

○ 陆
海
蒋湘宁
著



JIYIN DINGWEI TIAOKONG

基因定位调控

植物生长与性状原理与技术

ZHIWU SHENGZHANG YU XINGZHUANG YUANLI YU JISHU

KD00218688

南京林业大学优秀博
士学位论文基金资助丛书

中国环境科学出版社



·士论文基金资助丛书

基因定位调控植物生长 与性状原理与技术

陆 海 蒋湘宁 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

基因定位调控植物生长与性状原理与技术/陆海, 蒋湘宁著.
—北京: 中国环境科学出版社, 2005. 7
(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)
ISBN 7-80209-129-2

I. 基… II. ①陆… ②蒋… III. 树木学: 遗传学—研究
IV. S718. 46

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 055017 号

出版发行	中国环境科学出版社 (100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号) 网 址: http://www.cesp.cn 电子信箱: bjzhouyu@126.com 电话 (传真): 010—67112738
印 刷	北京中科印刷有限公司
经 销	各地新华书店
版 次	2005 年 9 月第一版 2005 年 9 月第一次印刷
印 数	1—3000
开 本	850×1168 1/32
印 张	5.125
字 数	132 千字
定 价	20.00 元

【版权所有, 请勿翻印、转载, 违者必究】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主 任 朱金兆

副主任 尹伟伦 马履一

委 员 (按姓氏笔画)

王礼先 王向荣 任恒祺 张启翔 李凤兰 孟宪宇

罗菊春 赵广杰 顾正平 续九如 翟明普 贾黎明

秘 书 何艺玲

序 言

科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着所高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看作是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还依此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才倍受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自

己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件难苦等等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士

沈国舫

2002年8月10日

引 言

木材作为一种可再生资源，一直是我国经济和人民生活中不可缺少的重要材料。树木生长和木材形成与形成层细胞的活动密切相关。形成层细胞的分裂启动、分裂速率及分裂时间等直接控制树木的生长。木质母细胞分裂活动的维持、新生木质部细胞的分化、纤维素分子的生物合成、定向增长及排列方向与沉积方式等都直接关系到胞质骨架与细胞壁的形成，最终影响到树木生长和木材的形成与品质。树木的次生木质部含有纤维素（ β -1,4 糖苷）、木质素和半纤维素（异型多糖），比例是 2 : 1 : 1。在树木生长时，纤维素微纤丝为细胞壁提供张力。木质素增加纤维素微纤丝的硬度。木质素是植物体中仅次于纤维素的一种重要大分子有机物质，具重要生物学功能。陆生植物的木质素合成是适应陆地环境的重要进化特征之一。

然而，制浆造纸的中心环节是用大量化学品将原料中的木质素与纤维素分离。脱木质素的化学品投入及废液的碱回收处理需大量耗能并增加造纸成本。饲草的木质素还影响牲畜的消化与营养吸收，木质素含量的高低是饲草优劣的指标之一。降低木质素含量或改变其组分，将有利于更好地利用资源植物。

环境保护是 21 世纪令人瞩目的研究课题，其中源头治理污染、实现清洁生产在国际上已成为重要研究方向。造纸原料植物的木质素是制浆造纸产生废水污染的根本原因。通过转基因技术调控植物木质素含量与组分，可以从根本上治理造纸废水污染并降低造纸成本。该项研究在国际上已成为热点，且木质素生物合成途径的基础研究也日新月异。

为了满足不同的用途,人们希望能够有目的地调控树木中纤维素与木质素的比例。由于常规遗传育种与栽培措施对木材的产量和品质的改良有一定的限度,要实现更高水平的定向改良目标,必须在基因水平上操纵形成层细胞的分裂和木质部细胞的分化方向。对这方面地研究一直是我国“七五”“八五”与“九五”科技攻关课题的重要研究内容之一。

从策略上说,可以从多个方面进行木质素含量控制:(1)控制木质素合成途径中的各种酶系的合成;(2)改变木质素的结构组成和化学性质。由于研究木质素含量遗传变异的重要目的之一就是为工业造纸服务,在难以直接降低木质素含量情况下,改变木质素的结构组成有可能间接地达到同样的效果;(3)必须认识到木质素的前体是在细胞质内合成的,然后转移到细胞壁并进行脱氢聚合形成木质素,因此木质素的合成调控也需注意涉及到一些非酶分子的作用,即传递运输过程的控制,但这方面的研究至今却很少见报道。单个酶的作用及多个酶的相互作用对于探索木质素的合成机理有重要意义,因此木质素合成酶的分子生物学特性及作用机理研究日益受重视。

从 20 世纪 60 年代以来,人们一直不断地对木质素生物合成途径进行研究,以便最终可以通过控制木质素的生物合成而控制木质素的含量。在研究过程中,人们发现,降低单个酶 OMT、CAD、POD (过氧化物酶)、COMT 和 F5H 等酶活性,并不影响木质素含量变化,但出现了非常规的木质素亚单位,而降低酶系 PAL、C4H、4CL 和 CCR 等酶活性,则可以降低木质素含量。这说明可能存在有不同于现在研究得到的木质素生物合成途径的补偿代谢途径。

目前所常用的利用基因工程手段在转基因植物中调控木材的合成都是使用强启动子在转基因植物中表达外源基因调控木质素的生长量。该技术虽然在一定程度达到了目的,改变了植物木质素的含量,但同时很大程度上影响了植物的正常生理生长。近

年来,对特异性定位启动子的研究成为热点。由于特异性定位启动子有在转基因植物的特定组织中定位表达目的蛋白,而在其他组织与器官中不表达目的蛋白的特点。在转基因植物中可以有效调控植物的性状同时又不影响植物的正常生理生长。由于植物中木质素主要是在形成层细胞中得到合成,使用形成层特异定位表达启动子在形成层特异定位表达木质素合成相关基因,从理论上可以有效调控木质素的合成,进而有效调控树木生长,同时较小地影响植物的正常生理生长,近年来该方向的研究成为热点,但是成功的报道还比较少。

在国家重大基础研究 973 项目课题——《树木木材形成分子调控机理与基因调控》与国家自然科学基金重点项目(39730350)——《树木形成层及木质部细胞骨架与木材形成机理与基因调控》的资助下,该研究通过使用维管组织区域定位表达启动子来驱动与植物(树木)生长和木材形成关键组分(纤维素、木质素等)生物合成关键酶的相关基因的表达,实现外源基因在植物(树木)生长与木材品质形成中的组织定位表达,达到定向调控树木生长和木材品质定向改良的目的,最终实现树木生长和木材品质定向改良的目标。

我们从多种木本植物刺槐、银杏和毛白杨中克隆得到在形成层定位表达的富甘氨酸结构蛋白基因(GRP1.8)启动子与木质素生物合成途径中关键酶 4-香豆素辅酶 A-连接酶 1(4CL1)基因及其启动子。并分别研究了这些基因与启动子的生物学活性与调控表达特性。利用基因重组技术,分别将花椰菜病毒启动子(35S)、刺槐 GRP1.8 启动子、毛白杨 4CL1 启动子与毛白杨 4CL1 基因相融合连接,并构建转基因表达载体 35S-4CL1、GRP1.8-4CL1 和 4CL1p-4CL1。结果发现在转基因烟草、毛白杨茎中 4CL 酶活性增加 30%~40%,木质素含量增加 10%~30%。将 4CL 反义基因与 35S 启动子,刺槐 GRP1.8 启动子,毛白杨 4CL1 启动子构建成融合基因,并构建 5 个表达载体。将这些表达载体分

别转化烟草、毛白杨、刺槐，得到转基因植物，结果发现转基因植物木质素含量降低了 15%~10%。本项研究不仅从分子水平对木质素生物合成的机理进行了探讨，还表明可以通过基因工程技术调节树木的木质素含量，达到定向调控树木生长和木材品质定向改良的目的。

目 录

1 维管组织定位表达启动子研究.....	1
1.1 植物基因启动子研究进展.....	1
1.1.1 植物基因启动子核心结构及其功能.....	1
1.1.2 植物基因启动子分类.....	3
1.1.3 组织特异性启动子.....	8
1.1.4 植物基因启动子的人工改造及其应用前景.....	11
1.2 维管组织定位启动子研究进展.....	13
1.2.1 维管组织特异性定位启动子研究的概述.....	13
1.2.2 特异性定位启动子序列的调控元件研究.....	16
1.2.3 小分子蛋白与特异性定位表达基因的 启动子的作用.....	17
1.3 木本植物维管组织特异性启动子 GRP1.8 启动子与 4CL1 启动子的研究.....	19
1.3.1 木本植物维管组织特异性启动子 GRP1.8 启动子的研究.....	19
1.3.2 木本植物维管组织特异性启动子 4CL1 启动子的研究.....	23
1.4 结束语.....	26
2 4-香豆素辅酶 A-连接酶 1 (4CL1) 基因克隆表达、 分离纯化与结构模型的构建.....	27
2.1 木质素研究进展.....	27

2.1.1 木质素的生物合成途径	27
2.1.2 苯丙基酶 4-香豆素 - 辅酶 A 连接酶的 结构与功能	29
2.2 毛白杨 4CL1 基因的克隆与分析	33
2.2.1 4CL1 基因的克隆与酶活性分析	33
2.2.2 4CL 蛋白结构模拟	36
2.2.3 酶分子与底物结合活性分析	39
3 形成层定位启动子表达 4CL1 基因调控植物木质素 代谢途径研究	42
3.1 基因工程调节木质素合成进展	42
3.2 转基因树木提高木质素含量的研究	45
3.3 转基因树木降低木质素含量研究	52
3.3.1 反义基因结构的构建	52
3.3.2 反义融合表达载体的构建	55
3.3.3 转基因烟草、毛白杨与刺槐研究	55
4 研究方法概论	58
4.1 原理部分	58
4.1.1 植物分子生物学中常用的受体菌	58
4.1.2 植物分子生物学中常用的载体	60
4.1.3 植物分子克隆中常用的工具酶	65
4.1.4 凝胶电泳	71
4.1.5 聚合酶链式反应 (PCR 技术)	76
4.1.6 基因克隆技术	80
4.1.7 植物基因组文库与 cDNA 文库的构建	83
4.1.8 核酸分子杂交	91
4.1.9 外源基因的表达	96
4.1.10 植物转基因技术	100

4.2 实验部分	104
实验一 琼脂糖凝胶电泳	104
实验二 植物总 DNA 的制备	106
实验三 植物总 RNA 提取	109
实验四 植物 mRNA 的分离纯化—磁珠法	110
实验五 植物 cDNA 文库的构建	111
实验六 聚合酶链式反应 (PCR) 技术	116
实验七 DNA 重组技术	117
实验八 大肠杆菌感受态细胞的制备及 外源 DNA 的转化	119
实验九 质粒 DNA 的制备	120
实验十 SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳分析样品	122
实验十一 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	123
实验十二 农杆菌感受态的制备及质粒向 农杆菌的转化	124
实验十三 农杆菌叶盘法转化烟草	124
实验十四 Southern 杂交技术检测外源基因的整合	125
实验十五 4CL 高效表达, 纯化与酶活性测定	129
实验十六 植物纤维素与木质素含量测定	130
参考文献	132
符号、缩略词、术语注释表	146
后 记	148

1 维管组织定位表达启动子研究

植物的生长发育和生命周期是不同的基因在时间和空间上有序表达的结果。基因的表达调控受多种内外因子的影响。根据基因表达性质可将其分为两大类：一是瞬时调控或称可逆性调控，包括某种底物或激素水平升降和细胞周期不同阶段中酶活性和浓度的调节；二是发育调控或称不可逆调控，它决定了细胞生长、分化和发育的全部进程。根据基因调控在同一事件中发生的先后次序，又可将其分为转录水平调控、转录后水平调控、翻译水平调控及蛋白质加工水平的调控等。植物基因调控主要是在转录水平上进行的，受多种顺式作用元件和反式作用因子的相互协调作用。植物基因启动子是重要的顺式作用元件，是位于结构基因 5' 端上游区的 DNA 序列，能指导全酶与模版正确结合，活化 RNA 聚合酶，并使之具有起始特异性转录的形式，并决定转录的方向和效率以及所使用的 RNA 聚合酶类型，是转录调控的中心。

1.1 植物基因启动子研究进展

1.1.1 植物基因启动子核心结构及其功能

通过对多种基因启动子区的分析发现，绝大多数功能蛋白基因的启动子都具有共同的结构模式。大部分植物基因多数情况下转录起点为 A（腺嘌呤），且两侧多为嘧啶碱基，在 -25~-30 bp 处含有 TATA 序列，-70~-78 bp 处有 CAAT 区出现，-80~-110 bp 区含有 GC 盒。习惯上将 TATA 区上游的保守序

列称为上游启动子元件 (UPE)，这些特定序列和结构共同作用确保转录精确而有效地起始。

真核生物基因启动子的典型核心结构 (Core promoter) 大约在转录起点 $-40 \sim +50$ 之间，具有结合并控制转录起始前复合物的装配、定位转录起始位点并控制转录的方向、对细胞内临近或远处的激活子或抑制子做出响应的功能，由 RNA 聚合酶指导转录的基因核心启动子大多包含一个 TATA 盒和 (或) 起始子 (Inr)。

1. TATA 盒

TATA 盒在转录起始位点的 32 ± 7 个核苷酸处，保守序列为 TCACTATATATAG，即 TATAAA 序列，一般被认为参与决定转录的方向，并在依赖于 RNA 聚合酶的启动子内起作用。近年来的研究表明，TATA 盒是没有方向性的。上游激活因子序列具有双重作用，既能通过 RNA 聚合酶 II 加强下游的转录，又能抑制 RNA 聚合酶和指导下游方向的转录。在 BSP (bone sialo protein) 基因的启动子中，反向的 TATA 盒，即 $5' -TTTATA-3'$ ，仍能指导下游方向的转录，而且与 TBP (TATA-box-binding protein) 的结合能力与一般 $5' -TATAAA-3'$ 的启动子的结合能力相似。这种反向的 TATA 盒能与 TBP 结合并指导下游的转录表明，在真核生物中 TATA 盒的方向并不决定转录的方向。

TATA 盒的功能依赖于它所在位置相对于起始位点的位置，碱基置换会使最小启动子失活。因此，TATA 盒是依赖于 RNA 聚合酶转录所必需的，能指导起始前复合物的形成，决定转录起始位点，并调控上游激活蛋白的行为。

2. 起始因子 (Inr)

起始因子 (Inr) 是基因启动子核心结构的第二种类型，与转录起始位点相重叠，一致序列为 PyPyANT/APyPy，其功能与 TATA 盒相似，能指导转录起始前复合物的装配、决定转录起始位点并调节上游激活蛋白的活性。

关于 TATA 盒和 Inr 的关系近年的研究也较多。在缺乏激活子的情况下, TATA 因子比 Inr 的活性高很多, 而 Inr 的结合比 TATA 启动子稍有效些; 在共表达激活蛋白存在下, TATA 因子是最有效的, Inr 活性也增加了许多, 表明在两种因子间有合作关系。对激活子 Sp1 则例外, 它在只有 Inr 的启动子中更有效, 增加 TATA 盒并没有增加其活性, 而且在 TATA+Inr 的启动子能够部分或完全抵制由转录因子 TFIIB 突变造成的负面影响。TATA 盒和 Inr 之间的距离而不是核酸序列对精确转录起始是重要的, 二者之间的特殊核酸序列可能影响转录的速度。其他研究表明, Inr 是一个共通的因子, 能影响转录的方向和转录起点的定位, 然而一般来讲 Inr 不能改变启动子内包含两个核心序列因子的 TATA 活性。

启动子进化成许多结构形式可能是转录调控中的特殊需要, 一个给定的基因, 其特异核心启动子可能在转录调控中起作用。并非任何细胞型特异的蛋白在任何情况下都起作用, 而是取决于这种启动子提供一个合适的环境来决定基因是被激活还是被抑制。

1.1.2 植物基因启动子分类

习惯上, 将植物基因的启动子按其基因的表达方式分为组成型启动子(即基因的表达不受时空限制和某种物质的诱导而在植物中表达出来)、诱导型启动子(其基因的表达受某种物质的诱导, 没有诱导物存在, 基因表达水平很低甚至没有)和组织特异性启动子(其基因的表达分布在植物的某个组织或器官中)。

1. 组成型启动子

CaMV35S 启动子是烟草花叶病毒基因的启动子, 能在大部分植物中对异源基因进行启动表达, 是组成型启动子。将该启动子分为几个区段研究的结果表明, 不同区段能够对基因表达产生组织特异性。A 区(-90~+8)主要在根或将来发育为根的胚组织中表达, B 区(-343~-90)主要在地上部分表达。完整

的 CaMV35S 启动子是植物基因工程中应用最为广泛的组成型启动子，如在马铃薯、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、蘑菇 (*Ganoderma lucidum* and *Pleurotu citrinopileatus*)、毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.) 等植物中的转基因应用。

MMV (mirabilis mosaic virus) 360 bp (−297~+63) 的全长启动子片段具有强启动子活性，比 CaMV35S 启动子活性高。上游区域 (−248~−193)、as-1 及 TATA box 是启动子具有活性表达所必需的。此外，31 bp 的序列 (+33 至+63) 也是全长启动子实现最大表达活性所必需的。除此之外，在植物基因工程中广泛应用的组成型启动子还有 NOS 启动子等。

从病毒中克隆出来的基因启动子序列应用到植物基因工程中，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。Naomi 等从拟南芥的色氨酸合成酶蛋白 β 亚基基因 (PTSB1) 和植物光敏色素 B 基因 (PPHYB) 中克隆了启动子序列做为替代 CaMV35S 的组成型启动子，PTSB1、PPHYB 启动子分别与 GUS 基因融合后，转基因烟草的 GUS 活性相比 CaMV35S 启动子融合的 GUS 活性具 50% 或更高的活性；当 3 种启动子分别驱动 NPTII 标记基因时，3 种启动子几乎都一样有用。这表明 PTSB1 和 PPHYB 是从植物中克隆的替代 CaMV35S 启动子的强组成型启动子。

植物 actin 启动子是一个高效表达的组成型启动子，actin 蛋白基因是植物细胞骨架的基本组分，因此该启动子可能在所有组织中都有活性。Act1 启动子是 actin 基因家族中使用最广泛的启动子之一，其启动转录的必需元件位于 Act1 基因转录起始密码子上游的 1.3 kb 长的区域。水稻 Act1 基因 5' 端有大量重复的小元件：在 608~619 bp 和 559~570 bp 处有一个 12 bp 的重复序列 GGTTTTTTAAGTT；−316~−345 bp 处一前一后排列两个 16 bp 的序列 AAG/C CCC (T) AAAGTG/C CTA。其下游相隔 20