

nifH 基因能够在高等植物叶绿体原核环境中表达

张中林^① 钱凯先^② 沈桂芳^①

(①中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ②浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027. E-mail: zzlmail@yahoo.com)

摘要 以高等模式植物烟草为材料, 对固氮酶铁蛋白基因 *nifH* 在叶绿体中的表达进行了研究. 构建了 *nifH* 基因叶绿体转化载体, 并利用基因枪轰击法对烟草叶片进行了转化. 基因枪轰击后, 共获得 6 株壮观霉素抗性再生植株. PCR 检测及 Southern 杂交鉴定结果表明, *aadA* 和 *nifH* 等外源基因已整合进入受体植物叶绿体基因组中; Western 免疫沉淀法的测定结果则证明, *nifH* 基因能够在叶绿体原核环境中表达.

关键词 叶绿体 *nifH* 基因 表达

如何使非豆科植物能够进行自生固氮, 一直是生物固氮领域的研究热点和难点. 虽然早在 20 多年前, 研究人员就已成功地将 *nif* 基因簇从 *Klebsiella pneumoniae* (Kp) 中转移到 *E. coli*, 从而产生了第 1 株能固氮的基因工程菌^[1]. 但由于固氮作用是一整套极其复杂的过程, 涉及的基因多达 16~20 个(它们以多顺反子的形式组成操纵子结构), 加之所有固氮基因均来源于原核生物, 与高等植物基因组内的真核环境不相亲和, 多年来, 非豆科植物生物固氮研究进展较慢.

叶绿体起源于蓝细菌, 其基因的组织 and 表达形式(如多顺反子转录、功能相近的基因聚合在一起组成操纵子结构等)均类似于原核生物, 因而可作为在高等植物中表达 *nif* 基因的候选场所^[2]. 其次, 固氮作用是一个极度耗能的过程, 叶绿体中光合作用产生的大量 ATP 和 NADPH^[3]可直接为固氮过程提供充足的能量来源. 此外, 叶绿体是氨基酸合成和氨同化的主要场所, 这就为固氮过程所固定氮的释放提供了良好的环境条件^[4]. 基于上述理由, 研究人员曾提出将叶绿体改造成为光合固氮体的构想^[5].

本研究正是在这样的前提下, 研究了利用叶绿体原核环境表达固氮酶铁蛋白基因 *nifH* 的可行性. 以期通过将 *nif* 基因导入高等植物叶绿体而非核基因组, 从而为非豆科植物生物固氮研究探索出一条新途径.

1 材料与方法

(i) 叶绿体转化载体 pTRCH205. 含目的基因表达盒 *psbA5'-nifH-psbA3'* 和选择标记基因表达盒 *Prrn-aadA-TpsbA* 以及两段烟草叶绿体基因组同源重组片段 *rpl2-trnH-psbA*, *trnK-ORF509A*. 具体构建过

程参见文献[6]. 受试植物 (*Nicotiana tabacum* cv. Dayanye) 由中国农业科学院烟草研究所提供.

(ii) 基因枪操作程序及转化再生植株叶绿体 DNA 提取方法. 参见文献[7].

(iii) PCR 及 Southern 杂交. 参见 Sambrook 等人^[8]的方法.

(iv) 植物叶片总蛋白提取. 取 1 g 烟草叶片置于小研钵中, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)(140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3~7.4), 充分研磨, 加入等体积 2 × SDS 凝胶加样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油); 将样品置于沸水浴中加热 10 min; 于室温以 10000 × *g* 将样品离心 10 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳.

(v) Western 检测. 采用 Promega 公司 ProtoBlot[®] II AP System 试剂盒, 并按其说明书进行操作. 兔抗 *Klebsiella pneumoniae* (Kp) 铁蛋白抗体由纯化的铁蛋白免疫日本大耳白兔制得.

(vi) 转基因植株受粉杂交及种子萌发试验. 方法参见文献[9].

2 结果

2.1 叶绿体转化及再生植株 PCR 检测

叶绿体转化载体 pTRCH205 结构如图 1 所示. 在转化载体 pTRCH205 中, 目的基因 *nifH* 受来自于水稻的叶绿体 *psbA* 基因启动子(*psbA5'*)和终止子(*psbA3'*)调控; 选择标记基因 *aadA* 则来自于烟草的 16S rRNA 启动子(*Prrn*)和 *psbA* 基因终止子(*TpsbA*)调控.

基因枪法分别以 pTRCH205 的线性和超螺旋

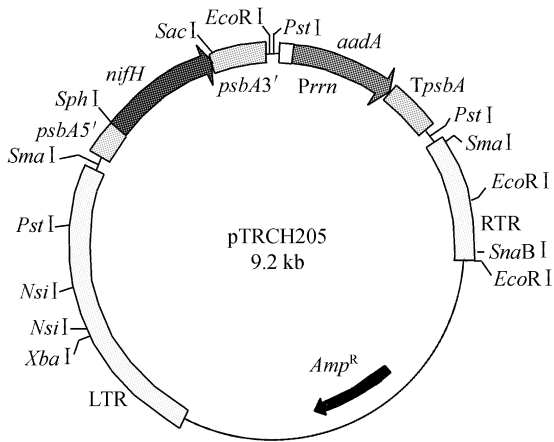


图 1 叶绿体转化载体 pTRCH205 结构图

LTR 示左侧同源片段 *rpl2-trnH-psbA*, RTR 示右侧同源片段 *trnK-ORF509A*

DNA 对烟草叶绿体进行了转化. 最终共获得 6 株壮观霉素抗性植株. 分别标记为 205H(线), 205H(1), 205H(2), 205H(3), 205H(4)和 205H(5).

根据 Chinault 等人^[10]发表的 *aadA* 编码序列, 合成一对 PCR 引物: *aadA* 引物 1: 5'-atg agg gaa gcg gtg atc gcc gaa-3'(24 nt), *aadA* 引物 2: 5'-aag ctt att tgc cga cta cct t-3'(22 nt). 分别以转基因烟草和未转基因的野生型烟草叶绿体 DNA 为模板, 用上述引物 PCR 扩增选择标记基因 *aadA*; 同时, 以 pTRCH205 质粒 DNA 为正对照. PCR 扩增结果见图 2.

在所有 6 株转基因烟草中, 有 5 株扩增出了约 0.8 kb 的 *aadA* 基因片段, 其条带大小与正对照 pTRCH205 质粒 DNA 所扩增出的条带完全相同; 而以未转基因的野生型烟草叶绿体 DNA 为模板的 PCR 反应则未扩增出任何可见的 DNA 条带。在相同的条件下, 壮观霉素抗性植株 205H(2)未能扩增出

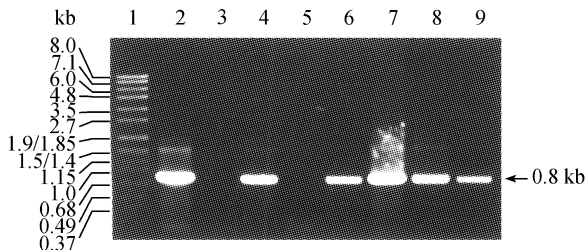


图 2 以转化再生植株叶绿体 DNA 为模板 PCR 扩增选择标记基因 *aadA*

1 示分子量标准 *Spp* I DNA/*Eco*R I; 2 示正对照, 质粒 pTRCH205;
3 示负对照, 未转基因的野生型烟草; 4~9 示转化再生植株 205H(1),
205H(2), 205H(3), 205H(4), 205H(5)和 205H(线)

0.8 kb 的片段, 表明 *aadA* 基因没有整合进入该植株的基因组中. 它之所以在含有高浓度壮观霉素的 MS 抗性培养基中能够再生, 可能是由于在转化过程中, 叶绿体 16S rRNA 的某些碱基发生了突变^[11, 12] (860 C→A, 1139 C→U), 从而产生了壮观霉素/链霉素抗性.

上述实验结果初步证明, 选择标记基因 *aadA* 在除 205H(2)以外的所有再生植株中均得到了整合.

2.2 外源基因在叶绿体基因组中的整合及同质化程度鉴定

为了验证外源基因是否确已整合进入烟草叶绿体基因组中并检测转基因植株的同质体化程度, 根据烟草叶绿体基因组全序列资料^[13], 设计合成了如下引物: CHR 引物 1: 5'-cca gtt aca gaa gcg acc cca tag g-3' (25 nt), CHR 引物 2: 5'-tga tct ggc gaa tta tca atg att c-3' (25 nt). 它们分别位于叶绿体基因组中外源基因插入位点(*Bgl* II 位点)两侧的同源片段(chloroplast homologous region, CHR)上, 两者相距约 0.6 kb(图 3).

当以烟草叶绿体 DNA 为模板, 用上述同源片段引物进行 PCR 扩增时, 野生型烟草应扩增出一条 0.6 kb 的 DNA 条带; 完全同质化的转基因烟草植株, 即转化叶绿体完全取代野生型叶绿体的植株, 应扩增出一条 3.4 kb 的条带; 而外源基因虽已整合进入叶绿体基因组但尚未达到完全同质化的转基因植株, 由于转化叶绿体和未被转化的野生型叶绿体同时存在, 所以应该能够扩增出 0.6 和 3.4 kb 两个条带。

PCR 扩增产物的电泳结果如图 4 所示, 其中负对照野生型烟草叶绿体 DNA 只扩增出了一条 0.6 kb 的条带, 正对照质粒 pTRCH205 扩增出了一条 3.4 kb 左右的 DNA 条带; 泳道 4~6 所示分别为转基因植株 205H(1), 205H(4)和 205H(5)经过 1 轮壮观霉素抗性筛选后的叶绿体 DNA 扩增结果, 泳道 7~9 为相应植株经过 3 轮次抗性筛选及 6~10 次继代再生后叶绿体 DNA 的 PCR 扩增结果. 只经过一轮次抗性筛选的 205H(1), 205H(4)和 205H(5)出现了 0.6 和 3.4 kb 两个条带, 且 0.6 kb 条带相对较强. 这说明此时的转化株为杂合体, 既含有已插入外源基因的转化叶绿体又含有未被转化的野生型叶绿体, 而且野生型叶绿体居于主导地位.

经过3轮次抗性筛选及多轮次继代后,转基因植株体内野生型叶绿体逐渐减少直至完全被转化叶绿体所取代,表现在PCR产物中含有外源基因的3.4 kb

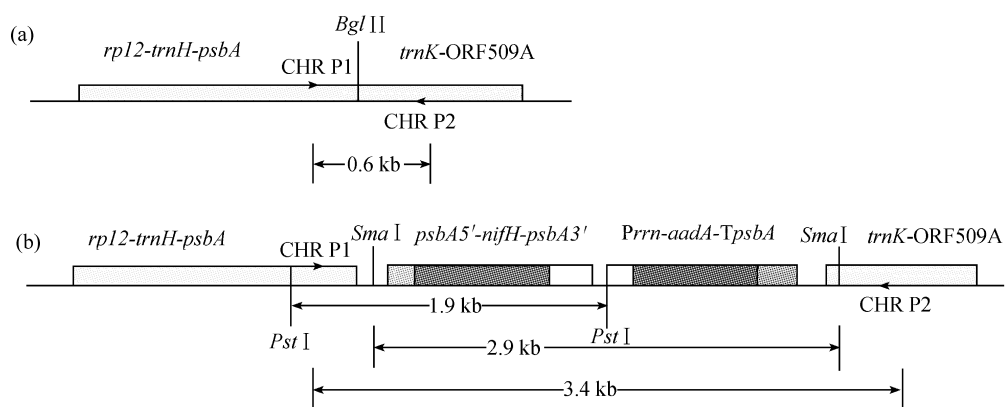


图 3 叶绿体同源片段、外源基因、PCR 引物及部分酶切位点的结构和位置示意图

(a) 外源基因整合前，两个 PCR 引物 CHR P1 和 CHR P2 之间的距离为 0.6 kb；(b) 外源基因整合后，两个 PCR 引物之间的距离扩大为 3.4 kb

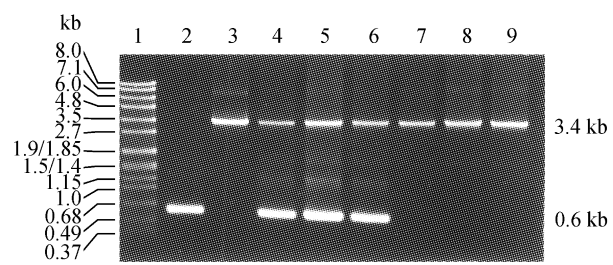


图 4 转化再生植株同质体化程度的 PCR 检测

1 示分子量标准 *Spp* I DNA/*Eco*R I；2 示负对照，未转基因的野生型烟草；3 示正对照，质粒 pTRCH205；4~6 示经 1 轮抗性筛选的转化再生植株 205H(1)，205H(4)和 205H(5)；7~9 示经 3 轮抗性筛选的转化再生植株 205H(1)，205H(4)和 205H(5)

条带相对增强，而野生型叶绿体的 0.6 kb 条带明显减弱甚至消失。这说明外源基因确实得到了整合，而且的确是整合到了叶绿体基因组中。

此外，本研究还选取了 PCR 信号较强的两株转基因烟草 205H(1)和 205H(4)，以目的基因 *nifH* 为探针，进行 Southern 分子杂交鉴定。图 5 为烟草叶片叶绿体 DNA 分别以 *Sma* I 和 *Pst* I 单酶切的 Southern 杂交结果。两种酶切处理的负对照均未出现任何杂交信号，而 205H(1)和 205H(4)则分别产生了与各自正对照相同的 2.9 和 1.9 kb 阳性杂交带(参照图 3(b))。

所有上述实验结果都确凿地证明，包括 *aadA* 和 *nifH* 在内的外源基因均已整合进入转基因植株叶绿体基因组中。

2.3 叶绿体原核环境适于 *nifH* 基因表达

提取转基因植株 205H(1)，205H(4)和 205H(5)叶片总蛋白，用兔抗 *Kp* 铁蛋白抗体进行 Western 检测。3 株转基因烟草均检测到了与正对照纯化 *Kp* 铁蛋白电泳迁移率相同的特异蛋白条带，表明 *nifH* 基因表

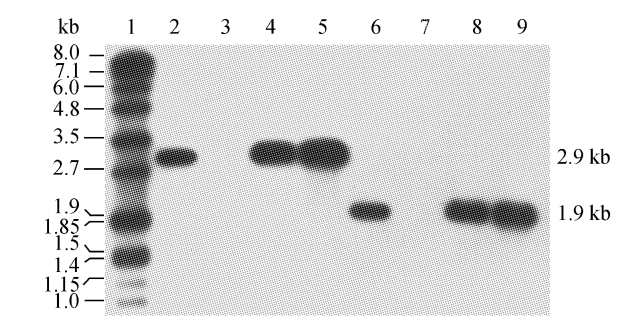


图 5 以目的基因 *nifH* 为探针的 Southern 杂交

1 示分子量标准 *Spp* I DNA/*Eco*R I；2 示质粒 pTRCH205 DNA/*Sma* I；3 示野生型烟草叶绿体 DNA/*Sma* I；4 和 5 示转化再生植株 205H(1)和 205H(4)叶绿体 DNA/*Sma* I；6 示质粒 pTRCH205 DNA/*Pst* I；7 示野生型烟草叶绿体 DNA/*Pst* I；8 和 9 示转化再生植株 205H(1)和 205H(4)叶绿体 DNA/*Pst* I

达产物(NifH)的分子量大小与标准 *Kp* 铁蛋白的分子量相同，约为 32 ku。而在负对照未转基因的野生型烟草的相应位置没有出现任何可见的信号(图 6)。

研究表明，固氮酶及其两组分铁蛋白和钼铁蛋白都对氧十分敏感。本工作中 *nifH* 基因在 *psbA* 启动子的驱动下能够在叶绿体中表达，说明作为铁蛋白单一亚基组分的 NifH 有可能是氧稳定的。但也不能排除由于氧的浓度低从而导致能够检测出有 NifH 存在的可能性。因为实验的取材是在由黑暗转变为光照的初期进行的，此时光合作用强度较弱。另一方面也说明 *psbA* 启动子可能不是严格的光诱导型启动子。总之，本研究的结果证明了在高等植物叶绿体中，完全具备合成固氮酶 *nifH* 基因表达产物所需的各种元素，而且在合适的条件下，原核 *nifH* 基因也能够

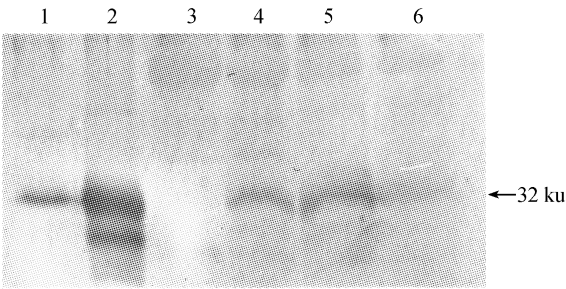


图 6 叶绿体转基因植株的 Western 检测
1 和 2 示正对照, 纯化的 *Kp* 铁蛋白(20, 200ng); 3 示负对照, 野生型烟草; 4~6 示叶绿体转基因烟草 205H(1), 205H(4)和 205H(5)

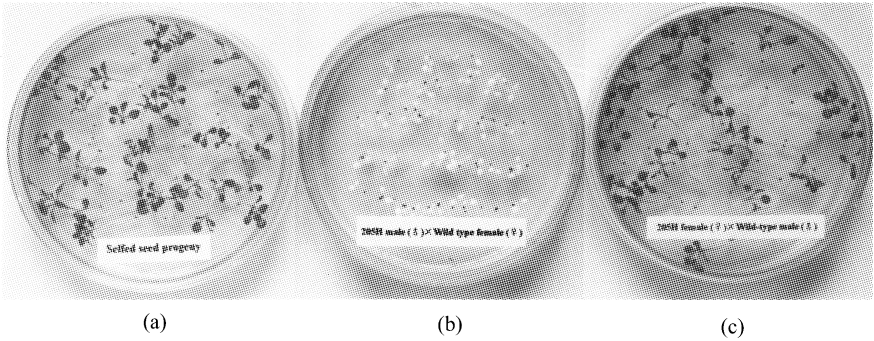


图 7 外源基因在叶绿体转基因植株中遵循母系遗传规律
(a) 叶绿体转基因植株自交种子; (b) 转基因烟草 205H(♂)×野生型烟草(♀); (c) 转基因烟草 205H(♀)×野生型烟草(♂)

上述结果表明, 外源基因在叶绿体中遵循单亲母系遗传规律, 即遗传性状通过母本直接传递给子代. 在核转化中, 转基因后代的表型遵循孟德尔遗传规律, 再生植株自交后代抗性幼苗与敏感幼苗的比率为 3 : 1, 在互交后代中, 无论转基因植株作母本还是作父本, 其比率都是 1 : 1.

3 讨论

本研究虽然能够在叶绿体中检测出有 NifH 的表达, 但要使其正确组装并形成有功能活性的铁蛋白, 尚有大量的工作要做. 首先, 在固氮生物中, 形成有功能活性的铁蛋白还需要有 *nifS* 基因和 *nifU* 基因产物的参与, 它们在 [Fe-S] 簇的形成过程中发挥作用^[14~16]; 而另一种固氮基因 *nifM* 的产物(NifM)则对铁蛋白的活性和稳定性都是十分重要的, 一般认为 NifM 在铁蛋白保持正确构象方面可能起类似分子伴侣的作用, 但其确切功能尚不十分清楚. 形成有功能活性的钼铁蛋白更是需要有 10 余个 *nif* 基因产物的参与. 其次, 叶绿体是进行光合作用的场所, 在这个过程中, 不仅会产生大量的能量, 同时还释放出氧气.

叶绿体中正确翻译和表达.

2.4 外源基因在叶绿体转基因后代中遵循母系遗传规律

为了研究外源基因是否得到稳定遗传及其在转基因植物后代中的遗传规律, 本研究选择以转基因植株 205H(4)的 T₁ 代杂交和自交种子进行壮观霉素抗性萌发试验. 以 205H(4)为母本、野生型烟草为父本的 F₁ 代种子在抗性培养基上都呈绿色; 而野生型为母本、转化株为父本的互交后代则对壮观霉素敏感(图 7).

而组成固氮酶的铁蛋白和钼铁蛋白均对氧十分敏感. 因此, 若想使叶绿体同时兼有光合和固氮的功能, 固氮酶的氧敏感性问题必须妥善解决. 这可通过尝试将 *nif* 基因置于受黑暗诱导的启动子的调控之下, 使其只在夜间表达, 从而避免光合放氧对固氮酶的损害来得以实现. 最近在高等植物叶绿体中已发现了受黑暗诱导表达的蛋白^[17], 这就为上述设想的实现提供了一种可能的途径.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39400067).

参 考 文 献

1 Dixon R, Postgate J R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*, 1972, 237: 102~103

2 Merrick M, Dixon R. Why don't plants fix nitrogen. *Trends in Biotechnology*, 1984, 2: 162

3 Quesada A, Gómez-García I, Fernández E. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 463~464

4 Dixon R, Cheng Q, Shen G F, et al. *nif* gene transfer and expression in chloroplasts: Prospects and problems. *Plant and Soil*,

1997, 194: 193–203

5 Maliga P. Towards plastid transformation in flowering plants. Trends in Biotechnology, 1993, 11: 101–107

6 张中林, 钱凯先, 沈桂芳. 同质化叶绿体转基因植株的获得. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(6): 620–626

7 张中林, 任延国, 沈燕新, 等. 苏云金芽孢杆菌晶体毒蛋白基因在烟草叶绿体中的表达. 遗传学报, 2000, 27(3): 270–277

8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9.31~9.58, 14.1~14.33

9 张中林, 陈曦, 钱凯先, 等. *Bt* 叶绿体转基因植株的抗虫性及后代表型分析. 植物学报, 1999, 41(9): 947–951

10 Chinault A C, Blakesley V A, Roessler E, et al. Characterization of transferable plasmids from *Shigella flexneri* 2a that confer resistance to trimethoprim, streptomycin, and sulfonamides. Plasmid, 1986, 15: 119–131

11 Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8526–8530

12 O’Neil C, Horváth G V, Horváth É, et al. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. Plant J, 1993, 3(5): 729–738

13 Shinozaki K, Ohme M, Wakasugi T, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. EMBO J, 1986, 5: 2043–2049

14 Zheng L, White R, Cash V, et al. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 2754–2758

15 Zheng L, Dean D. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulphur cluster. J Biol Chem, 1994, 269: 18723–18726

16 Zheng L, White R, Cash V, et al. Mechanism for the desulfurization of *L*-Cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. Biochemistry, 1994, 33: 4714–4720

17 Shimada Y, Wu G J, Watanabe A. A protein encoded by *din1*, a dark-inducible and senescence-associated gene of radish, can be imported by isolated chloroplasts and has sequence similarity to sulfide dehydrogenase and other small stress proteins. Plant Cell Physiol, 1998, 39(2): 139–143

(2000-12-26 收稿, 2001-04-17 收修改稿)