

植物细胞器遗传工程的曙光

程奇 沈桂芳

(中国农业科学院生物技术研究中心)

众所周知,生物的性状是由其遗传物质DNA决定的。在高等植物细胞中,除细胞核外,叶绿体和线粒体中也都有各自的DNA。叶绿体是光能转换、光合作用的场所。线粒体是氧化磷酸化的场所。线粒体和叶绿体的DNA,都具有细胞内半自主独立的自我复制能力,在遗传上表现为特有的母性遗传。在植物细胞中,叶绿体和线粒体具有许多与细菌共同的特性。这就给人们一个启示:那些有用的来自原核生物的目的基因能否以具有原核性的叶绿体和线粒体DNA做为它们的遗传受体,用以进行光合作用的遗传工程,生物固氮及其它遗传转化的研究。

一、叶绿体、线粒体的原核性

无论从内共生的角度还是内分化的角度看,叶绿体和线粒体的起源,都可以发现它们是那么地接近于原核生物。

共生学说认为叶绿体的祖先是蓝藻或光合细菌,在生物进化过程中被原始真核细胞捕获,共生在一起进化成为今天的叶绿体。因为叶绿体的DNA分子为环状、不和组蛋白结合,依赖DNA的RNA聚合酶为细菌型,核糖体为70S, rRNA也和细菌的一样,同属16S和23S型。mRNA一般不含polyA。用抗生素抑制蛋白质合成的效果也和细菌的情况一样,表现出相同的特异性。蛋白质合成也是以N-乙酰甲硫氨酸为开端的,所有这些都是原核细胞的特征。从分子杂交看,叶绿体DNA和核DNA的杂交率很低,和蓝藻及细菌的DNA之间的杂交率却较高,说明两者的进化距离较近。共生学说的一个有力例证是单细胞蓝藻共生在鞭毛藻细胞中,这种单细胞蓝藻DNA的GC含量为35.6%,同高等植物叶绿体中DNA的GC含量很近似。从基因组的大小来看,这种单细胞蓝藻为 1.17×10^8 道尔顿,和叶绿体基因组 9.3×10^7 道尔顿相近。另外,内共生学说则认为叶绿体等细胞器是由原始的原核细胞质膜下陷,分离而逐渐演变而来的。从叶绿体DNA的顺反子组成来看,也与核DNA有显著不同。

线粒体内共生假说认为,原始真核生物吞噬了细菌,并未把它消灭掉,而是从中得到大量的能量,而细菌也从宿主中利用其物质进行生活。这样,在长期的共生和进化中,细菌对宿主的依赖性增强,并逐渐丧失了自己固有的一部分基因,而逐步衍生成了现在的线粒体。因为从线粒体DNA的特点及其复制与转录方式看,与细菌细胞的更为相近。和细菌一样,线粒体DNA是环状的,有一端附着在内膜上,而且不与组蛋白结合。线粒体DNA与细胞核内的DNA在分子量、碱基比例与序列上均不一样,却与细菌的DNA相似。线粒体DNA有自己的基因组以及DNA聚合酶和RNA聚合酶等,能独立进行DNA复制,能转录线粒体特有的RNA,其中mRNA、rRNA的沉降系数都与细菌含有的相类似;从线粒体的蛋白质合成系统看,更接近于原核生物而与真核生物不同:①线粒体与细菌二者的蛋白质合成体系都对红霉素和氯霉素敏感,而对放线菌酮和吐根碱不敏感。但真核生物细胞质核糖体蛋白质的合成体系对红霉素和氯霉素不敏感,而对放线菌酮和吐根碱往往是敏感的。②线粒体与细菌的蛋白质合成都是从把N-乙酰甲硫氨酸tRNA结合到小的核糖体亚单位上开始的。而在真核生物细胞质核糖体的蛋白质合成中,起始的胺酰-tRNA是甲硫氨酰-tRNA;线粒体的内外膜在结构与功能上差别很大,这符合线粒体是被原始真核生物吞噬细菌后演变而

成的假说：线粒体的繁殖方式与细菌一样，为直接分裂。内分化学说则认为线粒体的DNA起源于质粒DNA，因为质粒DNA与线粒体DNA在分子量、长度、构型及复制方式上有很多相似之处，这就更接近于原核DNA了。

总之，叶绿体和线粒体的起源虽然还未彻底被人们揭示，但是它们的原核性是可以肯定的。因此用遗传工程方法改造和改变生物性状除了真核的细胞核之外，植物细胞的两大细胞器或许是更为良好的地方。

二、方兴未艾的叶绿体遗传工程

1988年，Cheung等利用Ti质粒将莴菜的抗除草剂阿特拉津的 *psbA* 基因与编码Rubisco小亚基转运肽的序列融合体先行整合至烟草的核基因组，其表达的产物通过Rubisco转运肽将 *psbA* 基因产物插到叶绿体膜上。能表现出抗阿特拉津的功能。

1990年，Daniield等构建了一系列叶绿体表达载体利用叶绿体基因的启动子表达目的基因。通过高速微轰击法直接转化入叶绿体，实现了Cat基因在烟草叶绿体中的表达。Boynton等也曾以三个叶绿体 *petB* 基因突变型的衣藻作为受体，将带有 *petB* 野生型基因的叶绿体DNA用直接轰击法转化进衣藻的叶绿体中，结果完全使突变体恢复了光合作用的能力。1990年5月在意大利召开的第五届国际非豆科植物固氮会议上，已经出现了第一篇将 *nif* 基因导入高等植物细胞并试图在叶绿体中表达固氮酶Fe蛋白的报道。此外，人们已经可能将外源蛋白通过线粒体、叶绿体本身的转运肽，分别定向导入线粒体、叶绿体，甚至于叶绿体的类囊体。

三、实现生物固氮的新设想与尝试

人们对生物固氮的研究从发现至今已有一百多年的历史。人们从生物化学到分子生物学，从固氮酶到固氮基因的认识逐步深入。认识到整个生物固氮的过程，需要一种复合酶的参加。这种固氮酶复合体 (nitrogenase complex) 由两种不同类型的蛋白质组分构成，通常一个是Fe蛋白 (还原酶)，提供具有高还原能的电子，另一个是MoFe蛋白 (固氮酶)，它利用这些电子将 N_2 还原成 NH_4^+ 。最近美国科学家通过X光衍射透视出Fe蛋白的结构看上去非常象一只翩翩起舞的蝴蝶，在固氮过程中发挥关键作用的Fe-S原子簇位于相当于蝴蝶头部的位置，好比镶嵌在戒指环上的一颗钻石，固氮酶结构研究突破有望。

近年来，在对肺炎克氏杆菌 (Kp) *nifA* 产物研究的基础上已建立了固氮基因调控的模型。固氮基因 (*nif*) 的表达受氮调节系统 *ntr* 和 *nifAL* 操纵子的两个系统的调控。*nif* 基因的表达受到氮源和氧分压的影响。在 *nif* 基因的表达过程中，*nifA* 是一个中心的环节，*nifA* 的产物能激活其他 *nif* 基因的启动子进行转录，而 *ntr* 系统又负责激活 *nifAL* 操纵子的启动子。在限氮的条件下，*ntrC* 基因产物磷酸化产生的 *ntrC*- P 是一个DNA结合活化因子。由 *rpoN* (*ntrA*) 基因编码的因子 *RpoN* (σ^{54}) 与RNA聚合体RNAP结合生物络合物 *RpoN*-RNAP，识别启动子，并与 *ntrC*- P 反应。*nifA* 的产物 *NIFA* 通常结合于启动子的上游活化因子序列 (UAS)。UAS的特点与真核生物的增强子相似。该UAS与其他原核生物能识别的同感序列 TGTGT- (N_6 - N_2)-ACACA 具有相似的活化位点。UAS与其下游的启动子之间能形成一个环，顺式时则具有活性，并在其相对于启动子的方向上独立地发挥作用。UAS启动子的最佳距离在100至150个碱基之间。*nif* 启动子通常位于相对于转录起点大约 -24/-12 的位置。*nifAL* 操纵子编码的抑制因子 *NIFL* 则类似于氧和氨的作用。人们对 *nif* 基因簇已经有了较为全面的认识，除了 *nifJ* 之外，*nifCHDKTYENXLSVWZMFLABQ* 的顺序都已完全测得。

固氮基因的转移，早在1972年Dixon和Postgate就首先成功地将 *nif* 基因从肺炎克氏杆菌 (Kp) 转移到了原先不固氮的大肠杆菌中，并得到了表达，从而实现了在原核生物之间固氮能力的移植。然而，人们也曾把肺炎克氏杆菌的 *nif* 基因整合到了最低等的原核生物——酵母的染色体上，但是还没有得到表达。这可能是在酵母中缺乏 *ntr* 系统。对向高等植物转移 *nif* 基因，还应选择合适的载体和受体，并且考虑将外源基因引入植物什么部位的细胞以及细胞的什么部位，同时还应考虑什么样的细胞状态才有利于外源基因

的表达。

固氮酶通常都是由细菌的DNA编码的,引导来自原核生物的DNA进入植物细胞的载体可以有下列几种:①叶绿体 因为叶绿体基因较小(80~100百万道尔顿),易于在体外进行基因重组操作,并且在蛋白质合成机制方面近似于原核生物,有利于原核DNA在其中分子克隆。叶绿体还含有大量的ATP,可以为高度耗能的固氮反应提供能量。②以Ti质粒为载体,因为土壤杆菌和根瘤菌是亲缘相近的土壤细菌,根瘤菌的带有固氮基因的大质粒有可能通过转座子导入土壤杆菌的Ti质粒,而Ti质粒的DNA能整合到植物细胞中。③以CaMV为载体,花椰菜病毒的DNA较小,正适合于携带nif基因,若克隆成功,作为载体将nif基因导入寄主植物,就可扩散侵染到植物各部位的细胞里。

至于受体,在理论上,将外源DNA导入植物细胞有三处潜在部位:细胞核、线粒体和叶绿体。但是,由于nif基因簇本身较复杂,使其在植物细胞核内表达必须单个操作较多的基因。以核为受体,问题会更加复杂。其次,线粒体DNA编码方式与通常的遗传密码系统略有不同,这给外源DNA的正常表达造成了一点困难。而叶绿体由于其rRNA基因的转译信息和大肠杆菌相似,可能为nif基因在植物细胞内表达提供最合适的环境。因此,叶绿体似乎是nif基因的理想载体和受体。因而,运用叶绿体的分子生物学可以设计这样的一条思路:以叶绿体的某个强启动子(事实上,有一些光合基因的启动子是非常强的)去连接ntrA基因和nif基因,用叶绿体rRNA聚合酶协作转录外源的nif基因。因为ntrA产物的作用是必不可少的,在启动所有nif基因之前,rRNA聚合酶需要在ntrA所编码的 σ^{54} 因子帮助下才能识别nif基因各启动子的UAS序列。但是,对nif基因簇可以进行适当的剪切,譬如不妨去掉负调控基因nifL或许更有利于nif HDK的表达。1990年英国Sussex大学的Merrick教授将nifH和nifM基因通过土壤杆菌Ti质粒转化了烟草。nifH和nifM的产物(Fe蛋白)通过rbcS的5'端先导肽引入到了叶绿体中,结果在叶绿体里Fe蛋白得到了至少有两个小时的稳定状态。这是向高等植物转移固氮基因表达固氮酶活性的最新尝试。nifH和nifM的产物之所以在叶绿体中不能稳定存在下去,这很可能与叶绿体进行光合作用放氧有关。叶绿体放氧毒害固氮酶的问题是有待解决的问题。除了可以设法控制叶绿体的前体——质体的发育外,也可人为改造一些细胞光合作用中起关键作用的有关基因,使之关闭光合,成为不放氧的突变体。

其次,线粒体也并非不是合适的载体。譬如,在玉米线粒体中,CGG是编码色氨酸(Trp)的,而通常CGG是编码精氨酸(Arg)的。那么为使外源密码与线粒体密码系统一致,我们可以设想利用体外合成技术或定点突变技术,将所有外源编码色氨酸的正常密码UGG变成在线粒体中真正编码色氨酸的CGG,或者用PCR方法在体外合成目的基因。

在载体方面,除了叶绿体DNA之外,一些植物如玉米、马铃薯、大豆等线粒体内所具有的一类质粒是相当稳定的。最近人们已经对玉米线粒体的类质粒S-1进行了克隆和鉴定,在此之前,人们还对另一些植物线粒体内的类质粒做了大量的研究。倘若能以线粒体内的类质粒为载体装载nif基因,并在线粒体内表达其产物,那么合成的固氮酶可能不会象在叶绿体中那么迅速地被分解。但是能否与线粒体中固有的蛋白质相互作用,共同发挥功能,还有待于进一步研究。

线粒体的遗传体系编码数十种蛋白质,除不同物种的线粒体遗传体系使用的某些密码子的意义与通常的遗传密码有所不同外,它们相互之间也不一致。通过不同物种中相同的蛋白质的氨基酸顺序及编码该蛋白的基因的核苷酸顺序的比较,这些变异的密码子意义已经初步确定。在高等植物线粒体中,虽然UGA不编码色氨酸,但似乎确实存在编码色氨酸的其它变异的密码子。玉米细胞色素氧化酶亚基III基因含有3个CGG密码子,它们编码产生的氨基酸相当于其它物种同等蛋白质中高度保守的色氨酸。这一事实表明,除标准的UGG外,CGG(通常编码精氨酸)也可作为色氨酸的密码子。同等的玉米和非洲爪蟾细胞色素氧化酶亚基II和无辅基细胞色素b基因的比较,有力地支持了CGG作为色氨酸密码子的推论,在几个位置上,把不同的物种之间的UGG和CGG进行了交换。还没有报道过高等植物线粒体中有其它非标准密码子的证据。对一种单细胞藻类植物中几个线粒体基因的研究揭示,这种植物中没有非标准的密码子。但是,从另一个角度来看,除线粒体外,某些独立生存的原核生物和真核生物也有使用不同的遗传密码子,在这些生物中,通常的终止密码子可编码氨基酸。所以线粒体的密码系统的特殊不是线粒体无法作外源基因受体的理由。

由于对固氮酶存在氧的问题，线粒体的确可能是比较好的场所，它极度需要氧，因此固氮酶在其中表达可能免遭氧的毒害。另外，最新研究发现固氮酶铁蛋白并非要绝对在厌氧环境中才能有活性，相反有时它恰恰还需要少量的氧，这正是符合了辩证法。

此外，最近有人在甜菜的叶绿体中也发现有类质粒（未发表）。还有人发现高等植物核部分有染色体外环状DNA。从小麦和烟草分离并纯化的细胞核中发现了共价闭环环状DNA（ccc DNA）。它们的大小范围在0.1~5 μm，且与线粒体环状DNA的大小分布有所不同，这些都为人们提供了一个希望，即能否以此构建游离于核、叶绿体、线粒体三者之间的外源基因载体。即使各自在细胞器中表达，它们的产物也是可能在核、叶绿体、线粒体三者之间转运的。事实上，细胞器与细胞核的相互作用又是极其密切，不可分割的。

有人从进化角度认为真核生物从原核生物进化之后，原核生物才获得了nif。但是真核生物中真的不存在nif基因或与之有若干同源性的区域吗？现在还未见有人做过这方面的分子杂交试验，至少未见报道。或许在庞大的真核基因库中本身存在着与nif基因有同源的顺序。倘若如此，那么对真核植物的改造只需在改造真核基因的基础上进行。事实上，人们在地钱叶绿体中已经发现地钱frx C基因产物与固氮菌nif H基因编码的一种铁蛋白即固氮酶的还原酶具有高度同源性。

四、结束语

综上所述，就生物固氮而言，一旦实现固氮基因在植物细胞器中的表达，那么目前生物固氮所面临的所谓三大问题：氮、氧和能量问题也就可以得到相当程度的解决，这显然是一个更有希望突破的攻关领域。对于生物固氮，人们不应为那么一种陈腐的观点束缚，以为“植物固氮非得结瘤，结了瘤的植物就能固氮”。豆科植物的根瘤充其量是豆科和根瘤菌在长期进化过程中为固氮酶所创造的一个厌氧系统，决非独一无二的固氮方式。有些生物既能光合又能固氮，它们或者从空间上解决两者的矛盾，或者从时间上解决两者的矛盾。

事在人为，历史会证明，通过遗传工程，植物细胞器可能成为固氮的良好场所，虽然生物固氮至今还是一个远期目标，但人类要实现这一目标已决非遥远的梦想。当然植物细胞器遗传工程不仅仅可以涉及生物固氮，它对光合作用、作物品质改良（抗虫、抗病、抗逆）等课题都将具有灿烂的应用前景。（参考文献35篇，略）