

## 文献综述

## 植物遗传工程概况

林 忠 平                  尹 光 初

(中国科学院植物研究所) (黑龙江省农业科学院大豆研究所)

## 前                  言

所谓遗传工程,简单说就是将具有特异遗传信息的外源 DNA 送入受体生物,使能表达、遗传,达到预期的工程设计效果,由于分子生物学的实验技术,如分子克隆(molecular cloning)、DNA 重组技术(DNA recombinant technics),大大推动了遗传工程的研究:遗传工程的研究从一开始就鲜明地展示出直接为生产服务的目的。1976年首先在美国成立基因工程公司。1977年用基因工程技术生产一个多肽激素(生长激素释放因子);1978年生产了人的胰岛素,1979年生产了一种人的生长激素;1980年起生产干扰素的研究更是迅速,目前已达到实际应用水平。基因工程生产的干扰素不但产量高,而且具有与天然干扰素同一抗原性,具有抗病毒、抗细胞生长、激活天然杀伤细胞等生物功能。

遗传工程在农业方面前景如何呢?至今国外的基因工程公司已开始生产牛的生长激素、疫苗。预计将为改善肉奶和防治牲畜疾病等方面开辟一条新的道路。然而人们期望更多的是,这个新技术能够导致粮食的增加和营养价值的改善。去年6月美国基因工程总裁 R. A. Swanson 访华时还谈到“可能将培育出适应性广、抗病力强和对化学毒剂耐受力大的粮食新品种。许多植物通常产生少量用于自我防御的多肽,对侵袭的病虫害起杀伤作用。利用重组 DNA 方法,可使这些植物增加这类多肽的产量,从而加强抗病力。未来的新品种,还可能出现能解除除草剂毒性的酶类。”

据统计现在美国的基因工程工厂超过400家。其主要成就是通过细菌来实现的。植物的基因工程还存在许多困难的情况,但是从科学研究的重心和趋势来看,植物遗传工程却更加引人注目。今年初美国科学促进协会(AAAS)的年会上,基因工程的论文中植物基因工程和农业基因工程的论文占80%以上。

此外,与遗传工程有关,或由遗传工程派生的遗传操作技术(genetic manipulation)和生物工艺学(biotechnology)大大吸引了植物细胞生物学工作者的兴趣。他们将植物细胞,经过酶解作用,除去细胞壁,获得原生质体。原生质体便于进行各种遗传操作,使细胞包含新的基因组。而后再将具有特定遗传类型的细胞株培养成植株。

## 植物遗传工程的早期工作

植物遗传工程的早期研究包括这样一些工作:利用幼苗、种子、离体器官进行核酸

的摄取,研究影响摄取过程的内外因素、核酸进入植物细胞后的命运以及植物性状变异等。这些工作中相当大一部分由于实验系统和使用技术不够严格,没有得出令人信服结论。

早期证明 DNA 整合和复制的主要依据是氯化铯密度梯度离心。用放射性标记的、密度不同于受体的 DNA 处理受体植物,经过一段时间的代谢,把 DNA 从受体中提取出来,作  $C_5Cl_4$  密度梯度离心分析。如果有供体密度的放射性 DNA 带,则当作 DNA 已被摄入的证据。也通过与此类似的实验证明供体—受体 DNA 复合体进行了复制。在这些试验中作为供体的 DNA 来自小球菌、 $T_4$  噬菌体、大肠杆菌及农杆菌等。作为受体的植物包括番茄、大麦、拟南芥菜、豌豆、烟草、衣藻等。这些实验往往由于实验控制不严,难于重复。有许多已被证明为假象。

此后又有一些研究者用原生质体(烟草、矮牵牛、*Ammi Visnaga* 等原生质体及无细胞壁的衣藻突变种)摄取外源 DNA,这些实验表明:虽然外源 DNA 通过细胞膜和细胞质时,有一部分被降解,仍有大片段 DNA 可能被摄入和整合。但是对于这种直接引入的外源 DNA 在细胞中长期存在的命运,以及这一方法在植物基因修饰上应用的潜力仍然受到一部分研究者的怀疑。后面我们还将谈到,有的研究者认为片段的外源 DNA 直接导入细胞在农业育种实践上仍是很有意义的。

还有一部分工作是用转导噬菌体作为供体,植物细胞作为受体。Carlson 报导了用  $T_3$  噬菌体接种的大麦原生质体有两个  $T_3$  特有酶的表达( $T_3$ —RNA 聚合酶及 s-腺苷甲硫氨酸分解酶)。Doy 等人报导番茄和拟南芥的单倍体细胞系用带有 *gal*、*lac* 或 *sup* 基因的  $\Phi_{30}$  或  $\lambda$  噬菌体处理。经  $\lambda$  *pgal*<sup>+</sup> 接种的细胞能在 2% 半乳糖培养基上存活并缓慢生长,而对照用  $\lambda$  *pgal*<sup>-</sup>、 $\phi 80$ 、 $\lambda$  *plac*<sup>+</sup> 噬菌体或未用噬菌体处理的则皆死亡。但后来用免疫学实验来验证,却没有得到相应的结果。并有人提出,后生变化(epigenetic changes)可以使植物细胞适应在乳糖上生长。

用提纯的 DNA 使植物发生表型上遗传变化的报导也不少。Hess 曾报告用矮牵牛红花品系的 DNA 转化白花品系的整体植株,达到 27% 的转化频率。后来的研究者认为环境的改变及外来核酸的刺激跟花青素的出现有关。从而对矮牵牛的实验持否定态度。后来 Soyfer 等人做了一些有趣的试验:将大麦野生型植株提取出来的稍稍去蛋白的高度聚合 DNA 注射给大麦乳熟期籽粒,能将腊质胚乳转化为野生型。对以后数代中,花粉类型等遗传性的变化做了比较详细的分析。这些工作刺激了人们对外源核酸作用的研究,而且发展了显微注射技术,以及用脂质体将核酸导入植物细胞的技术。

## 植物遗传工程的几个主要环节

高等植物的遗传控制系统是十分复杂的。要实现高度人工操纵的分子定向育种,就要对工程的每一步骤作细致的研究。这也是近年来植物遗传工程研究的特色。遗传工程的基因操作大致包括如下的步骤:分离和制备特定的基因;利用限制性内切酶和连接酶将基因嵌入载体,获得重组 DNA;重组 DNA 经过扩增,引入受体细胞,使他们整合

到受体细胞的染色体上，能够复制、转录和翻译。下面介绍这些步骤中某些重要环节的研究情况。

关于基因的分离和鉴定，引起广泛兴趣的是豆类蛋白的基因。豆类种子蛋白含量高而且富于赖氨酸，但缺乏甲硫氨酸。而禾本科作物的种子蛋白恰恰相反，甲硫氨酸高赖氨酸低。如果能够进行互补就可以提高蛋白质的营养价值。所以是很有实际意义的研究课题。

美国威斯康星大学园艺系的工作者对四季豆储存蛋白进行了系统的研究。建立了基因文库，分离了种子中含量最高的球蛋白  $G_1$  基因。 $G_1$  蛋白是在开花后2—3周内，在子叶中迅速积累的。在这段时间内  $G_1$  的合成达到总蛋白合成的 90%。因此  $G_1$  是在特定时间、特定组织里合成的蛋白，易于制备高纯度的  $G_1$  mRNA。分离基因时，先制备基因组 DNA，经限制性内切酶处理分成若干大小不同的片段，把它们嵌入载体进行扩增。也就是建立了所谓基因文库。利用 PBR 322（大肠杆菌的一种质粒）克隆的  $G_1$  mRNA 的 cDNA（互补 DNA）为探针，从基因文库中获得含有  $G_1$  基因的克隆株。通过分子杂交鉴定，其中一个 7.2 kbp DNA 片段包含完整的  $G_1$  基因和基因中的三个插入顺序（insertion sequence）。

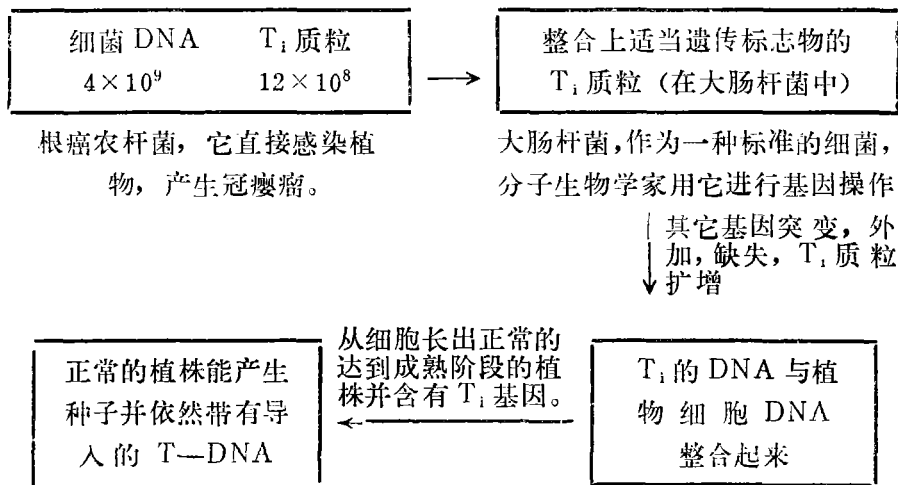
美国明尼苏达大学 Rubenstein 试验室分离、鉴定了玉米醇溶蛋白基因。目前，从一般高等植物组织中分离特异的 mRNA 有许多困难，因为一般的组织并不富集某种特异的 mRNA，所以局限于分离种子中大量的贮存蛋白的 mRNA 以及叶绿体中双磷酸核酮糖羧化酶的 mRNA。这使得从基因库中识别各种基因受到一定的限制。关于基因表达的遗传系统。上面提到基因之中包含插入顺序。就是说在核苷酸序列之中除了编码特定蛋白质的 mRNA 部分（即结构基因）之外，还有许多排列顺序并不编码某种蛋白质。已经知道高等植物，如同其它真核生物一样含有极高的非编码 DNA（可达 DNA 总量的 90% 左右）。而且含有长度不同的重复顺序，以大豆为例重复顺序可达 60%。一般认为非编码的 DNA 顺序与基因的调控有关。基因的调控存在着复杂的情况。就大豆贮存蛋白来说它的基因散布在大豆的各个染色体上。但这些贮存蛋白的基因中任何一个的 DNA 顺序都不相同。看来这些基因的调节部分是不同的。近年来发现，无论是编码的还是非编码的 DNA 顺序都能以很快的速度和很大的幅度在基因组里移动。这就使得基因究竟是怎样调控的成为一个难解的谜。这里我们提一下所谓的转移元件（transposable elements），它包括插入顺序及转位子（transposon）等中存在的实现移位功能的 DNA 部分。它们的共同之点是它们末端带有直接重复或反向重复的顺序，可以插入那些顺序基本不相同的 DNA 中，并带有转录起始和终止信号，因此整合在基因附近时能够控制基因的表达。有些研究者认为在种群之间结构基因的差别是不大的，重要的差别在于调控部分。因此遗传工程不能只着眼于编码某种蛋白质的 DNA，不能不考虑到大量存在的非编码部分 DNA。外源的片段 DNA（可能是结构基因、调控基因、转移元件，也可能是被切割后失去原来意义的片段），一旦被整合（integration），也可以影响受体基因的表达。基于这种见解，周光宇教授用远缘的 DNA 注射胚珠，这样一个不十分复杂的技术，在棉花上得到相当高的转化机率。她认为配合使用好的筛选方法，直接导入外源

DNA 仍然是可行的和很有意义的。

关于基因转移的载体。一般以细菌的质粒和病毒作为载体,它们一般不太大,以便于进行体外生化操作,它们还能自我复制,带有可供筛选识别的标记性状,具有特异的内切酶切点,可供一定大小的外源 DNA 连接,以便完成一个重组的 DNA 分子。事实上用载体做重组 DNA 的中心问题不单是基因的拼接,还要基因建株,必须找出方法使外源基因进入细胞并保证基因被表达,再筛选表达这些基因的细胞。花椰菜花叶病毒 (CaMV) 是一种植物 DNA 病毒。它能感染许多植物。它大小合适,很容易进行体外操作把新的基因加上,也易于克隆。引起人们的很大兴趣。很不幸,当病毒感染植物体后,植物细胞把一切非病毒的基因都排斥掉了。有些情况下,由于附加上去基因,又使得病毒失去感染能力。现在 Howell 等人正在研究在病毒基因上放置适当的信号,既保持病毒感染植物的能力,又不致使新的遗传信息很快排斥掉。迄今为止,人们认为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的致病质粒 (Tumour inducing plasmid), 即  $T_i$  质粒是最有希望的一种载体。

### $T_i$ 质粒作为基因的载体

农杆菌侵入受伤的植物组织 (根、茎、叶等部位) 与健康细胞接触后相互作用的结果,  $T_i$  质粒进入植物细胞诱发瘤,即冠瘿 (gall crown) 的出现。在没有活的菌的继续接触下,瘤细胞仍可以引发新瘤的产生。说明瘤的形成只是  $T_i$  转移的结果。



#### 用 $T_i$ 将新基因导入绿色植物示意

$T_i$  为一大的环状 DNA, 分子量约为  $12 \times 10^8$  道尔顿。它带有合成和分介胍基氨基酸衍生物 (opine) 的遗传信息。根据所产生这些氨基酸衍生物为章鱼碱 (Octopine) 或胭脂碱 (Nopaline),  $T_i$  质粒分为 Octopine  $T_i$  和 Nopaline  $T_i$ 。

通常被感染的植物组织被迫产生这些化合物。人们也可以依据瘤组织中产生的是 Octopine 或 nopaline 来判断  $T_i$  的性质。 $T_i$  转化的愈伤组织还有一个特点,它能在不含

外源生长素的培养基上生长。

T<sub>1</sub>质粒 DNA 的一部分转移到植物 DNA 上去, 整合上去的这一 DNA 片段称为 T—DNA (Transfer DNA)。一些实验室已对植物瘤组织中 T—DNA 结构进行了分析。分析了 T—DNA 末端联结方式、重复序列, 提出了 T—DNA 整合植物基因组的可能方式。

T<sub>1</sub>质粒作为遗传工程的通用载体之前, 必须除去其致瘤能力而保留它作为载体的能力。Schell 等一批西德、比利时的科学家致力于这方面的工作。他们把质粒 DNA 暂时放进大肠杆菌里。在大肠杆菌里致瘤基因突变了, 也就是说沉默了。但是质粒的其它基因并没有改变。尤其是与生成 opine 有关的 lysopine dehydrogenase 的基因仍然保持完整。用带有这样质粒的农杆菌感染马铃薯和烟草组织, 从中长出外形正常的苗。这些苗仍然有产生 opine 的基因。而且经过有性生殖, 传递了三代。通过有性生殖这一点也是植物遗传工程比细菌上进行的工程更加复杂之所在。如果子代不能保存重组 DNA 分子, 基因工程即告失败。人们认为其关键在于使外源 DNA 整合到植物的基因组中去。但是迄今在许多情况下从种子产生的子代和从花药诱导而来的单倍体植株都丧失了肿瘤组织的形态和生化特征, 看来使 T—DNA 成为一个稳定的遗传因子仍是一个重要的研究课题。

在改造 T<sub>1</sub>质粒的实验中, Schell 等人使农杆菌配备了某些大肠杆菌的基因, 包括转位子的遗传单位。转位子也能携带基因, 如抗氨甲喋呤的基因。这种质粒送入烟草细胞, 发现烟草细胞获得了抗氨甲喋呤的能力, 即能在含有氨甲喋呤的培养基上生长。

李向辉和 Schieder 报导农杆菌的一个株系 B 6s3 诱导的烟草冠瘿瘤能在乳糖培养基上生长。而对照的烟草野生型愈伤组织不能在这种培养基上生长。认为在瘤组织的细胞中可能出现了利用乳糖的基因; 也可能烟草细胞中含有沉默的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因, 在转化为瘤细胞时诱发其表达; 第三种可能性是烟草细胞中的 T<sub>1</sub>的某些基因表达, 而产生  $\beta$ -半乳糖苷酶。

虽然农杆菌质粒作为植物基因工程的载体引起了非常广泛的重视, 农杆菌系统还存在着大量的困难。例如目前发现的农杆菌只能感染双子叶植物。使它的应用范围受到局限。另外基因转移的效率不是很高, 基因表达的效率还很低。其主要原因是有关植物基因的基础知识太落后。基因表达的研究太贫乏。植物基因表达的起始和终止信号还没有一个被好好地确定过。

## 结 语

目前植物基因工程的研究, 还要做许多打基础的工作。这些工作一方面详细地揭示植物的遗传背景。另一方面也揭示出植物和细菌及动物细胞之间基因活动方式上没有根本性质的不同。Hall 把豆类贮存蛋白的信使 RNA 放进蟾蜍卵细胞使得蟾蜍细胞产生出植物蛋白。英国剑桥植物育种研究所的一组科学家已经在大肠杆菌中生产叶绿体部分 I 蛋白 (这个蛋白参与光合作用中 CO<sub>2</sub> 的固定)。而且数量之大多达细菌蛋白质总量

2%。Schweiger 等人对于动物病毒的DNA和RNA在伞藻细胞中的表达做了不少研究。

1981年美国农业部宣布威斯康辛大学的 Kemp 和 Hall 等人将菜豆贮存蛋白的基因转移进入向日葵的细胞内,并在受体细胞内用免疫学方法检测到了菜豆基因的翻译产物。因此他们称创造了“向日葵”(Sun-bean)。但是工作的详细情况尚未见报导。这是一种植物基因转移到另一种植物细胞的重要尝试。更多人在为固氮能力的转移,  $C_3$  植物转化成  $C_4$  植物,以及植物抗逆性状的转移做着大量的工作。

大豆是人类植物蛋白的主要来源,其蛋白质含量可占种子干重的40%,自然引起研究者的关注。目前,对于大豆基因组的复性动力学(reassociation kinetics),DNA序列的构成(sequence organization)、重复顺序的大小做了不少的分析 and 研究。在豆类种子中球蛋白(globulin)可占蛋白总量的60—80%,因而在实行大豆基因工程之前,研究球蛋白及其基因表达是十分重要的。对于大豆球蛋白的分析及RNA聚合酶(RNA polymerase)的分离已有初步工作。有的研究者致力于筛选高光效的大豆品系和高固氮能力的根瘤菌株系,并使二者结合在一起。但工作尚处探索阶段。大豆细胞培养并使之再生植株是大豆遗传工程的又一基础工作。目前国内外研究者已能使大豆原生质体培养成愈伤组织,但是经过多次继代培养的大豆愈伤组织发育成植株,尚有困难。

植物遗传工程由于在农业上有着巨大的潜力,吸引着愈来愈多的探索者。可以断言,在分子生物学、细胞生物学和遗传学迅速发展的推动下,植物遗传工程必将加快其前进的步伐。

### 主要参考文献

1. 周光宇 1981, 浅谈植物分子遗传和基因工程的几个问题。中国生物化学学会和上海市生化学会通讯 1981 年 2—3 期
2. 唐锡 1982, 植物基因工程的研究概况。植物生理学通讯 (2), 17—21.
3. Bingham, E. T. 1979, Prospects for novel genetic modification in plants using sexual and somatic cell methods. In Nucleic Acid in Plants vol. 2 T. C. Hall & T. W. Davies (eds) 211—227.
4. Cairns, E. et al 1978 Expression of a DNA animal virus genome in a plant cell. FEBS Letters 96 (2), 295—297.
5. Cairns, E. et al 1978 Translation of animal virus RNA in the cytoplasm of a plant cell. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 75 (11), 5557—5559. Cell Biology.
6. Hofschneider, P. H. & Starlinger, P. (eds) 1977 Integration and Excision of DNA Molecules. Springer-Verlag.
7. Kleinhof, A. and Behki, R. 1977 Prospects for plant genome modification by nonconventional methods. Annual Review of Genetics, 11, 79—101.
8. Li Xianghui (李向辉) and Schieder, O. 1981 Utilization in vitro of D-Lactose by B6S3 tumor cell of tobacco. Plant Science Letter, 21, 209—214.
9. Schell, J. 1979 Crown gall: Transfer of bacterial DNA to plants via the Ti plasmid. In Nucleic Acid in Plants, vol. 2, T. C. Hall and J. W. Davies (eds), pp 193—219.
10. Walbot, V. and Goldberg, P. 1979 Plant genome organization and its relationship to classical plant genetics. In Nucleic Acid in Plants, vol. 1, T. C. Hall and J. W. Davies (eds), pp 3—49.
11. Willimitzer, L. et al 1980 DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. Nature 278, 359—361.
12. Zambrysk, P. et al 1980 Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. Science 203, 1385—1391.