

道筛选了丙型肝炎病毒核心蛋白^[17]和炭疽芽孢^[18]等的适体。我们目前也正致力于筛选能特异识别网织红细胞的DNA适体,并拟将其以荧光标记后代替抗CD71荧光抗体,用于网织红细胞的流式细胞术检测相关研究。从适体所具有的优越性能,可以预见适体完全可能代替抗体或与抗体互为补充地应用于流式细胞术检测,适体筛选和适体在流式细胞术检测中的应用研究是很有价值的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Tuerk C. and Gold L. 1990, *Science*, **249**: 505-510.
- [2] Clark S. L. and Remcho V. T. 2002, *Electrophoresis*, **23**: 1335-1340.
- [3] Cerchia L., et al., 2002, *FEBS Lett.*, **528**: 12-16.
- [4] Burke D. H. and Gold L. 1997, *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2020-2024.
- [5] Marozzi A., et al., 1998, *J. Biotechnol.*, **61**: 117-128.
- [6] Darfeuille F., et al., 2002, *Biochemistry*, **41**: 12186-12192.
- [7] Lee J. H., et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*, **30**: 5360-5368.
- [8] Chaloin L., et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*, **30**: 4001-4008.
- [9] Wen J. D. and Gray D. M. 2002, *Biochemistry*, **41**: 11438-11448.
- [10] Jayasena S. D. 1999, *Clin. Chem.*, **45**: 1628-1650.
- [11] Jenison R. D., et al., 1994, *Science*, **263**: 1425-1429.
- [12] Morris K. N., et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(6):2902-2907.
- [13] Davis K. A., et al., 1996, *Nucleic Acids Res.*, **24**: 702-706.
- [14] Davis K. A., et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, **26**: 3915-3924.
- [15] Blank M., et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 16464-16468.
- [16] Yang X., et al., 2003, *Nucleic Acids Res.*, **31**: e54.
- [17] 詹利盛等, 2002, 中华微生物学和免疫学杂志, **22**: 578-581.
- [18] 甄蓓等, 2002, 生物化学与生物物理学报, **34**: 635-642.

十字花科作物转基因研究进展*

李春顺 陈利萍** 张明方

(浙江大学园艺系 杭州 310029)

摘 要 从转化受体、转化方法、转化频率、外源基因等方面对十字花科转基因研究进展进行了综述。并提出了当今十字花科转基因研究存在的问题。

十字花科(*Cruciferae*)植物包括许多重要的蔬菜、花卉、油料和饲料等作物,在人民生活及农业生产中有着重要的作用。培育十字花科作物的优良品种,满足社会生产和生活等各方面的需要,具有重大的理论和实践意义。迄今为止,利用常规育种技术来改良十字花科作物品种虽然取得了一定的成功^[1],但同时还存在着选育年限过长、远缘杂交不亲和以及有用亲本材料缺乏等问题,从而导致理想品种选育困难。植物转基因技术的兴起,为十字花科作物品种的改良和培育提供了一条新途径。它作为当代高效的育种辅助手段,解决了一些常规育种难以解决的问题,并取得了一定的成效。自1985年Ooms^[2]获得了第一例十字花科转基因作物——甘蓝型油菜以来,十字花科植物转基因的研究引起了世界上包括中国在内的很多国家的科学家的关注。目前,利用十字花科植物的不同转化受体,通过直接转化或间接转化等不同方式,已经得到了拟南芥、甘

蓝型油菜、花椰菜、大白菜、甘蓝、羽衣甘蓝、芜菁等转基因植物。同时,在转化受体、转化方法、不同外源基因的导入以及转基因植物获得等方法研究上也取得了重大进展。现在已经获得的十字花科作物的抗病、抗虫、高产优质等材料有几十余份,有的已经进入田间试验。

本文将从从以下几个方面对十字花科植物转基因技术的研究进行简要综述,并对存在的问题及前景进行讨论。

一、十字花科植物转基因研究进展

1. 转化受体

*基金项目:浙江省自然科学基金(编号:302340)和省科技厅项目(编号:2003C32038)资助。

**通讯作者。E-mail: chenliping@zju.edu.cn

良好的植物受体系统的建立是成功实现基因转化的首要条件之一。良好的受体必须具有高效稳定的再生能力、较高的遗传稳定性和稳定的外植体来源,并且要具备对选择性抗生素敏感、对农杆菌或其他转化方式敏感等特性。十字花科植物的转化受体主要是直接取自植物的组织块,包括无菌的下胚轴^[3-8]、子叶柄^[9,10]、子叶^[11,12]、根^[13-15]、叶^[15]等;也有人以花茎^[5]、花药^[16]、小孢子^[17-19]、花梗^[20]等花器官组织作为转化受体。下胚轴、子叶柄、子叶、叶、根等具有再生能力强、取材方便、转化简便、快捷等优点,曾被广泛利用。然而,由于这些外植体是多细胞结构,容易得到嵌合植株。因此,人们开始采用原生质体进行基因转化。原生质体为单细胞结构,作为基因转化的受体具有独特的优点^[21]。现已从拟南芥^[22]、甘蓝^[12,23]、花椰菜^[14,24]、青花菜^[25]、芜菁^[26]、甘蓝型油菜^[26]等的原生质体获得转基因植株。但是,由于原生质体再生体系的建立比较困难,再生频率较低,它的应用也因此而受到了一定的限制。为了避免组织、器官再生体系建立的困难,人们提出了用种子、完整植株等作为转化受体。实验结果表明,种子或完整植株也可以作为转化受体而获得转基因植株,但转化频率非常低,并且需要大量的种子或完整植株。但是,该方法具有获得转基因植株时间短、方法简单、成本低等优点。然而不管是利用植物的组织、器官和细胞,还是利用种子或完整植株进行基因转化,得到的皆为二倍体植株,后代会发生分离。而利用单倍体的小孢子为外植体进行基因转化,就可以获得纯合后代。现已从大白菜、甘蓝型油菜^[17,18]、芜菁^[19]等的小孢子获得转化植株或愈伤组织。

2. 转化方法

基因导入植株的方法有载体介导基因转化法、DNA直接导入法、种质系统介导基因转化法等。

(1) 载体介导转化法 载体介导转化又称间接转化法,该方法主要是利用农杆菌(根癌农杆菌和发根农杆菌)作为介体进行转化。由于十字花科植物是农杆菌良好的宿主,所以,利用农杆菌作为十字花科转化载体具有内在的优势。载体介导基因转化法作为最常用的基因转化方法,其转化受体广泛,转化技术较成熟,尤其在十字花科植物上已取得很大成功。例如,1997年Christey等^[27]以甘蓝、花椰菜等的子叶、叶柄为外植体,通过与根癌农杆菌共培养进行乙烯形成酶反义基因的转化,最高转化频率可达15%。Cao等^[28]以开花的小白菜完整植株为外

植体,利用根癌农杆菌真空渗透法进行Bar基因的转化,也得到了转化株,虽然转化率很低,但转化周期短,成本低。

利用农杆菌进行基因转化,在十字花科不同的作物间的转化效果是有很大的差异的,如Puddephat^[29]利用发根农杆菌转化系统对青花菜和花椰菜进行遗传转化,结果发现花椰菜和青花菜的转化能力有明显差异,花椰菜的转化频率达27%,而青花菜只有2.2%。此实验中,他们在悬浮培养发根农杆菌的培养基中加入2,4-D来提高毛根的出现水平,并利用毛根为选择标记进行转化植株的筛选,取代了标记基因的应用。这是一种较新的方法。但它的广泛应用还有待于进一步研究。

现通过载体介导转化得到的十字花科蔬菜主要有:拟南芥^[2,13,14,22]、菜薹^[3]、芥菜^[5]、甘蓝^[5,16]、大白菜^[7,8,11,27]、青花菜^[9,16]、甘蓝型油菜^[12,19]、花椰菜^[16,27]、羽衣甘蓝^[16]、芜菁甘蓝^[30]等。从这些研究结果来看,农杆菌侵染外植体后,会大大降低外植体的分化能力,从而影响了转化频率。因此,人们又希望通过直接转化的方法来获得转基因植株。

(2) DNA直接导入转化 DNA直接导入转化就是不依赖农杆菌载体和其他生物媒体,将特殊处理的裸露DNA直接导入植物体或离体组织、细胞,实现基因转化的技术,也被称为无载体介导DNA转化。常用的DNA直接转化的方法,根据其原理可分为化学法和物理法两大类。主要包括显微注射法^[18]、基因枪法^[19,31]、PEG(聚乙二醇)法^[22,23,30]、激光穿刺法^[32]、电击法^[26]、脂质体法^[33]等。如:1998年,Fukuoka^[32]等利用基因枪技术对甘蓝型油菜小孢子进行基因转化,当基因枪粒子重150 μ g,穿透距离6cm,轰击压力为900-1300Psi时,取得了较好的转化效果。但在其他作物上利用基因枪法进行基因转化,总的来说转化率不高,遗传稳定性差。1991年,Arundhati^[23]等利用PEG介导法,以甘蓝下胚轴原生质体为外植体直接吸收含有目的基因的质粒DNA获得转化株,结果原生质体分化频率达80%,转化频率达33%。Elizabeth^[18]等利用微注射法把含有目的基因的DNA导入了甘蓝型油菜的小孢子,发现虽然拷贝数较低(1-20)但仍得到了转化株。Chen^[19]等综合利用了基因枪和DNA直接吸收的方法,先用基因枪向外植体中打入DNA,再将外植体放入DNA溶液中进行直接吸收,向油菜小孢子发育的胚胎的下胚轴导入外源DNA。结果该方法大大提高了转化频率,并获得了纯合的

转化株。Rouan^[26]等利用电击法以芜菁、油菜的叶肉、下胚轴以及子叶为外植体,也得到了转化株。此外,还有一些十字花科作物也通过直接转化法获得转化株^[10,24,26]。

与载体介导转化相比,本方法具有技术要求简单、时间短、易得到转化体等多方面的优点。目前,上述几种DNA直接导入的方法在十字花科植物上都有成功的报道,但也存在转化率不高、后代遗传稳定性差的问题。

(3) 种质系统介导转化法 种质系统介导基因转化是借助生物体自身的种质细胞为媒体,特别是植物的生殖系统的细胞(花粉、卵细胞、子房、幼胚等)以及细胞的结构来实现转化之目的。本方法主要是通过向子房、幼穗及种胚注射外源DNA以获得转基因植株。种质系统介导基因转化的DNA可以是裸露的,也可以是重组在质粒上的。该方法不需建立离体培养体系,更简便易行。在十字花科作物上,该方法也有过成功的报道。1995年, Li^[30]等以甘蓝型油菜小孢子为外植体,通过基因枪法进行基因转化,得到了转化株。但是,此方法也同样存在转化效率不高、遗传稳定性差等问题,而且对DNA如何通过多层细胞壁的阻碍而到达分生细胞尚缺乏有力的证据。此方法目前仍处于研究阶段。

3. 目的基因

随着转基因技术的日益完善和国际市场上转基因产品的逐步商品化,转化的目的基因越来越受到人们的关注。近十年来,基因转化的目的主要有:对受体植物进行遗传改良,选育抗病、抗虫、高产、优质等符合育种目标的品种为生产实践服务;研究植物基因调控机理,以及功能基因,充分发展植物分子遗传学基础理论;研究无标记转基因技术系统,降低转基因安全隐患,进一步促进转基因产品的商品化进程。

从以上的目的出发,迄今为止向植物中导入的目的基因主要有以下两类:

(1) 改良植物遗传特异性的基因 在十字花科基因转化中应用的改良植物遗传特异性的基因主要有:抗虫基因 Bt. ^[3,6,7,9,20]、CpTI(豇豆胰蛋白酶抑制剂)基因^[6,25];抗病基因:CP(外壳蛋白)基因^[10,34]、抗菌肽基因^[8];抗非生物胁迫基因:Bar(耐除草剂)^[14,23,28]、AhproTI(脯氨酸转运蛋白基因)^[35];改善品质基因:ACC反义合成酶基因^[28]、乙烯形成酶反义基因^[30]。另外,还有改变种子内储存物质成分及含量的基因^[5,12,16,17]。以上这些改良

植物遗传特异性的基因都成功地在十字花科作物进行了转化。例如:2001年, Cho^[7]等对大白菜下胚轴进行 Bt. 基因转化,在对6个转化株系进行抗虫实验时发现,其中有4个株系抗虫性可达100%。朱常香等^[10]向甘蓝型油菜转 TuMV-CP 基因,结果对照接种20天后感病,30天后花叶严重皱缩畸形,而转化株45天后才略有花叶,并且症状不随植株发育而加重。

(2) 选择标记基因 在十字花科基因转化中应用的选择标记基因主要有:新霉素磷酸转移酶(Npt II)基因(能使受体细胞获得对卡那霉素的抗性)^[11,14,19,30]、潮霉素磷酸转移酶(hpt)基因(能使受体获得对潮霉素的抗性)^[36]、GUS(β -葡萄糖苷酶)^[23,37]基因以及能使受体具有对双丙氨酸产生抗性的 Bar 基因^[14,23,28]。这些选择标记基因的存在对转基因植株的安全性问题的影响也有待于进一步研究。

4. 最佳转化系统及最高转化频率

转化频率是评价各种作物转化技术成熟程度的主要标志之一。而转化频率的高低又依赖于转化体系。高效的再生体系,是转基因成功的前提之一。由于不同作物的转化受体不同,转化频率也差异很大,结果重复性差。因此,在转基因前,人们往往投入大量的时间来研究作物的高效再生体系。2000年 Pius^[38]经过研究建立了甘蓝以子叶为外植体的高效转化体系,最高分化频率达32%,处于报道中的中间水平。Arundhati 等^[23]建立了甘蓝下胚轴原生质体的高效再生体系,利用6天苗龄的无菌苗下胚轴原生质体进行培养分化,发现最高分化率达80%。也有人通过向培养基中加入其他利于分化的物质提高分化频率。如:2000年, Henzi 等^[37]向共培养的培养基中加入了乙酰丁香酮和甘露碱,转化频率明显提高,并发现加入50 μ mol/L 乙酰丁香酮和10mol/L 甘露碱时分化效果最好。同时,作者还对精氨酸对转化频率的影响进行了研究,结果发现适当的精氨酸浓度可以提高转化频率30-50倍。徐淑平等^[39]通过研究不同的激素配比、硝酸银浓度、卡那霉素、头孢霉素、羧苄青霉素处理和感染农杆菌的浓度以及感染时间对青菜芽分化频率的影响,建立了最佳的青菜再生体系,青菜无菌苗下胚轴切段的芽分化频率达65%,子叶切块的芽分化率为52%。但也有人报道乙酰丁香酮对分化的频率的作用不明显,甚至有反作用。如今,有些十字花科植物的最高分化频率已达100%,一般都在80%以上。

但是,仍有一些十字花科作物由于再生体系建立的困难,很少有人进行转基因方面的研究,如萝卜等。

5. 无选择标记基因转化

随着转基因植物环境释放种类增多,规模增大,转基因植物释放后可能引起的种种问题成为人们关注的热点。转基因植物释放后,可以通过花粉或种子将导入的基因从基因修饰植物向非目标植物或杂草扩散。转基因植物食品的安全性问题主要包括有无毒性物质及有无过敏性蛋白。

食品安全性中的另一个重要问题是标记基因的安全性评价。选择标记基因(报告基因)的表达产物易检测,便于研究基因的表达过程,利于筛选转化细胞、组织乃至植株,并对植物本身无特殊影响。但是,有些标记基因(如抗生素抗性基因、抗除草剂基因等)的安全问题也引起了广泛重视。近几年来,科学工作者对无标记转基因技术进行了研究,并在一些植物上取得了成功^[40,41]。同时在十字花科植物也取得了一定的研究进展。如:1991年,Block^[40]等利用两个不同的农杆菌菌系(同时分别含有 *bar* 基因和 *nptII*, *hpt* 标记基因)一起与甘蓝型油菜下胚轴外植体共培养,进行基因转化,转化效率比两农杆菌菌系各自侵染明显提高。但该结果是否与所用的抗性标记有关有待于进一步研究。Southern blotting 和遗传分析表明有 78% 的转化株的两个不同 T-DNA 整合到了同一个位点上。1997年,Neve等^[41]利用农杆菌 C58 菌系(双重载体,一个含有 *nptII*, 一个含有 *hpt* 基因)与拟南芥叶盘和根进行共转化。结果 72% 的转化株中两个 T-DNA 以同向或不同向连锁。表明不同细菌的 T-DNA 通常整合在同一个位点。

在十字花科植物中,无选择标记基因转化系统的研究仍处于初级阶段,须进一步研究和应用。

二、转基因技术存在的问题

目前,基因转化存在主要存在转化效率低、遗传稳定性差等问题;同时也存在转基因过程中还无法预测基因的插入位点或做到基因的定点整合、外源基因可插入植物基因组的非编码区、结构基因区或调控区,易引起插入突变等问题,这也是科学家一直探索和研究的重要课题之一。近年来,许多研究者发现,转基因表达水平不稳定,原因主要是外源基因插入容易导致基因沉默,表达水平明显下降,这也成为植物遗传转化技术用于基础研究和应用研究的

严重障碍之一。除此之外,人们对有可能出现的新组合、新性状是否会影响人类健康和生物环境还缺乏全面和清楚的认识,也不能完全精确地预测一个外源基因在新的遗传背景中所产生的相互作用等问题。

参 考 文 献

- [1] 张鲁刚等,2001,植物学报:1123-1128.
- [2] Ooms G., et al., 1985, *Theor. Appl. Genet.*, 71:325.
- [3] Xiang Y., et al., 2000, *Plant Cell Rep.*, 19:251-256.
- [4] Ding L. C., et al., 1998, *Plant Cell Rep.* 17:854-860.
- [5] Roger P., et al., 2000, *Plant Mole. Biol.*, 42:819-832.
- [6] 徐淑平等,2002,植物生理与分子生物学学报,28(3):193-199.
- [7] Cho H. S., et al., 2001, *Plant Cell Rep.*, 20:1-7.
- [8] Wang G. I., et al., 2002, *Acta Botanica Sinica*, 44(8):951-955.
- [9] Cao J., et al., 1999, *Molecular Breeding*, 5(2):131-141.
- [10] 朱常香等,2001,植物病理学报,31(3):257-264.
- [11] Zhang F. L., et al., 2000, *Plant Cell Rep.*, 19:569-575.
- [12] Dagmar W., et al., 1998, *Molecular Breeding*, 4(1):39-46.
- [13] Jelenska J., et al., 2000, *Plant Cell Rep.*, 19:298-303.
- [14] Leclere S., et al., 2001, *Plant Mole. Biol.*, 46:695-703.
- [15] Legue V., et al., 1994, *Physiologia Plantarum*, 91:559-566.
- [16] Cogan N., et al., 2001, *Plant Cell Rep.*, 20:755-762.
- [17] Fukuoaka H., et al., 1998, *Plant Cell Rep.*, 17:323-328.
- [18] Elizabeth J. V., et al., 1995, *plant cell, tis and organ cul.*, 40:97-100.
- [19] Chen J. L., et al., 1994, *Molecular Breeding*, 889:187-192.
- [20] Timothy D. M., et al., 1995, *Plant Cell Rep.*, 15:287-292.
- [21] Kren F. A., et al., 1982, *Nature*, 296:72.
- [22] Allan W., et al., 1997, *Plant Mol. Biol.*, 34:913-922.
- [23] Arundhati M., et al., 1991, *Plant Cell Rep.*, 10:375-379.
- [24] Volodymyr V., et al., 2002, *Physiologia Plantarum*, 114:492-438.
- [25] 余建明等,2000,江苏农业学报,16(2):79-82.
- [26] Rouan D., et al., 1991, *Plant Cell Rep.*, 10:139-143.
- [27] Christey M. C., et al., 1997, *Plant Cell Rep.*, 16:587-593.
- [28] Cao M. Q., et al., 2000, *Molecular Breeding*, 6:67-72.
- [29] Puddephat I. J., et al., 2001, *Molecular Breeding*, 7:

- 229-242.
- [30] Li X. B., et al., 1995, *Plant Cell Rep.*, **15**:97-101.
- [31] Puddephat I. J., et al., 1999, *J-Hortic-Sci-Biotech.*, **24**:714-720.
- [32] 张海燕等, 1999, *中国激光*, **26**(11):1053-1056.
- [33] Halfhill M. D., et al., 2001, *Theor. And Appl. Gene.*, **103**:659-667.
- [34] Seil J., et al., 1995, *Plant Cell Rep.*, **14**:620-625.
- [35] SHEN Y. G., et al., 2002, *Acta Botanica Sinica*, **44**:956-962.
- [36] Michael W. L., et al., 1995, *Plant Mole. Biol.*, **109**:1389-1394.
- [37] Henzi M. X., et al., 2000, *Plant Cell Rep.*, **19**:994-999.
- [38] Pius P. K., et al., 2000, *Plant Cell Rep.*, **19**:888-892.
- [39] 徐淑平等, 2002, *植物生理和分子生物学报*, **28**(4):253-260.
- [40] Block D., et al., 1991, *Theor. Appl. Genet.*, **82**:257-263.
- [41] Neve D. M., et al., 1997, *Plant J.*, **11**:15-29.

科学史简介

基因回眸与展望

崔映宇

(中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要 回顾基因由萌芽、产生到不断完善的过程,阐述其在不同历史时期的内涵与外延,结合遗传学的发展谈人们对其认识的不断深化,并联系学科发展前沿和最新研究成果展望其发展趋势。

基因是遗传学最基本的概念,1909年, Johannsen W. L. 首次提出,泛指控制生物性状、又按孟德尔规律传递的遗传因子。分子遗传学建立后,又被定义为“具有特定遗传效应的 DNA 片段”。近一个世纪来,随着技术进步和研究的深入,基因在内容和形式上不断完善,尤其是人类基因组计划实施以来,又被赋予新的内涵。因此回顾其产生和发展的历史,把握其与时俱进的脉络,并展望其前景颇有意义。

一、萌芽

基因的产生和发展离不开生产实践。19世纪中叶,孟德尔(Mendel G.)通过对豌豆杂交长达8年的观察和总结,于1865年报告了其结果,翌年发表了题为“植物杂交实验”的论文,首次提出遗传因子控制生物性状假说,并揭示其传递规律——孟德尔定律^[1]。他所指遗传因子,即基因的萌芽。

二、产生

1900年, H. de Vries, C. Correns 和 E. Tschermak Von 分别在月见草、玉米和豌豆的杂交实验中

证实孟德尔定律,标志着遗传学的诞生。1906年, Bateson W. 正式提出“遗传学”概念。1909年, Johannsen W. 用“基因”取代“遗传因子”,提出“基因型”和“表现型”,强调表现型是基因型和环境相互作用的结果^[2]。这表明自“基因”问世起,人们就注意从事物间的互作和联系来研究它。此时,“基因”仅是一个抽象的符号。

三、经典基因概念的确立^[3]

基于杂交实验中遗传因子的行为与配子形成和受精过程中染色体的行为完全平行,1903年, Sutton W. 和 Boveri T. 大胆假设,认为遗传因子位于染色体上,催生了细胞遗传学(cytogenetics)。

1910年, Morgan T. H. 等发现控制果蝇白眼突变性状的 w 基因 X 连锁现象,提出“特定基因与特定染色体上的特定位置相连锁”的观点,即“摩尔根连锁规律”,证明“基因线性排列在染色体上,并占据一定位置”,绘制出标示基因在染色体上位置的“染色体图”,正式建立“染色体遗传理论”,细胞遗传学