

## 植物次生代谢途径的遗传操作

王晓云<sup>1</sup>, 夏循礼<sup>1</sup>, 黄凤兰<sup>2</sup>, 张寿文<sup>1</sup>

1 江西中医学院药学院 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004

2 内蒙古民族大学生命科学学院, 内蒙古 通辽 028000

王晓云, 夏循礼, 黄凤兰, 等. 植物次生代谢途径的遗传操作. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1151-1163.

Wang XY, Xia XL, Huang FL, et al. Genetic modification of secondary metabolite biosynthesis in higher plants: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1151-1163.

**摘要:** 植物次生代谢产物种类极其丰富, 是人类的宝贵资源, 这些产物及其合成途径相关酶具有空间特异性分布的特征。植物次生代谢途径的调控是个复杂的过程, 受代谢产物水平、多酶复合物相互作用等多种因素的影响。通过遗传操作改造代谢过程, 调控产物在植物体内的含量, 是一条切实可行和具有广阔发展空间的途径。目前, 改造植物次生代谢途径可以采取单基因操作和多基因操作两种策略进行。

**关键词:** 次生代谢产物, 途径, 调控, 单基因操作, 多基因操作

## Genetic modification of secondary metabolite biosynthesis in higher plants: a review

Xiaoyun Wang<sup>1</sup>, Xunli Xia<sup>1</sup>, Fenglan Huang<sup>2</sup>, and Shouwen Zhang<sup>1</sup>

1 Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology Research Center of Jiangxi Province, Nanchang 330004, Jiangxi, China

2 College of Life Science, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

**Abstract:** Plants provide an immense reservoir of natural secondary metabolites. Secondary metabolites and those involved enzymes accumulate in various compartments in specific plant tissues. The biosynthesis of diverse groups of secondary metabolites is often complicated, tightly controlled *via* network interconnections, metabolite levels, metabolite channeling and multi-enzyme complexes, and so on. Secondary metabolite profiles could be genetically altered by two

**Received:** March 15, 2012; **Accepted:** May 4, 2012

**Supported by:** Research Foundation of Education Bureau of Jiangxi Province (No. GJJ11542), National Project Application in the 12th Five-Year Period (No. 2011BAI04B01), Ph.D Programs Foundation of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine (No. 530046).

**Corresponding author:** Shouwen Zhang. Tel: +86-791-87118994; E-mail: wtzsw@163.com

江西省教育厅科学技术研究项目 (No. GJJ11542), 国家十二五科技支撑计划 (No. 2011BAI04B01), 江西中医学院博士启动基金课题 (No. 530046) 资助。

strategies, i.e. single gene modification and multiple gene modification; which thus has opened a feasible and prospective platform for secondary chemicals production in plant.

**Keywords:** secondary metabolite, biosynthesis, regulation, single gene manipulation, multiple gene manipulation

植物次生代谢产物由次生代谢途径产生,是细胞生命活动正常运行时非必需的小分子有机化合物,种类繁多。它的分布通常具有种属、器官、组织和生长发育时期的特异性,是许多重要天然药物的主要来源,有些对人类健康有益。植物次生代谢途径是高度分支的途径,组成结构极其复杂,受途径互作、反馈抑制、前馈激活和酶催化反应等各种机制的调控,形成相互作用的代谢网络。

植物次生代谢产物的合成和分解是动态的,代谢途径构成的空间网络受到非常精准的调控。1) 次生代谢产物和催化酶往往定位在特定的细胞器中。例如,现在认为,与倍半萜、三萜、类胡萝卜素、甾体和辅酶 Q 等合成相关的甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径主要在细胞质和线粒体中进行,这一途径可以合成异戊烯基焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 前体;而有些植物体内还存在 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸生物合成途径 (2-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP pathway),也可以产生 IPP,该途径却是在质体中进行,它能够合成 IPP 的异构体焦磷酸二甲基烯丙酯 (Dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP),半萜、单萜、二萜和一些多萜就是通过 MEP 途径在质体中合成的。这两条途径并非完全独立,它们之间存在着代谢中间产物的交换,IPP 在异构酶的作用下能够转变成 DMAPP。紫杉醇可能就是这两条途径的共同产物<sup>[1]</sup>。2) 次生代谢途径还具有多细胞区域化

分布现象,即常常分布在特定的细胞类型内。长春花 *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don 是抗肿瘤药物长春碱和长春新碱的生物来源,它含有 100 多种具有重要药用价值的单萜吲哚生物碱类化合物,所有这些化合物都是经由中间产物 3 $\alpha$ (S)-异胡豆苷合成的。色氨酸脱羧酶 (Tryptophan decarboxylase, TDC) 和异胡豆苷合酶 (Strictosidine synthase, STR1) 是合成 3 $\alpha$ (S)-异胡豆苷的关键酶,这两个酶基因的转录产物定位在叶片表皮、根尖顶端分生组织周围的原表皮层和皮层细胞中<sup>[2-3]</sup>。3) 大多数次生代谢产物都积聚在植物特定器官或特殊的组织结构中,如分布在异形细胞、乳汁器、腺毛簇、分泌细胞等部位。例如,特化的腺体结构是单萜类和黄酮类化合物产生的部位。合成长春碱的前体物质是长春朵灵 (Vindoline),具有持久的降血糖作用,脱乙酰氧基文朵灵-4-羟化酶 (Desacetoxyvindoline 4-hydroxylase, D4H) 和脱乙酰文朵灵 4-O-乙酰基转移酶 (Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase, DAT) 是长春朵灵生物合成途径中的关键酶,这两个酶基因的转录产物定位在发育叶片的乳汁器和异形细胞内<sup>[2-3]</sup>。

多数次生代谢产物在植物中的含量低于干重的 1%<sup>[4]</sup>,远远无法满足需要。人们采取多种策略提高它们的含量。植物细胞或组织培养是提高次生代谢产物含量的主要手段之一,采用该手段时常常需要进行前体饲喂,并筛选高产细胞系。需要特别注意的是,由于植物次生代谢途径

各步骤的催化酶和代谢物特异地分布在特定器官、组织、细胞类型和细胞器内,进行细胞或组织培养时必须采用特定的细胞类型为材料,否则无法获得高产量的目的代谢产物,在培养物中也难以检测到合成途径的关键酶<sup>[5]</sup>。

对植物次生代谢途径进行遗传操作,是提高次生代谢产物含量最有效的一个手段,具有广阔的发展空间。遗传操作建立在对植物次生代谢途径有一定了解的基础之上,相关知识包括整个途径的组成步骤;催化各步反应的酶及其编码基因;调控因子及其编码基因;酶、调控因子、中间代谢物和终产物的组织定位和细胞器定位;终产物和中间代谢物的流向;途径中的能量流等。植物细胞培养体系的建立,显著提高了培养物中的酶含量,极大地改善了酶的检测和纯化手段。这些手段反过来被应用于原植物,鉴定了大量代谢途径相关酶。分子生物学技术的发展推动着人们克隆了大量次生代谢途径的相关基因,使得从基因水平对代谢途径进行遗传操作成为可能。

目前,对植物次生代谢途径进行遗传操作,提高代谢产物含量时,通常采取以下策略。

## 1 针对单个基因进行遗传操作

### 1.1 转化限速酶基因

转化次生代谢产物合成途径中的一个限速酶基因,克服限速步骤的影响,提高次生代谢产物在植物中的含量。这部分研究较多,最早的报道是 Yun 等将来源于天仙子 *Hyoscyamus niger* Linn.的天仙子胺 6 $\beta$ -羟化酶 (Hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, H6H) 基因转化到颠茄 *Atropa belladonna* Linn.中,提高颠茄中东莨菪碱的含量<sup>[6]</sup>。以后,越来越多代谢途径的限速步骤和限

速酶被鉴定,如萜类合成途径中的萜类合酶 (Terpenoid synthase, TS),吲哚生物碱合成途径中的异胡豆苷合酶 (Strictosidine synthase, STR),莽草酸途径中的苯丙氨酸脱氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL),青蒿素合成途径中的紫穗槐二烯合酶 (Amorpha-4,11-diene synthase, ADS) 等,并克隆了它们的编码基因,利用转化限速酶基因提高次生代谢产物含量的报道也越来越多<sup>[7-8]</sup>。反义抑制<sup>[9]</sup>、共抑制<sup>[10]</sup>或 RNA 干扰技术<sup>[11-12]</sup>也逐渐用于抑制或关闭竞争性分支代谢途径,从而提高目标代谢物的含量;有时也用于抑制不利代谢产物的产生<sup>[13-14]</sup>。

### 1.2 转化转录因子基因

提高原植物中转录因子的丰度,或引入外源转录因子,对代谢途径相关酶基因的表达进行调控,从而提高目标代谢产物的产量<sup>[15]</sup>。长春花 *C. roseus* 中合成的多种萜类吲哚生物碱 (Terpenoid indole alkaloids, TIAs) 是重要的天然抗癌化合物。这些萜类吲哚生物碱的合成途径受多个转录因子的调控,包括 ORCA3 转录因子、CrWRKY1 转录因子和 AtMYC2 转录因子等。超表达这些转录因子,可以增加合成途径中相关基因的表达量,显著提高长春花 *C. roseus* 中萜类吲哚生物碱的合成量<sup>[16-17]</sup>。另外,抑制转录因子的表达,也可能达到提高次生代谢产物含量的目的<sup>[18]</sup>。目前,已经克隆的代谢途径转录因子,大多数调控代谢途径中部分催化酶基因的表达,获得可以调控整条途径中多个乃至全部催化酶基因表达的转录因子具有重要意义<sup>[19]</sup>。有时,由于限速步骤的存在,对转录因子进行遗传操作时,次生代谢产物含量增加的效果不明显<sup>[20]</sup>。

### 1.3 转化转运蛋白基因

针对代谢途径的转运蛋白 (Transporter) 基因进行遗传操作, 协助底物、中间产物和终产物等代谢成分运输到正确的细胞类型和细胞器内, 避免反馈抑制和细胞毒性, 从而提高代谢产物含量。植物代谢的中心途径发生在一种细胞类型或细胞器中, 而分支代谢途径可能发生在其他细胞类型或细胞器内, 各中间产物在不同类型的细胞或细胞器间经过转运, 最终合成终产物<sup>[21]</sup>。转运蛋白在次生代谢产物的运输与贮存过程中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。目前, 对转运蛋白基因进行遗传操作, 从而调控次生代谢途径的研究报道不多。长春花 *C. roseus* 中的四氢蛇根碱 (Ajmalicine) 可用于治疗高血压, 而四氢鸭脚木碱 (Tetrahydroalstonine) 具有持久的降血糖作用。最近, 有研究表明, 超表达 ABC transporter (ATP-binding cassette transporter) 基因, 可以提高长春花中四氢蛇根碱和四氢鸭脚木碱的积累量<sup>[23]</sup>。

### 1.4 转化单链抗体基因

转入活性成分的单链抗体 (Single chain fragments variable, scFv) 基因, 提高代谢成分产量。田中宏幸等针对药用植物喀西茄 *Solanum khasianum* Jacquem. 中的药理活性成分澳洲茄碱糖苷制作了单克隆抗体<sup>[24]</sup>, 再从分泌抗体的杂交瘤细胞中提取 RNA, 扩增出抗体的重链可变区 (The variable, heavy chain domain, VH) 和轻链可变区 (The variable, light chain domain, VL) 序列, 通过弹性多肽接头稳定地连接在一起, 构成 scFv。在抗体序列 N 端添加一段内质网定位信号序列, C 端添加一段含有终止子的 KDEL 序列后, 插入到发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 中, 转化到

喀西茄植株内, 诱导产生毛状根。在毛状根中检测到 scFv 抗体的表达, 同时, 澳洲茄碱糖苷的产量较未转化的毛状根上升了 3 倍, 与 scFv 的表达水平呈正相关<sup>[25]</sup>。绝大多数药用植物的活性成分化学结构未知或复杂, 因而难以合成, 并且生物合成途径还未阐明, 如紫杉醇、人参皂苷、甘草皂苷等, 采用该方法有助于提高产量, 并可望逐渐发展成为一种新的分子育种方法<sup>[26]</sup>。

除了以上方法, 缩短植物生长期; 超表达代谢途径中催化酶的抗体<sup>[27]</sup>; 利用核酶技术, 关闭转录后生物合成途径<sup>[28]</sup>, 从而抑制分支或竞争性代谢途径等, 这些方法也可以用于代谢途径的遗传操作, 提高次生代谢产物的含量。

## 2 针对多个基因进行遗传操作

大多数植物次生代谢途径由多个反应步骤组成。对其中的一个限速步骤进行遗传操作, 可能增加该步骤及其下游中间产物的产量, 但由于缺乏对上游或后续限速步骤中催化酶的诱导, 有时未必有效。另外, 利用植物反应器生产次生代谢产物时, 有时需要向原本不具备这一代谢途径的植物中引入新的途径, 常常需要针对多个基因进行遗传操作。多基因操作是植物代谢途径改造的一个重要发展方向, 也是具有广阔应用前景的热点研究领域。目前, 主要采取以下策略。

### 2.1 有性杂交策略

分别转化代谢途径各催化步骤中的单个基因, 获得纯合的转基因后代, 再通过转基因后代的有性杂交, 将多个基因聚合, 最终获得转化了多个目标基因并稳定表达的转基因系。这方面的报道较多<sup>[29-30]</sup>。有学者将富养产碱菌 *Alcaligenes*

*eutrophus* 中由乙酰辅酶 A 合成聚(R)-(-)-3-羟基丁酸盐 (Poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate], PHB) 途径的 3 个酶基因, 分别添加了一段豌豆叶绿体转运肽序列, 转化到拟南芥中, 再进行有性杂交, 获得转化了 3 个基因的后代, 将转基因后代中的 PHB 含量提高了 100 倍<sup>[31]</sup>。这种方法是从大量的转基因后代群体中筛选表达稳定、单拷贝的转基因植株, 经过 2~3 个世代的自交后获得纯合的后代, 用做基因聚合的亲本。每聚合一个基因需要经过 2~3 代才能获得纯合的植株, 若是需要聚合 3~4 个外源基因, 则需要经过 4~6 代。当需要聚合的基因数目较多时, 由于分离方式复杂, 有时无法获得聚合了全部外源基因的纯合植株。另外, 在每一个育种世代中, 都要筛选外源基因持续稳定表达的个体, 还要保证所有外源基因能够持续多代稳定表达。因此, 这种方法的育种群体规模大, 育种周期长, 筛选工作量大。采用这种策略转化多个基因的反义序列或正义片段, 可以抑制或关闭竞争性代谢途径, 提高目标次生代谢产物含量; 但通常靶基因的活性被抑制 80% 以上时, 植物才能表现出相应的生理表型变化, 或表现出明显的代谢产物含量降低的变化, 因此, 筛选转基因后代的难度大。

## 2.2 再转化策略

以转化了代谢途径中某一个催化酶基因的转基因后代为受体, 进行再次转化<sup>[32]</sup>, 最终获得聚合了多个催化酶基因的转基因后代。该策略尤其适用于那些不可能或不方便通过有性杂交获得多基因聚合后代的植物, 如木本植物。有学者将肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 和咖啡酸/5-羟基阿魏酸

O-甲基转移酶 (Caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase, COMT) 的反义基因先后转化到杨树中<sup>[33]</sup>, 期望通过遗传操作改变杨树的木质素结构, 从而生产工业纸浆。与前一种方法相比, 这种方法同样需要大量的筛选工作, 实验周期更长。而且再转化容易诱发转基因沉默。另外, 再转化时采用的标记基因必须与上一次转化的标记基因不同, 这样才有利于后代的筛选。当待转化外源基因的数目较多时, 较难获得足够的标记基因, 有时需要移除上一代的选择标记, 但这无疑会增加工作量。

## 2.3 共转化策略

将代谢途径各步骤的催化酶基因构建在不同的载体上, 通过共转化获得多基因转化的后代。这种方法已经用于多种植物次生代谢途径调控。有学者给八氢番茄红素合酶 (Phytoene synthase, PSY) 基因、八氢番茄红素脱饱和酶 (Phytoene desaturase, CRT I) 基因和番茄红素环化酶 (Lycopene  $\beta$ -cyclase, LCY) 基因附加了不同的启动子和质体定位信号, 共转化后表达在水稻胚乳中, 获得胚乳中可产生维生素 A 原的转基因金米<sup>[34]</sup>。此后, 另有学者利用不同的胚乳特异性启动子, 将八氢番茄红素合酶 1 (Phytoene synthase 1, PSY1) 基因、八氢番茄红素脱饱和酶 1 (Phytoene desaturase, CRT I) 基因、 $\beta$ -胡萝卜素酮化酶 ( $\beta$ -carotene ketolase, CRT W) 基因、番茄红素  $\beta$ -环化酶 (Lycopene  $\beta$ -cyclase, LYCb) 基因和  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶 ( $\beta$ -carotene hydroxylase, BCH) 基因等 5 个基因通过基因枪方法, 共转化到白玉玉米的胚乳中, 获得转化了不同基因及其组合的后代群体, 也为类胡萝卜素生

物合成途径的解析创造了有价值的研究材料<sup>[35]</sup>。类胡萝卜素合成是植物体内重要的次生代谢之一,该途径以异戊烯基焦磷酸为前体,在异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPP isomerase, IPI)、牻牛儿苗基焦磷酸合酶 (GGPP synthase, GGPS) 等系列催化酶的作用下,生成多种多样的类胡萝卜素分子<sup>[36]</sup>。我们已经从药用植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的果实中克隆了该途径中 PSY (GenBank Accession No. JQ690895)、八氢番茄红素脱饱和酶 (Phytoene desaturase, PDS) (GenBank Accession No. JQ690896)、7,9,9'-顺式链孢红素脱饱和酶 (7,9,9'-cis-neurosporene desaturase, ZDS) (GenBank Accession No. JQ690897)、胡萝卜素顺反异构酶 (Carotene cis-trans isomerase, CRTISO) (GenBank Accession No. JQ690898)、番茄红素 $\beta$ -环化酶 (Lycopene- $\beta$ -cyclase, LYC) (GenBank Accession No. JQ690899) 和 $\beta$ -环羟化酶 ( $\beta$ -ring hydroxylase,  $\beta$ -OHase) (GenBank Accession No. JQ690900) 等 6 个酶基因的保守区段,为今后进行胡萝卜素生物合成途径的调控奠定了基础。在水稻中的研究表明,多个基因共转化时,T-DNAs 重复整合在基因组同一位点的转基因后代比例很高,整合了全部外源基因的转基因植株比例可以达到 40%~70%<sup>[37]</sup>。但随着外源基因数目的增加,筛选出包含所有目的基因、所有目的基因均整合在同一位点、各基因表达稳定的转基因植株的可能性大大降低。另外,共转化对实验技术的要求较高。

## 2.4 转录单位策略

每个催化酶基因构建一个转录单位,每个转录单位均包括启动子、编码区、终止序列和其他顺式调控元件。将这些转录单位(方向可以相

同,也可以相反)连接到一个转基因载体上,通过单次转化试验,获得转化了代谢途径中多个催化酶基因的植株。将这种策略与共转化联合使用,有助于克服载体容量的限制,获得转化了多个外源基因的植株,该策略已经成功用于转基因黄金水稻的培育<sup>[34]</sup>。有研究表明,这种方法更有利于获得较为一致的外源基因表达水平。但也有研究表明,各转录单位中外源基因的表达水平显著不同<sup>[38]</sup>,转录单位在 T-DNA 中的排列顺序影响外源基因的表达。构建这种转基因载体时,使用相同的组成型启动子,对外源基因的表达没有影响。但一个大的重组质粒上,存在多个相同的启动子或终止子元件,必然影响质粒在工程菌中和植物中的稳定性;重组质粒所包含的重复序列整合到受体植物基因组后,稳定性如何,也需进一步研究。

## 2.5 多顺反子策略

将代谢途径中多个催化酶基因的编码区合并构成多顺反子,再与启动子、终止序列和其他顺式调控元件共同构成一个转录单位,构建成重组载体,转化到植物体内。多顺反子在植物体内被翻译成聚多肽 (Polyproteins)。事实上,以聚多肽形式表达出多种蛋白质,是许多病毒固有的一种机制,尤其是许多正链 RNA 病毒。病毒翻译出多聚蛋白质分子以后,由剪切蛋白酶将该分子剪切成单个的蛋白质分子。目前,已经鉴定了许多剪切蛋白酶,破译了它们识别位点的特征,并应用到植物多基因表达系统中。其中,口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 基因组中的 2A 序列<sup>[39-40]</sup>长度为 19 个氨基酸,它可以通过削弱剪切位点两侧甘氨酸和脯氨酸残基之

间肽键的正常形成,发挥剪切作用,介导病毒自身 C-末端 2A 区域蛋白质的剪切或聚多肽解离。剪切不依赖酶的作用,也不会影响翻译的正常进行<sup>[41]</sup>。来源于不同病毒的 2A 序列长度范围仅为 16~20 个氨基酸,它们在转基因植物中也可以发挥剪切功能,因而具有较为广泛的应用前景<sup>[42]</sup>。根据这一原理,将 2A 序列的编码区置于多个目标基因的编码区之间,表达的聚多肽在 2A 序列的作用下,可以在植物体内发生解离。解离后,2A 序列残留在前一个蛋白质的 C-末端,一个脯氨酸残基残留在 2A 序列后面的蛋白质上。这些序列残留一般不会影响蛋白质正常功能的发挥。聚多肽中的蛋白质分子各自携带不同的亚细胞定位信号时,2A 序列能正常发挥功能;2A 序列也不会干扰聚多肽中的蛋白质分子向各自细胞器中的定位<sup>[43]</sup>。目前,2A 序列已经应用于植物次生代谢途径的遗传操作。例如,虾青素、角黄素和玉米黄素均为有高度营养价值的着色剂和食品添加剂,高等植物不能合成这些化合物及其中间产物。根据 2A 序列的特性,有学者将胡萝卜素 4,4-氧化酶 (Carotene 4,4-oxygenase, CRTW) 基因和胡萝卜素 3,3-羟化酶 (3,3-hydroxylase, CRTZ) 基因转化到烟草和马铃薯的质体中,两个基因编码的融合蛋白通过 2A 序列连接,成功地在高等植物中构建了虾青素、角黄素合成途径,在转基因烟草花朵中检测到较高数量的虾青素、角黄素和 4-酮基玉米黄素 (4-ketozeaxanthin)<sup>[44]</sup>。还有学者利用线粒体定位信号和 2A 序列,将紫穗槐-4,11-二烯合酶 (Amorpha-4,11-diene synthase, ADS)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-

methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)、法呢基二磷酸合酶 (Farnesyl diphosphate synthase, FPS) 和紫穗槐-4,11-二烯单加氧酶 (Amorpha-4,11-diene monooxygenase, CYP71AV1) 基因通过农杆菌转化到烟草中,引入了青蒿素前体物质——青蒿酸的生物合成途径<sup>[45]</sup>。

除了 2A 序列以外,马铃薯 Y 病毒组中编码烟草叶脉斑点病毒 (Tobacco vein mottling virus, TVMV) 或烟草缺刻病毒 (Tobacco etch virus, TEV) 的 NIa 蛋白酶也可以作为基因之间的连接肽,用于多基因转化,该酶分子量为 48 kDa,可识别并切割特异的七肽序列位点。将 NIa 蛋白酶的编码序列 (NIa 蛋白酶基因位于功能基因上游更有利于其作用的发挥) 与功能基因的编码序列连接在一起,并与启动子、终止序列和其他调控序列连接,构成一个转录单位,在功能基因的编码序列两侧引入 NIa 蛋白酶识别位点 (该识别位点一般位于 C 末端,第 4~20 个氨基酸之间,视所用蛋白酶的性质而定)。翻译出聚多肽以后,融合蛋白质分子被聚多肽自身内部编码的蛋白酶加工、剪切,释放出单个蛋白质分子<sup>[46]</sup>。尽管剪切酶对聚多肽的剪切效率很高,但这种方法转化的功能基因在植物中的表达水平普遍不高。原因可能在于,NIa 蛋白酶具有一个细胞核定位信号,它可能会引导一部分聚多肽定位到细胞核内,造成蛋白质翻译的提前终止<sup>[47]</sup>。另外,虽然所有基因的编码序列位于同一个转录单元内,但各基因的表达量并不相同,它们在聚多肽中的排列位置明显影响各自的表达水平和稳定性。即使将核定位信号从 NIa 蛋白酶中移除,聚多肽中各基因的表达量也未必相同<sup>[48]</sup>。这种方法用于在叶

绿体中表达多个基因时,比较有利。在聚多肽之前加上一段叶绿体基因的转运肽,可以引导部分聚多肽定位在叶绿体中,并进行加工<sup>[47]</sup>。凤仙花 *Impatiens balsamina* L.种子中表达的多肽 LP4 在转基因载体中也可以起连接肽的作用,用于聚多肽的剪切<sup>[49-50]</sup>。另外,将 LP4 的前 9 个氨基酸和 2A 融合起来,构成 LP4 /2A 序列,也可以用作连接肽,剪切效率比仅用 LP4 高<sup>[51-52]</sup>。N1a 蛋白酶和多肽 LP4 有望发展成为有效的工具,用于植物次生代谢物合成途径的遗传操作。

以上方法只需转化一个载体,一次转化即可获得转基因后代。但翻译出的嵌合蛋白分子量较大,折叠方式可能比较复杂,影响下一步剪切;正确蛋白质产物的产生依赖于起剪切作用的连接肽,在特殊情况下,连接肽的残留可能会影响蛋白质分子的功能<sup>[53]</sup>。另外,真核生物在细胞质中以 mRNA 为模板,启动翻译过程时,通常需要识别 RNA 5'端的帽子结构,组装成一个翻译起始复合物,才能进行有效的翻译。当完成第一个顺反子的翻译起始和阅读后,再起始就受到一定的抑制,常常使得下游顺反子的表达水平相对较低。尽管在有些研究中,下游顺反子的表达量不受影响<sup>[54]</sup>,但仍然有必要从技术层面上采取措施,以确保外源基因的表达量相对一致。一个有效的方法是在转基因载体上添加植物或动物病毒反式翻译激活因子 (Translational transactivator)<sup>[55]</sup>的编码序列,这些翻译激活因子可以协助并促进下游顺反子的翻译再起始,提高下游顺反子的表达量。如花椰菜花叶病毒 (Cauliflower mosaic virus, CaMV) 或花生褪绿条纹病毒 (Peanut chlorotic streak virus, PCISV)<sup>[56]</sup>

的翻译反式激活因子,由各自的 VI 基因编码。但有些情况下,基因 VI 的表达产物可能对植物的生长和发育有害<sup>[57]</sup>。

## 2.6 融合蛋白策略

将代谢途径各步骤中催化酶基因的编码序列融合在一起,与启动子、终止子等调控序列构成一个转录单位,再连接到转基因载体上,表达出融合蛋白,该融合蛋白具有全部外源基因所编码蛋白的功能。目前,该方法已经有成功的报道。有学者将异黄酮合酶 (Isoflavone synthase, IFS) 和查尔酮异构酶 (Chalcone isomerase, CHI) 基因通过一个甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸序列连接到一起,加上内质网膜定位信号,构建了一个双功能融合蛋白,转化到烟草中,使得转基因烟草花瓣和幼嫩叶片中的金雀异黄酮 (Genistein)、异黄酮糖苷 (Genistein glycoside) 的含量比单独转化异黄酮合酶基因时更高<sup>[58]</sup>。这种方法用于构建多个非同源基因的干扰载体时,具有明显的优势。由于一个基因的片段即可用来沉默该基因,几个基因的片段融合后,有时同样能够下调各基因的表达<sup>[59-60]</sup>。这种方法可以避免重复使用相同的启动子,降低了转基因当代及后续世代中发生转基因沉默的风险,育种程序也大大简化。然而,需要注意的是,有些蛋白质分子以融合蛋白形式表达以后,未必能够保持原来的功能。

以上策略各有优缺点。通过有性杂交、再转化或共转化聚合次生代谢途径中的多个催化酶基因时,被转化的基因往往整合到受体植物基因组的不同位点上,它们在转基因后代中的表达情况差异很大,遗传分离方式复杂,不利于获得纯合的后代。当使用不同的 T-DNA 分子和农杆菌



菌株进行转化时,整合情况更为复杂。利用多转录单位和多顺反子策略进行多基因转化与聚合,需要的转基因后代群体较小,所有目标基因整合在同一个位点,整合模式简单、清晰,遗传分离方式简单,有利于获得纯合的后代。因此,这两种策略应用前景更为广泛,更有优势。但利用这两种策略进行多基因转化时,采用传统的酶切、连接方法构建转基因载体时难度较大,往往缺乏足够的、合适的酶切位点。最近,利用连续杂交组装法 (Successive hybridization assembling, SHA),人们已经能够将多个大片段 DNA 整合到同一个载体上,而不需要经过酶切和连接步骤<sup>[61]</sup>,这种方法特别适合用于多基因转化载体的构建。

基因表达不稳定是植物多基因转化面临的一个难题。多个基因整合进入植物体后,表达水平与基因在染色体上整合的位点、基因本身的序列组成、转化策略息息相关,各个基因的表达水平显著不同。转基因丢失、转基因重排和转基因沉默<sup>[62]</sup>强烈影响转基因表达。随着转基因世代的增加,基因的表达情况更为复杂。有研究表明,在功能基因两翼或启动子之后附加核基质结合区 (Nuclear matrix-attachment regions, MARs),有助于稳定转基因当代和后续世代中功能基因在植株内的表达水平,也有助于防止基因沉默现象的发生<sup>[63]</sup>。

### 3 展望

植物次生代谢产物种类繁多,在植物体内常常数量极少甚至不稳定,只存在于特定部位,给代谢途径的调控增加了难度。植物次生代谢过程及代谢物的积累受到自身和环境各种生物和非生物因素的调控,进行遗传操作时,必然干扰

了细胞的生理状态,以及代谢物的动态和静态平衡。有时,代谢物超载会使得代谢途径产生反馈抑制现象;植物也可能会激发先天性免疫机制,使得转入的功能基因沉默。因此,植物次生代谢途径遗传操作具有一定的复杂性。然而,在对代谢途径有一定了解的基础上,人们已经能够通过遗传操作,增加某一个或一组次生代谢成分的含量,生产所需要的次生代谢产物,或获得具备所需要性状的植物新品种。有研究认为,以原植物的高产器官为材料,利用遗传操作提高次生代谢产物含量,不容易获得理想的结果,原因可能在于高产器官中这些产物的含量已经饱和,改良的潜力有限;而在原本不存在目的代谢产物的植物中引入新的代谢途径,常常能够产生较好的结果<sup>[64]</sup>。这是一个发展前景广阔、激动人心的研究领域,其中一些成果已经商业化,申请了专利<sup>[65-68]</sup>。近期已经进行遗传操作的药用植物在文献中有较为详尽的列举<sup>[69]</sup>。随着基因组和代谢组等组学技术的产生和发展,植物次生代谢研究获得了前所未有的机会,人们对代谢过程了解更加深入,利用系统生物学方法开展预见性代谢工程将会成为未来的研究趋势<sup>[70]</sup>。

### REFERENCES

- [1] Liao ZH, Chen M, Gong YF, et al. Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering. *J Biol Sci*, 2006, 6(1): 209-219.
- [2] Irmiler S, Schröder G, St-Pierre B, et al. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72a1 as secologanin synthase. *Plant J*, 2000, 24(6): 797-804.
- [3] St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Luca V.

- Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, 1999, 11(5): 887–900.
- [4] Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(9): 433–440.
- [5] Cordell GA. *The Alkaloids-Chemistry and Biology*. San Diego: Academic Press, 1998: 257–316.
- [6] Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y. Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(24): 11799–11803.
- [7] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(2): 155–160.
- [8] Verpoorte R, Alfermann AW. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 2000: 165–177.
- [9] Boase MR, Lewis DH, Davies KM, et al. Isolation and antisense suppression of *flavonoid 3', 5'-hydroxylase* modifies flower pigments and colour in cyclamen. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 107.
- [10] Wang E, Wang R, DeParasis J, et al. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 371–374.
- [11] Fujii N, Inui T, Iwasa K, et al. Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (S)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 363–375.
- [12] Runguphan W, Maresh JJ, O'Connor SE. Silencing of tryptamine biosynthesis for production of nonnatural alkaloids in plant culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 13673–13678.
- [13] Li FL, Qiu DY, Ma XJ, et al. Suppression of taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase gene expression in *taxus*  $\times$  *media* via RNA interference. *Chin Biotechnol*, 2009, 29(5): 55–60.
- 李凤岚, 邱德有, 马小军, 等. 利用RNAi抑制曼地亚红豆杉细胞紫杉烷 14 $\beta$ -羟基化酶基因的表达. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(5): 55–60.
- [14] Mahmoud SS, Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(8): 366–373.
- [15] Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1301–1308.
- [16] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, et al. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081–2093.
- [17] Montiel G, Zarei A, Körbes AP, et al. The jasmonate-responsive element from the ORCA3 promoter from *Catharanthus roseus* is active in *Arabidopsis* and is controlled by the transcription factor AtMYC2. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(3): 578–587.
- [18] Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, et al. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DET1* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 890–895.
- [19] Gantet P, Memelink J. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(12): 563–569.
- [20] Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(5): 212–219.
- [21] Yazaki K, Sugiyama A, Morita M, et al. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites.

- Phytochem Rev, 2008, 7(3): 513–524.
- [22] Kutchan TM. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 292–300.
- [23] Pomahačová B, Dušek J, Dušková J, et al. Improved accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in *Catharanthus* cells expressing an ABC transporter. *J Plant Physiol*, 2009, 166(13): 1405–1412.
- [24] Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, et al. Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine. *Cytotechnology*, 1996, 18(3): 153–158.
- [25] Putalun W, Taura F, Qing W, et al. Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(5): 344–349.
- [26] Verpoorte R, Alfermann AW, Johnson TS. *Applications of Plant Metabolic Engineering*. New York: Springer, 2007: 283–295.
- [27] Whitelam GC, Cockburn W. Antibody expression in transgenic plants. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(8): 247–248.
- [28] Rossi JJ. Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. *Trends Biotechnol*, 1995, 13(8): 301–306.
- [29] Guillet G, Poupart J, Basurco J, et al. Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiol*, 2000, 122(3): 933–944.
- [30] Lückner J, Schwab W, van Hautum B, et al. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpenes synthases from lemon. *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 510–519.
- [31] Nawrath C, Poirier Y, Somerville C. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(26): 12760–12764.
- [32] Tattersall DB, Bak S, Jones PR, et al. Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science*, 2001, 293(5536): 1826–1828.
- [33] Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*, 1999, 119(1): 153–164.
- [34] Ye XD, Al-Babili S, Klöti A, et al. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287(5451): 303–305.
- [35] Zhu CF, Naqvi S, Breitenbach J, et al. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18232–18237.
- [36] Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, et al. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(3): 139–145.
- [37] Maqbool SB, Christou P. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol Breeding*, 1999, 5(5): 471–480.
- [38] Peach C, Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(1): 49–60.
- [39] Ryan MD, King AMQ, Thomas GP. Cleavage of foot-and mouth disease virus polyprotein is mediated by residues within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, 1991, 72(Pt 11): 2727–2732.
- [40] de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, et al. *Eunum*

- pluribus*: multiple proteins from a self-processing polyprotein. Trends Biotechnol, 2006, 24(2): 68–75.
- [41] Ryan MD, Donnelly MLL, Lewis A, et al. A model for nonstoichiometric, cotranslational protein scission in eukaryotic ribosomes. Bioorg Chem, 1999, 27(1): 55–79.
- [42] Halpin C, Cooke SE, Barakate A, et al. Self-processing 2A-polyproteins-a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. Plant J, 1999, 17(4): 453–459.
- [43] El Amrani A, Barakate A, Askari BM, et al. Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene. Plant Physiol, 2004, 135(1): 16–24.
- [44] Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, et al. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. Plant J, 2004, 39(4): 477–486.
- [45] van Herpen TWJM, Cankar K, Nogueira M, et al. *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. PLoS ONE, 2010, 5(12): e14222.
- [46] Dasgupta S, Collins GB, Hunt AG. Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants. Plant J, 1998, 16(1): 107–116.
- [47] Marcos JF, Beachy RN. Transgenic accumulation of two plant virus coat proteins on a single self-processing polypeptide. J Gen Virol, 1997, 78(Pt 7): 1771–1778.
- [48] Ceriani MF, Marcos JF, Hopp HE, et al. Simultaneous accumulation of multiple viral coat proteins from a TEV-NIa based expression vector. Plant Mol Biol, 1998, 36(2): 239–248.
- [49] Tailor RH, Acland DP, Attenborough S, et al. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. J Biol Chem, 1997, 272(39): 24480–24487.
- [50] Jha S, Chattoo BB. Transgene stacking and coordinated expression of plant defensins confer fungal resistance in rice. Rice, 2009, 2(4): 143–154.
- [51] François IEJA, Van Hemelrijck W, Aerts AM. Processing in *Arabidopsis thaliana* of a heterologous polyprotein resulting in differential targeting of the individual plant defensins. Plant Sci, 2004, 166(1): 113–121.
- [52] Zhang B, Rapolu M, Huang LY, et al. Coordinate expression of multiple proteins in plant cells by exploiting endogenous kex2p-like protease activity. Plant Biotechnol J, 2011, 9(9): 970–981.
- [53] Dafny-Yelin M, Tzfira T. Delivery of multiple transgenes to plant cells. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1118–1128.
- [54] Blumenthal T. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. BioEssays, 1998, 20(6): 480–487.
- [55] Bonneville JM, Sanfaçon H, Fütterer J, et al. Posttranscriptional *trans*-activation in cauliflower mosaic virus. Cell, 1989, 59(6): 1135–1143.
- [56] Maiti IB, Richins RD, Shepherd RJ. Gene expression regulated by gene VI of caulimovirus: transactivation of downstream genes of transcripts by gene VI of peanut chlorotic streak virus in transgenic tobacco. Virus Res, 1998, 57(2): 113–124.
- [57] Cecchini E, Gong ZH, Geri C, et al. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. Mol Plant Microbe Interact, 1997, 10(9): 1094–1101.
- [58] Tian L, Dixon RA. Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. Planta, 2006, 224(3): 496–507.
- [59] Seymour GB, Fray RG, Hill P, et al. Down-regulation of two non-homologous

- endogenous tomato genes with a single chimaeric sense gene construct. *Plant Mol Biol*, 1993, 23(1): 1–9.
- [60] Jones CG, Scothorn GP, Lycett GW, et al. The effect of chimeric transgene architecture on co-ordinated gene silencing. *Planta*, 1998, 204(4): 499–505.
- [61] Jiang XL, Yang JM, Zhang HB, et al. *In vitro* assembly of multiple DNA fragments using successive hybridization. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30267.
- [62] Finnegan J, McElroy D. Transgene inactivation: plants fight back. *Nat Biotechnol*, 1994, 12(9): 883–888.
- [63] Allen GC, Spiker S, Thompson WF. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2/3): 361–376.
- [64] Fraser PD, Romer S, Shipton CA, et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 1092–1097.
- [65] Holton T. Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same: US, 6080920. 2000-06-27.
- [66] Holton T, Tanaka Y. Transgenic plants having altered anthocyanin levels: US, 5948955. 1999-09-07.
- [67] Koes R, De Vetten N, Mol J. Cytochrome b5 from *Petunia*: PCT-International Patent Application. WO 00/09720. 2000-02-24.
- [68] Vainstein A, Zuker A, Ovadis M. Transgenic plants and method for transforming carnations: PCT-International Patent Application. US, 7129393. 2006-10-31.
- [69] Ranalli P. Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. New York: Springer, 2007: 475.
- [70] Chen XY. Plant secondary metabolism. *World Sci-Tech R & D*, 2006, 28(5): 1–4.  
陈晓亚. 植物次生代谢研究. *世界科技研究与发展*, 2006, 28(5): 1–4.