

## 过量表达腺苷甲硫氨酸合成酶基因能提高转基因烟草中多聚胺的生物合成

戚元成<sup>1,2</sup>, 马雷<sup>1</sup>, 王菲菲<sup>2</sup>, 刘卫群<sup>1,2,\*</sup>

河南农业大学<sup>1</sup>烟草学院, <sup>2</sup>生命科学学院, 郑州 450002

**摘要:** 以土壤农杆菌介导的转化方法将盐地碱蓬的腺苷甲硫氨酸合成酶 cDNA (*SsSAMS2*) 转化到烟草 K326 中。PCR 分析的结果表明, *SsSAMS2* 整合进 K326 的基因组内。共筛选到 8 个转基因纯合品系, 分析其中 3 个品系 (ST8-9、ST14-2、ST3-5) 基因表达和多聚胺含量的结果表明, *SsSAMS2* 可在转基因烟草中表达, 转基因烟草中的多聚胺含量明显高于野生型烟草。这些结果表明, 腺苷甲硫氨酸合成酶基因已在转基因烟草中过量表达并导致多聚胺含量提高。

**关键词:** 腺苷甲硫氨酸合成酶; 多聚胺; 转基因烟草

## Overexpression of *S*-adenosylmethionine Synthetase Promote Polyamine Biosynthesis in Transgenic Tobacco

QI Yuan-Cheng<sup>1,2</sup>, MA Lei<sup>1</sup>, WANG Fei-Fei<sup>2</sup>, LIU Wei-Qun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Tobacco Science, <sup>2</sup>College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** The full-length *S*-adenosylmethionine synthetase (*SsSAMS2*) of *Suaeda salsa* was introduced into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. K326) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The gene integration in tobacco was confirmed by PCR. Eight homozygous transgenic lines (ST lines) were screened. The result of *SsSAMS2* expression and polyamines (PAs) content analysis of three lines (ST8-9, ST14-2, ST3-5) showed that *SsSAMS2* expressed in transgenic tobacco, and transgenic tobacco accumulated more soluble total PAs content than wild-type plants. These results indicated that the promotion of soluble total PAs content resulted from the *SsSAMS2* overexpression in transgenic plants.

**Key words:** *S*-adenosylmethionine synthetase; polyamine; transgenic tobacco

腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosylmethionine synthetase, SAMS)可催化底物 ATP 和蛋氨酸生成腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM) (Cantoni 1953)。腺苷甲硫氨酸合成酶是一个广泛存在并且相当保守的酶(Thomas 和 Surdin-kerjan 1991)。拟南芥(Peleman 等 1989)、水稻(Van Breusegem 等 1994)、番茄(Espartero 等 1994)等植物中的腺苷甲硫氨酸合成酶基因已经得到克隆。腺苷甲硫氨酸合成酶在一些植物[如在拟南芥的根和茎等器官的微观组织(Peleman 等 1989)、水稻的叶片(Dekeyser 等 1990)]中的表达模式早就有报道。腺苷甲硫氨酸是腺苷甲硫氨酸脱羧酶(*S*-adenosylmethionine decarboxylase, SAMDC)的底物, 脱羧基后的腺苷甲硫氨酸在多聚胺(polyamine, PA)的生物合成过程中提供氨基(Chiang 等 1996)。我们克隆到一个腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*SsSAMS2*) (GenBank 登录号 AF321001) (Ma 等 2003)。本文转化和筛选得到转*SsSAMS2*的烟草品系, 并研究其过量表达能否增加多聚胺的生物合成, 而多聚胺是渗透保护物质, 所

以也为我们以后研究腺苷甲硫氨酸合成酶过量表达能否增强植物抗盐胁迫的能力建立了基础。

### 材料与方法

将 *SsSAMS2* 克隆到 35S 启动子控制下的植物双元表达载体 prok2 中, 命名为 pSAMS。用 pSAMS 转化土壤农杆菌 GV3101, 得到阳性土壤农杆菌转化株 GV3101-SAMS, 并以此菌来转化烟草 (*Nicotiana tabacum* L. K326)。

将烟草在 MS 培养基上无菌培养 3 周后, 取无菌烟草苗的幼嫩、健壮叶片, 用打孔器制备叶圆盘, 然后将叶圆盘和土壤农杆菌 GV3101-SAMS 共培养。转化植株的再生和培养按照 Horsch 等 (1985) 的步骤进行, 转化植株纯合子的筛选和培养

收稿 2009-05-03 修定 2009-06-23

资助 国家“863”计划(2002AA629080)和国家烟草专卖局重点项目(110200001011A)。

\* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63555153)。

按照 Koo 等(2002)的方法进行。用于表达分析的 T2 代放在 14 h (光照)/10 h (黑暗), 光照度为  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、室温为  $(25\pm 5)^\circ\text{C}$  的条件下培养。

为了用 PCR 分析 *SsSAMS2* 整合情况, 采用 Ma 等(2003)文中的方法提取转基因和野生型烟草中的基因组 DNA。正向引物用 35S 启动子上的序列设计 35S-F (5' GTCTTGCGAAGGATAGTGG 3') 和反向引物 *SsSAMS2* -R (5' ATACTCAACAGTGAC-TTGAG 3')。重组质粒 pSAMS 作阳性对照, 以水作为空白对照, DNA 聚合酶是 Taq<sup>r</sup>。

采用 Trizol 试剂盒提取 T2 代转基因烟草和野生型烟草叶中的总 RNA, 用 RT-PCR 分析 *SsSAMS2* 的表达情况。RT-PCR 反应按照说明书(One Step RT-PCR kit; Takara, Shiga, Japan)进行。18S rRNA 作反应内参, 引物为 18S-F (5' ATGATAACTCGACG-GATCGC 3') 和 8S-R (5' CTTGGATGTGGTAGCC-GTTT 3')。 *SsSAMS2* 扩增引物是 *SsSAMS2*-F (5' TCTGAGTCTGTGAATGAAGG 3') 和 *SsSAMS2*-R (5' ATGTAGGCACCACTTCTGTGC 3')。反应体系为 50  $\mu\text{L}$ , 反应条件为  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $58^\circ\text{C}$  30 s 和  $72^\circ\text{C}$  1 min, 20 个循环。取 15  $\mu\text{L}$  反应产物, 并以 1% 琼脂糖凝胶作电泳分析。

为了 Northern 杂交进一步分析 *SsSAMS2* 的表达情况, 提取 T2 代转基因烟草和野生型烟草的总 RNA, 依据 Sambrook 等(2001)文中的步骤转膜, <sup>32</sup>P dCTP 随机标记 *SsSAMS2* 和 18S rDNA 做探针。探针标记和杂交步骤参照(威元成等 2004)。

T2 代转基因品系和野生型烟草幼苗长至 6 cm 左右时, 转移到盛有蛭石、腐殖质和草皮(1:1:1)的盆中, 在温室中培养 4 周, 期间用 1/2 Hoagland 营养液培养, 用上部伸展的烟叶测定多聚胺含量。取 0.3 g 叶片于 2 mL 5% 的 HClO<sub>4</sub> 溶液中研磨均匀, 后以 12 000×g 离心 30 min。取 0.2 mL 上清液, 然后加入 0.2 mL 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液和 0.4 mL 的丹磺酰氯 (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>S) (浓度为 mg·mL<sup>-1</sup> 丙酮), 混合液放在 60  $^\circ\text{C}$  中温育 1.5 h。多聚胺含量测定依照 Goren 等(1982)文中的方法进行。

## 实验结果

### 1 转基因烟草品系的获得和分析

用土壤农杆菌介导的转化方法, 筛选到 15 个抗卡那霉素的转基因品系, 并初步用 PCR 方法得到

了验证。进一步筛选得到 8 个转基因品系的纯合子, 其中 ST8-9、ST14-2 和 ST3-5 3 个转基因纯合子品系用于基因表达分析和生理指标测定。为了保证 *SsSAMS2* 基因的稳定整合和传递, 又进一步用 PCR 验证的结果显示, 在 ST8-9、ST14-2 和 ST3-5 3 个转基因品系中有目的条带, 而野生型植株则没有(图 1)。为了验证 *SsSAMS2* 基因在转基因烟草品系的表达, 同时作 RT-PCR 和 Northern 杂交的结果(图 2 和图 3)显示, 在转基因烟草中扩增出目的片段, 而野生型烟草则没有; 在转基因烟草中有杂交信号, 而野生型烟草则没有。这些都表明,

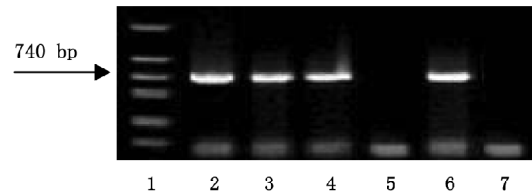


图 1 *SsSAMS2* 在转基因烟草中整合的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of *SsSAMS2* integration in transgenic tobacco

1: DNA 分子标记 DL2000; 2: ST8-9; 3: ST14-2; 4: ST3-5; 5: 野生型; 6: pSAMS; 7: H<sub>2</sub>O。

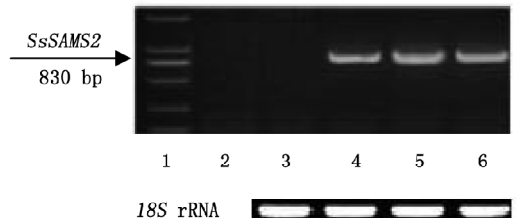


图 2 *SsSAMS2* 在转基因烟草中表达的 RT-PCR 分析

Fig.2 RT-PCR analysis of *SsSAMS2* expression in transgenic tobacco

1: DNA 分子标记 DL2000; 2: H<sub>2</sub>O; 3: 野生型; 4: ST8-9; 5: ST14-2; 6: ST3-5。

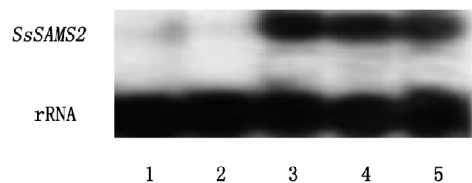


图 3 *SsSAMS2* 在转基因烟草中表达的 Northern 杂交分析

Fig.3 Northern blotting analysis of *SsSAMS2* expression in transgenic tobacco

1: 野生型; 2: 野生型; 3: ST8-9; 4: ST14-2; 5: ST3-5。

*SsSAMS2* 基因在转基因烟草中已稳定表达。

## 2 转基因烟草中多聚胺的积累

图4显示,转基因品系中的多聚胺含量显著高于野生型植株,这些与上述结果(图2和图3)一致。表明 *SsSAMS2* 的过量表达后多聚胺的生物合成在一定程度上有增加。

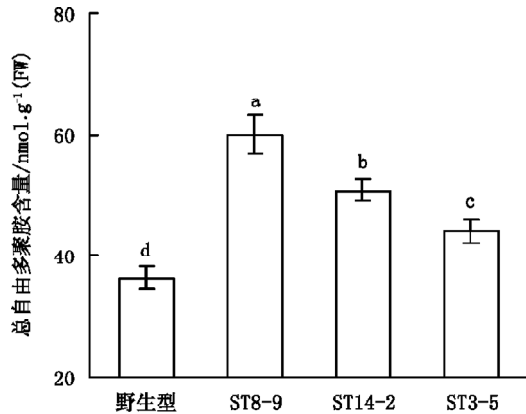


图4 转基因和野生型烟草中自由多聚胺含量的比较

Fig.4 Comparison on free PA contents in transgenic and wild tobacco

每个系列10个重复,数据用平均数±标准误表示。柱状图上不同字母表示0.05水平上的差异显著性。

## 讨 论

多聚胺的积累在一定程度上是由于参与多聚胺生物合成途径的酶类表达所致(Mo和Pua 2002)。本文的结果显示,转基因烟草过量表达*SsSAMS2*可导致较高水平的多聚胺生物合成。*SAMS*不是直接参与多聚胺生物合成的酶,但它可以合成SAM,即多聚胺生物合成过程中所需要的SAMDC前体物。所以很有可能是由于*SsSAMS2*的过量表达导致了SAM的大量积累,从而促进SAMDC的大量合成,因此转基因品系积累的多聚胺比野生型烟草高。

多聚胺是一类低分子量的渗透保护物质,它在一定程度上可以缓解逆境对植物的伤害(Yamaguchi等2006)。我们下一步将研究盐胁迫下转基因烟草品系的耐盐性。

## 参考文献

戚元成,张世敏,王丽萍,王明道,张慧(2004). 谷胱甘肽转移酶基

因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长. 植物生理与分子生物学学报, 30 (5): 517~522

- Cantoni GL (1953). *S*-adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Biol Chem*, 204: 403~416
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996). *S*-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*, 10: 471~480
- Dekeyser RA, Claes B, De Rycke R, Habets M, Van Montagu M, Caplan A (1990). Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell*, 2: 591~602
- Espartero J, Pintor-Toro JA, Pardo JM (1994). Differential accumulation of *S*-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol Biol*, 25: 217~227
- Goren RN, Palavan N, Flores H, Galston AW (1982). Changes in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol*, 23: 19~26
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 277: 1229~1231
- Koo JC, Chun HJ, Park HC, Kim MC, Koo YD, Koo SC, Ok HM, Park SJ, Lee S-H, Yun D-J et al (2002). Over-expression of a seed specific heveinlike antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*, 50: 441~452
- Ma XL, Wang ZL, Qi YC, Zhao YX, Zhang H (2003). Isolation of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress. *Acta Botanica Sinica*, 45 (11): 1359~1365
- Mo H, Pua EC (2002). Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiol Plant*, 114: 439~449
- Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, Alliotte T, VanMontagu M, Inzé D (1989). Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene in *Arabidopsis thaliana* encoding *S*-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell*, 1: 81~93
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Thomas D, Surdin-Kerjan Y (1991). The synthesis of the two *S*-adenosyl-methionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 226: 224~232
- Van Breusegem F, Dekeyser R, Gielen D, Van Montagu M, Caplan A (1994). Characterization of a *S*-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol*, 105: 1463~1464
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006). The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 580: 783~6788