[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00818368.6

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1249247C

[22] 申请日 2000.11.13 [21] 申请号 00818368.6
[30] 优先权
[32] 1999.11.12 [33] US [31] 09/438,392
[86] 国际申请 PCT/US2000/031070 2000.11.13
[87] 国际公布 WO2001/034821 英 2001.5.17
[85] 进入国家阶段日期 2002.7.12
[71] 专利权人 洛克菲勒大学
地址 美国纽约州
[72] 发明人 左建儒 蔡南海
审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 53 页 附图 17 页

[54] 发明名称

用于获得具有沉默标记的转基因植物的化学诱导型启动子,及细胞和生物体以及用其筛选突变的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种化学诱导型启动子，其用于用可调控基因转化植物或植物细胞，所述可调控基因通过将植物或细胞加入到含有诱导物的培养基中或将植物或细胞从这种培养基中移出而被调控。所述启动子可由糖皮质激素、雌激素或非植物内源性的诱导物诱导。 这种启动子可与促进茎干再生和发育的任何植物基因一起应用，以在存在糖皮质激素、雌激素或诱导物的情况下诱导茎干形成。所述启动子可与抗生素或除草剂抗性基因或可由给定诱导物的存在或不存在调控的其它基因一起应用。 本发明还提供了包含一种基因的生物体或细胞，其中所述基因的天然启动子被破坏且所述基因被置于转基因诱导型启动子的控制下。 这些生物体和细胞及其子代可用于筛选条件性功能增加和功能丧失突变。

1、一种包含编码一转录因子的核酸的载体，所述核酸从5'到3'方向包含：i)启动子；ii)编码细菌阻抑物LexA的DNA结合结构域的DNA；iii)编码VP16反式激活域的DNA及iv)编码雌激素受体的调节结构域的DNA。

2、权利要求1的载体，其还包含编码选择标记或筛选标记的基因，该基因的表达由所述转录因子控制。

3、权利要求2的载体，其中所述基因是*ipt*、*CKI1*、*luciferase*、*knotted*家族的一个成员、一种其表达能促进茎干再生和发育的基因或一种其表达促进体细胞胚胎发生的基因。

4、权利要求2的载体，其还包含一或多个感兴趣的基因。

5、权利要求2的载体，其还包含抗生素抗性基因。

6、权利要求2的载体，其还包含除草剂抗性基因。

7、权利要求1的载体，其中所述启动子是组成型启动子。

8、权利要求7的载体，其中所述组成型启动子是G1090。

9、权利要求1的载体，其中所述启动子是组织特异性启动子。

10、权利要求1的载体，其还包含与所述启动子的5'末端相邻的右边界序列，位于所述编码雌激素受体的调节结构域的DNA的下游的O^{LexA}结合位点，其连接于含有TATA盒的最小启动子的5'末端，以及与所述最小启动子的3'末端相邻的左边界序列。

11、一种编码转录因子的核酸构建体，其从5'到3'方向包含：i)启动子；ii)编码细菌阻抑物LexA的DNA结合结构域的DNA；iii)编码VP16反式激活域的DNA，及iv)编码雌激素受体的调节结构域的DNA。

12、权利要求11的核酸构建体，其还包含编码选择标记或筛选标记的基因，该基因的表达由所述转录因子控制。

13、权利要求12的核酸构建体，其中所述基因是*ipt*、*CKI1*、*luciferase*、*knotted*家族的一个成员、一种其表达能促进茎干再生和发育的基因或一

种其表达促进体细胞胚胎发生的基因。

14、权利要求 12 的核酸构建体，其还包含抗生素抗性基因、除草剂抗性基因或 *luciferase* 基因。

15、一种生产展示一荧光设计，一个字或多个字的转基因植物的方法，其中所述方法包含以下步骤：

a)制备一种转基因植物，其包含在化学诱导型启动子控制下的萤光素酶基因，所述启动子是由雌激素控制的，其中所述化学诱导型启动子是权利要求 11 的核酸构建体编码的转录因子；

b)将诱导所述化学诱导型启动子的化合物置于所述转基因植物上呈所需的设计，一个字或多个字的模式；

从而所述植物将产生萤光素酶并且以化学诱导型启动子置于所述转基因植物上的模式发出荧光。

用于获得具有沉默标记的转基因植物的化学诱导型启动子，及细胞和生物体以及用其筛选突变的方法

相关申请的交叉参考

本申请是 1999 年 12 月 12 日的申请的 No.09/438，392 的部分继续申请，而 09/438，392 是 1998 年 6 月 28 日申请的 No.09/014，592 的部分继续申请，其 2000 年 5 月 16 日被授予美国专利，专利号 6，063，985。

发明背景

转基因技术已经成为在多细胞机体中着力解决重要生物学问题的有力工具，并尤其在植物领域。许多通过传统遗传学方法不能解决的问题，现在可以通过转基因技术解决，包括将同源或异源基因导入植物，修改功能及改变表达模式。这种技术的成功通常依赖于使用标记，以鉴别转基因植物和控制转基因表达的启动子。

可选择的标记广泛用于植物转化。历史上这种标记通常是编码抗生素或除草剂抗性的显性基因（Yoder 和 Goldsbrough，1994）。尽管这种标记是高效的，但它们仍具有一些缺点。用于选择转化细胞的抗生素和除草剂通常具有对增殖和分化的负作用，并在转化过程期间可以延迟无定形茎的分化（Ebinuma 等，1997）。同样，一些植物种属对这些选择剂是敏感或耐受的，并因此难以分离转化和未转化的细胞或组织（Ebinuma 等，1997）。另外，这些基因是组成型表达的，并且在实验室之外生长的植物中插入这种组成型表达的基因还存在环境和健康问题（Bryant 和 Leather，1992；Gressel，1992；Flavell 等，1992）。

一种既不是抗生素也不是除草剂的标记是来自 Agrobacterium tumefaciens 的 Ti 质粒的 *ipt* 基因。这种基因编码用于细胞激动素合成中的异戊烯转移酶（Barry 等，1984）。异戊烯转移酶使用 5'-AMP 和异戊烯二磷酸催化异戊烯-腺苷-5'-单磷酸的形成，其是细胞激动素生物合成中的第一个中间体。*Ipt* 基因的过表达导致细胞激动素水平提高（Medford 等，1989；McKenzie 等，1998；Faiss 等，1997；Redig 等，1996；Ebinuma 等，1997）。细胞激动素是在植物发育中通过介导形态学变化起重要作用的激素（Mok 和 Mok，1994；Davies，1995；Coenen 和 Lomax，1997）。例如细胞激动素能刺激叶片扩展及延缓叶片衰老（Kuraish 和 Okumura，1956；Wingler，1998；Gan 和 Amasion，1995）。在黑暗生长的幼苗中，高细胞激动素水平可产生去黄化的表型，与光亮生长的秧苗的形态相似，具有短的下胚轴，开放的钩和扩展的子叶（Chaudhury，1993；Miklashevichs 和 Walden，1997）。细胞激动素也可以从顶端优势中释放侧向芽，并刺激芽从头形成（Cline，1991；Skoog 和 Miller，1957；Sachs 和 Thimmann，1967）。这类激素因此在无定形茎形成中起关键作用。如 Skoog 和 Miller（1957）所表明，高细胞分裂素水平可诱导茎干从烟草茎中分化，这是再生转基因植物的前提条件。除了支持肿瘤生长之外，将 T-DNA 导入植物细胞中也可诱导生理异常的茎干从转化的原生质体或叶片中再生。

ipt 基因，T-DNA 的一种成分，其过表达（Akiyoshi 等，1984；Barry 等，1984）导致与生长素相关的细胞分裂素水平提高，其引发茎干再生（Tran Thanh Van，1981）。这种茎干的超量产生可产生一种大量茎干的表型（在此称为 shooty 表型）。这种表型可以用作标记（Ebinuma 等，1997）。使用在组成型启动子控制下的 *ipt* 基因的研究示出，*ipt* 过表达导致在转基因植物中细胞分裂素水平提高（Smigocki 和 Owens，1988；Medford 等，1989）。已经将在花椰菜

花叶病毒（CaMV）启动子控制下的嵌合的 *ipt* 基因导入马铃薯（Ooms 等，1983），黄瓜（Smigocki 和 Owens，1989），和一些 Nicotiana 种属（Smigocki 和 Owens，1988）的细胞中，这些转基因细胞增殖并呈现一种极端的 shooty 表型，及在无激素的培养基中丧失顶端优势。研究表明在用 *ipt* 基因转化以超量产生细胞分裂素的植物中，细胞分裂素只是局部作为旁分泌激素（Faiss 等，1997）。使用野生型烟草植物和其中 *ipt* 基因过表达的烟草植物进行的嫁接实验示出，细胞分裂素水平提高仍然局限于 *ipt* 过表达的部分植物（Faiss 等，1997）。

使用组成型表达的 *ipt* 作为标记的一个问题是所得转基因植物丧失顶端优势，且因为细胞分裂素的超量产生而不能生根（Ebinuma 等，1997）。另外，组成型过表达 *ipt* 的植物具有改变的叶片形态和延迟的叶片衰老。这种植物示出少量的根生长和可怜的拔节，显示延迟的叶片衰老，和非常常见的不育（Mok 和 Mok，1994；Klee 等，1987；Ebinuma 等，1997）。

Ebinuma 等（1997）揭示了一种使用 *ipt* 标记以克服与 *ipt* 的组成型过表达相关的问题的方法。他们揭示了一种载体，其中将 *ipt* 基因插入包括转座因子 Ac 的质粒中。此构建体包括 T-DNA（移至植物细胞中的 Ti 质粒的部分）和 35S CaMV 启动子。将此构建体转化入 A.tumefaciens 中。将叶片节段用转化的细菌接种，并生长于非选择性培养基中。在很少的情况下，在切除之后 Ac 因子不能再整合或整合入姐妹染色单体中。选择具有特别的 shooty 表型的异常茎干，并进一步培养 6 个月。其中生长培育出一些正常的茎干。通过 DNA 分析测定，其中有一些是由于转座因子 Ac 与 *ipt* 基因一起从基因组中切除的结果。这些植物中有一些保留了也包含于质粒中的其它必需标记。因此这种方法克服了存在 *ipt* 基因组成型表达的问题。不幸地，这种方法需要培养许多个月，而且只产生丧失 *ipt* 基因的少数植物。Ebinuma 等（1997）报道了在感染 6 个月后，无标记的植物的

出现频率为 0.032%。另外，从异常的再生物中选择“正常”的茎干是基于可变的形态学标准。形态学选择在丧失 35S-*ipt* 基因的植物和嵌合植物或具有极低 *ipt* 表达水平的植物之间，也没有分辨力。

使用诱导型启动子是另一种方法，这种方法已经用于克服与 *ipt* 基因在转基因植物中组成型过表达相关的问题。使用铜诱导型启动子调节 *ipt* 基因表达，使 *ipt* 基因在根中特异性表达，根是细胞分裂素生物合成的重要器官（McKenzie 等，1998）。另外，通过四环素诱导系统调节的 *ipt* 基因表达（Gatz 等，1992），提供了关于细胞分裂素在植物中的生物作用，及其通过维管系统的转运（Faiss 等，1997；Redig 等，1996）的数据。也已经报道了携带在热激（Medford 等，1989），和光度诱导型启动子（Redig 等，1996）控制下 *ipt* 基因的转基因植物。所有这些系统均用于研究细胞分裂素的生物作用，而不是用于转化。

CKI1 基因是最近鉴别的（Kakimoto，1996）。这种基因在植物中过量产生导致植物呈现典型的细胞分裂素应答，包括在没有外源性细胞分裂素的组织培养物中的快速细胞分化和茎干形成（Kakimoto，1996）。*CKI1* 基因可以与 *ipt* 相似的方式用作选择标记，即 *CKI1* 基因可以置于启动子的控制下，并且在转基因植物细胞中过表达，从而在没有外源性植物激素的情况下诱导茎干形成。可以切下这种茎干，从而获得转基因植物。得自用 *ipt* 或 *CKI1* 基因转化的细胞的这种茎干不能正常生长，通式细胞过表达这些转基因。

knotted 基因和类 *knotted* 基因是第三组基因，当其过表达时可导致不定枝异位产生（Chuck 等，1996；Lincoln 等，1994；Matsuoka 等，1993）。这些基因可以与 *ipt* 和 *CKI1* 基因相同方式用作选择标记。通常地，任何可以促进茎干再生和发育的植物基因，可以与 *ipt*，*CKI1* 和类 *knotted* 基因相同方式用作选择标记。

除了使用标记以鉴别转基因植物之外，使用启动子以控制转基

因表达是这种实验的常规部分。在大多数实验中，转基因是强启动子转录的，如花椰菜花叶病毒（CaMV）的 35S 启动子。然而，需要一种更柔性的基因表达系统，以从转基因技术中获得更多的益处。良好的可诱导转录系统是所需的，因为具有可诱导表型的转基因植物与通过传统的遗传学分离的条件突变株一样有用。关于此，已经报道了一些诱导系统并成功使用（Ainley 和 Key，1990；Gatz 等，1992；Mett 等，1993；Weinmann 等，1994）。其中，依赖于四环素的表达系统是最先进的（参见 Gatz，1996）。

糖皮质激素受体（GR）是动物类固醇激素受体家族的一个成员。GR 不仅是受体分子，还是转录因子，其在存在糖皮质激素的情况下，激活含有糖皮质激素应答因子（GREs）的启动子转录（参见 Beato，1989；Picard，1993）。已经认为 GR 系统在植物中可以是良好的诱导系统，因为其简便，而且糖皮质激素自身在植物中不产生任何多效作用。然而，针对转基因植物还未构建出使用 GR 的通常及有效的糖皮质激素可诱导的系统，尽管已经证明包含 GR 和 GREs 的系统可以在具有培养的植物细胞的瞬时表达系统中工作（Schena 等，1991）。另一方面，已经报道了 GR 的（激素）调节区（或结构域）可以调节植物转录因子在转基因植物中的功能（Aoyama 等，1995；Lloyed 等，1994）。Lioyd 等（1994）揭示在 Arabidopsis 中毛状体的发育，可以由包含糖皮质激素调节结构域和玉米转录调节因子 R 的嵌合蛋白成功控制。然而，其活性由糖皮质激素受体结构域紧密调节的这种嵌合转录因子的构建，不总是容易的和在每种情况下都可以达到的。紧密调节表现为关键依赖于嵌合蛋白的分子内结构，尤其糖皮质激素受体结构域和其功能被调节的结构域之间的相对位置。

动物类固醇激素受体的调节区，包括激素结合结构域（HBD）和 HSP90 的结合位点，认为对共价键连的相邻结构域，在没有其关

联配体的情况下具有抑制作用，适当的配体与 HBD 结合导致去抑制（Picard，1993）。这种机制可以通过设计一种转录因子而加以利用，其中组成型激活反式功能是由大鼠 GR 的调节区顺式调节的（Picard 等，1988；Rusconi 和 Yamamoto，1987）。由于组成型激活反式功能，选择一种包含酵母转录因子 GAL4（Keegan 等，1986）的 DNA 结合结构域，和疱疹病毒蛋白 VP16（Triezenberg 等，1988）的反式结构域的嵌合转录因子。嵌合蛋白 GAL4-VP16 认为在所有细胞类型中均可以作为强转录因子，因为已知 VP16 的激活结构域直接与通常的转录因子相互作用，这些转录因子在真核生物中是进化保守的（Goodrich 等，1993；Lin 等，1991；Sadowski 等，1988）。已经揭示人雌激素受体的调节区可以在酵母和动物组织培养细胞中调节相似的嵌合转录因子（Braselmann 等，1993；Louvion 等，1993）。将大鼠 GR 的调节区加入嵌合转录因子中，并将所得杂交转录因子称为“GVG”，因为其由各来自 GAL4，VP16 和 GR 的一个结构域组成。将编码 GVG 转录因子的一个 DNA 片段置于花椰菜花叶病毒 35S 启动子（Odell 等，1985）和豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小亚单位基因 rbcS-E9（Coruzzi 等，1984）的聚（A）附加序列之间。作为 GVG 的一个结合位点，将含有 GAL4 UAS（Giniger 等，1985）的 6 个拷贝的一个 DNA 片段的 5’端，融合于最小的 CaMV 35S 启动子（－46 至＋9）。

遗传分析是最重要的基础之一，基于此建立了现代生命科学。历史上遗传学研究主要基于筛选丧失功能的突变，这种方法目前仍然是遗传学解剖途径的基本工具。然而，丧失功能的筛选有两个主要缺点。首先，这种筛选不能鉴别功能丰余的基因。乙烯信号途径的遗传学和功能分析例证了这样的一个实例。一些类受体组氨酸激酶在 Arabidopsis 中已经鉴别，而且示出它们彼此高度同源。提示这些蛋白质包含于乙烯信号化中，可能作为激素的受体。而这些基因

中的无效突变无一具有任何明显的表型，携带所有这些基因的 35S 反义转基因的转基因植物针对乙烯应答表现出一些丧失功能表型（Hua 和 Meyerowitz，1998）。然而，在任何这些基因中的显性阳性或功能增强的突变导致乙烯应答的组成型抑制。由于基因组测序已经证明在许多种属中存在许多多拷贝基因（Lin 等，1999；Mayer 等，1999），功能丰余的问题更加明显。丧失功能筛选的另一个问题是由于一些突变导致配子体或胚死亡，使其非常难以或者甚至不能鉴别这种基因或突变。例如，许多 Arabidopsis 缺陷胚（emb）和相关的突变体，是由 Meinke 及其同事通过对各个胚进行显微解剖鉴别的（Meinke，1985；Meinke，1995），这表明这种筛选的技术问题。

另一种情况是近年来已经开发并使用了显性阳性或增强功能的突变的筛选方法。在植物中，筛选增强功能的突变也称为激活标记，是由 Hayashi 等（1992）首先尝试的，其使用 35S 增强子的 4 个拷贝去激活在携带增强子的 T-DNA 插入体附近的基因。最成功的实施例是鉴别 Arabidopsis *CKI1*（细胞分裂素非依赖性 1）基因，其过表达导致在没有外部细胞分裂素的情况下茎干从外植体中再生（Kakimoto，1996）。最近，相似的激活标记构建体已经用于产生大量的转基因 Arabidopsis 植物，从中已经分离了大约 30 种显性突变体（Weigel 等，2000）。与丧失功能筛选类似，激活标记的主要缺点是由于一些基因的组成型过表达导致的致死性，因此不能鉴别这些基因。事实上，只有与形态改变或开花时间相关的突变从这种大规模筛选中分离（Weigel 等，2000），提示一些显性突变，尤其那些严重影响植物发育（例如胚发生）的突变，几乎不可能通过这种方法重获。

然而激活标记可以探查一些基因的功能重要性，丧失功能突变可提供对大多数基因功能的更直接的洞察。因此，组合增强和丧失功能筛选的方法在后基因组领域应是最有利的。在本发明中，我们

提出一种新策略，产生在一个基因座中携带条件增强和丧失功能（GLF）突变的植物突变体。靶基因座的增强或丧失功能由 XVE 化学可诱导的表达系统相互及紧密控制，由此靶基因座能在相应的给定发育时间表达表型。在靶基因座中增强和丧失功能的表型的可控制表达，与使用个体方法相比可以更全面地理解基因功能。原则上，这种方法更适于可以高频率同源重组的种属，例如哺乳动物和酵母细胞。这可以通过特异性破坏天然启动子，并用诱导型启动子加以置换而进行，所述诱导型启动子在哺乳动物和酵母细胞中是功能适当的。

在此所用以例证本发明背景的出版物和其它材料，尤其提供关于实践的附加详述的案例，均并入参考，为方便起见在文中以作者和日期表示，并分别在所附参考文献表详述。

发明概述

来自 Agrobacterium tumefaciens 的 T 质粒的异戊烯转移酶（*ipt*）基因的过表达，可以提高转基因植物中细胞分裂素的内在水平，使茎干从转化的植物细胞中再生。当与地塞米松（DEX）诱导系统组合时，*ipt* 基因的控制表达可用于特异性选择转基因再生体，而不需要抗生素抗性标记。这种组合的系统可以用其它基因高效联合转化，并产生没有形态学或发育缺陷的转基因植物。

本发明的一方面涉及一种选择转基因植物的方法，使用一种化学诱导型启动子控制下的选择标记。此方法包括用含有在化学诱导型启动子的控制下 *ipt* 基因，*CKI1* 基因或来自 *knotted* 家族的基因的载体转化植物细胞；将植物细胞在没有植物激素但存在启动子诱导物的情况下生长；切除发育的茎干。本发明还涉及一种选择转基因烟草和转基因莴苣植物的方法，该方法使用在化学诱导型启动子控制下的选择标记。

本发明另一方面涉及一种用于产生转基因植物的载体。将这种载体设计为包括一个选择标记，该标记在化学诱导型启动子而不是组成型启动子的控制下。

本发明还涉及使用上述诱导型载体的方法。

本发明还涉及包含化学诱导型启动子的核酸，其中所述核酸包含编码雌激素受体的 DNA。

本发明进一步涉及一种核酸，其包含 i)一个组成型启动子，ii)编码细菌阻抑物 LexA 的 DNA 结合结构域的 DNA，iii)编码 VP16 反式结构域的 DNA，iv)编码雌激素受体的 DNA，和 v)一或多个 LexA 结合位点。

本发明的另一方面涉及一种含有载体的转基因植物或转基因植物细胞，所述载体具有在化学诱导型启动子控制下的选择标记。本发明的一方面涉及的转基因植物是烟草或莴苣植物，转基因植物细胞是烟草或莴苣细胞。

本发明另一方面涉及一种选择转基因植物的方法，该方法使用在化学诱导型启动子控制下的抗生素和除草剂抗性基因。这种抗生素和除草剂抗性基因可以通过有或无诱导物调节。

本发明另一方面涉及一种转基因植物，其含有在化学诱导型启动子控制下的除草剂抗性基因或抗生素抗性基因。本发明还涉及一种转基因烟草植物或转基因莴苣植物，其含有在化学诱导型启动子控制下的除草剂抗性基因。

本发明还涉及一种在存在低水平生长素和细胞分裂素的情况下，选择用 *ipt*，*CKI1* 或 *knotted* 基因转化的根细胞。

本发明还涉及一种生产展示荧光设计的转基因植物。

本发明还涉及包含一种基因的机体或细胞，其中所述基因缺失天然启动子，而且将此基因置于转基因的诱导型启动子控制下。

本发明的另一方面涉及通过利用细胞或机体筛选基因中突变的

的方法，其中所述基因缺失天然启动子，将此基因置于转基因的诱导型启动子的控制下，并将机体或细胞或其子代在有或无诱导物的情况下生长。这可以在生命周期的特异时期加入或除去诱导物，以筛选增强功能的基因或丧失功能的基因。

附图简述

图 1 是在 pTA7002 中的左和右边界之间插入体的代表图式。RB 代表右边界，LB 代表左边界。限制酶位点在图的上方示出。限制酶位点是以缩写表示的，B－BamHI，H－HindIII，E－EcoRI。

图 2 例证了萤光素酶和 GVG 构建体的 pMON721 的插入点。萤光素酶插入 NotI 限制酶位点。GVG 插入载体的多克隆位点。

图 3A 示出自暗灰色（最低）至白色（最高）的发光密度。尽管是以暗灰色至白色衡量的，实际上冷光是蓝色的。这种衡量用于解释图 3B 的结果。图 3B 示出由不同浓度的 DEX 诱导的萤光素酶活性的固定表达水平。图 3C 示出图 3B 图式的抗 DEX 浓度的结果。将在 0uM DEX 获得的数值（基础的无诱导水平）设定为 1。

图 4A-C 示出在 Arabidopsis 中诱导萤光素酶活性。图 4A 是示出自暗灰色（最低）自白色（最高）发光密度的彩色衡量图式（如图 3 所示，冷光是蓝色的，不是图中所示的灰色）。图 4B 表示一种在罐中生长 3 周的转基因植物，然后用含有 0.5mM 荧光素钾和 0.01%(w/v) Tween-20 的溶液喷洒，并分析萤光素酶活性。图 4C 表示与图4B相同的植物，只是随后将植物含有30uM DEX和0.01%(w/v) Tween-20 的溶液喷洒。24 小时后，将植物再用荧光素溶液喷洒并分析。对图 4B 和 4C 而言，植物的发光是用高密度照相系统显影的（Hamamatsu 摄影系统）。用 DEX 处理的植物中见到的发光异质性是荧光素不均匀吸收所致。

图 5A－B 代表由 DEX 诱导的 luc mRNA 水平的动力学。将携带 GVG 基因和 luc 受体基因的转基因烟草植物首先在琼脂培养基上生

长 14 天，然后在水培培养基中适当生长 3 天。DEX 处理是通过在培养基中加入终浓度为 10uM 的 DEX 起始的（时间示为 0）。在处理 24 小时后，从培养基中除去 DEX。在每个所示时间从 20 个植物中制备总 RNA，并进行 Northern 分析。将萤火虫萤光素酶（图 5A）和 GVG 基因（图 5B）的 cDNA 片段用作探针。信号是通过 BAS-2000 系统显影的（富士摄影胶片公司）。封闭和开放的箭头分别表示加入和除去 DEX 的时间点。

图 6 示出由各种糖皮质激素诱导的密度和稳定性。将携带 GVG 基因和 luc 受体基因的转基因烟草植物首先在琼脂培养基上生长 14 天，然后移至含有 30uM 的不同糖皮质激素的新鲜琼脂培养基中再生长 2 天。在诱导后，将植物移回没有糖皮质激素的琼脂培养基中（时间标示为 0）。绘制由 DEX（●），氟羟脱氢皮醇 acetonide（○），βmethasone（■）和氢化可的松（□）诱导的相关萤光素酶活性图。将没有糖皮质激素获得的数值（非诱导水平）设定为 1。

图 7 示出通过喷洒糖皮质激素局部诱导的萤光素酶表达。

图 8 示出烟草和莴苣茎干的地塞米松依赖性再生。将烟草（上排）和莴苣（下排）的叶片用图 12 所示的转化盒转化。然后将植物材料在诱导（10uM DEX）或非诱导（0uM DEX）条件下生长 40 天。

图 9A-F 示出在烟草和莴苣再生体中萤光素酶活性。萤光素酶活性是在以表达 *ipt* 基因诱导条件下（10uM DEX）生长 40 天的再生体中测定的。再生体中萤光素酶活性是用视频显影系统测定的，综合 5 分钟的测定结果及从影像中减去背景测定。将萤光素酶影像转化为 16－8bit 图片，并人工涂色标示。红/绿覆盖图示出明亮区域和萤光素酶活性影像的叠印，以易于检测 luc 阳性和阴性再生体。图 9A，9C 和 9E 是烟草，图 9B，9D 和 9F 是莴苣。图 9A-B 示出明亮区域图片。9C-D 是萤光素酶影像，9E-F 是红/绿覆盖图。

图 10A-D 示出来自烟草的 *ipt* 和 luc 转录物的 Northern 印迹分

析。示出了来自有（＋1 至+10）或没有（－a 至－g）可检测萤光素酶活性的 30 天龄再生体的 *ipt* 和 luc 转录物的水平。将再生体在存在 10uM 地塞米松的情况下生长。图 10A 和 10C 示出 *ipt* 转录物水平，图 10B 和 10D 示出 luc 转录物水平。

图 11A-C 示出在转基因烟草秧苗中 luc 基因的分离和 Southern 分析。萤光素酶活性是在 44 株随机选择的秧苗中测定的。其中 33 株秧苗表现萤光素酶活性，11 株秧苗不表现萤光素酶活性（与图 11A 和 11B 相比），表明显性 luc 基因 3:1 分离。来自秧苗的 DNA 的 Southern 印迹分析示于图 11C。用未切割的 DNA（U）检测单条带，之后将 DNA 用 BamHI（B），SacI（S），NcoI（N）和 XbaI（X）消化，及用放射标记的 luc 基因片段杂交。

图 12 示出 *ipt* 基因可诱导表达的转化盒。将来自 Agrobacterium tumefaciens 的 *ipt* 基因在糖皮质激素应答启动子（融合于 CaMV35S 最小启动子的－46 位的 6xUAS）的控制下克隆，以调节基因的表达。*ipt* 基因的表达是由糖皮质激素激活的转录因子（GVG）介导的，如 Aoyama 和 Chua（1997）所述。将编码潮霉素磷酸转移酶（hpt）（Waldron 等，1985）和萤火虫萤光素酶（luc）（Millar 等，1992）的基因在组成型启动子的控制下克隆（NP，NOS 启动子；35S：CaMV35S 启动子），以易于检测转化和共转化效力。将上述基因在 T-DNA 的左和右边界（LB，RB）之间克隆（Klee 等，1987；Beavan 和 Chilton，1982）（pBI 101，Clontech 公司），以允许 Agrobacterium 介导的转化，所述 T-DNA 来自 Agrobacterium tumefaciens。

图 13 是 XVE 载体的图谱（Zuo 等，2000）。只示出了整合入植物基因组的区域（在右边界 RB 和左边界 LB 之间）（没有刻度）。G1090：驱动 XVE 的合成启动子（Ishige 等，1999）；XVE：编码嵌合转录因子的 DNA 序列，所述嵌合转录因子含有 LexA 的 DNA 结合结构域（DBD）（1－87 残基），VP16 的转录激活结构域（413－490）

和人雌激素受体的调节区域（272-595）；$E9_T$：rbcE9 聚 A 附加序列；NOS：胭脂氨酸合酶启动子；HPT：潮霉素选择标记；KAN：卡那霉素选择标记；NOS_T：胭脂合酶聚 A 附加序列；8XlexA：LexA 阻抑物结合位点的 8 个拷贝；－46：35S 最小启动子；$3A_T$：rbcS 3A 聚 A 附加序列；MCS：多克隆位点。

图 14A-B 示出由 XVE 诱导系统控制的 GFP 基因表达。图 14A 示出 pER8-GFP 转基因 Arabidopsis 系的根。发自相同根的 GFP 信号（绿色）是在荧光显微镜下观测的，如图 14B 所示。

图 15 示出对 XVE 诱导系统的 17-β-雌二醇的剂量依赖性。将在没有诱导物的情况下培养的 3 周龄 pER8-GFP 转基因植物，移至含有各种浓度 17-β-雌二醇的培养基上，温育 16 小时。从未处理（0 泳道；对照）或 17-β-雌二醇处理的植物中制备 RNA，并用 GFP cDNA 作探针通过 Northern 印迹分析。每条泳道上的数字表示处理的浓度（以 UuM 表示）。

图 16 示出 XVE 系统的泳道时程。将在没有诱导物的情况下培养的 3 周龄 pER8-GFP 转基因植物，移至含有 2uM 的 17-β-雌二醇的培养基上，并温育不同的时间（每条泳道上所示时间）。如图 15 所述进行 GFP 转录物的分析。

图 17 是 XVE 激活标记载体 pER16 的图式。只示出了右边界 RB 和左边界 LB 之间的区域（没有刻度）。两个转录单位和 O^{LexA}-46 启动子位于 RB 和 LB 之间。在第一个转录单位中，G10-90 启动子（Ishige 等，1999）驱动以 rbE9c 聚 A 附加序列终止的 XVE 融合基因。第二个转录单位由 Nopaline 合酶（NOS）基因启动子，新霉素转移酶 II（NPTII）基因的编码序列，和 NOS 聚腺苷酸化序列组成。O^{LexA}-46 启动子由融合于－46 CaMV35S 启动子的 LexA 操纵子序列的 8 个拷贝组成。在整合入植物基因组基础上，O^{LexA}-46 启动子可以激活以 17-β-雌二醇依赖性方式融合于启动子下游的序列的转录。

发明详述

我们详细论述了用 *ipt* 基因作为转化标记，而又没有组成型表达的缺点的诱导系统方案。在诱导条件下，用 *ipt* 基因转化的细胞的细胞分裂素水平应提高，并因此具有从植物愈伤组织或外植体中再生茎干的潜力。在文中，*ipt* 基因的过表达可作为无抗生素标记，特异性选择转化的细胞。如 Aoyama 和 Chua（1997）所述，地塞米松诱导系统紧密调节靶基因在转基因植物中的表达。这个系统由一个杂种转录因子和一个调节的基因组成，所述转录因子当用 DEX 激活时介导转录，所述基因在只对这种转录因子应答的顺式因子的控制下。因此，我们使用一种含有在 DEX 诱导系统控制下的 *ipt* 基因的转化盒，作为无抗生素标记以共转化两个其它组成型表达的基因（潮霉素磷酸转移酶（hpt）基因（Waldron 等，1985）和萤火虫萤光素酶（luc）基因（Millar 等，1992））。这种新的转化系统是用 Agrobacterium 介导的转化针对烟草和莴苣建立的。

本发明的一个实施方案涉及已经用一种载体转化的转基因植物，所述载体包括一个在诱导型启动子控制下的选择标记。在本发明的一个优选的实施方案中，转基因植物是烟草植物。在另一个优选的实施方案中，转基因植物是莴苣植物。

在本发明的一个实施方案中，用于形成转基因植物的载体包括一个激活选择标记的化学诱导型启动子。如果需要，也可以将任何其它的相应基因置于诱导型启动子的控制下，这样可以随时将基因启动。这样的基因不需要标记。这样的载体例如见于以下实施例中所述，所述实施例不仅阐述载体，还阐述了用于制备和筛选含有这种载体的转基因植物的方法。

在本发明的一个实施方案中，可以诱导启动子以选择已经成为转基因的细胞或植物，但所述启动子在天然生长条件下不被诱导。

在这种方式中，尽管可选择的标记存在于转基因植物中，但其在植物的正常生长起见是完全沉默的，并应不干扰植物的生长。这种沉默标记基因与例如具有抗生素抗性基因标记相比更合乎环境要求，其中所述抗性基因是在植物正常生长期间表达的。使用后一类型标记是肯定的，因为其可以使对抗生素有抗性的有机体发育。

在本发明的一个实施方案中，诱导型启动子是糖皮质激素受体。已经认为这是一种良好的植物诱导系统，因为糖皮质激素自身在植物中不产生任何多效性作用。在本发明的一个优选实施方案中，结合糖皮质激素受体的转录因子是一种嵌合转录因子，其中将大鼠 GR 的调节区域加入酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合结构域和疱疹病毒蛋白 VP16 的反式激活结构域中。所得杂合转录因子称为“GVG”，因为其是由分别来自 GAL4，VP16 和 GR 的一个结构域组成的。将 GVG 基因与萤光素酶（luc）受体基因一起导入烟草中，所述 luc 受体基因转录自含有 GAL4 上游激活序列（GAL4 UAS）的 6 个拷贝的启动子。基于糖皮质激素处理，可以观测到萤光素酶活性和 luc mRNA 水平均得以良好诱导。

GVG 系统在植物中的主要优点是 GR 和糖皮质激素，至少在所用的浓度，是无毒的并对植物没有可观测到的不利的生理影响，因此可以诱导靶基因而没有多效性作用。为保留这种优点，GVG 系统中所有其它成分也得自非植物源。

这个系统的另一个优点是糖皮质激素具有可以使其作为诱导物化合物的特性。由于糖皮质激素可以易于透过植物细胞，因此可以使用各种方法进行快速基因诱导。基因表达的局部诱导可以简便地透过喷洒糖皮质激素溶液而达到。当整个植物在露天条件下处理时，已知诱导物化合物在叶片中积累至较高浓度。甚至在这种条件下，积累的糖皮质激素对叶片没有任何可观测到的损害。诱导水平可以通过使用不同浓度的糖皮质激素或其不同的衍生物加以诱导。这个

特点有助于分析诱导的基因产物的剂量依赖性作用。糖皮质激素是经最佳研究的生物化合物之一，而且现在可以通过商业途径获得100种以上的不同类型的糖皮质激素衍生物。一些糖皮质激素衍生物在植物中可以是非常稳定的，而其它的是迅速降解的。这些类型的糖皮质激素分别用于稳定和瞬时诱导。另外，一些糖皮质激素拮抗剂可以用于反向调节诱导。

尽管以下阐述了特异的构建体，但本领域技术人员可以易于预想和产生其它构建体。本发明所述的 GVG 系统的组分是非常灵活的。例如，转录诱导可以通过用组织特异性启动子置换 GVG 基因的 35S 启动子而限于特异的组织。GVG 融合蛋白中的每个功能结构域也是可以置换的，使系统进一步精确。具有一个不同的 DNA 结合结构域和另一种类固醇激素受体的调节区域，可以产生另一种类固醇诱导系统，可以与 GVG 系统组合使用。

也已经产生了另一种构建体，其比 GVG 系统更具优点，或与其联合使用。这种构建体称为 XVE。其类似于 GVG 系统，但含有细菌阻抑物 LexA 的 DNA 结合结构域，和人雌激素受体的调节区域。XVE 构建体可以用于代替 GVG 构建体，无论 GVG 系统是否是本发明所阐述的，只要适当的诱导物用于所用的构建体。XVE 构建体可以与 GVG 构建体一起使用，并可以从 GVG 构建体中控制性分离。

在本发明的一个优选的实施方案中，所用的可现在标记是 *ipt* 基因。当此基因被诱导时，其产生极端的 shooty 表型，其中植物细胞生长多于根的茎干。这种表型易于通过目测选择。一旦除去诱导物，*ipt* 基因变为沉默的，而且细胞能正常生长。在本发明的其它实施方案中，其它选择标记例如 *CKI1* 基因可以相似方式使用。再声明一次，使用的标记只有当诱导时是活性的，一旦除去化学诱导物将变为沉默的。

结合使用化学可诱导标记的原理，可以产生各种 DNA 构建体。

在以下所述的质粒设计后，在质粒内装配可以良好控制的区域。

本发明的另一实施方案涉及一种使用选择标记选择转基因植物的方法，所述选择标记在化学诱导型启动子控制下。在本发明的一个优选实施方案中，将 *ipt* 基因置于质粒内糖皮质激素诱导型启动子的控制下。在另一优选的实施方案中，将 *CKI1* 基因或 *knotted* 家族的一个基因置于质粒内糖皮质激素诱导型启动子的控制下。地塞米松诱导系统由一种杂合转录因子组成，所述转录因子在存在 DEX 的情况下介导糖皮质激素受体转录。这个系统紧密调节 *ipt* 基因在转基因植物中表达。将植物细胞用这个质粒转化，并将细胞在 MS 培养基上生长，所述 MS 培养基没有植物激素，但有或没有地塞米松，这是一种合成的糖皮质激素类似物。在诱导条件下，用 *ipt* 转化的细胞的细胞分裂素水平提高，并将从植物愈伤组织或外植体中再生茎干。由于细胞是在没有植物激素的情况下生长的，茎干应只在转化的和在存在地塞米松的情况下超量产生细胞分裂素细胞中产生。未转化的细胞不产生茎干，而且在没有地塞米松情况下生长的细胞不产生茎干。*Ipt* 基因的过表达因此可以作为无抗生素标记系统，特异地选择转化的细胞。这个系统也可以作为第二标记，以将另外的基因导入对抗生素已经有抗性的植物中。在存在地塞米松的情况下生长的转化的细胞上，在 2－3 周内应出现畸胎瘤茎干。可以切下这些茎干并置于含有吲哚乙酸但没有地塞米松的 MS 培养基上。在这种条件下，*ipt*，*CKI1* 或 *knotted* 基因应不久就激活，而且转基因植物应表现是正常的和不育的，并能结种。原则上，这种方法可用于在任何适当诱导型表达系统控制下的任何植物基因，可以促进茎干再生和发育。

必须指出的是尽管一些植物具有如上所述表现（只有产生的茎干是来自转化的植物），一些植物即使不是转化的，其在无激素的培养基中也可以生长茎干。对这样的植物可以使用各种方法以成功选

择转化的植物。一种这样的方法是尽管茎干可以通过转化的植物产生，这种茎干看起来是正常的（野生型），而转化的植物具有 shooty 表型。因此可以使用这种表型区分转化的茎干和未转化的茎干。另一种方法是将一种激素如生长素加入生长培养基中，以抑制未转化的外植体形成茎干。这将降低未转化的茎干呈现的背景噪音水平。加入的生长素的数量可以通过滴定法确定，即使用不同浓度的生长素，确定在未转化的外植体中抑制茎干生长，但在转化的外植体中茎干生长的水平。

在本发明的一个实施方案中，使用一种转化盒（图 12）共同转化两个其它组成型表达的基因（潮霉素磷酸转移酶（hpt）基因和萤火虫萤光素酶（luc）基因），所述转化盒含有在 GVG 糖皮质激素诱导系统（Aoyama 和 Chua，1997）控制下的 *ipt* 基因，作为无抗生素标记。当用 DEX 诱导时，异戊烯转移酶表达自 *ipt* 基因，使细胞分裂素水平提高。在诱导 *ipt* 基因表达的条件下，细胞分裂素水平提高使转基因茎干从烟草或莴苣外植体中有效再生（图 8）。在再生体中测定 *ipt* 转录物水平表明再生与 *ipt* 表达紧密偶联（图 10A-D）。甚至在非诱导条件下，其中只有少量茎干自外植体中再生，也有至少 50% 的再生体含有转基因。对转基因茎干和植物的 Southern 和分离分析表明多数再生体只含有 *ipt* 基因的一个单一拷贝（图 11A-C）。时程实验表明再生是迅速的，而且特异性作用至少维持 20 天。细胞分裂素的作用因此是局限的，及激素不散播和触发未转化的细胞再生。这个发现与观测到的甚至外源性应用高浓度的细胞分裂素产生较多或较少的局部反应相一致。共同转化 hpt 和 luc 基因的效力，可以通过测定 Luc 活性（图 9A-F）和分析潮霉素抗性再生体加以确定。也可以进行 Northern 分析以确定 hpt 和 luc 转录物水平（图 10A-D）在大约 80%的茎干中，luc 和 hpt 基因是用 *ipt* 诱导系统成功共同转化的。在将再生体移至非诱导条件下时，烟草和莴苣植物的形态是完

全正常的。40%以上的烟草再生体在 20 天内产生强大的根系，并可以易于移至土壤中。所得植物示出没有形态学或发育异常，及转基因传递给子代。这些结果表明可诱导 *ipt* 表达优于 *ipt* 组成型表达。

在本发明的另一实施方案中，将抗生素或财产抗性基因置于糖皮质激素受体科技诱导启动子的控制下。启动子是可以诱导的以使抗生素或除草剂抗性基因表达，以选择转化的植物细胞。一旦已经选择了转化的植物细胞，可以抑制抗生素和除草剂抗性基因的表达。这个系统比其中转化的植物组成型表达激活抗生素基因或除草剂抗性基因的系统更合乎环境要求。

可以更常规使用化学诱导系统，而且当然不限于用于诱导 *ipt*，*CKI1* 或 *knotted* 基因或其它可选择的标记。其可以用于化学诱导任何感兴趣的基因。其可以用于诱导可筛选标记如萤光素酶或其它所需的可筛选标记。

所用系统是经过一系列步骤进行的，以测试终构建体的各个方面。这些步骤见于以下实施例。在此首先简要解释实验进程。首先使用 GVG 系统以示出可以产生一种构建体，其包括可由 DEX 或糖皮质激素类似物诱导的基因。为此使用质粒 pMON721，将 luc 置于 UAS 的控制下。这用于产生转基因烟草植物，其是在卡那霉素培养基上选择的。这些实验示出这样的系统的作用（Aoyama 和 Chua，1997）。接着，需要避免标记的抗生素抗性，使用 *ipt* 基因作标记设计新的构建体。用具有 6XUAS 下游多克隆位点的 pTA7001 或 pTA7002 载体产生构建体。这些构建体包括在 35S 启动子控制下的 GVG 嵌合的转录系统，也包括由 NOS 启动子调节的潮霉素抗性基因。将 *ipt* 基因置于 6XUAS 的下游。这个构建体的使用表明得自 *ipt* 过表达的“shooty”表型可以用作标记。然后产生不同的构建体以将此结果扩展到除烟草之外的其它植物。修饰 PTA7002/*ipt* 构建体，将用于表达 GVG 编码序列的 35S 启动子用称为 G10-90 的合成启动子

置换，G10-90 是比 35S 启动子更强的启动子。其由融合于 35S 启动子的－90 位的 G box 的 4 个拷贝组成。另外，加入一个另外的基因 35S-luc。将此构建体用于烟草和莴苣植物中。然后测试所选择茎干的萤光素酶表达和潮霉素抗性。结果表明 shooty 再生体示出萤光素酶表达和潮霉素抗性的百分率均非常高。这证明使用 GVG 系统和 *ipt* 基因可以使技术人员使用 shooty 表型在不同植物中作为标记。

本发明的另一个实施方案是通过增强或丧失功能（GLF）系统激活标记。GLF 系统的原理是用诱导型启动子置换植物基因组中相应基因的天然启动子。因此，由于缺失靶基因的启动子，置换将产生丧失功能的突变。另一方面，靶基因的表达由诱导物控制，而且诱导的靶基因的异位过表达产生功能增强的表型。另外，由于突变的类型是有条件的，因此丧失功能的突变可以在适当条件下通过靶基因的可诱导表达补足。在转基因性诱导型启动子控制下的基因表达，可以由所存在的诱导物浓度加以控制。在没有诱导物或在非常低水平的诱导物的情况下，启动子是失活的或最小限度的，而且不发生表达。在高水平诱导物的情况下，启动子可以过表达基因。在中等水平诱导物的情况下，基因的表达可以等价于野生型表达，而且植物，细胞或有机体可以表现为野生型。

实际上，GFL 系统需要一种紧密调节的和高效的诱导型启动子，和宿主基因组中靶启动子序列的相对精确的置换。本发明所述的XVE系统充分实现了 GFL 系统的需求。除了紧密控制之外，XVE 系统比 35S 启动子刺激靶基因表达 8 倍以上，可以理想地用于异位过表达研究。尽管未知同源重组在高等植物中难以高频率发生的原因，但可以产生一个突变体大集合，并随后筛选相应的功能增强或丧失的突变。我们确实鉴别了一些突变体，其中靶基因的启动子由诱导型启动子置换，因此在一个单一基因座产生功能增强或丧失的突变。如前所述，这个系统对哺乳动物和酵母中基因特异性突变是非常有

效的，其中同源重组实际上是可能的。

GFL 载体（图 17）是基于所述 XVE 载体构建的，也见于 Zuo 等（2000）所述，在此并入参考。在插入宿主基因组后，O^{LexA}－46 启动子以 17-β－雌二醇依赖性方式可激活下游融合的基因，或者 LexA 操纵子序列（O^{LexA}）也可作为强力的 17-β－雌二醇依赖性增强子，激活 T-DNA 插入体附近的基因。

本发明参考以下实施例进行阐述，以下实施例只是例证了本发明而无以任何方式限制本发明之意。使用的是本领域熟知的标准技术或下文特别阐述的技术。

实施例 1：DNA 构建体

A) 构建 pTA7002

质粒 pTA7002 与 pBI101（Clontech）类似，除了右边界和左边界之间的序列由 3 个转录单位置换。在 pTA7002 的右边界和左边界之间的插入体如图 1 所示，包含一个包括以下因子的质粒：一个 35S 启动子，一个 GAL4 DNA 结合结构域，一个 VP16 反式激活结构域，糖皮质激素受体调节结构域和一个豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小单位 rbcS-E9 聚（A）附加序列，所有这些均是第一个转录单位（35S-GVG-E9）的一部分；一种胭脂氨酸合酶（NOS）启动子，潮霉素磷酸转移酶编码序列，和 NOS 终止子，这些是第二个转录单位（NOS-HPT-NOS）的组成部分；及 GAL4 上游激活序列（UAS）的 6 个随机拷贝，置于包括 TATA 区域的最小限度 35S 启动子（－46 至＋8）的上游，这些是第三个转录单位（6xUAS-(-46/35S)-3A）的组成部分。第三个转录单位还包括插入任何所需编码序列的限制位点（XhoI 和 SpeI），和豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小单位 rbcS-3A（Fluhr 等，1986）。在 XhoI-SpeI 位点插入的编码区域应含有起始密码子和终止密码子。

更详细地，35S-GVG-E9 转录单位包括 CaMV 35S 启动子的－343至＋9 位碱基（Odell 等，1985）。GAL4 DNA 结合结构域包含 1－74 个氨基酸（Laughon 和 Gesteland，1984）。VP16 酸性结构域包含 413－490 个氨基酸（Dalrymple 等，1985）。GR 受体结构域包含 519－795 个氨基酸（Miesfeld 等，1986）。这个转录单位的 3’末端是豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小单位 rbcS-E9 的聚（A）附加序列（Coruzzi 等，1984）。驱动 GVG 基因的 35S 启动子可以变换为使用 Sse8387I 和 PmeI 限制酶位点选择的启动子片段。由此可以插入启动子，根据其特性这种启动子在特异组织中或在一段特异时期可以诱导插入的基因。

B) pTA7001

这个质粒与 pTA7002 相同，除了含有 6xGAL4 UAS-TATA-克隆位点-3A 终止子的片段的定向不同。因此在这个质粒的 T-DNA 区域中也均含有顺式和反式因子。反式因子是 GVG 区域，由 GAL4 DNA 结合结构域，VP16 反式结构域，和由 35S 启动子驱动的 GR 受体结构域组成。顺式因子由 35S 启动子的 6xGAL4 UAS 和 TATA 区域组成。再一次，这个质粒基于 pBI101（Clontech），其中 RB 和 LB 之间的区域已经置换。在 pTA7001 中，这个区域已经变为：

1-39：来自 pBI101 的 pTiPOST37（RB=1-25）

47-858：来自 pBI221 的 35S 启动子（TATA=813-816）

867-1097：GAL4（aa 1-77）

1117-1340：VP16（aa 519-795）

1347-2180：大鼠 GR（aa 519-795）

2207-2764：豌豆 rbcsE9 终止子

2780-3112：来自 pBI101 的 NOS 启动子

3120-4145：潮霉素磷酸转移酶

4147-4399：来自 pBI101 的 NOS 终止子

4893-4423：豌豆 rbcs-3A 终止子

4941-4894：XhoI，SpeI 的克隆位点

4995-4942：35S 启动子 TATA 区域（TATA=4980-4977）

5197-4996：6xGAL4 UAS

5198-5357：pBI101 的 M13mmp19 EcoRI-HaeII 片段

5358-5862：pBI101 的 pTiPOST37（LB=5838-5862）

C) pTA7002/*ipt*

这个质粒是通过在 pTA7002 质粒中 6xUAS 启动子的下游，插入含有 pTiT37 质粒（Goldberg 等，1984）的异戊烯转移酶（*ipt*）基因的限制性片段（XhoI，SpeI）而制备的。

D) pMON721/*ipt*

这个质粒在设计上与 pTA7002 相似，其中掺入相同的 GVG 系统。然而，这是基于 pMON721 载体（Monsanto Corp.，St.Louis，MO）而不是 pTA7002 质粒。转录自 CaMV 35S 启动子（Odell 等，1985）的－343 至＋1 区域的 GVG 基因，在豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小单位 rbcS-E9（Coruzzi 等，1984）的聚（A）附加序列 3’末端的两侧。编码特异结构域的 DNA 片段是用进行框架内克隆的适当序列的引物，通过聚合酶链反应（PCR）产生的。GAL4 DNA 结合结构域包含 1-74 个氨基酸（Laughon 和 Gestelang，1984），VP16 酸性结构域包含 413-490 个氨基酸（Dalrymple 等，1985），GR 受体结构域包含 519-795 个氨基酸（Miesfeld 等，1986）。GAL4 UAS DNA（5’-CGGGTGACAGCCCTCCG-3’ SE ID NO:1）是化学合成的，luc 基因的编码序列（Wet 等，1987）是自 pGEM-luc（Promega 公司）中移除的。Luc 编码序列转录自 GAL4 UAS 的 6 个拷贝，将 5’末端置于 35S 启动子的－46 至＋1 区域，并在豌豆 rbcS-3A 的聚（A）附加序列 3’末端两侧（Fluhr 等，1986）。图 2 例证了插入 GVG 和 luc 核酸构建体的 pMON721 中的插入点。

E）pTA7002G/*ipt*/luc（pYS4）

这个质粒类似于 pTA7002*ipt*，但有两处不同。pTA7002/*ipt* 载体的 35S 启动子用称为 G10-90 的合成启动子置换。G10-90 启动子由融合于 35S 的－90 位的 G box（GCCACGTGCC SEQ ID NO:2）的 4 个拷贝组成。另外，还包括 35S-luc 基因，以易于用感光显影系统目测识别转化体。这个载体示于图 12。见 Kunkel 等，1999.

F) XVE 载体

XVE 载体（见图 13）已经由 Zuo 等（2000）阐述。XVE：一种嵌合的转录因子，含有 LexA 的 DNA 结合结构域（1-87 残基），VP16 的反式激活结构域（413-490），和人雌激素受体的调节区域（272-595）。控制相应基因的第二个表达盒，是通过将 LexA 结合位点的 8 个拷贝融合于 35S 最小启动子的－46 位而产生的。

PER8-*CKI1*（XVE-*CKI1*）：将含有 *CKI1* cDNA 的编码区以及部分 5’和 3’未翻译区的 XhoI/SpeI DNA 片段，插入 8XLexA-46 启动子下游 pER8 载体的相同位点。在此构建体中，*CKI1* 基因因此置于 XVE 诱导系统的控制下，而且其转录只可由 17-β-雌二醇或 4-羟基三苯氧胺激活。

PER8-Lex1(XVE-Lec1)：将含有 Lec1 cDNA 的编码区以及部分 5’和 3’未翻译区的 XhoI/SpeI DNA 片段，插入 8XLexA-46 启动子下游 pER8 载体的相同位点。在此构建体中，Lec1 基因因此置于 XVE 诱导系统的控制下，而且其转录只可由 17-β-雌二醇或 4-羟基三苯氧胺激活。

PER8-SERK(XVE-SERK)：将含有 Arabidopsis SERK 基因的一个基因组 DNA 片段（没有 SERK 启动子和转录终止序列），插入 8XlexA-46 启动子下游的 pER8 载体的相同位点中。在此构建体中，SERK 基因因此置于 XVE 诱导系统的控制下，而且其转录只可由 17-β-雌二醇或 4-羟基三苯氧胺激活。

实施例 2：用基于 pMON721 的载体转化植物

载体 pMON721 可以与 A.tumefaciens 菌株 ABI 组合使用，但不能与 A.tumefaciens 菌株 LB4404 组合使用。菌株 ABI 不用激素单独就可以从在 MS 培养基上培养的叶片中诱导茎干，并因此不可用于标记是茎干生长的实验中。pMON721- A.tumefaciens 菌株 ABI 组合可用于那些实验，所述实验其中是筛选其它标记，例如选择抗生素抗性时。在这些实验中，细胞生长于具有激素的培养基中，而且是通过卡那霉素抗性选择的，并将其在有或没有诱导物如地塞米松的情况中生长。

A) 将质粒转化入细菌

将质粒导入 Agrobacterium tumefaciens 中。将衍生自 pMON721 的质粒通过本领域技术人员熟知的方法置于菌株 ABI（Monsanto Corp.，St.Louis，MO）中。例如，就 pMON721/Luc 而言，从含有 50mg/L 卡那霉素，25mg/L 氯霉素，100mg/L 壮观霉素和 100mg/L 链霉素的 YEB 培养皿中选择一个单一的 A.tumefaciens 菌株 ABI 的集落（Monsanto Corp.，St.Louis，MO）。将 Agrobacterium 细胞移至含有 10ml YEB 液态培养基的 50ml 无菌螺纹盖试管中，所述培养基具有 50mg/l 卡那霉素，25mg/l 氯霉素，100mg/l 壮观霉素和 100mg/l 链霉素。将培养物在 28° C 生长 24 小时。通过在 4° C 在 3000 rpm 离心 10 分钟收集培养物中的 Agrobacterium 细胞。将细胞沉淀在具有抗生素的 10mlYEB 培养基中冲洗 1 次，然后再悬浮于 30ml B5 培养基中，用于接种外植体。YEB 培养基是由 1.0L 以下物质组成的：5.0g 蔗糖，5.0g 蛋白胨，5.0g 牛肉膏，1.0g 酵母膏和 0.04g $MgSO_4.7H_2O$。

B) 与 Agrobacteria 共培养

如 Horsch 等（1988）所述转化和再生 Nicotiana tabacum cv SR1 的叶片，并根据 Valvekens 等（1988）所述方法进行转化 Arabidopsis。

C) 含有萤光素酶的转基因植物

使原始转基因植物自体受精并收集种子。将转基因子代在 MS 培养基（Murashige 和 Skoog，1962）上萌发以进行选择，所述培养基补加了 3%蔗糖，0.8%琼脂和 100ug/ml 卡那霉素。将在萌发后在相同琼脂培养基上生长 14 天的 T_3 纯合植物用于诱导实验。在一些实验中，将植物移至含有 1/100 浓度的 MS 盐的水培生长培养基中，并在使用前适于生长条件 3 天。在所有情况下，将植物暴露于持续光照和 27° C（烟草）或 22° C（Arabidopsis）的温度下。

实施例 3：用基于 PTA7002 或 PTA7001 的载体转化的植物

载体 pTA7002 和 pTA7001 可以与 A.tumefaciens 菌株 LB4404 一起使用。与 A.tumefaciens 菌株 ABI 不同，LB4404 菌株不诱导茎干，而且载体与细菌菌株的这种组合可以用于那些其中茎干生长是标记的实验中。在此所述实验使用的是 pTA7002/*ipt*。然而，使用的载体可以包括其它不在 GVG 系统控制下的感兴趣的基因，需要将这些其它基因转化入植物中。在这些实验中，植物是在没有激素和抗生素培养基上，但在有或没有诱导物（例如地塞米松）的情况下选择的。只有在存在诱导物的情况下生长的那些细胞应该产生茎干。切下这些茎干，置于具有生长素但没有诱导物的培养基中。没有诱导物使 *ipt* 基因转录停止，培养基中的生长素促进根再生。这些然后可以通过 Northern 印迹分析或潮霉素抗性测试，以确定哪个再生的植物实际上是转化的。

A) 将质粒转化入细菌中

将质粒导入 Agrobacterium tumefaci 中。将衍生自 pTA7002 或 pTA7001 的质粒，通过本领域熟知的方法置于菌株 LB404 中（Clontech 实验室公司）。例如，就 pTA7002/*ipt* 而言，含有 pTA7002/*ipt* 的 LB4404 的一个单一集落，选自含有 50mg/l 卡那霉素和 100mg/l 链霉素的 YEB 平板。将 Agrobacterium 细胞移至一个含有 10ml YEB 液态培养基的

50ml 无菌螺纹盖试管中，所述培养基中具有 50mg/l 卡那霉素和 100mg/l 链霉素。将培养物在 28° C 生长 24 小时。通过在 4° C 在 3000rpm 离心 10 分钟收集培养物中 Agrobacterium 细胞。将细胞沉淀在具有抗生素的 10ml YEB 培养基中冲洗一次，，然后再悬浮于 30ml 的 B5 培养基中，用于接种外植体。

B) 与 Agrobacteria 共培养

在湿的无菌滤纸上将烟草叶片切成 4mm×4mm 的切片，然后移至无菌的去离子水中。将叶片切片在培养皿中的 Agrobacteria 溶液（在 B5 培养基中）中浸渍几分钟。将切片在一张无菌滤纸上印干，然后置于 MBDK 平板上。MBDK 培养基的组分是：MS 盐－4.3g/l；维生素 B5－112mg/l；2-4-D－0.5mg/l；细胞分裂素－0.1mg/l；蔗糖－20g/l；phytagel－2g/l；pH5.7。

C) 茎干再生

在用 Agrobacteria 共培养烟草叶片 3 天后，将外植体通过在培养皿中含有 200mg/l 羧苄青霉素的 30ml 无菌水中浸渍冲洗 3 次。在无菌纸巾上印干之后，将外植体置于有或没有地塞米松（DEX，30uM）的 MBC 培养基上。MBC 培养基的组分是：MS 盐－4.3g/l；维生素 B5－112mg/l；蔗糖－20g/l；羧苄青霉素－200mg/l； phytagel－2g/l；pH5.7。将平板在 25° C 和 16 小时光照/8 小时黑暗的条件下，在组织培养室中温育。在 2 周后，只是在含有 DEX(30uM)的培养基上的外植体的伤口部位出现绿色茎干芽。切下这些茎干并移至 MBCI 平板上。MBCI 培养基的组分是：MS 盐－4.3g/l；维生素 B5－112mg/l；蔗糖－20g/l；羧苄青霉素－200mg/l； phytagel－2g/l；pH5.7，吲哚乙酸（IAA）－0.15mg/l。

D) 选择转基因植物

在 MBCI 平板上培养 10 天后，出现一些无定形的茎干。将这些茎干切下并移至新的 MBCI 平板上。这些茎干在培养 10 天后看起来

是正常的。在 2—3 周后，它们再生了根并生长为 4—6 个叶片的小苗。在这个阶段后，对它们进行测试以确定它们是否确实是转化的。由于 pTA7001 或 pTA7002 质粒含有 NOS-Hpt 基因，转化的茎干应对潮霉素有抗性。因此，切下含有叶柄的叶片样品并移至含有 40mg/l 潮霉素的 MBCI 培养基中，以诱导根产生。只有大约 10%的收集的茎干是确实转化的。由于吸收产生自邻近细胞的细胞分裂素，非转基因细胞可以形成根，所述邻近细胞是转化的并产生细胞分裂素。选择的茎干在存在潮霉素的情况下生长，可用于选择转化的茎干。Northern 或 Southern 印迹分析是另一种测试转化的方法。这些方法在其中 NOS-hpt 基因已经自 pTA7001 或 pTA7002 质粒中缺失，而且取而代之插入一个相应基因的实验中是有用的。将生根的茎干移至罐中并在温室中生长成熟。转基因植物表现是正常的，而且是不育的并结种。

实施例 4：用糖皮质激素诱导

所有糖皮质激素衍生物，地塞米松（DEX），氟羟脱氢皮醇 acetonide，betamethasone 和氢化可的松均购自 Wako Pure 化学制品厂。将化学制品在使用之前溶解于 30mM 乙醇中，并在生长培养基或喷洒溶液中稀释。将同体积的乙醇加入阴性对照培养基或溶液中。在组织培养实验的情况中（如实施例 3），具有 phytagel 的组织培养基中包括 DEX。在整个植物处理的情况中，将植物生长于含有糖皮质激素的琼脂培养基中，或将其根浸没在含有 0.01mM 糖皮质激素的水培生长培养基中。就喷洒方法而言，喷洒溶液含有 30uM DEX 和 0.01%（w/v）Tween-20；后者是作为湿润剂加入的。在包含喷洒一个叶片的一半的实验中，将叶片的另一半和植物的其它部分用塑料膜覆盖。应注意尽管 DEX 不是特别毒性的化合物，但其对人体有一些生理作用，所以应小心使用，尤其当喷洒此化合物时应使用眼

部防护措施。

实施例 5：萤光素酶分析

如 Millar 等（1992）所述进行萤光素酶提取和相关萤光素酶活性分析。为显影萤光素酶的冷光，将用 DEX 处理的植物根在含有 0.5mM 荧光素钾（Sigma）的溶液中浸没 1 小时，或将喷洒的叶片的叶柄在 0.5mM 荧光素钾的溶液中浸没 30 分钟。将罐中植物用含有 0.5mM 荧光素钾和 0.01% Tween-20 的溶液喷洒，并留置 30 分钟。用图象强化照相机（VIM）和光子计数图象加工仪（ARGUS-50）观测植物的萤光素酶冷光，所述仪器购自 Hamamatsu Photonic 系统。曝光时间为 10 分钟。为对喷洒的叶片的萤光素酶冷光摄像，将叶片和即时彩色胶片（LP100，富士胶片公司）中间放置一个薄塑料膜，彼此相接触 5 小时。

实施例 6：RNA 分析

如 Nagy 等（1988）所述进行总 RNA 分离 Northern 印迹杂交。在杂交后，用 BAS-2000 系统（富士胶片公司）对信号进行显影。

实施例 7：选择最佳的转基因品系

获得一些非依赖性转基因品系并进行测试。应选择具有低基础水平和高诱导水平的最佳品系。通常将 T-DNA 片段的多拷贝插入一个基因座中。在这种情况中，RB 附近的 35S 启动子可以恰巧在诱导型启动子附近，并将诱导型启动子转变为组成型激活的启动子。除了这种情况，在诱导型启动子附近的染色体序列也可以影响活性。因此最好测试所得转基因品系以发现具有低基础活性和高诱导水平的品系。

实施例 8：在转基因植物中诱导萤光素酶活性

测定萤光素酶活性对不同浓度糖皮质激素应答的固定诱导水平。将生长于琼脂培养基上的幼转基因植物（用 pMON721/luc 载体制备的），移至含有不同浓度 DEX 的新鲜琼脂培养基中。在诱导培养基上培养 2 天后，从 10 个植物中制备所有细胞裂解物并分析萤光素酶活性。图 3B 示出用高灵敏度照相机摄制的来自植物的萤光素酶冷光。图 3B 的彩色刻度示于图 3A。图 3C 示出由不同浓度的 DEX 诱导的相关萤光素酶活性。在没有 DEX 的情况下检测的萤光素酶活性非常低，并与得自携带加在 TATA 区域之前的萤光素酶基因的转基因植物的萤光素酶活性相当（数据未示出）。这个结果表明 GAL4 UAS 在植物中是静止的，并不能由任何内源性植物转录因子识别。在 0.1uM 或更高浓度的 DEX 情况下可以检测到诱导，在 01--10uM 浓度范围获得 DEX 浓度和诱导水平之间的良好关联。最大诱导水平是基础水平的 100 倍。

在这个实验中，将植物用 DEX 处理足够长的时间，以保证萤光素酶活性达到对每种 DEX 浓度均平稳的状态。如在这个实验中观测到的在塑料器皿中诱导水平非常低，可能是由于在封闭的条件下，蒸发的水流进培养皿中，并因此根吸收的糖皮质激素低于在未封闭的开放条件下吸收的糖皮质激素。另一方面，在后一条件下，难以精确控制植物中糖皮质激素浓度，因为激素由于蒸发的结果而迅速累积在叶片中。

已经将各种植物用于植物科学的基础和应用方面研究，其中 Arabidopsis 已经成为植物生物学基础研究的模型植物。然而针对这个植物模型还远未产生出良好的诱导系统。使用植物启动子如热激启动子的诱导系统是不适合的，因为它们刺激多效作用。尽管四环素依赖性表达系统已经成功用于烟草中，但在 Arabidopsis 中无效（Gatz，1996）。另一方面，观测到 GVG 系统在 Arabidopsis 中也起

作用。图 4A-C 示出转基因 Arabidopsis 中萤光素酶活性是由 DEX 有效诱导的。GVG 系统应该可以广泛用于许多基因和不同种属的转基因植物。

实施例 9：DEX 诱导转录的动力学

尽管萤光素酶活性易于测定，其在短时间范围内不适于动力学研究，因为萤光素酶活性的半衰期估计为大约 3 小时（Thompson 等，1991）。为获得关于诱导动力学的更直接的信息，制备总 RNA 并进行 Northern 印迹分析。在这些实验中，将植物置于通风处以保证 DEX 迅速吸收。将转基因植物在通风条件下适应水培生长条件，并在液态生长培养基中加入终浓度为 10uM 的 DEX。在每个时间点从 20 个植物中制备总 RNA 并进行 Northern 印迹分析。用 pMON721/luc 转染的植物的结果示于图 4A 和 5A。图 4A 示出在加 DEX 1 小时后首先检测到 luc mRNA，而且数量在接下来的 3 小时内提高到稳定水平。为检测诱导的持久性，将 DEX 从培养基中除去，并分析从植物中制备的总 RNA。图 5A 示出甚至在除去 DEX 4 天后，仍然可以检测到 luc mRNA。

通过监测萤光素酶活性可以获得相似的结果。由于检测的高灵敏性，在加入 DEX 30 分钟后和除去激素 8 天后，也可以测定诱导的萤光素酶活性（数据未示出）。从这些结果当中，可以认为由 DEX 诱导的转录是迅速的，并且可以长期持续。

实施例 10：对各种糖皮质激素的应答

测试不同糖皮质激素衍生物的强度和诱导持续时间。将在琼脂培养基上生长的幼转基因植物（用 pMON721/luc 转染的），移至含有 30uM 不同糖皮质激素的新鲜培养基上，并再生长 2 天。在诱导后，将植物再移至没有糖皮质激素的培养基中。在图 6 所示的每个时间点，收获 10 个植物并分析其萤光素酶活性。图 6 示出不同的糖皮质

激素衍生物的诱导水平及其持续时间示不同的。最高诱导水平是用 DEX 或 triamcinolone acetonide 获得的。相反，用 betamethasone 或氢化可的松分别只检测到低或中等诱导水平。在这些实验中，假定用每个糖皮质激素获得的诱导水平已经达到稳定水平，因为诱导较长时间也不明显提高萤光素酶活性（数据未示出）。与由 triamcinolone acetonide 诱导的水平相比，DEX 诱导可以持续较长时间，而这两种糖皮质激素在处理开始时诱导水平相同。尽管在这些实验中还未知这些糖皮质激素在植物中的稳定性，但不同糖皮质激素的诱导特性可以用于调节诱导强度和持续时间。

实施例 11：通过喷洒糖皮质激素局部诱导萤光素酶表达

将携带 GVG 和 luc 基因的成熟植物（植物是用 pMON721/luc 载体转基因的）的叶片（大约 10cm 长）的右半和左半，分别用含有 30uM DEX 和 0.01%（w/v）Tween-20 的溶液和对照溶液喷洒。在喷洒 24 小时后，切下叶片并使其通过叶柄吸取荧光素。图 7 示出来自已经用 DEX 处理的叶片部分的荧光，而在用没有 DEX 的对照溶液处理的叶片部分未见到荧光。图 7 是将即时彩色胶片（富士胶片公司，LP100）置于叶片上 5 小时的摄像，用薄塑料片间隔。

实施例 12：XVE 诱导型表达系统

在基础和应用科学中非依赖性地和可诱导性地控制多基因表达是非常有益的。第一步，我们研制了一种新的诱导型表达系统，称为 XVE（见图 13）。原则上，XVE 系统类似于 GVG，其中核受体的调节区域授予融合于样板序列的异源 DBD 激素可诱导性。此 XVE 异源嵌合体含有细菌阻抑物 LexA 的 DBD（X）（Horii 等，1981；Miki 等，1981），和人雌激素受体的调节区域（E）（Greene 等，1986）。这些结构特点使 XVE 具有不同的 DNA 结合特异性，并由与 GVG

不同的刺激激活。因此，将 LexA 结合位点的 8 个拷贝融合于 35S 最小启动子的－46 位，以驱动效应基因。

为测试 XVE 系统，将编码绿色荧光蛋白（GFP）的 cDNA 插入 XVE 载体的效应器弹夹中（pER8；见图 13 之详述）。将 pER8-GFP 载体转化入 Arabidopsis 和烟草中，并评定 GFP 基因的表达。在这两个种属获得相似的结果。在此我们示出了得自对 pER8-GFP Arabidopsis 转基因品系的进行详细分析的数据。我们最初筛选了 22 个非依赖性转基因品系，是在常规荧光显微镜下，目测在没有（对照）或有（诱导）诱导物（2uM 17-β-雌二醇和 1uM 4-羟基三苯氧胺的混合物）的情况下萌发的植物而筛选的。筛选的结果概括示于表 1。在一半以上的品系中观测到高水培诱导，代表性实施例示于图 14。在剩余的品系中，GFP 基因以较低水平表达（23%），或者在少数情况下检测不到表达（9%）。这些品系的一少部分以斑块模式表达 GFP(14%)。这些数据表示 XVE 是一种高效的表达系统。在所有测试的品系中，检测不到背景表达（在没有诱导物的情况下），提示此系统是紧密控制的。

表 1：pER8-GFP 转基因 Arbidopsis 品系概述

GFP 信号	品系数	%
强	12	54.5
弱	5	22.7
无信号	2	9.2
斑块	3	13.6
总计	22	100

实施例 13：XVE 诱导型表达系统的特性

在最初的筛选中，使用 17-β-雌二醇和 4-羟基三苯氧胺，这是两种最常用的雌激素受体诱导物。为区分哪个化合物是对应答活性形

式的，分别测试这两个化合物的可诱导性。这两个化合物均能诱导受体基因表达，4-羟基三苯氧胺比 17-β-雌二醇的活性略低。后一诱导物用于所有随后的实验中。

为测试系统的剂量依赖性，将在没有诱导物的情况下萌发的 3 周龄的秧苗，移至含有各种浓度 17-β-雌二醇的培养基中，温育 16 形式。从未处理的(对照)或处理的秧苗中制备 RNAs，并用 GFP cDNA 作探针通过 Northern 印迹分析。如图 15 所示，用 0.0004uM（0.4nM）17-β-雌二醇处理，可以检测到 GFP 转录物，及在大约 5uM 浓度诱导达到饱和。

在时程实验中，将 3 周龄的秧苗移至含有 2uM 的 17-β-雌二醇的培养基中，并温育不同的时间。如前所述制备和分析 RNAs。温育 30 分钟可以检测到 GFP 转录物，在诱导 24 小时后，表达达到最大水平（图 16）。在单独的实验中，在诱导培养基上诱导 5 周 GFP 荧光性表现为不变，提示此系统保持持续活性。

在图 15 和 16 所示的实验中测试 3 个非依赖性转基因品系，获得相似的结果。在这两种情况中，转录物的诱导通常达到 100－200 倍。更重要地，在所有测试的品系中未观测到明显的毒性作用或生理改变。以上分析表明 XVE 是一种有效的及可靠的诱导系统。

实施例 14：用 XVE-*CKI1* 转染烟草叶片和根细胞

除了 GVG-*ipt* 之外，pER8-*CKI1*(XVE-*CKI1*)已经用于转染烟草叶片。基于用 17-β-雌二醇诱导，不用任何外在应用的植物激素就可以再生根。在诱导 25－35 天后茎干发生。加入 IAA（0.15mg/l）不提高效力，反而对茎干形成有副作用。在培养基中再生效力依赖于 17-β-雌二醇剂量（在 1，5，10，20 和 30uM 浓度测试，在 10uM 发生饱和）。

XVE-*CKI1* 载体也用于转化烟草根细胞。使用这种根细胞，在用

17-β-雌二醇诱导后，不用任何外在植物激素就可以再生茎干。当用 Agrobacteria 共培养根时（在 22° C，2－3 天），包括 2,4-D（0.5mg/l）和细胞分裂素（0.1mg/l）。将感染的根置于有或没有 17-β-雌二醇（5uM）的 MBC 培养基上。每两周将外植体移至新鲜的 MBC 培养基中（有或没有诱导物）。在培养 20－30 天后，在没有诱导物的情况中生长的外植体不产生白色或暗黄色愈伤组织，但这些不形成茎干。在有诱导物的情况下生长的外植体形成绿色愈伤组织。在诱导 40－50 天后，茎干发生。在 MBC 培养基上，49 个白色/褐色愈伤组织中无一变为绿色及产生茎干，而在补加 5uM17-β-雌二醇的 MBC 培养基上，13/65 的白色/褐色愈伤组织变为绿色并产生茎干。这个实验使用与没有诱导物相同数目的具有诱导物的根外植体。由于有诱导物形成 65 个愈伤组织，而没有诱导物形成 49 个愈伤组织，因此 *CKI1* 的过表达也可以提高愈伤组织形成的效力。

实施例 15：用 XVE-*CKI1* 转染 Arabidopsis 根

A)制备根材料

将新鲜收获的种子在使用之前在 4° C 干燥贮存两周。将种子置于具有大约 1ml 灭菌溶液（50%Clorox＋0.01% Triton X-100）的 1.5ml Eppendorf 试管中（或其它常规容器中），并有规律地搅动 10 分钟。在 1.5ml Eppendorf 试管中最好不要使用太多的种子（＞1000 或大约 50uL），因为使用太多的种子导致灭菌无效。用无菌移液管除去灭菌溶液，并将种子在无菌蒸馏水中冲洗 3 次，每次用 1.0-1.5ml。

将灭菌的种子悬浮于大约 0.5ml 的无菌 0.15%琼脂水溶液中，然后将其涂布于 A 平板的表面（MS 盐＋30g/l 蔗糖＋0.8g/l 琼脂，pH5.7）。将种子在 4° C 春化两天，以改善种子的萌发率。然后将这些种子在培养室中温育，并萌发 3 天。将一周的秧苗用于根培养。

将 10-15 株秧苗移至含有 100ml B5 培养基（B5 盐＋30g/l 蔗糖

＋0.5g/l MES（2-[N-吗啉]乙磺酸），pH5.7）的 250ml Erlenmeyer 烧瓶中。将此烧瓶用两层铝箔密封，并置于 125rpm 摇动器上。将培养物在 22° C 用暗光照射。在 B5 培养基中培养 10－15 天后，将根用于转化。应选择白色的根进行转化。黄色或淡褐色的根不能良好转化。

B) 预处理根外植体

以下步骤应在无菌罩中进行。将如 A)步所述制备的根移至无菌培养皿中。用无菌解剖刀将根系从小植物中切下。。将根切成大约 1cm 的节段，并置于无菌纸巾中以吸干超量的培养基。然后用无菌镊子将根节段移至 F1 平板中（B5 盐＋20g/l 葡萄糖＋0.5g/l MES＋0.5mg/l 2,4-D＋0.05mg/l 细胞分裂素＋2g/l phytagel，pH5.7）。将根涂布开以使它们与培养基均接触。将平板用可透气的带子密封，并在组织培养室中温育 2－3 天。

C) 培养 Agrobacterium

将 Agrobacterium（LBA4404 菌株，Clontech）用 pER8-*CKI1*（XVE-*CKI1*）构建体转化，并将所得转化体在补加了 100mg/l 壮观霉素和 100mg/l 链霉素的 YEB 培养基中在 28° C 培养过夜，所述 YEB 培养基含有 5g/l 蔗糖，5g/l 蛋白胨，5g/l 牛肉膏和 1g/l 酵母膏，0.04g/l $MgSO_4.7H_2O$，pH7.0。然后将 Agrobacteria 沉淀，并用没有抗生素的 YEB 培养基冲洗两次，最后悬浮于 2.0－2.5ml YEB 中以感染 Arabidopsis 根外植体。

D) 用 Agrobacterium 接种根外植体并共培养

将如 B)步制备的根外植体移至无菌培养皿中，并切成 0.5cm 节段。将根外植体移至无菌篮中（例如一端有网盖的玻璃管），并将其置于含有 20ml B5 培养基的培养皿中。将得自 C）步的 2mlAgrobacterium 溶液置于 B5 培养基中。将此篮轻轻旋动大约 2 分钟，以确使根外植体用 Agrobacterium 接种。在接种后，将含有根外

植体的篮子置于 4 层无菌纸巾上以吸干超量的液体。用镊子将丛生的根节段每次从篮子中除去一小部分，并将 5－10 个丛生的根节段的置于 F2 平板上（F1 平板＋20mg/l 乙酰丁香酮）。将根节段用 Agrobacteria 在 22° C 共培养 2－3 天。

E) 选择和再生转化体

在用 Agrobacteria 共培养根节段后，用含有 200mg/l 羧苄青霉素的无菌蒸馏水将 Agrobacteria 从根外植体中冲洗去。将根外植体收集在篮子里，然后将篮子置于无菌纸巾上以吸干超量的液体。将根节段移至有或没有化学诱导物（5uM 17-β-雌二醇）的 MIC 培养基（MS 盐＋10g/l 蔗糖＋0.5g/l MES＋0.15mg/l 吲哚乙酸（IAA）＋100mg/l 羧苄青霉素＋2.0g/l phytagel，pH5.7）上，并在 22° C 以 16 小时光照/8 小时黑暗的循环培养。MIC 培养基含有 MS 盐，IAA 和羧苄青霉素，但不含有抗生素以选择转化体。应注意存在 IAA 是不重要的，但当与 Arabidopsis 一起使用时可提高再生效力。当与烟草一起使用时 IAA 没有作用。

在第一周后将上述材料在相同培养基中传代培养，然后每两周传代培养一次。在培养大约 10 天后，在具有化学诱导物的培养基上生长的外植体上出现一个小暗绿色愈伤组织，但在没有化学诱导物的平板上生长的外植体上没有绿色的愈伤组织。在大约 15 天后，在具有化学诱导物的培养基上出现小茎干。在茎干形成小玫瑰花形骨针后（3－4 片），将它们移至没有化学诱导物的 MIC 培养基中，以促进根再生。在根再生后，将小植物移至土壤中并生长至成熟。当将小植物移至土壤时，应将琼脂培养基从小植物中彻底冲洗干净。在土壤中生长的前 2 天，应将小植物用塑料膜覆盖以保持高度湿润。

F) 转基因植物的成熟

在大约 5－6 周后，大多数长角成为黄色的和干燥的。将种子单独收集并贮存在 4° C。

实施例 16：用 XVE-Lec1 转染 Arabidopsis

Lec1 在 XVE 诱导系统（pER8-Lec1）控制下的过表达，使转基因 Arabidopsis 秧苗的子叶中形成体细胞胚或类胚结构。在没有任何植物激素的情况中，这个系统可用于在没有植物激素的条件下产生体细胞胚。这与目前所有组织培养方法不同，目前的组织培养方法中体细胞胚的形成依赖于 2,4-D。在移至没有诱导物的培养基上后，体细胞胚将萌发为秧苗，从而产生不表达抗生素选择标记的转化体。Lec1 的有条件过表达也可以提高单子叶植物和裸子植物的转化和再生的效力。使用目前的技术，非常难以获得大多数有经济重要性的种属的再生体和/或转化体。本发明的这种方法对单子叶植物和裸子植物尤为重要，所述植物的再生主要是通过体细胞胚发生途径再生的。

实施例 17：用 XVE-SERK 转染

将 Arabidopsis SERK 基因通过 PCR（聚合酶链反应）克隆。将 SERK 基因置于 XVE 系统的控制下。将 XVE-SERK 系统用于转染烟草和 Arabidopsis。基于诱导，在没有任何附加的植物激素的情况中，体细胞胚在没有植物激素的条件下形成。现有技术需要存在 2,4-D 才能形成体细胞胚。在移至没有诱导物的培养基上后，体细胞胚萌发为秧苗，从而产生不表达抗生素选择标记的转化体。SERK 的有条件过表达也可以提高单子叶植物和裸子植物的转化和再生的效力，所述植物先前非常难以再生和转化。本发明的这种方法对单子叶植物和裸子植物尤为重要，所述植物的再生主要是通过体细胞胚发生途径再生的。

实施例 18：Dual 诱导系统

本发明的一个主要目的是产生一种双向诱导型表达系统，其中可以非依赖性及可诱导地调节多个基因。携带 a)XVE 和 b) GVG 的转基因 Arabidopsis 植物，可以通过共同转化或在各个品系之间杂交而产生。双重诱导系统中的每种成分将非依赖性地操纵并彼此互不干扰，而且它们还保持其可诱导性和紧密控制。在每种启动子控制下的基因可通过正确和适时使用启动子而依次或同时诱导。

实施例 19：使用 *knotted* 基因诱导茎干形成

knotted 基因及其家族成员例如 *knotted* 同源基因 KNAT1 和 KNAT2，在茎干中高度表达（Lincoln 等，1994；Chuck 等，1996）。已经用在 CaMV 35S 启动子控制下的例如 KNAT1 基因转化的转基因植物，发生明显变化，包括异位茎干形成（Lincoln 等，1994）。然而，这种茎干因为 *knotted* 基因的非控制表达而不能正常发育。一种其中植物是用可调节的 *knotted* 基因转化的系统，可产生将产生茎干的植物，然后通过抑制此基因在茎干中表达，使用此茎干再生正常的植物。本发明提供了达到这种目的的一种方法。将一种 *knotted* 基因例如来自玉米的 kn1 置于载体中，由此其在上述 GVG 系统的控制下。用这种载体转化的植物，在没有 GVG 或 XVE 系统的诱导物的情况下正常生长。外植体，例如这些转基因植物的叶片，可以用诱导物处理（例如地塞米松或 17-β-雌二醇），以刺激无定形茎干的发育。切下发育的茎干并抑制没有诱导物的培养基中。然后这些茎干将正常发育产生转基因植物。所用的载体可以包括需要转化入植物中的其它感兴趣的基因，这些基因不在 GVG 或 XVE 系统的控制下。选择的植物包括感兴趣的基因，而且不需要使用抗生素选择标记选择。注意选择转化的茎干应如实施例 3 所述进行，即在没有激素但具有杀死 Agrobacteria 的羧苄青霉素的培养基上（MBC）。也可以使用来自其它单子叶或双子叶植物的玉米 *knotted* 基因的同系物。

实施例 20：使用 *CKI1* 基因诱导茎干形成

CKI1 基因是最近鉴别的。这种基因在植物中的过表达导致植物呈现典型的细胞分裂素应答，包括在没有外源细胞分裂素的情况下，在组织培养物中快速的细胞分化和茎干形成。*CKI1* 基因可以类似于 *ipt* 的方式用作选择标记。一种其中植物是用可调节的 *CKI1* 基因转化的系统，可产生将产生茎干的植物，然后通过抑制此基因在茎干中表达，使用此茎干再生正常的植物。本发明提供了达到这种目的的一种方法。将一种 *CKI1* 基因置于载体中，由此其在上述 GVG 系统的控制下。用这种载体转化的植物，在没有 GVG 或 XVE 系统的诱导物的情况下正常生长。外植体，例如这些转基因植物的叶片，可以用诱导物处理（例如地塞米松），以刺激无定形茎干的发育。切下发育的茎干并抑制没有诱导物的培养基中。然后这些茎干将正常发育产生转基因植物。所用的载体可以包括需要转化入植物中的其它感兴趣的基因，这些基因不在 GVG 或 XVE 系统的控制下。选择的植物包括感兴趣的基因，而且不需要使用抗生素选择标记选择。如实施例 3 和 19 所述，在 MBC 平板上进行选择茎干，然后将其移至 MBCI 中生根。

实施例 21：在 GVG 或 XVE 控制下具有抗生素抗性或除草剂抗性的载体

产生抗生素抗性的基因已经广泛用于载体中作为选择标记。使用这种系统的一个问题是这些基因趋向于组成型激活，而且由此转化的植物将持续表达这些基因。将这种组成型表达的基因插入在实验室外生长的的植物中，存在环境和健康方面的问题（Bryant 和 Leather，1992；Gressel，1992；Flavell 等，1992）。将这种基因置于 GVG 或 XVE 系统控制下则克服了这些问题。抗生素抗性基因将只

在生长培养基存在糖皮质激素的选择期间表达，但这些基因当在实验室之外在没有糖皮质激素的情况下生长时不被激活。可以利用任何所需的抗生素抗性基因。可以使用经适当修改的 pTA7001 和 pTA7002 载体。将相应的抗生素基因克隆入例如 XhoI-SpeI 克隆位点中。修改 pTA7001 或 pTA7002 载体以使 hpt 基因失活或除去。可以使用这些修改的载体。适当的载体可以通过用例如 pBI101（Clontech）载体起始制备。将此载体左右边界之间的区域除去，并用上述 GVG 或 XVE 系统置换，简而言之，其包括 35S 启动子，GAL4 DNA 结合结构域，VP16 反式激活结构域，糖皮质激素受体结构域加上 6xGAL4 UAS 区域，后接克隆位点。这种载体不包括外源性抗生素抗性基因。可以将任何所需的抗生素基因插入 6xGAL4 UAS 区域附近的克隆位点中，并将在糖皮质激素的控制下。潮霉素磷酸转移酶基因和新霉素磷酸转移酶（npt）基因例如是可以利用的两种抗生素基因。包括 DEX 可调节的 npt 或 hpt 基因的 Ti 载体，可用于转化所需种属的外植体。在组织培养期间，在存在 DEX（其激活适当的抗生素抗性基因）和存在适当抗生素（卡那霉素或潮霉素）的情况下选择再生的茎干。一经核实，然后将转基因植物移至具有抗生素但没有化学诱导物（DEX）的组织培养基中。所得植物含有抗生素抗性基因，但这些基因在没有化学诱导物的情况下是没有活性的。

可将除草剂抗性基因类似地置于 GVG 或 XVE 控制下，并用于在组织培养期间选择转化在植物。这种植物在田地里不表达除草剂抗性基因。除草剂抗性基因例如是 PAT（膦丝菌素乙酰转移酶），其授予对 BASTA 除草剂（活性成分膦丝菌素）（Rathore 等，1993；Becker 等，1992）和一种突变形式的乙酰乳酸合酶的抗性，所述乙酰乳酸合酶对 DuPont 公司的磺酰脲除草剂有抗性（见例如 Wiersma 等，1989；Harms 等，1992；Hattori 等，1992；Hattori 等，1995）。原理上，这些基因不仅可以在组织培养中用作选择标记，也可以在田地

中表达。由于喷洒 DEX 或 17-β-雌二醇存在危险因素，人们不想在田地中的植物上喷洒 DEX，但如果将一种比 DEX 更安全的化合物用作诱导物，则可以使用这种方法。

实施例 22：植物生长和转化

将 Nicotiana tabacum 栽培种 SR1 在含有 0.02% Tween20 的 30% 商购漂白剂中表面灭菌 10 分钟，并用无菌水冲洗 5 次。将植物在 22°C 以 16 小时光照/8 小时黑暗的循环，生长于组织培养室中。基本如 Horsch 等（1985）和 Klee 等（1987）所述转化烟草。从 4 周龄的植物的幼叶中制备叶片，并将外植体在 MB 培养基（MS 盐，维生素 B5，20g/l 蔗糖，20mg/l 乙酰丁香酮，0.2% phytagel，pH5.7）上培养两天。在用 Agrobacterium tumefaciens 共培养 3 天后，将叶片移至含有不同 DEX 浓度的 MS 培养基中。在培养 20－40 天后，从外植体切下再生的茎干，并在含有 IAA 的 MS 培养基上培养以诱导根再生。

如针对烟草所述萌发灭菌的莴苣叶（Lactuca sativa var.Great Lake#118）及生长秧苗。如 Curtis 等所述（1996）进行转化莴苣叶片，除了培养基中没有细胞分裂素。

实施例 23：在转化的细胞中诱导 *ipt* 基因的最佳条件

将用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染获得的烟草叶片和莴苣叶片，置于含有羧苄青霉素和不同浓度地塞米松（DEX）的培养基中。每两周将外植体移至新鲜培养基中以保持恒定的培养条件。再生自给定数量叶片的茎干数目随着 DEX 浓度提高而明显提高(表 2)。在 10uM DEX 从 28 个外植体中再生了 170 个烟草茎干和 198 个莴苣茎干。在没有 DEX 的情况下，在均是 28 个外植体中烟草只有 7 个茎干再生，莴苣再生 30 个茎干（图 8）。

表 2

烟草					莴苣	
DEX（uM）	0	0.1	1	10	0	10
每 28 个外植体的再生总数	7	139	129	170	30	198
测试的再生体数目	7	72	72	72	28	28
LUC^+再生体的百分率	42	29	44	49	12	46

实施例 24：在烟草和莴苣再生体中测定 Luc 活性

转化弹夹 pTA7002G/*ipt*/luc（图 12）含有在 CaMV 35S 启动子控制下的 luc 基因（Millar 等，1992；Benfey 和 Chua，1990）。测定 luc 活性，以使用 Michelet 和 Chua（1996）所述的视频显影系统评估转基因茎干数目。综合 5 分钟以上的测定结果，并将相应背景从显影中减去（图 9A-F）。将近 50%的再生体表达 luc 基因（表 2）。在未诱导条件下（0uM DEX），42%的烟草再生体和 12%的莴苣再生体示出可检测的 luc 活性（表 2）。这表明少量转化的细胞对细胞分裂素非常敏感，其水平可以由于渗漏 *ipt* 表达而略微提高。由于再生体的高产量，使用来自用 10uM DEX 处理的外植体的茎干进行下述实验。

实施例 25：测定用 DEX 超时诱导 *ipt* 的作用

为进一步对转化系统定性，我们检测了诱导期间的作用以及外源应用植物激素的作用。进行时程实验以确定 *ipt* 基因的诱导特异性是否由于细胞分裂素的超量产生和扩散而随着时间而降低，细胞分裂素可以在相邻的未转化的细胞中引发再生。在用 10uM DEX 诱导 20，30 和 40 天后，测定 54 个烟草再生体（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）中 luc 活性，以评估转化率。随着时间的过去发现再生体中可检测 luc 活性没有明显差异。在 20 天后，46%的再生体具有可检

测的 luc 活性。另外，当 *ipt* 基因表达是在用 Agrobacterium 共培养期间直接诱导的时，转化效力没有可检测到的变化（如测定 luc 活性）。用莴苣也获得相似的结果。

实施例 26：在诱导期间外源应用生长素的影响

测定来自烟草外植体（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染的）的茎干中萤光素酶活性，将所述茎干在含有 1.0，1.5 和 2.0mg/ml 生长素和 10uM DEX 的培养基上培养 40 天。高生长素/细胞分裂素水平利于根再生，并对茎干再生有抑制作用，因此可以降低未转基因的再生体数目。萤光素酶活性在不同的生长素浓度没有明显差异。在 1.0mg/ml 生长素浓度，45%的再生体具有可检测的 luc 活性，在 1.5mg/ml 生长素浓度，58%的再生体具有可检测的 luc 活性，及在 2.0mg/ml 生长素浓度，47%再生体具有可检测的 luc 活性。

实施例 27：用 Northern 分析测定茎干中 *ipt* 转录物水平

ipt 转录物水平是在 30 天龄的具有或没有可检测萤光素酶活性的烟草和莴苣再生体（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）中测定的。将此再生体在存在 10uM 地塞米松的情况下生长。

使用 Qiagen RNA 提取试剂盒和方法，从 0.1g 植物材料中提取 RNA。将总 RNA 在含有 0.8uM 甲醛的 1%琼脂糖凝胶上分离。根据生产者指导（Stratagene），将 RNA 移至 Duralon UV 膜上。在印迹后，通过 UV 照射将 RNA 与膜共价交联。将此膜封阻，并用 Stratagene QuikHyb®溶液在 68° C 根据生产者指导进行杂交。在杂交后，将此膜用 2×SCC+0.1%SDS 在 65° C 冲洗 3 次 15 分钟，并用 0.1×SSC +0.1%SDS 在 60° C 冲洗 1 次 15 分钟。

Northern 分析的结果表明只有一个例外（图 10C，样品 f），其它所有测试的烟草和莴苣再生体均表达 *ipt* 基因（表 3）。*ipt* 转录物的

数量在烟草再生体中高于在莴苣再生体中，并在不同茎干之间各不相同。*ipt* 转录物水平在 LUC^+茎干中高于在没有可检测萤光素酶活性（LUC^-）的再生体中水平。这表明再生几乎全部偶联于 *ipt* 基因表达，导致细胞分裂素水平提高。

表 3

烟草再生体数目	萤光素酶活性	*ipt* 转录物	*luc* 转录物	*luc*（拷贝数）
9	+	+	+	1
1	+	+	+	>1
3	−	+	较短	1
1	−	+	较短	>1
3	−	+	−	0
1	−	−	−	0

实施例 28：使用 Southern 和 Northern 分析确定茎干中 luc 基因存在情况及其转录物的水平

为分析 luc 基因的存在情况，用来自 LUC^+和 LUC^-烟草再生体（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）的 DNA 进行 Southern 印迹分析。DNA 是用 Nucleon DNA 提取试剂盒和方法，从 0.1g 烟草植物材料中提取的。将 DNA 在 0.8%琼脂糖凝胶上分离。根据生产者指导将 DNA 移至 Duralon UV 膜上。在印迹后，通过 UV 照射将 RNA 与膜共价交联。将此膜封阻，并用 Stratagene QuikHyb®溶液在 68° C 根据生产者指导进行杂交。在杂交后，将此膜用 2×SSC＋0.1%SDS 在 65° C 冲洗 3 次 15 分钟，并用 0.1×SSC＋0.1%SDS 在 65° C 冲洗 1 次 15 分钟。在所有 LUC^+再生体和 50%LUC^-茎干中发现 luc 基因。

如实施例 27 进行 Northern 分析，以分析 LUC^+和 LUC^-烟草再生体中 luc 转录物的存在情况。与来自 LUC^+再生体的 luc 转录物相

比，LUC^-再生体具有较小的较低丰度的 luc 转录物，LUC^+再生体是较大及更高丰度的（表 3）。

实施例 29：潮霉素抗性分析

hpt 基因的表达授予潮霉素抗性。为分析 LUC^+和 LUC^-烟草再生体中（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）中 hpt 基因存在情况，如实施例 3 所述分析潮霉素抗性。将具有叶柄的幼叶片置于具有潮霉素的培养基中，并记录根形成情况。在具有含有 20mg/l 潮霉素的非诱导性培养基的平板上测试潮霉素抗性。所有测试的 LUC^+烟草再生体中 95%对潮霉素有抗性，及 60%以上的 LUC^-茎干是潮霉素抗性的。

实施例 30：根再生，植物形态，和烟草中拷贝数

将烟草茎干（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）移至不含 DEX 的诱导根再生的培养基中（1×MS 盐，维生素 B5，0.15mg/l IAA，20g/l 蔗糖，0.2% phytagel，pH5.7）。在转移后 20 天内，40%以上的转基因烟草茎干产生强大的根系。除了极少例外（少于 2%），转基因烟草植物的形态是正常的。然后将此烟草植物移至土壤中。植物产生正常的叶和花，及在种子产生方面无影响。

用一个转基因烟草系的 44 个随机选择的秧苗（T1 子代），对 luc 基因家族进行分离分析（图 11A-B）。从已经自身杂交的转基因植物中获取种子。对子代的一个群体（萌发的小植物）进行分析。在这些秧苗中测定萤光素酶活性示出显性 luc 基因明显 3：1 分离。这表明在一个基因座中插入一个插入体，而且转基因稳定地传递给第二世代。

在用限制酶消化 DNA 后，对来自秧苗的 DNA 进行 Southern 分析。检测单独的凝胶条带（图 11C）。

实施例 31：对烟草再生体进行 Southern 印迹分析

在将来自 18 个烟草再生体（得自用 pTA7002G/*ipt*/luc 转染）的 DNA 用 BamHI，SacI，和 XbaI 消化后，进行 Southern 分析。大多数茎干只含有转基因的一个单独的拷贝。18 个再生体中只有 2 个示出存在一个以上的杂交条带（表 3）。

实施例 32：GLF 系统的特点和应用

图 17 是 XVE 激活标记载体 pER16 的图式。只示出了右边界（RB）和左边界（LB）之间的区域（无刻度）。两个转录单位和 O^{LexA}-46 启动子位于 RB 和 LB 之间。在第一个转录单位中，G10-90 启动子（Ishige 等，1999）驱动以 rbcs E9 聚 A 附加序列终止的 XVE 融合基因。第二个转录单位由胭脂氨酸合酶（NOS）基因启动子，新霉素转移酶 II（NPT II）基因的编码序列和 NOS 聚腺苷酸化序列组成。O^{LexA}-46 启动子由融合于－46 CaMV35S 启动子的 LexA 操纵子序列的 8 个拷贝组成。基于整合入植物基因组，O^{LexA}-46 启动子可以以 17-β-雌二醇依赖性方式，激活融合于启动子下游的序列转录。

GLF 系统可以用于大范围遗传学筛选相应的突变体。例如，我们可以产生大量的携带功能性基因组 GLF 载体的 Arabidopsis 突变体（Bechtold 等，1993）。从在含有 17-β-雌二醇的诱导性培养基上生长的 T1 子代中，可以立即鉴别功能增强的突变体。即使在功能增强的突变是致死的情况下，除去诱导物也能恢复突变体。注意这种类型致死突变不能通过所有先前公布的系统恢复（Hayashi 等，1992；Kakimoto，1996；Weigel 等，2000）。另一方面，功能丧失的表型可以在 T2 子代中定性。GLF 系统的另一优点是可以有条件地遗传性补足功能丧失的突变。这可以通过用诱导物 17-β-雌二醇适当处理功能丧失突变体而达到，这样有条件性地将突变体表型恢复为野生型表型。

本发明通过参考优选的实施方案加以了揭示，应理解这种揭示只是例证了本发明而无限制之意，本领域技术人员在本发明精神和所附权利要求的范围内，可以对本发明加以修改。

参考文献：

Ainley WM 和 Key JL (1990). 植物分子生物学 14 : 949-966.

Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW 和 Gordon MP (1984).美国科学院院刊 81 : 5994-5998.

Aoyama T 和 Chua N-H (1997).植物杂志 11 : 605-612.

Aoyama T, Dong C-H, Wu Y, Carabelli M, Sessa G, Ruberti I, Morelli G 和 Chua N-H (1995).植物细胞 7 : 1773-1785.

Barry GF, Rogers SG, Fraley RT 和 Brand L (1984).美国科学院院刊 81 : 4776-4780.Beato M (1989). 细胞 56 : 335-344.

Beavan MW 和 Chilton MD (1982). Annu. Rev. Genet. 16 : 357-384.

Bechtold N, Ellis J 和 Pelletier G (1993). C. R. Acad Sci. Ser. III Sci. Vie 316 : 1194-1199.

Becker D, Kemper E, Schell J 和 Masterson R (1992).植物分子生物学 20 : 1195-1197.

Benfey PN 和 Chua N-H (1990). 科学 250 : 956-966.

Braselmann S, Graninger P 和 Busslinger M (1993).美国科学院院刊 90 : 1657-1661.

Bryant J 和 Leather S (1992). Trends Biotechnol. 10 : 274-275.

Chaudhury AM, Letham S, Craig S 和 Dennis ES (1993).植物杂志 4 : 907-916.

Chuck G, Lincoln C 和 Hake S (1996). The 植物细胞 8 : 1277-1289.

Cline MG (1991). Physiol. Plant. 90 : 230-237.

Coenen C 和 Lomax T (1997). Trends Plant Sci. 2 : 351-355.

Coruzzi G, Broglie R, Edwards C 和 Chua N-H (1984). EMBO J. 3 : 1671-1679.

Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, de Laat AMM 和 Davey MR (1996). J. Exp. Bot. 45 : 14411449.

Dalrymple MA, McGeoch DJ, Davison AJ 和 Preston CM (1985). Nucl. Acids Res. 13 : 78657879.

Davies PE (ed.) (1995). Plant Hormones 和 Their Role in Plant Growth 和 Development, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR 和 Subramani S (1987). Mol. Cell. Biol. 7 : 725737.

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E 和 Yamakado M (1997).美国科学院院刊 94 : 2117-2121.

Faiss M, Zalub lov Strnad M 和 Schmlling T (1997). Plant Journal 12 : 401-415.

Flavell RB, Dart E, Fuchs RL 和 Fraley RB (1992). BiolTechnology 10 : 141-

144.

Fluhr R, Moses P, Morelli G, Coruzzi G 和 Chua N-H (1986). EMBO J. 5 : 2063-2071.

Gan S 和 Amasino RM (1995). 科学 270 : 1986-1988.

Gatz C (1996). Curr. Opin. Biotechnol. 7 : 168-172.

Gatz C, Frohberg C 和 Wendenburg R (1992).植物杂志 2 : 397-404.

Giniger E, Varnum S 和 Ptashne M (1985). 细胞 40 : 767-774.

Goldberg SB, Flick JS 和 Rogers SG (1984). Nucl. Acids. Res. 12 : 4665-4677.

Goodrich JA, Hoey T, Thut CJ, Admon A 和 Tjian R (1993). 细胞 75 : 519-530.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y 和 Shine J (1986). 科学 231 : 1150-1154.

Gressel J (1992). Trends BiotechnoL 10 : 382.

Harms CT, Armour SL, DiMaio JJ, Middlesteadt LA, Murray D, Negrotto DV, Thompson Taylor H, Weymann K, Montoya AL, Shillito RD, et al. (1992). 分子及普通遗传学 233 : 427-435.

Hattori J, Rutledge R, Labbe H, Brown D, Sunohara G 和 Miki B (1992). Mol. Gen. Genet.232 : 167-173.

Hattori J, Brown D, Mourad G, Labbe H, Ouellet T, Sunohara G, Rutledge R, King J 和 Miki B (1995). 分子及普通遗传学 246 : 419-425.

Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, Schell J 和 Walden R (1992). 科学 258 : 1350-1353.

Horii T, Ogawa T 和 Ogawa H (1981). 细胞 23 : 689-697.

Horsch RB, Frey JE, Hofman NL, Eichholtz D, Rogers SG 和 Fraley RJ (1985). 科学 227 : 1229-1231.

Horsch R, Fry J, Hofman N, Neidermeyer J, Rogers S 和 Fraley R (1988). 植物分子生物学手册 A5 (Gelvin S 和 Schilperoort R, eds). Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, pp. 1-23.

Hua J 和 Meyerowitz EM (1998). 细胞 94 : 261-271.

Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua NH 和 Oeda K (1999). Plant J 18 : 443-448.

Kakimoto T (1996). 科学 274 : 982-985.

Keegan L, Gill G 和 Ptashne M (1986). 科学 231 : 699-704.

Klee H, Rorsch R 和 Rogers S (1987). Ann. Rev.植物生理学 38 : 467-486.

Kunkel T, Niu W-W, Chan YS 和 ChuaN-H (1999). Nat. Biotechnol. 17 : 916-

919.

Kuraish S 和 Okumura FS (1956). Bot. Mag. 69 : 817.

Laughon A 和 Gesteland R (1984). Mol. Cell. Biol. 4 : 260-267.

Lin Y-S, Maldonado E, Reinberg D 和 Green MR (1991). Nature 353 : 569-571.

Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Venter JC, et al. (1999). Nature 402 : 761-768.

Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K 和 Hake S (1994). 植物细胞 6 : 1859-1876.

Lloyd AM, Schena M, Walbot V 和 Davis RW (1994). 科学 266 : 436-439.

Louvion J-F, Havaux-Copf B 和 Picard D (1993). Gene 131 : 129-134.

Matsuoka M, Ichikawa H, Saito A, Tada Y, Fujimura T 和 Kano-Murakami Y (1993). 植物细胞 5 : 1039-1048.

Mayer K, Schuller C, Wambutt R, Murphy G, Volckaert G, Pohl T, Dusterhoft A, Stiekema W, Entian KD, Terryn N, Harris B, Ansorge W, Brandt P, Grivell L, Rieger M, Weichselgartner M, de Simone V, Obermaier B, Mache R, Muller M, Kreis M, Delseny M, Puigdomenech P, Watson M, McCombie WR, et al. (1999). Nature 402 : 769-777.

McKenzie MJ, Mett V, Reynolds PHS 和 Jameson PE (1998).植物生理学 116 : 969-977.

Medford JI, Horgan BR, El-Sawi Z 和 Klee HJ (1989). 植物细胞 1 : 403-413.

Meinke DW (1985). Theor. Appl. Genet. 12 : 382-392.

MeinkeDW (1995). Ann. Rev. PlantPhysiol. PlantMol. Biol. 46 : 369-394.

Mett VL, Lockhead LP 和 Reynolds PHS (1993).美国科学院院刊 90 : 4567-4571.

Michelet B 和 Chua N-H (1996). 植物分子生物学 Rep. 14 : 320-329.

Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Widstroem A-C, Gustafsson J-A 和 Yamamoto KR (1986). 细胞 46 : 389-399.

Miki T, Ebina Y, Kishi F 和 Nakazawa A (1981). Nucleic Acids Res. 9 : 529-543.

Miklashevichs E 和 Walden R (1997). Physiologia Plant. 100 : 528-533.

Millar AJ, Short SR, ChuaN-H 和 Key SA (1992). 植物细胞 4 : 1075-1087.

Mok DWS 和 Mok MC (1994). Cytokinins : Chemistry Activity 和 Function

(Mok DWS 和 Mok MC, eds.) Boca Raton, Florida : CRC Press.

Murashige T 和 Skoog F (1962). Physiol. Plant. 15 : 493-497.

Nagy F, Kay SA 和 Chua N-H (1988). 植物分子生物学手册, B4 (Gelvin S 和 Schilperoort R, eds). Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, pp. 1-12.

Odell JT, Nagy F 和 ChuaN-H (1985). 自然 313 : 810-812.

Ooms G, Kaup A 和 Roberts J (1983). Theor. Appl. Genet. 66 : 169-172.

Picard D (1993). Trends 细胞 Biol. 3 : 278-280.

Picard D, Salser SJ 和 Yamamoto KR (1988). 细胞 54 : 1073-1080.

Rathore KS, Chowdhury VK 和 Hodges TK (1993).植物分子生物学 21 : 871-884.

Redig P, Schmiilling T,和 Van Onckelen H (1996).植物生理学 112 : 141-148.

Rusconi S 和 Yamamoto KR (1987). EMBO J 6 : 1309-1315.

Sachs T 和 Thimmann KV (1967). Am. J. Bot. 54 : 136-144.

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S 和 Ptashne M (1988). 自然 335 : 563-564.

Schena M, Lloyd AM 和 Davis RW (1991).美国科学院院刊 88 : 10421-10425.

Skoog F 和 Miller CO (1957). Symp. Soc. Expl. Biol. 11 : 118-131.

Smigocki AC 和 Owens LD (1988).美国科学院院刊 85 : 5131-5135.

Smigocki AC 和 Owens LD (1989). PlantPhysiol. 91 : 808-811.

Thompson JF, Hayes LS 和 Lloyd DB (1991). Gene 103 : 171-177.

TranThanhVanKM (1981). Ann. Rev.植物生理学 32 : 292-311.

Triezenberg SJ, Kingsbury RC 和 McKnight SL (1988). Genes Devel. 2 : 718-729.

Valvekens D, Van Montagu M 和 Van Lijsebettens M (1988).美国科学院院刊 85 : 5536-5540.

Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL 和 Malcom SK (1985). 植物分子生物学 5 : 103-108.

Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF 和 Chory J (2000).植物生理学 122 : 1003-1013.

Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H 和 Gatz C (1994).植物杂志 5 : 559-569.

Wiersma PA, Schmiemann MG, Condie JA, Crosby WL 和 Moloney MM (1989).

分子及普通遗传学 219 : 413-420.

Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ 和 Quick WP (1998).植物生理学 116 : 329-335.

Yoder JI 和 Goldsbrough AP (1994). BiolTechnology 12 : 263-267.

Zuo J, Niu Q-W 和 Chua N-H (2000). 植物杂志 24 : 265-273.

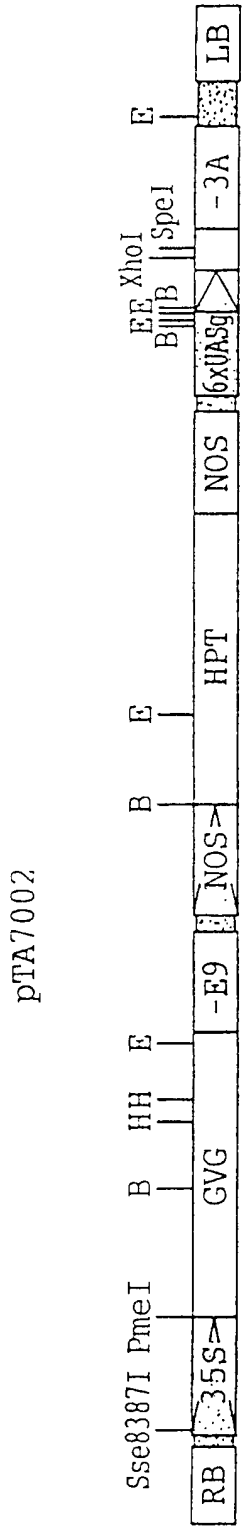

pTA7002
Sse8387I
PmeI
B
HH
E
B
E
B
E
XhoI
SpeI
E
RB
35S>
GVG
-E9
NOS>
HPT
NOS
6xUASg
-3A
LB

图1

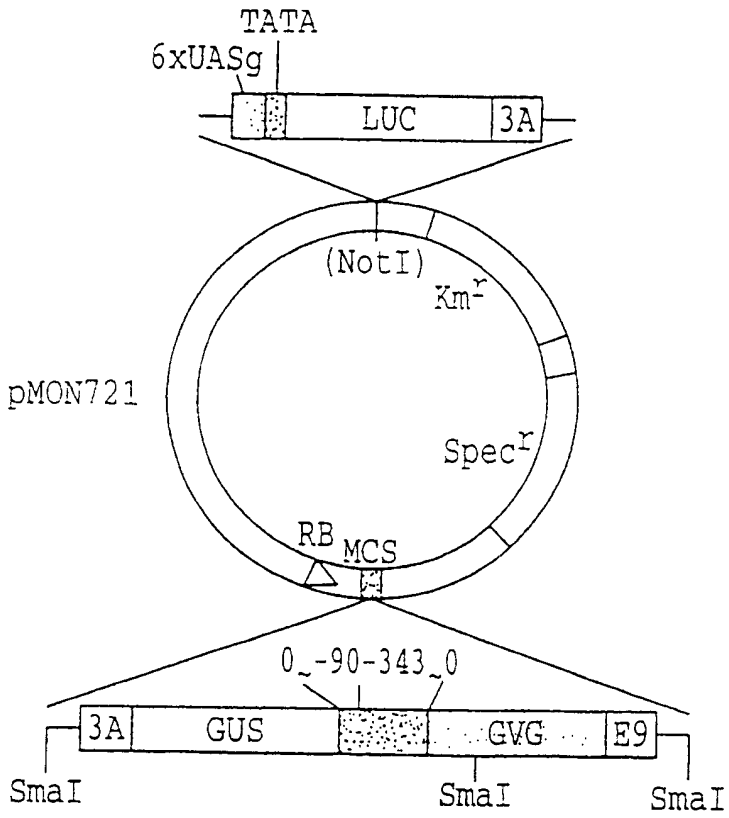

TATA
6xUASg
LUC
3A
(NotI)
Km^r
pMON721
Spec^r
RB
MCS
0_-90-343_0
3A
GUS
GVG
E9
SmaI
SmaI
SmaI

图2



图3A

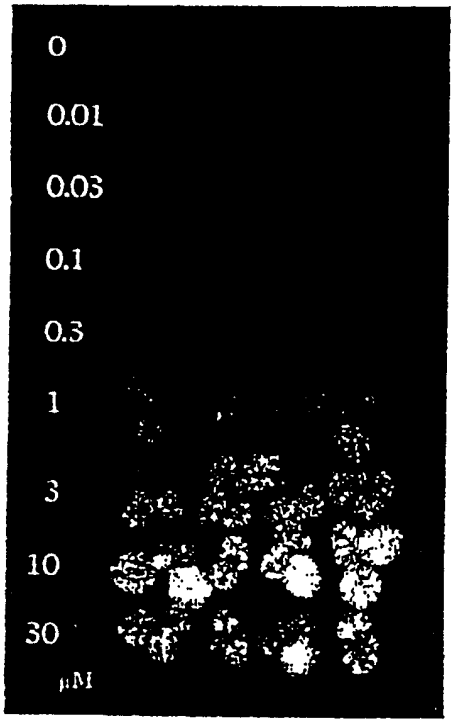


图3B

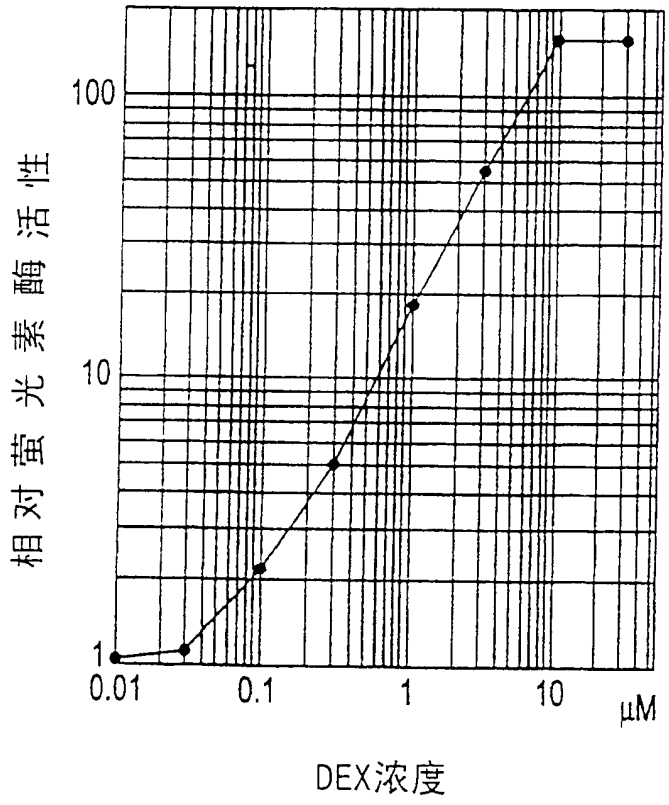


图3C



图4A

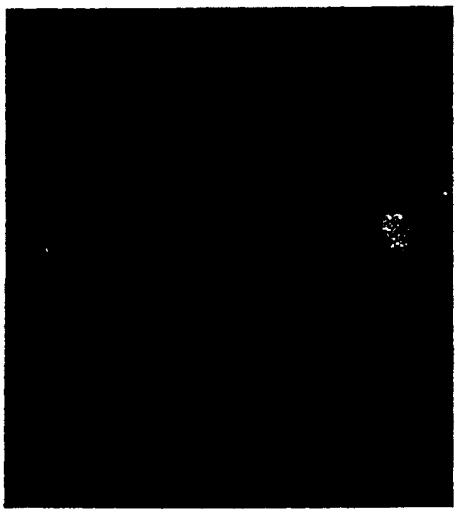


图4B

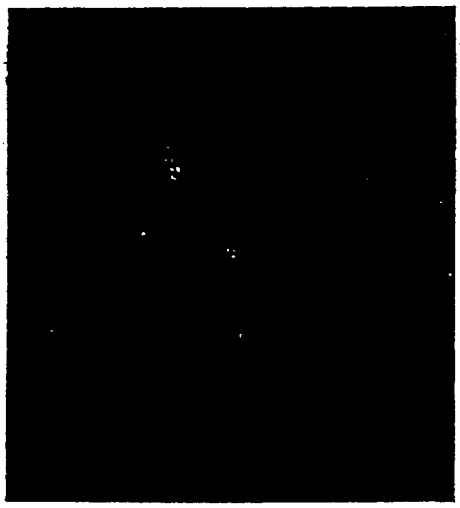


图4C

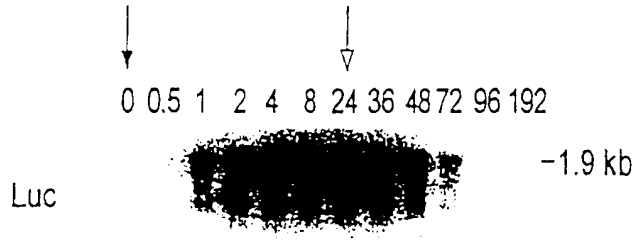


图5A



图5B

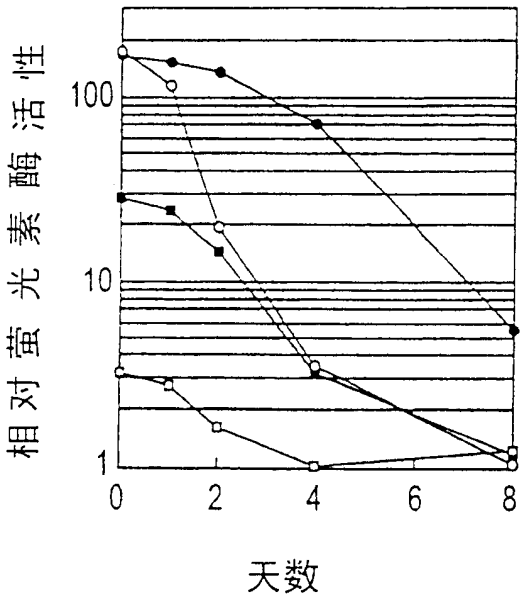


图6

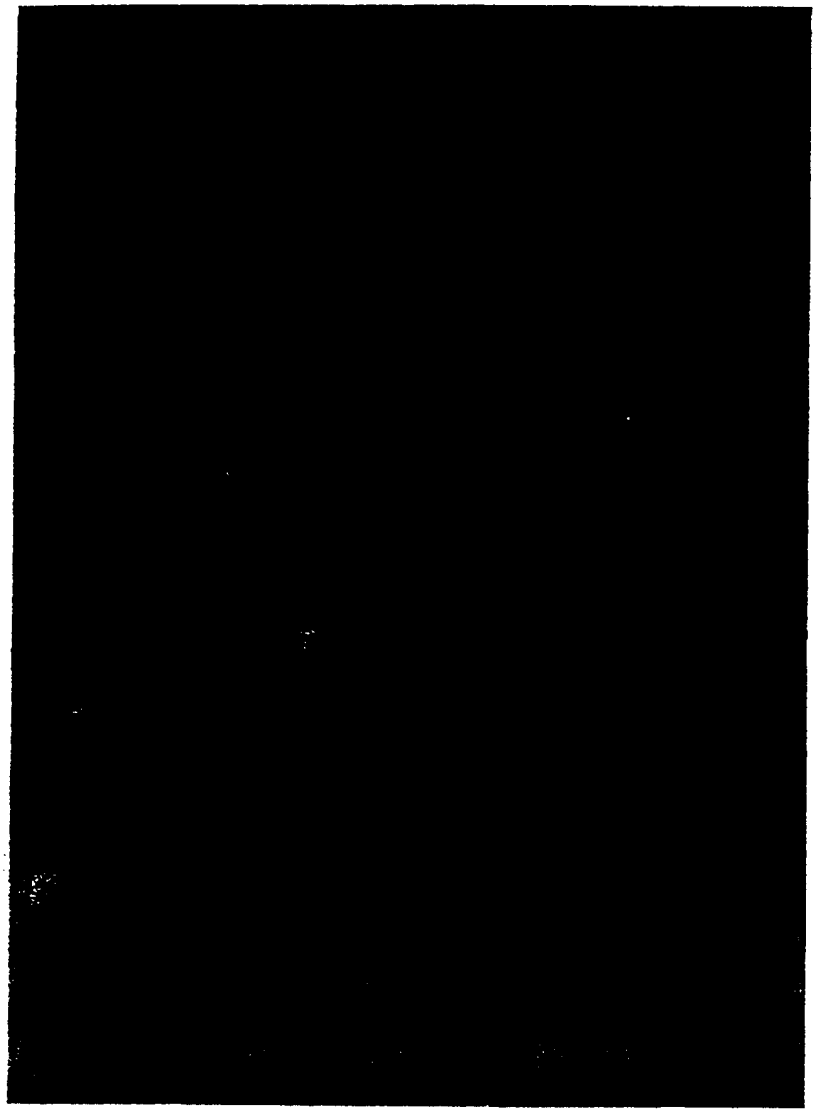


图7

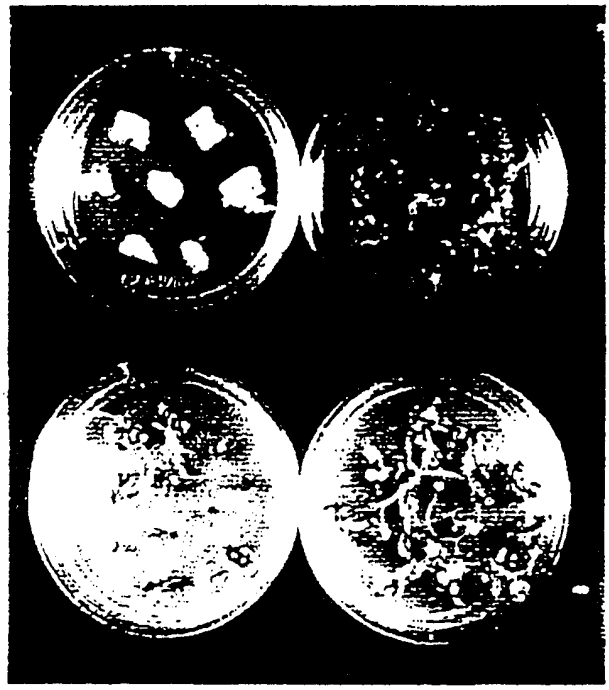


图8

(A)烟草 (B)莴苣

图9A

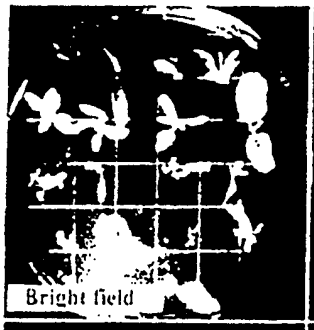


图9B



图9C



图9D



图9E



图9F



图10A

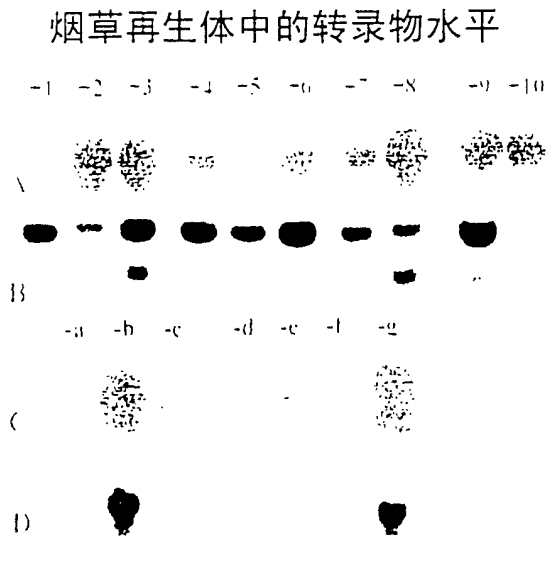


图10B

图10C

图10D

图11C

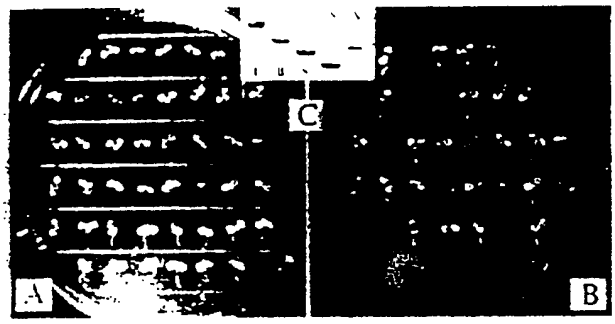


图11A 图11B

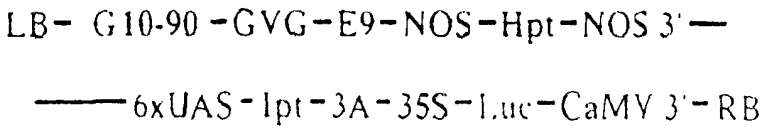


图12

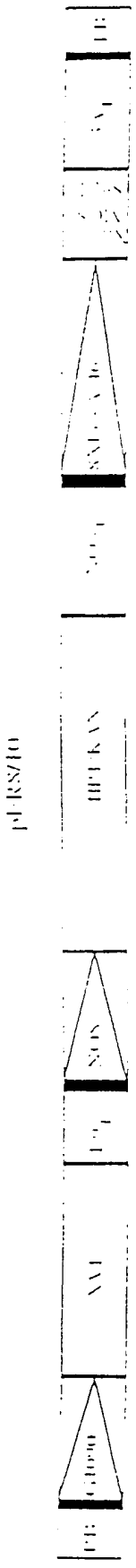


图13



图14A



图14B



图15

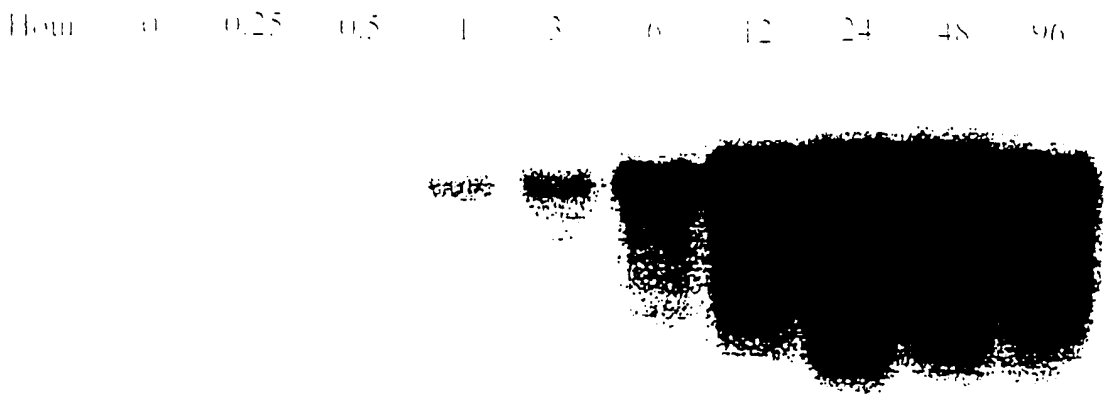


图16

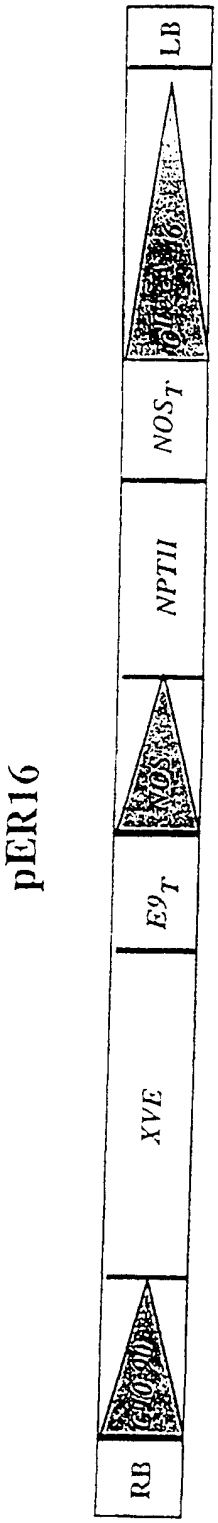


图17