

生物弹技术在禾谷类植物基因转移中的应用

梁建生

(扬州, 江苏农学院 225001)

80年代以来, 由于高效基因载体系统和遗传转化技术的发展, 植物遗传工程取得了迅猛的进展。特别是天然基因载体系统——根瘤农杆菌(*A. tumefaciens*)的发展及改良载体系统(如 Binary 载体)的构建和可选择性标志基因的筛选, 目前可有效地将外源基因导入双子叶植物细胞和少数单子叶植物中, 并且已获得一些转化的单株^[1]。

然而, 由于根瘤农杆菌寄主范围的特异性和单子叶植物, 尤其是禾谷类植物细胞的特殊性, 使该体系的进一步应用受到了限制^[2]。尽管近年来已发展起来许多基因转移、转化技术, 如 PEG 介导的基因转移^[3]、电激基因转移技术^[4]、微注射基因转移技术^[5], 等等, 都因其存在某些尚难克服的缺点, 影响了其实际应用。最近由 Sanford 等^[6]发明的生物弹基因转移技术可克服上述一些方法的缺点, 因而越来越受到广大研究者的关注。本文就该技术的发明、特点及应用前景作一综述。

一、生物弹基因转移技术的发明及作用特点

生物弹基因转移技术(Biolistic Process)又称高速粒子微喷射技术(High-velocity Particle Microprojection)或基因枪轰击技术(Gene gun bombardment)是由美国 Cornell 大学的 Sanford、Wolf 和 Allen 三人通力合作于 1984 年首先发明的。他们花了数年时间, 应用已有的各种基因转移技术, 试图将外源 DNA 导入植物花粉以直接产生转化单株, 但没有获得成功。后来他们利用高能离子束可在胞细壁上击孔的

原理将 DNA 直接射入细胞, 但由于 DNA 的密度低且比较脆弱, 这种设想似乎不可实现。然而他们从中得到了启发, 他们一面选用金属钨、金等固体微粒, 将 DNA 吸附在这些微粒表面, 继而用高压放电装置加速这些微粒, 使它们以很高速度直接轰击植物细胞, 击穿胞壁, 从而使吸附的 DNA 随金属微粒射入细胞。

同时, 他们选用细胞大, 且易获得的洋葱表皮组织作为研究对象。这是至关重要的, 因为洋葱表皮组织由体积较大的细胞组成的单层细胞, 它不但可用简单的光学显微镜技术很容易检测到固体微粒射入细胞的情况, 而且还可利用细胞质流动直接估计微粒射入后细胞的存活率。经过三年多的努力, 终于发明了生物弹基因转移技术^[7]。

二、生物弹介导的核酸转移及被转移核酸在细胞内的表达

为了证明核酸是否能通过生物弹基因转移技术射入细胞以及核酸进入细胞后是否有较高的生物活性, 即是否能得到表达, Klein 等(1987)使从 TMV(烟草花叶病毒)中分离到的 RNA 吸附到钨金属固体微粒表面, 然后高速轰击洋葱表皮细胞, 用显微镜检查受体细胞中是否含有病毒内含体以确定 TMV RNA 是否得到了表达。结果表明, 这技术能有效地将 TMV RNA 导入洋葱表皮细胞内, 并且病毒 RNA 在 30—40% 的受体细胞中得到表达, 此值和用电激基因转移技术^[8]或脂质体基因转移技术^[9]转移 TMV RNA 的效率相近。

生物弹技术也能将 DNA 转移到植物细胞

内,并且可得到瞬时或稳定的表达。用吸附带有编码 CAT 基因的质粒 P_{35S}-CAT 的钨固体微粒轰击 1 cm² 洋葱表皮组织,发现这些细胞内 CAT 的活性相当高,而在对照细胞中则无 CAT 活性^[7]。

这些结果表明,生物弹基因转移技术可将外源 RNA 或 DNA 导入完整的细胞,导入的核酸可在细胞内得到表达。

三、生物弹技术在禾谷类植物 基因转移上的应用

由于生物弹技术克服了现有利用原生质体^[10]和根癌农杆菌^[11]所固有的特点,因此,越来越受到研究者的重视。

那么生物弹基因转移技术是否能同样有效地应用于农业生产上重要的作物,特别是禾谷类作物呢? Klein 等(1988 a, b)^[12,18]首先将此技术应用于禾谷作物——玉米上。他们用 1 μm 大小吸附有编码 CAT 基因质粒 DNA 的钨微粒轰击悬浮的玉米细胞,在被轰击的细胞中测定到了非常高的 CAT 活性,这一活性与用同样质粒轰击过的洋葱细胞中测到的活性相近。

为了进一步证明用该技术对禾谷类植物细胞外源 DNA 的转移和表达效率, Klein 等(1989)应用带有编码 NPT II 和 GUS 标志基因的质粒 DNA 钨微粒轰击玉米细胞,然后从这些细胞中选择抗卡那霉素的愈伤组织。根据 Southern 印迹分析,这些愈伤组织中都带有 NPT II 和 GUS 基因^[14]。应用同样的分析方法证明这一技术也同样适用于水稻、小麦^[15]及大麦^[16]。这些结果说明该技术能将外源 DNA 转移入禾谷类作物细胞,并能得到瞬时或稳定的表达。不但如此,该技术能转化各种植物组织,如胚生成性细胞悬浮液^[12,17]、分生组织^[18]、胚、下胚轴、子叶、叶圆片、愈伤组织和细胞悬浮液^[9]。

四、生物弹基因转移技术在其他方面的应用

生物弹技术不仅能将外源核酸(DNA 或

RNA)导入禾谷类植物细胞或小组织块,还可以用来转化细胞器特异的基因组。Boynton 等(1988)^[19]的结果证明生物弹技术可转化衣藻(*Chlamydomonas*)的叶绿体,这是可重复地转化叶绿体的首例报道。以后不久,Johnston 等(1988)^[20]利用这一技术成功地转化了酵母线粒体。生物弹技术可转化细胞器的能力在植物生物工程和一些基本生理生化过程的研究方面具有非常重要的意义。因为许多重要的基因产物,如对除草剂阿特拉津(Atrazine)敏感或具抗性的蛋白质是由细胞器如叶绿体或细胞核基因组编码,并在这些细胞器或其他细胞器内合成和发生作用的^[21,22]。因此,生物弹基因转移技术为进一步研究细胞器的功能、调节基因的表达或鉴定未知基因等提供了一种有效的手段。最近这方面的研究进展很快^[17,23]。

五、展 望

与其他基因转移技术相比,生物弹基因转移技术有许多独特的优点:1. 操作简便,迅速,可在较短时间内完成整个导入过程。每培养皿板只需不到 5 分钟,且所需 DNA 量很少(每培养皿板需不到 1 μg)^[24];2. DNA 转移效率高。Klein 等(1988 a, b)利用植物细胞悬浮液作受体细胞,应用兰斑分析法(blue-spot assay)观察到 GUS 瞬时最高表达效率为每培养皿板上有 1000—2000 个兰斑;3. 对受体细胞的正常生命活动影响较小;4. 适用性广,不但适用各种植物,也适用于植物不同组织、器官,而且在细胞器转化方面也有应用潜力。因此, Potrykus(1990)^[25]认为,尽管目前此技术尚未在禾谷类作物上获得转基因植株,但它具有很高的应用潜力,可望成为禾谷类作物基因转移的常规实验技术。此技术在禾谷类作物未获得转基因植株可能与下列因素有关:(1) 外源 DNA 的整合、转化频率低且不稳定。我们知道 DNA 整合转化的频率取决于被转移 DNA 的浓度,如这个浓度低于一个相对高的数值,则转化频率接近于零。另外,在一个直

径仅为0.4—2 μ 的金属微粒上转移足够的DNA似乎是困难的,加上吸附在粒子表面的DNA释放过慢也会影响其转化频率;(2)要获得转移基因植株,受体细胞必须具有整合、转化、无性繁殖及再生等诸能力,而这样的细胞在禾谷类植物中相当少;(3)即使外源DNA在一些完整植物组织的某些细胞中得到了瞬时的表达,但这个转基因嵌合体要稳定下来则相当不易;(4)受体细胞的生活力与射入的固体微粒呈负相关,由于固体微粒的速率很快,要有效地控制射入一个细胞的微粒数是相当困难的,尤其是在受体细胞较小,应用的固体微粒更小时影响很大。当然这些缺点会随着实验技术的不断完善,各种试验参数的标准化得到逐步解决的。

虽然,应用于禾谷类植物基因转移的技术很多,但迄今为止,只有利用原生质体的电激基因转移技术获得了成功^[3,20,27]。然而,禾谷类植物原生质体再生还存在着许多技术上的困难,要成为一个常规实验手段看来为时过早。生物弹基因转移技术正是因为克服了现有各种基因转移技术难以克服的困难,所以有可能作为基因转移的常规手段。

摘 要

近年来植物基因转移,遗传转化技术取得了很大的进展,但将外源基因导入禾谷类植物细胞,获得转基因单株的成功事例很少,这主要是因禾谷类植物细胞的特殊性和现有基因转移技术固有的缺陷所致。由Sanford等发明的生物弹基因转移技术可克服上述不足,成功地将外源基因导入细胞。本文综述了该技术的发明、作用、特点及在禾谷类植物基因转移中的应用,并分析了该技术的优缺点,认为生物弹基因转移技术可望成为实验室常规的基因转移技术。

参 考 文 献

[1] Klee, H. J. and Rogers, S. G., 1989, In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics

- of Plants (Schell, J. and Vasil, I. K. eds), Vol. 6, pp 1—23, Academic Press.
- [2] Binns, A. N., 1990, *Physiol. Plant*, 79: 135—139.
- [3] Shimamoto, K. et al., 1989, *Nature*, 338: 274—276.
- [4] Lindsey, K. et al., 1990, *Physiol. Plant*, 79: 168—172.
- [5] Gunther, N. et al., 1990, *Physiol. Plant*, 79: 213—217.
- [6] Sanford, J. C., 1988, *Trends in Biotech.*, 6: 299—302.
- [7] Klein, T. M. et al., 1987, *Nature*, 327: 70—73.
- [8] Fraley, R. T. et al., 1982, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 79: 1859—1863.
- [9] Nishiguchi, M. et al., 1986, *Plant Cell Rep.*, 5: 57—60.
- [10] Cocking, E. C. et al., 1987, *Science*, 236: 1259—1262.
- [11] Klee, H. et al., 1987, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38: 467—486.
- [12] Klein, T. M. et al., 1988 a, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 4305—4309.
- [13] Klein, T. M. et al., 1988 B, *Bio/tech.*, 6: 559—563.
- [14] Klein, T. M. et al., 1989, *Plant Physiol.*, 91: 440—444.
- [15] Wang, Y. C. et al., 1988, *Plant Mol. Biol.*, 11: 433—439.
- [16] Mendal, R. R. et al., 1989, *Theor. Appl. Genet.*, 78: 31—34.
- [17] Daniell, H. et al., 1990, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 88—92.
- [18] McCabe, D. E. et al., 1988, *Bio/tech.*, 87: 923—926.
- [19] Boynton, J. E. et al., 1988, *Science*, 240: 1534—1538.
- [20] Johnston, S. A. et al., 1988, *Science*, 240: 1538—1541.
- [21] Shah, D. M. et al., 1986, *Science*, 233: 478—481.
- [22] Gaynor, J. J. et al., 1983, *Plant Physiol.*, 72: 80—85.
- [23] Wesley, B. B. et al., 1989, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 9692—9696.
- [24] Sanford, J. C., 1990, *Physiol. Plant*, 79: 206—209.
- [25] Potrykus, I., 1990, *Bio/tech.*, 6: 535—542.
- [26] Rhodes, C. A., et al., 1989, *Science*, 240: 204—207.
- [27] Vasil, I. K., 1988, *Bio/tech.*, 6: 397—401,