

基因枪转化籼稻的影响因素^{*}

许新萍 卫剑文 胡 明 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要 将含有 *gusA* 基因的质粒 pAct1-D 包裹在钨粉上轰击籼稻初生愈伤组织, 通过检测 *gusA* 基因在籼稻细胞中的瞬间表达情况, 对影响基因枪法转化效率的因素进行了研究. 这些因素包括微粒加速装置参数、微粒参数、生物参数及其它参数. 实验表明, 在合适的转化条件下, 籼稻品种青凤占 12 穗优占的最高转化效率分别为 439, 915 蓝点/皿.

关键词 籼稻, 基因枪法, 初生愈伤组织, β 葡萄糖苷酸酶 (GUS), 转化效率

分类号 Q 812

籼稻和粳稻是水稻的 2 个主要亚种, 其中籼稻占水稻栽培品种的 80%, 为全世界 20 亿以上的人口提供了主食. 自 1991 年基因枪法转化水稻获得成功以来, 不少实验室对水稻的基因枪转化系统进行了改进^[1]. 但是, 与粳稻品种相比, 籼稻品种的转化较为困难, 转化频率比较低, 培养周期过长, 绝大多数在生产上有应用价值的优良品种难以转化成功. 本文以广州地区推广的优良籼稻品种为转化材料, 对影响基因枪法转化效率 (Y) 的主要因素进行了分析, 为建立高效的籼稻转化系统打下基础.

1 材料与方法

1.1 基因枪

本研究采用的 JQ-700 型高速基因枪 (中科院生物物理所研制) 为火药爆发气体推进式, 可供选用的参数: 火药弹为绿弹、蓝弹和红弹, 其动力负荷依次增高; 火药套管长 15 mm, 25 mm, 35 mm, 其相应配套的加速管分别为 52 mm, 42 mm, 32 mm; 滤网为 40 目、80 目及 100 目; 空气压力 (p) 为 0.10~0.01 MPa, 连续可调; 靶距为 6 cm 或 9 cm.

1.2 植物材料

供试籼稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* Kato) 品种为青凤占 12 和穗优占, 去壳的种子消毒后, 接种在 MS 愈伤组织培养基上. 在暗中诱导培养 2~14 d 后, 分离出盾片部位诱导生长的愈伤组织作为靶样品.

1.3 质粒

质粒 pAct1-D (由吴瑞教授赠送) 含有由水稻 Act-1 启动子调控的 *gusA* 基因. 采用碱

^{*} 美国 Rockefeller 基金资助项目

收稿日期: 1997-04-24 许新萍, 女, 32 岁, 讲师

裂解法提取质粒 DNA, 并用 PEG法加以纯化.

1.4 包裹质粒 DNA的微粒的制备

按照 Sanford等^[2]方法对钨粉进行处理. 微粒的包裹方法作了改进: 取 25 μ L钨粉悬浮液 (60 μ g μ L) 用超声波清洗机超声处理 3 s, 然后在不断旋涡混匀情况下依次加入 1~ 7. 5 μ L 1 μ g μ L质粒 DNA 25 μ L 2. 5 mol/L CaCl₂ 及 10 μ L 0. 1 mol/L亚精氨, 将该混合液超声处理 3 s, 置于冰上 10 min, 脉冲离心 (1 000 r/min), 吸去 50 μ L上清液, 其余溶液混匀后即可上样, 每次用量为 1~ 7. 5 μ L, 注到塑料弹端部凹坑内.

1.5 基因枪转化

将愈伤组织置于含 MS愈伤组织培养基的培养皿中央约 1. 5 cm直径范围内, 按照该基因枪说明书所述程序对靶样品进行轰击, 每皿样品轰击 1或 2次, 每种参数重复试验 4皿样品. 在部分实验中, 转化时将愈伤组织放在含 0. 5 mol/L渗透剂 (等量的甘露醇和山梨醇) 的 MS愈伤组织培养基上培养 6 h.

1.6 GUS检测

经基因枪转化处理的愈伤组织暗培养 48 h后, 按照 Jefferson等^[3]方法进行组织化学染色. 在 Olympus解剖镜下观察和统计 gus A基因瞬间表达产物与底物 X-GLuc反应产生的蓝点, 每个蓝点作为 1个“表达单位”, Y由每皿的蓝点数目代表^[4].

2 结果与讨论

2.1 微粒加速装置参数对 Y的影响

2.1.1 火药弹动力负荷 火药套管 /加速管长度 使用蓝弹或绿弹, 15 mm火药套管, 52 mm加速管时, Y较高. 而用红弹, 15 mm火药套管, 52 mm加速管时, Y几乎为零 (表 1). 火药弹动力负荷越高, 火药弹至塑料弹的距离 (即火药套管长度) 越短, 塑料弹加速飞行距离 (即加速管长度) 越长, 塑料弹能够达到的撞击挡板的速度就越高, 因而微粒获得的初速度也越高, 越能有效地穿透细胞壁、细胞膜, 将外源基因导入细胞内. 但同时, 靶样品受到的冲击波也越强^[2], 越易引起严重的细胞损伤, 反而降低了 Y.

表 1 火药弹、火药套管 /加速管及滤网对水稻 Y的影响¹⁾

Tab. 1 Effect of power load, distance from power source to macroprojectile / macroprojectile flight distance and meshes on transformation efficiency of indica rice 蓝点数 $\cdot$ 皿⁻¹

火药弹	火药套管 / 加速管 (mm)	滤网 (目)						
		0	40	80	100	40+ 40	80+ 100	
红弹	15/52	—	—	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
	15/52	49 $\pm$ 25	157 $\pm$ 47	38 $\pm$ 16	12 $\pm$ 5	55 $\pm$ 9	0 $\pm$ 0	
蓝弹	25/42	—	—	2 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	—	—	
	15/52	110 $\pm$ 41	216 $\pm$ 58	57 $\pm$ 11	2 $\pm$ 2	—	0 $\pm$ 0	
绿弹	25/42	—	8 $\pm$ 3	—	—	—	—	
	35/32	—	0 $\pm$ 0	—	—	—	—	

1) 转化条件: 品种为青凤占 12; $p=0.01$ MPa; 靶距为 6 cm; $\bar{a}_{\text{弹}}=0.9\mu$ m; $m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})=1.67\times10^{-3}$; 上样量 2.5 μ L; 愈伤组织诱导时间 7 d, 轰击 1次, 无渗透压处理

2.1.2 滤网 孔数和层数 在挡板与靶样品间放置滤网,能够削弱冲击波,降低微粒速度,并帮助微粒均匀分布^[2].从表 1 可见,不加筛网时,可以得到的 Y 为 49 ± 25 (蓝弹) 及 110 ± 41 (绿弹) 蓝点/皿.愈伤组织间蓝点数目相差较大,为 0~45 个点,表明微粒分散性差.而且,强大的冲击波使靶样品陷入培养基内.1 层 40 目滤网可明显提高 Y ,每皿蓝点数目增加为 157 ± 47 (蓝弹)、 216 ± 58 (绿弹),蓝点分布也较均匀.随着滤网孔数和层数增加,蓝弹及绿弹的 Y 均逐渐降低.80 目及 100 目的 2 层滤网使 3 种火药弹的 Y 都变为零.这是由于微粒速度降低过多,而且轰击后残留在滤网上的微粒增多.

2.1.3 空气压力 图 1a 显示 Y 随着 p 的增高而不断提高,当 $p < 0.04 \text{ MPa}$ 时, Y 迅速提高, $p = 0.01 \text{ MPa}$ 时, Y 最高.微粒在惯性作用下作自由飞行运动,最后撞击靶样品,空气阻力会使微粒的撞击速度大幅度降低,而且,空气能够传导冲击波^[2].因此,低 p 可以显著提高 Y 值.

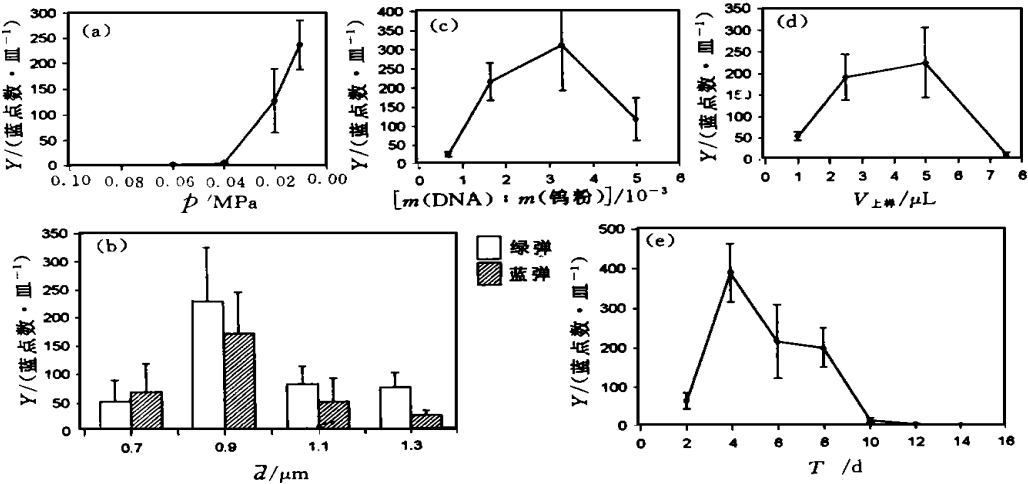


图 1 p (a)、微粒大小 (b)、 $m(\text{DNA}) : m(\text{钨粉})$ (c)、上样量 (d) 和愈伤组织生长期 (e) 对籼稻 Y 的影响,转化条件参见表 1、2 说明

Fig. 1 Effect of atmospheric pressure (a), particle size (b), DNA quantity (c), microprojectile volume (d), and cell age (e) on transformation efficiency of indica rice

2.1.4 靶距 靶距由 6 cm 增加到 9 cm 时,每皿蓝点数由 23 ± 55 变为 20 ± 32 , Y 降低不明显.这是由于较长的靶距在降低微粒撞击速度的同时,也减少了冲击波对细胞的伤害.而且本实验使用的钨粉平均直径 ($\bar{d}_{\text{钨}}$) 较大 ($0.9 \mu\text{m}$) 和 p 低 (0.01 MPa),微粒惯性较大而空气阻力极小,靶距对微粒撞击速度的影响不显著.因此, Y 变化不大.

2.2 微粒参数对 Y 的影响

2.2.1 微粒大小 微粒大小影响微粒穿透特定类型细胞的细胞壁和细胞膜的能力^[5].实验表明,无论选用蓝弹或绿弹, $\bar{d}_{\text{钨}}$ 为 $0.9 \mu\text{m}$ 时对籼稻初生愈伤组织的细胞的 Y 明显比其余 3 种钨粉高 (图 1b). $\bar{d}_{\text{钨}}$ 增大,微粒穿透时对靶细胞的损伤加大,而 $\bar{d}_{\text{钨}}$ 过小,微粒则不易穿入细胞内,都会降低 Y .

2.2.2 微粒的包裹方法 钨粉悬浮液储藏一定时间后,钨粉会发生凝聚,使微粒体积变大,增加对靶细胞损害,同时由于微粒总表面积变小,减少了 DNA 的包裹量,因此,在包裹

DNA之前应该使钨粉重新分散. 在包裹了 DNA之后, 由于 DNA大分子之间的相互作用, 微粒更易凝聚, 既对靶细胞有害, 也不利于 DNA的导入^[4]. 本文对常用的微粒包裹方法^[2]作了改进, 在包裹 DNA前后用超声清洗机超声处理钨粉悬浮液, 获得较好的分散钨粉效果, 使 Y由原方法的 60± 36蓝点/皿提高到 145± 52蓝点/皿, 而且蓝点分布较均匀.

2.2.3 $m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})$ 由图 1c可见, 随着 DNA与钨粉质量比 $[m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})]$ 由 6.7×10^{-4} 增加到 1.67×10^{-3} , Y随之提高. 当 $m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})$ 为 3.3×10^{-3} 时, Y达到最高. 此后 $m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})$ 再增加, Y反而降低. 因为 $m(\text{DNA}):m(\text{钨粉})$ 高时, 会引起微粒的严重凝聚, 而这种凝聚不易被超声或旋涡处理打散^[4].

2.2.4 上样量 随着上样量增加, 靶细胞接受导入微粒的机会增多, Y逐渐提高 (图 1d). 上样量达到 $5\mu\text{L}$ 时, Y最高, 为 24± 81蓝点/皿. 上样量增加至 $7.5\mu\text{L}$, Y迅速下降到 8± 5蓝点/皿, 在解剖镜下观察靶样品, 发现中央几块愈伤组织表面布满黑色微粒. 可见, 微粒过多会造成中央区域的靶细胞中弹数目过多而死亡.

2.3 生物参数对 Y的影响

2.3.1 愈伤组织的生长期 靶细胞的生理状态对外源基因的导入和表达有一定的影响^[5]. 图 1e表明, 4~ 8 d龄的籼稻初生愈伤组织的 Y较高, 尤其是 4 d龄的愈伤组织, 每皿蓝点数高达 389± 63. 8 d龄以后的愈伤组织, Y迅速下降. 12及 14 d龄的愈伤组织转化的蓝点数为 0± 0. 年轻的、分裂旺盛的细胞能够承受基因枪轰击并且易于接受转化^[6]. 随着愈伤组织培养时间的延长, 细胞的活力和分裂能力开始下降, Y也随之降低.

2.3.2 籼稻品种 对 2个优良籼稻品种青凤占 12和穗优占的 Y作了比较, 发现穗优占的 Y (39± 106蓝点/皿) 比青凤占 12 (187± 48) 高. 可见在相同转化条件下, 不同基因型的籼稻品种, Y有所不同. 这与 Aragao 等^[4]在菜豆转化实验中得到的结果一致.

2.3.3 渗透压处理 表 2证实渗透压处理对提高籼稻初生愈伤组织的 Y有利, 尤其是轰击 2次时, 效果比较明显, 由 3± 2蓝点/皿提高到 40± 16蓝点/皿. 靶细胞在渗压剂作用下会向外渗水, 使原生质体收缩, 当它受轰击时, 细胞质外渗和细胞破裂的情况就可以减轻. 轰击 2次时, 细胞损伤较大, 渗透压对靶细胞的保护作用就表现得比较明显.

表 2 渗透压处理、轰击次数对籼稻 Y的影响¹⁾
Tab. 2 Effect of osmoticum and the number of bombardments on transformation efficiency of indica rice

火药弹	滤网 (目)	渗透处理	Y (蓝点数/皿)	
			轰击 1次	轰击 2次
蓝弹	40	无	19± 53	-
	40	有	253± 57	-
	80	无	30± 21	4± 3
绿弹	40	无	195± 71	3± 2
	40	有	242± 84	40± 16
	80	无	56± 22	7± 5

1) 15 mm火药套管; 52 mm加速管; 其余转化条件参见表 1说明

2.4 其它参数

2.4.1 轰击次数 从表 2可以看出, 无论使用蓝弹或绿弹, 40目或 80目滤网, 轰击次数的增加均使 Y降低. 理论上, 多次轰击可以增加靶细胞被微粒击中的机会, 一些作者的实

验证明重复 2~3 次轰击可以提高 $Y^{[6]}$. 但是, 本实验中, 由于轰击 2 次造成细胞损伤增加反而降低了 Y , 与 Reggiardo 等^[6]的实验结果相符.

目前, 籼稻基因枪转化的靶样品主要为幼胚和悬浮培养细胞^[1]. 本文尝试了以籼稻初生愈伤组织作为基因枪转化的靶样品, 并摸索出较为合适的转化条件, 即选用绿弹或蓝弹, 15 mm 火药套管, 52 mm 加速管, 1 层 40 目滤网, $p = 0.01 \text{ MPa}$, 靶距 6 cm, $d_{\text{靶}} = 0.9 \mu\text{m}$, $m(\text{DNA}) : m(\text{钨粉}) = 1.67 \sim 3.33 \times 10^{-3}$, 2.5~5 μL 的上样量, 4~8 d 龄愈伤组织, 0.5 mol/L 的渗透压处理, 轰击 1 次. 在上述条件下转化籼稻品种青凤占 12 及穗优占, 最高 Y 分别可达到 439 蓝点/皿、915 蓝点/皿. 因此, 初生愈伤组织作为靶样品在籼稻转化中具有潜在的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Zhang S, Chen L, Qu R, et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 465~469
- 2 Sanford J C, Smith F D, Russell J A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, 1993, 217: 483~509
- 3 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6: 3901~3907
- 4 Aragao F J L, Grossi de Sa M F, Davery M R, et al. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 483~490
- 5 Duchesne L C, Charest P J. Transient expression of the β -glucuronidase gene in embryogenic callus of *Picea mariana* following microprojection. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 191~194
- 6 Reggiardo M I, Arana J L, Orsaria L M, et al. Transient transformation of maize tissues by microparticle bombardment. *Plant Science*, 1991, 237~243

Factors Influencing Biolistic Transformation of Indica Rice

Xu Xinping* Wei Jianwen Hu Ming Li Baojian

Abstract Primary calli of indica rice were bombarded with tungsten particles coated with the plasmid pAct1-D containing gusA gene. Factors influencing biolistic transformation efficiency were studied by detecting transient expression of gusA gene in indica rice cells. The factors included particle accelerator parameters, microprojectile parameters, biological parameters and other parameters. Under appropriate transformation condition, the highest transformation efficiency achieved is 439 and 915 blue spots per plate for indica rice variety Qingfengzhan 12 and Suiyouzhan, respectively.

Keywords indica rice, microprojectile bombardment, primary callus, β -glucuronidase, transformation efficiency

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275