

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

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, 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。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 10 多年来研究工作的实践体会, 对发展多基因转化策略的意义和由来、多基因转化可用的基因资源和技术思路, 进行了详细的论述。

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 (2004) 06-0011-06

21 世纪是生命科学的世纪。随着人类基因组测序计划的完成和其他物种基因组序列的陆续公布, 生命科学现已进入后基因组时代, 即功能基因组时代。在基因组计划的带动下, 人类将利用功能基因组研究所获得的极为丰富的基因资源, 通过基因工程技术从遗传本质上对包括人类在内的有关生物体进行改良, 如对生物的遗传性疾病进行基因水平上的彻底治疗; 通过调控基因的干预精确调整不同功能基因的表达, 从而控制生物体的分化、发育与病变; 通过外源基因进一步改良现有动植物、微生物的遗传性, 创造出优质、高产、多抗、高抗、均衡营养的优良品种等等。可以预见, 在新的时代通过功能基因组学与创新基因工程技术的结合, 必将推动现代生物技术的大发展, 从而产生巨大的科技成果与效益^[1, 2]。

在过去的 20 多年里, 人们通过基因工程技术, 往往仅利用 1~2 个基因来定向改良单一的性状。然而在自然界中, 生物的性状却常常是由多基因共同控制的。一个简单的代谢可能需要多种酶的参与才能进行。即使是海藻糖这样简单的双糖, 在酵母的代谢途径中也需要 4 个基因产物的直接参与^[3]; 对于农作物而言, 其农艺性状如株高、穗数、成熟期等, 在遗传上多是由多个不同的微效基因共同控

制的。而产量、抗性、质量性状等重要经济性状本身又是由若干数量性状构成的复合性状^[4]。对此, 传统的单基因改良可谓束手无策。另一方面, 对于商家来说, 一个有应用前途的园艺或农牧业品种, 通常必须聚合有多种优良品质, 如丰产、高营养、高抗、多抗或具备其他生产上有用的特性; 当转基因生物被作为某些重要蛋白质和次生代谢物的生物反应器时, 又常常需要输入多个目标基因, 以及能够修饰调控这些基因表达的非编码 DNA 元件。为此, 多基因组装与转化技术便应运而生了。

不仅如此, 在基础研究方面, 转基因动植物在研究特定基因对不同代谢途径、不同发育与生理过程中的作用方面, 也充当着核心的角色。无论是发育的调控, 代谢的特征, 还是生物的反应性与抗逆性, 多是依赖于多基因之间的互作。因此, 多基因转化的策略, 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^[5]。

近 10 年来, 本实验室一直致力于应用多基因转化策略综合改良生物体的研究。最近, 我们实验室在多基因转化农作物的领域中取得了一系列可喜的成果, 建立了一套适于多基因组装的高效的技术平台^[6], 构建了大量适合于多基因转化的载体^[7-9], 获得了一大批整合有多个外源有用目的基

^{*} 收稿日期: 2004-08-26

基金项目: 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 [B20]

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

因的作物品种或材料^[3, 6, 10-13], 并系统研究了多基因转化植物的理论与技术问题, 为今后多基因转化策略在基因工程研究中的发展打下了良好的基础。本文综合了本实验室十几年来研究工作中的实践与体会, 分两部分讨论了多基因转化策略改良生物体遗传性的基本规律及发展前景。在第 I 部分中, 将详细论述多基因转化策略的意义、可用基因资源与技术思路; 在第 II 部分 (待发表) 中, 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 多基因转化技术中的基因来源及应用领域

1.1 基因工程研究中可用的基因资源

据联合国环境计划署世界生态保护监测中心 (UNEP WCMC) 2000 年统计资料^[14], 全球物种共有 1 400 万种, 其中绝大多数尚未为人类所认知。已被命名确认的仅占 13% (约 175 万种)。此外, 还有些科学家估计全球物种至少有 3 000 万甚至上亿种。

每个生物体的基因组都是一个庞大的“基因资源库”, 如水稻 *Oryza sativa* L. ssp. *indica* 基因组大小为 466 MB, 约含基因 46 022 ~ 55 615 个^[15]; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 基因组约为 125 MB, 含有 25 498 个基因, 编码 11 000 个家族的蛋白^[16]; 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 全基因序列为 12 MB, 编码 5 885 个蛋白基因, 140 个 rRNA 基因, 40 个 snRNA 基因, 275 个 tRNA 基因^[17]; 线虫 *Caenorhabditis elegans* 基因组为 100 MB, 含有 20 443 个基因, 其中包括 1 270 个非蛋白编码基因 (如 tRNA、snRNA、rRNA、scRNA、假基因等) (资料来源: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map—search.cgi?taxid=6239>, 2004 年 7 月 24 日); 果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组大小为 120 MB, 编码 13 600 个基因^[18]; 而人类 (*Homo sapiens*) 序列约为 3 GB, 编码至少 3 万~4 万个基因^[19]。

可以说, 自然界生物的遗传多样性为人类提供了取之不尽的基因材料, 它们均是通过生物亿万年进化、繁衍和生存竞争而保留下来的极其宝贵的种质资源。但所有这些 DNA 序列 (无论是编码蛋白质的功能基因序列, 还是涉及基因调控与表达的非编码序列) 都是由最基本的 4 种碱基构成的, 并且其转录与翻译过程都遵循着基本相同的法则 (中心法则), 因此它们都可以直接或经一定的修饰改造后应用于基因工程, 成为创造新品种、新性状的基

因来源。

1.2 远缘基因在基因工程改良生物性状中的应用实例

自 1986 年以来, 本实验室通过大量研究至今共成功地获得 22 种转基因植物 (包括某些藻类和大型真菌), 其中属世界上首次获得的转基因植物有籼稻 (1990)、花椰菜 (1989)、甘蓝 (1989)、花叶芋 (1989)、番木瓜 (1991)、贡柑 (1992)、螺旋藻 (1997)、灵芝 (1998)、姬松茸 (2003)。另外, 还获得以下的转基因植物: 玉米、大豆、小麦、苜蓿、金鱼草、黄瓜、烟草、胡萝卜、番茄、马铃薯、拟南芥、龙葵、生菜等。在以上的工作中, 共分别应用了不同来源的 40 种以上的外源基因, 证明无论来自最低等生物 (病毒) 还是最高等生物 (人类) 的基因均可在植物基因组中整合、传代和得到一定程度的表达 (限于篇幅, 有关文献未能一一列出。其中部分文献可参见文[20])。这些基因包括:

(1) 5 种来源于病毒的基因: 烟草花叶病毒 TMV 的 CP (外壳蛋白) 基因, 黄瓜花叶病毒 CMV 的 CP 基因, 番木瓜环斑病毒 PRV 的 CP 基因和 RP (复制酶) 基因, 乙肝表面抗原 S 基因;

(2) 11 种来源于细菌的基因: 新霉素磷酸转移酶基因 (*npt II*), 胭脂碱合成酶基因 (*nos*), 潮霉素磷酸转移酶基因 (*hpt*), 抗除草剂基因 (*bar*, 即膦丝菌素乙酰转移酶基因), 氯霉素乙酰转移酶基因 (*cat*), β -葡糖醛酸糖苷酶基因 (*gus*), 细胞分裂素合成酶基因 (*roi*), 枯草杆菌核糖核酸酶基因 (*bamase*), 苏云金杆菌毒蛋白基因 (*cyt1A*), 天蚕抗菌肽 B 基因 (*cecB*), 霍乱肠毒素 B 亚单位 (CT-B) 基因;

(3) 4 种来源于动物的基因: 萤火虫荧光素酶基因 (*luc*), 3 种绿色荧光蛋白基因 (*gfp*);

(4) 7 种来源于人类的基因: 人生长激素 (*hgh*) 基因, 促红细胞生成素基因 (*epo*), 亮氨酸脑啡肽基因 (*enke*), 人肝金属硫蛋白基因 (*mt*), 肿瘤坏死因子 α 基因 (*tnf α*), 白介素 *il-2* 基因, *p53* 基因;

(5) 14 种来源于植物的基因: 雪花莲凝集素基因 (*gna*), 大豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*dbti*), 马铃薯蛋白酶抑制剂基因 (*pin II*), 龙葵蛋白酶抑制剂基因 (*sapin2a*), 水稻碱性几丁质酶基因 (*rc24* 和 *rch10*), 水稻酸性几丁质酶基因 (*rac22*), 苜蓿 β -1,3-葡聚糖酶基因 (β -*Glu*), 大麦核糖体抑制蛋白基因 (*B RIP*), *Xa21* 基因, 甜蛋白基因 (*Thaumatococcus* 和 *Monellin*), 野豌豆球蛋白基因 (*leg*), 金鱼草

Del 基因。

以上的工作表明: 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。据此可推理, 来自于各种生物体的不同基因也有可能在其他生物体的遗传改良中加以应用。例如在目前已相当成熟的4大类蛋白质表达系统(即大肠杆菌、酵母、杆状病毒—昆虫细胞和哺乳动物细胞表达系统)中, 已成功表达出多种不同生物来源的蛋白。上述这些事实都充分说明了遗传密码的统一性和同源性, 决定了来自于不同物种的基因, 在合适的启动子和调控、修饰元件的辅助下, 完全可能在另一远缘物种中得到正常的表达。这是基因工程之所以具有上述这种广泛适用性的理论基础。

2 利用多基因转化策略改良生物体遗传性的策略和方法

2.1 重复转化法(又称顺序转化法)

将一个个有用基因反复多次地导入同一生物体中的方式, 尽管理论上可行, 但由于耗时长, 筛选困难, 不同基因间易发生分离或诱发沉默, 且每次转化均需要不同筛选标记, 因而在实践中难度较大。在基因工程诞生之前, 传统的常规育种常采用这种思路, 即将多个优良性状逐个、逐次地累加到某个生产上常用的优良品种中。

2.2 杂交聚合法

先将不同基因转化两亲本, 再把获得的转基因纯系杂交以聚合多个目标基因。这种选育纯系再进行杂交的方法费时费力, 一般多适用于已有的转基因纯系。考虑到转基因的位置效应和基因表达的稳定性, 通常还必须扩大相应的育种群体。对于许多依赖于营养繁殖的作物和果树, 杂交法将完全无计可施。

2.3 直接转化法与回交转育法结合

对于那些已经获得目的基因的转基因材料而言, 采用回交法将其中的目标基因转育到其他近缘的优良品种中, 不失为获得具有转基因目标性状新品种的一种简便途径。这种方法特别适合于那些转基因操作困难, 但又已经具备其他有用性状的品种。如王才林等将转有 bar 基因的的水稻“HR”作为供体亲本, 优良恢复系 E32、9311 作为受体亲本, 经4轮回交转育出对除草剂有稳定抗性的水稻新品系 E32HR 和 9311HR^[21]。将回交法和基因枪法、农杆菌介导法、花粉管通道法等直接转化法结合起来, 可以大大加快具有转基因目标性状的新品系的选育过程。

2.4 非载体 DNA 转移途径导入外源整体 DNA

1974 年, 周光宇等提出了 DNA 片段杂交假说, 并利用花粉管导入等非载体 DNA 转移技术, 将外源植物的基因转入其他植物, 从大量变异后代中选育出了可供育种上使用的优良品种^[22]。目前已有多个例将野生稻、紫色稻、菰、玉米、高粱等 DNA 通过花粉管通道法导入栽培稻品种的报道^[23]。另外, 种苗浸泡法、孕穗茎注射法等也属于非载体 DNA 转化的分子育种方法^[24]。这类方法导入的外源 DNA 片段大小难于控制, 产生的变异广泛, 外源基因在直接转移入受体的同时还将引发复杂的生物诱变作用, 因此虽然有大量的育种研究结果证明了该方法的有效性, 但其转化的效率和精准性仍有待进一步提高。

2.5 多载体的共转化法

共转化法是将位于不同载体上的多个基因同时导入受体基因组中。Chen 等用基因枪法将 14 个带有不同基因的质粒共转化水稻, 有 17% 的转化子带有 9~13 个外源基因^[25]。本实验室通过基因枪法将位于多个质粒上的多个基因共转化水稻, 获得了可抗多种病虫害的转基因水稻^[3, 11, 12, 26, 27]。Ye 等^[28]则将 β -胡萝卜素合成途径相关的 3 个基因分置于 2 个质粒上, 通过农杆菌介导的共转化将有关基因导入水稻胚乳, 提高了水稻的营养价值, 成为农杆菌介导的多基因共转化改良农作物的成功范例。共转化方法由于简单易行已经成为目前多数实验室多基因转化的首选方法。但是共转化的共整合频率不稳定, 随不同转化事件、转化技术, 不同的受体, 不同的表达载体结构、大小和数量而变化。一般来说, 当转化载体的数量增加时, 获得多基因共转化体的频率将会大幅度下降^[3]。当然也可以先把多个基因分成几组分别构建在不同的载体上, 再将分别含有多个基因的载体进行共转化, 如此便可兼顾共转化的效率和载体的容量及构建载体的难度^[3]。另外各个基因的表达也受其复杂的整合模式影响而变化很大。因此同时进行转化的目的基因之间, 转化和表达的效率可能差异较大。

2.6 多基因单载体一次性转化法

多个基因如能构建在同一载体上, 无疑将会省去杂交法、回交法、重复转化法的繁琐费时, 避免或减少非载体 DNA 转化法的不确定性和共转化频率低、整合模式复杂以及多个转入的基因在后代中分离与重组等问题。因此多基因表达载体的构建已经成为多基因转化策略的关键性技术之一。但目前多基因载体的构建和组装仍面临着一系列的技术难题, 如大容量载体系统的构建, 大片段 DNA 分子

的定点切割与连接。基于酶切与连接方法的传统分子克隆技术显然已难以满足多基因大分子 DNA 的操作。

最近, 本实验室与华南农业大学遗传工程室合作, 建立了一套以可转化人工染色体 (TAC) 为基础、融合了稀有酶切位点技术、Cre-loxP 特异性重组系统及双元交替循环供给载体技术的多基因组组装载体系统, 使得目标基因的亚克隆与组装变得简单易行而程序化, 从而使载体可装载的 DNA 片段长度在理论上可以达到接受载体的最大容量 (如对于 TAC 载体而言, 其容量至少为 100 kb 的 DNA 片段^[9])。同时, 我们依靠上述技术已成功地首次构建了 2 个含有 10 个以上基因及分子元件, 大小超过 50 kb 的多基因植物表达载体, 并通过农杆菌介导法或基因枪转化法成功地将其转化到多个粳稻^[9]和籼稻品种中 (部分结果正待整理发表)。

目前, 多基因载体的构建策略主要有以下几种:

(1) 独立表达框组合法: 各个目的基因两端各携带有自己的启动子、增强序列、终止子等转录和翻译的调控元件, 将各个表达框串联在一起共同组建于一个表达载体中。这种组合在一起的目的基因由于有各自的表达元件, 因此能分别转录成多个转录本, 并表达出各自的产物。它们之间一般完全连锁, 可同时表达。通过不同的启动子元件, 还可以控制不同基因在表达上的时空特异性, 从而使多基因得到更灵活协调的表达。但具有同源性的启动子序列有时可能引致基因沉默。因此随着加入基因数的增多, 寻找多个合适启动子的工作将会变得越来越艰巨。此外, 调控序列的增加, 也将减少载体对外源基因的相对容量。

(2) 多聚蛋白-酶解法: 多个目的基因的编码序列融合在同一个表达框 (ORF) 内, 形成操纵子, 它们共用同一个启动子, 以多顺反子的形式转录成一个转录本, 翻译后得到一个由不同功能蛋白拼合在一起的多聚人工蛋白。运用这种方式产生的融合蛋白已广泛应用于基因表达、酶学定向药物设计及构建新的细胞因子等领域^[29]。考虑到融合蛋白结构和功能的复杂性, 如果欲将各个目的基因的表达产物分离开来行使各自的功能, 还可以在各基因之间插入编码某个蛋白酶特异识别位点的 DNA 序列, 这样, 融合蛋白一旦翻译成多肽, 就可以通过相应的酶解过程使其分离^[30]。由于融合在一起的多个基因处在同一个表达盒中, 缩小了整合进载体的 DNA 片段长度, 减轻了载体的运载负担, 同时还使各基因的表达完全同步, 表达水平相当, 因

此易于对表达进行控制。

(3) 利用内部核糖体进入位点 (IRES) 实现多基因表达: IRES 位于 2 个 ORF 之间, 是不依赖于启动子的翻译起始区。它们可以直接引导核糖体对下游 ORF 进行翻译而不需要 5' 帽子结构。它能完全独立于上游顺反子而介导下游顺反子的有效翻译, 即使 IRES 5' 端的转录本没有进行翻译也不会影响其 3' 转录本的翻译^[31]。因此可以将多个基因串联成多顺反子, 每 2 个顺反子间设置一个 IRES 来进行多基因表达。

2.7 利用同源重组将多个基因同时导入质体中, 即质体转化法

在叶绿体中, 许多功能相近的基因聚合在一起, 共用一个启动子, 以多顺反子的形式同时在叶绿体中转录和表达。因此可以利用叶绿体来进行多基因表达^[32]。叶绿体表达体系不仅有超量表达和积累外源蛋白的能力, 而且能为原核基因的表达提供理想场所。此外, 叶绿体属母系遗传, 有利于外源基因的稳定遗传, 还可以避免外源基因通过花粉漂移; 由于叶绿体 DNA 背景清楚, 可以通过同源重组实现定点整合, 因此可以在多个基因的两端加入叶绿体的同源重组序列, 通过基因枪转化等方法, 使目的基因定点重组于合适的表达位点, 较好地解决“顺式失活”、“位置效应”等基因沉默的问题。尽管叶绿体转化法目前还不成熟, 但它已显示出上述的许多优点^[32]。因此, 通过发展合适的叶绿体转化载体和转化方法, 可望为高等植物的多基因转化开辟一条新的途径。

总而言之, 通过基因枪法、农杆菌介导法、电激法、PEG 法、花粉管通道法等等, 可以成功地将多个基因一次性或多多次性地聚合到植物体中。与常规的育种方法 (杂交、测交、回交) 相结合, 还可以为农作物的种质创新开辟新的育种途径。同样地, 通过上述的多基因载体组装策略, 也可以将多个外源基因转化到动物体或微生物体中。目前用于动物细胞转化的方法主要有逆转录病毒载体或精子作为载体所介导的基因转化法、显微注射法、脂质体介导法、电场或离子束转基因法、PEG 法、高速微弹轰击法 (基因枪法) 等^[33]。但无论是那种方法, 其基本的多基因组装与转化的策略与上面所述的方法大体上是一致的。

参考文献:

- [1] 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.

- [2] 李宝健,刘秋云,李刚,等. 21 世纪医学主要进展的预测——以人类后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.
- [3] 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.
- [4] 童继平,孙林静,马忠友,等. 浅谈水稻超高产育种[J]. 生物学杂志, 1998, 15(6): 45—46.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 范钦,许新萍,李宝健,等. 多个抗虫基因转化水稻两用系培矮—64S[J]. 实验生物学报, 2002, 35(1): 42—46.
- [14] UNEP-WCMC. Global Biodiversity: Earth's living resources in the 21st century[M]. Cambridge: World Conservation Press, 2000.
- [15] YU J, HU S N, WANG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L ssp *indica*) [J]. Science, 2002, 296(5565): 79—92.
- [16] THE ARABIDOPSIS INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408: 796—815.
- [17] GOFFEAU A, BARRELL B G, BUSSEY H, et al. Life with 6000 genes[J]. Science, 1996, 274(5287): 546, 563—567.
- [18] ADAMS M D, CELNIKER S E, HOLT R A, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*[J]. Science, 2000, 287(5461): 2185—2195.
- [19] VENTER J C, ADAMS M D, MYERS E W, et al. The sequence of the human genome[J]. Science, 2001, 291(5507): 1304—1351.
- [20] 植物遗传分子遗传及基因工程专辑[J]. 中山大学学报论丛, 1989, 8(4) .
- [21] 王才林,赵凌,宗寿余,等. 抗除草剂水稻新品系“E32HR”的选育[J]. 江西农业学报, 2003, 15(3): 14—19.
- [22] ZHOU G Y, WEN J, HUANG J Q, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 433—488.
- [23] 丁国华,池春玉,史芝文. 农业分子育种中外源 DNA 导入技术的研究与发展[J]. 生物学教学, 2000, 25(11): 2—3.
- [24] 赵炳然,吴京华,王桂元. 用穗茎注射法将外源 DNA 导入水稻的初步研究[J]. 杂交水稻, 1994(2): 37—38.
- [25] CHEN L L, MARMEY P, TAYLOR N J, et al. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(11): 1060—1064.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] YE X D, AL-BABILI S, KLÖTI A, et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm[J]. Science, 2000, 287: 303—305.
- [29] 张毅,屈贤铭,杨胜利,等. 融合蛋白基因工程应用及研究[J]. 生物工程进展, 2000, 20(3): 13—17.
- [30] VON BODMAN S B, DOMIER L L, FARRAND S K. Expression of multiple eukaryotic genes from a single promoter in *Nicotiana* [J]. Biotechnology (NY), 1995, 13(6): 587—591.
- [31] TOTH R L, CHAPMAN S, CARR F, et al. A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors[J]. FEBS Lett, 2001, 489(2—3): 215—219.
- [32] 苏宁,吴燕民,孙丙耀,等. 植物基因工程新途径: 叶绿体转化[J]. 生物技术通报, 2001, 17(4): 9—13.
- [33] 邹莹. 转基因动物的研究进展[J]. 新疆农业科学, 1994(4): 143—146.

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

I . The Gene Resources and Technical Platform for Multi gene Transformation

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 //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. They will be applied to genetic improvement of organisms. Since most 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. Based on over ten years 'practice in the Biotechnology Research Center of Sun Yat sen University and Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, the significance and the reason why the MTS was proposed are reviewed. The available gene resources and the technical strategies for multi gene transformation were discussed.

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

(上接第 10 页)

Technology of Intensive Penaeid Shrimp Culture and Disease Control

HE Jian guo, SUN Cheng bo

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The history of intensive penaeid shrimp culture and disease control is introduced in mainland of P. R. China. The contents mainly include constitution of ponds for intensive shrimp culture, cultural technology, management, and viral diseases control methods, especially white spot syndrome (WSS) .

Key words: intensive culture; penaeid shrimp; cultural technology; disease control