

叶绿体基因工程简介

李宏韬,赵淑青,赵彦修,张慧

(山东师范大学 逆境植物重点实验室,济南 250014)

摘要:叶绿体是植物细胞中一种特殊的细胞器。自 1988 年开始,人们认识到叶绿体在植物基因工程中的特殊地位。叶绿体基因工程的特点,特别是其高效表达和安全性,使其受到越来越多的重视,本文对叶绿体转化作了较为全面的介绍,包括其优势、方法、用途及不足等内容。

关键词:植物基因组工程;核转化;叶绿体;叶绿体转化;叶绿体基因组

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)04-0495-04

The Intruduction of Chloroplast Gene Engineering

LI Hong-Tao, ZHAO Shu-Qing, ZHAO Yan-Xiu, ZHANG Hui

(Key Lab of Salt Stress Plants, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Chloroplast is a kind of special cell organin plant cells. Since 1988, Scientists have realized its advantages in plant gene engineering. It's high efficient expression and safety made it been attached more and more importance to. This paper introduces the chloroplast transfer mation, including its advantages, methods, uses and defects.

Key words: plant genetic engineering; nuclear transformation; chloroplast; chloroplast transformation; chloroplast genome

1882 年, Straburger 观察到藻类叶绿体能分裂并进入子代细胞; 1909 年, Baur 和 Correns 通过在三种枝条颜色不同的紫茉莉之间进行杂交得出结论: 质体是母本遗传的。这两项发现引起了人们对叶绿体遗传的研究兴趣^[1]。1988 年, Boynton 等首次用野生型叶绿体 DNA 转化了单细胞生物—衣藻—突变体 (*atpB* 基因突变体), 使其完全恢复光合作用能力, 标志着叶绿体基因工程的诞生^[2]; 1990 年, 高等植物烟草的叶绿体转化获得成功, 叶绿体转化的优势逐渐被人们认识并利用。

1 叶绿体简介

叶绿体是绿色植物光合作用的场所, 来源于古代的衣藻类原核生物, 含有双链环状 DNA (Manning, 1971)。叶绿体 DNA 有 IRA 和 IRB 两个反向重复序列(分别位于 A 链和 B 链), 两者基因大小完全相同, 只是方向相反, 它们之间有一个大的单拷贝区 (large single copy region, LSC), 大小约 80kb, 和一个小的单拷贝区 (small single copy region, SSC), 大小约 20kb。多数叶绿体 DNA 大小在 120~160kb, 最大 2000kb (伞藻), 最小 85kb (刺海松)^[1]。

叶绿体基因组中的基因在漫长的进化历程中, 有许多转

移到了核中, 遗留在叶绿体中的基因是功能必需的一些基因, 有巨大的拷贝数 (一个叶绿体中, 基因拷贝数可达上百个; 一个细胞中, 基因的拷贝数可达上万个), 而且它们都是原核生物来源的, 具有原核生物基因的特点。叶绿体基因多为多顺反子转录单位, 这些转录单位中基因的排列顺序是高度保守的^[1]。

2 叶绿体转化的优点^[3]

叶绿体转化的最大优点是外源基因的高效表达^[4-5]。这是因为叶绿体基因本身就有巨大的拷贝数 (5000~10000 拷贝/细胞), 下表列出了几种外源基因在叶绿体转化和核转化中表达丰度的比较:

外源基因	受体植物	叶绿体转化产物积累 (% TSP)	核转化产物积累 (% TSP)
<i>Bt CryIA (c)</i>	烟草	3%~5% ^[6]	0.01%~0.6%
<i>Bt Cry2Aa2</i>	烟草	2%~3% ^[6]	0.1%~0.15%
<i>Human therapeutic gene</i>	烟草	7% ^[7]	~0.025%
<i>FLARE-S</i>		18% ^[8]	

甚至有报道外源蛋白积累达 40% TSP 以上。

收稿日期: 2002-05-20; 修回日期: 2002-12-11

作者简介: 李宏韬 (1979-), 男, 汉族, 山东淄博人, 在读硕士, 专业方向: 植物发育遗传

通讯作者: 张慧 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 专业方向: 植物发育遗传。

转基因植物的安全性是植物基因工程的一个很重要的问题^[9]。不仅从理论上,实践中也有许多实例证明了这种情况确实存在,而且主要是通过花粉传播的^[10,11],这将很大程度上限制转基因植物的实际生产应用。叶绿体转化可以避免这种情况发生,因为绝大多数高等植物的叶绿体是母本遗传的,花粉中不存在外源基因^[10,12~14]。虽然来自野生种的基因渐渗现象理论上可造成外源基因的逃逸,但实际上很少发生^[12]。

叶绿体基因组小,与原核生物基因组相似,操作简便。外源基因使用的启动子和终止子是叶绿体特异的(如:Prrn、PpsbA、TpsbA、Trps16),具有原核性,所以在原核生物中也可以表达。如:Daniell 在用 EPSPS 转化烟草叶绿体时使用 16S rRNA 启动子^[15],首先在 *E. coli* 中检测了载体 Pzs-RD-EPSPS 的效率,才用于烟草叶绿体的转化,得到抗除草剂 Glyphosate 的高抗烟草植株,并可稳定遗传,简化了载体优化过程^[10]。

叶绿体中,功能相似的基因常常存在于同一操纵子中^[16],并同时表达,下表列除了叶绿体中几个常见的操纵子^[1]:

操纵子	基因产物
16S-trnI-23S-4.5S-5Srrn	rRNA、Trna
rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-infA-rps11-rpoA	核糖体蛋白、其实银子 1-RNA 聚合酶 α 亚基
rpoB-rpoC1-rpoC2	RNA 聚合酶 β 、 γ 亚基
psbB-psbH-petB-petD	PSII 和细胞色素亚基
psbA-psbK-psbD-psbC-orib2-trnG	PSII 亚基、orib2、Trna
PsaA-psaB-rps14	PSI 亚基、核糖体蛋白
atpI-atpH-atpF-atpH	ATP 酶

所以外源基因也可以以多顺反子(polycistron)的形式转化叶绿体,并被正常表达,避免了核转化中多基因转化时常出现的基因沉默现象,有利于标记基因和目的基因及功能相关基因的共同转化。使在一次转化中形成整条代谢途径成为可能。

核转化中,外源基因的插入是随机的,这就要求大量的筛选以找到需要的转化植株,而且随机的插入很难控制,可能引起基因的失活,使转化后的表型不能真正地反映外源基因的功能。叶绿体中的基因在不同的物种中是高度保守的^[10],可以利用同源整合,将外源基因定点地插入到两个基因之间^[6](常用的同源序列有:rbcL/accD、16StrnV/rps12rps7、psbA/trnK、rps7/ndhB等),并不影响叶绿体原有基因的的表达。

3 叶绿体转化的应用

3.1 叶绿体转化已经被用于医用蛋白的生产

Staub 等将 *hst*(human somatotropin) 基因转入烟草叶绿体中,有活性的 HST 蛋白的积累 >7% TSP,为核转化的

300 倍^[7];Rock 等用 *aadA* 基因转化番茄叶绿体,在果实中有高达 0.5% TSP 的蛋白积累,证明了叶绿体转化在食用性疫苗的生产中的可行性^[5,17]。其优势为:(1)减小了哺乳动物病毒污染的危害;(2)低耗费的大规模生产能力。

3.2 在植物耐性方面,叶绿体转化也有广泛的应用:

3.2.1 除草剂抗性

现有的多数除草剂都是通过抑制叶绿体中光合作用酶来杀灭植物^[10],在叶绿体中大量积累某种除草剂起作用的酶,可以提高植物对这种除草剂的抗性,就允许使用更高剂量的除草剂,来更有效地杀灭杂草。Daniell 等将 EPSPS 基因转入烟草叶绿体中,使烟草对 glyphosate 的抗性达 5mmol/L,比野生型烟草高 10 倍,100% 稳定遗传,无基因“逃逸”现象^[10]。

3.2.2 抗虫性

1995 年,Maliga 实验室用 BT 基因转化烟草叶绿体,BT 蛋白表达量为 3%~5% TSP^[6]。Kota 于 1999 年,Cosa 于 2001 年分别将 *BT Cry2Aa2* 基因转入烟草叶绿体,前者可 100% 杀死 4000 多倍抗性的抗性虫^[6],后者报道 BT 表达量达 46.1%。可以解决核转化中 BT 蛋白表达量低引起的害虫的抗药性问题^[6]。我国对叶绿体转化的研究主要是 Bt 基因^[18~20],张中林等发现,用未修饰的完整的 *Bt CryIA(C)* 基因转化叶绿体,植物抗虫性最大;侯丙凯等人构建了用于油菜叶绿体转化的载体 pNRAB,并验证了其杀虫性,为国内外首次关于重要经济作物—油菜叶绿体转化的报道^[21]。

3.2.3 抗逆性

人们早就注意到叶绿体转化在植物抗逆性研究中的重要作用。已有的工作主要是针对活性氧的清除。

植物受到环境胁迫,细胞中产生过量的活性氧,将对植物会造成巨大伤害。目前认为,活性氧的产生是环境胁迫对植物造成伤害的一个很重要的原因。

活性氧的清除有酶促(SOD、APX、GAT 等酶类)和非酶促(抗坏血酸、谷胱甘肽等还原性物质)两种途径。编码 SOD、APX 等酶的基因已经转入到烟草、苜蓿、马铃薯、棉花的叶绿体中,提高了植物的耐氧化能力,从而提高了植物对环境胁迫的耐受能力。将催化抗氧化物质生物合成的酶类转化叶绿体,也可提高植物的抗氧化能力。

另外,在渗透保护物质方面,叶绿体高效的外源基因表达是否有用武之地,还须作进一步研究。

作物改良是人们急需解决的问题,以往的方法是提高植物的耐逆、保水、营养吸收的能力,间接提高其产量。在作物叶绿体中转入光合作用相关酶类(如:叶绿素合成相关酶、RuBP 羧化酶等)的基因,可直接大幅度地提高植物光合能力,使作物产量明显增加。这也许是提高作物产量的最直接、有效的方法。

4 目前存在的叶绿体转化的方法

基因枪法是目前采用最多、转化效率最高的方法^[22]。

大多数已经成功的转化都是用这种方法实现的。基因枪法比较简便,其操作与核转化中使用的基因枪法相似,适用于各种外植体,造成的损伤小,外植体再生能力强。但比较昂贵。

1993年,Goldsmith等首次使用PEG介导的方法实现了烟草叶绿体的转化^[23]。1996年Koop等用PEG法将*aadA*基因(其5'端有烟草16S rRNA启动子和人工合成的核糖体结合位点,3'端有一个包含绿藻*rbcl*基因的3'UTR区的500bp的片段)导入烟草叶绿体的*rpl32*和*trnL*基因之间^[24],每106个原生质体中可得到20~40个转化植株。但总的来说PEG法效率较低。而且,需要制备原生质体,操作复杂,有待进一步优化。

1999年Knoblauch等发明了一种新的显微注射法GEF(galinstan expansion femesyrynge)^[4]用于叶绿体的转化。它使用更细的毛细针管(直径0.1 μ m)、更精确的推注方式(利用铍、钢、锡合金受热膨胀产生的力),将外源基因直接注射到叶绿体中。GEF减小了对细胞的伤害,提高了再生效率,能更精确地控制注射量。但操作较复杂,没有更多的报道验证其可靠性。

5 叶绿体转化存在的问题

5.1 叶绿体中巨大的基因拷贝数是其主要优点,也是其主要困难所在^[25]。要使外源基因稳定遗传,就需要若干个细胞世代使野生型基因拷贝完全去除,达到同质化(homoplasmic)状态。如水稻中叶绿体转化比较容易实现,但按已有的方法进行细胞培养,再生太快,无法达到同质化状态,现有的细胞培养方法需要改善,减缓细胞分化速度,以有足够的时间完成同质化过程。

5.2 用于叶绿体转化的载体系统不完善,不同物种转化效率不稳定。叶绿体转化中外源基因的插入是同源重组的过程,同源序列的长度影响转化效率。S. R. Sikdar等进行的拟南芥叶绿体转化中^[17],使用的载体pGSB1A的同源序列长左右各为1Kb,较烟草中使用的载体pZS197的同源序列(左:1.56Kb;右:1.29Kb)和pRB15的同源序列(左:1.56Kb;右:3.61Kb)短,所以转化效率低许多,100次样品轰击中只有一个转化植株,而烟草中一次样品轰击就可得到一个转化植株。目前认为同源序列的长度在1~2Kb为最佳。

5.3 目前已存在的载体pRB70、pRB94、pRB95适用于双子叶植物,但不适用于禾本科植物,因为禾本科植物(1)*trn-fM/rps14*区有一个断点产生的大的倒位,(2)*rps14*的转录有不同的RNA编辑方式^[24]。

5.4 要筛选转化子就要使用标记基因,而标记基因高的表达水平(>10% TSP)对植物是一个很大的代谢负担^[28]。目前有以下解决方案:

5.4.1 人们利用植物基因进行筛选。如用甜菜醛抗性,来自于编码BADH(betaine aldehyde dehydrogenase)的植物

基因在叶绿体中的表达^[28]。该基因的产物可被植物利用,减少了单纯用于筛选的蛋白表达量。

5.4.2 标记基因可以通过短的重复序列之间的同源重组去除。但这是一个自发的过程,无法控制^[29]。

5.4.3 一种Cre-lox叶绿体标记基因消除系统已经被人们使用^[25~27]。在标记基因两端各加一个lox位点,与目的基因一起在无CRE蛋白的条件下,导入叶绿体中。当标记基因需要被去除时,就用常规方法将Cre基因导入核内,该基因编码一种叶绿体定位的lox位点特异的重组酶,可以切掉两个lox位点之间的标记基因。

5.4.4 已经成功转化的植物种类少,在已转化的几种植物中,只有烟草和番茄能通过有性生殖使外源基因稳定遗传,而且番茄是唯一能产生有高的外源蛋白积累的可食用果实的植物。人类的主要作物都未能实现真正的叶绿体转化^[5,17,28]。

5.4.5 还有一些与核转化共有的问题。1)对非目的昆虫的毒害;2)外源基因的长期持续表达造成的能量的浪费等。

6 叶绿体转化有着广阔的应用前景:

1)对叶绿体光合作用机制的基础研究。2)改善农作物光合能力,提高作物产量。3)探索叶绿体转化时外源基因表达的信号,使外源基因在特定部位、特定时间表达,减少能量的浪费。

随着叶绿体转化的不断发展,拟南芥等模式植物叶绿体转化的成功,叶绿体转化的优点更加明显,必将成为人们对植物进行改造的重要手段,成为植物基因工程中一颗耀眼的新星。

参 考 文 献 (References):

- [1] LIU Liang-Shi, et al. Plant Molecular Genetics [M]. Beijing: Science Press, 1997.
刘良式,等. 植物分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1997年.
- [2] Boynton J E, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles [J]. Science 1988, 240:1534~1538.
- [3] Shimada H, Sugiura M. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19:983~995.
- [4] Knoblauch M, et al. A galinstan expansion femesyryne for microinjection of organelles and prokaryotes [J]. Nature biotechnology, 1999, 17:906~909.
- [5] Ruf S, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19:870~875.
- [6] HOU Bing-Kai, XIA Guang-Min, CHEN Zheng-Hua. Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering [J]. Hereditas (Beijing), 2001, 23(5):492~497.

- 侯丙凯、夏光敏、陈正华, 植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J]. 遗传, 2001, 23(5): 492~497.
- [7] Staub J M, Garcia B, *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 333~338.
- [8] Daniell H. New tools for chloroplast genetic engineering[J]. Nature biotechnology, 1999, 17: 856~857.
- [9] Mikkelsen T R, Anderson B, Jrgensen R B. The risk of crop transgenes spread[J]. Nature, 1996(380): 31.
- [10] Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee S B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome[J]. Nature biotechnology, 1998, 16: 345~348.
- [11] King J. Could transgenic supercrops oneday breed superweeds [J]. Science, 1996(272): 180~181.
- [12] Scott S E, Wilkinson M J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild Brassica rapa [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 390~392.
- [13] Cummins J E. Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 401.
- [14] Daniell H, Varma S. Chloroplast-transgenic plants: Panacea-No! Gene containment-Yes[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 602.
- [15] Kuroda H, Maliga P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29, 4: 970~975.
- [16] De Cosa B, Moar W, Lee S B, Miller M, Daniell H. Over-expression of the Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 71~74.
- [17] Sikdar S R, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 20~24.
- [18] ZHANG Zhong-Lin, REN Yan-Guo, SHEN Yan-Xin, SHAN Song, FAN Guo-Chang, WU Xiang-Fu, QIAN Kai-Xian, SHEN Gui-Fang. Expression of *Bacillus thuringiensis* (Bt) crystal toxin gene in the chloroplast of tobacco[J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(3): 270~277.
- 张中林、任延国、沈燕新, 山松、范国昌、吴祥甫, 钱凯先, 沈桂芳. 苏云金芽孢杆菌(Bt)晶体毒蛋白基因在烟草叶绿体中的表达[J]. 遗传学报, 2000, 27(3): 270~277.
- [19] TIAN Ying-Chuan, QIN Xiao-Feng, XU Bing-Yin, LI Tai-Yuan, FANG Rong-Xiang, MANG Ke-Qiang, LI Wen-Gu, FU Wen-Jun, LI Yi-Ping, ZHANG Shu-Fang, XIE Qiang-Jiang. Insect resistance of transgenic tobacco plants expressing δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. Chinese J of Biotech, 1991, 7(1): 1~10.
- 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅, 李太元, 方荣祥, 莽克强, 李文谷, 符文俊, 丽一平, 张书芳, 谢强江. 表达苏云金杆菌 δ 内毒素基因的转基因烟草的抗虫性[J]. 生物工程学报, 1991, 7(1): 1~10.
- [20] 任延国, 张中林, 沈桂芳, 等. Bt 毒蛋白基因叶绿体转化载体的构建及其生物杀虫实验[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4, 1: 23~27.
- [21] 侯丙凯, 张中林, 等. 油菜叶绿体定点转化载体的构建及其杀虫性[J]. 高技术通讯, 2000, 10(7): 5~11.
- [22] Daniell H. Foreign gene expression in chloroplast of higher plants mediated by tungsten particle bombardment[J]. Methods Enzymol, 1993, 217: 536~556.
- [23] Golds T, Maliga P, Koop H U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* [J]. Biotechnology, 1993, 11: 95~97.
- [24] Koop H U, *et al.* Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via PEG-mediated protoplast transformation [J]. Planta, 1996, 199: 193~201.
- [25] Maliga P. Plastid engineering bears fruit[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 826~827.
- [26] Corneille S, Lutz K, Svab Z, Maliga P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRF-lox site-specific recombination system. Plant J, 2001, 72: 171~178.
- [27] Hajdkiewicz P T, Gilbertson, Staub J M. Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids. Plant J, 2001, 72: 161~170.
- [28] Muhammed Sarwar Khan, Pal Maliga. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants[J]. Nature biotechnology, 1999, 17: 910~915.
- [29] Lamtham S, Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. [J], Nature Biotechnology, 2000, 18: 1172~1176.