



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105338805 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201480024708. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

A01H 1/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/00(2006. 01)

61/801, 320 2013. 03. 15 US

C12N 15/00(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029621 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/144987 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 希博斯美国有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 希博斯欧洲有限公司

(72) 发明人 P·R·比瑟姆 G·F·W·格卡尔

C·施波克 N·J·萨奥尔

J·皮尔斯 R·E·塞格米

J·莫左鲁克

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

权利要求书2页 说明书19页

(54) 发明名称

采用寡核苷酸介导的基因修复提高靶向基因修饰的效率的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供用于修饰植物细胞以及源自其的植物和种子中的基因的改进方法。更具体地说,本发明涉及通过组合基因修复寡核苷酸与增强靶细胞基因修复机制的组分的可用性的方法来增加靶基因突变的效率。

1. 一种用于将基因修复寡核碱基 (GRON) 介导的突变引入细胞中的靶脱氧核糖核酸 (DNA) 序列中的方法, 所述方法包括:

在将 GRON 递送至植物细胞中之前和 / 或同时在增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的条件下培养所述细胞。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中在 GRON 存在下增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的所述条件包括以下中的一种或多种: 将一个或多个位点引入至所述植物细胞 DNA 中, 所述位点是用于碱基切除修复的靶标; 将一个或多个位点引入至所述植物细胞 DNA 中, 所述位点是用于非同源末端连接的靶标; 将一个或多个位点引入至所述植物细胞 DNA 中, 所述位点是用于微同源介导的末端连接的靶标; 将一个或多个位点引入至所述植物细胞 DNA 中, 所述位点是用于同源重组的靶标; 以及将一个或多个位点引入至植物细胞 DNA 中, 所述位点是用于引导和增加修复的靶标。

3. 如权利要求 1 或 2 中的一项所述的方法, 其中所述增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的条件包括引入一种或多种化合物, 所述化合物在将所述 GRON 递送至所述植物细胞中之前或同时诱导单链缺口或双 DNA 链断裂进入至所述植物细胞中。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中诱导单链缺口或双 DNA 链断裂的所述一种或多种化合物包含一种或多种核酸酶和 / 或一种或多种博来霉素家族化合物。

5. 如权利要求 1-4 中的一项所述的方法, 其中诱导单链缺口或双 DNA 链断裂的所述一种或多种化合物共价偶联至所述 GRON。

6. 如权利要求 1-5 中的一项所述的方法, 其中所述细胞是选自由以下组成的组的物种的植物细胞: 芥花、向日葵、玉米、烟草、甜菜、棉花、玉米、小麦、大麦、水稻、苜蓿、大麦、高粱、西红柿、芒果、桃子、苹果、梨、草莓、香蕉、甜瓜、土豆、胡萝卜、莴苣、洋葱、大豆、大豆属、甘蔗、豌豆、鹰嘴豆、紫花豌豆、蚕豆、扁豆、萝卜、芜菁甘蓝、球芽甘蓝、羽扇豆、花椰菜、羽衣甘蓝、菜豆、杨树、松树、桉树、葡萄、柑橘、黑小麦、苜蓿、黑麦、燕麦、草皮和牧草、亚麻、油菜、芥菜、黄瓜、牵牛花、香脂、辣椒、茄子、万寿菊、莲花、卷心菜、菊花、康乃馨、郁金香、鸢尾以及百合。

7. 如权利要求 1-6 中的一项所述的方法, 其中所述细胞是转基因的。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述靶 DNA 序列是所述细胞的内源基因。

9. 如权利要求 1-8 中的一项所述的方法, 其中所述细胞是植物细胞, 并且其中所述方法还包括从所述植物细胞再生具有通过所述 GRON 引入的突变的植物。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其还包括从所述植物采集种子。

11. 一种植物细胞, 其包含根据权利要求 1-80 中的一项所述的方法由 GRON 引入的基因组修饰, 或一种植物, 其包含根据权利要求 9 所述的方法由 GRON 引入的基因组修饰, 或一种种子, 其包含根据权利要求 10 所述的方法由 GRON 引入的基因组修饰。

12. 在细胞中, 引入一种或多种化合物, 所述化合物引入单链缺口或双链断裂以通过作为供体的基因修复寡核苷酸 (GRON) 改进突变转化。

13. 一种评定 GRON 的转化效率的方法, 其包括:

将所述 GRON 引入至表达编码蓝色荧光蛋白的靶 DNA 序列的植物原生质体中, 其中所述 GRON 被构造成使所述靶 DNA 序列在预定位点处突变以引起所述蓝色荧光蛋白的转化, 由此所述蓝色荧光蛋白发射不同波长的荧光, 其中在引入所述 GRON 之前或同时, 所述原生质

体内的 DNA 与一种或多种化合物相接触,所述化合物将单链缺口或双链断裂引入至由所述 GRON 靶向的所述位点内的所述靶 DNA 序列;以及

测定所述转化的所述效率。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中引入单链缺口或双链断裂的所述一种或多种化合物包含一种或多种核酸酶。

15. 如权利要求 13 所述的方法,其中引入单链缺口或双链断裂的所述一种或多种化合物包含一种或多种博来霉素家族化合物。

16. 如权利要求 13-15 中的一项所述的方法,其中所述靶 DNA 序列存在于所述原生质体的所述染色体 DNA 中。

17. 如权利要求 13-15 中的一项所述的方法,其中所述靶 DNA 序列存在于质粒中。

18. 如权利要求 13-15 中的一项所述的方法,其中引入单链缺口或双链断裂的所述一种或多种化合物提供相对于在不存在引入单链缺口或双链断裂的所述一种或多种化合物的情况下针对所述 GRON 测定的效率提高的转化效率。

采用寡核苷酸介导的基因修复提高靶向基因修饰的效率的方法和组合物

[0001] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时专利申请号 61/801,320 的优先权, 所述专利申请特此以引用的方式并入。

发明领域

[0002] 本发明总体上涉及用于改进对基因组或其他核苷酸序列中的特定位置的修饰的靶向效率的新颖方法。另外, 本发明涉及已经通过本文所公开的方法修饰、突变或标记的靶 DNA。本发明还涉及已经通过本发明的方法修饰的细胞、组织和生物体。

[0003] 发明背景

[0004] DNA 双链断裂 (DSB) 增强在活细胞中的同源重组并且已经用于通过使用工程化核酸内切酶靶向基因组编辑。工程化核酸酶的关键组分是 DNA 识别结构域, 所述结构域能够将核酸酶引导至基因组的靶位点以用于基因组 DNA 双链断裂。由于非同源末端连接 (NHEJ) 所致的细胞 DSB 修复导致靶基因的诱变缺失 / 插入。或者, DSB 可刺激内源性靶基因座与具有所需遗传信息的外源引入的同源 DNA 片段之间的同源重组, 这是被称为基因靶向的一个过程。

[0005] 涉及基因或基因组编辑的最有希望的方法是定制设计的锌指核酸酶 (ZFN), 其是由锌指蛋白的 DNA 结合结构域和 FokI 核酸酶结构域 (FN) 组成的一种类型的杂交酶。ZFN 技术主要涉及使用来源于锌指 (ZF) 蛋白的 DNA 结合结构域与核酸内切酶 FokI 的非特异性裂解结构域的杂合蛋白。ZF 可被组装为进行定制设计以在于预先选定位点结合之后识别选定 DNA 序列的模块, DSB 通过 FokI 的裂解结构域的作用产生。

[0006] 首先从细菌海床黄杆菌分离 FokI 核酸内切酶。这种 IIS 型核酸酶由两个独立的结构域组成, N 末端 DNA 结合结构域和 C 末端 DNA 裂解结构域。DNA 结合结构域的功能是用于识别非回文序列 5'-GGATG-3' 和 5'-CATCC-3', 而催化结构域在所述识别位点下游 9 和 13 个核苷酸的固定距离处非特异性地裂解双链 DNA。FokI 作为无活性单体存在于溶液中, 并且在结合其靶 DNA 且在一些二价金属的存在下变成活性二聚体。作为功能性复合物, FokI 的各自结合双链 DNA 分子的两个分子通过 DNA 催化结构域二聚化以用于有效裂解 DNA 双链。

[0007] 以类似的方式, 还可通过使用其他蛋白质 / 结构域制备核酸酶, 如果所述蛋白质 / 结构域能够特异性 DNA 识别。TAL 效应子属于细菌蛋白的一大群体, 其存在于黄单胞菌属的不同菌株中并且通过 III 型分泌系统 (所谓的 III 型效应子) 易位至宿主细胞中。一旦在宿主细胞中, 一些 TAL 效应子已被发现针对菌株毒力 (引起疾病的能力) 或无毒力 (触发宿主抗性反应的能力) 转录活化其对应宿主靶基因, 这取决于宿主遗传背景。每个效应子包含为真核转录活化因子的特征的功能性核定位基序和有效转录活化结构域。并且每个效应子还含有由 34 个氨基酸的不同数目的重复单位组成的中心重复区域, 且作为 DNA 结合结构域的重复区域决定每个效应子的生物学特异性。

[0008] Zhang 等, *Plant Physiol.* 161:20-27, 2013 (其以引用的方式整体并入本文) 公开了使用 TALEN (转录活化因子样效应子核酸酶), 其是基于 TAL 效应子样 DNA 结合结构域

与 FokI 的催化结构域的组合的工程化的核酸内切酶。通过工程化 DNA 结合结构域,这些 TALEN 据报道可容易地设计来识别特异性 DNA 结合结构域。使用烟草原生质体作为模型系统,使用包含连接至 TALEN 识别位点的黄色荧光蛋白编码序列的单链退火多核苷酸报道基因评定 TALEN 活性。将此报道基因系统递送至原生质体,并且可通过功能性 YFP 的表达来测量裂解和修复事件。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一方面,本发明涉及用于将基因修复寡核碱基 (GRON) 介导的突变引入至植物细胞中的靶脱氧核糖核酸 (DNA) 序列中的方法。所述方法尤其包括在将 GRON 递送至植物细胞中之前和 / 或同时在增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的条件下培养植物细胞。

[0011] 在某些实施方案中,增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的条件包括以下中的一种或多种:将一个或多个位点引入至 GRON 中或至植物细胞 DNA 中,所述位点是用于碱基切除修复的靶标;将一个或多个位点引入至 GRON 中或至植物细胞 DNA 中,所述位点是用于非同源末端连接的靶标;将一个或多个位点引入至 GRON 中或至植物细胞 DNA 中,所述位点是用于微同源介导的末端连接的靶标;将一个或多个位点引入至 GRON 中或至植物细胞 DNA 中,所述位点是用于同源重组的靶标;以及将一个或多个位点引入至 GRON 中或至植物细胞 DNA 中,所述位点是用于推动修复的靶标。

[0012] 在某些实施方案中,靶脱氧核糖核酸 (DNA) 序列是在植物细胞基因组内。植物细胞可以是非转基因或转基因的,并且靶 DNA 序列可以是所述植物细胞的转基因或内源基因。

[0013] 在某些实施方案中,增加一种或多种细胞 DNA 修复过程的条件包括引入一种或多种化合物,所述化合物在将 GRON 递送至植物细胞中之前或同时将单或双 DNA 链断裂引入至植物细胞中。示例性化合物在下文描述。

[0014] 本文所述的方法和组合物适用于一般植物。仅作为举例,植物物种可选自由以下组成的组:芥花、向日葵、玉米、烟草、甜菜、棉花、玉米、小麦、大麦、水稻、苜蓿 (alfafa)、大麦、高粱、西红柿、芒果、桃子、苹果、梨、草莓、香蕉、甜瓜、土豆、胡萝卜、莴苣、洋葱、大豆、大豆属、甘蔗、豌豆、鹰嘴豆、紫花豌豆 (field bean)、蚕豆、扁豆、萝卜、芜菁甘蓝、球芽甘蓝 (brussel sprouts)、羽扇豆、花椰菜、羽衣甘蓝、菜豆、杨树、松树、桉树、葡萄、柑橘、黑小麦、苜蓿、黑麦、燕麦、草皮和牧草、亚麻、油菜、芥菜、黄瓜、牵牛花、香脂、辣椒、茄子、万寿菊、莲花、卷心菜、菊花、康乃馨、郁金香、鸢尾以及百合。这些还可全部或部分地适用于所有其他生物系统,包括但不限于细菌、真菌和哺乳动物细胞以及甚至其细胞器(例如,线粒体和叶绿体)。

[0015] 在某些实施方案中,所述方法还包括从植物细胞再生具有通过 GRON 引入的突变的植物,并且可包括从所述植物采集种子。

[0016] 在相关方面,本发明涉及包含根据本文所述的方法通过 GRON 引入的基因组修饰的植物细胞,包含根据本文所述的方法通过 GRON 引入的基因组修饰的植物,或包含根据本文所述的方法通过 GRON 引入的基因组修饰的种子。

[0017] 本发明的其他实施方案将是以下详述、示例性实施方案和权利要求书显而易见的。

[0018] 发明详述

[0019] 定义

[0020] 根据以下定义来理解本发明。

[0021] 寡核碱基是核碱基的聚合物,所述聚合物可通过沃森-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对与具有互补序列的 DNA 杂交。

[0022] 核碱基包含碱基,其是嘌呤、嘧啶或其衍生物或类似物。核碱基包括肽核碱基、肽核酸的亚基和吗啉核碱基以及核苷和核苷酸。核苷是含有戊呋喃糖基部分的核碱基,例如,任选取代的核糖核苷或 2'-脱氧核糖核苷。核苷可通过一些键联部分中的一种连接,所述连接部分可能含磷或不含磷。通过未取代的磷酸二酯键连接的核苷被称为核苷酸。

[0023] 寡核碱基链具有单个 5' 和 3' 端,其是聚合物的最终核碱基。特殊的寡核碱基链可含有所有类型的核碱基。寡核碱基化合物是含有一个或多个为互补的且通过沃森-克里克碱基配对杂交的寡核碱基链的化合物。核碱基是脱氧核糖型或核糖型。核糖型核碱基是含有戊呋喃糖基的核碱基,其中 2' 碳是被羟基、烷氧基或卤素取代的亚甲基。脱氧核糖型核碱基是不同于核糖型核碱基的核碱基且包括所有不含有戊呋喃糖基部分的核碱基。

[0024] 寡核碱基链一般包括寡核碱基链和寡核碱基链的区段或区域两者。寡核碱基链具有 3' 端和 5' 端。当寡核碱基链与一条链同延时,所述链的 3' 和 5' 端也是所述链的 3' 和 5' 末端。

[0025] 根据本发明,植物器官包括但不限于叶、茎、根、叶芽、花芽、分生组织、胚芽、子叶、胚乳、萼片、花瓣、雌蕊、心皮、雄蕊、花药、小孢子、花粉、花粉管、胚珠、子房和果实或从其取得的切片、薄片或盘。植物组织包括但不限于愈伤组织、基本组织、维管组织、贮藏组织、分生组织、叶片组织、茎组织、根组织、冠瘿组织、植物肿瘤组织以及再生组织。植物细胞包括但不限于具有细胞壁的分离的细胞、其各种大小的聚集体以及原生质体。

[0026] 当如下所述针对最大对应性进行比对时,如果两个多核苷酸或多肽序列中相应地核苷酸或氨基酸残基的序列相同时,则两个多核苷酸或多肽是相同的。在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“相同的”或“同一性百分比”是指当在比较窗上针对最大对应性比较和比对时,如使用以下序列比较算法中的一种或通过人工比对和目视检查所测量,两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸。对于序列在保守取代方面不同的多肽来说,序列同一性百分比可向上调整以校正取代的保守性质。用于进行这种调整的手段是本领域的技术人员熟知的。通常这涉及将保守性取代评分为部分而不是完全错配,从而增加序列同一性百分比因此,例如,在相同氨基酸被给予得分 1 并且非保守性取代被给予得分零的情况下,保守性取代被给与零与 1 之间的得分。根据例如 Meyers&Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4:11-17(1988) 的算法,例如如在程序 PC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA) 中所实施来计算保守性取代的得分。

[0027] 在两个核酸或多肽的背景下,术语“基本上相同的”和“同一性百分比”是指当在比较窗上针对最大对应性进行比对时,如使用以下序列比较算法中的一种或通过人工比对和目视检查所测量,具有至少 50%、有利地 60%、优选地 70%、更优选地 80% 且最优先地 90% -95% 核苷酸或氨基酸残基同一性的序列或子序列。当测试序列与参考序列具有实质同一性时,此定义还指测试序列的具有实质序列或子序列互补性的互补序列。

[0028] 本领域的技术人员将认识到如果两个多肽是免疫上类似的,则两个多肽也可以是“基本上相同的”。因此,当两个多肽的一级结构展示显著变异时,总体蛋白质结构可以是类

似的。因此,测量两个多肽是否是基本上相同的方法涉及测量单克隆或多克隆抗体与每个多肽的结合。如果对于第一多肽具有特异性的抗体以针对第一多肽的亲力的至少三分之一的亲和力结合第二多肽,则两个多肽是基本上相同的。对于序列比较来说,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参照序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要),并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0029] 可例如通过以下方法来进行序列的最佳比对以供比较,例如 Smith 和 Waterman, *O. Adv. Appl. Math.* 2:482(I 98 I) 的局部同源性算法; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970) 的同源性比对算法; Pearson 和 Lipman, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 5 85:2444(1988) 的相似性搜索法; 这些算法的计算机实施(威斯康辛遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); 用于算法的软件如 VECTOR NTI Version#6, InforMax, Inc. MD, USA; 描述于 ClustalW, Thompson, J. D., Higgins, D. G. 和 Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 中的程序或目视检查(一般参见 *Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel 等编辑, *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc., (1995 增刊)(Ausubel))。

[0030] 适合用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,其分别描述于 Altschul 等 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 和 Altschul 等 (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 中。用于执行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。这种算法包括首先通过鉴定查询序列中长度为 W 的短词来鉴定高分序列对 (HSP), 所述短词在与数据库序列中具有相同长度的词比对时匹配或满足某些正值的阈值分数 T。T 被称为邻近词分值阈值 (Altschul 等, 同上)。这些初始邻近词命中作为种子启动搜索,用以寻找含有它们的较长 HSP。接着所述词命中沿着每个序列在两个方向延伸,远至能够增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数 M(一对匹配残基的奖励分数;通常 >0) 和 N(不匹配残基的罚分;通常 <0) 计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。每个方向上词命中的延伸在下列情况时停止:当累积比对得分由其达到的最大值降低数量 X;由于一个或者多个残基比对负值的积累而使累积得分降至 0 或者以下;或者达到任一序列的末端。Blast 算法参数 W、T 和 X 决定比对的灵敏度和速度。BLAST 程序(对于核苷酸序列来说)使用的默认值是字长 (W) 为 11,期望值 (E) 为 10, M = 5, N = -4 和两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的默认值是词长 (W) 为 3,期望值 (E) 为 10 和 BLOSUM62 评分矩阵(参见 Henikoff&Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915(1989))。除了计算序列同一性百分比之外, BLAST 算法还进行两个序列之间相似性的统计学分析(参见例如 Karlin&Altschul, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787(1993))。由 BLAST 算法提供的相似性的一种量度是最小和概率 (P(N)), 其提供关于两个核苷酸或者核酸序列之间将偶然发生匹配的概率的指标。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中,最小和概率小于约

0.1、更优选地小于约 0.01 并且最优选地小于约 0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0031] 链断裂

[0032] 包括诱导单链或双链断裂成寡核苷酸或与寡核苷酸一起断裂的化合物产生通过非同源末端连接 (NHEJ)、微同源介导的末端连接 (MMEJ) 和同源重组修复的损害。作为举例, 抗生物素的博来霉素家族、锌指核酸酶、FokI (或限制酶的任何 IIS 型类别) 及其它核酸酶可共价连接至修复寡核苷酸的 3' 或 5' 端, 以便在靶向通过修复寡核苷酸转化的位点附近引入双链断裂。抗生物素的博来霉素家族是 DNA 裂解糖肽, 包括博来霉素、博来霉素 (zeocin)、腐草霉素 (phleomycin)、他利霉素 (tallysomycin)、培洛霉素以及其他。

[0033] 本发明的方法不限于所使用的 DNA 修饰试剂的性质或类型。例如, 这类 DNA 修饰试剂释放自由基, 所述自由基导致 DNA 链断裂。或者, 所述试剂烷基化 DNA 以形成将阻断复制和转录的加合物。在另一个替代方案中, 所述试剂产生抑制细胞酶、从而导致链断裂的交联或分子。已经连接至寡核苷酸以形成 TFO 的 DNA 修饰试剂的实例包括但不限于, 吡啶并咪唑、萘二咸亚安 (NDI)、反铂、博来霉素、环丙烷并吡咯并咪唑的类似物以及菲并二氢二噁英。具体地说, 吡啶并咪唑是拓扑异构酶 I 抑制剂。这些酶的抑制导致链断裂和 DNA 蛋白质加合物形成 [Arimondo 等, *Bioorganic and Medicinal Chem.* 8, 777, 2000]。NDI 是可氧化鸟嘌呤的光氧化剂, 所述鸟嘌呤可能引起鸟嘌呤残基的位点处的突变 [Nunez, 等, *Biochemistry*, 39, 6190, 2000]。反铂已经显示在 TFO 连接至所述试剂时与三链体靶标中的 DNA 反应。这种反应引起将是致突变的 DNA 加合物的形成 [Columbier, 等, *Nucleic Acids Research*, 24:4519, 1996]。博来霉素是广泛作用辐射模拟物的 DNA 断裂剂。它已经连接至寡核苷酸并且显示作为呈所述型式的断裂剂是活性的 [Sergeyev, *Nucleic Acids Research* 23, 4400, 1995; Kane, 等, *Biochemistry*, 34, 16715, 1995]。环丙烷并吡咯并咪唑的类似物已经连接至 TFO 并且显示烷基化三链体靶序列中的 DNA。烷基化 DNA 然后将含有将是致突变的化学加合物 [Lukhtanov, 等, *Nucleic Acids Research*, 25, 5077, 1997]。菲并二氢二噁英是在光活化时释放自由基种类的掩蔽醌。它们已经连接至 TFO 且已经显示在光活化时将断裂引入双链 DNA 中 [Bendinskas 等, *Bioconjugate Chem.* 9, 555, 1998]。

[0034] 用于产生靶向基因破坏的一种策略是通过产生由位点特异性核酸内切酶引起的单链或双链 DNA 断裂。核酸内切酶最常用于生物体中的靶向基因破坏, 所述生物体在传统上对于更常规的基因靶向方法难治, 如海藻、植物和较大动物模型, 包括人。例如, 存在涉及用于治疗 and 预防 HIV 感染的锌指核酸酶的进行中的当前人临床试验。另外, 核酸内切酶工程化当前用于尝试破坏作物中产生不希望的表型的基因。

[0035] 归巢核酸内切酶 (还被称为大范围核酸酶) 是序列特异性核酸内切酶, 所述核酸内切酶由于其较大 (例如, >14bp) 裂解位点而以较高特异性程度产生基因组 DNA 中的双链断裂。虽然归巢核酸内切酶对于其靶位点的特异性允许所诱导的 DNA 断裂的确切靶向, 但归巢核酸内切酶裂解位点是罕见的并且发现靶向基因中的天然存在的裂解位点的概率较低。

[0036] 工程化的归巢核酸内切酶通过修饰现有归巢核酸内切酶的特异性产生。在一种方法中, 将变异引入天然存在的归巢核酸内切酶的氨基酸序列中并且然后筛选所得到的工程化的归巢核酸内切酶以选择裂解靶向结合位点的功能性蛋白质。在另一种方法中, 嵌合归巢核酸内切酶通过组合两种不同归巢核酸内切酶的认识位点来进行工程化以产生由每个

归巢核酸内切酶的半位点组成的新识别位点。

[0037] 一类人工核酸内切酶是锌指核酸内切酶。锌指核酸内切酶将非特异性裂解结构域（通常 FokI 核酸内切酶的非特异性裂解结构域）与工程化以结合特异性 DNA 序列的锌指蛋白结构域组合。锌指核酸内切酶的分子结构使得它们是将位点特异性双链断裂递送至基因组的通用平台。锌指核酸内切酶的一个限制是对于靶位点的低特异性或基因组中多个靶位点的存在可导致脱靶裂解事件。因为 FokI 核酸内切酶裂解为二聚体，所以防止脱靶裂解事件的一种策略一直是设计在相邻的 9 碱基对位点处结合的锌指结构域。

[0038] TALEN 是用于诱导单链或双链断裂成特异性 DNA 位点的可靶向的核酸酶，其然后通过可用于产生裂解位点处的序列改变的机制修复。

[0039] 用于工程化 TALEN 的 DNA 结合区的基本结构单元是源自天然存在的由黄单胞菌属变形菌门编码的 TALE 的高度保守的重复结构域。通过 TALEN 结合 DNA 由高度保守的 33-35 个氨基酸的重复序列的阵列介导，所述重复序列由在重复序列的氨基末端和羧基末端处的另外 TALE 源性的结构域侧接。

[0040] 这些 TALE 重复序列特异性地结合 DNA 的单个碱基，所述碱基的身份由通常在重复序列的位置 12 和 13 处发现的两个高变残基确定，其中阵列中重复序列的数目对应于所需靶核酸的长度，选择重复序列的身份以匹配靶核酸序列。靶核酸优选地在 15 与 20 个碱基对之间以便最大化靶位点的选择性。靶核酸的裂解通常在 TALEN 结合的 50 个碱基对内发生。用于 TALEN 识别位点设计的计算机程序已经在本领域中描述。参见例如，Cermak 等，*Nucleic Acids Res.* 2011 年 7 月；39(12):e82。

[0041] 一旦被设计来匹配所需的靶序列，TALEN 可重组表达且引入至原生质体中作为外源蛋白质，或从原生质体内的质粒表达。

[0042] GRON 结构和引入至植物细胞中

[0043] 重组基因寡核碱基可使用本领域中通常使用的任何方法引入至植物细胞中，所述方法包括但不限于微载体（生物射弹递送）、微纤维（晶须）、电穿孔、直接 DNA 摄取和显微注射。重组基因寡核碱基的说明性实例在以下描述。

[0044] 本发明可使用具有在以引用的方式并入本文的 Kmiec I 和 Kmiec II 专利中描述的构象和化学的重组基因寡核碱基来实践。Kmiec I 教导一种用于将特异性遗传改变引入靶基因中的方法。Kmiec I 和/或 Kmiec II 中的重组基因寡核碱基含有两条互补链，其中一条含有与另一条链的 DNA 型核苷酸碱基配对的至少一个 RNA 型核苷酸区段（“RNA 区段”）。

[0045] Kmiec II 公开了可取代核苷酸的含有嘌呤和嘧啶碱基的非核苷酸。美国专利号 5,756,325、5,871,984、5,760,012、5,888,983、5,795,972、5,780,296、5,945,339、6,004,804 和 6,010,907 以及国际专利号 PCT/US00/23457 和国际专利公布号 WO 98/49350、WO 99/07865、WO 99/58723、WO 99/58702、WO 99/40789、US 6,870,075 以及美国公布专利申请 20030084473（其各自特此整体并入）公开了可用于本发明的另外重组基因分子。术语“重组基因寡核碱基”在本文用于指代可用于本发明的方法中的分子，并且包括混合双链寡核苷酸、在 Kmiec II 中教导的含有非核苷酸的分子、单股寡脱氧核苷酸以及在以上提及的专利和专利公布中教导的其他重组基因分子。

[0046] 在一个实施方案中，重组基因寡核碱基是混合双链寡核苷酸，其中混合双链寡核苷酸的 RNA 型核苷酸通过用氟、氯或溴官能团置换 2'-羟基或通过 2'-O 上安置取代基而

成为核糖核酸酶 (RNase) 抗性的。适合的取代基包括 Kmiec II 中教导的取代基。替代取代基包括美国专利号 5,334,711 (Sproat) 教导的取代基和专利公布 EP 629 387 和 EP 679 657 (总称 Martin 申请案) 教导的取代基,其以引用的方式并入本文。如本文所用,核糖核苷酸的 2'-氟、2'-氯或 2'-溴衍生物或者其 2'-OH 被 Martin 申请案或 Sproat 中所述的取代基取代的核糖核苷酸被称为“2'-取代的核糖核苷酸”。本文所用,术语“RNA 型核苷酸”意指通过未取代的磷酸二酯键联或由 Kmiec I 或 Kmiec II 教导的任何非天然键联与混合双链寡核苷酸的其他核苷酸连接的 2'-羟基或 2'-取代的核苷酸。如本文所用,术语“脱氧核糖型核苷酸”意指具有 2'-H 的核苷酸,其可通过未取代的磷酸二酯键联或由 Kmiec I 或 Kmiec II 教导的任何非天然键联与 MDON 的其他核苷酸连接。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,重组基因寡核碱基是单独通过未取代的磷酸二酯键连接的混合双链寡核苷酸。在替代实施方案中,通过由 Kmiec II 教导的取代的磷酸二酯、磷酸二酯衍生物和无磷基键联进行连接。在又一个实施方案中,混合双链寡核苷酸中的每个 RNA 型核苷酸是 2'-取代的核苷酸。2'-取代的核糖核苷酸的特别优选实施方案是 2'-氟、2'-甲氧基、2'-丙氧基、2'-烯丙氧基、2'-羟乙氧基、2'-甲氧基乙氧基、2'-氟丙氧基和 2'-三氟丙氧基取代的核糖核苷酸。2'-取代的核糖核苷酸的更优选的实施方案是 2'-氟、2'-甲氧基、2'-甲氧基乙氧基和 2'-烯丙氧基取代的核苷酸。在另一个实施方案中,混合双链寡核苷酸通过未取代的磷酸二酯键连接。

[0048] 虽然仅具有单一类型的 2'-取代的 RNA 型核苷酸的混合双链寡核苷酸更方便合成,但本发明的方法仍可用具有两种或更多种类型的 RNA 型核苷酸的混合双链寡核苷酸实践。由在两个 RNA 型三核苷酸之间引入脱氧核苷酸引起的中断可能不会影响 RNA 区段的功能,因此,术语 RNA 区段涵盖如“中断的 RNA 区段”。未中断的 RNA 区段被称为连续 RNA 区段。在一个替代实施方案中, RNA 区段可含有交替的抗 RNA 酶核苷酸和未取代的 2'-OH 核苷酸。混合双链寡核苷酸优选地具有少于 100 个核苷酸且更优选地少于 85 个核苷酸、但多于 50 个核苷酸。第一条链和第二条链进行沃森-克里克碱基配对。在一个实施方案中,混合双链寡核苷酸的链通过接头如单链六、五或四核苷酸共价键合,以使得第一条链和第二条链是具有单个 3' 端和单个 5' 端的寡核苷酸单链的区段。通过添加“发夹帽”可保护 3' 端和 5' 端,借此 3' 端和 5' 端核苷酸与邻近核苷酸进行沃森-克里克配对。另外,可在远离 3' 端和 5' 端的第一条链与第二条链之间的接点处安置第二发夹帽,以使得第一条链和第二条链之间的沃森-克里克配对稳定。

[0049] 第一条链和第二条链含有与靶 ACC 酶基因的两个片段同源的两个区域,即,具有与靶基因相同的序列。同源区含有 RNA 区段的核苷酸,并且可含有连接 DNA 区段的一种或多种 DNA 型核苷酸,并且还可含有不在插入 DNA 区段内的 DNA 型核苷酸。具有同源性的两个区域被一个区域分开且各自与上述区域相邻,所述区域具有与靶基因的序列不同的序列,被称为“异源区”。异源区可含有一个、两个或三个错配的核苷酸。错配的核苷酸可以是连续的或者可替代地被与靶基因同源的一个或两个核苷酸分开。或者,异源区还可含有插入或一个、两个、三个或五个或更少的核苷酸。或者,混合双链寡核苷酸的序列可能与靶基因序列不同,差别在于从混合双链寡核苷酸中缺失一个、两个、三个或五个或更少的核苷酸。在这种情况下,异源区的长度和位置被视为缺失的长度,即使没有混合双链寡核苷酸的核苷酸在异源区内。当意图一个或多个取代时,与两个同源区互补的靶基因片段之间的距离与

异源区的长度相同。当异源区含有插入时,同源区在混合双链寡核苷酸中分开的距离因而比其互补同源片段在基因中分开的距离要远,而当异源区编码缺失时情况相反。

[0050] 混合双链寡核苷酸的 RNA 区段各自是同源区的一部分,即,序列中与靶基因的片段相同的区域,其区段一起优选含有至少 13 个 RNA 型核苷酸且优选 16 至 25 个 RNA 型核苷酸或更优选 18-22 个 RNA 型核苷酸或最优选 20 个核苷酸。在一个实施方案中,同源区的 RNA 区段被插入 DNA 区段分开且与其相邻,即,由插入 DNA 片区段“连接”。在一个实施方案中,异源区的每个核苷酸是插入 DNA 区段的核苷酸。含有混合双链寡核苷酸的异源区的插入 DNA 区段被称为“突变区段 (mutator segment)”。

[0051] 待引入靶基因中的变化由异源区编码。待引入基因中的变化可以是将所述位置中的天然氨基酸改变成所需氨基酸的基因序列的一个或多个碱基中的变化。

[0052] 在本发明的另一个实施方案中,重组基因寡核碱基是单链寡脱氧核苷酸突变载体或 SSOMV,其公开于国际专利申请 PCT/US00/23457 中,其以引用的方式整体并入本文。SSOMV 的序列与美国专利号 5,756,325 ;5,871,984 ;5,760,012 ;5,888,983 ;5,795,972 ;5,780,296 ;5,945,339 ;6,004,804 和 6,010,907 以及国际公布号 WO 98/49350 ;WO 99/07865 ;WO 99/58723 ;WO 99/58702 ;WO 99/40789 ;US 6,870,075 ;以及美国公布专利申请 20030084473 中描述的突变载体基于相同的原理。SSOMV 的序列含有与靶序列同源、被一个区域分开的两个区域,所述区域含有所需的遗传改变,其被称为突变区。突变区可具有与靶序列中分开同源区的序列相同长度的序列,但是具有不同的序列。这样的突变区将引起取代。

[0053] SSOMV 的核苷酸是通过未修饰的磷酸二酯键连接的脱氧核糖核苷酸,除了 3' 末端和 / 或 5' 末端核苷酸间键联或者可替代地两个 3' 末端和 / 或 5' 末端核苷酸间键联可以是硫代磷酸酯或氨基磷酸酯。如本文所用,核苷酸间键联是 SSOMV 的核苷酸之间的键联,并且不包括 3' 端核苷酸或 5' 端核苷酸与封闭取代基之间的键联,参见上文。在一个具体的实施方案中,SSOMV 的长度在 21 与 55 个脱氧核苷酸之间,并且相应地,同源区的长度具有至少 20 个脱氧核苷酸的总长度且至少两个同源区应各自具有至少 8 个脱氧核苷酸的长度。

[0054] SSOMV 可被设计为与靶基因的编码链或非编码链互补。当所需的突变是单碱基取代时,优选突变核苷酸是嘧啶。在与实现所需的功能结果一致的程度,优选突变核苷酸和互补链中的靶核苷酸都是嘧啶。特别优选是编码颠换突变的 SSOMV,即,C 或 T 突变核苷酸分别与互补链中的 C 或 T 核苷酸错配。

[0055] 除了寡脱氧核苷酸,SSOMV 还可含有 5' 封闭取代基,其通过接头连接至 5' 末端碳。接头的化学结构并不重要,除了它的长度,长度优选应为至少 6 个原子长,且接头应当灵活。可使用多种无毒取代基,如生物素、胆固醇或其他类固醇或非嵌入的阳离子荧光染料。特别优选的作为制造 SSOMV 的试剂是由 Glen Research, Sterling VA (现在 GE Healthcare) 作为 Cy3™ 和 Cy5™ 销售的试剂,所述试剂是封闭的亚磷酰胺,其并入寡核苷酸后分别产生 3, 3, 3', 3' - 四甲基 N, N' - 异丙基取代的吡啶单碳菁染料和吡啶二碳菁染料。Cy3 是最优选的。当吡啶碳菁是 N- 氧基烷基取代的时,其可通过具有 5' 端磷酸酯的磷酸二酯,方便地与寡脱氧核苷酸的 5' 末端连接。染料与寡脱氧核苷酸之间的染料接头的化学并不重要,并且其选择是为了合成方便。当直接使用可商购的 Cy3 亚磷酰胺时,所得的 5' 修饰包括封闭取代基和接头,所述封闭取代基和接头一起是 N- 羟丙基、N' - 磷脂酰丙基

3, 3, 3', 3' - 四甲基吡啶单碳菁。

[0056] 在一个优选实施方案中,吡啶碳菁染料在吡啶环的 3 和 3' 位置被四次取代。不受理论的限制,这些取代防止染料变成嵌入染料。在这些位置处的取代基的身份不重要。SSOMV 还可具有 3' 封闭取代基。同样,3' 封闭取代基的化学不重要。

[0057] 在另一个优选的实施方案中,重组基因寡核苷酸是单链寡脱氧核苷酸,其具有 3' 端核苷酸、5' 端核苷酸、具有至少 25 个脱氧核苷酸且不超过 65 个脱氧核苷酸,并且具有包含各自至少 8 个脱氧核苷酸的至少两个区的序列,所述区各自分别与靶向染色体基因的至少两个区相同,所述区一起是至少 24 个核苷酸长,并且所述区由靶向染色体基因的序列中或寡脱氧核苷酸的序列中或两者中的至少一个核苷酸分开,以使得寡脱氧核苷酸的序列与靶向染色体基因的序列不相同。参见美国专利 6, 271, 360, 其以引用的方式并入本文。

[0058] 微载体和微纤维

[0059] 用于通过射弹穿透将 DNA 的较大片段引入具有纤维素细胞壁的植物细胞中的金属微载体(微球体)的使用是相关领域的技术人员所熟知的(自此生物射弹递送)。美国专利号 4, 945, 050 ;5, 100, 792 和 5, 204, 253 描述用于选择用于发射它们的微载体和装置的一般技术。美国专利号 5, 484, 956 和 5, 489, 520 描述使用玉米愈伤组织的微弹轰击来制备可育转基因玉米。生物射弹技术还用于转化不成熟的玉米胚芽。

[0060] 在本发明的方法中使用微载体的具体条件描述于国际公布 WO 99/07865 中。在说明性技术中,按顺序添加冰冷的微载体(60mg/ml)、混合双链寡核苷酸(60mg/ml)、2.5M CaCl₂和 0.1M 亚精胺;例如通过涡旋轻轻搅拌混合物 10 分钟,并且然后在室温下静置 10 分钟,随后将微载体在 5 体积的乙醇中稀释,离心并重悬于 100%乙醇中。在粘附溶液使用 8-10 μg/μl 微载体、14-17 μg/μl 混合双链寡核苷酸、1.1-1.4M CaCl₂和 18-22mM 亚精胺的浓度可获得良好结果。在 8 μg/μl 微载体、16.5 μg/ml 混合双链寡核苷酸、1.3M CaCl₂和 21mM 亚精胺的条件下观察到最佳结果。

[0061] 还可使用微纤维将重组基因寡核苷酸引入用于实践本发明的植物细胞中以穿透细胞壁和细胞膜。Coffee 等的美国专利号 5, 302, 523 描述使用 30×0.5 μm 和 10×0.3 μm 碳化硅纤维来促进黑色墨西哥甜的玉米悬浮培养物的转化。可用于使用微纤维引入用于植物细胞转化的 DNA 的任何机械技术可用于递送用于制备本发明的 ACC 酶突变体的重组基因寡核苷酸。用于重组基因寡核苷酸的微纤维递送的示例性技术是如下:将无菌微纤维(2 μg)悬浮在 150 μl 的含有约 10 μg 的混合双链寡核苷酸的植物培养基中。使悬浮培养物沉降并且将等体积的压积细胞和无菌纤维/核苷酸悬浮液涡旋 10 分钟并接种。立即或在达约 120 小时的延迟情况下(如对于特定性状适当的)施加选择性培养基。

[0062] 电穿孔

[0063] 在替代实施方案中,重组基因寡核苷酸可根据本领域的普通技术人员熟知的技术通过来源于植物部分的原生质体的电穿孔递送至植物细胞。参见,例如 Gallois 等,1996,Methods in Molecular Biology 55:89-107,Humana Press,Totowa,N.J.;Kipp 等,1999,Methods in Molecular Biology 133:213-221,Humana Press,Totowa,N.J.。

[0064] 重组基因寡核苷酸还可通过电穿孔引入小孢子中。在释放四分体之后,小孢子是单核的且薄壁的。它在外孢壁形式之前扩大且发育芽孔。在此阶段小孢子比其他植物细胞潜在更易于用外源 DNA 转化。此外,小孢子发育可体外改变以产生可再生成植物的单

倍体胚或胚性愈伤组织 (Coumans 等, *Plant Cell Rep.* 7:618-621, 1989; Datta 等, *Plant Sci.* 67:83-88, 1990; Maheshwari 等, *Am. J. Bot.* 69:865-879, 1982; Schaeffer, *Adv. In Cell Culture* 7:161-182, 1989; Swanson 等, *Plant Cell Rep.* 6:94-97, 1987)。因此, 转化的小孢子可在通过标准方法染色体加倍之后直接再生成单倍体植株或双单倍体可育植株。还参见标题为 *Compositions and Methods for Plant Genetic Modification* 的共同未决申请美国系列号 09/680, 858, 其以引用的方式并入本文。

[0065] 小孢子电穿孔方法描述于 Jardinaud 等, *Plant Sci.* 93:177-184, 1993 以及 Fennell 和 Hauptman, *Plant Cell Reports* 11:567-570, 1992 中。用于将 MDON 电穿孔至植物原生质体中的方法也可适用于小孢子电穿孔。

[0066] 晶须和显微注射

[0067] 在又一个替代实施方案中, 重组基因寡核碱基可通过植物细胞的晶须或显微注射递送至植物细胞。所谓的晶须技术基本上如 Frame 等, 1994, *Plant J.* 6:941-948 中所描述来进行。将重组基因寡核碱基添加至晶须且用于转化植物细胞。重组基因寡核碱基可与包含编码能够在植物细胞中形成重组酶复合物的蛋白质的序列的质粒共孵育, 以使得在寡核苷酸与靶序列之间催化重组。

[0068] 植物的选择

[0069] 在不同实施方案中, 如本文所公开的植物可以是双子叶植物、单子叶植物或裸子植物的任何物种, 包括作为树或灌木生长的任何木本植物物种、任何草本物种或产生食用水果、种子或蔬菜的任何物种或产生彩色或芳香花的任何物种。例如, 植物可选自由以下组成的组的植物物种: 芥花、向日葵、玉米、烟草、甜菜、棉花、玉米、小麦、大麦、水稻、苜蓿、大麦、高粱、西红柿、芒果、桃子、苹果、梨、草莓、香蕉、甜瓜、土豆、胡萝卜、莴苣、洋葱、大豆、大豆属、甘蔗、豌豆、鹰嘴豆、紫花豌豆、蚕豆、扁豆、萝卜、芜菁甘蓝、球芽甘蓝、羽扇豆、花椰菜、羽衣甘蓝、菜豆、杨树、松树、桉树、葡萄、柑橘、黑小麦、苜蓿、黑麦、燕麦、草皮和牧草、亚麻、油菜、芥菜、黄瓜、牵牛花、香脂、辣椒、茄子、万寿菊、莲花、卷心菜、菊花、康乃馨、郁金香、鸢尾、百合以及产坚果植物 (在它们尚未具体地提及的情况下)。

[0070] 可使用本领域中通常已知的方法针对对除草剂的抗性 or 耐受性对植物和植物细胞进行测试, 例如通过在存在除草剂的情况下生长植物或植物细胞且测量相较于在不存在除草剂情况下的生长的生长速率。

[0071] 如本文所用, 植物、植物器官、植物组织或植物细胞的基本上正常生长被定义为植物、植物器官、植物组织或植物细胞的生长率或细胞分裂率为表达野生型 AHAS 蛋白的对应植物、植物器官、植物组织或植物细胞的生长率或细胞分裂率的至少 35%、至少 50%、至少 60% 或至少 75%。

[0072] 如本文所用, 植物、植物器官、植物组织或植物细胞的基本上正常发育被定义为植物、植物器官、植物组织或植物细胞中的一个或多个发育事件的出现与在表达野生型蛋白质的对应植物、植物器官、植物组织或植物细胞中发生的那些发育事件基本上相同。

[0073] 在某些实施方案中, 本文提供的植物器官包括但不限于叶、茎、根、叶芽、花芽、分生组织、胚芽、子叶、胚乳、萼片、花瓣、雌蕊、心皮、雄蕊、花药、小孢子、花粉、花粉管、胚珠、子房和果实或从其取得的切片、薄片或盘。植物组织包括但不限于愈伤组织、基本组织、维管组织、贮藏组织、分生组织、叶片组织、茎组织、根组织、冠瘿组织、植物肿瘤组织以及再生

组织。植物细胞包括但不限于具有细胞壁的分离的细胞、其各种大小的聚集体以及原生质体。

[0074] 当与由类似经受的非耐受样植物提供的相比,植物当其经受相关除草剂时是对所述除草剂基本上“耐受性的”并且提供转移至右侧的剂量/响应曲线。这类剂量/响应曲线具有绘制在 X 轴上的“剂量”和绘制在 y 轴上的“致死百分比”、“除草作用”等。耐受性植物将需要比非耐受性样植物更多的除草剂,以便产生给定除草作用。当经受在通常由农用化学品团体用于杀死地中的杂草的浓度和比例下的除草剂时,对除草剂基本上“抗性”的植物展示很少(如果有)坏死、溶解、褪绿或其他损害。对除草剂具有抗性的植物还是能够容忍除草剂的。

[0075] 植物的产生

[0076] 植物物种的不同组织的组织培养和自其再生植物是已知的。例如,通过组织培养繁育芥花栽培品系在以下的任一者中描述但不限于以下中的任一者:Chuong 等,“A Simple Culture Method for Brassica hypocotyls Protoplasts,”*Plant Cell Reports* 4:4-6,1985;Barsby,T.L.,等,“A Rapid and Efficient Alternative Procedure for the Regeneration of Plants from Hypocotyl Protoplasts of Brassica napus,”*Plant Cell Reports* (Spring,1996);Kantha,K.,等,“In vitro Plant Formation from Stem Explants of Rape,”*Physiol.Plant*,31:217-220,1974;Narasimhulu,S.,等,“Species Specific Shoot Regeneration Response of Cotyledonary Explants of Brassicas,”*Plant Cell Reports*(Spring 1988);Swanson,E.,“Microspore Culture in Brassica,”*Methods in Molecular Biology*,第6卷,第17章,第159页,1990。

[0077] 变种的进一步繁殖可通过组织培养和再生发生。大豆的不同组织的组织培养和自其再生植物是熟知的和广泛公布的。例如,可参考Komatsuda,T.等,“Genotype X Sucrose Interactions for Somatic Embryogenesis in Soybeans,”*Crop Sci.*31:333-337,1991;Stephens,P.A.,等,“Agronomic Evaluation of Tissue-Culture-Derived Soybean Plants,”*Theor. Appl. Genet.*82:633-635,1991;Komatsuda,T.等,“Maturation and Germination of Somatic Embryos as Affected by Sucrose and Plant Growth Regulators in Soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max*(L.)Merr.”*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,28:103-113,1992;Dhir,S.et al.,“Regeneration of Fertile Plants from Protoplasts of Soybean(*Glycine max* L.Merr.); Genotypic Differences in Culture Response,”*Plant Cell Reports* 11:285-289,1992;Pandey,P.等,“Plant Regeneration from Leaf and Hypocotyl Explants of *Glycine wightii*(W. and A.)VERDC. var. *longicauda*,”*Japan J. Breed.*42:1-5,1992;以及 Shetty,K.,等,“Stimulation of In Vitro Shoot Organogenesis in *Glycine max*(Merrill.)by Allantoin and Amides,”*Plant Science* 81:245-251,1992.Collins 等的 1991 年 6 月 18 日颁布的美国专利号 5,024,944 和 Ranch 等的 1991 年 4 月 16 日颁布的美国专利号 5,008,200 特此以引用的方式整体并入本文。

[0078] 以下实施例说明本发明的实践,但不应被视为限制其范围。

[0079] 实施例 1:通过经由基因修复寡核苷酸 (GRON) 与在靶向碱基变化附近裂解的转录活化因子样效应子核酸酶 (TALEN) 对的组合引入靶向单核苷酸突变显著改进转基因拟南

芥细胞中的蓝色荧光蛋白 (BFP) 至绿色荧光蛋白 (GFP) 的转化。

[0080] 通过本领域的技术人员已知的方法产生具有蓝色荧光蛋白基因的多个拷贝的拟南芥品系 (参见例如, Clough 和 Brent, 1998)。用此品系建立源自根的分生组织培养物, 其用于原生质体分离和培养 (参见例如, Mathur 等, 1995)。GRON 递送至原生质体中通过聚乙二醇 (PEG) 介导的 GRON 摄取至原生质体中来实现。使用与由 Fujiwara 和 Kato (2007) 描述的方法类似的使用 96 孔型式的方法。在以下简要描述方案。所给出的体积是施加至 96 孔培养皿的单独孔的体积。

[0081] 1. 将 6.25 μ l 的 GRON/TALEN 混合物 (80 μ M BFP4 编码 /41 聚体 GRON) 与 25 μ l 的拟南芥 BFP 转基因根分生组织源性的原生质体在于 96 孔板的每个孔中 5×10^6 个细胞 /ml 下进行混合。。

[0082] 2. 添加 31.25 μ l 的 40% PEG 溶液并且混合原生质体。

[0083] 3. 将处理的细胞在冰上孵育 30 分钟。

[0084] 4. 向每个孔添加 200 μ l 的 W5 溶液且混合细胞。

[0085] 5. 使板在冰上孵育 30 分钟, 从而允许原生质体沉降于每个孔的底部。

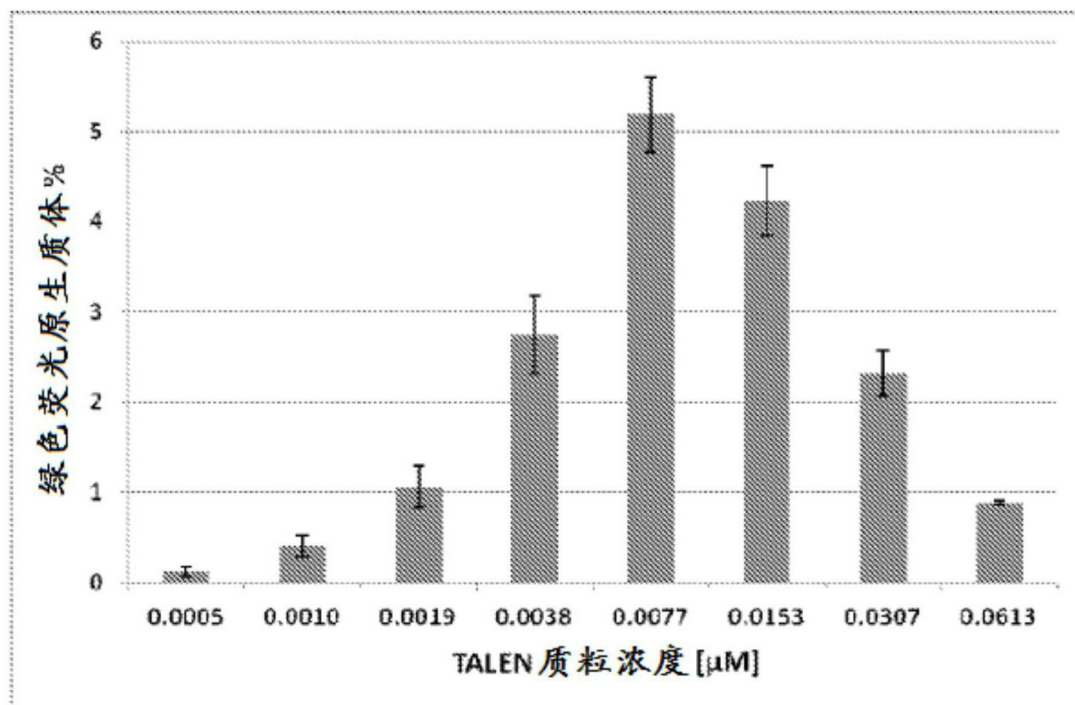
[0086] 6. 除去在沉降的原生质体以上的 200 μ l 培养基。

[0087] 7. 添加 85 μ l 的培养基 (MSAP, 参见 Mathur 等, 1995)。

[0088] 8. 将板在室温下在黑暗中孵育 48 小时。在添加培养基之后 GRON 的最终浓度是 8 μ M。

[0089] 使用此方案, 与 GRON 一起引入不同浓度的 TALEN 质粒。在 GRON 递送之后四十八小时, 通过流式细胞术对样品进行分析以便检测绿色和黄色荧光不同于对照原生质体的绿色和黄色荧光的原生质体。绿色荧光由在 BFP 基因中引入靶向突变引起, 从而导致 GFP 的合成。图 1 中示出了结果。

[0090]



[0091] 图 1. 将根分生组织源性的原生质体用不同浓度的 TALEN 质粒连同靶向 BFP 基因

中的突变的 GRON 进行处理,从而引起转化成 GFP 基因。在 GRON/TALEN 递送后 48 小时通过流式细胞术测量 GFP 表达。

[0092] 对于以下所有实施例 2-11,应用以下图例:

[0093] GRON

[0094] BFP->GFP 靶向设计。

[0095] BFP->GFP H66Y CAC->TAC。

[0096] BFP4/C/41/5' Cy3/3' idC

[0097] VCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

[0098] BFP4/NC/41/5' Cy3/3' idC

[0099] VGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

[0100] BFP 非靶向对照设计。

[0101] BFP H66 - CAC

[0102] BFP0/C/41/5' 3PS/3' 3PS

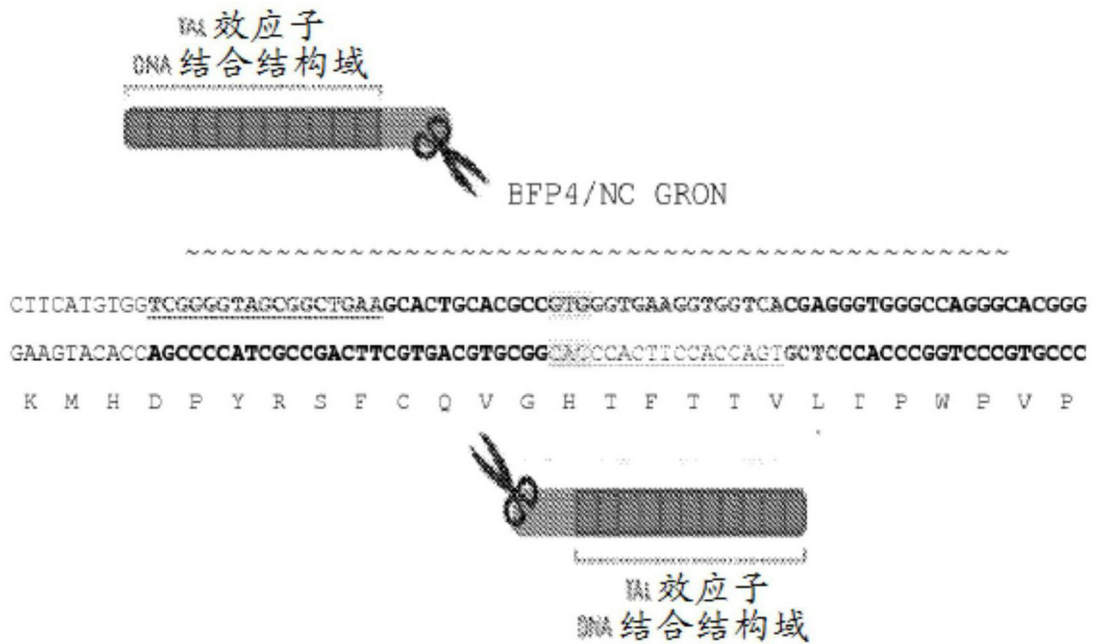
[0103] VCCCTCGTGACCACCTTCACCCACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

[0104] BFP0/NC/41/5' 3PS/3' 3PS

[0105] VGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

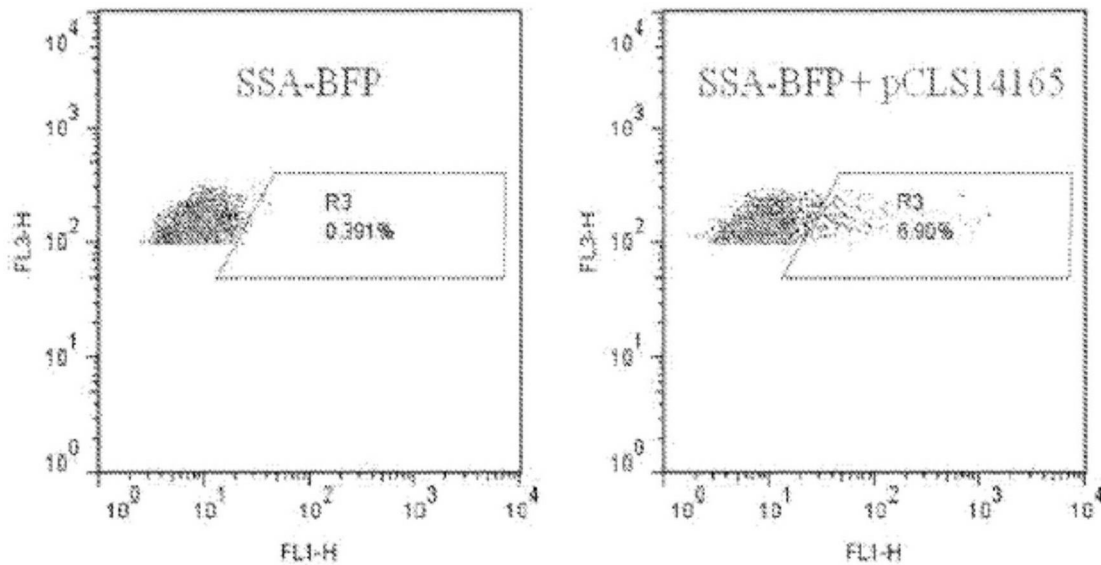
[0106] TALEN:

[0107]



[0108] pCLS14165 在单个质粒上具有两个 TAL 臂 (根据 Zhang 等, 2013 指定), 其中每个臂结合至加下划线的序列且连接至 FokI 单体。这种组合产生双链断裂 (DSB), 如以下在与 Zhang 等 (2013) 中的测定相同进行的单链退火测定 (SSA) 中所示。

[0109]



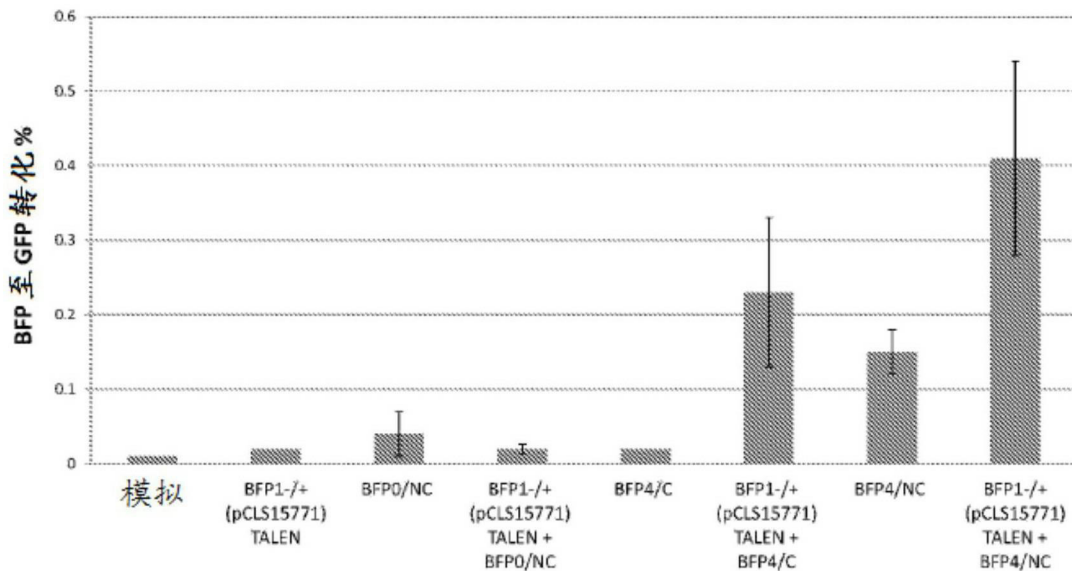
[0110] pCLS15771 是在 FokI 结构域中具有针对左臂的突变 (D450A) 的切口酶。此构建体中的右臂是根据 pCLS14165。

[0111] GRON 和 TALEN 如以下所示进行测试。由单独非靶向 GRON (BFPO/C 或 BFPO/NC) 和 TALEN 组成的对照处理以及使用缺乏 GRON 或 TALEN 质粒的 40% PEG 溶液的模拟处理不具有显著转化活性。

[0112] 在此系统中,单独 BFP4/NC GRON 设计好于单独 BFP4/C GRON 设计。将这些与 DSB TALEN (pCLS14165) 组合改进最佳活性和 BFP4/C GRON 的倍数改进 (在许多情况下 >2 个数量级) 两者。显著改进还在组合 GRON 与缺口酶 TALEN 对中观察到并且预期当同时在几个基因 / 等位基因中靶向突变时通过最小化附带损伤而是最有益的。

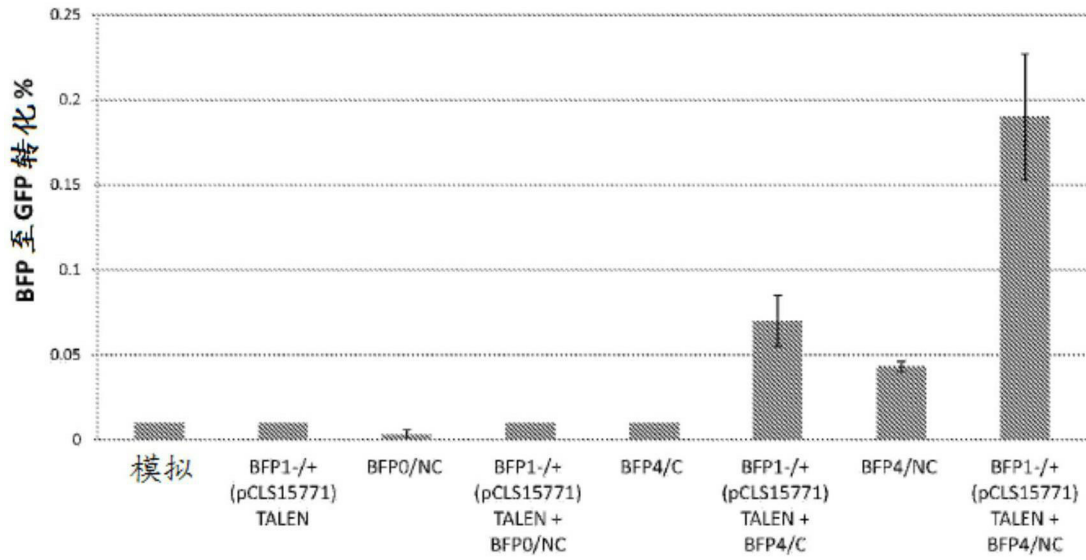
[0113] 实施例 2 :GRON 加 TALEN 缺口酶。

[0114]



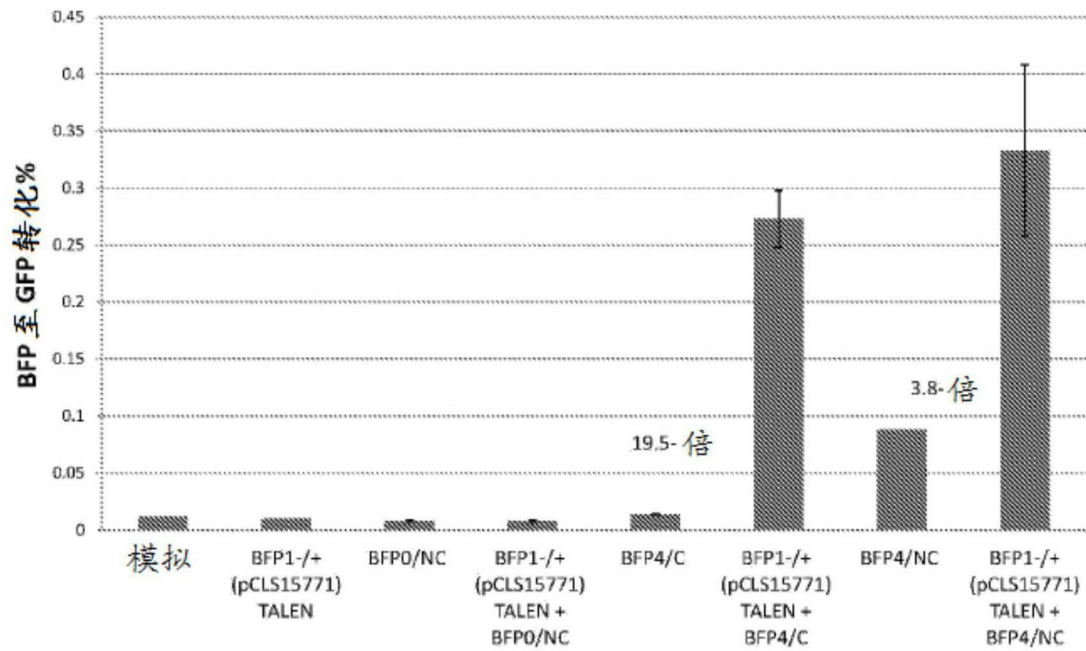
[0115] 实施例 3:GRON 加 TALEN 缺口酶。

[0116]



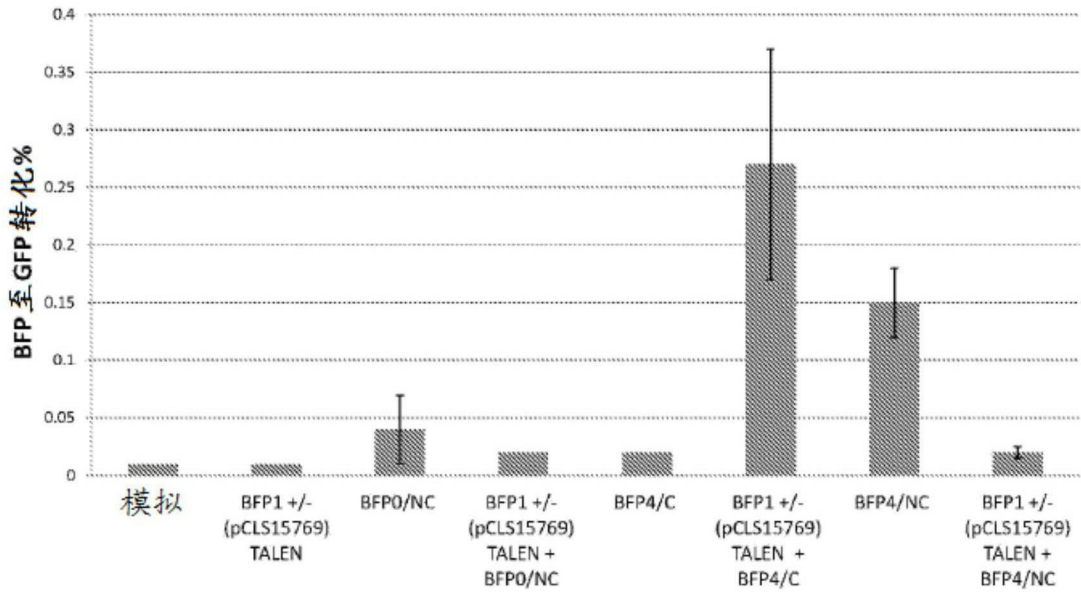
[0117] 实施例 4:GRON 加 TALEN 缺口酶。

[0118]



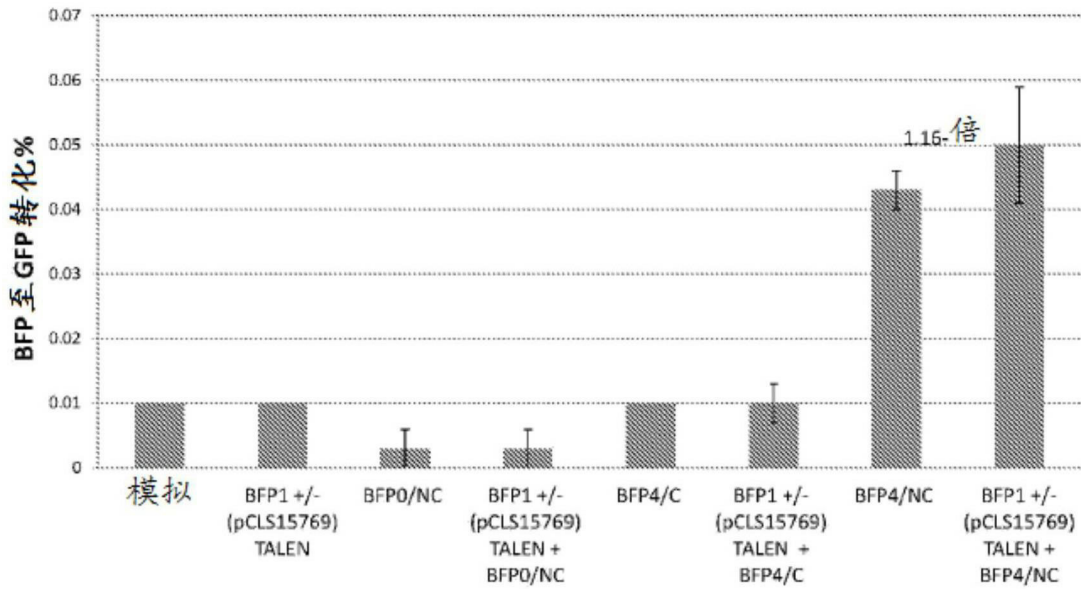
[0119] 实施例 5:GRON 加 TALEN 缺口酶。

[0120]



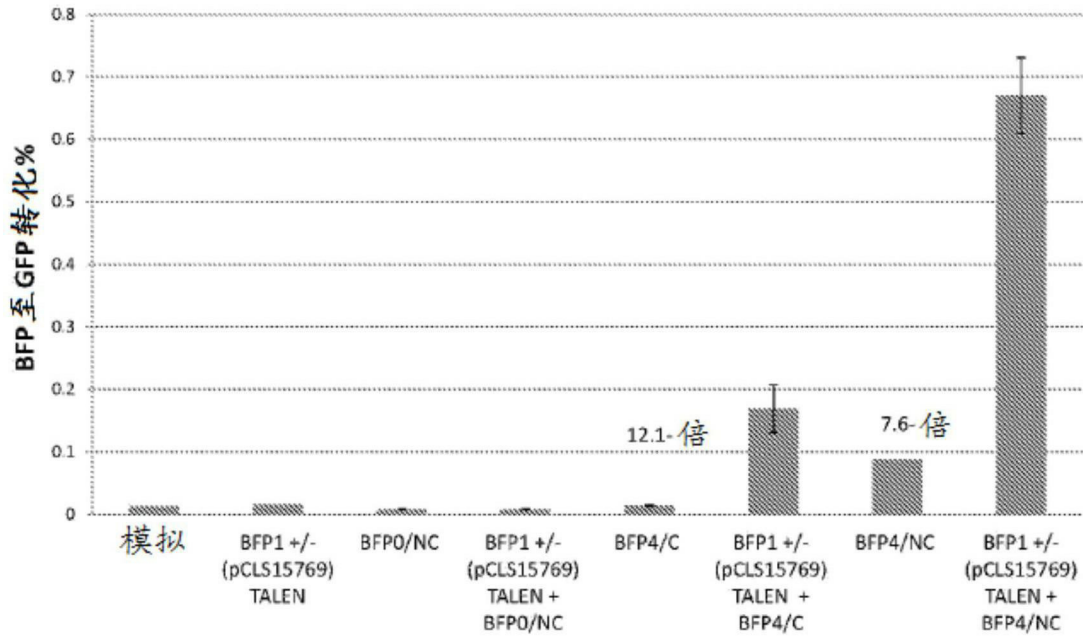
[0121] 实施例6:GRON加TALEN缺口酶。

[0122]



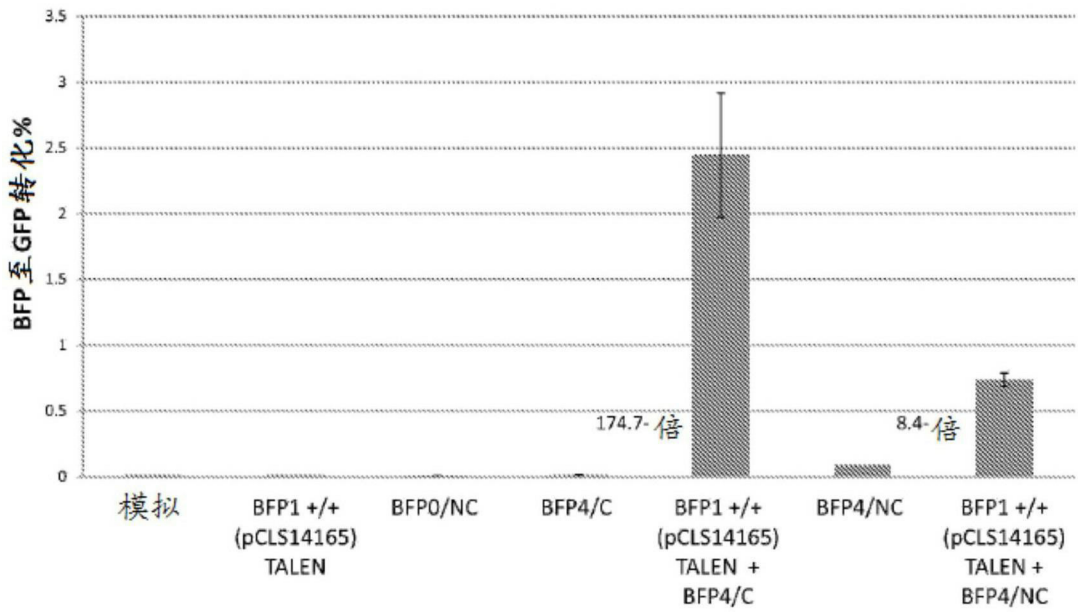
[0123] 实施例7:GRON加TALEN缺口酶。

[0124]



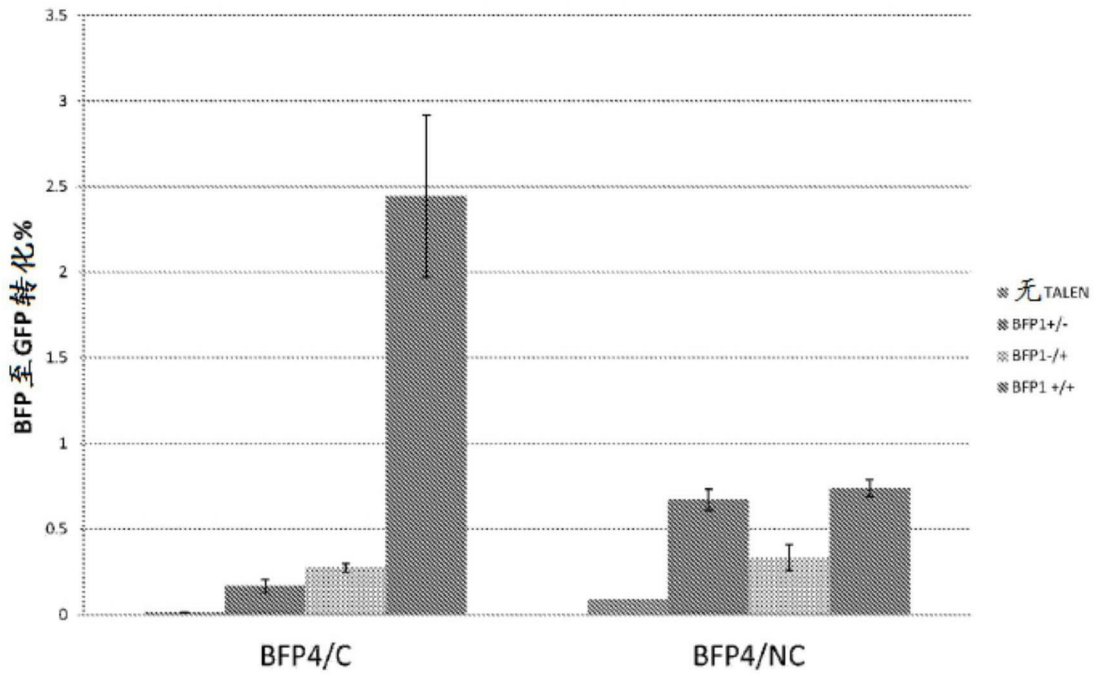
[0125] 实施例 8:GRON 加 TALEN DSB。

[0126]



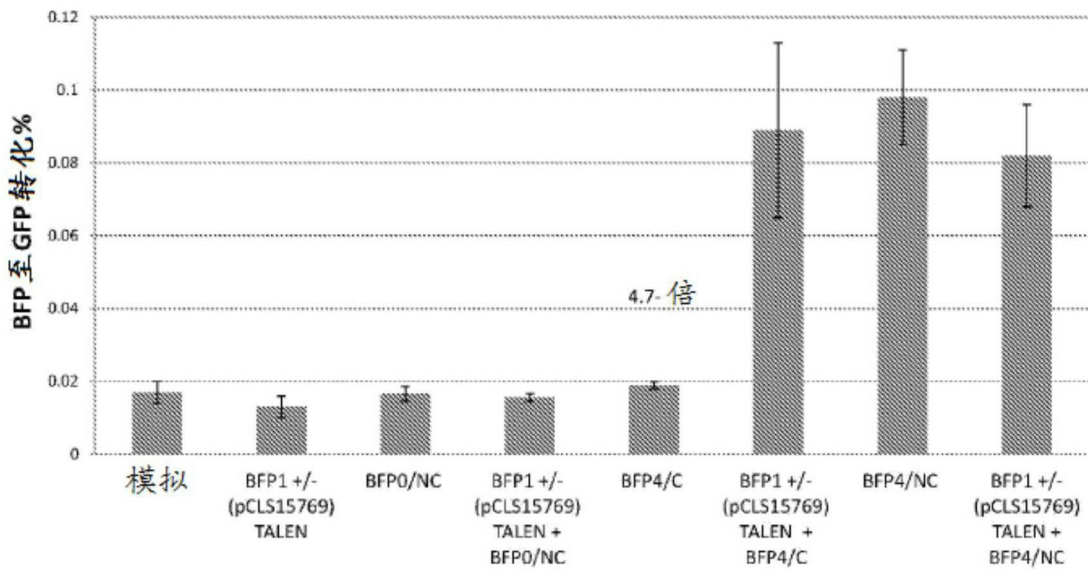
[0127] 实施例 9:GRON 加 TALEN。

[0128]



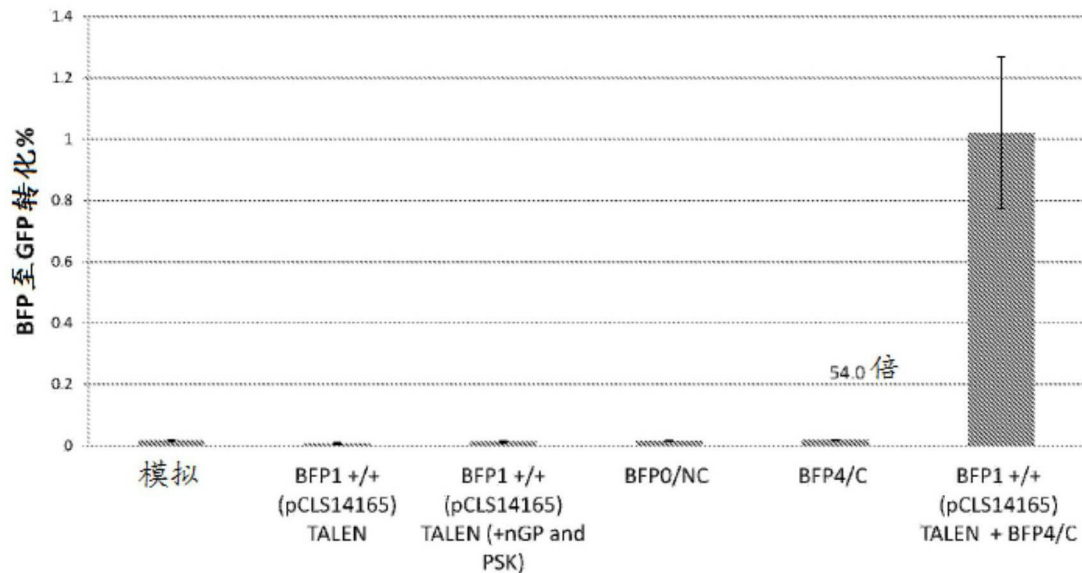
[0129] 实施例 10:GRON 加 TALEN 缺口酶。

[0130]



[0131] 实施例 11:GRON 加 TALEN DSB。

[0132]



[0133] 参考文献

[0134] Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.

[0135] Mathur, J., Szabados, L, and Konec, C. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Rep.* 14, 221-226

[0136] Fujikawa Y, Karo N (2007) Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. *Plant J* 52 :185-195

[0137] Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol.* 161(11) :20-7.