

- Biol.*, 10 : 279—290.
- [3] Kinoshita, K. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 1923—1927.
- [4] Kinoshita, K. et al., 1977, *Nature*, 268 : 438—441.
- [5] Wang, Tai-Kin et al., 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107:584—587.
- [6] Langridge, W. H. R. et al., 1985, *Plant Cell Reports*, 4 : 355—359.
- [7] Fromm, M. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 5824—5828.
- [8] Riggs, C. D., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 5602—5606.
- [9] Ou-lee et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 6815—6819.
- [10] Fromm, M. et al., 1986, *Nature*, 319 : 791—793.
- [11] Hauptmann, R. M. et al., 1987, *Plant Cell Reports*, 6(1): 265—270.
- [12] Rhodes, C. A. et al., 1988, *Science*, 240 : 204—207.
- [13] Kinya Toriyama et al., 1988, *Bio/Technology*, 6 : 1072—1074.
- [14] Zhang, H. M. et al., 1988, *Plant Cell Reports*, 7 : 379—384.
- [15] Fujimura, T. et al., 1985, *Plant Tissue Cult. Lett.*, 2 : 74—75.
- [16] Rhodes, C. A. et al., 1988, *Bio/Technology*, 6 : 56—60.
- [17] Harris, R. et al., 1988, *Plant Cell Reports*, 7(5) : 337—340.
- [18] Wei, Z. and Z. Xu, 1988, *Plant Cell Reports*, 7(5): 348—351.
- [19] Hashimoto, H. et al., 1985, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 336—339.
- [20] Morikawa, H. et al., 1986, *Gene*, 41 : 121—124.
- [21] Lindsey, K. et al., 1987, *Plant Mole. Biol.*, 10: 43—53.
- [22] Mishra, K. P. et al., 1987, *Plant Sci.*, 52: 135—140.
- [23] Klein, T. M. et al., 1987, *Nature*, 327 : 70—73.
- [24] McCabe, D. E. et al., 1988, *Bio/Technology*, 6: 923—926.
- [25] Klein, T. M. et al., 1988, *Bio/Technology*: 6:559—563.
- [26] Berns, M. W. et al., 1981, *Science*, 213 : 505—513.
- [27] Tao, W. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4180—4184.
- [28] Weber, G. et al., 1987, *Eur. J. Cell Biol.*, 43: 63.
- [29] Weber, G. et al., 1988, *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 12(2): 219—222.
- [30] Rosemarie, W. et al., 1987, *J. Cell Sci.*, 88: 145—149.

电场法介导植物基因的直接转移

张 谦

(兰州大学生物系细胞研究室)

植物基因工程的目的是将外源基因或DNA片段引入植物细胞,使之发生转化,获得具有各种优良特性和抗性的新型植物。达此目标的方法主要是以载体为媒介的基因转移和直接基因转移。

农杆菌的Ti质粒和Ri质粒以及植物病毒被认为是目前较为理想的载体,并取得了一些进展^[1]。但这些载体均具有一定的寄主范围,

其中最希望的Ti质粒也因根癌农杆菌的寄主范围的限制,而不能应用于与人类关系密切的禾谷类植物,病毒的寄主范围则更狭窄。相反,直接基因转移法不需要生物载体,可普遍应用于每一种植物,因而在近几年得到了较快的发展,主要有化学诱导法(PEG、高钙高pH或多聚鸟氨酸处理)和物理法(显微注射法、激光法、电场法)等。本文主要对近几年迅

速发展起来的电场法介导的基因直接转移作→概述。

一、方法简介

电场法(electroporation, 译名有电操作、电激、电脉冲刺激、电场转移基因法、电场法等)是通过电脉冲处理将外源基因导入细胞的方法。它的基本原理是:外界的高电压短脉冲可以改变细胞质膜的结构,使膜产生可逆性的孔隙或“孔洞”,从而增加了膜对一定大小的分子(包括DNA)的通透性,创造了外源物质进入细胞的通路。它起初用于将外源DNA转入哺乳动物的培养细胞,后来被用于诱导植物原生质体的融合,现在已被用来将RNA、DNA及病毒引入植物原生质体,使之发生转化。

电场法的主要步骤是:将制备好的原生质体同基因物质混合后,加到两个电极之间的微室里,然后在一定的电压下进行短时间(μsec — msec)的交流或直流电脉冲,处理后的原生质体转到培养基中进行正常培养,选择转化体并进行分析。用于电脉冲的仪器开始主要是自制(电泳仪改建)的,现在已有商业化仪器供使用。

最近Hibi等人^[2]构建了一个具流动装置的电操作仪(Continuous flow electro-manipulator),它由样品室、装有电极的流动处理室、细胞收集室、蠕动泵、脉冲发生器等构成。由于可以连续操作,因此可进行大量的原生质体融合或转染处理。他们用此装置进行了胡萝卜、烟草、豇豆的原生质体融合与TMV-RNA(烟草花叶病毒RNA)的转染,结果表明每分钟可处理 10^5 个原生质体,20分钟可处理100 ml的原生质体悬浮液,其融合率为10%,转染率为95%,这样在1分钟内就可得到 10^6 个异核体或 10^6 个被转染的原生质体。效率之高使其其他方法望尘莫及。

二、电场诱导的DNA转移

通过电脉冲将外源DNA引入植物原生质体始于1985年,首先在烟草、胡萝卜和玉米

原生质体中取得了初步结果^[3]。将胡萝卜原生质体与质粒pCaMVCAT或pNOSCAT($10\mu\text{g}/\text{ml}$)混合后进行电脉冲处理(200 V、100 msec),然后在不同的培养时间里检测转移的标记基因的瞬时表达。实验表明,在处理后的3—96小时内均可测到CAT(氯霉素乙酰转移酶)的活性,24—48小时活性最高。用同样方法转化烟草和玉米原生质体,也检测到了转移基因的瞬时表达。

Bekkaoti等^[4]用电场法将pBI 221和pCaMVCN引入了木本植物白云杉原生质体中,并分析了外源基因CAT和 β -GUS(β -葡萄糖苷酶)在原生质体中的瞬时表达。通过电场法使荧光素酶(luciferase)基因在玉米原生质体中也得到了表达^[5]。

电场法不仅可用于研究单、双子叶植物原生质体中基因的转移和瞬时表达,还可产生稳定的转化体。

Langridge等^[6]将胡萝卜原生质体与Ti质粒pTiC 58($10\mu\text{g}/\text{ml}$)混合,并加入小牛胸腺DNA(cDNA, $50\mu\text{g}/\text{ml}$),在40 V下进行6个电脉冲,以激素自主性选择转化细胞。45天后得到了转化胚,这些胚发育成为畸形瘤,能分化有限的根和苗,瘤中有胭脂碱(nopaline)的合成。用标记的pTiC 58的T-DNA作为探针进行的分子杂交证明,T-DNA整合到了转化细胞的DNA中,转化率为 1.6×10^2 转化体/ 10^4 体细胞胚/ μg pTiC 58 DNA。实验还表明,电场处理不影响胡萝卜原生质体形成胚和再生植株的能力。

Fromm等^[7]用玉米原生质体做了进一步的实验。他们以来自转座子Tn5的新霉素磷酸转移酶基因(NPT-II)与花椰菜花叶病毒(CaMV)的35 S启动子组成的嵌合基因作为标记基因,与胭脂碱合成酶基因等一起构成复合载体pCaMVNEO,通过电脉冲引入玉米原生质体,在含卡那霉素的培养基上选择转化细胞。结果从处理的 2×10^6 个原生质体中得到了161个抗卡那霉素的愈伤组织。对这些愈伤

组织进行了 NPT-Ⅱ 活性分析和 DNA 指纹迹分析,表明在处理后 24 小时就可和原生质体中测到 NPT-Ⅱ 的活性,抗性愈伤组织的 DNA 中有 1 kb 的 NPT-Ⅱ 基因片段。在检测的 4 个转化体中,每个单倍体基因组里含有 1 至 3 个拷贝的 CaMVNEO,这说明 pCaMVNEO 顺序确已整合到了玉米细胞的染色体中,转移基因在玉米细胞中得到了表达。

Rhodes^[8]及其同事们用质粒 pDP 25 和 pMP 1 (均含有 NPT-Ⅱ 基因和 CaMV 35S 启动子)转化来自玉米胚性悬浮细胞的原生质体,结合看护培养技术得到了 38 棵基因转化的再生植株。对抗性愈伤组织、再生植株的酶活性分析以及 DNA 杂交实验证明,外源基因整合到了植物的基因组中,每个基因组里估计有少于 5 个拷贝的 NPT-Ⅱ 基因。这些转化植株均生长发育到成熟,但花粉不育,他们认为这种不育性可能与细胞系本身培养已超过两年有关。

电场法的另一个重大突破是将外源基因导入水稻原生质体中,得到了基因转化的水稻再生植株^[9]。

除玉米、水稻外,在禾本科的其他植物中也进行了电场法介导的基因直接转移的研究。Horn 等^[10]用电场法和 PEG 法将质粒 pCIB 709 引入普通鸭茅 (orchard grass) 原生质体,结果经两种方法均得到了抗 Hygromycin 的胚性愈伤组织,并再生了 90 棵形态正常的转化植株,经分析证明,外源基因 APHIV 基因 (氨糖苷磷酸转移酶基因) 确已整合到了植物的染色体中,他们没有比较两种方法的转化率。Vasi 等^[11]比较了电场法与 PEG 液两种方法 (guinea grass) 原生质体的直接基因转化结果,发现电场法处理的原生质体,其 CAT 活性高于 PEG 处理的。

Guerche 等^[12]通过电脉冲将质粒 pABDI 引入油菜原生质体,从 4×10^6 个原生质体中得到了 21 个抗卡那霉素的克隆和两棵表型正常的转化植株。对其中的一棵 (PG 20) 进行了印迹分析与后代遗传特征的分析,证明在

PG 20 的基因组中存在着 pABDI 顺序与完整的 NPT-Ⅱ 嵌合基因,从强度可知为 1 COPY/genome。后代分析表明,卡那霉素抗性已作为一个显性的孟德尔遗传特征传给了后代。来自 PG 20 的原生质体克隆对卡那霉素的抗性比对照高 100 倍。他们指出,在油菜的原生质体转化中,通过农杆菌的得到的是表型不正常、可育性下降的转化植株,用显微注射法将 Ti 质粒注入原生质体或用 CMV 直接转化原生质体,均未得到再生植株。而电场法介导的基因转移成功地再生了表型正常、不育的再生植株,这正是作物改进所需要的。

此外,用 PHP 23 转化甜菜原生质体,也得到了稳定转化的愈伤组织^[13]。

在电场法中,最重要的影响因素是电压与脉冲时间。Bates 等^[14]对胡萝卜原生质体和烟草原生质体分别进行了低电压长脉冲与高电压短脉冲的处理。当胡萝卜原生质体与 pCaMVC-AT 在 250 V/cm 下进行 8—50 msec 的单脉冲时,CAT 活性一直很低,在 750 V/cm 下单脉冲,8 msec 时 CAT 活性就达到了最高,但同时也伴随着原生质体生活力的下降。他们认为,也许在低电压长脉冲下原生质体形成的膜孔大因而使活力下降,用高电压短脉冲 (2000 V/cm, 250 μ sec) 处理烟草原生质体与 pMON 200 的混合物,得到了抗卡那霉素的愈伤组织和 53 棵再生植株。DNA 顺序分析表明,质粒 DNA 整合到了烟草细胞基因组中,整合是随机的,转化体中有各种类型的整合,有质粒 DNA 的重排,也有多个拷贝的质粒 DNA。再生植株大多不育。对两个表型正常的转化植株的后代分析表明,抗性表型的遗传遵守孟德尔法则。

除电压与脉冲时间外,原生质体的大小、培养基组分、外源 DNA 的形式与浓度对转化结果也有影响^[4,13,14,18,20]。

三、RNA 与病毒的转移

电脉冲诱导的 RNA 与病毒转移的受体系

统仍为原生质体。RNA主要来自CMV与TMV, 转染结果的测定手段为免疫荧光法。

Okada等^[16]将烟草、*Vinca rosea*的原生质体与CMV-RNA或TMV-RNA一起在0℃下进行交流电脉冲处理(200V, 1—3.2 msec), 培养24小时后进行测定, 结果有80%的烟草培养细胞的原生质体被TMV-RNA或CMV-RNA侵染, 40%的烟草叶肉原生质体被TMV-RNA侵染, 65%的*Vinca rosea*培养细胞的原生质体被TMV-RNA侵染。

Nishiguchi等^[16]用直流电脉冲处理, 也可使46%的烟草原生质体被CMV-RNA侵染, 51%的原生质体被TMV-RNA侵染。条件是: 5—10 kV/cm的场强, 90 μsec脉冲, 10 μg/ml的RNA, 原生质体悬浮于0.5 M甘露醇中。但在同样条件下, 不能使病毒颗粒进入原生质体, 如果延长脉冲时间(0.67 kV/cm, 100 msec), 就可使80—90%的原生质体被病毒颗粒侵染^[17]。这表明电脉冲造成的膜洞足以使TMV颗粒(300 × 18 nm)进入原生质体。

对水稻原生质体也进行了电转染的研究^[18]。将TMV-RNA或CMV-RNA与水稻原生质体混合后进行电脉冲, 在最适条件下(1250 V/cm), 有65%的原生质体可被CMV-RNA侵染, 但不能被TMV-RNA侵染。如果将两种RNA与水稻原生质体一起处理, 则可使15%的原生质体被TMV-RNA侵染, 同时这些原生质体也被CMV-RNA侵染。CMV在原生质体中可自我复制, 而TMV则需要CMV的帮助下才能复制。此实验表明水稻原生质体也是CMV的一个寄主系统, 这在以前还不被人们所知。看来, 电场法也可用来进行病毒侵染、外源基因表达的基础研究。

四、电融合

植物原生质体的融合可产生对称与不对称的体细胞杂种和胞质杂种, 在基因转移方面具有一定的潜力。近年来, 用电场法诱导原生质体融合也取得了很大进展。

Zimmermann^[19]从双向电泳收集细胞的现象中得到启示, 采用两个电刺激过程来诱导原生质体融合。首先用交流电进行双向电泳, 使原生质体在电极间紧密接触排列成珠链, 然后给以高电压直流短脉冲, 使互相接触的膜瞬间被击破, 随着质膜结构的迅速恢复, 原生质体间形成嵌合膜而完成融合。

Tempelaar^[20]用大麦、小麦、黄花烟草、花叶曼陀罗、蚕豆、油菜等的原生质体进行了电融合实验, 结果表明, 来自不同种、不同组织的原生质体在电场中均可高频率的融合, 融合产物的生活力不受电场处理的影响, 异核体经培养可分裂形成克隆。

Spangenberg^[21]将来自油菜原生质体的核与胞质体同完整的原生质体一起进行不同组合的电融合, 得到了各种融合产物, 有细胞重组的(核-胞质体)、核转移的(核-原生质体)、细胞器转移的(胞质体-原生质体), 各种产物经培养都形成了愈伤组织。

水稻原生质体与野生种原生质体用PEG法不能诱导融合, 而用电融合却得到了水稻与4个野生种(*O. officinalis*, *O. eichingeri*, *O. brachyantha*, *O. perrieri*)分别融合后所产生的163块愈伤组织和250棵杂种植株。通过核型、同工酶及形态特征的分析证实了它们的杂种性, 并得到了水稻与*O. eichingeri*杂种植株的后代, 另外两种杂种植株(水稻+*O. officinalis*, 水稻+*O. perrieri*)也产生了有活力的花粉^[22]。

Yang等^[23]将水稻雄性不育系的原生质体与可育系的原生质体进行电融合, 得到了7个胞质杂种植株。Tariyama^[24]从水稻不同品种的花药愈伤组织的原生质体电融合中得到了3个二倍体、6个三倍体杂种植株, 其中的二倍体植株结了种子, 其后代的分离比同于有性杂交的杂种。另外, 从水稻与稗属(*barnyardgrass*)的原生质体电融合中也得到了杂种植株^[25]。

通过电融合得到杂种植株的还有: 粉兰烟

草+郎氏烟草、马铃薯+S. phureja、茄子+喀西茄、茄子+水茄^[26]。

此外,还尝试了用电脉冲刺激将TMV-RNA引入烟草细胞和对烟草花粉进行电场处理的研究^[27,28]。

总之,电场法作为基因直接转移法具有简便、高效、迅速、适用广泛的优点。尽管人们对电脉冲处理、对细胞生长和发育的影响还知之不多,在小麦原生质体的基因转移中只检测到了很低的CAT活性^[29],但电场法在玉米、水稻、油菜、胡萝卜等作物上取得的结果还是令人鼓舞的。相信随着分子生物学的发展及其对电场法生物机制的了解和技术的完善,必定会在植物基因的直接转移上取得更大的进展。

摘 要

本文简述了近几年迅速发展的电场转移基因法。通过一系列实验结果说明该法具有简便、高效、普遍适用的特点,有可能在作物的基因转移上做出贡献。另外还涉及了植物原生质体的电融合。

参 考 文 献

- [1] 李向辉等, 1988, 植物遗传操作技术, 科学出版社。
- [2] Hibi, T. et al., 1988, *Pl. Cell Rep.* 7: 153—157.
- [3] Fromm, M. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5824—5826.
- [4] Bekkaoui, F. et al., 1988, *Pl. Cell Rep.* 7: 481—484.
- [5] Planckaert, F. V. Walbot, 1989, *Pl. Cell Rep.* 8: 144—147.
- [6] Langridge, W. H. R., 1985, *Pl. Cell Rep.* 4: 355—359.
- [7] Fromm, M. E. et al., 1986, *Nature*, 319: 791—792.
- [8] Rhodes, C. A. et al., *Science* 24: 204—206.
- [9] Totiyama, K. et al., 1988, *Bio/Technology* 6: 1072—1074.
- [10] Horn, M. E. et al., 1988, *Pl. Cell Rep.* 7: 469—472.
- [11] Vasil, V. et al., 1988, *Pl. Cell Rep.* 7: 499—506.
- [12] Guerche, P. et al., 1987, *Pl. Sci.* 52: 111—116.
- [13] Lindsey, K. M. G. K. Jones, 1989, *Pl. Cell Rep.* 8: 71—74.
- [14] Bates, G. W. et al., 1988, *Pl. Cell Ti. Org. Cul.* 12: 213—218.
- [15] Okada, M. et al., 1986, *Pl. Cell Physiol.* 27: 619—626.
- [16] Nishiguchi, M. et al., 1986, *Pl. Cell Rep.* 5: 57—60.
- [17] Nishiguchi, M. et al., 1987, *Pl. Cell Rep.* 6: 90—93.
- [18] Okada, K. et al., 1988, *Pl. Cell Rep.* 7: 333—336.
- [19] Zimmermann, U. et al., 1981, *Plant* 151: 26—32.
- [20] Tempelaar, M. J. M. G. K. Jones, 1985, *Plant* 165: 205—216.
- [21] Spangenberg, G. H. G. Schweiger, 1986, *Eur. J. Cell Biol.* 41: 51—56.
- [22] Hayashi, Y. et al., 1988, *MGG.* 124: 6—10.
- [23] Yang, Z. Q. et al., 1988, *TAG.* 76: 801—808.
- [24] Toriyama, K. K. Hinata, 1988, *TAG.* 76: 665—668.
- [25] Terada, R. et al., 1987, *MGG.* 210: 39—43.
- [26] Sihachakr, D. et al., 1989, *TAG.* 77: 1—16.
- [27] Morikawa, H. et al., 1986, *Gene* 41: 121—124.
- [28] Mishra, K. P. et al., 1987, *Pl. Sci.* 52: 135—139.
- [29] Lee, B. T. et al., 1988, *Pl. Cell Org. Cul.* 12: 223—226.