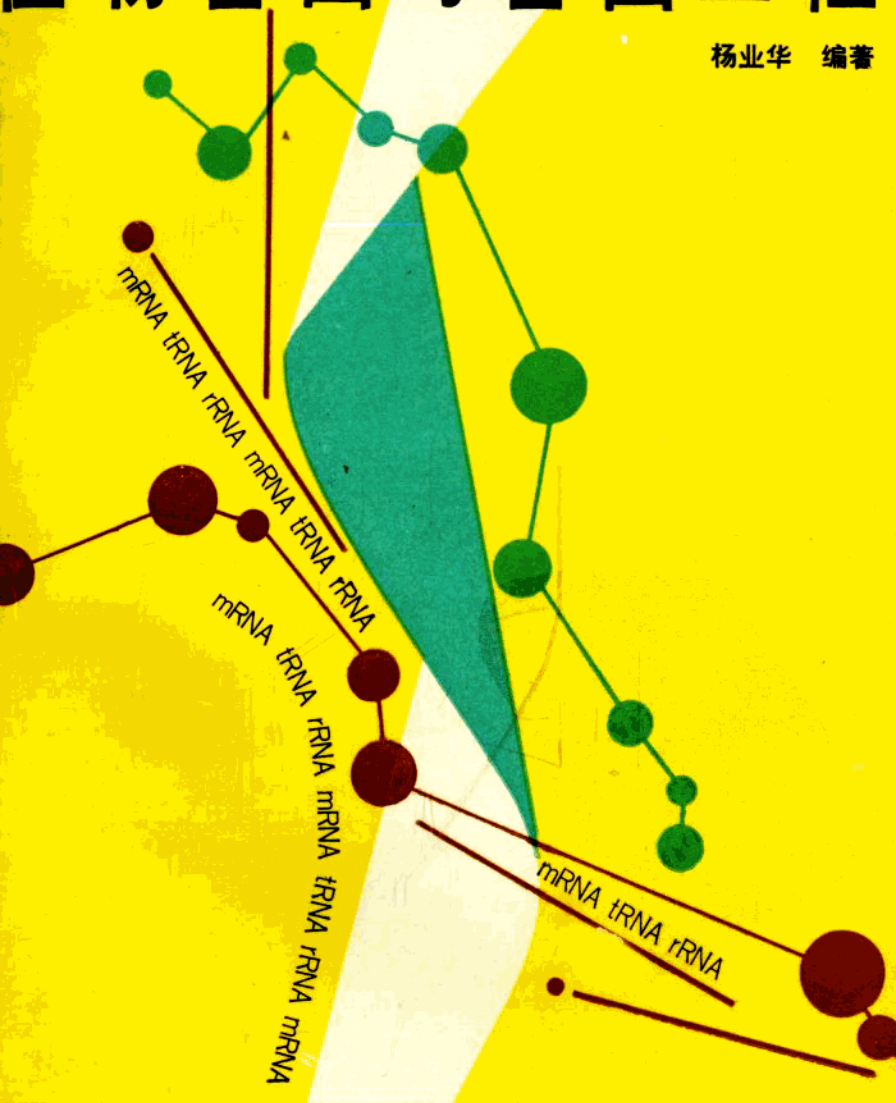


ZWJYYJYGC

植物基因与基因工程

杨业华 编著



目 录

- [1] **第一章 植物细胞核 DNA 的组成**
- [1] 第一节 植物细胞核、染色质和染色体
- [5] 第二节 DNA 的复制
- [9] 第三节 DNA 序列的组成
- [14] 第四节 卫星 DNA
- [15] 第五节 rDNA
- [19] 第六节 细胞核 DNA 含量与物种生物学特性的矛盾性
- [22] **第二章 植物基因的结构与表达**
- [22] 第一节 各种 RNA 聚合酶
- [24] 第二节 rRNA 和 tRNA 的转录和加工
- [28] 第三节 mRNA 的结构与蛋白质合成
- [39] 第四节 各种 snRNA 与 mRNA 加工
- [44] 第五节 植物基因的控制序列
- [49] **第三章 植物基因型的快速变异**
- [49] 第一节 转座子与植物基因型变异
- [60] 第二节 重复 DNA 与基因型变异

- [69] 第三节 环境条件与基因型变异
- [72] **第四章 叶绿体基因的结构和功能**
- [72] 第一节 叶绿体的结构和功能
- [75] 第二节 叶绿体的遗传组成
- [80] 第三节 叶绿体 rRNA 基因操纵子
- [85] 第四节 叶绿体 tRNA 基因
- [91] 第五节 叶绿体蛋白质基因
- [98] 第六节 质体基因与细胞核基因之间的互作
- [102] **第五章 植物线粒体基因组的结构和功能**
- [102] 第一节 高等植物线粒体 DNA 的组成
- [109] 第二节 植物线粒体核糖体、rRNA 和 tRNA
- [111] 第三节 植物线粒体蛋白质基因的结构及其 mRNA 的加工和翻译
- [114] 第四节 线粒体基因组与细胞核基因组之间的互作
- [121] **第六章 植物基因的调节表达及组织专性表达**
- [121] 第一节 植物激素在转录水平上对基因表达的调节作用
- [127] 第二节 光照对基因表达的调节作用
- [131] 第三节 环境压对基因表达的影响
- [138] 第四节 植物基因的器官和组织专性表达
- [143] 第五节 基因表达与植物发育
- [145] **第七章 根瘤菌与植物固氮**
- [145] 第一节 根瘤菌与豆科植物根系的共生关系
- [149] 第二节 根瘤细胞中固氮的生化反应
- [151] 第三节 与根瘤形成有关的根瘤菌基因
- [156] 第四节 与结瘤有关的植物基因

- [163] **第八章 农杆菌与植物根颈瘤**
- [163] 第一节 农杆菌与植物根颈瘤
- [164] 第二节 Ti 质粒的类型与结构特点
- [167] 第三节 T-DNA
- [172] 第四节 与 T-DNA 转移有关的功能结构
- [178] 第五节 农杆菌的寄主范围及其与根瘤菌之间的关系
- [181] **第九章 植物病毒及其与寄主之间的互作**
- [181] 第一节 植物病毒的类型及其遗传组成
- [184] 第二节 植物病毒感染的生物学特性
- [186] 第三节 RNA 病毒基因的表达和复制
- [190] 第四节 DNA 病毒
- [202] 第五节 植物类病毒及拟类病毒
- [205] **第十章 植物基因工程与植物育种**
- [205] 第一节 基因工程与植物育种
- [208] 第二节 植物基因工程的研究方向与重要基因的鉴定
- [221] 第三节 基因克隆
- [239] 第四节 植物基因种间转移的载体
- [247] 第五节 植物转化及转化植株再生
- [250] 第六节 目的基因的控制表达
- [254] **主要参考文献**
- [280] **外文索引**

第一节 植物细胞核、染色质和染色体

高等植物的细胞含有许多具有膜结构的细胞器如细胞核(nucleus)、叶绿体(chloroplast)、线粒体(mitochondrion)等,而细胞核则是所有这些细胞器中最主要的结构,它在细胞的繁殖、发育和分化等过程中起着决定性的作用。细胞核由双层膜所包裹,内外膜之间由叫做周核区(perinuclear space)的空间所隔开。核膜上存在许多核膜孔,直径为 50~100nm,核膜孔的一部分空间由一种蛋白质复合体所填充。一般认为这种蛋白质复合体在核膜孔内起着转运大分子化合物的作用。在细胞生长和分化过程中,核膜孔的数目和位置变化很大,这是核膜的重要动力学特征之一。核膜与内质网(endoplasmic reticulum)相连,在电镜下有时也可以见到核膜与叶绿体膜和线粒体膜相连的现象。核膜在细胞分裂期间逐渐消失,当细胞分裂完成以后又逐渐形成。

核仁(nucleolus)是细胞核内主要的细胞器。在细胞分裂以后,核仁通常位于某些染色体(chromosome)的特定位置上,这种与核仁相连的染色体区域就叫做核仁组织者(nucleolus organizer)。核仁没有膜结构,含有 DNA、纤维以及由 RNA 和蛋白质组成的颗粒。核仁是各种 rRNA 基因转录的场所,对植物细胞溶质中的 80S 核糖体起着加工和部分装配的功能。

染色质(chromatin)是间期细胞核中的酸性成分,易于被碱性染料染色。根据染色深浅程度不同,染色质可以分为两种类型,染色浅的即分散染色质叫常染色质(euchromatin),染色深的即浓缩染色质叫异染色质(heterochromatin)。这两种染色质在细胞中表现出不同的功能。在细胞分裂过程中,分裂间期的染色质逐渐收缩成染色很深、轮廓清晰的染色体。组成染色质的主要物质是 DNA 和蛋白质(表 1-1)。在高等植物中,大约 95% 的 DNA 存在于细胞核中,占整个细胞核干物重的 10~40%。除了 DNA 以外,细胞核还含有多种蛋白质如微管蛋白、肌动蛋白、酸性调节蛋白、碱性蛋白(组蛋白)、各种酶和 RNA 等。其中 DNA : 组蛋白 : RNA : 酸性蛋白的比例大约为 1 : 1.1 : 0.2 : 0.9。当组蛋白与 DNA 结合时,便形成染色质的基本结构单位核小体(nucleosome)。

在所有真核生物中,核小体的一般结构基本相似。核小体的核心颗粒为一种扁盘状结构(图 1-1),直径约为 110 Å,厚约 60 Å,由各为 2 个分子的 H₂A、H₂b、H₃ 和 H₄ 组成。沿核小体的短轴可以将这种扁盘结构对称地分成两半,一般认为,每一半各有一个分子的 H₂A、H₂b、H₃ 和 H₄。DNA 分子用 146 对碱基绕核心 1.75 圈,第 5 种组蛋白 H₁ 再与另外 20 对碱基的 DNA 结合,使 DNA 分子整整绕组蛋白核心 2 圈,形成念珠状

表 1-1 植物染色质的化学组成

(各种成分与总体 DNA 的比例)

植物	组织	组蛋白	非组蛋白	RNA
豌豆	胚	1.03	0.29	0.26
	营养体芽	1.30	0.10	0.11
	子叶	0.76	0.36	0.13
豌豆	胚	0.80	0.45	0.08
	幼苗	1.10	0.40	0.06
豌豆	上胚轴	1.27	0.17	—
	上胚轴 (GA ₃ 处理)	1.29	0.13	—
玉米	上胚轴	1.40	1.00	0.26
	中胚轴	1.39	1.16	0.23
	根	1.40	1.06	0.25
胡萝卜	细胞培养	1.02	2.17	0.28
菊芋(洋姜)	块茎	1.10	2.86	0.57
小麦	7 小时胚	1.16	0.42	—
	4 天胚	1.18	0.46	—
大麦	胚	0.75	0.91	—
浮萍	整体	0.87	0.46	—
平均		1.13±0.22	0.89±0.89	0.23±0.14

注:同一植物中不同数据为不同试验的结果。

结构。另外, H₁ 还与念珠之间的连接 DNA 松散结合, 形成连接丝, 所以在电镜下, 染色质就象一串念珠。连接丝中的 DNA 含量因物种不同或组织、器官不同而差异很大, 甚至同一细胞核中染色质的核小体连接丝中的 DNA 含量也有明显差异, 因此每个核小体的大小即每个核小体重复(nucleo repeat)的变

化很大。例如在某些真菌中,核小体的 DNA 为 160bp(碱基对),小麦(*Triticum sativum*)为 186bp,豌豆(*Pisum sativum*)为 191bp,某些海胆(*Echinoidea*)的核小体则为 240bp。通过蔗糖梯度离心对不同植物核小体的分析表明,单个核小体的沉降系数的差异也很大,例如烟草(*Nicotiana tabacum*)为 19S,豌豆、蚕豆(*Vicia faba*)和延年草(*Trillium kamtschaticum*)为 11S,大麦(*Hordeum vulgare*)为 10.6S。

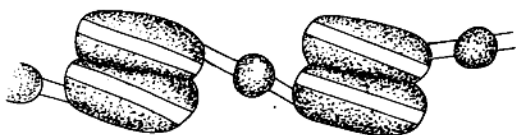


图 1-1 核小体的结构模型

关于染色质的更高级结构目前还不清楚,但是一般认为,核小体通过螺旋化形成一种叫做螺旋体(solenoid)的结构,然后螺旋体又进一步螺旋化,收缩成在光学显微镜下可以见到的染色体。在染色质不断螺旋化的过程中,可能需要某种蛋白质的参与才能形成有丝分裂中期的染色体。一般认为组蛋白 H_1 的磷酸化作用对染色质的螺旋化过程起着一定的作用。

在正常的间期细胞核中,常染色质通常与高速率的 RNA 合成有关;而异染色质则不具有转录 RNA 的活性,约占整个细胞核 DNA 含量的 90%。异染色质和常染色质的直径相差很大,异染色质的直径为 250 \AA ,在进入有丝分裂时大约为 300 \AA ,而常染色质的直径为 100 \AA ,几乎不含 H_1 组蛋白。常染色质和异染色质可以相互转化,当直径为 250 \AA 的螺旋化异染色质除掉 H_1 组蛋白以后,可以解螺旋而形成常染色质,

由非活性状态进入活性状态。

在常染色质和异染色质中,DNA 和组蛋白的比例差异不显著,相反,非组蛋白(酸性蛋白)与 DNA 的比例常染色质则是异染色质的 2~4 倍。所以通常认为,组蛋白可以抑制 DNA 的转录活性,而酸性蛋白则可以解除组蛋白的抑制作用,使基因活化。

第二节 DNA 的复制

处于高度分裂状态的植物细胞完成一个生长周期或一个细胞分裂周期大约需要 15~40 小时,其中 DNA 复制和组蛋白合成则需要 7~11 小时,合成过程主要在细胞分裂周期中的间期(S 期)完成。

如果通过放射性同位素标记植株,并在一定间隔时间内抽提、制备 DNA 来分析单个 DNA 分子的合成情况,就可以知道,每一条 DNA 分子沿其纵长方向在数百个位点上开始复制,从每一个复制起点开始,复制过程从两个方向同时进行(图 1-2)。因此,每一条新合成的 DNA 片段就叫做一个复制子(replicon),其长度等于同一条 DNA 分子上两个相邻的复制起点之间的距离。一般说来,双子叶植物中每一个复制子长约 20~30 μm 或 60~90kb(1kb=1000bp),而在单子叶植物中,其长度则为 5~21 μm (表 1-2)。DNA 在开始复制时,有关的复制酶首先在复制起点上将双链 DNA 分子打开,使之形成单链,然后再分别以单链为模板合成新的子链。DNA 在复制过程中的这种结构叫做复制叉(replication fork)。复制叉的移动速度因物种不同和环境因素的影响不同而差异很大,从每

小时移动 $1.6\mu\text{m}$ 到 $12.1\mu\text{m}$ 不等。根据对不同植物的分析,同一分类科中每一个复制子都是在 S 期的相同时间进行 DNA 复制,而不同科植物的复制子在 S 期的复制时间不同。

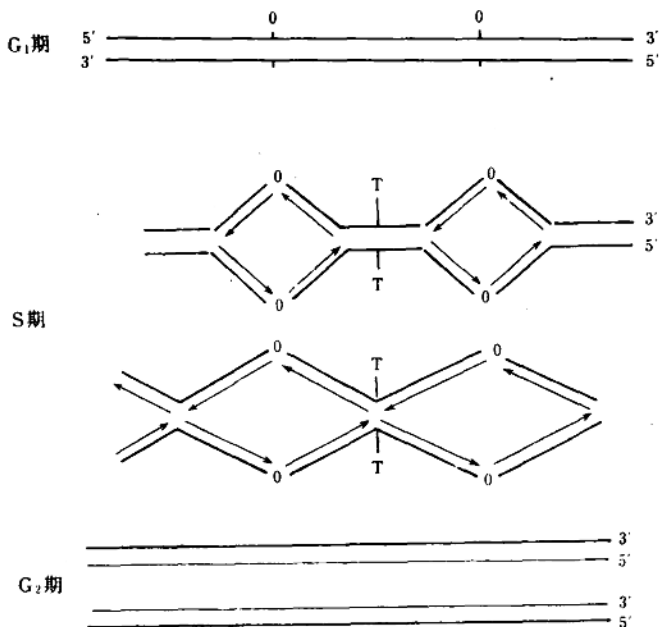


图 1-2 细胞分裂周期中的复制子及 DNA 合成过程

①—复制起点, T—复制终点, 箭头示新链合成的方向(5'→3')。

G₂ 期中的 2 条双链 DNA 表示细胞分裂时的两条姊妹染色单体

虽然目前对有关植物 DNA 复制的生物化学过程以及与复制有关的各种酶类的作用机理都还不十分清楚,但是根据对动物和其它低等真核生物的研究,一般认为植物 DNA 的复

表 1-2 部分植物根尖细胞中 DNA 复制速度和复制子长度

植物	复制子平均长(μm)	复制速度($\mu\text{m}/\text{小时}$)
拟南芥菜	23.0	5.8
水稻	17.5	6.0
红花菜豆	22.5	9.6
番茄	24.0	8.0
大豆	25.0	6.8
向日葵	22.0	10.0
豌豆	18.0	9.0
方穗山羊草	12.0	3.2
大麦	17.0	4.1
黑麦	20.0	7.3
黑麦	20.0	12.1
蚕豆	16.0	9.0
洋葱	21.0	7.5
中国春小麦	5.0	1.6

根据 Francis 等, 1985。

制过程包括如下几个步骤:

1. 在拓朴异构酶(topoisomerase)的作用下, DNA 超螺旋局部发生松弛, 成为一种适合于形成复制叉的双螺旋 DNA 分子。

2. 螺旋酶(helicase)利用 ATP 将双螺旋分开, 使之成为两条单链。

3. DNA 结合酶(DNA-binding enzyme)固定两条分开的单链。

4. 引物酶(primerase)以 DNA 单链为模板, 按 5'→3' 方向合成一条短的引物 RNA(primer RNA)。

5. α -或 r-DNA 聚合酶(DNA polymerase)按 5'→3' 方向延长引物 RNA, 形成一段新的 DNA 即冈崎片段(Okazaki fragment)。

6. 核酸酶 H (ribonuclease H) 然后从冈崎片段上将引物 RNA 除掉。

7. β -DNA 聚合酶修复各条 DNA 片段之间的空缺。

8. 相邻的 DNA 片段通过连接酶 (ligase) 连接在一起而形成新的子链 (图 1-3)。

随着复制叉继续向前移动, 细胞中又合成新的引物 RNA 和冈崎片段。当一个复制子的复制过程完成以后, 两个相邻复制子上的新形成的 DNA 链再连接起来 (图 1-2)。

根据对大豆 (*Glycine max*) 和粘菌 (*Physarum*) 的分析, DNA 复制过程中的每一条冈崎片段长约 200 个核苷酸, 由于其长度与核小体重复中 DNA 的长度相当, 可能冈崎片段与核小体的形成有关。

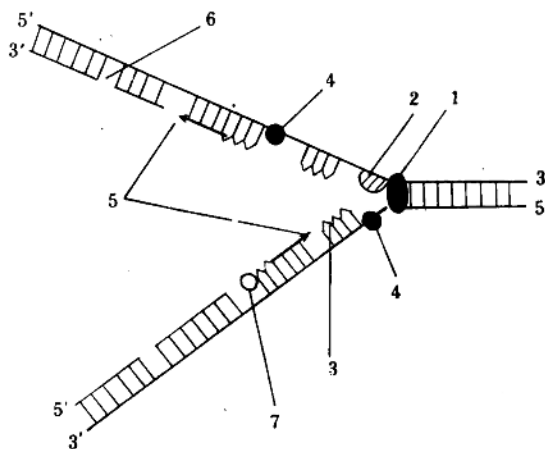


图 1-3 DNA 复制叉的结构模型

1. 螺旋酶 2. 引物酶 3. 引物 RNA 4. 单链 DNA 结合酶
5. DNA 聚合酶 6. 连接酶 7. RNA 酶 H

根据对 SV40 和动物多瘤病毒 (polyoma virus) 的研究, DNA 复制首先是从一段短的、富含碱基 AT 的顺接重复序列 5' TTAACGTTAA 3' 部位开始的, 所以这一段序列就叫做复制起始区 (replication origin)。由于这种序列为一种双向对称结构, 即分别从两条单链的 5' 至 3' 方向阅读时其序列相同, 所以这种序列在 DNA 复制过程中有可能形成一种发夹环 (hairpin loop) 结构, 作为起始复制过程的信号。但是在植物中, 有关 DNA 的复制起始区的结构特征目前还不清楚。

在高等植物中, DNA 复制完成以后, DNA 甲基化酶 (DNA methylase) 利用 S-腺苷甲硫氨酸作为供体, 使大约 25% 的胞嘧啶甲基化, 这些甲基化的末端结构通常为 GC、CG、CAG 和 GTC。一般认为 DNA 分子的甲基化作用会影响基因的表达活性, 但是在某些物种中, 并非所有甲基化的基因都失活; 也并非所有去甲基化的基因都能表达。

第三节 DNA 序列的组成

当双链 DNA 分子加热到溶解温度或用碱处理时, 其氢键就会被打断而使双链分开, 成为两条单链分子, 这个过程就叫做变性 (denaturation)。相反, 如果慢慢降低温度或使 pH 值恢复到接近中性时, 两条互补链又可以恢复到双链结构, 这个过程就叫做复性 (renaturation 或 reassociation)。复性的速率与温度、盐离子浓度等因素有关, 对大片段 DNA 分子来说, 还与 DNA 片段的长度有关。如果控制所有这些反应条件, 那么复性的速率就与参加反应的 DNA 序列的浓度和反应的时间成正比, 并遵循第二顺序复性动力学公式 (second order reassocia-

tion kinetics), 即:

$$C/C_0 = (1 + KC_0t)^{-1}$$

在上述公式中, C_0 为开始的 DNA 克分子浓度, C 为复性 t 秒后游离单链的浓度, K 为反应的速率常数。例如:

当 $C/C_0 = \frac{1}{2}$ 时, 那么 $K = 1/C_0t^{1/2}$ 。也就是说, 当有一半 DNA 复性时, $C_0t^{1/2}$ 与反应速率成反比。复性资料通常以 C_0t 曲线表示(图 1-4)。复性速率既可以用分光光度计(260nm)测量消色性, 也可以通过色层析(chromatography)将单链和双链 DNA 分开, 或用 S_1 酶处理以消除单链 DNA 来计算复性速率。

根据对 DNA 分子变性—复性过程的分析, 在高等植物的基因组中存在大量的重复 DNA 序列。例如在豌豆的基因组中, 大约只有 15% 的 DNA 不能复性, 这类 DNA 可能只有一个或少数几个拷贝, 大约 85% 的 DNA 的复性速率非常快, 可能在豌豆的基因组中, 许多基因都有数千个重复序列。其它许多高等植物的重复 DNA 序列也都基本上与豌豆 DNA 的组成相似。一般说来, 单拷贝 DNA 的含量(包括一个或少数几个拷贝)因物种不同和基因组的大小不同变化较大, 其比例通常变动于 20~40% 之间(表 1-3), 而重复 DNA 的含量则有随基因组增大而增加的趋势。

几乎在所有植物的基因组中, 绝大多数单拷贝 DNA 序列的长度都不超过 2000bp, 并分散在整个基因组中。在单拷贝 DNA 中, 只有一部分可以转录 mRNA, 例如在烟草的各种组织中, 总共大约有 6 万个基因可以转录, 而在烟叶的多核糖体中则大约只有 27 000 个不同的转录子。

植物基因组中的重复 DNA 序列大致可以分为两种类型,

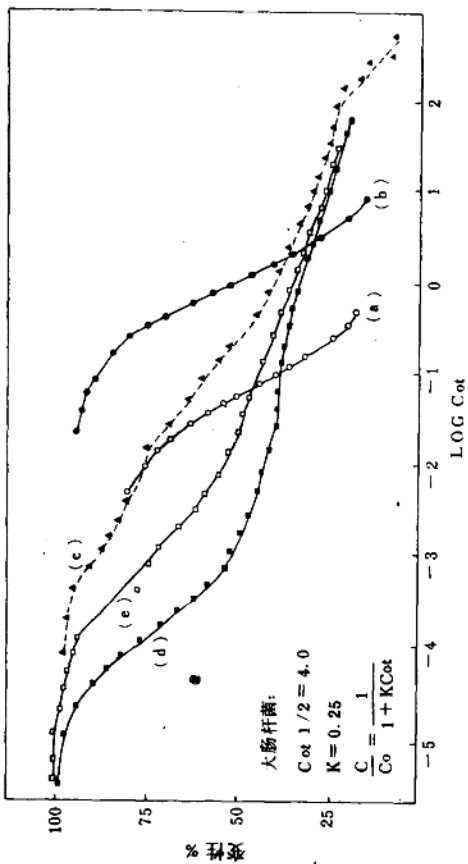


图 1-4 不同物种的 DNA 变性的动力学特征
 a、b、c、d 和 e 分别表示噬菌体 T₄、大肠杆菌、黑麦 DNA、黄瓜卫星 DNA I 和 DNA II 的变性动态(根据 E. G. Jordan 等, 1981)。

即衔接排列(long period arrangement)和分散排列(short period arrangement)(图 1-5)。分散排列的重复 DNA 通常分布在各个单拷贝 DNA 序列之间,其长度一般不超过 1 000bp。高等植物的重复 DNA 主要以分散排列的形式存在于基因组中,少数

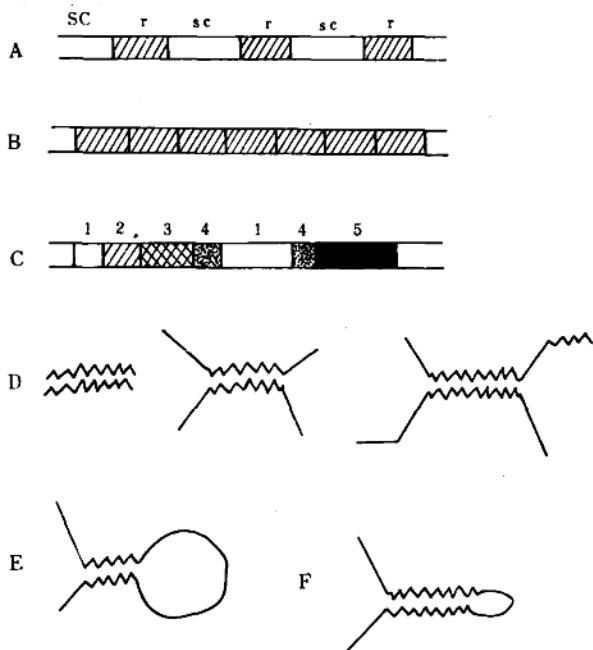


图 1-5 不同重复 DNA 的序列组成及其重复性

A: 重复 DNA 分布在各个单拷贝 DNA 之间 B: 衔接重复 DNA C: 各种重复次数不同的重复 DNA 的分布 D: 重复序列复性后, 各个单拷贝之间的重复 DNA 的复性情况 E: 由单拷贝 DNA 所隔开的颠倒重复序列在单链内的复性情况。sc 为单拷贝 DNA, r 为重复 DNA, 波澜线为碱基配对的序列

为衔接排列。在黑麦中,有些重复 DNA 位于染色体 1R 的端粒(telomere)上,有的位于着丝粒(centromere)上或中间异染色质区,但还有一些重复序列则分散在染色体的数千个不同的位置上,这类同源序列可能是在进化过程中不断发生重复和转座的结果(第三章)。

由于同一类重复 DNA 序列在染色体上存在的方向有所不同,所以重复 DNA 又可以分为顺接重复(direct repeat)和颠倒重复序列(inverted repeat sequense)。在真核生物的基因组

表 1-3 植物单拷贝 DNA 的分布情况(复性动力学分析结果)

物种	单倍体基因组(bp×10 ⁹)	片段长(bp)	单拷贝%
绿豆	0.5	300	65
	0.5	1 200	42
	0.5	6 700	31
大豆	1.1	300	23
	1.1	2 700	0
香芹菜	1.9	300	12
	1.9	1 350	4
	1.9	5 300	0
烟草	2.0	300	22
	2.0	950	19
	2.0	2 400	2
	2.0	4 300	1
豌豆	4.8	300	17
	4.8	1 000	≤3
	4.8	1 300	0
陆地棉	0.8	1 800	25

中,颠倒重复序列的长度一般为 50~1 000bp,其 C₀t 值非常低,在其双链 DNA 分子的一条单链以内,可以形成发夹环结