

Isolation and Function of Heavy Metal Responsive Gene in Plant

植物重金属调节基因 的分离和功能

张玉秀 柴团耀 编著

Isolation and Function of Heavy
Metal Responsive Gene in Plant

 中国农业出版社

植物重金属调节基因的 分离和功能

张玉秀 柴团耀 编著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物重金属调节基因的分离和功能/张玉秀, 柴团耀
编著. —北京: 中国农业出版社, 2006. 11
ISBN 978-7-109-11762-4

I. 植… II. ①张…②柴… III. 植物—调节基因—研究
IV. Q943.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 101720 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 张 利

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2006 年 11 月第 1 版 2006 年 11 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 18.5 插页: 1

字数: 326 千字

定价: 38.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

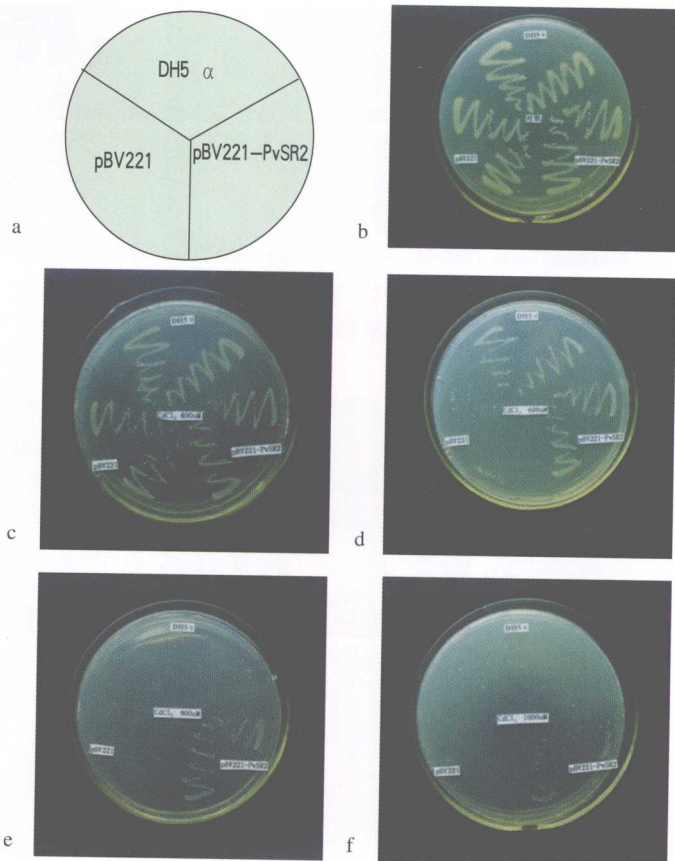


图 8-6 pBV221-PvSR2 转化菌的 Cd 抗性



图 9-6 转基因烟草和 WT 烟草的 GUS 活性分析

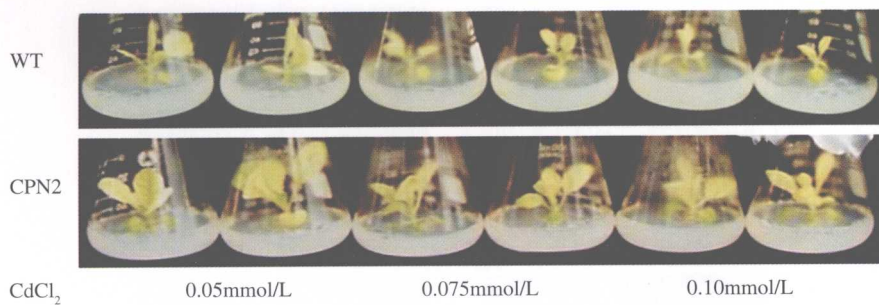


图 9-10 转基因烟草 CPN2 的 Cd 抗性分析

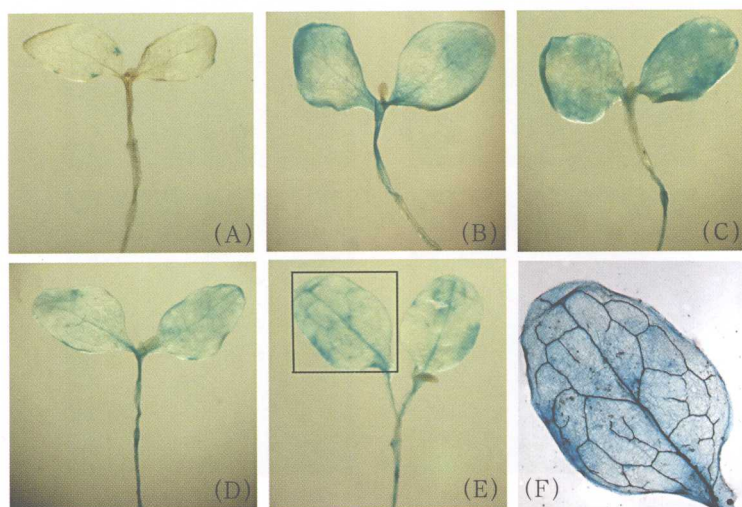


图 10-12 T_0 -8 株系子一代幼苗的 GUS 组织化学染色分析

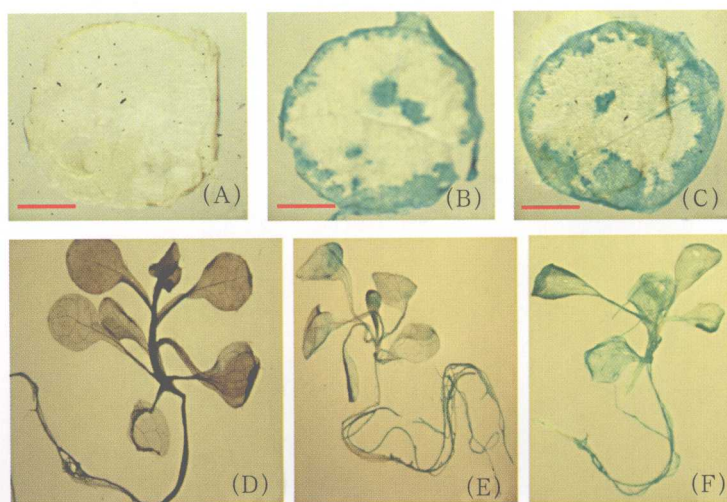


图 11-4 I-PvSR 驱动的 GUS 基因在烟草叶盘和拟南芥中表达的组织化学染色分析

内 容 提 要

植物重金属耐性/富集基因的克隆、表达和功能研究,是利用植物修复技术清除土壤重金属污染的基础。本书主要介绍了植物重金属耐性/富集机理的研究现状和发展动态,以菜豆和印度芥菜为材料,系统研究了重金属胁迫响应基因的克隆方法,基因的组织结构和表达调控特征,以及基因的功能,为分离重金属耐性/富集关键基因和利用转基因技术培育重金属超富集植物提供了新方法和思路。本书可供从事基因工程、环境科学和环境工程及相关学科的研究人员和技术人员、高等学校的教师和研究生阅读和参考。

中 国 农 业 出 版 社

前言

由于工业“三废”和机动车尾气的排放、污水灌溉及农药、除草剂和化肥的使用，造成了严重的土壤重金属（汞、镉、砷、铅和铜等）污染，并且随着经济全球化的迅速发展，污染土壤面积不断扩大。重金属在土壤中移动性差、滞留时间长、不能被微生物降解，所以土壤重金属污染具有隐蔽性、长期性和不可逆性的特点，土壤一旦受到重金属污染就难以恢复。重金属在土壤中的积累不仅会导致土壤退化，农作物产量和品质下降，而且还可以通过径流、淋失作用污染地表水和地下水，恶化水文环境，并能直接毒害植物或通过食物链途径危害人体健康！据报道，目前我国土壤重金属污染的总体形势相当严峻，据估算全国每年因重金属污染的粮食达 1 200 万 t，造成的直接经济损失超过 200 亿元。所以，清除土壤中的重金属污染，对于提高人民生活水平、改善生态环境和促进农业的持续发展具有重要的现实意义。

重金属污染土壤治理国外始于 20 世纪 60~70 年代，我国起步相对较晚。目前，重金属治理途径主要有两条：一是改变重金属在土壤中的存在形态，使其由活化态转变为稳定态，降低其在环境中的迁移性和生物可利用性；二是从土壤中去除重金属，以使其存留浓度接近或达到背景值。重金属治理方法包括工程治理、化学治理、生物治理和农业治理等，其中发掘的生物治理技术包括微生物修复技术和植物修复技术。微生物修

复是利用土壤中的某些微生物对重金属的吸收、沉淀、氧化和还原等作用,降低土壤中重金属的毒性。植物修复技术是利用具有重金属耐性/超积累(富集)能力的植物从土壤中吸收重金属,通过收割地上部并进行集中处理,降低或去除土壤重金属污染的技术。由于植物修复技术具有投资少、处理成本低,对环境友好,不破坏土壤结构、理化性质和土壤肥力,不引起地下水二次污染,以及在美化环境的同时修复污染土壤的优点。因而植物修复技术是一个彻底清除重金属污染的有效途径之一。

重金属超富集植物较普通植物富集 10~500 倍以上的某种重金属,而且地上部的重金属含量高于根部。挖掘和培育重金属超富集植物是植物修复的先决条件,目前,世界上已发现 500 多种重金属超富集植物,然而,多数自然界的重金属富集植物生物量低,对气候条件要求严格,同时,富集金属离子种类少,这些缺陷限制了植物修复技术的应用。所以,克隆植物重金属耐性/富集基因,研究其表达调控规律和揭示重金属耐性/富集机理,对于利用基因工程技术培育生物量大和适应性强的重金属富集植物有重要意义,为植物修复技术产业化提供基因和植物资源。

近年来,国内外研究主要集中在植物重金属耐性/富集基因的克隆、表达和机理研究,我们课题组紧跟世界研究前沿领域,在国家转基因植物研究与产业化专项、国家自然科学基金和国家高技术研究发展(863)计划等项目的资助下,以重金属敏感植物菜豆和拟南芥、重金属富集植物遏蓝菜和印度芥菜为材料,克隆了多个重金属胁迫响应基因,深入研究了重金属上调基因的表达调控规律,并利用转化细菌和酵母以及转基因植物技术鉴定重金属耐性关键基因的功能。本书总结我们课题组的部分研究成果,共分为两篇、十七章。第一篇共五章内容,主要介

绍植物重金属耐性/富集机理研究前沿动态。第二篇共十二章内容,详细描述了部分重金属上调基因的克隆、表达和功能研究,所获得的技术和研究成果为环境监测、减少重金属在粮食籽粒和蔬菜食用部位的累积及植物修复技术提供新的思路和技术支撑。

柴团耀教授负责全书的构思和审核,主要由张玉秀教授执笔著述,课题组成员张玉秀教授、郎明林博士研究生、祁小廷博士研究生、陈琼硕士研究生和董娟硕士研究生等参与了部分研究工作,孙涛博士研究生、刘戈宇博士研究生和王梓硕士研究生等参与了参考文献的编排和校对工作。本书的研究得到了中国科学院研究生院生物系丁文军教授、中国矿业大学(北京)土地复垦与生态重建研究所胡振琪教授和中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院朱书全教授的帮助,在此一并表示衷心的感谢。感谢中国农业出版社责任编辑张利在出版过程中给予的支持和帮助。

21 世纪是生物学的世纪,由于生物技术日新月异,基因表达调控网络错综复杂,所得的结果可能具有一定的局限性,需要同行专家进一步拓展,恳请专家、学者批评和赐教。

编著者

2006 年 8 月 6 日

27	植物重金属胁迫与基因工程	第一章
27	植物重金属胁迫与基因工程	第二章
27	植物重金属胁迫与基因工程	第三章
28	植物重金属胁迫与基因工程	第四章
28	植物重金属胁迫与基因工程	第五章

目 录

植物重金属胁迫与基因工程

前言

29	植物重金属胁迫与基因工程	第六章
----	--------------	-----

第一篇 植物重金属响应基因研究进展

1	第一章 植物耐重金属机理	4
1	第一节 植物耐重金属机理	4
1	第二节 植物响应重金属胁迫的信号传导途径	11
1	第三节 小结	15
1	参考文献	15
1	第二章 植物重金属超富集机理	22
1	第一节 重金属超富集的细胞机制	23
1	第二节 重金属超富集的分子机制	25
1	第三节 展望	35
1	参考文献	36
1	第三章 植物络合素和植物络合素合酶	41
1	第一节 植物络合素的一级结构和命名	41
1	第二节 植物络合素生物合成	42
1	第三节 植物络合素合酶	45
1	第四节 植物络合素的功能	48
1	第五节 展望	50
1	参考文献	51
1	第四章 重金属响应基因的转录调控	55
1	第一节 重金属响应基因的转录调控	55
1	第二节 植物内含子及其在基因表达中的调控功能	63
1	参考文献	68
1	第五章 基因工程技术改良植物重金属耐性/富集能力研究	75

第一节 转基因技术实施的双重目标	75
第二节 植物重金属耐性/富集的分子机制	76
第三节 转基因技术实施的途径	78
第四节 展望	83
参考文献	84

第二篇 植物重金属响应基因的分离和功能研究

第六章 菜豆重金属胁迫响应基因的克隆	93
第一节 材料和方法	93
第二节 实验结果	95
第三节 讨论	96
第四节 小结	99
参考文献	99
第七章 菜豆重金属特异响应基因 PvSR2 的 克隆和表达	101
第一节 材料和方法	101
第二节 实验结果	103
第三节 讨论	108
第四节 小结	110
参考文献	111
第八章 菜豆 PvSR2 基因转化细菌对重金属的耐性	113
第一节 材料和方法	113
第二节 实验结果	115
第三节 讨论	119
第四节 小结	120
参考文献	120
第九章 PvSR2 基因在烟草中的表达及其镉耐性分析	122
第一节 材料和方法	122
第二节 结果	125
第三节 讨论	131
第四节 小结	132
参考文献	132

第十章 菜豆 PvSR2 基因结构和启动子活性分析	134
第一节 材料和方法	135
第二节 结果分析	143
第三节 讨论	158
第四节 小结	161
参考文献	161
第十一章 菜豆 PvSR2 基因内含子的功能	166
第一节 材料和方法	166
第二节 结果	170
第三节 讨论	179
第四节 小结	183
参考文献	184
第十二章 菜豆脱水蛋白基因在逆境下的表达	187
第一节 材料和方法	188
第二节 实验结果	189
第三节 讨论	197
参考文献	199
第十三章 菜豆病源相关蛋白基因在重金属胁迫下的表达	203
第一节 材料和方法	203
第二节 实验结果	203
第三节 讨论	208
第四节 小结	209
参考文献	209
第十四章 菜豆泛肽基因在重金属胁迫下的表达	211
第一节 结果	211
第二节 讨论	216
第三节 小结	218
参考文献	218
第十五章 菜豆 DnaJ-like 基因在重金属胁迫下的表达	220
第一节 材料和方法	220
第二节 结果	221
第三节 讨论	228

181	第四节 小结	229
182	参考文献	229
183	第十六章 印度芥菜重金属胁迫响应基因的克隆	231
184	第一节 材料和方法	232
185	第二节 实验结果	236
186	第三节 讨论	246
187	第四节 小结	251
188	参考文献	252
189	第十七章 印度芥菜金属阳离子输出转运蛋白基因的克隆	257
190	第一节 材料和方法	257
191	第二节 结果	261
192	第三节 讨论	273
193	第四节 小结	280
194	参考文献	280
195		
196		
197		
198		
199		
200		
201		
202		
203		
204		
205		
206		
207		
208		
209		
210		
211		
212		
213		
214		
215		
216		
217		
218		
219		
220		
221		
222		
223		
224		
225		
226		
227		
228		

第一篇1

【植物重金属响应基因研究进展】

第一章 植物耐重金属机理

第二章 植物重金属超富集机理

第三章 植物络合素和植物络合素合酶

第四章 重金属响应基因的转录调控

第五章 基因工程技术改良植物重金属耐性 / 富集能力研究

重金属系指密度在 $5.0 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ 以上的金属元素, 砷和硒是非金属, 但是它的毒性及某些性质与重金属相似, 所以将砷和硒列入重金属污染物范围内。重金属包括汞 (Hg)、镉 (Cd)、铬 (Cr)、铅 (Pb)、锌 (Zn)、镍 (Ni)、铜 (Cu)、铁 (Fe)、钴 (Co)、银 (Ag)、钼 (Mo)、锡 (Sn) 和金 (Au) 等 45 种, 其中一些金属元素是生物体生理学上必需的微量元素 (如 Co、Cu、Fe、Ni、Zn), 而另一些金属元素至今还未发现其具有生物学功能 (如 Al、Cd、Hg、Sn)。环境污染方面所指的重金属主要是生物毒性显著的 Hg、Cd、Cr、Pb 和类金属 As, 以及具有毒性的重金属 Zn、Ni、Cu、Co 和 Sn 等污染物。目前, 汞、镉、铬、铜和砷等重金属污染引起人们的广泛关注。

由于工业“三废”和机动车尾气的排放、污水灌溉及农药、除草剂和化肥的使用, 严重地污染了土壤、水质和大气, 其中土壤中的重金属 (汞、镉、砷、铜和铅) 污染更为严重, 重金属在植物根、茎、叶及籽粒中的大量累积, 不仅严重地影响植物的生长和发育 (如生长缓慢、生育期推迟及产量降低等), 而且会进入食物链, 危及人类的健康。如日本的水俣病, 就是因为烧碱制造工业排放的废水中含有汞, 在经生物作用变成有机汞后造成的。植物根系吸收的 Cd 最易向籽实迁移, 而 Pb 和 As 的移动较困难, 食用植物产品中的 Cd 是动物和人体中 Cd 的主要来源, 因而 Cd 对动物乃至人类的健康威胁甚大。在 20 世纪 60 年代, 日本曾发生的第二公害病——痛痛病, 就是由于食用被镉废水污染了的土壤生产的“镉米”所致。因而研究植物对重金属的耐性/累积机理对于生产绿色食品、治理环境污染和保护生态环境有重要意义。土壤—植物系统中的重金属污染研究是人们关注的焦点问题之一, 它不仅涉及地球科学和环境科学, 而且在生命科学中占有非常重要的地位。近年来, 人们在矿区筛选出多种重金属耐性/累积植物, 分离鉴定了一些重金属耐性/累积相关基因, 在植物对重金属的吸收、转运、解毒和累积等方面进行了深入的探讨, 并有望利用基因工程技术这把双刃剑降低粮食作物籽粒中的重金属含量, 以及培育重金属超累积植物以便修复重金属污染的土壤。

第一章 植物耐重金属机理

一些重金属元素是植物生长发育所必需的微量营养元素，参与酶的催化和信号传导过程，如 Zn^{2+} 是许多酶的重要辅助因子，许多转录因子都含有锌结合结构域； Cu^{2+} 是电子传递链中的重要组成成分。然而，必需的重金属元素离子水平达到或超过植物所能忍受的生理极限时也会成为毒性元素，另外，非必需的重金属（如 Cd、Hg 和 Pb 等）离子具有极高毒性，严重影响植物的生长发育。重金属离子对细胞的毒害机理包括：细胞内的重金属离子（如 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} ）不仅能与酶活性中心或蛋白质中的巯基结合，而且还能取代金属蛋白中的必需元素（ Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} ），导致生物大分子构象改变、酶活性丧失及必需元素缺乏，干扰细胞的正常代谢过程；另外，重金属能干扰物质在细胞中的运输过程（如 Al^{3+} 能抑制植物对 Ca^{2+} 的吸收和运输），并能通过氧化还原反应产生自由基而导致细胞氧化损伤。尽管如此，不少种类的植物仍能在高浓度的重金属离子环境中生长，表明在长期的进化过程中植物亦相应地产生了维持对重要金属的动态平衡和持续耐性的适应机制及多种抵抗重金属毒害的防卫机制。如植物可以通过限制对环境中重金属离子的吸收和降低其向细胞质中的运输速率，减轻重金属离子对细胞的直接毒害作用；对进入细胞内的重金属离子植物则通过区域化、螯合及形成沉淀方式解毒；此外，一些防卫基因的表达也能提高植物的抗重金属能力。

第一节 植物耐重金属机理

一、限制对重金属的吸收和外排作用

植物可以通过限制对重金属离子的吸收，从而降低细胞内的重金属浓度。如蝇子草属中 *Silene vulgaris* 耐性细胞系中 Cu 的累积量明显低于敏感细胞系，*Silene cucubalus* 耐性细胞系中 Cd 的累积量明显低于敏感细胞系；在同一植物种中，绒毛草（*Holcus lanatus*）耐砷品种体内砷的累积速率远低于敏感品种。现已证明耐砷的绒毛草品种基因组中含有抑制砷酸盐/磷酸盐（arse-