

- Acad Sci USA, 1994; **91**: 4214
- 3 Oswald I P, Eltoum I, Wynn T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 999
  - 4 Nathan C, Xie Q W. J Biol Chem, 1994; **269**: 13725
  - 5 Knowles R G, Moncada S. Biochemistry, 1994; **298**: 249
  - 6 Marletta M A. Cell, 1994; **78**: 927
  - 7 Abu-Soud H M, Stuehr D J. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 10769
  - 8 Stuehr D J, Griffith O W. In: Meister A ed. Advances in enzymology. New York: Wiley Press, 1992: 287
  - 9 Kamijo R, Harada H, Matsuyama T *et al.* J Exp Med, 1994; **180**: 977
  - 10 Lowenstein C J, Alley E W, Raval P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 9730
  - 11 Youichi N, Nobuhiro I, Shoji T. Biochem Biophys Res Commun, 1994; **200**: 802
  - 12 Weiner C P, Lizasoain I, Baglis S A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **97**: 5212
  - 13 Chartrair N A, Geller D A, Koty P P *et al.* J Biol Chem, 1994; **269**: 6765
  - 14 Marsden P A, Heng H H Q, Scherer S W *et al.* J Biol Chem, 1993; **268**: 17478
  - 15 Miyahara K, Kawamoto T, Sase K *et al.* Eur J Biochem, 1994; **223**: 719
  - 16 Marletta M A. J Biol Chem, 1993; **268**: 12231
  - 17 Rush M D. Cell, 1994; **76**: 411
  - 18 Huang P L, Dawson T M, Bredt D S *et al.* Cell, 1993; **75**: 1273
  - 19 Bredt D S, Snyder S H. Annu Rev Biochem, 1994; **63**: 175
  - 20 Anggard E. The Lancet, 1994; **343**: 1199

**Nitric Oxide Synthase: Biochemistry and Molecular Biology.** Chen Jinwen, Sun Changkai, Huang Yuanguai (*Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China*).

**Abstract** Nitric oxide synthase (NOS) is an important part of nitric oxide (NO) research in the fields of biology and medicine. In recent years, there is a rapid development in the researches of the nature and molecular characteristics of NOS, ever in some aspects of molecular genetics of NOS. Researches showed that to intervene in some processes of NOS-NO pathway, such as activation of the enzyme, synthesis, release and transportation of NO, and even genes related to encoding and expressing enzyme will provide new clues and methods for managing some clinic problems.

**Key words** nitric oxide synthase (NOS), nitric oxide (NO), biochemistry, molecular biology

## 反义 RNA 技术在植物基因工程领域中的应用

周跃钢

(西南农业大学生物化学教研组, 重庆 630716)

**摘要** 反义 RNA 技术在植物基因工程领域中的应用包括: a. 番茄和其他水果的成熟控制; b. 植物的抗病性; c. 改变花卉的颜色; d. 植物淀粉合成的控制; e. 油料植物种子中脂肪酸合成的控制; f. 杂交种子生产中雄性不育性的控制; g. 其他.

**关键词** 反义 RNA, 反义基因, 成熟, 植物病毒, 花色, 淀粉合成, 脂肪酸合成, 不育性

反义 RNA 是指与靶 RNA (多为 mRNA) 具有互补序列的 RNA 分子, 它通过与靶 RNA 进行碱基配对结合的方式参与基因表达的调控. 通常把转录产生反义 RNA 的基因称为反义基因或反义 DNA, 因其与转录产生靶 RNA 的目的基因是反义的<sup>[1]</sup>.

参与基因表达调控的反义 RNA 最初是在

原核生物中发现的, 随后又陆续在原核生物中发现了许多种不同的天然存在的反义 RNA, 如在质粒的复制, Tn10 的转座, 噬菌体的繁殖等许多过程中都发现了反义 RNA 调控系统的存在. 显然, 在原核生物中存在有反义

收稿日期: 1995-07-21, 修回日期: 1996-01-10

RNA 调控系统是一种普遍的现象. 在真核生物中一直未能找到天然存在的反义 RNA 调控系统, 然而却检测出了许多具有互补碱基序列的小分子 RNA, 推测其中一部分参与了基因表达的调控, 可能起着类似于反义 RNA 的作用<sup>[2,3]</sup>. 由于从自然界中获得有价值的目标序列的反义 RNA 的可能性几乎为零, 因此, 反义 RNA 通常是通过人工的方法在体内或体外合成<sup>[1]</sup>. 反义 RNA 技术目前正日益广泛地应用于基因表达调控的研究和基因工程中, 成为基因工程操作中的一个强有力的工具<sup>[2~5]</sup>.

## 1 反义 RNA 的作用原理

反义 RNA 是通过与靶 RNA 进行碱基配对结合的方式参与有关的基因表达的调控. 目前推测的反义 RNA 作用方式有: a. 与 mRNA 结合形成的二聚体阻断了核糖核蛋白体同 mRNA 的结合, 从而达到了阻断翻译的目的; b. 与 mRNA 的结合阻断了 mRNA 向细胞质的运输; c. 与 mRNA 的结合使得 mRNA 易被酶识别而降解<sup>[2,3]</sup>. 但尚不清楚是否还有另外的作用方式存在.

常见的获得反义 RNA 的方法与基因工程方法相同. 首先, 以 mRNA 为模板合成互补配对的一条 DNA 链; 然后以合成的互补 DNA 为模板合成互补配对的另一条 DNA 链, 此双链 DNA 片段就是目的基因片段. 将目的基因片段反向插入适当的载体中, 然后将重组载体导入细胞, 当重组载体基因表达时, 由于是反向插入, 因此, 启动子引导的不是目的基因的转录, 而是与目的基因互补配对的反义基因的转录, 从而得到反义 RNA. 在实际应用中, 构建的反义基因常常只是目的基因的 5' 端与 3' 端的部分互补碱基配对序列, 但长度一般至少要大于 50 bp<sup>[1,6]</sup>.

## 2 反义 RNA 在植物上的应用

### 2.1 番茄和其他水果的成熟控制

在果实成熟期间, 将发生一系列涉及颜色、风味、香味和质地的生理生化变化, 使得

成熟的果实具有吸引力, 吃起来口感好. 这些成熟过程变化是由某些生化途径活性的改变引起的.

在番茄、苹果、香蕉和鳄梨中, 果实成熟的启动伴随着呼吸和乙烯合成的增加. 用外源乙烯处理可更快地催熟果实, 反之, 抑制乙烯的合成或除去环境中的乙烯, 将延迟采摘下的果实的成熟. 现已知乙烯是通过改变基因表达来调控果实的成熟<sup>[5]</sup>.

乙烯合成途径中的最后两步反应是 a. 1-氨基环丙烷-1-羧基 (ACC) 合成酶催化的 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) → ACC 和 b. 乙烯合成酶 (EFE, 又称为 ACC 氧化酶) 催化的 ACC → 乙烯. 已发现编码 ACC 合成酶和 EFE 的基因属于多基因家族, 这与乙烯的多种功能是相吻合的. 显然, 不同的环境因子将诱导不同的基因表达. Hamilton 等<sup>[7]</sup>成功地应用反义 RNA 技术抑制了番茄成熟过程中的 EFE 活性, 使乙烯合成被抑制了 97%. 转基因番茄的颜色变化进程同正常的对照番茄相同, 但比对照番茄更抗腐烂和皱缩, 延长了新鲜果实的寿命和存架期. Oeller 等<sup>[8]</sup>也成功地应用反义 RNA 技术抑制了番茄成熟过程中的 ACC 合成酶活性, 获得了类似结果, 果实的乙烯合成被抑制了 99.5%. 目前, 有关的研究工作仍在继续进行, 并已扩展到了草莓、梨、苹果、香蕉、芒果、甜瓜和桃<sup>[4,9]</sup>, 目的基因片段也扩展到了编码多聚半乳糖醛酸酶, 纤维素酶和果胶酯酶的基因<sup>[5]</sup>.

### 2.2 植物抗病性

利用反义 RNA 技术来阻断病毒复制的研究工作最初是在动物病毒上进行的, 80 年代末期开始应用于植物. 但由于在早期的研究中, 选择的目的是基因是编码病毒外壳蛋白 (CP) 的基因, 因此获得的已导入了反义基因并得到表达的转基因植株的抗病毒性并不明显. 显然, 选择 CP 基因片段作为目的基因是不合适的. CP 基因在植物病毒侵染的后期大量地进行表达, 外壳蛋白的合成是按组装病毒的需要在进行, 即表达的外壳蛋白是作为结构

成分而不是作为催化剂在起作用,因而可能导致了转基因植株中表达的反义 RNA 数量并不足以完全抑制 CP 基因的表达. Nelson 等<sup>[10]</sup>以 TMV 5'端的基因片段(该部分基因片段被认为涉及病毒侵染的初期事件的发生,编码了病毒 RNA 复制酶的一个组分)作为目的基因,成功地构建了其反义基因并获得了反义基因得到表达的转基因烟草植株. 实验结果表明病毒 RNA 和后代病毒的合成被抑制了 25~50 倍,系统的病毒侵染症状特征消失或大量地减少. Nelson 等的实验表明采用反义 RNA 技术来获得植物抗病毒性是一条相当可行的选择途径. 这是因为尽管目前在植物基因工程中,采用导入 CP 基因的途径来获得抗病毒性的效果最好,但尚不清楚是否所有农作物的植物病毒都适合这一途径. 其次也因为采用导入反义基因途径所获得的抗病毒性在遗传上是稳定的,并且采用该途径可专一地阻断细胞内的任何一个生物学过程.

从反义 RNA 技术在植物抗病毒基因工程中的应用来看,以编码起催化作用的蛋白质或与其表达有关的基因片段作为目的基因时,效果更好. 目前,有关的研究工作仍在继续进行<sup>[4,11]</sup>,随着反义 RNA 作用机制的进一步阐明,目的基因片段的正确选择,专一表达的、高效的启动子的发现,有可能在应用反义 RNA 技术于植物抗病毒基因工程方面取得新的突破.

### 2.3 改变花卉的颜色

花冠的颜色是由花冠中的色素组成决定的. 在大多数花卉中,色素为黄酮类物质,黄酮类色素物质的生物合成途径已基本清楚,而苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)是该生物合成途径中的一个关键酶. 在矮牵牛属(*Petunia*)植物中已成功地应用反义 RNA 技术抑制了 CHS 基因的表达,使得在转基因植株中的花冠颜色发生改变,从原来的野生型的紫红色转变成了白色,并且因对 CHS 基因表达的抑制程度的差异而出现了一系列中间类型的花色. 而在烟草中,反义 RNA 抑制 CHS 基因的表达

也获得了改变植株花色的同样结果,花冠由野生型的桃红色最终转变成了白色<sup>[1,6,12]</sup>. 目前,应用反义 RNA 技术来改变花卉颜色的有关研究工作仍在进行,并且主要是集中在世界上最大的花卉出口国荷兰. 该项研究工作具有可观的潜在商业价值.

### 2.4 植物淀粉合成的控制

淀粉是由直链淀粉和支链淀粉组成,淀粉的品质与淀粉的组成有关. 植物淀粉合成中的一个重要的酶是淀粉合成酶. 该酶有两种形式,一种是结合在淀粉颗粒上,称为 GBSS;另一种是以可溶性形式分布于叶绿体或淀粉体的基质中. 另一个重要的酶是分支酶(BE),其参与支链淀粉的合成. 淀粉的应用领域包括食品、化学、造纸和纺织工业. 不同的用途对淀粉的性质有不同的要求,工业上一般要求淀粉中直链淀粉的量要少或无. Visser 等<sup>[13]</sup>首先在马铃薯上成功地应用内源 GBSS 基因的反义基因抑制了 GBSS 基因的表达,降低了 GBSS 活性的 70% 到 100%,完全的抑制可得到不含直链淀粉的淀粉,而淀粉的合成总量基本上保持不变. 在马铃薯中导入外源 GBSS 基因的反义基因也得到了表达,获得了类似的结果<sup>[14]</sup>. 目前,有关控制植物淀粉合成方向的研究工作仍在进行,目的基因也扩展到了编码分支酶(BE)的基因<sup>[15]</sup>. 现已得到了无直链淀粉合成或无支链淀粉合成的转基因植物品系<sup>[15,16]</sup>.

### 2.5 油料植物种子中脂肪酸合成的控制

植物油是人类主要的脂类来源之一,其中的很大部分是人造黄油和起酥油形式,尤其是在西方国家. 由于植物油的组分大都是含有双键的不饱和脂肪酸,故在室温下多呈液态,因而在加工时往往需要对植物油进行催化加氢,改变其熔点等性质,使得成本升高,并且导致顺式双键转变为反式双键,而后者被认为对健康不利. 油料种子的脂肪酸生物合成途径中的第一步脱饱和步骤是硬脂酰-ACP 转变为油酰-ACP,反应由硬脂酰-ACP 脱饱和酶催化. 控制该酶的活性将改变植物油中不饱和脂肪酸与

饱和脂肪酸的比例. 美国 Calgene 公司的 Knutzon 等<sup>[17]</sup> 已成功地在芜菁 (*Brassica rapa*) 和甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 中导入了抑制硬脂酰-ACP 脱饱和酶基因表达的反义基因, 并得到了表达, 使得在贮藏脂类生物合成期间, 转基因植株种子中该酶的活性大大降低. 在甘蓝型油菜种子中硬脂酸的含量从原来的 2% 提高到了 40%, 不同的植物油用途对植物油的组成有不同的要求. 通过基因工程的方法来增加新酶, 超量表达现有的酶, 或利用反义 RNA 来抑制内源酶基因的表达, 降低内源酶的活性, 从而达到控制脂肪酸生物合成的方向, 完全有可能得到适合于不同用途的不同品质的植物油, 甚至开发出一些新型的有商业价值的脂肪酸. 目前, 有关的研究工作仍在继续进行.

## 2.6 杂交种子生产中雄性不育性的控制

应用反义 RNA 技术来获得雄性不育的转基因植株, 或恢复植株的雄性育性的研究工作也正在积极地进行着, 其在杂交种子生产中的应用有可能产生较大的经济效益. van der Meer 等<sup>[18]</sup> 首先报道了在矮牵牛属 (*Petunia*) 中, 反义 RNA 的表达在抑制了黄酮类色素的生物合成的同时, 也导致了转基因植株表现出雄性不育的特征. 已有报道指出, 在马铃薯和烟草中 rol C 基因的过度表达导致了雄性不育. Schmülling 等<sup>[19]</sup> 应用反义 RNA 技术获得了含有反义 rol C 基因的转基因烟草植株, 其与含 rol C 基因的植株杂交后得到的杂交种子的雄性育性得到了恢复. 现已发现了专一地在花药绒毡层细胞中表达的启动子, 将这些具有组织专一性的启动子同反义基因或编码裂解酶 (如蛋白酶、糖苷酶、核酸酶等) 的基因以及适当的标记序列连接后再导入植株, 可获得雄性不育的转基因植株, 并应用于杂交种子的生产中.

## 2.7 其他方面的应用

适当地应用反义 RNA 技术可以封闭某一特定基因的表达, 人为地模拟基因的点突变, 因而使该项技术具有极广泛的应用前景. 除了

上述介绍的以外, 目前正在进行的, 并且具有潜在开发价值的研究工作还包括: 应用反义 RNA 技术来抑制尼古丁合成酶基因的表达, 降低烟草中的尼古丁含量; 降低木质素的含量, 改善烟草或树木的加工特性<sup>[20]</sup>, 获得不含咖啡因的咖啡豆<sup>[4]</sup>

## 参 考 文 献

- 1 van der Krol A R, Mol J N M, Stuitie A R. *Gene*, 1988; **72**: 45
- 2 Green P J, Pines O, Inouye M. *Annu Rev Biochem*, 1986; **55**: 569
- 3 Eguchi Y, Itoh T, Tomizawa J-I. *Annu Rev Biochem*, 1991; **60**: 631
- 4 Bird C R, Ray T A. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1991; **9**: 207
- 5 Gray J, Picton S, Shabbeer J *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992; **19**: 69
- 6 van der Krol A R, Mur L A, de Lange P *et al.* *Plant Mol Biol*, 1990; **14**: 457
- 7 Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. *Nature*, 1990; **346**: 284
- 8 Oeller P W, Lu M W, Taylor L P *et al.* *Science*, 1991; **254**: 437
- 9 Tucker G A. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1990; **8**: 133
- 10 Nelson A, Roth D A, Johnson J D. *Gene*, 1993; **127** (2): 227
- 11 Bejarano E R, Lichtenstein C P. *Plant Mol Biol*, 1994; **24**: 241
- 12 van der krol A R, Mur L A, de Lange P *et al.* *Mol Gen Genet*, 1990; **220**: 204
- 13 Visser R G F, Somhorst I, Kuipers G J *et al.* *Mol Gen Genet*, 1991; **225**: 289
- 14 Salehuzzaman S N I M, Jacobsen E, Visser R G F. *Plant Mol Biol*, 1993; **23**: 947
- 15 Hofvander P, Persson P T, Tallberg A *et al.* Genetically engineered modification of potato to form amylose-type starch. PCT Int Appl. WO 9211375, 1992: 1~19
- 16 Hofvander P, Persson P T, Tallberg A *et al.* Genetically engineered modification of potato to form amylopectin-type starch. PCT Int Appl. WO 9211376, 1992: 1~46
- 17 Knutzon D S, Thompson G A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 2624
- 18 van der Meer I M, Stam M E. *Plant Cell*, 1992; **4**: 253
- 19 Schmülling T, Röhrig H. *Mol Gen Genet*, 1993; **237**: 385
- 20 Ni W, Paiva N L, Dixon R A. *Transgenic Res*, 1994; **3**

(2): 120

**Application of Antisense RNA Technique in the Areas of Plant Gene Engineering.** Zhou Yuegang (*Department of Biology, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China*).

**Abstract** The antisense RNA technique and its application in the areas of plant gene engineering were reviewed, including (1) ripening control of tomato and some other fruits; (2) plant resis-

tance to diseases; (3) modification of flower colours; (4) control of starch synthesis in plants; (5) control of fatty acid synthesis in plant rapeseeds; (6) inducing male sterility or restoring male fertility in hybrid seed production; and (7) others, for example, reduction of lignin content in tobacco or trees, reduction of nicotine content in tobacco.

**Key words** antisense RNA, antisense gene, ripening gene, plant virus, flower colours, starch synthesis, fatty acid synthesis, sterility

## 痘苗病毒载体研究进展

金宁一 殷震

(解放军农牧大学解放军基因工程实验室, 长春 130062)

**摘要** 制备高活性的真核蛋白, 必须使用哺乳动物细胞, 痘苗病毒为这一工作提供了简便、实用的工具。痘苗病毒宿主范围广, 无致癌性, 插入长达 20 多 kb 的外源基因后仍有感染性, 能够高效表达外源蛋白, 有效地加工表达产物。而且, 痘苗病毒的表达产物可刺激机体免疫系统产生良好的体液免疫和细胞免疫。利用这些特点构建成的哺乳动物细胞高效表达系统将是基因工程药物和基因工程疫苗的有效工具。

**关键词** 痘苗病毒, 载体, 疫苗

1982 年, Paoletti 研究组<sup>[1]</sup>将外源基因插入痘苗病毒的 TK 基因中, 首次成功地构建了在哺乳动物细胞中表达外源基因的重组痘苗病毒。10 多年来, 应用重组痘苗病毒成功地表达了来源于植物、动物乃至人类的数十种基因。重组痘苗病毒具有如下特点: a. 痘苗病毒宿主范围广, 感染几乎所有源于哺乳动物培养细胞, 并表达外源蛋白; b. 被表达的外源蛋白, 在感染细胞中, 能够有效地进行修饰, 产物接近天然; c. 具有较高的表达效率; d. 通过对动物接种重组痘苗病毒的方法, 能够了解外源蛋白对个体的作用及免疫应答; e. 表达抗原基因的重组痘苗病毒可作为基因重组疫苗。正因为有这些特点, 痘苗病毒载体广泛用

于分子生物学、细胞生物学、免疫学领域及新型疫苗的开发。

### 1 基因组结构与复制

痘苗病毒基因组为两端交叉闭锁的线型双链 DNA 分子, 根据毒株的不同其长度变化在 180~200 kb 间, 编码约 200 种蛋白<sup>[2]</sup>。基因组的两端向内。并有 10 kb 的倒置重复序列, 即序列完全一致, 方向相反, 呈倒置互补<sup>[2]</sup>, 其中含 70~125 bp 的重复区, 此 70 bp 为痘苗病毒的复制所必要, 其中 20 bp (ATTTAGT-GTCTAGAAAAAAT) 尤为重要。此末端倒置