

低压脉冲电泳介导的外源基因转化 部分酶解的水稻小细胞团*

杨金水 葛扣麟 王蕴珠 王蓓 谈家桢

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘 要

开发了一类新型的低压脉冲电泳法介导外源基因进入水稻细胞的转化系统。本系统以水稻部分酶解小细胞团为受体, 采用低压脉冲电泳推动质粒 DNA 进入水稻细胞。以报告基因 GUS 酶活性为指标, 借以测定转化了的水稻细胞。最佳的组合处理可以获得 8.2% 的转化频率。文中对低压脉冲电泳转移外源基因的条件亦作了讨论。

关键词: 水稻; 小细胞团; 电泳; 基因转化

作物中借助基因工程技术来改良常规育种手段难以获得的某些经济性状, 一直是人们竞相追求的目标^[1,2], 而探索与建立简便、高效、易于操作的外源基因转化方法, 则是进行这一研究的基本前提。在以双子叶植物为研究对象的基因工程研究中, 植物分子生物学家已建立了以农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒为主体的转化体系^[4], 并将一些重要的标记基因和抗性基因导入到烟草、胡萝卜等植物细胞中获得可遗传的转基因植株后代^[12,15]。多年来的研究表明, 由于存在遗传机制的差别, 农杆菌介导的植物转化系统并不适合大多数谷类作物^[13]。尽管采用了诸如酚类化合物预处理农杆菌以诱导 T-DNA 的转移^[9]等方法, 但农杆菌对单子叶谷类作物的转化及可重复性仍不尽理想^[7]。这一状况促使人们寻求某些以理化因素为手段的直接基因转化法, 如 PEG 法^[8]、电激法^[14]、微弹轰击法^[6,11]等。成功例证屡有报道^[2,6,16]。其中 PEG 法和电激法主要以原生质体为受体, 而微弹轰击法则以完整的细胞或组织为材料。原生质体虽然克服了细胞壁对基因转移的障碍, 但因其对外界条件的极度敏感, 加之谷类作物原生质体存在植株再生的困难, 获得的转化子克隆与转基因植株频率过分偏低。微弹轰击法虽然具有细胞再生与分化容易的优点, 但需要特定与昂贵的设备。此外, 微弹轰击一般只能穿击少数几层细胞, 而微弹的散落密度亦有限制, 需要花费大量人力、物力筛选转化的细胞^[11]。

本项研究试图采用低压脉冲电泳方法, 在较长时间脉冲电场作用下, 推动质粒 DNA 进入已经部分酶解除壁的水稻小细胞团^[1], 达到高效转化的目的。

* 本项研究得到美国洛克菲勒基金会及上海市科委的资助。

材料与amp;方法

一、部分酶解小细胞团的制备

经继代培养 2 年的水稻悬浮细胞系——籼稻珍汕 97A(2A-1)和梗稻繁 7-10(Fang7-10)用于本项试验。换入新鲜培养基(N₆ 液体培养基附加 2ppm 2,4-D, 3%蔗糖)培养 3 天后,将悬浮细胞团经 380μm 的尼龙网过滤离心(500r/min 3 min)收集小细胞团。约 1g 左右的小细胞团加入 1ml 酶解液,后者组成如下:1% (w/v) 纤维素酶 (cellulase RS-10, onzuka, Japan)、0.5% (w/v) 离析酶 (macerozyme R-10, onozuka, Japan)、2% 半纤维素酶 (Hemicellulase, Sigma)、5 mol/L MES, CPW 7.7 mol/L 缓冲液 (KH₂PO₄ 27.2mg/L; KNO₃ 101mg/L; CaCl₂ 2H₂O 1480mg/L; MgSO₄ · 7H₂O, 240mg/L; KI 0.16mg/L; CuSO₄ · 5H₂O, 0.025mg/L, 甘露醇 7.7% (w/v), pH5.6)。20℃ 条件下静置酶解。为确定酶解浓度,在不同间隔时间取样镜检观察。酶解后用 400 目镍丝网过滤释放的原生质体,小心收集滞留网上的部份酶解小细胞团悬浮于 CPW7.7mol/L 溶解,洗涤 2 次后用于转化试验。

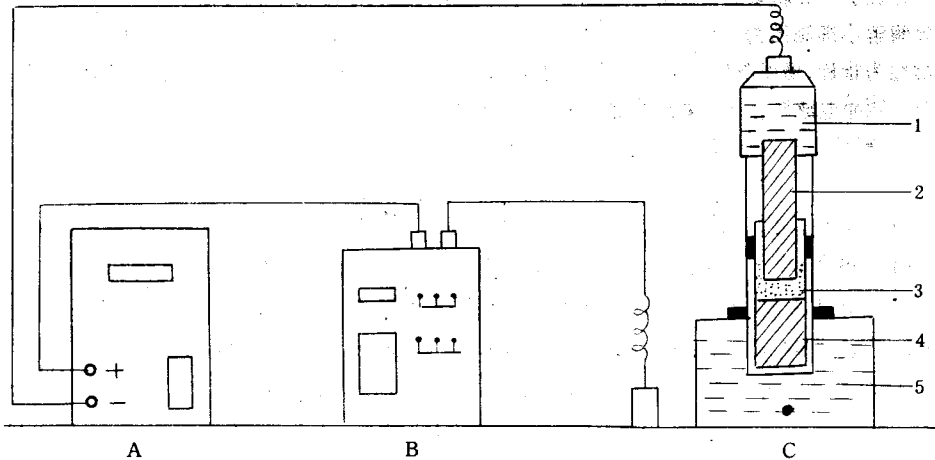


图 1 低压脉冲电泳装置

A. 低压电源; B. 脉冲时控仪; C. 样品槽

1. PB 电泳缓冲液; 2. E 极端 1% 琼脂糖凝胶柱; 3. 处理样品(小细胞团与 DNA 混合物); 4. 负极端 1% 琼脂糖凝胶柱; 5. PB 电泳缓冲液

Fig. 1 Electrophoresis apparatus for gene transfer

A. power supply; B. pulse time controller; C. sample chamber

1. PB buffer; 2. 1% agarose gel column at positive end; 3. samples, mixture of SCG and plasmid DNA; 4. 1% agarose gel column at negative end; 5. PB buffer.

二、细胞团部分酶解程度的确定

采用 2 种方法确定小细胞团的部分酶解程度:1. 在酶解的不同时间抽样检查,以酶解 7h 原生质体释放的百分比作为释放标准(100%)统计部分酶解的相对指标;2. 荧光增白剂 (fluorescent Brighter, Sigma) 对细胞壁纤维素分子具有特异结合的能力,按增白剂结合数量的多寡可以判别细胞壁残留的程度。方法是:将酶解收集的小细胞团经 CPW7.7 mol/L

溶液洗涤后,悬浮于含有荧光增白剂新鲜配制的甘露醇溶液中(荧光增白剂 0.1%(w/v),甘露醇为 0.4mol/L)。室温静置 30min,然后用 0.4mol/L 甘露醇溶液洗涤 2 次,荧光显微镜检测细胞的荧光程度。

三、质粒 DNA 的制备

用于转化的质粒 p^{BI}121 DNA(clontech)包含有可作选择标记的新霉素磷酸转移酶(NPT- I)及 β -葡糖苷酸酶(GUS)编码基因^[9]。经氯化铯梯度离心纯化质粒 DNA,然后制备成无菌的 DNA 水溶液(1 μ g/ μ l)备用。

四、低压脉冲电泳转移质粒 DNA

低压脉冲电泳装置由本实验室自行设计,委托复旦大学复旦生物实验技术研究所研制。整个装置由三部分组成:1. 低压电泳仪(0—50V);2. 脉冲时控仪;3. 样品槽(图 1)。经部分酶解的小细胞团(0.5g),用 PB 缓冲液(0.1mol/L Na₂HPO₄, 0.1mol/L KH₂PO₄, 0.4mol/L 甘露醇, pH7.4)洗涤一次,然后与 15 μ l 质粒 DNA 水溶液和 1ml PB 缓冲液充分混和,室温下(25 $^{\circ}$ C)静置 30min,再将细胞团与 DNA 的混合物等分成 200 μ l 的组分,分别转入 5 只样品管,使细胞团平铺于负极端的 1%琼脂糖凝胶面(PB 缓冲液融化凝胶),仔细插入正极端的 1%琼脂糖凝胶柱,使胶柱接触样品液液面。设置所需电泳时间、脉冲时间和处理电压。电泳后小细胞团经 N₆-1 培养基(N₆ 基本培养基, 2ppm. 2,4-D, 7.7%(w/v)甘露醇)洗涤 3 次后,转到小培养瓶中作浅层培养(N₆ 培养基附加 2ppm 2,4-D 3%蔗糖)。

五、GUS 酶活性检测

参照 Jefferson(1987)的 GUS 酶活性检测方法^[10]。

结果与讨论

一部分酶解小细胞团 悬浮培养细胞团经 380 μ m 筛网过滤后,其组成状况如表 1 所示。70%以上的细胞团由 50 个以下的细胞组成(图 2-1)。经酶解处理的小细胞团(图 2-2)随着酶解时间的延长,释放的原生质体数量越多(表 2),完全脱壁的原生质体荧光染料染色不显示蓝色荧光。脱壁程度与荧光亮度呈相关趋势,即胞壁成分保留越少,荧光越弱(图 2-3)。在脱壁细胞表面往往可观察到强度不一的荧光着色区。这表明细胞的酶解脱壁可能是一个渐进过程。不同区域进程不一。某些较易接触酶液的细胞表面区域更易受到降解,因而可能在局部区域形成完全降解区。这些区域可为质粒 DNA 进入细胞内部提供通道。酶解处理 7h 后,释放的原生质体数量与静置酶解 16h 的处理结果基本一致(资料未列)。酶解 2h 后释放的原生质数量约 10%左右,处理 4h 大部分原生质体(88%)均已释放。

二、脉冲电泳转化条件的选择 为了估测电泳对细胞的伤害作用,选择原生质体的破损率与小细胞团电泳后经过培养能够形成愈伤组织的数量作为判断标准。原生质体比之完整细胞对环境反应更为敏感。酶处理 3h 约有 20%的小细胞团可游离出原生质体(表 2)。CPW7.7mol/L 溶液洗涤后将小细胞团和原生体的混合物悬浮于 PB 缓冲液,移入脉冲电泳样品槽处理。脉冲时间固定在 30s,电泳时间为 30min。设置的电压强度

表 1 经 380 μm 筛网过滤之小细胞团*

Table 1 SCG collected by going through 380 μm nylon mesh

Kind of SCG containing different number of cell	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	>100
Number of SCG	5	9	5	1	5	2	1	3	2	2	1
percentage of SCG (%)	21.4	21.4	11.9	2.3	11.9	4.7	2.3	7.1	4.7	4.7	2.3

* 悬浮细胞系为 Fang 7-1.

Cell line Fang 7-11 was used in the experiment

表 2 酶解时间与原生质体释放数目*

Table 2 Amount of protoplasts released from SCG enzymatic digestion

Digestion time (min)	Amount of protoplasts released	percentage (%)
60	0.2×10^6	8
120	0.3×10^6	10
180	0.6×10^6	23
240	2.4×10^6	88
420	2.8×10^6	100

* 悬浮细胞系为 Fang 7-1.

Cell line Fang 7-10 was used in the experiment.

分别为 1V/cm, 3V/cm, 5V/cm, 7V/cm, 9V/cm, 11V/cm, 和 13V/cm。电泳处理后用 40 μ m 筛网分离原生质体,再置于倒置显微镜下计算完整原生质体的密度。图 3 为不同电泳条件下存留的完整的原生质体数目。结果表明,电压强度若高于 3V/cm,将有 50%以上的原生质体破损。另一组平行实验用于观察电泳对小细胞团存活率的影响。处理条件为电压 3V/cm,脉冲时间为 30s,电泳时间为 30min, 60min 和 90min。处理的小细胞团在培养 40 天后计算所形成的 1mm 以上愈伤组织块数量。结果表明(图 4),电泳时间过长,可造成对小细胞团的严重伤害。在 90min 电泳条件下,小细胞团生长的数目仅为对照的 1.7%。30min 的电泳处理可以回收到 30%存活的小细胞团所形成的愈伤组织块。

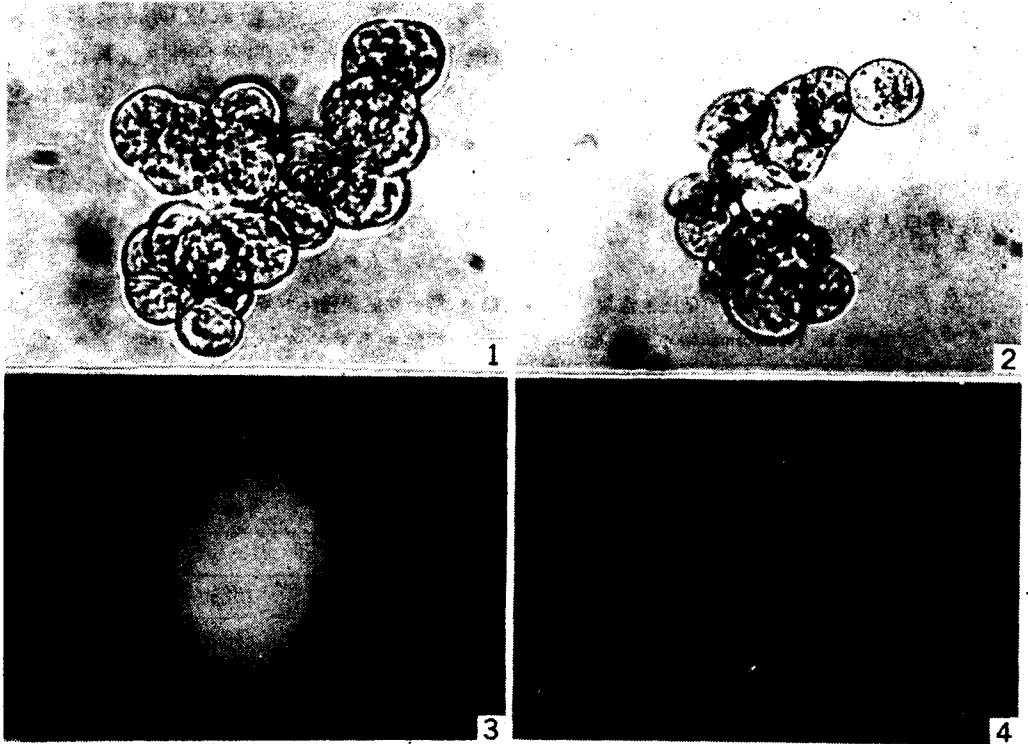


图 2 低压电泳解导转化部分酶解水稻小细胞团

1. 经 380 μ m 筛网过滤收集的水稻悬浮系 Fang 7-10 小细胞团; 2. 经酶解处理 3h 后的部分酶解小细胞团; 3. 部分酶解小细胞团的荧光染料染色; 4. 经质粒 PBI 121 DNA 转化的小细胞团, 培养 40d 后检测 GUS 酶活性。蓝色产物表示 GUS 基因在细胞中表达。

Fig 2 Transformation of SCG mediated by electrophoresis

1. SCG of suspension cell line Fang 7-10 collected by going through 380 nylon mesh; 2. Partially digested SCG; 3. Fluorescent Brighter staining of partially digested SCG; 4. Transformed cells of SCG after cultured for 40 days. Blue cells showed stable expression of GUS genes in transformed callus.

三、小细胞团的转化与 GUS 酶活性 根据不同电泳处理条件对小细胞团存活率的影响,实验选择了 2 种电压强度用于质粒 DNA 转移。设置电压分别为 1V/cm 和 3V/cm。脉冲时间 30s、电泳时间 30min。转化处理的细胞团培养 40 天后,检测 GUS 酶活性。由于转化的细胞含有报告基因 GUS 的表达产物,可将 GUS 酶反应底物分解产生特征性蓝色反应(图 2-4)。蓝色产物可沉积在细胞内原位反应部位而不扩散。根据蓝色细胞的数量来

确定转化的频率。采用了3种统计方法来评价小细胞团的基因转化:1. 蓝色细胞团(含有1个以上蓝色细胞的细胞团)占总细胞团的比例;2. 蓝色细胞占蓝色细胞团中总细胞数的比例;3. 蓝色细胞占有检测总细胞数的比例。表3为按以上方法统计的结果。2种电泳处理(1V/cm和3V/cm)均可获得转化细胞。转化率分别为2.9%(1V/cm)和8.2%(3V/cm)。如以细胞团为统计单位,蓝色细胞团占总细胞团的比例则分别为13.3%(1V/cm)和16%(3V/cm)。这一结果暗示,在转化处理的小细胞团中有1/6—1/8的细胞团含有转化细胞。这说明,即使不采用抗卡那霉素筛选培养基,也有相当高的机率获得转化的细胞系。而蓝色细胞团中蓝色细胞的比例在2种处理中分别为16%(1V/cm)和21.6%(3V/cm)。其中3V/cm一组实验中,约有1/5左右(21.3%)的蓝色细胞团中蓝色细胞的数目超过50%(数据未列)。必须指出的是,在对照组中也曾检测出0.2%的蓝色细胞,其出现频率远远低于转处理组的蓝色细胞频率(8.9%/0.2%)。这一现象表明,水稻悬浮细胞中可能含有少量具有分解GUS底物的酶活性,由于其强度较低(0.2%),不足以造成对电泳转化结果的干扰。以上分析表明,低压脉冲电泳转移外源DNA进入部分酶解水稻小细胞团,可以获得令人较满意的转化效果。

表3 低压电泳解导的水稻部分酶解小细胞团转化效果

Table 3 Transformation of SCG mediated by electrophoresis at low-voltage with long pulse

	Frequency of transformed cells	Electrophoretic treatments(V/cm)		
		1	3	ck
1	Blue SCG	6	29	
	Total SCG	45	180	
	Frequency of blue SCG (%)	13.3	16	
2	Blue cells	48	121	
	Total cells of blue SCG	293	559	
	Frequency of blue cells (%)	16	21.6	
3	Blue cells	48	121	6
	Total cells from blue and nonblue SCG	1631	1463	2533
	Frequency of blue cells (%)	2.9	8.2	0.2

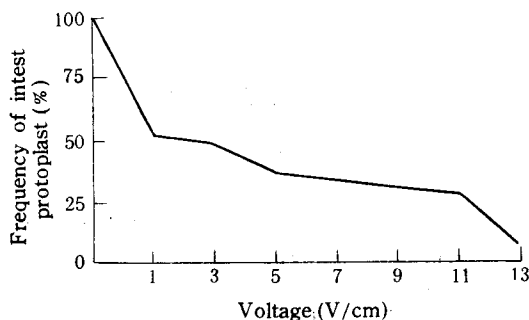


图3 电压强度与原生质体的破损比例

Fig. 3 Relation of voltage with damage of protoplasts from SCG

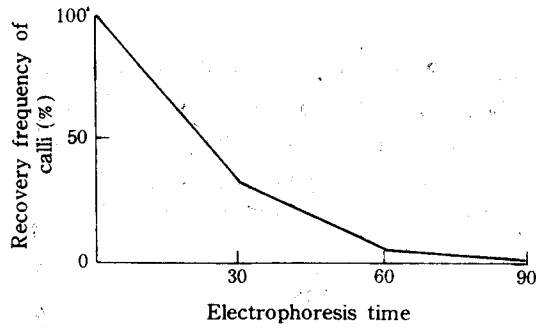


图4 电泳处理对小细胞团存活率的影响

Fig.4 Recovery frequency of calli from the survivors of SCG

本文所报道的低压脉冲电泳介导的转化方法,已经成功地将含有 GUS 基因的外源 DNA 导入部分酶解水稻小细胞团,并获得转化的细胞。本实验采用部分酶解小细胞团作为受体,兼顾了原生质体易于导入外源 DNA 和小细胞团易于生长的优点,又克服了原生质体对外界条件极其敏感的缺点,不仅大大简化了培养程序,而且便于实验操作。低压脉冲电泳转化仪,价格低廉将定型生产,国内一般实验室均可购置。这一系统可望推广到其他植物,特别是一些原生质体再生困难的谷类作物,用它来进行外源基因导入与转化研究前景更为广阔。

参 考 文 献

- [1] 杨金水、葛如麟、罗敏、王堇珠、王蓓、胡蓉霞、钱谈家桢,外源基因导入部分酶解的水稻小细胞团及其转基因植株的再生。植物学报,1991,33(11):825-832.
- [2] Battraw, M. and T. C. Hall, Stable transformation of *Sorghum bicolor* protoplasts with chimeric neomycin phosphotransferase II and beta-glucuronidase genes. *Theor. Appl. Genet.*, 1991, 82: 161-168.
- [3] Boulton, G. M., E. W. Nesteer and M. P. Gordon, Plant phenolic compounds induce expression of *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science*, 1986, 232: 983.
- [4] Bevan, M. W. and M. D. Chilton, T-DNA of *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Annu. Rev. Genet.*, 1982, 16: 375-384.
- [5] Chibbar, R. N., K. K. Kartha, N. Leung, J. Qureshi and K. Caswell, Transient expression of marker genes in immature zygotic embryos of spring wheat (*Triticum aestivum*) through microprojectile bombardment. *Genome*, 1991, 34: 453-460.
- [6] Finer, J. J. and M. D. McMullen, Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) via particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 1990, 8: 586-589.
- [7] Grimsley, M., B. Hohn, C. Ramos, C. Kado and P. Rogowsky, DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or *Brassica* by agroinfection is dependent on bacterium virulence functions. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, 217: 309.
- [8] Krens, F. A., K. L. Molendi, G. J. Wulloms and R. A. Schilperoort, In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, 1982, 296: 72-74.
- [9] Jefferson, R. A., S. M. Burgess and David Hirsh, Beta-Glucuronidase from *Escherichia Coli* as a gene fusion markers. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 8447-8451.
- [10] Jefferson, R. A., GUS fusions, beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 1987, 6: 3901.
- [11] McCabe, D. E., F. S. William, J. M. Brian and C. Paul, Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology*, 1988, 6: 923-926.
- [12] Ow, D. W., K. V. Wood, M. Deluca, J. R. Dewar, D. R. Helinski and S. H. Howell, Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*, 1986, 234: 856-859.
- [13] Potrykus, I., Gene-transfer to cereals: An assessment. *Bio/Technology*, 1990, 8: 535-542.
- [14] Sautter, C., H. Waldner, G. Neuhaus-Ur, A. Galli, G. Neuhaus and I. Potrykus, Micro-targeting: Higher efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Bio/Technology*, 1991, 9: 1080-1085.
- [15] Scott, R. J. and J. Draper, Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: A useful method system for gene expression studies in plants. *Plant Molecular Biology*, 1987, 8: 265-274.
- [16] Zhang, W. and R. Wu, Efficient regeneration of transgenic plant from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 76: 835-840.

**ELECTROPHORETIC DRIVE; HIGH EFFICIENCY GENE TRANSFER
USING A NOVEL APPROACH FOR THE DELIVERY
OF FOREIGN GENES INTO RICE CELLS***

Yang Jinshui, Ge Koulin**, Wang Yunzhu, Wang Bei and Tan Jiazhen
(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*)

Abstract

A new method has been developed to introduce foreign DNA into rice cells. Gene delivery occurs when a low-voltage electrophoresis at long pulse applied to a mixture containing partially digested SCG (small cell groups) and plasmid DNA. Gene-transfer efficiency is evaluated by a detection of GUS activity resulting from the chimeric plasmid DNA. The optimal combination of voltage and pulse produces a frequency of up to 8.2% for transformation of SCG. The results demonstrates that electrophoretic drive is applicable to introduce foreign genes into plant cells.

Key words: Rice; Small cell groups (SCG), Electrophoresis; Gene transfer; Stable expression.

* The research project is supported by the Rockefeller Foundation of the United States and Science Commission of Shan jhai Government.

** To whom correspondence should be addressed.