

外源基因直接转移技术之评价*

林良斌 官春云

(作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南农业大学, 中国长沙, 410128)

摘要 外源基因直接转移技术有 PEG 法、电击法、基因枪法、微注射法、脂质体法、生殖细胞转化法等。本文对它们进行了比较分析, 指出它们各自的优缺点, 并提出生殖细胞转化法是一种值得探索和应用的转化方法。

关键词 外源基因, 直接转移技术, 评价

分类号 Q343

Appraisalment on Exogenous Gene Direct Transferring Techniques

LIN Liangbin GUAN Chunyun

(Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province,
Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, PRC)

Abstract As for exogenous gene direct transferring techniques, there are PEG-mediated, electroporation, biolistic, microinjection, liposome-mediated, reproductive-cell transformation method, etc. Their advantages and disadvantages were pointed out by comparative analyses, the reproductive-cell transformation method which was worthy of researching and applying was put forward.

Key words exogenous gene, direct transferring technique, appraisalment

植物基因工程是近 20 多年来随着 DNA 重组技术、基因遗传转化技术、植物组织培养技术以及目的基因整合与表达检测技术的发展而发展起来的生物技术。遗传转化技术是其关键技术, 经过 10 多年的不断创新和发展, 植物遗传转化技术已取得了很大的进展。但目前遗传转化技术仍是植物基因工程的瓶颈, 阻碍着它的发展, 主要是由于它们存在着这样或那样的缺点, 或是转化频率低, 或是转化结果不稳定等。因此, 对它们进行比较、分析、归纳等研究, 有助于它们在植物基因工程中的应用, 促进植物基因工程的发展。

综合分析国际文献报道, 目前在植物基因工程中仍以农杆菌介导的外源基因间接转移技术为主, 获得成功的例子居绝大多数, 根癌农杆菌占 61%, 发根农杆菌占 18%, 两者几乎占 80%^[1]。但农杆菌介导的外源基因转移技术也有其局限性, 即它对多数单子叶植物不敏

感,因而受到宿主范围的限制,特别是具有重要经济价值的禾谷类作物,其高效转化迄今仍是一个难点。尽管近年来仍在不断探索,但还没有根本性突破。即使是双子叶植物,它也受供试植株基因型的影响。与此同时,一些以原生质体、胚性细胞、分生组织等为受体,借助化学或物理手段直接导入外源基因的方法应运而生。其中主要有PEG(聚乙二醇)法、电击法、基因枪法、微注射法、生殖细胞转化法、脂质体法等10余种外源基因直接转移方法。这些方法的开发有效地弥补了前述的不足,特别是对禾谷类作物遗传改良技术的发展具有重大的革新意义。

1 PEG法

该方法系将原生质体悬浮于含有外源基因(DNA)的介质中,用相对分子质量4 000~6 000的PEG,在pH 8~9条件下促进对DNA的摄取,从而使其转化。最早由Krens等用它实现了烟草的遗传转化。它不需要特定的仪器设备,结果比较稳定,重复性好,转化频率可达 10^{-2} 。此法已在水稻、玉米、小麦、油菜、烟草、番茄、马铃薯、拟南芥、诸葛菜^[5]等植物上获得成功。但影响其转化频率的因素也很多,如二价阳离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})、PEG的最终浓度、外源DNA的浓度和构象,加入DNA和PEG的次序等^[2-4],并且需要制备原生质体和建立原生质体再生系统。这是此法的主要缺点。

2 电击法

该法是利用原生质体在高压脉冲作用下在质膜上形成可逆性瞬间通道,从而促进外源DNA的摄取。此法的优点是操作简便,不受宿主限制,转化效率较高,重复性较好。与PEG法相比,它运用较广泛,既可以用于转化原生质体,也可以用于转化胚性悬浮细胞以及具有高度再生能力的组织和器官,不需要制备原生质体和建立原生质体再生系统。但它需要昂贵的电击仪,易造成原生质体损伤,对有壁细胞或组织的转化效果较差。Fromm等^[6]首先应用电击法将CAT基因转移到了烟草、胡萝卜和玉米原生质体中,并得到了表达。自此先后在水稻、马铃薯、番茄、甜菜、大豆、甘蔗、小麦、油菜等作物上获得成功^[1]。

3 基因枪法

又称生物射弹法,是由Sanford等于1987年创造发明的。其基本原理是将DNA包裹于微小的金属钨或金颗粒的表面,在高压下使金属颗粒喷射,高速穿透受体细胞或组织,使外源基因进入受体细胞的核中整合并表达。该法的优点是可以免去分离原生质体的麻烦,直接转化植物各种外植体、愈伤组织以及胚性细胞系。此法已在玉米、水稻、小麦、甘蔗、高粱、燕麦、兰花、烟草、菜豆、云杉、杨树、拟南芥等植物上获得成功^[7]。但它的转化频率较低,并需要昂贵的仪器,转化成本较高。克服了这些不足之处,它将成为很有发展前景的遗传转化技术。

4 微注射法

该法是在模拟注射动物卵细胞的方法的基础上发展起来的一种植物遗传转化技术。其

优点是转化受体比较广泛,可以是原生质体,也可以是细胞或多细胞的组织器官,它可以定点、定量注入外源 DNA,转化效率较高,达 20% 以上^[8],并且不需要特定的选择系统。但这一技术需要以精细的显微操作技术和细胞低密度培养技术为基础,技术要求高,工作效率低,应用不多。迄今,此法仅在油菜、番茄等少数植物上获得成功。

5 脂质体法

脂质体是由磷脂组成的膜状结构,将 DNA 分子包装在脂质体内,当与原生质体共保温时,通过两者之间膜结构的相互作用,可以将 DNA 分子高效地导入到植物原生质体中去。脂质体法最早应用于动物,现已成为动物细胞转化最为有效的手段,最近几年才运用于植物。脂质体法介导外源 DNA 转化可免受细胞内核酸酶的降解作用,同时还具有提高 DNA 局部浓度的效果,使之转化频率较高,操作较为简便,对原生质体无毒害。其缺点是需要制备原生质体和建立原生质体再生体系,对于还没有建立原生质体再生体系的植物,运用脂质体法进行转化受到了限制。迄今,此法仅在烟草、水稻中获得成功^[9]。

6 激光微束法

激光微束可引起细胞可逆性穿孔,将外源 DNA 导入到细胞中。最先是 Weber^[10]运用激光微束法于油菜的遗传转化,近来王兰岚等^[11~12]运用激光微束法在小麦等作物上获得成功,分子检测表明在一定能量状态的激光微束照射下,能够将外源 DNA 分子导入到受体细胞中,并稳定整合到受体基因组中并得到表达。其优点是受体材料广泛,不受植物种的限制,对细胞损伤小,转化频率高,重复性好。但激光微束法需要改进的问题还很多,比如激光照射时采用手动法费时且缓慢,每小时只能照射 10^3 个左右的细胞,并且只能照射到受体材料的表层细胞,只有那些表层细胞易于愈伤化且有较好分化潜力的材料才有可能获得相对较好的结果,这样就限制了它的使用范围。正如瑞士学者 Potrykus 所评价的那样,激光微束法只在那些不能使用基因枪及微注射法的特殊情况下,才可能显示出优越性。

7 生殖细胞转化法

Hess^[13]以人工培养萌发的花粉与外源 DNA 混合后授粉,在获得的后代中发现了外源基因的表达性状。De Wet^[14]应用 Hess 技术获得玉米叶斑病抗性转移。Ohta^[15]采用类似的方法,在子代中得到较高频率的外源基因转移。现在已有人用基因枪法、电击法等手段将外源基因导入花粉,再授粉获得转化的子代。

周光宇等^[16]分析了植物远缘杂交的成因,提出 DNA 片段杂交假设,认为在受精和胚发育初期是植物接受远缘遗传物质的敏感时期。并在此基础上设计了授粉后外源 DNA(基因)导入植物的技术,即在植物授粉后通过花粉管通道或子房注射将外源 DNA(基因)引入胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。花粉管通道法最先应用于棉花^[17],随后在玉米^[18]、水稻^[19]等农作物上获得成功。但对于不同的植物,其具体的技术细则却不同,应根据植物的花器结构以及授粉后受精的时间和过程来确定。我们用子房注射法将

Bt 毒蛋白基因导入甘蓝型油菜, Southern 分子杂交表明目的基因已整合到油菜基因组中. Pena 等^[20]将外源基因注射到减数分裂后 14 天的黑麦幼穗鞘腔里, 从得到的种子中筛选出了转化体, 并提供了 Southern 杂交的证据.

生殖细胞转化技术可分为两类: 即以雄配子体(花粉)为直接对象的花粉介导法和以雌配子体(胚囊)为直接对象的子房受体法(包括花粉管通道法和子房注射法). 它们具有如下优点: 1) 不需要昂贵的仪器设备, 操作简便, 易于掌握; 2) 不需要原生质体制备、细胞组织培养和植株再生, 避开了组织培养和植株再生过程中带来的遗传变异和优良农艺性状的丧失; 3) 不易产生嵌合体; 4) 不受供试植株基因型的影响; 5) 转化频率较高, 可达 $10^{-2} \sim 10^{-1}$, 转化结果稳定; 6) 用来进行转化的 DNA 可以是带有目的基因的重组 DNA 或总体 DNA. 特别是对由许多基因控制的经济性状的改良, 总体 DNA 导入就更显出其优越性; (7) 研究直接与大田实践相结合, 可加速科技成果的转化. 其缺点是得到的植株没有经过选择, 进行分子检测的工作量较大. 现在 PCR 技术的发展能解决这个问题.

8 其它方法

除了上述几种主要外源基因直接转移方法外, 还有真空渗入法(负压法)^[21]、低压脉冲电泳法^[22]、超声波转化法^[23]、碳化硅纤维介导法^[24]等. 这些方法只在少数几种植物上进行了尝试, 它的适用性有待于进一步研究.

综上所述, 向植物导入外源基因的直接转移技术多种多样, 各有利弊. 面对种类繁多、性状各异的植物, 无需也不可能有一致的、普遍适用的外源基因直接转移技术. 但对于开花植物, 生殖细胞转化法似乎是一种更值得探索和应用的转化方法. 因为它具有许多优点, 是其它方法所不能比拟的, 其中最主要的是它不会带来遗传变异和优良农艺性状的丧失, 不易产生嵌合体, 转化结果稳定, 转化效率较高, 可以用来改良多基因控制的经济性状, 并且研究直接与大田实践相结合, 可加速科技成果的转化等. 它是一种适合我国国情、有较好发展前景的转化方法. 虽然现在还有许多人对它持否定的态度, 但万变不离其宗, 其原理与其它转化方法一样, 都是将外源 DNA 导入细胞, 然后整合到细胞的基因组中. 我国在这方面的研究居世界领先水平, 充分显示出其发展前景.

参 考 文 献

- 1 傅荣昭, 孙如勇, 贾士荣主编. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994
- 2 Shillito RD, Saul MW, Paszkowko M M et al. High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnology*, 1985, 3: 1099 ~ 1130
- 3 Negrutiu I, Shillito RD, Potrykus I et al. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions: I. Setting up a simple method for direct gene transfer to protoplast. *Plant Mol Biol*, 1987, 8: 363 ~ 373
- 4 Kohler F, Cardon G, Pohlmann M et al. Enhancement of transformation rates in high plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? *Plant Mol Biol*, 1989, 12: 189 ~ 199
- 5 周翼明, 卫志明. PEG 法介导转化诸葛菜下胚轴原生质体获得转基因植株. *遗传学报*, 1996, 23(1): 69

- 6 Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation. Proc Natl Acad Sci U SA, 1985, 82: 5824 ~ 5828
- 7 梁建生. 生物弹技术在禾谷类植物基因转移中的应用. 细胞生物学杂志, 1992, 14(1): 13 ~ 15
- 8 Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid OM et al. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryos. Theor Appl Genet, 1987, 75(1): 30 ~ 36
- 9 朱祯, 李向辉. 植物遗传工程研究进展. 生物工程进展, 1991, 11(5): 35 ~ 43
- 10 Weber G, Monajembashi S, Greulich KO et al. Uptake of DNA in chloroplasts of *Brassica napus* facilitated by a UV-laser microbeam. European J Cell Biology, 1989, 49: 73 ~ 79
- 11 王兰岚, 宋桂英. 利用激光微束将外源基因导入高等植物细胞的研究. 激光生物学, 1995, 5(1): 809 ~ 811
- 12 王兰岚, 傅荣昭. 利用激光微束穿刺法将外源基因导入小麦的研究. 遗传学报, 1995, 22(5): 394 ~ 399
- 13 Hess D. Investigation on the intra- and interspecific transfer of Anthocyanin genes using pollen as vectors. Z. Pflanzenphysiol. Bd, 1980, 98: 321 ~ 327
- 14 DeWet JM J. The experimental manipulation of ovules tissue. In: GR Chapman et al. ed. published by longman Inc NY, 1983, 197
- 15 Ohta Y. High efficiency genetic transformation of mize by a mixture of pollen and exogenous DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 715 ~ 719
- 16 Gangyu Zhou et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Methods in Enzymology, 1983, 101: 433 ~ 448
- 17 黄骏麒等. 外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状变异. 遗传学报, 1981, 8(1): 56
- 18 丁群星, 谢友菊等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究. 中国科学 B 辑, 1993, 23(7): 707 ~ 713
- 19 谢道昕等. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. 中国科学 B 辑, 1991, 8: 830 ~ 834
- 20 Pena A, Lorz H, Schell J. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature, 1987, 325: 274 ~ 276
- 21 巩振辉, Milner JJ. 拟南芥基因转移新方法—真空渗入法的研究. 西北植物学报, 1996, 16(3): 277 ~ 283
- 22 王蓓, 谈家祯. 低压脉冲电泳介导的水稻转基因植株再生. 中国科学 B 辑, 1995, 25(3): 295 ~ 301
- 23 王国英, 张宏. 几种玉米基因转移技术的研究及转基因植株的获得. 生物工程学报, 1996, 23(1): 45 ~ 49
- 24 田桂英. 向植物导入外源 DNA 方法的研究与发展. 生物工程进展, 1996, 2: 4 ~ 7

(上接 171 页)

- 50 Grison R et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. Nature Biotechnology, 1996, 14: 643 ~ 646
- 51 Marchant R et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarp on rosae* Wolf). Molecular Breeding, 1998, 4: 187 ~ 194
- 52 Zhu Q et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Biotechnology, 1994, 12: 807 ~ 812
- 53 Neuhaus JM et al. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. Pl. Mol Biol, 1991, 16: 141 ~ 151