

现代生物技术前沿

# 遗传修饰植物

曾庆平 主编



科学出版社  
[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

现代生物技术前沿

曾庆平 主编

# 遗传修饰植物

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书包括植物遗传修饰的原理、用途和方法共三篇。上篇以基因供体—基因载体—基因受体操作系统为主线,从基因来源、基因中转和基因去路切入,系统阐述了植物遗传修饰的基本原理,包括基因的组织结构、表达调控、克隆和重组等基因工程核心技术;中篇全面总结了抗除草剂、抗虫、抗菌、抗病毒、抗逆、优质、高产及特殊产品合成等遗传修饰植物在现代农、林、园艺及药学领域的应用现状和开发前景;下篇简要列举了植物遗传修饰的常用实验方法,如基因制备、克隆、转化和鉴定等。全书图文并茂,深入浅出,基础理论与应用技术融会贯通,中外研究的最新成果与产业化进展兼收并蓄;实验部分皆为本实验室已经建立并应用多年的成熟方法。

本书可供从事植物分子生物学及植物基因工程研究的农学、林学、园艺学、中药学、药用植物学、植物生理学、植物生物化学和植物生物工程学等领域的科学工作者阅读和参考,也可作为高等院校相关专业植物基因工程课程的研究生或高年级本科生教学参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

遗传修饰植物/曾庆平主编. —北京:科学出版社,2007

(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-018102-2

I. 遗… II. 曾… III. 植物-遗传工程 IV. Q943.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 116721 号

责任编辑:夏 梁 王 静 彭克里 刘 晶/责任校对:李奕莹

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

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>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2007 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007 年 2 月第一次印刷 印张:24

印数:1—3 000

字数:547 000

定价:65.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

## 承 蒙

国家自然科学基金委员会  
国家中医药管理局  
广东省自然科学基金委员会  
广东省教育厅  
联合资助

## 前 言

转基因植物 (transgenic plant)、转化植物 (transformed plant)、基因工程植物 (genetically engineered plant) 和遗传修饰植物 (genetically modified plant, 简称 GM 植物) 作为同义语在本书中被交替使用, 是指采用基因操作方法培育的具有人工设计性状的植物。既然 GM 植物非“造物主”之作, 那就难免有“矫揉造作”之处, “设计师”的考虑也未必面面俱到。鉴于此, GM 作物的命运多舛, 如抗生素抗性 (antibiotics resistance) 被指有向环境扩散之嫌, 抗虫性 (insect pest resistance) 也颇受公众非议甚至受到抵制。过去曾发生过涉及苏云金芽孢杆菌毒蛋白的黑脉金斑蝶 (monarch butterfly) 事件 (Losey JE et al. 1999) 及凝集素毒性的 Pusztai 事件 (Ewen SWB et al. 1999); 最近有关中国超市销售的亨氏米粉转基因成分之争更令消费者闻“转基因”而色变, 转基因食品屡次在商场上架又下架, 后来硬性规定在转基因食品外包装上必须贴有醒目标签, 以还公众的知情权和遴选权; 环保人士扯起大旗游行示威令从事 GM 作物研究的科学家几乎成为“过街老鼠”, 转基因食品也屡被推上审判台。这些事件给人们留下一种错误的印象, 那就是转基因食品的生产和销售似乎有蒙骗大众的嫌疑, 无异于“黑市奸商”投机倒把赚取无辜民众的黑心钱。那么, 科学家们真的是昧着良心干着罪恶的勾当吗? 当然不是! 那么, 他们为什么还要如此卖力地扮演一种“费力不讨好”的角色呢? 那是因为他们相信, GM 作物必将成为养活地球上日益增多的人口的希望! 而且随着时间的推移, 这种不可阻挡的趋势会变得越来越明显!

GM 作物就像是尚未雕琢完成的玉石, 它本身的确存在这样或那样的不足, 但瑕不掩瑜, GM 作物仍以顽强的生命力“打拼并快乐着”! 尽管如此, 考虑到人们对转基因食品的态度, 不管这种疑虑是否科学和合理, 科学家们还是作出了实际让步。他们不再像以前那样喋喋不休地重复转基因表达蛋白在烹饪过程中会失效的老话题, 而是在 GM 作物的培育方法上进行彻底革新, 那就是不厌其烦地再转一次基因, 从而将“惹是生非”的抗药性基因剔除, 或者完全摒弃这些抗性基因而改用其他没有副作用的选择标记, 或者尽量避免在非烹饪型转基因食品 (如水果、蔬菜) 中生产可能引起过敏反应的蛋白质。可喜的是, 如今大众对转基因作物的负面评价越来越少, 社会对它的认可程度越来越高, 无论在发达国家还是在发展中国家转基因作物都广受欢迎, 其种植规模正在不断攀升, 大有兴起第二次“绿色革命”之势!

植物 GM 作为一种分子育种方法, 与常规育种一样都涉及基因的重组, 其后代也遵循独立分离、自由组合和连锁等经典的孟德尔、摩尔根遗传规律。然而, 分子育种是一种无性过程, 品种培育是在分子水平上完成的, 其特点是可以实现基因的跨物种传递 (cross-species transmission); 而常规育种是有性过程, 育种是在个体水平上完成的, 远缘物种之间杂交不亲和 (incompatibility)。因此, 常规育种需要父本授粉和母本受粉, 两者的亲缘关系必须接近, 杂交方式因不同植物而异, 包括异交 (异花授粉) 和自交 (自花授粉); 分子育种中提供基因的一方称为基因供体 (donor), 接受基因的一方称为

基因受体 (recipient), 两者之间还需借助基因载体 (vector) 作为中介, 但供体和受体可以来自任何近缘或远缘物种。这样的对比并非炫耀分子育种的优越性而贬低常规育种的重要性, 因为杂交水稻就是用常规方法由栽培稻与野生稻杂交育成的。

数十年来, 许多人似乎有一种误解, 以为离开了根癌农杆菌的 Ti 质粒, 植物转基因就寸步难行了。事实上, 生物体乃至细胞对外来遗传物质持有一定程度的开放和容忍态度。无论有意或无意, 它们都遵循着“利我者留, 害我者弃”的简单原则而猎取各种有用的外源基因, 殊不知人体中就有许多基因直接来源于细菌, 而且从细胞器的内共生起源 (endosymbiosis) 及随后持续不断的核质基因交流也可以看出来。

20 世纪 70 年代末, 中国科学院上海生物化学研究所的女科学家周光宇首先“打破迷信, 解放思想”, 将抗虫棉的总 DNA 滴加在普通棉的花柱上, 结果在普通棉的后代中居然奇迹般地出现了抗虫棉。这个结果在当时是不可思议的, 很长一段时间内也没有得到承认, 尤其是大家对她用不用载体而用总 DNA 的做法颇有微词。好在当年《酶学方法》的主编慧眼识英才, 在各种质疑之声中, 破例登出了周光宇主笔的《将外源 DNA 导入棉胚》(Zhou GY et al. 1983), 让国外学者领略了一番学院派以外的新气象。后来, 美国康奈尔大学吴瑞教授实验室的访问学者罗忠训以外国人认可的方式使用 Ti 质粒载体、35S 启动子、选择标记 NPTII 等转基因, 无可辩驳地证明了外源基因确实能从花柱进入子房, 并为这种方法取了一个漂亮的名字——花粉管通道法 (pollen tube pathway) (Luo ZX and Wu R. 1988)。有趣的是, 现在在拟南芥中转基因更为简单, 只要把正在开花的花朵在农杆菌菌液里浸一下, 剩下的工作就是等候收获转基因种子了, 这种方法被称为“花浸法” (flora dip)。

早在 20 世纪初, 美国科学家就发现植物的冠瘿瘤 (crown gall tumor) 是由根癌农杆菌引起的, 但直到 1974 年才由 Schell 研究小组发现了 Ti 质粒 (Van Larabeke N, Engler G, Hosters M et al. 1974)。美国华盛顿大学的“西雅图冠瘿瘤集团” (Seattle Crown Gall Group) 趁热打铁, 在不到三年的时间里搞清了 T-DNA 插入染色体才是植物致瘤的根本原因, 从而赶在比利时与荷兰科学家之前取得重大突破 (Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ et al. 1977)。1983 年, Schell 研究小组继上一轮较量败北后, 奋起直追, 一鼓作气, 培育出世界上第一棵转基因植株 (Zambryski P, Joos H, Genetello C et al. 1983)。从此, 由美国、比利时、荷兰的科学家各自组成的研究团队逐步形成了三足鼎立的植物转基因“正统学院派”。然而, 令这些权威们没有想到的是, 转基因并非如想像般的那样复杂, 有人在诱导转基因沉默 (transgenic silence) 时根本不用载体, 只要用基因枪把双链 RNA 射入细胞就可以了。还有一种由 DNA/RNA 组成的杂合寡核苷酸 (chimeric oligonucleotide) 打靶也能导致基因的点突变, 完全用不着载体、整合元件和选择标记, 正是“条条大路通罗马”!

上述对植物转基因发展历史的回顾, 不能不让我们有所启迪: 简单并不意味着无效, “土法”照样可以“上马”! 与其说转基因载体构建与转基因方法重要, 不如说转基因策略、思路及原始性创新成果更重要。我国有大量的杰出人才正在从事转基因方面的研究工作, 其中也不乏从国外留学归来的“海派”人物, 然而尽管载体你可以带回来, 方法你可以学回来, 但不会有人告诉你应该转什么样的基因。因此, 创新性思维应该永远摆在第一位! “独立精神”在某种程度上以“拿来主义”为基础, 因为我们在看“大

师级”论文时已经上了一个新的台阶，再加上“英雄所见略同”碰撞出来的“智慧的火花”，我们很可能由此获得灵感。不过，话说回来，如果仅仅一味地跟踪模仿，那就只会老是跟在别人的屁股后面转，等到人家的论文发表时才哀叹：我没想到的他们全想到了，而我想到的他们却完成了！

当然，在科学的竞赛中要处处领先又谈何容易！真是“失之毫厘，谬以千里”！这就更显出把握“先机”的重要性。以青蒿素的微生物合成的国际竞争为例，最先由荷兰的 Bouwmeester 小组分离出青蒿素合成的关键酶——紫穗槐二烯合酶基因并完成其功能表达和鉴定 (Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J et al. 2001)，可以说开局不错，为重建青蒿素合成途径打下了良好的基础。可是，美国加州大学的 Keasling 小组从一开始就将重建青蒿素合成途径定位在商业开发上，为此还申请到 Bill Gates 基金会数百万美元的巨额资助。在财大气粗的美国人面前，荷兰人意识到了新一轮竞争的残酷性，于是大张旗鼓地摆开架势准备迎战，力图先于美国人分离到第二个关键酶——细胞色素 P450 单加氧酶基因。他们构建了青蒿腺毛 (glandular trichome) 的基因文库，但只从中分离出一些无关紧要的基因，而细胞色素 P450 基因反而由加拿大的一个研究小组抢先分离成功 (Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW et al. 2006)。不过，由瑞典 Brodelius 领头开辟的欧洲“第二战场”却战果辉煌，他们先后在大肠杆菌和酵母菌中成功表达紫穗槐二烯合酶基因而暂时拔得头筹 (Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P et al. 2006)，总算给欧洲人挽回一点儿面子。可是，就在欧洲人还没有回过神来时，美国人突然在 *Nature* 上爆出猛料：他们不仅分离到青蒿细胞色素 P450 基因，而且已将它转入酵母内并成功地获得青蒿酸 (Ro DK, Paradise EM, Ouellet M et al. 2006)，这离青蒿素的全合成只差一步！面对这样的结局，荷兰人、瑞典人乃至整个欧洲人都只能惊呼：我的天啊！为什么我们总是在美国人面前吃败仗！实际上，美国人在开始时也走了一些弯路，那就是他们原本打算在大肠杆菌中重建青蒿素合成途径，并劳民伤财地在其中转了 10 多个基因。虽然这项研究结果后来在 *Nature Biotechnology* 上发表 (Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST et al. 2000)，但他们却无法再向前挪一步。他们后来才意识到，大肠杆菌的膜系统并不适合表达青蒿的膜结合型细胞色素 P450。

前不久，我曾去欧洲访问游学，历时一年有余，有幸耳濡目染了芬兰赫尔辛基大学农林学院植物生物技术教授 Teemu 先生的治学之道和转基因成就，拜访了瑞士联邦技术研究所发明“黄金水稻”的 Potrykus 教授及荷兰 Leiden 大学发现农杆菌可转化酵母的 Hooykaas 教授，参观了德国著名的 Max-Planck 研究所及英国大名鼎鼎的牛津大学、剑桥大学等。尽管 Teemu 教授深感生物工程研究所五年一次的评估和淘汰有可能鼓励学术上的急功近利，Potrykus 教授不时抱怨他的知识产权及专利之争，Hooykaas 教授更为转基因作物在欧盟各国受到的冷遇而鸣不平，但我所到之处，确确实实、真真切切能感受到科学家们为科学事业长期奋斗的献身精神！

面对国外先进的科研环境及科学家们训练有素的科研能力，我不仅会联想到国内植物转基因技术进步之神速和成绩之巨大，而且也会透视我们在取得辉煌成就背后的科研素质、学术水平和创新思维能力不足乃至欠缺的隐忧。中国人并不愚笨，你只要一打开 *Science* 和 *Nature* 等世界顶尖学术期刊，中国人的名字并不鲜见，但“老板”都是洋人！问题的关键在于我们的知识积累还不如别人丰厚，学术起点也没有人家高。因此，

我们应该像爱因斯坦那样，“站在巨人的肩膀上”，向科学高峰攀登！

俗话说得好：要当好先生，先做好学生！读书的人指望教书的人，而教书的人指望写书的人，科学知识的传播还是应该首先从学生抓起，而且重在抛砖引玉，集思广益！因此，这本书与其说是为同行们写的一部学术专著，还不如说是专门献给学生们的一本高级教材。事实上，本书的大部分内容都曾给研究生们反复讲授过，这次出版只是补充了一些新观点和新材料，并对一些旧提法或错误概念进行了勘误。同时，我们还将本实验室在已发表论文中引用过的一些较成熟的实验方法加以归纳和总结，一并列入书中。我们将尽可能多地引用近年来发表的 GM 植物方面的最新研究论文和综述，以便让有需要的读者进一步查阅。这些文献主要来自 *Science*、*Nature*、*Nature Biotech*、*Proc Natl Acad Sci USA*、*Plant J*、*Plant Cell*、*Plant Mol Biol*、*Plant Cell Rep*、*Plant Physiol*、*Transgenic Res* 等世界顶尖植物分子生物学及基因工程方面的专业杂志。

为了让那些较缺乏 GM 植物的背景知识而又对此感兴趣的学生们也能完全读懂本书，我们适当地增加了一些分子生物学、基因组学和基因工程方面的基础知识介绍，尤其是专业名词和术语的解释，并用粗体字一一标明。为了提高学生们直接阅读英文专业文献的水平，特别是增加他们的专业英文词汇量，我们还尽可能列出这些名词术语的英文原文及缩写。我们在本书中并不回避艰深难懂的名词术语和纷繁复杂的实验结果，但我们尝试着从行文的深入浅出和图表的辅助设计上下了一些工夫，而效果如何则只能由读者自行评判了。另外，考虑到读者对最新信息的需求，本书附录中列出了基因组学相关的生物信息学数据库及生物信息学工具的网址，并加以精心分类。

本研究室同事和学生们出于工作和学习的需要而翻译的牛津大学出版社出版的 2003 年版 A. Slater、Scott N、Fowler M 所著 *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants* 一书，为本书部分章节的编写提供了宝贵的参考资料，在此对他们的辛勤劳动表示衷心感谢，他们是：黄瑛、杨雪芹、徐小玲、冯丽玲、赵昌、杨瑞仪、尹录录。另外，本书的大部分图片引自各种专著和文献，限于篇幅恕不一一标明其出处，在此特向有关出版商及作者表示谢意！本书第 7、8 章主要由冯丽玲负责编写，另有杨瑞仪参与，杨雪芹负责图片扫描。本书的资料搜集还得到芬兰赫尔辛基大学生物工程研究所 Harri Savilahti 先生和 Meng X J 女士的支持，谨表谢忱！

由于本书编写时间仓促，加之编者水平有限，书中错漏之处在所难免，恳请读者不吝批评指正并赐教，以便有机会再版时修改，来信请寄：qpzeng@gzhtcm.edu.cn。

主编敬启

2006 年 5 月于广州

# 目 录

## 前言

## 上篇 植物遗传修饰原理

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>第一章 基因组织结构</b> .....          | 3   |
| <b>第一节 染色体和基因组</b> .....         | 3   |
| 一、真核细胞基因组 .....                  | 3   |
| 二、原核细胞基因组 .....                  | 11  |
| 三、染色体外基因组 .....                  | 12  |
| <b>第二节 结构基因组学</b> .....          | 16  |
| 一、基因标记 .....                     | 16  |
| 二、基因定位 .....                     | 22  |
| 三、基因作图 .....                     | 25  |
| 四、基因测序 .....                     | 29  |
| <b>第三节 功能基因组学</b> .....          | 31  |
| 一、基因表达 .....                     | 32  |
| 二、基因突变 .....                     | 35  |
| <b>第四节 进化基因组学</b> .....          | 42  |
| 一、基因比较 .....                     | 43  |
| 二、基因分类 .....                     | 52  |
| <b>第二章 基因表达调控</b> .....          | 57  |
| <b>第一节 组成型表达</b> .....           | 57  |
| 一、真核基因表达 .....                   | 57  |
| 二、原核基因表达 .....                   | 73  |
| <b>第二节 可诱导表达——转录调控</b> .....     | 74  |
| 一、信号转导 .....                     | 75  |
| 二、环境诱导基因表达 .....                 | 79  |
| 三、组织及发育特异表达 .....                | 89  |
| <b>第三节 转录后及翻译后调控</b> .....       | 95  |
| 一、基因沉默 .....                     | 96  |
| 二、RNA 编辑 .....                   | 99  |
| 三、换位剪接 .....                     | 100 |
| 四、轮换 .....                       | 100 |
| <b>第三章 基因克隆——基于供体的基因操作</b> ..... | 103 |
| <b>第一节 大肠杆菌转基因载体</b> .....       | 103 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 一、基因克隆载体                   | 104 |
| 二、基因展示载体                   | 109 |
| 三、基因表达载体                   | 113 |
| 第二节 基因克隆                   | 116 |
| 一、基因分离                     | 116 |
| 二、基因制备                     | 128 |
| 第三节 基因改造                   | 136 |
| 一、定点诱变                     | 137 |
| 二、定位诱变                     | 141 |
| 三、定向进化                     | 142 |
| <b>第四章 基因重组——基于受体的基因操作</b> | 144 |
| 第一节 植物转基因载体                | 144 |
| 一、天然宿主-载体系统                | 145 |
| 二、Ti 质粒衍生的随机整合载体           | 153 |
| 三、Ti 质粒衍生的定点整合载体           | 159 |
| 四、非 Ti/Ri 质粒衍生载体           | 161 |
| 五、植物病毒衍生的载体                | 162 |
| 第二节 基因转化                   | 163 |
| 一、细菌基因转移                   | 163 |
| 二、植物基因转移                   | 164 |
| 第三节 基因鉴定                   | 170 |
| 一、表型鉴定                     | 170 |
| 二、基因扩增                     | 174 |
| 三、分子杂交                     | 174 |
| 四、产物测定                     | 179 |
| 五、序列分析                     | 180 |

## 中篇 植物遗传修饰用途

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| <b>第五章 遗传修饰植物——供体基因观</b> | 185 |
| 第一节 转基因抗生物胁迫植物           | 187 |
| 一、抗除草剂                   | 187 |
| 二、抗虫                     | 194 |
| 三、抗病                     | 202 |
| 第二节 转基因耐非生物胁迫植物          | 209 |
| 一、抗渗透胁迫                  | 209 |
| 二、抗氧化胁迫                  | 214 |
| 第三节 转基因优质高产植物            | 218 |
| 一、水果保鲜                   | 219 |
| 二、花色调整                   | 221 |

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 三、营养改良 .....            | 223 |
| 四、产量提高 .....            | 226 |
| 第四节 转基因特殊产品合成植物 .....   | 229 |
| 一、医药用途蛋白质类 .....        | 229 |
| 二、工业用途蛋白质类 .....        | 233 |
| 三、糖类和脂类 .....           | 235 |
| 四、次生代谢物类 .....          | 237 |
| 五、生物塑料 .....            | 241 |
| 第六章 遗传修饰植物——受体植物观 ..... | 243 |
| 第一节 转基因粮食作物 .....       | 243 |
| 一、转基因水稻 .....           | 243 |
| 二、转基因小麦 .....           | 247 |
| 三、转基因玉米 .....           | 250 |
| 四、转基因马铃薯 .....          | 252 |
| 第二节 转基因经济作物 .....       | 255 |
| 一、转基因棉花 .....           | 255 |
| 二、转基因大豆 .....           | 257 |
| 三、转基因油菜 .....           | 259 |
| 四、转基因烟草 .....           | 261 |
| 第三节 转基因园艺作物 .....       | 264 |
| 一、转基因蔬菜 .....           | 264 |
| 二、转基因花卉和牧草 .....        | 270 |
| 三、转基因果树和林木 .....        | 274 |
| 第四节 转基因药用植物 .....       | 278 |
| 一、转基因毛状根和冠瘿瘤 .....      | 278 |
| 二、药用植物抗性 & 品质改良 .....   | 279 |
| 三、药用植物代谢工程 .....        | 279 |

## 下篇 植物遗传修饰方法

|                    |     |
|--------------------|-----|
| 第七章 基因制备与克隆 .....  | 289 |
| 第一节 DNA 分离纯化 ..... | 289 |
| 一、染色体 DNA 提取 ..... | 289 |
| 二、质粒 DNA 提取 .....  | 291 |
| 三、DNA 片段回收 .....   | 293 |
| 第二节 RNA 分离纯化 ..... | 294 |
| 一、总 RNA 提取 .....   | 294 |
| 二、mRNA 提纯 .....    | 296 |
| 第三节 基因扩增 .....     | 297 |
| 一、DNA 扩增 .....     | 297 |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 二、RNA 扩增 .....                | 300 |
| 第四节 载体构建 .....                | 305 |
| 一、PCR 产物的 TA 克隆 .....         | 305 |
| 二、基因敲除载体的构建 .....             | 306 |
| 第八章 基因转化与鉴定 .....             | 309 |
| 第一节 细菌转化 .....                | 309 |
| 一、大肠杆菌转化 .....                | 309 |
| 二、农杆菌转化 .....                 | 310 |
| 第二节 植物转化 .....                | 311 |
| 一、共培养法 .....                  | 311 |
| 二、电穿孔法 .....                  | 312 |
| 第三节 表型识别 .....                | 313 |
| 一、选择标记表型筛选 .....              | 313 |
| 二、报告表型观察 .....                | 314 |
| 第四节 分子鉴定 .....                | 315 |
| 一、离体转录-翻译 .....               | 315 |
| 二、DNA 杂交——Southern 印迹杂交 ..... | 315 |
| 三、RNA 杂交——Northern 印迹杂交 ..... | 317 |
| 四、蛋白质杂交——Western 印迹杂交 .....   | 318 |
| 五、点杂交 .....                   | 319 |
| 六、ELISA .....                 | 321 |
| 第五节 产物分析 .....                | 325 |
| 一、酶活性测定 .....                 | 325 |
| 二、酶促反应产物测定 .....              | 326 |
| 泛读书目 .....                    | 328 |
| 参考文献 .....                    | 329 |
| 附录 .....                      | 361 |
| 一、生物信息学数据库 .....              | 361 |
| 二、生物信息学分析工具 .....             | 368 |

# CONTENTS

## Preface

### Part A Principles of Plant Genetic Modification

|                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Chapter 1 Organization and Constitution of Genes</b>                   | 3   |
| 1.1 Chromosome and genome                                                 | 3   |
| 1.2 Structural genomics                                                   | 16  |
| 1.3 Functional genomics                                                   | 31  |
| 1.4 Evolutionary genomics                                                 | 42  |
| <b>Chapter 2 Expression and Regulation of Genes</b>                       | 57  |
| 2.1 Constitutive expression                                               | 57  |
| 2.2 Inducible expression; Transcriptional regulation                      | 74  |
| 2.3 Post-transcriptional and post-translational regulation                | 95  |
| <b>Chapter 3 Gene Cloning; Donor-Based Genetic Manipulation</b>           | 103 |
| 3.1 Vectors for transgene in E. coli                                      | 103 |
| 3.2 Gene cloning                                                          | 116 |
| 3.3 Gene modification                                                     | 136 |
| <b>Chapter 4 Gene Recombination; Recipient-Based Genetic Manipulation</b> | 144 |
| 4.1 Vectors for transgene in plants                                       | 144 |
| 4.2 Gene transformation                                                   | 163 |
| 4.3 Gene detection                                                        | 170 |

### Part B Applification of Plant Genetic Modification

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| <b>Chapter 5 GM Plants; Donor Gene View</b>       | 185 |
| 5.1 Transgenic biotic stress resistant plants     | 187 |
| 5.2 Transgenic abiotic stress tolerant plants     | 209 |
| 5.3 Transgenic good-quality and high-yield plants | 218 |
| 5.4 Transgenic specific product synthesis plants  | 229 |
| <b>Chapter 6 GM Plants; Recipient Plant View</b>  | 243 |
| 6.1 Transgenic food crop plants                   | 243 |
| 6.2 Transgenic economic crop plants               | 255 |
| 6.3 Transgenic horticultural crop plants          | 264 |
| 6.4 Transgenic medicinal plants                   | 278 |

### Part C Methods of Plant Genetic Modification

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| <b>Chapter 7 Preparation and Cloning of Genes</b> | 289 |
|---------------------------------------------------|-----|

|                         |                                                         |            |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|------------|
| 7.1                     | DNA isolation and purification .....                    | 289        |
| 7.2                     | RNA isolation and purification .....                    | 294        |
| 7.3                     | Gene amplification .....                                | 297        |
| 7.4                     | Vector construction .....                               | 305        |
| <b>Chapter 8</b>        | <b>Transformation and Identification of Genes .....</b> | <b>309</b> |
| 8.1                     | Bacteria transformation .....                           | 309        |
| 8.2                     | Plant transformation .....                              | 311        |
| 8.3                     | Phenotype observation .....                             | 313        |
| 8.4                     | Molecular confirmation .....                            | 315        |
| 8.5                     | Product analysis .....                                  | 325        |
| <b>Further Readings</b> | .....                                                   | <b>328</b> |
| <b>References</b>       | .....                                                   | <b>329</b> |
| <b>Appendix</b>         | .....                                                   | <b>361</b> |

# 上篇 植物遗传修饰原理



# 第一章 基因组织结构

无论是真核细胞 (eukaryote)、原核细胞 (prokaryote)、病毒 (virus) 或质粒 (plasmid), 其遗传信息 (genetic information) 都以脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 的形式储存。最新证据显示, RNA 比 DNA 更古老, 目前仅有部分病毒直接以 RNA 作为遗传指令。真核细胞有细胞核 (nuclei) 与细胞器 (organelle) 的分化, 它们都有各自独立的 DNA, 原核细胞则无任何细胞器。真核细胞中, 细胞核 DNA 与蛋白质构成染色体 (chromosome), 或称染色质 (chromatin), 而原核细胞的 DNA 及真核细胞的细胞器 DNA 以共价闭合环状 DNA (covalent closed circular DNA, cccDNA) 的形式存在。基因 (gene) 是遗传的结构、功能和突变单位, 其化学本质为 DNA 或 RNA。细胞核内染色体上的全部基因称为核基因组 (nuclear genome) 或染色体基因组 (chromosomal genome); 细胞器内的全部基因则称作细胞器基因组 (organelle genome) 或细胞质基因组 (cytoplasmic genome), 后者又分为质体基因组 (plast genome, plastome) 与线粒体基因组 (mitochondrial genome, chondriome), 统称为染色体外基因组 (extrachromosomal genome)。

遗传操作的对象是基因, 无论基因的来源如何, 其目的都是从某种生物细胞中获得有用基因 (interested gene) 并在其他生物细胞中实现异源表达 (heterologous expression), 如人类和动植物基因在微生物中的表达以及微生物基因在人类和动植物中的表达等。由于来自生物细胞的天然基因仍然是目前遗传操作中的主要目的基因 (target gene), 而植物遗传操作当然也要利用各种来源的目的基因, 因此有必要深入了解不同生物中基因的组织结构, 以便开展基因分离、转移和表达等基本遗传操作。

## 第一节 染色体和基因组

染色体是真核基因组存在的实体, 它是由 DNA 与组蛋白 (histon) 及非组蛋白 (non-histon protein) 共同组成的核蛋白复合体 (nucleoprotein complex), 具有非常复杂但精确组织的高级结构。另外, 虽然有时将原核基因组不严格地称作染色体, 但它们并无典型的染色体组成与结构。根据基因组的来源和性质的不同, 可分为真核细胞基因组、原核细胞基因组和染色体外基因组。此外, 真核病毒能以真核细胞作为宿主完成其生活史, 而原核病毒中的细菌病毒即噬菌体 (phage) 及质粒则依赖于原核细胞而繁殖, 它们都具有宿主基因的某些特征。

### 一、真核细胞基因组

真核基因组在细胞分裂期和细胞分裂间期 (非分裂期) 分别以染色体和染色质的形式存在于细胞核中, 前者呈凝缩状态, 后者呈松散状态。将处于分裂期的细胞用化学染