

通过叶绿体基因工程表达聚 3-羟基丁酸酯合成相关基因

张景昱^① 苏宁^② 张中林^② 赵华燕^① 朱生伟^① 宋艳茹^{*①}

(^①中国科学院植物研究所, 北京 100093; ^②中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081. * 联系人, E-mail: songyr@ns.ibcas.ac.cn)

摘要 构建了含 *phbB*, *phbA*, *phbC* 和 *aadA* 基因表达盒的叶绿体整合及表达载体, 通过基因枪轰击法转化烟草. 对具壮观霉素抗性的植株进行 PCR 和 Southern 等分析, 确证外源基因已整合到叶绿体基因组中, 同时测定了其同质化程度. Northern 点杂交、RT-PCR 分析结果表明, 叶绿体型转基因植株中目的基因在转录水平的表达明显高于核转化植株中相应基因, 并且未观察到基因沉默现象. 叶绿体型转基因植株还具有环境安全性好、底物丰富、产物区域化等优点, 表明叶绿体基因工程在转基因植物生产聚 3-羟基丁酸酯(PHB)方面极具潜力.

关键词 叶绿体基因工程 聚 3-羟基丁酸酯 叶绿体型转基因烟草 转录水平 基因沉默

聚 3-羟基丁酸酯(poly-D-3-hydroxybutyrate, PHB)及其他类型的聚 3-羟基链烷酸酯同属于聚酯类物质, 是自然界中多种细菌的碳源及能源储备物. 这种聚酯的物理化学特性与传统塑料相似, 而且具有生物可降解性, 如取代化学合成塑料将能从源头解决塑料废弃物引起的“白色污染”^[1]. 人们早已意识到生物可降解塑料的巨大商业价值, 并已实现微生物发酵法小规模生产 PHB, 但因价格过高, 在市场上无法与化学合成塑料竞争, 难以推广使用. 随着分子生物学的发展, 植物生物反应器的出现为此研究领域带来新的希望. 转基因植物能以二氧化碳为碳源、太阳能为能源合成目的产物, 大大降低生产成本, 为生产具有市场竞争力的新型生物可降解塑料提供可行途径.

人们最初通过农杆菌转化法在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)细胞质中建立 PHB 三步法合成途径. 利用电子显微镜观察到转基因植物细胞中存在 PHB 颗粒, 但产量过低, 而且由于底物乙酰 CoA 的严重消耗和 PHB 颗粒积累产生的毒害作用, 转基因植物出现生长延缓、种子产量下降等不良现象. 为改善转基因植物生产 PHB 的状况, 利用导肽将 PHB 合成相关基因产物定位于质体. 质体不但可为合成 PHB 提供充足的乙酰 CoA, 而且可避免 PHB 颗粒积累带来的负面影响. 借助产物定位法将 PHB 产量提高近 100 倍, 而且所得转基因植株形态和生长发育均无异常. 此后, 人们曾尝试在一系列不同类型细胞器中合成 PHB, 虽然取得一定进展, 但远未达到商业化生产水平.

大规模商业化生产要求转基因植物能够在确保环境安全的前提下高效、稳定地生产 PHB^[2].

我们已用种子特异性启动子和质体导肽实现 PHB 合成相关基因的定位表达, 但结果并不十分理想^[3]. 本研究采用新兴的叶绿体基因工程技术^[4], 希望在植物中为源于细菌的 PHB 合成相关基因提供适宜表达环境, 超量表达外源基因并消除基因沉默、基因逃逸现象, 提高转基因植物生产 PHB 的水平, 使“绿色”塑料能够早日进入市场. 为避免杂交带来的一系列问题, 我们构建了多基因载体, 使整个 PHB 合成体系通过一次转化导入植物体中.

1 材料与方法

(i) 叶绿体整合及表达载体的构建. 将 *phbB*, *phbA*, *phbC* 和 *aadA* 基因的表达盒(按此顺序排列)从质粒 pCAB^[5]中切下并导入 pTRV 质粒(本实验室保存)的两段同源片段之间. 在图 1 所示叶绿体整合及表达载体 pTRV-PHB 中, 烟草质体基因组两段基因 *rpl2-trnH-psbA* 和 *trnK-ORF509A* 为同源片段, *phbB*, *phbC* 和 *aadA* 基因由强质体启动子 Prm 驱动, *phbA* 基因由组成型启动子 PpsbA 驱动. 所有基因均受烟草或油菜 *psbA* 基因 3'端调控区的调控. 筛选标记基因为 *aadA*, 它可使转基因植株具有壮观霉素抗性.

(ii) 基因枪转化和抗性筛选. 大烟草(*Nicotiana tabacum* var Dayanyie)的叶绿体转化参照 Svab 和 Maliga^[6]的方法. 以幼嫩、无菌烟草叶片为受体,

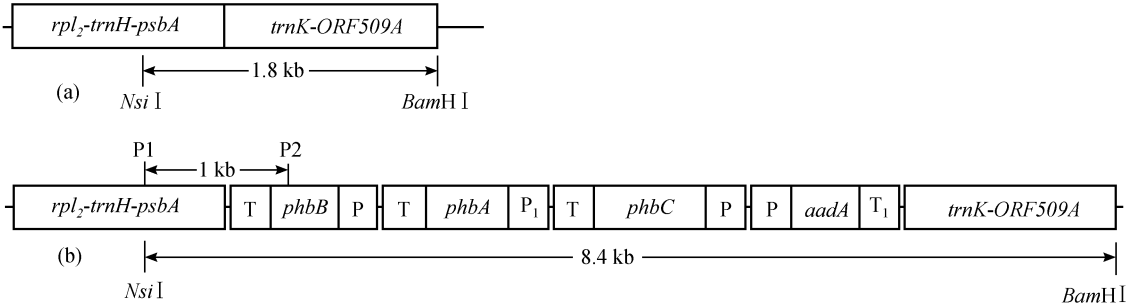


图 1 烟草叶绿体同源片段(a)及转化载体 pTRV-PHB (b)结构图

rpl2-trnH-psbA 和 *trnK-ORF509A* 示叶绿体基因组中两段基因, 在转化载体中作为同源片段; *phbA*, *phbB*, *phbC* 示 PHB 合成相关基因; P 示 16S rRNA 基因启动子 Prn; P₁ 示 *psbA* 基因启动子 PpsbA; T 示油菜叶绿体 *psbA* 基因 3' 端调控区; T₁ 示烟草叶绿体 *psbA* 基因 3' 端调控区; *aadA* 示壮观霉素抗性基因; WT 示野生型; P1, P2 为用于分析转基因植株同质化程度的 PCR 引物

所用基因枪为 BioRad PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System, 金粉颗粒的直径为 1.0 μm. 在真空中 94.28 kPa, 压强为 7.58 MPa 条件下进行轰击, 所得植株经两轮 500 mg/L 壮观霉素筛选以达到同质化.

(iii) PCR 检测. 以参考文献[7]提取的烟草叶片总 DNA 为 PCR 扩增模板. 用 *phbB* 基因引物 PrB1 (5'-TGACCATGACTCAGCGCATT-3') 和 PrB2 (5'-AGGCAAGCTTGTCAGCCCATAT-3') 进行 PCR 扩增, 以区分转基因植株和因突变获得抗性的植株; 用引物 P1 (5'-TAGCTGCAGAAGTAGGAATAATGG-3') 和 P2 (5'-GGTCTCTCCGGGCTATATCG-3') 进行 PCR 扩增, 以鉴定叶绿体型转基因植株的同质化程度.

(iv) Southern 杂交. 用高盐低 pH 法^[8]提取质体 DNA(ptDNA), Southern 杂交参照 Sambrook^[9]的方法进行. 烟草 ptDNA 经 *BamH* I, *Nsi* I 双酶切后于 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 用 785 型真空转移装置转移到尼龙膜上. 采用随机引物法以 [α -³²P]-dATP 标记探针.

(v) Northern 点杂交. 取总 RNA 样品约 70 ~ 100 μg 点于尼龙膜上. 将膜晾干并于 80℃ 烘烤 2 h 后, 与 DNA 探针杂交. 采用地高辛标记试剂盒标记探针^[9].

(vi) RT-PCR. 用 TriZol 提取总 RNA. 以 M-MLV 反转录酶合成的 cDNA 为模板, 扩增 *phbA*, *phbB*, *phbC* 基因. 以平行实验中扩增的烟草 *Histone3* 基因做内标, 根据其 PCR 产物量进行相应调整, 以确保 RT-PCR 分析中每个样品所取的模板量近似相等^[10].

2 结果

2.1 抗性烟草植株的获得及 PCR 分析

幼嫩无菌的烟草叶片经包裹 pTRV-PHB 质粒的金粉子弹轰击后于 MS 培养基培养 2 d, 切成小块并

转移到含 500 mg/L 壮观霉素的筛选培养基上. 1~2 个月叶片小块边缘长出绿色小芽, 继而长成幼苗. 平均每 3.75 个轰击过的叶片中可获得一株抗性植株. 对所得抗性植株进行第二轮筛选以达到同质化(整合外源基因的叶绿体基因组在筛选压的作用下完全取代野生型叶绿体基因组). 转基因植株中 *phbB* 基因整合情况的 PCR 检测结果显示, 71.43% 能得到预期产物 (780 bp) (图 2), 初步表明外源基因已经整合到这些植株中, 经 Southern 杂交确证在这些转化子中外源基因已整合到叶绿体基因组中. 本文中的转化频率低于同类报道^[6].

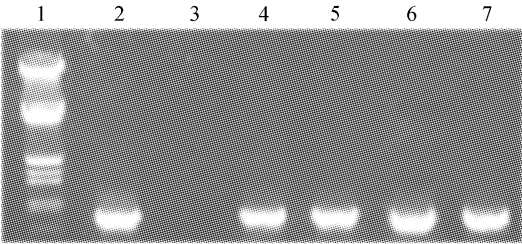


图 2 叶绿体型转基因烟草 PCR 检测
1 示λDNA (*EcoR* I/*Hind* III) 分子量标准; 2 示质粒 pTRV-PHB, 阳性对照; 3 示野生型烟草; 4~7 示叶绿体型转基因烟草 PB11, PB21, PB32, PB41

2.2 转基因烟草 Southern 印迹分析

为了检测外源基因是否已经整合到叶绿体基因组中, 对转基因烟草进行 Southern 印迹分析. 从叶绿体转化烟草和野生型烟草中提取质体 DNA (ptDNA), 分别以 *phbA*, *phbB*, *phbC* 基因为探针进行杂交. 图 1 表明如果有外源基因整合, 每一个杂交反应都应该产生 8.4 kb 大小的片段. 图 3 显示, PCR 阳性的转化子均能产生与预期大小一致的条带, 而野生型烟草不产生任何杂交信号, 表明 3 个 PHB 合成基因的确已导入叶绿体基因组中.

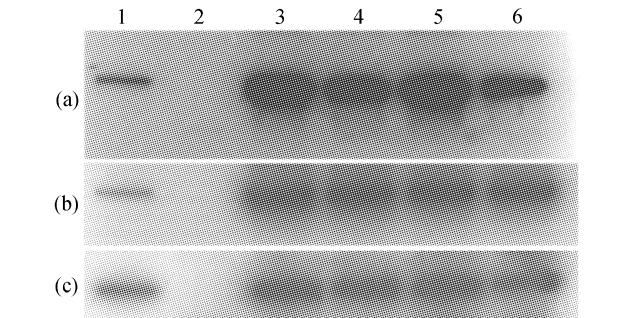


图 3 以 PHB 合成相关基因为探针对叶绿体型转基因烟草的 Southern 印迹分析

(a)~(c) 以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 标记的 *phbA*, *phbB*, *phbC* 基因为探针分别对转基因烟草叶绿体 DNA 的 Southern 杂交检测. 1 示质粒 pTRV-PHB 阳性对照; 2 示野生型烟草; 3~6 示叶绿体型转基因植株 PB11, PB21, PB32, PB41

2.3 叶绿体型转基因烟草同质化程度的鉴定

采取两种方法进行同质化鉴定. 首先对转基因植株进行 PCR 分析, 引物一端设在同源片段上, 另一端在 *phbB* 基因上. 对于有外源基因整合的叶绿体基因组应可扩增出 1.0 kb 的 PCR 产物, 野生型叶绿体基因组则无 PCR 产物(图 1). 二次筛选后转基因植株的 PCR 产物明显增多, 表明其同质化程度得到提高(图 4). 为了进一步准确地测定叶绿体型转基因植株的同质化情况, 以同源片段为探针进行 Southern 印迹分析. 由图 1 可以看出, 转基因烟草应产生 8.4 kb 的杂交条带, 而野生型烟草应产生 1.8 kb 的杂交条带. PB11, PB32 和 PB41 仅产生 8.4 kb 的杂交条带, 表明整合外源基因的叶绿体基因组已经基本上完全取代野生型叶绿体基因组, 每一叶细胞中外源基因拷贝数高达上万份. PB21 不但产生 8.4 kb 的杂交条带, 而且产生 1.8 kb 的杂交条带, 表明植物体内还存在部分野生型叶绿体基因组, 尚未达到完全同质化(图 5). 同时, 此结果进一步证明 4 个外源基因的表达盒都已整合到叶绿体基因组中.

2.4 Northern 点杂交

对转基因烟草进行 Northern 点杂交的结果表明,

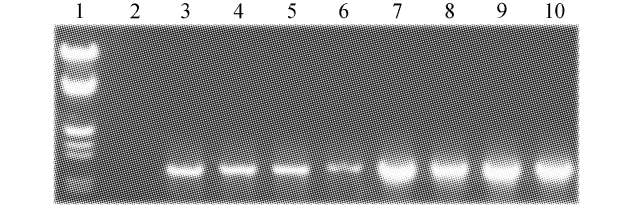


图 4 叶绿体型转基因烟草同质化程度的 PCR 分析
1 示 λ DNA(*EcoR* I / *Hind* III), 2 示野生型烟草, 3~6 示经第一轮筛选的叶绿体型转基因烟草, 7~10 示经第二轮筛选的叶绿体型转基因烟草

所获得的转基因植株中 *phbA*, *phbB* 和 *phbC* 3 个目的基因在转录水平均可表达, 无基因沉默现象(图 6). 但以传统核转化体系表达 PHB 合成基因时, 基因沉默现象严重, 目的基因表达的概率较低^[11].

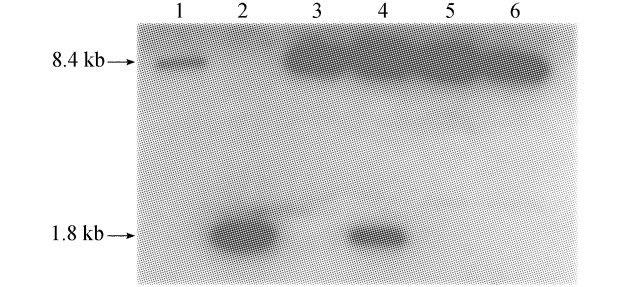


图 5 叶绿体型转基因烟草同质化程度的 Southern 印迹分析
1 示质粒 pTRV-PHB 的阳性对照; 2 示野生型烟草; 3~6 示叶绿体型转基因烟草 PB11, PB21, PB32, PB41

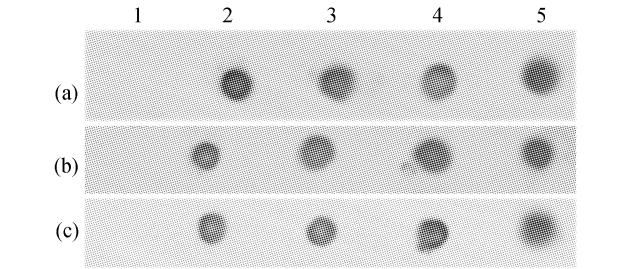


图 6 转基因烟草 Northern 点杂交分析
(a)~(c) 地高辛标记的 *phbA*, *phbB* 和 *phbC* 基因为探针(分别与烟草总 RNA)的点杂交分析. 1 示野生型烟草; 2~5 示转基因烟草 PB11, PB21, PB32, PB41

2.5 RT-PCR 分析

在 RT-PCR 中设置平行实验, 根据扩增烟草 *Histone3* 基因的 PCR 产物量调整相应样品模板量, 以确保 RT-PCR 分析中每个样品所取的模板量近似相等, 因此叶绿体转化型植株和相应核转化型植株可以在转录水平进行比较. 具 PHB 合成体系的核转化型烟草由本实验室保存, 其中 PHB 合成相关基因的产物由导肽定位于叶绿体, 因此 PHB 合成和积累的部位也是叶绿体^[11]. RT-PCR 检测表明, 叶绿体型转基因烟草中 PHB 合成基因的表达水平明显比核转化型植株中相应基因的表达水平高, 即使未同质化植株 PB21 的表达水平也高于核转化植株. 这说明叶绿体型转基因植物能够为 PHB 合成基因提供较合适的表达环境. 此外, 已同质化的转基因烟草在转录水平的表达要优于未同质化的转基因烟草(图 7), 表明外源基因在植物细胞中的拷贝数对基因表达量有一定影响.

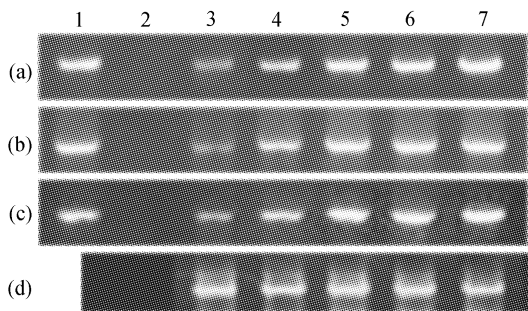


图 7 转基因烟草的 RT-PCR 分析

(a)~(c) *phbA*, *phbB*, *phbC* 基因的 RT-PCR 检测. 1 为正对照, 相应基因为扩增模板; 2 为负对照, H_2O 为扩增模板; 3 为核转化植株; 4~7 为叶绿体型转化植株 PB21, PB11, PB32, PB41. (d) *Histone3* 基因的 RT-PCR 检测, 内标. 2 为负对照, 3~7 为相同样品检测

3 讨论

叶绿体基因工程是近年来随着植物遗传转化技术的发展刚刚兴起的生物技术. 由于它能解决传统基因工程无法克服的一些问题, 因而自问世以来迅速在基础研究和实践应用等方面显示出旺盛的生命力, 尤其适用于以植物为生物反应器合成目标产物的商业化生产^[3]. 为探讨将此技术引入转基因植物生产生物可降解塑料这一研究领域的可行性, 我们将 PHB 合成相关基因整合到叶绿体基因组中, 检测其表达状况. 迄今为止, 叶绿体型转基因植物中一般仅导入 1 或 2 个外源基因表达盒, 而本研究中同时导入 4 个外源基因表达盒, 因而需将一段 6.8 kb 的 DNA 片段通过同源重组定点整合到叶绿体基因组中. 由于整合的外源片段过大, 导致转化频率低于同类实验, 但一次性导入多个外源基因并没有带来其他操作不便. 含有 PHB 合成系统的转基因烟草顺利达到同质化, 其形态结构和生长发育均无异常现象.

对所得转基因植株进行 Northern 点杂交, 结果表明, 导入的目的基因均能在转录水平表达, 核转化中经常发生的“基因沉默”现象^[11]在此并未出现. 其主要原因可能是: (1) 4 个外源基因以定点整合的方式同时插入叶绿体基因组中, 消除了“位置效应”; (2) 在表达载体中应用不同的质体启动子, 减小“共沉默”发生的概率. 通过 RT-PCR 对叶绿体型转基因烟草做进一步检测, 发现目的基因的表达水平明显比核转化植株中相应基因的表达水平高. 这可能是因为叶绿体基因组拷贝数高, 达到同质化后整合于其中的外源基因在一个叶细胞中的拷贝数可高达上万份, 为高效表达创造条件; 而且叶绿体的转录、翻译机制都具有明显原核特征, 能为源于细菌的 PHB 合成基因提供理想的表达环境. 利用叶绿体基因工程

生产 PHB 还具有以下优点: 叶绿体遵循母系遗传方式, 因此导入其中的 PHB 合成相关基因不会通过花粉传播, 环境安全性好; 叶绿体中存在多种代谢反应, 可以为合成 PHB 提供丰富底物; 在叶绿体中合成 PHB 直接实现产物区域化, 便于提取纯化. 这些都表明叶绿体转化体系适合用于转基因植物生产 PHB.

大规模生产“绿色”生物可降解塑料要求转基因植物以高效、稳定、无环境污染的方式生产 PHB. 尽管我们的研究表明叶绿体转化体系确实具有这方面的潜力, 但要将这一技术真正用于商业化生产仍有许多问题需要解决, 如需要在多种植物中建立叶绿体转化体系以拓宽受体植物范围; 需要提高外源基因导入叶绿体基因组的频率; 需要简化确定转基因植株是否达到同质化的方法等以降低生产成本. 目前, 本实验室正开展建立有效鉴定体系和叶绿体型转基因植物 PHB 产物检测等方面的研究, 我们相信在不久的将来应用转基因植物大规模生产生物可降解塑料的设想一定能实现.

致谢 本工作为国家高技术研究发展规划(批准号: 101-04-03-04)和国家自然科学基金(批准号: 59673008)资助项目.

参 考 文 献

- 1 van der Walle G A, de Koning G J, Weusthuis R A, et al. Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, 71: 263 ~ 291
- 2 Hanley Z, Slabas T, Elborough K M. The use of plant biotechnology for the production of biodegradable plastics. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(2): 45 ~ 46
- 3 叶梁, 李枫, 宋艳茹. 种子特异性表达载体 pSCB 和 pSCAB 的构建及表达聚羟基丁酸合成相关基因的转基因油菜的获得. *科学通报*, 2000, 45(5): 516 ~ 521
- 4 Heifetz P B. Genetic engineering of the chloroplast. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(7): 1688 ~ 1691
- 5 张中林, 张景昱, 李铁女, 等. 油菜叶绿体基因组同源重组片段的克隆及 *phb* 基因定点整合载体的构建. *植物生理学报*, 2001, 27(3): 235 ~ 242
- 6 Svab Z, Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 913 ~ 917
- 7 Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349 ~ 1351
- 8 Gong X S, Zeng F H, Yan L F. An efficient method for the purification of chloroplast DNA from higher plants. *J Wuhan Botanical Res*, 1994, 12(3): 277 ~ 280
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 362 ~ 373, 463 ~ 490
- 10 Luo P, Wang G D, Chen X Y. Isolation and expression analysis of two cDNAs encoding C4H homologues from *Gossypium arboreum*. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(1): 77 ~ 81
- 11 Zhang J Y, Ye L, Li L, et al. Obtainment of transgenic tobacco harboring *phbA*, *phbB* and *phbC* genes by twice transformation. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(1): 59 ~ 62

(2002-01-21 收稿, 2002-04-15 收修改稿)