

关于转基因植物的 遗传特性与表达调 控

一、转基因植物中外源DNA的整合特性

1、外源DNA的整合位点和拷贝数

(1) 整合位点：转基因导入植物细胞后，通过细胞分裂时遗传物质的复制过程整合到核基因组中，目前普遍认为，转基因在寄主染色体内的整合位点是随机的，外源DNA可以插入植物基因组的任何一条染色体，也可以插入一条染色体的任何位点或没有固定的插入位点，但往往对转录活跃区域具有优先插入特性。

(2) 整合拷贝数：许多研究表明，外源DNA的插入拷贝数有以下几种：**单拷贝单位点插入；串联多拷贝单位点插入；多拷贝多位点插入**，多数情况是以单拷贝在单位点整合，但在同一位点，也存在较多的多个拷贝串联整合的情况。形式为头对尾式串联和头对头式串联。农杆菌转化和基因直接转化整合拷贝数存在差异，前者拷贝数少，整合位点特异性强。

2、外源DNA结构对整合的影响

外源DNA结构分为四种类型：**单链线形DNA、单链环形DNA、双链线性DNA及双链环形DNA**。四种结构中单链线状DNA研究较多，一般认为单链DNA可以通过有效的不正常整合参与同源染色体序列的重组，研究认为单链DNA在单链完全变成双链之前已发生重组。此外Bilang等（1992）研究了导入烟草的DNA结构（线形和环形）的重组效率，结果表明线性单链DNA同环形单链DNA相比，其抗性愈伤组织数目要高于后者，说明线性DNA的整合效率要高于环形DNA。

3、转化后整合位点的DNA结构变化

保持整合外源基因的完整性是实现转基因功能表达的基本条件，外源基因整合后的完整性与其结构变化有关，现已明确，外源基因作为侵入者的整合，会引起不同程度的基因重排，涉及缺失、异位、倒位及重复等一系列现象。这主要与细胞本身的重复和修复功能有关。

Mayerhofer等（1991）和Gheysen等（1991）对15个独立的T-DNA插入进行了研究，提出了外源DNA整合模型，他们认为：

- （1）T-DNA的插入不会引起植物DNA大的重排，但在T-DNA的两侧各出现了一个158bp的正向重复序列，且多数插入会导致靶位点处小的缺失，最多79个核苷酸；
- （2）在T-DNA和植物DNA连接处常有几个至33个核苷酸的填充DNA，这些填充序列与靠近连接处的植物DNA序列相似；
- （3）在靶位点处不要求有特异的序列，但若T-DNA两端与植物靶位点之间有一段短序列（5-10bp）同源，则可能对T-DNA整合进植物基因组起作用。

此外，插入植物染色体的外源DNA大小是有限制的，如油菜插入外源DNA为5-6Kb，烟草中最大可达9Kb，但频率较低。

4、转化方法对整合外源基因结构的影响

尽管转化方法较多，但外源DNA以两种分子形式转化，一种是外源DNA插入T-DNA质粒载体中导入；另一种是裸露的DNA分子直接导入，由于转化原理不同，因此与整合后的外源DNA结构必然存在直接关系。

(1) T-DNA转化的外源DNA结构变化

农杆菌介导转化细胞中T-DNA结构完整，整合位点稳定，多数情况下在25bp处与植物DNA连接，整合后的外源基因结构变异少，但外源DNA也会出现结构变化，表现为T-DNA的串联和截短现象。

T-DNA串联：通常有5-20个拷贝的T-DNA的首尾相联，在大多数整合事件中，T-DNA可以在无选择压的情况下串联起来。

T-DNA截短：也是T-DNA转化时较多发生的结构变化，可能是由于T-DNA两侧各有一个25bp的边界类似序列。截短是在转移和整合过程中产生，由于T-DNA区内‘框类似’序列的存在，被用作引导T-DNA转移和整合的次级识别位点，从而代替正常情况下的25bp右边界序列，所以正常的有边界序列被截短。

截短在共整合载体中比二元载体系统更易发生。

(2) 裸露DNA直接转化的外源DNA结构变化

采用裸露DNA直接转化时，整合的外源DNA往往出现复杂的杂交图谱，在转化当代及子代中常出现DNA环化、甲基化、片段分离和丢失等现象。

在DNA直接转化中供体DNA容易在整合过程中发生各种结构变化和修饰，而且植物靶DNA序列也可在供体DNA整合过程中发生重排。

5、位点特异重组

(1) 位点特异性重组系统

遗传重组分为3类：**同源重组**，**转座和位点特异性重组**，也称**定位重组**。**同源重组**发生在两个具有一定程度同源性的**DNA**分子之间或同一分子的两个同源性区域，它们相互重组。**转座和位点特异重组**的共同点是重组只发生于具有特定的**DNA**序列的位置上，由特定的酶来识别某一种**DNA**序列，而造成重排。二者的区别在于**转座重组**中，识别位点之间的**DNA**片段被转位插入到另外的位点，是**DNA**合成过程中伴随而发生的**DNA**断裂、转移和插入。而**定位重组**并不涉及**DNA**的净合成，在两个识别位点之间的**DNA**片段并不转移到基因组中的另一地方，这段**DNA**是在重组酶所识别的位点上进行重组、交换而被切除或发生倒置，该定位系统越来越多地应用于转基因植物中，以改造基因重排，去除不需要的筛选基因、激活或缺失某一表达基因。

目前发现的有4个定位重组系统，**Cre/lox**、**FLP/FRT**、**R/RS**和**Gin/gix**。

(2) 位点特异性重组的作用机制

以**Cre/lox**为例加以说明，**Cre**来源于噬菌体P1，P1基因组中有**1029bp**的一段DNA，编码**343**氨基酸的**38.5 kDa**的蛋白质，即一种重组酶。该酶在离体系统中以含**loxP**基因座的DNA序列为底物，高效地使线状、环状甚至超螺旋DNA发生重组反应，而产生功能。

当两个**loxP**基因座方向相同，**Cre**介导的反应造成**loxP**基因座之间的DNA被删除，**loxP**基因座方向相反，**Cre**介导使两端携带**loxP**的片段发生倒位，如果**loxP**不在同一DNA分子，如一个在质粒上，另一个在染色体上，那么**Cre**酶可使质粒DNA整合到染色体**loxP**所在位置，实现定点重组。

四类定位重组系统的分子重组程序分以下几步：

- A** 重组酶识别并结合重组位点的反向重复序列，每一反向重复序列结合一个重组酶；
- B** 在重组酶作用下，两个重组位点发生通向联会；
- C** 联会后两个重组位点的**DNA**一条链在重组酶的作用下断裂，并通过**3'-PO₄**与重组酶的**Tyr**（酪氨酸）的游离**-OH**相连，保存了**DNA**断裂时的能量；
- D** 重组酶的断裂链与另一位点处断裂的**5'-OH**端相连，此时两**DNA**链的一条分别与对方交叉相连；
- E** 交叉相连的**DNA**链经旋转形成**Holliday**中间体；
- F** **Holliday**中间体分枝迁移数个碱基后，另一条链再断裂并与对方的断裂链重组，这时就完成重组，实现了交换。

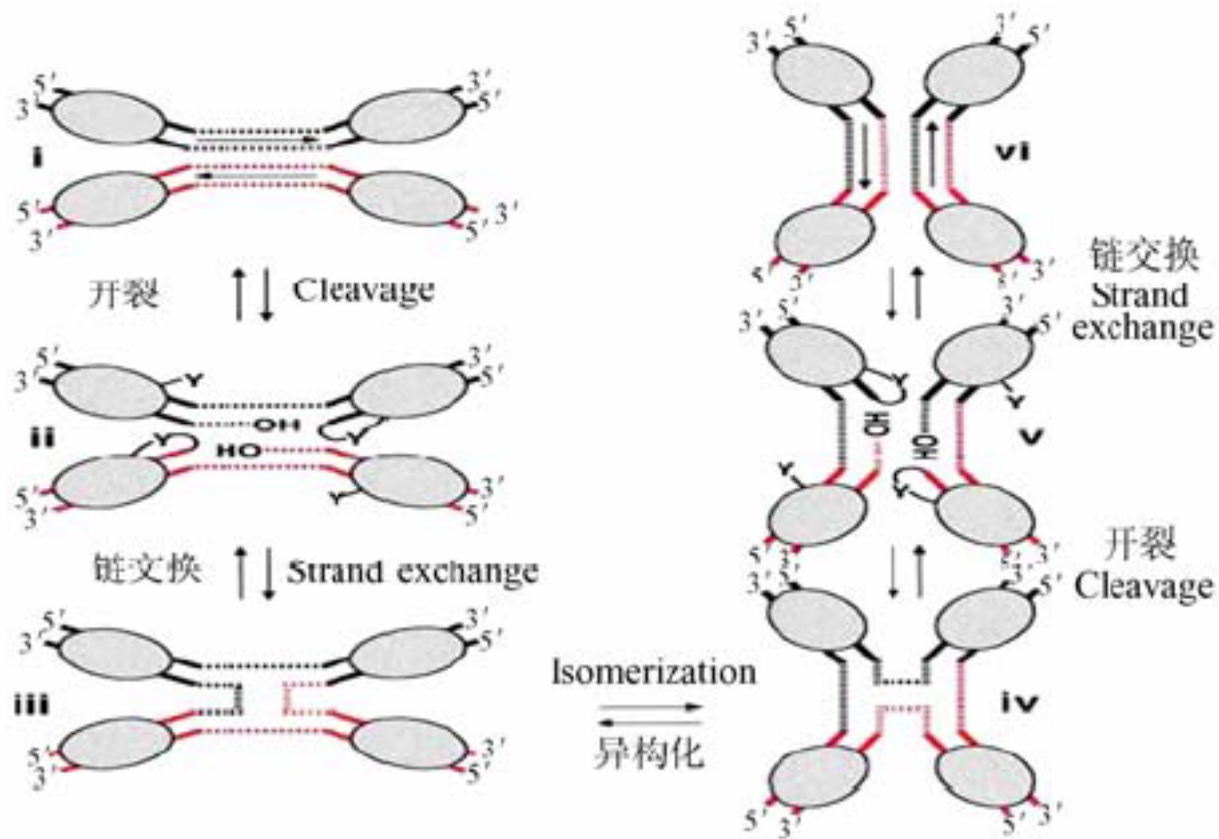


图1 Cre/loxP位点特异性重组系统的作用机制^[8]

Fig. 1 The mechanism of Cre/loxP site-specific recombination system

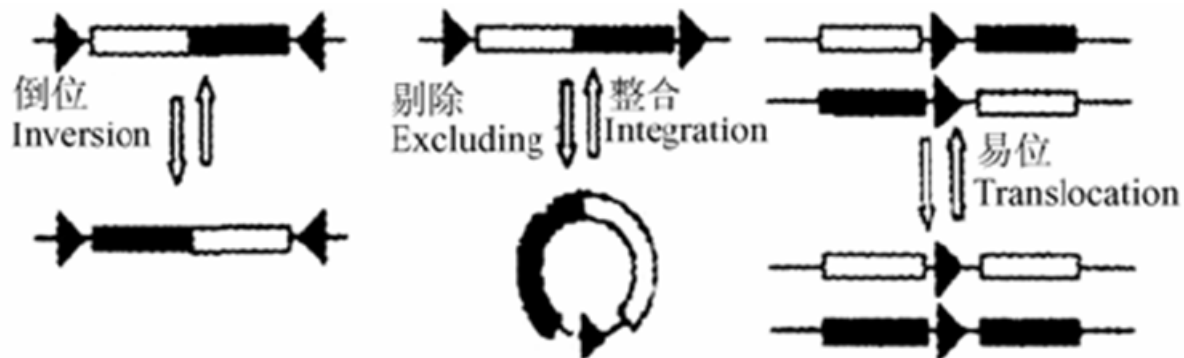
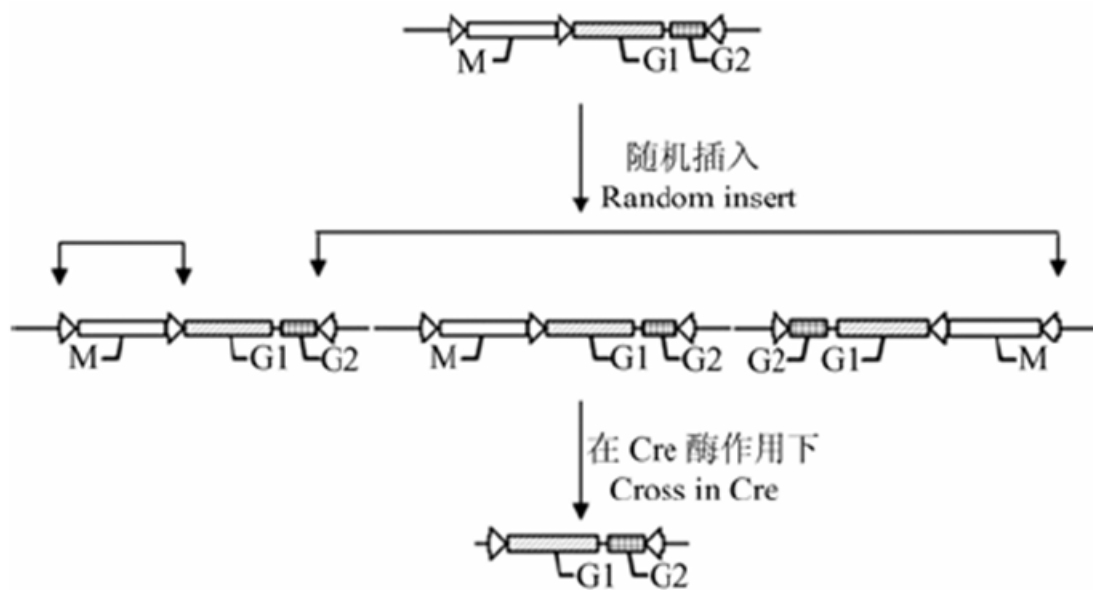


图 2 Cre/*loxP*位点特异性重组系统的重组模式^[9]

Fig. 2 Recombination pattern of Cre/*loxP* site-specific recombination system



G1、G2: 目的基因 1 和基因 2; M: 标记基因
 G1, G2: Target gene 1 and gene 2; M: Marker gene

图 3 利用 Cre/loxP 系统获得单拷贝转基因的原理

Fig. 3 The principle of producing single-copy transgene using the Cre/loxP system

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/128020113131006053>