

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/82

C12N 5/04



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98800476.3

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1155715C

[22] 申请日 1998.2.20 [21] 申请号 98800476.3

[30] 优先权

[32] 1997.2.20 [33] US [31] 08/808,988

[86] 国际申请 PCT/IB1998/000220 1998.2.20

[87] 国际公布 WO1998/037212 英 1998.8.27

[85] 进入国家阶段日期 1998.12.14

[71] 专利权人 植物遗传系统有限公司

地址 比利时根特

[72] 发明人 K·德哈瑞恩

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 31 页

[54] 发明名称 植物转化的改良方法

[57] 摘要

将 DNA 片段整合进单子叶植物细胞基因组中的方法，该过程包括的步骤有：1) 与 DNA 片段接触之前，在含有植物酚类化合物的培养基上培养未转化单子叶植物细胞的培养物一段时间，其时间足以刺激细胞分裂并增强外源 DNA 的整合能力；并且 2) 在所述 DNA 片段被未转化细胞吸收且稳定整合进未转化细胞基因组中的条件下，使未转化细胞与 DNA 片段相接触，产生转化细胞。

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

1. 将 DNA 片段整合进单子叶植物细胞基因组中的方法, 所述方法包括以下步骤:

5 1) 在与 DNA 片段接触之前, 在含有植物酚类化合物的培养基上培养未转化单子叶植物细胞的培养物大约 1 天至 10 天, 其中所述植物细胞的培养物是致密胚生成愈伤组织; 并且

 2) 在所述 DNA 片段被未转化细胞吸收且稳定整合进未转化细胞基因组中的条件下, 通过电穿孔、用聚乙二醇的直接基因转移、用 DNA
10 包裹微粒的轰击或用含有所述 DNA 片段的农杆菌菌株共培养, 使未转化细胞与 DNA 片段相接触, 产生转化细胞。

 2. 权利要求 1 的方法, 还包括从所述转化细胞再生转基因单子叶植物的步骤。

 3. 权利要求 1 的方法, 其中所述植物酚类化合物选自乙酰丁香酮、 α -羟基-乙酰丁香酮、芥子酸、丁香酸、阿魏酸、儿茶酚、对羟基
15 苯甲酸、 β -resorcylic acid、原儿茶酸、焦性没食子酸、没食子酸或香草醛。

 4. 权利要求 3 的方法, 其中所述植物酚类化合物是乙酰丁香酮。

 5. 权利要求 3 的方法, 其中所述植物酚类化合物是包含至少两种
20 选自以下的酚类化合物的混合物: 乙酰丁香酮、 α -羟基-乙酰丁香酮、芥子酸、丁香酸、阿魏酸、儿茶酚、对羟基苯甲酸、 β -resorcylic acid、原儿茶酸、焦性没食子酸、没食子酸和香草醛。

 6. 权利要求 5 的方法, 其中所述混合物至少包括乙酰丁香酮和对羟基苯甲酸。

 7. 权利要求 1 的方法, 其中所述单子叶植物是玉米、水稻、小麦
25 或大麦。

 8. 权利要求 1-6 中任一项的方法, 其中所述单子叶植物是玉米。

 9. 权利要求 8 的方法, 其中未转化单子叶植物细胞的所述培养物是 I 型愈伤组织。

 10. 权利要求 9 的方法, 其中所述 I 型愈伤组织在接触步骤前已被切割成片段。

 11. 权利要求 9 的方法, 其中所述 I 型愈伤组织在培养步骤之后

被切成片段。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述 I 型愈伤组织片段的最大长度为 0.5-5mm。

5 13. 权利要求 1 的方法，其中所述未转化细胞在与所述 DNA 片段接触之前，在含有所述植物酚类化合物的培养基上培养大约 4 天至 5 天。

14. 权利要求 12 的方法，其中所述未转化细胞在与所述 DNA 片段接触之前，在含有所述植物酚类化合物的培养基上培养大约 4 天至 5 天。

10 15. 权利要求 1 的方法，其中所述未转化细胞通过与包含所述 DNA 片段的农杆菌菌株共培养而与所述 DNA 片段相接触。

16. 权利要求 12 的方法，其中所述未转化细胞通过与包含所述 DNA 片段的农杆菌菌株共培养而与所述 DNA 片段相接触。

15 17. 权利要求 15 的方法，其中所述农杆菌菌株还含有额外的 *virG* 基因拷贝。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述 *virG* 基因来自 pTiBo542。

19. 权利要求 15 的方法，其中所述农杆菌菌株还包含与 *virB* 启动子操作性相连的 *virB11* 编码区的嵌合基因额外拷贝。

植物转化的改良方法

5 发明背景

(i) 发明领域

本发明涉及植物细胞、特别是单叶子植物细胞、更具体为玉米、水稻、小麦和大麦细胞的组织培养以及获得遗传转化植物细胞和植物的改良方法。

10

(ii) 相关技术描述

在过去的几年中已发展起许多植物的遗传转化技术。这些方法的最终目的是获得转基因植物，其所有细胞都含有包含稳定整合到其基因组、尤其是核基因组中的目的基因的外源 DNA(所谓的转基因)。

15

转化是一个复杂的过程，它总是包括使起始细胞与通常含有一个或多个外源目的基因的 DNA 接触。细胞与 DNA 的接触在有利于细胞吸收包括目的基因的 DNA 并将其整合入细胞基因组中的条件下进行。

20

用于转化的起始细胞通常是离体培养过一段时间的细胞。细胞与 DNA 接触之后，转化细胞一般需离体培养特定时期以便于从非转化细胞中分离转化细胞，并从转化细胞再生转化植株。

25

不同的植物转化方法已有所描述，并可划分为 DNA 直接转化法(例如电穿孔、PEG 介导的 DNA 吸收、生物发射(biolistics))或农杆菌介导的 DNA 转移。Vasil (1994)和 Christou (1994)综述了适合的禾谷类植物转化方法。农杆菌介导的 DNA 转移是 DNA 转移到植物细胞的最有效方式之一，且需要不同转化方法中所需的大概最少的技术硬件。此外在定量上，从农杆菌介导的 DNA 转移获得的转化植物的优越性在

于, 包含有较少数目的插入染色体上不同位置的转基因, 并且较少发生转基因畸变。农杆菌介导的植物 DNA 转化基于某些农杆菌菌株具有使其 Ti 质粒的一部分(即 T-DNA)导入植物细胞并将该 T-DNA 整合进细胞核基因组的能力。发现转移和整合的 Ti 质粒的部分已由特定 DNA 序列 - 即所谓的 T-DNA 左边界序列和右边界序列所标示, 并且位于这些边界序列之间的天然 T-DNA 序列能够被外源 DNA 所取代(欧洲专利公告“EP” 116718; Deblaere 等, 1987)。

农杆菌介导的单子叶植物转化已被多次报道(参见下文)。但是所报道方法的应用局限于特定的种或基因型, 或需要使用特殊组织或特定农杆菌菌株。对于大多数报道的方法, 转化率仍可大大提高。

Hooykaas-Van Solgteren 等(1984)描述了对两个用致癌型农杆菌菌株感染的单子叶种吊兰(*Chlorophytum capense*) 和水仙属栽培品种‘Paperwhite’中 Ti 质粒基因表达的检测。

Hernalsteens 等(1984)和 Bytebier 等(1987)描述用天然的根癌农杆菌分离菌, 以及用包含非致癌型 T-DNA 的根癌农杆菌菌株对石刁柏(*Asparagus officinalis*)的转化。

美国专利 5,164,310 号描述通过用根癌农杆菌接种切离的或培养的植物茎尖而转化植物(包括玉米和小麦)的方法。

美国专利 5,187,073 号和 5,177,010 号描述了在幼苗含有快速分裂细胞的区域制造创伤并用 Vir⁺根癌农杆菌接种伤口的产生转化禾本科(玉米)的方法。

PCT 专利公开 WO 92/09696 描述利用单子叶植物(如玉米和水稻)的致密型胚发生愈伤组织(玉米中的 I 型愈伤组织)和未成熟幼胚(机械性致伤或酶消化性致伤)作为转化过程的起始材料。

EP 0604662 A1 描述用含有所需基因的农杆菌属细菌在脱分化下或脱分化后的单子叶植物培养组织进行转化。EP 0672752 A1 描述用农杆菌转化单子叶植物未脱分化的未成熟胚盾片(scutulum)。两个专利均描述利用的农杆菌菌种除具有 Ti 质粒或 Ri 质粒之外, 还具有包含

来源于 Ti 质粒 pTiBo542 毒性区的 DNA 片段。

Raineri 等(1990)描述用农杆菌介导的基因转移系统, 对盾片区受创伤的两种水稻栽培品种的胚来源培养物进行转化。

5 Chan 等(1993)描述在含有番茄悬浮培养细胞的培养基上, 用农杆菌菌株接种, 对在存在 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的条件下已培养 2 天的水稻未成熟胚进行转化。

Mooney 等(1991)描述通过农杆菌介导将卡那霉素抗性基因导入酶处理的小麦胚中的方法。

10 已有报道, 在共培养之前通过细菌与乙酰丁香酮温育, 诱导农杆菌菌株的 Ti 质粒或辅助质粒的 *vir* 基因以增强转化, 并在植物细胞与细菌共培养期间添加乙酰丁香酮(Van Wordragen 和 Dons, 1992; Jacq 等 1993; James 等, 1993)。

Guivarc'h 等(1993)描述通过用乙酰丁香酮短暂预处理胡萝卜根圆盘 10 分钟, 进行瞬时农杆菌介导转化胡萝卜根圆盘的改进。

15

本发明概述和目的

提供了将 DNA 片段整合进单子叶植物、尤其是玉米、水稻、小麦或大麦细胞基因组中的方法, 包括以下步骤:

20 1) 与 DNA 片段接触之前, 在含有植物酚类化合物的培养基上, 特别是在含有选自乙酰丁香酮、 α -羟基-乙酰丁香酮、芥子酸、丁香酸、阿魏酸、儿茶酚、对羟基苯甲酸、 β -resorcglic acid、原儿茶酸、焦性没食子酸(pyrrogallic acid)、没食子酸及香草醛的植物酚类化合物的培养基上, 培育未转化单子叶植物细胞的培养物, 其培养时间足以刺激细胞分裂并增强外源 DNA 的整合能力, 时间最好为大约 1 至 10 天,
25 特别是大约 4 至 5 天; 并且

2) 在所述 DNA 片段可被未转化细胞吸收且稳定整合进未转化细胞基因组中的条件下, 尤其是通过电穿孔、用聚乙二醇的直接基因转移、用 DNA 包裹微粒的轰击或用含有所述 DNA 片段的农杆菌菌株共

培养, 使未转化细胞与 DNA 片段相接触, 产生转化细胞。

可选地使转化细胞再生成转基因单子叶植物。

还提供了将 DNA 片段整合进玉米植株细胞基因组中的方法, 包括以下步骤:

5 在与所述 DNA 片段相接触之前, 将 I 型愈伤组织、最好是已切成片段的 I 型愈伤组织、特别是最大长度为 0.5-5 mm 的片段与植物酚类化合物温育一段时间, 其时间足以刺激所述细胞分裂并增强外源 DNA 整合的能力, 最好约 1 至 10 天, 特别是约 4 至 5 天, 其中所述植物酚类化合物尤其是选自乙酰丁香酮、 α -羟基-乙酰丁香酮、芥子酸、丁香酸、阿魏酸、儿茶酚、对羟基苯甲酸、 β -resorcylic acid、原儿茶酸、
10 焦性没食子酸、没食子酸及香草醛的植物酚类化合物; 或者

 在与 D 所述 NA 片段接触之前, 在将 I 型愈伤组织切成片段、尤其是切成最大长度为 0.5-5 mm 的片段之前, 将所述 I 型愈伤组织在含有植物酚类化合物的培养基上温育一段足以刺激细胞分裂并增强外源
15 DNA 整合能力的时间; 并且

 2) 在所述 DNA 片段可被未转化细胞吸收并稳定整合进未转化细胞基因组的条件下, 尤其是通过电穿孔、用聚乙二醇的直接基因转移、用 DNA 包裹微粒的轰击或用含有所述 DNA 片段的农杆菌菌株共培养, 使 DNA 片段与未转化细胞相接触, 产生转化细胞。

20 也提供了在存在植物酚类化合物时提高单子叶植物稳定转化频率的方法, 其中所述的植物酚类化合物包含于在外源 DNA 与培养组织相接触之前植物细胞培养的培养基中。

 还提供了含有至少两种植物酚类化合物的植物培养基组成。

25 最佳实施方案详述

 本发明基于以下的最初观察, 即在含有如乙酰丁香酮的植物酚类化合物的培养基上, 培养植物愈伤组织、特别是玉米愈伤组织、更特别是精细切割的玉米 I 型愈伤组织碎片大约 5 天, 极大地刺激了细胞

分裂，产生通过农杆菌介导的转化将转移入细胞的外源基因整合进基因组的能力增强的可育愈伤组织，正如在标准条件下回收的转化细胞及转化植株的数目所反映的。

本处所用的“未转化细胞”指未与应用本发明方法时使用的特定DNA片段相接触的细胞。很明显，这种细胞也可以来源于先前用不同或相同DNA片段转化过的转基因植物或其组织。

本处所用的“转化效率”或“转化频率”可通过标准实验条件下(即就与外源DNA相接触的细胞量、传递的DNA量、DNA传递的类型和条件、一般的培养条件等角度看，属于标准或者正常)回收的转化细胞(或从各个转化细胞生长的转基因生物)的数目来计算。例如，用愈伤组织片段作为转化的起始材料时，可以每100个被转化愈伤组织碎片中所获得的转基因植物品系数目表示转化率。运用本发明方法可获得大约1%或更高的转化频率。

本处所用的转基因“植物品系”包括在再生过程中获得的源自一个培养细胞单位(如一个转化愈伤组织片)的一组转基因植物。通常，来自一个植物品系的植物具有遗传一致性，且源自一次转化事件，因而含有整合在相同的基因组位置处的相同转基因。但是，此处所定义的来自一个植物品系的各个植株可以源自单独的转化事件，尤其是用农杆菌介导的DNA转移时，因此可以互不相同。采用每100个起始愈伤组织片的植物品系数目来表示转化频率时，实际转化频率(转化事件/100个起始愈伤组织片)有可能更高。

适合本发明的“植物酚类化合物”或“植物酚类”指那些能够诱导阳性趋化反应的分离的取代酚类分子，特别是那些能够诱导含Ti质粒的农杆菌菌种、特别是含Ti质粒的根癌农杆菌中*vir*基因表达增强的取代酚类分子。Ashby等(1988)已描述了对植物酚类化合物趋化性反应的测量方法，而诱导*vir*基因表达的测量方法也已公知(Stachel等, 1985; Bolton等, 1986)。

人们认为，通过在含植物酚类化合物的培养基上培养植物组织而

对转化频率产生的良好转化效果，大部分应归功于细胞分裂的诱导及将外源 DNA 导入植物细胞基因组的能力的提高。众所周知，大多数单子叶植物，尤其是禾谷类，受伤时不能以在大多数双子叶植物中所观察到的类似方式反应(Potrykus, 1991)。人们认为外源提供植物酚类化合物可以触发类创伤反应，尤其是应用于单子叶植物时。在采用农杆菌介导的 DNA 转移时，通过预处理的植物组织吸收残余浓度的植物酚类化合物而进行的 *vir* 基因诱导也可以影响转化率，但据认为这种效应较不重要。事实上，在采用直接 DNA 转移法时也观察到同样的转化增强。

10 优选的植物酚类化合物是那些发现于植物细胞的创伤渗出液中的酚类化合物。最出名的植物酚类化合物之一是乙酰丁香酮，它存在于不同植物的许多创伤或完整细胞中，尽管其浓度不同。但是乙酰丁香酮(3,5-二甲氧基-4-羟基苯乙酮)并非唯一能够诱导 *vir* 基因表达的植物酚。其它例子有 α -羟基-乙酰丁香酮、芥子酸(3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸)、丁香酸(4-羟基-3,5-二甲氧基苯甲酸)、阿魏酸(4-羟基-3-甲氧基肉桂酸)、儿茶酚(1,2-二羟基苯)、对羟基苯甲酸(4-羟基苯甲酸)、 β -resorcylic acid(2,4-二羟基苯甲酸)、原儿茶酸(3,4-二羟基苯甲酸)、焦性没食子酸(2,3,4-三羟基苯甲酸)、没食子酸(3,4,5-三羟基苯甲酸)以及香草醛(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛)，这些酚类化合物是已知或期望能够在培养基中以同样的结果来替代乙酰丁香酮。在本文中所提及的分子量指植物酚类化合物。

25 可将植物酚类化合物单独或与其它植物酚类化合物一起加到植物培养基中。特别推荐的植物酚类化合物的组合物至少包括乙酰丁香酮和对羟基苯甲酸，但也预期其它两种或多种植物酚类化合物的组合能够协同作用增强转化频率。

此外，某些复合物，如渗透保护剂(osmoprotectant)(例如最好是浓度约为 700mg/L 的 L-脯氨酸或甜菜碱)、植物激素(尤其是 NAA)、冠瘿碱或糖，预期与植物酚类化合物组合加入时协同作用。

虽然本发明对于植物细胞、特别是玉米细胞的改良的农杆菌介导转化特别有用，但已经用植物酚类预处理的植物细胞培养物，特别是单子叶植物的培养物，可以用来采用如 PEG 介导的 DNA 转移、微粒轰击或电穿孔的直接 DNA 转移法获得较高的转化效率。因此本发明基本上通过在限定期限内在培养细胞的培养基中包含一种植物酚类化合物(如乙酰丁香酮)，提供对植物细胞、尤其是单子叶植物细胞、更特别是玉米细胞的现有遗传转化方法进行的改良。特别是，在或者通过电穿孔、PEG 介导的 DNA 转移或微粒轰击，或最好通过农杆菌介导的 DNA 转移而直接导入细胞的外源 DNA 与细胞相接触的时刻之前，在含有乙酰丁香酮(100-200 μM)的培养基上培养所述植物细胞或植物组织 5 天。

在最佳实施方案中，本发明方法可用于提高植物细胞、特别是玉米细胞农杆菌介导 DNA 转移的转化频率。

在植物细胞、特别是单子叶植物细胞遗传转化的许多传统方法中，用培养的细胞、组织或外植体作为起始材料，在能够促进外源 DNA 吸收入细胞基因组的条件下，将这种培养物中的细胞与含有至少一个目的基因(即转基因)的外源 DNA 相接触。适用于植物细胞、组织、器官或外植体培养的培养基通常为本领域技术人员所知。优选的植物培养基是那些化学组成已知的特定培养基。

在本发明的一个实施方案中，在细胞与外源 DNA 接触之前，最好将植物酚类化合物、尤其是将乙酰丁香酮加到培养基中大约 4 至 5 天或 6 天，至少约 5 天则最佳。我们认为在含有如乙酰丁香酮的植物酚类化合物的培养基中温育培养细胞的确切时段并不重要，但可能不应超过两周。1-10 天、特别是 3-7 天似乎是理想时段，在接触时间之前培养大约 4 至 5 天或 6 天获得了最好结果。一般认为在接触时间之前约 5 天是植物酚类化合物加入培养基的有益时段。

应该指出，培养组织在含有植物酚类的培养基(特别是当组培培养基中含有没食子酸时)上进行培养之后，表现出褐变甚至有限坏死。然

而，采用这些培养的细胞、组织或外植体能够获得更高的转化频率。

培养基中植物酚类化合物的浓度也被认为对整合型转化能力的发展有影响，这种变化取决于细胞性质(物种、组织外植体、一般培养条件等)。但是在特定浓度范围内影响微小，尤其当培养细胞的培养未
5 超过 7 天时。培养基中植物酚类化合物的最佳浓度范围可能随物种(即组织、细胞或细胞培养物的来源)或所用组织类型而有所变动，但预计大约 100 μ M-200 μ M 对于许多应用(如用于玉米来源的材料)而言是适宜的浓度。最佳浓度也取决于所采用的特定植物酚类化合物的性质，尤其是取决于其促细胞分离的强度。

10 例如已发现乙酰丁香酮的最佳浓度大约为 200 μ M，但是可用低至约 25 μ M 的浓度获得好的转化率效果。同样地，预期高至约 400 μ M 的较高浓度将产生同样效果。

可将类似浓度应用于其它植物酚类化合物，同时根据本发明能够通过实验容易地建立起最佳浓度。

15 如上所述，植物转化方法通常包括在培养组织与外源 DNA 相接触之前对细胞、细胞培养物、组织或外植体进行培养。已将几种组织描述为转化方法的起始材料，包括但不限于干种籽、未成熟胚、未成熟花序、花药、小孢子、盾片、茎节、幼叶基、胚轴外植体、根(特别是根尖)、致密胚生成愈伤组织(如玉米中的 I 型愈伤组织)、疏松胚性
20 愈伤组织(如玉米中的 II 型愈伤组织)、悬浮培养物、悬浮细胞团的培养物，体细胞胚以及茎尖。预期在与外源 DNA 接触之前，在培养这些组织、细胞、细胞培养物或外植体的培养基中包含植物酚类化合物，特别是乙酰丁香酮，将提高转化效率，特别是采用农杆菌介导的转化时。

25 很显然，每当用到“在(植物)培养基上进行培养”时，所述培养基或是液态或是固态。本发明框架中的植物培养基包含至少一种植物酚类化合物。

不用说，如先有技术领域中的广泛报道的，当将再生转基因植

物、特别是表型正常的植物作为转化方法的最终目的时，起始材料应该能够再生。

在特别优选的实施方案中，通过在含有植物酚类、最好是乙酰丁香酮的培养基上培养致密的再生型愈伤组织(例如玉米 I 型愈伤组织)，产生转化感受态植物细胞，最好是农杆菌转化感受态植物细胞。
5 为此，将致密愈伤组织割成更小片段。所得到的愈伤组织应当全部或至少一部分含有可再生(如胚生成)扇形体(sector)或愈伤组织部分。该愈伤组织片段平均最大长度也最好为 0.5 至 5mm，特别是为 1 至 2mm，更特别为 1.25 至 1.75mm，并最小长度最好约为 0.1mm。不过
10 使用大至约 1cm 的较大 I 型愈伤组织片段也便利。在含植物酚类化合物的培养基上培养之后，可将愈伤组织与外源 DNA、最好是与含外源 DNA 的农杆菌相接触，而不用再经创伤或用酶预处理。

或者，可在含植物酚类化合物的培养基上培养未经创伤(即切割)的致密愈伤组织，然后在接触步骤之前将其创伤，即切割成较小片段，
15 特别是具有以上所述大小的片段。

在另一实施方案中，通过在含有植物酚类(最好是乙酰丁香酮)的培养基上培养未成熟胚，最好是玉米未成熟胚，产生转化感受态细胞，特别是农杆菌转化感受态细胞。在这方面，对于如玉米的植物，最好是其未成熟胚的最大长度为约 0.5 至 2mm，最好为 0.5 至 1.5mm，虽然
20 长度为 0.5 至 1mm 的较小胚也可用。在含植物酚类的培养基上培养之后，未成熟胚可与外源 DNA 接触，最好是与含外源 DNA 的农杆菌相接触，不用进一步产生创伤或用酶预处理。

已经发现运用本发明，不同基因型的玉米适合于农杆菌介导的 DNA 转移，特别是玉米 PHH [(Pa91xH99)xH99]、Pa91 HE89 或 PHP [(Pa91xH99)xPa91]。
25 因此预期本发明能够不受基因型限制而应用于特别是玉米的转化。

按照本发明预培养植物细胞，特别是玉米细胞，可提高农杆菌介导 DNA 转移的转化效率，并预计这种效果与所用的农杆菌宿主的染色

体背景、Ti质粒类型、辅助质粒或T-DNA载体无关。因此本发明扩大了可有效使用的农杆菌菌株的范围。

特别优选的细菌染色体背景由根癌农杆菌 C58Cl (Van Larebeke 等, 1974)、A136 (Watson 等, 1975)或 LBA4011 (Klapwijk 等, 1980)提供。

在一个最佳实施方案中, 用于转化用植物酚类化合物预培养的植物组织的农杆菌菌株含有 L,L-succinamopine 型 Ti 质粒, 最好是解除武装的 Ti 质粒, 如 pEHA101。

在另一个最佳实施方案中, 用于转化用植物酚类化合物预培养的植物组织的农杆菌菌株含有冠樱碱型 Ti 质粒, 最好是解除武装的 Ti 质粒, 诸如 pAL4404。一般而言, 使用冠樱碱型 Ti 质粒或辅助质粒时, 最好是 *virF* 基因缺失或失活(Jarschow 等, 1991)。

本发明方法还可与特定农杆菌菌株组合使用, 进一步提高转化效率, 例如由于存在突变型或嵌合型 *virA* 基因或 *virG* 基因而使 *vir* 基因的表达和/或诱导有所改变的农杆菌菌株(如 Hansen 等, 1994; Chem 和 Winans 1991; Scheeren-Groot 等, 1994)。

在另一个实施方案中, 包含最好是连接在多拷贝质粒上的额外 *virG* 基因拷贝、特别是来自 pTiBo542 的所谓超级 *virG* 基因的农杆菌菌株可用来进一步提高转化效率。

在本发明的再一个实施方案中, 所用的农杆菌菌株包含额外的 *virB11* 基因拷贝, 特别是在农杆菌中表达的来自 pTiBo542 的 *virB11* 基因。这可最好通过提供含有 *virB11* 编码区的嵌合基因完成, 其中所述编码区操作性地连接在能够在农杆菌中表达的启动子(例如经分离的 *virB* 启动子)上, 而没有 *virB* 操纵子的间插编码区。

正如本领域技术人员所知, 要与植物细胞、特别是与玉米细胞共培养的农杆菌细胞, 可以或者与乙酰丁香酮或另一植物酚类化合物预培养, 或从它们的培养基中分离之后直接使用。Vernade 等(1988)描述了对根癌农杆菌特别适宜的诱导条件。

本发明方法原理上可用于用任何外源 DNA 转化植物细胞，特别是玉米细胞。所述外源 DNA 通常含有至少一个目的基因，它包括 1) 启动子区，具有能够指导真核细胞(如被转化的植物物种)中 DNA 转录为 RNA 的启动子，以及 2) 编码 RNA(如反义 RNA 或核酶)或蛋白质的编码区。多数情况下目的基因还将包括 3) 含有多腺苷酸化信号的真核基因的 3'端非翻译区。可选择启动子来指导真核生物所选组织中的表达。例如，已知可选择性地指导在植物雄蕊细胞(如绒毡层)中表达的启动子，并已将这样的启动子用于产生雄性不育植物和其它对产生杂种有用的植物(EP 344029；EP 412911；WO 9213956；WO 9213957；Mariani 等, 1990；Mariani 等, 1992)。

本发明方法中所使用的外源 DNA 最好还含有选择标记基因，它的表达允许从非转化细胞(或生物)中筛选转化细胞(或生物)。这种选择标记基因通常编码使细胞对抗生素或其它通常对细胞有毒的化学化合物形成抗性的蛋白。因此，植物中的选择标记基因也可以编码对除草剂形成抗性的蛋白，所述除草剂例如为含有谷酰胺合成酶抑制剂(如膦丝菌素)作为活性成份的除草剂。这种基因的例子有编码如 *sfr* 基因或 *sfrv* 基因的膦丝菌素乙酰转移酶的基因(EP 242236；EP 242246；De Block 等, 1987)。

因此本发明提供一个快速、有效并且可育的方法，用于提高植物细胞 DNA 转移、特别是农杆菌介导的效率，所述植物细胞特别是单叶植物细胞，更特别是玉米细胞，但也可以是水稻、小麦或大麦细胞。此外，与直接基因转移法相比，农杆菌介导转化法可产生数目较多的转基因植物，特别是玉米，其中所述植物具有在其细胞基因组中整合了有限数目的转基因拷贝，特别是一个转基因拷贝。另外，通过农杆菌介导转化所获得的转基因植物，特别是转基因玉米，其基因组中整合有一个以上的转基因拷贝，可频繁地产生子代植株，其中所述转基因的不同拷贝是单独遗传的，可允许后代植株中不同转基因拷贝分离。因此，预期用本发明的转化方法所获得的转基因植物群体中比从

直接基因转移法所获的转基因植物群体中发现更大比例的具有所需特征的“原种”转基因植物。虽然本发明特别适用于单子叶植物，但预期用双子叶植物的培养细胞作为本发明方法的起始材料也将获得相同的结果。

5 以下的实施例详细描述本发明方法。除非在实施例中有所指明，所有的重组 DNA 方法均按以下书中描述的标准方案进行： Sambrook 等(1989)的分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室出版(纽约)以及 Ausnbel 等(1994)分子生物学现行方法(美国)的第一卷和第二卷。植物分子操作的标准材料和方法描述于 BIOS 科学出版有限公司(UK)
10 和 Blackwecl 科学出版社(UK)联合出版的 R.D.D.Croy 的 *Plant Molecular Biology Labfax*(1993)。

在实施例及本发明描述中，引用了以下序列表中的序列：

- | | |
|--------------|---|
| SEQ ID No. 1 | pGVS71 中 T-DNA 的核苷酸序列 |
| SEQ ID No. 2 | 含 <i>adh1</i> 内含子的 <i>bar</i> 基因编码区的核苷酸序列 |
| SEQ ID No. 3 | pGVS8 中 T-DNA 的核苷酸序列 |
| SEQ ID No. 4 | 寡核苷酸 VG40 的核苷酸序列 |
| SEQ ID No. 5 | 寡核苷酸 VG41 的核苷酸序列 |

实验：实施例中所用的培养基、质粒及细菌菌株

15 1.1. 培养基

在所有实施例中，采用以下植物组培培养基：

- **MahiVII**：补充有 100 mg/L 酪蛋白水解物、6 mM L-脯氨酸、0.5 g/L 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、0.2 M 甘露醇、2%蔗糖、1 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、2.5 g/L 脱乙酰吉兰糖胶的 N6 培养基(chu 等, 1975)，调 pH 值为 5.8。
- **LSIDhy1.5VII**：补充有 0.5 mg/L 尼克酸、0.5mg/L 盐酸吡哆醇、1mg/L 盐酸硫胺素、100mg/L 肌醇、6mM L-脯氨酸、0.5g/L MES、20g/L 蔗糖、10g/L 葡萄糖、1.5mg/L 2,4-D、2.5g/L 脱

- 乙酰吉兰糖胶的 MS 盐(Murashige 和 Skoog, 1968), 调 pH 值为 5.2。
- **LSI**: MS 盐, 补充有如 LSIDhy1.5VII 中的维生素、1g/L 酪蛋白氨基酸、0.2M 蔗糖、0.2M 葡萄糖、1.5mg/L 2,4-D、2.5g/L 脱乙酰吉兰糖胶, 调 pH 值为 5.2。
 - **Ahx1.5VIIp500ino1000ppT 10**: MS 盐, 补有 1000mg/L 肌醇、0.5g/L MES、30g/L 蔗糖、10g/L 葡萄糖、1.5mg/L 2,4-D、2.5g/L Phytigel、10mg/L **glufosinate-ammonium**、500mg/L 羧苄青霉素, 调 pH 值为 5.8。
 - **Mh1VIIp500ppT5**: 补充有 0.5g/L MES、20g/L 蔗糖、1mg/L 2,4-D、5mg/L **glufosinate-ammonium**、500mg/L 羧苄青霉素的 N6 培养基, 调 pH 值为 5.8。
 - **A37VIIp500ppT2**: 补充有 0.5g/L MES、30g/L 蔗糖、5mg/L 玉米素、2.5g/L phytigel、2mg/L **glufosinate-ammonium**、500mg/L 羧苄青霉素的 MS 培养基, 调 pH 值为 5.8。
 - **LSIIDhy1.5XI**: 与 LSIDhy 1.5 VII 培养基一致, 但其中的 6mM L-脯氨酸被 1g/L 酪蛋白氨基酸所取代, 且 2.5g/L 脱乙酰吉兰糖胶被 0.5%琼脂 BRL Ultra Pure 取代。
 - **A6%VIIp500ppT2**: 补充有 0.5g/L MES、60g/L 蔗糖、2.5g/L phytigel、2mg/L **glufosinate-ammonium**、500mg/L 羧苄青霉素的 MS 培养基, 调 pH 值为 5.8。

1.2. T-DNA 载体:

在所有实施例中, 采用以下 T-DNA 载体:

- **pGSV71**: 是来自 pGSC1700(Cornelissen 和 Vandewiele, 1989)的 T-DNA 载体, 不同之处是缺少 β -内酰胺酶基并含有特征为 SEQ ID No.1 序列的 T-DNA。pGVS 71 含有操作性连接到 CaMV35S 启动

子和胭脂碱合酶基因 3'末端的选择性嵌合 *bar* 标记基因。

- **pTCO114**: 是与 pGSV71 相似的 T-DNA 载体, 所含有的 T-DNA 的 *bar* 基因序列(来自 SEQ ID No.1 的核苷酸位置 1437 至核苷酸位置 1988 的核苷酸序列)已被包含来自玉米 *adh1* 基因内含子的 *bar* 基因序列(来自 SEQ IN NO.2)所置换。
- **pTCO121**: 是载有源自 pTiBo542 的额外 *virG* 基因的 T-DNA, 所述 *virG* 基因包含在源自 pTiBo542 的约 1.3kb 的 *Bgl*III-*Sph*I 片段上。该 T-DNA 基本上与 pTCO 114 的相同。通过以下方法构建该载体:

从 pCNL2(Liu 等, 1992)纯化约 1.3kb 的 *Bgl*III-*Sph*I 片段。该片段含有 *virB* 操纵子的 3'末端、完整的 *virG* 基因以及来自 pTiBo542 的 *virC* 操纵子 3'末端。用 T4 聚合酶将该片段处理成平端, 并与 *Xba*I 线性化和克列诺(Klenow)处理的 pGSV8 相连接, 产生 pGSV15。pGSV8 是源自 pGSC1700 (Cornelissen 和 Vandewiele, 1989)的 T-DNA 载体, 不同之处在于缺少 β -内酰胺酶基并含有特征为 SEQ ID No.3 序列的 T-DNA。在下一个步骤中, 将载有嵌合选择性 *bar* 标记的 T-DNA 导入 pGSV15 中。为此, 用来自 pTCO114 的含有 T-DNA(右边界除外)的约 4kb *Eco*RI-*Bst*EII 片段取代 pGSV15 (*Eco*RI 位点在 pGSV15 的 T-DNA 中)的约 1.2kb *Eco*RI-*Bst*EII 片段, 产生 pTCO121。

- **pVE200**: 该 T-DNA 载体载有与 pTCO121 相同的 T-DNA 和类似的包含 *virB* 操纵子 3'末端(包括 *virB* 开放阅读框)的 pTiBo542 片段、完整的 *virG* 基因和 *virC* 操纵子 3'末端, 但是其中 *virB* 操纵子的 3'末端被经 PCR 扩增的 *virB* 启动子片段操作性地连接(即在其之前)。以以下方式构建该载体:

- 用引物 VG40 (SEQ ID No.4)和 VG41 (SEQ ID No.5)并以来自 A348 (pSM30)(Stachel 和 Nester, 1986)的总 DNA 为模板,

按标准的聚合酶链式反应扩增 *virB* 启动子片段。得到的约 390 bp 片段(基本上相应于 EMBL 检索 J03216 号中从核苷酸 475 至核苷酸 764 的序列)含有如 Das 等(1986)所描述的 *virB* 启动子, 将其用 *Xba*I 和 *Nhe*I 消化, 并与经 *Xba*I 线性化的 pCNL2 (Lin 等, 1992)相连接, 产生 pVE194。在 pVE194 中, *virB* 操纵子的 3'末端受 *virB* 启动子的转录调控。

- 然后将在 *virB* 启动子控制下的含有 pTiBo542 的 *virB* 操纵子 3'末端与 pTiBo542 的 *virG* 基因的 DNA 片段, 通过 pVE194 的约 1.6 kb *Xba*I-*Bgl*II 片段、 pVE194 的约 1.3 kb *Bgl*II-*Sph*I 片段和 pGSV8 包含 T-DNA 的约 7.2kb *Xba*I-*Sph*I 片段之间的三种方式的连接, 导入 T-DNA 载体中。获得的质粒命名为 pTVE197。

- 通过连接以下三个片段, 将 pTCO114 的选择标记基因导入 pTVE197:

i) pTVE 197 的约 5.3kb *Ban*II-*Bst*EII 片段, 含有 *virB* 的 3'末端和 *virG* 基基;

ii) pTVE197 的约 3.7kb *Ban*II-*Eco*RI 片段, 含有 T-DNA 右边界;

iii) pTCO114 的约 4kb *Eco*RI-*Bst*EII 片段, 含有嵌合的选择性 *bar* 基因和 T-DNA 左边界;

产生 T-DNA 载体 pVE200。

1.3. 根癌农杆菌菌株:

将 T-DNA 载体 pGSV71、 pTCO114、 pTCO121 和 pVE200 通过三亲交配法(Ditta 等, 1980)导入含有辅助 Ti 质粒 pAL4404 或 EHA101、 包括辅助质粒 pEHA101 的农杆菌菌株 LBA4404 中, 筛选对链霉素(300 μ g/ml)和壮观霉素(100 μ g/ml)的抗性。

在所有实施例中采用下列菌株:

菌株 A3593 : 包含 pGSV71 的 LBA4404

菌株 A3532 : 包含 pTCO121 的 LBA4404

菌株 A3638 : 包含 pVE200 的 LBA4404

菌株 A3460 : 包含 pTCO114 的 EHA101

5 菌株 A3533 : 包含 pTCO121 的 EHA101

菌株 A3637 : 包含 pVE200 的 EHA101

实施例

实施例 1. 乙酰丁香酮预处理的玉米 I 型愈伤组织的农杆菌介导的转化

基本上按 WO 92/09696 中的描述获得 I 型愈伤组织片段。从玉米
10 品系(Pa91xH99)xH99 (PHH 品系)授粉后 9-12 天的种子上切取未成熟
胚, 表面消毒后置于 MahilVII 培养基上诱导 I 型愈伤组织。在相同培
养基上每隔一个月传代培养 I 型愈伤组织约两个月至六个月。然后,
将 I 型愈伤组织精细切割成平均长度约为 1.5mm 的片段, 并在补充有
15 100-200 μ M 乙酰丁香酮的 LSIDhy1.5VII 培养基上培养所获得的片段 5
天。收集预诱导愈伤组织片并不经进一步创伤而浸入适合的农杆菌菌
株悬浮液中约 3 分钟至约 20 分钟。通过以下途径获得该细菌悬液: 细
菌在 MAG 培养基[补充有 2g/L 葡萄糖的基本 A 培养基(Jeffrey Miller,
1972)或 AB 培养基(Chilton 等, 1974)上生长 3 天至 6 天。收获细菌, 在
20 补充有 100-200 μ M 乙酰丁香酮的 LSI 液体培养基中, 以大约 5×10^9
细胞/ml 的浓度重悬浮。

在细菌悬液中浸过之后, 在补充有 100-200 μ M 乙酰丁香酮的
LSIIDhy1.5XI 培养基上, 于约 25 °C 共培养愈伤组织片段 3 天至 6 天
(LBA-型菌株为 3 天, EHA-型菌株为 6 天)。

25 共培养之后, 将组织转至 Ahx1.5VIIp500ino1000ppT10 中培养 3
周至 4 周。将正在增殖的磷丝菌素(PPT)抗性愈伤组织切下, 在
MhVIIp500ppT5 上传代培养至少两次, 隔 3 周传代培养一次。将胚生
成 ppT 抗性愈伤组织置于再生培养基(A37VIIp500ppT2)上, 并在相同

培养基上每隔 10 天至 14 天传代培养胚生成组织。将小植株转至含有供再一生长的 A6%VIIp500ppT2 培养基的玻璃容器中，并将发育中的苗转入补充有 1.5%蔗糖的半固体 MS 培养基中，使其进一步长大和生根。检测植株的膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)活性，将 PAT 阳性植株转至温室。通过 Southern 杂交检测 PAT 阳性植株中是否存在所述转基因。

表 1. 用或不用乙酰丁香酮预处理，玉米 PHH 品系 I 型愈伤组织农杆菌介导转化的平均转化效率总结

农杆菌菌株	不用预处理的大致平均转化频率 (%)	预处理的大致平均转化频率 (%)
A3460	< 0.1	0.3
A3533	< 0.1	0.8
A3638	< 0.1	0.9
A3637	< 0.1	0.8

10

在对照试验中，I 型愈伤组织片段未经在含乙酰丁香酮的培养基上培养以及如实验部分所描述的与农杆菌菌株共培养而进行预处理，虽然在每一例中都获得了 PAT 阳性植株，但其平均转化率从未超过 0.1% (见表 1)。

15

乙酰丁香酮的预处理使通过与农杆菌菌株共培养的 I 型愈伤组织的转化效率至少提高 3 倍。用乙酰丁香酮预处理的约 1700 个愈伤组织片段与菌株 A3460 共培养，产生 5 个 PAT 阳性品系(平均转化频率约为 0.3%；见表 1)。

20

约 4000 个预处理的愈伤组织片段(对每个实验系列而言)，与农杆菌菌株 A3638、A3533 和 A3637 共培养后，分别产生 37、30 和 33 个 PAT 阳性植株品系(平均转化频率约为 1%)。因此在这些试验中，转

化频率提高了至少约7倍至10倍。

通过用乙酰丁香酮预处理获得的玉米植株品系 (Pa91xH99)xPa91(PHP)和 Pa91 的 I 型愈伤组织的共培养, 也获得了转化率增高。

5

实施例 2. 存在附加的嵌合 *virBII* 基因提高农杆菌介导转化效率

按实施例 1 的描述获得 I 型愈伤组织片段, 并在补充有 100 μ M 乙酰丁香酮的 LSIDhy1.5VII 培养基上培养 5 天, 然后与农杆菌菌株 A3532 和 A3638 共培养。甚至用乙酰丁香酮预处理, 从菌株 A3532 仅获得了 1 个 PAT 阳性植株(转化频率<0.1%)。但是, T-DNA 载体上位于 *virBII* 开放阅读框之前的功能性 *virB* 启动子的存在, 使转化效率(见表 1)提高了至少几乎 10 倍。

10

实施例 3. 用不同植物酚类化合物预处理的玉米 I 型愈伤组织的农杆菌介导转化

15

按实施例 1 的描述获得 I 型愈伤组织片段, 并在补充有 100 μ M 表 II 中植物酚类化合物的 LSIDhy1.5VII 培养基上培养 5 天。大约 200 个预诱导的愈伤组织片段与农杆菌菌株 A3637(或 A3638)共培养。所获得的 PAT 阳性品数目和转化频率总结于表 II。

20

表 II. 不同植物酚类化合物对农杆菌介导的转化频率的影响

植物酚类化合物	PAT-阳性品系数	转化频率 (%)
没食子酸	3	1.5
香草醛	4	2
儿茶酚	1	0.5
3,4-二羟基苯甲酸	2	1
对羟基苯甲酸	2	1
乙酰丁香酮	2	1
2,4-二羟基苯甲酸	1	0.5

实施例 4. 用乙酰丁香酮预处理玉米 I 型愈伤组织, 可提高电穿孔转化频率

5 将得自 I 型愈伤组织并在如实施例 1 所描述在含 100 μ M 乙酰丁香酮的培养基上预培养 5 天的精细切割的愈伤组织碎片, 不经进一步创伤而如 WO 92/09696 所描述的进行电穿孔。简单地说, 将 50 个愈伤组织碎片重悬浮于 100 μ l EPM-KCl 缓冲液中, 并于室温预质壁分离 3 小时。然后在 EPM+KCl 缓冲液中漂洗愈伤组织碎片, 并转至电穿孔杯(electrocuvette)里的 EPM+KCl 缓冲液中。加入质粒 DNA (10 μ g PDE 10 110), 并于室温与愈伤组织片段一起温育约 1 小时。在标准条件(1 个脉冲, 起始场强为来自 900 μ F 电容的 375V/cm)下进行电穿孔。从未将愈伤组织置于冰上。筛选膦丝菌素(phosphinotrin)抗性愈伤组织并按描述(WO92/09696)使植株再生。按描述(WO92/09696)测定膦丝菌素 15 (phosphinotrin)乙酰转移酶活性。

大约 5640 个未经乙酰丁香酮预处理的愈伤组织碎片经过对照电穿孔获得 13 个 PAT 阳性植株(约 0.23%), 而大约 530 个用乙酰丁香酮预处理的愈伤组织片段经过电穿孔获得 4 个 PAT 阳性植株(约 0.75%)。因此精细切割的 I 型愈伤组织碎片经过在含 100 μ M 乙酰丁香

酮的培养基上培养 5 天的预处理后，转化频率提高了约 3 倍。

实施例 5. 植物酚类组合物进一步提高转化频率

按实施例 1 的描述获得 I 型愈伤组织片段，并在补充有 200 μ M 乙酰丁香酮或 100 μ M 乙酰丁香酮和 100 μ M 对羟基苯甲酸的组合物的 LSIDhy1.5VII 培养基上培养 5 天。约 250 个愈伤组织片与农杆菌菌株 A3533 共培养。在乙酰丁香酮上预诱导之后，在含 PPT 的培养基上获得 2 个苗再生品系(包括 1 个 PAT 阳性品系)(频率约为 1%); 而在乙酰丁香酮外加对羟基苯甲酸上预诱导后，在含 PPT 的培养基上获得 7 个苗再生品系(包括 5 个 PAT 阳性品系)(频率约为 3%)。

实施例 6. 对实施例 1-5 中经农杆菌介导转化获得的转基因玉米植株的分析

通过 Southern 杂交分析先前实施例的转基因玉米植株。

首先，证实是否所有从单个转基因愈伤组织系再生的转基因植株都是相同的或它们是否来自独立的转化事件。通过 Southern 分析得自 24 个独立转基因愈伤组织系的所有再生植株，鉴定了 37 个不同类型的 T-DNA 整合。换句话说，这 24 个植株系(如说明书中所定义)代表至少 37 个独立的转化事件。因此，以每 100 个转化愈伤组织片中所获得的转基因植株系数目为表示的转化率，低估了实际的转化频率。

接着，通过 Southern 杂交分析了不同玉米品系中转基因的拷贝数。所分析的大多数转化系(T0)显示相当简单的 T-DNA 整合模式(少于 4 个拷贝)。大约 1/3 的所分析转基因系(56/148)具有单拷贝的 T-DNA 整合。只有有限数目的品系(<10%)具有较复杂的 T-DNA 整合模式(>4 拷贝)。

还分析了先前实施例中转基因玉米植株后代中转基因的分离模式。在从 57 个独立转基因愈伤组织系再生的 113 株植物中，用 Basta 除草剂喷洒法监测其 PAT 活性的分离。在再生自 32 个独立转基因愈

5 伤组织系的 74 株植物后代中，观察到了 1:1 的 PAT 活性分离，表明在 T0 代植物中除草剂抗性转基因是以 1 个或多个紧密相连的拷贝存在的。在再生自 18 个独立转基因愈伤组织系的 31 个植物后代中，所有植株均可耐受 Basta 除草剂的喷洒，或耐受型的植株明显多于敏感型植株，表明在 T0 植株中存在二个或更多的非连锁拷贝。最后，在再生自 7 个独立转基因愈伤组织系的 14 个植物后代中，未观察到耐受植株，或敏感型植株明显多于耐受型植株。后面这些植株没有进行进一步分析。

10 对 53 个独立转化玉米植株(T0)中每一个的 2 个 Basta 除草剂抗性 T1 后代所进行的 Southern 分析，揭示在约 70%的受分析情况(35/53)中，两个后代植株均具有与 T0 亲本植株品系相一致的 T-DNA 整合模式。在约 18%的例子(10/53)中观察到了分离。

参考文献

- Ashby *et al.* (1988) *J. Bacteriol.* **170**: 4181-4187
- Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, USA.
- Bolton *et al.* (1986) *Science* **232**: 983-985;
- Bytebier *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5345-5349
- Chan *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* **22**: 491-506
- Chen and Winans (1991) *J. Bacteriol.* **173**: 1139-1144
- Chilton *et al.* (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 3672-3676
- Chu *et al.* (1975) *Sci. Sin. Peking*, **18**, 659-668
- Christou (1994) *Agro-Food Industry Hi-Tech* 17-27
- Cornelissen and Vandewiele (1989) *Nucl. Acids Res.* **17**: 833-.
- R.D.D. Croy (1993) *Plant Molecular Biology Labfax* BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK.
- Das *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**: 1355-1364
- Deblaere *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* **153**: 277-293
- De Block *et al.* (1987) *EMBO J.* **6**: 2513-2518).
- Ditta *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7347-7351
- Guivarc'h *et al.* (1993) *Protoplasma* **174**: 10-18
- Hansen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7603-7607
- Hernalsteens *et al.* (1984) *EMBO J.*
- Hooykaas-Van Slogteren *et al.* (1984) *Nature* **311**:763-764
- Jacq *et al.* (1993) *Plant Cell Reports* **12**: 621-624
- James *et al.* (1993) *Plant Cell Reports* **12**: 559-563)
- Jarchow *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10426-10430
- Klapwijk *et al.* (1980) *J. Bacteriol.*, **141**, 128-136
- Liu *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* **20**: 1071-1087
- Mariani *et al.* (1990) *Nature* **347**: 737-741
- Mariani *et al.* (1992) *Nature* **357**: 384-387

-
- Miller (1972) "Experiments in Molecular Genetics" Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- Mooney *et al.* (1991) *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* **25**: 209-218
- Murashige and Skoog (1968) *Physiol. Plant.* **15**, 473-497
- Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 205-225
- Raineri *et al.* (1990) *Bio/technology* **8**: 33-38
- Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Scheeren-Groot *et al.* (1994) *J. Bacteriol* **176**: 6418-6426
- Stachel *et al.* (1985) *Nature* **318**: 624-629
- Stachel and Nester (1986) *EMBO J.* **5**: 1445-1454
- Van Laerebeke *et al.* (1974) *Nature* **252**, 169-170
- Van Wordragen and Dons (1992) *Plant Mol. Biol. Rep.* **10**: 12-36
- Vasil (1994) *Plant Mol. Biol.* **25**: 925-937
- Vernade *et al.* (1988) *J. Bacteriol.* **170**: 5822-5829
- Watson *et al.* (1975) *J. Bacteriol* **123**, 255-264

序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人:

(A) 姓名: Plant Genetic Systems N.V.

(B) 街道: Jozef Plateatraat 22

(C) 城市: Gent

(E) 国家: 比利时

(F) 邮政编码(ZIP): B-9000

(G) 电话: 32 9 235 84 54

(H) 传真: 32 9 223 19 23

5

(ii) 发明名称: 植物转化的改良方法

(iii) 序列数: 5

10

(iv) 计算机可读形式

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本 1.30

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 2345 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc = “ pGSV71 的 T-DNA ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

- (B) 位置: 1...25
 (D) 其它信息: /标记 = RB
 /注释 = “ T-DNA 右边界”
- (ix) 特征:
 (A) 名称/关键词: -
 (B) 位置: 53...1436
 (D) 其它信息: /注释 = “ CaMV35S P3 启动子”
- (ix) 特征:
 (A) 名称/关键词: -
 (B) 位置: 53...1436
 (D) 其它信息: /产物 = “磷丝菌素(phosphintrin)乙酰转移酶”
 /标记 = bar
 /注释 = “磷酸乙酰转移酶编码区”
- (ix) 特征:
 (A) 名称/关键词: -
 (B) 位置: 2007...2266
 (D) 其它信息: /标记 = 3'nos
 /注释 = “含农杆菌 T-DNA 胭脂碱合酶多腺苷酸化信号的 3'非翻译区”
- (ix) 特征:
 (A) 名称/关键词: -
 (B) 位置: 2321...2245
 (D) 其它信息: /标记 = LB
 /注释 = “ T-DNA 左边界”
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 1:

AATTACAACG GSTATATATCC TGCCAGTACT CGGCCGTCGA CCGCGGTACC CGGAATTCCA

60

ATCCCACCAA AACCTGAACC TAGCAGTTCA GTTGCTCCTC TCAGAGACCA ATCGGGTATT	120
CAACACCCTC ATACCAACTA CTACGTCGTG TATAACGGAC CTCATGCCGG TATATACGAT	180
GACTGGGGTT GTACAAAGGC AGCAACAAAC GGTGTTCCCG GAGTTGCGCA TAAGAAGTTT	240
GCCACTATTA CAGAGGCAAG AGCAGCAGCT GACGCGTATA CAACAAGTCA GCAAACAGAT	300
AGGTTGAACT TCATCCCCAA AGGAGAAGCT CAACTCAAGC CCAAGAGCTT TCGGAAGGCC	360
CTAACAAGCC CACCAAAGCA AAAAGCCCAC TGCTCACGCT AGGAACCAA AGGCCAGCA	420
GTGATCCAGC CCCAAAAGAG ATCTCCTTTG CCCC GGAGAT TACAATGGAC GATTTCTCT	480
ATCTTTACGA TCTAGGAAGG AAGTTCGAAG GTGAAGGTGA CGACACTATG TTCACCACTG	540
ATAATGAGAA GGTAGCCTC TTCAATTCA GAAAGAATGC TGACCCACAG ATGGTTAGAG	600
AGGCCTACGC AGCAGGTCTC ATCAAGACGA TCTACCCGAG TAACAATCTC CAGGAGATCA	660
AATACCTTCC CAAGAAGGTT AAAGATGCAG TCAAAGATT CAGGACTAAT TGCATCAAGA	720
ACACAGAGAA AGACATATTT CTCAAGATCA GAAGTACTAT TCCAGTATGG ACGATTCAAG	780
GCTTGCTTCA TAAACCAAGG CAAGTAATAG AGATTGGAGT CTCTAAAAAG GTAGTTCCTA	840
CTGAATCTAA GGCCATGCAT GGAGTCTAAG ATTCAAATCG AGGATCTAAC AGAACTCGCC	900
GTGAAGACTG GCGAACAGTT CATAAGAGT CTTTTACGAC TCAATGACAA GAAGAAAATC	960
TTCGTCAACA TGGTGGAGCA CGACACTCTG GTCTACTCCA AAAATGTCAA AGATACAGTC	1020
TCAGAAGACC AAAGGGCTAT TGAGACTTTT CAACAAAGGA TAATTCGGG AACCTCCTC	1080
GGATTCCATT GCCCAGCTAT CTGTCACTTC ATCGAAAGGA CAGTAGAAAA GGAAGGTGGC	1140
TCCTACAAAT GCCATCATTG CGATAAAGGA AAGGCTATCA TTCAAGATGC CTCTGCCGAC	1200

AGTGGTCCCA AAGATGGACC CCCACCCACG AGGAGCATCG TGGAAAAAGA AGACGTTCCA	1260
ACCACGTCTT CAAAGCAAGT GGATTGATGT GACATCTCCA CTGACGTAAG GGATGACGCA	1320
CAATCCCCTT ATCCTTCGCA AGACCCTTCC TCTATATAAG GAAGTTCTATT TCATTTGGAG	1380
AGGACACGCT GAAATCACCA GTCTCTCTCT ATAAATCTAT CTCTCTCTCT ATAACCATGG	1440
ACCCAGAACG ACGCCCGGCC GACATCCGCC GTGCCACCGA GGC GGACATG CCGCGGTCT	1500
GCACCATCGT CAACCACTAC ATCGAGACAA GCACGGTCAA CTTCCGTACC GAGCCGCAGG	1560
AACCGCAGGA GTGGACGGAC GACCTCGTCC GTCTGCGGGA GCGCTATCCC TGGCTCGTCG	1620
CCGAGGTGGA CGGCGAGGTC GCCGGCATCG CCTACGCGGG CCCCTGGAAG GCACGCAACG	1680
CCTACGACTG GACGGCCGAG TCGACCGTGT ACGTCTCCCC CCGCCACCAG CGGACGGGAC	1740
TGGGCTCCAC GCTCTACACC CACCTGCTGA AGTCCCTGGA GGCACAGGGC TTCAAGAGCG	1800
TGGTCGCTGT CATCGGGCTG CCCAACGACC CGAGCGTGCG CATGCACGAG GCGCTCGGAT	1860
ATGCCCCCG CGGCATGCTG CGGGCGGCCG GCTTCAAGCA CGGGA ACTGG CATGACGTGG	1920
GTTTCTGGCA GCTGGACTTC AGCCTGCCGG TACCGCCCCG TCCGGTCCTG CCCGTCACCG	1980
AGATCTGATC TCACGCGTCT AGGATCCGAA GCAGATCGTT CAAACATTTG GCAATAAAGT	2040
TTCTTAAGAT TGAATCCTGT TGCCGGTCTT GCGATGATTA TCATATAATT TCTGTTGAAT	2100
TACGTTAAGC ATGTAATAAT TAACATGTAA TGCATGACGT TATTTATGAG ATGGGTTTTT	2160
ATGATTAGAG TCCC GCAATT ATACATTTAA TACGCGATAG AAAACAAAAT ATAGCGCGCA	2220
AACTAGGATA AATTATCGCG CGCGGTGTCA TCTATGTTAC TAGATCGGGA AGATCCTCTA	2280
GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTAGAT CCATGGAGCC ATTTACAATT GAATATATCC	2340

TGCCG

2345

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 1086 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 双链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (A) 说明: /desc = “包含 adh1 内含子的 bar 基因编码区”
- (ix) 特征:
- (A) 名称/关键词: CDS
 - (B) 位置: 1...233
 - (D) 其它信息: /产物 = “磷丝菌素乙酰转移酶(N端一半)”
- (ix) 特征:
- (A) 名称/关键词: 内含子
 - (B) 位置: 234...769
 - (D) 其它信息: /标准名称 = “adh1 内含子”
- (ix) 特征:
- (A) 名称/关键词: CDS
 - (B) 位置: 770...1086
 - (D) 其它信息: /产物 = “磷丝菌素(phosphintrin)乙酰转移酶 (C端一半)”
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 2:

```

ATGGACCCAG AACGACGCCG GGCCGACATC CGCCGTGCCA CCGAGGCGGA CATGCCGGCG      60
5  GTCTGCACCA TCGTCAACCA CTACATCGAG ACAAGCACGG TCAACTTCCG TACCGAGCCG      120
   CAGGAACCGC AGGAGTGGAC GGACGACCTC GTCCGTCTGC GGGAGCGCTA TCCCTGGCTC      180
   GTCGCCGAGG TGGACGGCGA GGTCGCCGGC ATCGCCTACG CGGGCCCCTG GAAAGGTCCG      240
10

```

	CCTTGTTTCT CCTCTGTCTC TTGATCTGAC TAATCTTGGT TTATGATTCG TTGAGTAATT	300
	TTGGGGAAAG CTTCGTCCAC AGTTTTTTTT TCGATGAACA GTGCCGCAGT GGCGCTGATC	360
5	TTGTATGCTA TCCTGCAATC GTGGTGAAC TATGTCTTTT ATATCCTTCA CTACCATGAA	420
	AAGACTAGTA ATCTTTCTCG ATGTAACATC GTCCAGCACT GCTATTACCG TGTGGTCCAT	480
10	CCGACAGTCT GGCTGAACAC ATCATACGAT ATTGAGCAAA GATCTATCTT CCCTGTTCTT	540
	TAATGAAAGA CGTCATTTTC ATCAGTATGA TCTAAGAATG TTGCAACTTG CAAGGAGGCG	600
15	TTTCTTTCTT TGAATTTAAC TAACTCGTTG AGTGGCCCTG TTTCTCGGAC GTAAGGCCTT	660
	TGCTGCTCCA CACATGTCCA TFCGAATTTT ACCGTGTTTA GCAAGGGCGA AAAGTTTGCA	720
	TCTTGATGAT TTAGCTTGAC TATGCGATTG CTTTCCTGGA CCCGTGCAGC TAGGAACGCC	780
20	TACGACTGGA CGGCCGAGTC GACCGTGTAC GTCTCCCCC GCCACCAGCG GACGGGACTG	840
	GGCTCCACGC TCTACACCCA CCTGCTGAAG TCCCTGGAGG CACAGGGCTT CAAGAGCGTG	900
25	GTCGCTGTCA TCGGGCTGCC CAACGACCCG AGCGTGCACA TGCACGAGGC GCTCGGATAT	960
	GCCCCCGCG GCATGCTGCG GCGGCCGGC TTCAAGCACG GGAAGTGGCA TGACGTGGGT	1020
30	TTCTGGCAGC TGGACTTCAG CCTGCCGGTA CCGCCCCGTC CGGTCCTGCC CGTCACCGAG	1080
	ATCTGA	1086

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 108 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc = “ pGSV8 的 T-DNA ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

(B) 位置: 1...25

(D) 其它信息: /标记 = RB

/注释 = “ T-DNA 右边界 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

(B) 位置: 26...83

(D) 其它信息: /标记 = MCS

/注释 = “ 多克隆位点 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

(B) 位置: 84...108

(D) 其它信息: /标记 = LB

/注释 = “ T-DNA 左边界 ”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 3:

AATTACAACG GTATATATCC TGCCAGTACT CGGCCGTCGA CCGCGGTACC CGGAATTCCG 60

GGGAAGCTTA GATCCATGGA GCCATTTACA ATTGAATATA TCCTGCCG 108

5

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

- (ii) 分子类型: 其它核酸
 - (A) 说明: /desc = “寡核苷酸 VG40”

- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 4:

GCCAAAAAGT TTGATCTAGA GCATTTTCG

29

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 33 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
 - (A) 说明: /desc = “寡核苷酸 VG41”

- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 5:

5

GCGACCCCGC TAGCTTAAAC AAAGCTTATC TCC

33