

- Ind. Res.*, 35: 626.
- [25] Glatto, M. F. et al., 1972, *Eur. J. Biochem.*, 54: 1291.
- [26] Landolo, J. J. et al., 1976, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69: 237.
- [27] Herrnstadt, C. et al., 1986, *Biotechnology*, 4: 305-308.
- [28] Krieg, A. et al., 1983, *Z. Ang. Ent.*, 96: 500-508.

## 植物细胞的转化系统\*

俞新大

(南开大学生物系)

植物细胞转化系统在体细胞遗传学、分子遗传学及遗传工程研究中已有许多应用,然而植物细胞转化的概念至今尚无严格定义。众所周知,“转化”(transformation)一词最初是用来描述细菌系统中由外部提供的裸露 DNA 转移遗传信息的过程。当 Doy 等(1973)报道细菌基因通过噬菌体转入植物细胞并且表达时,他们采用了一个新词“转入”(transgenesis)来说明其结果<sup>[1]</sup>。但是,这个词的含义和必要性并不完全清楚。八十年代以来,在植物细胞遗传操作实验中仍广泛采用“转化”一词来描述植物细胞对于外源遗传物质的摄取、整合及表达的过程。供体不但是分离的 DNA,甚至可以是完整的细菌、球质体、质粒、病毒、细胞核、染色体或用脂质体作载体等等。可见转化的含义已大大超越了原先的概念。本文就目前植物细胞转化系统的研究方法、技术特点及其进展作一论述。

### 一、整体和离体组织水平的冠瘿性转化

虽然早期有许多转化研究,但植物细胞转化现象的真正确立是从冠瘿瘤的研究开始突破的。七十年代中期,人们弄清了冠瘿转化的实质是由根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的诱瘤质粒(tumour-inducing plasmid)引起的,简称 Ti 质粒。该质粒的一个片段 T-DNA 能插入植物细胞核 DNA 中并共价结合,由于转移 DNA 的作用,转化的植物细胞能在无激素

培养基上持续生长,并合成一类正常植物所没有的冠瘿碱(opines)。由于冠瘿的形成过程包括遗传信息从细菌转移到植物细胞并且表达,因此它是一种天然转化系统。

利用农杆菌的基因转移能力, Murai 等(1983)用菜豆蛋白基因和胭脂碱合成酶基因启动子组建的嵌合基因 Ti 质粒农杆菌感染向日葵幼苗茎部和离体的茎切段,结果外源基因能在植物细胞中整合,并在转化的细胞中检测到菜豆蛋白<sup>[2]</sup>。蒋兴邨等(1985)用农杆菌诱发栽培大豆获得转化的大豆细胞系,并证实 T-DNA 能在大豆细胞系中表达和传递<sup>[3]</sup>。Deak 等(1986)用苜蓿幼苗茎切段和农杆菌过夜培养物共培养三天,然后在选择性培养基上培养,结果在切断处长出许多绿芽,产生转化再生植物的频率较高,分子杂交表明,外源卡那霉素抗性结构基因能稳定地转移整合和表达<sup>[4]</sup>。根癌农杆菌也能转化某些单子叶植物,直接在石刁柏的茎切段上接种农杆菌可诱导瘤状物,该组织能在无激素培养基上生长,并检测到 T-DNA 和编码的冠瘿碱<sup>[5]</sup>。

许多植物的叶片具有再生植株的能力,因此离体叶圆片转化法受到人们的重视。McCor-mick 等(1986)将番茄叶片小块浸入农杆菌培养液中,温和振荡,使叶块边缘都被感染。经培养后产生愈伤组织并分化出大量小植物, T-

\* 周之杭副教授热情指导,特此致谢。

DNA能以单拷贝或多拷贝插入植物核DNA中,并以孟德尔法则传递<sup>[6]</sup>。叶片转化法把转化、筛选和植株再生等几个步骤综合为一个简单而有效的过程,是研究外源基因在植物细胞中表达的有用工具。

## 二、原生质体再生细胞和农杆菌共培养转化

共培养转化系统(co-cultivation)是由Marton等(1979)建立的<sup>[7]</sup>,目前已成为植物细胞转化最常用的方法。先将分离的原生质体在含有激素的培养基上生长三天,然后把细胞壁局部再生的原生质体与农杆菌共培养32小时。植物细胞的生理状态是十分重要的,必须采用已经开始了细胞壁的合成,但还未经细胞分裂的原生质体作为受体。贾敬芬等(1983)用共培养方法转化矮牵牛单倍体和二倍体植物原生质体培养物,结果单倍体和二倍体的转化率分别为9.2和16.6(每 $10^5$ 原生质体),植物倍数性或许对转化有一定的效应<sup>[8]</sup>。用原生质体再生细胞与带有Ri质粒的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)共培养也能转化。卫志明等(1986)以预培养三天的龙葵叶肉细胞原生质体为受体,与细菌在26℃下共培养36—48小时,结果在无激素培养基上获得大量转化愈伤组织并长出许多发根,这种发根的切段极易诱导愈伤组织并分化出小植物,它们均含有T-DNA编码的冠瘿碱。由于用发根农杆菌转化的频率高,对受体细胞的毒性比Ti质粒要小,而且由Ri质粒转化的植物细胞容易形成形态上正常的植株,可望受到人们更多的重视<sup>[9]</sup>。总之,离体的共培养转化系统具有以下几个优点:(1)成百万个单细胞可以与大量的细菌相接触,因此有较高的频率选择转化子;(2)完全在实验条件下进行,重复性好;(3)方法简单,无需从农杆菌中分离质粒DNA。

## 三、原生质体与Ti质粒转化系统

该系统是用农杆菌中分离的Ti质粒DNA转化植物原生质体。Davey等(1980)以矮牵牛

悬浮培养细胞的原生质体为受体,将 $4 \times 10^6$ 原生质体与10微克质粒DNA混合,同时加入多聚-L-鸟氨酸促使转化,用无激素培养基选择转化子。结果在转化的组织中检测到冠瘿碱的酶活性<sup>[10]</sup>。Krens等(1982)从烟草无菌苗分离原生质体,在PEG和小牛胸腺DNA协助下用Ti质粒DNA转化,不但在转化组织中检测到冠瘿碱酶活性,而且证明T-DNA能稳定地整合进植物基因组中<sup>[11]</sup>。这些成功的实验开创了用裸露DNA直接转化植物原生质体的新局面,为后来的直接基因转移打下了基础。

## 四、原生质体和农杆菌球质体转化系统

用溶菌酶处理农杆菌可得球质体(spheroplasts)。Hasezawa等(1981)最早将球质体在PEG作用下转化悬浮培养的长春花(*Vinca rosea*)细胞的原生质体<sup>[12]</sup>。电镜观察表明,由于植物原生质体的内吞作用摄入了细菌球质体。对于球质体进入细胞后的详细过程尚不清楚,人们推测可能在进入细胞后几小时内降解掉,接着球质体的遗传物质就释放到细胞质中<sup>[13]</sup>。球质体的作用与脂质体作为基因转移的载体有相似之处,不过脂质体难以包装象Ti质粒那样的大分子,因此球质体是优良的自然包装体。此外,球质体的转化作用是借助于受体细胞的内吞或融合作用发生的,它避开了农杆菌只感染转化双子叶植物的局限性,从而扩大了受体的范围。新近,Baba等(1986)用球质体转化水稻原生质体成功<sup>[14]</sup>,可以预料,在转化禾本科作物细胞原生质体方面,球质体可发挥重要作用。

## 五、脂质体作载体的转化系统

脂质体是用磷脂或胆固醇与卵磷脂制成的小囊,它能将DNA包装在里面,通过植物原生质体的吞噬或融合作用把内含物转入受体细胞。脂质体具有制备方便、比较稳定、对受体细胞毒性小等优点,但在包装时要对样品作温和处理,有可能导致DNA断裂,同时在包装

大分子时也有一定困难。

Deshayes等(1985)用脂质体包装带有卡那霉素抗性嵌合基因的大肠杆菌质粒,用PEG诱导脂质体与烟草原生质体融合。结果从转化细胞获得再生植株,转化再生植物的叶肉原生质体仍能在高浓度的卡那霉素培养基上生长,而野生型的在低浓度时就杀死。在转化植物中检测到转移基因的酶活性及DNA序列。转化植物所结种子也不同于野生型,前者能在卡那霉素培养基上正常萌发生长。在转化植物自交和与野生型互交所得种子的萌发幼苗中,其抗性和敏感性表型的比例为3:1和1:1,说明抗性因子是以显性单因子核基因传递的<sup>[15]</sup>。

#### 六、直接基因转移(direct gene transfer)

这里所指的直接基因转移是指非借助于农杆菌及Ti质粒特异性转化能力的直接DNA转化。Paszkowski等(1984)将外源氨基糖苷磷酸转移酶[APH(3')II]基因的蛋白质编码区与花椰菜花叶病毒基因VI的表达信号相连接,组建成能在植物细胞中表达并带有抗性标志的嵌合基因质粒。转化时,将 $2 \times 10^6$ 原生质体与质粒DNA混合,在PEG和小牛胸腺DNA协助下温育30分钟。得到如下结果:(1)转化细胞系及其再生植株具有卡那霉素抗性表型;(2)该基因的DNA序列整合进植物基因组;(3)转化细胞系、再生植株及后代中均具有导入基因的酶活性,并以孟德尔比例传递<sup>[16,17]</sup>。

直接基因转移法打开了禾本科植物细胞转化的禁区,Potrykus等(1985)首次用选择性标记的嵌合基因质粒DNA转化意大利黑麦草原生质体,外源基因能稳定地整合进黑麦草基因组并表达<sup>[18]</sup>。后来相继有人在栽培一粒小麦和水稻原生质体转化中成功。直接基因转移不仅扩大了受体的范围,对建立植物遗传工程实验体系具有重要意义,还可以将非选择性的目的基因通过与选择性标记基因共转化而导入植物基因组,从而简化筛选非选择性标记基因转化细胞的程序。

值得重视的是,在直接基因转移中电激法(electroporation)已显示威力。Fromm等(1985)首次用该法将外源基因导入胡萝卜、烟草和玉米的原生质体中。供体是由氯霉素乙酰转移酶基因和Nos启动区或CaMV启动区组建的嵌合基因质粒DNA,用电泳冲处理含有原生质体及质粒DNA的缓冲液,结果80—100%的原生质体能存活,外源基因能稳定整合和表达<sup>[19]</sup>。电激法还能将Ti质粒DNA导入植物原生质体。其原理是原生质体经电脉冲刺激后,在膜上打开许多小孔,促使吸附到膜上的DNA进入原生质体。该法具有操作方便、对受体细胞毒性小、转化率高等优点。

#### 七、CaMV作载体的转化系统

花椰菜花叶病毒(简称CaMV)是由双链环状DNA分子组成的植物病毒,它是研究外源基因在植物细胞中表达的有用载体。由于CaMV基因组小,插入外源基因易引起感染能力的损失,Paszkowski等(1986)将外源APH(3')II的基因替代感染区基因VI的部位,组建成具有选择性标记基因但无感染能力的杂种CaMV,用它转化蕪菁的原生质体,获得了稳定的转化细胞系,外源基因能整合进植物基因组,并检测到APH(3')II特异性酶。值得指出的是,由于该杂种CaMV已失去感染能力,只有当它在野生型CaMV DNA的协助下才能发挥转化功能,可能是经野生型感染的受体细胞对外源DNA比较容易摄取和整合的原因<sup>[20]</sup>。

#### 八、微注射法(microinjection)

这是利用显微注射仪将外源DNA直接注入受体的细胞质或细胞核。虽然每次只能注射少量细胞,但转化成功率高,还可省去选择性标记的麻烦。一般用原生质体作微注处理,注射前必须将其固定位置。可以将原生质体先附着到用多聚-L-赖氨酸处理的玻片上再行注射。也可以将原生质体埋入半固体的琼脂糖微滴中

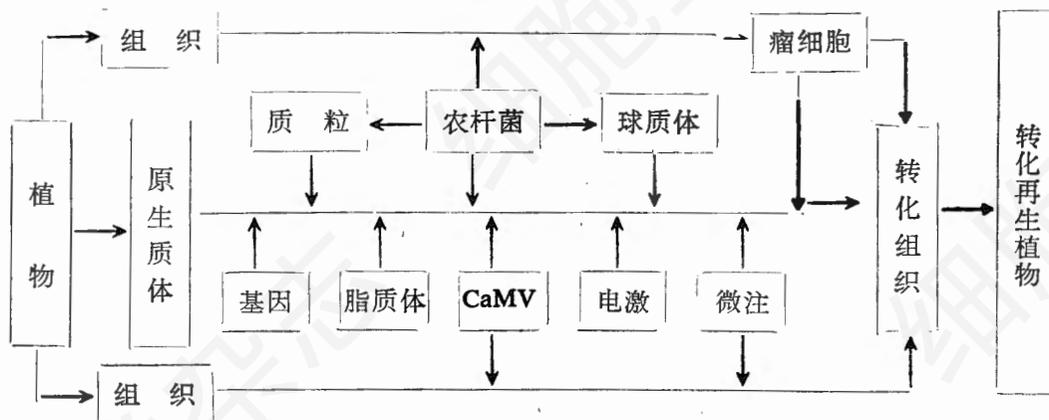
(5—15个原生质体/微升),注射后可将此微滴一起作饲养层培养<sup>[21]</sup>。最近, Crossway等(1986)将外源质粒DNA注入烟草原生质体,先用固定管吸住单个原生质体,再由微注管将DNA注入受体的细胞核或细胞质中,采用微悬滴方法培养,结果核内注射和胞质内注射的转化率分别为14%和6%<sup>[22]</sup>。

微注射法应用于胚组织可能更有应用价值。周光宇等建立了用注射法将外源DNA导入植物胚组织中去的技术<sup>[23]</sup>。先后将外源海岛棉DNA导入陆地棉和中棉得到变异的后代,还将抗枯萎病棉DNA导入感病但高产的优质棉品种中。这一技术系利用棉花自花受粉24小时后,将外源DNA注入子房中轴的胎座位置,使DNA可能沿着已形成的花粉管通道进入胚囊,从而转化受精卵或胚细胞。

除了上述各种转化系统外,用已转化的冠瘿瘤细胞原生质体与正常的原生质体融合也能实现T-DNA的转移,并得到属间体细胞杂种<sup>[24]</sup>。这是一种借助细胞融合技术的转化系统。

## 九、小 结

综上所述,我们可以用下图简要表示植物细胞的各种转化系统。图中明显可见植物原生质体作为转化受体的重要地位。研究各种转化系统的重要目的之一是为植物遗传工程建立实验体系,因此,进一步发展和完善重要作物的原生质体培养技术是十分必要的。另一方面,由于目前引入的外源基因大部分没有经济意义,仅仅有利于转化细胞的筛选和检测,因此加强对重要经济性状基因遗传背景和分子生物



植物细胞转化系统示意图

学研究也势在必行。只有这几方面的技术和知识达到统一和完善,植物细胞转化系统才能更好地在遗传工程研究中发挥重要作用。

## 摘 要

本文系统地论述了目前植物细胞各种转化系统的技术特点、基本原理和研究进展,对植物细胞转化概念的广泛含义进行了初步的讨论,文中指出了转化系统对植物细胞分子遗传学及遗传工程的重要意义,最后指出了转化系

统用于遗传工程尚需解决的问题。

## 参 考 文 献

- [1] Doy, C. H. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70: 723-726.
- [2] Murai, N. et al., 1983, *Science*, 222: 476-482.
- [3] 蒋兴邨等: 1985. 中国科学, B辑, 11: 1004-1007.
- [4] Deak, M. et al., 1986, *Plant Cell Reports.*, 5: 97-100.
- [5] Hernalsteens, J. P. et al., 1984, *The*

- EMBO. J.*, 3(13): 3039-3041.
- [6] McCormick, S. et al., 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 81-84.
- [7] Marton, L. et al., 1979. *Nature*, 277: 129-131.
- [8] Jia Jing-Fen(贾敬芬) et al., 1983. *Z. Pflanzenphysiol.*, 112: 1-6.
- [9] Wei Zhi-Ming(卫志明) et al., 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 93-96.
- [10] Davey, M. R. et al., 1980. *Plant Sci. Lett.*, 18: 307-313.
- [11] Krens, F. A. et al., 1982. *Nature*, 296: 72-74.
- [12] Hasezawa, S. et al., 1981. *Mol. Gen. Genet.*, 182: 206-210.
- [13] Okada, K. et al. 1985. *Plant Cell Reports*, 4: 133-136.
- [14] Baba, A. et al., 1986. *Plant Cell Physiol.*, 27(3): 463-471.
- [15] Deshayes, A. et al., 1985. *The EMBO. J.*, 4(11): 2731-2737.
- [16] Paszkowski, J. et al., 1984. *The EMBO. J.*, 3(12): 2717-2722.
- [17] Potrykus, I. et al., 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 169-177.
- [18] Potrykus, I. et al. 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183-188.
- [19] Fromm, M. et al., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82(17): 5824-5828.
- [20] Paszkowski, J. et al.: 1986. *Plant Mol. Biol.*, 6: 303-312.
- [21] Lawrence, W. A. et al.: 1985, *Plant Cell Reports*, 4: 33-35.
- [22] Crossway, A. et al.: 1986 *Mol. Gen. Genet.*, 202: 179-185.
- [23] Zhou, G. Y. (周光宇) et al.: Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 1983, 101, 433. Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. (eds), Academic Press, New York.
- [24] 李向辉等: 1981. 中国科学, B辑 3:223-230.

## 胶体金标记技术

夏诗茂 洪涛

(中国预防医学科学院病毒学研究所 北京)

凌静萍

(中国药品生物制品检定所 北京)

1962年, Feldherr和Marshall<sup>[1]</sup>第一次介绍了胶体金可作为一种在电子显微镜(以下简称电镜)下示踪的标志(trace)。1971年, Faulk<sup>[2,3]</sup>首先将胶体金作为一种特异的标记物(marker)应用于电镜研究中。近十年来,胶体金标记技术不仅越来越广泛地应用于透射电镜中研究各种生物大分子的定位、定性、形态发生、抗原特性等,而且同样可用于扫描电镜和光学显微镜方面。

### 一、原理与特点

氯化金在还原剂作用下(也可用其它方法)聚合形成特定大小的金颗粒,彼此因静电作用相互排斥使其保持一个较稳定的胶体状态,故称作胶体金(colloidal gold)。胶体金颗粒表面能结合多种生物大分子(如免疫球蛋白、葡

萄球菌A蛋白、植物凝血素、刀豆球蛋白A等)<sup>[4,5]</sup>。因此可利用胶体金的这些物理学特性(特定大小和形状、高电子密度、颜色反应等)和活化后不同的生物学特点,在细胞生物学领域内开展多方面的标记研究工作。而且该方法具有如下许多优越性:

1. 胶体金为颗粒性标记物,因此具有精确的定位能力,标记后不影响对细胞超微结构的分辨。

2. 具有高电子密度,电镜下很容易观察和辨认。与铁蛋白标记物相比,后者密度相对较低,其核心在电镜下易与其它重金属染料(如铅、铀等)的污染颗粒相混淆。

3. 活化后的胶体金颗粒在细胞上的非特异性吸附较低。

4. 金颗粒的高电子密度使其具有很好的