

学校编码: 10384

分类号: _____

密级: _____

学 号: 9726003

UDC _____

学位论文

卡特利亚兰遗传转化研究

韩冬丽

指导教师 杨汉金 教授、夏宁邵 副研究员(厦门大学生物系)

申请学位级别: 硕 士 专业名称: 植 物 学

论文提交日期: 2000 年 7 月 论文答辩日期: 2000 年 7 月

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学 2000 年 7 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2000 年 7 月 日

摘 要

本实验以卡特利亚兰为材料, 通过农杆菌介导法和基因枪法转化效果的比较, 确定以转化结果比较稳定的农杆菌介导法作为转化方法, 同时优化各种转化条件, 建立了卡特利亚兰遗传转化体系, 获得了再生植株。

以 35s 为真核表达启动子构建了两个植物双元表达载体 p1301BG 和 p1301B Ω G。这 2 个载体均以 Tnos 为报告基因和目的基因的终止子, 植物筛选标记基因以 35s PolyA 加尾, 融合成嵌合基因。其中 p1301BG 含有增强型绿色荧光蛋白基因 egfp, p1301B Ω G 在 egfp 与 35s 启动子之间插入 65bp 的增强子序列 Ω 因子。用直接法将这 2 个质粒导入农杆菌 EHA105、LBA4404 和 AGL1。

不同农杆菌株对卡特利亚兰的侵染力不同, 3 种菌株中以农杆菌 EHA105 的侵染力最强。选取液体培养的卡特利亚兰圆球茎做为受体材料, 在转化条件的优化上, 采用液体震荡的共培养方式, 在共培养基中加入 100 μ m/L 的 AS, 真空处理 6 次, 大大提高了 GUS 瞬时表达率。在进行抗生素基础抗性测定和转化体筛选时, 选择卡特利亚兰敏感的潮霉素(HYG)为抗性筛选剂, 筛选具有潮霉素抗性的抗性圆球茎, 并诱导成苗。GUS 表达的检测证明外源基因已经导入卡特利亚兰植株。用 egfp 双引物扩增卡特利亚兰基因组总 DNA, 得到与目的基因大小一致的特异性片段。再以 egfp 探针进行 Southern 点杂交和 PCR-Southern 杂交, 进一步证实了 GFP 基因已整合到卡特利亚兰基因组中。激光共聚焦显微镜观察转基因植株的 GFP 荧光, 发现在叶脉和表皮细胞的气孔内壁都发出比较强的 GFP 绿色荧光。

本文对卡特利亚兰遗传转化系统的建立和优化做了初步的探讨, 希望有助于以后的花卉基因工程操作。

关键词: 卡特利亚兰 遗传转化

I

Studies on Genetic Transformation of Cattleya Abstract

Agrobacterium-mediated transformation and gunpowder (ZHFQ-2) transformation of Cattleya were studied in this experiment. The contrast results demonstrated the results mediated by Agrobacterium were stable. The transformation system of Cattleya was established

by discussing the most optimal transformation conditions and the best transformation explants, and the transgenic plantlet was obtained.

Two plant expression plasmids were constructed for transformation (P1301BG and p1301B Ω G). The two plasmids, the CaMV35s promoter and nos terminator fragments were syncretized with reporter gene and targeted gene. The selectable marker gene terminated by polyA fragment for transformation of plants was hygromycin. Phosphotransferase gene that allows selection with hygromycin. And the selectable marker gene for plasmids was neomycin phosphotransferase gene, which allows selection with kanamycin. P1301BG was constructed for expressing green fluorescent protein gene (egfp), p1301B Ω G was for enhanced expression of egfp, by inserting a 65bp enhancer (Ω) between 35s promoter and gene egfp. Agrobacterium strains LBA4404, EHA105 and AGL1 cells were transformed by the direct method with plasmids mentioned above prepared from Escherichia coli clones.

There were different rates of infection of Cattleya with different Agrobacterium strains. Among the three strains (LBA4404, EHA105 and AGL1), the invasiveness of the strain EHA105 was the highest. Hyg was chosen as selection pressure. We chose the ballstem of Cattleya as transformation material. On the optimization of the transformations of Cattleya, we adopted swirling co-cultivating and appended 100 μ M AS in the co-cultivating media. Besides, we vacuumized the material six times in the co-cultivating solution. Compared with the routine method, the GUS transient expression activity was highly enhanced.

The results of GUS expression activity showed that the foreign genes were integrated randomly into Cattleya genome. A same size fragment as gene egfp was amplified by PCR with total genome DNA as template using two primers, which showed that the targeted gene egfp was inserted into Cattleya genome too. Southern blotting hybridization and PCR-Southern hybridization analysis of transformants indicated that the foreign gene had been integrated into the genome of Cattleya. Bright green fluorescence was observed when transformants were excited with the blue light in OCLC. Most of

them shone green fluorescence at bundle and air pore, epiderm or tomentum.

In this study, we have primary study on establishment and optimize of the efficient transgenic system of Cattleya. And I hope that would be beneficial to the development of flower transgenic engineering.

Key words : Cattleya Genetic transformation

II

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
引言.....	1
一 植物遗传转化研究现状.....	2
1 抗除草剂基因工程.....	3
2 抗病虫害基因工程.....	4
3 抗逆基因工程.....	5
4 品种改良基因工程.....	6
5 调控植物激素和生长发育的基因工程.....	7
6 调节植物次生代谢或植物医药基因工程.....	7
二 花卉基因工程的研究进展.....	8
三 卡特利亚兰遗传转化研究的的意义.....	12
1 目的基因绿色荧光蛋白基因gfp的研究现状.....	12
2 卡特利亚兰遗传转化研究的的意义.....	15
四 影响单子叶植物农杆菌法遗传转化的因素分析.....	16
五 转基因植物生物安全性的评价.....	23
材料与方法.....	25
一 材料.....	25
二 方法.....	29

结果与分析	36
一 卡特利亚兰组织培养再生系统的优化	36
二 转化方法的确定	38
三 植物表达载体的构建和鉴定	41
四 基础抗性的测定和筛选剂的选择	43
五 农杆菌转化条件的优化	44
5.1 受体材料的选择及优化	45
5.2 最佳培养基的确立	45
5.3 三种菌株对卡特利亚兰的侵染性比较	47
5.4 不同转化条件下农杆菌侵染卡特利亚兰效率的比较	48
六 转化体的筛选	50
七 转基因植株外源基因检测的结果	52
7.1 转基因植株外源基因整合检测的结果	52
7.1.1 目的基因PCR检测结果	53
7.1.2 基因组DNA杂交检测结果	53
7.2 转基因植株外源基因表达检测的结果	55
7.2.1 转化体的报告基因GUS的检测结果	55
7.2.2 绿色荧光蛋白GFP的显微镜检测结果	55
讨论	56
一 影响卡特利亚兰农杆菌法遗传转化因素的分析及今后的改进	56
二 GFP在转基因植株中的表达及前景展望	64
参考文献	69
致谢	79

引 言

植物基因工程研究自 1984 年首例转基因植株问世以来, 对它的研究与应用蓬勃发展, 被认为是 21 世纪农业的希望, 是生物科技革命的重要组成部分。迄今为止, 全世界已分离目的基因 100 多个, 获得转基因植物近 200 种, 我国科学家已获得 50 多种作物的转基因植株。其中大多是一些主要的农作物和蔬菜, 另外果树、花卉和牧草植物也均有转基因成功的报道。这些表明植物遗传转化已经逐渐成为改良作物品种, 探讨植物生长发育机理的核心工具, 并在农业生产实际应用领域有着广泛而诱人的前景。

植物基因转化的成功很大程度上依赖于一个良好的转化系统, 才能有效地把外源基因导入受体细胞, 得到预期的表达效果。对大多数双子叶植物种来说, 基因转移和植株再生的问题都已得到了解决。而对于单子叶植物来说, 除了世界上最重要的三大粮食作物水稻、玉米和小麦已基本解决转化和植株再生的问题以外, 其它大多数单子叶植物的转化和再生仍然是限制植物遗传转化这一技术应用的重要因素。迄今为止已建立了十一种转化方法, 以转化系统的原理分类, 可分为三种转化系统, 即种质转化系统、直接转化系统和载体转化系统。其中, 农杆菌质粒载体转化系统是双子叶植物最理想的转化方法, 但是其最大的缺点是农杆菌对单子叶植物不敏感, 限制了它的应用范围。PEG 法、电击法、微注射法的最大优点是无宿主范围, 但是大多数植物的原生质体培养和再生技术仍然很困难, 重复性差, 因此它们不是单子叶植物理想的转化系统。基因枪法是近年迅速发展的转化技术, 它克服了以原生质体为受体的缺点, 可适用于任何受体材料。但是该技术目前还很不成熟, 外源 DNA 整合的机理、拷贝数、遗传稳定性及整合外源 DNA 结构变化等都还不清楚, 尚待完善和深入研究。近年来提出的种质转化, 以生物体自身的细胞为载体进行转化, 其受体细胞可直接是具有全能性的卵细胞或受精卵细胞, 避开了组织培养和植株再生的困难。对于那些生殖系统发达的植物来说, 是一条最为简捷和理想的转化方法, 但不适用于有性生殖系统不发达的植物。综上所述, 转化系统各有所长, 单子叶植物也各有其自身的特性, 应该根据受体植物的特点选择合适的转化方法, 并进一步优化转化条件, 才能建立起一个良好的转化系统。

卡特利亚兰 (*Cattleya*) 属单子叶植物兰科, 是热带兰中的珍品, 也是优良的悬挂花卉。本课题研究是以卡特利亚兰的圆球茎和幼嫩的顶芽等为转化受体材料, 通过基因枪、农杆菌及基因枪结合农杆菌等不同的基因转化方法, 将报告基因 *gus* 及绿色荧光蛋白基因 *gfp* 导入卡特利亚兰的基因组中, 获得表达外源基因 *gus* 和 *gfp* 的转基因植株。通过检测 GUS 和 GFP 的表达情况来研究外源基因在转基因植株中的整合及表达情况, 探讨外源基因在转基因植株中的表达模式。同时, 通过比较各种转化方法, 优化转化条件建立一个比较成熟实用的卡特利亚兰基因

操作系统。为插入其它改造花品质的基因建立一个比较完善的转化表达模式，从而达到改善卡特利亚兰花品质，提高其观赏价值的目的。也可以为改造其它花的品质的遗传转化提供一些经验，同时从理论及应用上进一步探讨单子叶植物遗传转化中存在的问题及解决方法。

一、植物遗传转化的研究进展

从 1984 年第一例转基因植物(烟草)问世以来(De Block M,1984;Horsch R.B,1984;Pasikowski J,1984)，植物遗传转化研究得到了迅速发展。据统计，从获得第一株转基因植物到现在不到 20 年的时间内，已经有 140 多种植物，包括烟草、矮牵牛、胡萝卜、向日葵、荷花、黄瓜、大豆等植物相继被转化，内容涉及到植物的抗病、抗虫、抗除草剂和作物的高产、果蔬的储藏、药物生产及环境美化等方面(朱玉贤, 1999)。其中一些具有重大经济价值的转基因植物已进入大田实验和生产。

截止到 1997 年底，全球 45 个国家对大约 60 种作物的 10 类性状进行了田间试验，其中 15000 个田间试验是在前 10 年进行的，10000 个是在 1996-1997 进行的，占总数的 40%。第一个被批准进行商业化生产的植物遗传工程产品是美国 Calgene 公司于 1992 年 (Mason H.S,1992) 开发的延熟番茄 Flavor-Savr™。到 1997 年底，全球已有 12 种作物的 48 种转基因作物产品获准进行商品生产，转基因作物的种植面积已达到 1280 万 hm^2 ，其中美国即达 670 万 hm^2 。种植的 5 种主要的转基因作物分别是：水稻、大豆、玉米、油菜和马铃薯。主要的转基因性状为：抗除草剂和抗虫，二者之和占 99%。1996 年美国有 5600 个农户种植了 73 万公顷转基因抗虫棉花，70% 的农户没有喷药，其余农户也仅喷药一次，而非转基因抗虫棉品种需喷药 4~6 次，由此共节省农药 25 万加仑，平均增产 7%，共增加纯利 6000 万美元，而且减少了环境污染。据预测，在未来 10 年转基因作物的产量可能增加 10%~25%，将为全球的食品安全、食品营养和保健，以及多功能饲料的开发和生产作出重大贡献。我国植物转基因研究虽然起步较晚，但已逐步跟上世界先进水平，目前研究集中在一些主要农作物的基因改良方面。据统计，我国科学家已获得 50 多种作物的转基因植株，涉及到 100 多种外源基因。1998 年审批通过 39 例转基因产品的环境释放，其中 2 例已进入商品生产(刘信, 李宁,1999)。下面主要从以下几个方面综述植物基因工程的研究进展。

1. 抗除草剂基因工程研究

化学除草剂在现代农业中起着十分重要的作用，除草剂的年产量和销售量已跃居农药之首。作为一个理想的除草剂，必须具有高效、广谱的杀草能力，而且对作物及人畜无害，在土壤中残留期短。由于目前开发一种新除草剂的成本越来越高，因此寻求基因工程技术来提高除草剂的选择性及对作物的安全性，无疑具有重要的意义。在进行抗除草剂基因工程研究中，有两种策略：

①修饰除草剂作用的靶蛋白，使其对除草剂不敏感，或促其过量表达以使植物吸收除草剂后仍能进行正常代谢。利用这一原理成功的例子有抗草甘磷、磺酰脲类等除草剂的转基因作物。如：草甘磷专一性抑制芳香族氨基酸生物合成途径中的 EPSPS 酶(烯醇式丙酮酰莽草酸-3 磷酸合成酶)。矮牵牛中的编码突变 EPSPS 的基因被克隆，被转入多种植物中而且赋予它们草甘磷抗性。其中，烟草的转基因植株在喷洒 Roundup $3.6/m^2$ 的情况下没有受到伤害，并能正常开花结籽。Calgene 公司将草甘磷的耐性基因命名为“Glyphotol”；在 1985 年申请了专利。②引入酶或酶系统，在除草剂发生作用前将其降解或解毒。如 Stalker 等从土壤细菌 *Klebsiella ozaenae* 中分离出溴苯氰的降解基因，该基因编码氰水解酶。他们把该基因导入烟草后，使烟草获得了高水平的溴苯氰抗性。至今抗除草剂大豆已在美国和阿根廷大面积推广，抗除草剂的“canola”油菜在加拿大也已进入商品化生产。抗除草剂转基因作物的种植面积，已从 1996 年的 60 万 hm^2 增加到 1997 年的 690 hm^2 ，占有转基因作物种植面积的 54%，跃居首位(James C, 1997)。

2. 抗病虫害基因工程

植物病害和虫害常使农业生产受到严重损失，农作物产量损失的三分之一可归因于病害，而植物虫害也使世界每年大约损失数亿美元。基因工程的发展为培育抗病虫害的作物品种提供了新的手段，开辟了植物抗病虫害育种的新时代。自 1986 年 Powell Abel 等人首次将烟草花叶病毒的外壳基因导入烟草并获得抗烟草花叶病毒的烟草植株以来，植物抗病虫害基因工程取得了较大的进展。目前使用的抗病虫害基因有十余种，根据来源可以分为三类，一是从微生物中分离出的基因，如 Bt 杀虫结晶蛋白基因；二是从植物组织分离出的基因，如麦胚凝集素基因、雪花莲外源凝集素基因、 α -淀粉酶抑制物基因等。三是来源于动物的基因，如杀菌肽基因等。根据这些基因的作用功能和作用对象，也可分为三类：即抗虫基因、抗病毒基因、抗真菌和细菌基因。

在抗虫基因工程方面，Bt 制剂长期以来用于多种虫害的防治。自从将 Bt 毒蛋白基因导入烟草和番茄，表达后表现出抗虫特性以来(Vaeck M, 1987; Barton K.A, 1987)，国内外在这方面开展了许多工作，并相继获得了抗虫转基因玉米、马铃薯、甘蓝、棉花、杨树等。除了 Bt 毒蛋白以外，人们也在探索其它的途径，至今比较成功的是利用植物的蛋白酶抑制剂。这些蛋白酶抑制物广泛存在于豆科和茄科植物中，在番茄和马铃薯中，受机械损伤诱导后其含量可增加到占可溶蛋白的 2%-5%，在马铃薯中甚至高达 10%。它们能抑制昆虫消化系统中的蛋白酶，从而抑制蛋白质的降解，导致昆虫消化不良而影响其发育，甚至死亡。Johnson 等将编码番茄蛋白酶抑制物 I 和 II 及马铃薯的蛋白酶抑制物 II 的基因导入烟草中，结果表明，转化植物的叶抽提物明显表现出对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶的抑

制作用。此外，一些昆虫毒素(蝎子神经毒素、蜘蛛杀虫肽)基因也已被用于基因工程，如将蜘蛛杀虫肽基因导入烟草，转基因烟草表现出对棉铃虫有较强的抗性。

转 Bt 毒蛋白的抗虫棉花和玉米已在美国大面积推广，抗马铃薯甲虫的马铃薯也在推广之中。1997 年全球抗虫转基因作物的种植面积已达到 400 万 hm^2 ，比 1996 年增加了 3.8 倍，占转基因作物种植面积的 31%，仅次于抗除草剂的转基因作物的种植面积(Powell, Abell P, 1986)。我国在 1992 年完成 Bt 毒蛋白基因的全人工合成，1993 年起先后将 Bt 毒蛋白基因、CpTI 基因、慈姑蛋白酶抑制物基因用土壤农杆菌法和花粉管通道法导入多个棉花主栽品种，至今已获得一批抗虫性好的抗虫棉花品系，抗虫能力达 80%-95%，1997 年示范面积已达 670 hm^2 。

在抗病基因工程方面，黄瓜花叶病毒、马铃薯 X 病毒、木瓜环斑病毒等 20 多种病毒的外壳蛋白基因已导入植物，获得了具有相对病毒抗性的植株。除此之外，利用转移病毒的反义 RNA 或卫星 RNA 基因来提高植物的抗病毒能力，也获得了不同程度的成功。近年来，国内外一些实验室利用病毒复制酶基因、核酶基因等摸索一些新的抗病毒基因工程的途径，也已获得了成功(叶寅, 1996)。在使作物增强对细菌病和真菌病的抗性方面，基本还处于实验室阶段。目前研究集中在几丁质酶基因、 β -1,3-葡聚糖、渗调蛋白、蝗虫 α -淀粉酶抑制物等蛋白对真菌的抗性上。

3. 抗逆基因工程研究

植物对逆境的抗性一直是生物学家关心的问题，逆境包括干旱、盐碱、冻害及重金属毒害等等。在抗逆基因工程方面主要在以下三个方面开展：①一些小分子化合物(如脯氨酸、甜菜碱、葡萄糖等)与植物忍受环境渗透胁迫的能力有关，因此可以将与脯氨酸或甜菜碱合成有关的酶的基因克隆后转入植物，期望能提高作物对干旱和盐碱胁迫的抗性。中科院遗传研究所陈受宜等已将山菠菜的甜菜碱醛脱氢酶基因导入烟草、草莓和水稻，明显提高了转基因植物的耐盐性(陈受宜, 1996; Chen S.Y, 1996)。②通过改变膜脂成分以维持低温条件下膜的流动性，这对植物的耐寒性有重要意义。Murata 等通过向烟草导入拟南芥叶绿体的甘油-3-磷酸乙酰转移酶基因，以调节叶绿体脂膜的不饱和度，使获得的转基因烟草抗寒性增加。③植物经受环境胁迫过程中产生的损伤，在很大程度上与过量产生活性氧(如超氧离子、 H_2O_2 、 $\text{OH}\cdot$)有关。植物中通常含有相当高浓度的抗氧化物(如抗坏血酸、谷胱甘肽、类胡萝卜素等)，近年来，人们已试图通过基因工程技术来调控植物体内与抗过氧化物形成有关的酶类的活性，以提高作物的抗性。在转基因苜蓿中，增加叶绿体中的 MnSOD 活性，结果使之在冷冻处理后比对照组更为迅速地恢复生长。

4. 品质改良基因工程研究

作物的高产、优质一直是人们追求的目标。近年来随着对植物各种生理生化

过程分子基础研究的深入,人们试图利用基因工程技术来调控植物的生长发育和代谢过程,以达到改良作物的目的。在这方面已取得了重要的进展,主要涉及以下四个方面:①在蛋白质的改良方面,由于特定的作物种子往往缺少某几种必需氨基酸,通过基因工程改变蛋白质的必需氨基酸的组成,从而改善植物的营养价值,这在模式植物中已获得令人鼓舞的效果。例如,将巴西坚果(Brazil nut)的富含甲硫氨酸的 2S 清蛋白基因转入烟草,在菜豆种子的储藏蛋白菜豆蛋白基因的启动子的驱动下,表达的蛋白质中 18%的氨基酸为甲硫氨酸,在转基因烟草的种子蛋白质中甲硫氨酸的含量增加了 30%(Altenbach S.B,1989)。在这类实验中,必需考虑导入的基因在特定器官中表达后,能否使表达产物保持一定的空间结构以维持稳定,累积到一定的量。此外,在增加幅度很大时,也还会受必需氨基酸库容大小及相应的 tRNA 量的限制。而在种子中表达时,特别在籽粒型豆科植物中,由于种子含有多种不同的储藏蛋白,所以也必需考虑导入的外源基因的表达产物,能否在整个种子的储藏蛋白中占一定的份额。②在调控植物的淀粉及其它多糖化合物方面,人们关心的是在种子或贮藏器官中积累的淀粉或其它多糖类物质的种类和含量。在光合碳代谢中积累的大量酶学方面的知识,以及光合碳代谢和光合产物运输过程中不少关键酶和蛋白质基因的克隆,已驱使人们开始这方面的工作。通过对碳代谢过程中有关酶的基因的调节,将可能有效的调控一些重要糖类物质的合成和积累。③在改变油料作物油脂的组成方面,从食物消费角度考虑,改良植物脂肪酸组成的策略有两个:①增加不饱和脂肪酸含量;抑制硬脂酰 ACP 脱饱和酶活性的一个有效办法就是在植物体中表达硬脂酰 ACP 脱饱和酶的反义 mRNA。②减少饱和脂肪酸含量。③提高作物产量。目前提高作物产量的基因工程的主要设想是改造光合代谢过程。包括向 C3 植物导入 C4 型 PEPCase 基因;提高 Rubisco 的羧化系数;提高磷酸蔗糖合成酶及淀粉合成酶的活性。此外,不少研究者在研究与光合电子传递有关的叶绿体类囊体膜的一些组分的结构和功能,以及其基因表达的调控,这方面的研究将使人们构思出新的思路,最终提高光合作用的效率。

5. 调控植物激素和生长发育的基因工程研究

由于植物的不少变态器官(如块茎、块根、球茎、鳞茎、花球)等的形成均受植物激素的调控,通过对这类激素基因的遗传操作,有可能获得生长习性、株型等性状改变的植物。此外,克隆催化乙烯生物合成中的关键酶的基因,构建它们的反义 RNA 基因,导入番茄后,抑制果实中乙烯的合成,从而延迟成熟。这可以应用到其它作物、果树及园艺作物上。由于乙烯的生理功能涉及诸如性别分化、切花保鲜、逆境反应等许多方面,因此通过基因工程技术调控乙烯的生物合成有可能更有效的控制这些生理过程。对植物生殖生长过程的有效调控,在作物的生产及园艺上十分重要。新近最为成功的是利用基因工程产生新的雄性不育系。在

花药发育过程中，绒毡层对小孢子的正常发育具有重要作用。目前为止，已由未成熟花药获得一些在绒毡层细胞中专一表达的基因克隆。从这类基因获得的绒毡层专一的启动子，与核酸酶基因构成融合基因，导入植物后，由于外源的核酸酶基因在绒毡层中专一表达，致使绒毡层细胞败育，花粉发育不正常，表现为雄性不育。在花形成的发育生物学和分子生物学方面的大量研究，也终将使人们在调控花的形成和发育方面迈进一大步。在金鱼草和拟南芥中对控制花发育的多种同源异型基因的分离克隆，可望控制四种花器官的发育。此外，花青素生物合成途径中几乎所有的基因，包括一些调节基因均已分离。通过对这类基因的遗传操作，可以改变花的色素合成和积累，这在园艺上有重要意义。

6. 调节植物次生代谢或植物医药基因工程研究

植物的很多次生代谢产物被广泛用于生产药物、化妆品、食品添加剂等，但在天然植物中它们的含量通常都很低。在研究清楚次生代谢途径的前提下，导入在正常植物中该代谢途径限速酶的基因或有关的具调节功能的基因，有可能提高植物特定次生代谢物的产量，已有一些结果证明这些是可行的。比如：在表达细菌 *ubiC* 基因的转基因烟草中，4-羟基苯甲酸葡糖苷的含量增加了 1mg 的色胺。在这方面引人注目的是有关萜类化合物代谢的酶的基因的克隆。萜类合成酶处于代谢的分支点上，起主要的调控作用，是萜类生物合成的关键酶。此酶的 cDNA 已为我国学者克隆 (Chen X.Y, 1996)

聚 β -羟基丁酸 (PHB) 是多种细菌在环境胁迫下产生的一种贮能物质。PHB 具有热塑塑料及合成橡胶的特性，而且多种微生物都可将它降解为对环境无害的产物，所以它作为一种生物可降解塑料受到人们的关注。乙酰辅酶 A 是细菌中 PHB 合成以及植物中贮存油脂生物合成的前体。将从细菌中克隆的 PHB 和 PHC (分别编码依赖 NADPH 的乙酰辅酶 A 还原酶和 PHB 合成酶) 基因导入拟南芥，已发现在转基因植物中可产生 PHB。新近，将 PHB 合成酶基因在 35S 启动子的启动下导入棉花后，表达的结果表明形成的棉纤维中含有 PHB，这使纤维的绝热性比野生型增强。

转基因植物作为一种整体表达系统，也可望用于生产具有重要经济价值的重组蛋白质，如各种抗体、神经肽、血液因子、疫苗等生物活性肽。国内外一些实验室也正在利用重组的植物病毒 (如 TMV, CMV 等) 感染植物，以产生大量有医用价值的蛋白质。在烟草上的实验表明，每克组织的重组蛋白质产量可达 1mg 水平。

二、花卉基因工程的研究进展

随着经济的快速发展，人们对花卉的需求日益增加，使那些具有优良品质特性的高档奇花奇卉具有广阔的市场前景。但是，要占领国际花卉市场，必须尽快培育更新颖、更美丽、品质优异的花卉。蓬勃发展的生物技术为花卉品质的基础研究和改良以及花卉育种带来了全新的思路和途径。近十年来，花卉基因工程操

作的进展日益加快,很可能给花卉业带来革命性的影响。已经开展了目的基因的分离和鉴定,基因对性状的控制研究,组织培养、转化体系的建立等基础性的工作,在有些方面已取得较大突破(Zucker A,1995;Luo D,1996;Orzaez D,1997)。1995年,可以长久保存的花卉香石竹在澳大利亚获准上市,成为至今世界上唯一允许上市的转基因切花。

观赏花卉品质特性的具体涵义通常包括花形、花色、花姿、花香、花的大小、质地以及观赏寿命等(何生根,1997)。利用基因工程技术修饰花卉品质性状的一个常用方法是反义 RNA 抑制法(Hamilton AJ,1990;Ecker J.R,1986)。即首先明确决定品质性状的特异生物物质,然后分析该生物物质的代谢途径中各反应步骤的酶,克隆到编码这些酶的基因,反向转入到目的植物中,从而抑制目的植物中这些生物物质的合成。目前,反义 RNA 技术已广泛应用到了花色修饰(Van der;Krol A.R,1990),延长花卉观赏保鲜期(Aanhane T,1995)等的研究中。另外,人们利用基本的组培和转化技术,在广泛的观赏花卉中建立了转化体系(余迪求,1996;Robinson K.E.P,1993)。

在花色基因工程中,至今,花青素生物合成途径中几乎所有的基因,包括一些调节基因(如玉米的 R 和 C1)均已得到分离。通过对这些基因的遗传操作,有可能改变花的色素合成和积累,从而改变花色。1987年, Meyer 等(Meyer P;Heidmann I,1987)首次将玉米二羟甲基黄酮醇还原酶(DFR)基因转入矮牵牛,使矮牵牛的花色发生了改变。目前主要是利用反义 RNA 技术对花色素合成途径中关键酶基因的表达进行抑制,从而达到修饰花色的目的。利用此技术已在矮牵牛和菊花等几种观赏花卉中进行了成功的花色修饰(Ecker J.R,1986;Van der;Krol A.R,1988)。Gutterson (Gutterson N.C,1994)等通过根癌农杆菌介导转化法将苯基乙烯酮合成酶(CHS)基因,以反义和正义方向分别导入粉红色的菊花中,结果都得到了浅红色和白色花,对照没有白色花。人们一直想得到蓝色花卉,Holton 等(Holton T.A,1993)在矮牵牛中克隆到两个编码 F3' 5' H 酶的基因 Hf1 和 Hf2,这两个基因的表达都能使花色素苷生物合成途径趋向产生蓝色的翠雀绿-3-葡糖苷,从而使花趋向于显蓝色。此外,液泡液的 pH 值和色素浓度对花色也有影响。较低 pH 值时花趋向显红色,较高 pH 值趋向显白色,pH 值接近 7 时则显蓝色。Chuck 等(Chuck G,1993)报道从矮牵牛中分离到一个能调控花卉 pH 值的基因 PH6。Holton 等(Holton T.A,1993)又报道从矮牵牛中克隆并表达了辅色素黄酮醇合成酶基因 F1,增加这种辅色素通常也会使花显蓝色,因此培育珍稀的蓝色花卉是很有希望的。目前,花色基因工程的重点在以花色育种为目标的非洲菊、月季等商品花卉的基因操作上,主要集中在对黄酮类色素基因的修饰,包括花色素浓度的修饰、新花色的引入及调节基因的修饰。就目前的研究来看,可望在花卉种类、色素种类及着色因素三个方面有较大的突破。花色

不仅与花色素有关，还受液泡 pH 值、金属离子、色素细胞的形状与分布等许多内外因素的影响，目前对这些影响因素的遗传修饰还很少。同时，胡萝卜素的基因工程的研究还没有见到报道，自砖红色矮牵牛的基因工程植株问世至今已近 10 年，尚未见到花色基因工程育成的植株进入花卉市场。

在延缓花卉衰老的基因工程方面，目前，花卉保鲜通常还是采用传统的方法，如加入乙烯抑制剂 AgNO_3 、STS 等作为保鲜剂，或者用低温冷藏、气调储运等方法。但这些方法都有一些缺陷，而且绝对多数保鲜剂都有毒性，对环境会造成污染。因此，开发能延缓衰老的转基因花卉是花卉保鲜技术的生长点。花卉的衰亡是一个复杂的生理过程，涉及到一系列生理生化变化，包括乙烯的生物合成，以及色素、有机酸等物质的变化。有关花卉衰亡的基因工程，主要集中在观赏价值和商品价值都很高的植物上。研究得比较成功的是围绕乙烯与花卉衰老及萎焉关系的分子生物学的研究。各种花卉对乙烯均有一定程度的敏感性，而一大批商品价值很高的观赏花卉对乙烯非常敏感，如香石竹、百合、满天星、卡特兰等等，甚至痕量的乙烯浓度也会对敏感花卉造成伤害。Florigene Australia 公司 (Aanhane T, 1995) 将 ACC 合成酶基因反向导入香石竹，转基因的香石竹比正常香石竹延长了 2 倍的观赏寿命。

有关观赏花卉的其它一些品质，如花的香味、大小、质地、花形、花姿等，涉及到的代谢物质极其多样，其代谢途径也非常复杂，因此这些品质基因的分离和基因工程操作目前基本还处于起步阶段。Pellegrineschi 等 (Pellegrineschi A, 1994) 用发根农杆菌转化柠檬天竺葵，发现转化植株中牻牛儿醇及其芳香族物质有显著提高，植物矮化，枝叶更繁茂。由此可能开拓出一条研究花香、花姿等品质性状基因工程的途径。通过花形态突变体已鉴定出控制花发育的同源异型基因，通过改变同源异型基因的表达方式，按人们需要设计新的花形状已成为可能。Luo (Luo D, 1996) 等克隆到一种控制花形状的基因 CYC，发现金鱼草中一对 CYC 和 DICH 基因对花形状的形成起关键作用，此类基因发挥作用时金鱼草的花就发育成不规则型，发生变异时金鱼草的花就发育成规则型。这一研究为揭示基因如何控制花器基本结构形成的分子机理提供了可参考的信息，同时还有可能用来培育形状独特的珍奇花卉。通过转基因技术抑制 AG 基因的表达，其雄蕊被花瓣取代，心皮被新的花替代，结果形成多重瓣花 (Coen E.S, 1991)，这为观赏园艺设计创造更丰富的重瓣花提供了发展前景。另外，通过抑制基因 AP1 的表达，花萼被叶片器官取代，还可以产生无花瓣的花。在金鱼草和拟南芥中对控制花发育的多种同源异型基因的分离克隆，已使人们在控制四种花器官的发育方面前进了一大步。同时，通过控制同源异型基因在花发育过程中的表达，也可以用来改变植物的花期。如花分生组织特征基因的超表达，就可以加快花发育，使花期提前。常花的形成需要分生组织特征基因 (如 LFY, AP1 等) 的表达。在 CaMV35S

启动子控制下，在转基因的拟南芥中使 LFY 基因表达，明显地加快花发育，花期提前，大多数侧生枝发育成花。将 LFY 基因与 35S 启动子的嵌合基因导入烟草和杂种杨后使这些植物提早开花。特别是杨树，通常 8—10 年后才开花，但转基因杨在经 6—7 月的营养生长后，即形成顶花以及单个的腋生雄花，说明通过导入 LFY 基因，有可能调控开花时间。同样通过控制基因 AP1 超表达，转基因拟南芥花期明显提早。CO 是成花的重要计时基因，其产物达到一定阈值时，明显促进成花。用转基因技术在拟南芥的 co 突变体中，导入有 35s 启动子、CO 基因及糖皮质激素基因，然后用鼠的糖皮质激素 DEX 处理这一转基因植物，即可诱导转入的 CO 基因的表达，产生糖皮质激素受体蛋白和 CO 蛋白嵌合蛋白。而 CO 的表达又可迅速诱导 LFY 和 TFL1 基因的转录，结果表现为：在不同的时间用 DEX 处理，可诱导转基因植物在不同的时间开花。

目前，已经在一些具有较高商品价值的观赏花卉如(月季、百合、天竺葵、龙胆属植物(Robinson K.E.P,1993)、金鱼草(余迪求,1996)、等植物中成功的建立了转化体系。花卉基因工程操作给培育更新颖美丽的品质优异的花卉带来了希望。

三、卡特利亚兰遗传转化研究的的目的和意义

1. 目的基因绿色荧光蛋白基因 gfp 的研究现状

(1). GFP 研究简史

1962 年 Shimomura 等人 (Shimomura O,1962) 阐述了水母 *Aequoreavictoria* 中一种发光蛋白 Aequorin 的提取、纯化和性质研究，指出它能在 Ca^{2+} 离子的调节下发光，认为它就是水母发光的原因。1971 年，Morin 和 Hasting(Morin J.G,1971)经研究后发现，Aequorin 发出的是蓝光，与水母发出的绿光在波长上有不容忽视的一段差距。他们推测水母的发光有一个能量转移的过程，即有一种未知的蛋白吸收了 Aequorin 发出的能量并转化为绿光的形式发出。1974 年，Morise 等人(Morise J.G,1974)再次研究了水母 *A.victoria* 发光的机制，终于发现了这种可产生绿色荧光的蛋白，并将其取名为 GFP。

随后一些学者(Shimomura O,1979;Ward W.W,1981;Ward W.W,1982)对 GFP 作了一些基础性质的研究。1992 年 Prasher 等人(Prasher D.C,1992)首次将野生型 GFP 基因克隆成功，并测出了 wt-GFP 的全序列。1994 年 Inouye 和 Tsuji(Inouye S,1994)首次将 GFP 在大肠杆菌中表达并得到有荧光活性的 GFP。

1994 年，Chalfie 等人(Chalfie M,1994)将 GFP 基因克隆到 *mec-7* 启动子下，转化至线虫 *C.elegans* 幼虫中，利用 *mec-7* 启动子表达的组织特异性，使 GFP 在神经系统中特异性表达。这是首次利用 GFP 作为报告基因的例子，

它启示 GFP 在示踪技术方面的应用前景，引起了生物学界各学者的广泛兴趣。此后，GFP 的应用研究相继不断。从 1994 年至今几年的时间里，GFP 的相关文献已有五百多篇，其异源表达的范围也扩展到微生物（酵母 (Cody C.W, 1993)、粘菌 (Atkins D, 1995) 等）、植物（拟南芥、玉米、烟草、水稻等）(Fey P, 1995; Sheen J, 1995) 和动物（线虫 (Chalfie M, 1994)、果蝇 (Wang S, 1994)、斑马鱼 (Amsterdam A, 1996)、小鼠、哺乳动物和人的培养细胞等)。

(2) . GFP 理化特性

GFP 全长 238 肽，分子量约为 27Kda，其晶体结构是 α 螺旋外包围着紧密的 β 折叠。是一个很稳定的蛋白质，耐热 ($T=70^{\circ}\text{C}$)、耐碱、去污剂、有机溶剂、蛋白酶等。

GFP 在长波紫外光下会发出绿色荧光，其第 64-69 位的六个氨基酸组成 GFP 的发色团结构，埋在 α 螺旋中。其中 65-67 的三个氨基酸能够形成一种独特的丝氨酸-脱氢酪氨酸-甘氨酸环化结构，这一结构使得 GFP 具有在氧化环境下较强的荧光性 (Shimomura O, 1979)。GFP 的最大吸收峰在 395nm 附近，在 470nm 附近还有一个次吸收峰，发出的绿色荧光的最大发射峰在 509nm，在 540nm 处还有一个肩峰。

(3) . GFP 的优点

1、GFP 发光不需要底物或辅助因子。

GFP 的荧光产生于 65-67 位氨基酸残基 Ser-Tyr-Gly 的脱氢环化 (Cody C.W, 1993)，它在活细胞中的检测只需要一定波长的光激发。

2、GFP 可以在各种异源细胞中表达。传统的荧光标记物中，多数在表达时需要特定的因子辅助折叠，或是在折叠后需要特别的修饰，因此都有种属特异性，异源表达时会失去荧光活性，并且一些报告基因对细胞毒性很大。而 GFP 荧光结构的形成是一个自催化过程，因此可以在多种异源细胞中表达。众多研究都已表明 GFP 的表达对细胞的功能和生长、分化没有明显干扰，只有在表达量很大时少数细胞的生长会有所减缓。

3、GFP 的性质稳定。GFP 在 450-490nm 的光照下很稳定，一些突变型 GFP 还可以克服在 340-390 或 395-440nm 光照下发生光漂白的缺点。除此之外，GFP 能耐酸碱、氧化剂、较强的变性剂及 65°C 的高温。

(4) . GFP 在植物研究中的应用

在植物遗传转化过程中，需要检测外源基因在受体细胞、组织或完整植株内是否表达，报告基因应运而生。例如荧光素酶 (LUX) 基因和 β 葡萄糖苷酶 (GUS) 基因，但这些检测方法并不理想。LUX 检测时需向试验材料中渗入荧光素，而且由于其基因产物会在过氧化物酶体中累积和荧光素能够在维管束中运输，所以在检测整株植物时，荧光产生部位不一定反映荧光素酶基因的特异表达部位。而用

GUS 进行组织化学分析时，需要昂贵的反应底物 X-Gluc。GFP 作为一种检测方法操作简单，结果真实可靠而又不需任何外源底物或辅助因子，有广泛的应用前景。

1、新型的报告基因

基因枪转化云杉花粉、大豆悬浮细胞和水稻胚性愈伤（许新萍等,1998）GFP 都得到不同程度的瞬间表达。Vain 等用基因枪方法转化水稻未成熟胚，通过愈伤组织再生得到转基因植株。在根部及暗中培养的黄化幼苗中都有明显的绿色荧光。因此 GFP 作为报告基因的作用将会越来越大。

2、用于植物亚细胞定位

GFP 分子量较小，它能和多种不同的蛋白质 N 端或 C 端融合而保持其天然蛋白的特性，是一种直观性很强的遗传标记物。通过与某些单一序列融合，可特异地进行细胞核、质体等细胞器的定位。避免了提纯蛋白，标记异硫氰基荧光素等荧光染料、显微注射等导入细胞的复杂方法，使研究亚细胞定位方法变的简单易行。

3、研究植物与微生物的关系

传统的研究方法中，一般用荧光染料标记病原菌，但是由于病原菌分裂增殖，使染料被稀释，所以很难看见病原菌感染活细胞的实时实态过程。GFP 的直观性观察可以检测到病原菌的增殖情况，在检测过程中省去抗体检测或原位杂交的步骤。

4、完整植株的信号传导的研究

把 GFP 重组到某一诱导型启动子之后，可以研究基因表达的时空性。Chiu 等(Chiu W,1996)把来自拟南芥的干旱诱导型启动子与 GFP(S65T)重组，转化烟草得到转基因植株。当水分逐渐亏缺时，绿色荧光开始出现在叶片的表皮、叶肉和保卫细胞中，并且以保卫细胞和腺毛中荧光最强。此法可以明确植物对水分亏缺反应的敏感部位及诱导基因表达的先后。

5、转基因植物的生态检测

目前通过基因工程得到了许多种类的转基因植物，而且有些已开始大面积种植。但是这些转基因植株通过花粉传播可能会造成目的基因的漂移。检测抗除草剂和抗病虫害等转化基因向周围环境漂移扩散的程度，GFP 标记将是最理想的检测手段。

本实验选用绿色荧光蛋白基因 gfp 作为目的基因，一是想将绿色荧光蛋白作为 GUS 以外的另外一种报告基因，因为有时候 GUS 的表达由于酶的扩散等原因并不能确切地反映出外源基因整合和表达的组织部位。因此可以通过转基因植株绿色荧光蛋白的表达来证实并反映外源基因整合和表达的真实情况，探讨外源基因在转基因植株中的表达模式。其次是想建立起绿色荧光蛋白 GFP 在卡特利亚兰中

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库