

植物基因克隆研究进程分析

王新宇

北京市朝阳区爱迪外国语学校, 中国·北京 100018

摘要: 植物基因克隆研究在农作物、苗木、花卉、药材、果树、园艺、绿化造林等领域取得了巨大成功。通过人为调控培养条件, 植物基因克隆能够快速生长和繁殖, 且管理便利, 方便实现自动化操作。与传统方法相比, 其具有材料经济、成本节约的特点, 并能够培育出无毒苗木和突变体。植物基因克隆的结构多样, 根据不同目的可以进行适应性改良和设计。植物基因克隆的广泛应用将推动农业和园艺产业的发展, 并为人们提供更加高效和可持续的种植方式。未来的研究将进一步完善植物基因克隆的技术和方法, 以满足不同领域的需求。

关键词: 植物基因; 克隆; 材料经济; 成本节约

Analysis of the Research Progress on Plant Gene Cloning

Xinyu Wang

Aidi Foreign Language School in Chaoyang District, Beijing, Beijing, 100018, China

Abstract: Plant gene cloning research has achieved great success in fields such as crops, seedlings, flowers, medicinal herbs, fruit trees, horticulture, and afforestation. By artificially regulating the cultivation conditions, plant gene cloning can grow and reproduce rapidly, and management is convenient, making it easy to achieve automated operations. Compared with traditional methods, it has the characteristics of material economy and cost savings, and can cultivate non-toxic seedlings and mutants. The structure of plant gene cloning is diverse, and adaptive improvements and designs can be made according to different purposes. The widespread application of plant gene cloning will promote the development of agriculture and horticulture industries, and provide people with more efficient and sustainable planting methods. Future research will further improve the technology and methods of plant gene cloning to meet the needs of different fields.

Keywords: plant genes; cloning; material economy; cost savings

1 引言

植物基因克隆在农业和园艺领域具有广泛应用和巨大潜力。通过植物基因克隆技术, 可以有效改良植物的遗传特性, 提高农作物产量和质量, 增强抗病虫害能力, 并培育出具有特定功能和性状的新品种。此外, 植物基因克隆也为研究物种适应性、生长发育和生理机制提供了有力工具。然而, 尽管已取得明显成果, 仍需进一步研究解决其面临的挑战, 如技术限制、伦理问题等。论文旨在分析探讨植物基因克隆的研究进展, 并展望其未来发展方向, 以促进农业和园艺领域的可持续发展。

2 植物基因的结构和功能

2.1 植物基因的启动子

基因是核酸分子中包含遗传信息的基本单位。植物基因通常由转录区和非转录调控区组成。转录区指基因序列中编码蛋白质所需的区域, 包括启动子、外显子和内含子。其中, 启动子是位于结构基因上游的特定区域, 它决定了基因的转录起始点。启动子可以进一步划分为三个部分: 转录起始位点 (Transcription Start Site, TSS): 即基因转录的起始位置, 标志着 RNA 聚合酶的结合点。TSS 上游 25~40bp 区域

这是启动子的核心区域, 包含与起始转录复合物形成相关的序列元件, 如 TATA-box 和 CAAT-box 等。TSS 上游 75bp 以上的区域: 这部分区域被称为远距离调控区域, 包含与转录调控因子相互作用的位点, 如增强子和抑制子。这些调控元件可以通过与转录因子的结合来调节基因的表达。启动子的特征和序列元件的组合决定了基因的转录活性和调控能力。深入理解植物基因启动子的结构和功能对于揭示基因表达调控机制、提高植物产量和抗性等具有重要意义(见图 1)。



图 1 植物基因启动子

2.2 植物基因的增强

植物基因的增强子是调控基因表达的重要 DNA 序列, 包括多个顺式作用元件, 通过与转录因子相互作用来调节基

因表达。这些元件可以促进或抑制基因的转录活性，并通过介导染色质的改变来影响基因表达状态。研究显示增强子的特征、功能和调控机制对理解植物基因表达网络至关重要，有助于农业和园艺领域的品种改良和产量提高。

2.3 植物基因的加尾信号与密码

植物基因克隆研究中，加尾信号 (polyadenylation signal) 和密码子 (codon) 在基因表达调控中起着重要的作用。加尾信号是指在 RNA 转录过程中，在基因编码区域的 3' 末端位置附近存在的一段特定序列。这段序列是通过与聚腺苷酸 (A) 尾合成酶结合，促使 mRNA 转录过程中将 ADP-核糖基连接到基因末端形成聚 A 尾的信号。聚 A 尾的形成对于 mRNA 的稳定性、转运和翻译具有重要作用。聚 A 尾可以保护 mRNA 不受核酸酶的降解，延长 mRNA 的半衰期，增加 mRNA 的稳定性。同时，聚 A 尾还能够作为转运 RNA 的识别标志，帮助将 mRNA 从细胞核运送到细胞质，参与翻译过程。此外，聚 A 尾还在基因表达调控过程中发挥重要的调节作用，影响 mRNA 的转录速率和翻译效率。密码子是基因组中编码氨基酸的三个核苷酸序列。密码子的不同排列和序列决定了不同氨基酸的编码规则。植物基因中的密码子遵循通用的遗传密码表，对应着二十种常见氨基酸。密码子序列的变化可以导致氨基酸序列的改变，从而影响蛋白质的功能和结构。在植物基因克隆研究中，了解加尾信号和密码子的作用是至关重要的。合理设计和选择适当的加尾信号可以提高 mRNA 的稳定性、转运和翻译效率，有助于增强基因的表达。同时，对密码子序列的分析和优化也能够提高蛋白质的产量和质量，改良基因表达系统的效果。研究加尾信号和密码子在植物基因克隆中的作用，对于高效获得目标基因表达产物以及深入理解基因的功能和调控机制具有重要意义 (见表 1)。

3 基因克隆的载体

基因克隆的载体是可以携带外源 DNA 片段进入寄主细胞，并实现 DNA 片段复制或表达的 DNA 分子。根据其功能，可以将载体分为克隆载体和表达载体两大类。根据载体的组成不同，还可以进一步分为质粒载体、噬菌体载体、黏质载体和人工染色体等几种。克隆载体 (Cloning Vectors)：

克隆载体主要用于在细菌或其他寄主细胞中进行外源 DNA 片段的复制和克隆。常见的克隆载体是质粒 (Plasmid)，它是圆形或线性的双链 DNA 分子，能够自主复制并稳定存在于细胞中。质粒上有多个重要元件，如起始子 (Origin of Replication)，选择标记 (Selection Marker) 和多克隆位点 (Multiple Cloning Site)，分别用于复制、筛选和插入目标 DNA 片段。表达载体 (Expression Vectors)：表达载体是用于在细胞中实现外源基因的转录和翻译，从而使目标蛋白产生的载体。表达载体基本上包括克隆载体的功能，并添加了启动子 (Promotor) 和终止子 (Terminator) 等调控序列。此外，还可以加入报告基因 (Reporter Gene)，以便在转化细胞中检测基因表达程度。常见的表达载体包括 pET、pUC、pGEX 等。噬菌体载体 (Phage Vectors)：噬菌体载体是用细菌感染噬菌体，在噬菌体颗粒内复制和表达外源 DNA 片段的载体。常见的噬菌体载体有 M13、λ-phage 等。黏粒载体 (Homologous Recombination Vectors)：黏粒载体是结合了噬菌体和质粒的特点，不仅具备质粒的方便操作性，还可利用噬菌体感染特性使 DNA 片段进入宿主细胞中。人工染色体 (Artificial Chromosomes)：人工染色体是由大片段外源 DNA 构建的人造染色体，能够携带较长的外源 DNA 片段。常见的人工染色体有 BAC、YAC 等。这些载体在基因克隆和基因表达研究中发挥重要作用，能够有效地将目标基因导入到细胞中并进行复制或表达。

4 基因克隆的工具酶

在基因克隆的过程中，涉及了一系列工具酶的应用，包括限制性核酸内切酶、连接酶、修饰酶和合成酶等。限制性核酸内切酶 (Restriction Endonucleases)：限制性酶是一类能够识别特定 DNA 序列并在其内部切割双链 DNA 的酶。通过选择性切割 DNA，限制性酶在基因克隆中起到了重要的作用，如制备 DNA 片段、切割质粒和目标基因等。连接酶 (Ligases)：连接酶能够将两条 DNA 片段通过形成磷酸二酯键连接在一起。在基因克隆中，连接酶被广泛应用于连接同源或异源 DNA 片段，如质粒和目标基因、DNA 片段和载体等。修饰酶 (Modifying Enzymes)：修饰酶可以在 DNA 分子上进行特定的改变或修饰，如甲基化、去甲

表 1 加尾信号和密码子在植物基因克隆中的作用

加尾信号 (polyadenylation signal)	密码子 (codon)
通过与聚腺苷酸 (A) 尾合成酶结合，促使 mRNA 转录过程中将 ADP-核糖基连接到基因末端，形成聚 A 尾的信号	基因组中编码氨基酸的三个核苷酸序列
保护 mRNA 不受核酸酶降解，增加稳定性和延长半衰期	决定氨基酸的编码规则，遵循通用的遗传密码表
作为转运 RNA 的识别标志，帮助将 mRNA 从细胞核运送到细胞质，参与翻译过程	密码子序列的变化可以导致氨基酸序列的改变，影响蛋白质的功能和结构
在基因表达调控过程中发挥重要的调节作用，影响转录速率和翻译效率	合理设计和选择适当的密码子序列可以提高蛋白质的产量和质量
在植物基因克隆中，了解加尾信号的作用可以提高 mRNA 的稳定性 and 转运效率	在植物基因克隆中，对密码子序列的分析和优化有助于增强基因的表达
对于高效获得目标基因表达产物和深入理解基因的功能和调控机制具有重要意义	在基因表达系统的改良和优化方面具有重要作用

基化、磷酸化等。这些修饰过程可以影响 DNA 的结构和功能,对基因克隆的成功与否起关键作用。合成酶 (Synthetic Enzymes): 合成酶是通过合成新的 DNA 分子来应对基因克隆需求的酶类,如聚合酶、逆转录酶等。这些酶可以合成 DNA 片段,用于基因克隆中的重组和扩增。这些工具酶在基因克隆过程中起到了至关重要的作用,为科学家提供了有效的手段来操作和改变 DNA 分子。它们使得基因克隆技术成为可能,进一步推动了基因组学、分子生物学和生物工程等领域的研究和应用。

5 植物基因克隆的策略

5.1 功能克隆

植物基因克隆的策略主要包括功能克隆、表达克隆和高通量测序等方法。功能克隆: 功能克隆是根据已知基因的功能信息来克隆目标基因。具体步骤包括构建 DNA 文库或基因组文库,然后根据特定的筛选方法选择编码目标蛋白质的基因。常用的筛选方法有两种: 一种是基于已纯化的蛋白质进行氨基酸序列测定,然后合成寡核苷酸探针,从 DNA 文库或基因组文库中筛选出编码基因; 另一种是将已知蛋白质制备为相应的抗体探针,使用抗体方法从 DNA 插入载体的表达库中筛选出克隆。表达克隆: 表达克隆是针对感兴趣的基因进行表达,以获得大量的目标蛋白质。首先需要将目标基因插入表达载体中,并经过适当的转染、转化等方式使其进入宿主细胞,然后通过合适的诱导方法使宿主细胞表达目标蛋白质。在表达载体选择上,通常会根据目标蛋白质的性质选择合适的表达系统,如大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、哺乳动物表达系统等。高通量测序: 随着高通量测序技术的发展,现在可以直接对整个基因组进行测序分析。这种方法不需要构建文库,可以全面地获取基因组中的所有基因信息。通过对比分析,可以鉴定和分离出特定的基因,并进一步研究其生化功能和遗传调控关系。植物基因克隆的策略取决于所需的研究目标和条件。功能克隆适用于对已知基因功能的研究,表达克隆用于大规模获得目标蛋白质,而高通量测序则提供了全面的基因组信息。

5.2 定位克隆

定位克隆是一种基于遗传连锁分析的策略,通过将目标基因与 DNA 标记进行连锁分析,逐步缩小筛选区域来克隆该基因,并研究其功能或抗性的生化机制。在连锁分析中,通过观察基因与 DNA 标记之间的共遗传模式,可以对它们之间的距离进行估计。如果某一性状的基因与某个 DNA 标记在后代中呈现不分离的趋势,即具有连锁关系,那么可以将这个已知的 DNA 标记作为定位基因来进一步定位待研究的基因。然而,由于连锁分析需要依赖特定的基因作为连锁标记,也即标记基因与待研究基因之间的连锁关系,而满足这种连锁关系的基因往往非常有限,因此连锁分析在克隆大多数基因时存在一定的困难。然而,随着限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术的出现,多态性基因标记可以分布在整个基因组中,解决了连锁分析中与克服困难的难题。RFLP 技术利用 DNA 序列的变异可以产生限制性酶切位点的差异,

从而形成多态性标记。这些多态性标记可以用于连锁分析,并能够帮助确定目标基因在染色体上的位置。通过使用定位克隆策略,研究人员可以根据连锁分析结果逐步缩小筛选范围,最终克隆出目标基因,并进一步研究其功能、生化机制以及对特定性状的遗传调控关系。

5.3 转座标记法

转座子是一种能够从一个基因位置移动到另一个位置的 DNA 片段。在转座过程中,原来位置上的 DNA 片段并未消失,只有转座子的位置发生了转移。基因发生转座可以引起插入突变,使得新的编码基因出现在插入位置上。通过转座子上的标记基因,可以检测突变基因的位置并克隆它们。转座子标记法将转座子作为基因定位的标记,并利用转座子在染色体上的插入和结合来克隆基因。转座子标记法在植物基因克隆研究中发挥着重要作用。通过利用特定的转座子家族,研究人员可以将标记基因插入转座子中,并将其导入宿主细胞或植物。转座子在基因组中的插入和结合会产生可供筛选的突变体,进而帮助定位和克隆目标基因。通过分析突变体及其遗传学行为,研究人员可以确定转座子插入的位置,并进一步克隆和研究相关基因的功能。在植物基因克隆的领域,人类已经取得了显著进展。然而,要完全解读生命的基因组,植物基因克隆的研究仍然任重道远。进一步的植物基因克隆进展需要依赖基因克隆技术的不断发展与创新。转座子标记法作为一种重要的工具之一,为研究人员提供了定位和克隆基因的手段,促进了植物基因功能和调控机制的深入探索。

6 结语

植物基因克隆的研究为我们深入了解植物基因组的结构和功能提供了宝贵的工具。通过各种克隆策略,我们可以精确地定位、克隆和研究目标基因,进而揭示植物生物学中的重要机制和调控网络。然而,植物基因克隆仍然面临着许多挑战和困难。我们仍需不断推进基因克隆技术的发展与创新,以更好地理解植物的遗传特性并为植物育种、遗传改良和疾病治疗等领域的应用提供支持。相信未来植物基因克隆的进展将为人类的农业、环境和生命科学做出更大的贡献。

参考文献:

- [1] 王海波,吴贞莹,郭俊云.小桐子植物特异性酪蛋白激酶PS-CK1-5基因的克隆及原核表达分析[J/OL].热带亚热带植物学报:1-9 [2023-10-08].
- [2] 王月,薛佳宇,周广灿,等.十字花科植物芥酸合成基因FAE1-closest的克隆及功能分析[J].植物资源与环境学报,2023,32(3): 45-51.
- [3] 王新宇.植物基因克隆研究进程分析[J].基础医学理论研究,2023, 5(2):35-37.
- [4] 徐靖辰,王彦芹.荒漠植物花花柴耐高温相关基因HTR的克隆及表达模式分析[J].塔里木大学学报,2023,35(1):31-38.
- [5] 邹婷,刘丽莉,向建华,等.芸薹属植物MYBL2基因的克隆及其在A、B、C基因组中的PCR鉴别[J].中国农业科学,2023,56(3): 416-429.