

## 灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*)过表达提高拟南芥的耐盐性

胡有贞, 王瑜, 张富春\*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

**摘要:** 克隆获得包含完整开放阅读框(ORF)的灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*) cDNA 序列, 构建成基因表达载体 pCAMBIA1301.1-*CgVPI*后, 利用根癌农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥, 再以抗性筛选方法获得了T<sub>3</sub>代纯合的转基因植株, 经检测外源目的基因已经整合到拟南芥基因组中并能正常表达。分析结果表明, 在拟南芥中过表达*CgVPI*基因后提高了植株抗盐胁迫的能力。

**关键词:** 灰绿藜; 液泡膜焦磷酸酶基因; 过表达; 耐盐性

## Overexpression of *Chenopodium glaucum* Tonoplast Pyrophosphatase (*CgVPI*) Improves Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*

HU You-Zhen, WANG Yu, ZHANG Fu-Chun\*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

**Abstract:** The open reading frame (ORF) of halophyte *Chenopodium glaucum* tonoplast pyrophosphatase gene (*CgVPI*) was successfully cloned and inserted into plant expression vector pCAMBIA1301.1, then the recombinant (pCAMBIA1301.1-*CgVPI*) was transformed into *Arabidopsis thaliana* through floral dipping method, which was mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Homozygous T<sub>3</sub> transgenic plants that were resistant to hygromycin were obtained. The results indicated that *CgVPI* gene was integrated into *Arabidopsis thaliana* genome and expressed normally. Various salt tolerance analysis showed that that overexpression of tonoplast pyrophosphatase gene from *Chenopodium glaucum* could improve the salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*.

**Key words:** *Chenopodium glaucum*; tonoplast pyrophosphatase; overexpression; salt tolerance

一般来说, 高盐条件下, 盐生植物主要依靠液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白将细胞质中过多的Na<sup>+</sup>区隔到液泡中(Blumwald 和 Poole 等 1985; Gaxiola 等 1999), 它不仅降低胞质中的钠离子浓度, 还可以促使植物利用NaCl作为渗透剂, 来保持渗透势以驱动水分进入细胞(Niemietz 和 Willenbink 等 1985; Blumwald 等 2000)。因此, 离子区隔化机制对植物细胞适应盐生境十分重要, 而液泡膜上Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向运输是靠跨液泡膜的H<sup>+</sup>梯度驱动的, H<sup>+</sup>梯度的形成又依赖于液泡膜上的两种质子泵: H<sup>+</sup>-ATPase和H<sup>+</sup>-PPase分别以ATP和PPi为动力, 将H<sup>+</sup>泵到液泡中, 从而形成H<sup>+</sup>梯度(Glenn 等 1999)。

植物液泡膜H<sup>+</sup>-PPase(VPI)是一种广泛存在于很多生物体内的H<sup>+</sup>转运酶。它只由一条受单基因编码的多肽组成(Maeshima 2000), 结构非常简单; 其底物为简单的低价焦磷酸(PPi), 含有一个高能磷酸键。在植物对水分胁迫和盐分胁迫的响应中,

H<sup>+</sup>-PPase作为一种有效的质子泵调节细胞的酸度, 驱动各种离子在液泡内的区隔化(Peerbolte 等 1986)。在盐分或水分胁迫下, H<sup>+</sup>-PPase超表达能够增强H<sup>+</sup>跨液泡膜电化学梯度, 提高液泡膜上有H<sup>+</sup>参与的各种次级运输载体的运输效率, 促进包括Na<sup>+</sup>在内的各种运输和积累, 从而维持细胞中离子的平衡和细胞的膨压, 离子向液泡内运输的同时也可削弱过多Na<sup>+</sup>对细胞造成的伤害, 进而增强植物的耐旱性和耐盐性。

新疆的盐生植物资源非常丰富, 其中以藜科植物最多。灰绿藜属藜科一年生草本盐生植物, 能在干旱贫瘠的土地上生长, 在较高盐浓度的胁迫下正

收稿 2009-01-09 修定 2009-02-03

资助 新疆维吾尔自治区科技重大专项(200731138-3)和教育  
部科学技术研究重点项目(205178)。

\* 通讯作者(E-mail: zfcxju@xju.edu.cn; Tel: 0991-8583517)。

常完成其生活史。迄今为止, 抗逆植物的研究中有有关灰绿藜的报道极少, 对其抗逆相关基因的研究更是未见。所以开展灰绿藜液泡膜  $H^+$ -PPase (*CgVPI*)耐盐性的研究, 将有助于阐明干旱区盐生植物的耐盐性特征与分子机制。

## 材料与方 法

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L., Columbia ecotype)种子、植物表达载体 pCAMBIA1301.1、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌 EHA105 为本室保存。Taq 酶、抗生素购自上海生物工程技术有限公司。Trizol RNA 提取试剂盒、AMV 逆转录酶、限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Takara 公司。基因测序由上海生物工程技术有限公司完成。其它试剂均为分析纯产品。

总 RNA 分离用 Trizol 试剂, 总 cDNA 合成用 TaKaRa RNA LA PCR<sup>TM</sup> Kit (AMV) Ver 1.1 反转录试剂盒, 根据液泡膜焦磷酸酶基因的保守同源序列设计核心片段引物, P1: 5' ATGGTGGCGCCTGCTTTGTT 3'; P2: 5' GCCATAAGCTTGATCAGGATGTT 3'。灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*)完整编码区 cDNA 的获得采用 cDNA 末端快速扩增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)。5' RACE 引物为 5' P1: 5' ATGGGTGTTCTTCTTCC 3', 5' P2: 5' AGGATGTCGACGATTTACAATTTTGCCATT 3'。3' RACE 引物为 3' P1: 5' GACCATCACTCAACATCCTG 3', 3' P2: 5' GGATACATCTGGACCATCAC 3'。

分别设计带 *Kpn*I 酶切位点和带 *Sal*I 酶切位点的上下游引物(1301p1: 5' GCAGGTACCATGGGTGTTGTTCTTCTTCCAG 3', 1301p2: 5' ACTGTCGACTTAGAAGATCTTGAAGAGCAAGCC 3')进行 PCR 扩增, 获得 *CgVPI* 开放阅读框。PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

按照 Guo 等(2006)所述的方法筛选转化后具潮霉素抗性的拟南芥种子。收取 T<sub>3</sub> 代种子保存待用。

用 CTAB 法(Jia 等 2002)提取生长 6 周的拟南芥转化植株和野生型拟南芥植株基因组 DNA 作为 PCR 反应模板, 以 *CgVPI* 特异性引物 1301p1 和

1301p2 进行 PCR 扩增检测。RT-PCR 分析采用 Trizol 试剂盒分别提取拟南芥转化植株和野生型拟南芥植株叶片中总 RNA, 用 TaKaRa 公司反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 用 *CgVPI* 的特异上游引物 1301p1 和下游引物 LJY36W1P (5' TGCTTGGTGCTATCACCTCTTTGGC 3')进行 PCR 扩增。

选取野生型与转基因 T<sub>3</sub> 代各株系(纯合子)种子分别播于含有 0、50、100、150 和 175 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 1/2MS 固体培养基上生长 18 d 后, 观察种子萌发情况(每个盐浓度重复 4 次), 测量根长(每个盐浓度重复 4 次)并拍照。

将野生型与转基因 T<sub>3</sub> 代各株系(纯合子)种子播于 1/2MS 培养基上生长 2 周, 移栽至蛭石和珍珠岩(3:1)基质中培养 4 周, 分别用 0、50、100、150、200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 15 d。从中选取野生型和转基因型幼苗采用原子吸收光谱测定 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 离子含量。采用双组份分光光度计法分析丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。依照 Seong 等(2007)文中的方法测定叶绿素含量。

## 结果与讨论

### 1 灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*)的克隆及序列分析

PCR 扩增获得的 *CgVPI* 开放阅读框(ORF)经测序确定全长为 2 292 bp, 编码 763 个氨基酸(图 1)。*CgVPI* 与模式植物拟南芥液泡膜焦磷酸酶基因(*AtVPI*)的核酸同源性达到 69.73%。*CgVPI* 与已发表的同属红叶藜液泡膜焦磷酸酶(*CrVPI*)的同源性最高, 分别为 95% 和 98%; 推测其氨基酸序列中含有植物液泡膜焦磷酸酶 3 个保守的功能区(CS1、CS2 和 CS3) (Maeshima 2000), 此基因序列已在 GenBank 上注册(登录号 DQ443731)。

### 2 纯合转基因植株的获得

将 *CgVPI* 基因克隆到载体 pCAMBIA1301.1 中, 获得 pCAMBIA1301.1-*CgVPI* 基因表达载体(图 2), 然后导入根癌农杆菌菌株 EHA105 中, 用农杆菌介导的花序浸染法转入拟南芥。将转化植株收获的 T<sub>0</sub> 代种子在含 30 mg·L<sup>-1</sup> 潮霉素固体培养基上筛选培养, 连续筛选 3 代, 获得 T<sub>2</sub> 代纯合植株。

### 3 分子生物学检测

用 *CgVPI* 基因特异引物(1301p1 和 1301p2)对 T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥进行基因组 PCR 检测, 结果均

```

1   MGVVLLPDLG TEILIPVCAV IGIVFSLVQW YIVAQVKLSP DSGRSNSNKN GYSESLEIEE
61  GLNDPAVVAK CAEIQNAISE GSTSFLYTMY QYVGVFMVAF AVLIFVFLGS VEGFSTKSQE
121 CTYDKSKTCK PALATAVFST VSFLGGAITS LASGFLGMKI ATYANARTTL EARКСVГKAF
181 IVAFRSGAVM GFLLAANGLL VLYITILLK LYYGDDWEGL FEAITGYGLG GSSMALFGRV

                                CS1
241 GGGIYTKAAD VGADLVGKIE RNIPEDDPRN PAVIADNVGD NVGDIAGMGS DLFGSYAESS
301 CAALVVASIS SFGINHEFTA ILYPLLISSV GIVICLITL FATDFFEIKA VKEIEPALKK
361 QLVISTGLMT VAVAVISWVA LPSSFTIFDF GTQREVKNWQ LFLCVAVGLW AGLIIGFVTE
421 YYTSNAYSPV QDVADSCRTG AATNVIFGLA LGYKSVIPI FAIAVSIFVS FSFAAMYGIA

                                CS2
481 VAALGMLSTI ATGLAIDAYG PISDNAGGIA EMAGMSHSIR ERTDALDAAG NTTAAIGKGF
541 AIGSAALVSL ALFGAFVSRA AISTVDVLTQ KVFIGLLVGA MLPYWFSAMT MKSVGSAALK
601 MVEEVRROFN EIPGLMEGTT KPDYANCVKI STDASIKEMI PPGALVMLTP LIVGTLFGVE

                                CS3
661 TLSGVLGSLV VSGVQIAISA SNTGGAWDNA KKYIEAGASD HAVSLGPKGS DAHKAAVIGD
721 TIGDPLKDTS GPLSNILIKL MAVESLVFAP FFATHGGLLF KIF
    
```

图1 灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*)的氨基酸序列

Fig.1 The deduced amino acid sequence of *CgVPI* gene  
方框中分别是液泡膜焦磷酸酶的保守功能区 CS1、CS2 和 CS3。

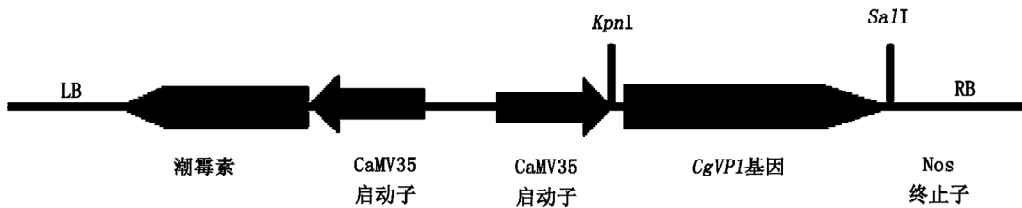


图2 pCambia1301.1-*CgVPI* 载体的 T-DNA 区域示意图

Fig.2 Sketch map of pCambia1301.1-*CgVPI*

扩增出预期大小(2 300 bp)的片段, 野生型拟南芥没有扩增出该片段(图3), 初步证明 *CgVPI* 基因已成功转入拟南芥。

挑选4个阳性T<sub>2</sub>代转基因拟南芥, 用*CgVPI*的特异引物(1301p1和LJY36W1P)进行RT-PCR分析。*CgVPI*基因在转基因拟南芥中都有一定量的表达, 而在野生型拟南芥中没有表达(图4)。表明*CgVPI*基因已整合到转基因拟南芥基因组中并正常转录。

#### 4 转基因植株耐盐性检测

**4.1 幼苗耐盐表型** 在 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下, 野生型植株和转基因植株的生长开始受到抑制, 随着盐浓度上升, 野生型植株的种子萌发率明显下降(图5)。当 NaCl 浓度为 100、150 和 175 mmol·L<sup>-1</sup>

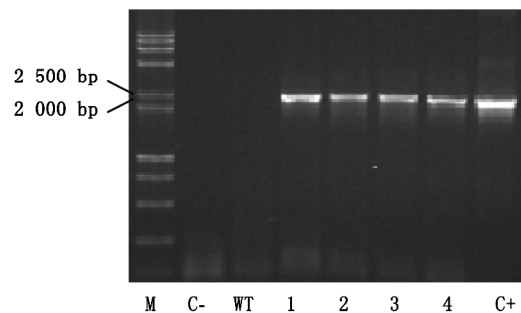


图3 转化拟南芥基因组 PCR 检测

Fig.3 Genome PCR of transformed plant of Arabidopsis

M: DL 15000+2000 Marker; C-: 阴性对照; WT: 野生型拟南芥; 1~4: 不同的转基因株系; C+: 阳性质粒。

时, 转基因植株的种子萌发率分别为 91.7%、89.2% 和 84.2%, 野生型萌发率为 67.5%、53.3% 和 35.8%

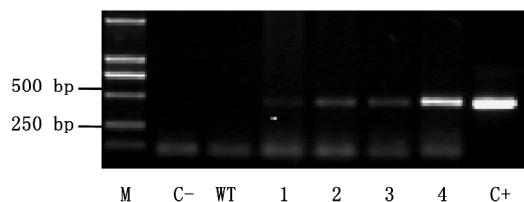


图4 转基因拟南芥 RT-PCR 检测

Fig.4 RT-PCR of transformed plant of Arabidopsis

M: DL2000 Marker; C-: 阴性对照; WT: 野生型拟南芥; 1~4: 不同的转基因株系; C+: 阳性质粒。

(图6), 两者萌发率差异极显著( $P < 0.01$ )。植株在 0、50、100、150 和 175  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的 1/2MS 培养基中培养 18 d 测量植株根长。图7表明, 正常生长条件下野生型植株和转基因植株之间的根长无明显差异, 随着盐浓度上升, 野生型植株与转基因植株根长差异显著( $P < 0.05$ )。前人研究显示在种子萌发过程中液胞膜质子泵主要由  $\text{H}^+$ -PPase 承担, 这可能是转基因植株的萌发率保持较高水平的原由。另外, 转基因植株比野生型植株具有更发达

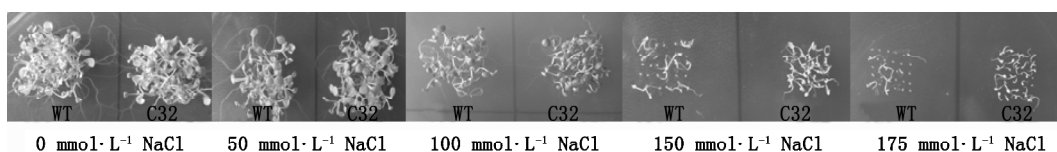


图5 盐胁迫下的转基因和野生型拟南芥幼苗

Fig.5 Transgenic and wild seedlings of Arabidopsis under salt stress

播种后 18 d 测定。WT: 野生型幼苗; C3: 32 号株系转基因幼苗。下图同此

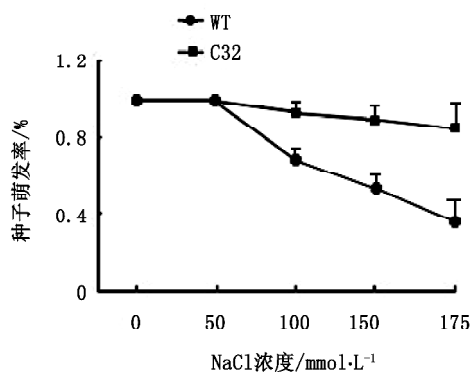


图6 盐胁迫下转基因和野生型拟南芥的萌发

Fig.6 Germination of transgenic and wild Arabidopsis under salt stress

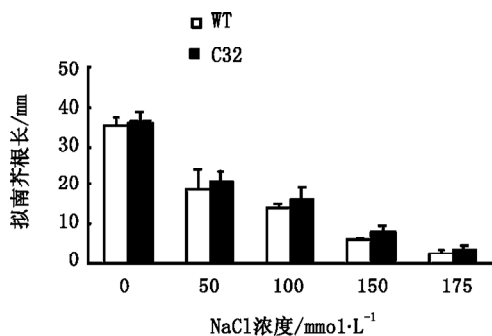


图7 盐胁迫下转基因和野生型拟南芥的根长

Fig.7 Root length of transgenic and wild Arabidopsis under salt stress

的根系(Li 等 2005), 在 NaCl 胁迫下, 转基因植株的根长都长于野生型植株的。这说明转基因植株比野生型植株具有更好的保水潜能, 以减少盐分对植物带来的渗透损伤, 因而更耐盐。

**4.2  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  含量**  $\text{K}^+$  涉及植物许多生理过程, 如酶活性调节、蛋白质合成及渗透调节, 因此维持细胞质中较高的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  对于植物的生长及耐盐性十分必要(Gaxiola 等 2002)。图8显示, 盐胁迫下的野生型和转基因植株  $\text{Na}^+$  含量随盐浓度的提高迅速增加, 而  $\text{K}^+$  含量则随盐浓度的提高而下降。但过表达液泡膜  $\text{H}^+$ -PPase 的拟南芥, 无论在叶中还是在根中都能减缓  $\text{K}^+$  的下降趋势, 从而保持植株体内相对较高的  $\text{K}^+$  浓度。另外, 转基因拟南芥叶中的  $\text{Na}^+$  含量低于野生型植株的, 而根中的却相反, 这可能是由于在长期盐胁迫下, 转基因植物优先将  $\text{Na}^+$  区隔到根部的细胞中, 减少  $\text{Na}^+$  向地上部的运输, 减轻了对地上部的伤害, 从而提高了植物的耐盐能力。

**4.3 丙二醛(MDA)和叶绿素含量** MDA 作为脂质过氧化作用的产物, 其含量的多少可以代表膜损伤程度的大小(王建明等 2001)。但在盐胁迫初期, 机体有一个保护应答过程, MDA 含量呈轻微的下落趋势; 随着胁迫的加剧, MDA 含量则迅速增加。本实验结果(图9)表明, 野生型拟南芥和转基因拟南芥

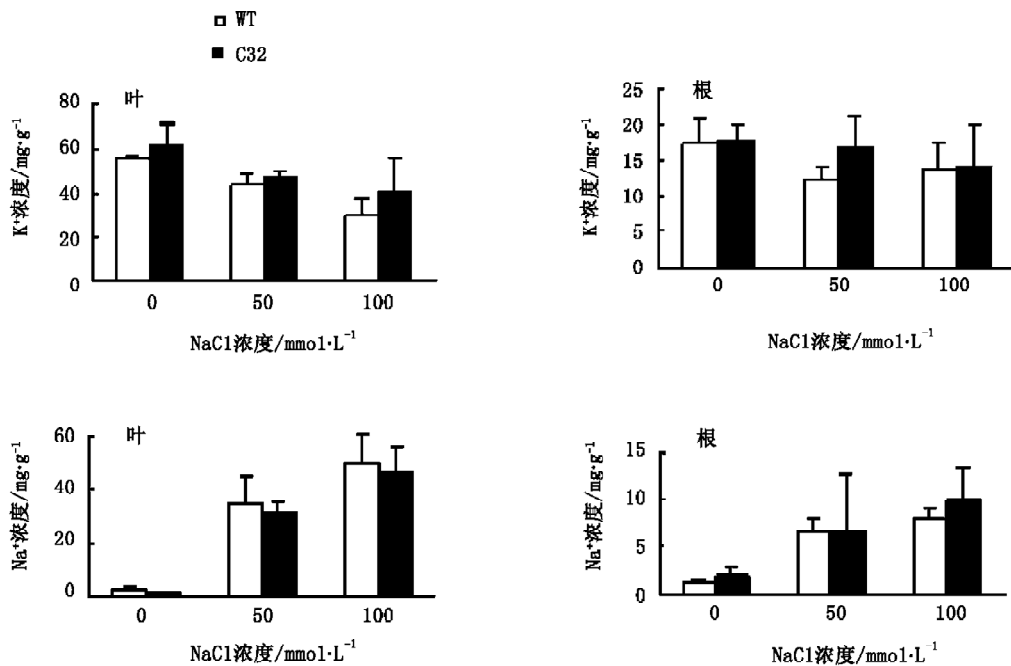


图8 转基因和野生型拟南芥的不同组织中K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>含量  
Fig.8 K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> contents of different tissues in transgenic and wild Arabidopsis

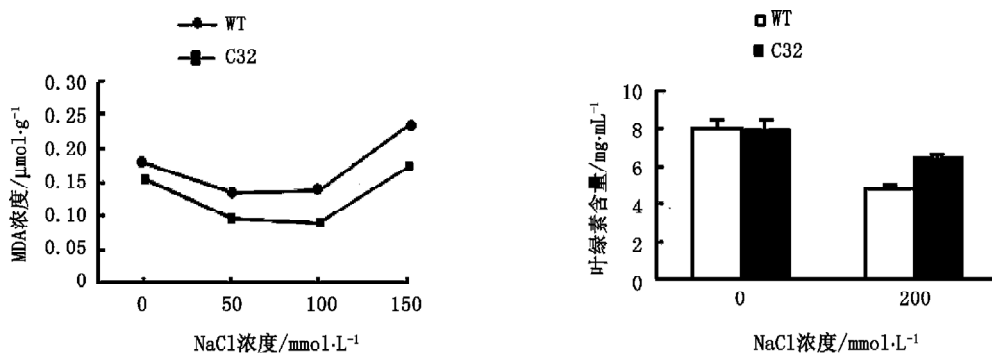


图9 转基因与野生型拟南芥的MDA和叶绿素含量  
Fig.9 MDA and chlorophyll contents of transgenic and wild Arabidopsis

的MDA浓度都是随着盐浓度的增加先下降后上升,但野生型拟南芥体内的MDA含量始终比转基因的拟南芥高,说明野生型拟南芥植物体内受到的伤害更严重。叶中叶绿素总含量的测定结果也显示,盐胁迫对野生型拟南芥的伤害较大,其莲座叶绿素含量下降较多,与转基因拟南芥差异极显著( $P<0.01$ )。

总之,质子泵在甜土植物和盐土植物中的作用机制不完全相同(Dietz等2001):耐盐性植物将大量钠离子区隔在液泡中,而盐敏感性植物主要将Na<sup>+</sup>外排至非原生质体空间以避免盐毒害(Blumwald等2000)。因此盐生植物的液泡膜H<sup>+</sup>-PPase可能具有

更强大的功能,而作为少数形态结构没有特化的耐盐植物灰绿藜,其耐盐机理则更有研究价值。本实验通过农杆菌浸染拟南芥花序的方法将灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVPI*)导入拟南芥能显著提高其耐盐能力,进一步证明盐生植物液泡膜质子泵的基因调控对植物的耐盐性有至关重要的作用,也为利用盐生植物基因资源改良农作物抗盐性提供了新的思路。

#### 参考文献

王建国, 张作刚, 郭春绒, 贺运春(2001). 枯萎病菌对西瓜不同抗感品种丙二醛含量及某些保护酶活性的影响. 植物病理学报,

- 31: 152~156
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 140~151
- Blumwald E, Poole RJ (1985).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 78: 163~167
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot*, 52: 1969~1980
- Gaxiola RA, Fink GR, Hirschi KD (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiol*, 129: 967~973
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1480~1485
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci*, 18: 227~256
- Guo SL, Yin HB, Zhang X, Zhao FY, Li PH, Chen SH, Zhao YX, Zhang H (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase gene, *SSVP*, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 60: 41~50
- Jia GX, Zhu ZQ, Chang FQ, Li YX (2002). Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep*, 21: 141~146
- Li JS, Yang HB, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL et al (2005). *Arabidopsis*  $\text{H}^+$ -PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science*, 310: 121~125
- Maeshima M (2000). Vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 37~51
- Niemietz C, Willenbrink J (1985). The function of tonoplast ATPase in intact vacuoles of red beet is governed by direct and indirect effects. *Planta*, 166: 545~549
- Peerbolte R, Leenhouts K, Hooykaas-van, Slogteren GMS, Wullems GJ, Schilperoort RA (1986). Clones from a shooty tobacco crown gall tumor II: irregular T-DNA structures and organization, T-DNA methylation and conditional expression of opine genes. *Plant Mol Biol*, 7: 285~299
- Seong ES, Cho HS, Choi D, Joung YH, Lim CK, Hur JH, Wang MH (2007). Tomato plants overexpressing *CaKRI* enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 363: 983~988