

第一章 聚乙二醇介导的烟草叶肉原生质体的转化： 一个研究 Cre 与 lox 重组的实验

1. 导 论

本章介绍了核酸转化植物叶肉原生质体及分析所编码蛋白瞬时表达的实验程序虽然在多数情况下应用稳定转化材料可能更好些，但向植物原生质体瞬时导入外源大分子，可以更快地对被导入材料的生物学活性进行分析。瞬时检测手段具有易操作性，例如可利于鉴定启动子区的顺式作用调节序列（参见 Ebert et al. 1987; Ellis et al. 1987; Ow et al. 1987），比较不同启动子间的转录强度（见 Fromm et al. 1985; Boston et al. 1987; Hauptmann et al. 1987），以及研究环境因子对基因表达的影响（见 Howard et al. 1987; Marcotte et al. 1988）。在 RNA 分子转化细胞的实验中，瞬时检测方法在确定信使 RNA 和病毒 RNA 的有效成熟、稳定性和翻译的顺式调控方面已取得了显著的进展（参见 Callis et al. 1987; Gallie et al. 1989）。最近在进行转录因子分析的实验中，蛋白质已被瞬时导入到植物细胞中（Katagiri and Chua 1992）。本章将在对转基因植物中 DNA 分子的生物学活性的检测进行介绍的同时，为大家提供一个稳定转化和瞬时导入相结合的应用范例。

聚乙二醇介导的转化

将 DNA 转入植物细胞有很多方法（参见 Potrykus 1991 的综述）。其中的聚乙二醇（PEG）介导的转化常用于建立稳定转化和基因的瞬时表达研究（Krens et al. 1982, Paszkowski et al. 1984; Shillito et al. 1985）。PEG-介导的转化具有一些优点。首先，在达到最大的基因瞬时表达条件时，被转化细胞的存活率和细胞分裂速率很高（Negrutiu et al. 1990）；其次，PEG-介导的转化所用的材料和仪器较常规和便宜；最后，进一步的研究证明这种简单可靠的方法广泛适用于各种可制备原生质体的植物和组织。这里，本操作方法是研究烟草（*Nicotiana tabacum*）叶肉原生质体基因组中已转入基因结构内的位点特异重组而设计的。

实验设计

本实验的目的在于检测转化 DNA 所引起的烟草基因组的重组事件。作用于特异位点的重组酶是一个分子量为 38.5 的噬菌体 P1 cre（control of recombination，由“重组控制”一词的第一二字母组成——译者注）基因的表达产物，它催化 lox（locus of cross [x] over）位点处 34 个碱基序列间的重组。正如早先指出的那样，这种特异性位点重组系统能介导植物细胞 DNA 的切除、倒位和共整合（Dale and Ow 1990, 1991; Odell et al. 1990）。本实验中重组酶的作用目标是由农杆菌（*Agrobacterium*）介导转化并稳定地整合进烟草基因组的一段 DNA-pED32（Dale and Ow 1990）。这一结构由一个花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子（35S）和萤火虫荧光酶的 cDNA（luc）和胭脂碱合酶的多聚腺苷酸区

(*nos3'*) 的融合片段 (*luc-nos3'*) 组成。但 *luc-nos3'* 片段与 35S 启动子方向相反 (如图 1.1 所示)。这一片段的一侧与 *lox* 位点在一端相接, 但方向是相反的。 *luc* cDNA 的转录则需要通过在 *lox* 序列相邻片段的重组即 *luc-nos3'* 倒位。而倒位所必需的重组酶则由 pMM23——35S-*cre-nos3'* 结构中的 *cre* 基因的瞬时表达来提供。这一个嵌合 *cre* 基因除了其原核的核糖体结合位点被移去外, 与早先的 pED23 (Dale and Ow 1990) 是相同的。由 pMM23 所产生的 Cre 重组酶必须进入到植物细胞核中去催化特异部位的反转, 这种倒位能够根据荧光酶的活性 (光产量) 来评定。 DNA 转化效率能够用一个 *luc* 表达质粒如 pDO432 (阳性对照) 来评估 (Ow et al. 1986)。近期的有关于 *luc* 标记基因的综述参见 Millar et al. (1992)。

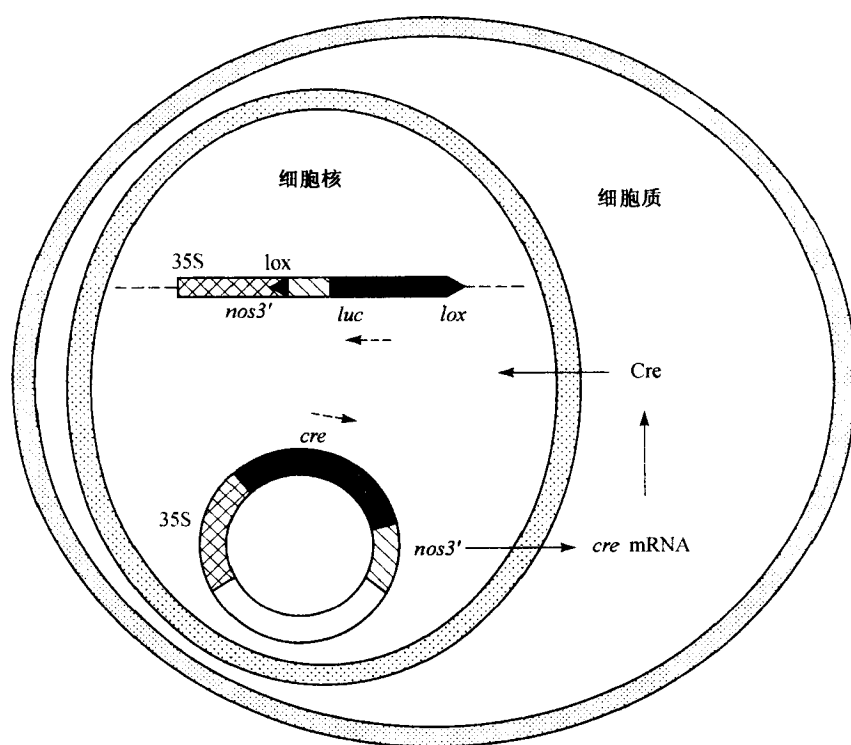


图 1.1 在植物基因组中 Cre-介导的 *cre* 基因 DNA 特异部位倒位。由转化 DNA 表达的 Cre 重组酶快速作用于已整合的能产生荧光酶活性 *luc* 基因的编码区域

表 1.1 显示了一个典型实验的数据, 在未加入 *cre* 表达质粒的情况下, 来自两个独立转基因烟草株系 (nt35.9 和 nt35.10) 的叶片叶肉原生质体, 由于整合的是反向的荧光酶基因结构, 几乎没有荧光酶的产生。这些数值仅比提取缓冲液本底水平或者没有转基因的野生型烟草的原生质体检测值高 3~4 倍。若在转化液中加入 *cre* 表达质粒, 其荧光酶的活性增加了 100 多倍, 表明 Cre 重组酶能够穿入植物细胞核并催化植物染色体 DNA 重组。这一实验原本是打算在进行稳定转化实验之前来检测原核蛋白进入核的能力 (Dale and Ow 1991), 那么既然实验证明这种分析方法是有效的, 将来也可能应用这种瞬时测定方法来分析在离体条件下改造了的非 *cre* 编码序列。

表 1.1 Cre 诱导的植物染色体 DNA 倒位

转基因的 <i>luc</i> 植株	转化 DNA ¹	光单位 ²	相对活性
nt35.9	载体	820	1
nt35.9	载体 + 10 μ g pMM23	1.14×10^5	139
nt35.10	载体	1190	1
nt35.10	载体 + 10 μ g pMM23	1.57×10^5	132

¹ 用 100 μ g 小牛胸腺 DNA 载体和 10 μ g pMM23 表示转化约 2×10^6 个原生质体。

² 转化 26 小时后制备提取液，每次提取都用荧光酶提取缓冲液调至 1ml 的总体积。将 100 μ l 提取液与 100 μ l 的荧光酶反应缓冲液混合，然后加入 100 μ l 0.5mmol/L 的 D-荧光素，以集成的方式作 30 秒光发射的计数，取 3 次读数的平均值，空白（只有提取缓冲液）的基线数为 279 光单位。

操作方法对其他系统的应用

为了使这里介绍的操作方法适用于其他系统，有必要改变一些操作步骤。

- 植物组织取材和原生质体制备方法可能会影响转化过程（Negrutiu et al. 1987, 1990）。有的学者提出，在分离原生质体操作中，用温和的条件进行较长时间（如过夜）的细胞壁消化，转化实验的结果会更好（Negrutiu et al. 1990）。关于原生质体分离方法的改进，请参见 Potrykus 和 Shillito（1986）的文献。
- 一些研究者指出，热激处理可以增加某些系统的瞬时表达水平（Oliveiria et al. 1991），但在另一些系统中却降低了表达水平（Negrutiu et al. 1990）。可以分别采取简短的热处理和不用热处理进行转化试验。
- 当 DNA 被用于转化过程，质粒模板的拓扑结构（环状与线状 DNA 比例）也会影响表达水平（Ballas et al. 1988），如果质粒是线性的，在远离基因 3' 端的位点断裂会增强基因的表达水平（Negrutiu et al. 1990）。
- 慎重调制 PEG 溶液中的二价阳离子是另一项具有不同效果的试验。Negrutiu（1990）提出，用 Ca^{2+} 取代 Mg^{2+} 可产生更高的瞬时表达水平，二价离子的浓度在 5 ~ 15mmol/L 范围可使细胞的存活与 DNA 吸收达到很好的平衡。
- 最后应该试验不同 PEG 的浓度和处理时间，另外 PEG 来源和分子量也是重要的，对较脆弱的原生质体的制备应用分子量高达 4000 或者甚至高达 8000 的 PEG 最合适（Negrutiu et al. 1987）。

致 谢

我们感谢 R. Shillito 和 H. Albert 为本章提出的有价值的建议。

参 考 文 献

- Ballas, N., N. Zakai, D. Friedberg, and A. Loyter. 1988. Linear forms of plasmid DNA are superior to supercoiled structures as active templates for gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **11**: 517-527.
- Boston, R.S., M.R. Becwar, R.D. Ryan, P.B. Goldsbrough, B.A. Larkins, and T.K.

- Hodges. 1987. Expression from heterologous promoters in electroporated carrot protoplasts. *Plant Physiol.* **83**: 742-746.
- Callis, J., M. Fromm, and V. Walbot. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**: 1183-1200.
- Dale, E.C. and D.W. Ow. 1990. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* **91**: 79-85.
- . 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 10558-10562.
- Ebert, P.R., S.B. Ha, and G. An. 1987. Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 5745-5749.
- Ellis, J.G., D.J. Llewellyn, J.C. Walker, E.S. Dennis, and W.J. Peacock. 1987. The *ocs* element: A 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. *EMBO J.* **6**: 3203-3208.
- Fromm, M., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5824-5828.
- Gallie, D.R., W.J. Lucas, and V. Walbot. 1989. Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* **1**: 301-311.
- Hauptmann, R.M., P.O. Akins, V. Vasil, Z. Tabaeiuzadeh, S.G. Rogers, R.B. Horsch, I.K. Vasil, and R.T. Fraley. 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Cell Rep.* **6**: 265-270.
- Howard, E.A., J.C. Walker, E.S. Dennis, and W.J. Peacock. 1987. Regulated expression of an alcohol dehydrogenase 1 chimeric gene introduced into maize protoplasts. *Planta* **170**: 535-540.
- Katagiri, F. and N.-H. Chua. 1992. Plant transcription factors: Present knowledge and future challenges. *Trends Genet.* **8**: 22-27.
- Krens, F.A., L. Molendijk, G.J. Wullems, and R.A. Schilperoort. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**: 72-74.
- Marcotte, W.R., Jr., C.C. Bayley, and R.S. Quatrano. 1988. Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* **335**: 454-457.
- Millar, A.J., S.R. Short, K. Hiratsuka, N.-H. Chua, and S.A. Kay. 1992. Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **10**: 324-337.
- Negrutiu, I., R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini, and F. Sala. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **8**: 363-373.
- Negrutiu, I., J. Dewulf, M. Pietrzak, J. Botterman, E. Rietveld, E.M. Wurzer-Figurelli, D. Ye, and M. Jacobs. 1990. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. II. Transient expression vs. stable transformation—Analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. *Physiol. Plant* **79**: 197-205.
- Odell, J., P.G. Caimi, B. Sauer, and S.H. Russell. 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 369-378.
- Oliveiria, M.M., J. Barroso, and M.S.S. Pais. 1991. Direct gene transfer into *Actinidia deliciosa* protoplasts: Analysis of transient expression of the CAT gene using TLC autoradiography and a GC-MS-based method. *Plant Mol. Biol.* **17**: 235-242.
- Ow, D.W., J.D. Jacobs, and S.H. Howell. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by the use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 4870-4874.

- Ow, D.W., K.V. Wood, M. DeLuca, J.R. de Wet, D.R. Helinski, and S.H. Howell. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856–859.
- Paszkowski, J., R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn, and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**: 2717–2722.
- Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 205–255
- Potrykus, I. and R.D. Shillito. 1986. Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol.* **118**: 549–578.
- Shillito, R.D. and M.W. Saul. 1988. Protoplast isolation and transformation. In *Plant molecular biology: A practical approach* (ed. C.H. Shaw), pp. 161–186. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Shillito, R.D., M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller, and I. Potrykus. 1985. High efficiency gene transfer to plants. *Biotechnology* **3**: 1099–1103.

• 时间表

聚乙二醇介导的烟草叶肉原生质体的转化

步 骤	需要时间
原生质体的制备	
从种子开始烟草植株的培育	5 ~ 7 周
酶解缓冲液的制备	1 小时
用于制备原生质体的叶片处理	1 小时
叶片酶解、保温过夜	14 ~ 18 小时
继续酶解叶梗（如果必要）	1 ~ 3 小时
收集和清洗原生质体	2 小时
用聚乙二醇进行的转化	
原生质体计 数与转化样品的制备	1 小时
转化	1 小时
收集原生质体并悬浮于 K_3AM 液中	30 分钟
培养原生质体用于瞬间表达分析	16 ~ 24 小时
收集并冻融原生质体裂解液	1 小时
荧光酶活测定	
分析荧光酶活性来定量转化效果	1 小时

2. 原生质体的制备

以下步骤均应在无菌条件下用灭过菌的试剂和器皿进行操作，叶组织和原生质体操作应在超净台中进行。

材料与仪器

烟草植株的培育 (*Nicotiana tabacum*)。用于本实验的烟草品种是“威斯康星 38”，它不具有商业用途。少量的转基因“威斯康星 38”（含有 pED32 结构）和未转化的帝本种子由 D. W. Ow 博士实验室惠赠（见附录 2）。

透明组织培养盒（10cm × 7.5cm × 7.5cm 型，Magenta 公司产品）

过滤装置（经灭菌处理的带 100 目尼龙筛；孔径 149μm，104 目/英寸，产品号 K-CMN 149，Small Parts 公司产品）。

培养基

用 K₃AS 培养液调制的酶解液（现配现用）

（配方参见培养基的配制，第 10 页 K₃AS 培养基）

试剂

W₅

（配方参见试剂的配制，第 11 ~ 12 页）

操作步骤

- 1) 采集生长在无菌透明组织培养盒中的烟草植株上中等大小的叶片〔这些培养箱可以使植物在有光照的条件下无菌生长，关于光照培养箱中烟草植株的培育，详见 Shillito and Saul (1988)〕常使用生长 5 ~ 7 周的烟草植株。
注意：烟草植株生长达到适当大小所需要的时间取决于植物的品种、所用培养基和生长条件在植株生长达到培养盒顶部或叶片密集之前就应进行采收，否则原生质体的产量就会相当低。
- 2) 用 8 个培养皿，每个培养皿中含有 10ml 用 K₃AS 调制的酶解液，放 3 ~ 4 片叶片
注意：酶解的速度和程度会受到苗龄和生长条件影响，最好从植株的中部采集中等大小的叶片，而不要用太老或太嫩的叶片。
- 3) 将叶片叠成两层，垂直于中肋切成 1 ~ 2mm 宽的小条。
- 4) 用封口膜将培养皿密封，24 ~ 26 °C 保温 14 ~ 18 小时，较老的叶片可能需要更长的酶解时间。
- 5) 检查酶解进行的程度，轻轻地搅动，使已分离的细胞释放进酶解液，如果需要，继续将叶片酶解 1 ~ 3 小时。
- 6) 为了促进原生质体的释放，可用大口径移液管缓慢地将酶解液上下吹吸 2 ~ 3 次。

注意：植物原生质体相当脆弱，渗透压的轻微变化和粗放的处理都会造成伤害。要尽可能地温和操作和使用大口径移液管来转移原生质体悬浮液。

7) 用 100 目尼龙筛的滤器过滤酶解混合液。

8) 将滤得的原生质体置于 50-ml 离心管 (Falcon tube) 中, 200g 离心 20 分钟, 使原生质体飘浮上层。

9) 用大口径移液管将上层原生质体以最小体积转移到新的 50-ml 离心管中。

注意：以最小体积转移漂浮的原生质体需要做些练习, 常使离心管倾斜从一边吸取原生质体。

10) 用 4 倍体积的 W_5 溶液稀释原生质体悬浮液, 温和混匀后, 以 200g 5 分钟离心沉淀原生质体。

注意 原生质体在 w_5 溶液中会下沉, 而在用 K_3AS 配制的酶解液中, 因含糖漂浮。

11) 再悬浮原生质体于 30~40ml 的 W_5 溶液, 200g 离心 5 分钟, 沉淀原生质体。

注意：开始时最好将原生质体沉淀悬浮于少量体积的悬浮液 (<1ml) 中, 然后再缓慢地加入所需的悬浮液。

12) 再一次用 W_5 溶液洗涤并以 200g 5 分钟离心沉淀原生质体。

3. 聚乙二醇介导的转化

以下方法根据 Negrutiu 等的方法改编 (1987), 各步均应使用经灭菌的溶液和器皿, 在无菌条件下操作, 原生质体的处理和 PEG 转化应始终在超净台中进行。

材 料

烟草叶片原生质体 (参见上文, 步骤 12)

用于转化的 DNA (*cre* 表达质粒 [pMM23], 可从 D.W.Ow 博士的实验室获得, 见附录 2)

培养基

K_3AM 培养基

(配方参见培养基的配制, 第 10 页)

试 剂

$MaMg$ (1× 和 2×) 溶液

聚乙二醇 (分子量 1450) 溶液 (PEG1450)

W_5 溶液

荧光酶提取缓冲液

(配方参见试剂的配制, 第 11~12 页)

操作步骤

- 1) 将烟草叶片原生质体悬浮于 10ml 1× $MaMg$ 溶液中, 用血细胞计数器测定原生质体的浓度。在 50-ml Falcon 管中加入原生质体, 使每个转化样品大约有 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞, 用 1× $MaMg$ 溶液稀释每个样品至终体积 10ml。

- 2) 200g 5 分钟离心沉淀原生质体，除去上清，再将沉淀悬浮于 0.5 ml 的 $1 \times \text{Mg}$ 溶液中。
- 3) 对原生质体在 45℃ 水浴中进行热激处理 5 分钟，取出样品后室温放置 5~10 分钟
- 4) 向样品中加入用于转化的 DNA，通常每个样品（约 10^6 个原生质体）大约加 10 μg DNA，这些 DNA 先已与大约 50 μg DNA 载体混合。DNA 应先溶于水，如果用 10mmol/L Tris/1mmol/L EDTA 溶解，体积应小于 30 μl 。
- 5) 缓慢加入 0.5 ml PEG 1450，温和混匀，以诱导细胞摄取 DNA。
注意 由于 PEG 溶液的粘性 每个转化样品的完全混合大约需要若干分钟。
- 6) 室温下转化 25 分钟
- 7) 用 5ml W_3 溶液稀释样品，温和搅匀后，用 200g 离心 5 分钟沉淀原生质体。
- 8) 按大约每毫升 10^5 个原生质体的密度将原生质体再悬浮于 K_3AM 培养液中
- 9) 在 24~26℃ 温度下，将 50-ml Falcon 管中的原生质体遮光培养 16~24 小时，进行瞬时表达，最好将 Falcon 管斜放以形成最大的表面积。
- 10) 200g 7 分钟离心收集原生质体，如果首先用 W_3 溶液将原生质体稀释 2~3 倍，沉降的效果会更好。
- 11) 将沉淀再悬浮于 500~1000 μl 的荧光酶提取缓冲液中并转移到 1.5-ml 的离心管中。交替地将样品在 -80℃ 和室温水浴中进行 3 次各 3 分钟的反复冻融后，4℃ 条件下离心 5 分钟沉淀细胞碎片，再分析上清液中荧光酶活性 [如果需要的话，可用如 Bio-Rad (Bradford) 蛋白分析仪测定样品的蛋白浓度]。提取液可在 -80℃ 条件下保存若干星期而不会丧失活性。

4. 荧光酶分析

材料与仪器

原生质体提取物（见上文，步骤 11）

发光光度计（Analytical Luminescence Laboratory 公司或 Turner Designs 公司产品）

试剂

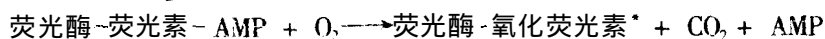
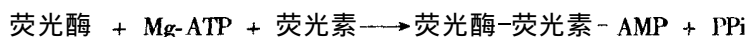
反应缓冲液

D-荧光素（0.5 mmol/L）

（配方参见试剂的配制，第 11~12 页）

操作步骤

- 1) 将 100 μl 反应缓冲液与 100 μl 原生质体提取物在发光光度计样品杯中混合，为了得到最佳的读数，按发光光度计要求调整其总体积。
- 2) 将样品杯放入发光光度计，注入 100 μl 0.5 mmol/L 的 D-荧光素以开始反应，记录光的发射。整个反应过程如下：



荧光酶-氧化荧光素* $\longrightarrow$ 荧光酶 + 荧光素 + 光(560 nm)
(PPi 为焦磷酸——译者注)

5. 培养基的配制

用 K_3AS 培养液配制的酶解液

1% 的纤维素酶 R10 (Serva 16419)

0.2% 解析酶 R10 (Serva 28302)

溶于 K_3AS 培养液中, 搅拌 30~60 分钟后, 用 1mol/L KOH 调 pH 至 5.8, 3000r/min 离心 5 分钟, 除去不溶物质并灭菌后过滤备用。注意要现配现用。

K_3AM 培养基

按以下配方先配制 K_3AS , 再按 30g/L (而不是 137g/L) 加入蔗糖, 按 72.8g/L 加入甘露糖醇, 室温保存, K_3AM 液在至少 1 个月内是稳定的。

K_3AS 培养基 (1L)

Muraghige 和 Skoog 盐 (GIBCO 11117-041)	4.3 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.46 g
木糖	0.25 g
B_5 维生素储藏液 (1000 $\times$)	1 ml
α -萘乙酸储藏液	1 ml
6-苄氨基嘌呤储藏液	25 μ l
蔗糖	137 g

溶于 900ml 水中, 用 KOH 调 pH 至 5.8, 加水定容至 1L, 过滤灭菌, 室温保存备用。
 K_3AS 培养液在至少 1 个月内是稳定的。

B_5 维生素储液 (1000 $\times$) (100ml)

烟酸	0.1 g
盐酸硫胺素	1 g
盐酸吡哆醇	1 g
肌醇	10 g

加水定容至 100ml, 过滤灭菌, -20°C 冷藏。

α -萘乙酸 (植物生长素) (GIBCO 21570-015)

储藏液: 2mg/ml 溶于二甲基亚砷, -20°C 冷藏。

6-苄氨基嘌呤 (细胞分裂素) (GIBCO 16105-017)

储藏液: 20mg/ml 溶于二甲基亚砷, -20°C 冷藏。

6. 试剂的配制

荧光酶提取缓冲液

含有 1mmol/L 二硫苏糖醇的 100mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.5)。在配制 100mmol/L 磷酸钾缓冲液时, 先将 16ml 0.2 mol/L 的 KH_2PO_4 和 84 ml 0.2 mol/L 的 K_2HPO_4 用蒸馏水定容至 100 ml, 过滤灭菌, 磷酸钾缓冲液在室温下保存, 使用前再加入 1mmol/L 二硫苏糖醇。

D- 荧光素

钾盐 (Analytical Luminescence Laboratory 公司产品, 分子量 318)

储藏液: 10mmol/L, 以水为溶剂

- 20 °C 遮光冷藏, 使用前将 250 μ l 的 D- 荧光素加入 4.75ml 水中, 配制成 0.5 mmol/L 的溶液, 避光置于冰浴上。

MaMg(1 $\times$) 液

将 2 $\times$ MaMg 液与无菌蒸馏水按 1:1 稀释, 室温保存。该溶液在室温下至少 1 个月内是稳定的。

MaMg(2 $\times$) 液 (100 ml)

0.8 mmol/L 甘露醇

30 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.2% 2-(N-吗啉) 乙酰磺酸 (MES)

将 14.6g 甘露醇, 0.61g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.2 g MES 溶于 70 ml 水中, 用 KOH 调 pH 至 5.6, 定容至 100 ml。过滤灭菌后室温保存该液在室温下至少 1 个月内是稳定的

聚乙二醇溶液 (PEG 1450)

PEG (Polysciences 公司产品, 产品号 1120, 分子量 1450) 溶于 2 $\times$ MaMg 溶液, 加水使 PEG 在 1 $\times$ MaMg 液达到 40% 浓度 (w/v)。PEG 溶解后检查 pH, 如果超出 5.6~7.0 范围, 用稀 KOH 或 HCl 将 pH 调到 5.6~7.0, 过滤灭菌后室温存放。注意要在转化的当天配制备用。

反应缓冲液 (10 ml)

500mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.8) 1ml

1mol/L MgCl_2 0.2ml

20 mmol/L ATP 5ml

50 mg/ml 牛血清蛋白 0.1ml

用水定容至 10 ml, 应在荧光酶分析前现配, 在 - 20 °C 冷藏 20 mmol/L ATP 和 50 mg/ml 牛血清蛋白。

W₅ 液 (1 L)

154 mmol/L NaCl

125 mmol/L CaCl₂ · 2H₂O

5 mmol/L KCl

5 mmol/L 葡萄糖

将 9 g NaCl, 18.37 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.37 g KCl 和 0.9 g 葡萄糖溶于水中并定容至 1 l 后, 用 1mol/L KOH 调 pH 至 5.8, 过滤灭菌, 室温保存。该液在室温下至少 1 个月内是稳定的。

(吴庆余译 唐莉校)

第二章 利用在玉米原生质体内的瞬时表达对一个植物转录因子进行功能分析

1. 导 论

与那些要求稳定遗传转化及再生的转基因植物研究方法相比，采用聚乙二醇处理 (Marcotte et al. 1988, 1989)、电击法 (McCarty et al. 1991; Hattori et al. 1992) 或者微弹轰击法 (particle bombardment) (Goff et al. 1990, 1991) 等将克隆 DNA 片段导入植物细胞的基因瞬时表达法在植物生物学的诸多研究方面表现出显著的优势，尤其是它具有快速、可重复性和分析容量大 (即可以同时大量的样品进行分析) 的特点。瞬时表达系统是一个非常灵活的分析体系，它允许各种不同的基因片段组合在一起接受检测，也允许各种外部处理措施 (如激素处理等) 的使用。这些快速灵活的特点在对植物转录因子的功能分析 (Goff et al. 1991; McCarty et al. 1991) 以及在对植物启动子的顺式调控元件的鉴定和分析 (Huttly and Baulcombe 1989; Marcotte et al. 1989; Guiltinan et al. 1990; Hattori et al. 1992) 方面尤其有利。

本章介绍运用瞬时表达法来研究玉米转录活化因子 (VP1) 与下游靶基因 (*Cl*) 间的相互作用的实验方案。*Vp1* 基因能调节多种在种子成熟过程中表达的基因。许多与成熟有关的基因，包括小麦 *Em* 基因 (Marcotte et al. 1988) 和玉米花色素苷合成调控基因 *Cl* (Hattori et al. 1992)，其表达也可被脱落酸 (ABA) 调控。在玉米种子发育过程中，VP1 首先激活 *Cl* 基因的转录，再由 *Cl* 基因编码的转录因子活化花色素苷合成途径中的结构基因，从而调控花色素苷合成途径。这个使 VP1 蛋白在玉米原生质体内过量表达的效应基因表达载体是由 *Vp1* cDNA 序列克隆到花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子下游而构成的 (McCarty et al. 1991) (见图 2.1)。在 *Vp1* cDNA 的 5'端非翻译区插入

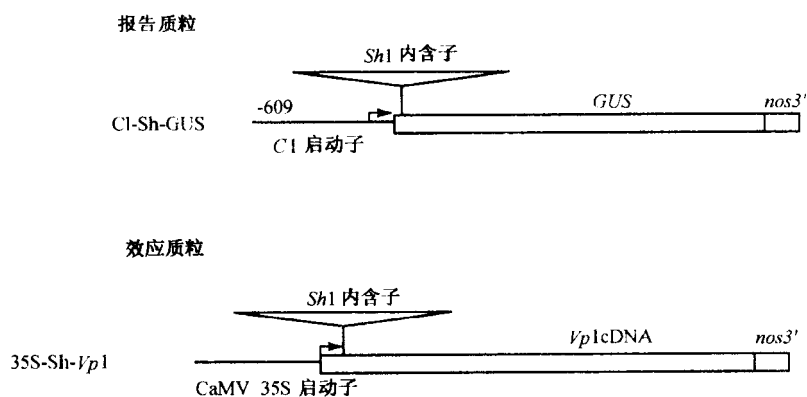


图 2.1 用于反式活化实验中的效应基因和报告基因载体的结构

玉米 *Sh1* 基因的第一个内含子序列会进一步促进该基因的表达 (Vasil et al. 1989) 为了监测 *VP1* 过量表达对其下游基因转录的影响, 还需用到一个由 *C1* 基因启动子与细菌 β -葡萄糖苷酶基因 (*GUS*) 融合而成的报告基因 (见图 2.1)。本项基本实验是采用电击法将 *C1-Sh-GUS* 报告质粒单独或者与 *35S-Sh-Vp1* 效应质粒一起导入悬浮培养的玉米细胞原生质体中, 24 小时后测定原生质体提取液的 *GUS* 酶活水平实验预期结果是: 同时获得两种质粒的细胞中 *VP1* 的过量表达将活化 *C1-Sh-GUS* 基因, 因此, 这类细胞中 *GUS* 酶活水平会高于那些只获得 *C1-Sh-GUS* 质粒的细胞。通过在含或不含 ABA (10^{-4} mol/L) 的培养基中培养各个等份电击样品来检测 ABA 对上述活化因子与结构基因相互作用的影响

参 考 文 献

- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* **16**: 659-688.
- Goff, S., K.C. Cone, and M.E. Fromm. 1991. Identification of functional domains in the maize transcriptional activator *C1*: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.* **5**: 298-309.
- Goff, S., T.M. Klein, B.A. Roth, M.E. Fromm, K.C. Cone, J.P. Radicella, and V.L. Chandler. 1990. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulatory genes into maize tissues. *EMBO J.* **9**: 2517-2522.
- Guiltinan, M.J., W.R. Marcotte, and R.S. Quatrano. 1990. A leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**: 267-270.
- Hattori, T., V. Vasil, L. Rosenkrans, L.C. Hannah, D.R. McCarty, and I.K. Vasil. 1992. The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *C1* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* **6**: 609-618.
- Huttly, A.K. and D.C. Baulcombe. 1989. A wheat α -amy2 promoter is regulated by gibberillin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J.* **8**: 1907-1913.
- Marcotte, W.R., Jr., C.C. Bayley, and R.S. Quatrano. 1988. Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* **335**: 454-457.
- Marcotte, W.R., Jr., S.H. Russell, and R.S. Quatrano. 1989. Abscisic acid response sequences from the *Em* gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 523-532.
- McCarty, D.R., T. Hattori, C.B. Carson, V. Vasil, and I.K. Vasil. 1991. The *viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**: 895-905.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Vasil, V., R.M. Hauptmann, F.M. Morrish, and I. K. Vasil. 1988. Comparative analysis of free DNA delivery and expression into protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) by electroporation and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep.* **7**: 499-503.
- Vasil, V., M. Clancy, R.J. Ferl, I.K. Vasil, and L.C. Hannah. 1989. Increased gene expression by the first intron of the maize *sh1* locus in grass species. *Plant Physiol.* **91**: 1575-1579.

• 时间表

玉米原生质体内的瞬时表达

步 骤	所需时间
玉米悬浮培养细胞的维持	
细胞继代培养	3 ~ 4 天
原生质体的制备	
细胞酶解	4 ~ 5 小时
原生质体的收集、洗涤和计数	1 小时
电击实验	
原生质体电击	1 小时
用于瞬时表达的原生质体的培养	24 ~ 48 小时
β -葡糖苷酸酶的提取	1 小时
β -葡糖苷酸酶的荧光测定	
测定 β -葡糖苷酸酶活性	3 小时

2. 玉米悬浮培养细胞的维持培养

本章所述获取原生质体的方案最初是为玉米未成熟胚衍生 II 型的胚生愈伤组织的细胞悬浮培养而设计的 (Vasil et al. 1989), 也可用于其他玉米细胞悬浮物的培养, 但为了获得理想的结果, 往往需要对酶解时间及继代培养间隔 (用于调节培养物生长速率) 作一些调整。细胞系在改良的 N6 培养基 (Chu et al. 1975) 中作维持培养。

材 料

玉米细胞悬浮培养株 [可从 I. K. Vasil 博士实验室获得, (见附录 2)]

培养基

改良的 N6 培养基 (配方参见培养基的配制, 第 20~22 页)

操作步骤

- 1) 将玉米悬浮细胞培养系置于旋式摇床上, 在黑暗条件, 28°C 下培养。
- 2) 每隔 4~5 天, 将 12ml 悬浮培养细胞转移至含 25ml 新鲜培养基的 250-ml 锥形瓶中进行继代培养。
注意 移取细胞时应采用一次性的 5-ml 塑料吸管, 为使其管口大些, 可将管尖去掉。
- 3) 在继代培养 3 天后, 从 4 个锥形瓶中收集细胞用于制备足够的原生质体, 以满足 20 次电击所需样品量。

3. 原生质体的制备

以下各个步骤都应在无菌条件下进行, 所用的仪器和试剂都应灭菌消毒、原生质体的处理应在层流式超净台 (laminar flow hood) 内进行。

材料与仪器

玉米细胞悬浮培养株 (见上文)

米拉纱布 (Miracloth) (Calbiochem 47855)

不锈钢过滤器 (100 μ m 和 50 μ m)

试 剂

酶解溶液

洗涤液

电击缓冲液

(配方参见试剂的配制, 第 22~23 页)

操作步骤

- 1) 将玉米悬浮培养细胞从摇床上取出静置 30 ~ 40 秒，将沉聚下来的细胞转入 12 个一次性的培养皿（15mm × 100mm）中，每个培养皿转入 2 ~ 3ml。然后往每个培养皿中加入 16ml 酶解溶液并混匀，再用封口膜将培养皿封紧，置于旋转摇床（10 ~ 20 r/min）上，室温下培养 4 ~ 5 小时。在培养结束时，可用吸管将那些未完全酶解的细胞块中的细胞分散。
- 2) 对原生质体悬浮液，先用一层米拉纱布（Miracloth）再用 100 μ m 和 50 μ m 规格的不锈钢过滤器过滤，弃去酶解后的残渣和未被消化的细胞。将纯化的原生质体转入 15-ml 一次性锥形离心管中，用医用离心机在 70g（即 1000r/min）转速下离心 3 分钟。
- 3) 弃去上清液，缓缓加入少量（每管约 1ml）洗涤液，使原生质体沉淀再次悬浮，将各管悬浮液汇集并分入两个离心管中，采用上述条件离心以洗涤原生质体。该步骤重复 2 次。
- 4) 将离心所得原生质体悬浮于电击缓冲液中，调整每管体积至约 11ml。
- 5) 用电击缓冲液将每份悬浮液再稀释 10 ~ 100 倍。用血细胞计数板确定原生质体的密度和产量。计数时只能对各个单独分开的球状原生质体进行计数。一般 35ml 左右的初始材料（上述步骤 1 中的静置沉聚细胞）可获得 $9 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 个原生质体，至少可满足 20 次电击所需用量。

4. 电击实验

以下 1 ~ 3 步应在无菌条件下完成，所用的仪器和试剂都应灭菌消毒，原生质体的操作应在层流式超净台内进行。

材料与仪器

玉米原生质体悬浮液（见上文）

电击仪（如：Bio-Rad Gene Pulser[®] System）

碳化硅（金刚砂）或石英砂粉

与 1.5-ml 微量离心管相配的小塑料杵（749515, Kontes Glass，或类似产品）

钻机

Bradford 试剂盒（Bio-Rad 产品）

培养基

含 0.5mg/l 的 2, 4-二氯苯氧乙酸和 0.5mol/L 葡萄糖的 KM 培养基
（配方参见培养基的配制，第 20 ~ 22 页）

试 剂

质粒混合物：

DNA 溶液 A