

转星星草金属硫蛋白基因烟草的获得及其抗重金属镉能力分析

王雷, 曲跃军, 杜人杰, 吴丽丽, 王玉成, 姜廷波*

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: 用农杆菌介导法将星星草金属硫蛋白基因(MT)转化烟草, PCR及PCR-Southern检测的结果表明, 该基因已导入烟草中。Real-Time PCR检测显示, 该基因在转基因后代中的转录水平高于非转基因植株。Cd²⁺胁迫下, 转基因植株能够正常生长, 鲜重、株高、叶绿素含量、Cd²⁺含量和SOD活性均高于非转基因植株, 表明MT基因的过量表达可提高转基因烟草的抗Cd²⁺能力。

关键词: 烟草; 金属硫蛋白; 转基因

Identification of *MT* Overexpression in Tobacco and Analysis of Cd²⁺ Resistance in Transgenic Plants

WANG Lei, QU Yue-Jun, DU Ren-Jie, WU Li-Li, WANG Yu-Cheng, JIANG Ting-Bo*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forest University, Harbin 150040, China

Abstract: The metallothionein gene (*MT*) from *Puccinellia tenuiflora* was transformed into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens*. The results of PCR and PCR-Southern hybridization showed that the transformed *MT* gene expressed in tobacco. Real-Time PCR demonstrated that the transcript level of *MT* gene in T₁ generation was higher than that in wild plants. With the treatment of Cd²⁺, the transgenic tobacco plants could grow normally. Fresh weight, plant high, chlorophyll content, Cd²⁺ content and activity of SOD were all higher than those in wild plants. The overexpression of *MT* gene enhanced the resistance to Cd²⁺ in transgenic tobacco plants.

Key words: tobacco; metallothionein; genetic transformation

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种低分子量、富含半胱氨酸残基的金属结合蛋白, 由于其巯基含量高, 对重金属的亲合力大, 因而对多种重金属, 如 Cu、Zn、Pb、Ag、Hg 和 Cd 阳离子都有螯合作用(Milan 和 Jeremias 1981)。另外, 也有报道称 MT 也是一类有效的活性氧清除剂, 能消除细胞内活性氧, 增强植物对外界胁迫的适应性(Campagne 等 1999; Robinson 等 1993)。目前, 人们在小麦、拟南芥、大豆、星星草、番茄及羊茅等植物中发现和克隆了编码该蛋白质的基因(刘桂丰等 2005; Giritch 等 1998; Lane 等 1987; Kawashima 等 1991; Ma 等 2003; Murphy 等 1997)。星星草是禾本科碱茅属多年生草本植物, 具有较强的抗寒、抗旱和耐盐碱能力。关于星星草是否耐重金属镉(Cd)的问题, 未见有文献报道。迄今, 人们已成功构建盐碱胁迫下星星草的消减文库(Wang 等 2007), 并发现在盐碱胁迫下星星草中金属硫蛋白基因的表达量显著升高。为明确星星草金属硫蛋白基因过量表达对提高植物抗 Cd²⁺ 的作用, 本文

用农杆菌介导法将星星草中的金属硫蛋白基因导入到烟草基因组中, 并对转基因烟草在 Cd 胁迫下的生理变化和外源基因的表达进行了检测, 以期用转基因技术改良植物的重金属抗性和对重金属污染的土壤进行植物修复提供参考。

材料与方法

植物材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.)。星星草[*Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. & Merr.]金属硫蛋白基因(MT)由本实验室根据文献(刘桂丰等 2005)中的序列信息克隆获得, 并将其导入植物表达载体 pBI121 上以取代花椰菜病毒 35S 启动子下游的 *gus* 基因, 农杆菌 EHA105 为本实验保存。

采用农杆菌介导的叶盘法对烟草进行遗传转化, 具体操作过程见李凤娟(2007)文中的方法。将

收稿 2008-12-01 修定 2009-02-06

资助 黑龙江省重点科技攻关项目(GB06B303-5)。

* 通讯作者(E-mail: tbjiang@yahoo.com; Tel: 0451-82190607)。

转基因烟草T₀代获得的种子接种于100 mg·L⁻¹卡那霉素的MS培养基上进行抗性筛选。

用CTAB法(王关林和方宏筠2002)提取烟草总DNA。以含有MT基因质粒DNA为阳性对照,以未转化烟草总DNA为阴性对照,以提取的待测烟草总DNA为模板同时进行PCR扩增,以PCR扩增的阳性株DNA为模板进行PCR-Southern杂交。

用Trizol法提取T₁代经PCR检测为阳性并且经Cd²⁺胁迫后的转化植株和未转化烟草的总RNA,按照Reverse Transcriptase M-MLV进行反转录,用SYBR Premix Ex Taq试剂盒(购于大连宝生物公司)进行Real-Time PCR(黄留玉2005; Wang等2006)。

随机挑选T₁代中PCR阳性植株(6株·株系⁻¹),将其移栽至含200 μmol·L⁻¹ Cd²⁺的MS培养基中,45 d后测定其株高、鲜重、POD活性、SOD活性、MDA含量(郝建军和刘延吉2001)和Cd²⁺含量,使用SPAD-502叶绿素仪测定样本叶绿素含量。

对于T₁代转基因植株Kan抗性分离规律的检验采用拟合优度检验中的适合性测验进行推断(杜荣骞1999)。其他数据均利用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析Tukey检验(林杰斌等2002)。

结果与讨论

1 转基因植株的获得

在T₀代中转化160个外植体,获得43株Kan抗性苗,经PCR检测获得37株阳性苗。在T₁代中,随机抽取9个阳性株系,将其种子接种于100 mg·L⁻¹ Kan的MS培养基上进行抗性筛选,结果(表1)表明:

T-1和T-2自交后代Kan抗性植株与非抗性植株的分离比例并不符合3:1($\chi^2 > \chi^2_{0.05}$),其余株系自交后代符合抗性植株:非抗性植株=3:1的比例($\chi^2 < \chi^2_{0.05}$)。这同孟德尔的单个显性基因的分离规律相一致(Horsch等1984;王忠华等2000)。相对于外源基因来说,植物同源染色体上没有其相对应的等位基因位点,外源基因有可能作为一个单显性基因在转基因后代中遗传。

2 转基因植株的分子检测

(1)用CTAB法提取T₀和T₁代Kan抗性植株的总DNA进行PCR检测的结果表明:转基因阳性植株被扩增出分子量约为500 bp的特异条带,与阳性对照大小一致,并且条带清晰,没有杂带,阴性对照未被扩增出目的条带,PCR检测的重复性高,比较稳定(图1)。

(2)随机抽取PCR阳性植株5株进行PCR-Southern杂交的结果(图2)表明,PCR阳性样品与阳性对照皆有杂交带,阴性对照则无杂交信号,表明PCR结果可靠。

(3)用Trizol法提取Cd²⁺胁迫下转基因烟草与非转基因烟草总RNA,反转录后进行Real-Time PCR(Marino等2003; Bustin 2002)的结果(图3、4)显示:各株系星星草金属硫蛋白基因的表达量均高于对照,其中T-4和T-6外源基因的表达量显著高于对照($P < 0.05$),T-5外源基因的表达量极显著高于对照($P < 0.01$)。上述结果表明星星草金属硫蛋白基因已转入烟草基因组中,并且该基因在烟草转基因后代中实现表达并有较高的转录水平。

表1 转基因烟草T₁代幼苗的卡那霉素抗性分析

Table 1 Kan-resistance analysis of transgenic tobacco seedlings of T₁ generation

株系	总株数	抗性株数	敏感株数	分离比例	期望比例	χ^2 值
T-1	149	95	54	1.76:1	3:1	9.4519
T-2	213	139	74	1.88:1	3:1	10.2676
T-3	45	33	12	2.75:1	3:1	0.0074
T-4	51	42	9	4.67:1	3:1	1.1045
T-5	54	44	10	4.40:1	3:1	0.8889
T-6	37	31	6	5.17:1	3:1	1.0900
T-7	46	31	15	2.07:1	3:1	1.0435
T-8	49	37	12	3.08:1	3:1	0.0068
T-9	82	63	19	3.32:1	3:1	0.0650

$$\chi^2_{0.05}=3.841, \chi^2_{0.01}=6.635。$$

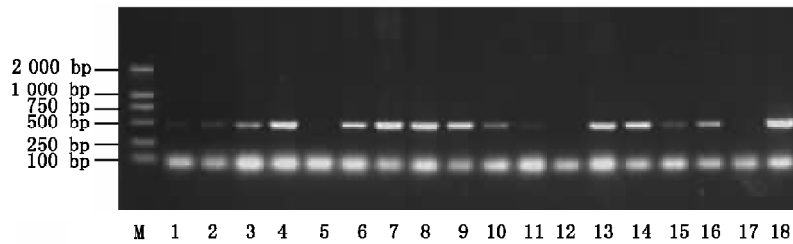


图1 转基因烟草PCR检测

Fig.1 PCR analysis of *MT* gene in transgenic tobacco

M 为 DL2000 分子量标准; 1~16 为待测植株; 17 为阴性对照; 18 为阳性对照。

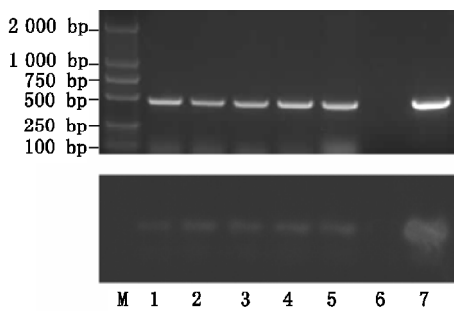


图2 转基因烟草PCR-Southern检测

Fig.2 PCR-Southern analysis of *MT* gene in transgenic tobacco

上图为 PCR 产物电泳图, 下图为 PCR-Southern 杂交图。M 为 DL2000 分子量标准; 1~5 为待检植株; 6 为阴性对照; 7 为阳性对照。

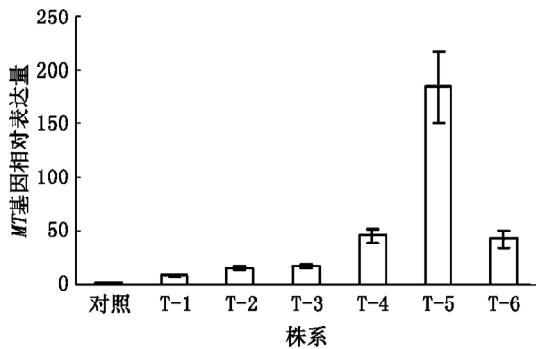


图3 转基因烟草中 *MT* 基因表达情况的 Real-Time PCR 检测

Fig.3 Real-Time PCR analysis of *MT* gene expression in transgenic tobacco

3 转基因烟草的生理指标分析

(1)一般认为,叶绿素含量在一定程度上可以反映植物光合作用和合成碳水化合物的能力。在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 胁迫下,叶片开始表现为黄萎,但2周后转基因烟草的叶片恢复正常绿色,而非转基因株系则不能恢复正常的绿色。转基因植株的叶

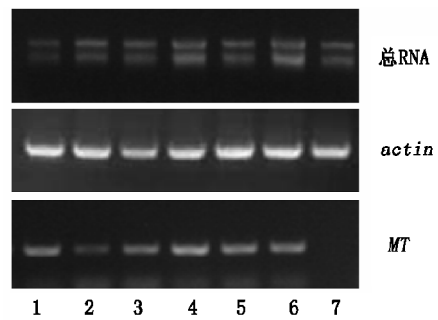


图4 转基因烟草金属硫蛋白基因的表达

Fig.4 The expression of *MT* gene in transgenic tobacco

1~6 为转基因株系; 7 为非转基因株系。

绿素含量均有提高,其中 T-1、T-2、T-4 和 T-5 株系的叶绿素含量均极显著高于非转基因株系($P < 0.01$), T-3 和 T-6 显著高于非转基因株系($P < 0.05$) (图 5)。

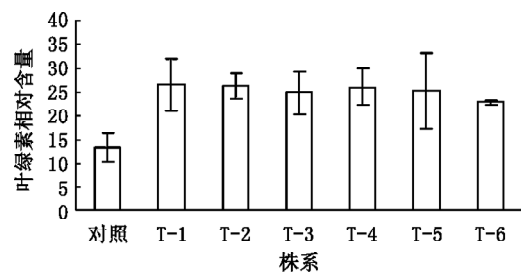
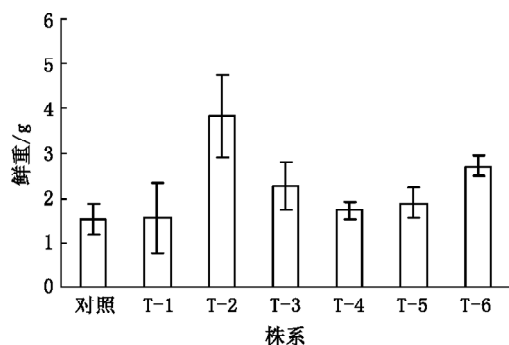
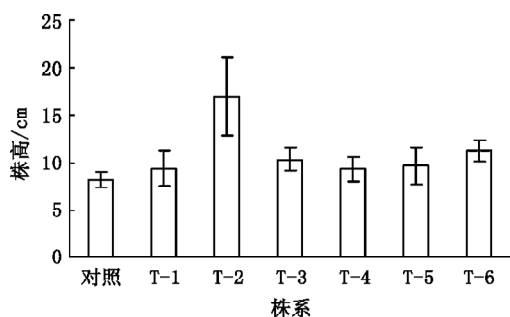


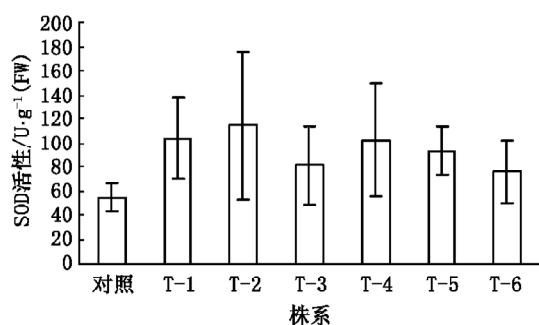
图5 Cd^{2+} 胁迫对烟草叶绿素含量的影响

Fig.5 Chlorophyll content of transgenic tobacco under Cd^{2+} stress

(2)在含 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 的 MS 培养基中,转基因植株的生长明显好于非转基因植株。转基因株系的鲜重与株高均高于非转基因株系,其中 T-2 株系的鲜重与株高均极显著高于非转基因株系($P < 0.01$) (图 6、7)。

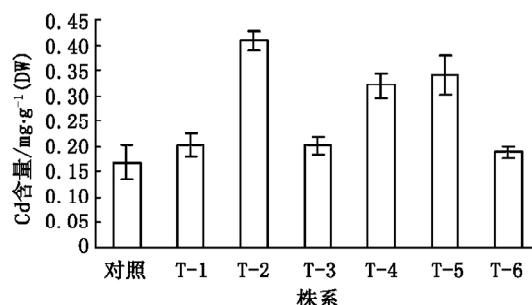
图6 Cd²⁺胁迫对烟草鲜重的影响Fig.6 Fresh weight of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress图7 Cd²⁺胁迫对烟草株高的影响Fig.7 Plant height of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress

(3)转基因株系SOD活性均高于非转基因株系(图8)。经重金属Cd²⁺胁迫处理后,转基因株系的株高、鲜重、叶绿素含量和SOD活性均高于非转基因株系,这表明星星草金属硫蛋白的过量表达对转基因烟草有保护作用,因而转基因植株的抗氧化能力得到提高。

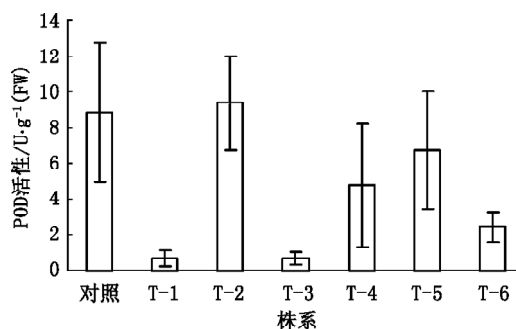
图8 Cd²⁺胁迫对烟草SOD活性的影响Fig.8 SOD activity of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress

(4)在含200 μmol·L⁻¹ Cd²⁺的MS培养基中处理45 d后,转基因烟草中累积的Cd²⁺总含量均高于非转基因植株。其中T-2、T-4和T-5株系中Cd²⁺

总含量极显著高于非转化株系($P < 0.01$) (图9)。这说明转基因植株对Cd²⁺的吸收能力及耐受能力均强于非转基因植株。

图9 Cd²⁺胁迫对烟草Cd²⁺含量的影响Fig.9 Cd²⁺ content of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress

(5)除T-2株系POD活性略高于非转基因株系外,其余转基因株系的POD活性均低于非转基因株系(图10)。这可能是由于外源基因的插入导致某些与POD活性相关的结构基因失活,从而降低了POD的活性所致。POD活性降低, H₂O₂积累(Banjerdkij等2005),膜脂过氧化程度加重,导致转基因株系(除T-1和T-3外)MDA含量高于非转基因株系(图11)。但转基因植株在Cd胁迫下叶片绿色,仍能正常生长,说明MT可能对膜脂过氧化带给植物的损伤有某种补偿作用。

图10 Cd²⁺胁迫对烟草POD活性的影响Fig.10 POD activity of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress

从总体来说,星星草金属硫蛋白的导入提高了转基因烟草的抗重金属胁迫的能力。但外源基因表达水平的高低与抗逆生理指标之间并未表现出线性关系,这也说明植物的抗逆机制是十分复杂的,并非简单的因果关系。MT基因的插入是否导致某些基因失活,以及MT除了与Cd²⁺形成结合态Cd²⁺

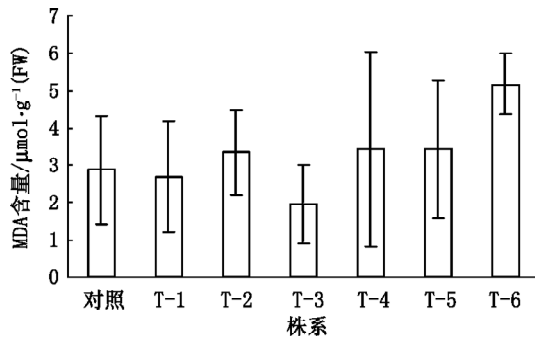


图 11 Cd²⁺ 胁迫对烟草 MDA 含量的影响

Fig.11 MDA content of transgenic tobacco under Cd²⁺ stress

外, 是否还有其他解毒方式和功能, 都有待于进一步研究。

参考文献

- 杜荣寿(1999). 生物统计学. 北京: 高等教育出版社, 103~104
- 李凤娟(2007). 植物铁蛋白基因表达载体的构建及对烟草和杨树的遗传转化[硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 林杰斌, 陈湘, 刘明德(2002). SPSS11.0 统计分析实务设计宝典. 北京: 中国铁道出版社, 245~248
- 刘桂丰, 褚延广, 王玉成, 侯英杰, 杨传平(2005). 星星草 cDNA 文库构建和金属硫蛋白(MT-1)基因的克隆. 植物生理学通讯, 41 (4): 424~428
- 郝建军, 刘延吉(2001). 植物生理学实验技术. 沈阳: 辽宁农业科学技术出版社, 71~73, 144~145, 180~181
- 黄留玉(2005). PCR 最新技术原理、方法及应用. 北京: 化学工业出版社, 131~157
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 744
- 王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 项友斌, 吴殿星, 高明尉, 夏英武, 成雄鹰, Altosaar I (2000). Bt 水稻杂交育种中转基因的遗传分析. 遗传, 22(5): 309~312
- Banjerdkij P, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S (2005). Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. Appl Environ Microbiol, 71 (4): 1843~1849
- Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse

- transcription PCR (RT-PCR): trends and problem. J Mol Endocrinol, 29: 23~39
- Campagne ML, Thibodeaux H, Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG (1999). Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 12870~12875
- Giritch A, Ganai M, Stephan UW, Baumlein H (1998). Structure, expression and chromosomal localization of the metallothionein-like gene family of tomato. Plant Mol Biol, 37: 701~714
- Horsch BB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A, Hoffmann N (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. Science, 223: 496~498
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N (1991). Isolation of a gene for a metallothionein protein from soybean. Plant Cell Physiol, 32: 913~916
- Lane BG, Kajioka R, Kennedy TD (1987). The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. Biochem Cell Biol, 65: 1001~1005
- Ma M, Lau PS, Jia YT, Tsang WK, Lam SKS, Tam NFY, Wong YS (2003). The isolation and characterization of type I metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Fesuca rubra* cv. Merlin. Plant Sci, 164: 51~60
- Marino JH, Cook P, Miller KS (2003). Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. J Immunol Methods, 283: 291~306
- Milan V, Jeremias HR (1981). Metalthiolate clusters in cobalt (II) metallothionein. Proc Natl Acad Sci USA, 78 (11): 6709~6713
- Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997). Purification and immunological identification of metallothionein I and II from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 113: 1293~1301
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993). Plant metallothioneins. Biochem J, 295: 1~10
- Wang YC, Yang CP, Liu GF, Zhang GD, Ban QY (2007). Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in *Puccinellia tenuiflora* after exposure to NaHCO₃. Plant Sci, 173: 309~320
- Wang Y, Zhu W, Levy DE (2006). Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. Methods, 39: 356~362