

エレクトロポレーションによる馬鈴しょ プロトプラストへの遺伝子導入*1

佐藤 毅*2 安積 大治*2
原田 竹雄*3 松川 勲*2

エレクトロポレーションにより β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を馬鈴しょプロトプラストへ導入するための最適条件を検討した。250 μ sec の直流電気パルスを 8 回、750 V/cm の電界強度で処理したとき導入後 24 時間で最も高い GUS 活性がみられた。この活性は加えられる GUS 遺伝子の濃度 (最高 70 μ g/ml) に比例して高くなった。遺伝子導入後 24 時間でその活性は最高になり、その後ゆっくり低下したが 96 時間後でも十分検出できた。DNA 導入時にニシン精子 DNA をキャリアーとして加えたところ GUS 活性の高まりがみられた。また、導入する DNA の形状について環状と線状を比較したところ、線状の方が GUS 活性が高かった。

緒 言

植物における遺伝子導入法に関しては、現在様々な方法が研究開発中であるが、大別すると物理的方法と生物的方法がある¹⁾。植物細胞に直接遺伝子を導入する前者にはエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法などがあり、一方生物を利用する後者にはウイルスを用いる方法、土壤細菌のアグロバクテリウムを用いる方法などがある。ここで取り上げたエレクトロポレーション法は、電気パルスを利用してプロトプラストの細胞膜に穴を開け、そこから外来遺伝子を導入するもので操作が簡便しかも効率がよいとされている^{5,6,13,18,23)}。この方法は、他に遺伝子発現を検討するアッセイ系として利用されたり^{4,19,22)}、細胞内でのウイルス粒子やウイルス遺伝子の動向を調べるためにも利用されている^{7,15,17,28)}。

エレクトロポレーションによる遺伝子の導入は

単子葉植物では形質転換植物の作出に有効な手段となっており、イネ^{3,24,26)}、トウモロコシ¹⁹⁾ 等が実例がありアメリカではイネに関して野外実験の段階まで進んでいる。

馬鈴しょに関しては形質転換植物を作出するのに Ti プラスミド系が利用されているが¹⁰⁾、プロトプラストからの再分化系が確立されたのでエレクトロポレーション法による形質転換実験が進められている^{9,27)}。ここでは実用形質に關与する遺伝子の単離解析が進んだ時に直ちに形質転換植物を作出するための基礎技術として馬鈴しょのプロトプラストを用いたエレクトロポレーションによる外来遺伝子導入の諸条件を検討した。

試験方法

1. 供試材料

馬鈴しょの供試品種はプロトプラスト培養において再分化植物体が得られやすい根育 20 号(マリスパイパー×スパータン)を用いた。この系統は北海道立根釧農業試験場が育成し、同試験場より分譲いただいた。その無菌植物体を用いた。プラスミドはマーカー遺伝子である β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) を持つ pBI 221 を用いた。

1991 年 1 月 16 日受理

*1 本報の一部は 1988 年度日本育種学会・作物学会北海道談話会講演会で発表した。

*2 北海道立中央農業試験場, 069-13 夕張郡長沼町

*3 同上 (現弘前大学農学部, 036 青森県弘前市)

2. 無菌植物体の育成とプロトプラストの単離

根育 20 号の塊茎を 25°C, 暗所で萌芽させ, 2 ~ 3 cm に伸長した芽を切り取り 70% エタノールに 30 秒, アンチホルミン (有効塩素濃度 1%) に 15 分間浸漬した。その後滅菌水で 2 回洗浄し切断面を再度切り直し培地 (MS 基本培地に, 20 g/l シュクロースを添加したホルモンフリー培地) に置床した。継代は茎頂部を 2 週間毎に同じ培地にさし木し, よく展開した上位葉をプロトプラストの単離に供試した。プロトプラストの単離は葉の裏表皮に鋭利な刃物で幅 1 mm 程度の傷をつけ, 酵素液 (1% セルラーゼオノズカ RS, 0.1% ペクトリアーゼ Y 23, 1.5% ドリセラゼ, 0.5% MES, 0.5% CaCl₂, 0.45 M マニトール, pH 5.6) に浸漬し, 30°C, 30 回/分の往復振とうで約 3 時間処理した。処理後, 酵素懸濁液を 44 μm のふるいでろ過し, ろ液を遠沈管にとり, 3 分間 (750 rpm) 遠心した。上清を捨て, 0.4 M のマニトールを加え同様に遠心した。遠心後, 上清を捨て, 0.6 M のシュクロースに再懸濁し, その上に 0.4 M のマニトールを積層し, 5 分間 (800 rpm) 遠心した。シュクロースとマニトールの界面に集まったプロトプラストをパスツールピペットで回収し, 0.45 M マニトール, 2.5 mM CaCl₂ 液に懸濁した。プロトプラスト数を血球計算盤で計測し, 所定の濃度に調製後エレクトロポレーションに供試した。

3. エレクトロポレーションの方法と導入条件の設定

使用機種は島津製作所 SSH-1 である。所定の濃度のプロトプラストとキャリアー DNA, RNA をプロトプラスト溶液に加え, これをチャンバーにいれ, 電気条件を設定して電気パルスを印加した。印加後プロトプラスト溶液を 10~15 分間氷上に静置した。その後プロトプラストを回収して洗浄後 Kikuta and Okazawa¹¹⁾ の培地で培養した。検討事項は以下のとおりである。基本的な条件は 500 μsec × 4 回, 750 V/cm, プラスミド濃度 20 μg/ml, キャリアー DNA 濃度 50 μg/ml とした。

- 1) エレクトロポレーションに供試した 1 区あたりの容量: 0.5 ml, 0.25 ml × 2 回
- 2) プロトプラストの密度: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 × 10⁵/ml
- 3) プラスミドの濃度: 0, 20, 50, 70 μg/ml
- 4) プラスミドの形状: 環状, 線状 (L 1:

pBI 221 を EcoRI で切断したもの, L 2: pBI 221 を EcoRI と HindIII で切断したもの)

- 5) キャリアーの濃度: ニシン精子 DNA および酵母 RNA をそれぞれ 0, 50, 100, 250, 500 μg/ml
- 6) 電気条件
 - (1) パルスの幅: 0, 10, 50, 100, 250, 500 μsec
 - (2) 電界強度: 500, 750, 1000 V/cm
 - (3) パルスを複数回印加した時のパルスの間隔: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 秒
 - (4) パルスの長さと同数: (50 μsec × 10) × 4 回, (125 μsec × 8) × 4 回, 250 μsec × 8 回, 500 μsec × 4 回
- 7) エレクトロポレーション後の培養時間: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 96 時間
- 8) 遠心加圧法: 150 秒間遠心後電気パルスを印加しさらに 30 秒遠心した。

これらの条件を培養経過 24 時間後 (7 を除く) の遺伝子発現量で検定した。

4. 測定法

1) プロトプラストの生存率の測定

培養後のプロトプラストに 1% のエバンスブルー¹⁰⁾ を加え顕微鏡下で観察した。1 回の観察に 200~300 個のプロトプラストを供試し, 青色に染色されない生存プロトプラストと染色された非生存プロトプラストに区分けし 2 回繰り返した平均値をプロトプラストの生存率とした。

2) 細胞内容物の抽出とタンパク質含量の測定

培養後のプロトプラストを 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブにとり, これを遠心して上清を捨てた。沈澱に 50 μl の Lysis buffer (50 mM NaPO₄, pH 7.0, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% sodium lauryl sarcosine, 0.1% トライトン X-100, 10 mM β-メルカプトエタノール) を加えて超音波で 3 分間処理し, 細胞を破壊し内容物を抽出した。10 分間遠心 (12000 rpm) し上清を抽出液とした。これをもう一度繰り返して合計 100 μl をサンプルとした。サンプルは使用するまで -80°C で保存した。

内容物の抽出程度を補正するため抽出液のタンパク質含量を測定した。染色剤を加え室温で 5 分間保った後分光光度計で 595 nm の吸光度を測定した。スタンダードとして牛の血清アルブミンを用いて, 検量線よりタンパク質含量を求めた。

3) β -グルクロニダーゼ活性の測定

Jefferson らの方法⁹⁾に準じた。Lysis buffer に基質の 4-メチルウンベリフェニルグルクロナイド (MUG) 1 mM を溶かした溶液 200 μ l に抽出液 20 μ l 加え 37°C で 2 時間培養した。2 時間後 1 M の Na₂CO₃, 400 μ l を加え反応をとめ蛍光分光光度計で吸光度を測定した。(励起光 365 nm にして 455 nm を透過するように設定)。スタンダードとして 100 nM ~ 10 μ M の 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) を用いて次式より活性を求めた。GUS 活性 (4-MU nmol/1000 μ g タンパク質/1 時間)

$$= \{(\text{MUs/Ps}) - (\text{MUc/Pc})\} \times 1000$$

MUs = サンプルの 4-MU 含量 (nmol/h)
 MUc = コントロールの 4-MU 含量 (nmol/h)
 Pc = サンプルのタンパク質含量 (μ g)
 Ps = コントロールのタンパク質含量 (μ g)

試験結果

プロトプラストにプラスミドが導入され GUS 遺伝子が発現すれば基質である MUG が分解され 4-MU が生成される。そのモル数をタンパク質 1 mg 当りに換算して GUS 活性とした。つまり、4-MU のモル数が高ければ遺伝子がよく発現したことになる。

1) エレクトロポレーションに供試した 1 区あたりの容量

一定量のプロトプラストがあった場合少しずつ

行うのがよいのか否かを確かめたところ実験によりばらつきがありどちらがよいかはっきりした差はみられなかった。以下の実験は 0.5 ml 1 回で行った。

2) プロトプラストの密度

密度が 0.5 $\times 10^5$ /ml 以下の低い時は内容物がよく抽出されなかったため全 4-MU のモル数で表示した。密度が 0.1 $\times 10^5$ /ml はプロトプラストの生存率が低く、他の 4 処理に比べ 3 分の 1 程度と低く GUS 活性は認められなかった (図 1)。0.5 $\times 10^5$ 以上 5/ml では生存率は他の 3 処理 (1, 5, 10) とほとんどかわらないが GUS 活性は認められなかった。密度が 1 $\times 10^5$ /ml 以上ではプロトプラストの密度とともに GUS 活性が高まっていた。

3) プラスミドの濃度

プラスミドがなく電気パルスのみ印加した時は活性がみられず、20, 50 μ g/ml と濃度が高まるにつれて GUS 活性が高まり両者間にはほぼ比例関係にあった (図 2)。プロトプラストの生存率はプラスミド高濃度 70 μ g/ml の時に少し減少しているが他の濃度ではほとんど変化がなかった。

4) プラスミドの形状

環状プラスミドに比べて線状プラスミドの方が明かに活性が高く、また線状プラスミドでは 2 か所で切断して短い L 2 が環状の 2 倍程度の活性になっている (図 3)。プロトプラストの生存率は線状の方が若干高い傾向にあるがその差は小さかった。

5) キャリアーの濃度

直接遺伝子導入法においてはキャリアー遺伝子

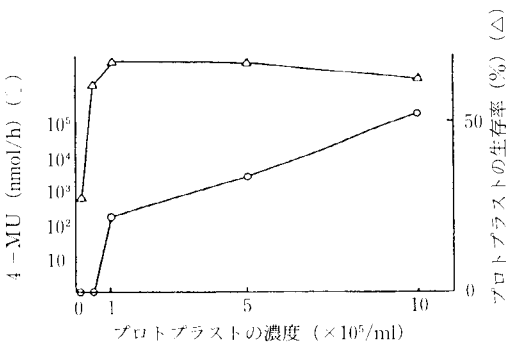


図 1 GUS 活性及びプロトプラスト活性に及ぼすプロトプラストの濃度の影響
 エレクトロポレーションの条件は 500 μ sec \times 4 回, 750 V/cm, プラスミド濃度 20 μ g/ml, キャリアー DNA 濃度 50 μ g/ml であり、処理による変更以外は以下の図も同じ条件である。

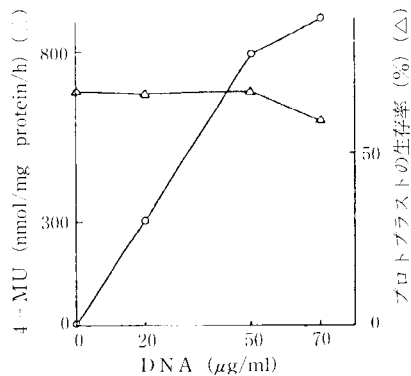


図 2 プラスミドの濃度

を用いると効率が高まることが知られている¹⁶⁾が、本実験ではニシン精子 DNA と酵母 RNA を用いて GUS 活性を比較した (図 4)。酵母 RNA を用いた時には効果が少なく 4-MU が 10~20 nmol 程度だったがニシン精子 DNA の低濃度 (50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では効果がみられた。ニシン精子 DNA 濃度が 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高まるにつれて GUS 活性は低下した。プロトプラストの生存率はニシン精子 DNA 量を増すにしたがい徐々に低下し、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では無添加に比べ半分以下であった。以上からキャリアーとして酵母 RNA よりニシン精子 DNA がよく濃度は 50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が適当であった。

6) 電気条件

(1) パルスの幅

電気パルスの回数を 4 回に固定してパルスの長

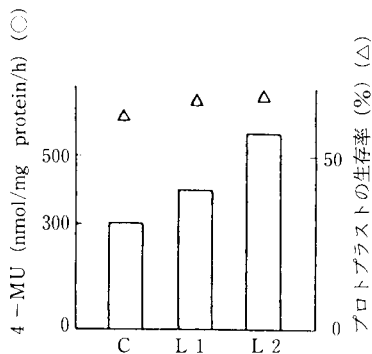


図 3 プラスミドの形状
C : 環状 pBI 221
L 1 : 線状 pBI 221/EcoRI
L 2 : 線状 pBI 221/EcoRI, HindIII

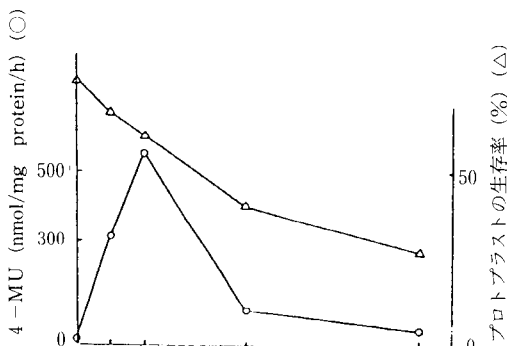


図 4 キャリア DNA の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
(ニシン精子 DNA)

さ (μsec) を 5 段階で GUS 活性を比較した。10, 50, 100 μsec ではほとんど活性はみられなかった。250 μsec から活性がみられて、500 μsec ではさらに高まった。本機の構造上これ以上長いパルスは印加できないが本機を使用し印加回数が 4 回の時は 500 μsec が最適である。プロトプラストの生存率はパルスの長さにはほとんど影響されなかった。

(2) 電界強度

電気パルスの長さを 500 μsec に固定して電気パルス印加回数と電界強度 (V/cm) の関係を見たのが図 5 である。プロトプラストの生存率はパルス回数が 4 回のデータを示した。印加回数 2 回の時は 500, 750 V/cm ではほとんど GUS 活性はみられず、1000 V/cm でわずかに活性がみられた。プロトプラストの生存率は 1000 V/cm で他の条件の時より 8% 程度低くなった (図示せず)。印加回数が 4 および 6 回の時は 750 V/cm で GUS 活性が最も高かった。プロトプラストの生存率は電界強度が高くなるにつれ低下し、1000 V/cm では 500 V/cm のおよそ半分であった。印加回数 8 回の時はプロトプラストの生存率が低く、GUS 活性も低かった。

(3) パルスを複数回印加する時のパルスの間隔

これまでの実験は 0.5 秒で行っていたが GUS 活性は 0.5 秒でやや低下するものの印加の間隔が短い 0.1~1.0 秒で高い傾向にあり、間隔が長くなると活性は低下した (図 6)。プロトプラストの生存率は間隔が長くなると若干低下傾向にあるがその差は小さかった。本実験からパルスの印加間隔は 1 秒以下が GUS 活性、プロトプラストの生存率の両方に適当であった。

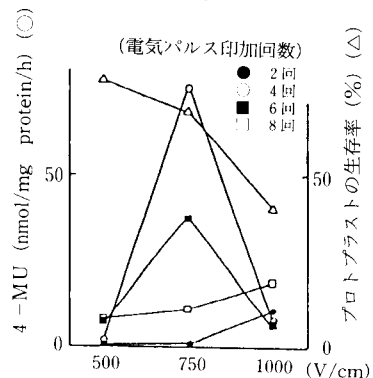


図 5 電界強度

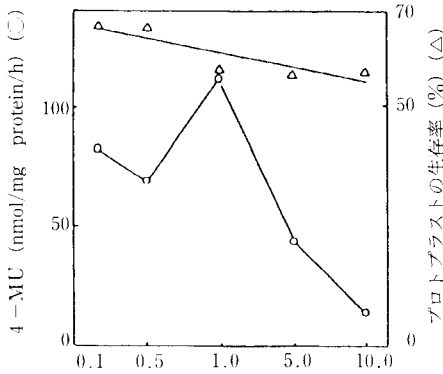


図6 電気パルス印加の間隔 (秒)

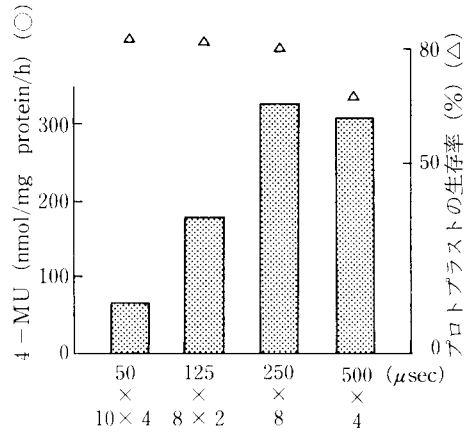


図7 電気パルスの長さと同数

(4) パルスの幅と回数

電気パルスの合計の長さを 2 msec に固定してパルスの長さと同数の関係を見た (図7)。GUS 活性は短いパルスをも、回数も多く印加するよりもある程度長いパルスで数回印加した方が高かった。250 μsec × 8 回と 500 μsec × 4 回では GUS 活性の差がほとんどなかったがプロトプラスト生存率は前者が高かった。

7) エレクトロポレーション後の培養経過

培養を開始して 2 ~ 4 時間後から GUS 活性がみられ、以後徐々に高まり 24 時間後にピークがみられた (図8)。その後活性は徐々に低下するが 96 時間後でも GUS 活性を検出することができた。プロトプラストの生存率は時間の経過とともに低下したが 96 時間後でも 50% の生存率を示した。

8) 遠心加圧法

他の条件を同じにして通常法 (今までの方法) と比較したところ、遠心法は通常法に比べ GUS 活性およびプロトプラスト生存率のいずれも低かった。

以上のそれぞれの最適条件を組み合わせることにより馬鈴しょプロトプラストへの一過性の遺伝子導入法はおおむね確立することができた。GUS 活性を経時的に調査した結果 96 時間後においても活性がみられたのでこの方法を用いて形質転換を試みた。上記のよい条件を組み合わせることでエレクトロポレーションを行い GUS 遺伝子を導入したプロトプラストを培養したところ無処理と同程度のカルス形成させることができた。そのカルスに pBI 221 が導入されているかを検定するために

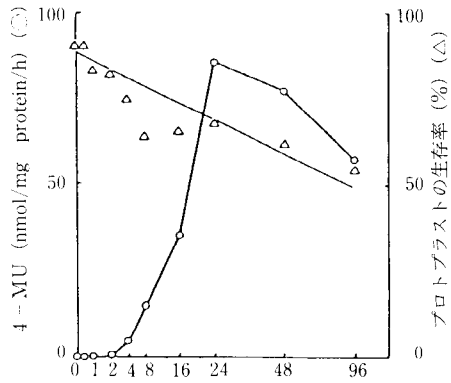


図8 培養経過時間 (h)

カルス 20 個を個々につぶした内容物を抽出し、MUG と反応させた。もし、遺伝子が発現していれば 360 nm の紫外線を照射した場合に蛍光を発する。調査した 20 個のカルスはいずれも蛍光を発せずコントロールと差がないことから GUS 遺伝子の発現は確認できなかった。この他のカルスについては検定していないので遺伝子発現については不明である。

考 察

北海道の主要作物は、交配を遺伝子組換えの主な手段としてこれまで数多くの優良品種が育成され大きな成果をあげてきた。人工交配は今後も育種の基本であるが、より効果的な品種改良を進めるためには植物の種・属を越えて外来遺伝子の導入を図り、新たな遺伝子源の開発が必要であり、またそれが可能になりつつある。我々は馬鈴しょ

への遺伝子導入法を確立するためプロトプラストへ直接遺伝子を導入する方法の一つであるエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入に関する諸条件を検討した。さらに導入遺伝子の活性およびプロトプラストの生存率を高めるための問題点について以下に考察を加えた。

エレクトロポレーションに適するプロトプラストの密度はGUS活性およびプロトプラストの生存率からみて $5 \times 10^5 \sim 10^6$ /mlであり、極端に密度の低い 0.1×10^5 /mlでは電氣的障害を受けプロトプラスト生存率が著しく劣り不適であった。

本実験でプラスミド濃度が増加するにつれてGUS活性が増加し、一方、プロトプラストの生存率にはほとんど変化しないのは、Nishiguchiら¹⁶⁾の結果と一致するものであった。しかし、Jonesら⁹⁾は用いるプラスミドの種類が異なると濃度が増しても遺伝子の活性が上がらないこともあると述べている。したがって、遺伝子を構築する際に用いるプロモーターやその他の部位の検討が必要であろう。また、プラスミドの形状は線状が、環状よりもGUS活性が高まったが、これについてはNegrutiuら¹⁴⁾はタバコにおいておよびBallasら²⁾はペチュニアにおいて同様の結果を報告しているがNishiguchiら¹⁶⁾は両者に差がないことを述べている。また、Ballasらは遺伝子の活性が高まる理由として、導入される遺伝子量には両者に差がないがノーザンブロットの結果から線状の方が環状より遺伝子の転写量が多くなることを報告しておりこの点は今後の課題である。

キャリアーとして用いたニシン精子DNAは効果があった。しかし、DNAの場合、導入された後染色体に組み込まれる可能性があり、宿主細胞の本来の遺伝子発現への影響が予測されるなど細胞にとっては好ましくないと思われる。そのためRNAの方が望ましいが本実験では酵母RNAの添加はGUS活性の向上には効果がなかったが、異なるRNAを用いての検討もさらに必要であろう。

本実験の電氣的条件は電界強度750 V/cm、電気パルス250 μ sec \times 8回がGUS活性には最適であった。使用した島津製作所のSSH-1は500 μ secを越えるパルスは設定できないが2 msecを1回で印加した場合にGUS活性およびプロトプラストの生存率がどのように変化するか検討する

必要がある。Van der Steege and Templer²⁷⁾は馬鈴しょ培養細胞を用いてパルスの長さを50 msecに固定すると500 V/cmが最適の条件であったと報告している。また、Jonesらの報告では葉肉プロトプラストで85 msecでは250 V/cm、225~250 V/cmが最適であった。我々の導入条件に比べこれらはいずれも電気パルスが非常に長く、電圧は低い条件であった。使用する機種を変えて500 μ secより長いパルスでの実験が必要であろう。

電気パルスをかける間隔が長くなるとGUS活性が低くなった理由としては、1秒より長い間隔になると電気パルスの長さ回数合計が2 msecであっても実際にはそれ以下のパルスしか印加されない状態になるのではないかと推察される。

Jonesらはエレクトロポレーション後の細胞内の遺伝子の活性を経時的にみており48時間でほぼ最高値に達し、その後84時間までその値はほとんど変わらなかった。我々の結果は培養24時間でGUS活性が最高値になりその後48時間まで維持された後活性が低下し、Jonesらに比べると活性反応が早く経過した。これは用いた遺伝子の違いによるものと思われる。

遠心加圧法は、細胞融合の際にパールチェーンを形成させずに電気パルスのみで行うことができる方法であり、高周波をかける必要がない。そのため緩衝液としてある程度の塩を入れることができ培養条件に近い条件で融合ができるため細胞の破損が少ないと考えられる。エレクトロポレーションにおいても培養条件に近い条件で電気パルスがかかることができるなら細胞へのストレスが少ないと思われるが遠心加圧法は通常法に比べてGUS活性、プロトプラスト生存率ともに低下した。この理由は通常法と同じ電気条件では遠心加圧法には強すぎたためと思われる。したがって、通常法よりは弱い電気条件、また遠心の回転数や時間等検討する必要があるであろう。

遺伝子の発現を高めるためにプロモーターと構造遺伝子の間に、ある遺伝子のイントロンを挿入する方法がある¹⁹⁾。エレクトロポレーションにより組み込まれた遺伝子の発現が弱く、目的とした形質が発現しない場合にはこれを利用することが有効である。また、パルスを印加するとき溶液

中にポリエチレングリコールを添加したり、熱ショックを与えると効率が上がることが知られている²³⁾。今後さらに効率を高めるためにその添加効果や濃度また温度等を検討する必要があると思われる。また、Okadaら¹⁸⁾はアフィディコリンで同調したプロトプラストを用いM期に遺伝子を導入すると効率が高まることを報告している。理由としてはこの時期には核膜が消失しているため遺伝子が導入されやすくなっていることがあげられるがこれを利用して効率を高めることも可能であろう。

本実験の限られたカルスからはGUS遺伝子の発現を検出することはできなかった。仮に、遺伝子が導入されていても染色体に組み込まれた位置やコピー数などの影響で発現が弱いことがあるため、遺伝子そのものの存在が検出できるサザンブロットを行って確認すべきであった。また、今回使用したプラスミドは遺伝子導入に広く利用されているカナマイシン耐性遺伝子などの選抜マーカーがないため事前の選抜ができなかったことが遺伝子検出を困難にしたものと思われる。

本実験からエレクトロポレーションによる遺伝子導入においていくつかの問題点が明らかになった。今後は遺伝子の発現を高めるための電気条件、プラスミドの形状、さらに選抜マーカーをもったプラスミドの利用などを考慮しより効率的な形質転換体作出法の確立を目指す。また、馬鈴しょへの遺伝子導入法を他の作物への応用し形質転換作物の種類拡大を図っていきたい。

参考文献

- 1) 旭 正, “序：遺伝子導入植物に関する研究の現状と将来”, 植物細胞工学, **1**, 19-22 (1989).
- 2) Ballas, N.; Zakai, N.; Friedberg, D.; Loytar, A. “Linear forms of plasmid DNA are superior to supercoiled structures as active templates for gene expression in plant protoplasts”. *Plant Mol. Biol.* **11**, 517-527 (1988).
- 3) Datta, S. K.; Peterhans, K.; Datta, K.; Potrykus, I. “Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplasts”. *BIO/TECHNOLOGY*, **8**, 750-754 (1990).
- 4) Ecker, J. R.; Davis, R. D. “Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5372-5376 (1986).
- 5) Fromm, M.; Taylor, L. P.; Walbot, V. “Expression of gene transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5824-5828 (1985).
- 6) Fromm, M.; Taylor, L. P.; Walbot, V. “Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation”. *Nature*, **319**, 791-793 (1986).
- 7) Hibi, T.; Kano, H.; Sugiura, M.; Kazami, T.; Kimura, S. “High efficiency electroporation of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA”. *J. Gen. Virol.* **67**, 2037-2042 (1986).
- 8) Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W. “GUS fusion; β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion maker in higher plants”. *EMBO J.* **6**, 3901-3907 (1987).
- 9) Jones, H.; Ooms, G.; Jones M. G. K. “Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts”. *Plant Mol. Biol.* **13**, 503-511 (1989).
- 10) Kanai, R.; Edwards, G. “Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts C 3, C 4, and crassulacean acid metabolism plant using an aqueous dextranpolyethylene glycol two phase system”. *Plant Physiol.* **52**, 484-490 (1973).
- 11) Kaniewski, W.; Lawson, C.; Sammons, B.; Haley, L.; Hart, J.; Delanny, X.; Tumer, N. E. “Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y”. *BIO/TECHNOLOGY*, **8**, 750-754 (1990).
- 12) Kikuta, Y.; Okazawa, Y. “Shoot bud formation and plantlet regenerated in potato tuber tissue cultured in vitro”. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **61**, 166-179 (1982).
- 13) Langridge, W. H. R.; Li, B. J.; Szaly, A. A. “Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA”. *Plant Cell Rep.* **4**, 355-359 (1985).
- 14) Negrutiu, I.; Shillito, R.; Potrykus, I.; Biasini, G.; Sala, F. “Hybrid genes in the analysis of transformation conditions”. *Plant Mol. Biol.* **8**, 363-373 (1987).
- 15) Nishiguchi, M.; Sato, T.; Motoyoshi, F. “An improved method for electroporation in plant

- protoplasts: infection of tobacco protoplasts with tobacco mosaic virus particles". *Plant Cell Rep.* **6**,90-93(1987).
- 16) Nishiguchi, M.; Sato, T.; Motoyoshi, F. "Factors influencing the transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene by electroporation and its transient expression in the tobacco mesophyll protoplasts". *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* **3**,105-114(1987).
 - 17) Okada, K.; Nagata, T.; Takebe, I. "Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation". *Plant and Cell Physiol.* **27**,619-626(1986).
 - 18) Okada, K.; Nagata, T.; Takebe, I. "Expression and integration of genes introduced into highly synchronized plant protoplasts". *Mol. Gen. Genet.* **205**,398-403(1986).
 - 19) Oard, J. H.; Paige, D.; Dvorak, J. "Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat". *Plant Cell Rep.* **8**, 156-160(1989).
 - 20) Ou-Lee, T.; Turgon, R.; Wu, R. "Expression of a foreign gene linked to either a plant virus or a *Drosophila* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat and sorghum". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**,6815-6819(1986).
 - 21) Rhodes, C. A.; Pierce, D. A.; Mettler, I. J.; Mascarenhas, D.; Detmer, J. J. "Genetically transformed maize plants from protoplasts". *Science.* **240**,204-207(1988).
 - 22) Riggs, C. D.; Bates, G. W. "Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**,5602-5606(1986).
 - 23) Shillito, R. D.; Saul, M. W.; Paszkowski, J.; Muller, M.; Potrykus, I. "High efficiency direct gene transfer to plants". *BIO/TECHNOLOGY.* **3**,1099-1103(1985).
 - 24) Shimamoto, K.; Terada, R.; Izawa, T.; Fujimoto, H. "Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts". *Nature.* **338**,274-277(1989).
 - 25) Teeri, T. H.; Patel, G. K.; Aspegren, K.; Kauppinen, V. "Chloroplasts targeting of *neomycin phosphotransferase II* with a pea transit peptide in electroporated barley mesophyll protoplasts". *Plant Cell Rep.* **8**,187-190(1989).
 - 26) Toriyama, K.; Arimoto, Y.; Uchimiya, H.; Hinata, K. "Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts". *BIO/TECHNOLOGY.* **6**,1072-1074(1988).
 - 27) Van Der Steege, G.; Tempelar, M. J. "Comparison of electric field mediated DNA uptake and fusion properties of protoplasts of *Solanum tuberosum*". *Plant Sci.* **69**,103-110(1990).
 - 28) Watts, J.; King, J. M.; Stacey, N. J. "Inoculation of protoplasts with viruses by electroporation". *Virology.* **157**,40-46(1987).

Introduction of the plasmid DNA by Electroporation into Potato Mesophyll Protoplasts

Takashi SATO*¹, Daiji ASAKA*¹

Takeo HARADA*² and Isao MATSUKAWA*¹

Summary

Electroporation was applied to introduce the plasmid DNA carrying the β -glucuronidase (GUS) gene into potato mesophyll protoplasts using a square DC pulse. The electroporation conditions were investigated to optimize the efficiency of gene transfer. Eight times of 250 μ sec square pulse at 750 V/cm gave the highest GUS activity in the protoplasts at a concentration of 5×10^5 /ml using DNA at a concentration of 20 μ g/ml. The GUS activity reached a maximal value at 24 hr after the electroporation and continued to be detected at least 96 hr after the electroporation. The GUS activity increased as the concentration of DNA rose up to 70 μ g/ml. The addition of herring sperm DNA as a carrier stimulated the GUS activity. The GUS activity was significantly different between circular and linear DNA in form.

*¹ Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-13 Japan

*² Hirosaki University, Hirosaki, Aomori, 036 Japan