(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104245939 A
(43)申请公布日 2014.12.24

(21)申请号 201380007014.X
(22)申请日 2013.01.24
(30)优先权数据
61/591329 2012.01.27 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/022891 2013.01.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/112686 EN 2013.08.01
(71)申请人 先锋国际良种公司
地址 美国依阿华州
申请人 纳幕尔杜邦公司
(72)发明人 S. C. 法尔科 M. 拉斯纳 Z. 李 C. J. 塞隆奇
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 邹雪梅 李炳爱
(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)

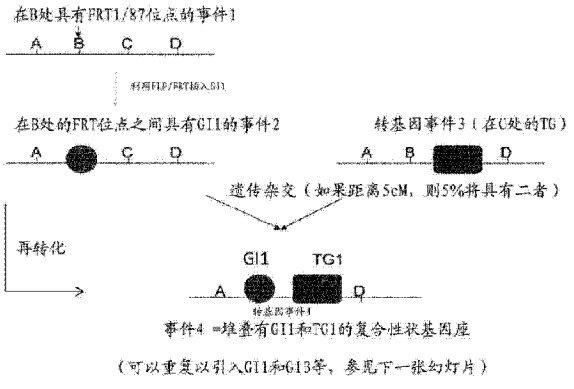
权利要求书8页 说明书60页
序列表7页 附图14页

(54)发明名称

产生复合性状基因座的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供了用于将多个独立的转基因座位堆叠进植物的基因组中的组合物和方法。组合物包括包含在基因组窗口内的不同基因组位点整合的至少一个转基因靶位点和至少一个目的基因组座位的植物、种子或植物细胞。可采用植物育种技术使得所述转基因靶位点和所述目的基因组座位可繁育在一起。以该方式，可在基因组窗口内产生多个独立的转基因整合以产生复合性状基因座。对所述复合性状基因座进行设计使得所述转基因靶位点和/或目的基因组座位可彼此独立地分开，从而提供通过以育种方法添加和以育种方法移除特定元件来变更复合性状基因座的有益效果。还可采用各种方法来修饰所述靶位点使得它们含有多种目的多核苷酸。



CN 104245939 A

1. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子，

其中所述基因组窗口长约 10cM；

其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点各具有不同的基因组插入位点；并且

其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

2. 根据权利要求 1 所述的植物或种子，其中所述基因组窗口长约 5cM；其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的植物或种子，其中

(a) 所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点与所述目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率独立地分开；或者

(b) 所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中

(i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异。或者

(ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低；

并且所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和第四重组位点，其中

(i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异；或者

(ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 5cM 以内。

6. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 2cM 以内。

7. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 0.5cM 以内。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的植物或种子，其中所述基因组窗口还包含具有第五重组位点和第六重组位点的第三转基因靶位点，其中

(i) 所述第五和所述第六重组位点彼此相异。或者

(ii) 所述第五和所述第六重组位点彼此相异且相容性降低；

并且所述第三转基因靶位点具有与所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位不同的基因组插入位点。

9. 根据权利要求 8 所述的植物或种子，其中所述第三转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 5cM 以内。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的植物或种子，其中所述目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的植物或种子，其中所述目的基因组座位包含转基因。

12. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的植物或种子，其中所述目的基因组座位包含天然性状。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点包含至少一种目的多核苷酸。

14. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含至少第二目的多核苷酸。

15. 根据权利要求 4 所述的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含与所述第一转基因靶位点相同的相异重组位点。

16. 根据权利要求 4 所述的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含与所述第一转基因靶位点不同的相异重组位点。

17. 根据权利要求 4 所述的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 LOX 位点、突变型 LOX 位点、FRT 位点或突变型 FRT 位点。

18. 根据权利要求 17 所述的植物或种子，其中所述第一和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 FRT 位点或突变型 FRT 位点。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的植物或种子，其中所述突变型 FRT 位点包含 FRT5 位点、FRT6 位点、FRT7 位点、FRT12 位点或 FRT87 位点。

20. 根据权利要求 15 所述的植物或种子，其中所述第一和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 FRT1 位点和 FRT87 位点。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的植物或种子，其中所述植物或种子是单子叶植物。

22. 根据权利要求 21 所述的植物或种子，其中所述单子叶植物是玉蜀黍、小麦、水稻、大麦、高粱或黑麦。

23. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的植物或种子，其中所述植物或种子是双子叶植物。

24. 根据权利要求 23 所述的植物或种子，其中所述双子叶植物是大豆、芸苔、向日葵、棉花或苜蓿。

25. 一种产生第二植物的方法，所述方法包括对第一植物或其部分应用植物育种技术，其中所述第一植物是根据权利要求 1-24 中任一项所述的植物，并且其中应用所述技术导致产生所述第二植物。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中当与所述第一植物比较时，所述第二植物在所述基因组窗口内包含至少一个另外的转基因靶位点或至少一个另外的目的基因组座位；其中所述另外的转基因靶位点和所述另外的目的基因组座位各自相对于彼此以及相对于所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中所述至少一个另外的转基因靶位点包含目的多核苷酸。

28. 根据权利要求 25 所述的方法，其中当与所述第一植物比较时，所述第二植物在所

述基因组窗口内包含少至少一个转基因靶位点或少至少一个目的基因组座位。

29. 一种在植物的基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

(a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物，并且其中所述基因组窗口长约 10cM 且所述第一植物不包含第一目的基因组座位；

(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点；以及，

(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物；其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

30. 一种在植物的基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

(a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点和第二转基因靶位点的第一植物，其中所述基因组窗口长约 10cM，并且其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点具有不同的基因组插入位点，其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位；

(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位，其中所述第二植物在所述基因组窗口中不包含所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点；以及，

(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的子代植物；

其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述第一目的基因组座位各具有不同的基因组插入位点；并且，

其中所述子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至 0.1％的比率彼此独立地分开。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述基因组窗口长约 5cM，并且其中所述子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 5％至 0.1％的比率彼此独立地分开。

32. 根据权利要求 30 或 31 所述的方法，其中

(a) 所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点与所述第一目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率独立地分开；或者，

(b) 所述子代植物的所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

33. 根据权利要求 30-32 中任一项所述的方法，其中所述方法还包括

(a) 将所述子代植物与包含第二目的基因组座位的第三植物进行育种，其中所述第三植物在所述基因组窗口中包含所述第二目的基因组座位，其中所述第三植物在所述基因组窗口中不包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位；以及，

(b) 从步骤 (a) 选择包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位和所述第二目的基因组座位的第二子代植物；

其中在所述第二子代植物中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位和所述第二目的基因组座位各具有不同的基因组插入位点；并且，

其中所述第二子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位或所述第二目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

34. 根据权利要求 30-33 中任一项所述的方法，其中

(a) 所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中

(i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；或者

(ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；并且

(b) 所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和第四重组位点，其中

(i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸；或者

(ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸。

35. 根据权利要求 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 5cM 以内。

36. 根据权利要求 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 2cM 以内。

37. 根据权利要求 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 0.5cM 以内。

38. 根据权利要求 30-31 中任一项所述的方法，其中所述第一目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

39. 根据权利要求 29-38 中任一项所述的方法，其中所述第一目的基因组座位包含天然性状、目的转基因或另外的转基因靶位点。

40. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点包含相同的相异重组位点。

41. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点包含不同的相异重组位点。

42. 根据权利要求 34、40 或 41 所述的方法，其中所述相异重组位点包含 LOX 位点、突变型 LOX 位点、FRT 位点或突变型 FRT 位点。

43. 根据权利要求 34、40 或 41 所述的方法，其中所述相异重组位点包含 FRT 位点或突变型 FRT 位点。

44. 根据权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述突变型 FRT 位点包含 FRT5 位点、FRT6 位点、FRT7 位点、FRT12 位点或 FRT87 位点。

45. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述第一和所述第二转基因靶位点包含 FRT1 位点和 FRT87 位点。

46. 一种变更植物的基因组中的复合性状基因座的方法，包括

(a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第一目的

基因组座位的第一植物，其中所述基因组窗口长约 10cM，并且其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点；

其中所述第一植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开；

(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种；以及，

(c) 从步骤 (b) 选择子代植物，其中所述子代植物的所述基因组窗口不包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位中的任一者或任两者。

47. 根据权利要求 46 所述的方法，其中所述基因组窗口长约 5cM，并且其中所述第一植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位各以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

48. 根据权利要求 46 或 47 所述的方法，其中

(a) 所述第一植物的所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开；或者，

(b) 所述第一植物的所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点与所述第一目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率独立地分开。

49. 根据权利要求 46、47 或 48 所述的方法，其中

(a) 所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中

(i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；或者

(ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；并且，

(b) 所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和第四重组位点，其中

(i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸；或者

(ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸。

50. 根据权利要求 46-49 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 5cM 以内。

51. 根据权利要求 46-49 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 2cM 以内。

52. 根据权利要求 46-49 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 0.5cM 以内。

53. 根据权利要求 46-49 中任一项所述的方法，其中所述目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

54. 根据权利要求 46-49 中任一项所述的方法，其中所述第一目的基因组座位包含天然性状、目的转基因或另外的转基因靶位点。

55. 根据权利要求 25-54 中任一项所述的方法，其中所述植物是单子叶植物。

56. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述单子叶植物是玉蜀黍、小麦、水稻、大麦、高

梁或黑麦。

57. 根据权利要求 25-54 中任一项所述的方法，其中所述植物是双子叶植物。

58. 根据权利要求 57 所述的方法，其中所述双子叶植物是大豆、芸苔、向日葵、棉花或苜蓿。

59. 一种产生植物、种子或植物细胞的文库的方法，其中所述文库中的所述植物、所述种子或所述植物细胞各包含转基因靶位点，所述方法包括：

(a) 向植物细胞的群体中引入包含转基因靶位点的重组构建体；

(b) 鉴别具有所述重组构建体的植物细胞或植物；

(c) 表征所述重组构建体在步骤 (b) 的所述植物细胞或植物内的基因组插入位点；以及，

(d) 集成所述植物、种子或植物细胞的文库，其中所述文库的每个成员包含具有不同基因组插入位点的转基因靶位点，并且当所述转基因靶位点组合进单个植物基因组中时，所述转基因靶位点彼此独立地分开。

60. 根据权利要求 59 所述的方法，其中步骤 (d) 的所述植物、种子或植物细胞的文库包含植物、种子或植物细胞的群体，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 10cM 的间隔至约 1cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

61. 根据权利要求 62 所述的方法，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 2cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

62. 根据权利要求 60 或 61 所述的方法，其中所述基因组窗口是整个基因组。

63. 一种鉴别在基因组窗口中具有转基因靶位点的植物或植物细胞的方法，包括

(a) 提供植物、种子或植物细胞的文库，其中所述文库中的所述植物、所述种子或所述植物细胞各包含不同基因组插入位点中的转基因靶位点，其中所述文库的每个成员中的所述转基因靶位点的所述基因组插入位点当存在于相同基因组中时彼此独立地分开；以及，

(b) 鉴别所述文库中的植物、种子或植物细胞的亚群，其中所述亚群的每个成员中的所述转基因靶位点的所述基因组插入位点当存在于相同基因组中时可以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

64. 一种包含植物、种子或植物细胞的群体的植物、种子或植物细胞的文库，所述植物、种子或植物细胞具有稳定掺入进其基因组中的转基因靶位点，其中所述文库的每个成员中的所述转基因靶位点的基因组插入位点当存在于相同基因组中时彼此独立地分开，并且所述群体的成员在基因组窗口内以约 10cM 的间隔至约 1cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

65. 根据权利要求 64 所述的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述基因组窗口包含完整的基因组。

66. 根据权利要求 64 所述的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述基因组窗口长约 10cM。

67. 根据权利要求 64、65 或 66 所述的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 2cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

68. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子，其中所述基因组窗口：

(a) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1160、UMC2224、

NPI579B、PMCB1、IDP3917、GPM199C、IDP1425、MMP68、UMC2225、STD2C(DBA)、TIDP3300、CSU1171、SUT1 或 UMC1166，所述第二标记包含 AY107207、UMC1568、IDP3783、BNLG1429、IDP209、LTK1 或 IDP7169；或者，

(b) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1625、UMC2196、UMC2312、BNLG1867、PZA03047、UMC1229、UCK1、RZ390D(CYB5)、MMP20、MMP10、MMP160、PHP20528、UMC2314、UAZ232B(SCI) 或 UMC2313，所述第二标记包含 CDO545、PHP20854、UMC1133、UFG69、MMP76、Y1、BNLG1422、MMP108B、MMP4、UMC1006 或 RZ444E；

其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点各具有不同的基因组插入位点；并且，

其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

69. 一种子代植物，所述子代植物从根据权利要求 68 所述的植物获得。

70. 根据权利要求 68 所述的植物，所述植物还包含至少一种变更的靶序列，其中所述至少一种变更的靶序列起源于被双链断裂诱导剂识别和切割的对应靶序列，并且其中所述至少一种变更的靶序列位于所述基因组窗口中。

71. 一种在植物基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

(a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物，其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位，并且其中所述基因组窗口：

(i) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1160、UMC2224、NPI579B、PMCB1、IDP3917、GPM199C、IDP1425、MMP68、UMC2225、STD2C(DBA)、TIDP3300、CSU1171、SUT1 或 UMC1166，所述第二标记包含 AY107207、UMC1568、IDP3783、BNLG1429、IDP209、LTK1 或 IDP7169；或者

(ii) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1625、UMC2196、UMC2312、BNLG1867、PZA03047、UMC1229、UCK1、RZ390D(CYB5)、MMP20、MMP10、MMP160、PHP20528、UMC2314、UAZ232B(SCI) 和 UMC2313，所述第二标记包含 CDO545、PHP20854、UMC1133、UFG69、MMP76、Y1、BNLG1422、MMP108B、MMP4、UMC1006 或 RZ444E；

(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点；以及，

(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物；其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

72. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子，其中所述基因组窗口：

旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 SATT613、SATT284、S60414-TB 或 SATT462，并且所述第二标记包含 SATT481、SATT156 或 SCT_010；

其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点各具有不同的基因组插入位点；并且，

其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

73. 一种子代植物，所述子代植物从根据权利要求 72 所述的植物获得。

74. 根据权利要求 72 所述的植物，所述植物还包含至少一种变更的靶序列，其中所述至少一种变更的靶序列起源于被双链断裂诱导剂识别和切割的对应靶序列，并且其中所述至少一种变更的靶序列位于所述基因组窗口中。

75. 一种在植物基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

(a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物，其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位，并且其中所述基因组窗口：

旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 SATT613、SATT284、S60414-TB 或 SATT462，并且所述第二标记包含 SATT481、SATT156 或 SCT_010；

(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点；以及，

(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物；其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

产生复合性状基因座的方法和组合物

[0001] 对通过 EFS-WEB 作为文本文件提交的序列表的引用

[0002] 通过 EFS-Web 以电子方式将序列表的正式副本作为 ASCII 格式的序列表提交，该文件名称为 428063SEQLIST.txt，创建日期为 2013 年 1 月 7 日，文件大小为 12KB，并且该文件与本说明书同时提交。该 ASCII 格式文档中所含的序列表是本说明书的一部分，并且全文以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及植物分子生物学领域。具体地讲，提供了用于变更植物的基因组的方法和组合物。

背景技术

[0004] 重组 DNA 技术已使得可以将外来 DNA 序列插入进生物体的基因组中，从而变更该生物体的表型。最常用的植物转化方法是土壤杆菌 (Agrobacterium) 感染和生物弹射粒子轰击，在所述方法中转基因以随机方式和以不可预测的拷贝数整合进植物基因组中。

[0005] 遗憾的是，与这些方法相关的问题可导致农艺经济性减低、进一步研究需要额外的费用、产生额外的转基因事件以及得到产物时间较慢。因而，需要更有效的用于将目的序列的插入靶向进所需的基因组位置、容易地修饰所靶向的多核苷酸和 / 或在所需整合位点附近堆叠额外的目的多核苷酸的方法。

发明内容

[0006] 提供了在植物中在包含至少一个转基因靶位点和至少一个目的基因组座位的基因组窗口 (genomic window) 中产生复合性状基因座的方法和组合物。该组合物提供在其基因组中具有长度约 10cM 的基因组窗口的植物或种子，其中该目的基因组座位以及该转基因靶位点具有不同的基因组插入位点并且以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。该转基因靶位点可包含至少第一重组位点和第二重组位点，并且该第一重组位点和第二重组位点相对于彼此是相异的。该转基因靶位点可还包含目的多核苷酸并且可通过位点特异性整合方法来变更。

[0007] 另外提供的是在植物的基因组中产生复合性状基因座的方法，该方法包括对在其基因组中具有约 10cM 的基因组窗口的第一植物应用植物育种技术，该基因组窗口带有至少第一转基因靶位点。该方法包括将所述第一植物与在基因组窗口中包含目的第一基因组座位的第二植物进行育种，并选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的第一基因组座位的子代，其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一基因组座位具有不同的基因组插入位点。使用这种方法，可将各种转基因靶位点和 / 或目的多核苷酸引入基因组窗口中。还提供的是通过利用各种育种技术或通过采用位点特异性重组技术来添加、移除或替换转基因靶位点、目的基因组座位或目的多核苷酸来变更复合性状基因座的方法。

[0008] 另外提供的是包含转基因靶位点的植物、种子或植物细胞的文库和制备该文库的

方法。该文库包含植物、种子或植物细胞的群体，各包含具有不同基因组插入位点的转基因靶位点，并且所述转基因靶位点当组合进单个植物基因组中时彼此独立地分开。还提供的是该文库的亚群，其中每个成员在给定基因组窗口内包含具有不同基因组插入位点的转基因靶位点，并且所述转基因靶位点在存在于相同基因组中时以约 10％至约 0.1％的比率独立地分开。该文库的转基因靶位点可在整个给定基因组窗口以确定的间隔定位，使得所述给定基因组窗口内用于转基因靶位点插入的所有可能位置由该文库群体的成员代表。因而，可将育种技术应用于所述文库的给定亚群以在植物中产生复合性状基因座。

附图说明

[0009] 图 1 :A) 和 B) :示出了通过杂交和 / 或重转化 (retransformation) 产生的复合性状基因座的非限制性示例设计。GI 指示目的基因，TG 表示转基因。A 至 D 是 10cM 基因组区。

[0010] 图 2 :示出了 SSI 平台 II 变体 a)pPHP35557 和 b)pPHP44290 的 T-DNA 区。这些质粒是土壤杆菌双元载体中间体的衍生物，该载体中间体与 Komari 等人 (1996) 中公布的用于玉米转化的 pSB11 相关。选择标记基因位于 T-DNA 左边界序列 (LB) 附近。供添加性状基因的多克隆位点 (未示出)(PHP35557) 或 Gateway 目的位点 (destination site)(PHP44290) 添加在右 T-DNA 边界 (RB) 附近。性状添加区位于一对 loxP 位点之间，该对 loxP 位点具有做 CRE/lox 切除的能力。位点特异性整合 (SSI) 能力通过在选择标记基因周围设置 FRT 位点 FRT1 和 FRT87 来赋予。

[0011] 图 3 :质粒 PHP44556 的概略示意图。

[0012] 图 4 :连接介导的巢式 PCR(LMnPCR) 的概略示意图。自源于转化程序的 T0 转基因植物的叶组织提取基因组 DNA，然后使用机械力进行随机剪切。DNA 剪切产生大量的随机片段，该随机片段的小的子集含有新插入的转基因的一部分，其中该转基因与基因组 DNA 邻接。带有转基因序列的基因组 DNA 片段代表基因组插入位点，并且该插入位点旁侧序列 (FS) 由其中基因组 DNA 与转基因序列邻接的区域限定。将确定的 DNA 接头连接至随机基因组片段的末端以方便使用 PCR 方法来扩增相对稀有的转基因插入片段。使用与该转基因的末端杂交的引物和与该 DNA 接头杂交的引物设计 PCR。扩增的 PCR 条带应该含有 FS，并将其提交进行序列分析，然后确认。序列结果的确认涉及针对玉蜀黍基因组序列数据库对所扩增的 PCR 序列进行 BLAST 分析。

[0013] 图 5 :A) 用于玉蜀黍 1 号染色体上的复合性状基因座 CTL3A 的转基因靶位点 (TTS) 和插入位点 (IS) 候选。B) 用于玉蜀黍 6 号染色体上的复合性状基因座 CTL6A 的转基因靶位点 (TTS) 候选。

[0014] 图 6 :玉蜀黍物理图谱上与目的基因组窗口 (TRAIT3A) 和公共 BACS 相关的 CTL3A 复合性状基因座的转基因靶位点 (TTS) 和插入位点 (IS) 的示意图。

[0015] 图 7 :包含供位点特异性整合 (SSI) 的转基因靶位点的转基因玉蜀黍事件中的位点特异性整合。

[0016] 图 8 :复合性状基因座 CTL3A 中 TTS-3A2 处的重组酶介导的盒交换 (RMCE)。

[0017] 图 9 :玉蜀黍物理图谱上与目的基因组窗口 (TRAIT6A) 和公共 BACS 相关的 CTL6A 复合性状基因座的转基因靶位点 (TTS) 和插入位点的示意图。

[0018] 图 10 :对一个基因组位置处的数个插入的表达分析。

[0019] 图 11 :用于基因枪大豆转化以产生转基因位点特异性整合 (SSI) 靶事件的 QC599A DNA 片段的示意图谱。标出了用于 qPCR 测定法的 FRT1 位点和 FRT87 位点以及用于反向 PCR 的三个独特限制位点 AflII、NsiI、PciI。GM-SAMS PRO 具有由实线指示的内含子。

[0020] 图 12 :大豆中 FLP 重组酶介导的盒交换的示意性描述。在瞬时表达的 FLP 重组酶的帮助下,事先整合在大豆基因组中的靶 DNA 与供体 DNA 在 FRT1 和 FRT87 两个位点重组。旁侧为 FRT1 和 FRT87 位点的靶 DNA 盒被替换为旁侧为 FRT1 和 FRT87 位点的供体 DNA 盒,从而导致该供体 DNA 盒被位点特异性整合至靶标的完全相同的基因组位点。

[0021] 图 13 :含有转基因靶标位点的 SSI 靶株系的鉴别。将单拷贝靶事件的基因组 DNA 分别用三种限制酶 AflII、NsiI 和 PciI 消化,这三种酶均切割 QC599A 转基因仅一次以及附近旁侧的基因组边界 DNA,例如 PciI 消化。将所得的混合的基因组边界和 QC599A 转基因 DNA 片段通过自我连接环化、PCR 扩增并测序。将使用两组引物 (用于 5′ 边界和 3′ 边界每一者) 进行的两轮 PCR 扩增用于特异性扩增边界 -QC599A DNA 片段。

[0022] 图 14 :包含大豆 19 号染色体上的复合性状基因座 CTL-LA 的基因组窗口中的转基因 SSI 靶位点 TTS-LA1 和 TTS-LA2 以及一个目的基因 (TRAITLA) 的遗传位置。SSI 靶位点 TTS-LA1 和 TTS-LA2 独立地产生并通过杂交合在一起。

具体实施方式

[0023] 下文将参考附图更完整地描述本发明,其中示出了本发明的一些但并非全部实施例。事实上,这些发明可以多种不同形式呈现,不应理解为受限于本文所述的实施例 ;更确切地说,提供这些实施例以使得本公开将满足适用的法律要求。同样的编号在全文中是指同样的要素。

[0024] 本发明所属领域的技术人员借助于上述说明和相关附图中所展示的教导内容,将想到本文阐明的本发明的许多修改形式和其他实施例。因此,应理解,本发明不应限于所揭示的具体实施例,而是意在将修改形式和其它实施例包括在所附权利要求书的范围内。虽然本文中采用特定术语,但所述术语仅在一般性和描述性意义上使用而并非用于限制目的。

[0025] I. 概述

[0026] 提供了用于将多个独立的转基因座位堆叠进植物的基因组中的组合物和方法。组合物包括包含在基因组窗口内的不同基因组位点处整合的至少一个转基因靶位点和至少一个目的基因组座位的植物、种子或植物细胞。可采用植物育种技术使得该转基因靶位点和该至少一个目的基因组座位可繁育为单个复合性状基因座。以该方式,可在基因组窗口内产生多个独立的转基因整合以产生复合性状基因座。如本文所用,“复合性状基因座”是确定的基因组窗口内的染色体片段,其包含至少一个转基因靶位点和至少一个目的基因组座位,其中该靶位点和该目的基因组座位在该确定的基因组窗口内具有不同的基因组插入位点。对该复合性状基因座进行设计使得在减数分裂期间该转基因靶位点和 / 或目的基因组座位可彼此独立地分开。这使得性状能在繁育中增添进复合性状基因座中以及在繁育中从复合性状基因座中消除。因而,本文所述的方法提供了能够通过在繁育中增添和消除复合性状基因座的特定元件来变更复合性状基因座的有益效果。还可采用多种方法来进一步

修饰该转基因靶位点和/或目的基因座使得它们含有多种目的多核苷酸。

[0027] II. 组合物

[0028] A. 基因组窗口

[0029] 本文提供在其基因组中具有基因组窗口的植物或种子。如本文所用,“基因组窗口”是植物基因组中的希望产生复合性状基因座的染色体片段,或者包含通过本文提供的方法产生的复合性状基因座的染色体片段。在基因组窗口中产生复合转基因性状基因座之前,基因组窗口可包括例如一种或多种性状。如本文所用,“性状”是指由具体基因或基因群组赋予的表型。

[0030] 基因组窗口长度可以是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多厘摩(cM)。或者,基因组窗口长度可以是约 1-10cM、约 2-8cM、约 2-5cM、约 3-10cM、约 3-6cM、约 4-10cM、约 4-7cM、约 5-10cM、约 5-8cM、约 6-10cM、约 6-9cM、约 7-10cM、约 8-10cM 或约 9-10cM。在一个实施例中,基因组窗口长度为约 10 厘摩 (cM) 或长度为约 5cM。“厘摩”(cM) 或者“图距单位 (map unit)”是两个连接的基因、标记、靶位点、目的基因组座位、基因座或者它们的任何配对之间的距离,其中 1% 的减数分裂产物是重组的。因此,一厘摩与等于两个连接的基因、标记、靶位点、基因座、目的基因组座位或者它们的任何配对之间的 1% 平均重组频率的距离相当。

[0031] 基因组窗口可包含多种组分。这类组分可包括例如转基因靶位点、天然基因、目的基因组座位、重组位点和目的多核苷酸。基因组窗口可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个转基因靶位点,使得每个转基因靶位点在基因组窗口内具有不同的基因组插入位点。此外,基因组窗口可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个目的基因组座位,各个目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。所谓“不同的基因组插入位点”意指基因组窗口的各组分(即转基因靶位点和目的基因组座位)在不同的位置处插入进基因组中并因此各组分可彼此独立地分开。例如,基因组窗口可包含转基因靶位点和/或目的基因组座位的组合,使得每个靶位点或目的基因组座位在基因组窗口内具有不同的基因组插入位点。

[0032] 本文提供的基因组窗口的组分具有不同的基因组插入位点并因而可彼此独立地分开。如本文所用,“独立地分开”用于指在减数分裂期间任何两个或更多个基因、转基因、天然基因、突变基因、靶位点、目的基因组座位、标记等彼此遗传分开。测量两个遗传元件是否独立地分开的测定法是本领域已知的。照此,本文提供的基因组窗口内的任何两个或更多个基因、转基因、天然基因、突变基因、靶位点、目的基因组座位、标记等具有彼此以适当距离定位的基因组插入位点,从而它们通常以约 10% 或更低的比率独立地分开。因而,本文提供的基因组窗口的组分可以约 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2% 或 0.1% 的比率彼此独立地分开。或者,本文提供的基因组窗口的组分可以约 10-0.1%、约 10-0.5%、约 10-1%、约 10-5%、约 9-0.1%、约 9-0.5%、约 9-1%、约 9-5%、约 8-0.1%、约 8-0.5%、约 8-1%、约 8-4%、约 7-0.1%、约 7-0.5%、约 7-1%、约 7-4%、约 6-0.1%、约 6-1%、约 6-0.5%、约 6-3%、约 5-0.1%、约 5-1%、约 5-0.5%、约 4-0.1%、约 4-1%、约 4-0.5%、约 3-0.1%、约 3-1%、约 3-0.5%、约 2-0.1%、约 2-0.5%、约 1-0.1% 或约 1-0.5% 的比率彼此独立地分开。例如,如果基因组窗口包含彼此相距约 5cM 的转基因靶位点和目的基因组座位,则转基因靶位点和目的基因组座位将以约 5% 的比率独立地分开。

[0033] 在一个实施例中，基因组窗口包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和至少一个目的基因组座位，其中转基因靶位点和目的基因组座位每一者具有不同的基因组插入位点并且以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0034] 任何给定的基因组窗口可还包含至少一个变更的靶序列，该变更的靶序列起源于被双链断裂诱导剂识别和切割的对应靶序列。如本文所用，“双链断裂诱导剂”是指任何能在靶序列中产生双链断裂的核酸酶。“靶序列”是指植物细胞基因组中的包含双链断裂诱导剂的识别序列的多核苷酸序列，双链断裂是在该识别序列处诱导。“变更的靶序列”是指当与未变更的靶序列相比时包含至少一个变更的靶序列。“变更”可包括例如 :(i) 置换至少一个核苷酸，(ii) 缺失至少一个核苷酸，(iii) 插入至少一个核苷酸，或者 (iv)(i)-(iii) 的任何组合。照此，可在任何给定的基因组窗口中产生用于基因组窗口的各种组分 (即转基因靶位点或目的基因组座位) 的插入位点。产生变更的靶序列的方法是已知的，并且在 2011 年 3 月 23 日提交的美国临时申请 No. 61/466,602 中公开，将该专利申请以引用的方式全文并入本文。

[0035] 在具体的实施例中，基因组窗口旁侧为至少第一标记和第二标记。玉米的 1 号染色体上的这类标记的非限制性例子包括例如 UMC1160、UMC2224、NP1579B、PMCB1、IDP3917、GPM199C、IDP1425、MMP68、UMC2225、STD2C(DBA)、TIDP3300、CSU1171、SUT1、UMC1166、AY107207、UMC1568、IDP3783、BNLG1429、IDP209、LTK1 和 IDP7169。表 2 示出了玉米 1 号染色体上的标记的公共 IBM2 遗传图谱位置。玉米 6 号染色体上的标记的非限制性例子包括例如 UMC1625、UMC2196、UMC2312、BNLG1867、PZA03047、UMC1229、UCK1、RZ390D(CYB5)、MMP20、MMP10、MMP160、PHP20528、UMC2314、UAZ232B(SCI)、UMC2313、CDO545、PHP20854、UMC1133、UFG69、MMP76、Y1、BNLG1422、MMP108B、MMP4、UMC1006 和 RZ444E。表 6A 示出了玉米 6 号染色体上的标记的公共 IBM2 遗传图谱位置。大豆的 19 号染色体上的这类标记的非限制性例子包括例如 SATT613、SATT284、S60414-TB、SATT462、SATT481、SATT156 和 SCT_010。表 11 示出了大豆 19 号染色体上的标记的公共遗传图谱位置。

[0036] B. 基因组窗口的组分

[0037] i. 转基因靶位点和变更方法

[0038] 转基因靶位点可包含多种组分。如本文所用，所谓“靶位点”是指包含具有至少一个重组位点的核苷酸序列的多核苷酸。所谓“转基因靶位点”意指这样的靶位点 :其对于植物基因组而言在序列上和 / 或在基因组位置上都是非天然的。在一些实施例中，转基因靶位点可包含至少 1、2、3、4、5、6 或更多个重组位点供位点特异性重组。在一个实施例中，转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点。在这类实施例中，所述第一和第二重组位点可相对于彼此是相异的，或者相对于彼此可以是相异的并且具有降低的相容性。当提供以适当的重组酶时，这类第一和第二重组位点能够与它们对应的或相同的重组位点重组。

[0039] 一条或多条间插序列可存在于靶位点的重组位点之间。特别关注的间插序列将包括接头、衔接子、选择性标记、目的多核苷酸、其他重组位点、启动子和 / 或其他有助于载体构建或分析的位点。在重组位点之间则可采用各种目的多核苷酸。变更靶位点的方法在本文别的地方更详细地论述。此外，靶位点的重组位点可位于多种位置，包括例如内含子序列、编码序列或非翻译区内。

[0040] 本文提供的方法和组合物中采用的重组位点可以是“对应的”位点或“相异的”位

点。所谓“对应的重组位点”或“一组对应的重组位点”意指重组位点具有相同的或对应的核苷酸序列。一组对应的重组位点在存在适当重组酶时将会有效地彼此重组（即对应的重组位点是会引起重组的 (recombinogenic)）。

[0041] 在其他实施例中，重组位点是相异的。所谓“相异的重组位点”或“一组相异的重组位点”意指重组位点是不同的（即，具有至少一个核苷酸不同）。

[0042] “一组相异的重组位点”内的重组位点可相对于于彼此是会引起重组的或者相对于彼此具有降低的相容性。所谓“会引起重组的”意指该组重组位点能够彼此重组。

[0043] 在其他实施例中，一组相异的重组位点可包含相对于彼此具有降低的相容性的重组位点组。所谓“降低的相容性”意指该组重组位点在存在适当的重组酶时，与在它们的同种 (cognate) 位点上所见到的重组效率相比将具有降低的重组效率。在一些实施例中，相容性降低将导致位点之间不重组。在其他实施例中，相容性降低将导致位点之间的重组水平极低。因而，用于本文所提供的方法和组合物中的彼此之间相容性降低的合适重组位点包括那些彼此以低于 90％、80％、70％、60％、50％、40％、30％、20％、15％、10％、5％、4％或 3％的频率重组（或切除）的位点。在一些实施例中，彼此之间的相容性降低的重组位点彼此以低于切除测定法中标准条件下的可检测限值、低于 2％、1.5％、1％、0.75％、0.5％、0.25％、0.1％、0.075、0.005％、0.001％的频率重组（或切除）。“相异重组位点组”内的每个重组位点是生物活性的并因而可与相同位点重组。

[0044] 在一些实施例中，基因组窗口包含具有彼此相异的第一和第二重组位点的转基因靶位点和具有彼此相异的第三和第四重组位点的第二转基因靶位点。在其他实施例中，基因组窗口包含具有彼此相异且相容性降低的第一和第二重组位点的第一转基因靶位点和具有彼此相异且相容性降低的第三和第四重组位点的第二转基因靶位点。在一些情况下，第一转基因靶位点和第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。因而，本文提供的各个靶位点中的任一个均可以约 10-0.1％、约 10-0.5％、约 10-1％、约 10-5％、约 9-0.1％、约 9-0.5％、约 9-1％、约 9-5％、约 8-0.1％、约 8-0.5％、约 8-1％、约 8-4％、约 7-0.1％、约 7-0.5％、约 7-1％、约 7-4％、约 6-0.1％、约 6-0.5％、约 6-1％、约 6-3％、约 5-0.1％、约 5-0.5％、约 5-1％、约 4-0.1％、约 4-.05％、约 4-1％、约 3-0.1％、约 3-0.5％、约 3-1％、约 2-0.1％、约 2-0.5％、约 1-0.1％或约 1-0.5％的比率彼此独立地分开。本文提供的各个靶位点在基因组窗口中可彼此相距约 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.7，0.8，0.9，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10cM 或更多。或者，各个靶位点在基因组窗口中可彼此相距约 0.5-10cM、约 1-10cM、约 2-10cM、约 2-5cM、约 3-10cM、约 3-6cM、约 4-10cM、约 4-7cM、约 5-10cM、约 5-8cM、约 6-10cM、约 6-9cM、约 7-10cM、约 8-10cM、约 9-10cM、约 0.1-0.5cM、约 0.1-1cM、约 0.1-2cM、约 0.1-3cM、约 0.1-4cM、约 0.1-5cM、约 0.1-6cM、约 0.1-7cM、约 0.1-8cM、约 0.1-9cM 或约 0.1-10cM。

[0045] 在一特定的实施例中，第二转基因靶位点的重组位点与第一转基因靶位点的相异位点不同。或者，第二转基因靶位点可包含与第一转基因靶位点相同的相异位点。在另一实施例中，基因组窗口包含具有彼此相异的第五和第六重组位点的第三转基因靶位点。在又一实施例中，基因组窗口包含具有彼此相异且相容性降低的第五和第六重组位点的第三转基因靶位点。在所有这类情况下，第一、第二和第三转基因靶位点具有不同的基因组插入位点。

[0046] 各种重组位点可应用于本文提供的方法和组合物中（即应用于本文所公开的各个转基因靶位点或目的基因组座位中）。所谓“重组位点”意指重组位点及其活性变体。许多重组系统是本领域已知的并且本领域技术人员将知道要与目的重组系统一起使用的适当重组位点。如本文别的地方更详细论述的，可采用重组位点的各种组合，包括相异位点组和对应的重组位点和/或相异重组位点和/或彼此相异且相容性降低的位点可用于本文提供的各种方法和组合物中。因此，任何合适的重组位点或重组位点组可用于本文，包括FRT位点、FRT位点的生物活性变体（即突变型FRT位点）、LOX位点、LOX位点的生物活性变体（即突变型LOX位点）、它们的任何组合或本领域已知的重组位点的任何其他组合。FRT位点的例子包括例如野生型FRT位点(FRT1)(SEQ ID NO:1)以及各种突变型FRT位点，包括但不限于FRT5(SEQ ID NO:2)、FRT6(SEQ ID NO:3)、FRT7(SEQ ID NO:4)、FRT12(SEQ ID NO:5)和FRT87(SEQ ID NO:6)。参见例如美国专利No.6,187,994。还可参见美国公开No.2011-0047655，将其以引用的方式并入本文。

[0047] 还可使用来自Cre/Lox位点特异性重组系统的重组位点。这类重组位点包括例如，野生型LOX位点和突变型LOX位点。对突变型LOX位点的重组活性的分析在Lee等人(1998)Gene(《基因》)216:55-65中给出，将该文献以引用的方式并入本文。还可参见例如，Schlake和Bode(1994)Biochemistry(《生物化学》)33:12746-12751;Huang等人(1991)Nucleic Acids Research(《核酸研究》)19:443-448;Sadowski(1995)，载于Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology(《核酸研究与分子生物学进展》)第51卷，第53-91页;Cox(1989)，载于Mobile DNA(《移动DNA》)，Berg和Howe(编辑)美国微生物学会(American Society of Microbiology)，华盛顿哥伦比亚特区，第116-670页;Dixon等人(1995)Mol.Microbiol.(《分子微生物学》)18:449-458;Umlauf和Cox(1988)EMBO(欧洲分子生物学组织)7:1845-1852;Buchholz等人(1996)Nucleic Acids Research(《核酸研究》)24:3118-3119;Kilby等人(1993)Trends Genet.(《遗传学趋势》)9:413-421;Rossant和Geagy(1995)Nat.Med.(《自然医学》)1:592-594;Albert等人(1995)The Plant J.(《植物杂志》)7:649-659;Bayley等人(1992)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)18:353-361;Odell等人(1990)Mol.Gen.Genet.(《分子遗传学与普通遗传学》)223:369-378;Dale和Ow(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)88:10558-10562;Qui等人(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)91:1706-1710;Stuurman等人(1996)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)32:901-913;Dale等人(1990)Gene(《基因》)91:79-85;Albert等人(1995)The Plant J.(《植物杂志》)7:649-659以及WO 01/00158;所有这些文献均以引用方式并入本文。

[0048] 在一特定的实施例中，第一和第二重组位点中的至少一者包含FRT1(SEQ ID NO:1)、FRT5(SEQ ID NO:2)、FRT6(SEQ ID NO:3)、FRT7(SEQ ID NO:4)、FRT12(SEQ ID NO:5)或FRT87(SEQ ID NO:6)。在一特定的实施例中，靶位点的第一和第二重组位点包含FRT1位点和FRT87位点。

[0049] 重组位点的活性变体和片段（即SEQ ID NO:1-6）也为本文提供的组合物和方法所涵盖。重组位点的片段保留了该重组位点的生物活性并因而有利于适当重组酶存在下的重组事件。因而，重组位点的片段可为至少约5、10、15、20、25、30、35、40个核苷酸，以及最多至该重组位点的全长。活性变体可与天然重组位点具有至少65%、70%、75%、80%、

85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性，其中该活性变体保留生物活性并因而有利于适当重组酶存在下的重组事件。测量重组位点的生物活性的测定法是本领域已知的。参见例如 Senecoll 等人 (1988)(《分子生物学杂志》)201 :406-421 ;Voziyanov 等人 (2002)Nucleic Acid Research(《核酸研究》)30 :7 ;美国专利 No.6,187,994 ;WO/01/00158 ;以及 Albert 等人 (1995)The Plant Journal(《植物杂志》)7 :649-659。

[0050] 在本文所提供的方法和组合物中也采用重组酶。所谓“重组酶”意指催化相容的重组位点之间的位点特异性重组的天然多肽。关于位点特异性重组酶的综述，参见 ;Sauer(1994)Current Opinion in Biotechnology(《生物技术新见》)5 :521-527 ;以及 Sadowski(1993)FASEB(美国实验生物学学会联合会)7 :760-767 ;将这两篇文献的内容以引用的方式并入本文。本方法中所用的重组酶可以是天然存在的重组酶或该重组酶的生物活性片段或变体。可用于本方法和组合物中的重组酶包括来自整合酶和解离酶家族的重组酶、其生物活性变体和片段以及任何其他天然存在的或重组产生的可催化指定的 DNA 重组位点之间的保守位点特异性重组的酶或其变体。

[0051] 重组酶的整合酶家族具有超过一百个成员并且包括例如 FLP、Cre、Int 和 R。关于整合酶家族的其他成员，参见例如 Esposito 等人 (1997)Nucleic Acid Research(《核酸研究》)25 :3605-3614 以及 Abremski 等人 (1992)Protein Engineering(《蛋白质工程》)5 :87-91，将这两篇文献以引用的方式并入本文。其他重组系统包括例如 :链霉菌噬菌体 phi C31(Kuhstoss 等人 (1991)J.Mol.Biol.(《分子生物学杂志》)20 :897-908) ;来自芝田硫化叶菌 (Sulfolobus shibatae) 的 SSV1 位点特异性重组系统 (Maskhelishvili 等人 (1993) Mol.Gen.Genet.(《分子遗传学与普通遗传学》)237 :334-342) ;以及基于逆转录病毒整合酶的整合系统 (Tanaka 等人 (1998)Gene(《基因》)17 :67-76)。在其他实施例中，重组酶是不需要辅因子和超螺旋底物的重组酶。这类重组酶包括 Cre(SEQ ID NO :7)、FLP(SEQ ID NO :8) 或它们的活性变体或片段 (SEQ ID NO :9 和 10)。

[0052] FLP 重组酶是催化这样的位点特异性反应的蛋白质，该反应涉及在 DNA 复制过程中扩增酿酒酵母 (S.cerevisiae) 的两微米质粒的拷贝数。如本文所用，FLP 重组酶是指催化两个 FRT 位点之间的位点特异性重组的重组酶。已经克隆并表达了 FLP 蛋白。参见例如 Cox(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(《美国科学院院刊》)80 :4223-4227。供在本方法中使用和与本组合物一起使用的 FLP 重组酶可源于酵母属 (Saccharomyces)。还可使用植物偏好的密码子合成构成重组酶的多核苷酸以便在目的植物中最佳表达。催化位点特异性重组事件的由包含玉蜀黍偏好的密码子的核苷酸序列编码的重组 FLP 酶 (FLPm) (SEQ ID NO :10) 是已知的。参见例如美国专利 5,929,301，将该专利以引用的方式并入本文。FLP 的另外的功能变体和片段是已知的。参见例如，Buchholz 等人 (1998)Nat.Biotechnol.(《自然生物技术》)16 :617-618 ;Hartung 等人 (1998)J.Biol.Chem.(《生物化学杂志》)273 :22884-22891 ;Saxena 等人 (1997)Biochim Biophys Acta(《生物化学和生物物理杂志》)1340(2) :187-204 ;以及 Hartley 等人 (1980)Nature(《自然》)286 :860-864，将以上所有文献以引用的方式并入本文。

[0053] 噬菌体重组酶 Cre 可催化两个 lox 位点之间的位点特异性重组。Cre 重组酶是本领域已知的。参见例如 Guo 等人 (1997)Nature(《自然》)389 :40-46 ;Abremski 等人 (1984)

J.Biol.Chem.(《生物化学杂志》)259:1509-1514;Chen 等人(1996)Somat.Cell Mol.Genet.(《体细胞和分子遗传学》)22:477-488;Shaikh 等人(1977)J.Biol.Chem.(《生物化学杂志》)272:5695-5702;以及 Buchholz 等人(1998)Nat.Biotechnol.(《自然生物技术》)16:617-618,将以上所有文献以引用的方式并入本文。Cre 多核苷酸序列也可用植物偏好的密码子合成。这类序列(moCre)在 WO 99/25840(将其以引用的方式并入本文)中进行描述并在 SEQ ID NO:9 中示出。

[0054] 还认识到,嵌合重组酶可用于本方法。所谓"嵌合重组酶"意指能够催化来源于不同重组系统的重组位点之间的位点特异性重组的重组融合蛋白。也就是说,如果一组功能重组位点(特征为彼此相异)被用于本方法和组合物中并且包含 FRT 位点和 LoxP 位点,则将需要嵌合 FLP/Cre 重组酶或其活性变体或片段,或者作为另一种选择,可能要分别提供两种重组酶。这类嵌合重组酶或其活性变体或片段的制备和使用方法在 WO 99/25840 中描述,将该专利以引用的方式并入本文。

[0055] 通过利用本文所提供的转基因靶位点中的重组位点的各种组合,本方法提供了目的多核苷酸被位点特异性整合进植物基因组中的特定位点中的机制。本方法还允许另外的目的多核苷酸后续插入进该特定基因组位点中。

[0056] 如本文所用,所谓"提供"意指任何允许氨基酸序列和/或多核苷酸与所叙述的组分合在一起的方法。将核苷酸序列引入进植物中的多种方法是本领域已知的。任何手段均可用于将重组系统的各种组分(即转基因靶位点和适当的重组酶)合在一起,包括例如转化和有性杂交。另参见 WO99/25884,将该专利以引用的方式并入本文。此外,可通过将多肽或 mRNA 引入进细胞中来提供重组酶。

[0057] 重组酶(即 FLP 或 Cre)的活性变体或片段也为本文提供的组合物和方法所涵盖。这类活性变体可与天然重组酶具有至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性,其中所述活性变体保留生物活性并因而实现重组事件。重组酶活性的测定法是已知的,通常是测量该酶对含有重组位点的 DNA 底物的总体活性。例如,为了测定 FLP 活性,含有两个反向 FRT 位点的环状质粒中的 DNA 序列的反转可检测为限制酶位点的位置的改变。该测定法在 Vetter 等人(1983)PNAS(《美国国家科学院院刊》)80:7284 中描述。或者,可测定由该酶引起的 DNA 从线性分子切除或者分子间的重组频率,如例如以下文献中所描述的:Babineau 等人(1985)Journal of Biological Chemistry(《生物化学杂志》)260:12313;Meyer-Leon 等人(1987)Nucleic Acid Res(《核酸研究》)15:6469;以及 Gronostajski 等人(1985)Journal of Biological Chemistry(《生物化学杂志》)260:12328。或者,还可通过切除旁侧为会引起重组的 FRT 位点的序列来测定重组酶活性,在移除时将激活可测定的标记基因。

[0058] ii. 目的基因组座位

[0059] 如本文所用,"目的基因组座位"包含遗传在一起的一组特定的多态性。给定的基因组座位可包含但不限于转基因、天然基因或额外的转基因靶位点,该额外的转基因靶位点可包含相异的重组位点对或彼此相异且相容性降低的重组位点对。

[0060] 目的基因组座位可以是例如任何赋予性状如转基因或天然性状的修饰。在一个实施例中,目的基因组座位包含天然性状。如本文所用,"天然性状"是指自然界中存在的性状。在另一个实施例中,目的基因组座位包含转基因。

[0061] 可杂交进植物的基因组窗口中的目的基因组座位的数目是至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个或更多个。任何所需性状均可在给定的目的基因组座位处引入进基因组中。这类性状包括但不限于赋予昆虫抗性、病害抗性、除草剂耐受性、雄性不育、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物或涉及位点特异性重组的序列的性状。

[0062] 在具体的实施例中，给定的目的基因组座位与植物中所需的和 / 或有利的表型相关联。例如，赋予昆虫抗性、病害抗性或除草剂耐受性的性状将是植物中所需的。在其他实施例中，该基因组座位与影响植物的农艺特性的性状不相关联。

[0063] 给定的目的基因组座位在基因组窗口内具有其自己的基因组插入位点。例如，基因组窗口内的目的基因组座位和转基因靶位点将在基因组内具有不同的基因组插入位点。给定的转基因靶位点可距离目的基因组座位在约 10cM、9cM、8cM、7cM、6cM、5cM、4cM、3cM、2cM、1cM、0.9cM、0.8cM、0.7cM、0.6cM、0.5cM、0.4cM、0.3cM、0.2cM 或 0.1cM 以内，使得该靶位点和目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。或者，给定的转基因靶位点可距离目的基因组座位在约 0.5-10cM、约 1-10cM、约 2-10cM、约 2-5cM、约 3-10cM、约 3-6cM、约 4-10cM、约 4-7cM、约 5-10cM、约 5-8cM、约 6-10cM、约 6-9cM、约 7-10cM、约 8-10cM、约 9-10cM、约 0.1-0.5cM、约 0.1-1cM、约 0.1-2cM、约 0.1-3cM、约 0.1-4cM、约 0.1-5cM、约 0.1-6cM、约 0.1-7cM、约 0.1-8cM、约 0.1-9cM 或约 0.1-10cM 以内，使得该靶位点和目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。在一特定的实施例中，第一转基因靶位点或第二转基因靶位点距离目的基因组座位在约 5cM 以内。在又一个实施例中，第一或第二转基因靶位点距离目的基因组座位在 2cM 或 1cM 以内。在其中基因组窗口包含第三转基因靶位点的这类情况中，该第三转基因靶位点可距离目的基因组座位在约 5cM 以内。

[0064] 在一些实施例中，第一转基因靶位点和第二转基因靶位点以约 5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或 0.1%的比率与目的基因组座位独立地分开。或者，第一转基因靶位点和第二转基因靶位点以约 5-0.1%、约 5-1%、约 5-0.5%、约 4-0.1%、约 4-0.5%、约 4-1%、约 3-0.1%、约 3-.05%、约 3-1%、约 2-0.1%、约 2-0.5%、约 1-0.1%或约 1-0.5%的比率与目的基因组座位独立地分开。

[0065] C. 目的多核苷酸

[0066] 可通过本文其他地方论述的转化方法或育种方法在本文所公开的方法和组合物的目的转基因靶位点或基因组座位中将任何目的多核苷酸（即，“目的多肽”或“目的基因”）提供给植物细胞。已经认识到任何目的多核苷酸均可提供、整合进植物基因组中的基因组窗口内并在植物中表达。目的多核苷酸或目的基因可包含例如转基因或天然基因。本文所公开的方法可使至少 1 种、2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种、10 种或更多种目的多核苷酸整合进基因组窗口中。

[0067] 有多种表型变化是值得关注的，包括修饰植物中的脂肪酸组成、变更植物的氨基酸含量、变更植物的病原体防御机制等等。这些结果可通过在植物中表达异源产物（即目的多核苷酸）、在植物中增加内源产物的表达来实现。或者，这些结果可通过在植物中减少一种或多种内源产物（特别是酶或辅因子）的表达来实现。这些改变导致转化植物的表型变化。

[0068] 目的多核苷酸反映出作物开发的参与者的商业市场和利益。目的作物和市场在变

化，并且随着发展中国家打开世界市场，也将出现新的作物和技术。另外，随着我们对农艺性状和特性如产量和杂种优势的理解的增加，对用于转化的基因的选择将会相应变化。目的基因的大体类别包括例如涉及信息的那些基因（如锌指）、涉及通信的那些基因（如激酶）和涉及看家的那些基因（如热休克蛋白）。转基因的更具体类别例如包括编码对农艺学、昆虫抗性、病害抗性、除草剂抗性、不育性、籽粒特性和商业产品重要的性状的基因。一般而言，目的基因包括涉及油脂、淀粉、碳水化合物或营养物质代谢的那些基因以及影响仁大小、蔗糖载量等的那些基因。

[0069] 目的多核苷酸 / 多肽包括但不限于除草剂耐受性编码序列、杀昆虫编码序列、杀线虫编码序列、抗微生物编码序列、抗真菌编码序列、抗病毒编码序列、非生物和生物胁迫耐受性编码序列、或修饰植物性状例如产量、籽粒质量、营养成分、淀粉质量和数量、固氮和 / 或氮利用、以及含油脂含量和 / 或油组成的序列。更具体的目的多核苷酸包括但不限于：改善作物产量的基因、改善作物合意性的多肽、变更磷含量的基因（如植酸酶编码基因）、变更抗氧化剂含量或组成的基因（如变更生育酚和三烯生育酚含量的基因）、变更碳水化合物的基因、编码赋予非生物胁迫（如干旱、氮、温度、盐度、毒性金属或痕量元素）抗性的蛋白质的基因，或赋予对毒素如杀虫剂和除草剂的抗性、或对生物胁迫如真菌、病毒、细菌、昆虫和线虫的攻击以及与这些生物体相关的病害发展的抗性的那些基因。

[0070] 目的多核苷酸还可以是产生供进行位点特异性 DNA 整合的位点的基因。这包括引入可用于 FLP/FRT 系统的 FRT 位点和 / 或可用于 Cre/Loxp 系统的 Lox 位点。这些系统及其他系统在本文其他地方进行了详细的描述。

[0071] “除草剂抗性蛋白”或由“除草剂抗性编码核酸分子”表达生成的蛋白质包括这样的蛋白质，其赋予细胞与未表达该蛋白质的细胞相比耐受更高浓度除草剂的能力，或赋予细胞与未表达该蛋白质的细胞相比对某种浓度除草剂耐受更长时间的能力。除草剂抗性性状可通过如下基因引入进植物中：编码对起到抑制乙酰乳酸合酶 (ALS) 的作用的除草剂（特别是磺酰脲类除草剂）的抗性的基因、编码对起到抑制谷氨酰胺合酶的作用的除草剂如膦丝菌素或 basta 的抗性的基因（如 bar 基因）、编码对草甘膦的抗性的基因（如 EPSP 合酶基因和 GAT 基因）、编码对 HPPD 抑制剂的抗性的基因（如 HPPD 基因）或本领域已知的其他这类基因。参见例如美国专利 No. 7,626,077、No. 5,310,667、No. 5,866,775、No. 6,225,114、No. 6,248,876、No. 7,169,970、No. 6,867,293 和美国临时申请 No. 61/401,456，将所述专利每一者以引用的方式并入本文。

[0072] 除了使用传统的育种方法之外，还可通过遗传方式变更农艺上重要的性状如油脂含量、淀粉含量和蛋白质含量。修饰包括增加油酸、饱和油和不饱和油的含量、提高赖氨酸和硫的水平、提供必需氨基酸以及对淀粉进行改性。美国专利 No. 5,703,049、No. 5,885,801、No. 5,885,802 和 No. 5,990,389 中描述了 Hordothionin 蛋白修饰，将这些专利以引用的方式并入本文。另外的例子是美国专利 No. 5,850,016 中描述的由大豆 2S 白蛋白编码的富含赖氨酸和 / 或硫的种子蛋白以及 Williamson 等人，(1987) Eur. J. Biochem. (《欧洲生物化学杂志》) 165 :99-106 中描述的来自大麦的胰凝乳蛋白酶抑制剂，将上述专利和文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0073] 还可在目的多核苷酸上编码可增加例如用于乙醇生产的淀粉，或提供蛋白质的表达的商业性状。经转化的植物的另一个重要商业用途是生产聚合物和生物塑料，如美国专

利 No.5,602,321 中所述。诸如 β - 酮硫解酶、PHB 酶（聚羟基丁酸酯合酶）和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶（参见 Schubert 等人 (1988)J.Bacteriol.(《细菌学杂志》)170 :5837-5847）之类的基因有利于聚羟基烷酸酯 (PHA) 的表达。

[0074] 可通过定点诱变产生编码序列的衍生物来增加预选氨基酸在所编码的多肽中的水平。例如，编码大麦高赖氨酸多肽 (BHL) 的基因源自大麦胰凝乳蛋白酶抑制剂 (1996 年 11 月 1 日提交的系列号为 08/740,682 的美国申请和 WO 98/20133，将它们的公开内容以引用方式并入本文）。其他蛋白质包括富含甲硫氨酸的植物蛋白质，如来自葵花籽的蛋白质 (Lilley 等人 (1989)Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs(《植物蛋白在人类食品和动物饲料中的利用世界大会会议录》)，Applewhite 编辑（美国油脂化学家协会 (American Oil Chemists Society)，伊利诺州香槟市 (Champaign,Illinois))，第 497-502 页 ；将该文献以引用方式并入本文）；来自玉米的蛋白质 (Pedersen 等人 (1986)J.Biol.Chem.(《生物化学杂志》)261 :6279 ;Kirihara 等人 (1988)Gene(《基因》)71 :359 ；将这两篇文献均以引用方式并入本文）；以及来自水稻的蛋白质 (Musumura 等人 (1989)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)12 :123，将该文献以引用方式并入本文）。其他农艺上重要的基因编码胶乳、Floury 2、生长因子、种子贮藏因子和转录因子。

[0075] 改善作物产量的多核苷酸包括矮化基因，如 Rht1 和 Rht2(Peng 等人 (1999) Nature(《自然》)400 :256-261) 以及增加植物生长的那些，如铵诱导型谷氨酸脱氢酶。改善作物合意性的多核苷酸包括例如允许植物具有减少的饱和脂肪含量的那些多核苷酸、提高植物营养价值的那些多核苷酸、以及增加籽粒蛋白的那些多核苷酸。改善盐耐受性的多核苷酸是增加或允许植物在与已引入耐盐基因的该植物的天然环境相比更高盐度的环境中生长的那些多核苷酸。

[0076] 不育基因也可编码在表达盒中，为物理去雄提供备选方案。以这种方式使用的基因的例子包括雄性组织偏好的基因和具有雄性不育表型的基因（如 QM)，在美国专利 No.5,583,210 中有描述。其他基因包括激酶和编码对雄性或雌性配子体发育有毒的化合物的那些。

[0077] 影响氨基酸生物合成的多核苷酸 / 多肽包括例如邻氨基苯甲酸合酶 (AS ;EC 4.1.3.27)，该酶催化植物、真菌和细菌中从芳族氨基酸途径分支到色氨酸生物合成的第一反应。在植物中，色氨酸生物合成的化学过程处于叶绿体区室中。参见例如美国专利公开 20080050506，将其以引用的方式并入本文。另外的目的序列包括分支酸丙酮酸裂解酶 (CPL)，其是指编码催化分支酸转化为丙酮酸和 pHBA 的酶的基因。表征最充分的 CPL 基因已从大肠杆菌中分离并具有 GenBank 登录号 M96268。参见美国专利 No.7,361,811，将其以引用的方式并入本文。

[0078] 该目的多核苷酸序列可编码涉及提供病害或害虫抗性的蛋白质。所谓“病害抗性”或“害虫抗性”意指植物避开作为植物 - 病原体相互作用的后果的有害症状。害虫抗性基因可编码对严重影响产量的害虫如根虫、切根虫、欧洲玉蜀黍螟等的抗性。病害抗性基因和昆虫抗性基因，如用于抗细菌保护的溶菌酶或天蚕抗菌肽 (cecropin)，或者用于抗真菌保护的蛋白质如防御素、葡聚糖酶或几丁质酶，或者用于防治线虫或昆虫的苏云金芽孢杆菌 (Bacillus thuringiensis) 内毒素、蛋白酶抑制剂、胶原酶、凝集素或糖苷酶，都是可用

的基因产物的例子。编码病害抗性性状的基因包括解毒基因，如对伏马毒素 (fumonosin) 的解毒基因（美国专利 No.5,792,931）；无毒力 (avr) 和病害抗性 (R) 基因 (Jones 等人 (1994)Science(《科学》)266 :789 ;Martin 等人 (1993)Science(《科学》)262 :1432 ;以及 Mindrinos 等人 (1994)Cell(《细胞》)78 :1089) 等等。

[0079] 此外，已经认识到目的多核苷酸可还包含与所靶向的目的基因序列的信使 RNA(mRNA) 的至少一部分互补的反义序列。构建反义核苷酸以与对应的 mRNA 杂交。可对反义序列作出修饰，只要该序列能杂交对应的 mRNA 并干扰其表达。以此方式，可使用与对应的反义序列具有 70％、80％或 85％序列同一性的反义构建体。此外，反义核苷酸的部分可用来破坏靶基因的表达。一般而言，可使用至少 50 个核苷酸、100 个核苷酸、200 个核苷酸或者更多个核苷酸的序列。

[0080] 另外，目的多核苷酸还可以以有义取向使用来抑制植物中的内源基因的表达。用有义取向的多核苷酸抑制植物中的基因表达的方法是本领域已知的。该方法通常涉及用包含这样的启动子的 DNA 构建体转化植物，该启动子有效连接至对应于该内源基因的转录物的核苷酸序列的至少一部分，能驱动在植物中的表达。通常，这种核苷酸序列与内源基因的转录物的序列具有实质的序列同一性，通常高于约 65％的序列同一性、约 85％的序列同一性或高于约 95％的序列同一性。参见美国专利 No.5,283,184 和 No.5,034,323 ;将这些专利以引用方式并入本文。

[0081] 目的多核苷酸还可以是表型标记。表型标记是可筛选或可选择的标记，其包括可视标记和选择标记，无论它是阳性还是阴性选择标记。可使用任何表型标记。具体地讲，可选择的或可筛选的标记包含这样的 DNA 区段，该 DNA 区段使得可以常常在特定条件下鉴别或选取或者不选取含有它的分子或细胞。这些标记可编码活性，例如但不限于 RNA、肽或蛋白质的产生，或者可为 RNA、肽、蛋白质、无机和有机化合物或者组合物等提供结合位点。

[0082] 选择标记的例子包括但不限于 ：包含限制酶位点的 DNA 区段 ；编码能提供对抗原本有毒的化合物的抗性的产物的 DNA 区段，所述有毒化合物包括抗生素如壮观霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、Basta、新霉素磷酸转移酶 II(NEO) 和潮霉素磷酸转移酶 (HPT)) ；编码原本在受体细胞中缺乏的产物的 DNA 区段（如 tRNA 基因、营养缺陷型标记）；编码可容易鉴别的产物的 DNA 区段（例如表型标记如 β - 半乳糖苷酶、GUS ；荧光蛋白如绿色荧光蛋白 (GFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、红色荧光蛋白 (RFP)，以及细胞表面蛋白）；PCR 新引物位点的产生（如两个之前不并置的 DNA 序列的并置）、限制性内切核酸酶或其他 DNA 修饰酶、化学剂等不作用或者作用的 DNA 序列的加入 ；以及使其得以鉴定的特定修饰（如甲基化）所需的 DNA 序列的加入。

[0083] 另外的选择标记包括能赋予对除草化合物如草铵膦、溴苯腈、咪唑啉酮和 2,4- 二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 的抗性的基因。参见例如 Yarranton,(1992)Curr Opin Biotech(《生物技术新见》)3 :506-11 ;Christopherson 等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89 :6314-8 ;Yao 等人,(1992)Cell(《细胞》)71 :63-72 ;Reznikoff,(1992)Mol Microbiol(《分子微生物学》)6 :2419-22 ;Hu 等人,(1987)Cell(《细胞》)48 :555-66 ;Brown 等人,(1987)Cell(《细胞》)49 :603-12 ;Figge 等人,(1988)Cell(《细胞》)52 :713-22 ;Deuschle 等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)86 :5400-4 ;Fuerst 等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)86 :2549-53 ;Deuschle 等人,

(1990)Science(《科学》)248:480-3;Gossen,(1993)博士论文,海德堡大学(University of Heidelberg);Reines等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)90:1917-21;Labow等人,(1990)Mol Cell Biol(《分子细胞生物学》)10:3343-56;Zambretti等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89:3952-6;Baim等人,(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)88:5072-6;Wyborski等人,(1991)Nucleic Acids Res(《核酸研究》)19:4647-53;Hillen和Wissman,(1989)Topics Mol Struc Biol(《分子结构生物学专题》)10:143-62;Degenkolb等人,(1991)Antimicrob Agents Chemother(《抗微生物剂化学疗法》)《抗微生物剂和化学疗法》)35:1591-5;Kleinschnidt等人,(1988)Biochemistry(《生物化学》)27:1094-104;Bonin,(1993)博士论文,海德堡大学;Gossen等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89:5547-51;Oliva等人,(1992)Antimicrob Agents Chemother(《抗微生物剂化学疗法》)36:913-9;Hlavka等人,(1985)Handbook of Experimental Pharmacology(《实验药理学手册》),第78卷(柏林斯普林格出版社(Springer-Verlag,Berlin));Gill等人,(1988)Nature(《自然》)334:721-4。

[0084] 还提供了目的多核苷酸/多肽的活性变体或片段。这种活性变体可与天然的目的多核苷酸/多肽具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性,其中该活性变体保留天然多核苷酸/多肽的生物活性。

[0085] D.植物

[0086] 还涵盖在其基因组中具有本文提供的基因组窗口的植物、植物细胞或种子。还提供包含至少一个复合性状基因座的植物、植物细胞或种子。所述植物、植物细胞或种子的基因组窗口和复合性状基因座可包含任何本文描述的各种转基因靶位点、目的基因组座位或目的多核苷酸的任何组合。

[0087] 如本文所用,术语植物包括植物细胞、植物原生质体、从中可再生出植物的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、在植物或植物部分中完好的植物块和植物细胞如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、仁、穗、穗轴、壳、茎、根、根尖、花药等。谷粒旨在表示由商业种植者出于栽培或繁殖物种之外的目的所生产的成熟种子。再生的植物的子代、变体和突变体也包括在本文内,只要这些部分包含所述的DNA构建体。

[0088] 本文所提供的转化植物或转化植物细胞是其中已针对目的基因实现了遗传变更(如转化)的植物或植物细胞,或者是从经如此变更的植物或细胞遗传下来并包含该变更的植物或植物细胞。“转基因”是已经通过转化程序引入基因组中的基因。因此,“转基因植物”是含有转基因的植物,而不论该转基因是通过转化还是通过育种引入该特定植物中的;从而,该定义涵盖了最初转化植物的后代。“对照”或“对照植物”或“对照植物细胞”提供测量主题(subject)植物或植物细胞的表型变化的参考点。对照植物或植物细胞可例如包括:(a)野生型植物或细胞,即具有与用于进行遗传变更的起始材料相同的基因型的植物或细胞,该遗传变更会得到主题植物或细胞;(b)具有与起始材料相同的基因型但已用无效构建体(即,用不表达该转基因的构建体,如包含标记基因的构建体)转化的植物或植物细胞;(c)为主题植物或植物细胞的子代中的非转化分离子的植物或植物细胞;(d)在遗传上与主题植物或植物细胞相同但不暴露于会引起转基因的表达的条件或刺激因素的植物

或植物细胞；或者 (e) 处于构建体不被表达的条件下的主题植物或植物细胞本身。

[0089] 已被转化而具有任何本文提供的各种组分（即转基因靶位点、目的基因组座位、位点特异性重组酶、重组位点、目的多核苷酸或其任何活性变体或片段）植物细胞可培养成全植物。从单一植物原生质体转化体或从各种转化的外植体再生、发育和培育植物是本领域熟知的。参见例如 McCormick 等人 (1986)Plant Cell Reports(《植物细胞报道》)5：81-84；Weissbach 和 Weissbach，载于：Methods for Plant Molecular Biology(《植物分子生物学方法》)，(编辑)，美国学术出版社公司 (Academic Press, Inc.)，加州圣地亚哥市 (San Diego, Calif.)，1988 年)。该再生和生长方法通常包括以下步骤：选择经转化的细胞，将那些个体化的 (individualized) 细胞培养经过胚发育的通常阶段经过生根小植株阶段。类似地再生转基因胚和种子。之后将所得的转基因生根苗种植在适当的植物生长培养基如土壤中。优选地，使再生的植物自花授粉以提供纯合的转基因植物。另外，将从再生的植物获得的花粉与农艺上重要的株系的种子培育植株进行杂交。反过来，用来自这些重要株系的植物的花粉对再生的植物进行授粉。可以培育两代或更多代以确保所需表型特性的表达得到稳定保持和遗传，然后收获种子以确保已经实现所需表型特征的表达。这样，本文给出的组合物提供了转化种子（也称为“转基因种子”），其在其基因组中稳定整合了本文所提供的多核苷酸，例如转基因靶位点。

[0090] 本文提供的各种组分（即转基因靶位点、目的基因组座位、位点特异性重组酶、重组位点、目的多核苷酸或其任何活性变体或片段）可用于任何植物物种（包括但不限于单子叶植物和双子叶植物）的转化。目的植物物种的例子包括但不限于玉米（玉蜀黍）(Zea mays)、芸苔属 (Brassica) 物种（如，甘蓝型油菜 (B.napus)、芜菁 (B.rapa)、芥菜 (B.juncea))，尤其是可用作种子油来源的那些芸苔属物种、苜蓿 (Medicago sativa)、水稻 (Oryza sativa)、黑麦 (Secale cereale)、高粱 (Sorghum bicolor, Sorghum vulgare)、粟（如，珍珠粟 (Pennisetum glaucum)、黍米 (Panicum miliaceum)、谷子 (Setaria italica)、龙爪稷 (Eleusine coracana))、向日葵 (Helianthus annuus)、红花 (Carthamus tinctorius)、小麦 (Triticum aestivum)、大豆 (Glycine max)、烟草 (Nicotiana tabacum)、马铃薯 (Solanum tuberosum)、落花生 (Arachis hypogaea)、棉花（海岛棉 (Gossypium barbadense)、陆地棉 (Gossypium hirsutum))、甘薯 (Ipomoea batatus)、木薯 (Manihot esculenta)、咖啡 (Coffea spp.)、椰子 (Cocos nucifera)、菠萝 (Ananas comosus)、柑橘 (Citrus spp.)、可可 (Theobroma cacao)、茶 (Camellia sinensis)、香蕉 (Musa spp.)、鳄梨 (Persea americana)、无花果 (Ficus casica)、番石榴 (Psidium guajava)、芒果 (Mangifera indica)、橄榄 (Olea europaea)、木瓜 (Carica papaya)、腰果 (Anacardium occidentale)、澳洲坚果 (Macadamia integrifolia)、杏树 (Prunus amygdalus)、糖用甜菜 (Beta vulgaris)、甘蔗 (Saccharum spp.)、燕麦、大麦、蔬菜、观赏植物和针叶树。

[0091] 蔬菜包括番茄 (Lycopersicon esculentum)、莴苣（如 Lactuca sativa)、青豆 (Phaseolus vulgaris)、利马豆 (Phaseolus limensis)、豌豆 (Lathyrus spp.) 和黄瓜属 (Cucumis) 的成员如黄瓜 (C.sativus)、香瓜 (C.cantalupensis) 和甜瓜 (C.melo)。观赏植物包括杜鹃 (Rhododendron spp.)、八仙花 (Macrophylla hydrangea)、朱槿 (Hibiscus rosasanensis)、玫瑰 (Rosa spp.)、郁金香 (Tulipa spp.)、水仙 (Narcissus spp.)、矮牵牛

(Petunia hybrida)、康乃馨(Dianthus caryophyllus)、一品红(Euphorbia pulcherrima)和菊花。

[0092] 可采用的针叶树包括例如松树如火炬松(Pinus taeda)、沼泽松(Pinus elliotii)、美国黄松(Pinus ponderosa)、黑松(Pinus contorta)和蒙特利松(Pinus radiata);花旗松(Pseudotsuga menziesii);西铁杉(Tsuga canadensis);北美云杉(Picea glauca);红杉(Sequoia sempervirens);枞树(true firs)如银枞(Abies amabilis)和胶枞(Abies balsamea);以及雪松如西方红雪松(Thuja plicata)和阿拉斯加黄雪松(Chamaecyparis nootkatensis)。在具体的实施例中,植物是作物植物(例如玉米、苜蓿、向日葵、芸苔、大豆、棉花、红花、花生、高粱、小麦、小米、烟草等等)。在其他实施例中,玉米和大豆植物是最佳的,在另外其他实施例中,玉米植物是最佳的。

[0093] 其他的目的植物包括提供目的种子的谷物植物、油料种子植物和豆科植物。目的种子包括谷物种子,如玉米、小麦、大麦、水稻、高粱、黑麦等。油料种子植物包括棉花、大豆、红花、向日葵、芸苔、玉蜀黍、苜蓿、棕榈、椰子等。豆科植物包括荚果类(beans)和豌豆。荚果类包括瓜尔豆、槐豆、胡芦巴、大豆、四季豆、豇豆、绿豆、利马豆、蚕豆、小扁豆、鹰嘴豆等等。

[0094] 已经认识到具有稳定掺入的DNA构建体的植物可进一步就位点特异性整合潜能、农艺潜能和拷贝数目进行表征。参见美国专利No.6,187,994。

[0095] 取决于掺入进基因组窗口中的目的多核苷酸,包含本文提供的目的多核苷酸的转基因植物、植物细胞或种子可具有表型变化,包括但不限于变更的病原体或昆虫防御机制、增加的对一种或多种除草剂的抗性、增加的抵抗胁迫性环境条件的能力、经修饰的产生淀粉的能力、经修饰的淀粉产生的水平、变更的油脂含量和/或组成、变更的碳水化合物含量和/或组成、变更的脂肪酸含量和/或组成、变更的磷含量和/或组成、变更的抗氧化剂含量和/或组成、经修饰的利用、分配和/或储存氮的能力等等。

[0096] III.产生和变更复合性状基因座的方法

[0097] A.形成复合性状基因座

[0098] 基因组窗口的组分(即转基因靶位点和/或目的基因组座位)可通过多种方法合在一起。一个这种方法是使包含在给定基因组窗口中具有不同基因组插入位点的各种靶位点和/或目的基因组座位的植物杂交,并选择已经经历重组事件使得转基因靶位点和/或目的基因组座位的所需组合存在于同一植物中的植物。可从而采用这类育种技术来在植物中产生复合性状基因座。

[0099] 如本文所用,“育种”是对活生物体的遗传操纵。通过利用植物的授粉方法的技术将植物进行育种。如果花粉从一朵花转移至相同植株的同一朵花或另一朵花,则植物是自花授粉。当相同家系或株系内的个体用于授粉时,则植物是近缘授粉。如果花粉来自不同家系或株系的不同植株上的花时,则植物是异花授粉。在育种应用中,育种者最初选择两株或更多株亲本植株并使其杂交。视上下文而定,本文所用的“杂交”可指简单的X×Y杂交或指回交过程。

[0100] 本文提供了使用育种技术来建立复合性状基因座或来使复合性状基因座分开的方法。例如,可使在基因组窗口内包含第一转基因靶位点的第一植株(并且该第一植株不包含第一目的基因组座位)与在同一基因组窗口内包含第一目的基因组座位的第二植株

（并且该第二植株在基因组窗口内不包含所述第一转基因靶位点）杂交。然后选择在基因组窗口内包含第一转基因靶位点和第一目的基因组座位二者的子代植株。选择包含靶位点和目的基因组座位二者的子代植株可通过多种方法进行。例如，可进行表型分析，据此检测子代植株中标记或所引入的序列的活性。测定对目的基因组座位和靶位点有特异性的标记的备选方法包括诸如 PCR、杂交、同工酶电泳、限制性片段长度多态性 (RFLPs)、随机扩增多态性 DNA(RAPDs)、任意引物 PCR(AP-PCR)、DNA 扩增指纹分析 (DAF)、序列特征化扩增区域 (Sequence Characterized Amplified Region，SCARs)、扩增片段长度多态性 (AFLPs)、简单序列重复 (SSRs) 和单核苷酸多态性 (SNPs) 之类的技术。

[0101] 在非限制性的实施例中，复合性状基因座可包含 (1) 在所述基因组窗口中具有不同基因组插入位点的转基因靶位点和目的基因组座位；(2) 在所述基因组窗口中具有不同基因组插入位点的 2 个转基因靶位点和一个目的基因组座位；(3) 在所述基因组窗口中具有不同基因组插入位点的 2 个转基因靶位点和 2 个目的基因组座位；(4) 包含一种或多种目的多核苷酸的目的基因组座位和靶位点，其中所述目的基因组座位和转基因靶位点具有不同的基因组插入位点；(5) 包含转基因的转基因靶位点和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(6) 包含天然性状的转基因靶位点和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(7) 包含第一和第二相异重组位点的转基因靶位点，和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(8) 目的基因组座位、包含第一和第二相异重组位点的第一转基因靶位点和包含第三和第四相异重组位点的第二转基因靶位点，其中所述目的基因组座位、第一转基因靶位点和第二转基因靶位点每一者具有不同的基因组插入位点；(9) 目的基因组座位、包含第一和第二相异重组位点的第一转基因靶位点、包含第三和第四相异重组位点的第二转基因靶位点和包含第五和第六相异重组位点的第三转基因靶位点，其中所述目的基因组座位、第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第三转基因靶位点具有不同的基因组插入位点；(10) 第一转基因靶位点和第二转基因靶位点（其中第二转基因靶位点包含与第一转基因靶位点不同的相异重组位点）以及目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(11) 第一转基因靶位点、第二转基因靶位点（其中第二转基因靶位点包含与第一转基因靶位点相同的相异重组位点）和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(12) 第一转基因靶位点、第二转基因靶位点（其中相异重组位点包含 FRT 位点和突变型 FRT 位点）和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；(13) 第一转基因靶位点和第二转基因靶位点（其中相异重组位点包含 FRT5、FRT6、FRT7、FRT12 或 FRT87 位点）和目的基因组座位，各具有不同的基因组插入位点；或者 (14) 第一转基因靶位点和第二转基因靶位点（其中相异重组位点包含 FRT1 和 FRT87 位点）以及目的基因组座位，各具有不同的基因组整合位点。

[0102] 可在植物基因组中的基因组窗口内产生包含多个靶位点、目的基因组座位和 / 或目的多核苷酸的复合性状基因座。图 1 提供了两种性状如何可以以例如彼此相距 5cM 的遗传距离被堆叠进基因组中的非限制性例子。使在基因组窗口内包含第一转基因靶位点并且不具有第一目的基因组座位的第一植株与在基因组窗口内的不同基因组插入位点包含目的基因组座位的第二转基因植株（并且第二植株不包含第一转基因靶位点）杂交。约 5% 的来自该杂交的植物子代将具有在基因组窗口内的不同基因组插入位点整合的第一转基因靶位点和第一目的基因组座位二者。可使在限定的基因组窗口中具有两个位点的子代植

株进一步与在限定的基因组窗口内包含第二转基因靶位点和/或第二目的基因组座位并且缺少第一转基因靶位点和第一目的基因组座位的第三转基因植株杂交。然后选择具有在基因组窗口内的不同基因组插入位点整合的第一转基因靶位点、第一目的基因组座位和第二目的基因组座位的子代。这类方法可用于产生包含复合性状基因座的转基因植物，该复合性状基因座具有在基因组窗口内的不同位点整合的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个转基因靶位点和/或目的基因组座位。以这种方式，可产生多个复合性状基因座。

[0103] 在一个非限制性的实施例中，在植物基因组中产生复合性状基因座的方法包括提供第一植株，该第一植株在长度为约10cM的基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点并且不包含第一目的基因组区。该基因组窗口可具有任何所需长度，如本文别的地方所述的。该方法涉及将该第一植株与在相同基因组窗口内的不同基因组插入位点包含第一目的基因组座位并且不包含该第一转基因靶位点的第二植株进行育种，并且选择包含该第一转基因靶位点和该目的基因组座位的子代。在另一个实施例中，该方法还涉及提供在基因组窗口内具有第一转基因靶位点和第二转基因靶位点的第一植株，所述第一转基因靶位点和第二转基因靶位点具有不同的基因组插入位点，其中该第一植株不包含目的基因组座位。将该第一植株与第二植株进行育种，其中该第二植株在基因组窗口内包含目的基因组座位并且不包含该第一和第二转基因靶位点，并且选择包含该第一转基因靶位点、该第二转基因靶位点和该目的基因组座位的子代植物，所述第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位全部在基因组窗口具有不同的基因组插入位点。该子代植物的第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位可以约10-0.1%、约10-0.5%、约10-1%、约10-5%、约9-0.1%、约9-0.5%、约9-1%、约9-5%、约8-0.1%、约8-0.5%、约8-1%、约8-4%、约7-0.1%、约7-0.5%、约7-1%、约7-4%、约6-0.1%、约6-0.5%、约6-1%、约6-3%、约5-0.1%、约5-0.5%、约5-1%、约4-0.1%、约4-0.5%、约4-1%、约3-0.1%、约3-0.5%、约3-1%、约2-0.1%、约2-0.5%、约1-0.1%或约1-0.5%的比率彼此独立地分开。

[0104] 以该方式，已经认识到可使本文提供的植物杂交以产生包含本文所述的各种基因组窗口、转基因靶位点、目的基因组座位和/或目的多核苷酸的任何组合的复合性状基因座。

[0105] B. 变更复合性状基因座

[0106] 前面的部分描述了通过将靶位点和/或目的基因组座位添加至基因组窗口从而制备复合性状基因座来产生复合性状基因座的各种方法。已经认识到还可通过移除或育种除去某些转基因靶位点和/或目的基因组座位来变更复合性状基因座。对本文提供的复合性状基因座进行设计，使得各转基因靶位点和/或目的基因组座位具有不同的基因组插入位点并且可独立地分开。这种设计使得性状能在育种中添加进基因组窗口中并且还使得性状能在育种中从基因组窗口移除。

[0107] 可采用上面描述的将性状组合进基因组窗口中的育种方法来通过育种移除性状而从基因组窗口移除性状。

[0108] 通过育种移除来变更复合性状基因座的方法包括提供包含待移除的转基因靶位点和/或目的基因组座位的第一植株，并使该第一植株与在基因组窗口中不具有该特定转基因靶位点和/或目的基因组座位的第二植株杂交。然后就选择缺少该转基因靶位点和/

或目的基因组座位的所得的子代。例如，可使包含各在基因组窗口内具有不同的基因组插入位点的第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的第一植株与第二植株杂交。选择其中该基因组窗口不包含所述第一转基因靶位点或所述第一目的基因组座位中的任一者或任两者的子代植物。以该方式，可从该复合性状基因座移除至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个靶位点和 / 或目的基因组座位。

[0109] 在该方法的一个实施例中，第一植株在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第一目的基因组座位。第一植株的基因组窗口长约 10cM，并且第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第一目的基因组座位的每一者具有不同的基因组插入位点并且以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。该方法还包括将第一植株与第二植株育种并选择其中子代的基因组窗口不包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位中的任一者或任二者的子代。在另一个实施例中，所述第一植株的基因组窗口长约 5cM，并且该第一植株的第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第一目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。在又一实施例中，第一转基因靶位点或第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率与第一植株的第一目的基因组座位独立地分开。

[0110] C. 变更转基因靶位点的方法

[0111] 本文提供的转基因靶位点包含至少一个重组位点，如本文别的地方描述的，其可用于将一种或多种目的多核苷酸直接插入进靶位点中。因而，可通过位点特异性整合方法操纵包含多个靶位点的复合性状基因座。这类方法在 WO 99/25821 中详细描述，将该专利以引用的方式并入本文。该方法使得能通过采用位点特异性重组在建立的复合性状基因座的转基因靶位点内移除、添加和 / 或替代多种目的多核苷酸。或者，可在将植物用于育种方法来产生复合性状基因座之前变更该植物中的转基因靶位点。

[0112] 可通过任何本领域已知的转化方法将转基因靶位点引入进植物基因组中。例如，将转基因靶位点作为多核苷酸构建体提供并引入进植物或植物细胞中。然后，可采用位点特异性整合来将转基因靶位点插入进植物的基因组中。参见例如美国专利 No. 6,187,994、No. 6,262,341、No. 6,330,545 和 No. 6,331,661 以及编号为 2011-0047655 的美国专利公开，将这些专利和专利公开以引用的方式全文并入本文。一旦产生，可将包含转基因靶位点的这种植株用于上面论述的育种方法中以及用于多种操纵靶位点内的序列的方法中。这类方法采用位点特异性重组系统的各种成分，如本文别的地方详细描述的。

[0113] 该方法还包括向包含整合的转基因靶位点的植物细胞中引入转移盒。该转移盒包含用于将目的多核苷酸掺入进植物基因组内的转基因靶位点中的各种成分。如本文所定义的，“转移盒”包含至少第一重组位点、目的多核苷酸和第二重组位点，其中所述第一和第二重组位点是相异的并且对应于转基因靶位点中的重组位点。在一些实施例中，转移盒的第一和第二重组位点是相异的并且彼此具有降低的相容性并且对应于转基因靶位点中的重组位点。已经认识到可将重组位点的任何组合用于转移盒中以提供目的多核苷酸。

[0114] 在一个实施例中，转移盒包含第一重组位点、第一目的多核苷酸和第二重组位点。在这类方法中，转移盒的所述第一和第二重组位点是可分别与转基因靶位点的第一和第二重组位点会发生重组（即相同的或对应的）。

[0115] 在一特定的实施例中，转移盒还包含至少一个与驱动在植物细胞中表达的启动子

有效连接的编码区。如本文别的地方论述的，提供了在转基因靶位点和转移盒的重组位点处识别并实现重组的重组酶。重组酶可通过本领域已知的任何手段提供并且在本文别的地方有详细描述。在一特定的实施例中，转移盒的编码区编码重组酶，该重组酶有利于转移盒和转基因靶位点的第一和第二重组位点之间的重组。

[0116] 另外，提供了选择至少一个在转基因靶位点处具有转移盒整合的植物细胞的方法。选择在转基因靶位点处具有整合的植物细胞，例如选择表达选择标记的细胞的方法是本领域已知的并且在本文别的地方有描述。

[0117] 照此，可变更复合性状基因座内的至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个转基因靶位点以包含各种目的多核苷酸。因而，本文提供的方法具有通过育种方法和通过位点特异性整合方法两者来变更复合性状基因座的有益效果。通过这类方法，可将任何目的多核苷酸从植物中的复合性状基因座中移除和 / 或引入其中。

[0118] IV. 引入方法

[0119] 本文提供的方法包括向植物细胞、植物或种子中引入各种多核苷酸构建体或多肽，包括但不限于本文提供的各种转基因靶位点、目的基因组座位、转基因、包含第一和第二相异重组位点或彼此具有降低的相容性的第一和第二相异重组位点的靶位点、位点特异性重组酶、转移盒、目的多核苷酸或其任何活性变体或片段。

[0120] 所谓“引入”意指将序列（多肽或多核苷酸）以使得该序列能够到达植物细胞的内部的方式呈送给植物。本文提供的方法不取决于将序列引入进植物中的具体方法，只要多核苷酸或多肽进入植物的至少一个细胞的内部即可。将序列引入进植物中的方法是本领域已知的，包括但不限于稳定转化方法、瞬时转化方法、病毒介导的方法和有性育种。因而，在将多核苷酸构建体插入进细胞中的语境中的“引入”意指“转染”或“转化”或“转导”并且包括指代多核苷酸构建体掺入进植物细胞中，其中该多核苷酸构建体可掺入进细胞的基因组中。

[0121] 在一些实施例中，本方法和组合物中采用的植物细胞、植物和种子具有稳定掺入进其基因组中的 DNA 构建体。所谓“稳定掺入”或“稳定引入”意指多核苷酸引入进植物中使得该核苷酸序列整合进植物的基因组中并且能够被其子代所遗传。可将任何规程用于该 DNA 构建体或本文采用的各种组分的稳定掺入。

[0122] 转化规程以及将多肽或多核苷酸序列引入进植物中的规程，可根据要进行转化的植物或植物细胞的类型（即单子叶植物或双子叶植物）而异。将多肽和多核苷酸引入进植物细胞中的合适方法包括显微注射 (Crossway 等人 (1986)Biotechniques(《生物技术》)4 :320-334)、电穿孔 (Riggs 等人 (1986)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国国家科学院院刊》)83 :5602-5606)、土壤杆菌介导的转化（美国专利 No.5,563,055 和美国专利 No.5,981,840)、直接基因转移 (Paszkowski 等人 (1984)EMBO J.(《欧洲分子生物学组织杂志》)3 :2717-2722) 和弹道粒子加速（参见例如美国专利 No.4,945,050、美国专利 No.5,879,918、美国专利 No.5,886,244 和 5,932,782 ;Tomes 等人 (1995)，载于 :Plant Cell，Tissue，and Organ Culture :Fundamental Methods(《植物细胞、组织和器官培养 :基础方法》)，Gamborg 和 Phillips 编辑（柏林斯普林格出版社）;McCabe 等人 (1988)Biotechnology(《生物技术》)6 :923-926) ;以及 Lec1 转化 (WO 00/28058)。还可参见 Weissinger 等人 (1988)Ann.Rev.Genet.(《遗传学年评》)22 :421-477 ;Sanford 等

人(1987)Particulate Science and Technology(《粒子科学和技术》)5:27-37(洋葱);Christou 等人(1988)Plant Physiol.(《植物生理学》)87:671-674(大豆);McCabe 等人(1988)Bio/Technology(《生物/技术》)6:923-926(大豆);Finer 和 McMullen(1991)In Vitro Cell Dev.Biol.(《体外细胞发育生物学》)27P:175-182(大豆);Singh 等人(1998),Theor.Appl.Genet.(《理论与应用遗传学》)96:319-324(大豆);Datta 等人(1990)Biotechnology(《生物技术》)8:736-740(水稻);Klein 等人(1988),Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)85:4305-4309(玉蜀黍);Klein 等人(1988)Biotechnology(《生物技术》)6:559-563(玉蜀黍);美国专利 No.5,240,855、No.5,322,783 和 No.5,324,646;Klein 等人(1988)Plant Physiol.(《植物生理学》)91:440-444(玉蜀黍);Fromm 等人(1990)Biotechnology(《生物技术》)8:833-839(玉蜀黍);Hooykaas-Van Slogteren 等人(1984)Nature(《自然》)(伦敦)311:763-764;美国专利 No.5,736,369(谷类);Bytebier 等人(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)84:5345-5349(百合科);De Wet 等人(1985),The Experimental Manipulation of Ovule Tissues(《胚珠组织的实验操作》),Chapman 等人编辑,纽约朗文出版社(Longman,New York),第 197-209 页(花粉);Kaeppler 等人(1990)Plant Cell Reports(《植物细胞报道》)9:415-418 以及 Kaeppler 等人(1992)Theor.Appl.Genet.(《理论与应用遗传学》)84:560-566(晶须介导的转化);D′ Halluin 等人(1992)Plant Cell(《植物细胞》)4:1495-1505(电穿孔);Li 等人(1993)Plant Cell Reports(《植物细胞报道》)12:250-255 以及 Christou 和 Ford(1995)Annals of Botany(《植物学年鉴》)75:407-413(水稻);Osjoda 等人(1996)Nature Biotechnology(《自然生物技术》)14:745-750(经由根癌土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)转化玉蜀黍);将所有这些文献和专利以引用方式并入本文。

[0123] 在其他实施例中,可以通过使植物与病毒或病毒核酸接触将任何本文所采用的多核苷酸引入植物中。一般地讲,这类方法涉及将所需的多核苷酸掺入在病毒 DNA 或 RNA 分子内。已经认识到,本文所提供的方法或组合物中采用的序列可最初作为病毒多聚蛋白的一部分来合成,其以后可通过体内或体外蛋白水解加工而产生所需的重组蛋白质。此外,已经认识到,本文所采用的启动子还涵盖用于通过病毒 RNA 聚合酶进行的转录的启动子。涉及病毒 DNA 或 RNA 分子的用于将多核苷酸引入植物中并表达其中所编码的蛋白质的方法是本领域已知的。参见(例如)美国专利 No.5,889,191、No.5,889,190、No.5,866,785、No.5,589,367、No.5,316,931 以及 Porta 等人(1996)Molecular Biotechnology(《分子生物技术》)5:209-221;将这些专利和文献以引用方式并入本文。

[0124] “瞬时转化”意指将多核苷酸引入宿主(即植物)中并进行暂时表达。这类瞬时转化方法包括但不限于直接将任何组分(即靶位点、目的基因组座位、重组位点、位点特异性重组酶、目的多核苷酸或其活性变体和片段)引入植物中或者将转录物引入植物中。这类方法包括例如显微注射或粒子轰击。参见例如 Crossway 等人(1986)Mol Gen.Genet.(《分子遗传学和基因组学》)202:179-185;Nomura 等人(1986)Plant Sci.(《植物科学》)44:53-58;Hepler 等人(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.(《美国科学院院刊》)91:2176-2180 以及 Hush 等人(1994)The Journal of Cell Science(《细胞科学杂志》)107:775-784,将以上所有文献以引用的方式并入本文。或者,可使用本领域已知的技术将多核苷酸瞬时转化进植物中。这类技术包括病毒载体系统以及将多核苷酸以避免该 DNA 随后释放的方式进行沉

淀。因此，可能从粒子结合的 DNA 发生转录，但将它释放出来以整合进基因组中的频率大大降低。此类方法包括使用聚乙基亚胺 (PEI ;Sigma #P3143) 包被的粒子。

[0125] 已转化的细胞可以根据常规方式培育成植株。参见例如 McCormick 等人 (1986) Plant Cell Reports(《植物细胞报道》)5 :81-84。然后可使这些植物生长，用相同的转化植株或不同的植株进行授粉，所得的子代具有所鉴定的所需表型特征的组成型表达。可以培育两代或更多代以确保所需表型特性的表达得到稳定保持和遗传，然后收获种子以确保已经实现所需表型特征的表达。这样，提供了所述 DNA 构建体稳定掺入进其基因组中的转化种子（也称为“转基因种子”）。

[0126] V. 多核苷酸

[0127] 本文提供包含复合性状基因座的各种组分或用于变更本文提供的复合性状基因座的各种组分（即各种转基因靶位点、目的基因组座位、转基因、重组位点、位点特异性重组酶、转移盒、目的多核苷酸或其任何活性变体或片段）的多核苷酸。

[0128] 术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”、“核酸序列”和“核酸片段”在本文可互换使用。这些术语涵盖核苷酸序列等。多核苷酸可以为 RNA 或 DNA 的聚合物，其为单链或双链的，并且任选含有合成的、非天然的或变更的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的多核苷酸可以由一段或多段 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或其混合物构成。术语“多核苷酸”的使用并不旨在将本发明局限于包含 DNA 的多核苷酸。本领域普通技术人员会认识到，多核苷酸可包含核糖核苷酸以及包含核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合。这种脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸既包括天然存在的分子也包括合成的类似物。本文所提供的多核苷酸还涵盖所有形式的序列，包括但不限于单链形式、双链形式、发夹结构、茎 - 环结构等。

[0129] 本文所提供的组合物可包含分离的或实质上纯化的多核苷酸。“分离的”或“纯化的”多核苷酸实质上或基本上不含通常在该多核苷酸的天然环境中存在的、与该多核苷酸相伴随或相互作用的成分。因此，分离的或纯化的多核苷酸，当通过重组技术生产时实质上不含其他细胞物质或培养基，或者当通过化学法合成时实质上不含化学前体或其他化学品。最佳的是，“分离的”多核苷酸不含在衍生该多核苷酸的生物体的基因组 DNA 中天然位于该多核苷酸的旁侧的序列（即位于该多核苷酸的 5′ 和 3′ 端的序列）（最佳的是蛋白质编码序列）。例如，在多个实施例中，分离的多核苷酸可含有小于约 5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb 或 0.1kb 的在衍生该多核苷酸的细胞的基因组 DNA 中天然位于该多核苷酸的旁侧的核苷酸序列。

[0130] 还提供的是包含各种靶位点、转基因、目的基因组座位、转移盒、重组位点、位点特异性重组酶、目的多核苷酸或任何其活性变体或片段的重组多核苷酸。术语“重组多核苷酸”和“重组 DNA 构建体”在本文可互换使用。重组构建体包含核酸序列（如自然界中不在一起的调控序列和编码序列）的人工或异源组合。例如，转移盒可包含限制位点和异源目的多核苷酸。在其他实施例中，重组构建体可包含源自不同来源的调控序列和编码序列，或者源自相同来源、但是以不同于自然界中存在的方式排列的调控序列和编码序列。此类构建体可单独使用或可与载体结合使用。如果使用载体，则载体的选择取决于本领域技术人员熟知的将用于转化宿主细胞的方法。例如，可使用质粒载体。技术人员充分认识到为了成功转化、选择和繁殖包含任何本文所提供的分离的核酸片段的宿主细胞而必须存在于载体上的遗传元件。技术人员还将认识到，不同的独立转化事件将导致不同的表达水平和表达

模式（Jones 等人 EMBO J.（《欧洲分子生物学学会杂志》）4：2411-2418（1985）；De Almeida 等人 Mol.Gen.Genetics（《分子遗传学与普通遗传学》）218：78-86（1989）），因而必须对多个事件进行筛选以获得显示所需表达水平和表达模式的细胞系。此类筛选可以通过对 DNA 的 DNA 印迹分析、对 mRNA 表达的 RNA 印迹分析、对蛋白表达的免疫印迹分析、或表型分析等等来实现。

[0131] 在具体的实施例中，可在表达盒中提供一种或多种本文所述的多核苷酸供在目的植物或其他生物体或细胞中表达。该表达盒可包括与本文所提供的多核苷酸有效连接的 5′ 和 3′ 调控序列。“有效连接”旨在意指两个或更多个元件之间的功能性连接。例如，目的多核苷酸与调控序列（即启动子）之间的有效连接是可使该目的多核苷酸得以表达的功能连接。有效连接的元件可以是连续的或非连续的。当用来指两个蛋白质编码区域的连接时，所谓有效连接意指所述编码区域处于相同的阅读框中。表达盒可另外含有至少一个待共转化进该生物体中的额外基因。或者，可在多个表达盒上提供额外的基因。这种表达盒设有多个限制位点和 / 或重组位点，以使重组多核苷酸的插入处于调控区域的转录调节之下。表达盒可另外含有选择标记基因。

[0132] 表达盒可在 5′ -3′ 转录方向上包括在植物中起作用的转录和翻译起始区（即启动子）、本文提供的重组多核苷酸以及转录和翻译终止区（即终止区）。调控区（即启动子、转录调控区和翻译终止区）和 / 或本文提供的多核苷酸对宿主细胞而言或彼此之间而言可以是天然的 / 同功的。或者，调控区和 / 或本文提供的多核苷酸对宿主细胞而言或彼此之间而言可以是异源的。如本文所用，指涉序列的“异源”为起源于外来物种的序列，或者，如果起源于相同物种的话，则是通过蓄意人为干预对其天然形式在组成和 / 或基因座方面进行实质性修饰的序列。例如，有效连接至异源多核苷酸的启动子来自与衍生这种多核苷酸的物种不同的物种，或者如果来自于相同 / 相似的物种，则一者或者两者由它们的原始形式和 / 或基因座经实质修饰而来，或者该启动子不是该有效连接的多核苷酸的天然启动子。或者，调控区和 / 或本文提供的重组多核苷酸可以是完全合成的。

[0133] 终止区可以对于转录起始区而言是天然的，可以对于有效连接的重组多核苷酸而言是天然的，可以对于植物宿主而言是天然的，或者可以衍自对于该启动子、该重组多核苷酸、该植物宿主或它们的任何组合而言别的来源（即外来的或异源的）。便利的终止区可获自根癌土壤杆菌的 Ti 质粒，如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶终止区。另参见 Guerineau 等人（1991）Mol.Gen.Genet.（《分子遗传学与普通遗传学》）262：141-144；Proudfoot（1991）Cell（《细胞》）64：671-674；Sanfacon 等人（1991）Genes Dev.（《基因和发育》）5：141-149；Mogen 等人（1990）Plant Cell（《植物细胞》）2：1261-1272；Munroe 等人（1990）Gene（《基因》）91：151-158；Ballas 等人（1989）Nucleic Acids Res.（《核酸研究》）17：7891-7903；以及 Joshi 等人（1987）Nucleic Acids Res.（《核酸研究》）15：9627-9639。

[0134] 在制备表达盒时，可对多个 DNA 片段进行操纵，以提供处于正确取向的 DNA 序列。为此目的，可应用衔接子或接头将 DNA 片段连接在一起，或者可涉及其他的操纵以提供便利的限制位点、去除多余的 DNA、去除限制位点等。出于这个目的，可涉及到体外诱变、引物修复、限制酶切、退火、再置换（如转换和颠换）。

[0135] 可将多个启动子用于本文提供的表达盒中。启动子可基于所需的结果来选择。已经认识到，可通过在表达盒中使用不同启动子来调节目的多核苷酸表达的时序、位置和 /

或水平而增强不同的应用。如果需要，这种表达构建体还可含有启动子调控区（如，赋予诱导型表达或组成型表达，由环境或发育调节的表达，或细胞或组织特异性 / 选择性表达的启动子调控区）、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA 加工信号、转录终止位点和 / 或多腺苷酸化信号。

[0136] 在一些实施例中，本文所提供的表达盒可以与用于在植物中表达的组成型启动子、组织偏好型启动子或其他启动子组合。组成型启动子的例子包括花椰菜花叶病毒 (CaMV)35S 转录起始区、源自根癌农杆菌 T-DNA 的 1′ - 或 2′ - 启动子、泛素 1 启动子、Smas 启动子、肉桂醇脱氢酶启动子（美国专利 No.5,683,439）、Nos 启动子、pEmu 启动子、rubisco 启动子、GRP1-8 启动子和源自技术人员已知的各种植物基因的其他转录起始区。如果低水平表达是所需的，则可使用弱启动子。弱组成型启动子包括例如 Rsyn7 启动子的核心启动子 (WO 99/43838 和美国专利 No.6,072,050)、核心 35S CaMV 启动子等。其他组成型启动子包括例如美国专利 No.5,608,149、No.5,608,144、No.5,604,121、No.5,569,597、No.5,466,785、No.5,399,680、No.5,268,463 和 No.5,608,142。还可参见美国专利 No.6,177,611，将其以引用方式并入本文。

[0137] 诱导型启动子的例子为 Adh1 启动子（其可由低氧或冷应激诱导）、Hsp70 启动子（其可由热应激诱导）、PPDK 启动子和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶启动子（两者均可由光诱导）。还可使用的是化学诱导型启动子，如受安全剂 (safener) 诱导的 In2-2 启动子（美国专利 No.5,364,780）、受雌激素诱导的 ERE 启动子、以及受植物生长素诱导的、绒毡层特异性的但在愈伤组织中也有活性的 Axig1 启动子 (PCT US01/22169)。

[0138] 在发育控制下的启动子的例子包括优先在某些组织（如叶、根、果实、种子或花）中起始转录的启动子。示例性启动子是花药特异性启动子 5126（美国专利 No.5,689,049 和 No.5,689,051）。种子偏好的启动子的例子包括但不限于 27kD γ 玉米醇溶蛋白基因启动子和蜡质基因启动子，Boronat,A. 等人 (1986)Plant Sci.（《植物科学》）47 :95-102 ;Reina, M. 等人 Nucl.Acids Res.（《核酸研究》）18(21) :6426 ;以及 Kloesgen, R.B. 等人 (1986) Mol.Gen.Genet.（《分子遗传学与普通遗传学》）203 :237-244。在胚、果皮和胚乳中表达的启动子在美国专利 No.6,225,529 和 PCT 公布 WO 00/12733 中有公开。将这些专利各自的公开内容全文以引用方式并入本文中。

[0139] 可将化学调节启动子用于通过施加外源化学调节剂来调控基因在植物中的表达。取决于目标，启动子可以是化学诱导型启动子，其中施用化学物质可诱导基因表达，或者是化学抑制型启动子，其中施用化学物质可抑制基因表达。化学诱导型启动子是本领域已知的，包括但不限于玉蜀黍 In2-2 启动子（其通过苯磺酰胺除草剂安全剂激活）、玉蜀黍 GST 启动子（其通过用作出土前 (pre-emergent) 除草剂的疏水性亲电化合物激活）和烟草 PR-1a 启动子（其通过水杨酸激活）。其他值得关注的化学调节启动子包括类固醇响应型启动子（参见例如，糖皮质激素诱导型启动子，载于 :Schena 等人 (1991)Proc.Natl.Acad. Sci.USA（《美国科学院院刊》）88 :10421-10425 ;以及 McNellis 等人 (1998)Plant J.（《植物杂志》）14(2) :247-257) 和四环素诱导型和四环素阻遏型启动子（参见例如，Gatz 等人 (1991)Mol.Gen.Genet.（《分子遗传学与普通遗传学》）227 :229-237 ;以及美国专利 No.5,814,618 和 No.5,789,156），将这些专利和文献以引用方式并入本文。

[0140] 可利用组织偏好的启动子来靶向目的多核苷酸在特定植物组织内的增强表达。

组织偏好的启动子是本领域已知的。参见例如 Yamamoto 等人 (1997)Plant J.(《植物杂志》)12(2) :255-265 ;Kawamata 等人 (1997)Plant Cell Physiol.(《植物细胞生理学》)38(7) :792-803 ;Hansen 等人 (1997)Mol.Gen Genet.(《分子遗传学与普通遗传学》)254(3) :337-343 ;Russell 等人 (1997)Transgenic Res.(《转基因研究》)6(2) :157-168 ;Rinehart 等人 (1996)Plant Physiol.(《植物生理学》)112(3) :1331-1341 ;Van Camp 等人 (1996)Plant Physiol.(《植物生理学》)112(2) :525-535 ;Canevascini 等人 (1996)Plant Physiol.(《植物生理学》)112(2) :513-524 ;Yamamoto 等人 (1994)Plant Cell Physiol.(《植物细胞生理学》)35(5) :773-778 ;Lam(1994)Results Probl.Cell Differ.(《细胞分化的结果与问题》)20 :181-196 ;Orozco 等人 (1993)Plant Mol Biol.(《植物分子生物学》)23(6) :1129-1138 ;Matsuoka 等人 (1993)Proc Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)90(20) :9586-9590 ;以及 Guevara-Garcia 等人 (1993)Plant J.(《植物杂志》)4(3) :495-505。如有必要,可对这种启动子进行修饰以用于弱表达。

[0141] 叶偏好的启动子是本领域已知的。参见例如 Yamamoto 等人 (1997)Plant J.(《植物杂志》)12(2) :255-265 ;Kwon 等人 (1994)Plant Physiol.(《植物生理学》)105 :357-67 ;Yamamoto 等人 (1994)Plant Cell Physiol.(《植物细胞生理学》)35(5) :773-778 ;Gotor 等人 (1993)Plant J.(《植物杂志》)3 :509-18 ;Orozco 等人 (1993)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)23(6) :1129-1138 ;以及 Matsuoka 等人 (1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)90(20) :9586-9590。此外,还可使用 cab 和 rubisco 的启动子。参见例如 Simpson 等人 (1958)EMBO J(《欧洲分子生物学组织杂志》)4 :2723-2729 以及 Timko 等人 (1988)Nature(《自然》)318 :57-58。

[0142] 根偏好的启动子是已知的,可选自许多可从文献得到的启动子,或者从多种相容物种从头分离。参见例如 Hire 等人 (1992)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)20(2) :207-218(大豆根特异性的谷氨酰胺合成酶基因) ;Keller 和 Baumgartner(1991)Plant Cell(《植物细胞》)3(10) :1051-1061(法国菜豆的 GRP 1.8 基因中的根特异性控制元件) ;Sanger 等人 (1990)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)14(3) :433-443(根癌土壤杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 的甘露氨酸合酶 (MAS) 基因的根特异性启动子) ;以及 Miao 等人 (1991)Plant Cell(《植物细胞》)3(1) :11-22(编码细胞溶胶谷氨酰胺合成酶 (GS) 的全长 cDNA 克隆,其在大豆的根和根瘤中表达)。另参见 Bogusz 等人 (1990),Plant Cell(《植物细胞》),2(7) :633-641,其中描述了从来自固氮非豆科植物榆科山黄麻 (Parasponia andersonii) 和相关的非固氮非豆科植物鸡屎藤山麻黄 (Trema tomentosa) 的血红蛋白基因分离的两个根特异性启动子。将这些基因的启动子连接至 β- 葡糖醛酸酶报告基因并引入非豆科植物烟草 (Nicotiana tabacum) 和豆科植物百脉根 (Lotus corniculatus) 二者中,在这两种情况中根特异性启动子活性得以保持。Leach 和 Aoyagi(1991) 描述了他们对毛根土壤杆菌 (Agrobacterium rhizogenes) 的高度表达的 roIC 和 roID 根诱导基因的分析(参见 Plant Science(《植物科学》)(Limerick)79(1) :69-76)。他们得出结论认为,增强子和组织偏好的 DNA 决定子在那些启动子中是分离的。Teeri 等人 (1989) 使用与 lacZ 的基因融合表明,编码章鱼氨酸合酶的土壤杆菌 T-DNA 基因在根尖的表皮中特别活跃,且 TR2′ 基因在完整植物中是根特异性的并且通过叶组织中的创伤刺激,这是与杀昆虫或杀幼虫基因一起使用的特别理想的特性组合(参见 EMBO J.(《欧洲分子生物学组织杂志》)8(2) :

343-350)。与 nptII(新霉素磷酸转移酶 II)融合的 TR1′基因显示了相似的特性。另外的根优选的启动子包括 VfENOD-GRP3 基因启动子 (Kuster 等人 (1995)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)29(4) :759-772) ;和 roIB 启动子 (Capana 等人 (1994)Plant Mol.Biol.(《植物分子生物学》)25(4) :681-691。还可参见美国专利 No.5,837,876、No.5,750,386、No.5,633,363、No.5,459,252、No.5,401,836、No.5,110,732 和 No.5,023,179。菜豆蛋白基因 (Murai 等人 (1983)Science(《科学》)23 :476-482 以及 Sengopta-Gopalen 等人 (1988)PNAS(《美国国家科学院院刊》)82 :3320-3324)。

[0143] 含有本文提供的多核苷酸的表达盒还可包含选择标记基因用于转化细胞的选择。选择标记基因被利用于转化细胞或组织的选择。选标记基因包括编码抗生素抗性的基因,如编码新霉素磷酸转移酶 II(NEO) 和潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 的那些基因,以及赋予对除草化合物的抗性的基因,所述除草化合物为例如草铵膦、溴苯腈、咪唑啉酮和 2,4- 二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 和磺脲。另外的选择标记包括表型标记如 β - 半乳糖苷酶和荧光蛋白如绿色荧光蛋白 (GFP)(Su 等人 (2004)Biotechnol.Bioeng.(《生物技术和生物工程》)85 :610-9 以及 Fetter 等人 (2004)Plant Cell(《植物细胞》)16 :215-28)、青色荧光蛋白 (CYP)(Bolte 等人 (2004)J.Cell Science(《细胞科学杂志》)117 :943-54 以及 Kato 等人 (2002)Plant Physiol.(《植物生理学》)129 :913-42) 以及黄色荧光蛋白 (来自 Evrogen 的 PhiYFP.TM. ;参见 Bolte 等人 (2004)J.Cell Science(《细胞科学杂志》)117 :943-54)。对于另外的选择标记,通常参见 Yarranton(1992)Curr.Opin.Biotech.(《生物技术新见》)3 :506-511 ;Christopherson 等人 (1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89 :6314-6318 ;Yao 等人 (1992)Cell(《细胞》)71 :63-72 ;Reznikoff(1992)Mol.Microbiol.(《分子微生物学》)6 :2419-2422 ;Barkley 等人 (1980),载于 :The Operon(《操纵子》),第 177-220 页 ;Hu 等人 (1987)Cell(《细胞》)48 :555-566 ;Brown 等人 (1987)Cell(《细胞》)49 :603-612 ;Figge 等人 (1988)Cell(《细胞》)52 :713-722 ;Deuschle 等人 (1989)Proc.Natl.Acad.Aci.USA(《美国科学院院刊》)86 :5400-5404 ;Fuerst 等人 (1989)Proc.Nail.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)86 :2549-2553 ;Deuschle 等人 (1990)Science(《科学》)248 :480-483 ;Gossen, (1993),海德尔堡大学博士论文 ;Reines 等人 (1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)90 :1917-1921 ;Labow 等人 (1990)Mol.Cell.Biol.(《分子细胞生物学》)10 :3343-3356 ;Zambretti 等人 (1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89 :3952-3956 ;Baim 等人 (1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)88 :5072-5076 ;Wyborski 等人 (1991)Nucleic Acids Res.(《核酸研究》)19 :4647-4653 ;Hillenand-Wissman(1989)Topics Mol.Struc.Biol.(《分子结构生物学主题》)10 :143-162 ;Degenkolb 等人 (1991)Antimicrob.Agents Chemother.(《抗微生物剂化学疗法》)35 :1591-1595 ;Kleinschnidt 等人 (1988)Biochemistry(《生物化学》)27 :1094-1104 ;Bonin,(1993),海德尔堡大学博士论文 ;Gossen 等人 (1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国科学院院刊》)89 :5547-5551 ;Oliva 等人 (1992)Antimicrob.Agents Chemother.(《抗微生物剂化学疗法》)36 :913-919 ;Hlavka 等人 (1985)Handbook of Experimental Pharmacology(《实验药理学手册》),第 78 卷 (柏林斯普林格出版社 (Springer-Verlag,Berlin)) ;Gill 等人 (1988)Nature(《自然》)334 :721-724。将这些公开内容以引用的方式并入本文。上面关于选择标记基因的名单并不意指是限制性的。可将

任何选择标记基因用于本文给出的组合物中。

[0144] 如果合适，可为了增加在转化植物中的表达对所述方法和组合物中采用的序列（即目的多核苷酸、重组酶等）进行优化。也就是说，可使用植物偏好的密码子来合成基因以改善表达。有关宿主偏好的密码子用法的论述，参见例如 Campbell 和 Gowri (1990) Plant Physiol.（《植物生理学》）92 :1-11。本领域可获得用于合成植物偏好的基因的方法。参见例如，美国专利 No. 5,380,831 和 No. 5,436,391，以及 Murray 等人 (1989) Nucleic Acids Res.（《核酸研究》）17 :477-498，将所述专利和文献以引用方式并入本文。

[0145] VI. 包含转基因靶位点的文库和制备方法

[0146] 本文提供产生包含本文所述的各种转基因靶位点中的任一者的植物、种子或植物细胞的文库的方法。该方法包括将包含转基因靶位点的重组构建体引入植物、种子或植物细胞的群体中。所谓“群体”意指一群或一批植物、种子或植物细胞。该群体可包含 2 个或更多个（即 5、10、100、300、500、700、900、1100、1300、1500、1700、1900、2100、2300、2500、2900、3100、3300、3500、3700、3900、4000、4096、10^4、10^5、10^6 个或更多个）植物、种子或植物细胞。如本文所用，“文库”是包含稳定掺入进其基因组中的至少一个转基因靶位点的植物、种子或植物细胞的群体。

[0147] 为了产生植物文库，将包含转基因靶位点的重组构建体引入进植物细胞的群体中。可通过任何本领域已知的的手段引入重组构建体。该方法包括鉴别具有该重组构建体的植物或植物细胞并表征该重组构建体的基因组插入位点。有多种方法可供鉴别至少一个在其基因组中包含转基因靶位点的植物细胞并表征基因组插入位点。这类方法包括但不限于根据选择标记进行的选择、PCR 方法、测序方法、核酸酶消化、DNA 印迹以及它们的任何组合。参见例如美国专利申请 12/147,834，将该专利申请全文以引用的方式并入本文。

[0148] 重组构建体可在植物基因组中的任何位置整合。在一个实施例中，集成植物、种子或植物细胞的文库使得该文库的每个成员包含具有不同基因组插入位点的靶位点，并且当组合进单个植物基因组中时，可彼此独立地分开。在这些情形中，转基因靶位点的整合位点在植物基因组中彼此相距约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10cM 或更远。或者，转基因靶位点的整合位点在植物基因组中彼此相距约 1-10cM、约 2-10cM、约 2-5cM、约 3-10cM、约 3-6cM、约 4-10cM、约 4-7cM、约 5-10cM、约 5-8cM、约 6-10cM、约 6-9cM、约 7-10cM、约 8-10cM、约 9-10cM、约 0.5-1％、约 0.5-5％、约 0.5-10％、约 0.1-1cM、约 0.1-2cM、约 0.1-3cM、约 0.1-4cM、约 0.1-5cM、约 0.1-6cM、约 0.1-7cM、约 0.1-8cM、约 0.1-9cM 或约 0.1-10cM。

[0149] 在一些实施例中，植物、种子或植物细胞的文库包含这样的群体，其中所述群体的成员在确定的基因组窗口内以约 10cM 至约 1cM 的间隔具有转基因靶位点。所谓“间隔”意指存在着以距离另一转基因靶位点确定的距离定位的转基因靶位点。例如，在 10cM 基因组窗口内以 1cM 间隔定位的转基因靶位点意指在该基因组窗口内每 1cM 距离有一个靶位点，使得该基因组窗口为靶位点所饱和。所谓“饱和”意指该文库包含这样的成员的群体，所述成员在整个基因组窗口上以约 10cM 间隔至约 0.1cM 间隔、约 10cM 间隔至约 0.5cM 间隔、约 5cM 间隔至约 0.1cM 间隔、约 4cM 间隔至约 0.1cM 间隔、约 3cM 间隔至约 0.1cM 间隔、或约 2cM 间隔至约 0.1cM 间隔具有转基因靶位点。

[0150] 在一些实施例中，植物、种子或植物细胞的文库包含这样的群体，其中所述群体的

成员在确定的基因组窗口内以约 10cM 至约 1cM 间隔具有转基因靶位点。所述确定的基因组窗口可具有任何长度，包括长度为约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000cM 或最多至整个基因组。基因组窗口可为约 1-5cM、约 1-10cM、约 10-30cM、约 30-60cM、约 60-100cM、约 100-500cM、约 500-1000cM、约 1000-2500cM、约 2500-5000cM 或最多至基因组的整个长度。在基因组窗口是整个基因组的情形中，植物、种子或植物细胞文库以每个确定的间隔包含转基因靶位点，使得整个基因组为转基因靶位点所饱和。

[0151] 本文还包涵鉴别在给定的基因组窗口内具有转基因靶位点的植物或植物细胞的方法。可从该文库选择植物、种子或植物细胞的亚群，使得文库每个成员内的转基因靶位点具有不同的基因组插入位点并且在存在于相同基因组中时以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0152] 在另一个实施例中，该文库包含植物、种子或植物细胞的群体，其中文库每个成员中转基因靶位点的基因组插入位点在存在于相同基因组中时彼此独立地分开，并且该群体的成员在基因组窗口内以 10cM 的间隔至约 1cM 的间隔定位。

[0153] 这些文库可用于通过使该文库内的植物杂交或使该文库内的植物与来自包含不同转基因靶位点的文库的植物杂交来在任何给定基因组窗口中产生复合性状基因座。以该方式，可将多个转基因靶位点在给定基因组窗口内合并进单个植物基因组中。

[0154] VII. 片段、变体和序列比较

[0155] 本文还提供了各种重组位点、位点特异性重组酶和目的多核苷酸的活性变体或片段。本文别的地方描述了这些成分每一者的生物活性。

[0156] 所谓“片段”，意指多核苷酸的一部分或由其编码的氨基酸序列从而由其编码的蛋白质的一部分。多核苷酸的片段可编码保留天然蛋白质的生物活性的蛋白质片段（即重组酶的片段可实现重组事件）。如本文所用，“天然”多核苷酸或多肽分别包含天然存在的核苷酸序列或氨基酸序列。因而，多核苷酸的片段可在至少约 20 个核苷酸、约 50 个核苷酸、约 100 个核苷酸以及最多至全长多核苷酸的范围内。本方法或组合物中所采用的编码蛋白质的生物活性部分的多核苷酸片段将编码至少 15、25、30、50、100、150、200 或 250 个连续的氨基酸，或最多至全长蛋白质中存在的总氨基酸数目。或者，可用作杂交探针的多核苷酸片段通常不编码保留生物活性的片段蛋白质。因此，核苷酸序列的片段可在至少约 10、20、30、40、50、60、70、80 个核苷酸或最多至全长序列的范围内。

[0157] “变体”序列具有高度的序列相似性。对于多核苷酸，保守变体包括由于遗传密码的简并性而编码天然多肽之一的氨基酸序列的那些序列。诸如这些变体之类的变体可用众所周知的分子生物学技术，例如用聚合酶链反应 (PCR) 技术和杂交技术来鉴别。变体多核苷酸也包括以合成法衍生的核苷酸序列，如那些例如通过使用定点诱变产生但仍编码蛋白质的核苷酸序列。通常，通过已知的序列比对程序和参数测定，特定多核苷酸的变体将与该特定多核苷酸具有至少约 40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性。

[0158] 特定多核苷酸（即参比核苷酸序列）的变体还可通过比较变体多核苷酸所编码的多肽与该参比多核苷酸所编码的多肽之间的序列同一性百分数来进行评价。因而，例如，编码与重组酶具有给定的序列同一性百分数的多肽的分离的多核苷酸是本领域已知的。任何

两条多肽之间的序列同一性百分数可用所述的序列比对程序和参数来计算。若任何给定的多核苷酸对是通过比较它们编码的两条多肽所具有的序列同一性百分数进行评价，则该两条编码的多肽之间的序列同一性百分数为至少约 40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性。

[0159] 所谓“变体”蛋白质意指通过如下手段而衍生自天然蛋白质的蛋白质：在天然蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端缺失（所谓的截短）或添加一个或多个氨基酸；在天然蛋白质中的一个或者多个位点缺失或添加一个或多个氨基酸；或在天然蛋白质中的一个或多个位点置换一个或多个氨基酸。变体蛋白质是有生物活性的，即它们继续具有天然蛋白质的所需生物活性。这类变体可例如由遗传多态性或由人类操纵而得到。通过已知的序列比对程序和参数测定，天然蛋白质的生物活性变体将与该天然蛋白质的氨基酸序列具有至少约 40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性。蛋白质的生物活性变体可与该蛋白质相差少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个如 6-10 个、少至 5 个、少至 4 个、3 个、2 个或甚至 1 个氨基酸残基。

[0160] 以下术语用于描述两条或更多条多肽或多核苷酸之间的序列关系：如本文所用，“参比序列”是用作序列比较的基础的确定的序列。参比序列可以是指定序列的一部分或全部。序列关系可使用计算机执行的算法分析和描述。两条或更多条多核苷酸或者两条或更多条多肽之间的序列关系可通过这样来测定：产生所述序列的最佳比对，并对该比对中的匹配和空位进行打分，这可得到序列同一性百分数和序列相似性百分比。多核苷酸关系还可根据每一者所编码的多肽的比较来描述。用于序列比较和分析的许多程序和算法是本领域所熟知的。

[0161] 除非另有规定，否则本文提供的序列同一性 / 相似性值是指使用 GAP 版本 10 (GCG，Accelrys 公司，加利福尼亚州圣地亚哥市 (San Diego，CA)) 采用以下参数获得的值：对于核苷酸序列的同一性百分数和相似性百分数，使用空位产生罚分权重 (gap creation penalty weight)50 和空位长度延伸罚分权重 (gap length extension penalty weight)3 以及 nwsgapdna.cmp 打分矩阵；对于氨基酸序列的同一性百分数和相似性百分数，使用空位产生罚分权重 8 和空位长度延伸罚分权重 2 以及 BLOSUM62 打分矩阵 (Henikoff 和 Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci USA(《美国科学院院刊》)89：10915)；以及它们的任何等同程序。所谓“等同程序”意指任何这样的序列比较程序，其对于任何两条所考虑的序列，相比于 GAP 版本 10 所产生的对应的比对，能产生出具有相同的核苷酸或氨基酸残基匹配和相同的序列同一性百分数的比对。

[0162] GAP 使用 Needleman 和 Wunsch(1970)J.Mol.Biol.(《分子生物学杂志》)48：443-453 的算法来寻找两个完整序列的比对，该比对使匹配数最大而使空位数最小。GAP 考虑所有可能的比对和空位位置，并产生具有最大数目的匹配碱基和最少的空位的比对。它使得可以提供以匹配碱基数为单位的空位产生罚分和空位延伸罚分。GAP 对于其插入的每个空位，必须利用匹配的空位产生罚分数。如果选择大于零的空位延伸罚分，GAP 对于每个插入的空位必须另外利用空位长度乘以空位延伸罚分。

[0163] GAP 给出该家族中的具有最佳比对的一个成员。可能存在这个家族的许多成员，但

其他成员没有更好的品质。GAP 显示用于比对的四个优值因素：品质、比率、同一性和相似性。品质是为了将序列进行比对而最大化的指标 (metric)。比率是品质除以较短区段中的碱基数。同一性百分数是实际匹配的符号的百分数。相似性百分数是相似的符号的百分数。将对应于空位的符号忽略。当一对符号的评分矩阵值大于或等于 0.50（相似性阈值）时，评定为相似性。

[0164] 如本文所用，“序列同一性”或“同一性”在两条多核苷酸或多肽序列的语境中是指当进行比对以获得最大对应时两条序列中相同的残基。差别在于保守置换的序列（特别是多肽）被称为具有“序列相似性”或“相似性”。作出这个调整的手段是本领域技术人员公知的。通常，这涉及将保守置换评定为部分错配而不是完全错配，从而增加序列同一性百分数。因而，例如，如果相同的氨基酸给予 1 分，非保守置换给予 0 分，则保守置换给予 0 至 1 之间的分数。保守性置换的打分使用所选择的打分矩阵（对于 GAP 默认 BLOSUM62）来计算。

[0165] 蛋白质可以各种方式进行变更，包括氨基酸置换、缺失、截短和插入。这类操纵的方法是本领域公知的。例如，重组酶蛋白的氨基酸序列变体可通过 DNA 中的突变来制备。诱变以及核苷酸序列变更的方法是本领域众所周知的。参见例如 Kunkel(1985)Proc. Natl.Acad.Sci.USA（《美国科学院院刊》）82：488-492；Kunkel 等人 (1987)Methods in Enzymol.（《酶学方法》）154：367-382；美国专利 No.4,873,192；Walker 和 Gaastra 编辑 (1983)Techniques in Molecular Biology（《分子生物学技术》）（纽约麦克米伦出版公司 (MacMillan Publishing Company，New York)）以及其中所引用的参考文献。有关不影响目的蛋白质的生物活性的适当氨基酸置换的指导，可见于 Dayhoff 等人 (1978)Atlas of Protein Sequence and Structure（《蛋白序列和结构图表集》）（华盛顿特区国家生物医学研究基金会 (Natl.Biomed.Res.Found.，Washington，D.C.)）的模型，将该文献以引用方式并入本文。保守置换，如将一个氨基酸用另一具有相似性质的氨基酸进行交换，可以是优选的。

[0166] 变体多核苷酸和蛋白质还涵盖衍生自诱变和重组程序（如 DNA 改组）的序列和蛋白质。使用这样一种程序，可操纵一条或多条不同的编码序列以产生具有所需特性的新蛋白质。这样，从包含具有实质的序列同一性且可体外或体内同源重组的序列区的相关多核苷酸的群体产生了重组多核苷酸的文库。这种 DNA 改组的策略是本领域已知的。参见例如 Stemmer(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA（《美国科学院院刊》）91：10747-10751；Stemmer(1994)Nature（《自然》）370：389-391；Crameri 等人 (1997)Nat Biotech.（《自然生物技术》）15：436-438；Moore 等人 (1997)（《分子生物学杂志》）272：336-347；Zhang 等人 (1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA（《美国科学院院刊》）94：4504-4509；Crameri 等人 (1998) Nature（《自然》）391：288-291；以及美国专利 No.5,605,793 和 No.5,837,458。

[0167] 本文所公开的方法和组合物的非限制性例子如下：

[0168] 1. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子，其中所述基因组窗口长约 10cM；

[0169] 其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点具有不同的基因组插入位点；以及

[0170] 其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以

约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0171] 2. 实施例 1 的植物或种子，其中所述基因组窗口长约 5cM ；

[0172] 其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以

[0173] 约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0174] 3. 实施例 1 或 2 的植物或种子，其中 (a) 所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率独立地与所述目的基因组座位分离 ；或者，(b) 所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0175] 4. 实施例 1、2 或 3 的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中

[0176] (i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异 ；或者 (ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低 ；

[0177] 并且所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和

[0178] 第四重组位点，其中 (i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异 ；

[0179] 或者 (ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低。

[0180] 5. 实施例 1-4 中任一项的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 5cM 以内。

[0181] 6. 实施例 1-4 中任一项的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 2cM 以内。

[0182] 7. 实施例 1-4 中任一项的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 0.5cM 以内。

[0183] 8. 实施例 1-7 中任一项的植物或种子，其中所述基因组窗口还包含具有第五重组位点和第六重组位点的第三转基因靶位点，其中 (i) 所述第五和所述第六重组位点彼此相异 ；或者 (ii) 所述第五和所述第六重组位点彼此相异且相容性降低 ；

[0184] 并且所述第三转基因靶位点具有与所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位不同的基因组插入位点。

[0185] 9. 实施例 8 的植物或种子，其中所述第三转基因靶位点距所述目的基因组座位在约 5cM 以内。

[0186] 10. 实施例 1-9 中任一项的植物或种子，其中所述目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

[0187] 11. 实施例 1-10 中任一项的植物或种子，其中所述目的基因组座位包含转基因。

[0188] 12. 实施例 1-10 中任一项的植物或种子，其中所述目的基因组座位包含天然性状。

[0189] 13. 实施例 1-12 中任一项的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点包含至少一种目的多核苷酸。

[0190] 14. 实施例 1-12 中任一项的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含至少第二目的多核苷酸。

[0191] 15. 实施例 4 的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含与所述第一转基因靶位点相同的相异重组位点。

[0192] 16. 实施例 4 的植物或种子，其中所述第二转基因靶位点包含与所述第一转基因靶位点不同的相异重组位点。

[0193] 17. 实施例 4 的植物或种子，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 LOX 位点、突变型 LOX 位点、FRT 位点或突变型 FRT 位点。

[0194] 18. 实施例 17 的植物或种子，其中所述第一和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 FRT 位点或突变型 FRT 位点。

[0195] 19. 实施例 17 或 18 的植物或种子，其中所述突变型 FRT 位点包含 FRT5 位点、FRT6 位点、FRT7 位点、FRT12 位点或 FRT87 位点。

[0196] 20. 实施例 15 的植物或种子，其中所述第一和所述第二转基因靶位点的所述相异重组位点包含 FRT1 位点和 FRT87 位点。

[0197] 21. 实施例 1-20 中任一项的植物或种子，其中所述植物或种子是单子叶植物。

[0198] 22. 实施例 21 的植物或种子，其中所述单子叶植物是玉蜀黍、小麦、水稻、大麦、高粱或黑麦。

[0199] 23. 实施例 1-20 中任一项的植物或种子，其中所述植物或种子是双子叶植物。

[0200] 24. 实施例 23 的植物或种子，其中所述双子叶植物是大豆、芸苔、向日葵、棉花或苜蓿。

[0201] 25. 一种产生第二植物的方法，所述方法包括对第一植物或其部分应用植物育种技术，其中所述第一植物是实施例 1-24 中任一项的植物，并且其中应用所述技术导致产生所述第二植物。

[0202] 26. 实施例 25 的方法，其中当与所述第一植物比较时，所述第二植物在所述基因组窗口内包含至少一个另外的转基因靶位点或至少一个另外的目的基因组座位；其中所述另外的转基因靶位点和所述另外的目的基因组座位各自相对于彼此以及相对于所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

[0203] 27. 实施例 26 的方法，其中所述至少一个另外的转基因靶位点包含目的多核苷酸。

[0204] 28. 实施例 25 的方法，其中当与所述第一植物比较时，所述第二植物在所述基因组窗口内包含少至少一个转基因靶位点或少至少一个目的基因组座位。

[0205] 29. 一种在植物基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

[0206] (a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物，并且其中所述基因组窗口长约 10cM 且所述第一植物不包含第一目的基因组座位；(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点；以及，(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物；其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

[0207] 30. 一种在植物基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

[0208] (a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点和第二转基因靶位点的第一植物，其中所述基因组窗口长约 10cM，并且其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点具有不同的基因组插入位点，其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位；

[0209] (b) 将所述第一植物与第二植物进行育种，其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位，其中所述第二植物在所述基因组窗口中不包含所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点；以及，

[0210] (c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的子代植物；其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述第一目的基因组座位各具有不同的基因组插入位点；

[0211] 以及，

[0212] 其中所述子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0213] 31. 实施例 30 的方法，其中所述基因组窗口长约 5cM，并且其中所述子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 5％至 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0214] 32. 实施例 30 或 31 的方法，其中 (a) 所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点与所述第一目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率独立地分开；或者，(b) 所述子代植物的所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0215] 33. 实施例 30-32 中任一项的方法，其中所述方法还包括 (a) 将所述子代植物与包含第二目的基因组座位的第三植物进行育种，其中所述第三植物在所述基因组窗口中包含所述第二目的基因组座位，其中所述第三植物在所述基因组窗口中不包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位；以及 (b) 从步骤 (a) 选择包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位和所述第二目的基因组座位的第二子代植物；并且

[0216] 其中在所述第二子代植物中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位和所述第二目的基因组座位各具有不同的基因组插入位点；并且，

[0217] 其中所述第二子代植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位或所述第二目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0218] 34. 根据实施例 30-33 中任一项的方法，其中

[0219] (a) 所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中 (i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；或者 (ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；并且，

[0220] (b) 所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和第四重组位点，其中 (i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸；或者

[0221] (ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸。

[0222] 35. 实施例 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 5cM 以内。

[0223] 36. 实施例 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 2cM 以内。

[0224] 37. 实施例 30-34 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 0.5cM 以内。

[0225] 38. 实施例 30-31 中任一项的方法，其中所述第一目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

[0226] 39. 实施例 29-38 中任一项的方法，其中所述第一目的基因组座位包含天然性状、目的转基因或另外的转基因靶位点。

[0227] 40. 实施例 34 的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点包含相同的相异重组位点。

[0228] 41. 实施例 34 的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点包含不同的相异重组位点。

[0229] 42. 实施例 34、40 或 41 的方法，其中所述相异重组位点包含 LOX 位点、突变型 LOX 位点、FRT 位点或突变型 FRT 位点。

[0230] 43. 实施例 34、40 或 41 的方法，其中所述相异重组位点包含 FRT 位点或突变型 FRT 位点。

[0231] 44. 实施例 42 或 43 的方法，其中所述突变型 FRT 位点包含 FRT5 位点、FRT6 位点、FRT7 位点、FRT12 位点或 FRT87 位点。

[0232] 45. 实施例 34 的方法，其中所述第一和所述第二转基因靶位点包含 FRT1 位点和 FRT87 位点。

[0233] 46. 一种变更植物基因组中的复合性状基因座的方法，包括

[0234] (a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和第一目的基因组座位的第一植物，其中所述基因组窗口长约 10cM，并且其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点、所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点；

[0235] 其中所述第一植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开；

[0236] (b) 将所述第一植物与第二植物进行育种；

[0237] (c) 从步骤 (b) 选择子代植物，其中所述子代植物的所述基因组窗口不包含所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位中的任一者或任两者。

[0238] 47. 实施例 46 的方法，其中所述基因组窗口长约 5cM 并且其中所述第一植物中的所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点或所述第一目的基因组座位各以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开；

[0239] 48. 实施例 46 或 47 的方法，其中 (a) 所述第一植物的所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点以约 5％至约 0.1％的比率彼此独立地分开；或者，(b) 所述第一植物的所述第一转基因靶位点或所述第二转基因靶位点与所述第一目的基因组座位以约 5％至约 0.1％的比率独立地分开。

[0240] 49. 实施例 46、47 或 48 的方法，其中

[0241] (a) 所述第一转基因靶位点包含第一重组位点和第二重组位点，其中 (i) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；或者 (ii) 所述第一和所述第二重组位点彼此相异且相容性降低，并且所述第一转基因靶位点包含目的多核苷酸；并且，

[0242] (b) 所述第二转基因靶位点包含第三重组位点和第四重组位点，其中 (i) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸；或者

[0243] (ii) 所述第三和所述第四重组位点彼此相异且相容性降低；并且所述第二转基因靶位点还包含第二目的多核苷酸。

[0244] 51. 实施例 46-49 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 2cM 以内。

[0245] 52. 实施例 46-49 中任一项的方法，其中所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的基因组位置彼此相距在 0.5cM 以内。

[0246] 53. 实施例 46-49 中任一项的方法，其中所述目的基因组座位赋予包含雄性不育、位点特异性重组、非生物胁迫耐受性、变更的磷、变更的抗氧化剂、变更的脂肪酸、变更的必需氨基酸、变更的碳水化合物、除草剂耐受性、昆虫抗性或病害抗性的性状。

[0247] 54. 实施例 46-49 中任一项的方法，其中所述第一目的基因组座位包含天然性状、目的转基因或另外的转基因靶位点。

[0248] 55. 实施例 25-54 中任一项的方法，其中所述植物是单子叶植物。

[0249] 56. 实施例 55 的方法，其中所述单子叶植物是玉蜀黍、小麦、水稻、大麦、高粱或黑麦。

[0250] 57. 实施例 25-54 中任一项的方法，其中所述植物是双子叶植物。

[0251] 58. 实施例 57 的方法，其中所述双子叶植物是大豆、芸苔、向日葵、棉花或苜蓿。

[0252] 59. 一种产生植物、种子或植物细胞的文库的方法，其中所述文库中的所述植物、所述种子或所述植物细胞各包含转基因靶位点，所述方法包括：(a) 向植物细胞的群体中引入包含转基因靶位点的重组构建体；(b) 鉴别具有所述重组构建体的植物细胞或植物；(c) 表征所述重组构建体在步骤 (b) 的所述植物细胞或植物内的基因组插入位点；以及，(d) 集成所述植物、种子或植物细胞的文库，其中所述文库的每个成员包含具有不同基因组插入位点的转基因靶位点，并且当所述转基因靶位点组合进单个植物基因组中时，所述转基因靶位点彼此独立地分开。

[0253] 60. 实施例 59 的方法，其中步骤 (d) 的所述植物、种子或植物细胞的文库包含植物、种子或植物细胞的群体，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 10cM 至约 1cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

[0254] 61. 实施例 62 的方法，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 2cM 间隔具有所述转基因靶位点。

[0255] 62. 实施例 60 或 61 的方法，其中所述基因组窗口是整个基因组。

[0256] 63. 一种鉴别在基因组窗口中具有转基因靶位点的植物或植物细胞的方法，包括 (a) 提供植物、种子或植物细胞的文库，其中所述文库中的所述植物、所述种子或所述植物细胞各包含不同基因组插入位点中的转基因靶位点，其中所述文库的每个成员中的所述转

基因靶位点的所述基因组插入位点当存在于相同基因组中时彼此独立地分开；以及 (b) 鉴别所述文库中的植物、种子或植物细胞的亚群，其中所述亚群的每个成员中的所述转基因靶位点的所述基因组插入位点当存在于相同基因组中时以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0257] 64. 一种包含植物、种子或植物细胞的群体的植物、种子或植物细胞的文库，所述植物、种子或植物细胞具有稳定掺入进其基因组中的转基因靶位点，其中所述文库的每个成员中的所述转基因靶位点的基因组插入位点当存在于相同基因组中时彼此独立地分开，并且所述群体的成员在基因组窗口内以约 10cM 间隔至约 1cM 间隔具有所述转基因靶位点。

[0258] 65. 实施例 64 的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述基因组窗口包含完整的基因组。

[0259] 66. 实施例 64 的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述基因组窗口长约 10cM。

[0260] 67. 实施例 64、65 或 66 的植物、种子或植物细胞的文库，其中所述群体的成员在基因组窗口内以约 2cM 的间隔具有所述转基因靶位点。

[0261] 68. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子，其中所述基因组窗口：(a) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1160、UMC2224、NPI579B、PMCB1、IDP3917、GPM199C、IDP1425、MMP68、UMC2225、STD2C(DBA)、TIDP3300、CSU1171、SUT1 或 UMC1166，所述第二标记包含 AY107207、UMC1568、IDP3783、BNLG1429、IDP209、LTK1 或 IDP7169；或者

[0262] (b) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1625、UMC2196、UMC2312、BNLG1867、PZA03047、UMC1229、UCK1、RZ390D(CYB5)、MMP20、MMP10、MMP160、PHP20528、UMC2314、UAZ232B(SCI) 或 UMC2313，所述第二标记包含 CDO545、PHP20854、UMC1133、UFG69、MMP76、Y1、BNLG1422、MMP108B、MMP4、UMC1006 或 RZ444E；

[0263] 其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点各具有不同的基因组插入位点；并且，

[0264] 其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10％至约 0.1％的比率彼此独立地分开。

[0265] 69. 一种子代植物，所述子代植物从实施例 68 的植物获得。

[0266] 70. 实施例 68 的植物，所述植物还包含至少一种变更的靶序列，其中所述至少一种变更的靶序列起源于被双链断裂诱导剂识别和切割的对应靶序列，并且其中所述至少一种变更的靶序列位于所述基因组窗口中。

[0267] 71. 一种在植物基因组中产生复合性状基因座的方法，包括

[0268] (a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物，其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位，并且其中所述基因组窗口：(i) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1160、UMC2224、NPI579B、PMCB1、IDP3917、GPM199C、IDP1425、MMP68、UMC2225、STD2C(DBA)、TIDP3300、CSU1171、SUT1 或 UMC1166，所述第二标记包含 AY107207、UMC1568、IDP3783、BNLG1429、IDP209、LTK1 或 IDP7169；或者 (ii) 旁侧为至少第一标记和至少第二标记，所述第一标记包含 UMC1625、UMC2196、UMC2312、BNLG1867、PZA03047、UMC1229、UCK1、RZ390D(CYB5)、MMP20、MMP10、MMP160、PHP20528、UMC2314、UAZ232B(SCI) 或 UMC2313，所述第二标记包含 CDO545、PHP20854、UMC1133、UFG69、MMP76、

Y1、BNLG1422、MMP108B、MMP4、UMC1006 或 RZ444E ;

[0269] (b) 将所述第一植物与第二植物进行育种,其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点 ;以及,(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物 ;其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

[0270] 72. 一种在其基因组中具有包含至少第一转基因靶位点、第二转基因靶位点和目的基因组座位的基因组窗口的植物或种子,其中所述基因组窗口 :旁侧为至少第一标记和至少第二标记,所述第一标记包含 SATT613、SATT284、S60414-TB 或 SATT462,并且所述第二标记包含 SATT481、SATT156 或 SCT_010 ;

[0271] 其中所述目的基因组座位、所述第一转基因靶位点和所述第二转基因靶位点各具有不同的基因组插入位点 ;并且,其中所述第一转基因靶位点、所述第二转基因靶位点和所述目的基因组座位各以约 10%至约 0.1%的比率彼此独立地分开。

[0272] 73. 一种子代植物,所述子代植物从实施例 72 的植物获得。

[0273] 74. 实施例 72 的植物,所述植物还包含至少一种变更的靶序列,其中所述至少一种变更的靶序列起源于被双链断裂诱导剂识别和切割的对应靶序列,并且其中所述至少一种变更的靶序列位于所述基因组窗口中。

[0274] 75. 一种在植物的基因组中产生复合性状基因座的方法,包括

[0275] (a) 提供在基因组窗口内具有至少第一转基因靶位点的第一植物,其中所述第一植物不包含第一目的基因组座位,并且其中所述基因组窗口 :旁侧为至少第一标记和至少第二标记,所述第一标记包含 SATT613、SATT284、S60414-TB 或 SATT462,并且所述第二标记包含 SATT481、SATT156 或 SCT_010 ;(b) 将所述第一植物与第二植物进行育种,其中所述第二植物在所述基因组窗口中包含所述第一目的基因组座位并且所述第二植物不包含所述第一转基因靶位点 ;以及,(c) 从步骤 (b) 选择包含所述第一转基因靶位点和所述目的基因组座位的子代植物 ;其中在所述子代植物中所述第一转基因靶位点和所述第一目的基因组座位具有不同的基因组插入位点。

[0276] 以下实例以说明性方式而不是以限制性方式提供。

[0277] 实验

[0278] 实例 1

[0279] 包含用于位点特异性整合 (ssi) 的转基因靶位点的玉米文库的产生

[0280] 如下所述针对玉米开发了一种产生一大批转基因植物或者包含用于位点特异性重组 (SSI) 的多个转基因靶位点 (TTS) 中的任一者的植物、种子或植物细胞的“文库”的方法。

[0281] SSI 平台 II 载体的开发

[0282] 使用 Komari 等人,1996 中描述的原始共整合土壤杆菌双元系统的衍生构建体开发了用于玉米的土壤杆菌转化的载体。这些载体携带必要的分子元件以使得能基于来自酵母的 FLP/FRT 系统进行位点特异性整合 (SSI)。将具有 FRT 位点以利于重组酶介导的盒交换 (Recombinase Mediated Cassette Exchange, RMCE)(Seibler 和 Bode,1997) 的土壤杆菌构建体命名为 SSI 平台 II 载体。除了 FRT 位点,SSI 平台 II 载体的中间体包括多克

隆位点或用于Gateway®克隆的Invitrogen™ Gateway®目的位点以有效地引入供转化的性状基因（图2）。SSI平台II载体的另一特征是包括处于引入性状基因的区域的旁侧的loxP位点以允许在需要时利用cre/lox切除来移除性状基因。包括在SSI平台II载体中的元件允许在转基因靶位点（TTS）将新的基因或多个基因添加至现有的基因，包括例如采用FRT1和FRT87。如果将cre/lox切除与新基因的SSI引入联合使用，则可在转基因靶位点处对现有基因进行有效置换。SSI平台II载体可用于在转基因靶位点上设置值以及为修饰被认为具有高价值的转基因靶位点的基因内容提供的灵活性。

[0283] SSI平台II载体的一个通用特征是设置FRT位点，FRT位点建立了基因俘获构造（gene-trapping configuration）。FRT1位点设置在启动子（例如玉蜀黍泛素启动子UBIZMPRO，如图2中所示）与玉蜀黍密码子优化的草胺膦乙酰转移酶的编码区（MO-PAT，PHP35557，图2A）或磷酸甘露糖异构酶（PMI，PHP44290，图2B）选择标记基因之间。FRT87位点设置在SSI平台II载体的SSI区中的最后的选择标记基因的终止子序列（例如PIN II终止子（PINII TERM）或钙花叶病毒35S终止子（CAMV35S TERM），如图2A中所示）的下游（3′）。一些载体包含第二选择标记，如FRT1与FRT87之间的MO-PAT，其由水稻（Oryza sativa）肌动蛋白启动子（OS-ACTIN PRO，图2B）驱动。在引入未包括在靶位点中并且以与针对SSI平台II载体所述相同的方式含有处于编码序列上游的FRT1位点的具有无启动子选择标记基因的DNA序列后，重组插入恢复。该无启动子标记构建体（称为SSI供体构建体）通过基因枪方法引入进具有转基因靶位点的细胞中。在成功RMCE后，初始的靶位点标记（MO-PAT、PMI）不再表达，并且新引入的来自供体构建体的标记因为在FRT1处的重组和在基因俘获物上游捕获启动子而得以表达（参见美国专利No.7,102,055）。选择标记和可视标记二者均可用于该俘获物中以指示成功的位点特异性整合。

[0284] 在选择标记基因或处于左T-DNA边界（LB）区的基因周围包括FRT1位点和FRT87位点的构建体中间体在图2中示出。为了简洁起见仅示出了该构建体的T-DNA区。PHP35557是pSB11样载体（Komari等人，1996）的衍生物，其中在形成最终的共整合构建体之前添加性状基因。PHP44290是pSB1样中间体与pSB11样中间体（Komari等人，1996）之间的共整合产物，并且Invitrogen™ Gateway®目的位点被用于供经由Gateway®克隆进行基因引入的位点中（图2）。一种SSI平台II载体（PHP44556）的例子在图3中示出。产生了大量的相关构建体，所述构建体不同之处在于基因数目、基因活性、基因序列、启动子、转录终止元件、基因相对于彼此的取向以及基因在loxP位点之间的位置。将每个新的构建体用于制备多株玉米转化株（n = 20至100），每株转化株具有独特的转基因靶位点。基于SSI平台II的该转化工作的结果是玉米中的大量的转基因靶位点，其携带元件以有利于位点特异性整合和/或性状基因切除并因而具有供基因添加或基因置换的能力。

[0285] 玉米SSI文库的开发

[0286] 转基因植物的第一群体使用玉蜀黍近交系（Maize Inbred line1，MI1）生成并且涉及构建自SSI平台II的16种构建体。这些构建体全部在T-DNA区中与图2中所示的两个构建体中的一个或另一个相同，不同的是loxP位点之间的基因中的计划变异。

[0287] 通过如（Djukanovic等人，2006）中所述的改良的土壤杆菌介导的转化程序，用这些构建体转化玉米未成熟胚。从经灭菌的籽粒切取8到10天的胚并置于液体培养基（4.0g/

I N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/l2,4D、0.690g/l L- 脯氨酸、68.5g/l 蔗糖、36g/l 葡萄糖，pH5.2) 中。在收集胚后，将培养基替换为 1ml 的土壤杆菌悬浮液，该悬浮液的浓度为在 550nm 光学密度为 0.175-0.45。在室温下温育五分钟后，将胚悬浮液倾倒于装有 4.0g/l N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/l2,4D、0.690g/l L- 脯氨酸、30.0g/l 蔗糖、0.85mg/l 硝酸银、0.1nM 乙酰丁香酮、3.0g/l Gelrite，pH5.8 的板上。将胚于暗处 21℃下温育 3-5 天，然后在新的板上于暗处 28℃下温育 3-7 天，该新板装有 4.0g/l N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/l2,4D、0.690g/l L- 脯氨酸、30.0g/l 蔗糖、0.5g/l MES、0.85mg/l 硝酸银、100mg/l 羧苄青霉素、9.0g/l 琼脂，pH5.8。然后将胚转移至新的板上 3-4 周，该新板装有 4.0g/l N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/l2,4D、0.690g/l L- 脯氨酸、30.0g/l 蔗糖、0.5g/l MES、0.85mg/l 硝酸银、1.5mg/l 双丙氨磷、100mg/l 羧苄青霉素、6.0g/l 琼脂，pH5.8。在第一选择培养基上 3-4 周后，将胚在 4.0g/l N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/l2,4D、0.690g/l L- 脯氨酸、30.0g/l 蔗糖、0.5g/l MES、0.85mg/l 硝酸银、3mg/l 双丙氨磷 (用于 moPAT 选择)、100mg/l 羧苄青霉素、6.0g/l 琼脂，pH5.8 上每 2-4 周进行分培直至鉴定到转基因事件。通过将小的组织部分转移至成熟培养基上来诱导再生，该培养基含有 4.3g/l MS 盐 (Gibco11117 :纽约格兰德岛 (Grand Island，NY)，Gibco 公司)、5.0ml/l MS 维生素母液、100mg/l 肌醇、0.1μM ABA、0.5mg/l 玉米素、1mg/l IAA、60.0g/l 蔗糖、3.0mg/l 双丙氨磷、100mg/l 羧苄青霉素、6.0g/l 琼脂，pH5.6)。将板于暗处 28℃下温育二周。将体细胞胚转移至含有 4.3g/l MS 盐 (Gibco11117 :纽约格兰德岛 Gibco 公司)、5.0ml/l MS 维生素母液、100mg/L 肌醇、40.0g/l 蔗糖、3.0mg/l 双丙氨磷、6.0g/l 琼脂，pH5.6 的培养基上，并在人造光下于 28℃温育。一周后，将小植株移进装有相同培养基的玻璃管中并培养直至对它们进行采样和 / 或将它们移栽至土壤。

[0288] 在使用玉蜀黍近交系 1 和相对有限数目的具有可用的旁侧序列数据的插入物进行探索性工作后，选择另一种玉蜀黍近交系 (玉蜀黍近交系 2，MI2) 来继续和扩展该工作。因为相较于玉蜀黍近交系 1 有优越的遗传学特性以及相当的转化效率的组合而选取 MI2。大量的具有旁侧序列数据的玉蜀黍近交系 2 转基因靶位点的集合是主要的目标。用于开发该新转基因靶位点集合的构建体和分子方法类似于 MI1，但是转化方法有变动，尤其是在组织培养基的配方方面。用于 MI2 的组织培养方法可见于 Cho，M-J 等人，2011(US20110165561)，更多细节见于 Wu，X.E. 等人 (US20100192253)。类似的方法用于这两种玉蜀黍近交系以回收转基因植物至温室、采样和下游处理。

[0289] 针对 T-DNA 拷贝数以及针对转基因靶位点基因组旁侧序列对转基因植株 (靶株系) 进行分析。将实时定量 PCR(qPCR) 用于评估 T-DNA 的拷贝数。高品质的转基因靶位点定义为以单拷贝存在于转基因植物中的转基因靶位点以及不包括超出 T-DNA 左边界或右边界 (RB、LB) 的来自土壤杆菌载体的额外序列的转基因靶位点。针对每个构建体的 T-DNA 边界内的每个基因开发了一种特异性、独立的 qPCR 测定法。此外，将多个 qPCR 测定法用于检测土壤杆菌构建体在 T-DNA 边界之外的独特序列 (通常称为载体骨架序列)。如果根据

qPCR 分析 T-DNA 内的所有基因被评定为单拷贝并且未检测到载体骨架序列，则该转基因靶位点被描述为单拷贝转基因靶位点（单拷贝插入）。将具有单拷贝转基因靶位点的那些转基因植物继续在温室里培养并用于进一步分析。来自玉米 SSI 文库的每个独立的单拷贝转基因靶位点视为独特的实体和用于位点特异性整合的潜在候选物。

[0290] 将含有单拷贝 T-DNA 插入的转基因植物作为第一或第二代转基因植物进行采样供旁侧序列分析以便开始对转基因靶位点的进一步表征。从每株植物取多份叶样品并汇集以供 DNA 提取。通过使用 Omega Bioteck E-Z96 植物 DNA 试剂盒按照制造商的推荐提取 DNA。通过反向 PCR(IPCR) 或连接介导的巢式 PCR(LMnPCR)（图 4）进行旁侧序列分析，然后对 PCR 产物进行测序。对于这两种方法二者，设计位点特异性引物来扩增正好 T-DNA RB 和 LB 内侧。如果使用 IPCR，则用 4-8 种不同的在接近外侧引物结合位点的 T-DNA 序列中切割一次的限制酶消化基因组 DNA 样品。所述酶可在处于转基因靶位点之外但邻近转基因靶位点的基因组序列中的未知位点以及基因组中的许多其他位点切割一次。然后将在每个末端具有类似限制性切割的 DNA 片段置于连接反应中以获得自身连接而生成由 T-DNA 的一部分和一段基因组 DNA 组成的小 DNA 环。用在该小环的 T-DNA 序列的每个末端处设计的向外引物进行巢式 PCR。PCR 可扩增含有 T-DNA 的末端和转基因靶位点的邻接基因组序列（旁侧序列）的产物。将小体积的 PCR 产物用 ExoSAP 处理以清除剩余的引物和 dNTP，然后使用桑格法对净化的扩增子进行测序。如果使用 LMnPCR 方法，则将基因组 DNA 机械剪切成较小的片段并使用具有 3′ 至 5′ 外切核酸酶活性的 Klenow 片段将片段的末端转化为平末端。接着将片段通过在 3′ 末端添加 dA 尾来进行加工以防止平末端片段连接，并提供互补的悬突端供衔接子连接至片段。如果使用桑格法对扩增子进行测序，则将衔接子连接至片段上并用衔接子特异性引物和针对 T-DNA 边界序列设计的引物进行巢式 PCR。如果使用 Solexa 法对扩增子进行测序，则将索引衔接子 (indexed adapter) 连接至 DNA 片段的末端供混合扩增子测序 (pooled amplicon sequencing) 并使用 DNA 特异性芯片在 2100Bioanalyzer 上运行以检验产物的大小和浓度。通过仅使用其中在各个单独的碱基判定 (base call) 中置信度高的最佳质量的读出结果，将来自 Solexa 的序列结果进行去卷积、比较和评价。将完成的序列数据用于针对整个玉蜀黍基因组序列进行 BLAST 分析。该方法预测了转基因靶位点位于 10 个玉米染色体中哪个染色体上以及来自染色体的该区域的相关数据，如转基因靶序列供 SSI 的遗传位置和该位置处的标记。并不是全部样品都能够以该方式解析，但在第一轮分析后根据来自 T-DNA 边界中的至少一者的序列数据，全部样品的大约 70％能够被分配到给特定的染色体（表 1A 和 1B）。通过详细的 BLAST 分析，一部分转基因靶位点被预测为间断内源基因。间断内源基因的转基因靶位点被视为不期望的并弃去。将来自包含其余的转基因靶位点的事件的种子作为种子保持于可在需要时容易存取的集合中。给予该集合的初期名称为“插入位点文库”，其是指相对大量的经表征的样品、涵盖全部 10 个玉蜀黍染色体的转基因靶位点分布以及允许我们按需通达玉蜀黍基因组中的特定位点的后续的种子集合。

[0291] 表 1A：玉蜀黍近交系 1 的样品数目和旁侧序列结果

[0292]

样品描述（基于旁侧序列结果）	样品编号

提交供旁侧序列的单拷贝插入物	494
所获得的旁侧序列结果	477
分配给染色体的旁侧序列	329
预测间断内源基因的转基因靶位点	172
两个 T-DNA 边界均解析的样品	405
两个 T-DNA 边界均在重复序列中的样品	46

[0293] 表 1B：玉蜀黍近交系 2 的样品数目和旁侧序列结果

[0294]

样品描述	样品编号
提交供旁侧序列的品质插入物	1286
所获得的旁侧序列结果	1157
分配给染色体的旁侧序列	810
预测间断内源基因的转基因靶位点	420
两个 T-DNA 边界均解析的样品	347
两个 T-DNA 边界均在重复序列中的样品	81

[0295] 获得单拷贝转基因靶位点的旁侧序列数据以及能够通过种子集合回溯到转基因材料，是将它们推进到位点特异性整合工作和建立复合性状基因座的过程中的第一个步骤。通过相对快速的筛选对大量的转基因植物产生初始的旁侧序列数据。当 T-DNA 边界区之一未解析或者针对 RB 和 LB 的结果之间相冲突时，仍将该植物保留于该集合。如果对于一株植物未获得旁侧序列 (FS) 结果，则从该集合弃除该植物。当来自该文库的转基因靶位点被鉴别为处于玉蜀黍基因组中的目的区域（也称为目的基因组座位）中时，则培养该植物的种子使其发芽并再次提交样品供旁侧序列分析。一旦获得了初始旁侧序列的确认，就开始额外的工作，包括用以证实 qPCR 结果的 DNA 印迹分析和表征该位点的频率的 SSI 转化工作。如果供 SSI 的转基因靶位点通过了 DNA 印迹分析而确认存在单一完整拷贝的 T-DNA 且没有载体骨架，并且它被证明经历了 SSI，则它变成重组靶基因座 (RTL) 并赋予它独特的标识符。将 RTL 进一步用于基因表达和农艺学的表征。目前已经鉴定了超过 1000 个转基因靶位点，跨越全部玉蜀黍染色体。

[0296] 实例 2

[0297] 复合性状基因座 (CTL3A) 的制备

[0298] 在 1 号染色体上

[0299] 如下鉴定了在 1 号染色体上含有目的性状（性状 3A）的一个有价值的玉米基因组

区（称为复合性状基因座 3A(CTL3A ;图 5a)。

[0300] 目的性状的鉴定

[0301] 在测定转基因靶位点旁侧序列后根据序列同源性测定性状 3A 在 1 号染色体上的位置，然后通过作图数据验证。通过使用反向 PCR(IPCR) 获得转基因靶位点旁侧序列 (FS) 并使用桑格测序法对扩增的 DNA 产物进行测序。一旦获得序列，就使用 BLAST 算法将 FS 数据与玉蜀黍基因组序列进行匹配来将结果与玉蜀黍整个基因组序列进行比较。将玉蜀黍基因组序列装配成每个单独的染色体的子集序列，使得可将 BLAST 分析用于预测 FS 在染色体上的位置。根据 DNA 标记组 (marker set) 将玉蜀黍遗传图谱与染色体序列相关联，这使得能鉴定具体 FS 在染色体上的位置。最后，通过对转基因靶位点进行作图来验证最初利于生物信息学测定的性状 3A 插入的染色体和位置。

[0302] 包含位于目的性状附近的转基因靶位点 (TTS) 的转基因事件的鉴定

[0303] 为了在性状 3A 位置产生复合性状基因座，需要产生在玉米基因组上与性状 3A 在遗传上邻近的一个或多个独立的转基因座位。这些独立的转基因座位可然后通过育种或重转化来组合，并且可在后续的育种步骤中分离为单个基因座位（如图 1 中所述）。

[0304] 如实例 1 中所述将一组 8 个 SSI 平台 II 构建体用于产生玉蜀黍近交系 1(MI1) 转基因植株（含有独立的转基因座位）(表 1A)。对于 8 个构建体每一者产生了 50 至 100 株具有单拷贝 T-DNA 插入的转基因植物。将来自大多数这些转基因植物的叶样品提交进行旁侧序列分析，最终的结果组包括近 500 个转基因个体。在涉及 BLAST 算法的生物信息学分析（数据未显示）后，大约 67% (329/494) 的提交的转基因植物给出了可与十个玉蜀黍染色体之一相关联的序列结果。不能与玉蜀黍染色体相关联的那些结果要么是旁侧序列方法的失效样品，要么是序列结果仅包括在重复的基因组序列中的样品。每个构建体提供了供 SSI 的多个转基因靶位点，这些靶位点分布在 10 个玉米染色体每一者之上。

[0305] 图 5A 示出了在 1 号染色体上鉴定的接近两个目的转基因性状（性状 3A 和性状 3C) 的转基因靶位点。染色体上每个单独的三角形和条棒（单个边界）或三角形和条棒对（两个边界）指示独特的转基因靶位点。图 5A 示出了作图定位至 1 号染色体的 15 个转基因靶位点。主要使用生物信息方法将性状 3A 和性状 3C 的转基因靶位点作图定位至 1 号染色体。使用来自我们的大约 500 个在玉蜀黍近交系 1 中的 SSI 平台 II 插入（单独的转基因事件）的文库的旁侧序列结果，鉴定了 4 个独立的供位点特异性整合的转基因靶位点 (TTS-3A1、TTS-3A2、TTS-3A3、TTS-3A4)，所述转基因靶位点的位置可以十分接近（加或减大约 5 厘摩）性状 3A 基因座（也称为目的基因组座位），并且如果每个转基因靶位点的性质保证进一步的开发的话它们一起可构成复杂性状基因座 3A(CTL3A)。此外，使用归巢内切核酸酶技术和重组在该区域中产生了插入位点 (IS)(IS-3A5，也称为 MHP14，参见 2011 年 3 月 23 日提交的美国临时专利申请 No.61/466,602)。这些 TTS 或 IS(TTS3A1-TTS3A4 以及 IS3A5) 各可独立地使用或者与性状 3A 联合使用并且可通过与性状 3A 杂交而物理连锁。可将所得的复合性状基因座引入育种程序，从而充当单个基因座位。

[0306] 选取代表围绕性状 3A 的 4 个转基因靶位点的 4 个转基因事件用于后续工作，包括在复合性状基因座形成之前进行的额外的表征。对于代表 TTS-3A1 的转基因株系没有种子可用，而代表 TTS-3A3 和 TTS-3A4 的转基因株系被预测会间断内源基因，因此对于复合性状基因座的开发是不可取的并因而将其弃除。使用衍生自 SSI 平台 II 中间体的土壤杆菌载

体生成包含 TTS-3A2（也称为插入位点 98281928）的转基因株系，该中间体与 PHP35557（图 2）密切相关，不同的是其掺入有 Invitrogen™ Gateway® 目的位点供 Gateway® 克隆。

[0307] 表 2 示出了一大批标记、转基因靶位点和插入位点（TTS 和 IS 以灰色突出显示）的公共 IBM2 遗传图谱位置（IBM 遗传图谱数据可通过 MaizeGDB 网站获得）以及内部推导的单次减数分裂图谱（PHB）的图谱位置。PHB 为基于已经经历一轮减数分裂的群体（如 F_2）的遗传图谱，而 IBM2 图谱由多次减数分裂组成。TTS-3A6 也称为插入位点 148053664，TTS-3A7 也称为插入位点 152323453，TTS-3A8 也称为插入位点 154587278，TTS-3A9 也称为插入位点 153175440，TTS-3A10 也称为插入位点 148016489。

[0308] 表 2 显示性状 3A 插入存在于 bin1.02 中 IBM 位置 134.66 处。从 MI1 鉴定了转基因靶位点 TTS-3A2 和插入位点 IS-3A5，并从我们的 MI2 集合鉴定了额外的接近性状 3A 目的基因组座位的 5 个 TTS 位点（TTS-3A6、TTS-3A7、TTS-3A8、TTS-3A9、TTS-3A10）。将包含 TTS-3A7 的事件（表 2）之一作进一步的表征。

[0309] 表 2. 玉米 1 号染色体上的复合性状基因座 CTL-3A

[0310]

位点	IBM 位置	PHB 位置
UMC1160	108.3	44.1
UMC2224	110.9	45.2
NPI579B	112.2	45.9
PMCB1	115.2	46.6
TTS-3A2	116.2	49.6
TTS-3A6	116.9	50.4
IDP3917	117.0	
GPM199C	117.2	
TTS-3A7	119.5	51.0
TTS-3A8	119.5	51.0
IDP1425	119.7	
MMP68	123.6	51.5
UMC2225	124.7	52.0
STD2C(DBA)	125.3	
IS-3A5	125.3	52.1
TIDP3300	125.4	
CSU1171	127.3	53.2
SUT1	133.6	
UMC1166	133.6	
性状 3A	138.6	55.0

[0311]

位点	IBM 位置	PHB 位置
AY107207	139.4	
UMC1568	141.8	54.1
IDP3783	141.8	
TTS-3A9	142.1	58.0
TTS-3A10	142.5	59.1
BNLG1429	143.5	57.8
IDP209	146.0	58.1
LTK1	148.0	58.6
IDP7169	153.2	63.3

[0312] 图 6 示出了玉蜀黍物理图谱上与目的基因组窗口 (TRAIT3A) 和公共 BACS 相关的 CTL3A 复合性状基因座的转基因靶位点的示意图。

[0313] 包含 TTS-3A2 的转基因玉蜀黍事件中的位点特异性整合

[0314] 将代表 TTS-3A2 的转基因事件 (表 2 和图 6) 通过测试其位点特异性整合目的基因的能力来进行进一步评价。使用与直接邻接两侧的 FRT 位点的 T-DNA 序列同源的寡核苷酸引物,通过 PCR 扩增该事件的每个 FRT 位点 (FRT1 和 FRT87) 以及该转基因靶位点下游和上游的一些 DNA 序列。通过琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物。从凝胶上切取预测的 PCR 产物的具有预计大小的条带、提取、提交进行 DNA 测序并确认该 FRT 靶位点序列是完整的。该数据证实,使用 TTS-3A2 进行的 SSI 将不会被 FRT 位点妨碍,因为它们是完整的并且展示出预期的序列结果。

[0315] 将粒子轰击用作用于 SSI 转化的 DNA 递送方法。经由基因枪介导的转化将含有旁侧为 FRT 位点的目的序列的“供体质粒”递送进含有 TTS-3A2 的杂合未成熟胚中。从经灭菌的籽粒切取 9 至 11 日龄的未成熟胚 (尺寸为 1-1.5mm),并以其胚轴向下接种至含有 4.0g/l N6 基础盐 (Sigma C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (Sigma E-1511)、1.0mg/l 盐酸硫胺素、1.5mg/12,4-D、0.690g/l L- 脯氨酸、30g/l 蔗糖、0.85mg/l 硝酸银、3.0g/l Gelrite, pH5.8 的培养基并于 28℃下暗处温育 3 至 5 天,然后引入 DNA。在轰击前二至四小时,通过将胚置于含有 120gm 蔗糖的培养基上使胚发生质壁分离。

[0316] 通过将 50ng 的 PHP27064、10ng 的 PHP5096(UBI:FLPm)、25ng 的辅助质粒 PHP31729(OLE PRO:ODP2) 和 25ng 的辅助质粒 PHP21139(IN2PRO:WUS)(将该 DNA 溶液的体积调整至 40μl)、50μl 的 0.01mg/μl 的 1-μm 金粒子和 5μl TFX-50(Promega E1811/2) 混合使质粒 DNA 与金粒子结合 (图 7)。SSI 可仅使用 PHP27064 和 PHP5096 完成,但早前的实验 (数据未示出) 显示,将基因处于 PHP21139 和 PHP31729 上的质粒包括在内增加了 SSI 频率。这些另外的基因有助于刺激培养物中的细胞分裂并且可增强重组 (见美国专利公布 No.US20110165679A1)。让该粒子 / 质粒溶液轻轻地混合 10 分钟。然后将粒子和附连的 DNA 以 10,000rpm 离心 1 分钟,移除上清液并替换为 120μl 的 100% 乙醇。然后通过温和的超声处理使粒子重新悬浮,将 10μl 的粒子溶液点样于每个载体盘上并让 EtOH 蒸发。将巨载体 (macro carrier) 距离 450psi 破裂盘 (rupture disc)2.5cm 放置,未成熟胚放置在发射装置下 7.5cm 的搁架上。

[0317] 在轰击后从高蔗糖培养基上移走胚并重新放置于含有 30g/l 蔗糖的相同培养基上。将胚于 28℃下暗处温育 7 天,此时将胚移至含有 0.1778mg/l 草甘膦的上述培养基的选

择板。3 周后将胚分培至新鲜培养基 ;4 周后鉴定转基因事件。然后对在选择下生长的转基因事件观察黄色荧光蛋白阳性表型。以与上面给出的水平相同的水平使用草甘膦作为选择剂,使展现出荧光表型 (指示 RMCE) 的那些事件再生。对小植株进行采样和 / 或移植至土壤。

[0318] 预期的结果在图 8 中示出为具有 RMCE 的靶标。

[0319] 将一系列 qPCR 测定法用于指示已经发生了 SSI,包括检验最初存在于靶标和供体质粒中的 FRT 位点之间的每个基因的拷贝数,以及用于其他共轰击质粒的检测测定法。为了获得这些结果,使用一冲孔 (200ng) 的新鲜叶样品通过改良的碱性溶解方法 (Truett 等人,2000) 从再生植物的叶样品提取 DNA。对于实时定量 PCR(qPCR),使用专有的正向引物和反向引物以及对应的基于 FAM 的探针定量每种基因。对每个测定法进行引物滴定并相对于来自单拷贝天然序列的扩增信号进行归一化,所述扩增信号通过另一不同的引物组和基于 VIC 的探针来测量。用于测定 HT(除草剂耐受性) 基因、YFP 基因和 MO-PAT 基因的拷贝数的每个扩增反应与归一化基因在单个试管反应中同时运行。完成 qPCR 时,将所有的原始数据用于计算 dCT 值。拷贝数测定用如 ABI(加利福尼亚州福斯特城的应用生物系统公司 (Applied Biosystems,Foster City,CA)) 用户公告 #2 中所述的 Δ ΔCT 方法计算。根据 dCT 估计,对于 FLP、ODP2、WUS 以及两个重组接合测定法 (UBI-FRT1-HT、供体 -FRT87- 靶标) 产生终点阳性和阴性 qPCR 响应。比天然归一化序列晚运行 5 个周期的 qPCR 反应称为阴性。

[0320] 有大约 1400 个对插入 1 是杂合的未成熟胚,其用供体质粒 PHP27064 和具有 FLP 重组酶、ODP2 和 WUS 的 SSI 相关质粒进行共轰击 (图 7)。如上文所述将经轰击的胚转移至选择培养基,然后进行培养供愈伤组织生长。将在存在草甘膦时生长并且当在解剖显微镜下以适当的光源和滤镜观察时显示黄色荧光表型的愈伤组织进一步用于植物再生。将两个独立的具有这些性质的愈伤组织进一步进行再生,回收再生的植物,并将来自该植物的叶组织提交进行 qPCR。该组 qPCR 测定法运行包括这样的测定法,其跨越 FRT1 和 FRT87 重组酶位点并包括为了得到结果而针对靶标 (插入 2) 和供体序列二者进行设计的引物 (表 3)。关于 FRT1 和 FRT87 的阳性 (POS) 响应 (call) 指示已经发生 SSI。运行另外的测定法来评估 SSI 的质量。针对供体中的基因 (HT 和 YFP) 运行拷贝数测定法以确定是否随机插入了额外拷贝的供体质粒。出于相同的原因运行针对 ODP2、WUS 和 FLP 的测定法,最佳结果是对于 ODP2 和 FLP 是阴性的并且对于 WUS 是 1 个拷贝 (测定法可检测内源 WUS 基因)。最后的测定法是针对靶序列中的基因 PAT 的检测方法,PAT 应该因为位点特异性整合而已被移除。该分析的累积结果显示,在两个回收的愈伤组织中已发生了 SSI,并且共同轰击的质粒的不期望整合是不太可能的 (表 3)。可将 Southern 分析用于进一步的确认,但是 qPCR 分析是有价值的初始筛选。基于总的胚数目,TTS-3A2 所获得的 SSI 频率是 0.14%。

[0321] 表 3. 对由来自包含 TTS-3A2 的事件的两个草甘膦抗性、黄色荧光愈伤组织得到的再生植物的 qPCR 分析将该分析用于检测 SSI 和检测包括 PHP21139、PHP5096、PHP31729 和 PHP27064 在内的质粒的存在。

[0322]

愈伤组织编号	植物编号	YFP表型	FRT1	FRT87	HT拷贝	YFP拷贝	PAT	ODP2	WUS	FLP
1	1	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG
1	2	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG
1	3	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG
1	4	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG
1	5	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG
1	6	POS	POS	POS	1	1	NEG	NEG	1	NEG

[0323]

2	1	POS	POS	POS	0.5	0.5	NEG	NEG	1	NEG
2	2	POS	POS	POS	0.5	0.5	NEG	NEG	1	NEG
2	3	POS	POS	POS	0.7	0.6	NEG	NEG	1	NEG

[0324] POS＝阳性。NEG＝阴性。YFP＝黄色荧光蛋白(ZS-YellowlNI,Clontech)。HT＝除草剂耐受基因。ODP＝胚珠发育蛋白。WUS＝wuschel。FLP＝flp重组酶。

[0325] 总结上面的工作,使用衍生自SSI平台II载体中间体的构建体生成了含有TTS-3A2的转基因事件并称为IE-2。在转化过程期间使用qPCR分析将转基因靶位点表征为品质插入。将来自IE-2的叶样品提交进行旁侧序列分析。将所得的旁侧序列数据用于估计其在1号染色体上十分接近性状3的基因组位置。后面的作图数据确认了最初使用旁侧序列数据估计的1号染色体位置。通过确认完整的FRT位点序列对IE-2进行进一步表征以用于SSI转化实验。接着,开始SSI转化过程以确定从IE-2获得重组酶介导的盒交换(RMCE)的频率。从这些实验回收显示SSI的正确表型的转基因植株。通过使用多个qPCR测定法证实SSI,所述qPCR测定法显示具有HT和YFP基因的盒替代了mopat基因并且与供体质粒共同轰击的完整质粒未整合。

[0326] 产生含有复合性状基因座3A的转基因植物

[0327] 为了构建复合性状基因座3A,可将额外的性状基因插入进IE-2的TTS-3A2中。然后可将所得的在TTS-3A2中含有额外性状基因的转基因植物与含有性状3A的转基因事件杂交(或用其重转化)(如图1中所示)。可通过产生具有在基因捕获位置中的MO-PAT和处于标记基因下游的性状基因的供体质粒,然后重复上文详细描述的转化规程(不同的是双丙氨磷和麟丝菌素将替代草甘膦作为组织培养中的选择剂,并且qPCR测定法将匹配mo-pat基因),来完成在TTS-3A2添加性状基因。

[0328] 根据内部推导的单次减数分裂遗传图谱(PHB)预测TTS-3A2距离性状3A为3.6cM,从而指示有100％的机会在400个子代中找到至少1个重组体。已进行杂交来将TTS-3A2与性状3A连接。

[0329] 完成了另一转基因靶位点在相同区域并且位置更靠近性状3A的相关工作。该插入位点IS-3A5(也称为MHP14)通过大范围核酸酶辅助的同源重组(在2011年3月23日提交的美国临时专利申请No.61/466,602中描述)生成(图5A,表2)。根据内部推导的单次减数分裂遗传图谱(PHB)预测该位点距离性状3A不到2cM(表2)。用于物理连锁的育种方案应该可用于2个插入位点或目的基因组位点(转基因插入、天然性状、QTL's、单元型、目的染色体区等)中的任一者或这两者的组合(表4)。简而言之,通过使对于需要连锁的

实体而言纯合的两株植物进行异化传粉来产生 F1 植物。使 F1 籽粒萌发并通过 qPCR 或其他分子方法来筛选以证实二者均存在于 F1 中。当 F1 植物开花时，则将花粉从 F1 携带至非转基因受体植物或不携带要连锁的实体的株系。对来自该杂交的子代筛选携带两个实体的个体，它们应该在来自 F1 植物花粉形成期间发生的重组的该点连锁。然后使鉴定具有两个实体的个体自花授粉，对于在一起的这两个实体，子代将会以 1 ： 2 ： 1 分离 (1 个纯合 ： 2 个杂合 ： 1 无效 (null))。该最终的育种步骤的 1 ： 2 ： 1 分离比证实两个实体在单个遗传座位物理连锁。

[0330] 表 4 :选择连锁的转基因靶位点或其它实体的育种方案和连锁的确认

[0331]

代数	材料	遗传状态	育种步骤	结果
1	实体 1，实体 2	对于各一个基因座是纯合的	实体 1 X 实体 2	F1 (1, 2) 未连锁
2	F1，无实体株系	F1，对于两个基因座是杂合的	无实体 X F1 （雌株 X 雄株）	F2（1，2，1:2，无效） （1:2 连锁的）
3	F2	杂合的连锁筛选	F2 (1:2) 自花授粉	F3（1:2，无效）
4	F3	单个基因座实体 1：实体 2	无	1:2:1（1:2，无效) （纯合：半合：无效）

[0332] 代数＝植物代数。

[0333] 将包含 IS-3A5 和性状 3A 的种子在后续每周的栽培中栽培并让植物成熟至开花阶段。开花时，将具有 IS-3A5 的植物用作花粉源并与含有性状 3A 的转基因植物杂交，从而产生 CTL3 复合性状基因座。

[0334] 从这些杂交收获雌穗，干燥，并移出 F1 籽粒。种植 F1 籽粒，并通过 qPCR 将所得的植物作为籽苗进行筛选以确认两个转基因座位存在。在种植 IS-3A5/ 性状 3A 籽粒的同时，种植另一合适非转基因株系的籽粒以充当与该 F1 转基因株系杂交的雌株。在这些植物开花时，将来自 IS-3A5/ 性状 3A 转基因 F1 的花粉携带至非转基因株系的雌穗。处理来自这些杂交的饱满雌穗，并将所得的 F2 籽粒更大量种植于浅箱 (flat) 中以筛选 IS-3A5 与性状 3A 之间的重组体。该筛选是基于 qPCR 分析，其中两个测定法是 Trait3A 特异性的，一个测定法是 IS-3A5 特异性的。总共筛选了 813 株 F2 植株，从而导致 419 株仅对 CTL3A 是阳性的，387 株仅对 IS-3A5 是阳性的，7 株植物对两个转基因座位是阳性的。假设这 7 个双阳性株都是所预期的重组体，则频率为 0.9％，从而指示 IS-3A5 距离 CTL3A 大约 1cM。让这 7 株植物长大并自花授粉，其余的 F2 子代弃去。对这 7 株植物中 IS-3A5 与性状 3A 的连锁的确认包括对来自自花授粉的子代的分析。如果两个转基因座位在一个基因座连锁，则它们将以 1 个纯 ： 2 个杂合 ： 1 无效分离。取来自七株自花授粉的 F2 植物之一的子代的叶样品供 qPCR 分析。所述 qPCR 测定法中的两个 (MHP14HR1 和 CTL3A) 被设计用于仅检测扩增子序列而不是指示扩增子序列的拷贝数。两个另外的 qPCR 测定法 (MHP14IS 和 CTL3A 基因 3) 被开发用于指示扩增子的拷贝数（表 5)。IS-3A5 靶位点处的转基因插入不包括通过 qPCR 测定法进行的检测。如果插入不存在，则 qPCR 是阳性的，该基因座被指定为野生型 (wt)。MHP14IS 测定法是定量的，有 2 个野生型等位基因的结果指示 IS-3A5 转基因插入不存在。性状 3A GENE3 测定法被设计在 CTL3A 堆叠中的基因之一的开放阅读框序列中。其为定量

测定法，使得 2 拷贝响应 (call) 指示供体植物对于性状 3A 是纯合的，1 拷贝响则是杂合的。其他两个测定法 (MHP14HR1 和性状 3A) 不指示插入拷贝的数目，但支持具有针对相关元件的阳性 / 阴性指示的拷贝数响应。例如，两个转基因等位基因的纯合植物将具有 0 个野生型拷贝的 MHP14IS，对于 MHP14HR1 的存在是阳性的，含有两个拷贝的性状 3A GENE3，并且对于针对 CTL3A 插入的不同额外测定法将会是阳性的 (表 5)。总之，分析证明存在 8 个纯合 :16 个杂合 :7 个无效，这与两个转基因在单个遗传座位处连锁的预期结果相符合。这证实了我们有能力将两个基因座连锁进 1 号染色体上的单个性状基因座中并产生复合性状基因座 3A。

[0335] 表 5 :对来自具有两个转基因座位 IS-3A5(MHP14) 和 CTL3A 的单株 F2 植物的自花授粉的子代的 qPCR 分析

[0336]

植物数目	MHP14IS	MHP14IS 响应	MHP14HR1	CTL3A GENE3	CTL3A
8	0	无野生型等位基因	阳性	2 个拷贝	阳性
16	1	1 个野生型等位基因	阳性	1 个拷贝	阳性
7	2	2 个野生型等位基因	阴性	阴性	阴性

[0337] 实例 3

[0338] VI 号染色体上的复合性状基因座 (CTL6A) 的产生

[0339] 如下鉴定了在 VI 号染色体上含有目的性状 (性状 6A) 的另一有价值的玉米基因组区，称为复合性状基因座 6A(CTL6A ;图 5b)。

[0340] 目的性状的鉴定

[0341] 仅根据在近交转变和性状整合过程期间获得的性状作图数据确定性状 6A 在 VI 号染色体上的遗传图谱位置。

[0342] 包含位于目的性状附近的 SSi 靶位点的转基因事件的鉴定

[0343] 为了在性状 6A 位置产生复合性状基因座，需要产生在玉米基因组上与性状 6A 在遗传上邻近的一个或多个独立的转基因座位。这些独立的转基因座位可然后通过育种或重转化来组合并且可在后续的育种步骤中分离为单个基因座位 (如图 1 中所述)。

[0344] 对来自玉蜀黍近交系 1(MI1) 的转基因插入的旁侧序列数据进行的初始筛选导致鉴定了性状 6A 附近的四个转基因靶位点 (TTS-6A1、TTS-6A2、TTS-6A3、TTS-6A4)(图 5B)。横跨染色体的条棒指示独特的插入位点并且代表复合性状基因座 6A(CTL6A) 的潜在成员。这 4 个 TTS 各可独立地使用或者可与性状 6A 联合使用并通过与性状 6A 杂交而物理连锁。从含有 TTS-6A3 位点 (图 5B，箭头) 的转基因事件 (称为 IE-7) 和含有 TTS-6A4(图 5B，箭头) 的转基因事件 (称为 IE-8) 获得种子。IE-8 由于在 Southern 分析中存在额外的条带而被弃去。TTS-6A3 也称为 97757511，TTS-6A4 也称为 97757502。

[0345] 将遗传图谱位置与物理图谱联合使用来鉴定预计距性状 6A 任一侧在 5cM 内的 MI2 插入位点 (图 9)。玉蜀黍遗传图谱有利于将染色体序列与 DNA 标记组相关联。

[0346] 表 6A 示出了一大批标记和转基因靶位点 (插入位点 ;TTS 以灰色突出显示) 的公

共IBM2遗传图谱位置(IBM遗传图谱数据可通过MaizeGDB网站获得)以及内部推导的单次减数分裂图谱(PHB)的图谱位置。PHB为基于已经经历一轮减数分裂的群体(如F_2)的遗传图谱,而IBM2图谱由多次减数分裂组成。TTS-6A5也称为插入位点145401580,TTS-6A6也称为插入位点124537396,TTS-6A7也称为插入位点148174073,TTS-6A8也称为插入位点145401461,TTS-6A9也称为插入位点148304686,TTS-6A10也称为插入位点147136301,TTS-6A11也称为插入位点145403827,TTS-6A12也称为插入位点145403004,TTS-6A13也称为插入位点149743000,TTS-6A14也称为插入位点148293657。

[0347] 表6A显示性状6A插入存在于IBM位置113.62、PHB位置23.70处。从MI1鉴定了转基因靶位点TTS-6A3,并且从我们的MI2集合鉴定了额外的接近性状6A目的基因组座位的10个TTS位点(TTS-6A5、TTS-6A6、TTS-6A7、TTS-6A8、TTS-6A9、TTS-6A10、TTS-6A11、TTS-6A12、TTS-6A13和TTS-6A14)。

[0348] 表6A. 玉米6号染色体上的复合性状基因座CTL-6A

[0349]

位点	IBM位置	PHB位置
UMC1625	86.20	16.72
TTS-6A5	76.75	18.40
TTS-6A6	77.15	18.50
UMC2196	86.40	18.73
TTS-6A7	91.03	19.90
UMC2312	75.80	21.38
BNLG1867	78.30	21.49
PZA03047	84.50	21.68
UMC1229	80.70	22.30
UCK1	96.00	22.76
RZ390D(CYB5)	85.50	22.79
MMP20	105.90	22.80
MMP10	110.40	22.83
MMP160	101.90	22.86
PHP20528	85.50	23.04
UMC2314	99.30	23.10
UAZ232B(SCI)	100.30	23.38
UMC2313	91.90	23.56
TTS-6A8	112.25	23.60
TTS-6A9	113.62	23.70
TRAIT 6A		23.70
CDO545	86.90	24.72
PHP20854	87.70	24.72
UMC1133	98.60	24.72
UFG69	104.80	24.72
TTS-6A10	114.92	23.80
TTS-6A11	114.92	23.80

[0350]

位点	IBM 位置	PHB 位置
TTS-6A12	119.31	24.90
TTS-6A13	119.53	25.00
MMP76	103.80	25.03
TTS-6A14	120.43	25.50
TTS-6A3	122.77	26.30
Y1	120.50	26.81
BNLG1422	121.10	26.87
MMP108B	118.30	26.93
MMP4	116.20	27.18
UMC1006	125.00	27.94
RZ444E	123.70	31.76

[0351] 图 9 示出了与玉蜀黍的玉蜀黍物理图谱上的公共 BACS 相关的 CTL6 复合性状基因座的插入位点 TTS 的位置。

[0352] 表 6B：在构成 CTL6A 的不同基因座处的成功位点特异性整合的确认“是”指示靶位点基因座被证实能够进行位点特异性整合。

[0353]

位点	IBM 位置	PHB 位置	SSI 确认
TTS-6A5	76.75	18.4	是
TTS-6A6	77.15	18.5	是
TTS-6A7	91.03	19.9	是
TTS-6A8	112.25	23.6	是
TTS-6A9	113.62	23.7	是
TTS-6A10	114.92	23.8	是
TTS-6A11	114.92	23.8	是
TTS-6A12	119.31	24.9	是
TTS-6A13	119.53	25	是
TTS-6A14	120.43	25.5	是

[0354] 转基因靶事件 TTS-6A3 中的位点特异性整合

[0355] 将代表 TTS-6A3 的转基因事件（图 5B 和表 6A）通过测试其位点特异性整合的能力来进一步评价。将 FRT 位点首先如此前所述进行序列验证并确认是完整的。将粒子轰击用作 DNA 递送方法，并将相同的供体质粒 PHP27064（含有 FRT1 和 FRT87）递送进含有供 SSI 的 TTS-6A3 的杂合未成熟胚中。用于进行 SSI 的方法与实例 2 中所述的方法相同。此

外，将与为实例 2 所列的那些 qPCR 测定法相似的一系列 qPCR 用于指示 SSI 已经发生。这些测定法包括检验每个在 FRT 位点之间的最初存在于靶标质粒中的基因 (MO-PAT) 和供体质粒中的基因 (HT，YFP) 的拷贝数，以及用于其他共轰击质粒 (flp、zm-odp2、zm-wus) 的检测测定法。对跨越 FRT 位点的新形成的重组靶基因座特异性的测定法是确定已发生 SSI 的关键。用于实时定量 PCR 分析的方法与为实例 2 所列的那些方法相同。

[0356] 有大约 4500 个对 TTS-6A3 是杂合的未成熟胚，其用供体质粒 PHP27064 和具有 FLP 重组酶、ODP2 和 WUS 的 SSI 相关质粒进行共轰击 (图 7)。如上文所述将经轰击的胚转移至具有草甘膦的选择培养基，然后进行培养供愈伤组织生长。将在存在草甘膦时生长并且当在解剖显微镜下以适当的光源和滤镜观察时显示黄色荧光表型的愈伤组织进一步用于植物再生。我们同时对来自 TTS-6A3 和 TTS-6A4 二者的材料进行共同处理 (表 7) 并观察 YFP 表型中的一些差异，其中来自所有的来自 TTS-6A3 的愈伤组织事件的 YFP 均匀且相对较强，但在 TTS-6A4 转基因愈伤组织中较弱且斑驳 (表 7)。将显著数目的具有所需表型的独立转基因愈伤组织进一步用于再生并回收再生的植物。通过 qPCR 分析对来自植物的叶组织进行分析而显示 SSi 已经实现并且通常在不存在具有 flp、zm-wus 和 zm-odp2 的辅助质粒的整合的情况下 (表 8)。在最终的分析中，弃除了一些额外的 SSI 转基因，尽管这些愈伤组织显示出所需的表型。像第 6 号事件的一些事件显示出 SSI，但也显示出额外的 PHP27064 和 PHP31729 的整合。仅来看干净的 SSI 事件 (包括第 1-2、4、7 和 9 号事件)，根据 TTS-6A3 基因座中起始的胚数目，我们能够实现 0.11％的 SSI 转化频率。将这 5 个独立的 RMCE 事件回收至温室并结籽，并计划额外的分子分析。

[0357] 表 7 :通过粒子轰击进行的 SSI 转化

[0358]

靶标	供体	外植体 (编号)	RMCE(编号)	频率	YFP
TTS-6A3	PHP27064	4498	9	0.21％	高，均匀
TTS-6A4	PHP27064	3118	19	0.60％	低，斑驳

[0359] 表 8. 对由来自含有 TTS-6A3 靶位点的未成熟胚的草甘膦抗性黄色荧光愈伤组织得到的再生植物的 qPCR 分析将针对位点特异性整合的转化方法用于引入 PHP27064。将 qPCR 分析用于检测 SSI 和检测包括 PHP21139、PHP5096、PHP31729 和 PHP27064 在内的质粒的存在。

[0360]

愈伤组织事件	植物（编号）	FRT1，FRT87	供体(HT, yfp)	靶标(mopat)	额外的基因(odp2, wus, flp)
1	10	10/10	10/10 单拷贝	10/10 NEG	10/10 NEG
2	5	5/5	5/5 单拷贝	5/5 NEG	5/5 NEG
3	9	9/9	9/9 单拷贝	9/9 POS	9/9 POS
4	1	1/1	1/1 单拷贝	1/1 NEG	1/1 NEG
5	2	2/2	2/2 多拷贝	2/2 POS	2/2 POS (wus)
6	8	8/8	8/8 多拷贝	8/8 NEG	8/8 POS (odp2)
7	3	3/3	3/3 单拷贝	3/3 NEG	3/3 NEG
8	2	0/2	2/2 多拷贝	2/2 NEG	2/2 NEG
9	8	8/8	8/8 单拷贝	8/8 NEG	8/8 NEG

[0361] POS = qPCR 检测阳性。NEG = qPCR 检测阴性。YFP =黄色荧光蛋白 (ZS-Yellow1 NI,Clontech)DNA 序列。HT =除草剂耐受基因。odp2 =玉蜀黍胚珠发育蛋白 2 序列。wus =玉蜀黍 wuschel 序列。FLP =酵母 flp 重组酶序列。

[0362] 概括地说，使用 SSI 平台 II 构建体 (PHP36678) 生成 TTS-6A3，该构建体与实例 2 中所用的构建体 (PHP36680) 差别仅在于包括不同的性状基因。选择该转基因靶位点是因为在转化过程期间使用 qPCR 分析该靶位点被表征为单拷贝 T-DNA 插入。将来自第一代 IE-7 转基因植株的叶样品提交进行旁侧序列分析，并将所得的旁侧序列数据用于评估十分接近 VI 号染色体上的性状 6A 的 TTS-6A3 的基因组位置。后面的作图数据确认了最初使用旁侧序列数据估计的 6 号染色体位置。接着使用 PHP27064 表征了 IE7 的 SSI 转化频率，基于初始的 qPCR 分析显示了 0.11％的 RMCE 频率。

[0363] 产生含有复合性状基因座 6A(CTL6A) 的转基因植物

[0364] 构建复合性状基因座 6A 涉及到用在 VI 号染色体上的适当区域包含各种性状基因的事件与包含转基因靶位点的转基因植物杂交或对其进行重转化（如图 1 中所示）。我们从玉蜀黍近交株系 1 和玉蜀黍近交株系 2 鉴定了经预测位于与性状 6A 相同的区域的多个转基因靶位点候选（图 5B)。如果未制得对特定区域而言具有所需性状基因的这些插入，则可经由 SSI 插入所需的基因，如在 1 号染色体上对 TTS-6A2 以及在 6 号染色体上对 TTS-6A3 所示范的。一旦插入了所需的基因，则必须进行重组以使转基因插入位点物理连锁。我们首先在开花期间利用减数分裂重组来获得 TTS-6A3 与性状 6A 之间的连锁。

[0365] 根据内部推导的单次减数分裂图谱 (PHB) 预测 TTS-6A3 距离性状 6A 为 2.6cM，因而可预测将有近 100％的机会在 500 个子代中找到 5 个重组体。用于物理连锁的育种方案应该可用于 2 个插入位点或目的基因组位点（转基因插入、天然性状、QTL's、单元型、目的染色体区等）中的任一者或这两者的组合（表 3)。该涉及性状 6A 和 TTS-6A3 的工作基本上与上面实例 2 中所述的工作相同。

[0366] 将包含性状 6A 基因座和 TTS-6A3 的种子在后续每周的栽培中栽培并让植物成熟至开花阶段。在该工作中我们使用了 qPCR 拷贝数分析来从分离群体鉴定纯合的个体。在开花时，将 TTS-6A3 纯合的植物用作具有性状 6A 基因座的植物的花粉源。从这些杂交收获雌穗，干燥，并移出 F1 籽粒。种植 F1 籽粒并通过 qPCR 将所得的植物作为籽苗进行筛选以确认两个转基因座位的存在。使两个纯合转基因株系杂交确保了每个 F1 子代具有两种转基因插入。将 F1 TTS-6A3/ 性状 6A 籽粒与另一合适的非转基因株系的籽粒一起种植以充当

杂交授粉中的雌株。当植物已发育至开花阶段时，将转基因花粉携带至该非转基因受体株系。将来自这些杂交的 F2 籽粒更大量种植于浅箱中以筛选 TTS-6A3 与性状 6A 之间的重组体。将双除草剂筛选用于选择具有草甘膦和双丙氨磷两种抗性的植物。当籽苗仅大约萌发后 10 天时首先施加双丙氨磷。在萌发后大约 3 周，施加草甘膦。双抗性植物会被进行盆栽以供回收并自花授粉以演示两个转基因性状的连锁。完成了两个独立的测试，该测试涉及萌发 500 粒籽粒供双除草剂处理。在第一组 500 粒中，我们鉴定了 5 个双抗性个体。第二组 500 粒仅产生了 2 个双抗性个体。将对双丙氨磷和草甘膦二者具有抗性的所有植物培养至开花并自花授粉。对于这两种除草剂抗性转基因，这些杂交的子代将以 1 个纯合 :2 个杂合 :1 个无效的比率分离。针对该分离对一小组进行了分析，结果包括在表 9 中。总之，该分析证明这两个转基因作为单个遗传基因座分离。这证实了我们能够将两个基因座 TTS-6A3 和性状 6A 连锁进染色体 6 上的单个性状基因座中以产生 CTL6A。

[0367] 表 9 :对由对于 Round Up® 和 Liberty® 两种除草剂有抗性的单独 F2 植物的自花授粉得到的子代进行的接合性 qPCR 分析

[0368]

F2 植物	种子编号	纯合	杂合	无效	Chi^2
1	40047413	6	17	9	0.68
2	40047414	4	20	8	3.00
3	40047431	5	18	7	1.46

[0369] 复合性状基因座 6A (CTL6A) 的另外的开发

[0370] 在初始测定插入位点旁侧序列和 FRT 位点序列后，将表 6A 中所列的 CTL6A 的全部转基因靶位点进一步用于 SSI 转化工作。重复提交样品来验证旁侧序列通常导致初始的结果得到验证（数据未示出）。有时候第二轮旁侧序列分析得到比初始更好质量的序列数据。对于这些株系每一者完成种子繁殖 (seed increase) 以利于在第三代进行额外的测试。使第三代籽苗长大供另外的采样和分析，分析包括 qPCR、Southern 分析和表达的 ELISA 分析（图 10）。收集样品并用定量 ELISA 分析进行分析以表征每个插入位点处的表达性质。可测试大量的样品，因为这些是在浅箱中生长的幼小植物（大约 V3/V4）。图 10 中的数据显示在多个独立的插入位点 GENE 1、GENE2 和 PAT 的 ELISA 水平是类似的，第一个事件除外，其显示具有重排的 T-DNA 右边界 (RB) 区。随后的旁侧序列分析指出了第一转基因群体的插入的问题。在采集大的叶样品供高质量基因组 DNA 提取和 Southern 分析后将成熟的籽苗处死。如下文所述在表 6B 中列出的所有靶位点 (TTS6A5-TTS6A14) 处发生了位点特异性整合。

[0371] 靶位点 TTS6A5-TTS6A14（表 6B）的位点特异性整合

[0372] 通过测试作为 CTL6A 的部分的许多基因座的位点特异性整合 (SSI) 的能力对这些基因座进行进一步表征，包括 TTS-6A5、TTS-6A6、TTS-6A7、TTS-6A8、TTS-6A9、TTS-6A10、TTS-6A11、TTS-6A12、TTS-6A13 和 TTS-6A14。使用实例 1 中描述的位点特异性整合方法，将命名为 PHP46438 的构建体独立地引入进这些基因座每一者中。PHP46438 与 PHP27064（图 7）类似，不同的是其含有无启动子 NPTII 作为该构建体中的第一个基因和由玉蜀黍泛素启动子表达的组成型 AM-CYAN1 基因作为第二个基因。针对在这 10 个基因座每一者处的 PHP46438 插入回收多个独立的候选，从每个候选再生 T0 转基因植物，将实时 qPCR 分析用于

鉴定其中已发生 RMCE 的事件。然后将具有最佳 qPCR 谱的植物回收至温室，将其培养至成熟，并让其结籽。将下一代 (T1) 的种子在浅箱中培养并通过实时 qPCR 进行分析以表征转基因分离来确认孟德尔遗传以及鉴定纯合供种子繁殖。对转基因阳性个体进行采样供进一步的分子分析，包括 Southern 分析、测序和 ELISA 表征。这些分析进一步确认了在 CTL6A 的全部基因座处的成功 RMCE 和位点特异性整合。

[0373] 实例 4

[0374] 包含用于位点特异性整合 (ssi) 的转基因靶位点的大豆文库的产生

[0375] 对于大豆已开发了生成包含各种转基因靶位点 (TTS) 的转基因植物、种子或植物细胞的方法，所述转基因植物、种子或植物细胞具有精确的转基因整合供位点特异性整合 (SSI)。通过基因枪轰击方法产生转基因靶事件并通过对旁侧基因组 DNA 边界进行测序来评价转基因整合。

[0376] SSI 靶载体的开发

[0377] 靶 DNA 构建体 QC599 按照标准的分子克隆程序修饰自以前的 SSI 靶 DNA QC288(Li 等人，Plant Physiol.(《植物生理学》)151 :1087-1095，2009)。QC599 携带相同的一对相异重组位点 FRT1 和 FRT87 以使得能使用酵母 FLP/FRT 系统进行后续的位点特异性整合 (SSI) 转化。将大豆 S- 腺苷甲硫氨酸合成酶启动子 GM-SAMS PRO(美国专利 No.7217858B2) 用于驱动潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 基因的表达供大豆转化选择。将开放读框终止密码子序列 ORFSTOP-B(SEQ ID NO :12) 和 ORFSTOP-A(SEQ IS NO :13) 添加至 QC599 的表达盒末端，以防止在 QC599A 靶基因整合进大豆基因组中时产生任何潜在的开放阅读框 (图 11)。通过 AscI 限制酶消化从构建体 QC599 释放用于基因枪轰击转化的靶 DNA 片段 QC599A，并用 DNA 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN®，加利福尼亚州瓦伦西亚市 (Valencia，CA)) 从琼脂糖凝胶纯化。

[0378] 将 FRT1 位点设置在 SAMS 启动子与 HPT 编码区之间以建立基因捕获构造。将 FRT87 位点设置在 NOS 终止子的下游和刚好在靶基因盒 3′ 端的 ORFSTOP-A 之前。在于图 12 中图示描述的 SSI 转化期间，通过基因枪轰击将 SSI 供体 DNA 引入进含有该转基因靶序列的细胞中，所述 SSI 供体 DNA 含有旁侧为相同的相异 FRT1 和 FRT87 位点的无启动子标记基因加上任何性状基因如青色荧光蛋白基因 CFP。供体和靶 DNA 的对应 FRT1 和 FRT87 重组位点之间的 DNA 重组将导致在 FLP 重组酶的存在下发生供体和靶 DNA 之间的盒交换，即在成功的 RMCE(重组酶介导的盒交换) 中旁侧为 FRT1 和 FRT87 位点的每个组分在供体和靶 DNA 之间交换。因此，初始的靶选择标记基因 HPT 被替换为新引入的来自供体的选择标记基因 HRA(突变的乙酰乳酸合成酶) 以使得该 RMCE 事件能耐受氯磺隆。靶基因 5′ 端上的 ORFSTOP-B、SAMS 启动子和靶基因 3′ 端上的 ORFSTOP-A 被固定在靶位点并且不能通过 RMCE 置换。

[0379] 通过基因枪转化开发 SSI 转基因靶事件

[0380] 如下文所详细描述，通过基因枪轰击方法 (Klein 等人，Nature(《自然》)327 :70-73(1987) ；美国专利 No.4,945,050) 将纯化的 QC599A DNA 片段转化至 Pioneer 精选大豆栽培种以产生转基因靶事件，通过分子测定法和序列分析将会从该事件鉴定到所需的 SSI 靶位点。

[0381] 从表面灭菌的未成熟种子解剖出大豆子叶 (长约 3mm) 并在 Murashige 和

Skoog(MS) 培养基上于 26℃下在光照中培养 6-10 周，该培养基含有 0.7％琼脂并且补充有 10mg/ml 2,4-D(2,4- 二氯苯氧乙酸）。然后切离球形阶段体细胞胚（其产生次生胚）并放置进装有补充有 2,4-D(10mg/ml) 的液体 MS 培养基的烧瓶中，并在旋转振荡器上在光照中培养。在重复选择增殖为早期球形期胚的体细胞胚簇后，将该大豆胚发生悬浮培养物于 26℃下维持在 150rpm 的旋转振荡器上的 35ml 液体培养基中，采用荧光灯按照 16 ： 8 小时白天 / 黑夜方案。每两周通过将大约 35mg 组织接种进 35mL 相同的新鲜液体 MS 培养基中，对培养物进行分培。

[0382] 然后使用 DuPont Biolistic™PDS1000/HE 仪（加利福尼亚州赫尔克里市的伯乐实验室公司 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)）通过粒子枪轰击方法对大豆胚发生悬浮培养物进行转化。向 50μL 的 60mg/ml 1.0mm 金粒子悬浮液添加（按顺序）:30μl 的 30ng/μl QC599A DNA 片段、20μl 的 0.1M 亚精胺和 25μl 的 5M $CaCl_2$。然后将粒子制备物搅动 3 分钟，在离心机中离心 10 秒，移除上清液。然后将 DNA 包被的粒子在 400μl 100％乙醇中洗涤一次并重新悬浮于 45μl 的 100％乙醇中。将 DNA/ 粒子悬浮液超声处理三次，每次一秒。然后将 5μL 的 DNA 包被的金粒子加载至每个巨载体盘上。

[0383] 将大约 300-400mg 两周龄悬浮培养物置于空的 60×15mm 培养皿中，用移液管将残余液体从组织移除。对于每次转化实验，轰击大约 5 至 10 个组织平板。将膜破裂压力设定为 1100psi，将腔室抽至 28 英寸汞柱的真空。将组织距离阻滞屏 (retaining screen) 大约 3.5 英寸放置，轰击一次。轰击后，将组织一分为二并放回到液体培养基中如上所述进行培养。

[0384] 轰击后五至七天，将该液体培养基更换为含有 30μg/ml 潮霉素 B 作为选择剂的新鲜培养基。该选择性培养基每周更换。轰击后七至八周，观察到绿色的转化组织从未转化的坏死的胚发生簇长出来。移出分离的绿色组织并接种进单独的烧瓶中以产生新的、无性繁殖的、转化的胚发生悬浮培养物。将每个无性繁殖培养物作为独立的转化事件对待，并在补充有 2,4-D(10mg/ml) 和 30μg/ml 潮霉素 B 选择剂的相同液体 MS 培养基中分培以增加质量。然后将胚发生悬浮液转移至未补充 2,4-D 的琼脂固体 MS 培养基平板以允许体细胞胚发育。在该阶段采集每个事件的样品供定量 PCR 分析。

[0385] 将子叶阶段体细胞胚弄干（通过将它们转移进处于 10cM 培养皿之上的空的小培养皿中来弄干，该 10cM 培养皿装有一些琼脂凝胶以允许缓慢干燥）来模拟大豆种子发育的最后阶段。将干燥的胚置于萌发固体培养基上并再生转基因大豆小植株。然后将转基因植株转移至土壤并维持在生长室中进行种子产生。

[0386] SSI 转基因靶位点的鉴定

[0387] 通过实时定量 PCR(qPCR) 分析在早期体细胞阶段采样的转基因事件以评估 QC599A 转基因靶基因的拷贝数，然后通过反向 PCR 对 qPCR 所鉴定的仅仅单拷贝事件的 QC599 转基因的旁侧的基因组 DNA 边界进行测序。

[0388] 从体细胞胚样品提取基因组 DNA 并使用 7500 实时 PCR 系统（应用生物系统公司 (Applied Biosystems)）以基因特异性引物和荧光探针通过定量 PCR 进行分析，以检验转基因 QC599A 的 FRT1 和 FRT87 位点周围的拷贝数。使用相对定量方法（应用生物系统公司 (Applied Biosystems)），以双重反应进行 qPCR 分析，其中以热休克蛋白 (HSP) 基因作为内源对照，以具有已知的单拷贝 QC599 转基因的转基因 DNA 样品作为校准。内源对照 HSP 探

针用 VIC 进行标记并且靶基因探针用 FAM 进行标记供同时检测两个荧光探针。仅进一步分析通过 FRT1 qPCR 测定法和 FRT87 qPCR 测定法二者鉴定为单拷贝的事件，并将其进一步用于再生植物。

[0389] 将所选择的单拷贝事件的 qPCR 所用的相同基因组 DNA 用三种不同的限制酶 AflII、NsiI 和 PciI 进行片段化，该三种酶均仅切割 QC599A 一次并且全部都在 NOS 区中切割，所以可将通用引物用于反向 PCR（图 13）。例如，PciI 在 NOS 区切割转基因 QC599A 一次并且在最接近 QC599A 的 5′ 端的旁侧基因组 DNA 边界中切割一次，以产生含有接近 QC599A 的 5′ 部分的基因组 DNA 区段并含有转基因 QC599A 的 5′ 部分的 DNA 片段，5′ 端和 3′ 端上各有一半 PciI 位点。相似地，同时产生含有转基因 QC599A 的 3′ 部分并含有接近 QC599A 的 3′ 端的基因组 DNA 区段的 DNA 片段，也是 5′ 端和 3′ 端上各有一半 PciI 位点。然后自我连接步骤使该 5’ 边界片段和 3’ 边界片段环化，从而使得它们的基因组 DNA 部分可通过仅采用 QC599A 特异性引物的 PCR 扩增。

[0390] 应用两轮 PCR 扩增以使任何非特异性基因组 DNA 片段的扩增减至最低（图 13）。将 Invitrogen 高保真 Taq DNA 聚合酶用于通过第一轮 PCR 扩增该经消化且然后自我连接的基因组 DNA 模板 25 个循环。然后将 1％的每种第一轮 PCR 的产物通过第二轮 PCR 扩增 35 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳检验第二轮 PCR 的产物，大多数时候扩增了不同的条带。然后使用桑格法以第二轮 PCR 中所用的相同对应有义引物和反义引物，对展示出不同条带的 PCR 产物进行测序。使用 Vector NTI 程序包（英杰公司）中的程序装配序列并分析。将序列用于 BLAST 搜索可公开获得的联合基因组研究所（Joint Genome Institute）大豆基因组序列，以通过序列同源性鉴定它们在基因组中的位置。

[0391] 总共产生了 830 个 QC599A 转基因事件并通过 qPCR 分析拷贝数，360 个（高达总数的 43％）被选择为单拷贝事件供通过反向 PCR 进行边界测序（表 10）。从 239 个单拷贝事件获得了 5′ 边界序列和 3′ 边界序列二者。但是它们中的大多数具有通常来自不同的染色体并且不自然连续的（甚至在它们处于相同染色体上时）的 5′ 边界和 3′ 边界。经测序的 239 个事件中仅 19 个具有它们处于相同染色体上而且还是自然连续的 5′ 边界和 3′ 边界。它们中的一些在转基因 QC599A 插入位点处可能具有小的缺失或插入。19 个事件被认为是具有匹配的基因组 DNA 边界的高品质事件，并将其选做 SSI 靶株系以待用于将来的 SSI 转化。

[0392] 表 10：大豆 SSI 靶事件评价

[0393]

样品描述	样品编号
提交用于通过 qPCR 进行拷贝数检验的总事件	830
选择用于反向 PCR 的单拷贝事件	360
具有 5′ 边界反向 PCR 条带的事件	313
具有 3′ 边界反向 PCR 条带基因的事件	310

同时具有 5′ 和 3′ 边界反向 PCR 条带的事件	274
具有 5′ 边界序列的事件	281
具有 3′ 边界序列的事件	247
同时具有 5’和 3’边界序列的事件	239
具有匹配的 5’和 3’边界序列的事件	19

[0394] 当在大豆基因组中的目的基因组座位中鉴定了 SSI 转基因靶位点，则通过 qPCR 和 Southern 杂交对再生的 T0 植物进行分析以确认先前的拷贝数检验和边界测序结果。将多种消化如 NdeI、NsiI 和 PciI 以及对 SAMS 探针、HPT 编码区和旁侧基因组边界有特异性的不同探针用于 Southern 分析，并且所有的条带必须匹配从插入位点周围的基因组 DNA 序列预测的大小以便确认靶位点。

[0395] 将转基因 SSI 靶 T0 植物维持在受控生长室内并监测农艺学异常，直至收获 T1 种子。每个靶事件种植 64 粒 T1 种子并通过相同的 FRT1 和 FRT87qPCR 测定法分析 T1 植物，以检验转基因 QC599A 分离。然后对选择的纯合 T1 植物进行采样并通过相似的 Southern 杂交进行分析，以确认此前在 T0 植物上获得的 Southern 结果。仅在通过所有上述评价后，将含有转基因靶位点的 SSI 转基因靶事件进一步用作可在 SSI 转化中用作靶株系的重组靶基因座 (RTL)。

[0396] 实例 5

[0397] 19 号染色体上的复合性状基因座的产生

[0398] 鉴定了一个有价值的大豆基因组区，称为复合性状基因座 LA(CTL-LA)，其含有 19 号染色体（或连锁群 L）上的目的性状（性状 -LA）和与其邻近的至少两个 SSI 靶位点（图 14）。

[0399] 复合性状基因座的鉴定

[0400] 在测定了转基因靶位点旁侧序列后根据序列同源性测定了目的性状即性状 -LA 在 19 号染色体上的位置，然后通过物理作图数据和遗传作图数据进行验证。通过使用反向 PCR 获得了转基因靶位点旁侧序列 (FS)。使用 BLAST 算法将每条 FS 序列与大豆整个基因组序列进行比较以预测其在染色体上的位置，因为已经将大多数大豆基因组序列组装为 20 个独立的染色体。然后将通过序列连续性鉴定的接近 FS 位置的 DNA 标记用于将 FS 位置（其代表转基因 SSI 靶位点位置）与大豆遗传图谱相关联。最后，将转基因 SSI 靶位点的遗传图谱位置用于测定它是否接近目的性状基因。作为本申请的一个例子，发现两个转基因 SSI 靶位点 TTS-LA1 和 TTS-LA2 在目的性状基因即性状 -LA 的附近。总之，产生了命名为 CTL-LA 的复合性状基因座，其含有天然性状基因 LA 基因座和两个附近的转基因 SSI 靶基因座 TTS-LA1 和 TTS-LA2（图 14）。可然后通过育种将独立的转基因座位从不同的亲本合并至该天然性状基因座，然后该复合性状基因座可在后续的育种步骤中分离为单个遗传基因座。

[0401] 表 11 :大豆 19 号染色体上的复合性状基因座 CTL-LA

[0402]

基因座	大豆复合物公共图谱	Pioneer 大豆图谱 v1.2
SATT613	36.04	45.1
SATT284	38.16	47.7
S60414-TB	-	49.3
SATT462	41.0	49.3
TTS-LA1		57.2
TRAIT-LA		60.1
TTS-LA2		62.9
SATT481	54.57	65.8
SATT156	56.13	65.8
SCT_010	59.52	68.5

[0403] 在开发大豆 TTS 文库的过程中，在 19 号染色体上鉴定了接近目的性状即性状 -LA 的两个转基因 SSI 靶位点 TTS-LA1 和 TTS-LA2。TTS-LA1 的插入位点被测定为仅距离目的性状（性状 -LA）大约 2.9cM（厘摩），作图定位于专有的 Pioneer 大豆图谱 v1.2 的 19 号染色体上的位置 60.1cM（表 11），而 TTS-LA2 在 TTS-LA1 的相对侧距离性状 -LA 大约 2.8cM。根据该图谱，更多的遗传标记和距性状 -LA 基因座大约 10cM 内的相关性状基因是显而易见的，它们中的一些在表 11 中列出。一些相同的标记在大豆复合物公共图谱上的对应位置通过搜索该公共图谱上的标记来测定（表 11）。

[0404] 在转基因靶位点 TTS-LA1 和 TTS-LA2 处的位点特异性整合

[0405] 通过测试含有 TTS-LA1 位点或 TTS-LA2 位点的转基因事件将目的基因进行位点特异性整合的能力，对所述转基因事件进行进一步的评价。使两个事件的 T0 转基因植物成熟并在受控生长室中种植 T1 种子。首先通过 FRT1 和 FRT87 qPCR 分析 T1 转基因植物的叶样品，以确认单拷贝 QC599A DNA 片段以孟德尔遗传定律分离以及鉴定纯合的植物。通过 Southern 杂交来分析所选择的纯合 T1 植物，以确认杂交的条带匹配从带有 QC599 转基因的 19 号染色体区段的基因组 DNA 序列预测的大小。还使用 5′ 边界有义引物和 3′ 边界反义引物通过 PCR 扩增了 5′ 边界的一部分、整个 QC599A DNA 片段以及 3′ 边界的一部分并进行测序，以确认所述转基因和所述边界接合区是完整的。

[0406] 从纯合的 T1 植物切取发育的 T2 胚并用作外植体来起始组织培养物，然后如实例 4 中所述通过基因枪轰击在 FLP 表达构建体的帮助下用 SSI 供体 DNA 构建体对其进行转化。一个靶位点 TTS-LA1 用含有一种或多种目的性状基因的 SSI 供体 DNA 构建体 QC728 转化。FLP 重组酶活性通过共轰击的 DNA 构建体 QC663 的瞬时表达提供。用 90ng/ml 氯磺隆选择仅其中供体 QC728 的 GM-ALS 标记基因通过 FLP 重组酶介导的 DNA 重组设置在 TTS-LA1 靶位点处的 QC599 转基因的 GM-SAMS 启动子下游的 SSI 转基因事件。在愈伤组织阶段对转基因事件进行采样并通过一系列 qPCR 测定法进行分析，以确定 SSI 是否已发生以及 RMCE 事件是否以与图 12 中所述类似的方式产生。使用不同的供体 DNA 构建体按照类似的转化程序在另一 SSI 靶位点 TTS-LA2 处整合不同的性状如除草剂耐受基因，并通过类似的 qPCR 测定法分析转基因事件。

[0407] 因为含有 QC599A DNA 片段的 SSI 靶事件用供体 DNA 在 FLP 表达 DNA 构建体的存在下转化以通过 FLP 介导的重组产生 RMCE，所以四种 DNA（包括靶 QC599A、供体 QC728、FLP 表达构建体 QC663 和 RMCE 产物 QC599A728A）可共存于任何在氯磺隆选择中合格的转基因事

件。随机整合的 DNA 可从 RMCE 基因座分离以产生在一个基因座包含目的性状（在 TTS-LA1 或 TTSLA2 处整合）的纯净 RMCE 事件。累积的 qPCR 结果显示，已发生了 SSI 并且从 TTS-LA1 和 TTS-LA2 转化回收了 RMCE 事件。

[0408] 可使在 TTS-LA1 处包含 RMCE 的转基因事件与在 TTS-LA2 处包含 RMCE 的转基因事件杂交，以产生包含堆叠的目的性状的复合性状基因座。

[0409] 产生含有复合性状基因座 CTL-LA 的转基因植物

[0410] 为了建立复合性状基因座 CTL-LA，需要将在 TTS-LA1 位点处携带性状基因的转基因植物与在 TTS-LA2 位点处携带不同性状基因的转基因植物杂交（图 14）。因为 TTS-LA1 位点距离性状 -LA 为 2.9cM 而 TTS-LA2 位点距离性状 -LA 为 2.8cM，所以 TTS-LA1 与 TTS-LA2 位点之间的总距离为 5.8cM。当使在 TTS-LA1 位点和 TTS-LA2 位点各具有性状基因的两个 RMCE 事件杂交时，仅一代后有近 6％的机会找到在这两个位点均携带性状的子代，因为 1cM 等于处于一个遗传基因座处的标记有 1％的机会由于单个世代中的交换而与另一基因座处的标记分离。

[0411] 可使所选择的在 TTS-LA1 含有目的性状基因的 RMCE 事件成熟，并且它们的纯合 T1 植物可通过 qPCR 来鉴定、通过 Souther 杂交和表型分析来评价。可选择一个完美的 RMCE 事件作为亲本。可通过类似的 qPCR、Southern 杂交和表型分析从在 TTS-LA2 位点处具有例如除草剂耐受性状的 RMCE 事件选择另一亲本。可使两个亲本杂交并可通过对每个亲本有特异性的 qPCR 测定法分析所得的子代，以鉴定含有 TTS-LA1 性状、TTS-LA2 性状二者以及处于它们之间的天然性状即性状 -LA 的重组体（图 14）。可种植所鉴定的重组体的 F1 种子，当植物自然自花授粉时可产生对于 TTS-LA1- 性状 -LA-TTS-LA2 复合性状基因座 CTL-LA 纯合的 T2 子代。可通过类似的 qPCR 测定法鉴定纯合的 TTS-LA1- 性状 -LA-TTS-LA2 复合性状基因座并且可随后使其繁殖为单个基因座。

[0412] 表 12 :SEQ ID NO 汇总

[0413]

SEQ ID NO:	NT/AA	说明
1	NT	最小的 FRT1 重组位点
2	NT	最小的 FRT5 重组位点
3	NT	最小的 FRT6 重组位点
4	NT	最小的 FRT7 重组位点
5	NT	最小的 FRT12 重组位点
6	NT	最小的 FRT87 重组位点
7	NT	Cre 重组酶

[0414]

8	NT	FLP 重组酶
9	NT	Cre 重组酶的变体（moCre-玉蜀黍偏好密码子）
10	NT	FLP 重组酶的变体（FLPm-玉蜀黍偏好密码子）
11	NT	用于基因枪大豆转化以产生转基因靶事件的 SSI 靶 DNA 片段 QC599A。
12	NT	在全部六个可能的开放阅读框中含有终止密码子 ORFSTOP-B 的寡核苷酸。
13	NT	在全部六个可能的开放阅读框中含有终止密码子 ORFSTOP-A 的另一寡核苷酸。

[0415] 本文所用的词语“一个”和“一种”指一个（种）或不止一个（种）（即，指至少一个（种））该词语的语法对象。举例说，“一个要素”是指一个或多个要素。

[0416] 本说明书中提及的所有公布和专利申请指示了本发明所属领域的技术人员的水平。所有公布和专利申请在相同程度上全文以引用方式并入本文，如同每个单独的公布或专利申请被具体地和独立地指出全文以引用方式并入本文一样。

[0417] 虽然为了清楚地理解而已经通过举例说明和实例较详细地描述了本发明，但显然可以在权利要求书范围内实施一些改变和修饰。

[0001]

序列表

<110> Falco, Carl
Lassner, Michael
Li, Zhongsen
Scelonge, Christopher

<120> 产生复合性状基因座的方法和组合物

<130> 035718/428063

<150> US 61/591,329
<151> 2012-01-27

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT1 重组位点

<400> 1
agttcctata ctttctagag aataggaact 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT5 重组位点

<400> 2
agttcctata ctcttttgag aataggaact 30

<210> 3
<211> 30
<212> DNA

[0002]

<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT6 重组位点

<400> 3
agttcctata ctttttgaag aataggaact 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT7 重组位点

<400> 4
agttcctata cttattgaag aataggaact 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT12 重组位点

<400> 5
agttcctata ctctatgtag aataggaact 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最小 FRT87 重组位点

<400> 6
agttcctata ctttctggag aataggaact 30

<210> 7
<211> 1032
<212> DNA

[0003]

<213> 噬菌体 P1

<220>
<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> 编码 Cre 重组酶的核苷酸序列

<400> 7
atgtccaatt tactgaccgt acaccaaaat ttgcctgcat taccggtcga tgcaacgagt 60
gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcagggatc gccaggcgtt ttctgagcat 120
acctggaaaa tgcttctgtc cgtttgccgg tcgtgggcgg catggtgcaa gttgaataac 180
cggaaatggt ttcccgcaga acctgaagat gttcgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
cgcggtctgg cagtaaaaac tatccagcaa catttgggcc agctaaacat gcttcatcgt 300
cggtccgggc tgccacgacc aagtgacagc aatgctgttt cactggttat gcggcggatc 360
cgaaaagaaa acgttgatgc cggtgaacgt gcaaaacagg ctctagcgtt cgaacgcact 420
gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga tatacgtaat 480
ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctgttacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
agggttaaag atatctcacg tactgacggt gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt aactaaactg 660
gtcgagcgat ggatttccgt ctctggtgta gctgatgatc cgaataacta cctgttttgc 720
cgggtcagaa aaaatggtgt tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 780
ctggaaggga tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggt 840
cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gccgtgtcgt gagccgcgcg agatatggcc 900
cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctggtg gctggaccaa tgtaaatatt 960
gtcatgaact atatccgtaa cctggatagt gaaacagggg caatggtgcg cctgctggaa 1020
gatggcgatt ag 1032

<210> 8
<211> 1260
<212> DNA
<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<220>
<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> 编码 FLP 重组酶的核苷酸序列

<400> 8
atgccacaat ttggtatatt atgtaaaaca ccacctaagg tgcttgttcg tcagtttgtg 60
gaaaggtttg aaagaccttc aggtgagaaa atagcattat gtgctgctga actaacctat 120
ttatgttgga tgattacaca taacggaaca gcaatcaaga gagccacatt catgagctat 180
aatactatca taagcaattc gctgagttta gatattgtca ataaatcact ccagtttaaa 240
tacaagacgc aaaaagcaac aattctggaa gcctcattaa agaaattgat tcctgcttgg 300
gaatttacaa ttattcctta ctatggacaa aaacatcaat ctgatatcac tgatattgta 360

[0004]

agtagtttgc aattacagtt cgaatcatcg gaagaagcag ataagggaaa tagccacagt 420
aaaaaaatgc ttaaagcact tctaagtgag ggtgaaagca tctgggagat cactgagaaa 480
atactaaatt cgtttgagta tacttcgaga tttacaaaaa caaaaacttt ataccaattc 540
ctcttcctag ctactttcat caattgtgga agattcagcg atattaagaa cgttgatccg 600
aaatcattta aattagtcca aaataagtat ctgggagtaa taatccagtg tttagtgaca 660
gagacaaaga caagcgttag taggcacata tacttcttta gcgcaagggg taggatcgat 720
ccacttgtat atttggatga atttttgagg aattctgaac cagtcctaaa acgagtaaat 780
aggaccggca attcttcaag caataaacag gaataccaat tattaaaaga taacttagtc 840
agatcgtaca ataaagcttt gaagaaaaat gcgccttatt caatctttgc tataaaaaat 900
ggcccaaaat ctcacattgg aagacatttg atgacctcat ttctttcaat gaagggccta 960
acggagttga ctaatgttgt gggaaattgg agcgataagc gtgcttctgc cgtggccagg 1020
acaacgtata ctcatcagat aacagcaata cctgatcact acttcgcact agtttctcgg 1080
tactatgcat atgatccaat atcaaaggaa atgatagcat tgaaggatga gactaatcca 1140
attgaggagt ggcagcatat agaacagcta aagggtagtg ctgaaggaag catacgatac 1200
cccgcatgga atgggataat atcacaggag gtactagact acctttcatc ctacataaat 1260

<210> 9
<211> 1032
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有玉蜀黍偏好密码子的编码来自噬菌体 P1 的 Cre 蛋白
的核苷酸序列(moCRE)

<400> 9
atgtccaacc tgctcacggt tcaccagaac cttccggctc ttccagtgga cgcgacgtcc 60
gatgaagtca ggaagaacct catggacatg ttccgcgaca ggcaagcgtt cagcgagcac 120
acctggaaga tgctgctctc cgtctgccgc tcctgggctg catggtgcaa gctgaacaac 180
aggaagtggt tccccgctga gccgcaggac gtgagggatt accttctgta cctgcaagct 240
cgcgggctgg cagtgaagac catccagcaa caccttggac aactgaacat gcttcacagg 300
cgctccggcc tcccgcgccc cagcgactcg aacgccgtga gcctcgtcat gcgccgcatc 360
aggaaggaaa acgtcgatgc cggcgaaagg gcaaagcagg ccctcgcgtt cgagaggacc 420
gatttcgacc aggtccgcag cctgatggag aacagcgaca ggtgccagga cattaggaac 480
ctggcgttcc tcggaattgc atacaacacg ctcctcagga tcgcggaaat tgcccgcatt 540
cgcgtgaagg acattagccg caccgacggc ggcaggatgc ttatccacat tggcaggacc 600
aagacgctcg tttccaccgc aggcgtcgaa aaggccctca gcctcggagt gaccaagctc 660
gtcgaacgct ggatctccgt gtccggcgtc gcggacgacc caaacaacta cctcttctgc 720
cgcgtccgca agaacggggt ggctgccccc agcgccacca gccaactcag cacgagggcc 780
ttggaaggta ttttcgaggc cacccaccgc ctgatctacg gcgcgaagga tgacagcggt 840
caacgctacc tcgcatggtc cgggcactcc gcccgcgttg gagctgctag ggacatggcc 900
cgcgccggtg tttccatccc cgaaatcatg caggcgggtg gatggacgaa cgtgaacatt 960
gtcatgaact acattcgcaa ccttgacagc gagacgggcg caatggttcg cctcctggaa 1020

[0005]

gatggtgact ga 1032

<210> 10
<211> 1260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有玉蜀黍偏好密码子的编码 FLP 蛋白的核苷酸序列(FLPm)

<400> 10
atgccccagt tcgacatcct ctgcaagacc ccccccaagg tgctcgtgag gcagttcgtg 60
gagaggttcg agaggcccte cggcgagaag atcgccctct gcgccgccga gctcacctac 120
ctctgctgga tgatcaccca caacggcacc gccattaaga gggccacctt catgtcatac 180
aacaccatca tctccaactc cctctccttc gacatcgtga acaagtcccc ccagttcaaa 240
tacaagaccc agaaggccac catcctcgag gcctccctca agaagctcat ccccgcctgg 300
gagttcacca tcatccccta ctacggccag aagcaccagt ccgacatcac cgacatcgtg 360
tcatccctcc agcttcagtt cgagtcctcc gaggaggctg acaagggcaa ctcccactcc 420
aagaagatgc tgaaggccct cctctccgag ggcgagtcca tctgggagat caccgagaag 480
atcctcaact ccttcgagta cacctccagg ttcactaaga ccaagaccct ctaccagttc 540
ctcttcctcg ccaccttcat caactgcggc aggttctcag acatcaagaa cgtggacccc 600
aagtccttca agctcgtgca gaacaagtac ctcggcgtga tcatccagtg cctcgtgacc 660
gagaccaaga cctccgtgtc caggcacatc tacttcttct ccgctcgcgg caggatcgac 720
ccctcgtgt acctcgacga gttcctcagg aactcagagc ccgtgctcaa gagggtgaac 780
aggaccggca actcctcctc caacaagcag gagtaccagc tcctcaagga caacctcgtg 840
aggtcctaca acaaggccct caagaagaac gccccctact ccatcttcgc catcaagaac 900
ggccccaagt cccacatcgg taggcacctc atgacctcct tcctctcaat gaagggcctc 960
accgagctca ccaacgtggt gggcaactgg tccgacaaga gggcctccgc cgtggccagg 1020
accacctaca cccaccagat caccgccatc cccgaccact acttcgccct cgtgtcaagg 1080
tactacgcct acgacccccat ctccaaggag atgatcgccc tcaaggacga gactaacccc 1140
atcgaggagt ggcagcacat cgagcagctc aagggctccg ccgagggctc catcaggtac 1200
cccgcctgga acggcatcat ctcccaggag gtgctcgact acctctcctc ctacatcaac 1260

<210> 11
<211> 2963
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SSI 靶 DNA 片段 QC599A

<400> 11

[0006]

cgcgccggta cccgggtacc gagctcacta gacgcggtga aattacctaa ttaacaccgg 60
tgtttaaaca ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttccca agctttgctc 120
tagatcaaac tcacatccaa acataacatg gatatcttcc ttaccaatca tactaattat 180
tttgggttaa atattaatca ttatttttaa gatattaatt aagaaattaa aagatttttt 240
aaaaaaaatgt ataaaattat attattcatg atttttcata catttgattt tgataataaa 300
tatatttttt ttaatttctt aaaaaatgtt gcaagacact tattagacat agtcttgttc 360
tgtttacaaa agcattcatc atttaatacta ttaaaaaata tttaatacta acagtagaat 420
cttcttgtga gtggtgtggg agtaggcaac ctggcattga aacgagagaa agagagtcag 480
aaccagaaga caaataaaaa gtatgcaaca aacaaatcaa aatcaaaggg caaaggctgg 540
ggttggctca attggttgct acattcaatt ttcaactcag tcaacggttg agattcactc 600
tgacttcccc aatctaagcc gcggatgcaa acggttgaat ctaacccaca atccaatctc 660
gttacttagg ggcttttccg tcattaactc acccctgcca cccggtttcc ctataaattg 720
gaactcaatg ctccccctcta aactcgtatc gcttcagagt tgagaccaag acacactcgt 780
tcatatatct ctctgctctt ctcttctctt ctacctctca aggtactttt cttctccctc 840
taccaaatcc tagattccgt ggttcaattt cggatcttgc acttctggtt tgctttgcct 900
tgcttttttcc tcaactgggt ccatctagga tccatgtgaa actctactct ttctttaata 960
tctgcggaat acgcgtttga ctttcagatc tagtcgaaat catttcataa ttgcctttct 1020
ttcttttagc ttatgagaaa taaaatcact ttttttttat ttcaaaataa accttgggcc 1080
ttgtgctgac tgagatgggg tttggtgatt acagaatttt agcgaatttt gtaattgtac 1140
ttgtttgtct gtagttttgt tttgttttct tgtttctcat acattcctta ggcttcaatt 1200
ttattcgagt ataggtcaca ataggaattc aaactttgag caggggaatt aatcccttcc 1260
ttcaaatcca gtttgtttgt atatatgttt aaaaaaatgaa acttttgctt taaattctat 1320
tataactttt tttatggctg aaatttttgc atgtgtcttt gctctctgtt gtaaatttac 1380
tgtttaggta ctaactctag gcttgttgtg cagtttttga agtataacaa cagaagttcc 1440
tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc cactagtcca tgaaaaagcc 1500
tgaactcacc gcgacgtctg tcgagaagtt tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga 1560
cctgatgcag ctctcggagg gcgaagaatc tcgtgctttc agcttcgatg taggagggcg 1620
tggatatgtc ctgcgggtaa atagctgcgc cgatggtttc tacaaagatc gttatgttta 1680
tcggcacttt gcatcggccg cgctcccgat tccggaagtg cttgacattg gggaattcag 1740
cgagagcctg acctattgca tctcccgccg tgcacagggt gtcacgttgc aagacctgcc 1800
tgaaaccgaa ctgcccgctg ttctgcagcc ggtcgcggag gccatggatg cgatcgctgc 1860
ggccgatctt agccagacga gcgggttcgg cccattcgga ccgcaaggaa tcggtcaata 1920
cactacatgg cgtgatttca tatgcgcgat tgctgatccc catgtgtatc actggcaaac 1980
tgtgatggac gacaccgtca gtgcgtccgt cgcgcaggct ctcgatgagc tgatgcttig 2040
ggccgaggac tgcccccgaag tccggcacct cgtgcacgcg gatttcggct ccaacaatgt 2100
cctgacggac aatggccgca taacagcggt cattgactgg agcgaggcga tgttcgggga 2160
ttcccaatac gaggtcgcca acatcttctt ctggaggccg tggttggctt gtatggagca 2220
gcagacgcgc tacttcgagc ggaggcatcc ggagcttgca ggatcgccgc ggctccgggc 2280
gtatatgctc cgcattggtc ttgaccaact ctatcagagc ttggttgacg gcaatttcga 2340
tgatgcagct tgggcgcagg gtcgatgcga cgcaatcgtc cgatccggag ccgggactgt 2400
cgggcgtaca caaatcgccc gcagaagcgc ggccgtctgg accgatggct gtgtagaagt 2460
actcgccgat agtggaaacc gacgccccag cactcgtccg agggcaaagg aatagtgagg 2520
tacctaaaga aggagtgcgt cgaagcagat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta 2580
agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt gaattacgtt 2640

[0007]

aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt 2700
agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag 2760
gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc gatgtcgacc cgggccctag 2820
gaggccggcc cagctgatga tcccggtgaa gttcctattc cgaagttcct attctccaga 2880
aagtatagga acttcactag agcttgcggc cgcgcatgct gacttaatca gctaacgcca 2940
ctcgaggggg ggcccggtac cgg 2963

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 所有开放阅读框终止密码子 ORFSTOP-B

<400> 12
tgaaattacc taattaa 17

<210> 13
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 所有开放阅读框终止密码子 ORFSTOP-A

<400> 13
tgacttaatc agctaa 16

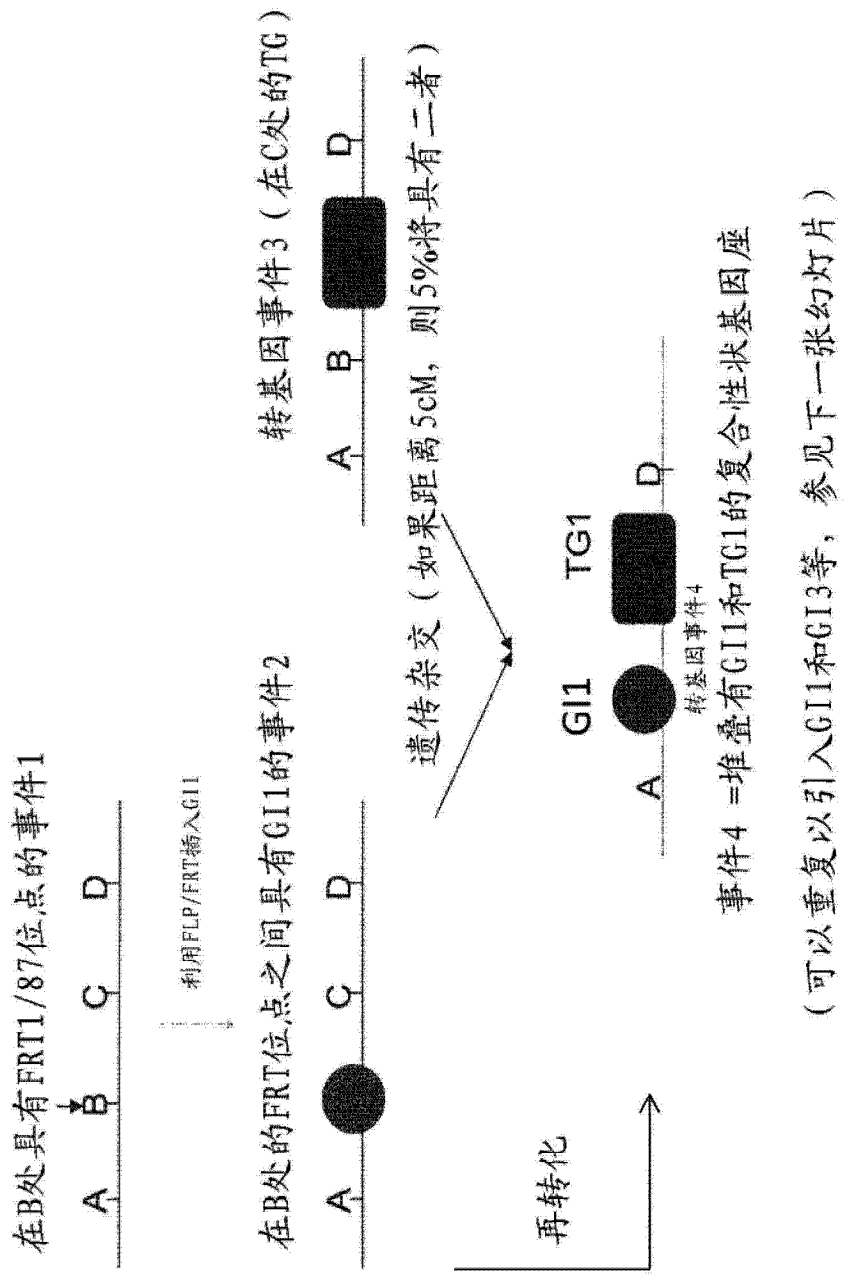

在B处具有FRT1/87位点的事件1
A B C D
利用FLP/FRT转入GI1
在B处的FRT位点之间具有GI1的事件2
A C D
转基因事件3（在C处的TG）
A B D
遗传杂交（如果距离5cM，则5%将具有二者）
GI1
TG1
A D
转基因事件4
再转化
事件4 =堆叠有GI1和TG1的复合性状基因座
（可以重复以引入GI1和GI3等，参见下一张幻灯片）

图 1-a

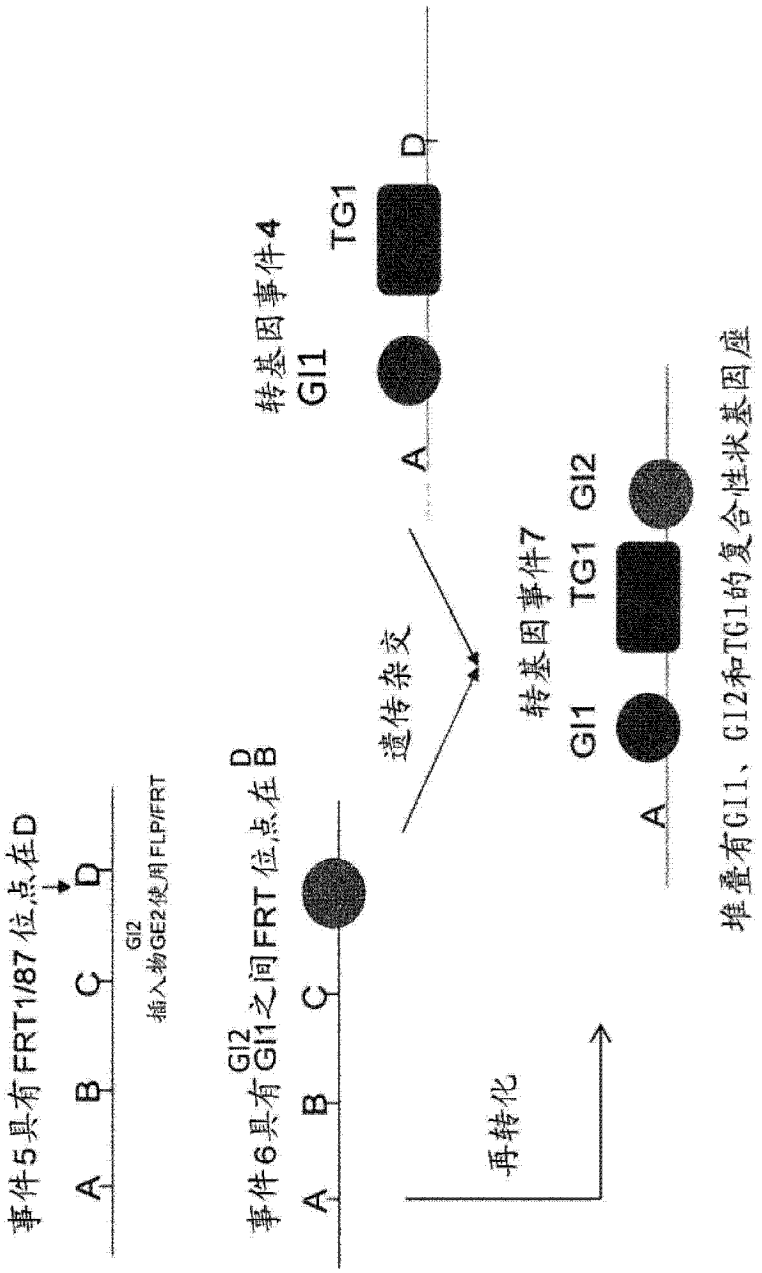

事件5具有FRT1/87位点在D
A B C D
GI2
插入物GE2使用FLP/FRT
事件6具有GI2GI1之间FRT位点在B
A B C D
遗传杂交
转基因事件4
GI1
TG1
A D
转基因事件7
GI1 TG1 GI2
A
再转化
堆叠有GI1、GI2和TG1的复合性状基因座

图 1-b

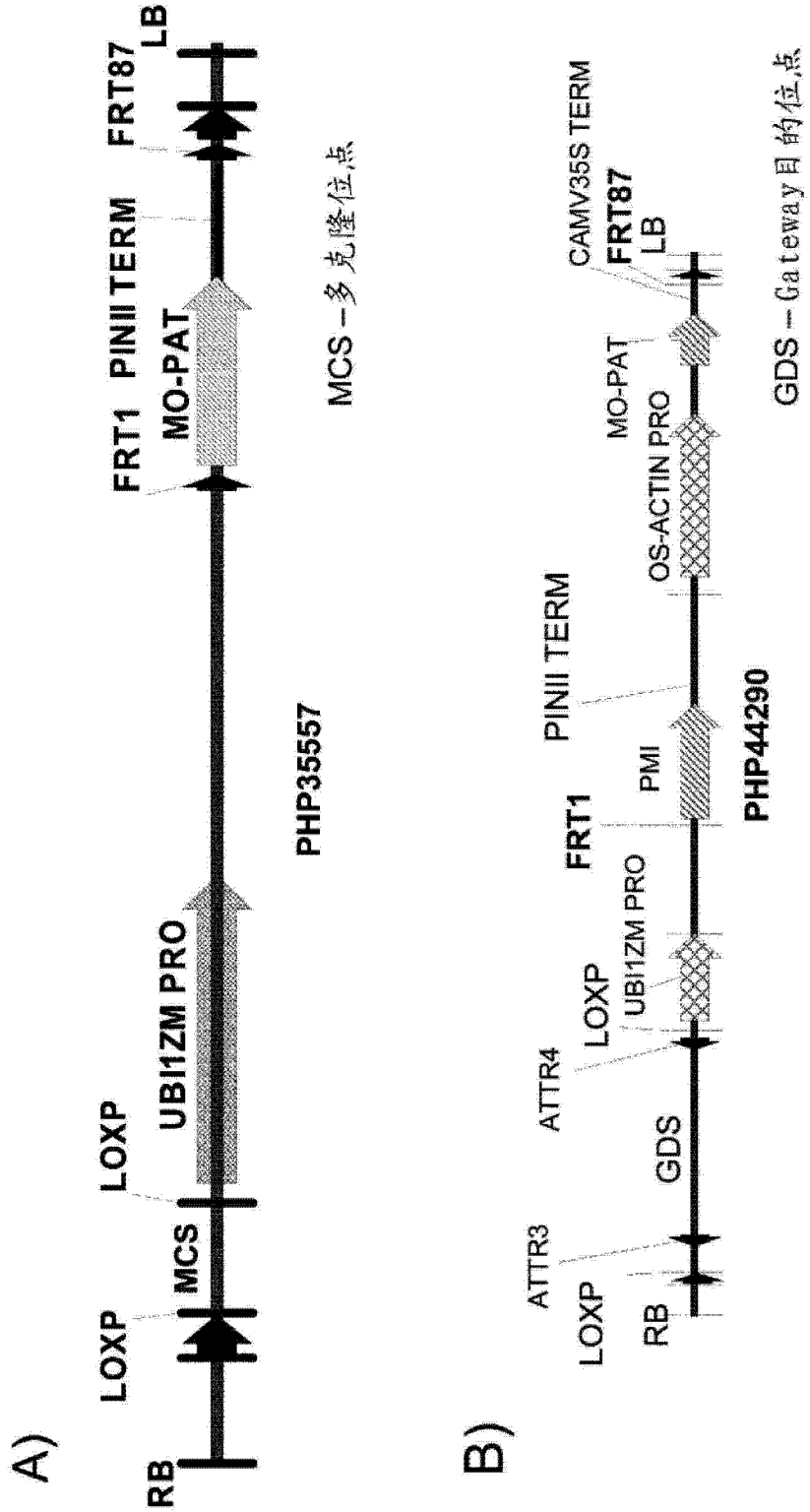

A)
LOXP
RB
MCS
LOXP
UBI1ZM PRO
FRT1
MO-PAT
PINII TERM
FRT87
LB
MCS－多克隆位点
PHP35557
B)
ATTR3
LOXP
RB
GDS
ATTR4
LOXP
UBI1ZM PRO
FRT1
PMI
PINII TERM
OS-ACTIN PRO
MO-PAT
CAMV35S TERM
FRT87
LB
GDS－Gateway目的位点
PHP44290

图 2

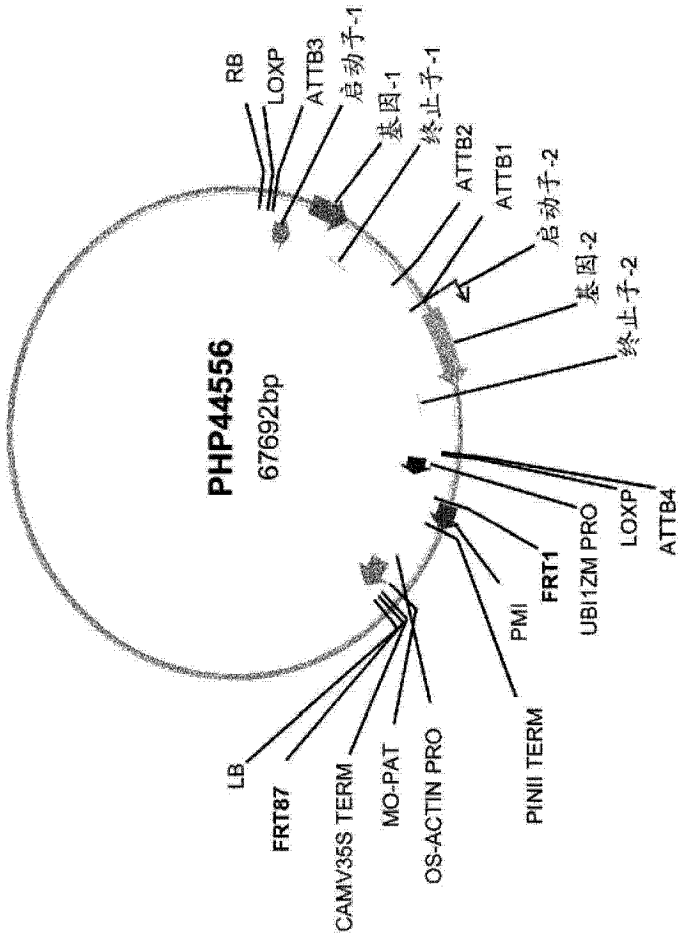

PHP44556
67692bp
RB
LOXP
ATTB3
启动子-1
基因-1
终止子-1
ATTB2
ATTB1
启动子-2
基因-2
终止子-2
ATTB4
LOXP
UBI1ZM PRO
FRT1
PMI
PINII TERM
OS-ACTIN PRO
MO-PAT
CAMV35S TERM
FRT87
LB

图 3

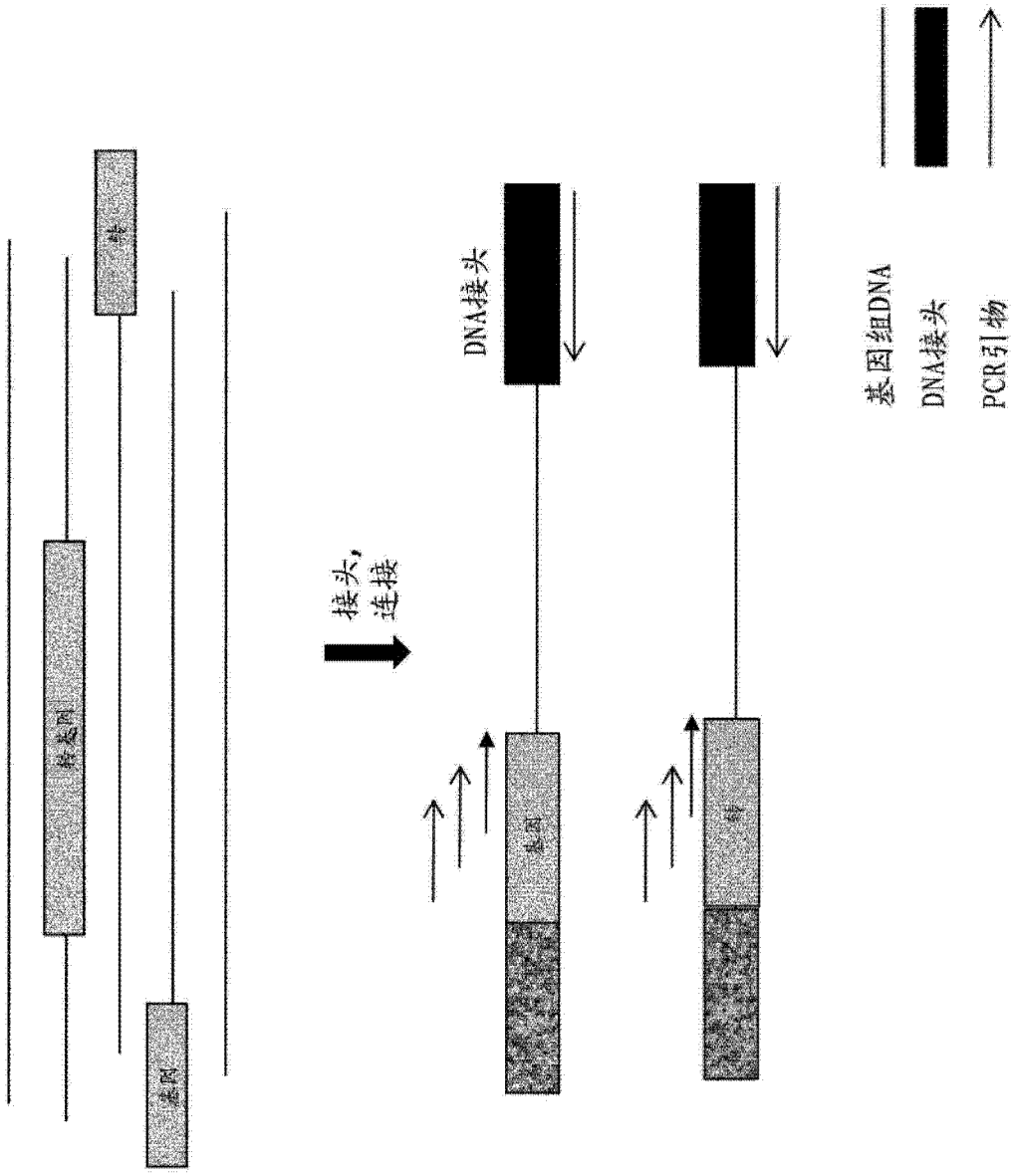


图 4

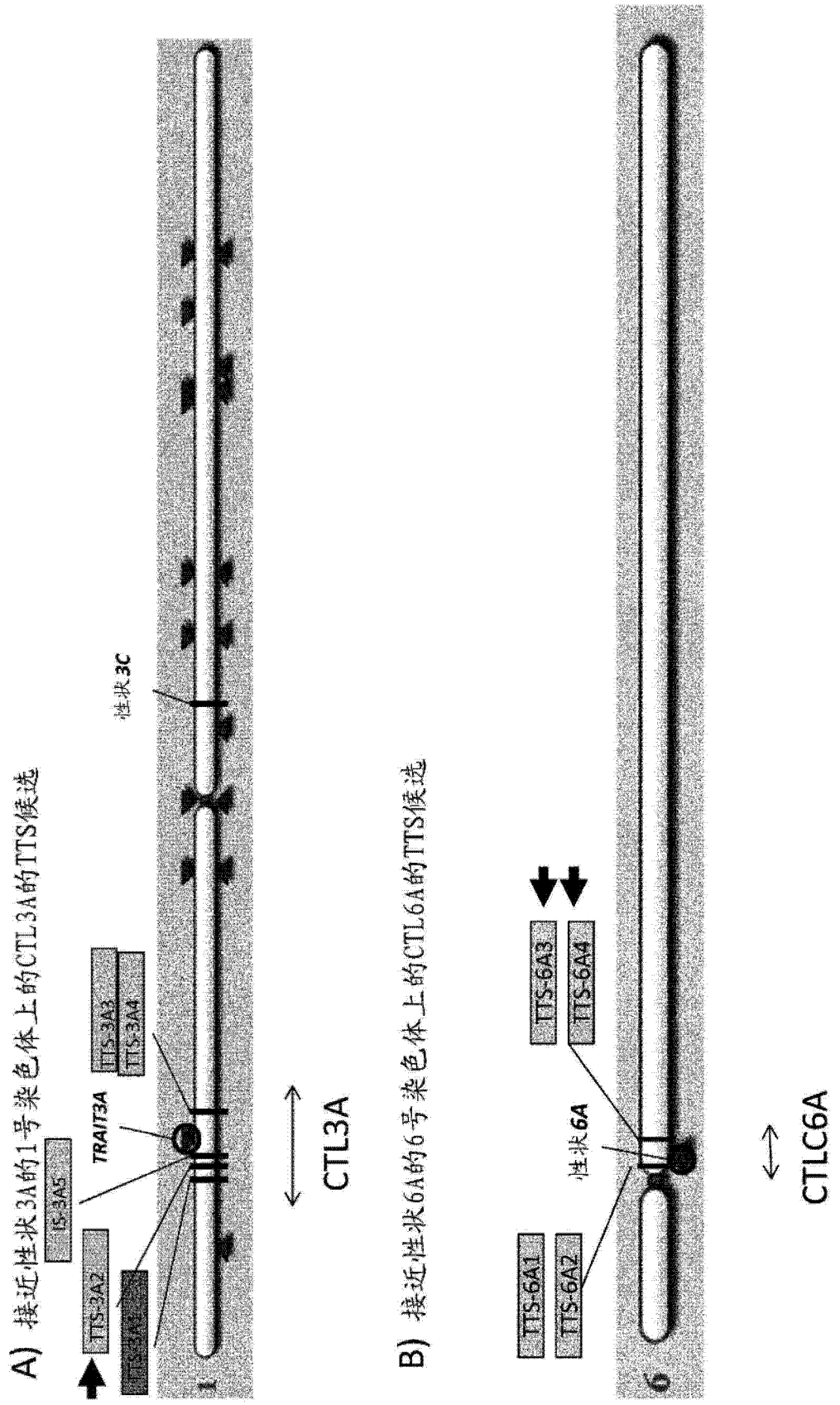

A) 接近性状3A的1号染色体上的CTL3A的TTS候选
IS-3A5
TTS-3A2
TTS-3A1
TRAIT3A
TTS-3A3
TTS-3A4
性状3C
1
CTL3A
B) 接近性状6A的6号染色体上的CTL6A的TTS候选
TTS-6A3
TTS-6A4
性状6A
TTS-6A1
TTS-6A2
6
CTLC6A

图 5

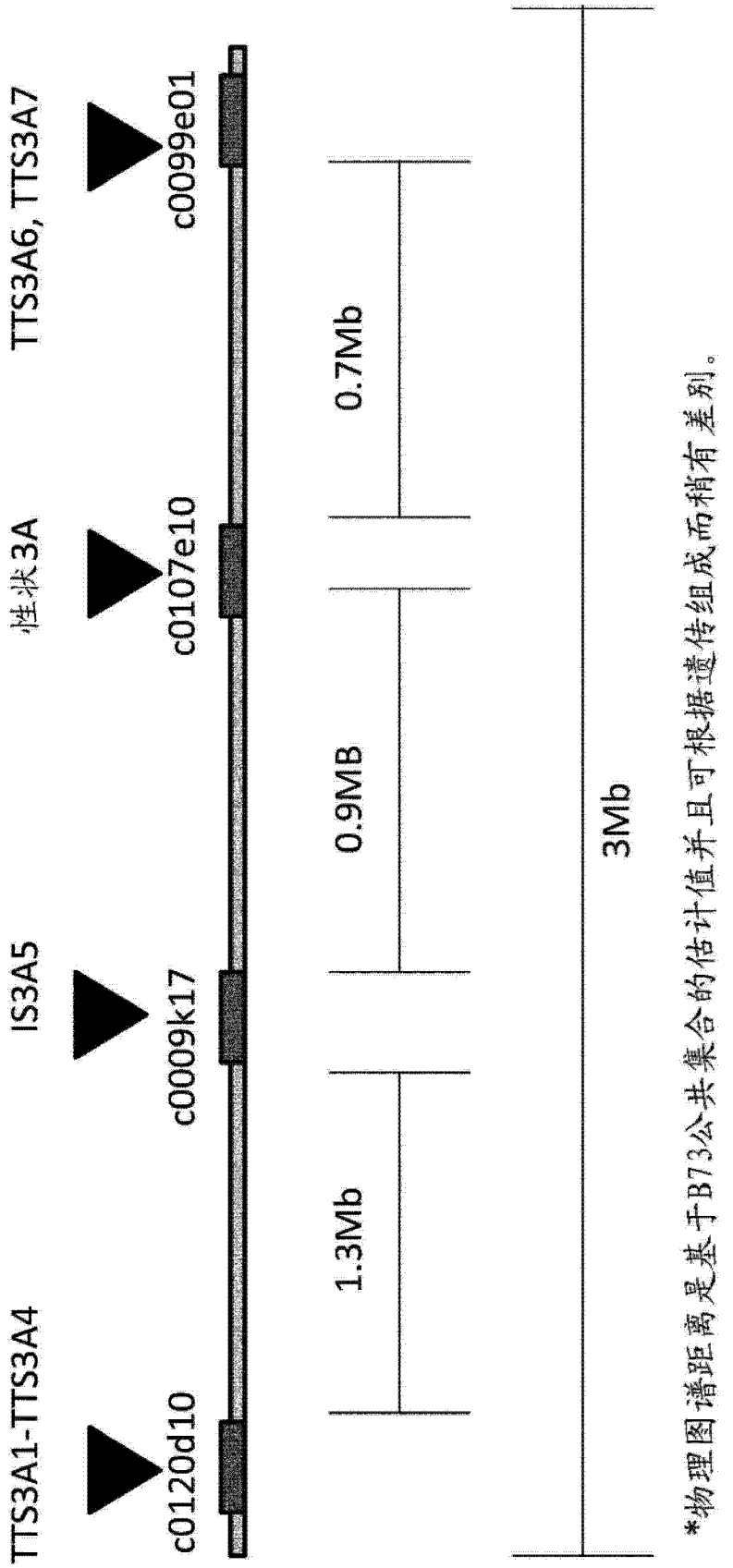

TTS3A1-TTS3A4
IS3A5
性状3A
TTS3A6, TTS3A7
c0120d10
c0009k17
c0107e10
c0099e01
1.3Mb
0.9MB
0.7Mb
3Mb
*物理图谱距离是基于B73公共集合的估计值并且可根据遗传组成而稍有差别。

图 6

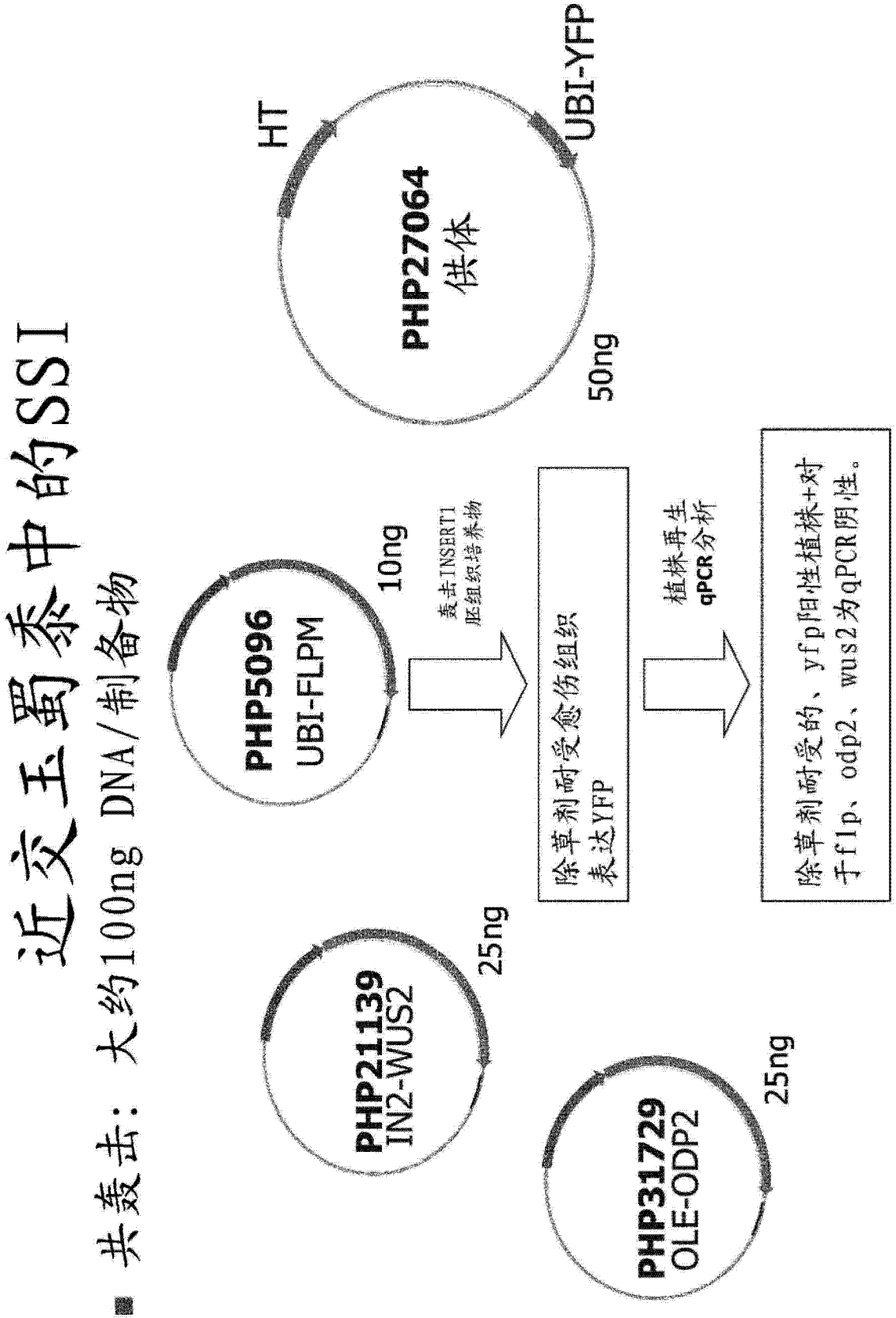

近交玉蜀黍中的SSI
共轰击：大约100ng DNA/制备物
PHP5096
UBI-FLPM
10ng
PHP21139
IN2-WUS2
25ng
PHP31729
OLE-ODP2
25ng
轰击TNSERT1
胚组织培养物
除草剂耐受愈伤组织
表达YFP
植株再生
qPCR分析
除草剂耐受的、yfp阳性植株+对于flp、odp2、wus2为qPCR阴性。
HT
PHP27064
供体
UBI-YFP
50ng

图 7

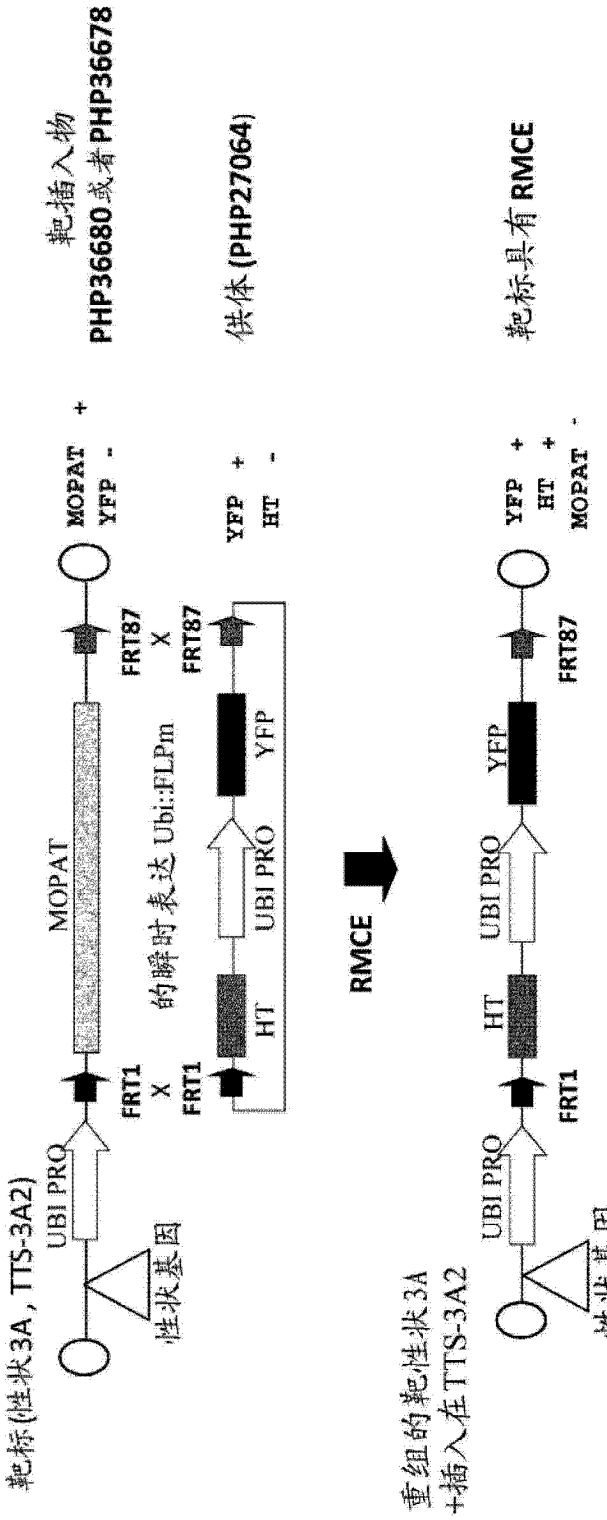
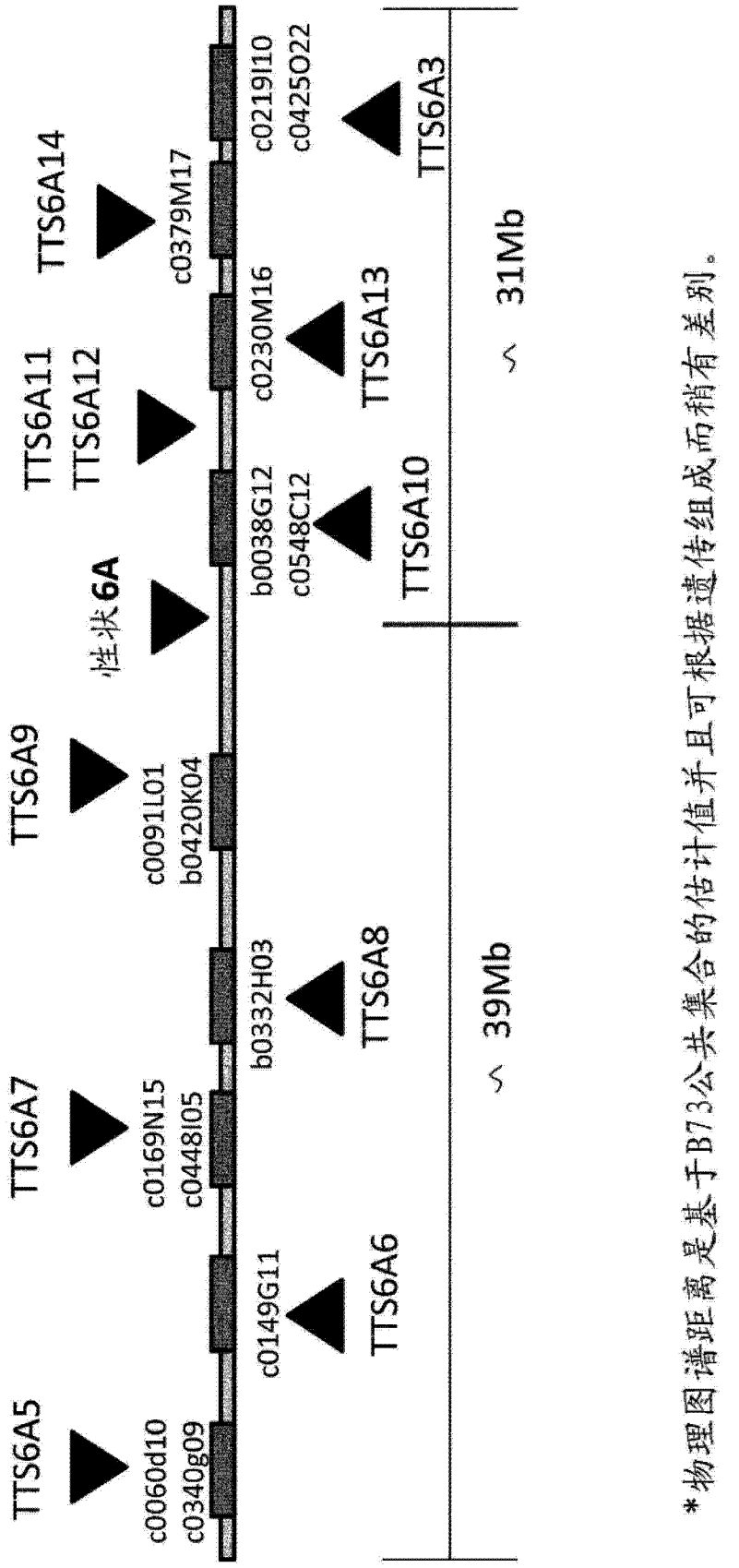

靶插入物
PHP36680或者PHP36678
供体 (PHP27064)
靶标具有 RMCE
靶标(性状3A，TTS-3A2)
UBI PRO
性状基因
FRT1
X
FRT1
MOPAT
的瞬时表达 Ubi::FLPm
FRT87
X
FRT87
HT
UBI PRO
YFP
MOPAT +
YFP -
YFP +
HT -
RMCE
重组的靶性状3A
+插入在TTS-3A2
YFP +
HT +
MOPAT -

图 8



*物理图谱距离是基于B73公共集合的估计值并且可根据遗传组成而稍有差别。

图 9

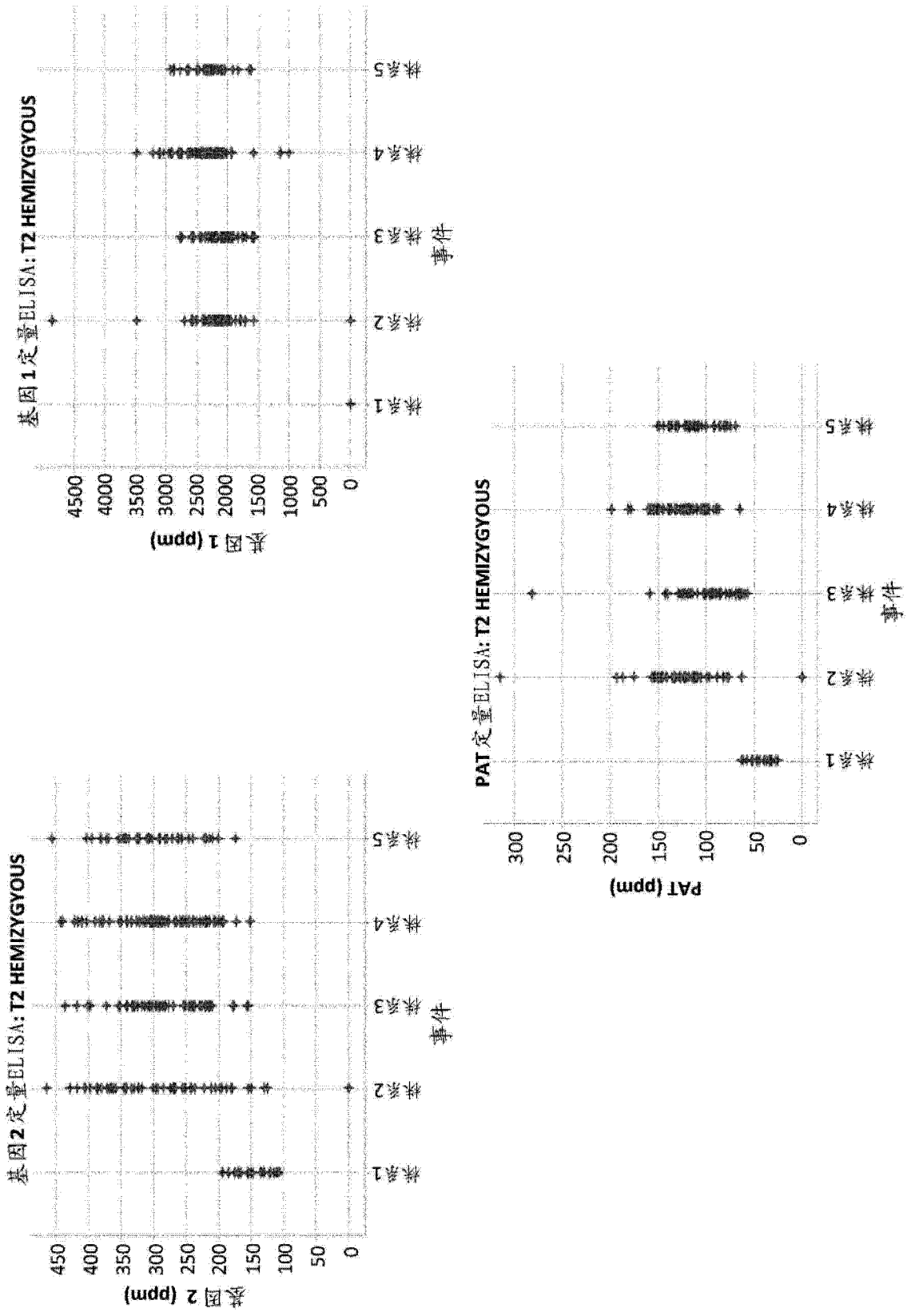

基因1定量ELISA: T2 HEMIZYGOUS
基因1 (ppm)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
株系1
株系2
株系3
株系4
株系5
事件
基因2定量ELISA: T2 HEMIZYGOUS
基因2 (ppm)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
株系1
株系2
株系3
株系4
株系5
事件
PAT定量ELISA: T2 HEMIZYGOUS
PAT (ppm)
0
50
100
150
200
250
300
株系1
株系2
株系3
株系4
株系5
事件

图 10

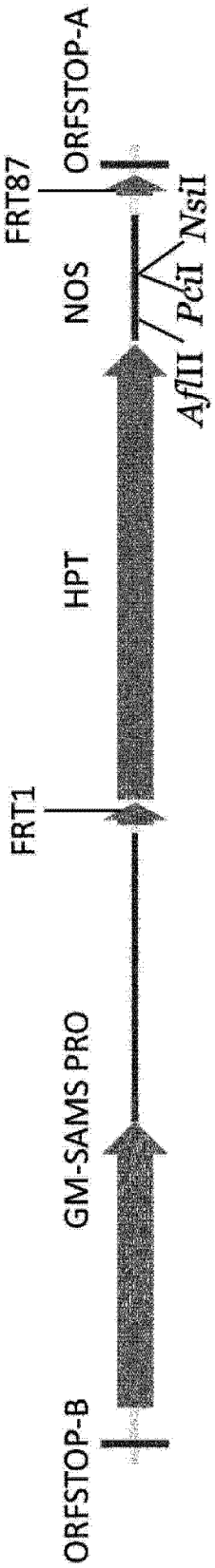

ORFSTOP-B
GM-SAMS PRO
FRT1
HPT
NOS
AflII
PciI
NsiI
FRT87
ORFSTOP-A

图 11

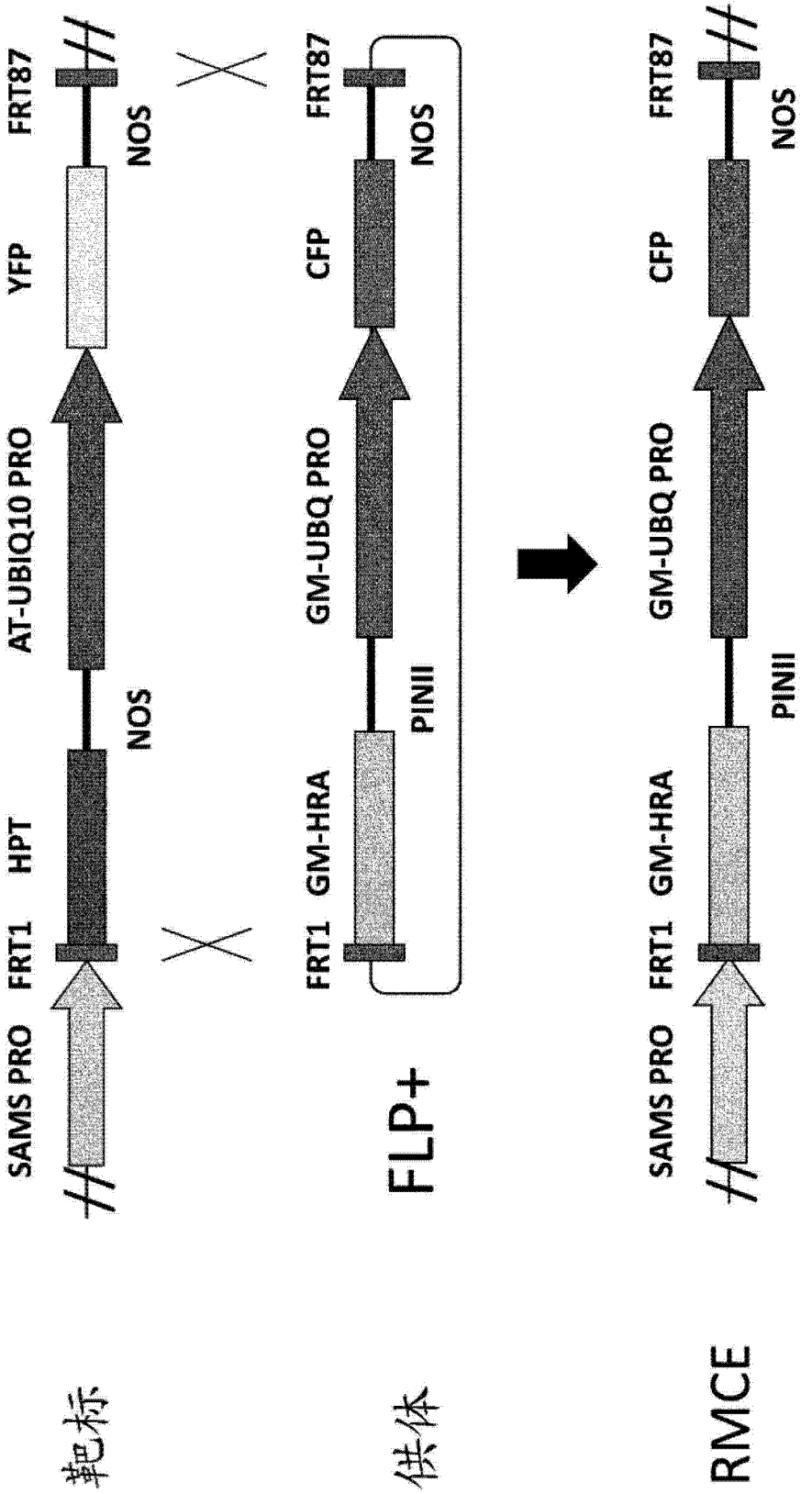

SAMS PRO
FRT1
HPT
NOS
AT-UBIQ10 PRO
YFP
NOS
FRT87
靶标
FRT1
GM-HRA
PINII
GM-UBQ PRO
CFP
NOS
FRT87
供体
FLP+
SAMS PRO
FRT1
GM-HRA
PINII
GM-UBQ PRO
CFP
NOS
FRT87
RMCE

图 12

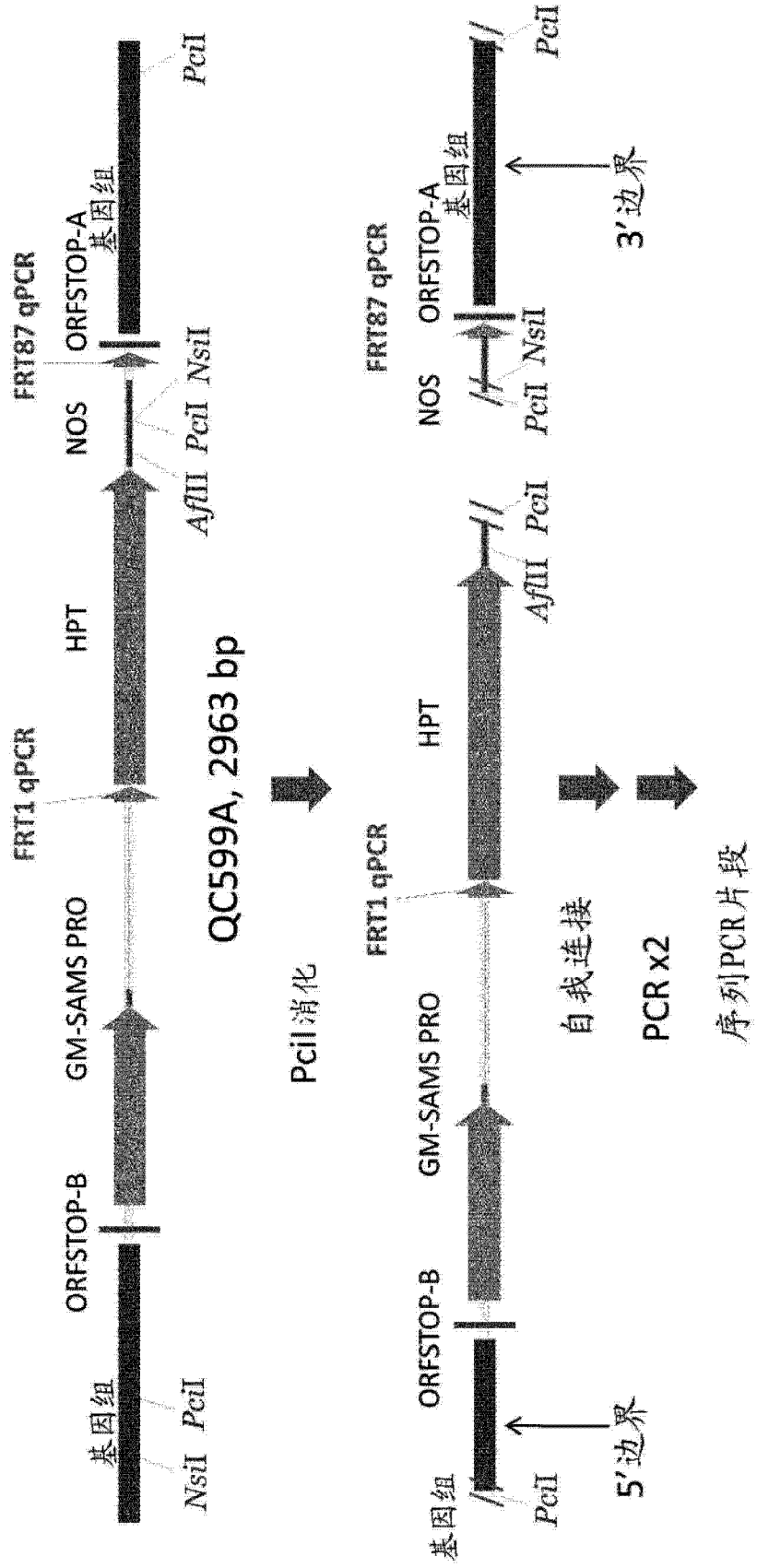

基因组
NsiI
PciI
ORFSTOP-B
GM-SAMS PRO
FRT1 qPCR
HPT
NOS
FRT87 qPCR
ORFSTOP-A
基因组
PciI
AflII
PciI
NsiI
QC599A, 2963 bp
PciI消化
基因组
PciI
5'边界
ORFSTOP-B
GM-SAMS PRO
FRT1 qPCR
HPT
AflII
PciI
自我连接
PCR x2
序列PCR片段
FRT87 qPCR
NOS
ORFSTOP-A
基因组
PciI
NsiI
PciI
3'边界

图 13

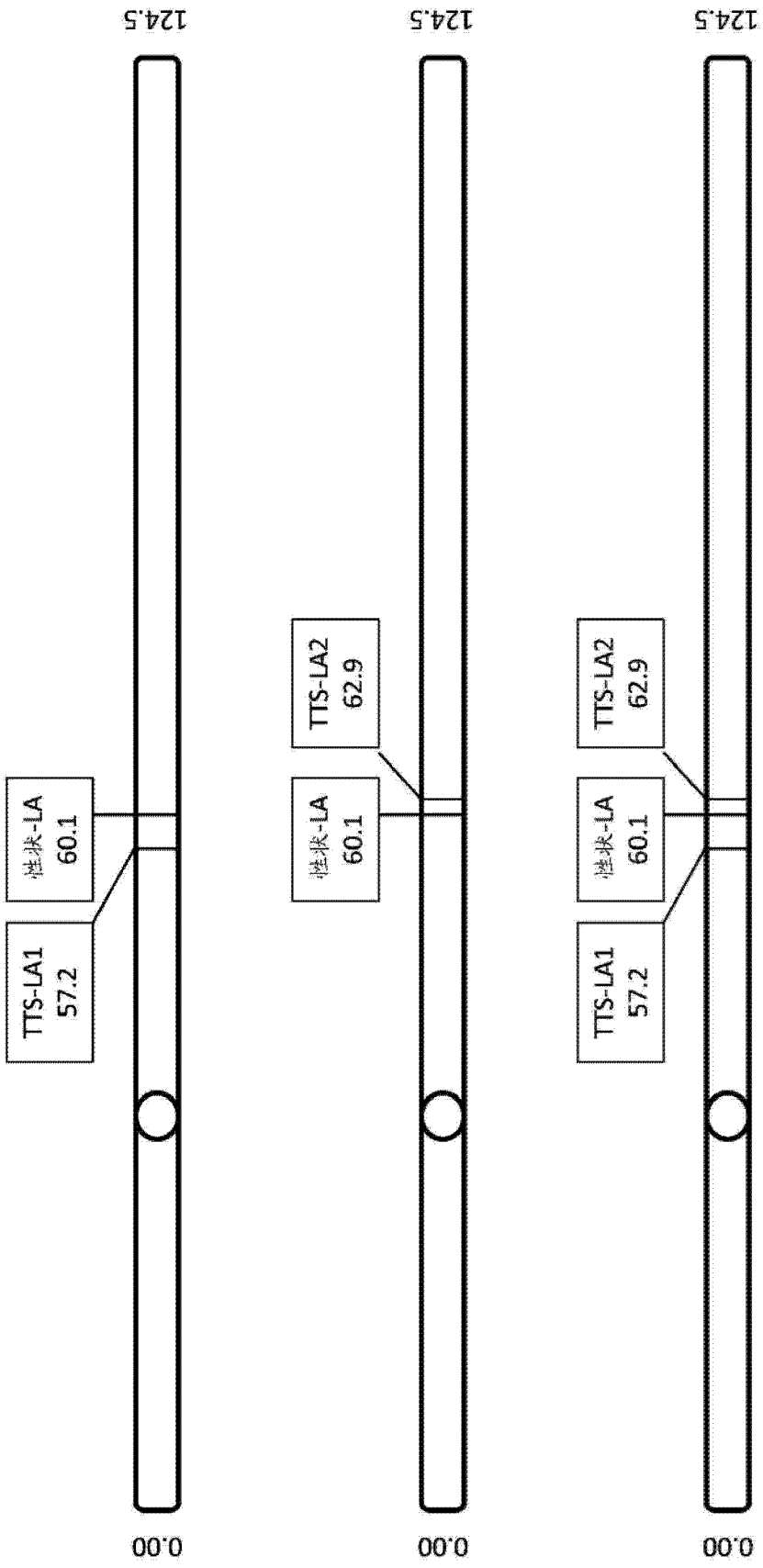


图 14