

转柽柳和星星草双价金属硫蛋白基因烟草对Cd²⁺和Cu²⁺的抗性分析

张艳^{1,2,3,*}, 杨传平⁴

¹黑龙江省教育学院, 哈尔滨150080; ²东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨150040; ³黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨150086; ⁴东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 金属硫蛋白(MT)是一类广泛存在于生物中的低分子量、富含半胱氨酸且可结合重金属的蛋白质, 在土壤重金属污染的治理中发挥重要作用。将从柽柳和星星草cDNA文库中克隆的MT基因构建在同一植物表达载体pRCXM上, 通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草‘龙江911’, 获得了抗卡那霉素的转基因植株。PCR-Southern和Northern blot检测证明双价MT基因已整合进烟草基因组中并可正常表达。抗性试验证明双价MT基因的转入提高了转基因烟草对Cd²⁺和Cu²⁺的抗性, 转基因烟草分别能在300 μmol·L⁻¹ Cd²⁺或150 μmol·L⁻¹ Cu²⁺的胁迫下正常生长。本研究结果对通过基因工程技术培育植物修复新品种提供了理论基础。

关键词: 金属硫蛋白; 星星草; 柽柳; 烟草

Ectopic Expression of Two Metallothionein Genes Enhances Tolerance to Cd²⁺ and Cu²⁺ in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

ZHANG Yan^{1,2,3,*}, YANG Chuan-Ping⁴

¹Heilongjiang College of Education, Harbin 150080, China; ²Station of Postdoctor, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ³Station of Postdoctor, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; ⁴Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Metallothionein (MT) is a low molecular weight, cysteine-rich, and heavy metal-binding protein. MT plays important roles in controlling heavy metal pollution of soil. Two MT genes from *Tamarix androssowii* and *Puccinellia tenuiflora* were cloned into the same vector pRCXM. Kanamycin-resistant transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* ‘Longjiang 911’) plants were obtained using *Agrobacterium*-mediated gene transferring method. PCR-Southern and Northern blot analysis indicated that two MT genes were indeed integrated into the tobacco genome and expressed in tobacco. Resistance tests proved that the expression of two MT genes enhanced tolerance to Cd²⁺ and Cu²⁺ in tobacco. The transgenic plants can live in the medium with 300 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ or 150 μmol·L⁻¹ Cu²⁺. Our study provides theoretical references for cultivating new varieties of phytoremediation by genetic engineering technology.

Key words: metallothionein; *Puccinellia tenuiflora*; *Tamarix androssowii*; tobacco (*Nicotiana tabacum*)

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量(6 000~7 000 Da)、富含半胱氨酸、不含组氨酸和芳香族氨基酸且具有金属结合能力的非酶多肽。1957年, 动物MT在马肾细胞中首次被发现(Margoshes和Vallee 1957)。1982年, 植物MT在大豆根中发现(Casterline和Barnett 1982)。与动物MT相比, 植物MT发现较晚, 由于其活性巯基含量较高, 易被氧化破坏, 因此分离、纯化非常困难。一般认为, 植物MT在转运重金属并解除其毒性、调节微量必需金属的体内稳态及参与多种胁迫抗性的形成和活性氧清除等方面起作用(代勋和龚明 2011), 其中研究最多的是MT对重金属的解毒能

力。Thomas等(2003)、Lee等(2004)、Grispen等(2009)相继证明转入外源MT基因有助于提高植物对重金属的抗性, 但目前的研究多集中在将单一MT基因转入不同的植物, 而转双价MT基因的报道还不多见。柽柳是抗干旱和耐盐碱能力极强的沙漠植物, 星星草是盐碱化草地上的优势植物, 也具有较强的耐盐碱能力, 本实验室在研究二者的抗逆性时, 从cDNA文库分别克隆了柽柳和星星草的

收稿 2012-12-14 修定 2013-01-28

资助 国家“973”计划项目(G1999016000)。

* 通讯作者(E-mail: zy021208@163.com; Tel: 0451-82456373)。

*MT*基因,本研究将柽柳和星星草双价*MT*基因导入烟草,获得了对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 具有较高耐受力的转基因植株。

材料与方法

植物表达载体pROKII由张慧教授惠赠;大肠杆菌感受态TOP10购自德美生物技术有限责任公司;农杆菌EHA105、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)‘龙江911’为东北林业大学林木遗传育种实验室提供。

根据柽柳(*Tamarix androssowii* L.)和星星草(*Puccinellia tenuiflora* L.) *MT*基因cDNA序列,设计并合成引物,以文库质粒为模板,分别从柽柳和星星草cDNA文库扩增*MT*基因。柽柳*MT*基因引物:5'引物,5'-CCTCTAGAGCAAAAATGTCTTCTTGTGGAGGAAGT-3';3'引物,5'-ATGGTACCCG-GGGATCCAGATGCAAATCGATGGCATATGAT-TAA-3'。星星草*MT*基因引物:5'引物,5'-CCTC-TAGATGCCGATTCGGCACGAGGGTAATCT-CA-3';3'引物,5'-ATGGTACCTGCAGCTTAA-CAGTTGCAAGGGTTGCA-3'。PCR反应条件为:94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,30个循环;最后72 °C延伸7 min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

将柽柳、星星草*MT*基因分别克隆到载体pROKII上,并将重组质粒命名为pRCM和pRXM。以pRXM为模板,PCR扩增包含P35S启动子和星星草*MT*基因约1 089 bp序列。将PCR扩增产物定向克隆到重组质粒pRCM中,构建的植物双价表达载体命名为pRCXM(图1)。

用电击法将植物双价表达载体pRCXM导入农杆菌EHA105中,通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草‘龙江911’,用卡那霉素(Kan)进行筛选,得到再生植株。

PCR及PCR-Southern分析时,以CTAB法提取的转基因烟草和对照烟草叶片总DNA为模板,进

行PCR扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后转至尼龙膜上,用DIG探针合成试剂盒(Roche公司),分别标记柽柳、星星草*MT*基因cDNA为探针,进行杂交。用DIG CDP-StarTM化学发光检测试剂盒(Roche公司)检测杂交条带。

Northern blot分析时,用SDS法提取转基因烟草和对照烟草叶片的总RNA,取20 μg总RNA在65 °C变性5 min,经1%甲醛变性胶电泳分离后转至尼龙膜上进行Northern杂交,探针标记方法及杂交程序与上述Southern杂交相同。

检测转基因烟草对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 抗性时,将转基因烟草和对照烟草的无根幼苗分别移到含 Cd^{2+} (浓度为0、100、200和300 μmol·L⁻¹)或 Cu^{2+} (浓度为0、75、150和225 μmol·L⁻¹)的MS生根培养基中,每个株系每个浓度选30棵植株,放在(26±1) °C、40 μmol·m⁻²·s⁻¹光强、16 h光照/8 h黑暗条件下培养,20 d后统计组织培养苗的生根情况,50 d后观察其生长状况并测量其鲜重和株高。

用SPSS软件进行数据分析。

实验结果

1 PCR扩增柽柳和星星草*MT*基因

PCR扩增的柽柳*MT*基因为513 bp,包括柽柳*MT*基因开放读码框(*MT_{cl}*) 256 bp及3'非翻译区终止序列(*T_{cl}*);PCR扩增的星星草*MT*基因(*MT_{xx}*)为289 bp,包括上游-45~-35 bp处一个金属应答元件(MRE)序列TGCCGATTCGG(图2)。

2 转基因烟草的PCR和PCR-Southern检测

PCR检测7株转基因烟草及对照烟草,结果表明,用柽柳*MT*基因特异引物进行扩增可获得256 bp的目的条带,用星星草*MT*基因特异引物进行扩增可获得289 bp的目的条带,7株转基因烟草均扩增出与阳性质粒对照大小一致的产物,而对照烟草则没有扩增出目的片段(图3)。

为进一步明确扩增产物是否为目的基因片段,

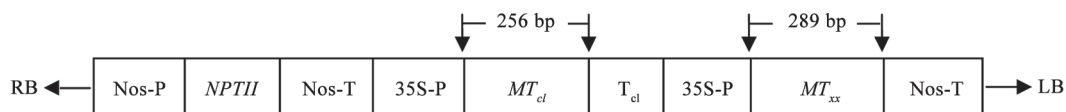


图1 载体pRCXM的构建

Fig.1 Construction of vector pRCXM

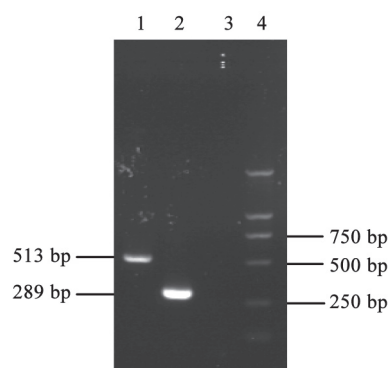


图2 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR product

1: 怪柳MT基因; 2: 星星草MT基因; 3: 阴性对照; 4: M: DNA分子量标准。

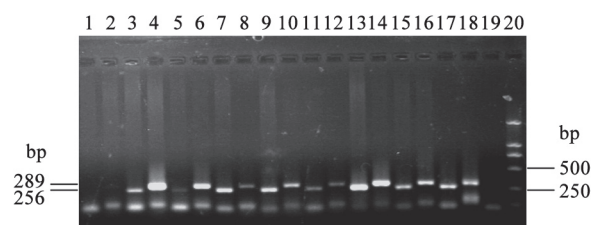


图3 转基因烟草的PCR检测

Fig.3 Identification of PCR products of transgenic tobacco plants

1和2: 对照烟草(阴性对照); 3~16: 转基因烟草T₀-1~T₀-7; 17和18: pRCXM质粒(阳性对照); 19: 水(对照); 20: M: DNA分子量标准。

分别用怪柳和星星草MT基因标记的探针对7株转基因烟草进行PCR-Southern杂交。图4显示, 7株转基因烟草均有杂交带, 证明PCR扩增得到的片段的确实是怪柳和星星草MT基因的扩增产物, 双价MT基因已整合到烟草基因组中。

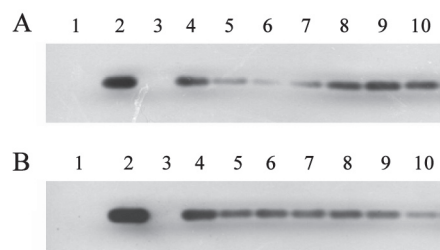


图4 转基因烟草的PCR-Southern杂交检测

Fig.4 PCR-Southern blot analysis of transgenic tobacco plants

A: 怪柳MT基因标记的探针杂交结果; B: 星星草MT基因标记的探针杂交结果。1: 水(对照); 2: pRCXM质粒(阳性对照); 3: 对照烟草(阴性对照); 4~10: 转基因烟草株系T₀-1~T₀-7。

3 转基因烟草Northern blot检测

对PCR-Southern杂交中表现为阳性的5株转基因烟草进行了Northern blot杂交检测。结果表明, 转基因烟草中的外源基因都有表达, 但表达量不同(图5)。

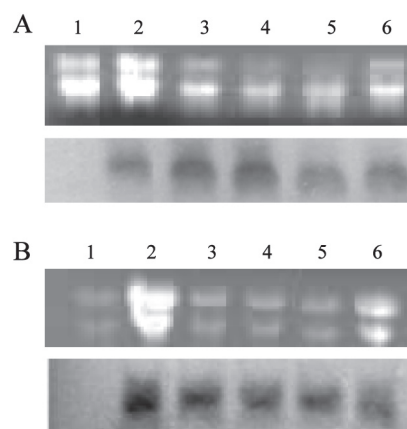


图5 转基因烟草的Northern blot杂交检测

Fig.5 Northern blot analysis of transgenic tobacco plants

A: 怪柳MT基因标记的探针杂交结果; B: 星星草MT基因标记的探针杂交结果。1: 非转基因烟草; 2~6: 转基因烟草T₀-1~T₀-5。

4 转基因烟草对Cd²⁺的抗性分析

非Cd²⁺胁迫下, 转基因烟草和对照烟草均能正常生根。当Cd²⁺浓度为100 μmol·L⁻¹时, 对照烟草生根率降为80%, 而转基因烟草除T₀-9外全部生根; Cd²⁺浓度为200 μmol·L⁻¹, 转基因烟草生长情况良好(图6), 生根率达到60%~90%, 而对照仅为30%; Cd²⁺浓度为300 μmol·L⁻¹, 对照烟草不能生根, 转基因烟草平均生根率为40%, 明显优于对照(表1)。根据转基因烟草及对照烟草在不同浓度Cd²⁺胁迫下的生根情况, 确认双价MT基因的转入提高了转基因烟草对Cd²⁺的耐受性。

图7显示, 在含不同Cd²⁺浓度的MS生根培养基中培养50 d的转基因烟草及对照烟草的鲜重和株高, 在非Cd²⁺胁迫下差异不大, 生长量基本一致。随着Cd²⁺浓度的提高, 转基因烟草的鲜重和株高均高于对照, Cd²⁺浓度为100 μmol·L⁻¹时, 转基因烟草的平均鲜重高于对照15%, 平均株高高于对照9.7%; Cd²⁺浓度为200 μmol·L⁻¹, 转基因烟草平均鲜重高于对照169%, 平均株高高于对照71.6%, 其中生长最好的T₀-6, 其鲜重和株高分别比对照高



图6 T₀代转基因烟草在Cd²⁺浓度为200 μmol·L⁻¹ MS中的生长情况

Fig.6 Growth assay of T₀ generation transgenic tobacco plants on MS medium with 200 μmol·L⁻¹ Cd²⁺

1: 对照烟草; 2: 转柃柳MT基因烟草; 3: 转柃柳和星星草双价MT基因烟草。

表1 Cd²⁺胁迫下T₀代转基因烟草的生根率

Table 1 Root proliferation rate of T₀ generation transgenic tobacco plants under Cd²⁺ stress

株系	个体数/株	Cd ²⁺ 浓度/μmol·L ⁻¹				%
		0	100	200	300	
对照	30	100	80	30	0	
T ₀ -1	30	100	100	60	50	
T ₀ -2	30	100	100	60	20	
T ₀ -3	30	100	100	80	50	
T ₀ -4	30	100	100	90	50	
T ₀ -5	30	100	100	70	30	
T ₀ -6	30	100	100	80	60	
T ₀ -7	30	100	100	60	40	
T ₀ -8	30	100	100	70	20	
T ₀ -9	30	100	90	60	30	

266%和115.1%; Cd²⁺浓度为300 μmol·L⁻¹, 转基因烟草平均鲜重高于对照133%, 平均株高高于对照109.5%。结果表明, 随着Cd²⁺浓度的提高, 转基因烟草由于双价MT基因的超量表达, 不同程度地提高了它们的耐Cd²⁺性。

5 转基因烟草对Cu²⁺的抗性分析

在非Cu²⁺胁迫下, 转基因烟草和对照烟草生根率均达到100%; 在Cu²⁺浓度为75 μmol·L⁻¹时, 转基因烟草平均生根率为94%, 而对照烟草仅为70%; Cu²⁺浓度为150 μmol·L⁻¹, 转基因烟草生长较好(图8), 生根率为30%~60%, 而对照烟草则不能生根; Cu²⁺浓度为225 μmol·L⁻¹, 转基因烟草平均生根率降到7% (表2)。可见, 双价MT基因的转入提高了转基因烟草对Cu²⁺的耐受性, 同时表明Cu²⁺对烟草

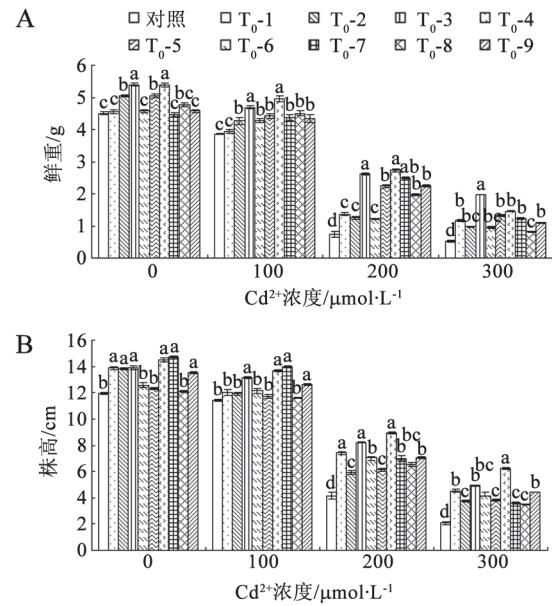


图7 Cd²⁺胁迫下T₀代转基因烟草与对照烟草的鲜重和株高
Fig.7 Fresh weight and height of T₀ generation transgenic tobacco plants and non-transgenic tobacco plant under Cd²⁺ stress

同一测定项目数值标有不同小写字母表示在α=0.05水平上差异显著。



图8 T₀代转基因烟草在Cu²⁺浓度为150 μmol·L⁻¹ MS中的生长情况

Fig.8 Growth assay of T₀ generation transgenic tobacco plants on MS medium with 150 μmol·L⁻¹ Cu²⁺

1: 转柃柳和星星草双价MT基因烟草; 2: 转柃柳MT基因烟草; 3: 对照烟草。

的生根抑制作用较强。

对在含不同浓度Cu²⁺的生根培养基中培养50 d的转基因烟草及对照烟草进行鲜重和株高分析, 结果表明, 在非Cu²⁺胁迫下, 转基因烟草与对照烟草的生长量基本一致; 3种Cu²⁺浓度(75、150和225 μmol·L⁻¹)胁迫下, 转基因烟草的平均鲜重分别高于对照17%、333%和129%, 平均株高分别高于对照9.8%、182%和111.9%; 其中生长最好的T₀-1在150

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu²⁺胁迫下, 鲜重高于对照411%, 株高高高于对照266% (图9)。可见, 随着Cu²⁺浓度的提高, 对照烟草的生长明显减弱, 而转基因烟草的鲜重

和株高明显高于对照, 说明转基因烟草由于双价MT基因的超量表达不同程度地提高了它们的耐Cu²⁺性。

讨 论

目前, 已在水稻、玉米、小麦、大豆、花生、棉花、番茄、腊梅等几十种植物中发现并克隆了MT基因。研究表明, MT基因的表达具有可诱导性, 它受重金属离子、胁迫、损伤、热激、激素等多种因素的影响, 并且诱导发生在转录水平。MT基因的上游存在多种转录调节元件, 如MRE、糖皮质激素效应元件(GRE)等, 这些调控元件协调作用是MT基因高效表达和受多因素诱导的基础(张艳和杨传平2006)。在豌豆、番茄和花旗松等(Evans等1990; Whitelaw等1997; Chatthai等2004)植物的MT基因上游均发现了上述调控元件, 本实验室克隆的星星草MT基因5'非翻译区-45~-35 bp处也包含一个MRE。

我国受重金属污染的耕地面积已达2 000万公顷, 占全国总耕地面积的1/6。植物修复技术是整治土壤重金属污染的重要手段之一, 尤其是MT超强的金属结合特性已成为研究热点。重金属中Cu是植物生长发育必需的微量元素, Cd是植物的非必需元素, 也是生物毒性最强的重金属之一, Cd和过量Cu都会对植物造成毒害, 研究表明将MT基因转入植物会不同程度地提高转基因植物对Cd和Cu的耐受性。张晓钰等(2000)发现, 转小鼠MTs突变体 $\alpha\alpha$ 烟草可在含 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺的培养基中正常生长。Thomas等(2003)获得的转酵母MTs基因CUP1的烟草幼苗叶片累积了高于对照2~3倍的Cu, 可在Cu含量较高的沙地上生长。张海燕等(2006)将大蒜AsMT2b基因转到拟南芥中过表达, 结果显示拟南芥抗Cd性明显提高, 积累量增加。我们在前期的工作中, 将柃柳MT基因转入烟草, 在Cd²⁺抗性试验中发现转基因烟草能在Cd²⁺浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下生长(张艳等2007), 而本研究获得的转柃柳和星星草双价MT基因烟草能在 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺浓度下正常生长, 说明双价MT基因比单价MT基因更能提高转基因烟草对Cd²⁺的耐受力, 但并不成倍数增长关系。在Cu²⁺胁迫试验中, 转双价MT基因烟草能在 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu²⁺浓度下正常

表2 Cu²⁺胁迫下T₀代转基因烟草的生根率

Table 2 Root proliferation rate of T₀ generation transgenic tobacco plants under Cu²⁺ stress

株系	个体数/株	Cu ²⁺ 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				%
		0	75	150	225	
对照	30	100	70	0	0	
T ₀ -1	30	100	100	60	20	
T ₀ -2	30	100	90	40	0	
T ₀ -3	30	100	80	30	0	
T ₀ -4	30	100	100	50	20	
T ₀ -5	30	100	100	40	0	
T ₀ -6	30	100	90	30	0	
T ₀ -7	30	100	100	40	10	
T ₀ -8	30	100	100	40	10	
T ₀ -9	30	100	90	30	0	

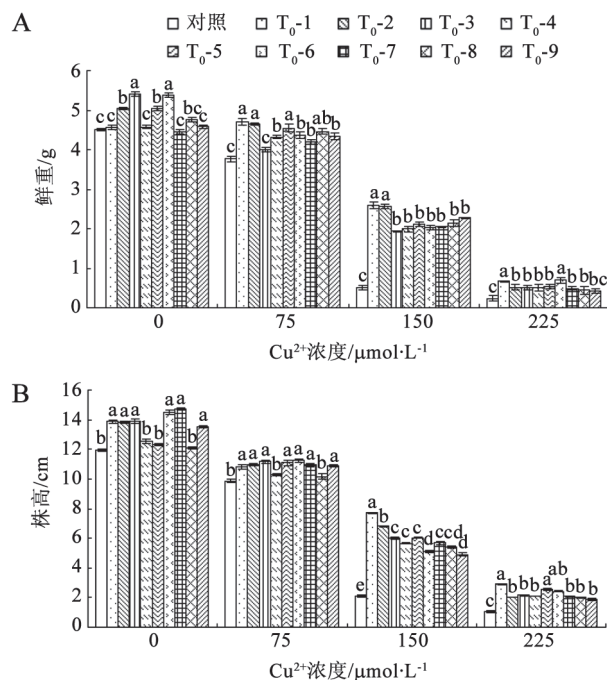


图9 Cu²⁺胁迫下T₀代转基因烟草的鲜重和株高
Fig.9 Fresh weight and height of T₀ generation transgenic tobacco plants and non-transgenic tobacco plant under Cu²⁺ stress

同一测定项目数值标有不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

生长, 而对照烟草只能在 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 浓度下生长, 说明双价 MT 基因的转入提高了植物对 Cu^{2+} 的抗性, 同时发现 Cu^{2+} 对烟草生长的抑制作用更强。本研究结果对通过基因工程技术培育植物修复新品种提供了理论基础。

参考文献

- 代勋, 龚明(2011). 植物金属硫蛋白在植物抗逆性中的作用. 宁夏师范学院学报(自然科学), 32 (3): 47~51
- 张海燕, 徐文忠, 戴文韬, 何振艳, 麻密(2006). 大蒜金属硫蛋白家族新成员AsMT2b在镉离子胁迫下的功能分析. 科学通报, 51 (3): 309~315
- 张晓钰, 周慰, 茹炳根(2000). 转金属硫蛋白突变体 aa 的烟草具有较高的重金属抗性. 植物学报, 42 (4): 416~420
- 张艳, 杨传平(2006). 金属硫蛋白的研究进展. 分子植物育种, 4 (3S): 73~78
- 张艳, 杨传平, 王玉成(2007). 柘柳金属硫蛋白基因($MT2$)的过量表达对烟草耐 Cd^{2+} 性的促进效应. 植物生理学通讯, 43 (4): 693~696
- Casterline JL, Barnett NM (1982). Cadmium-binding components in soybean plants. *Plant Physiol*, 69 (5): 1004~1007
- Chatthai M, Osusky M, Osuska L, Yevtushenko D, Misra S (2004). Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco. *Planta*, 220: 118~128
- Evans IM, Gatehouse LN, Gatehouse JA, Robinson NJ, Croy RRD (1990). A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett*, 262 (1): 29~32
- Grispen VMJ, Irtelli B, Hakvoort HWJ, Vooijs R, Bliet T, ten Boekum WM, Verkleij JAC, Schat H (2009). Expression of the *Arabidopsis* metallothionein 2b enhances arsenite sensitivity and root to shoot translocation in tobacco. *Environ Exp Bot*, 66 (1): 69~73
- Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y (2004). *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol Biol*, 54: 805~815
- Margoshes M, Vallee BL (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 79 (17): 4813~4814
- Thomas JC, Davies EC, Malick FK, Endreszl C, Williams CR, Abbas M, Petrella S, Swisher K, Perron M, Edwards R et al (2003). Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils. *Biotechnol Prog*, 19 (2): 273~280
- Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA, Tomsett AB (1997). The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol*, 33: 503~511