

文章编号: 1003-8701(2000)02-0038-03

# 基因枪在植物遗传转化中的应用

杜娟, 季静, 王罡, 胡汉桥

(中国人民解放军军需大学, 吉林 长春 130062)

**摘要:** 基因枪法 (particle gun) 又称微弹轰击法 (microprojectile bombardment, particle bombardment 及 biolistics), 是一种新型的遗传转化手段<sup>[1~3]</sup>, 已受到人们的普遍重视, 本文简要综述了基因枪法在植物转基因方面的应用情况。

**关键词:** 基因枪; 遗传转化; 植物转基因

**中图分类号:** Q 78

**文献标识码:** A

基因枪法, 又称生物弹法或微粒枪法、微粒轰击法, 是依赖高速度的金属微粒将外源基因引入活细胞的一种转化技术。所谓遗传转化是通过某种途径或技术将外源基因导入受体细胞的某基因组中, 并使之在受体细胞中表达。遗传转化主要有两类: 一类是农杆菌介导法, 一类是 DNA 直接转化法。DNA 直接转化技术包括化学方法和物理方法, 如电击、微注射、超声波和基因枪法。

基因枪法是继农杆菌介导转化法之后又一应用最广泛的遗传转化技术。最早是由美国 Cornell 大学的 Sanford 等 (1987 年) 研制出火药引爆的基因枪。并与该校工程技术专家 Wolf 及 Kallen 合作研究基因转移的新方法。Klein 等 (1987 年) 首次以洋葱表皮细胞为材料, 以钨粉为子弹, 把 DNA 或 RNA 导入细胞, 且观察到外源基因能表达, 并发表了第一篇文章, 证明此方法是可行的。1988 年, McCabe 等用外源 DNA 包被的钨粒对大豆茎尖分生组织进行轰击, 结果约有 2% 的组织通过器官发生途径获得再生植株, 并且在  $R_0$ 、 $R_1$  代植株中检测到了外源基因的表达。由于单子叶植物的遗传转化受农杆菌寄主的限制, 因此用基因枪法将外源 DNA 送入完整细胞成为单子叶植物遗传转化的主要手段。1990 年 Gordon-Kamm 等用基因枪法将 *gus* 报道基因和 *pat* 选择性基因导入玉米悬浮细胞系, 且再生的转基因玉米植株能够结实, 首次获得转基因玉米后, 1993 年 Kozziel 等构建了一个人工基因, 因苏云金芽孢杆菌的晶体杀出蛋白杀虫力强, 对非目标生物安全。为使 Bt 亚种 Kurstaki HD-1 的 CryIA(b) 晶体蛋白的表达水平达到杀虫剂量从而构建了一个人工基因, 并用基因枪将其导入一个优良玉米自交系的幼胚中。转基因植株能高水平表达 CryIA(b), 在温室和大田栽培中表现出很强的抗玉米螟的能力, 且在后代中稳定遗传。PCR 和 Souther 杂交分析表明, 外源基因插入玉米基因组的单一位点有多个拷贝。同年 Dupuis 和 Pace 用包被质粒 pCIB3007 (含 *Gus*)、PCIB3086 及 PCIB4436 (含花色苷合成酶基因 *Cl* 或 B-Peru) 的金粉, 在 25°C、18 h 光周期下轰击, 培养于含 0.3 mol/L-1 蔗糖、white 维生素和 0.1 μmol/L 激动素的 MS 培养基上的玉米

**收稿日期:** 1999-08-06

**作者简介:** 杜娟 (1966-), 女, 吉林省长春市人, 中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心助理研究员, 学士, 主要从事植物转基因研究。

OH43 雄穗原基。轰击后 24 h 的雄穗原基, *gus* 基因、*cl* 或 *B-peru* 基因在 *Camv35S* 启动子的驱动下瞬间表达, 经轰击的雄穗原基在 4 周内发育出的成熟花药维管组织中有 GUS 活性。1994 年, Rasmussen 等用质粒 PBC-17 或 PBAR-GUS 转化的完整大肠杆菌 DH5-a-F 和用质粒 PNY 转化的根瘤农杆菌 A208, 作为微弹转化玉米细胞, 用飞盘型氮动力基因枪轰击, 每次得到数个瞬间转化体, 6 个稳定转化体。同年 Register 用基因枪法转化玉米基因型 A188×B73 胚性悬浮细胞培养物, 得到玉米转化体。将超螺旋质粒 DNA 沉淀到钨粒上, 对靶细胞进行一次轰击。质粒 DNA 含有由玉米花粉特异性表达启动子驱动的 *uidA* 基因, 以及 *CaMV35S* 启动子驱动的筛选基因的遗传符合孟氏遗传规律。1996 年 Caimi 等将细菌的淀粉液化酶 *SacB* 基因转入玉米。不仅促进玉米合成具有较高经济价值的果聚糖, 而且有助于研究玉米种子中蔗糖代谢和淀粉合成途径, 显示出玉米遗传转化应用于农业生产的巨大潜力。1991 年 Christon 等以水稻的幼胚为材料用基因枪法获得了转基因水稻。在此之后, 1992 年 Jun Cao 等和 Li liang-cai 等 1993 年对水稻的基因枪转化系统作了进一步改进, 提高了转化频率。

小麦是世界上栽培面积最大的重要粮食作物。然而小麦却是最后一个获得转化成功的重要禾谷类作物。1992 年 Vasil 等首次报道, 将 GUS 基因和抗除草剂基因(即 *Bar* 基因)通过基因枪法导入长期培养过的小麦胚性愈伤组织中。1993 年 Vasil 用基因枪法直接枪击幼胚, 获得可育的转基因小麦株系, 效率比枪击愈伤组织要高, 转化率超过 1%。1993 年 Troy Weeks 等也报道, 通过基因枪法枪击愈伤组织获得可育的转报告基因的小麦植株。14 次独立实验平均的转化率为 0.1%~0.2%。1994 年 Becker 及 Nehra 等分别报道, 通过基因枪法枪击幼胚盾片组织获得转报告基因的小麦植株。国内, 1997 年傅荣昭首次报道用基因枪法直接枪击小麦幼胚, 将雄性不育基因—TA29-Barnase 基因导入小麦品种豫麦 18 号, 获得了经 Southern 杂交证实的转基因小麦植株。此外国内还有一些报道不在例举。

基因枪除了应用于植物基因转化和外源基因导入植物细胞的细胞器外, 还被应用于种质转化(*gem line transformation*)。所谓种质关系(*gem line*)就是合子胚中特定细胞将来分化发育成植物体的特定器官和部位, 这种预定的胚胎发育系统也称之为细胞种系关系(*cell line*), 目前研究最清楚的有玉米、拟南菜等植物。植物的种质系统包括茎尖分生组织、配子体及胚胎细胞, 它们均可能作为外植体而被转化。1992 年贾士荣等, 采用中国科学院生物物理所生产的 JQ-700 型高速基因枪法及 PBI121 质粒 DNA, 对玉米花粉和谷子花粉进行轰击转化, 再进行人工授粉。1989 年 Twell 等用基因枪及 PLAT52-7 质粒(*CaMV35S/GUS*)轰击烟草花粉, 获得 GUS 基因的表达, 但外源 DNA 没有传给子代。用基因枪法转化花粉迄今报道不多。

基因枪转化植物的优点: ①无宿无限制。能转化任何植物, 特别是那些由原生质体再生植株较为困难和农杆菌感染不敏感的单子叶植物, 这就为禾谷类作物的转化提供了可行的手段。②靶受体类型广泛。能转化植物的任何组织或细胞。③操作简便快速。基因枪转化技术从诞生至今 10 余年时间, 尽管取得可喜的成绩, 但还有不少问题如转化率低等有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Klein T M, et al. Applications of the particle gun in plant biology. In Nijkamp HJJ, Van der plas LHW, van Artrijk (eds). Progress on Plant Cellwler and Moiecular Biotogy. The Netherlands; Kluwer Academic Publish, 1990. 55—66.

- [2] Johnson S A. et al. The use of microparticle injection to introduce genes animal cells in vitro and in vivo. In Setlow JK(ed) · Genetic Engineering. New York: Plenum Press, 1993, 225—236.
- [3] Boynton J E. et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. Meth Enzymol, 1993, 217; 510—536.
- [4] Klein T M. et al. High-Velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature, 1987, 327; 70—73.
- [5] Klein T. et al. Transfer of foreign gene into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. Proc. Natl. Acad. Sci., USA; 1998, 85; 4305—4309.
- [6] Sanford J C. Biolistic plant transformation. Plant, 1990, 79; 206—209.
- [7] McCabe D E. et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology, 1988, 6; 923—926.
- [8] Gordon-Kamm W J. et al. Transformation of maize cell, 1990, 2; 603.
- [9] Kozidl M G. et al. Field performance of elite transgenic maize plant expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technol. 1993, 11; 194.
- [10] Dupuis I, Pace G M. Gene transfer to maize male reproductive structures by particle bombardment of tassels. Plant Cell Rep., 1993, 12; 607.
- [11] Rasmussen J L. et al. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. Plant Cell Rep., 1994, 13; 212.
- [12] Register III J C. et al. Structure and function of selectable and nonselectable in maize after introduction by particle bombardment. Plant Mol. Biol., 1994, 25; 951.
- [13] Caimi P G. et al. Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus anthracis* *SacB* gene. Plant Physiol, 1996, 110; 355.
- [14] Christon P. et al. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology, 1991, 9; 957—962.
- [15] Jun Cao. et al. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Reports, 1992, 11; 586—591.
- [16] Li Liangcai, et al. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Reports, 1992, 12; 250-255.
- [17] Vasil V. et al. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. Bio/Technology, 1993, 11; 1553—1558.
- [18] Troy weeks J. et al. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). Plant Physiol, 1993, 102; 1077—1084.
- [19] Becker D. et al. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. The Plant J. 1994, 5(2); 299—307.
- [20] Nehra N S. et al. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissue following microprojectile bombardment with distinct gene constructs. The Plant J., 1994, 5(2); 285—297.
- [21] 傅荣昭, 等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. 遗传学报, 1997, 24(4); 358—361.