

# 大片段 DNA 遗传转化的研究进展

石 玉, 蒋世翠, 张美萍, 孙春玉, 王康宇, 王 义

(吉林农业大学 生命科学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:** DNA 克隆技术是分子生物学研究中一项重要的技术手段。随着分子生物学技术的发展及植物基因组计划的进行, 产生了既能够克隆大片段 DNA 又能够将候选基因利用农杆菌介导法进行遗传转化试验的载体。现对大片段克隆载体的发展及大片段 DNA 遗传转化的影响因素进行综述, 并对大片段 DNA 遗传转化的发展作了展望。

**关键词:** 克隆载体; 大片段; 遗传转化

**中图分类号:** S 503.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)15-0208-04

## 1 概述

### 1.1 克隆载体的发展

自 1973 年有人构建了第 1 个质粒载体 pSC101 后, 越来越多的克隆载体相继出现<sup>[1]</sup>。克隆载体的发展作为基因工程技术的重要内容, 经历了以质粒(Plasmid)、λ 噬菌体(λ-bacteriophage)和柯斯质粒(Cosmid, 又称粘粒)为代表的第 1 代载体, 以 YAC、BAC、PAC 为代表的人工染色体的第 2 代载体; 以 BIBAC(a binary BAC)及 TAC(Transformation-competent artificial chromosome)等为代表的新型文库载体为第 3 代载体。第 1 代克隆载体特点是在宿主细胞内能够稳定遗传、易分离及转化效率高, 可是克隆容量有限, 只能携带小于 45 kb 的片段; 第 2 代载体系统容载能力扩大, 约 100~350 kb, 明显大于第 1 代载体。近年来, 通过对基因组文库载体进行改建, 发展了既可以用于克隆又能直接进行转化的载体即第 3 代载体, 它不仅具有第 2 代载体的所有特征, 而且具备了转化植物的功能。目前研究者正试图构建能够通过农杆菌介导转化植物的 BIBAC 库, 以加快基因的精细定位和基因克隆的速度。

### 1.2 大片段 DNA 的克隆载体

能够承载大片段的克隆载体 YAC 及 BAC 为人类基因组计划<sup>[2-3]</sup>的顺利进行做出了巨大贡献, 但其缺点是工作量大, 并存在遗漏目的基因的可能性。农杆菌介导的转化技术的成熟更促使了大片段克隆载体 BIBAC 和 TAC 的产生。

2 代载体(YAC、BAC、PAC)YAC 载体能够携带的动物片段长度为 900~1 000 kb; 植物片段的长度为 100~350 kb, 用 YAC 构建的基因组文库只需要较少的克隆就可以覆盖整个基因组。Phan 等<sup>[4]</sup>利用电击法将 YAC 转入番茄中, 并在番茄中获得了稳定的转基因细胞系, Adam 等<sup>[5]</sup>、Flynn 等<sup>[6]</sup>将同样的方法应用在烟草中, 但是 YAC 的稳定性差、操作不便、具有自身难以克服的缺点<sup>[7-8]</sup>。BAC 载体能携带的外源 DNA 长度为 100~350 kb, 容量没有 YAC 大, 但相比之下 BAC 拥有更多的优点。Choi 等<sup>[9]</sup>用 pBACwch 载体构建了棉花的 BAC 文库, 并利用基因枪法使一部分克隆转化到烟草中, 证明了外源 DNA 片段可整合到染色体的特定位点上。Song 等<sup>[10]</sup>将从高粱中获得的 90 kb 的 BAC 克隆利用基因枪法成功转入到玉米中, 并在玉米后代中检测到外源基因的高效表达。Ioannou 等<sup>[11]</sup>构建了 1 个 P1 载体(pCYPAC-1), 并通过电穿孔法将重组 DNA 转入到大肠杆菌中。这个新型的克隆载体能够承载平均大小为 130~150 kb 的片段, 并且没有明显的嵌合和缺失现象, 因此可以用来绘制物理图谱和分析复杂的基因组。日本水稻基因组计划就是用 PAC 文库构建的物理图谱。

Hamilton 等<sup>[12]</sup>设计了 1 个既可以承载重组质粒又可以转化植物的载体即双元细菌人工染色体(BIBAC), 这一载体可将大片段转入植物中, 并成功的将 150 kb 的人类基因组 DNA 通过农杆菌介导的方法转入到烟草中, 通过对转化烟草后代的鉴定发现此外源基因可以稳定的遗传表达。Hamilton 等<sup>[13]</sup>构建了世界上第 1 个番茄 Tomato (*L. esculentum*) Mogeor 和 Tomato (*L. pennellii*) LA716 的大片段 BIBAC 文库。大片段的基因组文库的构建, 使很多全长基因的筛选和获得均成为可能。目前, 已知的以 BIBAC 为载体构建的文库有烟草、番茄<sup>[14]</sup>、拟南芥<sup>[15]</sup>、水稻<sup>[16-17]</sup>、药用野生稻<sup>[18]</sup>、大豆<sup>[19]</sup>及人

**第一作者简介:** 石玉(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail: shiyu0608@gmail.com.

**责任作者:** 王义(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为药用植物细胞工程。E-mail: wanglaoshi2007@tom.com.

**收稿日期:** 2013-03-27

参<sup>[20]</sup>。这一载体是大片段 DNA 转化植物最为有用的载体。

可转化人工染色体(TAC)为加快从植物基因分离定位克隆,这就要求载体系统要适应于染色体步移和遗传互补,因此,Liu 等<sup>[15]</sup>构建了可转化的人工染色体(TAC)pYLTAC7,这一载体系统能够保证大片段 DNA (60~80 kb)在大肠杆菌和农杆菌中都保持稳定,并运用这一载体获得了转基因拟南芥以及转基因水稻,这一载体的出现弥补了 YAC、BAC 在定位克隆研究中的缺陷。

## 2 大片段 DNA 制备技术

植物总基因组 DNA 的制备通常有以下几种方法:CTAB 法、SDS 法、氯化苄法、果胶酶法、高盐低 pH 法等。对于大片段 DNA 文库构建、物理图谱、基因组功能分析等需要从细菌中提取 DNA,通常可采用碱裂解法、煮沸法、SDS 裂解法、溶菌酶裂解法<sup>[21]</sup>等。Stein 等<sup>[22]</sup>设计了一种可快速提取植物样本 DNA 的方法。Xin 等<sup>[23]</sup>通过使用 96 孔板作为提取容器,将研磨后的植物样本放入不同孔中进行提取,1 人 1 d 可提取近千个样本。

## 3 大片段 DNA 遗传转化的方法及其影响因素

当前根据有无载体可将转化方法分为 2 类:1 类是以质粒 DNA 等为媒介的遗传转化,即将目的基因插入到农杆菌的质粒等载体上,伴随着质粒 DNA 的转移将目的基因转入到植物中,如叶盘法、原生质体法、真空渗入法、脂质体法等;另 1 类为不需要载体的转化方法,如基因枪法、花粉管通道法、电击法、微注射法、聚乙二醇法、硅化纤维法等<sup>[24]</sup>。1982 年通过农杆菌介导的方法获得了全世界第 1 株转基因植物烟草<sup>[25]</sup>,这标志着转基因时代的全面到来。目前农杆菌介导法应用依然最广,在获得的百余种转基因植物中,有 80%是通过农杆菌介导的方法获得的<sup>[26]</sup>。

### 3.1 菌种和宿主范围

农杆菌菌株种类很多,每种菌株所具有的毒力也就是侵染能力各不相同,因此每种菌株都有其适宜侵染的最适合宿主。一般而言,农杆菌菌株侵染能力强弱依次为农杆菌碱型菌株、胭脂碱型菌株、章鱼碱型菌株。农杆菌碱型菌株有 EHA105、EHA101、AGL-1、A281,胭脂碱型菌株有 C58、GV3101,章鱼碱型菌株有 LBA4404、Ach5,选择对受体植物较为敏感的菌株是转化成功的重要因素。同一种植物对不同菌株的敏感程度也不相同,如 Hiei 等<sup>[27]</sup>在对水稻的研究中发现,EHA101(pTOK233)不如 LB4404(pTOK233)效果好;在西瓜<sup>[28]</sup>中,EHA105 的侵染能力明显优于 LB4404 和 AGL-1,转化率可达 76.7%。农杆菌宿主范围广泛,可转化许多双子叶植物、单子叶植物<sup>[29-30]</sup>和裸子植物<sup>[31-32]</sup>,此外,农杆菌也可以转化真菌,如酵母<sup>[33-34]</sup>、子囊菌<sup>[35-36]</sup>和担子

菌<sup>[36]</sup>。近期的报道农杆菌将 DNA 转化到了人类细胞中<sup>[37]</sup>。

### 3.2 大片段 DNA 在农杆菌中的稳定性

大片段 DNA 在大肠杆菌中是稳定的<sup>[38]</sup>,由于农杆菌承载大片段的能力不同,所以大片段 DNA 在农杆菌中不一定稳定,邢俊杰等<sup>[39]</sup>研究发现携带大片段 50、150 kb 的野生稻 BIBAC 克隆在 LBA4404 农杆菌中比较稳定,适合用于遗传转化试验,而在 EHA105 和 AGL-1 中质粒出现了明显的降解。Song 等<sup>[40]</sup>研究发现土豆基因组 DNA 超过 100 kb 的 BIBAC 和 TAC 克隆在农杆菌中不稳定,在同时进行试验的土豆基因组片段中,45 kb 的片段不会出现丢失的现象,遗传稳定。Shi 等<sup>[41]</sup>检测了玉米中 40~160 kb 的 BIBAC 克隆,无论在大肠杆菌中还是农杆菌中都稳定的遗传。

### 3.3 受体材料的选择

处于不同发育状态的受体材料对农杆菌侵染的敏感程度是不同的,但处于细胞分裂 s 期(DNA 合成期)的核基因组 DNA 正在复制,这对于外源基因的整合十分有利,选择此时期的细胞才具有整合外源基因的能力<sup>[42]</sup>。细胞具有分裂能力是转化的基本条件,创造出伤口的幼年组织细胞分裂快,处于转化的敏感期,因此农杆菌转化和再生的良好外植体来源是幼胚或经成熟胚诱导产生的胚性愈伤组织,一般幼胚的转化率略高于成熟胚。悬浮细胞系虽能活跃增殖,但其体细胞变异频率大、转化效率低,因而不适用于转化。

### 3.4 大片段 DNA 与基因组的整合

大片段 DNA 作为外来者被整合到受体植物基因组中,出现转基因表达有所下降或者不表达等复杂现象。根据 Cellini 等<sup>[43]</sup>报道,外源基因被整合到受体植物基因组后,将产生以下几种形式,一是外源基因插入到基因组的沉默区域内,导致基因组内沉默不表达的基因被激活而高效表达;二是外源基因随机插入到基因组的阅读框内,使基因组正常核酸序列被破坏不能有效表达;三是外源基因插入到基因组的功能区内,使其起调控的基因不能正常表达。Zhang 等<sup>[44]</sup>认为带有大片段的 BIBAC 克隆能否在转基因植物中整合特别是在远缘物种间的整合还需要深入研究。

### 3.5 提高大片段基因表达的策略

根据基因表达的机理,可以通过创建高效表达的转化载体来提高大片段基因表达。一是构建理想的人工启动子:构建理想的人工启动子对大片段的转化十分必要,Phuong-Phan 等<sup>[45]</sup>设计了一种简单快捷筛选强启动子的方法,可以快速筛选出恰当长度的启动子,为构建理想的人工启动子提供了保障。二是对具有表达作用的内含子序列进行改造并插入。近年来的研究发现内含子与基因表达有关,将单子叶植物基因的内含子插入

启动子和报告基因之间,可显著提高基因在单子叶植物中的表达效率<sup>[46]</sup>。Kausch 等<sup>[47]</sup>为了能够提高转基因表达的组织特异性,将拟南芥中 H3 组蛋白内含子进行改造,进而达到了预期效果。三是根据受体材料的基因组情况对目的基因进行改造。最典型的例子就是对 bttoxin 基因的转化,通过将其密码子的第 3 个碱基进行改造后,使其在植物中的毒蛋白表达量提高 0.2%~0.3%。

### 3.6 筛选标记基因

目前,大多数的筛选标记基因是抗生素和除草剂抗性基因,快速并高效的筛选标记基因是大片段转化的关键。He 等<sup>[48]</sup>通过 BIBAC 2 载体携带 2 个稳定的植物标记基因潮霉素和新霉素成功转化了水稻。此外,通过报告基因来筛选也比较快捷,但存在的问题是报告基因瞬时表达转入的外源基因,有时并非发生在可再生细胞中,这样则无法建立转化体系。

以上几个为主要影响因素,此外还有一些因素也对大片段 DNA 遗传转化有影响,如农杆菌的生理活性、感染时的菌液浓度、感染后的培养时间、温度、pH 值等以及表面活性剂的使用情况等。

## 4 结语

在近几年,通过农杆菌介导的遗传转化从一个设想变成了现实,对大片段 DNA 的研究更让人们对未来转基因植物充满了期待。大片段 DNA 基因组文库的构建对大而复杂的基因组的研究有突出的贡献。首先,可以将大基因组物种 DNA 有序的保存起来,通过将单个克隆保存在 384 板中,不仅减少后续研究中对 DNA 需求反复提取的繁琐,也使后续试验操作变得简单快捷;对基因组而言,有序文库比无序的片段要方便的多。其次,为基因组功能的研究、基因组测序及单个基因的克隆鉴定提供非常必要的操作平台。

大片段 DNA 遗传转化技术在基因簇转移、多基因、代谢工程、基因图位克隆、数量性状座位等方面有重要意义,是植物遗传转化的发展趋势,也是植物转化的现实要求。但是目前国内的大片段 DNA 研究起步较晚成果较少,仍存在很多挑战,如许多重要的经济作物、稀有物种对农杆菌介导的遗传转化高度不亲和性;转化后外源基因在植株中能否稳定的表达;如何提高转化效率等,这些都是未来需要探讨和深入研究的问题。相信随着分子生物学的发展,转基因技术日趋成熟,所面临的问题会迎刃而解,大片段 DAN 的未来会更光明。

### 参考文献

[1] 樊颖伦,赵开军. 大片段克隆载体研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004,24(3):12-16.  
[2] Dumham I, Shimizu N, Roe B A, et al. The DNA sequence of human chromosome 22[J]. Nature, 1999, 402: 489-495.

[3] Hattori M, Fujiyama A, Taylor T D, et al. The DNA sequence of human chromosome 21[J]. Nature, 2000, 405: 311-319.  
[4] Phan B H, Jin W, Christopher N T. Transformation of rice with long DNA-segments consisting of random genomic DNA or centromere-specific DNA[J]. Transgenic Research, 2007, 16(3): 341-351.  
[5] Adam A L, Pike S, Hoyos M E, et al. Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from erwinia amylovora[J]. Plant Physiol, 1997, 11(5): 853-861.  
[6] Flynn C R, Mullen R T, Trelease R N. Mutational analyses of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 709-720.  
[7] Shizuya H, Kouros-Mehr H. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system[J]. Keio Journal of Medicine, 2001, 50(1): 26-30.  
[8] Zhang H B, Wu C. BAC as tools for genome sequencing[J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 195-209.  
[9] Choi S, Begum D, Koshinsky H, et al. A new approach for the identification and cloning of genes: the pBACwch system using Cre/lox Site-specific recombination[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(7): 19.  
[10] Song R T, Gregorio S, Joachim M. Expression of the sorghum 10-member kafirin gene cluster in maize endosperm[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(22): e189.  
[11] Ionanou P A, Amermiya C T, Games J, et al. A new bacteriophage pl-derived vector for propagation of large human DNA fragments[J]. Nature Genetics, 1994, 6: 84-89.  
[12] Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. Plant Biology, 1996, 93: 9975-9979.  
[13] Hamilton C M, Anne Frary, Zhang H B, et al. Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary-BAC (BIBAC) vector[J]. The Plant Journal, 1999, 18: 223-229.  
[14] Frary A, Hamilton C M. Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation: an analysis in tomato[J]. Transgenic Research, 2001, 10: 121-132.  
[15] Liu Y, Shirano Y M, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. Plant Biology, 1999, 96: 6535-6540.  
[16] Liu Y G, Liu H M, Chen L T, et al. Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning[J]. Gene, 2002, 282: 247-255.  
[17] He R F, Wang Y Y, Shi Z Y, et al. Construction of a genomic library of wild rice and Agrobacterium-mediated transformation of large insert DNA linked to BPH resistance locus[J]. Gene, 2003, 321: 113-121.  
[18] 何瑞峰. 药用野生稻基因组文库构建与大片段 DNA 转化[D]. 武汉: 武汉大学, 2003.  
[19] Wu C C, Sun S K, Zhang H B. A BAC-and BIBAC-based physical map of the soybean genome[J]. Genome Research, 2004, 14: 319-326.  
[20] Zhang M P, Zhang H B, Wang Y. A plant-transformation-competent BIBAC library of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) for functional genomics research and characterization of genes involved in ginsenoside biosynthesis[J]. Molecular Breeding, 2013, 31(3): 685-692.  
[21] Zhang M P, Zhang Y, Chantel F S. Preparation of megabase-sized DNA from a variety of organisms using the nuclei method for advanced genomics



- research[J]. Nat Protoc, 2012, 7(3): 467-478.
- [22] Stein N, Herren G, Keller B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*[J]. Plant Breed, 2001, 120(6): 354.
- [23] Xin Z, Velten J P, Oliver M J, et al. High throughput DNA extraction method suitable for PCR[J]. Biotechniques, 2003, 34(4): 820.
- [24] 金万枚, 巩振辉, 李桂荣, 等. 植物遗传转化方法和转基因植株的鉴定[J]. 陕西农业科学, 2000(1): 24-29.
- [25] Zambryski P, Depicker A, Kruger K, et al. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA[J]. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1982, 1(4): 361-70.
- [26] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 452-453.
- [27] Hiei Y, Ohta S, Komari T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. The Plant Journal, 1994, 6(2): 271-282.
- [28] 李娟, 李万宁, 唐懿. 根癌农杆菌介导的西瓜遗传转化研究进展[J]. 中国蔬菜, 2010(8): 7-13.
- [29] Ishida Y, Saito H, Ohta S. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(6): 745-750.
- [30] Chan M T, Chang H H, Ho S L. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22(3): 491-506.
- [31] Morris J W, Morris R O. Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene inducer from the pinaceous gymnosperm *Pseudotsuga menziesii*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(9): 3614-3618.
- [32] Stomp A M, Loopstra C, Chilton W S. Extended host range of *Agrobacterium tumefaciens* in the genus *Pinus*[J]. Plant Physiol, 1990, 92(4): 1226-1232.
- [33] Bundock P, Amke den Dulk - Ras, Beijersbergen A. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. EMBO J, 1995, 14(13): 3206-3214.
- [34] Bundock P, Hooykaas P J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26): 15272-15275.
- [35] Abuodeh R O, Marc J, Orbach M, et al. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. J Infect Dis, 2000, 181(6): 2106-2110.
- [36] Marcel J A, de Groot Bundock P, Hooykaas P J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(9): 839-842.
- [37] Kunik T T, Tzfira Y, Kapulnik Y. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 1871-1876.
- [38] Hiroaki S, Bruce B, Ung J M. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(18): 8794-8797.
- [39] 邢俊杰, 杨剑, 梁铃. 携带大片段 BIBAC 克隆在不同农杆菌中的遗传稳定性研究[J]. 生命科学研究, 2006, 10(4): 291-294.
- [40] Song J, Bradeen J M, Naess S K. BIBAC and TAC clones containing potato genomic DNA fragments larger than 100 kb are not stable in *Agrobacterium*[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 958-964.
- [41] Shi X, Zeng H Y, Xue Y D. A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange[J]. Plant Methods, 2011, 7: 33.
- [42] Meyer K, Cusumano J C, Somerville C, et al. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6869-6874.
- [43] Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1089-1125.
- [44] Zhang H B, Zhang M P, Chang Y L. Characterization of a plant-transformation-ready large-insert BIBAC library of *Arabidopsis* and bombardment transformation of a large-insert BIBAC of the library into tobacco[J]. Genome, 2011, 54: 437-447.
- [45] Phuong-Phan T T, Nguyen H D, Schumann W. Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*[J]. Pro Exp Purification, 2010, 71: 174-178.
- [46] Luehrsen K R, Walbot V. Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells[J]. Mol Gen Genet, 1991, 225: 81-93.
- [47] Kausch A P, Owen T P, Zachnieja S J. Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns of replacement histone H<sub>3</sub> gene of *Arabidopsis*[J]. Plant Mol Biol, 2001, 45: 1-15.
- [48] He R F, Wang Y Y, Bu B, et al. Development of transformation system of rice based on binary bacterial artificial chromosome (BIBAC) vector[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(3): 269-276.

## Research Progress About Transformation of Large DNA Fragments

SHI Yu, JIANG Shi-cui, ZHANG Mei-ping, SUN Chun-yu, WANG Kang-yu, WANG Yi  
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** DNA cloning technology is an important means of technology in molecular biology research. With the development of molecular biology techniques and plant genome project progresses, the vector both capable of cloning large DNA fragments and candidate genes using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation experiments were produced. The development of large fragment cloning vector, and influencing factors of genetic transformation of large DNA fragments were summarized, and the development of genetic transformation of large DNA fragments were prospected in this paper.

**Key words:** cloning vector; large fragments; genetic transformation