

植物基因载体—Ti质粒的应用方法〈上〉

朱 群 白永延

(中科院上海植物生理研究所)

七十年代中期,在生物化学、分子生物学、DNA重组技术及细胞培养技术的发展基础上,出现了一个新的研究领域——植物基因工程。由于传统的农业育种工作对新技术的迫切需要,高等植物之基因工程一开始就发展迅猛。植物基因工程的关键是如何将外源DNA引入具有细胞壁的植物细胞,Chilton等(1977)证明,根癌农杆菌使许多双子叶植物产生冠瘿瘤是其Ti质粒的T区DNA转入植物细胞的结果。在这个自然界存在的遗传工程模式中,Ti质粒起了天然的基因载体作用。这一发现极大地激发了人们研究Ti质粒和利用它作为基因载体的热情^[1-3]。

利用转座子Tn7研究pTiT37质粒基因物理图的过程中,Hernalsteens等(1980)筛选到一个突变体,由于Tn7插入pTiT37T区DNA靠右边界的胭脂碱合成酶基因之中,故由这一突变体诱发的肿瘤中无胭脂碱的产生。Southern分子杂交表明Tn7作为T-DNA的一部分完整地存在于转化细胞中,这证明长达13 kb的Tn7 DNA片段插入23 kb的pTiT37的T-DNA后,并不影响Ti质粒转化植物细胞的能力,进而推断Ti质粒可作为基因载体,将外源DNA整合进植物细胞的染色体^[4]。

Ti质粒长达200 kb,其限制性内切酶图谱较复杂,一种限制性内切酶往往有几十个切割位点,经内切酶切割的片段不大可能重新环化成原来的顺序。又因Ti质粒不能在大肠杆菌中复制,即使外源DNA片段能插入Ti质粒的特定部位,转化根癌农杆菌的效率也非常低,当然人们可利用能在大肠杆菌中复制的突变体如Ti::RP4复合子,但这样的质粒更大,对大肠杆菌的转化也更困难,因而,要以常规

的方法将DNA插入Ti质粒则难以奏效。

一、中间载体

中间载体(Intermediate vector)是一种既能在大肠杆菌又能在根癌农杆菌中复制的小质粒,插入中间载体的外源DNA片段可被引入Ti质粒的特定区域,因而避免了在体外直接操作Ti质粒的障碍。构建和利用中间载体一般包括如下几个步骤:

1. 选择带有特定酶切位点的T-DNA片段,克隆进大肠杆菌的质粒之中。
2. 将所要引入的外源基因与某一特定的可在根癌农杆菌中进行筛选的标记基因相连。由于根癌农杆菌对氯霉素较易产生抗性,一般用卡那霉素、壮观霉素等标记为好。
3. 所要引入的基因与抗性基因相连的片段插入T-DNA片段的限制性内切酶位点,产生出T-DNA的工程片段。
4. 加工过的T-DNA片段再克隆或整合进具广宿主范围的质粒如pRK290。pRK290质粒起源于RK2质粒^[5,6],它在广宿主范围中复制和接合转移的起点,因而在有辅助质粒如pRK2013反式动员作用下pRK290即可从大肠杆菌转入根癌农杆菌之中。
5. 由于根癌农杆菌中的Ti质粒的T区DNA与加工过的T-DNA之间有同源性,经两次同源重组即可将特异的外源基因引入Ti质粒的T-DNA之中。
6. 利用一个与pRK290不相容的质粒,将与Ti两次重组后产生的pRK290质粒驱赶走(见图1)^[1-9]。

1983年,Comai, Van Haute等发明了一种比利用广宿主范围质粒作中间载体更为简单

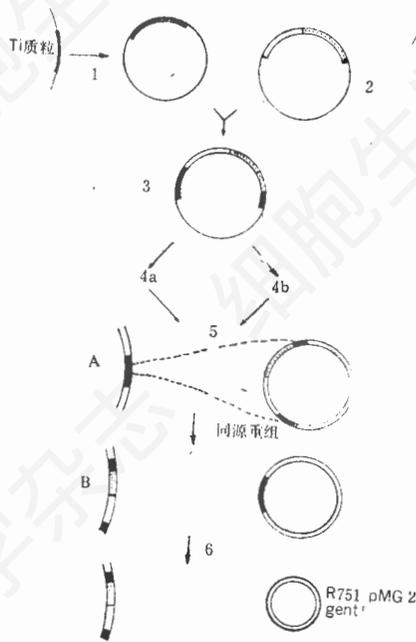


图1 中间载体的构建和利用示意图^[6]

1. 克隆 T-DNA 片段。2. 外源基因与抗性标记相连。3. 将基因克隆进 T-DNA 片段。4 a. 加工过的 T-DNA 克隆进 pRK 290 质粒。4 b. 经同源重组, 将加工过的 T-DNA 片段引入 pRK 290 质粒。5. 转化根癌农杆菌。6. pRK 290 的驱赶。A 野生型的 Ti 质粒。B 有外源基因插入的 Ti 质粒。▨表示外源基因。▧表示卡那霉素抗性基因。

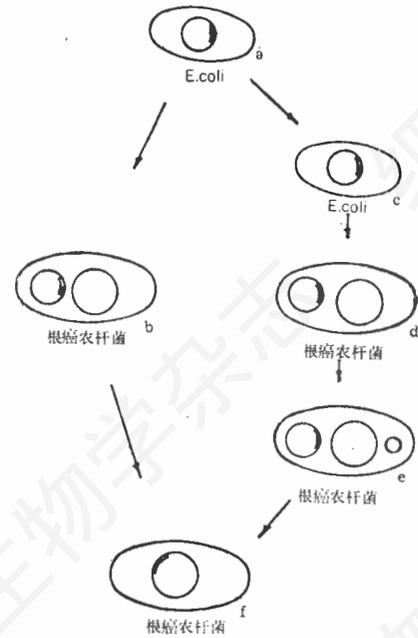


图2 利用广宿主质粒及窄宿主质粒为中间载体的比较^[10,11]

a. 外源基因和抗性标记基因克隆进 pBR 322 类质粒。b. 重组子引入根癌农杆菌进行同源重组。c. 外源基因和抗性标记基因插入 pRK 290 类质粒。d. 重组子引入根癌农杆菌。e. 同源重组及 pRK 290 的驱赶。f. 外源基因及抗性标记基因插入了 Ti 质粒。▨表示卡那霉素抗性基因。▧表示外源基因。

的办法, 他们利用能被引入根癌农杆菌但不能在其中复制的质粒如 pBR 322、pBR 325、pAcyc 184 等, 由于 pBR 322 类质粒上带有 pMB 1 的 bom 转移结合位点因而在带有 ColE 1 的 mob 转移作用基因的辅助质粒如 R 64 drd 11 的帮助下, pBR 322 类质粒即能被引入带有 Ti 质粒的根癌农杆菌之中, 由于 pBR 322 类质粒不能在根癌农杆菌中复制, 它们会自行消失。(见图 2)^[10,11]。

美国 Monsanto 公司的 Fraley 等 (1983) 构建的 pMon 120 类中间载体, 不仅具有 Tn 7 上的 Spc/Str^r 抗性标记 pTiA 6 T-DNA 上 HindIII 18 C 片段以及 pBR 322 的复制起始区域, 还有可供筛选转化植物的胭脂碱合成酶基因和单一的 HindIII、EcoRI 切割位点^[12], 从

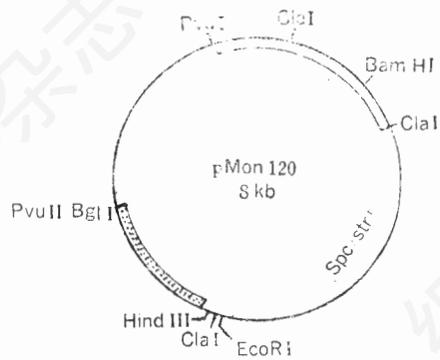


图3 Pmon 120 结构示意图^[12]

▨表示 Ti 质粒 T-DNA 同源片段。
▧表示胭脂碱合成酶基因。

而给外源基因的插入和转化植物的筛选带来了方便(见图 3)。

利用中间载体, 将一系列外源基因引入了

Ti 质粒并转化了植物,但在 1983 年上半年之前,未能在植物细胞中得到表达。由于 T-DNA 上的冠瘿碱合成酶基因能在植物中表达,促使人们对它进行详细的结构分析,结果表明,冠瘿碱合成酶基因尽管来自原核生物的 Ti 质粒,但具典型的真核生物基因结构,如 5' 端的 TATA 盒,3' 端的 AATAAA 多聚腺苷酸加尾信号等。以前引入 T-DNA 的外源基因,所以未能得到表达,可能是植物细胞的 RNA 聚合酶 II 不能识别其启动信号所致。

二、嵌合基因及表达载体

所谓嵌合基因 (Chimaeric gene) 即能被植物细胞识别的启动子信号和外源基因的编码顺序相拼接,构成一种能在植物中表达的基因。带有能表达的基因的中间载体称为表达载体 (Expression Vector) Herrera-Estrella 等 (1983) 根据冠瘿碱合成酶基因能在植物中表达,易检测,且无组织特异性等特点,首先构建了由胭脂碱合成酶基因的启动子和章鱼碱合成酶基因的编码顺序所组成的嵌合基因^[13]。

pTiC 58 HindIII-23 片段带有完整的胭脂碱合成酶基因,经限制性内切酶 *Sau3A* 切割后产生出一个仅带有 5' 控制区域及氨基端 15 个碱基的 DNA 片段,克隆产生 pLGV 13,利用限制性内切酶消化,外切酶及 DNA 多聚酶等处理,产生一系列不同的缺失类型 (pNos),顺序分析表明其中有一 pNos 的胭脂碱合成酶基因的所有编码区及 5' 端两个非转录核苷酸残基皆已缺失,将这片段的 *Sac II* 到 *BamHI* 部分替代 pGV 0601 上大的 *Sac II* *BamHI* 片段产生出 pLGV 2381,在 pLGV 2381 上,胭脂碱合成酶基因的四分之三已缺失,但 5' 和 3' 端的控制信号保持完整(见图 4)。

带有 pTiB 6 S 3 上完整的章鱼碱合成酶基因编码顺序和部分控制信息区 DNA 片段的 pBR 322,经处理去掉其 5' 端的启动子,其中 pAGV 40 仅带有 5' 端 7 个核苷酸残基和完整的章鱼碱合成酶基因编码顺序。

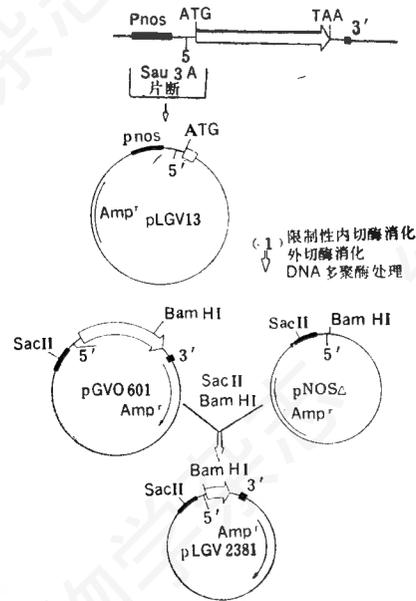


图 4 胭脂碱合成酶基因启动子 (Pnos) 表达质粒的构建示意图^[13]

① 限制性内切酶消化
外切酶消化
DNA 多聚酶处理

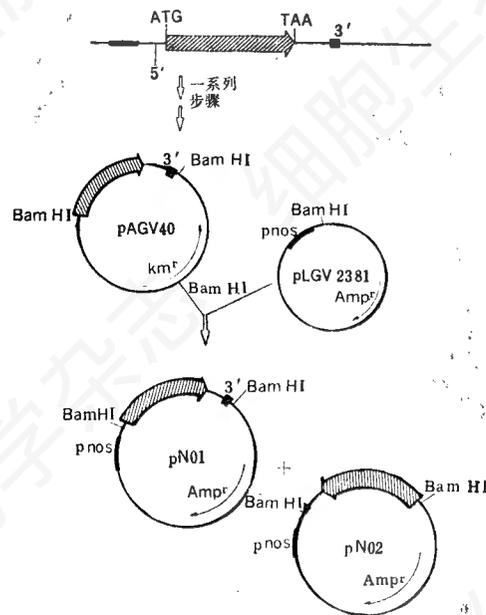


图 5 胭脂碱合成酶基因启动子与章鱼碱合成酶基因编码顺序拼接示意图^[13]

由胭脂碱合成酶基因的启动子和章鱼碱合成酶基因编码顺序组成的嵌合基因中,章鱼碱

合成酶基因有两种可能的连接方向,所以能产生两个不同的重组质粒 pNo 1 和 pNo 2(见图 5)。

pNo 1 和 pNo 2 分别引入带 pTiC 58 的根癌农杆菌中,经两次同源重组,产生四种重组子,然后分别感染植物,发现都能产生胭脂碱,但 pNo 1 × pTiC 58 还能产生章鱼碱,因而表明胭脂碱合成酶基因的启动子能启动正常顺序的章鱼碱合成酶基因的编码顺序,从而使后者得到表达。

利用类似的方法, Herrera-Estrella 等(1983)构建了由胭脂碱合成酶基因启动子(pNos)与细菌氯霉素乙酰转移酶基因(Cat)组成 pNos-Cat 嵌合基因,引入 pTiC 58 质粒做载体转化植物,转化的植物具备了正常植物所没有的抗氯霉素的能力,也即 Cat 基因在植物中,也能象在酵母和哺乳动物中那样得到表达^[14]。

进一步分析表明,由胭脂碱合成酶基因启动子和外源基因编码区组成的嵌合基因,在转化植物中能通过减数分裂传给子代,并且符合典型的孟德尔遗传规律^[15-17]。

能在植物中表达的抗性嵌合基因的构建,为筛选转化植物带来了极大的方便,特别是胭脂碱合成酶基因的启动子和细菌转座子 Tn 5 上的新霉素磷酸转移酶基因, R 17 质粒上的

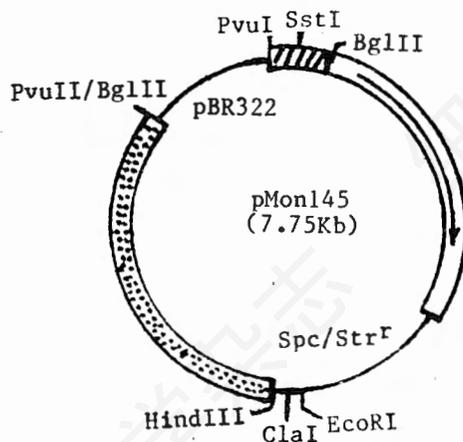


图 6 pMon 145 结构示意图^[21]

■表示 Ti 质粒 T-DNA 同源片段,
▨表示嵌合新霉素磷酸转移酶基因

二氢叶酸还原酶基因和 pIT 139 质粒上的湿霉素(Hygromycin)磷酸转移酶基因组成的嵌合基因,使转化的植物分别带上了相应的抗性^[18-20]。从而人们找到了筛选转化植物的新途径,不需要冠瘿瘤产生及在 MS0 培养基上自主生长作为 T-DNA 转化的标记。

美国 Monsanto 公司的 Broglie 等(1984)将能在植物中表达的嵌合新霉素磷酸转移酶基因(抗卡那霉素)插入了中间载体 pMon 120 构成了 pMon 145(见图 6)^[21]。嵌合基因的构建使中间载体的使用更为方便。(待续)

细胞的有被小泡

曹 英

(昆明植物研究所)

一、概 述

1961 年 Gray, E. G. 在用电镜研究大鼠的小脑皮层神经细胞时,发现树状神经末梢的细胞质内存在一些具有外壳的小泡,他当时

称之为复合小泡(complex vesicles)^[1]。继后 Wissig(1962)在大鼠肾上皮细胞中观察到质膜小泡与胞质小泡的结构分化,并且发现一类小泡的原生质膜表面覆盖有绒毛状物质,形成有被小泡(Coated Vesicles)^[2]。