

论应用多基因转化策略综合改良生物体遗传性 研究方向的前景*

II. 多基因转化策略中的规律、前景和问题

李宝健, 朱华晨

(中山大学生物工程研究中心//基因工程教育部重点实验室//植物基因工程国家专业实验室//
生物防治国家重点实验室转基因植物研究室, 广东 广州 510275)

摘 要: 随着后基因组时代的到来, 人类将克隆到越来越多的、生物学意义明确的有用基因应用于基因工程对生物体的遗传改良中。但生物体的绝大多数性状和生理功能都是依靠多基因的协调表达而实现的。因此, 多基因转化策略必将成为今后基因工程在基础理论与实际应用研究中的主流方向。综述了近年来中山大学生物工程研究中心//基因工程教育部重点实验室在多基因改良农作物方面的研究工作和进展, 分析了多基因转化中的基本规律和存在的问题, 最后对多基因转化策略在未来的应用前景作出了简要的展望。

关键词: 多基因转化策略; 基因工程; 后基因组; 遗传改良

中图分类号: Q78; Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0079-05

在文献 [1] 中, 结合中山大学生物工程研究中心//基因工程教育部重点实验室十几年来研究工作中的实践与体会, 详细论述了多基因转化策略的意义、可用的基因资源与技术思路; 在本文中, 我们将对近年来本实验室在多基因转化中取得的成果作一简单的总结, 并在此基础上对多基因转化策略的应用前景进行分析。

1 应用多基因转化策略及多基因载体构建技术方面的成果

以往的植物基因工程, 大多数是通过转单个或两个外源基因而获得某个新的性状或改善某个性状, 效果往往不太稳定或不够彻底, 很难真正做到作物较大程度的改良。在实践中, 我们首次明确提出了应用多基因 (3 个以上有用基因) 转化策略综合改良农作物的新思路^[2,3], 并在该思路的指导下, 获得了几十个含有 3~10 个外源基因的多基因表达载体^[4-8], 如 pTWB1 和 pTWB2 (含 *bar*, *Pin II*, *Bt*), pTF-3 (含 *hpt*, *Pin II*, *Bt*), pKC-3 (含 *hpt*, *Pin II*, *Bt*, *GNA*), pBAB3 (含 *RCH10*, *RAC22*, *RC24*), pBAB3H (含 *RCH10*, *RAC22*, *RC24*, *hpt*), pBRI (含 *RC24*, *hpt*, *B-RIP*), pGB12H 和 pDR10 (含 β -*Glu*, *RC24*, *hpt*), pRAJ09 (含 *RCH10*, *RAC22*, *B-RIP*), pRAS10 (含 *RCH10*,

RAC22, *B-RIP*, β -*Glu*), pRAS1300 (含 *RCH10*, *RAC22*, *B-RIP*, β -*Glu*, *hpt*), pRAX35 (含 *RCH10*, *RAC22*, *B-RIP*, β -*Glu*, *bar*), pYLTAC747H-GMBXRRPGM (含 *hpt*, *gus*, 2 个 *Mar* 序列, *bar*, *Xa21*, *RCH10*, *RAC22*, *Pin II*, *GNA*), pYLTAC747H-BCXRRPGM (含 *hpt*, *Bt*, *cecB*, *Xa21*, *RCH10*, *RAC22*, *Pin II*, *GNA* 及 *Mar* 序列) 以及一系列的中间载体 (如 pYLTAC747H-GM, pYLTAC747H-PGM, pYLTAC747H-RRPGM, pYLTAC747H-XRRPGM, pYLTAC747H-CXRRPGM, pYLTAC747H-BXRRPGM, pYLTAC747H-MBCRRPGM 等等)。这些载体根据不同的需要可以用于不同的转化事件和遗传改良中。

其次, 我们以生产上具有实用意义的重要籼稻品种七丝软占、特青、奇妙香、九六零、竹粳 B、培矮 64S、P88S、E32、9311、0293 和粳稻品种中花八号、中花 11、石豸白毛、台北 309 的胚性愈伤组织为外源基因的受体^[7-18], 应用基因枪法或农杆菌法, 通过单或共转化将多个基因导入上述水稻品种, 获得了几千个转有多个外源抗病抗虫基因的水稻株系 (部分结果待发表); 对转基因当代及其后代 (T_0 - T_6 代) 进行了 Southern blot、northern blot 或 western blot 等分子生物学鉴定和遗传学分析, 并进行了抗病抗虫生物学试验和农艺性状分析, 筛选

* 收稿日期: 2004-07-26

基金项目: 美国洛克菲勒基金资助项目; 国家 863 高技术计划资助项目 [101-01-02-02]; 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 [J00-A-009; J99-B-012]; 广东省科技计划资助项目 [B201]

作者简介: 李宝健 (1933 年生), 男, 教授, 博士生导师; E-mail: lssbj@zsu.edu.cn

出了多个高抗稻瘟病多个生理小种以及对纹枯病、稻纵卷叶螟、褐飞虱、二化螟、三化螟有一定抗性的水稻品系,其中双抗稻瘟病和纹枯病的籼稻品系“中大1号”、“中大2号”已获得农业部农业基因工程安全委员会批准进入了环境释放,“中大1号”更成为国际上首例应用基因工程培育成功的高抗稻瘟病的水稻新品系;双抗真菌病的中大5号、7号、9号及双抗稻纵卷叶螟和褐飞虱的转基因籼稻品系中大12号、16号已获准进入中间试验;双抗稻纵卷叶螟和三化螟的转基因品系中大6号、10号,也已申报中间试验。

2 多基因转化的理论依据与基本规律

通过上述实践,我们对多基因转化技术初步总结出以下规律^[7-29]:

(1) 由于遗传密码的统一性和同源性,从低等生物到高等生物的各种来源的外源基因几乎均有可能在植物改良中加以应用。根据同一原理,亿万种生物体的各种基因也将有可能在其他生物体(包括高等生物如人类,低等生物如各种微生物等)的遗传改良中加以应用。因此,在一个基因工程操作中,完全有可能同时应用不同生物来源的多个基因来定向地改良生物体的多个遗传性状。通过与常规育种技术相结合,将有可能培育出崭新水平的农畜产品。

(2) 目前,在多基因改良水稻的研究中,我们已成功地同时应用了分别来自3~7种不同生物体的异源基因。今后多基因改良的研究将有可能同时应用亲缘关系更远的多种基因,其应用前景将是十分宽广并将具有无限潜力的。

(3) 无论是多基因改良的策略,还是多基因载体的组装和构建的基本途径,在不同生物体中都是通用的。如:只要转化技术合适,一般外源基因均有可能成功地整合至被改良生物的基因组内并可代代相传;外源远缘基因只要装备了受体生物的启动元件和终止元件,便可具有表达的可能性等。我们在农作物多基因改良方面的工作,为今后多基因转化策略在其他物种中的应用,提供了可供借鉴的思路和技术。

(4) 对多基因转化的水稻及其后代进行Southern杂交分析,结果证明:分别来自3~7种不同远缘生物体的基因,在转化中可同时整合进同一受体的基因组内,整合模式(拷贝数、整合位点等)呈多样化特征,整合过程为一次性事件,多个外源基因整合完成后多数可按相同模式一直传给第7代(T_0)。另外,多个基因通常倾向于同时整合

至基因组内某一染色体的相同或相近的位点上。在不同状态的基因组上可能存在有各自的整合热点(integration hot point, IHP)。

(5) 多基因转化植株的 northern blot 分析表明:在基因组中多个外源基因的转录可能呈不同的水平,其中有的基因转录水平高,有的基因则一般,有个别的基因甚至不产生相应的 mRNA。但有些植株中也可能出现多个外源基因都有高转录水平的现象。另一方面,在转基因群体中,不同株系相同基因的转录水平也是不同的。通常,在 T_0 代中转录水平高的基因在后代中的转录水平也较高,即倾向于其亲代的转录水平。因此,转基因后代的转录水平,除了可能受环境影响外,主要还是由外源基因的整合模式所决定的。

(6) 转基因植株的 western blot 分析和酶活性分析结果显示,基因组中的多个外源基因在翻译水平的表现是复杂的。有的基因转录水平高,翻译水平也高。但也有相反的情况,有的 western blot 结果甚至表现为阴性。

(7) 尽管不同的转基因株系具有完全不同的整合和表达模式,但在绝大多数的转化事件中,外源基因都可以稳定传代和表达。在转多个基因的后代群体中,偶尔也发现有少部分外源基因出现关闭、沉默、丢失及内源序列的共抑制等现象。但通过扩大后代的筛选群体,可以从中选出多个基因均稳定整合、表达好(即转录、翻译水平较高或较合适)的植株。对于转多个抗病虫基因的植株而言,它们在田间实际的抗病抗虫能力往往也比较强。

(8) 在转多个基因后代的群体中,除了有少数产生不利农艺性状的变异系以外,大多数的转多基因后代株系的农艺性状仍可保持原有的状况。另外,发现在少数的转多个基因的后代株系中其非目标的农艺性状(包括产量和质量性状)尚可发生有利的遗传性改良。用基因枪方法转化的后代变异大,用农杆菌方法转化的后代仅出现少量变异。但无论是有益的变异还是不利的变异,都可以通过与常规育种相结合的方法(如回交法),使转基因植株有用的性状得到保存,而不利的性状得到剔除。

3 多基因转化可能存在的问题^[2-3,29-30]

3.1 基因工程普遍面临的问题:食品安全性问题与生态安全性问题

目前,基因工程改良的动植物、微生物新品种在推广中主要存在着两个大的问题,即环境生态的安全性问题和以基因工程改良后的动植物为原料所

制成的食品的安全性问题。多基因转化策略由于涉及的基因和序列更多、更复杂，因此势必面临更多的质疑和更严格的审查。

3.1.1 环境生态安全性问题 将经过遗传改造的生物释放到自然界，可能引起的后果主要有两方面：第一，由于转基因生物具有天然品种所不具备的优点，在自然界中又缺乏天敌，因此可能形成人工制造的“入侵物种”，直接影响生态平衡和生物多样性；第二，经基因改造的农作物可能通过基因漂移、杂交繁殖，使周围生存的野生生物受到“基因污染”，形成“超级杂草”和“超级病虫”，进而影响到生态平衡和其他物种的生存。

尽管转基因生物确实存在潜在的生态风险，但我们可以通过加强立法，科学利用“种质生殖隔离”及“生态隔离”等自然法则对其加以控制。而近10多年来，在大面积种植转基因农作物的国度里的实践也证明：至少至今尚未发现有充分根据证明种植基因工程作物会导致环境生态问题发生。

3.1.2 食品安全性问题 类似的，尽管转基因食品在毒性、过敏性、抗生素抗性等方面可能存在安全性方面的隐患，但到目前为止，仍然没有任何真正能提供确切证据证明转基因食品能危害健康的报导。美国推广转基因大豆、玉米已多年了，千百万人服食过转基因作物的食品，但至今尚未见其产品造成的食品为害的申诉。只要我们加强对基因功能的基础性研究，严格执行基因工程食品安全条例，确保转基因食品经过严格食品安全检验才能上市，这样便可解决这个问题。当然在技术上也可采取不少措施，如我们实验室用于改良农作物的基因，多采用其他可食性农作物来源的基因（如来自于大豆、大麦、水稻等的基因），“安全性”问题的解决则自然寓于其中；采用将标记基因与目标基因分置于不同载体的方法，在共转化的后代中可望筛选出标记基因被分离剔除的植株；或者采用无标记基因转化技术及其他基因剔除技术（如基因重组、基因敲除等），使载体中非目标的骨架序列在转化完成后可被成功剔除等。

迄今为止，有关基因工程产品风险性的讨论，仍然是当前学术界、舆论界争论不休的热点话题。有专家指出，转基因技术实际上已经由学术观点分歧，逐渐发展成为知识产权问题、环境问题、经济问题、宗教问题，甚至政治问题^[30]。我们认为：关于转基因产品的安全性问题，以科学的态度进行的讨论是有益的，但如果涉及了商业市场竞争或以宗教意识介入的立场来讨论问题，则应尽量予以避免。

简言之，任何新技术都是双刃剑，因噎废食是不可取的。对于基因工程技术，我们应该采取的态度是：以十分积极的态度迎接新知识经济时代的到来，充分发挥新技术能够给人类带来的积极作用，同时，应注意认真研究新技术可能带来的消极面，通过法律、法规和配套技术等手段，将其消极面的影响严格限制到最小的状态。

3.2 多基因转化在技术上面临的问题

多基因改良策略虽然具有许多至今尚无法准确评估的优点，但就象其他新生的技术一样，它也有着许多技术上迫切需要进一步解决的问题。根据我们的初步实践，我们认为：①在生物的遗传改良中，并不一定是基因愈多，亲缘关系愈远愈好，必须根据基因工程的目的来确定选用那些基因和用多少个基因；②应进一步大力开展功能基因组的研究，克隆出更多有实用价值的功能基因以作为今后发展的基础；③进一步改进多基因转化技术的细节，如更好的多基因表达载体的构建，更有效的多基因转化方法的建立，定点整合技术的建立以及寻找更多样化的启动子等；④虽然应用低等生物的基因改良高等生物的遗传性没有翻译后加工的障碍，但当将高等生物基因应用于相对较低等生物的改良时，其翻译后的加工往往可能会出现障碍。而多个基因在同一个转基因植株中的转录和表达水平往往也不一致。这一难点涉及蛋白质组学和RNA组学，人类至今了解尚少，因此有待于蛋白质组学和RNA组学的发展和配合，才能找到解决的方法；⑤应用多基因改良生物体有可能带来更为复杂的环境生态问题以及食品安全性问题，因此必须发展无标记基因技术及功能基因的特异性表达技术等。相信只要我们认真对待和深入研究，这些问题终将会获得解决。

4 多基因转化策略的应用前景

如前所述，生物体中的绝大多数性状都是由多基因控制的。而发育、分化、代谢等复杂的生理生化过程，更是由多种基因表达产物协调作用而共同表现出来的外部（整体）特征。弄清每个基因各自的功能及其相互之间的作用，不仅是生物学和遗传学理论研究中最重要课题，也将为21世纪生物科技的大革命奠定基础。

在新世纪中，后基因组时代的来临，为现代生命科学的发展提供了一个前所未有的绝好时机。生物科学在21世纪的飞速发展，将使农业、医疗和环保产生革命性的进步和变革。

随着功能基因组计划研究的深入，人类将克隆

到与个体发育及生物钟有关的基因,进而有可能控制各种生物体生长发育的各个过程;将克隆到与各种复杂的生理生化代谢途径有关的基因,因而可以控制生物的各种复杂的生理生化代谢途径,包括某种或某些代谢产物或药物的形成和生产;将可克隆到各种致病的基因及其相应的正常基因,因而将有可能从根本上纠正各种生物的遗传偏差或突变,保证农业生产的正常发展,保证人类自身的健康;将可克隆到各种抗病或抗虫的基因,从而使农业生物能抵御有害生物的侵扰,减轻农药的施用及其对环境污染的影响,并减少田间的劳动负担;将克隆到各种抗不良环境因子的基因,如:抗寒、抗旱、抗盐碱的基因等,从而可大大拓展农业生物适应的生态范围,使寒冷地区、干旱地区、盐碱地区的农业均能得到更好发展,甚至海洋农业也能实现规模化生产;还将克隆到各种控制多基因性状的基因,即 QTLs,或克隆到各种控制基因表达的分子元件,从而可以更精细地控制生物各种复杂性状的表达与强度,也可以调整或关闭不正常的基因表达等^[29,31]。

以此为基础,结合多基因转化的策略和传统的医疗、育种、生产方法,人类将有可能最大限度地改变由上述基因控制的有关性状,达到在医学上控制发育、分化与病变,在遗传上根治某些遗传缺陷的疾病,以及在农业上创造融合多种优良性状的新物种、在工业上利用生物反应器大规模生产有用代谢产物和药物的目的。

除此之外,多基因转化作为生物学基础理论研究的一个技术平台,也将在研究上述功能基因及调控序列的生物学意义中发挥作用,最终推进功能基因组计划的全面完成。

致谢:在此,谨对 10 多年来在植物基因工程国家专业实验室中曾与我合作共事过的全体同仁表示衷心的感谢,他们是许耀教授、王金发教授、石和平教授、尹中朝教授、欧阳学智教授、余迪求教授、徐增富教授、许新萍副教授、刘秋云副教授、张宏副教授、叶长明副教授、贺竹梅副教授、邱国华副教授、叶克难副教授、柯遐义副教授、黄俊潮副教授、李刚博士(排名不分先后),以及一大批优秀的研究生,如冯道荣、林莉、程度、范钦、卫剑文、李明、陈谷等等。没有他们的艰辛劳动、聪明才智以及为科学无私奉献的精神,就没有可能通过点点滴滴的知识积累形成本综述性论文中的各种观点。此外,我还要感谢如下的单位和个人:国家杂交水稻工程技术研究中心袁隆平院士及其同事、中国农科院生物技术研究所范云六院士、美国康奈尔大学吴瑞教授,以及复旦大学、华南农业大学、广东省农科院、中国科学院亚热带农业生态研究所、广州中医药大学、湛江海洋大学、仲恺农学院、东莞种子研究所等合作单位。

参考文献:

- [1] 李宝健,朱华晨.论应用多基因转化策略综合改良生物体遗传性研究方向的前景 I.多基因转化的基因来源与技术平台[J].中山大学学报(自然科学版),2004,43(6):11-15.
- [2] 李宝健,许新萍,冯道荣.农作物改良的多基因策略研究[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21:123-124.
- [3] 李宝健,许新萍,冯道荣,等.论改良生物体遗传性的多基因策略[C].中国生物工程学会第三次学术讨论会论文集,2001:130-132.
- [4] 冯道荣,邱国华,许新萍,等.多基因植物表达载体的构建[J].西北植物学报,2001,21(4):609-614.
- [5] 范钦,邱国华,许新萍,等.植物表达载体 pKC-3 的构建及大分子 DNA 连接策略[J].生物技术,2000,10(4):1-3.
- [6] 李明,邱国华,许新萍,等.含多种抗真菌病基因植物表达载体的构建[J].中山大学学报(自然科学版),1999,38(5):67-71.
- [7] LIN L, LIU Y G, XU X P, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multi-gene assembly and transformation vector system[J]. PNAS, 2003, 100(10): 5962-5967.
- [8] 冯道荣,许新萍,李宝健,等.转多基因水稻植株的获得[J].植物生理学报,2001,27(4):331-336.
- [9] 冯道荣,许新萍,邱国华,等.多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达[J].科学通报,2000,45(15):1593-1599.
- [10] 冯道荣,许新萍,范钦,等.获得抗稻瘟病和纹枯病的转多基因水稻[J].作物学报,2001,27(3):293-301.
- [11] 冯道荣,卫剑文,许新萍,等.转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得及其抗稻瘟病菌的初步研究[J].中山大学学报(自然科学版),1999,38(4):62-66.
- [12] 冯道荣,许新萍,卫剑文,等.使用双抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究[J].植物学报,1999,41(11):1187-1191.
- [13] 李爱宏,许新萍,戴正元,等.转基因水稻株系的纹枯病抗性分析[J].中国水稻科学,2003,17(4):302-306.
- [14] 李爱宏,许新萍,陈宗祥,等.转基因株系及不同水稻品种的几丁质酶活力及纹枯病抗性[J].作物学报,2003年,29(4):520-524.
- [15] 范钦,许新萍,李宝健,等.多个抗虫基因转化水稻两用品系培矮-64S[J].实验生物学报,2002,35(1):42-46.
- [16] 卫剑文,许新萍,陈金婷,等.应用 B.t. 和 SBTi 基因提高水稻抗虫性的研究[J].生物工程学报,2000,16(5):603-608.
- [17] 李桂英,许新萍,夏端,等.转 GNA + SBTi 双价基因抗虫水稻的遗传分析及抗虫性研究[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(1):125-126.
- [18] 许新萍,胡明,卫剑文,等.用高效的基因枪转化系统将抗虫抗病基因导入水稻[J].遗传,1998,20(S1):12

- 14.
- [19] 许新萍, 胡明, 卫剑文, 等. 用基因枪法转化水稻获得转基因植株[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(6): 25 - 29.
- [20] 许新萍, 卫剑文, 范云六, 等. 基因枪法转化籼稻胚性愈伤组织获得可育的转基因植株[J]. 遗传学报, 1999, 26(3): 219 - 227.
- [21] 许新萍, 胡明, 蚁乐洲, 等. 高效的水稻基因枪转化和可育转基因植株再生[J]. 作物学报, 1999, 25(6): 691 - 698.
- [22] 许新萍, 陈金婷, 张建中, 等. 抗稻瘟病和纹枯病的转基因水稻新品系[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(3): 131 - 132.
- [23] 左清凡, 张建中, 袁红旭, 等. 抗稻瘟病转基因水稻竹转 68 的选育[J]. 杂交水稻, 2001, 16(1): 10 - 11.
- [24] 袁红旭, 许新萍, 张建中, 等. 转几丁质酶基因(RC24)水稻中大 2 号抗纹枯病特性研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(1): 39 - 42.
- [25] 袁红旭, 许新萍, 郭建夫, 等. 转基因水稻“竹转 68”病害发生风险的初步研究[J]. 2001, 21(4): 52 - 56.
- [26] 杨祁云, 许新萍, 朱小源, 等. 转基因水稻对稻瘟病的抗性研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 162 - 166.
- [27] 张良佑, 吴洪基, 萧整玉, 等. 转基因水稻的抗虫性初探[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 4 - 7.
- [28] 尹中朝, 杨凡, 许耀, 等. 利用根癌农杆菌法获得转基因水稻植株及其后代[J]. 1998, 25(6): 517 - 524.
- [29] 李宝健, 朱华晨. 展望 21 世纪的农业生物技术——后基因组时代的农业生物技术[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(1): 56 - 61.
- [30] 钱迎倩. 转基因作物的利弊分析[J]. 生物技术通报, 1999, 15(5): 7 - 11.
- [31] 李宝健, 刘秋云, 李刚, 等. 21 世纪医学主要进展的预测——以人类基因组研究为主要特征的医学革命时代[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(2): 95 - 99.

On the Prospects of Applying the Multi-gene Transformation Strategy (MTS) to Modify the Inheritance of Organisms

II . General Principles, Possible Problems and Prospects of the MTS

Li Bao-jian , ZHU Hua-chen

(Biotechnology Research Center// Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education//
State Specialized Laboratory of Plant Gene Engineering// Division of Transgenic Plant,
State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: As the post-genome era is approaching, more and more genes with definite biological functions will be cloned and then be applied to genetic improvement of organisms. Since most of the phenotypes and physiological functions are determined by the coordination of multiple gene expression, the multi-gene transformation strategy (MTS) will be the main means for gene engineering in basic research and for practical application. The progress and achievements were summarized in applying MTS to improve the crops, which is made by our laboratory, the Biotechnology Research Center of Sun Yat-sen University and Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education during recent years. The general principles in multi-gene transformation and the possible problems related to MTS were analyzed. Finally, a concise perspective on the application of MTS was provided.

Key words: multi-gene transformation strategy (MTS); gene engineering; post-genome; genetic improvement