

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/63

C12N 15/29

C12N 15/31 C12N 5/10

A01H 1/00

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95120511.0

[45] 授权公告日 2001 年 10 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1073624C

[22] 申请日 1995. 11. 9

[21] 申请号 95120511.0

[30] 优先权

[32]1994. 11. 9 [33]JP [31]311399/1994

[32]1995. 5. 31 [33]JP [31]170123/1995

[32]1995. 10. 4 [33]JP [31]293254/1995

[32]1995. 10. 25 [33]JP [31]313432/1995

[73] 专利权人 日本制纸株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 海老沼宏安 杉田耕一 松永悦子

山门千子

[56] 参考文献

EP0334383 1989. 1. 1 C12N15/00

WO94/17176 1994. 1. 1 C12N15/00

审查员 孙广秀

[74] 专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 5 页 说明书 52 页 附图页数 31 页

[54] 发明名称 用于生产转基因植物的载体和方法

[57] 摘要

一种用于将目的基因导入植物的载体,它包括一个目的基因和至少一个作为标记基因的形态异常诱导(MAI)基因,或者它包括一个目的基因,至少一个 MAI 基因和一个可除去 DNA 因子。一种生产不受标记基因影响的转基因植物的方法。一种用于多次将目的基因导入同一植株的方法。

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

知识产权出版社出版

# 权 利 要 求 书

---

1、一种用于将目的基因导入植物的载体，它包括所述目的基因，至少一个作为标记基因的形态异常诱导基因，和一个可除去DNA因子，其中，所述形态异常诱导基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子一致，而目的基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子不一致。

2、如权利要求1所述的载体，其中，所述形态异常诱导基因位于可除去DNA因子之内。

3、如权利要求1所述的载体，其中，所述可除去DNA因子是转座子。

4、如权利要求1所述的载体，其中，所述可除去DNA因子来自一个位点专一性重组系统。

5、如权利要求1所述的载体，其中，所述形态异常诱导基因是从土壤杆菌属微生物中获得的。

6、如权利要求1所述的载体，其中，所述形态异常诱导基因是细胞分裂素合成基因。

7、如权利要求6所述的载体，其中，所述细胞分裂素合成基因是存在于根瘤土壤杆菌T-DNA上的ipt（转异戊烯酶）基因。

8、如权利要求1所述的载体，其中，所述形态异常诱导基因是选自rol基因中的至少一个基因。

9、如权利要求8所述的载体，其中，所述rol基因是存在于生根土壤杆菌T-DNA上的包括rolA、rolB和rolC的rol基因。



10、一种用于生产不受标记基因影响的转基因植物的方法，包括以下步骤：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，所述载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的形态异常诱导基因， 和一个可除去DNA因子，其中， 该形态异常诱导基因是这样定位的， 其行为与可除去DNA因子一致； 该目的基因是这样定位的， 其行为与可除去DNA因子不一致；

(B) 培养在步骤(A)中获得的植物细胞，检测在培养中出现的形态异常组织， 并选择出所述形态异常组织，

(C) 培养在步骤(B)中选择的形态异常组织，检测在培养中出现的形态正常组织， 选择出所述形态正常组织。

11、如权利要求10所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因存在于所述可除去DNA因子之内。

12、如权利要求10所述的方法，其中，所述可除去DNA因子是转座子。

13、如权利要求10所述的方法，其中，所述可除去DNA因子来自一个位点专一性重组系统。

14、如权利要求10所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因得自土壤杆菌属微生物。

15、如权利要求10所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因是细胞分裂素合成的基因。

16、如权利要求15所述的方法，其中，所述细胞分裂素合成基因是存在于根瘤土壤杆菌T-DNA上的ipt (转异戊烯酶) 基因。

17、如权利要求10所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因



是选自rol基因中的至少一个基因。

18、如权利要求17所述的方法，其中，所述rol基因是存在于生根土壤杆菌T-DNA上的包括rolA、rolB和rolC的rol基因。

19、一种用于将至少两个目的基因导入一株植物的方法，包括将以下步骤至少重复两次：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，该载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的形态异常诱导基因，和一个可除去DNA因子，其中，该形态异常诱导基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子一致，该目的基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子不一致；

(B) 培养在步骤(A)中获得的植物细胞，检测在培养中出现的形态异常的植物组织，并选择出所述形态异常组织，以及

(C) 培养在步骤(B)中选择的所述形态异常组织，检测在培养中出现的形态正常组织，选择出所述形态正常组织。

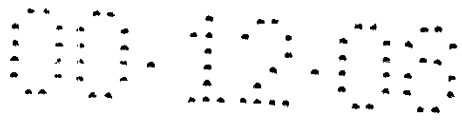
20、如权利要求19所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因存在于所述可除去DNA因子之中。

21、如权利要求19所述的方法，其中，所述可除去DNA因子是转座子。

22、如权利要求19所述的方法，其中，所述可除去DNA因子来自一个位点专一性重组系统。

23、如权利要求19所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因是从土壤杆菌属微生物中获得的。

24、如权利要求19所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因是细胞分裂素合成基因。



25、如权利要求24所述的方法，其中，所述细胞分裂素合成基因是存在于根瘤土壤杆菌T-DNA上的ipt（转异戊烯酶）基因。

26、如权利要求19所述的方法，其中，所述形态异常诱导基因是选自rol基因中的至少一个基因。

27、如权利要求26所述的方法，其中，所述rol基因是存在于生根土壤杆菌T-DNA上的包括rolA、rolB和rolC的rol基因。

28、一种生产不受标记基因影响的转基因植物的方法，该方法包括以下步骤：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，所述载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的形态异常诱导基因， 和一个可除去DNA因子，其中，所述形态异常诱导基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子一致，其中所述目的基因是这样定位的， 其行为与可除去DNA因子不一致；

(B) 培养在步骤(A)中获得的植物细胞，检测在培养中出现的形态异常植物组织，选择出所述形态异常组织，

(C) 培养在步骤(B)中选择的形态异常组织，检测在培养中出现的形态正常组织，选择出所述形态正常组织，以及

(D) 培养所述形态正常组织以再生植株。

29、一种生产含有2个或2个以上目的基因的植物的方法，该方法包括以下步骤：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，所述载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的形态异常诱导基因， 和一个可除去DNA因子，其中，所述形态异常诱导基因是这样定位的，其行为与可除去DNA因子一致，其中所述目的基因是这样定位的， 其行为与可除去



DNA因子不一致;

(B)培养在步骤(A)中获得的植物细胞,检测在培养中出现的形态异常植物组织,选择出所述形态异常组织,以及

(C)培养在步骤(B)中选择的所述形态异常组织,检测在培养中出现的形态正常组织,选择出所述形态正常组织,

(D)将步骤(A)至(C)至少进行一次,以及

(E)培养所述形态正常组织,以再生植株。

# 说明书

---

## 用于生产转基因植物 的载体和方法

本发明涉及一种用于将目的基因导入植物，利用遗传工程方法获得转基因植物的新载体；一种利用该载体生产不受标记基因影响的转基因植物的方法；以及一种利用该载体将至少两个目的基因导入植物的方法。

利用遗传工程的微生物转化和培养细胞的转化现已应用于可用作药品的生理活性物质的生产，并大大促进了制药业的发展。在植物育种领域，遗传工程的大规模应用滞后了，因为植物的生活周期远长于微生物的生活周期。然而，由于这一技术可将目的基因直接导入待培育的植物，与需要多次杂交的传统育种技术相比，它具有如下优点：

- (a) 可仅引入待改进的一个特征。
- (b) 可将植物以外物种（如微生物等）的特征引入植物。
- (c) 可大大缩短育种周期。

因此，已对用于植物育种的遗传工程方法进行了大量研究。

转基因植物的生产需以下三个步骤。

(1) 将目的基因导入植物细胞（包括将目的基因导入染色体，细胞核等。）

(2) 选择仅由导入了目的基因的细胞组成的植物组织。

### (3) 由选择的植物组织再生植株。

为了筛选导入了目的基因的转基因组织，一直渴望在不再生新植株的情况下，目测确认目的基因得到表达的组织。为达到这一目的，通常将目的基因和标记基因一起导入植物细胞，这样，在细胞培养阶段就可很容易地检测出标记基因的表达。即，将标记基因的表达用作目的基因表达的指示。常规标记基因的例子包括抗生素抗性基因，如卡那霉素抗性基因（即：NPTII；新霉素转磷酸酶基因），潮霉素抗性基因（即：HPT；潮霉素转磷酸酶基因），氨基酸合成酶基因，如胭脂碱合成酶基因（NOS），章鱼碱合成酶基因（OCS），以及能产生农药抗性的磺酰脲类抗性基因（即ALS；乙酰乳酸合成酶基因）。

然而，当把这种转基因植物用作食物时，标记基因的表达会造成严重后果。就是说，很难确保由标记基因表达所产生的基因产物对人体来说是安全的。因此，如果要把含有标记基因的转基因植物作为食品出售，必须进行深入研究以确定该标记基因对人体的影响。例如，从80年代初开始，NPTII基因就被在实验室水平上用作标记基因。1994年，该基因的产物终于被美国粮食和药物管理局（FDA）接受为食品添加剂。从那时起，含有NPTII基因作为标记基因的转基因植物一直可被用作食品。然而，含NPTII基因制品的某些消费者仍然担心该基因的作用。

不过，实际上被利用的标记基因只是诸如NPTII之类的基因，该基因对植物细胞内的生长抑制物质具有解毒作用。因此，为了选择出导入了目的基因的转基因植物组织，在含有其生长抑制物质的培养基上培养植物组织，并对标记基因的表达，即植物组织对生长



抑制物质的抗性进行评估，将评估的结果作为判断目的基因导入与否的指标。然而，即使某一组织具有这种抗性，在有抑制物质的情况下进行培养，仍能对植物细胞产生不良的副作用，如转基因组织增殖和再分化的减慢。

另外，在转基因组织选择以后，标记基因在植物细胞中的表达会严重影响随后导入基因的植物育种。即，当要把另一个基因导入含有标记基因的转基因植物时，该基因的导入必须用一个不同的标记基因来监测。然而，标记基因的效果随植物品种而变化。因此，需要初步试验以确定每一种标记基因的条件（例如，据报导，在水稻植株上HPT基因比NPTII基因更有效果(K. Shimamoto等, Nature (London), Vol. 338, P. 274, 1989)）。再者，由于标记基因的种类是有限的，不能单靠改变标记基因的办法无限制地多次导入基因。即，可导入某种植物的基因的数量本身，受到可用于植物上的标记基因种类的限制。此外，可实际应用的标记基因的种类又受以上限制。因此，一直希望找到一种能在选择出转基因植物组织以后从染色体上除去标记基因的方法，以排除标记基因对细胞、组织和植株的影响。

已报导过两种消除标记基因影响的方法。在一种方法中，把标记基因和植物转座子一起导入植物染色体，随后又随转座子一起从染色体上除去（国际公开号：WO 92/01370）。在第二种方法中，用P1噬菌体的位点专一性重组系统来代替以上的转座子（国际公开号：WO 93/01283）。采用上述方法，有可能在导入基因后标记基因又以一定的比例从植物染色体上除去的细胞，不幸的是，标记基因被除去的可能性很小。

另外，已用上述方法把标记基因从染色体上除去的植物细胞分散于仍具有标记基因且得到表达的细胞中。这种两种细胞不能用肉眼区分。

含有标记基因和目的基因的植物细胞是根据其抗药性、营养需求等特征来选择的。不过，在选择时缺少标记基因的细胞表现出严重的生长抑制，并在多数情况下被杀死。因此，这些选择方法不能用于选择缺少标记基因的细胞。

为了采用上述方法选择到缺少标记基因但具有目的基因的植株，繁殖缺少标记基因的细胞与具有标记基因细胞的植物组织，并使其再生，然后采用诸如Southern杂交或聚合酶链式反应的方法进行分析选择。该方法基于这样的前提，即再生的单株来源于单细胞，因此该单株上的所有植物细胞都应具备相同的特征。因此，由缺少标记基因的细胞所产生的单株仅由这种细胞组成。不幸的是，构成这种再生单株的细胞并非必然是一致的。缺少标记基因染色体的细胞和含有标记基因的细胞甚至共存并极无规律地分布于同一个再生的单株上，以及单株的同一组织中。因此，要在培养的组织再分化以再生单株的阶段获得仅由缺少标记基因的细胞组成的单株是极为困难的。

另外，现有的选择分析方法采用诸如叶子之类的组织作为测试样品（并非整个单株或单细胞）。因此，所分析的只是关于标记基因在一片叶子里存在的总倾向。此外，在这种情况下，无标记基因的细胞与含有标记基因的细胞存在于同一个体或组织中是很常见的。所以，即使偶而出现仅由缺乏标记基因的细胞组成的单株，要选择这种单株也是十分困难的。即使在这一组织中未检测出标记基因，

同一单株上其它部位的组织中也可能含有该标记基因，或者仅表明标记基因的数量低于检测极限。因此，不可能确定测试样品是否完全没有含标记基因的细胞。

采用上述方法，仅从生殖细胞获得了无标记基因的个体，生殖细胞有花粉、卵细胞等。按照经典的遗传定律，当用缺少标记基因的卵细胞进行自花授粉时，可获得一定比例缺少标记基因的受精卵，由这种受精卵可获得仅由具有与这种受精卵相同的特征的细胞所产生的单株。可用常规分析方法如Southern杂交对这种单株进行分析。即，尽管用上述方法可获得缺少标记基因的细胞，但通过从含有这种细胞的培养组织再分化出植株，从而获得仅由这种细胞组成的单株还是第一次。通过对该再生株进行杂交获得了 $F_1$ 代或更后代。由此获得的单株可选作缺少标记基因的单株。

为了从转基因植物中除去标记基因，JP-A-6-276872报导了一种基因导入技术，其中，将标记基因插入了与含有目的基因的载体不同的一个独立的质粒载体。在基因导入完成以后，含有标记基因的质粒被从细胞中除去(这里所用的“JP-A”的是指日本公开的专利申请)。然而，该技术需要一个杂交步骤以除去标记基因。在这一方面，这一技术与上述两篇报导相同。

上述方法很难应用于生长周期长的木本植物、不育的个体或杂种个体，其中 $F_1$ 本身就是有价值的。另外，当采用DNA可除去因子，如转座子时，这种因子从存在这种因子并起作用的染色体DNA、病毒载体DNA等上排除的比率是很低的。因此，实际上至少在组织培养阶段即可很容易地检测出这种因子被排除(即，标记基因被排除)是必要的。如果不能在培养的组织再分化之前和在通过所再生产的

单株的杂交产生后代以前检测出标记基因是否被除去，该方法就是不实用的。

因此，本发明的目的之一是提供一种含有希望导入植物的基因和标记基因的载体，其中，含有这种载体的植物，即使在标记基因表达的情况下，摄食后也不会对人体产生不利影响。

本发明的另一个目的是提供一种用于把目的基因导入植物的载体，其中，该载体含有不使用会降低细胞活性的细胞生长抑制物质即可选择出转基因组织的标记基因。

本发明的又一个目的是提供一种用于把目的基因导入植物的载体，其中，该载体含有一个标记基因，并通过从存在标记基因并起作用的DNA上除去该标记基因的方式起到消除标记基因影响的作用。采用这种载体，可将目的基因反复有效地导入植物。

本发明还有一个目的是提供一种利用这种载体生产转基因植物的方法，该方法无须进行杂交以获得 $F_1$ 或更后代的步骤即可消除标记基因的影响，以及利用上述方法把基因多次导入植物的方法。

本发明的上述目的及其它目的是采用一种载体实现的，该载体包括一个目的基因和至少一个作为标记基因的形态异常诱导（以下简称“MAI”）基因。

本发明的这些和其它的目的还可利用这样一种载体来实现，其中，该标记基因在表达后被从DNA上除去。标记基因的表达及其作用的消失可通过导入了标记基因的组织形态变化检测到。

另外，本发明的这些和其它目的也可以利用一种包括一个目的基因、至少一个作为标记基因的MAI基因和一个可除去DNA因子的载体来实现。MAI基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为一

致。目的基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为不一致。

此外，本发明的这些和其它的目的还可以通过一种生产不受标记基因影响的转基因植物的方法来实现，该方法包括以下步骤：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，所述载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的MAI基因，及一个可除去DNA因子。其中所述MAI基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为一致；目的基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为不一致，

(B) 培养在步骤(A)中得到的植物细胞，检测在培养中出现的形态异常的植物组织，并选择出这种形态异常的组织，以及

(C) 培养在步骤(B)中选择的形态异常组织，检测在培养中出现的形态正常的组织，并选择出这种形态正常的组织。

另外，本发明的这些和其它目的可以通过一种把至少两个目的基因导入植物的方法来实现，该方法包括将以下步骤进行至少两次：

(A) 将载体导入植物细胞，其中，该载体包括一个目的基因，至少一个作为标记基因的MAI基因，以及一个可除去DNA因子。其中，所述MAI基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为一致；目的基因的位置是这样的，它与可除去DNA因子的行为不一致，

(B) 培养在步骤(A)中获得的植物细胞，检测在培养中出现的形态异常的植物组织，并选择出这种形态异常的组织，以及

(C) 培养在步骤(B)中选择的形态异常的组织，检测在培养中出现的形态正常的组织，选择出这种形态正常的组织。

另外，本发明的这些和其它目的已通过培养上述的形态正常的组织再生的植物而实现。

图1是Ti质粒和根瘤土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 菌株PO22和T-DNA区和PstI片段的限制性内切酶图谱。

图2是pIPT2的构建示意图。

图3是pIPT2构建pIPT3的示意图。

图4是由pIPT3构建pIPT4的示意图。

图5是pIPT4结构中的T-DNA片段的限制性内切酶谱。

图6是用pIPT4导入了一个基因的烟草的极端多芽表型 (extreme Shooty Phenotype) 的PCR分析结果。

图7是pNPI102构建示意图。

图8是由pIPT4和pNPI102构建pNPI103的示意图。

图9是由pNPI103构建pNPI106的示意图。

图10是pNPI106上的T-DNA片段的限制性内切酶谱。

图11是实施例2中2号芽在培养1个月后的照片。

图12是实施例2中8号芽在经过1个月培养后的照片。

图13是实施例2中8号芽的PCR分析结果。

图14是实施例3中由13-1号芽和14-1号芽所获正常个体的PCR分析结果。

图15是实施例3中烟草的极端多芽表型分化而来的正常芽的照片。

图16是实施例2中由7号芽上的所长出的一片叶子所获得的正常个体的PCR分析结果。

图17是pNPI128构建示意图。

图18是由pNPI128构建pNPI129的示意图。

图19是由pNPI101和pNPI129构建pNPI132的示意图。

图20是pNPI132结构上T-DNA区的限制性内切酶谱。

图21是实施例5中由15至21号芽获得的正常个体的PCR分析结果，采用能检测到ipt基因存在的引物。

图22是实施例5中由15至21号芽获得的正常个体的PCR分析结果，采用可检测一对Rs之间区域，包括ipt基因的除去引物。

图23是实施例5中由15至21号芽获得的正常个体的PCR分析结果，采用可检测到GUS基因存在的引物。

图24A、图24B和图24C是从实施例5中由不能产生极端多芽表型的细胞系获得的正常个体的PCR分析结果。

图25是pNPI702构建的示意图。

图26是pNPI702结构上T-DNA区的限制性内切酶图谱。

图27是实施例7中由杂种白杨的极端多芽表型分化得到的正常芽的照片。

图28是pNPI140结构上的T-DNA区的限制性内切酶图谱。

图29是实施例8中在多次导入基因后由极端多芽表型分化得到的正常芽的PCR分析结果。

这里所用的MAI基因是一种能诱发植物组织发生形态异常分化，如矮化，丧失顶端优势，色素变化，生成根瘤，生成发根，叶子呈波浪状等的基因。就优选的MAI基因而言，可采用从能在各种植物上诱发肿瘤（例如，不定芽和不定根的产生）的土壤杆菌等细菌中分离的基因。所述各种MAI基因的例子包括细胞分裂素合成基因（例如，ipt（转异戊烯酶）基因（A.C.Smigocki, L.D.Owens, Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A., Vol.85, p5131, 1988)), iaaM(色氨酸加单氧酶) 基因(H.J.Klee等, GENES & DEVELOPMENT, Vol.1, P.86,

1987), 基因5 (H.Körker等, EMBO Journal, Vol.10, P.3983, 1991), 基因6b (P.J.J.Hoyaas等, Plant Mol.Biol., Vol.11, p791, 1988), 以及rol基因如rolA, rolB, rolC和rolD(F.F.White等, J.Bacteriol., Vol.164, P.33, 1985)。另外, 这种例子还包括丁香假单胞菌Savastanoi亚种(*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*)的*iaaL*(吲哚乙酸-赖氨酸合成酶)基因(A.Spena等, Mol.Gen.Genet., Vol.227, P205, 1991), 同源框基因和植物中的各种植物色素基因。最好采用细胞分裂素合成基因如*ipt*基因或从诸rol基因中选择的至少一个基因(更理想的是含rolA、rolB和rolC的rol基因)。*ipt*基因存在于根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的T-DNA中并会引发顶端优势的丧失。带有rolA、rolB、rolC的rol基因存在于生根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的T-DNA中, 至少其中之一会诱发由发根再生的植株产生发根、矮化、叶子呈波浪状等现象。

利用本发明的技术, 人们可以设计一种上述标记基因的组合, 以便在导入了这种基因的特定植物中再分化出诸如不定芽、不定根或类似器官的特殊结构。在本发明中, 根据生产转基因植物的条件, 如有待导入基因的植物种类采用MAI基因的这种组合。

将MAI基因导入细胞中所产生的形态异常的组织仅由含有这种基因的细胞组成。因此, 用该基因作标记基因, 与目的基因一起构建载体。当该载体被导入植物细胞, 并对转基因细胞进行培养时, 通过肉眼选择出由这种细胞组成的形态异常的组织, 可以选择出仅由导入了标记基因和目的基因的细胞组成的组织。

可在本发明中采用的适用载体具有一个能把外源基因导入宿主



细胞并在宿主细胞中表达该外源基因的DNA序列。

当利用本发明的载体导入基因时，只需在基因导入操作完成后，在诸如MS (Murashige-skoog)培养基的普通培养基中，在普通培养条件下培养该细胞，就可用肉眼选择出仅由转化细胞构成的植物组织。由于无须利用特殊物质，如植物细胞生长抑制物质来选择转化的组织，不仅简化了程序，而且植物细胞的活性也不因这种物质而下降。另外，植物本身就具备该MAI基因，或者MAI基因也可通过细菌等的感染而自发地导入植物。因此，利用本发明的载体所获得的植物与自然出现的具有这种形态异常性的植物没有区别。

本发明的合适载体包括这样一种载体，其中MAI基因的位置是这样的，它的行为与可除去DNA因子的行为一致；目的基因的位置是这样的，它的行为与可除去DNA因子的行为不一致。

这里所说的可除去DNA因子是一个DNA序列因子，它自身可从其赖以存在和作用的DNA序列上除去。在植物中，存在于染色体上的转座子就被认为是这种因子。转座子的结构、活性和表现几乎已被完全搞清。转座子的功能主要需要两个部分，(1) 由存在于转座子上的基因表达产生的一种酶，它能催化转座子本身的切除和转移(转座酶)，(2) 存在于转座子末端区的DNA结合序列，上述转座酶就作用在这一部分。在这些因子的作用下，转座子被从它所存在的染色体上切除，并通常易位到DNA上的一个新位点。然而，转座子也会以一定比例消失而不是易位。本发明就利用了转座子的这种易位错误。

所述转座子可以是两种类型中的一种：或是自主转座子或是非自主转座子。自主转座子保持着上述两个部分：转座酶和DNA结合

序列。在自主转座子中，转座酶被表达并与DNA结合序列结合，并发生作用，使转座子自动地从染色体上切除。非自主转座子保留着末端DNA结合序列，转座酶可与之结合发生作用。在非自主转座子中，转座酶基因发生突变，因此转座酶未能表达，转座子不能从染色体上自动地切除。不过，当转座酶被从自主转座子或一个独立的转座酶基因提供给非自主转座子时，非自主转座子的表现与自主转座子的表现相似。

自主转座子的例子包括从玉米中分离出的Ac和Spm (A.Gieri和H.Saedler, *Plant Mol.Biol.*, Vol 19, P.39, 1992)。Ac可以通过用限制性内切酶Sau3A消化玉米染色体上的WX-m7基因位点而获得(U.Behrens等, *Mol.Gen.Genet.*, Vol 194, p346, 1984)。该自主转座子是植物转座子中分析得最多的一种。实际上，其DNA序列已被确定(M.Müller-Neumann等, *Mol. Gen.Genet.*, Vol.198, P.19, 1984)。

非自主转座子的例子包括Ds和dSpm基因，是通过去掉Ac和Spm基因的内部区域而获得的(Doring和P.Starlinger, *Ann.Rev.Genet.*, Vol 20, P.175, 1986)，而且这些基因可以从除玉米之外的许多植物中分离，如金鱼草，朝颜花等(例如，Y.Inagaki等, *Plant Cell*, Vol.6, p.375, 1994)。当这些转座子被导入外源植物的染色体时，这些转座子也会从染色体上切除并易位，表现出其所固有的活性(例如，B.Baker等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol.83, P.4844, 1986)。

在本发明中，自主转座子和非自主转座子均可使用，非自主转座子可在插入一个有功能的转座基因后使用。

另一种不存在于植物中但可在本发明中使用的可除去DNA因子是从一个位点专一重组系统获得的因子。一个位点专一性重组系统由两部分组成，(1)一个具有特殊DNA序列的重组位点(与本发明的可除去DNA因子相当)，(2)与该DNA序列专一结合并催化DNA序列间的重组的一种酶(重组酶)，如果有两个或两个以上的DNA序列存在的话。当这样的两个DNA序列在同一个DNA分子上以一定的间隔有相同的取向时，这种DNA序列之间的部分就被从DNA分子，如质粒、染色体等上切除。当这样的两个DNA序列在同一个DNA分子上取向相反时，两DNA序列之间的部分会被颠倒。

本发明最好利用前一种切除。在重组位点上所发生的切除和颠倒都是通过上述位点专一性重组系统而进行的同源重组的结果，它与利用转座子的机理不同。已经知道，重组酶基因并非必须存在于存在着重组位点的同一个DNA分子上。为了切除或颠倒上述两个DNA序列之间的部分，只要在同一细胞中存在重组酶基因且该基因能表达即可(N.L.Craig, Annu.Rev.Genet., Vol 22, p.77, 1988)。

现已证实，在微生物如噬菌体、细菌(例如大肠杆菌(E.Coli))、酵母等中存在着位点专一性重组系统。这种例子包括Cre/lox系统，pSR1系统，FLP系统，cer系统和fim系统(例如，N.L.Craig, Ann.Rev.Genet., Vol.22, p.17, 1988)。当从这些微生物中分离的位点专一性重组系统用来自P1噬菌体的Cre/lox系统(WO 93/01283)导入与这种系统的原始生物不同的生物(包括植物)时，其表现与在其在原始生物中的表现一样。酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)的位点专一性系统(pSR1系统(H.Matsuzaki等, J.Bacteriology, Vol. 172, P.610, 1990))也可被用于本发明中。该pSR1系统在高等植物

中仍保持其固有的功能(H.Onouchi等, Nucleic Acid Res., Vol. 19, P. 6373, 1991)。

在本发明中, 可将形态异常诱导(MAI)基因插入该基因随可除去DNA因子一起被切除时的位点。例如, 当把转座子用作可除去DNA因子时, MAI基因可插入一个不会影响该转座子切除的位点, 该位点处在转座酶基因的启动子区上游, 但处于结合转座酶的末端区的下游。当采用pSR1时, MAI基因可被插入特征DNA序列之间不会抑制重组酶的表达的任何位置。

在本发明中, MAI基因最好位于可除去DNA因子内。另一方面, 目的基因的位置无特别限制; 不过, 该目的基因最好位于可除去DNA因子之外。

采用这种结构的载体, 在导入目的基因后, MAI基因可随可除去DNA因子一起以一定的频率从它被导入并起作用的DNA上除去。与标记基因的表现不一致的目的基因仍留在同一DNA上。用这种载体可将一个目的基因多次导入某种植物中。另外, 由于该MAI基因的功能丧失可根据培养过程中转基因组织的形态变化用肉眼检测出来, 因此, 无须经过特殊的过程即可很容易地选择出仅由带有目的基因但没有标记基因的细胞组成的组织。因此, 即使这种细胞实际出现的比例很低, 但这种细胞可被有效地选择出来, 从而使得该方法可实际应用。另外, 不仅采用这种载体的基因多次导入可重复许多次, 而且该方法可在成熟的植株被再生之前重复进行。因此, 可有效地实施多次导入。为了获得仅由这种细胞组成的转基因植物单株, 可由这样选择出的组织再生这种植株, 而不必进行杂交步骤。由此获得的转基因植物单株完全没有上述由标记基因引起的对人体的副作

用。此外，使用这种载体不需要细胞生长抑制物质，这种物质会在选择转基因组织步骤中降低细胞的活性。

本发明的载体可用在任一植物上，通过遗传工程方法把基因导入植物中。本发明的目的基因可以是任何能产生优良的农艺性状的基因和任何可用于研究基因表达机理，但并不一定会产生优良的农艺性状的基因等。

为了由一个基因产生一种蛋白质(如酶)，通常需要一个编码这种多肽信息的结构基因和该结构基因的调节序列，如一个启动子序列(表达启动序列)，一个终止子序列(表达终止序列)等。在植物中起作用的适当的启动子序列包括花椰菜花叶病毒的35S启动子(J. T. Odell等, *Nature (London)*, Vol. 313, P. 810, 1985)，胭脂碱合成酶的启动子(W. H. R. Langridge等, *Plant Cell Rep.*, Vol. 4, P. 355, 1985)，核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基的启动子(R. Fluher等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 83, P. 2358, 1986)。适当的终止子的例子包括胭脂碱合成酶的聚腺苷信号(A. Depicker等, *J. Mol. Appl. Gen.*, Vol. 1, P. 561, 1982)和章鱼碱合成酶的聚腺苷化信号(J. Gielen等, *EMBO J.*, Vol. 3, P. 835, 1984)。因此，必要时本发明的载体上的基因包括一个结构基因和基因表达调节序列。因此，该基因或基因和调节序列可通过化学合成或通过克隆cDNA或基因组DNA而获得。

本发明的载体可通过病毒或细菌对植物的感染而被间接导入植物细胞中(I. Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 42, P. 205, 1991)。适当的病毒的例子包括花椰菜花叶病毒，双生病毒，烟草花叶病毒和菠萝花叶病毒(brome mosaic virus)。

适当的细菌的例子包括根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和生根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)。一般公知的是双子叶植物会感染土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 的细菌。最近, 已有通过这种细菌感染的方式把基因导入单子叶植物的报导 (例如, 国际公开号 WO 94/00977)。

本发明的载体可用物理和化学方法直接导入植物细胞, 这些方法有显微注射法, 电击法, 聚乙二醇法, 融合法和高速冲击穿透法 (I. Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 42, P. 205, 1991)。由于利用土壤杆菌属细菌的普通间接导入方法不能适用于很多单子叶植物和抗土壤杆菌感染的双子叶植物, 因此, 对这些植物来说上述方法是有效的。

对用于本发明中的载体无特殊限定, 只要能满足本发明的要求即可。例如, 如果要把载体间接地导入植物细胞, 则该载体可以是 Ti 载体或病毒载体。用于本发明的 Ti 载体的例子有 Bin19 (M. Bevan 等, *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, p. 8771, 1984), pRAL3940 (A. Hoekema 等, *Plant Mol. Biol.*, vol. 5, p. 85, 1985), pGA492 和 pGA482 (G. An 等, *Plant Physiol.*, vol. 81, p. 86, 1986), pL22 (C. Simoens 等, *Nucleic Acids Res.*, vol. 14, p. 8075, 1986), pAGS111 (P. Van den Elzen 等, *Plant Mol. Biol.*, p. 5, vol. 149, 1985), pEND4K (H. J. Klee 等, *Bio/Technology*, vol. 3, p. 637, 1985), pGV831 (R. De Blaere 等, *Nucleic Acids Res.*, vol. 13, p. 4777, 1985), 和 pMON200 (R. T. Fraley 等, *Bio/Technology*, vol. 3, p. 629, 1985)。用于本发明的病毒载体的例子有花椰菜花叶病毒载体 (N. Brisson 等, *Nature (London)*, vol. 310, p. 511,

1984), 双生病毒载体(R.L.Hayes等, Nature (London), vol.334, p.179, 1988), 菠萝花叶病毒载体(R.French等, Science (vol. 231, p.1294, 1986), 烟草花叶病毒载体(N.Takamatsu等, EMBO J., Vol.6, P.307, 1987), 和农杆菌感染载体(N.Grimsley等, Nature (Londn), vol.325, p.177, 1987)。然而, 用于本发明中的载体并不局限于所列举的例子。

此外, 用于本发明中的目的基因也没有特别限制。目的基因的性质本身对本发明并不重要。用于本发明的目的基因的例子包括抗病基因(如色林吉亚杆菌(*Bacillus thuringiensis*)内毒素基因, WO 92/20802), 抗除草剂基因(突变的乙酰乳酸酶基因, WO 92/08794), 种子储存蛋白基因(如谷蛋白基因, WO 93/18643), 脂肪酸合成基因(如酰基载体蛋白硫酯酶基因, WO 92/20236), 细胞壁水解基因(如, 多聚半乳糖醛酸酶基因(D.Grierson等, Nucl. Acids Res., vol.14, p.8595, 1986)), 花色素苷生物合成基因

(如苯基苯乙烯酮合成酶基因(H.J.Reif等, Mol.Gen.Genet., vol 199, p.208.1985)), 乙烯生物合成基因(如, ACC氧化酶基因(A. Slater等, Plant Mol.Biol., Vol 5, p.137, 1985), 活性氧清除系统(如, 谷胱甘肽还原酶基因(S.Greer & R.N.Perham, Biochemistry, vol.25, p.2736, 1986)和木质素生物合成基因(如, 苯丙氨酸解氨酶基因, 肉桂醇脱氢酶基因, O-转甲基酶基因, 肉桂酸4-羟化酶基因, 4-香豆酸-CoA连接酶基因, 肉桂酰CoA还原酶基因(A.M.Boudet等, New Phytol., vol.129, p.203, 1995)。不过用于本发明的目的基因并不局限于这里所举的例子。

另外, 对用于本发明中的寄主植物也没有特别限制。用作寄主

植物的草本植物的例子包括烟草 (Tabacum), 番茄 (Lycopersicom), 甘薯 (Impoea), 马铃薯 (Solanum), 胡萝卜 (Dacus), 莴苣 (Lactuca), 花椰菜 (Brassica), 甘蓝 (Brassica), 油用油菜 (Brassica), 向日葵 (Helianthus), 甜菜 (Bela), 天门冬属植物 (Asparagus), 香蕉 (Musa), 棉花 (Gossypium), 拟南芥属植物 (Arabidopsis), 紫苜蓿 (Medicago), 豌豆 (Pisum), 大豆 (Glycine), 稻 (Oryza), 玉米 (Zea) 和黑麦 (Secale)。用作寄主植物的木本植物包括杨树 (Populus), 桉树 (Eucalyptus), 金合欢树 (Acacia), 梨树 (Pyrus), 苹果树 (Malus), 葡萄树 (Vitis), 核桃 (Juglans), 李树 (Prunus), 月季 (Rosa) 和云杉 (Picea)。不过, 用于本发明的寄主植物并不局限于以上所列举的例子。

在本发明中, MAI基因的表达使得细胞内部发生生理异常。生理异常包括在植物细胞中产生植物生长激素, 其结果是导致含有MAI基因的细胞的繁殖和分化发生混乱, 从而诱发各种形态异常。例如, 由导入了这种MAI基因的细胞可产生丧失了顶端优势的由无序的芽组成的团聚体 (极端多芽表型; ESP), 以及发根等。这种表型是由上述细胞的异常增殖和分化而产生的。因此, 这种形态异常的组织是仅由带有该基因的细胞组成的。因此, 如果载体是以该基因为标记基因与目的基因一起构成, 并将其导入植物细胞, 对该细胞进行培养的话, 仅通过肉眼选择由这种植物细胞产生的形态异常的组织即可选择出仅由导入了标记基因和目的基因的细胞组成的组织。这样, 无须进行任何特殊处理, 如向培养基中添加植物细胞生长抑制物质即可用肉眼选择出转基因组织。

尽管没有遗传工程就不能把常规的标记基因如NPTII基因导入



植物； 但本发明的MAI基因是一种植物固有的或是由细菌等的感染而被自然导入植物的基因。正因为如此，该基因产物被认为对人体具有很高的安全性。

另外，在本发明中，MAI基因被插入这样的部位， 其行为与可除去DNA因子一致。 当具有这种结构的载体被导入植物之后，用作标记基因的MAI基因随可除去DNA因子一起以固定的频率被从DNA上除去，从而使其失去作用。 同时，与可除去DNA因子行为不一致的目的基因仍留在同一DNA上并保持其功能。 这样，可将同一标记基因的表达反复用作目的基因导入的指标。因此，只需要改变与待导入目的基因有关的结构，而不必对标记基因和其它基因的结构作任何改变，即可用这种载体将基因多次导入某种植物中。因此，这种载体可反复使用无数次。

由于标记基因功能的丧失， 即MAI基因功能的丧失可用肉眼检测到，因而能轻易地、肯定地获得由缺少标记基因但带有目的基因的细胞构成的组织。即，为了获得这种组织，可反复进行培养、肉眼选择和分离，无须任何特殊处理。另外，无须进行杂交步骤，仅通过所获得的组织再生植株即可获得仅由上述细胞构成的植物。再者，尽管转座子因为其具有高易位能力而难于从DNA上完全排除，但由于选择的高效性，本发明仍可被充分的实际利用。

### 实施例

下面将通过实施例对本发明进行说明，但本发明并不局限于这些实施例。

在下面的实施例中，所有实验都是按照Molecular Cloning 第二版(Sambrook等著，Cold Spring Harbor Laboratory Press，

New York, 1989)或制造商的指示进行的,除非另有说明。

## 实施例1

### I. 载体的构建

用限制性内切酶PstI将存在于病原根瘤土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 菌株PO22 (H.Wabiko, Chemical Regulation of Plants, vol.24, p.35.1989(见图1)) 的T-DNA上的*ipt*基因切除, 并通过将*ipt*基因连接在质粒pUC7 (Molecular Cloning, 第二版, vol.1, 4.10)的PstI限制性内切酶位点上获得质粒pIPT1。用限制性内切酶BamHI和PstI将带有固有的启动子和固有的聚腺苷信号的*ipt*基因从上述质粒上切除, 并通过将该*ipt*基因连接在质粒pUC119(从Takara Shuzo Co., Ltd.获得)的BamHI-PstI限制性内切酶位点上得到质粒pIPT2。用限制性内切酶RsaI将*ipt*基因的结构基因和固有的聚腺苷信号从上述质粒上切除, 并通过将该*ipt*基因连接到质粒pUC119的SmaI限制性内切酶位点上得到质粒pIPT3。另外, 用限制性内切酶BamHI和SacI将插入pIPT3的*ipt*基因切除, 并通过将该片段连接到可用于将基因导入植物的载体质粒pBI121 (从Clontech Co.获得)的BamHI-SacI限制性内切酶位点上得到质粒pIPT4。当植物被带有质粒pIPT4的根瘤土壤杆菌 (*A. Tumefaciens*) 感染时, 存在于LB位点与RB位点之间的T-DNA, 亦即一个大约5Kb的、带有NPTII基因和*ipt*基因的片段就可整合到植物染色体上。该质粒pIPT4被导入大肠杆菌 (*E. Coli*) 的JM109菌株, 并按照布达佩斯条约以*E. Coli* JM109 (pIPT4) 的名称保藏, 保藏号:FERM BP-5063。

构建质粒pIPT4的方法在图2-4中进行了示意说明。其T-DNA片段的限制性内切酶谱如图5所示。在图2-4和5中, 圈起来的“P”

和“T”分别表示ipt基因固有的启动子和聚腺苷信号。35S-P表示花椰菜花叶病毒的35S启动子，而Nos-P表示胭脂碱合成酶基因的启动子。T(图4)或NOS-T(图5)表示胭脂碱合成酶基因的聚腺苷信号。

如图5所示，在该实施例中，MAI基因被用作标记基因，并采用通过引起顶端优势破坏以产生ESP的ipt基因，而NPTII基因被用作目的基因的模式。ipt基因是病原根瘤土壤杆菌(*A. Tumefaciens*)具有的致癌基因中的一员。导入了ipt基因的植物细胞，由于产生过多的植物激素细胞激动素而发生会导致ESP产生的分化。

在该实施例中，花椰菜花叶病毒的35S的启动子被用作ipt基因的启动子序列，而ipt基因所固有的聚腺苷信号则被用作终止子序列。

## II. 将pIPT4导入土壤杆菌(*Agrobacterium*)

将根瘤土壤杆菌菌株LBA4404(从Clontech Co.获得)接种在10 ml YEB液体培养基(含5 g/l牛肉膏, 1 g/l酵母提取物, 1 g/l脲, 5 g/l蔗糖和2-mM MgSO<sub>4</sub>, 22°C时pH为7.2(这一在22°C时的pH值在下面一直被采用, 除非另有说明))中, 并在28°C培养, 直至OD<sub>630</sub>在0.4-0.6之间。然后在4°C以6,900×g离心培养物10分钟, 收集细胞。将细胞悬浮于20 ml的10-mM Tris-HCl(pH 8.0)中, 并在4°C以6,900×g再离心悬浮液10分钟。然后, 将收集的细胞再悬浮于200 μl的YEB液体培养基中, 并把该悬浮液用作导入质粒的细胞溶液。

在一个15 ml的试管(由Falcon制造)中, 将200 μl用来导入质粒的细胞溶液与6 μg在上述步骤I中获得的质粒pIPT4混合, 将该

混合物浸入已在液态氮中冷却了30-40分钟的乙醇中冷却5分钟。将被冷却的溶液与试管一起在29°C的水浴中放置25分钟。然后加入750  $\mu$ l YEB液体培养基，并将混合液在29°C培养小时，同时振荡。将该细胞液涂布在加有50 mg/l卡那霉素的YEB琼脂培养基(含有1.2 w/v%的琼脂和与上述培养基相同的成份)，并在28°C温度下培养2天。将所得的细胞克隆接种到YEB液态培养基中并进一步培养。随后通过碱法(alkali method)将质粒从细胞中提取出来，并用限制性内切酶PstI、BamHI和EcoRI进行酶切。用琼脂糖凝胶电泳分析所获得的质粒片段，结果证实质粒pIPT4被导入了根瘤土壤杆菌菌株LBA 4404。

### III. 将pIPT4从土壤杆菌(Agrobacterium)中导入烟草

将生长在温室中的烟草(Nicotiana tabacum cv. xanthi, 下面所说的烟草均为该品种, 除非另有说明)的成熟叶片浸入1 v/v%的次氯酸钠水溶液中进行消毒, 并用消毒水洗涤3遍。然后把叶片的中脉去掉, 制成约8 mm<sup>2</sup>的小叶片。将所获得的小叶片在上述步骤II中获得的导入了pIPT4的土壤杆菌菌株LBA4404的细胞悬浮液中浸泡约1分钟, 以使其受细菌感染(悬浮液在YEB液体培养基中培养过夜后用消毒水稀释至OD<sub>630</sub> = 0.25)。将感染细菌的叶片放在消毒滤纸上, 除去任何多余的细胞悬浮液。然后将其叶背向上地放在含有50 mg/l乙酰丁香酮, 不含激素的MS琼脂培养基(T. Murashige和F. Skoog, *Physiol. Plant*, vol.15, p.473, 1962, (在配方中加入0.8 w/v%的琼脂))上, 并在25°C、全光照条件下培养3天(外植体, 植物组织和植物的培养都是在这种温度和光照条件下进行, 除非另有说明)。将由此获得的叶片再移植到仅含有500 mg/l羧苄青霉素

的不含激素的MS琼脂培养基上，并继续培养。结果，再分化出22个不定芽。分离这些不定芽并在具有上述配方的培养基上进一步培养，得到6个ESP系。将这些ESP系在相同的培养基上每月一次地进行继代培养，并在感染3个月以后在不含羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基上继代培养几次。当观察不到土壤杆菌的增殖以后，进行卡那霉素抗性试验和PCR分析。

#### IV. 对导入了基因的烟草的分析

##### A. 卡那霉素抗性试验

将在上述步骤III中所获得的6个ESP系在不继代的情况下培养。将这些ESP系上长出的叶子切成约3 mm<sup>2</sup>的叶片。将这样得到的叶片放在含有200 mg/l卡那霉素的MS琼脂培养基（加入了1 mg/l苄腺嘌呤，0.2 mg/l  $\alpha$ -萘乙酸）上。在这种含卡那霉素的培养基中培养1个月之后，从这些ESP系获得的叶片上观察到了ESP系的形成。

##### B. PCR分析

从上述步骤III中获得的所有6个ESP系中提取染色体DNA，用PCR法分析导入其中的基因。

染色体DNA的提取是用以下改进的CTAB方法进行的。

首先，将大约1 g由ESP长出的叶子用冷却的研钵和研棒在液氮中研磨，并将其悬浮于5 ml被加热至60°C的缓冲液（含有2 w/v% CTAB（溴化十六烷基三甲铵），1.4-M NaCl，0.2 v/v%  $\beta$ -巯基乙醇，20-mM EDTA，及100-mM Tris-HCl (pH 8.0)。将该悬浮液在60°C保温30-60分钟，同时轻轻摇动，然后冷却至室温。将等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混合物加入该悬浮液中，并轻轻混合。然后，将混合物在1,600×g离心5分钟，回收上清液。接着向上清

液中加入2/3体积的异丙醇，并再次轻轻混合。将混合物在冰上放置10分钟使染色体DNA沉淀。通过在1,600×g离心10分钟以收集沉淀的染色体DNA。用70 v/v%的乙醇洗涤所收集的染色体DNA，然后真空干燥，并溶解在300 μl TE缓冲液(包括10-mM Tris-HCl和1-mM EDTA)中。

与此同时，为了通过PCR法检测ipt基因，采用了一对由DNA合成仪(由Applied Biosystems Co.生产)合成的引物(寡核苷酸)。当其与ipt基因结合时，两个引物之间的距离约为800 bp。为了扩增ipt基因，将1 μg提取的染色体DNA溶于50 μl的混合溶液中，该混合溶液含有0.2 μM上述引物，10-mM Tris-HCl (25°C时pH 8.8)，50-mM KCl，1.5-mM MgCl<sub>2</sub>，1 w/v% Triton X-100，0.1-mM dNTP和1.25个单位的Taq聚合酶(从CETUS Co.获得)。将混合物在94°C加热1.5分钟后，将一个三步加热循环重复30次以完成反应。这三步加热循环是：94°C加热1分钟，在55°C加热2分钟，在72°C加热3分钟。通过琼脂糖凝胶电泳对所得到的反应混合物进行分析，以检测ipt基因在染色体DNA上的存在，即被扩增的大约800 bp的基因的存在。

结果如图6所示。从图6中可清楚地看到，在所有6个ESP系中都观察到大约800 bp的基因的扩增。在图6中，左侧的数字表示碱基长度，它是在电泳中测得的DNA大小标记(下文中被称作“带”)。

#### 比较实施1

针对无形成ESP能力的16个芽进行分析，这些芽是由实施1的步骤III中的土壤杆菌感染的叶片再分化出的不定芽中得到的。即，在实施例1的步骤III中对22个不定芽进行培养并选择6个ESP系的同

时，以与实施例1的步骤III和IV相同的方式对表现出形态正常的芽（以下称“非ESP”）（同时也无土壤杆菌）进行卡那霉素抗性测试。另外，对9个非ESP系进行PCR分析。不过，对非ESP系来说，放在含有卡那霉素的培养基上的叶片全部变褐，并在大约3个月后枯萎。此外，在PCR分析中，在所分析的9个系中任何一个上都未检测到能证明ipt基因存在的大约800 bp的DNA片段的存在。

PCR分析结果如图6所示。

## 实施例2

### I. 载体的构建

用限制性内切酶BamHI对质粒pHSG398（从Takara Shuzo Co., Ltd购得）进行消化。通过上述消化所产生的粘性末端由T<sub>4</sub> DNA聚合酶I（大亚基）转变为平头末端，通过连接上述末端得到质粒pNPI100。即，pNPI100是失去了BamHI限制性内切酶位点的pHSG398。同时，用限制性内切酶PstI对质粒pCKR97（T. Izawa等，Mol. Gen. Genet., vol. 227, P. 391, 1991）进行消化。将玉米的转座子Ac切除，并将其插入pNPI100的PstI限制性内切酶位点以得到质粒pNPI102。

接着，用限制性内切酶HindIII和SacI将花椰菜花叶病毒的35S启动子和ipt基因从在实施例1中构建的质粒pIPT4上切除。所获DNA片段的粘性末端被T<sub>4</sub> DNA聚合酶I转变成平头末端，并将该片段插入质粒pUC119的HincII限制性内切酶位点，以得到质粒pNPI101。再用限制性内切酶PstI和EcoRI将花椰菜花叶病毒的35S启动子和ipt基因从质粒pNPI101上切除，并用T<sub>4</sub> DNA聚合酶I将该片段的粘性末端转变成平头末端。另外，通过把该片段连接在pNPI102的平头BamHI内切酶位点获得质粒pNPI103。即，在质粒pNPI103上，连接

在其上面的35S启动子和ipt基因存在于转座子Ac内的旧BamHI限制性内切酶位点上。

用限制性内切酶PstI将带有花椰菜花叶病毒35S启动子和ipt基因的转座子Ac从质粒pNPI103上切除，并将该转座子Ac插入载体质粒pBI121的SseI限制性内切酶位点，即获得所需的载体。将其命名为质粒pNPI106。

质粒pNPI106也被导入大肠杆菌(E. Coli) JM109 菌株，并按照布达佩斯条约以E. coli JM109 (pNPI106)的名称进行保藏，保藏号为：FERM BP-5064。

构建质粒pNPI106的方法在图7-9中进行了示意性说明。其T-DNA片段的限制性内切酶谱如图10所示。在图7-9和10中，转座子Ac的末端区分别用相反的黑色三角表示。在图10中，Ac-P是Ac上固有的启动子。其它符号与图2-5中所示符号相同。

从图10中可清楚地看出，该质粒以ipt基因为标记基因，而以NPTII基因和GUS ( $\beta$ -半乳糖苷酶) 基因作为目的基因的模式，所述基因在T-DNA区，即在被整合到植物的染色体上的片段上。另外，ipt基因以插入的形式存在于转座子Ac上。由于带有GUS基因的细胞能代谢一种特殊的底物，由它产生蓝色色素，通过检测这种色素即可证实该基因的表达。因此，GUS基因被通常用于基因在植物中表达的分析。

## II. 将pNPI106导入烟草并分析导入了基因的烟草

### A. 将pNPI106导入烟草并测试被导入基因的表达

以与实施例1中步骤II和III相同的方式将pNPI106导入土壤杆菌菌株LBA4404，并让烟草叶片感染这种土壤杆菌。将受感染的烟



草叶片在无激素的、含有50 mg/l乙酰丁香酮的MS琼脂培养基上培养，然后再在加有500 mg/l羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基上培养。培养2个月后，分离出63个ESP系。

将这些ESP系移植到配方相同的培养基(含有500 mg/l羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基)。1个月后，从稍见长大的ESP芽中用肉眼选出9个芽(在下文中，由ESP产生的芽被简称为“芽”)，与其它芽相比，这些芽长大了2倍或更多倍，其中未见侧芽生长，而且ipt基因的影响似乎也减弱了。如在实施例1的步骤IV-A那样对这些芽的叶子作卡那霉素抗性试验，并根据Jefferson等人的方法检测GUS基因的表达(测GUS活性)。将切除叶子以后的芽移植到无激素的MS琼脂培养基上并进行培养。1个月之后，观测形态以检测这些芽形成ESP的能力，由此证明ipt基因的表达。

其结果如表1所示。

表 1

由载体pNPI106导入烟草的基因表达的测试结果

	芽号	卡那霉素抗性	GUS活性	培养1个月后的形态
实施例2	1	+	+	ESP
	2	+	+	ESP
	3	+	-	ESP
	4	+	+	ESP
	5	+	-	ESP
	6	+	-	ESP
	7	+	+	ESP
	8	+	+	正常
	9	+	+	ESP
	10	-	-	正常
比较实	11	-	-	正常
施例2	12	-	-	正常

注：1、在卡那霉素抗性一栏中，+表示“抗”，-表示“不抗”。

2、在GUS活性一栏中，+表示“活性”，-表示“无活性”。

3、“正常”表示顶芽有优势生长并长出了根的个体。

从表1中可以看出，尽管8号芽的叶具有卡那霉素抗性和GUS活性，即使将芽培养1个月也未出现ESP。据推测，这是因为能导致

ESP产生的ipt基因是以插入的形式存在于质粒pNPI106的转座子Ac上。就是说，在感染后的组织培养初期，ipt基因通过含有该质粒的土壤杆菌对组织的感染而被导入烟草的染色体并得到表达，该基因在随后的培养中通过Ac的活动随Ac一起被除去。同时，NPTII基因和GUS基因被插入同一载体上的这样一个位点，其表现与Ac不一致，因此，这些基因仍存留在植物染色体上并得到表达。

在表1中，在3、5和6号芽中观察到了卡那霉素抗性和ESP形成能力，但GUS活性呈阴性。这表示，在上述芽中由pNPI106导入的基因中仅有GUS基因未表达。这被认为是由于当这些基因被整合到包含具有pNPI106等结构的质粒的植物染色体上时发生了错误的整合。就是说，当该基因被土壤杆菌导入时，T-DNA片段，即RB位点与LB位点之间的整个内部区通常必须整合到植物染色体上。然而，有时该片段并不能被完全整合，而是被拉断，把缺少LB末端的某些部分的缺损片段插入进去。在pNPI106的T-DNA部分，GUS基因位于紧靠LB位点的部位。因此，据认为，由于基因导入时发生的错误整合，GUS基因以这样的方式整合到染色体上：GUS基因被撕成碎片并失去作用，或者GUS基因根本就未被插入，所以GUS基因在这些芽中未得到表达，也未观察到其活性。

图11和12为2号芽和8号芽在培养1个月后的照片。

用8号芽上长出的叶子作卡那霉素抗性试验，试验之后继续培养。由该叶子获得5个不定芽，这些芽都是非ESP。

## B. PCR分析

在对表1中1-9号芽进行ESP形成能力观察以后，以与实施例1中步骤IV-B相同的方式对其作PCR分析，以进一步验证ipt基因在

染色体中的存在，除了在实施例1的步骤IV-B中所用的引物之外，再用分别结合在NPTII基因和GUS基因上的成对引物。在采用这些引物的情况下，当插在上面的Ac和ipt基因(Ac-ipt基因复合体)被从pNPI106的T-DNA区上切除时，用PCR法扩增出一个大约3Kb的DNA片段。因此，可以这种扩增作指标检测Ac-ipt基因复合体从DNA上切除。

图13中给出了8号芽的PCR分析结果，其中，左侧的数值的含义与图6中的相同。

由上述结果可以看出，在从8号芽上提取的染色体DNA中观察到了能证明Ac-ipt基因复合体被切除的约3Kb DNA片段的扩增，但未观察到能证明ipt基因存在的约800 bp的DNA片段的存在。这表明ipt基因随Ac一起被从染色体DNA上切除并消失了。

另一方面在1-7号和9号芽的任何染色体DNA样品中都未检测到约3Kb DNA片段的扩增，但在所有的染色体DNA样品中都检测出约800 bp DNA片段的存在。因此认为，在这些芽中ipt基因和Ac一起仍存在于染色体DNA上。

### 比较实施例2

在实施例2的步骤II-A对被根瘤土壤杆菌感染的叶片的培养中，由ESP上再分化出的3个非ESP被分离出来，并作抗卡那霉素试验和GUS活性试验，培养一个月后作肉眼观察并以与实施例2的步骤II相同的方法作PCR分析。

结果如表1所示。由这些非ESP获得的芽不具备任何卡那霉素抗性、GUS活性和ESP形成能力。此外，在PCR分析中未观察到约800 bp的DNA片段和约3kb的DNA片段的扩增。

### 实施例3

另外，将从实施例2中分离的63个ESP系在无激素的MS琼脂培养基上继续培养。在分离以后约2个月，由两个ESP系上长出7个可用肉眼确认的正常芽，即表现出顶端优势的芽，编号为13-1至13-3和14-1至14-4。将这些芽分离并移植到具有前述配方的培养基中，这些芽正常伸长并长根。以与实施例2的步骤II-B相同的方式对由13-1号和14-1号芽长成的单株作PCR分析。结果，在上述两个芽上未观察到约800 bp DNA片段的扩增，而在这两个芽上都观察到了约3Kb DNA片段的扩增。由此可以确定，ipt基因已随Ac一起从上述单株的染色体DNA上切除并消失了。其结果如图14所示，其中，图左侧数值的含义与图6中的含义相同。另外，在由这7个芽长出的所有单株上都检测到了GUS基因的表达。

图15表示从一个ESP再分化出的正常芽的状态。

### 实施例4

将在实施例2中选择出的表1中列出的9个芽中的7号芽上长出的叶子在无激素的MS琼脂培养基上培养约1个月。从由所培养的叶片上所再分化出的6个不定芽中，肉眼选择并分离出一个正常芽。将该正常芽移植到上述配方的培养基中，然后得到一个正常伸长并长了根的单株。然后，以与实施例2的步骤II-B相同的方式对该单株作PCR分析。因为约800 bp DNA片段的消失和约3Kb DNA片段的扩增，可以确定ipt基因已随Ac一起从染色体DNA上切除并消失了。这一结果如图16所示，其中，图左侧所标出数值的含义与图6的含义相同。另外，在相同的单株上还检测到GUS基因的表达。

### 实施例5

## I. 从酵母中分离一种位点专一性重组系统(pSR1系统)

将酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*(从发酵研究所获得))接种到5 ml YPAD液体培养基中(含有10 g/l酵母膏, 20 g/l胨, 0.4 g/l腺嘌呤和20 g/l葡萄糖), 并在30°C温度下培养24小时。将培养液在20°C以6,900×g的速度离心3分钟, 以收集细胞(下文中都是以同一条件收集细胞)。将所得到的细胞悬浮于2 ml的包括0.2-M Tris-HCl (pH 8.0)和5 v/v%巯基乙醇的溶液中。将该细胞悬浮液在25°C下放置30分钟并偶尔轻轻搅动一下, 然后再收集细胞。另外, 将收集的细胞悬浮于1 ml的含有2.5 mg/ml Zaimolyeis-20T(从SEIKAGAKU CORPORATION获得), 10 w/v%山梨醇和5 w/v% KPO<sub>4</sub>的溶液(pH 6.8)中。将悬浮液在30°C放置90分钟, 并再次离心, 收集细胞。将所收集的细胞再悬浮于1 ml的含有0.2-M NaCl, 0.1-M EDTA, 5 w/v% SDS, 50-mM Tris-HCl (pH 8.5)的溶液中, 将蛋白酶K以20 mg/ml的浓度加入进去。混合液在60°C放置1小时, 然后恢复到室温, 用苯酚和氯仿混合物抽提, 并用氯仿提纯。向所得上清液中加入等体积的异丙醇, 使染色体DNA和质粒pSR1沉淀。混合物以6,900×g的速度在4°C温度下离心10分钟, 收集DNA, 所收集的DNA用70% v/v%的乙醇洗涤, 然后真空干燥并溶于100 μl的TE中。

以所提取的DNA(为染色体DNA与质粒pSR1的混合物)为模板, 通过PCR法仅对存在于pSR1上的位点专一性重组系统(以下称“pSR1”系统)进行扩增。该pSR1系统由一个R基因(它是一个重组酶基因)和一个重组序列Rs组成, 且其DNA序列已被确定(H. Araki等, *J. Mol. Biol.*, Vol.182, p.191, 1985)。在本发明中, 为了扩增R基因,

合成一个在其5' - 位点上加上一个22个碱基的XbaI限制性酶位点, 即质粒pSR1的第5,596-5,617碱基的序列(5' -CCTCTAGAATGCAATTGAC-CAAGGATACTG - 3')的引物, 和一个在其5' - 位点上加上一个22个碱基的SacI限制性内切酶位点, 即质粒pSR1的第4,126~4,147个碱基的序列(5' - CCGAGCTCTTAATCTTGTTCAGGAGGTGTCA - 3')的引物使用。另一方面, 为了扩增Rs, 合成两对各包括30个碱基(共4种类型)的引物使用。即, 一对是由一个质粒pSR1序列上第287 - 316间的3个碱基被取代, 并将SseI限制性内切酶位点导入的引物(5' - AGGATTGAGCTACTGGACGGGAATCCTGCA - 3')和一个质粒pSR1上第690 - 719间的4个碱基序列被取代, 并将HindIII限制性内切酶位点和XhoI限制性内切酶位点导入的引物(5' - CAACTCGAGCAATCAAAGCTTCTCGTAGTC - 3')组成。将用该引物对扩增的Rs被称为“Rs1”。另一对是由一个质粒pSR1上第287 - 316碱基间的3个碱基序列被取代并将XhoI限制性内切酶位点和EcoRI限制性内切酶位点导入的引物(5' - AGGATTGAGCTACTCGAGGGGAATTCTGGA - 3')和一个质粒pSR1上第688 - 717碱基序列中的5个碱基被取代并将SseI限制性内切酶位点导入的引物(5' - ACTGGACCAATCCCTGCAGGTCGTAGTCAA - 3')组成的。将用该引物扩增的Rs被称为“Rs2”。

为了扩增R基因和Rs基因, 将1 $\mu$ l的提取的DNA溶液分别加入50 $\mu$ l 在实施例1的步骤IV - B中所用的混合溶液中, 该溶液分别含有0.2 $\mu$ M的每种引物。对该混合物做一个三步加热循环共30次, 这三步加热循环是: 在95 $^{\circ}$ C30秒, 在55 $^{\circ}$ C30秒, 在72 $^{\circ}$ C1.5分。用琼脂糖凝胶电泳分析所得到的反应混合物, 以证实R基因和Rs基因的扩增。

## II. 载体的构建

用限制性内切酶PstI和XhoI消化由PCR法扩增的Rs1, 并将Rs1插入pSL1180 (从Pharmacia Biotech Co.获得) 的PstI - XhoI限制性内切酶位点得到质粒pNPI126。

接着, 为了消除pHSG398的EcoRI限制性内切酶位点和HindIII限制性内切酶位点, 用这些酶进行消化并用T<sub>4</sub>聚合酶I (大亚基) 将末端改变成平头末端, 并且平头末端的连接在序列上重复。以这种方式获得消除了这些限制性内切酶位点的质粒pNPI121。用限制性内切酶XhoI和PstI消化由PCR法扩增的Rs2, 并将Rs2插入质粒pNPI121的SalI - PstI限制性内切酶位点以得到质粒pNPI127。

用限制性内切酶SmaI和SpeI将Rs1从pNPI126上切除, 并将其插入pNPI127的SmaI - XhoI位点以得到质粒pNPI128。

用限制性内切酶XbaI和SacI消化由PCR法扩增的R基因, 并将其插入pHSG398的XbaI - SacI限制性内切酶位点。所得质粒被命名为pNPI124。

然后用限制性内切酶PstI消化pBI221 (从Clontech Co.获得)。消化的末端被转化成平头末端并以前述方法连接。由此获得消除了SseI和PstI限制性内切酶位点的质粒pNPI111。随后, 将用限制性内切酶XbaI和SacI从pNPI124上切除的R基因插入pNPI111的XbaI - SacI限制性内切酶位点, 取代GUS基因, 得到质粒pNPI125。另外, 用限制性内切酶HindIII和EcoRI将花椰菜花叶病毒的35S引物, 与启动子连接的R基因和胭脂碱合成酶的聚腺苷信号切除, 并将其插入pNPI128和HindIII - EcoRI限制性内切酶位点, 以得到质粒pNPI129。



用限制性内切酶SmaI消化pNPI101, 并将5' - 磷酸化HindIII连接物 (从Takara Shuzo Co., Ltd获得) 插入消化的位点, 得到质粒pNPI122。即pNPI122是一个pNPI101上的SmaI限制性内切酶位点被HindIII限制性内切酶位点取代了的质粒。另外, 用限制性内切酶PstI消化pNPI122, 消化的末端被转化成平头末端并连接成消除了SseI和PstI限制性内切酶位点的质粒pNPI123。用限制性内切酶HindIII将花椰菜花叶病毒的35S启动子和与启动子连接的ipt基因从pNPI123上切除, 并将其插入pNPI129的HindIII限制性内切酶位点, 以得到质粒pNPI130。

用限制性内切酶PstI切除带有ipt基因、R基因、花椰菜花叶病毒35S启动子以及在这些基因两末端的Rs的DNA片段, 并将该片段插入pBI121的SseI限制性内切酶位点, 以获得所需载体。所得到的载体被命名为pNPI132。

质粒pNPI132也被导入大肠杆菌 (E. Coli) 菌株JM109, 并以E. coli JM109 (pNPI132) 的名称根据布达佩斯条约进行保藏, 保藏号为FERM BP-5065。

在图17-19中示意地表示了质粒pNPI132的构建。图20中示出了其T-DNA片段的限制性内切酶谱。在图17-19和20中, 画有阴影的三角形表示来自酵母的pSR1质粒的重组序列Rs以及该序列的方向。其它符号的含义与图2-5中所示相同。

由图20可以看出, 质粒pNPI132与质粒pNPI106相似, 其T-DNA片段上具有作为标记基因的ipt基因, 以及作为目的基因的模型的NPTII和GUS基因。不过, 在这种情况下, 在pSR1系统的两个重组序列Rs之间的片段的表现与可除去DNA因子一致。因此, ipt基因是被

这样插入的，它被夹持在两个取向相同的重组序列之间。

III. 将pNPI132导入烟草，并分析导入了该基因的烟草

以与实施例1中步骤II和III相同的方法将质粒pNPI132导入根瘤土壤杆菌菌株LBA4404，并用这种根瘤土壤杆菌感染烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) 的叶片。将受感染的叶片放在含有50 mg/l乙酰丁香酮的无激素的MS琼脂培养基上培养，然后，再在含有500 mg/l羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基上培养。1个月后，将培养的叶片移植到相同配方的培养基中，再继续培养1个月。然后分离出48个ESP系。

将这些ESP系再次移植到相同配方的培养基中，继续培养。大约1个月后（即在用根瘤土壤杆菌感染后约3个月），从48个ESP系中的7个上长出了可用肉眼检测到的具有正常形态的芽。分离这些芽的并将其移植到相同配方的培养基中。随后获得了10个正常的单株。

以与实施例2的步骤II-B相同的方式对这些单株进行PCR分析，除了在实施例2的步骤II-B中所用的引物之外，还采用了一对用于检测GUS基因的引物。通过用上述引物进行PCR分析，当ipt基因存在时大约800 bp的DNA片段得到扩增；而当ipt基因通过切除Rs之间的片段的方式被从质粒pNPI132的T-DNA片段上切除时，大约3 kb的DNA片段得到扩增（这些结果与实施例2的步骤II-B分析的结果相同）；当GUS基因存在时，大约1.7 Kb的DNA片段得到扩增。结果如图21-23和表2所示。在图21-23中，左侧的数值与在图6中的含义相同。

表 2

用载体pNPI132导入了基因的烟草的转基因分析结果

ESP系号	单株号	关于ipt		关于GUS
		800 bp	3 kb	1.7 kb
15	1	-	+	+
	2	-	+	+
16	1	-	+	+
17	1	-	+	+
18	1	-	+	+
19	1	-	+	+
	2	-	+	+
20	1	-	+	+
	2	-	+	+
21	1	-	+	+

注：+表示相应的DNA片段得到扩增，

-表示相应的DNA片段未得到扩增。

从表2中可以看出，在任何用肉眼观察其形态选择出的单株的染色体上都未检测到标记基因ipt基因的存在，相反，检测到了表明ipt基因被切除的DNA片段的扩增。同时，在所有单株中都检测到作为目的基因的GUS基因的存在。

另一方面，采用含有200 mg/l卡那霉素的无激素的MS琼脂培养基检测各单株顶芽的卡那霉素抗性，这些芽是几乎同时地从48个ESP系上非ESP分化出来的，表现出正常伸长和生根。结果发现，16个单株中的两个具有卡那霉素抗性。

随后，以与分析由ESP获得的单株相同的方式同时对上述抗卡那霉素单株和3个从14个卡那霉素敏感单株中选出的单株一起进行PCR分析。这一结果如图24A、图24B和图24C所示，图中左侧的数值的含义与图6中的相同。

从图24A、图24B和图24C中可清楚地看到，两个抗卡那霉素单株中的每一个都表现出能表明Rs之间带有ipt基因的片段被切除以及GUS基因的存在的DNA片段的扩增。从而证明了来自pNPI132的基因已经整合到其染色体上。相反，在3个卡那霉素敏感单株上，都未发现这种扩增。另外，在任一个单株（即不论抗卡那霉素单株还是卡那霉素敏感单株）都不表现出能证明ipt基因存在的DNA片段的扩增。

因此假设这些从缺乏ESP形成能力的品系中获得的抗卡那霉素单株和卡那霉素敏感单株是一样的，都是由在用根瘤土壤杆菌感染时pNPI132未被导入其染色体的细胞形成的。基于这一假设，来自该载体的基因不可能被包含在染色体上。另外，鉴于这些基因都来自同一载体，不可能的是缺乏ipt基因的单株其染色体上以一定频率带有完整的NPTII基因（如已被证明的那样这些单株抗卡那霉素）和GUS基因。

也就是说，可以得出这样的结论：pNPI132曾被导入上述抗那霉素单株的染色体。即，据推测，由于根瘤土壤杆菌的感染pNPI132的T-DNA片段曾被导入其染色体，但由于用于该载体的pSR1系

统的过高的效率导致在受土壤杆菌感染以后在ESP形成以前ipt基因就被切除了。结果，NPTII基因和GUS基因单独地被留在染色体上。而且在PCR分析中抗卡那霉素单株所表现的带有ipt基因并由Rs序列夹持的片段被切除的结果，也支持这种推测。

## 实施例6

### I. 载体的构建

用限制性内切酶EcoRI切除rol基因(S.Kiyokawa, Plant Physiol., vol.104, p.801, 1994), 该基因包括rolA、rolB和rolC, 并共有7.6 kb长度, 这些基因被插在pBluescriptII SK<sup>+</sup> (由Toyobo Co., Ltd生产) 的EcoRI限制性内切酶位点。将该片段插入pNPI129的EcoRI限制性内切酶位点, 以产生质粒pNPI700。

用限制性内切酶SseI, 把rol基因、花椰菜花叶病毒35S启动子、连接该启动子的R基因以及位于这些基因两端的Rs序列从该质粒pNPI700上切除, 并将其插入pBI121的SseI的限制性内切酶位点, 以得到所需要的质粒pNPI702。

质粒pNPI702也被导入大肠杆菌的JM109菌株, 并根据布达佩斯条约以E.coli JM109 (pNPI702)的各称进行保藏, 保藏号FERM BP-5066。

图25示意性地表示了该质粒的构建方法。其T-DNA片段的限制性内切酶谱如图26所示, 图25和26中的符号与图2-5中的符号是一样的。

如图26所示, 质粒pNPI702类似pNPI132, 只是标记基因由ipt基因换成了rol基因。用于该载体的rol基因本来就存在于生根土壤杆菌的T-DNA上。业已知道, 当rol基因被导入植物细胞时, 会从

这种植物组织上长出发根，由这些发根再生出的芽表现出诸如矮化等的形态异常。

II. 将pNPI702导入烟草并分析导入了该基因的烟草

以与实施例1的步骤II和III相同的方式将质粒pNPI702导入根瘤土壤杆菌的LBA4404株，并用这种根瘤土壤杆菌感染烟草叶片，并将受过感染的烟草叶片放在含有50 mg/l 乙酰丁香酮的无激素的MS琼脂培养基上，在暗处培养3天，然后再在加有400 mg/l 羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基上培养。从开始培养之日起约15天后，观察到了分化的发根。将发根一个一个地分离，放在芽诱导培养基（含有0.1 mg/l  $\alpha$ -萘乙酸，2.0 mg/l 苄腺嘌呤和400 mg/l ticarcillin的MS琼脂培养基）上。然后用肉眼从再分化的芽中选择出18个被认为具有正常形态的芽，并以与实施例2的步骤II-B相同的方法进行PCR分析。采用通过大约3 kb的DNA片段的扩增以检测带有rol基因及两端的Rs序列的片段的切除的引物（与实施例2-5和比较实施例2中相同的引物），和通过大约1.1 kb的DNA片段的扩增以检测rol基因存在的引物。结果证实，带有rol基因且其两端有Rs序列的片段被从9个芽的染色体上切除了。

#### 实施例7

采用在实施例2中构建的载体pNPI106，将基因导入一种杂种白杨(*Populus Sieboldii* × *Populus grandidentate*; 木本植物)。

将生长在消毒三角瓶中的杂种白杨品系Y63的茎杆(采自A Kita Jujo Chemicals Co., Ltd.的实验林场)切成长5 mm的无节的片段。再将小片段垂直切成两片，并将其用作样品，以与实施例1相同的方法用导入了pNPI106的根瘤土壤杆菌菌株LBA4404感染的这些样品。

感染以后，将茎段放在加有40 mg/l 乙酰丁香酮的无激素的改性MS琼脂培养基（含有2 w/v% 蔗糖和0.8 w/v% 琼脂）上，并在那里培养3天。接着再将其移植到含有500 mg 羧苄青霉素而不是乙酰丁香酮的相同培养基上进一步培养。这里所采用的改性MS琼脂培养基是通过分别把普通MS培养基中的氨态氮和硝态氮的浓度变成10-mM 和30-mM而制备成的。

大约2个月后，分离由这些茎段上长出的不定芽，再将其培养2个月。这样获得了6个ESP系。对上述品系作进一步的继代培养。约4个月后（即，在用根瘤土壤杆菌感染之后大约8个月），第一次见到ESP上长出形态正常的芽。将这些芽移植到加有0.05 mg/l IBA（吲哚丁酸）的稀释2/3倍的MS gellan胶培养基（含2 w/v% 蔗糖和0.3 w/v% gellan胶）中并进行培养。这样，在用根瘤土壤杆菌感染之后10个月之内，从2个ESP系上共得到7个长根的正常单株。

然后以与实施例5中步骤III相同的方法对这些单株进行PCR分析。结果，在所有单株上都未检测到ipt基因。另一方面，在其中的两个单株上检测到GUS基因的存在。由此证实，本发明的载体也可在木本植物中有效地起作用。顺便说一下，在余下的5个正常单株中，仅检测到部分GUS基因。对这种单株来说，似乎是当由载体pNPI106导入的转座子Ac与ipt基因一起被从染色体上切除时，附近的GUS基因也参与了切除过程并被撕下。

图27表示由ESP分化的正常芽的状态。

#### 实施例8

在实施例5中已经用pNPI132导入了基因的正常单株（由ESP获得），用本发明的载体进一步导入基因。

pNPI132的GUS基因被HPT基因（潮霉素抗性基因）所取代。采用由此获得的载体（pNPI140，图28），以与实施例1中步骤II和III相同的方法对上述正常单株进行基因导入。在用导入了这种载体的根瘤土壤杆菌感染40天以后，得到10个ESP系。分别ESP系，移植到相同配方的培养基（含有500 mg/l羧苄青霉素的无激素的MS琼脂培养基）上进一步培养。结果，20天以后（即用根瘤土壤杆菌感染以后约2个月）在这些ESP系中的一个系中观察到了正常形态的芽的分化。

以与实施例1的步骤IV-B相同的方法对所分化出的正常芽之一进行PCR分析。结果如图29所示。应当指出，除了实施例1的步骤IV-B中所用的引物之外，这里还采用了一对被设计成分别结合在NPTII基因和HPT基因上用于检测带有ipt基因且两端有Rs序列的片段从染色体DNA上切除的引物，和另一对用于检测HPT基因存在的引物（分别通过约4Kb和约1Kb的DNA片段的扩增检测）。图29中，左侧的数值与在图6中的含义相同。

由图29可清楚地看出，在PCR分析中，从上述芽中提取出的染色体DNA显示约4kb DNA片段的扩增，这表明ipt基因已通过Rs序列间的片段的切除而被切除；若显示约1 kb DNA片段的扩增，则表明HPT基因的存在。另一方面，表明ipt基因的存在的约800 bp DNA片段的扩增未在相同的DNA中检测到。上述结果表明，曾被导入这些芽的染色体DNA中的ipt基因通过Rs序列之间的片段的切除而被切除并因此消失了，但HPT基因仍留在上述DNA上。就是说，已用pNPI132导入了目的基因（即NPTII基因和GUS基因）的单株，再用一种载体导入一个新的目的基因（即HPT基因），其中，仅对与目的基



因相关的结构加以改变 (即同样把ipt基因用作标记基因), 重复正常的培养、肉眼选择和分离步骤。此外, 这一结果还表明, 采用相同的标记基因可将第三、第四或更多个目的基因导入是很有可能性的。

从上述诸实施例可以看出, 所获得的ESP系其染色体内总是具有ipt基因, 如图6所示。另外, 通过作为目的基因的模式与ipt基因一起导入的NPTII基因的表达, 可用肉眼确认的表现出明显的形态异常性的ESP无一例外地表现出卡那霉素抗性。这表明, 这种MAI基因完全可用作将基因导入植物的标记基因, 而带有作为标记基因的MAI基因的本发明的载体也可用作将基因导入植物的载体。

如表1和图13、14和16所示, 当用载体pNPI106(其中ipt基因整合在转座子Ac上) 将基因导入植物时, 从导入基因操作后的培养初期曾形成过ESP的组织上获得了失去其ESP形成能力的芽等, 这是因为ipt基因从染色体上消失所致, 同时保留了由目的基因(NPTII基因和GUS基因) 所产生的性状。此外, 如图15和17所示, 可对所获得的组织(即失去了ESP-形成能力的芽等) 进行肉眼鉴别。而且, 当对这种芽进行选择、分离和培养时获得了具有正常形态的伸长并生根了的单株。另外, 由失去了ESP形成能力的芽上获得的组织的再分化所产生的组织也表现出正常形态, 不具备ESP形成能力。这证明这种芽等是由均一的细胞组成的。

当把一个来自位点专一性的重组系统的一页用作可除去DNA因子, 而把rol基因用作MAI基因时, 获得了相同的结果。即当用这样的载体把基因导入植物时, 由在刚导入基因后表现出异常形态的组织获得了MAI基因从其染色体上消失但保留了目的基因的形态正常

的组织 and 植株 (图21-23, 表2)。所用载体是这样的: 与实施例1-4和7中所用载体的转座子或转座子和ipt基因相关的结构被与上述重组系统和/或rol基因相关的结构所取代, 如在实施例5和6中所述。另外, 通过采用仅对其与目的基因相关的结构加以改变同时将相同的形态异常诱导基因用作标记基因的载体, 重复基因导入、培养和肉眼选择步骤, 可将目的基因多次导入同一单株(实施例8, 图29)。

因此, 通过采用以MAI基因作标记基因并将其插入使它与可除去DNA因子行为一致的位置的载体, 仅实施以下步骤即可获得仅由只保留了目的基因在染色体上并维持其功能的细胞构成的组织: (1) 在导入基因操作之后立即对细胞进行培养, 并用肉眼选择在培养过程中所出现的形态异常的组织; (2) 进一步培养上述形态异常的组织, 并用肉眼选择在培养中出现的形态正常组织。另外, 可由这种形态正常的组织获得仅由这种细胞构成的植株。

另外, 当把来自位点专一性重组系统的一员用作可除去DNA因子时, 由于其切除发生得较快且频率很高, 从形态异常的组织上出现的形态正常的组织也可被迅速检测到, 从而可以较高效率获得很多正常单株。

表3表示当把转座子或来自位点专一性重组系统的一员用作本发明载体的可除去DNA因子时, 从而形态异常的组织获得形态正常单株的效率。

表 3

根据可除去DNA因子的类型获得正常单株效率的差别

	载体	可除去DNA因子	ESP系数	再生正常单株的系数
实施例3	pNPI106	Ac(转座子)	63	2 (7个单株)
实施例5	pNPI132	pSR1系统(位点 专一性重组系 统)的Rs之间 的片段	48	7 (10个单株)

注: 1、在培养2个月以后分离的ESP

2、在实施例3中培养4个月以后, 在实施例5中培养3个月以后  
可得到正常芽。

3、每一个上述正常单株都含有GUS基因作为目的基因的模式。

在实施例1-5中, 在无激素的条件下, 带有转基因细胞的组织  
被增殖, 分化不定芽并再生植株。推测这是因为与标记基因一起被  
导入转基因细胞的ipt基因作用的结果。即, 通过该基因的表达,  
在细胞中产生了过多的植物激素。结果, 在含有ipt基因的细胞中  
所产生的植物激素不仅影响这种细胞自身以分化出ESP之类的组织,  
而且在一定程度上影响与这种细胞相邻的组织, 从而产生了人为地  
向培养基中添加激素时所应出现的结果。

在本发明的载体上，MAI基因被用作标记基因。因此，当用这种基因对植物实施基因导入时，可以这样选择导入了目的基因的组织：在普通的培养基中和普通的培养条件（并不加入任何化学物质的条件）下培养经过基因导入处理的细胞，并用肉眼鉴别所产生的形态异常的组织。因此，该方法被简化了，而且在选择时植物细胞的活性也不会下降。

另外，这种MAI基因是植物中固有的或是通过细菌等的感染而被导入植物的。因此，即使MAI基因在其被导入的植物细胞中得到表达，当将其摄入人体时其安全性也是相当高的。

而且，当把ipt基因用作MAI基因时，由于该基因的作用，含有转基因细胞的组织被增殖并分化出不定芽，从而可以消除向培养基中添加植物激素的必要，而这在植物细胞培养中通常被认为是增殖和分化所不可缺少的。

另外，在这种载体上，被用作标记基因的MAI基因被插入这样的位置，其表现与可除去DNA因子一致，因此，在基因被导入植物细胞以后，通过可除去DNA因子的除去功能，该标记基因以一定的频率被从其存在并起作用的DNA上切除，从而丧失其所具有的功能。因此，只有目的基因存在于该载体上的位置使其与可除去DNA因子的表现不一致，还保留在同一DNA分子上，并保持其表达能力。因此，在该结构上，只需改变待导入的目的基因部分，而不必对标记基因等的结构作任何改变，即可用该载体多次把有关基因导入某一单株。因此，可将多次导入进行无数次。

另外，在这种情况下，通过转基因组织的形态变化，可用肉眼检测到作为标记基因的MAI基因的功能的丧失。因此，可以确实地、

简便地选择出仅由只保留目的基因在其染色体上并维持该基因的作用的细胞构成的组织。结果，能以很高的效率实施基因的多次导入，而且无须进行杂交步骤即可获得仅由这种细胞构成的转基因植物，即不受标记基因的影响、完全没有因标记基因的产物所带来的任何健康危险的单株。

尽管已结合实施例对本发明作了详细说明，很明显，本领域的技术人员在不脱离本发明的精神范围的情况下可对本发明作出多种变化和改进。

说明书附图说明:

图 6:

泳道1: DNA大小标记

$\lambda / H i n d \text{ III} - \phi X 1 7 4 / H a e \text{ III}$   
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道2: p I P T 4 ( 对照 )

泳道3~11: 非极端多芽表型

泳道12~17: 极端多芽表型

图 13:

泳道1: DNA大小标记

$\lambda / H i n d \text{ III} - \phi X 1 7 4 / H a e \text{ III}$   
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道2: p N P I 1 0 6 ( 对照 )

泳道3: p B I 1 2 1 ( 对照 )

泳道4、5: 8号芽

泳道2、4: 用引物检测ipt基因的存在

泳道3、5: 用引物检测Ac-ipt基因复合物的切除

图 14:

泳道1: DNA大小标记

$\lambda$  / *Hind* III -  $\phi$ X174 / *Hae* III  
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道2: pNPI106 (对照)

泳道3: pBI121 (对照)

泳道4、5: 由13-1号芽得到的正常单株

泳道6、7: 由14-1号芽得到的正常单株

泳道2、4、6: 用引物检测ipt基因的存在

泳道3、5、7: 用引物检测Ac-ipt基因复合物的切除

图 16:

泳道1: DNA大小标记

$\lambda$  / *Hind* III -  $\phi$ X174 / *Hae* III  
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道2: pNPI106 (对照)

泳道3: pBI121 (对照)

泳道4、5: 正常单株

泳道2、4: 用引物检测ipt基因的存在

泳道3、5: 用引物检测Ac-ipt基因复合物的切除

图 21:

泳道 1 : DNA大小标记  
 $\lambda$ /Bind III -  $\phi$ X174/Bac III  
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道 2 : pNPI132 (对照)

泳道 3 :	系号15	-	1	号正常单株
泳道 4 :	系号15	-	2	号正常单株
泳道 5 :	系号16	-	1	号正常单株
泳道 6 :	系号17	-	1	号正常单株
泳道 7 :	系号18	-	1	号正常单株
泳道 8 :	系号19	-	1	号正常单株
泳道 9 :	系号19	-	2	号正常单株
泳道 10 :	系号20	-	1	号正常单株
泳道 11 :	系号20	-	2	号正常单株
泳道 12 :	系号21	-	1	号正常单株

图 22:

泳道 1 : DNA大小标记  
 $\lambda$ /Bind III -  $\phi$ X174/Bac III  
(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道 2 : pBI121 (对照)

泳道 3 :	系号15	-	1	号正常单株
泳道 4 :	系号15	-	2	号正常单株
泳道 5 :	系号16	-	1	号正常单株
泳道 6 :	系号17	-	1	号正常单株
泳道 7 :	系号18	-	1	号正常单株
泳道 8 :	系号19	-	1	号正常单株
泳道 9 :	系号19	-	2	号正常单株
泳道 10 :	系号20	-	1	号正常单株
泳道 11 :	系号20	-	2	号正常单株
泳道 12 :	系号21	-	1	号正常单株



图 23:

泳道 1 : DNA大小标记

$\lambda$ /Hind III -  $\phi$ X174/Bac III

(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道 2 : pNPI132 (对照)

泳道 3 : 系号15 - 1 号正常单株

泳道 4 : 系号15 - 2 号正常单株

泳道 5 : 系号16 - 1 号正常单株

泳道 6 : 系号17 - 1 号正常单株

泳道 7 : 系号18 - 1 号正常单株

泳道 8 : 系号19 - 1 号正常单株

泳道 9 : 系号19 - 2 号正常单株

泳道 10 : 系号20 - 1 号正常单株

泳道 11 : 系号20 - 2 号正常单株

泳道 12 : 系号21 - 1 号正常单株

图 24 A:

泳道 1 : DNA大小标记

$\lambda$ /Hind III -  $\phi$ X174/Bac III

(由TOYOBO CO.LTD生产)

泳道 2 : pNPI132 (对照)

泳道 3 : 未受感染的单株

泳道 4~6 : 卡那霉素敏感单株

泳道 7、8 : 抗卡那霉素单株

图 24 B:

- 泳道 1 : DNA大小标记  
 $\lambda$ /B<sub>ind</sub> III -  $\phi$ X174/Dac<sup>III</sup>  
(由TOYOBO CO.LTD生产)  
泳道 2 : pB1121 (对照)  
泳道 3 : 未受感染的单株  
泳道 4~6 : 卡那霉素敏感单株  
泳道 7、8 : 抗卡那霉素单株

图 24 C:

- 泳道 1 : DNA大小标记  
 $\lambda$ /B<sub>ind</sub> III -  $\phi$ X174/Dac<sup>III</sup>  
(由TOYOBO CO.LTD生产)  
泳道 2 : pNP1132 (对照)  
泳道 3 : 未受感染的单株  
泳道 4~6 : 卡那霉素敏感单株  
泳道 7、8 : 抗卡那霉素单株

图 29:

- 泳道 1 . DNA大小标记  
 $\lambda$ /B<sub>ind</sub> III -  $\phi$ X174/Dac<sup>III</sup>  
(由TOYOBO CO.LTD生产)  
泳道 2: pNP 1140 (对照)  
泳道 4: pNP 1139 (对照)  
泳道 6: pNP 1140 (对照)  
泳道 3、5、7: 多次导入后的正常芽  
泳道 2、3: 用引物检测 ipt 基因的存在  
泳道 4、5: 用引物检测含有 ipt 基因且有 Rs 片断的切除  
  
泳道 6、7: 用引物检测 HPT 基因的存在

# 说明书附图

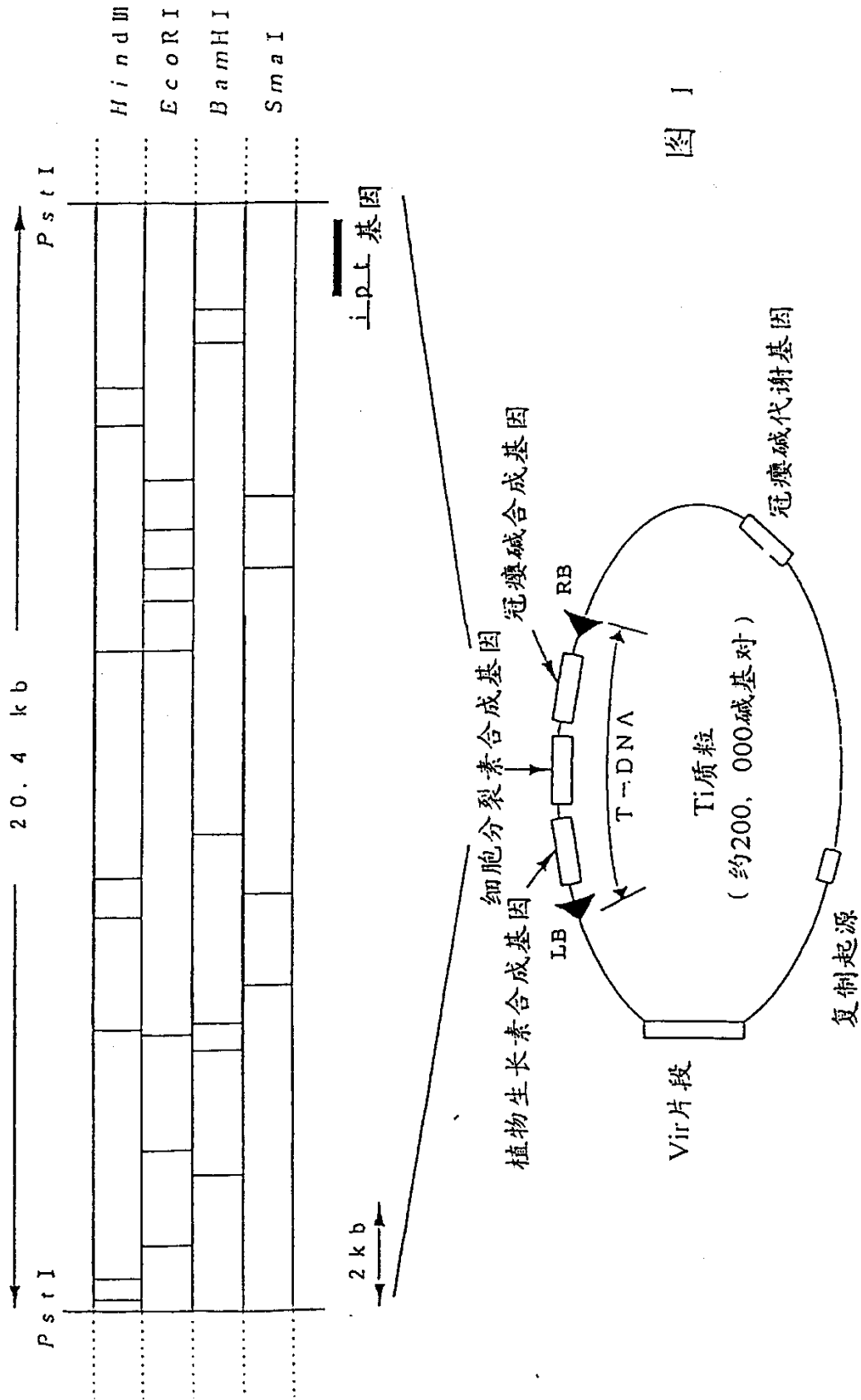


图 1

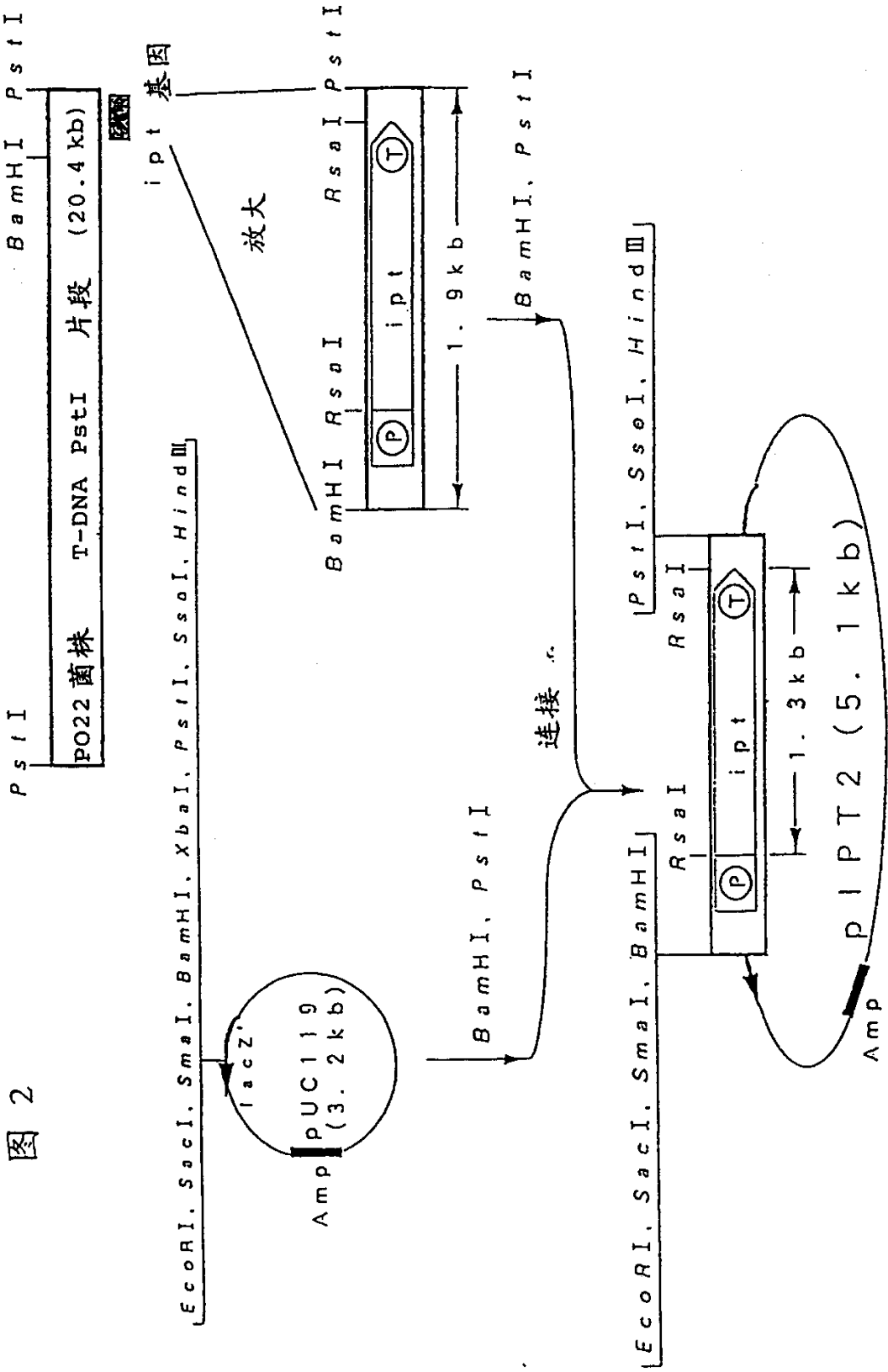


图 3

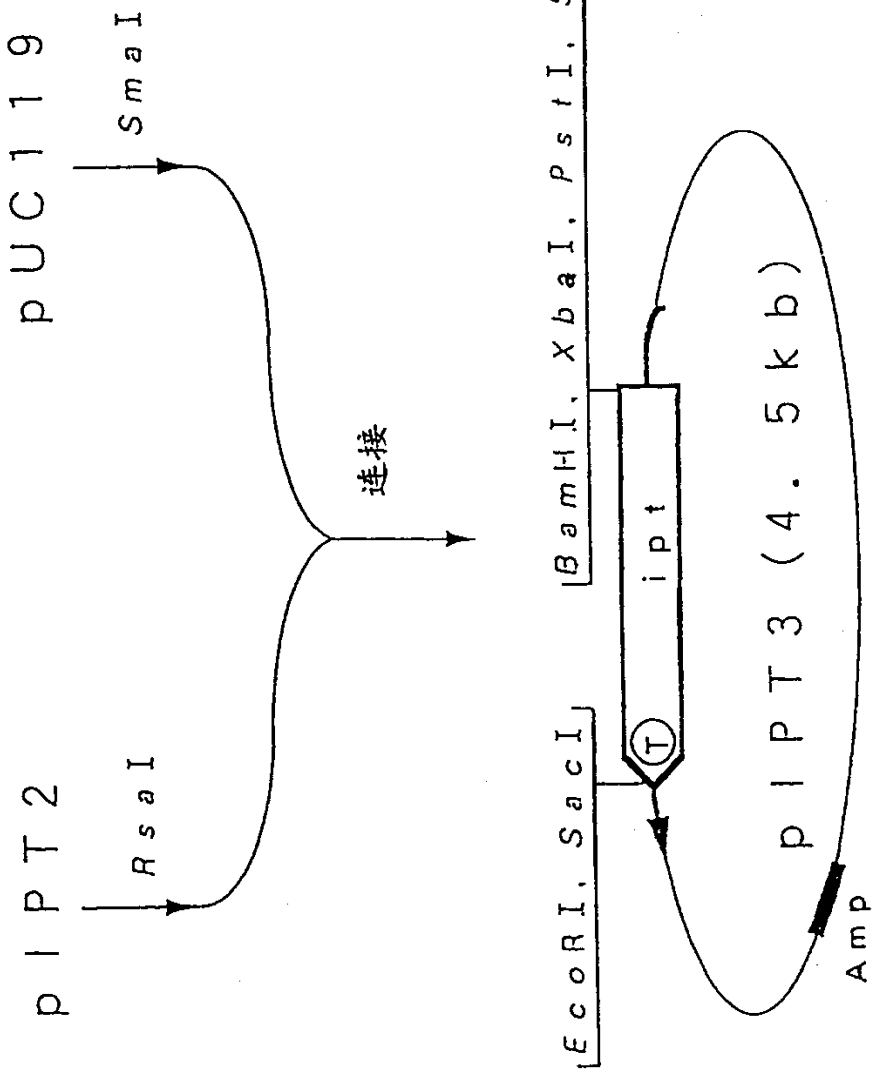


图 4

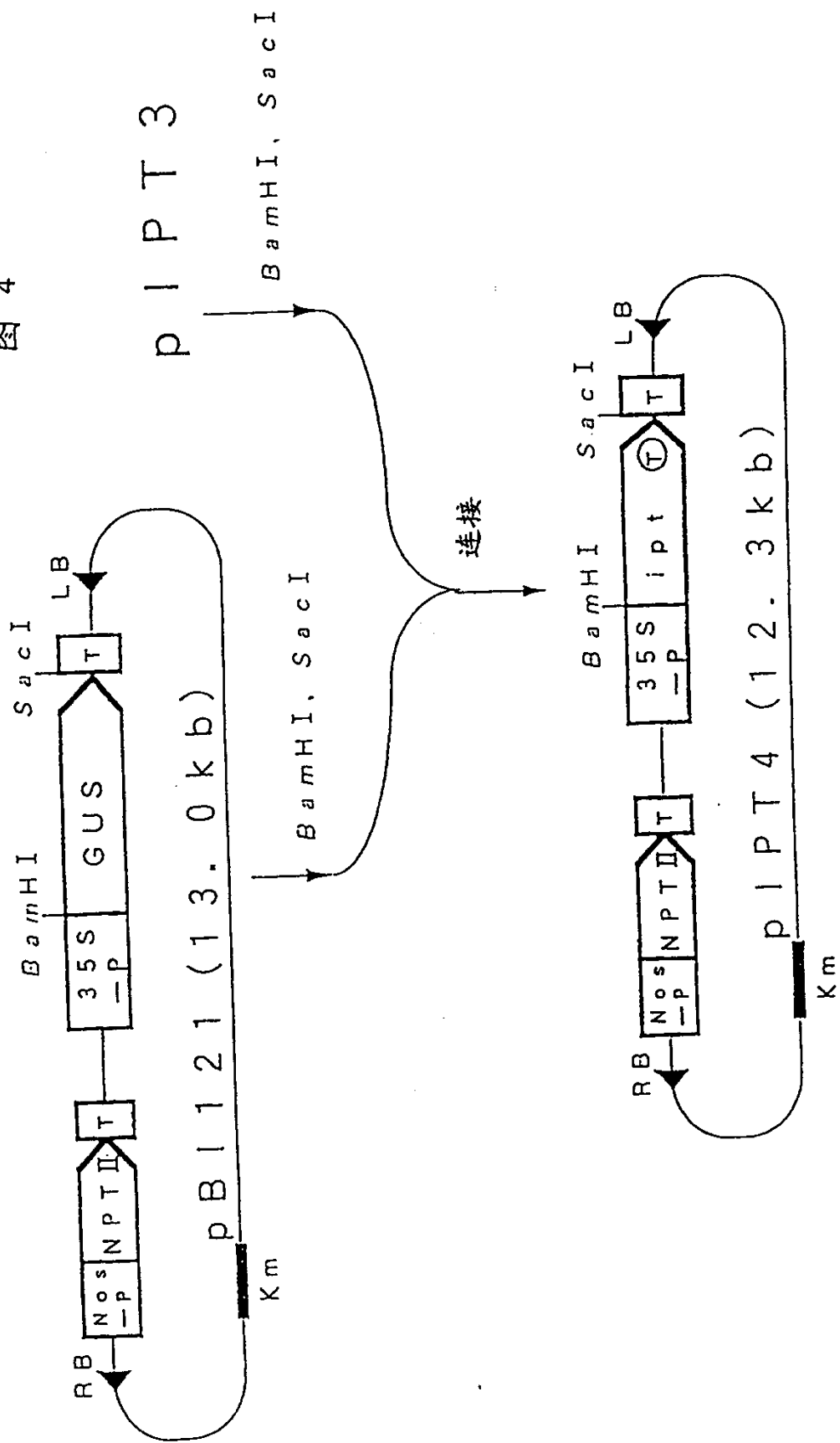
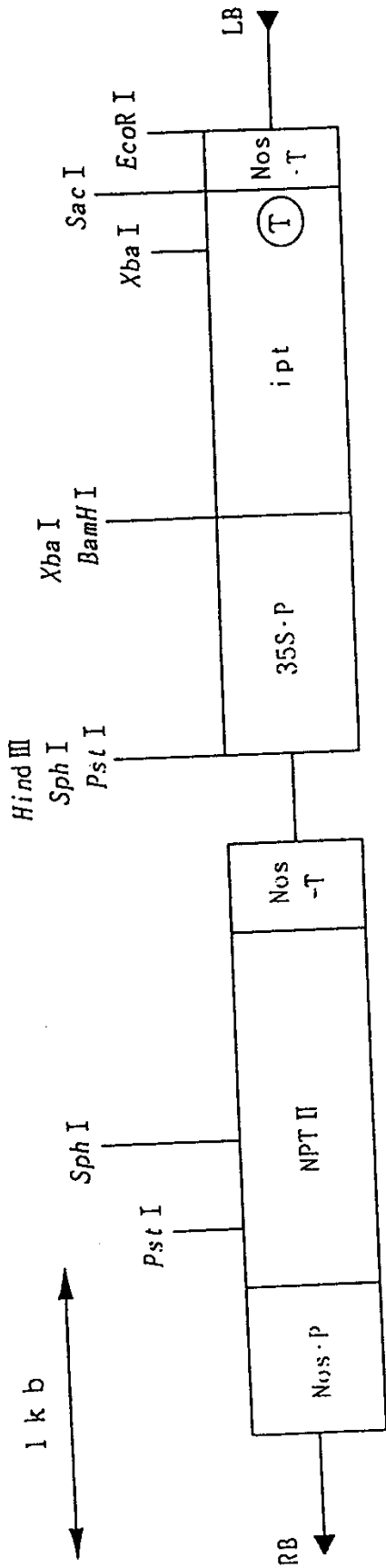


图 5



p I P T 4 ( 1 2 . 3 k b )

图 6

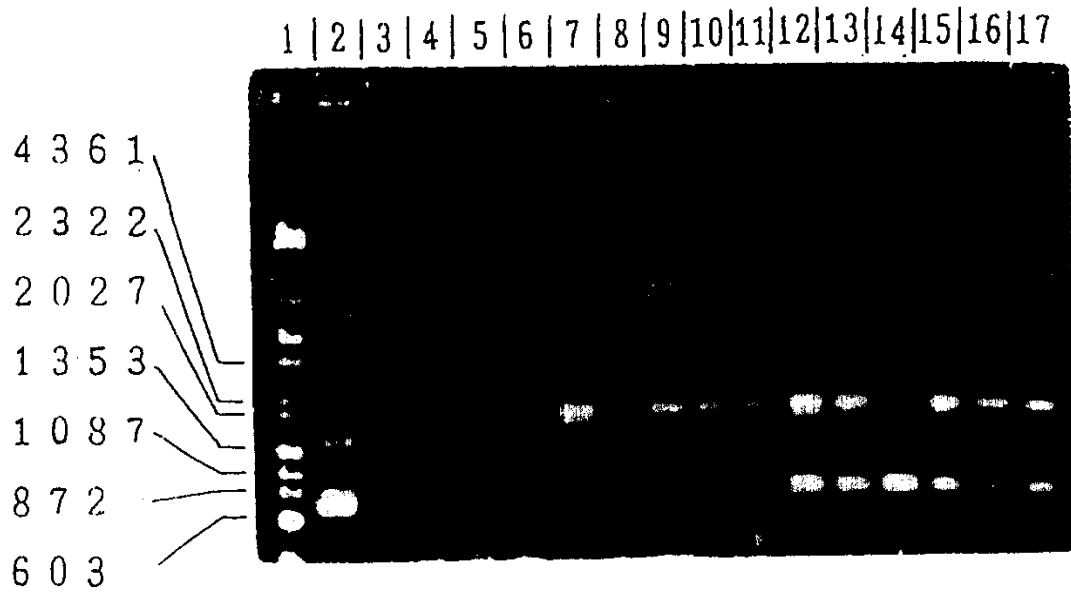




图 7

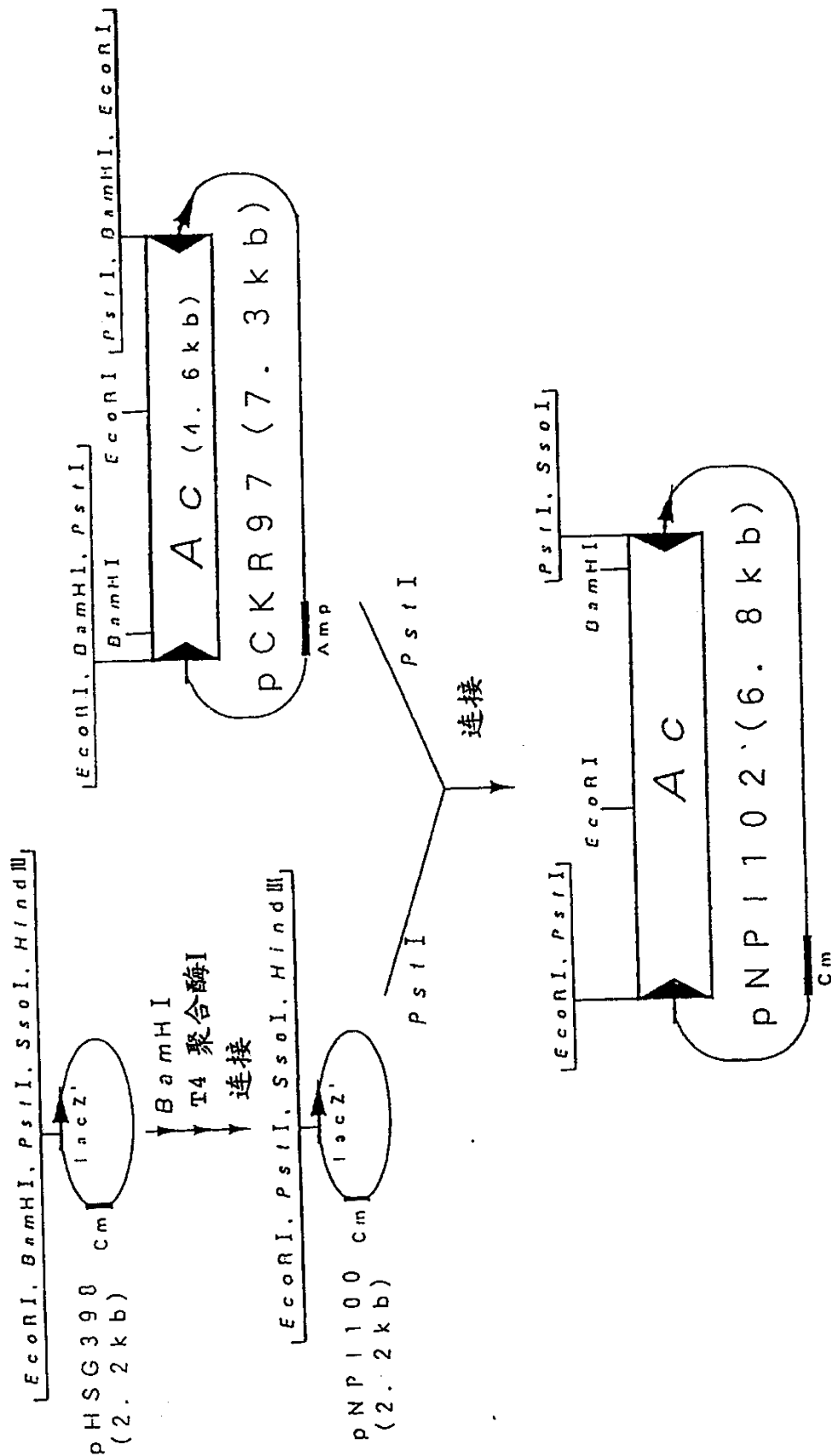


图 8

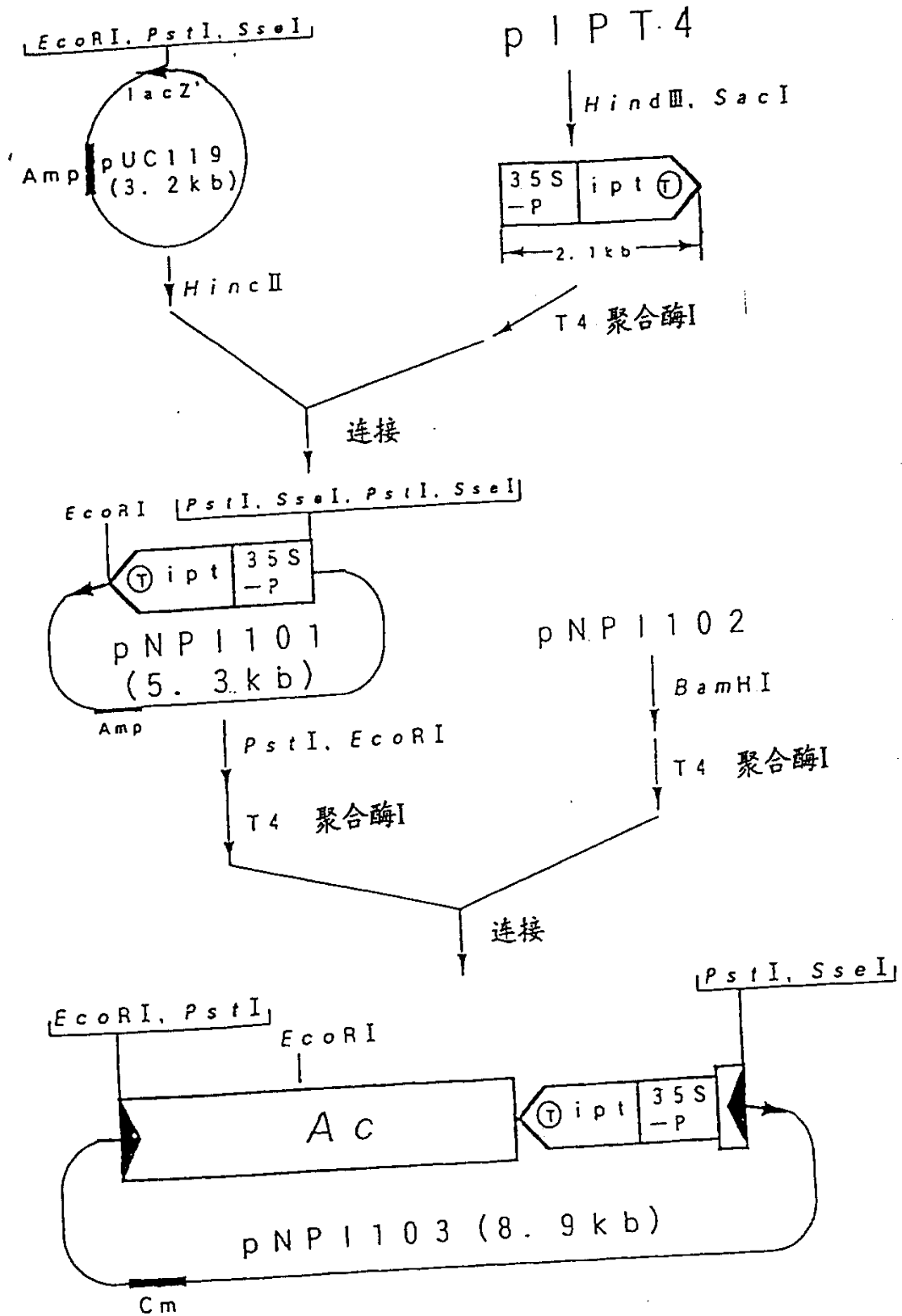


图 9

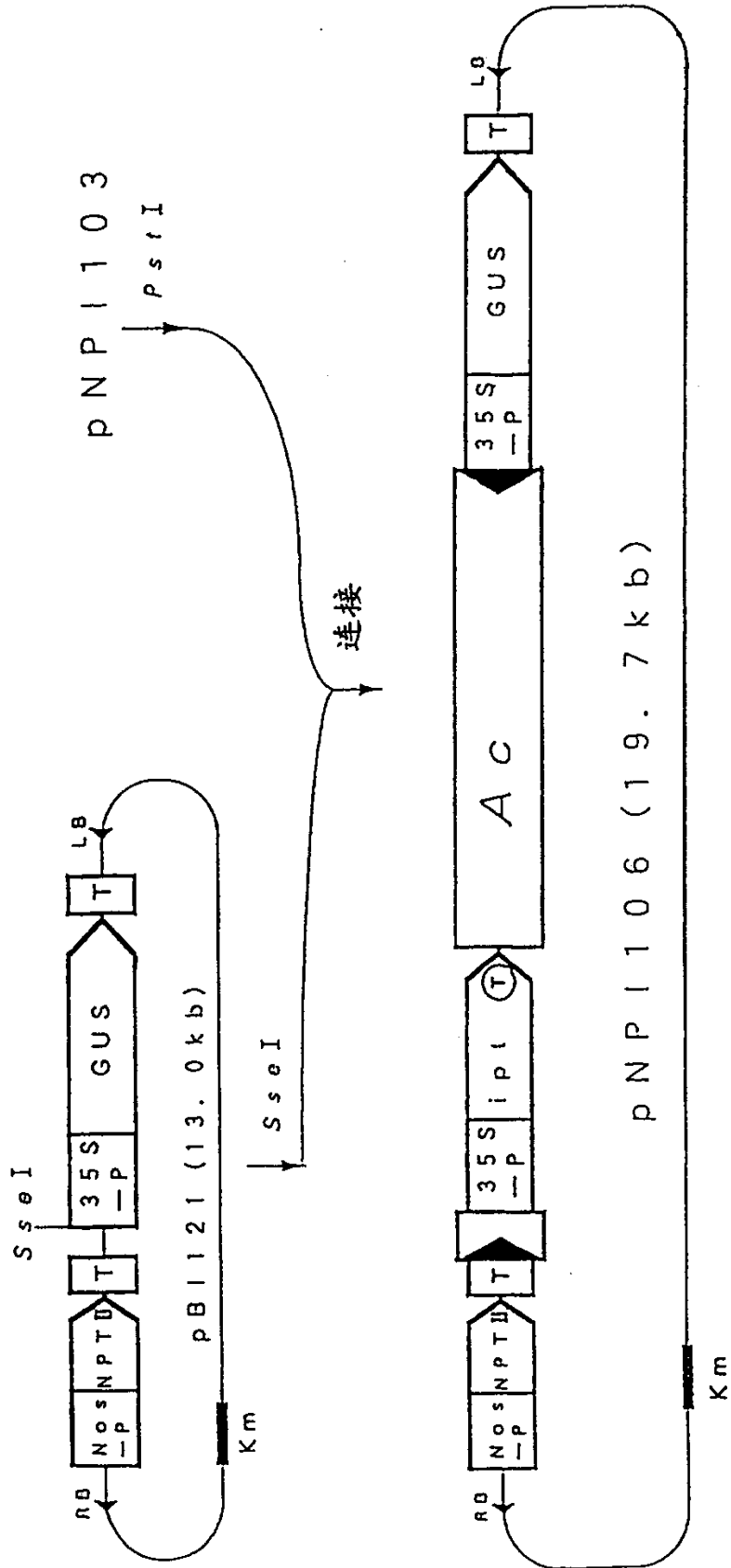


图 10

# pNPI106

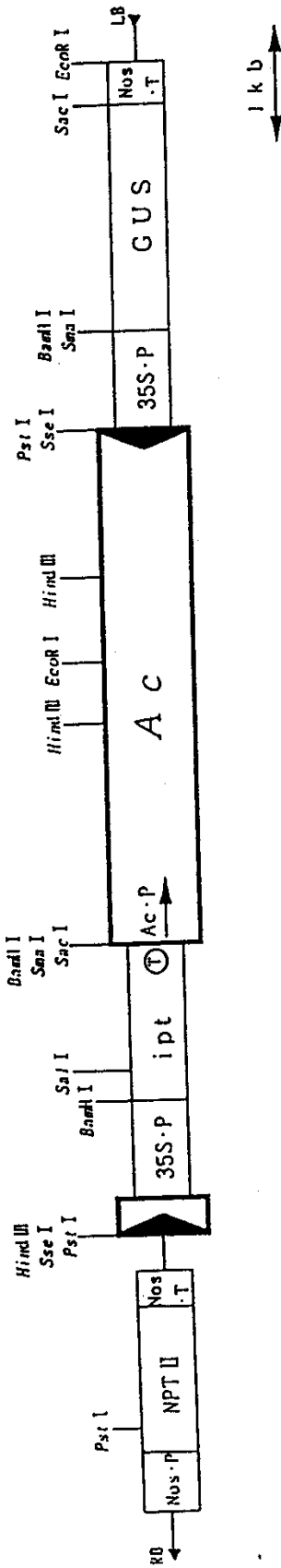


图 11

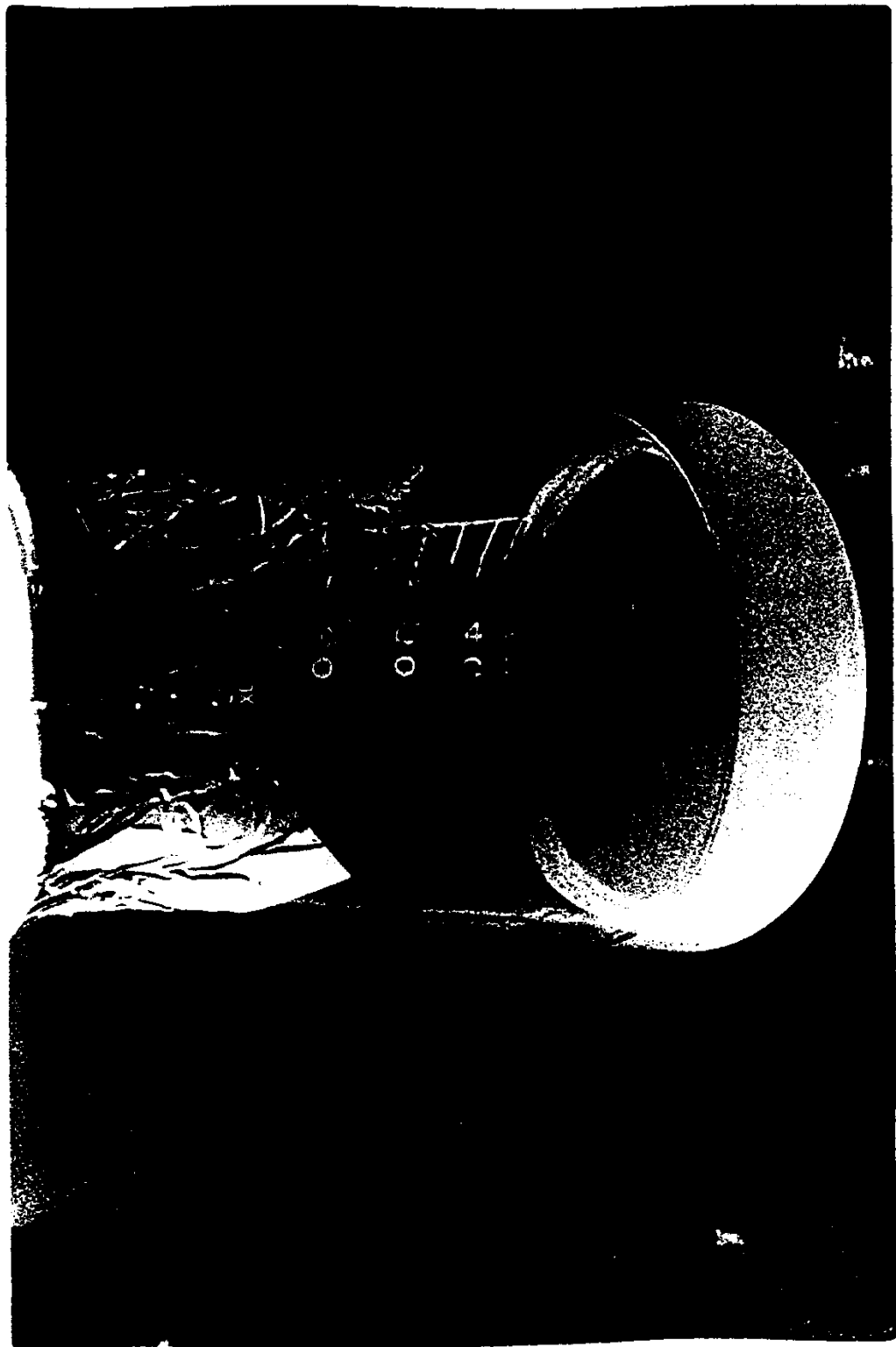


图 12

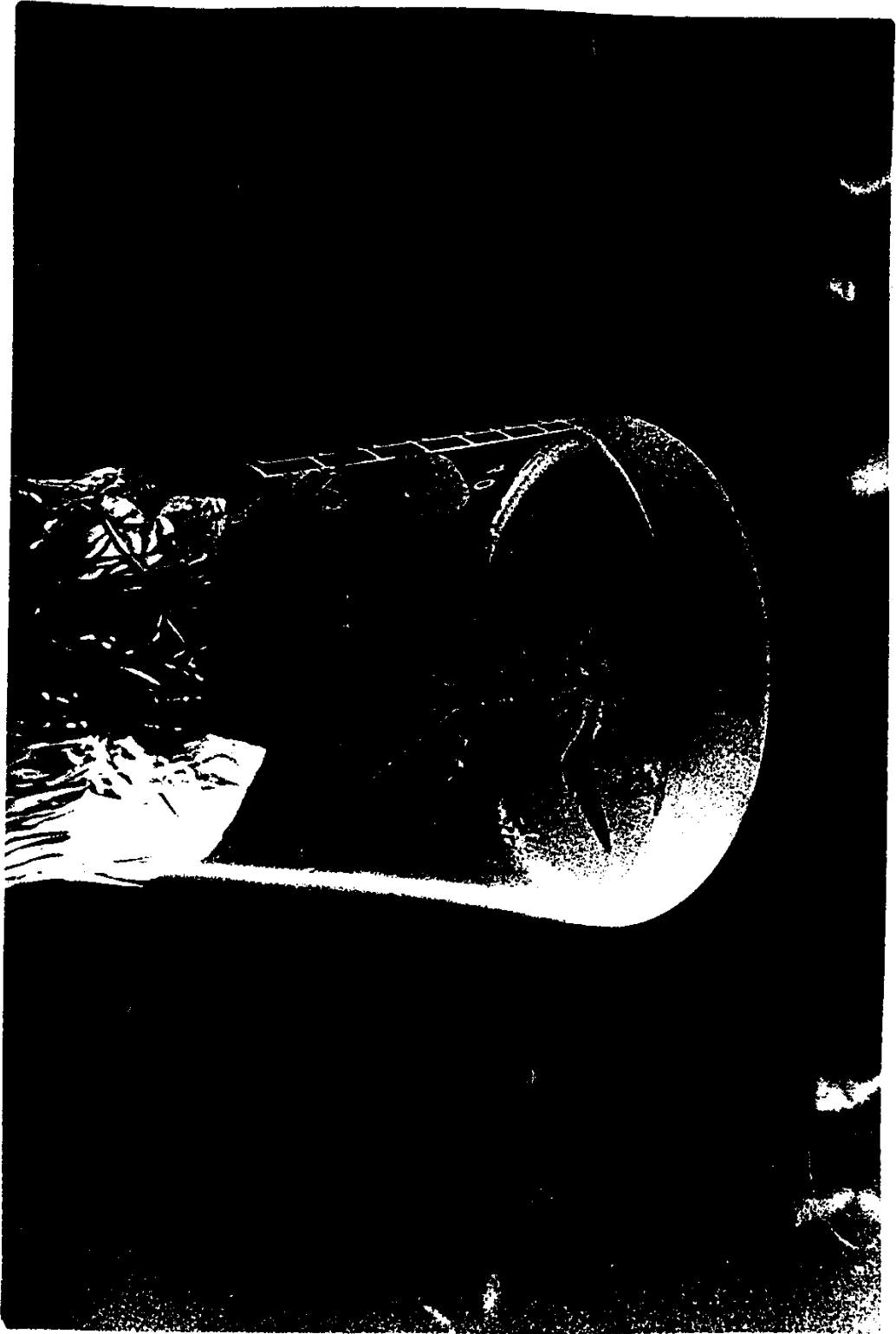


图 13

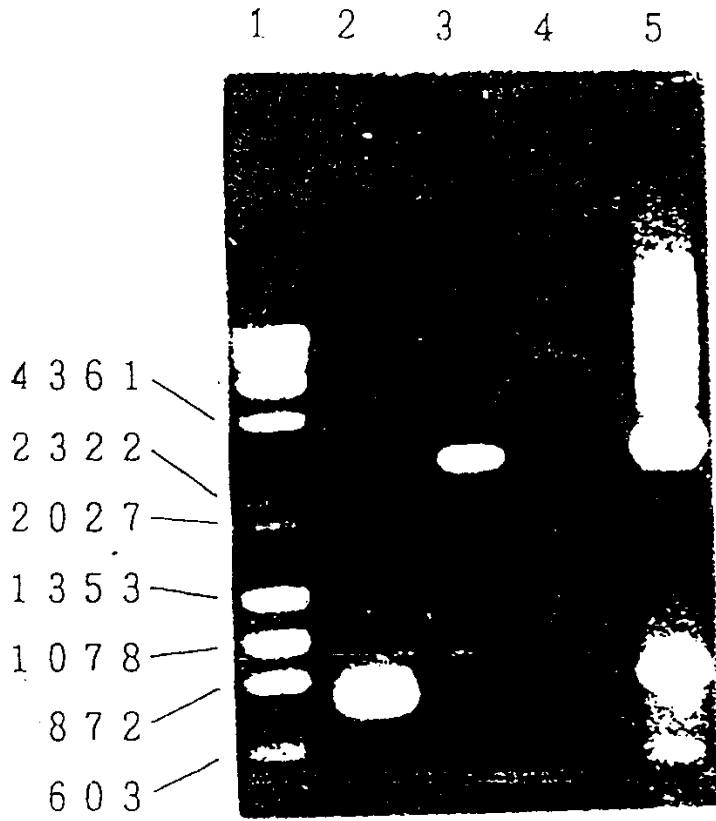


图 14

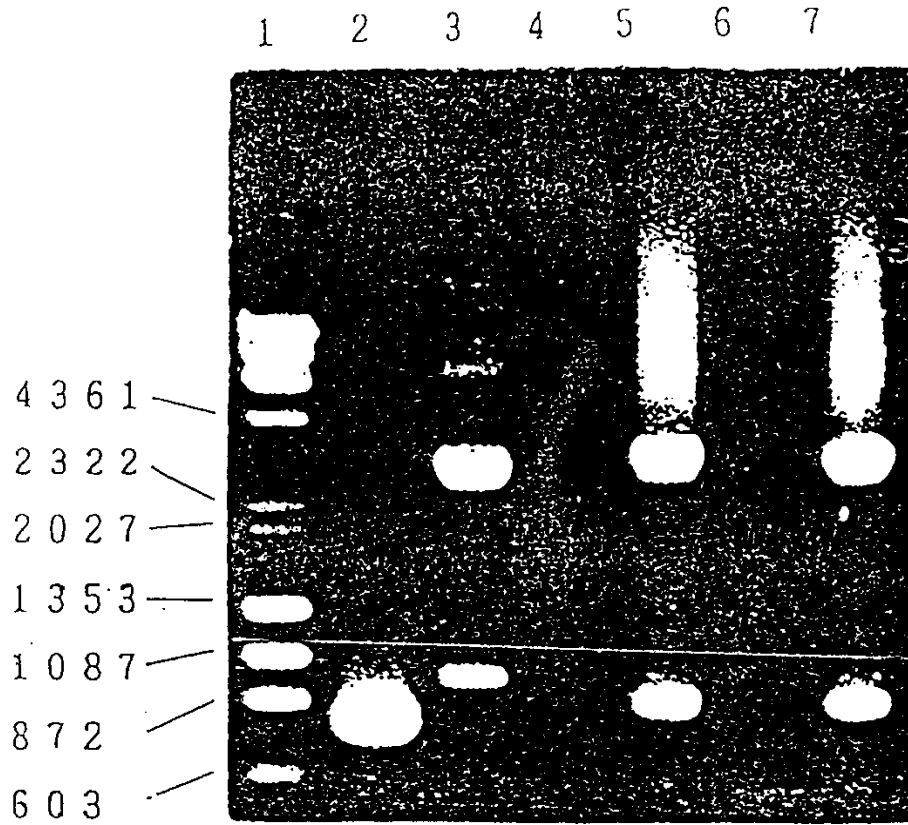




图 15

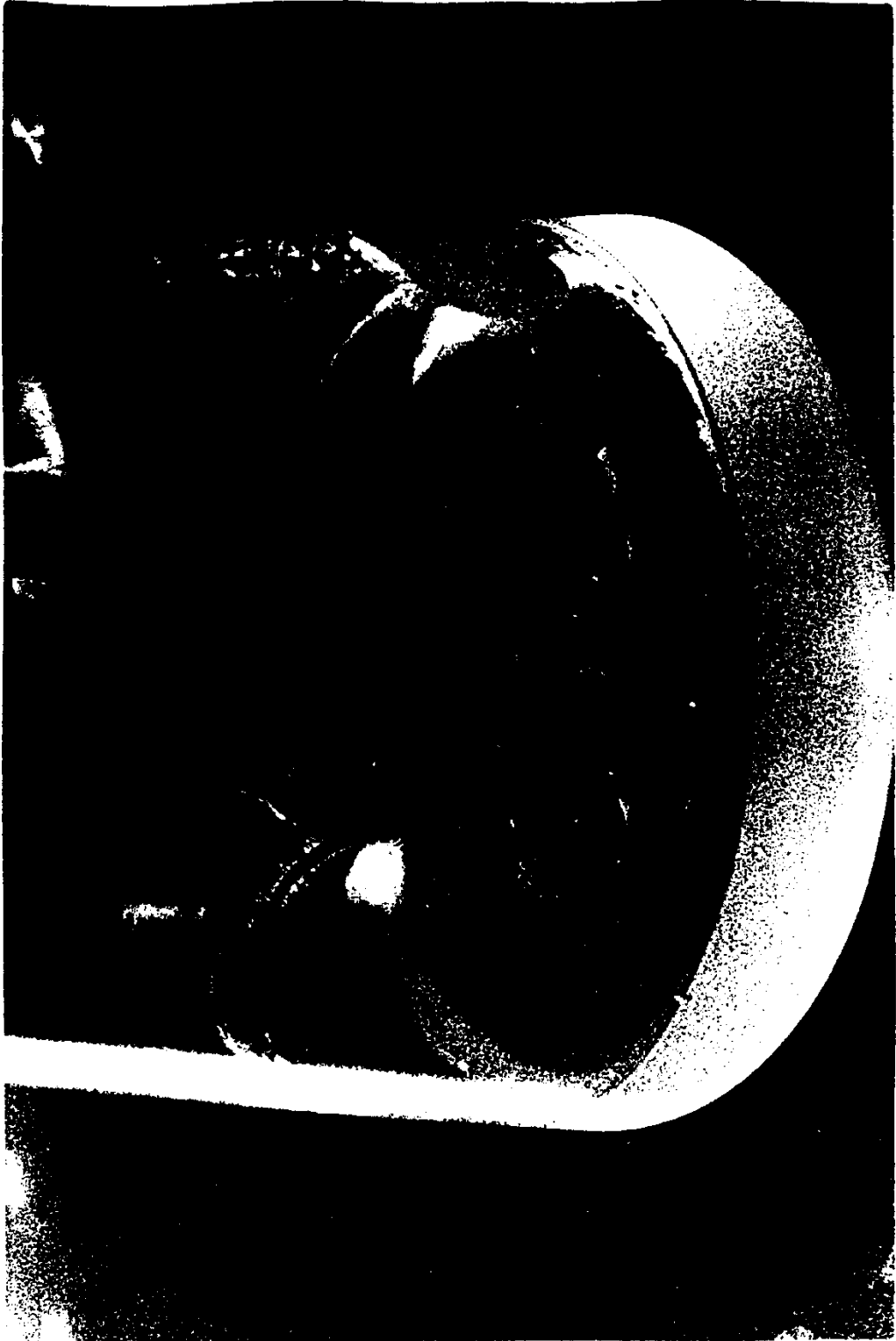


图 16

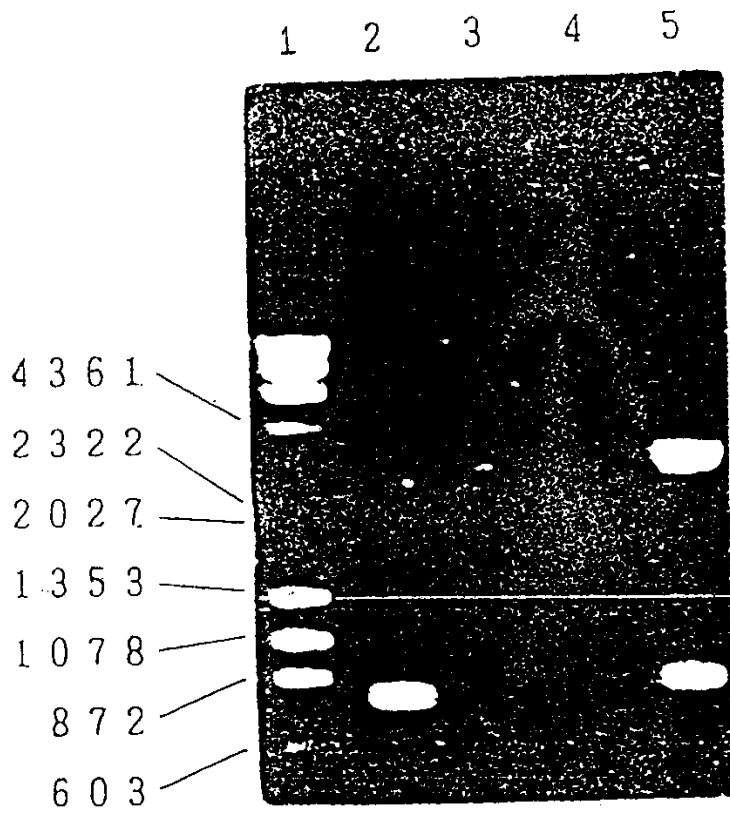


图 17

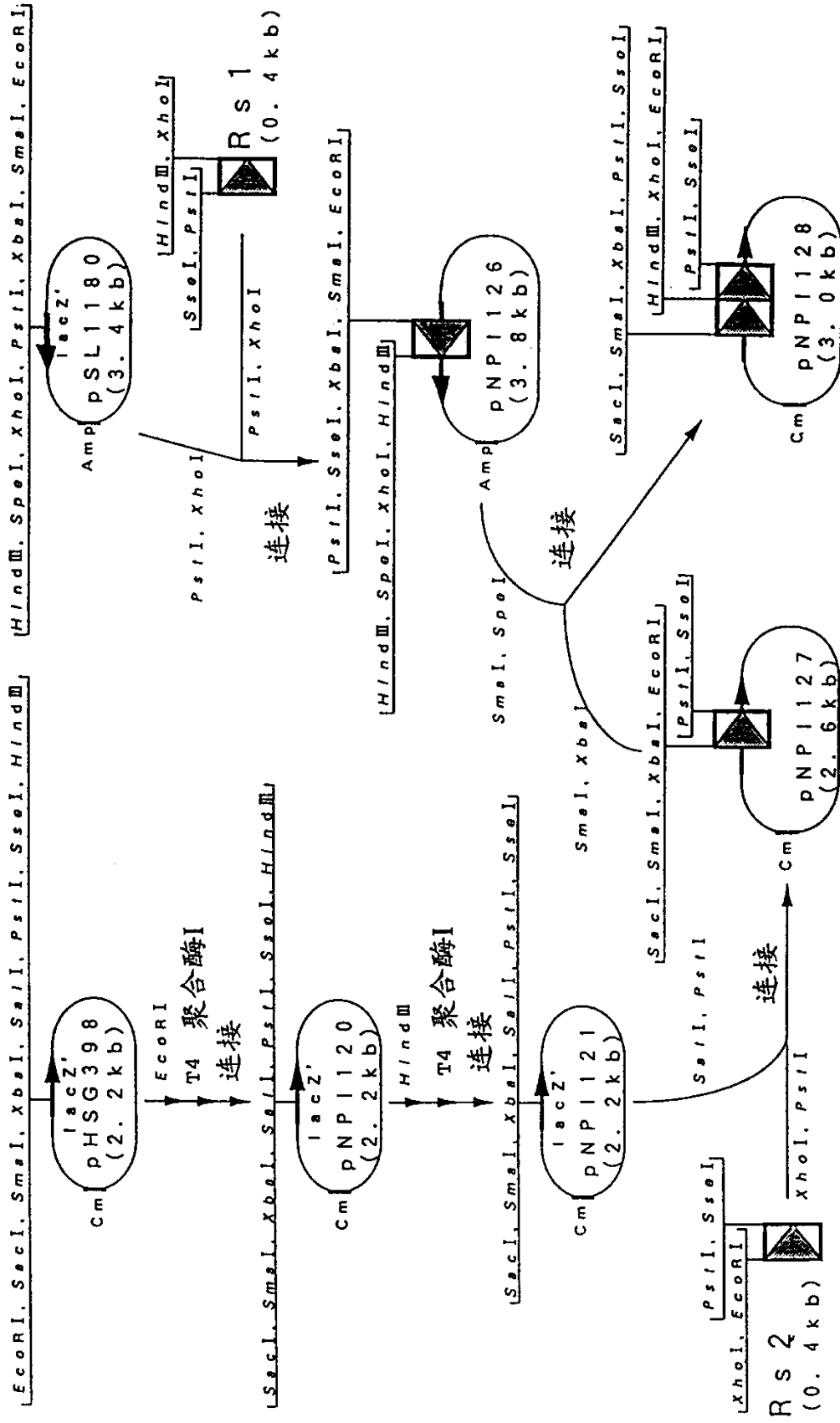


图 18

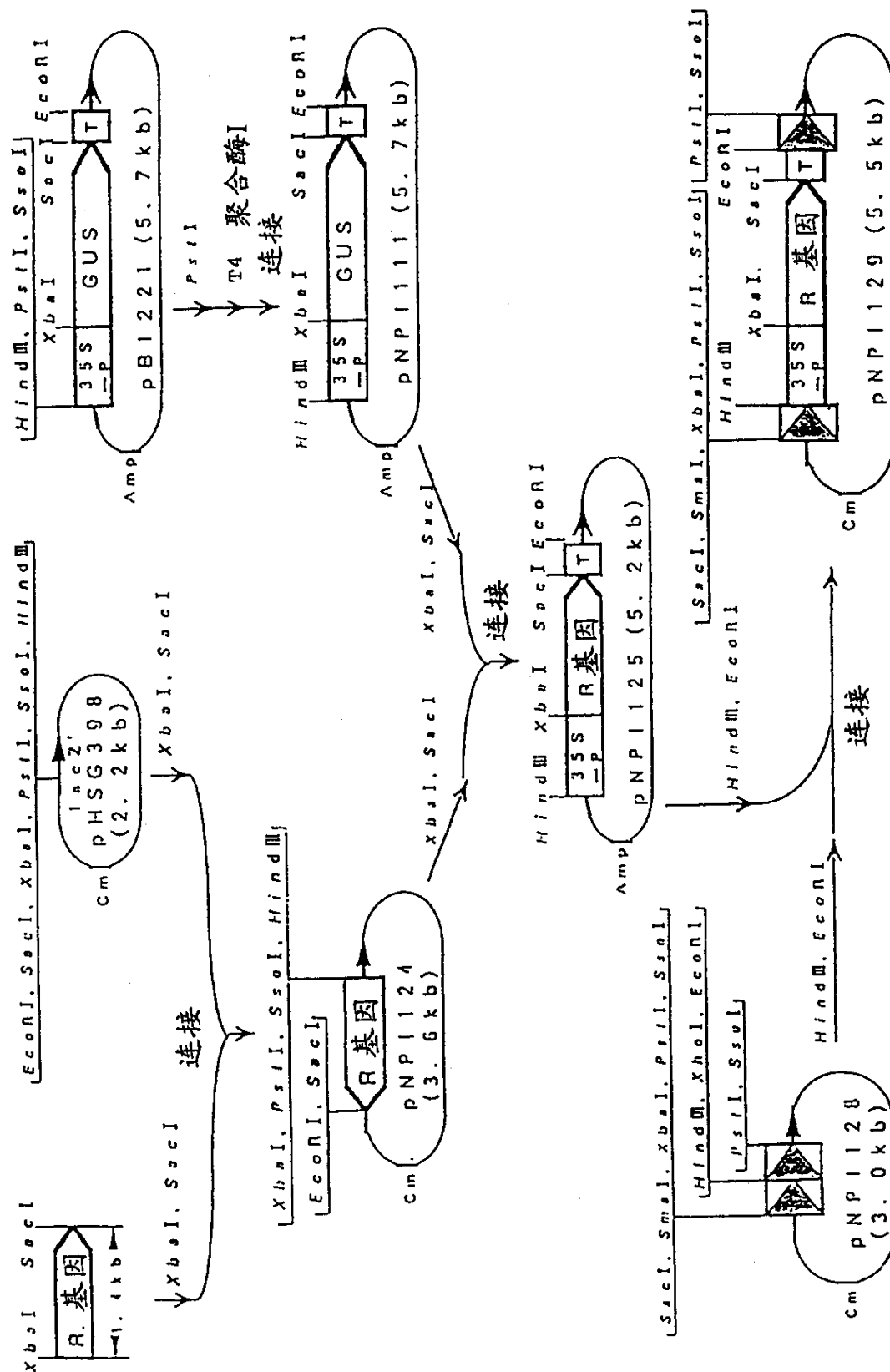


图 19

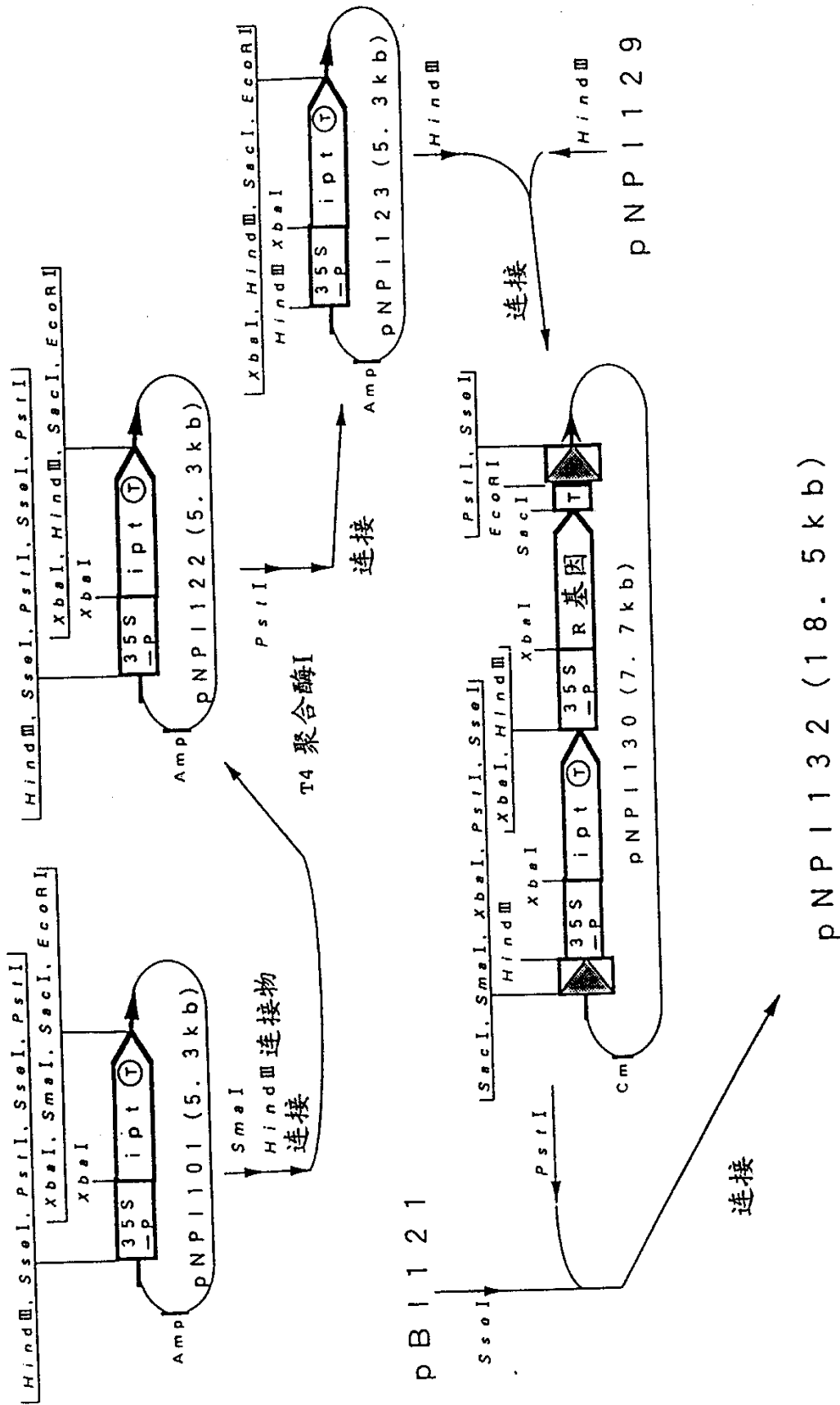
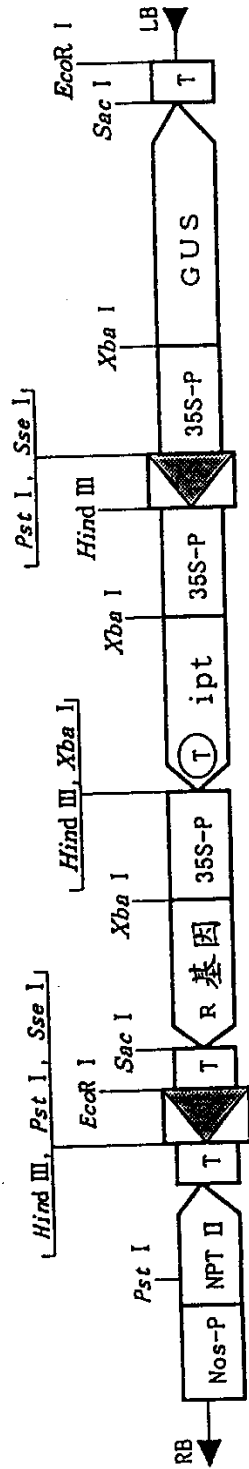


图 20



pNPI132 (18.5 kb)

图 21

用引物检测ipt基因的存在

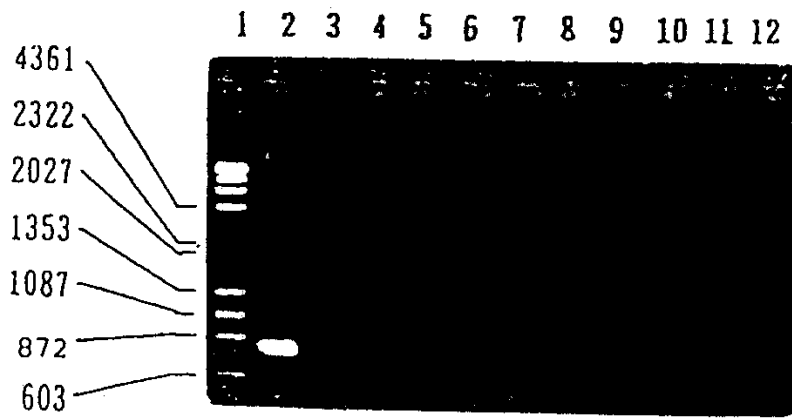


图 22

用引物检测带有ipt基因且两端有Rs序列的片段的切除

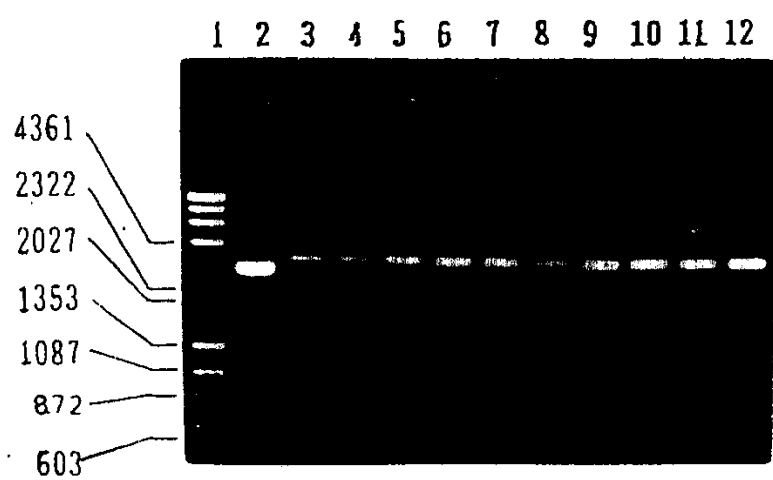




图 23

用引物检测GUS基因的存在

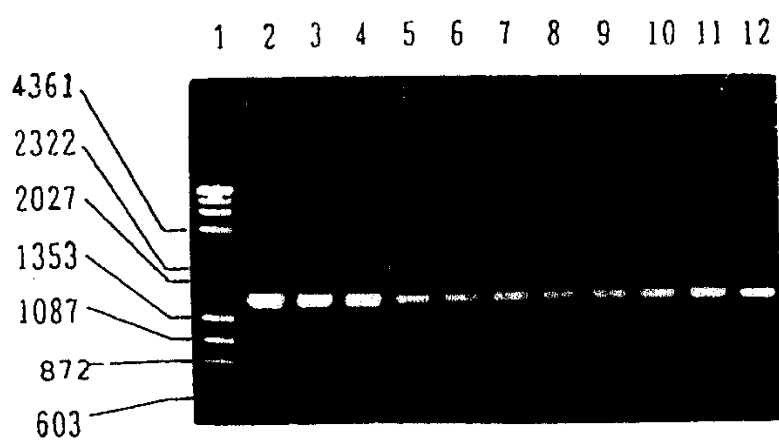


图 24 A

用引物检测ipt基因的存在

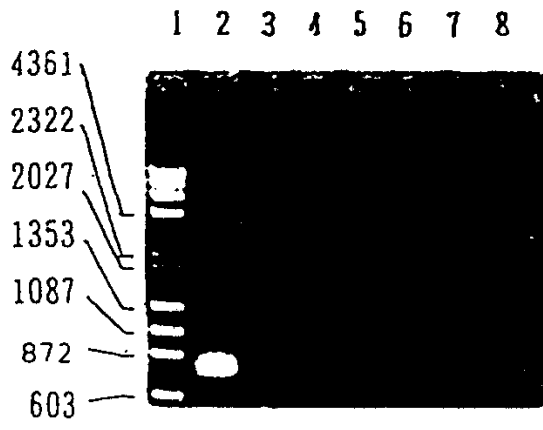


图 24 B

用引物检测带有ipt基因且两端有Rs序列的片段的切除

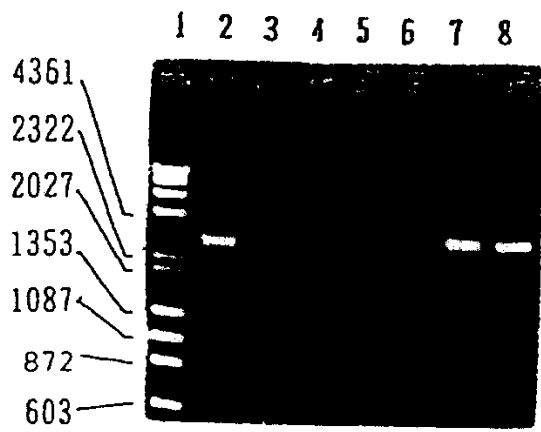


图 24 C

用引物检测Gus基因的存在

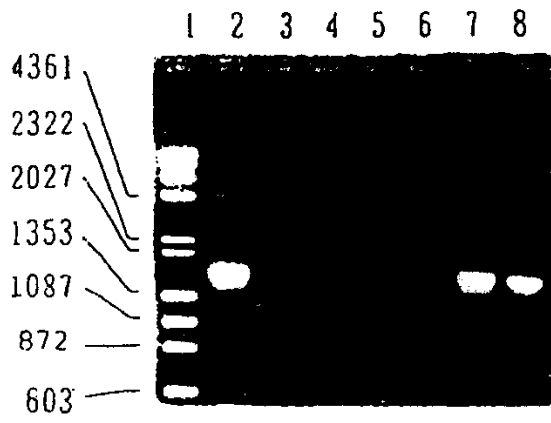


图 25

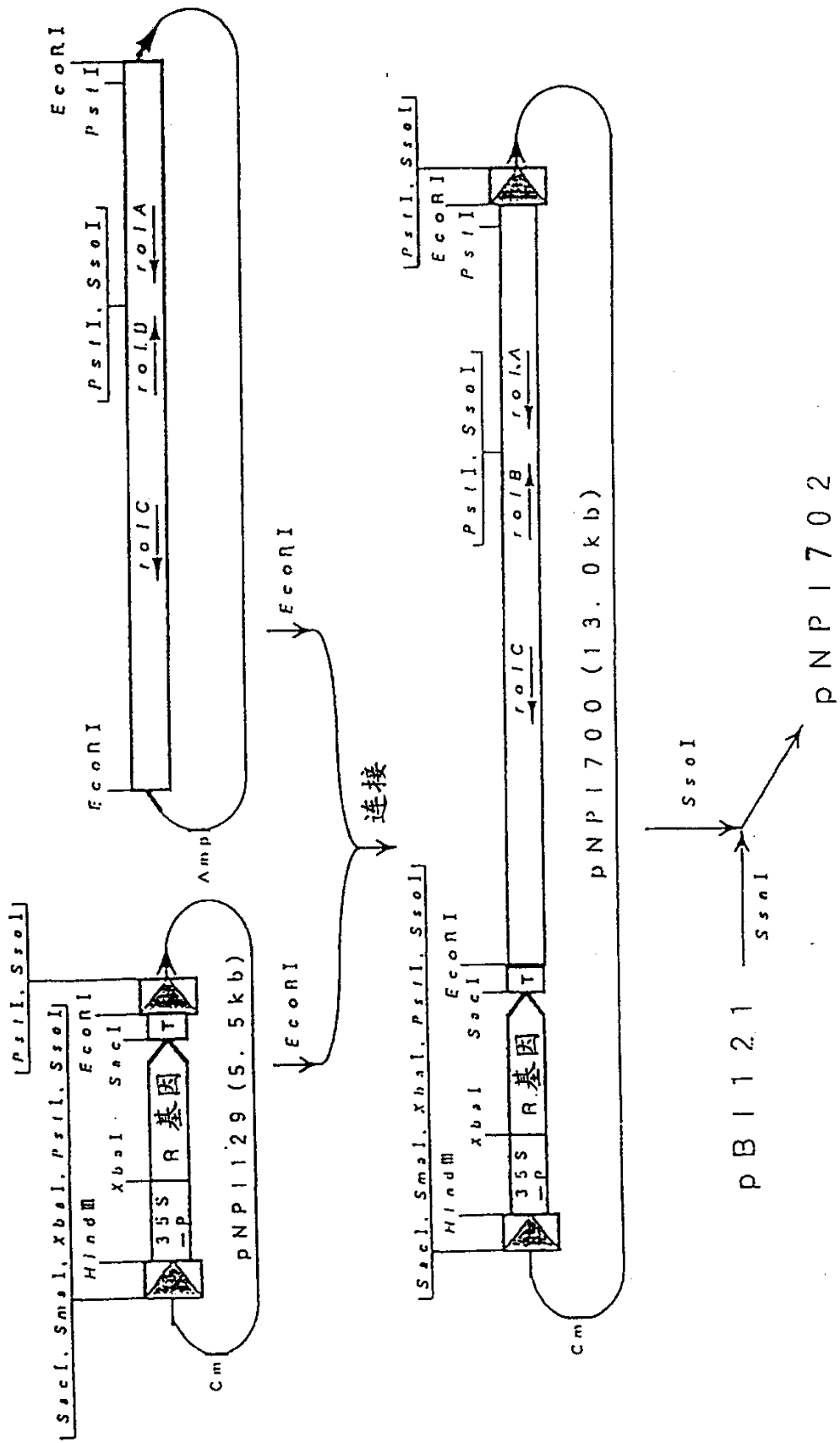
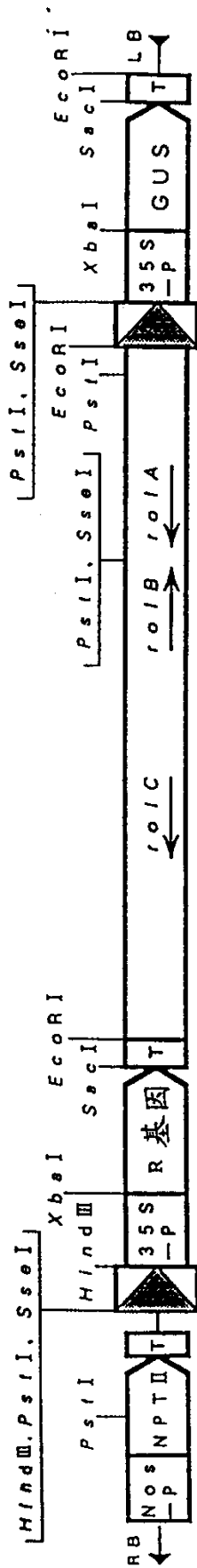


图 26

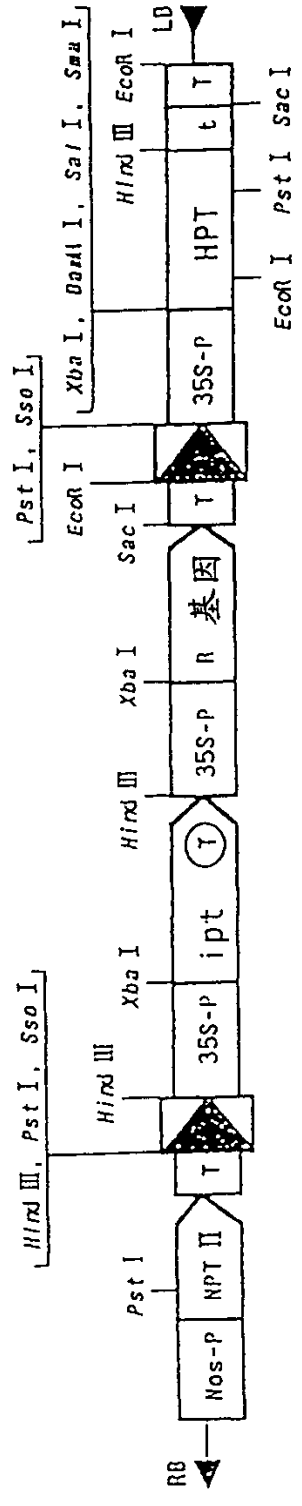


pNP1702 (23.9 kb)

图 27



图 28



pNP1140 (17.8 kb)



图 29

