

叶绿体基因组的改造和利用

程 奇 沈桂芳

(中国农科院生物技术研究中心)

在有人类生存着的太空里,沟通太阳与地球上的万物生灵的第一座桥梁当属植物的叶绿体,没有这座桥梁的贡献就没有地球上生机盎然的绿色世界。这就是通常所说的光合作用的神奇力量。人类对自然界中光合现象的感知和认识由来已久,但是直到二十世纪才揭示了它的本质。

自1909年Baur和Correns发现染色体外遗传后,遗传学家意识到植物细胞中至少存在两种遗传系统,推测叶绿体内存在遗传物质;1954年后Sager等人以藻类为实验材料揭示了叶绿体母性遗传的规律;1962年用电镜技术首次证实了叶绿体DNA(ctDNA)的存在;1972年以后人们分离到了ctDNA。叶绿体DNA是环状分子,能半自主复制。叶绿体DNA环状分子有三种结构类型:1.有一对较长的逆向重复顺序(20—80kb),把整个叶绿体基因组区分为两个单拷贝区,大拷贝区长约80kb,小拷贝区长约20kb。大多数高等植物如油菜,玉米,菠菜等均属此类;2.不含有逆向重复顺序,已研究过的四种豆科植物蚕豆,豌豆,鹰爪豆,苜蓿均属此类;3.有一个乃至三个以上的正向串联重复顺序,少数低等植物和眼虫藻,伞藻等属此类。1986年日本的Shinozaki等测定了双子叶植物烟草叶绿体DNA的全序列。1989年以来一些被子植物和裸子植物的叶绿体基因组也搞清楚了(Sugiura, 1989; Shimada等, 1991)。

人们认识自然的目的是为改造自然,同样叶绿体基因组也已开始被人们改造和利用。现在人们的眼光已不仅仅是在通过改造叶绿体基因组去提高光合作用的效率上,而是要将它改造成一种遗传表达受体,使之在现代植物基因工程领域充当重要角色。

植物叶绿体基因组具有核基因组所不具备的两大天然优势:一、叶绿体基因组的拷贝数是核基因组的几十乃至几千倍;二、叶绿体基因组的遗传表达体系具有原核性,分子量小、无组蛋白、易操作,而且目前很多具有重要经济价值的目的基因大都来自原核生物(如:苏云金芽胞杆菌*B.t.*杀虫基因,以及所有的固氮基因)。要让那些具有重要经济价值的目的基因在植物体内高效表达,正是植物基因工程的当务之急,科学家们正在从各个不同的角度来攻克这个难关。已有证据表明用叶绿体作遗传表达受体有利于抗虫基因产物的高效表达(Wong等, 1992)。

目前,将外源DNA整合到植物细胞核基因组内已是很常规的方法。通过多种技术已经能够很快构建出在核DNA中含有外源基因的转基因植物。相比之下,质体基因组的转化有几个核转化所不具有的潜在问题。首先,DNA要穿过质体的双层膜可能较穿过核膜困难;其次,质体基因组出现的拷贝数远较核基因组高——含单个叶绿体的衣藻有80个基因组拷贝,而高等植物含有100或者更多个质体,每个质体又有许多个基因组拷贝。因此,转化的基因组要取代所有原基因组拷贝,必须向它提供很强的选择压力。

1985年,欧洲的Max-Planck实验室声称首次证明了农杆菌Ti质粒载体能被用以向烟草(*Nicotiana tabacum* cv.)叶绿体导入外源基因。他们构建了嵌合基因Pnos-Cat,并且以氯霉素(Cm)作筛选标记发现Cm抗性不能通过花粉传递,而是典型的母性遗传。Southern杂交后也在叶绿体中发现了Pnos-Cat基因,而且Cat活性总伴随着叶绿体而出现。加增该实验结果后来没有得到重复。

直到1988年,美国哈佛大学的Chuang等才成功地用间接的方法实现了叶绿体的转化。他们将能抗除草剂Atrazine的莧菜psbA基因与编码rbcS转运肽的序列融合后以Ti质粒为载体,用叶圆盘法转化烟草细胞,结果发现这个嵌合基因整合到了烟草的核基因组上,并且该基因的产物正常表达后插到了叶绿体内,发挥出了抗Atrazine的功能。同年,美国Duke大学的Boynton等将带有petB野生型基因的叶绿体

DNA袭击了三个含有petB基因突变型的衣藻细胞，结果完全恢复了这些突变体的光合作用能力。这就直接证明了叶绿体基因组是可以被转化的。

转化衣藻叶绿体成功的例子后来还有，1991年，瑞士Geneva大学的Takahashi等将带有编码光系统I中的铁硫蛋白的psaC基因载体通过基因枪法，并利用同源重组的原理，直接转化了衣藻叶绿体。同年，美国康乃尔大学的Kindle等采用了一种十分简易的方法：将玻璃珠和DNA的混合物与脱壁细胞在0.5mM 5-氟脱氧尿苷中共培养，用atpB基因作选择性标记，结果每毫克DNA得到了50个转化子。这种方法不需要特别的设备，很简便，虽然转化效率不如基因枪法。他们还用基因枪法发展了一种共转化的途径：将编码壮观霉素的叶绿体16S rDNA用作选择性标记，与没有选择性标记的共转化，效率很高。

转化高等植物（以烟草为模式植物）叶绿体成功最早的例子是在1990年，美国Idaho大学的Daniell等构建了一系列叶绿体载体转化烟草的叶绿体，结果得到了瞬间表达。美国新泽西州Rutgers大学的Svab等稳定地转化了烟草的叶绿体基因组。

1991年，Daniell等又在小麦的叶和愈伤组织的叶绿体中得到了报道基因瞬间表达的结果。另外，加拿大的Venkateswarku和德国的Sporlein等也分别利用T-DNA和PEG介导的方法对烟草的质体进行了直接转化和瞬间表达的实验。

1992年以来，美国新泽西州Rutgers大学的Maliga教授实验室的工作开始走向该领域的前列。他们的实验从分子水平上进一步揭示了供体DNA整合至烟草质体基因组的本质。他们选用16S rDNA区域的较大的片段作为供体DNA，除了选择性的壮观霉素（Sp）抗性标记外，还附带了6个非选择性标记（5个RFLP标记，1个链霉素Str抗性标记）。他们证实了同源DNA的长区域确实通过同源重组整合到了质体基因组。他们通过这种长片段代替小片段的同源DNA转化烟草质体基因组，使得转化的效率提高了100倍，并且稳定了转化的效果，获得了2个转质体株系。两者全是或者几乎全是供体DNA的同种移植产物。该实验室正在应用这方面的转基因技术去全面解决目前质体生物学中的许多机理方面的问题，并且已经开辟了广阔的应用前景。

总之，植物叶绿体遗传改造的技术将会日益成熟，欧美一些实验室的这些研究进展十分有助于我们国家从事植物基因工程的科学家们借鉴。我们相信这方面应用的美好前景不久将向人们展示。叶绿体——这座架接太阳与生物界的桥梁必将为人类发挥出更神奇的功能。

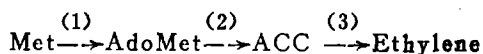
（参考文献39篇从略）。

通过抑制基因表达改变果实成熟

Athanasios Theologis等

乙烯是最简单的生物活性分子之一。它的生理作用十分重要并有一定的经济价值。一般来说，这一碳氢气体物质是果实的成熟激素。它对植物衰老的促进效应，给美国每年的水果和蔬菜生产造成了很大损失。由于发展中国家缺少良好的降温和运输能力，他们在这方面的损失就更大。控制乙烯的产生或生理作用，并以一种可逆转的方式阻止或推迟果实的成熟，一直是植物生理学家的重要研究课题。因此，了解乙烯的生理作用和生物合成不仅在理论上，而且在应用上都有十分重要的意义。本文摘要介绍利用基因工程技术改变乙烯生物合成途径关键基因的表达，最终阻止乙烯产生和果实成熟方面研究的最新进展。

高等植物乙烯生物合成的前体是蛋氨酸（Met），它通过下列三个反应形成乙烯：



这一合成途径的限制步骤是氨基环丙烷羧酸（ACC）合成酶催化的反应（2）。反应（3）由ACC氧化酶催化。通过分子克隆和异源系统的表达已分离了S-腺苷甲硫氨酸（AdoMet）合成酶[反应（1）]，ACC合成酶与ACC氧化酶。