

柽柳金属硫蛋白基因(*MT2*)的过量表达对烟草耐 Cd^{2+} 性的促进效应

张艳^{1,2}, 杨传平^{1,*}, 王玉成¹

¹东北林业大学林学院林木遗传育种教研室, 哈尔滨 150040; ²黑龙江省教育学院生物化学系, 哈尔滨 150080

摘要: 将在柽柳(*Tamarix androssowii*)中克隆的金属硫蛋白基因 *MT2* (GenBank 登录号: AY620987)构建到载体 pROKII 上。用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 检测证明外源基因已整合进烟草基因组并可正常表达。 Cd^{2+} 抗性实验证明柽柳金属硫蛋白基因(*MT2*)的表达可提高转基因烟草的抗 Cd^{2+} 性。

关键词: 柽柳; 重金属; 金属硫蛋白; 烟草

Stimulation Effect of Overexpression of the Metallothionein Gene (*MT2*) from *Tamarix androssowii* on the Cd^{2+} Tolerance in Tobacco

ZHANG Yan^{1,2}, YANG Chuan-Ping^{1,*}, WANG Yu-Cheng¹

¹Laboratory of Forest Genetics and Breeding, College of Forest, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Department of Biochemistry, Heilongjiang College of Education, Harbin 150080, China

Abstract: The *MT2* gene from *Tamarix androssowii* (GenBank accession number: AY620987) was cloned into vector pROKII. Transgenic tobacco lines were generated using *Agrobacterium*-mediated gene transferring method. PCR-Southern and Northern blot analysis indicated that the *MT2* gene was indeed integrated into the tobacco genome and expressed in tobacco. The test of Cd^{2+} resistance proved that the expression of *MT2* gene enhanced the Cd^{2+} tolerance in tobacco.

Key words: *Tamarix androssowii*; heavy metal; metallothionein; tobacco

1977年, 植物金属硫蛋白(metallothionein, MT)在大豆根中发现后, 人们又陆续在拟南芥、水稻、棉花、玉米、小麦、番茄等植物中检测到 *MT* 基因(Kawashima 等 1991; Zhou 和 Goldsbrough 1995; Hsieh 等 1995; Hudspeth 等 1996; de Framond 1991; Lane 等 1987; Whitelaw 等 1997), 并克隆了相应的 cDNA 或基因组序列。但在林木中克隆的 *MT* 基因数量不多, 对其功能的研究也少。MT 与植物的抗逆反应、胚胎发育、果实成熟、衰老以及基因调控等过程均有关联(常团结和朱祯 2002)。目前, 对 MT 的金属结合能力的研究较多, 尤其是 MT 对重金属的解毒已越来越引起人们的重视。1987年, Lefebvre 等(1987)证明仓鼠 *MT* 基因可以在植物中表达, 并可提高植物的耐 Cd^{2+} 力。尔后人们又相继将不同来源的 *MT* 基因导入植物, 获得了能耐 Cd 和 Cu 的转基因植物(张晓钰等 2000; 安志装等 2001; Thomas 等 2003; Lee 等 2004)。另外, 作为荒漠地区盐渍化沙地上良好固沙造林树种的紫杆柽柳

(简称柽柳), 具有较强的抗盐、旱胁迫和耐高温等特性(张道远等 2003)。本文将从柽柳中克隆的 *MT2* 基因导入烟草, 获得了有较高耐 Cd^{2+} 性的转基因植株, 现报道如下。

材料与方法

植物表达载体 pROKII 由张慧先生惠赠, 大肠杆菌感受态 Top10 购自天根公司, 农杆菌 EHA105、转化材料烟草(*Nicotiana tabacum*)‘龙江911’为东北林业大学林木遗传育种实验室保存, 柽柳(*Tamarix androssowii* L.) cDNA 文库为东北林业大学林木遗传育种实验室构建。XbaI、KpnI、T4 DNA ligase 均购自 Promega 公司, Taq 酶、DL-2000 marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, dNTP 为上海生工生物技术服务有限公司产

收到 2007-02-01 修定 2007-06-21

资助 国家“973”计划(G1999016000)。

* 通讯作者(E-mail: yangcp@nefu.edu.cn; Tel: 0451-82190607)。

品, 质粒(小量)提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司, 卡那霉素和利福平购自 Sigma 公司, 头孢霉素购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 苄基腺嘌呤(BA)、奈乙酸(NAA)及其他试剂均为分析纯。

构建植物表达载体 pRCM 时, 根据柾柳 *MT2* 基因 cDNA 序列, 设计并合成引物, 以文库质粒为模板, 从柾柳 cDNA 文库扩增柾柳 *MT2* 基因。5' 引物: 5'-CCTCTAGAGCAAAAATGCTCTTCT-TGTGGAGGAAGT-3'; 3' 引物: 5'-ATGGTAC-CGTTTACTTAACAAGTACATGGGTCACA-3'。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min, 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。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。将柾柳 *MT2* 基因 PCR 扩增片段回收后用 *Xba*I/*Kpn*I 双酶切, 与同样用 *Xba*I/*Kpn*I 双酶切的载体 pROKII 16 kb 连接过夜, 转化大肠杆菌感受态 Top10, 在 Kan^r 抗性板上筛选转化质粒, 并用 PCR、酶切和测序鉴定。

电击法将植物表达载体 pRCM 导入根癌农杆菌 EHA105 中, 以 20 d 左右苗龄的烟草无菌苗为实验材料, 用农杆菌介导的叶盘法转化烟草, 用卡那霉素进行筛选, 得到再生植株。

PCR 及 PCR-Southern 分析时, 以 CTAB 法提取转基因植株和非转基因植株叶片的总 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。反应体积为 20 μL, 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min, 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。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分离后转至尼龙膜上, 用 DIG 探针合成试剂盒标记柾柳 *MT2* 基因 cDNA 为探针, 进行杂交。用 DIG CDP-StarTM 化学发光检测试剂盒检测杂交条带。

Northern blot 分析时, 用 SDS 法提取转基因植株和非转基因植株的叶片总 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。

作转基因烟草抗性实验时, 将转基因植株和非转基因植株无根幼苗分别移到 Cd²⁺ 浓度为 100、200 和 300 μmol·L⁻¹ 的 MS 生根培养基上, 每个株

系每个浓度选 10 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, 50 d 后观察其生长状况, 测量其鲜重和株高。

结果与讨论

1 PCR 扩增柾柳 *MT2* 基因

柾柳 *MT2* 基因 cDNA 序列长 535 bp, 去除载体和 PolyA 后长 517 bp。其 5' 非翻译区 31 bp, 3' 非翻译区 267 bp, 开放读码框(ORF)长 219 bp, 编码 72 个氨基酸。加入酶切位点及部分上游序列后, PCR 扩增的柾柳 *MT2* 基因为 256 bp (图 1)。

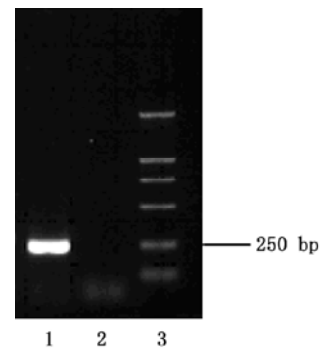


图 1 PCR 产物凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product
1: 柾柳 *MT2* 基因; 2: 水对照; 3: DL-2000 分子量标准。

2 植物表达载体 pRCM 的构建和鉴定

将 PCR 扩增产物克隆到 pROKII 载体上, 转化 Top10, 随机挑选菌落用 *Xba*I/*Kpn*I 酶切, 得到 256 bp 片段, 证明 PCR 扩增片段已克隆到 pROKII 载体中(图 2)。阳性克隆测序表明插入片段的序列是正确的(资料未列出)。

3 转基因烟草的 PCR 和 PCR-Southern 检测

检测 9 个转基因植株及非转基因植株, PCR 的结果图 3 表明, 9 个转基因植株均扩增出与阳性质粒对照目的片段大小一致的产物, 而非转基因植株则没有扩增出目的片段。为进一步明确扩增产物是否为目的基因片段, 将其中 6 个转基因植株的 PCR 扩增产物作电泳分离后用 Southern 印记转移到尼龙膜上进行 PCR-Southern 杂交。图 4 中结果表明, 经 PCR 扩增得到的特异片段的确是目的基因的扩增产物, 证明外源基因已整合到烟草基因组中。

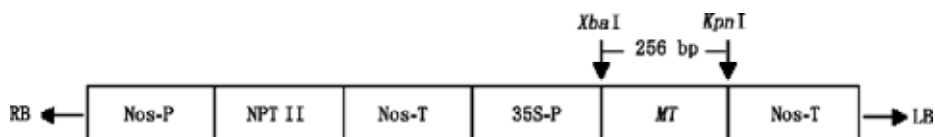


图2 载体 pRCM 的构建

Fig.2 Construction of vector pRCM

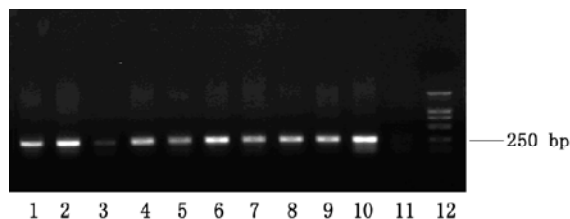


图3 转基因烟草的 PCR 检测

Fig.3 Identification of PCR product of transgenic tobacco plants

1~9: 转基因烟草 PCR 扩增结果; 10: 阳性对照; 11: 非转基因烟草 PCR 扩增结果; 12: DL-2000 分子量标准。

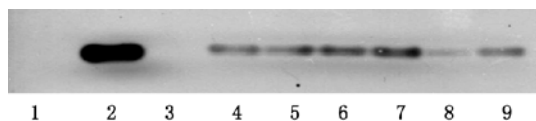


图4 转基因烟草的 PCR-Southern 杂交检测

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

1: 对照(水作模板); 2: 阳性对照(pRCM 质粒作模板); 3: 非转基因对照(非转基因烟草作模板); 4~9: 转基因烟草株系 T₀-1~T₀-6。

4 转基因烟草的 Northern blot 检测

对 Southern 杂交中表现为阳性的 6 个转基因植株进行 Northern 杂交, 检测的结果图 5 表明, 转基因植株中的外源基因都有所表达, 但表达量有所不同。其中, T₀-2 表达量最高, T₀-4 和 T₀-5 的表达量较低。

5 转基因烟草的 Cd²⁺ 抗性分析

将从分化培养基上长出的约 2 cm 高的幼苗移入含有不同 Cd²⁺ 浓度的 MS 生根培养基中, 生长 50 d 后, 测量植株的鲜重和株高。比较转基因烟草和非转基因烟草的鲜重和株高并结合形态观察, Cd²⁺ 浓度为 100 μmol·L⁻¹ 中的转基因烟草生长状态正常, 非转基因烟草也可正常生长, 但长势不如转基因烟草; Cd²⁺ 浓度为 200 μmol·L⁻¹ 中

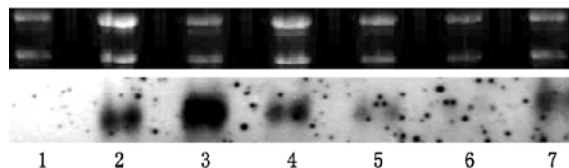


图5 转基因烟草的 Northern 杂交检测

Fig.5 Northern blot analysis of transgenic tobacco plants

1: 对照(非转基因烟草); 2~7: 转基因烟草株系 T₀-1~T₀-6。

的转基因烟草原有老叶变黄, 但新叶鲜绿, 根系较正常植株稍粗短, 但仍可生长, 而非转基因烟草叶片与茎均变黄, 根系极短, 植株矮化枯死, 明显受到 Cd²⁺ 毒害; Cd²⁺ 浓度为 300 μmol·L⁻¹ 中的转基因烟草生长缓慢, 叶片发黄, 根系短粗颜色发褐, 生长受到抑制。从鲜重和株高的结果中可以看到, 在 200 和 300 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ 胁迫下, 转基因烟草的鲜重分别高于非转基因烟草 95.69% 和 73.77%, 株高分别高于非转基因烟草 53.77% 和 41.70%, 说明柃柳 MT2 基因的导入可减轻 Cd²⁺ 对烟草的毒害, 提高烟草的耐 Cd 性。比较各转基因株系间生长情况可见, 各株系的耐 Cd 性不同, 其中 T₀-2 株系的表现最好, 在 200 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ 下, 其鲜重和株高比非转基因烟草分别提高 1.55 倍和 1.05 倍, 增长显著。各株系耐 Cd 能力的不同, 可能是外源基因插入烟草基因组的位点有异所致。同时生长最好的 T₀-2 株系在 Northern 杂交中表达量也最多, 说明外源基因表达量的多少与 Cd²⁺ 胁迫下的植株生长情况呈正相关(图 6)。

总之, 柃柳 MT2 基因编码的 MT 蛋白能够与 Cd²⁺ 结合, 说明采用基因工程技术在植物中过量表达 MT 基因可以提高植物抗重金属的能力, 这是净化污染土壤和减少食物链中重金属污染的一条值得考虑的途径。

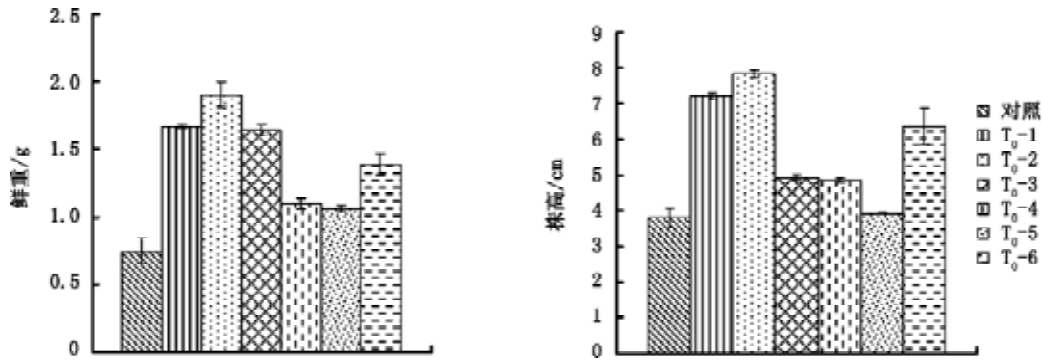


图6 Cd^{2+} ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫下转基因烟草与非转基因烟草生长的比较

Fig.6 Comparison on growth of transgenic tobacco and non-transgenic tobacco under $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ stress

参考文献

- 安志装, 王校常, 严蔚东, 施卫明, 曹志洪(2001). 植物螯合肽及其在重金属胁迫下的适应机制. 植物生理学通讯, 37 (5): 463~467
- 常团结, 朱祯(2002). 植物金属硫蛋白研究进展(一). 生物技术通报, (3): 5~10
- 张道远, 张娟, 谭敦炎, 潘伯荣(2003). 国产柞柳科3属6种植物营养枝的解剖观察. 西北植物学报, 23 (3): 382~388
- 张晓钰, 周慰, 茹炳根(2000). 转金属硫蛋白突变体 $\alpha\alpha$ 的烟草具有较高的重金属抗性. 植物学报, 42 (4): 416~420
- de Framond AJ (1991). A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*) cloning and characterization. FEBS Lett, 290: 103~106
- Hsieh HM, Liu WK, Huang PC (1995). A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. Plant Mol Biol, 28: 381~389
- Hudspeth RL, Hobbs SL, Anderson DM, Rajasekaran K, Guala JW (1996). Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton. Plant Mol Biol, 31: 701~705
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N (1991). Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. Plant Cell Physiol, 32: 913~916
- Lane B, Kajoika R, Kennedy T (1987). The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. Biochem Cell Biol, 65: 1001~1005
- 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 (6): 805~815
- Lefebvre DD, Miki BL, Laliberete JF (1987). Mammalian metallothionein function in plants. Biotechnology, 5: 1053~1056
- 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 characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L). Plant Mol Biol, 33: 503~511
- Zhou J, Goldsbrough PB (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. Mol Gen Genet, 248: 318~328