

绵羊卵泡成分对卵母细胞体外减数分裂调控的研究

布赫 旭日干

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学教育部重点实验室 呼和浩特 100021)

摘要 哺乳动物卵巢中的卵母细胞一直处于减数分裂的停滞状态,卵泡内各成分被认为是产生抑制因子的主要来源。本研究以绵羊卵泡各成分为研究对象,用共培养的方法对卵丘细胞、颗粒细胞、膜细胞在卵母细胞体外减数分裂过程中的作用加以探讨。结果表明:1. 卵泡整体及卵泡分泌物在体外可以有效地维持减数分裂停滞,经过 24h 培养,这两个处理组中,处于 GV 期的卵母细胞分别为 69.6% 和 49.1%。经抑制处理后的卵母细胞脱离抑制环境后可以继发成熟, MII 比率可达 88.9%。去掉卵丘细胞的裸卵其减数分裂过程不能被卵泡分泌物有效抑制, 24h 培养后其 GV 期比例为 17.8%。以上结果说明卵泡中的抑制因子主要是通过卵丘细胞来发挥其调控作用的。2. 用颗粒细胞与卵母细胞共培养,结果发现具有颗粒细胞卵丘细胞缝隙连接的卵母细胞(COCGs)在培养 24 小时后 47.4% 达到 MII,与在不具有细胞连接的悬浮颗粒细胞中共培养的卵母细胞之间存在无显著差异,无论是紧密连接的颗粒细胞层还是悬浮在培养液中的颗粒细胞都不能有效抑制生发泡破裂(GVBD)的发生,只能将卵母细胞抑制在 MII 以前的各个时期。以上结果说明颗粒细胞在体外分泌抑制因子的活力大大下降。3. 卵泡膜细胞具有分泌抑制成熟分裂因子的能力,与膜细胞层共培养的卵母细胞在 8h 和 24h 时,其 GV 期的比例为 34.4% 和 32.7%,显著高于没有膜细胞层的对照组(4.5% 和 1.1%)。综上所述,绵羊卵泡中的抑制因子不仅来自于颗粒细胞,而且膜细胞也参与了成熟分裂的抑制,这些细胞在体外仍具有分泌抑制因子的能力,只是与体内分泌能力有所不同。

关键词: 绵羊卵母细胞 减数分裂停滞 卵泡细胞成分 体外共培养

减数分裂的调控是生殖生物学研究的重要课题。在卵巢中卵原细胞结束有丝分裂增殖之后不久,就进入了减数分裂期,并完成了第一次减数分裂前期的大部分过程停滞于双线期^[1]。这种停滞会持续很长时间,有的卵母细胞甚至终生都处于停滞状态。解除这种停滞需要两个条件:1)卵母细胞在生长卵泡中必须得到充分发育,具体的表现是卵母细胞的大小有明显的增长;2)体内的卵母细胞只有在促性腺激素 FSH 和 LH 的协同作用下才能打破停滞而重新启动减数分裂。在 1935 年 Pincus 与 Enzmann 将充分生长的卵母细胞移出卵泡在成分明确的培养液中培养,结果发现没有经过任何激素的诱导,卵母细胞也能重新启动减数分裂发生 GVBD,直到 MII 期。这个过程完全自发完成,因此被称之为自发成熟^[2]。由此人们设想卵母细胞原来所处的卵泡环境中一定存在某些抑制因子,使卵母细胞一直处于停滞状态,而当促性腺激素峰出现之后,引起卵泡环境中信号传递的变化,卵母细胞才

能重新启动减数分裂。目前,关于卵泡成分对减数分裂的调控研究主要利用小鼠^[1]、猪^[5]和牛^[7]等动物来进行,利用绵羊进行研究的报道比较少见。绵羊是一种重要的家畜,在胚胎工程和转基因生物反应器研究中颇受重视。本研究以绵羊卵泡中的细胞成分为研究对象,利用共培养的方法讨论其在卵母细胞减数分裂中的作用,为建立减数分裂调控机制提供有益的信息。

材料与方 法

1. 卵巢的采集及卵母细胞培养

从本地屠宰场收集绵羊卵巢,放在盛有 30℃ 左右生理盐水的保温筒中 1-2h 内带回实验室,采卵前用 30℃ 生理盐水将卵巢充分清洗 3 次,收集到的卵巢处于发情周期中的不同时期。使用带有 18-G 针头的 5ml 注射器抽吸卵泡获得

本文 2002 年 7 月 15 日收到,11 月 22 日接受。
国家自然科学基金资助,项目编号 39860056。
E-mail: dwzx@mail.imu.edu.cn

卵母细胞。卵母细胞在培养前并不需要过分洗净。在立体显微镜下捡卵,选择具有完整紧密卵丘细胞层的卵母细胞进行微小滴培养,基础培养液的主要成分为 TCM199、10mM Hepes、3mg/ml BSA、双抗。FSH 的浓度为 0.02IU/ml。培养小滴体积为 50 μ l,用液体石蜡覆盖,培养条件为 5% CO₂、95% 空气。温度为 38.5 $^{\circ}$ C,湿度为 100%。以下所有实验凡涉及共培养的,体细胞成分均先于卵母细胞至少 1 小时进入培养小滴中平衡。

2. 裸卵的获得

自制玻璃细管,其口径与卵母细胞直径大小相当。在 PBS 缓冲液中(不含 Ca²⁺, Mg²⁺),反复吹打卵母细胞,直至其外层卵丘细胞全部去掉。

3. 卵泡整体培养

将卵泡整体放入到培养液小滴中,用手术刀刺开一小口,将每个卵泡注入 5 枚卵母细胞,培养 24h 后取出一半固定观察核相,另外一半取出后继续培养在含有 FSH 的培养液中,24h 后观察核相。将卵泡整体培养在 50 μ l 微滴中 24h,之后弃掉卵泡,将 10-20 枚具有卵丘细胞的卵母细胞和去掉卵丘细胞的裸卵分别培养在这种具有卵泡分泌物的培养液中,24h 后观察核相。

4. 与颗粒细胞共培养

将卵巢上约 2mm 的卵泡用手术刀剔取出来,在立体显微镜下选择具有一定透明度的卵泡用手术刀将其一切两半。符合要求的情况是可见较为完整的颗粒细胞层和被卵丘紧紧包被的卵母细胞。将完整的颗粒细胞层挑出,用 PBS 冲洗 3 遍。在无 Ca²⁺, Mg²⁺ 的 PBS 中用吸管吹打,或在电动涡旋器上振荡,使其离散。然后以 2 000rpm 离心 5min,弃上清,加 0.5ml 培养液洗涤、离心,重复 2 次,颗粒细胞在培养液中的浓度最终调整为 2 \times 10⁶/ml。将卵母细胞培养在浓度为 2 \times 10⁶ 个/ml 的颗粒细胞悬液中,另一组中的卵母细胞是在采卵中产生的带有一片紧密相连颗粒细胞层的颗粒-卵丘-卵母细胞复合体,培养 24h 后观察核相变化。

5. 与膜细胞层共培养

将取完颗粒细胞层的卵泡,用自制的玻璃环仔刮去与膜细胞层相连的残余的颗粒细胞,获得纯的膜细胞层。外层的膜细胞层由大量的胶原纤维和很少的细胞组成,而内层的膜细胞层含有大量细胞和丰富的血管,前人的研究表明用组化法染色获得的膜细胞层,发现很少带有颗粒细胞^[3],这种方法制备膜细胞层简便易行。将卵母细胞分别培养在由半卵泡剥离的膜细胞层和不经剥离的颗粒细胞膜细胞复合层中,每个小滴中含有 2 个半卵泡层,每个上放 5 枚卵母细胞,分别在 8h 和 24h 观察其核成熟状况。

6. 核相的观察

将卵母细胞放在含有透明质酸酶的 PBS 中用细管吹打去掉卵丘细胞。立体显微镜下压片,直至卵母细胞形变。滴加以醋酸和乙醇 1:3 比例混合固定液,并使其在固定液中浸泡 24h,随后取出用 1% 醋酸地衣红染色 10 分钟,然后脱色封片。在相差显微镜下观察核相。

7. 数据统计

实验数据用卡方检测。如果 P<0.05 认为有显著差异, P<0.01 认为有极显著差异。

结 果

1. 卵泡整体及细胞连接在减数分裂中的作用

将卵母细胞注入卵泡内培养,几乎完全模拟卵母细胞在体内的存在方式。经过 24h 培养有 69.6% (16/23) 的卵母细胞处于 GV 期,没有启动减数分裂。培养在卵泡中的卵母细胞移出卵泡后可继续成熟,有 88.9% (24/27) 达到 MII。培养在卵泡分泌物中的卵母细胞 24h 后 49.1% (52/106) 处于 GV 期,与在卵泡内培养无统计学上的差异,只是在卵泡分泌物中卵母细胞达到 MII 的比率 29.2% (31/106) 要高于在卵泡中培养的 MII 的比率 8.9% (2/23) (P<0.01)。卵泡分泌物不能有效抑制裸卵减数分裂的进行,经 24h 培养后裸卵只有 17.8% 处于 GV 期,而 MII 期则高达 57.2%。

表 1 卵泡整体与细胞连接对绵羊减数分裂过程的影响

培养液	总卵数	处于不同减数分裂时期的卵母细胞数目		
		GV (%)	Int (%)	MI (%)
对照组	57	2(3.5) ^a	4(7)	51(89.5) ^a
卵泡内培养	23	16(69.6) ^c	5(21.7)	2(8.7) ^c
抑制后继续培养	27	3(11.1) ^{ab}	0(0.0)	24(88.9) ^a
卵泡分泌物	106	52(49.1) ^c	23(21.7)	31(29.2) ^b
裸卵与卵泡分泌物	56	10(17.8) ^b	14(25.0)	32(57.2) ^a

注: Int 为减数分裂过程中 GVBD 到 MII 之间各时期代号(包括 PI, MI, AI) a, b, P<0.05; b, c, P<0.01。

2. 颗粒细胞在体外对减数分裂的影响

卵母细胞与颗粒细胞共培养 24h, 绝大多数的卵母细胞都已发生 GVBD, 与新鲜颗粒细胞共培养的处理组中其处于 GV 期的卵母细胞为 9.6% (6/62), MII 期的为 48.4% (30/62), 而培养中的 COCGs, GV 期的比例为 13.1% (5/38), MII 期为 47.4% (18/38), 两者无显著差异。

表 2 颗粒细胞对绵羊卵母细胞成熟分裂的影响

培养液	总卵数	处于不同减数分裂时期的卵母细胞数目		
		GV (%)	Int (%)	MI (%)
对照组	45	0 ^a	14(31.2)	31(68.8) ^a
悬浮的颗粒细胞	62	6(9.6) ^b	26(41.2)	30(48.4) ^b
颗粒卵丘卵母细胞	38	5(13.1) ^b	15(39.5)	18(47.4) ^b

注: a, b, P<0.05。

3. 膜细胞与颗粒细胞对体外减数分裂过程的影响

卵母细胞与颗粒细胞膜细胞复合层共培养 8h 后, 处于 GV 期的卵母细胞为 50%, 显著高于与膜细胞或颗粒细胞单独培养的处理组 (34.4%,

27.1%; $P < 0.01$)。经过 24h 培养之后,各培养体系中的 GV 期的卵母细胞数量明显减少,各处理组之间不存在明显的差异,但与没有经过共培养的对照组间存在显著差异。结果表明,在共培养的早期,颗粒细胞和膜细胞都能抑制减数分裂的进行,而且膜细胞与颗粒细胞的协同作用可产生更显著的抑制效果。

表 3 膜细胞和颗粒细胞对绵羊卵母细胞减数分裂恢复的影响(8h)

培养液	总卵数	处于不同减数分裂时期的卵母细胞数目	
		GV(%)	Int(%)
对照组	67	3(4.5) ^a	64(95.5)
颗粒细胞	85	23(27.1) ^b	62(72.9)
膜细胞	90	31(34.4) ^{bc}	59(65.6)
膜细胞颗粒细胞	48	24(50) ^c	24(50)

注: a,b,c $P < 0.01$ 。

表 4 膜细胞、颗粒细胞对绵羊卵母细胞体外减数分裂成熟的影响(24h)

培养液	总卵数	处于不同减数分裂时期的卵母细胞数目		
		GV(%)	Int(%)	MII(%)
对照组	91	1(1.1) ^a	29(31.5)	62(67.3)
膜细胞	55	18(32.7) ^b	17(30.9)	20(36.4)
膜细胞颗粒细胞	47	13(27.6) ^b	25(54.3)	9(19.1)

注: a,b, $P < 0.01$ 。

讨 论

Moor 等人首先在体外进行了绵羊卵泡的整体培养,结果发现所有的卵母细胞都停滞在 GV 期^[4]。本研究利用向卵泡内注入卵母细胞的方法,试图模拟体内的环境,结果发现注入的卵母细胞在 24h 后有 69.6% 处于 GV 期。而且这种抑制作用可以逆转。因此可以说明卵泡整体与卵母细胞共培养,在短期内可以抑制成熟分裂的发生。猪的卵泡只有在促性腺激素的存在下才能抑制成熟分裂的重新启动^[5]。而马的卵母细胞注入卵泡培养后,虽然可以产生抑制,但只有很少一部分卵母细胞能够逆转这种抑制,大部分都退化了^[6]。卵母细胞在卵泡内可以与颗粒细胞重建联系,在从卵泡中吸取培养后的卵母细胞时可以明显感到这种连接的存在。Hinrich 的研究结果也证明了这一点^[6]。在卵泡分泌物中培养的卵母细胞 GV 期比例低于卵泡中培养卵母细胞的 GV 期的比例,原因可能是卵泡中抑制因子的浓度要高于分泌物。卵泡液中存在多种抑制因子,但是它们是直接作用于卵母细胞,还是通过卵丘细胞间接调控,还存在很多的争议。在本研究中,卵泡在体外仍具有较强的分泌抑制因子的能力,只要抑制因子的浓度足够,无论是否与卵泡有细胞连接,都能产生抑制,但是这种抑制主要是通过卵丘细胞

来作用于卵母细胞的,卵丘细胞与卵母细胞间的联系非常重要。与卵泡分泌物共培养的卵母细胞去掉卵丘细胞后,不能被有效地抑制成熟分裂,这说明卵泡中的抑制因子主要是通过卵丘细胞来发挥其抑制作用的。Richard 等人也发现没有卵丘细胞的卵母细胞在与单层膜细胞共培养时,不能被膜细胞产生的抑制因子有效地抑制成熟分裂^[7]。通常认为使卵母细胞处于停滞状态的因子来自于颗粒细胞并通过卵丘细胞来发挥其作用,OMI 和来自于卵泡液中的小分子片断都是通过卵丘间接去调控卵母细胞的成熟分裂^[8]。Miyano 等发现较高浓度的次黄嘌呤可以使裸卵的成熟分裂受到抑制^[9]。而在本研究中卵泡分泌物中的卵母细胞仍有 17.8% 处于 GV 期,显著高于没有抑制的对照组(3.5%),由此推测虽然卵泡中的抑制因子可能主要是通过卵丘细胞来发挥其作用的,但是不能否认其他一些因子可以直接作用于卵母细胞的可能性。在减数分裂过程中,细胞信号的传递至关重要,一些激素和生长因子与颗粒细胞上受体结合引起细胞内第二信使的变化,而卵丘细胞与卵母细胞的缝隙连接是信息传递的有效通道^[10]。

本研究在选择共培养的颗粒细胞的浓度时参考了 Sirard 等人的结果,他发现在牛的颗粒细胞悬液浓度达到 2.0×10^6 时,可以使 40% 的卵母细胞停滞于 GV 期,而添加一定比例的卵泡液可以使处于 GV 期的比例提高到 70%^[11]。在本研究中绵羊的颗粒细胞来自于被认为具有较强抑制效力的小腔卵泡,从形态上并无闭锁现象,但即使这样,绵羊的颗粒细胞仍不能将体外培养的卵母细胞抑制在 GV 期,但不能由此说明颗粒细胞没有抑制减数分裂的能力,因为毕竟有将近一半的卵母细胞被抑制在 MII 以前的各个时期,Hinrich 等发现马的颗粒细胞在体外也不能有效地阻止减数分裂的启动,他把原因归结为颗粒细胞的采集方法的不同^[6]。他认为 Sirard 利用抽吸法从卵泡内抽取的颗粒细胞连带有多种成分,如卵泡液、膜细胞和血细胞等;这些成分在分离颗粒细胞时不能被有效地清除掉,一起参与了对卵母细胞的抑制。而 Hinrich 是用分割剥离卵泡的方法获得较纯的颗粒细胞,所以抑制效果不明显。虽然本研究的结果与 Hinrich 相似,但作者认为绵羊的颗粒细胞在体外对减数分裂抑制效力减弱的原因是颗粒细胞本身在体外分泌抑制因子的能力下降所致。而且不同种类动物其颗粒细胞分泌抑制因子的能力也存在较大的差异。牛的 COGs 在

体外培养 24h 只有一半发生 GVBD^[12], 而我们的实验中却高达 87.9%, 推测可能由于种间差别造成。Javoslav 等将牛的卵母细胞与猪的颗粒细胞层共培养, 只有 21% 的卵母细胞在 24h 后发生 GVBD^[13]。由此可见颗粒细胞分泌的抑制因子在功能上无种间差异。由于颗粒细胞产生的抑制因子可能打乱了纺锤体的有序形成, 造成其功能不全从而导致减数分裂不能顺利完成全过程^[14,15]。于是在实验中出现了卵母细胞被抑制在 MII 以前的各个时期的结果。Vale 等人发现在细胞周期的调控中, 通过对微管蛋白合成系统的调控, 从而影响微管结构的形成, 是控制的关键所在^[16]。因此颗粒细胞产生的抑制因子有可能改变了卵母细胞的蛋白合成过程。从生理角度来讲, 卵泡壁上各种细胞成分可以产生多种抑制卵母细胞成熟分裂的因子是比较合理的观点。因为在卵泡液和血液中存在多种促进成熟分裂的因素如 FSH、EGF、IGF。

早先的研究认为, 膜细胞层没有分泌抑制因子的能力^[17], 本研究中与膜细胞层共培养的卵母细胞在培养 8h 和 24h 后, 其 GV 期的比例 (34.4%, 32.7%) 显著高于对照组 (4.5%, 1.1%), 说明膜细胞能够独立产生抑制减数分裂的因子, Richard 等已从膜细胞分泌物中获得了一个 214kd 的蛋白因子, 证明它在牛的成熟分裂中起着重要抑制作用。卵母细胞与膜细胞颗粒细胞复合层共培养 24h, 其产生的抑制效果与单独膜细胞培养的结果没有明显差异。综上所述, 绵羊卵泡成分对卵母细胞的减数分裂过程有不同程度的抑制作用, 而且这种抑制作用

存在协同关系。但这毕竟是体外的研究结果, 而非真正的生理过程, 在研究中发现, 虽然一些卵母细胞被抑制在 GV 期, 但其染色体已发生不同程度的凝集。因此, 在体外的研究结果只能作为一种有益的参考, 而是否真正是体内的调控过程的再现, 仍有待进一步细致地探讨。

参 考 文 献

- [1] Anne Grete Byskov. et al., 1997, *J. Reprod. Dev.*, **43**: Suppl 31.
- [2] Pincus G., Enzmann EV., 1935, *J. Exp. Med.*, **62**: 665 - 675.
- [3] Junqnein JC., 1986, 5th ed Los Altos, CA: Lange medical publications: 486.
- [4] Moor R. M., 1977, *J. Reprod. Fert.*, **49**: 101 - 109.
- [5] Fleming A. D., 1985, *Gamete Research*, **11**: 107 - 119.
- [6] Hinrichs K., 1995, *J. Reprod. Fert.*, **104**: 144 - 156.
- [7] Richard FJ, Sirard MA, 1996, *Biol. Reprod.*, **54**: 16 - 21.
- [8] Larsen W. J, Wert S., 1988, *Tissue and Cell*, **20**: 809 - 48.
- [9] Takashi miyano., 1995, *J. Exp. Zool.*, **273**: 70 - 75.
- [10] Berridge M. J., 1993, *Nature*, **361**: 315 - 325.
- [11] Sirard M. A, Bilodean S., 1990, *Biol. Reprod.*, **43**: 777 - 783.
- [12] Vantol H. T. A. et al., 1996, *Mol Reprod Dev.*, **45**: 218 - 224.
- [13] Jaroslav Kalons, et al., 1993, *Mol. Reprod. Dev.*, **34**: 58 - 64.
- [14] Kubelka et al., 1988, *Gemete. Res.*, **19**: 423 - 431.
- [15] Motlik J., 1990, *Mol Reprod Dev.*, **27**: 316 - 375.
- [16] Vale R. D., 1991, *Cell*, **64**: 827 - 839.
- [17] Foote W. D., 1969, *Aun Biol Anim Biochim. Biophys.*, **3**: 329 - 349.

THE EFFECTS OF FOLLICULAR COMPONENTS ON MEIOSIS PROGRESSION OF OVINE OOCYTES CULTURED IN VITRO

Bu He BAO Shorgan

(The Research Centre for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

ABSTRACT Mammalian oocytes are arrested at dictyate stage of the first meiotic division in the ovary. The present studies were undertaken to evaluate the inhibitory effect of follicular components that including granulosa cells, cumulus cells and theca cells in vitro. 1. Injected in the whole intact follicle or cultured in the secretion of follicles, oocytes could be maintained in meiosis arrest in high proportion. In the two groups, the percentages of oocytes arrested in GV stage were 69.6% and 49.1%, respectively. When the oocytes were removed from the follicles and put into the maturation medium, 88.9% of them reached MII stage. The meiosis resumption of denuded oocytes can not be prevented by secretion of follicles, only with 17.8% of oocytes arrested in GV stage. The results showed that the meiosis arrest was controlled by inhibitory factors through the gap junction. 2. When cumulus oocyte complexes (COCs) with granulosa cells were cultured in vitro for 24h, 47.4% reached MII stage. Neither granulosa cells that had intact gap junctions with COCs nor granulosa cells in co-culture could prevent the GVBD of COCs. The result showed that the secretion of inhibitory factors in

granulosa cells declined significantly in vitro. 3. Theca cells can secrete inhibitory factors to maintain oocytes in meiosis arrest. When oocytes were co-cultured with theca cells for 8h and 24h, the percentages of oocytes in GV stage were 34.4% and 32.7%, respectively, significantly higher than in theca cell-free medium (4.5% and 1.1%). In conclusion, the inhibitory factors in ovine follicle not only come from granulosa cells but also theca cells. These cells still to some extent have the ability to secrete inhibitory factors in vitro. The inhibitory factors or signals transmit mainly through gap junction between cumulus cells and oocyte.

Key words: Ovine oocyte Meiosis arrest Follicular component Co-cultured in vitro

LeETR1 反义基因对番茄的遗传转化

杨虎清* 应铁进*,*** 向庆宁** 杜荣茂* 郑铁松*

(*浙江大学食品科学与营养系, **园艺系 杭州 310029)

摘要 从番茄果实中提取总 RNA, 根据 GeneBank 中 LeETR1 序列, 设计合成特异性引物, 利用 RT-PCR 技术克隆了 LeETR1 基因 3' 端非编码区 313 bp 的 cDNA, 经酶切图谱和序列分析鉴定无误后, 反向插入到植物表达载体 pPZP111A 中, 构建了表达 LeETR1 反义 RNA 的双元载体。经农杆菌途径转化番茄品种 B₁ 后, 通过 PCR 检测从抗卡那霉素再生植株中筛选到 13 株阳性植株, Southern blot 杂交确证反义基因已经整合到番茄染色体中。对果实乙烯释放的测定结果表明, 转基因番茄乙烯释放高峰的出现比对照果实推迟 10 天, 番茄红素的合成受到显著抑制, 果实不能形成正常的红色。推测 LeETR1 和番茄的成熟有着密切的关系。

关键词: 番茄果实 LeETR1 基因 克隆 反义表达载体

乙烯是植物调控自身生长发育、成熟衰老的五大激素之一, 在水果蔬菜的成熟衰老过程中起着重要的作用。乙烯的生理作用是通过植物对它的感受和信号转导来实现的, 其作用机理一直是采后生理学研究的热点。20 世纪 70 年代末, 杨祥发等人阐明了植物体内乙烯的生物合成途径^[1], 乙烯生物合成机理得到广泛、深入的研究^[2,3]。90 年代以来, 乙烯信号转导研究也取得了一些进展^[4,5], 在模式植物拟南芥中已建立起 C₂H₂→ETR→CTR→EIN2→EIN3→ERF→生化反应的模型^[6-8]。但在果实成熟衰老研究的模式材料番茄中, 乙烯信号转导的研究还不够深入, 到目前为止只有乙烯受体基因 LeETR (1-5) 及负调节因子 CTR 被分离出来^[9-12], 其生理功能还远远没有被人们所认识。本研究在已经报道的 LeETR1 基因序列^[9,10]的基础上, 克隆 LeETR1 基因部分特异序列, 构建反义 LeETR1 植物表达载体, 利用农杆菌介导法进行遗传转化并获得了转基因番茄植株, 经分子生物学检测, 证实反义基因已导入番茄。这就为探讨番茄乙烯受体基因 LeETR1 在果实成熟衰老过程及乙烯信号转导途径中的作用和生理学功能打下基础, 以便

阐明果蔬成熟衰老机制和乙烯作用机制。

材料与方 法

1. 质粒、菌株和试剂

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Miller) Epi 由美国加州大学 UC Davis 番茄种子中心提供, 转化用番茄品种自交系 B₁, 高抗番茄青枯病, 由浙江大学生物技术研究所提供。

大肠杆菌 TOP 10F' 和克隆载体 PCR2.1[®] 由英国 Nottingham 大学的 BBSRC 植物基因调节实验室提供。大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 LBA4404 为浙江大学采后生物技术实验室保存; 植物表达载体 pPZP111A 由新加坡国立大学分子农业生物学院杨唯才博士提供。各种限制性内切酶、MM-LV 反转录酶、T4DNA 连接酶、Taq 酶、dNTPs 等为 Promega 公司产品; PCR 及酶切产物回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 为 QIAGEN 产品; PCR 引物由上海生工公司合成。探针标记采用 Promega Primea-Gene Label 试剂盒, 其他化学试剂为国产分析纯。

本文 2002 年 8 月 5 日收到, 2002 年 10 月 8 日接受。

本文为国家自然科学基金资助项目 (39870512)。

*** 通讯作者。E-mail: tjying@hzcnc.com

致谢: 浙江大学农业建筑环境工程研究所崔绍荣教授为本课题提供人工气候室特此感谢!