



第五章 转基因植物

湖南师范大学生命科学学院

袁蓂洲



本章目录

5.1 植物的转基因技术

5.2 转基因植物的筛选与检测

5.3 转基因植物研究和生产现状

5.4 转基因植物的安全性



第一节 植物的转基因技术

- 植物转基因的基本路线
- 植物表达载体的选择
- 植物转化受体系统
- 外源基因导入植物的方法

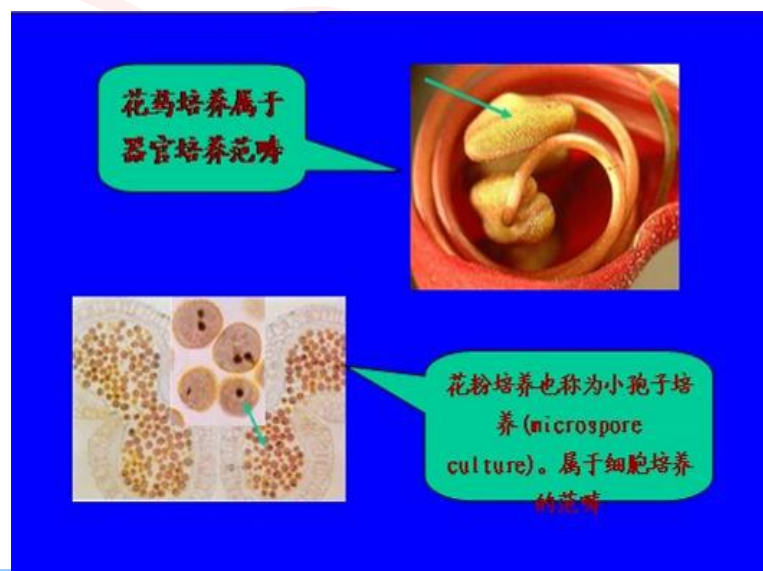
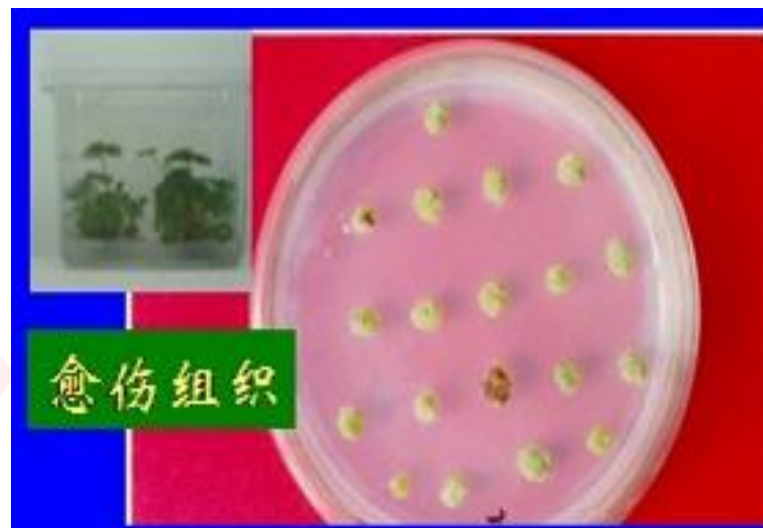


一、植物转基因的基本路线

- 1) 分离目的基因
- 2) 将目的基因与载体连接，形成重组DNA
- 3) 利用细菌繁殖扩增重组DNA
- 4) 将与表达载体相连的重组DNA导入到目标植物的细胞中
- 5) 筛选转化细胞，并诱导产生转基因植株
- 6) 转基因植株大规模种植

二、转基因的受体系统

- 1) 植物组织受体系统
- 2) 植物细胞原生质体系统
- 3) 生殖细胞受体系统
- 4) 叶绿体转化系统





三、外源基因导入植物的方法

DNA直接转移法

Ti 质粒载体介导法



1. DNA直接转移法

1) 化学刺激法

PEG、PNA（肽核酸）、磷酸钙、氯化钙等化学试剂等处理原生质体，可使其捕获外源DNA。

2) 电击法

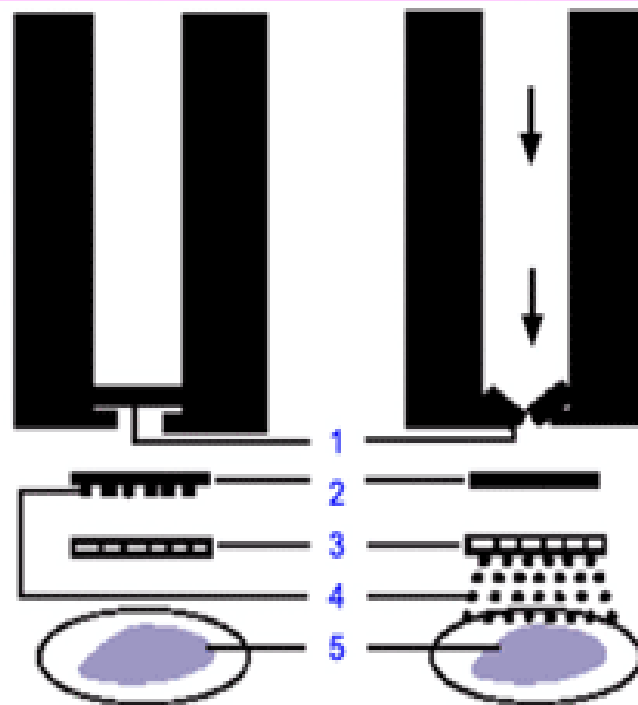
在适当的外加电压下，细胞膜可能被击穿，使得外源DNA容易进入细胞内。原生质体不受伤害，而且膜孔可恢复。

3) 显微注射法

借助显微注射仪，将外源DNA通过机械方法直接注射到受体细胞。

4) 基因枪法

基因枪法，也称微粒轰击法，是将DNA包被到金粒或钨粒中然后把这些粒子加速推进靶细胞。优点是转化受体迅速简单、取材广泛，不受基因型限制，金属微粒的喷射面广，植株可育性高，转化频率高等。





5) 脂质体介导法

是将DNA或RNA包裹于脂质体内，然后进行脂质体与细胞膜的融合，通过融合导入细胞。转化效率较高，简单易操作，重复性好。

6) 微激光束法

利用激光微束脉冲引起细胞膜可逆穿孔，从而将外源DNA导入受体细胞。

7) 花粉通道法

将外源DNA片段在自花授粉后的特定时期注入柱头或花柱，外源DNA沿花粉管通道或传递组织通过珠心进入胚囊，转化不具备细胞壁的受精卵，合子或早期胚体细胞。由于转化的是完整植株的卵细胞、受精卵或早期胚胎细胞，导入的DNA分子整合效率较高。

2. Ti 质粒载体介导法

豆科类植物的根部常常会形成根瘤，这是由于植物根部被一种革兰氏阴性土壤杆菌农杆菌根瘤菌

(*A. tumefaciens*) 感染所致，其致瘤特性是由该菌细胞内的野生型质粒 Ti (Tumor-inducing) 介导的



Ti 质粒的结构图谱

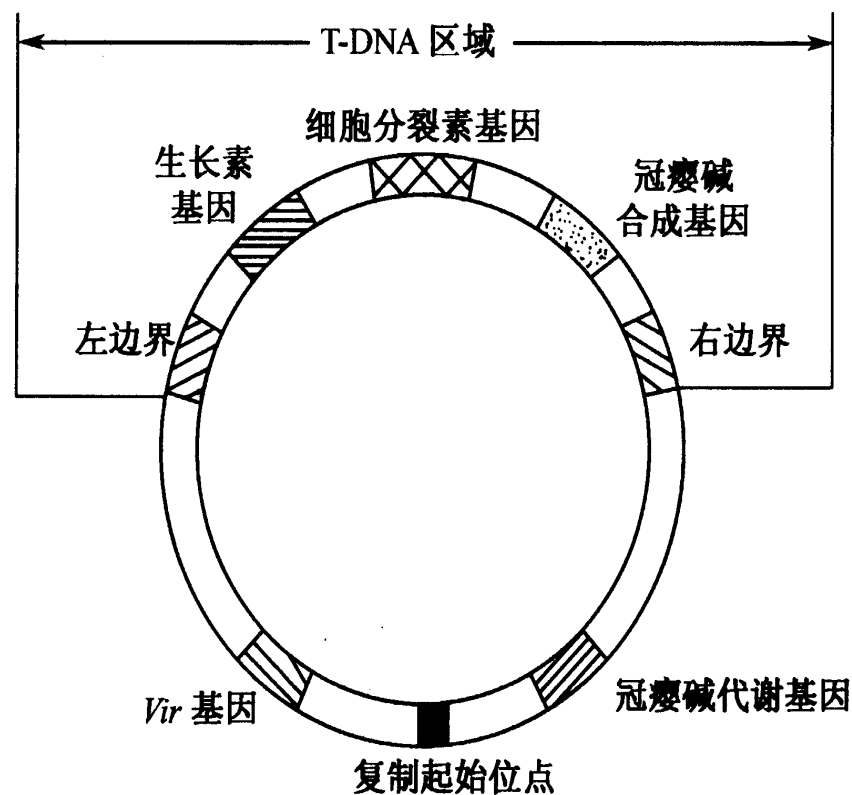
天然Ti质粒的结构可
分4个区：

复制起始区

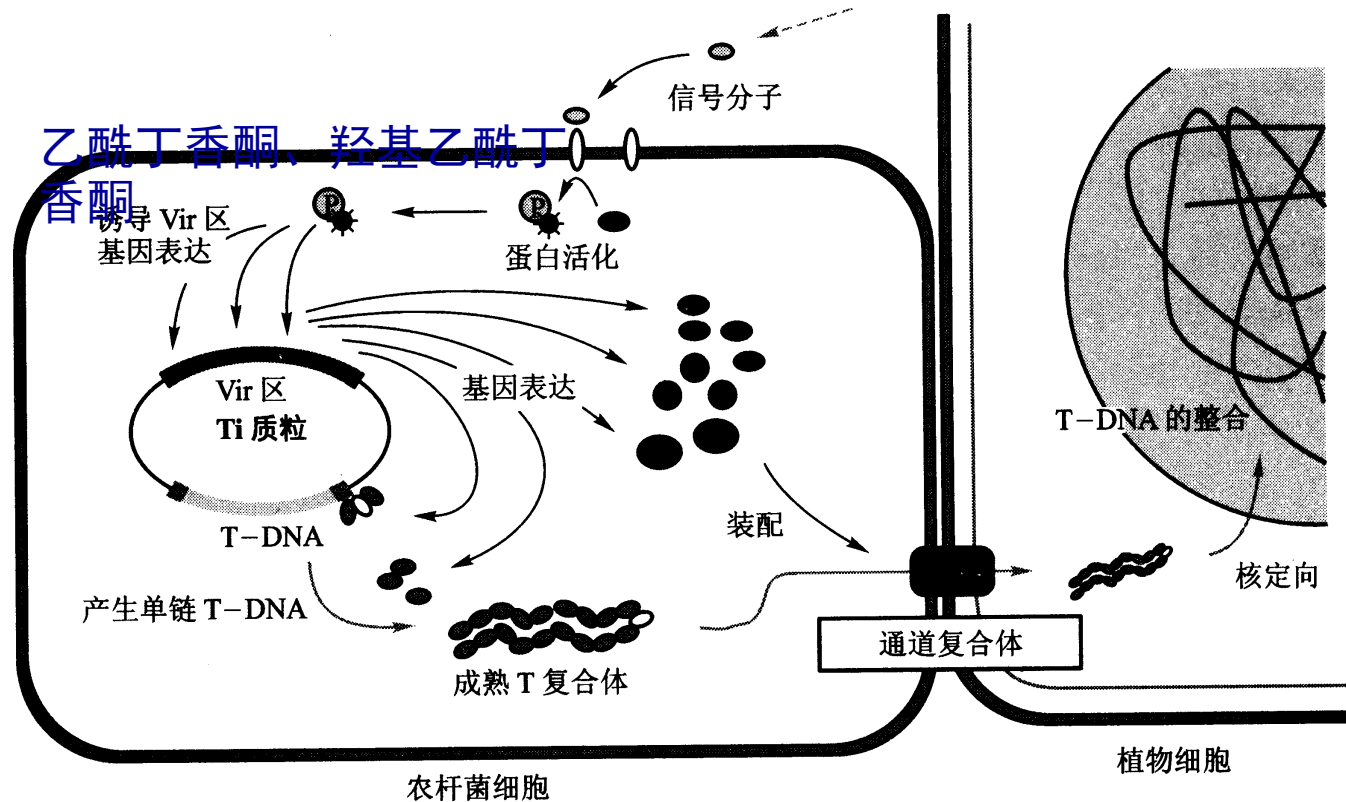
结合转移区

转移DNA区 (T-DNA区)

毒性区 (Vir区)



Ti 质粒致瘤的分子机制



乙酰丁香酮和羟基乙酰丁香酮，能诱导Ti质粒上的*vir*基因以及根瘤菌染色体上的一个操纵子表达。VirD2蛋白将T-DNA从边界末端第3和第4碱基处切下单链T-DNA。同时单链T-DNA与VirE2蛋白形成单链T-DNA转移复合体，穿过VirB蛋白在细胞膜上形成的通道，到达植物细胞，使T-DNA与植物基因组整合。



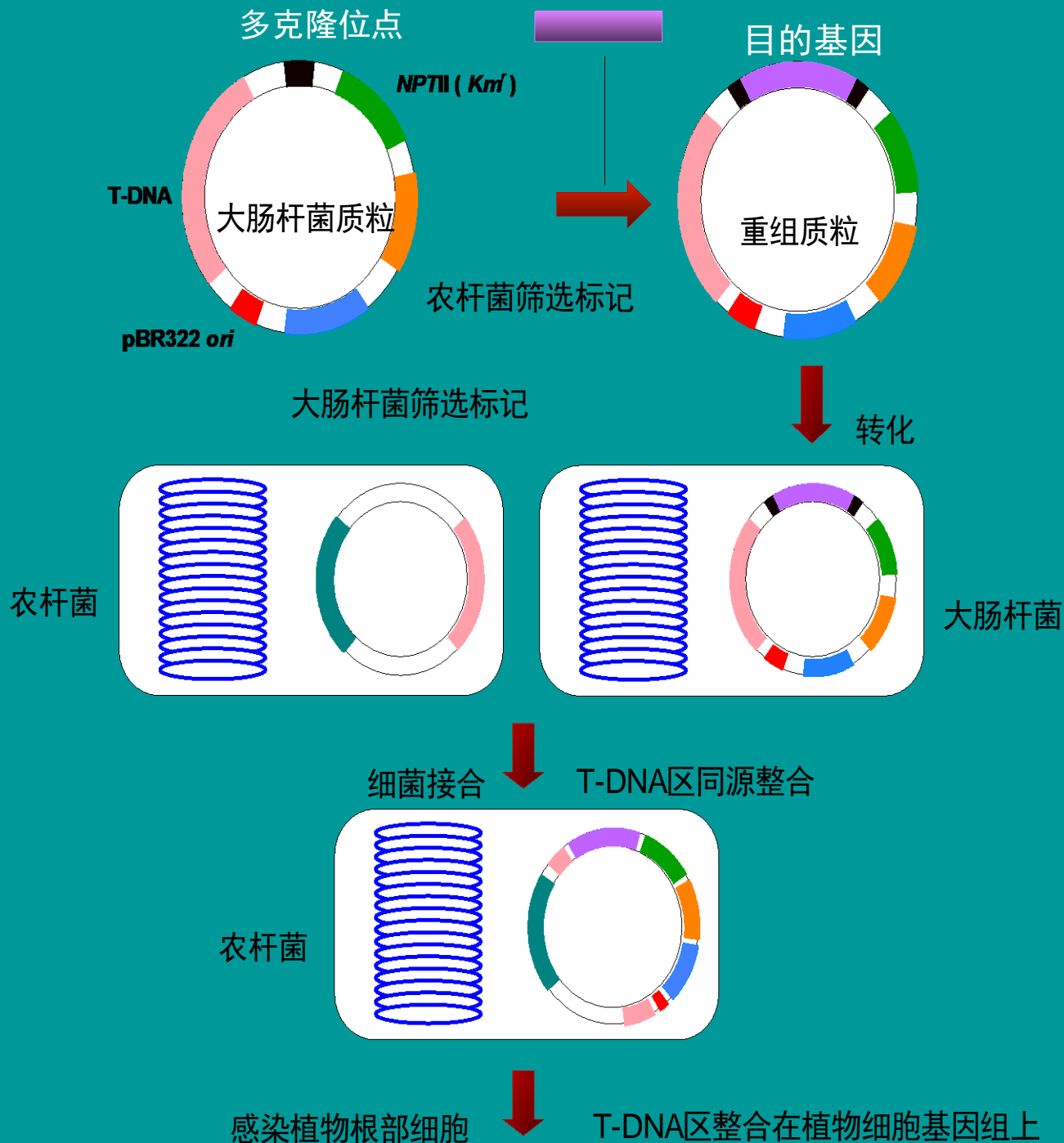
Ti 质粒的改造

- ① 使载体具备2个DNA复制原点。一个作为大肠杆菌的复制位点，一个作为农杆菌的复制位点，即构建称为大肠杆菌-农杆菌穿梭载体；
- ② 至少具备2个筛选标记：一个是植物选择标记基因，便于转化植物细胞后的选择；一个是细菌的选择标记，便于载体构建和克隆的筛选。
- ③ 减小质粒分子量。天然质粒由于分子量太大不利于克隆操作，因此要尽量减小质粒分子量。通常将T-DNA上的三个结构基因去除，代之以目的基因和植物筛选标记。同时将Ti质粒上其他非必须序列也要去除。
- ④ 删除质粒上多余的酶切位点，增加多种酶的单一酶切位点即多克隆位点。

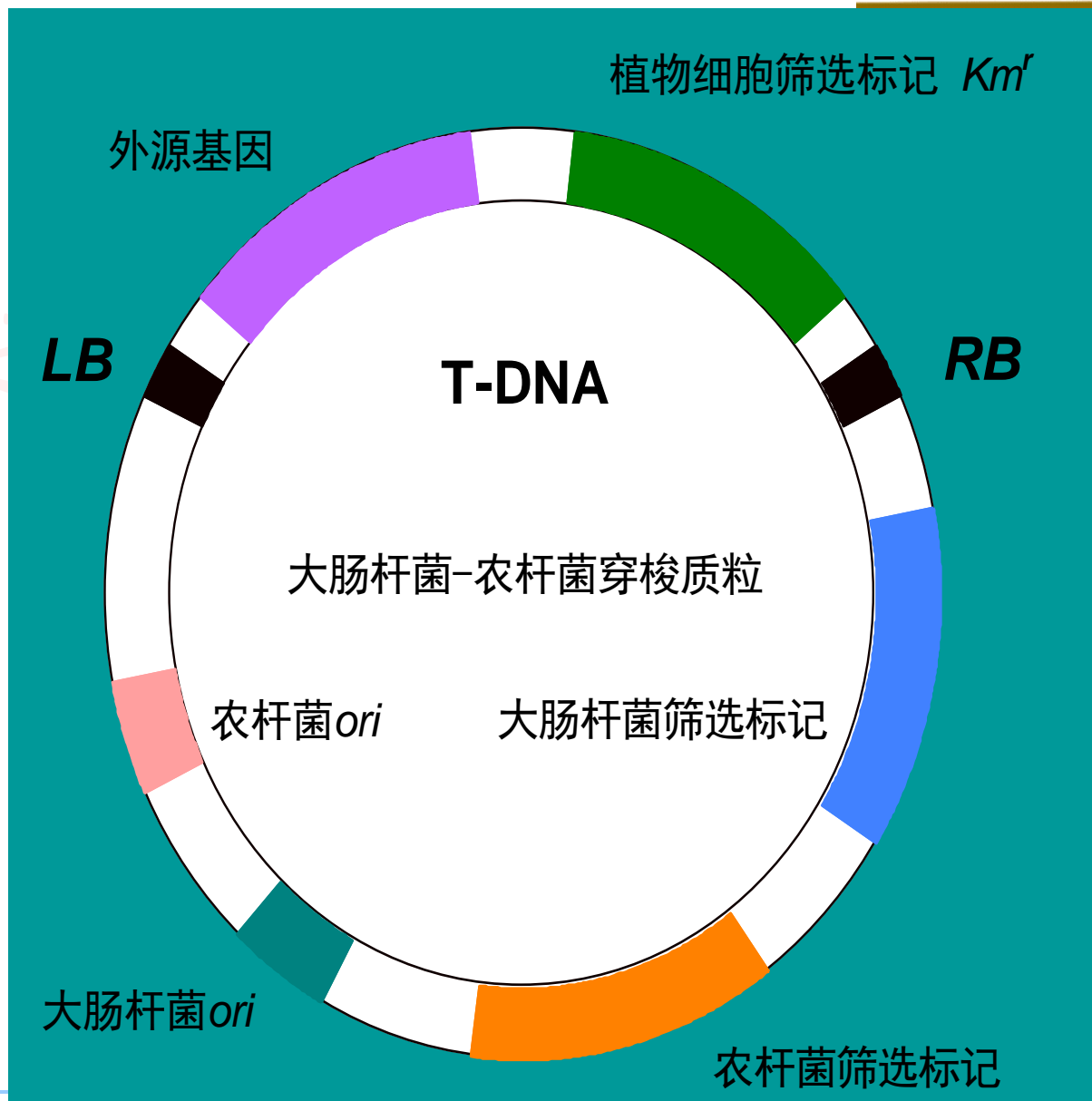
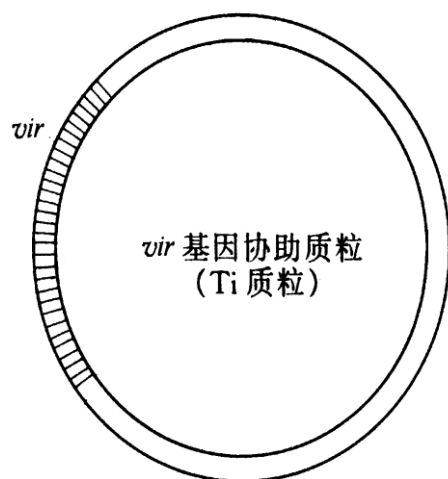


共整合载体系统

先通过pBR322插入一段T-DNA区段构建中间载体，克隆目的基因。再将含有中间载体的大肠杆菌与含有Ti质粒的农杆菌进行细菌融合，两个质粒通过T-DNA的同源区段发生同源重组，最后在农杆菌内得到vir共整合的Ti质粒载体。



双元载体系统





第二节 转基因植物的筛选与检测

- 报告基因检测
- 分子生物学检测方法



一、抗生素抗性基因

- *npt*, 新霉素磷酸转移酶基因, 对卡那霉素、G418, 巴龙霉素及新霉素等具有抗性;
- *aph* IV, 潮霉素磷酸转移酶基因, 对潮霉素具有抗性;
- *spt*, 链霉素磷酸转移酶基因, 对链霉素具有抗性;
- *cat*, 氯霉素乙酰转移酶基因, 使氯霉素丧失抗菌素活性。
- *aacc*, 庆大霉素3-N-乙酰转移酶基因, 对庆大霉素有抗性;
- *b1e*, 博来霉素抗性基因, 对博来霉素有抗性。



二、抗除草剂抗性基因

- *bar*, 编码膦化麦黄酮乙酰转移酶 (PAT), 使PPT (膦化麦黄铜) 的自由氨基乙酰化而对PPT解毒。抗除草剂草丁膦和双丙氨膦;
- *epsps*, 草甘膦抗性标记基因, 抗草甘膦;
- *a/s*; 绿黄隆抗性标记基因。



三、显色或发光报告基因

- GUS酶活性检测

GUS使 β -葡萄糖苷酶，能催化裂解一系列的葡萄糖苷，产生一系列具有发色基团或发荧光的物质，可用分光光度计、荧光计或组织化学法对GUS活性进行定量和空间定位分析，检测方法简单灵敏。

- 荧光素酶活性检测

荧光素酶催化的底物使6-羟基喹啉类似物，在镁离子、ATP及氧的作用下酶使底物脱羧，生成激活态的氧化荧光素，发射光子后，转变成常态的氧化荧光素。

绿色荧光蛋白检测

GFP产生绿色荧光蛋白，在395nm和490nm的波长下发出独特的绿色荧光。





四、 分子生物学检测

- 酶联免疫检测 (ELISA)
- PCR技术检测
- 分子杂交

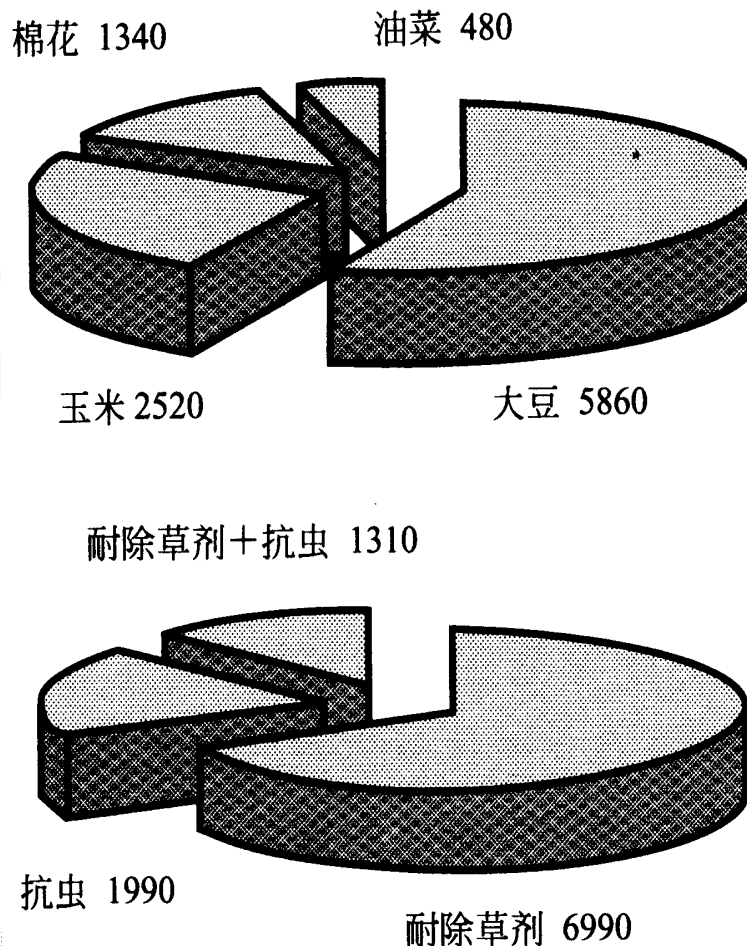


第三节 转基因植物研究和生产现状

- 抗除草剂转基因作物
- 抗虫转基因作物
- 提高作物产量和品质的转基因作物
- 其他转基因作物
- 植物生物反应器

转基因植物现状

- 批准商业化种植有100多个转基因作物品种
- 两种类型：
 - 输入性 (input)
 - 输出性 (output)
- 4类主要农作物 (大豆、玉米、棉花和油菜)





一、抗除草剂的转基因植物

- 抑制农作物对除草剂的吸收
- 高效表达农作物体内对除草剂敏感的靶蛋白
- 降低敏感性靶蛋白对除草剂分子的亲和性
- 向农作物体内导入除草剂的代谢灭活能力



1、抗除草剂bar基因的工作原理

- PPT是目前广泛使用的除草剂的成分，杀草谱广，对植物的地上部分和地下部分均有枯杀作用，在土壤中易被代谢分解，残留期短，半衰期只有2—3天。
- 谷氨酰胺合成酶GS在植物的氨同化及氮代谢过程中起重要的作用，是植物体内唯一能够解除由硝酸盐还原、氨基酸代谢及光呼吸中释放出来的氨毒性的解毒酶。
- PPT能够强烈抑制GS的活性，导致细胞内氨的含量的迅速积累。抑制光系统I和光系统II反应，减少跨膜PH梯度，使光合磷酸化解耦联，随之叶绿体结构解体，整个植物死亡。
- bar基因编码PPT乙酰转移酶，催化乙酰辅酶A的乙酰基转移到PPT的氨基上，形成乙酰PPT，而使PPT失活。



抗除草剂的水稻

基因工程





2、抗除草剂作物的优点

- ①简化除草管理，减少喷洒除草剂的次数；
- ②可以不用或少用机械除草，节省燃料；
- ③避免机械除草造成土壤水分丢失和土壤侵蚀；
- ④避免使用其他高毒性和残留性的除草剂，保护环境。



3、抗除草剂作物的缺点

- ①可能通过基因漂流使几种除草剂抗性基因在杂草中堆叠，形成超级杂草；
- ②长期大面积使用一种除草剂易诱发杂草抗性产生；
- ③不利于多样性作物种植系统的实施；
- ④杂草种子减少，影响野生鸟类的食物链等等。



二、抗虫转基因植物

苏云金芽孢杆菌的**毒晶蛋白基因**

蝎毒素、蜘蛛毒素基因

蛋白酶抑制剂基因

淀粉酶抑制剂基因

几丁质酶基因

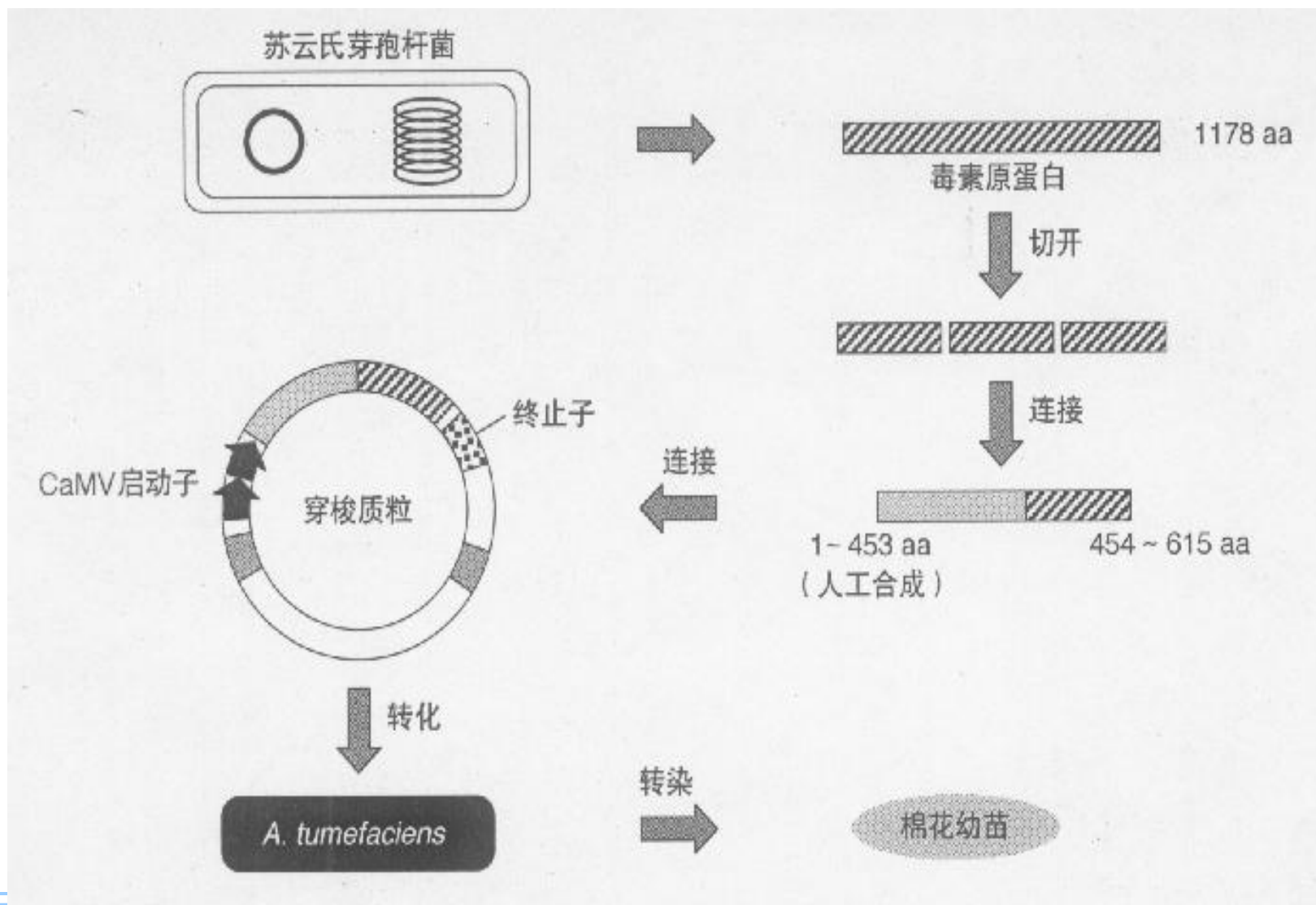
凝集素基因



1、Bt的种类

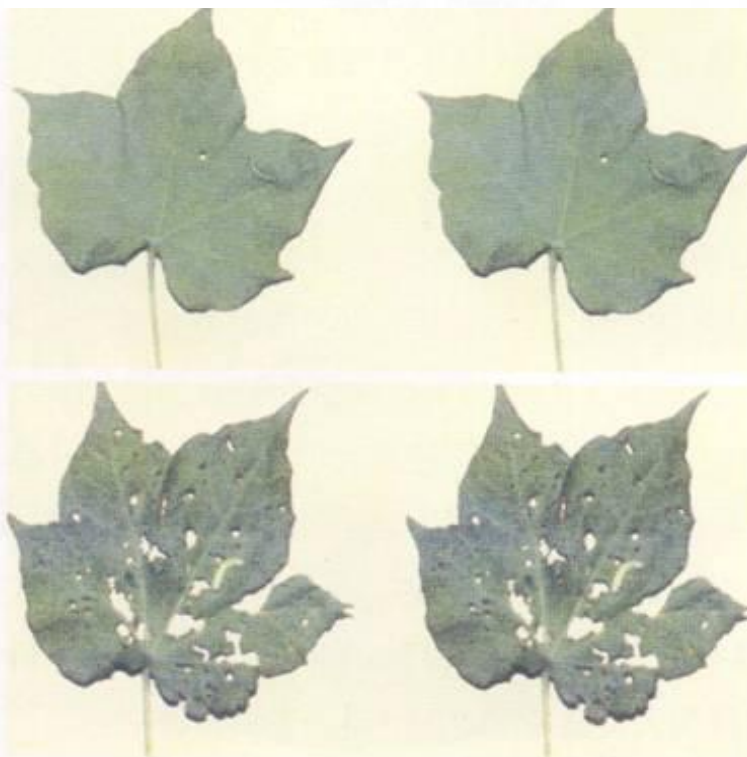
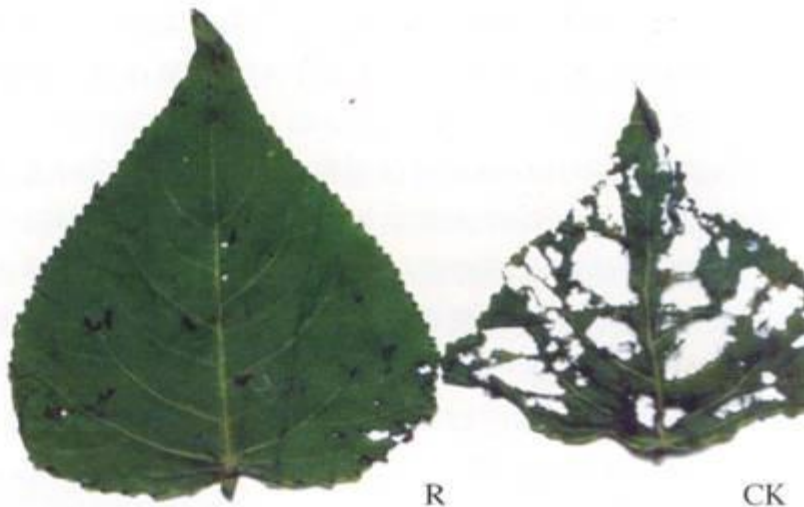
- 苏云金杆菌（Bt）毒素蛋白基因有四种：*cry I*、*cry II*、*cry III*、*cry IV*
- I型毒素蛋白抗鳞翅目昆虫
- II型毒素蛋白抗鳞翅目核双翅目昆虫
- III型毒素抗鞘翅目昆虫
- IV型毒素抗双翅目昆虫

2、Bt抗虫转基因植物的制作流程



Bt 抗虫转基因植物

转基因抗虫植株叶片与
非转基因叶片的对照
CK-非转基因欧洲黑杨树的
叶片
R-转基因欧洲黑杨植株的
叶片



转基因抗虫棉(上)与普
通棉(下)



3、Bt抗虫转基因植物的优点

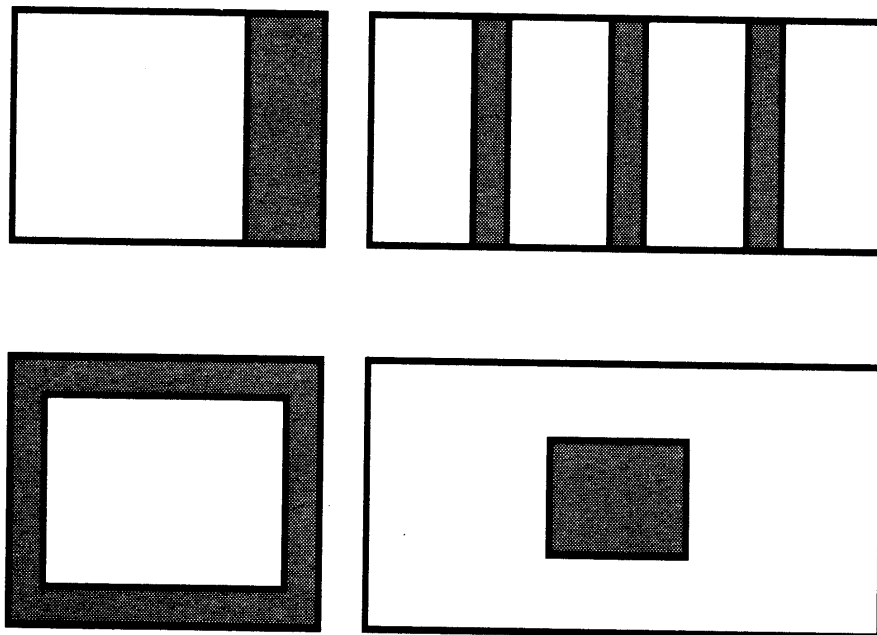
- ①对植物具有连续保护作用，只杀死摄食害虫，对非危害生物的昆虫无影响，保护整体植株，包括农药难以作用的部位；
- ②所表达的抗虫物质仅存在于植物体内，不存在环境污染问题。据估计，使用Bt棉花可减少杀虫剂用量一半以上，减少化学农药在环境中的残留量。
- ③成本低，有利于推广，并且可以减少喷药劳动量。
- ④产生较好的经济效益。

4、Bt抗虫转基因植物的缺点

- ①是昆虫对Bt杀虫晶体蛋白产生抗性
- ②Bt晶体蛋白表达低下

“昆虫抗性管理”策略 IRM

转基因植物与非转基因植物混合播种，建立害虫的庇护所。黑色区域代表常规玉米（非Bt玉米）种植区，白色区域代表Bt转基因玉米种植区。



提高外源基因表达水平的策略

- 1) 选择合适的转化方法
- 2) 选择强启动子和诱导型启动子
- 3) 使用植物偏爱的密码子
- 4) 使用MAR序列（基质结合区序列）

- MAR是染色质上的一段DNA序列，长度一般为300~1000bp，它可以与核骨架结合，在两个MAR之间的染色质区域可连接成环。每一个环为一个独立的表达结构。





三、提高作物产量的转基因作物

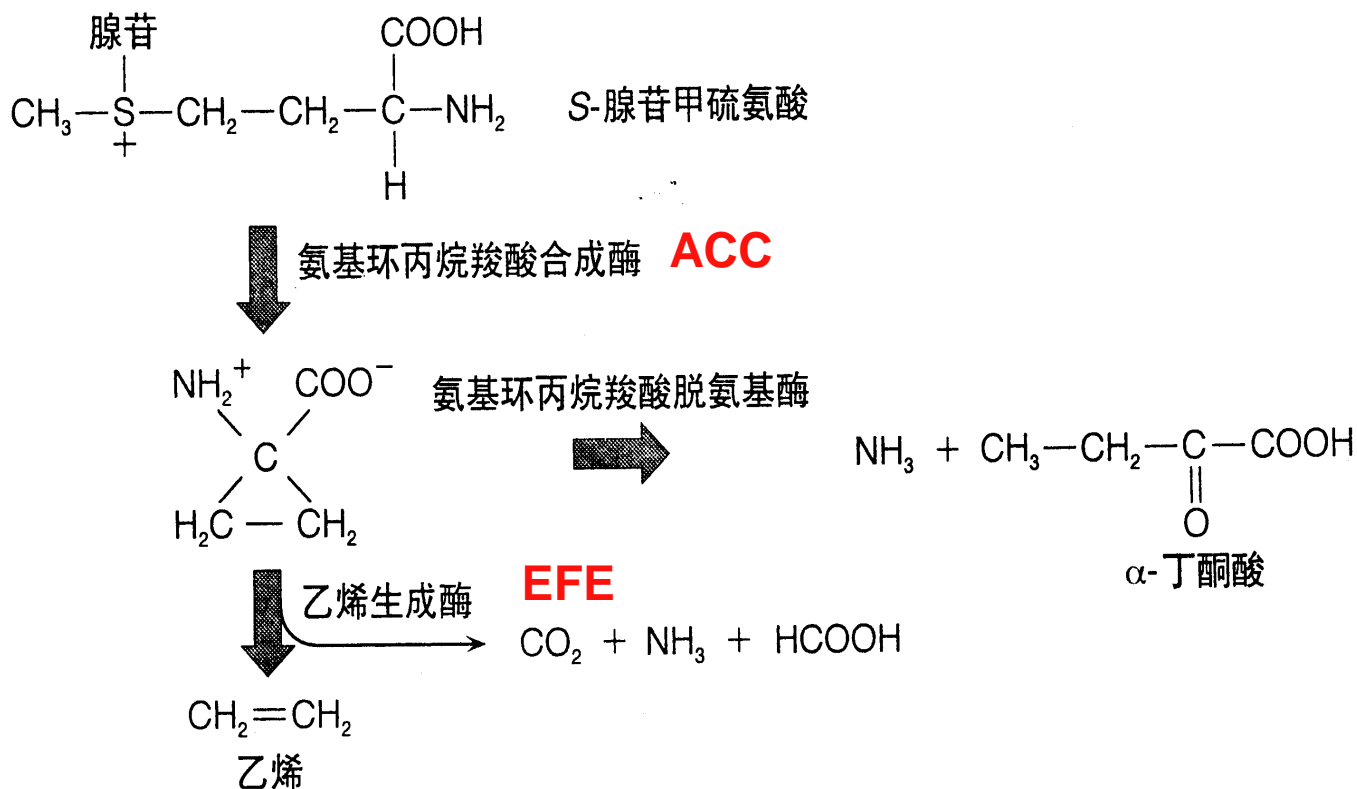
- Rubisco（核酮糖-1，5-二磷酸羧化酶）
- PEPCase（磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶）
- AGPP（腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶）
- Monsanto公司商用马铃薯Russet Brubank品系

四、高品质的转基因植物

- 延长棉花纤维的长度
- 将不饱和脂肪酸转化为饱和脂肪酸
- 提高粮食中必需氨基酸的含量
- 提高粮食中铁元素和维生素的含量



五、控制果实成熟的转基因植物



采用反义RNA技术封闭番茄细胞中ACC和EFE两个基因的表达，由此构建出的重组番茄的**乙烯合成量**分别仅为野生植物的3%和0.5%，明显延长了番茄的保存期。

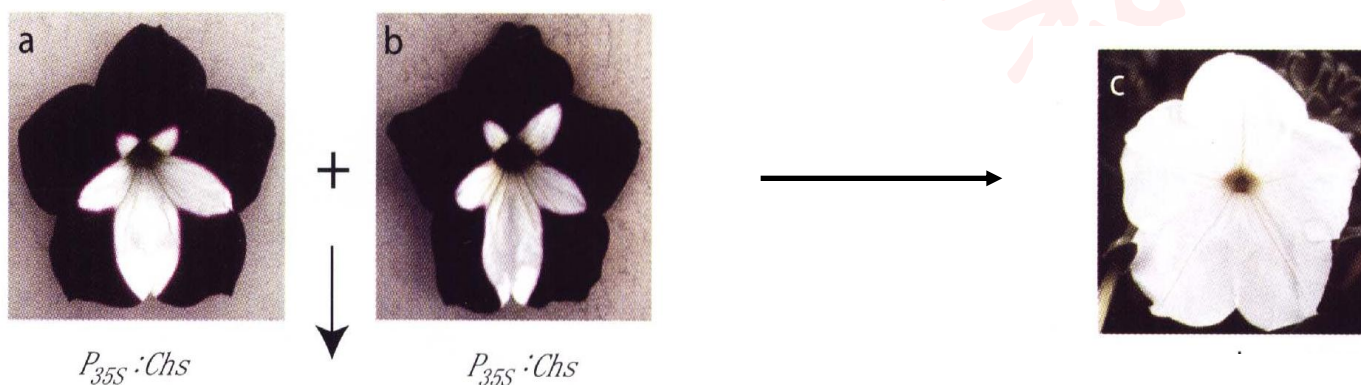


图6 转基因番茄

左图为转基因番茄，耐储存；右图为正常番茄，不耐储存。

六、改变花卉形状和颜色的转基因植物

大多数花卉的色素为黄酮类物质，颜色主要取决于色素分子侧链取代基团的性质和结构，如花青素衍生物呈红色，翠雀素衍生物呈蓝色等。在黄酮类色素的生物合成途径中，**苯基苯乙烯酮合成酶（CHS）**是一个**关键酶**。利用反义RNA技术可有效抑制矮牵牛花属植物细胞内的**CHS**基因表达，使转基因植物花冠的颜色由野生型的紫红色变成了白色。



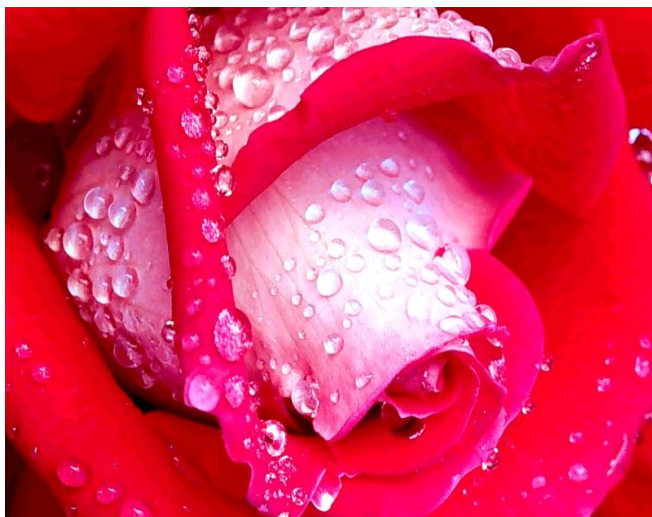


转基因牵牛花和转基因荷花



黑色郁金香





蓝色妖姬与日本三得利公司蓝色月季

六、植物生物反应器

- 植物生物反应器是指利用植物表达系统和转基因技术生产过去只能从稀有植物乃至其他生物体才能获得的或者收获量甚微的一些具有商业价值的物质，如激素、单克隆抗体、疫苗、酶、生长因子、植物次生代谢物及其他一些小分子药物等。



能产生脂肪酸的
转基因烟草



转基因植物作为生物反应器的优势

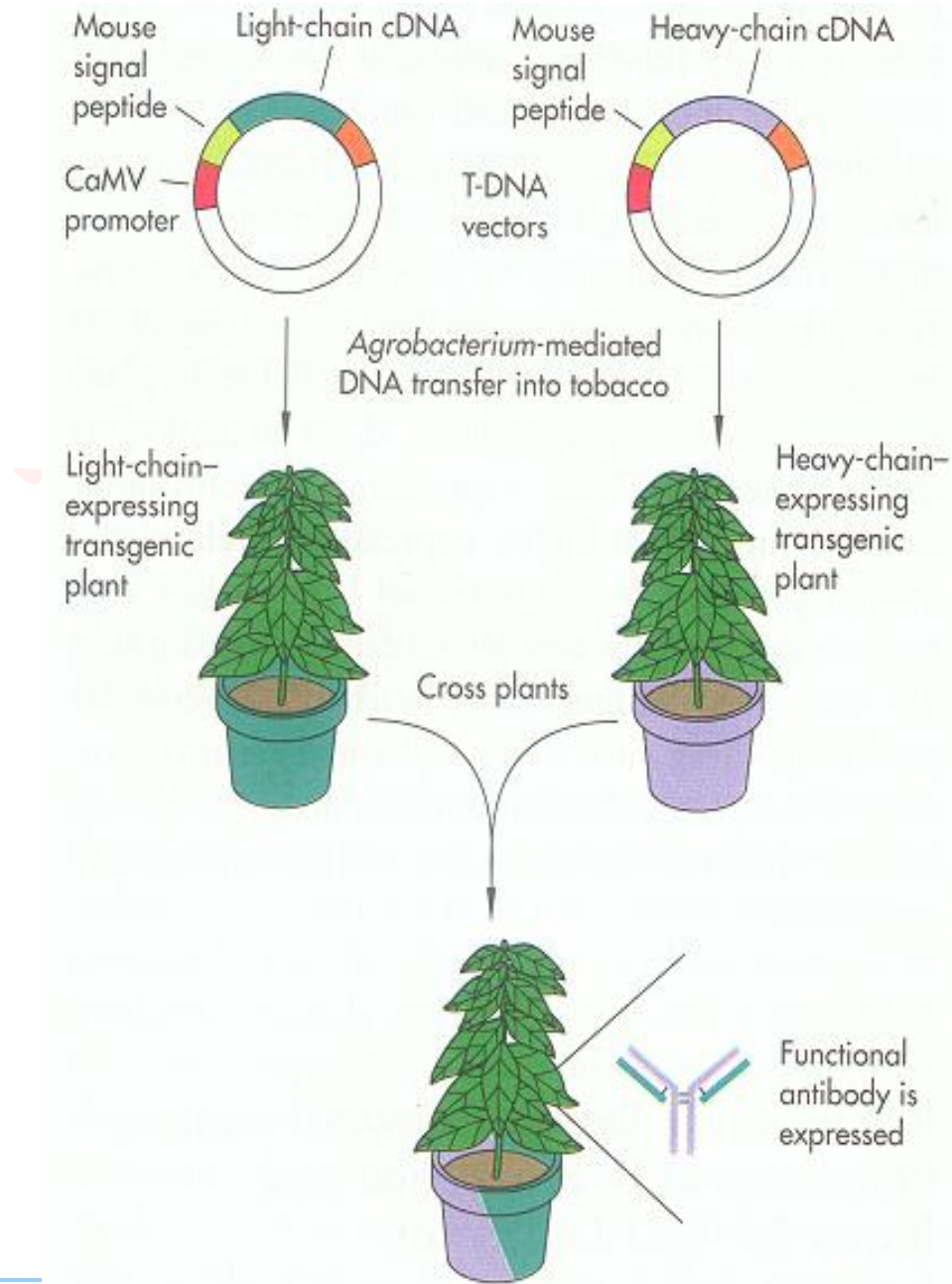
植物易于生长，农田管理成本相对低廉，操作技术要求也不高。

植物表达系统生产的疫苗可以直接储存在植物种子和果实中，无需冷藏系统进行储藏运输，易于长距离运输及推广。

植物具有完整的真核表达修饰系统利用转基因植物生产的重组蛋白。

药物和疫苗在分子结构和生物活性上与人体来源的蛋白质相似

转基因烟草生产单克隆抗体





第四节 转基因植物的安全性

- 转基因安全性的由来
- 转基因植物安全性的争论



转基因植物与食品的利与弊 辩论赛

基地班VS生技班

- 正方——基地班：
转基因植物与食品利大于弊
- 反方——生技班：
转基因植物与食品弊大于利



辩论赛流程

- 正方一辩开篇立论（时间：3分钟）
- 反方一辩开篇立论（时间：3分钟）
- 正方二辩选择反方二辩或三辩进行一对一攻辩（时间：1分30秒）
- 反方二辩选择正方二辩或三辩进行一对一攻辩（时间：1分30秒）
- 正方三辩选择反方二辩或三辩进行一对一攻辩（时间：1分30秒）
- 反方三辩选择正方二辩或三辩进行一对一攻辩（时间：1分30秒）
- 正方一辩进行攻辩小结（时间：1分钟）
- 反方一辩进行攻辩小结（时间：1分钟）
- 自由辩论（正方先），双方各累计计时4分钟
- 反方四辩总结陈词（时间：4分钟）
- 正方四辩总结陈词（时间：4分钟）
- 自由发言时间（20分钟）
- 老师点评



一、生物安全的含义

- 生物安全是指在一定的时间与空间范围内，由于自然或人类活动引起外来物种迁移，外来物种在定居、建群、繁衍、扩展的连串过程中造成对本土物种和生态系统的威胁、危害，使之衰退，甚至退化和灭绝；（外来物种入侵）
- 或由于人为造成环境的剧烈变化，导致生态环境的破坏或掠夺生物资源，砍伐和捕捞过度，严重时导致物种濒危或灭绝；（生态环境破坏）
- 或由于科学研究、开发、生产和应用中造成对人类健康、生存环境和社会生活的有害影响。（生物技术）



生物安全问题的提出与演化

- 1973年在美国新罕布尔州举行的哥敦会议上（Gordon），在讨论核酸问题时，许多生物学家对即将到来的大量基因工程操作的安全性提出担忧；
- 1975年2月，在美国加州阿西罗玛（Asilomar）举行了一次国际会议，第一次正式讨论转基因生物的安全性问题；
- 1976年，美国国立卫生研究院（NIH）发布《重组DNA分子研究准则》，随后，德、法、日、澳等也相继制定了有关重组DNA技术的安全操作指南或准则，经济发展合作组织（OECD）颁布了《生物技术管理条例》，欧盟颁布了《关于控制使用基因修饰微生物的指令》、《关于基因修饰生物向环境释放的指令》等。

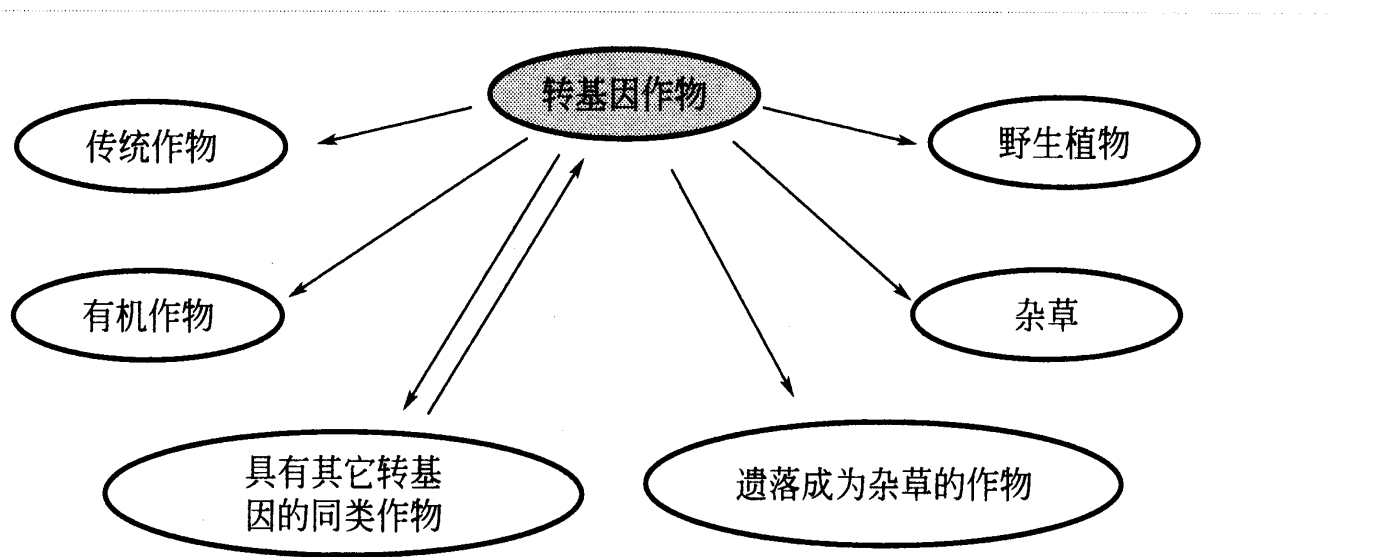


- 1992年6月，联合国环境与发展大会通过《生物多样性公约》，直至2000年1月正式通过《生物安全议定书》。
- 1993年，国际经济合作与发展组织（OECD）提出转基因食品安全性分析原则是“实质等同性”原则。即转基因食品及其成分应与市场上销售的对应食品具有实质等同性。这种等同性包括表型性状、分子特性、主营养成分及抗营养因子。
- 2001年5月23日，中国国务院第304号令颁布了《农业转基因生物安全管理条例》。该条例共分8章，分别是总则、研究与试验、生产与加工、经营、进口与出口、监督检查、罚则、附则等。

二、转基因生物的潜在生态风险

1、“基因漂流”

- 基因漂流 (gene flow) 是指遗传品质通过有性生殖的交配作用在生殖相容性的不同种群之间转移, 从而改变种群基因库的组成。



超级杂草

- 1998年，加拿大Alberta省发现一种Canola油菜，它由于基因污染而含有抗草甘膦、抗固沙草、抗咪唑啉类除草剂等三掌转基因堆积而成的“广谱抗除草剂基因”（HT基因）。



2、对生物多样性的威胁

- J. E. Losey 1996年在《Nature》杂志发表的一篇报导：他们用**转Bt基因玉米花粉**的马利筋叶片来饲喂大斑蝴蝶幼虫，对照组是加普通玉米花粉的马利筋叶片及不加玉米花粉的马利筋叶片，结果转基因玉米花粉的叶片饲喂幼虫后，第二天死亡10%以上，4天后死亡44%。而对照组全部存活。这就表明，Bt转基因玉米花粉可能威胁大斑蝴蝶的生存，引起生态种群的破坏。





三、转基因食品对人类健康的影响

- 毒性问题
- 过敏性问题
- 抗生素抗性问题

1、毒性问题

- 1998年8月，苏格兰某研究所的一位老教授取了两种带有雪花莲植物凝集素基因的抗虫转基因马铃薯在大白鼠上进行毒性试验，发现其中一种转基因马铃薯对大白鼠的生长和免疫机能存在负面影响，消化系统异常，器官受损严重。英国“世界在行动”电视节目公布了该研究结果。





2、过敏性问题

- 1998年美国环保局批准安万特公司生产含有毒晶蛋白Cry9C的转基因玉米“**星联玉米**”，明确规定只准供动物饲料之用。2000年9月，发现美国市场的玉米面饼等300多种产品中含有微量“星联玉米”，引发轩然大波。少数人吃了之后引起皮疹、腹泻或呼吸系统的过敏反应并有潜伏效应。为回收被“星联玉米”污染的玉米食品，安万特公司花费了约10亿美元。这就是在转基因安全史上著名的“星联玉米”事件。



2009年2月26日，墨西哥玉米保护委员会和“没有玉米，就没有国家”等组织在首都墨西哥城的宪法广场用玉米组成一个矩形图案。图案中的文字是“**没有玉米，就没有国家**”，旨在呼吁墨西哥保护自己的优良玉米品种，不要进口转基因玉米。



菲律宾从2002年开始商业化种植具有混合性状（抗除草剂和抗虫性）的转基因玉米。据统计，菲律宾转基因玉米在2003至2006年，共帮助农民增加收入2900 万美元。



3、抗生素抗药性问题

- 转基因操作中常常需要使用抗药性基因作为标记基因。如 *Amp^r* 基因, *Kan^r* 基因, *Tet^r* 基因, *Neo^r* 抗性基因等等。这些抗性基因会不会通过食物链被传入人畜消化系统中细菌体内, 使这些细菌对抗生素药物的治疗产生抗性?
- 例如, 氨基丁卡霉素被认为是人类医药中的“保留”或“急救”抗生素, 是国际医药界储备的应急“救危”药物, 而现在却为GMO捷足先登, 并滥用于多种GMO作为标记基因, 广泛在环境中释放, 在各种动植物机体内产生抗性。
- 欧盟规定2008年以后不得进行含抗生素标记基因的转基因作物的田间试验。可以肯定, 抗生素抗性基因行将终结。



四、基因工程的 实验室安全问题

- 病毒、菌株、品系

严格的隔离与防护，限制区域使用、防止逃逸，专门地域埋藏

- 特殊试剂、荧光染料、EB

工作服、手套、目镜防护，通风柜，专用废物缸，避免直接入下水道。

EB废液净化：1X水稀释，1X0.5MKMnO₄，1X2.5MHCl通风柜过夜1X2.5M NaOH丢弃

酚：强腐蚀性，用肥皂和水冲洗，切勿用乙醇！

- 同位素

同位素使用许可证，专门的运输渠道，专门的同位素室，容器、挡板隔离，手套，专用废物桶、废液缸，衰变期完全过后方可遗弃
(³²P3个月)