

曾庆平 编著

生物反应器

——转基因与代谢途径工程

BIOREACTORS:

TRANSGENE
AND METABOLIC
PATHWAY ENGINEERING



化学工业出版社

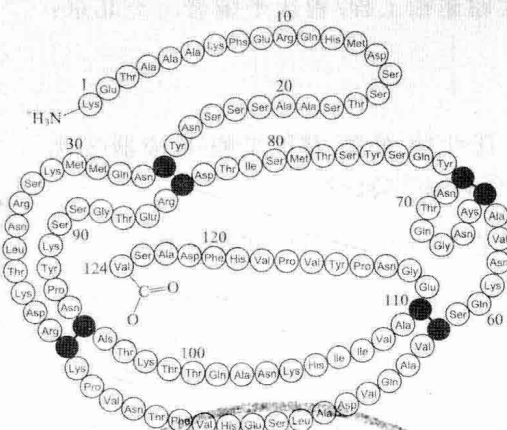
曾庆平 编著

生物反应器

转基因与代谢途径工程

BIOREACTORS:

TRANSGENE AND METABOLIC PATHWAY ENGINEERING



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书以天然生物反应器为切入点,系统地介绍了信息流(遗传信息传递、环境信号转导)、能量流(光能转换、化学能转换)和物质流(碳代谢、氮代谢)等三大基本生命运动形式的内涵。本书尝试将生物反应器与转基因及代谢工程融为一体,在现代基因组学辉煌成就的映衬下,提纲挈领地概览了结构与功能基因组学及序列与资源基因组学,并深入浅出地阐述基因工程(基因分离与重组)、蛋白质工程(分子改造与组合)、代谢途径工程(包括转基因植物和工程微生物培育)等人工生物反应器研制技术主轴。在仿生生物反应器部分,对生物孵化器、生物传感器、生物解码器等从纳米元器件到成套仿生分子机器的前瞻性领域进行了概述与展望。全书共分9篇,下设19章,分章内容贯穿着1条“主线”,即生命的基本运动形式(信息流、能量流、物质流);2条“副线”,即转基因植物和基因工程微生物;3条“纵线”,即生物孵化、生物传感、生物解码;4条“横线”,即应用于食品、药物、能源、材料。

本书以2000~2009年国内外公开发表的研究论文为主要参考资料,集作者长期从事生物工程教学科研所积累的研究成果编撰而成,可供从事基因工程、分子生物学、生物化学、化学生物学、合成生物学和系统生物学的专业研究人士,供职于食品生物技术、医药生物技术、环境生物技术、材料生物技术等领域的技术人员,高等院校生物学、农学、林学、轻工、食品等专业的教师和学生及非生物医学领域的读者阅读和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物反应器:转基因与代谢途径工程/曾庆平编著. —北京:
化学工业出版社, 2010.9
ISBN 978-7-122-08746-1

I. 生… II. 曾… III. ①生物-外源-基因工程-反应器②代谢-生物工程-反应器 IV. ①Q78②Q493

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第101832号

责任编辑:郎红旗

文字编辑:张春娥

责任校对:洪雅妹

装帧设计:张辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市万龙印刷有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张30¼ 字数757千字 2010年10月北京第1版第1次印刷

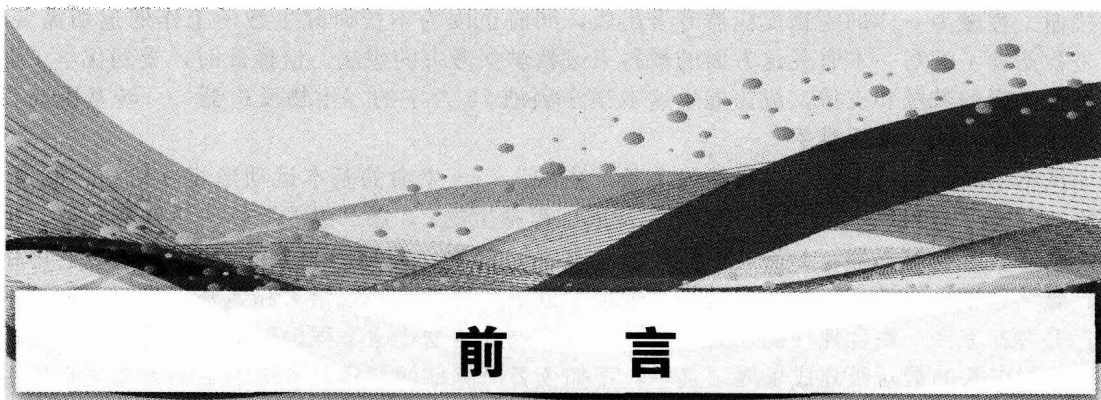
购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:75.00元

版权所有 违者必究



前言

2007年7月,编者荣幸地获邀参加了在美国新罕布什尔州小镇 Tilton 举行的 Gordon 科学大会(GRC)植物代谢工程卫星会议。以本次会议主席 Joe Chappell 教授领衔的本领域著名科学家和资深学者,美国能源部(DOE)、美国国家卫生研究院(NIH)以及美国国家自然科学基金(NSF)的科学官员,大型跨国生物技术公司(MONSANTO、SYNGENTA、MENDEL、BAYER、CERES、ARCADIA、ATHENIX)的技术专员等114人出席了会议。会议设有主会场和分会堂,其中主会场共有9个议题:①代谢网络与工程:非植物类;②植物代谢途径的组织与进化;③酶的可塑性:在代谢工程中是友还是敌?④代谢工程调控因子;⑤植物化学品的转运与滞留;⑥获取能源及生物转换;⑦复杂农艺性状工程;⑧发展中世界的植物代谢工程;⑨通向未来的窗口。分会堂共有4个议题:①代谢在植物与环境相互作用中扮演的新角色;②植物代谢的发育及细胞生物学;③理解代谢网络的综合方法;④植物代谢工程的策略。另外,会议上还展示了74份墙报。

按照 GRC 的惯例,会议报告不发摘要,墙报内容不许摄(像)录(音),与会者只能凭耳朵听、大脑记、敲键盘。既然有这样不成文的规定,那我也不好破例,尽管我事先准备了摄录设备,但都没有派上用场。作为本次会议唯一的中国参会者,我希望尽我所能对会议报告和墙报内容进行博闻强记,并尽可能多地跟参加会议的顶尖科学家们交流,争取将会议中透出的“亮点”和一些不会公开发表的重要信息带回国来。早在20年前,我就曾拜读过植物基因工程鼻祖、比利时根特大学教授 Marc de Block 先生有关农杆菌及 Ti 质粒的论文,这次有幸巧遇并当面求教,心情非常激动。世界著名植物生物工程学家、美国阿堪萨斯生命科学研究院教授 Pamela Weathers 女士的实验室是目前世界上植物生物反应器做得最出色的研究团队之一,能有机会亲耳聆听她的报告的确是极大的享受。同时,这次会议上有关生物合成途径的人工设计、转录因子文库用于突变体发现、总转录因子调节代谢网络相关基因表达、植物细胞的基因组尺度模型构建、基于系统学方法的高灵敏度代谢交通控制检测器研制等都值得特别关注。

在会议间歇的休闲划艇比赛以及从美国东部到西部的长途跋涉中,我都一直在思考如何将会议内容及时传达给国内同行,倒是在我北欧访学时就已熟识的一位中国旅芬学者在洛杉矶国际机场甩给我一句话:“Write it and tell them”。诚然,写点东西实在是个不难的“冲动”,但怎么写和写成多大篇幅却让我犯难。说实话,由于平常工作较忙,最初仅仅打算在国内发表1篇会议纪要或参会感想,以飨国内读者。可是,我后来发现,这篇小品文怎么也拿不出手,因为会议涉猎的专业领域既新且广,而我实在欠缺高屋建瓴的能力。如此思忖,

与其“蜻蜓点水”般泛泛而谈，不如静下心来慢慢捋一捋。考虑到国内目前还没有将转基因和代谢工程融为一体的生物反应器专著出版，同时也因为本校研究生教学工作的迫切需要，于是我萌发了编写一本有关这方面的教科书或教学参考书的想法。恰逢此时，受到化学工业出版社编辑的鼓励和支持，成为催生这本洋洋洒洒 75 万字的《生物反应器——转基因与代谢途径工程》的“幕后推手”。

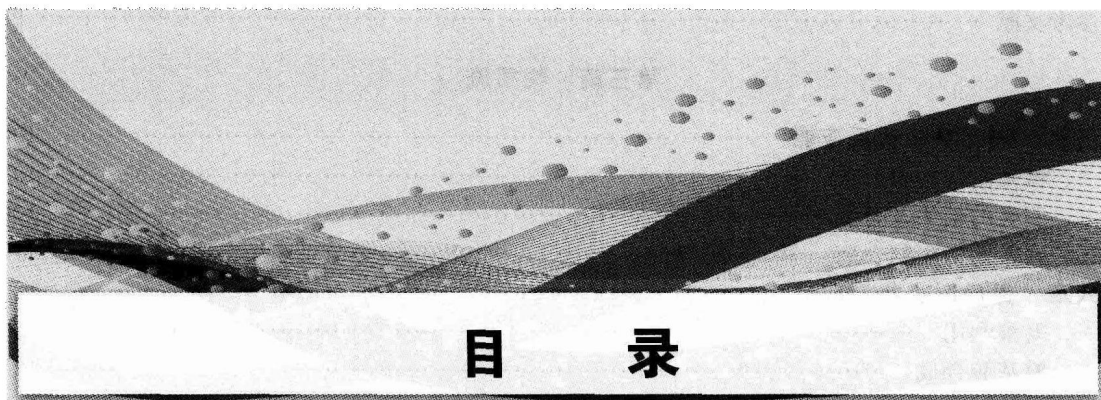
从本书间架结构来看，可概括为 1 条“主线”——生命的基本运动形式（信息、能量、物质）；2 条“副线”——转基因植物和基因工程微生物；3 条“纵线”——生物孵化器、生物传感器、生物解码器；4 条“横线”——食品、药物、能源、材料，由此对涉及生物化学、酶学、微生物学、遗传学、植物生理学、分子生物学、基因组学和转基因代谢工程技术的有关内容进行一番合理穿插及有机整合，再将此次植物代谢工程国际会议的精华内容及近几年来国内外的最新研究成果融汇其中。正如读者所见证的那样，本书的主要参考文献集中选择了 2000~2009 年时段内经过同行评议并用英文发表的一批高水平研究论文。

一晃 2 年过去了，这本书终于脱稿，我如释重负，但同时又有些忐忑不安，毕竟将转基因与代谢途径工程融入生物反应器还是一个初步尝试，加之从创意、计划、实施到完成的时间较为仓促，牵涉的学科领域和专业知识既有广度又有深度。好在此前我曾主编过几本相关的中文专著并参编过英文专著，加之我还有 10 年担任生物化学和分子生物学课程教学工作的经历，同时我的研究团队近年来在高产青蒿素转基因青蒿及基因工程酵母培育等植物及微生物代谢途径工程方面积累了一定的研究经验，令我在这些相关内容的编写上颇有驾轻就熟和顺理成章之感。但是，在这部尚属草创的作品里，差错甚至谬误在所难免，篇章结构、遣词造句和数字化表述也有不足。借此初版之机，笔者恳请广大读者提供宝贵意见，尤其欢迎同行们不吝批评、赐教！以便下次再版或重印时修改。邮件请寄：qpzeng@gzhtcm.edu.cn。

本书的部分图表借鉴或参考自国内外多部专著，在此一并致谢！同时，本书收录的本课题组近年以来的研究成果得到国家自然科学基金（30870072）、留学回国人员科技活动择优经费资助，特致谢忱。

编者谨识

2010 年 9 月于广州



目 录

绪论	1
一、生物反应器的定义及研究范畴	1
二、代谢途径工程的内涵与外延	2
三、工程化生物反应器的研究背景	3
四、工程化生物反应器的发展前景	5

第一篇 信息流

第一章 遗传信息传递生物反应器	8
一、DNA 指导 DNA 合成	8
二、DNA 指导 RNA 合成	12
三、RNA 指导蛋白质合成	25
第二章 环境信号转导生物反应器	31
一、信号系统	31
二、受体蛋白系统	37
三、信号转导功能模块	41
四、环境及发育信号转导	43
五、逆向信号转导——质体信息传递	54
参考文献	58

第二篇 能量流

第三章 光能转换生物反应器	62
一、质体的演化与发育	62
二、叶绿体基因组	64
三、叶绿体的功能结构	69
四、光反应——光能的吸收、传递和转换	70
五、CO ₂ 固定	81
第四章 化能转换生物反应器	86
一、线粒体的结构与功能	86
二、线粒体基因组	87
三、底物磷酸化	90

四、氧化磷酸化	95
参考文献	99

第三篇 物质流

第五章 碳代谢生物反应器	102
一、糖类的结构及合成	102
二、脂类的结构及合成	106
三、碳代谢衍生物合成	111
第六章 氮代谢生物反应器	122
一、氮素利用	122
二、氨基酸合成	124
三、核苷酸合成	132
四、氮代谢衍生物合成	135
参考文献	149

第四篇 结构与功能基因组学

第七章 基因结构剖析	153
一、基因组织	153
二、基因标记	159
三、基因分型	162
四、基因定位	165
五、基因作图	167
六、基因测序	173
第八章 基因功能注释	177
一、基因表达	177
二、基因比较	184
三、基因变异	189
参考文献	196

第五篇 序列与资源基因组学

第九章 基因序列挖掘	200
一、基因测序	200
二、基因搜寻	209
第十章 基因资源利用	221
一、抗生物胁迫基因	221
二、抗非生物胁迫基因	231
三、优质高产基因	235
四、沉默及抗沉默基因	241
参考文献	242

第六篇 基因工程

第十一章 基因克隆	246
一、基因克隆载体	246

二、基因制备	249
三、基因分离	255
第十二章 基因重组	268
一、基因表达载体	268
二、基因转移	279
三、植株再生	285
四、基因鉴定	285
参考文献	289

第七篇 蛋白质工程

第十三章 分子修饰	293
一、蛋白质结构组织	293
二、蛋白质分子设计	301
三、蛋白质及核酶修饰	304
第十四章 组合筛选	312
一、克隆组合基因文库	312
二、合成组合化学文库	323
三、组合文库筛选	328
参考文献	336

第八篇 代谢途径工程

第十五章 转基因植物	339
一、植物基因工程食品	339
二、植物基因工程药物	352
三、植物基因工程能源	362
四、植物基因工程材料	365
第十六章 工程微生物	370
一、微生物基因工程食品	370
二、微生物基因工程药品	376
三、微生物基因工程能源	381
四、微生物基因工程材料	394
参考文献	398

第九篇 仿生分子机器

第十七章 生物孵化器	403
一、生物培养	403
二、生物转化	410
三、生物修复	418
第十八章 生物传感器	423
一、生物响应	423
二、生物换能	425
三、生物传感	430
四、生物记忆	443

第十九章 生物解码器 447

 一、生物检测 448

 二、生物反应 453

 三、生物计算 454

 参考文献 462

附录 缩略语对照表 465

推荐阅读的书目 472

绪 论

一、生物反应器的定义及研究范畴

广义的生物反应器泛指能行使全部或部分生物学功能的天然生物体或人工模拟器具，因而有活体天然生物反应器与离体人工生物反应器之分。狭义的生物反应器仅指离体生物反应器，如发酵罐。Ratledge 和 Kristiansen 在其编著的“Basic Biotechnology”（2001）一书中对后者的定义为：“生物反应器或称发酵罐是一切基于生物技术的生产过程（疫苗、蛋白质、有机酸、氨基酸、抗生素、酶或微生物的生物转化、生物修复和生物降解以及用作生物肥料的微生物接种培养物）的核心。生物催化剂、微生物、动物或植物细胞均在生物反应器中产生和维持”。

就植物而言，活体生物反应器可细分为：①主要基于细胞膜及内膜系统的环境信号转导生物反应器，因为绝大多数感应环境信号的受体皆为细胞膜或细胞内膜镶嵌蛋白；②基于细胞核与细胞质的遗传信息传递生物反应器，遗传物质的复制主要发生在细胞核，而转录和翻译主要发生在细胞质，尽管细胞器也是遗传信息表达的场所；③基于叶绿体的光能转换生物反应器，负责执行光能驱动的光合链电子传递与光合磷酸化，即光合作用；④基于线粒体的化能转换生物反应器，负责执行化能驱动的呼吸链电子传递与氧化磷酸化，即呼吸作用；⑤以活细胞为基地的物质代谢生物反应器，主要包括碳代谢、氮代谢及其衍生物的合成与分解。

活体生物反应器属于生物学研究范畴，其研究内容基本上涵盖生物学的大部分基础学科，但涉及更多分支学科及前沿领域。植物生理学、生物化学、分子生物学、遗传学和基因组学等就是植物活体生物反应器涉及的重要学科，其中遗传信息传递和环境信号转导等信息流的代谢解析必须借助遗传学和分子生物学理论，光能转换与化能转换等能量流的代谢诠释需要植物学和植物生理学知识，碳代谢和氮代谢及其衍生物的合成与分解等物质流的代谢注解会涉及生物化学（糖、脂、氨基酸、核苷酸合成）、微生物学（共生固氮）等专业领域。同时，基因组学和生物信息学是指导基因分离、重组、改造、设计、转移等基因工程、蛋白质工程和代谢途径工程赖以建立的最可靠和最实用的参照系及理论基础。

离体生物反应器至少包括：①安装固定化酶板、添加液化酶、植入固定化细胞或悬浮培

养细胞的生物孵化器，本书用此术语表示发酵罐和动植物培养装置；②配备蛋白质（酶、抗体、受体）、类固醇、DNA 等生物分子或细胞、组织敏感膜的生物传感器；③设置具有反应、识别和运算功能的分子、细胞或组织芯片的生物解码器。除生物分子核心元器件外，离体生物反应器的其他外围设备还涉及工程学及电子学领域，尤其是生物化学工程领域与之密切相关，它从工程设计、机械制造和元件加工的角度出发，通过模拟生物分子、细胞、组织或器官的信号响应、传送和反馈等生命现象，实现孵化（反应）、传感（应答）和解码（识别）等仿生效果。诸如数字模型、动力学参数、热力学方程、优化工艺设计和计算机程序编制是仿生分子机器研制的关键词和热点话题。不过，只要面向生物系统，即使仅仅是纯工艺设计，也必须在遵循生物体“功能法则”的前提下模仿生物体的工作原理并适度操作，才能发掘其应有的功用，而生物系统区别于机械或电子系统的最大特征就是常温、恒压、需氧和中性环境等。

本书将以介绍活体生物反应器为主，特别注重基于酶促反应关键步骤的基因修饰和改造，必要时也将兼顾基于网络调节的活体生物反应器相关内容，几乎包括了基因工程、蛋白质工程和代谢途径工程的全部内容。转基因植物、转基因动物和工程微生物统称为遗传修饰生物，本书将依照习惯保留“转基因植物”的称谓，“转基因微生物”则改称为“基因工程微生物”或简称“工程微生物”。在介绍离体生物反应器时，本书分别以生物孵化器（微生物发酵罐及动植物培养装置）、生物传感器（纳米元器件）和生物解码器（分子、组织和细胞芯片）为题，重点讨论生物分子纳米元器件的组成、制作和工作原理，将不从机械或电子工程学角度展开讨论，也不会涉及过多的数学表达式和动力学模型，对此感兴趣的读者可以参考此类专著。

二、代谢途径工程的内涵与外延

简而言之，代谢途径工程是关于代谢途径分析和修饰的科学。根据美国密歇根州立大学 Della Penna 教授给出的定义，代谢途径工程是指对一个或多个酶促反应进行重新导向，以便在某种生物中生产新的化合物、改进已有化合物的生产或介导化合物的降解（Plant Physiology, 2001, 125: 160~163）。德国 Fraunhofer 分子生物学及应用生态学研究所的 Capell 和 Christou 教授将植物代谢途径工程定义为涉及增大特需分子流量的内源性途径的修饰，以便增大天然产物的生产或合成一种新的化合物或大分子（Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15: 148~154）。

由于代谢途径工程在代谢途径的改造上可能涉及基因上调、下调、敲除、敲弱、敲入和干扰中的任何一种或多种技术，在此给出植物代谢途径工程定义如下：通过对植物基因组、表观基因组、转录组、蛋白质组、代谢组的全方位分析，阐明植物细胞中信息、能量和物质代谢的动态流向及其网络调节机理，并采用基因操作及表达检测技术，对植物代谢途径进行人工改造，包括让天然代谢途径改道（引流）、添加新的反应步骤（开源）、删减原有反应环节（截流）等，人工构建工程化生物反应器，最终实现利用植物获得人类理想产品的目的。

代谢途径工程包括两个明确的步骤，即分析和合成。但因为代谢途径工程是在重组 DNA 基础上产生的新技术，所以最初代谢工程几乎都集中在合成方面，它在很大程度上是应用分子生物学的技术体现，而很少带有工程方面的内容。尽管生物过程考虑的问题并不具

备代谢途径工程的条件,但在代谢途径工程的分析方面仍然可以找到许多重要的工程内容。分析网络结构及其表现的主要工具包括如下几种:①基于约束力的网络分析。其目的是不依赖动力学参数而阐明代谢网络的功能和容量,包括网络构建、限制网络破解空间的约束力应用、生理相关网络表现信息的提取等步骤。第1步偏重于利用基因组注释,但生化和生理数据可提供补充信息,有助于改进推导网络的准确性。理论上,重建的网络也应当囊括基因表达水平上的调节因素,以使模型在非稳态下也适用。第2步是使用反应计量性、方向性和酶水平约束网络,得出整套可允许的流量分布。第3步是对上述解答进行分析,以鉴定使某个结论(如生长速率)优化的流量分布。②网络流量分析。采用代谢网络的化学计量模型,定量测定全部组分的流量。在简单系统中,这些流量可以从底物消耗与产物形成的稳态速率推导出来,但更实用的方法是分析来自一种或多种 ^{13}C 标记底物的代谢再分布。③动力学建模。动力学模型可提供了解稳态及非稳态条件下流量分布的最有效方法,但这些模型完全依赖网络中每个酶促反应步骤的准确动力学数据的有无。④代谢控制分析。代谢控制分析可以为分析代谢的控制与调节提供一种理论架构。

鉴于本书的高级教科书及教学参考书性质,同时考虑到化学及工程学专业学生的入门阅读需要,本书以不分学科方式从天然生物反应器的“信息流”、“能量流”和“物质流”开篇,提纲挈领和深入浅出地介绍了生物代谢活动规律所涉及的遗传学、生物化学、植物生理学和分子生物学等交叉性专业知识(第一~第三篇),同时以“结构与功能基因组学”(第四篇)及“序列与资源基因组学”(第五篇)为题介绍了植物功能基因组学的最新进展。在植物人工反应器部分,首先分别说明“基因工程”(第六篇)、“蛋白质工程”(第七篇)和“代谢途径工程”(第八篇)的基本技术环节。已经培育成功的基因修饰生物包括转基因植物和工程微生物,其应用领域涉及食品生物技术、药品生物技术、能源生物技术、环境生物技术和材料生物技术。最后特别引荐了“仿生分子机器”(第九篇),它们代表着人类从利用自然迈向创造自然的崭新阶段。最后,书末所列“推荐阅读的书目”为精选的国内外最新生物技术专著,同时也是本书编写过程中的重要参考文献。

三、工程化生物反应器的研究背景

植物素有“地球母亲的乳汁”之美誉。几乎所有生物都直接或间接地靠植物供养,亦即植物处于食物链的最末端。如果没有植物的光合作用,地球上一切动物及人类赖以生存的食物、油料、蔬菜、水果等生活必需品都无法供应,根本不可能见到今天如此丰富多彩的生命现象。因此,如何让植物生产更多的生活必需品,成为过去到现在人类锲而不舍、孜孜以求的奋斗目标。

早在19世纪中叶奥地利遗传学家孟德尔就开始进行豌豆的杂交试验,试图从中探索并发现生物遗传和繁衍的奥秘。经过多年的努力,他发现植物性状的遗传是非常有规律的,而且可以明确区分在后代中可以表现的显性性状和隐匿于后代中不表现的隐性性状,由此提出了控制单个性状遗传的“分离规律”和多个性状遗传的“自由组合规律”。20世纪30年代,美国遗传学家摩尔根及其学生步孟德尔的后尘长期开展果蝇遗传研究,不仅破解了控制多个性状遗传的“连锁规律”,而且划时代地提出了“基因”的概念,首次通过杂交实验令人信服地阐明了遗传的物质基础。50年代,美国生物学家Watson和英国物

理学家 Crick 成功建立了 DNA 双螺旋结构模型,首次从分子水平上解释了生物遗传的分子机理,为开创基因工程改造生物遗传特征的新时代奠定了雄厚的理论基础,具有里程碑式的意义。70 年代, Cohen 等又在大肠杆菌中表达了第 1 个外源基因,由此迈向了基因工程领域。1977 年, Chilton 等成功开发出根癌农杆菌 Ti 介导植物基因转移系统,1983 年 Zambryski 等培育出第 1 株转基因植物,从此开创了植物基因工程研究与应用的新纪元!

如今,植物基因工程领域的发展突飞猛进,取得的进步日新月异。转基因作物逐步进入农业生产领域,为解决人类生存与繁衍的重大问题做出巨大贡献。尽管在转基因食品问题上学术界的“赞成派”与民间“反对派”之间长期各执己见,有时甚至争得不可开交,但在庞大的食品“刚性需求”面前,人类改造作物性状的脚步不可能停息!

在植物基因工程发展早期,由于对植物遗传背景的了解十分有限,基因克隆和鉴定技术单调而且低效,故成功分离的有用基因寥寥无几。屈指数来,在 1980~1990 年间被成功克隆并用于转基因作物培育的有用基因仅限于抗虫基因和抗除草剂基因。然而近 20 年来,由于科学家的勤勉工作和不懈努力,不仅已从无数植物突变体的分析中加深了对植物基因表达及其调控机理的了解,而且从植物中分离出各种有利用价值的基因,甚至包括控制数量性状(如产量、品质等)的基因资源,为全方位、多层次、高效率地培育符合人类理想的转基因作物品种提供了取之不尽、用之不竭的基因素材。预计在不久的将来,通过基因操作的方式培育出“超级作物”、“超级树种”和“超级药材”将不再是遥不可及的梦想!

为了获得控制某条代谢途径的关键酶基因,首要任务是要阐明其代谢途径尤其是催化各个反应步骤的酶类并进行通量分析。过去采用植物化学方法只能对产物的结构进行分析,而同位素示踪法也只能对中间产物进行追踪,但它们无一例外都不能确定性状表现过程中具体的酶促反应步骤,更不能分离出每种酶类所对应的编码基因,这样就大大阻碍了对植物特定代谢途径的改良。利用转座子或 T-DNA 随机插入植物基因组后产生的表型变化,就能方便而快捷地鉴定出控制某种性状或某条代谢途径的基因。在鉴别突变型的基础上,可利用基因打靶技术定点敲除某个基因或某些基因,从而筛选和分离特异的靶基因。例如,早在 20 世纪 70~80 年代,人们就已经在生物化学水平上对植物脂质合成的每一反应步骤有了充分了解。但由于酶分离技术本身的困难,在纯化及克隆脂质合成途径中的酶类尤其是膜结合型酶方面的进展十分缓慢。在拟南芥中采用诱变法获得 1 万个脂质合成突变体,随后利用气相色谱法对这些突变体进行筛选,结果导致一大批新的及有用的脂质合成途径相关突变体被鉴定,为下一步利用染色体步行法、T-DNA 标签法及其他各种基于同源性的筛选方法分离靶基因打下了基础。以此为突破口,在短短几年的时间里,采用类似的诱变技术又陆续阐明了氨基酸、蜡、花青素和抗坏血酸等植物代谢产物的合成途径。

以 20 世纪 90 年代启动的人类基因组计划(Human Genome Project)为契机,植物学家们也果断地摒弃了过去那种原始而落后的基因分离方法,而是改用高通量、大规模、跨物种的全新基因发现新模式,不失时机地开展了对模式植物拟南芥和模式作物水稻的基因组测序计划,并相继在 2000 年底和 2002 年底提前完成了拟南芥和水稻的全基因组测序任务,所有数据均已向社会公开。近年来,以基因组测序图谱为基础绘制的功能注释图谱的问世为解决基因资源不足的难题提供了最大契机。目前已有多达几十种植物包括农作物的基因组计划正

在实施之中,这无疑将大大开阔人们认识作物基因功能和了解植物基因表达调节的视野,并有效地应用于农业生产实践中。由此可见,植物基因工程操作必然以植物功能基因组学研究成果作为铺垫,而植物基因工程技术的应用也为开展植物功能基因组学研究开创了全新领域。

根据现在的了解,植物细胞中各种代谢活动都以代谢途径为单位进行协调控制,以往某些转基因研究未能取得预期效果,可能与植物内部稳态系统的自我调节有关,也可能反映出对特定代谢途径缺乏足够的了解。植物代谢途径工程的早期工作主要集中在单基因的转移,其策略不外乎增大或减小通向目的化合物的流量、阻断竞争性途径或引进能分流的捷径等。然而,在很多情况下单基因转移的价值十分有限,因其微弱的增效作用常常被系统的稳态调节所抵消。相反,若能针对同一条代谢途径的多个步骤尤其是关键酶催化步骤进行基因操作,则有助于以更预见的方式控制代谢流向,所期望的增效作用也更显著。为此,可采用以下3种方式进行基因操作:①上调一条途径中几个连续的酶;②上调一条途径中的酶而下调另一条竞争性途径中的酶;③利用调节基因对细胞中的一条或多条途径进行多节点调节。实际上这些措施正是基因工程改造代谢途径所使用的重要手段。

四、工程化生物反应器的发展前景

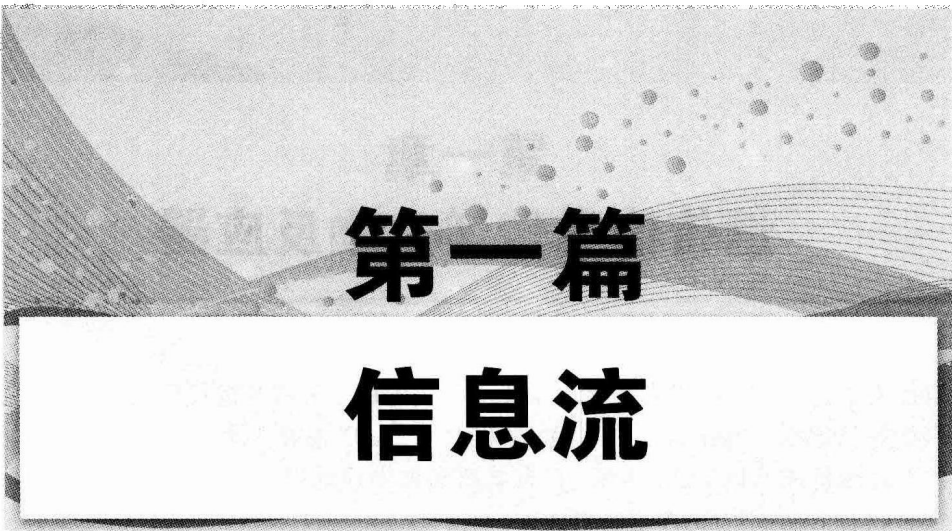
工程化生物反应器的研究是主要涉及生物学、化学和工程学的边缘学科。近年来,系统生物学、合成生物学、化学生物学、化学遗传学、化学基因组学等新学科不断涌现,工程化生物反应器理论研究领域逐渐成型,世界顶尖学术杂志也相继做出了将生物学、化学和工程学等融合的有益尝试,如几年前创刊的“Nature Biotechnology”、“Nature Chemical Biology”和前不久才创刊的“PLoS ONE”等。随着植物基因组学、表观基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等先进生物技术的不断发展,植物代谢工程领域取得了许多令人瞩目的成就。目前,人们不仅可以通过导入多个基因对代谢途径进行局部调控,而且正在开始着眼于对整个代谢网络进行整体调控。例如,通过转录因子基因修饰技术控制某类相关基因的协同表达,这在当初利用单基因培育转基因植物的时代是不可想象的。按照这样的趋势发展下去,在不久的将来人们所看到的将不仅仅是基因组序列图谱,而更多的是功能化的酶促反应路线图、代谢产物路线图和代谢途径调节网络图。有了这样的动态代谢图谱,人工设计和体外重建代谢途径将可能很快变成现实。

生物质能源开发中涉及的能源植物改良是植物代谢途径工程研究的一个热点。为了减轻生物能源利用造成的世界粮食危机和避免食用油价格飙升,就必须刻不容缓地开拓新的能源植物资源。生物乙醇能否替代汽油在很大程度上取决于纤维素的生物转化程度,而生物柴油的广泛应用只有通过开发非食用油植物才能实现。目前,如何促进能源消费从面临枯竭的石油向可再生性生物质能源转变是一个备受全球关注的问题。为此,2008年6月在墨西哥召开的泛美植物及生物能源大会(PanAmerican Congress on Plants and BioEnergy)专门就植物与能源的紧密关系进行了研讨,其中不乏一些有益的话题:“营养生长-开花发育开关及其对生物质累积的影响”、“甘蔗能源作物设计”、“木本植物生物质的遗传控制”、“改变木质素组成和促进生物质转化”、“能源作物氮素利用的遗传学”、“能源作物设计的实际考察”等。由此可见,能源植物的遗传改良将在未来生物质能源的开发中发

挥重要作用。

植物代谢途径工程领域内较有发展前景的研究方向之一是让原本在细胞质中生产的代谢产物转移到叶绿体或线粒体中生产。由于细胞器相对于细胞而言具有数量上的绝对优势，这样可以使其生产能力得到成千上万倍的提高，在蛋白质、酶和小分子药物的超高量生产上具有极大潜力。美国肯塔基大学 Chappell 小组的最新报道显示，将细胞质中合成倍半萜的酶靶向导入叶绿体后，相应的倍半萜合成酶活性最高升幅达到 1000 倍以上；另一个新颖的产业化领域是将植物次生代谢物的合成途径移植到微生物体内，尤其是那些植物与微生物部分共同的次生代谢物合成途径，可望实现各种植物次生代谢物的工业化生产。美国洛杉矶加州大学 Keasling 教授领导的研究小组在比尔·盖茨基金会的资助下，利用植物（青蒿）与微生物（酵母菌）共有的异戊二烯途径，已将青蒿素合成基因从青蒿中移植到酵母细胞中，并成功生产出高含量的青蒿酸，展现出由青蒿酸半合成青蒿素的产业化前景。

总之，植物代谢途径工程在技术环节上虽源自基因工程的原理和方法，但前者更倾向于从全局着眼和从网络调节入手，能更准确地预见基因转移的结果，有助于阐明植物细胞中纷繁复杂的代谢主流及分支途径，为人类更好地模拟自然现象并进行仿生创意开辟新的领域。可以预期，植物代谢途径工程的广泛应用必将能生产出更多理想的“绿色”食品和饮料、开发出更安全的药物、提供更洁净的能源以及创造更优美的环境！



第一篇

信息流

植物细胞内外环境中存在着两条主要的信息流，即遗传信息流和环境信息流，前者源于植物细胞固有的遗传特性，信息的传递顺序是从核酸到蛋白质再到表型，其中核酸的核苷酸序列决定着蛋白质的氨基酸序列，功能蛋白质（如酶）的催化性能决定着所合成化合物的性质，从而影响个体的形态特征及性状；后者由内外环境因素所决定，其传递依赖配基与受体的相互作用，受到信号转导过程中激酶磷酸化与脱磷酸化的级联调节，最终通过影响基因表达来发挥作用。几乎可以肯定，所有生命活动都通过基因表达而实现，其过程符合中心法则所界定的主干流向，即脱氧核糖核酸（DNA）→核糖核酸（RNA）→蛋白质。

遗传信息流指导植物细胞内的遗传物质合成、细胞分裂、组织器官分化及植物体的生长、发育、开花、结实、衰老和死亡；环境信息流调节细胞对内外环境的响应模式及其程度，同样影响植物体生命周期的运转。遗传信息流是内因，决定基因能否表达；环境信息流是外因，决定基因是否表达。遗传信息流与环境信息流相辅相成，确保适当的基因在适当的时间和适当的空间正确表达，使形形色色的生物得以在地球上生生不息、世代繁衍。

植物对环境变化的反应极其灵敏，处置也十分迅速，这对其生存、适应以及防御具有重大意义，因为植物不能离开原地自由移动，不具备动物遭遇危险时的逃逸行为。毋庸置疑，植物对环境的适应丝毫不逊色于动物，这与它们对环境的独特应答机制是分不开的。

第一章

遗传信息传递生物反应器

生物固有的遗传特性决定着性状由亲代向子代的稳定传递及世代延续。遗传信息的表现形式是基因和基因组，其化学本质是 DNA 和 RNA。DNA 在人类及动植物和绝大多数微生物中负责贮存和传递遗传信息，RNA 仅在某些病毒中作为遗传信息的直接贮存者，但据考证作为遗传物质 RNA 比 DNA 更古老。

人类及动物细胞含有两套不同的基因组，即位于细胞核内的核基因组和位于线粒体内的线粒体基因组，而植物细胞除核基因组和线粒体基因组外，还有一套质体基因组，其中位于叶绿体（含有叶绿素的质体）中的基因组称为叶绿体基因组。由于核基因组以染色体形式存在，故又称为染色体基因组，质体基因组（包括叶绿体基因组）和线粒体基因组则合称为染色体外基因组或细胞器基因组。从化学组成上来看，染色体基因组是由 DNA 与组蛋白及其他非组蛋白类蛋白质组成的线状核蛋白复合体，而染色体外基因组则为近乎裸露的环状 DNA。

所有真核细胞及绝大部分原核细胞的基因组都是双链 DNA，而噬菌体基因组既有双链 DNA（如 λ 噬菌体、T4 噬菌体等），也有单链 DNA（ ϕ X174、MS2 等）。原核细胞（包括古细菌和真细菌）的基因组以环状 DNA 占绝大多数，但也有呈线状的原核基因组，如 ϕ X174、 λ 、T4 等噬菌体及螺旋体的基因组。

基因传递与基因表达是中心法则概括的两个中心环节。基因传递是指由亲代 DNA 通过复制产生子代 DNA 的过程，发生在细胞分裂期；基因表达是指由 DNA 转录生成 RNA 及 RNA 翻译产生蛋白质的过程，发生在细胞分裂前后。在某些病毒中，还存在 RNA 复制及反转录等独特的基因传递方式。核基因组的复制和转录都是在细胞核内进行的，翻译则在细胞质中完成；细胞器基因组的复制、转录和翻译都发生在细胞器基质中。细胞核与细胞器之间尚存在蛋白质的翻译后靶向机制，即细胞核基因编码合成的蛋白质可定向运送至细胞器。因此，细胞核、细胞质和细胞器共同组成了植物遗传信息表达生物反应器，由 DNA 指导 DNA 合成、DNA 指导 RNA 合成、RNA 指导蛋白质合成。



一、DNA 指导 DNA 合成

DNA 指导 DNA 的合成泛指复制、修复和重组等依赖于 DNA 模板的 DNA 合成过程。至于 DNA 合成的原理，早在 1953 年 Watson 和 Crick 在“Nature”发表的划时代论文中就