

用反义技术解决番茄保鲜的研究进展*

陈 瑛 黄永芬 汪清胤

(哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080)

摘要 目前发现 20 多种与果实发育有关的酶和蛋白, 其中 14 种 mRNA 在果实成熟过程中增加, 8 种受乙烯诱导, 相关的基因已被克隆、测序并在染色体上定位. 利用反义技术抑制这些酶和蛋白的表达, 一方面可研究它们在果实成熟过程中的作用, 另一方面从分子水平上解决了番茄保鲜问题. 已将 7 种反义基因导入番茄, 反义果实离体条件下可保鲜 90~120 d.

关键词 番茄, 成熟酶, 反义技术, 保鲜

有人统计过, 每年烂在地里或没等吃就烂了的番茄占总数的一半. 传统的利用气调或使用各种保鲜涂剂的方法相应增加了番茄的成本. 人们试图用基因工程的方法来解决这一问题. 1986 年第一次应用反义技术抑制了 CAT (氯霉素乙酰转移酶) 基因^[1], 为用反义技术解决番茄保鲜的研究指明了道路. 以美国 Calgene 公司、Monsanto 公司以及英国 ICI Seeds 公司为首的至少 10 多家生物技术公司以每年数亿美元的投入掀起了利用生物技术改良作物品质的第二浪潮.

1 反义 RNA 与反义技术

1981 年 Tomizawa 发现了反义 RNA^[2], 它可以与靶 RNA 互补杂交产生双链 RNA 来阻断基因的正常表达. 其机理仍在探讨中, 目前有几种推测^[3]: a. 转录提前终止. 反义 RNA 可以与靶 RNA 相互作用形成类似不依赖 ρ 因子的终止子结构, 使转录过程提前终止, 从而对 DNA 转录起负调控作用. b. 降低 mRNA 浓度. 反义 RNA 与靶 RNA 结合形成双链结构, 这种杂交分子极不稳定, 易被酶降解掉. c. 抑制翻译起始. 反义 RNA 可直接结合在目标 mRNA 的核糖体结合区以及起始密码处, 影响核糖体与 mRNA 结合, 从而阻断 mRNA 翻译. d. 抑制肽链延伸. 反义 RNA 的

阻断作用并不是完全不表达了, 而即便表达出部分肽链, RNA 杂交双链也会阻止肽链的进一步延伸. e. 碱基修饰. 当反义 RNA:mRNA 杂交分子注入细胞后, 其中 A-U 碱基对中的 A 可被修饰为 I, 改变了密码结构, 这种碱基修饰作用可以加强反义 RNA 的抑制作用.

通过人工导入反义 RNA 来调控细胞内某些基因的表达从而定向地控制某些生物性状, 称之为反义技术. 导入反义 RNA 的方法有两种: 一种是插入法, 即通过 cDNA 文库路线构建反义基因, 通过载体法将反义融合基因插入到受体染色体上并随受体基因的表达而表达. 另一种是注射法, 即将反义 RNA 直接注射到受体细胞内, 干扰受体细胞 mRNA 的翻译过程, 从而起到短时间的抑制作用.

2 与番茄果实成熟有关的酶和蛋白

van der Krol 等^[4]最早提出用反义 RNA 可以对内源植物基因进行负调控. 目前已成功地建立了通过 cDNA 文库合成反义基因再转化植物的全套技术.

利用反义技术来解决番茄保鲜问题, 其首要问题是与成熟有关的因素的研究. 目前发现与果实成熟有关的酶和蛋白有 20 多种 (表 1).

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-04-02, 修回日期: 1995-07-04

表 1 与果实成熟有关的酶和蛋白^[5~9]

酶和蛋白	cDNA 大小 /kb	转录产物 大小/kb	多肽大小 /ku	染色体 定位	测序	绿果中 mRNA	熟果中 mRNA	是否受 乙烯诱导
多聚半乳糖醛酸酶	1.8/1.6	1.58	55/50	10	+	很低	增高	+
外多聚半乳糖醛酸酶 (exo-PG)						很低	变化 很小	
内多聚半乳糖醛酸酶 (endo-PG)						无	增高	
1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶 (ACC 合成酶)	1.846	54.7			+	未测	增高	+
ACC 氧化酶 (EFE)	1.4	1.4	35	7	+	很低	增高	+
八氢番茄红素合成酶 (PSY)	1.7	1.96	48 ¹⁾	7	+	低	增高	+
八氢番茄红素脱氢酶 (PDS)				3				
番茄红素环化酶 (LCY)								
果胶酯酶 (PE) ²⁾	1.665/0.6	1.6/1.9	42.5/37		+	高	降低	+
热休克相关蛋白 (pTOM66)	0.652	0.53			+	低	增高	
巯基蛋白酶 (C14)	1.378	1.9			+	未测	降低	
与 I 型蛋白抑制剂基因同源 克隆 (E17)		0.58			+	低	增高	+
与 Bowman-Birk 型蛋白抑制 剂和贮存蛋白同源的蛋白 (2A11)		0.7	10.6		+	低	增高	
E4		0.88	25		+	低	增高	+
与 EFE 相关的羟化酶 (E8)		1.6	42		+	低	增高	+
酸性转化酶	2.3		52	3				
蔗糖合成酶						高	降低	
葡聚糖酶			12					
半乳糖苷酶			63				降低 (I、III 型) 增高 (II 型)	
精氨酸脱羧酶								
纤维素酶								

¹⁾Fraser 测出在绿果中为 42 ku, 在成熟果中为 38 ku.

²⁾又称果胶甲基酯酶 (PME).

3 反义基因转化番茄

目前成功地从 cDNA 文库分离并利用反义技术转化番茄的成熟基因至少有 7 个: PG、

PE、ACC 合成酶、ACC 氧化酶、pTOM5、E8 和 2A11.

3.1 PG 基因的反义抑制

利用反义技术抑制番茄成熟的首例是 PG

(多聚半乳糖醛酸酶) 基因的反义抑制^[10]。早在 1964 年 Hobson 就指出了 PG 酶和番茄果实成熟的关系。其主要功能是将果实细胞壁中多聚半乳糖醛酸降解为半乳糖醛酸, 使细胞壁结构解体导致果实变软。它在绿果中没有, 只是在成熟过程中才开始合成。它至少有 3 个异构形式 (PG1、PG2、PG3), 1986 年 Grierson 等^[11]克隆、测序并鉴定了番茄 PG 酶基因。同年, Penna 等^[12]也测序并鉴定了 PG 基因的 cDNA 文库。

1988 年美国 Calgene 公司以及英国诺丁堡大学各自独立地构建了 PG 的反义基因。Smith 等^[10]将 PG cDNA 5' 端的 730 bp 片段反向插入, 接上 CaMV 35 S 启动子和 Nos 基因 3' 末端, 构建了一个反义融合基因, 将其导入 Bin19, 再通过三亲交配转入农杆菌 LBA4404, 用来转化番茄茎段, 在叶中和果实中都发现了反义 PG RNA, 其 PG 酶活性只有正常株的 10%。Sheehy 等^[13]用全长的 PG cDNA 做了同样的实验。测得在果实成熟的各个阶段 PG mRNA 和 PG 酶的水平大大降低。PG 反义 RNA 只专一性地抑制 PG 酶的活性, 对其他生理生化过程, 如乙烯产量、番茄红素合成、蔗糖酶活性调节以及果实抗压性等都无影响。反义基因能稳定遗传, 自花授粉植株的后代含有 0、1 或 2 个反义基因拷贝^[14], 继承了 2 个拷贝反义基因的植株, PG 酶活性只有正常株的 1%, 说明多拷贝反义抑制是极强的抑制特定基因的手段。

Steve 等^[15]将受乙烯诱导的 E8 启动子启动的 PG 基因转入 rin 突变株 (正常状态下, 只低水平表达 PG 酶, 果实几乎不变软), 然后用乙烯处理转基因果, 果胶急剧降解, 而变软过程却没有发生。证实 PG 酶不是果实变软的决定因素。

PG 反义果在抗摔、抗机械损伤以及防止二级真菌感染上有很大优越性。其果皮细胞紧密连接、易除去, 又给制罐头工艺提供了便利。

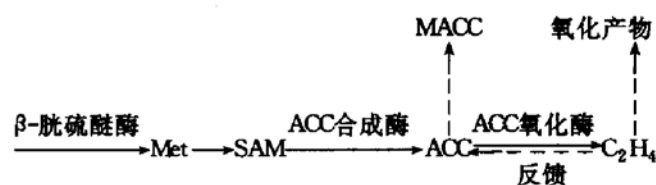
3.2 PE 基因的研究

果胶酯酶 (PE) 在绿果中就存在了, 在

成熟过程中 mRNA 水平降低, 而 PE 酶变化很小。PE 酶活性降低可以提高果胶酯化, 从而防止细胞壁降解。1986 年 Markovic 等^[16]发表了番茄 PE 的氨基酸序列。Ray 等^[17]1988 年构建了番茄 PE 的 cDNA 文库, 并构建了一个 35 S 启动子控制的反义 PE 基因。反义果只有大约 10% 的正常 PE 活性, 但叶和根中 PE 酶的活性无变化 (L. Hall, 个人通讯)。

3.3 乙烯合成的控制和保鲜

乙烯在成熟过程中起着至关重要的作用。乙烯通过控制和协调与成熟过程有关基因的表达来调控果实成熟, 这些过程包括: 加强呼吸跃迁、乙烯自催化、叶绿素降解、类胡萝卜素合成、淀粉转变成蔗糖和提高细胞壁降解酶活性。乙烯生物合成路径如下:



3.3.1 ACC 合成酶: 1979 年 Aadms 和 Yang 确定了 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 是乙烯合成的直接前体。1991 年 Oeller^[18]利用夏南瓜 (Zucchini) 的 ACC 合成酶基因调出了番茄的 ACC 合成酶基因。用 35 S CaMV 启动子反向连接上 1.7 kb 该基因的酶切片段, 3' 端连接上 NOS 终止子, 再将反义融合基因转到农杆菌, 进而转化番茄。反义果中乙烯含量减少 99.5%, 每小时每克果释放乙烯在 0.1 nl 以下; 由叶绿素降解、番茄红素合成而得到的番茄红颜色的产生都受到抑制; 在空气中放 95 d 也不发生呼吸剧增现象。绿熟反义果在室温空气中或在植株上可保存 120 d, 最后变为橙色, 150 d 后也不变红、变软, 不产生气味。

反义 ACC 基因的抑制作用是可以逆转的。外源乙烯或丙烯处理反义果 5~7 d 即可成熟食用。该项研究已获美国农业部专利, 被称为美国农业最伟大的工程产品之一。

3.3.2 ACC 氧化酶: 乙烯生物合成最后一步

是由 ACC 氧化酶催化的. 1985 年 Liu 等^[19]最初称之为乙烯形成酶 (EFE). 1990 年 Hamilton 等^[20]构建了 EFE cDNA 克隆——pTOM13, 并构建了反义 EFE 融合基因, 转入番茄后 ACC 合成酶活性大大降低, 乙烯产量亦降低 97%. 在不同植株中反义基因效力不同, 这可能与基因插入位点有关. 在反义果中, 成熟的许多方面都延缓了, 将果实从植株上摘取下来后延缓作用将加强, 绿熟果成熟延缓作用最强. 施加乙烯后成熟抑制作用可以逆转, 但有些反义果只能发生部分逆转, 这表明乙烯在果实成熟过程中不只是简单的开关, 而具有更为复杂的作用.

3.3.3 E8 基因: E8 编码与 ACC 氧化酶同源的羟化酶, 二者在 295 个氨基酸中 34% 是相似的. E8 在未成熟的果实中没有, 在果实颜色变化的同时出现. Deikman 等^[21]发现并鉴定了影响 E8 基因表达的三个 5' 区和一个 3' 区的 DNA 序列. Penarrubia 等^[22]将 E8 反义基因转化番茄, 反义果中 E8 蛋白不足正常果的 1%, 而乙烯量却增加了, 说明 E8 对于果实中乙烯的积累起负作用. 它可能是在果实成熟过程中通过限制 ACC 量或使之失活来抑制乙烯产量.

Tigchelaar^[23]和 Baldwin^[24]认为 PG 酶片段生成可刺激乙烯生成. Navre 指出乙烯的合成优先于 PG 酶的合成. 后来发现, 在反义 EFE 果中即便转录大量的 PG mRNA, PG 多肽也不积累, 这表明 PG 的转录与乙烯是相互独立的, 乙烯只是控制 PG mRNA 的翻译能力或 PG 多肽的稳定性. Theologis^[25]也提出乙烯是控制果实成熟的一个变阻器, 而不是一个开关. 同时对于突变体研究表明: 番茄果实成熟过程至少有两个信息传递途径, 一是不依赖乙烯的路径, 如 PG、ACC 氧化酶、叶绿素酶基因的转录; 二是依赖乙烯的路径, 如 PG 的翻译、ACC 合成酶基因的表达、番茄红素和香味的产生以及呼吸代谢等. 低水平乙烯对于刺激成熟的某些方面是有效的, 但要使果实完全成熟则需要高水平的乙烯; 另外, 生长在植

株上和摘取下来的反义果在成熟上的差异, 说明果实成熟过程还有其他因子参与. 该因子与果实是否长在植株上有关, 它在低水平乙烯存在下即能调节成熟. 这个“成熟因子 X” (ripening-factor-X), 可能是一个重要的加强子, 或者是一个在果实成熟开启后即可从果实转位的可输出的抑制子.

3.4 八氢番茄红素合成酶和果实颜色的控制

pTOM5 编码八氢番茄红素合成酶, 在果实成熟过程中能影响类胡萝卜素的产量. 在反义 pTOM5 中, 未检测到番茄红素, 所结的果是黄色的. 而果实成熟的其他方面, 如 PG mRNA 水平没受影响. 从另一角度讲, 如果 pTOM5 基因在番茄中过度表达, 那么果实的颜色就会加深, 这似乎可以解决转基因果在色泽上居于劣势这一问题. 对于番茄商来说也将会创造出不小的价值.

4 展 望

用器官特异性或发育调节启动子来启动基因表达, 可以达到在植物特异部位或生命周期特定阶段中表达. 1991 年 Van Haaren 等^[26]将番茄 2A11 基因 5' 和 3' 区加到 GUS 基因两边, 获得了 GUS 基因只在果实中表达而不在其他组织、器官中表达的转基因植株. E4 在成熟开启后马上开始转录, 它对乙烯极其敏感. 针对这一特性, Montgomery 等^[27]于 1993 年分析了 E4 启动子, 鉴定了受乙烯诱导的 -142 ~ -110 区域. 我们可以在任何时候通过施加乙烯来启动 E4 启动子后面的基因的表达. 这样反义基因的调节更具有方向性和可调性了.

利用反义技术进行番茄保鲜的优点是能高度专一地调节基因的活动; 另外, 由于只是反向引入, 不改变基因结构, 对植物无毒性, 比较安全. 然而用反义 RNA 分子调节基因表达时, 经常会碰到一些困难: a. 反义模板的稳定性差. b. 反义 RNA 的最佳长度难以确定. c. 对寿命不同的目标 mRNA 需采用不同的调控水平. d. 反义 RNA: 目标 RNA 互补区内各

自会形成有碍互补结合的二级结构. e. 启动子的选择. 针对上述问题, 在设计反义 RNA 分子时: a. 反义模板比正向模板稳定性差可能是由于反义 RNA 上缺少活跃的翻译过程, 若将反义模板的 3' 端同另一基因的编码区相连可通过核糖体保护反义分子. b. 由于短寿 mRNA 可能未和反义 RNA 形成双链时就被降解, 对应基因的调控只能在转录水平上, 而长寿 mRNA 的基因表达只能在翻译水平上加以控制. c. 真核生物中 5' 端非编码区形成的杂交分子比编码区杂交分子更为有效. d. 若在二级结构的“基”部分插入一个或几个核苷酸即可破坏二级结构的稳定性. e. 使用强启动子来获得高水平的反义 RNA 更为有利.

用基因工程方法培育作物新品种目的性强、见效快, 然而转基因植物的商业开发比 80 年代中期人们预想的要慢得多, 这很大程度上是由于人们对遗传工程产品安全的担心. 由于转基因操作需要引进抗药性基因, 有的人担心它会导致人具有抗药性. 但食用含抗生素抗性基因的转基因作物是没有危险的, 基因本身以及编码的蛋白质对消费者都没有毒性, 它们在消化过程中会象其他核酸和蛋白质一样被分解. Dale 等^[28]运用传统的转基因技术成功地使选择标记基因失活, 从而使转基因烟草不再具有 Kan^r, 这一工作意义十分重大. 由此, 利用反义技术培育不具抗药性的保鲜番茄势在必行.

参 考 文 献

- Joseph R E, Ronald W D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**: 5372
- 闻 伟, 杨胜利. *生物工程进展*, 1990; **10** (3): 38
- 周爱儒. *生命的化学*, 1991; **11** (3): 14
- van der Krol A R, Lenting P E, Veenstra J *et al.* *Nature*, 1988; **333**: 866
- Brady C. *New Zeal J Crop Hort Sci*, 1992; **20**: 107
- Klann E M, Chetelat R T, Bennett A B. *Plant Physiol*, 1993; **103**: 863
- Fraser P D, Mark R T, Colin R B *et al.* *Plant Physiol*, 1994; **105** (1): 405
- Rastogi R, Dulson J, Rothstein S J *et al.* *Plant Physiol*, 1993; **103** (3): 829
- Pressey R. *Phytochemistry*, 1987; **26**: 1867
- Smith C J S, Watson C F, Ray J *et al.* *Nature*, 1988; **334** (25): 724
- Grierson D, Tucker G A, Keen J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1986; **14**: 8595
- Penna D D, Alexander D C, Bennett A B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**: 6420
- Sheehy R E, Kramer M, Hiatt W R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 8805
- Gray J, Picton S, Shabbeer J *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992; **19**: 69
- Steve P, Gray J, Barton S *et al.* *Plant Mol Biol*, 1993; **23**: 193
- Markovic O, Jornell H. *Eur J Biochem*, 1986; **158**: 455
- Ray J, Knapp J, Grierson D *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; **174**: 119
- Oeller P W, Min-Wong L, Taylor L P *et al.* *Science*, 1991; **254**: 437
- Liu Y, Hoffman N E, Yang S E. *Plant Physiol*, 1985; **77**: 407
- Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. *Nature*, 1990; **346**: 284
- Deikman J, Fischer R L. *EMBO J*, 1988; **7**: 3315
- Penarrubia L, Aguilar M, Robert L F. *Plant Cell*, 1992; **4**: 681
- Tigchelaar E C, McGlasson W B, Buescher R W. *J Hort Sci*, 1978; **17**: 508
- Baldwin E A, Pressey R. *J Am Soc Hort Sci*, 1988; **113**: 92
- Theologis A, Zarembinski T I, Oeller D W *et al.* *Plant Physiol*, 1992; **100**: 549
- Van Haaren M J J, Houck C M. *Plant Mol Biol*, 1991; **17**: 615
- Montgomery J, Goldman S, Deikman J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 5939
- Dale E C, Ow D W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 10558

Progress in the Studies on Keeping Tomato Fresh by Using Antisense Technology. Chen Ying, Huang Yongfen, Wang Qingyin (*Biology Department, Harbin Normal University, Harbin 150080, China*).

Abstract At present, it is found that there are over 20 enzymes related to fruit development among which 14 mRNA increase. Eight

enzymes can be induced by ethylene. Many ripening-related genes have been cloned, sequenced and located in the chromosomes. The expression of these enzymes can be inhibited by using antisense technology, thus disclosing the function of them in fruit ripening, and inhibiting

the senescent process of tomato from molecular level. Seven antisense genes have been transferred to tomato. Antisense fruits keep fresh for 90 ~ 120 days *in vitro*.

Key words tomato, ripening-related enzymes, antisense technology, keeping fresh

人羧酯酶的研究进展*

唐景荣 孙曼霁

(军事医学科学院药物毒物研究所, 北京 100850)

摘要 羧酯酶是一类可与有机磷化合物结合且活性受抑制的 B-酯酶, 分布很广, 能水解许多羧酯类、酰胺类、硫酯类物质, 其天然底物尚未清楚, 故其生理功能仍在研究中, 可能与脂质代谢, 药物或毒物的生物转化有关. 对羧酯酶的一级结构及基因序列的研究表明, 羧酯酶是由许多生化特性不同的同工酶组成.

关键词 羧酯酶, 生化特性, 一级结构, 活性位点, 基因

羧酯酶 (carboxylesterases, EC 3.1.1.1) 是一类广泛分布于组织与器官的丝氨酸酶类, 能水解许多含有羧酯键、硫酯键、酰胺键的内源性及外源性物质, 可与有机磷化合物结合且活性受抑制, 属于 B-脂酶, 其主要功能可能是参与药物与毒物等的生物转化、脂质代谢、信号转导及维持生物膜结构的完整性^[1~5]. 因其生理底物尚不清楚, 故该酶在体内的生理作用亟待研究. 近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 羧酯酶的一级结构及其体外表达的研究更加深入, 将促进该酶生物特性及相关功能的研究.

1 分布与亚细胞定位

1.1 分布

羧酯酶在生物界分布极广, 从古细菌和真细菌^[5,6]、至真核微生物^[7]、昆虫乃至哺乳动物的各种组织均有活性较高的羧酯酶, 尤以肝脏中的酶活性最高^[1,8,9]. 用组织化学染色法

发现在血管内皮细胞^[10]、血液单核细胞^[11]、肺泡巨噬细胞^[2]、肾近曲小管上皮细胞、肠上皮细胞, 中枢神经系统均有羧酯酶分布^[10], 而血清中的羧酯酶是由肝脏合成分泌的^[3,12].

1.2 亚细胞定位

羧酯酶的亚细胞分布有明显的组织差异性. 采用差速离心法发现, 人肝、肾、脑等组织的羧酯酶主要位于微粒体的可溶性部分^[9,10], 而电镜观察其分布非常复杂, 羧酯酶主要位于肝细胞的粗面及滑面内质网腔内、线粒体、胞浆脂滴内; 肾近曲小管上皮细胞的滑面内质网及线粒体周围; 而空肠上皮细胞中除位于滑面内质网外, 尚存在于核膜及其他部位. 羧酯酶胞内分布的差异性, 一方面是由于存在着性质不同的同工酶^[9~12], 另一方面与该酶羧基端的氨基酸序列有关^[13~15].

*解放军总后勤部攻关课题.

收稿日期: 1995-04-07, 修回日期: 1995-06-10