

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 B<sub>1</sub> 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<sup>[1]</sup>, 乙烯生物合成机理得到广泛、深入的研究<sup>[2,3]</sup>。90 年代以来, 乙烯信号转导研究也取得了一些进展<sup>[4,5]</sup>, 在模式植物拟南芥中已建立起 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>→ETR→CTR→EIN2→EIN3→ERF→生化反应的模型<sup>[6-8]</sup>。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<sup>[9-12]</sup>, 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<sup>[9,10]</sup>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 B<sub>1</sub>, 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<sup>®</sup> 由英国 Nottingham 大学的 BBSRC 植物基因调节实验室提供。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、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!

## 2. 番茄果实总 RNA 的提取

参照 Grierson 等<sup>[13]</sup>的方法。

## 3. LeETR1 cDNA 的克隆和鉴定

根据 GeneBank 中 LeETR1 序列,设计合成一对特异引物: P1: 5'-TAGTGAATGTAGGAGGAAAA-3'; P2: 5'-CACATAATAATCTATTGTTG-3'。采用 RT-PCR 方法,用目的基因 3'-端引物,以 MMLV 反转录酶从总 RNA 样品中反转录合成目的基因的 cDNA 第一链,以此为模板,用 PCR 法合成目的基因 cDNA 部分序列。反应参数为 94℃ 变性 40sec, 53℃ 退火 50sec, 72℃ 延伸 50sec, 30 个循环,反应总体积为 50 $\mu$ l。用 QIAquick<sup>TM</sup> PCR 产物纯化试剂盒 (QUIGEN, Germany),按所提供的程序纯化 PCR 产物,用 Original TA Cloning<sup>®</sup>克隆试剂盒 (Invitrogen, UK),按所提供的程序,将纯化的 cDNA 部分序列插入 PCR<sup>®</sup>2.1 质粒载体,转化感受态的大肠杆菌 TOP 10F'。以 LacZ  $\alpha$ -互补法筛选阳性部分菌落,以 PCR2.1<sup>®</sup>质粒中自带的 T7 启动子序列和目的基因 cDNA 的 3'-端部分序列为引物,直接挑取微量菌体为模板,用 PCR 筛选以正确方向插入(使用 T7 转录酶时有义链为模板链)的菌落,扩大培养后以 Wizard<sup>®</sup>质粒 DNA 提取试剂盒 (Promega) 提取质粒 DNA,经 373A 核酸自动测序仪 (Applied BiosystemS, USA) 测序确认后,保存于 -20℃ 备用。

## 4. 反义 LeETR1 基因植物表达载体的构建及鉴定

将含有目的基因 LeETR1 cDNA 部分序列的克隆载体 PCR<sup>®</sup>2.1 和中间表达载体 pPZP111A 用 BamH I 和 Xba I 双酶切。电泳后回收有关片段,用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶将切割下的目的基因反向连接到 pPZP111A 的多克隆位点,构建成反义表达载体 pPZPE。然后把连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,用卡那霉素筛选转化子。提取质粒,分别用 PCR 和酶切鉴定反义重组子。为了构建及检测的方便,我们将 PCR<sup>®</sup>2.1 载体上与目的基因相连的部分序列一并切割下来转入表达载体中,并以此部分序列设计 PCR 鉴定的引物。因此转入表达载体中的反义基因 LeETR1 实际长度是 410bp。

上游引物序列: 5'-GGATCCACTAGTAACGGCC-3'

下游引物序列: 5'-CTAGATGCATGCTCGAGCG-3'

酶切、连接、筛选的方法按《分子克隆》操作说明。筛选后,用三亲杂交法将 pPZPE 转化农杆菌 LBA4404 中,提取转化农杆菌中的质粒 DNA,分别用 PCR 和酶切鉴定反义 LeETR1 表达载体是否已转化到农杆菌内。

## 5. 番茄的转化和植株的再生

用 pPZPE/LBA4404 转化 7-9d 番茄幼苗子叶,在含卡那霉素的 MS 培养基上选择转化子及再生植株。

## 6. 转基因植株的 PCR 检测及 Southern blot 杂交

**PCR 检测** 用 CTAB 法提取再生植株叶片 DNA,并以此为模板在 50 $\mu$ l 反应体系中进行 PCR 反应。

**Southern blot 分析** 用 CTAB 法提取再生植株叶片 DNA,杂交实验参照 Sambrook<sup>[14]</sup>的方法。转基因及阴性对照番茄总 DNA 用 Hind III 进行酶切后,在 0.8% 琼脂糖凝胶

上电泳分离。DNA 片段分离后经毛细作用转移到硝酸纤维素膜上。以 NPT II (Km) PCR 回收产物作为探针,用 Promega Primea-Gene Label 试剂盒进行标记,然后在 65℃ 杂交过夜。

## 7. 转基因番茄果实乙烯释放量测定及其贮藏情况观察

从花药开放之日起挂牌标记花和果实,当果实绿熟 (MG) 或花蒂出现第一丝红色时 (破色, BK) 分别采收果实,然后在室温 (20℃) 下成熟。以 BK 为起点,分别取处于第 0、5、10、15、21、30 天的果实进行测定。

**乙烯的测定:** 单个番茄果实放入一个密闭容器中, 20℃ 放置 1 小时后抽取 1mL 气样,用 SP6800 气相色谱仪 (山东鲁南化工仪器厂) 测定乙烯含量。重复三次。

**番茄红素含量的测定:** 参照 Davis<sup>[15]</sup>的方法,以己烷丙酮混合试剂 (60:40) 提取果实组织混合样品中的色素,以空白溶液做对照,用扫描分光光度计测定消光曲线,读取 OD502,根据番茄红素 ( $\mu$ g/ $\text{mL}^{-1}$ ) = 3.12 \* OD502 计算提取液中的番茄红素含量。

# 结 果

## 1. LeETR1 cDNA 的克隆和测序

我们克隆基因的目的是为了构建反义表达载体。据报道番茄乙烯受体与其他重要的信号传导蛋白之间存在 5 个保守的功能域<sup>[9,11,12]</sup>, LeETR1 基因与 LeETR2 和 NR 基因都具有一定的同源性,而它们 3'-端的差异则较大<sup>[9,10,12]</sup>。若把全长的基因用于反义 RNA 技术,很可能会阻碍番茄体内其他一些重要信号传导蛋白基因的表达。我们仅以 LeETR1 3'-端的特定序列设计引物,克隆 LeETR1 的部分序列。LeETR1 的长度为 2681 bp,我们克隆的产物在 LeETR1 的第 2351-2664 之间,长度为 313 bp。测序结果显示,我们克隆的目的基因序列与文献报道的相同<sup>[9,10]</sup>。

## 2. LeETR1 反义表达载体的构建

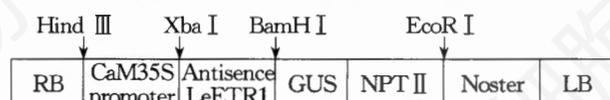


图 1 反义 LeETR1 基因表达载体 pPZPE 的构建策略

将质粒 PCR<sup>®</sup>2.1 用 BamH I 和 Xba I 双酶切以后,与同样酶切的中间表达载体 pPZP111A 连接,得到表达 LeETR1 反义基因的双元载体 pPZPE (图 1)。提取阳性克隆质粒 DNA 进行 PCR,可扩增出 410bp 的反义基因 (图略),表明重组质粒中已经含有 LeETR1 基因片段。将 pPZPE 转化农杆菌 LBA4404,提取转化菌落中的质粒,以其为模板进行 PCR 扩增来检测 LeETR1 反义基因的插入,结果见

图2,表明从农杆菌中提取质粒的 PCR 结果与设计反义基因大小一致。用 BamH I 和 Xba I 双酶切的结果如图3所示。酶切鉴定结合 PCR 鉴定结果表明,已成功地实现了反义 LeETR1 向农杆菌的转化。

### 3. 番茄的转化和转基因植株的再生

通过农杆菌介导转化番茄子叶,获得再生植株。我们在构建反义 LeETR1 基因表达载体 pPZPE 时,将 PCR<sup>®</sup>2.1 载体上与目的基因相连的部分多克隆位点序列一并切割下来转入表达载体中,并以此部分序列设计 PCR 鉴定的引物。而该段 DNA 序列在番茄基因组中是不存在的。因此可以用这对引物直接对转化番茄进行 PCR 鉴定。由图4可以看出,对反义 LeETR1 转基因植株,阳性对照质粒 DNA 在 410bp 处有一特异扩增带,11 株反义 LeETR1 转化植株中全都扩增出与阳性对照大小一样的单一特异带,而阴性对照(未转化植株)没有得到任何特异性扩增条带,说明目的 DNA 已经转化到番茄中。为了对上面 PCR 的结果做进一步的验证,以 NPT II

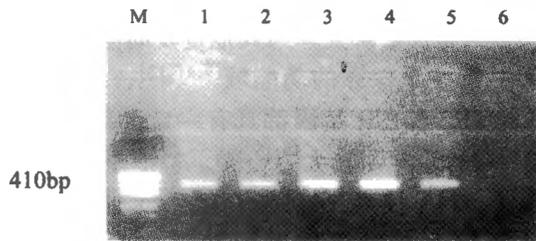


图2 农杆菌菌株中质粒 pPZPE 的 PCR 鉴定  
M: pUC19 DNA 标准分子量; 1-2: LBA4404 (pPZPE) 3-4: EHA105 (pPZPE); 5: PCR<sup>®</sup>2.1 (pPZPE) (阳性对照) 6: LBA4404 (阴性对照)。

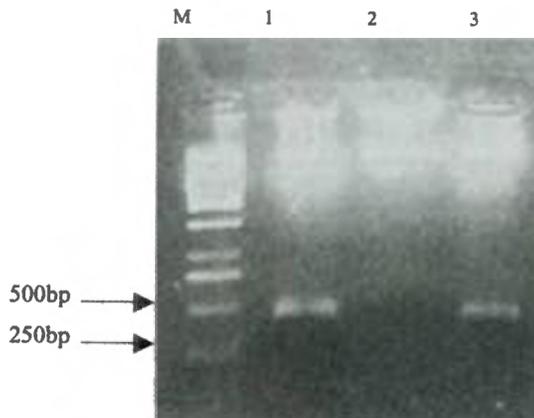


图3 农杆菌中质粒 pPZPE 的酶切鉴定  
M: 1Kb DNA 标准分子量; Lane1: PCR<sup>®</sup>2.1 (LeETR1) / Xba I + BamH I (阳性对照); Lane2: pPZ111A / Xba I + BamH I (阴性对照); Lane 3 为农杆菌 pPZPE / Xba I + BamH I。

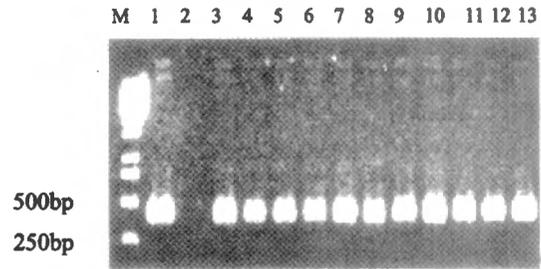


图4 转基因番茄植株中目的 DNA 的 PCR 检测  
M: 1Kb DNA 标准分子量; 1 为 pPZPE (阳性对照); 2 为未转化番茄植株 (阴性对照); 3-13 为反义 LeETR1 转基因番茄植株。

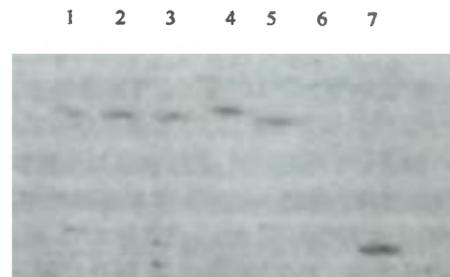


图5 转基因番茄的 Southern blot 分析  
1-5 为反义 LeETR1 转基因番茄植株; 6 为未转化番茄植株 (阴性对照); Lane 7 为 NPT II PCR 回收产物 (阳性对照)。

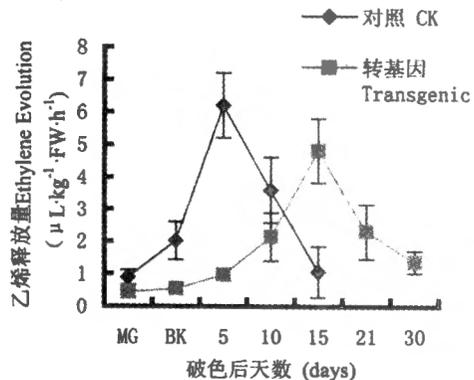


图6 番茄果实乙烯释放强度的变化

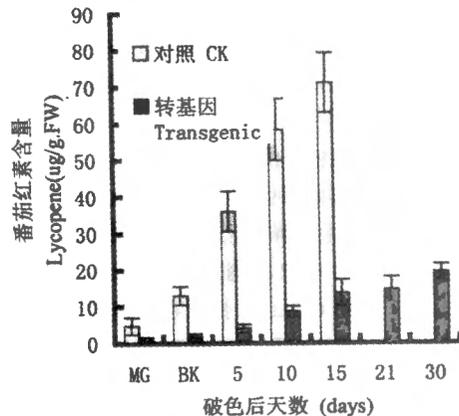


图7 番茄果实番茄红素变化

基因 PCR 的扩增产物为探针和阳性对照,以未转化的番茄为阴性对照,对部分 PCR 鉴定为阳性的转化植株进行 Southern 杂交。结果见图 5,说明外源 NPT II 基因已整合到番茄染色体上,推测反义 LeETR1 基因也一并整合到番茄基因组中。

#### 4. 番茄乙烯释放强度和番茄红素的变化

图 6 看出,对照番茄的乙烯释放强度在采后迅速上升,破色后 5 天达到最大,之后又迅速降低;转基因番茄的乙烯释放强度变化较为缓慢,乙烯释放高峰在破色后 15 天出现,此时的乙烯释放强度为  $4.82\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$ ,相当于对照果实的 77%。

从图 7 可以看出,对照番茄在破色后番茄红素含量急剧上升,在破色后 15d 达到最大值,外表呈现正常的红色;转基因果实破色后 30d,番茄红素的含量只相当于对照的 27.2%,外表呈现橘黄色,番茄红素的合成受到显著抑制。

## 讨 论

LeETR1 是用拟南芥 ETR1 的 cDNA 为探针,从番茄叶片离层 cDNA 文库中筛选得到的一个 ETR1 的同源基因<sup>[9]</sup>。LeETR1 编码产物的氨基酸序列与 ETR1 有 81% 的同源性。它同 ETR1 一样有 3 个功能结构域:乙烯结合/感受域(sensor)、组氨酸激酶域(Histidine kinase)和反应调节域(response regulator)。许多资料表明,LeETR1 有可能扮演番茄乙烯受体的角色<sup>[6]</sup>。

我们应用反义基因技术对 LeETR1 实施“基因封闭”,获得了仅有一个基因差异的反义转基因番茄材料,本研究发现 LeETR1 被封闭以后与对照番茄有明显的不同:(1)成熟推迟(2)番茄红素的合成受到显著抑制,果实没有表现出正常的红色果皮(3)果实推迟软化。一般认为乙烯调节果实成熟是通过协同成熟过程中相关基因的表达实现的,如提高呼吸强度与乙烯自动催化产量,加快叶绿素分解,促进类胡萝卜素合成,增强细胞壁水解酶活性等<sup>[16]</sup>。本研究中,转基因番茄的乙烯生物合成途径并没有受到

阻断,它的最高乙烯释放强度相当于对照番茄的 77%,但乙烯释放高峰却比对照果实推迟了 10 天。我们知道,在植物体内存在两套乙烯合成系统:所有植物在生长发育过程中都能合成并释放微量乙烯,这种乙烯的合成系统称为系统 I,如非跃变型果实和未成熟的跃变型果实所产生的乙烯。跃变型果实完熟期前期合成并大量释放的乙烯,由另一个系统产生,为乙烯合成系统 II。在跃变型果实成熟过程中系统 I 生成的乙烯会诱导系统 II 生成大量乙烯。前面已经提到,LeETR1 有可能在番茄发育过程中扮演乙烯受体的角色<sup>[6]</sup>。LeETR1 被封闭以后,组织对乙烯信号的感知可能受到损害,进而降低了果实对乙烯的敏感性,延缓了乙烯的自我催化合成和一系列与成熟有关基因的正常表达。据此,可以推测 LeETR1 在番茄成熟过程中起着重要的作用。本实验构建了反义 LeETR1 植物表达载体并获得转基因植株,为研究番茄果实中 LeETR1 基因的生理功能和乙烯信号转导奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Adams D. O., et al., 1977, *Plant Physiol.*, **70**: 117-123.
- [2] Olson D. C., et al., 1991, *Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 5340-5344.
- [3] Theologis A., 1992, *Cell*, **70**: 181-184.
- [4] Chang C., et al., 1993, *Science*, **262**: 539.
- [5] Kieber J. J., et al., 1993, *Cell*, **72**: 427.
- [6] Schaller G. E., et al., 1995, *Science*, **270**: 1809-1811.
- [7] Sakai H., et al., 1998, *PNAS*, **95**(10): 5812-5817.
- [8] Hua J., et al., 1998, *Cell*, **94**(2): 261-271.
- [9] Zhou D., et al., 1996, *Plant Mol. Biol.*, **30**: 1331-1338.
- [10] Zhou D., et al., 1996, *Plant Physiol*, **110**: 1435.
- [11] Lashbrook C. C., et al., 1998, *Plant J.*, **15**: 243-252.
- [12] Tieman D. M., et al., 1999, *Plant Physiol*, **120**: 165-172.
- [13] Grierson D., et al., 1985, *Rev Plant Sci.*, **3**: 113-132.
- [14] Sambrook J., et al., 1989, *Molecular cloning: laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- [15] Davis B. H., 1976, *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. In: Goodwin TW ed., London: Academic Press. 38-165.
- [16] Ray J., et al., 1992, *Plant Mol Biol.*, **19**: 49-87.

## TRANSFORMING OF LeETR1 ANTISENSE GENE INTO TOMATO

YANG Hu Qing\* YING Tie Jin\* XIANG Qing Ning\*\* ZHENG Tie Song\*

(\* Department of Food Sci. and Nutri. Zhejiang University \*\* Department of Horticulture, Hangzhou 310029)

**ABSTRACT** Total RNA was isolated from the pink tomato fruits. By using the specific primers designed from the LeETR1 cDNA, a 313bp fragment on 3' encoding region was produced by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The cloned LeETR1 gene was then inserted into a binary vector pPZP111A,

基因 PCR 的扩增产物为探针和阳性对照,以未转化的番茄为阴性对照,对部分 PCR 鉴定为阳性的转化植株进行 Southern 杂交。结果见图 5,说明外源 NPT II 基因已整合到番茄染色体上,推测反义 LeETR1 基因也一并整合到番茄基因组中。

#### 4. 番茄乙烯释放强度和番茄红素的变化

图 6 看出,对照番茄的乙烯释放强度在采后迅速上升,破色后 5 天达到最大,之后又迅速降低;转基因番茄的乙烯释放强度变化较为缓慢,乙烯释放高峰在破色后 15 天出现,此时的乙烯释放强度为  $4.82\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$ ,相当于对照果实的 77%。

从图 7 可以看出,对照番茄在破色后番茄红素含量急剧上升,在破色后 15d 达到最大值,外表呈现正常的红色;转基因果实破色后 30d,番茄红素的含量只相当于对照的 27.2%,外表呈现橘黄色,番茄红素的合成受到显著抑制。

## 讨 论

LeETR1 是用拟南芥 ETR1 的 cDNA 为探针,从番茄叶片离层 cDNA 文库中筛选得到的一个 ETR1 的同源基因<sup>[9]</sup>。LeETR1 编码产物的氨基酸序列与 ETR1 有 81% 的同源性。它同 ETR1 一样有 3 个功能结构域:乙烯结合/感受域(sensor)、组氨酸激酶域(Histidine kinase)和反应调节域(response regulator)。许多资料表明,LeETR1 有可能扮演番茄乙烯受体的角色<sup>[6]</sup>。

我们应用反义基因技术对 LeETR1 实施“基因封闭”,获得了仅有一个基因差异的反义转基因番茄材料,本研究发现 LeETR1 被封闭以后与对照番茄有明显的不同:(1)成熟推迟(2)番茄红素的合成受到显著抑制,果实没有表现出正常的红色果皮(3)果实推迟软化。一般认为乙烯调节果实成熟是通过协同成熟过程中相关基因的表达实现的,如提高呼吸强度与乙烯自动催化产量,加快叶绿素分解,促进类胡萝卜素合成,增强细胞壁水解酶活性等<sup>[16]</sup>。本研究中,转基因番茄的乙烯生物合成途径并没有受到

阻断,它的最高乙烯释放强度相当于对照番茄的 77%,但乙烯释放高峰却比对照果实推迟了 10 天。我们知道,在植物体内存在两套乙烯合成系统:所有植物在生长发育过程中都能合成并释放微量乙烯,这种乙烯的合成系统称为系统 I,如非跃变型果实和未成熟的跃变型果实所产生的乙烯。跃变型果实是在完熟期前期合成并大量释放的乙烯,由另一个系统产生,为乙烯合成系统 II。在跃变型果实成熟过程中系统 I 生成的乙烯会诱导系统 II 生成大量乙烯。前面已经提到,LeETR1 有可能在番茄发育过程中扮演乙烯受体的角色<sup>[6]</sup>。LeETR1 被封闭以后,组织对乙烯信号的感知可能受到损害,进而降低了果实对乙烯的敏感性,延缓了乙烯的自我催化合成和一系列与成熟有关基因的正常表达。据此,可以推测 LeETR1 在番茄成熟过程中起着重要的作用。本实验构建了反义 LeETR1 植物表达载体并获得转基因植株,为研究番茄果实中 LeETR1 基因的生理功能和乙烯信号转导奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Adams D. O. , et al. , 1977, *Plant Physiol.* , **70**: 117 - 123.
- [ 2 ] Olson D. C. , et al. , 1991, *Natl. Acad. Sci. USA* , **88**: 5340 - 5344.
- [ 3 ] Theologis A. , 1992, *Cell* , **70**: 181 - 184.
- [ 4 ] Chang C. , et al. , 1993, *Science* , **262** : 539.
- [ 5 ] Kieber J. J. , et al. , 1993, *Cell* , **72**: 427.
- [ 6 ] Schaller G. E. , et al. , 1995, *Science* , **270**: 1809 - 1811.
- [ 7 ] Sakai H. , et al. , 1998, *PNAS* , **95**(10): 5812 - 5817.
- [ 8 ] Hua J. , et al. , 1998, *Cell* , **94**(2): 261 - 271.
- [ 9 ] Zhou D. , et al. , 1996, *Plant Mol. Biol.* , **30**: 1331 - 1338.
- [ 10 ] Zhou D. , et al. , 1996, *Plant Physiol.* , **110**: 1435.
- [ 11 ] Lashbrook C. C. , et al. , 1998, *Plant J.* , **15**: 243 - 252.
- [ 12 ] Tieman D. M. , et al. , 1999, *Plant Physiol.* , **120**: 165 - 172.
- [ 13 ] Grierson D. , et al. , 1985, *Rev Plant Sci.* , **3**: 113 - 132.
- [ 14 ] Sambrook J. , et al. , 1989, *Molecular cloning: laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- [ 15 ] Davis B H. , 1976, *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. In: Goodwin TW ed. , London : Academic Press . 38 - 165.
- [ 16 ] Ray J. , et al. , 1992, *Plant Mol Biol.* , **19**: 49 - 87.

## TRANSFORMING OF LeETR1 ANTISENSE GENE INTO TOMATO

YANG Hu Qing\* YING Tie Jin\* XIANG Qing Ning\*\* ZHENG Tie Song\*

(\* Department of Food Sci. and Nutri. Zhejiang University \*\* Department of Horticulture, Hangzhou 310029)

**ABSTRACT** Total RNA was isolated from the pink tomato fruits. By using the specific primers designed from the LeETR1 cDNA, a 313bp fragment on 3' encoding region was produced by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The cloned LeETR1 gene was then inserted into a binary vector pPZP111A,

in an inverted orientation between the CaM 35S promoter and the Nos 3' termination sequence. Transgenic tomato plants were obtained by Agrobacterium-mediated transformation of cotyledons. PCR detection and Southern blot analysis confirmed the integration of antisense LeETR1 gene in tomato genome. Ethylene production peak of transgenic fruits appeared 10d after control. After 30 days in normal room, transgenic tomatoes eventually developed an orange colour but never turned red. These data suggest that LeETR1 was closely correlated with the ripening of tomato fruits.

**Key words:** Tomato fruit LeETR1 gene Cloning Antisense expression vector

## 实验技术

# 原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞

陈 钟<sup>\*,\*\*</sup> 丁义涛<sup>\*\*</sup>

(\*南通医学院附属医院普外科 南通 226001 \*\*南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008)

**摘 要** 本文建立了原位胶原酶循环灌注分离猪肝细胞方法与离体两步胶原酶灌注法进行了比较。猪门静脉和下腔静脉分别插管,先用 D-Hanks 液灌注,再采用自制的循环灌注装置进行胶原酶循环原位灌注分离猪肝细胞,分离后的肝细胞以  $5 \times 10^5$ /ml 培养,观察分离和培养 7d 的肝细胞产量、活率、蛋白质合成功能、葡萄糖合成功能和 LDH 含量。同时测定离体组的上述指标。研究表明采用原位胶原酶循环灌注法每克肝组织分离获得的肝细胞总量为  $5.1 \times 10^7$ ,肝细胞活率 98.6%,培养 7d 肝细胞活率 89.5%。肝细胞的蛋白质合成功能在培养 7d 中保持稳定;葡萄糖合成功能从 1d 时  $1.05 \pm 0.15$ nmol/cell 下降到 3d 时  $0.74 \pm 0.09$ nmol/cell;LDH 含量在 3d 较高。原位胶原酶循环灌注法分离的猪肝细胞总量、活率高于离体法;蛋白质合成功能和葡萄糖合成功能强于离体法。因此,原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞方法可获得大量高活率和良好功能的猪肝细胞。

**关键词:** 肝细胞 分离 胶原酶 培养 生物人工肝

以培养肝细胞为生物成分的生物人工肝(BAL)有望成为治疗急性肝衰竭的有效手段<sup>[1-3]</sup>。随着该研究的深入,迫切需要理想的肝细胞来源与分离、培养技术。猪肝细胞因结构和功能与人肝细胞相似,是 BAL 较理想的肝细胞来源<sup>[4-6]</sup>。目前,猪肝细胞分离多采用离体两步胶原酶灌注法,肝细胞产量及活率有限<sup>[1]</sup>。本文采用自制的循环灌注装置应用原位胶原酶循环灌注方法分离猪肝细胞,取得了满意的效果,现将结果报告如下。

## 材料和方法

### 1. 材料

中国实验用小型乳猪 10 只,出生后 10-15d,体质量 2.7-4.0kg,雌雄不限,由本院实验动物中心提供;胶原酶(collagenase)IV、RPMI1640 购于 Gibco 公司,新生牛血清(NBS)购于 Hyclone 公司,头孢哌酮钠为辉瑞制药有限公司

(大连)产品,青霉素、链霉素为华北制药厂产品,CO<sub>2</sub> 培养箱为日本 IKEMOTO RK110-2。

### 2. 实验分组

将 10 只中国实验用小型乳猪平均分为两组,A 组为原位胶原酶循环灌注组(n=5),B 组为对照组,即离体两步胶原酶灌注组(n=5)。

### 3. 方法

实验猪于术前 12h 禁食。氯胺酮 20mg/kg iv 麻醉动物,固定,常规方法消毒皮肤,开腹。

A 组:分离门静脉、肝下下腔静脉,门静脉内注入肝素钠 125U,分别结扎门静脉、肝下下腔静脉远心端,近侧插管分别作为灌注流入道和流出道,阻断肝上下腔静脉。先用经 37℃ 预热的无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> Hanks 液(D-Hanks 液)门静脉内

本文 2002 年 10 月 28 日收到,2003 年 1 月 15 日接受。

本研究受江苏省卫生厅重点项目基金(BQ200020)、南京市科委科技发展计划(20012095)资助。

\*联系人。E-mail:zchen9999@sina.com.cn