

DNA重组与叶绿体遗传工程*

李继耕

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

本文引用新近文献,综述了基因重组技术的一般程序(包括制备目标DNA分子, DNA载体的选择、连接到载体上的方法、转化和转化体的筛选鉴定等)及其应用于叶绿体遗传工程的最新研究成果。可以对叶绿体DNA编码的基因,通过基因库的建立加以保存;利用分子杂交为基因定位以确定基因序列组成,并绘制基因的物理图;以及经过特异基因重组研究基因的表达。据此,提出今后叶绿体遗传工程研究的主要侧重点。

DNA重组技术,包括DNA分子的体外连接以及把它们引入到能在其中复制的活细胞中两个方面^[1]。它是从分子水平对生物遗传特性进行重新构建的重要手段,是十多年发展起来的遗传学中的新领域。借助于这个手段,哺乳动物的几种生长素,如生长激素释放因子(Somatostatin),已经能够在细菌中生产^[2],类似于若干真核生物中发现的多肽,已经能够在E.coli中合成^[3]。这些新的成就,为大规模生产所选择的多肽或蛋白质,提供了一种新的廉价的手段,从而受到普遍的重视。若干学者已经将这种DNA重组技术应用于叶绿体遗传工程的研究中,并已取得初步成果。本文将综合加以介绍。

一、DNA重组的一般程序

整个DNA重组过程,大致包括制备目标DNA分子、DNA载体的选择、连接到载体上的方法,以及转化和转化体的筛选、鉴定等几个步骤。

制备目标DNA片段的方法很多,最常用的是用限制性核酸内切酶酶切,然后用琼脂糖凝胶电泳分离,即可看到不同的酶切片段,依分子量大小排列在胶中。如果采用随机片段,即可将经内切酶酶切的片段,连同带有相同粘性末端的载体DNA一起保温“退火”。如果为了获得特异的DNA片段,就要选择携带有特异基因的片段,用于同载体DNA的重组。

特异DNA片段的载体,包括细菌质粒及病毒两种。质粒是能够在某些微生物细胞中独立复制的环状DNA分子。质粒具有某几种限制性内切酶的酶切位点,如果这些位点所在部位不是复制起始点所在部位,酶切后不影响它的复制,那么,这种经内切酶

* 此文系校友来稿,亦是1984年4月西北农学院建校50周年校庆征文。

酶切而线状化了的质粒,即可与另外的DNA片段连接,重新环化;当以后再把它放回寄主细胞中去而不失去其复制能力。具有这种特性的质粒,方可用作DNA克隆的载体^[4]。

用作克隆载体的质粒分为两类^[4]:第一类以pSC101及其衍生物为代表。这类质粒在DNA复制方面为“紧缩型”(strigent)。指数生长的细胞,每个细胞有6—8个质粒分子,质粒的复制需要新的蛋白质合成,而不需要活化的DNA聚合酶I。第二类质粒以COLE 1及其衍生物为代表。这类质粒的DNA复制属“松弛型”(relaxed)。指数生长的细胞,每个细胞有20—30质粒分子,质粒的复制不需要新的蛋白质合成,但需要一个活化的DNA聚合酶I。无论pSC 101或COLE 1质粒及其衍生物,都是不能自己转移的,它们只能通过接合,从一个细胞转移到另一个细胞。

病毒,主要是 λ 噬菌体的衍生物,很早即被用作克隆载体。野生型 λ 为46.5kb长的DNA。它具有5个EcoRI位点。 λ 的全顺序已测定完。

Charon噬菌体是 λ 衍生物,广泛用作载体。其中有一些具有最大的插入DNA能力,如Charon4及8—11,能插入大于22kb的外源DNA。

此外,还有一种可以用作载体的质粒称为Cosmids。它们一方面具有 λ 噬菌体COS的DNA位点,这是包装到噬菌体颗粒所必需的;另一方面,它们又具有COLEI DNA片段,可以作为质粒复制,故而称之为Cosmids。这类质粒的主要优点是连接到外源DNA上的pJC DNA(Cosmids的一种)能在体外包装,并能有效地感染E.coli,每微克重组DNA可产生多达500,000重组克隆。

在选择采用质粒或噬菌体作为克隆DNA载体时,首先应该考虑,所要克隆的DNA分子的大小,鉴定插入DNA所用的方法以及有关克隆的生物学问题。噬菌体载体适合于克隆大的DNA片段以及准备用与核酸“探针”杂交进行鉴定的DNA片段。质粒载体的体积较小,限制性内切酶谱亦较简单,更适合于克隆DNA的表达工程。

还有两种载体SV40与T₁质粒。SV40为已知的唯一真核细胞克隆载体。T₁质粒是植物根癌农杆菌所含有的大质粒。冠瘿肿瘤的诱导即由于T₁质粒DNA进入植物细胞的结果。常用于高等植物原生质体的转化,并已在烟草原生质体的转化试验中获得成功^[5,6]。

把作为“乘客”(passenger)的特异DNA片段连接到载体上的方法有三^[7]:

(1) 粘性末端连接

很多限制性内切酶可以在DNA链的特异对称位点上造成交错切割,从而在链的两端留下突出的单链粘性末端。这种不配对的粘性末端长度可以为2—6个核苷酸。用相同的或能产生相近似末端的内切酶消化另一来源的DNA,也产生相同的、或与之相近似而可以互补的末端。在适当条件下这两种单链末端可以“退火”,连接成正常的双螺旋DNA—重组体DNA。

实际操作过程中,载体DNA往往自行连接成环,而不带有插入的DNA片段。为了防止这一点,常用的一个方法就是用碱性磷酸酶一起保温,以便使质粒的5'—末端去磷

酸。这样,可以减少载体DNA自身环化。

(2) dA:dT连接

另一个连接DNA片的程序是利用末端脱氧核苷转移酶把dA—残基加到载体片段两端链上,把dT—残基加到插入片段的末端链上。这两个片段本身不能形成环,但是,当把两个不同延伸的片段混合时,在适当条件下,它们被连接形成一个dA:dT互补连接片段。这个方法又称同聚体尾(homopolymer tails)连接法。

(3) 平头连接

平头连接是用T4 DNA连接酶把DNA的双链碱基对末端进行连接。T4连接酶的浓度,对于保证足够的DNA末端连接、组成一个新质粒是十分重要的。所用的DNA片段长度在200—500bp之间,片段的浓度为100—300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

另外,也可以把内切酶裂解造成的粘性末端,作为一个接头,把它们加到“乘客”及载体DNA的平头上,利用它们的粘性末端,连接为新的重组体DNA分子。带有EcoRI、BamHI及HindIII位点的接头,国外市场已有出售。

反之,用单链特异的核酸酶SI一起保温,也可以除去单链末端造成平头,然后再接平头连接法用T4连接酶连接。

顺便应该指出,关于连接酶的应用,不同的连接方法有所不同。DNA连接酶及T4连接酶,可用于连接短的、经内切酶消化产生的粘性末端;而平头的连接,只能用T4连接酶连接。末端的浓度,反应液以及反应温度,均有不同的要求。

最后一个步骤就是转化及转化体的筛选和鉴定。

把上述连接反应混合物引入到能在其中复制的寄主细胞中,根据表型标记的变化,即可筛选出所希望的重组体。以质粒为载体,常用的转化试验的受体菌,都是大肠杆菌K—12的衍生株,如C600、HB101、X1776等。将这些菌中的任一种同连接反应所产生的重组体混合物的DNA一起加CaCl₂并保温,重组DNA即可进入寄主细胞,引起转化。

转化体的鉴定采用两个方法。一是按照插入钝化原理,将带有插入DNA的转化培养物,涂布在含有一定浓度的抗生素的固体培养基上,根据转化培养物所缺少的与载体有关的表现型,亦即根据其抗药性变化,即可鉴定并筛选出所希望的重组体。例如,pBR322是应用最广泛的载体质粒,带有Ap^r及Tc^r两个标记基因,Pst I的识别位点位于Ap^r基因区,而BamHI及Sal I的识别位点位于Tc^r基因区。如在BamHI点插入外源DNA,使Tc^r钝化,失去对四环素的抗性,从而获得Ap^rTc^s质粒。

另一个鉴定方法是將转化体经培养扩增后,分离其质粒DNA,再用连接试验时所用的同一种内切酶消化,由于内切酶酶切位点相同,重组体质粒仍在“外源DNA连接的位点上被切开,形成载体DNA片段与插入的外源DNA片段,通过琼脂糖凝胶电泳,即可按照其迁移率准确地确定它们的存在及片段大小。

二、叶绿体遗传工程

(1) 叶绿体基因库的建立

利用DNA重组技术, 组建叶绿体的基因库, 是一个行之有效的手段。根据苏联学者Андрюанов等人^[8,9]的报道, 将豌豆叶绿体DNA与质粒(E. Coli, RSF2124)DNA按3:1比例混合, 用过量的EcoRI消化, 再用T4 DNA连接酶处理, E. Coli C600作为受体菌, 按一定程序进行转化处理, 再将转化体细菌涂布在含有抗生素的选择性培养基中, 进行抗药性鉴定, 获得带有重组质粒的转化体, 并将其分别克隆。

豌豆叶绿体DNA, 经EcoRI完全消化后, 裂解为21个片段, 电泳时表现为21条带。EcoRI在RSF2124质粒中的切割位点, 位于大肠杆菌素合成基因区, 当外源DNA片段插入质粒中时, 即失去合成大肠杆菌素的能力, 但仍保持对它的免疫特性。据此, 即可对转化体进行筛选。

工作结果获得分别具有豌豆叶绿体DNA不同分子量片段的30个转化体。不同插入片段的分子量总和为 47×10^6 道尔顿, 相当于叶绿体DNA分子量的一半。插入片段的性质是用DNA/DNA分子杂交证明了的。此外, 将这些克隆再经EcoRI酶切后进行电泳, 所得到的图式也充分证明所获得的转化体是质粒DNA与不同叶绿体DNA片段的重组体。这样, 这30个转化体就组成了豌豆叶绿体DNA的基因库。

重组质粒中插入的叶绿体DNA片段的GC含量测定的结果表明, 不同克隆片段的GC含量是异质的。有些片段富含AT对, 另一些片段主要含GC对。这同眼虫中所观察到的结果是一致的^[10]。

(2) RuBPC酶大亚基和rRNA基因定位

将玉米叶绿体DNA的BamHI片段, 插入到细菌质粒RSF1030 DNA中, 提取其DNA用于转化E. Coli HB101受体细菌, 再用蔗糖梯度离心分离出较重的转化体。其中之一为pZmc37。它是一个带有叶绿体DNA的BamHI片段9的重组质粒。经纯化后将pZmc37DNA加到转录翻译偶联系统中, 可以指导^[35S]蛋氨酸掺入到多种多肽中, 包括与RuBPC酶大亚基的迁移率相当的多肽在内。为了证明多肽的合成是由pZmc37的叶绿体DNA序列所指导而非克隆载体DNA所指导, 再用BamHI把叶绿体DNA从pZmc37上切下来, 再经蔗糖梯度离心纯化后, 这个DNA可以指导与大亚基大小相当的多肽的合成, 而RSF1030DNA单独不能指导这一产物的合成。经免疫沉淀和蛋白质酶解产物分析均证明, 编码大亚基的基因就位于BamHI的第9片段上^[11]。

另一项有关玉米的工作, 是用EcoRI消化叶绿体DNA与载体pMB9 DNA之后, 用DNA连接酶共价连接, 连接的DNA被用于转化E. coli FMA-Z受体菌。获得50个抗四环素的转化体。用^[32P]标记的叶绿体rRNA与这些转化体杂交, 筛选与之互补的转化体, 获得两个互补于rRNA序列的重组质粒pZmc100及pZmc134。再用EcoRI消化这两个重组质粒后进行电泳。结果表明, 两个重组质粒均带有EcoRI片段a。pZmc100带有的叶绿体DNA片段约为17,000bp, pZmc134带有的片段约为18,000bp。

将EcoRI消化过的pZmc134,再用Sal I酶切,电泳分离,并直接转移到硝酸纤维素滤膜上,分别用 $[^{32}\text{P}]$ 标记的23S、16S及5S rRNA杂交,结果,三种rRNA均可与EcoRI片段a杂交。用BamHI及Hind III也有类似情况。为了进一步确定,是否所有的rRNA都是从EcoRI片段a同一条链上转来的,再将a片段变性后电泳分离为两条带,转移到硝酸纤维素滤膜上,再分别同上述 $[^{32}\text{P}]$ 标记的三种rRNA杂交。结果,三种rRNA均与迁移快的条带杂交。这就表明,5S、16S及23S rRNA是从EcoRI a片段转录来的,它们的编码基因位于这一片段的同一条链上。此外,还证明,在16S与23S rRNA基因之间被一个2100bp的序列隔开^[12]。

与此相似,烟草叶绿体DNA上rRNA基因的定位是由日本学者Sugiura(杉浦昌弘)^[13,14,15]等人进行的。烟草叶绿体DNA用EcoRI消化后,可以分离出30个片段。片段的大小范围在4.7— 0.2×10^6 道尔顿之间。将这些条带转移到硝酸纤维素滤膜上,用 $[^{32}\text{P}]$ 标记的烟草叶绿体16S与23S rRNA混合物与之杂交,结果两条DNA带E与I(即第5与第9片段)具有明显的放射性。E带的分子量约为 2.8×10^6 ,即编码23S rRNA的基因;I带的分子量为 1.9×10^6 ,为编码16S rRNA基因。将带有抗四环素标记基因的pMB9质粒作为载体,用EcoRI消化的叶绿体DNA与pMB9 DNA混合物并用T4连接酶共价连接,连接过的DNA用于转化E.coli HB101受体菌。经过鉴定,最后获得重组质粒TC I与TC309,分别带有互补于rRNA的16S及23S叶绿体DNA的I片段与E片段。

接着作者等利用数种限制性酶切割和限制性片段同 $[^{32}\text{P}]$ 标记的16S与23S rRNA杂交,组建了一个烟草叶绿体DNA的物理图,并借助于带有R环的分子电泳分析,确定了16S与23S rRNA基因的位置。这些基因中没有插入序列,两个基因之间被一条DNA链编码的 1.3×10^6 道尔顿的序列隔开,转录的方向是从16S基因至23S基因。

(3) 叶绿体基因的转录和表达

如所周知,RuBPC酶发现于C₄植物玉米的鞘细胞中,而叶肉细胞中则不存在。它的大亚基,已经定位在叶绿体DNA的BamHI的第9片段上。但是,还应该指出,Bam 9片段上还携带着一个1.4kb的基因,它在体内转录成为功能未定的2.2kb RNA。这两个基因之间被一个330bp长的间隔区隔开,并且是从相对链上转录的。为了搞清楚Bam 9上不同基因片段在基因表达与转录调节中的作用,进行了以下试验。

Bam 9片段全长约4.35kb。它的中间部分为B2.7区,即大亚基基因所在部位。其中H 0.44片段占大亚基基因区一小部分。E1.55片段携带有1.4kb部分的2.2kb RNA基因。按照前述程序将这些不同片段同质粒载体重组嵌合质粒:pZmc37由RSF1030/玉米叶绿体DNA Bam9片段组成,pZmc 3711由RSF1030/Bam9的H片段构成,pZmc465由pBR322/Bam9的E片段构成。将这些质粒DNA提纯以后,用琼脂糖凝胶电泳分离,再转移到滤膜上,分别用带同位素标记的、来自鞘细胞与叶肉细胞的RNA杂交,结果,玉米叶绿体DNA Bam9片段,可以同鞘细胞和叶肉细胞来的RNA杂交。这表明,两类细胞叶绿体DNA中均存在有大亚基基因。但是,H片

段只同鞘细胞RNA杂交,而不同叶肉细胞RNA杂交,反之,E片段则以同等强度同两类细胞的叶绿体RNA杂交。这就表明,大亚基的mRNA仅存在于鞘细胞中,而2.2kb RNA基因转录物,则存在于两类细胞中。换言之,位于叶绿体DNA Bam9片段上的基因,在鞘细胞与叶肉细胞中是分别转录的^[16]。

另一篇有关RuBPC酶大亚基基因表达的报告是Gatenby等人^[17]提出的。玉米、小麦叶绿体DNA中均含有一个单拷贝的RuBPC酶大亚基基因,用BamH1消化,可以从两个种中分离出带有大亚基基因的完整的DNA片段。玉米中片段长为4.3kb,小麦为9.7kb,所有这些片段,可直接克隆到pBR322的BamH1位点中。大亚基基因在噬菌体内的转录,或是在l链上利用启动子P_L,或是在r链上利用启动子P_r'起始的。将玉米的大亚基基因转移到pBR322的BamH1位点上。由于这个基因在叶绿体DNA片段内及质粒内相对于Rst1位点的对称位置不同,而得到两个大亚基基因方向相反的重组质粒:pZmB1A及pZmB1B。同样,小麦RuBPC酶大亚基基因插入到pBR322的BamH1位点后,也得到两个大亚基基因方向相反的重组质粒pTac39及pTac518。

将这四种质粒按照转化程序引入到生产小细胞(minicell)的品系DS410中,将含有这四种质粒中每一种质粒的小细胞,连同对照pBR322同时制备,并在带有^[35S]的蛋氨酸中温育,以标记由质粒合成的特异蛋白质,利用SDS—PAGE分离带有放射性的提取物。结果表明,当小细胞含有重组质粒时,可以合成若干种多肽,其中之一分子量为52,000—53,000道尔顿,其迁移率非常近似于从叶片分离纯化的大亚基。利用体内标记的小细胞提取物同抗RuBPC酶的血清一同保温,并借助于吸附到蛋白质A-Sepharose检出抗原—抗体复合物的方法,均证明小细胞合成产物之一就是RuBPC酶大亚基。很可能,叶绿体DNA片段本身所携带的启动子以及由启动子起始的转录和翻译,是造成这种表达的原因。

最后应该补充说明一点,1983年我们也成功地完成了菠菜叶绿体DNA的BamH1片段同质粒pBR322 DNA的体外重组。所用的受体菌是C600,鉴定方法同前述。研究报告见1983年遗传所工作年报。

从以上所列举的几个方面可以看出,应用叶绿体遗传工程,可以对叶绿体DNA编码的基因,通过基因库的建立加以保存,利用分子杂交为基因定位,确定其序列组成并绘制基因的物理图,最后,经过特异基因重组研究基因的表达。因此,今后叶绿体遗传工程研究,主要应侧重于RuBPC酶大亚基基因或其他已经定位在叶绿体DNA上的基因,利用体外重组技术研究其调控与表达,以期在短期内取得应用方面的效果。在这方面人们已经提出了若干诱人的设想,例如,C₃与C₄光合途径的转化,非豆科植物的固氮等。其中有的已正在探索中。另一方面,同此密切相关的是,由于叶绿体分子遗传学的历史毕竟太短,很多基本的方面还不清楚,这对于它的实际应用是有影响的。因此,还应该不断地充实并揭露新的叶绿体遗传规律。例如,发现新的由叶绿体DNA编码的基因,叶绿体DNA与线粒体DNA、核DNA的相互关系,并将之同高等植物的细胞质遗传联系起来,为今后叶绿体遗传工程研究提供更加广泛的基础。

参 考 文 献

1. J. F. Morron 1979 Recombinant DNA techniques, in "Methods in Enzymology" 68 : 3-24.
2. K. Itakura, et al. 1977 Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198 : 1056-1062.
3. K. Struhl, et al. 1976 Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *PNAS* 73 : 1471-1476.
4. F. Boliver, et al. 1979 Plasmid of *Escherichia coli* as cloning vectors, in "Methods in Enzymology", 68 : 245-261.
5. A. Rorch et al. 1978 *Agrobacterium tumefaciens* plasmids : potential vectors for genetic engineering of plants, in "Genetic engineering" p. 189-196.
6. F. A. Krens 1982 In vitro transformation of plant protoplast with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296 : 72-74.
7. R. L. Sinsheimer 1977 Recombinant DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 46 : 415-438.
8. В. М. Андрианов и др. 1978 Клонирование ДНК хлоропластов в *E. coli* Сообщение 1 *Генетика* 14 : 1503-1512.
9. В. М. Андрианов и др. 1979 Клонирование ДНК хлоропластов в *E. coli* Сообщение II *Генетика* 15 : 1918-1924.
10. J. R. Mieleny et al. 1977 Analysis of *Euglena gracilis* chloroplast deoxyribonucleic acid with a restriction endonuclease *Eco RI*. *J. Bacteriol.* 130 : 860.
11. D. M. Coen et al. 1977 Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase. *PNAS* 74 : 5487-5491.
12. J. R. Bedbrook et al. 1977 *Zea mays* chloroplast ribosomal RNA genes are part of a 22000 bases pair inverted repeat. *Cell* 11 : 739-749.
13. M. Sugiura and J. Kusada 1979 Molecular cloning of tobacco chloroplast ribosomal RNA genes. *MGG* 172 : 137-141.
14. J. Kusada et al. 1980 Characterization of the cloned ribosomal DNA of tobacco chloroplast. *MGG* 178 : 1-7.
15. K. Shinozaki and M. Sugura 1982 Sequence of the intercistronic region between the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase la-

rge subunit and the coupling factor subunit gene. *Nucleic Acid Res.* 10 : 4923-4934.

16. S. G. Jolly et al. 1981 Differential transcription in vivo and in vitro of two adjacent maize chloroplast genes: the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and 2.2 kilobase gene. *PNAS* 78 : 6821—6825.

17. A. A. Gatenby et al. 1981 Expression in *E. coli* of maize and wheat chloroplast genes for large subunit of ribulose biphosphate carboxylase. *Nature* 291 : 117-121.

DNA Recombination and Chloroplast Genetic Engineering

Li Jigen

(Genetic Research Institute of Academia Sinica)

Abstract

This paper deals with the general procedures (including the preparing objective of DNA molecules/selection of DNA carriers/methods and conversion to connect with the carriers/selection and identification of conversion carriers etc.) of DNA recombination and the latest achievements applied to chloroplast genetic engineering with the latest literatures. Genes coded by the chloroplast DNA may be preserved through the establishment of gene pools. Loci of genes can be fixed by molecular crossing so as to determine the genetic sequential components and to draw the physical genetic chart. And also, the genetic expression was studied through the recombination of specific genes. Thus, priority given to the future research on the chloroplast genetic engineering was advanced in this paper.