

植物基因克隆的方法与应用实践

关亚丽 潘 琴◎编著

GUANYALI PANQIN BIANZHU



植物基因克隆的方法与应用实践

关亚丽 潘 琴 编著

中国科学技术出版社

·北 京·

图书在版编目 (CIP) 数据

植物基因克隆的方法与应用实践 / 关亚丽, 潘琴编著.
北京: 中国科学技术出版社, 2009.6
ISBN 978-7-5046-5455-7

I. 植… II. ①关…②潘… III. 植物—无性系—遗传工程 IV. Q943.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 088349 号

自 2006 年 4 月起本社图书封面均贴有防伪标志, 未贴防伪标志的为盗版图书。

责任编辑: 张楠 周倩如

责任校对: 林华

责任印制: 安利平

中国科学技术出版社出版

北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码: 100081

电话: 010-62173865 传真: 62179148

<http://www.kjpbooks.com.cn>

科学普及出版社发行部发行

北京京晟纪元印刷有限公司印刷

*

开本: 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张: 15.5 字数: 250 千字

2009 年 6 月第 1 版 2009 年 6 月第 1 次印刷

定价: 48.00 元

ISBN 978-7-5046-5455-7/Q·143

(凡购买本社的图书, 如有缺页、倒页、
脱页者, 本社发行部负责调换)

前言

21 世纪是生命科学的世纪。20 世纪后叶，现代生命科学尤其是基因工程取得了一系列突破性成就，是发展最为迅速和引人注目的研究领域。植物基因工程以 DNA 重组技术为核心技术，实现了按人类意愿跨植物物种基因交流，在迄今短短的 30 多年时间里产生了大量的转基因植物，在农业上取得了斐然成果，成为农业绿色革命的最重要技术手段。

基因工程技术克服了远缘物种之间杂交不亲和的难题，打破了物种间的生殖隔离，使来源于同一物种不同品种之间，甚至于不同物种之间的基因可以进行交流。目前，随着植物组织培养、遗传转化技术的日臻成熟，目的基因的克隆已经成为植物遗传改良亟需解决的问题。

近 20 年来，已出版了多部基因工程方面的专著或教材，对促进学科发展起到了积极的作用。但是，目前专门论述基因克隆的方法与实践的学术专著还很少见，很多基因克隆的研究方法散见于各种有关基因操作技术的专著和教材，因此，笔者在相关专家的支持与帮助下，结合自己的研究实际，着手编著了一本植物基因克隆的方法与实践的图书，意在总结自己研究及教学工作的同时，为该领域的发展尽一份绵薄之力。

本书共 10 章，分为三篇。第一篇包括三章内容，其中第一章对基因克隆的概念及步骤进行概述，第二、三章分别介绍了植物基因克隆的酶学基础和所需的载体；第二篇（第四、五章）介绍植物基因克隆的主要技术、策略和研究方法；第三篇（第六至十章）则结合笔者的教学与研究工作，介绍了植物基因克隆的方法之一——同源序列克隆法在柳树基因克隆中的应用实践。本书是一部有自己特色、体系新颖、基础理论与实际应用并重的学术著作，在内容的安排上注重科学性、先进性、系统性和条理性；在具体编写上坚持基础性、通用性和实用性相结

合，既阐述基本理论、方法和原理，同时又以实际应用为例，突出植物基因工程的应用性特点。本书力求深入浅出地反映当代基因克隆技术领域的发展状况，适合生命科学领域相关专业教学与研究使用，也可作为其他学科生物技术有关科研人员的参考书。

本书在实验和编写过程中，得到王明庥院士和博士生导师黄敏仁教授的指导、鼓励和支持，得到南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室陈英、程强老师和同学的大力帮助，另外，为了更好地说明植物基因克隆研究的方法和原理，本书引用或参考了一些出版物中的相关图表和学术观点，在此一并对同行及参考其资料的作者表示衷心感谢！

虽然在本书的编写上进行了不懈的努力，但由于时间紧迫，加上笔者水平有限，撰写、统稿中难免存在欠妥和疏漏之处，恳请同行专家和读者批评指正。

* 本书获得“国家级第一批第二类特色专业建设点——海南师范大学生物科学特色专业”建设基金、“海南师范大学博士启动基金”和“海南师范大学著作出版基金”的资助。

目 录

第一篇 植物基因克隆的基础

第一章 概论	3
第一节 基因工程的内容与应用	3
第二节 基因克隆的基本概念及步骤	6
第三节 基因工程与生物安全	8
参考文献	10
第二章 基因克隆的酶学基础	13
第一节 限制性核酸内切酶	14
第二节 DNA 连接酶	18
第三节 DNA 聚合酶	21
第四节 DNA 修饰酶	24
第五节 单链核酸内切酶	27
参考文献	28
第三章 基因克隆载体	31
第一节 质粒载体	32
第二节 噬菌体载体	40
第三节 病毒载体	44
第四节 酵母载体	46
参考文献	47

第二篇 植物基因克隆的策略与主要方法

第四章 基因克隆的相关技术	51
----------------------------	----

第一节 核酸的分离和纯化	51
第二节 PCR 技术	53
第三节 DNA 序列测定	62
第四节 核酸和蛋白质的分子杂交	65
第五节 基因定点诱变	72
参考文献	76
第五章 植物基因克隆的主要方法与研究策略	77
第一节 功能克隆	78
第二节 图位克隆	81
第三节 转座子标签法和 T-DNA 标签法	90
第四节 mRNA 差异显示技术获得差异表达的基因	95
第五节 抑制性差减杂交技术获得差异表达的基因	101
第六节 同源序列克隆	106
第七节 电子克隆	110
参考文献	113

第三篇 柳树 AP3 同源基因 SSMADS 的克隆及表达分析

第六章 植物花发育分子生物学研究进展	127
第一节 植物花发育概述	127
第二节 植物成花基因研究进展	128
第三节 植物 MADS 盒基因的克隆	140
参考文献	141
第七章 RNA 干扰及其在功能基因组学中的应用	149
第一节 RNA 干扰及其作用机制	150
第二节 功能基因组学研究的主要内容和研究方法	157
第三节 RNA 干扰在功能基因组学中的应用	170
第四节 RNAi 研究中存在的问题及展望	173
参考文献	175
第八章 柳树 AP3 同源基因 SSMADS 的克隆及表达分析	183
第一节 材料和方法	183

第二节 结果与分析	201
参考文献	215
第九章 转 OsMADS16 基因研究	217
第一节 材料和方法	217
第二节 结果与分析	222
参考文献	228
第十章 簸箕柳组织培养初探	229
第一节 材料和方法	230
第二节 结果与分析	231
参考文献	236
附录缩略词中英文对照表	237

第一篇

植物基因克隆的基础

第一章

概 论

从孟德尔发现生物遗传性状由细胞物质控制，至今已有 100 多年历史了。现在，我们都知道控制生物遗传性状的基本单位是基因。1944 年，美国微生物学家 Avery 发表了细菌转化的研究报告，证明了基因的物质基础是 DNA。1953 年，Watson 和 Crick 揭示了 DNA 的分子结构，接着，DNA 的半保留复制机制被阐明，基因研究进入到分子水平。20 世纪 70 年代初，DNA 的体外重组获得成功，由此诞生了以 DNA 重组技术为核心的基因工程。

基因工程的诞生，标志着人类打破了历经数十亿年所形成的自然界固有的秩序，使人类从认识生命、探索生命奥秘的必然王国进入到改造生命的自由王国。21 世纪已经进入了生物技术的时代，基因工程作为生物技术领域的先导技术，正以日新月异的方式快速发展，已经渗透到了包括农业和食品工业的众多领域，深刻影响着整个生命科学的研究与发展，成为当今科学领域最具影响力的技术之一。

第一节 基因工程的内容与应用

一、基因工程的概念

基因工程 (genetic engineering) 开始于 1973 年，实际上是分子生物学原理的应用，核心内容是实现物种之间的基因转移。基因工程是将目的基因或 DNA 片段与合适的载体连接并转入目标生物细胞，通过复制、转录、翻译外源目的基因以及蛋白质的活性表达，使转基因生物获得新的遗传性状。传统的杂交育种只能

在近缘物种之间转移遗传信息，而基因工程技术没有物种限制，可以将任何一个物种的基因转移到另外一个物种的基因组（genome）中，每次转移的基因仅有一个或几个，并且可以人为控制。

基因工程具有以下几个重要特征：①打破物种的界限，实现跨物种的基因转移；②通过已知功能基因的遗传转化，可进行物种的定向改良；③可以按照人们的意愿，设计出新的基因蓝图，创造出自然界中原本没有的生物。

二、基因工程的研究内容

基因工程的研究内容可分为上游和下游两个层面。上游泛指基因组学研究、基因的分离克隆以及基因的表达调控机理研究，包括顺式作用元件和反式作用因子的鉴别。下游包括表达载体的构建、转基因技术、表达体系、表达产物的纯化和活性分析等。通常来说，基因工程主要包括以下几个基本步骤。

（1）分离目的基因：采用各种方法从复杂的生物体基因组中分离获得带有目的基因的 DNA 片段。

（2）切割目的基因和载体：用限制性内切核酸酶切割目的基因和载体，以进行连接。

（3）连接目的基因和基因载体：在体外，将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到具有自我复制功能及筛选标记的载体分子上，构建成重组 DNA 分子（也称为重组体）。

（4）转化到宿主细胞：将重组体转移到宿主细胞（受体细胞），并随宿主细胞的繁殖而扩增。

（5）筛选阳性细胞克隆：从大量的细胞繁殖群体中，筛选出转化成功（带有重组体）的受体细胞克隆。从筛选出来的受体细胞中提取扩增的目的基因，以做进一步的分析鉴定。

（6）重组体的大量培养，外源基因表达分析与开发应用：将目的基因克隆到合适的表达载体上，导入宿主细胞，构建成高效、稳定的具有功能性表达能力的基因工程细胞；利用工程技术大规模培养上述的基因工程细胞，获得大量的外源基因表达产物；分离纯化工程细胞表达产物，并最终获得所需的基因工程产品。

三、基因工程在植物中的应用

基因工程技术由于可以跨越物种界限转移有经济价值的基因，已经被广泛用

于改造有机体的遗传性状。如将黄水仙、玉米和细菌的维生素 A 前体合成酶基因转移到水稻基因组中，产生了金色大米。通过导入色素合成代谢基因，可以产生彩色棉花，织成的布不用染色。在植物中表达病毒的表面抗原基因，可以产生疫苗水果，例如，含流感疫苗的转基因番茄，含乙肝疫苗的转基因香蕉，生吃后水果中的活性抗原可以使人体产生抗体。

在农作物生长过程中，病虫害历来都是严重威胁产量与品质的重要因素，全世界每年因虫害所造成的农作物减产损失高达数千亿美元，因此有效防治害虫一直是农业生产的重点。基因转化技术不仅可以加快抗病育种进程，而且可以将多个抗病基因导入目的植物中，解决常规育种种质资源匮乏的难题。现在，世界范围内已有多种抗虫转基因作物商品化，常用的抗植物虫害基因主要有苏芸金杆菌杀虫结晶蛋白基因、豇豆胰蛋白酶抑制剂基因、植物凝集素基因、淀粉酶抑制剂基因等。丁玉梅等通过农杆菌介导法将 Bt 基因的 Cry1Ab 类型导入马铃薯中，以期获得高抗虫性的马铃薯基因工程植株。宋萍等从土壤中分离得到苏云金芽孢杆菌 WZ-9，生物活性测定表明，WZ-9 菌对马铃薯瓢虫 2 龄幼虫 72h 校正死亡率达 100%。Hilder 等发现转 GNA 基因的烟草减少了桃蚜的生长发育和繁殖力。李友莲等研究结果发现，马铃薯凝集素对桃蚜的生长发育有强烈的影响，如能将其基因转入到桃蚜取食为害的植物中，则可大大减少化学农药的使用。

利用基因操作技术有可能增加植物对逆境的耐受能力，也可以提高植物的光合效率。谭洁等人通过农杆菌介导法将烟草 NPK1 基因导入辣椒中，以增强辣椒抗逆性。Mc Kersie 用根癌农杆菌介导，获得了转 MnSOD 的苜蓿，并且转基因植株对冻害的抗性增加，其后代在冻害胁迫后生长比没有转基因植株快得多，表明 MnSOD 抑制无氧自由基产生，从而提高抗寒能力。Hsieh 将拟南芥的 CBF1 基因转入番茄，转基因番茄叶片中的过氧化氢酶的活性比对照显著提高， H_2O_2 含量比对照明显降低，转基因番茄的抗寒性和抗旱性也得到明显的提高。日本奈良尖端科学技术大学将两种蓝藻的高活性光合作用相关基因导入烟草叶绿体基因组，使烟草的光合作用效率比原来增长 70%，15 周后比普通植物高 40%，从光合作用中得到的淀粉也比原来增加 70%。

在农作物品质的改良上，基因工程技术也得到了广泛的应用，并取得了丰硕成果。用基因工程的方法可以方便地改变油料作物的油脂组成及含量，以使其更加适于食用或加工的需要。如通过导入硬脂酸 2ACP 脱氢酶的反义基因，可使转

基因油菜种子中硬脂酸的含量从 2% 增加到 40%。而将硬脂酰 CoA 脱饱和酶基因导入作物后, 可使转基因作物中的饱和脂肪酸(软脂酸、硬脂酸)的含量有所下降, 而不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸)的含量则明显增加, 其中油酸的含量可增加 7 倍。高油酸含量的转基因大豆及高月桂酸含量的转基因油料作物芥花菜在美国已经成为商品化生产的基因工程油料作物品种。通过基因工程技术也可以改变植物食品中淀粉组成及含量。例如在马铃薯上利用淀粉合成酶 GBSS 基因的反义基因抑制了该酶的活性, 使反义转基因马铃薯中 GBSS 的活力降低了 70% ~ 100%, 而另一形式的淀粉合成酶则不受影响, 从而获得了支链淀粉含量很高或完全不含直链淀粉的马铃薯, 而通过反义基因抑制淀粉分支酶基因则可获得完全只含直链淀粉的转基因马铃薯。

第二节 基因克隆的基本概念及步骤

一、基因克隆的基本概念

1969 年, 美国哈佛大学的 R.Beckwith 博士领导的研究小组运用 DNA 杂交技术成功地分离了大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因, 开创了基因分离的成功先例, 从而激发了人们从不同角度分离基因的积极性。1972~1973 年, 以 H.Boyer 和 P.Berg 等人为代表的一批科学家发展了重组 DNA 的技术, 并于 1972 年得到了第一个重组 DNA 分子, 于 1973 年完成了第一个基因的克隆, 由此宣告了基因克隆技术的诞生。

“克隆”(clone)一词, 作名词使用时是指从一个共同祖先无性繁殖的一群遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的群体; 作动词使用时, 是指产生这一群体的过程。基因克隆(gene cloning)的“克隆”一词是动词, 指“进行克隆”, 即指在体外, 借助于能自我复制的载体, 将目的基因引入到宿主细胞中进行增殖, 以获得大量的特定 DNA 片段, 或以此为基础, 通过工程方法表达出大量相应的蛋白质产物。基因克隆实验包括 DNA 片段的产生、DNA 片段与载体分子的连接、将重组 DNA 分子导入受体细胞和目的克隆的筛选四个基本步骤。一个基因被克隆以后, 就可以在细菌中保存, 也可以通过培养细菌进行扩增。一般情况下, 微量的 DNA 片段不能直接观察和分析, 只有扩增到微克水平后才能进行酶

切、连接和序列分析等分子生物学操作，而扩增目的 DNA 片段的最常用途径就是基因克隆。基因克隆是在分子水平上进行操作的，故也被称作分子克隆 (molecular cloning)，其本来的含义与有机体克隆接近，都是通过无性途径产生相同拷贝的意思。

二、基因克隆的技术途径

概括起来，基因克隆包括如下主要内容或步骤：

(1) 选择用于基因克隆的 DNA 材料及获取带有目的基因的 DNA 片段：从复杂的生物细胞基因组中，经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤，分离出带有目的基因的 DNA 片段，取得所需的基因（外源性 DNA 片段）；或者从特定细胞里提取所需基因的 mRNA 后，在适宜的条件下利用逆（反）转录酶的作用来取得所需基因；或者通过探明目的基因所含的遗传密码及其排列顺序，然后用化学方法人工合成所需的基因。

(2) 带有目的基因的外源 DNA 片段与载体分子在体外进行连接，形成重组 DNA 分子。基因载体是具有自我复制能力的另一种 DNA 分子，经过处理后，能与外来基因（外源性 DNA）相结合。目前，常用的基因载体主要有两类：一类是质粒，一类是病毒（包括噬菌体）。

(3) 将重组 DNA 分子导入合适的宿主细胞：重组 DNA 是带有目的基因的运载体（杂种质粒或病毒）。用人工的方法（转化或转导法）将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞（宿主细胞）中，使它能在细胞中“定居”下来。通过自体复制和增殖，形成重组 DNA 的无性繁殖系（克隆），从而扩增产生大量特定目的基因，并使之得到表达，即能指导蛋白质的合成。

(4) 重组菌的筛选、鉴定和分析：从大量受体菌中筛选出带有目的基因的重组菌，并进行鉴定。然后培养克隆株系，提取出重组质粒，分离已经得到扩增的目的基因，再分析测定其基因顺序。

(5) 工程菌的获得和基因产物的分离：将目的基因克隆到表达载体上，再次导入到受体菌中，经反复筛选、鉴定和分析测定，最终获得较稳定的高产的基因工程菌，然后进行大量培养繁殖，产生所需要的目的基因产物，再进行分离纯化。

三、基因克隆的技术特点

基因克隆技术与其他育种技术相比，具有如下特点。

(1) 能像工程一样按人们的意愿来事先设计和控制：基因克隆技术不仅可预知某一基因的改变，而且可以及早纠正，可以有计划、有目的地构建基因，所以基因克隆技术育种是比较定向的。此外，基因克隆技术育种的每步变化均可检测，可保证产品的纯度和安全性。

(2) 人工的、离体的、分子水平上所进行的遗传重组：基因克隆技术有能力在极端错综复杂的生物细胞内取出所需基因，并能人为地将此目的基因在试管中进行剪切、拼接、重组并转化到受体细胞中，经无性繁殖能增产出数百数千倍的新型蛋白质，这是基因克隆技术最突出的优越性。

(3) 能在动植物和微生物间进行任意的、定向的超远缘杂交：基因克隆技术的最大威力在于能使 DNA 片段越过不同生物间特异的细胞壁而进入到完全不同的没有亲缘关系的生物体内，能定向地控制、修饰和改变生物的遗传和变异。因而完全有可能创造出前所未有的具有新的遗传性状的生物，使育种工作产生了革命性变化。

第三节 基因工程与生物安全

一、基因工程的潜在威胁

与传统的生物技术相比，基因工程技术带来了很大争议，有很多国家的公众拒绝接受和消费转基因食品。随着基因工程技术的推广应用，生物安全 (biological safety) 问题引起越来越多的关注。我们每个人将不得不面对基因研究及其应用带来的后果。基因工程技术的发展和应用有可能带来生物公害，主要有以下几个方面。

(1) 在 DNA 重组实验时，可能意外地造出一些对人、畜有害的细菌或病毒。这些微生物进入自然界会引起预想不到的危害。

(2) 感染致癌基因的重组体时，可能使人、畜患癌症。在美国，曾有人申请用大肠杆菌生产乳牛胃细胞凝乳酶原基因的产品，遭到拒绝，就是考虑到这种可能。

(3) 有些重组体虽不直接给人、畜带来危害，但是可能给其他生物（如植物、微生物、昆虫）带来影响，使地球生态平衡受到破坏。1999 年，*Nature* 的一个报道指出广泛分布于北美的一种橙褐色大蛱蝶的幼虫暴露到 Bt 玉米花粉中

时受到了伤害，显示种植 Bt 玉米对非目标物种可能存在潜在危险。尽管同意释放 Bt 玉米的管理部门在考察了这种可能性后认为没有太大的风险，但是争论还在继续。

(4) 基因工程被用于军事目的，用来制造生物武器，有可能危及大批生命或遗留严重后遗症。

二、对生物安全的担忧

基于生物技术发展有可能带来的不利影响，使人们提出了生物安全的概念。生物安全是指对转基因生物及其产品、病原生物体、外来有害生物等生物体对人类、动植物、微生物和生态环境可能产生的潜在风险或现实危害的防范和控制。目前，生物安全主要涉及几个方面的内容：①防范生物恐怖；②防止外来生物入侵；③保障转基因生物体安全；④病原微生物的控制、高等级生物安全实验室的建立及管理；⑤生物治疗、干细胞、克隆技术等引发的生命伦理问题。

生物安全概念的提出源于 20 世纪 40 年代，但其内容较为模糊，更多地倾向于实验室污染所造成的危害，即实验室生物安全。1975 年 2 月 24 日，在美国加利福尼亚州的 Asilomar 召开了第一次国际生物安全会议，第一次正式提出了转基因生物安全性的问题。从此，转基因生物安全性就成为基因工程发展研究中必须考虑的重要问题。在 Asilomar 会议之后，一些国家就开始着手制定有关生物安全的管理条例和法规。1976 年，美国国立卫生研究院（NIH）率先颁布了《重组 DNA 分子研究准则》，从此拉开了 GMOs 生物安全相关法规制定的序幕。

迄今为止，各界对生物安全问题还存在不同的看法：有人认为转基因植物与杂交水稻没有什么区别，都是改变了某种生物的个别基因，因此不应该有什么危害；也有人认为转入的基因在食用后必然会被消化系统分解掉，而对人体无害；还有学者指出，在自然界有很多谷物、蔬菜和水果都会经常受到植物病毒侵袭，实际上人们每天都在大量摄入病毒外壳蛋白，但多年来人们食用后并没有见到明显的不良反应。

总之，对于生物技术能给人类带来的威胁和影响，人们还只能进行某种程度的预期，至于这种威胁到底会有多严重，涉及面到底有多广，现在还很难给出一个量化的结论。尽管一些发达国家已经开始拨出专门经费针对生物安全进行实验研究，但毕竟时间不长，还很难得到准确的结论，特别是生物技术产品自然积累的数据还很少。