

青 ★ 年 ★ 科 ★ 学 ★ 家 ★ 文 ★ 库

THE SERIAL BOOKS WRITTEN
BY MODERN SCIENTISTS

植物基因工程学

陈章良 著

青年科学家文库

植物基因工程学

Plant Genetic Engineering

陈章良 著

吉林科学技术出版社

【吉】新登字03号

青年科学家文库
植物基因工程学

陈章良 著

责任编辑：张瑛琳 成与华

封面设计：杨玉中

出版：吉林省科学技术出版社	850×1168毫米32开本	9.125印张
发行：吉林省新华书店	插页4	227 000字
印刷：长春市永昌福利印刷厂	1994年5月第1版	1994年5月第1次印刷
装订：长春市东新印刷厂	印数 1-1640册	定价：11.50元

ISBN 7-5384-1411-8/Q·8

《青年科学家文库》评审委员会

顾问	问：	王大珩	杨振宁		
主任委员：		高景德			
副主任委员：		高潮	刘东生	卢良恕	
		丁石孙	鲍奕珊		
委员：		王寿仁	王泽九	石元春	叶耀先
		田光华	许翔	杨芙清	吴博
		何耀坤	张锐生	陆道培	陈运泰
		陈佳洱	陈章良	罗伟	赵玉秋
		赵柏林	俞鸿儒	姜东华	顾方舟
		高为炳	阎隆飞	雷天觉	黎乐民

内容提要

本书以十章的篇幅系统地介绍了植物基因工程涉及的几个主要方面,包括植物基因克隆的策略与方法、原理和技术,植物基因的调控机制以及植物病理和抗病基因工程等,并着重对植物基因的克隆方法和转化方法进行了全面的归纳综述;本书内容重点突出在植物方面,就是希望能使读者对植物基因工程这一新颖而又迅速崛起的领域有一较为深入全面的了解,同时对于它与其它基因工程的异同有一定认识。本书对各部分内容都列出了相应的进一步阅读的文献。

本书内容丰富,结构紧凑,配以大量图表,既可作为高等院校生物工程、生物化学、分子生物学、植物生理学等专业大学生、研究生的教学用书,也可供有关科研人员和高校教师教学和研究参考。

SUMMARY

This book describes more or less comprehensively several main areas in plant genetic engineering. It contains ten chapters covering the principles, strategies, techniques and methods of plant gene cloning, studies on plant gene regulation and transgenic plants of disease-resistance. Each chapter has a literature citation for further reading.

This book focuses on plant genetic engineering, which is a very young and rapidly developing field. It covers the most up-to-date development in this field supplemented with many explicit figures and tables. It can be used as a text book for undergraduate or graduate students at universities or colleges, or as a reference book for researchers who are working on plant biological sciences.

祖国的希望 未来的曙光

——寄语青年科技工作者

王大珩

翻开吉林科学技术出版社送来的《青年科学家文库》书目及作者名单，一个个自强好学，勇于探索创新的青年人仿佛就在眼前，使我欣慰，感到后生有望。所以在《文库》编辑出版之际，我很乐于借此机会，同广大青年科技工作者讲几句共勉的话。

这些年来，一大批在五星红旗下诞生，成长起来的年轻科技工作者崭露头角，在面向国民经济主战场的应用研究和在基础科学以及高技术研究等诸多方面取得优异成就，有的跻于国际领先地位，或达到国际先进水平，有的填补国内空白，这些成果对推动科学技术进步，发展国民经济起到了重要作用。为鼓励青年科技工作者的科学研究和发明创造，中国科学技术协会、中国科学院分别设立了青年科技奖和青年科学家奖，规定每两年评选一次。首届青年科技奖评出 94 名，首届青年科学家奖评出 25 名，他们是从全国数以百万计的青年科技工作者中层层遴选出的佼佼者。

在此基础上，经过中国科协和中国科学院的推荐，吉

林科学技术出版社编辑出版首届部分获奖者的著作，并获得长白山学术著作出版基金的资助，这对广大青年科技工作者是很大的鼓舞。出版社关心青年科技工作者的成长是值得赞扬的。

当今，在激烈的国际竞争中，重要的是看一个国家的综合国力，而其中重要的一个方面是科学技术的进步，所以各国都把科学技术作为推动经济发展和社会进步的重要手段。我国是一个拥有十一亿人口的大国，经济还很落后，但是我们有志气、有能力振兴中华，立足于世界民族之林。实现这样的宏愿，要靠我们几代人的艰苦奋斗。中国科学技术的兴旺发达要靠我们老中青科技工作者团结合作，但归根到底要靠你们青年人。长江后浪推前浪，一代更比一代强。党和人民把国家的前途、民族的命运寄托在你们青年人身上，正如江泽民同志所说：“你们是祖国的希望所在，是中国未来的曙光。”

我们这些人已年逾古稀，要你们接好班，要有理想、有志气。一个人也好，一个民族也好，都要有一点精神，要有使命感，要有民族自强心，要为国家、为民族争口气，奋发向上，勇于进取；作为优秀的青年科技人才，除业务上有突出成就外，还要有不计名利、无私奉献的高尚精神，现在尤其是要提倡这种精神，还要有求实的科学态度，尊重知识，尊重他人的劳动；你们要发扬中华民族的美德，那就是要有集体主义精神，要团结协作，自力更生，艰苦奋斗，不折不扣地去拼搏，满怀希望，开拓未来！

1990年2月

前 言

我自 1987 年回国以来,在有关部门的大力支持下,经过艰苦的创业,在北京大学建成了一个植物基因工程实验室。数年来,在实验室同仁的共同努力下,我们取得了一系列重大科研成果,发表了几十篇重要的科研论文,研究内容涵盖了植物基因工程的大多数领域,这些成果的取得使我们这个年轻的实验室在国际上占领了一席之地,成为有一定国际影响的实验室。应该说,没有这些成果也就不可能有今天这本书的问世。作为对于植物基因工程领域的基本知识的系统总结,本书力图从最基础的概念入手,深入浅出地对这个新崛起的研究领域进行全面的阐述,同时也将国际上最新的技术和方法介绍给读者,使读者能够站在世界科学研究的前沿纵观植物基因工程的发展历程。

在本书的撰写过程中,我实验室的瞿礼嘉先生为本书的成稿付出了大量辛勤的汗水和智慧,他的聪颖慧质以及勤奋好学的上进精神给我留下了深刻的印象,在此深表感谢。

另外,我衷心感谢《青年科学家文库》评审委员会对本书的厚爱及长白山学术著作出版基金会、吉林科学技术出版社的大力支持。

陈章良

1993 年 2 月

目 录

第 1 章 植物基因工程总论	(1)
1.1 导论	(1)
1.2 植物基因的分离	(3)
1.3 植物基因转入植物细胞的方法	(5)
1.4 转基因植物的组织培养	(7)
1.5 转化后植物细胞的选择与转基因植物的鉴定	(8)
1.6 植物基因工程的几大研究方向	(10)
1.7 植物基因工程的发展趋势	(18)
第 2 章 植物基因工程所需仪器以及实验操作的安全问题	(21)
2.1 植物基因工程所需仪器	(21)
2.2 实验操作中的安全问题	(31)
第 3 章 植物基因工程的主要技术	(37)
3.1 电泳技术的应用	(37)
3.2 酶学原理的应用	(43)
3.3 载体选择原理	(67)
3.4 DNA 序列测定技术	(76)
第 4 章 植物基因克隆及鉴定	(86)
4.1 目的基因的克隆方法	(86)
4.2 对目的基因的鉴定	(98)
第 5 章 聚合酶链式反应 (PCR) 技术	(103)
5.1 PCR 反应的原理	(104)
5.2 PCR 反应的操作方法	(107)
5.3 PCR 反应的设计及优化	(108)

5.4	耐热 DNA 聚合酶	(116)
5.5	PCR 反应中出现的问题及解决方法	(122)
5.6	PCR 技术的应用方法	(125)
第 6 章	农杆菌与植物基因载体	(131)
6.1	农杆菌与冠瘿瘤和茎瘿瘤	(131)
6.2	Ti 质粒与 Ri 质粒	(134)
6.3	Ti 质粒衍生的载体系统	(142)
第 7 章	植物基因转移技术	(151)
7.1	农杆菌介导的基因转移	(151)
7.2	根瘤感染法	(157)
7.3	电击法	(159)
7.4	聚乙二醇法	(168)
7.5	微注射法	(169)
7.6	脂质体法	(173)
7.7	体外花粉成熟法	(177)
7.8	激光微束转移法	(180)
7.9	超声波法	(184)
第 8 章	基因枪技术	(197)
8.1	基因枪的原理	(197)
8.2	基因枪技术的应用	(200)
8.3	基因枪技术的操作	(202)
8.4	基因枪的发展前景	(208)
第 9 章	植物病毒	(214)
9.1	病毒的基本定义	(214)
9.2	植物 RNA 病毒基因组的表达方法	(216)
9.3	植物 DNA 病毒基因组的表达方式	(222)
9.4	亚病毒	(224)
9.5	抗病毒的植物基因工程	(226)
9.6	植物病毒载体	(241)

第 10 章	植物基因的调控	(246)
10.1	对 CaMV35S 启动子的研究	(247)
10.2	光调控基因的表达调控	(248)
10.3	组织特异性基因的调控	(254)
10.4	环境胁迫诱导的基因调控	(259)
10.5	激素对基因表达的调控	(263)
附录		(275)

第 1 章

植物基因工程总论

1.1 导论

从生命现象的表面观察日益深入到生命活动本质的研究，是当代生物科学发展的主流。50 年代，DNA 分子双螺旋结构理论的问世，作为生物学发展史上的一座里程碑，奠定了分子遗传学的基础，从此掀起了继达尔文进化论之后生命科学领域中最伟大的一次革命。虽然许多科学家不断提醒我们，人类对于 DNA 的了解还很不够，对于庞杂纷繁、孳息不绝的生命体系，分子生物学和遗传学的研究所及，都还只不过是一些小零件；但是，大家对于这些初步揭开了生命奥秘的成果仍然感到欢欣鼓舞，因为，生物技术和基因工程在工业、农业和医学上的日益广泛应用，已经开始造福人类了，人类按照自己的愿望和需要控制生物性状的理想终于开始在一步步变为现实。

生物工程技术中的基因工程，或称 DNA 的重组技术，按照接受基因的受体细胞所属的生物类别，可以分为动物基因工程、植

物基因工程和微生物基因工程三个大类。基因工程，就是用人工的方法，把生物体的有用的目的基因提取出来，经过体外的改造和重组后，导入受体生物中表达，从而使受体生物获得新的遗传特性。根据不同的生产目的和要求，有时需要外源导入的基因高效地普遍地表达，有时则只要求在生物体一定的生长发育阶段，一定的器官中有限制地表达。基因工程最早是在医学上的应用获得成功的，利用重组 DNA 技术，科学家们从工程菌株中生产治疗疾病的药物疫苗。随着技术的不断提高和完善，基因工程在其它领域的应用不断获得巨大成功。进入 80 年代，它的巨大影响已经深入到了广阔的农业科学领域，植物基因工程的研究获得了极大的发展。80 年代中后期，科学家们在植物抗病、抗虫、抗除草剂和改变植物的某些成分方面都已得到了不少转基因植株，有的已经建成了品系，这就为提高农作物及其它经济作物的产量和抗逆能力、改进它们的品质以及进行快速、优质、稳产的良好选育提供了一条全新的途径。作为生物技术的一个重要组成部分，植物基因工程的研究和开发利用已被列入我国新技术研究计划之内。目前，植物基因工程技术研究中的首批成果已经接近或初步进入了开发利用阶段。

自从 70 年代末首次从分子水平上证实了有一种细菌，即土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在侵染植物细胞后，不但能将它的一段 DNA 插入到被侵染的细胞的基因组中，并且还能稳定地随着植物遗传给后代之后，植物基因工程的研究连续取得了一系列重大的突破。最近 10 年，人们从植物基因的分离，基因工程载体的组建，细胞的基因转化，转化细胞的组织培养和植株再生，直到外源基因表达的检测手段等方面，都取得了相当大的进展。植物基因工程中的几个重要环节都已形成了相当成熟的实验流程，使得不少实验室都能开展这方面的工作。在经济和科学比较发达的一些国家，譬如美国，有些中学里已经开始设置了这方面的课程，学生能够实际操作其中的某些有关实验，例如将

植物的单个细胞培养成为完整的植株,证实植物细胞的全能性。估计在今后的 10 年内,这方面的知识和训练将会有较大规模的普及。

当然,目前的植物基因工程中还存在着一些理论性问题尚有待解决,例如,外源基因在转基因植物品系、品种中的遗传稳定性如何;转基因植物可能造成的农业污染等等,但无论如何,植物基因工程正在为农业生产走出一条增产增质、划时代的新路子。

1.2 植物基因的分离

要开展植物基因工程的工作,目的基因的分离通常是我们首先需要考虑的问题。根据我们所要达到的某项目的,譬如说,为了防治虫害,我们就要以此为目标来获得能够达到这一目的的抗虫基因。最早运用基因克隆技术克隆的基因是植物种子、块茎等贮藏器官中的贮藏蛋白基因,目的是想提高某些植物中蛋白质的含量。后来随着克隆技术的发展,科学家们相继分别从病毒、细菌和植物中克隆了抗病毒、抗虫和抗除草剂基因,这些都是农业上急需使用的工程基因。近年来,在世界上普遍关注抗病毒、抗虫、抗除草剂等农业工程基因的同时,植物体中一些与重要的生命活动有关的基因也受到了极大的重视,越来越多的这类基因被克隆出来,例如与光合作用关系重大的核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶的大小亚基基因和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因;在植物生长发育过程中控制信息转导调控的光敏色素基因和钙调蛋白基因;在植物固氮中起重要作用的硝酶还原酶基因;在植物次生代谢及抗病性中起重要作用的查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)基因以及苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)基因等等,科学家们不仅考虑病虫害的逆境影响,而且开始从光合作用效率、信息传递、固氮作用和自我保护机能等多方位全面地考虑植物基因工程对农业增产的可行途径了。另外,植物中的医用药用基因的研究

也已成了热门课题，例如已经克隆的具有多种抗菌效用，对妇科疾病极有价值的天花粉蛋白基因，以及多种功能性小肽的基因等等，这表明植物基因工程在医药工业上又开拓了一个新的研究应用领域。到目前为止，全世界克隆到的目的基因还没有超过一百个，常用的才三十几个，因此尽管目前植物基因工程已取得了极大的成果，但相对于动物基因工程来说，它的鼎盛时期还刚刚开始，还有极大的发展潜力。

由于目的基因的来源各不相同，因此目的基因分离出来以后，往往还需要经过一定的修饰才能在植物中使用，譬如我们必须将某些病毒基因或细菌基因的启动子（promoter）或者它的 3' 端非编码区（3' non-coding region）换成植物基因的启动子或 3' 端非编码区才能转入植物中表达；如果所用的动物基因中还含有内含子（intron）的话，那么还需要将这些内含子切除。总而言之，修饰目的基因的目的就是希望让它们能够更好地在转基因植物中进行表达。

选用的启动子必须适当，因为一个启动子的作用部位及强弱直接关系到它所启动的基因在转基因植物中表达产物的组织特异性以及表达量的大小，从而决定此项工程的成败。目前，在植物基因工程中使用得最普遍的是 35S 启动子，这个启动子是从植物 DNA 病毒花椰菜花叶病毒（CaMV）的基因组中分离出来的，它是目前已知的在植物中表达能力最强的组织特异性较小的启动子之一。另外，还有一些诸如 CaMV19S 启动子和从土壤农杆菌的 Ti 质粒中分离出来的 NOS 启动子等其它的启动子（见表 1-1），但它们的启动能力都不如 35S 启动子强，因而用得不如 35S 启动子那么普遍。

获取目的基因，可以说是植物基因工程工作中的一个核心部分，这部分工作十分重要，但是困难程度比起其它部分的工作来也要大一些，不但技术要求高，需要投入的经费和工作量很大，而且最终得到的有用基因的成功率也并不高。目前我国已有许多实

验室开展了这方面的工作，并且取得了不少成果。有关基因分离的具体方法我们将在以后的章节中详细讨论。

表 1-1 植物基因工程常用启动子

启动子名称	来源	表达特性
胭脂碱合成酶基因(NOS)启动子	Ti 质粒的 T-DNA	组成型表达
章鱼碱合成酶基因(OCS)启动子		组成型表达
双向启动子		组成型双向表达
V 基因启动子		组织特异性表达
tml 基因启动子		组成型表达
MAS 基因启动子	CaMV 35S 基因	组成型表达
35S 启动子		组成型表达
19S 启动子		组成型表达

1.3 植物基因转入植物细胞的方法

获得目的基因以后，我们就可以经过一定的修饰改造之后将它们转入植物中表达，让植物或获得抗病抗逆性，或提高蛋白质和某些氨基酸的含量，或用于医药生产。自从植物基因工程技术发展以来，植物基因工程转化的方法主要可以归纳成两大类，第一大类就是直接导入法，即通过生物、物理或化学的方法将植物细胞“打个洞”，然后让外源目的基因进入；第二大类就是载体导入法，即通过某种载体携带目的基因进入植物细胞。

首先谈谈载体导入法。载体导入法最关键的问题就是载体的构建与选择。土壤农杆菌中的 Ti 质粒载体和花椰菜花叶病毒是两类研究得最早的载体系统。Ti 质粒上有一段转移 DNA (T-DNA)，它能跳跃插入到细胞核基因组中去，植物基因工程就是用