



植物遗传工程

二、突变和突变体的筛选

彼得·卡尔逊

(美国密执安州立大学土壤和作物科学系)

植物细胞和植物系统的突变体可以分为两大类:

一类是可用选择系统回收的突变体;一类是不能用选择系统回收的自发突变体。这里,我们只讨论第一类。在细菌中,可以利用正选择系统和负选择系统回收突变体;在植物系统中,情况也如此。

首先讲正选择系统。所谓正选择系统,系指在培养基中加入某种对正常细胞有毒的化学物质,从而使正常细胞不能生长而突变体却可生长的系统。它又可以分为两种:一种是一步选择系统,即只需通过一步选择,便可筛选出突变体;一种是多步选择系统,即通过多步连续选择才能筛选出突变体。这两种不同的选择系统可以筛选出不同类型的突变体。现在以植物悬浮细胞培养物的生长为例,看一下这两种选择系统的差别。以悬浮细胞生长数量对培养时间作图,得出其生长曲线。细胞接种后经过一段滞缓期开始分裂,此后细胞数量随着培养时间的延长而增加,最后达到最大值。平皿培养细胞也如此。这种稳定的生长型是在不加有毒物质时(即有毒物质的处理时间为零)得到的。现在看看加入有毒物质(例如抗菌素、抗代谢物或盐类)后的情况。在毒素剂量较低时,滞缓期延长,细胞分裂速度放慢,细胞数量的最大值降低。毒素的剂量不同(例如相对剂量为1单位,10单位、100单位或更高),生长曲线也不同。根据这一原理,便可选出突变细胞。对于一步选择系统来说,加入的毒素剂量应当较高(例如100单位),此时未发生突变的正常细胞不能生长,只有突变细胞才能生长。对于多步选择系统来说,在低剂量毒素的条件下,培养物的生长速度非常缓慢,在相当长的时间内只有最小量的细胞生长或存活下来,因此可以选择生长最快的细胞群体。这是两者在选择速度上的差别,此外还有另一些重要区别:一步选择只需一次实验,即在高剂量毒素的培养基中寻找突变体,而不管突变是否发生;多步选择则需经过几个不同步骤,第一步加入低剂量毒素,使90%的细胞不能生长,从中选出生长较好的细胞,然后再依次增加毒素剂量,进行第二轮、第三轮等筛选。简言之,一步选择只需一次实验,多步选择则需要数次。迄今所知道的抗逆性性状一般都有几个不同的水平,故需应用多步

选择系统。

再者,所用的正选择系统的类型还决定着突变体的性质。用一步选择系统得到的突变体一般是单基因突变。在细菌中,单基因缺陷多为隐性突变,而且按孟德尔定律传递。在植物细胞中,抗代谢物[例如,5-甲基色氨酸、蛋氨酸磺胺(methionine sulfoximine),S-氨基乙基半胱氨酸等]和抗菌素抗性突变体也是很好的例子,它们都是用一步选择系统得到的单基因隐性突变。在植物中,多步选择的例子很少,但很有趣。Nabors用多步选择获得了抗氯化钠的烟草细胞系和植株。他先用低浓度氯化钠使90%的悬浮细胞的生长受到抑制,选出能够生长的细胞,然后再依次增加盐浓度,进行多次选择,最后得到了耐盐的细胞系和再生植株。业已证明,多步选择系统对于那些生化背景不详但可能颇为复杂的突变体的获得,颇为有效,因此可用于抗盐、抗低温和抗旱等突变体的筛选。多步选择得到的突变体,不是由于单基因的变化,而是由于多基因的变化,因此需要更多的步骤,以便发生更多的突变事件,从而使有关的各基因在所处的环境中逐步发挥功能。

多步选择系统还有一个更令人感兴趣的优点,即可以增加特定基因的拷贝数。在动植物任何特定组织中,某种蛋白质的总量决定于细胞内该蛋白质编码基因的拷贝数。因此,可以用增加特异基因拷贝数的方法提高细胞中相应蛋白质的含量,例如特异地增加胚乳中高营养蛋白的含量,这当然非常有用。Polacco和Filner都作过脲酶突变体的研究。现以Filner关于烟草高脲酶细胞突变体的筛选为例,说明这一问题。烟草细胞可以利用尿素作为唯一氮源,但效率不高,所以在烟草的标准培养基中都以硝酸铵作氮源。以细胞总量对培养时间作图便可得到细胞生长曲线。在总氮量相同但氮源不同(硝酸铵和尿素)的两种培养基中,细胞的生长曲线也不同。但是,Filner选到了在两种培养基上长得同样好的突变细胞系,发现这些细胞在尿素中的生长速度提高了12倍,这暗示出脲酶的含

Peter S. Carlson: Plant Genetic Engineering II. Mutation and Selection of Mutants

量也提高了 12 倍。另一个巧妙的关键是,他还用脲酶抑制剂——羟基脲进一步选择脲酶含量更高的突变体。羟基脲是一种活性位点抑制剂,它可以和脲酶的活性位点结合,使其不能再作用于尿素的氨基,从而使脲酶失活。Filner 的方法是,在细胞培养基中同时加入作为氮源的尿素和羟基脲,这样,一部分脲酶分子由于活性位点被羟基脲占据而失活,要达到与无羟基脲时同样的生长水平,就需要有更多的脲酶分子,因此,在尿素加羟基脲的培养基中生长速度与只有尿素的培养基中相同的细胞,便会含有更多的脲酶。他用这种方法使细胞中脲酶的含量提高了 50 倍。这一结果有两种可能的解释:一是由于调控水平的变化使转录和翻译产物增加,而结构基因的数量不变;二是结构基因的拷贝数增多。也可能二者兼有。为弄清其机制,须找出编码脲酶的 mRNA。实验程序如下:首先制备脲酶的抗体,然后取产生脲酶的细胞培养物,收集多核糖体,这些多核糖体产生的多肽与加入的脲酶抗体发生沉集反应,再从这些沉淀复合物中回收 mRNA, mRNA 在逆转录酶作用下产生出 cDNA,把这种 cDNA 作成标记探针,用以寻求烟草细胞中相应基因的拷贝数,即与从出发细胞和脲酶活性提高 50 倍的细胞中分离出的总 DNA 进行分子杂交。结果发现,出发细胞的杂交活性若为 1 单位,突变细胞则为 30—40 单位。这表明,突变主要是由于基因拷贝数的增加,但也不排除调控系统的变化。如果能用这种方法提高大豆中脲酶蛋白质的含量,就会增加其营养价值。然而,这里有两个问题:一是此实验是用烟草作的,不一定适合于大豆;二是烟草突变细胞系一般不易再生完整植株。但不管怎样,增加基因的拷贝数仍然是很重要的,因为在选择中基因仍然保持完整,所产生的蛋白质的一级结构没有变化,即只是提高了基因的表达水平,而没有破坏发育中的调控系统,这一点对于育种很有意义。更为有趣的例子是 Shipen 在哺乳动物中所用的类似的筛选系统。他用二氢叶酸还原酶 (DHFR) 活性位点抑制剂氨基喋呤,选出了高 DHFR 突变体,经十几年的努力,使基因组中 DHFR 基因的拷贝数提高了一万多倍。即使对于动物,这也很有意义,这样便可以把基因剂量增加到在染色体上可见的程度。他发现染色体发生了重要变化:首先含 DHFR 基因的染色体增加了,第二个变化更为有趣,即出现了一条只含 DHFR 基因的额外的小染色体。这暗示出,在高等生物中,在特殊情况下,有可能创造出含有令人感兴趣的遗传物质的新染色体。此点对于高等植物系统可能很有价值。

基因拷贝数发生的机制可能是有丝分裂过程中发生的体细胞重组。已知,体细胞重组可发生于果蝇和真菌,而且可以被某些物理和化学诱变剂所诱发。现在看看在植物中体细胞重组如何造成基因拷贝数的变化。在植物中体细胞重组发生在 DNA 复制后的 G2

期和有丝分裂初期。假设两条同源染色体上的杂合等位基因 A 和 a 位于着丝粒附近,并在着丝粒部位发生重组。在有丝分裂过程中,这两条染色体的染色单体可以独立地分开,一条染色体的一个着丝点可以移到另一条染色体的一个着丝点部位,一条染色单体也到另一染色单体的一极,于是便造成含有纯合等位基因 (AA, aa) 的新染色体。由于交换不很准确,单基因的体细胞重组有时便会在有丝分裂过程中增加或减少基因的拷贝数。此外,还可用某些诱变剂(例如丝裂霉素 C、低剂量的紫外线或 γ 射线照射)提高植物体细胞重组频率。因此,用低剂量的物理和化学诱变剂,结合上述的选择系统,就有可能更有效地增加基因剂量。

现在讲正选择系统存在的问题和解决途径。主要问题是,许多重要基因在细胞培养物中不表达,故无法筛选相应的突变体,例如抗杀草剂的突变体。许多杀草剂只能杀死进行光合作用的细胞,而培养细胞的光合作用极微弱,所以无法在细胞培养物的水平上区别突变体和非突变体。要选择这类突变体,就必须把着眼点放在完整植株上。叶片的细胞群很象培养皿中的细胞,其中某些部位的细胞也能发生突变。我们可以用实验的方法对叶片造成正选择压力,然后切下组织上可以区辨的突变部位,进行培养,使之再生成植株,借此便可选出抗杀草剂的突变体。我们以烟草为例说明这一过程。取烟草单倍体植株(温室内生长的小植株),以 5000 拉德剂量的 γ 射线进行处理,叶片中有些细胞可能发生了抗杀草剂毒莠定 (picloram) 的突变,但我们无法区别每个细胞,故应让植物继续生长,直至长出十片新叶。在此期间每个突变细胞发生分裂而形成由突变细胞组成的小区,这样我们便可以对一群细胞进行选择,而不是对单个细胞。此时喷以杀草剂,敏感细胞逐渐变成浅绿、黄色和白色,最后死亡;而抗性小区仍然呈绿色。取下活的绿色小区,进行培养,使之再生成完整植株。再生植株的染色体可能已经加倍,估计这种二倍体才具有抗杀草剂的抗性。这些植株有些是抗杀草剂的,但并非全部,故尚须进一步选择。杀草剂抗性性状是由一个或两个基因控制的,可以按照孟德尔定律传给后代。这是用正选择系统对感兴趣的发育组织或区域进行筛选的例子。业已证明,此法对抗病原菌毒素和抗病毒突变体的选择也是有效的。

最后再讲讲负选择系统。在植物中除 Polacco 所用的负选择系统外,还有两种重要的负选择系统,即 5-溴脱氧尿苷 (BrdUrd) 系统和高氯酸盐系统。BrdUrd 系统的基础是,合成 DNA 的细胞才能生长,不合成 DNA 的细胞不生长,生长的细胞可将有毒的 BrdUrd 掺入到其 DNA 中,因而死亡,不长的细胞无此能力,故存活下来。此系统已用于营养缺陷型和温度敏感型突变体的选择。选择营养缺陷型的大体步骤是,将经过诱变剂处理的细胞群体放在不含补充营养物质的低

限培养基中,加入一定浓度($5 \times 10^{-3}M$)的 BrdUrd 处理 1—2 天,此时在低限培养基中生长的原养型细胞便将 BrdUrd 掺入到其 DNA 的胸苷位置,然后用新鲜培养基洗去 BrdUrd,再加入到含补充营养物质(维生素、氨基酸、核酸碱基)的培养基,暴露于可见光或波长为 360 毫微米的光线中,掺入了 BrdUrd 的 DNA 对光照很敏感,因而死亡,不掺入者不敏感,因而存活下来,这样便可选出营养缺陷型。温度敏感突变体的选择也大体如此。植物细胞生长温度是 20—30℃。温度敏感突变体是指在高温下(28℃)不长而在低温下(23℃)生长的突变体。诱变剂处理过的细胞群体先放在 28℃,此时正常细胞生长,突变体不长,然后暴露于 BrdUrd 1—2 天,再洗去 BrdUrd,最后放在低温下进行光照,选出生长的细胞。我们用此法已选出了数种温度敏感突变体。温度敏感突变体的重要性在于,它涉及到植物中的蛋白质,其机制是使某些蛋白质在非允许温度下的变性增加,而任何一种重要蛋白质若经历着快速的变性,细胞便不能生长。营养缺陷型与此不同,它

只限于某些单倍体。

高氯酸负选择系统也可用来筛选温度敏感突变体。其原理是,硝酸还原酶含量高的植物细胞,能在硝酸盐作为氮源的培养基上迅速生长;硝酸还原酶含量很低或根本不含有的细胞,则生长很慢或停止生长。高氯酸盐本身并没有毒,但它可与硝酸还原酶结合并被催化而形成次氯酸盐(ClO_2); ClO_2 则是一种非常有毒的物质,能杀死细胞。所以,不生长的细胞,就能抗次氯酸盐的毒害;而生长的细胞,则对次氯酸盐毒害非常敏感,以致被杀死。用高氯酸系统选择温度敏感突变体的步骤大体与用 BrdUrd 系统时相同,即先用诱变剂对细胞群体进行短时间处理,然后提高温度,加入高氯酸盐,过一段时间(在此期间,正常的非突变细胞由于处在生长状态,因而被杀死,而突变体由于不生长而存活下来)再洗去高氯酸盐,转至低温,存活的高温敏感突变体就开始了生长。

突变体选择还有一些重要问题,留待以后讨论。

(魏荣璋根据 Peter S. Carlson 讲话录音整理)



中国遗传学会召开科普工作经验交流会

中国遗传学会科普工作经验交流会于 1982 年 2 月 23 日至 28 日在广州召开。20 个省市遗传学会的代表以及新闻、出版单位的代表共 51 人参加了会议。这次会议对科普工作的基本概念进行了探讨。大家一致认为,科普工作是认识和改造自然的有目的、有意识的活动,是直接提高生产力的重要组成部分。科普不仅是知识和技能的传播,而且是科研成果的传播、推广和普及,在方法上应该多种多样,要具有准确的科学性,鲜明的思想性以及文艺性。会议认为广大的人民群众是科普的主要对象,科学家也是重要的科普对象,人人都是科普的给与者,同时又是科普接受者。

会议检阅了两年多来各地遗传学会开展普及工作的情况,认为之所以能在短时间内取得很大的成绩,主要是适应了社会的需要,按照党中央的方针政策,开展了多种多样的活动方式。两年来,各地遗传学会共举办各种训练班 85 次,培训各类人员近 2 万人次。这些活动因为从实际出发,具有现实意义,普遍受到欢迎,引起社会上的重视和兴趣。总的来说,在各地遗传学会的带领下,在广大会员的支持下,我们的普及工作逐步深入,初步繁荣。

实物交流是这次会议的一个特色。会议放映了科教影片“遗传工程初探”、“婚姻与优生”、“遗传疾病”和“蝗虫的减数分裂”,播放了录相片“生得好一点”、“生物演化和物种起源”、“植物辐射育种”,以及“细胞生物学”、“性别之谜”、“让人类更健美”等投影片、幻灯片,内容涉及到遗传学的各个分枝,生动活泼、丰富多彩。会上还展出了 35 种科普丛书和 3 种期刊,这些书刊均为学会理事和会员撰写编译。实物交流的同时代表们还订购了获得好评的录相片,幻灯片等,并对一些科教电影、幻灯片中存在的问题提出了修改意见。这些实物对遗传学普及是一个推动,带有引路和开拓性的意义。会议希望今后有更多的遗传学界同仁加入到普及队伍中来,使遗传学普及工作锦上添花。

会议在总结经验、肯定成绩的基础上,检查了普及工作中的不足。会议要求各地遗传学会在科普宣传工作中一定要有一个严肃的态度,切实注意思想性、科学性,尽量做到深入浅出,生动活泼。会议希望各地遗传学会把科普工作抓紧、抓好,创造出更多更好的经验,迎接中国遗传学会第二次代表大会的召开。

(安锡培)