

新一代转基因植物研究进展

黎昊雁^{1,2} 王玮^{3*}

(1 浙江大学生命科学院 杭州 310027 2 浙江出入境检验检疫局 杭州 310011

3 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

摘要 转基因植物具有抗病、抗虫、抗逆、高产、营养成分改善等优良性状,但其安全性引起了人们的关注。新一代植物转基因技术,如叶绿体基因工程、基因约束、多基因共转、去除抗性标记基因、对外源基因进行实时监控、抗性管理策略、最小程度地改变基因等技术的发展,将使未来的转基因植物更好地适应人们的需求,更有利于消费者食用安全和生态环境的可持续发展。

关键词 转基因植物 安全性 基因工程

自1984年第一例转基因植物问世以来,植物基因工程取得了飞速发展,同时转基因植物的安全性也引起了人们的关注。目前全球转基因作物种植面积已达近4000万ha,市场上有近4000种转基因食品,预计每年转基因植物产值达100亿美元以上,如何进一步发展和优化基因改造技术,使新一代转基因植物更好地适应人们的需求,更有利于消费者食用安全和生态环境的可持续发展是亟待解决的问题。

1 叶绿体基因工程

1.1 精确、安全、高效

叶绿体基因组较小,性质研究得比较透彻,目前已掌握了18个物种的叶绿体基因组全序列信息,这意味着对外源基因即将进入的基因环境有详细了解,利用DNA同源重组机制能够精确地控制外源基因的插入位点,避免位置效应产生。叶绿体系母性遗传,遗传性状稳定快,外源基因一般不会通过花粉介导而转移到近源物种中,或对非靶生物产生危害。叶绿体环形基因在每个细胞中的数目高达500~10000,较核基因组可显著提高所转入的外源基因的拷贝数,从而使基因表达产物成倍增加,甚至可达到总可溶蛋白的46%;且表达产物富集在叶绿体中,不会对细胞产生损害。叶绿体基因工程是新一代生物技术发展的里程碑,它为外源基

因提供了一个比核基因组更为精确、安全和高效的位置。

1.2 叶绿体基因工程的方法

常用叶绿体转化方法有微弹轰击法,即以构建完整的质粒载体包裹钨粉,用基因枪轰击至植物组织器官中,再对重组叶绿体进行筛选;农杆菌T-DNA介导法是通过将外源基因构建至农杆菌Ti质粒中从而将其转化至叶绿体中;PEG法是把构建好的质粒与原生质体共培养从而将外源基因融合至叶绿体基因组中。在所构建的载体上均有叶绿体基因同源片段,可将外源基因定位地整合至叶绿体基因组中。

1.3 进展

抗除草剂基因(EPSPS)、抗细菌和真菌病原体蛋白基因(MSF99)、抗虫基因(Cry)、耐盐基因(tpsl、BADH)等均已实现了在叶绿体中的高效表达^[1]。苏宁等(2002)用基因枪法获得了双价抗虫基因(水稻巯基蛋白酶抑制剂OC基因和苏云金杆菌晶体毒蛋白基因Cry IAc)的叶绿体共转化烟草。近来叶绿体基因工程在经济作物马铃薯和番茄中取得十分重要的进展,特别是Ruf等^[2]获得的叶绿体转化番茄果实中外源基因表达量达到了叶片中的一半,非绿色器官如果实、块茎中外源基因的表达量还有望进一步提高。叶绿体基因工程尤其适用于植物生物反应器。将对反馈抑制不敏感的氨基苯甲酸合成酶的编码基因转入烟草叶绿体中,使游离色氨酸含量上升了10倍。张景煜等(2002)将聚3-羟基丁酸酯合成相关基因导入了烟草叶绿体

收稿日期:2002-12-16 修回日期:2003-03-17

*通讯作者,电子信箱:wanfy9048@sina.com.cn

中,为生产新型生物可降解塑料提供了可行途径。利用叶绿体基因工程还实现了对光合作用中的关键酶 Rubisco 的操纵,Whitney 等^[3]用 *Rhodospirillum rubrum* 的 II 型 Rubisco 取代了烟草 Rubisco 大亚基编码基因 *rbcL*,从而创造了第一株有生存能力的、Rubisco 特性得到改造的植物,将更高效的 Rubisco 转入植物叶绿体中可望提高光合作用效率。可见,叶绿体基因工程这一新兴技术有着广阔的运用前景,无疑将开创一个更为安全有益的生物技术的新时代。

2 去除抗性标记基因

转化过程中使用的抗生素或除草剂抗性标记基因,转化完成后就失去了价值,且还存在向其它微生物或杂草转移的可能,其编码产物对人体的安全性也尚不确定。去除抗性标记基因将使转基因植物对人体和环境更安全。

2.1 抗性标记的替代物

甜菜碱乙醛脱氢酶基因是从菠菜中分离得到的,可将有毒的甜菜碱乙醛转化为无毒的氨基乙酸甜菜碱,只有成功转入该酶的转化体才能在含有甜菜碱乙醛的培养基上生长,从而实现标记功能^[4]。色氨酸脱羧酶的标记原理与之相同,其可去除培养基中一种色氨酸类似物的毒性。葡萄糖苷酶可将无活性的细胞分裂素衍生物转化为活性形式,从而实现标记作用;异戊烯转移酶的标记原理与之相似,其可提高转化体中细胞分裂素的水平,促进再生。木糖异构酶、磷酸甘露糖异构酶等则是利用转化体在碳源利用特性上的不同来实现标记。这样,不仅避免了导入易引起争议的抗性基因,还消除了抗生素等物质对植物组织生长的不利影响,提高了再生速度与转化效率。

2.2 HIT AND RUN 策略

即在标记基因完成使命后再将其从基因组中删除。

2.2.1 同源重组或位点专一性重组 同源重组不需导入重组酶,但在核基因组中效率较低。常用的位点专一性重组系统有 Cre-lox, HLP-FRT 及 R-RS^[5]。重组酶通过杂交或再次转化导入,通过育种在后代中分离除去或仅瞬时转入宿主内。Gleave 等^[6]以携带 cre 重组酶和 *hpt* 基因的农杆菌质粒,对转有 35S-uidA、*nptII* 和 *codA* 基因的烟草进行再转化。作者利用 cre 重组酶的瞬时表达,既通过重

组去除了 *nptII* 和 *codA*,又避免与 cre 重组酶相连的 *hpt* 的再插入。Corneille 等^[7]比较了通过花粉及通过农杆菌转化导入 cre 重组酶两种方法,作者更倾向于前者。Alexander 等^[8]利用 HLP-FRT 重组系统去除了玉米中的抗性标记基因 *neo*。通过叶绿体实现的基因转化外源基因拷贝数高,高数量的标记基因更易引起安全性问题。Siriluck Lamtham 等^[9]利用 2~3 个正向重复序列的同源重组,成功地去除了转入烟草叶绿体中的标记基因 *aadA*。

2.2.2 转座子 标记基因实现功能后,玉米转座子可携带其从植株中去除,因为约 10%左右的转座子转位后不再插入基因组中,或插入染色体后在体细胞分裂中丢失。Hiroyasu 等^[10]将标记基因插入玉米转座子 *Ac* 中,获得了无选择标记的转基因烟草和白杨。

2.2.3 不同载体 用不同载体或二元载体中的不同 T-DNA 元件分别携带目的基因与标记基因,若两者插入不同染色体,则可通过分离在后代中筛选到无标记的转基因植物。这一方法已成功地运用于大麦中。

3 多基因共转

3.1 优势

许多重要的农艺性状属于定量性状或受多基因控制,基因工程已从最初的转入单一基因逐渐向转入多基因发展,从而可实现完整代谢途径、细菌操纵子或复杂多亚基蛋白大分子的编码基因的转化,这一发展趋势将给食品、营养、医药、保健等领域带来革命性的影响。

3.2 进展

尽管核基因组多基因共转化过程中存在不少技术障碍,如核基因组不能处理多顺反子、转入多基因需要进行大量育种工作、由于相同调控序列的反复出现易产生基因沉默、多基因插入易产生位置效应等,研究仍取得重大进展。2000 年 Ye XD 等耗时 7 年,终于成功地将 -胡萝卜素生物合成途径中所需的 3 个酶基因转入了水稻中,使其可富集维生素 A 原。维生素 A 缺乏症可导致夜盲甚至失明,这一成就被誉为“金色大米”。为实现多基因的同时转化,Dasgupta 等^[11]将烟草脉斑驳病毒 (TMV) 的 NIa 蛋白酶插在其他两个基因中共同进行转化,该酶的水解活力可迅速释放多聚蛋白中另外两个基因的编码产物。

叶绿体基因组可处理多顺反子的能力及其精确、安全、高效的特点更有利于实现多基因共转。且表达产物在叶绿体中可完成二硫键交联、正确折叠等后转录修饰,具备生物活性。许多涉及多基因协同作用或多亚基装配的生物大分子如人血清蛋白(HSA)、用于龋齿治疗的 Guy '13 单克隆抗体、霍乱毒素 亚基等均实现了在叶绿体中的表达与装配^[12]。

4 控制基因漂移——基因约束

基因漂移可导致“超级杂草”或新杂草的产生、破坏生态平衡及生物多样性。目前,除叶绿体基因工程之外,还发展了许多分子技术(表1)来控制基因漂移^[13]。

4.1 干扰生殖过程

转入绒毡层特异性启动子引导下的 Rnase T1 或 barnase 基因,可破坏花粉囊发育,阻止花粉形成,得到雄性不育的转基因植株。而干扰与种子的形成与萌芽过程相关的基因则可实现种子不育,如已由 Monsanto 公司获得专利的终止子技术通过外环境刺激(如用抗生素浸泡)启动重组酶活力,将核糖体抑制蛋白基因中一段内含子去除,解除其表达抑制,最终破坏种子组织,导致不育。另外,将控制闭花受精、孤雌生殖的基因导入植物中,改变其生殖表型,也能达到基因约束的目的^[13]。

表1 基因约束技术的运用现状

技术策略	运用现状
卵细胞遗传	已在烟草、土豆、番茄中运用
雄性不育	已在烟草、油菜中运用,雄性不育且草甘膦抗性的油菜籽已获商品化
种子不育	已在烟草中运用
闭花受精、孤雌生殖	实验室阶段
基因组不相容	实验室阶段
利用化学诱导型启动子	实验室阶段
去除外源基因	实验室阶段
降低杂交后代的适应性	实验室阶段

4.2 基因组不相容性

当转基因作物的基因组与杂草不相容时,它们杂交的几率就很低。通过研究,确定那些与相容性相关的基因,降低转基因作物与杂草之间的基因相容性,减少它们之间的杂交几率,可起到控制基因漂移的作用^[14]。

4.3 利用化学诱导型启动子去除外源基因

Keenan 等^[15]建议在转基因作物开花前,利用

化学物质诱导的位点特异性重组酶 Cre 的表达,通过重组机制将外源基因从种子或整个植株中去除,以从根本上防止外源基因的漂移。

4.4 降低杂交后代的适应性

将外源基因与那些对作物无害、却可大大降低杂草适应性的基因紧密相连,一旦发生基因漂移,杂交后代的竞争力下降,从而从杂草群体去除。这些基因包括可导致杂草的次级休眠期缺失、种子同步成熟、种子不散射、植株矮化等的基因。

5 实现对转入基因的实时监控

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种从水母等海洋生物中分离得到的可在紫外光或蓝光下发出绿色荧光的 27kDa 的单聚体蛋白,它使植物基因工程的研究人员第一次拥有了通用的、可对外源基因进行实时监控的可视化标记。一方面,它可在实验室阶段帮助实现对核基因或叶绿体基因转化过程的监控。已报道将 GFP 基因与抗性标记相连成功运用于小麦、苹果、大豆、油菜、甘蔗、烟草、莴苣、玉米等植物的核基因转化过程中,不仅可帮助克服抗生素或除草剂对植物组织再生的不利影响,还有助于转化组织的分离^[16]。Muhammad 等^[17]报道了利用 GFP 基因与抗生素抗性标记基因相融合,实现了对叶绿体基因转化过程的监控,可方便、高效地获得叶绿体被均一转化的植物组织。GFP 还可望完全取代非可视化的选择标记,这在大麦和水稻中已实现,与抗性标记系统比较,它降低了可处理的组织量下限,简化了筛选步骤,节约了处理时间。另一方面,由于转基因作物在生态环境安全性方面存在的许多不确定性,如基因漂移、外源基因表达产物对非目标生物的作用等,使得建立适用于田间运用的外源基因监控系统变得十分必要。GFP 则是可用于标记种子、花朵或其他器官的非常有价值的工具。Hudson L C 等将花粉特异性启动子引导下的 GFP 基因导入烟草中,实现对花粉的 GFP 标记,从而可区分转基因植物和非转基因植物的花粉,追踪转基因植物花粉的移动情况、空间传播方式和传粉机制,估计出漂移到一定距离外的转基因植物花粉数量。他们将开花的转基因植物与蜜蜂共置一笼中,在显微镜下观察到蜜蜂的翅、头、腿部带上了荧光花粉颗粒。转入种皮特异性启动子引导的 GFP 基因,可对转基因种子进行 GFP 标记,从而实现对转基因种子和

非转基因种子的大范围分拣,追踪其扩散。这一非破坏性、实时、动态、可视的监控技术无疑将推动植物基因工程及其在农业、生态安全性方面的研究。

6 保持 Bt 蛋白珍贵的杀虫性能

全世界每年使用的杀虫剂达 81 亿美元,而 Bt 技术可使这个数字下降 27 亿,但害虫正迅速产生针对 Bt 的抗性,目前已有菱形斑纹蛾(diamond back moth)产生了抗性,这一技术陷入进退两难的境地之中。

6.1 避难所策略

在抗性管理策略方面进行的大量研究有助于寻求目前与长远的平衡点。其中,既能保证足够数量的敏感害虫个体的存在,又能保证较高产量,且商业可行的重要策略之一就是建立避难所。避难所由非 Bt 植株组成,可使害虫群体的大部分保持 RS 或 SS 基因型,从而维持 Bt 蛋白的有效性。而避难所的大小和位置均是影响抗性管理策略有效性的重要变量。Anthony 等^[18]研究表明,增大避难所的面积可减缓害虫抗性的产生,而分离型避难所(避难所与 Bt 植株间存在一定距离)因可限制幼虫的移动,比混合型避难所更能保持敏感型害虫的数量。

6.2 采用综合性策略

害虫对杀虫剂产生抗性是一个关系到经济、生态和公众健康的重大问题,Hoy^[19]提出抗性是生物对环境压力进行反应的一个自然进化过程,抗性是无法进行“管理”的,只能通过综合性策略予以延缓,这些策略包括采用有效的耕作方法、监控害虫密度、衡量经济损失并只在必要时使用杀虫剂、重视自然天敌的作用等等。任何单一策略都不能解决问题,只有进一步掌握 Bt 抗性产生的生化和基因机制并共同使用多种策略,才能维持 Bt 技术的可持续性。由于不同害虫和作物的生物学特性不同,因此每种昆虫/Bt 作物系统有其独特的抗性管理要求,需进一步研究以确定影响不同系统的不同变量及其要求,从而延缓害虫抗性的出现。

7 最少地改变宿主基因组

通过基因组的最小改变来获取目的性状,从而使风险减少到最小是未来植物基因改造技术发展的方向。Berns 等^[20]报道可利用植物的同源重组系统将与光吸收分子相连的、具有特定序列的探针送达特定区域,在激光的作用下,只有该具有光敏感

性的区域受到作用而被敲除。利用此法将一与衰老相关的转录因子的编码基因的启动子中的关键区域去除,从而成功地推迟了花朵的腐烂。较之于现行技术的大范围干预,定位技术的实施无疑更为简便安全。

另一强大的技术是定点突变,即通过一个或几个碱基的改变来获得新性状。Zhu 等^[21]报道了利用一个与氨基酸合成相关的蛋白质的单点突变获得了抗除草剂的玉米,这一改变对植株的其他代谢特性不产生任何影响。

8 展 望

转基因植物的出现与发展引起了人们极大的关注,这些担忧主要集中在其对食用者的安全性,具有多种抗性基因的超级杂草和具有高度抗药性的农业害虫的出现,对非目标生物的危害,对生态平衡和生物多样性的影响,大范围环境释放可能造成的其他非预期效果或累积效应等。人们虽然在转基因植物及其产品的定性及定量检测技术、风险评估、环境释放的管理、市场标签制度等方面进行大量研究,但风险的防范和化解最终有赖于转基因植物本身的发展与成熟。第一代转基因植物的基因随机插入、抗生素或除草剂抗性标记基因滥用等缺点将为如上所述的更安全、成熟和精确的技术所克服,新一代转基因植物将对人类更安全、对环境更友好,而来自功能基因组学、蛋白组学和蛋白结构研究的更多成果必将激发植物转基因技术的进一步合理化和精确化,从根本上化解人们的担忧和有关安全性的激烈争论,为转基因技术的进一步发展创建良好的社会环境,从而改变转基因技术的未来以及人类的未来。

参考文献

- [1] Henry D, Muhammad SK, Lori A. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*, 2002, 2(2): 84 ~ 91
- [2] Ruf S, Hermann M, Berger J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9): 870 ~ 875
- [3] Whitney SM, Andrews TJ. Plastome-encoded bacterial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) supports photosynthesis and growth of tobacco. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(25): 14738 ~ 14743
- [4] Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. Marker free transgenic plants:

- engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet*, 2001, 39(2) : 109 ~ 116
- [5] Salle G. Joint FAO/WHO expert consultation on food derived from biotechnology, Topic 12: marker gene, 29 May ~ 2 June, 2000
- [6] Geave AP, Mitra DS, Mudge SR, et al. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(2) : 223 ~ 235
- [7] Corneille S, Lutz K, Svab Z, et al. Efficient elimination of selectable marker gene from the plastid genome by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant J*, 2001, 27(2) : 171 ~ 178
- [8] Alexander L, Rao KV, Thomas KH. HLP-mediated recombination of FRT sites in the maize genome. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(19) : 3784 ~ 3789
- [9] Siriluck Iamtham, Anil D. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(11) : 1172 ~ 1176
- [10] Hiroyasu E, Koichi S, Etsuko M, et al. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94 : 2117 ~ 2121
- [11] Dasgupta S, Collins GG, Hunt AG. Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants. *Plant J*, 1998, 16(1) : 107 ~ 116
- [12] Henry D, Amit D. Multigene Engineering: Dawn of an Exciting New Era in Biotechnology. *Current opinion of Molecular Biotechnology*, 2002, 13 : 136 ~ 141
- [13] Daniell H. Molecular strategies for gene containment in GM crops. *Nature Biotechnology*, 2002, (20) : 581 ~ 586
- [14] Kuvshinov V V, Koivu K, Kanerva A, et al. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. *Plant Sci*, 2001, 160(3) : 517 ~ 522
- [15] Keenan RJ, Stemmer WP. Nontransgenic crops from transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3) : 215 ~ 216
- [16] CN Stewart Jr. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(5) : 376 ~ 382
- [17] Muhammad SK, Pal M. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9) : 910 ~ 918
- [18] Anthony MS, Juliet DT, Richard TR, et al. Field test on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 : 339 ~ 342
- [19] Hby MA. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, 353 (1376) : 1787 ~ 1795
- [20] Berns MW, Wang Z, Dunn A, et al. Gene inactivation by multiphoton-targeted photochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 : 9504 ~ 9507
- [21] Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, et al. Engineering herbicide-resistance maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 : 555 ~ 558

Progress in Next Generation of Genetically Modified Plants

Li Haoyan^{1,2} Wang Wei³

(1 College of Life Sciences Zhejiang University Hangzhou 310027)

(2 Zhenjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Hangzhou 310011)

(3 Shanghai Jiao Tong University College of Life Sciences & Technology Shanghai 200030)

Abstract Genetically modified plants boast of excellent characteristics of pest resistance, disease resistance, stress resistance, high yield, modified nutrition ingredients etc, but it has also roused people's concerns about its effect on human's health and the environment. The progress of next generation of gene modification technology, such as chloroplast genetic engineering, gene containment, multi-gene co-transfer, removal of resistant marker gene, dynamic monitoring of foreign genes, resistance management and the minimum change of host genome will make the genetically modified plants safer for the consumers and the environment.

Key words Transgenic plants Safety Gene engineering