

## 转DREB基因烟草悬浮细胞系(BY-2)的建立及其几个与抗盐和抗渗透胁迫相关指标的检测

陈军营<sup>1</sup>, 阮祥经<sup>1</sup>, 杨凤萍<sup>2</sup>, 张晓东<sup>2</sup>, 陈新建<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学农学院, 郑州 450002; <sup>2</sup>北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100089

**摘要:** 用基因枪法将DREB基因和诱导型启动子rd29B构建的载体pBAC128F转入烟草悬浮细胞。通过除草剂抗性筛选、PCR和PCR-Southern检测, 获得转DREB基因的细胞系。以300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl和15% PEG6000处理14 d后, 转基因细胞系存活并生长, 而野生型则接近死亡。转基因细胞系的脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性普遍高于野生型的, 而丙二醛含量则相反。

**关键词:** 转基因烟草; DREB基因; 渗透胁迫; 盐胁迫; 抗性

## Establishment of DREB Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2 Cell Line and Detection of Some Indexes Related with Its Tolerances to Salt and Osmotic Stresses

CHEN Jun-Ying<sup>1</sup>, RUAN Xiang-Jing<sup>1</sup>, YANG Feng-Ping<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-Dong<sup>2</sup>, CHEN Xin-Jian<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100089, China

**Abstract:** By particle bombardment, expression plasmid pBAC128F carrying DREB gene and inducing promoter rd29B, was transformed with BY-2 (bright yellow 2) suspension cells of tobacco (*Nicotiana tabacum*). After screen by Bialaphos and identification by PCR, PCR-Southern blotting, transgenic suspension cell line were produced. Under 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl or 15% PEG6000 stress for 14 d, transgenic cell line could grow, but wild type (WT) was near to death. The results showed that proline content and SOD activity were higher in transgenic cell line than those in WT, but MDA content was opposite.

**Key words:** transgenic *Nicotiana tabacum*; DREB gene; osmotic stress; salt stress; resistance

通过转基因方法提高农作物的抗旱和盐能力是现代农业生物技术应用中的热点(Wang等2003)。用于植物抗逆性基因工程改良的外源目的基因依据其产物的作用分为两大类。一类是一些功能蛋白和渗透调节因子的基因(如LEA、P5CS、mtl、gutD和BADH等)。这类基因一直受到国内外广泛重视, 研究得比较透彻, 并已获得了一些耐旱和耐盐能力得到改善的转基因植物。第二类主要为传递信号和调控基因表达的转录因子(如bZIP、MYC、MYB和DREB等)(Shen等2003)。这类基因表达特性及基因产物调控作用的研究是植物分子生物学领域中的前沿性工作。其中, 脱水响应元件结合蛋白(dehydration-responsive element binding, DREB)转录因子在基因工程方法综合性改良植物抗逆性中的应用日益受到关

注。DREB转录因子和脱水响应元件(dehydration-responsive element, DRE)在干旱和高盐胁迫信号传递中起作用, 一个DREB转录因子可以调控多个与植物干旱和高盐耐性有关的功能基因的表达, 从而综合提高植株的抗逆性(刘强等2000; Xiong和Fei 2006)。

BY-2 (bright yellow 2)悬浮细胞生长迅速、易于培养、受环境因子干扰少、细胞分散性好、胁迫处理均匀、研究周期短、不受季节限制等多种优点, 是研究转化基因功能的良好试材。本文采

收稿 2006-11-06 修定 2007-03-15

资助 国家转基因植物研究与产业化专项基金(JY03-B-19-2)和河南省杰出人才创新基金(022100090)。

\* 通讯作者(E-mail: xinjian@371.net; Tel: 0371-63978318)。

用基因枪转化法, 于诱导型启动子 rd29B 的控制之下将 *DREB* 基因转入 BY-2 细胞系, 检测了转 *DREB* 基因细胞系的抗盐和抗渗透胁迫能力。

## 材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)悬浮细胞(BY-2, 河南农业大学刘卫群先生提供)接种于MS基本培养基中。MS液体培养基: MS大量元素、MS微量元素、MS铁盐、 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 肌醇、 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{VB}_1$ 、 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$ 、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸和  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.8。在  $25^\circ\text{C}$ , 震幅为  $125 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  黑暗条件下培养, 每隔 7 d, 将其中 2 mL 的培养液转移到另一新的盛有 50 mL 基本培养基的三角瓶中。MS固体培养基: MS液体培养基用琼脂粉  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  固化。固体培养的接种方法: 将  $30 \mu\text{L}$  液体培养 7 d 的溶液加到固体培养基的表面,  $25^\circ\text{C}$  黑暗条件下培养。

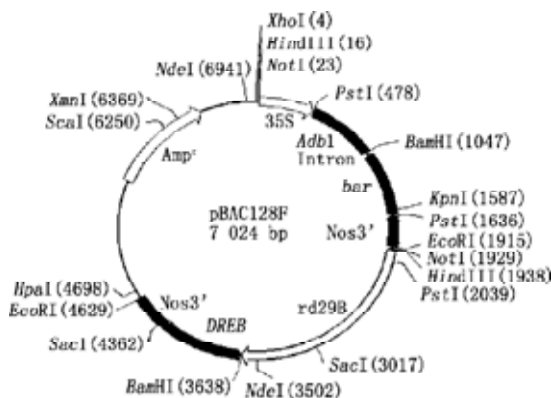


图1 表达载体 pBAC128F 质粒图谱(王军卫等 2006)

Fig.1 Schematic map of expression vector pBAC128F  
括号内数字表示酶切位点。

用于基因枪转化 BY-2 的质粒为 pBAC128F (图1), 含有来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *DREB* 基因和受 CaMV35S 强启动子调控的 *bar* 基因(王军卫等 2006)。

转化前将 BY-2 转到固体培养基上预培养 1 周, 然后转移到含有 3.64% (W/V) 山梨醇和 3.64% (W/V) 甘露醇的固体培养基上预处理 4~6 h。采用 Bio-Rad 公司生产的 PDS-1000/He 基因枪进行转化, 轰击金粉的制备参照 Bio-Rad 公司基因枪操作

指南进行制备。选用可裂膜片压力为  $7\ 579 \text{ kPa}$ , 真空度为  $27\sim 28 \text{ Pa}$ , 靶材料距离载样膜为  $9 \text{ cm}$ , 对靶材料进行轰击。转化后的 BY-2 继续在上述高渗培养基中培养 16 h, 然后转移到固体培养基中过渡培养 1 周, 之后将 BY-2 转到添加了除草剂 Bialaphos 的液体培养基中进行筛选培养, 最后得到抗除草剂的稳定细胞系。

收集具有除草剂抗性的转 *DREB* 基因细胞系, 采用 CTAB 法提取总 DNA。以野生型的为阴性对照、质粒 pBAC128F 为阳性对照, PCR 产物用 1% 凝胶电泳检测。转基因 BY-2 的 PCR 检测, 根据 *DREB* 基因设计引物, 上游引物: 5' TCCGATTACGAGCCTCAA 3'; 下游引物: 5' CAAAGCGACACGTCACCA 3'。以质粒酶切的目的基因为探针 DNA, 用地高辛随机引物法标记探针, 采用 Roche 公司生产的地高辛试剂盒对 PCR 产物进行 Southern 杂交分析。

分别对转基因 BY-2 和野生型细胞系进行盐胁迫和渗透胁迫处理: 在含  $100$ 、 $200$ 、 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$  和 5%、10%、15% PEG6000 的 MS 固体培养基中对转基因细胞系和野生型细胞系进行胁迫处理 14 d。培养皿的一半接种转 *DREB* 基因细胞系, 另一半接种野生型细胞系, 接种量为  $30 \mu\text{L}$  (液体培养 7 d 后的 BY-2 悬浮细胞系), 以供观察细胞生长情况。在 MS 液体培养基模拟盐和渗透胁迫处理: 在 MS 液体培养基中分别添加  $150$ 、 $200$ 、 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$  和 10%、15% PEG6000, 并对细胞处理 24、48 和 72 h, 以未经处理的细胞系为对照, 测定相关指标。

细胞中的脯氨酸提取采用磺基水杨酸法的方法(张殿忠等 1990)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定采用 NBT 光化还原法(Beauehamp 和 Fridorich 1971)。丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定参照朱广廉等(1990)的方法。

## 结果与讨论

### 1 转 *DREB* 基因烟草细胞系的筛选和检测

基因枪转化后将 BY-2 转到添加了  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Bialaphos 的液体培养基中进行筛选培养, 2 周后,

挑选存活下来的细胞系转到含有 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Bialaphos 的液体培养基中继续筛选培养3周, 最后得到抗 Bialaphos 的稳定细胞系。并且分别提取细胞中 DNA。PCR 检测结果(图2)表明, 可以扩增出预

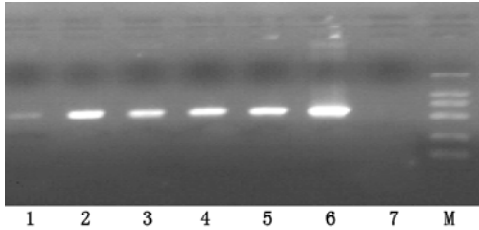


图2 转基因烟草细胞系的PCR检测

Fig.2 PCR analysis of transgenic tobacco cell line  
M: 2 000 bp DNA 标准分子量; 1~5: 转基因细胞系;  
6: 质粒; 7: 野生型细胞。

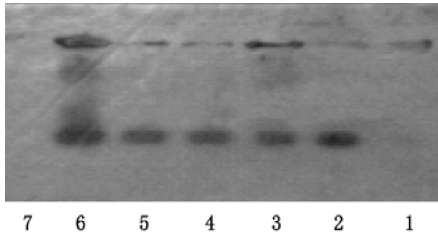


图3 转基因烟草细胞系的PCR-Southern 杂交

Fig.3 PCR-Southern blotting of transgenic tobacco cell line  
1~5: 转基因细胞系; 6: 质粒; 7: 野生型细胞。

期的 500 bp 左右的特异性条带, 此带与质粒扩增的条带大小相同, 但未经转化的细胞系则未扩增出相应的条带, 初步显示外源 *DREB* 基因已经在受体中存在。

为进一步验证 PCR 检测结果的可靠性, 对上述转基因细胞系进行 PCR-Southern 杂交分析结果(图3)显示, 在 500 bp 的位置均出现了与质粒—pBAC128F 相同的带, 而野生型细胞则无, 这进一步证明外源 *DREB* 基因已整合在转基因细胞的基因组中。

## 2 转 *DREB* 基因烟草细胞系的抗盐和抗渗透胁迫能力的鉴定

通过添加外源的 100、200、300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 5%、10%、15% PEG6000 到 MS 固体培养基中, 对转基因及野生型的细胞系进行胁迫处理 14 d 的结果(图4)显示, 在正常的生长条件下, 转基因和野生型的细胞生长良好, 呈现亮黄色致密的小颗粒。在 100 和 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 下的转基因细胞系依然保持黄色并能生长, 而野生型细胞生长缓慢并有发白的趋势。经 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 处理的转基因和野生型细胞的生长均受到抑制, 但转基因细胞系仍能存活, 而野生型则发白并接近死亡。同样, 经 15% PEG6000 处理的转基因细胞

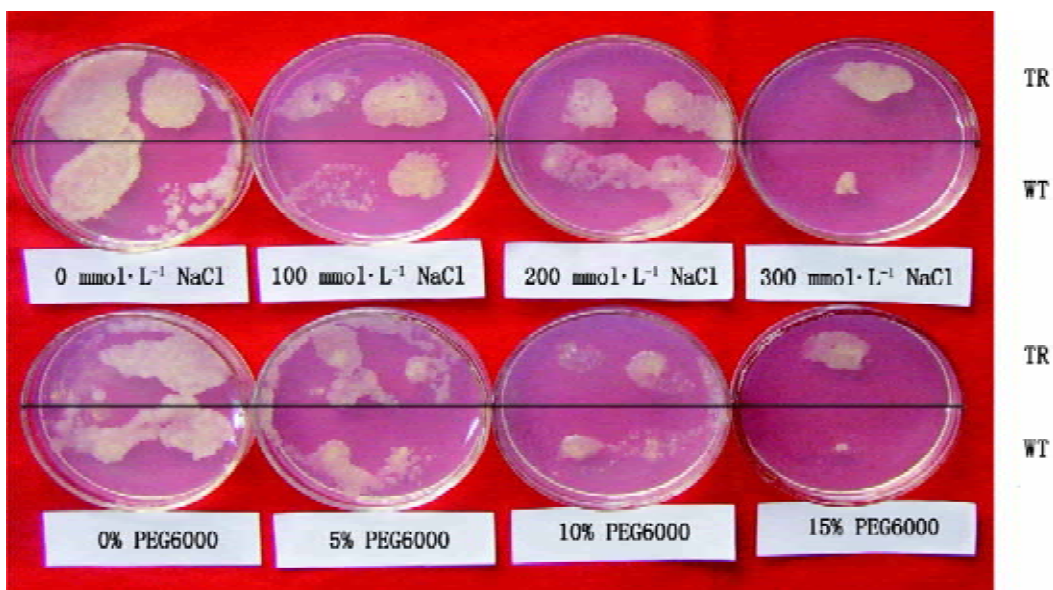


图4 转基因烟草细胞系的抗盐和抗渗透胁迫能力鉴定

Fig.4 Identifications of resistance of transgenic tobacco cell line to osmotic and salt stresses  
培养皿上半部为转基因细胞系(TR); 下半部为野生型细胞系(WT)。

系生长受到轻微抑制但依旧呈现黄色, 而野生型的细胞系的生长则严重受抑并呈灰白颜色。这表

明转 *DREB* 基因细胞系的抗盐和抗渗透胁迫能力增强。

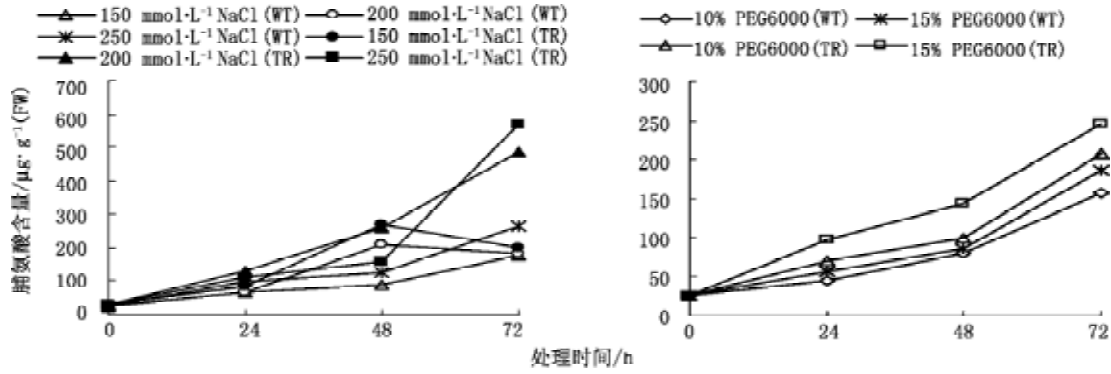


图5 NaCl和PEG胁迫下烟草细胞中脯氨酸含量的变化

Fig.5 Changes in proline contents of tobacco cells under NaCl and PEG stresses

TR : 转基因细胞系 ; WT : 野生型细胞系。下图同此。

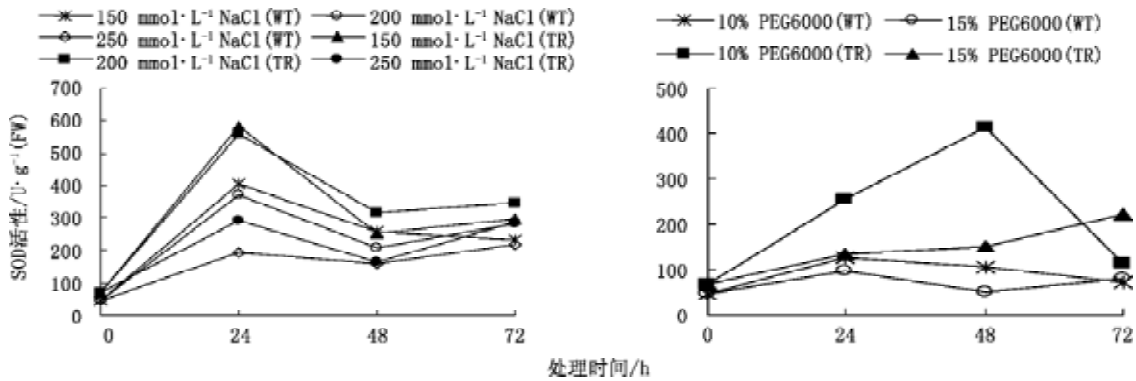


图6 NaCl和PEG胁迫下烟草细胞中SOD活性的变化

Fig.6 Changes in SOD activities of tobacco cells under NaCl and PEG stresses

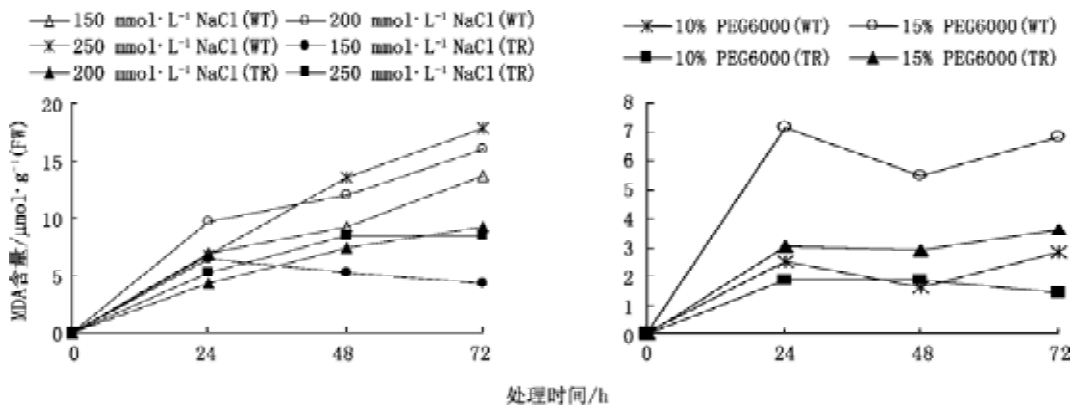


图7 NaCl和PEG胁迫下烟草细胞中MDA含量的变化

Fig.7 Changes in MDA contents of tobacco cells under NaCl and PEG stresses

### 3 转 *DREB* 基因烟草细胞系的几个与抗盐和抗渗透胁迫相关生理指标的变化

图 5~7 显示:(1)在 NaCl 和 PEG 胁迫下的转基因及野生型细胞系的脯氨酸含量均有明显积累。250 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 48 h 的转基因细胞系的脯氨酸含量比野生型高出 4 倍。PEG 胁迫下的转基因细胞系脯氨酸含量也普遍高于野生型。未经 NaCl 和 PEG 胁迫的转基因细胞系和野生型的脯氨酸含量较低(图 5)。

(2) NaCl 和 PEG 胁迫的转基因细胞系和野生型的 SOD 活性均不同程度地增强。200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 24 h 的转基因细胞系的 SOD 活性比野生型的高出 1 倍。转基因细胞系 SOD 活性普遍高于野生型的, 未经 NaCl 和 PEG 胁迫的转基因细胞系和野生型的 SOD 活性均保持在较低的水平上(图 6)。

(3) NaCl 和 PEG 胁迫下的转基因及野生型细胞系 MDA 的含量均明显增加。但 NaCl 和 PEG 胁迫的野生型细胞系高于转基因的。未经盐和 PEG 胁迫处理的转基因细胞系和野生型的 MDA 含量较低(图 7)。

总之, 我们建立的转 *DREB* 基因烟草悬浮细胞系为研究其它与抗盐和抗渗透胁迫相关基因功能

的检测提供理想的实验系统, 可为其它相关研究提供借鉴。

### 参考文献

- 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). *DREB* 转录因子在提高植物抗逆中的作用. 科学通报, 45 (1): 11~16
- 王军卫, 杨凤萍, 陈绪清, 梁荣奇, 张立全, 耿东梅, 张晓东, 宋亚珍, 张改生(2006). 外源脱水应答转录因子 *DREB* 基因在转基因小麦中的诱导型表达与抗干旱生理效果研究. 遗传学报, 33 (5): 468~476
- 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤(1990). 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, (4): 62~65, 32
- 朱广廉, 钟海文, 张爱琴(1990). 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem, 44: 276~287
- Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q, Chen SY (2003). An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Theor Appl Genet, 106: 923~930
- Wang WG, Vinocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218: 1~14
- Xiong YW, Fei SZ (2006). Functional and phylogenetic analysis of a *DREB*/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Planta, 224: 878~888