

研究简报

# 电穿孔法诱导 GUS 基因在坛紫菜 原生质体中的瞬间表达

## TRANSIENT EXPRESSION OF GUS GENE IN *PORPHYRA* *HAITANENSIS* BY ELECTROPORATION TRANSFORMATION

王素娟 李 晖

(上海水产大学渔业学院, 200090)

Wang Su-juan and Li Hui

(Fisheries College, SFU, 200090)

李 瑶 沈大稜

(复旦大学遗传学研究所, 200433)

Li Yao and Shen Da-leng

(Institute of Genetics, Fudan University, 200433)

**关键词** 电穿孔法, 遗传转化, 坛紫菜, 原生质体, 瞬间表达

**KEYWORDS** electroporation, gene transformation, *Porphyra haitanensis*, protoplast, transient expression

基因工程研究已在高等植物中广泛开展, 尤其对重要经济作物如水稻、玉米、大豆等的品种改良不断取得可喜成果。在藻类中基因工程起步较晚。Rochaix 和 Van Dillewijn 于1982年第一次报道了对单细胞衣藻以质粒为载体进行的基因转移[Rochaix 等, 1982]; Veeck 等于1987年以蓝藻为材料进行了基因转移的研究, Boynton 等于1988年以衣藻为材料成功地得到了转基因藻株[王素娟, 1994]。除蓝藻和单细胞绿藻外, 外源基因导入大型藻类的工作尚未见成功的报道。Cheney 与 Kurtzman 用表基因枪将 GUS 基因导入红藻(*Kappaphycus alvarezii*)中得到瞬间表达[Cheney 等, 1990], 但未见正式报道。国内中国科学院海洋研究所有关于用基因枪法把 GUS 基因导入褐藻海带和裙带菜组织块中培养至48小时并检测到瞬间表达[秦松等, 1994]。

在基因转移的多种方法中, 电穿孔法(electroporation)是应用最广的方法之一。用这种方法已成功地转化了玉米、水稻、烟草等高等植物。它利用短暂加到细胞膜上的高压电场使其形成一些可逆的瞬时孔洞, 从而允

质粒 DNA 通过它们进入细胞。电穿孔法的优点在于它可广泛地应用于不同物种,并且对原生质体纯度要求不高,为转化后的培养工作带来便利。本研究即采用电穿孔法把带有 35SCaMV 启动子(如图1中 P35S),Km (图1中 Kam)和 GUS 基因的质粒 PBI121 转入到坛紫菜原生质体中,以探索电穿孔法,35SCaMV 启动子及 GUS 基因检测方法在藻类基因转移中的应用,为改良藻类品种的研究打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 *Ecoli*-MC1061(PBI121)

1.1.2 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)叶状体

### 1.2 方法

1.2.1 坛紫菜培养及原生质体分离

按照王素娟等(1986)的方法培养种藻及分离原生质体。

1.2.2 质粒的结构和制备

含有质粒 PBI121(结构见图1)的大肠杆菌菌株 *Ecoli*-MC1061由复旦大学遗传学研究所提供,质粒的制备参照《分子克隆实验指南》[Sambrook 等,1989],用碱裂解法大量制备质粒 DNA。

1.2.3 转化前对坛紫菜细胞 Km 抗性的测定

酶解原生质体以均匀密度分别培养于含 Km 浓度为 0,25,50,100,200,300,400  $\mu\text{g/ml}$  的 MES 培养液中,每周更换1次培养液,显微镜下观察并计数细胞。

1.2.4 坛紫菜细胞色素的快速去除试验

为了避免坛紫菜细胞内色素对组织化学检测的影响,转化前试验以有机溶剂,加热及两者相结合的方法快速去除坛紫菜细胞色素,同时观察这些方法对 GUS 组织化学检测的影响。(1)坛紫菜分别用6种不同有机溶剂处理:无水乙醇、异丙醇、丙酮、二甲苯、正丁醇、异戊醇。(2)不同温度(65 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $^{\circ}\text{C}$ )加热处理。(3)100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热30分钟后再加入不同有机溶剂。(4)各种有机溶剂处理后,再100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30分钟。同时把经过 GUS 检测的含质粒 PBI121 的大肠杆菌菌体(此时为深蓝色)做相同处理作为对照,观察颜色变化。

1.2.5 转化前坛紫菜细胞内源 GUS 背景检测

为排除坛紫菜细胞内源 GUS 活性而出现假阳性的可能,把未转化的坛紫菜原生质体培养生成的细胞团用 Jefferson 的方法[Jefferson, 1987]检测细胞在不同条件下(pH 5,6,7,7.5,8)的内源 GUS 酶活性,然后进行色素去除处理,在显微镜下观察。

1.2.6 电穿孔法转化试验

酶解所得原生质体以密度为  $2\sim 4\times 10^6$  个/ml 悬浮于缓冲溶液中,加入10微克 PBI121质粒 DNA 和30微克载体 DNA(小牛胸腺 DNA),冰浴20分钟后把悬浮液转移至电击杯中选择最大场强450 V/cm,电容1550 mfd 及不同时间,不同电击次数分别进行电穿孔转化试验,然后在冰浴中放置20分钟,离心收集原生质体。对照组中不加 DNA,但以相同方法处理。转化后的原生质体按王素娟等[1986]方法进行培养。

1.2.5 电穿孔转化后细胞中 GUS 酶活性检测。

①荧光分光光度计法定量检测。不同条件下电穿孔转化的细胞每隔一定时间取样用 Jefferson 方法进行

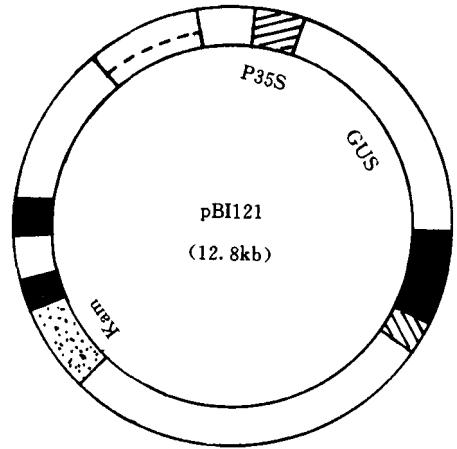


图1 质粒 PBI121 的结构

Fig. 1 Construct of plasmid PBI121

检测[Jefferson, 1987]。并用福林-酚法(参照复旦大学《普通生物化学实验》)测定样品中总蛋白浓度。GUS 酶活性以每微克蛋白中每小时产生的 4-MU 的量加以衡量。②组织化学法定点检测。根据荧光分光光度计法检测结果,取 GUS 酶活力最强的一组及其对照组和未转化细胞同时按照 Jefferson 方法[Jefferson, 1987]进行组织化学法定点检测(已培养至第 42 天)。随后进行色素去除处理,显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 坛紫菜细胞对 Km 的抗性

分别在 Km 浓度为 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/ml}$  培养液中生长的坛紫菜细胞计数见表 1。表 1 中细胞数以 5 个视野观察计数取均值。不同浓度 Km 中细胞数量及其形态无明显差别,细胞分裂时均有正常苗和畸形苗形成,在培养数周后,均长出 1~3 mm 的小苗。由此认为坛紫菜细胞对 Km 不敏感,故 Km 不能作为筛选转化细胞的方法。但培养过程中观察到 Km 的加入可抑制细菌和原生动物的生长,因此本实验中均在培养液中加 300  $\mu\text{g/ml}$  的 Km。

表 1 含不同浓度 Km 的培养液中细胞生长比较(个数/20 $\times$ 10 视野)

Table 1 Statistics of cells (cell-groups) cultured in MES medium with different [km] (cells per eyeshot of 20 $\times$ 10)

生长天数 (d)	[km] $\mu\text{g/ml}$	0	25	50	100	200	300	400
3		12	15	13	21	22	24	19
10		4	3	2	5	4	1	2
30		2	0.8	0.6	0.4	1	1.6	1
60		均有 1-3 mm 大小不等的小叶状体长出						

### 2.2 坛紫菜细胞色素去除试验

#### 2.2.1 有机溶剂对细胞色素的去除效果

试验所用六种有机溶剂在常温下对坛紫菜细胞色素去除效果很缓慢,24 小时内无显著效果,但长时间作用均可使藻体脱色。

#### 2.2.2 不同温度的色素去除效果

随着温度升高,藻体颜色变化显著。但加热不能完全去除色素。实验结果见表 2。

表 2 不同温度的色素去除效果

Table 2 Effect of pigment elimination by heating under different temperature( $^{\circ}\text{C}$ )

时间 (min)	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	65	80	90	100
5		—	—	—	—
10		—	—	—	—
30		—	—	—	—
60		—	—	—	—
蓝色菌体		+	+	+	+

注:“—”颜色变浅;“—”,绿褐色;“—”,浅绿色;“+”,颜色加深。

### 2.2.3 加热与有机溶剂联合处理的色素去除效果

以100℃水浴加热处理30分钟后,藻体变为淡绿色,再分别加入上述六种有机溶剂,12小时后观察结果。无水乙醇去除色素效果最好,使加热过的藻体接近于无色。其它溶剂中藻体颜色变化不显著。

### 2.2.4 有机溶剂处理12小时后再100℃加热的色素去除效果

先以有机溶剂处理再加热,仍然无法使色素显著减少。

以上四种去除色素的试验结果中看出100℃加热后再以有机溶剂处理的效果最好,时间最短。而对组织化学检测的结果无影响。

## 2.3 坛紫菜细胞内源 GUS 背景检测

未转化细胞在不同 pH 的 GUS 检测液中的反应见表3。

表3 坛紫菜细胞内源 GUS 背景检测

Table 3 Histochemical assay of intrinsic GUS activity in cells of *Porphyra haitanensis*

pH	5	6	7	7.5	8
着色反应	—	—	—	—	—

注:“—”,无着色反应

由表3中看出,未转化的坛紫菜体细胞在 pH 5~8范围内均无可检测的背景 GUS 酶反应,从而证明坛紫菜中没有内源 GUS 酶活性,而高等植物在酸性条件下往往有内源 GUS 酶背景。因此本实验中采用 pH 7检测液,不会有背景干扰。

## 2.4 电击次数对转化效率的影响

在较强的电场中能提高转化效率,但连续电击使缓冲液温度急剧升高,使细胞大量死亡。实验中发现,连续电击3次,死亡率达100%,2次连续电击后细胞存活率低于1次。因此在本实验中全部采取1次电击。

## 2.5 电击转化后细胞 GUS 酶活力测定

### 2.5.1 荧光分光光度计检测

不同电击时间的转化组(分别是5毫秒和10毫秒)与不加 DNA 但相同电击处理(电击时间为5毫秒)的对照组在不同时间同时取样所测得细胞内荧光物质浓度见表4。由表4制成图2。

表4 荧光分光光度计检测结果  
(荧光物质 MU 浓度单位:nM/小时/微克蛋白)

Table 4 The result of fluorometric assay (NM/hr/ $\mu$ g protein)

[ MU ]	days	6	8	10	12	14	33	35	42
		I	.565	.148	.181	.016	.144	.179	.102
II		7.840	.312	.273	1.260	.386	.430	.093	.251
III		.107	.312	.176	.732	.236	.197	.199	.176

I:无 DNA 的电击处理细胞,电击条件:450 V/cm,1550 mfd,5 ms。

II:DNA 转化细胞,电击条件,同 I。

III:DNA 转化细胞,电击条件:450 V/cm,1550 mfd,10 ms。

由表4及图2中看出,电场强度相同的条件下,电击时间为5 ms 的细胞内荧光物质含量(主要为 MU)显著

高于10 ms 转化组。由于藻胆素的荧光特性使对照组中具有荧光背景。随着培养时间延长, MU 浓度呈下降趋势, 认为有可能外源基因未得到稳定表达而丢失。由于检测中取样的随机性使荧光检测结果含有不确定因素, 需要以组织化学法联合检测转化细胞中 GUS 酶的存在。

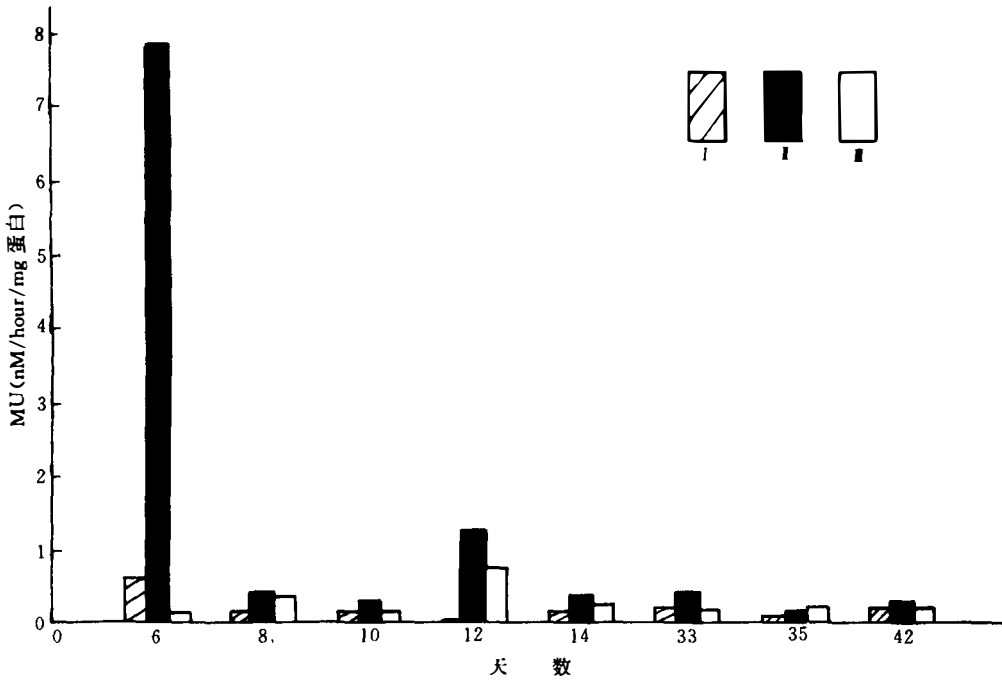


图2 荧光分光光度计检测结果

Fig. 2 The result of fluorometric assay

注: I: 无 DNA 的电击处理细胞, 电击条件: 450 V/cm, 1550 mfd, 5 ms。

II: DNA 转化细胞, 电击条件: 同 I。

III: DNA 转化细胞, 电击条件: 450 V/cm, 1550 mfd, 10 ms。

2.5.2 组织化学法定点检测 GUS 酶活性

在荧光检测中显示最高酶活性的实验组中取样做组织化学检测, 在显微镜下观察到蓝色着色细胞及大部分细胞为深蓝色的小叶状体。在对照组及其它转化条件下的细胞则无此现象(因故未附彩照)。由以上两种方法检测结果确认, 在较短的电击时间下, 转化效率高于长时间的转化, 并且质粒 DNA PBI121 已进入坛紫菜细胞瞬间表达, 合成具有活性的 β-葡糖苷酸酶。在转化后第42天, 检测到已分化成小叶状体的转化细胞, 其个体远小于未转化小叶状体。显微镜下也看到组织检测后有着色于细胞壁的蓝色, 因已排除背景干扰, 认为这些 β-葡糖苷酸酶来源于未进入细胞内的 GUS 基因利用解体细胞内物质合成的, 在其它高等植物转化的文献中亦有此报道。

### 3 讨论

本研究所进行的外源基因转化坛紫菜体细胞的初步探索中,由检测结果认为质粒 DNA PBI121所携带 35SCaMv 启动子能够在坛紫菜细胞中瞬间表达,因而 GUS 基因可作为进一步的藻类基因转移研究中的报告基因(report gene),电穿孔法也可成为藻类基因转移的有效手段。

由于实验条件所限,本实验中电击条件仅为允许范围内的选择,其他的有效转化条件有待于进一步探索。另外坛紫菜细胞对 km 不敏感的特性成为进一步转化筛选的障碍,因而寻找可筛选的标记基因是藻类转基因研究必须解决的问题之一。

### 参 考 文 献

- [1] 王素娟,1994.海藻生物技术,143-148.上海科学技术出版社。
- [2] 王素娟等,1986.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I。海洋与湖沼,17(3):217-221。
- [3] 秦 松等,1994.用基因枪法将 GUS 基因导入褐藻细胞中表达.海洋与湖沼,25(4):424-429。
- [4] Cheney D. P., *et al.*, 1990, Direct gene transfer and transient gene expression in a marine red alga using the biolistic method. Abstracts. *Fourth International Phycological Congress*. No. 232.
- [5] Jefferson R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants; the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5(4): 387-405.
- [6] Sambrook J. *et al.*, 1989. *Molecular cloning; a laboratory manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [7] Rochaix J. d. *et al.*, 1982. Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature*, 296:70-72.