



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103484433 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310438280. X

(22) 申请日 2007. 07. 18

(30) 优先权数据

60/831, 814 2006. 07. 19 US

(62) 分案原申请数据

200780034442. 6 2007. 07. 18

(71) 申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 X·叶 L·吉尔伯森

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页

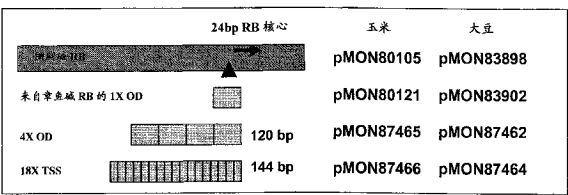
序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

提高植物转化效率的多个转化增强子序列的应用

(57) 摘要

本发明涉及提高农杆菌 (Agrobacterium) 和根瘤菌 (Rhizobium) 介导的植物细胞转化效率的方法和组合物, 通过使用可操作地连接到包含 T-DNA 的重组构建体上的 T-DNA 边界序列上的附加转化增强子序列例如超驱动序列或者 TSS 序列可实现上述转化效率提高。



1. 用包含 T-DNA 边界序列的重组 DNA 构建体转化的转基因植物细胞,所述边界序列可操作地连接到转化增强子序列,后者包含选自以下序列的两个或更多个拷贝:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、与 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:13 中的任一个互补的序列、及它们的组合。

2. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述增强子序列包含所述序列的至少约四个拷贝。

3. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述边界序列是右边界(RB)序列。

4. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述边界序列是左边界(LB)序列。

5. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述构建体包含 SEQ ID NO:10。

6. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中所述构建体包含 SEQ ID NO:11。

7. 权利要求 3 的转基因植物细胞,其中所述 RB 序列来自胭脂碱 Ti 质粒。

8. 权利要求 3 的转基因植物细胞,其中所述 RB 序列来自章鱼碱 Ti 质粒。

9. 权利要求 1 的转基因植物细胞,其中植物细胞来自选自以下的植物:大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。

10. 用包含 T-DNA 边界序列的重组 DNA 构建体转化的转基因植株的细胞,所述边界序列可操作地连接到转化增强子序列,后者包含选自以下序列的两个或更多个拷贝:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、与 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:13 中的任一个互补的序列、及它们的组合。

11. 权利要求 10 的转基因植株的细胞,其中,所述的植株选自:大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。

提高植物转化效率的多个转化增强子序列的应用

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 07 月 18 日和发明名称为“提高植物转化效率的多个转化增强子序列的应用”的 200780034442.6 号发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求获得于 2006 年 7 月 19 日提交的美国临时专利申请 60/831,814 的优先权,其公开通过引用全文结合到本文中。

[0004] 1. 发明领域

[0005] 本发明主要涉及植物生物技术。更具体地说,本发明涉及提高细菌介导的植物转化效率的方法和组合物。

[0006] 2. 相关技术描述

[0007] 在天然的农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的植物细胞的转化中,来自根瘤农杆菌 (*A. tumefaciens*) 的 Ti 质粒或者发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 的 Ri 质粒的一段 DNA 被转移到植物细胞中 (例如 Gelvin, 2003)。该被转移的 DNA (T-DNA) 片段侧翼是不完全的 24bp 正向重复序列,该重复序列可被农杆菌核酸内切酶 VirD2 识别,通过在每一重复序列的一条链上的特定位置点上形成切口而产生单链的 T 链。引发单链的 T 链形成的重复序列称为“右边界” (RB),而终止单链的 T 链形成的重复序列被称为“左边界” (LB)。形成切口后, VirD2 蛋白粘附在所述链的 5' 端,并引导 T 链进入植物细胞,在其他农杆菌和植物编码蛋白的帮助下 T 链被整合到植物基因组中。包含载体骨架序列在内的 T-DNA 区域的序列下游 (从 5' 到 3' 方向) 也可能被转移 (例如 Kononov 等, 1997)。这有可能是由于在转移到植物细胞之前农杆菌中至少一个边界不能形成缺口所致。

[0008] 通过比较多种农杆菌菌株的 RB 和 LB 序列,表明 RB 和 LB 享有共同的基序 (Canaday 等, 1992), 这表明可能有其他元件参与 RB 加工效率的调节。邻近 RB 的顺式作用序列存在于许多农杆菌菌株中,包括根瘤农杆菌和发根农杆菌。这些序列对野生型侵入性而言是必需的 (Veluthambi 等, 1988; Shurvinton 和 Ream 1991; Toro 等, 1989; Toro 等, 1988; Hansen 等, 1992)。在根瘤农杆菌中该序列被 Peralta 等 (1986) 称为“超驱动 (overdrive)”或者“T-DNA 传递增强子”。在发根农杆菌中该序列被 Hansen 等 (1992) 称为“T-DNA 转移激活序列 (TSS)”。超驱动 (“OD”) 序列起始被定义为直接存在于章鱼碱 Ti TL-DNA 的 RB 重复序列之前的特定 24bp 基序 (Peralta 等, 1986)。类似的序列存在于章鱼碱 Ti TR-DNA 的 RB 重复序列之前,并且也存在于胭脂碱 Ti RB 和农杆菌 Ri TL 右边界之前 (Peralta 等, 1986; Shaw 等, 1984; Barker 等, 1983; Slighton 等, 1985)。进一步比较不同根瘤农杆菌显示 8bp 的超驱动核心序列存在于所有右边界序列之前,那些菌株包括胭脂碱菌株 pTiT37、章鱼碱菌株 pTiA6 和发根农杆菌 pRiA4 (Peralta 等, 1986)。

[0009] 章鱼碱超驱动序列的存在增强农杆菌细胞中单链 T-DNA 的形成,促进 T-DNA 转移到植物细胞中,并且对野生型侵入性是必需的 (Peralta 等, 1986, Shurvinton 和 Ream 1991)。当将 pTiT37 (产生胭脂碱的 Ti 质粒) RB 近端的顺式作用序列放置在 pTiT37 的 LB 重复序列之前时,后者能够产生高效的单链 T-DNA,这表明类似超驱动序列确实也存在于胭脂碱 Ti 质粒上 (Culianez-Macia 和 Hepburn 1988, Peralta 等, 1986), 正如其

在其他鉴定的（产生章鱼碱的）Ti 质粒中一样。使异源的章鱼碱超驱动序列整合到胭脂碱 pTiT37RB 之前，导致比仅包含一个合成 pTiT37RB 重复序列的亲本菌株更大的侵入性（Peralta 等，1986）。

[0010] VirC1 蛋白结合到超驱动序列并且被认为可促进 VirD2 产生切口（Toro 等，1988，1989），而 virC 突变导致了在植物中侵入性减弱（Close 等，1987）和加工的单链 T-DNA 序列产量减少。根瘤农杆菌的章鱼碱和胭脂碱 Ti 质粒皆包含 virC 并且可以与 virC 突变反式互补以使减弱的侵入性恢复到野生型水平（Close 等，1987）。

[0011] 在发根农杆菌菌株 8196、A4 和 2659 中发现的 TSS 与根瘤农杆菌中的超驱动序列起着相似的作用。每一种发根农杆菌菌株具有不同但相关的序列（Hansen 等，1992）。8bp 的 TSS 核心序列在 pRiA4 重复 5 次、在 pRi8196 中重复 6 次而在 pRi2659（Genbank 登录号 AJ271050）中重复 17 次（而不是 Hansen 等，1992 中的 16 次）。除这些重复外 pRiA4 还具有保守的 8bp 超驱动核心序列。在 pRiA4 和 pRi8196 中更短的核心序列重复对于野生型侵入性而言是不足够的（Hansen 等，1992）。

[0012] Depicker 等（美国专利公开 2003/0140376 和相应的国际公开 W001/44482）描述了具有修改的 T-DNA 边界以减少或者阻止载体骨架序列的转移的重组构建体。Conner 等（WO 05/121346）描述了 T-DNA 边界类似区域的序列的产生和应用，该区域包含来自植物的序列。Heim 等（美国公开 2003/0188345）描述了具有修饰的边界区的载体用于农杆菌介导的植物转化。Lassner 等（美国公开 2006/0041956）描述了对 T-DNA 边界区域进行修饰以能够鉴定不包含非 T-DNA 序列的转基因事件。

[0013] 虽然前述的研究增加了对现有技术的理解，但是仍需要的是一种方法来提高农杆菌介导的植物转化效率。尽管与缺少这些序列的质粒相比，超驱动或者 TSS 序列的存在增加了野生型农杆菌的侵入性并且促进 T-DNA 转移到植物细胞中，但是如何进一步提高转化效率（包括通过使用超驱动或者 TSS 序列在内）仍是不清楚的。

[0014] 发明概述

[0015] 一方面，本发明提供了增加细菌介导的植物转化效率的方法，其包含如下步骤：a) 将至少一个附加的转化增强子序列引入到包含至少一个 T-DNA 边界区域的植物转化载体中；b) 通过细菌介导的转化用上述载体转化植物细胞，其中所述细菌能够对植物细胞进行转化。该方法任选可包括从植物细胞再生转基因植株。在一个实施方案中，所述附加的转化增强子序列包含 TGTWTGTK (SEQ ID NO:20) 的共有核心序列。在其他实施方案中，所述附加的转化增强子序列选自：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13，和与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或者 SEQ ID NO:13 中的任意一个互补的序列。在具体的实施方案中，本发明提供了包含 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或者 SEQ ID NO:16 的重组 DNA 构建体。

[0016] 本发明所用的转化增强子序列可位于 T-DNA 边界区或序列（例如右边界（RB）序列）的近端，即在侧翼序列例如载体序列和边界序列之间。转化增强子序列可来自根瘤农杆菌的 Ti 质粒例如胭脂碱或章鱼碱质粒，或者可来自发根农杆菌的 Ri 质粒。在某些实施方案中，细菌介导的转化可利用选自农杆菌介导的转化、根瘤菌（*Rhizobium*）介导的转化和中华根瘤菌（*Sinorhizobium*）、中间根瘤菌（*Mesorhizobium*）或者慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium*）介导的转化的技术来实现。在某些实施方案中，转化增强子序列可包含

SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17 或者 SEQ ID NO:18。在进一步的实施方案中，T-DNA 边界区可能包含 1- 约 18 个拷贝的转化增强子序列，包括从约 2 或约 4 到约 18 个拷贝的转化增强子序列。

[0017] 本发明的植物细胞可以是任何植物细胞。在某些实施方案中，所述植物细胞来自选自以下的植物：大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。在具体的实施方案中，所述植物细胞是玉米细胞或大豆细胞。

[0018] 在另一方面，本发明提供重组 DNA 构建体，其包含可操作地连接到转化增强子序列上的 Ti 或 Ri 质粒 T-DNA 边界序列，所述转化增强子序列包含选自以下序列的两个或更多个拷贝：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:13 中的任意一个互补的序列及它们的组合。在具体的实施方案中，本发明提供了包含 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的重组 DNA 构建体。

[0019] 在这样的构建体中，增强子序列可包含该序列的至少约四个拷贝。边界序列可为右边界 (RB) 或者左边界 (LB) 序列。在某些实施方案中，所述构建体可包含 SEQ ID NO:10 和 / 或 SEQ ID NO:11。RB 序列可来自胭脂碱 Ti 质粒或者农杆菌、甘露碱、琥珀碱、黄瓜碱或者章鱼碱 Ti 或 Ri 质粒并且可包含 SEQ ID NO:12。

[0020] 在另一个方面，本发明提供了用本文所提供构建体转化的细胞。该细胞可能是植物或者细菌细胞，包括农杆菌细胞或者根瘤菌细胞。在一个实施方案中，所述植物细胞来自选自以下的植物：大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、大麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草和向日葵。本发明还提供了由本发明的构建体转化的转基因植株。在具体的实施方案中，所述转基因植株可选自：大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、大麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草和向日葵。

[0021] 特别地，本发明涉及以下各项：

[0022] 1. 提高细菌介导的植物转化效率的方法，其包括如下步骤：

[0023] a) 将至少一个附加的转化增强子序列引入到包含至少一个 T-DNA 边界区的植物转化载体中，所述 T-DNA 边界区包含转化增强序列；和

[0024] b) 通过细菌介导的转化用所述载体转化植物细胞，其中所述细菌能够转化植物细胞。

[0025] 2. 第 1 项的方法，其中附加的转化增强子序列包含 SEQ ID NO:20 的共有核心序列。

[0026] 3. 第 2 项的方法，其中所述附加的转化增强子序列包含选自以下的序列：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、和与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:13 中的任一个互补的序列。

[0027] 4. 第 1 项的方法，其中所述转化增强子序列位于 T-DNA 右边界 (RB) 序列的近端。

[0028] 5. 第 4 项的方法，其中所述转化增强子序列来自根瘤农杆菌 (*A. tumefaciens*) 的胭脂碱或章鱼碱 Ti 质粒。

[0029] 6. 第 4 项的方法，其中所述转化增强子序列来自发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 的 Ri 质粒。

[0030] 7. 第 1 项的方法，其中所述细菌介导的转化是农杆菌介导的转化。

- [0031] 8. 第 1 项的方法,其中所述细菌介导的转化是根瘤菌介导的转化。
- [0032] 9. 第 8 项的方法,其中所述根瘤菌介导的转化是农杆菌 (*Agrobacterium*)、根瘤菌 (*Rhizobium*)、中华根瘤菌 (*Sinorhizobium*)、中间根瘤菌 (*Mesorhizobium*) 或慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 介导的转化。
- [0033] 10. 第 1 项的方法,其中所述植物细胞来自选自以下的植物:大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。
- [0034] 11. 第 1 项的方法,其中所述转化增强子序列包含 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、或与 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 互补的序列。
- [0035] 12. 第 1 项的方法,其中所述植物细胞是玉米或者大豆细胞。
- [0036] 13. 第 1 项的方法,其中所述 T-DNA 边界区域包含 1- 约 18 个拷贝的所述转化增强子序列。
- [0037] 14. 第 1 项的方法,进一步包含以下步骤:
- [0038] c) 从所述植物细胞再生转基因植株。
- [0039] 15. 包含 T-DNA 边界序列的重组 DNA 构建体,所述边界序列可操作地连接到转化增强子序列,后者包含选自以下序列的两个或更多个拷贝:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:13 中的任一个互补的序列、及它们的组合。
- [0040] 16. 第 15 项的构建体,其中所述增强子序列包含所述序列的至少约四个拷贝。
- [0041] 17. 第 15 项的构建体,其中所述边界序列是右边界 (RB) 序列。
- [0042] 18. 第 15 项的构建体,其中所述边界序列是左边界 (LB) 序列。
- [0043] 19. 第 15 项的构建体,其中所述构建体包含 SEQ ID NO:10。
- [0044] 20. 第 15 项的构建体,其中所述构建体包含 SEQ ID NO:11。
- [0045] 21. 第 17 项的构建体,其中所述 RB 序列来自胭脂碱 Ti 质粒。
- [0046] 22. 第 17 项的构建体,其中所述 RB 序列来自章鱼碱 Ti 质粒。
- [0047] 23. 用第 15 项的构建体转化的转基因细胞。
- [0048] 24. 第 23 项的细胞,限定为植物或者细菌细胞。
- [0049] 25. 第 24 项的细胞,其中所述细胞是农杆菌细胞。
- [0050] 26. 第 24 项的细胞,其中所述细胞是根瘤菌细胞。
- [0051] 27. 第 24 项的细胞,其中植物细胞来自选自以下的植物:
- [0052] 大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。
- [0053] 28. 用第 15 项的构建体转化的转基因植株。
- [0054] 29. 第 28 项的转基因植株,限定为选自:大豆、玉米、棉花、油菜、水稻、小麦、苜蓿、菜豆、花生、烟草、向日葵、大麦、甜菜、青花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、大白菜、黄瓜、茄子、韭葱、莴苣、甜瓜、燕麦、洋葱、豌豆、胡椒、花生、马铃薯、西葫芦、萝卜、高粱、菠菜、南瓜、糖萝卜、西红柿和西瓜。

[0055] 附图简述

[0056] 后面的附图是本说明的一部分,其被包括以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些图并结合本文提出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0057] 图 1 :用以提高转化效率的不同转化增强子序列的略图。

[0058] 图 2 :pMON87464 的简图。

[0059] 图 3 :pMON87465 的简图。

[0060] 图 4 :改造的 RB 序列 ;超驱动序列用黑体标出,而 24bpRB 核心序列用下划线标出。(A) 胭脂碱 RB 序列 +1x 超驱动序列 (SEQ ID NO :14) ;(B) 胭脂碱 RB 序列 +4x 超驱动序列 (SEQ ID NO :15) ;(C) 胭脂碱 RB 序列 +18x TSS 序列 (SEQ ID NO :16)。

[0061] 序列表描述

[0062] SEQ ID NO :1 用以制备 2X OD 序列的正向引物 Xd463。

[0063] SEQ ID NO :2 用以制备 2X OD 序列的反向引物 Xd464。

[0064] SEQ ID NO :3 用以制备 6X TSS 序列的正向引物 Xd465。

[0065] SEQ ID NO :4 用以制备 6X TSS 序列的反向引物 Xd466。

[0066] SEQ ID NO :5pTiA6 的 24bp 核心 OD 序列。

[0067] SEQ ID NO :68bp1x TSS 序列。

[0068] SEQ ID NO :7pTiA6 的 30bp1x OD 序列 ;SEQ ID NO :17 的反向互补序列。

[0069] SEQ ID NO :8 来自 pTiAB3 的 1X OD 序列。

[0070] SEQ ID NO :9 来自 pTi15955 的 1X OD 序列。

[0071] SEQ ID NO :104X 叠加 OD 序列。

[0072] SEQ ID NO :1118X 叠加 TSS。

[0073] SEQ ID NO :12 具有 1X OD 序列的边界区。

[0074] SEQ ID NO :13 部分 OD 序列。

[0075] SEQ ID NO :14 具有 1X OD 的胭脂碱 RB 区。

[0076] SEQ ID NO :15 具有 4X OD 的胭脂碱 RB 区。

[0077] SEQ ID NO :16 具有 18X TSS 的胭脂碱 RB 区。

[0078] SEQ ID NO :171X OD ;SEQ ID NO :7 的反向互补序列。

[0079] SEQ ID NO :184X 叠加 OD ;SEQ ID NO :10 的反向互补序列。

[0080] SEQ ID NO :19 共有的 OD 序列 (Toro 等,1988)。

[0081] SEQ ID NO :20 共有的 8bp 核心 OD 序列。

[0082] 发明详述

[0083] 以下是本发明的详细描述,供以帮助本领域技术人员实践本发明。在不脱离本发明的精神和范围下本领域一般技术人员可对本文中描述的实施方案做出修改和变更。

[0084] 本发明提供用于提高农杆菌介导的植物细胞转化效率的方法和组合物。对发根农杆菌 K599 (一种大豆超侵入性菌株) 的 20kb T-DNA 区的测序,从而认识到发根农杆菌 K599 中的 pRi 质粒等同于发根农杆菌 NCPBB2659 菌株。因此 K599 菌株的超级侵入性可能与存在于 RB 附近的 TSS 序列的数目相关。因此,在二元载体中对多个超驱动和 TSS 重复的叠加 (stacking) 与胭脂碱 RB (例如来自 pTiT37) 进行测试,以提高转化效率。来自 pTiA6 以 4 拷贝存在的章鱼碱 Ti 质粒的 30bp 超驱动序列 (Shurvinton 和 Ream1991) 和以 18 拷贝存

在的发根农杆菌 NCPBB2659 的 TSS8bp 核心序列,被用以提高 T-DNA 传递效率。

[0085] 对包含不同数目超驱动或者 TSS 序列的构建体效用进行比较的转化研究表明,通过提高转化频率和提高所产生的转基因事件的质量,这些序列附加的“叠加”拷贝的存在提高了转化效率。例如,具有单拷贝插入并且还缺少载体骨架序列(例如 oriV)的转基因事件的比例增加。通过减少为进一步商业开发而进行的选择事件所需来源的数量,增加转化频率和优质事件(qualityevent),使转化过程整体效率得以提高。

[0086] 因此本发明提供了改进方法,用于获得可育的转基因植株,以及用于转化植物细胞或组织和使经转化的细胞或组织再生成为可育的转基因植株。为了起始本发明所述的转化过程,首先要选择需要插入到植物细胞或者组织中的遗传组分。遗传组分可以包括任何通过本发明方法引入到植物细胞或者组织中的核酸。遗传组分可以包括非植物 DNA、植物 DNA 或者合成 DNA。

[0087] 在本发明的某些实施方案中,遗传组分被并入到例如重组体、双链质粒或者载体分子的 DNA 组合物中,所述 DNA 组合物包括遗传组分例如:(a) 在植物细胞中起产生 RNA 序列作用的启动子,(b) 产生编码所需蛋白或多肽的 RNA 序列的结构 DNA 序列和(c) 在植物细胞中起到使 RNA 序列 3' 端聚腺苷酸化作用的 3' 端非翻译 DNA 序列。所述载体也可包含促进转化和调节所要基因的表达的遗传组分。

[0088] 所述遗传组分通常被定向以表达 mRNA,该 mRNA 在一个实施方案中可以翻译成蛋白。以双链形式存在的植物结构编码序列(基因、cDNA、合成 DNA 或者其他 DNA)的表达包括:通过 RNA 聚合酶将一条 DNA 链转录成信使 RNA(mRNA)以及接着在细胞核中加工 mRNA 初级转录物。这样的加工包括 mRNA3' 端的聚腺苷酸化,涉及 3' 非翻译区。

[0089] 制备包含所需遗传组分并可用于转化植物的质粒或载体的一般方法、以及构建这些载体的方法为现有技术所已知。载体通常由许多遗传组分组成,包括但不限于,调节元件例如启动子、前导序列、内含子和终止序列。调节元件也称为反式或顺式调节元件,视与该元件与其所控制序列或者基因的接近程度而定。所述启动子区包含一段碱基序列,转导信号使 RNA 聚合酶与 DNA 缔合并以 DNA 链中的一条作为模板起始 mRNA 转录,形成相应的 RNA 互补链。

[0090] 构建体还可包含在细菌细胞中提供复制功能和抗生素筛选的质粒骨架 DNA 区段,例如大肠杆菌复制起点如 ori322、广谱宿主性复制起点例如 oriV 或者 oriRi 和选择标记的编码区域例如 Spec/Strp 选择标记基因(其编码赋予壮观霉素或链霉素耐受性的 Tn7 氨基糖苷腺苷酸转移酶(aadA))或庆大霉素(Gm, Gent)选择标记基因。对植物转化而言,宿主细菌菌株常常是携带对于表达单元具有转移功能的质粒的根瘤农杆菌 ABI、C58、LBA4404、EHA101 或者 EHA105。植物转化领域中技术人员所知的其他细菌菌株可以用于本发明,包括发根农杆菌、中华根瘤菌、中间根瘤菌、慢生根瘤菌和根瘤菌菌株。

[0091] 在文献中已经描述了许多在植物中具有活性的启动子。这样的启动子包括但不限于,胭脂碱合成酶(NOS)启动子和章鱼碱合成酶(OCS)启动子,它们携带在根瘤农杆菌的根瘤诱导质粒中;花椰菜花叶病毒启动子例如花椰菜花叶病毒(CaMV)19S 和 35S 以及玄参花叶病毒(FMV)35S 启动子,加强的 CaMV35S 启动子(e35S);以及来自核酮糖二磷酸羧化酶的小亚基(ssRUBISCO,一种非常丰富的植物多肽)的光诱导启动子。所有这些启动子已经被用于构建已在植物中表达的不同类型的 DNA 构建体。也可构建杂合启动子以增加转录活性

或者联合所需的转录活性、可诱导性和组织或发育特异性。

[0092] 因此,在植物中起作用的启动子可为所描述的可诱导的、病毒性的、合成的、组成性的,时间调节的、空间调节的、和 / 或者时空调节的。组织增强的、组织特异的或者发育调节的其他启动子也在现有技术中所知并且被考虑在本发明实践中可用。可以从多种来源例如植物和植物 DNA 病毒中获得有用的启动子。优选所选的特定启动子应该能够造成充分表达,以产生有效数量的目标基因产物。

[0093] 若有需要,在本发明 DNA 构建体(即嵌合 / 重组的植物基因)中所用的启动子可以经过修改以影响其控制特性。可以通过与操纵区连接、进行随机或受控诱变等方法获得启动子。此外,启动子可经改造以包含多种“增强子序列”以协助促进基因表达。

[0094] 由本发明的 DNA 构建体产生的 mRNA 也可包含 5' 非翻译前导序列。该序列可以来自选以表达基因的启动子并且也可经特定修饰以增加 mRNA 的翻译。5' 非翻译区域也可以从病毒 RNA、从合适的真核基因或者从合成的基因序列获得。这样的“增强子”序列可以合乎需要地增加或者改变产生的 mRNA 的翻译效率并且常称为翻译增强子。其他用于增强表达或者影响基因转录或翻译的遗传组分也被考虑作为遗传组分。嵌合构建体的 3' 非翻译区域优选包含转录终止子、或具有等价功能的元件以及聚腺苷酸信号位点,其在植物中起聚腺苷酸化 RNA 的 3' 端的作用。合适的 3' 区的实例为 (1) 3' 转录非翻译区域,其包含农杆菌根瘤诱导 (Ti) 质粒基因例如胭脂碱合成酶 (nos) 基因的聚腺苷酸信号,和 (2) 植物基因例如大豆贮藏蛋白基因和核酮糖 -1,5- 二磷酸羧化酶 (ssRUBISCO) 小亚基基因。优选的 3' 区的实例来自于豌豆的 ssRUBISCO E9 基因。

[0095] 典型地,位于聚腺苷酸位点下游几百个碱基对的 DNA 序列用作终止转录。这些 DNA 序列在本文中被称为转录终止区。这些区域为转录信使 RNA (mRNA) 的有效聚腺苷酸化所需并且称为 3' 非转录区。RNA 聚合酶通过聚腺苷酸化发生的位点转录编码 DNA 序列。

[0096] 在许多转化体系中,优选包含可选择的、可筛选的或可选的 (scoreable) 标记基因的转化载体。这些遗传组分在本文中也称为功能性遗传组分,因为其产生可用于鉴定转化植株的产物或有所需效用的产物。

[0097] 用作筛选工具的 DNA 可在再生植物组织中起作用,以产生可赋予植物组织对另外的毒性化合物耐受的化合物。可作为可选择的、可筛选的或可选的标记使用的目标基因可以包括但不限于:葡萄糖醛酸酶 (gus)、绿色荧光蛋白 (gfp)、荧光素酶 (lux)、抗生素例如卡那霉素 (Dekeyser 等,1989),给予对除草剂耐受的基因如对草甘膦 (Della-Cioppa 等,1987),例如 CP4EPSPS (美国专利 5,627,061 ;美国专利 5,633,435 ;美国专利 6,040,497 ;美国专利 5,094,945 ;W004/074443 ;W004/009761) ;如对草胺膦的 (美国专利 5,646,024,美国专利 5,561,236,美国专利 5,276,268 ;美国专利 5,637,489 ;美国专利 5,273,894) ;如对 2,4-D (W005/107437) 和麦草畏,例如 DMO (美国专利 7,022,896) 耐受。也可实行其他筛选方法,包括但不限于对草丁膦、双丙氨磷耐受和阳性筛选机制 (Joersbo 等,1998) 并且也将落入本发明的范围内。在 Miki 和 McHugh (2004) 中公开了各种可选择的 / 可筛选的 / 可选的标记的实例和编码它们的基因。

[0098] 本发明可与任何合适的植物转化质粒或载体一起使用,这些质粒或载体包含上述可选择或可筛选标记和相关的调节元件、连同一种或多种以足以赋予个别所需特征的方式表达的核酸 (目标结构基因)。本发明所考虑的合适目标结构基因的实例包括但不限于:

昆虫或者害虫耐受性基因,除草剂耐受性基因,品质改良基因例如产量提高、营养加强、环境或者胁迫耐受性,或者在植物生理、生长、发育、形态或者植物产物上有任何想要的改变的基因。

[0099] 备选地,上述 DNA 编码序列可以通过编码非翻译 RNA 分子来影响这些表型,这些非翻译 RNA 分子例如通过包括反义介导和共抑制介导的机制在内的双链 RNA 介导机制(参见例如 Bird 等,1991),造成内源基因表达受到靶向性抑制。所述 RNA 还可以是一种被加工以切割所需内源 mRNA 产物的催化性 RNA 分子(即核酶)(参见例如 Gibson 和 Shillitoe, 1997)。更具体地说,关于反义调节植物细胞中基因表达的详述参见美国专利第 5,107,065 号,而关于通过转录 dsRNA 实现植物中基因阻抑的详述参见美国专利第 6,506,559 号、美国专利申请公开第 2002/0168707 号 A1 和美国专利申请系列第 09/423,143(参见 W098/53083)、09/127,735(参见 W099/53050)和 09/084,942 号(参见 W099/61631),以上所有通过引用全文结合到本文中。

[0100] 还考虑造成其他内源基因沉默(例如包括 miRNA 的 RNAi 技术)以获得一种表型的序列的使用。例如 RNAi 可用于沉默一种或多种引起可选表型的基因。一个实施方案是组装转录反向重复序列的 DNA 盒,以产生双链 RNA(dsRNA),该双链 RNA 通常至少长约 19-21bp 并且与一个或者多个待靶向沉默基因的一部分对应。因此任何产生表达感兴趣的表型或者形态变化的蛋白或 mRNA 的基因对本发明的实践都是有用的。

[0101] 可通过本发明所包含的方法引入的例示性核酸包括:例如外源 DNA 序列(即来自另一个种的序列或者基因),或者甚至是起源于或者存在于相同种中但通过遗传工程方法而非传统的繁殖或者育种技术并入到受体细胞中的基因或者序列。然而术语外源的也意指通常在待转化细胞中不存在的基因;或指不以如在转化 DNA 区段中发现的形式或者结构等存在的基因;或指正常存在但希望有不同的表达的基因。因此,术语“外源的”基因或者 DNA 意指引入到受体细胞中的任何基因或者 DNA 区段,而无论是否可能已有类似的基因存在于这样的细胞中。包括在外源的 DNA 中的 DNA 类型可以包括已经存在在植物细胞中的 DNA、另一种植物中的 DNA、不同的生物体的 DNA 或外部产生的 DNA,例如包含基因反义信息的 DNA 序列、或基因或者序列的合成或修饰型的 DNA 编码序列。

[0102] 根据本公开,很多其他可能的可选择的或可筛选的标记基因、调控元件和其他目标序列对本领域的技术人员将是显而易见的。因此,前述讨论旨在是示范的而并非无遗漏的。

[0103] 构建植物转化载体或构建体之后,通常使在体外制成 DNA 组合物的核酸分子引入合适的宿主例如大肠杆菌中并配入另一个合适的宿主例如农杆菌或者根瘤菌;或直接转化到感受态农杆菌或者根瘤菌中。这些技术为本领域技术人员所熟知并且已经对许多植物体系作出描述,包括大豆、棉花和小麦(参见例如美国专利第 5,569,834 和 5,159,135 号以及 W097/48814)。本领域技术人员将认识到农杆菌介导的转化方法的效用。菌株可包括但不限于:根瘤农杆菌菌株 C58 的卸甲衍生物、用以介导 DNA 转移入植物细胞的胭脂碱菌株;章鱼碱菌株例如 LBA4404;或农杆菌菌株例如 EHA101、EHA105 或具有 Ti 或 Ri 质粒的豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*) USDA2370。已经报道了这些菌株在植物转化上的用途而且本领域技术人员熟悉这些方法。

[0104] 通常用包含重组构建体的根瘤农杆菌或发根农杆菌接种待转化的植物组织,使两

者共培养,并在适合的条件下进行筛选,所述重组构建体包含至少一个外源超驱动或者 TSS 序列、待转移的目标序列和至少一个用以限定待转移 DNA 的 RB 序列。在某些实施方案中,还有至少一个 LB 序列存在于重组构建体中。在某些其他实施方案中,边界序列可以是“植物来源类似边界序列”。在 Rommens 等,2005、Rommens 2004a、Rommens 等,2004b 中描述了鉴定和使用这样的序列的方法。

[0105] 本发明可以与任何可转化的细胞或者组织一起使用。本领域内技术人员认识到可转化的植物组织通常指那些具有外源 DNA 插入到其基因组并在适合的培养条件下可以形成分化植株的组织。这些组织可以包括但是不限于细胞悬浮物、愈伤组织、下胚轴组织、子叶组织、胚、分生组织、根和叶。例如,可转化的组织可包括:来自花药愈伤或者胚状体、小孢子、花序和叶组织。其他组织也被考虑在本发明的实践中有效,并且对于特定植物品种需要特定的外植体这已为现有技术所知或者可以通过常规的筛选和测试实验确定,由此在转化过程使用了不同的外植体并且鉴定出了那些在产生转基因植物中更成功的。

[0106] 已经公开了对许多作物包括棉花、大豆、芸苔 (Brassica) 和花生利用根瘤农杆菌或者发根农杆菌转化双子叶植物并获得转基因植株的方法。也已经报道了通过基于根瘤农杆菌或者发根农杆菌的方法实现对单子叶植物的成功转化。至少在芦笋、大麦、玉米、燕麦、水稻、甘蔗、苇状羊茅和小麦中已经实现并报道了转化和植物的再生。在美国专利第 5,846,797、5,159,135、5,004,863 和 6,624,344 号中公开了可以特别用于棉花转化背景的技术。在例如美国专利 5,750,871 中公开了具体用于转化芸苔属植物的技术。在例如 Zhang 等 (1999) 和美国专利 6,384,301 中公开了转化大豆的技术;而在例如美国专利 5,981,840、美国专利 7,060,876、美国专利 5,591,616、W095/06722 和美国专利公开 2004/244075 中公开了转化玉米的技术。

[0107] 在一个实施方案中,在包含抑制农杆菌和根瘤菌生长的抗生素且没有筛选剂的培养基(延迟培养基)上进行培养之后,使外植体在选择生长培养基上培养,所述生长培养基包括但不限于包含植物细胞筛选剂的愈伤诱导培养基。已经描述了典型的筛选剂,其包括但不限于抗生素例如 G418、巴龙霉素、卡那霉素或者其他化学物质例如草甘膦、麦草畏和草胺膦。接着将在筛选培养基上存活的植物组织培养物转移到适于产生转化植株的再生培养基上。再生可以通过几个步骤执行。本领域技术人员知道可以使用的不同类型的培养基和转移所需条件,并可根据每一种植物体系为植株转化和再生来对它们进行优化。

[0108] 接着分析产生的转化株以确定是否存在包含在转化载体上的特定的目标核酸。分子分析可以包括但不限于 DNA 印迹或者 PCR(聚合酶链式反应)分析。可执行这些或者其他熟知的方法,以确认通过公开方法产生的转化植株的稳定性、插入的拷贝数以及 T-DNA 侧翼的载体骨架序列的存在情况。这些方法为本领域技术人员所熟知并且已被报导过(参见例如 Sambrook 等,1989)。

[0109] 前述讨论仅仅是对标准的转化和再生实验方案的粗略描述。本领域技术人员知道具体作物和具体方案可以与粗略描述稍微有所不同。每一种体系也可使用多种培养基。本领域的技术人员熟悉当适合地进行补充时支持植物组织生长和发育的组织培养培养基种类。这些组织培养培养基可以作为商业制剂而购得或者也可以由本领域的技术人员定制和修改。这样的培养基的实例包括但不限于由 Murashige 和 Skoog(1962)、Chu 等(1975)、Linsmaier 和 Skoog(1965)、Uchimiya 和 Murashige(1962)、Gamborg 等(1968)、

Duncan 等 (1985)、McCown 和 Lloyd(1981)、Nitsch 和 Nitsch(1969) 以及 Schenk 和 Hildebrandt(1972) 描述的培养基或者根据需要进行补充的这些培养基的衍生。本领域技术人员知道用于转化和再生的培养基和培养基补充物 (例如营养和生长调节剂) 通常根据特定的目标作物或者感兴趣的品种进行优化。试剂是市售的并且可从许多供应商处购得 (参见例如 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)

[0110] 在许多 Ti 质粒中鉴定有“超驱动”序列, 其中包括 pTiA6、pTiAB3 和 pti15955。例如使用 Wis. 53711, 麦迪逊, 威斯康辛大学生物技术中心, 遗传计算机组, 序列分析软件包的“BestFit”、“Gap”或“FASTA”程序, 或者使用“BLAST”程序 (Altschul 等, 1990), 或者另一个可获得的 DNA 序列分析包, 可以鉴定出与超驱动或者 TSS 具有高度同源性的其他序列。当这样的序列以多拷贝于 RB 序列附近存在时, 可以测定其转化提高活性, 这与下文对增强子活性进行描述的序列相似。

[0111] 本文中所用的“转化的频率”或者“转化频率”指所产生的转基因事件 / 外植体的百分比或所产生转基因植株 / 外植体的百分比。

[0112] “边界序列”, 例如右边界 (RB) 或者左边界 (LB), 指限定转移 DNA (T-DNA) 区域末端的直接重复核酸序列, 通常约 24bp 长。边界序列可来自农杆菌的 Ti 或者 Ri 质粒, 或者可为功能相似的植物来源的序列。

[0113] “T-DNA 边界序列”指 RB 或者 LB 序列和相关的侧翼序列, 通常约 100bp 长, 并且如在自然中发现的, 可以包括转录增强子序列。

[0114] 本文中所用“转化效率”, 指任何改进, 例如通过减少为进一步商业开发而进行的选择事件所需来源的数量, 实现影响转化过程整体效率的转化频率和优质事件的增加。

[0115] 本文所使用的“转化增强子”指超驱动和 TSS 序列。

[0116] 当第一核酸序列与第二核酸序列经过排列 (arrange) 致使前者影响后者功能时, 则第一核酸序列与第二核酸序列“可操作连接”。优选两个核酸序列是单个邻接的核酸分子的一部分。超驱动或者 TSS 增强子序列可直接位于邻近边界序列例如 RB 序列。可供选择地, 在某些实施方案中, 超驱动或者 TSS 序列位于边界序列末端约 1、10、25、50、100、250、500、1000 或者更多核酸处, 包括所有中间范围。超驱动序列可位于相应于边界的每一个方向。

实施例

[0117] 本领域技术人员将理解本发明提供的方法和组合物的许多优点。下述实施例被包括在内以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解下述实施例中公开的技术代表发明者发现的在本发明实践中作用良好的技术, 因此可以考虑为构成本发明实践的优选模式。然而, 根据本公开本领域技术人员应当理解, 在不脱离本发明的精神和范围下, 在公开的具体实施方案中可以作出很多改变并仍获得类似或者相似的结果。本文所引用的全部参考文献到作为补充、解释、提供背景或教导本文所用方法、技术或者组合物的程度下, 通过参考合并到本文中。

[0118] 实施例 1

[0119] 转化增强子序列的合成

[0120] 1) 4x 超驱动序列的合成

[0121] 将 2x30bp 超驱动引物对 5' caaacaacatacacagcgacttattcacacaacacatacacagcgacttattcaca3' (Xd463 ;SEQ ID NO :1) 和 5' tgtgaataagtcgctgtgtatgtttgtgtgaataagtcgctgtgtatgtttgtttg3' (Xd464 ;SEQ ID NO :2) 合成、混合并且在 Stratagene (La Jolla, CA) 高保真 **PfuTurbo®** 聚合酶存在下 PCR 扩增 20 个循环,以合成 4x 30 bp 超驱动 (OD) 序列 (5' caaacaacatacacagcgacttattcacacaacacatacacagcgacttattcacacaacacatacacagcgacttattcaca3' ;SEQ ID NO :18)。在 1% 琼脂糖凝胶上 PCR 产物分成几部分,将对应的大小范围在 100–300bp 之间的凝胶部分切下、经纯化并连接到 Invitrogen (Carlsbad, CA) 的 TOP0 Zero 平端 PCR 载体上。通过测序确定重复叠加。尽管在随后的多拷贝超驱动构建体的克隆中只用了 4x30bp 超驱动插入,但是 PCR 后观察到至多 6x 的超驱动序列,。

[0122] 2) 18x TSS 序列的合成

[0123] 将 6x8bp TSS 重复引物对:

[0124] 5' ctgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaa3' (Xd465 ;SEQ ID NO :3) 和 5' ttcgtcagttcgtcagttcgtcagttcgtcagttcgtcagttcgtcag3' (Xd466 ;SEQ ID NO :4) 合成、等份混合并且在 Stratagene (La Jolla, CA) 的 **Pfu Turbo®** 聚合酶存在下扩增 5 个循环。切下 100–300bp 大小的凝胶薄片、经纯化并连接到 Invitrogen 的 TOP0 Zero 平端 PCR 载体中。通过测序确认至多 35x TSS 重复,但只保留 18x TSS 重复作进一步克隆用。超驱动和 TSS 的大小取决于 PCR 循环和切下的凝胶位置。

[0125] 实施例 2

[0126] 具有 RB 连同超驱动、附加的超驱动或 18xTSS 的的载体的构建

[0127] 为了将超驱动或者 TSS 序列置于 24bpRB 之前,将 EcoRI 位点引入到胭脂碱 RB 中,其位于 RB (pMON83900 的) 上游 11bp 处。从被 EcoRI 消化的相应的 TOP0 克隆载体上切下 4x 超驱动序列或者 18xTSS 序列,将其插入到被 EcoRI 切开的 pMON83900 中,分别得到 pMON83903 和 pMON83909。

[0128] 用 HindIII/SpeI 消化 pMON83903 或 pMON83909 的包含 4x 超驱动序列或者 18xTSS 序列的经修饰的 RB,用此包含 4x 超驱动或者 18xTSS 增强子序列的 HindIII/SpeI 区段置换 pMON83902 的 1x 超驱动 RB 序列,分别得到 pMON87462 和 pMON83864 用于大豆转化。可供选择的是,通过插入 pMON83903 或 pMON83909 的 SpeI/SalI 片段,来对 pMON80105 的 RB 进行修饰从而使 4x 超驱动或者 18xTSS 序列被包含,以分别获得 pMON87465 和 pMON87466 用于玉米转化。在图 1 和 4 以及 SEQ ID NO :14–16 中展示了具有 1x、4x 和 18x 转化增强子序列的经修饰的 RB。

[0129] 通过首先根据标准实验方案组装包含 30bp 超驱动序列的寡核苷酸,然后将其克隆到 **pBlueScript® II** (Stratagene Inc., La Jolla, CA) 来合成包含 1x 超驱动序列 (SEQ ID NO :17) 的构建体,得到 pMON80088。接着将来自 pMON80088 的 SpeI 和 NotI (用聚合酶补平) 片段插入到用 SpeI 和 SmaI 消化的 pMON80105 中,得到 pMON80121 用于棉花转化。对于大豆转化,通过利用 PmeI/NdeI 限制性内切酶位点用来自 pMON80121 的 1x 超驱动 RB 片段替代 pMON83898 中的 RB,得到 1x 超驱动 RB 构建体 pMON83902。

[0130] 实施例 3

[0131] 超驱动或者 TSS 增强型 RB 序列对玉米的转化

[0132] 如在美国专利申请公开 2004/244075 所描述的,用包含 oriV 的载体 pMON80105、pMON80121、pMON87465 或 pMON87466 转化玉米 (*Zea mays*) 细胞,以评价附加的超驱动和 TSS 增强子序列的叠加提高转化频率的能力,以及评价包含低拷贝数目 T-DNA 插入和缺少载体骨架序列的事件的比例(例如来自大肠杆菌的 oriV)。对照处理包括用缺少超驱动或者 TSS 序列的 pMON80105 的转化。如表 1 所示,包含叠加的增强子序列的构建体的使用导致了转化频率在统计学上显著增加。用这些构建体也获得了更高百分比的优质 TF(转化频率)。优质 TF 结合了 TF 和具有一个或两个拷贝的事件。同样,具有一个或者两个拷贝的事件百分比也增加了。

[0133] 表 1:转化增强子序列对玉米中转化频率和事件质量的影响

[0134]	RB 中的 超驱动序 列	构建体 (pMON)	% 转 化 频 率 (TF)a	% 优 质 TF	% 不考虑骨架的 1 个或 2 个拷贝的事 件
	4X OD	87465	25.3	12.7%	50.1
	1X OD	80121	24.1	10.4%	43.2
	18X TSS	87466	22.8	10.2%	44.7
	对照	80105	17.7	6.4%	39.0

[0135] a 表示统计学显著性

[0136] 实施例 4

[0137] 超驱动或者 TSS 增强的 RB 序列对大豆的转化

[0138] 如在美国专利 6,384,301 所描述的,用包含 oriV 的载体 pMON83898、pMON83902、pMON87462 或 pMON87464 转化大豆 (*Glycine max*) 细胞,以评价附加的超驱动和 TSS 增强子序列的叠加提高转化频率的能力,以及评价和包含低拷贝数目的 T-DNA 插入和缺少载体骨架序列的事件的比例(例如来自大肠杆菌的 oriV)。叠加的 4x 超驱动序列和 18xTSS 增强子序列分别在 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 中找到。对照处理包括用缺少超驱动或者 TSS 序列的 pMON83898 的转化。如表 2-3 所示,包含叠加的增强子序列的构建体的使用导致了转化频率的增加。单拷贝和无骨架序列的事件的比例也得以增加(表 3;列 5)。同样,具有一个或两个拷贝的事件百分比也得到增加。

[0139] 表 2:转化增强子序列对大豆转化频率的影响

[0140]

增强子序列	pMON 质粒	转化频率 (%)
对照	83898	2.79

1X 超驱动	83902	3.06
4X 超驱动	87462	4.22*
18X TSS	87464	4.10*

[0141] * 统计学显著增加

[0142] 表 3 :转化增强子序列对事件质量的影响

[0143]

pMON 质粒	事件总数	oriV 阳性 / 总数 GOI 阳性	oriV 阴性 / 总数 GOI 阳性	1 个拷贝 / oriV 阴性	不考虑是否存在 oriV 的 1 或 2 拷贝
83898 (对照)	31	6/24 (25%)	18/24 (75%)	1 (4%)	19 (79%)
83902 (1X OD)	61	16/45 (35.5%)	29/45 (64.5%)	6 (13.3%)	30 (66.7%)
87462 (4X OD)	43	12/33 (36.4%)	21/33 (63.6%)	4 (12.1%)	23 (69.7%)
87464 (18X TSS)	71	10/50 (20%)	40/50 (80%)	17 (34%)	37 (74%)

[0144] 实施例 5

[0145] 另外的转化增强子序列

[0146] 除了上面所用的 pTiA6 的超驱动序列外 (SEQ ID NO:17), 其他超驱动序列 (包括反义互补序列) 已为现有技术所知 (例如 Shurvinton 和 Ream, 1991), 并且同样可被使用。这些序列可包括但不限于那些来自于 pTiAB3 (GenBank M63056) (TGTGAATAAATCGCTGTGTATGTTTGTGTTG; SEQ ID NO:8) 和 pTi15955 (GenBank AF242881) (TTGTCTAAATTTCTGTATTTGTTTGTGTTG; SEQ ID NO:9), 以及共有序列 AAACAAACATACACAGCGAC TTATTCACA (SEQ ID NO:13) 和 TAARTYNCTGTRTNTGTTTGTGTTG; (SEQ ID NO:19, Toro 等, 1988) 等等的序列。可相应地合成引物并如在实施例 1 中所描述的进行 PCR 以创造包含这些序列的 DNA 区段, 用于构建与 pMON83902、pMON80121、pMON87462 和 pMON87465 等等类似的重组质粒。可用包含一个或更多的这些转化增强子序列的构建体转化作物植株, 并且可以根据其提高转化频率和包含低拷贝数目的 T-DNA 插入和缺少载体骨架序列的事件比例的能力, 对这些增强子序列进行评价。

[0147] ***

[0148] 根据本公开,在本文中公开或要求保护的所有组合物和方法可以在没有不当的实验下制备和实行。虽然已根据前面的阐述性实施方案对本发明的组合物和方法作出了描述,但对本领域的技术人员来说显而易见的是,在不背离本发明真实构思、精神和范围下,变更、变化、修改和变动可应用于本文描述的组合物、方法和步骤或方法步骤的顺序。更具体地说,可用化学和生理上皆相关的某些试剂替代本文所述的试剂同时可以获得相同或者相似的结果,这一点是显而易见的。所有这样的对于本领域技术人员显而易见的类似的替代和修改被认为落入根据所附权利要求所限定的本发明精神、范围和构思之内。

[0149] 参考文献

[0150] 下面的参考文献,在某些程度上其对本文的陈述提供例示性的程序上或其他细节补充,通过引用被特别结合到本文中。

[0151] 美国专利 5,004,863,美国专利 5,094,945;美国专利 5,107,065;美国专利 5,159,135;美国专利 5,273,894;美国专利 5,276,268;美国专利 5,561,236;美国专利 5,569,834;美国专利 5,591,616;美国专利 5,627,061;美国专利 5,633,435;美国专利 5,637,489;美国专利 5,646,024;美国专利 5,750,871;美国专利 5,846,797,美国专利 5,981,840;美国专利 6,040,497;美国专利 6,506,559;美国专利 6,624,344;美国专利 6,384,301;美国专利 7,022,896;美国专利 7,060,876。

[0152] 美国专利系列 09/084,942;美国专利系列 09/127,735;美国专利系列 09/423,143

[0153] 美国专利公开 2002/0168707A1;美国专利公开 2003/0188345;美国专利公开 2004/0140376;美国专利公开 2004/244075;美国专利公开 2006/0041956。

[0154] Altschul 等, *J. Mol. Biol.*, 215 :403-410, 1990。

[0155] Barker 等, *Plant Mol. Biol.*, 2 :335-350, 1983。

[0156] Bird 等, *Biotech Gen. Engin. Rev.*, 9 :207-227, 1991。

[0157] Canaday 等, *Mol. Gen. Genet.*, 235 :292-303, 1992。

[0158] Chu 等, *Scientia Sinica*, 18 :659, 1975。

[0159] Close 等, *J. Bacteriol.*, 169(11) :5113-5118, 1987。

[0160] Culianez-Macia 和 Hepburn, *Pl. Mol. Biol.*, 11 :389-399, 1988。

[0161] Dekeyser 等, *Pl. Physiol.*, 90 :217-223, 1989。

[0162] Della-Cioppa 等, *Bio/Technology*, 5579-584, 1987。

[0163] Depicker 等, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 :561-573, 1982。

[0164] Duncan 等, *Planta*, 165 :322-332, 1985。

[0165] Gamborg 等, *Exp. Cell Res.*, 50 :151, 1968。

[0166] Gelvin, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 67 :16-37, 2003。

[0167] Gibson 和 Shillito, *Mol. Biotech.*, 7 :125-137, 1997。

[0168] Hansen 等, *Plant Mol. Biol.*, 20(1) :113-122, 1992。

[0169] Jen 和 Chilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(11) :3895-3899, 1986。

[0170] Joersbo 等, *Mol. Breed.*, 4 :111-117, 1998。

[0171] Kononov 等, *Plant J.* 11 :945-957, 1997。

[0172] Linsmaier and Skoog, *Physiol. Plant.*, 18100, 1965。

- [0173] McCown and Lloyd, HortScience, 16 :453, 1981。
- [0174] Miki and McHugh, J. Biotechnol. , 107 :193, 2004。
- [0175] Murashige and Skoog, Physiol. Plant, 15 :473-497, 1962。
- [0176] Nitsch and Nitsch, Science, 163 :85-87, 1969。
- [0177] PCT 申请 W001/44482 ;PCT 申请 W002/00900 ;PCT 申请 W004/074443 ;PCT 申请 W004/009761 ;PCT 申请 W005/121346 ;PCT 申请 W005/107437 ;PCT 申请 W095/06722 ;PCT 申请 W097/48814 ;PCT 申请 W098/53083 ;PCT 申请 W099/53050 ;PCT 申请 W099/61631。
- [0178] Peralta 等, EMBO J. 5(6) :1137-1142, 1986.)。
- [0179] Rommens 等, Plant Physiol. , 139 :1338-49, 2005。
- [0180] Rommens, Trends Plant Sci. , 9 :457-64, 2004a。
- [0181] Rommens 等, Plant Physiol. , 135 :421-31, 2004b。
- [0182] Sambrook 等, 分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning :A Laboratory Manual), 第二版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约, 1989。
- [0183] Schenk and Hildebrandt, Can. J. Bot. , 50 :199-204, 1972。
- [0184] Shaw 等, Nucleic Acids Res. , 12(15) :6031-6041, 1984。
- [0185] Shurvinton 和 Ream, J Bacteriol. , 173(17) :5558-5563, 1991。
- [0186] Slighton 等, EMBO J. , 4(12) :3069-3077, 1985。
- [0187] Toro 等, J. Bacteriol. , 171(12) :6845-6859, 1989。
- [0188] Toro 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 :8558-8562, 1988。
- [0189] Uchimiya 和 Murashige, Plant Physiol. 15 :73, 1962。
- [0190] Van Haaren 等, Nucleic Acids Res. , 15(21) :8983-8997, 1987a。
- [0191] Van Haaren 等, Plant Mol. Biol. , 11 :773-781, 1988。
- [0192] Van Haaren 等, Plant Mol. Biol. , 8 :95-104, 1987b。
- [0193] Wang 等, Cell, 38 :455-462, 1984。
- [0194] Zhang 等, Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 56 :37-46, 1999。

[0001]

序 列 表

<110> L. 吉尔伯森
X. 叶

<120> 提高植物转化效率的多个转化增强子序列的应用

<130> MONS:102W0

<140> 未知

<141> 2007-07-18

<150> 60/831,814

<151> 2006 07-19

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 1

caaacaaca tacacagcga cttattcaca caaacaaca tacacagcga cttattcaca 60

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 2

tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgtttg tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgtttg 60

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 3

ctgacgaact gacgaactga cgaactgacg aactgacgaa ctgacgaa 48

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 4

ttcgtcagtt cgtcagttcg tcagttcgtc agttcgtcag ttcgtcag 48

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

[0002]

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 5

taagtcgctg tgtatgtttg ttg

24

<210> 6

<211> 8

<212> DNA

<213> 发根农杆菌(Agrobacterium rhizogenes)

<400> 6

ctgacgaa

8

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 7

tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 8

tgtgaataaa tcgctgtgta tgtttgttg

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 9

tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg

30

<210> 10

<211> 120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 10

tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg 60

tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg tgtgaataag tcgctgtgta tgtttgttg 120

<210> 11

<211> 144

<212> DNA

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 11

ctgacgaact gacgaactga cgaactgacg aactgacgaa ctgacgaact gacgaactga 60

cgaactgacg aactgacgaa ctgacgaact gacgaactga cgaactgacg aactgacgaa 120

ctgacgaact gacgaactga cgaa

144

<210> 12

<211> 80

<212> DNA

<213> 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)

<400> 12

tgatgatgct gactggcagg atatataccg ttgtaatttg agctcgtgtg aataagtcgc 60

tgtgtatgtt tgtttgattg

80

[0003]

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 13
 aaacaaacat acacagcgac ttattcaca 29

<210> 14
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 14
 aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
 cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaaatg ctgctccgtc 120
 gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgacacg aatgccaaagc 180
 actcccgagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240
 ttacagccct tttaaataatc cgattattct aataaacgct ctttcaaaca aacatacaca 300
 gcgacttatt cacatctctt aggtttaccg gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt 360
 taaactgaag gcgggaaacg acaatct 387

<210> 15
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 15
 aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
 cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaaatg ctgctccgtc 120
 gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgacacg aatgccaaagc 180
 actcccgagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240
 ttacagccct tttaaataatc cgattattct aataaacgct ctttgaattc gcccttcaaa 300
 caaacataca cagcgactta ttacacacaa caaacataca cagcgactta ttacacacaa 360
 caaacataca cagcgactta ttacacacaa caaacataca cagcgactta ttacacaaag 420
 gcgaattctc ttaggtttac ccgccaatat atcctgtcaa acactgatag tttaaactga 480
 aggcgggaaa cgacaatct 499

<210> 16
 <211> 521
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 16
 aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
 cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaaatg ctgctccgtc 120
 gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgacacg aatgccaaagc 180
 actcccgagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240
 ttacagccct tttaaataatc cgattattct aataaacgct ctttgaattc gcccttctga 300
 cgaactgacg aactgacgaa ctgacgaact gacgaactga cgaactgacg aactgacgaa 360
 ctgacgaact gacgaactga cgaactgacg aactgacgaa ctgacgaact gacgaactga 420
 cgaactgacg aactgacgaa ggccgaattc tcttaggttt acccgccaat atatcctgtc 480
 aaacactgat agtttaaact gaaggcggga aacgacaatc t 521

<210> 17

[0004]

<211> 30 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列描述: 合成引物 <400> 17 caaacaaca tacacagcga cttattcaca	30
<210> 18 <211> 120 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列描述: 合成引物 <400> 18 caaacaaca tacacagcga cttattcaca caaacaaca tacacagcga cttattcaca 60 caaacaaca tacacagcga cttattcaca caaacaaca tacacagcga cttattcaca 120	
<210> 19 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列描述: 合成引物 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (7)..(14) <223> n = a, c, g 和/或 t/u <400> 19 taartynctg trtntgtttg ttg	24
<210> 20 <211> 8 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列描述: 合成引物 <400> 20 tgtwtgk	8

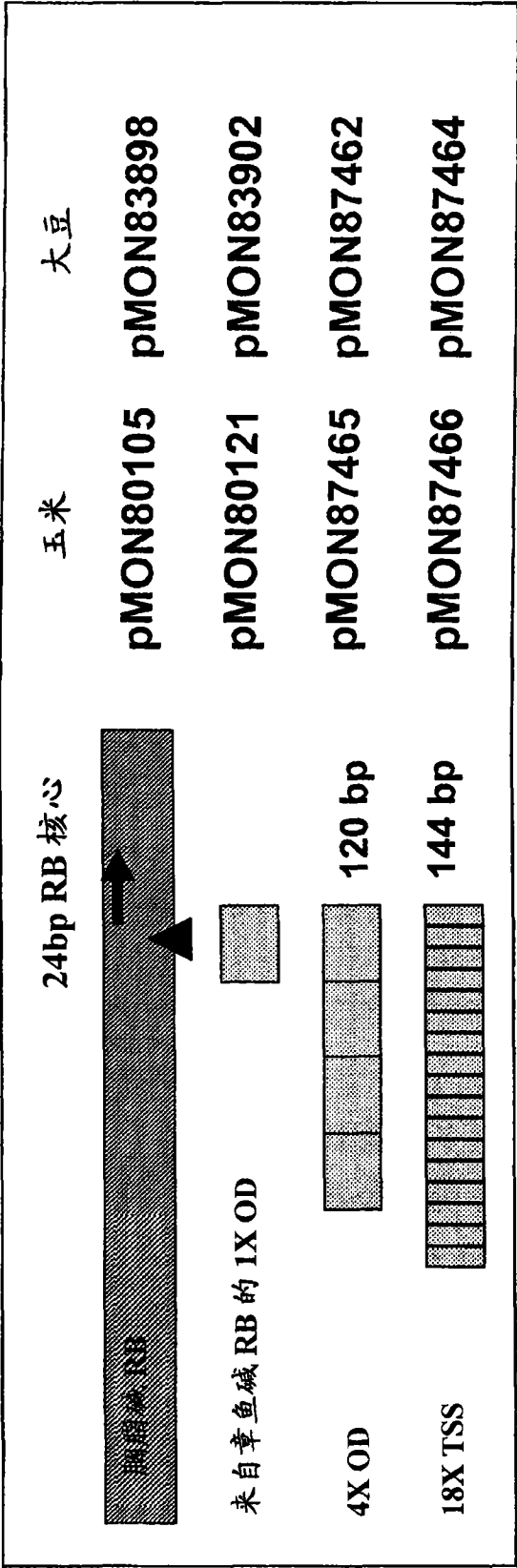


图 1

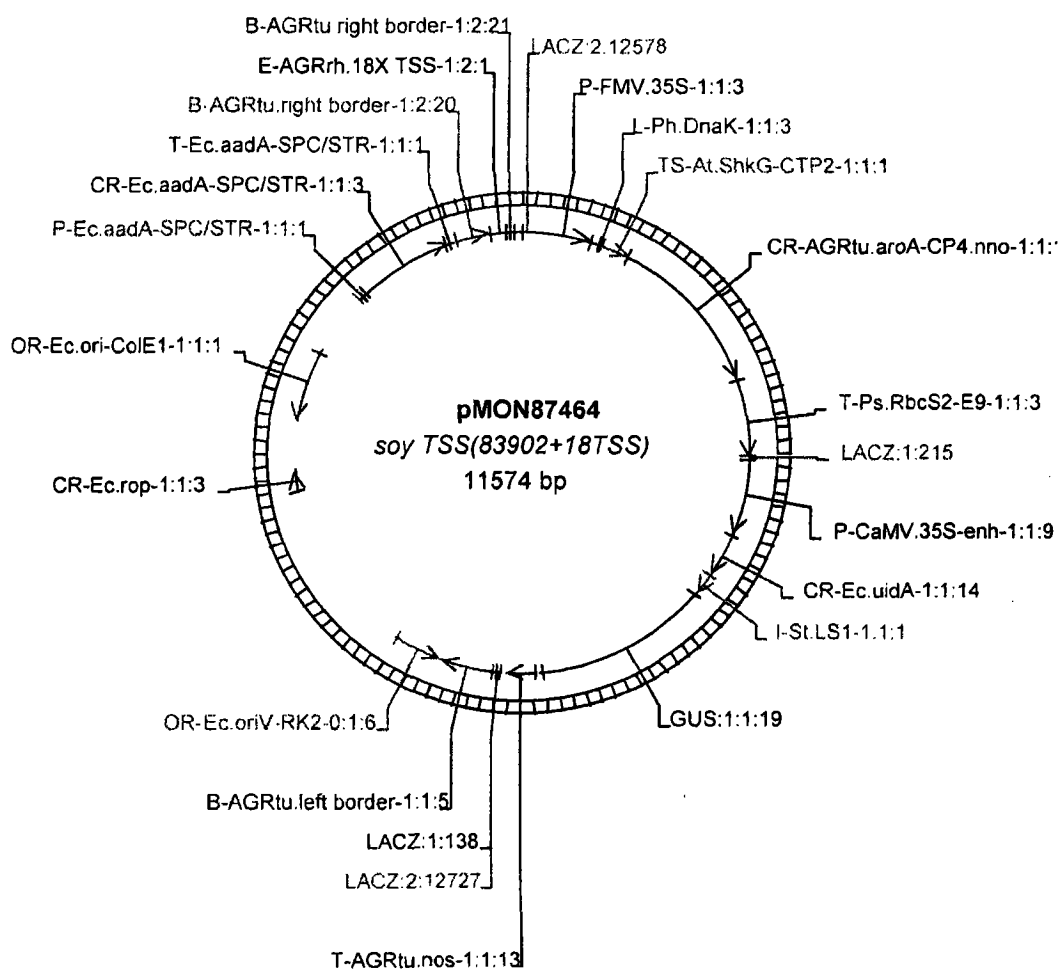


图 2

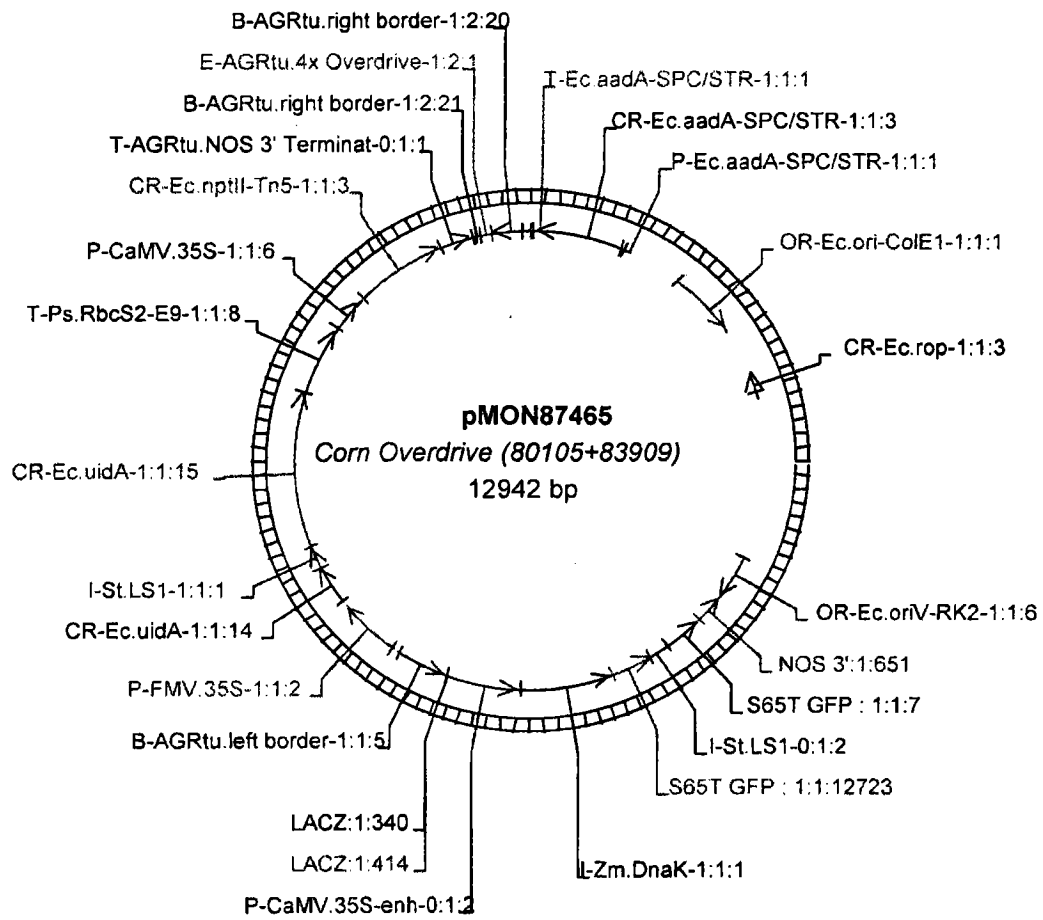


图 3

