

of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. J Biol Chem, 1993, **268** (23): 17309~ 17316

5 Fu Ha, Xia K, Pallas D C *et al.* Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. Science, 1994, **266** (5182): 126~ 129

Research Progress of Raf-1 Protein Kinase in Signal Transduction. LI Biao, LI Xiao-mei (*The First Hospital and Institute of Nephrology, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

Abstract Raf-1 protein kinase has been known as an important component of Ras/ Raf-1/ MAPK signaling pathway related to cell proliferation. It also may be a cross-talk point among different signal transduction pathways. This is a review about the characteristics of Raf-1 molecule, its activation and relationship with other proteins.

Key words signal transduction, protein kinase, Raf-1, cells

外源基因在叶绿体中表达的研究

范国昌¹⁾ 张中林 钱凯先¹⁾ 沈桂芳
(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

摘要 综述了叶绿体表达系统的特点, 及国内外此方面的研究动态, 提出了外源基因在叶绿体中表达存在的问题和解决策略.

关键词 叶绿体, 外源基因表达体系, 同质化

学科分类号 Q78

自 1962 年, Ris 和 Plaut 利用电镜首次证明叶绿体中含有 DNA 以来, 学者们一直致力于研究它的结构和功能. 随着研究的深入, 人们对叶绿体提出了新的课题: 外源基因能否在叶绿体中表达? 表达量如何? 本文综述近年来国内外此方面的研究成果并就此进行探讨.

1 叶绿体表达系统的特点

叶绿体基因组的遗传表达体系具有原核性. 其基因组分子质量小, 无组蛋白、易操作, 基因的排列方式, 调控方式, GC 碱基对含量以及翻译所偏爱的密码子与原核生物相接近, 这将有利于来自原核生物的基因 (如 Bt 毒蛋白基因等) 的直接高效表达. 同时叶绿体基因组具有某些真核基因组的特点, 所以叶绿体也有可能直接表达来自真核生物的基因.

大多数植物的叶绿体基因组为多顺反子转

录单位, 根据对 15 个质体基因连缀转录物测量的结果, 发现在质体中, 一些基因的转录活性大约有 300 倍的差别, 其 RNA 水平有 900 倍的变化. 而且质体中不同 mRNA 的稳定性差别很大, 许多叶绿体 mRNA 的稳定性和位于 3' 端非翻译区的一些短倒位重复序列有关, 而 mRNA5' 端多样性的加工可能控制一些 mRNA 在不同物种、不同发育阶段的翻译能力. 在叶绿体中, 有关蛋白质的翻译后修饰, 研究最广泛的是其磷酸化, 无论是内外包被膜、类囊体膜、基质中都发现有磷酸化的蛋白质^[1].

叶绿体遗传方式是母系遗传, 所以一旦得到叶绿体稳定转化植株, 其自交后代应当全部是转化纯系. 这一特点还决定了性状不会通过花粉进行传递, 更有利于环境保护.

¹⁾ 浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027.
收稿日期: 1997-10-31, 修回日期: 1998-04-03

2 叶绿体中表达外源基因的研究进展

1988年, Boynton 及其合作者利用基因枪法, 将带有 *atpB* 野生型基因的叶绿体 DNA 直接轰击三个含有 *atpB* 基因突变型的衣藻细胞, 结果完全恢复了这些突变体的光合作用能力, 证明了植物叶绿体基因组是可以被转化的. Svab 等 (1990年) 首次成功地转化了烟草叶绿体基因组, 获得了稳定表达. Daniell 等 (1991年) 也在小麦的叶片和愈伤组织的叶绿体中得到了报告基因 GUS 的瞬间表达的结果.

1992年以来, 美国 Rutgers 大学的 Maliga 实验室的工作尤其引人注目. 他们不仅从分子水平上揭示了供体 DNA 整合至烟草叶绿体基因组的本质, 而且还证实了 *uidA* 基因 (编码葡萄糖苷酶 GUS) 能在烟草质体转化株中高效表达, 其表达产物——葡萄糖苷酸酶可积累至总蛋白含量的 2.5%, 并表现出稳定的母系遗传^[1]. 而 *uidA* 的核转化株中, GUS 的积累量要低得多, 只占植物总蛋白的 0.1%. 1995年他们又将 Bt 毒蛋白基因和启动子 *Prrn* 的嵌合基因导入到烟草叶绿体中, 得到的毒蛋白原占可溶性蛋白 3%~5% 的高效表达, 杀虫活性在 90% 以上. 该表达量比改造后 Bt 毒蛋白基因转到植物核基因组中的最高表达量高了 50 倍, 从而在叶绿体基因工程的应用方面迈出了可喜的一步^[2].

近来又有报道, 将含有外源基因的非抗性标记载体通过与抗性标记载体共转化而将外源基因导入并整合到烟草叶绿体基因组中; 另外, 在拟南芥 (*Arabidopsis*) 叶绿体中也建立了新的瞬间表达体系, 使这种常用模式植物有可能应用于叶绿体遗传工程的研究中^[1]. Guda 等^[3]把合成的聚合物基因 (GVGVP) 121 插入到载体质粒 pZS197 上的 16S rRNA 启动子和 *psbA*3' 之间, 得到同源重组载体质粒 pZS-CG-121, 利用基因枪法将该载体导入到烟草叶绿体中, 以此来生产有利于环境的可生物降解塑料.

1997年, Wilfrid 等^[4]利用农杆菌介导,

rbcS 信号肽作为引导肽在烟草叶绿体中成功地表达了具有活性的人血红蛋白 rHb 四聚体, 其表达量占总蛋白的 0.05%, 并且消除了细菌源、动物源 rHb 具有的污染, 显示出利用转基因植物大量提供 rHb 的潜力. 另据 Biotech Report (1997, Vol 14 (7): 11) 报道, 美国的分子生物学家们, 已将 Bt 毒蛋白基因导入棉花叶绿体中, 此抗虫棉能有效防止昆虫产生 Bt 毒蛋白抗性, 以及 Bt 毒蛋白基因的扩散.

3 存在问题与解决策略

尽管叶绿体表达系统具有优势和很好的前景, 但是在产业化应用的道路上还有许多难题需要解决.

由于质体基因组拷贝数远较核基因组高, 如: 含单个叶绿体的衣藻有 80 个基因组拷贝; 而高等植物细胞内则含有 100 或更多个质体, 每个质体又有许多个基因组拷贝. 因此, 整合入外源基因的叶绿体基因组要取代所有原基因组拷贝 (即同质化), 是叶绿体表达体系要解决的关键问题. 目前可以采取三种方法: a. 在外源基因转入叶绿体前, 降低受体叶绿体基因组拷贝数, 如: 在衣藻培养基中加入 0.5 mmol/L FdUrd, 可抑制衣藻叶绿体 DNA 的复制, 使衣藻叶绿体基因组拷贝数降低 10 倍. b. 得到外源基因的转化子后, 不断在增加选择压的培养基上反复筛选, 从而让整合有外源基因的拷贝占优势, 逐步淘汰野生型拷贝. c. 选用光致死的突变体 (如 *petB* 突变体) 作为外源基因的转化受体, 再构建带有野生型 *petB* 基因 (作为同源片段的一部分)——外源基因表达盒的同源重组型质粒, 将此质粒用基因枪法轰击入叶绿体, 通过光照培养来筛选外源基因转化株 (全文另发), 这样可避免在抗生素的选择培养基上经常出现的卫星型非转化叶绿体拷贝现象.

另外, 外源基因在植物叶绿体中的表达量相对较低, 一般仅占可溶性蛋白的 5% 以下, 同时, 外源基因的表达产物也只局限在叶绿体

内,这在很大程度上影响了叶绿体表达体系的产业化进程.近年来,中国农业科学院生物技术中心叶绿体基因工程实验室,在完善叶绿体转化体系的基础上,开始进行外源基因在叶绿体中的表达量的研究: a. 筛选可在叶绿体中诱导表达的强启动子, b. 在启动子 5' 端和终止子 3' 端进行适当修饰,以增加 mRNA 的稳定性和提高 mRNA 的翻译能力, c. 外源基因表达盒的有效串连 (一般 3 个左右), d. 通过构建带有标签抗体基因的融合表达载体,在获得稳定的转基因植株后,分离叶绿体,将其破碎,混和物经过带有此抗体的亲和层析柱,再洗脱而得目的蛋白.

4 结 论

综上所述,利用植物叶绿体作为外源基因的表达体系,是植物分子生物学发展的新思路.植物细胞中含有多个叶绿体,而每个叶绿体中又含有多个基因组拷贝.如果将外源基因导入叶绿体基因组中,并达到同质化,该基因在细胞内的拷贝数将增加到大约10 000个.增加基因拷贝数并结合使用叶绿体中表达的强启动子,可以大大提高该基因的表达量.随着生物技术的发展,叶绿体生物反应器必将得到很大应用.

参 考 文 献

1 Ort D R, Youm C F. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 589~ 619
2 McBride K E, Svab Z, Schaaf D J *et al.* Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/technology*, 1995, **13** (4): 362~ 365
3 Guda C, Daniell H. Expression of a synthetic gene for biodegradable plastics in tobacco chloroplasts. *Plant Physiol*, 1996, **111** (2): Suppl~ 56
4 Wilfrid D, Josee Pagnier, Claude Poyart *et al.* Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*, 1997, **386** (6620): 29~ 30

Expression of Foreign Gene in Chloroplast.
FAN Guo-chang¹⁾, ZHANG Zhong-lin, QIAN Kai-xian¹⁾, SHEN Gu-fang (*Biotechnology Research Centre, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China;* ¹⁾ *Department of Biosciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*).

Abstract The characterizations of chloroplast expressing system were described, and research progressing was also summerized, then put forward some questions about foreign gene expression in chloroplast, and give some ideas to resolve them.
Key words chloroplast, foreign gene expressing system, homoplasmy

白介素-6 细胞因子家族新成员: 心肌营养素-1

华 平 葛忠良

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 心肌营养素-1 (cardiotrophin-1, CT-1) 是一个新发现的白介素-6 家族细胞因子, 小鼠 CT-1 的 mRNA 长约 1.4 kb, 编码蛋白由 203 个氨基酸组成, 以 gp130 和 LIFR 为受体. CT-1 对心肌细胞既有肥大诱导作用, 又有保护作用; 能改变交感神经元的递质表型, 促进多巴胺神经元、睫状神经元和运动神经元的存活; 还能抑制骨髓白血病细胞 M1 的生长; 诱导肝细胞急性相反应; 小鼠腹腔注射给药可增加血小板、红细胞记数和血红蛋白浓度.
关键词 心肌营养素-1, 白介素-6, gp130, 心肌肥大
学科分类号 Q71