

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/14

C12N 5/04 C12N 15/05

C12N 15/82 A01H 5/00

A01H 5/10 A01H 1/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807068. X

[43] 公开日 2003 年 5 月 21 日

[11] 公开号 CN 1419599A

[22] 申请日 2001.3.22 [21] 申请号 01807068. X

[30] 优先权

[32] 2000. 3.22 [33] US [31] 60/191,147

[86] 国际申请 PCT/US01/09318 2001.3.22

[87] 国际公布 WO01/70939 英 2001.9.27

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.23

[71] 申请人 依康遗传学股份有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 N·V·屈奇克

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称 转化植物质体和制备转质体基因组植物的方法

[57] 摘要

公开了转化质体和将转化的质体从一种植物移到另一种的方法。还公开了转质体基因组植物、其部分和其衍生的种子。还公开了一种植物的细胞或原生质体,或其培养物(例如愈伤组织培养物),其中细胞或原生质体含有从遗传上不同的植物的细胞获得的,并含有感兴趣的核酸的质体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种转化质体的方法，其特征在于，该方法包括：
- (a)将质体从第一种植物的细胞转移到第二种基因不同的植物的细胞；
- 5 (b)将感兴趣的核酸转移入所述质体，从而产生转化的质体；和
- (c)将所述转化的质体引入第三种植物的细胞，其中第一和第三种植物可以是彼此基因相同或基因不同的。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，(a)包括将衍生自第一种植物的细胞的原生质体与衍生自所述第二种植物的细胞的原生质体融合，从而形成第一
- 10 胞质杂种。
- 3.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述(c)的转移步骤包括将含有所述转化的质体的胞质杂种与衍生自所述第三种植物的细胞的原生质体融合。
- 4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述第一、第二和第三种植物是同一科的成员。
- 15 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述转移是通过细胞融合实现的。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述转移是通过有性杂交实现的。
- 7.一种转化质体的方法，其特征在于，该方法包括：
- (a)将质体从第一种植物的细胞转移到第二种基因不同的植物的细胞，其中所述质体与所述第二种植物的质体基因重组，从而产生重组质体；
- 20 (b)将感兴趣的核酸引入所述重组质体，从而产生转化的质体；和
- (c)将所述转化的质体转移入第三种植物的细胞，其中第一和第三种植物可以是彼此基因相同或基因不同的。
- 8.一种形成转质体基因组植物的方法，其特征在于，该方法包括：
- (a)将质体从第一种植物的细胞转移到第二种基因不同的植物的细胞；
- 25 (b)将含有可选择标记基因的感兴趣的核酸引入所述质体，从而产生转化的质体；
- (c)将所述转化的质体转移入第三种植物的细胞，其中第一和第三种植物可以是彼此基因相同或基因不同的；和
- (d)从(c)的细胞再生出表达可选择标记基因的转质体基因组植物。

9. 一种转化质体的方法，其特征在于，该方法包括：
- (a)将感兴趣的核酸引入第一种植物的细胞的质体，从而产生转化的质体；和
- (b)将转化的质体转移到第二种植物的细胞，其中所述第一和第二种植物是基因不同的。
- 5 10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述第一和第二种植物是同一科的成员。
11. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述第一和第二种植物是同一属中的物种。
12. 一种制备转质体基因组植物的方法，其特征在于，该方法包括：
- 10 将含有可选择标记基因的感兴趣的核酸引入第一种植物的细胞的质体，从而产生转化的质体；
- 将转化的质体转移到第二种植物的细胞，其中第一和第二种植物是基因相同的；和
- 从表达可选择标记基因的(b)的细胞再生出转质体基因组植物。
- 15 13. 用权利要求 8 所述的方法产生的转质体基因组植物，或其部分。
14. 如权利要求 13 所述的转质体基因组植物，其特征在于，该植物是同质体基因组的。
15. 衍生自权利要求 13 所述的转质体基因组植物的种子。
16. 用权利要求 12 所述的方法产生的转质体基因组植物，或其部分。
- 20 17. 如权利要求 16 所述的转质体基因组植物，其特征在于，该植物是同质体基因组的。
18. 衍生自权利要求 16 所述的转质体基因组植物的种子。
19. 一种植物的细胞或原生质体，或其培养物，其特征在于，所述细胞或原生质体含有从基因不同的植物获得的质体，其中所述质体已用感兴趣的 DNA 分子
- 25 转化。
20. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，该细胞是烟草属细胞。
21. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，该细胞是茄属细胞。
22. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，该细胞是诸葛菜属细胞。
23. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，该细胞是雷斯克懒勒属细胞。

-
24. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，该细胞是芸苔属细胞。
 25. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，所述质体是从马铃薯获得的。
 26. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，所述质体是从番茄获得的。
 27. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，所述质体是从茄子获得的。
 - 5 28. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，所述质体是从枸杞获得的。
 29. 如权利要求 19 所述的细胞，其特征在于，所述质体是从芸苔获得的。

转化物质体和制备转质体基因组植物的方法

5 技术领域

本发明一般涉及将外源核酸引入植物，更特别的涉及转化质体的方法。

发明背景

质体是一类以各种形式存在所有活植物细胞中的密切相关的细胞器。所有质体有几个共同特征。例如，它们具有小基因组，并且被由双层膜组成的包膜包裹。

10 所有质体来自原生质体，是存在于分生组织细胞中的较小的细胞器。质体根据各分化细胞的需要产生。例如，如果叶子在暗处生长，原生质体发育成含有称为原叶绿素的黄色叶绿素前体的黄化质体。如果另一方面，叶子在光线下生长，通过将原叶绿素转化成叶绿素，黄化质体发育成叶绿体。叶绿体是光合作用(植物制造其自身的有机营养物的过程)的部位。质体的其它形式是聚集类胡萝卜素色素的色

15 质体。这些质体负责许多物种中花瓣和果实的黄-橙-红色。白色体基本上是增大的前质体。它们存在于许多表皮和内部组织中，不变成绿色和进行光合作用。造粉体是白色体的常见形式。它们在贮藏组织中贮藏淀粉，在一些茎、叶和根的细胞中作为植物响应重力的部分。所有质体含有多个质体基因组拷贝，大部分能够在细胞中分裂。缺少其质体群的唯一类型的高等植物细胞是一些物种中的雄性精

20 细胞。因此，玉米等植物的质体是母体遗传的。即，它们仅从卵细胞获得其质体。见 Alberts 等, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing (New York), 1983, pp. 1120-1122。

高等植物的质体基因组是环形的双链 DNA 分子，约 120-165kb，在每个叶细胞中可存在 2,000-50,000 个拷贝。与植物的核基因组相比，质体基因组由于几个

25 理由成为了基因操纵的非常吸引人的目标。由于质体中的蛋白质以非常高的水平表达，质体的分子机制主要是细菌机制。另外，可实现更程度的屏蔽(不通过花粉传递)，并通过同源重组机制整合异源 DNA。DNA 随机整合到植物的核基因组中。另一方面，质体基因组整合的位置可以通过特定的旁侧序列来控制。没有基因沉默或所谓的位置效果，因此表达的水平更可预测。表达的水平也高得多，因为每

个植物细胞中有多个 DNA 拷贝。叶绿体基本上是一种细菌，因此它比基因组 DNA 更容易容纳细菌核酸，而不需要修饰。该优点也适用于相关的调节序列，例如细菌启动子。基本消除了基因释放到环境中的危险(称为“异型杂交”)，因为叶绿体不移动到花粉中。最后，由于叶绿体是大部分生物合成途径，例如淀粉、氨基酸和脂肪的位置，它插入基因，并使其在感兴趣的细胞器中发挥作用相对方便，而不需要特定的前导序列。

证明质体转化非常难，特别在于农业有价值的作物中。大部分转化方法是物种和变种特异性的。总的说，这些限制反映了复杂和独特的物种特异性途径，这些途径是在体外生长的植物组织中选择转化的质体。仅报道过能育的转质体烟草植株的能再现的生产(Svab 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530(1990))。在 Sikdar 等, Plant Cell Rep. 18:20-24(1998)中报道了转质体的拟南芥属植物，但这些植株是不育的。在该领域缺乏成功，虽然作了巨大投资，说明了问题的重大。因此，对于产生转质体基因组(transplastomic)植物的方法存在迫切需要。

15 发明简述

本发明的第一个方面针对一种转化质体的方法。该方法包括进行步骤：

(a) 将来自第一种植物的细胞的质体转移到第二种通常是基因不同的植物的细胞中；

(b) 在质体中引入感兴趣的核酸，因此产生转化质体；和

20 (c) 将转化的质体转移到第三种植物的细胞中，其中第一和第三种植物可以是基因上相同或不同的。

在优选例中，质体从一种植物转移到另一种，是在细胞水平上进行的，涉及体细胞融合。衍生自第一种植物的一个细胞的原生质体与衍生自第二种植物的细胞的原生质体融合，从而形成胞质杂种。在其它优选例中，转移的质体与第二种植物的质体基因重组，导致形成重组质体。然后用核酸转化重组质体。在其它优选例中，第一和第三种植物是同一植物科的成员或更优选的，是同一属中的物种。烟草是优选的受体植物(即第二种植物或剪切板(clipboard)植物)，在其中进行核酸的转化。芸苔属(Brassica)是另一类优选受体植物。

本发明的第二个和相关的方面针对一种产生转质体基因组植物的方法，包

括：

(a) 将质体从第一种植物的细胞转移到第二种基因不同的植物的细胞；

(b) 在质体中引入感兴趣的核酸，它含有可选择标记，从而提供转化的质体；

(c) 将转化的质体转移到第三种植物的细胞中，其中第一和第三种植物可以

5 是彼此基因相同或基因不同的；和

(d) 从(c)的细胞再生表达标记基因的转质体基因组植物。

还提供了转质体基因组植物本身及其部分，例如叶、根、茎、芽和衍生自植物的种子。在优选例中植物是同质体基因组的(homoplastomic)。

本发明的第三个方面针对一种转化质体的方法，包括：

10 (a) 将感兴趣的核酸引入第一种植物的细胞的质体，从而产生转化的质体；

和

(b) 将转化的质体转移到第二种植物的细胞，其中第一和第二种植物是基因不同的。

在该方面，质体的转化在质体转移到另一植株前进行。在优选例中，第一和
15 第二种植物是同一科的成员，更优选是同一属的成员。上述的其它与本发明的第一方面有关的优选例在本这里适用。

本发明的第四个和相关的方面针对一种制备转质体基因组植物的方法。该方法包括步骤：

(a) 将含有可选择标记基因的感兴趣的核酸引入第一种植物的细胞的质体，
20 从而产生转化的质体；

(b) 将转化的质体转移到第二种植物的细胞，其中第一和第二种植物是基因不同的；

(c) 从(b)的细胞再生表达可选择标记基因的转质体基因组植物。

本发明的第五个方面针对从植物获得的植物细胞或原生质体，或所述细胞或
25 原生质体的培养物，含有从基因不同的植物获得的质体，其中质体被感兴趣的 DNA 分子转化。在优选例中，植物细胞是烟草属(*Nicotiana*)细胞、茄属(*Solanum*)细胞、诸葛菜(*Orychophragmus*)细胞、雷斯克懒勒属(*Lesquerella*)细胞或芸苔属(*Brassica*)细胞。在其它优选例中，质体获自马铃薯、番茄、茄子、枸杞(*Licium*)属或芸苔属。在其它优选例中，受体或剪切板植物细胞是烟草细胞，质体来自茄

科的另一成员，例如马铃薯、番茄、茄和宁夏枸杞 (*Lycium barbarum L.*) 获得(或“供给”)。在其它优选例中，受体植物细胞是诸葛菜属细胞或雷斯克懒勒属细胞，质体是从芸苔 (*Brassica napus L.*) 获得的。在其它实施例中，受体和供体植物是禾本科的成员。

- 5 本发明的方法是特别有利的，因为它们对于几乎所有作物物种，特别是经济上重要的变种提供了相对容易和有效的质体操纵方法。

附图简述

图 1 是本发明实施例的示意性说明。

- 图 2 是溴乙锭染色的凝胶的照片，显示在各种植物中存在外源 DNA。用对 *aadA* 10 基因的内部特异性的引物进行了 PCR 扩增反应。扩增产物长 479bp。转化的烟草 (*N. tabacum*) DNA 用作阳性对照。泳道 1-马铃薯(即马铃薯/烟草重组质体)，未转化的植株(阴性对照)；2-马铃薯，克隆 1；3-马铃薯，克隆 2；4-马铃薯，克隆 3；5-烟草，转化植株(阳性对照)，478bp；6-烟草(颠茄属 (*Atropa*))胞质杂种；7-烟草(赛茛苳属 (*Scopolia*))胞质杂种；8-烟草(蛾蝶花属 (*Salpiglossis*))胞质杂种；15 9-1kb DNA 序列梯。

- 图 3 是溴乙锭染色的凝胶照片，表明外源 DNA 在植物中的存在。进行 PCR 扩增反应，其中一个引物对于 *aadA* 基因的内部部分是特异性的，其它引物对于叶绿体基因组 DNA 是特异性的。扩增产物的大小是 1100-1400bp 之间。作为阳性对照，使用了转化的烟草的 DNA。泳道 1-1kb DNA 序列梯；2-烟草，转化的植株(阳性对 20 照)；3-马铃薯，克隆 1；4-马铃薯，克隆 2；5-烟草(蛾蝶花属)胞质杂种。

- 图 4 是溴乙锭染色的凝胶照片，显示马铃薯/烟草重组质体中质体的嵌合性质。比较了烟草(泳道 2、5、8、11、14)、马铃薯(泳道 3、6、9、12、15)和马铃薯(泳道 4、6、10、13、16)的叶绿体基因组。片段 *trnI-ndhD* 未消化(泳道 2-4)，或用 *DraI*(泳道 5-7)、*StyI*(泳道 8-10)、*EcoRI*(泳道 11-13)或 *HaeIII*(泳道 14-16) 25 限制性内切核酸酶处理。

图 5 是优选例中质体 pCB033 的图，用于用含有 *aadA* 基因的茄属植物相关的质体制备转质体基因组植物，该基因用于在 16S rRNA 启动子的控制下在大观霉素/链霉素上选择，侧接用于同源重组整合的序列。

图 6 是与 pCB033 类似的质体 pCB040 的图，但其中选择旁侧区用于经同源重

组整合入芸苔物种。

本发明的优选实施模式

制备转质体基因组植物的困难不仅与在细胞水平引入外源核酸有关。事实上，整个挑战特别困难的方面在于转质体细胞缺乏再生性，特别是对于产生同质体基因组细胞。见 Bilang 等，Nature Biotech, 16:333-334(1998)。术语“同质体基因组”意味着细胞的质体中不含野生型质体基因组(plastome)(即质体基因组)。即，所有质体含有感兴趣的核酸。除了再生性小，选择同质体基因组植物细胞非常困难。

本发明克服了这两个主要障碍，通过将要转化的质体移动或重新定位到核环境中，在其中不难实现同质体基因组细胞的选择。受体细胞提供了对质体和外源核酸转化到质体中相容和适宜的环境。转化后，受体或剪切板细胞在更容易转化的核背景中继续生长并分裂，促进同质体基因组细胞的选择。

根据本发明的一个方面，提供了一种转化植物质体的方法，其中将感兴趣的核酸引入非天然环境中的质体。转化的质体被移回原植物或基因不同的植物的细胞中。本文所用的术语“基因不同”的植物意味着包括相同物种的突变体、不同的物种、属和科。术语“植物”意味着包括所有高等植物，优选有花植物。类似的，各种植物，例如本文所用的“马铃薯”和“番茄”意味着含有马铃薯和番茄的所有形式、品系和变种等。本文所用的“转化的”意味着在植物质体中通过掺入感兴趣的核酸(例如编码一种蛋白质)进行基因修饰。一般核酸对于供体植物(即质体来源的植物)、受体和/或最终受体是外源性的 DNA。“外源性”意味着在要转化的植物中正常情况下找不到该核酸，或在正常情况下发现的拷贝数与引入的不同。在优选例中，核酸对于供体植物是外源性的。

烟草是一种感兴趣的质体的优选受体(或剪切板)。设计了一系列远缘胞质杂种，它们组合了烟草核和其它经济上重要的茄科物种(马铃薯、番茄、胡椒、茄、曼陀罗)的质体。然后测试这些胞质杂种的质体转化性，将得到的转化的质体返回其原始核背景，从而产生转质体基因组植物。同样的方法用于十字花科，由此说明发明的广泛实用性。一般可用以下方法选择在本发明的方法中使用的植物配对。受体(或“剪切板”)的候选植物是突变的。筛选含有不合成叶绿素的质体的突变株(“白色突变株”)。处理，例如辐照来自候选质体供体的原生质体，杀死核。使衍

生自白色突变株的原生质体与衍生自候选供体的经处理的叶绿体融合。选择绿色集落和再生的胞质杂种或体细胞杂种。绿色集落含有从供体转移来的功能性质体。辐照确保唯一可能的转化事件涉及质体，而不是核。绿色集落的形成证明供体和受体植株是相容的，至少在质体的范围内。

- 5 从一种植物将质体转移到另一种植物可以通过融合衍生自供体和受体细胞的原生质体最方便地进行，然后从受体移到最终植物。质体的重组是随机事件，但用分子生物学中的标准技术可鉴定该事件。可以通过有性杂交实现质体转移，其中花粉提供了非天然的核环境。

引入感兴趣的核酸的优选方法是通过基因枪(biolistics)或 PEG-介导的基因
10 转移。见 Daniell, *Methods Enzymol.* 217:536-556(1993); Ye 等, *Plant Mol. Biol.* 15:809-819(1990); Daniell 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:88-92(1990); Daniell 等, *Plant Cell Reports* 9:615-619(1991)和 Svab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917(1993)。核酸包括用于鉴定转化体的标记。选择方案包括由于质体 16S 核糖体 RNA 基因突变，或表达工程改造的细菌 *aadA* 得到的大观霉素
15 抗性(Svab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530(1990); Svab 和 Maliga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917(1993))和由于表达新霉素磷酸转移酶的卡那霉素抗性(Carrer 等, *Mol. Gen. Genet.* 241: 49-56(1993))。标记基因不需要与 DNA(例如编码感兴趣的蛋白质的)物理上相连；它可以通过另一种载体传递。见 Carrer 等, *BIO/TECHNOLOGY* 13:791-794(1995)。优选但不必
20 要把核酸整合到质体基因组中。为了促进感兴趣的核酸有效和定向整合到质体基因组中，核酸侧接靶质体中存在的 DNA 序列。实施例 1 中列出了特定的序列。另见国际专利出版物 WO 00/28014(“茄科植物的质体转化”)和 WO 00/39313(“芸苔属的质体转化”)。

感兴趣的核酸变化很广，并包含从任何观点看有价值的植物中编码表达的任何
25 蛋白质的 DNA。本发明特别适合在转质体基因组植物中显示需要非常高的表达水平的新性状。根据本发明产生的转质体基因组植物，在每一个细胞中含有数千个 DNA 拷贝，导致非常高的基因表达水平。DNA 和蛋白质属于作物保护、作物改良、产生包括特定化学物质、营养物质和其它与食物质量有关的产物的特定化合物，例如改性淀粉、油和蛋白质成分，总的来说需要一组协同基因的表达，因此

需要特别的转化系统来使植物显示感兴趣的性状。外源基因可用于改进植物的输入需求，例如它们对环境的反应，它们保护自身不受虫害的能力，保护自身不受生物异源物质的伤害，或改变其它性状，例如总产量，产生营养平衡的蛋白质，质量更好的淀粉，高质或高产量的油或维生素水平。基因还可以使植物进行它们通常不实现的功能，例如产生药物，例如蛋白质(如促生长素等生长激素)、抗原和小分子。例如，文献报道了带有赋予抗昆虫性和除草剂，以及胞质雄性不育性的转基因的经基因工程改造的质体。见 McBride 等，*Bio/Technology* 13:362-365(1995) (含有“先前未有的” 3-5% cryIAC 蛋白的转质体烟草叶); Kota 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1840-1845(1999) (报道在叶绿体中表达 Bt Cry2Aa2 蛋白降低昆虫抗性); McBride 和 Maliga, PCT 专利, WO 95/24492; McBride 和 Stalker, PCT 专利 WO 95/24493; Daniell 等, *Nature/Biotechnology* 16:345-348(1998); Blowers 等, PCT 专利 WO 99/05265; Maliga, PCT 专利 WO 95/25787。

本发明的一个实施例在图 1 中示意说明。最初可产生一个宿主(剪切板)，它由于叶绿体功能受损是白色的。选择容易转化和再生的剪切板。将来自感兴趣的物种的叶绿体通过原生质体融合转移到剪切板植物中，产生了稳定的中间物。从含有剪切板物种的核和靶物种的质体的融合产物再生出的植物是正常和稳定的。在这些胞质杂种中进行转化。胞质杂种与靶物种的融合可以用衍生自同质体基因组胞质杂种植物的原生质体进行，从而产生具有转化的质体的靶植物。可以从这些细胞再生出完整植物。

在本发明的另一个方面，质体在其天然环境中转化，然后转化入基因不同的植物。当供体植物能对许多相关的受体植物(例如茄科的成员)提供质体时该方法特别有利。可以根据标准技术分离或制备含有转化的质体的细胞(或原生质体)(其中质体对于基因不同的植物是天然的)、细胞的培养物或原生质体。

一旦转化的质体转移入或在最终受体植株的细胞中形成，可从表达可选择标记基因的细胞再生出转质体基因组植物。在优选例中，植物是从同质体基因组的细胞再生的。同质体基因组性可以根据标准技术实现，例如在选择培养基上重复细胞分裂的过程中选择性消除野生型质体基因组拷贝。DNA(即引入序列)的拷贝数指示了是否实现了同质体基因组性。见 Daniell 等(1998)，见上，Kanevski 等，

Plant Physiol. 119:133-141(1999) (通过在相同的选择培养基上从叶子再生出芽的重复循环, 然后在无抗生素的 Murashige-Skoog 琼脂上令芽生根获得同质体基因组的大观霉素抗性植物)。一旦获得同质体基因组受体细胞, 将转化的质体转移到供体植物的细胞中。受体的同质体性质促进了转移后的选择。优选转移是通过融合衍生自各细胞的原生质体进行的。能育植物可以根据标准技术从原生质体再生。用标准方法也实现了获得各种植物部分, 例如根、芽、叶和茎, 和从植物得到的种子。

据信本发明的转质体基因组植物具有可跟踪的基因差异, 可将它们在基因水平上与通过直接质体转化产生的植物区别开来。最令人注意的区别在于讨论的物质的线粒体 DNA 组成 (GLEBA, Y. Y., SYTNIK, K. M. (1984) 原生质体融合, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1-220)。高等植物的线粒体 DNA 是多形性的, 任何种间细胞杂交始终产生非常独特的重排, 大部分没有表型效应 (GLEBA, Y. Y., SHLUMUKOV, L. R. (1990) 体细胞杂交和胞质杂交, 于: Bhojwani, S. S. 编, Plant Tissue Culture: Application and Limitations, Elsevier, Amsterdam, Oxford New York, 316-344)。但是它们可方便的通过线粒体 DNA 分析的标准分子生物学方法被识别, 例如亲本物种跟细胞杂交第一和第二轮产生的材料的限制性分布或聚合酶链式反应。因此, “剪切板”介导的质体转化所得的材料通常是独特的, 在该方面不同于用其它技术获得的转质体材料。

除了线粒体组成, 从含有对植物为非天然的转化质体的细胞再生的植物完全可以与通过直接的方法产生的转质体作物植物区分开来。例如, 本发明的方法产生含有来自 *Solanum rickii*、*Solanum cardiophyllum* 或 *Solanum papita* 的转化叶绿体的具有完整功能的马铃薯 (*Solanum tuberosum*)。还描述了马铃薯与这些质体基因组的功能性胞质杂种 Sidorov、Samoylov、Samoylov、Glagotskaya、Gleba, Proc Academy of Sci USSR 308, 741-744(1989) 和 Sidorov、Yevtushenko、Shakhovskiy 和 Gleba, Theor. Appl. Genet. 88:525-529(1994)。

在优选例中, 植物细胞是烟草属细胞、茄属细胞、诸葛菜属细胞、雷斯克懒勒属细胞或芸苔属细胞。在其它优选例中, 从马铃薯、番茄、茄、枸杞属或芸苔属获得质体。在其它优选例中, 受体或剪切板植物细胞是烟草细胞, 质体从茄科, 例如马铃薯、番茄、茄和宁夏枸杞等另一个成员获得 (“或供给”)。在其它优选

例中,受体植物细胞是诸葛菜属细胞或雷斯克懒勒属细胞,质体从芸苔获得。在其它实施例中,受体和供体植物是禾本科的成员。

下面一种和多种出版物描述了本领域有关的质体转化,包括本文所用的技术和遗传因子的状态。

- 5 Daniell 和 McFadden, 美国专利 5,693,507
McBride 和 Maliga, 美国专利 5,545,818
McBride 和 Maliga, PCT 专利 WO 95/24492;
McBride 和 Stalker, PCT 出版物 WO 95/24493;
McBride 和 Stalker, PCT 出版物 WO 95/16783;
- 10 Maliga, PCT 出版物 WO 95/25787;
Maliga, Allison 和 Haydukiewicz, PCT 出版物 WO 97/06250;
Maliga, Carrer 和 Chaudhuri, PCT 出版物 WO 97/47771;
Maliga 和 Maliga, 美国专利 5,451,513;
Maliga, Sikdar 和 Reddy, PCT 出版物 W097/32977;
- 15 Baldev, Gaikwad, Kirti, Mohapatra, Prakash 和 Chopra, *Mol. Gen. Genet.*,
260: 357-361(1998);
Boynton, Gillham, Harris, Hosler, Johnson, Jones, Randolph-Anderson,
Robertson, Klein, Shark 和 Sanford, *Science*, 240:1534-1537(1988);
Carrer, Hockenberry, Svab 和 Maliga, *Molec. Gen. Genet.* 241: 49-56(1993);
- 20 Daniell, Datta, Gray, Varma 和 Lee, *Bio/Technology* 16:345-348(1998);
Eigel 和 Koop, *Mol. Gen. Genet.* 233:479-482(1992);
Fahleson, Eriksson, Landgren, Stymne 和 Glimelius, *Theor. Appl.
Genet.* 87: 795-804(1994)。
Gleba 和 Sytnik, *Monogr. Theor. Appl. Genet.* 8:1-220(12984)。
- 25 Jarvis, Chen, Li, Peto, Fabkhauser 和 Chory, *Science* 282:100-103(1998);
Kermickle, *Science* 166:1422-1424(1969);
Kindiger, *Crop Sci.* 34:321-322(1994);
Koop, Steinmueller, Wagner, Roessler, Eibl, Sacher, *Planta*
199:193-201(1996);

- Kota, Daniell, Varma, Garczynski, Gould 和 Moar, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 96:1840-1845(1999);
- Kushnir, Shlumukov, Pogrebnyak, Berger 和 Gleba, Mol. Gen. Genet. 209:159-163(1987);
- 5 McBride, Svab, Schaaf, Hogan, Stalker 和 Maliga, Bio/Technology 13:362-365(1995);
- Ramulu, Dijkhuis, Famelaer, Cardi 和 Verhoeven, Planta 190: 190-198(1993);
- Sidorov, Yevtushenko, Shakhovsky 和 Gleba, Theor. Appl. 10 Genet. 88:525-529(1994);
- Sidorov, Kasten, Pang, Hajdukiewicz, Staub, Nehra, The Plant J. 19:209-216(1999);
- Sikdar, Serino, Chaudhuri 和 Maliga, Plant Cell Rep, 18:20-24(1998);
- Strepp, Scholz, Kruse, Speth 和 Reski, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 15 95:4368-4373(1998);
- Svab, Hajdukiewicz 和 Maliga, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530(1990);
- Svab 和 Maliga, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917(1993);
- Thanh 和 Medgyesy, Plant Mol. Biol. 12:87-93(1989);
- 20 Thanh, Smith, Medgyesy 和 Marton, Mol. Gen. Genet. 213:186-190(1988);
- Verhoeven, van Eck, Blaas 和 Dijkhuis, Plant Cell Rep. 14:781-785(1995);
- Wolters, Vergunst, van der Werff 和 Koorneef, Mol. Gen. Genet. 241:707-718(1993);
- Zubko 和 Day, Plant J. 15:265-271(1998);
- 25 Zubko, Zubko, Patskovsky, Rhvedynych, Fisahn, Gleba 和 Schieder, J. Exp. Botany 47:1101-1110(1996)。

下文所述的实验基于使用具有有利于质体转化的核背景的系统, 提供了重要作物物种(马铃薯、番茄、胡椒、曼陀罗、颠茄和十字花科植物)成功的质体转化的例子。

实施例 I

蛾蝶花属质体的转化和蛾蝶花属转质体基因组植物的产生

如 Sidorov 等, Theor. Appl. Genet. 88:525-529(1994)所述, 体外培养喇叭舌草(*Salpiglossis sinuata* L.)植株和具有质体基因组编码的叶绿素缺陷

5 (Kushnir 等, Mol. Gen. Genet. 209:159-163(1987))的烟草突变植株。根据 Gleba 和 Sytnik, Monogr. Theor. Appl. Genet. 8:1-220(1984)所述的标准方法分离和融合叶肉原生质体。再生绿色重组株, 选择绿色烟草样的小植株。选出了几种独立的光合作用品系并进一步分析。以基于 PEG-介导的基因传递的公开方法(Koop, Steinmueller, Wagner, Roessler, Eibl, Sacher, Planta 199:193-201(1996)), ,

10 与大观霉素和链霉素筛选(Svab 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530(1990))组合, 用含有喇叭舌草质体和烟草核的重组株进行质体转化。选出了几种独立的推测已转化株, 进一步测试。在产生的植物材料中, 鉴定出真实稳定的质体转化株。见图 2 和 3。然后分离这些植株的叶肉原生质体, 将喇叭舌草品系的体细胞与其融合。不需要白化的突变株, 因为可以轻易的鉴定 str/spm 抗性

15 叶绿体。获得了许多进行光合作用的大观霉素/链霉素抗性再生株, 它们是喇叭舌草样的植物, 含有转质体喇叭舌草质体(照片未显示)。

实施例 II

番茄质体的转化

在这些实验中, 使用了体外生长的正常番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)

20 植株和龙葵(*Solanum nigrum*)的卡那霉素和潮霉素抗性植株。所用的培养条件和融合方法基本如 Wolters 等, Mol. Gen. Genet. 241:707-718(1993)所述。通过在番茄和辐照过的龙葵之间融合获得了剪切板品系。产生的植株具有花, 但是雄性不育的。产生的绿色再生株含有番茄叶绿体和来自原始的两个亲本的杂交核物质。转化和推测的转质体基因组的选择如实施例 I 所述。用正常番茄植株对稳定的

25 的转质体基因组植物授粉。获得种子, 长出具有转化的质体的番茄样植株。

实施例 III

茄(*Solanum melongena*)质体的转化

如 Sidorov 等, Theor. Appl. Genet. 88:525-529(1994)所述, 体外培养茄植株和具有质体基因组编码的叶绿素缺陷(Kushnir 等, Mol. Gen. Genet.

209:159-163(1987))的烟草突变植株。根据 Gleba 和 Sytnik, Monogr. Theor. Appl. Genet. 8:1-220(1984)所述的标准方法分离和融合叶肉原生质体。再生绿色重组株,选择绿色烟草样的小植株。分离和选择了几种独立的光合作用品系并进一步分析。以基于 PEG-介导的基因传递的已出版的方法(Koop 等, Planta 199:193-5 201(1996)),与大观霉素和链霉素筛选(Svab 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530(1990))组合,处理含有茄质体和烟草核的几种重组植株,来获得转化的质体。选出了几种独立的推测已转化株,进一步测试。如图 2 和 3 所述,从植物材料中鉴定出稳定的质体转化株。然后分离这些植株的叶肉原生质体,与茄品系的体细胞融合。由于叶绿体具 str/spm 抗性,不需要白化的突变株。获得的 10 许多进行光合作用的大观霉素/链霉素抗性再生株是茄样的植物,含有转质体基因组的茄质体(照片未显示)。

实施例 IV

颠茄质体的转化和颠茄转质体基因组植物的产生

不用喇叭舌草而使体外培养的颠茄(*Atropa belladonna* L.)的正常植株生 15 长。再次使用具有质体基因组编码的叶绿素缺陷的烟草突变植株作为这些实验的受体。所有其它条件和实验基本如实施例 I 中所述。颠茄原生质体与烟草融合后,转化和融合,使转化的质体从烟草移回颠茄绿色植株,获得了颠茄样的植株。

实施例 V

枸杞质体转化和枸杞转质体基因组植物的产生

20 在该实验中代替喇叭舌草使用体外培养的宁夏枸杞的正常植株,和质体基因组编码的叶绿素缺陷的烟草突变植株作为受体。所有其它条件和实验如实施例 I 所述。

实施例 VI

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)质体的转化

25 在该实验中使用体外生长的正常和白化马铃薯植株代替喇叭舌草。作为受体物种,使用野生型茄属物种 *Solanum rickii* L. 为了培养 *S. rickii* 体外生长的植株的叶肉原生质体,如 Thanh 等, Plant Mol. Biol. 12:87-93(1989)所述使用含有维生素和氨基酸的富集培养基。所有其它条件和实验基本如实施例 I 中所述。

实施例 VII

芸苔 (*Brassica napus*) 质体的转化

如 Zubko 等(1998), 见上)所述体外培养芸苔(欧洲油菜)的正常植株和具有质体基因组编码的叶绿素缺陷的诸葛菜属或雷斯克懒勒属突变植株。根据标准方法(Fahleson 等, Theor. Appl. Genet. 87:795-804(1994))分离和融合叶肉或胚芽鞘原生质体。再生绿色重组株, 选择绿色诸葛菜和雷斯克懒勒样的小植株。选出了几种独立的进行光合作用的品系并进一步分析。用基于基因枪的基因传递的已发表方法, 和大观霉素和链霉素选择组合, 对组合芸苔质体和诸葛菜或雷斯克懒勒核的重组株进行质体转化。选出了几种独立的推测已转化株, 进一步测试。从产生的植物材料中鉴定出真正稳定的质体转化株。然后分离这些植株的叶肉原生质体, 与芸苔品系的体细胞融合。获得的许多进行光合作用的大观霉素/链霉素抗性再生株是芸苔样的植物, 含有转质体基因组的芸苔质体。

实施例 VIII

重组烟草+茄属质体的转化

在该实验中使用体外生长的正常和白化马铃薯植株。基本如 Thanh 等, Plant. Mol. Biol. 12:87-93(1989)所述, 产生了组合烟草核和重组烟草-马铃薯质体基因组(图 4)的重组植株。所有其它条件和实验基本如实施例 I 中所述。产生含有重组和表达抗生素抗性的转质体基因组质体的正常马铃薯植株。见图 1 和 2。

实施例 IX

质体转化载体 pCB033 的构建

从烟草 (*N. tabacum*) ptDNA 亚克隆 pNtcPsl (pNtcPsl 含有 99983-123672 位之间的烟草质体基因组片段; Shinozaki 等, EMBO J. 5:2043-2049(1986))切下 4656bp 的 Bgl II 片段。琼脂糖凝胶纯化含有基因 *ndhF*, *rpl32* (CDS79) 和 *trnL* (*trn30*) 的 Bgl II 片段, 亚克隆入质粒 pBluescript KS (Stratagene, Heidelberg, Germany) 的 Bam HI 位点, 得到亚克隆 pF4656BB。

在烟草 16S *rrn* 启动子 (16S-rDNA 启动子) 的控制下, 如下克隆含有大肠杆菌的氨基糖苷 3'-腺苷酸转移酶 (*aadA*) 的表达盒: 用聚合酶链式反应从烟草总 DNA, 用引物 "5-24" 5'-CCGAATTCGCCGTCGTTCAATGAG-3' 和 "3-21" 5'-CACGATATCGCCCGGAGTTG-3' 扩增含有 *rrn* 启动子的 DNA 片段。用 EcoRI 和 EcoRV 切割扩增的片段。用退火引物 "5-rbs" 5'-CTCGATATCACTAGTTGTAGGGAGGGA-3' 和引

物“3-rbs”5'-GTGCCATGGATCCCTCCT-3'构建含有烟草 rbcL 基因的核糖体结合位点(RBS)的接头 DNA 片段。用 DNA 聚合酶的 Klenow 片段填充突出端。随后用 EcoRV 和 NcoI 切割该片段。用 EcoRV 和 NcoI 切割含有与增强鞘单胞菌(*Chlamydomonas reinhardtii*) rbcL 下游区 440bp 片段融合的细菌 aadA 基因的质粒 pUC-atpX-
5 AAD(Dr. M. Goldschmidt-Clermont 提供), 从而除去原始的 pUC-atpX-AAD 启动子片段。将用 EcoRV 和 NcoI 处理的“5-rbs”和“3-rbs”(核糖体结合位点)的退火产物和 EcoRI 和 EcoRV 处理的 PCR 产物(rrn 启动子)同时插入无启动子的 pUC-atpX-AAD 载体, 得到克隆 pUC16SaadA。

从 pUC16SaadA 上通过用 SmaI 和 EcoRI 切割切下含有 aadA 表达盒的 1.4kbp
10 片段。通过与 DNA 聚合酶的 Klenow 片段的填充反应, 将 EcoRI 末端转换成平端。凝胶纯化所得到的平端片段。

用 SnaBI 限制性酶使载体 pF4656BB 线性化。用碱性磷酸酶处理线性片段, 防止在下面的连接反应中自身环化。然后在连接反应中使用从 pUC16SaadA 切下的 aadA 表达盒和 pF4656BB 的线性片段。筛选得到的克隆是否存在 aadA 盒。选择含
15 有与 ndhF 基因具有相同取向的 aadA 盒的分子, 得到转化载体 pFaadAI。

通过将 Sal I/XbaI 片段(携带含有质体基因组序列和 aadA 表达盒的插入片段)亚克隆入 pKS-负载体(已用 XhoI/XbaI 线性化), 除去载体多克隆位点中的 HincII 限制性位点。

为了减少载体的总尺寸, 用 Nde I 和 Sma I 消化分子, 在用 DNA 聚合酶的 Klenow
20 片段处理后重新连接, 得到质粒 pCB033, 如图 5 所示。

实施例 X

质体转化载体 pCB040 的构建

用 DNeasy 植物小试剂盒(QIAGEN, Hilden, Germany)分离芸苔(欧洲油菜)的总 DNA。

25 选择 2515bp(烟草质体基因组图中的位置 140126bp-142640bp)的烟草(*N. tabacum*)的高度保守的质体基因组片段。用该烟草序列设计 PCR 引物:

左侧引物: “trn V-li-65”5'-CCA CGT CAA GGT GAC ACT C-3'

右侧引物: “rps 7-re-66”CTG CAG TAC CTC GAC GTG

用引物“trn V-li-65”和“rps 7-re-66”, 以芸苔的总 DNA 作为模板, 用

Pfu-聚合酶(Promega)进行 PCR 扩增。确定 PCR 最佳条件(加入 4mM MgCl₂, 退火温度升至 57°C)后, 反应得到约 2800bp 的产物, 然后用琼脂糖凝胶纯化。

以 Taq DNA 聚合酶(QIAGEN)如 pGEM-T-easy 手册(Promega)所述, 用“A-加尾”直接将该片段克隆入 pGem-T-easy 载体中。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化反应, 根据厂商说明与 pGEM-T-easy 载体一起用于连接反应。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化连接产物, 用于电穿孔介导的“Epicurian Coli Sure”电感受态细胞(Stratagene)的转化。电穿孔在细菌电穿孔的标准条件下(电容 25μF, 分路电阻 201 OHM, 脉冲 5ms)用 Peqlab(Erlangen, Germany)电脉冲装置进行。细菌铺在含有 100 微升 10mM IPTG 和 100 微升 2% X-gal 的氨苄青霉素 (75mg/L) LB-琼脂平板上。

用蓝-白选择系统, 选出白色集落, 用 QIAprep Spin Mini Prep 试剂盒(Qiagen)分离其质粒 DNA。

用限制性分析(以 NotI 限制), 选出阳性克隆得到质粒 pCan01。阳性克隆的质粒 DNA 进行测序(TopLab, Martinsried, Germany)。用序列数据确定插入片段的取向, 找出 aadA 盒的合适整合位点。选择位置 828 的 Bpu1102I 位点作为 aadA 标记盒的插入位点。

如下制备携带 aadA 标记盒的 DNA 片段: 用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR, 从模板 pUC 16SaadA 扩增 aadA-表达盒(见实施例 IX)。用引物“aadA-uni-li-94” 5'-GCT CGA GAT ACC GGT CCC GGG AAT TCG CCG TCG-3' 和“aadA-uni-re-95” 5'-GGT TAA CGG CGC CTG GTA CCG AGC TCC ACC GCG-3' 进行 PCR 反应。通过琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 反应产物。

用 Bpu1102I 消化载体 pCan01, 用 Klenow 片段产生平端。然后进行去磷酸化(首先用虾碱性磷酸酶, 然后再用小牛肠磷酸酶处理), 防止自身连接。用苯酚抽提灭活磷酸酶。

用线性的 pCab01 片段与上述 aadA-标记片段进行连接反应。用“快速连接试剂盒”(Roche, Penuberg, Germany)进行连接。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化连接产物。用电穿孔法在上述标准条件下转化 Epicurian Coli Sure 电感受态细胞(Stratagene)。

在含有氨苄青霉素(75mg/L)和大观霉素(100mg/L)的 LB-琼脂培养皿上选择集

落。用 Cfr42I、Eco32I、NotI 和 PvuI 进行限制性分析，鉴定阳性克隆，并分析插入片段的取向。显示正确插入的克隆称为 pCB040，在图 6 中示意性说明。

工业应用性

5 本说明书所有引用的专利和非专利出版物说明了本发明涉及的领域的技术人员的技术水平。所有这些出版物和专利申请在此以相同程度引用以供参考，如同各单独出版物或专利申请是特别和单独说明在此引用以供参考的。

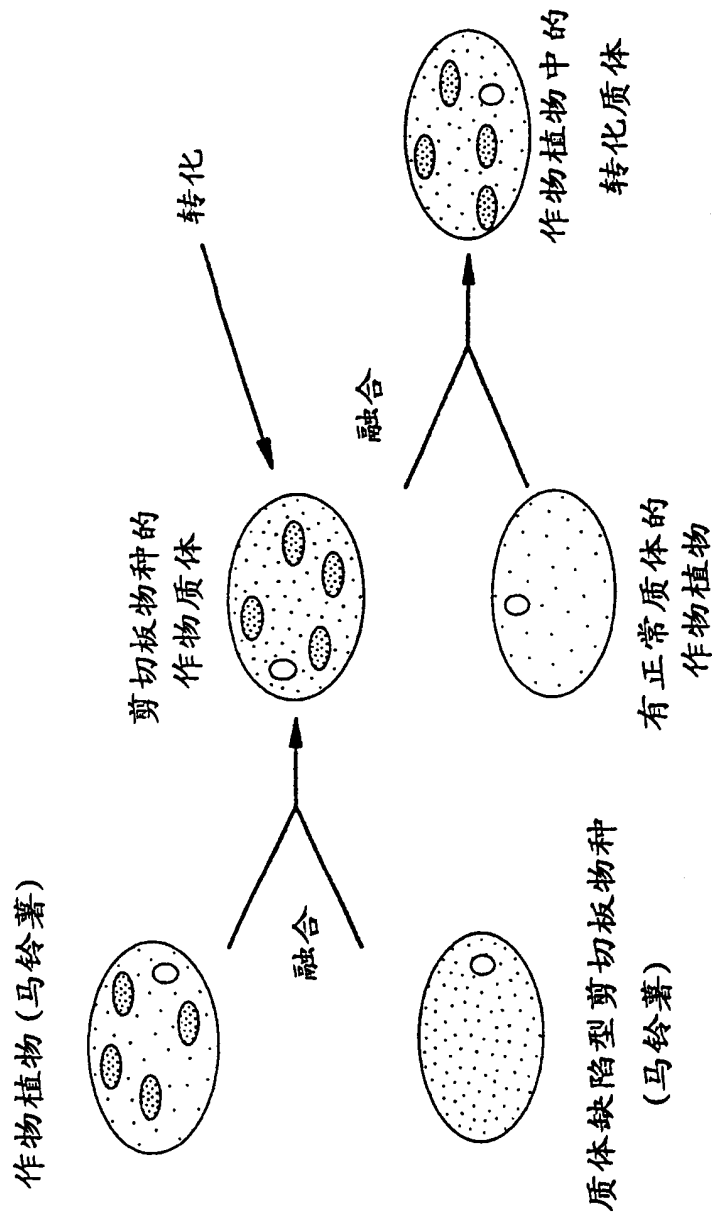


图 1

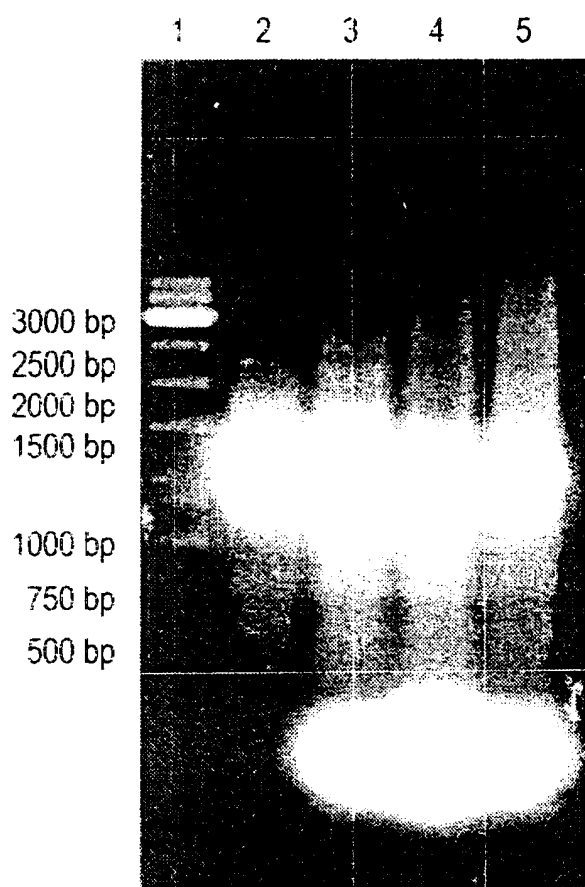


图 2

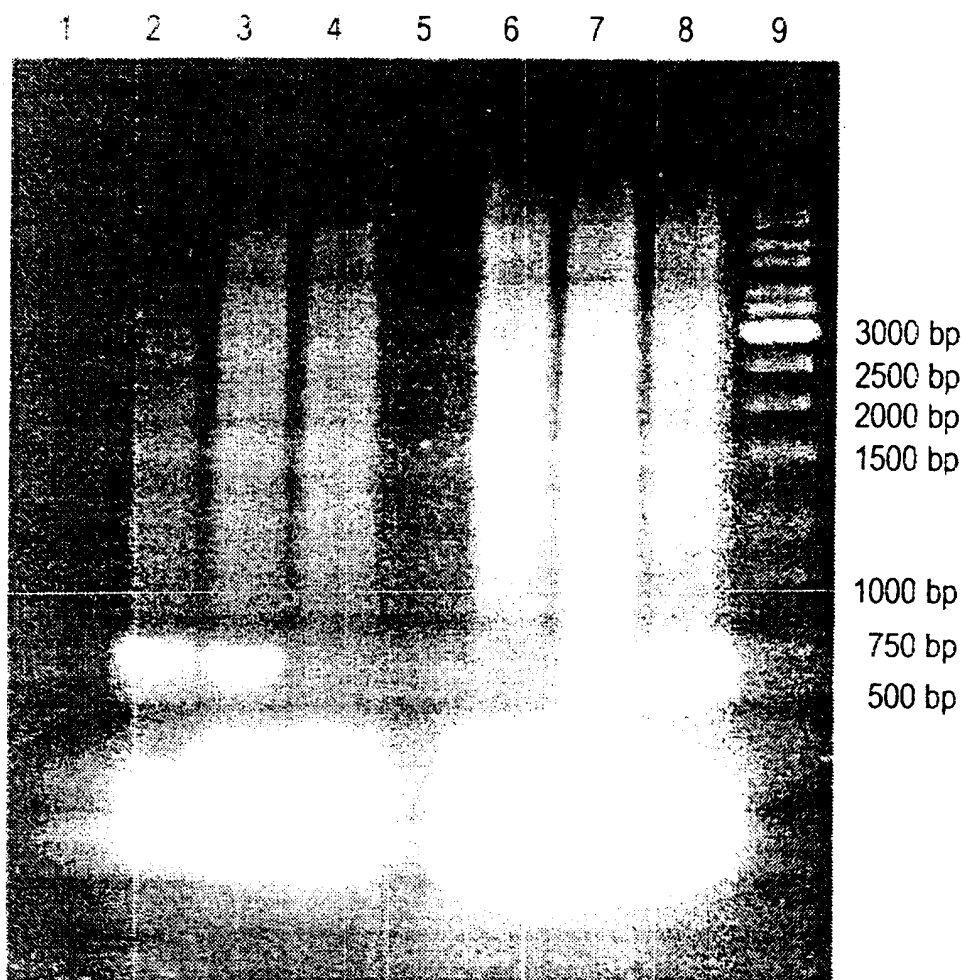


图 3

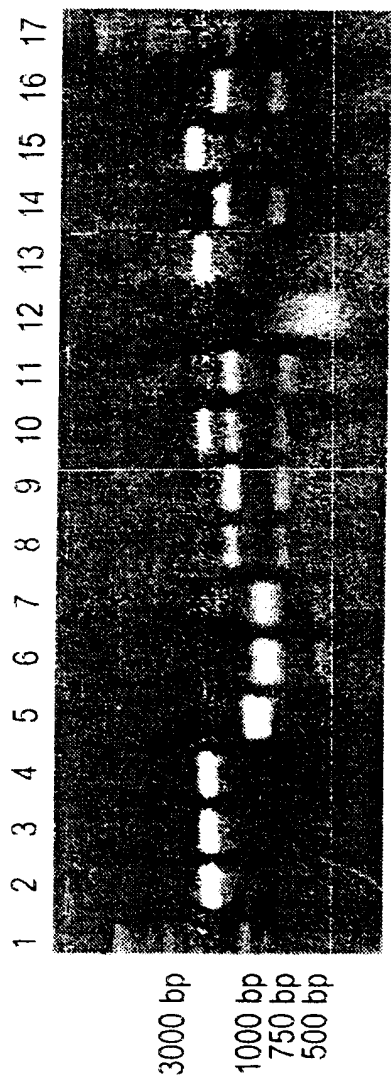


图 4

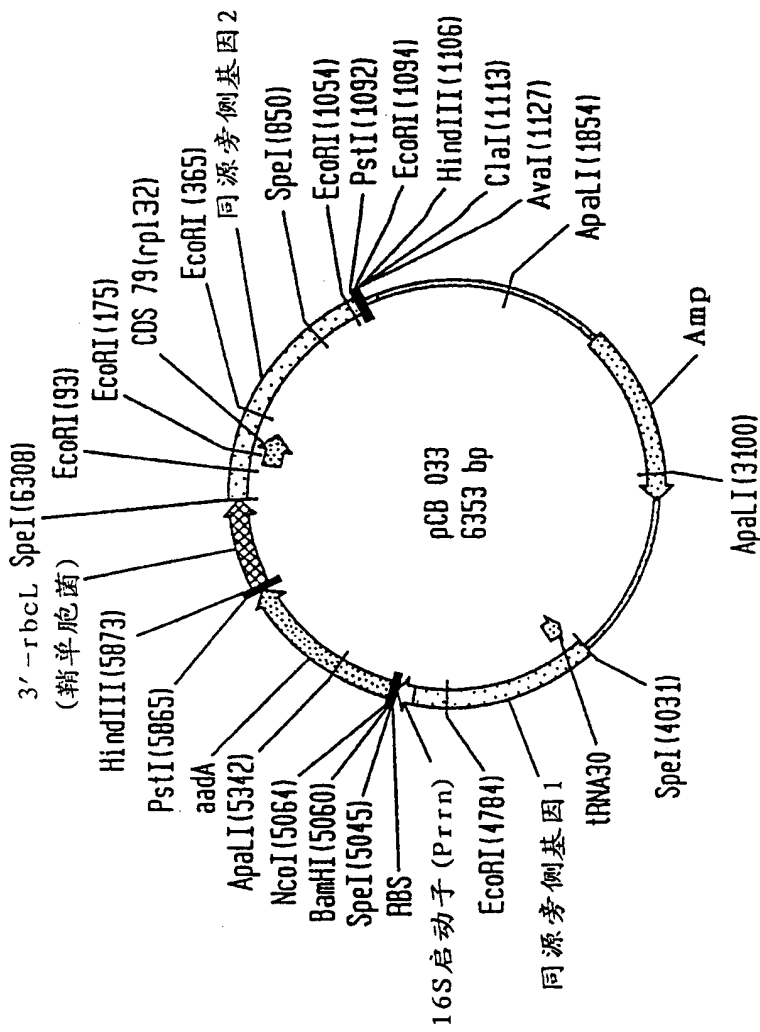


图 5

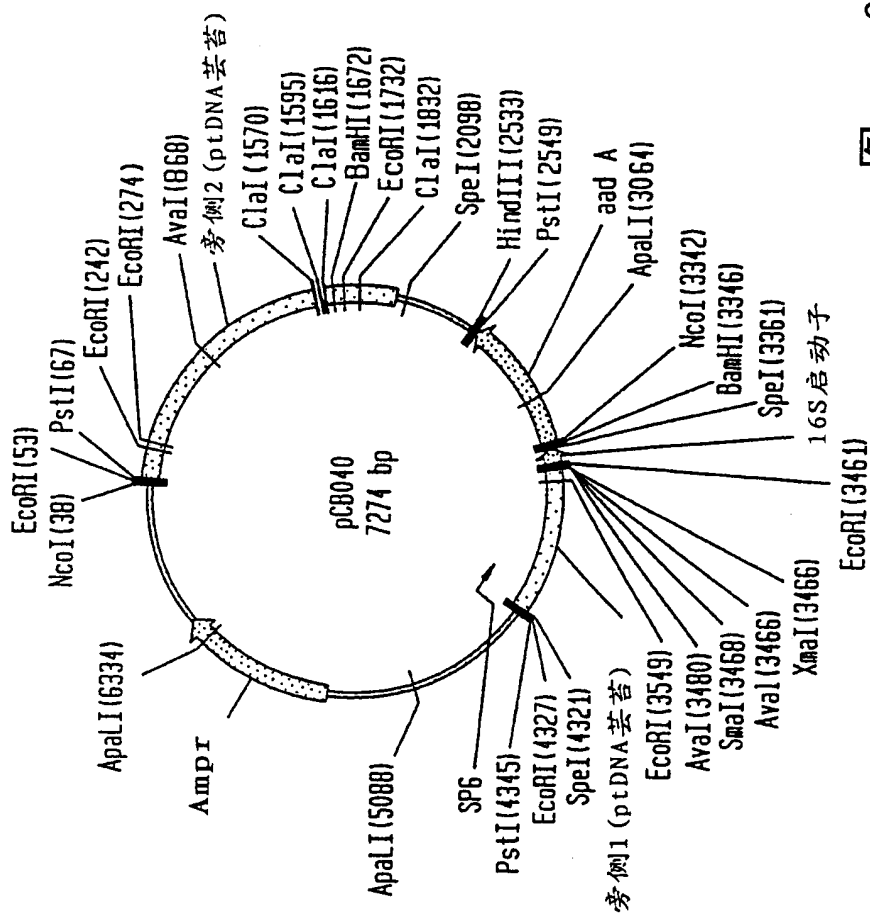


图 6