

## 中文摘要

本文从拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织生物学特性研究入手,以期制备适合农杆菌高效转化的受体材料,并制定科学、合理、有效的转化方案;利用所构成的多个质粒载体,进行拟南芥悬浮细胞基因转化,以检验多种转化方案的可行性,并优化转化条件;检测转化细胞报告基因的瞬时表达和稳定表达,以期建立有效的转化模式,并获得可利用的转化材料。本论文所做的主要工作如下:

### 1、拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织生长特性与培养条件

试验研究了拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织的生长特性及其继代培养条件,旨在摸索维持拟南芥悬浮细胞正常稳定生长的培养技术,并为拟南芥悬浮细胞进一步的遗传操作提供良好的受体材料和科学依据。结果表明,在每个 7d 一次的继代周期中,拟南芥悬浮细胞的生长表现明显的 S 型生长曲线。正常培养条件下,继代后 2-4 d 出现快速生长时期,此后生长量迅速下降,但接种量不同,其继代后悬浮细胞生物量及快速增长发生时期不同。维持 7d 继代周期的理想接种量为起始悬浮液按 10ml/50ml 稀释。接种量小,生长迟缓,甚至不能增殖。培养基中不同激素及不同蔗糖含量均会对其生长产生极明显的影响,在 B5+0.2mg/L NAA 条件下反复继代后的细胞,再加入外源 NAA 时,反而会抑制其生长。蔗糖含量以 30g/L 最好;蔗糖含量低,悬浮生物量及细胞活性明显下降。

拟南芥愈伤组织生长也呈现一定的规律性,正常条件下,需经历约各 10d 的诱导时期、快速生长时期和生长停滞及老化时期。愈伤组织诱导及其生长对外界条件也特别敏感,一定的表面湿度及较低的培养温度是必须的。

### 2、拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对抗生素的反应

试验研究了拟南芥悬浮及其愈伤组织对潮霉素、卡那霉素、头孢霉素等 3 种抗生素的反应,为拟南芥悬浮细胞转化子抗生素选择浓度和选择方案的制定提供依据。结果表明:潮霉素对拟南芥悬浮细胞生长、愈伤组织诱导及其生长均有极明显的抑制作用,但作用效果和特性均有所不同。拟南芥悬浮细胞继代培养阶段、愈伤组织诱导阶段和愈伤组织增殖阶段的临界致死浓度分别为 25, 2.5, 1.5mg/L,液体与固体培养条件下差异极大。当采用潮霉素抗性标记筛选转化子时,应当分别采用相应阶段的临界致死浓度作为转化子选择浓度。与此同时,潮霉素需要一定处理时间才能充分表现其抑制细胞生长或杀死细胞的效果,一般液体培养条件下 3d 以后、固体培养条件下 5d 以后效果趋于稳定,但不同的处理浓度有较大差异,建议选择时间在液体培养条件下不少于 3d,在固体培养条件下不少于 5d。否则,假阳性率会很高,从而大大加重后续转化子检测的工作量。

卡那霉素与潮霉素有类似的影响,在愈伤组织诱导阶段,适宜的选择浓度为 50mg/L,根据潮霉素作用特性推测,其在液体培养阶段和愈伤组织生长阶段的适宜选择浓度分别在 100mg/L、25mg/L 左右。后续的转化试验中,若利用卡那霉素选择,我们将采用这一选择浓度。

试验中意外发现头孢霉素能促进绿色悬浮细胞的获得,并具有逆转悬浮细胞

“白化”的稳定效果。有关悬浮细胞“白化”原因及头孢霉素逆转效应机理，有待进一步研究。

### 3、拟南芥悬浮细胞耐受性试验

选择与其遗传转化相关的常温静置、低温静置、高温振荡、蔗糖饥饿和常温振荡（对照）几种不同处理方式，从其生长和细胞活性两个方面，研究其对环境胁迫的耐受性，以更好地制定拟南芥悬浮细胞基因转化时细胞同步化或预处理及共培养的方案和条件。结果表明：拟南芥悬浮细胞对各种胁迫处理的耐受性表现出明显的差异，整体耐受性强弱依次为：常温振荡（对照）>蔗糖饥饿>高温振荡>低温静置>常温静置，常温静置最低。拟南芥悬浮细胞对胁迫处理的不适应表现在多个方面，总生物量增长很少或不能增长，细胞相对活性及活细胞生物量不断下降，耐受系数低。随着时间的变化，拟南芥悬浮细胞对胁迫处理的耐受性或不适性的表现呈现不同的变化规律，这种变化的可能机制与细胞间协同与竞争、细胞自我适应机制的调节等有关。

### 4、拟南芥悬浮细胞超低温保存试验

探索一般实验室条件下拟南芥悬浮细胞的简便保存技术，为中长期保存遗传背景稳定一致的拟南芥悬浮细胞起始材料提供有效的方法。通过一系列试验，本文获得了拟南芥超低温保存的适宜方法。优化方案如下：选择继代后 2d 的拟南芥悬浮细胞，洗涤 1 次，细胞沉淀重悬浮于 6%蔗糖培养基，于 4℃ 低温下锻炼 6h；浓缩细胞使之有较高的细胞密度（0.25~0.30g/ml），加入 16%（W/V）甘油作为冰冻保护剂，直接置于-80℃深冷冰箱保存；使用时以 37℃快速解冻，离心后除去保护剂，然后可用去离子水洗涤后进行活性检测，也可用基本培养基洗涤后重新进行悬浮培养。此方法保存 30d 后的细胞相对活性达 0.8 左右，可以满足实验室一般研究用。如果对其保存后的活性要求不很严，还可以进一步简化，例如，预处理前以悬浮细胞自然沉降代替离心洗涤后收集细胞沉淀；免去高渗预处理，直接加入冰冻保护剂后在低温下锻炼 6h；室温下解冻等。

### 5、农杆菌的转化与制备

对本文拟使用的 pBIB/GUS、pBIB/SARs、pBINm-gfp5-ER 等几种质粒载体构建和工程菌制备及其生长特性等进行了系列试验。通过酶切和 PCR 检测实验，证明所构建的 pBIB/GUS、pBIB/SARs 载体正确，含有相应的标志基因，可以用于后续的拟南芥悬浮细胞基因转化。采用电转化法，成功地将 pBINm-gfp5-ER 质粒 DNA 转入农杆菌细胞，转化频率为  $2.152 \times 10^4$  个/ $\mu\text{g}$  质粒，并在一系列检测实验中得到证明。拟用的几种不同质粒具有基本相似但不完全相同的生长特性，而且接种量及培养条件等，对其生长量有很大影响。采用本文方法，成功地制备了可用于植物基因转化的一系列工程菌株。

### 6、转化模式与转化细胞选择

比较 3 种拟南芥悬浮细胞转化方案，共培养后均获得 GUS 的瞬时表达，但仅模式 III 成功地获得抗性愈伤组织。在模式 III 基础上，对所获得的抗性愈伤组织

进行二次选择,发现一次选择后的转化细胞“假阳性”现象十分普遍,推测农杆菌潜伏与爆发、悬浮细胞存在大量细胞团结构并导致嵌合体形成,是转化细胞“假阳性”现象的主要原因。预处理方法、静置共培养时间、恢复培养与液体选择时间、载体种类等转化条件对转化效率有重要影响,以  $20\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮预培养 1d、静置共培养 36h、液体选择培养 2d、pBIB/SARs 为质粒载体,可以获得较高的转化效率,并大大降低假阳性率。对以上条件进行综合优化后,假阳性率从 82%降为 17%。研究结果表明,在模式III基础上对转化条件进行适当优化,可用于拟南芥悬浮细胞高效转化。

## 7、报告基因诊断与分子检测

对所获得的抗性愈伤组织进行 GUS 活性检测和 PCR 分析。结果表明:具有 GUS 活性抗性愈伤组织均扩增出目的基因片段,初步证明,所选择的 74 份抗性愈伤组织已成功地转化。对低温、高温、高盐及对照 4 种处理后的悬浮细胞进行蛋白质抽提,表明悬浮细胞的蛋白质组与叶片的蛋白质组有很大不同;分别用 L-PS10H3 和 L-PS10AcK14H3 作为第一抗体进行蛋白质免疫杂交,表明各处理均不同程度地发生组蛋白 H3 磷酸化及乙酰化,但高温处理降低了磷酸化或乙酰化水平。

## 8、本文的所取得的重要进展及主要创新点

1)系统研究了拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织有关生物学特性、对抗生素的反应和对环境胁迫的耐受性,不仅积累了这一重要模式植物的细胞生物学资料,同时使其遗传转化方案和条件的制定建立在细胞生物学依据之上,为实现拟南芥悬浮细胞高效转化提供了新的途径,也为类似转化系统的建立提供了新的思路。

2)摸索了拟南芥悬浮细胞维持培养的继代条件,提出“继代指数”概念,同时建立了拟南芥悬浮细胞理论生长模型,为受体材料的制备提供了科学依据。

3)摸索了拟南芥悬浮细胞在不同培养条件下和不同生长阶段对抗生素的反应,使抗生素抗性标记选择方案更加科学,改善了抗生素选择效果。

4)检测或转化了多种质粒载体系统,建立了不同质粒载体农杆菌的理论生长模型,比较了不同质粒载体农杆菌的生长特性,制备了可用于植物基因转化的一系列工程菌株。

5)改进和优化了拟南芥悬浮细胞遗传转化方案及条件,证明所建立的优化模式能够大幅度提高基因转化效率,促进了拟南芥悬浮细胞高效转化目标的实现。

6)发现并证明了头孢霉素能显著地促进拟南芥绿色悬浮细胞的获得,成功解决了悬浮细胞“白化”的技术难题,并且有可能发掘这一抗生素新的利用途径。

7)初步建立了拟南芥悬浮细胞的简便保存技术,为中长期保存遗传背景稳定一致的拟南芥悬浮细胞起始材料提供了有效的方法。

**关键词:** 拟南芥; 根癌农杆菌; 悬浮细胞; 遗传转化; 生物学特性; 细胞耐受性; 超低温保存; 抗生素抗性选择

## ABSTRACT

Transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension cells was performed. Different protocols and parameters affecting the transformation procedure were tested, and an optimized protocol was determined. Transformants were selected with antibiotic resistant gene screening and checked with histochemical GUS and PCR assay. Prior to transformation experiments, some relational biology characteristics of *Arabidopsis thaliana* suspension cells and *Agrobacterium* harboring certain plasmid were observed. The main works and results are shown as follows.

### **Subculture Conditions and Growth Characteristics of *Arabidopsis* Suspension Culture**

The experiments of *Arabidopsis thaliana* suspension culture were performed. Some subculture conditions were determined, and the growth characteristics of suspension culture were observed. The typical S-like growth curve in a subculture cycle was obtained. In normal condition, a logarithmic phase of growth of suspension biomass was occurred in 2-4 days after subculture. Then the growth of biomass slowed down quickly. However, its growth and time of logarithmic phase were changed with inoculation amount. 10ml/50ml of diluting ratio is advisable to subculture. The growth was slowed down even halted with 10ml/50ml of diluting ratio. Different hormones in media affected growth of suspension cells, but the result was unexpected. The biomass of suspension cells subcultured in B5 medium without any hormones was higher than with 0.1mg/L of BAP and 0.2mg/L NAA (as normal medium). Concentration of sucrose greatly affects growth of suspension cells. Changing it from normal 30g/L to 10,20,40 g/L, more or less inhibition of growth and viability were observed.

The pattern of callus growth was observed. In general, each a 10 d of period is presented in callus induction phase, logarithmic growth phase and growth-stopped phase. Incubation temperature and humidity had a remarkable impact on both inducement and growth of callus. A certain surface humidity on plate and lower incubation temperature were indispensable.

### **Impact of Antibiotics on *Arabidopsis* Suspension Cells and Calli**

The impact of Hygromycin B on *Arabidopsis* suspension cells and calli was studied. The results show that the growth of *Arabidopsis thaliana* cells *in vitro* was significantly inhibited with Hygromycin B, and different effects and characteristics of inhibition were presented among different culture stages, especially between liquid and solid culture. On suspension subculture, callus induction and callus subculture, the lethal critical concentrations of Hygromycin B for *Arabidopsis thaliana* cells were 25, 2.5, 1.5mg/L in turn. A long or short time of treatment with Hygromycin B was necessary to impact on *Arabidopsis thaliana* cells fully. The inhibition efficiency became stabilization in 3-days in liquid and in 5-days on solid after treatment with Hygromycin B, but a considerable change presented among different concentrations. Furthermore, the probable causes of the different inhibition efficiency between liquid and solid culture condition were discussed, and some suggestions for selection of hygromycin- resistance marker on transformation of *Arabidopsis* suspension cells were made.

The impact of kanamycin on *Arabidopsis* suspension cells was similar to of Hygromycin B. The lethal critical concentration was 50mg/L on callus induction. The rest may be deduced by analogy of the reaction of *Arabidopsis* suspension cells on Hygromycin B, 100mg/L and 25mg/L of lethal critical concentrations should be rational on suspension subculture and callus subculture respectively.

The effect of cefetaxime on keeping suspension color green was found by chance. The further experiments were showed that suspension color can be changed from pale to green with cefotaxime. The potential cause of the result was undefined. It is valuable to make further experiment.

### **The Tolerability of *Arabidopsis* Suspension Cells to Stress Factors**

The tolerance of *Arabidopsis* suspension cells to 4 stress factors was checked. The result shows that the tolerability to different stress factors was ranked from higher to lower as 'room temperature with shaking'(control), 'sucrose starvation', 'high temperature with shaking', 'low temperature without shaking' and 'room temperature without shaking'. Slowed growth of biomass and depressed viability of cells were represented with the unsuitability of *Arabidopsis* suspension cells to stress factors. Different patterns of tolerabilities of *Arabidopsis* suspension cells were presented with

time among to 4 stress factors.

### **Cryopreservation of *Arabidopsis* Suspension Cells**

A series of experiments on cryopreservation of *Arabidopsis* suspension cells was performed, and a viable sample method was obtained. The optimized protocol is shown as follows: taking *Arabidopsis* suspension cells in 2 days after subculture, washing them for one time, resuspending the cell pellet in basic medium with 6% of sucrose, pretreating the suspension for 6h with 4°C degree temperature, concentrating the suspension, adding 16% (W/V) of glycerol as cryoprotective agent, placing and keeping it in cryogenic refrigerator ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), thawing it with  $37^{\circ}\text{C}$  degree temperature when using, then checking viabilities of cryopreserved suspension cells after washing or resuspending them in liquid medium. After cryopreservation, the relative viability of cryopreserved suspension cells could reach 0.8 after 30 days. This protocol can be further simplified depending on the requirement of viability of cryopreserved suspension cells, such as without pretreating in low temperature, thawing cryopreserved suspension cells in room temperature.

### **Transformation of *Agrobacteria* with Plasmids and Preparation of Engineering Bacteria.**

The correct cloning of inserts into pBIB/GUS、pBIB/SARs was confirmed by digestion of enzymes and PCR assay of *uidA* or SARs. The result indicated both pBIB/GUS and pBIB/SARs carried corresponding marker genes, and they can be used for transformation of *Arabidopsis* suspension cells. The DNA isolated from pBINm-gfp5-ER was transferred into *Agrobacterium* with electrotransformation, and  $2.152 \times 10^4$  transformants per  $1\mu\text{g}$  of plasmid DNA were obtained. The similar growth characteristics was observed among several clonings of *Agrobacteria* with different plasmids, and the growth of *Agrobacterium* was affected with the amount of inoculation and culture condition.

### **Protocol of Transformation and Selection of Transformants**

Three kind of *Arabidopsis* suspension cells transformation protocols were put in practice, and the transient expression of GUS gene was observed in all of the three protocols, but the resistant calli was obtained only in protocol III. Base on protocol III, a second selection of antibiotics resistance was performed, and a very high frequency of 'false positive' in the first selection was tested. A strong effect on

efficiency of *Arabidopsis* suspension cells transformation exerted by pretreatment, co-cultivation without shaking, reviviscence culture or liquid-selection and vectors. The efficiency of transformation would be improved while the frequency of 'false positive' would be reduced notably with following transformation conditions: pretreatment for 1 day with 20  $\mu$ mol/L of acetosyringone, co-cultivation for 36h without shaking, selection for 2 days in liquid and mediating with pBIB/SARs. Putting every measures above together, the frequency of 'false positive' falld down from 82% to 17%. The results were shown that, after optimizing transformation conditions in a certain extent, the protocol III can be used for *Arabidopsis* suspension cells transformation.

### **Diagnoses and Molecular Detection of Reporter Gene**

Histochemical GUS and PCR assay for detection of resistant calli were conducted. The results were shown that the segments of target gene were amplified by PCR from each resistant calli which were tested as positive with GUS staining. It was indicated all of 74 pieces of calli had been transferred successfully. Total protein was isolated from *Arabidopsis* suspension cells and leaves which were treated with cold, heat and salt respectively. Two different protein maps were obtained between suspension cells and leaves. Immunoblotting of histone H3 on *Arabidopsis* suspension cells was performed. by L-PS10H3 and L-PS10AcK14H3. The result was shown that the phosphorylation and acetylation were presented in each treatments. However, the strength of phosphorylation and acetylation was reduced with high temperature (37°C).

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Agrobacterium tumefacion*, Suspension cells, Biology characteristics, Tolerance of cells, Cryoperservation, Antibiotic resistant gene screening

## 缩略词

| 缩写     | 英文名                                                                                                              | 中文名                        |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 2,4-D  | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid                                                                                   | 2,4-二氯苯氧乙酸                 |
| 6-BA   | 6-Benzylaminopurine                                                                                              | 6-苄基腺嘌呤                    |
| AS     | acetosyringone                                                                                                   | 乙酰丁香酮                      |
| CATB   | cetyltriethylammonium bromide                                                                                    | 十六烷基三乙基溴化铵                 |
| cDNA   | Complementary DNA                                                                                                | 互补脱氧核糖核酸                   |
| Cef    | Cefotaxime                                                                                                       | 头孢霉素                       |
| DNA    | Deoxyribonucleic                                                                                                 | 脱氧核糖核酸                     |
| EB     | Ethidium Bromide                                                                                                 | 溴乙锭                        |
| EDTA   | Ethylene diamine tetraacetic acid                                                                                | 乙二胺四乙酸                     |
| ER     | estrogen receptor                                                                                                | 人类雌激素受体                    |
| GFP    | green fluorescent protein                                                                                        | 绿色荧光蛋白基因                   |
| GMP    | genetically modified plant                                                                                       | 遗传改良植物                     |
| GUS    | Glucuronidase                                                                                                    | 葡萄糖苷酸酶                     |
| HDGS   | homology-dependent gene silencing                                                                                | 同源依赖性沉默                    |
| Hyg    | hygromycin                                                                                                       | 潮霉素                        |
| IAA    | Indole-3-acetic                                                                                                  | 吲哚乙酸                       |
| Kan    | Kanamycin                                                                                                        | 卡那霉素                       |
| MAR    | matrix attachment region                                                                                         | 核基质结合序列                    |
| MAT    | multi-auto-transformation                                                                                        | 多元自主转化载体                   |
| ME     | Mercaptoethanol                                                                                                  | 巯基乙醇                       |
| NAA    | Naphthalene acetic acid                                                                                          | 萘乙酸                        |
| NOS    | nopaline synthase                                                                                                | 胭脂碱合成酶                     |
| NPT II | neomycin phosphotransferase                                                                                      | 新霉素磷酸转移酶 II                |
| OD     | Optical density                                                                                                  | 吸光度                        |
| PCR    | Polymerase chain reaction                                                                                        | 聚合酶链式反应                    |
| PDGS   | position-dependent gene silencing                                                                                | 位置依赖性沉默                    |
| PEG    | Polyethylene glycol                                                                                              | 聚乙二醇                       |
| PMBE   | Laboratory of Plant Molecular Biology<br>at the Institute of Experimental Plant<br>Biology, University of Warsaw | 华沙大学实验生物学研究所<br>植物分子生物学研究室 |
| PTGS   | post-transcriptional gene silencing                                                                              | 转录后水平基因沉默                  |
| SAR    | scaffold attachment region                                                                                       | 核骨架结合序列                    |
| SDS    | Sodium dodecyl sulfate                                                                                           | 十二烷基硫酸钠                    |
| SMF    | selectable marker-free                                                                                           | 标记基因的剔除                    |
| TAE    | Tris-aceto EDTA buffer                                                                                           | TAE 缓冲液                    |
| TBE    | Tris-borate EDTA buffer                                                                                          | TBE 缓冲液                    |
| TE     | Tris-EDTA buffer                                                                                                 | TE 缓冲液                     |
| TEMED  | N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine                                                                           | N,N,N',N'-四甲基乙二胺           |
| TGS    | transcriptional gene silencing                                                                                   | 转录水平基因沉默                   |
| TTC    | triphenyl tetrazolium chloride                                                                                   | 氯化三苯基四氮唑                   |

# 中南林业科技大学

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品，也不包含为获得中南林业科技大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式表明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：

李建安

2006年6月 日

# 中南林业科技大学

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件或电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权中南林业科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于：

1、 保密□，在年解密后适用本授权书。

2、 不保密☒。

(请您在以上相应方框打“√”)

作者签名：

李建安

2006年6月 日

导师签名：

胡芳名 谭悦斌

2006年6月 日

## 1 综述—植物遗传转化及模式植物拟南芥研究进展

植物遗传转化 (plant genetic transformation), 又称植物转基因, 是植物基因工程 (plant genetic engineering) 的核心内容。主要指运用重组DNA技术, 将外源基因整合于受体植物基因组、改变其遗传组成的过程。通过遗传转化获得的植株及其后代称为转基因植物 (transgenic plant), 亦称遗传改良植物 (genetically modified plant, GMP)<sup>[1]</sup>, 另有称生物工程植物 (biotech plant)。

传统的遗传改良方法存在育种周期长、定向性差、受亲缘关系限制等诸多障碍, 植物遗传转化能从根本上克服这些障碍。与传统植物遗传改良相比, 植物遗传转化的显著特点是: (1) 极大程度上打破亲缘关系的限制, 可实现动物、植物和微生物间遗传物质的交流; (2) 转化的基因具有明确的功能, 能够有目的地改变植物基因组的结构与功能, 选育出具有预期性状的新品种, 使遗传改良具有明确的方向性; (3) 体外人工构建基因载体, 不带有冗余基因 (选择标记基因及报告基因要求对植物无害或者能够剔除), 从而有效地打破有利基因和不利基因的连锁; (4) 在实验室条件下直接转化目的基因, 可避免田间复杂且繁重的人工选择和自交等过程, 从而大大加快育种进程, 并减少育种成本。(5) 能够与常规育种及其他生物技术手段相结合, 从而丰富了品质改良的内涵, 并拓展了其应用的领域<sup>[2]</sup>。事实上, 遗传转化不仅仅用于植物遗传改良, 还是生命科学基础研究的重要手段, 例如, 通过分析遗传转化获得的突变体, 是新基因的发现和功能基因组研究的有效途径<sup>[3]</sup>。

自从 1983 年首次获得转基因烟草以来<sup>[4]</sup>, 植物转基因技术日益得到广泛的应用。特别是近年来, 随着植物转基因技术日渐成熟, 检测手段日益完善, 其发展速度越来越快。实践证明, 植物基因工程的发展, 不仅开辟了育种工作的新局面, 还极大地促进了植物分子生物学、植物遗传学、植物发育生物学等基础学科领域的发展, 同时对植物细胞工程、代谢工程、酶工程、发酵工程、免疫工程、生物制药、生物反应器等诸多生物技术研究 and 应用领域也将产生巨大的影响<sup>[5]</sup>。

### 1.1 植物遗传转化研究和利用简况

1983 年世界上首例转基因植物——转基因烟草问世, 标志植物转基因时代的到来。至今, 全世界已有 200 多种植物实现了基因转移, 涵盖了经济作物、观赏植物、药用植物、蔬菜、果树、林木和牧草等大多数栽培种<sup>[1,3]</sup>。应用于植物基因工程, 并在植物中成功转化的目的基因愈来愈多, 主要包括: 抗虫基因、抗病毒基因、抗真菌病毒基因、抗细菌病毒基因、抗除草剂基因、抗逆基因、改良

品质的基因、控制果实成熟的基因、雄性不育基因等。应用这些有用基因,在一大批植物上创造出丰产、优质、高抗植物新品种,例如,对番茄、豌豆、胡椒、热带水果、椰菜、覆盆子、甜瓜的转基因目的是控制成熟,提高品质和加工性,延长货架期;番茄、马铃薯、玉米、莴苣、咖啡、卷心菜和苹果的研究方向是增强抗虫性,减少杀虫剂用量;对于胡椒、马铃薯和黄瓜主要是增强其抗真菌性以减少抗真菌剂的用量;马铃薯、番茄、哈密瓜、黄瓜、玉米、油菜、大豆和葡萄的转基因目的是抗病毒,以减少病毒引起的病害;大豆、马铃薯、玉米、油菜和小麦引入的是抗除草剂基因;增加必需氨基酸、维生素和其他营养素也是玉米、向日葵、大豆和其他作物的转基因目标之一;增加不饱和脂肪酸含量,提高热稳定性是油菜、花生的发展方向;玉米、豌豆的另一转基因目的是控制糖类转化为淀粉,以期在整个货架期保持甜度;天然去咖啡因咖啡是咖啡转基因研究的主要目的<sup>[6-9]</sup>。

现代分子生物学和生物技术的蓬勃发展,也极大地促进了植物基因工程的发展,与代谢工程、蛋白质工程、免疫工程及基因调控技术等相结合,大大拓展了植物遗传转化的手段和应用领域。2001年,瑞士科学家Potrykus领导的研究小组历时8年,成功地将类胡萝卜素生物代谢途径迁移至水稻中,并在所获得的转基因水稻植株中检测到了类胡萝卜素的存在。这个所谓“金稻”(Golden Rice)的转基因作物,是通过基因工程改良作物品质的一个成功范例。Thomashow等(1998)将拟南芥冷诱导转录因子基因CBF-1导入拟南芥,当其不经过冷驯化直接放至-20℃时,材料表现出了极佳的抗冻性能。以往的研究通常是将一个或几个抗冻蛋白基因转至植物中,然而效果始终不理想。Thomashow等的工作在于利用转录因子启动抗冻蛋白群表达,从而首次显示出了植株水平的抗性。这是植物转化领域思想上的一次革新。类似地,可以利用各种转录因子尤其是与植物抗逆性有关的转录因子转化植物,以获得预期的抗逆性状。

自从Parson等(1986)<sup>[10]</sup>证实杨树可以进行遗传转化和外源基因在林木细胞中表达以来,林木基因工程研究也取得很大进展。现已对杨树(*Populus* spp.)、火炬松(*Pinus taeda* Linn.)、桉树(*Eucalyptus* spp.)、苹果、核桃等20多个树种进行了转化研究。许多树种已获得转基因植株,其中杨树、松树(*Pinus* spp.)、桉树、云杉(*Picea* spp.)等树种已经进入田间试验阶段,在抗虫、抗病、抗除草剂、耐盐、耐旱、耐冻、耐高温等方面也进行了转化研究<sup>[11]</sup>。

1986年,抗虫和抗除草剂的转基因棉花首次进入田间试验,到1992年,全球批准进入田间试验的转基因作物已增加到675项<sup>[12]</sup>。1992年第一个商品化的转基因作物(双价抗病毒转基因烟草)在中国问世<sup>[13]</sup>。1994年,第一个转基因产

品——延熟保鲜转基因番茄“Flavr Savr”获美国农业部和美国食品与药物管理局批准进入市场，自此以后，转基因作物在全球获得迅速发展，种植面积持续10余年直线上升。据农业生物技术应用国际服务组织（ISAAA）的估计<sup>[14]</sup>，2005年全球转基因作物种植面积达到9000万 $\text{hm}^2$ ，比2004年增长了11%，是1996年的50倍（见表1-1、图1-1）。2004年，全球转基因作物总产值达65亿美元，1996-2004共创效益270亿美元。短短10年时间，转基因作物实现了从实验室走向田间，从技术开发到产业化生产的转变，推动了全球农业进入新的绿色革命。

表1-1 2005年全球主要转基因作物种植国家及历年种植面积/100万 $\text{hm}^2$

Table 1-1 Growing area of GM crops ranking the top five contries of the world(1996-2005)

| 国 别  | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 美 国  | 1.5  | 8.1  | 20.5 | 28.7 | 30.3 | 35.7 | 39.0 | 42.8 | 47.6 | 49.8 |
| 阿根廷  | 0.1  | 1.4  | 4.3  | 6.7  | 10.0 | 11.8 | 13.5 | 13.9 | 16.2 | 17.1 |
| 巴 西  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 3.0  | 5.0  | 9.4  |
| 加拿大  | 0.1  | 1.3  | 2.8  | 4.0  | 3.0  | 3.2  | 3.5  | 4.4  | 5.4  | 5.8  |
| 中 国  | <0.1 | <0.1 | <0.1 | 0.3  | 0.5  | 1.5  | 2.1  | 2.8  | 3.7  | 3.3  |
| 总面积  | 1.7  | 11.0 | 27.8 | 39.9 | 44.2 | 52.6 | 58.7 | 67.7 | 81.0 | 90.0 |
| 国家总数 | 6    | 6    | 9    | 12   | 13   | 13   | 16   | 18   | 17   | 21   |

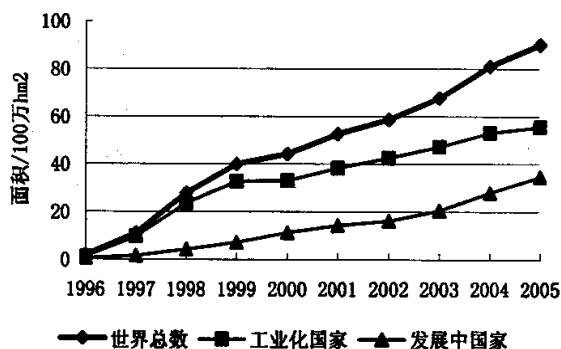


图1-1 全球转基因作物种植面积增长情况

Fig. 1-1 Global area of biotech crops (1996-2005)

我国是世界第5大转基因作物种植国，2005年种植面积为330万 $\text{hm}^2$ ，主要为棉花、烟草、油菜、水稻等。我国是第一个商品化种植转基因的国家<sup>[13]</sup>，也是继美国之后自主研发成功Bt抗虫棉的国家<sup>[15]</sup>，但我国转基因作物面积占世界总种植面积的比例还相当少，2005年仅占3.7%<sup>[16-18]</sup>。

## 1.2 植物遗传转化方法

可供选择的植物遗传转化方法颇多,通常分为两大类:一类以载体为媒介的间接转化方法,另一类是外源目的基因的直接转化方法。各种方法各有长短,DNA直接转化法的优点是没有宿主的限制,但转化的DNA重组率高,往往导致多拷贝整合,引起基因丢失或沉默。载体法得到单拷贝或低拷贝整合的外源DNA的频率高,但易受宿主限制。使用时可根据不同植物、不同受体材料和不同转化目的等多种因素选择最适合的方法。

### 1.2.1 间接转化方法

#### 1.2.1.1 农杆菌介导法 (Agrobacterium-mediated transformation)

用于转化的农杆菌主要有2种,即根癌农杆菌 (*Agrobacterium*) 和发根农杆菌 (*Rhizobium*)。根癌农杆菌中, Ti质粒 (tumor-inducing plasmid) 能够诱发植物形成“冠瘿瘤(crown gall tumor)”,而在发根农杆菌中, Ri质粒 (root-inducing plasmid) 能诱发植物形成“发状根 (hairy root)”。Ti质粒和Ri质粒均可改造成为携有外源DNA的载体,并将其转移到植物细胞中。其中,由于根癌农杆菌转化系统的简单性和转化基因整合的准确性, Ti质粒载体 (Ti plasmid-based vector) 仍然是植物转基因最好的系统<sup>[19]</sup>。在已成功的约200种转基因植物中, 80%是由农杆菌介导的<sup>[3]</sup>, 特别是在双子叶植物上, 获得了很大的成功。随着载体的不断改良和转化技术的提高, 近几年来在裸子植物和一些重要的单子叶植物上应用农杆菌转化获得了成功<sup>[20]</sup>。

农杆菌介导的遗传转化具有广泛的适应性, 只要找到合适的转化条件, 从整体植株到细胞, 甚至原生质体, 都可以以农杆菌介导实现目的基因的转化<sup>[21]</sup>。事实上, 农杆菌Ti质粒被视为是“万能载体”, 还可以用于酵母 (yeast)<sup>[21]</sup>、曲霉素 (*Aspergillus*)<sup>[22]</sup> 和人类细胞<sup>[23]</sup> 的遗传转化。由于农杆菌也能够转化真菌, 利用酵母这一经典的遗传学研究模式生物来研究这一病原菌与宿主细胞的相互作用是十分可行的<sup>[24]</sup>。

用农杆菌介导, 最常用的方法是“叶盘法” (leaf disc transformation), 是由著名的孟山都公司 (Monsanto) 的Horsch等人于1985年创立的<sup>[25]</sup>。也有利用其他器官、胚性愈伤组织、悬浮细胞、单细胞 (如花粉)、原生质体等作为受体材料。近年来, 证明农杆菌也很适合胚状体、叶绿体受体系统的转化。以离体组织或细胞作为受体材料, 必须要先建立植物的再生体系, 而且无性系变异的干扰使转化后代遗传背景难以保持一致, 对于那些难以建立再生体系的植物, 如果以获得转

基因植株为最终目的,不宜使用农杆菌介导。Bechtold等<sup>[26]</sup>1993年首创了一种新颖、简单、高效的转化拟南芥的方法,称为真空渗入法(negative pressure infiltration)。该方法不需要建立再生体系,也是利用农杆菌进行介导,转化后代遗传背景一致,平均每株处理可获得1~4个转化体<sup>[27]</sup>。在此基础上,已发展了一系列相当成熟的“在体(整体)”(*in planta*)转化方法。

#### 1.2.1.2 脂质体法(liposome)

Dellaporta等人于1981年创立的方法。脂质体法是人工拟造的类胆固醇与磷脂构成的小体,能够跨膜转运,可将核酸包裹起来免于核酸酶的作用而保持核酸的完整性。此方法介导的基因转移在烟草原生质体(Deshayes等,1985;袁天华等,1994)、玉米原生质体(Antonelli等,1990)<sup>[28]</sup>、水稻原生质体(朱祯等,1992)<sup>[29]</sup>、青菜(王颉等,1997)等植物上有报道<sup>[30]</sup>。

#### 1.2.1.3 原生质球法

原生质球法与脂质体法相类似,原生质球是除去细胞壁的细菌细胞,通过与植物原生质体融合将外源基因导入植物细胞中。利用这种方法转化植物细胞的报道不多<sup>[1-3]</sup>。

#### 1.2.1.4 病毒载体转化法

植物病毒载体系统是将外源基因插入到病毒基因组中,通过病毒对植物细胞感染而将外源基因导入植物细胞。Koxiel和Siegal于1984年应用TRV(烟草脆裂病毒)首先发展了这种载体系统<sup>[1-3]</sup>。这种方法的转化效率比较高,但安全性受到质疑,是一种正在发展与完善中的转化方法。

此外,作为载体法的转基因方法还有*Ac/Ds*转座系统、噬菌体PIGre-Lox位点的特异性重组系统、酵母线粒体I-SceI核酸内切酶特异性诱导植物DNA双链断开引起的同源重组系统、双元细菌人造染色体载体系统等。这些方法有的可提高转化率,有的可提高转基因位点的质量<sup>[31]</sup>。

### 1.2.2 外源DNA直接转化法

通过修饰之后的目的基因就可以直接导入植物的外植体。常见的外源DNA直接转化法有基因枪法、化学药剂诱导法和花粉管通道法等<sup>[1-3]</sup>。

#### 1.2.2.1 基因枪法(particle gun, gene gun, biolistics, microprojectile)

又称微粒轰击法(particle bombardment),1987年美国康奈尔大学Sanford

等人首先发明这种方法<sup>[32]</sup>。原理简单,用被放电而加速的金属颗粒对细胞击孔,通过金属微粒将附着其表面的外源目的基因引入到受体细胞中。1987年 Klein 等首次应用基因枪法转化洋葱细胞<sup>[33]</sup>,此后,相继在水稻、小麦、玉米、大豆、棉花等重要农作物上获得转基因植株<sup>[34-37]</sup>。

该方法的优点是无宿主限制,且受体材料类型十分广泛,几乎包括所有具有潜在分化能力的组织和细胞。此外,可将 DNA 转入叶绿体、线粒体,也很方便与其他方法协同转化。但是转化的频率低,嵌合体较多,转化的基因在寄主基因组中通常为多拷贝,易导致基因沉默,且研究成本较高。

#### 1.2.2.2 化学药剂诱导法

常用的转化细胞的化学药剂有聚乙醇 PEG、多聚鸟氨酸 PLO、聚乙烯醇 PVA 等,其中以 PEG 法 (Darey 等 1980 年建立) 应用较多,效果较好<sup>[1-3]</sup>。它们能够诱导质粒 DNA 进入植物细胞,从而达到转基因的目的。应用这种方法已在大麦<sup>[38-39]</sup>等禾谷类作物上成功地获得了转基因植株。

#### 1.2.2.3 花粉管通道法 (pollen-tube pathway)

是由周光宇等 (1978) 建立并逐步发展起来的方法<sup>[40]</sup>。这种方法是利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接将外源目的基因导入尚不具备正常细胞壁的卵合子或早期胚细胞实现目的基因的转化。它是一种简便的转基因方法,不需要组织培养的继代,从而排除了植株再生的障碍。1983 年,周光宇等利用花粉管通道法成功将外源 DNA 转入棉花<sup>[41]</sup>,在蔬菜作物中也有应用报道<sup>[42]</sup>。

其它直接转化方法,如电激法 (electroporation, 1985 年 Fromm 等率先将原生质体“电击穿孔”应用于植物) (注:另有文献报导是 1985 年我国李宝健等率先应用于植物)、显微注射法 (microinjection, 我国童第周在动物转基因中创立; 1987 年 Neuhaus 等用于植物)、激光微束穿刺法 (microlaser inducing, 1988 年 Weber 引入植物)<sup>[43]</sup>、多聚阳离子基因导入法<sup>[44]</sup>、超声波转化法 (sonication, 1990 年许宁等创立, 1992 年贾士荣等发展了这一方法)<sup>[45]</sup>、低能离子法 (low energy ion beam, 我国余增亮等创立)、浸泡法 (上世纪 70 年代由我国创立)、纳米粒子转化法等,在不同植物上有成功的报道。

近年来还产生了一些两种以上方法相互结合形成的新技术方法<sup>[1-3]</sup>,如超声波辅助农杆菌介导法 (sonication assisted agrobacterium mediated transformation, SAAT)、低能离子束与农杆菌介导结合法、基因枪与农杆菌介导结合法、负压与农杆菌介导结合法等,均可增强农杆菌侵染,提高转化效率。

### 1.3 根癌农杆菌介导的遗传转化原理

根癌农杆菌的Ti质粒是迄今为止少数能携带外源DNA 插入植物细胞染色体上的细菌质粒, Ti质粒中一段T-DNA在这一转移整合过程中起关键性作用<sup>[46-47]</sup>。由于T-DNA 与寄主细胞染色体可以非同源重组, 所以将T-DNA 整合到寄主细胞, 即可改变寄主细胞的遗传基础, 改变寄主的性状。野生型的农杆菌Ti质粒能诱发肿瘤或转化细胞, 其T-DNA 基因产物引起植物激素不平衡, 难以再生正常植株, 因此, 必须将Ti质粒加以修饰和改建, 即去掉Ti质粒上有致癌作用的那段基因, 并保持其T-DNA的转移能力和在再生植物上的表达能力<sup>[48-50]</sup>。

T-DNA 转移要求穿越细菌和植物的细胞壁、原生质膜和核膜。Tzfira和Citovsky<sup>[51]</sup>将农杆菌的转化过程分为7步: (1)农杆菌与寄主细胞的识别与附着; (2)农杆菌对植物信号的感受; (3)毒性基因的激活; (4)可移动T-DNA 复合体形成; (5)T-DNA 从细菌细胞输出; (6)T-DNA 导入植物细胞核; (7)T-DNA整合到寄主基因组。农杆菌基因组DNA及Ti质粒编码的与转移整合相关的蛋白质研究已比较清楚<sup>[52-55]</sup>: 由细菌基因组基因*Chv A*、*Chv B*、*psc A*、*att R*等编码的蛋白参与识别寄主细胞; Ti质粒编码的毒性蛋白Vir A、Vir G对植物信号作出反应, 激活其它一系列毒性基因表达; 在这些毒性蛋白中, VirD2、VirD1、VirE 参与形成T-转移复合体(T-transfer complex), 而Vir D4及Vir B系列的蛋白质组装成毒性菌毛, 毒性菌毛与寄主细胞接触后打开T-复合体转移通道, T-DNA 复合体跨过膜转移到寄主细胞, 在Vir D2与Vir E2的协助下, T-DNA 进入核内整合到寄主细胞染色体组上<sup>[46]</sup>。

Ti 质粒已能转化双子叶植物、裸子植物和少数单子叶植物, 其中双子叶植物尤其是一些模式植物, 其转化正成为一项常规技术, 而对部分双子叶植物的转化研究也随着组培工作进行而逐步展开。近年来, Ti 质粒转化在真菌、裸子植物和单子叶植物转化方面取得了一定进展, 其中单子叶植物, 尤其是在禾谷类作物上成功转化<sup>[56-57]</sup>。

### 1.4 农杆菌介导的遗传转化影响因素

#### 1.4.1 载体因素

转基因使用的质粒载体均是人工构建完成的, 选用或构建的什么样的质粒载体, 直接关系到能否成功转化, 因此, 转基因技术发展的过程与载体的不断改良是分不开的。自1983年Hoekema等提出双元载体构建策略后, 双元载体系统(binary vector system) 迅速成为转基因通用载体。pBIN19是最早出现的双元载

体 (Bevan, 1984) [58], 改进后的pBIN19系列仍然经常使用。常用的双元载体还有pBI、pGA、pKYLX、pLB4404等系列。不同的植物对同一载体敏感性会有所不同, 而不同质粒对同一植物的作用效果也会不一样。

典型的双元载体系统包含一个章鱼碱(octopinetype)vir辅助系(helper strain), 如LBA4404, 以装载去掉了*Ach5*的Ti质粒和一个穿梭载体(shuttle vector)。随着胭脂碱MP90(nopaline-type MP90)和L,L-succinamopinetype EHA101的应用, vir辅助系的有效系列被扩大, EHA101删除卡那霉素抗性基因后发展成EHA105, EHA101和EHA105表现出广阔的寄主范围和转化效率, 许多对Ti质粒不敏感的“顽固型植物”, 如水稻、小麦、大麦等, 均成功地转化[59-64]。pTOK233是在pGA472基础上改造的载体[65], 许多研究证明, 其对单子叶植物也非常有效。

载体中单一酶切位点对能否装载目的基因有重要影响, 尤其是单一位点的限制是转移复合基因的重大技术障碍。T-DNA共转化是转化多基因的可能途径[66]。

核基质结合序列(matrix attachment region, MAR), 也称核骨架结合序列(scaffold attachment region, SAR) 是一个富含AT碱基的、能与核基质特异结合的一段DNA 序列(Mirkovitch *et al*, 1984) [67], 在两个MAR之间可以构成一个DNA 环, 形成一个独立的区域。针对这个特性, 在质粒载体构建中, 可以将MAR置于所转的外源基因的两侧, 构建成MAR-基因-MAR 的形式进行转化, 其形成的一系列loop结构, 可避免邻近基因相互抑制的影响, 被认为是打破基因沉默的有效方法[68-70]。MAR序列的存在还将报告基因表达量提高到3.3-650倍[71]。

Ebinuma等(1997)和Endo等(2002)构建了新的多元自主转化载体系统——MAT (multi-auto-transformation), 它含有一插入于转座子*AC* 内的嵌合的*ipt*基因, 该*ipt*基因即可作为转化的标记基因。MAT载体系统可以大大缩短育种时间, 对木本植物特别有用[72-73]。

#### 1.4.2 寄主因素

在农杆菌转化过程中, 不同植物种对农杆菌侵染的敏感性差异很大, 同一种内不同的栽培品种或生态型也常表现出巨大差异[74]。在许多植物种中, 遗传背景差异对农杆菌转化频率的影响非常明显。用拟南芥菜为材料的大量研究结果表明, Ti质粒转移基因机理与植物的基因型有关[75]。Nam 等[76]比较了近40 个拟南芥生态型对于T-DNA 整合的敏感性, 发现UE-1 具有很高的T-DNA 编码报道基因的瞬时表达, 但是其稳定整合水平却很低。

近年来随着人们对 Ti 质粒本身因子的转录与调控的深入研究, 被感染植物细胞中有关的分子过程及作用机理的研究已逐渐成为热点[77-81]。在自然界中, 受

伤的植物组织分泌一些被认为是农杆菌趋化性诱导因子的酚类和糖类化合物<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明寄主细胞因子影响着农杆菌转化的整个过程,包括细菌细胞与寄主细胞的识别与附着<sup>[82-85]</sup>、毒性基因的诱导与表达<sup>[86-89]</sup>、T-复合体运输<sup>[90-95]</sup>及 T-DNA 整合<sup>[96-103]</sup>等。

### 1.4.3 菌株因素

不同农杆菌菌株有不同的宿主范围,并有其侵染的最适宿主<sup>[1-3]</sup>。不同类型农杆菌菌株的毒力(侵染力)不一样,一般而言:琥珀碱型菌株(如 *A281*) > 胭脂碱型(如 *C58*) > 章鱼碱型(如 *Ach5*, *LBA4404*)。选择适宜的菌株对于植物转基因是非常重要的。

同一农杆菌菌株在不同的生长阶段表现为不同的侵染能力,一般认为,处于指数生长期的菌株侵染力最强,此时  $OD_{600}$  处于 0.3~1.8 范围内( $1.0 OD_{600} \approx 1 \times 10^9$  细胞/ml),一般用 0.3~1.5  $OD_{600}$  农杆菌菌液接种植物材料为宜,但不同的菌株及不同的受体材料最适宜的时期有较大差异。

*Vir*区基因的活化是农杆菌Ti质粒转移的先决条件。酚类、单糖或糖酸、氨基酸、磷酸饥饿和低pH都会影响到*Vir*区基因的活化。通常可选用乙酰丁香酮(AS)或羟基乙酰丁香酮(HO-AS)做为活化诱导物<sup>[86-87]</sup>,其中以AS为佳,使用浓度一般为5~200  $\mu\text{mol/L}$ ,培养基pH5.1~5.7,共培养温度15~25℃。AS的应用,也是实现单子叶植物成功转化的关键<sup>[104-106]</sup>。

### 1.4.4 共培养条件

共培养方法与条件对能否获得转化体有极大影响<sup>[1-3]</sup>。主要影响因子有下:

#### 1.4.4.1 外植体预处理

热击、低温、营养饥饿、预培养等与外植体转化有明显的关系,这可能与提高受体材料对农杆菌的敏感性、降低受体材料免疫能力及促使细胞同步化有关。Atkinson等(1993)研究表明,不同外植体有不同的预培养时间,一般以2~3d为宜。

#### 1.4.4.2 外植体接种

外植体种类、切割方法、大小、接种方式等都可能影响到转化效率,此外还会影响到再生能力。一般而言,外植体小,可以获得更高的转化频率,但选择及再生均比较困难。例如,我们在拟南芥悬浮培养基转化中发现,转化子选择和转化子生长是一对很难调和的矛盾,有利用选择就不利于生长,有利于生长就

不利于选择。而材料大，则不易转化，且多为嵌合体。

#### 1.4.4.3 培养基成分

多采用低盐培养基。宜加入较高量的生长素类，而应避免使用细胞分裂素。因为生长素能促进T-DNA转移，而细胞分裂素可抑制其转移。但也有相反的报导。可加入AS和单糖类化学诱导物。

#### 1.4.4.4 共培养方法

这也是成功转化的关键之一。离体材料通常直接与农杆菌共培养，整株材料则应当借助真空负压的帮助，使农杆菌导入细胞，或者采用特殊的方法，如花粉管通道法、花浸法等。

共培养时间对转化有重要影响。农杆菌附着外植体表面并不能立即转化，只有创伤部位生存8~16h之后的菌株才能诱发肿瘤，因此，共培养时间必须长于8~16h，一般为3d，过长也可能会因为植物细胞受到农杆菌强烈毒害而死亡。对于悬浮细胞，还必须有一个静置培养阶段，以利于农杆菌附着细胞表面，但静置培养时间太长，可能会因为气体得不到交换而发生细胞严重伤害现象。

### 1.5 转化体标记基因选择策略

目前，外源DNA片段插入到植物基因组的转化过程都是在组织水平上进行，转化后的植物组织中只有一部分细胞的基因组整合进了外源DNA，所以同时还存在着未转化的细胞。通常用标记基因将转化细胞从未转化的细胞中筛选出来。常用的标记基因大多是一些对抗生素或除草剂的抗性基因。当它与目的基因共转化植物细胞时，就可以为植物细胞提供在含有抗生素或除草剂的培养基上生长的能力，而未转化细胞不能在这样的培养基上生长，因此存活下来的细胞就只有转化细胞。

在构建载体时，人们常将选择标记基因(selectable marker gene)与报告基因(reporter gene)和启动子、终止子、目的基因重组在同一个载体上，共转化受体细胞。由于选择标记基因与报告基因和目的基因紧密连锁，如果检测出选择标记基因与报告基因在植物体内表达，那么目的基因也很可能整合到了植物基因组内。

目前被广泛应用的标记基因大致可分为选择基因、报告基因两类。还有一些基因兼具选择和报告的功能<sup>[1, 3, 107-113]</sup>。

#### 1.5.1 选择基因

目前广泛用于选择的标记基因主要有两大类：一类是抗生素抗性基因类，另

一类是抗除草剂基因类。抗性标记基因的编码产物通常是分解除草剂或抗生素的酶,可赋予转化细胞除草剂或抗生素抗性,从而使转化细胞能够在含有一定浓度除草剂或抗生素的筛选培养基上生长,非转化细胞在筛选培养基上则被除草剂或抗生素杀死。

常用的抗生素抗性标记有:新霉素磷酸转移酶基因*npt II*(卡那霉素和新霉素的抗性),氯霉素乙酰转移酶基因*cat*(氯霉素的抗性),潮霉素磷酸转移酶基因*hpt*(潮霉素B抗性),庆大霉素乙酰转移酶基因*gent*(庆大霉素抗性),链霉素磷酸转移酶基因*str<sup>I</sup>*、*spc*、*spt*(链霉素抗性)等。*Kan<sup>r</sup>*基因*npt II*是植物转化所用的第一个标记,也是最常用的显性选择标记。*NPT II*酶可催化卡那霉素及其他氨基糖苷类抗生素氨基己糖上的3'-羟基发生依赖于ATP的磷酸化,修饰后的卡那霉素不能再进入细胞并与30S核糖体亚单位结合而导致mRNA的错译。潮霉素抗性基因(*hpt*)在某些作物上选择效率比*Kan<sup>r</sup>*高,应用也较多。

常用的抗除草剂标记有:5-烯醇丙酮酰草莽酸-3-磷酸合成酶基因 *epsps*(抗草甘膦),PPT乙酰转移酶基因*bar*(Glufosinate)等。草甘膦是可控制大多数有害杂草的非选择性除草剂。抗草甘膦的*epsps*基因是5-烯醇丙酮酰草莽酸-3-磷酸合成酶*epsps*的突变体。除草剂草甘膦是*epsps*合成酶的抑制剂。细胞或农杆菌中分离的*epsps*基因与叶绿体转运肽序列融合,可显著提高对草甘膦的抗性。Glufosinate是一种谷酰胺合成酶抑制剂,由磷化麦黄酮和两个L-丙氨酸组成,只有除去两个L-丙氨酸残基后,非选择性除草剂Basta的活性成分PPT才有活性。*bar*基因编码磷化乙酰转移酶使PPT的自由氨基乙酰化从而对PPT解毒。

### 1.5.2 报告基因

报告基因指能被快速测定的特殊基因,如 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因即GUS基因(*uidA*)可发生颜色反应,绿色荧光蛋白基因(*gfp*)、荧光素酶基因(*luc*)可发光,胭脂碱合成酶基因(*nos*)、章鱼碱合成酶基因(*ocs*)可用Otten法快速测定。

GUS基因(*uidA*)在转入植物组织后,可将无色底物5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸水解,产生蓝色的水解产物,观察产生蓝色反应即可对GUS基因的表达进行分析。GUS基因可以在完整的植物组织中进行检测。GUS在有些植物中如甜菜和小麦中有较高的内源表达,但外源表达的GUS水平高出20~50倍。天然存在的GUS酶的最适pH为4.5,用pH8.0检测时,通常内源GUS很少被测出。GUS基因的检测方法主要有:组织化学染色法(通过显色反应定性观察)、荧光分析法测定GUS活性、分光光度法测定GUS活性(415nm)。GUS活性荧光分析法非常灵敏,较分光光度法高100~1000倍。

GFP是一种用于转昆虫的标记基因,现广泛用于转基因植物的活体检测。GFP在荧光酶的参与下被 $\text{Ca}^{2+}$ 所激活,使蛋白质的共价键发生一定的变化从而形成不稳定的中间体,中间体分解后,释放能量,经过一定波长紫外光照射后,可以激发出绿色荧光。GFP的检测具有不需要添加任何底物或辅助因子,不使用同位素,也不需要测定酶的活性等优点。同时GFP生色基团的形成无种属特异性,在原核和真核细胞中都能表达,其表达产物对细胞基本上没有毒害作用,并且不影响细胞的正常生长和功能。

*cat*和*nptII*也可作为报告基因使用。CAT活性可通过反应底物乙酰CoA的减少或反应产物还原型CoA SH和乙酰化氯霉素的生成来测定,常用的方法有:硅胶G薄层层析法和DTNB分光光度法。*npt II*编码氨基糖苷-3'-磷酸转移酶(aminoglycoside-3'-phosphotransferase II),该酶使糖苷类抗生素(新霉素、卡那霉素、庆大霉素等)磷酸化而失活。作为报告基因使用时,可使用放射性标记的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,通过 $\gamma$ -磷酸基团转移,生成带有放射性的磷酸卡那霉素。具体方法有:点渍法、层析法和凝胶原位检测法。

### 1.5.3 安全标记基因

抗性标记选择的策略是负向选择(negative selection),这种方式一方面可能带来生物安全问题,而且选择压力常常也不利用转化子的生长。为此,近年来发展了基于生物安全标记的正向选择(positive selection)方法。现已发现的生物安全标记基因主要有两类:一类是有关糖类代谢酶的基因,主要有6-磷酸甘露糖异构酶基因(*pmi*)、木糖异构酶基因(*xylA*)、核糖醇操纵子(*rtl*)和谷氨酸-1-半醛转氨酶基因(*hemL*)等;另一类是有关激素代谢的基因,主要有异戊烯基转移酶基因(*ipt*)、吲哚3-乙酰胺水解酶基因(*iaaH*)等。这些标记基因与常规标记基因的不同在于没有抗生素或除草剂抗性。使用这类基因作选择标记时,转化了的细胞处于某种有利的代谢或发育条件下,获得生长或竞争优势,从而筛选出转化植株。

*ipt*是一个日益重视的选择基因。它是农杆菌的致瘤基因之一,编码异戊烯基转移酶(IPT),参与细胞分裂素的合成,因此转化了的细胞能在未加激素的培养基上正常生长,而未转化的细胞不能正常生长而死亡,从而使*ipt*成为一个有效的正向选择基因(Ebinuma等,1997)<sup>[114]</sup>。在烟草中,*ipt*的选择效果好于卡那霉素抗性基因(Endo等,2001)<sup>[115]</sup>。

有报导认为(Okkels等,1997),GUS基因在一定条件下也有与*ipt*相似的效果。在培养基中添加激动素葡萄糖苷酸(cytokinin glucuronide),含有GUS基因转化子能在GUS的作用下水解,释放出激动素,从而促进转化细胞的生长<sup>[116]</sup>。

## 1.6 转化体的分子检测

基因转化后,外源基因是否进入植物细胞,进入植物细胞的外源基因是否整合到植物染色体上,整合的方式如何,整合到染色体上的外源基因是否表达,这一系列的问题仍需回答。1991年,Potrykus对转基因植物提出了一个明确的检测标准,现得到了大多数学者的认同:①要有严格的对照(包括阳性及阴性对照);②转化当代要提供外源基因整合和表达的分子生物学证据、物理数据(southern杂交,northern杂交,western杂交)与表型数据(酶活性分析或其它);③提供外源基因控制的表型性状证据(如抗虫、抗病等);④根据该植物的繁殖方式(有性繁殖还是无性繁殖)提供遗传证据。有性繁殖作物需有目的基因控制的表型性状传递给后代的证据,无性繁殖作物有繁殖一代稳定遗传的证据。只有获得充分的证据后才可认定被检测的材料是转基因的。

一般来说,检测外源基因是否转化成功,首先是对报告基因进行检测,必要时在进行目的基因的检测。用简单的生化方法即可检出选择标记基因和报告基因。报告基因多数是编码酶的基因,通过对酶活性的分析,可对基因表达水平进行定量或定性分析。也可对其进行必要的分子检测。如以NPT II为标记基因时,常根据其片段设计引物对材料进行PCR扩增,效果较好;GUS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)原位分析效果与western杂交相当。报告基因检测的主要目的是早期诊断,以便尽早剔除非转化体,还必须做进一步的分子检测,确定是否成功转化。

转基因植株的分子检测方法有许多种。Southern杂交、PCR、PCR-Southern杂交可检测植物基因组是否整合有外源基因,原位杂交<sup>[117-118]</sup>可确定外源基因在染色体上整合的位点及在哪些组织中表达,IPCR可克隆转基因植株中外源基因的旁侧序列,Northern杂交和RT-PCR可检测外源基因在植物细胞内是否正常转录,Western杂交和ELISA则可检测外源基因在植物细胞内是否转录翻译为特异的蛋白质。近年来发展起来的Quantitative Real-time PCR(实时定量PCR)技术可快速、准确、高效地检测到转基因的拷贝数<sup>[119]</sup>。此外,RFLP及RAPD技术也可用于鉴定外源基因的整合。

## 1.7 转基因沉默

### 1.7.1 导致转基因沉默的机理

1986年,Peerbotte发现转基因烟草中转入基因在当代或后代的表达不稳定,甚至不表达。进一步的研究表明,大多数转入基因的完整性没有变化,转入基因

的表达受阻并不是由于该基因的丢失或突变引起的,而是该基因失活的结果,即转入基因发生了沉默(transgene silencing)<sup>[120]</sup>。

导致转基因沉默的机理有很多种,各种机理都涉及到核酸(DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA)间的相互作用。根据其作用机理的不同,人们通常把转基因沉默分为3种情况<sup>[121-122]</sup>:位置依赖性沉默(position-dependent gene silencing, PDGS)、转录水平基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)、转录后水平基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。TGS和PTGS都是由于转入基因为多拷贝或与内源基因相互作用而诱发的后成性失活,因此,属于同源依赖性沉默(homology-dependent gene silencing, HDGS)或重复序列诱导的基因沉默(repeat-induced gene silencing)。转基因沉默的机制非常复杂,并且每种机制都是相互关联的,有时会同时发生。最近还发现,PTGS与植物抗病毒能力也有很大的联系<sup>[123-129]</sup>。

## 1.7.2 控制基因沉默的策略

### 1.7.2.1 转化方法的选择

外源基因的表达水平与拷贝数有着密切的关系,多拷贝的整合方式并未能使基因表达水平有所增加,反而使DNA发生甲基化(methylation)或其它原因引起的基因失活。转化方法不同,外源基因整合的拷贝数也不同,农杆菌介导的转化法比DNA直接转化法所产生的拷贝数低或只为单拷贝(Spencer等,1990)<sup>[130]</sup>,因此,农杆菌介导的转化株,发生基因沉默的可能性比直接转化法要少得多。此外,也可以对多拷贝整合的转化体通过后代有性分离来筛选单拷贝的基因个体,以此消除基因沉默。

### 1.7.2.2 避免重复序列的产生

重复序列导致的从头甲基化和异位配对引起的染色质异化,阻碍了基因的转录,产生基因沉默。因此,在构建载体时要尽量少使用同源序列(朱莉等,1999)<sup>[131]</sup>;不同的基因最好使用不同的启动子驱动;避免使用相同的选择标记。无标记基因的选择方法(Yader和Goldsbrough,1994)<sup>[132]</sup>,省去多次转化或转入多个基因时选择标记基因的重复问题,有利于避免基因沉默。

### 1.7.2.3 实现共整合与共表达的一致

有实验证明,位于不同质粒上的两个基因共转化时发生的共整合频率低于同一质粒上的两个基因,前者共整合的频率在20%~80%之间<sup>[133-134]</sup>,后者却可达

80%~100%<sup>[135]</sup>。多个基因要想实现共表达,首先要发生共整合,所以,要针对转化的目的来构建载体,结合适宜的转化方式,将影响转化效率的各种因素综合考虑,才有可能提高共整合的频率,实现共整合和共表达的统一。

#### 1.7.2.4 对外源基因进行修饰

TGS和PTGS均与DNA甲基化有关,TGS 涉及启动子甲基化,而PTGS与转化基因的编码区甲基化相联系。不同物种碱基组成中的GC 含量或AT含量有差异,外源基因由于其碱基组成与整合位点处的不同而被识别,发生DNA 甲基化,关闭基因的表达。因此,对外源基因的序列进行修饰,使其适于所转植物的碱基组成,并采用植物偏爱的密码子,可以提高基因的表达,降低基因沉默的几率。也可采用定点插入的方法,将外源基因整合进与其碱基组成较一致的植物基因组上,减少甲基化的发生,提高基因的表达效率。与甲基化有关的突变系的利用,有可能找到避免甲基化的有效途径。MET基因的突变,编码一种DNA转甲基化酶(methyltransferase),使DNA甲基化极显著降低,同时释放大多数基因座(loci)的沉默<sup>[136]</sup>。

#### 1.7.2.5 避免反义 RNA 的产生

研究表明,PTGS中合成异常RNA,RNA-依赖RNA聚合酶用这些异常RNA做底物合成反义RNA;的正义和反义RNA配对形成双链RNAs逐向降解,从而使基因的表达效率降低或失活<sup>[137]</sup>。因此,在构建载体时最好将DNA序列顺式排列,避免反义RNA产生引起的后果。

#### 1.7.2.6 MAR 的应用

MAR使外源基因形成独立的转录单位,使其不受周围基因的影响,这种结构可以克服植物基因组对外来基因的识别,避免位置效应引起的基因失活。另外MAR 中有拓扑异构酶II识别序列,核基质中含有拓扑异构酶II,两者相互作用,使外源基因产生独立的松弛结构域,有利于转录因子的结合,使外源基因易于表达(Bode等,1992)<sup>[138]</sup>。因此,MAR可以增强基因的稳定表达(Mlynarova等,1994)<sup>[139]</sup>,减少转基因个体之间的差异。苏金等(1999)将其构建在GUS基因两侧,发现其表达活性比GUS基因两侧没有MAR的高900倍<sup>[140]</sup>。Han和Stauss(1997)发现,在转基因杨树中,由于MAR的存在,使GUS的表达量比没有MAR存在的平均提高10倍<sup>[141]</sup>。这是由于MAR与核基质有特定的结合区,使目的基因的导入有了一定的方向性,这也许为外源基因的定点插入提供了一个途径,所以,MAR成为近年来植物基因转化研究的热点之一<sup>[142]</sup>。

### 1.7.2.7 利用具有组织与发育特异性调控作用的增强子

现已发现动物免疫球蛋白K链基因的增强子可以在细胞发育的特定阶段指导该基因区段的去甲基化,从而启动基因的转录(Lichtensten等,1994)<sup>[143]</sup>。因此,如果能从植物基因中分离到相应的增强子,并构建成嵌合基因,可望确保转基因能够按合适的调控模式进行表达,消除基因表达在时空上的专一性所造成的失活现象。

### 1.7.2.8 利用特异性重组系统

利用噬菌体P1 Cre-*lox*、接合酵母R-*rs*和酿酒FLP-*FRT*位点特异性重组系统可以将基因整合到已有*lox*、*rs*和*FRT*位点的植物上。Albert等(1995)利用噬菌体P1 Cre-*lox*系统将外源基因整合到烟草基因组中预先存在的*lox*位点<sup>[144]</sup>。Vergunst和Hooykass(1998)等也通过此系统将T-DNA整合到拟南芥基因组特定位点<sup>[145]</sup>。

## 1.7.3 转录后基因沉默的利用

大量转基因植物的实例证明,外源基因沉默是一个经常发生的现象,是否发生沉默也无法事先预测,其作用机制也比较复杂。转基因失活现象虽然不是人们希望得到的结果,但它对植物的进化却有重要的作用:可以防止转座子跳动影响植物基因组的正常结构和功能;还可防止外源基因,也许是病原菌基因的侵入造成的损失(Finnegan和McElroy,1994;Matzke等,2000)<sup>[146-147]</sup>。因此,研究外源基因的失活机制,对于人们有效的进行植物的遗传操作,提高外源基因表达水平以及获得稳定表达的转基因株系均有重要的理论和实践意义<sup>[148-150]</sup>。

## 1.8 转基因安全

自1983年世界上第一株转基因作物产生以来,作物安全性问题一直是争议的焦点,也是制约转基因作物发展的瓶颈之一<sup>[151]</sup>。人们对转基因安全性的关注主要是要环境安全性和食品安全性两个方面,而标记基因的安全策略是与这两个问题密切相关的技术问题。

### 1.8.1 标记基因的安全策略

标记基因只是为获得转基因植物,作为试验室操作程序的产物被引入进来,没有直接的农艺价值。一旦获得转化植株后,尤其在转基因产品的产业化过程中,标记基因的存在是多余的,甚至是有害的。(1)在转化细胞的筛选过程中,大量

生长受到抑制的未转化的细胞会阻碍转化细胞对营养物质的吸收,并且还可能分泌一些有毒的物质抑制转化细胞的生长。(2)当需要用重转化(re-transformation)方法进行基因堆积(gene stacking)时,无法利用前一次转化中未被剔除的选择标记进行重转化株筛选。(3)基因的水平转移与基因逃逸可能产生的生物安全性问题:作为标记基因的抗生素抗性基因一旦流动到危害人类健康的微生物中就会为其提供抗药性,而除草剂抗性基因如果流动到危害粮食作物生长的杂草中就会使其获得除草剂抗性而成为难以杀灭的“超级杂草”。所以,标记基因的安全性与标记基因的剔除(selectable marker-free, SMF)已成为转基因植物研究中的新课题[152-157]。

根据不同原理,剔除标记基因的方法可以分为两类:分离剔除和重组剔除[158]。前者是通过标记基因与目的基因分别插入到植物基因组的非连锁位点上,再经减数分裂实现标记基因与目的基因的分离,而达到标记基因剔除的目的。后者是将标记基因构建在DNA裁剪单元中,由起裁剪作用的酶(重组酶或转座酶)识别并切除裁剪单元,从而将标记基因从植物基因组中剔除。

#### 1.8.1.1 标记基因的分离剔除法

以土壤农杆菌的T-DNA为基因转移载体的转化中,标记基因与目的基因以紧密连锁的方式构建在一个T-DNA单元中,因此两者总是共整合进植物基因组中,从而很难通过在减数分裂的细胞中的基因的自由组合或交叉互换相互分离。要实现转化后标记基因与关注基因的分离,可以将这两类基因分别设计在两个T-DNA单元中,使它们分别插入而非共整合到植物基因组中(Komari等, 1996)<sup>[159]</sup>。由于T-DNA的插入是随机的,因此插入后的标记基因与关注基因可能分别位于不同染色体上,即非连锁位点上,或位于同一染色体相距较远的位点上;减数分裂后,标记基因与关注基因就可以分离,从而在下一代中获得无标记基因的转基因植物。

#### 1.8.1.2 标记基因的重组剔除法

与标记基因分离剔除法不同,重组剔除法无需将标记基因和关注基因分别插入到两个T-DNA中,两者仍然以紧密连锁的方式构建在一个T-DNA中,但在标记基因的两端插入DNA裁剪系统的识别序列,即构成一个裁剪单元,在起裁剪作用的酶的作用下将它裁剪除去。也就是说,DNA重组系统是由识别序列界定的裁剪单元和起裁剪作用的酶两个部分组成,在标记基因完成对转化细胞的筛选后,将它从植物基因组中剔除。Lu等<sup>[160]</sup>将两个独立的T-DNA序列改建成含双

右边界T-DNA和一个左边界T-DNA的序列。用含该T-DNA的质粒转化水稻,其中36%~64%的转基因后代标记基因与目的基因发生了分离。

标记基因的剔除应在转化筛选以后进行,因此通常先将裁剪单元和它以外的紧邻的目的基因插入到植物基因组中,再将进行裁剪用的酶基因引入;在标记基因随裁剪单元除去后,插入在植物基因组中的起裁剪作用的酶基因再经过减数分裂与目的基因分离,这样在子代中可以得到只带有目的基因的转基因植株。将裁剪酶基因引入到已插入了标记基因的转基因植物基因组中的方法有重转化和杂交授粉(cross-pollination)两种。

裁剪发生时间的控制和裁剪细胞的筛选是关键问题,可以通过对裁剪单元的改进设计加以解决。将标记基因与裁剪的酶基因紧密排列在一个裁剪单元中同时插入到植物基因组里,就可以在 $T_0$ 代中筛选出标记基因与裁剪的酶基因都被剔除了的只带有目的基因的转基因植株。但是标记基因与裁剪酶基因共整合进植物基因组过程中,裁剪酶基因的表达可能使标记基因也被过早地裁剪除去,因此应将裁剪酶基因置于诱导型启动子的调控之下,使标记基因在完成转化筛选后再被裁剪剔除。Zuo等(2001)<sup>[161]</sup>在转基因拟南芥中用 $\beta$ -雌二醇( $\beta$ -estradiol)诱导表达系统控制Cre基因的表达。在Cre基因的CaMV35S启动子的上游融合了8个拷贝的LexA操纵子(operator)序列,使Cre基因可以在 $\beta$ -雌二醇的诱导下表达。他们以GFP基因作为报告基因,将包含标记基因、Cre基因和XVE反式激活基因的裁剪单元插入在GFP的启动子和编码区之间,因此只有当裁剪单元被剔除以后,GFP基因才能表达。*codA*基因已被用于无标记基因的转基因烟草的筛选(Gleave等, 1999; Corneille等, 2001)<sup>[162]</sup>。

### 1.8.2 环境安全性

环境安全性评价包括生存竞争性、生殖隔离距离(通过花粉传播引起的转基因漂流)、与近缘野生种的可交配性及对非靶生物的影响等<sup>[163]</sup>。

转基因作物与近缘野生种的可交配性是环境安全性的最重要指标之一,因为这决定了转基因作物是否会成为不可控的杂草。这些基因能否扩散到亲缘关系相近的野生种或其他微生物体内而破坏自然的生态平衡有较大争议。转基因作物与近缘野生种的可交配性视物种及地理环境而定。自然条件下,可交配性一般很小,但是1994年Jorgensen等发现转基因油菜(*Brassica napus*)与其野生种(*Brassica campestris*)间存在基因渗透现象<sup>[164]</sup>。

转基因对非靶生物的影响也是安全性评价的重要内容之一。如果转基因扩散到土壤微生物或人畜肠道微生物是通过DNA的直接转移实现的,这种转移须通

过质粒以接合方式进行,而转基因植物DNA不是以质粒形式存在的。此外,因为转基因的启动子在微生物体内无法工作,这种转化子必须经体内重组后才能被表达。根据以上两点原因,转基因作物不会改变土壤和肠道的生态环境<sup>[165]</sup>。对矮牵牛、马铃薯、棉花、水稻和番茄的大量试验均表明,转基因作物对土壤微生物的种类和数量没有影响<sup>[166]</sup>。

目前对植物转化中最常用的显性选择标记的卡那霉素抗性基因和除草剂草甘膦抗性基因的毒性、过敏性、基因表达产物的多效性及对抗生素治疗影响的评价,作了较为详尽的分析<sup>[167-168]</sup>。理论上,抗性标记基因不会直接转移到非靶生物体,但在自然条件下是否会漂移,目前还没有证据证明。这一机制非常复杂,在尚不能准确把握前,应优先选择安全标记或无选择标记,或者在转化后剔除标记,可大大减少由此带来的可能风险。

在商业化生产中,植物病毒异源重组和异源包装的可能性及其后果,是安全性评价的重要内容之一。自然界中的植物病毒间存在异源重组和异源包装现象,可改变病毒的宿主范围。转基因作物表达的病毒外壳蛋白在体外试验中,可包装入侵另一种病毒的核酸,从而产生新病毒。迄今在田间试验中尚未发现病毒的异源包装。根据推测,即使在转基因作物中发生病毒的异源包装,该病毒再次入侵原宿主时会因无法形成病毒外壳蛋白而死亡。但小规模田间试验得到的结论不一定与大规模生产应用结果相同。

### 1.8.3 食品安全性

转基因作物生产的食品是否适于人类食用,目标基因及其产物是否对人畜有害是争论的焦点<sup>[169]</sup>。

编码抗新霉素和卡那霉素的*nptII* (aphA2)基因是植物基因工程最常用的标记基因,其基因产物是新霉素磷酸转移酶,对底物有高度特异性,只作用于氨基己糖环3'位羟基上,催化的磷酸化反应依赖ATP,而对其他氨基糖苷类抗生素如Amikacin和Netilmycin都无作用。此外,抗除草剂基因也常用做标记基因。目前认为植物食品中标记基因水平转移至肠道微生物中的可能性极小。*nptII*基因及编码ESPPS的草甘膦抗性标记基因已被批准在商业化的转基因植物中使用。而且消化道中ATP量很低,不足以造成催化活性。若该酶被分泌至消化道中,20~30min即被充分降解而失活<sup>[170-173]</sup>。

目前转基因作物中抗虫作用所占比重很大,如将各种杀虫蛋白基因转入植物而获得抗鳞翅目害虫的番茄、杨树、棉花、玉米;抗鞘翅目昆虫的番茄、杨树等。苏云金杆菌作为生物防治剂已在世界各地应用30年,证明是安全的,含Bt基因的

转基因植物也应是安全的。目前,大多认为Bt是安全的,但要监测害虫对Bt产生抗性。

利用反义RNA技术阻断某些关键酶基因表达来改良植物品质的应用越来越多,如反义RNA转基因番茄。一般认为这些基因同人们每天吃下的大量DNA一样很快被分解,不会对机体有毒或产生过敏反应。

## 1.9 模式植物拟南芥研究进展及其在植物基因工程中的应用

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)是十字花科拟南芥属一种草本植物,是当今最重要的模式植物。由于其植株很小(株高约15cm)、生活周期很短(约6-8周)、种子丰富(每株3000粒以上)、易于繁殖和人工诱变等优点,早在1943年就被欧洲学者Laibach选为模式植物(model plant)进行研究;1980年美国学者Redei公布了它的遗传图谱;1997年公布了拟南芥线粒体基因组(mtDNA),这是有花植物中第一个完整的线粒体基因组分析;1999年日本学者Tabata测定了其叶绿体基因组DNA全序列;2000年拟南芥国际合作组织AGI(the *Arabidopsis* Genome Initiative)完成了其核基因组全长测定,是迄今唯一完成全部基因组序列测定的植物。目前,拟南芥已经成为植物分子生物学、植物基因组学和植物蛋白组学极好的模式系统<sup>[174-176]</sup>,并极大地推动了植物发育生物学、植物遗传学、植物基因工程、植物蛋白质工程等诸多领域的向前发展。

### 1.9.1 拟南芥的生物学特性

拟南芥又称鼠耳芥,是芥子家族中的一种一年生小植物<sup>[177]</sup>。野生的拟南芥主要分布在亚洲、非洲和欧洲,我国除华南地区以外均产<sup>[178]</sup>。株高随生长环境或培养条件的变化而变化,一般为15至30cm。基生叶多数,长圆形或椭圆形,呈莲坐状排列;茎生叶具短柄或无柄。总状花序顶生,花瓣白色;雄蕊6枚,花药黄色;雌蕊圆柱状。长角果线形,长约10至16mm,成熟时开裂。种子呈卵形,长约1mm,成熟时红褐色。

拟南芥具有诸多独特的生物学特性,使之具有成为模式植物的有利条件<sup>[174]</sup>:

1) 拟南芥植株个体小,可以大批量地在温室中生长,也可以将盆栽小植株放在人工气候室培养,甚至在培养皿中培养小苗,在生长箱中生长,从而使生长条件易于控制,极大地减少环境因素对实验的干扰。

2) 拟南芥生长周期短,播种后2~3d就开始萌发,20d左右抽苔开花,40d左右可以收到第一个成熟的种子芽,完成一个生命周期只需要6-8周,具生长

无明显的季节性, 人工条件下, 1年内可以繁殖许多代, 十分有利于快速遗传分析。

3) 拟南芥是一种典型的自交繁殖植物, 开花后一般为自体授粉, 因此在人工诱变后可在子二代中直接筛选变异株的纯合子。根据遗传分析的需要, 也要在实验室条件下进行人工异花授粉而完成杂交过程。

4) 拟南芥的种子量很大, 生长良好的植株可结上万粒种子, 可为子代遗传分析提供足够的群体, 也非常便于扩增变异株种子库。此外, 其种子十分小, 是理想的诱变实验材料。

### 1.9.2 拟南芥的核基因组研究

拟南芥也是基因组分析重要的模式植物<sup>[179-186]</sup>。1996年AGI启动拟南芥核基因组序列测定这一国际合作项目, 1999年完成5条染色体中2号、4号染色体测序工作, 在2000年完成其余3条染色体测序工作, 并于当年年底在《NATURE》(2000, Vol. 408:796-815) 公布了拟南芥115.4 Mb的全序列图谱。拟南芥DNA全长125 Mb, 只剩下10Mb的中心着丝区DNA, 因为多重复序列所含基因很少, 还未全测出。拟南芥全基因组DNA包含25498个功能基因组及其所对应的11601个蛋白质家族。对拟南芥基因组全序列的分析表明, 拟南芥的进化过程中包含了一个全基因组的复制, 随后又发生了某些基因的缺失及重复复制, 而且叶绿体和线粒体中的一部分基因转移至核基因组中也丰富了核基因组的内容。与线虫及果蝇相比, 拟南芥基因组编码的11601个蛋白质家庭中虽然包含了许多新的家族, 但也缺少了几种常见的蛋白质家族。这一结果表明在这3种多细胞真核生物中, 一系列的普遍蛋白经历了不同的扩增及收缩过程。例如, 根据序列分析, 拟南芥中13%的基因与转录及信号转导有关, 其中只有8%~23%的蛋白质可在其它真核生物基因组中找到相关基因, 这反映了许多植物转录因子的独特进化过程。

在目前已知基因组大小的高等植物中, 拟南芥的核基因组最小, 只有 125Mb, 仅比单细胞酵母的基因组大 7 倍左右, 比大肠杆菌大 15 倍。由于基因组小, 使得基因文库的构建、筛选等过程变得简便、快速。测序结果表明, 在确定的 25498 个基因中, 至少有 70%的基因组是重复的, 故只有少于 15000 个不同的基因存在, 只比果蝇的 13601 个基因略大些, 而少于线虫的 18424 个基因。

拟南芥在植物进化中处于相当高的位置。在植物进化中, 很多具有重要功能的基因都比较保守(否则物种会在漫长的进化过程中被淘汰), 在拟南芥中发现的一些重要的调节基因都能在其他植物中找到它们的同源基因。据初步推测, 有 80.6%的拟南芥基因与水稻具有同源性, 反之, 只有49.4%的推测水稻基因与拟

南芥有同源性。因此,从比较容易的模式植物入手,获得的基因研究成果可以容易地向农作物转化,如通过拟南芥研究得到的抗衰老基因目前已成功地用于水稻、玉米、烟草、番茄中,表现出可观的经济效益。

### 1.9.3 拟南芥组织培养

拟南芥很容易利用种子进行无菌培养(axenic culture),方法是将常规消毒后的种子接种到培养皿或试管的培养基上,培养基采用全浓度或半浓度的B5或MS培养基,1%-3%蔗糖或葡萄糖作碳源,培养条件一般为25℃,连续光照或16h/8h光/暗周期,相对湿度60%以上。种子还能在液体培养基中培养,如加有1%蔗糖的1/2MS液体培养基。水培方法可参考Gibeau等(1997)使用的方法<sup>[187]</sup>。以上方法均可在人工气候室生长。自然条件下,拟南芥是一种冬花植物,在下列理想条件下,植株生长最健康,种子育性最强<sup>[188-191]</sup>。

**温度:**生长的理想温度是16-25℃,22-23℃是快速发育的最佳温度。如果有足够的水分,植株可在34℃条件下存活,但育性(fertility)下降。较低的温度可推迟开花,而较高的温度使叶片和花的数量减少。

**光照强度:**理想的光照强度为120-150μmol/m<sup>2</sup>sec,可由日光灯提供。

**光照周期:**8-24h光照。长光照可加速生长循环,短光照有利于营养生长。对许多迟花生态型,幼年种子经历数周4℃低温春化处理,对于促进开花是必要的。

**湿度:**多为25%-75%,高湿度条件下(90%以上)可以导致不育(sterility)。

拟南芥的种子、子叶、叶、根、茎等外植体均能诱导愈伤组织<sup>[174, 192-195]</sup>。愈伤组织形态受加入激动素浓度影响,0.05mg/L浓度下形成松散型愈伤组织,而1.5mg/L高浓度则形成紧密型愈伤组织。以B5为基本培养基,在0.05-2 mg/L 2,4-D浓度范围内,茎诱导出的愈伤组织要好于叶和种子。用拟南芥子叶、叶、根、茎作外植体,经器官发生途径再生早已有报道,现已是简单而有效的操作,但经体细胞胚再生的报道很少。有研究认为,来自花药、种子和叶的初生愈伤组织有较好的形态发生能力;一些内外条件影响再生,如低光照(小于2000lx)有利于再生,4℃低温预处理愈伤组织24h能提高其再生能力。上述各种途径形成的愈伤组织均可在液体培养基中培养。Glab(1994)发展了拟南芥悬浮细胞有效的培养方法<sup>[196]</sup>:基本培养基为B5+0.2mg/L NAA液体培养基,蔗糖30g/L, pH5.8。培养条件:23℃, 24h光照, 120 rpm。一般按1/10稀释比例每7d继代1次。也有用其他培养基或培养条件的。

#### 1.9.4 拟南芥基因转化及其应用

拟南芥能够通过农杆菌诱导被稳定转化。基本方法有：1) 农杆菌接种外植体组织，如子叶、叶和根等；2) 农杆菌接种完整种子；3) 农杆菌注射到完整的植物枝分生组织；4) 完整拟南芥植株用农杆菌悬浮液作真空渗入

(vacuum-infiltration)。其中，真空渗入法<sup>[26, 197]</sup>的发明是拟南芥研究的一个突破，其可高效、简单而稳定地获得转化子，并毋须组织培养。1998年Clough和Bent发明的花浸法 (floral dip)<sup>[198]</sup>更加简单、有效，其基本操作是将预先人工促生的花序枝 (inflorescence shoot) 浸入农杆菌悬浮液30s，并以塑料薄膜覆盖24h 以实现与农杆菌共培养。目前这一方法已被广泛采用<sup>—[199]</sup>。与拟南芥器官、种子及整体植株成功转化的大量报导相比，有关拟南芥悬浮细胞基因转化极少报导。已有报导的少量例子<sup>[200-201]</sup>，在技术上远未成熟，尚有许多技术难点有待攻克，以至于我们在大量的重复实验中并没有获得相同的实验结果。

通过与已知功能的基因序列进行比较，可大致确定拟南芥中69 %的基因功能。但在事实上，了解某一类基因的普遍功能并不等于洞察了这一基因在特定有机体中所扮演的特殊角色。例如知道一个基因编码激酶或转录因子对了解这一基因如何控制生命过程没有任何帮助。而对拟南芥基因组研究的最终目的是为了认识所有基因并了解它们的功能，因此，随着拟南芥基因组序列的完成，第二阶段的工作就是改进并发展基于序列的更为有效的基因功能的研究方法。

最近，最为有效的改善措施就是随机大范围插入诱导突变 (Random Large-scale Insertional Mutagenesis)，T-DNA或转座子的插入可导致基因的完全失活。随着各种基因克隆方法的建立，克隆的拟南芥基因越来越多，其中转座子标签和T-DNA 插入诱变克隆的拟南芥基因的数目最多，插入诱变已成为克隆和鉴定很多重要植物基因的方法<sup>[202]</sup>。由于插入片段的序列已知，用与插入片段末端及感兴趣基因互补的序列为引物，即可用多聚酶链式反应(PCR, Polymorphism Chain Reaction)的方法筛选到在感兴趣基因中含有插入序列的突变体。或者可对每一插入序列的两侧进行测序，由此直接确定被打断的基因。基因组测序的完成使我们即使只知道插入序列两侧很短的部分也可确定插入在基因组DNA中的确切位置，并由此可分析确认被打断的基因，而对相应突变体的表型及其他性状的分析就可对被打断基因的功能有了大致了解。要获得随机插入有两种方法可供使用：转座子插入诱变法 (transposon mediated insertional mutagenesis; 又称转座子标签法, transposon tagging) 和T-DNA插入诱变法 (T-DNA mediated insertional mutagenesis; 又称T-DNA标签法, T-DNA tagging)，它们必须以农杆菌介导的

转化为基础<sup>[203]</sup>。

在拟南芥中,玉米的*Ac/Ds* (Activator/Dissociation) 转座子双系统被广泛地用于基因标签的研究<sup>[204]</sup>。*Ac*是一段约4.5 kb 的DNA 片段,其内含基因可能只编码转位酶,*Ds* 是*Ac*的衍生物,但已丧失了产生转位酶的能力,因此不能自身转位。但如果体内有由*Ac*产生的转位酶,*Ds* 在此*Ac*转位酶的帮助下也能发生转位。*Ac* 或*Ds*转入拟南芥基因组中,是在T-DNA帮助下完成的。往往在转座子上还构建上一个抗性基因(如抗卡那霉素),这样利于在后代中筛选转化植株和有利于遗传分析。

利用农杆菌中T-DNA可以稳定整合到寄主基因组的特性,将其作为插入因子,产生各种突变体,而利用已知的T-DNA序列作为标签,可寻找由于插入而引起的突变体基因<sup>[205]</sup>。然而,当一个基因的功能或全部或部分地为另一个基因代替时,例如,该突变体基因是一个功能相关的基因家族的一个成员,此时表型畸变的症状将不产生或很少呈现,即不可能或很难检测其突变。解决这类基因分离、鉴定的一个有用方法是在T-DNA上融合一个外源报告基因,这个报告基因只有插入到功能基因中或邻接功能基因的染色体上才能被激活。因为报告基因的表达一般是显性的,且均不是来自植物体,故可能用来探测功能冗余的基因。此外,报告基因的表达可显示T-DNA在基因活性区的位置,报告基因的表达模式能反映标签基因的活性及调控状况,这样T-DNA就能捕捉那些即使没有表型突变的基因。随着方法的改进和T-DNA 转化效率的提高,T-DNA 在拟南芥中仍然是一种被广泛应用的插入诱变剂。目前已经获得了拟南芥T-DNA 插入的突变群体库,可以从中筛选某一已知序列的基因突变。

与此同时,瞬时表达(transient expression)在拟南芥表达调控研究中得到广泛应用,它可以测定RNA和蛋白质的早期积累以及确定不同蛋白质的核定位。例如,在研究启动子、增强子在基因表达调控中的作用时,只要把一定的启动子区域和报告基因构建在一起,转化植物细胞,在短时间内就可测定报告基因的瞬时表达而了解哪些启动子序列是调节基因表达必需的。也可以获得转基因植株后了解其表达类型。如将光调节基因启动子与GUS基因构建嵌合基因,进而经转化将其导入光形态建成反应被改变了的突变体,在位点*det1*、*det2*和*cop1*的突变使暗生长下的突变体植株其形态表现类似于野生型植物在光下的形态表型。结果表明这些位点的突变使光调基因表达在暗条件下被阻遏。PFG介导、微粒轰击、电穿孔法等物理或化学转化方法均可实现瞬时表达。

### 1.9.5 展望

20世纪的遗传学研究以孟德尔定律的重新发现开始,以模式植物拟南芥基因组完全测序结束。人类第一个植物基因组全序列的得到,完全改变了植物遗传学分析的基础,为功能基因组时代的到来开辟了新纪元。最近几年通过拟南芥的研究,我们已经获得植物花器官发生、光对植物发育调节机理及植物激素的作用机理等方面许多重要信息,其结果是带动其它生物学科的发展。预计在10年以内,拟南芥中每一基因的表达模式、蛋白质的定位和修饰及基因产物之间的相互作用等信息都可以从相关数据库中得到。由这些信息不仅可以推测基因产物的独特功能,了解它们在组织生长及发育中的作用,而且对研究拟南芥以外的所有高等植物都将大有帮助。一大批拟南芥的研究成果将用于与人类密切相关的作物上,特别是一些重要的基因如抗病虫基因,抗冻基因,抗旱基因,改善品质基因等,会因拟南芥的研究而有突破性进展。

### 1.10 本研究的目的是和意义

拟南芥是当前生物学,尤其是植物分子生物学、植物基因组学等方面研究最为深入的植物材料,许多有关植物遗传转化的理论与技术,也是首先以拟南芥为模式建立的。这一重要模式植物研究的深入与发展,无疑会极大地推动生物学及其众多相关研究领域的向前发展。

拟南芥遗传转化是植物功能基因组研究最重要的手段,众多新基因的发现、功能基因的鉴定、基因表达与调控模式、蛋白质定位与修饰、基因产物之间的相互作用等,均需要借助这一手段来实现。可以说,通过对拟南芥及其他模式植物突变体的研究,是现代生命科学迅速发展的基础。

以拟南芥花、种子或整体植株作为受体材料,很容易将外源基因整合到拟南芥基因组,因而为目前国际学术界所普遍采用。然而,这些方法均需要经过有性过程,由于受有性世代性状分离的干扰,加之嵌合体的大量存在,很难获得遗传背景稳定、一致的转化子(transformant)。

悬浮细胞是良好的实验材料,在研究植物遗传转化、体细胞胚胎发生、人工诱变、生物反应器等方面有巨大的应用潜力和前景。其突出的优点是细胞数量巨大、增殖速度快、材料均质、同一,可按微生物方法在小试管内进行更精确的遗传操作,而且可以有效克服性状分离和嵌合体的干扰。如果能实现拟南芥悬浮细胞的高效转化,无疑会大大加快研究进程,提高研究效率和研究结果的可靠性程度。随着对拟南芥研究的不断深入,如何有效转化拟南芥悬浮细胞,成为国际学术界欲攻克的重点和难点问题之一。完成本研究所在的华沙大学实验生物学研究

所植物分子生物学研究室 (Laboratory of Plant Molecular Biology at the Institute of Experimental Plant Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Poland, 简称“PMBE”), 在开展基于染色质修饰的植物发育机制的研究课题[Mechanisms of transcriptional activation and repression of plant genes through remodeling of chromatin structure and in the biological functions of linker (H1) histones]之中, 就试图借助悬浮细胞遗传转化方法的突破加快研究进程, 并组织了一批有生力量, 投入到这一研究之中。本文正是这一研究的部分工作。

由于悬浮细胞的特殊性, 有关拟南芥悬浮细胞遗传转化仍然存在许多技术难点, 结合我们在研究中观察, 我们认为主要难点如下: (1) 悬浮细胞与整体植株或组织有很大差异, 对质粒载体的适应性和Ti质粒的敏感性有很大不同; (2) 悬浮细胞十分娇嫩, 转化子选择与转化子生长矛盾的难以调和性; (3) 悬浮细胞在长期的继代培养中, 体细胞无性系变异的普遍性; (4) 悬浮细胞对环境的反应尤其强烈, 由此干扰实验的可重复性。

针对如上难点问题, 我们从拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织生物学特性研究入手, 以期制备适合农杆菌高效转化的受体材料, 并制定科学、合理、有效的转化方案; 利用所构成的多个质粒载体, 进行拟南芥悬浮细胞基因转化, 以检验多种转化方案的可行性, 并优化转化条件; 检测转化细胞报告基因的瞬时表达和稳定表达 (stable expression), 以期建立有效的转化模式, 并获得可利用的转化材料。

## 2 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织生长特性与培养条件

拟南芥组织培养是研究这一模式植物的重要手段和基本技术<sup>[206]</sup>。拟南芥种子很容易在人工条件下进行纯性培养,根、茎、叶、下胚轴、子叶、叶柄等组织均能通过组织培养诱导出愈伤组织,并且能够通过器官发生途径或胚状体途径再生植株<sup>[207-211]</sup>。形成的愈伤组织可在液体振荡条件下获得悬浮细胞,悬浮细胞在固体条件下可重新获得愈伤组织或再生<sup>[212-213]</sup>。悬浮细胞是良好的实验材料,在研究植物遗传转化、体细胞胚胎发生、人工诱变、生物反应器等方面有巨大的应用潜力和前景,因此,基于拟南芥悬浮细胞培养进行细胞和分子生物学的研究,已成为新的热点<sup>[214-215]</sup>。本文研究了多种条件下拟南芥悬浮细胞的生长特性,旨在摸索维持拟南芥悬浮细胞正常稳定生长的培养技术,并为拟南芥悬浮细胞进一步的遗传操作提供良好的受体材料和科学依据。

### 2.1 材料和方法

#### 2.1.1 材料来源

所有材料均由华沙大学实验生物学研究所植物分子生物学研究室 (Laboratory of Plant Molecular Biology at the Institute of Experimental Plant Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Poland, 简称“PMBE”) 提供并在该实验室完成全部试验,其中:拟南芥起始悬浮细胞为按文献<sup>[196]</sup>方法反复继代后的野生型 *Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系, PMBE 制备:商品 B5 粉末培养基购于 Sigma 公司。

#### 2.1.2 培养基配方及其制备

培养基及培养方法参照 Glab (1994) 使用的方法<sup>[196]</sup>。悬浮细胞继代基本培养基为 B5+0.2mg/L NAA (naphthalene acetic acid) 液体培养基。取 3.2g B5 粉末培养基,蔗糖 30g, 200 $\mu$ l 体积质量为 1mg/ml 的 NAA 贮备液,溶于约 800ml 蒸馏水中,置于磁力搅拌机上混合均匀, pH 计测定 pH 值, 1mol/L KOH 调节 pH 值至 5.8, 加蒸馏水定容至 1L, 铝铂纸封口后置于全自动高压灭菌锅在 121 $^{\circ}$ C 条件下灭菌 20min, 贮于 4 $^{\circ}$ C 条件下备用。接种前水浴或自然升至室温。

#### 2.1.3 悬浮细胞继代培养

一般每 7d 继代 1 次。取 40 或 45ml 前述液体培养基注于 300ml 三角瓶, 正常培养时接种 10 或 5ml 起始悬浮细胞液 (每瓶总体积 50ml), 铝铂纸封口, 置

于光照培养室中振荡培养, 培养条件: 23°C, 24h 光照, 120 rpm。以上操作均在无菌条件下进行。

#### 2.1.4 悬浮细胞愈伤组织诱导及愈伤组织继代培养

每皿约取 1ml 继代后 2d 的悬浮细胞, 均匀涂布于前述固体培养基上, 敞开放置约 15min (以倾斜不见液体流动为宜), 透明封口膜 (parafilm) 包扎, 置于光照培养室中静置培养, 培养条件: 25°C, 24h 光照。诱导出愈伤组织后, 挑取单个愈伤组织团 (一般认为每个愈伤组织团起源于同一细胞), 接种于固体培养基上, 每皿约接种 20-30 个, 培养条件同上。以上操作均在无菌条件下进行。

悬浮细胞愈伤组织诱导及其继代基本培养基为 B5+0.2mg/L NAA 固体培养基。按上述方法定容后加 8g 琼脂粉, 按上述方法常规灭菌后在无菌条件下分装至一次性已灭菌培养皿, 每皿约 25ml 培养基。接种前冷却至室温。

#### 2.1.5 悬浮细胞生物量快速测定

对于尚须继续培养的悬浮细胞, 其生物量 (鲜重) 按如下方法取样测定: 充分混合均匀后取 1ml 悬浮细胞液, 注入预先称重的 1.5 ml eppendorf 管 (约 0.900g 每管), eppendorf 微型高速离心机 (centrifuge 5415R) 12000 rpm 离心 5-10 min, 抽吸 (aspiration) 除去上清液, 室温下敞口自然风干 24h, 称重, 减去空管重量即为 1ml 悬浮细胞液的鲜生物量, 重复 3 次。对于不再继续培养的悬浮细胞, 改用 15ml 离心管, 每管取样 10ml, 重复 3 次, 或用 50ml 离心管测定整瓶 (50ml) 悬浮细胞生物量。

#### 2.1.6 增殖倍数与继代指数测算

增殖倍数 (multiplication ratio) 按下式计算: 增殖倍数 = 继代后悬浮细胞密度 / 接种时悬浮细胞密度。

本文引入“继代指数 (subculture velocity)”概念, 按下式计算: 继代指数 = 继代后悬浮细胞密度 / 超始悬浮细胞 (母液) 密度。即, 继代指数 = 增殖倍数 \* 稀释倍数。在悬浮细胞制备与保持时, 要维持悬浮细胞正常稳定生长, 应当使每个继代周期的继代指数达到或接近 1。

本文细胞密度 (cell density) 以单位体积悬浮细胞生物量 (鲜重) 表示, 稀释倍数 (dilution ratio) 以“接种量 (体积) / 继代培养悬浮细胞总体积”表示。

### 2.1.7 悬浮细胞活性测定

氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 法检测悬浮细胞活性。该法利用活细胞呼吸所产生的  $\text{NADH}_2$  和  $\text{NADPH}_2$  催化渗透到细胞内的 TTC, 使其还原生成红色的三苯基甲腈 (TTF), 通过观察其显色反应和提取 TTF 分别定性和定量衡量细胞活性。取 1ml 悬浮细胞培养液和 1ml 0.4%TTC 溶液, 充分混匀后于室温下暗反应 3-6 h (时间过长, 红色物质会扩散到 TTC 溶液之中), 此时活细胞染成红色, 死细胞不染色。离心, 真空吸去 TTC 溶液, 去离子水洗涤 3 遍。加入 5ml 的 95%乙醇, 置于振荡机上轻柔振荡提取 TTF 9h。取乙醇提取液, 在分光光度仪上 485nm 处测定其分光光度值, 以不同比例稀释乙醇提取液, 使其 OD 值维持在 1.0 以下, 空白提取液调零, 重复 3 次。与此同时, 按上述方法测定单位体积细胞鲜重。按下式估算细胞活性(cell viability 或 cytoactive):

悬浮细胞活性=实际 OD 值 $\times$ 稀释倍数/细胞鲜重 (g)

按同样方法测定起始悬浮细胞活性, 继代后悬浮细胞相对活性用下式估算:

悬浮细胞相对活性=被测悬浮细胞活性/起始悬浮细胞活性

0.4% TTC 贮备液: 溶解 0.4g TTC 试剂在 0.5mol/L 磷酸缓冲液中, 配制成 0.4%(W/V) TTC 贮备液。

95%乙醇抽提液: 95%乙醇缓冲液 (pH7.4) 加 0.05%(V/V)吐温 80, 充分混匀即可。

### 2.1.8 悬浮细胞生长模型的建立

采用 SPSS 12.0 统计软件自带的具有“S”型增长特征的生长模型(Logistic 模型、Richards 模型、Chanter 模型和 Gomportz 模型), 选用拟和效果最好 Logistic 模型进行的模拟。模型公式为:

$$B=k/(1+e^{-at})$$

式中:  $B$ ——生物量(g/ml)

$t$ ——生长时间(d)

$a$ 、 $b$ ——估计参数

$k$ ——生长极限

二阶导数为零时为生长拐点 (快速生长中期), 三阶导数为零时为加速拐点 (快速生长始期) 和减速拐点 (快速生长末期)。

模型建立与分析均用 SPSS 12.0 统计软件完成。

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 拟南芥悬浮细胞生长特性

#### 2.2.1.1 不同接种量对悬浮细胞的影响

表 2-1 不同接种量（稀释倍数）条件下拟南芥悬浮细胞的生物量（密度）

Table 2-1 Biomasses of *Arabidopsis thaliana* suspension under different inoculation amounts

| 接种量<br>(ml/ml) | 生物量(g/ml) |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | 0 d*      | 1 d   | 2 d   | 3 d   | 4 d   | 5 d   | 6 d   | 7 d   |
| 2.5/50         | 0.007     | 0.008 | 0.014 | 0.016 | 0.017 | 0.018 | 0.019 | 0.019 |
| 5.0/50         | 0.014     | 0.019 | 0.023 | 0.029 | 0.043 | 0.059 | 0.064 | 0.067 |
| 7.5/50         | 0.021     | 0.030 | 0.037 | 0.059 | 0.073 | 0.079 | 0.084 | 0.087 |
| 10.0/50        | 0.028     | 0.035 | 0.065 | 0.097 | 0.107 | 0.114 | 0.121 | 0.129 |

\*起始悬浮细胞的生物量为 0.140g/ml。0 d（接种时）生物量值是按照各自的稀释倍数折算得出的。

从上表可见，继代培养时不同接种量对培养物的生物量有很大影响，高接种量（即低稀释倍数）能获得更大的生物量，而低接种量（即高稀释倍数）不利于培养物生长。当接种量低至 2.5 ml/50ml（每瓶悬浮细胞总体积 50 ml，后同）时，悬浮细胞生物量增长十分缓慢，基本处于生长停滞状态。

比较不同接种量悬浮细胞生物量变化曲线，能清楚地看出不同接种量悬浮细胞生物量的增长特性（见图 2-1）。

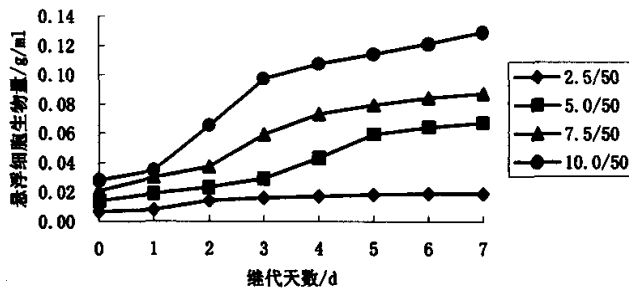


图 2-1 不同接种量条件下拟南芥悬浮细胞生物量变化曲线

Fig.2-1 Biomasses of *Arabidopsis thaliana* suspension under different inoculation amounts

从图 2-1 可见，除 2.5ml 外其余 3 种接种量条件下，拟南芥悬浮细胞的生物量表现出明显的 S 型生长曲线，且均有 2d 的快速生长时期，但不同接种量的快速生长发生的时期不同。随着接种量的降低，快速生长逐渐推后：接种量在 10.0ml 时，出现在第 2 至第 3 天；接种量在 7.5ml 时，出现在第 3 至第 4 天；接种量在 5.0ml 时，出现在第 4 至第 5 天。2.5ml 接种量条件下，仅第 2 天有少量生长。

## 2.2.1.2 悬浮细胞的理论生长模型

通过 SPSS 软件, 用  $B=k/(1+e^{-a-bT})$  拟合不同接种量生长模型, 结果如表 2-2。

表 2-2 不同接种量拟南芥悬浮细胞的理论生长模型

Table 2-2 Theoretic growth models of *Arabidopsis thaliana* suspension under different inoculation amounts

| 接种量<br>(ml/ml) | 参数估计  |       |       | 拟合优度<br>( $R^2$ ) | 快速生长期 (d) |      |      |
|----------------|-------|-------|-------|-------------------|-----------|------|------|
|                | k     | a     | b     |                   | 始期        | 中期   | 末期   |
| 2.5/50         | 0.019 | 1.497 | 0.748 | 0.971             | 0.25      | 2.64 | 3.76 |
| 5.0/50         | 0.084 | 2.363 | 0.490 | 0.978             | 2.13      | 4.82 | 7.51 |
| 7.5/50         | 0.092 | 2.055 | 0.640 | 0.988             | 1.15      | 3.21 | 5.27 |
| 10.0/50        | 0.127 | 2.370 | 0.819 | 0.986             | 1.29      | 2.89 | 4.50 |

注: 初始值  $k=1$ 、 $a=4$ 、 $b=0.1$ 。

从表 2-2 可见, 用该模型获得了较高的拟合效果。理论上, 随着接种量减少, 悬浮细胞的生长极限 ( $k$  值) 依次降低, 快速生长期依次推后 (除 2.5ml 外), 与实际观察结果基本相符。10.0ml 时生长极限为 0.127g/ml, 生长拐点在 2.89d。

## 2.2.1.3 不同接种量悬浮细胞的增殖倍数及继代指数

继代 7d 后拟南芥悬浮细胞增殖倍数及继代指数见图 2-2。

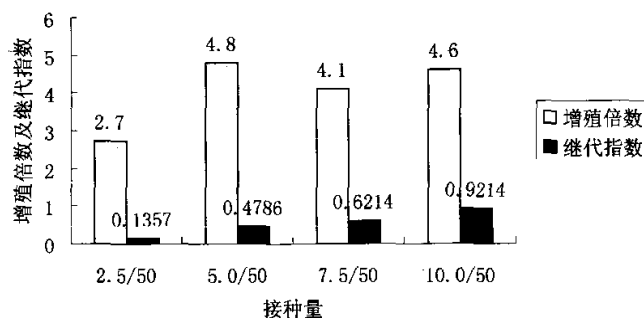


图 2 拟南芥悬浮细胞增殖倍数及继代指数

Fig. 2 Multiplication ratio and subculture velocity of *Arabidopsis thaliana* suspension

在本实验条件下, 按照通常每 7d 继代 1 次来看, 接种量以 10.0ml 比较恰当, 继代指数为 0.9214, 此时悬浮细胞密度达 0.129g/ml, 基本接近起始悬浮细胞密度 (0.140g/ml)。而采用 5.0 或 7.5ml 接种量时, 虽然也能获得较大的增殖倍数, 但经过 7d 培养后的继代指数仅分别为 0.4786 和 0.6214, 要维持多次继代后的稳定生长, 则必须延长继代周期。图 2-3 是 4 种不同接种量两周后悬浮细胞状。



图 2-3 不同接种量 2 周后悬浮细胞状

Fig. 2-3 Suspension growths of different diluting ratio in two weeks after subculture

注：从左至右依次为 10.0/50、7.5/50、5.0/50、2.5/50

2.2.2 激素对拟南芥悬浮细胞生长的影响

培养基附加不同激素对拟南芥悬浮细胞生长有明显影响。结果见图 2-4、2-5。



图 2-4 不同激素处理后悬浮细胞状及离心收集的细胞

Fig. 2-4 Suspensions and biomasses with different hormones

注：从左至右依次为无激素、0.1mg/L BAP 和 0.2mg/L NAA

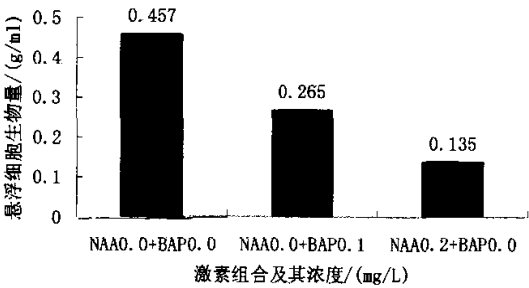


图 2-5 不同激素对拟南芥悬浮细胞生物量的影响

Fig.2-5 Biomasses of *Arabidopsis thaliana* suspension with different hormones

目前广泛采用的拟南芥悬浮细胞基本培养基为 B5+0.2mg/L NAA，但本试验得出了不同结果。培养基中附加 0.2mg/L NAA，0.1mg/L BAP（6-Benzylamino-Puring Solution）和不加任何激素 3 种处理，起始悬浮细胞生物量为 0.132g/L，接种量均为 5.0/50 ml/ml，继代后 14 d 的生物量分别为：0.135，0.265，0.457g/ml，以不加激素处理的表现最好，而附加 0.2mg/L NAA 和 0.1mg/L

BAP, 均不同程度地限制了悬浮细胞的生长。

### 2.2.3 蔗糖浓度对拟南芥悬浮细胞生长及活性的影响

起始悬浮细胞生物量为 0.137g/ml, 接种量均为 10.0 ml /50 ml, 10, 20, 30, 40g/L 蔗糖浓度条件下继代 7 d 后悬浮细胞生物量见图 2-6。结果表明, 蔗糖浓度对拟南芥悬浮细胞生长有明显的影响, 以 30g/L 蔗糖浓度表现最好, 40g/L 蔗糖浓度次之, 10g/L 蔗糖浓度表现最差。

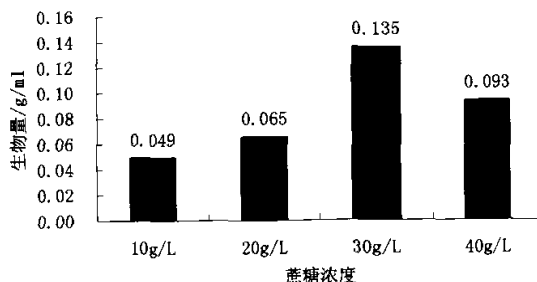


图 2-6 不同蔗糖浓度对拟南芥悬浮细胞生物量的影响

Fig.2-6 Biomasses of *Arabidopsis thaliana* suspension with different concentrations of sucrose

本文方法测定的起始悬浮细胞活性为 16.4740, 继代 7d 后悬浮细胞相对活性见图 2-7。结果表明, 蔗糖浓度在 20-40g/L 时, 细胞相对活性无明显差异, 但当蔗糖浓度低至 10g/L 时, 细胞相对活性极低, 仅 0.2268, 说明大多数细胞已死亡。蔗糖不仅提供了细胞生长所必须的碳源, 而且还能保持适当的渗透压, 浓度过低, 不仅得不到充足的碳源保证, 还会发生营养物质外渗现象, 最终导致细胞死亡; 相反, 过高也会因为细胞内水分外渗而出现生理性缺水现象。

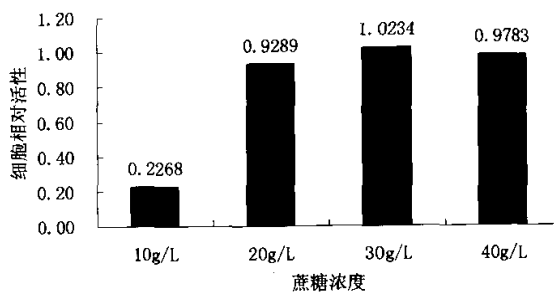


图 2-7 不同蔗糖浓度对拟南芥悬浮细胞相对活性的影响

Fig.2-7 Viability of *Arabidopsis thaliana* suspension with different concentrations of sucrose

### 2.2.4 拟南芥悬浮细胞愈伤组织诱导及其生长特性

以 B5+0.2mg/L NAA 为基本培养基, 在适宜的条件下, 拟南芥悬浮细胞能很快诱导出愈伤组织, 并迅速增殖。图 2-8 是拟南芥悬浮细胞诱导出愈伤组织后不同阶段生长状况。

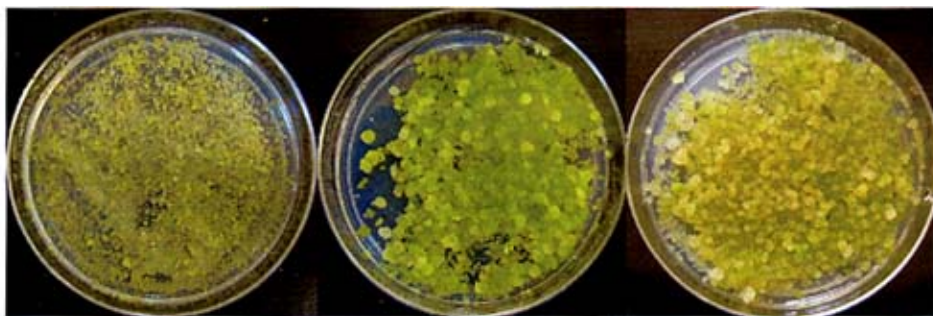


图 2-8 拟南芥愈伤组织诱导及不同时期生长状况

Fig.2-8 Calli induction and growth of *Arabidopsis thaliana* suspension in different stages

注: 从左至右, 分别为铺平板后 10、20、30d 状况

据观察, 在不转换新鲜培养基情况下, 铺平板后 1-10d 为诱导期, 通常 5d 左右便诱导出可见愈伤组织, 但生长较为缓慢; 10-20d 是快速生长时期, 生长速度明显加快; 20-30d 生长逐渐停止, 并出现细胞老化死亡症状。

挑选单个愈伤组织转接到新鲜培养基上, 愈伤组织重新获得迅速生长。与前类似, 在不转接培养基情况下, 也是在 15d 前生长旺盛, 30d 时愈伤组织明显老化 (图 2-9)。

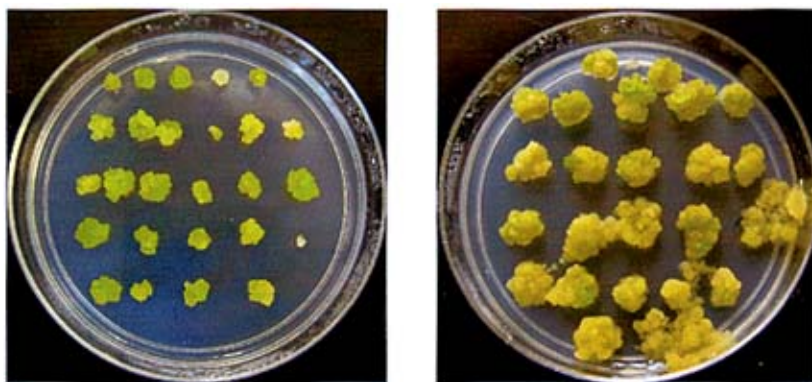


图 2-9 愈伤组织继代后不同阶段生长情况

Fig.2-9 Growth of single calli in different stages of development

注: 左为转接后 15d, 右为转接后 30d

### 2.2.5 影响拟南芥愈伤组织诱导及其生长的主要因素

据观察,拟南芥愈伤组织诱导及其生长对环境条件的反应也极为敏感,主要影响因素为培养温度和培养基表面湿度。

培养温度对愈伤组织诱导和生长有重要影响,理想的培养条件应该为 23℃ 或稍低,25℃ 以上就可能受到抑制,甚至不能诱导或生长。图 2-10 是 27℃ 条件下 7d 时愈伤组织诱导及生长情况,结果表明,悬浮细胞不能诱导出愈伤组织并死亡,正常条件下诱导出的愈伤组织及其单克隆不能生长并全部死亡。标准 23℃ 光照培养室,如果离日光灯管过近、或灯管过高,培养皿温度就可能达到甚至超过 27℃。



图 2-10 27℃ 条件下愈伤组织诱导及生长情况

Fig.2-10 Calli induction and growth under high temperature(27℃)

培养基表面湿度对愈伤组织诱导影响也非常明显。我们在实验中发现,通常铺平板后敞开 15min 左右使表面水分蒸发,但过干的培养基表面,不能或很少诱导出愈伤组织。为了证明培养基表面水分对愈伤组织诱导的影响,我们设计了一个简单的试验,将培养皿呈一定倾斜放置,培养基表面少量的水分流向斜面,结果下斜面诱导出愈伤组织并生长良好,而上斜面不能诱导出愈伤组织(见图 2-11)。由此可见,一定的表面湿度是愈伤组织诱导所必须的。



图 2-11 培养皿倾斜放置的愈伤组织诱导情况

Fig.2-11 Induction of calli on a inclined plane

## 2.3 讨论

### 2.3.1 悬浮细胞生物量及活性测定的可靠性

拟南芥悬浮细胞通常以细胞团形式存在,单细胞很少,很难在显微条件下进行细胞计数。本文以悬浮细胞生物量测算其细胞密度,证明是可行的和可靠的,更能准确地反映悬浮细胞的总体生长情况。用本文方法测算悬浮细胞生物量,最关键的是要减少样品误差。条件许可时应尽量加大一次取样量,并尽可能使用规格大的吸头,如果用 1ml 吸头,应当在灭菌前将吸头尖嘴剪去,否则会因为大细胞团堵塞吸嘴而导致取样不准确。

由于样品及操作条件不同,如暗反应及乙醇提取的时间和温度等差异,用 TTC 法测算悬浮细胞活性会存在很大误差,不同批次实验很难比较,但是,同一批次实验很容易将这些因素控制在同一水平,因此利用其估计细胞相对活性是比较可靠的。

### 2.3.2 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织生长特性

拟南芥悬浮细胞的生长表现明显的 S 型生长曲线,正常培养条件下,继代后 2-4 天出现快速生长时期,但接种时不同稀释倍数,其继代后悬浮细胞生物量及快速增长发生时期不同。拟南芥愈伤组织生长与悬浮细胞有基本相似的特性,但生长速度不如悬浮细胞快。相似的生长特性也存在于悬浮细胞制备阶段,但快速生长及生长停滞时期大为推后。Encina 等<sup>[207]</sup>从拟南芥种子、叶片、根等诱导的愈伤组织建立悬浮细胞系(1g 愈伤组织接种于 50ml 液体培养基),前 5 周表现明显的 S 生长曲线,前 2 周几乎不生长,第 3-4 周出现快速生长,5 周后生长停止。同时,也发现接种量过小,生长迟缓且快速生长时期推后现象。Richard 等(2001)<sup>[216]</sup>使用同样的培养方法研究了拟南芥悬浮细胞细胞分裂指数(cell division parameters)及细胞周期基因(cell cycle gene)的表达,证明细胞生长相对速率(RGR)及细胞分裂相对速率(RDR)均为继代后前 2d 最高,而细胞分裂特征是受细胞周期关键基因 CDKA、CDKB1 等多基因控制的。

从拟南芥悬浮细胞生长特性来看,选择继代后 2d 的悬浮细胞作为转基因的受体材料应该是合适的,此时细胞分裂旺盛,有利于外源基因的整合。

从愈伤组织生物特性观察,作为遗传转化的一个环节,正常诱导后 7-10 的愈伤组织比较适合挑选单克隆转接到新鲜培养基,过早愈伤组织尚不健壮,转接后容易死亡;过迟,愈伤组织开始老化,或比较密集(当采用“延迟选择”,即诱导阶段不作抗生素抗性选择时,就可能存在这一问题),不好挑取单克隆。

### 2.3.3 拟南芥悬浮细胞生长条件

接种密度对悬浮细胞生长有重要影响,一定的细胞密度是悬浮细胞维持正常生长的条件。在液体条件下,细胞间仍然存在物质及信号交换,起始培养的细胞密度过低,即使前期有一定生长,但由于生长代谢积累的有害物质,抑制了细胞的进一步生长,甚至会出现细胞死亡。本研究暗示,出现快速生长前的悬浮细胞密度在 0.029-0.037g/ml,而稀释倍数在 2.5/50 时,前 7d 达不到这一条件,所以未出现快速生长。

拟南芥悬浮细胞对培养条件十分敏感,培养基中不同激素及不同蔗糖浓度均会对其生长产生极明显的影响。有文献认为,BAP 和过量的 NAA 对某些植物细胞的生长有抑制作用。本试验所采用的起始悬浮细胞为在 B5+0.2mg/L NAA 条件下反复继代后的细胞,可能由于其细胞内累积了足够的 NAA,再加入外源 NAA 时,反而会抑制其生长。碳源是植物组织培养中必须的营养因子,通常是在培养基中加 20-30g/L 蔗糖作为碳源。培养基中蔗糖浓度对培养物的生长有明显影响,“碳饥饿”还可能改变离体细胞的发育方向和改善某些遗传操作的效率。实验中还观察到,温度、光照条件、振荡速率等因素,均会影响到其生长特性。例如,光照可能会诱导某些植物生长调节因子的降解,暗培养有助于细胞增殖。

本文主要目的是实验室条件下维持拟南芥悬浮细胞正常稳定生长。有关拟南芥悬浮细胞培养条件及其与细胞生长的关系值得进一步研究。

## 2.4 结 论

在每个 7d 一次的继代周期中,拟南芥悬浮细胞的生长表现明显的 S 型生长曲线。正常培养条件下,继代后 2-4 天出现快速生长时期,此后生长量迅速下降,但接种量不同,其继代后悬浮细胞生物量及快速增长发生时期不同。维持 7 天一个周期的理想接种量为起始悬浮液按 10ml/50ml 稀释。接种量小,生长迟缓,甚至不能增殖。

培养基中不同激素及不同蔗糖含量均会对拟南芥悬浮细胞的生长产生极明显的影响,在 B5+0.2mg/L NAA 条件下反复继代后的细胞,再加入外源 NAA 时,反而会抑制其生长。蔗糖含量以 30g/L 最好;蔗糖含量低,悬浮生物量及细胞活性明显下降。

拟南芥愈伤组织生长也呈现一定的规律性,正常条件下,需经历约各 10d 的诱导时期、快速生长时期和生长停滞及老化时期。愈伤组织诱导及其生长对外界条件也特别敏感,一定的表面湿度及较低的培养温度是必须的。

### 3 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对抗生素的反应

悬浮细胞数量巨大, 对其进行遗传转化时, 如何有效地进行转化子选择, 是制约这一技术的难点之一。借鉴微生物遗传操作技术, 利用抗生素抗性标记筛选转化子是植物悬浮细胞转化子选择最可行的方法。潮霉素 (hygromycin) 抗性基因 *hpt* 和卡那霉素 (kanamycin) 抗性基因 *nptII* 是目前使用较多的选择标记基因 (selectable marker gene)。潮霉素和卡那霉素对植物细胞有强烈的杀灭作用, 但对已获得相应抗性基因的突变细胞不起作用或作用很小。头孢霉素 (cefotaxime) 能抑制根癌农杆菌生长, 但对植物细胞不起作用或作用很小, 是植物细胞与农杆菌共培养 (co-cultivation) 结束后用来除去农杆菌的常用抗生素。本研究的主要目的是确定潮霉素对野生型拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织的抑制效应, 与此同时, 研究头孢霉素对拟南芥悬浮细胞的影响, 为拟南芥悬浮细胞转化子抗生素选择浓度和选择方案的制定提供依据。

#### 3.1 材料和方法

##### 3.1.1 试验材料

所有材料均由PMBE提供并在该实验室完成全部试验。其中: 拟南芥起始悬浮细胞为按文献[196]方法反复继代后的野生型 *Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系, PMBE制备; 潮霉素 (Hygromycin B)、卡那霉素、头孢霉素、商品B5粉末培养基购于Sigma公司。

##### 3.1.2 液体条件下抗生素处理试验

培养基为B5+0.2mg/L NAA (naphthalene acetic acid) 液体培养基。每300ml三角瓶, 取10 ml起始悬浮细胞液, 接种于40ml液体培养基, 分别加入设计浓度的抗生素 (预先已灭菌), 铝铂纸封口, 置于光照培养室中振荡培养, 培养条件: 23°C, 24h光照, 120 rpm。重复3次。TTC法测定细胞活性或死亡率。

##### 3.1.3 固体条件下抗生素处理试验

培养基为B5+0.2mg/L NAA固体培养基, 琼脂含量8g/L。常规灭菌后分装至一次性已灭菌培养皿, 每皿约25ml培养基, 抗生素在培养基冷却至尚未凝固前约60°C时加入。完全凝固并冷却至室温后接种。

愈伤组织诱导阶段抗生素处理试验按下述方法进行：每皿约接种1ml继代后2d的悬浮细胞，平板培养，培养条件：23℃，24h光照，重复3次。根据平板上的细胞密度及分布，用记号笔在培养皿底部沿圆心等分出4-8个扇形区，每皿随机抽取1-2个扇形区统计诱导出的愈伤组织数量，根据愈伤组织颜色，可以判别其死活情况。一般活细胞为浅绿色到嫩黄色，死细胞为白色到浅灰色。由个别大细胞团顶部未接触培养基面的细胞诱导出的愈伤组织不计数。

愈伤组织继代阶段抗生素处理试验按下述方法进行：起始材料（外植体）来自常规方法诱导10-15 d长成的愈伤组织（此时愈伤组织长成适宜大小，太小即不好操作，又不容易成活或生长慢），挑取起源于同一细胞的单个愈伤组织团，接种于按上述方法制备的含有不同浓度抗生素的新鲜固体培养基上，每皿接种10个，培养条件同上，重复3次。愈伤组织死活情况可以直接观察，必要时也可采用TTC法定量测定。

### 3.1.4 细胞活性 TTC 法定量测定

TTC法检测细胞活性。取1ml悬浮细胞培养液或小块愈伤组织，加入1ml 0.4%TTC溶液，充分混匀后于室温下暗反应3-6 h，此时活细胞染成红色，死细胞不染色。观察细胞染色情况，可以初步判别细胞活性。以下步骤用于细胞活性定量测定。离心，抽吸除去TTC溶液，去离子水洗涤3遍。加入5ml的95%乙醇，置于振荡机上轻柔振荡提取TTF（三苯基甲腈）9h。12000 rpm 离心 5-10 min，取乙醇提取液，在分光光度仪上485nm处测定其分光光度值，以不同比例稀释乙醇提取液，使其OD值维持在1.0以下，空白提取液调零，重复3次。抽吸剩余提取液，室温下自然风干24h，称取细胞重量（愈伤组织细胞活性定量测定时，在染色前称取重量为佳）。按下式估算细胞活性(cell viability)及死亡率(death rate)：

$$\text{细胞活性} = \text{实际OD值} \times \text{稀释倍数} / \text{细胞鲜重}$$

$$\text{细胞相对活性} = \text{处理组细胞活性} / \text{对照组细胞活性}$$

$$\text{死亡率} = (1 - \text{细胞相对活性}) \times 100\%$$

## 3.2 结果与分析

### 3.2.1 液体条件下拟南芥悬浮细胞对抗生素的反应

#### 3.2.1.1 不同浓度潮霉素对拟南芥悬浮细胞的作用效果

各处理潮霉素质量浓度如下：0（对照），5，10，25，50mg/L，起始悬浮液细胞浓度为147μg/ml，接种时稀释5倍。培养6d后测定其细胞密度及相对活性。

结果见表 3-1、图 3-1。

表 3-1 不同浓度潮霉素处理后悬浮细胞密度和相对活性

Table 1 Cell density and relative viability of *Arabidopsis* suspension with different Hygromycin B concentrations

| 测定项目          | 潮霉素质量浓度/mg/L |        |        |        |       |
|---------------|--------------|--------|--------|--------|-------|
|               | 0            | 5      | 10     | 25     | 50    |
| 细胞密度* (μg/ml) | 128          | 114    | 73     | 56     | 38    |
| 相对活性          | 1.000        | 0.8235 | 0.3083 | 0.0052 | 0.000 |

\*各处理的初始细胞密度均为 147/5=25.4μg/ml

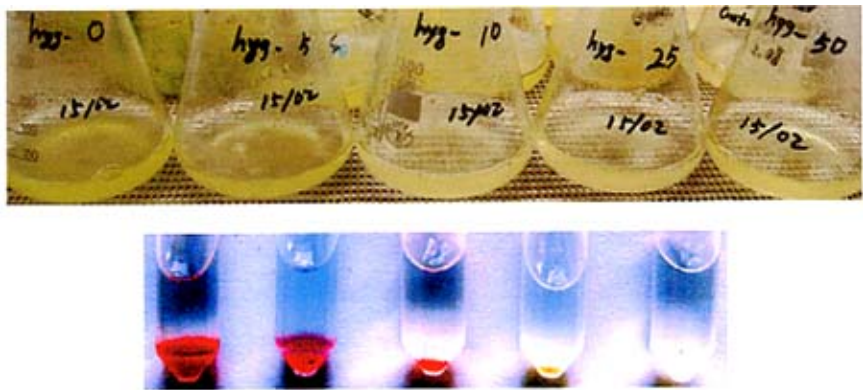


图 3-1 不同浓度潮霉素处理悬浮细胞状及 TTC 染色情况

Fig.3-1 TTC staining in 6d after treatment of hygromycin on *Arabidopsis* suspension cells

由表3-1、图3-1可知，潮霉素对拟南芥悬浮细胞有极明显的抑制作用，随着培养基中潮霉素含量的增加，其细胞密度和细胞活性均急剧下降，至25mg/L时，其细胞密度和相对活性均极低。据我们在显微镜下进一步观察，此时存活（染成红色）的极少数细胞均为数十个到上百个细胞组成的细胞团，单细胞及小细胞团均无染色现象。据此，可以认为，25mg/L是潮霉素对野生型拟南芥悬浮细胞的临界致死浓度。

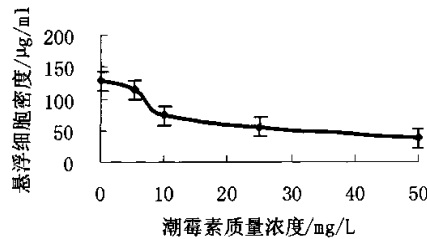


图 3-2 潮霉素对拟南芥悬浮细胞密度的作用效果

Fig.3-2 Effect of Hygromycin B on cell density of *Arabidopsis thaliana* suspension

图3-2和图3-3可以进一步看出不同质量浓度潮霉素对拟南芥悬浮细胞的作用效果。随着培养基中潮霉素用量的增加, 悬浮细胞密度及其相对活性均呈现先急速下降然后再缓慢下降的变化规律。

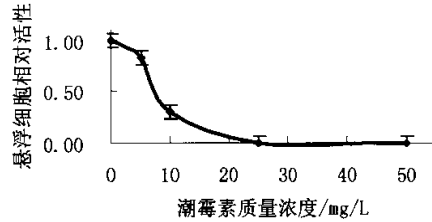


图 3-3 潮霉素对拟南芥悬浮细胞相对活性的作用效果

Fig. 3-3 Effect of Hygromycin B on relative cell viability of *Arabidopsis thaliana* suspension

### 3. 2. 1. 2 潮霉素对拟南芥悬浮细胞的作用特性

为了进一步了解潮霉素对拟南芥悬浮细胞的作用特性, 我们选择前述试验确定的临界致死浓度 (25mg/L), 研究其作用效果的时间变化规律。结果如图3-4。

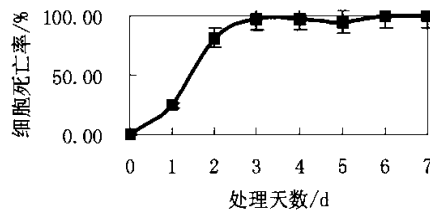


图 3-4 潮霉素 (25mg/L) 致死拟南芥悬浮细胞的动态曲线

Fig.3-4 Trend of cell death rate of *Arabidopsis thaliana* suspension after treatments of Hygromycin B (25mg/L)

由图 3-4 可知, 25mg/L 潮霉素能迅速杀死野生型拟南芥悬浮细胞, 其中前 3d 作用效果最强, 第 3 天的死亡率就高达 97.25%。本试验第 5 天的死亡率回落至 94.73%, 这可能是因为取样误差造成的, 例如, 若取样时大细胞团比例高, 则细胞死亡率的测定值会比实际平均值低。从死亡速率上来看, 第 2 天明显快于第 1 天, 这可能与潮霉素渗入到细胞内相应的作用部位需要一定的时间有关。而 3d 后, 少量大细胞团仍能存活, 可能与潮霉素尚未渗入到内部细胞或产生一定的适应性有关。根据我们对拟南芥悬浮细胞生长特性的观察, 正常培养条件下, 悬浮细胞生物量快速增长时期出现在继代后 2-4d, 而 25mg/L 潮霉素能在前两天就已将大部分细胞 (81.19%) 杀死, 这也是前述试验中, 25mg/L 以上潮霉素处理后细胞密度非常低的原因。从本试验可知, 如果利用潮霉素抗性标记进行转化子选择, 25mg/L 质量浓度处理 3d 便可获得很好的选择效果。

3.2.2 拟南芥悬浮细胞愈伤组织诱导阶段对抗生素的反应

3.2.2.1 对潮霉素的反应

将拟南芥悬浮细胞转移到固体平板培养基上，正常条件下7d左右便能诱导出愈伤组织。各处理潮霉素质量浓度如下：0（对照），1.0, 2.5, 5.0, 10.0mg/L，平板培养7d后统计已诱导并存活的愈伤组织数量，并以对照组数据作参照，统计愈伤组织相对诱导率。见图3-5、3-6。

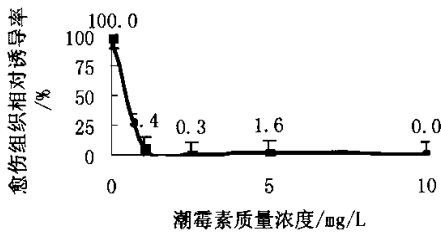


图 3-5 潮霉素对拟南芥悬浮细胞愈伤组织诱导的作用效果  
Fig. 3-5 Effect of Hygromycin B on callus induction of *Arabidopsis thaliana* suspension

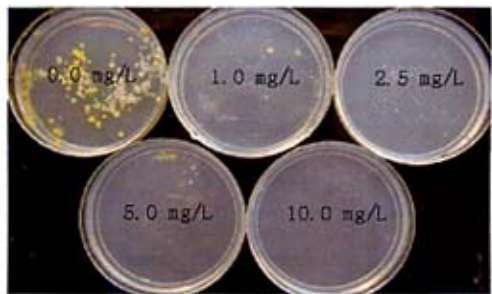


图 3-6 潮霉素对拟南芥悬浮细胞愈伤组织诱导的影响  
Fig.3-6 Influence of hygromycin on *Arabidopsis thaliana* cells

图3-5、3-6可知，拟南芥愈伤组织诱导阶段对潮霉素特别敏感，1.0mg/L质量浓度下，其相对诱导率仅为5.4%；2.5mg/L处理，就几乎不能诱导出愈伤组织（0.3%），但2.5mg/L处理的相对诱导率回升至1.6%，估计由样品误差或处理时操作误差（如潮霉素在培养基中的分布不均匀等）造成。据此，可以认为，2.5mg/L是潮霉素对野生型拟南芥愈伤组织诱导阶段细胞的临界致死浓度。与液体培养下相比，其临界致死浓度要低得多，仅为液体条件下25mg/L的1/10。

3.2.2.2 对卡那霉素的反应

各处理卡那霉素质量浓度如下：0（对照），10, 25, 50, 100 mg/L，愈伤组织相对诱导率的统计方法同上。图 3-7、3-8 可知，拟南芥愈伤组织诱导阶段对卡那霉素也很敏感，10mg/L 质量浓度下，其相对诱导率仅为 3.4%；50mg/L 处理，就几乎不能诱导出愈伤组织（0.1%）。据此，可以认为，50mg/L 是潮霉素对野生型拟南芥愈伤组织诱导阶段细胞的“临界致死浓度”。

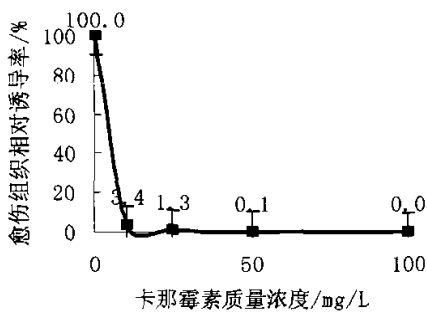


图 3-7 卡那霉素对拟南芥愈伤组织诱导的作用效果

Fig.3-7 Effect of Kanamycin on callus induction of *Arabidopsis thaliana* suspension

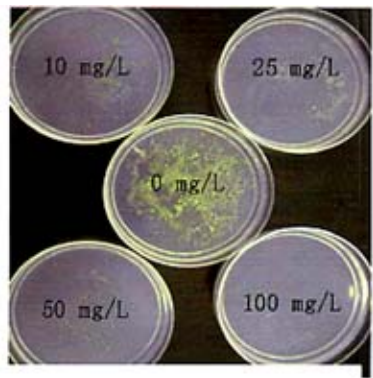


图 3-8 卡那霉素对拟南芥悬浮细胞诱导的影响

Fig.3-8 Influence of kanamycin on *Arabidopsis thaliana* cells

### 3. 2. 3 拟南芥愈伤组织继代增殖阶段对抗生素的反应

各处理潮霉素质量浓度如下：0（对照）,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5mg/L。继代后连续7d 直接观察并统计其存活情况。结果见表3-2、图3-9、3-10。

表 3-2 潮霉素处理对拟南芥愈伤组织继代增殖阶段的影响

Table 3-2 Effect of Hygromycin B on cell viability of *Arabidopsis thaliana* at calli subculture

| 处理浓度<br>(mg/L) | 继代后不同天数平均每皿愈伤组织存活数量 |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                | 0d                  | 1d  | 2d  | 3d  | 4d  | 5d  | 6d  | 7d  |
| 0.0            | 10                  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| 0.5            | 10                  | 10  | 9.7 | 8   | 7.7 | 6   | 5.7 | 5.7 |
| 1.0            | 10                  | 10  | 8.3 | 8   | 5   | 2.7 | 2.7 | 2.3 |
| 1.5            | 10                  | 9.7 | 7.7 | 4   | 3.3 | 0.7 | 0.3 | 0.3 |
| 2.0            | 10                  | 10  | 6.3 | 3.7 | 1.3 | 0.3 | 0.3 | 0   |
| 2.5            | 10                  | 8.7 | 4   | 3   | 0.3 | 0   | 0   | 0   |

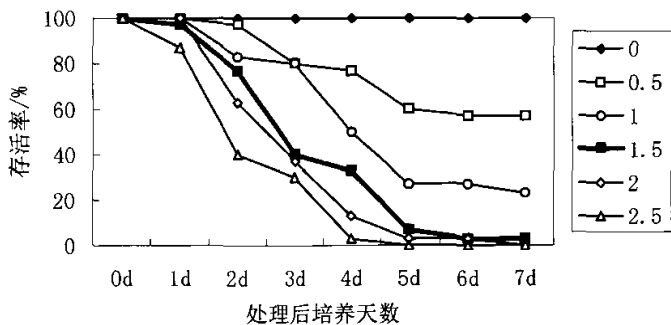


图 3-9 潮霉素处理后拟南芥愈伤组织存活率变化动态

Fig. 3-9 Trends of surviving rate of *Arabidopsis thaliana* calli after treatments of Hygromycin B

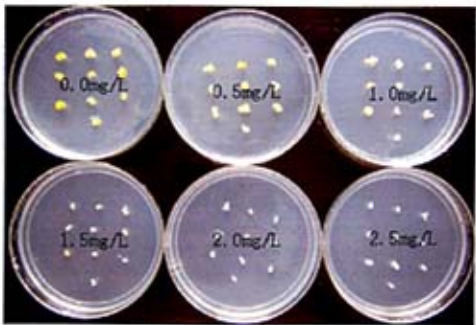


图 3-10 对愈伤组织继代增殖阶段的影响  
Fig.3-10 Influence of hygromycin on growth of *Arabidopsis thaliana* calli

表3-2、图3-9、3-10可知，潮霉素对拟南芥愈伤组织有极明显的抑制作用，随着培养基中潮霉素含量的增加，其抑制效果越强。从图中还可以看出，需要一定处理时间潮霉素才能充分表现其抑制愈伤组织生长的效果，处理后2-5d抑制作用最强，5d后存活率基本平稳，但不同的处理浓度有较大差异。1.5mg/L处理组第7天时存活率仅7%（3个重复中仅存活1例），此时1.5mg/L以上质量浓度处理组均死亡，据此，可以认为，1.5mg/L是潮霉素对野生型拟南芥愈伤组织继代增殖阶段的细胞临界致死浓度。

### 3.2.4 头孢霉素对拟南芥悬浮细胞“白化”的逆转效果

在进行拟南芥对抗生素反应时，为使其他条件更接近于遗传转化中悬浮细胞所处的真实状况，同时加有250mg/L头孢霉素，意外发现只加有头孢霉素的悬浮细胞比正常培养的悬浮细胞还要绿（见图3-11左），推测其能促进拟南芥悬浮细胞叶绿素合成，并可能改善悬浮细胞的“白化”。为此，设计了一系列试验，证明其确能抑制悬浮细胞“白化”，并且对“白化”细胞有极其稳定的逆转效果。

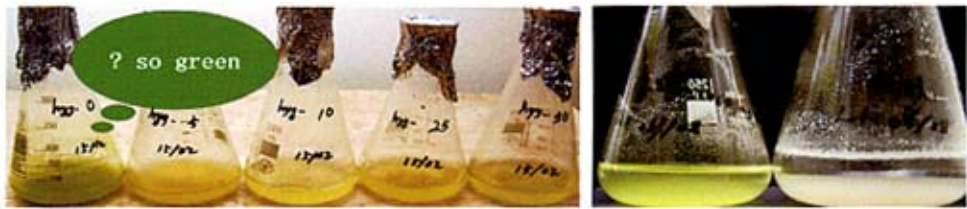


图 3-11 头孢霉素维持悬浮细胞绿色的发现及验证  
Fig.3-11 Effect of cefetaxime on suspension green color

以已经“白化”的悬浮细胞作为起始母液，按正常接种量分别接种在含有250mg/L头孢霉素的液体培养基和正常液体培养基，7d后，加有头孢霉素培养瓶细胞呈现新鲜绿色，而不含头孢霉素培养瓶及起始培养瓶中细胞仍然为“白色”（图3-12左）。与此同时，已逆转“白化”的细胞，可以在正常培养条件维持培养（图3-12右）。我们在多次重复实验中，均获得同样的结果（图3-11右），并成为所在实验室拟南芥绿色悬浮细胞制备的基本手段。



图 3-12 头孢霉素逆转悬浮细胞“白化”系列试验结果

Fig 3-12 Suspension color was changed from pale to green with cefotaxime

左图：依次为加有头孢霉素培养瓶、不含头孢霉素培养瓶和起始培养瓶（已“白化”）

右图：依次为起始培养瓶（已逆转“白化”）、不含头孢霉素培养瓶和加有头孢霉素培养瓶

### 3.3 讨 论

#### 3.3.1 有关液体与固体培养条件下抗生素作用效果差异的讨论

从临界致死浓度来看，潮霉素对拟南芥悬浮细胞继代培养阶段的临界致死浓度为25mg/L，大大高于愈伤组织诱导阶段及其增殖阶段的2.5和1.5mg/L，液体与固体培养条件下的差异极大。一般认为，液体培养更有利于拟南芥细胞增殖、生长。据我们观测，正常培养条件下，拟南芥悬浮细胞生物量可以在继代后7d内增长4-5倍，而愈伤组织固体培养时仅能增长1-2倍；悬浮细胞继代后2-4天便出现快速增长，而悬浮细胞铺平板后还要有很长的时间才能适应固体条件。培养条件的不同和改变，是拟南芥对潮霉素不同反应的可能原因<sup>[417-418]</sup>。

一般认为，每个愈伤组织起源于同一个细胞，是选择转化子的良好材料，因此，基因转化中通常在这个阶段进行抗生素抗性标记选择。然而，我们在实验中发现，愈伤组织诱导阶段拟南芥对潮霉素反应太敏感，且各重复间差异较大，内外因素偶然的波动，均可能对其实际的临界致死浓度产生影响，从而影响转化子的选择效率；此外，这一阶段潮霉素的抑制作用太强烈，加之从液体条件到固体条件的巨大转变，即便是真正的转化子，也很可能会在选择压力和环境压力的双重胁迫下死亡。因此，我们认为，在制定选择方案时，应该将潮霉素抗性标记选择的时机提前或推后。

#### 3.3.2 有关野生型拟南芥对抗生素的耐受性和适应性的讨论

不同基因型材料对抗生素的敏感性存在较大差异。例如，潮霉素对小麦愈伤组织的适宜筛选质量浓度为 110 mg/L，对转基因小麦后代种子筛选以140mg/L 较为适宜<sup>[219]</sup>；潮霉素对粳稻品种愈伤组织的筛选质量浓度以50mg/L较为适合<sup>[220]</sup>；谷子组织培养不同阶段(愈伤组

织、分化再生苗和根)潮霉素抗性浓度均在5mg/L, 明显敏感, 最高临界浓度为10mg/L; 米粒的潮霉素抗性浓度偏高, 10mg/L开始敏感, 最高临界浓度15mg/L<sup>[221]</sup>; 棉花转化中潮霉素的筛选浓度范围为 2.5-10mg/L<sup>[222]</sup>。潮霉素对多数植物的临界致死浓度在40-210 mg/L, 比本文获得的结果要高, 这说明离体条件下拟南芥细胞更为幼嫩, 对潮霉素的耐受性更差。即使如此, 本研究结果暗示, 拟南芥对潮霉素尚有一定的耐受性和适应性。其一表现在不同处理浓度作用效果的差异上。临界致死浓度以下处理, 较长时间内不能使所有细胞致死。我们在试验中观察到, 液体条件下10mg/L以下潮霉素处理7d, 重新转移到不含潮霉素的新鲜培养基上, 能迅速恢复生长。其二表现在不同处理时间的作用特性上。以临界致死浓度处理, 并不能在一两天内迅速杀灭细胞, 通常要3d以上才会出现细胞死亡高峰, 且此后死亡率逐步减慢, 这与一些代谢旺盛的细胞逐渐调动适应机制不无关系。

### 3.3.3 有关拟南芥悬浮细胞“白化”及头孢霉素逆转机理的讨论

在拟南芥悬浮细胞继代培养中, 我们发现细胞“白化”是常有的现象, 特别是对同一材料反复多次继代以后, “白化”尤其严重。据我们对“白化”悬浮细胞进行 TTC 活性检测, 发现“白化”细胞与正常细胞活性没有明显差别, 即“白化”细胞仍然保持旺盛的生命活力, 而非细胞坏死。由此推断, 细胞“白化”属于对环境条件不适应的一种生理现象, 与通常离体培养中“玻璃苗”或“白化苗”的形成可能有很大相似之处。“玻璃化(vitrification)”被认为是一种非胁迫条件下的生理反应, 主要特征是体内水分含量高, 干物质、叶绿素、木质素含量低, 吸收和光合功能不全; 主要原因是水势过高和通气不良造成的, NAA 供应过量也会诱导“玻璃化”<sup>[223]</sup>。已有文献报道青霉素<sup>[224]</sup>对“玻璃化”有缓解作用。但未见有关悬浮细胞白化机理的报导。悬浮细胞“白化”可能也与通透性不良有很大关系, 特别是液体条件下悬浮细胞分裂十分旺盛, 更需要良好的条件维持各种生理机能的平衡。

有大量文献报导头孢霉素对一些植物具有某些生理作用, 例如, 能促进体细胞胚的发生、抑制愈伤组织形成等<sup>[225-227]</sup>, 但未见其作用机理的报导。我们推测, 头孢霉素对拟南芥悬浮细胞的作用机理可能有如下途径: 一是通过调节某些色素酶的活性, 从而促进叶绿素合成; 二是降低细胞生长速率, 使之更适应不良的通气状况。有关其作用机理值得进一步研究, 同时, 其能否用于克服试管苗“玻璃化”, 很值得探讨。

### 3.4 结 论

潮霉素对拟南芥悬浮细胞生长、愈伤组织诱导及其生长均有极明显的抑制作用,但作用效果和特性均有所不同。拟南芥悬浮细胞继代培养阶段、愈伤组织诱导阶段和愈伤组织增殖阶段的临界致死浓度分别为 25, 2.5, 1.5mg/L, 液体与固体培养条件下差异极大。当采用潮霉素抗性标记筛选转化子时,应当分别采用相应阶段的临界致死浓度作为转化子选择浓度。与此同时,潮霉素需要一定处理时间才能充分表现其抑制细胞生长或杀死细胞的效果,一般液体培养条件下 3d 以后、固体培养条件下 5d 以后效果趋于稳定,但不同的处理浓度有较大差异,建议选择时间在液体培养条件下不少于 3d,在固体培养条件下不少于 5d。否则,假阳性率会很高,从而大大加重后续转化子检测的工作量。

卡那霉素与潮霉素有类似的影响,在愈伤组织诱导阶段,适宜的选择浓度为 50mg/L,根据潮霉素作用特性推测,其在液体培养阶段和愈伤组织生长阶段的适宜选择浓度分别在 100mg/L、25mg/L 左右。后续的转化试验中,若利用卡那霉素选择,我们将采用这一选择浓度。

试验中意外发现头孢霉素能促进绿色悬浮细胞的获得,并具有逆转悬浮细胞“白化”的稳定效果。有关悬浮细胞“白化”原因及头孢霉素逆转效应机理,有待进一步研究。

本研究所获结论仅供确定选择浓度和制定选择方案时参考,不同的材料来源、不同的培养条件、甚至不同的载体等因素,其作用效果和特性均会有所不同,具体操作时应该做进一步的浓度筛选等试验。

## 4 拟南芥悬浮细胞耐受性试验

相比于拟南芥个体植株,其悬浮细胞对环境条件的反应更敏感、更强烈,不利的培养条件,甚至环境条件的偶然波动,均可能对其生长和发育方向产生严重干扰。本文选择与其遗传转化相关的常温静置、低温静置、高温振荡、蔗糖饥饿和常温振荡(对照)几种不同处理方式,从其生长和细胞活性两个方面,研究其对环境胁迫的耐受性,以期为寻找合适的悬浮细胞转化方案和转化条件提供科学依据。

### 4.1 材料和方法

#### 4.1.1 材料来源

所有材料均由PMBE提供并在该实验室完成全部试验,其中:拟南芥起始悬浮细胞为按文献[196]方法反复继代后的野生型*Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系,PMBE制备;商品B5粉末培养基购于Sigma公司。

#### 4.1.2 悬浮细胞维持培养方法

基本培养基为B5+0.2mg/L NAA (naphthalene acetic acid) 液体培养基,蔗糖30g/L, pH 5.8。取10ml起始悬浮细胞液接种于装有40ml前述液体培养基的250或300ml三角瓶(每瓶悬浮细胞总体积50ml),铝铂纸封口,置于光照培养室中振荡培养,维持培养条件:23°C, 24h光照, 120 rpm。继代周期7d。

#### 4.1.3 悬浮细胞密度、活性及耐受性测定

TTC法检测细胞活性。摇匀后每瓶取3ml悬浮细胞培养液,加入3ml 0.4%TTC溶液,充分混匀后于室温下暗反应3-6 h,此时活细胞染成红色,死细胞不染色。离心,去离子水洗涤3遍,细胞沉淀加入10ml的95%乙醇,置于振荡机上轻柔振荡提取9h。12000 rpm 离心 5-10 min,取乙醇提取液,在分光光度仪上485nm处测定其分光光度值,空白提取液调零,重复3次。吸去剩余提取液,室温下自然风干24h,称取细胞重量(即为3ml悬浮细胞的生物量)。按同样方法测定起始悬浮细胞活性,按下列各式估算继代后悬浮细胞活性(cell viability)、相对活性和活细胞密度:

悬浮细胞活性=实际OD值×稀释倍数/细胞鲜重

悬浮细胞相对活性=被测悬浮细胞活性/起始悬浮细胞活性

悬浮细胞活细胞密度=悬浮细胞相对活性\*悬浮细胞密度(测定值)

实际上我们无法得到一个细胞100%成活的理想悬浮系统,因此,按上述方法测定并计算出的相对活性有可能大于1,这说明测定样品活细胞比例高于对照样品。同样道理,理论活细胞密度可能高于悬浮细胞密度测定值。

悬浮细胞是一个伴随着细胞不断增殖与死亡的双向动态系统,胁迫因子对细胞的影响包括抑制增殖和加速死亡两个方面。为了更好地衡量细胞对不同胁迫因子的耐受性强弱,本文引进的“细胞耐受系数(tolerance strength)”概念,其表述为:在特定培养条件下,细胞维持基本生存的能力。本文按下式计算:

细胞耐受系数=当天活细胞密度/前一天活细胞密度

可见,在某个培养系统中,如果细胞即不增殖又不死亡,或者增殖生物量与死亡生物量相等,那么其对这一培养系统的耐受系数为1;如果耐受系数高于1,则意味着活生物量会有相应增加;否则,如果耐受系数低于1,则意味着活生物量会有相应减少。

#### 4.1.4 试验设计

共设5个处理,每处理3个重复。各处理方案如下:

- I、常温振荡:对照,同维持培养。
- II、常温静置:静置培养,余同维持培养。
- III、低温静置:4℃下静置,余同维持培养。
- IV、高温振荡:37℃,余同维持培养。
- V、蔗糖饥饿:培养基蔗糖含量10g/L,余同维持培养。

## 4.2 结果与分析

### 4.2.1 不同处理拟南芥悬浮细胞的整体表现

正常维持培养后7d的悬浮细胞,按10ml/50m稀释比例接种,施加不同的胁迫处理。继代后连续7d取样测定不同处理悬浮细胞的TTC活性和生物量,并统计其相对活性、理论活细胞密度、和耐受系数。结果见表4-1。

从表4-1可知,除对照(常温振荡)之外,其余4种处理均对拟南芥悬浮细胞产生极强的不利影响,表现为总细胞密度增加缓慢或无明显增加,细胞相对活性及活细胞密度逐渐下降(仅“蔗糖饥饿”在1-2d有少量增加)。各测定项目或统计指数的变化规律和特点详细分析结果见以下各节。

表 4-1 不同胁迫处理悬浮细胞密度、活性及耐受性统计表 (密度单位: mg/ml)

Table 4-1 Cell density, viability and tolerance strength under adversities (mg/ml)

| 处理   | 测定项目  | 处理天数     |         |         |         |          |          |          |          |
|------|-------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
|      |       | 0 d*     | 1 d     | 2 d     | 3 d     | 4 d      | 5 d      | 6 d      | 7 d      |
| 常温振荡 | 总细胞密度 | 36       | 44      | 52      | 72      | 102      | 120      | 135      | 143      |
|      | 相对活性  | 1        | 1.0054  | 1.0180  | 1.0356  | 1.0332   | 1.0320   | 0.9987   | 0.9938   |
|      | 活细胞密度 | 36       | 44.2376 | 52.9360 | 74.5632 | 105.3864 | 123.8400 | 134.8245 | 142.1134 |
|      | 耐受系数  | 1.2236** | 1.2288  | 1.1966  | 1.4086  | 1.4134   | 1.1751   | 1.0887   | 1.0541   |
| 常温静置 | 总细胞密度 | 36       | 40      | 47      | 46      | 45       | 48       | 48       | 47       |
|      | 相对活性  | 1        | 0.7843  | 0.5043  | 0.3081  | 0.1252   | 0.0327   | 0.0162   | 0.0086   |
|      | 活细胞密度 | 36       | 31.3720 | 23.7021 | 14.1726 | 5.6340   | 1.5696   | 0.7776   | 0.4042   |
|      | 耐受系数  | 0.5595   | 0.8714  | 0.7555  | 0.5979  | 0.3975   | 0.2786   | 0.4954   | 0.5198   |
| 低温静置 | 总细胞密度 | 36       | 36      | 35      | 37      | 36       | 37       | 35       | 37       |
|      | 相对活性  | 1        | 0.6742  | 0.3873  | 0.2593  | 0.1820   | 0.1238   | 0.0624   | 0.0432   |
|      | 活细胞密度 | 36       | 24.2712 | 13.5555 | 9.5941  | 6.5520   | 4.5806   | 2.1840   | 1.5984   |
|      | 耐受系数  | 0.6473   | 0.6742  | 0.5585  | 0.7078  | 0.6829   | 0.6991   | 0.4768   | 0.7319   |
| 高温振荡 | 总细胞密度 | 36       | 45      | 57      | 60      | 68       | 66       | 67       | 66       |
|      | 相对活性  | 1        | 0.7038  | 0.5734  | 0.4890  | 0.2832   | 0.1853   | 0.1048   | 0.0540   |
|      | 活细胞密度 | 36       | 31.6710 | 32.6838 | 29.34   | 19.2576  | 12.2298  | 7.0216   | 3.5640   |
|      | 耐受系数  | 0.7404   | 0.87975 | 1.0320  | 0.8977  | 0.6564   | 0.6351   | 0.5741   | 0.5076   |
| 蔗糖饥饿 | 总细胞密度 | 36       | 42      | 53      | 57      | 59       | 59       | 57       | 60       |
|      | 相对活性  | 1        | 0.9540  | 0.8868  | 0.7320  | 0.5583   | 0.4627   | 0.3446   | 0.2806   |
|      | 活细胞密度 | 36       | 40.0680 | 47.0004 | 41.7240 | 32.9397  | 27.2993  | 19.6422  | 16.8360  |
|      | 耐受系数  | 0.9098   | 1.1130  | 1.1730  | 0.8877  | 0.7895   | 0.8288   | 0.7195   | 0.8571   |

\*起始悬浮细胞密度为 168 mg/ml, 起始悬浮细胞 TTC 活性为 22.6379。接种时 (0d) 密度按 10ml/50ml 稀释比例折算, 即为 36mg/ml。

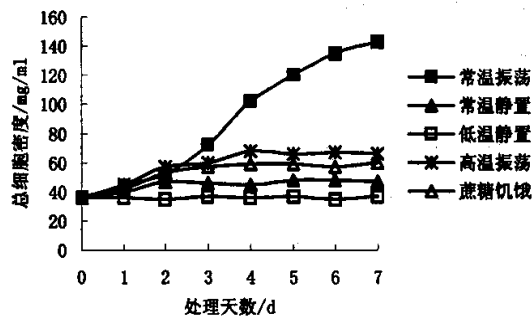
\*\*为 1~7d 耐受系数的平均值。下同。

## 4.2.2 不同处理拟南芥悬浮生物量及其相对活性变化动态的比较

### 4.2.2.1 总生物量的变化规律

图 4-1 不同处理总细胞密度变化动态

Fig.4-1 Trends of total cell density with time



因为处理过程悬浮液总体积是不变的,因此,本文细胞密度实际上代表了生物量。图4-1显示各处理总细胞密度的变化规律。对照总细胞密度呈现典型的“S”型增长规律,且增长迅速。其余4种处理均未出现“S”型增长,且增长缓慢或无明显增长。低温静置的悬浮细胞基本上不能增长,而常温静置、高温振荡和蔗糖饥饿仅在1-2d内有一定的增长。这说明,这些条件均是不宜悬浮细胞生长的条件。

#### 4.2.2.2 活生物量的变化规律

胁迫处理除了抑制细胞增殖外,还会导致细胞死亡。图4-2显示各处理活细胞密度的变化动态。随着时间的变化,仅对照活细胞密度与总细胞一样,呈现相同的“S”型增长规律,而其余各处理仅蔗糖饥饿处理在第1~2d有小量增加。此外,各处理活细胞密度变化曲线表现出不同的特点。低温静置和常温静置活细胞密度下降的快速时期出现在前3d,而高温振荡和蔗糖饥饿出现的3d以后。

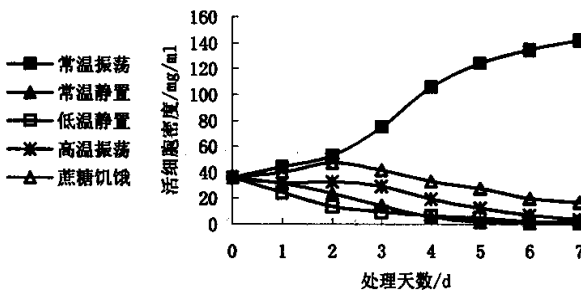


图 4-2 不同处理活细胞密度变化动态

Fig.4-2 Trends of living cell density with time

#### 4.2.2.3 细胞相对活性的变化规律

相对活性更能反应不同处理对拟南芥悬浮细胞的影响,结果见图4-3。

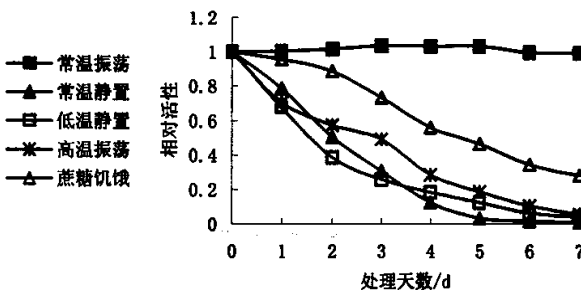


图 4-3 不同处理细胞相对活性变化动态

Fig.4-3 Trends of relative cell viability with time

图4-3表明,对照细胞相对活性基本平稳,前5d有少量提高,这与细胞分裂旺盛有关;此后,可能由于养分的竞争及培养基中有害物质的积累等原因,导致部分细胞死亡,所以5d后细胞相对活性有所下降。而其余各处理表现为持续迅速

下降的态势,以常温静置、低温静置和高温振荡下降最为剧烈;2d内,相对活性接近50%,蔗糖饥饿下降相对平缓。从图中还可以看出,4℃低温对保持细胞活性有一定作用,但不明显。前3 d低温静置的相对活性比是所有处理当中最低的,这与低温伤害有关;但3d后其相对活性略高于常温静置。

#### 4.2.3 拟南芥悬浮细胞对不同处理耐受性的比较

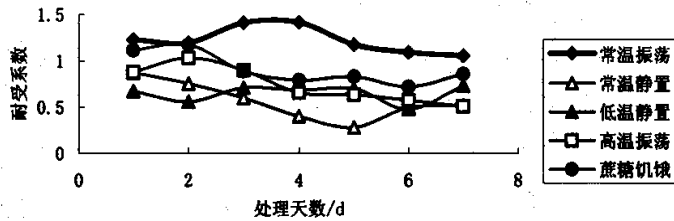


图 4-4 不同处理细胞耐受系数变化动态

Fig.4-4 Trends of cell tolerance strength with time

图4-4表明,在一个7d的处理时期内,细胞耐受系数呈现一定的变化规律。对各处理的初始耐受性强弱依次为:常温振荡(对照)>蔗糖饥饿>高温振荡>常温静置>低温静置,低温静置最低;7d后,这一次序有了很大改变,常温振荡(对照)>蔗糖饥饿>低温静置>高温振荡>常温静置,低温静置超过高温振荡和常温静置,常温静置最低。处理后7d内,对照的细胞耐受系数始终保持在1以上,7d后仍然会有活生物量的增加,其中第3~4d耐受系数提高到1.4以上,4d后耐受系数下降,到第7d时只有1.0541。常温静置处理前5d细胞耐受系数迅速下降,5d后有一定回升。高温振荡和蔗糖饥饿细胞耐受系数变化规律基本相似,前一两天有所增加,此后两天迅速下降,再逐渐平稳或缓慢下降,但细胞对蔗糖饥饿的耐受系数始终比高温振荡高出许多。低温静置的细胞耐受系数一直维持在较低的水平窄幅波动,3d以后有一定程度的提高。我们以各处理7d内悬浮细胞耐受系数的平均数代表其整体耐受性强弱,见图4-5所示。

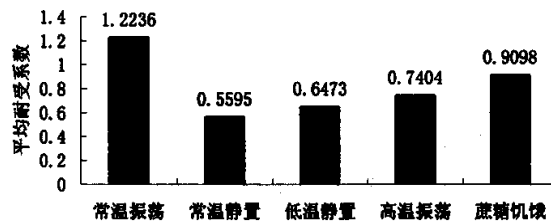


图 4-5 拟南芥悬浮细胞对不同处理的整体耐受性

Fig.4-5 Cell tolerance strength of *Arabidopsis thaliana* to each treatments

图4-5表明,整体而言,拟南芥悬浮细胞对各处理的耐受性强弱依次为:常温振荡(对照)>蔗糖饥饿>高温振荡>低温静置>常温静置,常温静置最低,说明拟南芥悬浮细胞对缺氧的耐受性极低。

### 4.3 讨论

#### 4.3.1 拟南芥悬浮细胞对生存条件耐受性机制的讨论

细胞对某一环境的耐受性是受环境的压力和细胞的适应性双重决定的,如果忽略取样及实验操作误差,那么细胞耐受系数的变化极可能与细胞代谢活动引起环境条件的改变以及细胞适应环境的机制有关。

对照(常温振荡)的细胞耐受系数始终维持在高水平之上,说明常温振荡是拟南芥悬浮细胞的良好生长条件。前期耐受系数有很大程度提高,这与细胞增殖后悬浮液积累到较高的细胞密度、细胞间物质和信号的传递增加有关;继续增殖到一定密度后,细胞间的竞争作用就会超过协同作用,后期耐受系数逐渐下降,7d后细胞耐受系数降到接近1,此时悬浮液活细胞生物量不再增加,从维持培养的角度考虑,应该更新培养基。正常维持培养的继代周期为7d,从其对培养条件的耐受性角度考虑,也是合适的。

常温静置有适宜的温度条件,细胞代谢活动仍然活跃,但缺少振荡条件,气体扩散与交换受阻,培养瓶内 $\text{CO}_2$ 、乙烯浓度会迅速升高,而细胞得不到足够的 $\text{O}_2$ 供应,无氧呼吸形成的糖酵解途径,使培养条件迅速恶化,因此细胞耐受系数迅速下降。据观察,常温下静置1~2d,悬浮细胞便开始严重“白化”,3d后就几乎不能恢复培养。5d后存活的少量细胞,多是大细胞团,当然,与细胞产生一定的适应不无关系。组织培养中外植体呼吸需要氧气,所以需要增加可利用的氧气,并能迅速除去释放出来的二氧化碳(如液体振荡培养),不良通透性的封口物,如铝箔等,也可能不利于氧气供应和有害气体排释而影响培养物生长。

高温振荡条件下,细胞代谢十分旺盛,实际上,在前两天,总生物量与对照几乎没有差异;另一方面,不适的高温条件也加速了细胞的死亡,前两天细胞相对活性下降到0.7038、0.5734,此时,环境对细胞的“良性作用”尚大于“恶性作用”。然而,两天后,活细胞生物量迅速降低,加之前两天旺盛代谢使培养液中有毒物质浓度迅速增加,3~4d时,环境对细胞的“恶性作用”膨胀,耐受系数随之迅速下降。蔗糖饥饿处理情况可能不同,前两天细胞密度尚小,细胞间对蔗糖营养的竞争尚没有表现出来,而细胞密度的增加又促进了细胞间物质和信息的交换,其耐受性几乎与对照相当;两天后,细胞对营养的竞争、培养液中蔗糖含量减少带来渗透压的改变、有害物质的积累等,均引起细胞对环境的不适,耐

受性随之迅速下降。4d 后, 存活的少量细胞也多是细胞团, 同时, 与细胞产生一定的适应也有关系, 因而, 耐受系数下降速度放缓。

低温静置是特殊的生存环境, 基本上不会发生细胞增殖, 而冻害作用使细胞相对活性迅速下降, 因此, 耐受系数一直维持在较低的水平窄幅波动。3d 以后, 存活的细胞对低温有了一定的适应性, 耐受系数有一定程度的提高。

#### 4.3.2 活细胞密度与细胞活性恢复

7d 内, 4 个胁迫处理均会出现“半死亡”时间点(即活细胞密度为  $36/2=18\text{mg/ml}$  时), 但出现的早晚不同, 从早到晚依次排列的次序是: 处理 III 1~2d, 处理 II 2~3d, 处理 IV 4~5d, 处理 V 6~7d。根据我们实验, 悬浮细胞起始细胞密度在  $7\text{mg/ml}$  时, 悬浮细胞在正常培养条件下不能增殖, 或极少增殖。由此推断, 胁迫处理后, 如果悬浮细胞中活细胞密度低于  $7\text{mg/ml}$ , 除非采取一定的“拯救培养”措施, 正常培养条件下, 其活性是不可以逆转或恢复的。我们以此作为拟南芥悬浮细胞的“临界活性恢复密度”。7d 内, 3 个胁迫处理达到“临界活性恢复密度”, 但出现的时间点不同, 从早到晚依次排列的次序是: 处理 III、II 3~4d, 处理 IV 6d, 处理 V 不出现。这说明以“蔗糖饥饿”处理, 7d 内是可以重新在正常培养条件下恢复其活性的。

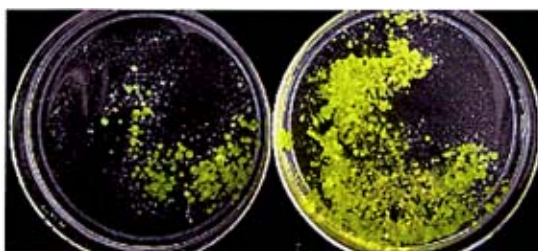
#### 4.3.3 环境胁迫与基因转化中预处理

环境胁迫对细胞同步化有作用, 一定的胁迫处理有助于细胞分裂停留在某个细胞周期, 如果能使更多的细胞停留在 DNA 合成的关键时期, 就能改善基因转化的效率; 胁迫处理还能降低细胞免疫能力, 可能有助于土壤农杆菌侵入细胞, 或提高细胞接受外来基因的敏感性。实际上, 饥饿、热击、低温是一些植物基因转化前常用的预处理手段。从本文试验结果来看, 如果以 0.5 相对活性为基准, 那么, 低温处理不宜超过 1d, 高温处理不宜超过 2d, 而蔗糖饥饿不宜超过 4d。凭经验, 处理后的细胞相对活性最好在 0.8 以上, 否则, 接下来还要经过细胞多次离心洗涤、静置共培养等环节, 加之土壤农杆菌等对细胞的抑制作用, 最后存活的细胞会很少, 不利于转化。然而, 低温和高温处理 1d 后, 细胞的相对活性就降到 0.7 甚至更低, 因此, 当采用这两种手段作为同步化或预处理手段时, 应该在 1d 之内完成, 甚至数小时即可。10g/L 蔗糖饥饿处理也不宜超过 2d。1d 内拟南芥悬浮细胞对低温和高温的耐受性, 有必要进一步试验。此外, 从细胞增殖与死亡的特性上看, 高温处理存在很大的分化, 一方面, 细胞分裂迅速, 另一方面, 细胞死亡极快。这暗示, 不仅不能提高细胞同步化, 还可能加重细胞的分化,

有必要做进一步的细胞分裂周期测定。

#### 4.3.4 静置培养与基因转化中共培养

在拟南芥悬浮细胞基因转化中,与土壤农杆菌共培养时,静置培养是必要的条件。各文献推荐的静置时间不一,有认为要 2d 甚至更长,也有认为 6~24h 即可。要获得较高的转化成功率,较长的静置时间是必要的,但对细胞的伤害又会很大,即使成功转化,也可能由于细胞活性太低而不能获得转化子。进一步的悬浮细胞愈伤组织诱导试验也证明了这一点。下图是转接到固体培养基上 2 周的诱导结果,起始材料分别为常温静置后 2d 的悬浮细胞(图左)和正常继代培养后 2d 的悬浮细胞(图右)。静置处理后的悬浮细胞,愈伤组织诱导能力大大下降。



综合考虑各因子,拟南芥悬浮细胞对静置处理的严重不适反应,基本上是发生在 2d 之后。因此,与土壤农杆菌静置共培养的时间应在 2d 之内。否则,应采用一定的改良措施,或后续的“拯救措施”。例如,封口时不宜过紧,尽可能用通透性好的封口材料;静置培养时尽量改善室内通气条件,最好置于排气扇附近;适当降低培养温度,不要太靠近日光灯管或其他热源;共培养后重新离心洗涤,收集细胞,并适当提高接种密度等。

#### 4.4 结 论

拟南芥悬浮细胞对各种胁迫处理的耐受性表现出明显的差异,整体耐受性强弱依次为:常温振荡(对照)>蔗糖饥饿>高温振荡>低温静置>常温静置,常温静置最低。拟南芥悬浮细胞对胁迫处理的不适应表现在多个方面,总生物量增长很少或不能增长,细胞相对活性及活细胞生物量不断下降,耐受系数低。随着时间的变化,拟南芥悬浮细胞对胁迫处理的耐受性或不适应性的表现呈现不同的变化规律,这种变化的可能机制与细胞间协同与竞争、细胞自我适应机制的调节等有关。

了解拟南芥悬浮细胞对胁迫处理的耐受性规律,有助于拟南芥悬浮细胞基因转化时,确定细胞同步化或预处理及共培养的方案和条件,同时,为拟南芥悬浮细胞生物学特性的研究积累资料。

## 5 拟南芥悬浮细胞超低温保存试验

维持培养是悬浮细胞保存的基本方法,然而,由于拟南芥悬浮细胞增殖速度快、继代周期短,经过连续多次继代以后,特别是长期处于激素刺激环境,悬浮细胞体细胞无性系变异和类减数分裂现象十分普遍,从而在一定程度上改变悬浮细胞的遗传基础和生物学特性。主要表现为:反复继代后,细胞分裂能力下降,增殖速度减慢;愈伤组织诱导及形态发生困难,细胞再生能力下降。实际上,在目前的技术条件下,拟南芥多次继代后的悬浮细胞基本上失去了再分化的能力。此外,据我们在遗传转化试验中观察,连续多次继代以后,悬浮细胞的敏感性降低,对外源基因反应迟钝,转化效率下降。超低温保存(cryopreservation)为避免长期维持培养中悬浮细胞发生遗传变异提供了有效的手段。以适当的冰冻保护剂处理的种质材料,采用适当的降温程序,投入到液氮环境( $-196^{\circ}\text{C}$ )或深冷冰箱( $-80^{\circ}\text{C}$ 或更低),几乎完全终止其生命活动;然后,采用适当的升温程序,又可以恢复其生命能力。尽管低温条件也会对细胞带来一定的损伤,但其染色体数目与结构及DNA分子是相当稳定的。这一技术已经在包括植物在内的生物种质资源的保存中广泛使用,实践证明是有效的和可靠的<sup>[228]</sup>。本文目的是为了探索一般实验室条件下拟南芥悬浮细胞的简便保存技术,为中长期保存遗传背景稳定一致的拟南芥悬浮细胞起始材料提供有效的方法。

### 5.1 材料和方法

#### 5.1.1 材料来源

所有材料均由PMBE提供并在该实验室完成全部试验。拟南芥起始悬浮细胞为按文献[196]方法反复继代后的野生型*Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系,以B5+0.2mg/L NAA液体培养基维持培养,培养条件:  $23^{\circ}\text{C}$ , 24h光照, 120 rpm, 继代周期7d。

#### 5.1.2 保存方法

保存材料为继代后2d的悬浮细胞。此时是正常继代培养条件下悬浮细胞快速生长的启动期,细胞密度尚较低,因此,在保存前离心洗涤,按1:3~5浓缩细胞。取1.5ml eppendorf 管(已灭菌),按试验设计用量,准确吸取相应量的拟南芥悬浮细胞,加入相应量的80%甘油(glycerol)作为冰冻保护剂(cryoprotective agent,

CPA), 使冻存液总体积为1ml; 按照试验设计的降温程序冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱; 30 d 后取出, 按试验设计的升温程序解冻, 检测细胞活性。

### 5.1.3 悬浮细胞 TTC 活性测定

TTC法检测细胞活性。解冻后迅速离心, 6000 rpm, 5-10 min, 吸去上层冰冻保护剂和培养基混合液, 去离子水洗涤3遍。加入0.3ml 0.4%TTC溶液, 充分混匀后于室温下暗反应3-6h。离心, 去离子水洗涤3遍, 细胞沉淀加入3ml的95%乙醇, 置于振荡机上轻柔振荡提取9h。12000 rpm 离心 5-10 min, 取乙醇提取液, 在分光光度仪上485nm处测定其分光光度值, 空白提取液调零, 重复3次。保存前按同样方法测定起始悬浮细胞的TTC活性(为减少误差, 取样量和试剂加入量均扩大5倍), 然后再吸去剩余提取液, 室温下自然风干24h, 称取细胞重量。各处理的细胞重量按悬浮细胞用量折算。按下式估算细胞活性(cell viability)和细胞相对活性:

$$\text{细胞活性} = \text{实际OD值} \times \text{稀释倍数} / \text{细胞鲜重}$$

$$\text{悬浮细胞相对活性} = \text{被测悬浮细胞活性} / \text{起始悬浮细胞活性}$$

### 5.1.4 试验设计

根据有关前人的研究和预备实验的初步结果, 选择冰冻保护剂使用浓度、降温程序和升温程序3个因素进行研究。各因素的水平如下:

I、冰冻保护剂用量(1ml冻存液中80%甘油用量): 0.6, 0.4, 0.2ml, 即甘油(丙三醇)在冻存液中的质量浓度(W/V)为48%, 32%, 16%。

II、降温程序: ①一步预冻: 保护剂处理后的材料在 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下预冻1h, 再置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冻存; ②逐步预冻: 保护剂处理后的材料依次在 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 条件下各预冻1h, 再置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冻存; ③快速冷冻: 保护剂处理后浸入液氮( $\text{LN}_2$ )约1min, 完全结冻后置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冻存。

III、解冻程序: ①自然解冻: 冻存样品取出后置于室温( $23^{\circ}\text{C}$ )条件下解冻; ②慢速解冻: 冻存样品取出后置于冷室( $4^{\circ}\text{C}$ )解冻; ③快速解冻: 冻存样品取出后置于温箱( $37^{\circ}\text{C}$ )解冻。

选用 $\text{L}_9(3 \times 4)$ 正交表安排以上因素和水平, 共9个处理, 每处理重复3次。正交设计试验安排表如下:

表5-1 拟南芥悬浮细胞超低温保存L9 (3×4) 正交试验安排表

Table 5-1 Arrangement for test of cryopreservation on *Arabidopsis thaliana* suspension cells

| 处理号 | 保护剂用量/ml | 降温程序 | 解冻程序 | 空白 |
|-----|----------|------|------|----|
| 1   | 0.6      | 一步预冻 | 自然解冻 | 1  |
| 2   | 0.6      | 逐步预冻 | 慢速解冻 | 2  |
| 3   | 0.6      | 快速冷冻 | 快速解冻 | 3  |
| 4   | 0.4      | 一步预冻 | 慢速解冻 | 3  |
| 5   | 0.4      | 逐步预冻 | 快速解冻 | 1  |
| 6   | 0.4      | 快速冷冻 | 自然解冻 | 2  |
| 7   | 0.2      | 一步预冻 | 快速解冻 | 2  |
| 8   | 0.2      | 逐步预冻 | 自然解冻 | 3  |
| 9   | 0.2      | 快速冷冻 | 慢速解冻 | 1  |

## 5.2 结果与分析

### 5.2.1 拟南芥悬浮细胞超低温保存的基本条件

浓缩后的起始悬浮细胞的细胞密度为0.278g/ml, 细胞活性为20.5382。 -80℃保存30d后TTC活性检测的情况见图5-1。结果表明, 9个处理中仅处理7显示出细胞活性, 相对活性为0.1054。由此可见, 处理组合“0.2ml甘油(16%) + 一步预冻 + 快速解冻”能够作为拟南芥超低温保存的基本条件。然而, 其相对活性低, 尚不能满足实验室长期保存这一材料的需要。这也暗示, 除了试验的3个因素之外, 尚有其他因子是其超低温保存的重要限制因子, 有必要在此基础上进一步优化。



图 5-1 正交试验 TTC 活性检测结果图

Fig.5-1 TTC viabilities of cryopreserved suspension cells

### 5.2.2 拟南芥悬浮细胞大小对超低温保存的影响

从上述试验中还发现, 唯一有TTC活性的悬浮细胞, 其染色情况在不同沉降层次上有很大差异 (见图5-1右), 被染色的细胞几乎全部沉降在试管底部, 实际上是一些大小细胞团结构。这暗示, 细胞团大小对其保存效果有重要影响。为此,

本研究利用不同大小悬浮细胞团沉降速度不同的特点,做了进一步试验,以验证这一推断,结果如图5-2。图中从左到右依次为混合细胞、摇匀后自然沉降3min的细胞沉淀(大细胞团为主)、摇匀后自然沉降3min的细胞悬浮(小细胞团或单细胞),按上述处理7方法冻存30d后的细胞相对活性分别为0.1264, 0.5738和0。这说明单细胞或小细胞团(据显微观察,一般为10个细胞以下)不适合这种冻存方法。

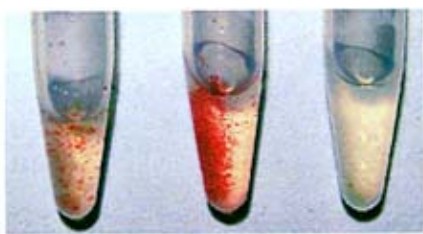


图 5-2 不同类型细胞对超低温保存的影响

Fig.5-2 Influence of cell size on cryopreservation

### 5.2.3 预处理对拟南芥悬浮细胞超低温保存的影响

在上述基础上,进一步试验了细胞预处理对低温冻存的影响。本文采用低温锻炼(4℃低温下静置6h)和高渗处理(6%蔗糖培养基中常温下振荡6h)2种预处理方式,以无预处理作对照。预处理前所有细胞均洗涤1次(目的是收集大细胞团,效果同自然沉降),方法如下:加入10倍新鲜培养基,6000 rpm离心5min,弃去上层液,洗涤后重新悬浮于等量新鲜培养基。按上述处理7方法冻存30d后的活性检测结果如图5-3。结果表明,细胞预处理对拟南芥悬浮细胞超低温保存有重要影响,高渗处理和低温锻炼后细胞相对活性有明显提高,其中,以高渗处理效果最好。



图 5-3 细胞预处理对超低温保存的影响

Fig.5-3 Influence of pretreatments on cryopreservation

### 5.2.4 拟南芥悬浮细胞超低温保存优化方案

为了进一步验证上述研究结果,并建立拟南芥悬浮细胞超低温保存的优化方案,重新进行了上述正交试验。各处理均增加“洗涤+高渗处理+低温锻炼”细胞预处理方式,即取洗涤后的细胞沉淀于6%蔗糖培养基中4℃低温下静置6h,相应取消原来“一步预冻”和“逐步预冻”降温方式中4℃低温下静置1h预冻步骤。冻存30d后的活性检测结果如图5-4。结果表明,9个处理中处理7和处理8显示出良好的细胞活性,相对活性分别为0.8231, 0.7589。处理7和处理8组合分别为:“0.2ml甘油(16%)+一步预冻+快速解冻0.2ml”、“甘油(16%)+逐步预冻+自然解冻”。这说明,高浓度的冰冻保护剂、快速冷冻、逐步解冻的方式,均不适宜拟南芥悬浮细胞超低温保存。



图 5-4 正交优化试验 TTC 活性检测结果

Fig 5-4 TTC viabilities after optimizing conditions of cryopreservation

## 5.3 讨论

### 5.3.1 冰冻保护剂

冰冻保护剂是拟南芥超低温保存的重要影响因子<sup>[228]</sup>。甘油是常用的冰冻保护剂,系低分子中性物质,在溶液中易发生水合作用,使溶液的粘性增加,从而弱化水的结晶过程,达到保护的目的。另一方面,甘油又属渗透型保护剂,可以渗入到细胞内,使胞内压接近胞外压,降低了细胞脱水皱缩程度和速度。然而,拟南芥悬浮细胞长期处于液体条件,细胞内自由水含量高,一定的脱水处理有利于提高细胞的抗冻能力。蔗糖也可以作为冰冻保护剂,但它属于非渗透型保护剂,不能进入细胞内内部。蔗糖预处理后提高了培养液的渗透势负值,促进了细胞脱水,并产生轻微的质壁分离,从而提高了细胞对低温的抵抗力。本研究采用的处理方法,实际上相当于2种不同类型冰冻保护剂的综合使用,大大提高了低温保

存的效果。此外,冰冻保护剂的使用浓度对低温保存有重要影响。本研究结果表明,16%甘油是合适的,而32%甘油或48%甘油均不适应。使用浓度过高,渗入到细胞内部的保护剂浓度大,可能会对细胞产生某种不适应性甚至毒性,与此同时,冻存细胞密度会相应降低,在降温过程及解冻过程中,细胞间的信号交换及相互保护受阻。二甲亚砜(DMSO)是超低温保存的最常用冰冻保护剂,但其极易渗入到细胞,且在常温下对细胞有一定毒性。

### 5.3.2 冰冻程序

降温程序也是超低温保存中的重要影响因子<sup>[228]</sup>。本研究表明,快速冷冻不适合拟南芥悬浮细胞的超低温保存,这可能与细胞种类和冰冻保护剂类型有关。本试验条件下,拟南芥悬浮细胞液胞大,含水量高,快冻会使细胞内自由水来不及渗出到细胞外结冰,从而形成大量冰晶造成细胞伤害,且甘油是渗透型保护剂,一般认为,其更适合慢冻。快冻方法只适宜高度脱水的植物材料,如种子、花粉等。有研究表明,  $-140^{\circ}\text{C}$ — $-10^{\circ}\text{C}$ 是胞内冰晶形成和增长的危险区域,  $-140^{\circ}\text{C}$ 不再形成冰晶。超低温保存的玻璃化法(vitrification),就是采用极高的速度降温,使之迅速通过危险区,同时以一些极高浓度(40%—60% W/V)冰冻保护剂(如甘油、DMSO、丙二醇等)作为玻璃化溶液,使水分子来不及重排形成冰晶,就已进入玻璃态,大大减少了快速降温对细胞的伤害。例如,常用的土壤农杆菌及质粒的长期保存,标准的方法是使用64%甘油(80%甘油0.8ml+0.2ml菌液)作冰冻保护剂,迅速投入液氮使之发生玻璃化转变,再置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 达到长期保存的目的。从一般温度下直接投入液氮,降温速度可达 $300\sim 1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。本研究预备试验曾采用这一方法,分别采用快速( $37^{\circ}\text{C}$ )、慢速( $4^{\circ}\text{C}$ )、和自然( $23^{\circ}\text{C}$ )解冻方式,但无一有冻后活性。另外,本研究正交试验处理3,实质上相当于这一方法。这说明,按照本文的试验条件,还无法实现拟南芥悬浮细胞的玻璃化保存。

### 5.3.3 解冻程序

解冻程序是超低温保存中的另一个重要影响因子<sup>[228]</sup>。本研究表明,慢速解冻不适合拟南芥悬浮细胞的超低温保存。有研究表明,解冰过程中还会形成次生结冰,其危险区域为 $-50^{\circ}\text{C}$ — $-10^{\circ}\text{C}$ 。理论上,快速解冻能够迅速通过这一区域,使胞内水分子来不及再次形成冰晶就已完全解冻。然而,解冻速率太快,也可能会由于细胞吸水猛烈,细胞膜受到强烈的渗透冲击而被破坏,进而导致细胞死亡。本研究条件下,以 $25\sim 37^{\circ}\text{C}$ 作为解冻温度是合适的。

### 5.3.4 细胞水分含量

从上述讨论中可以看出,拟南芥悬浮细胞内水分含量高是超低温保存的重要限制因子。除了以蔗糖进行高渗脱水预处理外,还要注意选择不同生长时期的悬浮细胞。一般认为,分生细胞或处于旺盛分裂时期的细胞,其细胞质浓,液胞小,细胞含水量低。据我们试验,正常继代后2d恰好是拟南芥悬浮细胞快速生长的起点,从理论上,以此作为保存材料是合适的,本研究也在试验中证明了这一点。

综上,拟南芥悬浮细胞十分娇嫩,加之长期在液体条件下生长,细胞内水分含量很高,很容易在降温或解冻过程中形成细胞内部冰晶,低温保存难度较大。1990年,拟南芥的悬浮细胞首次被超低温保存,而且利用它的冻后恢复细胞重新建立了悬浮细胞系<sup>[229]</sup>。一种被称为两步法的方法被人用来冻存拟南芥细胞,并发现它的冻后恢复细胞可以再生出植株<sup>[230]</sup>。Bachir等(2000)将包埋冷冻法运用于拟南芥悬浮细胞的超低温冻存中,细胞在富含糖的溶液中被预培养后,包埋入褐藻钙中,空气脱水,再被直接投入液氮中冻存,冻后细胞存活率约为34%<sup>[231]</sup>。胡明珏等(2004)<sup>[233]</sup>建立拟南芥悬浮细胞系并对其进行玻璃化法超低温研究,经过合理的预培养处理和保护剂处理,直接投入液氮贮存,复温后的细胞能恢复生长,恢复生长的细胞保持着植株再生。胡明珏等人(2006)<sup>[233]</sup>还研究了脱落酸在拟南芥悬浮细胞超低温保存信号转导中的作用。本文的特点是保存方法非常简便,一般的实验室都可做到。同时,在冰冻保护剂的种类和预处理方法上,与前人的研究也各不相同。

## 5.4 结论

通过一系列试验,本文获得了拟南芥超低温保存的适宜方法。优化方案如下:选择继代后2d的拟南芥悬浮细胞,洗涤1次,细胞沉淀重悬浮于6%蔗糖培养基,于4℃低温下锻炼6h;浓缩细胞使之有较高的细胞密度(0.25~0.30g/ml),加入16%(W/V)甘油作为冰冻保护剂,直接置于-80℃深冷冰箱保存;使用时以37℃快速解冻,离心后除去保护剂,然后可用去离子水洗涤后进行活性检测,也可用基本培养基洗涤后重新进行悬浮培养。此方法保存30d后的细胞相对活性达0.8左右,可以满足实验室一般研究用。如果对其保存后的活性要求不很严,还可以进一步简化,例如,预处理前以悬浮细胞自然沉降代替离心洗涤后收集细胞沉淀;免去高渗预处理,直接加入冰冻保护剂后在低温下锻炼6h;室温下解冻等。

超低温保存的最终目的是获得可用的材料,本研究仅从TTC活性检测结果判断其保存效果,理论上是可靠的,但其实际的效果还有赖于重新悬浮培养后进一步

步检验。此外， $-80^{\circ}\text{C}$ 条件只适宜一般目的用植物材料的保存，如果作为种质材料长期保存应该使用更低的保存温度，如液氮（ $-196^{\circ}\text{C}$ ）。本文采用的方法，能够保存多长时间，以及保存后细胞遗传基础是否发生了改变，有待进一步研究。

## 6 拟南芥悬浮细胞遗传转化——农杆菌的转化与制备

利用农杆菌质粒 (plasmid) 载体系统将外源 DNA 导入宿主细胞已成为目前应用最为普遍的转化策略。常用的农杆菌质粒有 2 种, 即 Ti 质粒和 Ri 质粒, 其中, 使用最早、最普遍的是 Ti 质粒。制备携有合适质粒载体的工程农杆菌是遗传转化的首要环节。这一环节的好坏对基因转化成功与否常常起决定性作用, 不仅关系到外源基因能否成功整合到宿主基因组, 而且还关系到其转化效率和转化子的选择策略等。本章就本研究使用的 pBIB/GUS、pBIB/SARs、pBINm-gfp5-ER 等几种载体系统的转化与制备过程等进行讨论。

### 6.1 材料

所有材料均由 PMBE 提供并在该实验室完成全部试验。该实验室 Andrzej Jerzmanowski 教授提供全方位支持, Agnieszka Sokół 博士协助部分实验。

#### 6.1.1 受体菌及转化质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefacion*) LBA4404 电敏感突变系 (electro-competent)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a, PMBE 保存。质粒载体来源及其标志基因见表 6-1。

表 6-1 所使用的质粒载体

Table 6-1 Plasmid vectors

| 载体名称          | 标志基因                                    | 选择方法                                      | 备注                   |
|---------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|
| pBIB          | <i>nptII</i> , <i>hpt</i>               | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup>       | PMBE 受赠, 已转入 LBA4404 |
| pBIB/GUS      | <i>nptII</i> , <i>hpt</i> , <i>uidA</i> | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup> , GUS | PMBE 改造, 已转入 LBA4404 |
| pBIB/SARs     | <i>nptII</i> , <i>hpt</i> , <i>uidA</i> | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup> , GUS | PMBE 改造, 已转入 LBA4404 |
| pBINm-gfp5-ER | <i>nptII</i> , <i>gfp</i> , <i>ptp</i>  | kan <sup>r</sup> , tet <sup>r</sup> , GFP | PMBE 受赠, 未转化         |
| pAL4404 (对照)  | <i>Rif<sup>r</sup></i>                  | rif <sup>r</sup>                          | LBA4404 自带, 空质粒      |

#### 6.1.2 主要化学试剂及试剂盒

化学试剂分别购自 Merck 公司(Darmstadt, Germany), Roth 公司(Karlsruhe, Germany), Calbiochem 公司(La Jolla, USA), Amersham 公司(Braunschweig, Germany), Agfa 公司(Gaevert, Belgium), Sigma Aldrich 公司(Deisenhofen, Germany), Duchefa 公司(Haarlem, Netherland), Difco 公司(USA), Feinbiochemika 公司(Heidelberg, Germany)及波兰国内有关公司。其中:

Taq DNA 聚合酶 (Super pfu polymerase) PCR 相关生化试剂: POLGEN 公

司 (Poland, 华沙大学植物分子生物学实验室研制)。

限制酶及酶切相关生化试剂, Invitrogen 公司, MBI Fermentas 公司 (Lithuania), Gibco BRL 公司 (Germany)。

RNase A 酶: POLGEN 公司。

DNA Marker: MBI Fermentas 公司。

抗生素 (kanamycin, hygromycin, rifampicine, tetracycline) 均购自 Sigma Aldrich 公司。

RNA/DNA Midi kit (Cat. No.14142): Qiagen 公司 (Hilden, Germany)。

DNA 纯化系统 (Cat. #A1460 SV Minipreps): Promega 公司(USA)

其他抽提、分离、纯化试剂盒均购自 Qiagen 公司, 包括: Plasmid Isolation Kits(midi, maxi preps)、Gel extraction kit (Qiaex II)、Nucleotide-Removal kit、PCR-Purification kit、QIAquick Gel Extraction kit、Dneasy Plant (DNA-Isolation kit) 等。

### 6.1.3 培养基配方及溶液 (缓冲液) 配制

YEB 培养基 (培养农杆菌): Trypone 5g/L, 酵母提取物 (Yeast extract) 1g/L, 牛肉浸膏 5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.493g/L, pH7.0 (固体培养基加 1.5%的琼脂)

LB 培养基 (培养大肠杆菌): Tryptone 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L, pH7.0 (固体培养基加 1.5%的琼脂)

抗生素的配置: 按 100mg/L 的浓度计算称取固体药品, 溶于无菌双蒸水中, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

6 $\times$ 上样缓冲液 (DNA 凝胶上样): 0.25%溴酚蓝(Bromophenol blue), 0.25%二甲苯胺 FF(Xylene cyanol FF), 40%(W/V)蔗糖 (sucrose)

0.5 $\times$ TBE : 45mM Tris-硼酸(Tris-borate), 1mM EDTA

1 $\times$ TE: 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA

GTE: 25mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM 葡萄糖 (glucose), 10mM EDTA

溶液 II (碱法质粒 DNA 少量提取): 0.2M NaOH, 1%SDS

溶液 III (碱法质粒 DNA 少量提取): 7.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (ammonium acetate)

溴化乙锭(EB)贮存液(10mg/L) : 1g 溴化乙锭溶于 100ml 蒸馏水中, 磁力搅拌器搅拌数小时。工作液浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 6.1.4 主要仪器设备

PCR 仪: Mastercycler Personal (eppendorf 公司, Germany)、Mastercycler Gradient (eppendorf)

电转化仪: Multiporator (eppendorf)

紫外观察仪: T2201 (Sigma)

超速低温离心机: SORVALL RC 5B Plus (Kendro 实验室, USA)

分光光度仪: Bio Photometer (eppeendorf); Jasco J700 (Jasco, Japan)

微型高速离心机: centrifuge 5415R (eppendorf)

水平电泳仪: Biometra Agogel Mini

BioRad 凝胶成像系统: BioRad 公司 (Germany)

干胶机 (Gel drier): Model 583 Gel Dryer (BioRad)

温育箱 (0~100℃): CL-65 (ELKON 公司, Poland)

温控仪: Thermoblock TB-941U (LECTRONIC), Thermomixer comfort (eppendorf)

## 6.2 方法

### 6.2.1 菌株选择及培养方法

表 6-2 所使用的选择培养基

TABLE 6-2 SELECTION MEDIA FOR BACTERIA

| 载体名称          | 农杆菌                                   | 大肠杆菌                     |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| pAL4404       | YEB +2.5mg/L rif                      | LB                       |
| pBIB          | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           | LB+ 50mg/L kan           |
| pBIB/GUS      | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           | LB+ 50mg/L kan           |
| pBIB/SARs     | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           | LB+ 50mg/L kan           |
| pBINm-gfp5-ER | YEB+ 5mg/L tet+50mg/L kan+2.5mg/L rif | LB+ 5mg/L tet+50mg/L kan |

农杆菌悬浮培养方法: YEB 液体培养基, 28℃, 140rpm, 暗培养, 2d

农杆菌平板培养方法: YEB 固体培养基, 倒扣, 28℃, 暗培养, 2d

大肠杆菌悬浮培养方法: LB 液体培养基, 37℃, 230rpm, 光照培养, 1d

大肠杆菌平板培养方法: LB 固体培养基, 倒扣, 37℃, 光照培养, 1d

### 6.2.2 质粒载体转化细菌方法

- 1) 冰浴上加 40 $\mu$ l 无菌水于已消毒过的电转化槽 (cuvette), 加 40 $\mu$ l 欲转化菌液
- 2) 加 0.5 $\mu$ l 质粒 DNA (本研究转化用质粒 pBINm-gfp5-ER 的 DNA 纯度为 278ng/ $\mu$ l)
- 3) 混匀后装入电转化仪, 选择合适的转化模式和参数 (本研究选择空核细菌或细胞模式, 2500V, 5ms)
- 4) 迅速倒入 1ml 预热后 (农杆菌 28 $^{\circ}$ C, 大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C) 的液体培养基 (含适当抗生素)
- 5) 温育 (农杆菌 28 $^{\circ}$ C, 2h 左右; 大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C, 1h)
- 6) 吸取 10~100 $\mu$ l 转化后菌液涂平板培养 (培养基见上)
- 7) 取 10 个单克隆分别接种到 3-4ml 液体培养基悬浮培养 (加适当抗生素)

### 6.2.3 碱法少量提取质粒 DNA (Mini Prep)

- 1) 取 1.5ml 经悬浮培养后的菌液于 eppendorf 试管 (冰浴, 后同)
- 2) 离心, 13.4rpm, 4 $^{\circ}$ C, 1min
- 3) 抽吸 (aspiration) 除去培养基 (细胞沉淀可在 -20 $^{\circ}$ C 下保存数周)
- 4) 重悬浮细胞沉淀于 1ml 0.1M N-lauroyl sarcosine, 2-3min 后如上离心 3min (只用于农杆菌, 大肠杆菌跳过此步到下一步)
- 5) 重悬浮细胞沉淀于 100 $\mu$ l GTE 溶液+5 $\mu$ l RNase A(10mg/ml)
- 6) 剧烈摇动后于温室下温育 5min
- 7) 加 200 $\mu$ l 新配制的溶液 II, 快速上下倒动试管 5 次, 然后冰上放置近 5min(不宜超过 5min)
- 8) 加 150 $\mu$ l 冰上冷过的溶液 III, 轻摇 10s, 然后冰上放置 10min
- 9) 离心, 13.4rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15min
- 10) 上层液移至另一干净试管, 加 900 $\mu$ l -20 $^{\circ}$ C 存放的 96% 乙醇, 并置于 -20 $^{\circ}$ C 条件下至少 20min
- 11) 离心, 13.4rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15min
- 12) 真空泵或移液枪小心移去上清液
- 13) 取 1ml 在 -20 $^{\circ}$ C 存放的 70%乙醇洗双链 DNA 沉淀
- 14) 照上述方法再离心洗涤 1 次
- 15) DNA 分子可以在空气中风干 10min

16) 溶于 50 $\mu$ l TE (pH8.0),  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下可存放数月甚至更长

## 6.2.4 QIAGEN-tip 100 中量提取质粒 DNA (Midi Prep)

本法采用 QIAGEN-tip 100 试剂盒。操作步骤按该试剂盒说明书或 QIAGEN 公司发布的《Bench Guide》进行。主要步骤如下 (以大肠杆菌为例):

1) 起始菌液按 1/500-1/1000 稀释比例加于 25ml LB 选择培养基, 悬浮培养 12-16h

2) 离心收集细胞: 6000 $\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15min (细沉淀可置于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下供下一步实验)

3) 重悬浮细胞沉淀于 4ml P1 缓冲液 (已含 RNase A)

4) 加 4ml P2 缓冲液, 上下轻轻倒动 5 次, 室温下温育 5min

5) 加 4ml P3 缓冲液 ( $4^{\circ}\text{C}$  预冷), 上下迅速倒动 5 次, 冰浴上温育 20min

6) 离心, 20000 $\times g$  以上,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30min, 上层液移于新容器

7) 再如上离心, 15min, 上层液移于另一新容器

8) 摆正 QIAGEN-tip, 加 4ml QBT 缓冲液, 使其在重心作用下全部流出

9) 加入前述离心过的上层液于 QIAGEN-tip

10) 缓慢向 QIAGEN-tip 加 2 $\times$ 10ml QC 缓冲液

11) 5ml QF 缓冲液洗提 DNA

12) 加 3.5ml 室温的异丙醇 (isopropanol) 促使洗提的 DNA 沉淀, 摇匀并立即离心, 15000 $\times g$  以上,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30min, 小心弃去上层液

13) 吹风机冷风下吹干 5-10min

14) 溶于 100ml TE (pH8.0),  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下存放

## 6.2.5 酶切反应

本研究选用 5 种限制酶进行单酶切或双酶切, 其酶切性质如表 6-3。

表 6-3 所使用的限制酶

TABLE 6-3 RESTRICTION ENDONUCLEASES

| 种 类                              | 酶切位点                                 | 检验质粒                   | 位点数 | 预期片段    |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----|---------|
| <i>Sal</i> I + <i>Sac</i> I      | G $\nabla$ TCGAC + GAGCT $\nabla$ C  | pBIB/GUS,<br>pBIB/SARs | 1+1 | ~1900bp |
| <i>Eco</i> R I                   | G $\nabla$ AA*TTC                    | pBINm-gfp5-ER          | 2   | ~840    |
| <i>Hind</i> III + <i>Bam</i> H I | A* $\nabla$ AGCTT + G $\nabla$ GATCC | pBINm-gfp5-ER          | 1+1 | ~860bp  |

根据所提取的质粒 DNA 浓度确定样品用量和酶用量, 一般 1ng 样品加 1U 酶液 (为保证消化完全, 可适当增加酶用量); 根据酶的性质选择适宜的消化温度和中止反应温度, 以上 5 种酶适宜的消化条件均为 37°C、1h, 终止反应条件均为 65°C、20min; 如果反应条件完全相同, 双酶切可以两种酶同时进行, 否则要分别先后酶切。以下以 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切 pBINm-gfp5-ER 为例, 说明本文采用的酶切体系。

根据厂家说明, *Hind*III 使用 REact 2(10×, 50 NaCl)缓冲液, *Bam* H I 使用 REact 3 (10×, 100 NaCl)缓冲液, REact 3 盐浓度高于 REact 2, 故不能同时酶切。盐浓度低的缓冲液宜先酶切。

第一反应体系 (总体积 20μl):

14.5μl 去离子 H<sub>2</sub>O (mini q)

3μl 质粒 DNA (3μl×278ng/μl≈0.9μgDNA)

2μl REact 2

0.5μl *Hind* III (10U/μl)

反应条件: 37°C, 1h

中止反应条件: 65°C, 20min

第二反应体系 (总体积 20μl):

17.5μl 第一反应液[先用盐析膜 (salt-dialysis membrane) 析盐处理 15-20min]

2μl REact 3

0.5μl *Bam* H I (10U/μl)

反应条件: 37°C, 1h

中止反应条件: 65°C, 20min

## 6.2.6 PCR 反应

表 6-4 所使用的 PCR 引物

TABLE 6-4 PRIMERS FOR PCR

| 检测基因        | 引物名称及其序列                                                              | 扩增片段长度  | 引物来源   |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|--------|
| <i>uidA</i> | uidA-U: 5' -TGTGGGCATTTCAGTCTGGAT<br>uidA-L: 5' -TAATGCGAGGTACGGTAGGA | 939 bp  | POLGEN |
| SAR1        | SAR1-U: 5' -TCGATTAAAAATCCCA ATTA<br>SAR1-L: 5' -TATTTTCAGAAGAAGTCCC  | 1166 bp | POLGEN |
| <i>hpt</i>  | HPT102: 5' -CAGCTTCGAGAGGAGGC<br>HPT603: 5' -AGGACTTGTTCGAGCCGAA      | 401 bp  | SIGMA  |

本研究采用的 PCR 反应体系如下：

H<sub>2</sub>O (mini q): 13.5 $\mu$ l  
 PCR 缓冲液 (10 $\times$ ): 2 $\mu$ l  
 dNTP 混合液 (10 $\times$ ): 2 $\mu$ l  
 引物 1: 0.5 $\mu$ l  
 引物 2: 0.5 $\mu$ l  
 模板 DNA: 1 $\mu$ l  
 Taq 酶: 0.5 $\mu$ l

反应液总体积: 20 $\mu$ l, 装于 0.2ml PCR 试管, 冰浴上进行。轻弹混匀, 瞬时离心。按下列参数进行 PCR 扩增, 如果效果不佳, 则根据引物性质、模板 DNA 质量等作适当调整。反应结束后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

|     |                 |        |          |
|-----|-----------------|--------|----------|
| 预变性 | 95 $^{\circ}$ C | 4' 30" | } 28 次循环 |
| 变性  | 95 $^{\circ}$ C | 30"    |          |
| 退火  | 55 $^{\circ}$ C | 40"    |          |
| 延伸  | 72 $^{\circ}$ C | 40"    |          |
| 延伸  | 72 $^{\circ}$ C | 6' 00" |          |

### 6.2.7 DNA 电泳分析

10%琼脂糖凝胶电泳, 上样液 1 $\times$ loading buffer, 电泳缓冲液 0.5 $\times$ TBE, 染色剂溴化乙锭 (ER, 小许加于电泳缓冲液), 电压 $\sim$ 100Vt (5 $\sim$ 10Vt/cm 胶宽), 紫外透射仪观察, BioRad 凝胶成像系统照相。

### 6.2.8 转化子统计与分析

转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子。转化试验的同时设一对照: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液, 但涂板时只取等量菌液涂布于不含抗生素的平板上, 正常情况下会产生大量菌落。统计每个培养皿中的菌落数, 根据菌落数可计算出转化子总数和转化频率, 公式如下:

转化子总数 = 菌落数  $\times$  稀释倍数  $\times$  转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积  
 转化频率 (单位质粒 DNA 转化子数) = 转化子总数 / 质粒 DNA 加入量 ( $\mu$ g)  
 感受态细胞总数 = 对照组菌落数  $\times$  稀释倍数  $\times$  菌液总体积 / 涂板菌液体积  
 感受态细胞转化效率 = 转化子总数 / 感受态细胞总数

## 6.2.9 细胞密度测定与生长模型建立

取适当稀释倍数的菌液装于比色杯, 分光光度计测定  $OD_{600}$  值。无菌培养基调零, 重复 3 次。以平均  $OD_{600}$  值代表细胞密度。每隔一定时间取样测定细胞生长情况。

采用 SPSS 12.0 统计软件自带的具有“S”型增长特征的生长模型(Logistic 模型、Richards 模型、Chanter 模型和 Gompertz 模型), 选用拟和效果最好 Logistic 模型进行的模拟。模型公式为:

$$OD_{600}=k/(1+e^{-bt})$$

式中:  $OD_{600}$ ——细胞密度

$t$ ——生长时间(h)

$a$ 、 $b$ ——估计参数

$k$ ——生长极限(细胞密度极限)

二阶导数为零时为生长拐点(快速生长中期), 三阶导数为零时为加速拐点(快速生长始期)和减速拐点(快速生长末期)。

模型建立与分析均用 SPSS 12.0 统计软件完成。

## 6.2.10 菌株保存与活化

转化子悬浮培养到适当细胞密度后按如下方法保存: 200 $\mu$ l 菌液加于 800 $\mu$ l 已灭菌的 80%甘油(用冻存管或 1.5ml eppendorf 试管均可), 混匀后迅速浸入液氮(LN<sub>2</sub>), 完全凝结后保存到-80 $^{\circ}$ C 深冷冰箱(可保存 2 年)。

使用时按如下方法活化: 少量(约 10 $\mu$ l)-80 $^{\circ}$ C 下冻存的菌液, 接种于 3~4ml 前述的液体选择培养基, 在前述相应培养条件下使细胞达到指数增长期, 通常此时菌株的转染能力最强。正常条件下培养 2d 的农杆菌达到指数增长期, 此时  $OD_{600}$  值约为 2 时, 对应的细胞密度约为  $2 \times 10^9$  cells/ml。如果细胞已老化(如存放太久、继代次数太多)应重新涂平板, 挑选单克隆继续悬浮培养以获得活化细胞。

## 6.3 结果与分析

### 6.3.1 质粒载体构建策略及克隆位点

pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 质粒构件及其构建策略如图 6-1 所示。

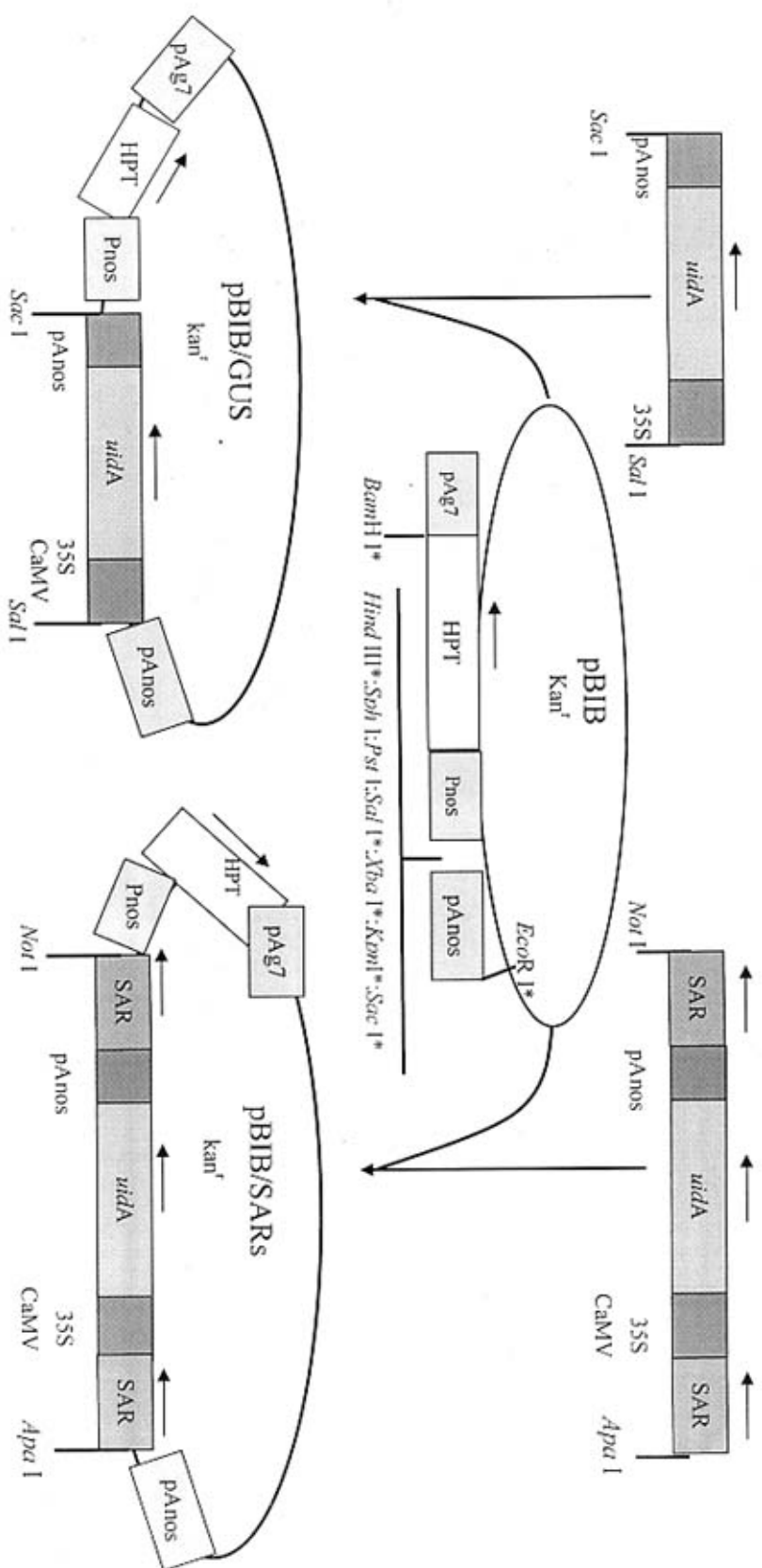


图 6-1 PBIB/GUS 和 PBIB/SARs 质粒及其构建策略示意图  
Fig-6-1 Maps of PBIB/GUS and PBIB/SARs

其中，pBIB 质粒携带的 HPT 基因及其多克隆位点如图 6-2 所示。

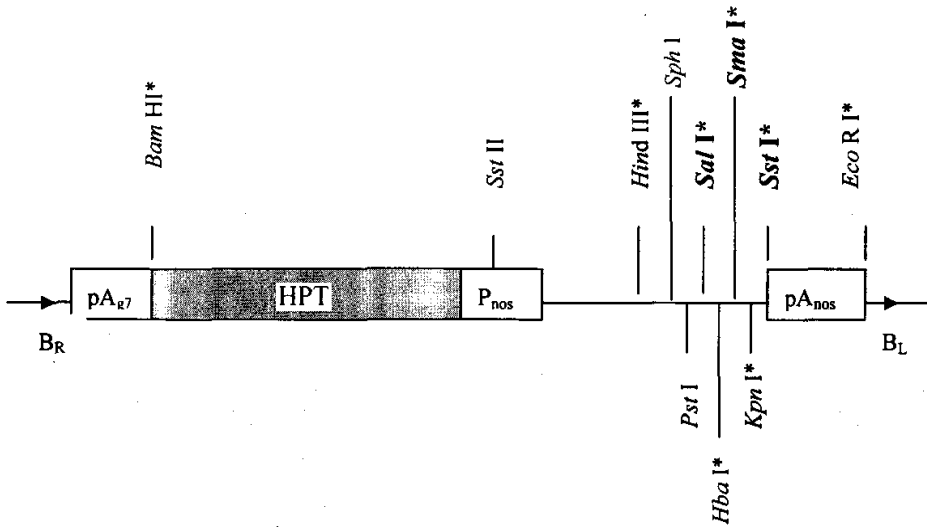


图 6-2 pBIB 系列载体 HPT 基因克隆位点图

Fig.6-2 Map of cloning sites of HPT gene inserted into pBIB/GUS and pBIB/SARs

pBINm-gfp5-ER 质粒及其多克隆位点如图 6-3 所示。

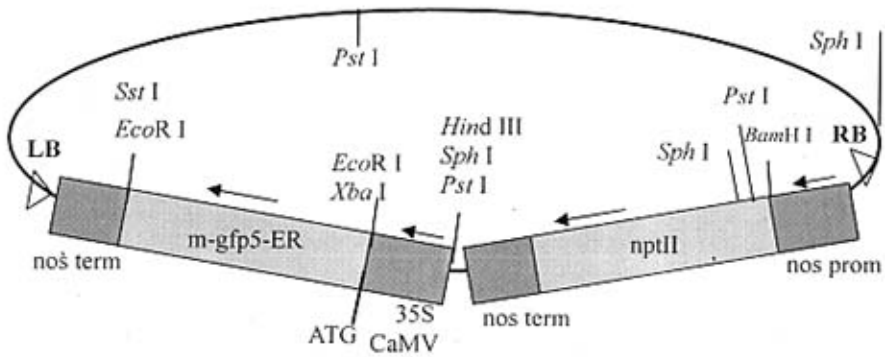


图 6-3 pBINm-gfp5-ER 质粒结构及多克隆位点示意图

Fig.6-3 Map of pBINm-gfp5-ER and its cloning sites

### 6.3.2 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 转化农杆菌后 DNA 检测

pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 转化 LBA4044 后,通过 Midi Prep 法提取质粒 DNA,经酶切和 PCR 反应,电泳结果如图 6-4 所示。

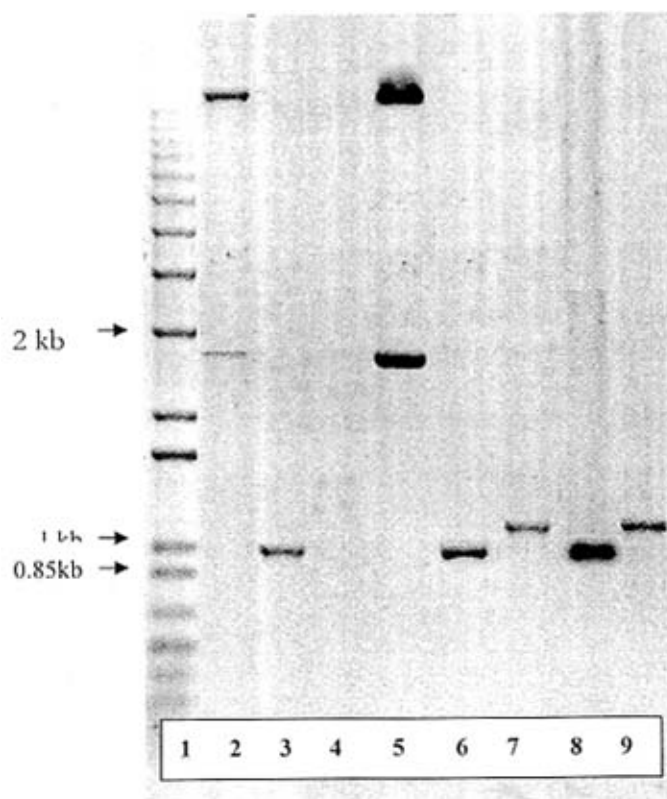


图 6-4 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 构建 DNA 检测结果

Fig.6-4 Agarose gel, confirming the correct cloning of inserts into pBIB/GUS and pBIB/SARs.

1. Marker
2. pBIB/GUS 以 *Sal* I 和 *Sac* I 双酶切
3. pBIB/GUS PCR 反应产物(引物: *uidA*-U, *uidA*-L)
4. pBIB/GUS PCR 反应产物(引物: SAR1-U, SAR1-L)
5. pBIB/SARs 以 *Sal* I 和 *Sac* I 双酶切
6. pBIB/SARs PCR 反应产物(引物: *uidA*-U, *uidA*-L)
7. pBIB/SARs PCR 反应产物(引物: SAR1-U, SAR1-L)
8. pBIB/GUS PCR 反应产物(两倍引物: *uidA*-U, *uidA*-L)
9. pBIB/SARs PCR 反应产物(两倍模板 DNA; 引物: SAR1-U, SAR1-L)

图 6-4 结果显示,无论是酶切反应,还是 PCR 反应,均出现预期条带。由此说明, Midi Prep 提取质粒 DNA 方法,以及前期 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 质粒载体的构建、质粒 DNA 对根癌农杆菌的转化,均是成功的。

### 6.3.3 pBINm-gfp5-ER 对根癌农杆菌的转化效率分析

电转化法将 pBINm-gfp5-ER 质粒转入根癌农杆菌,在选择培养基上均获得大量转化子(见图 6-5),以 100 $\mu$ l 菌液涂板,菌落数为 162 个。

获得转化子总数 2997 个,转化频率  $2.152 \times 10^4$  个/ $\mu$ g 质粒。计算过程如下:

$$\text{转化子总数} = 162 \times 1 \times 1850 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l} = 2997 \text{ 个}$$

$$\begin{aligned} \text{转化频率} &= 2997 \text{ 个} / (0.5 \mu\text{l} \times 278 \text{ ng}/\mu\text{l}) \\ &= 21.52 \text{ 个}/\text{ng} = 2.152 \times 10^4 \text{ 个}/\mu\text{g} \end{aligned}$$

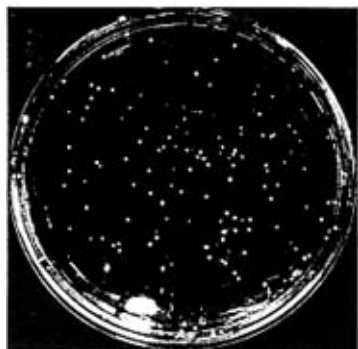


图 6-5 选择培养基上获得的 *Agrobacterium tumefaciens* 转化菌落

Fig.6-5 Calli of *Agrobacterium tumefaciens* on selection medium

### 6.3.4 pBINm-gfp5-ER 对转化根癌农杆菌的 DNA 检测

为了确定 pBINm-gfp5-ER 质粒是否成功转入根癌农杆菌，本研究进行了下述各项实验：1) 挑取 10 个单克隆，悬浮培养后用碱法少量提取质粒 DNA，供酶切分析；2) 如果不能成功获得质粒 DNA、或 DNA 浓度太低，则将提取上一步提取的 DNA 以电转化法分别转入 *E. coli*，挑选选择培养基上单克隆悬浮培养（每个转化系挑选 6 个 *E. coli* 转化子），用碱法少量提取质粒 DNA，供酶切分析；3) 如果仍然不能成功获得质粒 DNA、或 DNA 浓度太低，则加大培养量，用 QIAGEN-tip 100 中量提取 *E. coli* 质粒 DNA (Midi Prep)，供酶切分析；4) 酶切确定成功转化后，重新涂平板活化起源农杆菌菌株，继续悬浮培养，按前述方法于  $-80^{\circ}\text{C}$  下长期保存。

以上第一步（农杆菌质粒少量提取）没有获得 DNA 条带；第二步仅 2 个起源于农杆菌单克隆 9 号和 10 号的 *E. coli* 转化子获得微弱条带（如图 6-6）；分别以双酶切和单酶切，仅单酶切获得微弱预期条带（如图 6-7）



图 6-6 Mini Prep 提取的 *E. coli* 质粒 DNA (9 号农杆菌菌株)

Fig.6-6 Plasmid DNA of pBINm-gfp5-ER isolated by Mini-Prep



图 6-7 Mini Prep 提取的 *E. coli* 质粒 DNA 酶切结果

Fig.6-7 Plasmid DNA of pBINm-gfp5-ER from Mini-Prep digested by enzymes  
1-2 道分别为 9、10 号起始菌株双酶切  
4-5 道为 9、10 号起始菌株单酶切

继续采用 Midi Prep 法后，从转化的 *E. coli* 中成功获得了质粒 DNA（见图 6-8），分别以 *EcoR* I 单酶切和 *Hind* III + *Bam* H I 双酶切，电泳结果显示预期条带（见图 6-9）。

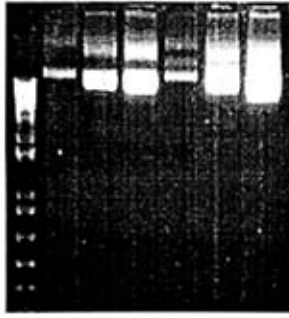


图 6-8 Mini Prep 提取的 *E. coli* 质粒 DNA  
Fig.6-8 Plasmid DNA of pBINm-gfp5-ER isolated by Mini-Prep  
2-4 道为 9 号起始菌株不同加样量  
5-7 道分别为 10 号起始菌株不同加样量  
加样量分别为 1, 5, 10 $\mu$ l



图 6-9 Midi Prep 提取的 *E. coli* 质粒 DNA 酶切结果  
Fig.6-9 Plasmid DNA of pBINm-gfp5-ER from Mini-Prep digested by enzymes  
2-3 道分别为 9、10 号起始菌株双酶切  
4-5 道为 9、10 号起始菌株单酶切

所证明已成功转化的 *E. coli* 分别起源于 9 号和 10 号 2 个农杆菌单克隆，分别命名为 LBA-gfp-09 和 LBA-gfp-10。证明在所获 10 个转化后的农杆菌株系中，至少这 2 个已成功地转入 pBINm-gfp5-ER 质粒。

### 6.3.5 农杆菌菌株生长情况

#### 6.3.5.1 pBIB 系列菌株生长特性

接种后分不同时段测定 pBIB 系列菌株的 OD<sub>600</sub> 值，结果如图 6-10。

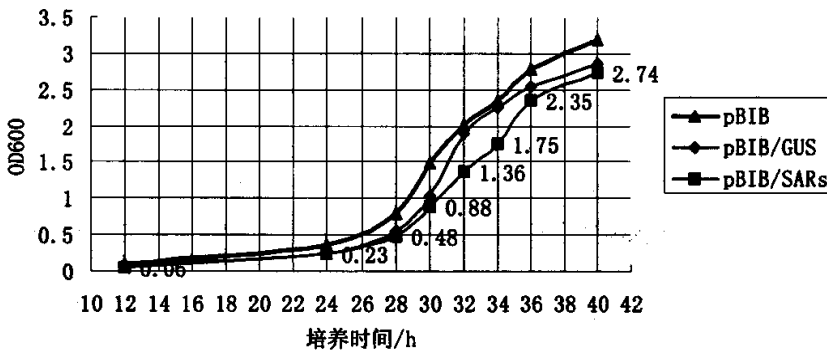


图 6-10 pBIB/GUS、pBIB/SARs 与 pBIB 菌株生长情况的比较

Fig.6-10 Comparison of growth among pBIB/GUS, pBIB/SARs and pBIB strains

注：接种量均为 3ml 培养基接种 5 $\mu$ l 起始菌液。

1.0 OD<sub>600</sub>  $\square$  1 $\times$ 10<sup>8</sup> 细胞/ml

以 pBIB 改造后的 pBIB/GUS、pBIB/SARs，转化 LBA4044 后表现出相似的生长特点，但生长量比 pBIB 有一定程度降低。其中，pBIB/GUS 高于 pBIB/SARs。

3 种菌株的快速生长启动期均在 28h 左右, 生长拐点出现在 32h 左右。

通过 SPSS 软件, 用  $OD_{600}=k/(1+e^{-a-bt})$  拟合不同质粒菌株理论生长 (密度) 模型, 结果见表 6-5。

表 6-5 pBIB 系列质粒菌株理论生长模型和生长时期

Table 6-5 Theoretic growth models and growth stages of *Agrobacterium* with pBIB strains

| 菌株        | 参数估计  |        |       | 拟合优度<br>( $R^2$ ) | 快速生长时期 (h) |       |       |
|-----------|-------|--------|-------|-------------------|------------|-------|-------|
|           | k     | a      | b     |                   | 始期         | 中期    | 末期    |
| pBIB      | 3.385 | 9.322  | 0.300 | 0.996             | 26.68      | 31.07 | 35.47 |
| pBIB/GUS  | 3.125 | 10.074 | 0.306 | 0.995             | 28.61      | 32.92 | 37.23 |
| pBIB/SARs | 2.893 | 12.969 | 0.419 | 0.991             | 27.81      | 30.95 | 34.10 |

注: 初始值  $k=5$ 、 $a=2$ 、 $b=0.2$

从表 6-5 可见, 用该模型获得了很高的拟合效果。3 种质粒菌株的理论快速生长始期在 27-29h, 中期在 31-33h, 最大  $OD_{600}$  值 ( $k$  值)  $pBIB > pBIB/GUS > pBIB/SARs$ , 均与实际观察结果基本相符。一般认为, 处理快速生长阶段的农杆菌菌株具有更强和侵染力。由此可见, 遗传转化时, 3 种质粒菌株理论上的最佳接种时间为 32h 左右; 超过 36h, 基本上进入速生末期, 不宜用于接种。

#### 6.3.5.2 LBA-gfp-9、LBA-gfp-10 菌株生长特性

接种后分不同时段测定 pBIB 系列菌株的  $OD_{600}$  值, 结果如图 6-11。

图 6-11 显示, pBINm-gfp5-ER 质粒转化 LBA4044 后, 生长量比 LBA4044 有很大程度降低。LBA-gfp-9 和 LBA-gfp-10 菌株的快速生长启动期均在 28h, 快速生长中期约在 32-33h, 而 LBA4044 从图上不容易判断。

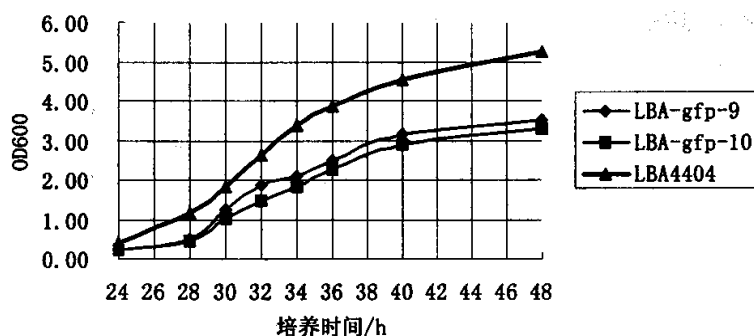


图 6-11 LBA-gfp-9、LBA-gfp-10 与 LBA4404 菌株生长情况的比较

Fig.6-11 Comparison of growth among LBA-gfp-9、LBA-gfp-10 与 LBA4404 strains

通过 SPSS 软件, 用  $OD_{600}=k/(1+e^{-a-bt})$  拟合不同质粒菌株理论生长 (密度) 模型, 结果见表 6-6。

表 6-6 pBINm-gfp5-ER 质粒菌株理论生长模型和生长时期

Table 6-6 Theoretic growth models and growth stages of *Agrobacterium* with pBINm-gfp5-ER

| 菌株         | 参数估计  |       |       | 拟合优度<br>( $R^2$ ) | 快速生长时期 (h) |       |       |
|------------|-------|-------|-------|-------------------|------------|-------|-------|
|            | k     | a     | b     |                   | 始期         | 中期    | 末期    |
| LBA4044    | 5.142 | 9.548 | 0.297 | 0.995             | 27.71      | 32.15 | 36.58 |
| LBA-gfp-9  | 3.489 | 9.841 | 0.304 | 0.985             | 28.04      | 32.37 | 36.70 |
| LBA-gfp-10 | 3.290 | 9.681 | 0.293 | 0.995             | 29.16      | 33.04 | 35.24 |

注：初始值  $K=1$ 、 $A=4$ 、 $B=0.1$  和初始值  $K=5$ 、 $A=2$ 、 $B=0.2$ 

从表 6-6 可见，用该模型获得了很高的拟合效果。3 种质粒菌株的理论快速生长始期在 27-29h，中期在 32-33h，最大  $OD_{600}$  值 (k 值)  $LBA4044 > LBA-gfp-9 > LBA-gfp-10$ ，均与实际观察结果基本相符。此外，经计算， $OD_{600}$  值达到 2.0 时的理论培养时间是：LBA4044, 30.63h; LBA-gfp-9, 33.30h; LBA-gfp-10, 34.54h。遗传转化时，3 种质粒菌株理论上的最佳接种时间亦为 32h 左右；超过 36h，不宜用于接种。

由于 LBA4044 不具有卡那霉素和四环素抗性，与 LBA-gfp-9 及 LBA-gfp-10 培养条件不同，因此，这一结果不能完全说明生长量的降低是由于转化了 pBINm-gfp5-ER 质粒的原因，但 LBA-gfp-9 生长状况要优于 LBA-gfp-10，故后续的拟南芥悬浮细胞基因转化中，选用 LBA-gfp-9 菌株作为工程菌。

### 6.3.5.3 接种量对菌株生长的影响

研究还发现，菌株悬浮培养时，接种量（每 3ml 培养基接种量）对其生长量有很大影响（见图 6-12）。据 48h 后测定的  $OD_{600}$  值，接种量大时，其细胞密度越大。

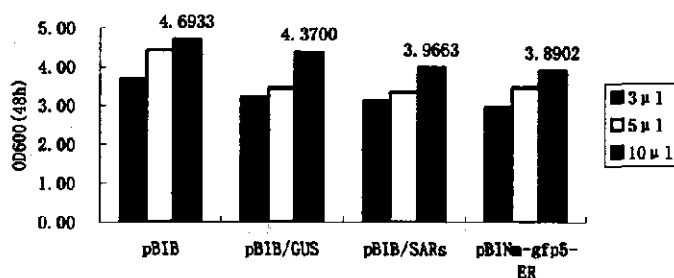


图 6-12 不同接种量菌株生长情况的比较

Fig.6-12 Comparison of bacterium growth among different inoculation quantities

## 6.4 讨论

### 6.4.1 关于质粒载体

本研究使用或改建的几种质粒载体均含有多个不同的标志基因。pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 含有 *nptII*, *hpt*, *uidA* 基因, pBINm-gfp5-ER 含有 *nptII*, *gfp*, *ptp* 基因, 这意味着, 使用这些载体进行基因转化, 至少有 3 条途径可用来选择转化子, 其中, 前两种载体可以通过 GUS 生化检测、后一种载体可以通过 GFP 荧光检测直接观察基因转化情况, 所以 *uidA* 和 *gfp* 均为报告基因。标志基因多, 可以提供更多的转化子选择途径。各种不同的途径结合使用, 可以提高选择的效率和准确性。但是, 标志基因过多, 不仅构建载体及成功转化后除去这些标志基因困难, 还可能增加外源目的基因转入植物细胞的难度, 因为标志基因多, 占用 T-DNA 区的长度更长, 而能够转入植物细胞的基因长度也是有限的。因此, 适度、简便、有效的标志基因, 才是理想的载体系统。

改建的 pBIB/SARs 与 pBIB/GUS 携有相同的标志基因, 只是在其 GUS 基因表达框两侧分别加上一段来源于烟草的 SAR 序列 (又称 MAR 序列), 理论上对于克服转基因沉默、提高转化效率有重要作用。Spiker 等 (1996) 首次应用其构建表达载体, 可使转基因表达量提高 4~140 倍<sup>[234]</sup>。PMBE 以此作为烟草基因转化载体, 效果特别好。能否用于拟南芥基因转化并提高其转化效率, 还有待后续的研究检验。

pBINm-gfp5-ER 是这一系列改良后的第 5 代载体, 其 *gfp* 基因是人工合成的, 排除了一种隐藏在 *gfp* 基因中的内含子的干扰, 同时改变其编码嗜好偏向有花植物, 并且熔入信号缩氨酸编码序列, 使其在细胞质中的溶度 (solubility) 明显提高, 从而使绿色荧光量增加<sup>[235]</sup>。ER (estrogen receptor) 是人类雌激素受体, Bruce 等 (2000) 首先发展了以 ER 为基础的转基因诱导表达载体, 用于转化墨西哥甜玉米, 雌二醇处理明显诱导了报告基因的表达量<sup>[236]</sup>。

克隆位点的数目也是衡量载体好坏的重要标准。克隆位点多, 特别是单一位点多, 则可供插入的外源基因种类及插入的方式多, 否则, 必须对载体或目的基因作一系列改造, 插入的难度较大。本研究使用或改建的几种质粒载体均含有较多的克隆位点, 且多为单一位点, 有利于外源目的基因的插入, 是植物转化的良好载体。

### 6.4.2 关于电转化频率

细胞转化的频率, 是受多种因素制约的, 如转化 DNA 浓度、转化细胞的生理状况、转化条件等<sup>[107]</sup>。其中, 如何诱导受体菌呈现感受态是其能否成功转化质粒 DNA 的关键。采用  $\text{CaCl}_2$  或  $\text{MgCl}_2$  预处理大肠杆菌细胞, 然后与质粒共保温, 很容易实现质粒对大肠杆菌细胞的转化。 $\text{CaCl}_2$  能够人为地诱导大肠杆菌细胞呈现感受态 (M. Mandel & A. Higa, 1970), 而  $\text{MgCl}_2$  不仅具有与  $\text{CaCl}_2$  相似的作用, 而且二价镁离子对于维持 DNA 的稳定性起重要的作用。较之于大肠杆菌, 农杆菌的转化比较困难, 通常上采用“两步接合转移法”、“三亲株杂交转移法”间接将质粒转入农杆菌细胞。

本文利用根癌农杆菌电敏感株 (electro<sup>-</sup> competent), 采用电激法成功地直接将质粒 DNA 转入农杆菌细胞, 获得了 2997 个转化子, 转化频率达  $2.152 \times 10^4$  个/ $\mu\text{g}$  质粒。这种方法简单有效, 虽然相对于 DNA 分子数量, 其转化的绝对效率不高, 但对于构建质粒载体系统, 是足够的。采用电激法, 也很好地实现了农杆菌质粒对大肠杆菌细胞的转化。凭肉眼观察, 在选择培养基上, 10 $\mu\text{l}$  大肠杆菌转化液涂板, 便获得了比 100 $\mu\text{l}$  农杆菌转化液涂板更多的菌落数。尽管本实验因为没有测定从农杆菌中提取的质粒 DNA 浓度而无法计算其转化频率, 但碱法提取农杆菌质粒 DNA 十分困难, 据此推测其转化频率应该比农杆菌高很多, 这说明大肠杆菌对电激法是非常敏感的。

### 6.4.3 关于质粒 DNA 提取

Ti 质粒没有自主复制能力, 因此, 其数量的扩增只能依靠寄主数量的扩增。这为其质粒 DNA 的提取带来一定困难, 当受体菌数量少时, 其 DNA 就不容易提取, 或者虽然已少量提取, 但很难用常规的电泳方法检测到。大肠杆菌具有比农杆菌更快的繁殖速度, 因此, 能够很快得到大量质粒。尽管用 Mini Prep 仍然难以提取 DNA 样品, 但最终用 Midi Prep 从转化后的大肠杆菌悬浮系中提取到足够的 DNA。本研究从 10 个农杆菌转化子悬浮系中, 以 Mini Prep 提取质粒 DNA 转化大肠杆菌, 仅有 2 个转化子的质粒 DNA 再次转入大肠杆菌, 并在随后的酶切中得到证实。其余 8 个未被证明成功转化的农杆菌株系, 不排除抗生素选择培养基上出现“假阳性”的可能性, 但更大的可能是没有提取到足够的质粒 DNA, 不能完成对 *E. coli* 的有效转化。

#### 6.4.4 关于菌株生长密度

不同菌株具有不同的生长速度,因此,同样的培养时间,不同菌株的细胞密度会有很大差异。一般认为,OD<sub>600</sub>为2时处于快速生长期,这也是植物材料基因转化中常常被推荐的工作浓度。本研究证明,尽管都是LBA4404农杆菌株,但其携带的质粒不同,生长特性明显不一样。因此,在基因转化时,应该根据不同质粒菌株的生长特点确定准确的培养时间,以使其感染植物细胞的能力达到最强。

本研究表明,接种量对其生长量有重要影响。因此,转化实验中,仅据OD<sub>600</sub>值判断其生长时期是不准确的。此外,我们还注意到,培养条件,如温度、振荡频率等,对其生长状况也有相当大的影响。因此,在农杆菌培养中,还要掌握好适宜的培养条件。本文所使用的几种菌株,5μl起始菌液接种3ml培养基,正常条件下培养32h,此时基本处于快速生长中期,OD<sub>600</sub>多在2左右,适合进行植物基因转化。本研究后续的基因转化试验中,均采用这一方案。

#### 6.5 结论

通过酶切和PCR检测实验,证明本研究所使用的几种质粒载体构建正确,含有相应的标志基因,可以用于后续的拟南芥悬浮细胞基因转化。采用电转化法,成功地将质粒DNA转入农杆菌细胞,并在一系列检测实验中得到证明。拟用的几种不同质粒具有基本相似但不完全相同的生长特性,而且接种量及培养条件等,对其生长量有很大影响。采用本文方法,成功地制备了可用于植物基因转化的一系列工程菌株。

## 7 拟南芥悬浮细胞遗传转化——转化模式与转化细胞选择

### 7.1 材料

所有材料均由 PMBE 提供并在该实验室完成全部试验。该实验室 Andrzej Jerzmanowski 教授提供全方位支持, Agnieszka Sokół 博士协助部分实验。

#### 7.1.1 转化材料

拟南芥起始悬浮细胞为按文献[196]方法反复继代后的野生型 *Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系, PMBE 制备。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefacion*) 为 LBA4404 电敏感突变系 (electro<sup>-</sup>competent)。

#### 7.1.2 载体系统

所用 4 种载体系统为已转入不同质粒的根癌农杆菌菌株, 其中, pBIB、pBINm-gfp5-ER 质粒为 PMBE 获赠, pBIB/GUS、pBIB/SARs 质粒为 PMBE 改建。本研究主要使用的是 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs。

所有质粒均用电激法转入根癌农杆菌 LBA4404。对农杆菌的转化及检测均在该室完成。必要时, 以含有“空质粒”pAL4404 的根癌农杆菌菌株作对照。

表 7-1 所使用的质粒载体

Table 7-1 Plasmid vectors

| 载体名称          | 标志基因                                    | 选择方法                                      | 备 注             |
|---------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|
| pBIB          | <i>nptII</i> , <i>hpt</i>               | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup>       | PMBE 获赠         |
| pBIB/GUS      | <i>nptII</i> , <i>hpt</i> , <i>uidA</i> | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup> , GUS | PMBE 改造         |
| pBIB/SARs     | <i>nptII</i> , <i>hpt</i> , <i>uidA</i> | hyg <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup> , GUS | PMBE 改造         |
| pBINm-gfp5-ER | <i>nptII</i> , <i>gfp</i> , <i>ptp</i>  | kan <sup>r</sup> , tet <sup>r</sup> , GFP | PMBE 获赠         |
| pAL4404 (对照)  | <i>Rif<sup>r</sup></i>                  | rif <sup>r</sup>                          | LBA4404 自带, 空质粒 |

#### 7.1.3 主要化学试剂

化学试剂分别购自 Merck 公司(Darmstadt, Germany), Roth 公司(Karlsruhe, Germany), Calbiochem 公司(La Jolla, USA), Amersham 公司(Braunschweig, Germany), Agfa 公司(Gaever, Belgium), Sigma Aldrich 公司(Deisenhofen, Germany), Duchefa 公司(Haarlem, Netherland), Difco 公司(USA), Feinbiochemika 公司(Heidelberg, Germany)及波兰国内有关公司。其中:

B5 培养基 (粉剂): Sigma Aldrich 公司。

抗生素 (kanamycin, hygromycin, rifampicine, tetracycline, cefetaxine): Sigma Aldrich 公司, POLGEN 公司。

### 7.1.4 主要仪器设备

紫外观察仪: T2201 (Sigma)

超速低温离心机: SORVALL RC 5B Plus (Kendro 实验室, USA)

分光光度仪: Bio Photometer (eppeendorf); Jasco J700 (Jasco, Japan)

微型高速离心机: centrifuge 5415R (eppendorf)

温育箱 (0~100℃): CL-65 (ELKON 公司, Poland)

水平电泳仪: Biometra Agogel Mini

Vortex 混匀器: WL-1 (波兰)

## 7.2 方法

### 7.2.1 菌株选择培养方法

表 7-2 所使用的农杆菌选择培养基

Table 7-2 Selection media for *Agrobacterium tumefaciens*

| 载体名称          | 农杆菌                                   |
|---------------|---------------------------------------|
| pBIB (对照 1)   | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           |
| pBIB/GUS      | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           |
| pBIB/SARs     | YEB+ 50mg/L kan+2.5mg/L rif           |
| pBINm-gfp5-ER | YEB+ 5mg/L tet+50mg/L kan+2.5mg/L rif |
| pAL4404(对照 2) | YEB +2.5mg/L rif                      |

YEB 液体培养基, 28℃, 140rpm, 暗培养, 2d。

YEB 培养基 (培养农杆菌): Trypone 5g/L, 酵母提取物 (Yeast extract) 1g/L, 牛肉浸膏 5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.493g/L, pH7.0 (固体培养基加 1.5%的琼脂)

抗生素的配置: 按 100mg/L 的浓度计算称取固体药品, 溶于无菌双蒸水中, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, -20℃保存备用。

### 7.2.2 转化细胞选择培养方法

根据试验设计, 分别在不同阶段以相应的抗生素抗性标记进行选择。各阶段抗生素选择工作浓度如表 7-3。

表 7-3 本研究选择培养基抗生素工作浓度

Table 7-3 Working concentrations of antibiotics for selection media of *Arabidopsis*

| 抗生素种类 | 悬浮细胞培养阶段 | 愈伤组织诱导阶段 | 愈伤组织继代阶段 | 适用转化载体        |
|-------|----------|----------|----------|---------------|
| 潮霉素   | 25 mg/L  | 2.5 mg/L | 1.5 mg/L | pBIB 系列       |
| 卡那霉素  | 100 mg/L | 50mg/L   | 25 mg/L  | pBINm-gfp5-ER |

基本培养基: B5+0.2mg/L NAA+3%蔗糖, pH5.8。

培养条件: 23℃, 24h 光照。

液体选择培养 120 rpm 振荡, 固体选择培养加 0.8% 琼脂粉。

### 7.2.3 转化细胞报告基因诊断

pBIB/GUS 或 pBIB/SARs 以 GUS 组织化学染色进行定性 (或半定量) 观察。

pBINm-gfp5-ER 在紫外光下观察 GFP 发光情况。

GUS 组织化学染色: 加入 GUS 酶的底物 X-Gluc (5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酯)。在酶活性部位产生蓝色沉淀, 即可观察定位。取 300 $\mu$ l 悬浮细胞液于 eppendorf 管, 低速离心收集细胞 (2000rpm, 5min, RT), 加入 1ml GSS 缓冲液 (GUS 染色液) 和 10 $\mu$ l X-Gluc 溶液 (25mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 至过夜。

对愈伤组织的检测改用 96 孔微量滴定板, GUS 染色液完全浸没材料即可, 再加入相应量的 X-Gluc 溶液, 温育时以塑料膜平封。若材料叶绿素含量高, 阴性材料被染色, 则以 70% 乙醇脱色到阴性对照呈黄白色为止 (注: 本研究未发生此类情况)。

X-Gluc 溶液: 用 N-N-二甲基酰胺配成 25mg/ml 贮备液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

GSS buffer (GUS 染色液): 10mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , 1~5mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (铁氰化钾), 1~5mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (亚铁氰钾), 0.001% (V/V) Triton-100。

### 7.2.4 转化模式 (方案) 与程序

本研究共试验了 3 种不同的转化方案。

#### 7.2.4.1 模式□

该模式源于烟草 YB-2 悬浮细胞转化方案, 由 Agnieszka Sokł 博士提供。基本步骤如下:

1) 悬浮细胞预处理: 加 4 $\mu$ l 已灭菌 20mM 乙酰丁香酮 (acetosyringone) 于 4ml 继代后 3d 的拟南芥悬浮细胞液, 以一次性注射器或移液枪吹打悬浮细胞 20 次。

2) 与根癌农杆菌共培养: 加 100  $\mu$ l 培养后 1~2 d ( $\text{OD}_{600}$ □2.0) 携有抗生素抗性标记质粒载体的根癌农杆菌悬浮液于上述吹打后的悬浮细胞液, 充分混匀后置于 28 $^{\circ}$ C、黑暗条件下静置培养 3d。

3) 农杆菌清除: 以 10~15ml 含有 500mg/L 头孢霉素的 B5 新鲜液体培养洗涤细胞 5 次, 1000 rpm, RT (室温), 5 min, 然后重悬浮于 5ml 同一培养基。

4) 转化子选择: 取 1 ml 洗涤后悬浮细胞液, 接种于含有合适种类和浓度抗生素的 B5 固体选择培养基, 常温、光照条件下培养。

## 7.2.4.2 模式 II

该模式参考 Ferando 等[Plant Journal 2000, 22 (6), 553-560]悬浮细胞转化方案。基本步骤如下:

- 1) 与根癌农杆菌共培养: B5 液体培养基离心洗涤 3ml 培养后 1~2 d ( $OD_{600}=2.0$ ) 携有抗生素抗性标记质粒载体的根癌农杆菌悬浮液 2 次, 3000 rpm, RT, 10min, 然后加于 50ml 预先正常继代的拟南芥悬浮细胞液, 静置培养 1~2h, 然后振荡培养 3 d, 120 rpm, 23℃, 光照。
- 2) 农杆菌清除: 以含有 500mg/L 头孢霉素的 B5 新鲜液体培养液离心洗涤 2 次, 每次洗涤后置于振荡培养机上振荡培养 30min。
- 3) 恢复培养: 重悬浮于不含抗生素的 B5 液体培养基上恢复培养, 120 rpm, 23℃, 光照, 5~6 d。
- 4) 转化子选择: 加合适种类和浓度抗生素于上述悬浮细胞液, 在液体条件下选择培养 1~2d, 然后取 1ml 转接于固体选择培养基平板培养, 23℃, 光照。

## 7.2.4.3 模式 III

该模式参考 Gallego 等(1999)<sup>[237]</sup>拟南芥悬浮细胞转化方案, 本研究做了较大调整。其与模式 II 相近, 但将静置共培养的时间延长到 2d, 且改进了培养条件和抗生素选择时机。正常情况下, 从共培养到转化系获得, 约需 40~60d。详细步骤如下:

取培养后 1~2d ( $OD_{600}=2.0$ ,  $2 \times 10^9$  cells/ml) 农杆菌悬浮液以 B5 培养基稀释 10 倍

↓

B5 培养基离心洗涤 2 次, 13000 rpm, RT, 15s

↓

加 1/250 体积(100 $\mu$ l to 25ml) 农杆菌悬浮液于 5 倍稀释量 (5ml 直始悬浮液接种于 20ml B5 培养基) 接种后 2 d 的拟南芥悬浮细胞

↓

室温、光照下静置培养 2d

① ↓ 0.5~2d

B5 培养基离心洗涤 2 次, 1000 rpm, RT, 3 min

↓

重悬浮于含有 500mg/L 头孢霉素的 B5 液体培养基, 16/8h 光暗,  $23 \pm 2$  °C, 120 rpm,

2~3d

② ↓ 2~3d

离心洗涤 1 次（条件同上）

↓

接种于 B5 固体选择培养基，16/8h 光暗， $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，1~2 周

③ ↓ 7~15d

单个挑取抗性愈伤组织，接种于 B5 固体选择培养基上继续培养 1~2 周

④ ↓ 7~15d

逐个挑取抗性愈伤组织的一半进行 GUS 或 PCR 检测，转移检测后为阳性的抗性愈伤组织到新鲜选择培养基继续培养 1~2 周

⑤ ↓ 7~15d

获得足够的材料后继续进一步分子检测 (GUS assays, PCR, Southern blotting, Western blotting, etc.)

↓

重悬浮于 B5 液体基本培养基培养 1~2 周

⑥ ↓ 7~15d

获得转基因悬浮细胞系

## 7.3 结果与分析

### 7.3.1 转化模式的比较分析

本研究使用的 3 种转化模式的异同见表 7-4:

表 7-4 3 种转化模式方案的比较

Table 7-4 Comparison of procedures among three protocols of transformation

| 模式  | 受体材料   | 预处理   | 共培养  |      | 头孢霉素处理 |                        | 恢复培养 | 液体选择培养 |
|-----|--------|-------|------|------|--------|------------------------|------|--------|
|     |        |       | 静置   | 振荡   | 方式     | 时间                     |      |        |
| I   | 继代后 3d | 吹打+AS | 3d   | —    | 离心洗涤   | $5\times 5\text{min}$  | —    | —      |
| II  | 继代后 0d | —     | 1~2h | 3d   | 洗涤+振荡  | $2\times 30\text{min}$ | 5~6d | 1~2d   |
| III | 继代后 2d | —     | 2d   | 2~3d | 振荡培养   | 2~3d                   | —    | —      |

#### 7.3.1.1 模式 I 转化结果分析

该方案的主要特点是有一个受体材料预处理过程，与农杆菌共培养是在静置条件下进行（3d），用洗涤方式清除农杆菌，转化步骤简单、所需时间短。这一方案在烟草悬浮细胞的转化中特别有效（私人交流，Agnieszka Sokół 博士提供）。乙酰丁香酮预处理在许多植物的遗传转化中被证明能提高受体材料对 T-DNA 的敏感性，大大提高转化效率。对一些单子叶禾谷类植物，乙酰丁香酮的应用被认为是必需的。

图 7-1 是共培养后 GUS 组织化学染色情况，说明 GUS 基因有瞬时表达，其中 pBIB/SARs 转化后细胞染色略深于 pBIB/GUS 转化后细胞，这说明 SAR 序列在一定和程度上提高了 GUS 基因的表达量。图 7-2 是转化后 15d 平板上细胞状，包括对照（control）在内的 4 个处理均不能获得愈伤组织，说明细胞已经死亡。



图 7-1 模式 I 转化后 GUS 染色情况

Fig.7-1 GUS staining of Protocol I



图 7-2 转化后细胞平板培养状 (15d)

Fig.7-2 Culture on plate after transformation (15d)

在拟南芥悬浮细胞转化中，这一方案证明是不适用的。所转化的拟南芥悬浮细胞，均在液体共培养阶段死亡。主要原因如下：拟南芥对静置培养的耐受性极差，据我们在耐受试验中证明，正常培养的悬浮细胞，常温下静置 3d，几乎不能在常规条件下恢复其生长，特别是经过多次吹打、洗涤及与土壤农杆菌共培养，其悬浮细胞的活性更低。

### 7.3.1.2 模式 II 转化结果分析

该方案的主要特点是在一个短时间（1~2 h）的静置后在振荡条件下完成共培养（3 d），洗涤加振荡方式（2 个 30min）清除农杆菌，选择前有一个 5~6d 的恢复培养阶段（不加抗生素），接着进行液体条件下抗生素选择（1~2d）。



图 7-3 模式 II 恢复培养后悬浮细胞状

Fig.7-3 Suspension station after co-cultivation

by Protocol II



图 7-4 转化后 3 d 和 8 d GUS 染色情况

Fig.7-4 GUS staining in 3d and 8d

after transformation

图 7-3 是经过恢复培养和液体选择后的悬浮细胞状，各处理的悬浮细胞仍然保持较深的绿色，与通常经过液体选择后，由于大量非转化细胞的死亡而呈现淡白色悬浮细胞状有极明显的不同。这暗示，1~2d 的抗生素选择，并不能有效淘去未转化细胞。

图 7-4 分别是转化后 3d (共培养后恢复培养前)和 8d (选择培养后铺平板前)的 GUS 组织化学染色情况。从中可以看出, pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 转化后均染成深蓝色, 而 pBIB 转化后未被染色。这说明, GUS 基因在悬浮细胞中有极强的瞬时表达 (transient expression)。其中, 转化后 3d, pBIB/SARs 与 pBIB/GUS 处理染色程度无明显差别, 但 8d 时, pBIB/SARs 处理染色程度明显深于 pBIB/GUS。这暗示, 不同时期, SAR 序列提高转化基因表达量的效果有差异。

将悬浮细胞转移到固体选择培养基上, 含有 3 种质粒的农杆菌转化后的悬浮细胞, 意外地诱导出大量愈伤组织, 而对照不能诱导出愈伤组织 (贴壁处少量诱导的愈伤组织, 推测是由于制平板时, 该处粘有培养基, 而加入的抗生素不能渗入该处所致) (图 7-5)。然而, 一定时间后, 这些愈伤组织不再生长并逐步白化。推测是由于共培养后农杆菌清除的时间过短、恢复培养时间过长, 悬浮细胞潜伏有大量仍然具有活力的农杆菌, 以某种未知的方式将抗生素抗性转移到拟南芥细胞, 从而使并未真正转化的细胞也获得抗生素抗性。

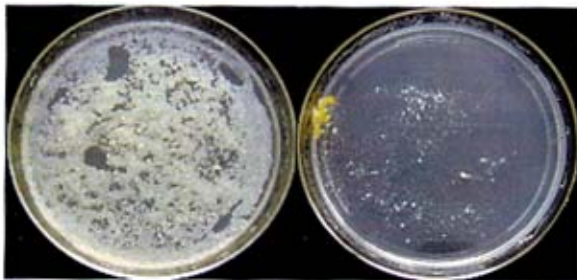


图 7-5 转化后悬浮细胞在选择培养基上愈伤组织诱导情况 (15d)

Fig.7-5 Calli or cells died on selection media after transformation (15d)

注: 左为 pBIB/GUS, 右为空白对照

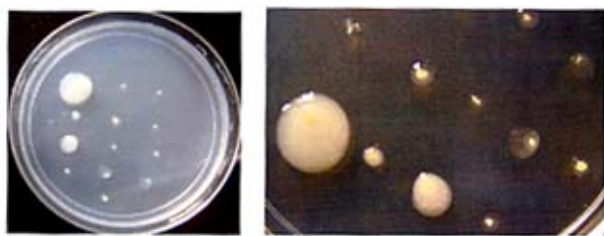


图 7-6 愈伤组织转移后萌发的农杆菌菌落 (pBIB/GUS)

Fig.7-6 Growth of *Agrobacterium* after transferring *Arabidopsis* calli (pBIB/GUS)

注: 右为放大后菌落形态

进一步的试验证明了上述推测。挑取单个愈伤组织转移到新鲜选择培养基上重新培养, 愈伤组织不能生长, 并且数天后所有愈伤组织周围均长出浮白色农杆菌菌落 (图 7-6)。这一结果暗示, 悬浮细胞中未杀死的农杆菌并不会在愈伤组织诱导阶段萌发, 在一定的刺激信号 (如转接) 作用下才集中爆发。

以上结果说明，可能由于农杆菌清除的时间过短、恢复培养时间过长、选择培养时间过短等因素的综合影响，通过这一方案初步选择的愈伤组织均表现为“假阳性”，不能获得真正的阳性转化子。

### 7.3.1.3 模式III转化结果分析

该方案的主要特点是有一个较长时间的静置共培养（2d）和振荡共培养（2~3d），理论上有利农杆菌附着受体细胞并充分转化；振荡条件下以头孢霉素处理 2d，理论上有利清除农杆菌；选择培养改在固体培养阶段，可能有利于转化细胞生长。

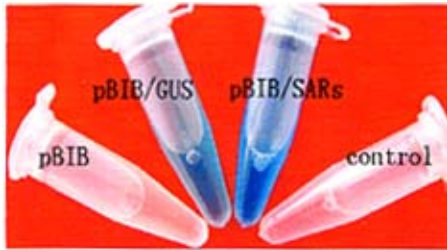


图 7-7 模式III转化 7d GUS 染色情况  
Fig 7-7 GUS staining in 7d by Protocol III

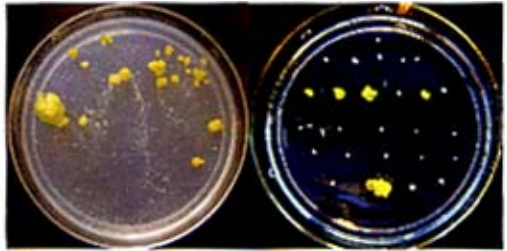


图 7-8 模式III抗性愈伤组织（pBIB/SARs）  
Fig 7-8 Antibiotics-resistance calli by Protocol III

图 7-7 显示该方案 GUS 基因仍然获得较好的瞬时表达。图 7-8 左显示转化后的悬浮细胞在选择培养基上成功诱导出抗性愈伤组织，图 7-8 右显示挑选抗性愈伤组织单克隆在选择培养基中再选择一次后结果，部分愈伤组织变白死亡，表现为“假阳性”。

上述结果表明，在采用的 3 种转化模式中，仅模式III成功地获得抗性愈伤组织。因此，后续的模式优化，均采用 pBIB/SARs 质粒在模式III基础上进行。

## 7.3.2 转化模式优化

### 7.3.2.1 预处理的效果

分别试验了低温（4℃ 静置 1d）、高温（37℃ 振荡 1d）、蔗糖饥饿（无蔗糖培养基预培养 1d）、AS 诱导（含 20μmol/L 乙酰丁香酮培养基预培养 1d）、对照（无预处理）5 种材料预处理方式，重复 3 次。以对照获得的抗性愈伤组织块数为 100%，计算各处理愈伤组织相对转化率；根据抗性愈伤组织再选择后死亡块数，计算假阳性率。结果见表 7-5、图 7-9。

表 7-5 预处理对拟南芥悬浮细胞基因转化的影响

Table 7-5 Influence of pretreatments on transformation of Arabidopsis suspension cells

| 预处理方法 | 获抗性愈伤组织块数 | 相对转化率/% | 转移抗性愈伤组织块数 | 阳性愈伤组织块数 | 假阳性率/% |
|-------|-----------|---------|------------|----------|--------|
|-------|-----------|---------|------------|----------|--------|

|          |    |     |    |    |    |
|----------|----|-----|----|----|----|
| 低温       | 28 | 50  | 28 | 9  | 68 |
| 高温       | 16 | 29  | 16 | 3  | 81 |
| 蔗糖饥饿     | 43 | 77  | 30 | 11 | 63 |
| AS 诱导    | 67 | 120 | 30 | 13 | 57 |
| 对照(无预处理) | 56 | 100 | 30 | 8  | 73 |

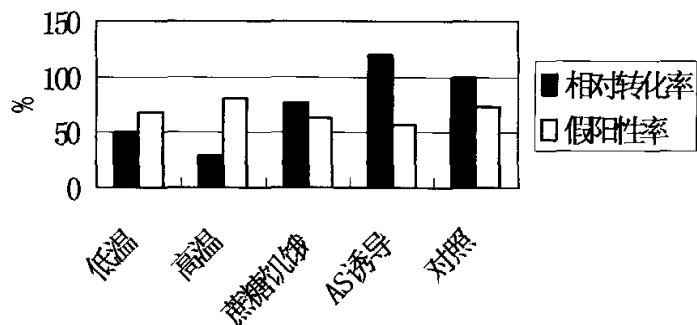


图 7-9 不同预处理转化效果

Fig.7-9 Effect of pretreatments on transformation

表 7-5、图 7-9 表明, 仅 AS 诱导预处理获得的抗性愈伤组织块数高于对照, 与对照相比, 转化率提高 20%, 且假阳性率较低; 高温、低温和蔗糖饥饿均不利于转化, 获得的抗性愈伤组织块数, 分别为对照的 27%、50%和 77%。这与前人及理论上的推测结果不一致, 可能与处理时间过长, 影响细胞活性有关。

### 7.3.2.2 静置共培养对转化效率的影响

分别试验了 6、12、24、36、48h (对照) 静置共培养时间处理 (静置后均有 2d 振荡共培养), 重复 3 次。统计方法如前所述。结果见表 7-6、图 7-10。

表 7-6 静置共培养对拟南芥悬浮细胞基因转化的影响

Table 7-6 Influence of co-cultivation without vibration on transformation of Arabidopsis suspension cells

| 静置共培养<br>时间/h | 获抗性愈伤<br>组织块数 | 相对转化率<br>/% | 转移抗性愈<br>伤组织块数 | 阳性愈伤<br>组织块数 | 假阳性率<br>/% |
|---------------|---------------|-------------|----------------|--------------|------------|
| 6             | 10            | 19          | 10             | 2            | 80         |
| 12            | 26            | 48          | 26             | 3            | 88         |
| 24            | 57            | 106         | 30             | 7            | 77         |
| 36            | 69            | 128         | 30             | 13           | 57         |
| 48 (对照)       | 54            | 100         | 30             | 10           | 67         |

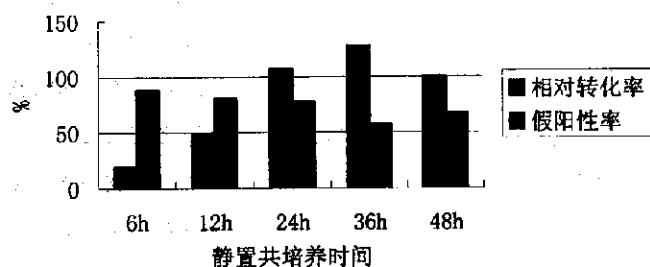


图 7-10 不同静置共培养时间转化效果

Fig.7-10 Effect of co-cultivation duration without vibration on transformation

表 7-6、图 7-10 表明, 静置共培养时间对转化效果有明显影响, 以 36h 表现最好, 获得的抗性愈伤组织块数是 48h (对照) 的 128%, 而静置 6h 和 12h 显然过短, 不利于农杆菌附着, 转化率低, 假阳性率高。

### 7.3.2.3 恢复培养与液体选择的效果

在农杆菌清除后悬浮细胞铺平板前, 设计了恢复培养和液体选择处理, 分别是: 恢复培养 2d、液体选择培养 2d、无恢复培养无液体选择 (对照), 重复 3 次。统计方法如前所述。结果见表 7-7、图 7-11。

表 7-7 恢复培养与液体选择对拟南芥悬浮细胞基因转化的影响

Table 7-7 Influence of reviviscence culture and liquid-selection on Arabidopsis suspension cells transformation

| 处 理  | 获抗性愈伤组织块数 | 相对转化率 /% | 转移抗性愈伤组织块数 | 阳性愈伤组织块数 | 假阳性率 /% |
|------|-----------|----------|------------|----------|---------|
| 恢复培养 | 55        | 87       | 30         | 4        | 87      |
| 液体选择 | 87        | 138      | 30         | 14       | 53      |
| 对照   | 63        | 100      | 30         | 12       | 60      |

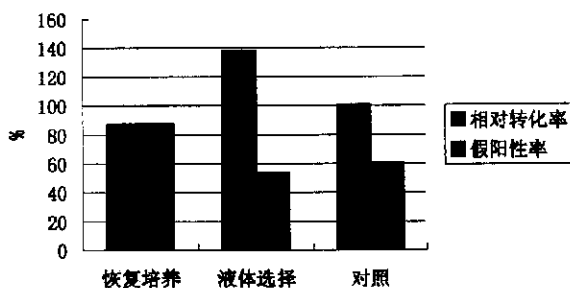


图 7-11 恢复培养与液体选择的效果

Fig.7-11 Influence of reviviscence culture and liquid-selection on transformation

表 7-7、图 7-11 表明,恢复培养与液体选择对转化效果有明显影响。增加 2d 液体选择,不仅使转化率提高 38%,而且明显降低了假阳性率;然而,恢复培养表现出相反的结果,转化率降低,假阳性率增加。液体条件下,转化子的生长和转化子的选择始终是一对矛盾,有利于生长,就可能不利于选择;而有利于选择,则可能不利于生长。本试验设计的液体选择,一方面由于重新更换了培养基,使转化子有良好的生长条件;另一方面,抗生素的存在,抑制了非转化子的竞争性生长。而增加恢复培养环节,可能会因为大量非转化子的生长而使转化子的生长受到抑制,因此,转化率下降,而假阳性率上升。

### 7.3.3 不同质粒载体的转化效果

除了前述 3 种载体之外,另外增加了 pBINm-gfp5-ER (以卡那霉素作为选择标记),转化方案采用未经优化的模式Ⅲ,对照为 LBA4404。

表 7-8 质粒载体对拟南芥悬浮细胞基因转化的影响

Table 7-8 Influence of vectors on Arabidopsis suspension cells transformation

| 载体种类          | 获抗性愈伤组织块数 | 转移抗性愈伤组织块数 | 阳性愈伤组织块数 | 假阳性率/% |
|---------------|-----------|------------|----------|--------|
| pBIB          | 67        | 30         | 6        | 80     |
| pBIB/GUS      | 56        | 30         | 6        | 80     |
| pBIB/SARs     | 73        | 30         | 11       | 63     |
| pBINm-gfp5-ER | 43        | 30         | 3        | 90     |
| LBA4404(对照)*  | 8         | 8          | 0        | 100    |

\*LBA4404 菌株处理,采用与 pBINm-gfp5-ER 同样的选择方案,即卡那霉素选择。

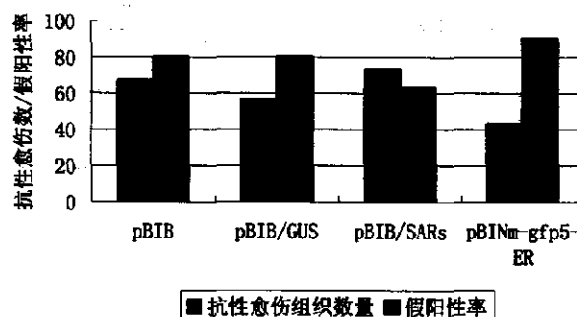


图 7-12 不同质粒载体转化效果

Fig.7-12 Effect of vectors on transformation

表 7-8、图 7-12 表明,3 种 pBIB 系列载体在抗性愈伤组织诱导率及假阳性两方面均有一定差异,以 pBIB/SARs 表现最好;pBINm-gfp5-ER 质粒载体获得的抗性愈伤组织明显低于 pBIB 系列,而假阳性率高达 90%,明显高于 pBIB 系

列，这与本方案是在 pBIB 系列基础上建立的有关。对所获得的 3 块经 pBINm-gfp5-ER 转化并二次选择后阳性愈伤组织进行荧光观察，未见绿色荧光发出。

不含质粒载体（含有 pAL4404 “空质粒”）的 LBA4404 菌株侵染后，也获得 8 块“抗卡那霉素愈伤组织”，这说明，未转化细胞仍然可能在选择培养基上生长，特别是一些大细胞团结构，下层细胞具有一定的“隔离”抗生素毒性的作用，上层细胞仍然可以生长，这可能是前述试验中假阳性率均较高的原因之一。但在二次选择中，这些愈伤组织均不能继续生长。

### 7.3.4 优化后效果

根据上述试验，我们综合采用了前述试验获得各项优化条件，即在模式Ⅲ基础上，20 $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮培养基预培养 1d，静置共培养 36h，液体选择培养 2d，以 pBIB/SARs 为质粒载体，检测优化后的效果，重复 1 次。结果如下图所示。从图中可见，优化前后获抗性愈伤组织块数分别为 17、18 块，无明显差别，但再选择后所获得的阳性愈伤组织块数差异极明显，分别为 3、15 块，优化前的假阳性率高达 82%，优化后降为 17%。这说明，综合使用以上优化措施，能大大降低假阳性率，从而提高转化效率。

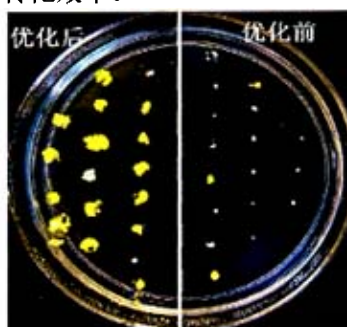


图 7-13 优化后转化效果

Fig.7-13 comparison of effects between optimization and non-optimization

## 7.4 讨论

### 7.4.1 关于 GUS 基因的瞬时表达

外源基因在转化细胞中表达的方式有两种：瞬时表达（transient expression）与稳定表达（stable expression）。瞬时表达是指导入外源基因后在短时间内（如数小时）就能检测到其表达的产物，但几天后表达水平逐渐降低，直到消失的外源基因表达方式。这是因为外源基因导入细胞后，大部分未整合到染色体上，而是以游离状态存在。瞬时表达在基因表达调控研究中得到广泛应用。例如研究启

动子、增强子在基因表达调控中的作用时,只要把一定的启动子区域和报告基因构建在一起,转化植物细胞,在短时间内就可以通过测定报告基因的瞬时表达了解哪些启动子序列是调节基因表达必需的。在瞬时表达中,并不要求取得有经济价值的转基因植物,即不要求转化的外源基因能稳定地遗传给下一代。此外,研究环境条件、植物激素等对基因表达调控的影响时,只要在改变外界条件和激素的情况下,检测外源基因的瞬时表达,就可以了解这些因子调控基因表达的机理[3: 252-253]。

获得 GUS 基因的瞬时表达是本研究的基本目的。共培养后进行 GUS 组织化学染色表明,3 个不同的转化方案中 GUS 均有较高丰度的瞬时表达,表明所构建的质粒载体 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 能够用于拟南芥悬浮细胞基因转化。虽然本研究未做 GUS 活性定量测定,但从染色深浅上可以看出, SAR 序列在一定程度上提高了 GUS 的表达量,尤其是共培养后 8d 时, pBIB/SARs 处理染色程度明显深于 pBIB/GUS。这暗示,不同时期, SAR 序列提高转化基因表达量的效果有差异。

#### 7.4.2 关于抗生素选择与假阳性现象

本研究各个转化方案获得的转化子假阳性比率均较高,究其原因,可能与选择浓度偏低、选择时间偏短有关,选择强度不够,导致选择不充分。另一个更重要的原因是嵌合体的存在。由于悬浮细胞大多是细胞团结构,选择后的转化愈伤组织,很可能由转化细胞和未转化细胞共同发育形成,从而造成大量假阳性的出现。提高选择强度可能降低假阳性率,但同样由于嵌合体的存在,又会使部分已转化细胞不能在选择培养基上生长。

理论上,要提高转化效率并获得成功转化的纯合体,应当提高细胞的分散性。然而,据我们在反复的实验中观察,高度分散的游离细胞很难获得转化子。这与单细胞对抗生素反应更敏感有关。尽管游离细胞可能更容易被转化,但在抗性选择环节,很容易被杀死或受抑制。选择后少量幸存者,也很难诱导出愈伤组织。由此可见,如何从悬浮细胞中选择出转化子而又不影响其生长,是悬浮细胞遗传转化的一大技术难点。

液体条件下,转化子的生长和转化子的选择始终是一对矛盾,有利于生长,就可能不利于选择;而有利于选择,则可能不利于生长。本试验设计的液体选择,一方面由于重新更换了培养基,使转化子有良好的生长条件;另一方面,抗生素的存在,抑制了非转化子的竞争性生长。而增加恢复培养环节,可能会因为大量非转化子的生长而使转化子的生长受到抑制,因此,转化率下降,而假阳性率上

升。

正向选择可能是解决这一难点的有效途径。从另一个角度来看,细胞团结构的存在正是悬浮细胞成功转化的有利因素。尽管会出现大量假阳性现象和嵌合体,但可以比较方便地通过多次选择或重悬浮后再选择加以排除。

#### 7.4.3 关于群体选择与个体选择

拟南芥遗传转化可通过多个方式进行抗生素抗性选择,群体选择的基础是液体选择,个体选择的基础是平板选择。由于拟南芥悬浮细胞数量巨大,而转化的细胞仅仅是其中的极少部分,因此,个体选择的工作量会很大,选择效率低。悬浮细胞为共培养后的转化群体在液体条件下进行抗生素选择提供了条件。液体条件下进行群体选择的最大困难是大量死亡的未转化细胞会产生某些毒性,对转化细胞生长的愈伤组织诱导有强烈抑制作用。我们在实验中发现,如果选择的时间较长,则无法在平板上获得愈伤组织。优化试验采用 2d 液体选择方法,证明是可行的。

### 7.5 结论

比较 3 种拟南芥悬浮细胞转化方案,共培养后均获得 GUS 的瞬时表达,但仅模式Ⅲ成功地获得抗性愈伤组织。在模式Ⅲ基础上,进一步优化了转化条件,表明  $20\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮预培养 1d、静置共培养 36h、液体选择培养 2d、以 pBIB/SARs 为质粒载体,可以大大降低假阳性率。研究结果暗示,所构建的 pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 均可用于拟南芥悬浮细胞基因转化。

## 8 拟南芥悬浮细胞遗传转化——报告基因诊断与分子检测

### 8.1 材料

所有材料均由 PMBE 提供并在该实验室完成全部试验。该实验室 Andrzej Jerzmanowski 教授提供全方位支持, Agnieszka Sokół 博士协助部分实验。

#### 8.1.1 转化材料及转化载体

拟南芥起始悬浮细胞为按文献[196]方法反复继代后的野生型 *Arabidopsis thaliana* (Columbia) 悬浮细胞系, PMBE 制备。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为 LBA4404 电敏感突变系 (electro-competent)。所用4种质粒载体为: pBIB、pBIB/GUS、pBIB/SARs、pBINm-gfp5-ER, 本研究主要使用的是 pBIB/GUS。所有质粒均用电激法转入根癌农杆菌。

#### 8.1.2 主要化学试剂

化学试剂分别购自 Merck 公司(Darmstadt, Germany), Roth 公司(Karlsruhe, Germany), Calbiochem 公司(La Jolla, USA), Amersham 公司(Braunschweig, Germany), Agfa 公司(Gaevert, Belgium), Sigma Aldrich 公司(Deisenhofen, Germany), Duchefa 公司(Haarlem, Netherland), Difco 公司(USA), Feinbiochemika 公司(Heidelberg, Germany)及波兰国内有关公司。其中:

Taq DNA 聚合酶 (Super pfu polymerase) 及 PCR 相关生化试剂: POLGEN 公司 (Poland, 华沙大学植物分子生物学实验室研制)。

DNA Marker (1kb): MBI Fermentas 公司。

蛋白质 Marker: Prestained protein molecular weight marker (Fermentas)

抗体 (一抗): Anti-phospho-Histone H3(Ser10)、Anti-phospho(S10)-Acetyl (K14)-Histone H3 (Upstate Biotechnology)

抗体 (二抗): HRP(horseradish peroxidase)、AP(Alkaline phosphatase)

固相膜 (PVDF): Wetran Clear Signal 蛋白质杂交膜(BioScience)

3MM 滤纸: whatman

#### 8.1.3 主要仪器设备

PCR 仪: Mastercycler Personal (eppendorf 公司, Germany)、Mastercycler Gradient (eppendorf)

紫外观察仪: T2201 (Sigma)

超速低温离心机: SORVALL RC 5B Plus (Kendro 实验室, USA)  
 分光光度仪: Bio Photometer (eppendorf); Jasco J700 (Jasco, Japan)  
 微型高速离心机: centrifuge 5415R (eppendorf)  
 水平电泳仪: Biometra Agogel Mini  
 垂直电泳系统: Amersham (Biosciences)  
 匀浆机: TKA LABORTECHNIK T25basic  
 电源系统: Bio-RAD POWER PAC 3000  
 蛋白质电转移仪: Bio-RAD SEMI-DRY TRANSFER CELL  
 BioRad 凝胶成像系统: BioRad 公司 (Germany)  
 干胶机 (Gel drier): Model 583 Gel Dryer (BioRad)  
 摇床: BLOKADA KL-942 (波兰)  
 温育箱 (0~100℃): CL-65 (ELKON 公司, Poland)  
 温控仪: Thermoblock TB-941U (ELECTRONIC), Thermomixer comfort (eppendorf)  
 Vortex 混匀器: WL-1 (波兰)

## 8.2 方法

### 8.2.1 转化细胞 (愈伤组织) GUS 组织化学染色

分别挑取一半经过二次固体选择后的愈伤组织 (另一半继续培养作进一步的 PCR 检测等), 加于 96 孔微量滴定板, 每孔加入约 100 $\mu$ l GSS 缓冲液 (GUS 染色液) 和 1 $\mu$ l X-Gluc 溶液 (25mg/ml), 塑料膜平封, 37℃温育过夜。次日观察染色情况。若材料叶绿素含量高, 阴性材料被染色, 则以 70%乙醇脱色到阴性对照呈黄白色为止 (注: 本研究未发生此类情况)。

X-Gluc 溶液: 用 N-N-二甲基酰胺配成 25mg/ml 贮备液, -20℃保存备用。

GSS buffer (GUS 染色液): 10mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , 1~5mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (铁氰化钾), 1~5mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (亚铁氰钾), 0.001% (V/V) Triton-100。

### 8.2.2 拟南芥基因组 DNA 抽提

GUS 检测后为阳性的愈伤组织, 余下的另一半转移到新鲜培养基上细胞培养 7~10d, 待愈伤组织重新长成适宜大小后, 挑取一半提取 DNA (另一半继续培养作进一步检测或重悬浮获得转化悬浮细胞系)。愈伤组织参照 PMBE 提供的基因组 DNA 快速抽提方法, 悬浮细胞增加离心收集细胞步骤。详细步骤如下:

1) 根据细胞不同密度, 取约 1ml 悬浮细胞 (使其细胞生物量约为 100mg)

于 eppendorf 管，低温高速离心（13000rpm, 1min, 4°C），完全抽吸除去上清液。愈伤组织直接取约 100mg 材料即可。

- 2) 液氮中用小杵 (pestle) 碾磨 15~20s (破坏细胞壁)。
- 3) 加 400 $\mu$ l 抽提缓冲液，在 Vortex 混匀器上均匀 5s (破坏细胞膜并释放 DNA)。
- 4) 13000 rpm 离心 1min，取 300 $\mu$ l 上液移至另一 eppendorf 管。
- 5) 加 300 $\mu$ l 异丙醇 (isopropanol) 轻轻混合 2 min (使 DNA 沉淀)。
- 6) 13000rpm 离心 5min，500 $\mu$ l 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀 (以除去部分杂质)。
- 7) 重复离心上述 1 次，尽量移去上液，并用冷风吹干。
- 8) 重悬浮 DNA 于 30 $\mu$ l 去离子水，4°C 下可保存 1 年。

抽提缓冲液：200mM Tris-HCl (pH7.5)，250mM NaCl，25mM EDTA，0.5%SDS。常温保存 (低温下出现白色 SDS 沉淀)。

### 8.2.3 DNA 电泳分析

10%琼脂糖凝胶电泳，上样液 1 $\times$ loading buffer，电泳缓冲液 0.5 $\times$ TBE，染色剂溴化乙锭 (EB，小许加于电泳缓冲液)，电压~100Vt (5~10Vt/cm 胶宽)，紫外透射仪观察，BioRad 凝胶成像系统照相。

6 $\times$ 上样缓冲液 (DNA 凝胶上样)：0.25%溴酚蓝(Bromophenol blue)，0.25%二甲基苯胺 FF(Xylene cyanol FF)，40%(W/V)蔗糖 (sucrose)

0.5 $\times$ TBE：45mM Tris·硼酸(Tris·borate)，1mM EDTA

1 $\times$ TE：10mM Tris-HCl (pH8.0)，1mM EDTA

溴化乙锭(EB)贮存液(10mg/L)：1g 溴化乙锭溶于 100ml 蒸馏水中，磁力搅拌器搅拌数小时。工作液浓度为 0.5  $\mu$ g/ml。

### 8.2.4 PCR 检测

本研究采用的 PCR 反应体系如下：

H<sub>2</sub>O (mini q)：13.5 $\mu$ l

PCR 缓冲液 (10 $\times$ )：2 $\mu$ l

dNTP 混合液 (10 $\times$ )：2 $\mu$ l

引物 1：0.5 $\mu$ l

引物 2：0.5 $\mu$ l

模板 DNA：1 $\mu$ l

Taq 酶：0.5 $\mu$ l

反应液总体积：20 $\mu$ l，装于 0.2ml PCR 试管，冰浴上进行。轻弹混匀，瞬时

离心。按下列参数进行 PCR 扩增, 如果效果不佳, 则根据引物性质、模板 DNA 质量等作适当调整。反应结束后于 4°C 保存。

|     |      |        |          |
|-----|------|--------|----------|
| 预变性 | 95°C | 4' 30" | } 28 次循环 |
| 变性  | 95°C | 30"    |          |
| 退火  | 55°C | 40"    |          |
| 延伸  | 72°C | 40"    |          |
| 延伸  | 72°C | 6' 00" |          |

### 8.2.5 蛋白质抽提

本方法为提取核心组蛋白 (core histones) 而设计, 由 Agnieszka Sokół 博士提供。悬浮细胞增加过滤收集细胞步骤。详细步骤如下:

- 1) 植物材料 (不超过 1g) 用锡铂纸包好, 浸于液氮中。
- 2) 在碾钵中碾碎材料至粉末状 (在液氮条件下操作), 倒入 15ml 离心管
- 3) 加 10ml HI 缓冲液, 4°C 下用 IKA 均浆机均浆 20s。
- 4) 离心, 12000×g, 15min, 4°C。以双层滤膜 (Miracloth, CLAB BIOCHEM 475855 1R) 转移上液至另一预冷过的离心管。
- 5) 加入 100%TCA 溶液使其终浓度为 20%~25%, 摇床上 4°C 下至少摇摆 30min。
- 6) 离心, 16000×g, 30min, 4°C, 倾去上液, 沉淀用 -20°C 丙酮 (acetone) 洗涤 2 次。
- 7) 离心, 16000×g, 5min, 4°C, 倾去上液, 冷风吹干。
- 8) 重悬浮于 300μl 1×SDS 样品缓冲液。此时, 正常为浅蓝色, 如果为浅红色, 则加 1μl 1M Tris-HCl (pH8.0)。

HI 缓冲液配制: 10mM Tris-HCl, pH7.5

2mM EDTA, pH8.0

0.25M HCl

5mM β-巯基乙醇 (β-mercaptoethanol)

0.2mM PMSF

1×SDS 样品缓冲液: 45 mM Tris-HCl, pH6.8

10%甘油 (glycerol)

1% SDS (sodium dodecyl sulfate)

0.01%溴酚蓝 (bromophenol blue)

50mM DTT (dithiothreitol, 二硫苏糖醇)

## 8.2.6 蛋白质分离——SDS-PAGE

SDS-PAGE 参照《Current Protocols in Molecular Biology》Chapter 10 : Analysis of proteins (R.K. Scopes and John A.Smith, 1998) 提供的方法。常用聚丙烯酰胺浓度为 8%~20%，浓度越高，有效分离的蛋白质分子质量越低。本文采用 12%聚丙烯酰胺胶初分离，17%聚丙烯酰胺胶用于 western 杂交，配制方法如下：

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 分离胶: monomery         | 6 ml (western blotting 7.5 ml)    |
| 1.5 M Tris·HCl, pH8.8 | 3.6ml                             |
| 10% SDS               | 150 $\mu$ l                       |
| H <sub>2</sub> O      | 5.25ml (western blotting 3.75 ml) |
| 10% APS               | 150 $\mu$ l                       |
| TEMED                 | 15 $\mu$ l                        |
| 浓缩胶: monomery         | 0.65 ml                           |
| 0.5 M Tris·HCl, pH6.8 | 1.2ml                             |
| 10% SDS               | 120 $\mu$ l                       |
| H <sub>2</sub> O      | 3ml                               |
| 10% APS               | 150 $\mu$ l                       |
| TEMED                 | 15 $\mu$ l                        |

分离及分析过程如下：

- 1) 样品准备：取 10 或 20 $\mu$ l 前述蛋白质样品，加 0.5 或 1 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，95℃ 温育 5min，高速离心 4min (4℃)。
- 2) 样品电泳：设置电流 25mA (320V, 30W)，溴酚蓝跑至胶底时断开电源。
- 3) 分离胶染色：剥取分离胶后，浸于 Gomassie G-250 染色液，摇床上过夜。
- 4) 漂洗：用缓冲液 II (10% 醋酸, 25% 甲醇) 漂洗 15min 至底色变白，再用 10% 甲醇漂洗。
- 5) 图像采集与分析：透明塑料膜封好胶后，于高分辨率扫描仪采集图像，用 Image J 分析软件分析蛋白质条带密度。
- 6) 固定：旧胶浸于固定液 (7% 甲醇, 7% 醋酸, 1% 甘油) 中于摇床过夜。
- 7) 干胶：胶下垫硬纸板，上覆保鲜膜，于干胶机上 80℃ 条件下干胶 2h，取出后可长期保存。

## 8.2.7 Western 杂交

本研究共进行了 2 种不同的蛋白质 Western 杂交，如表 8-1：

表 8-1 Western 杂交系统

Table 8-1 Two Western Blotting systems

| 杂交系统 | 抗体类型 | 一抗                                        | 二抗                          | 检出方式                   | 检测目的                            |
|------|------|-------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------------|
| I    | 鼠抗   | Anti-phospho-Histone H3(Ser10)            | HRP(horseradish peroxidase) | Amersham detection kit | H3 Serine 10 磷酸化                |
| II   | 兔抗   | Anti-phospho(S10)-Acetyl (K14)-Histone H3 | AP(Alkaline phosphatase)    | 碱性磷酸酯酶检出法              | H3 Serine 10 磷酸化和 lysine 14 乙酰化 |

1) 蛋白质分离: 以上述 SDS-PAGE 法初分离待测样品蛋白质。采集图像后, 以 Image J 软件分析组蛋白 H3 (17kDa) 条带密度 (像素), 根据密度大小调整加样量, 确保再次电泳分离的组蛋白 H3 质量一致。按调整后的加样量重新用 SDS-PAGE 分离 1 次。

2) 蛋白质印迹: 电泳结束后, 取出胶, 投入 TGM 缓冲液中浸泡约 30min。剪一张 8.5×8.0cm 大小 (适应胶尺寸) Wetran Clear Signal 蛋白质杂交膜 (0.45 $\mu$ m 孔径 PVDF 膜), 揭去两边保护膜后浸入甲醇 (methanol) 15s。上下各覆 4 张相应尺寸 3MM 滤纸 (预先在 TGM 缓冲液浸透), 形成三明治夹层结构, 排尽气泡, 置于电转移仪上, 合上盖板, 调整电流、电压、功率和时间 (宽 8cm 胶: 105mA, 60V, 7W, 至少 3h)。

3) 染色、封闭: 去除滤纸, 取下胶, 迅速投入 Buffer I, 摇匀, 加 Gomassie 染色液摇床过夜染色。完毕剥去杂交膜, 投入封闭液 (Blocking solution), 室温振荡 0.5h 封闭。

4) 第一抗体反应: 倾去封闭液, 加入用孵育液 (Incubation solution) 稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。

5) 第二抗体反应: 室温下 TBST 洗涤 3 次, 每次 10~15min, 加入 5 封闭液, 再加入二抗, 室温下反应 2~3h。温室下于 TBST 洗涤 3 次, 每次 10~15min, 然后进行显色反应。

6) 检出: 本研究 2 种杂交反应采用不同的检出方式, 具体如下:

方式 1: 碱性磷酸酯酶检出法 (Alkaline phosphatase detection)。杂交膜浸于 15ml 磷酸酶孵育液 (Phosphatase developing solution)、50 $\mu$ l BNT 和 50 $\mu$ l BCIP 混合液, 轻轻摇晃, 直到显色为止。

方式 2: Amersham 试剂盒检出。具体操作按厂家说明书。最后按常规显微摄影技术拍摄感光照片。

Western 杂交使用的相关溶液溶液配方如下:

TGM buffer: 1.514g Tris-HCl

7.207g 甘氨酸

100ml 甲醇

加水至 500ml

Buffer I : 含 7%HAc 的 40%甲醇溶液

Blocking solution: 含 5%脱脂牛奶的 TBST

Incubation solution: 适量 (约 5 $\mu$ l) 抗体加于 Blocking solution

TBST (Tris buffer saline with tween, 国内称 TNT):

1M Tris 22 ml

5M NaCl 33 ml

加 H<sub>2</sub>O 至 1L

加 1ml Tween

TNT buffer: 10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)

150mmol/L NaCl

0.05%Tween-20

Phosphatase developing solution:

0.1M NaCl

0.01M MgSO<sub>4</sub>

0.1M Tris-HCl (pH9.5)

NBT (nitro blue tetrazolium) : 含 100mg/ml NBT 的 70%DMF (dimethyloformamide)

BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate) : 含 50mg/ml BCIP 的 100%DMF

## 8.3 结果与分析

### 8.3.1 二次选择抗性愈伤组织 GUS 诊断结果

对二次选择后获的愈伤组织 GUS 染色情况见表 8-2、图 8-1。

表 8-2 pBIB 系列质粒载体转化后抗性愈伤组织 GUS 染色分析

Table 8-2 Result of GUS staining of calli induced on selection media

| 质粒载体      | 检测愈伤组织块数 | GUS 染色块数 | GUS 阳性率/% |
|-----------|----------|----------|-----------|
| pBIB/GUS  | 77       | 35       | 45        |
| pBIB/SARs | 72       | 39       | 54        |
| pBIB (对照) | 30       | 0        | 0         |

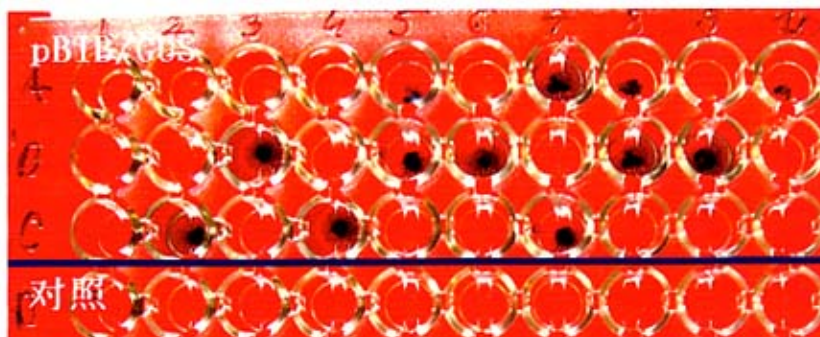


图 8-1 pBIB/GUS 转化细胞 GUS 染色情况

Fig.8-1 GUS staining of calli transferred by pBIB/GUS

表 8-2 表明, 二次选择后的抗性愈伤组织中, pBIB/GUS 和 pBIB/SARs 分别获得了 45%和 54%的 GUS 阳性率, 初步说明, 有约一半的抗性愈伤组织已整合 GUS 基因, 并获得稳定表达。

从表 8-2 还可以看出, 经过二次抗生素选择后, GUS 检测仍然有约 50%抗性愈伤组织表现为假阳性, 除了极少数愈伤组织诱导适应性外, 最主要的原因是嵌合体的存在。由于悬浮细胞多以小细胞团形式而极少以单细胞形式存在, 在小细胞团嵌合体结构中, 未转化的细胞可以从转化的抗性细胞获得抗性成分或信号, 从而具有在抗生素培养基上生长的能力。

### 8.3.2 拟南芥愈伤组织 DNA 抽提

在 GUS 检测的基础上, 随机选择 10 个 GUS 阳性愈伤组织, 抽提基因组 DNA 进行 PCR 检测。其中 1-5 号来自 pBIB/SARs 转化细胞, 6-10 号来自 pBIB/GUS 转化细胞。结果如图 8-2 所示, 在所选取的 10 个样品中, 有 9 个样品成功抽提基因组 DNA。

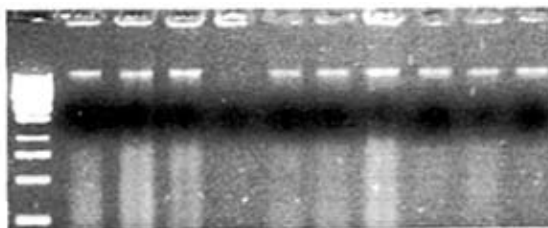


图 8-2 10 个转化细胞 DNA 抽提结果

Fig.8-2 result of DNA extraction of 10 transferred calli

### 8.3.3 GUS 阳性愈组织 PCR 检测结果

对上述 9 个 DNA 样品及一个阳性对照进行 PCR 检测, 被测基因为 *hpt*, 引物名称及其序列如下:

HPT102: 5'-CAGCTTCGAGAGGAGGC

HPT603: 5'-AGGACTTGTTTCGAGCCGAA

引物购自 SIGMA 公司, 预期扩增产物 501bp。结果如图 8-3 所示。



图 8-3 9 个转化样品 DNA *hpt* 基因片段 PCR 检测结果

Fig.8-3 PCR of 9 transferred calli for *hpt* gene

图中 (从左自右): 1 道为 DNA Marker, 2-5 道来自 pBIB/SARs 转化细胞, 6-10 道来自 pBIB/GUS, 11 道为阳性对照 (检测过的 pBIB/GUS 质粒 DNA)。

图 8-3 可见, 所有 9 个样品均获得预期条带, 表明携带有目的基因的 T-DNA 已整合到拟南芥细胞基因组。pBIB/SARs 转化细胞扩增出的条带明显比 pBIB/GUS 的浓重, 暗示 pBIB/SARs 转化细胞中转化基因的表达量比 pBIB/GUS 的要高, 但不排除模板 DNA 量不一致带来的干扰。分别加大模板用量 1 倍和 2 倍, pBIB/GUS 亦获得较清晰条带 (图 8-4)。

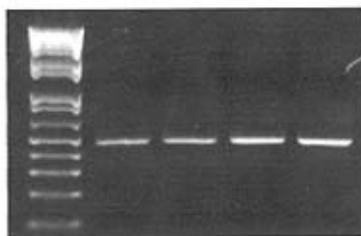


图 8-4 不同模板用量 pBIB/GUS 转化细胞 *hpt* 基因 PCR 扩增片段

Fig.8-4 PCR of pBIB/GUS transformants for *hpt* gene with different template quantities

图中 (从左自右): 1 道为 DNA Marker, 2、3 道为 2μl 模板用量, 4、5 道为 4μl 模板用量。

以上结果表明: GUS 检测具有极强的可靠性。由此证明, 表 8-2 中检测出的 74 块 GUS 阳性转化愈伤组织, 已成功地转化 GUS 报告基因。也证明, 前述优化后转化方案, 适合拟南芥悬浮细胞基因转化。

### 8.3.4 拟南芥悬浮细胞蛋白质抽提分离试验

悬浮细胞来自同一起始母液, 4 份样品作如下不同处理: (1) 对照; (2) 低温处理: 4°C, 20min; (3) 高温处理: 37°C, 20min; (4) 高盐处理: 250mM, 20min。

提取蛋白质后初分离 (20μl 点样量), 根据采集的图像以 Image J 分析组蛋白 H3 区域, 结果如表 8-3:

表 8-3 蛋白质初分离 H3 区域图像分析结果

Table 8-3 Analysis of isolation of histone H3 by Image J

| 样品号/处理 | H3 条带像素 | 相对像素     | 调整点样量/ $\mu\text{l}$ |
|--------|---------|----------|----------------------|
| 1 对照   | 8163    | 1.000000 | 18.0                 |
| 2 低温   | 7164    | 1.139447 | 20.5                 |
| 3 高温   | 8458    | 0.965122 | 17.4                 |
| 4 高盐   | 7306    | 1.117301 | 20.1                 |

按表中调整后的点样量重新分离蛋白质，结果如图 8-5。图中可见，用本方法分离拟南芥悬浮细胞蛋白质得到满意效果；调整点样量后的 H3 条带密度基本一致，可用于半定量 Western 杂交。

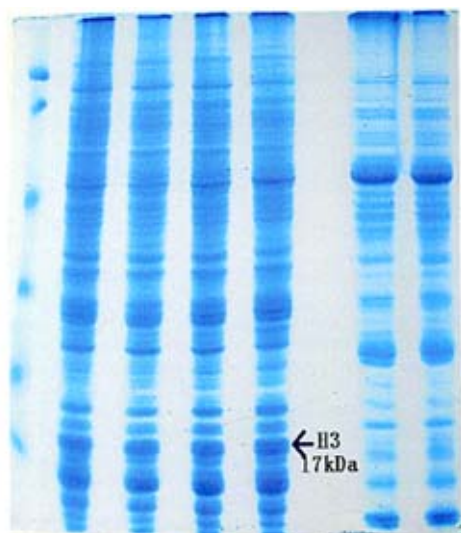


图 8-5 蛋白质分离情况

Fig 8-5 Isolation of core histones

图中(从左自右): 左边 4 道依次为 1-4 号样品;  
右边 2 道来自拟南芥叶样品

此外，从图中可见，悬浮细胞与叶片的蛋白质组有很大不同，组蛋白 H3（以及上下其余组蛋白）所占比例明显高于叶片。这与悬浮细胞旺盛的细胞分裂不无关系。

### 8.3.5 拟南芥悬浮细胞 H3 杂交结果

两种杂交系统结果如图 8-6、图 8-7。 $\alpha$ -PS10H3 能识别组蛋白 H3 缬氨酸 10（Serine10）磷酸化，从图 8-6 可见，4 种处理均不同程度磷酸化，其中低温处理磷酸化相对程度稍高于对照，而高温和高盐处理低于对照，高温处理最低。 $\alpha$ -PS10AcK14H3 能识别组蛋白 H3 缬氨酸 10 磷酸化及赖氨酸 14 乙酰化。在某些细胞系，还能识别一种尚未确定的蛋白质（ $\sim 40\text{kDa}$ ）。图 8-7 显示与图 8-6 类似结果，初步表明，高温降低了 H3 磷酸化或乙酰化水平，但其机理和可能的效应尚待进一步研究。

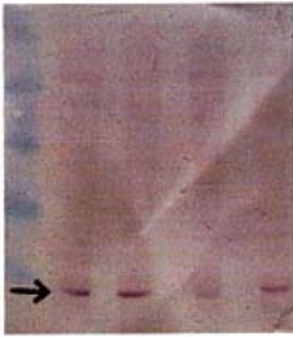


图 8-6  $\alpha$ -PS10H3 为探针杂交结果  
Fig.8-6 Immunoblotting by  $\alpha$ -PS10H3  
注：依次为对照、低温、高温、高盐处理



图 8-7  $\alpha$ -PS10AcK143 为探针杂交结果  
Fig.8-7 Immunoblotting by  $\alpha$ -PS10AcK143  
注：依次为对照、低温、高温、高盐处理

## 8.4 讨论

### 8.4.1 关于 PCR 检测的讨论

PCR 是检测外源基因在植物染色体基因组整合情况基本方法。PCR 检测十分灵敏，所需的 DNA 模板量仅为 10ng 以内，而且用粗提的 DNA 就可得到良好的效果。然而，也正由于 PCR 具有极高灵敏性的缘故，使 PCR 检测结果只能作为成功整合转化子的初筛。因为一旦有极少量农杆菌未去除干净，那么，也可能被 PCR 检出。本研究 PCR 检测结果表明，凡是经 GUS 检测为阳性为转化体，均扩增出目的基因片段。这说明 GUS 组织化学染色作为转化子诊断的依据是比较可靠的。但检测出的 GUS 活性也可能来自农杆菌中的表达，即使是用植物启动子。这一问题可以用内含子插入来解决，使 GUS 活性仅限于转化的植物细胞中而非农杆菌中<sup>[1]</sup>。

### 8.4.2 关于免疫杂交的讨论

蛋白质免疫杂交也是检测外源基因在植物基因组表达的有效方法，关键是要有能够识别蛋白质的合适抗体。一抗探针的质量是影响杂交效果的主要因素之一，只有得到特异性强、效价高的抗体，目的抗原的检出才能达到一定的灵敏度。一抗可以使用由目的蛋白制成的抗血清或单克隆抗体。本研究检测的是 4 种处理的组蛋白 H3 磷酸化和乙酰化，这与转化体检测没有关系，但在预处理条件的摸索上有一定意义。转化体免疫检测可利用本文使用的拟南芥悬浮细胞蛋白质提取、分离和杂交体系。

#### 8.4.3 关于 H 3 修饰的讨论

组蛋白某些特定的氨基酸残基往往被共价修饰,除了乙酰基化、磷酸化,还有甲基化。乙酰基化和甲基化发生在赖氨酸残基的自由基上,磷酸化则发生在丝氨酸的羟基及组氨酸上。这些修饰都会降低组蛋白所携带的正电荷(碱性程度),但正电荷的减少与功能之间的关系尚不明确,但有研究认为,其对染色体的结构有影响,正电荷减少可能暂松弛它们与 DNA 的结合,便于更好地控制核小体的装配。本研究所所在的 PMBE 实验室,正致力于组蛋白修饰的功能的研究,但对拟南芥悬浮细胞尚属首次尝试。

#### 8.5 结论

经过提取 DNA 进行 PCR 分析,结果表明:具有 GUS 活性抗性愈伤组织均扩增出目的基因片段,初步证明,所选择的 74 份抗性愈伤组织已成功地转化。对低温、高温、高盐及对照 4 种处理后的悬浮细胞进行蛋白质抽提,表明悬浮细胞的蛋白质组与叶片的蛋白质组有很大不同;用蛋白质免疫杂交进行分析,表明各处理均不同程度地发生组蛋白 H3 磷酸化及乙酰化,但高温处理降低了磷酸化或乙酰化水平。

## 参考文献

- [1] 闫新浦. 转基因植物. 北京: 科学出版社, 2003
- [2] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术. 北京: 科学出版社, 2003
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002
- [4] Zambrysk P. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regulation capacity [J]. EMBO, 1983, (2): 2143-2150
- [5] 曹仪植. 植物分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 2002
- [6] Dale P J. 转基因植物在农业中的田间释放[J]. 生物技术通报, 1995, (1): 4 - 6.
- [7] Kareiva, Peter. Transgenic plants on trail [J]. Nature, 1993, 363 (17): 580 - 581.
- [8] 王芳琴, 方宜钧. 转基因植物发展现状[J]. 农业生物技术通讯, 1998, (4): 4-6
- [9] 雷茂良, 程金根. 全球转基因植物发展现状[J]. 生物技术通报, 1998, (6): 30-31
- [10] Parsons T J., Sinkar V P. And Stettler R F, et al. Transformation of Poplar by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Biotechnology, 1986, 4 (6): 533-536
- [11] 苏晓华, 张冰玉, 黄烈健等. 转基因林木研究进展[J]. 林业科学研究, 2003, 16 (1): 95-103
- [12] 刘谦、朱鑫泉. 转基因植物的生物安全性. 北京: 科学出版社, 45~53
- [13] 方荣祥. 双抗转基因烟草纯合系的选育及田间试验[J]. 中国科学 (B 辑), 1993, (5): 481-488
- [14] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005.  
[http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press\\_release/briefs34/ESummary/Executive%20Summary%20\(English\).pdf](http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs34/ESummary/Executive%20Summary%20(English).pdf), 2006.
- [15] 贾士荣, 郭三堆, 安道昌. 转基因棉花. 科学出版社, 2001
- [16] James C. 全球转基因作物商品化情况[J]. 生物技术通报, 2000, (1): 45 - 46.
- [17] 翁延年, 张树庸. 国内外生物技术的发展情况简介[J]. 生物工程进展, 1998, 18(5): 5 - 10.
- [18] Veluthambi K., Gupta A.K. and Sharma A. The current status of plant transformation technologies[J]. Current Science. 2003, 84 (3): 368-380
- [19] Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing glucuronidase gene[J]. Plant Mol Biol, 1993, (22): 491~506
- [20] Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas[J]. P. J. J., EMBO J., 1995, (14): 3206-3214
- [21] Stanton B., Gelvin. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool [J]. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 2003, 67 (1): 16-37

- [22] de Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M[J]. *Nature Biotechnol.*, 1998, (16): 839-842
- [23] Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, (98): 1871-1876
- [24] 李卫, 郭光沁, 郑国. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展[J]. *科学通报*, 2000, 45(8): 798-807
- [25] Horsch RB., Fry J. and Hoffman N L., et al. A simple and general method for transferring gene into plants[J]. *Science*, 1985, (227): 1229-1231
- [26] Bechtold N, Ellis J et al. In *Planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *C. R. Acad. Sci.* 1993, (316): 1194-1199
- [28] Antonelli NM., and Stadle J. Genomic DNA can be used action methods for highly efficient transformation of maize protoplasts[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1990, (80): 395-399
- [29] 朱桢, 李向辉, 孙勇如等. 转基因水稻植株再生及外源  $\alpha$ -干扰素 cDNA 的表达[J]. *中国科学 (B 辑)*, 1992, (2): 149-155
- [30] 王颢, 林其谁. 阳离子脂质体介导基因转染的最优化条件[J]. *生命的化学*, 1997, 17(1): 32-34
- [31] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为[J]. *植物学报*, 1999, 41(1): 1-5
- [32] Sanford J. C. et al. Particulate[J]. *Sci. Technol.* 1987, (5): 27-37
- [33] Klein TM., Wolf ED., and Wu R., et al. High-velocity microprojectile for delivering nucleic acid into living cells[J]. *Nature*, 1987, (327): 70-73
- [34] Christou P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment[J]. *Euphytica*, 1995, (85): 13-27
- [35] 许新萍, 卫剑文. 基因枪转化水稻的影响因素[J]. *中山大学学报 自然科学版*, 1998, 37(1): 88-92
- [36] 刘金元, 时香玉, 陈晓等. 利用基因枪技术转化小麦. 玉米的研究[J]. *山东农业科学*, 1999, (2): 5-8
- [37] 董云洲, 段胜军, 赵连元等. 用基因枪转化花粉获得转基因谷子和玉米. *中国农业科学*, 1999, 32
- [38] Toriyama K. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts[J]. *Biotechnology*, 1988, (6): 1072-1074
- [39] 马伯军, 袁妙葆. 一种简便的遗传转化技术在大麦中的应用[J]. *广西植物*, 1998, 18(1): 51-53
- [40] 周光宇, 陈善葆, 黄骏骐. 农业分子育种研究进展[J]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993

- [41] 张宝红,丰小嵘.转基因抗虫棉现状、问题和对策[J]. 作物学报.1998,24 (2) :248-256
- [42] 王光清,王蕴珠等.青菜花粉管通道法导入外源 DNA 的研究初报.1996,23 (2) :127-131
- [43] 周奕华,韩历玲.利用激光微束穿刺法将 GUS 基因导入百脉根并获得转基因植株的研究[J].激光生物学报,1998,(7):1 57
- [44] 李恩义.多聚阳离子基因导入法. 上海农业科技,1999,18,10
- [45] 贾士荣,曹冬孙. 转基因植物[J]. 植物学通报, 1992, (9):3-15
- [46] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998
- [47] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. Annu. Rev Plant Physiol Plant MolBiol , 2000 ,51 : 223~256
- [48] Paul J J , et al[J]. Plant Molecular Biology, 1992, (19): 15-38.
- [49] Zambryski P A., Depicker A., and Kruger K, et al. Tumor introduction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the Boundaries of T-DNA[J] .Mol Appl Genet ,1982 , (1) :361-3701
- [50] 陶 均, 李玲. 农杆菌转化的分子生物学[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (6): 639-644
- [51] Tzfira T. andCitovsky V. From host recognition to T-DNA integration: The function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction[J]. *Mol Plant Pathol* 2000. (1): 201-212
- [52] Zhan YaGuang , Zeng FanSuo , Xin Ying. Progress on Molecular Mechanism of T-DNA Transport and Integration[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32 (6) : 655-665
- [53] Ballas, N., and V. Citovsky. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997,94:10723-10728
- [54] Baron, C., N. Domke, M. Beinhofer, and S. Hapfelmeier. Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. J. Bacteriol. 2001,183:6852-6861
- [55] Chen, C.-Y., L. Wang, and S. C. Winans. Characterization of the supervirulentvirG gene of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiBo542. Mol. Gen. Genet. 1991,230:302-309
- [56] Groot M J A , Bundock P, Hooykaas P J J , et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat Bio techno., 1998, 9(16): 839-842.
- [57] 李立等. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展[J].科学通报,2000,45(8): 799-800.
- [58] Bevan, M., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 8711-8721.
- [59] Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D., *J. Bacteriol.*, 1986, 168, 1291-1301.

- [60] Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A., *Transgenic Res.*, 1993, 2, 208–218.
- [61] Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K. and Hinata, K., *Plant Cell Rep.*, 1996, 15, 727–730.
- [62] Cheng, M. *et al.*, *Plant Physiol.*, 1997, 115, 971–980.
- [63] Tingay, S., Mc Elroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. and Brettel, R., *Plant J.*, 1997, 11, 1369–1376.
- [64] Torisky, R. S., Kovacs, L., Avdiushko, A., Newman, J. D., Hunt, A. G. and Collins, G. B., *Plant Cell Rep.*, 1997, 17, 102–108.
- [65] Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T.[J]. *Plant J.*, 1994, 6, 271–282.
- [66] Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I. *Science*, 2000, 287, 303–305.
- [67] Mirkovitch J , Mirault M E , Laemmli U K, 1984. Organization of the higher-order chromatin loop : a specific DNA attachment sites on nuclear scaffold[J]. *Cell* , 939) : 223~23
- [68] Allen, G. C., G. E. Hall, L. C. Childs, A. K. Weissinger, S. Spiker, and W. F. Thompson. 1993. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell* 5:603–613
- [69] Allen, G. C., G. E. Hall, S. Michalowski, W. Newman, S. Spiker, A. K. Weissinger, and W. F. Thompson. 1996. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* 8:899–913.
- [70] Allen, G. C., S. Spiker, and W. F. Thompson. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* 2000, 43:361–376
- [71] Allen, G. C., Hall, G., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K. and Thompson, W. F., *Plant Cell*, 1996, 8, 899–913
- [72] Endo S, Sugita K, Sakai M, Tanaka H, Ebinuma H. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system [J]. *Plant J*, 2002, 30(1):115-122
- [73] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (6):2117-2121
- [74] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000(51):223~256
- [75] Hiei Y, komari T, Kubo T, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Mol Biol*. 1997, (35): 205~218
- [76] Nam J, Matthysse AG, Gelvin SB. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T2DNA integration. *Plant Cell* , 1997, 9: 317~333

- [77] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000,(51):223~256
- [78] 李卫, 董文, 周非等. 参与在农杆菌介导的遗传转化过程中的植物因子研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, 23 (12): 62-67
- [79] 赵文锋, 杨清, 陈敏. 影响T-DNA 转移的寄主植物细胞因子, 植物生理学通讯, 2004 , 8(4) :521-5264
- [80] Tzfira T, Citovsky V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol Plant Pathol*, 2000,1:201~212
- [81] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000,51:223~256
- [82] Paulsson M, Wadstrom T. Vitronectin and type-I collagen binding by *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative streptococci[J]. *FEMS Microbiol Immunol*, 1990,(65): 55~62
- [83] Wagner VT, Matthysse AG. Involvement of vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells[J]. *J Bacteriol*, 1992,(174):5999~6003
- [84] Swart S, Logman TJJ, Smit G et al. Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin an attachment protein of *Rhizobiaceae*[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, (24): 171~183
- [85] Nam J, Mysore KS, Zheng C et al. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*[J]. *Mol Gen Genet*, 1999,(261):429~438
- [86] Stachel SE, Messens E, Van Montagu M et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature*, 1986,(318):624~629
- [87] Jin SG, Roitsch T, Ankenbauer RG et al. The Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *Vir* gene regulation[J]. *J Bacteriol*, 1990,(172):525~530
- [88] Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990,(87):6708~6712
- [89] Zhang J, Boone L, Kocz R et al. At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation[J]. *Chem Biol*, 2000,(7): 611~621

- [90] Howard EA, Citovsky V. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex[J]. Bioessays, 1990,(12):103~108
- [91] Citovsky V, Warnick D, Zambryski P. Nuclear import of *Agrobacterium* Vir D2 and Vir E2 proteins in maize and tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,(91):3210~3214
- [92] Zupan J, Citovsky V, Zambryski P. *Agrobacterium* Vir E2 protein mediates nuclear uptake of ssDNA in plant cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996,(3):2392~2397
- [93] Ballas N, Citovsky V. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,(94): 10723~10728
- [94] Zhu Y, Nam J, Humara JM et al. Identification of *Arabidopsis* rat mutants[J]. Plant Physiol, 2003,(132):494~505
- [95] Tzifira T, Citovsky V. VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with *Agrobacterium* Vir E2, is involved in Vir E2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. EMBO J, 2001,(20):3596~3607
- [96] Ziemienowicz A, Tinland B, Bryant J et al. Plant enzymes but not *Agrobacterium* Vir D2 mediate T-DNA ligation in vitro[J]. Mol Cell Biol, 2000,(20): 6317~6322
- [97] Bravo-Angel AM, Gloeckler V, Hohn B et al. Bacterial conjugation protein MobA mediates integration of complex DNA structures into plant cell[J]. J Bacteriol, 1999, (181): 5758~5765
- [98] Villemont E, Dubois F, Sangwan RS et al. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium* mediated genetic transformation of petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer[J]. Planta, 1997,(201):160~172
- [99] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000,(51):223~256
- [100] Nam J, Matthyse AG, Gelvin SB. Difference in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration[J]. Plant Cell, 1997,(9): 317~333
- [101] Nam J, Mysore KS, Zheng C et al. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*[J]. Mol Gen Genet, 1999,(261):429~438
- [102] Yi H, Mysore KS, Gelvin SB et al. Expression of the *Arabidopsis* histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation[J]. Plant J, 2002, (32):285~298

- [103] Greveling C, Fantes V, Kemper E et al. Single-copy T-DNA insertion in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics whereas multiple insertions are formed in leaf discs[J]. *Plant Mol Biol*, 1993,(23): 847~860
- [104] Aldemita, R. R. and Hodges, T. K., *Planta*, 1996, 199, 612~617.
- [105] Sarma, K. S., Sunilkumar, G., Balamani, V. and Veluthambi, K., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1995, 13, 377~382.
- [106] Sunilkumar, G., Vijayachandra, K. and Veluthambi, K., *Plant Sci.*, 1999, 141, 51~58.
- [107] 吴乃虎. 基因工程原理 (上、下册). 第2版, 科学出版社, 1998
- [108] Ebinuma H, Sugita K, Yamakado M. Selection of Marker - free Transgenic Plants Using the Isopentenyl Transferase Gene [ J ] . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,(94) :2117-2121
- [109] Haldrup A ,Petersen SG, Okkels FT. Positive Selection :A Plant Selection Principle Based on Xylose Isomerase , an Enzyme Used in the Food Industry[J ] . *Plant Cell Rep* ,1998 ,(18) :76-81
- [110] Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J ,et al . Analysis of Mannose Selection Used for Transformation of Sugar Beet [ J ] . *Mol Breed* ,1998 ,(4) :111-117
- [111] Reiner. Genes for Ribitol and D - arabitol Catabolism in *Escherichia Coli* :Their Loci in C Strains and Absence in K- 12 and B Strains[J ] . *Bacteriol* ,1975 ,(123) :530-536
- [112] La Fayette P R ,Parrott WA. A Non - antibiotic Marker for a Multiplication of Plant Transformation Vectors in *E. coli* [ J ] . *Plant Cell Rep* . 2001 ,(20) :338-342
- [113] Gough KC , Hawes WS , Kilpatrick J ,et al . Cyanobacterial GR6 Glutamate - 1 - semialdehyde aminotransferase : a Novel Enzyme-based selectable marker for plant transformation[J ] . *Plant Cell Rep* ,2001 ,(20) :296-300
- [114] Ebinuma H,, Sugita K., and Matsunaga E., et al. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, (94): 2117-2121
- [115] Endo S., Kasahara T. and Sugita K., et al. The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* C. V. Petite Havana SRI) [J]. *Plant Cell. Rep.*, 2001, (20): 60-66
- [116] Okkels F T., Ward J., and Joersbo M. Synthesis of cytokinin glucuronides for the selection of transgenic plant cells[J]. *Phytochem.*, 1997,( 46): 801-804
- [117] Yutaka Sato , Masanori Tamaoki , Taka Murakami , et al . Abnormal cell divisions in leaf primordia caused by the expression of the rice homeobox gene *osH1* lead to altered morphology of leaves in transgenic tobacco[J ] . *Molecular Genetics and Genomics* , 1996 ,251 (1) :13 -22.

- [118] Pedersen C , Zimny J ; Becker D , et al . Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley , wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization[J]. *Theoretical and Applied Genetics* , 1997 ,94(6-7) :749 - 757.
- [119] Giovanna M, Paolo P, Anna M V, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real - time PCR[J]. *BioMed Central Biotechnology*, 2002, 2 (1): 20
- [120] Prins M, Goldach R. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants[J]. *Arch Virology* , 1996 ,(141) :2259-2276.
- [121] Stam M, Mol J N M, Kooter J M. The silence of genes in transgenic plants[J]. *Annals of Botany* , 1997 ,79(1) :3-12.
- [122] Ratcliff F G, MacFarlane S A , Baulcombe D C. Gene silencing without DNA:RNA2mediated cross2protection between viruses[J]. *Plant Cell*, 1999, (11): 1207-1215.
- [123] Waterhouse PM, Smith N A , Wang MB. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger[J]. *Trends Plant Sci*, 1998 ,(4) : 452-457.
- [124] Inge Ibrecht I L, Irvine J E , Mirlov T E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane :dissecting of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome[J]. *Plant Physiol* , 1998 ,(119) :1187-1188.
- [125] Pinto YM, Kok R A , Baulcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus(RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. *Nat Biotechnol* , 1998 ,(17) :702-707.
- [126] Heut H, Mahendra S, Wang J *et al* . Near immunity to rice tungro spherical virus achieved in rice by a replicase-mediated resistance strategy[J]. *Phytopathol* , 1998 ,(89) :1022-1027.
- [127] Baulcombe D C. Gene silencing :RNA makes RNA no protein[J]. *Current Biology* , 1998 ,(9) :599-601.
- [128] Voinnet O , Vain P , Angel S *et al* . Systemic spread of sequence2specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA[J]. *Cell* , 1998 ,(95) :177-187.
- [129] Voinnet O , Lederer C , Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Cell*, 2000, (103): 157-167.
- [130] Spencer TM, Gordon- Kamm WJ , Daines R J , Daines R J , Start W G, Lemaux P G. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, (79) : 625-631

- [131] 朱莉,张春义,范云天. 转基因植物中外源基因沉默机制的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (2): 102-104
- [132] Yader J , Goldsbrough A P. Transformation systems for generation maker-free transgenic plants[J]. *Bio/ Technol*, 1994 , (12) : 263-267
- [133] Chistor P , Swain W F. Cotransformation frequencies of foreigen gene in soybean cell cultures[J]. *Theor Appl Genet* , 1990 ,( 79) : 337-347
- [134] Schocher R J , Shillito R D , Saul M W, Paszkowski J , Dotrykus I. Co-transformation of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer[J]. *Bio Technology* , 1986 , (4) : 1093-1096
- [135] Cooley J , Ford T , Christou P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electic-discharge particle acceleration[J]. *Thero Appl Genet* , 1995 ,( 90 ):97-100
- [136] Morel, J. B., Mourrain, P., Beclin, C. and Vaucheret, H., *Curr.Biol.*, 2000, 10, 1591-1594.
- [137] Fagard, M. and Vaucheret, H., *Plant Mol. Biol.*, 2000, 43, 285-293.
- [138] Bode J , Kohwi Y, Dickinson L , Jeh T , Klehr D , Mielle C , Kohwi-Shi G T. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associated DNA[J]. *Science* , 1992 ,( 255 ): 195-197
- [139] Mlynaroval , Loonen A , Heldens J , Jansen R C , Keizer P , Stre Kema WJ , Nap J P. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region[J]. *Plant Cell* , 1994 ,( 6) : 417-426
- [140] 苏金, Targolli J , 吴乃虎,吴瑞. 在转基因植株中实现外源基因最佳表达的途径[J]. 生物工程进展, 1999, 19 (4): 3-6
- [141] Han K H , Stauss S H. Matrix attachment regions(MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in polar[J].*Transgenic Res* , 1997 ,( 6) : 415~420
- [142] Spiker S , Thompson W F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants[J]. *Plant Physiol*, 1996 ,( 110) : 15-21
- [143] Lichtensten M, Kein G G, Cendar H. Bcell specific demethlation :anovel role for the introni c k chain enhance sequence[J]. *Cell* , 1994 ,(6) : 913-923
- [144] Albert H , Dale E C , Lee E , Oll D W. Site- specific integration of DNA into wildtype and mutant lox sites placed in the plant genome[J]. *Plant J*, 1995 , 7 (4) : 649-659
- [145] Vergunst A C , Hooykass P J. Cre/ lox - mediated sitespecific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of *cre*[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, (38 ): 393-406

- [146] Finnegan J , McElroy D. Transgene inactivation[J]. plant fight back. *Bio Technology* , 1994 , (12) : 883~888
- [147] Matzke M A., Wette M F., and Matzke A J M. Transgenic silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2000, (43): 401~415
- [148] Anandalakshmi R ,Pruss GJ ,Ge X *et al* . A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 , (95 ):13079~13084.
- [149] Ding S W. RNA Silencing. *Curr Opin Biotechnol* ,2000 , 11 :152~156.
- [150] Jan F J ,Fagoaga C ,Pang S Z *et al* . A single chimeric transgene derived from two distinct virus confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing[J]. *J Gen Virology* ,2000 ,(81) :2102~2109
- [151] Mikkelsen T R. The risk of crop transgene spread[J] . *Nature*, 1996 , 380(7) :31
- [152] 程志强,陈旭君等. 转基因植物中抗性基因的安全性评价[J] . *生命科学*, 2002 , 14(1): 14~16
- [153] 王中华,夏英武. 转基因植物中报告基因GUS 的表达及其安全性评价[J] . *生命科学*, 2000 , 12 (5) :207-209
- [154] Joersbo M,Donaldson I ,Kreiberg J ,et al . Analysis of Mannose Selection Used for Transformation of Sugar Beet [J] . *Mol Breed* ,1998 ,(4) :111-117
- [155] La Fayette P R , Parrott WA. A Non - antibiotic Marker for a Mplication of Plant Transformation Vectors in E. coli [J] . *Plant Cell Rep.* 2001 , (20):338-342
- [156] Ebinuma H ,Sugita K,Matsunaga E ,et al . Selection of Marker – free Transgenic Plants Using the Oncogenes ( IPT ,ROLA ,B ,C)of *Agrobacterium* as Selectable Markers[J] .*Molecular Biology of Woody Plants*. (2000):24-26
- [157] Dale E C, Ow D W. Gene Transfer with Subsequent Removal of the Selection Gene from the Host Genome [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 ,23 ,10558-10562
- [158] 吕慧涓, 龚祖坝.转基因植物中标记基因的剔除[J].*植物生理与分子生物学报*, 2004, 30 (2) : 121-126
- [159] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. *Plant J.*1996, (10): 165-174
- [160] Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX, Upadhyaya NM. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors[J]. *Aust J Plant Physiol*, 2001, (28): 241-248

- [161] Zuo J, Niu QW, Moller SG, Chua NH. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. *Biotechnol*, 2001, 19(2):157-161
- [162] Corneille S, Lutz K, Svab Z, Maliga P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system[J]. *Plant J*, 2001, 27(2):171-178
- [163] 贾士荣. 转基因植物的环境及食品安全性[J]. *生物工程进展*, 1997, 17(6): 37-42.
- [164] Jorgenson R. Spontaneous hybridization between oilseed rape and weed *Brassica campestris*: a risk of growing genetically engineered modified oilseed rape[J]. *American Journal of Botany*, 1995, (81):1620 - 1626.
- [165] 莽克强. 转基因植物的生物安全性的商榷[J]. *生物工程进展*, 1996, 16(4): 2 - 6.
- [166] Donegan K K. Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms[J]. *Recent Res. Dev. Microbiol*, 1999, (3):415 - 424.
- [167] WHO. Health Aspects of Marker Genes in Genetically Modified Plants[R]. 1993. 1-32
- [168] Zambryski P A ,Depicker A , Kruger K, et al . Tumor introduction by *Agrobacterium Tumefaciens* : Analysis of the Boundaries of T-DNA[J] .*Mol Appl Genet* ,1982 , (1):361-370
- [169] 李书国. 转基因食品及其安全性研究进展[J]. *食品工业*, 2001, (2): 20 - 23.
- [170] Koskella J . Microbial utilization of free and clay - bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes[J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9):3561 - 3568.
- [171] Prykus I. Gene transfer to plants assessment of published approaches and results[J] . *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 1991, (12):205 - 225.
- [172] Calgene, Inc. Request for advisory opinion - kan<sup>r</sup> gene: safety and use in the production of genetically engineered plants [Z] .FDA Docket Number 1990 , 90A - 0416
- [173] Fuchs R L. Safety Assessment of the Neomycin Phosphotransferase H (NPTII) protein[J] . *Bio Technology*, 1993 ,(11):1543 - 1547
- [174] 曹植仪.拟南芥.北京: 高等教育出版社, 2004: □-□, 45-66
- [175] Meyerowitz E M, and Pruitt R E, *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics[J]. *Science*. 1985, (229):1214-1218
- [176] 初立业, 邵宏波, 曲德业. 拟南芥的核基因组研究, *生命科学*, 1994, 6 (4): 16-18
- [177] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册). 北京: 科学出版社, 1972
- [178] 王绍明, 李学禹. 中国拟南芥属植物种质资源及其地理分布[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2001, 5 (2): 102-108

- [179] David W. Meinke. *Arabidopsis thaliana*: A Model plant for Genome Analysis[J]. Science, 1998, 282 (5389): 662-682.
- [180] 孟金陵. 拟南芥及其分子生物学研究. [J] 遗传, 1995, 17 (增刊): 41-45
- [181] Meinke D W, Cherry J M, Dean C, et al. *A rabidopsis thaliana* :A model plant for genome analysis[J]. Science, 1998, 282 :662~682.
- [182] 陈璋. 拟南芥:植物分子生物学的模式物种. 植物学通报, 1994, 11 (1) :6~11
- [183] 樊妙姬. 拟南芥的分子遗传学研究概况[J]. 遗传, 1992, 14 (3) :40~42
- [184] 黄娟, 李家洋. 拟南芥基因组研究进展. 微生物学通报, 2001, 28, (3) :99~101
- [185] Meyerowitz E M, and Pruitt R E, *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics[J]. Science. 1985, (229):1214-1218
- [186] Pruitt R E, and Meyerowitz E M, Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol. Biol., 1986, (187):169-183
- [187] Gibeaut D.M., Hulett J., and Cramer G.R. et al. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions[J]. Plant Physiol. 1997, (115):317-319
- [188] Weigel D and Glazebrook J. *Arabidopsis*-A Laboratory Manual. New York: Gold Spring Harbor Laboratory, 2002
- [189] 陈敏, 白书农. 拟南芥培养经验点滴. 植物生理学通讯, 1995, 31:436~438
- [190] 韩玉珍, 李睿, 孟繁静. 拟南芥开花的光周期调节. 植物生理学通讯, 1998, 34:401~406
- [191] 李俊华, 张艳春, 徐云远等. 拟南芥室内培养技术. 植物学通报, 2004, 21 (2) :201~204
- [192] 厉秀茹. 拟南芥胚愈伤组织诱导和植株再生. 植物生理学通讯, 1998, 34 (2): 122
- [193] Andrew F. Bent. *Arabidopsis* in planta transformation. Use, mechanisms and prospects for transformation of other species[J]. Plant Physiology, 2000, 10 (124): 1540-1547
- [194] Hai Huang, Hong Ma. An improved procedure for transformation *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta) root explant [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1992, 10 (4): 372-383
- [195] 黄欣, 周一兵, 尤瑞麟. 拟南芥菜离体培养中愈伤组织的诱导和植株再生的初步研究[J]. 西北植物学报, 1994, 14 (2): 91-96
- [196] Glab N, Labidi B, and Qin LX. et al. Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. FEBS Letters, 1994, (353) :207-211.
- [197] 巩振辉, Milner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法—真空渗入法的研究, 西北植物学报[J] 1996. 16 (3) :277-283

- [198] Clough S.J., and Bent A. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. 1998, Plant J. (16): 735-743
- [199] 徐芳, 熊爱生, 彭日荷等. 植物遗传转化的新方法: Floral Dip. 中国蔬菜, 2005 (3): 29-31
- [200] Richard C, Granier C, and Inzé D et al. Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(361):1625-1633
- [201] Forreiter C, Kirschner M, and Nover L. Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*[J]. The Plant Cell, 1997, (9): 2171-2181
- [202] 陆晓春, 薛庆中. 插入诱变在拟南芥基因克隆中的应用. 中国生物工程杂志, 2002, 22 (4): 66-69
- [203] Walbot V. Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1992, (43): 49-82
- [204] Bancroft I. Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*[J]. Mol. Gen. Genet., 1992, (233): 449~461. 167
- [205] Krysan P.J., Young J.C., and Sussman M.R. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell. 1999, (11): 2283-2290
- [206] Weigel D and Glazebrook J. *Arabidopsis-A Laboratory Manual*. New York: Gold Spring Harbor Laboratory, 2002
- [207] Encina CL, Constantin M and Botella J. An Easy and Reliable Method for Establishment and Maintenance of Leaf and Root Cell Cultures of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, (19): 245-248
- [208] Baskin J M, and Baskin C C. Ecological life cycle and physiological ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*[J]. Can. J. Bot. 50:353-363
- [209] Ikeda-Iwai M, Satoh S, and Kamada H. Establishment of a reproducible tissue culture system or the induction of *Arabidopsis* somatic embryos[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 1575-1580
- [210] Ford K G. Plant regeneration from *Arabidopsis thaliana* protoplasts[J]. Plant Cell Rep. 1990, 8, 534-537
- [211] Martinez-Zapater J M and Salinas J. Methods in Molecular Biology: *Arabidopsis* Protocols. Totowa: Humana Press, 1998: 27-34

- [212] Gleddie S. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* Heynh[J]. Plant Cell Rep 1989, (8) : 1-5
- [213] Forreiter C, Kirschner M, and Nover L. Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*[J]. The Plant Cell, 1997, 9: 2171-2181
- [213] Gibeaut D M, Hulett J, and Seemann J R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions[J]. Plant Physiol, 1997, (115): 317-319
- [214] King P J. Induction and maintenance of cell suspension cultures. In: Vasil I K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants[J]. New York: Academic Press, 1984: 130-138.
- [215] Martinez-Zapater J M and Salinas J. Methods in Molecular Biology: *Arabidopsis* Protocols[J]. Totowa: Humana Press, 1998: 27-34
- [216] Richard C, Granier C, and Inzé D et al. Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(361): 1625-1633
- [217] Ven den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, et al. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells[J]. Plant Mol Biol, 1985, 5: 299-302
- [218] Blochlinger K and Diggelmann H. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eukaryotic cells [J]. Mol Cel Biol, 1984, 4: 2929-2931
- [219] 奚亚军, 范学科, 侯文胜, 等. 小麦遗传转化中潮霉素适宜筛选浓度的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 1
- [220] 周玲艳, 姜大刚, 吴豪, 等. 潮霉素和 PPT 对水稻愈伤组织筛选效果的比较[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 2
- [221] 王节之, 郝晓芬, 郑向阳, 等. 谷子潮霉素抗性浓度的筛选与研究[J]. 华北农学报, 1999, 4
- [222] 岳建雄, 张慧军, 张炼辉. 以对潮霉素抗性为筛选标记的棉花遗传转化[J]. 棉花学报, 2002, 4
- [223] 梁海曼, 周菊华, 试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨, 武汉植物学研究[J], 1994, 3 (8): 281-288
- [224] 高疆生, 张卫芳, 段黄金等, 克服香石竹试管苗玻璃化研究[J], 北方园艺, 2001, (3): 34-36

- [225] Tsong-Ann Yu, Shyi-Dong Yeh, and Jiu-Sherng Yang. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya[J]. Bot. Bull. Acad. Sin. 2001, (42): 281-286
- [226] 曾建军, 孙敏, 肖璇等, 4种抗生素对菰蓝外植体生长的影响[J], 西南师范大学学报(自然科学版), 2003, 28(6): 987-990]
- [227] 王萍, 王罡, 吴颖, 抗生素对大豆未成熟子叶愈伤形成和体细胞胚胎发生的影响[J], 中国油料作物学报, 2003, 25(1)
- [228] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学, 湖南科技出版社, 1998
- [229] Karen G.F. Plant regeneration from *Arabidopsis thaliana* protoplasts[J]. Plant .Cell Rep. 1990, 8, 534-537
- [230] Ribeiro R.C.S., Jekkel Z., Mulligan B.J., et.al. Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Science. 1996, 115, 115-121
- [231] Bachiri Y, Bajon C., Sauvanet A., Gazeau C., and Morisset C. Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension: Protoplasma, 2000: 227-243
- [232] 胡明珏, 王君晖, 拟南芥悬浮细胞系的玻璃化法超低温保存, 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 81-84
- [233] 胡明珏, 拟南芥悬浮细胞超低温保存及脱落酸在胁迫信号转导途径中的作用研究, 浙江大学硕士学位论文, 导师: 王君晖, 2006. 6
- [234] Spiker S. and Thompson W.F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants[J]. Plant Physiol., 1996, (100): 520-527
- [235] Veluthambi K., Gupta A. K. and Sharma A. The current status of plant transformation technologies[J]. CURRENT SCIENCE, 2003, 84(3): 368-380
- [236] Bruce W., Folkerts O. and Garnat C., et al. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P[J]. Plant cell, 2000, (12): 65-80
- [237] Gallego M E., Sirand-Pugnet P. and White C.I. Positive-negative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation. Plant Molecular Biology, 1999, 39:83-93
- [238] Frederick M A. *Arabidopsis* Genome: A milestaone in plant biology [J]. Plant Physical, 2000, 124: 1451-1454

## 附录

## 附录 A GUS 基因表达框全序列

ttagcttcat  
 ggagtcaaag attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaagactg gcgaacagtt  
 catacagagt ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tgggtggagca  
 cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat  
 tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat  
 ctgtcacttt atttgtgaaga tagtgaaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg  
 cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc  
 cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt  
 ggattgatgt gatatactcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca  
 agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agaacacggg ggactcttga  
 c  
 catggtagat ctgactagtt tacgtcctgt agaaacccca acccgtgaaa tcaaaaaact  
 cgacggcctg tgggcattca gtatggatcg cgaaaactgt ggaattgatc agcgttggtg  
 gaaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt  
 cgccgatgca gatattcgta attatgcggg caacgtctgg tatcagcgcg aagctttat  
 accgaaaggt tgggcaggcc agcgtatcgt gctgcgttcc gatgcggtca ctcttacgg  
 caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgat ggagcatcag ggcggctata cgccatttga  
 agccgatgtc acgccgtatg ttattgccgg gaaaagtgt cgtatcacccg tttgtgtgaa  
 caacgaactg aactggcaga ctatcccgcc gggaatgtg attaccgacg aaaacggcaa  
 gaaaaagcag tcttacttcc atgatttctt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat  
 gctctacacc acgccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtgtgacgc atgtcgcgca  
 agactgtaac cacgcgtctg ttgactggca ggtgggtggc aatgggtgatg tcagcgttga  
 actgcgtgat gcggatcaac aggtggttgc aactggacaa ggactagcg ggactttgca  
 agtgggtgaat ccgcacctct ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac tgtgcgtcac  
 agccaaaagc cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc ggtcagtggc  
 agtgaagggc caacagttcc tgattaacca caaaccttc tactttactg gctttggtcg  
 tcatgaagat gcggacttac gtggcaaagg attcgataac gtgctgatgg tgcacgacca  
 cgcattaatg gactggattg gggccaactc ctacogtacc tgcattacc cttacgtga  
 agagatgctc gactgggcag atgaacatgg catcgtgggtg attgatgaaa ctgctgctgt  
 cggctttcag ctgtctttag gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgta  
 cagcgaagag gcagtcacg gggaaactca gcaagcgac ttacaggcga ttaaagagct  
 gatagcgcgt gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcca acgaaccgga  
 taccgcctcg caaggtgcac gggaatattt cgcgccactg gcggaagcaa cgcgtaaact  
 cgacccgacg cgtccgatca cctgcgtcaa tgtaatgttc tgcgacgctc acaccgatac  
 catcagcgat ctctttgatg tgctgtgcct gaaccgttat tacggatggg atgtccaaag  
 cggcgatttg gaaacggcag agaaggtact ggaaaaagaa cttctggcct ggcaggagaa  
 actgcatcag ccgattatca tcaccgaata cggcgtggat acgttagccg ggctgcactc  
 aatgtacacc gacatgtgga gtgaagagta tcagtgtgca tggctggata tgtatcacccg

cgtctttgat cgcgtcagcg ccgtcgtcgg tgaacaggta tggaatttcg ccgattttgc  
 gacctcgcaa ggcatattgc gcgttggcgg taacaagaaa gggatcttca ctgcgcaccg  
 caaaccgaag tcggcggctt ttctgctgca aaaacgctgg actggcatga acttcggtga  
 aaaaccgcag cagggaggca aacaagctag taaaggagaa gaacttttca ctggagtgtg  
 cccaattctt gttgaattag atggtgatgt taatgggcac aaattttctg tcagtggaga  
 ggggaaggt gatgcaacat acggaaaact tacccttaaa tttatttgca ctactggaaa  
 actacctgtt ccgtggccaa cacttgtcac tactttctct tatgggtgtc aatgcttttc  
 aagataccca gatcatatga agcggcacga cttcttcaag agcgccatgc ctgagggata  
 cgtgcaggag aggaccatct tcttcaagga cgacgggaac tacaagacac gtgctgaagt  
 caagtttgag ggagacaccc tcgtcaacag gatcgagctt aagggaatcg atttcaagga  
 ggacggaaac atcctcggcc acaagttgga atacaactac aactccaca acgtatacat  
 catggccgac aagcaaaaga acggcatcaa agccaacttc aagaccgcc acaacatcga  
 agacggcggc gtgcaactcg ctgatcatta tcaacaaaat actccaattg gcgatggccc  
 tgcctttta ccagacaacc attacctgtc cacacaatct gccctttcga aagatcccaa  
 cgaaaagaga gaccacatgg tccttcttga gtttgtaaca gctgctggga ttacacatgg  
 catggatgaa ctatacaaag ctagccacca ccaccaccac cacgtgtgaa ttggtgacca

注：下划线斜体部分为引物序列。

## 附录 B SAR 序列

1 tcgattaaaa atcccaatta tatttgggtct aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt  
 61 cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt tttatatata tgcotttaag actttttata  
 121 gaattttctt taaaaaatat ctagaatat ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt  
 181 taaatatgaa gtgctccatt tttattaact ttaaataatt ggttgtaga tcaactttctt  
 241 atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct  
 301 atcaaaatc ttatatatct ttttcgaatt tgaagtgaat tttcgataat ttaaaattaa  
 361 atagaacata tcattattta ggtatcatat tgatttttat acttaattac taaatttggt  
 421 taactttgaa agtgtagatc aacgaaaaat tagtcaaagc actaaaataa ataaatatca  
 481 tgtgttatta agaaaattct cctataagaa tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa  
 541 aattaatttt tactaacaca tatatttact tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa  
 601 taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga aaatgctgaa aaccggcaa aaccgaacca  
 661 atccaaaccg atatagttgg ttgggttga ttttgatata aaccgaacca actcgggtcca  
 721 tttgcacccc taatcataat agctttaata tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca  
 781 atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag  
 841 cagctcgatg tgggtgtaat atgtaattta cttgattcta aaaaaatc ccaagtatta  
 901 ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac gatttacagc aaagccagaa tacaagaac  
 961 cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga aggaacaaat atttttaaaa aaatcgcga  
 1021 tgacttgga caaaagaaag tgatatattt tttgttctta aacaagcatc cctcctaaag  
 1081 aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt atgctccctt cgttacaaaa attttgact  
 1141 actattggga acttctcttg aaaatagt

注：下划线斜体部分为引物序列。

## 附录 C 攻读学位期间主要的学术成果

## 1) 参加项目课题

| 序号 | 项目、课题名称(下达编号)                                                  | 项目课题来源<br>属何种项目  | 起讫时间                | 经费<br>(万元)   | 本人承担任务   | 进展情况 |
|----|----------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|--------------|----------|------|
| 1  | 枣花药雄核发育诱导及单倍体种质材料的建成, (02JJY4017)                              | 湖南省自然科学基金项目      | 2003.01~<br>2004.12 | 2.0          | 主持       | 结题   |
| 2  | 湘西坡耕地经济林生态种植模式的研究 (03A056)                                     | 湖南省教育厅<br>重点项目   | 2004.01~<br>2006.12 | 6.0          | 主持       | 进行中  |
| 3  | 枣花药培养雄核发育诱导条件的研究 (0463 项)                                      | 校青年科技基金<br>重点项目  | 2002.07~<br>2004.07 | 1.5          | 主持       | 结题   |
| 4  | 油茶雄核发育途径及其机理 (30471418)                                        | 国家自然科学基金<br>基金项目 | 2005.01~<br>2005.12 | 8.0          | 第二       | 结题   |
| 5  | 湖南枣树优良品种脱毒苗快繁技术体系的建立[湘林科外(2002)25 号]                           | 湖南省林业厅           | 2003.01~<br>2005.12 | 2.0          | 第二       | 结题   |
| 6  | 榉树优良无性系培育及其快速繁殖技术研究(湘农综[2003]14 号)                             | 湖南省农发办           | 2004.01-<br>2006.12 | 16.0         | 主要<br>参加 | 进行中  |
| 7  | Transformation of <i>Arabidopsis thaliana</i> suspension cells | PMBE (自选)        | 2004.11-<br>2005.10 | 10.0<br>(折合) | 实施       | 完成   |

## 2) 发表论文(第一作者)

| 序号 | 论文作者          | 论文题目                   | 期刊名称       | 发表时间        |
|----|---------------|------------------------|------------|-------------|
| 1  | 李建安, 胡芳名, 谭晓风 | 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对潮霉素的反应   | 中南林业科技大学学报 | 2006, 26(3) |
| 2  | 李建安, 胡芳名      | 拟南芥悬浮细胞生长特性及其继代培养条件    | 经济林研究      | 2006, 24(2) |
| 3  | 李建安, 张日清等     | 油茶两物种花药培养愈伤组织诱导试验      | 经济林研究      | 2003, 21(4) |
| 4  | 李建安, 胡芳名, 谭晓风 | 花药(花粉)培养及其在经济林品种改良中的应用 | 经济林研究      | 2002, 20(4) |

## 3) 出版专著

| 序号 | 专著名称                 | 出版时间 | 出版单位    | 著作字数<br>(万字) | 作者名次   |
|----|----------------------|------|---------|--------------|--------|
| 1  | 中国主要树种栽培技术           | 2005 | 中国林业出版社 | 110          | 编写 1 章 |
| 2  | 经济林栽培学(教育部“十一五”规划教材) | 2004 | 中国林业出版社 | 50           | 编写 4 章 |
| 3  | 经济林栽培学(第二版)          | 2004 | 中国林业出版社 | 60           | 编写 2 章 |

## 致 谢

本论文是在导师胡芳名教授、谭晓风教授的悉心指导下完成的。衷心感谢他们多年来的谆谆教诲和深切关怀。胡先生是开学科先河之大家，一生专于林学，传业授道，桃李满天，是我人生和事业上敬仰的丰碑。有幸成为他的弟子，受其广博才学之恩泽、儒深思想之熏陶、高尚人格之感染，学生倍感荣幸并十分珍惜。在此，谨向他表示崇高的敬意和衷心的感谢，并祝愿他健康长寿！谭晓风教授以其渊博的专业知识和严谨的治学态度，对我的博士论文从选题到定稿，给予了热情的指导，使我终身受益。

感谢华沙大学植物分子生物学实验室 Andrzej Jerzmanowski 教授，他为我这位来自东方的学子，提供了极好的实验研究条件，并做了周到的安排，体现了一位国际知名学者的博大胸怀，使我能够在短短的一年间，顺利地完成本文的全部实验研究工作。特别要感谢该实验室 Agnieszka Sokół 博士，她以精湛的实验技能和坚实的理论知识，全力指导并协助我完成每一项实验，使我能够迅速掌握现代生物学领域的诸多实验技术与研究方法。还要感谢该实验室 Andrzej Wierzbicki、Marcin Puzio、Tomasz Maciek 博士，Ola、Anna Pietras、Rafał Wieczorek、Marcin Puzio 硕士等众多波兰同事，在我留学期间，他们给过我这样或那样的帮助。

感谢中南林业科技大学何方教授、谢碧霞教授、刘显旋教授、龙光生教授、刘友全教授、赵思东教授等我的老师，他们一直关注并指导我在学术的道路上成长，对我的治学态度和学术思想的形成有着积极的影响。我的博士学业的完成，同样倾注了他们的心血。

感谢中南林业科技大学森林培育学科张日清教授、吕芳德教授、李志辉教授、陈建华教授等学长及同事，他们在我工作和学业上给予了大力扶持与帮助，使我深切地感受到这支学术团队团结合作的良好风貌和向前发展的勃勃生机。同时，感谢经济林重点实验室杨伟老师、张党权博士、乌云塔娜博士、孙颖同学等，他们在本论文修改、印制及答辩准备过程中给予过无私的帮助。

感谢师兄陈永忠博士、郭起荣博士及 2001 级博士班石明旺博士、李保国博士、王义强博士、朱宁华博士、张贵博士、尹少华博士等同学。在我攻读博士学位期间，他们给了我诸多鼓励与帮助，使我深切地感受到学友间真挚的情谊。

感谢中南林业科技大学章怀云校长、吴晓英副校长、曾思齐副书记、曹福祥副校长、任湘郴副校长，研究生部李际平主任，科技处文仕知处长，学科建设处余济云处长，资源与环境学院林亲众书记、颜正良副书记、周国英、陈亮明副院长等领导长期以来的关心与爱护，使我能以饱满的热情投入到工作与学习之中。

还要感谢国家自然科学基金委员会生命学部于振良学科主任、谷瑞生学科主任等领导的关心与支持，在我与他们短短数月共事期间，他们给了我充分的信任和热心的帮助，使我进一步明确并坚定了自己努力的方向。

特别要感谢我的妻子、女儿及父母等家人，她们给了我大量的幕后支持和鼓励，并能以一颗平常心对待我在事业上的成败与得失。

最后，感谢所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、同事和朋友。

李建安

2006 年 6 月