

叶绿体基因组在系统发育学及基因工程领域的应用

燕安*, 朱登云

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要:介绍了叶绿体基因组在系统发育学和基因工程这两个领域的应用研究进展: 1) 叶绿体基因组的DNA序列比较为植物系统发育学研究提供了可靠数据基础; 2) 叶绿体基因工程是高水平表达外源基因的重要途径之一, 在生产医用蛋白、改良作物农艺性状和环境保护等方面有着广阔的应用前景。

关键词: 叶绿体基因组; 系统发育学; 基因工程

中图分类号: Q941, Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-153-04

叶绿体基因组的应用研究虽然领域不大, 但近年来非常活跃。基于叶绿体基因组的保守性和易于分析的特点, 分类学家们在系统发育的研究中广泛地使用叶绿体DNA。叶绿体基因组的多拷贝性则使它成为一个优良的遗传载体。

1 叶绿体基因组结构与功能

叶绿体作为一个具有特殊遗传机制的细胞器, 是伴随着染色体外遗传现象的发现而被认识的。一般认为, 高等植物叶绿体基因组是由蓝细菌入侵而来。叶绿体基因组多是以环状双链DNA分子的形式存在的, 在细胞中是多拷贝的, 大小在120~190kb左右。从结构上看, 叶绿体基因组是十分保守的, 地钱、水稻、烟草的叶绿体基因组的全序列具有较广泛的代表性。它分为大单拷贝序列(large single copy, LSC)、小单拷贝序列(small single copy, SSC)和反向重复序列(inverted repeat sequence, IR)。但叶绿体基因组的保守性也是相对的, Zhang^[1]等人发现在双鞭甲藻(*Dinoflagellate*)中叶绿体基因组的结构是十分特殊的, 不同的基因处在不同的微小环状DNA上, 存在着一个基因一个小环的对应关系。Jason^[2]等人使用基于DNA纤维的原位杂交技术研究了叶绿体基因组在细胞中的组织结构, 发现在叶绿体中DNA的高级结构的可变性比以往设想的要大。由一至四个拷贝的环形DNA分子构成线状或环状的DNA纤维, 其中以单拷贝的DNA纤维为主。

叶绿体是与光合作用直接相关的细胞器, 叶绿体基因组的功能也跟光合作用密不可分。但叶绿体

基因组并不编码光合作用所需要的所有的蛋白, 只有将叶绿体基因组和核基因组编码产物进行精细的装配, 才能构建出有光合作用活性的酶复合体。

2 叶绿体基因组在植物系统发育研究上的应用

2.1 叶绿体基因组用于植物系统发育研究的优点

DNA序列比较是分子系统学最有用的工具, 植物叶绿体基因组的两个特点为在种级以上较高阶元的系统发育研究提供了显著的优点。首先, 叶绿体基因组是仅次于核基因组的第二大基因组, 为比较研究提供了一个较大的数据基础。其次, 叶绿体DNA的核酸置换率适中, 在应用上很有价值。叶绿体基因组的编码区和非编码区的分子进化速度差异显著, 分别适用于不同层次的系统学研究^[3]。

编码区的DNA变化会带来很大的表型改变, 因此进化速度较慢, 适用于较高阶元(科、目乃至更高)的系统发育学研究。Sean^[4]等人采用了叶绿体基因组的17个基因片段(主要是编码区基因, 含3个十分保守的内含子)对主要被子植物的系统发育进行了分析, 理清了各主要分枝间的关系。Masanori^[5]等人对角苔(*Anthoceros formosae*)的叶绿体基因组进行了全序列分析, 并将角苔叶绿体基因组编码的52种蛋白与高等陆生植物的对应蛋白进行了比较, 认为角苔与高等陆生植物是平行进化的关系。Akiko^[6]

等人从两种原叶绿体生物(*prochlorophytes*)和几种主要的真叶绿体生物中分离出合成叶绿素 b 的基因 并对其进行系统学分析, 结果发现这些基因有着共同的起源。这一结果说明, 营好氧光合生活细菌的祖先(包括含有叶绿体的细菌的祖先)同时含有叶绿素 b 和藻胆素。传统的序列分析显示, 绿色植物可以分为两个分支: *Streptophyta*(陆生植物及与之相近的绿藻)和 *Chlorophyta*(其余的绿藻)。Claude Lemieux^[7]等人则通过对鞭毛藻(*Mesostigma*)的叶绿体DNA序列做系统学分析, 发现这种绿藻属于先于以上两大分支分化出的一个类群, 从而揭示出了一个绿色植物的早期分支。

非编码区的突变给表型带来的影响很小, 因此进化速度较快, 适用于较低阶元(种、属)的系统发育学研究。Yoshihiro^[8]等人通过对禾本科内水稻、玉米、小麦叶绿体基因组(主要是非编码区)的核酸置换率的比较分析, 构建出了禾本科内的进化树。Zhang^[9]等人则通过双鞭甲藻(*Dinoflagellate*)叶绿体基因组的转录起始区域的多样性来探究这类特殊的叶绿体基因组结构的起源。

2.2 叶绿体基因组用于系统发育的不足

用叶绿体 DNA 研究系统发育也有明显的局限性。首先, 叶绿体基因组是母性遗传的, 因此并不能单靠叶绿体基因组来解释居群间的杂交现象。其次, 虽然有越来越多的叶绿体 DNA 被用作分子标记来研究类群间的系统发育关系, 但只有将这些分子片段提供的信息与其他的分子片段信息、传统的形态及生理特征结合起来, 获得更多的信息, 才能更接近系统发育的本来面目^[10]。

3 叶绿体在植物转基因中的应用

3.1 叶绿体作为遗传载体的优点

对叶绿体基因的改造是转基因技术中一个颇有前途的领域。叶绿体基因组有很多特点使它十分适宜作为插入基因的载体^[11]。首先, 叶绿体基因组在一个细胞里有多达数百个的拷贝, 这种高基因含量一般会导致目的基因的高水平表达。其次, 叶绿体基因组结构不像核基因组那么复杂, 目的基因可以十分精确地定位在叶绿体基因组上, 从而避免了由位置效应带来的基因表达的不确定性, 使植物转基因工作的可控制性增强。第三, 由于在被子植物中, 叶绿体是母性遗传的, 这就使目的基因通过传粉扩散到环境中的危险大大降低。但这并不是说,

叶绿体转基因技术没有任何安全隐患。Maria^[12]等人将 *aadA* 基因转入烟草叶绿体基因组, 并将转基因烟草叶片在模拟自然条件下埋入土壤使其腐烂, 最后在土壤用 PCR 法仍能检测到 *aadA* 基因。这一研究表明, 虽然大部分遗传物质在叶片老化、死亡和腐败的过程中会被多种核酸酶降解, 转入的目的基因仍有被释放到土壤中的可能。

3.2 叶绿体转基因在生产医用蛋白上的应用

叶绿体转基因的应用是与市场需求紧密联系的, 一些医用价值高的生物活性蛋白成了转基因研究的首选。Jeffrey^[13]等人得到了叶绿体转基因烟草, 可以高效地表达可溶的、有生物活性的生长激素。产物在总可溶性蛋白中比例超过了 7%, 比用细胞核转基因的方法高出 300 倍。转基因植物在可食部分表达的抗原蛋白很可能代替目前的商用注射疫苗。Liz^[14]等人将乙肝表面抗原的基因转入马铃薯叶绿体基因组中, 用转基因马铃薯块茎喂养小鼠, 发现小鼠对 HbsAg 产生了抗性。

叶绿体是质体的一种, 质体基因组所包含的基因大多与光合作用直接相关。在植物的非绿色组织中, 光合作用很弱, 因此质体基因表达水平通常也较低。Stephanie 等人^[15]将 rRNA 操纵子的启动子和 *aadA* 基因共同转入西红柿果实质体基因组中, 使目的基因 *aadA* 高水平表达, *aadA* 蛋白产物可以占到总可溶蛋白的 20% 以上。此项研究为下一步在果实质体中高水平表达口服疫苗等医用蛋白开辟了道路。

3.3 叶绿体转基因表达抗虫蛋白

对于抗虫毒蛋白在叶绿体中表达的研究上世纪九十年代已经开始^[16,17], Cosa^[18]等人的研究较为突出。他们将 *Bt. Cry2Aa2* 操纵子转入烟草叶绿体中, 抗虫蛋白表达量占可溶产物的 45.3%, 电镜照片显示抗虫蛋白形成立方晶体, 产物的杀虫性能高达 100%。

3.4 叶绿体转基因生产可降解塑料

随着塑料制品对环境造成的污染日益加剧, 可降解塑料的开发成为了时代的要求。Poirier^[19]等在拟南芥质体中表达生物可降解塑料 PHB 基因, 产物占植株干重的 14%。

3.5 叶绿体转基因对农作物代谢途径的改造

除了直接引进外源基因用以编码外源蛋白外, 通过引入外源基因来改变生化反应途径, 引起代谢产物向设计者期待的方向变化, 也是叶绿体转基因

应用的一个有效的方法。

叶绿体中的类胡萝卜素生物合成途径的改造是一个重要的领域。Varda^[20]等人通过改变烟草(*Nicotiana tabacum*)叶绿体中的类胡萝卜素生物合成途径,生成具有较高商业价值的变胞藻红素(astaxanthin)。他们从一种鞭毛藻(*Haematococcus pluvialis*)中提取编码 β 类胡萝卜素酮酶的cDNA,从西红柿中提取Pds(八氢番茄红素脱氢酶)启动子,共同转入烟草叶绿体基因组中,结果在转基因植株的蜜腺组织中,变胞藻红素呈现出积累现象。而Susanne^[21]等人则通过引入来自细菌的编码八氢番茄红素脱氢酶的Crtl基因,大大提高了 β 类胡萝卜素在西红柿果实中的含量,比正常值高出约三倍,提高了果实的营养价值。在其它作物上的此类研究也正在大力展开,并取得了不小的成果。

另一个重要的领域是对光合作用的改造,Spencer等人^[22]的研究在此领域已迈出了重要的一步。在光合作用中,有一个对碳固定起重要作用的关键酶——rubisco(核酮糖二磷酸羧化酶—加氧酶),而此酶的很大一部分亚基由叶绿体基因编码。在研究中,他们用较为低效的红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)的rubisco代替高效的烟草的rubisco,培育出的转基因烟草的光合效率下降。虽然在此项研究中,光合效率是下降的,但它为今后提高光合效率的研究提供了启示。

3.6 叶绿体转基因的技术问题

对叶绿体基因进行改造这一技术本身也有着不小的缺陷。叶绿体基因组在每一个细胞中是多拷贝的,要保证转基因技术的成功,就得使目的基因进入每一个拷贝中去,这一过程被称为同质化培养。为了达到这一目标,首先将目的基因插入单个的质体中并对其进行培养,然后用化学试剂精确地控制好培养条件,使拥有更多转基因拷贝的质体能更好地发育。经过数月的选择,转基因拷贝在总拷贝中占的比例就会增长到符合要求的水平。传统上,主要利用抗生素作为质体培养的选择条件,但近来出于生物安全的角度考虑,不使用抗生素作为选择条件的叶绿体基因工程已经成为了一大趋势^[23]。在烟草、马铃薯、西红柿等一些茄科植物中,质体相对容易在多种激素诱导下增殖,对叶绿体基因的改造因而也就显得较为容易。但当科学家们将这一套技术用于其他的植物类群时,就遇到了不小的困难^[24]。因此,到目前为止,能够进行叶绿体基因改

造的植物种数远远小于能够进行核基因改造的种数,叶绿体基因改造在克服种属特异性上亟待重大突破。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Z, BEVERLEY G, THOMAS C S. Single gene circles in *dinoflagellate* chloroplast genomes [J]. *Nature*, 1999, **400**: 155 — 159.
- [2] JASON W L, MICHAEL J H, SCOTT A J, *et al.* Cytogenomic analysis reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**: 245 — 254.
- [3] RICHARD G O, JEFFREY D P. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis [J]. *Amer J Bot*, 1994, **81**: 1205 — 1224.
- [4] SEAN W G, RICHARD G O. Utility of 17 chloroplast phylogeny of basal angiosperms [J]. *Amer J Bot*, 2000, **87**: 1712 — 1730.
- [5] MASANORI K, AKIRA K, YUHEI Y, *et al.* The nucleotide sequence of the hornwort (*Anthoceros formosae*) chloroplast genome: insight into the earliest land plants [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**: 716 — 721.
- [6] AKIKO T, KIYOTAKA O, HIDEAKI M, *et al.* Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts [J]. *Nature*, 1999, **400**: 159 — 162.
- [7] CLAUDE L, CHRISTIAN O, MONIQUE T. Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma Viride* reveals an early branch of green plant evolution [J]. *Nature*, 2000, **403**: 649 — 652.
- [8] YOSHIHIRO M, YUKIKO Y, YASUNARI O, *et al.* Whole chloroplast genome comparison of rice, maize, and wheat: implications for chloroplast gene diversification and phylogeny of cereals [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**: 2084 — 2091.
- [9] ZHANG Z, THOMAS C S, BEVERLEY G. Evolution of dinoflagellate unigenic minicircles and the partially concerted divergence of their putative replicon origins [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**: 489 — 500.
- [10] 田欣, 李德铁. DNA 序列在植物系统学研究中的应[J]. *云南植物研究*, 2002, **24**: 170 — 184.
- [11] GIOFFREY I M. Chloroplast Origin and Integration [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**: 50 — 53.
- [12] MARIA TC, JOHN P, ELISABETH K, *et al.* Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 673 — 678.
- [13] JEFFREY M S, BRADLEY G, JULIE G, *et al.* High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 333 — 338.
- [14] LIZ J R, YASMIN T, CHARLES J A, *et al.* Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 1167 — 1171.
- [15] STEPHANIE R, MARITA H, IRVING J B, *et al.* Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 870 — 875.
- [16] MCBRIDE K E. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplast leads to an extraordinary level of an insecti-

- cidal protein in tobacco [J]. *J Bio Technol*, 1995, **13**: 362—365.
- [17] MADHURI K, HENRY D, SAM V, *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplast confers resistance to plants against susceptible and Bt resistant insects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1840—1845.
- [18] BRANDY C, WILLIAM M, SEUNG B L, *et al.* Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplast leads to formation of insecticidal crystals [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 71—74.
- [19] NAWRATH C, POIRIER Y, SOMERVILL C. Targeting of the polyhydroxy butyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 12760—12764.
- [20] VARDA M, MARK H, IRIS P, *et al.* Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 888—892.
- [21] SUSANNE R, PAUL D F, JOY W K, *et al.* Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato flowers [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 666—669.
- [22] SPENCER M W, JOHN A. Plastome encoded bacterial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (ribisco) supports photosynthesis and growth in tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 14738—14743.
- [23] HENRY D, MUTHUKUMAR B, LEE S B. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection [J]. *Curr Genet*, 2001, **39**: 109—116.
- [24] JOSH G. Plant scientists see big potential in tiny plastids [J]. *Science*, 2002, **295**: 258—259.

The Application of Chloroplast Genome in the Studies of Systematics and Bioengineering

YAN An*, ZHU Deng Yun

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The applications of chloroplast genome in the studies of phylogeny and bioengineering are reviewed: 1) the DNA sequence of chloroplast genome provides a sound data base for plant phylogenic studies; 2) the chloroplast engineering is an important way to overexpress the target gene of interest, so it has considerable potential in areas such as production of therapeutic proteins, bioengineering of crops and environment protection.

Key words: chloroplast genome; systematics; bioengineering

*Corresponding author, E-mail: yananpaper@hotmail.com