

# 应用电注射法将外源基因导入水稻种胚 及获得转基因水稻植株研究\*

李宝健 许新萍 石和平 柯遐义

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

## 摘 要

用我们实验室自制的电容放电式电激仪,成功地把质粒 pLGVneo2103 上的 NPT II 基因导入两个水稻品种(籼稻品种三二矮和粳稻品种农虎 6 号)的种子胚细胞中,在含有  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的 MS 培养基上选择出抗性愈伤组织,并由此通过体胚发生途径再生出转基因植株,NPTII 检测和 DNA 分子杂交证实外源基因已在上述转化体中得以稳定的整合和表达。

**关键词:** 水稻种子胚, 电注射法, NPT II 基因, 基因转化, 转基因水稻植株

自 80 年代以来,虽然应用 DNA 重组技术已将多种外源基因成功地转化入植物,并培育了不少转基因工程植物。但禾谷类植物转基因工程植株,仅在粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. japonica)和玉米(*Zea mays* L.)获得成功<sup>[1-6]</sup>。看来,以下的困难妨碍了水稻转基因研究的进展,如:在植物基因工程中应用最普遍的通过农杆菌嵌合 Ti 质粒系统转化的方法,受农杆菌宿主范围的限制<sup>[7]</sup>;尽管水稻原生质体培养再生植株已在若干实验室取得成功<sup>[8]</sup>,但不少当前生产上应用的水稻品种的原生质体培养技术尚未过关,且原生质体培养难度大,流程长,有时不易重复。自 Langridge 等<sup>[9]</sup>、Fromm 等<sup>[10]</sup>运用电激法(electroporation)将外源基因转入植物原生质体获得长期或瞬间表达以来,用电激法转化基因入植物已在多个实验室得以成功。1986 年, Morikawa 等<sup>[11]</sup>提出了电注射法(electroinjection),即利用与电激法相同的原理,将外源基因直接注入了带细胞壁的烟草细胞。我们实验室<sup>[12]</sup>又用电注射法将外源基因转入烟草、玉米、大豆等植物细胞,但转化细胞除烟草外都未能培养成株。

本文试图应用电注射法直接将外源基因转化入水稻种子胚的细胞中,并探讨一个将转化胚细胞培养成株的有效途径,以找出不受细胞遗传背景限制的、更简便的从事水稻基因工程研究的崭新技术。

## 一、材 料 与 方 法

### 1. 材料

(1)电激仪 本实验室研制的 I 型电激仪,为指数式电容放电型,可产生指数衰减波,峰

本文 1990 年 3 月 19 日收到, 1990 年 8 月 14 日收到修改稿。

\*国家自然科学基金资助项目。

值电压范围 0—700 V, 可调。电容量为  $2\mu\text{F}$ ,  $4\mu\text{F}$ ,  $6\mu\text{F}$ ,  $62\mu\text{F}$ ,  $168\mu\text{F}$ ,  $232\mu\text{F}$ , 有级可调。电激池的3个面用有机玻璃板制成, 另外相对的两个面用不锈钢片制成, 同时兼作两电极, 电极间距为 4 mm。电激仪输出电压从电激池两极板的外表面引入。

(2)培养基 MS 愈伤组织培养基: MS 基本成分(Murashige and Skoog 1962), 附加 2,4-D  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ , 6-BA  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 水解酪蛋白  $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

$\text{N}_0$  再生培养基:  $\text{N}_0$  基本成分(朱至清等, 1975), 附加 NAA  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ , KT  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 2. 方法

(1)植物材料和 Km 抗性的测定试验 水稻栽培稻种的籼亚种三二矮(*Oryza sativa* L. subsp. indica cv. Sanerai)和粳亚种农虎 6 号(*Oryza sativa* L. subsp. japonica cv. Nonghu No. 6)种子, 由广东省仲恺农业技术学院农学系遗传组提供。

将三二矮或农虎 6 号的灭菌种子, 接种在不含 Km 的 MS 愈伤组织培养基上, 两天后, 分别转到含卡那霉素(以下用 Km 表示, 美国 Sigma 化学公司出产)浓度为 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MS 愈伤组织培养基上。两周后, 在含 Km 浓度为  $75\mu\text{g}/\text{ml}$  以下的培养基上, 种子胚芽鞘的基部, 能不同程度地长出愈伤组织; 在含  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的培养基上, 只有个别种子胚长出较小的愈伤组织; 在含  $125\mu\text{g}/\text{ml}$  以上浓度的 Km 培养基上, 无愈伤组织生长。继代培养两周后, 发现在含  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的培养基上, 连极个别的小愈伤组织也发黑死亡; 而在含 25— $75\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的培养基上, 愈伤组织只出现程度不同的褐化。

因此, 通过本试验, 可确定以  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Km 浓度作为上述两个水稻品种的外源 NPTII 基因导入后的筛选浓度。

(2)质粒 DNA 的提取和纯化 pLGVneo2103 具有由胭脂碱合成酶基因启动子, 来自 Tn5 的新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 基因的编码序列和章鱼碱合成酶基因的多聚腺苷酸终止信号所组成的嵌合基因(PNOS-NPTII-OCS poly A)<sup>[13]</sup>。此质粒存于 *E. coli* HB101 受体菌中, 参照 Maniatis 等<sup>[14]</sup> 和刘伟民等<sup>[15]</sup> 的方法提取和纯化质粒 DNA。

(3)电激处理方法 将剥去内外颖的水稻种子用 0.5% 的过氧乙酸消毒 15min, 无菌水冲洗 5 次, 接种到 MS 愈伤组织培养基上。两天后种子露白, 在种子胚处制造伤口, 再将种子放入电激池中, 每 20 粒种子加入 0.8ml 含 pLGVneo2103  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ , 小牛胸腺 DNA  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Hepes 缓冲液(Hepes  $8\text{mmol}/\text{L}$ , 葡萄糖  $272\text{mmol}/\text{L}$ , 甘露醇  $200\text{mmol}/\text{L}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $4\text{mmol}/\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $1\text{mmol}/\text{L}$ , pH7.4)。调电压 650V, 电容量  $62\mu\text{F}$ , 进行电激处理。对照组种子在无 DNA 的与上相同的条件下进行电激处理。

(4)愈伤组织的诱导和 Km 抗性愈伤组织的筛选 将电激后的种子放回 MS 愈伤组织培养基培养两天后, 一部分种子保留在不含 Km 的上述培养基上继续培养, 以统计无选择压力时形成的愈伤组织数; 另一部分种子转到含  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的 MS 愈伤组织培养基上进行四周的筛选培养。每两周继代 1 次。

将对照组种子放回 MS 愈伤组织培养基培养两天后, 一部分种子保留在不含 Km 的上述培养基上继续培养, 诱导非转化愈伤组织, 提供 NPTII 分析和分子杂交的材料; 另一部分种子则转到含  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的 MS 愈伤组织培养基上培养。每两周继代 1 次。

(5)愈伤组织再生成株 将电激处理后在 Km 选择培养基上生长的愈伤组织, 一部分转到含有  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的  $\text{N}_0$  再生培养基上; 另一部分愈伤组织转到不含 Km 的  $\text{N}_0$  再生培养基上, 以后再将分化出绿芽和根的愈伤组织转到含  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的  $\text{N}_0$  再生培养基上; 将其

余愈伤组织在含  $100\mu\text{g/ml}$  Km 的 MS 愈伤组织培养基上继代培养。

将在不含 Km 的 MS 愈伤组织培养基上生长的对照组愈伤组织,一部分转到含 Km  $50\mu\text{g/ml}$  的  $\text{N}_6$  再生培养基上;另一部分转到不含 Km 的  $\text{N}_6$  再生培养基上诱导再生植株,作为一种对照,并提供 NPTII 分析和分子杂交的材料。

以上愈伤组织的诱导和生长均在暗中进行,诱导愈伤组织再生植株过程则在光下进行,每日光照 10 h, 光强约 2000 lx. 培养温度皆为  $28\pm 2^\circ\text{C}$ 。

(6) DNA/DNA 分子杂交 参照 Paszkowski 等<sup>[16]</sup> 的方法提取水稻 DNA. 从 pLGVneo2103 上分离含有 NPTII 基因编码序列的 1.6 kb pst I 片段作探针 DNA<sup>[17]</sup>, 采用缺口翻译法<sup>[14]</sup> 标记探针. 约  $5\mu\text{g}$  水稻 DNA 用 EcoRI 和 HindIII 消化. 同时 pLGVneo2103 也用相同的双酶消化, 作为正对照. 以经 EcoRI/HindIII 消化的  $\lambda$  DNA 的电泳图谱作为 DNA 分子量的标准. 酶解物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 按 Maniatis 等<sup>[14]</sup> 方法进行 Southern 转移及杂交。

(7) NPTII 活性检测 采用王金发等<sup>[18]</sup> 改进的 An 等的 NPTII 点滴分析法来确定 NPTII 基因是否表达. 其材料处理如下: 植物样品 100mg 加  $100\mu\text{l}$  抽提缓冲液( $0.5\text{mol/L}$  蔗糖,  $0.1\text{mol/L}$  Tris-HCl,  $0.1\%$  抗坏血酸,  $0.1\%$  半胱氨酸, pH7.5), 愈伤组织用超声波破碎 30 s, 植株碎片在冰上匀浆, 离心( $16000\text{ r/min}$ )15min. 细菌样品是含有 pLGVneo2103 的 *E. coli* HB101, 作正对照. 100mg 细菌加  $100\mu\text{l}$  抽提缓冲液( $10\text{mmol/L}$  Tris-HCl,  $10\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $25\text{mmol/L}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.6\text{mmol/L}$   $\beta$ -巯基乙醇, pH7.4), 超声波破碎 30 s, 离心( $16000\text{ r/min}$ )15min.

(8) 转化频率的计算 水稻种子胚经电激处理后的转化频率分别用绝对转化率和相对转化率来表示:

$$\text{绝对转化率}(\%) = \frac{\text{在含 Km 培养基上形成愈伤组织数}}{\text{电激种子数}} \times 100\%,$$

$$\text{相对转化率}(\%) = \frac{\text{在含 Km 培养基上形成愈伤组织数}}{\text{在不含 Km 培养基上形成愈伤组织数}} \times 100\%.$$

## 二、结 果 与 分 析

### 1. Km 抗性愈伤组织的形成

电激处理的部分种子在不含 Km 的 MS 愈伤组织培养基上培养 3,4 天后, 从种子胚伤口处开始出现愈伤组织. 再过 1 周, 愈伤组织长至直径 2—4mm 大小, 颗粒状, 呈白至淡黄色. 另外一部分经电激处理的种子, 在含 Km  $100\mu\text{g/ml}$  的选择培养基上培养 1—2 周, 其中一部分种子胚的伤口处可开始出现少量愈伤组织, 继代培养 2—3 周, 愈伤组织直径才可达 2—4mm, 亦呈白至淡黄色, 为颗粒状; 此外, 也有相当部分的上述经电激处理的种子胚逐渐黑化死亡(图版 I-1,4).

而在含  $100\mu\text{g/ml}$  Km 的培养基上培养的对照组种子胚, 4 周后全部变黑死亡(图版 I-2,5).

### 2. Km 抗性愈伤组织的体胚发生和植株再生

将 Km 抗性愈伤组织转移到含  $50\mu\text{g/ml}$  Km 的  $\text{N}_6$  再生培养基和不含 Km 的  $\text{N}_6$  再生培养基上, 这些愈伤组织都能继续生长. 但在含 Km 的  $\text{N}_6$  再生培养基上, 愈伤组织只能分化出

根,却没有芽的分化或体胚的发生. 而在不含 Km 的  $N_6$  再生培养基上,只经过两周左右的培养,就有部分愈伤组织块能分化出绿芽和小根. 如将这些已分化出绿芽和小根的愈伤组织块转移到含  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  Km 的  $N_6$  再生培养基上继续培养 3 周,则每块愈伤组织都可长出 2—10 株高 10cm 左右的绿色植株并形成根系(图版 I-3,6);只有极个别三二矮愈伤组织分化出几株白苗,长至 4—6cm 高,然后死亡.

应用 Olympus 型解剖显微镜观察,在上述愈伤组织中可见到球形胚、心形胚、鱼雷形胚、成熟胚以及整个体胚发生的过程. 由此可见,Km 抗性愈伤组织的细胞是通过体胚发生途径再生成完整植株的. 而这些植株的外观形态与在不含 Km 的  $N_6$  再生培养基上所再生的对照组植株又是基本上相同的(图 1).

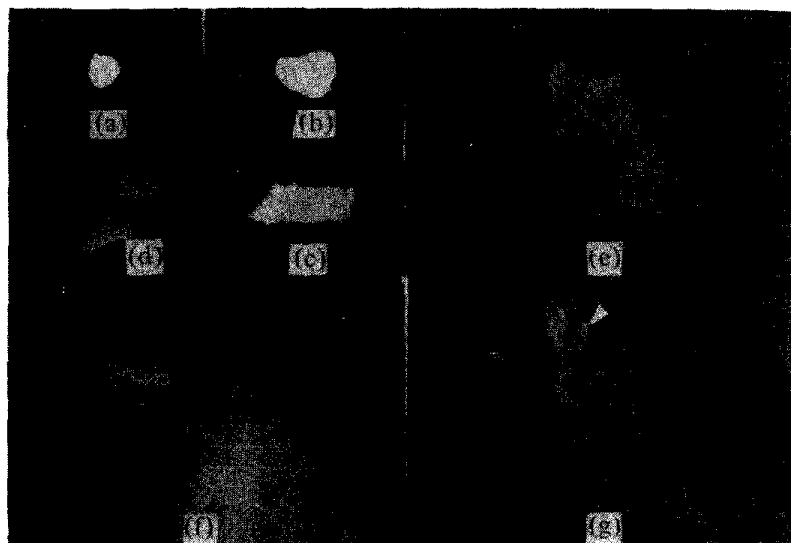


图 1 梗稻转化细胞体胚发生的主要过程

((a)球形胚, (b)心形胚, (c), (d)鱼雷形胚, (e), (g)成熟胚的胚芽, (f)胚根  
(箭头所指为胚芽发育时退化的一片子叶))

对照组的愈伤组织在含 Km  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $N_6$  再生培养基上无法分化,而且逐渐褐化.

### 3. 外源 NPTII 基因在水稻 Km 抗性愈伤组织和再生植株的基因组中的整合

从具 Km 抗性的三二矮和农虎 6 号愈伤组织及其再生植株中分别提取的 DNA,经 EcoRI/HindIII 双酶消化并电泳后,发现其中大小在 3.3kb 的 DNA 片段能与编码 NPTII 基因序列的探针杂交. 而对照组的愈伤组织及再生植株 DNA 的 EcoRI/HindIII 酶切电泳的全部谱带均不能与上述探针杂交(图版 I-7,8). 由此证明,外源的 NPTII 基因已分别整合到具 Km 抗性的三二矮及农虎 6 号愈伤组织和再生植株的基因组中. 另外,三二矮 Km 抗性再生植株的 DNA 酶解物与探针 DNA 杂交后,还出现了其它两条杂交带(图版 I-8),我们认为这可能与 NPTII 基因序列重排(rearrangement)有关,已有不少文献<sup>[2,3,6]</sup>报道了这种现象.

### 4. 外源 NPTII 基因在水稻 Km 抗性愈伤组织和再生植株中的表达

利用 NPTII 点滴分析法,可在三二矮和农虎 6 号的 Km 抗性愈伤组织及再生植株中检测到较高的 NPTII 活性,而在对照组的愈伤组织和再生植株中检测到很弱的 NPTII 活性,两者有显著差别(表 1,图版 I-9). 因此,可以认为外源的 NPTII 基因已进入这些 Km 抗性的愈伤组织及其再生植株的细胞中,得到了较强的表达.

表1 NPTII 活性检测的液闪计数结果\*

| dpm i/dpml** | 三二矮愈伤组织(A) | 农虎6号愈伤组织(B) | 三二矮再生植株(C) | 农虎6号再生植株(D) |
|--------------|------------|-------------|------------|-------------|
| 对照组(b)       | 0.05       | 0.05        | 0.05       | 0.04        |
| Km 抗性(c)     | 0.36       | 0.38        | 0.39       | 0.33        |

\* 表中出现的 A—D, a—c 与图版 I-9 对应。

\*\* dpm: 实际衰减数/min. 每列的 dpm i/dpml 值都以含 pLGVneo2103 的 *E. coli* HB101(a) 的 dpm i/dpml 值为 1.00 作标准。

## 5. 外源基因在水稻中的转化频率以及转化细胞再生成株的情况

实验统计数据及计算结果列于表 2、表 3 中。

表2 水稻种子胚经电激处理后的转化频率

| 品 种  | 电激种子数*<br>(个) | 形成愈伤组织数*(个) |          | 转化频率(%) |     |
|------|---------------|-------------|----------|---------|-----|
|      |               | 不含 Km 培养基   | 含 Km 培养基 | 绝 对     | 相 对 |
| 三二矮  | 100±0         | 96±2        | 56±6     | 56      | 58  |
| 农虎6号 | 100±0         | 93±2        | 39±4     | 39      | 42  |

\* 3次重复的均值。

表3 水稻Km 抗性愈伤组织再生情况

| 品 种  | 转到不含 Km 的 N <sub>6</sub><br>培养基上愈伤组织数(个)* | 分化的愈伤组织数(个) |          | 再生植株总数(株) |     |
|------|-------------------------------------------|-------------|----------|-----------|-----|
|      |                                           | 分化绿芽和根      | 继而长成绿色植株 | 绿色植株      | 白 苗 |
| 三二矮  | 60                                        | 9           | 8        | 45        | 3   |
| 农虎6号 | 50                                        | 4           | 4        | 11        | 0   |

\* 在整个实验过程中, 长在同一种子胚上的愈伤组织未曾经分割处理。

## 三、讨 论

Zhang 等<sup>[3]</sup> 认为 NPTII 基因可作为一个标志基因应用在水稻基因工程中。而 Vasil<sup>[19]</sup> 提出在一些单子叶植物中存在 Km 内源抗性, 因而会妨碍以 Km 抗性基因作为标志基因来研究这些植物的基因转化。我们曾以含有 pLGVneo2103 的 *E. coli* 的 NPTII 活性值为 1.00dpmi/dpml 作标准, 经过 NPTII 点滴分析, 在 20 个水稻(包括籼稻、粳稻)品种中分别检测到 0.04—0.08dpmi/dpml 的 NPTII 活性值, 表明在一些水稻品种中只有极少量的内源 NPTII 活性。我们从中选用了内源 NPTII 活性很低的籼稻品种三二矮和粳稻品种农虎 6 号(表 1 中对照组的 NPTII 活性值)作为外源 NPTII 基因转化的受体材料, 以避免转化实验结果中可能出现的误差。我们的实验结果证明用 NPTII 基因作为一些内源 NPTII 活性很低的水稻品种外源基因转化的标志基因是合适的。

本试验品种之一的籼稻三二矮原生质体培养较为困难, 参照前人的经验, 我们曾研究了一年多, 仍只能得到几次的分裂相, 因而就探索了新的水稻受体系统及其转化体的筛选和培养方法。总的看来, 根据本文所述的转化水稻受体系统可概括为以下几个步骤: (1) 外源基因先转入水稻种子的部分胚细胞; (2) 将转基因的胚细胞诱导产生胚性愈伤组织; (3) 从胚性愈伤组织诱导产生胚状体; (4) 将胚状体培养成完整植株。而在上述各转化体的培养环节中, 需巧妙地安排筛选因子并特别注意采用筛选因子的适当浓度, 如: 在水稻 Km 抗性愈伤组织的体胚发

生和再生成株的最初阶段,移去 Km 选择压力对子培养转基因的抗性植株是必须采取的一个措施。在这个实验系统中,由于体细胞胚胎是起源于单细胞的,就有可能减少转化体的嵌合现象,也可降低胚性愈伤组织在多次继代培养中发生突变的频率<sup>[20]</sup>。另外,本文中所列的水稻种子胚转化细胞培养成植株的步骤也较简化,先后只用了成分较简单的两种培养基(MS 愈伤组织培养基, N<sub>6</sub> 再生培养基),且仅仅在两个月的时间内,就可获得再生植株。因此,用水稻种子胚细胞作为外源基因转化的受体具有明显的优点。

文献上迄今已经报道的获得转基因植株成功的禾本科农作物仅有玉米<sup>[6]</sup>、粳稻<sup>[1-5]</sup>。这些实验都是以来源于悬浮培养细胞的原生质体作为受体细胞的,尽管在原生质体培养中采用了看护细胞<sup>[6]</sup>、热休克处理<sup>[3]</sup>等方法,以提高转化率和原生质体分裂频率,水稻的绝对转化率最高只能达到  $2.8 \times 10^{-4}$ <sup>[3]</sup>,而最高的相对转化率在玉米中仅为 5%<sup>[6]</sup>、在水稻中为 25%<sup>[3]</sup>。而且,转化细胞培养成株的能力一般也较低,如 Zhang 等<sup>[3]</sup>报道,在 400 个水稻 Km 抗性愈伤组织中,只有 6 个愈伤组织再生出 12 株绿苗。而本研究中我们用电注射法转化水稻种子胚细胞,可得到较高的转化频率。从表 2 可见,以种胚为单位,三二矮的绝对转化率可达到 56%,相对转化率达 58%,农虎 6 号的绝对转化率和相对转化率分别为 39%、42%。而且, Km 抗性愈伤组织再生植株的频率亦较高,如表 3 所列,从 60 块三二矮 Km 抗性愈伤组织中有 8 块分化出 45 株绿苗,而从农虎 6 号的 50 块愈伤组织中有 4 块分化出 11 株绿苗。

具有特殊意义的是本论文所报道的籼稻三二矮转基因植株的获得,这是籼稻转基因植株成功的第一实例;而且,三二矮作为广州地区推广的栽培品种,有较高的经济价值。这一事实可能表明,应用基因工程手段改良水稻现有的栽培品种看来已进入了实际可行的阶段。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang, W. & Wu, R., *Theor. Appl. Genet.*, **76**(1988), 835 — 840.
- [2] Toriyama, K. et al., *Bio/Technology*, **6**(1988), 1072 — 1074.
- [3] Zhang, H. M. et al., *Plant Cell Reports*, **7**(1988), 379 — 384.
- [4] Shimamoto, K. et al., *Nature*, **338**(1989), 274 — 276.
- [5] 杨虹等, 中国农业科学, **22**(1989), 6:1 — 5.
- [6] Rhodes, C. A. et al., *Science*, **240**(1988), 204 — 207.
- [7] Potrykus, I., *Titech*, **7**(1989), 269 — 273.
- [8] Lee, L. et al., *Planta*, **178**(1989), 325 — 333.
- [9] Langridge, W. H. R. et al., *Plant Cell Reports*, **4**(1985), 355 — 359.
- [10] Fromm, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**(1985), 5824 — 5828.
- [11] Morikawa, H. et al., *Gene*, **41**(1986), 121 — 124.
- [12] 李宝健等, 中山大学学报论丛, 植物遗传分子遗传及基因工程专辑, **8**(1989), 4:73 — 78.
- [13] Hain, R. et al., *Mol. Gen. Genet.*, **199**(1985), 161 — 168.
- [14] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [15] 刘伟民、杨志兴, 遗传, **9**(1987), 1:43 — 44.
- [16] Paszkowski, J. et al., *EMBO J.*, **3**(1984), 12:2717 — 2722.
- [17] de la Peña, A. et al., *Nature*, **325**(1987), 274 — 276.
- [18] 王金发、李宝健, 中山大学学报论丛, 植物遗传分子遗传及基因工程专辑, **8**(1989), 4:166 — 169.
- [19] Vasil, I. K., *J. Plant Physiol.*, **128**(1987), 193 — 218.
- [20] Hanna, W. W. et al., *Theor. Appl. Genet.*, **67**(1984), 155 — 159.