

- Rev. Lett.*, **68**(1992), 3092.
- [11] B. Barbara, C. Paulsen and M. Uehara, *J. Appl. Phys.*, **73**(1993), 6703.
- [12] J. Tejada, X. X. Zhang and LI. Balcells, *J. Appl. Phys.*, **73**(1993), 6709;
E. M. Chudnovsky, *ibid*, **73**(1993), 6697.
- [13] M. Uehara, B. Barbara et al., *Phys. Lett. A*, **114**(1986), 23;
W. D. Zhong et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **74**(1988), 39.
- [14] J. I. Arnaud et al., *Phys. Rev. B*, **47**(1993), 11924.
- [15] X. X. Zhang et al., *J. Appl. Phys.*, **75**(1994), 5637; R. H. Kodama et al., *ibid*, **75**(1994), 5639.
- [16] X. X. Zhang et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **137**(1994), L235.
- [17] J. Clarke et al., *Science*, **239**(1988), 992.
- [18] 钟文定等, *物理学报*, **44**-9(1995), 1516.
W. D. Zhong et al., *Proc. Inter. Symp. Phys. Magn. Mater.*, Beijing, (1992), 30; *ibid*, Seoul, (1995), Press.
- [19] J. M. Gonzalez et al., *Phys. Rev. B*, **49**(1994), 3867.
- [20] M. J. Oshea et al., *J. Appl. Phys.*, **76**(1994), 6174.
- [21] P. Stamp et al., *Int. J. Mod. Phys. B*, **6**(1992), 1355.
- [22] *J. Magn. Magn. Mater. Part 3*, **140—144**(1995), 1815; 1821; 1825; 1851; 1853; 1859; 1883.
- [23] A. Garg, *J. Appl. Phys.*, **76**(1994), 6168;
B. Barbara et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **136**(1994), 183.

现代生物工程中的物理学方法*

习 岗 张 振 瀛

(西北农业大学物理教研室, 陕西杨陵 712100)

摘要 简要介绍了现代生物工程中已经广泛应用的一些物理学方法, 指出了这些方法的优越性和取得的成就.

关键词 物理, 生物工程, 应用

Abstract Some physical methods widely used in modern biological engineering are briefly described. Their advantages and results obtained through their use are presented.

Key words physics, biological engineering, application

现代生物工程的发展方兴未艾, 它将成为影响下一世纪人类进步的带头科学技术之一. 目前, 在现代生物工程中广泛应用着许多物理学方法, 这些方法在生物工程的发展中起着极为重要的作用. 本文对此作一简要介绍.

1 细胞融合中的物理学方法

细胞融合是生物工程中的主要技术之一. 所谓细胞融合是指通过某些融合因子使不同物种的两个单核细胞融合为异核体, 再经过分裂产生新的两个单核的杂种细胞的技术. 由于通

过这种技术可以实现种间和种内不同体细胞的融合, 进而产生出具有新性状的新细胞, 因此, 它在国民经济的许多领域中具有极为重要的意义.

自从 60 年代初 Okado 首次发现活的仙台病毒可以诱发细胞融合以后, 人们开始了人工诱导细胞融合的研究. 70 年代, Kao 等使用聚乙二醇(PEG)、钙离子、溶血卵磷脂等化学诱导因子成功地实现了细胞融合, 由此提出了化合融合的思路与方法, 在过去的几十年里, 生物

* 1995 年 2 月 27 日收到初稿, 1995 年 5 月 8 日收到修改稿.

和化学融合技术虽有进展,但融合率不高,一般仅为10—30%,而且还有病毒引起感染、药品毒性以及在融合过程中随机性强而无法控制等许多缺点.自从80年代 Zimmermann 研制成功了利用高压脉冲电场诱导细胞融合的电融合仪后,细胞融合技术进入了采用物理学方法的新阶段.除了电场诱导的细胞融合方法以外,人们还开发了激光诱导细胞融合的新方法.这些物理学新方法在相当程度上克服了上述的各种缺点,因此,很快得到了广泛的应用.

1.1 电场诱导的细胞融合方法

1.1.1 电介质电泳-电融合法

细胞融合的关键是,首先设法使细胞集聚,在细胞之间建立稳定的接触,然后通过某种方式使接触区膜的结构受到扰动而紊乱,再经恢复而融合.为了实现细胞集聚并建立稳定的接触,Zimmermann 等人首先提出了利用电介质电泳的原理诱导细胞集聚的方法^[1].

电介质电泳是指中性粒子在电场诱导下形成偶极子,偶极子在非均匀场中向高场强区的迁移.在电介质电泳中,当诸偶极子相互接近时,由于偶极子的相互作用会产生相互吸引而形成“珠串”,从而实现诸偶极子的集聚.由于细胞在外电场中会发生极化,因而也会出现上述“珠串”现象.当细胞排成“珠串”,实现了细胞间稳定接触以后,再施加高强脉冲电场(场强 kV/cm 量级,脉冲宽度 μ s 量级),就会使电场方向的膜结构出现局部扰乱,使两个并列相接触的膜上出现孔洞而产生电击穿.当撤去脉冲电场后,孔洞处的两个膜类脂分子在范德瓦尔斯力作用下重新排列,形成连接桥使两个细胞连接起来.由于在细胞接触处膜表面曲率很高,处于高张力状态,因此在不需要能量的条件下融合体会逐步变圆,最后合二而一,形成球形,完成电诱导的融合过程.

利用上述原理,电介质电泳-电融合法逐步发展成为一种成熟而有效的细胞融合技术.在植物体细胞杂交方面,利用这种技术实现了高频率地融合植物原生质体,并已获得了杂种

植株^[2,3].

当然,电介质电泳-电融合法也有不足之处.例如,当脉冲电场过高或膜暴露在高场强中的时间过长,会导致膜的不可逆损伤.另一方面,电介质电泳要求细胞处于低离子浓度溶液中,从而限制了外界溶液的离子浓度,使处于其中的细胞的活力受到影响.为此,人们又陆续发展了一些其他的物理新方法.

1.1.2 磁-电融合法

这种方法是利用磁场力使已表面磁化的细胞相互集聚接触,然后再施加高压脉冲电场使已相互接触的细胞融合.细胞的表面磁化是通过将细胞悬浮在含有磁性粒子(Fe_3O_4)的溶液中温浴,使细胞膜外表面吸附磁性粒子来实现的.这样,利用两对电磁铁形成的磁场就可使细胞集聚在两电极之间^[4].由于这种方法用磁场代替了电场,可以避免交变电场对细胞的损伤及作用时间较长而造成的热效应,而且还可以使用最简单的电极系统并在高离子浓度溶液中进行电融合,因此,磁-电融合法具有较电介质电泳-电融合法明显的优点.

1.1.3 超声-电融合法

该法利用声场力使细胞集聚接触,然后施加电脉冲诱导细胞融合.利用声波不仅可使细胞形成“珠串”,而且可使细胞密聚在驻波的波峰处(此时声压最强).Vienken 等人使用1.0MHz的超声波使红细胞及骨髓瘤细胞集聚在同轴圆柱状电极之间,再施加电脉冲实现了高频率的细胞融合^[5].这种方法不仅具有与前述磁-电融合法相同的优点,而且还不必对细胞进行预先处理,可以避免由于预处理而带来的不良影响.

1.1.4 电-机械融合法

实验发现,用可逆击穿电脉冲作用之后,在数分钟以内再使细胞相互接触,同样可以实现细胞融合,人们又发展了电-机械融合法^[6].其具体作法是,先对细胞进行可逆电击穿,然后迅速离心沉降细胞,利用离心力造成细胞集聚,从而产生细胞融合.该法的主要优点是可以大

量制备融合细胞,而且融合系统比较简单.

1.2 激光诱导的细胞融合方法

上述电融合法尽管取得了很大的成功,但都具有一些难以避免的缺欠,其中最主要的是电场会引起细胞损伤.有实验表明,电融合法应用于动物生殖细胞时,其卵裂不能正常进行,原因就是电融合时贯穿于整个细胞的高压电脉冲造成了细胞内含物的损伤.

微束激光技术的发展,特别是利用微束激光技术对单个活细胞进行亚细胞水平的显微外科手术的成功,预示着微束激光可能成为细胞工程的一种有力手段.用光学系统对激光进行会聚可以形成光斑极小的微束激光.由于微束激光具有高功率密度、短脉宽、极小作用范围和很好的单色性等特点,利用它对活细胞进行亚细胞水平的手术就不会造成其他内含物的损伤.因此,近年来微束激光技术逐步发展成为一种无损伤的细胞融合新技术.

激光诱导细胞融合的基本装置是微束激光系统.一般采用高峰值功率密度、短脉宽的YAG激光作为微束激光系统的基本光源,工作激光是将YAG激光通过二倍频产生的 $0.53\mu\text{m}$ 的激光以及由它泵浦染料产生的 $0.59\mu\text{m}$ 激光,同时还需另置一台He-Ne激光器用于光学系统的调准和激光照射的瞄准.工作时将待融合的细胞单层排布于显微镜下,用He-Ne激光瞄准两个紧贴在一起的细胞接触处,用会聚后的工作激光在与细胞排列相互垂直的方向上进行照射,调整激光的能量密度使质膜产生可逆光击穿,这样,两个细胞内含物就可通过激光照射部位进行混合而实现细胞融合.

近年来,利用微束激光技术进行细胞融合已取得了不少成果,Schierenberg以线虫为材料成功地进行了激光诱导的细胞融合^[7].张闻迪等则以泥鳅受精卵为材料,采用微束激光技术使细胞融合率达到了40%,而且融合后的卵可以进一步发育,甚至形成了幼体^[8].Wiegand等则用微束激光技术进行了骨髓瘤细胞与小鼠B

淋巴细胞的融合以及植物原生质体之间的融合^[9].

激光诱导的细胞融合技术的突出优点是定位和定时性强,可控性高,激光的波长、脉宽、功率密度、作用范围等都可以通过激光器件及聚焦参数的调整来调节,并可对激光的作用严格控制在某一特定时刻和细胞某一特定部位,以避免引起其他部位的损伤.

2 基因转移中的物理学方法

基因转移技术是现代生物工程中又一项主要技术.它是基因工程的关键.所谓基因转移技术是指将目的基因通过载体或非载体的方式转移到宿主细胞中,以实现新移植基因与宿主细胞基因的融合、扩增和表达的技术.以前,基因转移主要是利用根癌农杆菌的Ti质粒做载体来实现的.但是,由于根癌农杆菌不感染多数单子叶植物,因此无法实现这些植物的基因转移.为了克服农杆菌转移法的这种宿主限制,80年代以后又陆续发展了一些非载体的基因转移方法,这里介绍其中的物理方法.

2.1 电激法

如前所述,利用高压脉冲电场可以在细胞膜上形成孔洞,在一定条件下,DNA分子就可以通过这一孔洞进入细胞.利用这种方法导入外源基因就称为电激法.在Zimmermann利用电穿孔操作实现了细胞的电融合以后,Newmann等利用这种方法将外源基因成功地注入到鼠细胞中,高频率地得到了转化体.此后,又有人成功地将质粒DNA转移到蜡状杆菌的原生质体中和完整的酵母细胞中,也获得了转化体^[10].在植物方面,也有利用高压、短脉冲^[11]或低压、长脉冲^[12]诱导植物原生质体吸收外源基因均获成功的报道.

2.2 超声波法

超声波可以通过机械作用、热作用和空化作用产生生物学效应.其短暂的空化作用表现在空泡湮灭过程中小泡内部可以产生高温、高

压,甚至产生电离效应和放电效应.这种作用可能会导致空泡周围的细胞的细胞壁和细胞质膜破损而发生可逆的质膜透性改变,从而可使细胞内外发生物质交换.因此,若将植物组织或叶片放入含有外源 DNA 的溶液中,再将它们一并置于超声波发生器的超声小室,用超声波处理就可以将外源 DNA 转移到叶片细胞中去.迄今为止,已有利用超声波法将外源基因导入小麦^[13]、甜菜和烟草^[14]的原生质体中并获短暂表达的报道.实验发现,超声波法比电激法的效率高 7—15 倍,其原因可能是超声波在液体和固体中传播时衰减较小,穿透性强以及界面反射造成的植物组织受超声作用的面积较大等.

超声波法的特点是设备便宜、操作简单,特别适用于将外源基因直接导入植物带壁细胞或组织,因此在植物基因工程中有重要的意义.

2.3 微束激光导入法

以前一般认为,在高等生物之间转移外源基因的最好方法是显微注射法,即在显微镜下用细针在受体细胞上刺一微孔,再用玻璃微管将外源目的基因直接注入受体细胞中.

1982 年,Palmiter 曾用这种方法将人类生长激素基因注入到鼠的受精卵内的细胞核中创造了“超级小鼠”.微束激光技术的产生使人们认识到微束激光是显微注射中细胞穿孔的最佳方法,从而诞生了转移外源基因的微束激光导入法.其做法是将受体细胞浸入含有目的基因或染色质的溶液中,然后用微束激光照射细胞,在细胞膜上产生瞬间光击穿,使目的基因进入受体细胞.目前这种方法已有应用.例如,1984 年 Tsukakoshi 等将大鼠肾细胞浸在含有大肠杆菌的 Eco - gpt 基因的溶液中,用波长 355nm、脉宽 5ns、光斑直径 0.3 μ m 的 Nd:YAG 激光照射大鼠肾细胞,在细胞膜上瞬间形成孔洞,大肠杆菌的 Eco - gpt 基因自动流入大鼠肾细胞中,被穿孔的细胞膜在 1s 内即自动愈合.

微束激光导入法的优点是操作迅速、成活率高.由于短脉冲激光与细胞膜作用时间极短,

热效应很小,再加上作用范围也很小,因此,细胞可以承受较强的激光照射,即使多次照射,成功率也很高.缺点是基因溶液的利用率低.为了提高利用率,近年来又发展了将微束激光技术与显微注射技术相结合的新方法,即先用微束激光穿孔,再用微管注入外源基因,这样可以大大提高基因利用率.

2.4 基因枪法

基因枪法是最新发展起来的、值得广泛重视的新技术,它是一种将载有外源 DNA 的钨(或金)颗粒加速后射入细胞的物理方法.最先出现的是美国 Cornell 大学研究的火药引爆的基因枪^[15].其主要部分是圆筒状的尼龙子弹(直径 5mm,长 8mm)和阻挡板,在子弹前端装填已沉淀有 DNA 的钨粉粒(直径 4 μ m,重 0.05mg).当用铁撞针起爆时,子弹带着钨粉粒高速运动,当运动至阻挡板时,子弹被挡住,而钨粉粒则通过一个 1mm 的小孔直射靶细胞.在火药引爆的基因枪出现以后,又先后出现了压缩气体驱动^[16]、高压放电^[17]等其他枪型.压缩气体基因枪采用的气体是氦气、氢气或氮气,其原理是把载有 DNA 的钨粉粒悬滴在金属网筛上,用压缩气体冲击网筛,使钨粉粒射入靶细胞.近年来,Sautter 等^[18]设计了一种新型的压缩气体基因枪,其不需要事先将 DNA 沉淀结合在金属颗粒上,而是将两者简单混合,经过雾化,由压缩气体驱动射入细胞.高压放电基因枪则是通过改变加速电压来实现对粒子速度的控制.

采用基因枪法导入外源基因已有一些报道.例如,1987 年 Klein 等用火药引爆的基因枪对具有 2000 多个细胞、面积为 1cm² 的洋葱组织切块进行轰击,结果使表面吸附有烟草花叶病毒 RNA 的钨粉粒进入细胞,并在受体细胞中检测到了病毒 RNA 的复制.Christou 等^[19]采用高压放电基因枪在大豆和水稻上成功地获得了转基因植株.而 Vasil 等^[20]则用同样的方法将目的基因转入了小麦的胚性愈伤组织.目前,利用基因枪法获得的转基因植株种类日益

增多,在水稻、玉米、小麦三大作物中均已用基因枪法获得了转基因植株.由此可见,基因枪法具有十分广阔的应用前景.

迄今为止,现代生物工程中的物理学方法主要集中在上述两个领域中,细胞电融合法正日趋成熟,并已获得了广泛的应用.基因转移中的基因枪法还在发展之中,尚需进一步完善的地方主要在轰击的准确性、可控性;射弹大小均一性及其结构、物理参数与靶细胞之间的关系等方面.

参 考 文 献

[1] U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**(1982), 227.
[2] R. Terada et al., *Mol. Gen. Genet.*, **210**-1(1987), 39.
[3] K. Toriyama et al., *Theor. Appl. Genet.*, **76**(1988), 665.

[4] I. Kramer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **772**(1984), 407.
[5] J. Vienken et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **820**(1985), 259.
[6] U. Zimmermann et al., *Adv. Biotechnol. Processes*, **4**(1985), 79.
[7] E. Schierenberg, *Dev. Biol.*, **101**(1984), 240.
[8] 张闻迪, *生物工程学报*, **4**(1988), 298.
[9] R. Wiegand, *J. Cell Sci.*, **88**(1987), 145.
[10] H. Hashimoto et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**(1985), 336.
[11] I. Negratin et al., *Plant Mol. Biol.*, **8**(1987), 363.
[12] M. Fromm et al., *Nature*, **319**(1986), 791.
[13] 许宁等, *生物物理学报*, **6**-2(1990), 281.
[14] M. Joersbo et al., *Plant Cell Reports*, **9**(1990), 207.
[15] J. C. Sanford et al., *J. Part Sci. Tech.*, **5**(1987), 27.
[16] J. H. Oard et al., *Plant Physiol.*, **92**(1990), 234.
[17] D. E. McCabe et al., *Bio. Tech.*, **6**(1988), 923.
[18] C. Sautter et al., *Bio. Tech.*, **9**(1991), 1080.
[19] P. Christou, *The Plant J.*, **2**-3(1992), 275.
[20] V. Vasil et al., *Bio. Tech.*, **10**(1992), 667.

激光在农业中的若干应用*

吴孔宝

(北京农业工程大学基础科学部, 北京 100083)

摘要 概述了激光的基本特性及其对生物体的作用过程,介绍了激光诱变、激光微束、激光荧光光谱、激光扫平等技术在现代农业中的一些应用.

关键词 激光诱变,激光微束,激光扫平

我国是一个农业大国,农业是国民经济的基础,在人口众多、农业自然资源相对不足、特别是人均占有耕地甚少的情况下,要从根本上解决好我国的农业问题,需要从各方面去努力,其中一个很重要的方面就是要依靠高科技,走生物技术和工程技术相结合的道路.激光是一种新型光源,由于其发射的光具有方向性好、单色性好、相干性好、亮度高等特点,在激光产生的短短 30 多年时间里,已经在工业、国防、医学

等领域获得愈来愈多的应用.近 10 年来,激光在农业和生物科学中的应用也发展很快,在激光育种、生物工程、激光扫平等许多方面都取得了可喜的成果.此外,由于激光的出现,使得光谱技术也获得了新的进展,并且也成为农业生物检测中的重要手段之一,本文仅对上述几个方面作一简要介绍.

* 1995 年 3 月 13 日收到初稿,1995 年 6 月 14 日收到修改稿.