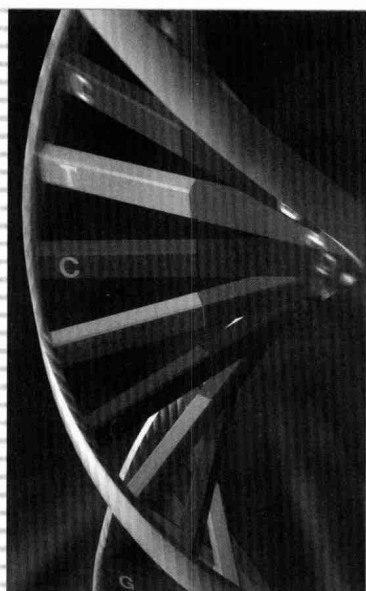




生命科学研究进展

Advances in Life Science Research

■ 王利琳 主编



生命科学研究进展

A d v a n c e s i n L i f e S c i e n c e R e s e a r c h



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生命科学研究进展 / 王利琳主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2008. 5

ISBN 978-7-308-05936-7

I. 生… II. 王… III. 生命科学—研究 IV. Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 059612 号

生命科学研究进展

王利琳 主编

责任编辑 沈国明

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: jsjsyb@zju.edu.cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>

<http://www.press.zju.edu.cn>)

排 版 浙江大学出版社电脑排版中心

印 刷 杭州杭新印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 12.75

字 数 310 千

版 次 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷

印 数 0001—3000

书 号 ISBN 978-7-308-05936-7

定 价 25.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

主 编 王利琳

副主编 王慧中

编 委 (按姓氏笔画排列)

王世贵 向太和 沈 波 陈建明 庞基良

金孝锋 施心路 施农农 施曼玲

前 言

回顾 20 世纪,生命科学硕果累累。50 年代 DNA 分子双螺旋模型的发现,60 年代操纵子学说的提出、具有生物活性的牛胰胰岛素的人工合成,70 年代的 DNA 重组技术,80 年代的 PCR 技术,90 年代的 DNA 测序和动物克隆技术的产生,将生命科学带向一个由宏观到微观,再到宏观的整合生物学时代。展望 21 世纪,生命科学充满希望。人类基因组计划的完成,克隆技术的日益成熟和应用,人类各种疾病的进一步研究……在生命科学领域的研究正带领全球的科学发展走向一个新纪元。

为了庆祝杭州师范大学建校 100 周年和生命与环境科学学院建院 30 周年,生命与环境科学学院生物科学和生物技术专业部分骨干教师编写出版了《生命科学研究进展》一书。全书共十一章,内容涉及生命科学宏观和微观的多个研究内容,反映了生命科学各相关领域的发展状况和教师的最新研究成果。

生命科学作为一门多学科综合发展的学科,正与其他学科不断交叉渗透,其发展之快,影响之大,为科学史上少有。新问题不断产生和解决,新概念、新理论不断提出,新技术、新方法不断发明与改进。《生命科学研究进展》一书包含的仅仅是生命科学知识中的沧海一粟,加之我们学识有限,书中不足和错误之处在所难免,恳请读者批评指正。

在本书编写过程中,参考和引用了国内外一些专家、学者的文献资料,也引用了他们的部分研究成果,在此向他们深表谢意!浙江大学出版社对本书的出版给予了大力支持,在此表示衷心的感谢!

编 者

2008 年 5 月

目 录

第一章 启动子研究进展	1
1 引 言	1
2 启动子的结构及分类	2
3 启动子的克隆	7
4 启动子的功能研究	9
5 松树根特异性表达启动子研究	11
第二章 小麦品质基因遗传转化研究进展	19
1 引 言	19
2 改良小麦品质的遗传育种研究进展	20
3 我国小麦加工品质及 HMW-GS 亚基研究进展	22
4 线型表达框基因转化研究的意义	23
5 小麦品质基因转化过程中的组织培养效应研究	25
6 小麦品质基因的转化效应研究	26
7 多重 PCR 对有益转基因的快速检测	28
8 转基因的表达效应	31
9 展 望	34
第三章 水稻生理性状 QTL 的研究进展	39
1 引 言	39
2 与光合作用相关的生理性状 QTL	40
3 与籽粒灌浆相关的生理性状 QTL	41
4 与物质代谢相关的生理性状 QTL	42
5 与逆境相关的生理性状 QTL	45
6 展 望	46
第四章 寄生蜂对寄主的生理抑制策略研究进展	53
1 引 言	53
2 寄生蜂作用于寄主的主要生理抑制因子	53
3 寄生蜂对寄主的调控作用	62
4 小 结	64
第五章 赤霉素促进花发育的作用及分子机理	72
1 引 言	72
2 赤霉素在花发育中的生理作用	72

3 赤霉素促进花发育的分子机制·····	74
第六章 高等植物性别决定机理及其应用研究进展 ·····	86
1 以白麦瓶草为研究对象对雌雄异株植物性别决定的研究·····	86
2 以玉米为研究对象对雌雄异花同株植物性别决定的研究·····	87
3 以黄瓜为研究对象对雌雄异花同株植物性别决定的研究·····	89
4 以其他植物为研究对象对植物性别决定的研究·····	91
5 植物性别决定在农业生产中的应用·····	92
6 展 望·····	94
第七章 豌豆花发育的分子生物学研究进展 ·····	101
1 引 言 ·····	101
2 豌豆花器官结构和花发育过程的特殊性 ·····	102
3 豌豆花分生组织属性的决定 ·····	102
4 豌豆花器官属性的决定 ·····	104
5 问题和展望 ·····	108
第八章 p200 家族蛋白及其在肿瘤和自身免疫疾病中的作用 ·····	111
1 引 言 ·····	111
2 p200 家族蛋白基因的克隆和染色体定位 ·····	112
3 p200 家族蛋白的结构 ·····	115
4 p200 家族蛋白的亚细胞定位、组织分布及诱导表达情况 ·····	117
5 p200 家族蛋白在细胞生长调控中的作用 ·····	120
6 p200 家族蛋白抑制肿瘤的形成 ·····	123
7 p200 家族蛋白在自身免疫疾病中的作用 ·····	125
第九章 芜菁花叶病毒研究进展 ·····	135
1 引 言 ·····	135
2 芜菁花叶病毒普通生物学研究 ·····	135
3 芜菁花叶病毒分子生物学研究 ·····	141
4 芜菁花叶病毒病原的检测与鉴定 ·····	152
第十章 微型生物与水质关系及在西湖水质监测上的应用 ·····	164
1 微型生物与水质关系 ·····	164
2 西湖水质监测工作 ·····	168
第十一章 莎草科藎草属的系统分类研究 ·····	186
1 引 言 ·····	186
2 国内外研究现状 ·····	186
3 存在及需要解决的问题 ·····	189

第一章 启动子研究进展

1 引言

我们知道,生物中基因表达的最终产物是 RNA 和蛋白质,这两大类物质及其次级产物维持着整个生命机体的有序活动。2003 年 4 月,国际人类基因组测序组宣布,通过美、英、日、法、德和中国科学家历经 13 年的共同努力,人类基因组“序列图”提前绘制成功。至此,以测序为主的“结构基因组学”研究已趋于尾声,基因组学进入了“后基因组学”(也称“功能基因组学”)时代。人类基因组大约由 30 亿个碱基对构成,在功能基因组时代,如何在这浩如烟海的序列数据中定位基因组中的各种功能单元,建立这些功能单元之间的相互作用关系网络,从而在分子水平上全景式揭示生命的奥妙已成为巨大的挑战。

基因表达的程序、时间和位置在不同层次上受不同调节因素的控制,这种控制机制不仅决定基因的表达水平,而且还决定基因表达的时空顺序。而在每种生命体的基因组 DNA 中都包含两类功能区域:一类是决定基因产物结构和功能的编码区;另一类是调控基因时空表达顺序和表达方式的调控区。调控区包含启动子、增强子、内含子等为数众多的非编码组分,隐含着整个生命活动的根本控制定律。基因表达调控的机理是分子生物学研究的热点和前沿。蛋白质编码基因的表达需经过转录和翻译两大环节,且每个环节都存在着不同的基因表达调控位点。在这个十分复杂的调控过程中,转录水平上的调控最为重要,而启动子的调控在转录环节中又占有重要的地位。启动子是 RNA 聚合酶能够识别并与之结合,从而起始基因转录的一段 DNA 序列,通常位于基因上游。启动子是基因表达所必需的,启动子上任何一个碱基的变化都可以引起基因表达的改变,从而引起生物机体的生理生化性质、表型等出现差异。同时,在基因工程中,启动子对外源基因的表达水平影响很大,要使克隆的基因能够在宿主细胞中顺利表达,其编码结构应该处于宿主启动子的有效控制之下,且启动子与受体细胞之间的合理匹配对异源基因在宿主细胞中的表达有着重要的作用。不论是原核生物还是真核生物,在基因表达调控的细节上尽管差异很大,但两者的调控模式却具有极大的相似性和可比性,而启动子的调控在转录环节中又占有十分重要的地位。因此,启动子对于基因表达调控机制的研究具有十分重要的理论意义,而且还对基因工程产业化发展具有重要的现实意义。

2 启动子的结构及分类

2.1 启动子的结构

2.1.1 原核生物的启动子结构

在原核生物中,很多功能上相关的基因前后相连成串,由一个共同的控制区进行转录的控制。包括结构基因和控制区以及调节基因的整个核苷酸序列叫做操纵元(孙乃恩,1996)。在操纵元中,从 mRNA 开始转录的位点以上,都是启动子的序列。整个启动子可以分为两个部分:上游部分是 CAP-cAMP 结合位点,下游部分是 RNA 聚合酶进入位点。RNA 聚合酶进入位点包括识别位点和结合位点。大多数原核生物启动子在-25bp 附近都有一个 TATA 框,在-75bp 附近有一个 CCAAT 框。原核生物启动子有三个重要的区域,包括:①Pribnow 框,在-10bp 左右的一段核苷酸序列中,是 RNA 聚合酶的牢固结合位点;②Sextama 框,位置在-35bp 附近,是 RNA 聚合酶初始结合位点;③CAP 位点,是负调控机制中阻遏蛋白结合位点。

2.1.2 真核生物的启动子结构

在真核生物中已鉴定了多种特定的启动子序列,这些序列多位于基因转录起始位点 5' 近端的核苷酸序列上游-20~-220 bp 区域内。经比较发现,真核生物启动子一般由四部分组成(见图 1-1):①上游元件;②TATA 框;③起始序列,即转录起始区,位于基因转录的起始位点;④下游元件,即转录开始位点的下游部分(Weaver,2000)。

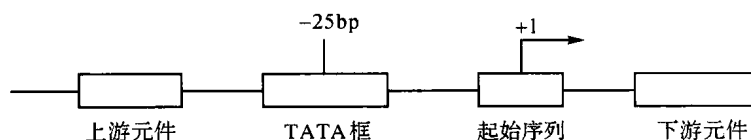


图 1-1 真核生物中被 RNA 聚合酶 II 识别的启动子(Weaver,2000)

在上游元件中,除了 CCAAT 框以外,还包括上游几百个 bp 中的多种基序,又称为顺式作用元件,它是指特异转录因子的结合位点或 DNA 序列,如 G-box 等。顺式作用元件对基因表达起调控作用。根据顺式作用元件的位置、功能及作用方式,可将这些元件分为启动子元件、增强子和抑制子(Weaver,2000)。顺式作用因子功能复杂,影响着启动子的空间、时间特异性和表达强度等特性。

真核生物启动子核心元件包括 TATA 框和转录起始位点附近的起始子。TATA 框又称 Hogness 框、Goldberg-Hogness 框,其一致序列是: $T_{85}A_{97}T_{93}A_{85}A_{63}A_{83}A_{50}$,常在起始位点的上游-25bp 左右,相当于原核生物的-10bp 序列。原核生物中-10bp 序列是不可缺少的,而真核生物启动子中有的却缺乏 TATA 框。TATA 框的作用是:①选择正确的转录起

始位点,保证精确起始,故也称为选择子。有的基因当缺少 TATA 框时,可能由 Inr 来替代它的这一作用。如鼠的脱氧核苷转移酶基因就没有 TATA 框,但有 17bp 的 Inr。②影响转录的速率。TATA 框的 8bp 保守序列一般都由 A-T 对组成,少数情况在其中的两个位点上由 G-C 对取代 A-T,可见它比较容易打开。当它的序列因发生突变或缺失而改变时,就会影响它与酶的结合能力,从而影响转录的能力。当兔的珠蛋白基因的 TATA 框的保守序列 ATAAAA 人工突变为 ATGTAA 时,转录效率会下降 80%。人的 β -珠蛋白基因的 ATAAAA 序列变为 ATGAAA 或 ATAG/CAA 时, β -珠蛋白产量也会大大降低而出现地中海贫血症。

转录起始位点是真核生物 RNA 聚合酶 II 识别模板链和转录起始的位点,如果转录起始位点发生变化就会影响转录。植物基因启动子利用 ATG 作为起始密码子,与动物基因的 CCACCATG(G)保守序列不同,ATG 旁侧的保守序列为 TAAACAATGGCT,其中旁侧序列及其与 TATA 框的距离能够感受光、不同发育阶段或微生物感染引起的信号,受不同因子的诱导和调节。已有研究表明,高等植物的转录起始位点具有帽结构。帽加在 mRNA 分子的 5'端,大多数真核类 mRNA 的第一个核苷酸是腺嘌呤,帽就加在其上。真核生物转录的起始位点不但要具有帽结构的专一性,而且大多数情况下只有嘌呤残基(以腺嘌呤为主)才能启动转录(朱玉贤和李毅,1997)。

2.2 启动子的种类

目前已从动物、植物及微生物中分离到许多启动子。这些启动子按其作用方式及功能可以分为三类(表 1-1):组成型启动子、诱导型启动子和组织或器官特异性启动子。这种分类大体上反映了它们各自的特点,但在某些情况下,一种类型的启动子往往兼有其他类型启动子的特性(王关林等,1998)。

表 1-1 主要启动子类型

启动子类型	特 点	举 例
组成型启动子	基因表达持续恒定,没有时空特异性,可在任何组织中表达	CaMV35S 启动子
诱导型启动子	启动子活化受物理或化学信号的诱导;启动子分子结构都有增强子、沉默子或类似功能的序列结构;感受特异性诱导的序列都有明显的专一性;部分该类型的启动子同时具有组织特异性表达特点;该类启动子常以诱导信号命名,分为光诱导、热诱导、愈伤诱导、真菌诱导和共生细菌诱导表达启动子	如:叶绿素 a/b 结合蛋白(Cab)基因启动子受光调节,热休克蛋白(Hsp)基因启动子受热启动等
组织或器官特异性启动子	基因表达往往只发生在某些特定器官或组织部位,并往往表现出发育调节的特性	gbss1 启动子、glutelin 启动子等

2.2.1 组成型启动子

组成型启动子的特点是表达具有持续性,不受时空及外界因素的影响,能驱动目的基因在生物体各发育阶段和不同部位都表达,且表达水平没有明显差异。目前基因工程常用的启动子主要是组成型启动子,如花椰菜花叶病毒 35S(CaMV 35S)启动子、根癌农杆菌 Ti 质粒

T-DNA 区域的胭脂碱合成酶基因(Nos)启动子、章鱼碱合成酶基因(Ocs)启动子、玉米泛素基因(Ubi1)启动子、水稻肌动蛋白基因(Act1)启动子等。单子叶转基因植物主要使用来自玉米的 Ubi1 启动子和来自水稻的 Act1 启动子。双子叶转基因植物主要使用 35S 启动子。35S 启动子整合到双子叶植物基因组后,能在大多数器官和不同的发育时期高强度地启动外源基因的表达(Odell et al, 1985)。此外,35S 启动子也可以驱动基因在单子叶植物和双子叶植物的原生质体以及单子叶植物的植株中表达(Benfey et al, 1990)。35S 启动子可分为两个区域(domain):从-90bp 至+8bp 为 A 区域,主要负责基因在胚根、胚乳及根组织内表达;B 区域(-343bp 至-90bp)负责基因在胚的子叶、种子或成熟植株的茎部表达。35S 启动子中只有两区都存在时基因才能在各个发育时期的大部分组织中表达(Benfey et al, 1990)。在 B 区域的增强子序列可以提高表达水平,如果 35S 启动子中存在两个 B 区域将能使 35S 启动子的活性提高 10 倍(Kay et al, 1987)。值得注意的是,对于某些启动子,B 区域起到的是阻遏因子的作用。

虽然 Nos 和 Ocs 启动子来自细菌,但都具有与植物基因相似的共有序列,因此具有植物启动子的特性。值得注意的是,Nos 和 Ocs 启动子也具有一定的损伤诱导和激素诱导活性(Angenon et al, 1990)。另外还发现,Nos 启动子的强度因组织部位及器官位置不同而变化,在老组织中通常比新生组织中强,在生殖器官内随发育状态不同而不同(王颖等,2003)。由于从病毒中克隆出来的基因启动子序列应用到基因工程中可能存在潜在的生物不安全性,因此,从植物本身克隆活性强的组成型启动子势在必行。目前,有些研究已经初见成效,例如水稻肌动蛋白(actin)和玉米泛素(ubiquitin)等基因的启动子已被克隆。用这些启动子代替 CaMV 35S 启动子,可以更有效地在单子叶植物中驱动外源基因的转录(Sun et al, 2002;McElroy 和 Brettell,1994;Christensen et al,1992)。

组成型启动子已经广泛地应用于双子叶植物、单子叶植物以及真菌等生物的基因工程中。但是由于组成型启动子所驱动的基因在植物各组织中均有不同程度的表达,故应用中逐渐暴露出一些问题。例如外源基因在整株植物中表达,产生大量异源蛋白质或代谢产物并在植物体内积累,打破了植物原有的代谢平衡,有些产物对植物并非必需甚至有毒,因而阻碍了植物的正常生长,甚至导致死亡;另外,重复使用同一种启动子驱动两个或两个以上的外源基因可能引起基因沉默或共抑制现象(Kumpatla et al, 1998)。因此,人们在寻找更为有效的组织、器官特异性启动子来代替组成型启动子,以更好地调控基因表达。

2.2.2 组织或器官特异性启动子

特异性启动子只在特定的器官或组织部位表达,并往往表现出发育调节的特性。目前已经发现这类启动子中一般同时存在几种控制组织特异性表达的元件,其表达特异性由这些元件的种类、数目及相对位置等共同决定。深入研究这些启动子不仅有助于阐明植物形态、发育、代谢途径等基础理论,而且具有广泛的应用价值。目前,组织或器官特异性启动子的研究和应用已成为植物基因工程研究的热点之一。

根特异性表达启动子:随着植物根特异性表达启动子研究的不断进展,特别是差别筛选(differential screening)和减除技术(subtractive techniques)的应用,现已分离出了一些植物根特异性表达基因和增强序列。报道较多的有分离自烟草的富含羟脯氨酸的糖蛋白(HRGP)基因,尽管其表达水平很低但确是根特异性的,在烟草侧根分化诱导过程中,在中

柱鞘和内皮层中其启动子表现短时间活跃,特别是在后期根发生组织细胞中活性强,这个基因所编码的蛋白被认为可以强化新形成侧根的细胞壁(Keller 和 Lamb,1989)。在油菜 *Brassica napus* 伸展蛋白 cDNA 文库中发现两个转录本(1.45kb 和 1.26kb)与根组织中的同源,而且这两个转录本在叶、茎组织中不存在,此基因 1kb 的启动子序列融合 GUS 基因,导入 *B. napus* 根维管束组织中表现活跃(Shirsat et al,1991)。在转基因烟草中,一个 French bean 胞壁蛋白基因启动子,是根维管束组织特异表达的,−96bp~−76bp 中有一个特异性表达元件负责相应于根尖—维管分化区组织带中的表达(Keller 和 Baurngartner,1991)。McElroy(1990)分离鉴定的 4 个水稻肌动蛋白基因(Rac1,Rac2,Rac3,Rac7)在不同发育阶段的根、芽中表达也表现出差异。小麦胚凝集素(WGA)主要存在于不定根的表层细胞、根冠、胚的外胚叶、胚根和胚芽鞘内,其基因是较早分离出的一类根特异性基因;特异性表达研究表明幼苗根尖的 WGA mRNA 比成熟种子的该转录物多 3 倍;而大麦中根特异性 Lec 也已证明在根细胞外层表达,与 WGA13 有很高的同源性。Conkling 等利用改良的分离方法,从烟草 Wisconsin 中分离了 4 个根特异性 cDNA 克隆 RB7、RD2、RD5、RH12,体外转录后的分子杂交检测证实为根特异性转录。用 RB7 研究了在转化烟草根中的表达,表达定位在根分生区和未成熟组织中柱鞘,叶子不能检测到活性;启动子缺失分析表明 5'端−299bp~−636bp 序列对于根特异性表达是必需的。国内南兰等(2002)分离了烟草根特异性表达基因 TobRB7 启动子中所包含的顺式作用激活序列,将不同长度的顺式激活序列以不同方向与含有 GUS 编码基因的载体进行重组构建,然后转化烟草,通过转基因烟草的 GUS 表达活性,对 TobRB7 启动子所包含的顺式激活元件的功能特性进行了分析。证明 TobRB7 启动子具有双向启动子功能,并表现出根组织特异性。此外,应奇才和王慧中(2006)运用松树根特异性启动子 PmPgPR10 驱动将 CMO/BADH 双价基因转入水稻。对转基因植株根和叶的 CMO 酶、BADH 酶活性及其他生理生化指标进行了测定,结果表明 CMO/BADH 双价基因能在根部特异性表达。

花器官特异性表达启动子:与植物根(包括不定根)的发生和发育相比,植物特异性基因表达及调控在花(顾红雅,1993;Coen et al,1991)等方面的工作则起步较早,已做了大量工作。利用作物的杂种优势是大幅度提高作物产量和改良作物品质的一条重要途径,而三系配套育种是实现作物杂种优势、创造杂种的重要手段。但实践中由于一些作物缺乏理想的天然不育系和恢复系,致使杂种优势的利用受到一定限制。自 Mariani 等(1992)利用花药特异性表达启动子表达核糖核酸酶 Barnase 基因转化烟草获得人工雄性不育植株,又获得首例转基因雄性不育油菜及其恢复系后,国内外一些实验室也先后在此方面进行了研究。Williams 等(1993)创建了玉米的转基因雄性不育系;De Block(1997)用来自玉米和水稻绒毛毡层的特异性启动子与 Barnase 基因构建嵌合分子,用基因枪法转化小麦,培育出基因不育系。以上例子说明组织特异性的启动子在高等植物中是通用的,烟草的花药特异性启动子可以在油菜和玉米中表达,水稻的启动子可以在烟草中引导基因特异性表达。但这种人工雄性不育系育性不是十分稳定,雄性不育表现为显性,不育性的保持和恢复都比较困难。最近,我们从裸子植物松树中分离出了花原基特异性表达的启动子 PrAG1,并将该启动子与 RNAase 基因相连,构建成双元载体 pRAGpR,利用卡那霉素作为筛选标记,转化烟草,获得了不育转基因烟草。目前我们正通过转基因技术将不育基因导入悬铃木,获得不育的悬铃木新品种,以期从根本上解决悬铃木开花时絮状花蕊对人体造成的危害。

种子特异性表达启动子:目前,用种子特异性表达启动子改良种子蛋白质的基因工程和用营养体特异性表达启动子带动抗病虫的基因工程已比较成熟,达到或接近应用水平。李丽等(2001)利用 PCR 技术从油菜 *Brassica napus* H165 基因组 DNA 中分离出 napin B 启动子。序列分析表明,扩增片段(nap 300)与文献报道的 napin B 启动子相应区域的同源性为 97%。将其与 GUS 连接构建种子特异性表达载体,农杆菌介导转化烟草。PCR、Southern 结果显示,nap 300 已整合到烟草基因组 DNA 中,获得了转基因植株。赵倩等(1999)为研究玉米相对分子质量为 19000 的醇溶储藏蛋白(Zein)基因启动子种子特异性表达的控制区段,将全长 694bp 的启动子进行 5'端缺失,共得到 6 个缺失突变体,长度分别为 488bp、378bp、302bp、152bp、124bp 和 85bp。将 6 个片段分别与报告基因 GUS 连接构建成表达载体 pDGB 系列,经农杆菌介导转化,引入烟草。GUS 活性检测证明,488 bp 启动子片段能促使 GUS 基因在种子中特异性表达。水稻种子贮藏醇溶蛋白 4a 基因 5'端上游区由两个启动子组成。游志鹏等(1999)将启动子 I 与 GUS 融合,在农杆菌介导下,转化烟草,经组织化学分析,确定启动子 I 为种子特异性表达启动子。5'端系列缺失分析证明,-212bp~-167bp 区段是启动子 I 种子特异性表达的关键调控元件。张宪银等(2002)以水稻品种“密阳 46”的 DNA 为模板,用 PCR 方法从谷蛋白基因 Gt1 上游序列扩增出特异性条带,并克隆出种子特异性表达启动子。GUS 基因检测结果表明,由该启动子序列引导的 GUS 基因能在胚乳中表达,其他组织不能表达。

2.2.3 诱导型启动子

与组织器官特异性启动子相比,诱导型启动子有着独特的优点:它可根据需要在植物特定的发育阶段、组织器官或生长环境下,快速诱导基因转录的“开”与“关”。在某些物理或化学信号的刺激下,该类型的启动子可以大幅度地提高基因的转录水平。它们有以下共同特点(王关林和方宏筠,1998):①启动子的活化受物理或化学信号的诱导;②具增强子、沉默子或类似功能的序列结构;③感受特异性诱导的序列都有明显的专一性;④一部分该类型的启动子同时具有组织特异性表达的特点;⑤该类启动子通常以诱导信号命名。环境诱导型启动子对抗逆、抗病虫的基因工程具有十分重要的意义。

创伤诱导表达启动子:许多植物都能对人为创伤或害虫造成的机械损伤作出反应。这些创伤诱导的基因编码多种蛋白产物,包括几丁质酶和 β -1,3 葡萄糖酶等水解酶类,结构蛋白、木质素、蛋白酶抑制剂等。比较成功的一个例子是用马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的 pin2 启动子带动抗虫基因培育抗虫转基因植物。Bryant 等(1976)在马铃薯块茎中发现了蛋白酶抑制剂——马铃薯蛋白酶抑制剂 II,开始认为蛋白酶抑制剂只存在于马铃薯块茎中,后来发现有时在马铃薯叶子中也会短暂存在。Green 等(1972)证实了蛋白酶抑制剂在叶子中的出现是由损伤诱导的,并意识到蛋白酶抑制剂的诱导表达可能是植物的一种天然的防护机制。Thornburg 等(1987)、Keil 等(1986)分别对马铃薯蛋白酶抑制剂 II K 和抑制剂 II 基因的调控序列进行了研究,两个基因的 5'端序列都可以带动报告基因 CAT 进行损伤诱导性表达。后来,有人用它带动蛋白酶抑制剂基因转入烟草,结果对鳞翅目昆虫产生了抗性(Hilder et al,1987;Johnson et al,1989)。到 1992 年,已基本搞清楚从损伤到产生原初的损伤信号一直到最后诱导蛋白酶抑制剂基因表达的全过程。马铃薯蛋白酶抑制剂基因的表达不仅可以由损伤诱导,还可以由一些化学物质诱导。Xu 等(1996)用马铃薯 pin2 启动子构建出驱动报告

基因 GUS 表达的转基因载体,转化入水稻,证实了该启动子在单子叶植物水稻中也具有相同的功能,并且水稻肌动蛋白基因 Act1 的第一个内含子可以加强启动子的表达水平。Duan 等进一步把带有自己启动子和 Act1 第一个内含子的马铃薯蛋白酶抑制剂基因转化入水稻,得到了抗螟虫的水稻。马铃薯 pin2 启动子在水稻中仍能保持伤诱表达的特性,更加证实了植物调控机理的保守性,该启动子可以普遍用于抗虫基因工程。

激素诱导表达启动子:当前关于激素 ABA 在调节基因表达的信号传递途径中的作用日益受到重视。Xu 等(1996)在转基因水稻中研究了马铃薯 pin2 启动子诱导表达活性,构建的嵌合体经 MJ 或 ABA 处理后,GUS 酶活性及 mRNA 水平都受到强烈诱导。Jane 等利用转基因拟南芥和烟草的气孔保卫细胞分析了 Em、CdeT 2745 基因的 ABA 诱导活性。可以看出,受 ABA 调节表达的基因启动子区域存在 ABA 反应元件(ABREs),在受到 ABA 诱导时,通过 ABREs 的顺式调节作用导致了基因的表达。ABREs 具有 ACGTGG 保守序列和 G 盒元件,能与具有亮氨酸拉链(bZIP)的核结合蛋白特异性地结合。

光诱导表达启动子:光调节基因有捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体(LHCP)基因以及核酮糖二磷酸羧化酶小亚基基因(SSrbcS)等。来自豌豆 rbcS 基因的 973bp 片段可以促使 CAT 报告基因的光照和叶绿体依赖性表达,后来的研究表明,rbcS 转录起始点上游-330bp~-50bp 之间 280bp 序列参与光诱导反应。

真菌诱导表达启动子:在烟草悬浮培养中,类型 I 几丁质酶的表达受到真菌的强烈诱导,转录起始点上游-788bp~-345bp 区域是诱导所必需的。凝胶迁移率变动分析及甲基干涉实验研究表明,-539bp~-518bp 之间 22bp 的重复序列-553GTCAGAAAGTCAG-521 是核因子特异的结合部位,这个基序是类型 I 几丁质酶基因转录顺式作用的激发子反应元件(EIRE)。

3 启动子的克隆

基因工程中常常需要构建一种能高水平表达异源蛋白质的表达载体。而启动子对外源基因的表达水平影响很大,是基因工程表达载体的重要元件。因此,启动子的克隆对研究基因表达调控和构建表达载体至关重要。对于已知序列的启动子,只需设计相应的引物,然后采用 PCR 扩增的方法就可以获得该启动子;而对于未知序列或只知部分序列的启动子,随着分子生物学技术的不断发展,越来越多的方法与手段被应用在该项研究中,使得启动子克隆的方法也日趋完善和多样化。启动子克隆的方法大致可以分为两种:一种是利用启动子探针质粒载体筛选启动子;另一种是利用 PCR 技术克隆启动子,主要包括常规 PCR、TAIL-PCR 和基于染色体步移原理的 PCR 法等(李姗姗等,2005;王莹等,2007)。

3.1 利用启动子探针质粒载体筛选启动子

利用启动子探针质粒载体筛选启动子是一种常用的方法,它是利用缺失启动子、产物易检测的报告基因,构建启动子探针质粒载体来克隆有启动功能的 DNA 片段。一般程序是:首先提取基因组 DNA,用限制性内切酶消化产生出适合于克隆的 DNA 片段,然后在体外

将这些 DNA 片段同适当的 λ 噬菌体连接成重组体分子,并转化到大肠杆菌的受体细胞中。将构建好的基因组文库铺板,转移到尼龙膜上,用部分已知序列的片段或特异的基因片段作探针进行杂交,以便筛选出具有目的启动子的阳性克隆。最后经过测序及活性分析,确定启动子的确切结构及序列。Rachael 等(1997)首先在大肠杆菌中以四环素抗性基因为报告基因构建了启动子探针质粒 pBRH3B,并用它克隆了一些原核和真核启动子片段。其后,Donna 等(1981)以氯霉素抗性基因为报告基因,Mark 等(1990)以邻苯二酚双加氧酶基因为报告基因,在枯草杆菌中构建了启动子探针质粒并克隆了一些启动子片段。国内也有一些研究,例如李奉锡和李育阳(1987)克隆了一些噬菌体 T5 启动子片段。金红和王以光(1994)利用启动子探针质粒载体 pIJ486 克隆得到了一段具有启动功能的 DNA 片段,并分析了插入片段在两个不同方向上的启动能力。

利用启动子探针质粒载体筛选启动子是一种高效、经济、快速分离基因启动子的方法。该方法不需要知道具体基因的序列,可随机筛选启动子,避免了引物设计,能获得大量的启动子片段。但这种方法需要构建一个穿梭载体、建库、转化、筛选,工作量较大,费时费力。随着 PCR 技术的发展,各种 PCR 方法逐步应用于从基因组中分离已知、未知序列的启动子。

3.2 利用常规 PCR 技术克隆启动子

该方法是根据已知的基因序列,设计引物,采用 PCR 技术克隆基因的启动子。彭仁旺等(1995)根据已报道的序列设计引物,通过 PCR 扩增,从烟草中克隆了花药特异性表达基因 TA229 的启动子。山松等(1999)根据已报道的烟草叶绿体 16S rRNA 基因序列设计 5' 启动子序列的引物,以烟草叶绿体 DNA 为模板,PCR 扩增出 16S rRNA 基因 5' 启动子区的 150bp 片段。苏宁等(2003)根据已报道的水稻叶绿体 16S rRNA 基因启动子序列设计 5' 端启动子序列的引物,以水稻叶绿体 DNA 为模板,PCR 扩增出 16S rRNA 基因 5' 端启动子区的片段。这种方法是建立在对基因序列十分清楚的基础上的,只有知道了基因序列,才能根据已知序列设计出引物,对该基因的启动子进行扩增,且只能扩增两端已知序列之间的区域,因此有一定的局限性。

3.3 利用 TAIL-PCR 技术克隆启动子

TAIL-PCR(Thermal Asymmetric Interlaced PCR)技术又叫热不对称交错 PCR,首先由 Liu 和 Whitter(1995)提出,该方法不需要 PCR 前的任何 DNA 操作,避免了环化和连接,速度快,特异性强,效率高,灵敏,在分子生物学研究的各个领域都有广泛的应用。TAIL-PCR 可以从突变体中克隆获得外源插入基因的旁侧序列,从而为启动子的克隆提供了一种有效的新方法。

TAIL-PCR 技术适合于分离获得克隆载体上的 DNA 序列,达到克隆相关基因的启动子的目的,Gento 等(2003)曾用构建的含有潮霉素抗性基因(hph)的双元表达载体 pBIG2RHPH2 转化真菌,然后利用 TAIL-PCR 法克隆真菌转化子基因组 DNA 的 T-DNA 插入区的旁侧序列,并取得了成功。财音青格乐等(2005)用 TAIL-PCR 法从大豆基因组中扩增得到启动子片段 BCSP666,虽然延伸的片段较短,但可以通过增加随机简并引物的数

量使其延长。

3.4 基于染色体步移原理的 PCR 法克隆启动子

染色体步移是指从生物基因组文库中的已知序列出发,逐步探知其相邻的未知序列核苷酸组成的方法和过程。对于未知序列或只知部分序列的启动子,可采用基于染色体步移原理的 PCR 法进行分离,目前常用的主要有反向 PCR 和 P-PCR(Panhandle PCR)。

3.4.1 反向 PCR

反向 PCR 是由 Triglia 等(1988)最早提出的一种基于 PCR 的改进的染色体步行方法。它的基本程序是选择在已知序列内部没有切点的限制性内切酶,对包含已知序列的某段 DNA 进行酶切,然后在 DNA 连接酶的作用下自连,形成环状 DNA 分子,设计合适方向并与已知序列两端互补的引物,以连接成环的 DNA 为模板,经 PCR 扩增后,可以得到已知序列的旁侧 DNA 片段。韩志勇等(2001)以反向 PCR 为基础,通过设计两对引物,结合热启动 PCR 和降落 PCR 技术,从水稻总 DNA 中成功克隆了转基因水稻的外源基因旁侧序列。袁烁等(2002)利用该方法克隆得到了水稻花粉 Profilin 基因的启动子序列。杨满业等(2003)则利用该方法成功地从苦瓜中分离出 BAG 启动子,并进行了表达载体构建等工作。王新国等(2001)对胡萝卜基因组 DNA 进行酶切,将酶切后的片段与一特殊的衔接头连接作为模板进行 PCR 扩增,成功地克隆得到一个新的 SⅡ 基因启动子片段。这种方法利用特殊的衔接头,避免了 DNA 环化,是寻找已知序列旁侧未知启动子或其他调控区域的有效方法。

3.4.2 P-PCR

P-PCR,由 Jones 和 Winistorfer (1992)提出,它利用末端反向重复序列与已知序列互补配对形成环状单链模板,有效增强了引物与模板结合,具有非常高的特异性。反应需要 3 个根据已知序列设计的引物,3 个引物在已知序列内呈线性排列,其中第三个引物作为接头使用,可与已知序列互补配对形成锅柄状单链模板。黄君健等(1999)用 P-PCR 技术成功地获得了人体外周血单核细胞基因组 DNA 中 hTERT 基因翻译起始位点上游 2090 bp 的 DNA 序列。

4 启动子的功能研究

启动子序列克隆以后,需要对启动子的功能进行研究。目前,研究启动子功能的方法主要有转化分析、瞬时表达分析以及生物信息学方法等。

4.1 转化分析

为了获得准确结果,通常采用转化分析的方法。此方法是将某些基因的启动子序列连接上报告基因(常用的报告基因有 GUS、GFP 等),通过载体(主要是质粒)介导转化植物细胞,

分析检测转基因植物中报告基因的表达,结合构建不同的缺失序列,从而确定负责组织特异性表达的作用序列和调控元件。

已有研究者采用此方法对大量启动子进行了详细分析。杨予涛等(2003)用接头 PCR 技术,克隆了长度为 1415bp 的 PNZIP 基因启动子。根据 PNZIP 基因启动子的序列特征,利用 PCR 技术对该启动子进行了有目的的缺失,将 5 个长度不同的启动子片段分别与报告基因 GUS 相连接,构建表达载体,转化烟草。荧光定量检测结果表明:5 个不同长度的 PNZIP 启动子均能驱动 GUS 基因在光合组织中专一表达,它们的活性随着启动子 5' 端的逐步缺失而不断下降;在叶片组织中长度为 1415bp 的 PNZIP 启动子活性比 35S 启动子高 9 倍。李军等(2004)将保卫细胞特异性表达元件和干旱答应元件进行改造,构建成为一个新的受干旱诱导的保卫细胞特异性的启动子 DGP1。转基因烟草的组织化学定位表明,DGP1 驱动的 GUS 基因在受到干旱诱导的情况下,在保卫细胞特异性表达,而在未经干旱处理植株的保卫细胞和干旱处理的根、茎和花中均不表达。对 GUS 活性进行定量测定,结果显示 GUS 活性明显地受干旱诱导,并且随着处理时间的延长而增强。

4.2 瞬间表达分析

运用载体构建和转化基因的方法检测启动子的特性,周期长,费时费力,近年来,又发展了启动子的瞬间表达分析法。即目的启动子连上一种易检测的报告基因并转化到受体中,观察报告基因的表达情况,从而确定启动子的活性。运用 GUS 瞬间表达系统可以很好地检测一些转录因子的相互作用以及特异启动子对基因的调控特性(Unger et al,1993;Clarke 和 Appels,1998)。钟蓉等(1997)利用基因枪转化法将连接有 GUS 基因的 TA29 启动子转入烟草、番茄花药,证明 TA29 启动子在烟草和番茄花药中具有时空特异性。研究发现,在云扁豆蛋白(β -phaseolin)基因启动子调控下,uidA 基因的瞬间表达与在烟草转基因植株中的长久表达一致(Terada 和 Shimamoto,1990;Kawagoe et al,1994)。但一些研究也发现,启动子瞬间表达 uidA 基因的结果与长久表达结果有一定差异(Müller 和 Knudsen,1993)。在 GUS 瞬间表达过程中,除胚乳外,小麦 gbss1 基因启动子在小麦籽粒的果皮细胞内表现活性(Kluth et al,2002),瞬间表达体系的确存在一定的局限性。总体来看,GUS 瞬间表达体系虽然对启动子的组织特异性、相对启动子强度或基因表达时空特异性说明不足,但是,在一定程度上能够反映出在特定组织(包括胚乳)中 GUS 基因表达所必需的启动子序列,对启动子功能有初步说明。另外,这种瞬间表达与长久表达的差异是缘于检测系统还是缘于启动子序列自身作用,尚须进一步研究。

4.3 生物信息学方法

用实验的方法分析和鉴定启动子是前些年来进行启动子研究的主要途径,但近年来,随着人类基因组测序的完成和根据实验获得的对启动子的序列特征与结构功能的认识,利用生物信息学的方法通过计算机模拟和计算来预测基因启动子的相关信息,已获得越来越多的应用(Fickett 和 Hatzigeorgiou,1997)。生物信息学用较低的成本和较快的时间就能获得可靠的结果,促进了各种基因序列分析和预测技术与软件的发展,目前已经可以用理论预测