜温度 22/15°C, 补充光照达日照 16 小时/天), 开花后 14 天(胚长 1mm)的 NB1 小麦(Nickerson Seeds Ltd., Rothwell, Lincs 的一种春小麦)分蘖, 长 50cm。除去旗叶(flag leaf)外的所有叶子, 清洁旗叶以去除真菌孢子污染。小心地除去小穗的颖片和头两朵花的外稃, 暴露出未成熟的种子。只暴露各小穗中的这两粒种子。对花序全长进行该过程。然后, 给处理过的区域喷以 70% IMS, 20 作为简单的表面消毒。

### 分蘖接种

- 用 10ml 的 Hamilton 注射器, 将 1 $\mu$ l 农杆菌悬浮液在大致盾片位置即胚乳界面接种到未成熟种子中。然后将分蘖放入水中, 包以塑料袋, 防止种子脱水, 放入光培养箱中 23°C, 3 天, 每日光照 16 小时, 45 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>PAR。

### 胚的分离与培养

- 共培养 3 天后, 分离出接受了接种的未成熟种子, 表面消毒(70%中 30 秒, 20%Domestos 中 20 分钟, 然后在无菌蒸馏水中彻底洗涤)。无菌分离出未成熟的胚, 置于加有 150mg/l Timentin 的 W3 培养基(参见 WO98/49316)(W3T)上, 盾片在最上面(每盘 20 个胚)。培养物在 25°C 接受光照(16 小时/日, 80 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>PAR)。

W3T 上培养 3 天后, 取 50 个胚加入 X-gluc 溶液(Jefferson, 植物分子生物学

报道(1987)5: 386-405), 37°C培养 16 小时, 评价 GUS 的表达。分离后 5 天, 评价剩余胚上胚轴的发育, 在需要改善愈伤组织形成的地方去除胚轴。分离后 8 天, 再取 31 个胚, 如前所述进行染色。

5 剩余的 55 个胚留在 W3T 培养基上维持 4 周, 期间, 在分离后第 2 周转移到新鲜培养基上。

胚分离出后 1 个月, 评价剩余的由胚形成的愈伤组织的胚形成能力, 并染色评价 GUS 表达。

## 结果

### 10 接种后 4 天的组织化学染色

部分分离的胚显示有接种造成的针刺损伤。这对组织化学法分析的 GUS 表达结果几乎没有影响。

胚内 GUS 表达表现为 3 种形式:

1. 如文献所述的标准蓝色 GUS 斑, 见图 3;
- 15 2. 数个 GUS 表达水平相当的相连细胞构成的小虚线, 见图 3;
3. 盾片和胚轴上大块的深蓝色染区, 起先是斑或虚线, 迅速侵入组织的大面积区域, 因此无法定量。

将 1. 和 2. 的结果相结合, 得出每个胚 6 个斑点的平均值, 范围是 0—64 个斑点。

20 接种仅含 pEHA101 而没有载体质粒的 EHA101 的菌株产生的对照胚(30)没有形成任何 X-gluc 蓝色染区。含 SCVsulugi 的 EHA101 也没有被染色。

### 接种后 14 天的组织化学染色

25 这些胚的染色结果与 4 天后的略有不同。染色结果通常为小斑点, 有时是小的染区。每个胚上斑点/区的平均数为 3, 范围为 0—25 个。染色最多的胚, 其盾片组织上一般较少见的蓝色“区”也较多。

### 愈伤组织的发育

30 生长 4 周后, 接种胚形成的愈伤组织与非接种胚形成的对照愈伤组织非常相似。农杆菌的存在似乎没有显著降低接种胚形成愈伤组织的胚形成能力。

### 接种后 1 个月的组织化学染色

5 剩余 55 个未成熟胚形成的愈伤组织经 x-gluc 染色，其中 16 个显示有 GUS 表达，表现为染成深蓝色的细胞。其中 6 个愈伤组织中可观察到相当大的深蓝色染区，直径达 1mm，而且表现为轮廓清晰的区域，见图 4。有 3 个蓝色染区显示为三维结构，即细胞从愈伤组织表面突起(见图 5)，检测发现它们位于胚形成性愈伤组织内，具有良好的再生能力。

在该试验中回收到 3 种具有良好再生能力的稳定整合，说明本发明方法具有较高的转化率。

## 实施例 2：用种子接种法转化小麦—转化和转基因植物的再生

10 如实施例 1 所述，但接种并分离了 187 个胚，并对它们进行了选择。

### 转化愈伤组织的选择

15 在 W3T 上培养 12 天后，将胚形成性愈伤组织转移到含 2mg/l Asulam 和 150mg/l Timentin 的 W3 培养基(W32AT)上。愈伤组织在此培养基上再维持 2 周，然后将各愈伤组织分割成 2mm 的碎片，重新接种在 W32AT 上。

再培养 2 周后，评价所有组织的胚形成性愈伤组织发育：经 4 周的选择后表现出持续发育的愈伤组织全部转移到再生培养基(含 40g/l 麦芽糖和 150mg/l Timentin 的 RMT-MS, pH5.8, 以 6g/l 琼脂糖固化, Sigma I 型)上。在此培养基上，4 周内再生出茎，然后转移到含 150mg/l Timentin 的 MS30 培养基上，进行茎的  
20 延长和生根。

### 结果

用一种或多种以下方法测定转化：

- 25 a) 至少在根和叶上进行 GUS 组织化学染色(Jefferson, 1987);
- b) sul 基因的 PCR 分析。用 Stacey 和 Isaac 所述的微制备法(分子生物学方法, Vol.28: 放射性探针进行核酸分析的方法, 9-15, Humana Press Inc., Totawa, NJ(1994))自 1-2cm<sup>2</sup> 新鲜叶材料中抽提基因组 DNA, 进行 PCR 分析。用以下引物通过 PCR 反应扩增 380bp 的 Sul 片段: 5' TTGTGCGGTTCTTCGAGGCG 3'和 5' TGCGCTTCGCAGATCTCCAG 3'。反应条件如下: “热启动”(94℃, 3 分钟),  
30 然后是 30 轮(变性(95℃, 30s), 退火(60℃, 30s), 延伸(73℃, 2 分钟)), 然后是 1 轮 73℃, 5 分钟, 然后 24℃ 保温。

c) Southern 分析

从冷冻干燥的粉碎组织进行完全 DNA 抽提(9ml)(Stacey 和 Isaac, 1994)进行 Southern 分析。将 DNA 样品调节为 0.2mg/ml, 用限制酶 HindIII, EcoRI 和 KpnI 消化。按照 Stacey 和 Isaac(1994)所述进行限制酶消化, 凝胶电泳和真空点样。按照 McCreery 和 Helentjaris 所述的方法(分子生物学方法, Vol.28: 放射性探针进行核酸分析的方法, 9-15, Humana Press Inc., Totawa, NJ(1994))用 PCR 合成洋地黄毒苷标记的 Sul 和 GUS 探针。按照 McCreery 和 Helentjaris 所述的方法(同上)进行探针与 Southern 印迹的杂交, 并通过化学发光法进行检测。

d) T1 代的分离分析

对籽苗进行组织化学染色分析。

10 再生得到 2 株代表 2 种转化结果的(转化率 1.1%)植株, 组织化学染色显示其叶和根都表现出强 GUS 表达。Southern 分析和对子代的基因分离评价证实为稳定转化。

在另一实验中, 116 个胚接受接种, 再生得到 4 个 GUS 阳性转基因品系。

15 所得的转化率(1.1 和 3.4%)与组合运用其它载体及菌株所得的相当(见实施例 5)。

**实施例 3: 用种子接种法转化玉米—瞬时表达, 转基因愈伤组织的产生, 和转化植株的再生**

构建物的制备

20 参见实施例 1。

实验用农杆菌的制备

25 农杆菌在加有适当抗生素的 YEP 固化培养基上 27°C 培养 2 天。然后收集菌体, 重悬于含 100-400µM 乙酰丁香酮的 TSIM1(MS 培养基含 100mg/l 肌醇, 10g/l 葡萄糖, 50mg/l MES 缓冲液 pH5.5), 至 650nm 光密度 2.0-2.4。

植物材料的制备

30 切取玉米 A188(暖房培养, 20-35°C, 16 小时日照)的一部分, 该部分至少包括开花后 6-14 天时玉米棒上和棒下的茎节, 并留有至少一片叶子。小心地拉去玉米棒的外壳叶, 暴露出未成熟的种子, 去除所有穗丝。

用利器每隔两纵向行小心地去除一行种子, 对整个切下部分轻轻喷以 70%乙醇。





Nehra 等, 植物杂志(1994), 5: 285-297, Becker 等, 植物杂志(1994), 5: 299-307, Zhou 等, 植物细胞报道(1995), 15: 159-163, Cheng 等(1997))。

### 整合方式

转化品系的基因整合方式包括具有 Mendelian 遗传方式的单插入, 至具有 7 份 T-DNA 拷贝的多拷贝品系。

## **实施例 6: 用种子接种法转化玉米—瞬时表达和转化植株的再生构建物的制备**

按照实施例 1 所述。或者用 Ishida 等(1997)所述的 LBA4404(pSB131)。

### 10 实验用农杆菌的制备

农杆菌在加有适当抗生素的 YEP 固化培养基上 27°C 培养 2 天。然后收集菌体, 重悬于含 100-400 $\mu$ M 乙酰丁香酮和 0-0.5%普卢兰尼克酸 F68 的 TSIM1(MS 培养基含 100mg/l 肌醇, 10g/l 葡萄糖, 50mg/l MES 缓冲液, pH5.5), 至 650nm 光密度 2.0-2.4。

### 15 植物材料的制备

切取玉米 A188 或 Hi II(暖房种植, 20—35°C, 16 小时日照)的一部分, 该部分需至少包括开花后 6—14 天玉米棒上和棒下的茎节, 并留有至少一片旗叶。小心地拉掉外壳叶, 暴露出未成熟种子, 去除所有穗丝。在棒上轻轻喷以 70%乙醇进行消毒。

### 20 玉米棒的接种

如实施例 1 所述进行接种。然后将植物部分放在水中, 重新包以外壳叶和保鲜膜, 以防种子脱水。然后将材料在光培养箱中 22—25°C 放置 2—5 天。

### 胚的分离与培养

共培养后, 玉米棒在 20%Domestos 溶液中消毒 20 分钟。然后无菌地分离出 25 胚, 用加有 250mg/l Cefotaxime 的 Lsinf(Ishida 等, 1997)洗涤 2 次, 转移到愈伤组织诱导培养基 LSD(Ishida, 1997)上, 25°C 无光培养 2—10 天。

继接种后 2 天, 取出胚进行瞬时表达分析, 其余的如 Ishida 等(1997)所述进行选择, 用于再生成稳定转化的玉米植株。

### 结果

30 如表 2 所示, 对玉米种子内的胚进行接种, 所用两个品种植株都实现了 T-DNA 转移和 GUS 基因表达。虽然在共培养后只有 3—10%未成熟胚表达 GUS, 但再生得到了 phosphinothricin 抗性株, 且该株表达 GUS。因为通过选择进行稳

定转化的胚数量较少，可以认为转化率是较高的。该实验还表明，虽然 T-DNA 转移低于传统的完全体外系统(Ishida 等, 1997)，在其天然种子环境中进行的胚接种主要针对再生能力较高的细胞。

以上结果还显示，该方法可用于其它单子叶植物，转化步骤没有种依赖性。

5

### 实施例 7：通过将农杆菌接种到子叶柄的根部产生转基因蔓菁

将分离自 pCaMVNEO(Fromm 等, 自然(1996), 319: 791-793)的 P35S-nptII-tNOS HindIII 片段插入 pSCV1(Firek 等, 植物分子生物学(1993)22: 129-142)形成 pSCV1.2。将 p35S-gus-内含子-聚 A CaMV Hind III 片段(Vancanneyt 等, 10 M.G.G.(1990), 220: 245-250)插入 pSCV1.2 的 SmaI 位点, 形成 pSCV1.2GI(图 7)。

将该构建物引入根癌农杆菌 C58pMP90(Koncz 和 Schell, 1986)。

#### 籽苗的制备

用 15%Domestos 对蔓菁 caRV31 的种子进行 20 分钟的表面消毒，然后用无 15 菌水彻底洗涤，去除真菌和细菌病原。然后将种子(110)放在 Beatson 罐中的出芽培养基(含 20g/l 蔗糖的 MS 培养基)上(每罐 10 颗种子)，25℃，16 小时光照，培养 3 天。由此产生的籽苗所处的阶段是：已经出现子叶和与之相连的叶柄，但尚未完全展开。

#### 农杆菌的制备

20 将 C58pMP90 SCV1.2GI 接种到 10ml 含适当抗生素的 mg/L 选择培养基中，在旋转振荡器上 28℃培养 24 小时。然后将此培养物 2000rpm 离心 20 分钟，弃去上清液。将菌体沉淀重悬于 MS30 液体(含 30g/l 蔗糖的 MS 培养基)，直至 OD<sub>650nm</sub> 约 2.0(2.175)。

#### 农杆菌接种

25 用 10μl Hamilton 注射器将细菌悬浮液(0.5-1.0μl)注射到子叶柄根部。然后将籽苗转移至 20℃培养 2 天。

#### 愈伤组织诱导和植株再生

30 切取籽苗的子叶，根据 Moloney 等(植物细胞报道(1989)8: 238-242)所述进行培养。以这种方式培养，Barssica 子叶柄的切面在一段短时间内由曝露的维管束组织发育形成愈伤组织，然后，在 8 天培养期内，由此愈伤组织形成茎分生组织(Ono 等, 植物细胞报道(1994)14: 13-17)。

#### 结果



根据 GUS 基因表达的 x-gluc 染色和 NptII 基因的 PCR 分析, 由切下的 200 个子叶柄再生得到 6 个转化茎, 相当于 3.0%转化率。另一品系的 PCR 分析显示含有所述基因, 但 x-gluc 染色则没有测得 GUS 活性。对 5 个表达 GUS 的转化品系的 T1 代进行 x-gluc 染色分析, 显示 GUS 基因向下一代的传递结果为:

5 T1 代植株的 GUS 活性

品系	阳性	阴性	比例
1	10	10	1:1
2	9	0	9:0
3	21	0	21:0
4	19	0	19:0
5	14	1	14:1

讨论

10 当子叶柄的根部仍与籽苗相连时将农杆菌接种到其中, 这与已知转化系统截然不同, 已知转化系统中, 首先切取叶柄, 然后进行农杆菌接种。虽然在操作上有 一定的物理困难, 但小规模实施已经证明, 该方法效率突出。凭数年的经验, 用标准的已知方法和同种的蔓菁, 一般可获得 5-10%转化率。用本发明新方法, 第二次就获得 3.0%的转化率(第一次实验由 80 个外植体获得一个转化茎, 转化率为 1.25%)是 出人意料的。这进一步证明, 本发明基因传递方法适用于存在愈伤组织期的任何单子叶或双子叶组织培养系统。

15

**实施例 8: 用种子接种法转化大豆一瞬时表达**

构建物的制备

20 用含有 CaMV35S 启动子驱动下的 GUS 内含子的超级双元载体 pVec035(B.Pelissier 提供, Aventis Crop Science, Lyon, Fr)转化根癌农杆菌 LBA4404。

实验用农杆菌的制备

将农杆菌接种到含有合适抗生素的 YEP 固化培养基上 27℃培养 2 天。然后收集菌体重悬于含 0-400μM 乙酰丁香酮的 TSIM1(含 100mg/l 肌醇, 10g/l 葡萄糖, 50mg/L MES 缓冲液, pH5.5), 至 650nm 光密度为 0.5-2.0。

25 植物材料的制备

*Glycine max* cv Jack 大豆植株种植在暖房中, 23-25℃, 补足光照至每天 14

小时。

### 大豆种子接种

当胚长到 3—7mm 时，给未成熟种子接种。如实施例 1 所述将 0.5-1 $\mu$ l 农杆菌悬浮液注射到两子叶之间，通过荚，沿径向到达胚。植株然后在 23—25 $^{\circ}$ C 培养 2—5 天。

### 胚的分离与培养

共培养后，取出未成熟种子，用 20% Domestos 溶液消毒 20 分钟。然后将胚无菌地转移到加有 350mg/l Cefotaxime 的愈伤组织诱导培养基 MSI(MS 培养基加维生素 B5，含 60g/l 蔗糖和 40mg/l 2,4-D，加 3g/l Phytigel 固化，调节至 pH7)上，在光照条件下 27 $^{\circ}$ C 培养。2—10 天后，对胚进行组织化学 GUS 染色，以评估 T-DNA 转移率。

### 结果

如表 3 所示，对处于种子和荚内的未成熟胚接种实现了 T-DNA 转移和 GUS 表达。GUS 阳性斑或区域在未成熟胚内分布广泛，且不限于损伤部位(图 8)。与 SAAT 转化大豆子叶法(Santarem 等，植物细胞报道(1998)，17: 752—759)不同，本发明方法提供了更简便的转化方法，不受伤的靶细胞具有更高的再生能力。

## **实施例 9：用种子接种法转化向日葵—瞬时表达**

### 构建物的制备

C58C1(pGV2260)(Simpson 等，植物分子生物学(1986)6：403-416)(pBin19)(Bevan，核酸研究(1984)12：8711-8121)。

C58pMP90(pSCV1.2GI)(见实施例 7)

### 实验用农杆菌的制备

将农杆菌接种到含有合适抗生素的 YEP 固化培养基上 27 $^{\circ}$ C 培养 2 天。然后收集菌体重悬于含 0-400 $\mu$ M 乙酰丁香酮的 TSIM1(含 100mg/l 肌醇，10g/l 葡萄糖，50mg/L MES 缓冲液，pH5.5)，至 650nm 光密度为 2.0-2.4。

### 植物材料的制备

*Helianthus annuus* cv HA300B 向日葵植株种植在暖房中，15—25 $^{\circ}$ C，补足光照至每天 14 小时。

### 向日葵种子接种

当开花后 10—25 天，给未成熟种子接种。如实施例 1 所述将 1 $\mu$ l 农杆菌悬浮液通过珠孔注射到两子叶之间。头状花序然后 22—25 $^{\circ}$ C 培养 2—5 天。

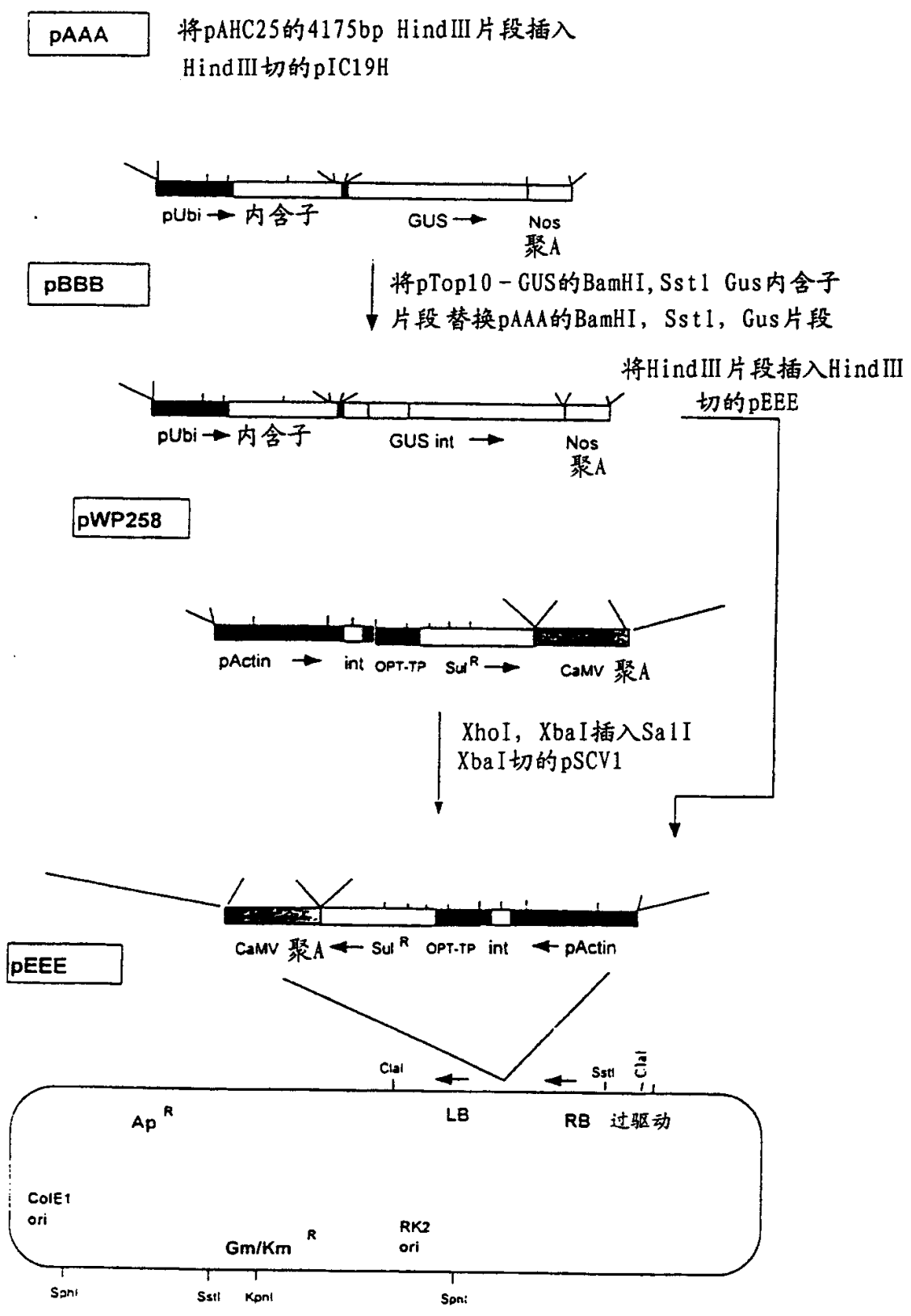
### 胚的分离与培养

共培养后，取出未成熟种子，用 20% Domestos 溶液消毒 20 分钟。然后将胚无菌地转移到愈伤组织诱导培养基 MSI (MS 培养基加 30g/l 蔗糖，加 Agar-agar 10g/l 固化，pH5.7，并加入 0.5mg/l NAA，0.5g/l BAP 和 500mg/l Cefotaxime) 上，  
5 21-24℃，16 小时日照， $30\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR。2-10 天后，对胚进行组织化学 GUS 染色，以评估 T-DNA 转移率。

### 结果

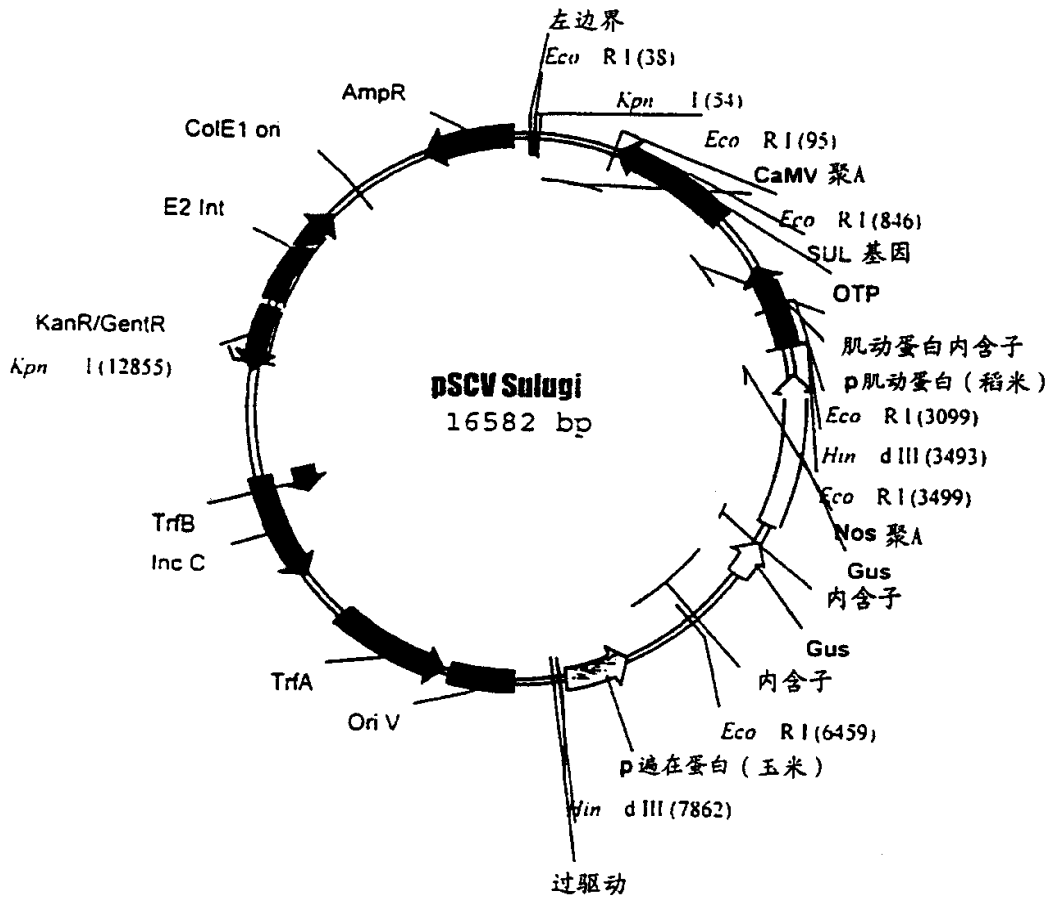
10 如表 4 所示，对处于种子内的向日葵未成熟胚接种，所用的植株都实现了 T-DNA 转移和 GUS 表达(5.9-65.4%)。GUS 阳性主要位于子叶上，但下胚轴上也发生转化。仅对 2 个实验评估了用种子接种法转化向日葵未成熟胚的能力。出人意料的是，但该方法已被证明十分有效，尽管关键的似乎是未成熟胚的发育。

# 说明书附图



pSCV sulugi克隆策略

图 1



pSCV Sulugi

图 2

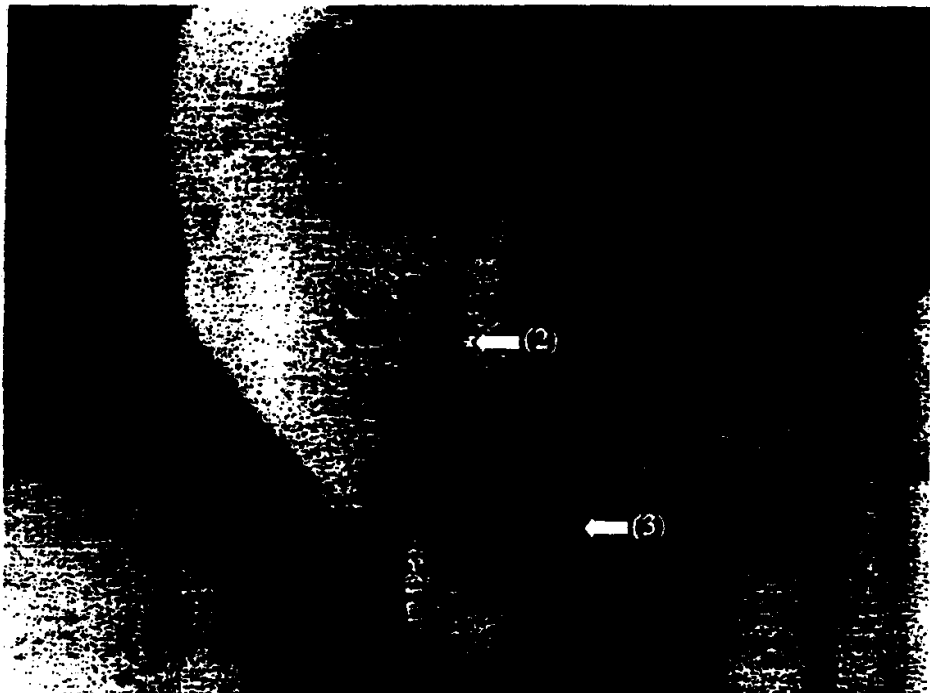
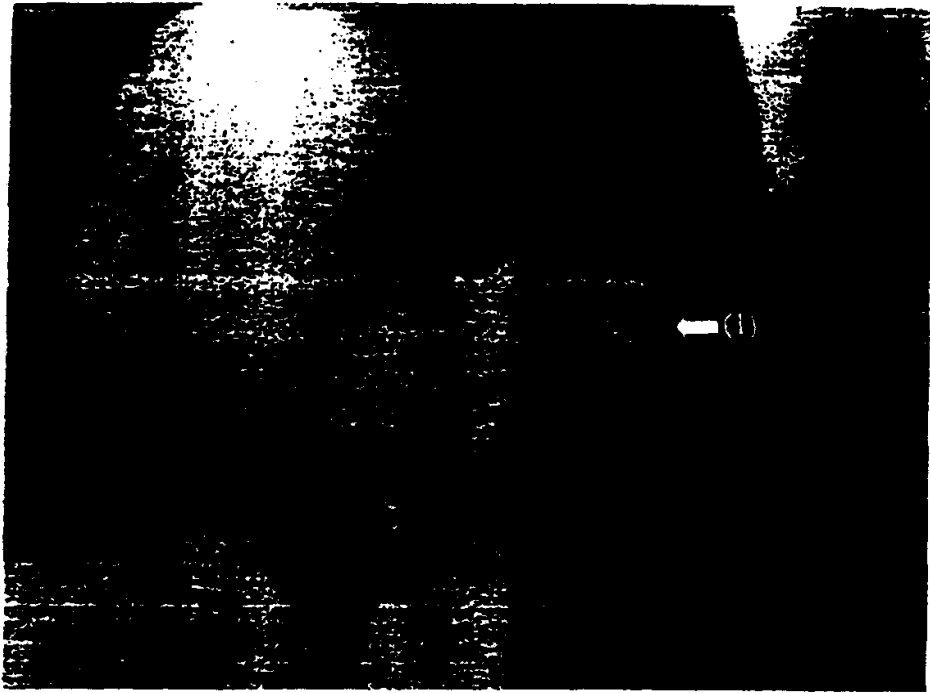


图 3: 小麦未成熟胚的瞬时表达  
(1) 标准蓝色GUS斑  
(2) 数个细胞连成的蓝色小虚线  
(3) 大蓝色染区

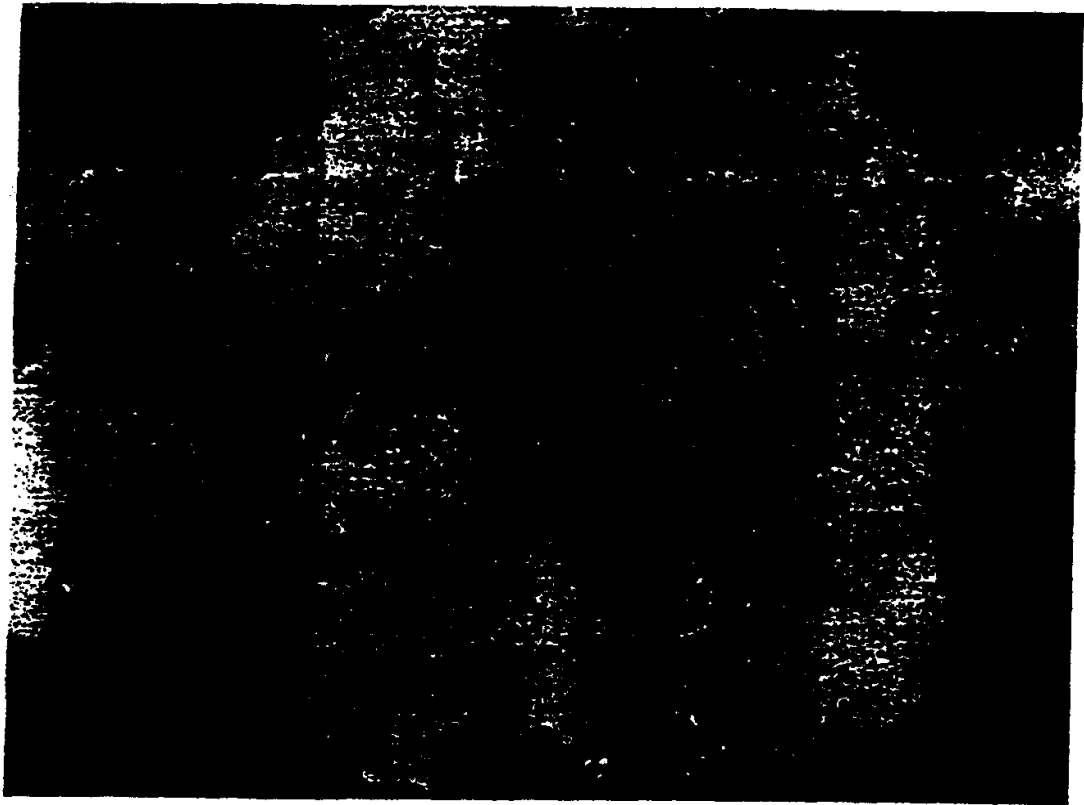


图 4: 小麦愈伤组织内稳定的GUS表达

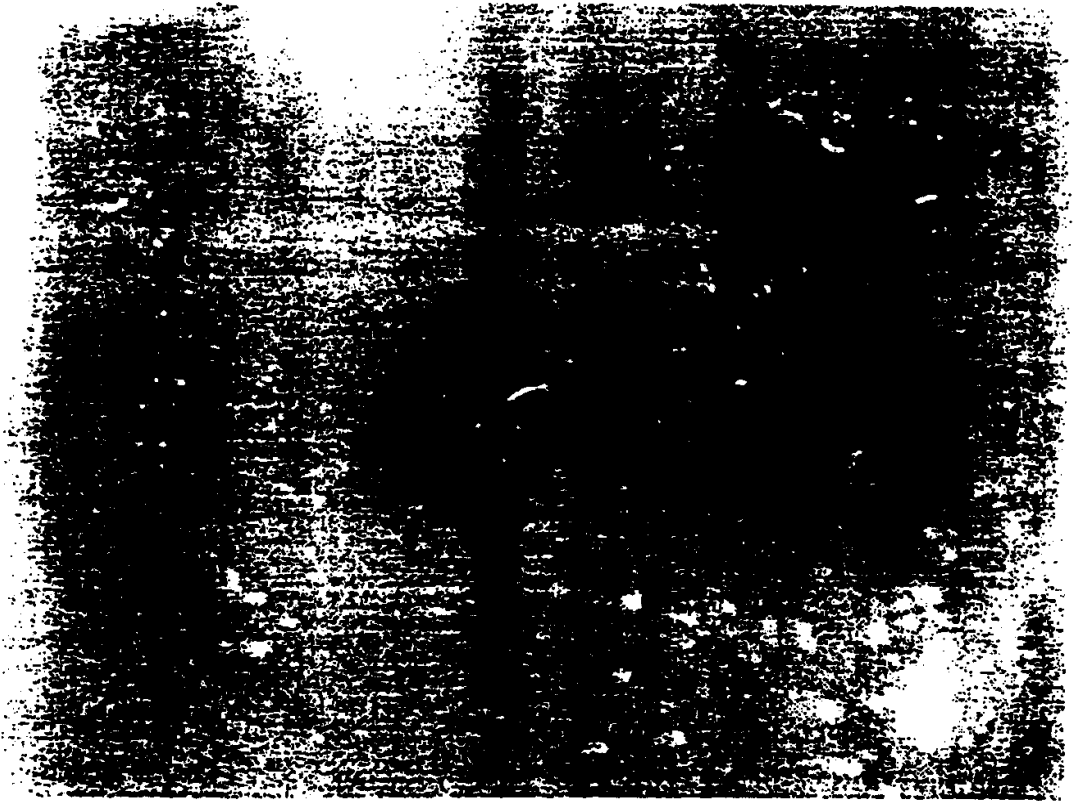
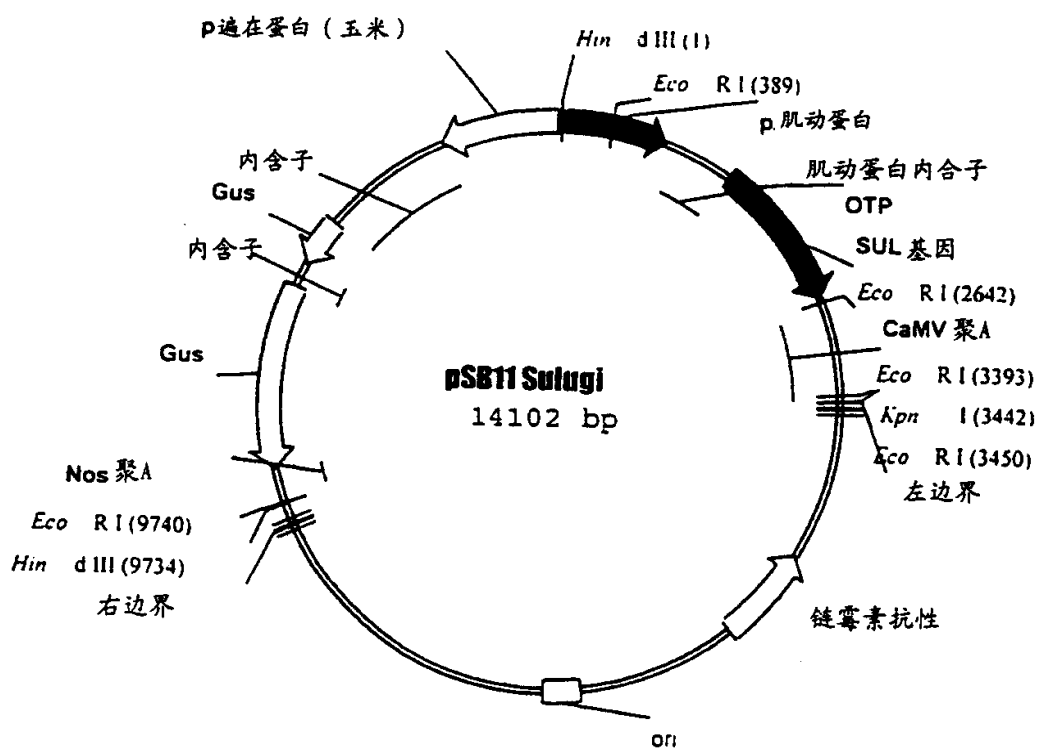
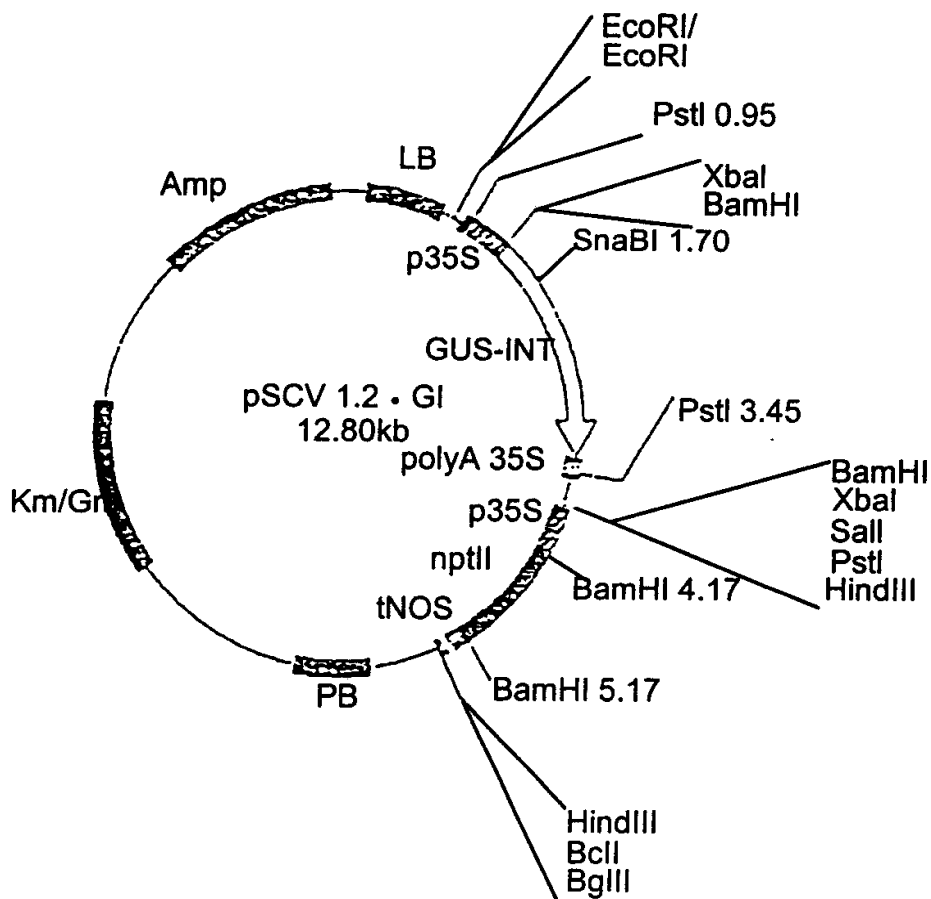


图 5: 小麦愈伤组织内稳定的GUS表达 (局部放大)



pSB11Sulugi

图 6



pSCV1.2G

图 7



图 8: 大豆未成熟子叶内GUS瞬时表达实施例

实施例	处理	分离出的胚数 (X)	再生转基因 植株的胚数	转基因数 (Y)	转化率 (Y/X%)	向子代的传递
1	+AS	86	1	5	5.8	是
2	+AS	144	1	1	0.7	是
3	+AS	159	1	1	0.6	是
4a	-AS	146	1	1	0.7	是
4b	+AS	150	1	2	1.3	是
5	-AS	214	1	1	0.5	是
7	+AS	283	5	ND	$\geq 1.8$	ND
9	+AS	135	2	ND	$\geq 1.5$	ND
11	+AS	155	2	ND	$\geq 1.3$	ND
14	+AS	154	1	ND	$\geq 0.6$	ND
15	+AS	105	2	ND	$\geq 1.9$	ND
					平均值 $\geq 1.5\%$	

表 1: 用种子接种法转化小麦未成熟胚的转化率

A188	LBA 4404 (pSB131)	EHA101 (pSCV5ulugi)
GUS瞬时表达GUS阳性胚/被测胚 (%)	36/1345 (2.7%)	33/393 (8.4%)
稳定转化率 (再生数/所选胚)	2/421 (0.5%)	
III II		
GUS瞬时表达GUS阳性胚/被测胚 (%)	20/381 (9.2%)	7/66 (10.6%)
稳定转化率 (再生数/所选胚)	5/225 (2.2%)	

表 2: 种子接种法转化玉米的T-DNA传递率和转化率

实验	1	2	3
接受接种的胚	27	40	42
农杆菌OD	0.5	1.0	0.5
乙酰丁香酮 ( $\mu\text{M}$ )	400	400	200
共培养天数	2	5	5
阳性子叶/被测子叶	0/24	2/30	3/38
愈伤组织诱导	-	7	6
阳性子叶/被测子叶	-	2/35	0/40
具有GUS阳性斑的子叶百分数	0%	6.2%	3.8%

表 3: 对大豆种子接种法的T-DNA传递率

	C58pGV2260 pBin 19		C58pMP90 pSCV1.2GI			
开花后天数	21	16	13			
接受接种的胚	107	17	70			
愈伤组织诱导	7	6	14	6	14	
阳性胚/被测胚	34/52	0/11	1/6	0/31	0/38	
具有GUS阳性斑的 外植体百分数	65.4%	5.9%		0.0%		

表 4: 对向日葵未成熟胚进行种子接种的T-DNA传递率