转基因植物
风险防控技术研究

杨剑波 倪大虎 魏鹏程 李浩 马卉 编著

科学出版社

转基因植物风险防控技术研究

杨剑波 倪大虎 魏鹏程 李浩 马卉 编著

科学出版社
北京

内 容 简 介

植物转基因技术是有效的品种遗传改良方法，具有可用基因资源广、定向性好、改良效率高等优点，受到广泛关注，为农作物的产量提升、品质改良和抗性增强提供了新路径、开拓了新空间。同时，转基因植物风险防控技术的研究，也成为近年来科研学者潜心研究、社会大众广泛关注的热点。

本书汇总多年来在该领域的研究成果，力求使读者深入了解植物转基因技术原理，正确认识和评价转基因植物的风险性和安全性。本书可作为高等院校教师、研究生及从事植物转基因技术研究的相关科学工作者参考使用。

图书在版编目（CIP）数据

转基因植物风险防控技术研究/杨剑波等编著. —北京：科学出版社，2015.11
ISBN 978-7-03-046350-0

Ⅰ. ①转… Ⅱ. ①杨… Ⅲ. ①转基因植物-风险管理-研究 Ⅳ. ①Q788

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2015）第 269972 号

责任编辑：刘思佳 / 责任校对：刘玉靖
责任印制：吕春珉 / 封面设计：艺和天下

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京中科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 11 月第 一 版 开本：B5（720×1000）
2015 年 11 月第一次印刷 印张：12 3/4
字数：250 000

定价：100.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈中科〉）
销售部电话 010-62142126 编辑部电话 010-62130750

版权所有，侵权必究

举报电话：010-64030229；010-64034315；13501151303

前　言

植物转基因技术是20世纪80年代初发展起来的一种有效的品种遗传改良方法，具有可用基因资源广、定向性好、改良效率高等优点，受到广泛关注，为农作物的产量提升、品质改良和抗性增强提供了新路径、开拓了新空间。国际农业生物技术应用服务组织（ISAAA）对 1995～2014 年间转基因作物产生的效益分析表明：采用转基因技术使化学农药的使用率降低了 37%，作物产量提高了 22%，农民利润增加了 68%，从 1996～2013 年间预计增加的作物产量的价值为 1 333 亿美元。

植物转基因技术在为农作物的改良带来巨大前景的同时，也引起了社会对转基因植物及其产品的一些安全担忧，例如，转基因技术本身是否安全？转基因产品是否有害？对环境会不会产生不良的影响？在种植、收获、加工、运输、销售及其残留物处理等过程中能否实现有效监管？等等。由于人们对这些问题缺乏详尽的了解，加之对一些不确定因素缺乏系统讨论，影响了人们对转基因植物及其产品的客观评价。因此，分析影响转基因植物安全的因素，研究风险防控技术，对推动转基因植物的科学合理应用，将具有非常重要的意义。

本书作者正是针对以上种种疑问，从实际出发，结合多年来在此领域一线科研工作经验，系统总结、概括、创作而成本书。

本书共分 7 章，第 1 章，转基因植物的兴起与发展；第 2 章，转基因植物的安全性争论、分析与评价；第 3 章，筛选标记基因的安全性与风险防控；第 4 章，目的基因的安全表达与风险防控；第 5 章，基因漂移问题的应对及其防控技术；第 6 章，知识产权的安全风险及其应对；第 7 章，转基因植物及其产品的检测及管控。每章不仅综合阐述国内外最新研究进展、基本原理及其发展趋势，而且特别介绍了本书作者在相关方面的研究成果。相信本书

的出版，对读者深入了解植物转基因技术原理，正确认识和评价转基因植物的安全性，有一定的参考价值。

本书的作者都是从事转基因技术研发和相关研究的一线同志，具有各自的研究重点和研究特色，力求从理论与实践的结合上说明问题。本书的出版得到安徽省农业科学院水稻研究所和国家转基因重大专项的资助，在此表示衷心的感谢。

本书的组稿、撰稿和统编工作都十分仓促，书中难免有不足之处，欢迎读者批评指正。

杨剑波

安徽省农业科学院

2015 年 9 月 8 日于安徽

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

目　　录

第 1 章　转基因植物的兴起与发展……1

1.1　转基因植物概念的提出……1

1.1.1　基因及基因技术……1

1.1.2　植物组织培养技术……2

1.1.3　植物转基因技术……3

1.2　植物转基因的技术流程和主要方法……4

1.2.1　植物转基因的技术流程……4

1.2.2　植物转基因的主要方法……5

1.2.3　转基因植物中外源基因的整合机制……17

1.2.4　植物转基因育种应用……20

主要参考文献……31

第 2 章　转基因植物的安全性争论、分析及评价……50

2.1　风险争论的由来……50

2.2　科学的风险分析……53

2.2.1　转化子筛选中的问题及可能存在的风险……53

2.2.2　外源基因表达中的问题和风险……54

2.2.3　外源基因漂移的问题和风险……55

2.2.4　其他风险……56

2.3　对转基因技术和转基因产品的风险评价……59

2.3.1　环境风险评估……61

2.3.2　食用安全性评估……62

2.4　我国转基因植物安全性管理体系……64

2.4.1　法规体系……64

2.4.2　安全评价体系……64

2.4.3　技术检测和安全监测体系……64

2.4.4 技术标准体系 …… 65
主要参考文献 …… 65

第 3 章 筛选标记基因的安全性与风险防控 …… 70

3.1 安全替代 …… 72
3.1.1 氨基酸代谢类相关基因作为 SMG …… 73
3.1.2 糖类分解代谢酶基因作为 SMG …… 75
3.1.3 其他 SMG …… 77
3.2 筛选标记基因的安全删除 …… 78
3.2.1 共转化系统的利用 …… 79
3.2.2 位点特异性重组系统 …… 83
3.2.3 利用转座子成分删除选择标记基因 …… 86
3.2.4 利用同源重组去除选择标记基因 …… 87
3.2.5 锌指核酸酶技术 …… 87
3.2.6 TALEN 技术 …… 88
3.2.7 CRISPR/Cas9 技术 …… 91
主要参考文献 …… 92

第 4 章 目的基因的安全表达与风险防控 …… 101

4.1 启动子的类型及其应用 …… 101
4.1.1 组成型启动子 …… 102
4.1.2 特异型启动子 …… 108
4.2 转基因沉默的风险应对 …… 123
4.2.1 转基因沉默风险原因分析 …… 123
4.2.2 转基因沉默风险的应对 …… 125
主要参考文献 …… 128

第 5 章 基因漂移问题的应对及其防控技术 …… 141

5.1 利用分子生物学方法阻断基因漂移 …… 141
5.1.1 叶绿体转化技术 …… 141
5.1.2 雄性不育 …… 142
5.1.3 种子不育 …… 142

5.1.4 转基因弱化技术 ······144
5.1.5 基因拆分技术 ······144
5.2 利用常规方法阻断基因漂移 ······145
5.2.1 物理隔离 ······145
5.2.2 闭颖授粉 ······146
5.2.3 无融合生殖 ······146
5.3 闭颖授粉基因研究进展 ······147
主要参考文献 ······151
第6章 知识产权的安全风险及其应对 ······155
6.1 知识产权的安全风险 ······155
6.1.1 外源基因使用的风险 ······155
6.1.2 核心元件使用的风险 ······156
6.1.3 转基因方法使用的风险 ······157
6.2 专利申请数量不足、覆盖面有限 ······157
6.3 知识产权保护的专业化水平较低，缺乏总体战略布局 ······159
主要参考文献 ······160
第7章 转基因植物及其产品的检测及管控 ······162
7.1 核酸检测的策略和技术 ······163
7.1.1 核酸检测的策略 ······163
7.1.2 核酸检测的技术 ······165
7.2 蛋白检测技术 ······174
7.2.1 酶联免疫吸附法 ······174
7.2.2 侧向流动型免疫测定 ······174
7.2.3 Western 免疫印迹 ······174
7.2.4 试纸条法 ······175
7.3 其他检测技术 ······175
7.3.1 多光谱无损检测技术 ······175
7.3.2 基因芯片技术 ······176
7.3.3 毛细管凝胶电泳技术 ······177
7.3.4 生物传感器 ······177

7.3.5 色谱技术 …… 178
7.4 转基因生物安全监管的几种模式 …… 178
7.4.1 以美国为代表的宽松管理模式 …… 178
7.4.2 以欧盟为代表的严厉管理模式 …… 180
7.4.3 以日本为代表的既不宽松也不严厉的管理模式 …… 181
7.4.4 我国对转基因植物及其产品的安全管理 …… 182
主要参考文献 …… 184
缩略词表 …… 190

第 1 章　转基因植物的兴起与发展

植物转基因是指利用现代基因工程技术，将人工分离或合成的目的基因，经过体外修饰或重组，利用物理、化学或生物的方法，导入需要改良的植物细胞，插入并整合到宿主基因组中，从而实现细胞的转化。转化的植物细胞经过培养、筛选，完成植株再生，并稳定表达和遗传目标基因性状，实现植物的定向分子改良。它是建立在基因技术和细胞技术之上植物定向遗传改良的新方法。

1.1　转基因植物概念的提出

1.1.1　基因及基因技术

1854～1865 年，奥地利僧侣学者孟德尔（Gregor Mendel）在进行豌豆杂交试验中天才地发现植物性状遗传的规律，提出了外部性状表达是由内在遗传因子（基因）控制的。美国遗传学家摩尔根（Thomas Hunt Morgen）得出了染色体是基因载体的结论，证明基因是在生物细胞核的染色体上呈线性排列，并可以通过连锁交换进行基因重组。他的学生穆勒（Hermann Joseph Muller）进一步证明基因是可以修改和变更的。1909 年，丹麦遗传学家约翰逊（W. Johansen）在《精密遗传学原理》一书中正式提出“基因”概念。沃森（James D. Watson）和克里克（Francis Crick）在 1953 年最终揭示了基因的本质，即基因是具有遗传效应的 DNA 片段，并证实了 DNA 的双螺旋结构。每个 DNA 片段上可以有许多基因，每个基因都是由四类脱氧核苷酸 A、T、G、C 按一定规律成百上千的排列组合而成。由于不同基因的脱氧核苷酸的排列顺序（碱基序列）不同，因此也就包含着各不相同的遗传信息。20 世纪 60 年代末，多个实验室发现了可把不同基因片段拼接到一起的 DNA 连接酶（Lehnman，1974）。1968 年 Meselsom 和 Yuan 等从大肠杆菌（*E. coli*）中分离出可以剪切 DNA

的限制性内切酶，使得对基因的体外操作成为可能。1973 年 Cohen 等首次综合利用这些技术成功实现体外 DNA 重组，开创了基因工程技术的先河。1985 年美国生物化学家 Kary Mullis 发明了具有划时代意义的“聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）”（Mullis 等，1986），该技术可以不通过活细胞，在体外直接利用微量的 DNA 样品大量生产目标 DNA 片段，操作简便，极大方便了目标基因的获得，真正实现了基因的体外复制和自主合成。随着基因技术的不断进步，人们对基因本质认识的不断加深，这些为植物转基因的研究和发展奠定了基础。

1.1.2 植物组织培养技术

组织培养是植物转基因技术的一个重要基础。1838 年德国植物学家 T. Schleidon 首先提出了植物细胞学说，认为如果给细胞提供与生物体相同的条件，每个细胞都应该能够独立生活；1902 年德国植物生理学家 G. haberlandt 开始了植物组织培养的探索，提出了植物细胞的全能性概念，即植物细胞通过培养增殖可形成有结构的组织，并能进一步再生成完整植株。这就是说人们可以利用离体植物器官（如根、茎、叶、茎尖、花、果实等）、组织（如形成层、表皮、皮层、髓、胚乳等）或细胞（如大孢子、小孢子、体细胞等）以及原生质体，在适宜的培养条件下，能够诱导出愈伤组织、不定芽、不定根，最后形成完整的植株。1958 年，Maheshwari 从柑橘胚珠的珠心组织培养中再生获得体细胞胚；同年，Steward 和 Reinert 分别从胡萝卜的愈伤组织和细胞培养中得到了完整植株（Steward 等，1958; Reinert，1958），植物细胞的全能性得到了试验证实。1953 年 Tulecke 首次从花粉培养中获得银杏的单倍体愈伤组织，1964 年 Guha 和 Maheshwari 成功地在毛叶曼陀罗花药培养中，由花粉诱导得到单倍体植株，从而促进了花药和花粉培养的研究。1971 年日本学者 Nagata 和 Takebe 等首次将去除细胞壁的烟草细胞原生质体通过培养实现了植株再生，这不仅在理论上证明了无壁的原生质体同样具有全能性，而且在实践上为外源基因的导入提供了理想的受体材料。

植物组织培养的成功，首先得益于培养基成分和培养条件的突破，培养基是提供植物组织和细胞在离体条件下生存和生长发育所需

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

的营养，决定着植物细胞和组织的生长状况和发育方向，培养条件直接影响组织和细胞的生长发育状态。不同植物、同一植物不同器官、甚至同一器官不同发育时期，对培养基成分和培养条件的要求都不同。1937 年 White 系统研究了光照、温度、通气状况、pH、培养基组分等条件对培养细胞生长的影响，研制了第一种适于植物组织培养的培养基，其成分均为已知化合物，包括 3 种 B 族维生素（吡哆醇、硫胺素和烟酸），命名为 White 培养基。20 世纪 40 年代 Skoog 和 Tsui 在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中发现，腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素对芽形成的抑制作用，有利于芽的分化，从而明确了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一，即这一比例高时，有利于产生芽；这一比例低时，则有利于形成根；比例相当时则有利于保持脱分化的状态。1955 年，Miller 等发现了激动素，这一植物激素促进细胞分裂的效率比腺嘌呤高 3 万倍，可代替腺嘌呤促进芽的形成。其后，众多研究学者对培养基成份进行了大量研究和优化，开发出适于不同植物、不同用途的多种培养基。1962 年由 Murashige 和 Skoog 共同研制的 MS 培养基，离子浓度高、营养丰富，不需要添加更多的有机附加物，就能满足植物组织对矿质营养的要求，广泛地用于植物器官、花药、细胞和原生质体培养，效果良好；1963 年推出改良的 White 培养基，无机盐浓度较低，有机成分更为丰富，对生根培养、胚胎培养、原生质体培养都有较好的效果（White，1963）。1968 年 Gamborg 等发明了 B5 培养基，具有较低的铵盐含量，适合双子叶植物特别是木本植物的组织培养。1975 年我国学者朱至清等专门为禾谷类作物设计了 N6 培养基，对小麦、水稻等禾谷类植物组织培养效果较好。1986 年，英国植物学家 E.Cocking 等对水稻等禾谷类作物的原生质体培养做出了巨大贡献，由于去除了细胞壁的障碍，为外源基因的导入提供了方便。

1.1.3　植物转基因技术

1973 年美国斯坦福大学的 Stanley Cohen 教授首先提出转基因的构想，即将体外克隆的目的基因片段（生物体基因组中分离的目的基因或人工合成的具有特定功能的 DNA 片段），转入待改良的生物细胞内，使之整合到宿主的基因组中，经过筛选培养和扩繁，表达并遗传

目标性状。1983年全球第一例转基因植物成功获得（Fraley等，1983；Schell等，1983），标志着不同种类生物基因可能通过基因工程技术进行重组，人类可以根据自己的意愿定向地改造生物的遗传特性，创造新的生物类型。与传统育种技术比较，转基因技术具有基因来源广泛（可以是植物、动物、微生物及人工合成的基因，不受种属关系的限制）、性状稳定快、选择效率高、预期性更强的特点，从根本上打破了物种间的生殖隔离，开辟了基因自由交流和重组的新通道，为农作物的产量提升、品质改良、抗性和适应性增强提供了新路径、开拓了新空间。因此，自植物转基因技术发明以来，植物基因分离、载体构建、外源基因转化、植株再生及外源基因检测等各项技术得到了快速发展和不断完善，业已建立起比较成熟的技术体系。

1.2　植物转基因的技术流程和主要方法

1.2.1　植物转基因的技术流程

植物转基因一般流程如图1-1所示。

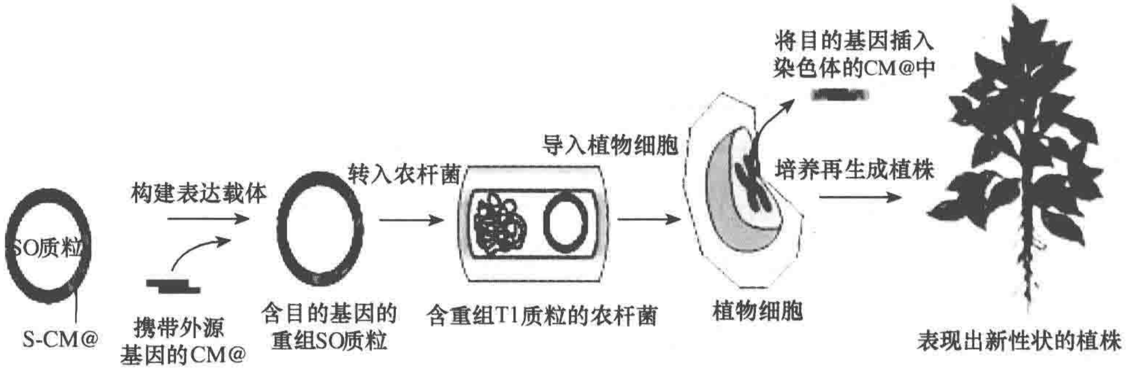

图1-1　植物转基因示意图（姚晓波和郭辉，2004）

（1）目的基因获取

寻找合适的目的基因是植物转基因的前提，也是通过转基因技术实现对原有植物不良性状进行改造成败的关键。常用的方法是从生物有机体中分离克隆带有目的基因的DNA片段，也可以根据报道的文献人工设计和合成目的基因。

（2）目的基因载体构建

在细胞外，将带有目的基因的DNA片段通过剪切、拼接，连接

到具有植物启动子和筛选标记的运输载体分子上，形成具有表达能力和运载功能的重组 DNA 分子。

（3）目的基因的导入

通过物理、化学或生物的手段和方法，将重组的 DNA 分子导入受体细胞（亦称宿主细胞），并整合到受体细胞基因组中，经过对标志基因的筛选，使带有重组 DNA 的细胞增殖扩繁，获得大量的细胞繁殖体。

（4）转化子筛选与植株分化

在继续对转化细胞筛选的基础上，通过植物组织培养技术，将转化的细胞或组织，分化再生成完整植株。

（5）目的基因表达鉴定

将得到的再生植株，进行目的基因的功能验证，筛选具有预期功能的改良单株，培育成稳定的转基因株系。

1.2.2　植物转基因的主要方法

转基因的方法按介导方式和受体系统的不同可分为以下几类：①以原生质体、培养细胞等为受体的直接转化法；②农杆菌介导法；③依靠生物自身的种质系统或特殊组织结构来实现外源基因转化的其他方法。

1.2.2.1　直接转化法

直接转化法（又称 DNA 直接导入法），是指将裸露的 DNA 直接送入到植物细胞或原生质体中的转化方法。

（1）聚乙二醇转化法

聚乙二醇转化法作用原理是借助聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）、聚乙烯醇（polyving akohol, PVA）、聚磷酸鸟苷（poly l-guanosine monophosphate, pLO）等细胞融合剂的作用，在高钙离子和高 pH 的条件下，诱导细胞膜之间或者使 DNA 与细胞膜之间形成分子桥，改变细胞膜的通透性，引起膜表面电荷的紊乱及干扰细胞间的识别，促进细胞膜间的融合，原生质体膜通过内吞噬作用将外源 DNA 分子摄入受体细胞。摄入的 DNA 大部分被细胞内酶降解，一小部分 DNA 整合到核基因组中，实现细胞转化。不同 PEG 浓度和处理时间对转

化频率有一定的影响，丁群星等（1992）研究认为，6%～10%（质量百分数）的 PEG 处理 30min 效果较好。

该方法率先在烟草作物上获得成功（Krens 等，1982），以后相继在水稻、玉米等重要粮食作物上获得突破。Toriyama 等（1988）、Shimmamoto 等（1989）、Datta 等（1990）均利用该方法获得转基因水稻植株。我国学者 Zhang 等（1988）、杨虹等（1989）以水稻原生质体为受体、郭光沁等（1993）以小麦济南 177 的原生质体为受体、程振东等（1994）以甘蓝型油菜原生质体为受体，分别获得了转基因植株。

PEG 介导的遗传转化方法，所需设备简单、易于筛选、转化后代嵌合体少。但 PEG 转化法是以原生质体为受体，对培养条件要求苛刻，对操作的精细程度要求也较高，费时费力，转化效率较低，重复性欠佳，并受到基因型限制，未能得到普遍应用。

（2）电激转化法

电激转化法作用原理是将原生质体在溶液中与外源 DNA 混合后，用一定强度的脉冲电流处理，在原生质膜的某些部位瞬间产生可回复的小孔通道，外源 DNA 可以通过小孔进入原生质体内。质膜上可逆孔隙的大小、数量与电场强度、处理时间、溶液性质等密切相关。1988 年 Rhodes 等首次利用该方法获得转基因植株。1992 年 D'Halluin 等利用该方法在玉米转基因上获得成功。

电激法与 PEG 法相似，都依赖于原生质体的培养，比较适合于瞬时表达的研究，在遗传转化技术研究的初期得到了较多的关注。

（3）脂质体转化法

磷脂分子在水中可自动生成闭合的双层膜，形成一种囊状物，称为脂质体，具有类似细胞膜的构造和功能（也称为人工细胞膜）。脂质体转化法是利用阳离子脂质体表面携带的正电荷与核酸的磷酸根通过静电作用，将 DNA 分子包裹入内，形成 DNA-脂复合体。带正电荷的复合物与带负电荷的细胞膜，通过融合或细胞内吞作用等，将 DNA 传递进入细胞形成包涵体。包涵体在二油酰基磷脂酰乙醇胺（dioleoyl phosphoethanolamine, DOPE）作用下，使原来与脂质体结合的 DNA 游离出来，进入细胞质，进而通过核孔进入细胞核，最终实现细胞的转化。

Felgner 等 1987 年首次利用 N-［1-（2，3）-二油烯氧基］丙基-N, N, N-三甲基氯化胺（N-[1-(2，3-Dioleyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium chloride, DOTMA）与 DOPE 制备成小单层脂质体（lipofectin），实现 DNA 转化。Spörlein 等（1991）利用转化脂将新霉素磷酸转移酶（neomycin phosphotransferase）基因 *NPT* Ⅱ 转移到烟草原生质体，经筛选培养，获得了稳定转化的植株。

脂质体转化法对细胞毒性和损伤相对较小，对被转移的核酸类型和分子量有很高的包容性，但同样需要原生质体作为受体，限制了其应用的自由度。

（4）基因枪转化法

基因枪转化法的原理是将带有目的基因载体包裹在金粉或钨粉的表面，通过一定的高压气体（如氦气）把这些金属微粒加速到足以击穿植物细胞壁的速度，将外源基因直接送入植物细胞、组织和细胞器，整合到宿主染色体上并得到表达，然后通过细胞和组织培养技术，再生完整的转基因植株。该方法也称微弹轰击法（microprojectile bombardment）或微粒轰击法（particle bombardment），由美国科学家 Sanford 提出（1987）。通过基因枪技术直接导入的外源基因必须克隆于适当的载体上，并能够通过载体的扩增、繁殖获得实验所需的 DNA，将纯化的 DNA 在亚精胺及氯化钙同时存在的条件下，吸附到金粉或钨粉上（微载体），然后将微载体均匀铺在大载体上，进行基因枪转化。如果需要从目标组织再生转基因植株，那么整个过程必须在无菌条件下进行。微粒大小和压力的控制直接决定着打靶深度，目前普遍采用 1.0μm 的金粉，压力控制在 1 500 psi 左右。在基因转移过程中，DNA 以双链超螺旋（偶尔以单链）的形式与金属微载体结合被导入植物细胞，通过目标组织的切片观察 DNA 的去向，发现 90% 瞬时表达的细胞，在接受微载体后能直接进入细胞核。最常用微粒轰击的目标组织是胚性组织及分生组织，这类细胞具有快速分裂、液泡小以及细胞核占总细胞体积比例大等特征，因而是接受和整合外源 DNA 的适合材料。

1991 年基因枪法在水稻细胞的转化上初获成功（Christou 等，1991），随后在小麦、高粱、大麦、燕麦、黑麦等重要禾谷类作物相继获得转基因植株（Vasil 等，1992；Casas 等，1993；Wan 和 Lemaux,

1994；Somers 等，1992；Castillo 等，1994）。

基因枪转化法的优点是无明显的宿主限制，受体材料十分广泛，凡是具备再生能力的细胞或组织都可以作为基因枪的转化受体。载体质粒的构建也相对简单，转化过程的可控性较好、已经成为常用植物转基因技术之一。基因枪转化法另一个重要特点是有利于实现多个目标基因的共转化，多基因的共转移可在同一转化步骤中进行。还可以通过目标基因和筛选标记基因随机插入的分选，实现筛选标记基因的剔除。Chen 等（1998）将 1 个抗生素标记基因与 13 个分别含不同转基因表达盒的质粒混合在一起，轰击水稻胚性愈伤组织，通过对 120 个独立转基因株系分析表明，85%的转化体含有 2 个以上目的基因，17%转化体含有 9 个以上的目的基因。本研究组吴家道等（2000）利用基因枪转化法将分别携带 *Xa21* 和 *HPT* 基因（hygromycin phosphortransferase，潮霉素磷酸转移酶）的 2 个质粒同时导入水稻受体细胞，通过分离和筛选，成功获得不含 *HPT* 的抗白叶枯病水稻转基因株系 M12 和皖 21B。基因枪转化法的缺点是转化频率较低，实验的成本较高，需要专门的仪器设备，外源 DNA 易发生结构变化和修饰，整合位点较复杂，易出现多拷贝插入和基因沉默现象。

（5）显微注射转化法

显微注射转化法是利用带针尖的毛细微管（一般针尖直径为 0.5 nm），将 DNA 直接注射到固定好的单个活细胞或原生质体中，随着细胞的生长发育，部分外源 DNA 随机地整合到受体细胞基因组中。这种方法首先应用于转基因动物的研究，操作植物细胞需要将培养细胞或原生质体事先进行固定，常用的细胞固定方法有琼脂糖包埋法、多聚 L-赖氨酸粘连法和吸管支持法。

Neuhaus 等（1987）用显微注射法转化绿藻获得成功。同年，De la Pena 等（1987）用微型注射器将含 *NPT II* 基因的重组质粒注射到减数分裂前 14 天的黑麦幼花序中，获得 7 株卡那霉素抗性苗，经 Southern 杂交证明质粒 DNA 整合到黑麦基因组中。随着技术的发展，微注射的对象扩展到细胞核、细胞器，以及多细胞结构（如分生组织、胚状体、原胚等）。显微注射方法虽然无需特殊的选择系统，但细胞再生率很低，因此，外源基因的整合效率不理想，在实际应用中成功的报道较少。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com