

# 通过细胞击孔向植物导入外源基因

路铁刚 孙敬三

(中国科学院植物研究所)

近年来,植物基因工程有了引人注目的发展,这主要基于两个基础领域取得的成就,一是基因重组技术的发展,使得有目的地拼接基因片段成为可能,从而能得到大量的克隆DNA;二是基因转移技术的改进和发展,尤其是近年发展起来的细胞击孔导入外源遗传物质技术被证明是最有效的方法之一。

## 一、细胞击孔转移外源遗传物质技术的优越性

向植物体内转移外源遗传物质的方法,早期是将种子直接浸渗在外源DNA溶液中,后来改用培养细胞为受体。由于DNA通过质膜的机率很低,再加之裸DNA转移到细胞后往往会部分被降解,转化效率非常低。以后又创立和发展了有载体的外源基因转移技术,如利用Ti质粒、Ri质粒、病毒、脂质体等作为载体,也有用花粉作为载体通过受精作用进行基因转移以及用PEG介导进行基因直接转移。以上方法虽然对外源基因的导入都是成功的,但效率不高,而且大部分受到宿主细胞的种的限制,缺乏普遍应用的价值。为了提高外源基因的转移频率,特别是解决禾谷类作物缺乏适当的基因载体问题,近年来发展出利用细胞击孔直接进行基因转移的新方法。

利用细胞击孔转移外源基因目前常用的有3种技术:一是电激击孔技术,二是基因枪喷射技术,三是激光微束细胞击孔技术。它们与传统的基因转移技术相比具有以下几个优点:

**1. 操作简便** 整个导入过程能在较短的时间内完成,大大减轻了由于实验操作而造成的对细胞的损伤。

**2. 基因转移效率高** 由于细胞瞬间击孔,尤其是电激击孔和基因枪喷射法可同时在膜上的多个区域击孔,使外源基因同时由多个孔道进入细胞,从而导致高效的基因转移。

**3. 无宿主限制** Ti质粒作为载体是很有效的,但由于根癌农杆菌仅对某些双子叶植物敏感,对大多数单子叶植物,尤其是重要的禾谷类作物不敏感,使得Ti质粒作为载体的根癌农杆菌转化作用很难应用于主要的禾谷类作物。而细胞击孔则不受物种限制,不论对双子叶植物还是对单子叶植物都是有效的。

**4. 对受体细胞正常的生命活动影响较小** 常规外源基因转移技术对受体组织或细胞的生命活动有较大的影响,如PEG介导的植物原生质体为受体的基因转移,由于PEG对植物原生质体有较大的毒性,处理不当甚至会造成原生质体的死亡,而电激基因转移则没有此弊病。实验证明,电激击孔对细胞的生命活动所造成的影响不但很小,甚至300伏至500伏电压的瞬间脉冲反而能促进细胞分裂、刺激愈伤组织生长和分化<sup>[1]</sup>。推测这是由于内源激素在电场作用下的极性运输而造成的。

**5. 可作为受体的类型广泛** 除质粒作为载体的根癌农杆菌转化外,其他方法如PEG或脂质体介导的基因转移等都需要原生质体作为受体。而利用细胞击孔,尤其是基因枪喷射技术不仅可以在原生质体,而且可以在单细胞、细胞团甚至小组织块的水平上进行基因转移,由这些培养物诱导植株再生比由原生质体诱导植株再生一般来说要容易得多。另外,激光微束可以在显微水平上对原生质体、单细胞

(或游离花粉)以及分离的或在活细胞内部的细胞器进行基因转移研究。尽管电激穿孔技术目前仍多以原生质体为受体,但可望在单细胞或细胞团、薄组织块,至少是细胞团或组织块的表层细胞进行操作。

## 二、电激基因转移技术(Gene transfer by electroporation)

Neuman 等于 1972 年发现电脉冲可以引起小囊泡膜通透性的改变<sup>[2]</sup>, 1977 年 Kinoshita 等发现高压直流电脉冲引起红细胞溶血并认为与细胞穿孔有关<sup>[3]</sup>, 同年又报道了如何控制红细胞膜上由外围电场造成的穿孔的大小<sup>[4]</sup>, 从而为电激基因转移工作奠定了基础。我们知道细胞膜是细胞的外部屏障,也是阻止外源基因进入细胞的主要障碍。由于细胞膜的基本成分是磷脂双分子层,致使膜的导电性很差,外加电场的作用主要是加在细胞膜上,而对细胞质的影响很小,这样在适当强度的外加电场作用下,细胞膜有可能被击穿而不影响或很少影响细胞质的生命活动。另外外加电场引起的膜穿孔是可逆的,即穿孔在一定时间内可以自动修复,这不但为外源基因的导入创造了条件,而且也保证了经电激后细胞仍处于较正常的生理状态。电激法基因转移的要点是:植物细胞经酶解去壁获得原生质体,将原生质体和外源基因混合,置于电激仪的样品小室中,然后在一定的电压下进行短时间(微秒至毫秒)直流电脉冲;电激处理后的原生质体经静置和洗涤之后转移到培养基中进行培养;然后对再生的愈伤组织进行筛选并诱导转化体进行植株分化。最后通过分子杂交技术检测外源基因在转化植株中的表达。过去各实验室多用自制的电激基因转移仪进行实验,虽然所用技术参数不好比较,但影响电激基因转移的主要因素是一致的,它们是:电场强度(电压与电极距之比)、脉冲宽度、脉冲个数及电液缓冲液的离子强度、原生质体的热激与冷激预处理、电激后原生质体的静置时间等。

开始时电激基因转移主要用于动物细胞和

酵母原生质体<sup>[5]</sup>。在植物方面,1985 年 Langridge 等用这种技术将 Ti 质粒 DNA 导入胡萝卜原生质体,得到了稳定的表达<sup>[6]</sup>。同年 Fromm 等将氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因同样导入胡萝卜原生质体,得到了瞬间表达<sup>[7]</sup>。由此电激基因转移引起了研究者们极大的兴趣,开展了不少工作。Riggs 等<sup>[8]</sup>成功地将卡那霉素抗性基因导入烟草原生质体并得到了抗性植株。对于根癌农杆菌不敏感的禾本科植物,利用电激基因转移技术进行外源基因的导入也有了突破性进展。1986 年 Ou-lee 等人将携带有 CAT 基因的质粒 DNA 导入水稻、小麦及高粱的原生质体,都得到了瞬间表达<sup>[9]</sup>。Fromm 等<sup>[10]</sup>将带有卡那霉素抗性基因的质粒 DNA 导入玉米原生质体,通过培养得到了抗卡那霉素的愈伤组织,利用分子杂交证明外源基因已整合到玉米染色体上。1987 年 Hauptmann 等将 CAT 基因导入几种双子叶植物(胡萝卜、大豆等)和几种单子叶植物(一粒小麦、象草、羊草等)的原生质体,得到了瞬间表达,并指出这种技术可以用于单子叶及双子叶植物基因功能的快速分析<sup>[11]</sup>。1988 年 Rhodes 等利用电激基因转移技术将携带有新霉素磷酸转移酶(NPT II)基因的质粒 DNA 导入了由玉米 A 188 自交系的胚性细胞悬浮系来源的原生质体,然后通过看护培养使玉米原生质体再生植株。通过分子杂交证明由被转化的原生质体而来的愈伤组织和再生植株中都有新霉素磷酸转移酶基因的存在,但转化植株没有得到种子,他们认为不育问题可能与悬浮细胞系本身有关<sup>[12]</sup>。Kinya 等将整合有氨基糖苷磷酸转移酶 I (APH(3') II, 亦即 NPT II) 基因的质粒 DNA 通过电激基因转移技术导入水稻原生质体,转化的愈伤组织通过抗生素抗性选择后得到了完整植株,并证明完整的外源基因组已被整合到再生植株的基因组上,测到了植株水平的外源基因活性表达<sup>[13]</sup>。最近 Zhang 等将新霉素磷酸转移酶基因整合到水稻染色体上并在植株水平得到表达,他们发现在电激基因转移

前将原生质体置于45°C水浴中热激一分钟,然后放在冰浴中进行10秒钟的冷预处理可大大地提高转化频率和克隆形成的数目<sup>[14]</sup>。

目前电激基因转移的受体主要是原生质体,这就不可避免地遇到原生质体的再生问题,尽管近年来原生质体培养工作有了很大的突破,特别是水稻<sup>[15]</sup>、玉米<sup>[16]</sup>、小麦<sup>[17]</sup>、大豆<sup>[18]</sup>等植物的原生质体培养已得到了再生植株,然而总的说来原生质体培养工作仍是困难、复杂的。最近有人用带壁细胞作受体进行电激基因转移取得了满意的效果。1985年Hashimoto和Moriyama等用电激基因转移技术转化了带壁酵母细胞<sup>[19]</sup>。1986年他们报道了烟草游离叶肉细胞的电激基因转移,通过产生的病毒外被蛋白的免疫荧光测定和病毒感染试验证明,烟草花叶病毒RNA在转化细胞中成功地得到表达<sup>[20]</sup>。1987年Lindsey等把CAT基因通过电激基因转移不仅导入到甜菜原生质体,同时也导入了甜菜悬浮细胞并得到瞬间表达<sup>[21]</sup>。电激基因转移用于带壁细胞的成功使人们很自然地联想到单倍体的花粉(小孢子)可能是一个更为理想的受体。Mishra等于1987年用电脉冲处理花粉后使得花粉被荧光素二乙酸酯染色的程度和具荧光的花粉粒数目下降。他们认为这是由于电脉冲引起膜通透性的改变,使荧光物质渗漏,荧光物质的渗漏是可逆的,而且和其他可溶物具有不同的性质。电脉冲引起花粉壁和膜的通透性的改变可能会使生活的花粉吸收一些大分子物质。目前有关花粉电激基因转移的工作正在Mishra实验室展开<sup>[22]</sup>。

### \* 三、基因枪喷射技术(Gene transfer by microprojection)

这种技术原理很简单,实际上就是用被放电而加速的金属颗粒对细胞击孔。其做法是首先使钨、金等金属微粒与外源DNA溶液共同保温,使DNA吸附在金属颗粒的表面,当金属颗粒被高压放电而加速后,高速微粒直接喷射原生质体、单细胞或小组织块,从而使细胞

击孔,外源遗传物质随金属颗粒而进入细胞内部,由于基因枪可以同时喷射多个包有外源DNA的“小子弹”,因此其转化效率非常高。而且它的转化受体类型广泛,不但可以用于原生质体、单细胞,而且对于细胞团、组织块水平的转化更具有其他方法不可比拟的优点。这种方法能使细胞团、组织块表面的多个细胞同时得以转化,操作迅速、简单,因而具有广泛的应用前景。已经证明在用基因枪喷射技术转化的细胞或组织中外源基因可以得到瞬间或稳定的表达。Klein的试验指出,这种技术对于能够再生植株的较小细胞能得到稳定的转化。当被加速的钨微粒对面积为1cm<sup>2</sup>、具2000多个细胞的洋葱组织块进行轰击时,约有90%的细胞同时被击孔,使表面吸附有烟草花叶病毒RNA的钨颗粒进入细胞,并在受体细胞中检测到了病毒RNA的表达<sup>[23]</sup>。他们还利用这种技术将CAT基因导入洋葱表皮组织,从被轰击的表皮组织提取液中检测出很高的CAT活性<sup>[23]</sup>。1988年McCabe等应用外源DNA包被的金微粒对大豆组织进行放电轰击,约有2%的被轰击组织通过器官发生途径再生了植株,而且在所得到的R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>代植株中都检测到了外源基因的表达<sup>[24]</sup>。

基因枪喷射技术在禾谷类作物转化上也显示出一定的优越性。Klein等用被携带有葡萄糖苷酸酶(GUS)基因的质粒所包被的钨微粒轰击玉米悬浮培养物,使葡萄糖苷酸酶基因在转化细胞中得到表达。当悬浮细胞用一层滤纸做支持物时,转化细胞的数目大约是无滤纸支持的30倍。影响转化效率的因素还有微粒的喷射速度,用以轰击的微粒的数量以及CaCl<sub>2</sub>和亚精氨酸的浓度<sup>[25]</sup>。他们认为CaCl<sub>2</sub>和亚精氨酸影响到外源DNA和微粒的结合。此外他们还对玉米胚切片表面的完整细胞进行了转化实验<sup>[25]</sup>。

### \* 四、激光微束基因转移技术(Gene transfer by laser microbeam)

激光是一种很强的相干单色电磁射线。细胞膜系统或细胞内的某些结构由于能够吸收特

定波长的激光而招致某种程度的损伤。一定波长的激光束经聚焦后到达细胞膜平面时其直径大约只有0.3—0.5 μm, 这种直径很小但能量很高的激光微束可引起膜的可逆性穿孔, 在短时间内(短于10秒)又可自动修复<sup>[26]</sup>。Berns等指出可以利用激光的这种效应对细胞进行遗传操作<sup>[26]</sup>。Tao等首先利用激光聚焦后的微束对哺乳动物细胞进行了DNA转化试验<sup>[27]</sup>, 此后Weber等对分离的叶绿体引入外源DNA也获得了成功<sup>[28]</sup>。由于激光微束的直径很小, 为在显微水平对目的细胞或细胞器进行遗传操作提供了方便。

Weber等人利用激光微束技术对原生质体、花粉以及完整生活细胞内的叶绿体进行操作, 以导入荧光标记的大肠杆菌的pBR 322质粒DNA。通过荧光检测发现DNA分别导入了原生质体、花粉和活细胞内的叶绿体, 并证明外源DNA的导入是由于细胞壁、花粉壁和膜系统的瞬间击孔而造成的, 由于这种穿孔可在5秒钟之内关闭, 外源遗传物质可以流入细胞或细胞器, 而对细胞或细胞器本身损伤不大。外源DNA的流入过程可被细胞在低渗溶液中保温处理所促进, 由于外源物质流入相对高渗的细胞或细胞器内部, 细胞的体积大约增大20%<sup>[29]</sup>。

另外, 激光微束还可用来在显微条件下进行染色体切割、细胞核击孔以及细胞融合等与基因导入有关的操作。Rosemarie等利用激光微束诱导植物原生质体的融合和哺乳动物细胞的融合, 它与电融合相比其优点在于能在显微镜下有选择性地<sup>[30]</sup>。

有关影响激光微束基因转移效率的因素, 目前尚无完整、系统的工作, 已知悬浮原生质体或细胞的介质的渗透压是影响基因导入的重要因素, 操作时原生质体或悬浮细胞的低渗处理可促进外源基因的导入。

### 五、对几种细胞击孔基因转移技术的评价

电激基因转移和基因枪喷射基因转移技术操作简单、效率高, 而且无宿主限制, 既可用

于转化双子叶植物, 又可用于转化单子叶植物, 因此可以广泛地用来开展各种细胞的转化研究, 特别是用于植物原生质体已被证明是行之有效的。电激基因转移技术用于转化带壁细胞、基因枪喷射基因转移技术用于转化单细胞、细胞团或组织块可以避开原生质体培养繁杂的实验操作。另外应用电激或基因枪喷射技术向花粉内导入外源遗传物质通过正常的受精作用有可能得到转化的种子。激光微束基因转移技术对于细胞器如线粒体、叶绿体的遗传操作具有精密和定向选择等特点, 应用这种技术开展线粒体、叶绿体的遗传工程以及细胞质遗传的研究, 将有可能对一些育种学家关心的重要问题如细胞质雄性不育基因的转移等提出有效的解决途径。

综上所述, 迅速发展的电激基因转移技术、基因枪喷射基因转移技术和激光微束基因转移技术是近年来基因工程研究中的一大进步, 虽然和Ti质粒为载体的农杆菌转化相比需要较昂贵的仪器和设备, 但由于它为解决禾本科植物缺乏有效的转化体系展示了光明的前景而受到了植物基因工程研究者的重视, 可以预料随着这些技术的逐步完善和广泛应用, 基因工程在粮食作物的改良上将发挥它应有的作用。

### 摘 要

禾本科植物的基因转移工作由于缺乏适当的转化系统而进展缓慢, 近年来发展起来的电激基因转移技术、基因枪喷射基因转移技术和激光微束基因转移技术为解决这一难题提供了可能, 并已利用电激法成功地将外源基因转入水稻和玉米, 得到了转化植株。本文扼要介绍了上述几种外源基因转移新技术的基本原理、操作要点及其在基因转移工作中所取得的成就, 并对这几种新技术在基因转移特别是禾谷类植物基因转移中的应用前景进行了评价。

### 参 考 文 献

- [1] Ochatt, S. J. et al., 1988, *Plant Sci.*, 54 : 165—169.
- [2] Neumann, E. et al., 1972, *J. Membr.*

- Biol.*, 10 : 279—290.
- [3] Kinoshita, K. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 1923—1927.
- [4] Kinoshita, K. et al., 1977, *Nature*, 268 : 438—441.
- [5] Wang, Tai-Kin et al., 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107:584—587.
- [6] Langridge, W. H. R. et al., 1985, *Plant Cell Reports*, 4 : 355—359.
- [7] Fromm, M. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 5824—5828.
- [8] Riggs, C. D., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 5602—5606.
- [9] Ou-lee et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 6815—6819.
- [10] Fromm, M. et al., 1986, *Nature*, 319 : 791—793.
- [11] Hauptmann, R. M. et al., 1987, *Plant Cell Reports*, 6(1): 265—270.
- [12] Rhodes, C. A. et al., 1988, *Science*, 240 : 204—207.
- [13] Kinya Toriyama et al., 1988, *Bio/Technology*, 6 : 1072—1074.
- [14] Zhang, H. M. et al., 1988, *Plant Cell Reports*, 7 : 379—384.
- [15] Fujimura, T. et al., 1985, *Plant Tissue Cult. Lett.*, 2 : 74—75.
- [16] Rhodes, C. A. et al., 1988, *Bio/Technology*, 6 : 56—60.
- [17] Harris, R. et al., 1988, *Plant Cell Reports*, 7(5) : 337—340.
- [18] Wei, Z. and Z. Xu, 1988, *Plant Cell Reports*, 7(5): 348—351.
- [19] Hashimoto, H. et al., 1985, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 336—339.
- [20] Morikawa, H. et al., 1986, *Gene*, 41 : 121—124.
- [21] Lindsey, K. et al., 1987, *Plant Mole. Biol.*, 10: 43—53.
- [22] Mishra, K. P. et al., 1987, *Plant Sci.*, 52: 135—140.
- [23] Klein, T. M. et al., 1987, *Nature*, 327 : 70—73.
- [24] McCabe, D. E. et al., 1988, *Bio/Technology*, 6: 923—926.
- [25] Klein, T. M. et al., 1988, *Bio/Technology*: 6:559—563.
- [26] Berns, M. W. et al., 1981, *Science*, 213 : 505—513.
- [27] Tao, W. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4180—4184.
- [28] Weber, G. et al., 1987, *Eur. J. Cell Biol.*, 43: 63.
- [29] Weber, G. et al., 1988, *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 12(2): 219—222.
- [30] Rosemarie, W. et al., 1987, *J. Cell Sci.*, 88: 145—149.

## 电场法介导植物基因的直接转移

张 谦

(兰州大学生物系细胞研究室)

植物基因工程的目的是将外源基因或DNA片段引入植物细胞,使之发生转化,获得具有各种优良特性和抗性的新型植物。达此目标的方法主要是以载体为媒介的基因转移和直接基因转移。

农杆菌的Ti质粒和Ri质粒以及植物病毒被认为是目前较为理想的载体,并取得了一些进展<sup>[1]</sup>。但这些载体均具有一定的寄主范围,

其中最希望的Ti质粒也因根癌农杆菌的寄主范围的限制,而不能应用于与人类关系密切的禾谷类植物,病毒的寄主范围则更狭窄。相反,直接基因转移法不需要生物载体,可普遍应用于每一种植物,因而在近几年得到了较快的发展,主要有化学诱导法(PEG、高钙高pH或多聚鸟氨酸处理)和物理法(显微注射法、激光法、电场法)等。本文主要对近几年迅