View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编码：10384　　　　　　　　　　　　分类号 ____密级____

学号：21620111152447　　　　　　　　　UDC ____

厦门大学

硕士学位论文

拟南芥茎尖干细胞决定基因 *WUSCHEL* 的泛素化研究及 WUS 相互作用蛋白的筛选

The studies on the ubiquitination of WUS protein and WUS interacting proteins

王晓爽

指导教师姓名：黄 涛 教 授

专业　　名称：遗　传　学

论文提交日期：2014 年 4 月

论文答辩时间：2014 年 5 月

学位授予日期：2014 年 6 月

答辩委员会主席：_

评　　阅　　人：

2014 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

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

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘 要 I

Abstract II

第一章 前言 1

1 高等植物茎端分生组织 1

1.1 茎端分生组织的形成 1

1.2 茎端分生组织的结构、功能 2

1.3 茎端分生组织的调控机制 2

1.4 *WUS* 基因 4

2 泛素蛋白酶体系统 7

2.1 泛素蛋白酶体系统的构成 8

2.2 泛素蛋白酶体系统介导的蛋白降解过程 10

2.3 蛋白酶体抑制剂 11

3 酵母双杂交技术 12

3.1 酵母双杂交技术的原理 12

3.2 酵母双杂交技术的发展、应用及特点 13

3.3 Matchmaker™Gold Yeast Two-Hybrid System 简介 15

4 立题依据及研究意义 17

第二章 材料与方法 18

1 实验材料 18

1.1 植物材料 18

1.2 菌株和质粒 18

1.3 常用培养基 18

1.4 抗生素 19

1.5 引物 19

1.6 主要试剂 20

厦门大学博硕士论文摘要库

1.7 主要仪器 22
2 实验方法 **23**
2.1 拟南芥相关实验操作 23
2.2 DNA 和 RNA 相关实验操作 24
2.3 蛋白相关实验操作 29
2.4 酵母双杂交相关实验技术 32
第三章 结果与分析 **37**
1 超表达 *WUS* 植株中 WUS 蛋白和 *mRNA* 水平的检测 **37**
2 蛋白酶体介导 WUS 蛋白的降解 **39**
2.1 体外表达载体 pMBP-WUS 的构建 39
2.2 MBP-WUS 蛋白的体外诱导表达与纯化 39
2.3 MBP-WUS 蛋白在 *WT* 无细胞提取液中会被降解 40
2.4 蛋白酶体抑制剂可以抑制 MBP-WUS 蛋白的降解 41
2.5 蛋白酶体抑制剂可以抑制超表达 *WUS* 幼苗中 WUS 蛋白的降解 42
3 酵母双杂交筛选与 WUS 相互作用的蛋白 **43**
3.1 酵母双杂交自激活检测和毒性检测 43
3.2 酵母双杂交筛选 cDNA 文库 47
3.3 阳性菌落插入片段的筛选及测序 47
第四章 讨论与展望 **52**
1 WUS 蛋白通过蛋白酶体途径被降解 **52**
2 酵母双杂交筛选到可能与 WUS 有相互作用的蛋白 **52**
3 总结与展望 **53**
参考文献 **55**
致谢 **63**
厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENT

Abstract (in Chinese) I

Abstract (in English)... II

Chapter 1 Introduction... 1

1 Shoot apical meristem in higher plant 1

1.1 The formation of shoot apical meristem.. 1

1.2 The structure and function of shoot apical meristem........................ 2

1.3 The regulatory mechanism of shoot apical meristem 2

1.4 The *WUS* gene 4

2 UPS.. 7

2.1 The composition of ubiquitin-proteasome system................................ 8

2.2 The process of protein degradation via ubiquitin - proteasome pathway10

2.3 Proteasome inhibitors...11

3 Yeast Two-Hybrid 12

3.1 The principle of Yeast Two-Hybrid.. 12

3.2 The development,characteristics and applications of the yeast two-hybrid 13

3.3 Introduction of Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System 15

4 The significance of this research.. 17

Chapter 2 Materials and methods... 18

1 Materials 18

1.1 Plants materials 18

1.2 Strains and plasmids.. 18

1.3 Mediums.. 18

1.4 Antibiotics.. 19

1.5 Primer sequences 19

1.6 Main reagents... 20

厦门大学博硕士论文摘要库

1.7 Main instruments 22
2 Methods 23
2.1 Work on Arabidopsis 23
2.2 Work on DNA and RNA 24
2.3 Protein experiments 29
2.4 Yeast Two-Hybrid work 32
Chapter 3 Results and analysis 37
1 The detection of WUS protein and *mRNA* level in over-expression WUS plants 37
2 Proteasome inhibitors mediate the degradation of WUS protein 39
2.1 Construction of pMBP - WUS 39
2.2 The expression in vitro and purification of MBP-WUS protein 39
2.3 MBP-WUS protein will be degraded in *WT* cell free extracts................ 40
2.4 Proteasome inhibitors can inhibit MBP-WUS protein’s degradation .. 41
2.5 Proteasome inhibitors can inhibit WUS protein’s degradation in over-expression WUS plants 42
3 Screening proteins interacted with WUS by the yeast two-hybrid 43
3.1 Testing for toxicity and autoactivation... 43
3.2 Screening Arabidopsis cDNA library 47
3.3 The Screening and sequencing for the insertion fragments from Positive colonies 47
Chapter 4 Discussion and Outlook... 52
1 WUS protein was degraded by the proteasome pathway 52
2 Screening to proteins may interacted with WUS by yeast two-hybrid ... 52
3 Conclusion and outlook 53
References 55
Acknowledgement 63
厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

高等植物茎端分生组织的调控是一个复杂而精细的过程，*WUS* 是茎尖干细胞决定基因，与茎端分生组织干细胞的发生和维持都密切相关。本论文就前人还没有研究过的 WUS 蛋白的泛素化过程及其相互作用蛋白展开研究。

首先本实验建立了离体的蛋白分析系统，将纯化的WUS蛋白加入拟南芥幼苗的无细胞提取液中反应，然后检测其水平的变化，结果证明WUS蛋白在无细胞提取液中被逐渐降解，并且这种降解不能被广谱型蛋白酶抑制剂PMSF抑制，却可以被适当浓度的蛋白酶体抑制剂MG132、ALLN抑制。用蛋白酶体抑制剂来处理超表达*WUS*的转基因幼苗，发现经处理后其体内原本水平很低的WUS蛋白显著升高，得到与离体实验一致的结果，表明超表达*WUS*的转基因植株中的WUS蛋白通过泛素蛋白酶体途径被降解了。为了找到介导WUS蛋白泛素化的E3连接酶，本实验又建立了WUS蛋白的酵母双杂交系统，以WUS蛋白作为诱饵蛋白，在拟南芥cDNA文库中找到了多个与其可能存在相互作用的蛋白质，这些蛋白的发现为进一步研究WUS蛋白提供了基础和思路。

关键词：WUS；泛素蛋白酶体途径；酵母双杂交

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The regulation of shoot apex meristem in higher plant is a complicate and delicate process. The *WUS* gene is involved in the maintaince of the shoot apex meristem. In this study, the ubiquitination of WUS protein and WUS interacting proteins were investigated, which have not been studied before.

Firstly, we established an *in vitro* protein analysis system. The addition of purified WUS protein in cell free extracts prepared from *Arabidopsis* seedlings caused the gradual degradation of WUS protein, which could be inhibited by the proteasome inhibitor MG132 or ALLN, but not by the broad-spectrum protease inhibitor PMSF. When the *35S::HA:WUS* seedlings were also treated with the proteasome inhibitors, the HA:WUS protein level increased significantly. This result is consistent with the results obtained *in vitro*, suggesting that the WUS protein in *35S::HA:WUS* plants is degraded via the proteasome pathway. We also established theWUS yeast two-hybrid system to screen the E3 ligase which might specifically mediates the ubiquitination of WUS protein. We found a dozen of proteins potentially interacted with WUS protein in an *Arabidopsis* cDNA libraries. Although these proteins remain to be characterized, the discovery of these proteins provides new ideas and basis for further research on WUS protein.

Keywords: WUS protein; ubiquitin proteasome system; yeast two-hybrid

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1 高等植物茎端分生组织

1.1 茎端分生组织的形成

卵细胞受精之后形成二倍体的受精卵（合子）是高等植物个体发育的起点，合子在胚珠中发育成胚的过程称为胚胎发生(embryogenesis)。顶端分生组织（包括茎尖分生组织和根尖分生组织）的形态建成就起始于这一过程[1]。

高等植物的胚胎发育过程：合子通过有规律的细胞分裂依次形成四分体原胚、八细胞原胚、早期球形胚、成熟球形胚，然后经过较大的形态变化和功能区域的划分形成心形胚、鱼雷胚，最后经历拐杖胚和弯子叶胚发育成为成熟胚[2-5]。

造成植物极性生长的茎端分生组织和根端分生组织起源于胚珠中极性合子的第一次不对称分裂，合子第一次分裂形成顶细胞和基细胞，合点端的顶细胞发育成胚体，珠孔端的基细胞发育成胚柄[2, 3]。合子胚总是在近珠孔端产生胚根，而在合点端形成子叶和茎端生长点。

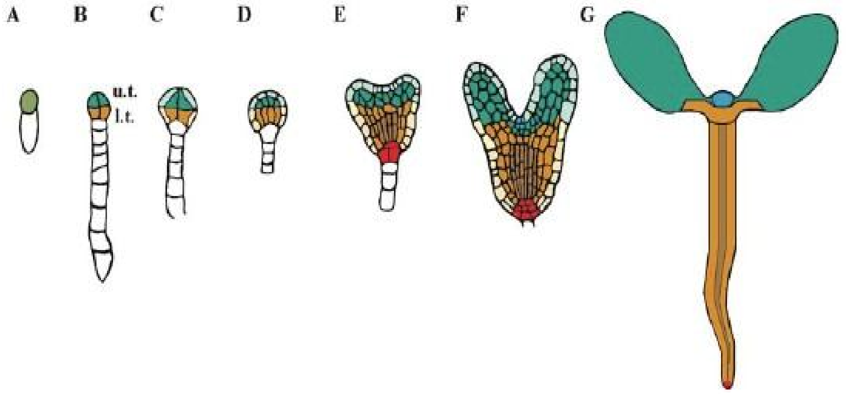

图 1 拟南芥的胚胎发育过程[5]

Figure1-1 Embryogenesis of dicotyledonary plant（Arabidopsis）[5]

胚胎发生是放射式模型和顶-基模型交叉作用的结果[6]，茎端分生组织自然也不例外。早期球形胚（16 细胞原胚）时期，位于茎端原表皮下方的细胞开始

出现干细胞特异基因的表达信号[7]，说明茎端分生组织的干细胞在胚胎发育的早期已经出现，后来经过心形胚和鱼雷胚的阶段，位于子叶原基之间的几个细胞经过细胞分裂形成最初的茎端分生组织，此时的茎端分生组织已经初步具有原套和原体的结构[8,9]。顶－基模型中顶部茎顶端分生组织(Shoot Apical Meristem,SAM)通常位于子叶的侧边，且通过下胚轴和胚根与基部的根端分生组织(Root Apical Meristem,RAM)相连。

1.2 茎端分生组织的结构、功能

茎端分生组织(shoot apical meristem,SAM)通常是指最小的叶原基上方的茎端区域，是一个原套-原体组成的半球状穹型结构，由多个功能结构域组成。随着对植物干细胞研究的深入，在细胞水平可以把分生组织细胞分为 4 个群体（如下图）：干细胞、干细胞的组织者细胞、中央区域的子细胞、周围启动器官发生的前体细胞(founder cells) 。分生组织中所有的细胞都来源于干细胞[10]。

在茎端分生组织中，干细胞群位于分生组织的顶端区域，原套外层的干细胞不断形成表皮组织，外层以内的干细胞则形成内部组织[11]。位于顶端中心区域的干细胞分裂后，一部分细胞仍然保留在中心区域，保持多潜能性，继承干细胞的衣钵；另一部分细胞（中央区域的子细胞）则随着干细胞的分裂逐渐迁移到分生组织的周边区域，通过较快的细胞分裂，维持一定的细胞总量并启动新器官的发生。

茎端分生组织是植物地上部分各组织器官（茎、叶和花等）发生的源泉，其在植物不同生长阶段表现为不同的状态：在营养生长阶段，不断分化出茎和叶；经成花诱导进入生殖生长阶段时，转换为具有无限(indeterminate)分化能力的花序分生组织，其上的局部组织又转换为有限的(determinate)花分生组织，在各类花器官决定基因的作用下按一定的空间结构分化出各轮花器官。

1.3 茎端分生组织的调控机制

目前，随着对几个重要基因的深入探索，关于茎端分生组织调控机制的研究

厦门大学博硕士论文摘要库

已经取得了很大进展。近些年来的众多研究表明，茎端分生组织的发生、结构与功能的维持是多种基因共同作用的结果；茎端分生组织与根端分生组织中的干细胞存在不同基因控制的相似的调控机制；某些蛋白家族，其蛋白不仅能在动物干细胞调控中起作用，在植物干细胞的调控中同样发挥功能。维持茎端分生组织正常功能的基因主要有 *STM*、 *WUS*、 *CLV3* 和 *CLV1* 等。

*WUS*编码一个291个氨基酸组成的同源异型结构域蛋白的转录因子，作为目前发现的最早的茎端分生组织信号，直到花发育的5、6期才在茎端分生组织转化的花分生组织中停止表达，对茎端分生组织的调控和维持贯穿始终，有抑制干细胞分化和维持干细胞数量的功能[12, 13]。研究发现，*WUS*的存在使周围细胞具有干细胞的特征；*WUS* 与*CLV*构成一个反馈调节环来保证拟南芥分生组织的正常增殖与分化；在花分生组织中，*WUS*促进第三、四轮花器官特征基因*AG*的表达。

拟南芥的*CLV1*、*CLV2*、*CLV3*是一组促进干细胞分化和器官形成的基因，它们的突变会导致茎端干细胞数目增多，分生组织膨大，花器官数目出现不同程度的增加[14-18]。*CLV3*属于*CLE(CLV3/ESR)*基因家族，*CLE*家族基因编码分子量较小的蛋白，都含有一段由14个氨基酸残基组成的保守序列，是植物形态发生和细胞间信号传导的关键基因[19-22]。*CLV1*编码一个受体激酶，*CLV2* 则编码一个缺少胞内激酶区的类受体蛋白。现已证明，在SAM的维持中，*CLV1*、 *CLV2*、 *CRN (CORYNE)/SOL2 (SUPPRESSOR of LLP2)* 和 *RPK2 (receptor-like protein kinase 2)* 作为受体以多个可能的作用形式(*CLV1/CLV1*、*CLV1/CLV2*、*CLV2/CRN*、*RPK2/RPK2*等)并行参与介导*CLV3*的信号转导过程[23]。

STM 基因最早在晚期球形胚和早期心形胚之间被观察到[24]，之后特异地表达于茎端分生组织（整个分生组织区域都有表达）及发育早期的胚珠。*stm* 突变体幼苗在胚胎发生时不形成茎端分生组织，只有基部融合的子叶，即使有时候形成了比野生型小的茎端分生组织，也会很快停止生长，说明 *STM* 是胚胎中形成茎端分生组织所必需的，并在茎端分生组织的维持中发挥一定的作用。其主要功能是抑制分生组织中细胞的分化，保证分生组织内细胞的扩增，从而有足够数量的细胞成为器官原基。

Katz 等[25]研究发现，FIE 和 cLF 蛋白(分别与 PcG 家族蛋白 Eed 和 Ezh2 同源)抑制 *STM* 基因表达。研究表明植物干细胞全能性的丧失与 PcG 介导的基因沉

默有关。

*CUC*属于*NAC*基因家族，是一类转录因子。该基因的主要功能被认为是建立和维持茎端分生组织细胞与子叶原基细胞之间的边界[26-28]。

拟南芥ZLL是AGo家族蛋白，在*zll*突变体中，种子萌发不久茎尖分生组织就进入终端分化，导致只产生一个或少数几个花器官[29]；ZLL的异位表达引起细胞过度分裂并形成异位分生组织，说明ZLL在建立稳定的干细胞群中发挥重要作用。研究已证实，AGO家族蛋白的功能是通过siRNA和miRNA控制mRNA稳定性或者抑制frlRNA翻译[30]。在动物中，AGo蛋白也与干细胞的调控有关[31]。

*BARD1*对茎端分生组织有重要作用。研究发现*bard1-3*完全敲除突变体在茎端分生组织表现出剧烈异常，大量细胞快速增生，但只形成许多管状的突起，突变体引起的性状改变与*WUS*相关[32]。

在生殖生长阶段，茎端分生组织转变为花分生组织。遗传学和分子生物学实验证明有许多基因参与花分生组织的调控，形成特定种类和数量的花器官。比如；ABCDE”模型中的各类基因单独或协同作用形成花的各轮器官；*AP1*是花序分生组织向花分生组织转变过程中的必需基因等。

激素对植物的生长和发育具有重要的调控作用[33, 34]。最近的研究表明，生长素通路中的 *PCN* 基因能通过整合生长素信号参与和维持茎顶端分生组织[35]。在茎端，生长素控制茎尖干细胞的分化、促进器官原基的形成。生长素向茎端分生组织运输，在分生组织中形成生长素高浓度区域；与此同时，生长素的积累会抑制Ⅰ型 *KNOX* 基因的表达，如 *STM*[24]，然后高浓度的生长素和Ⅰ型 *KNOX* 的表达下降共同促进该区域的细胞参与器官原基的形成。

1.4 *WUS* 基因

1.4.1 *WUS* 对茎端分生组织的调控

*WUS*基因的研究，尤其是*WUS*与其他几个茎端分生组织相关基因之间关系的阐明，使茎端分生组织调控机制的研究取得重大突破。

wus 突变体生成的有缺陷的茎端分生组织，使植物生长发育走走停停，不仅速度减缓，而且在器官的发生上总是过早终止并不断形成新的分生组织，最终以

厦门大学博硕士论文摘要库

单个雄蕊状心皮结束，说明 WUS 对与茎端分生组织的自我更新和维持是必不可少的。WUS 的异位表达会引起异位分生组织的生成。*WUS* 胚胎时期表达模式的分析，表明 *WUS* 在茎端分生组织的组织中心表达（少数 L3 层的细胞），表达 WUS 的细胞对其上面一群细胞的命运起决定作用，即 *WUS* 是干细胞决定基因。

1.4.2 WUS 蛋白是一个双功能的转录因子

WUS 是一个具有双功能的 WOX(WUS-like homeobox)家族蛋白[36]，对于茎端分生组织具有负调控作用，而对于花分生组织中的 AG 基因却具有正调控作用[37]。

WUS 与 CLV3 形成一个反馈调节环来维持茎端分生组织中新器官的启动和干细胞的维持[38]。干细胞标志基因 CLV3 在 WUS 表达区上面表达，限于茎端分生组织中央区的表层(L1 和 L2)。*clv3* 与 *wus* 突变体的茎端分生组织状态相反，形成膨大的分生组织和较多的花器官，而 *wus* 和 *wus clv3* 突变体的茎尖分生组织以及花分生组织结构没有差别；在转 *ANT::WUS* 拟南芥中(ANT 在器官原基以及正在发育的器官中表达)出现含有 CLV3 表达产物的栓状分生组织，说明 WUS 可以诱导 CLV3 的表达[38, 39]，而且决定该位置的细胞成为干细胞。过表达 CLV3 会导致分生组织终止，产生类似于 *wus* 的表型[6,19]；WUS 在 *clv3* 中表达区域扩大，说明过表达的 CLV3 会反过来抑制其激活子 WUS 的表达。

研究认为，WUS 和 AG 在花分生组织中也形成了一个反馈调节环，调节三四轮花器官的形成和花分生组织的终止[40, 41]。遗传学实验表明，在花发育第三期，AG 被 WUS 激活并在第 3 轮和第 4 轮花器官中表达，当心皮原基启动之后，AG 抑制 WUS 的转录，CLV3 也被抑制，最终导致花分生组织活性终止。但 lfy-6/lfy-6 植株中的 WUS 不能激活 AG::WUS AG::GUS，说明 WUS 诱导 AG 需要 LFY 的活性，不过 LFY 与 WUS 之间没有相互作用[40]。WUS 和 LFY 这 2 个基因都通过与 AG 的 cis 调控位点结合来诱导 AG 的表达[42]。AG 则通过两条途径来抑制 WUS 的表达：一条是通过招募 PcG 蛋白直接抑制 WUS 表达[13]，另一条是通过激活 KNU 基因的表达间接抑制 WUS 表达[43]。在花发育第三期，WUS 的表达水平达到高峰，之后 AG 通过第一条途径直接抑制 WUS 的表达，直到花发育的第六期，第二条途径也加入进来[13]。

厦门大学博硕士论文摘要库

1.4.3 *BARD1* 是 *WUS* 表达的限制因子

*BARD1*可能通过限制WUS在组织中心的特异表达进而调节茎尖分生组织功能。*bard1-3*完全敲除突变体在茎端分生组织表现出剧烈异常，大量细胞快速增生，但是没有正常的组织分化，通过检测发现*WUS*的转录水平剧烈升高，同时表达区域从组织中心转移到外面的几层细胞；凝胶阻抑实验结果表明，野生型核提取物可以与*WUS*上游启动子区(F4)DNA形成DNA-蛋白复合物，并被特异性识别BARD1蛋白的抗体所识别，而在*bard1-3*中无法形成；遗传学分析表明，*bard1-3*茎端分生组织的表型在*wus-1 bard1-3*双突变体中被抑制，过表达*BARD1*的拟南芥茎端分生组织表型与*wus-1*类似，这些实验都证明了*BARD1*能够限制WUS在组织中心的特异表达[32]。用BARD1 C末端的氨基酸部分（464）可以使*bard1-3*的表型回复，同时恢复WUS表达水平，表明BARD1对于WUS的调节主要通过C末端起作用[44]。

在分生组织内 *WUS* 和 *STM* 的功能是互相独立的[45]，但当 *WUS* 与 *STM* 共同组成性表达时可以在下胚轴启动器官发生，在抑制细胞分化方面它们表现出一定的协同性[46]。Brand 等发现，在胚胎中 *WUS* 是 *CLV3* 的唯一激活因子，而在胚胎以外的组织 *WUS* 和 *STM* 一起激活 *CLV3* 的表达(如下胚轴、幼苗分生组织) [45]。

在胚胎后期发育过程中，*WUS* 能抑制一些 A 类 ARRs（Arabidopsis response regulator）的表达，这些 ARRs 是细胞分裂素的负调控因子[47, 48]；细胞分裂素水平的升高可以抑制 *CLV3* 进而影响 WUS-CLV 反馈调节环，使 WUS 的表达水平也升高。因此 *WUS* 和细胞分裂素信号形成正反馈调控机制以介导顶端分生组织的正确形成[49]。

1.4.4 WUS 基因的功能域分析

研究发现，WUS 的 C 末端区域，对于 WUS 发挥生物功能是必不可少的。WUS 的 C 末端主要包括三个区域：acidic region，WUS-box 和 EAR-like motif[50]。其中 WUS-box 区域在 WUS 直系同源蛋白 WOX 中是一个保守区域[50, 51]，而 EAR-like motif 在植物转录因子中也是一个保守区域[41]。

对 WUS 基因功能域的分析主要从这三个区域着手。2009 年，Miho 等人进

行了瞬时表达实验：构建 pro35S:GAL4-WUS 和 pro35S-GAL4:LUC 这两个载体并同时在拟南芥叶片中表达，此时 WUS 全蛋白具有很强的抑制活性，抑制报道基因 *LUC* 的表达；当分别对 WUS 的 WUS-box 和 EAR-like motif 区域进行突变，WUS 的抑制活性不变；但若将这两个区域同时突变，不仅 WUS 的抑制活性丧失，而且还有比较强的激活作用；如若将 WUS C 末端的三个区域同时突变，WUS 的激活作用也消失。证明 WUS-box 和 EAR-like motif 这两个区域为 WUS 的抑制域，而 acidic region 为其激活域[37]。

进一步研究发现，acidic region 区域或 EAR-like motif 区域突变的 WUS 依然可以诱导幼苗根部形成体细胞胚，但若超表达 WUS 的 WUS-box 区域突变，则幼苗，花等正常，说明 WUS-box 的突变能够消除 WUS 诱导干细胞形成的功能，其它两个区域突变则不能；当 WUS-box 区域缺失时，WUS 激活 CLV3 和 AG 的功能丧失；互补分析实验证明用 *WUS* 启动子表达的 WUS box 缺失的 WUS 不能恢复 *wus-1* 的表型，这些都说明 WUS-box 区域对 WUS 的功能发挥是必不可少的，是其重要功能域。

2 泛素蛋白酶体系统

目前的研究发现真核生物体内存在多种蛋白降解方式，按其对能量的需求可划分为两类：ATP 非依赖型蛋白降解和 ATP 依赖型蛋白降解，前者主要包括溶酶体途径和胞液蛋白水解酶途径（钙蛋白酶系统、半胱氨酸蛋白酶家族等）；后者则包括非泛素蛋白酶体系统和泛素蛋白酶体系统（UPP）。自科学家阿龙切哈诺沃(A aron Ciechanover)、阿夫拉姆赫什科（Avram H ershko）和美国科学家欧文罗斯（Irwin Rose）[52]发现泛素介导的蛋白质降解机制以来，与这一降解过程相关的细胞新功能不断被发掘出来。

泛素蛋白酶体途径是指目标蛋白在泛素相关酶的作用下被加上多泛素链后，进入蛋白酶体发生降解的过程[53]。主要作用于细胞内变性、错构、损伤或过量表达的蛋白质以及细胞中的许多调控蛋白[54]。

UPP 系统是真核生物中最精细的调控体系之一，很多重要生命过程的关键蛋白都受到它的调节，对维持细胞功能、DNA 修复、抵御环境胁迫、胚胎发育、

厦门大学博硕士论文摘要库

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