

国际学术动态

植物基因工程技术在降低食品和烟草产品中镉的应用潜力

George J. Wagner¹ Victor Koren'kov¹ Kendal Hirschi² Ning-Hui Cheng²

(1 肯塔基大学, 美国肯塔基州列克星敦; 2 得克萨斯州 A&M 大学, 美国得克萨斯州)

中图分类号: Q78 TS45

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2006)02-0047-04

植物基因工程技术的应用已使改变植物内污染离子浓度的设想成为可能。然而, 对于植物根系吸收污染离子的生理和生物化学特性, 植物如何将污染离子从根系运输到茎、籽粒、果实、茎秆, 如何积累污染离子的机理目前尚未弄清。由于缺乏植物体内离子吸收和运转机理的支持, 难以实现利用基因工程方法来准确和有效地调控离子的吸收与运输。如降低食品和烟草产品中重金属镉的研究表明, 镉积累的调控可以对 Ca、Zn 和 Mn 等其它有关重要离子的体内平衡产生不利影响, 并对作物的产量与质量产生负面影响。我们已经开始研究离子在植物体内平衡的中心点, 探讨许多相对重要离子各自运载蛋白的类型, 离子运载蛋白如何受多因素调控, 离子运载蛋白对离子选择的基础和范围。这方面知识仍然是重要的和基本的, 尽管对上述问题的认识尚不够, 但是我们现在有机会可以让植物组织特异过量表达运载蛋白基因, 从而使这种基因影响植物对不合需要离子(如镉)的积累, 并在田间种植组织特异过量表达的转基因植物, 以检测这些植物在正常的田间条件下的反应。本文主要描述拟南芥 CAX 基因在烟草中过量表达的研究, 探讨的首要目标是将镉封锁在烟草植物的根系中, 以致于降低叶片组织中镉的浓度。根系选择性启动子是从不同生物体获得的, 这类选择性启动子基因目前也正在植物基因工程中得到应用。有关研究还处于初始阶段, 2004 年我们在田间种植了表达这些基因的 KY14 转基因烟草(转基因烟草采用了几种根系特异性启动子), 并观察

了转基因烟草中镉的积累情况。由于田间试验是检测转基因烟草效果和可用性的最终试验, 迅速开展田间试验非常必要。

蔬菜是人类获取镉的主要来源, 大约占人体吸收总量的 70%。烟草是吸烟者获取镉的一个额外来源。烟田土壤含有相当高的镉, 这是因为含有镉的磷酸矿物肥料的施用、连作、以及在酸性土壤环境中有利于烟根对镉的吸收。目前尚未发现镉在烟草中的正向生物学功能, 镉被称为“重金属”元素, 已知镉是与吸收剂量相关的人体毒素。就镉的含量而言, 烟草看起来似乎与其它植物没有什么不一样, 在一定的条件下仍然可以积累一定的镉。利用液体培养法对适量镉存在进行的初步研究结果显示, 烟草由茎到根系镉的变化分布, 栽培烟草茎/根中镉的比例 ≥ 1 。相反, 黄花烟 (*Nicotiana rustica*) 茎/根中镉的比率为 0.2 左右。然而, 种种原因表明, 通过常规育种手段将黄花烟根的高镉积累特性和叶片的低镉积累特性转育到栽培烟草上是不可行的。研究发现, 烟草品种之间镉的积累水平和茎/根镉的比率变化很大, 相关资料是在土壤种植和液体培养条件下, 不同株龄和不同镉含量的条件下获得的。

将黄花烟的茎嫁接到普通栽培烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的根上, 茎中镉的积累量与普通栽培烟草的积累量相类似(表 1); 相反的嫁接得到茎中镉的积累量与黄花烟的积累量相似的结果。这些结果表明, 根系控制着茎中镉的积累。因此, 加强根系封锁镉的能力可以降低镉向茎组织中转移的设想是合理的, 这种研究结果有利于降低镉等有害污染离子在大多数食用作物, 如叶用蔬菜、谷类作物(二价镉离子的主要来源)和烟草中的含量。

译者: 时焦, 女, 博士, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛, 266101。E-mail: jshi42@sohu.com

校者: 徐宜民。

收稿日期: 2005-05-25

表 1 嫁接对镉分布的影响

(单位: $\mu\text{g/g}$ 干重)

组 织		普通烟 普通烟	黄花烟 普通烟	黄花烟 普通烟	黄花烟 黄花烟	普通烟 黄花烟
上部	叶片	116±39(3)	118 102	209±79(4)	47	36±9(3)
	中脉	109±53(3)	112 92	209±58(4)	—	14±3(3)
	茎	63±24(3)	40 50	73±24(4)	—	11
中部	叶片	90±42(3)	103 31	133±20(4)	41	30 40
	中脉	89	109 62	147±26(4)	19	20 17
	茎	70 74	80 56	65±12(4)	17	10
下部	叶片	28±9(3)	14 8	70±31(4)	16	14 17
	中脉	38±17(3)	40 34	116±35(4)	17	14 11
	茎	61±13(3)	62 62	—	12 7	
烟茬	嫁接位上	45±7(3)	60 58	72±19(4)	15	8 5
	嫁接位下	44±5(3)	65 62	91±51(4)	—	5
根	根基	44±5(3)	58±19(3)	66±16(4)	40	37 11
	侧根	75±13(3)	77±5(3)	111±14(4)	43	56±15(3)
	不定根	138±5(3)	184±35(3)	214±16(4)	250	222±30(3)
上部叶/不定根镉的比率		0 84	0 59	0 97	0 19	0 16

20 世纪 90 年代生物化学研究表明, 镉最初在根系和叶片细胞的液泡中积累, 液泡积累的主要机理是通过一个二价的阳离子/质子运载蛋白, 运载蛋白利用来源于 ATP 的质子(能量)在液泡汁液中的梯度, 浓缩二价阳离子(包括镉离子)进入液泡中, 从而远离细胞溶质和主要代谢细胞器(如叶绿体、线粒体等)。人们认为, 运载蛋白也利用这种方式负责液泡中其它营养二价阳离子在液泡中的积累, 这些二价离子包括 Ca、Mg、Mn、Zn, 现在已知这些被称作液泡金属²⁺/质子运载蛋白(CAX 运载蛋白)没有严格的离子选择特性, 其中一些看起来只对一定的金属有偏爱。到目前为止, 大约有 11 个不同的 CAX 基因从模式植物拟南芥中分离出, 大多数 CAX 基因所具有的 N 端基因调节区域已被分离, 有可能参入运载蛋白调控的磷酸化位点也进行了鉴定, 因此, 我们对这些调控蛋白的理解程度也与日俱增。

在过去的 20 年中, 植物基因工程迅速发展, 其中编码膜载体蛋白的 CAX 基因和其它基因的获得, 形成了新的植物基因工程技术思路, 包括过量表达(增加和加强特殊性状), 不同形式的基因抑制(如反义、共同抑制, RNAi), 以便除去一些性状。我们认为, 将镉封锁基因导入烟草的根系, 并让其过量表达, 可能是目前降低茎中镉的最好的方法。一般来说, 成功的过量表达方法所用基因应该来源于不同的物种。我们发现拟南芥 CAX 基因在烟草中很容易过量表达, 并且这些基因

的运载蛋白产物具有活性; 且拟南芥和烟草 CAX 的运载蛋白特性是类似的。许多非常成功的基因工程尝试, 奠定了特异组织操纵的方向, 并且可以通过采用组织特异启动子达到这一目的。这种方法具有易于避开植物代谢、发育和生理活动干扰的优势。最好例证是 patatin 启动子的应用(目的是在马铃薯块茎中高水平表达外源基因)和来源于白杨属植物木质部特异启动子的应用。后者的利用是将 2 个基因在白杨属植物中表达, 从而大量降低木质素含量(偶然增加了纤维素的含量), 低木质素是木浆生产的理想性状。在我们的试验中, 很明显 CAX 基因在根系中的特异表达是合乎需要的; 若整株表达可能整个植株包括叶片中的积累也增加; 干扰营养离子体内平衡的潜在可能性可以通过对光合成组织的影响得到提高。

我们设想把镉封锁在烟草根系中的努力, 始于最近发现的拟南芥 CAX 基因的利用, 该基因可以输送二价阳离子穿过液泡膜, 其目的是引入根系选择性基因, 将镉封锁在烟草根系细胞的液泡内, 以便减少镉在叶片中的积累, 从而减低叶片组织中镉含量。以上所叙述的方法可以用于其它作物中镉含量的降低。所发现的大多数 CAX 基因, 都是用来将植物基因转入缺乏输送二价阳离子的酵母突变体中, 以便让植物功能 CAX 基因在酵母菌中表达, 然后使酵母菌在含有该离子的培养基质中生长, 利用载体蛋白对该离子的抗性进行选择, 这些加上了植物基因的酵母菌突变体, 称为“补

体”酵母菌。补体酵母菌能够培养,并用于补体植物载体蛋白基因的分离与鉴定。CAX1 基因是用这种方法分离获得的第一个拟南芥 CAX 基因,其它的 CAX 基因是由补体酵母菌或者同源克隆获得的。

我们设计了一种方法,即制备来源于中度成熟烟草根的运载—竞争液泡膜气泡囊,并分析镉离子在其中运输的方法。来源于烟草成熟根的液泡膜气泡囊具有与燕麦苗液泡膜气泡囊类似的性状,这表明来源于不同物种的幼嫩和成熟的组织的液泡膜气泡囊是类似的。重新设立对照,成熟烟草根系液泡膜气泡囊可导致 Ca 运输的损失,但是镉运载蛋白活性加强(图 1)。利用表达了拟南芥 CAX2 基因的转基因烟草进行研究发现了类似的结果(未发表的资料)。重组包括溶解从根系磷脂中分离的液泡膜小泡囊的膜、稀释湿润剂和声波处理蛋白质脂质体的结果表明,烟草、燕麦和拟南芥 CAX 具有类似性,很可能它们的调控也具有类似性,如果这种观点被进一步证实,将大大地简化拟南芥基因导入烟草的过程。不同的 CAX 基因被导入烟草,所用启动子为 CaMV 35S (这一启动子可在烟草的根、茎和叶组织中大量表达),目的是证实是否液泡膜运载蛋白的加强增加了镉的积累潜力,同时还证明那一种 CAX 基因运载镉最有效和最具有选择性。我们应用了图 1 所描述的类似的方法,来调控二价阳离子在小液泡(来源于表达不同 CAX 基因的转基因植物)中的运载。从这些试验中我们选择了 2 个 CAX 基因(CAX2 和 CAX4),这 2 个基因在植物和酵母菌中都对镉运载蛋白具有选择性。现在我们只利用 CAX4 基因进行研究,以便能够集中研究在根系中的选择性表达,同时达到叶片中镉积累量低的目的。在开展镉运输和积累研究的同时,我们也在调控 Ca、Zn 和 Mn 的积累,如果植株的生长与发育保持正常,这些营养离子在体内必须达到平衡。到目前为止,有关镉的积累的研究表明,外源 CAX 基因的导入,可引起对镉的积累的修饰,但是可能只具有烟草特异性效果。

最近我们将 CAX4 基因导入烟草品种 KY14 中,由 3 个启动子基因调控,据报道这些启动子在植物根系中是特异表达的,而在其它植物组织中表达量很低。设想将这些基因在根系中表达可使镉被控制在植物的根系中,并抑制这一重金属向叶片组织中转移。基因表达的研究结果(Nothem 分析)表明,其中的一个启动子显示出良好的根/茎镉选择特性,比率为 5:1;另外 2 个启动子看起来似乎在烟草中表达很差,因此没有多大利用价值。我们正在对表达了 CAX4 基因的 KY14

烟株(由组织选择性启动子控制)进行研究。

我们深入了解了 CAX 运载蛋白基因的调控,同时研究修饰这些基因的方法,从而探讨调控和改变离子选择的可能性。结果表明,离子选择可以通过 CAX 基因的改变而得到改善,达到将镉封锁在根系中的目标,以避免体内营养离子失去平衡的负面影响,以及进一步达到提高作物产量和质量的目的,这方面的研究具有潜在的重要性。

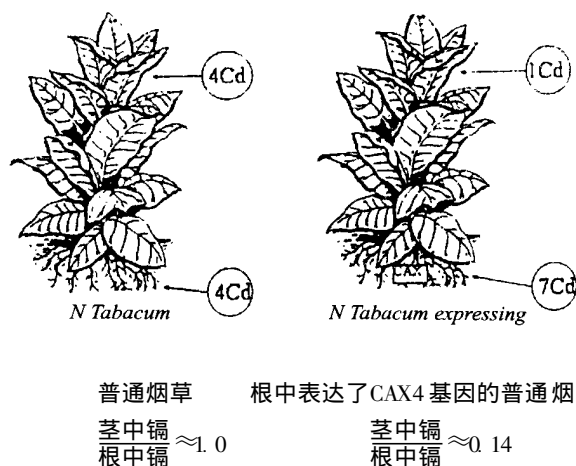


图 1 CAX4 基因在烟草中根选择性表达可导致镉离子在根中的积累增大,而在叶片中的积累减少

尽管我们的研究还处于初始阶段,但正在进行膜运载蛋白的分离和探讨液体培养条件下 CAX 基因工程种苗对烟草的影响。2004 年夏季开展田间种植条件下镉积累的研究,采用典型的烟草田间管理措施,在未加任何处理的烟田土壤上(这种条件是实验室中难以模仿的条件)进行试验,只有在这种条件下才能检测受调控的“真实世界”和“真实农业”的效果。最近的检测结果表明,土壤中镉的浓度范围为 $0.0001 \sim 0.2 \mu\text{mol}$,就镉对植物影响的研究揭示,91%的试验是在镉含量 $> 1 \mu\text{mol}$ 的水平下进行的,最高的为 $3 \mu\text{mol}$ 。在田间条件下,不是所有镉诱导的效果都是恒定的,因此人们寻求理解田间反应机理,应该集中在田间条件下进行研究,最终任何调控效果都应得到田间条件下的证实。

以上已经讨论了可以通过提高根系液泡膜中 CAX4 的水平,使根中镉运载蛋白能力加强,这一点还可以通过向液泡中引入额外的镉封锁能力来实现。因此,随着额外的镉进入液泡,应该获得足够的封锁配合基,这可以允许镉在根中较高的积累,也可以说是较少量的镉从根中逃逸,或者说是在普通烟田较低镉存在的情况下,导致较少量的镉转移到茎中,减少镉在叶片

中的积累。最初的生物化学研究表明, 这种方法是很有利用价值的。在未来的试验中, 准备探讨转双基因, 即 CAX 运载蛋白基因和液泡特异镉配合基基因的转育。

现代分子生物学的方法为发现控制离子吸收与积累、组织特异性等重要新基因提供了可能的方法。最近序列分析烟草 EST 文库和鸟枪法序列分析烟草基因组的研究, 使迅速发展的生物信息工具在寻找其它运载蛋白基因和离子运输所包含的转录因素中得到应用。如嵌合阻遏蛋白干扰, 允许人们将激活剂基因元件转变成阻遏蛋白元件, 这可以产生功能降低的突变体, 这种突变体可用于鉴定转录因素的功能。这种方法类似于基因抑制(基因沉默、反义抑制或者 RNAi)或者基因敲除, 它与基因沉默不同之处在于, 它是非常有效的大基因家族成员的抑制方法, 这种方法常常用于运载蛋白基因的抑制。同一基因家族单一基因的沉默效果常常导致不出现表现型, 因此, 嵌合阻遏蛋白干扰对于分离属于大基因家族的运载蛋白基因很可能特别有价值。

称作转录子的方法, 如微点阵技术, 用于在生长过程中基因表达的 mRNA 水平控制, 能够鉴定出在特定条件下的一系列基因。由于运载蛋白的不足, 很可能造成运载蛋白基因表达也不足, 从而限制这种方法在发现密切相关离子运载蛋白基因上的应用。然而, 微点阵技术正在以飞快的速度向前发展。

膜/蛋白的蛋白质组学的应用(对分离的膜进行大规模蛋白成分分析), 对于鉴定与离子运输有关的运载蛋白和调控因子受到一定限制, 这主要是由于含量低的原因。但是, 利用这种方法对叶绿体和线粒体运载蛋白进行研究获得了一些成功的例证。用 SDS-PAGE 从膜和细胞器中分离蛋白, 然后用质谱仪对其进行分析, 如对胰蛋白酶的分析, 以便决定新的蛋白与已知功能蛋白的相互关系。

另一发展方向帮助我们加速对植物运输过程离子通道的理解, 这一发展方向起源于离子通道药物的开发。离子通道看起来是镉离子穿过原生质膜的途径。

有关镉运输与积累的细胞水平的知识人们了解的很少。借助电压钳研究离子通道的自动化设备已商品化生产, 这基于机器人技术对膜片钳技术的推动, 据介绍这些技术可在 1 d 内完成数百项完整细胞运输记录。这种系统能够推进一系列转基因品系的原生质体离子通道的详细分析, 或者推进原生质体对一系列镉离子浓度反应的详细研究。

对于了解和调控污染物离子在植物体内离子平衡, 其它领域的研究和发展成果无疑也具有很重要的借鉴作用, 其中包括离子融合生殖诱变、植物营养控制、辐射诱变新类型的有关基因; 蛋白互作与基因组调控/蛋白质相互作用网络信息; 酶调控和信号传导的其它 2 个集中领域; kinomics(激酶学), 激酶对不同刺激、传感、调法和细胞反应的调控; 含磷蛋白领域, 这方面的研究是将全部含磷蛋白分离出来, 然后用质谱仪进行分析, 以便发现植物暴露在污染金属存在的环境下的调控蛋白。

最近遗传学和基因组学的研究表明, 有许多不同的运载蛋白可以将离子通过膜组织转移, 据估计拟南芥中有 5%~10% 这类基因编码运载蛋白。已知的和可以估计的这类液泡膜运载蛋白包括: 反向输送蛋白、通道、ABC 型运载蛋白、ATP 提供能量的离子泵、Nramp 运载蛋白、ZIP 运载蛋白、MATE 运载蛋白、CDF 运载蛋白, 等等。我们不知道其中的哪些与镉离子在根中的封锁有关, 或者与镉离子在烟草田中的积累有关。但是我们相信 CAX 运载蛋白工程的研究, 能够对其它运载蛋白的研究起到抛砖引玉的作用。目前 ABC-型运载蛋白 YCF1 看起来很可能是镉离子液泡封锁的控制蛋白, 因此可能我们将 CAX 和 YCF1 基因构建在一起, 共同导入烟草, 研究是否高度根封锁性状可以通过 piggy-backing 基因获得是很有趣的。我们认为将来特殊运载蛋白的基因工程, 可以根据烟草品种的特殊需要和栽培烟草对特殊条件的需要, 达到有害离子吸收的最小化, 甚至向营养离子的最优化目标来设计烟草的基因。