



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 88104467.9

[45]授权公告日 1998年7月8日

[11] 授权公告号 CN 1039031C

[22]申请日 88.7.21 [24]颁证日 98.4.9  
[21]申请号 88104467.9  
[30]优先权  
    [32]87.7.21 [33]DE[31]P3724154.0  
[73]专利权人 化学控股有限公司  
    地址 奥地利林茨  
[72]发明人 埃尔文·海贝尔拉-布尔斯  
    罗萨玛利·贝尼托莫里诺  
    安娜·奥文  
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标  
    事务所  
    代理人 李 瑛  
    审查员 47 08

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 将基因转入植物的方法

[57]摘要

基因转入植物的方法，其包括：

- a) 未成熟花粉粒子于营养溶液中从花药分离，并去掉它们所附着的组织。
- b) 于营养溶液中培养分离的，未成熟花粉粒
- c) 在体外培养和成熟过程中将外源遗传物质转入花粉粒
- d) 在体外使转化的花粉粒完全成熟。
- e) 用转化的花粉粒向受体植物传粉，并从中得到种子，及基因转移种子和繁殖产物。

# 权 利 要 求 书

---

1. 基因转入植物的方法,其包括
  - a) 将未成熟花粉粒于营养溶液中,自花药分离,并去掉它们所附着的组织,
  - b) 在一种营养溶液中培养这些分离的,未成熟的花粉粒,
  - c) 在体外培养和成熟过程中转移外源遗传物质至花粉粒,
  - d) 在体外使转化的花粉粒完全成熟,
  - e) 用转化的花粉粒向受体植物传粉,并从受体植物得到种子。
2. 权利要求 1 所述方法,其中外源遗传物质的转移是在单核小孢子阶段进行的。
3. 权利要求 1 所述方法,其中外源遗传物质的转移是在第一次花粉有丝分裂时进行的。
4. 权利要求 1 所述方法,其中外源遗传物质的转移是在早期双核阶段进行的,只要生殖细胞仍附于花粉壁上。
5. 权利要求 1 所述方法,其中外源遗传物质的转移是在花粉第二次有丝分裂之前不久或其过程中进行的。
6. 权利要求 1 所述方法,其中外源遗传物质的转移是通过与根瘤土壤杆菌共同培养进行的。

# 说 明 书

---

## 将基因转入植物的方法

本发明涉及到一种基因转入植物的方法，即利用分离后，未成熟的在试管内培养的花粉粒，以及从中产生的种子和繁殖产物。

将基因转入植物内可采用不同的技术。每种技术都有它的优点和缺点 (Goodman et al. Science 236: 48-53, 1987)。根瘤土壤杆菌是现在最常用的载体。但是，它限制了宿主的范围。将根瘤土壤杆菌用作载体，仍然依赖于体外培养的体细胞的再生，以产生能形成基因转移子代的基因转移植物。用电穿透，脂质体，显微注射和其它物理—化学方法等进行的直接基因转移，在很大程度上取决于采用原生质体作为靶细胞。然而，在很多品种中，从原生质体再生是困难的，甚至在某些品种中是不可能的。

作为这些基因转移方法的改进，曾有人提出采用一种不同的靶细胞，即花粉粒。根据 D. Hess, Plenum Press, New York, 519-537 (1975), 成熟花粉有可能载上外源 DNA，并通过天然传粉和受精作用将此外源 DNA 转移至卵细胞，作为“超载体”。类似地，X-射线处理过的花粉据说能够将照射过的基因组片段转移至卵细胞 (Pandey, Nature 256:310-313, 1975)。Dewet (W O85/01856) 报导，经外源 DNA 处理过的玉米花粉在发芽时可载此 DNA，并在受精后将其转移至卵细胞。

尽管基因转移至花粉以及通过花粉进行转移具有极大的潜在重要性，但其它实验室至今还未能重复出 Hess, Pandey 和 Dewet 的结果。例如，Engvild (Theor, Appl, Genet 69: 457-461, 1985) 就没能重复出 Pandey 的实验。在 Hess (1975) 和 Dewet 的实验中，携带外源 DNA 至花粉粒，以及转移的 DNA 的遗传学和分子学证据是整个推理过程中的关键环节。表现型证据和生理学证据是不够的 (Hess in: Genetic

Manipulation in plant breeding, de Gruyter, Berlin, New York 803-811, 1986)。Sanford 等人的实验 (Biotechnology and ecology of pollen (Mulcahy D. ed), Springer, Heidelberg, New York, 71-75, 1968) 也表明, 将成熟的兰根朵夫烟草花粉与土壤杆菌共同培养并不产生基因向花粉中的转移。在大量实验中, Negrutiu, Heberle-Bors 和 Potrykus (Loc. cit. 65-70, 1986) 未能成功地转移能产生抗卡那霉素药性的新霉素磷酸转移酶基因至成熟的花粉 (shillito et al. Biotechnology 3: 1099-1103, 1985)。因此, 根据近期文献所述方法, 无法证实 Hess 和 Dewet 的说法。Hess 和 Dewet 的结果不能重复这一事实可这样解释, 成熟的花粉粒一旦被置于对于基因转移所必须的水介质中时, 便立即开始形成花粉管, 显然, 它们在此阶段不再能育, 或者说用于基因转移的时间太短了。

在 *Planta* 170: 141-143 (1987) 中, Pareddy 等人报导了未成熟玉米雄穗在体外的培养和成熟。用分离的成熟花粉传粉, 便可从传过粉的植物得到种子。通过基因标志物方法, 不能证实是否有成功的受精作用。

意外的是, 已发现可以在没有天然营养组织情况下培养未成熟花粉粒, 此外可将外源基因在成熟的不同阶段引入到这些分离的, 未成熟的花粉粒中, 结果, 利用这些成熟的花粉粒, 植物可被传粉, 受精, 从而使正常的种子形成, 发芽, 并繁殖。

因此, 本发明涉及一种基因转入植物的方法, 其包含:

- a) 在营养溶液中从花药分离未成熟花粉粒, 并移除它们所附着的组织;
- b) 在一种营养溶液中培养这些分离的, 未成熟的花粉粒,
- c) 在体外培养和成熟过程中转移外源遗传物质至花粉粒,
- d) 在体外使转化的花粉粒完全成熟,
- e) 用转化的花粉粒向受体植物传粉, 并从受体植物得到种子。

一种全新的基因转移至植物的策略是，将基因转入分离的、未成熟的花粉粒，体外成熟，以及采用花粉作为普遍的“超载体”。与其它方法比较，此法大大简化，因为细胞培养期大大缩短，而伴有比较麻烦的体克隆变异现象的再生阶段也被省去了。采用此新方法，还可以转化那些迄今未能成功进行基因转移的植物：例如，多种谷物，豆类和树木不能从单细胞或原生质体再生。

基因转移技术的潜在利益具有很大的经济，生态学和社会价值。其目的在于从遗传学上改变植物，使产量增加，植物更能抗病虫害，耐寒，耐热，耐旱，耐盐及耐养分缺乏，并具有更高的营养质量，为生产新的工业原材料，或它们自己固氮，或以另一种方式不依赖于化肥。

对本发明来说，花粉粒培养时，周围没有组织，即是隔离的这一点很重要，这样要转移的遗传物质，与载体偶联或裸露，可直接与花粉粒接触。如果培养完全的雄穗，则不能用常用的转移方法（根瘤土壤杆菌，电穿透，显微注射等）将基因转移至花粉粒。这是由于很多周围组织的障碍作用。

本发明的另一重要特点是采用未成熟花粉粒。这样，基因转移可在体外成熟的整个期间进行。向未成熟花粉粒的转移，可在成熟的不同阶段进行，它取决于植物的特点。重要的是，遗传物质必须通过尽可能少的细胞壁以便进入精子核的基因组，并在受精时成为合子基因组的一部分，尤其是当载体用于基因转移时。转移最好在小孢子处于单核期时进行，但也可在早期双核阶段第一次花粉有丝分裂时进行，只要生殖细胞仍附于花粉壁上，或在其它情况下，那些植物的花粉在成熟阶段为三核状态（谷物），即在第二次花粉有丝分裂不久之前或期间内进行基因转移。

具体地讲，此方法如下述那样进行，烟草（*Nicotiana tabacum*）作为一典型体系，此体系适用于可以通过传粉而繁殖的所有植物，尤其是单子叶和双子叶农作物，如小麦，玉米，水稻，大豆，油类作物，蔬菜植物，

水果植物和森林植物。

在一个初步实验中，所选定植物的花粉发育阶段用常规方法以下列步骤确定：分离一个花药，压片，加入例如乙酸洋红后在显微镜下观察。

当花粉已达到所需要的阶段时，在无菌条件下于营养性介质中将花粉从花药中挤出，过筛，洗涤，用离心方法收集，并重新悬浮，可分离出花粉粒。

在花粉粒早期发育阶段细胞密度应该比发育阶段后期的细胞密度高。对于烟草，双核花粉粒的细胞密度约为 $10^5$ /毫升，约为单核小孢子情形的两倍。

所用的营养介质含有培养和保持花粉粒的成熟能力所必需的所有养分及生长物质。根据不同的植物，可采用不同的成分，以便实现营养组分（花药绒毡层）的功能。此处，营养介质的主要成分为糖，营养物质，无机盐类和维生素，pH值为6.5至7.5。

在单核小孢子情况下，培养至双核阶段过程在富含糖，例如蔗糖，和其它营养物质的介质中进行。例如，额外的营养物质可以椰子汁的形式加入。当花粉粒达到双核阶段时，可将其转移至一种营养物质较少的介质中。

当体外成熟完成以后，收集花粉粒进行传粉。为此，进行离心，洗涤，为了传粉，将此花粉粒加到那些已提前去掉花药的花上去，以水溶液形式或干粉形式均可，以常用方法从这些用体外成熟的花粉粒传粉的植物得到发芽的种子。

为在体外培养时进行基因转移，可将要转移的外源遗传物质引入花粉粒，采用一种常用载体，例如根瘤土壤杆菌，或用电穿透，显微注射，或其它物理，化学方法直接转移裸DNA均可。“外源遗传物质”这个词表示在要进行转化的花粉粒之外产生的任何遗传物质。当完全成熟后，按上述方法收集花粉粒以便传粉。

为证实体外成熟的成功进行，具有2个标志基因（KAN<sup>R</sup>, NOS）的烟草植物的花粉粒在体外成熟，用这些花粉粒向正常野生型植物传粉。将收集的种子灭菌，于一含有卡那霉素的发芽介质中发芽。这些标志基因的孟德尔式分离通过计数选择性培养基中的籽苗而得到证实。那些已在无卡那霉素培养基中发芽的籽苗经高效纸电泳作曙红检测也显示NOS基因的孟得尔式分离。

这证明正是体外成熟的花粉粒进行了受精作用，而不是任何其它植物的杂质花粉。

为证实在体外培养过程中由转化作用引进的外源基因的表达，在用转化的花粉粒制备的匀浆液中用酶检测法检测了氯霉素乙酰基转移酶（CAT）的活性。

除了CAT基因，一种细胞化学可测基因，即 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因（GUS基因）也被采用，在这个实验中，土壤杆菌与花粉一起培养，然后每天用抗生物素claforan洗涤以便除去或杀死它们。在细胞化学检验中（花粉染为蓝色），可检测出高于50%蓝色，即体外成熟的花粉。非感染的花粉，或用土壤杆菌在没有或有非功能性GUS基因情况下感染的花粉在加入底物时不表现兰色染色。荧光测定法显示在GUS-转化花粉中有高的GUS活性，在作为阴性对照的GUS-转化的植物的花粉中也发现高的GUS活性。未被感染的花粉，或被没有GUS基因的土壤杆菌感染的花粉，不显示GUS活性。此外，用在T-DNA中无毒性基因但有完全GUS基因的土壤杆菌，感染后，在花粉中也不显示GUS活性（用细胞化学方法测定及荧光法测定）。

这样可得出结论，基因转移至花粉是由根瘤土壤杆菌完成的。土壤杆菌可见地粘附于花粉表面形成纤维素纤丝（电镜照片）可进一步证实基因转移至花粉的成功。

### 实例1

#### 确定花粉发育的阶段

收集不同长度的烟草花，在无菌条件下分离花药，5个花药中的一个与一滴乙酸洋红(4% 洋红置于45% 强度乙酸中)一同加于玻片上制备成压片。半小时后显微镜下确定花粉粒的发育阶段。

### 实例2

#### 花粉粒的分离

烟草花粉粒通过在一个小研钵的AMGLU介质(1)中，无菌条件下，小心用玻棒压花药而得到分离，然后将得到的花粉悬浮液通过一个75微米的筛，并用AMGLU介质冲洗花粉悬浮液两遍。最后在Eppendorf离心机上以6,500转/分的速度离心收集花粉悬浮液。

### 实例3

#### 使早期双核花粉粒成熟的花粉培养

分离早期双核烟草花粉粒，调节AMGLU介质中细胞密度达到 $10^5$ /毫升。取1毫升花粉悬浮液在黑暗中于35毫米培养皿中25℃下培养。在培养2到5天后(确切时间取决于花粉粒的发育阶段)它们就已成熟并可以收集了。

### 实例4

#### 使单核小孢子成熟的花粉培养

将单核烟草小孢子培养于MR24介质(2)中，细胞密度为 $2 \times 10^5$ /毫升。一旦花粉粒达到双核阶段(2到5天后，取决于确切年龄)，用离心方法收集，在MIS介质(3)中连续培养至完全成熟。

此外，当采用MR26介质(2')进行培养时得到了非常好的结果。一旦

花粉粒达到双核阶段(3天后),加入等体积M<sub>2</sub>S<sub>1</sub>介质,再过一天,用离心方法收集花粉粒,在M<sub>2</sub>S<sub>1</sub>介质(3')中继续培养,细胞密度为 $10^5$ /毫升,至完全成熟(一天)。

### 实例5

#### 传粉和受精的证据

用离心方法收集烟草花粉粒,在BK介质中洗涤(Brewbaker and Kwack 1963),将细胞密度调节至 $1.25 \times 10^6$ /毫升。从含苞待放的花(红花尖)上移去仍然关闭的花药。一旦花开放了,借助于20微升移液管加入4微升-滴花粉悬浮液至花柱头,使柱头完全被花粉悬浮液覆盖。这些操作在没有风及远离同品种其它植物情况下进行。一旦液滴在柱头上干了,用4厘米草秆盖住柱头和雌蕊,防止交叉传粉。然后将植物放回温室。

### 实例6

#### 种子收集、发芽及遗传学检测

为证实是体外成熟的花粉粒参与了传粉和受精,使基因转移植物的花粉粒在体外成熟,用这些花粉粒向野生型植物传粉。该基因转移植物含有新霉素磷酸转移酶基因(抗卡那霉素)及曙红合成酶基因作为标志基因。也进行了自体受精和与体外成熟的野生型花粉的交叉受精。

收集由实例5中得到的成熟种子荚膜(褐色,干燥),切去荚膜尖并将种子粒直接转移至一支Eppendorf试管中分离种子,种子在NaOCl(次氯酸钠)溶液(3%游离氯)中表面灭菌5分钟,用无菌水冲洗2次,置于含有卡那霉素的种子发芽介质(4)中。4周后,计数 $Kan^R$ 和 $Kan^S$ 的籽苗数。在上述交叉实验中,得到两种按 $Kan^R:Kan^S \phi 1:1$ 分离的相互交叉物。采用高效纸电泳作曙红检验在无卡那霉素存在下生长的籽苗表现出 $Nos^+:Nos^- = 1:1$ 的分离。如所期望,对在体外成熟的野生型植物的

自体受精观察到两种标志基因的分离都是0 : 1。基因转移植物体外成熟花粉的自体受精得到3 : 1 的分离。

### 实例7

#### CAT基因的瞬时表达

土壤杆菌 (根瘤土壤杆菌, 没有瘤基因, 含有与35 S启动子偶联的CAT基因) 在Luria 肉汤中预培养1天。分离早期双核阶段的花粉粒, 培养于AMGLU介质中。用AMGLU介质调节细菌悬浮液至 $OD_{580} = 0.2$ , 用AMGLU介质按1 : 10进一步稀释后, 将20微升细菌悬浮液加至1毫升花粉悬浮液中共同培养24小时后, 每毫升加入1微升claforan (1克/2毫升) 以杀死土壤杆菌。再过2天, 收集花粉粒, 制备提取物。为此, 将1.5毫升钙洗液(5) (pH 5.6) 加入到每毫升花粉悬浮液中, 混合液以4,000转/分的速度离心5分钟, 用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(0.25 M, pH 7.8) 洗涤、离心后, 将200微升三羟甲基氨基甲烷缓冲液加入到花粉沉淀物中, 在冰环境中超声匀浆(3×15秒)。在冰上10分钟后, 将混合物离心, 上清液保存于-20℃。

按Sleigh描述的方法 (Anal. Biochem., 56: 251-256, 1986) 进行CAT检测。将30微升提取物与20微升氯霉素 (8mM), 30微升三羟甲基氨基甲烷缓冲液和20微升 $^{14}C$ 标记的乙酰辅酶A (5微居里/毫升于0.5mM冷乙酰辅酶A中) 混合。37℃培养1小时后, 用乙酸乙酯(2×100微升) 振摇萃取乙酰化氯霉素, 用闪烁计数器测放射活性。

在烟草花粉提取物与根瘤土壤杆菌共同培养后进行CAT检测, 放射活性(cpm) 如下:

	cpm
花粉在 AMGLU 介质中	400
花粉与土壤杆菌一起在 AMGLU 介质中	6,000
花粉与用乙酰丁香酸活化的土壤杆菌一起在 AMGLU 介质中	6,000
只有土壤杆菌在 AMGLU 介质中	500
只有乙酰丁香酸活化的土壤杆菌在 AMGLU 介质中	500

强的放射活性信号表明，土壤杆菌已成功地感染了花粉粒，T-DNA 一定已经进入了生长细胞的核，并表达（转录）。

作为表明土壤杆菌本身并不具有 CAT 活性的进一步的对照，在培养于 Luria 肉汤中的土壤杆菌的整个生长周期中未检测到 CAT 活性。

### 实例8

#### GU S 基因在烟草花粉中的表达

将 LBA4404 土壤杆菌菌株（根瘤土壤杆菌，除去其防卫器官，具有  $\beta$ - 葡糖苷酸酶（GU S）基因，与 35s 启动子和终止区偶联，(Matzke and Matzke in Plant Molecular Biology 7:357-365 (1986)) 于 Luria 肉汤中预培养 1 天。分离单核阶段后期的花粉粒，在 MR26 介质中调节  $OD_{580} = 0.2$ 。在用 MR26 介质按 1 : 10 稀释后，将 20 微升细菌悬浮液加入到 1 毫升花粉悬浮液中。共同培养 14 ~ 20 小时后，离心收集花粉，用 MR26 介质（含有 claforan, 1 克/2 毫升）洗三次并继续培养。每天更换含有 claforan 的介质，直至花粉成熟。最后向 Luria 肉汤中加入 40 微升

介质 (M 2 S, 含 Claforan)。未观察到有细菌生长。

离心收集成熟花粉, 其中一些置于 M R26 介质中。加入 X- Glu (5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷酸) 至终浓度 1mM, 并于 37°C 培养 4 ~ 12 小时 (Jefferson in Plant Molecular Biology Reporter, Vol.5, №4, 387-405, (1987)), 形成靛蓝色 (X- Glu 的  $\beta$ - 葡萄糖苷酸酶产物), 可借助于花粉的蓝色染色于光学显微镜下观察到。多于 50% 的活的成熟花粉显示蓝染色。

第二部分共同培养和体外成熟的花粉于 GK 介质 (似 BK 介质, 但有二倍浓度的硼酸) 中发芽。在发芽花粉的花粉管中可检测到 G U S 活性。

在对照实验中, 花粉用 L B A4404 土壤杆菌菌株感染, 在该菌株的 T- DNA 中含有无启动子的 G U S 基因 (由 Drs. Matzke, Salzburg 提供)。此花粉在体外成熟和加入 X- Glu 以后未染上蓝色, 不含 G U S 基因的土壤杆菌也未染上蓝色, 但 Kan<sub>35S</sub> 基因在与花粉共同培养并加入 X- Glu 后染上蓝色。。没被土壤杆菌感染的花粉在加入 X- Glu 后也未染上蓝色。作为一种阳性对照的 G U S<sub>35S</sub> 转化植物的花粉 (用叶- 盘转化方法得到) 也未染上蓝色。土壤杆菌的另一菌株, 其 T- DNA 中含有功能性 G U S 基因, 但不含 Ti-质粒 (双载体), 在花粉中并不表现 G U S 活性。

从第三部分花粉中制备提取物, 为此, 离心收集部分  $4 \times 10^5$  花粉, 置于提取缓冲液 (6) 中。该花粉用玻璃珠粉碎, 同时用超声处理。按

Jefferson 描述的方法进行荧光 G U S 检测, 50 微升提取物用提取缓冲液稀释至 1 毫升, 加入 M U G (4- 甲基伞形酮葡萄糖苷酸) 至终浓度为 1mM。每 10 至 30 秒取 200 微升试样, 用 800 微升 (0.2M) 碳酸钠终止酶反应。在荧光计上, 于 365nm 处激发后于 455nm 测吸收度, 借助于 M U G 标准溶液将此值转换为浓度单位, 以  $\mu\text{m}/\text{ml}$  表示。

来自烟草花粉提取物的  $\beta$ - 葡萄糖苷酸酶在与根瘤土壤杆菌共同培养后

在10, 20和30分钟时用荧光计测其活性 ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ )。

	10分钟	20分钟	30分钟
标准1	1.0	1.0	1.0
标准2	0.1	0.1	0.1
无土壤杆菌时	0.016	0.020	0.019
花粉			
花粉, 与 $\text{GU S}_{35\text{S}}$	0.057	0.078	0.109
土壤杆菌共同培养			
$\text{KAN}_{35\text{S}}$ 土壤杆菌	0.023	0.019	0.021
花粉, 与没有 Ti 质	0.022	0.023	0.018
粒但有来自基因转移	0.051	0.085	0.121
的 $\text{GU S}^+$ 植物的			
$\text{GU S}_{35\text{S}}$ 的双载体共同			
培养			

培养基

(1) AMGLU介质

Miller 粗盐

M S细盐

蔗糖 (0.25 M)

谷氨酰胺 (440mg/l)

pH=7

(2) M R24介质

M S粗盐

M S细盐

蔗糖(0.5M)

谷氨酰胺(440mg/l)

椰子汁(2% 体积)

乳清蛋白水解产物(200mg/l)

肌醇(100mg/l)

pH=7

(2')M R26介质

似M R24介质，其中乳清蛋白水解产物浓度为1g/l

(3) M 1 S介质

Miller 粗盐

M S细盐

Fe EDTA (乙二胺四乙酸铁)( $10^{-4}$  M)

蔗糖(0.25 M)

pH=7

(3')M 2 S介质

Kyo和Harada 氏盐(in Planta 186: 427-432 (1986))

蔗糖(0.25 M)

pH=7

(4) 种子发芽介质

M S粗盐

M S细盐

Fe EDTA ( $10^{-4}$  M)

蔗糖 (1 % 重量)

琼脂 (0.8% 重量)

硫酸卡那霉素 (50 $\mu$ g/l)

pH=5.5

(5) 钙冲洗液

Ca Cl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O (0.16 M)

M E S缓冲液 (0.5 % 重量)

pH=5.6

(6) 萃取缓冲液

磷酸钠 (50mM ,pH7)

2-巯基乙醇 (10mM)

Na<sub>2</sub> EDTA (10mM)

月桂酰肌氨酸钠 (0.1% )

Triton X-100 (0.1 % )