



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103930552 B

(45)授权公告日 2016.12.07

(21)申请号 201280038722.5

C07K 7/08(2006.01)

(22)申请日 2012.08.02

C12N 15/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103930552 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2014.07.16

CN 101889091 A,2010.11.17,
Mileshina D等.Mitochondrial
transfection for studying organellar DNA
repair,genome maintenance and aging.
《Mechanisms Ageing Dev》.2011,第132卷1872-
6216.

(30)优先权数据

61/514,988 2011.08.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.02.07

A. Flierl等.Targeted Delivery of DNA
to the Mitochondrial Compartment via
Import Sequence-Conjugated Peptide
Nucleic Acid.《MOLECULAR THERAPY》.2003,第7
卷(第4期),550页,摘要;551页右栏第2-4段,表
1;554页左栏第3-4段.

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2012/000727 2012.08.02

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/016810 EN 2013.02.07

A. Flierl等.Targeted Delivery of DNA
to the Mitochondrial Compartment via
Import Sequence-Conjugated Peptide
Nucleic Acid.《MOLECULAR THERAPY》.2003,第7
卷(第4期),550页,摘要;551页右栏第2-4段,表
1;554页左栏第3-4段.

(73)专利权人 加拿大农业及农业食品部
地址 加拿大,亚伯达省

(72)发明人 F·欧德斯 T·麦克米伦

Kristin L. Horton等.Mitochondria-
Penetrating Peptides.《Chemistry &
Biology》.2008,第15卷375页摘要、左栏第2段,
377页右栏第1-3段,379页表1、图4.

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 孟锐

审查员 王宽

(51)Int.Cl.

C12N 15/87(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

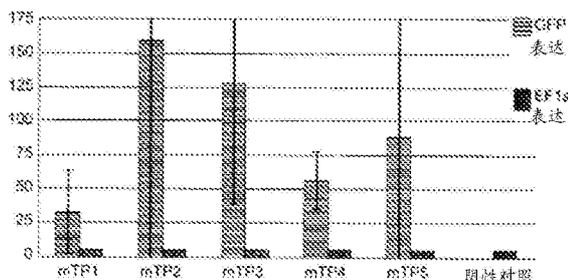
权利要求书3页 说明书35页 附图9页

(54)发明名称

靶向细胞器的纳米载体

(57)摘要

本发明提供了靶向细胞器的纳米载体,包括肽,其用于将生物学分子例如核酸递送至非核细胞器例如线粒体和叶绿体.本发明还提供了使用这样的纳米载体的用于非核细胞器的遗传转化的方法。



1. 一种将核酸递送至细胞中的非核细胞器的方法,所述方法包括使所述细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体多肽,其中,所述至少一种靶向细胞器的纳米载体多肽用于递送所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜并且进入所述非核细胞器,

其中所述非核细胞器为线粒体并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列:

MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

MAAWMRSLSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5);或

所述非核细胞器为叶绿体并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列:

MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6);

MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7);

MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述核酸为DNA。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述非核细胞器为线粒体,并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列:

MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

MAAWMRSLSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述细胞为植物细胞。

5. 如权利要求3所述的方法,其中所述细胞为动物细胞。

6. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述非核细胞器是叶绿体,并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列:

MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6);

MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7);

MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述细胞为植物细胞。

8. 一种制造经遗传改造的植物细胞的方法,所述方法包括将包含非核细胞器的植物细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体多肽,其中,所述至少一种靶向细胞器的纳米载体多肽用于递送所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜并且进入所述非核细胞器,以转染所述非核细胞器,

其中所述非核细胞器为线粒体并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列：

MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1)；

MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2)；

MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3)；

MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4)；和

MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)；或

所述非核细胞器为叶绿体并且所述靶向细胞器的纳米载体多肽是选自下述的序列：

MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6)；

MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7)；

MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8)；

MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9)；和

MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

9. 如权利要求8所述的方法，其中所述植物细胞为胚性小孢子。

10. 一种制造经遗传改造的植物的方法，所述方法包括：

通过如权利要求8或9所述的方法制造经遗传改造的植物细胞；和

由所述经遗传改造的植物细胞产生植物。

11. 一种制造经遗传改造的动物细胞的方法，所述方法包括使包含至少一个线粒体的动物细胞暴露于组合物，所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向线粒体的纳米载体多肽，其中，所述至少一种靶向线粒体的纳米载体多肽用于递送所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜并且进入所述至少一个线粒体，以转染所述至少一个线粒体，

其中所述靶向线粒体的纳米载体多肽是选自下述的序列：

MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1)；

MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2)；

MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3)；

MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4)；和

MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

12. 一种靶向线粒体的纳米载体多肽，其中，所述靶向线粒体的纳米载体多肽是选自以下的序列：

MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1)；

MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2)；

MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3)；

MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4)；和

MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

13. 一种靶向叶绿体的纳米载体多肽，其中所述靶向叶绿体的纳米载体多肽是选自以下的序列：

MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6)；

MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7)；

MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8)；

MAALIPATIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和
MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

靶向细胞器的纳米载体

技术领域

[0001] 本申请涉及用于将生物学分子例如蛋白质和核酸递送至非核细胞器的组合物和方法。更特别地,本申请描述了用于线粒体和叶绿体的遗传转化的组合物和方法。

背景技术

[0002] 需要可选的农业分子生物技术对全球性的重要食物和工业作物进行遗传改造,以满足对于这些可再生资源的世界性的需求。不幸的是,对于大多数被开发用于操作哺乳动物细胞的遗传转化方法来说,植物是难以处理的。然而,肽转染技术为目前新兴的可行的植物转染技术。

[0003] 细胞穿透肽(CPP)为短的阳离子肽,其能够以不依赖于受体的方式跨细胞膜转导极性亲水性化合物例如核酸(Veldhoen,S.,Recent Developments in Peptide-Based Nucleic Acid Delivery.International Journal of Molecular Sciences(2008)9(7):1276-1320)。这样的细胞穿透肽的实例为HIV-1Tat49-57(RKKRRQRRR)(Vives,E.,P.Brodin,和B.Lebbleu,A Truncated HIV-1Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus.J.Biol.Chem.(1997)272(25):16010-16017;Wender,P.A.,等,The design, synthesis,and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters.Proceedings of the National Academy of Sciences(2000)97(24):13003-13008)。

[0004] Tat序列包括碱性氨基酸,其允许Tat跨细胞的外质膜转导其自身和连接的负荷。由于在其肽序列中存在被称为核定位信号(NLS)的亚细胞定位序列,因此Tat-负荷复合物在细胞的核中聚集(Nagahara,H.,等,Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells:TAT-p27Kiplinduces cell migration.Nat Med(1998)4(12):1449-1452)。

[0005] 在蛋白质的N-末端上发现的这样的亚细胞定位序列被总体地称为蛋白质分选信号序列。各蛋白质分选信号序列为不同的肽序列,其将在细胞溶质中翻译的初生蛋白质靶向至细胞中的特定的亚细胞位置。蛋白质分选信号包括靶向核的核定位信号(NLS),靶向线粒体的线粒体靶向肽(mTP),和靶向叶绿体的叶绿体运输肽(cTP),cTP、mTP和NLS通过易位机构识别,其有助于包含这些序列的细胞溶质蛋白质跨双膜输送至特定的细胞器(Emanuelsson,O.,等,Locating proteins in the cell using TargetP,SignalP and related tools.Nat.Protocols(2007)2(4):953-971)。

[0006] 有助于有效的细胞吸收和线粒体聚集的特定结构和化学性质已被应用于线粒体治疗剂和癌症药物的开发。例如,已制备了引入移位亲脂性阳离子(DLC)的合成肽(Fernandez-Carneado,J.,等,Highly Efficient,Nonpeptidic Oligoguanidinium Vectors that Selectively Internalize into Mitochondria,Journal of the American Chemical Society(2004)127(3):869-874)。此外,已开发了用于减少由线粒体

内膜中的活性氧类导致的细胞氧化应激的可穿透细胞的抗氧化剂肽(Zhao,K.,等,Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling,Oxidative Cell Death,and Reperfusion Injury, J.Biol.Chem.(2004)279(33):34682-34690)。这些肽具有结构模体,其包括交替的赋予抗氧化剂性质的合成的芳香残基和赋予细胞穿透性质的碱性氨基酸。最近,已开发了基于此先前识别的交替的芳香残基和碱性残基的结构模体的线粒体穿透肽(MPP),并且已将DLC的性质引入这些肽之中的特定位置(Horton,K.L.等,Mitochondria-Penetrating Peptides, Chemistry&Biology(2008)15:375-382)。

[0007] 某些细胞器,例如线粒体和叶绿体包含DNA,所述DNA与核基因组不同,其经表达但通常仅继承自亲本之一。线粒体基因通常自母方继承,且例如在大多数有花植物中叶绿体并非继承自父本。由此,这样的细胞器已成为遗传转化的目标,特别是在植物中,这是由于任何转化的基因更可能被生物学地包含于花粉,而非通过花粉传播,由此具有较低的环境风险。此外,已将线粒体的机能障碍与特定的疾病联系,直接地施用至线粒体的遗传治疗和其他治疗对于所述疾病可能是有效的治疗。

[0008] 因此,期望通过将遗传物质选择性地引入细胞器例如线粒体和叶绿体的基因组而将有机体遗传转化的新方法。

发明内容

[0009] 本发明的一个方面提供了将核酸递送至细胞中的非核细胞器的方法,所述方法包括使所述细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体;其中,在存在至少一种靶向细胞器的纳米载体的情况下,所述至少一种核酸跨细胞膜移位并且进入所述非核细胞器。在至少一个实施方案中,所述细胞为植物细胞。在至少一个实施方案中,所述植物细胞选自胚性体细胞、原生质体和小孢子。在至少一个实施方案中,所述细胞为动物细胞。在至少一个实施方案中,所述核酸为DNA。

[0010] 在至少一个实施方案中,非核细胞器为线粒体。根据这样的实施方案,靶向细胞器的纳米载体可以为具有约4至约7的电荷比和约0至约-0.5的亲水性的多肽。可选地,在这样的实施方案中,靶向细胞器的纳米载体可以为具有选自以下的序列的多肽:

[0011] MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

[0012] MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

[0013] MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

[0014] MWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

[0015] MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

[0016] 在至少一个实施方案中,非核细胞器为叶绿体。根据这样的实施方案,靶向细胞器的纳米载体可以为具有约2至约4.2的电荷比和约0至约-0.2的亲水性的多肽。可选地,在这样的实施方案中,靶向细胞器的纳米载体可以为具有选自以下的序列的多肽:

[0017] MGGCVSTPKSCVGAKLK(SEQ ID NO:6);

[0018] MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTF(SAQ ID NO:7);

[0019] MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

[0020] MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

[0021] MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

[0022] 在本发明的另一个方面,提供了制造经遗传改造的植物细胞的方法,所述方法包括将包含非核细胞器的植物细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体;其中在存在至少一种靶向细胞器的纳米载体的情况下,所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜移位并且进入所述非核细胞器,以转染所述非核细胞器。在至少一个实施方案中,所述植物细胞为胚性小孢子。

[0023] 本发明的另一个方面提供了通过此处所述的方法制造的经遗传改造的植物细胞。

[0024] 在本发明的另一个方面,提供了制造经遗传改造的植物的方法,所述方法包括使包含非核细胞器的植物细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体;其中,在存在所述至少一种靶向细胞器的纳米载体的情况下,所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜移位并且进入所述非核细胞器,以转染所述非核细胞器;并且由包含所述经转染的非核细胞器的植物细胞生成植物。在至少一个实施方案中,所述植物细胞为胚性小孢子。

[0025] 本发明的另一个方面提供了通过此处所述的方法制造的经遗传改造的植物。另一个方面提供了这样的经遗传改造的植物的种子,所述种子包含如此处所述的经转染的非核细胞器。

[0026] 在本发明的另一个方面中,提供了制造经遗传改造的动物细胞的方法,所述方法包括使包含至少一个线粒体的动物细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向线粒体的纳米载体;其中,在存在至少一种靶向线粒体的纳米载体的情况下,所述至少一种核酸跨所述细胞的细胞膜移位并且进入所述至少一个线粒体,以转染所述至少一个线粒体。在至少一个实施方案中,所述动物细胞为哺乳动物细胞。在至少一个实施方案中,所述动物细胞为人类细胞。

[0027] 本发明的另一个方面提供了通过此处所述的方法制造的经遗传改造的动物细胞。

[0028] 本发明的另一个方面提供了靶向线粒体的纳米载体,其中所述靶向线粒体的纳米载体为具有线粒体靶向肽(mTP)序列,约4至约7的电荷比和约0至约-0.5的亲水性的多肽。在至少一个实施方案中,所述多肽具有选自以下的序列:

[0029] MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

[0030] MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

[0031] MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

[0032] MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

[0033] MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

[0034] 本发明的另一个方面提供了靶向叶绿体的纳米载体,其中所述靶向叶绿体的纳米载体为具有叶绿体运输肽(cTP)序列,约2至约4.2的电荷比和约0至约-0.2的亲水性的多肽。在至少一个实施方案中,所述多肽具有选自以下的序列:

[0035] MGGCVSTPKSCVGAQLR(SEQ ID NO:6);

[0036] MQTLTASSSVSSIQRHRPHAGRRSSSVTF(SAQ ID NO:7);

[0037] MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

[0038] MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

[0039] MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

附图说明

[0040] 本发明的这些特征和其他特征将由以下说明书和权利要求,以及附图而变得明显,其中:

[0041] 图1A为黑小麦原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的cTP1(SEQ ID NO:6)的荧光;

[0042] 图1B为黑小麦原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的cTP1(SEQ ID NO:6)的荧光和叶绿体自发荧光;

[0043] 图2A为黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光;

[0044] 图2B为黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0045] 图2C为黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0046] 图3A为烟草原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Olympus),显示叶绿体自发荧光;

[0047] 图3B为烟草原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Olympus),显示获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光;

[0048] 图3C为烟草原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Olympus),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0049] 图3D为烟草原生质体的横截面的共聚焦显微图像(Olympus),显示叶绿体自发荧光、获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0050] 图4A为烟草原生质体的叠加深度共聚焦显微图像(Olympus),显示叶绿体自发荧光;

[0051] 图4B为烟草原生质体的叠加深度共聚焦显微图像(Olympus),显示获自荧光素标记的cTP1(SEQ ID NO:6)的荧光;

[0052] 图4C为烟草原生质体的叠加深度共聚焦显微图像(Olympus),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0053] 图4D为烟草原生质体的叠加深度共聚焦显微图像(Olympus),显示叶绿体自发荧光、获自荧光素标记的cTP1(SEQ ID NO:6)的荧光、和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0054] 图5A为小孢子的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光;

[0055] 图5B为小孢子的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP3(SEQ ID NO:3)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;

[0056] 图6A为小孢子的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP1(SEQ ID NO:1)的荧光;

- [0057] 图6B为小孢子的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0058] 图6C为小孢子的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP1(SEQ ID NO:1)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0059] 图7为MDCK(Madin-Darby犬肾)细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP1(SEQ ID NO:1)的荧光;
- [0060] 图8A为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP1(SEQ ID NO:1)的荧光;
- [0061] 图8B为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0062] 图8C为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP1(SEQ ID NO:1)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0063] 图9A为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP5(SEQ ID NO:5)的荧光;
- [0064] 图9B为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0065] 图9C为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP5(SEQ ID NO:5)的荧光和获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0066] 图10为MDCK细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自荧光素标记的mTP4(SEQ ID NO:4)的荧光;
- [0067] 图11为报告基因质粒pWMaadAGFP的图谱;
- [0068] 图12为报告基因质粒pWCaadAGFP的图谱;
- [0069] 图13A为在存在mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自绿色荧光蛋白(GFP)的荧光;
- [0070] 图13B为在存在mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP和 **MitoTracker**[®] Orange两者的荧光;
- [0071] 图13C为在存在mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP和 **MitoTracker**[®] Orange两者的荧光和叶绿体自发荧光;
- [0072] 图14A为在存在mTP2(SEQ ID NO:2)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP的荧光;
- [0073] 图14B为在存在mTP2(SEQ ID NO:2)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自 **MitoTracker**[®] Orange的荧光;
- [0074] 图14C为在存在mTP2(SEQ ID NO:2)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP和 **MitoTracker**[®] Orange两者的荧光;
- [0075] 图15为在存在mTP1(SEQ ID NO:1)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的Caco-2细

胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP和MitoTracker[®] Orange两者的荧光;

[0076] 图16为在存在mTP1(SEQ ID NO:1)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的F1112细胞的共聚焦显微图像(Nikon),显示获自GFP和MitoTracker[®] Orange两者的荧光;

[0077] 图17为显示通过mRNA水平的定量实时PCR而测量的在存在mTP1(SEQ ID NO:1)、mTP2(SEQ ID NO:2)、mTP3(SEQ ID NO:3)、mTP4(SEQ ID NO:4)或mTP5(SEQ ID NO:5)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦小孢子中GFP的表达水平(增加倍数,平均4次重复)与内对照延伸因子1a(EF1a)的表达水平(增加倍数)的比较的图;

[0078] 图18为显示通过mRNA水平的定量实时PCR而测量的在存在cTP1(SEQ ID NO:6)、cTP2(SEQ ID NO:7)、cTP3(SEQ ID NO:8)、cTP4(SEQ ID NO:9)或cTP5(SEQ ID NO:10)的情况下用pWCaadA16GFP质粒转染的黑小麦小孢子中GFP的表达水平(增加倍数,平均4次重复)与内对照延伸因子1a(EF1a)的表达水平(增加倍数)的比较的图;

[0079] 图19为显示通过mRNA水平的定量实时PCR而测量的在存在mTP1(SEQ ID NO:1)、mTP2(SEQ ID NO:2)、mTP3(SEQ ID NO:3)、mTP4(SEQ ID NO:4)或mTP5(SEQ ID NO:5)的情况下用pWMaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体中GFP的表达水平(增加倍数,平均4次重复)与内对照延伸因子1a(EF1a)的表达水平(增加倍数)的比较的图;且

[0080] 图20为显示通过mRNA水平的定量实时PCR而测量的在存在cTP1(SEQ ID NO:6)、cTP2(SEQ ID NO:7)、cTP3(SEQ ID NO:8)、cTP4(SEQ ID NO:9)或cTP5(SEQ ID NO:10)的情况下用pWCaadA16GFP质粒转染的黑小麦原生质体中GFP的表达水平(增加倍数,平均4次重复)与内对照延伸因子1a(EF1a)的表达水平(增加倍数)的比较的图。

具体实施方式

[0081] 本发明的一个方面提供了将核酸递送至细胞中的非核细胞器的方法。在至少一个实施方案中,细胞为植物细胞,包括但不限于体细胞、胚性体细胞、叶肉原生质体和小孢子。在至少一个实施方案中,细胞为动物细胞,包括但不限于哺乳动物细胞。在至少一个实施方案中,细胞为人类细胞。

[0082] 核酸被递送至细胞中的亚细胞非核细胞器。期望的靶非核细胞器为包含内源性核酸(包括但不限于基因组DNA)且可以由内源性核酸表达一种或多种基因的那些。在至少一个实施方案中,细胞器为叶绿体。在至少一个实施方案中,细胞器为线粒体。

[0083] 将细胞暴露于组合物,所述组合物包含至少一种核酸和至少一种靶向细胞器的纳米载体。期望地,核酸可以在非核细胞器中表达或可以转化所述非核细胞器的基因组。核酸可以为RNA或DNA,并且可以为天然存在的核酸或为人工核酸。此处使用的术语“人工核酸”意图指已经人工地或合成地制造或改变的核酸(RNA或DNA)。在至少一个实施方案中,核酸包含DNA。在至少一个实施方案中,核酸包含可在靶非核细胞器中表达的一种或多种基因。在至少一个实施方案中,核酸包含质粒、人工染色体、或基因构建体。本领域技术人员应知道适合的核酸,以及选择和制备这样的核酸的方法。

[0084] 在至少一个实施方案中,核酸还包含标记基因。此处使用的术语“标记基因”意图指当被表达时编码其存在可以被检测和/或测量的基因产物的基因。标记基因是本领域公知的,并且包括但不限于编码其存在可以通过化学或生物化学方式检测和测量的蛋白质的

基因,以及编码可以通过它们的物理性质检测和/或测量的蛋白质的基因。编码其存在可以通过化学或生物化学方式检测和测量的蛋白质的基因包括但不限于编码酶的基因及类似基因,和其表达与抗生素抗性有关的基因。编码可以通过它们的物理性质检测和/或测量的蛋白质的基因包括但不限于编码可以通过荧光检测的蛋白质例如维多利亚多管发光水母(*Aequorea victoria*)绿色荧光蛋白(GFP)及类似蛋白的基因。本领域技术人员应了解,标记基因可以用于选择稳定地表达所述标记基因的细胞。例如,当标记基因为与对抗生素的抗性有关的基因时,可以通过在存在对于不存在所述标记基因的表达的细胞而言为致死性的量的抗生素的情况下使细胞生长而选择表达所述标记基因的细胞。

[0085] 在至少一个实施方案中,靶向细胞器的纳米载体为多肽,其能够靶向一种或多种亚细胞非核细胞器。在至少一个实施方案中,纳米载体多肽包括N-末端蛋白质分选信号序列。在至少一个实施方案中,纳米载体多肽包括N-末端蛋白质分选信号序列,其对于如上所述的亚细胞非核细胞器为特异性的。在至少一个实施方案中,N-末端蛋白质分选信号序列为叶绿体运输肽(cTP)序列。在至少一个实施方案中,N-末端蛋白质分选信号序列为线粒体靶向肽(mTP)序列。在至少一个实施方案中,N-末端蛋白质分选信号序列为在至少一种植物的至少一种蛋白中天然发现的序列。

[0086] 不期望受理论的限制,目前认为靶向细胞器的纳米载体与非核细胞器的膜相互作用,从而促进核酸进入非核细胞器。靶向细胞器的纳米载体自身可以进入或不进入非核细胞器,且本领域技术人员应了解这样的靶向细胞器的纳米载体自身进入非核细胞器并非为了在存在靶向细胞器的纳米载体的情况下核酸进入非核细胞器的必要条件。

[0087] 在至少一个实施方案中,靶向细胞器的纳米载体多肽还具有细胞穿透性质。在至少一个实施方案中,多肽包含不多于100个氨基酸残基。在至少一个实施方案中,多肽包含不多于35个氨基酸残基。在至少一个实施方案中,多肽包含约5至约35个氨基酸残基。

[0088] 此处使用的关于多肽的术语“净阳离子电荷”定义为使用下式在pH7.0下计算的肽的净电荷Z:

$$[0089] \quad Z = \sum_i N_i \frac{10^{pH - pK_{a_i}}}{10^{pH - pK_{a_i}} + 10^{pK_{a_i} - pH}} - \sum_j N_j \frac{10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_{a_j} - pH}}$$

[0090] 其中 N_i 为肽中的第*i*个碱性基团的个数(N-末端氨基基团和精氨酸、赖氨酸和组氨酸残基的侧链); pK_{a_i} 为第*i*个碱性基团的 pK_a 值; N_j 为肽中的第*j*个酸性基团的数目(C-末端羧基基团和天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、和酪氨酸残基的侧链);且 pK_{a_j} 为第*j*个酸性基团的 pK_a 值。使用的 pK_a 值如下(Nelson,David L.,Michael M.Cox,Lehninger Principles of Biochemistry,第四版):

	碱性基团	pK_a	酸性基团	pK_a
	(NH ₂ -)	9.69	(-COOH)	2.34
[0091]	K, Lys	10.5	D, Asp	3.86
	R, Arg	12.4	E, Glu	4.25

	碱性基团	pK _a	酸性基团	pK _a
[0092]	H, His	6.00	C, Cys	8.33
			Y, Tyr	10.0

[0093] 在至少一个实施方案中,靶向细胞器的纳米载体多肽包括叶绿体运输肽(cTP)序列,且具有等于或大于约2的净阳离子电荷。在至少一个实施方案中,所述包括cTP序列的多肽具有约2至约6的净阳离子电荷。在至少一个实施方案中,所述包括cTP序列的多肽具有约2至约4.2的净阳离子电荷。

[0094] 在至少一个实施方案中,靶向细胞器的纳米载体多肽包括线粒体靶向肽(mTP)序列,且具有等于或大于约3.5的净阳离子电荷。在至少一个实施方案中,所述包括mTP序列的多肽具有约3.5至约9.2的净阳离子电荷。在至少一个实施方案中,所述包括mTP序列的多肽具有约4至约7的净阳离子电荷的。

[0095] 此处使用的关于多肽的术语“亲水性”定义为对于水的亲和性或溶于水、与水混合或被水润湿的倾向。使用如下的获自Hopp&Woods亲水性等级的亲水性数值(Hopp T.P., Woods K.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1981)78:3824-3828),以多肽中单个氨基酸残基的亲水性数值的总和的形式计算多肽的亲水性:

	A, Ala	-0.5	C, Cys	-1	D, Asp	3	E, Glu	3
	F, Phe	-2.5	G, Gly	0	H, His	-0.5	I, Ile	-1.8
[0096]	K, Lys	3	L, Leu	-1.8	M, Met	-1.3	N, Asn	0.2
	P, Pro	0	Q, Gln	0.2	R, Arg	3	S, Ser	0.3
	T, Thr	-0.4	V, Val	-1.5	W, Trp	-3.4	Y, Tyr	-2.3

[0097] 在至少一个实施方案中,靶向细胞器的纳米载体多肽具有不大于0的亲水性。在至少一个实施方案中,多肽包括线粒体靶向肽(mTP)序列且具有约0至约-0.6的亲水性。在至少一个实施方案中,所述包括mTP序列的多肽具有约0至约-0.5的亲水性。在至少一个实施方案中,多肽包括叶绿体运输肽(cTP)序列且具有约0至约-0.5的亲水性。在至少一个实施方案中,所述包括cTP序列的多肽具有约0至约-0.2的亲水性。

[0098] 在至少一个实施方案中,当多肽包括线粒体靶向肽(mTP)序列时,多肽具有和选自以下的序列具有至少约80%相似性、至少约90%相似性、至少约95%相似性、或至少约99%相似性的序列:

[0099] MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

[0100] MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

[0101] MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

[0102] MWWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4); 和

[0103] MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

[0104] 在至少一个实施方案中,当多肽包括线粒体靶向肽(mTP)序列时,多肽具有和选自以下的序列具有至少约80%一致性、至少约90%一致性、至少约95%一致性、或至少约99%一致

性的序列:

[0105] MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

[0106] MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

[0107] MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

[0108] MWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

[0109] MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5)。

[0110] 在至少一个实施方案中,当多肽包括线粒体靶向肽(mTP)序列时,多肽具有选自以下的序列:

[0111] MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALLRYQ(SEQ ID NO:1);

[0112] MAAWMRSLFSPLKKLWIRMH(SEQ ID NO:2);

[0113] MKLLWRLILSRKW(SEQ ID NO:3);

[0114] MWRRSRTNSLRYT(SEQ ID NO:4);和

[0115] MLFRLRRSVRLRGLLA(SEQ ID NO:5);

[0116] 或包含氨基酸残基的一个或多个缺失、添加或保守置换的其类似的序列,使得所述类似的序列包含约5至约35个氨基酸。

[0117] 在至少一个实施方案中,当多肽包括叶绿体运输肽(cTP)序列时,多肽具有和选自以下的序列具有至少约80%相似性、至少约90%相似性、至少约95%相似性、或至少约99%相似性的序列:

[0118] MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6);

[0119] MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7);

[0120] MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

[0121] MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

[0122] MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

[0123] 在至少一个实施方案中,当多肽包括叶绿体运输肽(cTP)序列时,多肽具有和选自以下的序列具有至少约80%一致性、至少约90%一致性、至少约95%一致性、或至少约99%一致性的序列:

[0124] MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6);

[0125] MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7);

[0126] MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

[0127] MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

[0128] MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10)。

[0129] 在至少一个实施方案中,当多肽包括叶绿体运输肽(cTP)序列时,多肽具有选自以下的序列:

[0130] MGGCVSTPKSCVGAKLR(SEQ ID NO:6);

[0131] MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS(SEQ ID NO:7);

[0132] MKNPPSSFASGFGIR(SEQ ID NO:8);

[0133] MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS(SEQ ID NO:9);和

[0134] MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR(SEQ ID NO:10);

[0135] 或包含氨基酸残基的一个或多个缺失、添加或保守置换的其类似的序列,使得所

述类似的序列包含约5至约35个氨基酸。

[0136] 此处使用的术语“保守置换”意图指肽序列中的氨基酸残基被具有相似的化学性质和/或物理性质的不同的氨基酸残基替换,使得肽的物理性质和/或化学性质仅最小化地被所述置换改变。物理性质和化学性质的实例包括但不限于极性、电荷、位阻效应、 pK_a 、和芳香性。例如,选自甘氨酸、丙氨酸或缬氨酸的一个小的疏水残基可以被选自此组中的不同的小的疏水残基置换;选自苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的一个芳香残基可以被选自此组的不同的小的芳香残基置换;选自天冬氨酸或谷氨酸的一个酸性残基可以被选自此组的不同的小的酸性残基置换;选自精氨酸或赖氨酸的一个碱性残基可以被选自此组的不同的小的碱性残基置换;选自丝氨酸和苏氨酸的一个羟基化的残基可以被选自此组的不同的小的羟基化的残基置换,等等。本领域技术人员应知道预期仅最小化地改变现有肽的物理性质和/或化学性质的其他氨基酸置换。

[0137] 本发明的其他方面提供了通过此处所述的方法和组合物制造的动物细胞、植物细胞和植物及其种子。用于遗传转化植物细胞,由通过本方法制造的遗传转化的植物细胞产生植物,和由这样的植物产生种子的方法是本领域公知的,包括但不限于植物细胞的核或叶绿体的基因枪转化、使用抗生素抗性的标记选择转化的植物细胞的,和自转化的分离小孢子培养物再生整个转基因植物(Chugh, A., E. Amundsen, 和 F. Eudes, Translocation of cell-penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticale microspores. *Plant Cell Reports*(2009)28(5):801-810; Lee, S.M., 等, Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Molecules and Cells*(2006)21(3):401-410; 和 Cui, C., 等, Stable chloroplast transformation of immature scutella and inflorescences in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(2011)43(4):284-291)。本领域技术人员也应具有其他这样的方法的知识。此外,遗传转化动物细胞的核的方法是本领域公知的。

[0138] 实施例

[0139] 可以通过参考以下具体的实例而更完全地了解此处所述的发明,呈现的所述实例仅用于说明本发明的具体实施方案并且并非意图限制其范围。本领域技术人员应理解,此处所述的方法和步骤可以被修改,且意图包括这样的修改。尽管在这些实例中已使用具体的术语,但这样的术语意图为非限定性的并且以描述性的意义使用。说明书中和以下实施例中提及的但未详细地描述的方法是本领域技术人员公知的。

[0140] 实施例1-细胞器靶向肽(oTP)序列的识别

[0141] 小麦(*Triticum aestivum*)、稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的可获得的蛋白质序列下载自NCBI(National Center for Biotechnology Information)GenBank。为了消除蛋白质序列数据集中的序列冗余,使用电脑软件程序Cluster Database at High Identity with Tolerance(CD-HIT)产生无冗余序列的集合(Huang, Y., 等, CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences, *Bioinformatics*(2010)26(5):680-682)。随后使用TargetP软件程序分析蛋白质序列,以识别N-末端蛋白质分选信号序列并且预测这些N-末端蛋白质分选信号序列的亚细胞定位性质(Emanuelsson, O., 等, Predicting Subcellular Localization

of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence, Journal of Molecular Biology(2000)300(4):1005-1016)。自蛋白质序列数据集识别对于叶绿体特异性的N-末端蛋白质分选信号肽序列(叶绿体运输肽(cTP)序列)和对于线粒体特异性的N-末端蛋白质分选信号肽序列(线粒体靶向肽(mTP)序列)。如表1和2中所总结的,通过对特定的选择标准的顺序应用,进一步选择具有潜在的细胞穿透性质的候选的信号序列。

[0142] 表1-线粒体靶向肽序列选择

[0143]

物种	总起始蛋白质序列	总 mTP 序列	相对置信水平 ≥ 0.9	序列长度 ≤ 35	净正电荷 ≥ 3.5	平均亲水性 ≤ 0
拟南芥	387781	45588	1619	503	488	282
稻 (<i>Oryza sativa</i>)	302221	55065	4635	1167	701	362
玉米 (<i>Zea mays</i>)	60709	10251	423	250	139	81
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	34904	4594	312	81	23	23
总计	785615	115498	6989	2001	1351	748

[0144] 表2-叶绿体运输肽序列选择

[0145]

物种	总起始蛋 白质序列	总 cTP 序列	相对置信 水平 ≥ 0.9	序列长 度 ≤ 35	净正 电荷 ≥ 2.0	平均亲水性 ≤ 0
拟南芥	387781	41132	5016	503	299	193
稻 (<i>Oryza sativa</i>)	302221	40830	6571	476	258	115
玉米 (<i>Zea mays</i>)	60709	9898	904	78	52	33
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	34904	2931	373	19	31	8

[0146]

物种	总起始蛋 白质序列	总 cTP 序列	相对置信 水平 ≥ 0.9	序列长 度 ≤ 35	净正 电荷 ≥ 2.0	平均亲水性 ≤ 0
总计	785615	94791	12864	1076	640	349

[0147] 表1和表2中的前三栏数据分别表示获自各有机体的NCBI GenBank的起始蛋白质序列的总数目,通过TargetP预测的cTP或mTP序列的总数目,和TargetP相对置信水平 $\geq 90\%$ 的cTP或mTP序列的预测的数目。其余栏的数据表示当顺序地且累积地应用以下选择标准时预测的序列的数目:35个氨基酸或更少的序列长度; ≥ 2.0 (对于cTP)或 ≥ 3.5 (对于mTP)的净正电荷;和 ≤ 0 的平均亲水性。由于已知mTP具有相对高的精氨酸浓度并因此具有相对高的净正电荷,因此所选的mTP序列的电荷阈值高于cTP序列(Bhushan, S., 等, The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and miss-sorting, FEBS Letters(2006)580(16):3966-3972)。

[0148] 实施例2-肽的细胞穿透性质和细胞器靶向性质

[0149] 肽合成和标记

[0150] 如本领域中公知的,使用固相Fmoc(苄基甲氧基羰基)化学合成54种候选的细胞器靶向肽(oTP)序列(31种mTP序列和23种cTP序列,各自选自符合以上所列出的全部标准的那些)。使用公知的步骤,使用异硫氰酸荧光素(FITC)在N-末端标记各肽,以有助于通过荧光进行肉眼检测。

[0151] 黑小麦叶肉原生质体分离和纯化

[0152] 在无菌条件下进行原生质体分离和纯化。黑小麦(cv.AC Alta)种子的胚胎的一半用4%次氯酸盐表面灭菌,并接种于基础MS(Murashige和Skoog)培养基上,pH5.82(Murashige T.和Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures(1962)Physiol.Plant15(3):473-497)。在25℃下,在黑暗中将获自六日龄的幼苗的去皮的叶在酶溶液[2%纤维素酶和2%浸解酶(Yakult Honsha Co Ltd, Japan)在CPW(细胞原生质体洗涤液)中的溶液,pH5.6(Frearson EM,Power JB,Cocking EC(1973)Dev Biol33:130-137)]中温育4小时。在室温下,通过在100g下离心3分钟分离原生质体(Eppendorf离心机5810R,USA),用CPW溶液洗涤两次,并通过在21%蔗糖在CPW中的溶液上分层而纯化。将在界面处形成的原生质体带小心地移除,并悬浮于CPW溶液中。用CPW溶液洗涤两次之后,将原生质体密度调节为 10^6 原生质体/ml。

[0153] 烟草原生质体分离和纯化

[0154] 在所有实验之前使烟草(*Nicotiana benthamiana*)植物生长6-8周,并在黑暗中保持24小时。所有移液都使用大孔的微量移液器缓慢地进行,以防止原生质体溶解。在下侧将叶切为许多浅的薄片,取掉中间的叶脉,并在28℃下在15mm Petri培养皿中下侧向下用酶消化溶液[2%纤维素酶和2%浸解酶(Yakult Honsha Co Ltd,Japan)在CPW(细胞原生质体洗涤液)中的溶液,pH5.6(Frearson EM,Power JB,Cocking EC(1973)Dev Biol33:130-137)]温育3-5小时。温育之后,用钳子轻轻地震动叶,以释放任何剩余的原生质体,并将培养基轻轻地通过100 μ m筛过滤并转移入50mL离心管。在4℃下,在300g下将培养基旋转5分钟,并将原生质体的漂浮带自悬浮液顶端移除,再悬浮于W5洗涤溶液(154mM NaCl、125mM CaCl₂·2H₂O、5mMKCl,5mM葡萄糖、0.5M甘露醇,用0.1M KOH调节至pH5.8)中,并在4℃下在300g下旋转3分钟。在15mL离心管中使沉淀在5mL20%麦芽糖上轻轻地分层,并且在300g下离心5分钟。将溶液中心中漂浮的带小心地移除,并用MaMg溶液(15mM MgCl₂、0.1%MES、0.4M甘露醇、用KOH调节至pH5.6)再悬浮,并在4℃下在300g下旋转3分钟。使用血细胞计数器将原生质体悬浮液稀释至100,000细胞/ml。

[0155] 小孢子分离和纯化

[0156] 如Eudes等(Chugh,A.,E.Amundsen,和F.Eudes,Translocation of cell-penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticale microspores.Plant Cell Reports(2009)28(5):801-810)所述,在NPB-99培养基(pH7.0)中由表面灭菌的花药分离中-晚单核阶段的黑小麦(cv.Alta)小孢子。

[0157] MDCK细胞培养物

[0158] 在37℃下,在包含5%CO₂的潮湿气氛中,在包含5%(v/v)胎牛血清(FBS)和1%(v/v)青霉素/链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养MDCK细胞。使用胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(EDTA)将在10-cm皿上生长的细胞分离,并用DMEM/FBS洗涤。通过将100000细胞添加至12-mm直径Transwell™可穿透的支持物(Costar, Cambridge, MA)的顶室而制备用于显微术的细胞。细胞在DMEM/FBS中培养3-5天。

[0159] Caco-2和F1112细胞培养物

[0160] 在37℃下,在包含5%CO₂的95%潮湿气氛中,在包含10%(v/v)胎牛血清(FBS)和50 μ g/ml庆大霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养Caco-2和F1112细胞。细胞在Falcon™25cm²或75cm²细胞培养瓶中生长,直至它们达到融合,随后用0.25%胰蛋白酶和

0.02%EDTA分离,并用DMEM洗涤。

[0161] 通过将1000细胞添加至Nunc盖玻片室(2.5cm²)而制备用于光度细胞成像的配制物。如上所述将细胞培养3至7天。使用上皮细胞盐水(pH7.4)将细胞单层洗涤3次。

[0162] MG细胞培养物

[0163] 在37℃下,在包含5%CO₂的95%潮湿气氛中,在包含20%(v/v)胎牛血清(FBS)和50μg/ml庆大霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养MG细胞。细胞在Falcon™25cm²或75cm²细胞培养瓶中生长,直至它们达到融合,随后用0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA分离,并用DMEM洗涤。

[0164] 通过将1000细胞添加至Nunc盖玻片室(2.5cm²)而制备用于光度细胞成像的配制物。如上所述将细胞培养3至7天。使用上皮细胞盐水(pH7.4)将细胞单层洗涤3次。

[0165] 使用荧光标记的肽温育黑小麦原生质体

[0166] 在室温下,在黑暗中使用180μl荧光标记的mTP或cTP(100μM)将叶肉原生质体(500μl10⁶/ml配制物)温育1小时,随后用CPW溶液洗涤。随后用胰蛋白酶-EDTA(0.25%,Sigma-Aldrich)在CPW中的溶液(1:4)处理5分钟,随后用CPW溶液洗涤,并最终悬浮于CPW溶液中(500μl)。

[0167] 使用荧光标记的肽温育烟草原生质体

[0168] 以20μM的最终浓度将使用灭菌的最优水制备的荧光标记的mTP或cTP(100μM)的储备溶液添加至原生质体悬浮液中。在室温下,在黑暗中将各悬浮液温育1小时。温育之后,添加25%胰蛋白酶EDTA,持续5分钟,并将溶液在120g下离心2分钟。将沉淀再悬浮于新鲜的MaMg培养基中,并添加1.5μl MitoTracker[®]Orange CM-H₂TMRos(M7511,Invitrogen),持续15分钟,随后在120g下离心2分钟。对于共聚焦显微术(Olympus;XY横截面以及XYZ深度图像两者),将原生质体封装在载玻片上的1%低熔点琼脂中(琼脂与原生质体悬浮液的比例为2:1)。

[0169] 使用荧光标记的肽温育小孢子

[0170] 在室温下,在黑暗中使用180μl荧光标记的mTP或cTP(100μM)将小孢子(500μl10⁶/ml配制物)温育1小时,随后使用NPB-99溶液洗涤。随后用胰蛋白酶-EDTA(0.25%,Sigma-Aldrich)在NPB-99中的溶液(1:4)将小孢子处理5分钟,随后用NPB-99溶液洗涤,并最终悬浮于NPB-99溶液(500μl)中。

[0171] 使用荧光标记的肽温育MDCK细胞

[0172] 在室温下,在黑暗中使用80μl荧光标记的mTP或cTP(100μM)和320μl Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)温育在12-mm直径Transwell™可穿透的支持物的顶室中培养的MDCK细胞,随后用400μl DMEM洗涤。

[0173] 使用荧光标记的肽温育Caco-2、F1112和MG细胞

[0174] 将不同浓度的荧光标记的mTP(100μM)添加至上皮细胞盐水,以获得400μl的最终工作体积。添加至如上所述的Caco-2、F1112和MG细胞单层的最终浓度为17μM、9μM和4μM。在37℃下,在黑暗中,在包含5%CO₂的95%潮湿气氛中使用肽温育细胞1小时。在温育期末,使用上皮细胞盐水将细胞单层洗涤三次,并添加500μl上皮细胞盐水。

[0175] 共聚焦显微术

[0176] 使用共聚焦显微镜(Nikon C1,Nikon Canada Inc.或Olympus FluoView™)观察细

胞,以分析荧光的mTP或cTP(激发波长490nm/发射波长520nm)的定位。通过自发荧光识别叶绿体。将荧光染料MitoTracker®Orange CM-H2TMRos(M7511,Invitrogen)用于线粒体染色(激发波长554nm/发射波长576nm)。在10-15nm z-共聚焦平面中收集荧光发射,并使用EZ-C1软件3.6版本(Nikon)或Olympus FluoView™软件2.0b版本(Olympus)分析。

[0177] 光度细胞成像

[0178] 使用光度检测器/细胞成像系统(PTI)对经标记的肽被细胞的吸收进行定量。进行激发扫描以确定是否已发生吸收(通过合适的波长处的峰显示),并确定与未经标记的细胞相比较,量是否以剂量依赖性的方式变化。随后使用约20细胞/视野/重复,在最优化的激发波长和发射波长下进行基于时间的扫描,以对总吸收进行定量。记录视野中显示荧光的细胞的比例。

[0179] 结果

[0180] 在合成的54种候选的用荧光素标记并用黑小麦原生质体温育的肽中,发现10种细胞器靶向肽(oTP)既穿透细胞膜又定位至叶绿体或线粒体之一,如图1A-B和2A-C所示。这10种肽的序列提供于表3和表4中。

[0181] 表3-靶向线粒体的细胞穿透肽

[0182]

mTP	肽电荷	亲水性	肽序列	物种
mTP 1	7	-0.1	MFSYLPRYPLRAASARALVRATRPSYRSALL RYQ (SEQ ID NO: 1)	小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)
mTP 2	4.1	-0.52)	MAAWMRSFLSPLKKLWIRMH (SEQ ID NO: 2)	玉米 (<i>Zea mays</i>)
mTP 3	4	-0.4	MKLLWRLILSRKW (SEQ ID NO: 3)	拟南芥
mTP 4	4	0	MWWRRSRTNSLRYT (SEQ ID NO: 4)	拟南芥
mTP 5	5	0	MLFRLRRSVRLRGLLA (SEQ ID NO: 5)	拟南芥

[0183] 表4-靶向叶绿体的细胞穿透肽

[0184]

cTP	肽电 荷	亲水 性	肽序列	物种
cTP1	2.9	0	MGGCVSTPKSCVGAALR (SEQ ID NO: 6)	拟南芥
cTP2	4.2	0	MQTLTASSSVSSIQRHRPHPAGRRSSSVTFS (SEQ ID NO: 7)	小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)
cTP3	2	-0.1	MKNPPSSFASGFGIR (SEQ ID NO: 8)	稻 (<i>Oryza sativa</i>)
cTP4	2.1	-0.2	MAALIPAIASLPRAQVEKPHPMPVSTRPGLVS (SEQ ID NO: 9)	小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)
cTP5	2	0	MSSPPPLFTSCLPASSPSIRRDSTSGSVTSPLR (SEQ ID NO: 10)	拟南芥

[0185] 还使用共聚焦显微术(Olympus)观察了烟草原生质体中的经标记的oTP穿透细胞膜和定位至叶绿体或线粒体之一。观察到肽mTP2(SEQ ID NO:2)和mTP3(SEQ ID NO:3)定位至线粒体(图3A-D)且发现肽cTP1(SEQ ID NO:6)、cTP2(SEQ ID NO:7)、cTP4(SEQ ID NO:9)和cTP5(SEQ ID NO:10)定位至叶绿体(图4A-D)。

[0186] 还在其他细胞类型中测试了被识别为既具有细胞穿透性质也具有细胞器靶向性质的10种oTP(mTP1-mTP5,表3和cTP1-cTP5,表4),包括分离的小孢子培养物,其为叶肉原生质体的替代性的植物细胞培养物系统,支持整个植物再生。胚性小孢子成为多细胞的且生成胚胎,该胚胎再生成为单倍体或双单倍体植物(José, M. S.-S. 和N.Fernando, How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis, *Physiologia Plantarum*(2008)134(1):1-12)。可以使用核细胞穿透肽小孢子转染方案由小麦和黑小麦的分离的小孢子培养物生成转基因植物(Chugh, A., E. Amundsen, 和F. Eudes, Translocation of cell-penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticale microspores. *Plant Cell Reports*(2009)28(5):801-810)。

[0187] 将表3和4中识别的10种荧光素标记的oTP用黑小麦小孢子温育并且使用上述步骤通过共聚焦显微术(Nikon)对小孢子进行观察。已发现所述10种oTP能够穿透分离的小孢子,如图5A-B和6A-C中所示。

[0188] 还使用Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞温育表3中列举的荧光素标记的mTP,并使用

上述步骤,使用共聚焦显微术(Nikon)观察所述细胞。如图7、8A-C、9A-C和10中所述,在MDCK细胞中,所有测试的mTP都具有细胞穿透性质。观察到mTP1(SEQ ID NO:1)、mTP3(SEQ ID NO:3)和mTP5(SEQ ID NO:5)(图7、8A-C、9A-C)的特异性的线粒体靶向,而观察到mTP2(SEQ ID NO:2)和mTP4(SEQ ID NO:4)(图10)的非特异性的线粒体定位。

[0189] 还使用Caco-2(人结肠上皮细胞系)、F1112(牛结肠细胞系)和MG(牛乳腺)细胞温育表3中列举的荧光素标记的mTP。使用上述步骤,通过光度细胞成像测量经标记的肽的吸收。当检测到适合的信号时,视野中的所有细胞都是发荧光的。表5显示当将细胞暴露于不同浓度(4 μ M、9 μ M或17 μ M)的经标记的肽时,经标记的肽的吸收结果。细胞系的背景自发荧光为约1x10⁵计数/秒。表6显示暴露于17 μ M浓度的经标记的肽的细胞中测量的肽的平均浓度。

[0190] 表5-不同浓度的标记的肽被Caco-2、F1112和MG细胞的吸收

[0191]

肽	重复次数	浓度(μ M)	光度细胞成像 (平均计数/秒)		
			Caco-2	F1112	MG
mTP1	3	17	1600000	1200000	1900000
	3	9	1200000	560000	1800000
	3	4	200000	330000	400000

[0192]

肽	重复次数	浓度(μM)	光度细胞成像 (平均计数/秒)		
			Caco-2	F1112	MG
mTP2	3	17	490000	1700000	1500000
	3	9	420000	1800000	160000
	3	4	340000	450000	140000
mTP3	3	17	1600000	1300000	1500000
	3	9	1200000	1100000	1000000
	3	4	460000	350000	430000
mTP4	3	17	1600000	3500000	1400000
	3	9	1200000	300000	1200000
	3	4	300000	250000	430000
mTP5	3	17	1600000	1600000	1600000
	3	9	650000	2000000	1400000
	3	4	280000	440000	440000

[0193] 表6-暴露于17 μM 浓度的经标记的肽的Caco-2、F1112和MG细胞中测量的经标记的肽的平均浓度

[0194]

肽	重复次数	平均浓度 (nM)		
		Caco-2	F1112	MG
mTP1	3	70	49	78
mTP 2	3	20	70	62
mTP 3	3	60	53	62
mTP 4	3	60	144	58
mTP 5	3	60	60	60

[0195] 实施例3-肽的DNA结合性质

[0196] 使用凝胶迁移率变动分析和核酸酶保护分析,测试识别为既具有细胞穿透性质又具有靶向细胞器性质的10种未经标记的oTP序列(表3和4)的非共价地与核酸结合的能力。这些分析的结果示于下表7中。

[0197] 凝胶迁移率变动分析

[0198] 使用凝胶迁移率变动分析测定与质粒DNA结合并导致其在电泳期间迁移所需的最小的肽浓度。根据经计算的逐渐增加的肽:DNA电荷比例(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1等)将经纯化的线性质粒DNA(100ng线性双链DNA,6.8kb)与浓度逐渐增加的表3和4中列举的10种oTP中的每一种混合,直至电泳期间观察到质粒DNA完全的迁移。在无菌水中将DNA制备为100ng/ μ l的最终浓度。各反应的最终体积为25 μ l,并且为了复合物形成而温育30分钟,并在用溴化乙锭染色的1%琼脂糖凝胶上进行电泳。

[0199] 核酸酶保护分析

[0200] 如凝胶迁移率变动分析所述,将表3和4中列举的10种oTP与质粒DNA混合。对于核酸酶保护分析,将5 μ l DNA酶I(无RNA酶的DNA酶集;Qiagen,Valencia,CA,USA)添加至混合物体积(50 μ l)。将混合物在室温下温育15分钟,并随后在冰上温育5min。质粒-肽解离和质粒纯化使用可商购的DNA纯化试剂盒(QIAquickTMPCR纯化试剂盒;Qiagen)进行。DNA在无菌水中洗脱。对6 μ l的等分试样进行1%琼脂糖凝胶电泳。

[0201] 表7-细胞器靶向肽-DNA结合性质

[0202]	肽	肽电	亲水性	肽 : DNA 比例	核酸酶
--------	---	----	-----	------------	-----

[0203]

			摩尔结 合比例	测试的 最高比 例	
cTP1 (SEQ ID NO: 6)	2.9	0	-	775:1	+
cTP2 (SEQ ID NO: 7)	4.2	0	-	975:1	+
cTP3 (SEQ ID NO: 8)	2	-0.1	-	1400:1	-
cTP4 (SEQ ID NO: 9)	2.1	-0.2	-	2050:1	-
cTP5 (SEQ ID NO: 10)	2	0	-	1775:1	-
mTP1 (SEQ ID NO: 1)	7	-0.1	264.14	800:1	+
mTP2 (SEQ ID NO: 2)	4.1	-0.5	167.39	800:1	+
mTP3 (SEQ ID NO: 3)	4	-0.4	71.39	2650:1	+
mTP4 (SEQ ID NO: 4)	4	0	-	2700:1	+

肽	肽电 荷	亲水性	肽 : DNA 比例		核酸酶 保护
			摩尔结 合比例	测试的 最高比 例	
[0204] mTP5 (SEQ ID NO: 5)	5	0	114.29	2050:1	+

[0205] 结果

[0206] 如表7中所示,在电泳期间,5种mTP肽中的4种导致DNA迁移率变动,表明发生与DNA的结合。表7中列举的其余oTP在测试的肽:DNA比例下未显示出迁移率变动。此外,核酸酶保护分析的结果显示具有 ≥ 2.9 的阳离子电荷的细胞器靶向肽防止DNA被核酸酶分解。此数据表明阳离子电荷为 ≥ 2.9 的oTP具有以非共价的方式与DNA结合的能力,暗示这样的肽能够被用于将核酸递送至特定的植物细胞细胞器。

[0207] 实施例4-肽的DNA递送性质

[0208] 使用oTP-GFP报告基因构建体转染分析测试表3和4中列举的10种未经标记的oTP将生物学活性的DNA递送至叶绿体或线粒体的能力。将oTP与编码拟南芥绿色荧光蛋白(GFP)的双链(ds)DNA构建体混合以形成复合物。形成的质粒-肽纳米复合物用黑小麦叶肉原生质体、小孢子、或MDCK、Caco-2、F1112或MG细胞温育。通过共聚焦显微术和/或光度细胞成像的荧光信号的检测将表明dsDNA已被输送至细胞器中并且已发生GFP的瞬时表达。此外,可以使用定量实时PCR测量基因表达,以确定gfp mRNA丰度。

[0209] 用于在线粒体中表达的dsDNA构建体

[0210] 小麦线粒体aadA16GFP报告基因质粒(pWMaadA16GFP,图11)为4587个碱基对的小麦特异性的线粒体转化载体,其靶向插入trnfM和rrn18基因簇之间的第四重复区域,其在大小麦线粒体基因组中重复三次。插入位点在大小麦线粒体基因组中,在核苷酸300805-300878和300880-302834处(GenBank登录号AP008982.1)。多克隆位点在trnfM靶插入序列后引入。选择标记基因为细胞器密码子特异性aad-gfp融合基因,其通过aadA衍生物和通过GFP荧光的肉眼检测而有助于壮观霉素耐药的双重选择方法(GenBank登录号ABX39486;Khan和Maliga,Nat Biotechnol.(1999Sep)17(9):910-5)。选择标记基因由小麦线粒体atpA基因启动子(GenBank登录号X54387.1)驱动。aad-gfp融合基因以源自小麦线粒体基因组核苷酸62871-62565处的TpsbA终止子序列(GenBank登录号AP008982.1)为末端。

[0211] 用于在叶绿体中表达的dsDNA构建体

[0212] 小麦叶绿体aadA16GFP报告基因质粒(pWCaadA16GFP,图12)为4212个碱基对的小麦特异性的质体转化载体,其靶向插入小麦质体基因组核苷酸92850-93727和93794-94671处(GenBank登录号AB042240.3)的trnI-trnA反向重复区域。多克隆位点在trnI靶插入序列后引入。选择标记基因为细胞器密码子特异性aad-gfp融合基因,其通过aadA衍生物和通过GFP荧光的肉眼检测而有助于壮观霉素耐药的双重选择方法(GenBank登录号ABX39486;Khan和Maliga,NatBiotechnol.(1999Sep)17(9):910-5)。选择标记基因由核苷酸1282-

1153处的小麦质体基因组启动子(psbA)(GenBank登录号AB042240.3)驱动。aad-gfp融合基因以源自叶绿体转化载体pVSR326核苷酸4014-4387的稻psbA终止子序列(GenBank登录号AF527485.1)为末端。

[0213] 使用gfp报告基因的原生质体转化

[0214] 在终体积为100 μ l的CPW溶液中将dsDNA构建体(对于线粒体表达为pWMaadA16GFP,或对于叶绿体中表达为pWCaadA16GFP)与mTP(对于线粒体表达)或cTP(对于叶绿体中表达)合并。对于使用mTP1(SEQ ID NO:1)、mTP2(SEQ ID NO:2)、mTP3(SEQ ID NO:3)、或mTP5(SEQ ID NO:5)的实验,将肽(由100ng放大,为在凝胶迁移率变动分析中导致DNA迁移所需的浓度的四倍(表7))与pWMaadA16GFP构建体组合(5 μ g)。对于使用其余oTP的实验,将肽(30 μ g)与适合的dsDNA构建体(1.5 μ g)组合。将混合物在室温下温育10分钟,随后在室温下在黑暗中用分离的黑小麦叶肉原生质体(500 μ l,10⁶原生质体/ml,如实施例2中所述制备)温育1小时。添加CPW溶液(500 μ l)并且将混合物在黑暗中温育24h。如实施例2中所述,使用共聚焦显微术使细胞成像,使用MitoTracker®Orange染色以使线粒体和叶绿素自发荧光可视化,以使叶绿体可视化。

[0215] 使用gfp报告基因的小孢子转化

[0216] 在终体积为100 μ l的NBP-99溶液中,以上述原生质体转化试验中使用的量将dsDNA构建体(对于线粒体表达为pWMaadA16GFP,或对于叶绿体中表达为pWCaadA16GFP)与mTP(对于线粒体表达)或cTP(对于叶绿体中表达)合并。将混合物在室温下温育10分钟,随后在室温下在黑暗中用分离的黑小麦小孢子(500 μ l,10⁶小孢子/ml,如实施例2中所述制备)温育1小时。添加NBP-99溶液(500 μ l),并且将混合物在黑暗中温育24h。如实施例2中所述,使用共聚焦显微术使细胞成像,使用MitoTracker®Orange染色以使线粒体可视化。

[0217] 使用gfp报告基因的MDCK细胞转化

[0218] 在终体积为100 μ l的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中,以上述原生质体转化试验中使用的量将dsDNA构建体(pWMaadA16GFP)与mTP合并。在室温下将混合物温育10分钟,随后在包含5%CO₂的潮湿的气氛中,在37℃下,在300 μ l DMEM中用MDCK细胞(如实施例2中所述制备)温育24小时。如实施例2中所述,使用共聚焦显微术使细胞成像,使用MitoTracker®Orange染色以使线粒体可视化。

[0219] 使用gfp报告基因的Caco-2、F1112和MG细胞转化

[0220] 将dsDNA构建体(pWMaadA16GFP,100 μ l储备溶液,5 μ g)与mTP1(SEQ ID NO:1)或mTP4(SEQ ID NO:4)(100 μ l未经标记的储备,500 μ g)组合,并在37℃下温育15分钟。将800 μ l DMEM的等分试样添加至混合物,并且随后将100 μ l的此混合物添加至具有500 μ l完全培养基的各细胞单层(如实施例2中所述制备)。在包含5%CO₂的潮湿的气氛中,在37℃下将细胞温育24至72小时。如实施例2中所述,使用光度检测器/细胞成像系统(PTI)在40小时时测量GFP报告基因的吸收和表达。还如实施例2中所述使用共聚焦显微术使细胞成像,使用MitoTracker®Orange染色以使线粒体可视化。

[0221] 由转染的小孢子提取RNA

[0222] 使用清洁的陶瓷珠使小孢子破裂,并且在组织解冻时剧烈振荡。添加RLT缓冲剂/B-Me(450 μ l)并将样品涡旋。将样品在55℃下加热1分钟,并再次涡旋。使用RNeasy™Plant Mini Kit(Qiagen)提取RNA,将柱上DNA酶I消化引入方案。最终的洗脱体积为40 μ l。使用琼

脂糖凝胶色谱(以确定RNA是完整的)和分光光度法(用于定量)两者评价RNA。

[0223] cDNA合成

[0224] 使用First Strand Synthesis kit(Invitrogen)生成cDNA。将RNA(1 μ g)添加至各样品,并且遵循制造商的合成方案,例外之处在于反应混合物的体积由20 μ l增加至30 μ l。在cDNA合成中使用包含所有的试剂但不包含RNA的negRT样品作为阴性对照。

[0225] 实时PCR

[0226] 对于延伸因子1a(EF1a)(内对照)和绿色荧光蛋白(GFP)(测试)基因两者生成标准曲线。通过将6 μ l各cDNA样品(不包括negRT对照)池化,随后对于另外5次稀释进行0.5的连续稀释生成EF1a曲线。使用用于转染的质粒DNA(13ng/ μ l质粒,其中3 μ l(40ng)用于PCR反应,随后对于另外5个样品进行0.5的连续稀释)生成GFP标准曲线。

[0227] 使用QuantiTectTMSYBRTMGreen PCR Master Mix(Qiagen),在20 μ l反应体积中进行实时PCR反应。各样品一式三份进行反应,各反应使用3 μ l模板。如下进行循环:95 $^{\circ}$ C持续15分钟,94 $^{\circ}$ C持续15秒重复40次,58 $^{\circ}$ C持续30秒,72 $^{\circ}$ C持续30秒。PCR反应完成之后运行解离曲线。将各样品的三个数据点平均,计算标准偏差。通过绘制平均CT值对各样品中的DNA的量的log的曲线而产生标准曲线,使得可以评价各引物集的PCR有效性。将引物集以可比的有效性扩增,使得可以直接地比较CT值。

[0228] 结果

[0229] 如图13A-C和14A-C所述,mTP4(SEQ ID NO:4)和mTP2(SEQ ID NO:2)能够介导黑小麦叶肉原生质体的线粒体的转染。通过共聚焦显微术观察到线粒体为绿色荧光,表明mTP转染的原生质体中的线粒体正在表达GFP。还通过如实施例2中所述进行光度细胞成像,在存在mTP1(SEQ ID NO:1)和mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下在用线粒体gfp-报告基因构建体转染的Caco-2、F1112和MG细胞的线粒体中检测到GFP的表达。然而,如表8中所示,通过在存在mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下转染观察到的信号强度弱,并且未观察到荧光。相反,通过在存在mTP1(SEQ ID NO:1)的情况下转染观察到的信号强度高于通过在存在mTP4(SEQ ID NO:4)的情况下转染观察到的信号强度,且在所有细胞中都观察到荧光。经转染的Caco-2和F1112细胞的共聚焦成像确认gfp表达在线粒体的定位(图15和16)。表8-Caco-2、F1112和MG细胞系中gfp表达的检测

[0230]

肽	重复次数	光度细胞成像 (平均计数/秒)		
		Caco-2	F1112	MG
mTP1 (SEQ ID NO:	3	2000000	1900000	1900000

[0231]

1)				
mTP4 (SEQ ID NO: 4)	3	570000	650000	650000

[0232] 此外,定量实时PCR(qRT-PCR)分析确认GFP由在存在mTP1(SEQ ID NO:1)、mTP2(SEQ ID NO:2)、mTP3(SEQ ID NO:3)、mTP4(SEQ ID NO:4)或mTP5(SEQ ID NO:5)的情况下用gfp报告基因构建体转染的小孢子和原生质体的线粒体表达。与内对照延伸因子1a(EF1a)mRNA的丰度相比较,获自经转染的线粒体的标准化的gfp mRNA丰度在小孢子中显示0.1-0.7倍的增长(平均4次重复试验)(图17)和在原生质体中显示32-159倍的增长(平均4次重复试验)(图19)。此外,定量实时PCR(qRT-PCR)分析确认GFP由在存在cTP1(SEQ ID NO:6)、cTP2(SEQ ID NO:7)、cTP3(SEQ ID NO:8)、cTP4(SEQ ID NO:9)或cTP5(SEQ ID NO:10)的情况下各自用gfp报告基因构建体转染的小孢子的前质体和原生质体的叶绿体表达。与内对照延伸因子1a(EF1a)mRNA的丰度相比较,获自经转染的前质体的标准化的gfp mRNA丰度在小孢子中显示0.10-0.37倍的增长(平均4次重复试验)(图18),且获自经转染的叶绿体的标准化的gfp mRNA丰度在原生质体中显示24-122倍的增长(平均4次重复试验)(图20)。

[0233] 实施例5-由经转化的小孢子的繁殖植物

[0234] 在存在mTP1(SEQ ID NO:1)的情况下用线粒体报告基因质粒WMaadAGFP(实施例4)或在存在cTP1(SEQ ID NO:6)的情况下用叶绿体报告基因质粒WCaadAGFP(实施例4)转染分离自黑小麦栽培变种Ultima的小孢子。植物由经转化的小孢子再生,并且在壮观霉素选择下生长,并通过定量PCR表征以测量经转染的线粒体或叶绿体中的绿色荧光蛋白(GFP)DNA的拷贝数。在没有壮观霉素选择压力的土壤中培养对于aadA-gfp转染呈阳性的植物,以测试返祖现象。生成的植物的特征示于下表9中。

[0235] 小孢子分离

[0236] 在层流洁净工作台中使用剪刀去除黑小麦栽培变种Ultima的芒。使用10%漂白剂(5.25%次氯酸钠)将穗状花序(8穗状花序用于小孢子分离,4穗状花序用于提供子房)灭菌3分钟,并在持续搅拌下用灭菌的重蒸馏水洗涤4次,持续1分钟。将外部的颖移除,并在4℃下将获自8穗状花序的小花无菌地剥离并转移至无菌的且冷冻的包含50ml过滤灭菌的提取溶液(0.4M甘露醇、GEM(单子叶植物的胚萌发)大分子盐(F.Eudes, S.Acharya, A.Laroche, L.B.Selinger&K.-J.Cheng. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture(2003)73:147-157)、10mM2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、和100mM Fe-EDTA, pH6.5)液体培养基的110ml Waring搅拌杯(VWR international, #58983-093)。将小花在低速(18000rpm)下混合两次,持续7秒。将悬浮液通过1mm筛,随后通过100μm灭菌筛(VWR International, #CA21008-950)倾倒入两个50ml离心管(各自为25ml)。在4℃下用50ml提取溶液洗涤搅拌杯,并通过100μm筛倾倒入并添加至50ml管中的第一等分试样中。随后通过使用浮筒式转头通过离心(4℃下, 100x g, 持续5分钟)沉淀细胞。将上清液倒出,并且在一个50ml管中将小孢子沉淀合并并再悬浮于50ml冷提取溶

液中。使用离心(4℃下,100x g,持续5分钟)再次沉淀细胞,将上清液倒出,并将沉淀转移(约5ml)至15ml管。将沉淀再悬浮于15ml诱导培养基中(补充有2 μ M谷胱甘肽和10mg/l Larcol1™(阿拉伯半乳聚糖)的NPB-99溶液)并在与上述条件相同的条件下洗涤和离心。将上清液倒出,并将沉淀再悬浮于5至6ml 20%麦芽糖中,随后在麦芽糖的顶端小心地层叠1ml诱导培养基,并将管在100g下离心13分钟(麦芽糖梯度纯化)。在界面处形成小孢子带,将其收集于新的15ml管中。管中充满诱导培养基,并将管在150g下再次离心5分钟。将上清液倒出,并将细胞悬浮,总体积为1.4ml。对于每次小孢子提取和纯化,使用血细胞计数器测定细胞的浓度。每次小孢子提取允许生成15至20个实验单元。

[0237] dsDNA-oTP复合物的制备:

[0238] 使用用于细胞器转染的质粒pWMaadA16GFP和pWCaadA16GFP(实施例4)进行中量制备。根据NEB(New England Biolabs)指导,使用A_{vr}II和SpeI限制性内切酶将pWMaadA16GFP双酶切,使用A_{at}II和X_{mn}I限制性内切酶将pWCaadA16GFP双酶切。将基因组(dsDNA)凝胶纯化。

[0239] 对于线粒体转染,在1.5mL微型离心管中,在100 μ L中将1.5 μ gpWMaadA16GFP dsDNA和7.5 μ g mTP1(SEQ ID NO:1)混合在一起。对于叶绿体转染,在1.5mL微型离心管中,在200 μ L中将1.5 μ gpWCaadA16GFP dsDNA和30 μ g cTP1(SEQ ID NO:6)混合在一起。在使用前将复合物在RT下温育15分钟。

[0240] 小孢子转染

[0241] 将dsDNA-oTP复合物(100或200 μ l)添加至小孢子,轻轻地混合,并用复合物温育15分钟。添加100 μ l诱导培养基(补充有2 μ M谷胱甘肽和10mg/l Larcol1™(阿拉伯半乳聚糖)的NPB-99溶液),并将混合物在RT下温育45分钟。使用诱导培养基将经转染的小孢子洗涤一次,离心,并且移除上清液。将不包含DNA和纳米载体的对照处理应用至获自经纯化的各小孢子批次的两个试验单元。如F.Eudes和E.Amundsen, Isolated microspore culture of Canadian6 • triticale cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture(2005)82: 233-241中所述重新取得小孢子培养物。

[0242] 经转化的植物的再生

[0243] 将经转染的小孢子移液(0.2ml)入各自包含含10%Ficoll™的3.3ml诱导培养基的35x10mm Petri培养皿中。将直接地取自黑小麦栽培变种Ultima植物的灭菌的穗状花序的4或5个子房添加至包含小孢子的各皿中。用Parafilm™将皿密封,并将皿置于包含无菌蒸馏水的敞口50mm Petri培养皿周围的150mm Petri培养皿中。还使用Parafilm™将150mm皿密封,并且在25℃下在黑暗中温育20至30天。自Petri培养皿移除大于0.5mm的胚胎,并将所述胚胎置于GEM培养基上(20ml,在10cm Petri培养皿中)(F.Eudes, S.Acharya, A.Laroche, L.B.Selinger&K.-J.Cheng. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture(2003)73:147-157)。再次用Parafilm™密封Petri培养皿,并在16℃的室温下将所述培养皿置于递送80 μ m²s⁻¹(16h灯光周期)的SylvaniaGro-lux™宽光谱灯泡(40瓦)下方30cm。一旦胚胎变绿,就在相同的条件下,将其无菌地转移至在Magenta™Vessels(VWR International)中的50ml生根培养基上(F.Eudes, S.Acharya, A.Laroche, L.B.Selinger&K.-J.Cheng. A novel method to induce

direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2003) 73:147-157)。一旦植物达到2-3叶发育阶段并且具有足够的根生长,则将其移植至土壤中(4x8 Spencer-Lemaire Roottrainer™; Spencer-Lemaire Industries Ltd., Edmonton),并且在与母本植株相同的条件下置于生长室中。开花期之后两周,通过检查种组估测多倍性程度。

[0244] 抗生素选择

[0245] 对小孢子培养物的经选择的批次和土壤中生长的绿色植物应用壮观霉素选择。在批次1中,在3周时,使用补充有200 μ l PPM™的200ml液体GEM培养基将发育中的胚胎移植至RITA™箱半自动浸渍培养系统,并添加200或400mg/L壮观霉素。在批次2中,在培养开始时,对小孢子施用100mg/L壮观霉素的第一次剂量。在3-4周时,将发育中的多细胞结构移植至RITA™箱半自动浸渍培养系统中,并且将壮观霉素浓度增加至200mg/L。两周后,用补充有200 μ l PPM™的新鲜的液体GEM(200ml)替换培养基,并以400mg/L应用第三次剂量的壮观霉素。在高选择压力下另外两周之后,将发芽的(绿色的和杂色的)小植物移植至Roottrainers™。对于源自批次1和2的植物,在土壤中未应用壮观霉素选择性压力。

[0246] 在随后的批次中,在培养开始时,对小孢子施用50mg/L壮观霉素的第一次剂量。在3-4周时,将发育中的多细胞结构移植至RITA™箱半自动培养系统中,并且将壮观霉素浓度增加至100mg/L。两周后,用补充有200 μ l PPM™的新鲜的液体GEM(200ml)替换培养基,并添加200mg/L的第三次剂量的壮观霉素。在另外两周之后,将发芽的(绿色的和杂色的)小植物移植至Roottrainers™。随后,以400mg/L壮观霉素的浓度,向土壤中应用壮观霉素选择性压力。连续地使用400mg/L壮观霉素溶液自底部对土壤中培养的植物进行浇水。

[0247] 自再生的绿色植物提取物基因组DNA和RNA

[0248] 使用清洁的陶瓷珠使叶样品破裂,并且在组织解冻时剧烈振荡。添加RLT缓冲剂/B-Me(450 μ l)并将样品涡旋。将样品在55℃下加热1分钟,并再次涡旋。使用AllPrep™DNA/RNA Mini Kit(50)(Qiagen)提取RNA,将柱上DNA酶I消化引入方案。最终的洗脱体积为40 μ l。使用琼脂糖凝胶电泳(以确定RNA是完整的)和分光光度法(用于DNA和RNA的定量)两者评价RNA。

[0249] 用于测定拷贝数的SYBR™Green qPCR分析

[0250] 如实施例4中所述进行SYBR™Green实时PCR分析。对于此引物集,将测定的CT值拟合至标准曲线,并使用曲线公式计算相对于输入DNA的拷贝数。通过以一系列6个1/10稀释的样品稀释线粒体或叶绿体报告基因质粒(实施例4)而生成标准曲线。线粒体报告基因质粒的标准曲线中的拷贝的范围为882,352/ μ l至0.8/ μ l。叶绿体报告基因质粒的标准曲线中的拷贝的范围为234,042/ μ l至0.2/ μ l。所有的基因组DNA样品都经过分光光度计定量,并制备用于实时的样品,使得所有的反应都包含2X SYBR™Green QuantiTect™ Master Mix (Qiagen)(12.5 μ l)、Gfp4L Fwd引物(10 μ M, 1 μ l)、Gfp4R Rev引物(10 μ M, 1 μ l)、和DNA(200ng, 11 μ l)。所有的生物学样品都重复三次。如下进行循环:95℃持续15分钟,95℃持续15秒重复35次,60℃持续30秒,72℃持续30秒。将得到的C_T值平均。计算每个样品的三次重复的标准偏差,并弃去异常值。通过绘制各样品中平均C_T值对DNA的量的log的曲线生成标准曲线。将平均C_T值拟合至通过各质粒的回归曲线而生成的公式($y=mx+b$)。对于线粒体报告基因标准

曲线,等式为 $y=-3.4845x+43.742$,且 R^2 的值为0.992。对于叶绿体标准曲线,等式为 $y=-3.256x+45.469$,且 R^2 的值为0.9705。随后将得到的log值转化至实际的拷贝,并将此值与各200ng样品中的背景DNA的总拷贝数相比较。使用下式计算200ng中的拷贝:

[0251] bp Ultima的数目(19,000Mb) \times 660g/摩尔(bp的重量) \times 109ng/g。

[0252] 用于测定拷贝数的Taq Man qPCR分析

[0253] 使用7900HT Fast Real Time PCR系统(Applied Biosystems)和Qiagen化学,在96孔板中进行实时PCR反应。使用FAMTM在5'末端标记用于gfp基因的TaqMan探针;使用VICTM在5'末端标记用于pKABA1基因的探针。两种探针都使用四甲基罗丹明(TAMRATM)在3'末端标记作为猝灭剂分子。对于各反应,添加2 μ l DNA、12.5 μ l 2XTaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystem,Foster City,CA)、0.4 μ M gfp和PKABA1引物和200nM各双标记的探针,并用H₂O使反应达到25 μ l的终体积。如下进行PCR:95 $^{\circ}$ C下10分钟,95 $^{\circ}$ C下1分钟40循环,58 $^{\circ}$ C下1分钟。所有反应都重复进行两次,且对于两种生物学样品进行所有反应。使用公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算拷贝数。校准样品的 ΔC_T 值的调整为-1反映了如下事实:内对照基因(PKABA)仅通过小麦基因组A和B对于黑小麦的贡献而显示。黑麦基因组R不包含此基因(单倍体基因组的2/3染色体组具有PKABA基因)。标准曲线还通过目标模版和基因组DNA的连续稀释,以及基因组DNA的目标基因稀释而建立。测定各引物集的PCR有效性、引物的动态范围、和多重反应中是否存在引物竞争。在各qPCR运行中还包括校准样品。

[0254] 结果

[0255] 由经转染的小孢子产生的植物的列表提供于表9中。产生绿色的、白化的、和杂色的植物。在其中在施肥之后三周末将胚胎暴露于壮观霉素的批次1中,在再生的植物中可以观察到更高丰度的杂色的表型。随后的批次主要产生绿色的植物和白化的植物的混合。在开始移植至土壤(RootainersTM)之时通过qPCR对获自批次1和2的单倍体和双单倍体黑小麦植物进行表征。获自批次1和2的一些黑小麦系通过qPCR(使用SYBRTMGreen方法或Taq Man方法之一)被识别为具有细胞器基因组中的报告基因的整合的阳性指征。在不存在壮观霉素选择压力的情况下将获自批次2的植物在土壤中培养,并且如通过qPCR测量的拷贝数减少以及此时细胞质保持异源胞质(heteroplasmic)的证据所示,发现其在1个月之后已出现返祖。

[0256] 表9-通过小孢子的转染产生的黑小麦单倍体植物

[0257]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
有 400 选择的对 照-01	1	-	0			死亡
有 400 选择的对 照-02	1	-	0			杂色的
有 400 选择的对 照-03	1	-	0.5			死亡
有 400 选择的对 照-04	1	-	0.2			死亡
有 400 选择的对	1	-	0			杂色的

[0258]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
照-05						
有 400 选择的对照-06	1	-	0			死亡
有 400 选择的对照-07	1	-	0			死亡
有 400 选择的对照-08	1	-	0			杂色的
无选择的对照-01	1	-	0.6			杂色的
无选择的对照-02	1	-	0.2			杂色的
无选择的对照-03	1	-	0.3			杂色的
GE-T0-Wc200-01	1	叶绿体	1.8			杂色的
GE-T0-Wc200-02	1	叶绿体	0			杂色的
GE-T0-Wc200-03	1	叶绿体	0.2			杂色的
GE-T0-Wc200-04	1	叶绿体	0.2			杂色的
GE-T0-Wc400-01	1	叶绿体	0.9			杂色的
GE-T0-Wc400-02	1	叶绿体	0.6			死亡
GE-T0-Wc400-03	1	叶绿体	0			死亡
GE-T0-Wm200-01	1	线粒体	0			死亡
GE-T0-Wm200-02	1	线粒体	0			死亡
GE-T0-Wm200-03	1	线粒体	0			死亡
GE-T0-Wm200-04	1	线粒体	0			死亡
GE-T0-Wm400-01	1	线粒体	0			杂色的
GE-T0-Wm400-02	1	线粒体	0.3			死亡

[0259]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
GE-T0-Wm400-03	1	线粒体	0			死亡
GE-T0-Wm400-04	1	线粒体	0			死亡
有选择的对照-01	2	-		0	0	杂色的
有选择的对照-02	2	-		0		死亡
无选择的对照-04	2	-		0	0	杂色的
GE-T0-Wc-01	2	叶绿体		1	0	杂色的
GE-T0-Wc-02	2	叶绿体		1		死亡
GE-T0-Wc-03	2	叶绿体		1		死亡
GE-T0-Wc-04	2	叶绿体		805	6.3	绿色的且健康的
GE-T0-Wc-05	2	叶绿体		1		死亡
GE-T0-Wc-06	2	叶绿体		12	0	杂色的
GE-T0-Wc-07	2	叶绿体		555	2.3	绿色的且健康的
GE-T0-Wc-08	2	叶绿体		1137	0	绿色的且健康的
GE-T0-Wc-09	2	叶绿体		5	0	杂色的
GE-T0-Wc-10	2	叶绿体		1	0	杂色的
GE-T0-Wc-11	2	叶绿体		1	0	杂色的
GE-T0-Wc-12	2	叶绿体		2	0	杂色的
GE-T0-Wm-01	2	线粒体		261	0	绿色的且健康的

[0260]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土壤中 1 个月)	
GE-T0-Wm-02	2	线粒体		12	0	绿色的且健康的
GE-T0-Wm-03	2	线粒体		8		死亡
GE-T0-Wm-04	2	线粒体		281	0.1	绿色的且健康的
GE-T0-Wm-05	2	线粒体		485	0.3	绿色的且健康的
GE-T0-Wm-06	2	线粒体		311	0.1	绿色的且健康的
GE-T0-Wm-07	2	线粒体		3	0	杂色的
GE-T0-Wm-08	2	线粒体		3	0	杂色的
GE-T0-Wm-09	2	线粒体		8	0	杂色的
无存活的植物	3					所有植物均为白化的 - 少数植物
有选择的对照-03	4	-				死亡
有选择的对照-04	4	-				死亡
有选择的对照-05	4	-				死亡
有选择的对照-06	4	-				死亡
有选择的对照-07	4	-				死亡
有选择的对照-08	4	-				死亡
有选择的对照-09	4	-				杂色的
有选择的对照-10	4	-				杂色的

[0261]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
有选择的对照-11	4	-				杂色的
有选择的对照-12	4	-				杂色的
有选择的对照-13	4	-				杂色的
有选择的对照-14	4	-				杂色的
有选择的对照-15	4	-				杂色的
有选择的对照-16	4	-				杂色的
有选择的对照-17	4	-				死亡
有选择的对照-18	4	-				死亡
GE-T0-Wc-13	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-14	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-15	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-16	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-17	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-18	4	叶绿体				绿色的且健 康的
GE-T0-Wc-19	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-20	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-21	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-22	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-23	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-24	4	叶绿体				杂色的
GE-T0-Wc-25	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-26	4	叶绿体				死亡

[0262]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
GE-T0-Wc-27	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-28	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wc-29	4	叶绿体				死亡
GE-T0-Wm-10	4	线粒体				绿色的且健 康的
GE-T0-Wm-11	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-12	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-13	4	线粒体				绿色的且健 康的
GE-T0-Wm-14	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-15	4	线粒体				杂色的
GE-T0-Wm-16	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-17	4	线粒体				杂色的
GE-T0-Wm-18	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-19	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-20	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-21	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-22	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-23	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-24	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-25	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-26	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-27	4	线粒体				死亡

[0263]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
GE-T0-Wm-28	4	线粒体				绿色的且健康的
GE-T0-Wm-29	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-30	4	线粒体				杂色的
GE-T0-Wm-31	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-32	4	线粒体				绿色的且健康的
GE-T0-Wm-33	4	线粒体				绿色的且健康的
GE-T0-Wm-34	4	线粒体				绿色的且健康的
GE-T0-Wm-35	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-36	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-37	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-38	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-39	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-40	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-41	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-42	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-43	4	线粒体				绿色的且健康的
GE-T0-Wm-44	4	线粒体				绿色的且健康的

[0264]

植物名称	批次	转染的目标细胞器	实时 PCR 筛选 (gfp 拷贝 / 基因组)			在土壤中 1-2 个月之后的 表型
			SYBR™ Green	Taq Man 1	Taq Man 2 (在土 壤中 1 个月)	
GE-T0-Wm-45	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-46	4	线粒体				绿色的且健 康的
GE-T0-Wm-47	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-48	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-49	4	线粒体				死亡
GE-T0-Wm-50	4	线粒体				死亡

[0265] 本发明所述的实施方案意图为说明性的而非限定性的。意图包括对本发明技术人员显而易见的各种修改。权利要求的范围不应受此处所述的实施方案的限制，而应得到符合对整个说明书的最广泛的解释。

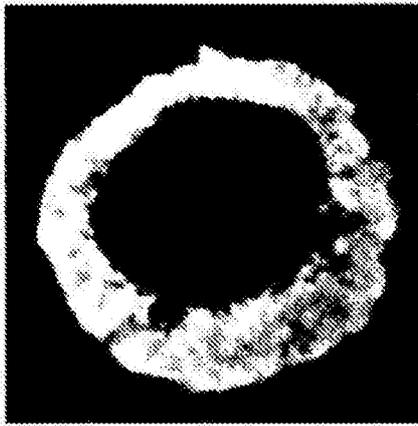


图1A

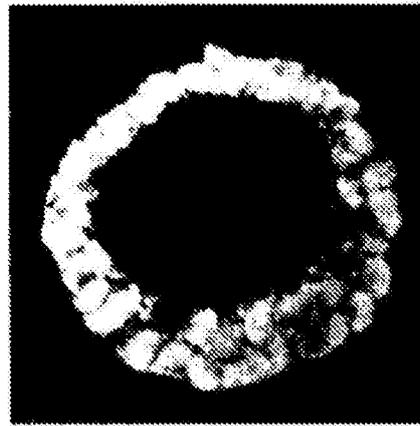


图1B

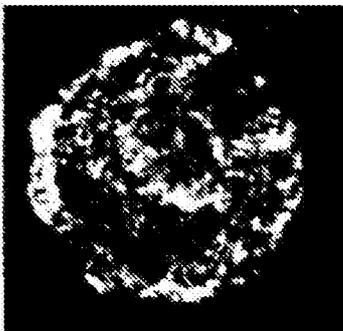


图2A

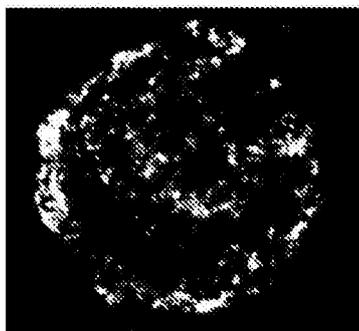


图2B

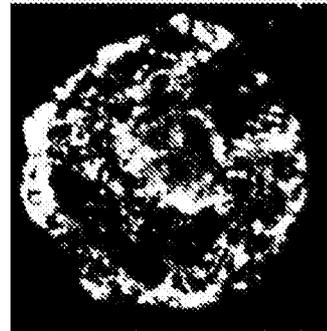


图2C

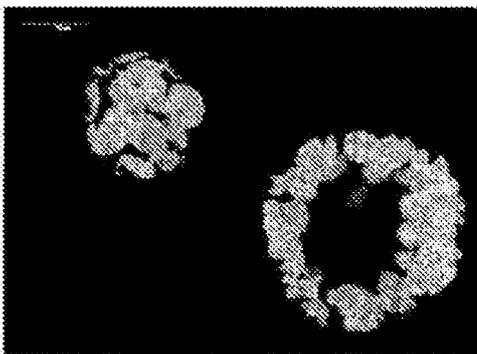


图3A

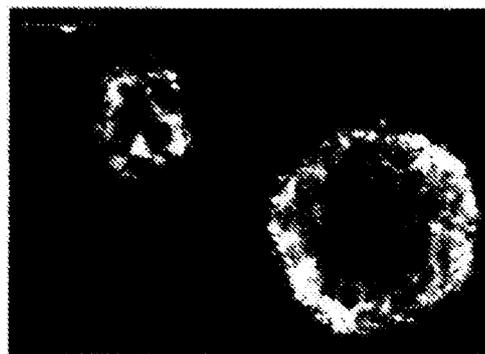


图3B

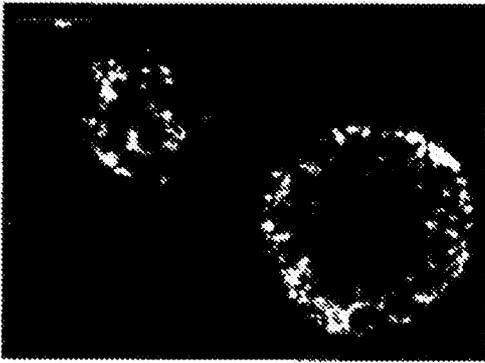


图3C

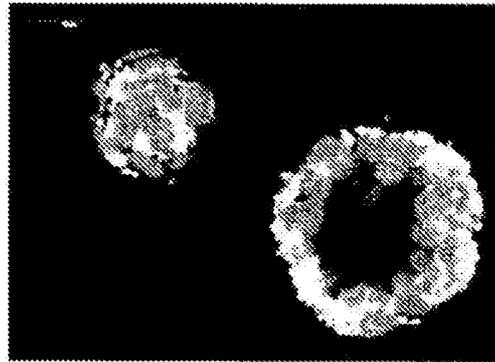


图3D

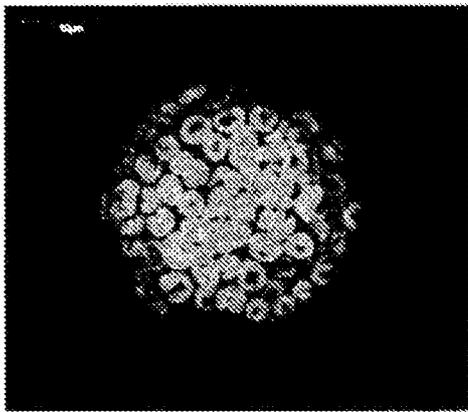


图4A

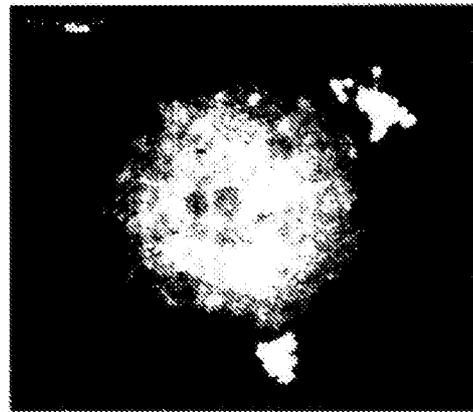


图4B

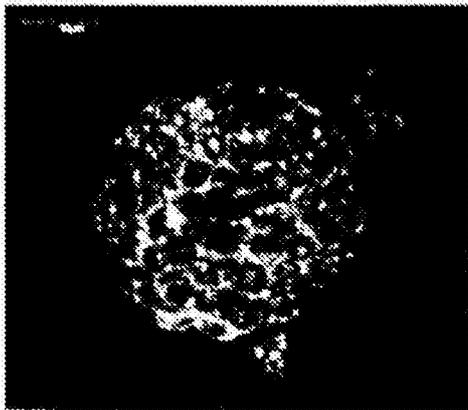


图4C

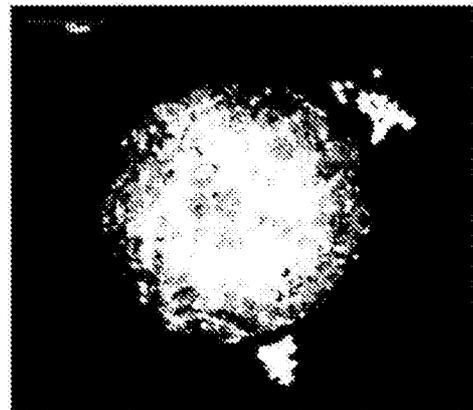


图4D

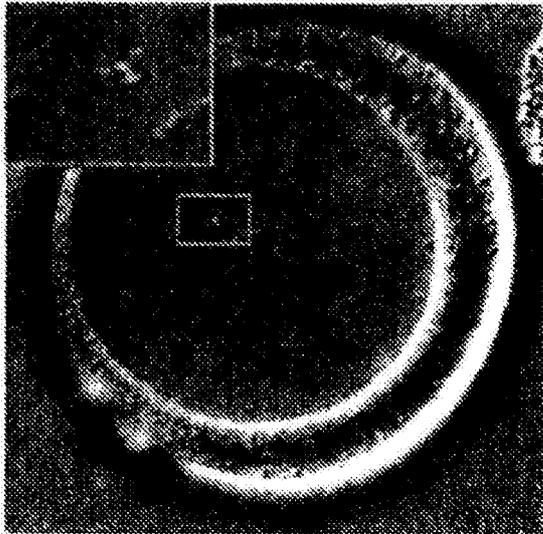


图5A

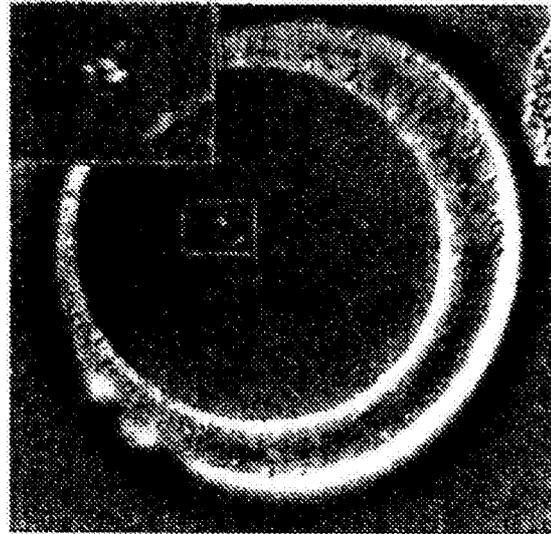


图5B

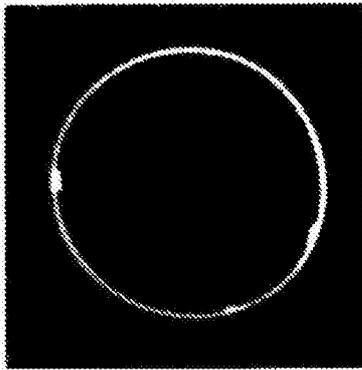


图6A

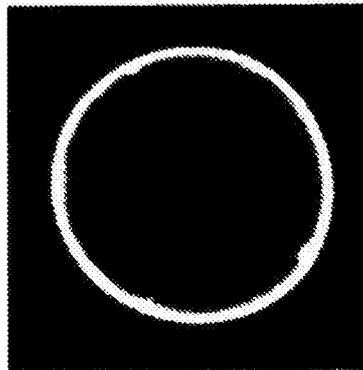


图6B

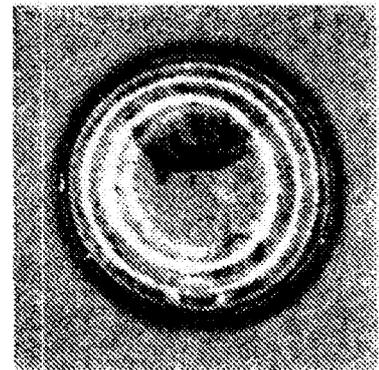


图6C

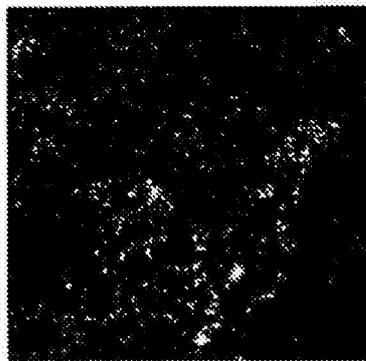


图8A

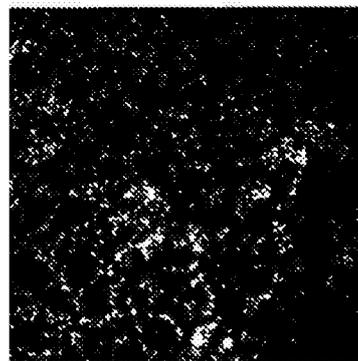


图8B

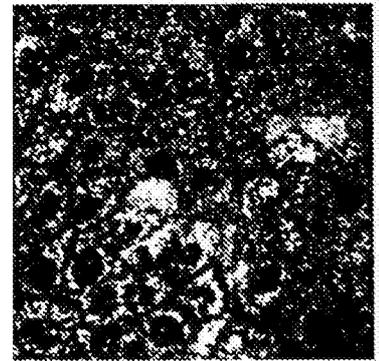


图8C

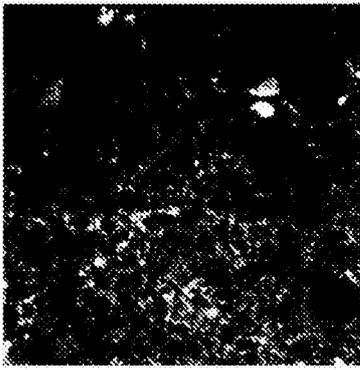


图9A

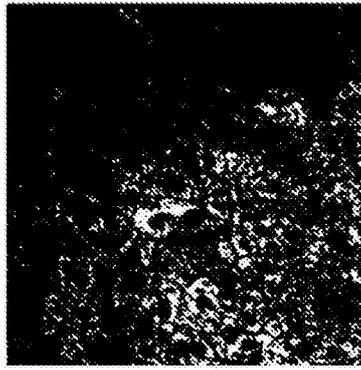


图9B

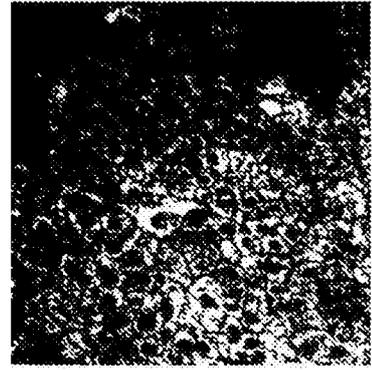


图9C

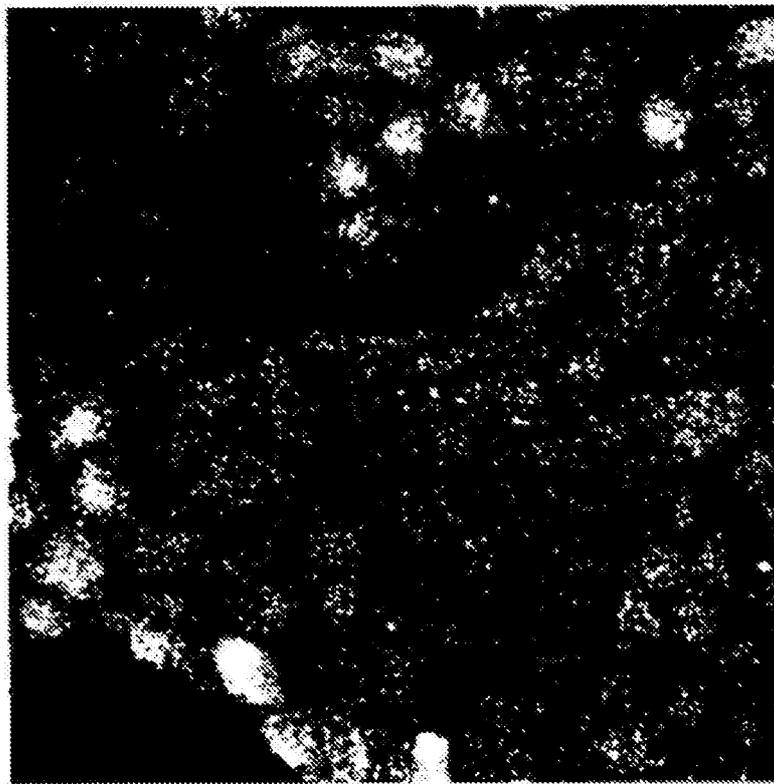


图7

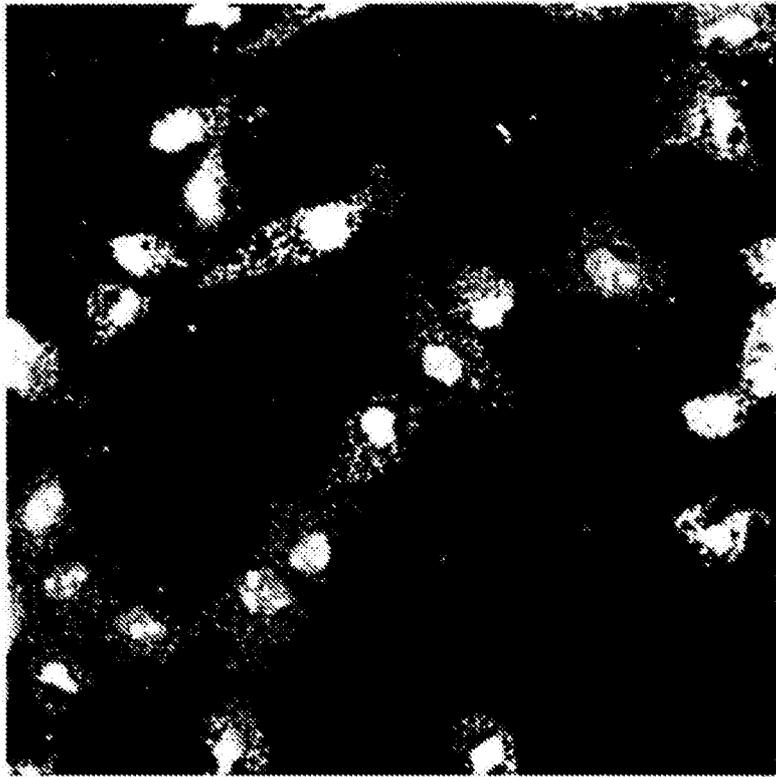


图10

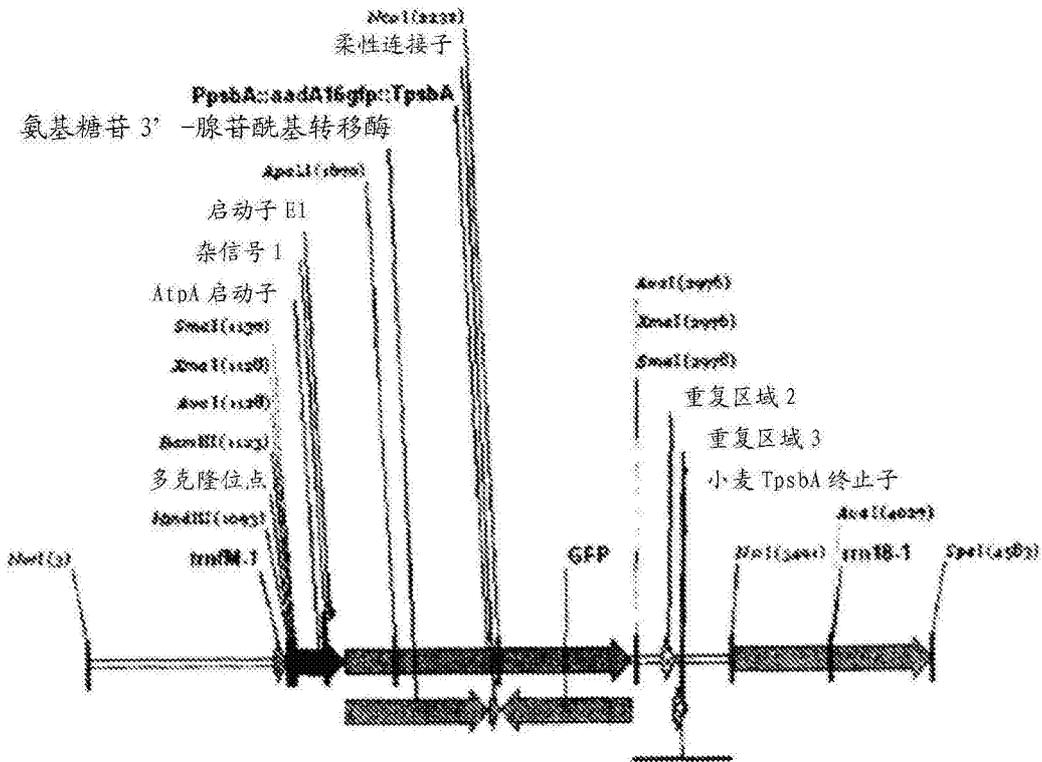


图11

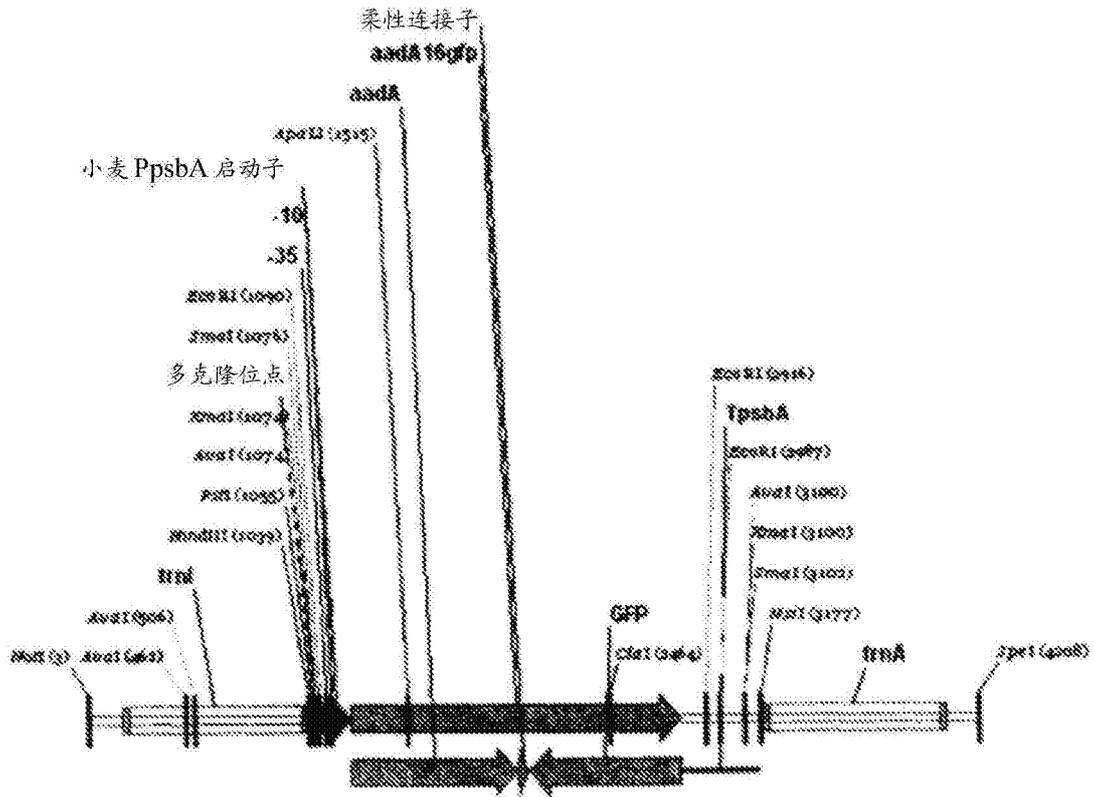


图12

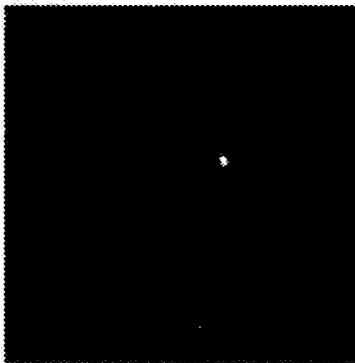


图13A

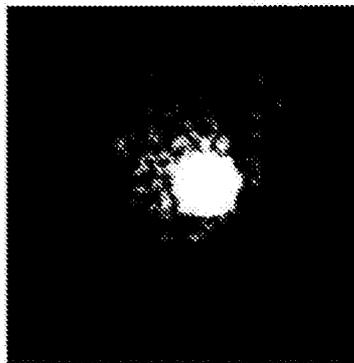


图13B

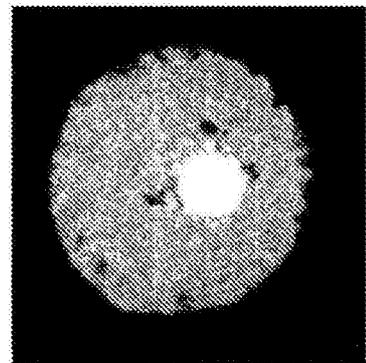


图13C

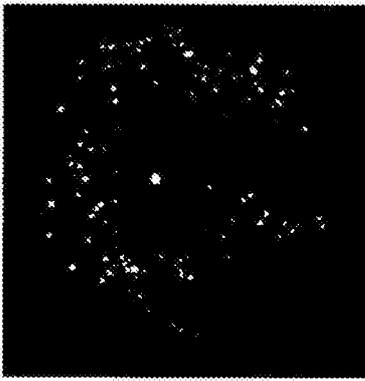


图14A

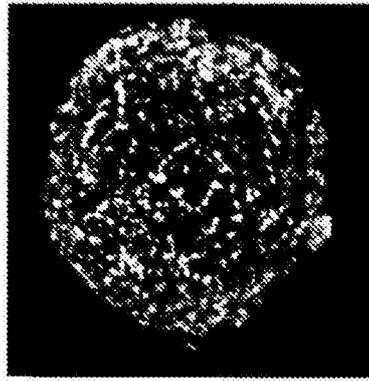


图14B

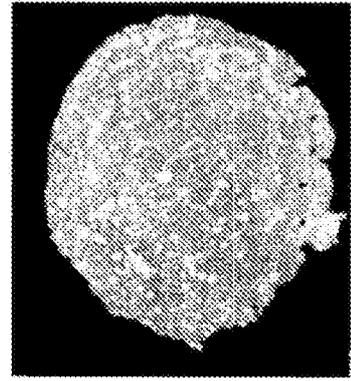


图14C

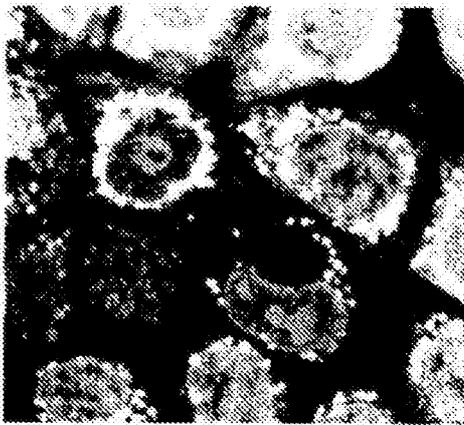


图15

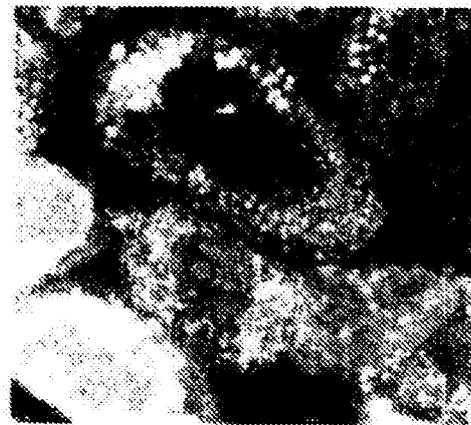


图16

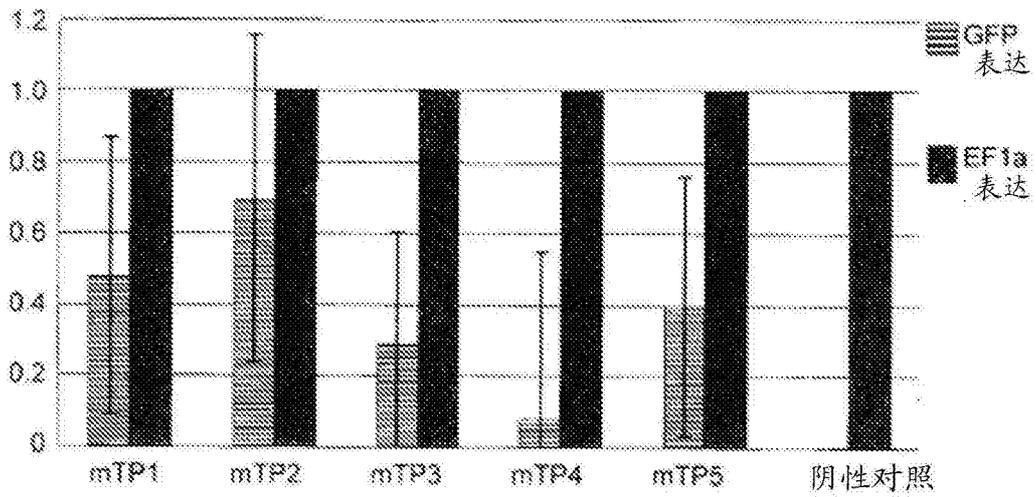


图17

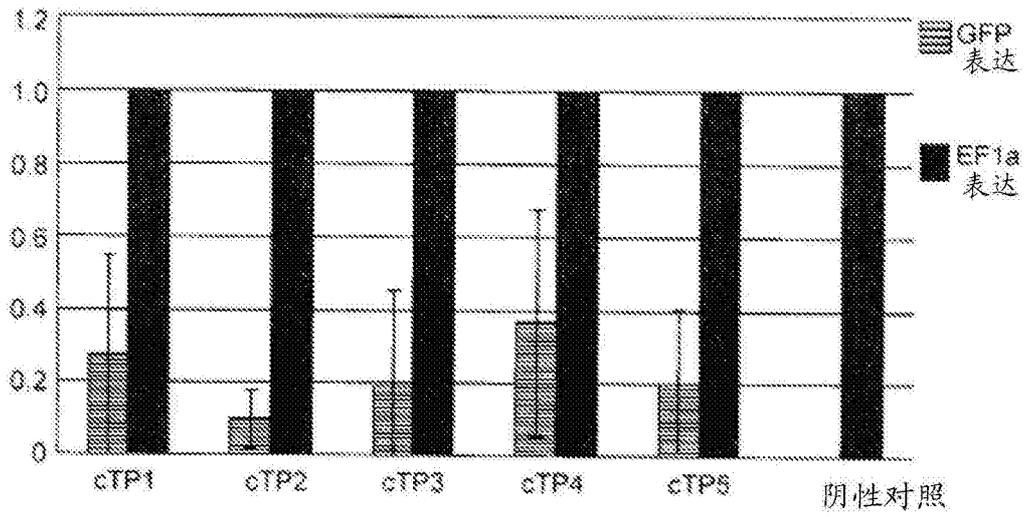


图18

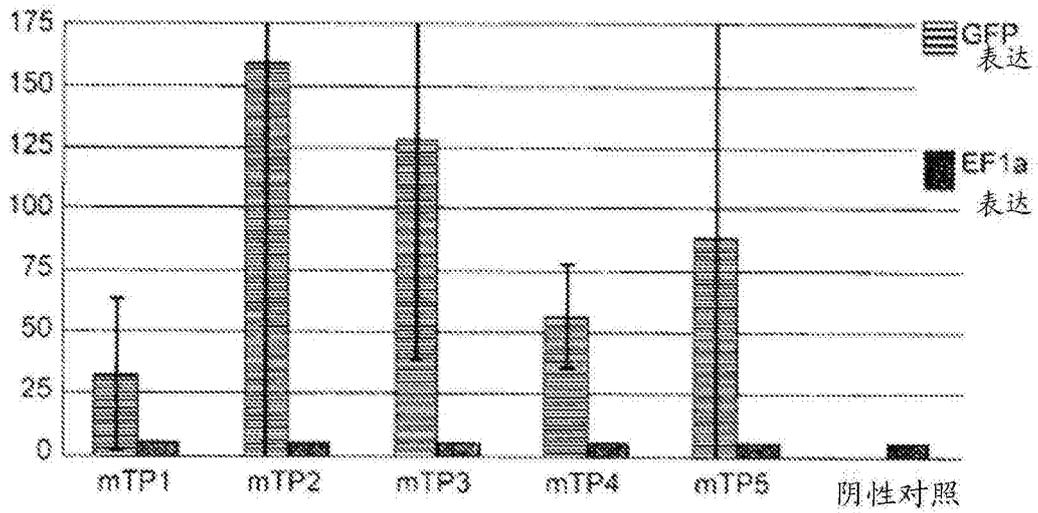


图19

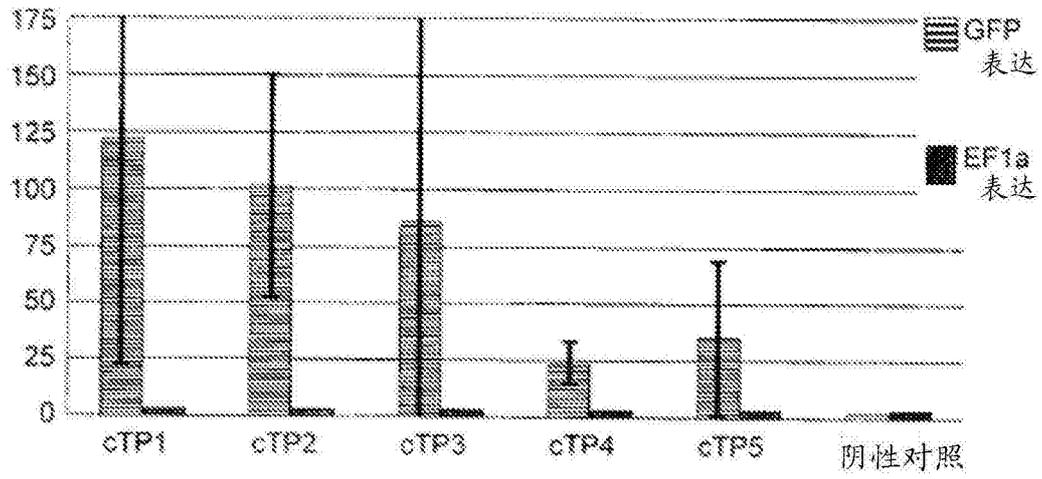


图20