

申請日期	87 年 7 月 2 日
案 號	87110865
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 人 創作	姓 名	(4) 史蒂芬·奧爾 Ohl, Stephan Andreas (5) 奧斯卡·卡迪恩 Goddijn, Oscar Johannes Maria (6) 安·波恩斯丹 Ponstein, Anne Silene
	國 籍	(4) 德國 (5) 荷蘭 (6) 荷蘭 (4) 荷蘭萊登·瑪達珍森帕德三十四號 Magda Janssenspad 34, 2331 JP Leiden, The Netherlands
三、申請人	住、居所	(5) 荷蘭來登 LN 奧德席蘭格雷特五號 Oude Herengracht 5, 2312 LN Leiden, The Netherlands (6) 荷蘭雷敦米福爾 5 號 Meerforel 5, 2318 MR Leiden, The Netherlands
	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

申請日期	87 年 7 月 2 日
案 號	87110865
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 人 創作	姓 名	(7) 伯娜德斯·黛克 Dekker, Bernardus Martinus Maria (8) 席茲凱·何克斯特拉 Hoekstra, Sietske (9) 漢瑞克·堤傑拉 Tigelaar, Hendrik
	國 籍	(7) 荷蘭 (8) 荷蘭 (9) 荷蘭
	住、居所	(7) 荷蘭高達海爾那荷福路40號 Helena Hoeve 40, 2804 HZ Gouda, The Netherlands (8) 荷蘭歐格斯吉斯特葛洛恩荷福蘭恩71號 Groenhoevelaan 71, 2343 BR Oegstgeest The Netherlands (9) 荷蘭雷敦歐那漢凱立克路19號 Onafhankelidsweg 19, 2332 ZM Leiden, The Netherlands
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權荷蘭 1997年6月30日 97201990.5 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係關於土壤桿菌 (Agrobacterium) 中介之植物轉形作用，特別係關於利用 T - D N A 之植物轉形作用，其中非 T - D N A 之載體序列的意外轉移係被禁止。

先前技藝

自 1 9 8 3 年，已知藉由利用土壤桿菌和存在於野生型土壤桿菌菌株中之 T i 或 R i 質體以進行植物之轉形 (例如，E P 0 1 1 6 7 1 8 和 E P 0 1 2 0 5 1 6) 。此轉形步驟通常係由利用非產生腫瘤之土壤桿菌菌株以感染植物所構成，該非產生腫瘤之土壤桿菌菌株係併有異種基因。該異種基因係位於質體上，稱之為 T - D N A 之片段中，該 T - D N A 係位於 2 個約 2 4 個鹼基對 (b p) 長度之不完全直接重覆 (稱為 T - D N A 邊界) 之間的 D N A 。異種基因轉移至植物之過程中，藉由培育土壤桿菌和植物細胞且利用酚化合物，活化亦位於質體上之 v i r 基因。該等 v i r 蛋白質 (D 1 和 D 2) 致使於該邊界重覆之精確位置上產生缺口，因而自該質體之 T - D N A 邊界上切割該 T - D N A ，且將該 T - D N A 插入至植物基因體中。

於 T - D N A 轉移中，最為必要的是右邊界區域：去除該 T - D N A 右邊界區域之 T i 質體係不具毒性的 (Holsters, M. et al., Plasmid 3, 212-230, 1980) 。去除該左邊界區域對毒性無任何影響 (Joos, H. et al., Cell 32,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

1057-1067, 1983)。

當利用二元載體系統以進行轉形時，仍有需要存有該 T - D N A 邊界，其中該 T - D N A 係位於個別獨立之複製子(二元載體)上。

經轉形後，該 T - D N A 係以單一單元或多個單元縱列排列於宿主植物之基因體中。然而，亦經常觀察到縮短之 T - D N A 區域(Deroles, S.C. and Gardner, R.C., Plant Mol. Biol., 11, 365-377, 1988)。近來，有資料顯示該邊界外之 D N A 亦接合至宿主植物之基因體中。經報告於 20 至 30% 之轉殖基因的植物中，會產生此一情況(Martineau, B. et al., The Plant Cell 6, 1032-1033, 1994)。然而，最近之文獻報告表達約 75% 之煙草轉形株含有載體之“主鏈”序列(Kononov, M.E. et al., The Plant J. 11(5), 945-957, 1997)。

有時出現之另一個現象是，T - D N A 之轉移係起始於左邊界，該左邊界亦可充作(弱)起始點。“通讀(read-through)” D N A 之量可為實質相當的：經發現，有時起始於左邊界之轉移係通讀至右邊界，且再次終止於左邊界，產生完整二元載體之轉移(van der Graaff, E. et al., Plant Mol. Biol. 31, 677-681, 1996)。

植物遺傳學家之目標係僅轉移存在於 T - D N A 中之 D N A，因此需要抑制通讀之抑制。進一步，處理要求轉殖基因之植物及/或轉殖基因之食品的(市場)登記之註冊相關亦表達出應儘可能地避免載體 D N A 污染轉殖基因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (3)

之植物的意見。

發明摘要

本發明包含一種用於植物轉形之載體，其係包含 T - D N A 和側面 T - D N A 邊界，其特徵係在於該載體進一步包含一核酸序列，該核酸序列阻擾植物轉形株之發育，該植物轉形株具有非該 T - D N A 序列之多個載體序列。

該阻擾具有非該 T - D N A 序列之多個載體序列的轉形株之發育的序列係編碼毒性化合物之基因，該毒性化合物係適宜地選自 R N A s e ， D N A s e ，植物毒素，白喉毒素，蛋白酶及反向必需基因，諸如 A T P 合成酶，細胞色素 c ，丙酮酸激酶，胺醯基轉移酶，或磷酸鹽，二 - ，三羧酸鹽及 2 - 酮 - 戊二酸移位子。

該載體之另一較佳體系係阻擾具有該 T - D N A 序列外之載體序列的轉形株之發育的序列，包含結合與 D N A 結合之蛋白質的序列或富於 G 和 C 含量之序列。

獲致不含有 T - D N A 外之載體序列的轉殖基因之植物的方法亦為本發明之一部份，依據本發明該方法係藉由利用載體以轉形植物。進一步，含有該載體之宿主，如細菌，適宜地為土壤桿菌科 (Agrobacteriaceae) 之一員，較適宜地為土壤桿菌屬 (Agrobacterium) 或根瘤菌屬 (Rhizobacterium) 之一員，最適宜地為根癌土壤桿菌 (Agrobacterium tumefaciens) ，亦為本發明之一部份。

進一步，本發明包含一種轉形植物之方法，其特徵在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4)

於使用本發明之載體。

圖式簡單說明

圖 1 係圖示說明所使用之建構物。

圖 2 係圖示說明引子雜交之位置，該引子係用於檢測載體序列之共接合。

發明詳述

基本上，所有已知用於植物轉形之質體和載體可適於充作本發明之載體或可用於本發明之方法中的載體。該質體之實例係為 p B i n 1 9 (Bevan, M., Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721, 1984)，p M O G 1 0 1 (W O 9 3 / 1 0 2 5 1)，p M O G 8 0 0 (W O 9 5 / 0 5 4 6 7)，p M O N 1 2 8 (E P 0 1 3 1 6 2 3)，G V 2 2 6 0 (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788, 1985)，及其他質體等，以及其所衍生之所有質體。

該等質體之主要特徵係在於其含有 T - D N A 和側面之 T - D N A 邊界序列。進一步，該等質體必須適於在土壤桿菌中複製，因此其應該含有適用於土壤桿菌中之複製起點 (o r i) 序列。雖然最常使用之土壤桿菌菌株係根癌土壤桿菌，但發根土壤桿菌 (Agrobacterium rhizogenes) 亦適於用以轉形植物。此處，可轉形之 D N A 係位於 R i 質體上，且該 D N A 隨後係稱之為 R - D N A。然而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

，一般使用的係 T - D N A 一詞且此並不限制本發明僅為使用根癌土壤桿菌，而應包括所有之轉形方法，其中係使用位於 2 個直接重覆之間的 D N A 序列以進行植物之轉形。

為進行轉形，需要緊鄰 T - D N A 之毒性蛋白質之基因。該編碼毒性蛋白質之基因可位於含有 T - D N A 之相同質體上，該質體於此技藝中通常亦稱為共接合質體。通常，該毒性基因係位於另一質體上（此系統通常稱之為二元載體系統）或甚至位於細菌之染色體上。

進一步，該質體正常地亦含有編碼耐抗生素之基因（以利於選擇條件下培養）和於大腸桿菌中複製之起點。

轉形基因至植物及土壤桿菌和於其中之 T i 質體所扮演之角色的一般描述，可參閱 " Principles of gene Manipulation " (Old, R.W. and Primrose, S.B., Blackwell Scientific Publications, London, 1994, Chapter 14, pp. 268 -301) 之手冊。

本發明之一較佳體系包含一載體，其中於植物可表現之啓動子的控制下，編碼毒素之基因係位於 T - D N A 邊界之外。基本上，該基因並不對細菌產生毒性或並不於細菌中表現，因為此將破壞細菌且妨礙 T - D N A 轉形至植物之能力。存有數種方法可防止對細菌之毒性作用。其中一種係選擇使用對細菌不具毒性之毒性化合物。該毒性化合物之實例之一係為白喉毒素。同樣地，除去 (knock out) 植物基本必需基因之逆向 (antisense) 操作方式亦能防

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

止細菌之破壞。對此，須選取於植物中呈活性（且為基本所需），但於細菌中不具活性或僅具些微活性，或並非同質而被其逆向表現所妨礙之必需基因。

然而，即使毒素係對細菌有害，可找出方法以防止該毒素於細菌中表現。對此，一種可能之方法係藉由產製基因建構物，其中毒素基因係在植物啓動子之控制之下。雖然並非所有之特定植物啓動子可用於該載體中（因為該等植物啓動子於細菌中產生至少某些表現），但是若選擇之啓動子於細菌細胞中並不產生表現，則可易於達成利用該啓動子（例如，利用前置有該啓動子之 G U S 基因以轉形細菌；可輕易地分析細胞中 G U S 基因之表現）。

最後，一種防止於細菌中表現之方法係將不表現子（intron）插入序列導入至毒素之編碼序列中（或，利用含有不表現子插入序列之基因體序列）。因為細菌係無法切除不表現子，因而僅能產生非官能性（部份）之蛋白質，該蛋白質係不能傷害細菌。

可使用之毒素係包含專一於某些植物之毒素，但亦可使用較為慣用可獲致之毒素，其係作用於膜系統及／或其他一般之細胞結構或代謝過程。該毒素之實例係為 R I P，美格素（magainins），R N A s e（諸如，核糖核酸酶 barnase），D N A s e，蛋白酶，及其他等等。

可以數種方式使用其他之處理方法，且該處理方法所使用之基因可選自（a）拮抗內源性 R N A 轉錄之編碼核酶之基因，（b）產製能引起超敏性反應之蛋白質之基因

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (7)

， (c) 當轉錄時產生 R N A 轉錄體之基因，該 R N A 轉錄體係互補於或至少部份互補於內源性基因之 R N A 轉錄體，該內源性基因之 R N A 轉錄體對細胞存活係必需的 (逆向抑制基因表現之已知方法，揭示於 E P - A 2 4 0 2 0 8 中) ，或 (d) 當轉錄時產生 R N A 轉錄體之基因，該 R N A 轉錄體係相同於或至少非常相似於內源性基因之轉錄體，該內源性基因之轉錄體對細胞存活係必需的 (一種尚未完全明瞭之抑制基因表現 (稱之為共抑制) 之方法，揭示於 Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289 文獻中) 。

當源自病原之誘出蛋白質和源自對應植物之受體蛋白質同時表現時，可引起超敏性反應 (H R) 。該等對應之誘出蛋白質 / 受體基因及其於轉殖基因植物中引起 H R 之應用，於此技藝中係為習知，例如黃枝孢 (*Cladosporium fulvum*) a v r 基因和長刺馬勃菌 (*Lycopersicon esculentum*) C f 基因 (W O 9 1 / 1 5 5 8 5) 或丁香假單孢菌 (*Pseudomonas syringae*) a v r 基因和擬南芥 (*Arabidopsis thaliana*) R P M I - 基因 (Grant M.R., et al., Science 269, 843-846, 1995) 。於本發明中，利用該等基因之一般概念係將該等基因之一插入至 T - D N A 邊界和該邊界外側之互補基因之間。因此，當該邊界外側之 D N A 轉移至植物中時，基因將會表現且超敏性反應將會產生，其係會殺死所轉形之細胞。

基於源自於植物之抗性基因係天然地存在於某些植物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

中，該等植物於 T - D N A 邊界外側具有足夠之編碼對應無毒性之基因係可能的。經轉形後，當表現時，將遭遇內源性所生成之對應植物基因，並引發 H R 反應。

針對該 H R 機轉（考慮調節性限制），該等建築物之較佳體系係為源自植物之基因存在於 T - D N A 邊界之間且源自病原之基因存在於邊界外側之建構物。

本發明之另一較佳體系係利用逆向基因以抑制對細胞存活為必需之內源性基因的表現，該等基因係表現於植物細胞中。

對逆向破壞者基因之標的基因係選自編碼對細胞存活為必需之酶的基因（該酶亦稱之為必需（housekeeping）酶），且應為細胞核所編碼，適宜地為單份存在之基因（雖然，小基因群所編碼之標的基因亦適用於本發明）。進一步，經由該酶所正常合成之酶產物自其他細胞或胞器之擴散或移位作用，必須無法使該基因之逆向表現的效果失效。適宜的係選取編碼膜移位酶之基因，因為該基因係涉及建立跨越胞器膜之化學梯度。於定義上，藉由基質跨越該膜（存有該等蛋白質）之擴散作用，係無法除去經由逆向表現之該等蛋白質的抑制作用。該移位化合物並不限於有機分子，而可具有無機性質；例如，P，H，OH 或電子。

藉由實例列示標的酶於表 1 中，但本發明並不限表 1 所列之酶。詳細之列示可為 Biochemistry of Plants (Eds. Stumpf & Conn, 1988-1991, Vols. 1-16 Academic Press) 或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

Encyclopedia of Plant Physiology (New Series, 1976, Springer-Verlag, Berlin)之系列的組合。

雖然僅於某些案例，已分離編碼該等酶之基因，因而未知基因之份數，但是必須符合之標準係描述於本發明中。

。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(10)

表 1

用於逆向和正向表現之標的酶的實例

酶	途徑 / 胞器
A T P 合成酶	粒線體
腺嘌呤核苷酸移位子	粒線體
磷酸鹽移位子	粒線體
三羧酸鹽移位子	粒線體
二羧酸鹽移位子	粒線體
2 - 酮 - 戊二酸移位子	粒線體
細胞色素 C	粒線體
丙酮酸激酶	糖原酵解
甘油醛 - 3 P - 脫氫酶	糖原酵解
細胞色素 P 4 5 0 還原酶	脂質代謝
脂肪酸合成酶複合體	脂質代謝
甘油 - 3 P - 醯基轉移酶	脂質代謝
羧甲基 - 戊二醯輔酶 A 還原酶甲羧戊酸途徑	
胺基醯基轉移酶	核酸代謝
轉錄因子	核酸代謝
延伸因子	核酸代謝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

為於植物宿主中達到最大之逆向效果，適宜的係使用同源基因。同源係意謂著可獲致於充作植物宿主之相同植物物種。對本發明之目的而言，異源係意謂著可獲致於不同之植物或非植物之物種。異源亦包含基因之合成類似物，其係於其編碼核酸序列之 mRNA 經修飾以使至少 5% 之宿主基因有所不同。因為必需基因通常係具高度保留性 (conserved)，可使用源自其他 (植物) 物種之異源探針以自穀物物質 (欲加入抗性) 分離出對應之基因。參照現存之教示，無需過度之實驗，該基因之分離係為熟悉此技藝之人士所習知。

關於轉錄終止區域之必要性，咸信該區域係促進植物細胞中轉錄之確實性和有效性。因此，本發明之敘述中，使用該區域係非常適宜的。

本發明之另一較佳系係為一載體，其中藉由插入一核苷酸序列至 T - DNA 邊界之外側，抑制自左邊邊界 DNA 轉移之通讀或起始，該插入之核苷酸序列妨礙 DNA 解鏈之過程，該 DNA 解鏈之過程係自然上需要的以生成欲移位至植物之 DNA 分子。

該序列之實例係為約 40 個核苷酸 (適宜地為 20 - 60 個鹼基對) 富含 GC 之序列，其 DNA 之解鏈於能量之考量上係不利的，因此預期會經由此序列阻擾 DNA 之解鏈。然而，亦可使用其他之序列，其係阻斷通讀或左邊邊界起始之讀取。對於該雙股序列之增強穩定性之計算係為熟悉此技藝之人士所習知者，且係描述於 Maniatis,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

Fritsch and Sambrook: Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, 1982, pp. 388 文獻中。

阻擾 T - D N A 邊界外側之序列的 D N A 解鏈過程之另一核苷酸序列的實例，係為由土壤桿菌 D N A 結合蛋白質之結合部位所構成之序列。對於 D N A 之解鏈，需要替換已結合之雙股 D N A 結合蛋白質，因此對股替換所需之能量係顯著地增加。此外，鄰近左邊邊界所存在之 D N A 結合蛋白質可自然地妨礙用於左邊邊界下端之 D N A 的解鏈之 D N A - 蛋白質複合體的組合。

通常，所有的雙股 D N A 結合蛋白質將會干擾此一過程。適宜地，所使用之蛋白質結合部位係可藉土壤桿菌細胞之處理，經外界之刺激，引發或加強該 D N A - 蛋白質之交互作用。較適宜地，該 D N A 結合蛋白質係 v i r G，其係亦為涉及 T - D N A 移動和轉移之所有 v i r 蛋白質之活化蛋白質。已知 v i r G 係結合至 v i r 框 (b o x)，該 v i r 框係由序列 5' T N C A A T T G A A A Y 3' (其中，N 為任一之核苷酸，且 Y 為嘧啶鹼核苷酸 (T 或 C)) 所構成。藉土壤桿菌之活化作用，經由 v i r A / v i r G 二元調節系統，起始或增強 v i r G 結合至該 v i r 框。於活體內，v i r 基因之活化係取決於 v i r G 之磷酸化作用，但該修飾作用之真正角色至今仍不清楚。如述於 Sheng and Citovsky (The Plant Cell 8, 1699-170, 1996)，一種非常可能的解釋是經磷酸化之 v i r G 蛋白質對其同源之結合部位具有增強之親和性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

同時，導入對鄰近連接至左邊邊界序列之結合的 DNA 結合蛋白質之結合部位，可藉由立體障礙自然地干擾於該左邊邊界上需用於股置換之蛋白質的組合，因此能有效地於左邊邊界上降低起始效果。

雖然，本發明較佳體系之某些部份現今可能係為不可預期的，諸如因為某些植物物種迄今尚無法進行基因之轉形，但是於該植物物種上實施本發明僅是時間上之問題，並非為原理之問題，因為實行基因轉形與否無關於本發明之較佳體系。

植物物種之轉形現今對許多植物物種而言係慣用的，該等植物物種包括雙子葉植物和單子葉植物。原則上，可使用任何一種轉形方法以將本發明之嵌合 DNA 導入至適當之先期細胞中。依據本發明，適宜之方法係包含由土壤桿菌所中介之 DNA 轉移。特別適宜的係使用所謂之二元載體技術，如 EP - A 1 2 0 5 1 6 和 US P 4 , 9 4 0 , 8 3 8 所揭示者。

適宜地，進行蕃茄之轉形主要係描述於 Van Roekel et al. (Van Roekel, J.S.C., Damm, B., Melchers, L.S., Hoekema, A. (1993), " Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*)" , Plant Cell Reports, 12, 644-647) 。馬鈴薯適宜之轉形主要係描述於 Hoekema et al. (Hoekema, A., Huisman, M.J., Molendijk, L., vna den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1989), " The genetic engineering of two

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

commercial potato cultivars for resistance to potato virus X" , Bio/Technology 7, 273-278) 。

雖然，單子葉植物被視為較不利於進行基因之轉形，但單子葉植物仍可進行基因之轉形，且自經轉形之細胞或胚胎，或其他植物物質可再生出能產生種子之轉形基因植物。單子葉植物（包括商業上重要之穀物，諸如稻米和玉米）可藉由利用土壤桿菌菌株進行 DNA 之轉移（vide WO 94/00977; EP 0 159 418 B1; Gould J. Michael D, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH, (1991), Plant. Physiol. 95, 426-434) 。

已知實際上所有之植物可自培養之細胞或組織再生。再生之手段方法可依植物物種之不同而不同，但通常首先係提供轉形原生質體之懸浮液或含有轉形培養物之培養皿。芽苗可直接誘發，或藉由有機生成法或胚胎生成法自節管間接誘發，並隨後生根。除了可選擇之標記物外，培養基通常含有各種不同之胺基酸和生長激素，諸如植物生長素和細胞分裂素。適宜地，亦可加入穀氨酸和脯氨酸至培養基中（特別係針對諸如玉米和紫花苜蓿之植物）。有效之再生係取決於培養基，基因型及培養之歷程。當控制此 3 種變數時，再生通常具有再現性且為可重覆的。經轉形之基因序列穩定地併入至轉殖基因植物中時，其所展現之表徵可藉由異性交配轉移至其他植物上。取決於所欲交配之物種，可使用許多種標準培育技術。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (15)

實驗部份

實施例 1

建構二元載體骨架

將唯一之 S a l I 限制核酸內切酶部位導入至 p M O G 8 0 0 中，以使抑制通讀或逆選取帶有載體序列之轉殖基因之成份可選殖至左邊邊界之旁邊。該部位係位於鄰近左邊邊界 1 0 b p 之位置。利用引子 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 4 進行簡單以 P C R 為基礎之突變方式，製造含有 D r a III 和 N r u I 單一部位之片段，其係幾乎等於二元載體 p M O G 8 0 0 (寄存於 Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Necherlands; CBS 414.93; 1993 年 8 月 12 日) 中對應之片段，該二元載體 p M O G 8 0 0 於 T - D N A 外側左邊邊界重覆體 1 0 b p 之位置含有額外之單一 S a l I 部位。

利用 D r a III 和 N r u I 切割該 P C R 片段，並將其選殖至先期以 D r a III 和 N r u I 切割之 p M O G 8 0 0 中。所生成之質體稱之為 p N E 0 3 。

實施例 2

插入富含 G C 之伸長片段

藉由連接 S E Q I D N O : 5 和 6 ，製造 4 0 b p 富含 G C 之伸長片段。插入該片段至一個 S a l I 部位，遺留下僅位於終端之完整 S a l I 部位。利用 T 4 聚核苷酸激酶磷酸化該雙股合成之寡片段，並將其選殖至經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

S a l I 切割之 p N E 0 3 載體中。所生成之質體 p E N 0 7 具有插入至 S a l I 部位之富含 G C 之伸長片段，其係造成除去最接近左邊 T - D N A 邊界之 S a l I 部位。其方向之圖形表示係如圖 1 所示。

實施例 3

插入 v i r G 結合部位

含有 v i r G 結合部位之片段係源自於土壤桿菌菌株 E H A 1 0 1 之 v i r B 啓動子。該 v i r B 啓動子含有兩個 v i r 框序列，其係皆為 v i r G 所辨識 (Das and Pazour, 1989, Nucl. Acids Res. 17. 4541-4550)。單獨之 v i r 框不被認為足以結合 v i r G 蛋白質，額外特定之未保留序列 3' 至 v i r 框 (約 1 9 b p) 最可能亦為需要以結合 v i r G 蛋白質。利用引子 S E Q I D N O : 7 和 8 以進行源自根癌土壤桿菌菌株 M O G 1 0 1 之約 9 0 b p 的 v i r B 啓動子片段之 P C R 放大反應。利用 S a l I 和 A v a I 切割該片段，並將其導入至 p N E 0 3 載體之唯一 S a l I 部位中。再次，該片段之方向係使該 S a l I - A r a I 終端連接並最後近左邊邊界。該方向之圖形表示係如圖 1 所示。此載體稱之為 p N E 0 9。

實施例 4

導入核糖核酸酶 barnase 表現匣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明 (17)

利用 N c o I 和 E c o R I 部位自 p M O G 9 4 4 (W O 9 8 / 2 2 5 9 9) 切割出核糖核酸酶 barnase 開放密碼和 n o s 終結子序列 (9 2 5 b p) , 並將其選殖至經 N c o I 和 E c o R I 切割之 p M O G 1 3 0 2 中。

p M O G 1 3 0 2 含有 G a p C 啓動子片段 (Shin et al. 1991, Gene 104, 133-138) 且具有 p M O G 4 4 5 (p U C 爲基底) 載體骨架 (p M O G 4 4 5 係源自於 p U C 1 8 (Yannisch-Perron and Messing, 1985, Gene 33, 103-119) , 其係藉由插入由引子 S E Q I D N O :

9 和 1 0 所製造之雙股合成 D N A 至經 E c o R I 和 S s t I 切割之 p U C 1 8 中) 。所生成之質體具有核糖核酸酶 barnase 開放密碼和偶合至 G a p C 啓動子及

N c o I 部位之 5 ' 未轉譯序列之 n o s 3 ' 未轉譯序列 / 終結子 , 該 N c o I 部位係位於起始密碼子上。所生成之質體稱爲 p N E 0 1 。隨後 , 利用 B a m H I 和

X h o I 部位 , 將 p N E 0 1 之整個表現匣 (GapC-barnase-nos) 選殖至 p B S K + (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 中。該質體稱之爲 p N E 0 5 。利用 B a m H I 切割

p N E 0 5 , 並導入破壞 B a m H I 部位且植入 S a l I 部位之附加子 (adaptor) (S E Q I D N O : 1 1)

。所生成之質體稱爲 p N E 0 8 。利用 S a l I 和

X h o I , 將表現匣移出 p N E 0 8 , 並選殖至經

S a l I 切割之改造的二元載體 p N E 0 3 , p N E 0 7 及 p N E 0 9 中。此生成載體 p N E 1 0 (barnase 匣) ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (18)

p N E 1 1 (G C 部份 + barnase 匣) 及 p N E 1 2 (v i r G 結合部位 + barnase 匣) 。

實施例 5

導入 G U S 標記物匣

源自 p M O G 1 0 5 9 之 E c o R I - H i n d III 片段含有 G U S 表現匣，該 G U S 表現匣包含 (1) FdrolD 嵌合啓動子和未轉譯序列 (專利申請案 N o .

9 7 2 0 3 9 1 2 . 7 , 1 9 9 7 年 1 2 月 1 2 日 申 請)

， (2) 含有 S t L S 1 不表現子之 G U S 開放密碼 (

Vancanneyt et al., 1990, Mol. Gen. Genet. 220-245-250)

及 (3) 蛋白酶抑制劑 II 基因之 3 ' 未轉譯 / 終結子序列

(Thornburg et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,

744-748) 。 將 該 E c o R I - H i n d III 片 段 插 入 至 二

元 載 體 p N E 1 0 , p N E 1 1 及 p N E 1 2 介 於 邊 界 之

間 之 E c o R I - H i n d III 部 位 。 該 G U S 匣 係 最 接 近

右 邊 邊 界 ， 而 n p t III 選 擇 標 記 匣 係 最 接 近 左 邊 邊 界 (參

閱 圖 1) 。 使 用 p M O G 1 0 5 9 充 作 未 改 造 之 對 照 組 ，

而 其 載 體 序 列 係 為 未 改 造 之 p M O G 8 0 0 之 骨 架 。

p M O G 1 3 1 3 係 為 具 有 T - D N A 上 FdrolD - G U S

匣 和 鄰 近 於 其 左 邊 邊 界 之 G C 部 份 的 二 元 載 體 ，

p M O G 1 3 1 4 同 樣 地 含 有 T - D N A 但 含 有 鄰 近 於 其

左 邊 邊 界 之 v i r G 結 合 部 位 ， 而 p M O G 1 3 1 5 具 有

相 同 之 T - D N A 序 列 和 鄰 近 於 左 邊 邊 界 之 barnase 匣 。 同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

樣地，p M O G 1 3 1 6 含有 G C 部份和 barnase 匣，而 p M O G 1 3 1 7 含有 v i r G 結合部位和隨後之 barnase 匣。

實施例 6

分析利用新穎之二元載體轉形馬鈴薯之頻率

於 3 個分開之轉形實驗中，利用標準之轉形步驟（參閱 P C T / E P 9 8 / 0 2 9 7 9 ），以根癌土壤桿菌菌株 E H A 1 0 5 轉形馬鈴薯（cv. Kardal）莖片段。對每一種建構物，使用最少 1 5 0 個培養物。通常，此將導致再生約 9 0 個轉形體 / 建構物。利用相對於所使用之培養物數目的再生體數目（能夠於含有康霉素之生長培養基的選擇性壓力下生根者），測定轉形頻率。對於表 1，對照組建構物 p M O G 1 0 5 9 之轉形頻率經標準化後係為 1 . 0 。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (20)

表 1 . 測試建構物所觀察到之平均相對轉形頻率。所有數值皆經標準化 (對每一個實驗, 相對於 p M O G 1 0 5 9 , 其值設定為 1 . 0) 。該數值係為 3 個獨立之轉形實驗的平均值。

建構物	敘述	轉形頻率
p M O G 1 3 1 3	G C 部份	1 . 3 5
p M O G 1 3 1 4	v i r G 結合部位	1 . 2 4
p M O G 1 3 1 5	barnase 匣	0 . 9 7
p M O G 1 3 1 6	G C + barnase 匣	0 . 8 5
p M O G 1 3 1 7	v i r G + barnase 匣	0 . 9 0

於左邊邊界外側, 插入 G C 部份或 v i r G 結合部位顯示些微增加轉形頻率。該效果之緣由並不十分清楚。一種解釋是利用左邊邊界起始物干擾 D N A 之轉移 (某些研究者已注意到此一現象, 參閱 Kononov. M.E. et al., 1997, Plant J. 11, 945-957; Ramanathan, V. and Veluthambi, K., 1995, Plant Mol. Biol. 28, 1149-1154) 將會增加 T - D N A 轉移之機會, 此將增加具有 n p t II 選擇性標記物之起始轉形細胞的數目。

實施例 7

分析載體骨架之共接合

下一步, 藉由 P C R 分析橫越左邊和右邊 T - D N A 邊界之 D N A 片段之存在, 及說明轉形體中載體 D N A 共

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (21)

接合之片段。對每一個建構物，藉由多重 P C R，針對外側邊界序列分析 7 5 個個別之細胞系。該多重 P C R 係使用 6 種引子，且使用 n p t II 引子作為內部控制。二元載體上引子之位置係參照圖 2。

利用引子 S E Q I D N O : 1 2 和 1 3，放大含有載體 p M O G 1 3 1 3，p M O G 1 3 1 4 及 p M O G 1 0 5 9 之轉形株的跨越左邊邊界之序列，以生成約 1 2 0 0 b p 之片段。對含有建構物 p M O G 1 3 1 5，p M O G 1 3 1 6 及 p M O G 1 3 1 7 之轉形株，利用引子 S E Q I D N O : 1 2 和 1 4 放大跨越左邊邊界之序列。此情況下，外部引子接合 barnase 基因。選擇使用該引子係因為避免 P C R 片段太長而無法達成有效之放大。作為內部對照組 (n p t II)，利用引子 S E Q I D N O : 1 5 和 1 6 之 P C R 放大反應將生成約 8 5 0 b p 之片段。對含有右邊邊界之序列，利用引子 S E Q I D N O : 1 7 和 1 8 放大 5 0 0 b p 之片段。利用 Perkin-Elmer 480 熱循環器進行該 P C R 反應。

經放大反應後，利用含有溴化乙錠之 0 . 8 % 瓊脂糖膠電泳所獲致之 P C R 片段。經攝影後，計算不同之片段並測定通讀之百分比 (經編輯後，參閱表 2)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

表 2 . 具有跨越右邊界和左邊邊界之序列的個別轉形株的百分比

建構物	僅含左 邊邊界	僅含右 邊邊界	含有左邊和 右邊邊界	總和
pMOG 1313	2.82%	16.90%	28.17%	47.89%
pMOG 1314	4.76%	12.70%	20.63%	38.10%
pMOG 1315	4.17%	6.94%	2.78%	13.89%
pMOG 1316	4.35%	4.35%	1.45%	10.14%
pMOG 1317	5.56%	5.56%	1.39%	12.50%
pMOG 1059	2.90%	8.70%	37.68%	49.28%

如表 2 所示，具有不要之載體序列的共接合之轉形株數目係很多。約有一半由未改造之 p M O G 1 0 5 9 建構物所製造之轉形株具有共接合至少部份之載體骨架。當導入富含 G C 之伸長片段至左邊邊界旁邊時，此數目並未減少。於左邊邊界旁，導入 v i r G 結合部位顯示可些微減少過渡邊界之數目。很清楚地，當導入富含 G C 之伸長片段或 v i r G 結合部位至左邊邊界之外側時，可顯著地減少具有過渡左邊邊界之轉形株的數目（計算帶有左邊邊界或左邊 + 右邊邊界過渡區之轉形株的百分比），自 4 0 %（p M O G 1 0 5 9）減少至約 3 0 %（p M O G 1 3 1 3）和 2 5 %（p M O G 1 3 1 4）之轉形株。

建構物 p M O G 1 3 1 5（於左邊邊界外側僅帶有

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

錄

五、發明說明 (23)

barnase 表現匣) 顯示非常少量含有載體序列之轉形株。該 G C 伸長片段或 v i r G 結合部位與 barnase 匣之結合, 顯示更進一步減少轉形株之數目。該實驗結果顯示, 具有過渡邊界之轉形株數目減少至約 1 0 % , 相對於未改造之 p M O G 1 0 5 9 對照組, 此減少係非常顯著的。

初級蕃茄轉形株之簡單調查顯示, 約有 4 0 % 之轉殖基因蕃茄植物含有邊界外側之序列。此清楚地說明其他植物物種亦需要此種技術。

實施例 8

利用非毒性和抗性基因逆向選取 T - D N A 外側之載體基因

將源自丁香假單孢菌之 AvrRpml 抽出物編碼區域操作地選殖至強基本啓動子之後且於馬鈴薯蛋白酶抑制劑 II 轉錄終結子序列之前。將該匣導入至左邊 T - D N A 邊界下端之 B g l II 部位。將含有源自擬南芥之 R p m l 抗性基因 (兩側係基本啓動子和終結子序列) 的基本體 D N A 片段導入至 T - D N A 中, 因此形成 p M O G 1 2 5 7 (參閱圖 2) 。利用標準步驟以該建構物進行轉形蔓菁 (Brassica napus) , 蕃茄及馬鈴薯。

對利用此轉形步驟所獲致之轉殖基因植物, 藉由 P C R 反應對每一個轉形株之基因體 D N A , 分析其 T - D N A 外側是否存有載體序列。所使用之引子係跨越約 3 0 0 b p 之序列, 位於 T - D N A 外側且接近左邊邊

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (24)

界。

實施例 9

測定重覆份數

為測定含有建構物 p M O G 1 3 1 7 之植物的重覆份數和含有建構物 p M O G 1 0 5 9 之對照組植物的重覆份數，利用 C T A B 萃取法（主要係描述於 Rogers and Bendich, 1985, Plant. Mol. Biol. 5, 69-76 文獻中），自每一轉形株 2 5 株植物之葉子分離基因體 D N A。於 3 7 °C 和於適當之緩衝液中，利用限制酶 E c o R I 切割約 1 0 μ g 基因體 D N A 達 1 6 小時。該限制酶切部位於該兩種建構物中僅有一個，位於 G U S 表現匣和 n p t II 表現匣之間。利用 1 倍體積之酚：氯仿：異戊醇（2 5：2 4：1，v / v，Gibco BRL）萃取切割混合物，且將其沈澱於 0 . 1 倍體積之 3 M N a A c（p H 5 . 2）和 2 . 5 倍體積之 9 6 % 乙醇中。利用 7 0 % 乙醇沖洗 D N A 沈澱物，隨後將該沈澱物溶解於 2 0 μ l 蒸餾水中。

於 0 . 7 % 瓊脂糖膠上，以 2 V / c m 分離每一個樣品達約 1 6 小時。利用 southern blotting（0 . 4 M N a O H），將 D N A 轉移至耐龍（nylon）膜（Hybond-N+, Amersham Life Science）上。利用經 32 P - d C T P 標記之 5 5 8 b p G U S 片段（p M O G 之 N c o I - E c o R V 片段；Sijmons et al., Biotechnology vol. 8,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (25)

March 1990, page 217-221) 充作探針，雜交浸漬物 (blot) (條件為 65°C , 16 小時) 。隨後，於 65°C 下以 $0.2 \times \text{SSC}$ 嚴苛條件沖洗該浸漬物。其結果 (southern blot) 係列示於表 3 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

表 3 . 以 p M O G 1 0 5 9 和 p M O G 1 3 1 7 轉形各種不同之個別轉形株中觀察到之 T - D N A 插入份數

轉形株	重覆份數	轉形株	重覆份數
6 6	5	1	3
6 7	5	2	1
6 8	1	3	1
6 9	2	5	1
7 0	3	6	4
7 1	3	7	4
7 2	3	8	2
7 3	5	9	2
7 4	6	1 1	1
7 6	2	1 2	1
7 7	9	1 4	1
7 8	3	1 5	3
7 9	4	1 6	2
8 0	2	1 7	4
8 1	3	1 8	3
8 2	1	1 9	2
8 3	3	2 0	1
8 5	1	2 1	3
8 6	3	2 2	2
8 7	4	2 3	2
8 8	9	2 5	3
8 9	2	2 6	2
9 0	1		
9 1	2		
平均值	3 . 4	平均值	2 . 2
標準誤差	2 . 2	標準誤差	1 . 1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

五、發明說明 (27)

序列列示

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: MOGEN International nv
- (B) STREET: Einsteinweg 97
- (C) CITY: LEIDEN
- (E) COUNTRY: The Netherlands
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 2333 CB
- (G) TELEPHONE: 31-(0)71-5258282
- (H) TELEFAX: 31-(0)71-5221471

(ii) TITLE OF INVENTION: Novel plasmids for plant transformation and method for using same.

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 18

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: EP 97201990.5
- (B) FILING DATE: 30-JUN-1997

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GATGGCAAAC GCTAATAAGG G

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

GAGCGGGTTT AACCTACTTC C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 39 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

CTGTTGTCGA CGGCTGGCTG GTGGCAGGAT ATATTGTGG

39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 38 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

CCAGCCGTCG ACAACAGCTC CCCGACCGGC AGCTCGGC

38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 44 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

泉

五、發明說明 (29)

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

TCGACGGGGT GCCTGGGGCG GTGGCGGGGC GGGCCGGGGC GTGC

44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 44 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

TCGAGCACGC CCCGGCCCCG CCCGCCACCG CCCCAGGCAC CCCG

44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

TTCTCGAGAG GGTCTGTTAC TCG

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (30)

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

TTGTCGACTC CAAGACGCCG AGC

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 28 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

AATTCAGATC TCCATGGATC GATGAGCT

28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 20 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

CATCGATCCA TGGAGATCTG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 12 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (31)

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

GATCGGTCGA CC

12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 23 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

GACGCTAAAG GCAAACCTGA TTC

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 23 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

TTAACCTACT TCCTTTGGTT CCG

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 23 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (32)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

AGCGGCCCAT TTTAGTAGAC GGG

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

ATCAATTCGA ACCCCAGAGT CCCGTCCA

28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

CTGGATCGTT TCGCATGATT G

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

CCAACCTATC AGTGATAAAG AATCCGC

27

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (33)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

GAGATCAGAT TGTCGTTTCC CGCCTTC

27

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：供植物轉形用之新穎質體及使用彼) 之方法

本發明係關於土壤桿菌 (Agrobacterium) 中介之植物轉形作用，特別係關於利用 T-DNA 之植物轉形作用，其中邊界上之通讀 (read-through) 係被禁止。達成此植物之轉形作用可藉由於 T 邊界外創造 DNA 之結合部位以抑制載體 DNA 轉移至植物細胞內，且於 T 邊界外插入一編碼序列，該編碼序列無論是否能與宿主植物之基因或共轉移之基因共同作用，對植物係有毒的，因此對具有多餘的載體 DNA 之植物，彼存在有逆向選擇性。

英文發明摘要(發明之名稱：Novel plasmids for plant transformation) and method for using same

This invention relates to the Agrobacterium mediated plant transformation, especially to transformation of plants with T-DNA, where read-through at the borders is prohibited. This can be done by inhibition of transfer of vector DNA to the plant cell by creating DNA binding sites outside the T-borders, but also to insert a coding sequence outside the T-borders which, whether or not in cooperation with genes from the host plant or genes cotransferred, are toxic to plants so that there is counterselection for plants with superfluous vector-DNA.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

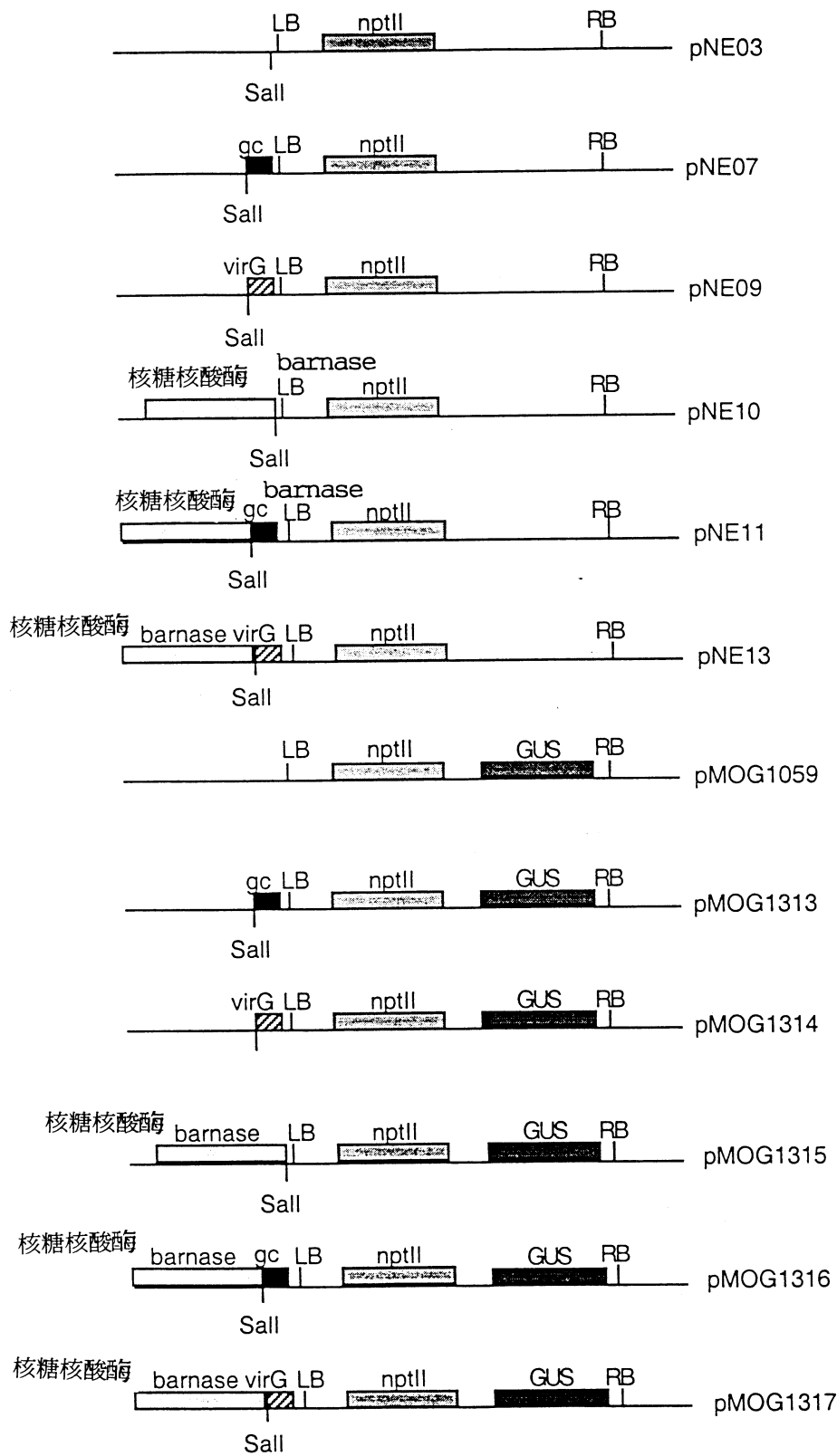
裝

訂

線

圖 1

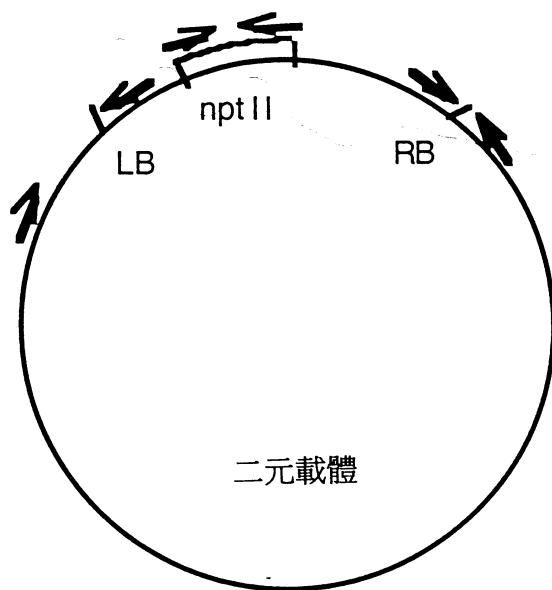
8 2 8 4 1 8



6054 PCT

圖 2

5



10

民國 91 年 1 月 呈

申請日期	87 年 7 月 2 日
案號	87110865
類別	C12N ¹⁵ /82

修正
補充
A4
C4
1.20

公告本

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 575663
新 型

一、發明 名稱	中文	供植物轉形用之新穎質體及使用彼之方法
	英文	Novel plasmids for plant transformation and method for using same
二、發明 創作人	姓名	(1) 馬堤漢瑞·史都弗 Stuver, Maarten Hendrik (2) 蘭伯特斯·賽門 Simons, Lambertus Henricus (3) 尼可拉斯·艾爾林加 Elzinga, Nicolas
	國籍	(1) 丹麥 (2) 荷蘭 (3) 荷蘭
	住、居所	(1) 荷蘭歐格吉斯葛洛恩荷夫蘭 7 1 號 Groenhovelaan 71, 2343 BR Oegstgeest, The Netherlands (2) 荷蘭阿姆斯特丹安里思蘭路 20 號 Anne de Vrieslaan 20, 1187 WL Amstelveen, The Netherlands (3) 荷蘭阿姆斯特丹維亞南街 200 號 Vianenstraat 200, 1106 DE Amsterdam, The Netherlands
三、申請人	姓名 (名稱)	(1) 辛根塔摩根有限公司 Syngenta Mogen B.V.
	國籍	(1) 荷蘭
	住、居所 (事務所)	(1) 荷蘭來登·安斯坦路九十七號 Einsteinweg 97, 2333 CB Leiden, The Netherlands
	代表人 姓名	(1) 奧斯卡·高汀 Goddijn, Oscar J. M.

裝

訂

線

六、申請專利範圍

附件 一B : 第 87110865 號 專利 申請 案
中文 申請 專利 範圍 修正 本

民國 92 年 10 月 3 日 修正

1 . 一種 構築 含有 T - D N A 之 載體 之 方法 , 該 載體 係 用於 植物 之 轉形 , 其中 該 植物 轉形 株 不 含有 轉移 至 該 植物 之 T - D N A 外側 之 載體 序列 , 該 方法 之 特徵 係 在於 將 阻擾 該 含有 1 或 多個 非 該 T - D N A 序列 之 載體 序列 的 植物 轉形 株 發育 之 核苷 酸 序列 插入 至 包含 該 T - D N A 和 側面 T - D N A 邊界 之 載體 中 , 其中 該 核苷 酸 序列 編碼 R N A s e 或 與 D N A 結合 蛋白質 結合 以 妨礙 該 載體 D N A 之 解鏈 。

2 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 方法 , 其 特徵 在於 該 R N A s e 係 barnase 。

3 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 方法 , 其 特徵 在於 該 與 D N A 結合 蛋白質 結合 之 核苷 酸 序列 係 v i r 框 。

4 . 如 申請 專利 範圍 第 3 項 之 方法 , 其 特徵 在於 該 與 D N A 結合 蛋白質 結合 之 核苷 酸 序列 係 5 ' - T N C A A T T G A A A Y 3 ' (其中 N 係 任一 核苷 酸 且 Y 係 嘧啶 鹼 基 核苷 酸 (T 或 C)) 。

5 . 如 申請 專利 範圍 第 3 項 之 方法 , 其 特徵 在於 該 妨礙 D N A 解鏈 之 核苷 酸 序列 係 具有 高 G C 含量 及 2 0 - 6 0 個 鹼 基 對 (b p) 之 核苷 酸 序列 。

6 . 如 申請 專利 範圍 第 5 項 之 方法 , 其 特徵 在於 該 核

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

核苷酸序列係 4 0 b p 之核苷酸序列。

7 . 如申請專利範圍第 3 或 5 項之方法，其特徵在於該核苷酸序列具有超過 8 0 % 之 G C 含量。

8 . 如申請專利範圍第 7 項之方法，其特徵在於該核苷酸序列具有超過 9 0 % 之 G C 含量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線