

超声法转基因及其应用前景

初志战¹, 黄卓烈¹, 丘泰球²

(1. 华南农业大学生物技术学院, 广州 510641; 2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

摘要: 目前基因工程蓬勃发展, 转基因的方法也越来越多, 超声波作为一种新兴的转基因方法开始被应用于科研工作, 文章主要阐述了超声法转基因的机理、步骤、影响因素、存在问题及应用前景。

关键词: 超声; 转基因; 声孔效应

中图分类号: TB559 **文献标识码:** A

The application and prospect of gene transfer by ultrasound

CHU Zhi-zhan¹, HUANG Zhuo-lie¹, QIU Tai-qiu²

(1. Biotechnology Institute, South China Agricultural University, Guangzhou 510641, China;

2. Food & Biological Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The methods of gene transfer are increasing with the development of gene engineering. Ultrasound is used in scientific research as a novel gene transfer method. The paper mainly discusses the method about the procedure and the affecting factors. The existing problems and its future are also discussed.

Key words: ultrasound; gene transfer; sonoporation

1 引言

早在 1894 年人们就发现了空化现象, 英国的 Rayleigh 勋爵经过仔细研究于 1917 年发表了题为《液体中球形空穴崩溃时产生的压力》的著名论文, 为以后的空化理论研究奠定了基础^[1]。自 80 年代以来超声技术在生物工程方面开始受到重视, 90 年代随着基因工程的进一步发展, 超声在这一领域中独特的作用被人们发现, 尤其是在把外源基因导入受体细胞这一基因工程中的关键技术方面。

目前, 转基因的方法有近 10 种^[2], 可大致分为 3 类: 一是生物方法如农杆菌 Ti 或 Ri 质粒载体法、病毒载体法, 二是化学方法如磷酸钙沉淀吸收法、多聚物介导法、脂质体载体法, 三是物理方法如显微注射法、基因枪喷射法、微光束法、粒子轰击法、电击法等。但这些方法有些操作烦琐, 机制复杂, 有些虽操作简单但需要昂贵复杂的仪器, 有些则转化率很低, 重复性差, 对基因型的依赖性强, 而化学方法则多具有化学毒性, 容易破坏细胞, 因此有的细胞不能用此类方法进行基因转移, 超声法转基因则具有诸多优点, 能较好地克服转基因过程中所遇到的问题, 因此为人们所逐渐认同。

收稿日期: 2001-07-27; 修回日期: 2002-02-25

作者简介: 初志战(1977-), 男, 硕士生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

2 超声作用机制

超声与媒质的相互作用可分为热机制、机械机制和空化机制。空化现象是超声的主要作用方式, 也是被大量应用的主要方面。根据空化泡的变化, 空化现象可分为瞬态空化和稳态空化。瞬态空化一般在较大声强处理下, 一个周期内完成。空化泡在负压作用下迅速增大, 而在正压作用下则迅速收缩至崩溃, 在崩溃瞬间泡内 5000K 高温和上千个 atm 的高压可产生巨大的冲击波或射流破坏空化泡周围的大分子物质。而稳态空化则常常表现为在多个周期内的非线性振荡, 可引起空化泡周围物质的较剧烈的流动, 稳态气泡可以经过几个振荡周期转向瞬间空化, 也可以继续增长直到逸出水面。

3 超声在基因转移中的应用

3.1 发展近况

自从 1990 年许宁等利用超声波首次将外源基因导入小麦幼穗愈伤组织获得 GUS 基因的短暂表达之后, 超声法转基因已取得了许多成果。在对烟草和甜菜原生质体的转化^[3]、玉米和小麦幼胚的转化^[4,5]、玉米愈伤组织的转化^[6]、酵母原生质体的转化^[7]及烟草叶片的转化^[8]上均获得了较高的短暂表达频率, 甚至在动物细胞如对 CHO 细胞的转化也获得了 2.8×10^{-3} 转化率^[9]。

3.2 操作步骤

高效超声法基因导入方法的大体步骤为:

- (1) 受体材料(组织、细胞或原生质体)的制备; 外源质粒 DNA 的制取
- (2) 配适宜的缓冲液
- (3) 将外源质粒 DNA、预处理过的受体材料分别加入缓冲液中并迅速混匀
- (4) 将超声探头置于缓冲液中, 开启超声波调控各项参数
- (5) 转化材料的培养并检查转化率

3.3 影响因素

(1) 连续型和脉冲型的超声波对转基因的影响效果是不一致的。许宁在诱导小麦幼胚基因转移的实验中发现, 用声强 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 的超声处理相同时间, 连续型比脉冲型转化率低, 而在用声强 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 的超声处理相同时间的条件下, 连续型超声则杀死了全部的幼胚, 因此证明了脉冲型超声更适合于基因转移^[10]。脉冲宽度对转化率的高低也有很大影响, 许宁在 CHO 细胞导入 Calcein 的实验中发现, 占空比 5:1 作用时间 120s 时基因导入率为 79%, 而占空比 5:4 作用时间 120s 时导入率则为 43%; Joersbo 在转化甜菜原生质体时发现, 在 45W、脉冲宽度为 680ms~800ms 时转化率最高可达 14%~18%, 同时发现在 45W 时, 随着脉冲宽度增大, 受体细胞成活率显著下降。

(2) 超声声强和处理时间是决定转化效果的最关键的两个参数, 许多实验均证明了这一点。超声可降低受体细胞成活率, 当其它条件不变时, 声强逐渐增大, 受体细胞成活率则明显下降。同样, 超声也可降解外源 DNA, 但由于外源 DNA 体积较小等特点, 在相同声强强度条件下, 受体细胞比外源 DNA 更易受到破坏。超声声强对转化率的影响则稍微复杂, 随声强由弱增强, 转化率也逐渐提高, 当声强进一步提高引起受体细胞和外源 DNA 大量降解时, 转化率也急剧下降。作用时间对基因转移的调控主要表现在对受体细胞的成活率的影响。随处理时间的延长, 受体细胞成活率逐渐下降, 在其他条件适宜的情况下, 通常因超声处理较短时间(几 min), 基因的转化率即可达到最大值。Joersbo 和 Brunstedt 在甜菜和烟草原生质体转化, 许宁在小麦幼胚组织转化, 张宏在玉米愈伤组织转化等许多实验中均证明了这一规律。

各项调控参数对转化效果的影响并不是一致的, 因此要获得较好的转化效果需要协调各项参数,

保证受体细胞有较高的成活率和较高的转化率。李重九^[11]在超声法转染烟草花叶病毒的研究中发现, $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 超声波处理 10min~20min, 细胞有较高的成活率和转化率, 增大声强和延长处理时间均能引起细胞存活率的明显下降, 超过一定限度时, 细胞的转化率和成活率则急剧下降。分析原因可能是超声波在细胞表面瞬间造成微伤, 使病毒粒子进入细胞, 当超声强度适当时, 这些伤口较小, 可以被生物体自己修复, 当超声能量过强, 细胞本身就会受到损伤以至逐渐衰亡, 过强的超声也会使病毒粒子部分断裂, 影响转染率。

(3) 外源质粒 DNA 的浓度对转化率有较大的影响。Joersbo 在烟草转化中证明, 在 30W, 570ms 脉冲超声波处理下, 随着质粒 DNA 浓度的增大 ($0\mu\text{g}/\text{ml}\sim 110\mu\text{g}/\text{ml}$), CAT 基因活性也增高 (0%~2.0%)。李重九在烟草花叶病毒转染的实验中也发现, 随着 TMV 浓度的增加转染率提高。其原因可能是外源 DNA 浓度增加使 TMV 进入细胞的机会增多, 因此转化的几率就会提高。

(4) 缓冲液的组成对基因转移有很大的影响, 准确地说, 每种材料都有合适自己的最佳缓冲液, 因此适宜的缓冲液对获得较好的转化效果是非常重要的。李重九在转染烟草花叶病毒实验中发现, 多聚鸟苷酸可减弱植物细胞表面的负电荷, 使之易与带负电荷的 TMV 接触, 增加转染率, 还发现由于受体细胞的最适 pH 值为 5.2, 病毒粒子在 PH7.0 左右稳定, 当 pH 值接近 5.2 时, 转化效果最好。Joersbo 在转导 CAT 基因时发现, 缓冲液中蔗糖浓度对 CAT 基因的转化率有较大的影响。Clark 和 Hill1970 年发现哺乳动物细胞死亡与自由基的生成密切联系, 而自由基清除剂则可提高转化效率。章力建在烟草叶片转化中发现缓冲液中加入 5% 的 DMSO 可提高短暂表达的效果, 20% 的 DMSO 则明显地损伤叶片。

(5) 超声的热机制在有些长时间转基因过程中也是不可忽视的。章力建用超声波处理烟草叶片发现 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 和 $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ 的超声处理 30min 能导致缓冲液温度分别上升 17°C 和 28°C , 叶片组织有大量损伤, 而在短时间低声强处理条件下, 超声产热一般不会引起明显损害。

4 超声法转基因机制

目前, 较一致的观点认为空化作用在转基因中起主要作用, 当空化泡在崩溃的瞬间, 其内部的高温

高压能在空化泡表面产生强大的射流和冲击波,甚至电离效应和发光,导致空化泡周围细胞的细胞壁和质膜被击穿,造成质膜的可逆透性或非可逆透性的改变,使细胞内外物质发生交换,外源 DNA 顺着小孔进入受体细胞从而发生转化现象。Chapman1974 年发现超声处理鼠胸腺细胞可使其原生质膜产生亚致死的改变,造成细胞内大量钾离子流失。1980 年 Zimmerman 等证明了 60MPa~100 MPa 的高压足以击破人体细胞的细胞膜。张宏等在扫描电子显微镜下观察到,经超声处理的玉米愈伤组织的条状突起细胞壁上有很多的小孔。

1991 年 Joersbo 根据 Zimmerman1974 年提出的电-机械模型提出了另一种观点即“声孔效应”,其认为:在超声达到一定强度下,膜内的流体静压力可诱导细胞膜的机械破裂。

这两种观点并不矛盾,很可能是从不同方面对转基因机制进行的阐述。

5 优点

超声法转基因与其他转基因技术相比具有:设备简单,操作方便,易于实现连续化、自动化,样品处理量大,成本低,转化率高等优点。Joersbo 和 Brunstedt 证明在甜菜原生质体转化中用超声法比电击法转化率高 7~15 倍,并发现在超声处理甜菜 1 小时后其转化现象才逐渐消失,这使得外源 DNA 有足够的时间进入受体细胞。超声法转基因不受宿主基因的限制,而且可将外源基因直接导入带壁的植物细胞,甚至植物体的组织块中,可望解决单子叶植物特别是禾本科植物基因转移所遇到的困难,而且通过组织培养生成植株比原生质体培养要容易得多,也可大大缩短转基因植物再生所需要的时间。章力建等对烟草叶片进行超声处理后发现,GUS 基因的短暂表达率高达 80%,叶片组织的转化面积达 60%~70%。对小麦愈伤组织处理后发现 GUS 基因的短暂表达率达 30%,转化面积达 20%~25%。超声波可直接用于带壁细胞,使细胞的代谢更接近于自然状态,在通过病毒粒子转染的实验中还可使病毒的侵染和增殖更趋于一致,便于进行病生理和药生理学的研究。

6 存在问题及发展前景

当然超声转基因也有不足之处,由于目前超声转基因应用不多,经验积累较少,所以需要通过大量的预备实验进行总结论证来选择适当的超声参数和

缓冲液浓度,因此前期处理工作量大,这是限制超声法转基因被广泛应用的主要原因。另外,超声法转基因的准确机制还有待进一步证实。

最近 Trick 等将超声技术与农杆菌转化法相结合,建立了 SAAT 转化技术,使 GUS 基因的平均短暂表达频率提高 100~1400 倍^[12,13],这为超声用于转基因又开辟了一条新的途径。

目前已经证实了双频、三频超声辐照能易于在液体体内形成更多的空化核提高空化产率,因此我们可将其用于基因转移,提高转化率。

相信随着人们对超声法转基因的进一步探索,大量经验的积累,这些问题将会逐渐被解决,超声法转基因也将会更广泛地应用于这一领域。

参考文献:

- [1] 冯若,李化茂编著.声化学及其应用[M].安徽:安徽科学技术出版社,1992.1-10.
- [2] Fu Rongzhao, Sun Yongru, Jia Shirong. A technical handbook for plant transformation[M]. Bei jing : China Science and Technology Press, 1992.1-25.
- [3] Joersbo M., Brunstedt J. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication[D]. Plant Cell Reports, 1990,9:207-210.
- [4] Zhang H, Xie Y J, Dai J R, et al. Proceeding of Asia-Pacific Conference on Agriculture Biotechnology[C]. Bei jing: China Science and Technology press, 1992. 311-312.
- [5] Xu N, Zhao N M, Zhang H, et al. Proceeding of Asia-Pacific Conference on Agriculture Biotechnology[C]. Bei jing :China Science and Technology Press, 1992. 294-295.
- [6] 张宏,许宁等.超声波介导法转化玉米愈伤组织及可育转基因植株的获得[J].中国科学 C 辑,1997,27(2):163-167.
- [7] 丁志山,沃兴德.超声波法转化酵母原生质体[J].生物技术,1996,6(4):41-43.
- [8] 章力建,陈乐攻等.超声波法直接导入外源基因[J].中国农业科学,1991,24(2):83-89.
- [9] 许宁等.超声波诱导基因在 CHO 细胞的高效转移[J].自然科学进展(国家重点实验室通讯),1994,4(3):368-370.
- [10] 许宁,张宏等.超声波诱导小麦幼胚基因转移[J].自然科学进展(国家重点实验室通讯),1994,4(4):507-509.
- [11] 李重九,侯玉霞等.用超声波法使烟草花叶病毒侵染烟草细胞的研究[J].植物病理学报,1999,29(1):86-90.
- [12] Trick H N, Finer J J. SAAT: Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation [J]. Transgenic Res.,1997,6:329-336
- [13] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean [Glycine mux (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Rep., 1998,17:482-488.
- [14] Joersbo M, Brunstedt J. Sonication: A new method for gene transfer to plants[J]. Physiologia Plantarum,1992,85:230-234.