

# 植物基因叠加技术的研究进展

谭茂玲<sup>1,2</sup>, 李晨<sup>2</sup>, 闫晓红<sup>2</sup>, 梁国鲁<sup>1\*</sup>, 魏文辉<sup>2\*</sup>

(1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 中国农业科学院油料作物研究所  
基因组学与分子生物学研究室/农业部油料作物生物学重点开放实验室, 湖北 武汉 430062)

**摘要:** 将不同外源基因转入植物并实施基因叠加是植物基因工程技术发展的一个重要方向。虽然在商业化的转基因作物中, 一部分已经实现了基因叠加和优良性状的重组, 但只是极少数转基因事件实现了 3 个或者更多外源基因的导入。为此, 综述了基因叠加的几种主要方法, 分析了其面临的问题, 并对其发展前景进行了展望。

**关键词:** 植物; 转基因; 基因叠加

**中图分类号:** Q343.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)04-0017-05

## Review on the Gene Stacking in Plants

TAN Mao-ling<sup>1,2</sup>, LI Chen<sup>2</sup>, YAN Xiao-hong<sup>2</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1\*</sup>, WEI Wen-hui<sup>2\*</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;  
2. Department of Genomics and Molecular Biology, Oil Crops Research Institute of the  
Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Oil Crop Biology of the  
Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** One of the important directions of plant genetic engineering and biotechnology is to transfer different foreign genes into plants and implement gene stacking of plant genetic engineering and biotechnology is an important direction. Gene stacking and reorganization of choice characters were realized within a small scope of commercial genetically modified (GM) crops, but only a handful of products have been developed by introducing three or more novel genes. This article reviews several major techniques of gene stacking, and analyse the potential and problems of these various techniques, and then describes the prospects of its development.

**Key words:** Plant; Transgene; Gene stacking

转基因技术的应用极大地推动了植物遗传改良的进程, 从单个基因的转化发展到了多个基因的叠加。生物体内大多数代谢过程都是通过多个基因的协同表达才得以完成, 有效的基因叠加只有在多个基因同时参与并且相互作用时才能实现。例如, 将 3 个控制类胡萝卜素合成的基因成功地转入“金黄色大米”使其产生了维生素 A<sup>[1]</sup>, 而维生素 A 的有

效吸收需要增加含铁量, 这就需要导入另外的 3 个基因; 利用农作物生产持久耐用的可降解塑料时需要同时有 4 到 6 个基因的表达<sup>[2]</sup>。尽管基因叠加技术目前还没有取得较大的进展, 但这些研究为未来的基因叠加技术奠定了很好的基础。通过回顾基因叠加的各种方法和技术, 综述了其优点与存在的问题, 并对其应用前景进行了展望。

收稿日期: 2010-11-17  
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30671312); 湖北省自然科学基金一般项目(2009CDB191); 武汉市青年科技晨光计划项目(201050231022)  
作者简介: 谭茂玲(1986-), 女, 四川宜宾人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程。E-mail: tml920@163.com  
\* 通讯作者: 梁国鲁(1960-), 男, 重庆酉阳人, 研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: lianggl@swu.edu.cn  
魏文辉(1971-), 男, 湖北红安人, 副研究员, 主要从事遗传学、基因组学和分子生物学研究。  
E-mail: whwei@oilcrops.cn

## 1 多次转化实现基因叠加

通过传统的转化方法可以将 2 个或多个基因连续地转入植物中,比如将含有一个目的基因的植物与携带另一个目的基因的植物进行杂交(杂交聚合法),或者将转基因的植株再导入另外的目的基因(再转化法)。从目前的研究来看,通过杂交聚合的策略可以使不同的外源基因转入同一植株中,最终增强转基因效果或者同时表达不同的外源基因。例如,将含有不同 Bt 杀虫蛋白的植株杂交,可以延缓昆虫对 Bt 杀虫蛋白产生抗性<sup>[3]</sup>。同样,含有 Bt 基因与抗枯萎病基因的转基因水稻与含有 *Xa21* 基因的转基因水稻杂交获得了同时具有抗病和抗虫能力的杂交后代<sup>[4]</sup>。将细菌中有关 PHB 合成的 3 个基因附加上豌豆叶绿体转移肽序列后,转基因植株可以同时表达 3 个基因并在质体中积累 PHB 颗粒,其表达的量接近植物干质量的 14%<sup>[5]</sup>。

再转化同样是基因叠加的有效方法。金鱼草属植物中控制黄酮酮醇的基因与紫罗兰中控制花色素合成的基因先后转入连翘属植物中,最终调控花青素的合成从而改变其花色<sup>[6]</sup>。另外,含有 2 个控制乙二醛合成途径的基因相对于只含有其中一个基因的转基因烟草其耐盐性明显地提高<sup>[7]</sup>。反义抑制 3 个淀粉合成酶的基因通过再转化的方法成功地转化到马铃薯中<sup>[8]</sup>,转化后改变了淀粉的合成,最终生产出冻融稳定的支链淀粉。在食品工业中,如果用这种方法替代当前化学处理的技术,对环境和消费者将具有很大的益处。用再转化的方法将 3 个控制长链多不饱和脂肪酸的基因连续地导入拟南芥中,证实了在植物中也能够产生  $\Omega-3$  和  $\Omega-6$  脂肪酸,这类脂肪酸通常只有在鱼的脂肪里才能够提取<sup>[9]</sup>。

尽管多次转化有着很多成功的例子,但是用多次转化的方法来实现多基因叠加仍然有许多缺陷。其中最大的问题就是这些基因导入的时候会随机地插入染色体不同的位置,从而在后代中发生分离,如果要从后代中筛选出保持这些性状的植株就需要很大的工作量和众多的后代群体。为了获得稳定遗传的植株,在实际生产中要将每个基因座位进行纯和,就需要将后代群体扩大,因此,巨大的工作量和投入成本就限制了多次转化转基因的数量。即使在实验室中通过杂交或再转化策略也是非常困难的,不仅需要大量的劳动力,同时每一个外源基因的转化还需要鉴定转基因表达水平,而且通过杂交实现基因叠加的方式要经过几代,实现 3 个到 4 个基因聚合可能需要 4 至 6 代的时间<sup>[10]</sup>。多次转化还存在的

问题就是需要用各种各样的标记基因,虽然目前筛选标记越来越多,但含有多种筛选标记基因的转基因作物不一定会得到大众接受和推广种植。因此,怎样去除筛选标记也是近年来植物转基因的研究热点<sup>[11]</sup>。

## 2 多基因的共转化

共转化被认为是多基因转化中最有发展潜力的方法。这种方法非常的快速并且简单易行,它可以采用粒子轰击的方法也可以用农杆菌介导的转化法,不管是携带不同 T-DNA 单一的菌株,还是携带不同 T-DNA 的多个菌株,都能一起转入植物组织。共转化一个最主要的优点是同时导入的目的基因容易整合到宿主染色体的相同位置上,这样就保证了转基因植株的性状在后代中不容易分离。但是,这个方法存在的问题就是紧密连锁的筛选标记基因不容易通过后代染色体交换过程去除。有人曾在烟草的试验中用 2 个 T-DNA 进行共转化,结果表明,共转化的频率高达 100%,其中 40%~50% 会出现性状分离<sup>[12]</sup>,这种方法进一步体现了一步转化多个目的基因的优势。但是随着共转化基因数目的增多,分离筛选标记的后代群体要求越大,就带来了巨大的工作量。

许多转基因玉米都是通过共转化的方法来实现基因叠加,比如抗虫和抗除草剂性状的叠加。分别携带 2 个基因的 2 个 T-DNA 用农杆菌介导法同时导入水稻,在胚乳中控制类胡萝卜素的合成途径的基因顺利表达并且产生了  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[1]</sup>,这种在胚乳中引进  $\beta$ -胡萝卜素的方法可以减少大米作为主食地区的维生素 A 的缺乏。在共转化时用粒子轰击法同时将 3 个抗虫基因导入水稻,可明显提高其病虫害抗性<sup>[13]</sup>。

## 3 独立表达框组合法

独立表达框组合法是指每一个基因都有单独的启动子和终止子,将他们串联在一起共同导入植株。用这样的方法,将合成 PHB 的 3 个基因加上选择标记基因连接到 2 个 T-DNA 上同时转入拟南芥里。结果表明,有 16% 的植株成功合成 PHB<sup>[14]</sup>。通过 Cre/loxP 系统使基因连续转入载体上并且成功构建多达 10 个目的基因的载体,并且已经成功将 6 个基因转入水稻<sup>[15]</sup>。这个方法最主要的问题就是利用传统的转基因载体进行目的基因连接时,是否有足够的限制性酶切位点以及构建的载体大小的限制。另外一个问题是导入的目的基因不能协同表

达,即使用相同或者相似的启动子,各个目的基因的表达水平也有差异<sup>[16]</sup>。为了解决这个问题,Mlynářová等用MAR系统将2个报告基因连接在一起共同导入烟草中。结果表明,这2个基因共同表达的效率非常高<sup>[17]</sup>。尽管这个技术并不成熟,但MAR系统为提高目的基因共同表达奠定了基础。

将不同的目的基因连接起来在一个启动子下游表达,这种方法避免了使用复杂的调控区域,可以提高不同目的基因的协同表达,比如用IRESs(内部核糖体进入位点)系统将多个基因串联成多顺反子,每两个顺反子间设置一个IRESS来进行多基因表达<sup>[18]</sup>。近年来,叶绿体转化作为一种新的方法用于基因叠加中<sup>[19]</sup>。通过细菌操纵子使控制PHB合成的3个基因在烟草的叶绿体中表达<sup>[20]</sup>。在叶绿体表达体系中,由于叶绿体是母性遗传从而降低了转基因由于花粉传播的风险,提高了转基因作物的安全性。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道路。

#### 4 多聚蛋白酶法

将多个目的基因的DNA序列融合在一起,使其处于同一表达框(OFR)内,多个基因在同一个启动子下转录成一个转录本,翻译后得到一个由不同的功能蛋白拼合在一起而形成的新型多结构域的人工蛋白(多聚蛋白)。这种多聚蛋白可以行使不同蛋白的功能,它已广泛应用于基因表达、药物设计及构建新的细胞因子等领域。如果欲将各个目的基因的表达产物单独行使各自的功能,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,多聚蛋白一旦翻译成多肽,就可以用特异的酶比如Nla蛋白酶使其分离<sup>[21]</sup>。利用这个策略将烟草和大豆2种病毒的外壳蛋白在烟草中融合表达,最终使烟草对2种病毒产生了抗性<sup>[22]</sup>。

由于融合在一起的多个基因处在同一个表达框中,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。多个基因一般整合在受体染色体的一个遗传位点上,转化后筛选也很简单和方便,比较容易获得能稳定遗传的转化植株。然而这个策略的缺陷是它的表达量低,而且容易受到融合蛋白基因内各个基因位置的影响<sup>[23]</sup>。同时由于定位在某个亚细胞结构中的融合蛋白转运速度大于切割速度导致了这种融合蛋白部分加工的产物在该处的积累<sup>[24]</sup>。

#### 5 面临的问题和挑战

目前还没有找到一种最理想的方法有效地实现

多基因的叠加,不管哪种方法都需要去除筛选标记才能获得安全性的认可。近年来,出现了很多去除筛选标记基因的方法,比如转座子,位点特异性重组酶系统,这些有利于克服转化的局限。Ebinuma等设计了MAT载体系统(自主转化载体系统),将*ipt*作为选择标记基因插入到Ac因子中,并随着Ac从转化细胞中的转座而丢失,因此获得了无选择标记基因的转基因植株<sup>[25]</sup>。用这种MAT载体系统不需要有性杂交过程就可将选择标记基因切除,得到无筛选标记的植株,使那些繁殖周期长的树木品种和需要无性繁殖作物的转化变得更为容易。另一种删除筛选标记的方法是位点特异性重组酶系统,目前重组系统主要有:FLP/FRTs系统、R/RS系统、Cre/lox系统,以及噬菌体Mu的Cin重组酶系统。Endo等也将*ipt*基因作为筛选标记再通过R/RS系统删除标记基因<sup>[26]</sup>。利用Cre/lox重组酶系统来删除筛选标记已经有很多成功的报道<sup>[27]</sup>。另外还有一些特殊处理筛选标记的方法,比如选择标记基因的组织特异性表达<sup>[28]</sup>。

近来,还有一些没有用到筛选标记基因的转基因报道。例如通过病毒诱导的转基因并利用PCR检测,用这种方法在土豆中有1%~5%的转化效率<sup>[29]</sup>。对于像土豆、木薯这种转化率高的物种,这种方法是比较适用的。然而,对于转化率低的物种用这种方法会需要很大的工作量,甚至为了寻找适合推广种植的植株需要有很大的转化群体。一个新的转化系统可以解决这个难题并且更加有效地产生不含标记基因的转基因植株。这种方法用临时的筛选标记基因,同时利用来源于植物的重复序列P-DNA代替农杆菌的T-DNA<sup>[30]</sup>。虽然上述这些标记基因删除系统在商业应用中还不成熟,效率也不高,但是它们未来的发展和应用前景却非常的好,同时还促进了植物多基因叠加的发展。

不同的基因转化方法都有各自的优点和不足,多次转化的杂交聚合法避免了因位置效应而影响基因的表达,但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,多次转化的第二种方法再转化对于通过有性繁殖的作物来说不是很理想的,但是却比较适合于无性繁殖的物种。共转化是目前实现多基因叠加最有效的方法,但是它的标记基因不易剔除,而且共转化基因的数目越多对分离筛选标记的后代群体要求就越大,从而带来了巨大的工作量。独立表达框组合法是一种简单易行的方法,但是随着导入基因数量的增多寻找多个合适的酶切位点和启动子将会变得很难,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。多聚蛋白酶法由于融合在一起的多个基因处在同一个表达框中,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更加同步、表达水平相当,但是它的表达水平很低,易受到内部连接的基因位置的影响并且需要在不同编码基因之间加上蛋白酶特异识别位点的 DNA 序列。

## 6 展望

基因工程技术的不断发展为定向改造植物带来了机遇。如何有效地实施基因叠加,则是未来转基因研究的主要挑战和目标。必须要完善现有的多基因转化方法,开发新的技术,才能够解决转基因产品安全性和稳定性等诸多问题。对于一些传统的多基因聚合方法存在的缺陷,比如“位置效应”、“基因沉默”、“标记基因剔除”、“协同表达”,要积极寻找解决的途径,同时应该更多地探索和尝试一些创新的方法,比如寻找新的转基因载体,将外源基因通过游离病毒载体进行表达<sup>[31]</sup>或者通过工程细胞器<sup>[32]</sup>、人工微小染色体<sup>[33]</sup>等。目前,人工微小染色体在植物中已经有成功的报道,比如通过端粒介导的染色体截断技术在玉米中都产生了微小染色体<sup>[33]</sup>。此项技术也开始应用到其他的物种中,研究人员正在应用此项技术构建油菜人工微小染色体。利用位点特异性重组无论在体内还是体外都有很大的用处,在体外通过位点特异性重组系统在构建载体时实现基因叠加,在体内也有类似于 MISSA 系统实现基因叠加的策略<sup>[34]</sup>。多基因叠加技术的完善对农作物的遗传改良将具有重要的实际意义。

## 参考文献:

- [1] Ye X D, Al Babili S, Kloti A, *et al.* Engineering the provitamin A (beta carotene) biosynthetic pathway in rice endosperm[J]. Science, 2000, 287: 303-305.
- [2] Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, *et al.* Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 1011-1016.
- [3] Zhao J Z, Cao J, Li Y X, *et al.* Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(12): 1493-1497.
- [4] Datta K, Baisakh N, Thet K M, *et al.* Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial

blight, yellow stem borer and sheath blight[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 106(1): 1-8.

- [5] Ma J K C, Hiatt A, Hein M, *et al.* Generation and assembly of secretory antibodies in plants[J]. Science, 1995, 268: 716-719.
- [6] Rosati C, Simoneau P, Treutter D, *et al.* Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4 reductase and anthocyanidin synthase genes of the flavonoid pathway[J]. Molecular Breeding, 2003, 12: 197-208.
- [7] Singla Pareek S L, Reddy M K, Sopory S K. Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003, 100: 14672-14677.
- [8] Jobling S A, Westcott R J, Tayal A, *et al.* Production of a freeze thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 295-299.
- [9] Qi B, Fraser T, Mugford S, *et al.* Production of very long chain polyunsaturated omega 3 and omega 6 fatty acids in plants[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22: 739-745.
- [10] Halpin C, Barakate A, Askari B M, *et al.* Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 47: 295-310.
- [11] 陆晓春, 薛庆中. 转基因植物中标记基因的消除[J]. 生命科学, 2001(2): 78-81.
- [12] McCormac A C, Fowler M R, Chen D F, *et al.* Efficient cotransformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation[J]. Transgenic Research, 2001, 10: 143-155.
- [13] Maqbool S B, Riazuddin S, Loc N T, *et al.* Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests[J]. Molecular Breeding, 2001, 7, 85-93.
- [14] Poirier Y, Ventre G, Nawrath C. High frequency linkage of co-expressing T-DNA in transgenic *Arabidopsis thaliana* transformed by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 487-493.
- [15] Lin L, Liu Y G, Xu X P, *et al.* Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003, 100: 5962-5967.
- [16] Gidoni D, Bond Nutter D, Brosio P, *et al.* Coordinated expression between 2 photosynthetic petunia genes in

- transgenic plants [ J ]. Molecular General Geneicst, 1988, 211: 507-514.
- [ 17 ] Mlynárová L, Loonen A, Mietkiew ska E, *et al.* Assembly of two transgenes in an artificial chromatin domain gives highly coordinated expression in tobacco[ J ]. Genetics, 2002, 160: 727-740.
- [ 18 ] Urwin P, Yi L, Martin H, *et al.* Functional characterization of the EMCV IRES in plants[ J ]. The Plant Journal, 2000, 24: 583-589.
- [ 19 ] Bock R, Khan M S. Taming plastids for a green future [ J ]. Trends Biotechnology, 2004, 22: 31-318.
- [ 20 ] Lossl A, Eibl C, Harloff H J, *et al.* Polyester synthesis in transplastomic tobacco ( *Nicotiana tabacum* L. ): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction[ J ]. Plant Cell Reports, 2003, 21: 89-899.
- [ 21 ] 张毅, 屈贤铭, 样胜利. 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.
- [ 22 ] Marcos J F, Beachy R N. Transgenic accumulation of two plant virus coat proteins on a single self processing polypeptide[ J ]. Journal of General Virology, 1997, 78: 177-1778.
- [ 23 ] Ceriani M F, Marcos J F, Hopp H E, *et al.* Simultaneous accumulation of multiple viral coat proteins from a TEV-NIa based expression vector[ J ]. Plant Molecular Biology, 1998, 36: 239-248.
- [ 24 ] Dasgupta S, Collins G B, Hunt A G. Coordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants[ J ]. The Plant Journal, 1998, 16: 107-116.
- [ 25 ] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, *et al.* Selection of marker free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene[ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1997, 94: 2117-2121.
- [ 26 ] Endo S, Kasahara T, Sugita K, *et al.* A new GST-MAT vector containing both *ipt* and *iaaM/H* genes can produce marker free transgenic tobacco plants with high frequency[ J ]. Plant Cell Report, 2002, 20: 923-928.
- [ 27 ] Gleave A P, Mitra D S, Mudge S R, *et al.* Selectable marker free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene[ J ]. Plant Molecular Biology, 1999, 40( 2 ): 223-235.
- [ 28 ] Özcan S, Firek S, Draper J. Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation[ J ]. Nature Biotechnology, 1993, 11( 2 ): 218-221.
- [ 29 ] deVetten N, Wolters A M, Raemakers K, *et al.* A transformation method for obtaining marker free plants of a crosspollinating and vegetatively propagated crop[ J ]. Nature Biotechnology, 2003, 21( 4 ): 439-442.
- [ 30 ] Rommens C M, Humara J M, Ye J S, *et al.* Crop improvement through modification of the plant's own genome[ J ]. Plant Physiology, 2004, 135( 1 ): 42-431.
- [ 31 ] Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants[ J ]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18( 2 ): 134-141.
- [ 32 ] Bock R. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming[ J ]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18( 2 ): 100-106.
- [ 33 ] Yu W, Han F, Gao Z. Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2007, 104( 21 ): 8924-8929.
- [ 34 ] Chen Q J, Xie M, Ma X X, *et al.* MISSA is a highly efficient *in vivo* DNA assembly method for plant multiple gene transformation[ J ]. Plant Physiology, 2010, 153( 1 ): 4-51.