

学校编码: 10384

学号: 200326074

分类号 _____ 密级 _____

UDC _____

厦 门 大 学
_____硕士_____学 位 论 文

AtPCS1 基因的克隆及其农杆菌介导的
苜蓿遗传转化

Cloning *AtPCS1* gene and *Agrobacterium*-mediated
transformation of *AtPCS1* into *Medicago sativa*.L

吴亦亮

指导教师姓名: 陈亮 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006年6月

论文答辩时间: 2006年7月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 王鸣刚教授

评 阅 人: _____

2006年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要1

Abstract3

第一篇 文献综述

第一章 植物修复5

1 超富集植物及其对重金属的耐性机理5

2 超富集植物特点及植物修复 8

3 植物修复中的转基因技术 8

4 植物螯合肽及其在植物修复中的作用 9

第二章 苜蓿遗传转化研究进展11

1 苜蓿再生体系的研究进展12

2 苜蓿的遗传转化13

第三章 研究的意义、内容15

第二篇 研究报告

第一章 *AtPCSI*基因克隆、原核表达及其多抗血清的制备.....16

1 材料与方法16

2 实验结果21

2.1 *AtPCSI* 基因的克隆21

2.2 原核表达载体 pET28a-*AtPCSI* 的构建22

2.3 融合蛋白的诱导表达及纯化23

2.4 抗体的制备与鉴定23

3 讨论25

第二章 苜蓿再生体系的优化27

1 材料与方法27

2 实验结果28

2.1 品种对植株再生的影响	28
2.2 不同外植体对植株再生的影响	30
2.3 培养基对再生植株生根的影响	32
3 讨论	32
第三章 农杆菌介导的 <i>AtPCS1</i> 基因的苜蓿遗传转化	35
1 材料与方法	35
2 实验结果	39
2.1 <i>AtPCS1</i> 植物表达载体的构建及农杆菌转化子的鉴定	39
2.2 Kan 选择压的确定	41
2.3 <i>AtPCS1</i> 基因导入苜蓿及植株再生	41
2.4 转基因植株 PCR 鉴定	43
3 讨论	44
第四章 总结	47
参考文献	48
缩略词	54
致谢	55

Table of Content

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	3

Part I: Introduction

Chapter I: Phytoremediation	5
1 Hyperaccumulator and their mechanism of tolerance to heavy metals	5
2 The characteristic of hyperaccumulator and phytoremediation	8
3 The transgenic technology using in phytoremediation	8
4 Phytochelatins and their function in phytoremediation	9
Chapter II: The recent progress on the genetic transformation of alfalfa	11
1 Recent research on regeneration of alfalfa	12
2 Genetic transformation of alfalfa	13
Chapter III: Research content and meaning of the thesis	15

Part II: Research report

Chapter I: Cloning <i>AtPCS1</i>, Expression the Recombinant <i>AtPCS1</i> and Preparation of Polyclonal Anti-serum against <i>AtPCS1</i>	16
1 Materials and methods	16
2 Results	21
2.1 Clone of <i>AtPCS1</i>	21
2.2 Prokaryote expression plasmid pET28a- <i>AtPCS1</i> construct	22
2.3 Expression and purification of recombinant protein	23
2.4 Preparation and identity of anti-serum	23
3 Discussion	25

Chapter II: Establishment of regeneration system of alfalfa	27
1 Materials and methods	27
2 Results	28
2.1 Influence of genotypes to regeneration	28
2.2 Influence of explants to regeneration	30
2.3 Influence of medium to rooting of the seedlings	32
3 Discussion	32
Chapter III: Agrobacterium-mediated transformation of AtPCSI into Medicago sativa.L	35
1 Materials and methods	35
2 Results	39
2.1 Plant expression plasmid pBI121-AtPCSI construct and identity of the AtPCSI transformed EHA105	39
2.2 Selection pressure of Kan	41
2.3 Transformation of AtPCSI into alfalfa and regeneration	41
2.4 PCR identity of transgenic alfalfa	43
3 Discussion	44
Chapter IV: Summary	47
Reference	48
Abbreviation	54
Acknowledgement	55

摘 要

利用植物修复重金属污染土壤是一种廉价并且可行的修复技术。大部分已发现的超富集植物生物量小,限制了其在植物修复方面的应用。本实验借助基因工程手段将重金属富集、耐受相关的基因*AtPCS1* 转入生物量大且适应性广的苜蓿中,以期获得能够富集重金属的苜蓿,为今后的工作提供基础材料。

首先,比较了六种不同基因型苜蓿(阿尔岗金、三得利、陇东、甘农一号、大花及天兰)愈伤组织的形成及分化能力。以叶片为外植体,在含1.0 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT 的B5 培养基上诱导胚性愈伤组织,将愈伤组织置于无激素的B5 培养基上诱导植株再生。六种不同基因型的苜蓿愈伤形成率均在90%以上,品种对苜蓿愈伤组织形成能力差异并不显著($P>0.05$)。不同品种苜蓿的分化率并不高(0-42.9%),其中甘农一号分化率最高(42.9%),品种间分化率存在显著差异($P<0.05$)。进一步比较了甘农一号叶片、下胚轴及子叶等不同外植体的分化再生能力,不同外植体分化能力差异不显著,但是叶片起源的愈伤组织分化时间短,且其丛生芽形成数量高于下胚轴和子叶。再生芽在B5 培养基上成苗并在蔗糖浓度为10 g/L的1/2 MS 培养基上顺利生根。从愈伤组织的诱导到分化形成再生苗总共约80-100 d。对于我们所选的再生体系,甘农一号叶片是适于做苜蓿遗传转化的理想材料。

通过植物螯合肽同重金属结合形成复合物,进而输送到液泡中隔离是植物对吸收的重金属进行解毒的重要途径。植物螯合肽合成酶是植物螯合肽合成途径的关键酶。通过 RT-PCR,克隆拟南芥植物螯合肽合成酶(*AtPCS1*)基因,构建原核表达载体 pET28a-*AtPCS1*。转化大肠杆菌 BL21 (DE3),0.75 mM IPTG 诱导融合蛋白 His-*AtPCS1* 表达,将其纯化后采用皮下多点注射免疫的方法免疫 BALB/C 小鼠,获得特异性抗血清。抗血清同纯化的融合蛋白及拟南芥总蛋白的 western-blot 结果表明制备的抗血清具有较高的活性和一定的特异性。为进一步研究 PCS 在植物体内的分布及不同组织表达上的差异性,获得可用于重金属污染土壤的生物修复的转基因植物做准备。

进一步,构建了 *AtPCS1* 的植物表达载体 pBI121-*AtPCS1*,转化农杆菌 EHA105。通过叶盘法以重组的农杆菌侵染甘农一号叶片,在 50 mg/L Kan 的筛

选压下，经过约 80-100 d 筛选获得 57 棵再生苗。取其中 9 棵再生苗进行 PCR 检测，其中 5 棵为阳性。初步结果表明 *AtPCSI* 基因已整合到苜蓿基因组中，该基因有无转录、翻译及转基因苗的生物学特性需进一步的分子生物学及生理学实验进行验证。

关键词：拟南芥植物螯合肽合成酶；苜蓿；植物修复

厦门大学博硕士论文摘要库

Cloning *AtPCS1* gene and *Agrobacterium*-mediated transformation of *AtPCS1* into *Medicago sativa*.L

Abstract

Plants have many natural properties that make them ideally suited to clean up polluted soil in the process called phytoremediation. Most native hyperaccumulators can not be used broadly for their slow growth and little biomass. We tried to use transgenic approach for transferring the metal-accumulate related gene (*AtPCS1*) to the plant with advantages of high biomass and easy grown — alfalfa, to obtain transgenic plant which can accumulate heavy metals.

Firstly, six alfalfa genotypes (A'ergangjin, Sandeli, Longdong, Gannong No.1 , Dahua and Tianlan) were evaluated for their callus induction capacity and plant regeneration ability. Leaf cylinders were used as explants using B5 based medium supplemented with 1 mg /L 2,4 dichlorophenoxyacetic acid and 0.1 mg /L kinetin. Plant regeneration was accomplished on hormone free modified B5 medium. The genotypes tested showed high callus induction percentage (all are above 90%), and there is no obvious difference between genotypes ($P>0.05$). These genotypes showed no high regeneration capacities, with regeneration percentages ranged between 0 to 42.9%. Significant differences were observed between genotypes for regeneration ability ($p<0.05$) indicating that this criteria is genotype dependent and the Gannong No.1 has the highest regeneration ability. Furthermore, we compared callus induction and plant regeneration ability of different explants as leaf, hypocotyl and cotyledon, and there was no difference observed among these explants, but the calluses coming from leaf differentiated much earlier and had more regeneration buds than any others. The *in vitro* regenerated plants were successfully rooted in 1/2 MS medium and well acclimatized in growth cabinet conditions. It takes about 80-100 days to transfer the seedlings to soil. Those results above suggested that the leaf of Gannong No.1 is ideal explant for transgene research.

Phytochelatin synthase (PCS) catalyzes the final step in the biosynthesis of

phytochelatins, which are a family of cysteine-rich thiol-reactive peptides believed to combine with metals then the complex is transferred to vacuole. So, it plays an important role in processing many thiol-reactive heavy metals. The full length of *AtPCS1* gene was amplified by RT-PCR from *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *AtPCS1* gene with right sequence was cloned into the expression vector pET28a to construct AtPCS1 expression plasmid pET28a-AtPCS1. The *E.coli* BL21 contained the expression plasmid was induced by 0.75 mM IPTG. Balb/c Mouse was immunized with the purified protein to obtain the anti-serum. Western-blot analysis of the anti-serum with purified protein His-AtPCS1 and the total protein of *Arabidopsis thaliana* showed the polyclonal anti- His-AtPCS1 serum was available with high activity and speciality.

Furthermore, we constructed AtPCS1 plant expression vector pBI121-AtPCS1, transferring it into *Agrobacterium* EHA105 and transferred *AtPCS1* gene into alfalfa Gannong No.1 by leaf infection method. Transgenic alfalfa plants have been regenerated under the 50 mg/L Kan concentration pressure after 80-100 days. Five putative transgenic plants were screened by *AtPCS1*-specific PCR in nine random chosen samples. The primary results showed that the *AtPCS1* has been transferred into alfalfa. Further research would be necessary to testify whether the gene has transcription and translation in transgenic alfalfa, and the characteristic of transgenic alfalfa under the heavy metal (such as Cd²⁺) pressure.

Key Words: AtPCS1; alfalfa; phytoremediation

第一篇 文献综述

土壤是人类赖以生存的自然环境和农业生产的重要资源。当今世界面临的粮食、资源和环境问题都与土壤密切相关。工业、农业及各种各样的区域性活动造成环境特别是土壤中大量的有毒重金属污染物的积累达到无法接受的程度,严重地影响着全球人类的健康^[1]。重金属污染不仅使土壤肥力下降,严重阻碍农业生产,而且多数污染物可以在食物链中积累进而威胁到人的健康。例如,长期的接触镉(Cd)会导致肾脏损坏,急性汞中毒会引起肺损伤,而长期接触铅引起人的记忆衰退、反应时间延长以及理解能力的降低^[2]。

土壤中重金属来源包括工业废渣、废气中重金属的扩散、沉降、累积;用于农田灌溉的重金属污染的废水;以及含重金属农药、磷肥的大量施用等。目前,我国受镉、砷、铅等重金属污染的耕地面积近 $2.0 \times 10^7 \text{ hm}^2$,约占总耕地面积的1/5;其中工业“三废”污染耕地 $1.0 \times 10^7 \text{ hm}^2$,污水灌溉的农田面积 $3.3 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 。每年因重金属污染而减产粮食超过 $1.0 \times 10^7 \text{ t}$,另外被重金属污染的粮食每年也多达 $1.2 \times 10^7 \text{ t}$,由此造成的经济损失合计至少为200亿元^[3]。虽然我们都清楚的知道避免重金属进入土壤是防治其污染的首要途径,但是在人类历史特别是近现代史中长期没有得到重视。土壤中重金属较为稳定,自然净化过程十分漫长,因此采用人为的方法消除土壤中的重金属污染物是十分必要的。1983年,Chaney首次提出了利用某些能够富集重金属的植物清除土壤重金属污染的设想——植物修复技术。与传统的治理土壤中重金属如淋滤、客土、吸附固定等物理方法以及生物还原、螯合浸提等化学方法相比,植物修复法具有更为经济以及生态协调性等优势^[4],对广泛的浅度重金属污染的土壤进行修复有较好的作用。

一 植物修复 (phytoremediation)

1 超富集植物及其对重金属的耐性机理

自然界中有很多植物可以在重金属含量很高的土壤上生长,即这些植物对重金属毒害有较高的耐受能力,这类植物叫重金属耐性植物。植物对重金属的耐受主要通过植物固定(phytostabilization)及植物萃取(phytoextraction)两种截然不同的策略^[5]。前者是通过在污染土壤的表层覆盖上一层密度适中的植物,以防止风、水侵蚀造成的重金属在土壤中自由扩散。这类植物往往有茂盛的根系,能

够很好的覆盖土壤并且对污染的土壤具有耐受能力,而最理想的是多数植物能够将重金属污染物聚集在根系周围^[6, 7]。它们通过改变根际环境(pH、Eh)使重金属的形态发生化学改变或者分泌的粘胶状物质与 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 等金属离子竞争性结合,从而使重金属在植物根系周围沉淀下来,同时也影响其在土壤中的迁移性。植物固定可能是植物对重金属毒害抗性的一种表现,并未去除土壤中的重金属,环境条件的改变仍可使它的生物有效性发生改变。

植物萃取是指通过将重金属吸收到植物可收割的组织中以除去土壤中污染的重金属。重金属通过植物根部的吸收、根茎之间的转运及在叶片等组织中螯合和区室化(Compartmentation)从土壤转移到植物体中^[8]。相对植物固定,通过植物萃取重金属可以真正的从土壤中去掉。

1.1 重金属离子的吸收

土壤中重金属主要以离子形式存在,根内皮细胞壁上凯氏带在木栓层上形成溶液无法渗透的区域,造成金属离子无法直接通过渗透作用进入植物体。因此,重金属离子需要根部细胞膜上的转运蛋白从根际转运到木质部。多数植物细胞膜上并没有专门针对重金属离子的转运蛋白,但是多数的有毒金属离子由于结构上同植物必需金属离子的相似性,容易因为协同效应而通过根部细胞膜上的其它转运蛋白进入植物体内。例如,砷酸盐可以通过磷酸盐转运蛋白进入植物根部,而硫酸盐转运蛋白可以转运硒酸盐等^[9, 10]。此外,植物能够将柠檬酸、苹果酸、尼克酰胺以及富含巯基的多肽等次生代谢产物释放到土壤中,从而提高根际金属离子的可溶性,或形成螯合物促进根部对重金属离子的吸收^[11, 12]。近年来,超富集植物对重金属的高吸收能力的研究在生理和分子水平有了相当可观的进展。通过对芥菜Zn超富集品种*Arabidopsis halleri*与无富集能力的*Arabidopsis petraea*两个品种之间进行的杂交实验表明Zn的富集和耐受是相互独立的特性,对金属的耐受能力可能由单个主要基因控制^[13]。证据表明褐蓝菜(*T. caerulescens*)对 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 的超富集能力主要依赖于根部对金属吸收能力的提高^[14, 15, 16]。从褐蓝菜中克隆了多个属于ZIP家族转运蛋白的cDNA^[17, 18],其中ZNT1和ZNT2在褐蓝菜的根部高表达且不依赖植物体内 Zn^{2+} 的浓度水平。将ZNT1在酵母中异源表达,通过功能互补实验表明ZNT1的过量表达同转化酵母细胞对 Zn^{2+} 高亲和性的吸收及对 Cd^{2+} 低亲和性的摄取密切相关^[18]。Southern French生态型褐蓝菜具有较高的

吸收 Cd^{2+} 的能力, 这可能同根部 $IRT1$ 基因的高表达有关^[19]。拟南芥中 $IRT1$ 在对 Fe^{3+} 的吸收过程中是必需的, 同时它也能促进植物体高亲和性的对 Cd^{2+} 的吸收^[20, 21]。

1.2 重金属离子的转运

重金属离子在根茎间转运的显著增强, 是植物富集重金属的另一个主要原因。高效的根茎转运可以降低金属离子在根部液泡中的聚集, 将其多数定位于木质部组织中从而提高植株对重金属的耐受及富集能力^[22]。通过根部原生质层的膜转运蛋白实现从根部原生质体到木质部导管的转运, 是重金属离子从根部迁移到茎的首要过程。这方面的研究进展较为缓慢, 对Ni 超富集植物*Alyssum lesbiacum* 的研究表明, Ni^{2+} 胁迫下植物体木质部中组胺酸的浓度大量提高, 木质部中的金属离子同组胺酸形成复合物, 在降低 Ni^{2+} 毒性的同时也促进了根对 Ni^{2+} 的转运^[23]。这可以解释*A. lesbiacum* 根部对 Ni^{2+} 的高耐受能力及高效的根茎之间的转运。

1.3 螯合和区室化

如前所述, 植物体内有机酸、尼克酰胺及富含巯基的多肽等有机小分子可以同重金属离子螯合来抑制它们的生物学活性。通过特定的转运蛋白, 这些复合物可以从木质部的导管运输到叶肉细胞。一旦进入叶肉质体 (leaf symplast) 中, 重金属离子可以被固定在特定的组织或细胞器中, 从而对正常的细胞新陈代谢形成最低伤害。组织水平上, 重金属离子可以在叶表皮层或叶毛的等部位上富集^[24, 25]; 在细胞水平, 重金属离子则主要富集在液泡和细胞壁。研究者分别从 *T. caerulescens*^[26] 及 *Thlaspi goeingense*^[27] 中找到定位于液泡上的转运蛋白 ZTP1 和 TgMTP, 这些转运蛋白属于阳离子输出蛋白家族 (cationefflux, CE)。ZTP1 基因与从拟南芥中克隆的 ZAT 基因同源, 后者在拟南芥中过量表达可以提高 Zn^{2+} 在液泡中的聚集, 增强植株对 Zn^{2+} 的耐受能力^[28]; TgMTP1 在缺失 CE 家族蛋白的酵母突变株 *cot1⁻ zrc1⁻* 中异源表达可以明显地抑制突变酵母对 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Co^{2+} 的敏感性。除了将重金属离子区室化以降低其毒性外, 对于 Se、Hg 等某些植物还可以将其转化成可挥发的气态排除植物体。例如, 通过同化作用, Se 同 Cys 或 Met 结合由无机离子变成有机化合物进而被甲基化形成二甲基硒醚 (dimethylselenide, DMSe) 而挥发^[29]。

2 超富集植物特点及植物修复

超富集植物在相同环境条件下,同普通植物相比其对金属离子的吸收能力高100倍甚至更高^[8]。自1977年Brooks 等在意大利发现能够富集Ni 的超富集植物 *Alyssum bertoloni* 以来,已陆续发现超过400种可以富集各种重金属的植物。在我国也已经发现了一些超富集植物,例如As 的超富集植物蜈蚣草^[30] (*Pteris vittata* L) 及最近发现的Cd 超富集植物宝山堇菜^[31],其地上部份对Cd²⁺ 的富集能力可达1168 mg/kg。目前发现能被植物富集的重金属包括As、Co、Cu、Mn、Ni、Pb、Se 及Zn 等^[8]。即使外部环境中金属离子浓度极低,超富集植物对重金属的富集能力也能达到干重的0.1-1%,它们在植物干重中的浓度往往是土壤中浓度的100倍以上。多数情况下,重金属离子浓度在叶根中的比大于1,这有效的说明超富集植物具有高效的根茎转运机制^[7]。这些超富集植物似乎可以作为对土壤中污染的金属进行植物萃取的理想载体,但是这些植物往往具有较低的生物量。最显著例子是Zn/Cd 超富集植物 *Thlaspi caerulescens*,其地上部分的干重只有2-5 t/hm²,以它作为植物修复的材料效率极低^[32]。值得一提的是最近新发现的As 超富集植物 *P. vittata* 在合适的气候条件下具有相当可观的生物量^[33],可能作为理想的载体用于对As 污染土壤进行植物修复。除了生物量低外,生长缓慢也是制约自然的超富集植物用于植物修复的一个重要因素;而且植物对重金属的富集跟耐受能力并非一致的,某些超富集植物在轻微或中度污染的土壤中可正常生长,但是一旦移植到重度污染的土壤中往往无法正常生长。因此,为了能使植物修复具有更大的实际应用价值,必须选择既有高生物量、生长迅速,又具有超富集植物的优良性能的品种。这方面,已有研究者将转基因技术应用于植物修复的研究。

3 植物修复中的转基因技术

目前,越来越多的与重金属吸收、转运及代谢相关的基因从植物、微生物或者动物中陆续得到克隆并应用到合适的植物载体中。例如,从细菌中分离的促进汞挥发的汞离子还原酶基因 *merA*、有机汞裂解酶基因 *merB* 被克隆到拟南芥、烟草及白杨等植物中^[34,35];来源于酵母的 *YCF1* 基因编码ABC 型转运蛋白,可将共价结合Cd²⁺转运至液泡,将此基因转入拟南芥可显著提高拟南芥对Cd²⁺ 的耐性及富集能力^[36];此外金属硫蛋白基因 *MT*、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *gsh1*、谷胱甘肽合成酶基因 *gsh2* 等同重金属整合、转运相关的基因也被分离并在异源植

物中表达。研究者将这些基因转入相应的植物中获得的转基因植物表现出或多或少的重金属耐受性和富集能力（表1）。

表 1 转入植物中的基因及转基因植物茎对金属的富集能力
Table.1 Altered metal tolerance/uptake in transgenic plants

基因	产物/功能	来源	受体植物	表达情况	最高效果 ^a	培养介质
<i>arsC</i>	砷还原酶	大肠杆菌	烟草	芽	Cd, 1.4 倍	培养液
<i>arsC</i> 及 <i>γ-ECS</i>	砷还原酶 γ -EC 合成酶	大肠杆菌	拟南芥	芽或组成性 表达	As, 3 倍	琼脂
<i>SMTA</i>	硒代半胱氨酸 甲基转移酶	<i>A. bisulcatus</i>	拟南芥	组成性表达	Se, 8 倍	改良土壤
<i>SMTA</i>	硒代半胱氨酸 甲基转移酶	<i>A. bisulcatus</i>	芥菜	组成性表达	^b Se, 5 倍 ^c 挥发	琼脂 沙
<i>YCF1</i>	GSH 衍生物在 液泡中隔离	酿酒酵母	拟南芥	组成性表达	Pb, 1.4 倍 Cd, 1.5 倍	砂砾或培养液
<i>HMA4</i>	细胞内金属转运	拟南芥	拟南芥	组成性表达	^d Zn, 2 倍 Cd, 1.4 倍	培养液

注：^a“最高效果”是指同未转基因的对照植物相比，转基因植物芽干重所含的金属的最高增加浓度；^b整株植株的增加量；^cSe 以 MeSe-SeMe 形式挥发；^d数据来源于单一转基因植株。

4 植物螯合肽及其在植物修复中的作用

植物螯合肽（phytochelatins, PCs）是长链GSH 衍生物，其通式为 $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Xaa}$ 其中n可达11但多数为2-5^[37]。1984年，Kondo 等首先从裂殖酵母中分离得到PCs^[38]。目前普遍认为PCs 能够同重金属离子螯合形成稳定的共价物并通过液泡上的转运蛋白转运到液泡中进而达到隔离重金属的目的。在*S. pombe* 中发现由*hmt1* 基因编码的一个ABC 转运蛋白能够将Cd-PC（或类PCs）复合物从细胞质转运到液泡中^[39,40]。

4.1 植物螯合肽的结构

PCs 在生物体中广泛存在，根据多肽链C 端氨基酸的组成主要可以分为标准PCs、类PCs [(PC)(β -Ala)]、羟甲基PCs [(PC)(Ser)]、异PCs [PC(Glu)]及无Gly 残基的PCs [des(Gly)PC]五类，它们多肽链C 端在 γ -Glu-Cys 后分别为Gly、 β -Ala、Ser、Glu 或无氨基酸残基^[41]。除了标准PCs 及可能存在的缺少Gly 残基的PCs 两类螯合肽普遍存在外，其余各类PCs 的分布及含量有着显著的物种特异性^[42]。

4.2 植物螯合肽的合成

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库