

# 转基因生物

王莹莹

导师：何进

- 转基因生物既是转入了外源目的基因并使其得到表达的生物体。
- 转基因微生物（细菌、酵母）  
用于高效表达外源蛋白质的表达系统，大肠杆菌表达载体
- 转基因动物  
转化载体多病毒载体
- 转基因植物  
质粒载体、病毒载体

# 已获成功的转基因植物

- 植物

- 至少35科200种

- 性状

- 抗虫、抗病（病毒、细菌和真菌性病害）

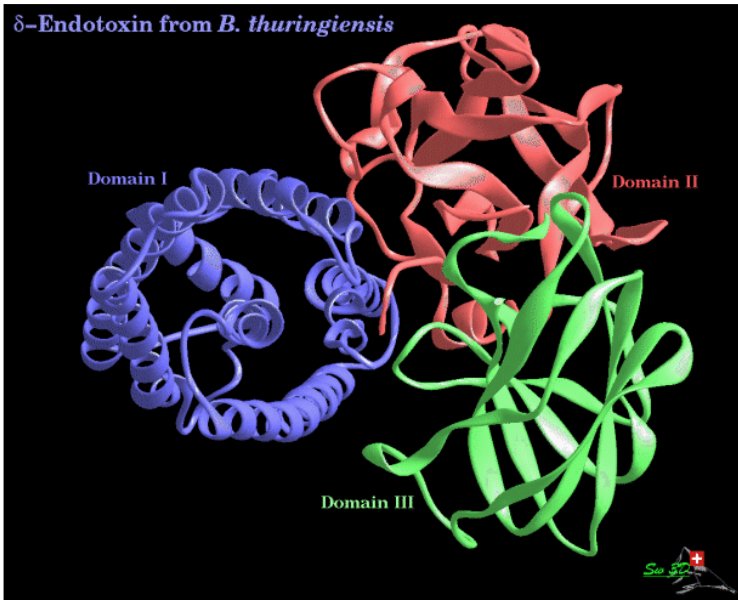
- 抗除草剂

- 抗逆境（抗旱、抗渍、抗高温冷害等）

- 品质改良、生长发育调控、产量潜力

# 目的基因

- **抗病：** 抗病毒基因 (CP基因及病毒卫星RNA) 抗细菌基因 (抗植物细菌性病害转基因育种工作中应用的主要是病原菌本身的抗性基因、杀菌肽和溶菌酶三大类基因) 抗真菌基因 (几丁质酶基因与 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因)
- **抗虫：** 微生物源, **Bt基因**  
植物源, 蛋白酶抑制剂基因、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂基因、凝集素基因
- **非生物胁迫抗性：** 耐除草剂基因、抗冻蛋白基因 (脯氨酸合成酶基因、甜菜碱合成酶基因、调渗蛋白基因)
- **改良作物品种质量：** 控制果实成熟的基因、改良脂肪酸组成的基因、提高作物产量的基因

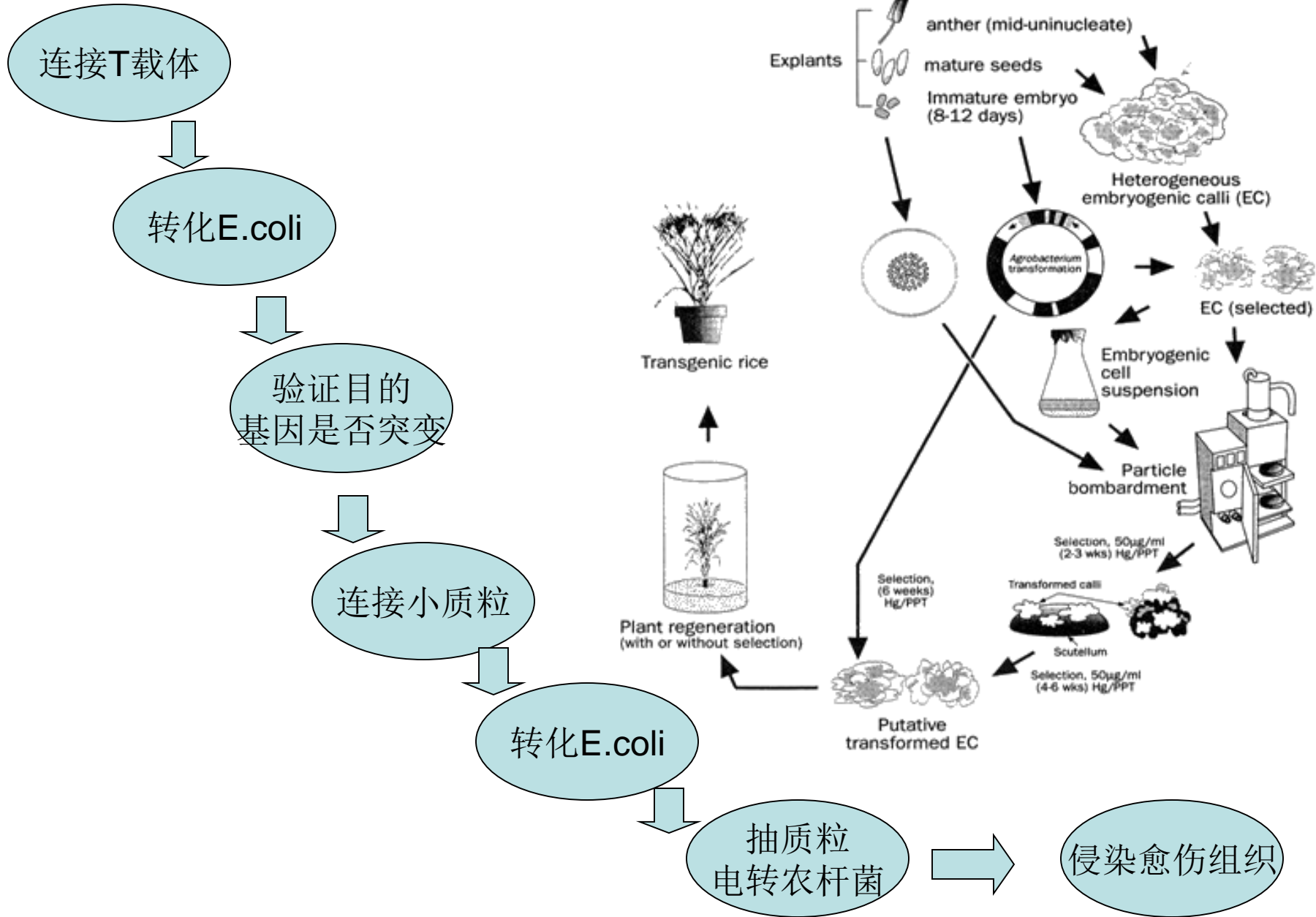


**Domain I:** 由7个 $\alpha$ -螺旋组成，其中一个 $\alpha$ -螺旋疏水性较强，位于结构域I的中心，其余6个 $\alpha$ -螺旋与跨膜孔道的形成有关。

**Domain II:** 由三个反相平行的 $\beta$ 折叠形成一个三棱形结构，该结构域主要参与毒蛋白与受体的识别。

**Domain III:** 由两个反相平行的具有 $\beta$ 构象的肽链高度缠绕而形成一个 $\beta$ 三甲板结构，该结构域主要起维持蛋白结构稳定和保证毒蛋白与受体稳定结合的作用。

# 目的基因 Cry I Ab (domain I II) +Cry I Ac (domain III)



- 农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌
- 它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位，并诱导产生冠瘿瘤或发状根。
- 根瘤农杆菌和发根农杆菌细胞中分别含有Ti质粒和Ri质粒，其上有一段T—DNA，农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后，可将T—DNA插入到植物基因组中。

## Ti质粒结构：

**1) T-DNA区** ( transfer-DNA region )：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；该片段上的基因与肿瘤的形成有关。

**2) Vir区** (Virulence region)：该区段上编码的基因能激活T-DNA转移，使农杆菌表现出毒性，故也称作致毒区。T-DNA区与Vir区在质粒上彼此相邻，合起来约占Ti质粒DNA的三分之一。



**3) Con区** (region encoding conjugations) : 该区段存在与细菌间接合转移有关基因 (*tra*) , 调控Ti质粒在农杆菌间转移。冠瘿碱能激活*tra*基因, 诱导Ti质粒的转移, 因此称为接合转移编码区。

**4) Ori区** (origin of replication) : 该区段基因调控Ti质粒的自我复制。

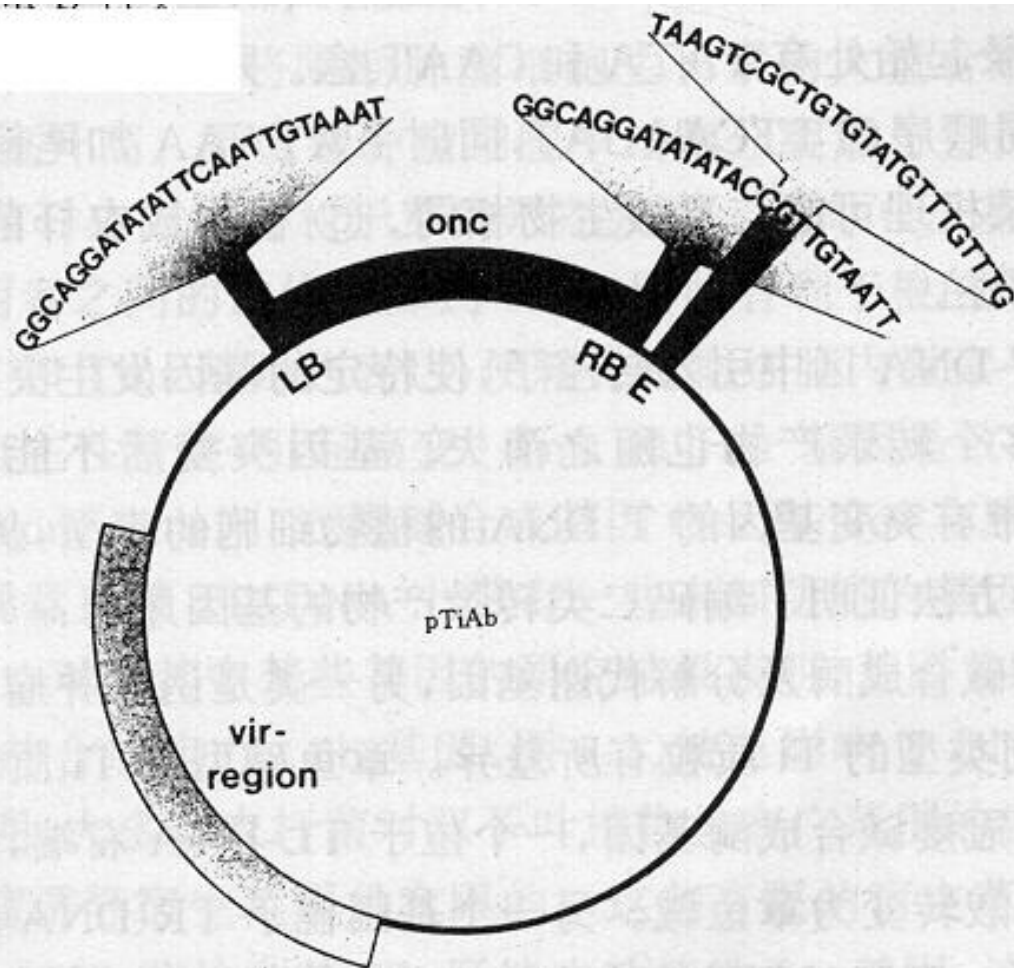


图 8-4 Ti 质粒上与肿瘤形成有关的几个重要区域及其序列(引自 Paul 等,1992)

Vir region:Vir 基因区 LB:左边界序列 Onc:与致瘤有关的 T-DNA 核心区

RB:右边界序列 E:增强子序列

# 载体构建

- 一元载体系统

去除野生型Ti质粒T-DNA中的Onc基因，引入一段工程操作的小质粒序列，保留T-DNA的边界序列。

**转化菌株的制备过程：**将外源基因装载到小质粒上，然后把载有外源基因的小质粒通过一定的方法导入农杆菌，利用Ti质粒与小质粒的同源重组，将外源基因引入T-DNA，制成用于转化的一元载体转化菌株。

**双元载体系统：**即指由两个分别含T-DNA和Vir区的相容性突变Ti质粒构成的双质粒系统。

√ **双元载体系统涉及到两个Ti质粒的改造。**

**大Ti质粒的改造：**主要是去除T-DNA上的Onc基因（卸甲过程），甚至完全消除T-DNA，保留Ti质粒上的其它部分，并保留在受体菌体中。小质粒只带有T-DNA、复制起点和选择标记基因，有些仍保留VirG序列，并在T-DNA上引入多克隆位点；

**农杆菌工程菌的制备过程：**将载有外源基因的小质粒引入含卸甲的大Ti质粒的菌株，组成含两个质粒的转化菌株。T-DNA介导外源基因转移是利用反式激活原理。

## • 选择标记基因

### 1 新霉素磷酸转移酶基因（挑选出转化细胞）

选择试剂：卡那霉素（Kan）和新霉素（G418）

作用机制：选择试剂通过与核糖体小亚基的结合，从而抑制蛋白质的合成。Hpt-II基因编码产物使选择试剂磷酸化而失效。

### 2 Bar基因

选择试剂：膦丝菌素（Basta）

作用机制：选择试剂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。Bar基因编码的膦丝菌素乙酰转移酶，通过乙酰化作用使膦丝菌素失活。

### 3 潮霉素磷酸转移酶基因（hpt）

选择试剂：潮霉素（Hygromycin）

作用机制：潮霉素抑制细胞的蛋白质合成，从而抑制非转化细胞的生长。转化细胞中表达的hpt基因产物通过磷酸化作用使潮霉素失去毒性。

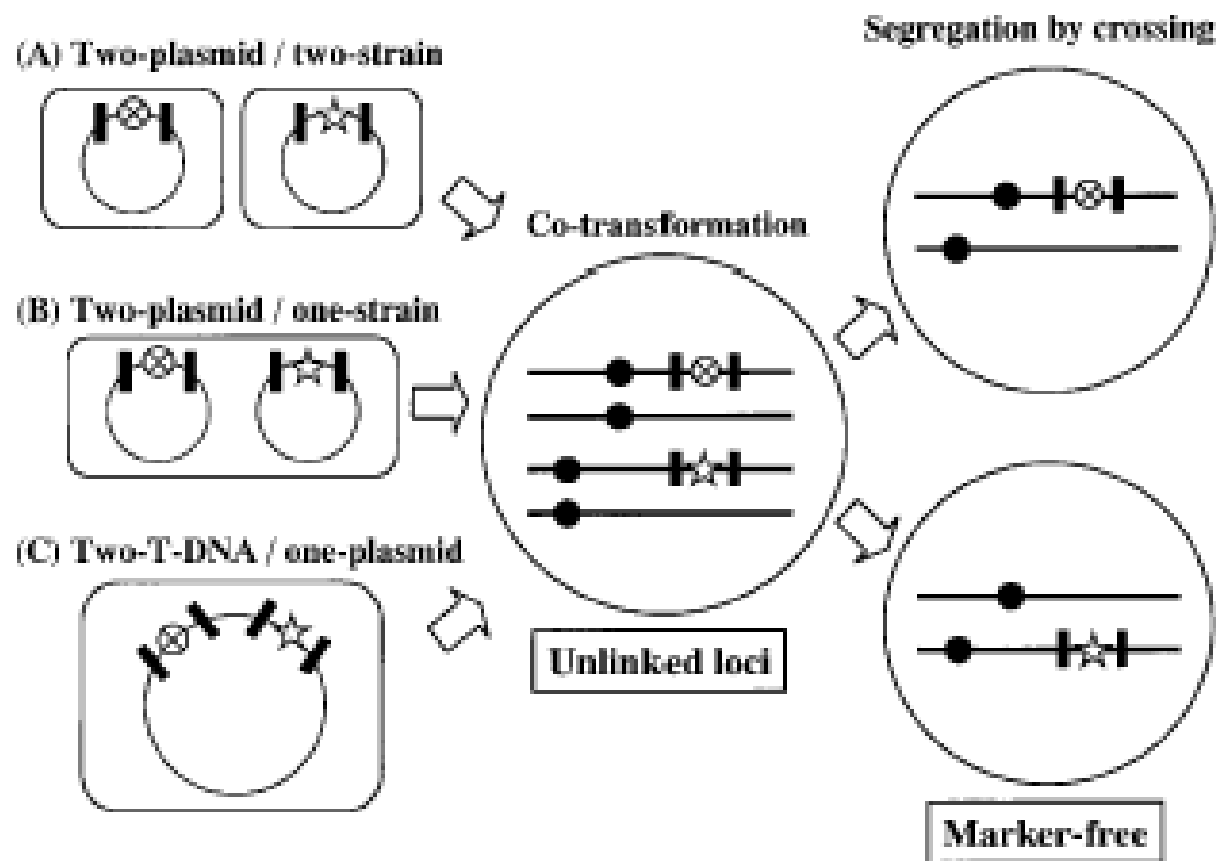
# 标记基因存在着一定的负面影响：

- **农杆菌介导的共转化法**

通过共转化的方式，农杆菌可以将两个不同的T-DNA片断转化到同一个植物细胞中去，其中一个T-DNA片断带有目的基因，另一个带有标记基因。如果两个T-DNA片断整合到植物基因组上不同的位置，则目的基因和标记基因就可以通过有性杂交在子代水平上分离开来。

- **位点特异性重组酶介导的标记基因的消除**

利用位点特异性重组系统消除标记基因通常的转化方法即在转化载体T-DNA区上标记基因的两侧加上特异的重组位点。首先进行正常的农杆菌转化筛选，然后再在转化植株中引入重组酶。重组酶的引入方式一般为两种，即再次转化或与带有重组酶的转基因植株进行杂交。重组酶的引入可使转化植株中重组位点之间发生特异重组，剪切掉标记基因。



**Fig. 1A–C** Generation of marker-free transgenic plants by the co-transformation methods. A selectable marker gene and a gene of interest from two different T-DNAs are integrated into unlinked loci by co-transformation. The gene of interest is segregated from the selectable marker gene by sexual crossing. ⊗ Selectable marker gene, ☆ gene of interest, █ border sequence of T-DNA



6月24日



7月15日



7月26日



7月31日





我想请问你，为什么会减少农药用量？

我们不要将什么大道理，就用直觉来做判断，为什么农药用量会减少？

因为虫子不敢来，或者虫子吃了会死，我想请问为什么？

你们不要谈科学，就回答我这个问题，这就是本质的问题。

请你们这些水稻专家亲自来回答我这个问题，我希望你们这些水稻专家当面来向我挑战。

虫子吃了转基因水稻后会死掉，那它为什么会死掉？

因为转基因水稻一定会释放出某一种毒素，否则虫子怎么会死呢？

既然你能把虫子毒死，那么人呢？人吃了就没事了吗？

### 3) Bt杀虫蛋白的作用过程与杀虫机理

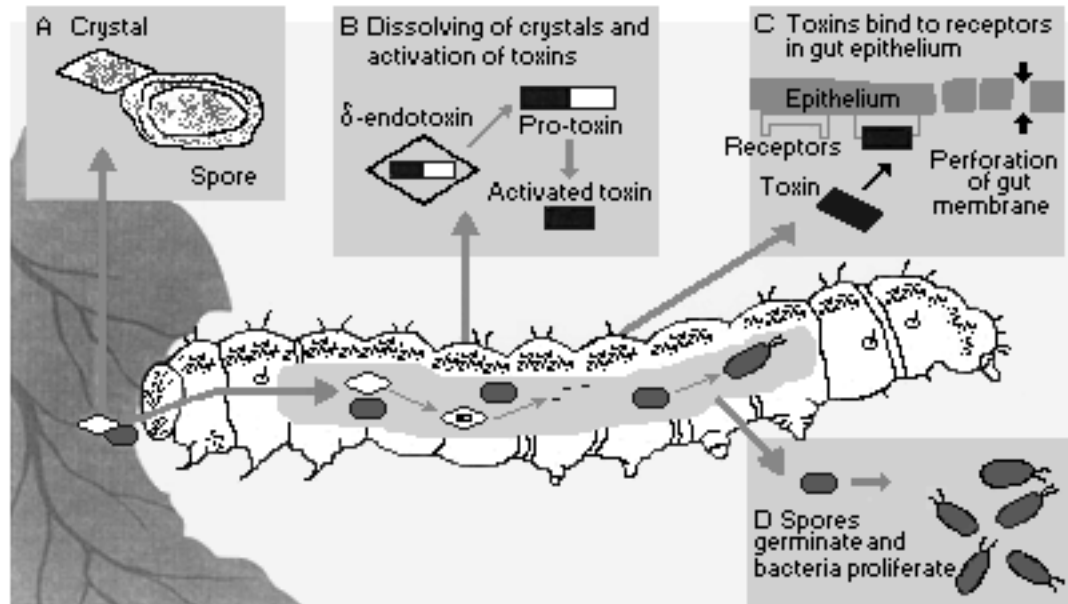


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

Bt毒蛋白的作用过程大致可划分为7个步骤，即：原毒素的溶解、原毒素的蛋白酶水解、毒素分子穿过围食膜（peritrophic membrane）、毒素分子与受体的结合、毒素分子插入膜中、小孔的形成、中肠细胞失去离子平衡裂解。

- 首先，必须先溶解在昆虫的肠道里，杀虫结晶蛋白只能溶于碱性条件下，而不能溶于中性条件或者酸性条件。
- 第二，一经溶解，在专一性蛋白酶水解切割作用下，释放出毒素核心肽段，原毒素被活化成毒素。
- 第三，活化后的杀虫结晶蛋白不被胰蛋白酶或者其它蛋白酶所破坏，它能与昆虫肠道上皮细胞上面的特异性受体结合，结合之后杀虫结晶蛋白全部或部分嵌合于细胞膜中，使细胞膜产生一些孔道，从而导致细胞由于渗透平衡被破坏而破裂。大多数情况下杀虫结晶蛋白的毒性都来源于它与受体的结合。

伴随着上述过程，昆虫幼虫将停止进食，最终死亡。

- 首先，人或其它哺乳动物的肠道不同于昆虫的，是酸性环境，杀虫结晶蛋白在其中不能溶解和进一步活化。
- 第二，不能活化的杀虫结晶蛋白则很容易被肠道中的蛋白酶分解成小的肽段或者氨基酸，与其它食物的结果一样被消化吸收。
- 第三，人或其它哺乳动物肠道中没有可以与杀虫结晶蛋白结合的特异性受体。
- 另外，该蛋白是热不稳定性，人一般吃的是熟食，而杀虫结晶蛋白在60°C煮一分钟就会完全变性，对靶标昆虫也失去了毒性。

Thank you

# Coho Salmon

**Novel gene construct:  
strong promoter (sockeye MT) +  
extra growth hormone gene (sockeye GH).**



**Growth hormone expressed in cold waters, unlinked from temperature cue.**

