

采用快速繁殖的技术繁殖一些用途独特、市场急需和需要进口的紧张的药材。近年还在向调味品和色素等代谢产物的生产发展。

后 语

我们展望未来，见到曙光已露，认为曙光在前，齐心努力，就可促使我们的这一门科学早日为社会主义建设作出更大的贡献。我们虽然走过一些曲折的道路，但是纵观今日，我们的队伍壮大了，工作也从各方面开展起来了，这是值得庆贺的，我们也感到无限欣慰。党和国家重视科学研究，同时也对我们提出更高的要求，这是推进我们工作的动力。前途无限光明，寄希望于在座的同行及青年同志们。祝愿同志们在党中央召开的三月七日全国科技工作会议的号召下，合作分工，奋力前进，作出光辉的贡献。

参 考 文 献

- [1] The World Biotech. Report. 1984, Vol. II. Online publications. UK.
- [2] S. Sens & Y. Okada (ed.) Intern. Cell Biology. 1984, Tokyo.
- [3] 国际植物遗传操作会议论文集, 1984年10月, 北京香山.
- [4] 罗士韦, 许智宏, 1985, *Ann. Rev. of Biol. Science in China* (曹天钦编).
- [5] 全国植物分子遗传学术工作会议(细胞生物学会), 1984年12月, 上海.
- [6] 罗士韦, 许智宏编, 1985, 《经济植物的组织培养》(科学出版社).
- [7] 詹祥灿, 1984, 植物生理通讯, 2期74页.
- [8] Montagu, M., et al., 1984, *EMBO*, 3: 1681.
- [9] Chua, Nan-hai, et al., 1984, *Science*, 224: 838.
- [10] Fraley, R. T., et al., 1983, *P. N. A. S.*, 80: 4803.
- [11] Helmer, G., & M. D. Chilton, 1984, *Bio-tech*, 2: 520.
- [12] Hernalsteems, G. P., et al., 1984, *EMBO*, 3: 3039.
- [13] Hooykaas, G. P. et al., 1984, *Nature*, 311: 763.
- [14] An, G., et al., 1985, *EMBO*, 4: 277—284.
- [15] Murai, N. et al., 1983, *Science*, 22: 476—482.
- [16] Van Broeck, G., et al., 1985, *Nature*, 313 (6001): 358—363.
- [17] Montagu, M., et al., 1983, *Nature*, 303: 209.
- [18] Fraley, et al., 1984, *Science*, 223: 496.
- [19] 唐惕, 1984, 植物生理通讯, 4期第11—13页.
- [20] 小林敏幸编, 《植物组织培养与代谢产物》, 1984.

叶绿体基因的定位和结构

肖 伟
(南京农学院)

自从1962年发现叶绿体DNA(ctDNA), 以及后来证明叶绿体分裂和叶绿体基因组自主复制以来, 20余年间对叶绿体的研究有了长足的进步, 成为植物分子生物学的“生长点”之一。这些研究成果对于揭示光合作用过程、叶绿体基因的作用及其调控具有重要意义。迄今为止已有几十种蛋白质及核酸分子被证明是由叶绿体基因指导下合成的, 其中有些基因已经定位, 有些并做了较详细的研究。对于探索生物的演

化规律、人工模拟光合作用过程, 以及通过改造光合过程来改良植物品种, 无疑具有一定的指导作用。

叶绿体蛋白质的合成

高等植物叶绿体基因组的分子量为 10^8 道尔顿(D)或120—160千碱基对(kb), 可编码100种以上蛋白质和核酸分子。但是仅叶绿体中DNA复制、转录和翻译就需要约100个基

因。考虑到有 40 种酶参与色素合成, 40 种酶参与光合作用, 还有构成叶绿体骨架所必需的酶及蛋白质, 单靠叶绿体基因组是不够的。已经证明细胞核基因参与叶绿体建成及光合作用, 叶绿体的自主性是相对的。确定一种叶绿体多肽链是由核基因组编码还是由叶绿体基因组编码一般采用三种方法^[1]:

1. 利用蛋白质缺失突变体或使用专一性蛋白合成抑制剂, 进行活体标记示踪。常把 ³⁵S-甲硫氨酸加入培养基培养植物或组织, 分析比较野生型和突变体在蛋白质组成上的差异, 就可以确定缺失的蛋白质是由何种基因指导合成的。叶绿体具有类似原核生物的 70 S 核糖体。氯霉素(D-threo-chloramphenicol)、林肯霉素、壮观霉素等能抑制它的活力。细胞质中的核糖体为 80 S, 放线菌酮等能抑制它的活力。在活体标记的同时, 分别加用上述蛋白质合成抑制剂, 可以从蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱对比中判断蛋白质是由细胞核还是由叶绿体基因编码的。这一方法有缺点, 因为叶绿体核糖体与原核生物核糖体并不完全相同, 其次抑制剂可能产生副作用, 从而间接抑制其它合成过程。因此所得结果不能做为定论。

2. 用离体叶绿体合成蛋白质。如果标记的氨基酸能参入悬浮的叶绿体中的蛋白质, 则可以认为此蛋白质是由叶绿体基因组编码的。但是分离纯化叶绿体过程中不免有一定程度的混杂。而且没有观察到标记的蛋白质也不能认为就是核基因编码的。这一方法使用得比较普遍, 所报道的蛋白质种类较多, 差异也大。例如 Ellis 等^[2]曾报道双向电泳谱上有多达 80 个标记斑点, 单向电泳谱上也有 37 个之多, 很可能其中一些是不完全的多肽链。

3. 体外合成多肽链。提取多聚核糖体(包含 mRNA)进行体外翻译反应, 可以探讨蛋白质的编码基因来源。一般认为 mRNA 不能透过叶绿体被囊, 因此叶绿体内的 mRNA 是从 ct-DNA 转录的。这一方法经过改进, 可靠性大大提高了。并且将转录与翻译过程偶联起来,

同时在体外进行。常用的转录-翻译系统有大肠杆菌、麦胚无细胞系统和兔网织红细胞系统。

Paterson 等^[3]发明了一种杂交捕捉技术(hybrid arrest), 即将样品中的 mRNA 与已知来源的 DNA 杂交, 同时进行翻译, 使其中与 DNA 杂交的分子不再能用做翻译的模板, 由此定位编码蛋白质的基因。

利用上述技术已经证明, 叶绿体基因组指导几十种不同分子量的蛋白质的合成, 其中一些是功能已知的。还有许多叶绿体蛋白质来源于细胞质合成系统。尚不能肯定是否有线粒体基因参与叶绿体蛋白质的合成。

基因在 ctDNA 上的定位

叶绿体 mRNA 大多没有多聚腺苷酸(polyA)尾巴, 有的则仅有很短 polyA 尾巴。利用多聚尿苷酸凝胶过滤, 可将它们与细胞质 mRNA 分开。通过体外合成蛋白质, 然后做免疫沉淀可以分离到所需的 mRNA 分子。然后将此 mRNA 与经限制酶切开、凝胶电泳分离、并转移到硝酸纤维素膜上的 ctDNA 片段进行 DNA-RNA 杂交, 就可以确定该基因的位置^[4]。也可以直接用 ctDNA 基因库, 经过体外转录翻译获得多肽链, 然后进行免疫沉淀, 做出基因定位。核糖体 RNA、转移 RNA 基因则可以通过 DNA-RNA 分子杂交直接实现定位。

研究得较详细的高等植物有菠菜、小麦和豌豆等, 低等植物则以衣藻和眼藻研究得较多。已经定位在叶绿体基因组上的基因有: 叶绿体核糖体基因(包括 23 S、16 S、5 S 和 4.5 S RNA)、20 种以上的 tRNA 的基因、RuBP 羧化酶大亚基的基因、类囊体膜 32 KD 蛋白质的基因、ATP 合成酶偶联因子 CF₁ 的三个亚基 α 、 β 、 ϵ 的基因^[5]、ATP 合成酶偶联因子 CF₀ 的亚基(又叫脂蛋白亚基、DCCD-附着蛋白、质子转运亚基)的基因^[6,7]、细胞色素 f 和 b₆ 的基因以及 P₇₀₀ 叶绿素 a 蛋白质的基因^[8-10]。另外细胞色素 b₆/f 复合体中被称为“亚基 IV”的 17 KD 蛋白质的基因和 PS II 反应中心的 P₆₈₀

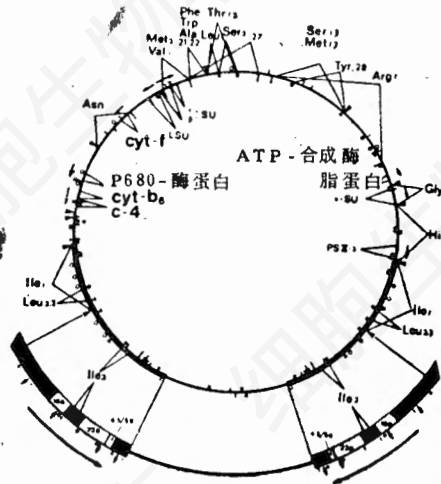


图1 菠菜叶绿体基因图

图上标明位置的基因有细胞色素 F(cyt-f)、 B_6 (cyt-b₆)、亚基 IV(c-4)基因; P_{680} -酶蛋白基因; ATP 合成酶 CF₁ 二个亚基 α 、 β 、 ϵ 的基因 (α -Su, β -Su, ϵ -Su), CF₀ 的脂蛋白亚基基因; 类囊体膜 32 KD 蛋白质基因 (PS II-3); RuBP 羧化酶大亚基基因 (Lsu); 各种 t-RNA 基因 (圆圈外由 3 字母组成的氨基酸名称缩写); 2 个 rRNA 基因操纵子 (即重复顺序区, 用粗线表示)。箭头表示基因转录方向。圆周上的小符号表示不同限制酶的切点。

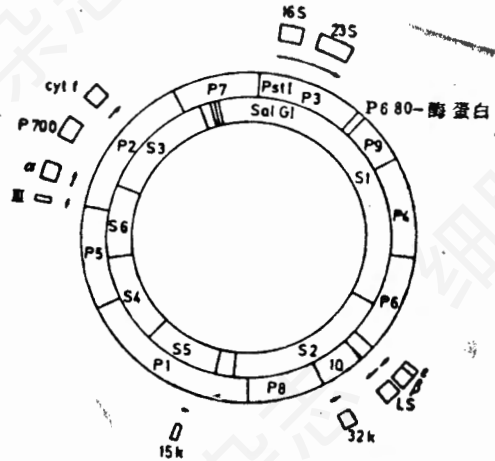


图3 豌豆叶绿体 DNA 图

表示已知的基因位置和基因转录方向。

叶绿素 a 复合蛋白 (51 KD) 的基因在菠菜叶绿体 DNA 上的位置也已确定^[11]。Watson 等^[12] 确定了蛋白质合成延长因子 Tu (EF-Tu) 在衣藻叶绿体 DNA 上的位置。Wong 等^[13] 将指导 DNA 复制的基因 (OriA, OriB) 也定位在衣藻基因组上。图 1、2 和 3 分别表示基因在菠菜、衣藻和豌豆叶绿体基因组上的位置。

基因的结构与表达

对部分叶绿体基因进行了核苷酸顺序分析。由现有的结果来看，它们都具有原核生物基因的某些特点，如 70 S 核糖体附着点，类似于大肠杆菌基因的起始顺序和终止顺序等。但它们的相似程度又有所不同。有趣的是，指导 ATP 合成酶 CF₁ 因子中 β 和 ϵ 亚基的基因具有首尾相接的重叠顺序。 β 亚基的基因 (atpB) 的终止结构与 ϵ 亚基的基因 (atpE) 的起始顺序有四个碱基对的重叠 (菠菜, Zurawski 等^[14])，它们总是被转录于同一双顺反子 mRNA 中。比较已知基因的碱基顺序发现，叶绿体基因与大肠杆菌有不同程度的同源性，同时不同植物种间叶绿体 DNA 的碱基顺序却有非常保守的倾向。

叶绿体指导合成的蛋白质具有前体结构，这一点与核基因编码的叶绿体蛋白质相似。

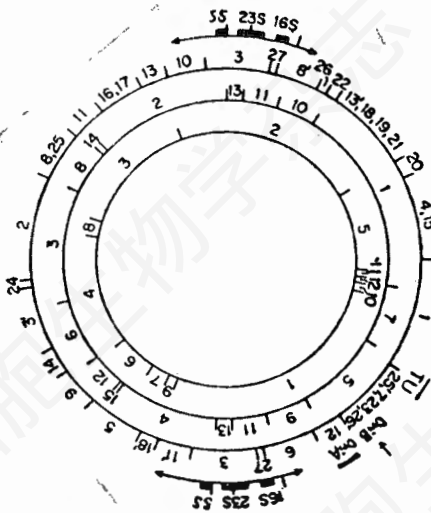


图2 衣藻叶绿体 DNA 的限制酶图

图上标明 rRNA 基因，蛋白质合成延长因子基因 (Tu)，复制起始点 (oriA, oriB)。箭头表示转录方向。内圈-BglI 图，中圈-BamHI 图，外圈-EcoRI 图。数字为 DNA 片段编号。

32 KD 类囊体膜蛋白的前体约为 34.5 KD, RuBP 羧化酶大亚基的前体也比成熟的酶蛋白略大。它们要经过翻译后的加工,切去一段多肽,才转变成有功能的酶蛋白。核基因编码的蛋白质前体的加工是在叶绿体被膜上进行的,这一过程有利于蛋白质进入叶绿体。

在低等植物眼藻的 RuBP 羧化酶大亚基基因中最近发现了 9 个插入顺序(内含子)^[15]而在高等植物叶绿体 rRNA 的基因中也有插入顺序。

叶绿体基因的转录并不都是一个方向。大多数物种的叶绿体 DNA 中都有一重复顺序区,它们的转录方向是相对的,共同指向一小的单拷贝顺序区。rRNA 基因和部分 tRNA 基因就位于这一重复顺序区中。其它已知基因都在单拷贝顺序区里。

叶绿体基因组结构的演化

基因定位分析有助于探讨叶绿体起源及演化规律。配合酶谱分析及顺序分析,人们发现叶绿体基因组的结构在不同物种间有很大差异。从现有资料看,可将高等植物叶绿体 DNA 分为四种类型,其中三种具有典型的重复顺序区。菠菜、十字花科植物等多数双子叶植物的 32 KD 类囊体膜蛋白基因(*psbA*)和 RuBP 羧化酶大亚基基因(*rbcL*)处于对位位置;小麦、玉米等也是这样,但它们的 ATP 合成酶偶联因子 $CF_1\alpha$ 亚基的基因(*atpA*)和 CF_0 的亚基 III 的基因(*atpH*)所在部位似乎发生了一次约 20 kb 的 DNA 倒置。这可能是单子叶植物的特征结构^[16]。豆科植物中的绿豆(*Vigna radiata*)等的 *psbA* 和 *rbcL* 基因相邻,并向同一方向转录^[17]。属于第四类型的有豌豆、蚕豆和鹰咀豆(*Cicer arietinum*),它们没有重复顺序,结构的变化较大。Palmer 等^[18]认为这是重复顺序缺失的结果。Tassopulu 等^[19]比较了几种烟草的叶绿体 DNA 结构的差异,认为重复顺序是由于两个单一的原始叶绿体 DNA“头—头”“尾—尾”相接,然后又发生缺失造成的。鉴于绿藻叶绿

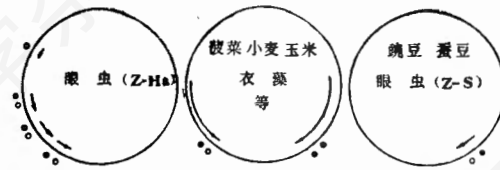


图 4 三种不同的叶绿体基因组的重复顺序

箭头表示重复顺序区和 rRNA 操纵子的转录方向。黑点代表 16 S rRNA 基因,空圈代表 23 S rRNA 基因。

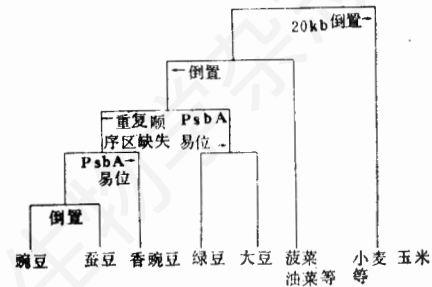


图 5 推测的被子植物叶绿体基因组的“进化树”

体 DNA 同样具有重复顺序(图 4)以及豆科植物的进化地位,作者认为这一过程可能发生在原始生物时期。高等植物叶绿体 DNA 的可能的演化趋势见图 5。随着更多的叶绿体基因的发现、定位及定向,以及对叶绿体基因组更广泛的研究,这一问题将得到明确的解答。

叶绿体基因工程

叶绿体 DNA 编码的基因在叶绿体形态建成和光合作用中起着重要的作用,此外叶绿体基因组还参与其它一些生物反应,如氮素代谢等。用遗传工程的技术改变生物的特性是生物学领域的一场革命。高等植物的叶绿体基因组作为一种类似原核生物的简单的环状 DNA 分子,它的基因与核基因既独立又相互作用和互相依赖,已经成为植物分子生物学研究中很活跃而又大有希望的领域。据统计每一光合细胞有 40—50 个叶绿体,每一叶绿体含有 4—8 个叫做类核体(nucleoids)的小颗粒,而每一类核体通常由 10—100 个叶绿体 DNA 分子聚集而成。因此一个光合细胞中有约 20,000 个叶

绿体 DNA 分子! 数量之多可以和大肠杆菌的质粒比美。

叶绿体基因组与核基因组有密切的联系。一些复合酶的亚基由这两类基因组分别编码, 通过组装构成有功能的酶蛋白, 如 RuBP 羧化酶和 ATP 合成酶。RuBP 羧化酶的小亚基由核基因编码。ATP 合成酶的 CF₁ 由 8 个亚基(2 α 、2 β 、2 ϵ 、1 γ 、1 δ)组成, CF₀ 由 3 个(或 4 个)亚基组成, 共同构成质子通道。其中的 CF₁ 的 γ 和 δ 亚基, 和 CF₀ 的两个亚基已经证明是由核基因编码的^[1]。

一些除草剂的作用机理是影响植物叶绿体的结构和光合作用。均三氮苯类除草剂阿特拉津的作用位点是 32 KD 类囊体膜蛋白, 阻断光系统 II (PS II) 的电子传递。这一蛋白是叶绿体基因组编码的并且是光诱导合成的。它的基因 *psbA* 又叫“光基因”。有些杂草对这类除草剂具有抗性、这种抗性是细胞质遗传的。Hirschberg 等(1983^[20])分析了抗性基因和敏感基因的碱基顺序, 发现仅有 3 个碱基的差别, 蛋白质仅有一个氨基酸的变化, 即在第 228 位上敏感型蛋白的缬氨酸突变为甘氨酸。在小苋和龙葵两种植物上发现这一变化是相同的。推测这样的氨基酸代换改变了 32 KD 蛋白质对除草剂的亲和性。Beverdors(1980)^[21]等通过杂交及回交的方法将一种野油菜的抗除草剂特性转移到异倍体栽培作物芸苔中。相信将来一定能够用基因工程的方法将抗除草剂的基因引入栽培作物, 同时开辟一条叶绿体基因工程的道路。

参 考 文 献

- [1] Bottomley W, Bohnert HJ 1983, in Boulter D, Parthier O. (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology: Nucleic Acids and Proteins*, Springer Berlin 148: 531—596.
- [2] Ellis RJ, Highfield PE, Silverthorne J 1978, In: Hall DO et al. (eds) *Photosynthesis* 77. *Biochem Soc, London*, pp 497—506.
- [3] Paterson BM, Robert BE, Kuff EL 1977, *Proc Natl Sci USA* 74: 370—4374.
- [4] Southern EM 1975, *J Mol Biol* 98: 503—517.
- [5] Bohnert HJ, Crouse EJ, Schmitt JM 1983, In Boulter D, Parthier O (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology: Nucleic Acids and Proteins* Springer Berlin 148: 475—530.
- [6] Alt J, Winter P, Sebald W, Moser JG, Schedel R, Westhoff P, Herrmann RG 1983 a, *Curr Genet* 7: 129—138.
- [7] Howe CJ, Auffret AD, Doherty A, Bowman CM, Dyer TA, Cray JC 1982, *Proc Natl Sci USA* 79: 6903—6907.
- [8] Smith AG, Gray JC 1984, *Mol Gen Genet* 194: 471—476.
- [9] Alt J, Westhoff P, Sears BB, Nelson N, Hurt E, Hauska G, Herrmann RG 1983 b, *EMBO J* 2(6): 979—986.
- [10] Willey DL, Huttly AK, Phillips AL, Gray JC 1983, *Mol Gen Genet* 189: 85—89.
- [11] Morris J, Herrmann RG 1984, *Nucleic Acids Res* 12: 2837—2850.
- [12] Watson JC, Surzycki SJ 1982, *Proc Natl Sci USA* 79: 2264—2267.
- [13] Wong XM, Chang CH, Waddell J, Wu M 1984, *Nucleic Acids Res* 12: 3857—3872.
- [14] Zurawski G, Bottomley W, Whitfield PR, 1982, *Proc Natl Sci USA* 79: 6260—6264.
- [15] Koller B, Gingrich JC, Stiegler GL, Farley MA, Delius H, Hallick RB 1984, *Cell* 36: 545—553.
- [16] Howe CJ, Bowman CM, Dyer TA, Cray JC 1983, *Mol Gen Genet* 190: 51—55.
- [17] Palmer JD, Thompson WF 1982 b, *Cell* 29: 537—550.
- [18] Palmer JD, Edwards H, Jorgenson RA, Thompson WF 1982 a, *Nucleic Acids Res* 10: 6819—6832.
- [19] Tassopulu D, Kung SD 1984, *Thero Appl Genet* 67: 185—193.
- [20] Hirschberg J, McIntosh L 1983, *Science* 222: 1346—1349
- [21] Beverdors WD, Weiss-Lerman J, Erickson LR, Machado VS 1980, *Can J Genet Cytol* 22: 167—172.