

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200326047

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

拟南芥生育酚环化酶基因 (*VTE1*) 与烟草
维生素 E 含量和抗性关系的研究

The Relationship between Tocopherol Cyclase Gene(*VTE1*)
from *Arabidopsis* and Content of Vitamin E and Tolerance in
Tobacco W38

郭 娟

指导教师姓名: 田惠桥教授

刘公社研究员

专业名称: 发育生物学

论文提交日期: 2006年6月8日

论文答辩日期: 2006年7月8日

学位授予日期: 2006年 月 日

答辩委员会主席: 李爱贞 副教授

评 阅 人: _____

2006年7月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要	1
Abstract	3
第一章 前言	6
1 维生素 E 研究进展概述	6
1.1 维生素 E 的研究历史	7
1.2 维生素 E 的基本结构与主要种类	8
2 维生素 E 的作用	8
2.1 维生素 E 的抗氧化和光保护作用	8
2.2 维生素 E 在细胞内信号传导上的功能	11
3 维生素 E 代谢的基本途径	11
3.1 维生素 E 生物合成的基本途径	11
3.2 维生素 E 生物合成中的关键酶基因及其调节基因	12
4 维生素 E 代谢工程研究进展	14
5 本研究的目的地及意义	15
5.1 拟南芥 <i>VTE1</i> 基因对提高烟草维生素 E 含量的效应	15
5.2 高含量生育酚对植物的抗逆性的效应	15
第二章 材料与方法	16
1 实验材料	16
1.1 植物材料	16
1.2 菌株与质粒	16
2 实验方法	16

2.1 正义表达载体的获得	16
2.2 反义表达载体构建	16
2.3 烟草遗传转化及转基因烟草的获得	21
2.4 转基因烟草分子检测	21
2.5 转基因烟草表型分析	25
2.6 VE 含量测定	25
2.7 转基因烟草植株对胁迫耐受性的鉴定	26
第三章 结果与分析	29
1 转基因烟草植株的获得	29
2 转基因烟草的分子检测	29
2.1 转基因烟草的 PCR 检测	29
2.2 转基因烟草的 PCR-Southern 杂交检测	30
2.3 转基因烟草植株 RT-PCR 检测	31
3 转基因与非转基因烟草表型分析	31
4 转基因与非转基因烟草 VE 含量的测定	31
5 转基因烟草的耐受性分析	32
5.1 转基因烟草的耐盐性分析	32
5.2 转基因烟草的耐强光分析	35
第四章 讨论与总结	38
1 野生型与转基因烟草的表型分析	38
2 野生型与转基因烟草 VE 含量比较	38
3 盐胁迫总结	38

4 强光胁迫下野生型与转基因烟草 VE 含量比较	39
5 强光胁迫下超氧化物歧化酶活性比较	40
6 强光胁迫下过氧化物酶活性比较	41
7 强光胁迫下丙二醛含量比较	42
8 小结	45
参考文献	46
在学期间发表的论文	54
致谢	55

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	3
Chapter 1 INTRODUCTION	6
1 Researches on vitamin E	6
1.1 The history of studying on VE	7
1.2 The structure and compounds of VE	8
2 The functions of VE	8
2.1 Antioxidant functions and photo protective mechanism of VE	8
2.2 The effects of VE in intracellular signaling	11
3 Metabolic pathway of VE	11
3.1 Biosynthetic pathway of VE	11
3.2 Key enzymes and genes in the biosynthesis of VE	12
4 Researches on metabolic regulation and bioengineering of VE	14
5 Purpose and meaning of this study	15
5.1 The effectiveness of <i>VTE1</i> from Arabidopsis in elevating the content of vitamin E	15
5.2 The effectiveness of high vitamin E content in enhancing the tolerance to stress of plant	15
Chapter 2 MATERIALS and METHODS	16
1 materials	16
1.1 plant materials	16
1.2 Bacterial strains and plasmids	16

2 Methods	16
2.1 Obtainment of sense <i>VTE1</i> expression vectors.....	16
2.2 Development of antisense <i>VTE1</i> expression vectors.....	16
2.3 Transformation of tobacco plants.....	21
2.4 Molecular analysis of transgenic tobacco.....	21
2.5 Phenotype analysis of transgenic tobacco.....	25
2.6 Vitamin E analysis.....	25
2.7 The tolerance analysis to stress treatments of transgenic tobacco.....	26
Chapter 3 RESULTS and ANALYSIS	29
1 The obtainment of transgenic tobacco plants.....	29
2 Results of molecular analyses of transgenic plants.....	29
2.1 PCR analysis.....	29
2.2 PCR-Southern analysis.....	30
2.3 RT-PCR analysis.....	31
3 Results and analysis of phenotype of transgenic plants and wild type.....	31
4 Vitamin E content of transgenic plants and wild type.....	31
5 Endurance to stress of transgenic plants and wild type.....	32
5.1 Endurance to salinity stress of transgenic plants and wild type.....	32
5.2 Endurance to high light stress of transgenic plants and wild type.....	35
Chapter 4 DISCUSSIONS	38
1 phenotype analysis of transgenic plants and wild type.....	38
2 Vitamin E analysis of transgenic plants and wild type.....	38

3 The tolerance to salinity stress of transgenic plants and wild type	38
4 VE content of transgenic plants and wild type during the high light	39
5 SOD activity during the high light	40
6 POD activity during the high light	41
7 MDA content during the high light	42
8 Summary	45
REFERENCES	46
PAPER	54
ACKNOWLEDGEMENTS	55

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

生育酚又称维生素 E (VE)，是一类重要的脂溶性抗氧化剂，是植物在逆境下细胞膜上重要的效应物。生育酚环化酶 (TC) 催化形成抗氧化芳香环并最终形成相应的生育酚，在拟南芥中 TC 是由 *VTE1* 编码的。本实验利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法在烟草中过量表达拟南芥来源的 *VTE1*，检验其对提高烟草维生素 E 含量的效应。同时为验证生育酚水平与外界胁迫程度的相关性，本实验还研究了转基因烟草对高光强、高盐等胁迫条件的耐受性，为植物抗逆机理的研究奠定基础。主要实验结果如下：

Southern 杂交和 RT-PCR 检测发现有 10 株转基因烟草扩增出特异条带，经测定，转基因烟草的 VE 含量普遍比野生型高 2 倍左右，最多的可达 11.32 倍，表明 TC 是生育酚合成途径中的关键限速酶，过量表达 *VTE1* 基因可以有效地提高生育酚的含量。

对盐胁迫下烟草叶片枯死程度进行分析发现，转基因烟草叶片枯死面积较野生型烟草小。在不同浓度(150、250 mmol/L)盐胁迫下转基因烟草 VE 含量比野生型增加了 1.3-1.8 倍，说明植物体内 *VTE1* 的过量表达在一定程度上提高了转基因烟草对盐胁迫的耐受性。同时，野生型烟草中脯氨酸含量随盐浓度的升高而升高，而转基因烟草中脯氨酸含量则是先升高后降低，野生型烟草和转基因烟草的脯氨酸含量在 150 mmol/L 盐浓度下分别是 0 mmol/L 的 2.43 倍和 9.94 倍，在 250 mmol/L 盐浓度下分别是 0 mmol/L 的 4.99 倍和 6.44 倍，推测在一定逆境条件下，生育酚水平的变化会引起植物体内脯氨酸的更大积累，协同作用共同抵抗外界不良环境。

对野生型和转基因烟草进行光胁迫处理发现，在不同强光照时间下，转基因烟草的 VE 含量均比野生型烟草的高，有的甚至高达 6.2 倍。不同时间内的强光处理，转基因烟草和野生型烟草的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均表现为先增加、后降低、再增加的趋势，而且在整个处理过程中野生型烟草的 SOD 活性始终高于转基因烟草。强光处理过程中，野生型和转基因烟草中的过氧化物酶 (POD) 活力均呈现上升趋势，当光胁迫 30 h 后，野生型烟草 POD 活性增加量高于转基因烟草。强光胁迫下产生的丙二醛 (MDA) 含量也逐渐增多，处理 30 h 后，转基因烟草和野生型烟草的 MDA 含量最多，表明植物受伤害逐渐严重，但转基因

烟草 MDA 累积量相对较少, 表明其受伤害程度比野生型烟草轻, 说明高含量生育酚与细胞内其它抗氧化剂交互作用可以降低胁迫对植物的伤害。

综上所述, 生育酚环化酶基因 *VTE1* 过量表达可以在一定程度上提高植物的抗逆性, 烟草在受到逆境胁迫时, 起抗氧化作用的酶促系统的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和非酶促保护系统的生育酚之间存在某种交错复杂的协调机制, 当其中一类抗氧化物的活性降低, 所产生的可能的氧化物的积累将诱导另外一类抗氧化物水平的提高, 由于作用方式的不同, 在一定胁迫下不同抗氧化剂对不同的胁迫可能存在响应时间和响应强度的差别, 根据我们的实验, 短时间的强光胁迫便可诱导生育酚的高表达, 其后可能与酶系统交互变化从而维持植物抗氧化系统的动态平衡。

关键词: 生育酚环化酶基因; 维生素 E; 抗性

Abstract

Tocopherol is also called vitamin E (VE), it is one kind of the important lipophilic antioxidant on cell membrane for plants under the stressful environments. Tocopherol cyclase (TC) catalyzes the conversion of various phytyl quinol pathway intermediates to their corresponding tocopherols through the formation of the chromanol ring. In this study, tobacco W38 was transformed with a construct containing a cDNA insert encoding tocopherol cyclase (*VTE1*) from *Arabidopsis* under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and we examine if the content of VE in transgenic tobacco plants increase with the over-expression of *VTE1*, and then study the improve effect of *VTE1* from *Arabidopsis* on the content of VE in tobacco. Based on the fact that the level of tocopherols vary with the stress level outside, we studied the endurance of transgenic tobacco plants to high light and salinity, in order to provide the exact evidence for the relationship between the tocopherols of high content and the stress condition, form a solid foundation for the study of the mechanism and utility of endurance in plants, The main results were as follows:

The ten transgenic tobacco plants were confirmed by Southern blot and RT-PCR analyses, which lead the same PCR product of 495 bp as the positive control. Compared to the wild type controls, the content of vitamin E in transgenic lines was two times higher than that in the wild type, the most was 11.32 times, which showed that TC is the important limiting enzyme in the biosynthesis of tocopherols. The over-expression of *VTE1* could increase the content of tocopherols effectively.

The endurance of transgenic plants was higher than that of the wild type to salinity stress on their phenotype, which showed on the withered areas of leaves. In different salinities(150、250 mmol/L), the content of tocopherols in transgenic lines was 1.3-1.8 higher than that in wild type, which indicated that the over-expression of *VTE1* had increased the salt stress tolerance in tobacco plants.

Meanwhile, the content of proline in wild type increased with the increase of salinity, but it increased first and then decreased in transgenic tobacco. The content of

proline in wild type and transgenic lines in 150 mmol/L are 2.43 and 9.94 times higher than those in 0 mmol/L, respectively. They are 4.99 and 6.44 times higher in 250 mmol/L than in 0 mmol/L.

When we compared the content of VE in wild type with that in transgenic plants, both them are treated with high light, the results showed that the content of VE in transgenic lines is consistently higher than that in wild type during different illuminating time, some is 6.2 times higher.

In the different treat time of the high light, the activity of superoxide dismutase (SOD) in transgenic plants and wild type were increased first and then decreased, then increased at last. The activity in wild type was consistently higher than that in transgenic tobacco.

The activity of peroxidase(POD) increased in both them in different illumination of high light. After 30h treatment of high light, the increasement of POD activity in wild type was higher than that in transgenic plants.

The content of monodehydroascorbate(MDA) also increased both of them, and it reached the high level after 30h. It indicated that the plants were injured more seriously, but the injurement of transgenic plants were light than wild type. Data abovementioned showed that there was a crosstalk in tocopherols and other antioxidants in protecting plants from high light.

In conclusion, the over-expression of *VTE1* could elevate the tolerance of tobacco plants to salinity and high light stress. To control the level of ROS and to protect cells under stress conditions, plant tissues contain enzymatic ROS scavenging mechanisms in plant include SOD, POD and CAT and a network of low molecular mass antioxidants such as tocopherols, and complicated mechanisms were in the two protective system. There was some relationship between antioxidant levels and the activity of antioxidant regenerating enzymes. When the activity of one kind of enzymatic/nonenzymatic scavengers decreased, the other one would enhance the level for the oxidants accumulation. Because of different mechanisms, there would be difference of respondent duration and intensity under kinds of stress for every antioxidant. Based on our experiments, short illumination of high light could induce

high expression of tocopherols, and then the equilibrium between production and removal of ROS may be kept by VE and enzymatic scavengers.

Keyword: Tocopherol cyclase gene(*VTE1*); Vitamin E; Tolerance

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

生育酚又称维生素 E (VE)，是一类重要的脂溶性抗氧化剂，是植物在逆境下细胞膜上重要的效应物。生育酚环化酶 (TC) 催化形成抗氧化芳香环并最终形成相应的生育酚，在拟南芥中 TC 是由 *VTE1* 编码的。本实验利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法在烟草中过量表达拟南芥来源的 *VTE1*，检验其对提高烟草维生素 E 含量的效应。同时为验证生育酚水平与外界胁迫程度的相关性，本实验还研究了转基因烟草对高光强、高盐等胁迫条件的耐受性，为植物抗逆机理的研究奠定基础。主要实验结果如下：

Southern 杂交和 RT-PCR 检测发现有 10 株转基因烟草扩增出特异条带，经测定，转基因烟草的 VE 含量普遍比野生型高 2 倍左右，最多的可达 11.32 倍，表明 TC 是生育酚合成途径中的关键限速酶之一，过量表达 *VTE1* 基因可以有效地提高生育酚的含量。

对盐胁迫下烟草叶片枯死程度进行分析发现，转基因烟草叶片枯死面积较野生型烟草小。在不同浓度(150、250 mmol/L)盐胁迫下转基因烟草 VE 含量比野生型增加了 1.3-1.8 倍，说明植物体内 *VTE1* 的过量表达在一定程度上提高了转基因烟草对盐胁迫的耐受性。同时，野生型烟草中脯氨酸含量随盐浓度的升高而升高，而转基因烟草中脯氨酸含量则是先升高后降低，野生型烟草和转基因烟草的脯氨酸含量在 150 mmol/L 盐浓度下分别是 0 mmol/L 的 2.43 倍和 9.94 倍，在 250 mmol/L 盐浓度下分别是 0 mmol/L 的 4.99 倍和 6.44 倍，推测在一定逆境条件下，生育酚水平的变化会引起植物体内脯氨酸的更大积累，协同作用共同抵抗外界不良环境。

对野生型和转基因烟草进行光胁迫处理发现，在不同强光照时间下，转基因烟草的 VE 含量均比野生型烟草的高，有的甚至高达 6.2 倍。不同时间内的强光处理，转基因烟草和野生型烟草的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均表现为先增加、后降低、再增加的趋势，而且在整个处理过程中野生型烟草的 SOD 活性始终高于转基因烟草。强光处理过程中，野生型和转基因烟草中的过氧化物酶 (POD) 活力均呈现上升趋势，当光胁迫 30 h 后，野生型烟草 POD 活性增加量高于转基因烟草。强光胁迫下产生的丙二醛 (MDA) 含量也逐渐增多，处理 30 h 后，转基因烟草和野生型烟草的 MDA 含量最多，表明植物受伤害逐渐严重，但转基因

烟草 MDA 累积量相对较少, 表明其受伤害程度比野生型烟草轻, 说明高含量生育酚与细胞内其它抗氧化剂交互作用可以降低胁迫对植物的伤害。

综上所述, 生育酚环化酶基因 *VTE1* 过量表达可以在一定程度上提高植物的抗逆性, 烟草在受到逆境胁迫时, 起抗氧化作用的酶促系统的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和非酶促保护系统的生育酚之间存在某种交错复杂的协调机制, 当其中一类抗氧化物的活性降低, 所产生的可能的氧化物的积累将诱导另外一类抗氧化物水平的提高, 由于作用方式的不同, 在一定胁迫下不同抗氧化剂对不同的胁迫可能存在响应时间和响应强度的差别, 根据我们的实验, 短时间的强光胁迫便可诱导生育酚的高表达, 其后可能与酶系统交互变化从而维持植物抗氧化系统的动态平衡。

关键词: 生育酚环化酶基因; 维生素 E; 抗性

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