

● 李向辉 主编

植物遗传操作

Genetic Manipulation
in Crops

Edited by LiXianghui



高等教育出版社

植物遗传操作

李向辉 等编著

高等教育出版社

(京)112号

内 容 简 介

植物遗传操作是在离体的分子和细胞水平上对植物遗传结构的定向修饰和重组的技术,是国内外科学家热衷研究的重要领域。本书是我国“七五”科技攻关计划中所取得的部分重大成果。它反映了我国生物技术研究的最新进展和水平,具有重要理论意义和实际应用价值。

本书由我国本领域的著名科学家撰写。以重要禾谷作物(水稻、小麦、玉米等)、主要经济作物(大豆、烟草、番茄等)以及微生物为主要研究对象进行各种类型的遗传操作研究,包括:目的基因的克隆,原生质体(基因的受体)的再生,转基因的工程植物,基因组的转移——体细胞杂种,以及原生质体植株的体细胞变异等。既有系统的理论的综述,又有具体的新方法和技术的描述。

本书可供植物遗传工程、细胞工程、分子遗传学、细胞生物学、生理学、微生物学及生物技术等研究专家和大中院校师生参考。

责任编辑 李茂国

植物遗传操作

李向辉 等编著

高等教育出版社出版

新华书店总店科技发行所发行

北京印刷二厂印装

开本 850×1168 1/32 印张 14.25 插页 4 字数 370 000

1994年8月第1版 1994年8月第1次印刷

印数 0001—1 035

ISBN7-04-004364-5/Q·212

定价 16.65元

主要撰稿者单位及通讯地址、邮政编码

- | | |
|-----|----------------------------------|
| 卫志明 | 中国科学院,上海植物分子遗传重点实验室,上海 200032 |
| 王雅平 | 北京大学,生物系,蛋白质及植物基因工程实验室,北京 100821 |
| 方荣祥 | 中国科学院,微生物研究所,北京 100080 |
| 邓秀新 | 华中农业大学,柑橘研究所,武汉 430020 |
| 孙宝林 | 中国科学院,遗传研究所,北京 100101 |
| 田 波 | 中国科学院,微生物研究所,北京 100080 |
| 刘春明 | 中国科学院,遗传研究所,北京 100101 |
| 许智宏 | 中国科学院,上海植物分子遗传重点实验室,上海 200032 |
| 朱 颖 | 中国科学院,遗传研究所,北京 100101 |
| 李向辉 | 中国科学院,遗传研究所,北京 100101 |
| 余建明 | 江苏省农科院,生理遗传研究所,南京 210014 |
| 吴乃虎 | 中国科学院,发育生物研究所,北京 100080 |
| 吴世宣 | 中国科学院,微生物研究所,北京 100080 |
| 阳体冰 | 江苏省农科院,生理遗传研究所,南京 210014 |
| 范云六 | 中国农科院,分子生物中心,北京 100086 |
| 陈章良 | 北京大学,生物系,蛋白质及植物基因工程实验室,北京 100821 |
| 陈惠民 | 山东大学,生物系,济南 250100 |
| 夏镇澳 | 中国科学院,上海植物生理研究所,上海 200032 |
| 贾敬芬 | 兰州大学,生物系,细胞生物学实验室,兰州 730000 |
| 施介村 | 中国科学院,遗传研究所,北京 100101 |
| 颜秋生 | 中国水稻研究所,杭州 310000 |
| 张春霞 | 中国科学院,微生物研究所,北京 100080 |
| 董晋江 | 中国科学院,上海植物生理研究所,上海 200032 |
| 王辅德 | 中国科学院,上海植物生理研究所,上海 200032 |
| 刘芝华 | 北京大学,生物系,蛋白质及植物基因工程实验室,北京 100821 |

序言 植物遗传操作研究的进展

植物遗传操作是在离体细胞及分子水平上对其遗传结构的定向修饰及重组,以改变植物体遗传性状。它既是研究分子生物学、分子遗传学基础问题的手段,又是定向改良作物品种特性的有利途径(李向辉,1988,1991;荆玉祥,1988),它是生物技术的核心领域。

由于分子生物学、DNA 重组以及细胞组织培养等各领域的飞速发展,给植物遗传操作打下了理论和技术基础,使人们有可能通过基因转移的遗传操作技术,增加某些有益外源基因,或删除某一不利的内源基因,导致定向产生可遗传的新的工程植物(或细胞系)。利用植物细胞(或植物体)作为“生物反应器”导入修饰过的医用蛋白基因,以生产贵重医药蛋白或多肽,如白蛋白、血液因子、神经多肽等。以达到按人类需要定向地操纵生物遗传性状的目的。

20 年来,科学家们用标记基因(一些简单的基因)建立了转移(增加)基因的遗传转化体系,获得一批转基因植物。利用异源原生质体融合的遗传操作技术建立了体细胞杂交体系,转移较大的基因群、基因组,获得一批非对称及对称体细胞杂种植物。这些工程植物有的已进入田间、工厂,有的已进入市场。它们对发展新型农业、工业、医药及环保卫生事业蕴育着巨大的潜在的利益。

然而,不论是上述那种遗传操作技术,人们还不能准确控制外源 DNA 进入细胞后的行为,由于外源基因可以随机地插入受体基因组的未知位置,就有可能错误插入有益基因结构,使之发生不利变异。导入的外源基因表达的水平高低、正常与否,尚缺少控制办法。因此,人们在寻求实现外源基因定位整合的技术体系。

近年,在遗传操作技术的基础上,开辟了同源位点重组(homologous site recombination)体系或称基因定位整合(site - directed integration of gene)体系的研究。它可以通过同源重组使特定基因失活(或删除)或修饰,得到减去某一不利的遗传性状的个体。它比反义 RNA(antisense RNA)的作用有更深刻的意义。目前,利用人工合成的反义 RNA 已在少数植物(Smith, 1988; Sheehy, 1988)、动物实验中取得成功。基于分子遗传学理论一些新的遗传操作设想层出不穷,也表明各种遗传操作技术发展有赖于分子遗传学理论的发展和对已有的理论的变通应用,人类终有一天能摆脱自然的限制,在较大程度上控制生物为人类服务。

因此,不断总结和发展遗传操作技术是刻不容缓的研究任务。本文就植物遗传操作在近 5 年中在中国及国外的基因转移及原生质体融合、同源重组等研究进展及存在问题进行概要综述。

一、基因转移

在目前技术水平上,一个成功的植物基因转移往往需符合下列要求:(1)鉴定、提取或合成特定的外源基因;(2)将外源基因修饰、重组;(3)将重组好的外源基因导入到受体细胞;(4)外源基因整合到受体细胞的基因组内,并稳定地进行复制;(5)有效地进行表达、选择、再生;(6)将外源基因遗传给后代。目前人们已经成功地完成了这一过程,并建立了以原生质体为受体的多种基因转移体系,以及以根癌农杆菌为载体,以多种细胞、组织为受体的载体基因转移体系。获得了一批有价值的工程植物。

(一)基因转移的受体

系统地研究了单子叶、双子叶植物原生质体的再生能力,迄今已使如水稻、小麦、大豆、高粱、谷子、大麦、棉花、甘蔗等几乎全部重要农作物以及一大批双子叶植物原生质体再生植株(参见第二章第一节)。并以其为受体,将人的干扰素基因转入水稻(朱桢, 1991),将苏云金杆菌(B.T.)的 δ 内毒素蛋白转入了水稻(杨虹,

1989)。以原生质体为外源基因的受体,随着禾谷作物原生质体难再生问题的解决,使之成为一种理想的受体。它的遗传均质性,易摄入外源 DNA,高转化频率,便于选择转化体,避免嵌合体,以及在转化初期即允许研究外源基因的表达状态,都是任何别的受体所做不到的。迄今,已获得的转基因植物,大多以原生质体为受体取得成功的。它是在分子水平和细胞水平上精确研究遗传信息转化后早期动态的结合点。特别是以植物细胞为生物反应器的开发,使单细胞原生质体为受体的价值更趋明显。值得指出,在新发展的同源位点重组(基因定位整合)技术中,有全能性的单个细胞原生质体是理想的受体,这一优越性是哺乳动物细胞的同源重组不可比拟的。

对双子叶作物来说,如烟草、番茄、棉花等也可以用各种组织、器官,如叶片、茎段、胚、花药管通道、子房等以及胚性悬浮性细胞团为受体,通过根癌农杆菌载体转化取得成功(Uchimiya, 1990%)(表 1)

表 1 受体与转化体系

受体	适于植物类别	适于转化体系
原生质体	单、双子叶植物	直接基因转移
悬浮胚性细胞	双、单子叶植物	直接基因转移
叶片、茎段	双子叶植物	农杆菌载体转移
胚、胚轴、子叶、花粉管通路、子房	种子植物(单、双子叶)	直接基因转移(或载体转移)

值得注意的是应尽可能采用遗传上一致的、较稳定的品种为受体,从而可避免那些遗传上异质的、不稳的或杂种性的亲本所产生的分离、多种变异而影响对特定基因转化的分析以及影响对有益性状的表达及不利性状发生的判断。

(二)基因转移体系

如何把特定的基因转移,并插入受体植物细胞基因组中?已形成的技术体系虽然不少,但可归纳为二:

1. 载体转移外源基因 自发现根癌农杆菌自然界的遗传工程现象以来,已知它能够通过伤口感染植物,导致许多双子叶植物产生冠瘿瘤。这主要是依赖于农杆菌中的一个大的环状质粒(Ti质粒),其中有一段能够转移到植物的T-DNA片段。T-DNA含有编码植物激素酶系的基因(这些激素过量表达则导致冠瘿瘤形成)及对其转移时必要的片段。当农杆菌感染植物伤口细胞时,能把Ti质粒的T-DNA转移到植物细胞,并随机地插入植物基因组中。它启发人们,以外源有益基因替代产生冠瘿瘤等基因,而保留具有转移作用的部分,即构成一个强的载体转移基因系统,使之感染植物原生质体(细胞去壁即形成受伤状态)或植物组织,再使之形成植株。这便产生了用农杆菌(T-DNA)为载体的转移体系。

现在已比较清楚,转移外源基因的整合只需T-DNA两端小片段,为了检查外源基因是否插入整合,可加入标记基因、报道基因,去除T-DNA的致癌基因,使受体植物能正常发育成转基因植物。

采用共培养技术,即把受体的原生质体或叶盘与含外源基因的载体——根癌农杆菌一起培养,经感染处理后的转化的原生质体或叶盘能被选择,再诱发形成转基因植株。Herrera - Estrella (1983)改良共培养方法,将氯霉素乙酰转移酶基因(CAT)转移到烟草原生质体中,并能表达。其转化频率高者可达3~4%。其转化频率可能和染色体的倍性、细胞周期、培养基中生长激素水平有关。

目前,已建立了不少行之有效的载体,如pGV3850, pGV3851,前者来自pTiC58,其T-DNA上的致癌基因(Onc⁻)已被pBR322的一部分所取代,为非致癌载体。后者比pGV3850只多一个tmr基因,它能使转化细胞恢复再生芽的能力。另一种,用发根农杆菌(*A. rhizogenes*)的Ri质粒的T-DNA也广为使用(Tepfer, 1984)。

近年,又发展了一些双元载体,由 T-DNA 和 Vir 区分别克隆的 2 个复制子组成, Vir 区的反式互补功能使 T-DNA 转移到植物基因组中, An G (1988) 构建的双元载体,为把 T-DNA 克隆到 pRK2 的复制子上,使之在大肠杆菌和农杆菌中都能复制,去除致癌基因,保留边界序列,并引入抗卡那霉素的 NPT II 标记基因,再引入多克隆位点,以便插入目的基因。再在 mini-Ti 中插入 COS 位点,构建粘粒(cosmid)载体、组装上表达启动子,构建成表达载体。这种双元载体可以转到根癌农杆菌中去,即可有广泛的宿主(受体)植物。

目前,载体转移外源基因的技术主要在双子叶植物中应用。其受体小者如原生质体,大者如叶、茎、根等组织。用标记基因、病毒外壳蛋白基因、卫星 cDNA、B.T. 毒蛋白基因、蛋白酶抑制剂基因、除草剂基因等为供体,转化成功的植物多达百种,如烟草、矮牵牛、番茄、甘薯、拟南芥菜、向日葵、莴苣、油菜、甜菜、亚麻、棉花、芹菜、苜蓿、大豆、白杨等双子叶植物(Uchimiya, 1989)。

虽然,大多数单子叶植物,尤其是禾谷类作物,对根癌农杆菌不敏感,主要障碍是它难以附着或结合到这类植物细胞表面。最近唐惕等(1990)研究证明,根癌农杆菌可有条件地感染水稻芽鞘及根尖。以含 HYP(抗潮霉素)及 GUS(葡萄糖酸苷酶)报道基因的农杆菌经过乙烯丁香酮的处理成功地转化了水稻的组织,获得了转基因水稻植株。发现转化频率还受农杆菌的类型、受体组织的预培养等条件的影响。

我国科学家利用载体转移有用目的基因,将人的 α -干扰素基因成功地转入了烟草,获得了转基因烟草,并且表达的干扰素产物有抑制病毒活性(陈炬, 1988)。以黄瓜花叶病毒(CMV)的卫星 cDNA 转化番茄(赵淑珍, 1990)、烟草(吴世宣, 1988),都取得显著能抗 CMV 病毒病的番茄和烟草,其后代已进入大田试验。

借助载体转化体系将苏云金杆菌的 δ -内毒蛋白基因转入了烟草(田颖川等, 1991)、棉花(谢道昕, 1991)、水稻(谢道昕, 1991)、

杨树(伍宁丰等,1990),也证明这个转化体系是有效的。

以上述转化体系所得转基因植物,在外源基因表达的水平,在后代中的遗传稳定性,以及受体有益性状的表现都有待进一步分析研究。

2. 直接转移外源基因 由于前述载体转移基因体系对单子叶植物,特别是禾本科作物缺乏有效性,因此,在80年代发展了直接基因转移技术体系,即不使用T-DNA及农杆菌载体,而是把外源基因修饰重组后,以质粒DNA的形式(直链或环链)直接转化原生质体或其他组织、器官,获得了许多转基因植物。表明不用T-DNA载体系统,直接转化原生质体是更简单易行的。随着禾谷类原生质体再生植株的问题取得突破,已获得了一批转基因的水稻(朱桢,1991;田波,1992)、玉米等植物。发展了许多不同的直接基因转移方法,如化学的PEG法、脂质体法;物理的电穿孔法、基因枪法、显微注射法等。

目前,植物遗传工程中使用最为广泛的是PEG法和电穿孔转化方法,基因枪等其他转化方法的效率也还在不断探索。

(1)PEG转化法 利用原生质体摄取外源DNA分子的特点,成功地使聚乙二醇(PEG)诱导外源DNA进入原生质体的转化方法,已成为广为使用的基本方法(Krens,1982)。Shillito(1985)把PEG和热击处理结合起来处理烟草原生质体和含有标记基因的质粒DNA,先热击处理原生质体,加入DNA后再经PEG处理的程序,取得了较高的转化频率(0.2~2%)。Negrutiu(1987)在此基础上,先用氯化钙代替热击处理烟草原生质体,加入DNA后,再以PEG处理。结果,每 3×10^5 个原生质体中获得了1400个转化体(最后选出的克隆),转化频率约为4.8%。Lyznik(1989)以玉米原生质体为受体,用PEG转化方法,使非选择性的GusA基因和选择性基因Neo(NPT II)共转化,获得了 1×10^{-4} 的转化频率,比电穿孔转化法高10~100倍。成为遗传工程中最常用而有效的转化方法。它可以避免嵌合转化体,更重要的是易于选择转

化体,和早期分析转化的动态。

(2) 脂质体介导转化法 脂质体是由磷脂、胆固醇(cholesterol)和脂肪酸等脂类分子组成的球形双层膜结构,使包在脂质体内的 DNA、RNA 等大分子可免于受到细胞内源核酸酶的降解作用;同时在 PEG 的作用下,可以更有效地进入受体原生质体(Dellaporta, 1981)。实验结果表明用脂质体包裹的质粒 DNA 分子后,以 PEG 法在转化烟草原生质体时,其转化频率可达到 10^{-8} 以上(Zhu, 1989)。为了避免在包裹 DNA 时超声波和有机溶剂对 DNA 的损伤,通常使用去垢剂透析法制备脂质体。也有人使用反相蒸发法。

最近美国出售一种转化脂(lipofectin),它由 DOTMA 丙酰(N,N,N-三甲氨的盐酸盐)和磷脂组成的小单层脂质体(suv),它具有较强的正电荷。将转化脂与 DNA 简单地混合,即可形成转化脂与 DNA 的复合物。用此转化水稻原生质体,可以将转化频率提高到 10% 以上(Zhu Z., 1990)。由于有商品出售,免去耗时的制备工作,简化了实验程序。因此,脂质体介导转化原生质体法是值得广泛试用的一种转化方法。

(3) 电穿孔转化法 电穿孔法转移外源基因是基于 Neumann (1982) 的实验。用短时、高脉冲电处理可导致细胞膜出现可恢复性孔隙,从而发生新的渗透孔(3~4nm),为外源 DNA 分子进入细胞提供了通路。此孔隙形成的数量和大小与电场强度有关,它也关系到进入的 DNA 的量。因此电场强度是影响转化频率的重要参数。用此法迅速而有效地转化基因,已被用于多种生物,如细菌、真菌、动物细胞及植物的原生质体和细胞。1985 年以来在烟草(Shillito, 1985)、胡萝卜(Fromm, 1985)、玉米(Fromm, 1986)、水稻(Toriyama, 1988)等原生质体的转化中取得了成功。然而这些研究多限于标记基因,目的在于建立有效的转化体系。其转化率,在玉米中可达 1%,转化的水稻原生质体已再生可育的后代。表明此法对单子叶植物的直接转化也具有重要的使用价值。虽然

它的转化频率没有 PEG 法那么高,但是它比 PEG 法简便、迅速。

(4)基因枪转移基因法 近年开发的一种机械转移基因的方法,使外源 DNA 随着高速微弹进入植物细胞或原生质体(Klein, 1987)。微弹为 $0.2\sim 2.0\mu\text{m}$ 的钨粉,用超声波使外源 DNA 液均匀地包裹微小的钨粉颗粒。利用手枪的动力原理发射出微弹与 DNA 的复合体,并击中靶细胞,穿透细胞壁或原生质体膜,进入细胞或原生质体,从而为进一步整合到基因提供了机会。适宜的速度,与靶细胞的距离,微弹的直径、速度、射击的扩散半径的大小,以及外源 DNA 的量和预处理条件都是影响转化频率的重要因素。初期曾作为研究基因暂时性表达的工具,后来成为稳定的基因表达的一种转化方法(Klein, 1989)。用此法将 NPT II 和 GUS 标记基因转入了玉米细胞,并在其再生的愈伤组织中,以 Southern Blot 法检出了 NPT II 及 GUS 基因片段。利用此法,在单子叶植物、双子叶植物都获得稳定的基因表达(Klein, 1989)。它为重要农作物的基因工程提供了方便的技术。近来开发一种气动的基因枪。受体也扩大到胚、组织等。问题是价值昂贵、转化频率偏低,嵌合体不易排除,更不易选择转化体,后效还有待分析,技术有待进一步改进。

(三)目的基因的克隆和修饰

1. 目的基因的克隆 目前,已被鉴定和克隆的可供植物遗传操作的有益基因多达几百个,它们分别来自微生物、植物、动物和人体,并分别与农作物的抗病、抗虫、抗盐碱、抗除草剂等抗逆性有关。一批与贮存蛋白、淀粉合成、光合、固氮及雄性不育等性状有关。一些来自人和哺乳动物的基因,如人的干扰素基因,白蛋白、血清蛋白等基因,可能与医疗、药物生产有关,而另一些,如比目鱼的抗冻基因等,都先后被用为植物遗传操作的对象。

(1)与抗逆性有关的基因:如烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、卫星 RNA、马铃薯卷叶病毒(PRV)、X 病毒、Y 病毒、大麦黄矮病毒等的外壳蛋白基因(CP)都已被鉴定和克隆。试

图利用交叉感染机制,使转基因植物产生抗相应病毒的作物。我国已经克隆了 CMV 卫星 RNA 的基因(张春霞,1990)、TMV-CP 基因(方荣祥,本书)。经修饰、重组、转化已获得有一定表达能力的转基因烟草、番茄。

近年,由真菌克隆了几丁质酶基因,它将对解决由真菌传播引起的稻瘟病有潜在的防治作用。此外,还克隆了苯丙烯酰合成酶(CHS)及苯丙氨酸裂解酶(PAL)的基因,二者与苯丙酸类代谢的生物合成黄酮类的酶有关。二者的表达产物可防治真菌引起的棉桃腐烂病。

较早的研究苏云金杆菌(B.t)的毒蛋白(Barton,1987),并从 B.t 的以色列变种克隆了 δ -内毒蛋白基因(陈骥,1989)。这种基因表达产生的伴孢晶体蛋白能特异地在取食的害虫消化道内(碱性)裂解成多肽,造成害虫消化道损伤而中毒。然而这种 B.t 毒蛋白的抗虫谱窄,并且,害虫易产生抗毒性而失效,这使一些科学家忧心忡忡。对它的修饰、改造工作是艰巨的。孟山都公司已经修饰和重组一种较为有效的克隆,正在测试之中。

然而人们发现害虫不吃的一种豇豆,并由它分离和克隆了称为 CpTI(胰蛋白酶抑制物)基因(Hilder et al., 1989),它与 B.t 毒蛋白迥然不同。它的抗虫机制是它与取食害虫消化酶能特异结合,使害虫失去消化蛋白的能力导致厌食或死亡。它的两大优点是,一是不易使害虫产生耐受性(与 B.t 不同),二是它能广谱抗虫,一个基因能防御很多害虫,如鳞翅目、鞘翅目、直翅目的 70% 以上的害虫,而对人畜无危害(Newmark,1987)。1990 年我们已经用 PCR 等技术分离、克隆了 CpTI27,及 CpTI 7 大小不等的两个基因克隆(刘春明,1991)。初试结果,产生了显著抗虫的烟草(刘春明,1992),表明是一个很有效的抗虫基因。此外,在欧美由马铃薯、大豆、大麦、番茄中分离出不同型的蛋白酶抑制剂基因(Ryan,1989)。但是它对蚜虫、稻飞虱等抗虫效果不理想。最近,英国又克隆了对蚜虫等吸管害虫有防御能力的 lectin 基因(凝集

蛋白)。将可能对水稻、小麦、蔬菜等作物起到更有效的抗虫作用,但是它的凝集作用对人的影响尚需研究。

(2)与抗盐碱有关的基因 近年我国已由黑麦中分离和克隆了脯氨酸合成酶基因(ProA gene),经修饰、重组、转化烟草,获得了能在1%NaCl的条件下正常生长的转基因烟草植株。它的机理可能是调整渗透压的结果(汤成章,1990)。该基因对适应我国大面积盐碱地作物改良有潜在价值。抗除草剂的阿特拉津基因也已克隆,并在转化中获得转基因大豆植株(刘博林,1989)。

(3)与蛋白质有关的基因 先后由菜豆、大豆、玉米、水稻、小麦、马铃薯等作物分离和克隆了一批贮存蛋白基因及与蛋白有关的酶基因(Okita, 1991; 范云六, 本书),对它们进行了修饰和重组研究(Okita, 1990)。武志亮(1990)还首次由水稻克隆了蜡质基因(WX gene),它是控制胚乳和花粉粒中直链淀粉合成的基因。它特异地在胚乳中和花粉粒中表达,并受发育阶段的控制。对它的研究将有助于调控作物中淀粉组成。对马铃薯淀粉合成的关键酶基因业已克隆,并对它进行了表达及调控的研究(Okita, 1990)。

(4)与固氮有关的基因 研究受到很大重视,虽然其复杂程度高,但也取得相当的进展。如豆血红蛋白基因已被克隆(荆玉祥, 1991)。固氮时控制结瘤的基因群的调控关系也已被深入地研究了(洪国藩, 1991)。

(5)与光合作用有关的基因 主要集中在叶绿体基因组的研究,如编码 RuBP 羧化酶的大亚基与小亚基的基因(rbc-L, rbc-S),前者由叶绿体基因组控制,后者由核基因组编码。提高光合效率的基因,如小麦、玉米的光系统 I 及光系统 II 的反应蛋白(PsbA, PsaB)基因已分离并克隆(吴乃虎, 本书)。编码 C₃ 及 C₄ 的基因也被克隆出来。与花色素形成有关 CHS 基因是类黄酮糖苷的代谢途径的关键酶基因,也已被克隆。这些对提高光合作用、或控制花色将起重要的作用。

2. 目的基因的修饰 迄今,植物遗传工程所能转移的仍局限

于一些较为简单的基因,在转移之前必须对这些目的基因进行必要的修饰,使之在受体细胞中能整合并表达,即使之按部位、按时转录、复制、转译及后加工表达。这些是受专一的分子元件调控的。如豌豆的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶-加氧酶(rubisco)基因是催化光合作用的基因,当把它转入矮牵牛时,既表现有豌豆的许多特性,又能形成矮牵牛的 rubisco,但是,此基因只在矮牵牛叶片中表达,却不能在根中表达;它只受光调节表达,而不能在黑暗中表达。如能搞清楚调控机理,对提高光合效率会发挥更大作用。

现已初步探明,外源基因插入受体基因组后,其表达过程受基因转录、转录后加工、转译及转译后加工等一系列步骤的影响。植物细胞对这些步骤进行调控,控制外源基因的表达方式、表达水平。因此主动修饰目的基因,以控制它各步骤的表达是非常必要的。如对结构基因 5'端及 3'端的调控区,特别是对 5'端的启动区的修饰,是必不可少的,如各类启动子,增强子等正确组装,以及对以后的各步骤的调控对基因完整、准确的表达产生重大的作用。这些已成为分子遗传学及遗传工程的中心课题(详细请参阅本书第三章)。

(四)转基因植物及基因表达

分子生物学家研究了一些标记基因在植物中表达和遗传模式的工作取得了不少新的技术性进展,现在对有生产价值的基因的遗传工程又做出了举世瞩目的成就。

1. 抗病毒的遗传工程 将合成的黄瓜花叶病毒 CMV 卫星 RNA-1 的 cDNA 单体重组到含 CaMV 的 35S 启动子的植物表达载体 pRok2 上,并转入含 Ti-质粒的根瘤农杆菌中,感染烟草叶盘,再生的植株接种强毒分离物后,大部分转移植株有大量卫星 RNA 的表达,病状减轻(田颖川,1990,1991;吴世宣,1992)。将黄瓜花叶病毒的卫星 RNA 单体及双体基因转入番茄,能正确表达,表明转基因番茄植株能干扰病毒的复制,能显著抗病毒感染(赵淑珍等,1990)。同法将此基因转入甜椒,也已获得抗病的转基因植

株(李春玲,1991)。

2. 杀虫遗传工程 将苏云金杆菌 δ 内毒蛋白的 cDNA 转入烟草和番茄,幼虫取食其转基因植株叶片的 48 小时后即行死亡,而叶片只有一点损伤。但其杀虫效果不同。目前,已成功地将 BT- δ 内毒蛋白 cDNA 转化了棉花(谢道昕,1991)、杨树(伍宁丰,1990)、水稻(谢道昕,1991),获得了转基因植物。进一步表达,杀虫性及害虫对它的抗毒适应性还有待观察。

近年中科院遗传所由豇豆中分离和克隆了一种能广谱抗虫的胰蛋白酶抑制剂基因(CpTI7, CpTI27)(刘春明,1992)用以转化烟草,其再生的转化植株含有 CpTI cDNA 的分子片段,转基因烟草的虫试结果,表明能显著地抗虫,二龄虫放食后经 3 天即死亡,或厌食,不能发育(刘春明,1992)。CpTI 基因的优点是能广谱抗虫(鳞翅目、鞘翅目、直翅目等)且害虫不易对它产生抗药性。它极可能成为最有希望的抗虫基因用于棉花、杨、松树等遗传工程,将可产生重大经济效益。

黄自然等(1991)已克隆了一种能广谱杀菌和抑制病毒的柞蚕抗菌肽(36 肽),转入烟草后(1992),分子杂交已证明它已被转入烟草植株,正在测试其抗青枯病的作用(农生技术信息,1992,6:2)。邹勤、黄大年等利用蚕抗菌肽以增强水稻抗病能力的研究中,已鉴定出家蚕抗菌肽 β 组分对水稻白叶枯病菌有抑制作用。而且 β 、 γ 、 δ 三个组分混合的粗制品也有明显抑制白叶枯病菌的效应(农业生物技术信息,1992,6:2)。

3. 抗除草剂基因工程 将抗除草剂阿特拉津的 cDNA 通过花粉管注射到子房中获得了转基因的大豆植株,其种子后代能明显抗阿特拉津除草剂(刘博林等,1989)。

4. 干扰素遗传工程 人体 α -干扰素即有抑制 TMV 病毒的作用,可否抑制植物其他病毒或利用植物生产人干扰素的可能性?1988 年我们将人 α -干扰素 cDNA 结合于根癌农杆菌中,以叶盘法转化烟草,由叶盘再生植株中选出能表达人 α -干扰素植株,

DNA 分子杂交检验证明其含有 α -IFN 片段。在植株中能产生相当量的 α -干扰素(2048u/g)(陈炬等, 1988), 1989 年我们(朱桢等, 1992)又成功地将人 α -IFN 基因通过直接基因转移法转入水稻。即先使含有人 α -IFN cDNA 和 lipofectin(转化脂)均匀混合后用来转化水稻悬浮细胞原生质体, 选择的转化体再生植株中除分子杂交证明植株含有 α -IFN 及 NPT II 分子片段外, 植株中还有 α -IFN 的明显表达, 植株提取物中含有 2040u/mg 的抑制病毒活性的 α -干扰素。这一结果表明人的 α -干扰素在适当的修饰后可以在植物(双子叶及单子叶植物)中完全表达, 并能抑制人羊水细胞中的动物滤泡性口膜炎病毒(WSV)。它的种子后代的遗传能力正在研究中。

5. 抗盐抗寒遗传工程 美国 DNA 植物技术公司将来自比目鱼的抗寒基因成功地引入番茄, 使番茄果实经受冷冻不坏, 正申请美国大田试验(ABC, 1991, 15(13)54383; 13(9) 51742)。将含有脯氨酸合成酶基因的根癌农杆菌以叶盘法转化烟草, 得到的转基因烟草在含 1% NaCl 培养基中表现比未转化的对照植株生长旺盛, 有较强的抗盐能力。其种子后代仍保留有 ProA 基因和 NPT II 基因的表达, 并仍表现出一定的抗盐能力(汤成章, 1990)。

(五) 外源基因能否遗传

植物遗传工程, 特别是种子植物遗传工程其重要的一环是已转入的外源基因能否持续地在受体中表达, 传递下去。以标记基因为例, 用卡那霉素与烟草实验表明在转基因烟草植株的自交后代中抗卡那霉素特性出现了 3:1 分离。转移菜豆蛋白基因到烟草中, 其种子后代该基因按孟德尔显性规律遗传(Uchimiya, 1990)。当把抗除草剂的 bar 基因转入烟草, 其后代中的抗除草剂特性也表现为孟德尔式遗传。说明转移标记基因到异源受体中, 是可以遗传给后代的。

在转移抗病毒的黄瓜花叶病毒的卫星 cDNA 的转基因烟草植株种子后代仍保持大量卫星 RNA 的表达及对 CMV 的抗性, 并表