

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/29



[12] 发 明 专 利 说 明 书

C12N 15/34 C12N 15/82
C12N 1/21 C12N 5/04
C12N 5/10 A01H 5/00

[21] ZL 专利号 98805629.1

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1150320C

[22] 申请日 1998.5.29 [21] 申请号 98805629.1
[30] 优先权
[32] 1997. 6. 2 [33] US [31] 08/867,869
[86] 国际申请 PCT/EP1998/003215 1998.5.29
[87] 国际公布 WO98/054961 英 1998.12.10
[85] 进入国家阶段日期 1999.11.30
[71] 专利权人 辛根塔参与股份公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 G·汉森
审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 41 页

[54] 发明名称 植物转化方法
[57] 摘要

本发明提供用能抑制农杆菌诱导的坏死的条件对植物、特别是禾本科植物进行农杆菌转化的改进方法。

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

1. 用目的基因转化植物细胞的方法，包括将该植物细胞在抑制农杆菌诱导的坏死 (AIN) 的条件下与农杆菌共培养，其中所述农杆菌包含有所述目的基因的载体，而且所述条件选自：

(a) 在热激处理所述植物细胞后将所述植物细胞与农杆菌共培养；

(b) 在存在 AIN 抑制剂的情况下将所述植物细胞与农杆菌共培养，其中所述 AIN 抑制剂选自：乙烯合成抑制剂、赤霉素拮抗剂、磷酸酶抑制剂和由乙烯抑制剂组成的抑制剂；和

(c) 在存在编码能够抑制 AIN 的 mRNA 或蛋白质的核苷酸序列的情况下将所述植物细胞与农杆菌共培养；

和选择由此转化的细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述热激处理在 40 - 50℃ 进行。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述处理在 42 - 48℃ 进行。

4. 权利要求 2 或 3 的方法，其中所述处理持续 2 - 10 分钟。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 AIN 抑制剂由乙烯抑制剂组成。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述核苷酸序列编码选自 p35、iap 和 dad-1 的基因的蛋白。

7. 权利要求 1 - 6 任一项的方法，其中所述植物细胞是禾本科植物细胞。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞是玉米或小麦细胞。

9. 根据权利要求 1 - 8 任一项的方法产生的转化植物细胞。

10. 权利要求 9 的转化植物细胞，其是玉米或小麦细胞。

11. 植物细胞或组织培养基，包含：

(a) 选自乙烯合成抑制剂、赤霉素拮抗剂、磷酸酶抑制剂和由乙烯抑制剂组成的抑制剂的 AIN 抑制剂；和

(b) 包含含有目的基因的质粒的农杆菌；和

(c) 植物细胞；和

(d) 水和必需盐类。

12. 制备能育转基因植物的方法，包括通过将植物组织在抑制 AIN 的条件下与农杆菌共培养而转化植物组织，并再生由此转化的组织，其中所述农杆菌包含含有目的基因的载体，而且所述条件选自：

(a) 在热激处理所述组织后将所述组织与农杆菌共培养；

(b) 在存在 AIN 抑制剂的情况下将所述组织与农杆菌共培养，其中所述 AIN 抑制剂选自：乙烯合成抑制剂、赤霉素拮抗剂、磷酸酶抑制剂和由乙烯抑制剂组成的抑制剂；和

(c) 在存在编码能够抑制 AIN 的 mRNA 或蛋白质的核苷酸序列的情况下将所述组织与农杆菌共培养。

植物转化方法

技术领域

本发明涉及使用农杆菌转化植物的方法，此方法在抑制农杆菌诱导的坏死的试剂存在的情况下进行转化和/或使用不诱导坏死的农杆菌菌株进行转化。

背景技术

将外源遗传物质导入植物的第一种方法并且仍是最广泛使用的方法之一是利用农杆菌属种类的天然转化系统、使用其中 T-DNA 包含目的基因的重组 Ti(诱导肿瘤的)或 Ri(诱导根的)质粒。目的基因通过与用于天然系统以整合癌基因或冠瘿碱生物合成基因的相同机制掺入植物遗传物质中。

尽管农杆菌转化对于那些在野外由农杆菌天然侵染和转化形成肿瘤和/或发根的植物有效，但对于其它植物并不是很有效。例如，已知禾本科(Gramineae)成员如玉米在暴露于农杆菌时不形成肿瘤并且已普遍证明它极不易受农杆菌的转化。Ishida 等在《自然生物技术》(1996)14:745-750 已报道了使用带有“超级双元”载体的农杆菌转化来自特定玉米株系(A188)及其杂种的胚，但这些结果的重复性以及此系统用于其它玉米株系和/或使用带有其它载体的农杆菌的适用性还不清楚。还有用顶端分生组织作为靶组织进行玉米的农杆菌转化的报道，但与例如胚发生愈伤组织相比，作为靶组织的顶端分生组织的低效率使得此方法不够理想。甚至一些在野外对农杆菌侵染和肿瘤形成易感的双子叶植物如葡萄、大豆或胡椒也已证明难于在实验室中转化，因为优选的转化和再生靶组织看来对暴露于农杆菌反应很弱。对农杆菌侵染和肿瘤形成的抗性机制缺乏理解看来是设计解决方案时的障碍，甚至也是适当评估在抵抗农杆菌转化的植物如禾本科中农杆菌转化问题的障碍。

现已惊人地发现农杆菌能在植物细胞，特别是禾本科如玉米中诱导凋亡性坏死。已发现筛选和产生具有较低诱导坏死能力的农杆菌的方法和/或在转化细胞中抑制坏死反应的方法。

在暴露于农杆菌之后禾本科细胞培养物中可见到的坏死是细胞通过

信号转导机制导致其自身死亡的程序性细胞死亡。它不同于被动的细胞死亡,即它是涉及膜完整性瓦解和随后引起溶解的膨胀的坏死,正如细胞暴露于各种毒素时可见到的。经历程序性细胞死亡的细胞表现出特征性形态变化和 DNA 片段化,这些特征结合起来限定了凋亡的过程并通过涉及从头基因表达的机制产生。所描述的动物细胞中凋亡的定性特征是皱缩、形成器官的组织中细胞与细胞间接触的丢失、核和染色质凝聚、DNA 片段化(DNA“梯状”)以及核和膜空泡形成。我们已证明农杆菌与玉米或小麦组织的共培养导致与动物细胞中凋亡极其相似的过程,其中细胞死亡的特征在于 DNA 断裂为寡核小体片段以及所定义的形态变化。在暴露于农杆菌的玉米细胞中, Ca^{2+} 增加 DNA 片段化的强度而 Zn^{2+} 具有相反的效应,这与这些二价阳离子在动物细胞凋亡过程中对负责 DNA 断裂的内源性核酸内切酶的效应一致。此片段化也通过加入放线菌酮得到减弱,这是此过程需要从头基因表达的证据。对暴露于农杆菌应答的程序性细胞死亡尚未见报道。

已进一步发现在禾本科植物中观察到的这种农杆菌诱导的坏死(AIN)可通过使用 AIN 抑制剂诸如硝酸银的化合物或者在要转化的细胞中稳定结合或暂时起作用的抑制 AIN 的核苷酸序列而得到抑制。通过筛选一系列农杆菌样品还发现农杆菌菌株诱导坏死的能力不同,因此可筛选出适于转化抗性植物如禾本科植物的菌株。

发明内容

因此,本发明包括以下几个实施方案:

1. 用目的基因转化植物细胞的方法,包括:将该植物细胞在抑制 AIN 的条件下(如存在 AIN 抑制剂或热击处理)暴露于农杆菌,其中上述农杆菌包含一种或多种含有一种或多种目的基因的质粒。

1.1. 在前面方法的一个实施方案中,AIN 抑制剂是化学抑制剂。化合物抑制剂优选地选自乙烯抑制剂(如 2,5-降冰片二烯、降冰片烯、硫代硫酸银和硝酸银)、乙烯合成抑制剂[如氨基乙氧基乙烯基甘氨酸(AVG)、钴盐、乙酰水杨酸或水杨酸]、赤霉素拮抗剂[如脱落酸(ABA)]和磷酸酶抑制剂(如冈田酸)的化合物。最优选地,化学抑制剂是乙烯抑制剂;优选地,化学抑制剂是硝酸银。蛋白和肽也可作用为化学抑制剂。例子是天然存在的蛋白如 DAD-1、凋亡的杆状病毒抑制剂(IAP)、

杆状病毒 p35 或与能激发凋亡的半胱氨酸水解酯类似的合成肽。化学抑制剂适当地以有效浓度存在，例如对于硝酸银以 0.1 - 20mg/l，优选地 1 - 10mg/l。

1.2.1 在此方法的可选实施方案中，AIN 抑制剂是核苷酸序列。抑制 AIN 的核苷酸序列可直接抑制 AIN 或通过编码可编码 AIN 抑制蛋白的抑制 AIN 的 mRNA 来抑制 AIN。例如，它可以是反义寡核苷酸或编码反义 mRNA 的基因，它们对于编码坏死相关酶（如蛋白酶、激酶或磷酸酶）或调节蛋白的基因是反义的。选择性地，它可以包含在能在植物中表达的启动子控制下的、能抑制凋亡的基因的编码区，如在能在植物中表达的启动子控制下的哺乳动物 bcl-1 基因的编码区、来自杆状病毒的凋亡抑制基因如 p35 或 pIAP 的编码区或者能抑制植物中疾病反应的基因如 nahG、dad-1 或 mlo。表达 AIN 抑制蛋白的抑制 AIN 的核苷酸序列可通过制备编码相同蛋白的合成核苷酸序列但使用宿主植物偏爱的密码子并避免可影响宿主植物中最佳表达的核苷酸序列如聚腺苷酸化信号或编码区内部的剪切位点来选择性地使之适应在宿主植物中的表达，例如与 US 5,380,831 或 US 5,610,042 中所述的方法相类似。

1.2.2 抑制 AIN 的核苷酸序列可稳定地整合入要转化植物的基因组中或者可以仅仅是暂时，例如在细胞暴露于农杆菌时或其左右存在并起作用。暂时表达可例如使用农杆菌侵染系统获得，其中 T-DNA 带有一前一后两个双生病毒从而使带有抑制 AIN 的核苷酸序列的病毒复制子可在细胞中复制。在此系统中，病毒典型地不整合入植物基因组中但将复制至高拷贝数并提供高水平的暂时表达。然后，这样产生的对坏死有抗性的细胞可用带有包含目的基因的 Ti 质粒的农杆菌转化，该质粒将整合入基因组中，而病毒将通过再生得到稀释并且不会传递给种子。因此受侵染植物的后代被目的基因稳定转化而没有被抑制 AIN 的核苷酸序列稳定转化。选择性地，可以通过将短的抑制 AIN 的寡核苷酸序列如反义序列导入植物而获得暂时表达。

1.3 在另一可选实施方案中，AIN 通过在与农杆菌共培养之前对要转化的植物组织进行热击处理而得到减弱或受到抑制。热击处理在 40 - 50℃，优选地在 42 - 48℃ 进行，45℃ 对于玉米是优选的温度。处理持续

2-10分钟并且优选4-8分钟。

2. 制备可育的、包含通过上面的方法1得到的转化植物组织的转基因植物，并再生这样转化的组织的方法。优选地，组织选自未成熟胚或胚发生愈伤组织如玉米I型愈伤组织。当组织是未成熟胚时，方法优选地进一步包含在暴露于农杆菌之前或之后将胚置于愈伤诱导培养基上并从获得的胚发生愈伤组织再生植物。优选地，目的基因（或其中之一）是选择性的或可评估的标记，允许筛选或鉴定转化的细胞、转化的组织和/或再生的转化植物。

3. 在植物或其组织或细胞的农杆菌转化的方法或制备可育的转基因植物的方法如根据上面1或2所述的方法中，AIN抑制剂如AIN的化学抑制剂（例如乙烯抑制剂如硝酸银）或抑制AIN的核苷酸序列（例如编码抑制AIN的mRNA或蛋白的序列）的用途。

4. 通过上面2的方法制备的转基因植物或其种子或后代。

5. 包含抑制AIN的异源来源核苷酸序列如合成的核苷酸序列或来自不同生物物种的基因组的核苷酸序列的植物、植物组织或植物细胞。

6. 例如用于禾本科植物转化的植物细胞或组织的培养物，包含

a) AIN的化学抑制剂，

b) 包含含有目的基因的质粒的农杆菌，以及

c) 水和必需盐类。

化学抑制剂适当地以抑制坏死的浓度存在。化学抑制剂优选地选自乙烯抑制剂（如2,5-降冰片二烯、降冰片烯、硫代硫酸银和硝酸银）、乙烯合成抑制剂[如氨基乙氧基乙烯基甘氨酸(AVG)、钴盐、乙酰水杨酸或水杨酸]、赤霉素拮抗剂[如脱落酸(ABA)]和磷酸酶抑制剂（如冈田酸）的组中的化合物。最优选地，化学抑制剂是硝酸银，例如以0.1-20mg/l浓度，优选1-10mg/l。必需盐类的最佳组成和浓度为本领域人员所知并可在一定程度上依赖于细胞或组织的物种、类型和发育阶段而变化，但一般来说将培养基中离子和营养物的浓度（如硝酸盐、钾离子、磷酸盐、钙离子、镁离子、钠离子和氯离子的浓度）维持在植物细胞和农杆菌能很好耐受的水平。培养基可选择性地进一步包含适当的营养物质（例如，糖如蔗糖）、维生素、氨基酸、激素和植物细胞或组织培养领域已

知的其它成分（如 2, 4-D）。植物优选地是禾本科植物如玉米。细胞或组织优选地包含胚发生愈伤组织如 I 型或 II 型愈伤组织。

7. 转化禾本科植物的全能细胞的方法，包括将全能细胞的群体或包含全能细胞的组织暴露于包含一种或多种含有一种或多种目的基因的质粒的农杆菌，其中农杆菌是在暴露期间和足以完成上述细胞转化的浓度下不在上述群体中诱导高水平坏死的菌株。组织优选地是非顶端分生组织，例如优选地是未分化的组织如平板接种的合子胚或胚发生愈伤组织，优选地是起始期（如从起始培养基上平板接种起最多 28 天，优选地最多 14 天）的胚发生愈伤组织或可连续繁殖的胚发生愈伤组织如 I 型或 II 型愈伤组织。

8. 测定农杆菌菌株用于转化禾本科植物的可再生细胞的适用性的方法，包括将上述植物的再生细胞群体暴露于农杆菌菌株，并观察或测定上述细胞群体中的坏死量。

9. 已经遗传修饰以减弱或消除农杆菌坏死因子表达的农杆菌菌株或这样的修饰菌株的衍生物。农杆菌坏死因子是在能在玉米胚中诱导坏死如程序性细胞死亡的浓缩上清中观察到的热不稳定因子。农杆菌和玉米细胞之间的不相容性可能涉及一些遗传成分。本发明描述了三个来自农杆菌参与玉米组织细胞死亡反应的基因。它们是通过筛选农杆菌的 BAC 文库而得到鉴定的。发现 3 个独立的引起细胞死亡的 BAC 并表现出与 xylA-xylB、virB1 和 acvB 的同源性。可能所报道的基因仅仅是决定农杆菌与玉米组织间不相容性的基因的亚群。用于本发明方法的植物细胞优选地来自在农杆菌转化时不产生菌瘿或发根的植物物种或变种。植物物种优选地是禾本科（Gramineae）的成员，最优选地是玉米或小麦，特别是玉米。植物细胞优选地是全能细胞，即能自身再生成植物、优选地可育植物的细胞。全能细胞存在于如未成熟胚和胚发生愈伤组织中。靶组织优选地是非顶端分生组织。更优选地，靶组织包含未分化的组织如平板接种的合子胚或胚发生愈伤组织。胚发生愈伤组织可以是愈伤组织起始期（如从在起始培养基上放置未成熟胚起最多 28 天，优选地最多 14 天的时期）与胚结合的或者可以是能连续繁殖的胚发生愈伤组织如 I 型或 II 型愈伤组织。玉米 I 型愈伤组织是包含用于本发明的全能细胞的优

选组织。农杆菌优选地选自根瘤农杆菌和发根农杆菌。农杆菌菌株优选地是根瘤农杆菌菌株，最优选地是利用胭脂氨酸的菌株。当农杆菌菌株是发根农杆菌菌株时，它优选地是利用农杆菌氨酸和甘露氨酸的菌株。最优选地，农杆菌是不在禾本科植物中诱导坏死的农杆菌如选自根瘤农杆菌菌株 A 和 B 的农杆菌。农杆菌菌株 A 和 B 已根据布达佩斯条约于 1997 年 5 月 2 日分别在 ATCC 指定号 55964 和 55965 下保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 美国。

目的基因优选地是除草剂抗性、疾病抗性或昆虫抗性基因或者选择性或可评估的标记基因，并包含植物可用的启动子、编码区和 3' 终止区。除草剂抗性基因包括对咪唑啉酮或磺酰脲除草剂有抗性的 AHAS 基因、对 bialaphos 和 glufosinate 有抗性的 pat 或 bar 基因、对草甘膦有抗性的 EPSP 合酶基因等。疾病抗性基因包括抗生素合成酶基因如 pyrolnitrin 合成酶基因、植物来源的抗性基因等。昆虫抗性基因包括来自苏云金芽孢杆菌的杀昆虫蛋白基因。选择性标记包括除草剂抗性基因和抗生素（如潮霉素或卡那霉素）抗性基因以及阳性选择性标记如甘露糖磷酸异构酶基因。可评估的标记包括易于分析的酶的基因如 gus 基因和 cat 基因。质粒可包含多于一种目的基因和/或农杆菌可包含带有不同目的基因的不同质粒。

此处所用的术语农杆菌诱导的坏死（AIN）是指任何农杆菌介导的植物细胞死亡，但特别包括农杆菌诱导的程序性细胞死亡。

实施例

实施例 1 暴露于农杆菌的玉米中坏死的作用机制

a. 农杆菌存在的情况下玉米而非烟草中坏死的证明

已证明玉米的胚发生愈伤组织和胚对于农杆菌转化是特别困难的组织。下面的实验使用玉米自交系(*Zea mays* L.) HE/89 和这里定名为原种 1 的株系。玉米株系 HE/89 的易碎胚发生愈伤组织由 Gunter Donn 提供。HE/89 在 Mórocz, S., Donn, G., Németh, J. 和 Dudits, D. (1990) Theor. Appl. Genet. 80: 721-726 中描述。原种 1 是与 B73 相关的 Novartis 所有的原种系。原种 1 的悬浮培养物从选自未成熟胚的易碎胚发生愈伤组

织起始。HE/89 株系在补加 500mg/l Bacto 胰蛋白胨、30g/l 蔗糖和 0.5mg/l 2,4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)的修饰液体 N6 培养基(N6M)中生长。原种 1 系在补加 30g/l 蔗糖和 2mg/l 2,4-D 的 N6 液体培养基(2N63S) (Chu 等, 1975)中生长。在补加 2mg/l 2, 4-D 和蔗糖(30g/l)的 Murashige 和 Skoog 培养基(M53S)中生长的烟草细胞系 NT-1 用作农杆菌易感的对照。悬浮培养物于旋转摇床上(120rpm)保持在液体培养基中并且每 7 天传代一次。

细菌于 28℃ 在 YP 培养基(5g/L 酵母提取物、10g/l 蛋白胨、5g/l NaCl, pH6.8) 中生长 24 小时。细菌经离心并在适当的植物培养基中重新悬浮。为接种原种 1、HE/89 和 N/T-1 植物细胞, 细菌分别重新悬浮于 2N63SM、N6M 和 MS3S 液体培养基中。

在接种玉米胚发生愈伤组织后不久, 许多细胞发生坏死(表 1)。甚至在将处理的胚发生愈伤组织转移到不含细菌、含氨噻肟头孢霉素的培养基之后仍可观察到坏死。将玉米细胞与非常稀的农杆菌培养物共培养很短的时间就足以诱导玉米自交原种 1 的坏死反应或生长的抑制。对于 HE/89 胚发生愈伤组织, 短时间的共培养可在一定程序上减弱坏死, 但不能完全防止坏死。在对照实验中, 氨噻肟头孢霉素不引起玉米组织坏死。因此, 看来坏死效应是农杆菌与玉米愈伤组织之间相互作用的结果。作为对照, NT1 烟草细胞也接种了农杆菌但未观察到坏死。

表 1: 植物悬浮细胞与 LBA4404 的共培养

	HE/89			原种		
	2 天	4 天	7 天	2 天	4 天	7 天
无农杆菌	-	-	-	-	-	-
OD=0.2						
10 分钟	-	-	+	-	+	+
1 小时	-	-	+	+	+	++
24 小时	-	+	+	+	+	++
48 小时	+	+	++	+	++	+++
OD=1						
10 分钟	-	+	+	+	+	+
1 小时	-	+	+	+	+	++
24 小时	+	+	++	+	++	++++
48 小时	+	+	++	++	+++	++++

保存在液体培养基中的 HE/89 玉米和其特有的原种自交玉米的易碎的胚发生愈伤组织在转移到含氨基胍头孢霉素的培养基中之前与农杆菌一起培养 10 分钟、1 小时、24 小时或 48 小时。将指示为最佳密度 (OD=600nm) 的 50 μ l 细菌加入含 1ml 添加细胞体积的 10ml 组织培养基中。如果培养物要培养超过两天, 就洗去细菌并将植物细胞重新悬浮于补加氨基胍头孢霉素(250mg/l)的相同培养基中。坏死的存在或缺乏在接种后 2、4 和 7 天进行评估并且坏死的相对强度如下表示: +, 几乎不形成坏死; ++, 弱坏死; +++, 强坏死; +++, 非常强坏死。

b. 程序性细胞死亡的证据

为测定玉米组织中由农杆菌诱导的细胞死亡的机制, 从用农杆菌接种后 24 或 48 小时收获的植物悬浮细胞提取基因组 DNA。暴露于农杆菌在两个玉米株系中引起具有核小体间片段化模式特征的 DNA 片段化, 这认为是程序性细胞死亡的早期标志。单独保存在培养基中的对照玉米细胞和烟草细胞在这些条件下未表现出 DNA 片段化。用大肠杆菌或高

压灭菌的农杆菌细胞接种玉米细胞不引起 DNA 片段化。更进一步地, 经历程序性细胞死亡的玉米细胞不诱导新鲜玉米胚发生组织的细胞死亡。

农杆菌诱导 DNA 片段化的进一步证据通过研究对 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的敏感性过程来获得。在 HE/89 细胞系中, Ca^{2+} 增加 DNA 梯状的强度而相反 Zn^{2+} 显著地减弱基因组的片段化。这些特征与这些二价阳离子在动物系统凋亡过程中对负责 DNA 断裂的内源核酸内切酶的效应完全一致。梯状的强度也因为放线菌酮的加入而降低, 这是凋亡过程需要从头基因表达的证据。这些结果表明农杆菌与玉米细胞的接触是导致玉米组织细胞死亡的原因。凋亡过程中的 DNA 片段化也通过与核小体单位上暴露的羟基反应的试剂在原位得到检测。用 LBA4404 接种来自 Lancaster 家系的特有原种系的 12 天龄玉米胚并平板接种在补加草灭畏(chlramben) 的 DG4 培养基上。Koziel, M.G.等, 1993 生物/技术 11: 194-200。凋亡细胞可通过用 TACS-1 试剂盒(Trevigen 公司)原位染色来检测, 这包括使用与可检测标记结合的 dNTP, 通过克列诺酶末端标记 DNA 片段, 给出表明基因组片段化的黑色不溶沉淀。Cullivier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutking, J.S.和 Spiegel, S. (1996) 自然 381, 800-803。胚在 3.7% 的甲醛溶液中浸泡并按制造商所描述的操作。为在原位检测基因组 DNA 断裂, 用 TACS-1 试剂盒处理固定的胚。固定的横切片先用蛋白酶 K 在室温处理 5 分钟然后将其浸入 2% 过氧化氢 5 分钟以去除内源的过氧化物酶。用克列诺缓冲液简单清洗之后, 将组织与能将外源修饰的脱氧核苷酸掺入断裂片段 5' 末端的克列诺酶一起在 37℃ 温育 1 小时。出现在单独细胞中的指示凋亡的黑色不溶性沉淀可用显微镜检测。

农杆菌处理的细胞在 48 小时暴露后变黑并且形状扭曲。单独保持在培养基中或用大肠杆菌接种的对照胚在这些条件下未表现任何沉淀。还发现并非所有玉米组织对农杆菌侵染有相似反应: 茎保持不变相反胚发生坏死。用不带有病原质粒的农杆菌菌株(菌株 A136 和 LBA4402), 也观察到 DNA 片段化, 表明引起程序性细胞死亡的因子与质粒无关。当玉米胚与来自诱导细胞死亡的农杆菌(菌株 LBA4404) 的 20 倍浓缩

上清一起培养 20 分钟时，也可观察到程序性细胞死亡，但当胚与用相同方法从大肠杆菌制备的上清接触时无此现象。如果浓缩的农杆菌上清在接种前于 100℃ 加热 20 分钟，程序性细胞死亡也不会发生。

玉米胚发生愈伤组织经常含有明显活着的细胞区域以及坏死的其它区域。甚至在其中反应区之外的细胞同时暴露于刺激物的情况下也仅有有限区域死亡的这一事实说明，在控制的形成器官的组织中单独细胞对不同刺激物反应的情况存在暂时或永久的差异。在形成器官的组织中，经历程序性细胞死亡的细胞数与总质量相比可能很小并且该过程可能是不同期的。在给定区域或组织中的一个或一些细胞的 PCD 诱导可能激发如动物细胞中观察到的周围细胞的迅速死亡，后者细胞可能不表现程序性细胞死亡的表型但仍然走向死亡。

实施例 2: 抑制农杆菌诱导的程序性细胞死亡

用于制备农杆菌接种的组织:

未成熟胚（长 1.2 - 2.2 毫米）在传粉后 14 - 15 天从表面无菌的、温室生长的谷穗上无菌切除，并将其盾片朝上平板接种到愈伤诱导培养基 2DG4 + 5mg/l 草灭畏 (2DG4-5Ch1) 中。2DG4 培养基是修改为含有 20mg/l 蔗糖的 Duncan 的培养基。

有愈伤反应的胚:

未成熟胚按上述的方法灭菌并平板接种到愈伤诱导培养基(2DG4-5Ch1)上培养 1 到 7 天。获得的组织用作接种的样品。

幼 I 型愈伤组织:

平板接种于愈伤诱导培养基（2DG4+5 草灭畏）上 7 天到 20 天的胚产生了愈伤组织。这些愈伤组织是对于所用的自交玉米典型的 I 型愈伤组织，它们是紧密而相对组织较好的细胞簇。将得到的胚发生愈伤组织从胚上切下并转移到愈伤保持培养基 2DG4 + 0.5mg/l (2,4-二氯苯氧)乙酸(2, 4-D)上，并用作用于接种的样品。

I 型愈伤组织:

通过上述方法获得的 I 型愈伤组织可保存在保持培养基上(2DG4+2, 4 D 0.5mg/l)并且每 2 周传代一次。

农杆菌:

菌株根瘤农杆菌 LBA4404 (pAL 4404, pSB1)用于这些实验中。pAL4404 是去毒的辅助质粒。pSB1 是含有与 pGIGUP 同源的区域和来自 pTiBo542 毒性区域的 15.2Kb KpnI 片段的广谱宿主范围质粒(Ishida 等, 1996; 由根瘤农杆菌介导的玉米(*Zea mays* L)的高效转化, 自然生物技术 14, 745-750)。通过电穿孔将质粒 pGIGUP 导入 LBA4404(pAL4404, pSB1)中导致 pGIGUP 和 pSB1 的共整合。此质粒的 T-DNA 含有由遍在蛋白启动子驱动的、提供膦丝菌素抗性的植物可表达的 PAT 基因和由 Gelvin 启动子驱动的、在编码序列的 N-端密码子中带有内含子的 GUS 基因。这个内含子-GUS 基因在植物细胞而不在农杆菌中表达 GUS 活性。

细菌生长:

农杆菌在补加 50mg/l 壮观霉素和 10mg/l 四环素的 YP 培养基(5g/l 酵母提取物、10g/l 蛋白胨、5g/l NaCl、15g/l 琼脂, pH6.8)中生长 3 天。细菌用接种环收集并以 $10^9 - 5 \times 10^9$ 细胞/ml 密度范围悬浮于 N6 液体培养基中。农杆菌也可以从 YP 培养基的过夜培养物收集并重新悬浮于 N6 液体培养基中。

存在或缺乏硝酸银时的共培养:

按上述方法制备的玉米组织用农杆菌接种。将玉米组织浸泡在细菌悬浮液中 5-10 分钟, 然后平板接种到有或无硝酸银(1-10mg/l)的培养基上。组织也可用 5 μ l $10^9 - 5 \times 10^9$ 细胞/ml 农杆菌悬浮液滴剂接种于组织顶部。接种后, 将玉米组织在有或无硝酸银(1-10mg/l)的培养基中于 25℃ 黑暗中培养。接种后 2 或 3 天, 将组织转移到补加氨噻肟头孢霉素(250mg/l)的有或无硝酸银的相同培养基中。

结果:

玉米胚和玉米胚发生愈伤组织对农杆菌的敏感性。

当玉米胚平板接种到愈伤诱导培养基上时, 可从玉米胚发育出胚发生愈伤组织。当来自胚的细胞系保持在含有 2, 4-D 的培养基中时可维持高度胚发生能力。对此胚发生愈伤组织和来自玉米自交系的胚对农杆菌 LBA4404 的敏感性进行评估。在农杆菌和玉米组织共培养后观察到组织

的明显变褐。用不带有其病原质粒的 LBA4402, 也可观察到此反应。与大肠杆菌共培养并经历相同步骤的对照胚和胚发生愈伤组织未表现细胞死亡或显著变褐。因此, 看来细胞死亡是玉米细胞和农杆菌之间相互作用的结果。看来胚对农杆菌比胚发生愈伤组织更敏感。 10^9 细胞/ml 浓度足以诱导细胞死亡。而且, 短时间的暴露 (5 分钟) 足以诱导此反应。

对在共培养培养基和愈伤诱导培养基中加入硝酸银的效应进行测试。加入硝酸银可使健康组织得以恢复 (表 2 和 3)。约 50% 平板接种于含硝酸银的培养基中的胚能产生胚发生愈伤组织。将胚在用农杆菌接种之前平板接种到愈伤诱导培养基上至少 2 天可获得最佳效应。发现这两个因子的结合显著防止与农杆菌共培养后的玉米胚发生愈伤组织的坏死。

胚发生愈伤组织变褐的减弱与农杆菌接种后愈伤组织诱发和组织的存活相关。约 80% 未经农杆菌处理的对照胚发生胚发生愈伤组织。

用农杆菌接种的 I 型愈伤组织, 也观察到硝酸银的效应 (表 3)。看来幼小株系对农杆菌接种更有抗性并且用硝酸银预处理改善了健康组织的恢复。

为证实共培养过程中硝酸银的存在不降低农杆菌的毒性, 用 10^9 细胞/ml 浓度的 LBA4404 (GIGUP) 接种烟草叶片。观察到烟草叶中的 GUS 活性没有显著下降。

表 2: 用 LBA4404 接种玉米胚

用农杆菌 LBA4404 (GIGUP) (10^9 细胞/ml) 接种胚和有胚发生愈伤反应的胚。基本培养基是 2DG4 + 5 草灭畏 (2DG4)。所有处理对约 80 - 100 个胚进行并重复两次。愈伤组织诱发在接种后两周评估。

预处理(时间)	共接种培养基	转移	评估
未预处理	2DG4	2DG4+Cef	1 %
未预处理	2DG4	2DG4+AgNO ₃ +Cef	30 %
未预处理	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	55 %
2DG4+AgNO ₃ (1 天)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	43 %
2DG4+AgNO ₃ (4 天)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	27 %
2DG4(6 天)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	65 %
2DG4(6 天)+ 2DG4+AgNO ₃ 上 1 天	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	88 %

表 3: 玉米 I 型愈伤组织的接种

用农杆菌 LBA4404 (GIGUP) (10^9 细胞/ml) 接种 I 型愈伤组织。用于这些实验的基本培养基是有或无硝酸银(AgNO₃)的 2DG4 + 0.5 2, 4D (2DG4)。所有实验对约 150 块 I 型愈伤组织进行。组织存活在接种后两周评估。

I 型愈伤组织	预处理	共接种	转移	评估
1/2 月大	2DG4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	75 %
	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	95 %
	2DG4	2DG4	2DG4+Cef	22 %
10 月大	2GD4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	55 %
	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	66 %
	2DG4	2DG4	2DG4+ Cef	12 %

实施例 3: 通过农杆菌转化未成熟合子胚并用腈丝菌素、潮霉素或甘露糖作为选择试剂分离转化的愈伤组织。

未成熟胚在自花传粉后大约 10 到 14 天获得。未成熟合子胚从含有能诱导和支持胚发生愈伤组织形成的培养基的不同平板中以每板约 25 个未成熟胚的比例分化出来。

按实施例 2 中所述在平板上或液体中用带有包含选择性标记基因的 Ti 质粒的农杆菌接种。通过一系列实验,发展用于未成熟胚的最佳条件。在一个最佳条件中,未成熟胚在用农杆菌接种之前或接种后立即平板接种到含有硝酸银(10mg/l)的愈伤诱导培养基上。每个平板上放置约 25 个未成熟胚。接种后 16 到 72 小时,将未成熟胚转移到含有硝酸银和氨基头孢霉素的愈伤诱导培养基中。转化细胞的选择如下进行:

a. PPT 抗性标记:

用带有含有在 T-DNA 区编码膦丝菌素抗性基因的质粒的农杆菌菌株进行转化。通过在接种后 2 到 20 天使用 3mg/L 浓度的膦丝菌素并维持共 2-12 周在体外选择转化细胞。这样获得的胚发生愈伤组织在存在或缺乏膦丝菌素的标准再生培养基中再生。所有植物通过氯酚红(CR)测试检测其对 PPT 的抗性。此分析利用 pH 敏感指示染料显示哪些细胞在 PPT 存在时生长。生长的细胞在培养基中产生 pH 变化并使指示剂氯酚红变黄(由红)。表达 PPT 抗性基因的植物在此测试中可容易地得到鉴定。CR 测试阳性的植物通过 PCR 分析 PAT 基因的存在。PCR 测试阳性的植物通过 Southern 印迹分析。

b. 潮霉素抗性标记:

用带有包含在 T-DNA 区编码潮霉素抗性基因(hpt, 潮霉素 B 磷酸转移酶)的质粒的农杆菌菌株进行转化。通过在接种后 2 到 20 天使用 3mg/L 浓度的潮霉素并维持共 2-12 周选择转化细胞。这样获得的胚发生愈伤组织在存在或缺乏选择性试剂的再生标准培养基中再生。测试所有植物对潮霉素的抗性。表达潮霉素抗性基因的植物可在此测试中容易地得到鉴定。此测试阳性的植物通过 PCR 分析 hpt 基因的存在。PCR 测试阳性的植物通过 Southern 印迹分析。

c. 使用甘露糖的阳性选择:

用带有含有在 T-DNA 区编码甘露糖耐受性基因(甘露糖磷酸异构酶)的质粒的农杆菌菌株进行转化。甘露糖用于在体外筛选转化细胞。

此选择可在接种后 2 到 20 天用 1g/L 低浓度进行并维持共 2-12 周。这样获得的胚发生愈伤组织可在存在或缺乏甘露糖的标准再生培养基上再生。所有植物通过氯酚红 (CR) 测试检测其对甘露糖的耐受性。此分析利用 pH 敏感的指示剂染料显示哪些细胞在甘露糖存在时生长。生长的细胞在培养基中产生 pH 变化并使指示剂氯酚红由红变黄。表达甘露糖耐受性的植物可在此测试中容易地得到鉴定。CR 测试阳性的植物通过 PCR 分析甘露糖基因的存在。PCR 测试阳性的植物通过 Southern 印迹分析。

实施例 4: 用农杆菌转化来自未成熟合子胚的愈伤组织并用磷丝菌素、潮霉素和甘露聚糖作为选择性试剂分离转化的愈伤组织

用常规培养技术从未成熟合子胚获得 I 型愈伤组织。在用农杆菌接种之前或之后将约 15 块 I 型愈伤组织放置于含有硝酸银的保持培养基上。接种可按实施例 2 中所述的进行。接种后约 16-72 小时将愈伤组织转移到含有硝酸银和氯噻肟头孢霉素的标准培养基上。筛选可在转移到培养基上后立即或在 1 到 20 天后进行。然后将愈伤组织在选择中传代培养约 2 至 12 周, 之后将存活和生长的细胞转移到标准再生培养基上以产生植物。

对于用磷丝菌素抗性、潮霉素抗性基因或甘露糖磷酸异构酶基因转化的细胞, 按前面实施例中所述的进行选择。

实施例 5: 通过用农杆菌接种转化玉米的 I 型愈伤组织并用磷丝菌素、潮霉素和甘露糖作为选择性试剂分离转化的愈伤组织

愈伤组织来自平板接种的原种表型的未成熟胚。培养物在保持培养基 (2DG4 + 0.5mg/l 2,4-D) 上一月两次传代并且将传代后 2-3 天的细胞团置于 2DG4 培养基上。在用农杆菌接种之后或之前, 将细胞团置于含有硝酸银的 2DG4 培养基上。用农杆菌接种可按实施例 2 中所述的进行。接种后 16 到 72 小时, 将愈伤组织转移到含有氯噻肟头孢霉素和硝酸银的新鲜保持培养基上。愈伤组织用选择性试剂在选择中传代培养总共约 2-12 周, 之后将存活和生长的细胞转移到标准再生培养基上以产

生植物。对于膦丝菌素抗性、潮霉素抗性基因或甘露糖异构酶基因转化的细胞，按前面实施例所述的进行筛选。

实施例 6: 热击处理防止农杆菌激发的凋亡

未成熟胚:

玉米自交系在温室中生长。未成熟胚(长 0.8 - 2.2mm)在传粉后 8 到 15 天之间(依赖于环境因素)从表面无菌的谷穗上无菌切除。将胚盾片朝上平板接种于愈伤诱导培养基上。对于大多数自交系，将胚接种于 LS 培养基(Linsmaier 和 Skoog, 植物生理学, 18: 100-127, 1965) 上。将 CG00526 的胚放在 2DG4 + 5mg/l 草灭畏(2DG4-5Chl)上。2DG4 培养基是修改为含有 20mg/l 蔗糖的 Duncan 培养基(Kozziel 等, 生物/技术 11:194-200, 1993)。

I 型愈伤组织:

未成熟胚如上所述灭菌并平板接种于愈伤诱导培养基(2DG4-5Chl)上并在其中培养 1 到 7 天。平板接种于愈伤诱导培养基(2DG4+5Chl)上 7 到 20 天的胚产生了愈伤组织。这些愈伤组织是典型的 I 型愈伤组织。I 型愈伤组织是相对组织较好的细胞的紧密的簇。将所得的胚发生愈伤组织从胚上切下并转移到愈伤保持培养基 2DG4+0.5mg/l 2,4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)上并用于接种。通过上述方法获得的 I 型愈伤组织可在保持愈伤组织培养基(2DG4+ 2, 4 D 0.5mg/l)上保存并大约每 2 周传代培养一次。

农杆菌:

所用菌株是根瘤农杆菌 LBA4404 (pAL4404, pSB1)。pAL4404 是去毒的辅助质粒(Ooms 等, 7: 15 - 29, 1982)。pSB1 是含有与 pGIGUP 同源的区域和来自 pTiBo542 毒性区的 15.2kb kpnI 片段的广谱宿主范围质粒(Ishida 等, 自然生物技术 14, 745-750, 1996)。通过电穿孔将质粒 pGIGUP 导入 LBA4404(pAL4404, pSB1)中导致 pGIGUP 和 pSB1 的共整合。pGIGUP 含有由玉米遍在蛋白启动子驱动的、提供膦丝菌素抗性的、可在植物中表达的膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)基因(Christensen 等, 植物分子生物学, 18: 675-689, 1992)。它还含有由来自章鱼氨酸和甘露

氨酸合酶基因的嵌合启动子驱动的、在编码序列的 N-端密码子中带有内含子的、用于 β -葡糖醛酸酶表达的基因(GUS) (章鱼氨酸合酶启动子上游活化序列与甘露氨酸合酶启动子结构域的三聚体, Ni 等, 植物杂志, 7:661-676, 1995)。此内含子-GUS 基因在植物细胞但不在农杆菌中表达 GUS 活性。农杆菌在补加 50mg/l 壮观霉素和 10mg/l 四环素的 YP 培养基(5g/l 酵母提取物、10g/l 蛋白胨、5g/l NaCl 琼脂, pH6.8)中生长 3 天。细菌用接种环收集并以 $10^9 - 5 \times 10^9$ 细胞/ml 密度范围悬浮于 N6 液体培养基中。选择性地, 从 YP 培养基中的过夜培养物收集农杆菌并将其重新悬浮于 N6 液体培养基中。它也可在农杆菌诱导培养基[AIM; K_2HPO_4 , 10.5g; KH_2PO_4 , 4.5g $(NH_4)_2SO_4$, 1.0g; NaCitrate $\cdot 2H_2O$, 0.5g; $MgSO_4 \cdot H_2O$ (1M), 1.0ml; 葡萄糖, 2.0g; 甘油, 5.0ml; MES(10mM); 乙酰丁香酮(50-100 μ m);pH5.6)中预诱导 4 到 6 小时。

组织的热击处理:

共培养前, 将玉米组织置于装有 N6 液体培养基的离心管中并在水浴中于 45℃ 培养 4 分钟。然后用如上所述制备的农杆菌悬浮液替换培养基。于室温 5 分钟后, 将组织平板接种于适当的固体培养基上。共接种后 3 天, 将组织用 X-Glu 染色以检测 GUS 活性或平板接种于含有氨噻肟头孢霉素(250mg/l)的培养基上。然后测试玉米组织以检测表明农杆菌接种后组织存活百分率的愈伤反应。

共培养:

按上述方法制备的玉米组织用农杆菌接种。将它们浸泡于细菌悬浮液中 5-10 分钟并然后平板接种于固体培养基上。接种之后, 玉米组织于 25℃ 黑暗中培养。接种后 2 或 3 天, 将组织转移到补加氨噻肟头孢霉素(250mg/l)的相同培养基上。

原位检测 DNA 片段化:

将胚浸泡于 3.7% 甲醛溶液中并按照制造商(Trevigen 公司)所描述的操作。为在原位检测基因组 DNA 的断裂, 用 TACS-1 试剂盒处理固定的胚(Cullivier 等, 自然 381: 800-803, 1996)。固定的横切片先用蛋白酶 K 于室温处理 5 分钟然后将其浸入 2% 过氧化氢 5 分钟以去除内源的过氧化物酶。用克列诺缓冲液简单清洗之后, 将组织与能将外源修饰

的脱氧核苷酸掺入断裂片段 5'末端的克列诺酶于 37℃ 培养 1 小时。出现在单独细胞中指示凋亡的黑色不溶沉淀可用显微镜检测。

结果:

农杆菌与玉米组织共培养之后观察到严重的变褐现象并且 10^9 细胞/ml 浓度可诱导细胞死亡。看来胚对农杆菌比胚发生愈伤组织更敏感。

胚和 I 型愈伤组织经热击然后用 10^9 细胞/ml 浓度的农杆菌进行接种。共培养 3 天后并培养一周之后, 对组织进行测试。通过计数从接种存活下来的组织数对由热击预处理赋予的保护水平进行定量。

所有用农杆菌接种的胚在热击预处理之后表现愈伤组织的发生而相反从未经热击的胚中没有愈伤组织出现(表 4)。

表 4:

胚用 10^9 细胞/ml 的农杆菌 LBA4404 (pGIGUP) 接种然后平板接种于愈伤诱导培养基上。基本培养基是 2DG4 + 5Chl(2DG4)。所有处理对约 80 到 100 个胚进行并重复两次。愈伤组织诱发在接种两周后评估。

预处理	有愈伤反应的胚/接种的胚
对照	137/150(91%)
未经热击+农杆菌	3/150(2%)
热击 + 农杆菌	112/150(75%)

在愈伤组织中观察到与热击处理相同的有益效应（表 5）。

表 5:

用 10^9 细胞/ml 农杆菌 LBA4404 (pGIGUP) 接种 I 型愈伤组织。所用的基本培养基是 2DG4 + 0.5 2, 4D (2DG4)。所有实验对约 1000 块 I 型愈伤组织进行。组织存活在接种 2 周后评估。

预处理	存活评价
3 月龄 I 型愈伤组织系	
农杆菌	0/1000
农杆菌 + 热击	≈1000/1000
10 月龄 I 型愈伤组织系	
农杆菌	0/1000
农杆菌 + 热击	≈1000/1000

热击处理后观察到的保护作用看来与热击有关，因为可通过 RT-PCR 扩增到主要热击蛋白。

在经受热击处理的胚中未检测到 DNA 片段化。

来自不同玉米株系的胚用在 AIM 溶液中诱导的经过或未经过热击预处理的农杆菌菌株 LBA4404 接种。共培养 3 天之后，对胚进行 GUS 活性染色。结果在表 6 中表示。看来热击预处理在暂时表达中具有有益的效应。

表 6:

谱系	处理	总数中 GUS 阳性百分率*	GUS 率**
0F502	-	15	0.3
	HS	74	1.8
FNU007	-	90	2.0
	HS	96	3.4
HAF031	-	0	0.0
	HS	67	0.9
2N217A	-	13	0.1
	HS	46	0.4
1NJ20	-	5	0.1
	HS	38	0.4
JEF091	-	59	1.2
	HS	81	1.4

-: 未经热击

HS: 热击

*GUS 百分率是基于大小约为 50 个未成熟胚的样本。

**GUS 率是基于 0-5 级 (0=无 GUS 染色, 1=1-5 点/胚, 2=5-15 点, 3=15-30 点, 4=~25% 胚表面 GUS 染色, 5=~50% 胚表面 GUS 染色)。

实施例 7: 小麦的农杆菌转化

切下未成熟合子胚 (0.75mm 到 1.25mm) 并将其平板接种到基于 MS 含 3mg/l 2, 4-D、300mg/l 谷氨酰胺、150mg/l 天冬酰胺和 3% 蔗糖的培养基 (3MS3S) 上, 在用农杆菌接种前培养 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8 或 21 天。到第 21 天时, 外植体产生胚发生物质称为 3 周龄愈伤组织。

共培养:

按实施例 6 中所述的用农杆菌接种小麦组织。将小麦组织浸泡于

细菌悬浮液中 5-10 分钟然后平板接种到固体培养基。接种之后, 将小麦组织于 25℃ 黑暗中培养。接种 2 或 3 天后, 将组织转移到补加氨基胍头孢霉素 (250mg/l) 的相同培养基上。外植体不经预处理就进行接种或者它们于 42-48℃ 热击 4-8 分钟。热击处理在接种前进行。胚可以在 3MS inf 中或含有 100mM AS 液体的 AIM 中进行热击而相反愈伤组织是“干”热击。

接种:

外植体可以离心管中或平板上进行接种。当在离心管中接种时, 将 1ml 农杆菌溶液移入管中, 用手指旋转或摇动并使其静置 5-15 分钟。然后将农杆菌溶液和外植体材料倒在含 100mM AS 的 2MS3S 平板上并用一次性窄头移液管去除液体。当接种在平板上进行时, 将农杆菌直接移到外植体上并在 5-15 分钟后去除。胚经过整理从而使胚轴与培养基相接触。

愈伤组织诱发、筛选和再生:

胚在含有抗生素的愈伤组织诱导培养基 (3MS3S) 中生长 3 周。将胚发生愈伤组织切开并置于含有 5mg/l GA₃ 和 1mg/l NAA 以及选择试剂和抗生素的 MS3S(非 2, 4D) 上 2 周, 然后将其转移到含有抗生素和更高浓度筛选试剂的 MS3S 上约 4 周。然后在保持与上一步相同的选择试剂浓度的情况下, 将胚转移到含有 1/2 MS 盐和 0.5mg/l NAA 的品红盒。对于愈伤组织, 筛选和再生系统是相同的, 除了愈伤组织在胚平板接种后仅生长最多 6 周, 也就是说, 愈伤组织接种 3 周, 在筛选和再生开始前共培养和生长最多 3 周。

结果:

按实施例 6 中所述的方法研究用农杆菌接种的胚中 DNA 的片段化。经热击预处理的胚中未检测到 DNA 片段化。

在农杆菌接种前的热击预处理能防止凋亡发生。

**实施例 8: 通过 p35 和 iap 抑制玉米细胞中农杆菌诱导的凋亡
用于 biolistic 转化的载体**

用于通过 biolistic 装置转化玉米的载体都是 pUC 的衍生物。

pUbiPAT 包含由玉米遍在蛋白启动子(Christensen 等, 1992)驱动的、提供膦丝菌素(PPT)抗性的、编码膦丝菌素乙酰转移酶的植物可表达的 *bar* 基因。p35, *iap* 和 *dad-1* 的编码区克隆在玉米金属硫蛋白样基因启动子(MTL)的控制之下(de Framond, 1991)。p35 和 *iap* 由 Lois Miller (乔治亚大学, Athens, 乔治亚)提供。将包括编码区的 p35 PstI-EcoRI 片段从 pHSP35VI⁺切下(Chem 和 Miller, 1994), 克隆入 pBluescript (Stratagene, La Jolla, 加利福尼亚)的相应位点, 然后作为 PstI-Asp718 片段克隆入 pMTL 的相应位点。pMTL 含有 MTL 启动子和 CaMV35S 终止子。包含来自 pHSCpIAPVL⁺ (Clem 和 Miller, 1994)的 *iap* 编码区的 Sall-SpeI 片段克隆入 pMTL 的 XhoI-SpeI 位点。

将 *dad-1* 的编码序列作为来自拟南芥 cDNA 克隆 12T7 (密歇根大学)的 Sall-XbaI 片段进行克隆。

用于农杆菌转化的载体:

将由 MTL 启动子驱动的 p35, *iap* 和 *dad-1* 的编码区克隆入超级双元载体 pSB11 边界序列之间。

在编码序列的 N-端密码子中含有内含子的 β -葡萄糖醛酸酶基因(GUS)由来自章鱼氨酸和甘露氨酸合酶基因的嵌合启动子驱动(mas; 章鱼氨酸合酶启动子上游活化序列与甘露氨酸合酶启动子区的三聚体; Ni 等, 1995)。将在植物细胞中但不在农杆菌中表达 GUS 活性的 Mas-Gus 克隆入 pSB11 中以获得 pMasGUS。

然后将这些载体通过电穿孔用 0.2cm Bio-Rad 公司小容器以 2kV/cm 场强、600 Ohms 电阻和 25 μ F 电容导入 LBA4404(pAL4404, pSB1)中。pSB1 是含有与 pSB11 同源的区域和来自 pTiBo542 毒性区的 15.2kb KpnI 片段的广谱宿主范围质粒(Ishida 等, 1996)。通过电穿孔将质粒 pSB11 导入 LBA4404(pAL4404, pSB1)导致 pSB11 和 pSB1 的共整合。用农杆菌接种玉米胚:

在传粉后 12 到 15 天无菌切下未成熟胚(0.8 到 2.5mm)并将其盾片向上平板接种于愈伤诱导培养基(2DG4+5 草灭畏; Duncan 等, 1985)上。胚用 10⁹ 细胞/ml 密度的农杆菌接种 5 分钟然后在愈伤诱导培养基上培养 3 天。然后将组织转移到补加氨基噻肟头孢霉素(250mg/l)的相同培养

基上。组织的存活在接种 2 周后评估。

I 型愈伤组织的起始:

平板接种于愈伤诱导培养基 7 到 20 天的胚产生了愈伤组织。这些愈伤组织是典型 I 型愈伤组织, 它们是相对组织较好的细胞的紧密簇 (Suttie 等, 1994)。将所得的胚发生愈伤组织从胚上切下并转移到愈伤保持培养基 2DG4 + 0.5mg/l (2,4-二氯苯氧) 乙酸 (2, 4-D) 上。通过上述方法获得的 I 型愈伤组织可在保持培养基(2DG4+ 2, 4 D 0.5mg/l) 上保存并且大约每 2 周传代培养一次。I 型愈伤组织用于农杆菌的接种实验和通过 biolistic 装置进行的转化。

转化实验:

按 DuPont Biolistic 手册中所描述的将质粒 DNA 沉淀在 0.3 到 1 μ m 金微载体上。每 50 μ l 微粒载体使用 2 μ g 抗凋亡基因和 2 μ g pUbiPAT。用 PDS - 1000/He biolistic 装置(DuPont 公司)轰击每个平板上的 16 块 I 型愈伤组织。将组织置于停止屏层 8cm 下的层上并使用带有 650psi 值破裂板的 10 $\times$ 10 μ m 不锈钢屏。轰击之后, 将组织于 25 $^{\circ}$ C 黑暗中培养一天, 然后转移到愈伤保持培养基 2DG4+0.5mg/l 2, 4-D 上。10 天后, 将组织转移到补加 100mg /l PPT 的相同培养基上。六到八周后, 将组织转移到含 40mg/l PPT 的培养基上。然后将一些组织用于接种实验并将其其中一些转移到再生培养基(含有 3% 蔗糖、0.25mg/l ancymitol 和 5mg/l 激动素的 Murashige 和 Skoog 培养基)上, 每天 16 小时光照。转化的植物使用氯酚红 (CR) 分析测试 PPT 抗性来进行鉴定(Cramer 等, 1993), 然后通过 PCR 证实。

用农杆菌接种转基因 I 型愈伤组织:

按上述方法获得的转基因 I 型组织用农杆菌接种。将玉米组织浸泡于细菌悬浮液中 5 - 10 分钟。接种后, 将玉米组织于 25 $^{\circ}$ C 在 2DG4+0.5mg/l 2,4-D 中避光培养。接种后 2 或 3 天, 将组织转移到补加氨基胍头孢霉素(250mg/l)的相同培养基上。

转基因物质的分析:

用 Isoquick 试剂盒(Micropore 公司, CA)从 100mg 愈伤组织中提取基因组 DNA 并将其重新悬浮于 20 μ l 水中。1 μ l 用于 PCR 反应。PCR

反应在用 $1 \times$ PCR 缓冲液、0.5 单位 AmpliTaq 酶、 $200\mu\text{M}$ 每种 dNTP、 $0.2\mu\text{M}$ 每种引物的 $25\mu\text{l}$ 反应中 Perkin-Elmer 热循环仪上进行。为检测组织中 pat 基因的存在, 用 PAT 引物以 55°C 的退火温度进行 PCR 反应。对于转基因组织中 iap、p35 和 dad-1 基因的检测, 用于每个反应的引物是 P 和 I、P 和 35、P 和 D, 退火温度分别是 55°C 、 55°C 、 48°C 。

PAT1: 5'-TGTCTCCGAGAGAGACC-3' (SEQ ID NO: 1)

PAT2: 5'-CCAACATCATGCCATCCACC-3' (SEQ ID NO: 2)

MTL (P): 5'-AGGTGTCCATGGTGTCTCAAG-3' (SEQ ID NO: 3)

iap (I): 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (SEQ ID NO: 4)

p35 (35): 5'-CCAGGTAGCAGTCGTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 5)

dad-1 (D): 5'-CCTTGTTTCCTTTGTTCACT-3' (SEQ ID NO: 6)

p35 和 iap 的 RT - PCR:

用 Tripure 分离试剂(Boehringer Mannheim 公司)从转基因愈伤提取总 RNA, 用无 RNA 酶的 DNA 酶处理, 取 $0.5\mu\text{g}$ 使用高级 RT - PCR (Clothech 公司)和 oligo - dT 引物进行 cDNA 合成。第二链合成之后, 此反应的二十分之一用作 Taq DNA 聚合酶 PCR 反应的模板。

用于 RT - PCR 的 p35 引物是: 5'-GGTCCTATACGAAGCGTTAC-3' (SEQ ID NO: 7)和 5'-CCACGTAGCAGTCGTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 8)扩增 300bp 转录本。

用于 RT - PCR 的 iap 引物是: 5'-CATGTCTGACTTGCGATTGG-3' (SEQ ID NO: 9)和 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (SEQ ID NO: 10)扩增 248bp 转录本。

为排除基因组 DNA 的污染, 平行进行其中不加逆转录酶的对照 cDNA 反应。

结果:

大多数胚和胚发生愈伤组织不能在农杆菌接种后存活。短时间的暴露(5 分钟)是以诱导此反应。与大肠杆菌共培养并经历相同步骤的组织未表现出任何损伤。

将 p35、iap 和 dad-1 克隆入植物表达盒中 T - DNA 边界序列之间。由于这些抗凋亡基因由 T - DNA 携带, 因此在接种时它们将转递到

玉米细胞中。用有或无细胞死亡抑制基因(括号中)的农杆菌 LBA4404(10^9 细胞/ml)接种玉米组织。共培养之后,测试玉米胚或 I 型愈伤组织以对组织存活进行定量,作为通过表达抗凋亡基因赋予的保护水平的指示。所有实验对约 50 到 80 个玉米外植体进行并重复两次。在接种后 3 天将组织转移到含有氨基胍头孢霉素的相同培养基中。农杆菌的效应在接种后两周评估。结果分别表示于表 7 和表 8 中。

表 7(胚)

	有反应的组织数/测试的组织数(%)	
	实验#1	实验#2
无细菌	52/63(82%)	25/31(80%)
LBA4404	2/55(3%)	3/89(3%)
LBA4404(p35)	19/75(25%)	18/74(24%)
LBA4404(iap)	22/89(24%)	21/75(28%)
LBA4404(dad-1)	4/48(8%)	10/66(15%)

表 8(I 型愈伤组织)

	有反应的组织数/测试的组织数(%)	
	实验#1	实验#2
无细菌	76/80(95%)	72/80(90%)
LBA4404	8/80(10%)	6/80(7.5%)
LBA4404(p35)	23/80(29%)	27/80(33%)
LBA4404(iap)	25/80(31%)	30/80(37%)
LBA4404(dad1)	15/80(18%)	13/80(16%)

约 80% 的胚在未用农杆菌处理时产生胚发生愈伤组织。约 25% 的用带有 p35 或 iap 基因的农杆菌处理的胚产生胚发生愈伤组织而相反用不带这些基因的农杆菌接种的胚仅有 3% 表现愈伤组织发生。在用带有 p35 或 iap 基因的农杆菌接种 I 型愈伤组织时,观察到类似效应(表

2)。dad-1 在任何系统中只赋予低水平的保护。

看来 p35 和 iap 的暂时表达在一定程度上减弱组织的变褐但不完全抑制此现象。这可以用 T-DNA 向玉米细胞转移的低效率来解释。如通过 GUS 的暂时表达所判断的, 看来靶组织没有均匀转化。这可以是极少细胞是 T-DNA 受体的证据。

从用含有 p35 或 iap 的农杆菌接种的胚产生的胚发生愈伤组织的结构不象对照组那样紧密。这可以通过只有接受了带有抗凋亡基因的 T-DNA 的细胞才能存活以及单独的转化细胞不必然将信号传递给相邻细胞的事实来解释。这种组织生长的类型可作为细胞死亡抑制基因非常有效地挽救死亡细胞但它们的短期表达不能提供对农杆菌影响的完全保护的证据。

转基因 p35、iap 和 dad-1 的胚发生愈伤组织是使用微粒轰击将受控于植物可表达的启动子的上述基因转移入 I 型愈伤组织得到的。构建体与 bar 基因一起轰击, 组织在 PPT 上选择并且这些愈伤组织的转化状态通过 PCR 首先证实(表 9)。

表 9

转化实验	#PCR+
UbiPAT	5PAT+
MTLp35, UbiPAT	9PAT+, 3p35+
MTLiap, UbiPAT	7PAT+, 5iap+
MTLdad, UbiPAT	11PAT+, 4dad-1+

然后对独立的情况分析对农杆菌接种的敏感性。用农杆菌 LBA4404(10^9 细胞/ml)接种愈伤组织。测试两个独立的转基因愈伤系。所有处理重复两次。将组织在接种 3 天后转移到含有氨基胍头孢霉素的相同培养基上。玉米组织的存活在用农杆菌接种后两周评估(表 10)。

表 10

转化实验	对 LBA4404 有抗性的愈伤组织数目	
	系 1	系 2
UbiPAT	1/24(4%)	1/32(3%)
MTLp35, UbiPAT	22/25(88%)	25/28(89%)
MTLiap, UbiPAT	20/22(90%)	19/25(76%)
MTLdad, UbiPAT	12/27(44%)	9/22(41%)

转基因 p35 和 iap 的胚发生愈伤组织用农杆菌接种时不表现细胞死亡而相反在共培养之后的对照组织中可观察到严重变褐现象。dad-1 基因的存在延迟了凋亡的发生但不阻止细胞死亡, iap 和 p35 也是这样。结果在几个独立实验中是可重复的。

当用寡核小体 DNA 片段电泳测定时, p35 和 iap 的保护效应也是明显的。

看来, dad-1 的效应当在组织中稳定表达时更为明显。

在抗凋亡基因的表达与细胞死亡的消失之间有明显的联系。如通过反转录 PCR(RT-PCR)判断的, p35 和 iap 基因在转基因愈伤中表达。对照都是阴性的。

实施例 9: 筛选和鉴定不诱导玉米细胞中细胞死亡的农杆菌菌株

用一组 40 个野生型农杆菌菌株测试已深入研究的玉米株系(A188)和特有的原种系(原种 2)的胚发生愈伤组织和胚对不同农杆菌菌株的敏感性。首先测试这些菌株与 A188 和原种 2 胚发生愈伤组织和胚的相容性。其中, 40 个菌株中的 6 个不完全阻止玉米组织的生长, 并且进一步对平板接种到愈伤诱导培养基上的原种 2 胚进行测试并以 10^9 细胞/ml 浓度接种。在接种后 2 周评估愈伤的发生并表示为有反应的胚的百分比。

还测试了这些菌株对平板接种于不含激素培养基上的烟草叶片的毒性, 并且应当指出菌株诱导玉米细胞中程序性细胞死亡的能力与毒性无关。表 11 中的百分比描述了有肿瘤的叶片数目。

表 11 非致死菌株的毒性比较

菌株	来源	冠瘿碱	烟草上的 毒性测试	2DG4+5Chl(%)
1	玫瑰	?	100	37
2	桃	胭脂氨酸	82	25
3	银白杨	农杆菌氨酸	66	50
4	菊花	L, L Sap	100	63
A	玫瑰	胭脂氨酸	92	66**
B	salix	胭脂氨酸	76	58**

**好的 I 型愈伤组织。

农杆菌菌株 A 和 B 已在布达佩斯条约下于 1997 年 5 月 2 日分别以 ATCC 指定号 55964 和 55965 保藏于 ATCC。

实施例 10: 农杆菌基因在玉米细胞中激发凋亡

为鉴定玉米胚发生组织中决定细胞死亡反应的遗传因子, 用约 100 - 200kb 的农杆菌基因组 DNA 片段构建 BAC 文库 (细菌人工染色体)。将文库导入大肠杆菌中。为检查这样的背景是否适于 BAC 文库的筛选, 用只含有 BIBAC 载体的大肠杆菌接种玉米胚。发现大肠杆菌不诱导特征性凋亡反应。

假定农杆菌的基因组大小与大肠杆菌(4.6×10^6 bp)完全相同, 估计约 25 到 30 个含有 150 - 200kb 插入片段的 BAC 克隆足以覆盖农杆菌完整基因组。为测试在大肠杆菌中制备的 BAC 文库是否是农杆菌基因组的确定代表, 用农杆菌染色体探针(chvD)与相对较大数目的克隆(200)杂交。在测试的 200 个克隆中, 5 个与 chvD 探针发生反应 (数据未表示)。

一个挑战是, 来自农杆菌的遗传成分可能在大肠杆菌中是沉默的。而且, 来自植物和/或农杆菌的其它因子可能是这样的克隆表达必需的。因此, BAC 载体也包含农杆菌中有功能的复制起点并能在这样的方案中容易地转化入农杆菌中。

细菌生长:

农杆菌当需要在补加 100mg/l 卡那霉素的 YP 培养基(5g/l 酵母提取物、10g/l 蛋白胨、5g/l NaCl、15g/l 琼脂, pH6.8)中生长 3 天。细菌用接种环采集并以 $10^9 - 5 \times 10^9$ 细胞/ml 范围的密度悬浮于 N_0 液体培养基中。农杆菌也可以从 YP 培养基中的过夜培养物收集并重新悬浮于 N_0 液体培养基中。

大肠杆菌 DH10B 在 LB 培养基(1% Bacto-胰化蛋白胨、0.5% Bacto 酵母提取物、170mM NaCl, pH7.0) 中生长。转化之后在 SOC 溶液(2% Bacto 胰蛋白胨、0.5% Bacto 酵母提取物、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM $MgCl_2$ 、10mM $MgSO_4$ 、20mM 葡萄糖, pH7.0) 中生长。

从农杆菌制备基因组 DNA:

LBA4404 菌株用于文库的构建。所用的方案、材料和试剂来自 Imbed 试剂盒(Biolabs 公司, 美国)。4 × 10ml 农杆菌培养物于 28℃ 生长过夜。收获前一小时, 加入 180mg/ml 氯霉素以排列染色体。将细胞在 800g 于 4℃ 离心 15 分钟并使沉淀在空气中干燥。细胞在包埋于琼脂糖之前于 0.5ml 细胞悬浮溶液(10mM Tris-HCl、20mM NaCl、10mM EDTA, pH7.2)中预保温到 42℃。将农杆菌细胞包埋在琼脂糖杆中以进行细胞壁的降解和去蛋白作用从而避免 DNA 断裂。为将细胞包埋于琼脂糖杆中, 将细胞与冷却至 42℃ 等体积的 ddH₂O 中的 1% 低熔点琼脂糖混合然后使之在凝胶注射模中硬化。在琼脂糖固化后, 将填料转移到 3 体积的溶菌酶溶液(1mg/ml 溶菌酶、10mM Tris-HCl、50mM NaCl、10mM EDTA、0.2% 脱氧胆酸钠、0.5% N-月桂肌氨酸, pH7.2)中并于 37℃ 轻微摇动下培养 2 小时。去除溶菌酶溶液并将杆用 3ml 清洗溶液洗二次, 每次 15 分钟。然后将杆在 3ml 蛋白酶 K 溶液(1mg/ml 蛋白酶 K、100mM EDTA、1% N-月桂肌氨酸、0.2% 脱氧胆酸钠, pH8.0)中于 42℃ 轻微摇动下培养 20 小时。通过吸出去除蛋白酶 K 溶液并将杆逆着 5ml 清洗溶液(20mM Tris-HCl、50mM EDTA, pH8.0)透析两次 15 分钟, 然后用 3ml PMSF 溶液(20mM Tris-HCl、50mM EDTA、1mM 苯甲基磺酰氟, pH8.0)透析 1 小时, 再用清洗溶液洗两次。然后将杆用 5ml 贮存液(2mM Tris-HCl、5mM EDTA, pH8.0)洗两次再将其重新装入凝胶注射模中。用刀片切下 1mm 长的样品(10-20ml)并逆着 NotI 限制

性内切酶缓冲液(Biolab 公司, 美国)于 4℃ 透析 30 分钟。用新鲜缓冲液代替限制性内切酶缓冲液并用 20 单位的 NtoI 酶(Biolab 公司, 美国)于 37℃ 进行过夜温育。农杆菌 DNA 的部分消化通过使用稀有切割酶 NotI 来完成。假定农杆菌基因组的 G/C 含量为 60%, 理论上全部消化之后 NotI 产生 18kb 的片段(结果来自对不同农杆菌基因的分析)。然后用切去头部的移液管上样等分样品。通过脉冲电场凝胶(PFG)电泳, 用 Bio-Rad CHEF Mapper 以 6V/cm 于 14℃ 在 0.5 × TBE 中的 1% 琼脂糖凝胶中分离 DNA 32 小时。凝胶在 1mg/ml EtBr ddH₂O 浴中染色 20 分钟并且将含有对应于 100 - 200kb 的片段的琼脂糖薄片从凝胶上切下。将琼脂糖薄片逆着 TE 于 4℃ 透析两次 1 小时并用琼脂糖缓冲液(Biolabs 公司, 美国)于 4℃ 透析两次 1 小时, 于 65℃ 融化 10 分钟并用每 100mg 一单位的琼脂糖酶(Biolabs 公司, 美国)消化。用 DyNA Quant 200(Hoefer 公司, 美国)通过荧光测定估计 DNA 浓度。

BIBAC 载体的制备:

BIBAC 载体由 Carol M. Hamilton 博士(康奈尔大学, Ithaca)惠赠(Hamilton 等, 美国国家科学院院报 93, 9975-9979, 1996)。BIBAC 设计为在大肠杆菌和农杆菌中复制并也包含允许在蔗糖培养基上直接选择克隆的插入片段的 sacBII 基因。BIBAC 载体还带有使每个细胞上至 300kb 的插入片段的一或两个拷贝稳定保持的 F⁻ 因子游离基因的起点(Shizuya 等, 美国国家科学院院报 89, 8794 - 1992)。用 Wizard® Plus Maxiprep 试剂盒(Promega 公司, 美国)分离质粒。在异丙醇沉淀之前进行酚 - 氯仿抽提。质粒用 NotI 消化并用 1 单位虾碱性磷酸酶(Boehringer Mannheim 公司)于 37℃ 去磷酸化 1 小时。连接在 40ml 体系中于 17℃ 进行过夜, 其中 150ng 农杆菌 DNA 与 17ng 切开的载体(按分子比 10:1 估计的过量载体)及 400 单位 T₄ DNA 连接酶(Boehringer 公司)一起温育。在转化前, 连接反应在 Micro-Collodion 袋中(Sartorius 公司, 德国)逆着 TE 和 1/10 TE 于 4℃ 透析 2 小时。

用 pBAC 文库转化 DH10B

感受态大肠杆菌 DH10B 细胞(F⁻, recA1; EletroMax, Gibco-BRL, 美国)的转化通过使用下列设置: 电压 2.5kV、电容 25mF 和电阻 200W

在带有 Gene Pulser™(Bio-Rad 公司,美国)的预冷的 Gene Pulser 容器(Bio-Rad 公司,美国)中电穿孔来进行。将 25ml 感受态细胞与 1ml 连接溶液混合用于每次电穿孔。电穿孔之后,将细胞转移到 0.5ml SOC 溶液中并在旋转轮里于 37℃ 温育 45 分钟。细胞的 150μl 等分试样平板接种于含有卡那霉素(40mg/ml)和蔗糖(5%)的 LB 培养基。

BAC DNA 的分离和 BAC 克隆 DNA 插入片段大小的测定

BAC 克隆在连续摇动下于 10ml 含卡那霉素(50mg/ml)的 LB 中生长过夜。按照有下列修改的碱裂解方法(Sambrook 等, 1989)提取 DNA: 在重新悬浮溶液中加入 30mg/ml RNAase 并且在异丙醇沉淀之前进行一次酚-氯仿纯化。核酸沉淀溶解于 50ml ddH₂O 中。用 Bio-Rad CHEF Mapper 以 6V/cm 于 14℃ 在 0.5×TBE 中的 1% 琼脂糖凝胶上通过 PFG 电泳 32 小时分离 DNA。

用农杆菌接种玉米胚:

在传粉 12 到 15 天后无菌切下未成熟胚(0.8 到 2.5mm)并将其盾片朝上平板接种于愈伤诱导培养基(2DG4+5 草灭畏)(Duncan 的含有葡萄糖的“D”培养基: N₆ 大量、B₅ 小量、MS 铁、20g/l 蔗糖、5mg/l 草灭畏、8g/l 纯化琼脂、G₄ 添加剂和 10mg/l 葡萄糖, pH5.8)(Duncan 等, 1985)。细菌细胞重新悬浮于 2N63SM(3.97g/l N₆ 盐, N₆ 维生素、30g/l 蔗糖、2mg/l 2,4-D、8g/l 纯化琼脂, pH5.8)中。胚与 10⁹ 细胞/ml 密度的农杆菌或大肠杆菌培养 5 分钟, 然后在愈伤诱导培养基上培养 3 天。然后将组织转移到补加氨噻肟头孢霉素(250mg/l)的相同培养基上。组织的存活在接种后 2 周评估。

农杆菌转化:

农杆菌转化按前面所述的(Wen-Jun 和 Forde, 核酸研究 20:8385, 1989)用 Gene Pluser™ (Bio-Rad 公司, 美国)以 10kV/cm (2.00KV)场强、25mF 电容和 600Ω 电阻在 0.2cm 电穿孔池(Bio-Rad Laboratories Ltd., 美国)中进行。

用于 biolistic 转化的载体:

用于通过 biolistic 装置转化玉米的载体都是 PUC 的衍生物。pMTL 是含有玉米金属硫蛋白样基因启动子(MT-L)的植物转化载体(de

Framond, 1991)。以 BAC 克隆为模板, 用下列引物: 5'-GGAGAGGCGGTGTTAGTT-3'(SEQ ID NO:11); 5'-CATCATCGCA TTCGAGAG-3'(SEQ ID NO:12)通过聚合酶链式反应从菌株 A 扩增 virB1 的编码区。PCR 反应在 25 μ l 含有 1 $\times$ PCR 缓冲液、0.5 单位 Ampli Taq 酶、200 μ M 每种 dNTP、0.2 μ M 每种引物的反应体系中于 55 $^{\circ}$ C 在 Perkin-Elmer 热循环器里进行。将 PCR 产物首先克隆入用于 TA 克隆的 PCR2.1 载体中(Invitrogen 公司, 圣地亚哥, 美国)。然后用 XbaI-SpeI 双酶切切割, 再将其以正义和反义方向克隆入 pMTL 载体的 XbaI 位点中分别产生 pMTL-virB1 和 pMTL-virB1as。类似地, 将从菌株 A 扩增的 PCR 产物以正义和反义方向克隆入 pMTL 分别产生 pMTL-virB1A 和 pMTL-virB1Aas。

将 acvB 克隆入 pTMLsense 和 pMTL antisense 的 XbaI-XhoI 位点中, 产生 pMTL-acvB 和 pMTL-acvBas。

pGUS 含有在编码序列的 N-端密码子中带有内含子的 β -葡萄糖醛酸酶基因并由来自章鱼氨酸和甘露氨酸合酶基因的嵌合启动子驱动(章鱼氨酸合酶启动子上游活化序列与甘露氨酸合酶启动子区的三聚体)(Ni 等, 1995)。

玉米悬浮细胞:

玉米变种 Black Mexican Sweet (BMS)的悬浮培养物在 N₆ 培养基 (Chu 等, 1975)中维持并补加 30g/l 蔗糖和 2mg/l 2,4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D) (2N63S)。用于轰击实验的玉米细胞悬浮液取自 3 天的快速生长培养物。在轰击前, 将约 0.5ml 填充体积的细胞在 7cm 滤纸(Whatman 公司, N^o4)上真空过滤。轰击前将平板接种的细胞在含有 120g/l 蔗糖的 phytagar-固化的 2N6 培养基上于 25 $^{\circ}$ C 保持 4 小时。

植物细胞的轰击:

用上面沉淀有质粒混合物的金微粒轰击组织。pGUS 质粒 DNA 用作暂时表达研究中的内对照。对于共转化实验, 金颗粒带有等量的全部质粒 DNA (每一靶平板 0.5 μ g 每种质粒 DNA)。将适量每种 DNA 混合于 10 μ l 总体积中并用 50 μ m 2.5M CaCl₂ 和 20 μ l 0.1M 不含亚精胺的碱基将其沉淀在 50 μ l 0.3 μ m 的金微粒(60mg/ml)上。微粒轰击 PDS - 1000He

biolistic 装置(Dupont 公司)中使用 1100psi 破裂板进行, 样品置于停止屏层下 8cm 处。

暂时表达分析:

用 GUS - 发光试剂盒(Tropix 公司)通过化学发光分析测定 β - 葡萄糖醛酸酶活性。 β - 葡萄糖醛酸酶活性表示为用分析发光 2001 型光度仪于 25℃测定共 10 秒钟的光单位。

菌落杂交:

将生长一天的 BAC 克隆转移到尼龙滤膜上(Hybond-N, Amersham Life Sciences 公司, UK)用于与放射性标记的来自农杆菌的探针杂交。DNA 探针用 Pharmacia 公司的寡标记试剂盒以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记。chvG 探针和 virD1 探针对应于 PCR 扩增片段。文库滤膜于 65°在杂交溶液中预杂交两小时(5×SSPE、5×Denhardt's 溶液、0.5%SDS、0.1mg/ml 鲑精 DNA)。杂交于 65℃在同样的溶液中进行过夜。滤膜于 65℃在 1×SSC、0.1%SDS 中洗 15 分钟, 然后于 65℃在 0.1×SSC、0.1%SDS 中温育 15 分钟。将滤膜简单吸干, 并使用增感屏使胶片于 -70℃曝光过夜。

为进行 PCR 扩增, 将一接种环的 LBA4404 重新悬浮于 ddH₂O 中, 于 95℃加热 15 分钟, 离心并取 1ml 以下列条件进行 PCR 反应: 95℃5 分钟, 然后以 95℃45 秒、55℃45 秒及 72℃45 秒进行 30 个循环。

结果:

约 20 个玉米胚用来自 BAC 文库的一个克隆接种并平板接种到愈伤诱导培养基上。共培养后, 将胚转移到补加 250mg/ml 氯霉素头孢霉素的相同培养基上。然后检测胚以评估由重组细菌造成的损伤。在筛选的 160 个克隆中鉴定了 4 个独立的 BAC 克隆(BAC1、BAC2、BAC3、BAC4)。

为进一步定位决定玉米组织细胞死亡的 BAC 克隆上的区域, 将来自 BAC 克隆的 HindIII 片段亚克隆入 bluescript 载体中。在玉米组织中测试这些克隆中的每一个以测定哪一个保留了引起细胞死亡的能力。

通过使用亚克隆和寡核苷酸测定 DNA 序列。BAC1 - 2、BAC2 - 2 的序列和 BAC3 - 2 分别表现与 virB1、xylA-xylB 和 acvB 同源。BAC - 4 与 BAC3 - 2 相同。

将带有 *acvB*(BAC3 和 BAC4)、*virB1*(BAC1)和 *xyl A-xyl-B*(BAC2) 的 BAC 克隆导入菌株 A 产生菌株 A(*acvB*)、A(*virB1*)和 A(*xylA*)。这些菌株用于接种玉米组织。以 LBA4404 接种的组织表现典型的细胞死亡模式而相反用菌株 A 侵染未引起这些症状。A(*acvB*)、A(*virB1*)和 A(*xylA*) 在不同水平上诱导细胞死亡, A(*acvB*)是诱导死亡水平最强的一个。因此这些基因的存在改变了菌株 A 与玉米的相互作用并导致玉米组织对侵染更为敏感(表 12)。

表 12

菌株	实验 1	实验 2	实验 3
无细菌	19/22(86%)	15/18(83%)	16/18(88%)
LBA4404	2/20(10%)	1/17(6%)	3/20(15%)
大肠杆菌	17/20(85%)	16/19(84%)	17/21(81%)
菌株 A	19/20(95%)	17/21(81%)	17/20(85%)
大肠杆菌(BAC1)	5/20(25%)	5/17(30%)	4/18(22%)
大肠杆菌(BAC2)	10/19(52%)	10/20(50%)	9/19(47%)
大肠杆菌(BAC3)	3/18(16%)	4/17(24%)	3/20(15%)
大肠杆菌(BAC4)	4/19(21%)	3/19(16%)	2/21(9%)
菌株 A(BAC1)	5/19(26%)	6/17(35%)	8/25(32%)
菌株 A(BAC2)	9/22(41%)	10/23(43%)	8/19(42%)
菌株 A(BAC3)	3/20(15%)	2/18(11%)	3/21(14%)
菌株 A(BAC4)	2/20(10%)	3/19(16%)	4/20(20%)

在 Southern 分析中, 用带有 *xylA* 或 *acvB* 的片段在中度严格条件下探测来自农杆菌菌株 A136、LBA4404、LBA4402、A 和 B 的 *HindIII* 消化的基因组 DNA。 *xylA* 的同源片段在所有测试的菌株中都存在。发现与 *acvB* 杂交的序列存在于在玉米细胞中诱导细胞死亡的 LBA4404、LBA4402 和 A136 中。令人感兴趣的是, 农杆菌菌株 A 和 B 中缺乏 *acvB*。因此 *acvB* 的分布是有限的。正如以前所报道的, *acvB* 存在于相对较少的农杆菌菌株中(Wirawan 等, 生物科学、生物技术与生化化学 60:44-49,

1993)。xylA 和 acvB 不由 Ti 质粒携带，这是因为它们存在于 Ti 清除的菌株 LBA4402 上。

为测定玉米细胞中 acvB 和 virB1 的表达是否是致死的，将这些基因克隆入植物表达载体中并与表达 β -葡萄糖醛酸酶（GUS）的载体 pGUS 共转化。如果测试基因是致死的，那么 GUS 活性将减弱或消除(Mindrinos 等, 1994)。将两个基因的编码区以正义和反义方向亚克隆入含有 MTL 启动子的植物表达载体中并与载体 pGUS 一起 biolistically 转移入玉米细胞中。30 小时后评估玉米细胞中的 GUS 活性。结果在表 13 中表示。当 virB1 与 pGUS 共轰击时，GUS 活性下降约两倍。用 acvB 和 pGUS 共轰击的玉米细胞持续表现 GUS 活性 35 倍的下降。这表明玉米细胞中 acvB 的高水平表达是有害的。

表 13:

质粒构建体通过 biolistic 装置转移入玉米细胞中。培养 30 小时后，将组织匀浆并测定 GUS 活性。活性以光单位/ μg 蛋白表示。分析了独立的轰击，并且数据用五次重复的平均值 $\pm$ 标准差来表示。

质粒 + pGUS	平均值 $\pm$ 标准差 (光单位/ μg 蛋白)
pUC	2082 $\pm$ 199
pMTL-virB1	1014 $\pm$ 106
pMTL-virB1as	2543 $\pm$ 176
pMTL-virB1K6	1738 $\pm$ 330
pMTL-virB1K6as	2168 $\pm$ 282
pMTL-acvB	61 $\pm$ 19
pMTL-acvBas	2378 $\pm$ 292

序列表

(1) 基本信息

(i) 申请人:

(A)名称: NOVARTIS AG

(B)街道: Schwarzwaldallee 215

(C)城市: Basel

(E)国家: 瑞士

(F)邮政编号(ZIP):4058

(G)电话: + 41 61 324 11 11

(H)电传: + 41 61 322 75 32

(ii)发明名称: 植物转化方法

(iii)序列数: 10

(iv)计算机可读形式:

(A)介质类型: 软盘

(B)计算机: IBM PC 兼容机

(C)操作系统: PC - DOS/MS-DOS

(D)软件: Patent In Release #1.0, Version # 1.25 (EPO)

(2) 关于 SEQ ID NO:1 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 19 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(vii)直接来源:

(B)克隆: PAT1

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1

TGTCTCCGGA GAGGAGACC

(2) 关于 SEQ ID NO:2 的信息**(i) 序列特征:****(A) 长度: 20 个碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑结构: 线型****(ii) 分子类型: DNA (基因组)****(iii) 假设: 无****(iii) 反义: 无****(vii) 直接来源:****(B) 克隆: PAT2****(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2****CCAACATCAT GCCATCCACC****(2) 关于 SEQ ID NO:3 的信息****(i) 序列特征:****(A) 长度: 20 个碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑结构: 线型****(ii) 分子类型: DNA (基因组)****(iii) 假设: 无****(iii) 反义: 无****(vii) 直接来源:****(B) 克隆: MTL(P)****(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3****AGGTGTCCAT GGTGCTCAAG****(2) 关于 SEQ ID NO:4 的信息****(i) 序列特征:**

- (A)长度: 20 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑结构: 线型
- (ii)分子类型: DNA (基因组)
- (iii)假设: 无
- (iii)反义: 无
- (vii)直接来源:
 - (B)克隆: iap(I)
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 4
ACAATCGAAC CGCACACGTC

(2) 关于 SEQ ID NO:5 的信息

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 20 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑结构: 线型
- (ii)分子类型: DNA (基因组)
- (iii)假设: 无
- (iii)反义: 无
- (vii)直接来源:
 - (B)克隆: p35(35)
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 5
CCAGGTAGCA GTCGTTGTGT

(2) 关于 SEQ ID NO:6 的信息

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 20 个碱基对
 - (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(vii)直接来源:

(B)克隆: dad-1(D)

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6

CCTTGTTTCC TTTGTTCAC

(2) 关于 SEQ ID NO:7 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7

GGTCCTATAC GAAGCGTTAC

(2) 关于 SEQ ID NO:8 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8

CCACGTAGCA GTCGTTGTGT

(2) 关于 SEQ ID NO:9 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9

CATGTCTGAC TTGCGATTGG

(2) 关于 SEQ ID NO:10 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 10

ACAATCGAAC CGCACACGTC

(2) 关于 SEQ ID NO:11 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 11

GGAGAGGCGG TGTTAGTT

(2) 关于 SEQ ID NO:12 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iii)反义: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 12

CATCATCGCA TTCGAGAG