



广东海洋大学  
GUANGDONG OCEAN UNIVERSITY

# 转基因育种

---

戴双凤 讲师、博士  
滨海农业学院 农学系

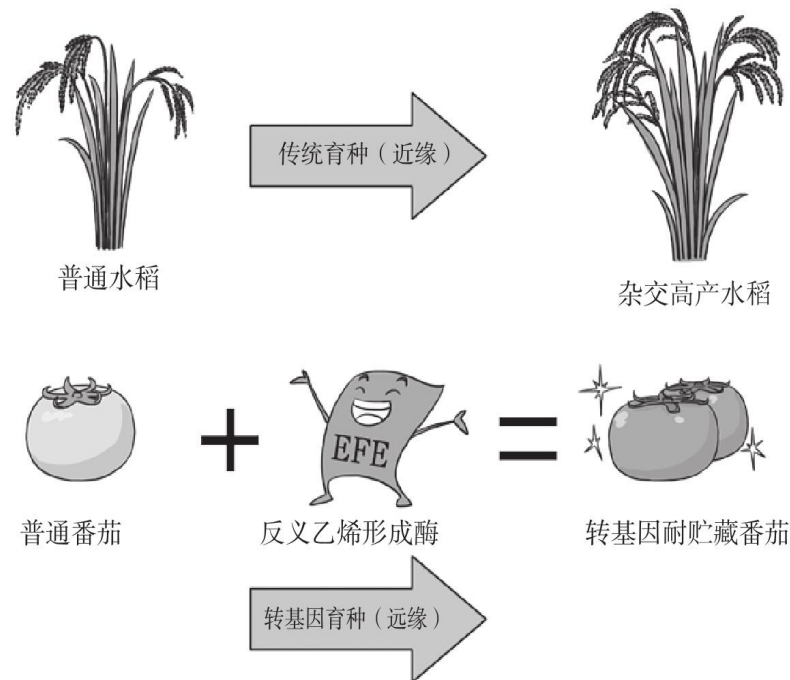
# 主要内容

---

- 转基因育种概述和现状
- 基因工程理论技术准备
- 植物遗传转化
- 基因编辑技术与作物品种选育
- 转基因作物的遗传特点
- 转基因作物品种的选育
- 转基因作物的生物安全性

# 概述和现状

- **传统遗传育种**方法是建立在有性杂交的基础上，通过遗传重组和表型选择进行新品种选培。**生物技术**的创新极大地推动了现代育种的发展。
- 作物育种技术常用的有9种：杂交育种、单倍体育种、多倍体育种、诱变育种、细胞工程育种、全基因组选择与分子设计育种、**转基因育种**。



# 概述和现状

---

- 转基因育种： 从供体生物中分离目的基因，经DNA 重组与遗传转化或直接运载进入受体作物，经过筛选获得稳定表达的遗传工程体，并经过田间实验与大田选择育成转基因新品种或种质资源。
- 转基因作物 (GMC, genetically modified crops)



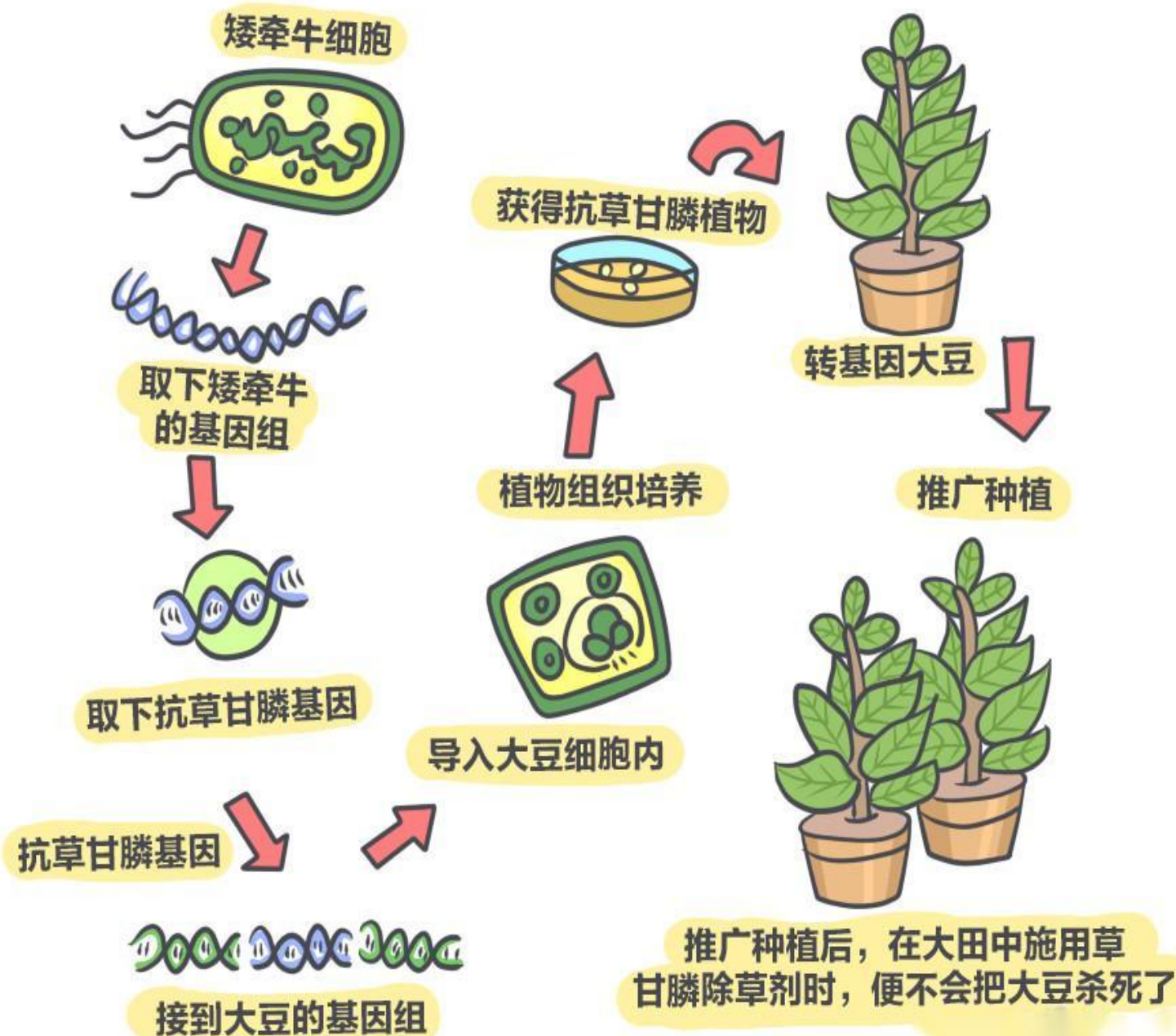
# 概述和现状

---

与常规育种技术相比，转基因育种在技术上较为复杂，要求也很高，但是具有常规育种所不具备的**优势**：

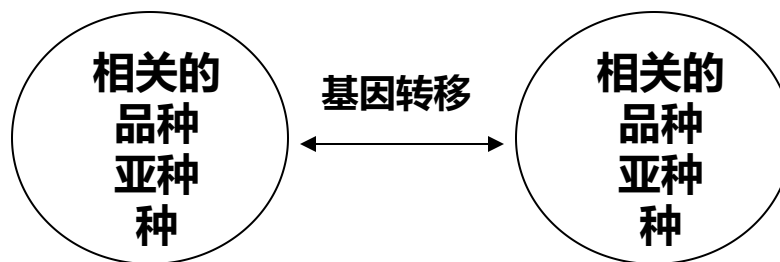
1. 拓宽可利用的基因资源；
2. 培育高产、优质、高抗优良品种提供了崭新的育种途径；
3. 可以对植物的目标性状进行定向变异和定向选择；
4. 可以大大提高选择效率，加快育种进程。

此外，还可将植物作为生物反应器生产药物等生物制品。

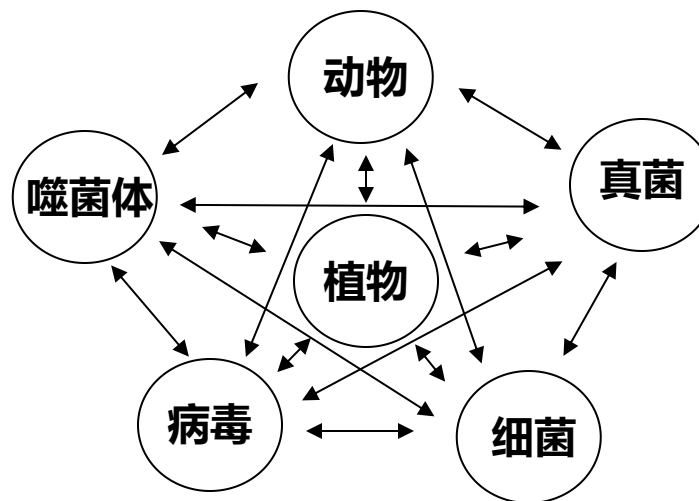


# 转基因途径对传统育种法的优点

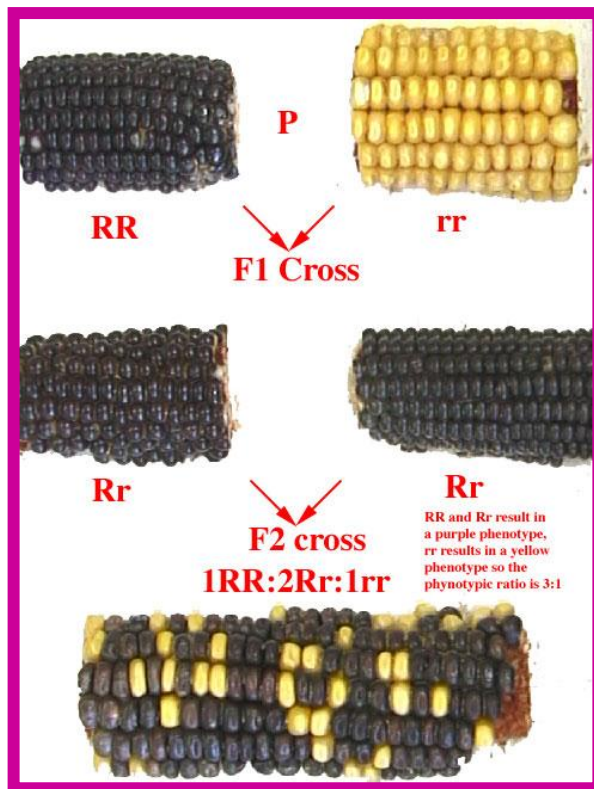
传统育种法:



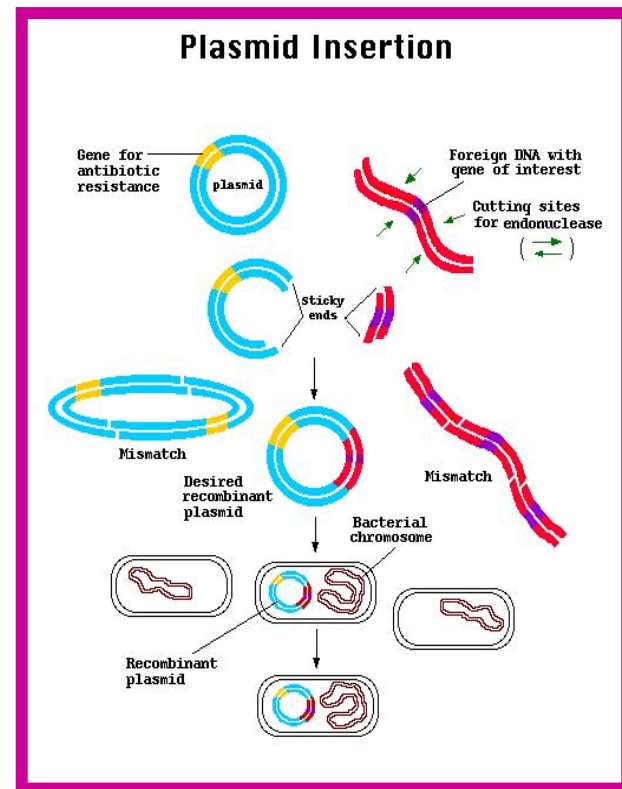
转基因途径:



## Traditional crossbreeding

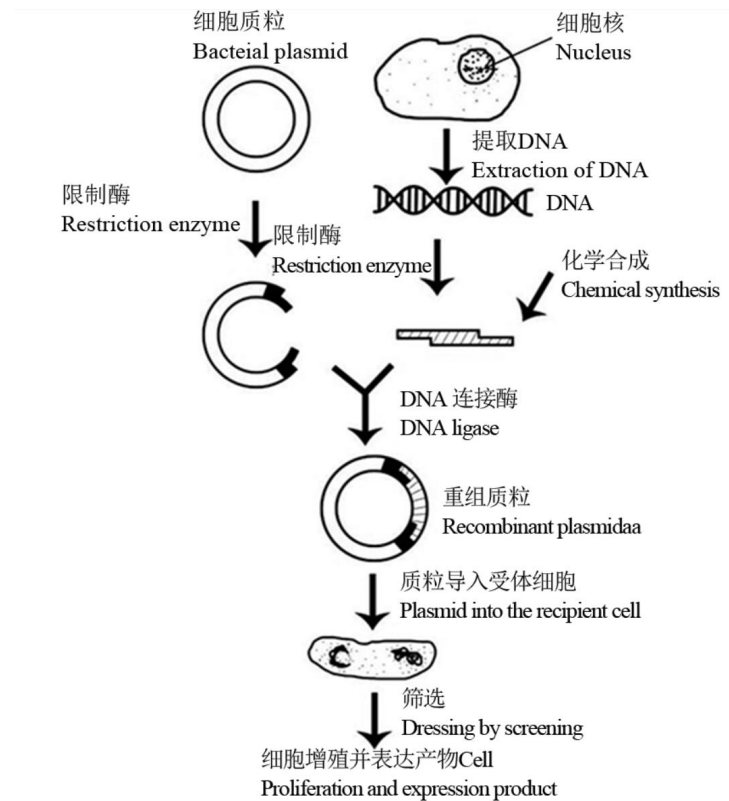


## Recombinant DNA techniques



# 转基因技术与转基因育种

- **转基因技术**：将人工分离和修饰过的**基因**导入到生物体基因组中，由于导入基因的**表达**，引起生物体的**性状**的可遗传的修饰，这一技术称之为转基因技术（Transgene technology）。



# 转基因技术与转基因育种

- 今年（2024）是全球生物技术/转基因投入实际应用的第43年，也是生物技术/转基因作物商业化的第29年，现代种业已进入“常规育种+现代生物技术育种+信息化育种”的4.0时代。
- 截至2024年10月，已有30多个国家批准了转基因作物的种植。这表明利用生物技术作为应对粮食安全和气候变化等全球挑战的可持续工具方面取得了显著增长。
- 目前已获得转基因植株的物种有120多种，包括：粮食作物--水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯；经济作物--棉花、油菜、向日葵、亚麻等；还有蔬菜、牧草、花卉和部分木本植物等

# 全球近十年转基因面积变化趋势

Global GM Crop Area Historical

年份	转基因面积 (百万公顷)	年际变化 %
2013	170.1	4.2
2014	178.5	4.9
2015	176.3	-1.2 ▼
2016	179.7	1.9
2017	186.5	3.8
2018	185.9	-0.4 ▼
2019	185.9	0.0
2020	188.7 ▲	1.5
2021	195.7 ▲	3.7
2022	202.5 ▲	3.4
2023	206.3 ▲	1.9

Source: Agbioinvestor 2024



# 不同国家转基因面积变化趋势

GM Crop Area by Leading Country

排名	国家	转基因面积 (百万公顷)	年际变化 %	占比 %
1	 美国	74.4	-0.4 ▼	36.1
2	 巴西	66.9	5.9	32.4
3	 阿根廷	23.1	-1.4 ▼	11.2
4	 印度	12.1	-2.3 ▼	5.9
5	 加拿大	11.5	1.5	5.6
6	 巴拉圭	3.7	8.2	2.1
7	 南非	3.2	3.6	1.6
8	 中国	2.9	-7.9 ▼	1.3
9	 巴基斯坦	1.7	33.3	1.1
10	 澳大利亚	1.5	7.0	0.7
Na	其它	4.2	-1.8 ▼	2.0
	总计	202.2	1.9	100.0

Source: Agbioinvestor 2024



# 全球不同作物转基因面积变化趋势

Global GM Crop Area by Crop

作物	转基因面积 (百万公顷)	年际变化 %	占比 %
 苜蓿	1.2	5.0	0.6
 茄子	0.00	-12.5 ▼	0.0
 油菜	10.2	2.9	5.0
 棉花	24.1	- 5.5 ▼	11.7
 玉米	69.3	4.5	33.6
 水稻	0.05	22.2	0.0
 大豆	100.9	1.9	48.9
 甜菜	0.5	- 3.5 ▼	0.2
 甘蔗	0.06	9.3	0.03
 小麦	0.04	- 17.6 ▼	0.02
总计	206.3	1.9	100.0

Source: Agbioinvestor 2024

统计农业农村部2019年至今发布的批准清单可知，截至目前，我国共有20个转基因玉米转化体、7个转基因大豆转化体获得生产应用安全证书，包括：抗虫耐除草剂玉米12个，耐除草剂玉米6个，抗虫玉米2个；抗虫耐除草剂大豆1个、耐除草剂大豆5个、抗虫大豆1个。

2024 年农业转基因生物安全证书（生产应用）批准清单

2024 年农业转基因生物安全证书（进口）批准清单

根据《农业转基因生物安全管理条例》及其配套规章办法的规定，耐除草剂玉米 MON87427 等经农业转基因生物安全委员会评价合格，予以发放进口用作加工原料的安全证书，均为原证书到期后续发。上述转基因作物进口至国内，只能用作加工原料，不能改变用途、不能进入环境。

序号	审批编号	申报单位	项目名称	有效期
1	农基安证字（2024）第 065 号 （续申请）	拜耳作物科学公司	转 <i>cp4epsps</i> 基因耐除草剂玉米 MON87427 进口用作加工原料的安全证书	2024 年 10 月 8 日至 2029 年 10 月 7 日
2	农基安证字（2024）第 066 号 （续申请）	拜耳作物科学公司	转 <i>cry1A.105</i> 和 <i>cry2Ab2</i> 基因抗虫大豆 MON87751 进口用作加工原料的安全证书	2024 年 10 月 8 日至 2029 年 10 月 7 日
3	农基安证字（2024）第 067 号 （续申请）	拜耳作物科学公司	转 <i>FAD2-1A/FATB1A</i> 表达抑制盒和 <i>cp4epsps</i> 基因品质性状改良耐除草剂大豆 MON87705 进口用作加工原料的安全证书	2024 年 10 月 8 日至 2029 年 10 月 7 日

# 主要内容

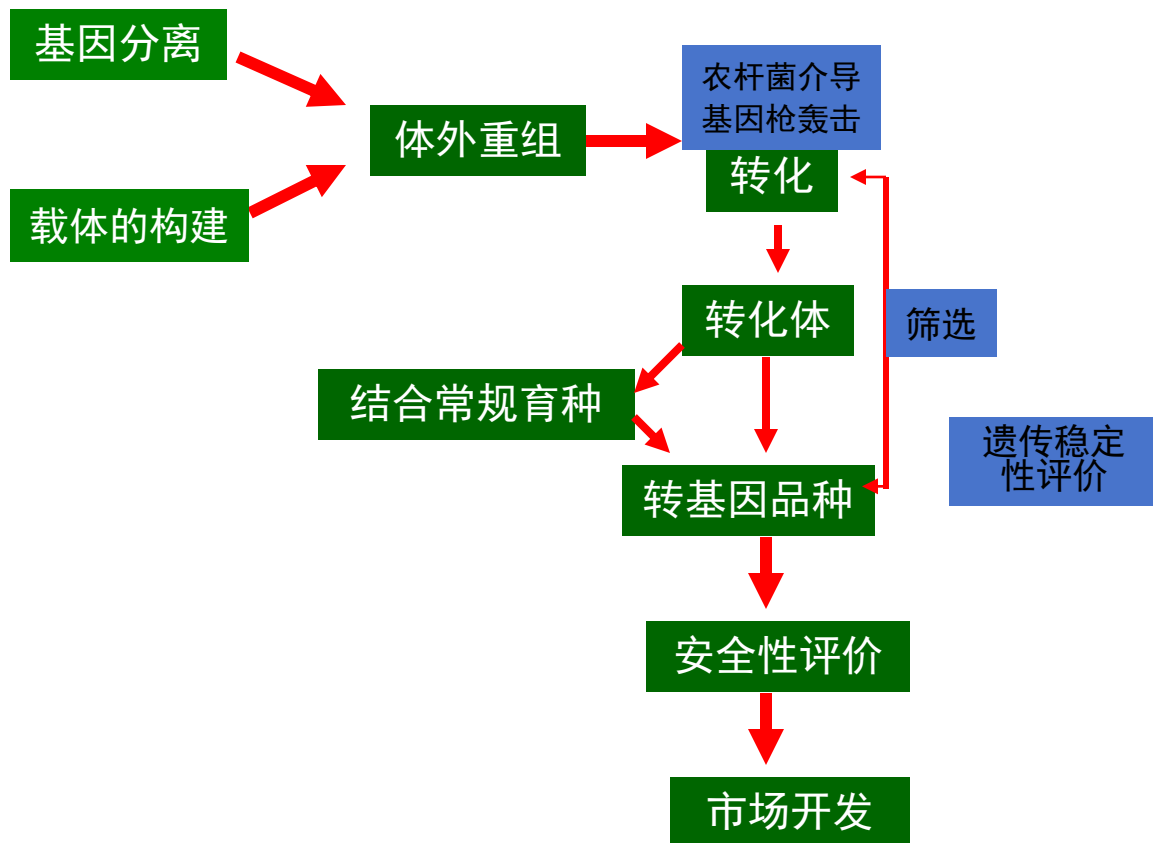
---

- 转基因育种概述
- 基因工程理论技术准备
- 植物遗传转化
- 基因编辑技术与作物品种选育
- 转基因作物的遗传特点
- 转基因作物品种的选育
- 转基因作物的生物安全性

# 基因工程理论技术准备

- 基因工程迅猛发展的重要理论和技术基础是：
  - ① 分子生物学中心法则的确立；
  - ② 限制性内切酶及其它工具酶的发现；
  - ③ DNA、RNA和蛋白质的序列分析；
  - ④ DNA和RNA合成技术和转移基因载体的发现。

# 转基因育种的程序



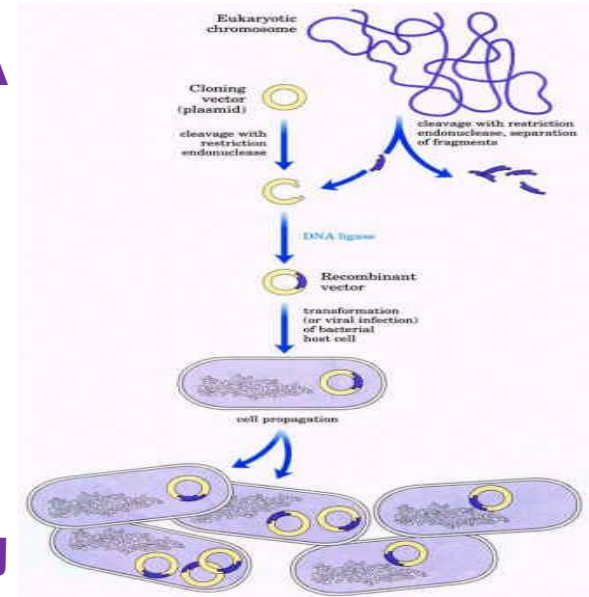
# 一. DNA分子克隆的基本原理

- ❖ **基因 (gene)** 是细胞内DNA分子上具有遗传效应的特定核苷酸序列的总称，是具有遗传效应的DNA分子片段。 基因控制蛋白质合成，是不同物种以及同一物种的不同个体表现出不同的性状的根本原因。
- ❖ **基因克隆 (gene cloning)** 或分子克隆,又称为重组DNA技术，是应用酶学方法，在体外将不同来源的DNA分子通过酶切、连接等操作重新组装成杂合分子，并使之在适当的宿主细胞中进行扩增，形成大量的子代DNA分子的过程。



# 一个完整的基因克隆过程包括以下步骤

- 1. 从生物有机体基因组中，分离出带有目的基因片段。
- 2. 将带有目的基因的外源DNA片段连接到能够自我复制的并具有选择记号的载体分子上，形成重组DNA分子。
- 3. 将重组DNA分子转化到适当的受体细胞（亦称寄主细胞）并与之一起增殖。
- 4. 从大量的细胞繁殖群体中，筛选出获得了重组DNA分子的受体细胞，并筛选出已经得到扩增的目的基因。
- 5. 将目的基因克隆到表达载体上，导入寄主细胞，使之在新的遗传背景下实现功能表达，产生出人类所需要的物质。



# 基因工程操作的工具

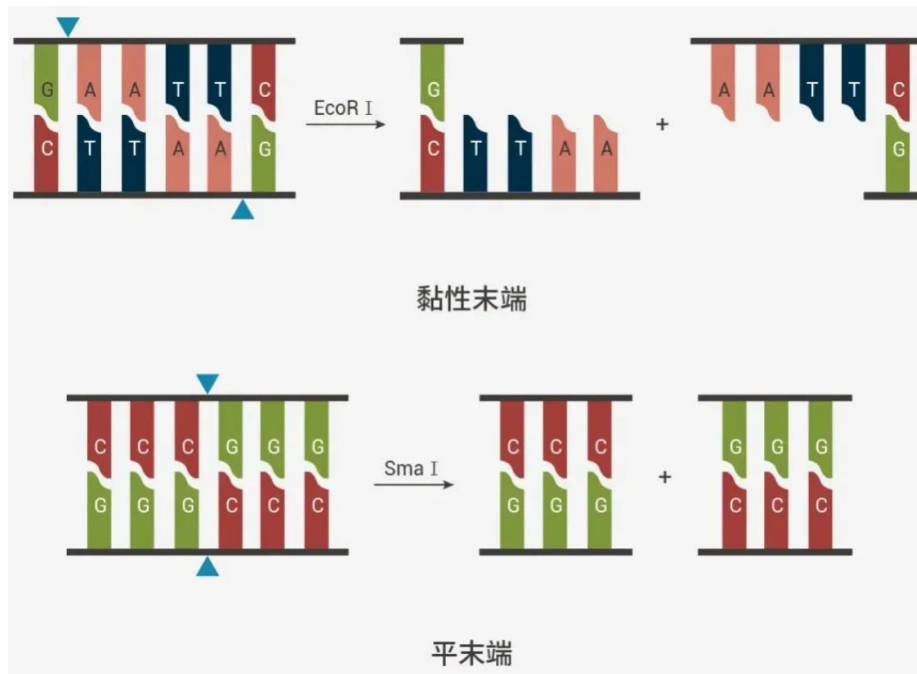
---

1. 将目的基因片断从受体细胞内提取，  
需要基因的剪刀——**限制性核酸内切酶**。
2. 将目的基因与质粒DNA连接，  
需要基因的针线——**DNA连接酶**。
3. 将目的基因运入大肠杆菌，  
需要基因的运输工具——**运载体**。



# 限制性核酸内切酶

- **限制性核酸内切酶** (限制酶, Restriction Endonuclease) 是可以识别并附着特定的脱氧核苷酸序列, 并对每条链中特定部位的两个脱氧核糖核苷酸之间的磷酸二酯键进行切割的一类酶。切割形式有两种, 分别是可产生具有突出单股 DNA 的黏性末端, 以及末端平整无凸起的平末端。



# 限制性核酸内切酶

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
Acc I	GGTCGACC	0	0
	CGGTCGACCG	0	0
	CCGTCGACCGG	0	0
Afl III	CACATGTG	0	0
	CCACATGTGG	>90	>90
	CCCACATGTGGG	>90	>90
Asc I	GGCGGCGC	>90	>90
	AGGCGGCGCT	>90	>90
	TTGGCGGCGCAA	>90	>90
Ava I	CCCCGGGG	50	>90
	CCCCGGGGG	>90	>90
	TCCCCGGGGGA	>90	>90
BamH I	CGGATCCG	10	25
	CGGGATCCCG	>90	>90
	CGCGGATCCGCG	>90	>90
Bgl II	CAGATCTG	0	0
	GAAGATCTTC	75	>90
	GGAAGATCTTCC	25	>90

## 产品概述

## 图表

## 推荐产品

5' G↓G A T C C 3'  
3' C C T A G↑G 5'

Thermo Scientific FastDigest BamHI 限制性内切酶可识别 G<sup>A</sup>GATCC 位点，于 37°C 下使用通用型 FastDigest 缓冲液在 5–15 分钟内的切割效果最佳。

Thermo Scientific FastDigest BamHI 是一系列高端快速限制性内切酶之一，该系列在通用型 FastDigest 和 FastDigest 绿色反应缓冲液中均具备 100% 活性。

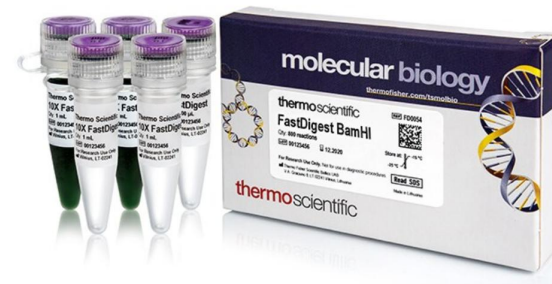
通用型缓冲液可实现 5–15 分钟内快速完成 DNA 单酶切、双酶切或多酶切，无需更换缓冲液或后续 DNA 纯化步骤。有关该酶和其他 FastDigest 限制性内切酶的酶活性、热灭活和孵育时间的表格，请参见 [FastDigest 酶的反应条件](#)。DNA 修饰酶（如 Klenow 片段、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶和 T4 DNA 聚合酶）在 FastDigest 缓冲液中均具有 100% 活性。因此，在下游应用中使用的酶可直接添加至 FastDigest 反应混合物中。

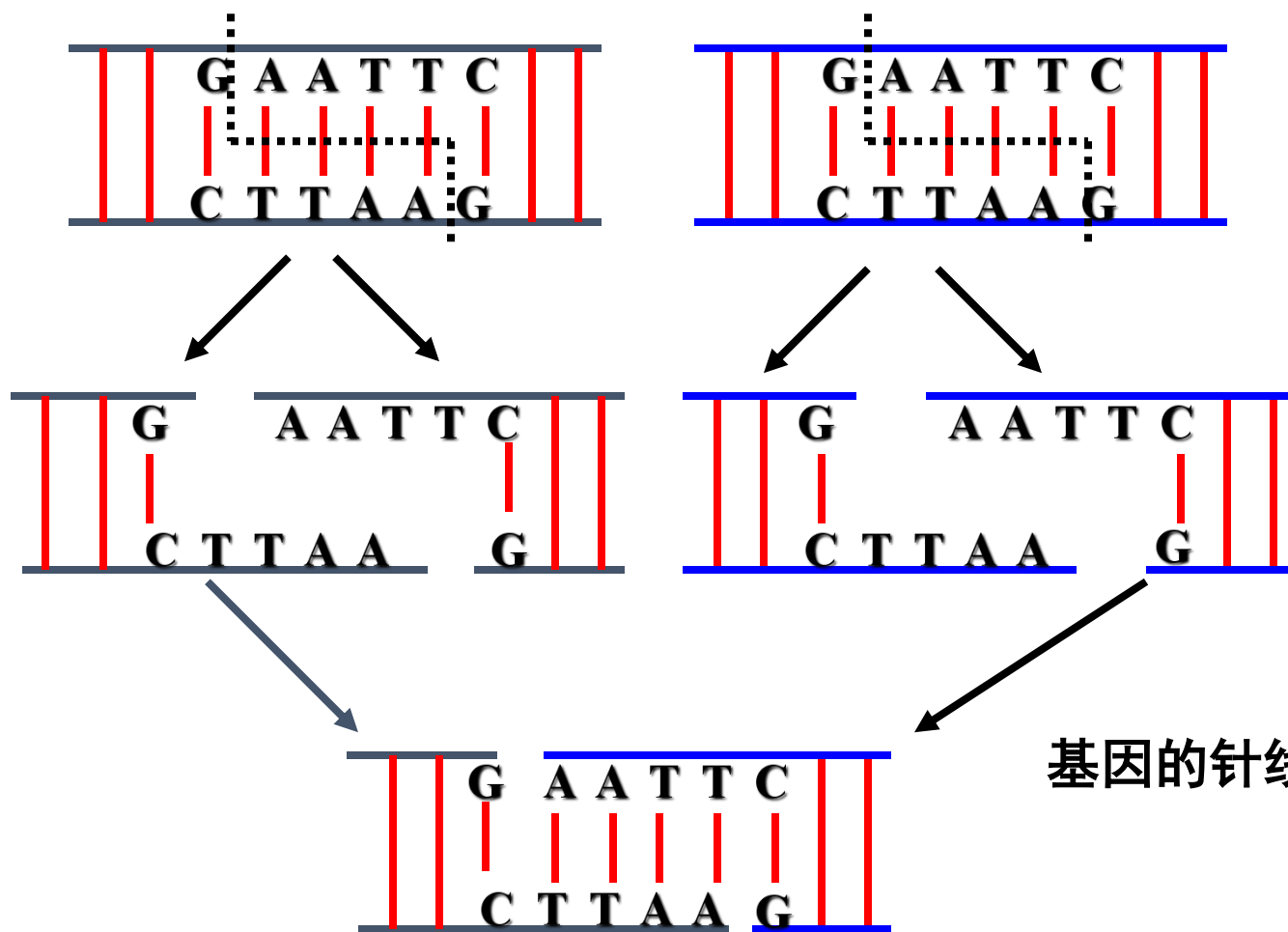
为了方便起见，FastDigest 绿色缓冲液包括用于直接将酶切反应产品上样至凝胶的 1 种密度试剂和 2 种示踪染料。

较短的孵育时间和较优的通用型 FastDigest 缓冲液组成消除了星活性效应。

## 特点

- 所有 FastDigest 酶在通用型缓冲液中的 100% 活性
- 与下游应用的 100% 缓冲液兼容性
- 5–15 分钟内即可完成酶切





用同种限制酶切割

基因的针线：DNA连接酶

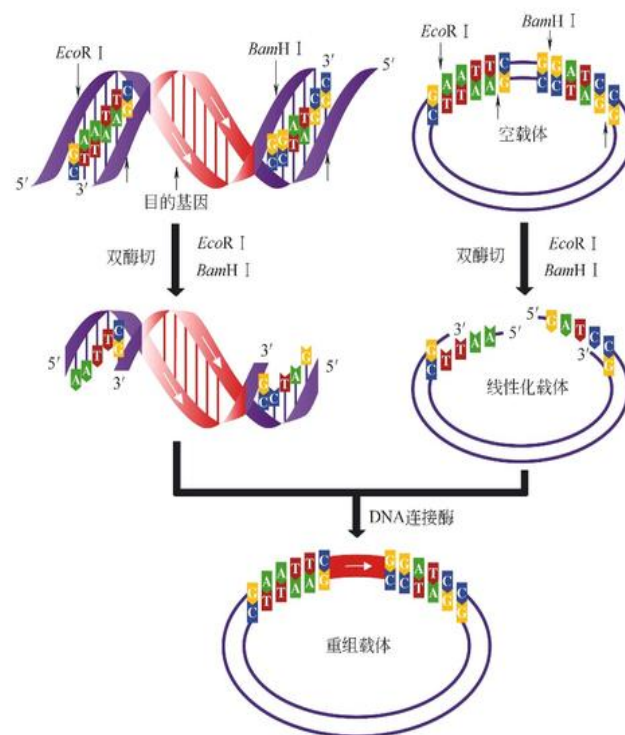
# DNA连接酶

## 1、连接酶的作用：

将互补配对的两个黏性末端连接起来，使之成为一个完整的DNA分子。

## 2、连接的部位：

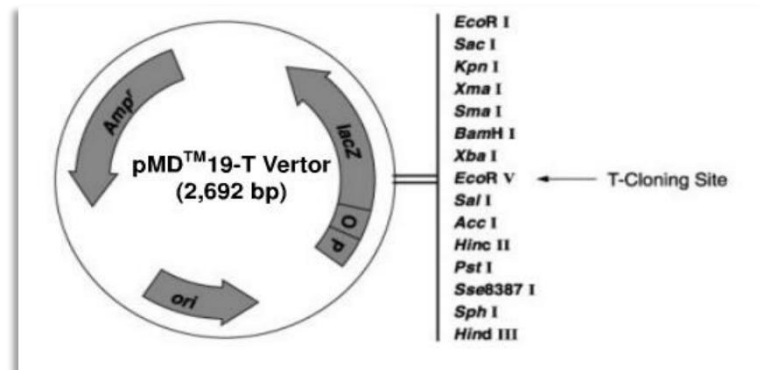
磷酸二酯键，不是氢键。



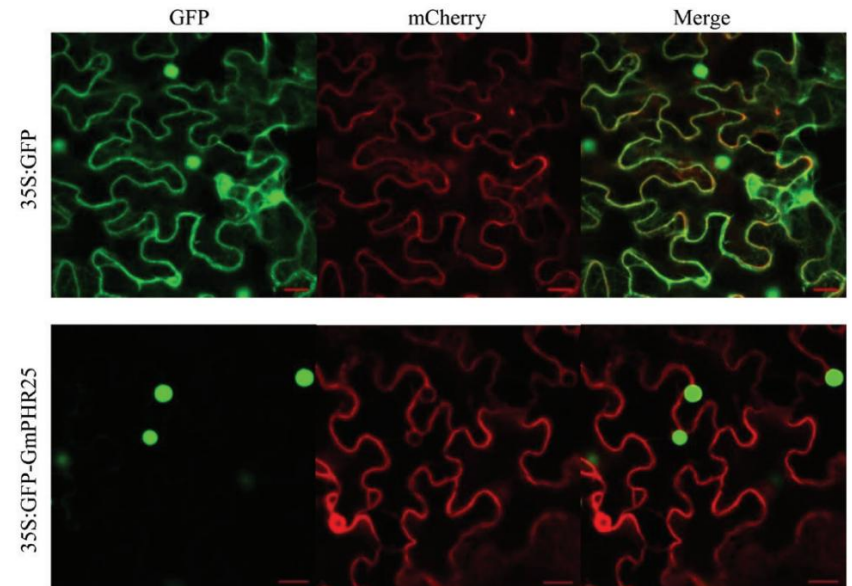
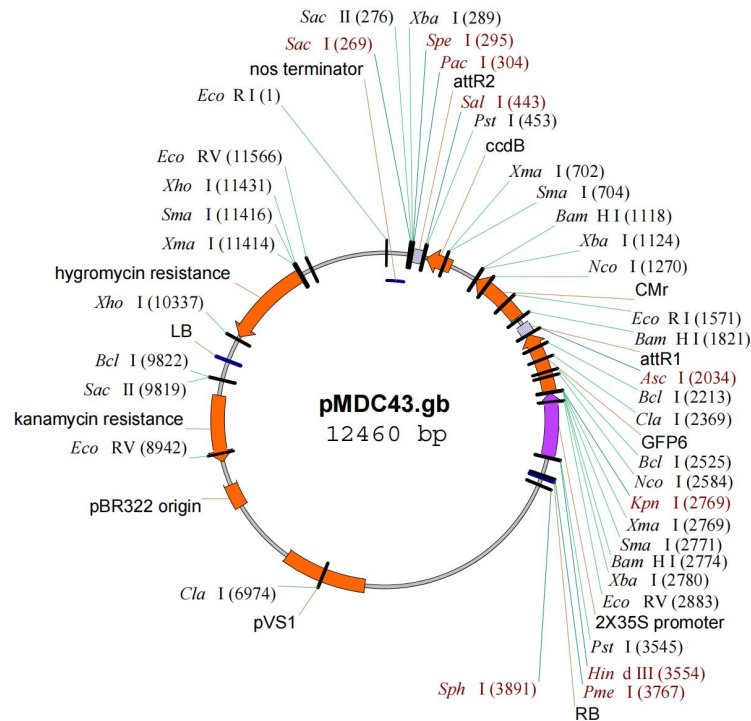
# 克隆T载体

- 要让一个从甲生物细胞内取出来的基因在乙生物体内进行表达，首先得将这个基因送到乙生物的细胞内去。能将外源基因送入细胞的工具就是运载体。

- ①能自我复制
- ②含有限制性内切酶的位点
- ③含有筛选标记，一般为抗性基因
- ④能启动外源目的基因的转录和翻译
- ⑤能在宿主细胞内复制并稳定地保存



# 表达载体



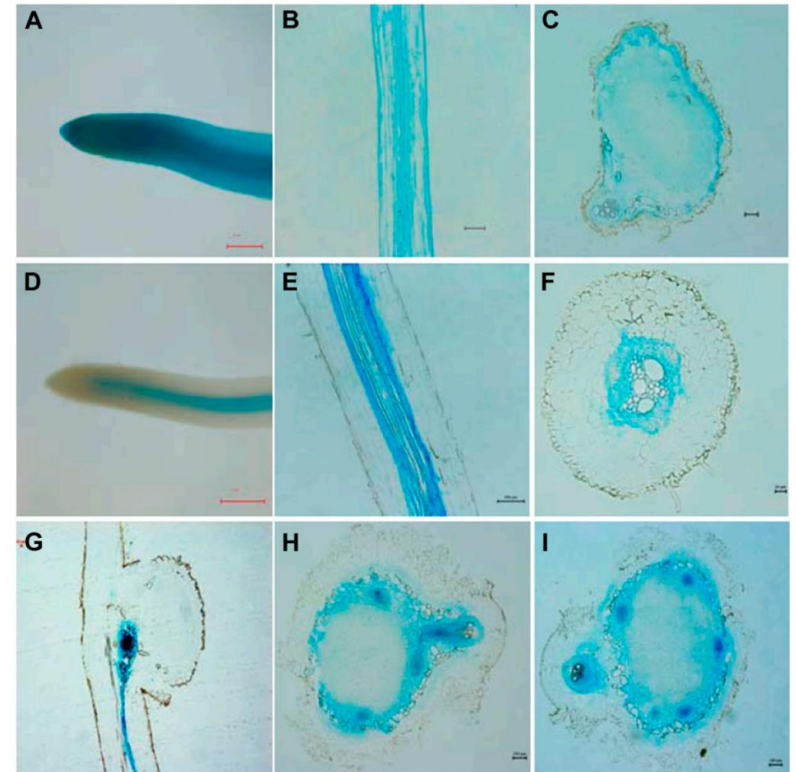
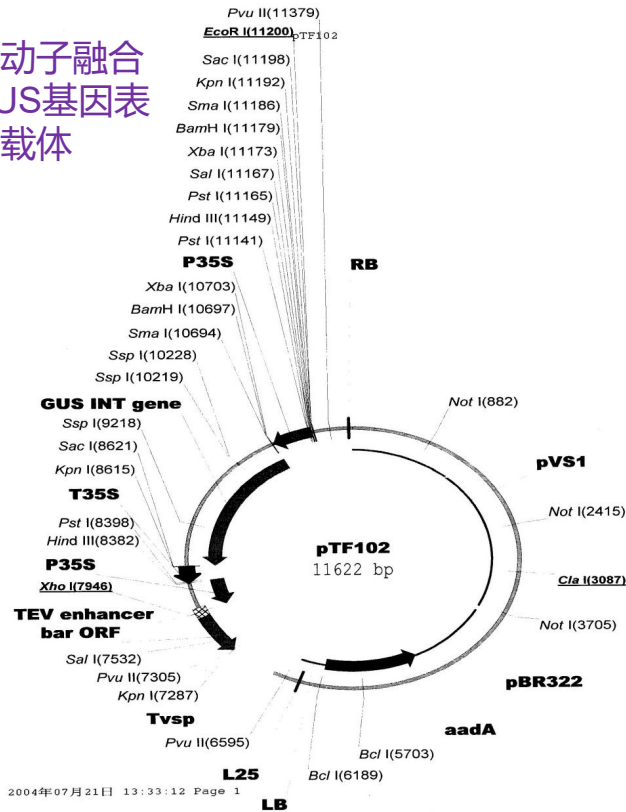
(Xue et al., 2017)

含绿色荧光蛋白GFP的表达载体



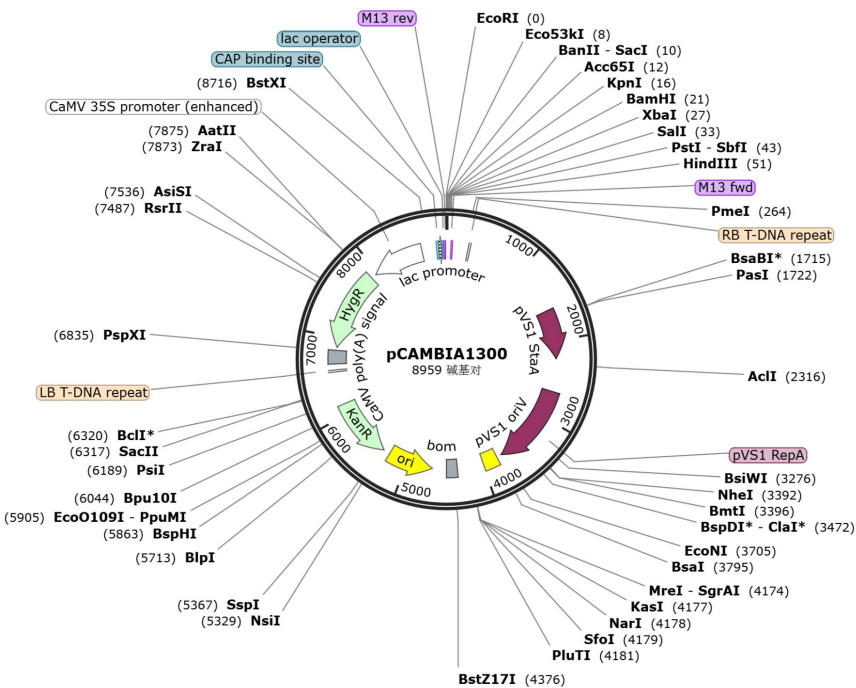
# 表达载体

启动子融合  
GUS基因表  
达载体



(Qin et al., 2012)

# 表达载体

图3 水稻基因 *OsCLF* 功能互补拟南芥 *clf* 突变体的表型

**Figure 3** Phenotype of functional complementation of transgenic lines expressing *OsCLF* in *Arabidopsis clf* mutant

*clf* mutant had curly leaf and early flowering phenotype, *OsCLF* over-expression lines recover *clf* phenotype to wild type

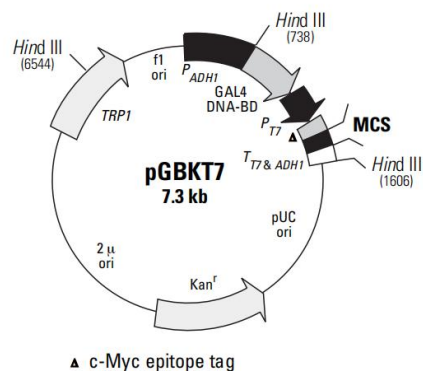
(李超 等; 2022)

## 35S增强表达载体

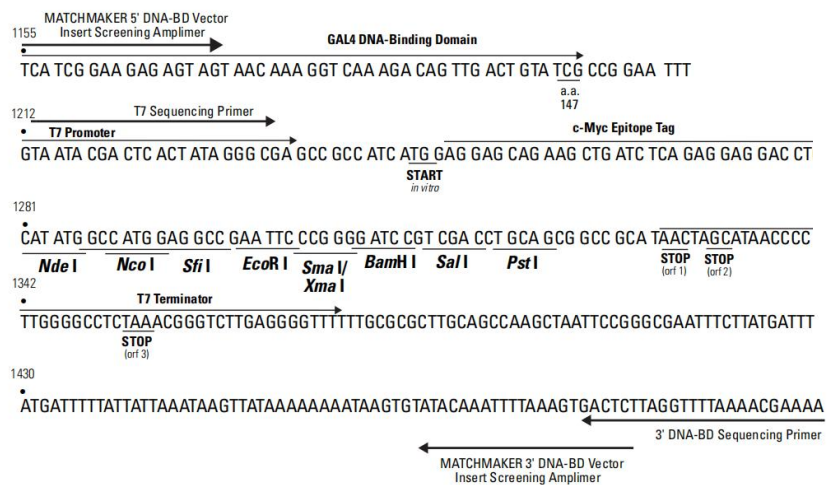


# 表达载体

酵母  
表达  
载体



▲ c-Myc epitope tag



(a)

AD	+	-	-
BD	-	+	-
GmNF-YC4-AD	-	+	+
GmSPX5-BD	+	-	+



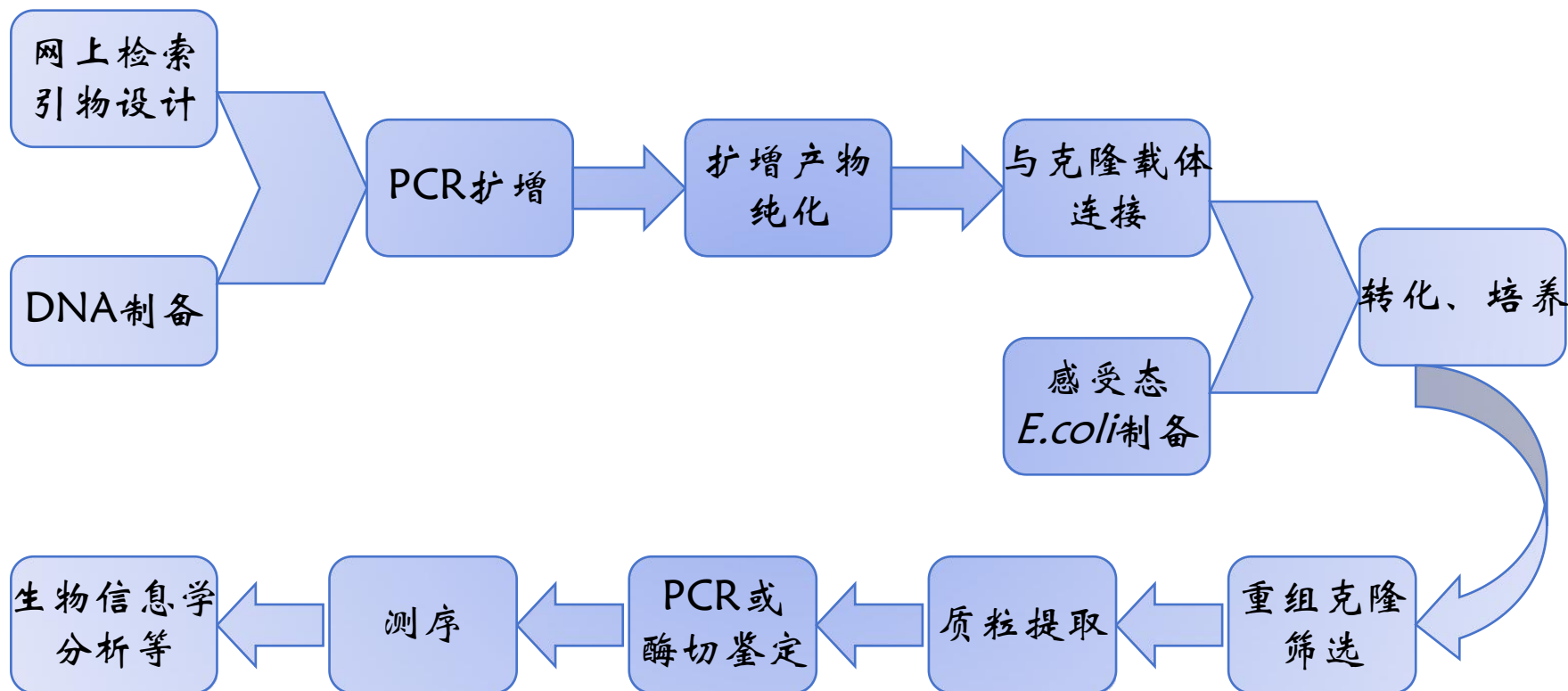
SD/-Leu-Trp



SD/-Leu-Trp-His-Ade/X-α-Gal

(Zhuang et al., 2021)

# 实验流程





引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## 引物设计原则

Primer长度	★★	17–25 base
GC含量	★	40–60%（最好45–55%）
Tm值	★★★★	两条引物的Tm值尽量接近，应用专用软件计算Tm值
序列	★	· 整体上碱基不能过偏
		· 局部避免GC rich或AT rich（特别是3'端）
		· 避免T/C连续，A/G连续
3' 末端序列	★★	· 3'末端避免GC含量过高
		· 3'末端碱基最好为G或C
		· 3'末端碱基尽量避免为T
互补性	★★★★	· 引物内部或两条引物之间避免3 base以上的互补序列
		· 引物3'末端避免2 base以上的互补序列
特异性	★★★★	使用BLAST检索，确认引物特异性

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## 引物设计原则

MADS42-pTF01s-F (SacI): **C**GAGCTCATGGTGAGGGGGGAAACTC.....59°C

MADS42-pTF01s-R (SmaI): **TCC**CCCGGGTTACGCTATGTATGCATGAGCAC.....61°C

>Glyma.05G050700.1.CDS..

ATGGTGAGGGGGGAAACTCAGATGAAGCGCATAGAAAATGAGACGAGTAGGCAAGTAACG  
TTCTCCAAGAGAAGGAACGGGTTGCTCAAGAAGGCCTTTGAGCTTTCGGTGCTGTGTGAT  
GCTGAAGTCGCACTCATCATCTTCTCTACCAGAGGGAGGCTTTATGAGTTCTCCAGTTCA  
AGATGCTCCAGTATAAACAAAACAGTTGAACGCTATCAAAGGAAGATCGAGGACCTGGGT  
GTCAGCAACAAAGGAATCCATGAAAATACACAGCATCTGAAGGAAGTTGATATGAGCATG  
GCAAAGAAGATCGAGCATCTAGAAGATTCAAGAAGAAAGCTTTTGGGAGATGAATTGGAT  
AAATGCAGTATTGACGAGTTACAACAGCTAGAGAACCAGCTCGAACGCAGCCTGGACAAA  
ATTAGGGCAACAAAGAATCAATTGTTTCAGGAAGCGAATCGAGAAGCTAAAAGAAGAGGAA  
AAGTGCTTACTCGAAGTAAATAAACGCTTACGTGAGCAGTACCGGATTGAACGACAACGT  
TGTTTGAGTGATCAGGATGTCGAATTCGCCACAAAAAAGGAGGGAGAAGAGGTGGAGACG  
GAGTTATTCATAGGAAGACCTGAGAGAAGAATGCCGTTAAAGTTGAAACCTACAACATAT  
AGTGCTCATGCATACATAGCGTAA

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

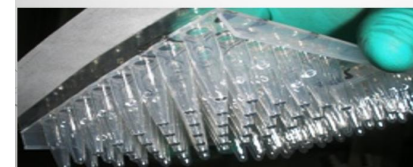
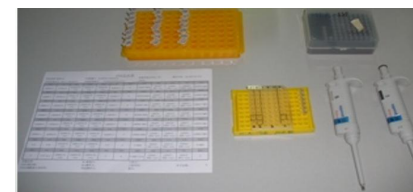
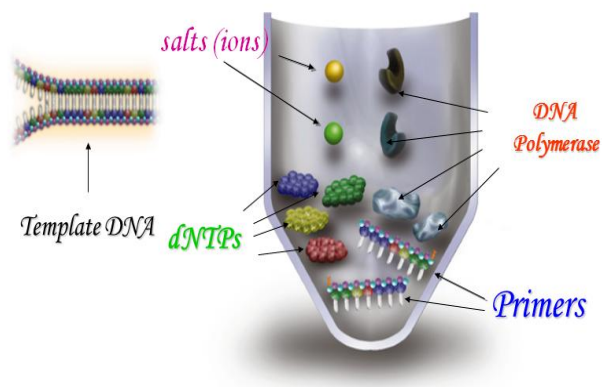
转化

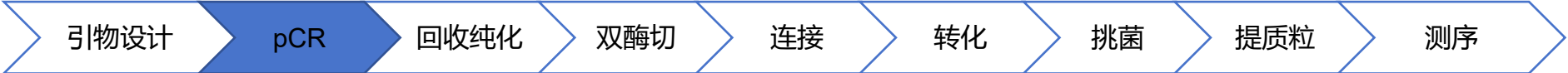
挑菌

提质粒

测序

成分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
灭菌dd H <sub>2</sub> O	33
10 $\times$ KOD-plus-neo Buffer	5
dNTPs (2mM)	5
MgSO <sub>4</sub>	3
Template	1
Primer R (10 $\mu\text{M}$ )	1
Primer F (10 $\mu\text{M}$ )	1
KOD-plus-neo Polymease	1
Total	50





引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Attention

- 试剂如不完全融化，会造成浓度不均，酶需冰上放置
- PCR管根据目的基因名称、日期、编号做标记
- 模板(Template)可根据浓度确定加入体积，缓冲液(Buffer)必须在酶之前加入。
- 注意不同引物对应不同PCR管



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

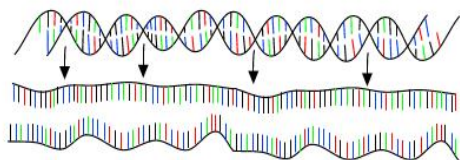
测序

## PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

### Step 1 : denaturation

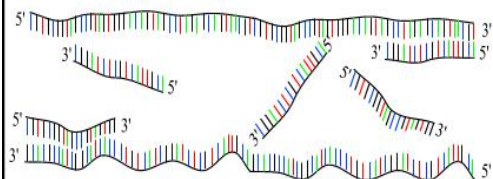
1 minut 94 °C



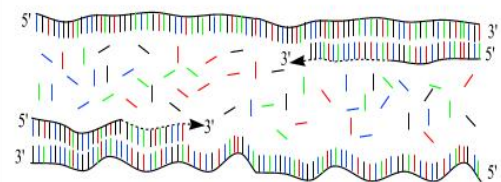
### Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

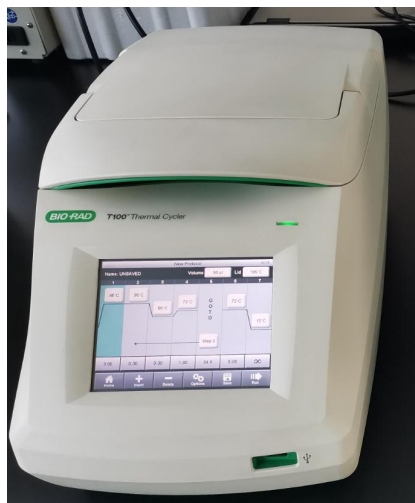
forward and reverse primers !!!



### Step 3 : extension

2 minutes 72 °C  
only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)



0 预变性	94°C 3min
1c 变性	94°C 30s
2c 退火	58 °C 30s
3c 延伸	72°C 1 min
4 保温	72°C 10min
5 冷却	16°C 10min
总循环数	30-40 (from 1c to 3c)



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

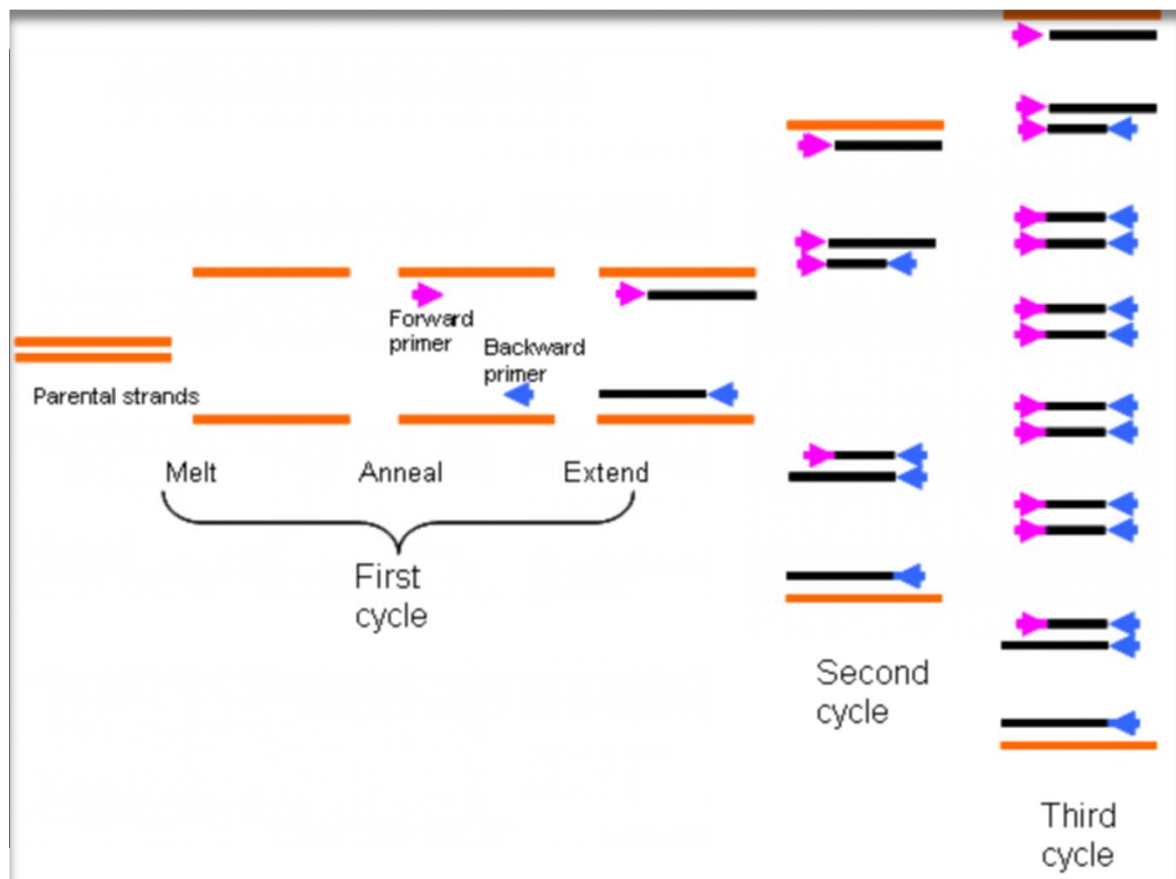
连接

转化

挑菌

提质粒

测序



0 预变性	94°C 3min
1c 变性	94°C 30s
2c 退火	58 °C 30s
3c 延伸	72°C 1 min
4 保温	72°C 10min
5 冷却	16°C 10min
总循环数	30-40 (from 1c to 3c)

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

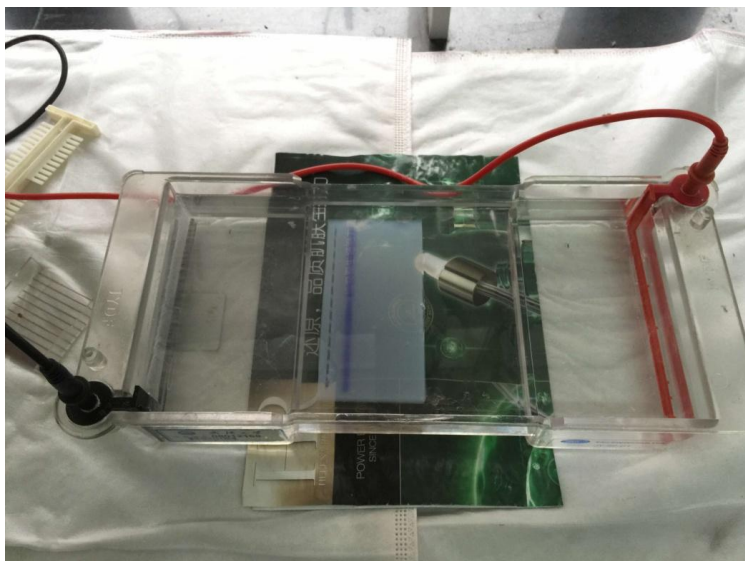
转化

挑菌

提质粒

测序

## Attention



- 琼脂糖凝胶可根据情况分成数小块，或插入孔径不同的梳子
- EB具有强致癌性，应在污染区操作
- 为保持凝胶成像仪与点样顺序一致，点样时应从右往左点（靠近自己一段开始）
- Marker是已知大小的正对照DNA，电泳能分离出不同条带，相当于尺子上的刻度，可以用来测算未知DNA样品的大小。
- **红色**为正极，黑色为负极，DNA 样品由负极往正极泳动（靠近加样孔的一端为负）。

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

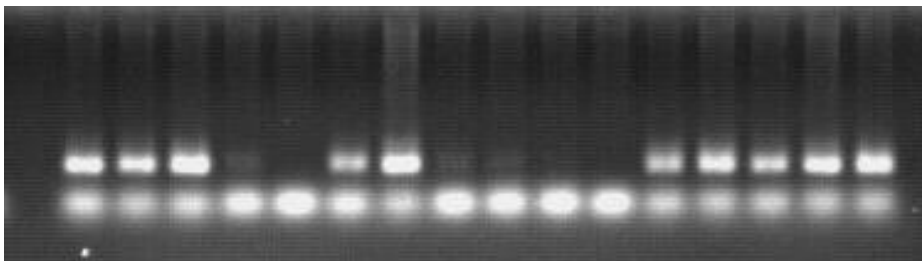
挑菌

提质粒

测序

## 可能的结果分析

### (1) 不出现扩增条带



原因:

- 1、模板质量 (含有抑制物, 浓度纯度低)
- 2、引物质量 (错配, 引物降解)
- 3、人为原因 (体系错配, 扩增程序有误)

对策:

- 1、纯化模板或重提或加大模板用量
- 2、更换新引物
- 3、重做

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

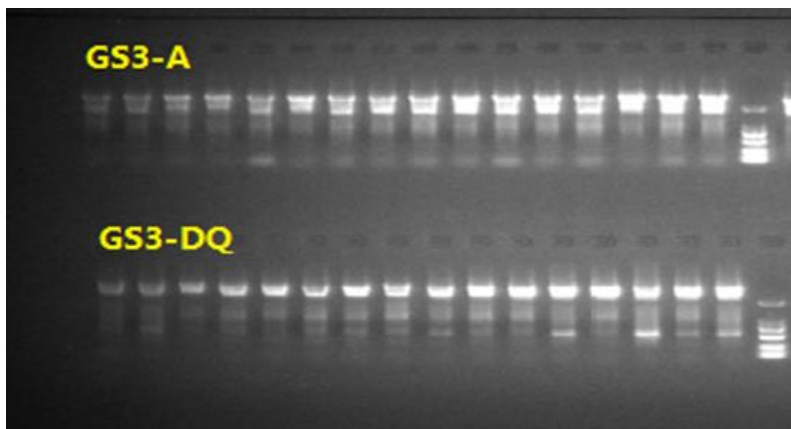
转化

挑菌

提质粒

测序

## (2) 扩增到别的基因



原因：

- 1、引物特异性差
- 2、模板或引物浓度过高
- 3、酶的质量差或量过高
- 4、 $Mg^{2+}$ 浓度过高
- 5、退火温度偏低
- 6、循环次数过多

对策：

- 1、重新设计引物
- 2、降低模板或引物浓度
- 3、减少酶量，更换另一种酶
- 4、降低 $Mg^{2+}$ 浓度
- 5、提高退火温度
- 6、减少循环次数

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

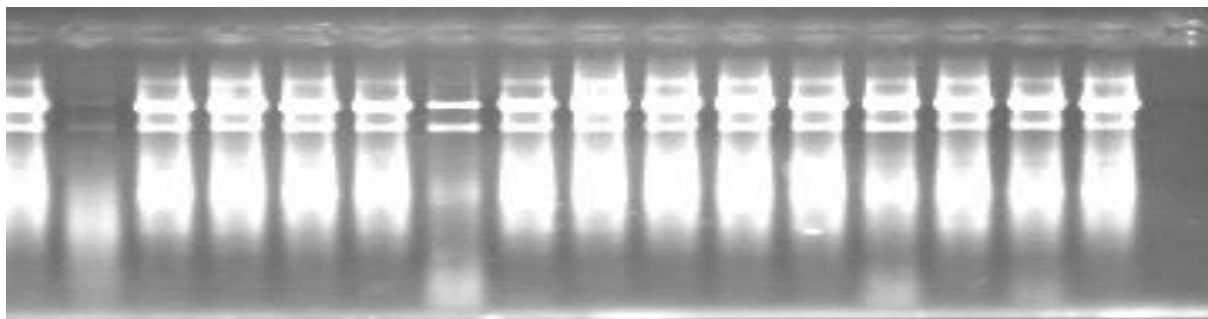
转化

挑菌

提质粒

测序

### (3) 出现片状拖带或涂抹带

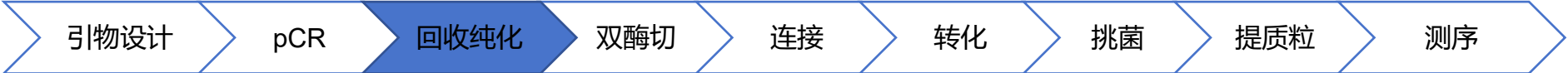


原因：

- 1、模板不纯
- 2、buffer不合适
- 3、退火温度偏低
- 4、酶量过多
- 5、dNTP、 $Mg^{2+}$ 浓度偏高
- 6、循环次数过多

对策：

- 1、纯化模板
- 2、更换buffer
- 3、适当提高退火温度
- 4、适量用酶
- 5、适当降低dNTP、 $Mg^{2+}$ 浓度
- 6、减少循环次数



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## PCR操作中出现的错误、原因及后果

### ● 试剂污染

原因：加不同的试剂时忘记换枪头；试剂打开盖子后放置时间过长；

后果：试剂作废、人力物力的浪费。

### ● 样品污染

原因：加不同的样品时忘记换枪头；样品在提取时发生污染；

后果：直接导致实验结果的失败，有的严重的会导致给客户的反馈结果出现错误；

### ● 样品加错

原因：进行PCR时加错样品，这个是最严重的错误，也是很难找到原因的错误。

后果：直接导致反馈结果出现错误，影响移植配型。

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

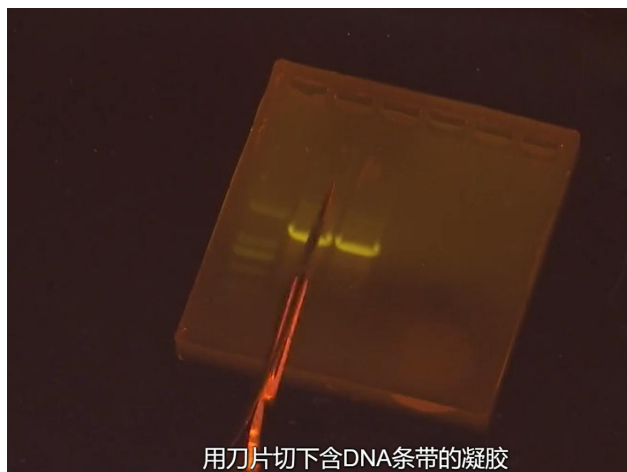
测序

## 正确的条带进行切胶回收

- 打开紫外灯，在操作台上根据荧光位置切胶，动作要快并尽可能切小块，切出的凝胶转移至1.5ml Ep 管里，称量凝胶重量

\*凝胶成像仪的紫外灯对DNA有突变作用，应尽可能减少紫外灯对凝胶的照射

按照 *Gel Extraction Kit(200)*试剂盒说明书回收纯化DNA：



用刀片切下含DNA条带的凝胶

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Objective

- 原理：限制性内切酶能特异地结合于一段特定的DNA序列的特异位点上,并切割双链DNA
- 目的DNA与质粒载体同时进行双酶切（两个不同的酶切位点，如BamH1和EcoR1），形成同样的酶切位点为进行连接



## Procedure

目的DNA酶切体系

试剂	用量
目的DNA	41μl
Buffer（10×）	5μl
enzyme 1	2μl
enzyme 2	2μl
dd H <sub>2</sub> O	补至50μl

载体酶切体系

试剂	用量
Plasmid	4μg(X μl*)
Buffer（10×）	5μl
enzyme 1	2μl
enzyme 2	2μl
dd H <sub>2</sub> O	补至50μl

\*根据质粒浓度（如pcDNA3.1+3flag浓度为455ng/μl，4000bp，反应体积约为9μl）

- 混匀，37℃孵育4-6h（6h以上更佳）



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Objective

- 通过凝胶电泳验证目的DNA、质粒是否酶切成功，并通过胶回收DNA及质粒（切去的片段除外）最终回收体积为30 $\mu$ l
- 通过连接使目的DNA导入质粒中，为下一步转染准备

## Procedure

目的DNA与质粒连接体系

试剂	用量
目的 DNA	13-15 $\mu$ l
plasmid	2-4 $\mu$ l
10 $\times$ Ligase Buffer	2 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- 混匀，4 $^{\circ}$ C过夜或常温条件下反应4h



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Objective

- 将连接产物通过转化转入到感受态大肠杆菌中，从而使连接产物（重组质粒）在大肠杆菌中大量复制

### LB培养基配制

胰蛋白胨（Tryptone）	10g/L
酵母提取物（Yeast extract）	5g/L
氯化钠（NaCl）	10g/L
琼脂粉（Agar）*	10-15g/L
*配制固体LB时加入 每锥形瓶加入200/250ml（定量）	

置于平板上



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

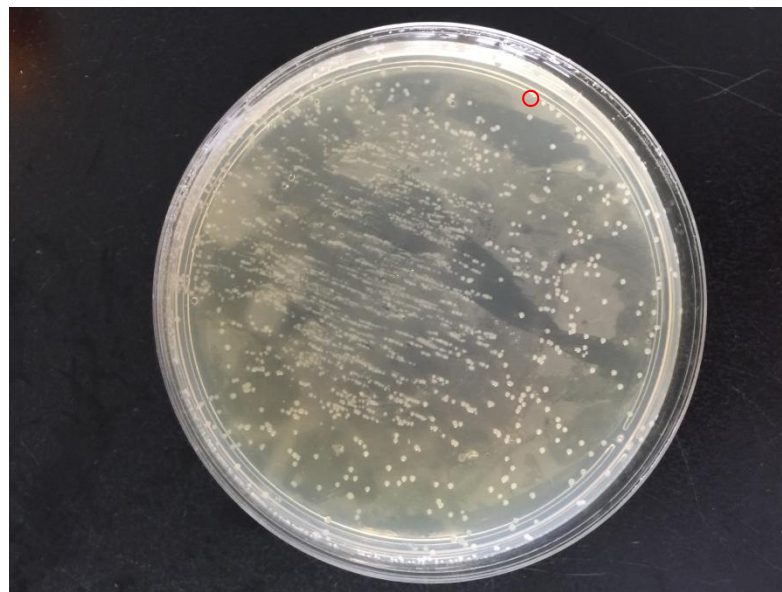
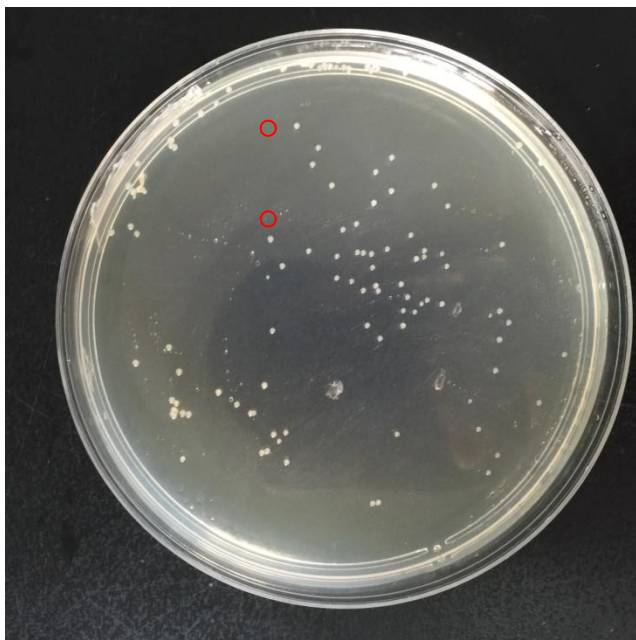
挑菌

提质粒

测序

## Objective

- 从大肠杆菌培养基中挑取优势菌落（单菌落）进行扩大培养
- 培养过夜后取出部分菌液进行保菌



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Procedure

- 消毒实验台及器具，取酒精棉球擦拭桌面、镊子，准备无菌枪头、试管、试管板两个，点燃酒精灯，酒精消毒双手
- 取LB培养液加入抗生素，向各试管中倒入LB培养液约10-15ml
- 从培养箱中取出培养皿，在火源附近打开，用镊子夹取一个枪头，挑取一个单菌落，轻轻沾取菌落，枪头丢入试管内，每菌种挑取2-3管
- 培养皿用封口膜封好放入4℃保存
- 将试管放入摇床震荡培养过夜，次日出现浑浊
- 消毒桌面，取1.5ml无菌Ep管标记
- 摇匀试管，使底部菌落分散，吸取1000μl菌液，加入200μl 60%甘油，-20℃装袋保存

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

转化

挑菌

提质粒

测序

## Objective

- 从宿主细胞大肠杆菌中提取大量复制后的质粒

## Procedure

- 按照E.Z.N.A<sup>TM</sup> *Endo-free Plasmid Mini Kit II (200)*试剂盒说明书提取质粒



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

连接

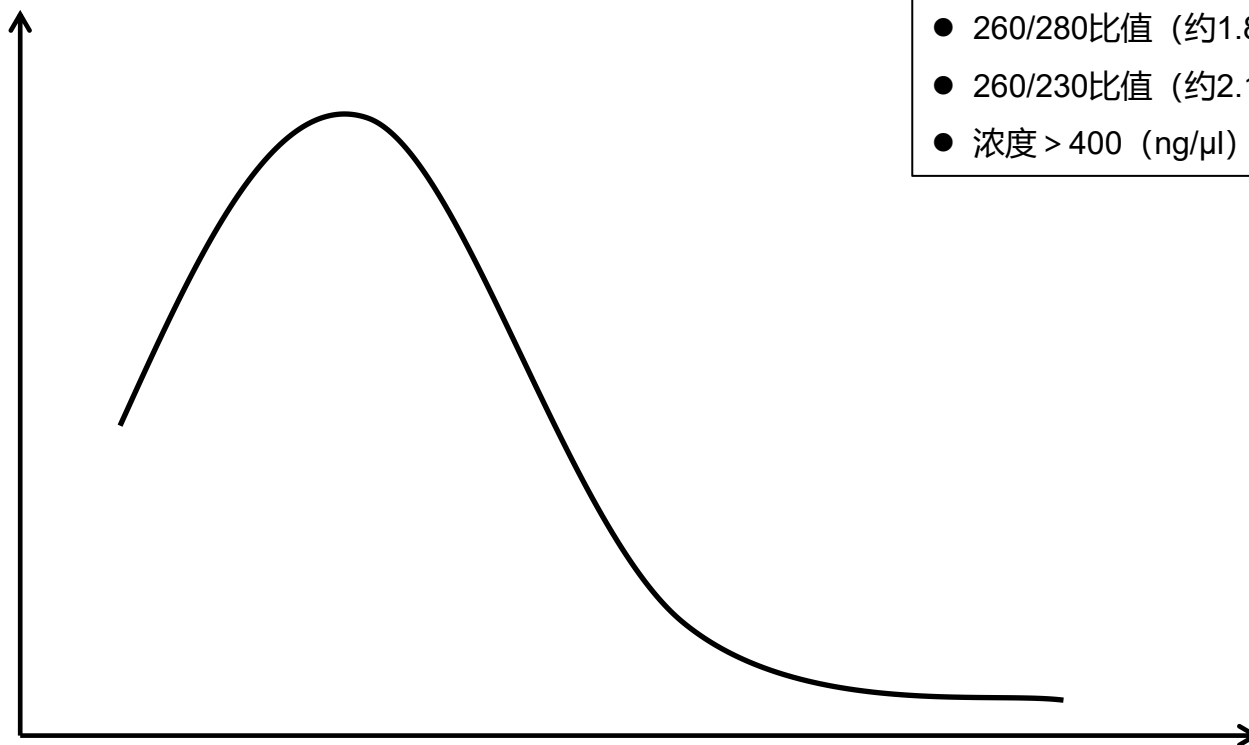
转化

挑菌

提质粒

测序

## 质粒浓度检测器



- 260/280比值 (约1.8)
- 260/230比值 (约2.1)
- 浓度 > 400 (ng/μl)

引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

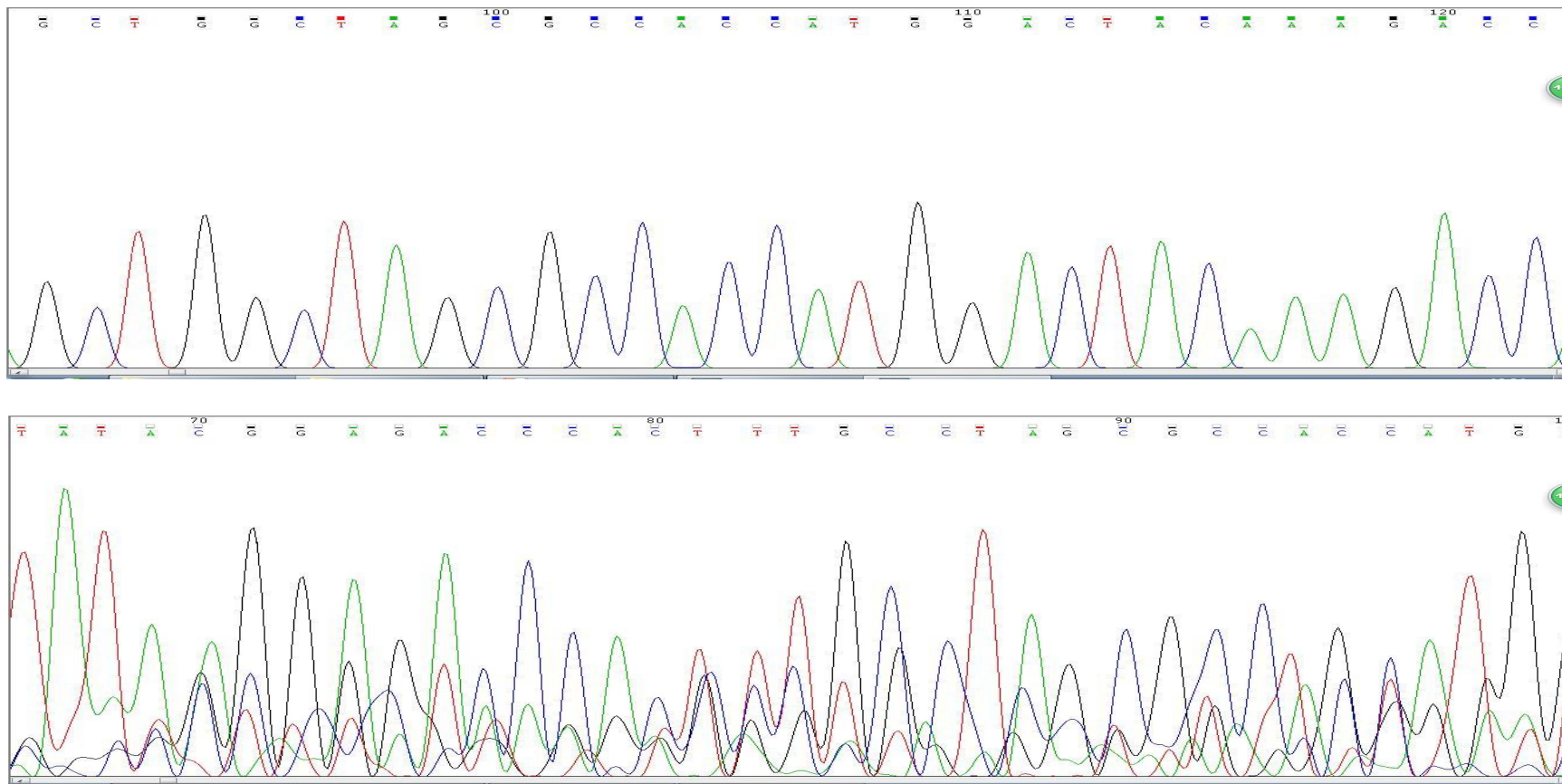
连接

转化

挑菌

提质粒

测序



引物设计

pCR

回收纯化

双酶切

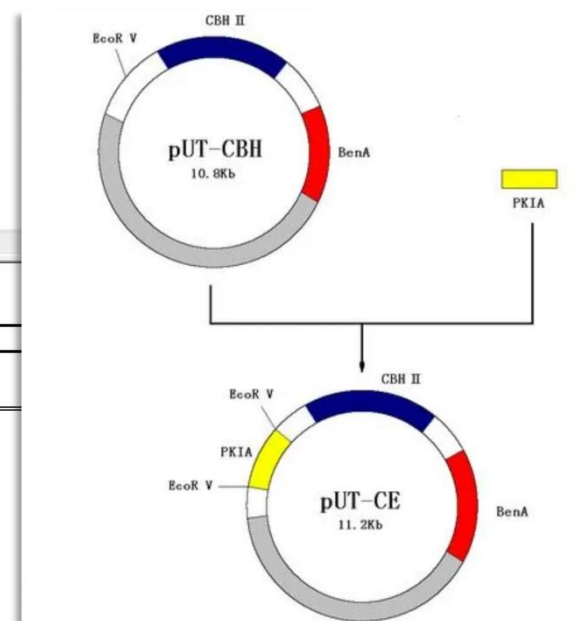
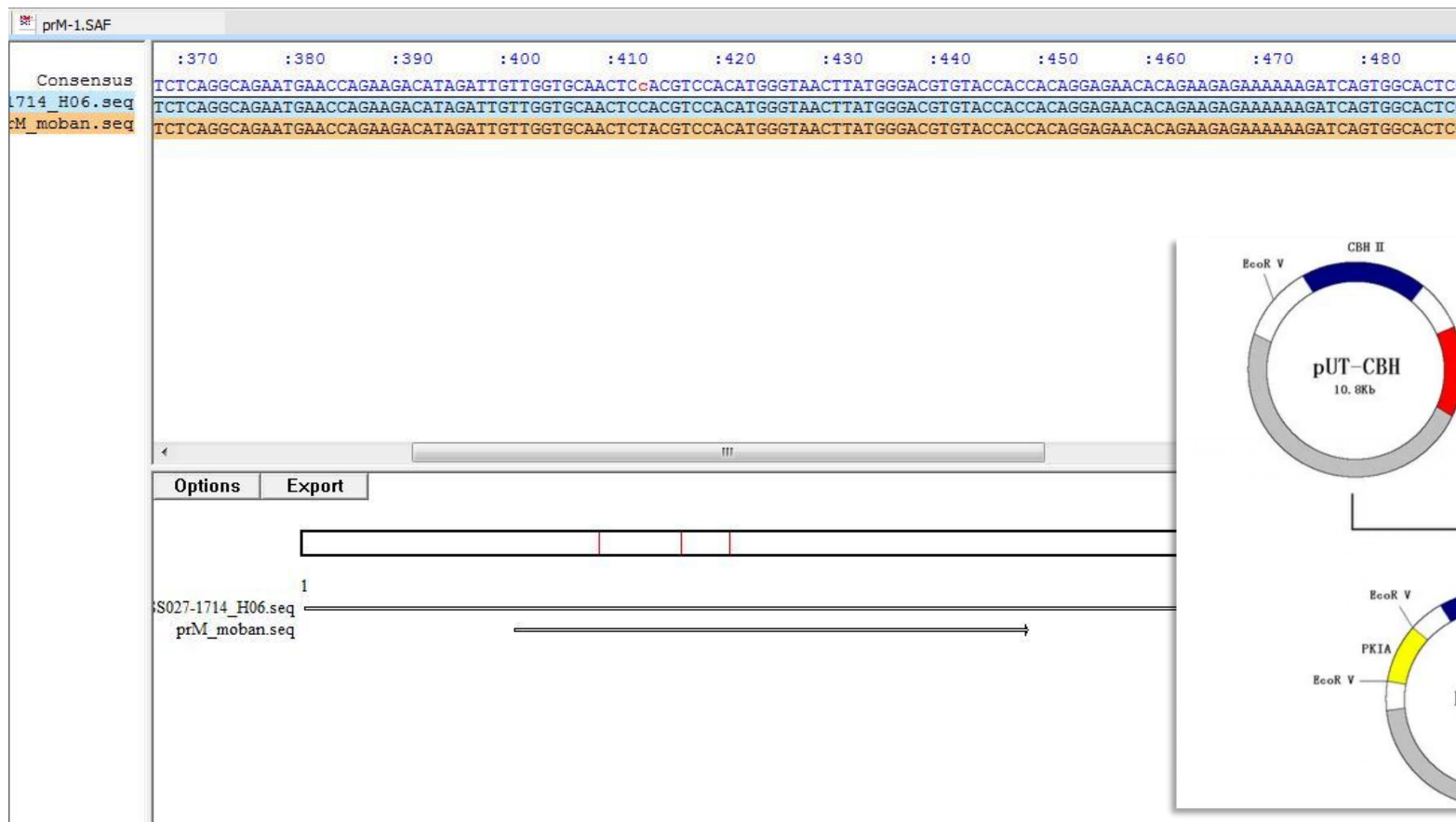
连接

转化

挑菌

提质粒

测序



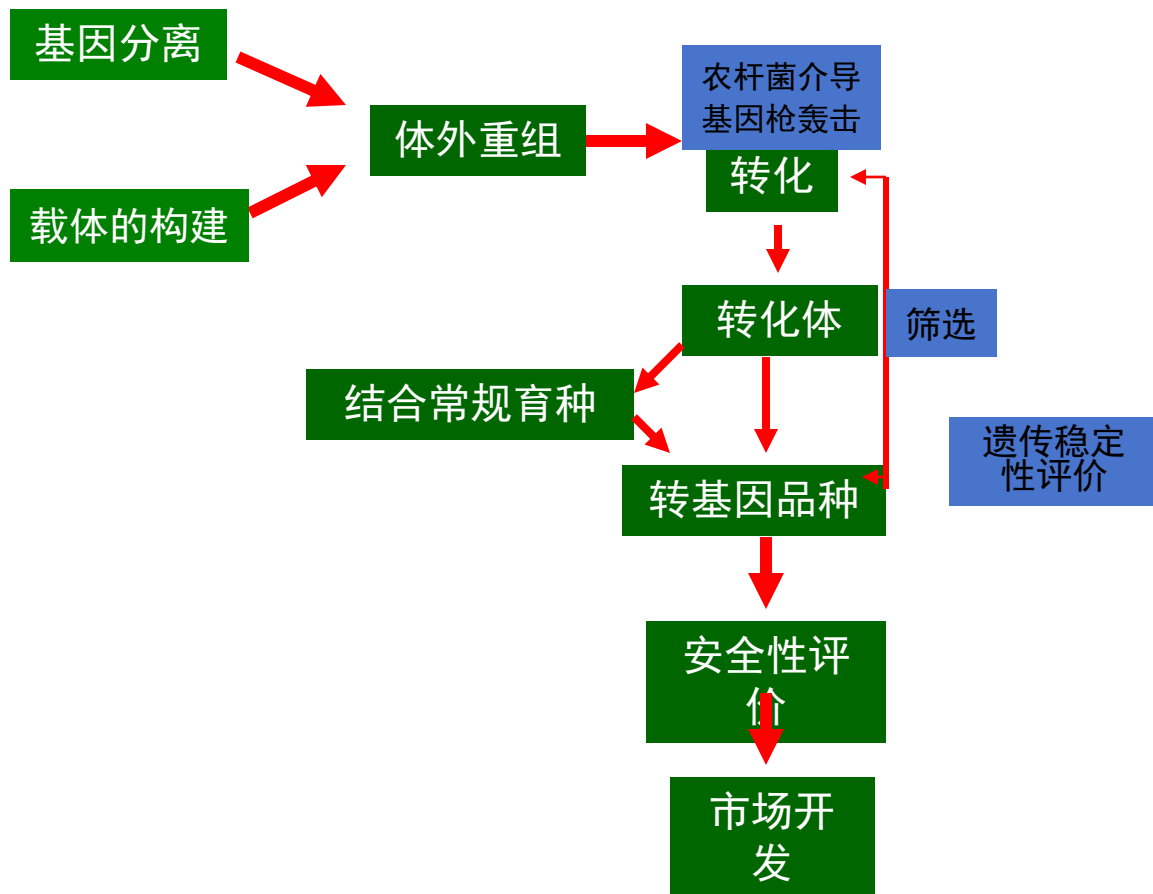


# 主要内容

---

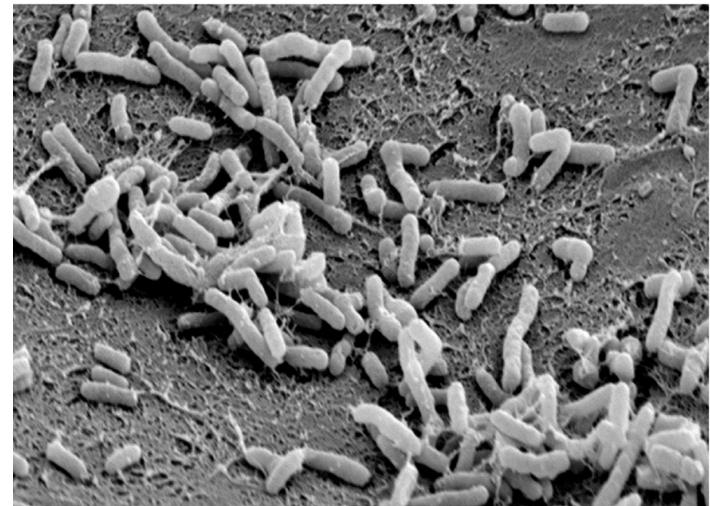
- 转基因育种概述
- 基因克隆
- 植物遗传转化
- 基因编辑技术与作物品种选育
- 转基因作物的遗传特点
- 转基因作物品种的选育
- 转基因作物的生物安全性

# 转基因育种的程序



# 一、根癌农杆菌介导法

- 根癌农杆菌介导法的分子机制
- 农杆菌介导法需要具备的条件
- 农杆菌介导法的基本流程



扫描电子显微镜下的根癌农杆菌，钨酸染色

# (一) 根癌农杆菌介导法的分子机制

## 1、植物冠瘿瘤——植物的一种癌症

### (1) 冠瘿瘤的起因：

由根癌农杆菌对植物的侵染而引起。

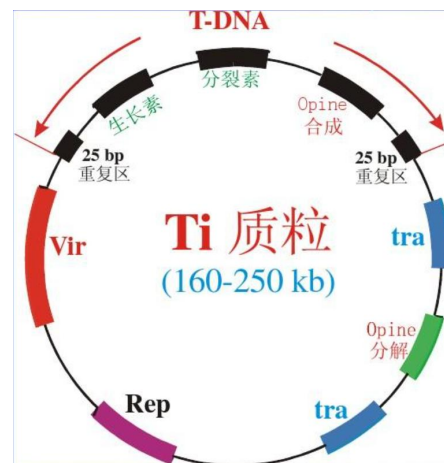
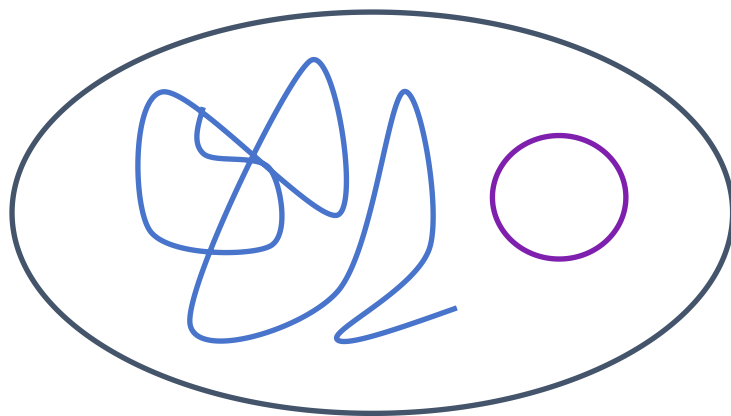
### (2) 冠瘿瘤的侵染过程：

细菌通过伤口进入植物，在基因水平上转化植物。细菌DNA中的编码基因在植物细胞中表达，刺激植物细胞不受控制的分裂，形成瘤。



## 2、Ti 质粒

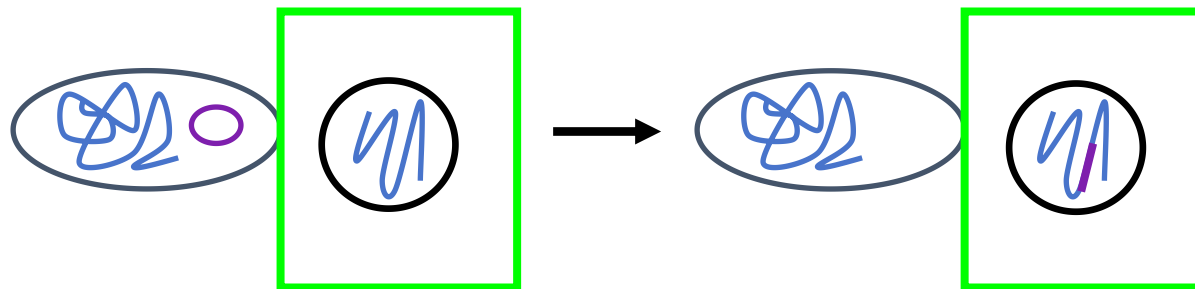
**Ti质粒**是在根瘤土壤杆菌细胞中存在的一种核区DNA外的自主复制的环形双链DNA分子。是英文肿瘤诱发（tumor-inducing）的缩略式。



此质粒既有在**细菌中表达**的基因，又有在**高等植物中表达**的基因，这是很独特的。

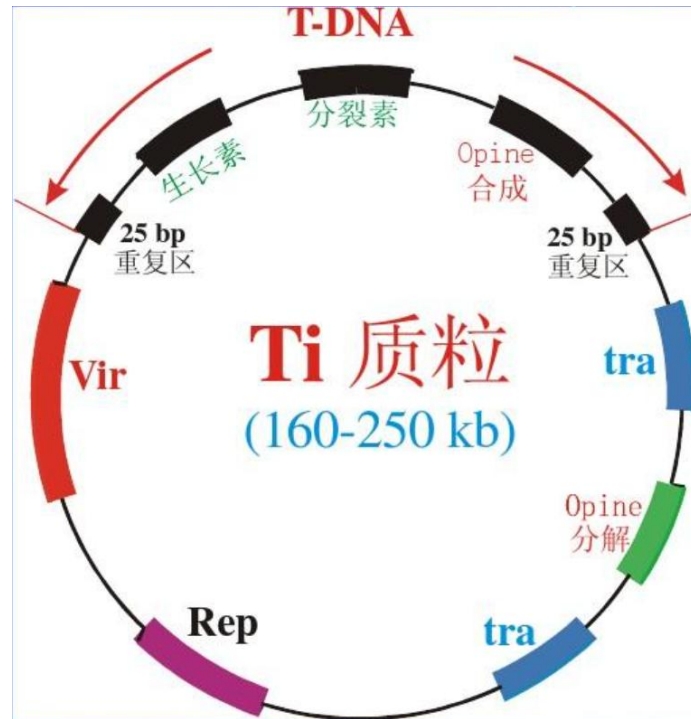
# (1) Ti质粒的功能

- ① **为农杆菌提供附着于植物细胞壁的能力**，Ti质粒为其寄主根瘤土壤杆菌提供附着于植物细胞壁的能力，从而帮助细菌在植物体内定殖；
- ② **参与寄主细胞合成激素的能力**，Ti质粒参与寄主细胞制造吲哚乙酸（IAA）和一些细胞分裂素的活动，这些激素在植物生长和发育中起重要作用；
- ③ **诱发植物产生冠瘿瘤**，Ti质粒决定所诱导的肿瘤的形态学特征和冠瘿碱的成分，这些成分对肿瘤的生长和特性有重要影响；
- ④ **赋予寄主分解冠瘿碱的能力**，Ti质粒赋予寄主菌株分解代谢各种冠瘿碱化合物的能力，并对其寄主范围有决定作用；



## (2) Ti质粒的功能区域

- T-DNA区
- Vir 区
- Con 区
- Ori 区



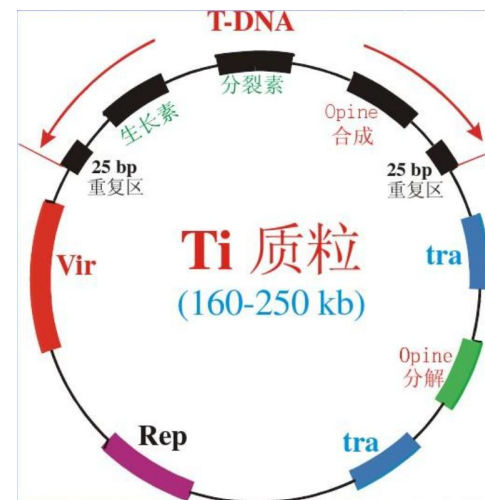
## ① T-DNA区（transferred-DNA regions）：

左边界      核心区      右边界



T-DNA是农杆菌侵染植物细胞时，从Ti质粒上切割下来转移到植物细胞的一段DNA，故称之为转移DNA。

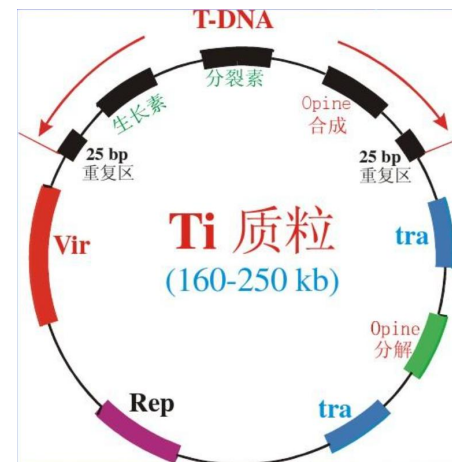
该DNA片段上的基因与肿瘤的形成有关。





## ② Vir区操纵子基因的结构与功能

- Vir区是一段长度为35KB操纵子；
- 包含六个基因：VirA、VirB、VirC、VirD、VirE、VirG。
- 该区段上的基因能激活T-DNA转移，使农杆菌表现出毒性，故称之为**毒性区**。
- T-DNA区与Vir区在质粒DNA上彼此相邻，合起来约占Ti质粒DNA的三分之一。

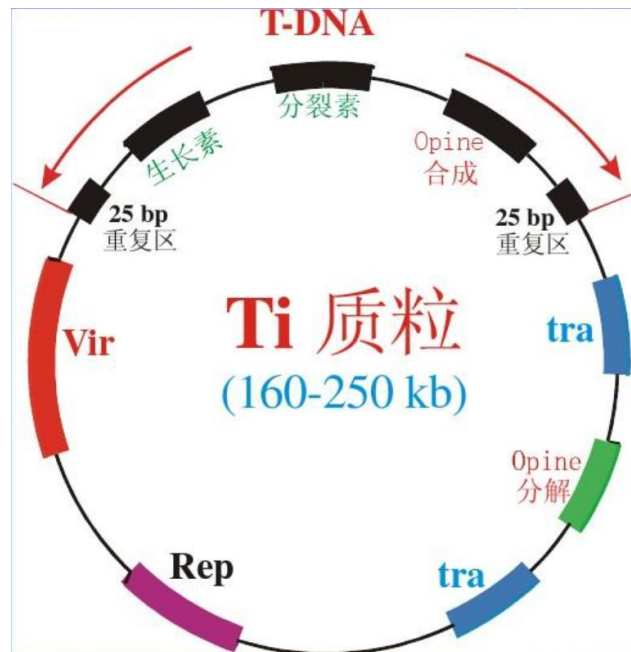


### ③ Con区 (regions encoding conjugations)

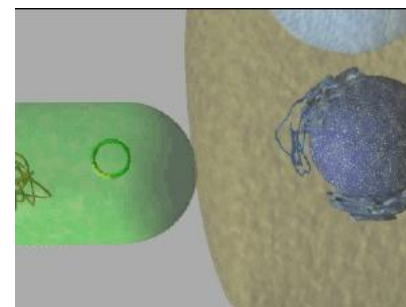
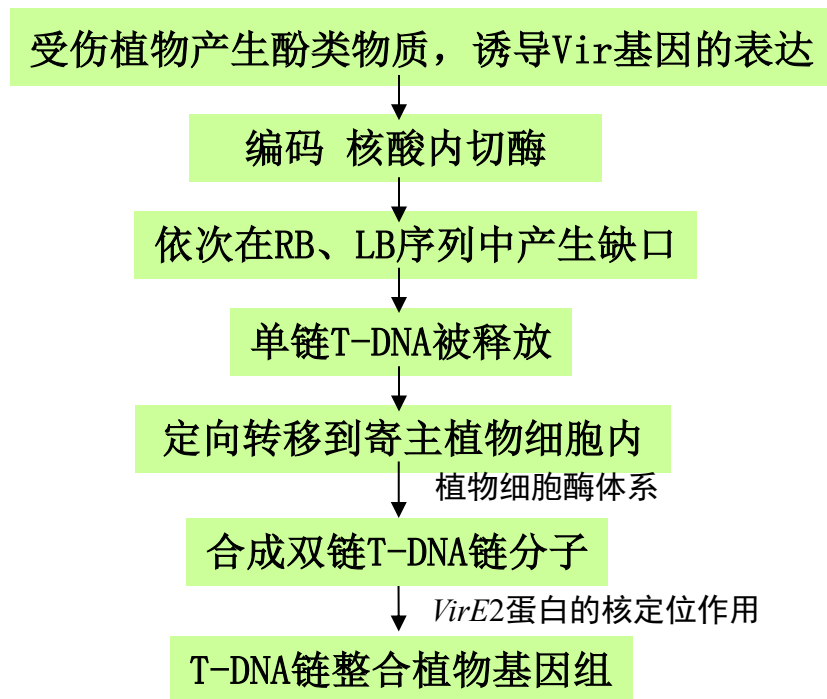
该区段上存在着与细菌接合转移的有关基因 (tra)，调控Ti质粒在农杆菌之间的转移。冠瘿碱能激活tra基因，诱导Ti质粒转移，因此称之为接合转移编码区。

### ④ Ori区 (origin of replication)

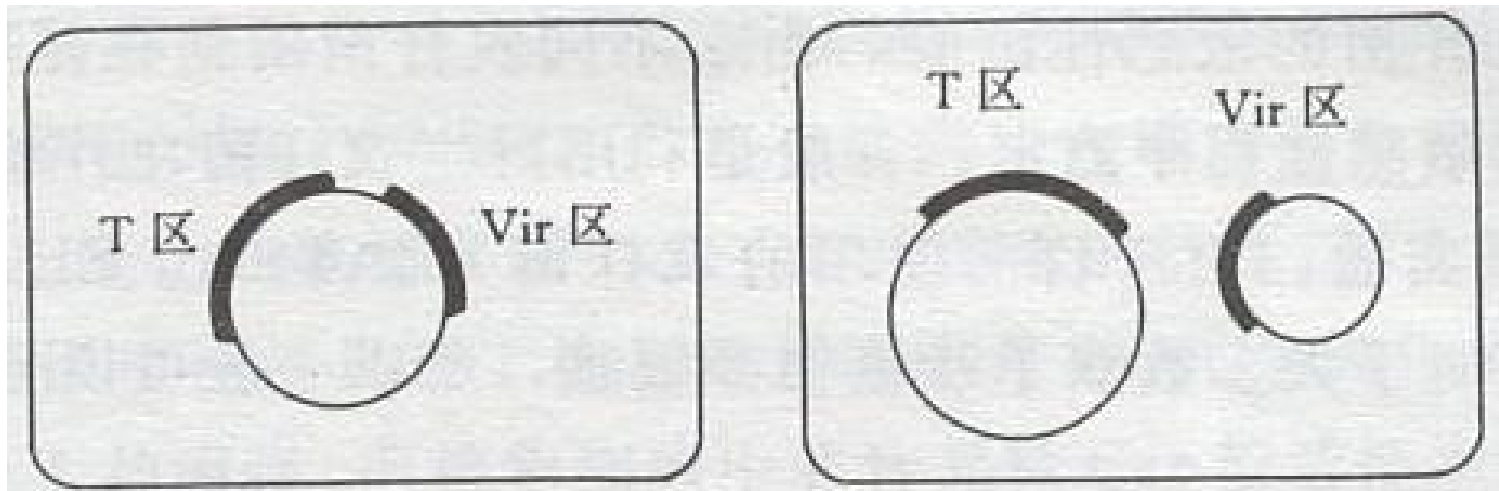
该区段基因调控Ti质粒的自我复制，故称之为复制起始区。



### 3、T-DNA转移的机制



## 4、植物遗传转化的载体系统



一元载体（顺势载体）

双元载体（反式载体）

## 野生型Ti质粒不能直接作为植物基因工程载体：

---

- ① Ti质粒分子量过大，一般在160 ~ 240kb；
- ② 分布各种限制酶的多个切点；
- ③ T-DNA区内含有许多编码基因，干扰宿主植物中内源激素的平衡，转化细胞长成肿瘤，阻碍细胞的分化和植株的再生；
- ④ Ti质粒不能在大肠杆菌中复制，即使得到重组质粒，也只能在农杆菌中进行扩增；
- ⑤ Ti质粒上还存在一些对于T-DNA转移不起任何作用的基因。

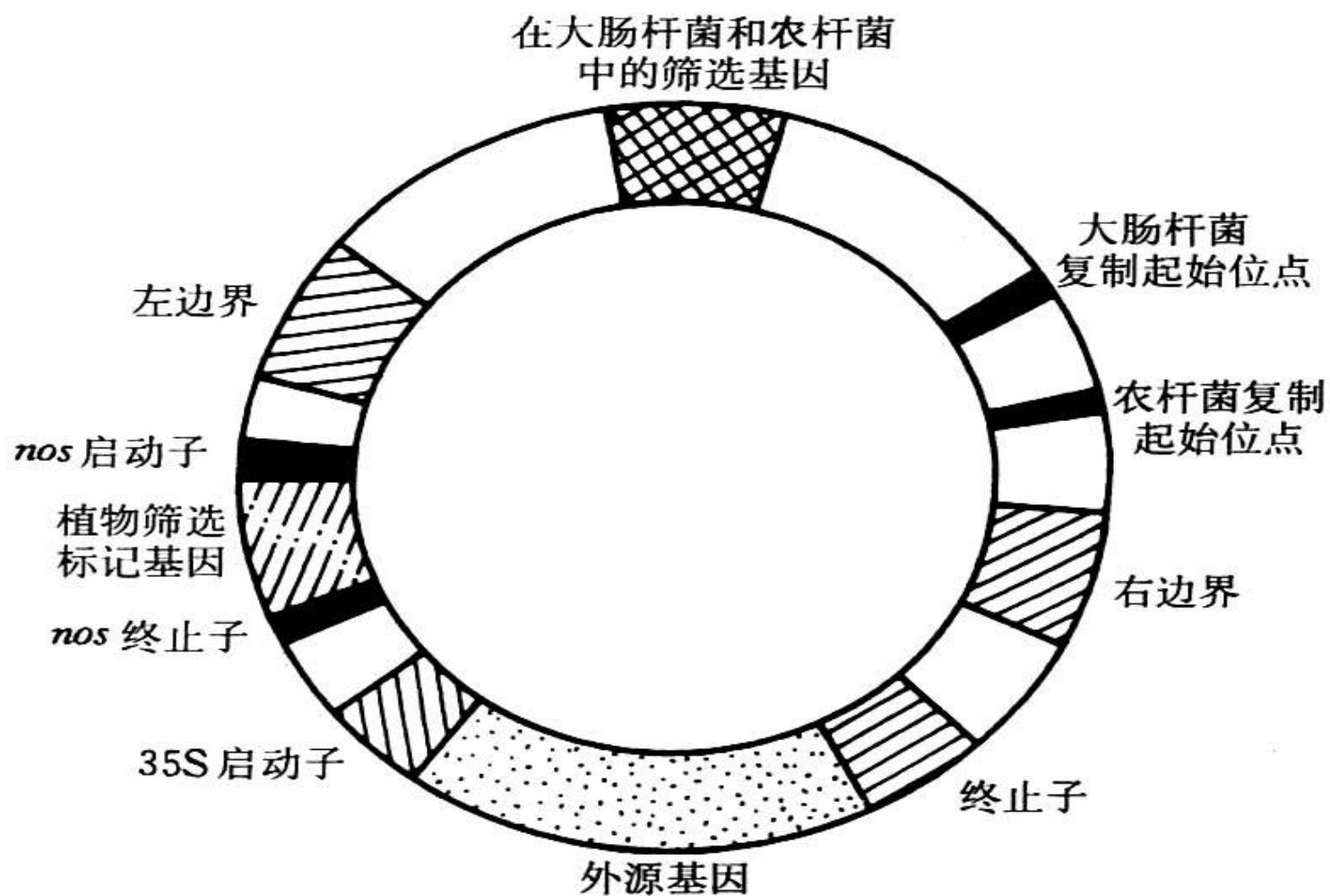
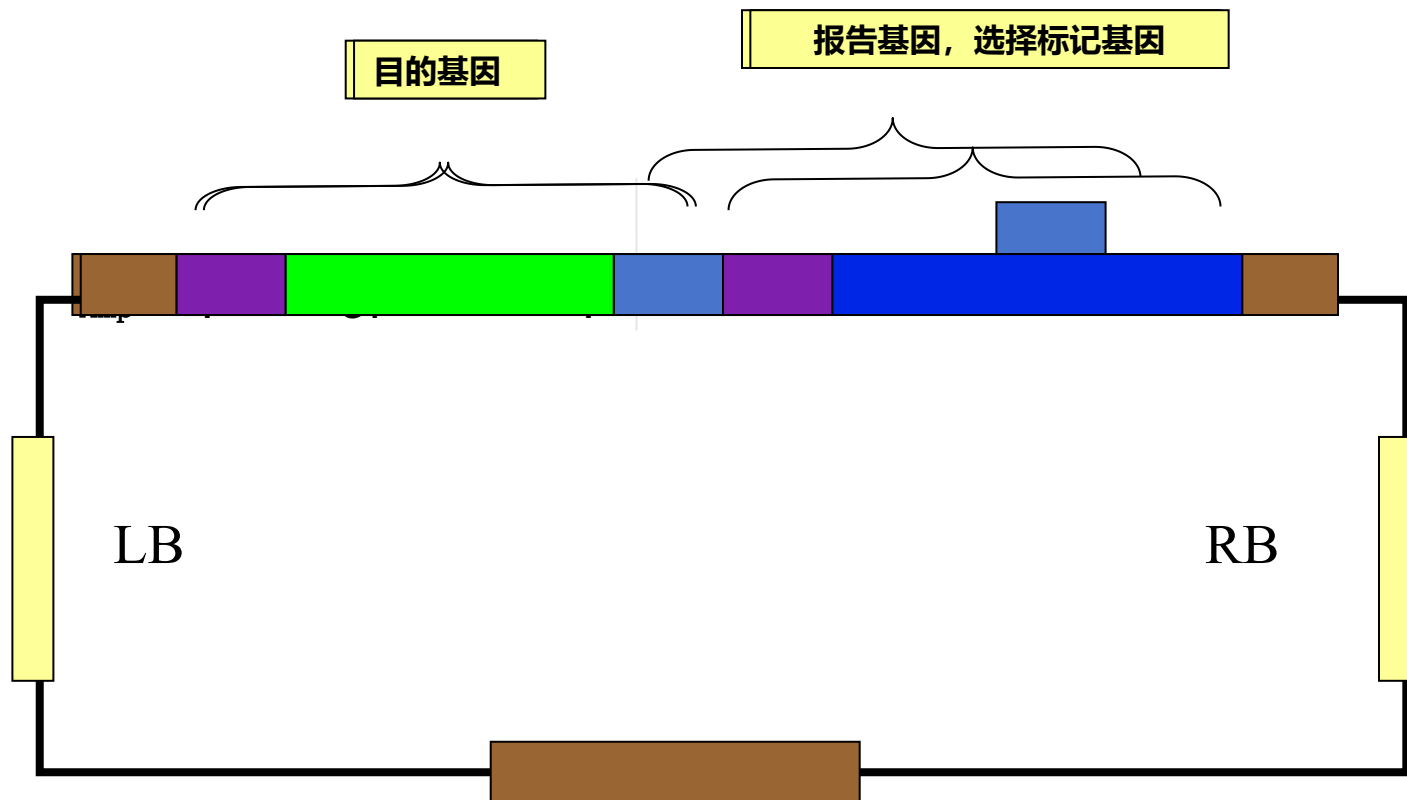
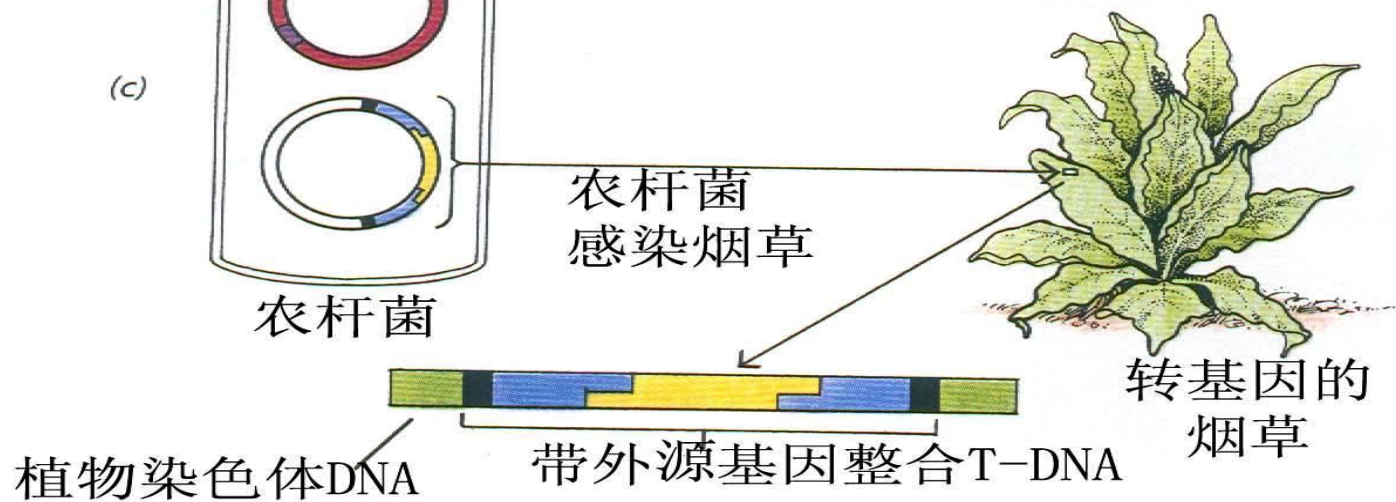
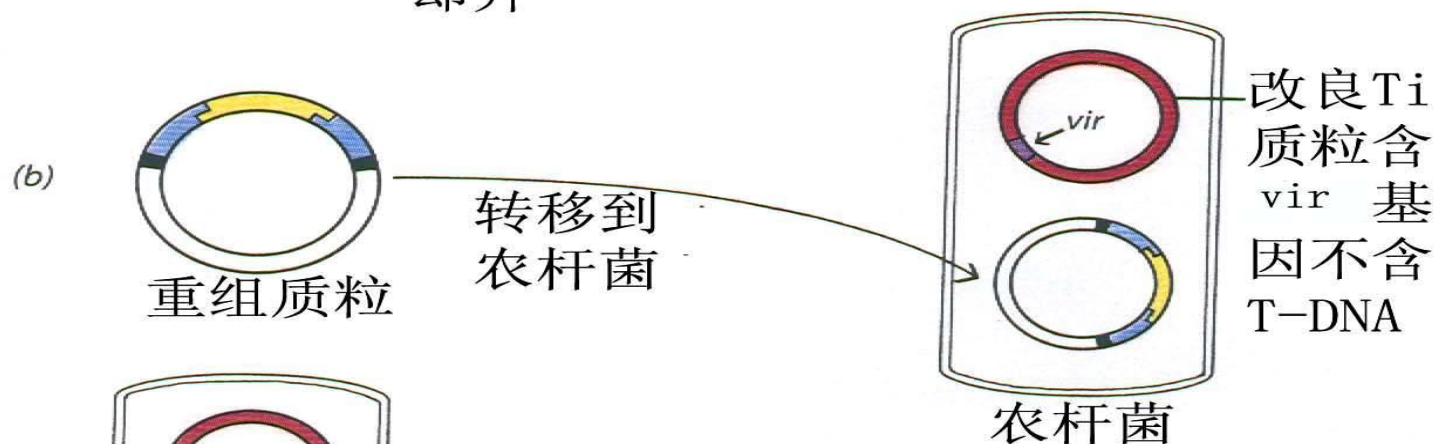
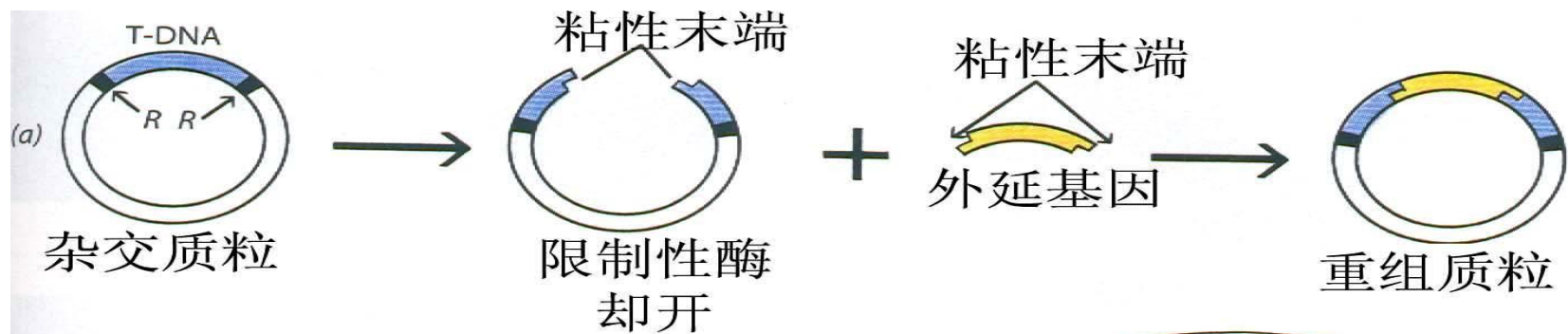


图 11-7 双元载体结构示意图

## 5、农杆菌介导的转化质粒的构建







## **(二) 农杆菌介导法需要具备的条件**

---

- **高效的植物基因转化受体系统**
- **受体植物细胞对农杆菌要有很高的亲和力。**
- **具有有效的选择系统。**
- **稳定的转化技术和基因表达。**

# 1、高效的植物基因转化的受体系统

---

- 成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立。
- **受体系统：**用于转化的外植体通过组织培养途径或其它非组织培养途径（如发苗产生子叶、胚轴等），能高效、稳定地再生无性系，并能接受外源DNA整合，对转化选择抗生素敏感的再生系统。

## A. 植物基因转化受体系统的条件

---

- 1、**高效稳定的再生能力；**
- 2、**受体材料要有较高的遗传稳定性；**
- 3、**外植体来源方便，如胚和其它器官等；**
- 4、**对筛选剂敏感；**
- 5、**转化率高**

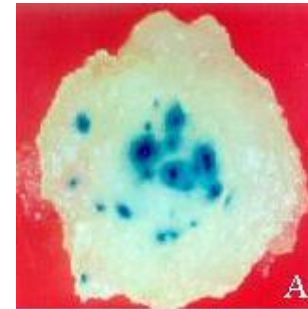
## B. 植物基因转化受体系统的类型

### 1. 愈伤组织再生系统

外植体材料经过脱分化培养诱导形成愈伤组织，转化（含目的基因质粒的农杆菌侵染），分化培养获得再生植株。

优点：外植体来源广，繁殖快，易接受外源基因，  
转化效率高。

缺点：遗传稳定性差、嵌合体  
因此需要连续的再生系统



## 2. 直接分化再生系统

**外植体材料细胞不经过脱分化形成愈伤组织阶段，而是直接分化出不定芽形成再生植株。**

**优点：**周期短、操作简单，体细胞变异小，遗传稳定；

**缺点：**材料局限，转化率低。



### 3.原生质体再生系统

---

**原生质体恢复细胞壁具有分化再生能力，是应用最早的再生受体系统之一。**

**优点：**高效、广泛地摄取外源DNA或遗传物质，获得基因型一致的克隆细胞，所获转基因植株嵌合体少，适用于多种转化系统；

**缺点：**不易制备、再生困难和变异程度高。

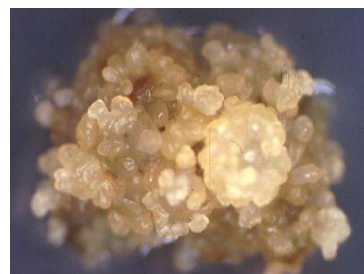
## 4. 胚状体再生系统

---

是指具有胚胎性质的个体。胚状体是一种早期发育的结构，主要由全能细胞组成，未来可能发育成完整的植物体。

**优点：**个体数目巨大、同质性好，接受外源基因能力强，嵌合体少，易于培养、再生。

**缺点：**技术含量高，多数植物不易获得胚状体。



## 5. 生殖细胞受体系统

---

以生殖细胞如花粉粒、卵细胞等受体细胞进行外源基因转化的系统。

一是利用组织培养技术进行小孢子和卵细胞的单倍体培养、转化受体系统；

二是直接利用花粉和卵细胞受精过程进行基因转化，如花粉管导入法，花粉粒浸泡法，子房微针注射法等。





## 2、选择系统

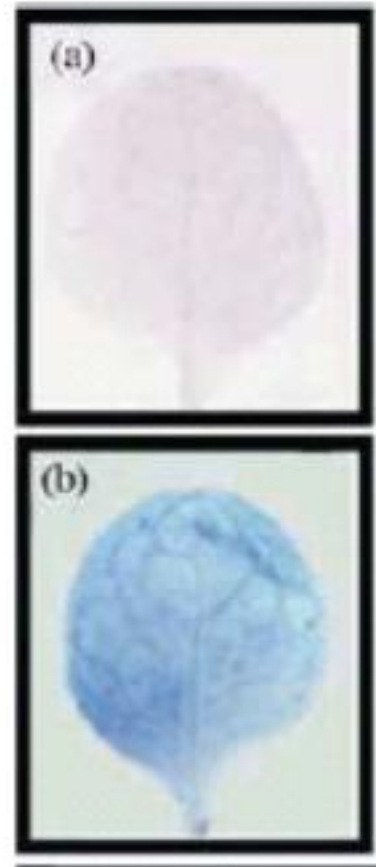
---

- **选择是为了将转化细胞与非转化细胞区分开，使转化细胞具有生长优势。在构建载体时，往往在目的基因上连上一个选择标记基因。**
- 必须具备以下四个条件：
  - ①编码一种不存在于正常植物细胞中的酶；
  - ②基因较小，可构成嵌合基因；
  - ③能在转化体中得到充分表达；
  - ④检测容易，并且能定量分析。
- 细菌筛选标记基因：
  - 产物给予细胞产生一种选择压力，致使未转化细胞不能生长、发育与分化。而转化细胞对该标记产生抗性，不影响其生长等，从而将转化细胞选择出来，例如，`Cat`（氯霉抗性基因）。
- 植物筛选标记基因：
  - 强调给转化细胞带上一种标记，起报告和识别作用，故称报告基因。

## 报告基因: Gus基因 ( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因)

在植物细胞中所产生的葡萄糖苷酸酶在检测上具有以下特点:

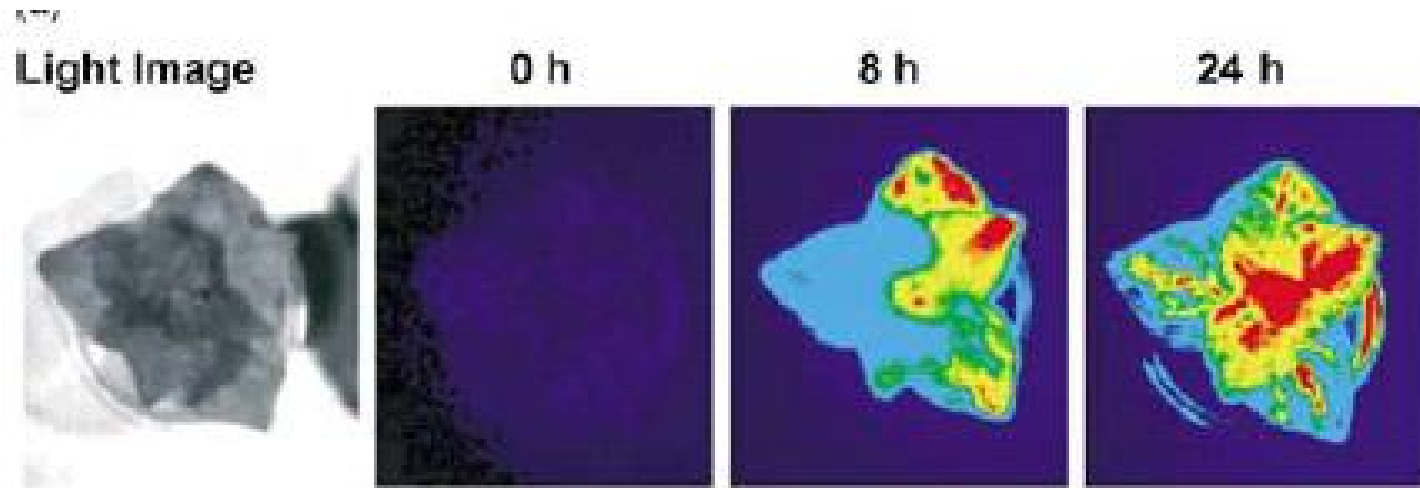
- ① 在一定条件下与X-Glucuronic acid (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glucuronic acid) 底物发生作用, 产生蓝色沉淀, 既可以用分光光度计法测定, 又可以直接观察到植物组织中形成的蓝色斑点。
- ② 当加入4-甲基伞形酮基和葡萄糖苷酸时生成荧光 (光 ( $\lambda=465\text{nm}$ ))。因而可以用荧光光谱法测定。由于荧光检测极为灵敏。
- ③ 检测容易、迅速并能定量, 只需少量植物组织。在短时间内测定完毕。
- ④ 价格便宜。



## 报告基因:

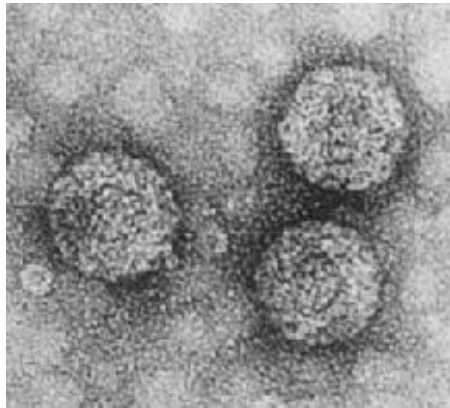
GFP (绿色荧光蛋白基因) ;

LUC (萤火虫荧光素酶基因) ;



# 启动子的选择

35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter



CaMV 35S is a strong promoter  
that is active  
in essentially all dicot plant tissues.

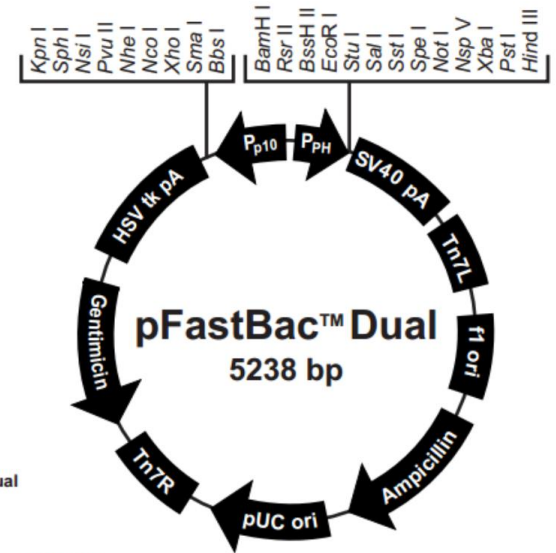
## A、新霉素磷酸转移酶基因 (Npt-II)

---

- 新霉素抗性基因是从大肠杆菌转座子Tn5中分离的，其对应失活的选择试剂为卡那霉素、新霉素和G418。
- 对茄科植物（烟草、马铃薯、番茄）转化特别有效，对豆科和单子叶植物效果不佳。

## B、庆大霉素抗性基因 (gent)

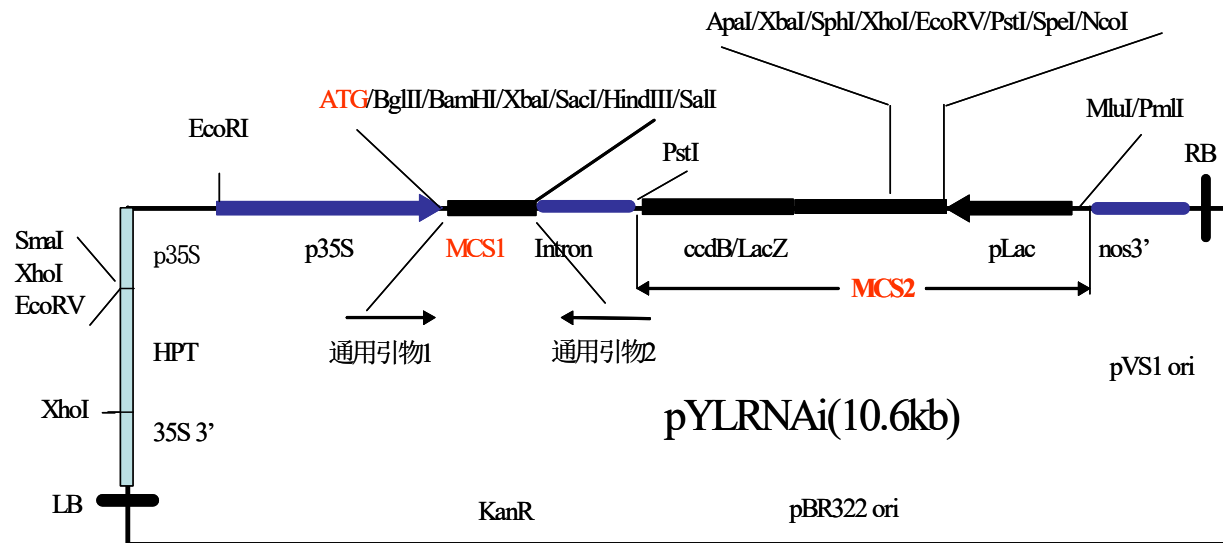
- 该基因编码一种乙酰转移酶，属抗生素标记基因，它通过对庆大霉素的乙酰化而使其失活。
- 该选择系统目前也有一定的应用，例如矮牛、烟草和番茄。



f1 origin: bases 102-557  
Ampicillin resistance gene: bases 689-1549  
pUC origin: bases 1694-2367  
Tn7R: bases 2611-2835  
Gentamicin resistance gene: bases 2902-3435 (complementary strand)  
HSV tk polyadenylation signal: bases 3992-4274 (complementary strand)  
Multiple cloning site: bases 4274-4337 (complementary strand)  
p10 promoter (P<sub>p10</sub>): bases 4338-4459 (complementary strand)  
Polyhedrin promoter (P<sub>pH</sub>): bases 4478-4606  
Multiple cloning site: bases 4606-4704  
SV40 polyadenylation signal: bases 4722-4962  
Tn7L: bases 4991-5156

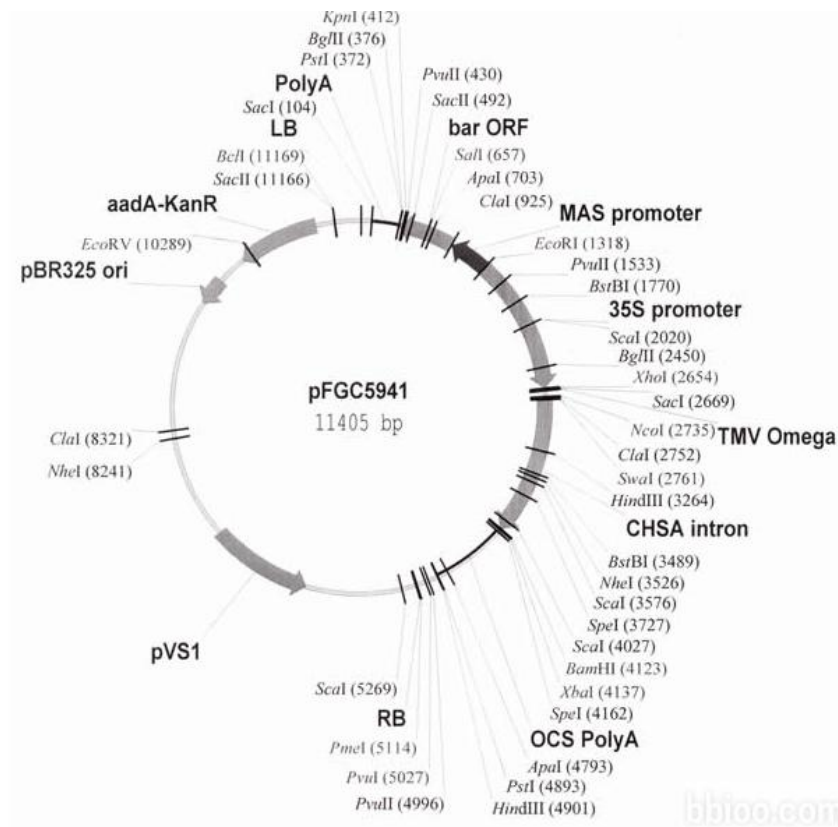
## C、潮霉素磷酸转移酶基因 (hpt)

潮霉素是一种很强的细胞抑制剂，对许多植物都有很强的毒性。潮霉素磷酸转移酶可通过对潮霉素磷酸化而使其失活。



## D、膦丝菌素乙酰转移酶基因 (bar)

- 该基因是从吸水链霉菌中克隆的一种基因，其对应的选择试剂为膦丝菌素（basta），膦丝菌素可抑制谷氨酰胺合成酶的活性，从而导致非转化细胞发生氨的致死性累积。





## **(四) 转基因方法的确定和外源基因的转化**

**转基因方法概括起来说主要有两类：**

**第一类是以载体为媒介的遗传转化，也称为间接转移系统法。**

**第二类是外源目的DNA的直接转化。**

# **1.载体介导转移系统**

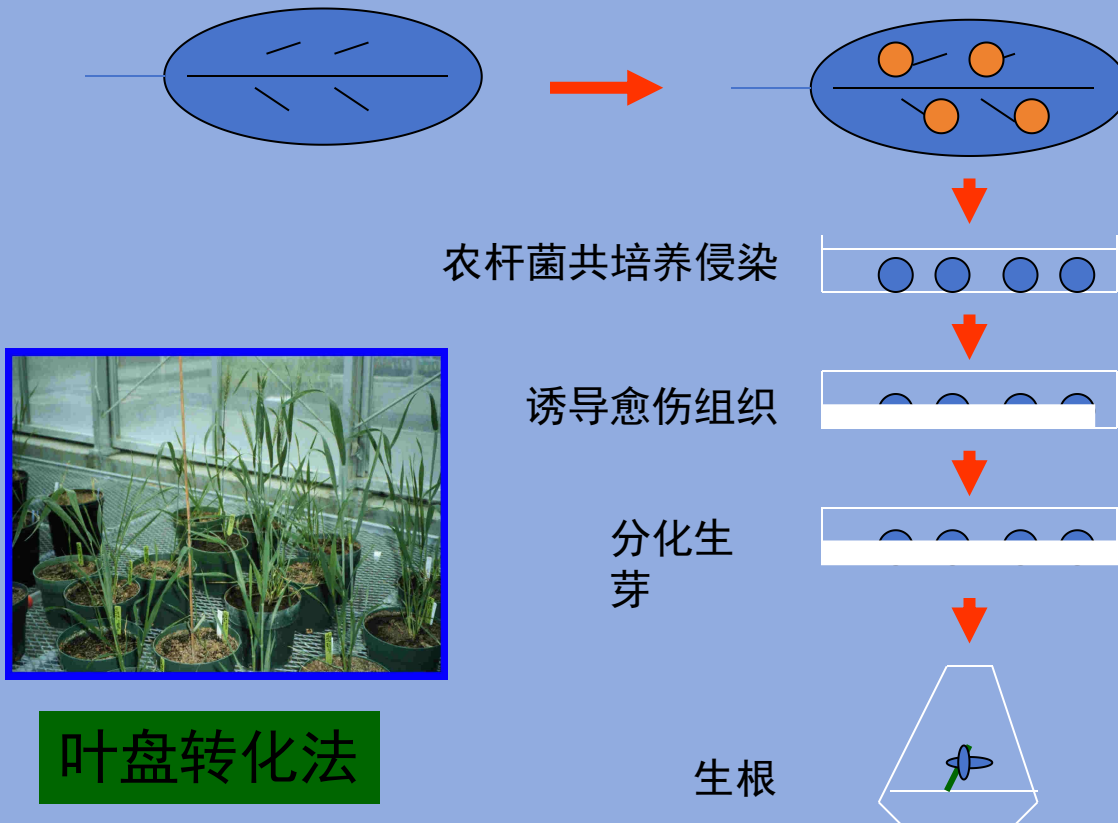
**最常见的转基因方法。**

- ① 将外源基因重组进入适合的载体系统，通过载体将携带的外源基因导入植物细胞，整合在核染色体组中并随核染色体复制和表达。**

**农杆菌Ti质粒 (tumor-inducing plasmid) 或 Ri质粒(root-inducing plasmid)介导法是迄今为止植物基因工程中应用最多、机理最清楚、最理想的载体转移方法。**

## (1) 叶盘法

双子叶植物较为常用、简单有效的方法。



## (2) 真空渗入法

将适宜转化的健壮植株倒置浸于装有携带外源目的基因的农杆菌渗入培养基的容器中，经真空处理，造伤，使农杆菌通过伤口感染植株，在农杆菌的介导下，发生遗传转化。

简便、快速、可靠，不需要组织培养。

## (3) 愈伤组织共培养

## (4) 原生质体共培养

## **2.外源基因直接导入法**

### **(1) 化学刺激法**

**借助于细胞融合剂（聚乙二醇 PEG、聚乙烯醇 PVC、多聚-L-鸟甘酸 PLO 等）的作用，使细胞膜表面电荷发生紊乱，干扰细胞间的识别，使细胞膜之间、DNA/RNA 与细胞膜之间形成分子桥，促使细胞膜间的相互融合（接触和粘连）和外源 DNA/RNA 进入原生质体。**

## **(2)基因枪轰击法**

**(微弹轰击技术micro-projectile bombardment)**

**将外源DNA包裹在微小的钨粉或金粉颗粒的表面，借助高压动力射入受体细胞或组织，最后整合到植物基因组并得以表达。**

**步骤简单易行：适合于大多数细胞或组织，克服了受体材料的限制，不必制备原生质体，具有相当广泛的应用范围，已经成为植物细胞转化最有效方法之一。**

**到目前为止，利用基因枪法已经在烟草、豆类和多数禾本科农作物、果树花卉和林木等植物上获得转基因植株。**



### **(3)高压电穿孔法（又称电击法）**

**利用高压电流脉冲在细胞质膜上形成瞬间微孔，使 DNA 直接通过微孔或者作为微孔闭合时伴随发生的膜组分重新分布进入细胞质并整合到宿主细胞中。**

### **(4)微注射法**

**细胞操作：**

**利用琼脂糖包埋、聚赖氨酸粘连和微吸管吸附等方式将受体细胞（原生质体或生殖细胞）固定，然后将供体DNA或RNA直接注射进入受体细胞。**

**子房注射法或花粉管通道法：**

**具有较大子房或胚囊的植株可在田间进行活体操作。操作简便、成本低。**

## 2.转化体的鉴定

通过筛选得到的再生植株初步证明标记基因整合进入受体细胞。至于目的基因是否整合到受体核基因组、是否表达，还必须对抗性植株进一步检测。

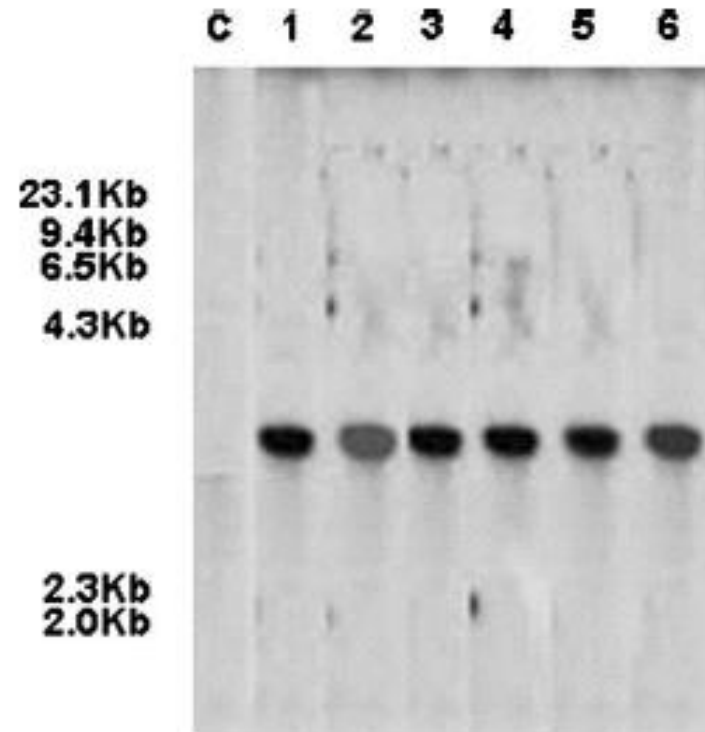
### (1) DNA水平的鉴定

检测内容：是否整合、拷贝数、整合位置。

检测方法：特异性PCR（以外源基因两侧序列设计引物）

Southern杂交（外源目的基因序列为探针）





特异性PCR检测外源基因整合到受体

## (2) 转录水平的鉴定

### 常用的方法

Northern杂交 (标记的RNA为探针对总RNA杂交)  
RT-PCR 检测

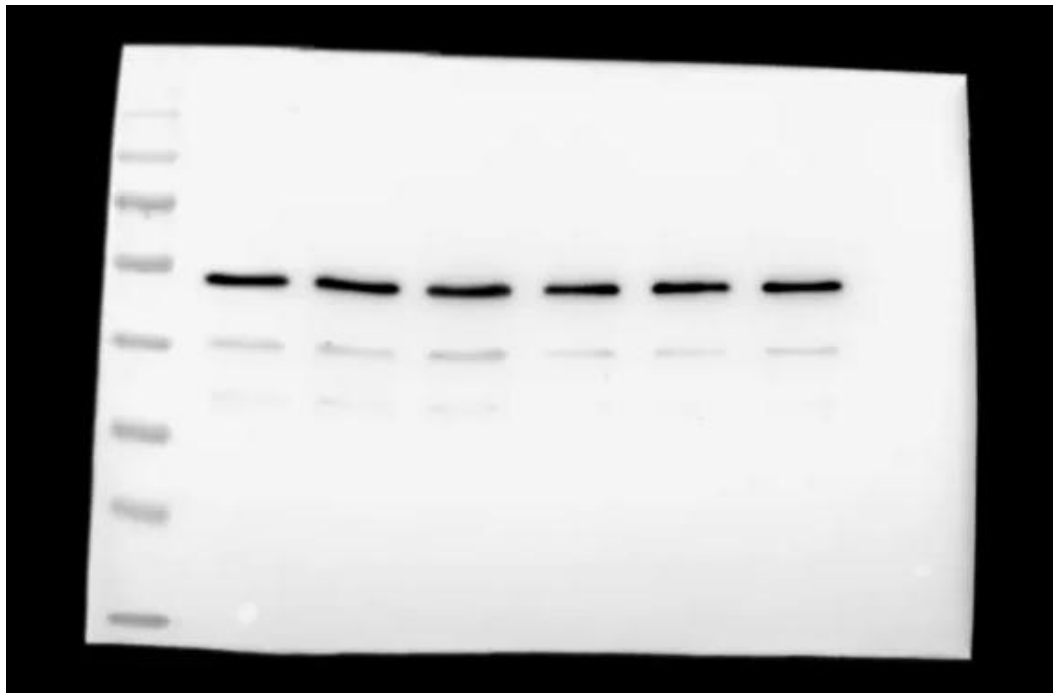


### (3) 翻译水平的鉴定

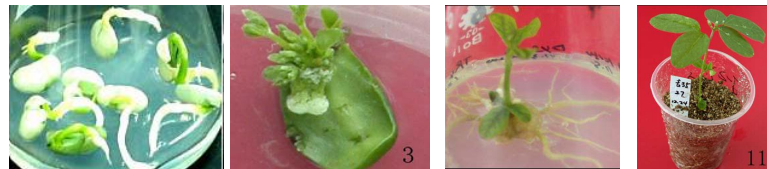
为检测外源基因转录形成的mRNA能否翻译，还必须进行翻译或者蛋白质水平检测。

主要方法：Western杂交

免疫检测



# 大豆子叶节法为例：



## (1) 大豆种子的消毒

选取种皮光滑无病斑、无裂痕、无霉变的大豆种子，采用氯气熏蒸法进行消毒。

- ❖ 1. 将种子放入培养皿，将培养皿放入通风橱的干燥器中；
- ❖ 2. 在干燥器的烧杯中加入100mL次氯酸钠溶液；
- ❖ 3. 沿烧杯壁加入4mL浓度为12N的盐酸溶液；
- ❖ 4. 关闭干燥器，过夜放置16-18小时；



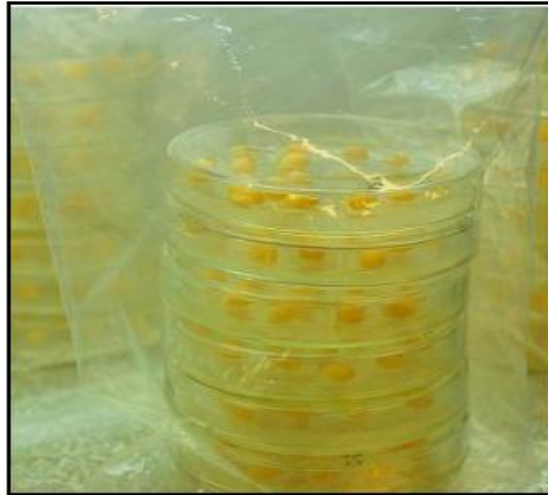
Seed sterilization

## (2) 大豆种子的萌发

- 消毒后的种子被直接播种于萌发培养基中，培养皿不封口。将萌发培养基放入环境条件为温度25℃，光照周期18hr/d，培养室中萌发4-6天。
- 萌发培养基 成分：

B5加入2%的蔗糖，

0.8%琼脂，pH调到5.8。



**Seed germination**

### (3) 农杆菌的准备

- 在YEP平板中挑取农杆菌单克隆3-4个，接种于2ml含相应抗生素的YEP液体培养基中，温度28℃，转速250 rpm过夜培养，使菌液达饱和。



挑单克隆  
纯化农杆菌



### (3) 农杆菌的准备

- 将上述培养菌液加入200mL 含相应抗生素的 YEP 液体培养基，温度 28℃，转速 250rpm 培养至对数生长期（OD<sub>650</sub>=0.6-1.0）。



### (3) 农杆菌的准备

---

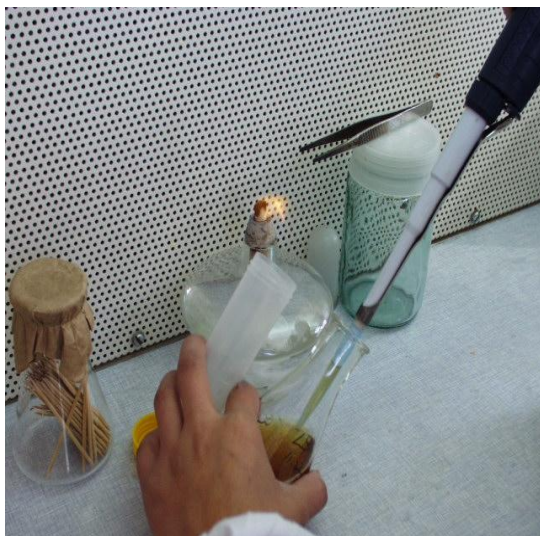
- 分别向每50 mL离心管中分装40mL上述菌液，常温，转速3500rpm 离心10分钟。





### (3) 农杆菌的准备

- 将离心管中的 YEP培养基倒掉，加入重悬液，吹吸使菌体充分悬浮，使用重悬液将菌液重悬，温度28℃，转速160rpm摇至OD650=0.6，形成工程菌液。



用液体MS培养基重悬细胞（减少细菌培养基对植物体伤害）

## (4) 外植体的准备与侵染

- 切取萌发良好的大豆子叶外植体，除去种皮，保留长度约0.5厘米的下胚轴。沿下胚轴将两片子叶竖直切开，剥离胚芽，将切下的外植体置于菌液中，沿子叶节处向下平行用手术刀划伤8-10次。
- 准备60个半种子的外植体，放入100 x 25 mm平板中，并加入30mL的侵染培养基，室温下侵染30分钟。



## (5) 共培养

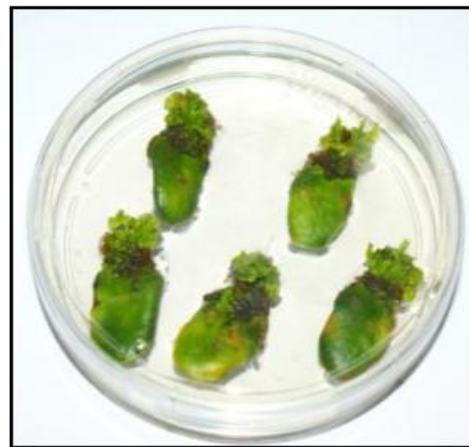
- 浸染结束后，使用无菌滤纸清除外植体表面多余菌液，将外植体子叶内面向下平放在表面附有灭菌滤纸的共培养培养基中进行培养，用 Parafilm 封口，置于培养室中，温度 24℃，光照时间18小时，共培养5天。



Co-culture

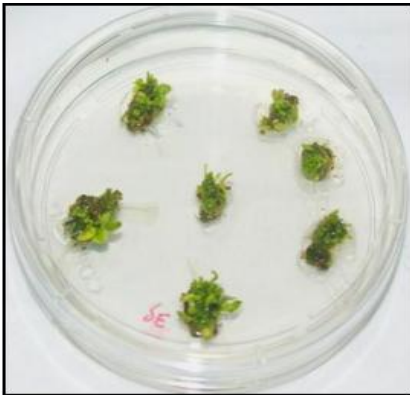
## (6) 生芽诱导

- 使用丛生芽诱导液体培养基（含抑菌抗生素）清洗共培养后的外植体，浸泡 30分钟后，用滤纸吸取表面多余液体培养基，将子叶内面向上倾斜 30-45度角插入芽诱导培养基（Shoot Induction Medium I, SIM-I）中，每皿8-10个外植体。将培养皿置于温度25℃，光照18h的培养室中，培养**两周**。将外植体取出，用刀片除去顶芽，保留丛生芽，在下胚轴包埋面下方进行切面处理，露出新鲜的组织。将外植体插入芽诱导培养基（Shoot Induction Medium II, SIM-II）中，每皿8-10个外植体。将培养皿置于温度25℃，光照时数18h培养室，培养**两周**。



## (7) 芽伸长

- 选取分化良好的外植体，除去死芽和大芽，切掉子叶部分，在外植体底面进行切面处理，露出新鲜的组织。将外植体转入芽伸长培养基中，温度 25℃，光照时数 18小时，培养两周。



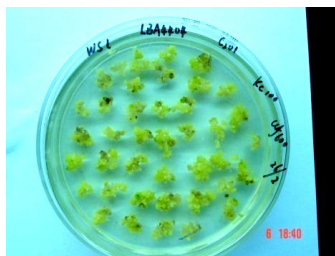
## (7) 生根

- 芽伸长时期的再生芽长到3厘米以上时可进行生根处理。将伸长芽切下转入生根培养基诱导生根，在温度 25℃、光照周期 18小时的条件下培养至再生苗生出 3-6 条主根。

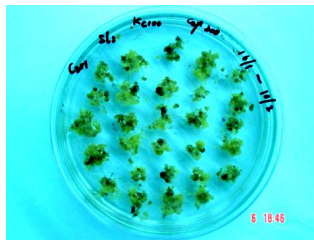




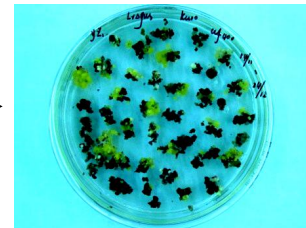
# 棉花



1. 共培养



2. 在选择培养基上筛选



3. 筛选获得的抗性愈伤



4. 抗性愈伤分化成胚状体

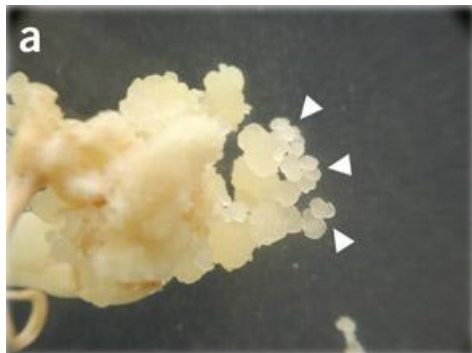


5. 胚萌发成苗

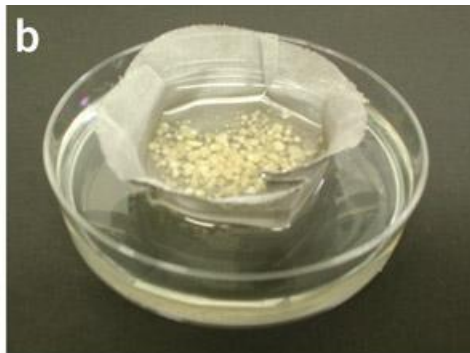


6. 转基因植株移栽大田

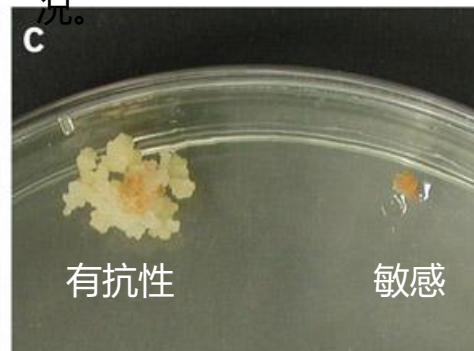
由成熟种子的鳞片产生的胚性愈伤组织。箭头显示愈伤组织生长活跃，适合接种农杆菌。



根癌农杆菌接种愈伤组织。



转移后3周耐潮霉素愈伤组织在N6D-S培养基上的增殖情况。



转移后3周，耐潮霉素愈伤组织在MS-NK培养基上的茎再生情况



转基因水稻植株的生根和生长



# 发根农杆菌Ri质粒介导的基因转化

---

- 发根农杆菌入侵植物伤口后，不是产生瘤，而是产生大量不定根，呈毛状，称毛状根或发状根。这是由于发根农杆菌细胞中Ri（root-inducing plasmid）决定的。发状根实际上是单个转化细胞的克隆体。
- Ri质粒与Ti质粒非常相似，同源性高，经改造后也形成共合载体和双元载体。发根农杆菌介导基因转化方法也与根癌农杆菌基本相同。

## 与Ti相比，Ri有以下特点：

---

- ①发根的形成作为转化体的识别和筛选提供了方便；
  - ②发根的单细胞克隆性质可避免出现嵌合体；
  - ③Ri质粒的T-DNA转化产生的发根较易经体外培养获得再生植株。
- ▶ 随着对发根农杆菌及Ri质粒的深入研究，Ri质粒载体作为Ti质粒的补充，在植物基因工程中有广泛的应用前景。



# Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture

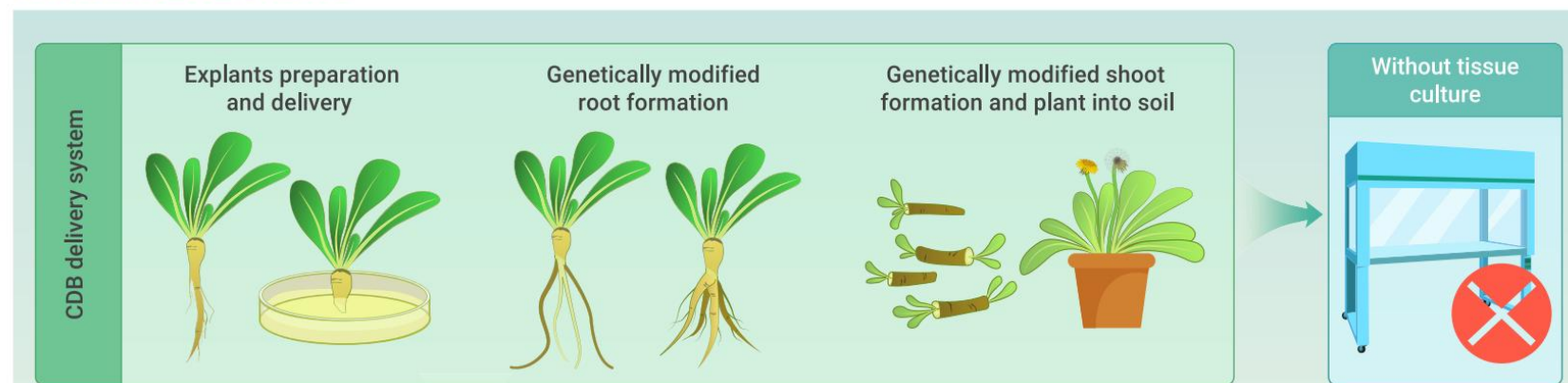
Xuesong Cao,<sup>1,3,7</sup> Hongtao Xie,<sup>2,7</sup> Minglei Song,<sup>1,3,7</sup> Jinghua Lu,<sup>6,7</sup> Ping Ma,<sup>2</sup> Boyu Huang,<sup>1,3</sup> Mugui Wang,<sup>1</sup> Yifu Tian,<sup>5,6</sup> Fan Chen,<sup>6</sup> Jun Peng,<sup>5,6</sup> Zhaobo Lang,<sup>4</sup> Guofu Li,<sup>2,\*</sup> and Jian-Kang Zhu<sup>4,5,6,\*</sup>

\*Correspondence: [liguofu@bellagen.cn](mailto:liguofu@bellagen.cn) (G.L.); [zhujk@sustech.edu.cn](mailto:zhujk@sustech.edu.cn) (J.-K.Z.)

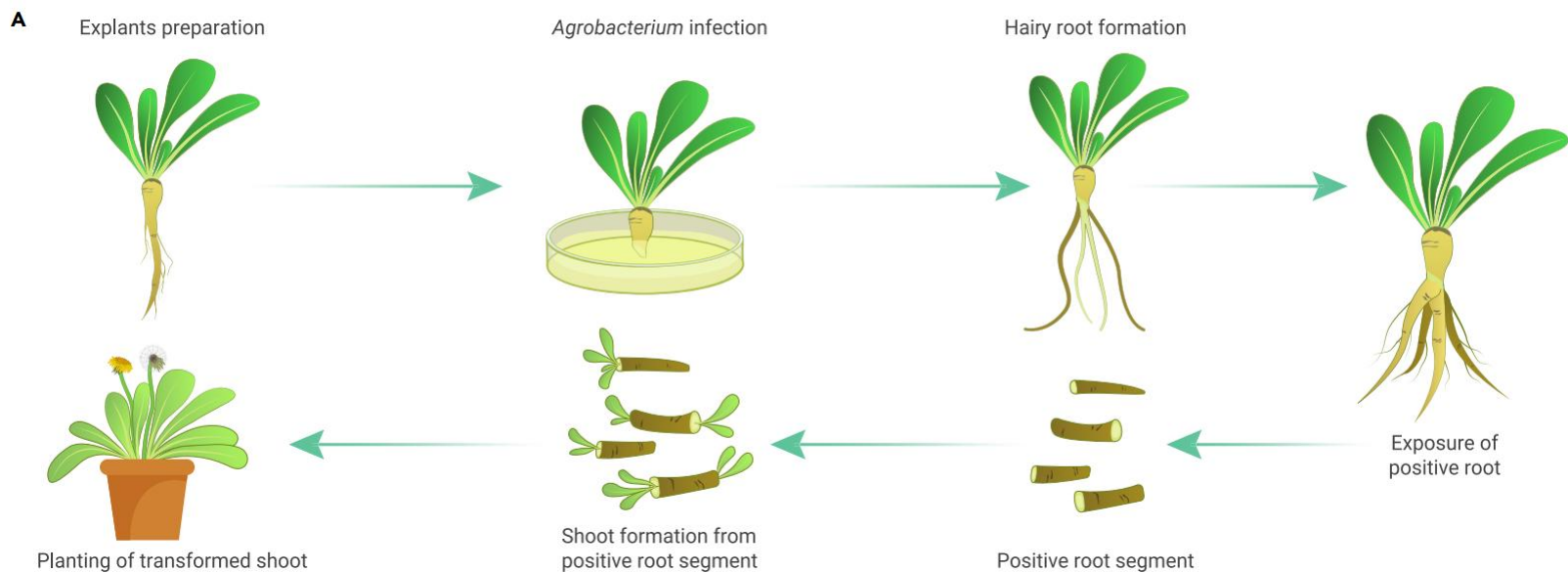
Received: October 20, 2022; Accepted: October 24, 2022; Published Online: October 25, 2022; <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100345>

© 2022 The Authors. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## GRAPHICAL ABSTRACT

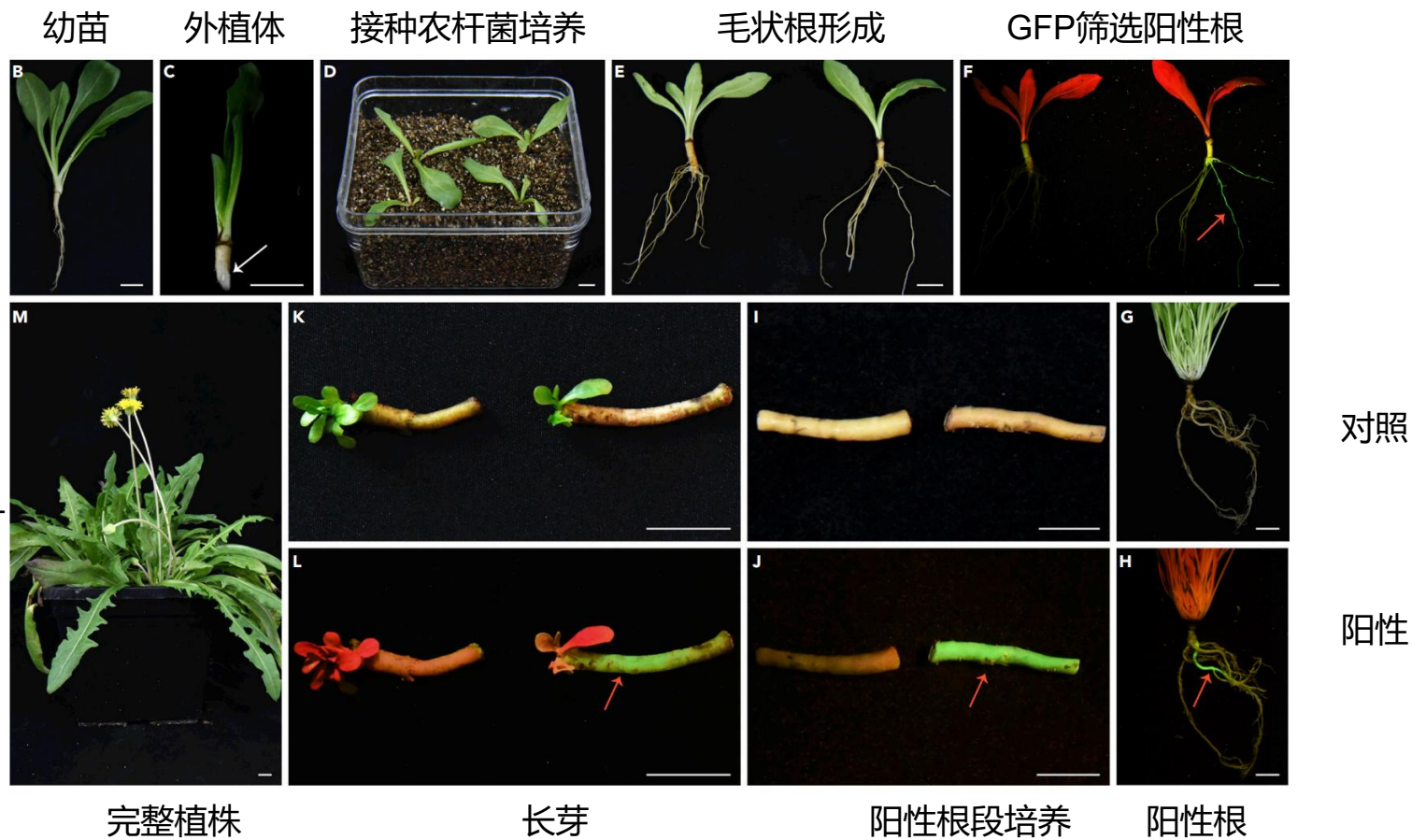


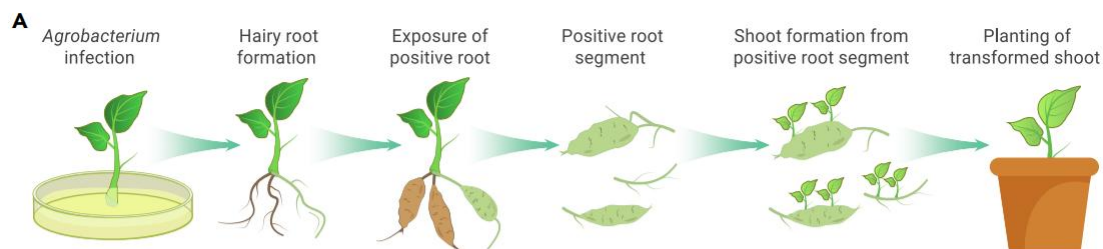
切-浸-出芽 (CDB) 体系-----获得转基因植物  
发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* K599



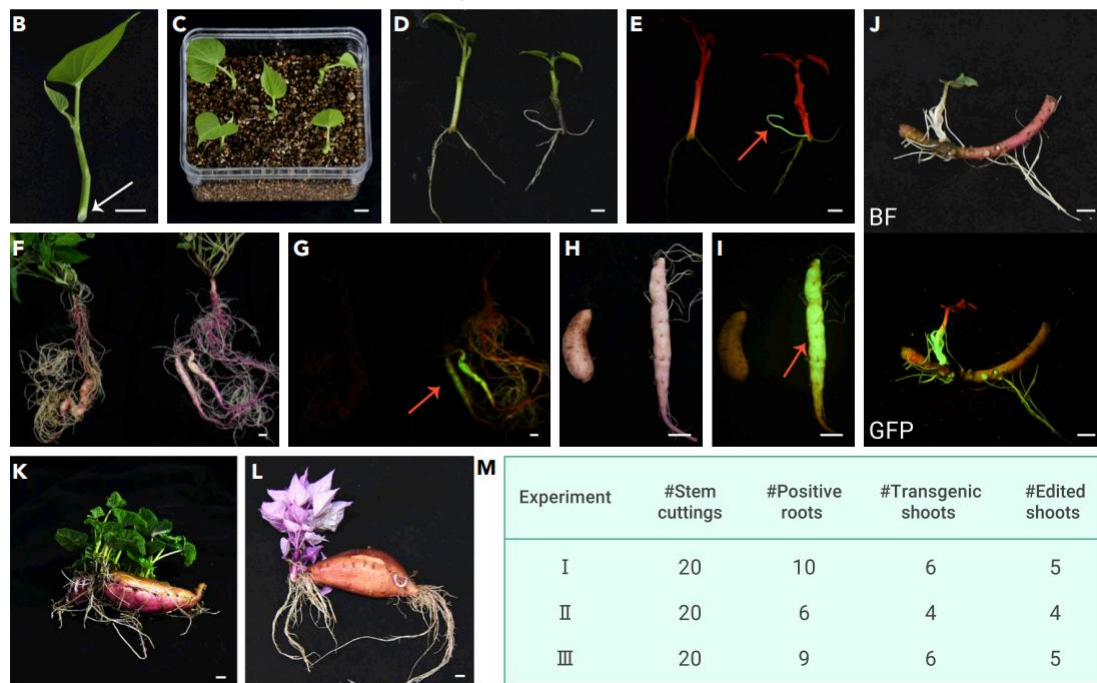
将3-4周龄的幼苗扦插作为外植体。报告基因或基因编辑构建物通过发根农杆菌传递到切口附近的植物细胞中。几周后形成毛状根。将阳性的根切段培养，产生转基因阳性或基因编辑的芽。

罗丹





甘薯的茎尖---诱导出毛状根。大约10周后--发育成结节根----收获转基因根(包括块根)并使其发芽----转基因阳性芽移栽到土壤中。



(D、E)转基因毛状根形成。

(F和G)毛状根发育成块根。

(H和I) gfp阳性根切段。

(J)在根片段上形成转基因阳性芽。

(K)在野生型根段上形成的芽。

(L)纯合子PDS基因敲除突变体的白化芽。

甘薯

## **(六) 转化体的安全性评价和育种利用**

**根据有关转基因产品的管理规定、在可控制的条件下进行安全性评价和大田育种利用研究。**

**通过转基因方法往往难以直接获得理想的品种（系）原因：外源基因失活、纯合致死、花粉致死、其它性状变化等。**

**因此获得转化体后，应结合杂交、回交、自交等常规转育手段，最终选育综合性状优良的转基因品种。**



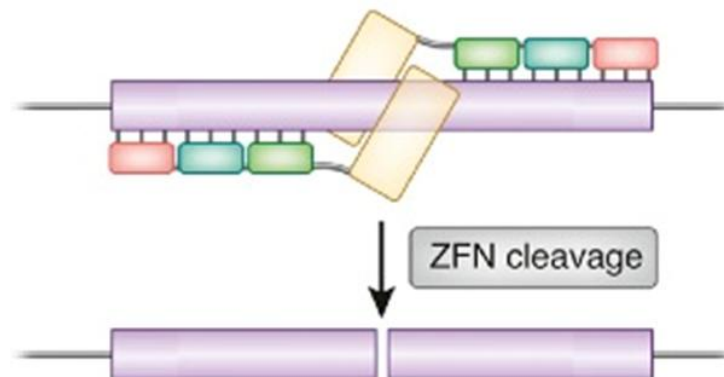
# 基因编辑技术与作物品种选育

- 通过精确识别靶细胞DNA片段中靶点的核苷酸序列，利用核酸内切酶对DNA靶点序列进行切割，从而对目标基因进行编辑，实现对特定 DNA 片段的敲除、加入等技术。目前，该技术主要包括：
- 1、**ZFN** (Zinc Finger Nuclease, 锌指核酸酶)
- 2、**TALEN** (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, 转录激活因子样效应核酸酶)
- 3、**CRISPR/Cas9** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, 成簇的规律间隔短回文重复序列)



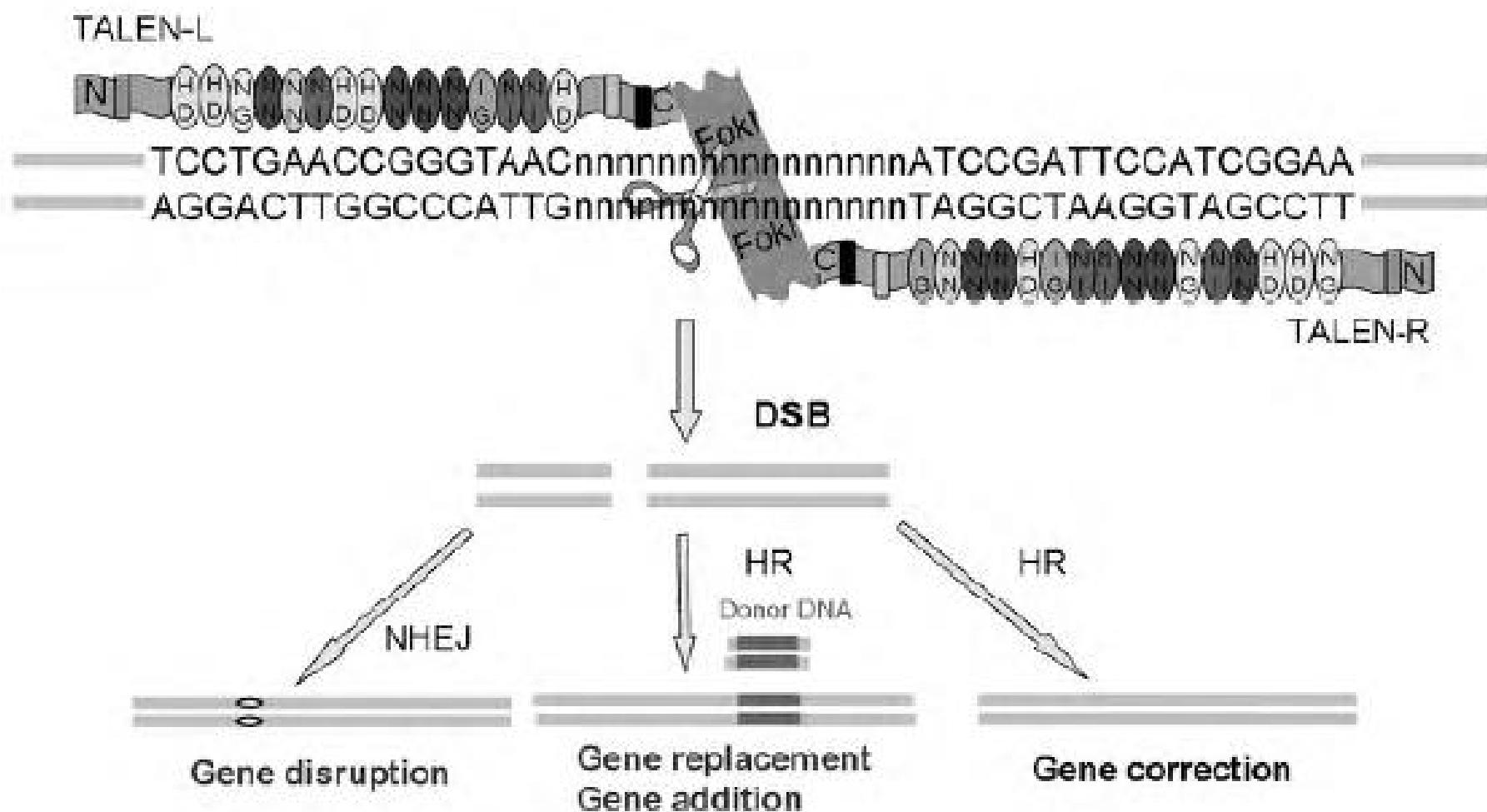
# ZFN (Zinc Finger Nuclease)

- ZFNs 是第一种由人工改造应用的核酸内切酶，ZFN 单体由位于 C 末端的非特异性切割结构域 FokI 和位于 N 端的特异性识别 DNA 的锌指蛋白结构( Zinc finger protein, ZFP) 组成，其中，锌指蛋白可以识别特异的 DNA 序列，而 FokI 则有切割功能域的功能。将人工构建的锌指结构与改造后的 FokI 限制性内切酶融合，就构成了可以对特定的目标序列进行切割的人工核酸酶 ZFNs。



# TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

- 与 ZFN 相似，TALEN 也是一种核酸酶介导的基因组编辑技术。
- TALEN 是一种可靶向特异 DNA 序列的酶，它借助于 TAL 效应子来识别特异性 DNA 碱基对。TAL 效应子可被设计识别和结合所有的目的 DNA 序列。对 TAL 效应子附加一个核酸酶就生成了 TALEN。TAL 效应核酸酶可以 DNA 结合并在特异位点对 DNA 链进行切割，并借助于细胞内固有的同源定向修复 (HDR) 或非同源末端连接途径 (NHEJ) 修复过程完成特定序列的插入、删除及基因融合，从而导入新的遗传物质。



# CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

- CRISPR/Cas系统存在于细菌和古细菌基因组中，是一种规律的成簇间隔短回文重复序列结构。CRISPR由一系列高度保守的重复序列与间隔序列相间排列组成，在CRISPR序列附近存在高度保守的CRISPR相关基因(Cas gene)，这些基因编码的蛋白具有核酸酶功能，可以对DNA序列进行特异性切割。根据Cas基因核心元件序列的不同，CRISPR/Cas免疫系统被分为I型、II型和III型3种类型，I型和III型CRISPR/Cas免疫系统需要多个Cas蛋白形成的复合体切割DNA双链，而II型系统只需要1个Cas9蛋白。CRISPR介导的免疫需要2个RNA，分别tracrRNA和crRNA。crRNA与tracrRNA形成向导RNA(single guide RNA, sgRNA)的嵌合RNA分子，sgRNA引导Cas9蛋白在双链DNA的靶位点上，并在原型间隔毗邻序列(PAM)的上游3~8bp位置对结合的序列进行切割。

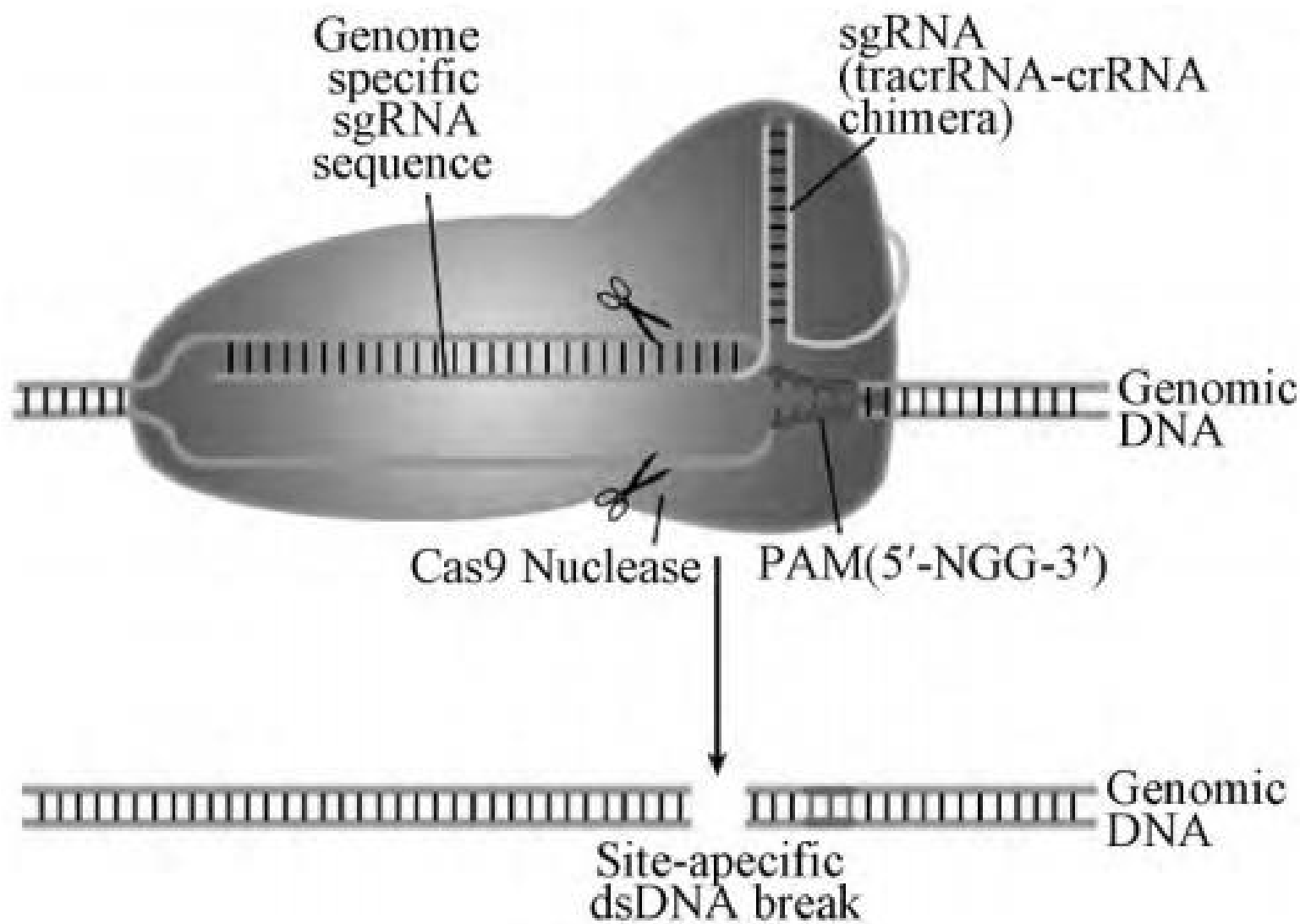


图 2 CRISPR/Cas 9 的原理

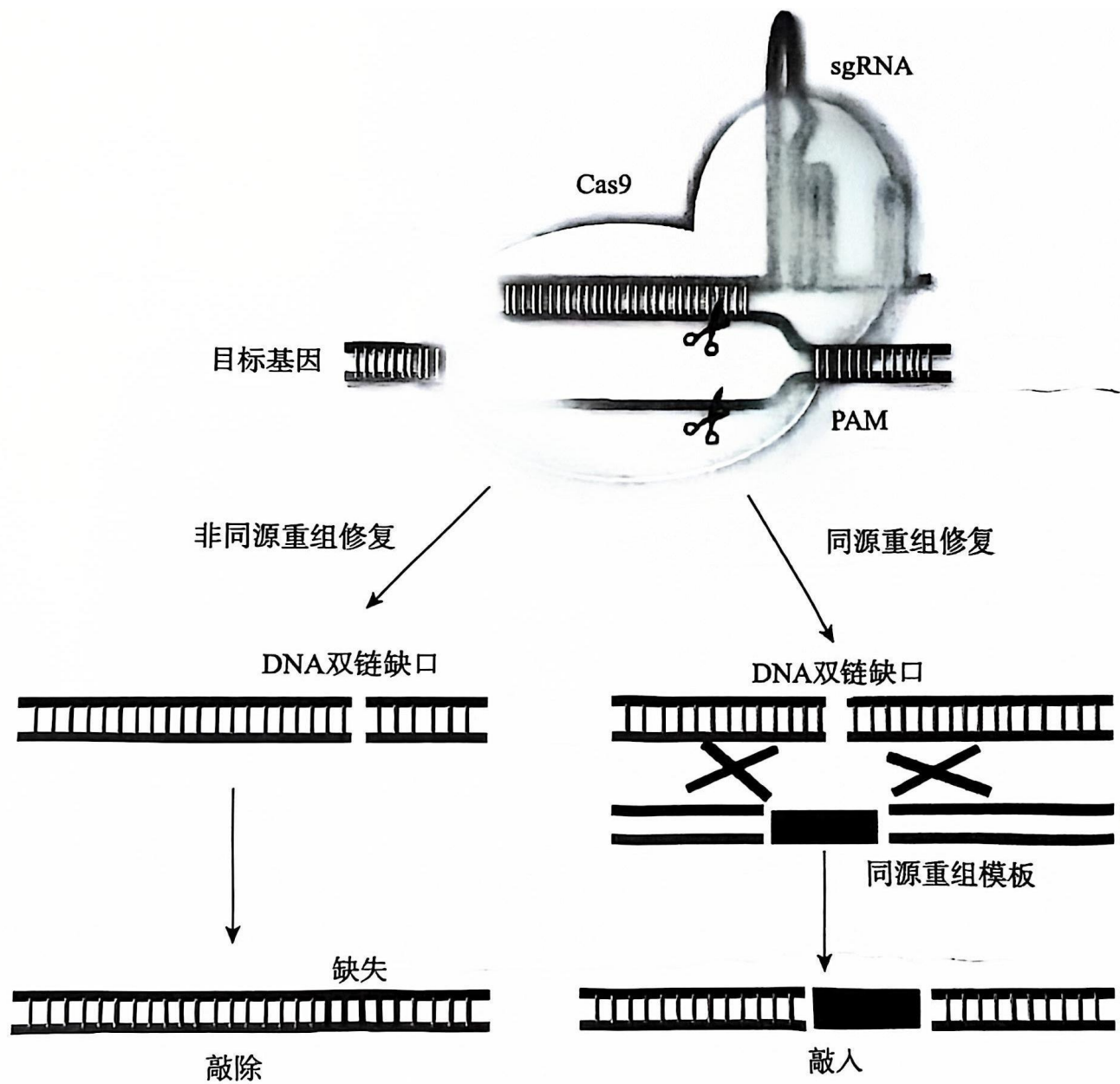


图 16-13 CRISPR/Cas9 工作原理

# 基因编辑技术在作物育种中的应用

## 1. 提高作物产量

如同时敲除水稻中三个与籽粒质量相关的基因（GW2, GW5和TGW6导致性状叠加，大大增加了谷粒的质量（Xu等，2016））

## 2. 作物品质改良

敲除水稻Waxy基因获得低直链淀粉含量的大米（Sun等，2017）；

甜菜碱醛脱氢酶2（BADH2）的基因缺陷导致了香米中香气化合物的合成（Shan等，2015）

## 3. 作物抗逆性改良

敲除乙烯应答转录因子OsERF922获得抗稻瘟病性水稻（Wang等，2016）

水稻中OsSWEET13启动子的缺失可以产生抗白叶枯病的水稻（Zhou等，2015）

## 4. 加速杂交育种

热敏不育系tms5品系、光敏基因雄性不育csa水稻（Li等，2017）

敲除籼稻等位基因Sc-1中的一个或两个拷贝Sc基因可以恢复籼稻-粳稻杂种的雄性育性

## 脱靶效应:

因为在基因组中存在很多相似序列的DNA片段，核酸酶在切割特定基因片段时，有可能会切割相似序列而产生错误切割，这种在特定定位点之外的错误切割造成非预期基因突变的现象称为脱靶效应。

## 基因编辑作物是否属于转基因生物？

1. 美国农业监管部门认为基因编辑作物是通过细胞自我修复机制产生的突变体，与作物自然突变以及物理化学方法诱导的突变极为相似，因此基因编辑作物不被定义为转基因生物
2. 欧洲联盟认为只要有外源DNA转入，不论最终植物中是否存在外源DNA，都被定义为转基因生物



# 转基因作物的遗传特点

## 一、外源基因整合的机制

### (一) 同源重组

### (二) 位点特异性重组

### (三) 异常重组整合

- 30-40bp, 发生同源重组的保险线;
- 0.259-1.8 kb之间, 重组频率与同源序列长度成正相关;
- 长度在200bp或90bp以下以下时, 重组效率是上述长度时的1%-5%。

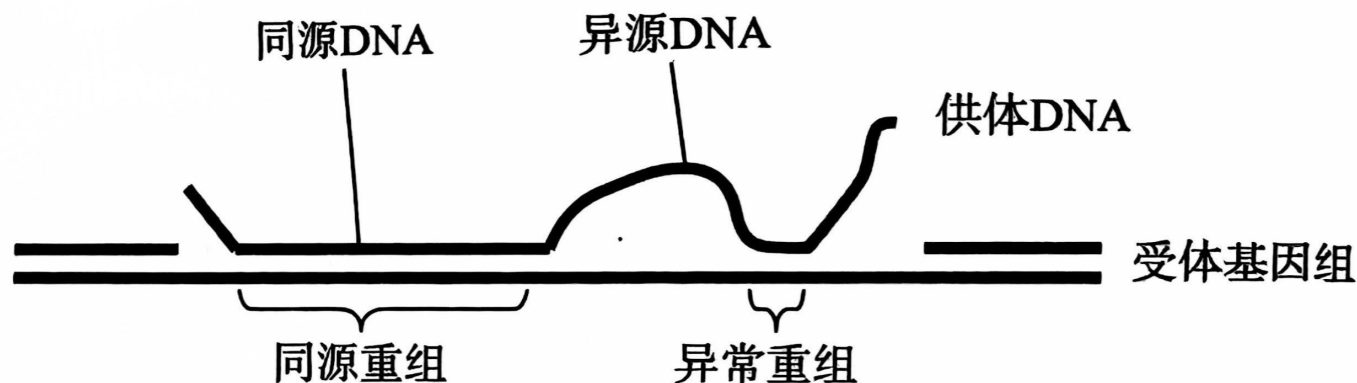


图 16 - 15 同源重组和异常重组

## 二、整合后的外源基因在植株内的表现

### 不表达

#### 1、基因丢失

#### 2、基因沉默

顺式失活：多拷贝外源基因甲基化

反式失活：顺式失活的转基因作为沉默因子影响等位基因或非等位基因的的甲基化

共抑制：发生在转基因和内源同源基因之间，或者转基因纯合体两个位点之间相互作用导致基因沉默

### 表达

#### 1、符合孟德尔遗传

#### 2、独立转化体之间差异

#### 3、无规律

# 转基因作物品种的选育

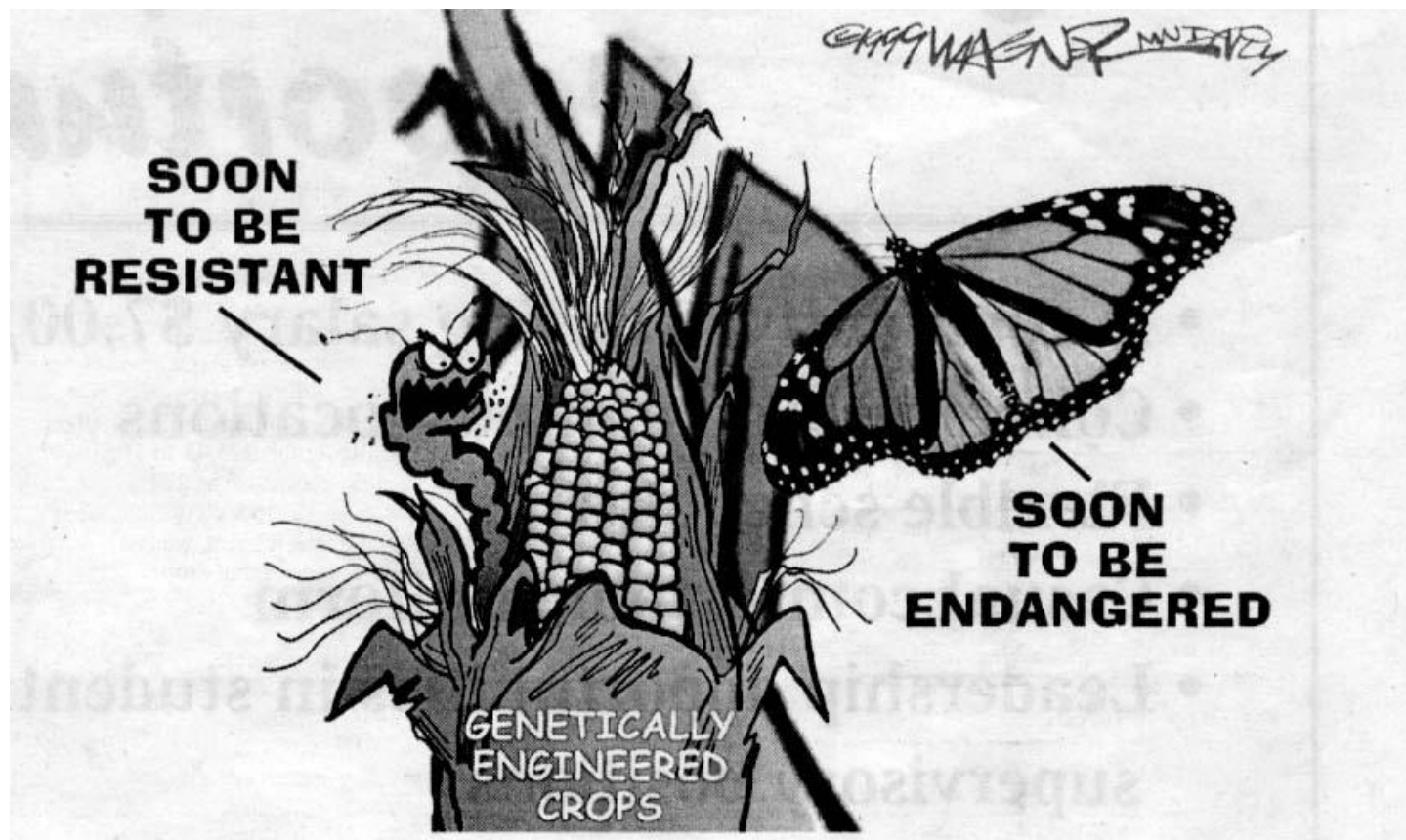
- 纯系育种
- 回交育种
- 杂交育种
- 杂种品种的选育

# 多个目的基因遗传转化的转基因育种

表 16-5 植物中不同多种转基因方法的优势和劣势及例子

技术	优势	劣势	实例	参考文献
杂交	技术简单	时间长	汞脱毒 ——	Bizily 等, 2000
	利用优异的基因表达来	难以进行进一步选育	抗体工程	Hiatt 等, 1999
	进行亲本的预选择	不适用于无性繁殖植物	抗菌剂抗性	Zhu 等, 1994
连续转化	适用于无性繁殖植物	浪费时间	植物育性恢复系统	Hird 等, 2000
	允许维持优良基因型	对于不同的选择标记来说是必需的	去除选择的标记基因	Gleave 等, 1999
共转化				
单质粒	交联整合	依赖技术	报告基因的表达	Christou 等, 1990
	只进行 1 次转化	交联整合		
多质粒	技术简单	非交联整合	产生富集维生素 营养米 (黄金稻)	Al-Babili 等, 2000
	进行 1 次转化	由共转化效率决定	聚羟基卡诺的生产	Slater 等, 1999

## 转基因作物的生物安全性



# 转基因作物的生物安全性

表 16 - 6 转基因作物潜在的风险

转基因修饰	利益	风险
抗除草剂作物	减少除草剂的使用，增加了减少耕作系统的机会	增加除草剂的使用，减少生物多样性可能生态系统提供的生态学服务
含有 Bt 毒蛋白的作物	减少杀虫剂的使用，比广谱性杀虫剂杀死的非目标生物少	促进 Bt 蛋白抗性的产生，会消减 Bt 作为一种相对安全的杀虫剂，杀死非目标毛虫和蝴蝶，例如大花蛾 (Pimentel, 2000)
外壳蛋白导致小粒谷物病毒抗性	减少杀虫剂的使用以控制病原菌的昆虫传播 (Hails, 2000)	促进新病毒的产生，把基因引入非农业生态系统，不断增加杂草物种的适应性，可能消除濒临灭绝的物种 (Hails, 2000)
作物和观赏植物中的致死或其他不育性状	预防对非目标生物性状进行作用，预防向其他生态系统引进物种的可能 (Walker 和 Lonsdale, 2000)	阻止农民使用自己提供的种子适应当地的环境 (Conway, 2000)
合成维生素 A 和其他的营养成分	提高以水稻为主食的这部分人营养水平 (Conway, 2000)	如果产生生态限制养分或蛋白就会破坏当地的生态环境
非豆科植物的氮素固定	减少肥料使用和减少能源消耗 (Pimentel, 2000)	在农业生产活动中产生额外的养分，降低人类健康和减少生物多样性



**针对转基因产品的安全性，从保障人类健康、发展农业生产和维护生态平衡与社会安全的基础出发，提出的一系列具有指导意义的对应策略和行之有效的具体措施：**

- 1. 加强转基因产品的安全性研究**
- 2. 建立完善的检测体系和质量审批制度**
- 3. 不断完善相关法规**
- 4. 加强宏观调控**
- 5. 加强对公众的宣传和教育**
- 6. 为公众提供良好的咨询服务**
- 7. 规范转基因产品市场**