

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720081152570

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

调控 *FT* mRNA 长距离运输的顺式作用元件  
的研究

Research on A *cis*-Element within *FT* mRNA that  
Determines Its Long-distance Trafficking

吴晓婧

指导教师姓名: 黄涛 教授

专 业 名 称: 发育生物学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于      年      月      日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目 录

摘 要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 立题依据与研究意义	1
1.2 模式植物拟南芥	2
1.3 高等植物开花概述	3
1.3.1 植物调控开花时间的信号途径	6
1.3.2 花的发端	10
1.3.3 花器官形成	11
第二章 材料与方法	12
2.1 实验材料	12
2.1.1 植物材料	12
2.1.2 菌株与质粒	12
2.1.3 主要试剂	12
2.1.4 培养基	13
2.1.5 常用溶液	14
2.1.6 主要仪器	15
2.2 实验技术	16
2.2.1 拟南芥实验操作	16
2.2.2 分子实验操作	18
2.2.3 蛋白质实验操作	24
2.2.4 实验方法	24
2.2.5 表达载体 <i>35S:HA:FTm</i> 的构建	27
2.2.6 拟南芥转化子的筛选	28
2.2.7 <i>35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10</i> 系列转基因植株热激诱导开花的	

研究 .....	28
2.2.8 蔗糖密度梯度离心实验 .....	29
<b>第三章 实验结果与分析 .....</b>	<b>31</b>
3.1 FT 蛋白与 FT mRNA 协同进行长距离运输 .....	31
3.2 FT mRNA 负责长距离转运的顺式作用元件 .....	32
3.2.1 35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10 转基因植株热激诱导开花表型 ..	32
3.2.2 35S:HA:FTm 系列突变表达载体的构建 .....	34
3.2.3 35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10 转基因植株的构建 .....	35
3.2.4 35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10 系列转基因植株热激诱导开花的表型 .....	37
3.3 FT mRNA 定位在内质网上 .....	39
3.3.1 蔗糖密度梯度离心 .....	39
3.3.2 FT mRNA 定位于内质网 .....	40
3.4 水稻 Hd3a 作为 FT 的同源基因可以调控拟南芥开花信号的转运 .....	44
3.4.1 水稻 Hd3a 基因及其表达调控 .....	44
3.4.2 Hd3a mRNA 与 FT 蛋白协同运输到茎尖诱导开花 .....	44
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>46</b>
4.1 FT mRNA 和 FT 蛋白协同转运调控植物开花时间 .....	46
4.2 FT mRNA 在内质网的定位 .....	48
<b>第五章 总结与展望 .....</b>	<b>51</b>
参考文献 .....	52
致谢 .....	57



# Content

<b>Abstract(Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract(English)</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Purpose and significance</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> as a model plant</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Overview of higher plants flowering</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 The pathways regulating plants flowering .....	6
1.3.2 Flower evocation .....	10
1.3.3 Floral organ formation.....	11
<b>Chapter2 Materials and methods</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Plant materials .....	12
2.1.2 Bacterial and plasmid materials .....	12
2.1.3 Main reagents .....	12
2.1.4 Medium .....	13
2.1.5 Solution .....	14
2.1.6 Main instruments .....	15
<b>2.2 Technology</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Plant technology .....	16
2.2.2 Nuclear acid technology .....	18
2.2.3 Protein technology.....	24
2.2.4 Methods.....	24
2.2.5 The constuction of <i>35S:HA:FTm</i> .....	27
2.2.6 Screening of transgenic plants .....	28
2.2.7 Heat shock experiment .....	28

2.2.8 Sucrose gradient ultracentrifugation .....	29
<b>Chapter3 Results and analysis .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 FT protein and FT mRNA traffic together for long-distance trafficking.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 A cis-element within FT mRNA that responsible for its long-distance trafficking.....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Heat shock experiment on <i>35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10</i> .....	32
3.2.2 The constuction of N- and C-series of <i>35S:HA:FTm</i> .....	34
3.2.3 The constuction of transgenic plants.....	35
3.2.4 Phenotype of <i>35S:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10</i> transgenic plants subjected to heat shock treatment .....	37
3.3 Localization of FT mRNA to ER .....	39
3.3.1 Sample analysis by Sucrose gradient ultracentrifugation.....	39
3.3.2 Localization of FT mRNA to ER.....	40
<b>3.4 Hd3a in rice as a homogenous gene of FT can regulate signal transportation in Arabidopsis thaliana .....</b>	<b>44</b>
3.4.1 Introduction of <i>Hd3a</i> in rice .....	44
3.4.2 <i>Hd3a</i> mRNA and FT protein can traffic together to shoot apex for floral induction .....	44
<b>Chapter4 Discussion .....</b>	<b>46</b>
4.1 FT mRNA and FT protein act together to regulate flowering time.....	46
4.2 Localization of FT mRNA to ER.....	48
<b>Chapter5 Summary and outlook .....</b>	<b>51</b>
<b>References .....</b>	<b>52</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>57</b>

## 摘要

高等植物的开花诱导是指由营养生长向生殖生长的转变。开花诱导由植物本身的遗传因子和外界环境因子两方面决定。长日照植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, *Flowering locus T (FT)* 是光周期诱导开花途径中一个重要的因子。长日条件下, 叶片韧皮部伴胞细胞中的 *FT* 基因被 *CONSTANS(CO)* 激活。在茎尖, *FT* 蛋白与转录因子 *Flowering locus D (FD)* 结合, 然后由 *FT/FD* 激活下游基因 *SOCI* 和 *APETALA1 (API)* 的表达最终诱导开花。这说明 *FT* 蛋白和/或 *FT* mRNA 能够从叶片移动到茎尖从而诱导开花。本实验室已有的研究结果表明 *FT* 蛋白和 *FT* mRNA 是协同从叶片运输到茎尖的。

本试验研究发现, 在一个叶片中热激诱导表达 *HA:FT:GFPm* (下标 *m* 表示 *GFP* 基因不翻译) 融合基因不能诱导开花, 可能因为 *HA:FT* 蛋白不能与过长的 *HA:FT:GFPm* mRNA 协同进行长距离运输。在 *HSP:HA:FT:GFPm ft-10* 转基因植株中再引入 *FT* 基因不翻译的 *HA:FTm* 融合基因, 则 *HA:FT* 蛋白与 *HA:FTm* mRNA 在热激诱导表达后可以从热激处理的叶片协同运输到茎尖而诱导开花。在此基础上我们进一步针对 *HA:FTm* 融合基因中不翻译的 *FT* 基因分别从 N 端或 C 端做一系列的删减, 以此研究控制 *FT* mRNA 长距离运输的顺式作用元件。研究表明, *FT* mRNA 不依赖于翻译过程可以直接结合在内质网上, *FT* mRNA C 末端的 100 个碱基上含有一个控制 *FT* mRNA 在内质网定位与长距离运输的顺式作用元件。

关键词: *FT* mRNA; 内质网; 转运; 开花

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Abstract

In higher plants, floral induction is a critical transition from the vegetative stage into the reproductive stage. It is regulated by both endogenous genetic factors and a variety of external environmental factors. In long-day plant *Arabidopsis*, *Flowering locus T (FT)* is an important factor in photoperiodic pathway that is engaged in floral regulation. In long days, *FT* gene is activated by *CONSTANS(CO)* in leaf. And then in apex, FT protein interacts with a transcription factor FD and activate the expression of a floral meristem identity gene *APETALAI(API)*. This suggests that the products of *FT* (FT protein and/or *FT* mRNA) might move from leaf to shoot apex and induce flowering. According to acquired results within our lab, FT protein and *FT* mRNA are supposed to transport along with each other from leaf to shoot apex where they trigger flowering.

*HSP:HA:FT:GFPm ft-10* transgenic plant in which *GFP* is not translatable was not triggered to develop visible flower buds after single-leaf heat shock treatment. The possible reason is that HA:FT protein cannot traffic long-distance together with the long *HA:FT:GFPm* mRNA from the heated leaf to shoot apex. When the *HA:FTm* fusion gene in which *FT* is not translatable is introduced into *HSP:HA:FT:GFPm ft-10* plants, HA:FT protein and *HA:FTm* mRNA are able to traffic long-distance together from heated leaf to shoot apex and induce flowering.

We made a progressive deletion in untranslatable *FT* region of *35S:HA:FTm* construct from N terminus and C terminus respectively, and further introduced these constructs into *HSP:HA:FT:GFPm ft-10* plants. The rationale is that the long-distance trafficking of *HA:FTm* mRNA would be disabled when the *cis*-element responsible for long-distance trafficking was removed. Our genetic and molecular evidence suggested that *FT* mRNA localization to the ER is independent of translation and the C terminal 100 bases of the *FT* mRNA coding sequence is responsible for directing *FT* mRNA to the ER membrane and long-distance trafficking.

**Key words:** *FT* mRNA; ER; Long-distance trafficking; Flowering

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 立题依据与研究意义

在高等植物的生长发育过程中,营养生长和生殖生长构成了其完整的生命周期。其中由营养生长向生殖生长的转变是这个过程中的一件大事,这个转变过程被称为开花诱导。开花诱导是由植物本身的遗传因子和外界环境因子两方面决定的。高等植物调控开花时间的信号途径分为四条:春化途径、光周期途径、自主途径和赤霉素途径。在长日照植物拟南芥中,*FT*是光周期诱导开花途径中一个重要的因子。长日条件下,*CO*在叶片中表达,从而诱导激活了位于叶片韧皮部伴胞细胞中的*FT*基因。在茎尖,*FT*蛋白与转录因子*FD*结合形成一个异源二聚体*FT/FD*,然后由*FT/FD*激活下游基因*SOC1*和*API*的表达最终诱导开花。这说明*FT*蛋白和/或*FT* mRNA能够从叶片移动到茎尖从而诱导开花。

本实验室已有研究结果表明,*HSP:HA:FT ft-10*植株在整株热激或者单叶片热激之后两周即能发育出可见的花芽,*HA:FT* mRNA与*HA:FT*蛋白在热激后的叶片以及与其相连的叶柄中也能检测到,这说明*HA:FT* mRNA和*HA:FT*蛋白可能共同从叶片移动到茎尖<sup>[1]</sup>。而单叶片热激另一转基因植株*HSP:HA:FT:GFPm ft-10*(下标 *m* 表示 *GFP* 基因不翻译)时却不能诱导早花,*HA:FT*蛋白与*HA:FT:GFPm* mRNA也不能在相连的叶柄中检测到<sup>[2]</sup>。但是当对*HSP:HA:FT:GFPm*中非翻译的*GFP*序列进行了一系列删除,再转化*ft-10*突变体后发现,只有表达的*HA:FT:GFPm* mRNA长度短于某个极限值的植株才能被单叶片热激诱导早花,此时相应的*HA:FT*蛋白与短于极限值的*HA:FT:GFPm* mRNA也能在相连叶柄中检测到<sup>[1]</sup>。与转基因植株*HSP:HA:FT ft-10*相比,*HSP:HA:FT:GFPm ft-10*植株受到热激时除了有相同大小的*HA:FT*融合蛋白以外,不同的是有了长度更长的*HA:FT:GFPm* mRNA。综合以上结果推断:可能是*FT*转录产物的长度影响了*FT* mRNA的长距离移动,长度过长的*HA:FT:GFPm* mRNA不能与*HA:FT*融合蛋白一起协同从叶片运输到茎尖从而不能诱导植物开花。

将 *HSP:HA:FTm ft-10* (下标 *m* 表示 *FT* 基因不翻译) 与上述转基因植株 *HSP:HA:FT:GFPm ft-10* 杂交后, 构建了 *HSP:HA:FTm HSP:HA:FT:GFPm ft-10* 植株<sup>[2]</sup>。单叶片热激后可以诱导早花。进一步检测杂交植株受热激叶片的叶柄, 可以发现 *HA:FT* 蛋白和 *HA:FTm* mRNA 都可以被测定出来, 而 *HA:FT:GFPm* mRNA 依然不能被检测到。由于 *HA:FTm* 不能翻译成蛋白, 那么单叶片热激后诱导早花的只能是 *HA:FT:GFPm* 翻译出来的 *HA:FT* 蛋白。杂交植株中 *HA:FT* 蛋白可能和 *HA:FTm* mRNA 形成可移动的复合物从叶片运输到茎尖而诱导开花<sup>[2]</sup>。

综上所述, *FT* 的 mRNA 和蛋白可能结合成一个复合物才能从叶片运输到茎尖; 并且当 *FT* mRNA 长度过长的时候因其与 *FT* 蛋白形成的复合物过大而不能长距离运输。因此有必要研究 *FT* mRNA 是否含有一个顺式作用元件调控它的长距离运输。为研究这个问题, 本研究在 *HA:FTm* 的基础上针对不翻译的 *FT* 基因做了一系列定点突变, 直接转化 *HSP:HA:FT:GFPm ft-10* 植株, 然后通过单叶片热激的生理学实验观察其被诱导早花与否来研究 *FT* mRNA 的控制运输的顺式作用元件。

同时又进一步研究了 *FT* mRNA 在内质网中的定位, 发现 *FT* mRNA 可以定位在内质网上。那么控制 *FT* mRNA 定位在内质网上的元件也是待解决的问题。针对这个问题本论文通过蔗糖密度梯度离心的方法分离内质网, 检测不同长度删减的 *FT* 转录产物的分布情况, 从而探索 *FT* mRNA 的功能区域与内质网的定位关系和它本身的运输机制。

## 1.2 模式植物拟南芥

拟南芥属于十字花科, 与白菜, 油菜, 甘蓝等经济作物同属一科。在自然界中, 拟南芥主要分布于温带, 集中在欧洲地区, 在东非, 亚洲大陆, 日本也都有分布, 一般生长在野外干燥的土壤中。拟南芥本身并无明显的经济价值, 但是从 16 世纪被发现到现在, 作为一种模式植物, 它的巨大的研究价值就一直被国内外的科学家们所重视。

但是自然界中有形形色色的高等植物, 为什么小小的拟南芥得以成为世界范



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库