法来研究花粉流。只要亲本个体间有一定差异,避免操作中可能的污染,迅速简捷的 RAPD 标记方法将可能成为普遍适用的花粉流标记方法,同时扩增产物的结果提供了评价居群遗传多样性和真正繁育系统的必要信息。

致谢 武汉大学遗传研究所朱英国教授、何玉卿博士后、关和新博士、杨征博士等在室内工作中提供了帮助,谢志雄博士提供了有益的建议,谨表谢忱。本工作为国家自然科学基金(批准号:39391500)资助项目。

参 考 文 献

- 1 郝日明,贺善安,汤诗杰,等. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点. 植物资源与环境, 1995, 4(1): 1~ 6
- 2 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4 321~ 4 325
- 3 Handel S N. Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In: Leslie Real ed. Pollination Biology. Orlando, Florida: Academic Press Inc, 1983. 163~ 211
- 4 Richard A J. Plant Breeding Systems. London: George Allen & Unwin, 1986. 135~ 188
- 5 黄双全,郭友好,陈家宽. 鹅掌楸的授粉率及花粉管生长. 植物分类学报, 1998, 36(4): 待刊
- 6 朱晓琴,马建霞,姚青菊,等. 鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)遗传多样性的等位酶论证. 植物资源与环境, 1995, 5(3): 9~ 14
- 7 黄双全,郭友好,吴艳,等. 鹅掌楸的花部数量变异与结实率. 植物学报, 1998, 40(1): 22~ 26
- 8 Schaal B A. Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. Nature, 1980, 284: 450~ 451
- 9 Nilsson L A, Rabakonandrianina E, Pettersson B. Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. Nature, 1992, 360: 666~ 669
- 10 Lonn M, Tegelstrom H, Prentice H C. The synthetic (TG)_n polydinucleotide: a probe for gene flow and paternity studies in wild plant populations? Nucleic Acids Research, 1992, 20: 1 153

(1998-02-05 收稿, 1998-04-07 收修改稿)

兔防御素 NP_1 基因在转基因烟草中的 表达及其对烟草青枯病的抗性研究

傅荣昭 彭于发^④ 曹光诚 陈彩霞^④
马江生 张丽明 李文彬 孙勇如^{*}

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101: ④中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094. * 联系人)

摘要 从兔子肝脏细胞中扩增到防御素 NP_1 成熟肽的编码序列, 长约 200 bp. 将此片段插入到切除了 GUS 编码序列的 pBI121 质粒载体中, 构建成植物表达载体 pBIC_35SNP1. 通过根癌农杆菌介导的叶盘法, 将 pBIC_35SNP1 导入烟草细胞中, 并获得了经 Southern 杂交证实的转基因植株. 进一步的 Northern 杂交证明防御素 NP_1 基因能够在转基因植株中正常转录. 抗菌实验表明转基因植株增强了对烟草青枯病的抗性并延缓了烟草青枯病的发病。

关键词 防御素基因 转基因表达 烟草青枯病

植物抗病基因(即 R 基因)的分离已取得了突破性进展^[1]. 然而, 这些 R 基因都是病原菌

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1519>

防御素(defensin)是生物界较广泛存在的一类抗微生物和一些恶性细胞的短肽(antimicrobial and malignant cell toxic peptides). 它通常由 29~ 54 个氨基酸组成,通过至少 6 个保守的半胱氨酸构成 3 对二硫键使肽环合成一个稳定的反向平行 β 片状结构,有的防御素还含有一个 α 螺旋结构^[2~ 6]. 兔防御素 NP_1(由 33 个氨基酸组成)是迄今表现出抗微生物谱最广的防御素之一,能抗多种革兰氏阴性与阳性细菌、真菌及被膜病毒,还能杀灭鼠肿瘤细胞等恶性细胞^[3,4]. 哺乳动物防御素的抗菌机理是:依靠带正电荷的防御素分子与带负电荷的靶细胞表面分子之间的静电相互作用,扰乱了细胞膜的通透性及细胞能量状态,导致细胞膜去极化,呼吸作用受到抑制以及细胞 ATP 含量严重下降等,从而使微生物细胞致死^[2,4]. 本研究将兔防御素基因用于植物抗病研究,为探索植物基因工程广谱抗病育种途径奠定基础.

兔防御素 NP1 基因由本实验室分离, 并构建成植物表达载体 pBIC_35SNP1^[7] (如图 1). 烟草青枯菌 *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* Tb43 由中国农科院植保所提供. 烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* 由中国科学院微生物研究所提供. 尼龙膜购自 Boehringer mannheim 公司, 同位素[α -³²P] dCTP 购自北京亚辉生物医学公司, 引物标记盒 (Prime a Gene Labeling Sys-

取 4 棵 Southern 杂交阳性植株及另外 2 棵 Km 抗性植株用于 Northern 杂交分析. 按傅荣昭等的方法提取单株的总 RNA^[8]. 分别取 20 μg 总 RNA 于 2% 的变性胶上电泳, 按王革娇的方法转移至尼龙膜上, 用经 Xba iv 和 Sac iv 酶切并回收到的 NP_1 编码片段标记探针, 再于 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交, 42 $^{\circ}\text{C}$ 及 60 $^{\circ}\text{C}$ 下分别洗 3 次, - 70 $^{\circ}\text{C}$ 自显影 1 周^[9]. 然后, 随机取 Northern 杂交分析为阳性的转基因烟草植株 C₁, I₁ 和 T₁₋₁ 用于抗烟草青枯病(细菌病)分析, 并设立未转化的对照植株. 当转基因植株和对照植株生长至高约 25 cm, 并长出 5~ 6 片叶片时, 用一注射器

图 1 兔防御素 NP_1 基因植物表达载体 pBIC_35SNP1 的构建示意图

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1519>

针头于单株顶部第三叶的基部打一小孔,再通过毛细管注入 50 mL 青枯病菌悬浮液(3×10^8 细胞/mL). 将上述处理过的植株移入温度为 30℃、日照 12 h、相对湿度为 90%~100% 的培养箱中培养 30 d. 然后按株计算病情指数. 每株的发病级数用 0, 1, 2, 3, 4 五个等级来分级. 0 表示植株未发病; 1 表示植株 1 叶枯萎; 2 表示植株近 1/3 部分枯萎; 3 表示植株近 2/3 部分枯萎; 4 表示植株完全枯萎. 病情指数由下列公式求算出来:

$$\text{病情指数} = \frac{(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e)}{4 \times t} \times 100$$

其中 a, b, c, d, e 分别代表发病级数为 0~4 五个等级中每个级别的植株总数目. t 为测试的植株总数目.

随机取 Northern 杂交为阳性的转基因植株 A_1, B_1 和 T_{8-1} 用于抗烟草赤星病(*Alternaria alternata*) (真菌病)的分析,并设立未转化的对照植株. 在欲测试的植株叶片表面喷洒赤星病菌液(10^5 孢子/mL),然后将植株转入温度为 25℃、日照为 12 h 和相对湿度为 90%~100% 的生长箱中培养. 按国际标准记录病情.

2 结果与讨论

2.1 转基因的表达分析

通过对 Southern 杂交为阳性的转基因烟草单株所进行的 Northern 杂交分析表明(如图 2),每个所分析的转基因植株皆显示出长度约为 200 个核苷酸的杂交带,这与防御素 NP_1 编码序列的转录本的理论值基本上是一致的. 这些结果表明防御素 NP_1 基因能够在转基因植株中正常转录并产生预期长度的转录本. 从图 2 的杂交信号强弱来看,尽管每个转基因单株采用等量的总 RNA 进行 Northern 杂交分析,但其产生的杂交信号强度是不一样的. 与转基因单株 A_1, C_1, I_1 和 I_{8-1} 相比,转基因植株 B_1 和 T_{1-1} 产生较弱的杂交信号,也即转录出较少的 mRNA. 前人的研究结果也表明,在同一次转化实验中,转基因在不同转化体之间所转录的 mRNA 多寡通常有较大差异,这种差异称为转化体间差异(Intertransformant variability)^[10]. 形成这种转化体间差异的原因是多方面的. 比如,不同的转基因拷贝数、转基因位置效应及转基因 RNA 降解等因素都会引起转化体间差异.

2.2 转基因植株的抗病性分析

图 3 显示转基因植株 I_1 与对照植株相比表现出明显的抗烟草青枯病. 表 1 则进一步显示转基因植株 I_1 比对照植株推迟 5 d 发病,转基因植株 C_1 推迟 3 d 发病,而转基因植株 T_{1-1} 则不表现抗烟草青枯病. 同一转基因在不同转化体间除了存在转录本差异外,还存在着蛋白质表达量差异,这种差异通常可达 10~50 倍^[10]. 因此,同一转基因在不同转化体间表现的抗病性差异也会较大,转基因及其抗病性在后代中的稳定遗传以及广谱细菌抗病性的研究尚在进行中.

图2 转基因植株的 Northern 杂交分析

条带 1~6 分别为转基因植株 A_1, C_1, T_1, T_{1-1} 和 T_{8-1} 的总 RNA 于变性胶上电泳分离后转移至尼龙膜上最后与 ^{32}P 标记 NP_1 编码序列的探针杂交所获得的杂交条带

比较 Northorn 杂交结果(图 2)和抗病性结果(表 1)可以看出,转基因 mRNA 水平越高则其抗病性越强. 如转基因植株 I₁ 较 C₁ 和 T₁₋₁ 转录产生更多的 mRNA, 因此, I₁ 抗烟草青枯病的能力比 C₁ 和 T₁₋₁ 强. 同样, C₁ 较 T₁₋₁ 转录产生更多的 mRNA, C₁ 抗病性也比 T₁₋₁ 强. 这些结果表明转基因的转录水平存在一个临界水平(threshold level), 只有达到或超过这一临界水平才能引发转基因植株的抗病性. 这与 Smith 等人的研究结果是一致的^[11]. 因此, 欲使兔防御素 NP₁ 基因产生高的抗病性, 必须使其转录水平达到或超过这一临界水平. 我们正在尝试用增强子和核骨架附着区(Scaffold attachment regions, SARs)来实现这一目的. 防御素 NP₁ 转基因植株对真菌抗性结果表明, 所有测试的转基因植株没有表现出对烟草赤星病产生抗病性. 在转基因植株中 NP₁ 基因是否完全不表现抗真菌活性, 更加广泛的真菌测试分析正在进行中.

图 3 转基因烟草植株与对照植株感染烟草青枯病后的表现型比较
左边为对照植株, 右边为转基因植株

表 1 转基因烟草植株感染烟草青枯病后的病情指数

	3 d	5 d	7 d	10 d	15 d
T ₁₋₁	25	50	75	100	100
C ₁	0	25	50	100	100
I ₁	0	0	25	50	100
CK	25	50	75	100	100

参 考 文 献

1 Jones J D G. Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7: 155~ 160

2 傅荣昭, 李文彬, 孙勇如, 等. 防御素及其在基因工程上的应用前景. *高技术通讯*, 1996, 6(3): 61~ 62

3 傅荣昭, 李文彬, 孙勇如. 防御素(defensin)的研究进展. *农业生物技术学报*, 1996, 4(4): 348~ 353

4 Lehrer R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Res Immunol*, 1993, 11: 105~ 128

5 Lanbert J, Kuppi E, Dimarcy J L, et al. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran phormia terranovae of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 262~ 266

6 Terras F R G, Eggermont K, koralera V, et al. Small cystein —rich antifungal Proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 1995, 7: 573~ 588

7 Fu R Z, Cao G C, Li W B, et al. Construction of a plant expression vector of rabbit defensin (NP₁) gene. In: *Proc of 2nd Asia-Pasic Conference on Plant Cell and Tissue Culture*, July 28_August 1, Beijing, 1996. Beijing: China Forstry Publishing House, 1996. 239~ 244

8 傅荣昭, 王革娇, 李文彬. 植物遗传转化技术手册. 见: 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编. 北京: 中国科学技术出版社, 1996. 1522

1994. 141~144

- 9 王革娇. 植物遗传转化技术手册. 见: 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 157~161
- 10 Hobbs S L A, Kpodar P, Delong C M O. The effect of T —DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 851~864
- 11 Smith H A, Swaney S L, Parks T D, et al. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell*, 1994, 6: 1441~1453

(1997-11-29 收稿, 1998-02-10 收修改稿)

Wortmannin 和 3_AB 对辐射所致细胞 G2 期阻滞及 MPF 活性抑制的影响

孟祥兵 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 p34^{cdc2}与周期蛋白 B(Cyclin B)形成的有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF)的激酶活性是细胞由 G2 期进入 M 期所必需的. 近来研究表明, 电离辐射引起 MPF 活性抑制是细胞 G2 期阻滞的重要机制. 低剂量照射主要引起 p34^{cdc2}不能及时脱磷酸化, 而不是引起周期蛋白 B 的表达或与 p34^{cdc2}形成 MPF 受到抑制, 但 DNA 损伤与 MPF 之间的信号传递途径尚不清楚. 研究表明, PI3 激酶家族抑制剂 Wortmannin (Wort) 和 PARP 特异抑制剂 3_AB 可以部分消除 2Gy γ 射线引起的 G2 期阻滞. 免疫沉淀分析也表明, Wort 和 3_AB 可促进受照细胞的 p34^{cdc2}及时脱磷酸. 这些观察表明, wort 敏感的途径及 PARP 参与了辐射引起的 G2 期阻滞信号传递的起始过程.

关键词 G2 期阻滞 电离辐射 MPF wortmannin 3_AB

电离辐射引起 G2 期阻滞, 导致细胞分裂延迟, 被认为是为细胞进行损伤修复提供充足的时间. 最近关于细胞周期调控机制的认识使探讨辐射引起细胞 G2 期阻滞的机制成为可能. 由催化亚基 p34^{cdc2}和调节亚基周期蛋白 B 组成的有丝分裂促进因子(MPF)激酶活性是细胞由 G2 期进入 M 期所必需的, 两者在 G2 期聚合成 p34^{cdc2} Thr14 和 Tyr15 特异磷酸化的无活性的 MPF 前体. 在由 G2 期进入 M 期时, 这些残基经 cdc25C 脱磷酸化使 MPF 前体迅速活化转变成 MPF^[1]. 研究表明, 辐射引起细胞 G2 期阻滞与 MPF 失活有密切关系. Muschel 等人^[2]研究表明, 大剂量照射(如 10Gy X 射线)同步在 S 期的 HeLaS3 引起的 G2 期阻滞主要是周期蛋白 B 表达受到抑制. Metting 等人^[3]报道小剂量(2Gy X 射线)照射引起的细胞 G2 期阻滞主要与 MPF 不能及时脱磷酸有关, 而不是因为缺乏两亚基之一或不能形成复合物. 但受照细胞 DNA 损伤与 p34^{cdc2}活性调节间的信号传递途径尚不清楚.

哺乳动物细胞对 DNA 损伤的反应是复杂的, 涉及 DNA 损伤识别、活化修复及细胞周期改变的相互关联的信号传导网络. PARP(多聚腺苷转移酶)、DNA PK(依赖 DNA 的蛋白激酶)、ATM(毛细血管扩张共济失调综合征遗传突变基因)等参与 DNA 损伤反应的蛋白可能在 DNA 损伤监视网络信号转导的起始中发挥关键作用. PARP 是在多数真核细胞中含量丰富