



◆ 夏海武 著

YUANYI ZHIWU JIYIN GONGCHENG

园艺植物 基因工程



科学出版社

www.sciencep.com

园艺植物基因工程

夏海武 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书总结了园艺植物基因工程研究进展,在介绍园艺植物基因工程的一些基本理论和基本技术的基础上,结合作者多年来的教学和研究工作,着重论述了园艺植物基因工程的技术体系及实例,特别注重前沿知识的通俗化和高新技术的实用化,以期对从事园艺植物基因工程的学者提供有益的参考。本书共6章,包括园艺植物基因工程概述、园艺植物基因转化受体系统的建立、园艺植物基因的分离克隆、转基因园艺植物、转基因植株的鉴定、园艺植物基因工程展望及安全性等方面内容。在园艺植物基因的分离克隆、转基因园艺植物等的章节中详细讲述了具体步骤,便于在实际操作中参考、借鉴。

本书可供高等院校生命科学学院与园艺学院学生作为教材使用,也可作为其他教学、科研人员参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

园艺植物基因工程/夏海武著. —北京:科学出版社,2010.4
ISBN 978-7-03-026954-6

I. 园... II. 夏... III. ①园林植物—基因工程 IV. ①Q943.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第040105号

责任编辑:潘志坚 朱 灵 / 责任校对:刘珊珊
责任印制:刘 学 / 封面设计:殷 靓

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>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年4月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2010年4月第一次印刷 印张: 11 1/2

印数: 1—2 200 字数: 221 000

定价: 28.00 元

前 言

1983 年采用农杆菌介导法转化烟草细胞,培育出世界上第一例转基因植物,标志着植物基因工程诞生。自此,植物基因工程的研究迅速发展。特别是 1994 年,第一个转基因植物产品——延熟保鲜转基因番茄获得美国农业部(USDA)和美国食品药品监督管理局(FDA)批准进入市场,转基因植物产品进入实用阶段。此后,转基因植物研究及商品化种植日新月异,硕果累累。特别是大豆、玉米、棉花等大田作物在全球大面积种植,产生了巨大的经济效益和社会效益。

虽然第一例被批准商品化生产的转基因番茄属于园艺植物,但园艺植物基因工程的研究和应用速度相对较慢,现在已经大大落后于大田作物,这与园艺植物的商品价值是不相适应的,换句话说园艺植物基因工程的研究和应用的空间是巨大的,前景非常广阔。

也就是在首例转基因植物进入市场的同时,本人开始涉足植物生物技术的教学和研究工作,后来有幸到北京大学蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室做访问学者,以及到福建农林大学园艺学院攻读博士学位,使自己真正成为一名园艺植物基因工程研究工作者。

我国是一个人口众多的农业大国,随着国人生活水平的提高,对园艺植物的需求越来越迫切,应用基因工程手段改良园艺植物,促进园艺生产的发展是一个十分紧迫和重要的任务。目前我国的园艺植物基因工程研究已蓬勃展开,转基因番茄和甜椒、矮牵牛等转基因园艺植物也早已通过安全审批投放生产,各高等院校为适应人才需求而在园艺学等相关专业相继开设植物基因工程课程,从事该领域的研究人员不断增多,因而以新的知识和实用技术指导科学研究是推动我国园艺植物基因工程事业更快发展的当务之急,迫切需要更多这方面的学术著作出版。

本书总结了园艺植物基因工程研究进展,在介绍园艺植物基因工程的一些基本理论和基本技术的基础上,结合本人多年来的教学和研究工作,着重论述了园艺植物基因工程的技术体系及实例,特别注重前沿知识的通俗化和高新技术的实用化,以期对从事园艺植物基因工程的学者提供有益的参考。本书包括园艺植物基因工程概述、园艺植物基因转化受体系统的建立、园艺植物基因的分离克隆、转基

因园艺植物、转基因植株的鉴定、园艺植物基因工程展望及安全性等部分。

为了反映近年来园艺植物基因工程的研究成果和更好地阐明园艺植物基因工程的原理和技术系统,引用了多位学者公开发表论文和著作成果,特此对这些为植物基因工程的发展做出贡献的学者表示真诚的感谢。

园艺植物基因工程是近年来发展起来的新兴学科,新理论和技术日新月异,由于本人知识面和水平有限,加之时间比较仓促,书中可能存在许多缺点甚至错误,恳请各位同行和读者批评指正。

夏海武

2009年9月

目 录

前 言

第一章 园艺植物基因工程概述	1
第一节 基因工程的诞生和发展	1
一、基因概念的产生和发展	1
二、基因工程的概念及诞生	3
三、基因工程的发展概况	6
第二节 园艺植物基因工程的特点及研究内容	7
一、园艺植物基因工程的特点	8
二、园艺植物转基因研究的主要内容	8
第二章 园艺植物基因转化受体系统的建立	11
第一节 植物基因转化受体系统概述	11
一、植物基因转化受体系统的条件	11
二、植物基因转化受体系统的类型	12
三、植物基因转化受体系统建立的程序	14
第二节 花卉的组织培养与植株再生	16
一、花卉的组织培养概述	16
二、香石竹的组织培养	17
三、兰花的组培快繁	22
第三节 果树的组织培养与植株再生	25
一、果树组织培养概述	25
二、草莓的脱毒快繁	26
三、草莓遗传转化再生系统的建立	29
四、苹果砧木品种珠美海棠试管苗叶片再生系统的建立	30
五、“富士”苹果的植株再生	31

第四节 蔬菜的组织培养与植株再生	32
一、蔬菜的组织培养研究概述	32
二、甜瓜组织培养及高效再生系统的建立	37
三、西瓜组织培养及遗传转化再生系统研究	41
第五节 药用植物组织培养与植株再生	45
一、药用植物组织培养概况	45
二、半夏的组织培养研究	47
三、虎杖组培快繁影响因素的研究	49
 第三章 园艺植物基因的分离克隆	53
第一节 园艺植物基因组 DNA 的提取	53
一、榛基因组 DNA 提取与纯化方法	54
二、虎杖嫩茎基因组 DNA 的提取	57
三、柑橘组织培养材料基因组 DNA 的快速提取	58
四、改进的 SDS 法提取苹果叶片的基因组 DNA	60
第二节 园艺植物总 RNA 的提取	61
一、羊蹄甲果荚总 RNA 的提取	62
二、玳玳花瓣总 RNA 的提取与检测	65
三、榛果肉总 RNA 提取与纯化方法	66
第三节 园艺植物的基因分离与克隆	67
一、基因分离克隆的策略	68
二、植物基因分离方法的选择	73
三、利用 RACE 技术从羊蹄甲果荚中克隆芪合酶基因	74
四、玳玳花瓣脂氢过氧化物裂解酶(HPL)基因 cDNA 全长的克隆	84
 第四章 转基因园艺植物	95
第一节 植物基因表达载体的构建	95
一、农杆菌 Ti 质粒载体及其构建	95
二、植物病毒载体系统	100
三、农杆菌质粒载体和植物病毒载体的比较	103
四、植物表达载体的改进和优化策略	103

第二节 农杆菌介导的基因转移	108
一、整体植株接种共感染法	109
二、离体器官、组织转化法	109
三、原生质体共培养转化法	109
四、农杆菌介导的 floral-dip 转化方法	110
第三节 DNA 直接转移法	111
一、化学法	111
二、物理法	112
第四节 芪合酶基因对甜瓜的遗传转化	114
一、羊蹄甲芪合酶基因全长的获得	114
二、植物表达载体的构建	116
三、芪合酶基因对甜瓜的遗传转化	119
四、转基因植株的检测	121
第五章 转基因植株的鉴定	124
第一节 抗性标记基因及报告基因	124
一、选择性标记基因	125
二、报告基因	129
第二节 目的基因的检测	134
一、分子杂交	134
二、免疫学检测	141
三、PCR 检测	142
第六章 园艺植物基因工程展望及安全性	146
第一节 园艺植物基因工程研究及发展	146
一、花卉基因工程	146
二、果树基因工程	151
三、蔬菜基因工程	154
四、药用植物基因工程	158
第二节 园艺植物转基因研究的安全性问题	162
一、转基因植物安全性评价的主要内容	162

二、国内外转基因植物的安全性评价概况	166
主要参考文献	170
附 录	171
附录 1 常用缩略语	171
附录 2 园艺植物组织培养常用的培养基	172
附录 3 一些植物生长调节物质及其主要性质	174
附录 4 常用抗生素配制及使用浓度	174
附录 5 常用限制性核酸内切酶的主要性质	175

第一章 园艺植物基因工程概述

第一节 基因工程的诞生和发展

一、基因概念的产生和发展

基因的概念随着遗传学、分子生物学、生物化学、微生物学等领域的发展而不断突破和完善。在遗传学发展的早期阶段,基因仅仅是一个逻辑推理的概念,而到了现代,遗传学对基因的认识不再局限于是一种已经证实了的物质和结构,而是不断深入细致,目前遗传学家认为,应该把基因看做是 DNA 分子上具有特定功能的核苷酸序列,包括合成有功能的蛋白质、多肽链或 RNA 所必需的全部核苷酸序列。基因概念的形成应追溯到孟德尔的工作。

(一) 基因学说的创立

早在 1865 年,遗传学的奠基人孟德尔(Mendel GJ,1822~1884)在利用豌豆进行了长达 8 年杂交实验的基础上,发表了“植物杂交试验”论文,提出了分离和自由组合两个遗传学的基本规律,认为生物的某种性状是由遗传因子负责传递的。遗传因子是颗粒性的,体细胞内成双存在,生殖细胞内成单存在。遗传因子是决定性状的抽象符号。

1909 年,丹麦遗传学家约翰森(Johannsen WL,1859~1927)发表了“纯系学说”,首先提出了“基因”的概念,代替了孟德尔的“遗传因子”概念。遗传学上开始用“基因”这一名词来表示遗传的基本单位,但没有提出基因的物质概念。

1910 年以后,摩尔根(Morgan TH,1866~1945)等提出了基因的连锁遗传规律。说明了基因是在染色体上占有一定空间的实体。他认为,基因是以直线的形式排列在染色体上,是功能、突变、重组三位一体的不可分割的单位。从此,基因不再是抽象符号,被赋予物质内涵。

(二) 基因的分子生物学阶段

20 世纪 50 年代前后,由于近代物理学、化学等先进技术和设备的应用,在遗传物质的研究上取得了重大突破,证实了染色体是由 DNA、蛋白质和少量的 RNA 所组成,其中 DNA 是主要的遗传物质。

1953 年,年仅 25 岁的美国生物学家沃森(Watson JD,1928~)和 35 岁的英国物理学家克里克(Crick FHC,1916~2004)提出了 DNA 分子结构的双螺旋模型,这是遗传学发展史上一个重大的转折点。至此,基因不再是一种只能用育种实验

手段进行研究的神秘成分,而是一种真正的物质分子,能够像其他大分子一样进行研究,从而开辟了基因的分子生物学研究新时代。从此之后,人们普遍认为基因是DNA的片段,确定了基因的化学本质。

1957年,本泽尔(Benzer S)以T₂噬菌体为材料,在DNA分子水平上研究基因内部的精细结构,提出了顺反子(cistron)学说,这一学说包括顺反子、突变子和重组子三个概念。DNA分子上一个碱基的变化可以引起基因突变,因此可看成是一个突变子;两个碱基之间可以发生互换,可以看成是一个重组子;一个顺反子是具有特定功能的一段核苷酸序列,作为遗传功能单位的基因应该是顺反子。基因内部突变子、重组子的发现,表明基因是可以分割的,从而打破了摩尔根提出的基因“三位一体”的概念。

(三) 现代基因阶段

随着分子生物学和分子遗传学实验手段的不断发展和完善,使人们对基因的结构和功能有了更充分的认识。

1961年,法国遗传学家雅各布(Jacob F)和莫诺(Monod JL)基本上阐明了原核生物基因表达的调控机制,提出了大肠埃希菌乳糖操纵子模型。在乳糖操纵子上有三个结构基因,分别携带一种酶的遗传信息。三个结构基因前面有一个操纵基因,上面有与阻遏物结合的位置,当阻遏物与其结合时,结构基因不能表达,从而不能合成这三种酶。在操纵基因前面有一个启动基因,当操纵基因上没有阻遏物时,同启动基因结合的RNA聚合酶向操纵基因和结构基因移动,于是能合成出三种酶。启动基因以外还有一个调节基因,它编码阻遏物,调节结构基因的活性。操纵基因同一个或几个结构基因联合起来在结构和机能上形成一个协同活动的整体,称为一个操纵子。调节基因通过产生阻遏物来调控操纵基因,从而控制结构基因的功能。因此,依基因的功能可以分为调节基因、操纵基因和结构基因三大类。

从基因研究的发展水平上看,操纵子概念比顺反子概念又近了一步。它指出基因不但在结构上是可分的,而且在功能上也是可分的。

1950年,麦克林托克(McClintock, 1902~1992)在研究玉米籽粒的色素斑点时,提出了有一个可在染色体上移动的“控制因子”,一个控制因子整合到一个基因位点上,可产生一种新的突变型。如果把控制因子准确地切除下来,基因位点的表型也恢复正常。这些可移动的DNA片段称为跳跃基因。也就是说,DNA能在有机体的染色体组内从一个地方跳到另一个地方,它们能从一个位点切除,然后插入同一或不同染色体上的另一个位置。跳跃基因的发现使人们进一步认识到基因不是静止不动的实体,它是一段DNA序列,在结构上有明确的界限,在功能上是一个独立的遗传单位,它可以通过自身的运动调节基因的活性。因此,基因是可以移动的。

1977年,美国的夏普(Sharp)和罗伯茨(Roberts)同时分别发现了断裂基因,

提出基因是一个嵌合体,它包含两个区段:一个是在成熟 mRNA 中不出现的片段,称内含子;一个是在成熟 mRNA 中出现的表达片段,称外显子。因能表达的外显子被不表达的内含子隔开,故称为断裂基因。基因不连续性是真核类基因的普遍现象,即基因编码序列在 DNA 分子中是不连续的,为不编码序列所间隔。

1977 年,桑格(Sanger F)等人在分析了一个小的单链 DNA 噬菌体 Φ X174 的全序列后,惊奇的发现在只有 5 386 个核苷酸组成的序列却包含 11 个基因,通过对这 11 个基因编码的氨基酸总数计算,其所需核苷酸数超过 5 386 个。后来 Sanger 实验室的 Garrell 等发现, Φ X174 噬菌体基因组中的有些密码是重读的,从而形成重叠基因。后来,除在病毒中,还在细菌和果蝇中发现了不同基因的核苷酸序列有时是可以共用的,即它们的核苷酸序列彼此重叠,这样的基因称为重叠基因。重叠基因的重叠方式可以有多种,如小基因包含在大基因之内、前后两个基因首尾重叠甚至三个基因重叠、操纵子重叠或反向重叠等。

人们对哺乳动物珠蛋白基因簇的核苷酸序列分析时发现,除正常功能基因外,还有一些基因的核苷酸序列与相应的正常基因相比约有 75%~80% 是同源的,但由于许多突变而阻碍了自身的表达,这类功能失活的基因称为假基因。

现代大多认同对基因的定义是:DNA 分子中含有特定遗传信息的一段核苷酸序列,是遗传物质的最小功能单位。

二、基因工程的概念及诞生

(一) 基因工程的基本概念

生物学家都对 20 世纪 60 年代的绿色革命记忆犹新,它是通过遗传改良的手段培育的优质、高产小麦和水稻良种的全面推广,使全世界粮食产量跃上了一个新的台阶,为解决发展中国家的食品短缺做出了重要贡献。21 世纪被认为是另一个生物革命的世纪,这次生物革命是通过现代遗传工程的技术手段去实现。

遗传工程是指利用工程技术的方法改造和修饰生物体,使其产生新的性状和产品,从而改良生物体的一种手段。遗传工程使得科学家可以按照人们的需要分离基因,在不通过有性杂交的情况下,使基因从一个生物转移到另一个生物的目标。遗传工程涵盖的内容比较广泛,它包括细胞水平、染色体水平和分子水平等几个层面上的遗传操作,而分别被称为细胞工程、染色体工程和基因工程。虽然遗传工程包含很多方面,但有时人们往往把遗传工程狭义地专指基因工程。

基因工程是利用人工的方法将 DNA 在体外进行切割,再和一定的载体拼接重组,获得重组 DNA 分子,然后导入宿主细胞或个体,使受体生物的遗传特性得到修饰或改变的过程。

(二) 基因工程产生的基础

基因工程得以诞生完全依赖于分子生物学、分子遗传学、微生物学等多学科研究的一系列重大突破,概括起来,从 20 世纪 40 年代开始,在现代分子生物学研究领域中,理论上的三大发现和技术上的三大发明对基因工程的诞生起到了决定性的作用。

1. 理论上的三大发现

(1) 发现了生物主要的遗传物质是 DNA。1928 年,英国医生格里菲斯(Griffith F)首次将肺炎双球菌 RⅡ 型转变为 SⅢ 型,实现了细菌遗传性状的定向转化。试验方法是先将少量无毒的 RⅡ 型肺炎双球菌注入家鼠体内,再将大量有毒但已加热(65℃)杀死的 SⅢ 型肺炎双球菌注入,结果家鼠发病死亡,且从死鼠体内分离出了 SⅢ 型肺炎双球菌,说明了被加热杀死的 SⅢ 型肺炎双球菌中,必然含有某种活性物质,促成了 RⅡ 型细菌的转变。

1934 年,阿委瑞(Avery OT)在美国的一次学术会议上首次报道了肺炎双球菌的转化实验,但这一重要成果当时没有得到公认。直到 1944 年,阿委瑞的论文才得以公开发表。他们不仅成功地重复了格里菲斯的实验,而且将 SⅢ 型肺炎双球菌的 DNA 提取物与 RⅡ 型肺炎双球菌混合在一起,在离体条件下也成功地使少数 RⅡ 型细菌定向转化为 SⅢ 型细菌。由于该提取物不受蛋白酶、多糖酶和核糖核酸酶的影响,而只能为 DNA 酶所破坏。因此确认导致转化的物质是 DNA。事实上,阿委瑞的工作不仅证明了 DNA 是生物的遗传物质,而且还证明了 DNA 可以转移,能把一个细菌的性状传给另一个细菌,理论意义十分重大,也可以说是基因工程的先导。

1952 年,赫尔歇(Hershey AD)等的噬菌体侵染实验也证明了 DNA 的遗传物质本质。利用³²P 和³⁵S 分别标记 T₂ 噬菌体 DNA 和蛋白质,然后用带有标记的 T₂ 噬菌体分别感染大肠埃希菌,10 min 后,用搅拌器甩掉附着于细菌外面的噬菌体外壳。发现在用³²P 标记的情况下,基本上全部放射线见于细菌内而不被甩掉,并可传递给子代。在用³⁵S 标记的情况下,放射性见于被甩掉的外壳中,细菌内只有极低的放射性活性,且不能传递给子代。该实验证明了只有 DNA 进入细胞内产生完整的噬菌体。所以说 DNA 是具有连续性的遗传物质。

(2) 明确了 DNA 的双螺旋结构和半保留复制的机制。1953 年,沃森和克里克根据查戈夫法则以及对 DNA 分子的 X 射线衍射研究的结果,提出了著名的 DNA 分子双螺旋结构模型。这个模型不仅解释了当时所知道的 DNA 的一切理化性质,还将结构和功能联系起来,极大地推动了分子遗传学的发展,具有划时代的意义。20 世纪 60 年代确立的 DNA 半保留复制和蛋白质合成的中心法则提出了遗传信息流是 DNA—RNA—蛋白质,从分子水平上揭示了神秘的遗传现象,为遗传和变异提供了理论依据。1970 年,波尔蒂莫(Baltimore D)和特明(Temin HM)

等人发现了逆转录酶,发展了中心法则。

(3) 遗传密码的破译。从 1961 年到 1966 年,以莱文伯格(Nirenberg MW)为代表的一批科学家,经过大量的实验,确定遗传信息是以密码方式指导合成蛋白质的,每三个核苷酸组成一个密码子,代表一个氨基酸。到 1966 年全部破译了 64 个密码,编排了一本遗传密码字典。这些遗传密码具有通用性,为基因的可操作性奠定了理论基础。

2. 技术上的三大发明

(1) DNA 分子的体外切割和连接。由于不同种生物在 DNA 水平操作的相似性,因此需要一种能将不同生物的 DNA 分子进行切割的“手术刀”和将切割片段连接起来的“黏合剂”,限制性核酸内切酶就是能对 DNA 分子进行体外切割的“手术刀”,DNA 连接酶则是可以进行 DNA 分子连接的“黏合剂”。1970 年,史密斯(Smith HO)首次从流感嗜血杆菌中分离并纯化了限制性核酸内切酶 *Hind*Ⅲ,使 DNA 分子的切割成为可能。1972 年,Bover 实验室又发现了一种名叫 *Eco*R I 的限制性核酸内切酶,这种酶每当遇到 GAATTC 序列,就会将双链 DNA 分子在该序列中切开形成 DNA 片段。1967 年,世界上有五个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶,这种酶能参与 DNA 缺口的修复。1970 年,美国的 Khorana 实验室发现了 *T*₄ DNA 连接酶,具有更高的连接活性,为 DNA 片段的重组连接提供了技术基础。

(2) 利用载体携带 DNA 片段。在体外利用限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶进行 DNA 的切割和重组,还远不能满足基因工程的要求。由于大多数的 DNA 片段不具备自我复制能力,为了使 DNA 片段能够在受体细胞中进行繁殖,就必须将获得的 DNA 片段链接到一种具备自我复制能力的 DNA 分子上。这种 DNA 分子就是基因工程的载体。根据微生物遗传学研究的成果,有可能用作基因克隆载体的有病毒、噬菌体和质粒等不同的小分子质量的复制子。其中研究的最为深入,而且已被改造成实用克隆载体的是噬菌体载体和质粒载体分子。

(3) 大肠埃希菌转化体系的建立。外源 DNA 片段同上述这些载体分子重组而成的杂种 DNA 分子,需要一个能够提供增殖条件的“复制工厂”,大肠埃希菌作为寄主细胞就能够满足杂种 DNA 分子的这种要求。这种将外源 DNA 导入细菌细胞的转化现象早在 20 世纪 40 年代就已经在肺炎链球菌中发现,但对于大肠埃希菌来说,却直到 1970 年由 Mandel M 和 Higa A 发现大肠埃希菌细胞经过氯化钙的适当处理之后,能够吸收 λ 噬菌体的 DNA,才获得成功。1972 年,斯坦福大学的 Cohen S 等人报道,经氯化钙处理的大肠埃希菌细胞同样也能够摄取质粒的 DNA。从此,大肠埃希菌便成了分子克隆的良好转化受体。大肠埃希菌转化体系的建立,对基因工程的创立具有特别重要的意义。

此外,DNA 分子的核甘酸序列分析技术、琼脂糖凝胶电泳技术和 Southern 印迹转移杂交等技术的发展对于基因工程的开展都起到了促进作用。

(三) 基因工程的诞生

具备了以上的理论和技术基础,基因工程诞生的条件已经成熟。两位科学的“助产士”Berg P 与 Cohen S 把基因工程接到了人间。

1972 年,美国斯坦福大学医学中心的 Berg 和他的同事使用限制性核酸内切酶 *EcoR* I,在体外对猿猴病毒 SV40 的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA 分别进行酶切,然后再用 *T*₄ DNA 连接酶把两种酶切的 DNA 片段连接起来,获得了包含猿猴病毒 SV40 和 λ 噬菌体 DNA 重组的杂交 DNA 分子。幸运地成为世界上第一位操作基因重组 DNA 分子的科学家。到 1975 年,Berg 成功地用 SV40 携带外加的细菌基因或动物基因引进了培养的细胞,并在培养的细胞中得到了显示。由于 Berg 对重组 DNA 分子进行的根本性研究,从而获得了 1980 年的诺贝尔化学奖。

然而,基因工程的正式诞生是以斯坦福大学的 Cohen 等人于 1973 年建立的基因工程的基本模式为标志的。他们将大肠埃希菌的抗四环素(Tc^r)的质粒 pSC101 和抗新霉素(Ne^r)的质粒 pR6-3 提取出来,在体外用限制性内切酶 *EcoR* I 切割后拼接成一个杂合的质粒。然后把杂合质粒导入大肠埃希菌,结果在含有四环素和新霉素的平板中,筛选出了抗四环素和新霉素的重组菌落,说明重组质粒能在大肠埃希菌内复制并表达双亲质粒的遗传信息。这是基因工程的第一个成功的克隆转化实验。Cohen 的实验向人们证实,基因工程很容易打破不同的物种之间的界限,可以根据人们的目的和意愿定向地改造生物的遗传特性,甚至创造新的生命类型。因此把这一年定为基因工程诞生元年。

三、基因工程的发展概况

基因工程技术从问世至今,经过了 30 多年的发展历程。无论是在基础理论研究领域,还是在生产实际应用方面,都已取得了惊人的成绩。它不仅使整个生命科学的研究发生了前所未有的深刻变化,而且也给工农业生产和国民经济带来了巨大的经济效益和社会效益。

1974 年,Cohen 和 Boyer 等人把非洲爪蟾编码核糖体的 DNA 片段同 pSC101 质粒重组后导入大肠埃希菌,经分析转化细胞,结果表明非洲爪蟾的基因确实进入了大肠埃希菌并转录出相应的 RNA 产物,说明真核生物的基因可以转移到原核细胞并能实现功能的表达。1977 年,日本的 Itakura 及其同事又将人工合成的生长素释放抑制素基因首次在大肠埃希菌中克隆并表达。几个月后,美国的 Ullrich 克隆表达了人的胰岛素基因。1978 年,美国 Genentech 公司开发出利用重组大肠埃希菌合成人胰岛素的先进生产工艺,从而揭开了基因工程产业化的序幕。1982 年,美国和英国批准生产和使用人胰岛素,这是第一个投放市场的基因工程药物。自此世界范围基因工程药物的研制与开发得到飞跃发展,利用基因工程技术开发新型治疗药物或疫苗是当前最活跃和发展最快的领域。目前这个领域中已经取得

了许多成功的事例,重组胰岛素、人生长素、干扰素、人生长激素释放抑制素、乙型肝炎疫苗、人白细胞介素、人促红细胞生成素、人粒细胞集落刺激因子、人组织纤溶酶原激活剂等都已利用基因工程手段进行生产。

1974年,在农杆菌中发现一种致癌的环形DNA,称为Ti质粒。该质粒上有一段DNA(T-DNA)包含有生长素基因和细胞分裂素基因,被农杆菌感染的植物形成冠瘿瘤的原因是该T-DNA片段在侵染中插入到植物染色体中,并得到表达。从此人们便利用这种天然的转化体系进行植物转基因。但是,整段的T-DNA转入植物后所形成的冠瘿瘤很难分化成植株。1983年,科学家们将T-DNA上的致癌基因切除,换上研究用的目的基因,然后用带有这种修饰后的T-DNA的农杆菌感染植物烟草细胞,获得转基因烟草植株,分子检测证明了这一基因在植物中能够整合和表达。至此,高等植物转基因技术问世。

1986年,美国和法国同时对抗除草剂转基因烟草进行了田间试验。

1994年,第一个转基因植物产品——延熟保鲜转基因番茄获得美国农业部和美国食品药品监督管理局批准,进入市场。此后,转基因植物研究及商品化种植迅速发展。

1988年,美国国会批准了《人类基因组计划》。同年9月,诺贝尔奖金获得者、DNA双螺旋结构的发现者之一——沃森出任人类基因组计划的负责人,开始了举世瞩目的人类基因组研究。人类基因组研究自1990年正式启动以来,其进展速度比预想的要快,人类基因组草图已于2000年提前完成,并迅速进入后基因组时代。我国自1992年开始执行《水稻基因组作图和测序计划》也已取得很大进展,2001年在《科学》杂志上发表了水稻基因组图。

在人类基因组计划的影响下,从低等到高等生物的基因组不断被揭秘,由此产生了基因组学。

1982年,美国科学家将大鼠的生长素基因转入小鼠体内,培育出具有大鼠雄健体魄的转基因小鼠及其子代。受此启发,动物转基因研究与开发迅速发展,转基因猪、羊、牛、兔、鸡、鱼等都已成功,在改良动物生产性状、提高畜禽抗病能力、生产人药用蛋白及建立人类分子病的研究模型方面,已显示出广阔的前景。

1990年,美国政府首次批准了一项人体基因治疗临床研究计划,对一名因腺苷脱氨酶基因缺陷而患有重度联合免疫缺陷症的儿童进行基因治疗,该计划的成功开创了分子医学的新纪元。

第二节 园艺植物基因工程的特点及研究内容

随着生活水平的改善,人们对园艺产品数量的需求不断增加,对质量的要求也不断提高,因此,园艺产品的商业价值在不断攀升,园艺产业的发展前景非常广阔。

传统的育种技术在园艺生产上的应用受到很多限制,用基因工程的方法培养园艺新品种成为转基因研究的又一热点。

一、园艺植物基因工程的特点

园艺植物基因工程就是利用基因工程技术将外源基因导入园艺植物基因组内,改变园艺植物的某些遗传特性,培育具有高产、优质、抗病、抗虫、抗旱、抗寒、抗涝、抗盐碱、抗除草剂等特性的园艺植物新品种,或者利用转基因园艺植物或离体培养的细胞,来生产外源基因的表达产物,生产药用成分或保健功能食品。因此,园艺植物基因工程属于基因工程的一个分支,除了具有基因工程的一些共性外,还有以下几个特点。

1. 植物细胞具有全能性

植物细胞具有全能性(totipotency),即植物细胞可以在体外培养条件下进行脱分化,再由非分化的细胞再生出完整的植株。这样就可以用基因工程技术,把来源不同的优良基因或是经过改造的基因,转入植物细胞,然后通过细胞培养的方法再生出转基因植株,从而快速地创造出优良的农作物新品种,培育出目前栽培作物尚不具备的新的遗传性状。而且,园艺植物的细胞和组织培养已取得巨大成绩,为基因工程奠定了良好的基础。

2. 园艺植物遗传资源丰富

园艺植物的遗传育种具有漫长的历史,为遗传育种学家积累了十分丰富的各种突变体资源,并对有关的突变基因作了相当详细的遗传鉴定,可供分子水平上的研究使用。鉴于许多园艺植物不具有自花授粉或自交(selfed)的能力,因而特别适合于基因工程的实验操作。

3. 植物细胞具有细胞壁

植物细胞具有坚硬的细胞壁,细胞壁对植物本身有着重要的意义,然而对于基因工程来说,对基因的提取及转化都带来不小的困难,在获取植物基因时,不论是基因组DNA,还是RNA的提取,都必须先破碎或降解掉植物的细胞壁,使所需的核酸游离出来,再进行提取和纯化。同时,遗传转化过程中也由于细胞壁的限制而变得较为困难。

4. 染色体基因组庞大而且往往是多倍性的

许多高等植物的染色体不但数目繁多,而且往往还是多倍性的。大多数高等植物还都具有庞大的染色体基因组,这是从分子水平上了解植物遗传变异的又一个障碍。同时也增加了转基因植物的筛选和检测的难度。

二、园艺植物转基因研究的主要内容

园艺植物转基因研究主要包括目的基因的克隆、表达载体的构建、目的基因对