

合时的具体作用和卵母细胞的激活机理, fertilin 在顶体反应时是否具有结构上的变化以及 α 和 β 亚基的糖基在受精时是否具有作用等。

摘 要

精子头后部(或赤道区)表面 fertilin 糖蛋白由相关的两个跨膜亚基 α 和 β 构成异二体形式。这两个亚基前体均含有金属蛋白酶区(metalloprotease domain)和整联蛋白配体区(disintegrin domain), 属于 ADAMs gene 家族。 α 和 β 前体分别在睾丸和附睾中从上述两区域连接处水解后, 得到成熟型亚基。受精时, 穿过透明带的顶体反应后精子借助 β 亚基的 disintegrin 肽段与卵母细胞表面的整联蛋白结合, 同时 fertilin 结构发生变化, 暴露出 α 亚基上潜在的融合肽段(90-111aa), 并介导精子与卵母细胞发生质膜融合, 最终完成受精过程。

参 考 文 献

- [1] Myles DG & P Primakoff. 1997. *Biol Reprod.* **56**:320-327.
- [2] Primakoff P. et al., 1987, *J Cell Biol.* **104**:141-149.
- [3] Blobel CP. et al., 1992, *Nature.* **356**:248-252.
- [4] Myles DG. 1993, *Dev. Biol.* **158**:35-45.
- [5] Yanagimachi R. 1994. In *Physiology of Reproduction*. Ed. By Knobil E. & JD Neill. pp. 189-317. Raven Press. New York.
- [6] Evans JP et al., 1995, *J Cell Biol.* **108**: 3267-3278.
- [7] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.*, **187**:79-93.
- [8] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.* **187**:94-106.
- [9] Arts EGJM et al., 1997, *Biochem J.* **325**: 191-198.
- [10] Diza-Perez E & S Meizel. 1992, *Mol Reprod Dev.* **31**:122-130.
- [11] Yuan RY et al., 1997, *J Cell Biol.* **137**:105-112.
- [12] Wolfsberg TG et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:10783-10787.
- [13] Wolfsberg TG et al., 1995, *Dev. Biol.* **169**:378-383.
- [14] Cowan AE & DG Myles. 1993, *Dev. Biol.* **155**:124-133.
- [15] Hunnicutt GR. et al., 1997, *Dev. Biol.* **191**:146-159.
- [16] Lum L & Blobel CP 1997, *Dev. Biol.* **191**: 131-145.
- [17] Waters SI & JM White. 1997, *Biol Reprod.* **56**:1245-1254.
- [18] White JM et al., 1992, *Science.* **258**:917-924.
- [19] Rooke J et al., 1996, *Science* **273**:1227-1231.
- [20] Perry AC et al., 1994, *Biochem Biophys Acta.* **1207**:134-137.
- [21] Cho C et al., 1996, *Genomics.* **34**:413-417.
- [22] Hynes RO et al., 1992, *Cell.* **69**:11-25.
- [23] Wolfsberg TG et al., 1995, *J Cell Biol.* **131**:(2)275-278.
- [24] Takako Yagami-Hiromasa et al. 1995, *Nature*, **377**:652-656.
- [25] Myles DG. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:4195-4198.
- [26] Almeida ECA. et al., 1995, *Cell.* **81**:1095-1104.
- [27] Sutherland AE et al., 1993, *Development.* **119**:1175-1186.
- [28] Muga A et al., 1996, *Biochemistry.* **33**: 4444-4448.
- [29] Martin I & JM Ruyschaert. 1997, *FEBS Lett.* **405**:351-355.
- [30] Perry ACF et al., 1996, *Biochem.* **307**:843-850.

用示踪技术研究视神经再生细胞学的新进展

王 子 仁

(兰州大学生物系 兰州 730000)

鱼类和两栖类成年动物的视神经, 作为中枢神经的一部分(来源于胚胎的神经管), 已被

电生理学和解剖学的实验证明具有再生的能力^[1,2]。当其视神经被损伤后, 经过 3 至 6 个

月,视神经可再生回到其靶组织——顶盖,形成与正常动物一样的视网膜—顶盖投射。由于鱼类取材方便,易于饲养和繁殖,并且可以在其视网膜和顶盖上进行各种切除和移植手术,所以鱼类的视网膜-顶盖系统已成为研究视神经再生最常用的动物实验模型。

视神经再生中细胞学研究在很大程度上依赖于示踪方法和其他技术的发展。随着神经细胞示踪方法和其他技术的不断发展,结合光镜和电镜技术,对神经细胞整体及其终末的精细结构,神经纤维投射和神经细胞间突触连接构筑的研究更准确翔实,为正常的和再生的视网膜—顶盖投射的形成,中枢神经系统的再生和神经网络的构筑,以及神经功能的研究提供更精确和丰富的基础理论知识。

一、视神经再生细胞学研究的简短历史回顾

自从 Sperry 于 1944 年用电生理学的方法证明鱼类的视神经具有再生的能力后,对视神经再生的细胞学研究相继开展。放射自显影的示踪方法很快被用于金鱼视神经再生的研究^[3]。到本世纪 70 年代,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)被首次用于长距离标记神经元的投射^[4],这一方法经不断改良已被广泛地用于神经元的顺行和逆行标记,它既可用于光镜,也可用于电镜研究,为神经细胞超微结构的研究提供了极大的帮助。辣根过氧化物酶示踪技术也很快被直接地和间接地结合免疫组织化学方法用于视神经再生中视网膜—顶盖投射的研究^[5]。早期的形态学研究纠正了电生理学研究提出的再生从一开始就遵循正常的视网膜—顶盖投射进行的观点,证明视神经再生的过程与发育的过程相似,分为早期视神经纤维的过度增生和晚期的精确化两个时期,在再生早期有相当一部分神经纤维是沿着错误的路径投射到顶盖上。在晚期的精确化过程中,分布于错误路径和区域的神经纤维消失,形成正常的视网膜—顶盖投射。

上述的方法尽管至今仍被使用,但在同时满足神经细胞学多种研究的需要时都存在一定的局限性。如在同一个实验材料中既要研究固定的组织,同时又要研究活体内或组织细胞培养中活的神经细胞;既要研究整装的组织或器官中神经细胞的全貌,同时又要研究切片标本中神经细胞的显微和亚显微结构。而上述方法往往仅能同时完成其中的一两项。

二、DiI 及其同族示踪物

在 80 年代中期,一种长链亲脂类的碳花青(carbocyanine)荧光染料 DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate)被首次报道用于神经细胞学的研究。此后其同族示踪物 DiO, DiS 等也相继被研制出来,并很快被应用于神经细胞学的研究。它们的基本化学结构如下图所示(图 1)。

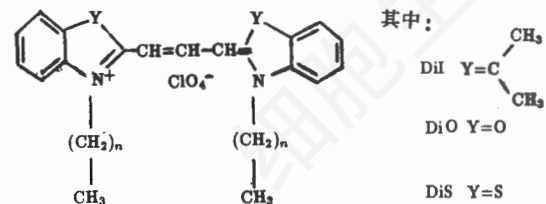


图 1 碳花青染料的化学结构,其中 $n=17$ 。Y 位置的基团决定染料的类型(DiI, DiO 和 DiS)

这些碳花青染料(DiI, DiO 和 DiS)在标记神经细胞中具有的共同特点是:(1)它们标记细胞质膜,对体外培养的神经细胞能明亮地标记细胞体和细长的突起,对生长的神经突起末端生长锥(growth cones)具有的板状伪足和丝状伪足等最精细的结构都能清楚地显示出来。(2)在活体内和已固定的组织中进行顺行和逆行标记,向细胞体注射染料可顺行标记到离细胞体较远的神经细胞突起;也可向细胞突起注射染料经较长距离逆行地标记细胞体。(3)标记物只沿细胞质膜扩展,而不会扩散到相邻的神经细胞。这一点在神经细胞学的研究中极为重要,因为这样就可以显示出单个神经细胞

的形态和传导途径。(4)与其他荧光染料相比,它们可以较长时间保持荧光,组织培养的神经细胞荧光至少可以保持两周,在三周半后标记的荧光减弱成为不可检测的^[6]。但也有报道,DiI 在成体的神经系统中作为一种活体的逆行标记物可保持荧光长达九个月之久^[7]。

标记已固定的组织与标记活细胞相比,在同样的组织中标记相同的距离所需的时间要长得多。例如 DiI 在活体中标记移动速度每天可达 6mm,标记四天可以延长到 2—3cm。而在已固定的组织中标记相同的距离则需要数周,数月或更长的时间。最近已研制出快速 DiI (fast DiI),它在已固定的组织中标记的速度大大加快,原来需要数月才能标记的材料,现在仅需数周即可;但是与活体内标记相比其速度仍然较慢。在已固定的组织中进行标记也具有一定的优点,因为已固定的组织可以保持足够长的时期,可以保证染料标记移动所需的时间,这样就能标记一些处于组织深处的,通常不易直接染色的神经细胞和纤维。另外,在已固定的组织中即使标记很长时间也不会象在活体中那样,由于细胞的作用而内化(internailization),形成一些颗粒而使图像变模糊。在已固定的组织中标记的神经细胞及其突起可以一直保持清晰均一的细胞膜的标记形式。

三、DiI 类示踪物在视神经再生细胞学研究中的应用

1. 用 DiI 标记对视神经再生进行更精确的形态学研究

过去用辣根过氧化物酶(HRP)标记早期再生的视神经纤维,通常将染料颗粒放置在视神经中,标记的神经纤维数量较多。由于在视神经损伤位点处发生出芽生长,神经纤维数量增加 4—5 倍,在顶盖上标记的神经纤维数量大大增加,因此不易分辨单个的神经纤维及其分支。即使用显微注射标记,因标记的神经纤维呈黑色,反差小,不利于观察。

DiI 及其同族示踪物通常可溶于纯酒精,

二甲亚砜(DMSO)或其混合物,也可溶于二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)。这种溶液可以象 HRP 那样直接注射标记,也可将其结晶的染料颗粒放置于组织中标记。我们借助显微微量注射器,每次仅注射 1—2nl 的染料溶液,这样就可保证标记少数或单个的神经细胞或纤维,可以精确地观察正常的神经纤维在顶盖投射的分布及其终末分支的形态学,特别有利于观察早期再生的视神经纤维在顶盖上的分布。

(1) 金鱼正常视神经纤维的形态学研究

主要发现标记的相邻视网膜神经节细胞的轴突(视神经纤维),在顶盖上投射的终末分支相互重叠^[8],虽然目前对这种重叠现象与视觉功能之间有什么关系尚不清楚,但是根据生物的结构与功能的关系,可以肯定这种特殊的形态结构与视觉功能之间存在某种联系。另外,用 DiI 标记的神经纤维的分布路径,投射的位置,终末分支的大小和形态学与其他标记方法所得的结果完全一样。

(2) 金鱼视神经再生过程的细胞学研究

在再生早期由于损伤位点处发生出芽生长,神经纤维数量增加,已往的研究认为在前三个月增加了四倍。现在通过 DiI 标记后,在顶盖的特定区域定量统计结果表明,在六周前再生的神经纤维数量逐渐增多,在第六周最多,增加了 4.2 倍,此后逐渐减少。表明增加的再生纤维生长速度不同,消失的速度也不同。过去认为,在损伤视神经六周后,视神经纤维经过精确化过程,逐渐形成正常的视网膜-顶盖投射。DiI 标记的研究发现,在再生早期,视神经纤维形成的分支的大小(前后轴×背腹轴)较大,主要是近侧端出现探测性侧支。此后因为近侧端的分支逐渐减少,远侧端的分支增多,视神经纤维分支的大小逐渐缩小,变为正常。因此认为在视神经再生早期就存在一种修整的过程,即在再生的视神经纤维到达顶盖后其细胞学形态就开始不断的进行调整。

在再生的晚期,到达顶盖靶区的相邻视神

范国昌 张中林*

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

沈桂芳

(中国农科院生物技术研究中心 北京 100081)

植物细胞中,遗传物质存在于这三个细胞器:细胞核、叶绿体和线粒体。向细胞核中导入外源基因的技术,已经非常普遍的应用于作物

改良的基因工程和植物分子生物学的研究及实

*浙江大学生物科学与技术系博士研究生

践中。然而,叶绿体的遗传转化研究却起步较晚;近几年来,这项研究工作正显示出旺盛的生命力,日益受到越来越多的科学家的广泛关注。本文主要就叶绿体遗传转化的特点、原理、方法以及理论和实践意义等方面作一综述。

一、叶绿体的分子生物学特点

在叶绿体中存在有独立于核 DNA 的遗传物质,即环状叶绿体基因组。其最显著的特点是含有反向重复序列 IR,大小约为 6—67kb 之间。两个 IR 序列把环状叶绿体 DNA 分成两个部分,即大单拷贝区 LSC(10—85kb)和小单拷贝区 SSC(10—20kb)。反向重复序列的大小决定了绝大部分植物叶绿体 DNA 的分子量。

在叶绿体基因组中,具相同或相关功能的基因组成复合操纵子结构。这一特点有利于叶绿体基因的表达与调控。例如 *rpoB-rpoC-rpoC₂* 操纵子是由编码 RNA 聚合酶的各个亚基的基因聚合在一起而成的;而 *psbI-psbK-psbD-psbC* 操纵子则编码 PSII 的蛋白质。

除上述特点外,叶绿体作为植物分子生物学的研究对象还具有诸多方面的优越性:

1. 便于外源基因定位整合

由于叶绿体基因组的遗传背景非常清楚,而叶绿体转化又是通过载体上的同源片段与叶绿体基因组相应的同源片段发生双交换后,将外源基因定位整合到叶绿体基因组中,所以外源基因插入的位置决定于构建转化载体时所选取的同源片段。但到目前为止,外源基因在细胞核转化中达到定位整合的目的还无法实现。

2. 基因为多拷贝,表达量高

植物细胞中含有多个叶绿体,而每个叶绿体中又含有多个基因组拷贝。以显花植物为例,显花植物的每个叶肉细胞中约有 100 个叶绿体,而每个叶绿体中又含有 100 多个质体基因组拷贝。如果将外源基因导入叶绿体基因组中,并达到同质化,该基因在细胞内的拷贝数将增加到大约 10000 个^[1]。增加基因拷贝数并结合使用叶绿体中表达的强启动子,可以大大提高

该基因的表达量^[2]。同时大多数叶绿体基因都以多顺反子为转录单位,产生多顺反子 mRNA 来合成蛋白质,所以由一个启动子引导下的多个外源基因可以同时也在叶绿体中得到表达。这有利于向叶绿体中引入新的成套合成途径和改变叶绿体的物质代谢方向。已有试验证明利用噬菌体 T₇RNA 聚合酶在烟草叶绿体中可以高水平表达由噬菌体 T₇基因 10 启动子控制下的 β -葡萄糖苷酶(GUS)基因的表达。使 GUS 在成熟叶片组织中占全部可溶性蛋白的 20%—30%。在核转化中不仅无法实现多顺反子表达,而且拷贝数的增加并不意味着外源基因表达量的提高,有时甚至呈负相关。

3. 导入的外源基因性状稳定性高、安全性好

外源基因的定位整合确定了外源基因插入叶绿体基因组的位置,使由同一个转化载体转化得到的不同转基因植株之间具有相同的转化叶绿体基因组。因而消除了核转化中存在的“位置效应”^[3]。另外叶绿体遗传方式是母系遗传,即母本的叶绿体基因组直接传给子代,不存在核基因组在后代中性状分离的现象,所以一旦得到叶绿体稳定转化植株,其自交后代应当全部是转化纯系。这一特点还决定了性状不会通过花粉进行传递,更有利于环境保护。

4. 直接表达原核基因

叶绿体基因组的遗传表达体系具有原核性^[4]。其基因组基因的排列方式,调控方式,GC 碱基对含量以及翻译所偏爱的密码子与原核生物相接近,这有利于来自原核生物的基因(如 Bt 毒蛋白基因,固氮 Nif 基因)的直接高效表达。不仅如此,叶绿体基因组同时具有某些真核基因组的特点,如叶绿体基因组某些基因存在有内含子和 RNA 编辑等现象,所以叶绿体也有可能直接表达来自真核生物的基因。

5. 育种快、省时省钱

由于叶绿体转化对转化所需的原核基因无须进行全面改造(如核转化中,增加其密码子的 GC 含量),外源基因的定位整合和转化后性状

稳定快等特点,要获得稳定转化外源基因的植物品种,相对核基因转化来说容易、快捷,可以节省大量经费和时间,加快育种速度和缩短品种换代周期。

二、叶绿体遗传转化的基本原理、方法和技术

叶绿体中存在遗传物质 DNA,为进行遗传操作,实现外源基因的转化提供了先决条件。外源基因进入到叶绿体基因组的原理十分简单,它利用 DNA 片段同源重组机制,经双交换将插入在同源片段之间的嵌合外源基因整合到叶绿体基因组中(图 1)。如果同源片段位于基因组的重复序列区内,整合到其中一个拷贝上的外源基因通过拷贝纠正作用(Copycorrection)使两个重复序列保持相同。转化基因组拷贝进一步地与未转化拷贝发生分子间的重组,使转化 DNA 在叶绿体内扩增,直到在选择压力下转化子占优势。

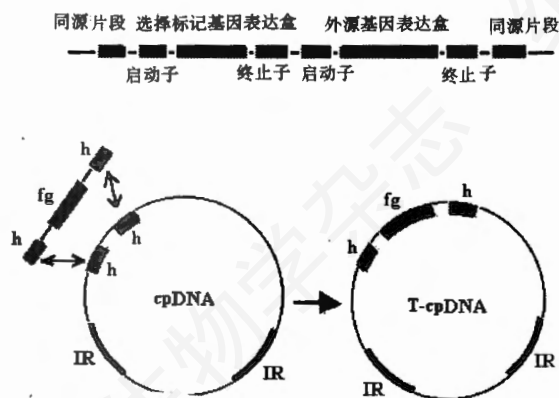


图 1 叶绿体转化载体的基本元件以及外源基因在叶绿体基因组中的插入

cpDNA: 叶绿体 DNA; T-cpDNA: 转化后的叶绿体 DNA; IR: 反向重复序列; fg: 外源基因; h: 同源片段

嵌合外源基因需要有能在叶绿体起作用的启动子和终止子,才能保障整合后外源基因的有效表达和高效表达^[5]。其次,还要有源于所要插入的叶绿体基因组位点上的同源片段,同源片段的长度大约需要 1kb 左右,据报道较长的同源片段有利于同源重组的发生^[6]。此外,选择

标记基因的选择,是影响高等植物叶绿体成为外源基因受体的主要困难;是影响转化效率,获得稳定转化植株的关键因素。

目前,在叶绿体遗传转化的研究中所采用的选择标记基因有以下几种:① 叶绿体基因突变引起的抗生素的抗性。例如:壮观霉素、链霉素、卡那霉素的抗性来自于 16S rDNA 和 23SrDNA 上不同位点的突变^[7-10];② 细菌编码的壮观霉素/链霉素的 *aadA* 基因^[11,12];③ 细菌编码的卡那霉素抗性基因 *kan/neo*^[13];④ 除草剂抗性基因^[14,15]。

在叶绿体遗传转化的方法和技术上,国外许多学者曾先后尝试过^[16-23]:① 农杆菌介导的转化法;② 基因枪转化法;③ 微注射法;④ UV 光束法;⑤ 玻璃珠搅拌法;⑥ 电激法以及 PEG 法等。这些叶绿体转化方法中,基因枪法转化频率高,重复性好,而且可以转化从单细胞再生的植物,因而此方法是叶绿体遗传转化中最常用的 DNA 导入技术。

三、叶绿体遗传转化的研究进展及现状

叶绿体作为遗传物质载体的研究源于 1909 年 Bear & Correns 对高等植物花斑病的研究,他们观察到非孟德尔遗传现象,并推测叶绿体中含有遗传物质。1954 年后 Sager 等人通过藻类的研究揭示了叶绿体母系遗传的规律。1962 年,电子显微镜技术的发展确证了叶绿体 DNA 的存在。1975 年 Kolodner & Tewari 第一次纯化得到完整的叶绿体基因组。

70 年代后期逐渐发展起来的基因克隆重组和 DNA 序列分析技术,使叶绿体基因组的研究得到迅速发展。1976 年玉米叶绿体 DNA 的物理图谱首次被建立^[24];1977 年第一个叶绿体基因被克隆,这两项研究成果开辟了分子生物学研究的新领域“叶绿体分子生物学”。1986 年以来,研究人员完成了 RNA 和蛋白质基因在叶绿体基因组上的定位。自从 1986 年第一种植物 (*Nicotiana tabacum*) 叶绿体基因组全

序列被测定出来,到目前为止共有十余种植物和藻类的叶绿体基因组全序列被测定^[24]。但以叶绿体基因组作为遗传转化受体的研究起步却比较晚,与过去十余年来高等植物核转化研究不断取得的重大进展相比,叶绿体转化的研究显得大大的滞后了,直到最近才真正实现了外源基因对高等植物叶绿体的转化。这主要是受到两个因素的制约:即必需建立起一个成功的转化方法,使得供体 DNA 能够穿越细胞质中的叶绿体的双层膜;转化子能够在高背景的非转化子中占一定的比例,这是由于单个叶绿体中就含有数十甚至更多的叶绿体基因组,而每个高等植物细胞中的叶绿体数量又高达上百个,所以转化子要取代所有的非转化子就必需有一个强大的选择压^[3]。

1985 年欧洲的 Max-Planck 实验室用农杆菌 Ti 质粒载体向烟草叶绿体导入了外源基因。他们构建了嵌合基因 Pnos-Cat,以氯霉素为选择标记,并发现氯霉素抗性通过母系遗传。但他们的结果并未得到重复。直到 1988 年,美国哈佛大学的 Chueng 等用间接的方法成功地实现了叶绿体的转化^[25]。

1987 年, Sanford 和 Klein 等人发明的微弹轰击法(biolic)使得外源基因穿透叶绿体的双层膜成为可能。1988 年, Boynton 及其合作者利用基因枪法首次直接用野生型的叶绿体 DNA 转化单细胞生物-衣藻的突变体,证明了植物叶绿体基因组是可以被转化的^[16]。Takahashi^[26]等利用同源重组的原理,结合基因枪法,将编码光系统 I 中的铁硫蛋白的 *psaC* 基因,直接转化了衣藻叶绿体。此后有了一系列关于衣藻叶绿体转化以及利用衣藻叶绿体转化体系所进行的叶绿体基因的表达与调控的研究报道。

而高等植物的叶绿体转化主要是在模式植物——烟草中进行了研究。1990 年, Svab 等首次成功地转化了烟草叶绿体基因组,获得了稳定表达^[27]。Guang-ning Ye^[28]用基因枪法得到了叶绿体的瞬间表达。1991 年, Venkate^[22]等

用 T-DNA 和 PEG 介导的方法,对烟草的叶绿体进行了直接的转化,也获得了瞬间表达。Daniell^[29]等也在小麦的叶片和愈伤组织的叶绿体中得到了报告基因 GUS 的瞬间表达的结果。

1992 年以来,美国 Rutgers 大学的 Maliga 实验室的工作尤其引人注目。他们选用 16S rDNA 区域的较大片段作为供体 DNA,除了壮观霉素(Spc)选择性抗性标记外,还附带了 6 个非选择性标记,证明长片段比小片段的同源 DNA 转化烟草叶绿体基因组,可以使转化效率提高 100 倍,并且获得了 2 个叶绿体转基因同源株系,叶绿体基因组 100% 得到转化。从分子水平上,揭示了供体 DNA 整合至烟草叶绿体基因组的本质。1993 年又利用基因枪法将源于细菌的 *uidA* 基因(编码葡萄糖苷酶 GUS)整合到烟草叶绿体基因组的 25kb 反向重复序列中^[30],证实了 *uidA* 基因能在质体转化株中高效表达,其表达产物——葡萄糖苷酸酶可积累至总蛋白含量的 2.5%,并表现出稳定的母系遗传。而 *uidA* 的核转化株中, GUS 的积累量要低得多,只占植物总蛋白的 0.1%。他们进一步将细菌来源的 *aadA* 基因(壮观霉素抗性基因)作为转化烟草叶绿体基因组的选择标记基因,大大提高了转化频率,使烟草叶绿体基因组转化真正成为现实^[11,30]。目前他们的转化频率已经达到每枪获得一个转化子的高效率。

近来又有报道,将含有外源基因的非抗性标记载体通过与抗性标记载体共转化而将外源基因导入并整合到烟草叶绿体基因组中^[31]。另外,在拟南芥(*Arabidopsis*)叶绿体中也建立了新的瞬间表达体系,使这种常用模式植物有可能应用于叶绿体遗传工程的研究中^[32]。

1995 年 P. Maliga 实验室将 Bt 毒蛋白基因和启动子 *Prn* 的嵌合基因导入到烟草叶绿体中,得到的毒蛋白原占可溶性蛋白 3%—5% 的高效表达,杀虫活性在 90% 以上。该表达量比改造后 Bt 毒蛋白基因转到植物核基因组中

的最高表达量高了 50 倍^[33]。从而在叶绿体基因工程的应用方面迈出了可喜的一步。此后,英国 Guda^[34] 等人把合成的聚(合)物基因(GVGVP)121 插入到载体质粒 pZS197 上,利用基因枪法将该载体导入到烟草叶绿体中,以此来生产有利于环境的可生物降解塑料。

1997 年,法国的 Wilfrid 等人在烟草叶绿体中成功地表达了具有活性的人血红蛋白 rHb,其表达量占总蛋白的 0.05%,并且消除了细菌源、动物源 rHb 具有的污染,显示出利用转基因植物大量提供 rHb 的潜力^[35]。

国内中国农科院生物中心沈桂芳实验室,自 1990 年创建叶绿体基因工程实验室以来,先后建立起烟草和衣藻叶绿体遗传转化体系,并把 Bt 基因、Nif 基因成功导入烟草和衣藻的叶绿体基因组中^[36-39]。

四、结 语

叶绿体转化技术的出现,为叶绿体分子生物学研究提供了强有力的工具。它可以用于研究叶绿体基因表达调控机制、核-质相互作用、RNA 拼接、光合作用等基础领域;而且在生物技术领域它也展示了广阔的前景:叶绿体可以超量表达外源蛋白,可应用于蔬菜和牧草的营养品质改良,或成为工业用酶如 α -淀粉酶、医用蛋白如抗体、生长因子、干扰素等基因工程产品的“生物反应器”^[40]。当然,基因拷贝数高不一定总能引起蛋白质产物的过量积累。必须对 mRNA 稳定性、翻译及翻译后水平的调控进行更深入的了解才能使设想成为现实。

叶绿体遗传转化技术的出现促使人们对它未来的辉煌前景作出种种美妙设想,尽管有些可能并不完全可行,但在众多有志于此的科学工作者的努力下,叶绿体基因工程的美好前景一定会成为现实。

摘 要

叶绿体的遗传转化是近几年发展起来的新

领域。本文主要介绍了叶绿体遗传转化的特点、基本原理和外源基因转化叶绿体的方法与技术;综述了国外在此方面的研究进展及最新成就,以及叶绿体遗传转化体系在基础研究和生物技术领域中的应用。

参 考 文 献

- [1] Bendich, A. J., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **6**:279-282.
- [2] Wong, E. Y. et al., 1992, *Plant Molecular Biology*, **20**:81-93.
- [3] Boynton, J. E. et al., 1993, *Methods in Enzymology*, **217**:510-536.
- [4] Grray, M. W. 1993, *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**:884-890.
- [5] Zoubenko, O. N., 1994, *Nucleic Acids Research*, **22**(14):3891-3824.
- [6] Staub, J. M., 1992, *Plant Cell*, **4**:39-45.
- [7] Boynton, J. E. et al., 1990, *Current research photosynthesis*, M. Baltschettsky ed., vol3, pp509-516.
- [8] Robin, A. Roffey et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:9122-9126.
- [9] Scott, M. Newman et al., 1991, *Mol. Gen. Genet*, **230**:65-74.
- [10] W. Sakamoto et al., 1993, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**:497-501.
- [11] Svab Z. & Maliga P. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **9**:913-917.
- [12] Erickson, J. M. 1996, *Chloroplast Transformation: Current Results and Future Prospects*, *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, pp589-619. Donald R et al(eds), Printed in The Netherlands.
- [13] 岳绍先等, 1989, *植物学报*, **32**(5):343-349.
- [14] Elisabeth, P. et al., 1991, *Plant Cell*, **3**:169-174.
- [15] Michel Gold & Schmidt Clermont, 1991, *Nucleic Acid Res.*, **19**(15):4083-4089.
- [16] Boynton, J. E. et al., 1988, *Science*, **240**:1534.
- [17] Kindle, K. L. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:1721-1725.
- [18] 刘博林等, 1987, *中国科学 (B 辑)* **7**(1):54-61.
- [19] Daniell, H. et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:88-92.
- [20] Kindle, K. L. et al., 1994, *Plant Cell*, **6**:187-200.
- [21] Weber, G. et al., 1989, *J. Cell Bio.*, **49**:73-79.
- [22] Venkate Swarlu K. et al., 1991, *Bio/technology*, **9**:1103-1105.

- [23] 邹竹荣等, 1997, 生物技术通报, 3: 16—20.
- [24] BedBrook, J. R. 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 4309—4319.
- [25] Cheung, A. Y. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 391—395.
- [26] Takabashi Y. et al., 1991, *EMBO J.*, 10 (8): 2033—2040.
- [27] Svab Z. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8526—8530.
- [28] Guang-ning Ye et al., 1990, *Plant Molecular Biology*, 15: 809—819.
- [29] Daniell, H. et al., 1991, *Plant Cell Reports*, 9: 615—619.
- [30] Timothy Golds, 1993, *Bio/technology*, 11: 95—97.
- [31] Carrer, H. et al., 1995, *Bio/technology*, 13 (8): 791—794.
- [32] Seki, M et al., 1995, *J. Plant. Res.*, 108: 235—240.
- [33] McBride, K. E. et al., 1995, *Bio/technology*, 13(4): 362—365.
- [34] Guda, C., 1996, *Plant Physiol.* 111(2), Suppl. —56.
- [35] Wilfrid, D. et al., 1997, *Nature*, 386: 29—30.
- [36] 沈桂芳等, 1996, 全英中国学生生命科学学会第五届年会报告集, 82—84.
- [37] 任延国等, 1995, 农业生物技术学报, 3(4): 78—83.
- [38] 任延国等, 1996, 农业生物技术学报, 4(1): 23—27.
- [39] 任延国等, 1997, 农业生物技术学报, 5(1): 47—53.
- [40] 范国昌等, 1998, 遗传, 20(1): 42—44.

研究工作

电离辐射对伤口巨噬细胞生长因子基因表达的影响及苯妥因钠的作用

宋述强

(广州军区广州总医院临床药理科 广州 510010)

程天民 林 远

(第三军医大学全军复合伤研究所 重庆 630038)

巨噬细胞(Macrophages, $M\Phi$)在创伤愈合过程中起重要的调节作用,耗竭伤口 $M\Phi$,创伤愈合过程受到明显阻碍,而增强 $M\Phi$ 功能能明显促进创伤愈合^[1,2]。我们先前的研究表明,在机体受到全身辐射后,伤口 $M\Phi$ 数量和功能的下降是造成愈合延迟的重要原因之一;而苯妥因钠能提高伤口 $M\Phi$ 数量和功能,促进伤口愈合^[2]。本实验以大鼠背部置入聚乙烯醇海绵的切口伤为模型,进一步研究全身和局部辐射后伤口 $M\Phi$ 血小板源性生长因子-B(PDGF-B)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) mRNA 表达的变化以及苯妥因钠的作用。

材料与 方法

1. 动物

Wistar 大鼠,雄性,218±23.5g,四川省中药研究所提供。

2. 试剂

DMEM 培养基: Gibco 公司;苯妥因钠(Phenytoin Sodium PS): 江苏省盐城制药厂;DNA-地高辛标记试剂盒及显色系统: 宝灵曼(Boehringer Mannheim)公司。

3. 创伤模型^[3]

大鼠分三大组,即单纯创伤组,全身辐射合并创伤组,局部辐射合并创伤组,每组又分生理盐水对照组和苯妥因钠用药组。全身辐射合并创伤组大鼠装在一特制的笼子里,在离⁶⁰Co源1.0米处接受 γ 射线6Gy的照射(剂量率61.64cGy,照射时间9分50秒),局部辐射合并创伤组大鼠预先麻醉后固定在一特制的铅盒子里,背部皮肤从铅盒中间裂缝拉出固定,形成2×8cm²的皮肤皱折,在离⁶⁰Co源1.0米处接受 γ 射线20Gy的照射(剂量率136.5cGy,照射时间14分48秒),这样背部皮肤形成4×8cm²的局部辐射区域。正常大鼠和辐射后(不超过4h)的大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,在无菌条件下背部切开长约7cm的全皮层