

细胞穿透肽在白菜小孢子中的内化及其效率的探究

秦莹^{1,2} 王桂香² 郭宁² 宗梅² 刘凡^{2*}

(¹首都师范大学生命科学学院, 北京 100089; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 北京 100097)

摘要 该研究以大白菜‘94-323’为材料, 通过分析细胞穿透肽(cell-penetrating peptide, CPP)在其小孢子细胞中的内化及其效率, 证明了细胞穿透肽Tat₂可以克服花粉壁的障碍, 独自或者转导GUS酶和DNA(环型质粒DNA、线型质粒DNA)等大分子进入大白菜小孢子中; 同时研究了Tat₂介导的DNA在白菜小孢子中内化效率的影响因素。结果表明: 内化效率与Tat₂/DNA复合物和小孢子共育时间正相关, 随复合物浓度的升高而增加, 最适共育温度为33 °C, 与转导DNA片段的长度关系不明显。该研究首次证明, Tat₂可以作为纳米载体传递大分子进入双子叶植物小孢子细胞, GUS酶的内化频率可达到18%, 可为细胞穿透肽介导的芸薹属小孢子转基因技术的建立提供直接的实验依据。

关键词 细胞穿透肽; 小孢子; 白菜; 内化效率; 转基因

The Internalization of Cell-penetrating Peptide in Chinese Cabbage Microspores and Its Efficiency

Qin Ying^{1,2}, Wang Guixiang², Guo Ning², Zong Mei², Liu Fan^{2*}

(¹School of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100089, China; ²Vegetable Research Centre, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract In this study, our results proved that the cell-penetrating peptide (CPP) Tat₂ had the ability to penetrate the pollen wall and carry the cargoes including DNA (circular and linear plasmid) and GUS enzyme into the microspores of Chinese cabbage ‘94-323’. The influence factors of internalization efficiency were also researched. The results showed that internalization efficiency of CPP into Chinese cabbage microspores had positive relationship with incubation time of Tat₂/DNA and microspores. Meanwhile, the internalization efficiency increased with the increasing of complexes concentration and 33 °C was the optimal incubation temperature. The internalization efficiency had no obvious relationship with DNA fragment length. This study first proved that Tat₂ could act as a nanocarrier to deliver macromolecules into microspores cells of dicotyledonous plants and the internalization frequency of Tat₂/GUS enzyme could reach to 18%. The results proved a direct experimental basis for establishment of a new transgenic technology mediated by CPP in microspore of *Brassica* crops.

Keywords cell-penetrating peptide; microspore; Chinese cabbage; internalization efficiency; genetically modification

收稿日期: 2015-03-25 接受日期: 2015-05-04

北京市农林科学院科技创新能力建设专项(批准号: KJCX2013、CXJJ2013)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-51503016, E-mail: liufan@nercv.org

Received: March 25, 2015 Accepted: May 4, 2015

This work was supported by Innovation and Capacity-building Projects by Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences (Grant No.KJCX2013, CXJJ2013)

*Corresponding author. Tel: +86-10-51503016, E-mail: liufan@nercv.org

网络出版时间: 2015-07-02 10:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150702.1000.005.html>

细胞穿透肽(cell-penetrating peptide, CPP)家族由长度、大小和携带电荷不同的一类短肽组成, 这些短肽有一个共同的特点, 即不仅可以穿过细胞膜^[1], 而且可以作为载体携带多种分子量比自己大、没有能力克服细胞膜通透性障碍的高分子化合物进入细胞^[2-3]。目前, 对CPP的研究主要在动物方面, CPP介导的大分子传递在植物上的应用仍然是一个新兴领域。

研究显示, 转运素、穿透素和肽血管内皮钙黏蛋白(peptide vascular endothelial-cadherin, pVEC)可以在烟草、小黑麦叶肉原生质体悬浮细胞中内化^[4-5]。在洋葱表皮细胞以及番茄、玉米、洋葱的根尖细胞中都有荧光蛋白成功被CPP内化的报道^[6-9]。Chugh等^[10]证明了荧光标记的pVEC和转运素可以在小黑麦幼苗各种组织中内化。在2007年报道了Tat和Tat₂在小黑麦叶肉原生质体中有核积累的现象^[11]。上述的报道都是在植物体细胞中进行的, 并没有针对植物配子体细胞的研究。只有在2012年, Ziemienowicz等^[12]在小黑麦小孢子中, 借助Tat₂/T-DNA复合物成功地获得转基因植株。这些工作表明, CPP在植物纳米生物技术中有巨大的潜力。

植物小孢子是特殊的配子体细胞, 具有单倍性、单细胞性及发育的基本同步性, 并且数量巨大。单核靠边期的小孢子在经一定的诱导处理和培养后, 能够在短时间内离体条件下形成胚状体, 在简单的培养条件下就能很快地形成完整植株, 再生株的遗传背景可以实现完全纯合。由于这些特点, 使小孢子转基因材料后代的遗传稳定及分析鉴定大为简化, 同时, 这也是小孢子培养途径受到高度重视的原因。

白菜类作物(*Brassica rapa* L.)属于十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*), 包含许多重要的蔬菜和油用作物, 在我国农业生产和居民膳食结构中占有举足轻重的地位。随着白菜全基因组测序的完成, 许多功能基因被定位与克隆出来, 建立高效、稳定的遗传转化技术体系已成为白菜基因功能研究需要解决的关键科学问题。目前, 白菜类蔬菜转基因技术主要有农杆菌介导的转化法^[13-14]和原位转化法^[15-16]等。转基因技术虽取得了一些进展, 但仍存在着很多问题。由于白菜类蔬菜脱分化难、再生率低、受基因型影响大^[16]、不易感染农杆菌, 使得白菜类蔬菜的转化效率很低。因此, 建立高频再生体系一直是研究者探索的重要课题。近年来, 关于CPP在植物组织内化和转基因方面的报道较多, 但是有关CPP介导的

白菜小孢子转基因研究未见报道。

白菜游离小孢子培养系统已经建立了20多年, 并广泛应用于双单倍体育种及相关研究。如果能够证明CPP可以有效地转导蛋白、核酸等大分子化合物进入白菜小孢子细胞, 建立一套稳定高效的细胞穿透肽介导的白菜小孢子遗传转化技术体系, 对于白菜基因功能验证和基因工程研究将具有重要的指导意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 实验采用的材料为大白菜‘94-323’, 2013年9月中旬将已催芽的供体材料种子在温室播种育苗, 幼苗4~5叶期置于5℃下春化处理21 d。11月中旬定植于北京市农林科学院蔬菜研究中心试验田, 春季3~4月份是大白菜小孢子培养的最佳时期。

1.1.2 质粒DNA、多肽和蛋白 全长9 337 bp的“pBBBast-gus-intron”环型质粒DNA, 包含gus、bar基因的编码区; 经限制性内切酶Not I酶切后, 得到9 337 bp的线型质粒DNA; 经限制性内切酶BsiW I、Age I、Not I共同酶切后, 可得到4 860 bp、2 044 bp的线型质粒DNA。

9 337 bp环型质粒DNA和4 860 bp的线型质粒DNA分别用罗丹明标记试剂盒(Mirus Bio, Madison, WI, USA)^[17]进行标记(R-DNA)。

Tat二聚体(Tat₂, RKKRRQRRRRKKRRQR-RR)^[11]以及用FITC在Tat₂的N端进行荧光标记的多肽均在生工生物工程(上海)股份有限公司合成; β-glucuronidase (GUS) enzyme (272 kDa)购买于Sigma Aldrich公司(Saint Louis, Missouri, USA)。

1.2 方法

1.2.1 花粉发育时期的观察 选择适宜的花粉发育时期是提高胚状体诱导频率极其重要的因素。有报道称, 在大白菜游离小孢子培养中, 诱导胚状体发生的小孢子最佳时期是单核后期^[18], 花蕾长度与小孢子发育时期有着密切的正相关性, 但受生长环境的影响^[19]。因此, 本实验首先采用DAPI核染色的方法, 测定单核靠边期小孢子所处的花蕾长度。

于晴天上午9:00左右取完整花序。用卡诺氏液固定后备用。根据花蕾形态特征, 将不同花蕾长度大小分为以下4个等级: 1~1.99 mm, 2.00~2.99 mm,

3.00~3.45 mm, 3.5~5.00 mm。在10%的蔗糖溶液中, 将每个级别花蕾中的小孢子游离出, 加入适量50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI染液, 混匀, 避光处理10~15 min。滴1~2滴经DAPI染色后的小孢子溶液于载玻片。于荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i)下观察并拍照记录, 使用激发光波长360 nm、发射光波长460 nm。

1.2.2 单独的Tat₂进入白菜小孢子细胞 CPP在动物和单子叶植物细胞转导方面都有了明确的证据, 但在双子叶植物细胞中是否也具有同样的功能, 有待于证实。为了检测白菜单核靠边期小孢子细胞是否能摄取Tat₂, 首先从大小合适的花蕾中游离出活性较高的单核靠边期小孢子细胞^[15], 小孢子密度用B5液体培养基调整到 $2 \times 10^6/\text{mL}$; 然后在200 μL 新鲜小孢子溶液中分别加入200 μL 的ddH₂O(对照组)、4 μg Tat₂和4 μg Tat₂-FITC, 室温避光共育1 h; 最后洗去小孢子表面的附着物: 先用B5培养基洗两遍, 再与胰蛋白酶-EDTA[trypsin-EDTA:B₅ medium=1:1(v/v)]室温混合共育3~4 min, 随后再次用B5培养基洗两遍后荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 Tat₂介导GUS酶进入小孢子细胞 为了探究白菜小孢子能否摄取Tat₂/蛋白复合物, 蛋白选用了GUS酶。分别将4 μg Tat₂和1 μg GUS酶定容到100 μL 无菌水中, 然后在2 mL EP管中将两者混合共育1 h形成复合物, 混合溶液中多肽与蛋白的比例是4:1。随后, 游离出的小孢子细胞分别与200 μL 的ddH₂O(对照组)、4 μg Tat₂、1 μg GUS酶、多肽/蛋白复合物室温避光共育1 h后, 按上述的方法清洗细胞壁; 最后, 加入染色液进行GUS活性检测, 避光4 h后, 显微镜下观察并拍照。整个实验处理过程要在低温下操作, 确保GUS酶的活性。

1.2.4 Tat₂介导环型和线型质粒DNA进入小孢子细胞 为了测定Tat₂能否携带质粒DNA进入细胞, 我们分别对环型和线型两种质粒DNA进行检测观察。多肽与DNA的基本比例是4:1^[20](将4 μg Tat₂和1 μg R-DNA、4 μg Tat₂-FITC和1 μg R-DNA分别各自定容到100 μL 无菌水中), 然后混合共育1 h形成复合物, 游离出的小孢子分别与200 μL 的ddH₂O(对照组)、4 μg Tat₂、1 μg R-DNA、4 μg Tat₂-FITC、Tat₂/R-DNA、Tat₂-FITC/R-DNA于室温避光共育1 h。后续操作与单独的Tat₂进入细胞一致。

1.2.5 影响Tat₂内化效率的各种因素 为了探究影响Tat₂在白菜小孢子中内化效率的因素, 对Tat₂-FITC/

DNA的浓度、线型DNA片段长度、Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育时间以及共育温度进行了检测。每组平行实验都以200 μL 的 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 新鲜小孢子溶液与4 860 bp的线型质粒DNA(除DNA片段长度对内化效率影响的实验组外)做基准, 每组实验独立重复3次。

在Tat₂-FITC/DNA的浓度对内化效率影响的探究实验中, 将游离出的单核靠边期的细胞分别加入200 μL 不同浓度的复合物: 4 μg Tat₂-FITC/1 μg DNA、8 μg Tat₂-FITC/2 μg DNA、12 μg Tat₂-FITC/3 μg DNA、16 μg Tat₂-FITC/4 μg DNA、20 μg Tat₂-FITC/5 μg DNA。室温避光共育1 h后, 按1.2.2所述方法洗去附着在细胞壁上的荧光, 然后加入5% TritonX-100(稀释到B5培养基), 4 $^{\circ}\text{C}$ 共育30 min。破碎细胞壁, 高速离心5 min后取上清, 在 λ 为515 nm处用荧光分光光度计(Thermo Scientific NanoDrop 3300)测量相对荧光强度RFU(relative fluorescence uptake), 代表细胞对DNA/Tat₂-FITC的摄取量。

在DNA片段长度对内化效率影响的研究中, 选用单核靠边期的小孢子细胞, 复合物是由4 μg Tat₂-FITC分别与1 μg 不同片段长度(9 337 bp、4 860 bp、2 044 bp)的线型质粒DNA所形成, 其他步骤与上述一致。

在Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育时间对内化效率影响的研究实验中, 除了各组共育时间为0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 h外, 其他步骤与上述一致。

在Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育温度对内化效率影响的研究实验中, 每组的共育温度分别设为4, 10, 25, 33 $^{\circ}\text{C}$, 其他步骤与上述一致。

2 结果

2.1 白菜小孢子发育时期的确定

荧光显微镜下观察到细胞核发出蓝色光, 核质清晰。由图1可以看出, 1.00~1.99 mm长度花蕾中的小孢子绝大多数处于单核中期以前的时期, 2.00~2.99 mm长度花蕾中的小孢子核偏离细胞中间, 可判断处于单核靠边期, 3.00~3.45 mm长度花蕾中的小孢子处于双核期, 大于3.5 mm的花蕾都出现了三核细胞。因此, 长度为2.00~2.99 mm的花蕾中游离出的小孢子才是单核靠边期的小孢子, 适合进行小孢子培养。

2.2 Tat₂可以单独进入白菜小孢子

细胞穿透肽能否独自进入白菜游离小孢子细胞, 是进一步探究其携带遗传物质进行遗传转化等

相关研究的前提。为了证明细胞穿透肽Tat₂能够独自进入白菜小孢子细胞中, Tat₂的N端标记了FITC, Tat₂-FITC与小孢子共育后在荧光显微镜下观察。如图2所示, 在对照组和无标记的Tat₂组都没有观察到荧光信号, 但是在Tat₂-FITC处理后的小孢子中观察

到了绿色荧光的信号。这种现象证明了多肽Tat₂能够内化到白菜小孢子细胞中。

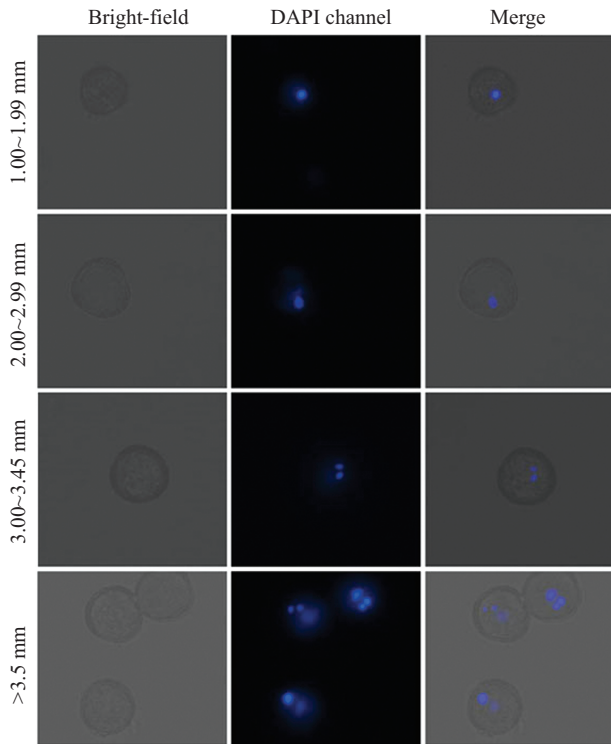
2.3 Tat₂能够介导GUS酶进入白菜小孢子

为了探究Tat₂能否携带活性蛋白进入小孢子细胞, 我们选用了较易检测的GUS酶。GUS活性检测结果显示, Tat₂可以运载GUS酶进入白菜小孢子。如图3所示, 由于小孢子本身呈黄色, X-Gluc染色后的GUS阳性细胞呈现蓝绿色, 没做处理或只与Tat₂或者GUS酶共育的小孢子检测后未见GUS阳性的现象。本实验中, 小孢子与Tat₂/GUS酶复合物共育组出现GUS阳性的细胞为18%(图3B), 即Tat₂携带GUS酶进入白菜小孢子的内化率为18%。

2.4 Tat₂介导环型和线型质粒DNA进入白菜小孢子

要探索CPP转基因技术, 首先必须明确CPP是否能携带DNA进入白菜小孢子细胞。在本实验中选择了质粒DNA的两种形态, 环型质粒DNA和线型质粒DNA来分别进行研究。

小孢子分别与Tat₂、罗丹明标记的环型或线型质粒DNA(R-DNA)、Tat₂-FITC、Tat₂/R-DNA和Tat₂-FITC/R-DNA复合物共育处理。如图4所示, 前两种处理在荧光显微镜下没有观察到荧光信号。在小孢子与Tat₂/R-DNA的处理组中观察到了红色荧光, 与Tat₂-FITC/R-DNA共育的同一细胞中既看到了红色的罗丹明荧光, 也观察到了绿色的FITC荧光, 在合并后产生了黄色图像。这些结果表明, Tat₂可以帮助实现环型质粒DNA进入白菜小孢子中, 且环型与线型质粒DNA的内化情况相同。

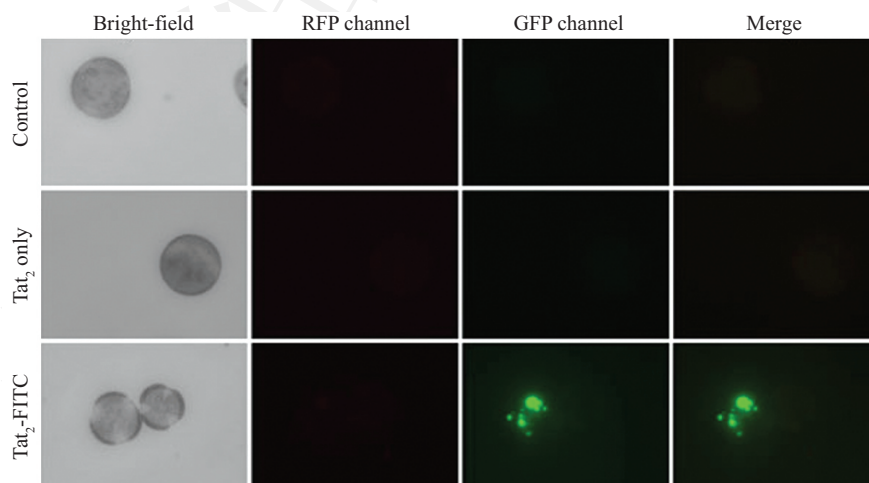


Merge呈现的图像表明了细胞核在细胞中的位置。

The merge image indicated the location of nuclei in the cells.

图1 ‘94-323’不同发育时期小孢子细胞的DAPI染色(60×)

Fig.1 DAPI staining of different developmental stages of ‘94-323’ microspore cells (60×)

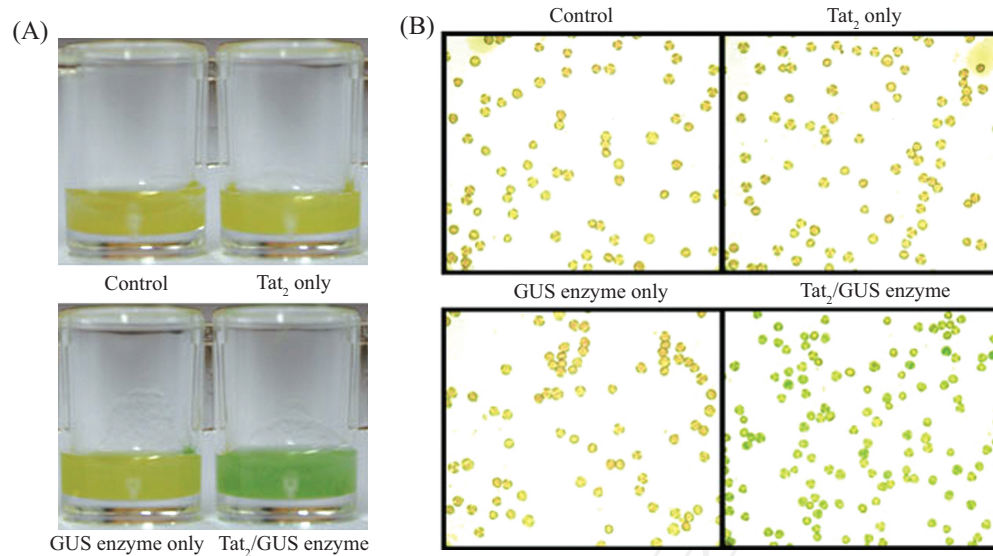


Merge通道呈现的图像表明了Tat₂-FITC在细胞中的位置。

The merge image indicated the location of Tat₂-FITC in the cells.

图2 细胞穿透肽Tat₂在白菜小孢子细胞中的内化(60×)

Fig.2 Internalization of peptide Tat₂ into microspores of Chinese cabbage (60×)

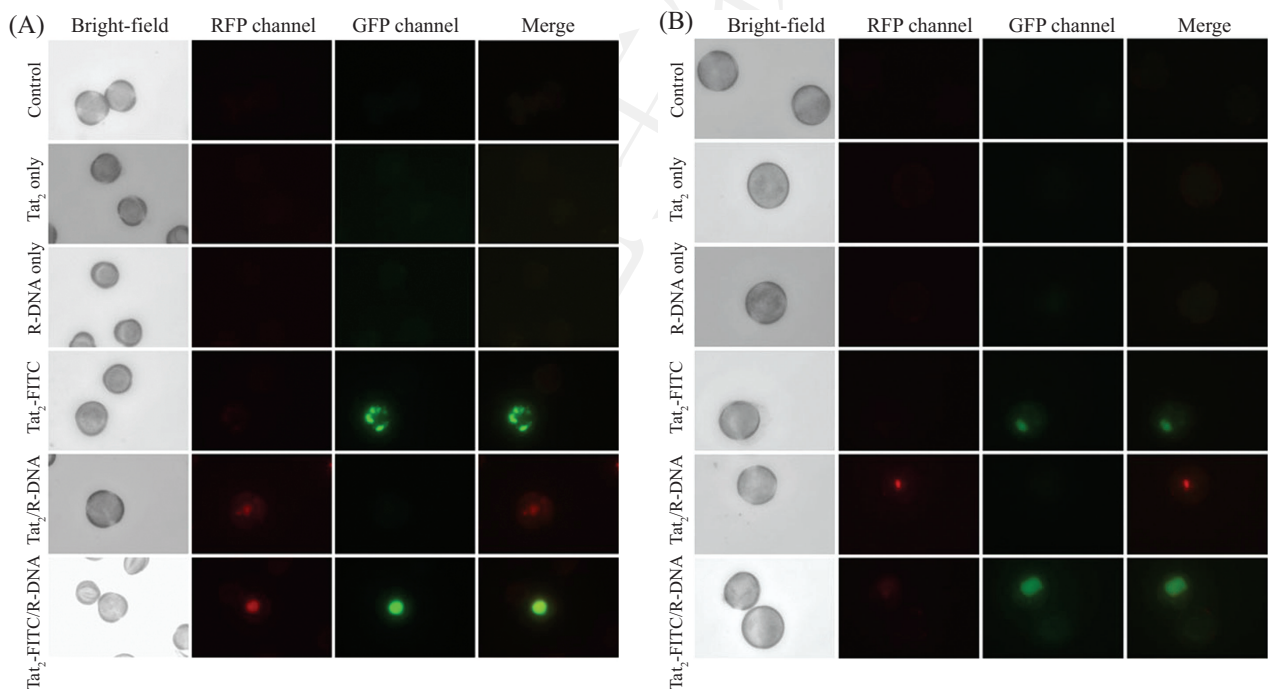


A: 对经过不同处理(水、 Tat_2 、GUS酶、 Tat_2 /GUS酶)的小孢子悬浮液进行GUS活性检测后的结果; B: 小孢子图像表明, GUS阳性呈现出的蓝绿色仅仅出现在与 Tat_2 /GUS酶复合物共育组的小孢子中, 图像的放大倍数为 $20\times$ 。

A: microspore suspensions with different treatments for GUS histochemical assay; B: microscopic images revealed that GUS activity (green blue color) only occurred in microspores incubated with Tat_2 /GUS enzyme complexes. Images were shown at a magnification of $20\times$.

图3 细胞穿透肽 Tat_2 携带GUS酶在白菜小孢子细胞中的内化

Fig.3 Tat_2 peptide-mediated GUS enzyme delivery into Chinese cabbage microspores



A: 细胞穿透肽 Tat_2 携带环型质粒DNA在白菜小孢子细胞中的内化; B: 细胞穿透肽 Tat_2 携带线型质粒DNA在白菜小孢子细胞中的内化。

A: Tat_2 -mediated delivery of Rhodamine-labeled circular plasmid DNA into Chinese cabbage microspores; B: Tat_2 -mediated delivery of Rhodamine-labeled linear plasmid DNA into Chinese cabbage microspores.

图4 细胞穿透肽 Tat_2 携带质粒DNA在白菜小孢子细胞中的内化($60\times$)

Fig.4 Tat_2 -mediated delivery of plasmid DNA into Chinese cabbage microspores ($60\times$)

2.5 Tat_2 -FITC/DNA的浓度对内化效率的影响

DNA的内化效率是建立有效转基因技术的基础。由图5可见, 随着 Tat_2 -FITC/DNA浓度的不断增加, 各处理的RFU值也有所提升, 由第一组的1 539

升高到3 063。结果表明, 随着复合物浓度的增加, Tat_2 -FITC携带DNA进入白菜小孢子细胞的量也随之增加, 也即 Tat_2 -FITC/DNA复合物的浓度与其在白菜小孢子的内化率呈正相关。有研究表明, Tat_2 在动

物细胞系的内化是浓度依赖型并且是不饱和的^[21]。因此我们推测,在植物细胞系中, Tat₂-FITC/DNA浓度的升高会导致内化效率的相对增加。

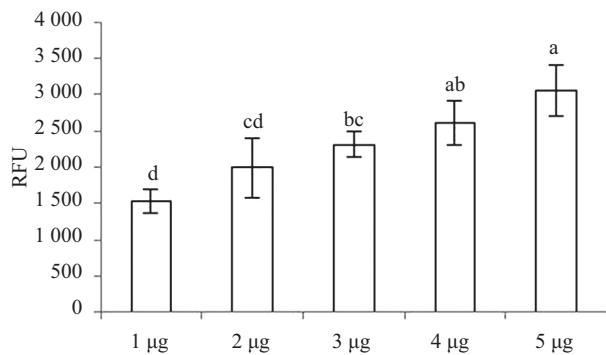
2.6 DNA片段长度对内化效率的影响

为了探究DNA片段的长短对其在小孢子中内化效率的影响。本实验用同一个质粒设计了不同DNA片段长度,检测Tat₂携带DNA的内化情况。从图6可以看出,RFU并没有因线型DNA的片段长度不同而有明显变化,都保持在RFU值为1 600的一个相对水平上,即在测试的2 044 bp~9 337 bp范围内,Tat₂-DNA复合物的内化率没有明显变化。这样我们就可以对小于10 Kb的线型质粒DNA进行Tat₂介导

的植物转基因研究,但对于10 Kb以上的目的基因还需进一步探究。

2.7 Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育时间对内化效率的影响

共育时间过长会影响白菜小孢子细胞的活性,从而导致细胞出胚率降低,因此要控制在合适的范围之内,我们设定了0.25~2 h之间的五个时间段。随着Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育时间的延长,细胞内的相对光强度明显增加(图7),表明Tat₂-FITC有更大的机率携带DNA进入小孢子细胞。后续的实验又验证了2 h不会影响出胚率。因而,我们确定在五个时间段中,2 h为最佳共育时间。

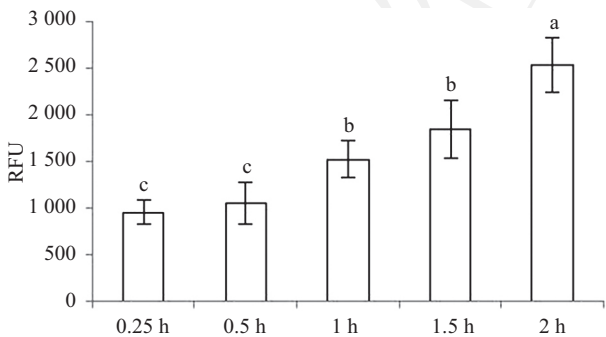


Tat₂-FITC/DNA的浓度与相对应光强度的变化。实验重复3次,数据用mean±S.D.表示,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The change of Tat₂-FITC/DNA concentration and RFU. The data were presented as mean±S.D. of three experiments. Bar with different lowercases indicated significant difference ($P<0.05$).

图5 Tat₂-FITC/DNA的浓度对内化效率的影响

Fig.5 The influence of internalization efficiency of Tat₂-FITC/DNA concentration

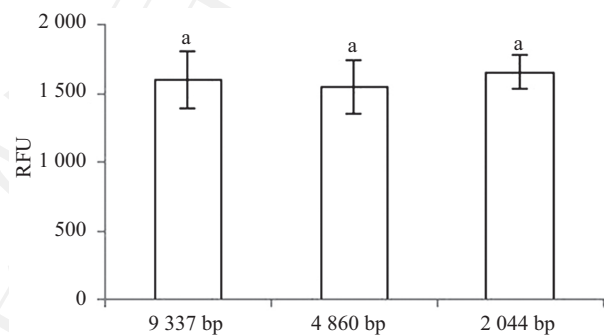


共育时间与相对应光强度的变化。实验重复3次,数据用mean±S.D.表示,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The change of incubation time and RFU. The data were presented as mean±S.D. of three experiments. Bar with different lowercases indicated significant difference ($P<0.05$).

图7 Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育时间对内化效率的影响

Fig.7 The influence of incubation time on the cell internalization efficiency

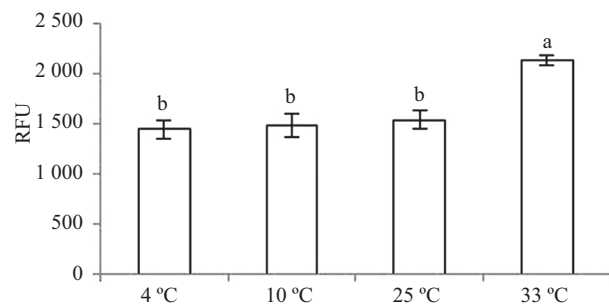


DNA片段长度与相对应光强度的变化。实验重复3次,数据用mean±S.D.表示,相同小写字母表示无显著差异($P>0.05$)。

The change of DNA fragment length and RFU. The data were presented as mean±S.D. of three experiments. Bar with the same lowercase indicated no significant difference ($P>0.05$).

图6 DNA片段长度对内化效率的影响

Fig.6 The influence of DNA fragment length on the cell internalization efficiency



共育温度与相对应光强度的变化。实验重复3次,数据用mean±S.D.表示,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The change of incubation temperature and RFU. The data were presented as mean±S.D. of three experiments. Bar with different lowercases indicated significant difference ($P<0.05$).

图8 Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育温度对内化效率的影响

Fig.8 The influence of incubation temperature on the cell internalization efficiency

2.8 Tat₂-FITC/DNA与小孢子共育温度对内化效率的影响

温度一方面影响小孢子的活力及发育途径, 另一方面也可能影响Tat₂的跨膜运输。在白菜小孢子培养过程中, 游离出的小孢子需33 °C热激处理来诱导出胚。因此在不影响细胞活性的情况下, 设计的最高温度为33 °C。结果显示, 复合物与小孢子的共育温度在4 °C、10 °C、25 °C时, 各处理的RFU值没有明显地变化, 但在33 °C时却有显著地提升(图8)。说明33 °C有利于Tat₂携带DNA的跨膜以及进入细胞。

3 讨论

虽然有研究者推测, CPP携带“货物”在不同物种和不同细胞中的内化是普遍存在的^[22]。但目前大多数关于CPP和“货物”内化的研究都基于动物细胞系, CPP在植物方面的研究才刚刚开始。植物细胞的全能性更有利于植物细胞培养和CPP介导的植物遗传转化研究, 有可能研发出一项更简单、高效、低成本的新型转化技术。植物细胞培养主要有三个途径: 体细胞胚胎发生、原生质体培养和再生、游离小孢子培养胚状体形成。其中, 游离小孢子培养与体细胞、原生质体培养相比有一些独特的优势, 如细胞的单倍性、发育的基本同步性、数量巨大、操作简单等。我们的研究首次证明了Tat₂既可以独自, 也可以携带蛋白、环型质粒DNA和线型质粒DNA进入白菜小孢子细胞, 揭示了Tat₂作为载体在利用植物小孢子培养系统转基因技术上的巨大潜力。

本实验表明, Tat₂介导的DNA在白菜小孢子中的内化效率与Tat₂/DNA复合物的浓度、复合物与小孢子共育的时间以及共育温度有关, 但与DNA片段的长度关系不明显。由于DNA的内化是进一步发生转染及遗传修饰的基础, 因此我们要在尽量保证小孢子细胞活力的基础上, 通过处理条件的优化, 提高DNA的内化率。虽然Tat₂的跨膜运输机制尚未明了, 但多数研究表明, Tat₂及其货物的转运是浓度依赖型的^[10], 而且在小麦小孢子细胞上的研究显示, 复合体的内化存在巨胞饮途径^[20]。我们在白菜小孢子上的实验结果支持了这些观点。由于白菜小孢子培养本身就需要一个33 °C、24 h的高温诱导期, 因此, 在33 °C下, Tat₂复合物内化率的提高将更有助于该技术处理条件的优化。

大多数单子叶植物, 例如小麦、玉米的小孢子细胞壁较薄, 具单一微孔; 但多数双子叶植物, 比如白菜的小孢子细胞壁较厚, 在发育过程中逐步形成3条萌发沟。小孢子的细胞壁由内壁和外壁组成, 能够抵御外源物质的侵入, 小孢子细胞对大部分营养物质的摄取是通过微孔完成的, 有研究者认为CPP内化到细胞内也是经过同样的途径^[22]。CPP内化频率的高低与微孔的多少是否有关系? 我们的研究结果显示, Tat₂携带GUS酶进入白菜小孢子细胞时的频率为18%, 略高于Chugh等^[20]在小黑麦小孢子细胞中的14%内化率。

具有gus基因的线型质粒DNA与Tat₂和小黑麦小孢子共育后, 观察到了gus基因的瞬时表达^[20]。Tat₂介导的T-DNA转染在小黑麦小孢子中成功地获得了转基因再生植株^[12]。但是, Tat₂介导质粒DNA在白菜小孢子转染的实验中并没有观察到gus基因的瞬时表达, 这也许是由于35s启动子在花粉细胞中效率比较低, 或者因为DNA没有从细胞内涵体中释放出来。许多报道表明, CPP通过内吞作用进入细胞形成内涵体, 再从内涵体中释放到细胞质^[23]。有报道称, 内涵体不充足的释放阻碍了基因进入细胞核的活动^[24], 进而影响转染效率。因此, 基因没有表达最有可能的原因是内涵体滞留^[25]。研究发现, CPP/DNA复合物在氯喹^[26]或者蜂毒素^[27]的作用下能更有效地从内涵体中逃逸, 我们需要开展进一步的研究才能建立有效的转染技术。

综上所述, 由于小孢子细胞的高胚胎发生能力、单倍性、细胞壁表面有微孔结构等特点, 它将是CPP介导的植物细胞转化技术研究的重要材料。我们利用白菜小孢子细胞研究了Tat₂在双子叶植物小孢子中的内化, 显示了Tat₂运载大分子进入白菜小孢子细胞的巨大潜能, 为CPP在植物上的应用提供了新的实践基础。

参考文献 (References)

- 1 Wang F, Wang Y, Zhang X, Zhang W, Guo S, Jin F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release* 2014; 174: 126-36.
- 2 Rolland A. Nuclear gene delivery: the Trojan horse approach. *Expert Opin Drug Deliv* 2006; 3(1): 1-10.
- 3 Wagstaff KM, Jans DA. Protein transduction: Cell penetrating peptides and their therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2006; 13(12): 1371-87.
- 4 Chugh A, Eudes F. Translocation and nuclear accumulation

- of monomer and dimer of HIV-1 Tat basic domain in triticale mesophyll protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768(3): 419-26.
- 5 Mae M, Myrberg H, Jiang Y, Paves H, Valkna A, Langel U. Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1669(2): 101-7.
- 6 Chang M, Chou JC, Chen CP, Liu BR, Lee HJ. Noncovalent protein transduction in plant cells by macropinocytosis. *New Phytol* 2007; 174(1): 46-56.
- 7 Chang M, Chou JC, Lee HJ. Cellular internalization of fluorescent proteins via arginine-rich intracellular delivery peptide in plant cells. *Plant Cell Physiol* 2005; 46(3): 482-8.
- 8 Unnamalai N, Kang BG, Lee WS. Cationic oligopeptide-mediated delivery of dsRNA for post-transcriptional gene silencing in plant cells. *FEBS Lett* 2004; 566(1/2/3): 307-10.
- 9 Violini S, Sharma V, Prior JL, Dyszlewski M, Piwnica-Worms D. Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: Lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry* 2002; 41(42): 12652-61.
- 10 Chugh A, Eudes F. Cellular uptake of cell-penetrating peptides pVEC and transportan in plants. *J Pept Sci* 2008; 14(4): 477-81.
- 11 Chugh A, Eudes F. Translocation and nuclear accumulation of monomer and dimer of HIV-1 Tat basic domain in triticale mesophyll protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768(3): 419-26.
- 12 Ziemienowicz A, Shim YS, Matsuoka A, Eudes F, Kovalchuk I. A novel method of transgene delivery into triticale plants using the *Agrobacterium* transferred DNA-derived nano-complex. *Plant Physiol* 2012; 158(4): 1503-13.
- 13 Park YH, Choi C, Park EM, Kim HS, Park HJ, Bae SC, *et al.* Over-expression of rice leucine-rich repeat protein results in activation of defense response, thereby enhancing resistance to bacterial soft rot in Chinese cabbage. *Plant Cell Rep* 2012; 31(10): 1845-50.
- 14 Yu JG, Lee GH, Kim JS, Shim EJ, Park YD. An insertional mutagenesis system for analyzing the Chinese cabbage genome using *Agrobacterium* T-DNA. *Mol Cells* 2010; 29(3): 267-75.
- 15 Cao MQ, Li Y, Liu F, Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa L. ssp. chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 1994; 13(8): 447-50.
- 16 Bai J, Wu F, Mao Y, He Y. In planta transformation of *Brassica rapa* and *B. napus* via vernalization-infiltration methods. *Protocol Exchange* 2015; 120: 813-39.
- 17 Chen CP, Chou JC, Liu BR, Chang M, Lee HJ. Transfection and expression of plasmid DNA in plant cells by an arginine-rich intracellular delivery peptide without protoplast preparation. *FEBS Lett* 2007; 581(9): 1891-7.
- 18 姜立荣, 刘凡, 李怀军, 李岩, 曹鸣庆. 大白菜小孢子胚状体发生早期的超微结构研究. *北京农业科学*(Jiang Lirong, Liu Fan, Li Huaijun, Li Yan, Cao Mingqing. Study on ultrastructure of early occurrence of Chinese cabbage microspore embryoid. *Beijing Agricultural Sciences*) 1996; 16(3): 28-31.
- 19 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响. *华北农学报*(Cao Mingqing, Li Yan, Liu Fan. The effects of genotype and donor plant growth environment on embryogenesis in isolated Chinese cabbage microspores. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*) 1993; 8(4): 1-6.
- 20 Chugh A, Amundsen E, Eudes F. Translocation of cell-penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticale microspores. *Plant Cell Rep* 2009; 28(5): 801-10.
- 21 Eudes F, Chugh A. Cell-penetrating peptides: From mammalian to plant cells. *Plant Signal Behav* 2008; 3(8): 549-50.
- 22 Chugh A, Eudes F, Shim YS. Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life* 2010; 62(3): 183-93.
- 23 Cleal K, He L, Watson PD, Jones AT. Endocytosis, intracellular traffic and fate of cell penetrating peptide based conjugates and nanoparticles. *Curr Pharm Des* 2013; 19(16): 2878-94.
- 24 Turner JJ, Ivanova GD, Verbeure B, Williams D, Arzumanov AA, Abes S, *et al.* Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent transactivation in cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(21): 6837-49.
- 25 Räägel H, Hein M, Kriiska A, Säälik P, Florén A, Langel Ü, *et al.* Cell-penetrating peptide secures an efficient endosomal escape of an intact cargo upon a brief photo-induction. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(24): 4825-39.
- 26 El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: Ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J* 2009; 11(1): 13-22.
- 27 Ogris M, Carlisle RC, Bettinger T, Seymour LW. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47550-5.