

- 34: 871—878.
- [6] Wong, S. L. and D. P. S. Verma, 1985, *EMBO J* 4: 2431—2438.
- [7] Rezaian, M. A. and R. H. Symons, 1986, *Nucleic Acids Res.* 14: 3229—3239.
- [8] Murray, V. and R. Holliday, 1979, *FEBS Letts* 106: 5—7.
- [9] Rogers, J. and R. Wall, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1877—1879.
- [10] Berget, S. W. and B. L. Robberson, 1986, *Cell* 46: 691—696.
- [11] Coleman, J. et al., 1984, *Cell* 37: 429—436.
- [12] Pestka, S. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7525—7528.
- [13] Izant, J. G. and H. Weintraub, 1984, *Cell* 36: 1007—1015.
- [14] Rubenstein, J. L. R. et al., 1984, *Compts. Rendus Academie Sciences* 299: 271—274.
- [15] Kim, S. K. and B. J. Wold, 1985, *Cell* 42: 129—138.
- [16] Zamecnik, P. C. and M. L. Stephenson, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 280—284.
- [17] Melton, D. A., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 144—148.
- [18] Crowley, T. E. et al., 1985, *Cell* 43: 633—641.
- [19] Ecker, J. R. and R. W. Davis, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5372—5376.
- [20] Rosenberg, U. B. et al., 1985, *Nature* 313: 703—706.
- [21] Weintraub, H. and J. G. Izant, 1985, *Trends in Genetics* 1: 22—25.

## 植物基因载体—Ti 质粒的应用方法 (下)

朱群 白永延

(中科院上海植物生理研究所)

### (三) Ti 质粒的改建

众所周知, Ti 质粒分子大, 并有许多基因分布其上, 为克服直接操作完整 Ti 质粒的困难, Chilton, Framond 等(1983)分别构建了一批微型 Ti 质粒(Mini Ti)<sup>[22, 28]</sup>, 他们将 T 区 DNA 插入既能在大肠杆菌中, 又能在根癌农杆菌中复制的广宿主质粒上, 这个微小的 Ti 自身并无转化植物细胞的能力, 但当有 Ti 质粒 Vir 区域在同一菌中起反式互补作用时, 这个微型 Ti 即能将 T-DNA 转入植物细胞的染色体之中, 因而外源基因只要能插入微型 Ti 的 T 区 DNA, 便能被转入植物细胞的基因组。

无论是野生型的 Ti 质粒, 还是改建的微型 Ti 质粒, 尽管它们已能将外源基因引入植物细胞, 并能使此外来基因通过减数分裂, 但由于被转化的植物会产生肿瘤, 而肿瘤组织难以再生成完整植株, 因而必须将 Ti 质粒的致

瘤基因去掉, 构建出解除了“武装”的 Ti 质粒用作基因载体。

#### (1) pGV 3850 系统

pGV 3850 是 Zambryski 等(1983)利用 pAcgB 和 pGV 3839 构建而成的。pAcgB 是 pBR 322 中插有胭脂碱型质粒 T-DNA 左右两个边

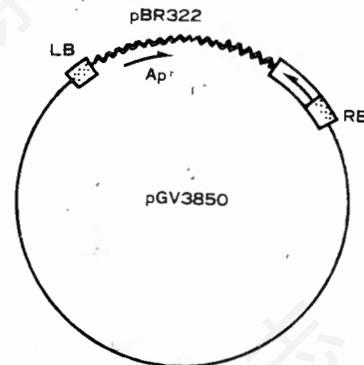


图 7 pGV 3850 结构示意图<sup>[15]</sup>  
LB、RB 分别表示左、右边界。□表示胭脂碱合成酶基因

界及胭脂碱合成酶基因的重组质粒。pGV 3839 是 Ti 质粒的 T 区中央 插有卡那霉素抗性基因的突变体。pAcgB 在辅助质粒的帮助下, 转入带有 pGv 3839 的根癌农杆菌之中, 经两次重组, pGv 3839 的带有卡那霉素抗性基因的 T-DNA 就被 pAcgB 的包括 T-DNA 的两个边界, 一个胭脂碱合成酶基因和 pBR 322 的顺序所替代, 从而产生出 pGV 3850。转化实验和限制性内切酶结果表明, pGV 3850 无致瘤能力, T 区的致瘤基因被 pBR 322 顺序所替代(图 7)。遗传分析表明, pGV 3850 转化的植物, 其 T-DNA 能通过减数分裂传给子代<sup>[15,16]</sup>。

pGV 3850 的 T-DNA 中有 pBR 322 的顺序, 因而外源基因只要插入带有另一可在根癌农杆菌中进行筛选的抗性基因的 pBR 322 类质粒, 通过同源重组外源基因即能整合进 pGV 3850 的 T-DNA 中。西德 Schell 实验室构建的 pLGVneo 1103 是符合以上条件的一个中间载体, 不仅如此, pLGVneo 1103 上还带有一卡那霉素的嵌合基因, 后者与 pGV 3850 上的胭脂碱合成酶基因一道可作为筛选转化植物的双重记号。当然, 利用 pLGVneo 1103 上胭脂碱合成酶基因的启动子, 可与外源基因构成嵌合基因, 反之利用外源基因的启动子, 又可跟 Tn 5 的卡那霉素抗性基因构成嵌合基因, 因而中间载体 pLGVneo 1103 有多种用途(图 8)。最近, Schell 实验室又将一系列单一的限制性内切酶位点插入了 pLGVneo 1103 构成 PUCNK 1, 这样用起来就更方便了。

### 〈2〉双质粒系统

双质粒系统, 类似 Chilton 等构建的微型 Ti 质粒, 其原理主要利用 Ti 质粒 Vir 区域与 T-DNA 间的反式互补作用。双质粒系统是在微型 Ti 质粒基础上产生的, 它的 T 区 DNA 仅剩下左右边界, 因而转化的植物不会产生肿瘤。Bevan 等(1984)构建的 Bin 19 是一系列双质粒系统中的一个, 它主要由 T-DNA 左右边界、嵌合的新霉素抗性基因、抗卡那霉素基因(筛

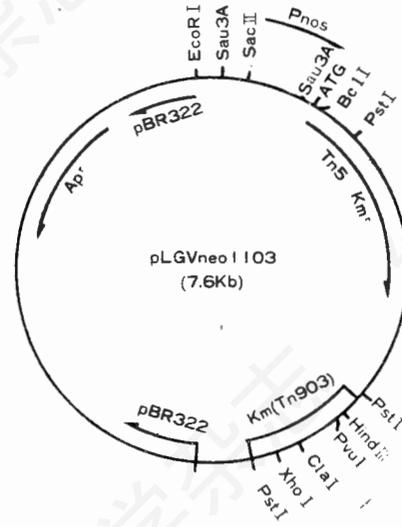


图 8 pLGVneo 1103 结构示意图  
Pnos 表示胭脂碱合成酶基因启动子

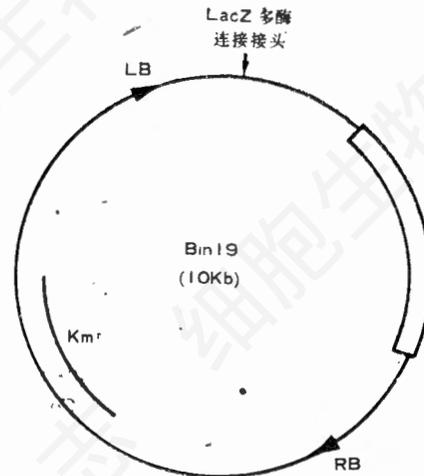


图 9 Bin 19 结构示意图<sup>[24]</sup>  
LB、RB 表示左右边界。□表示嵌合新霉素基因

选根癌农杆菌用)、带有多种酶连接接头的 LacZ 基因以及广宿主质粒 RK 2 的复制和转移起始区(图 9)<sup>[24]</sup>。

Bin 19 质粒小, 宿主广, 还带有 LacZ 基因和 EcoRI、BamHI、HindIII、SstI、KpnI、SmaI、XbaI、SalI 等单一限制性内切酶切点组成的多用接头, 故外源基因较易插入, 并且可在含 X-gal 和 IPTG 的平板上直接进行筛选, 因而操作极为方便。Bin 19 等双质粒系统,

在外源 DNA 转入植物细胞前, 无需进行同源重组, 插入载体的外源基因变异的可能要比 pGV 3850 系统来得小。

Klee 等(1985)也构建了一套双质粒系统, 其中 PENDING 4 K 最有用, 它除有 pTiA 6 T-DNA 的左右边界 LacZ 基因, 嵌合新霉素基因和 RK 2 的复制和转移的起始区外, 还有多拷贝的 ColE 复制子以及噬菌体的 Cos 位点(图 10) [25-227]。PENDING 4 K 类质粒在细菌中的拷贝数高, 并能包装大至 35 kb 的 DNA 片段, 因而, 在植物基因库中以鸟枪法筛选基因, 此类质粒可能有效。

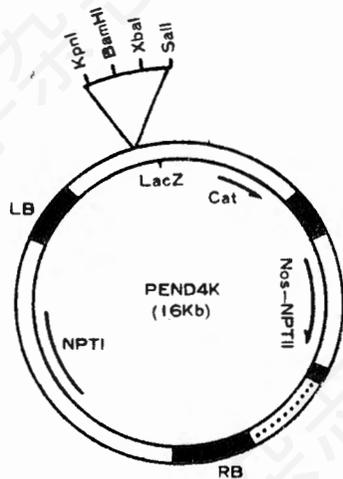


图 10 pPEND4K 结构示意图<sup>[25]</sup>  
LB, RB 表示左右边界。□ 表示 Cos 位点

### (3) SEV 系统

SEV 系统即是 T-DNA 边界拼接系统<sup>[28]</sup>。

pTiB 6 S3-SE 是野生型质粒 pTiB 6 S3 的突变体, 其中 TL-DNA 的致瘤基因及右边界都已缺失, 因而只要 pTiB 6 S3-SE 与带有 T-DNA 右边界的 pMon 120 或 pMon 200 类中间载体进行同源重组, 就能产生出带有不同来源左右边界的非致瘤性 Ti 质粒。由于 pMon 200 等中间载体带有嵌合基因, 因而转化的植物可直接进行筛选(图 11)。

SEV 系统与 pGV 3850 系统有相似之处, 但后者由于带有大肠杆菌 pBR 322 质粒的顺序, 因而带有外源基因的 pBR 322 类质粒与

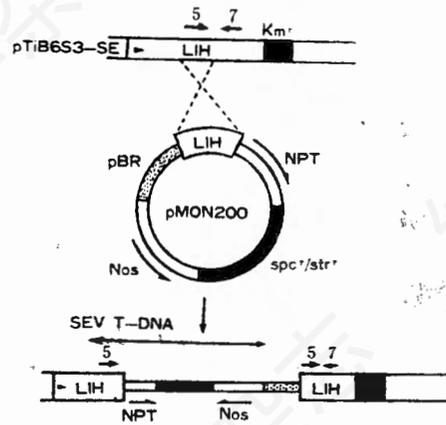


图 11 SEV 系统基因载体构建示意图<sup>[28]</sup>

pGV 3850 重组后转化的植物中带有重复的 pBR 322 的顺序, 此重复顺序可能对转化植物中的外源基因的稳定性有影响, 而 SEV 系统则排除了这种可能。

总之, Ti 质粒基因载体日趋成熟, 一系列外源基因经 Ti 质粒基因载体被引入了植物细胞并使转化植物产生了新的性状。尽管被转化的植物只有烟草、向日葵、矮牵牛等几种, 所引入的外源基因也无重大的经济价值, 但我们看到了 Ti 质粒基因载体在植物基因工程中潜在的力量和光明的前途。

根癌农杆菌宿主范围研究表明, 它能感染一些单子叶植物如水仙、石刁柏、吊兰等<sup>[29, 30]</sup>, 但主要还是双子叶植物, 因而以 Ti 质粒作为载体, 在目前有其一定的局限性。在继续探索扩大 Ti 质粒应用范围的同时, 还必须注意发展新的基因载体。最近 Brisson 等(1984)以花椰菜花叶病毒为载体, 已将氨基蝶呤抗性基因引入了植物<sup>[31]</sup>。RNA 病毒如紫苜蓿花叶病毒 (AMV), 尽管有人认为在它复制过程中有较高频率( $10^{-4}$ )的变异, 但它并不是整个分子随机突变, 而是与 RNA 的特定结构有关, 因而以植物病毒作为基因载体尚有潜力可挖<sup>[32, 33]</sup>。

转座因子是 McClintock(1951)首先在玉米中发现的<sup>[34]</sup>。新近对果蝇转座因子 P-因子的研究中发现, 当外源基因插入 P-因子中与转座有关的区域时, P-因子不再能转座, 但当用

微注射方式注入合适的受体细胞时, P-因子能携带外源基因整合进受体细胞染色体之中<sup>[35-37]</sup>, 因而, 结合微注射和转座因子的研究成果, 可能开发出一种新的途径, 并有希望在单子叶植物上得到应用。

利用花粉在柱头上萌发的特性, 将外源基因注入花粉管, 后者能伸入子房。如果外源基因能整合进合子的染色体中, 那么将避免原生质体转化时所碰到的难以再生的困难。Portrykus等(1985)利用DNA直接转化原生质体的方法, 分别将烟草和禾本科植物黑麦草原生质体转化成功, 在转化的细胞中外源基因能表达<sup>[38-40]</sup>, 这一方法可能大有前途。

由上可见, 在现有基础上有选择地构建多种基因载体, 开辟多种转化植物途径大有必要, 随着技术的不断完善, 植物基因工程在改良植物性状和创造新一代种质过程中将发挥巨大的作用。

### 摘 要

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, Ti质粒是天然的植物基因载体。为克服直接操作Ti质粒的困难, 人们构建了中间载体, 将嵌合基因插入中间载体构成表达载体。改建的Ti质粒——pGV 3850等系统, 是缺失了致瘤基因, 但保持转化植物细胞的能力的Ti质粒。双质粒系统, SEV系统则是进一步完善化的Ti质粒载体。另外我们还讨论了构建其它基因载体, 开辟多种转化途径的必要性。

### 参 考 文 献

- [1] 白永延等, 1984, 细胞生物学杂志, 84(6): 97—102.  
 [2] 唐惕, 1984, 植物生理学通讯, 14(4): 12—13.  
 [3] 朱群, 1984, 植物生理学通讯, 85(1): 1—7.  
 [4] Hernalsteens, J. P. et al., 1980: *Nature (London)*, 287: 654—656.  
 [5] Ditta, G. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* 77: 7347—7351.  
 [6] Barton, K. A. et al., 1983, *Methods in Enzymology*, 101: 527—539.  
 [7] Garduer, R. C., 1984, In "Plant-Microb interactions" *Molecular Genetic Perspectives*, 1: 147—157.  
 [8] Mantell, S. H. et al., In "Principles of Plant Biotechnology" *An Introduction to Genetic Engineering in Plants*, pp 62—88.  
 [9] Shaw, C. H. et al., 1983, *Gene*, 23: 315—330.  
 [10] Comai, L. et al., 1983, *Plasmid*, 10: 21—30.  
 [11] Van Haute, E. et al., 1983, *The EMBO journal*, 2: 411—417.  
 [12] Fraley, R. T. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 4803—4807.  
 [13] Herrera-Estrella, L. et al., 1983, *Nature (London)*, 303: 209—213.  
 [14] Herrera-Estrella, L. et al., 1983, *The EMBO journal*, 2: 987—995.  
 [15] Zambryski, P. et al., 1983, *The EMBO journal*, 2: 2143—2150.  
 [16] Block, M. et al., 1984, *The EMBO journal*, 3: 1681—1689.  
 [17] Horsch, R. B. et al., 1984, *Science*, 223: 496—498.  
 [18] Bevan, M. W. et al., 1983, *Nature (London)*, 304: 184—187.  
 [19] Hoekema, A. et al., 1985, *Plant Molecular Biology*, 5: 85—89.  
 [20] Helmer, G. et al., 1984, *Bio/Technology*, 206: 526—527.  
 [21] Broglie, R. et al., 1984, *Science*, 224: 838—843.  
 [22] Chilton, M-D. 1983, *Bio/Technology*, 1: 163—164.  
 [23] De Framond, A. J. et al., 1983, *Bio/Technology*, 20 262—269.  
 [24] Bevan, M. W., 1984, *Nucl Aci Res*, 12: 8711—8721.  
 [25] Klee, H. J. et al., 1985, *Bio/Technology*, 3: 637—642.  
 [26] An, G. et al., 1985, *The EMBO journal*, 4: 277—284.  
 [27] Elzen, P. V. D., 1985, *Plant Molecular Biology*, 5: 149—154.  
 [28] Fraley, R. T. et al., 1985: *Bio/Technology*, 3: 629—635.  
 [29] Hernalsteens, J. P. et al., 1984, *The EMBO journal*, 3: 3039—3041.  
 [30] Slogteren, H. V. et al., 1984, *Nature (London)*, 311: 763—764.

- [31] Brisson, N. et al., 1984, *Nature(London)*, 310: 511—514.
- [32] Siegel, A. et al., 1985, *Plant molecular Biology*, 4: 327—329.
- [33] Van Vloten-Doting, L., 1985, *Plant Molecular Biology*, 4: 323—326.
- [34] McClintock, B., 1951, *Cold Spring Harbor Symp. Quant*, 16: 13—47.
- [35] Sprading, A. C. et al., 1982, *Science*, 218: 341—347.
- [36] Rubin, C. M. et al. 1982, *Science*, 218: 348—353.
- [37] Sprading, A. C. et al., 1983, *Cell*, 34: 47—57.
- [38] Potrykus, I. et al., 1985, *MGG*, 199: 183—188.
- [39] Potrykus, I. et al., 1985, *MGG*, 199: 169—177.
- [40] Potrykus, I. et al., 1985, *Plant Molecular Biology reports*, 3: 117—128.

## 普通小麦减数分裂中单价体的错分裂

樊路 韩敬花

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

在普通小麦(*T. aestivum*)减数分裂中单价体(univalent)的一个重要特点,便是发生错分裂(misdivision)。它一般是指单价体着丝点或靠近着丝点处,发生的形成端着丝点染色体或等臂染色体的分裂。

1933年Hakanson第一个报道了小麦的等臂染色体,这是认识单价体错分裂的开始<sup>[1]</sup>。

单价体错分裂行为的研究是一项很有意义的工作。它不仅可以使我们进一步了解细胞分裂中染色体的行为,加深对细胞分裂本质的理解。同时通过单价体的错分裂可获得端体植株和等臂染色体植株。这两种植株在小麦细胞学及细胞遗传学研究中都有重要作用。我们可以利用端体鉴定单体系统,进行基因的染色体定位;培育品种间代换系及异代换系;诱导部分同源染色体(homoeologous chromosomes)配对,把外源有益基因转移到普通小麦中。等臂染色体是研究有丝分裂中染色体“结合”,特别是研究基因剂量效应的好材料<sup>[2]</sup>。此外,我们还可以利用单价体错分裂后形成的两个不同种的端着丝点染色体在着丝点处的结合现象,以罗勃逊氏易位(Robertsonian translocation)形式把带有外源有益基因的染色体片段转移到普通小麦染色体上去<sup>[3]</sup>。

### 单价体错分裂发生的时期、位置、方式及原因

在减数分裂中,从中期I——直到后期II,单价体都可以发生错分裂。观察单价体错分裂适宜的时期是在后期I。通常单价体错分裂发生在着丝点上<sup>[4-6]</sup>。但也有人发现在极个别情况下可以发生在紧靠着丝点地方<sup>[7]</sup>。一般认为错分裂方式有两种类型,即包括一条染色单体的错分裂(图1,a;图2,a,b)和包括两条染色单体的错分裂(图1,b;图2,c,d,e,f)<sup>[8]</sup>。最近,樊路和R. Morris还提出了不同错分裂次数的概念<sup>[9]</sup>,这是对错分裂方式提出的另一种分类方法。对于单价体发生错分裂的原因。至今还没有人提出比较圆满合理的解释。一般认为单价体之所以发生错分裂是由于在减数分裂中



图1 单价体的错分裂方式(自R. Morris)

- a. 包括一条染色单体的错分裂  
b. 包括两条染色单体的错分裂