

用于叶绿体遗传转化的表达载体

侯丙凯¹,于惠敏²,夏光敏¹

(1 山东大学生命科学院 济南 250100;2 山东教育学院生物系 济南 250013)

摘要:叶绿体遗传转化是植物基因工程的新方向。本文简要介绍用于叶绿体遗传转化的表达载体的构建方法,涉及同源重组片段、叶绿体特异的启动子和终止子、筛选标记基因,以及目前在叶绿体中已实现表达的外源基因等内容。

关键词:叶绿体;遗传转化;表达载体

中图分类号:Q25

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)01-0100-04

Expression Vector Used in Chloroplast Genetic Transformation

HOU Bing-kai¹, YU Hui-min², XIA Guang-min¹

(1. School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Department of Biology, Shandong Education College, Jinan 250013, China)

Abstract: Chloroplast genetic transformation is a new way of plant genetic engineering. This paper reviews the construction methods of expression vector used in chloroplast genetic transformation. It contains the homologous recombinant fragments, the chloroplast specific promoter and terminator, the selectable marker genes and the interest genes whose expression in chloroplast have been achieved.

Key words: chloroplast; genetic transformation; expression vector

近二十年来,外源基因向细胞核中转化一直是植物基因工程的主要研究方向。然而,随着研究的不断深入,人们逐渐认识到对细胞核基因组的遗传转化有其难以克服的弊端,例如:由于细胞核基因组大,背景复杂,外源基因的整合位点和整合的拷贝数难以人为控制,造成外源基因表达效率低,在后代中表达不稳定,以及容易出现基因失活、基因沉默、位置效应等现象。另外,由于核基因容易随花粉扩散,随之带来的安全性问题正在全球范围内引起人们的担忧。国外有许多学者曾对此问题进行过专门研究,发现在靠近转基因作物甚至是相距很远的地带,从野生近缘种或非转基因植物中能检查到转基因的扩散^[1~4]。最近, Losey 等人的实验表明抗虫转基因玉米的花粉对非目的昆虫蝴蝶能产生毒害^[5],这更加重了人们(特别是西欧国家)对转基因植物的担忧。为了克服外源基因导入细胞核所带来的某些弊端,自 1988 年有些学者相继开展了叶绿体遗传转化研究,使这项新的遗传

转化技术的优越性和发展前景日益为人们所认识并受到重视。到目前为止,已在烟草、水稻、拟南芥、马铃薯和油菜 5 种植物中实现了叶绿体转化,这一转化系统已开始成为植物基因工程中新的生长点。

要实现外源基因在叶绿体基因组的整合及有效表达,载体的构建方法与细胞核表达载体有所不同。本文将从几个方面分别介绍叶绿体表达载体的构建特点。

1 利用同源重组片段实现定点整合

由于叶绿体基因组小,目前已有多种植物的叶绿体基因组全序列得到测定,这就为外源基因通过同源重组机制定点整合进叶绿体基因组奠定了基础。因为定点整合有利于人为控制外源基因的插入位点,消除核转化中存在的“位置效应”,能够维持植物基因的正常功能,所以目前构建的叶绿体表达载体基本上都属于定点整合载体。为了实现外源 DNA

收稿日期:2001-02-27;修回日期:2001-10-10

作者简介:侯丙凯(1964-),男,汉族,山东德州人,副教授,博士。专业方向:植物分子生物学与基因工程。E-mail:bkhou@sina.com

Tel:0531-8564525

的定点整合,构建叶绿体表达载体时,一般都在外源基因表达盒的两侧各连接一段叶绿体的 DNA 序列,称为同源重组片段或定位片段(targeting fragment)^[6]。当载体被导入叶绿体后,通过这两个片段与叶绿体基因组上的相同片段发生同源重组,就可以将外源基因整合到叶绿体基因组的特定位点。如果同源片段来自于叶绿体基因组的反向重复序列区,整合到其中一个重复序列区上的外源基因会通过拷贝纠正作用(copy correction)使另一个重复序列区也含有外源基因^[7,8]。

作为同源重组片段,一般要求具备下面 4 个条件:(1)足够的长度,以保证外源 DNA 的有效整合。从理论上讲,同源重组片段越长,发生交换重组的可能性就越大,转化频率就越高。实际结果也是如此,例如:在烟草的叶绿体转化载体 pZS197, *aadA* 基因两边的同源片段分别是 1.56kb 和 1.29kb,每片受轰击叶子可得到 1 株转化植株^[9];而在烟草的另一个叶绿体转化载体 pRB15, *aadA* 基因两边的同源片段分别是 1.56kb 和 3.6kb,每片受轰击的叶子却得到了 5 株转化植株^[10]。同源重组片段过短会降低重组频率,而过长虽然能增加转化效率,但操作较为复杂。根据文献报道,同源重组片段的长度在 1~2kb 比较合适^[6,9,11,12]。(2)合适的插入整合位点。在以研究基因功能为目的的叶绿体转化中,通常以所研究基因的两段序列作为同源重组片段,报道基因就插入在这两段序列之间,当同源重组发生以后,报道基因即可插入目的基因的内部,造成了插入失活,从而可从植物的表型了解被破坏基因的功能^[13~15]。在以作物改良为目的的叶绿体转化中,要求同源重组发生以后,外源基因的插入既不引起叶绿体基因原有序列丢失,又不致于破坏插入位点原有基因的功能。为满足这一要求,已有的工作都选用了相邻的两个基因作为同源重组片段,例如 *rbcl/aacD*^[9,11,16], *16StrnV/rps12rps7*^[6], *psbA/trnK*^[17], *rps7/ndhB*^[18]。当同源重组发生以后,外源基因定点插入在两个相邻基因的间隔区,保证了原有基因的功能不受影响。(3)具有合适的限制性酶切位点。要求同源重组片段两端的酶切位点是单一的,以防止在克隆时该片段被切成几段。通常需要对所使用的 DNA 片段进行酶切分析,然后选择两端带有单一酶切位点的一段作为同源重组片段。也可以通过 PCR 方法引入单一酶切位点。(4)与内源 DNA 片段具有完全的同源性。这一要求既满足了同源片段与内源 DNA 片段发生高效重组,又可以保证重组后叶绿体原有基因序列不发生改变。因此,目前已构建的叶绿体表达载体基本上都具有植物种的特异性,也就是说,同源重组片段来自哪种植物,所构建的载体就适用于那种植物^[8,18,19,20]。最近, Daniell 等利用烟草叶绿体基因 *trnA* 和 *trnI* 作为同源重组片段,构建了可用于多种不同植物叶绿体转化的通用载体(universal vector)^[20]。因为 *trnA* 和 *trnI* 的 DNA 序列在高等植物中是高度保守的,例如,两基因在烟草和水稻中的同源性为 100%,这一工作为构建各种方便实用的新型叶绿体表达载体提供了一个好思路。

2 利用叶绿体特异的启动子和终止子实现基因表达

为了使外源基因整合进叶绿体基因组后能够高效表达,构建转化载体时,一般选用叶绿体来源的启动子和终止子。例如,在已有的报道中,常用的启动子是叶绿体的 16S rRNA 基因启动子 *Prrn*^[9,11,12,16,19,21],以及光系统 II 作用中心蛋白基因的启动子 *PpsbA*^[22,23]。常用的终止子包括叶绿体 *psbA* 基因的终止子 *TpsbA*^[9,11,19,22]和叶绿体 *rps16* 基因的终止子 *Trps16*^[22,23]。由于使用了叶绿体来源的启动子和终止子,从而可以保证外源基因在叶绿体中正常表达。

叶绿体基因的启动子有多种类型,具有原核和真核基因启动子的双面特征^[24,25],还发现叶绿体有多种类型的 RNA 聚合酶^[26]。叶绿体基因的启动子在原核细胞中启动外源基因表达的作用已被证实^[18],但在真核细胞的细胞核中能否发挥启动子作用至今还没有定论。从已有的研究似乎可以看出,叶绿体基因的启动子在真核细胞的核中可能没有启动作用或启动作用很弱,带有叶绿体启动子的外源基因即使整合进细胞核基因组,也不会表达或者只有很微弱的表达。

在构建叶绿体表达载体时,同源重组片段之间如果包含两个以上的表达盒,这些表达盒的转录方向可以相同,也可以不同。例如, Zoubenko 等构建了烟草叶绿体表达载体 pLAA24A 和 pLAA24B^[6];两者都含有 *aadA* 基因和 *UidA* 的表达盒,不同的只是在前一个载体两个表达盒方向相反,而在后一载体两个表达盒方向相同。无论采用哪一种载体,在获得的叶绿体转化体中两个基因都能得到高效表达。

另外,在叶绿体表达载体构建时有可能用到与叶绿体内源基因相同的启动子或终止子,因此,常常令人担忧的一个问题是:外源基因是否会通过同向重复的启动子或终止子之间的重组而导致丢失(loop-out)? Zoubenko 等人曾就此问题进行过研究^[6],在烟草的叶绿体表达载体构建时,他们使用与内源基因同向重复的 *Prrn*(或 *PtrnV*)启动子启动筛选标记基因 *aadA* 的表达(产生壮观霉素抗性),随后对叶绿体转基因植株的种子进行了抗壮观霉素分析,结果在 4000 多粒种子苗中未发现一粒丢失抗性。由此他们认为像启动子这样的小片段的序列重复不会导致外源基因的不稳定性。

3 利用筛选标记基因实现叶绿体基因组的同质化

叶绿体基因组通常以高拷贝数存在,一般每个细胞有 10000 个叶绿体基因组,因而同时转化这么多基因组几乎是不可能的,极易出现转化的与未转化的叶绿体组成的异质体,无法保证获得的性状稳定遗传下去。因此叶绿体转化所面临的一个关键问题就是去除未转化的基因组和未转化的叶绿体。这个问题的解决是通过向叶绿体表达载体中加入筛选标记基因、转化后进行抗菌素抗性筛选,淘汰掉未转化的叶绿体,以实现转化叶绿体基因组的同质化。在实际工作中用到的筛选标记基因主要有以下 4 种。

3.1 突变型 16S rRNA 基因

这是在叶绿体转化中最早用到的筛选标记,它们来自烟草的突变细胞系。由于突变型 16S rRNA 基因的导入,使得转化细胞能抗壮观霉素、链霉素或林可霉素对叶绿体蛋白合成的抑制^[27]。所以在早期的叶绿体转化工作中都应用了此种筛选标记^[7,28,29],但转化频率较低。

3.2 NPT II 基因

来自于细菌的 *NPTII* 基因编码新霉素磷酸转移酶,能赋予细胞抗卡那霉素的能力,这是核转化中常用的一种筛选标记。1993 年, Carrer 等人将 *NPTII* 基因构建进叶绿体转化载体,首次用作叶绿体转化的筛选标记^[11]。实验发现在 50 μ g/ml 卡那霉素的选择压力下,能同时筛选得到叶绿体转化体和细胞核转化体。但在 500 μ g/ml 压力下,由于细胞核转化体不抗如此高的浓度而被淘汰掉。结果表明,在较高选择压力下,*NPTII* 基因也可以作为叶绿体转化的筛选标记。

3.3 aadA 基因

aadA 基因来自于原核生物,编码氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶,能产生壮观霉素和链霉素抗性。*aadA* 基因是目前叶绿体转化中最常用、最好的筛选标记。已有的工作表明,用 *aadA* 作筛选标记,平均每个被轰击的叶片就可获得 1 个稳定的叶绿体转化植株,它比用 16S rRNA 基因的转化频率高大约 100 倍^[9],比 *NPTII* 基因的转化频率高 20~30 倍^[11]。因此,在目前的叶绿体表达载体构建时,一般都选用 *aadA* 基因作为筛选标记。

3.4 荧光标记基因

最近 Khan 等人报道了绿色荧光蛋白和抗生素抗性标记相结合在高等植物叶绿体转化中的应用^[20]。他们将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)和壮观霉素的抗性基因(*aadA*)构成了融合基因,构建在叶绿体表达载体中。当转化叶绿体后,被转化的叶绿体将产生出两种基因的融合蛋白,称为“FLARE-S”。这种产物既有利于筛选,又有利于检测,使研究者能够借助于绿色荧光很方便地从嵌合组织中挑选出被转化的组织块。特别适用于禾谷类作物非绿色胚性细胞系的叶绿体转化研究。

4 已在叶绿体中实现表达的外源目的基因

由于叶绿体基因的拷贝数非常大,整合在其中的外源基因也会以高拷贝数存在,这就为外源基因的高效表达提供了条件。至目前为止,已有多种目的基因构建在叶绿体表达载体中并被转入叶绿体基因组,结果发现这些基因均能获得高水平的表达。

4.1 杀虫蛋白基因

在已有的关于叶绿体表达载体构建和转化研究中,以转移杀虫蛋白基因的报道最多。例如:McBride 等首次将 *Bt cryIA(c)* 杀虫蛋白基因转入烟草叶绿体^[12],*Bt* 毒蛋白的表达量可达到叶子总蛋白的 3%~5%;Kota 等将 *Bt cryIAa2*

基因转入烟草叶绿体,也发现毒蛋白在烟草叶子中表达量很高,转基因烟草对害虫产生了显著抗性^[16]。国内张中林等^[17,30]和侯丙凯等(待发表)分别将 *Bt* 杀虫蛋白基因导入烟草和油菜叶绿体基因组,转基因植株对鳞翅目害虫均表现出较高抗性。

4.2 抗除草剂基因

Daniell 等首次将抗除草剂(草甘膦)的 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因(*EPSPS*)构建在烟草叶绿体表达载体中并转入叶绿体基因组,转基因烟草对除草剂表现出很强的抗性^[21]。

4.3 药用蛋白(多肽)基因

由于叶绿体可超量表达外源蛋白,植物的叶绿体有可能成为工业用酶或药用蛋白等产品的“生物反应器”。例如,具有多种医用价值的多肽药物“GVGVP”目前已在烟草叶绿体中得到了超常量表达,其表达量为细胞核表达的 100 倍。最近,Staub 等将人的生长素基因转入烟草叶绿体^[23],发现该基因在叶绿体的表达量高达可溶性蛋白的 7%,比细胞核转化高 300 倍。这些研究结果对人们利用叶绿体生产蛋白质药物的努力是极大鼓舞。

4.4 光合调控基因

叶绿体的主要功能是光合作用,通过叶绿体转化,改变或替换与光合作用调控有关的基因,可望增强作物的光合效率,提高产量。最近,Kanevski 等在这方面做了一些探索性的工作^[31],他们将向日葵的 *rbcL* 基因转入烟草叶绿体,以取代烟草自身的 *rbcL*,发现在转基因烟草中由向日葵的 Rubisco 大亚基和烟草的 Rubisco 小亚基构成了完整而有活性的酶,这项工作作为优化 Rubisco 酶的结构,提高光合性能奠定了基础。

5 结 语

至今为止,高等植物中的叶绿体转化除了在模式植物烟草已有许多报道获得了稳定的转基因植株以外,在拟南芥^[19]、水稻^[20]和马铃薯^[22]分别只有一例研究报道,叶绿体遗传转化研究工作在我国还刚刚开始。Kota 等认为,限制高等植物叶绿体转化的主要瓶颈,是大多数植物的叶绿体基因组序列不清楚,因此无法确定用于载体构建的同源重组片段和外源基因的插入位点^[16]。Daniell 等构建的通用载体无疑为这一问题的解决提供了方便^[21]。最近,侯丙凯等参考烟草的叶绿体基因组序列,从油菜叶绿体基因组克隆得到 *rps7* 和 *ndhB* 基因,发现这两个基因在油菜中也是相互毗邻的,并由此构建了适于油菜叶绿体转化的表达载体^[18]。应用此表达载体进行转化,已成功地将杀虫蛋白基因定点插入油菜的叶绿体基因组中(有关转化结果已投稿),这一工作对于叶绿体基因组序列未知的植物(包括经济作物)如何构建载体和进行遗传转化提供了重要参考。叶绿体遗传转化技术的发展前景是诱人的,目前已开始引起国内许多学者的关注。相信在科学工作者的不懈努力下,这一技术将为遗传工程带来

新的生机与活力,也将更广泛地应用到叶绿体基因组研究和重要农作物的遗传改良中。

参 考 文 献 (References):

- [1] Umbeck P F, Barton K A, Nordheim E V, *et al.* Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton[J]. *J Econ Entomol*, 1991, 84:1943~1950
- [2] Llewellyn D, Fitt G, Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi valley, Australia[J]. *Mol Breed*, 1996, 2:157~166.
- [3] King J, Could transgenic supercrops one day breed superweeds? [J] *Science*, 1996, 274:180~181.
- [4] Mikkelsen T R, Anderson B, Jorgensen R B. The risk of crop transgene spread[J]. *Nature*, 1996, 380:31.
- [5] Losey J E, Rayor L S, Carter M E, Transgenic pollen harms monarch larvae[J]. *Nature*, 1999, 399:214.
- [6] Zoubenko O V, Allison L A, Svab Z, *et al.* Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome[J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22:3819~3824.
- [7] Staub J M, Maliga P, Long region of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation [J]. *Plant Cell*, 1992, 4:39~45.
- [8] Maliga P, Towards plastid transformation in flowering plants [J]. *TIBTECH*, 1993, 11:101~107.
- [9] Svab Z, Maliga P, High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:913~917.
- [10] Bock R, Hagemann R, Kossel H, *et al.* Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids—a new regulatory mechanism. *Mol Gen Genet*, 1993, 240:238~244.
- [11] Carrer H, Hockenberry T N, Svab Z, *et al.* Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 241:49~56.
- [12] McBride K E, Svab Z, Schaaf D J, *et al.* Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco[J]. *Bio/technol*, 1995, 13:362~365.
- [13] Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, *et al.* Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:9705~9714.
- [14] Burrows P A, Sazanov L A, Svab Z, *et al.* Identification of functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* gene[J]. *EMBO J*, 1998, 17:868~876.
- [15] Hager M, Biehler K, Illerhaus J, *et al.* Targeted inactivation of the smallest plastid genome—encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b6f complex[J]. *EMBO J*, 1999, 18:5834~5842.
- [16] Kota M, Daniell H, Varma S, *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:1840~1845.
- [17] 张中林, 任延国, 沈燕新, 等. 苏云金芽孢杆菌(Bt)晶体蛋白基因在烟草叶绿体中的表达[J]. *遗传学报*, 2000, 27:270~277.
- [18] 侯丙凯, 张中林, 周奕华, 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.
- [19] Sikdar S R, Serino G, Chaudhuri S, *et al.* Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 18:20~24.
- [20] Khan M S, Maliga P, Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17:910~915.
- [21] Daniell H, Datta R, Varma S, *et al.* Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16:345~348.
- [22] Sidorov V A, Kasten D, Pang S Z, *et al.* Stable chloroplast transformation in potato; use of green fluorescent protein as a plastid marker[J]. *Plant J*, 1999, 19:209~216.
- [23] Staub J M, Garcia B, Graves J, *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18:333~338.
- [24] Sugiura M. The chloroplast genome[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 19:149~168.
- [25] Sugita M, Sugiura M. Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32:315~326.
- [26] Allison L A, Simon L D, Maliga P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants [J]. *EMBO J*, 1996, 15:2802~2809.
- [27] Moll B, Polsby L, Maliga P, Streptomycin and lincomycin resistances are selective plastid markers in cultured *Nicotiana* cells[J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 221:245~250.
- [28] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P, Stable transformation of plastids in higher plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:8526~8530.
- [29] Staub J M, Maliga P, Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA[J]. *EMBO J*, 1993, 12:601~606.
- [30] 张中林, 陈曦, 钱凯先, 等. Bt 叶绿体转基因植株的杀虫性及后代表型分析[J]. *植物学报*, 1999, 41:947~951.
- [31] Kanevski I, Maliga P, Rhoades D F, *et al.* Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119:133~141.