

## 农杆菌介导外源基因转化及整合机制的教学探讨

曾凡锁, 詹亚光\*, 齐凤慧, 范桂枝, 由香玲, 尹静 (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** 从学生的实际情况出发, 针对“农杆菌介导外源基因转化及整合机制”这部分教学内容抽象、枯燥、难于理解的特点, 从结合最新研究进展、整合模型讲授、实施研究性教学、开展综合性实验几方面探讨了教学改革, 以促进学生的学习积极性, 提高教学效果。

**关键词** 植物基因工程; 整合机制; 研究性教学

**中图分类号** S-01 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)23-09853-02

### Exploration of Integration Mechanism and Transformation of *Agrobacterium*-mediated Exogenous Gene

ZENG Fan-suo et al (College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** Starting from the actual situation of students, in view of the characteristics of abstract, boring and difficult to understand in the "integration mechanism and transformation of *Agrobacterium*-mediated exogenous gene" teaching contents, the teaching reform was discussed from several aspects of the combination of the latest research progress, integration the model teaching, carrying out research-based teaching and carrying out comprehensive experiments, so as to promote the student's study enthusiasm and improve the teaching effect.

**Key words** Plant genetic engineering; Integration pattern; Research teaching

基因工程是在生物体外, 通过对 DNA 分子进行人工剪切和拼接, 对生物的基因进行改造和重新组合, 然后导入受体细胞内进行无性繁殖, 使重组基因在受体细胞内表达, 产生人类所需的基因产物或定向培育生物的新性状, 使其稳定地遗传给子代。

农杆菌介导外源基因转化及整合是获得转基因植物的关键环节。此部分是植物基因工程教学的主要内容, 要求学生了解农杆菌介导外源基因转化及整合的几个关键过程, 理解 T-DNA 的加工及转移、T 链复合体的形成及 vir 蛋白的功能及 T-DNA 在植物基因组中的整合等内容。这部分内容较抽象, 难于理解和记忆。另外, 这部分内容是当前研究的热点问题, 提出了很多新的机理或假设。近年来关于农杆菌介导的整合机制研究已经取得了很大进步, 但有些问题仍存在一定争议。农杆菌介导的外源基因转化是目前植物转基因应用较广泛的方法, 在教学过程中相关教材更新相对滞后。为此, 东北林业大学对基因工程中“农杆菌介导外源基因转化及整合机制”这部分教学内容进行了改革, 探讨如何促进学生的学习积极性, 以期为提高教学效果提供借鉴。

#### 1 结合最新研究进展及整合模型讲授课程内容

近年来, 关于农杆菌介导的整合机制的研究已经取得了很大进步。研究表明, 在 VirD2 和 VirE2 协助下, 农杆菌转移 T-DNA 进入植物细胞, 这 2 种蛋白共同协助 T-DNA 完成转移、核定位及在植物基因组中的整合。关于拟南芥突变体的研究表明, 被转化植物的宿主基因在 T-DNA 转移及整合过程中也发挥主要的作用。现有研究成果详细讨论了 Vir 蛋白 (VirD2 和 VirE2) 及植物基因在农杆菌介导植物转化中的作用, 并据此提出了依靠 Vir 蛋白、农杆菌及宿主植物蛋白的

整合模型。将转化全过程分为由 8 个相互关联的步骤进行讲授: ①农杆菌以其基因组编码的蛋白和宿主植物特异受体相互作用、识别并吸附在受体细胞表面; ②农杆菌通过 VirA-VirG 信号转导系统识别特异植物信号; ③ VirG 蛋白激发信号转导, 同时活化 vir 基因区; ④ T-DNA 区切割形成 T-strand; ⑤形成 VirB-VirD4 转运复合物, 将 T-strands 和 Vir 蛋白复合物转入宿主植物细胞质中; ⑥形成成熟的 T 链复合物; ⑦在农杆菌 AtKAP $\alpha$ 、VIP1 蛋白和宿主 Ran 蛋白作用下, 将 T 链复合物通过核孔复合体进入细胞核; ⑧在 VirD2 和 VirE2 以及宿主植株相关蛋白作用下, T-DNA 整合入基因组中 (图 1)。

这一整合模型将农杆菌介导的外源基因转化及整合分为 8 个相互关联的过程。这使得教师讲授时条理更加清楚, 便于学生理解和记忆。学生也反映教师在授课过程中采用类似的模型和分解教学, 能够将复杂的问题和知识点简单化, 便于理解和记忆的同时也激发了学习兴趣。这 8 个过程同时也是当前研究的热点问题, 而且有些问题尚不明确仍存在一定争议。这样的假说和争议更能够激发学生的好奇心和求知欲。例如, 大量研究报道了外源基因在宿主中的整合与重排机制。对于农杆菌介导的 T-DNA 整合机制主要分为两类。在第一类整合机制中认为 T-DNA 5' 端连接的 VirD2 蛋白起主要作用。在这种机制下 T-DNA 两端的作用机制不同。T-DNA 的右边界和植物基因组的目的位点只有 1 个或没有碱基配对, 然而 T-DNA 的左边界和预整合位点 (pre-insertion site) 间有较长的相似片段存在。T-DNA 整合的发生是通过 VirD2 蛋白将 T-DNA 5' 端与基因组序列相连。然而, 一些研究表明, VirD2 蛋白不能拥有连接酶的活性<sup>[1-2]</sup>。与第一类不同, 在第二类整合机制中不强调 VirD2 蛋白的作用。只是由于 T-DNA 的右边界与预整合位点 (pre-insertion site) 的序列具有较高的同源性且右边界被部分截短。有研究者认为, 这类整合机制通过双链断裂 (DSB) 修复机制完成<sup>[3]</sup> (图 2)。这个双链断裂 (DSB) 修复机制可以很好地解释 T-DNA 的整合过程及填充 DNA (Filler DNA) 的形成, 但不能很好地解释多项研究所报道的多拷贝单位点整合等复

**基金项目** 黑龙江省教育科学研究规划课题 (JG1201201017); 东北林业大学教育教学研究项目 (DGY2011-14)。

**作者简介** 曾凡锁 (1980 - ), 男, 黑龙江哈尔滨人, 副教授, 从事植物生物技术研究, E-mail: zengfansuo@126.com。\* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事林木遗传育种等方面研究工作, E-mail: yaguangzhan@126.com。

**收稿日期** 2013-07-10

杂的整合方式,也不能解释 DNA 直接转化中的整合情况。Kohli 等<sup>[4]</sup>提出的两阶段整合机制,可以解释上述整合方式。这种机制认为外源基因的整合分 2 个阶段进行。第一阶段为预整合阶段,在这一阶段转化的质粒分子(完整的或不完整的)相互连接形成多联体。这一过程增加了外源基因重排的可能性。第二阶段为外源基因的整合阶段,在这一阶段中外源基因在宿主染色体中的整合开始。在这一过程中最初的整合位点被认为是“热点(hot spot)”,它促进了随后的整合外源基因分子整合在同一位点进一步形成了连续的多拷贝单位点整合。

学生通过转化及整合模型加深理解,并通过学习相关研究进展进一步明确了外源基因整合是一个相当复杂的问题。虽然有许多研究报道了不同的模型与机制,但这些模型只是根据某一物种或某一转化方法的研究提出的,并不适合所有的整合情况,有待于进一步研究。通过结合最新研究进展和

整合模型讲授课程内容激发了学生参与科研的兴趣,培养了从事科研工作的能力。

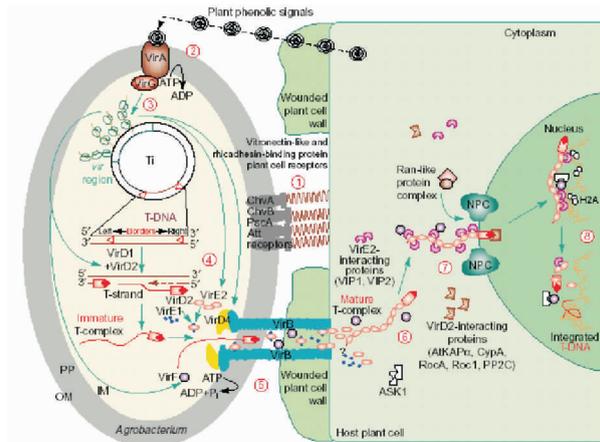
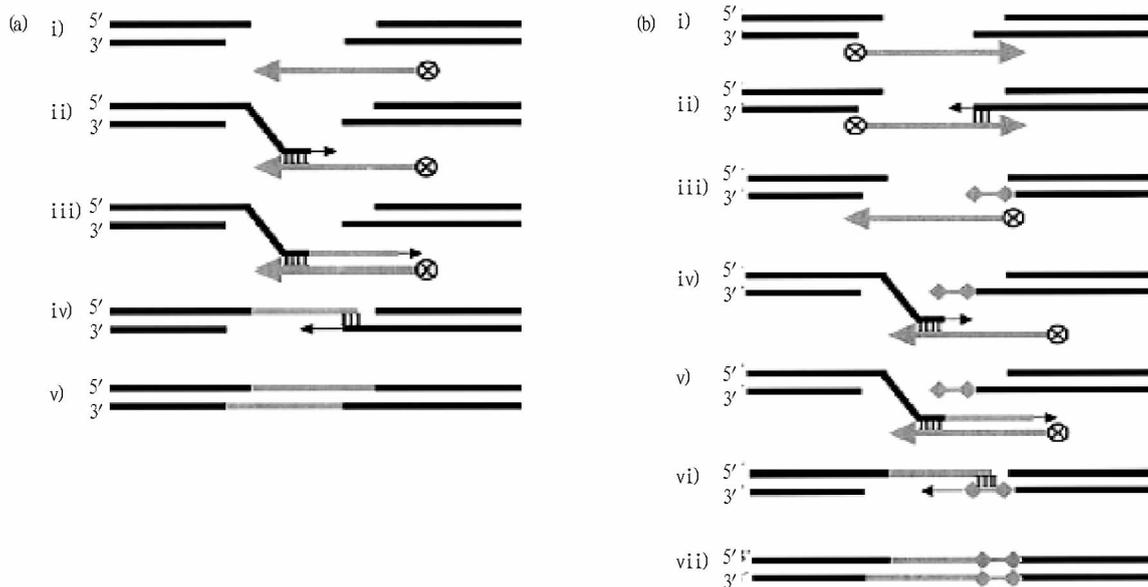


图 1 农杆菌介导的 T-DNA 转化模式



注:a 中,i. 植物基因组 DNA 通过核酸外切酶产生单链 3' 突出端;ii. 3' 突出端与 T-DNA 的左边界中的少数几个同源碱基配对并且开始缺口修复过程;iii. 单链 T-DNA 为模板进行 T-DNA 的合成;iv. 新合成的序列的 3' 末端与另一部分的相似序列连接;v. 单链的缺口修复完成同时 T-DNA 的整合完成;b 中,i. 植物基因组 DNA 通过核酸外切酶产生单链 3' 突出端;ii. 下方的单链自由 3' 末端与 T-DNA 的左边界末端的较短的相似序列配对并把 T-DNA 作为模板开始缺口的修复完成;iii. 缺口的修复过程中途失败停止,并且 T-DNA 的左边界重新与上方的单链 3' 末端结合(T-DNA 的左边界已经被复制连接于下方的单链上——灰色哑铃形);iv ~ vii 与 a 中的 ii ~ v 相同。

图 2 T-DNA 的整合模型

## 2 实施研究性教学和讨论

农杆菌介导的 T-DNA 转化中 VIR 蛋白功能,T 链复合体的形成及迁移及外源基因在基因组中的整合机制等内容都是当前植物基因工程研究的热点领域<sup>[5-7]</sup>,尤其是很多优秀的博硕士论文的研究成果更加激发了学生的学习热情。在实际教学中,除了按照教学大纲和教材内容讲授,向学生介绍有关研究进展外,还组织学生就课堂教学的内容开展师生之间的互动交流。将全班学生分为 6 个小组,每组 5 人。题目有:①转基因植物中外源基因整合的多样性;②整合方式的研究策略;③农杆菌染色体基因对 T-DNA 转移的调控;④VIR 蛋白的功能;⑤宿主植物自身基因是否参与整

合。学生自由选题。要求同组学生分工合作,提前查阅相关文献资料,尤其是最新研究进展,撰写 1 篇综述性课程论文,并由各个小组推荐一名学生以幻灯片的形式介绍讲解,其他同学提问并开展讨论。然后结合实验室及已发表的相关文献就学生讲解的内容进行总结和归纳,并指出和补充学生讲解的不足之处。实践证明,探讨相关领域的研究内容和方向,有利于激发学生的学习兴趣并培养创新思维。

## 3 尝试将科研成果转化为综合性实验内容

结合植物基因工程实验课的实际情况,在完成基础性实验的前提下,将已经结题和正在开展的国家自然科学基金和

浩明<sup>[14]</sup>的解释较为充分,“(虽然乡规民约的订立过程中)存在首倡和唱和的机构关系,(但)其基础的一部分在于参加者们相互之间的合意是没有疑问的。”

《中华人民共和国村民委员会组织法》规定:村民会议可以制定和修改村民自治章程、村规民约。村规民约的条款以及章程必须经由村民同意认可,然后交由村民会议或村民大会通过才具有约束力。因此,村民的合意是村规民约产生的前提,而村民会议或村民大会通过则是必经程序。通过后的村规民约要么形成书面的、要么上墙予以宣示,使其深入人心,成为村民自己的行动。

村规民约不仅在订立的时候充分尊重村民的意愿,要约内容方面也充分反映出村民自治的性质。村规民约不仅约定了村庄民主管理的内容,例如民主选举制度、村务公开制度、民主议事制度、村民代表会议制度等;而且对民主监督也特别强调,例如村委会工作制度、村干部目标岗位责任制、村干部廉洁规定等。此外,一些涉及村庄环境整治、公共事务治理、集体资源保护、村庄治安维护、违规处罚措施等规定也充分反映了村庄实际和村民意志。可见,“村规民约作为村民自治制度为农村社会各阶层参与自我管理所做的制度安排之一,具有强烈的民主契约特性。”<sup>[15]</sup>

综上,村规民约无论是从规约内容还是订立程序都体现了现代契约法治和民主精神,虽然在实践中会出现一些背离或偏差,但是村民自治的大方向不会变化,因此村规民约在村民自治中依然会占据十分重要的位置。

### 3 余论

村民自治章程是村规民约发展出的一种高级形态,是村民自治的重要制度依据。村民自治章程和其他单约性村规

民约一道,构成了村民自我管理、自我教育、自我服务的重要规则与依据。历史与经验证明,由村民自主创立并得到国家倡导的村规民约必定会进一步推动我国村民自治制度的完善与发展。而进一步发挥村民在村规民约制定与实施过程中的参与权与话语权,既能确保村规民约产生实效,也能从根本上保证村民自治制度的成果。

### 参考文献

- [1] 村民委员会组织法编写组. 村民委员会组织法讲话[M]. 北京:中国法制出版社,1999:2.
- [2] 李可. 论村规民约[J]. 民俗研究,2005(4):16-28.
- [3] 全国人大常委会法制工作委员会. 中华人民共和国村民委员会组织法释义[M]. 北京:法律出版社,2010.
- [4] 袁海平. 村规民约创新及价值分析[J]. 长白学刊,2010(1):105-108.
- [5] 王华华,邱奇芳,丁强. 村民自治的困境及其实现[J]. 理论学习,2011(5):38-41.
- [6] 刘祖云,韩鹏云. 乡村社区公共品供给模式变迁——历史断裂与结合[J]. 南京农业大学学报,2012(1):1-8.
- [7] 王晓慧,翟印理. 村规民约略论[J]. 大连海事大学学报:社会科学版,2006(4):127-131.
- [8] 张静. 乡规民约体现的村庄治权[M]//北大法律评论:第1辑. 北京:北京大学出版社,1999:4-48.
- [9] 曹锦清. 黄河边的中国——一个学者对乡村社会的观察与思考[M]. 上海:上海文艺出版社,2000:675.
- [10] 吴冬梅. 乡规民约的合理性及其与国家法律的协调[J]. 湖南农业大学学报:社会科学版,2012(2):54-60.
- [11] 李朝晖. 民间秩序的重建——从乡规民约的变迁中透视民间秩序与国家秩序的协同趋势[J]. 学术研究,2001(12):131-135.
- [12] 曹长秋,刘宏艳. 论村规民约在和谐社会建设中的独特功能[J]. 学习论坛,2012(8):71-73.
- [13] 党晓红,樊志民. 传统乡规民约的历史反思及其当代启示——乡村精英、国家政权和农民互动的视角[J]. 中国农史,2010(4):100-105.
- [14] 寺田浩明. 明清时期法秩序中“约”的性质[M]//滋贺秀三. 明清时期的民事审判与民间契约. 北京:法律出版社,1998:156.
- [15] 赵佳维,杨建华. 村规民约与社会整合[J]. 中国党政干部论坛,2009(5):34-35.

(上接第9854页)

教育部重点科技计划项目资助的“转抗虫基因白桦”的相关研究与“外源基因转化及整合”相关的成果转化为综合性实验内容。例如,“多重PCR检测外源基因整合的体系建立和优化”“southern杂交和reverse primer PCR分析T-DNA整合的排列方式”“外源基因的沉默机制”等。

实验过程中教师起到辅导和指导的作用,引导学生从基因工程基础知识学习到学科发展的前沿领域探索,提高学生的创新能力。这就要求教师具备较强的专业知识,从事该领域的研究工作并能够紧跟学科发展的前沿。另外,教师还要具备丰富的实验经验,指导学生从事科学研究,通过言传身教潜移默化地感染学生,培养学生的科研创新能力。

### 4 结语

对“农杆菌介导外源基因转化及整合机制”部分教学进行改革,促进教师与学生的互动交流,改变传统的教学模式和方法。因此,学生对这一章的教学内容评价较高,认为该教学模式能够启发思维,开阔思路,提高认识,可以培养和提高学生的自主学习能力,了解植物基因工程的最新研究动态和发展方向。部分学生还根据科研课题,提出自己的想法,

设立创新项目。如“外源基因在转基因白桦离体培养中转录沉默研究”“转基因白桦不同发育时期DNA甲基化水平的变化及对内外源基因表达的影响”“T-DNA整合位点的分子特征”等。这些课题已获得了学校或学院的立项资助。

### 参考文献

- [1] 曾凡锁,詹亚光. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略[J]. 植物学通报,2004,21(5):565-577.
- [2] ZHAN Y G, ZENG F S, XIN Y. Progress on Molecular Mechanism of T-DNA Transport and Integration[J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32:655-665.
- [3] KUMAR S, FLADUNG M. Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration[J]. Plant J, 2002, 31: 543-551.
- [4] KOHLI A, LEECH M, VAIN P, et al. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:7203-7208.
- [5] GRANGE W, DUCKELY M, HUSALE S, et al. VirE2: A unique ssDNA-compacting molecular machine[J]. PLoS Biol, 2008, 6:44.
- [6] YANG G, LEE Y, JIANG Y, et al. Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58:351-366.
- [7] TZFIRA T, VAIDYA M, CITOVSKY V. Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*[J]. Nature, 2004, 431:87-92.