

一个耐硒基因过表达载体的构建及转基因植株的筛选鉴定

钱靓雯, 欧阳剑, 孟云, 樊婷婷* (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]进一步验证 *WRKY47* 基因在调控硒胁迫应答中的功能, 构建 *WRKY47* 过表达载体, 获得相应的转基因株系。[方法]以野生型拟南芥的 cDNA 为模板, 利用 PCR 扩增 *WRKY47* 基因全长, 将该基因连接到 pBI121 载体上。将获得的重组载体转化至农杆菌菌株 GV3101, 通过浸花转化法将 *WRKY47* 重组质粒转化到拟南芥野生型植株中, 利用转基因筛选与遗传鉴定获得 *WRKY47* 转基因阳性植株。[结果]扩增获得 *WRKY47* 基因, CDS 全长 1 470 bp, 连接转化并获得测序正确的重组载体 pBI121-*WRKY47*。通过抗性筛选和分子鉴定获得阳性转基因植株。[结论]成功构建过表达载体并获得相应的转基因株系, 为进一步研究该基因的分子机制奠定基础。
关键词 拟南芥; *WRKY47* 基因; 过表达; 转基因植株
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)20-0086-03

Construction and Characterization of a Se-resistant Gene Overexpression Plants in *Arabidopsis thaliana*
QIAN Liang-wen, OUYANG Jian, MENG Yun et al (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] To further confirm that *WRKY47* gene was involved in the regulation of selenium stress response, the transgenic lines *WRKY47* overexpression were generated. [Method] With the cDNA of wild type *Arabidopsis thaliana* (Col-0) as a template, the full length of *WRKY47* gene was amplified by PCR and cloned into pBI121 vector. The recombinant vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101. *WRKY47* recombinant plasmid was transformed into *Arabidopsis thaliana* wild type by dipping transformation. The transgenic lines were isolated through antibiotic screening and genetic identification. [Result] The *WRKY47* gene was amplified and the CDS was 1 470 bp in length, ligated and transformed to obtain the correct recombinant vector pBI121-*WRKY47*. Transgenic plants were obtained by resistance screening and molecular identification. [Conclusion] The overexpression vector was successfully constructed and the corresponding transgenic lines were obtained, which laid the foundation for further study on the molecular mechanism of the gene.
Key words *Arabidopsis thaliana*; *WRKY47* gene; Overexpression; Transgenic plants

硒(Selenium, Se)是自然环境中广泛存在的一种非金属元素^[1]。尽管没有直接证据显示硒对植物是必需的, 但其已被证实是人类和动物所必需的微量元素^[2]。硒作为一种降低生物氧化胁迫的生物活性物质, 其功能受到抗氧化硒蛋白的调节, 如谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和硫氧还蛋白还原酶(TrxR)^[3]。近年来, 有研究也证实补硒对预防与氧化胁迫或炎症相关疾病有重要影响^[4]。植物吸收硒的主要形式为硒酸盐(SeO_4^{4-})和亚硒酸盐(SeO_3^{3-})。硒在植物体内能够以多种化合物的形式存在, 这些化合物大体可以分为无机态和有机态。植物体内主要以有机硒的形式存在, 占 80% 以上; 无机硒含量较少, 占总硒的 8% 左右^[5]。通过分子和基因组分析许多硒诱导基因已经在拟南芥和其他植物中确定, 其中包括一系列的调节胁迫诱导基因表达量的转录因子。胁迫诱导基因不仅在最初胁迫反应中起作用, 而且还影响植物对该胁迫的耐受性。硒是人和动物所必需的营养元素, 而它的最低剂量和中毒剂量之间的范围很窄。

合肥工业大学食品科学与工程学院分子生物学实验室在前期试验工作中筛选到 2 个具有硒敏感表型的突变体 *wrky47-1*、*wrky47-2*, 研究了 *WRKY47* 基因在硒胁迫下的相关耐硒机理及对相关基因的转录调控机制。笔者通过运用生物学方面的各种方法成功构建了 *WRKY47* 过表达载体并筛选鉴定得到过表达株系, 为进一步探究该基因分子功能提供试验基础。

作者简介 钱靓雯(1991—), 女, 浙江德清人, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事植物逆境生物学研究。
收稿日期 2018-04-17

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。采用的植物材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 购于美国拟南芥种子资源中心, 遗传背景为哥伦比亚(Col)型, 后由分子生物学实验室繁殖培育。

植物培养黑土购置于镇江市京口区绿岛园艺开发中心, 土壤 pH 为 5.6~7.0。

1.1.2 主要试剂和酶类。Easy Taq DNA Polymerase(TransGen); Trans Start Fast Pfu DNA Polymerase(TransGen); 限制性内切酶 *Xba*I(NEB)、*Kpn*I(NEB)、*Hind*III(NEB); T₄ DNA Ligase(TransGen); Prime STAR HS DNA Polymerase(TaKa-Ra), Silwet L-77, 蔗糖, MES, HgCl₂。

1.1.3 菌体和质粒载体。大肠杆菌感受态 DH5α、农杆菌感受态 GV3101、pBI121 表达载体。

1.2 方法^[6-7]

1.2.1 土培营养液配制。按照表 1、2 配方配制土培营养液。

表 1 大量元素营养液配方
Table 1 Formula of nutrient solution of macroelement

序号 No.	化合物名称 Compound	浓度 Concentration mol/L
1	KNO ₃	1
2	KH ₂ PO ₄	1
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
4	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1
5	Fe-EDTA	0.02

表 2 微量元素营养液配方

Table 2 Formula of nutrient solution of microelement

序号 No.	化合物名称 Compound	浓度 Concentration mol/L
1	H ₃ BO ₃	70
2	MnCl ₂ · 4H ₂ O	14
3	NaCl	0.5
4	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
5	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
6	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	10
7	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01

1.2.2 拟南芥土壤培养。首先将黑土高温高压灭菌 20 min 以上,冷却后粉碎,再将蛭石、黑土、珍珠岩按照 9.0:3.0:0.5 的比例混合,装入提前清洗干净的钵子中。将配制好的营养液倒入托盘中,待土壤充分吸足营养液后,将种子用牙签蘸取后点在土壤表面,置于温室中培养。

1.2.3 WRKY47 过表达载体的构建。

1.2.3.1 目的基因片段的获得。①利用软件设计所需引物,选用 *Xba* I 和 *Kpn* II 2 个酶切位点。所需引物为 FP: 5'-GGGGT ACCATGGAAGAACATA TTCAAGATC-3', RP: 5'-CGGCGAGCTCTTACTTTGT AGAGAAAGT GG-3'。②提取拟南芥植物组织 RNA,反转录成 cDNA,以其为模版用 PS 酶进行 PCR 扩增。

1.2.3.2 重组载体的获得。①用分子生物学试剂盒回收目的基因及 pBI121 载体,用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Kpn*II 置于 37 ℃ 生化培养箱中进行酶切。②用 T₄ 连接酶将酶切产物置于金属浴 16 ℃ 过夜连接。③用热击转化的方法将连接产物转入到大肠杆菌感受态 DH5α 中,然后涂布在含有 50 μg/mL Kana 抗性的固体 LB 平板上,置于 28 ℃ 生化培养箱中培养 12 h。④待其长出单菌落后挑取单克隆转接至含有相应抗性的液体 LB 培养基中,置于 37 ℃ 恒温振荡器中振荡培养 12 h,进行 PCR 鉴定,挑选阳性菌液送至上海生工生物公司测序,并用 50% 甘油以 1:1 的比例将其置于-20 ℃ 冰箱保存待用。

1.2.4 拟南芥转基因。用电击转化法将测序正确的质粒转化到农杆菌感受态 GV3101 中,涂布在含有 50 μg/mL Kana 抗性和 50 μg/mL Gen 抗性的固体 LB 平板上,置于 28 ℃ 生化培养箱中培养 12 h。待其长出单菌落后挑取单克隆进行 PCR 鉴定,用条带大小正确、成功转化的阳性菌落进行转基因。

转基因方法:将阳性菌液活化至 OD₆₀₀ 达 0.8 左右,用普通离心机离心,转速为 5 000 r/min,时间为 10 min,离心所得菌体用提前配制好的浸染缓冲液洗涤 2 次,最后重悬至菌液的 OD₆₀₀ 为 0.8 左右,浸染前 1 d 将开放的花朵剪去,浇满水,次日将选取未盛开的花苞置于转基因缓冲液中浸泡 30~60 s,用保鲜膜包裹好置于黑暗处理 24 h 后于温室培养。

1.2.5 转基因阳性株系的筛选与鉴定。将收集的种子置于常温下干燥 7 d,并于 4 ℃ 春化 7 d,将种子消毒后置于滤纸上干燥,用无菌牙签慢慢地拨撒到含有 50 μg/mL Kana 抗性

的 1/2MS 培养基上,置于光照培养箱培养 14 d,可以看到阳性植株的根系发达并且叶片颜色翠绿,将其移栽至土壤中于培养室正常培养,并将其作为 T₁ 代植株。

待阳性植株生长 21~28 d 后,取植株叶片用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 PCR 扩增条带鉴定筛到的是否为阳性株系,将假阳性株系去除。将阳性植株所收获的种子记为 T₂ 代植株。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 WRKY47 基因克隆 用 Trizol 法提取拟南芥野生型植株的 RNA,用反转录试剂盒将其反转为 cDNA,然后以 cDNA 为模板 PCR 扩增 WRKY47 基因片段。扩增出的目的基因片段如图 1a 所示,扩增后的片段电泳检测条带大小与预计一致,大小为 1 470 bp 左右,这证明已经成功克隆出 WRKY47 基因。然后繁殖了 pBI121 质粒载体,并进行电泳检测,由图 1b 可知,条带大小正确,条带清晰,均可用于后续试验。

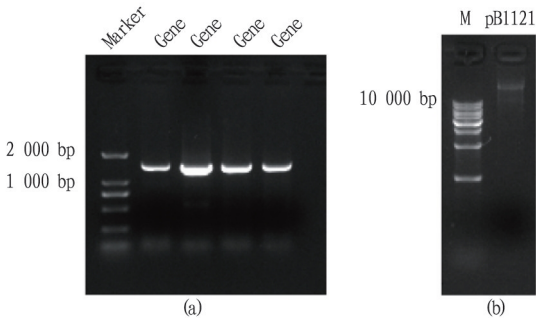


图 1 目的基因片段和质粒电泳检测

Fig.1 Target gene fragment and plasmid electrophoresis

2.2 过表达载体的构建 选用 pBI121 质粒作为过表达载体,经软件设计后选择的酶切位点是 *Xba*I 和 *Kpn*I。将产纯后的目的基因与表达载体进行双酶切,进行电泳检测(图 2a、b),酶切后的基因和载体条带清晰、大小正确,可用于下一步试验。

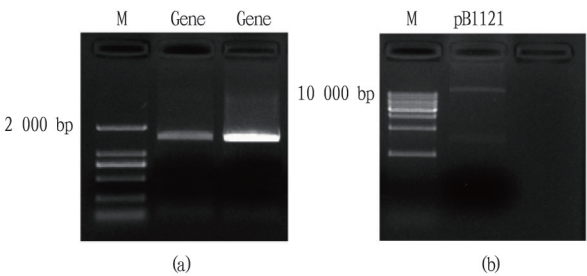


图 2 酶切回收电泳检测

Fig.2 Electrophoresis detection of enzyme digestion recovery

酶切成功后置于金属浴中 16 ℃ 过夜连接,接着将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞中,涂于含有抗性的平板上,待长出单菌落后挑取单克隆进行 PCR 鉴定,使用基因自身引物进行扩增,电泳检测结果见图 3。

将阳性菌株的菌液送至上海生工生物公司测序,测序比对结果与拟南芥网站上查得的序列一致。由以上结果可知 WRKY47 基因过表达载体构建成功,可以用于后续试验。

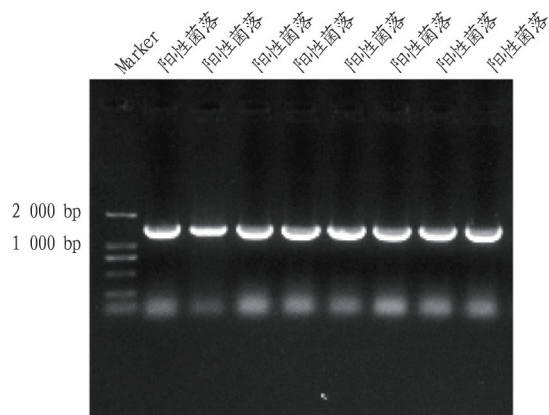


图3 *WRKY47* 过表达菌落 PCR 后电泳检测

Fig.3 Electrophoresis detection after overexpression colony PCR of *WRKY47*

2.3 转基因阳性植株的鉴定与筛选 收种后室温干燥7 d,置于4℃冰箱春化3 d,消毒后用无菌牙签拨撒到含有30 μg/mL Kana 抗性的1/2MS培养基上,置于温室培养14 d。14 d后可以看到转化成功的拟南芥植株,它的长势状态比未成功转基因的植株状态好,并且它的根系发达、叶片翠绿。挑选长势好的幼苗进行土培移栽。抗性筛选结果见图4。

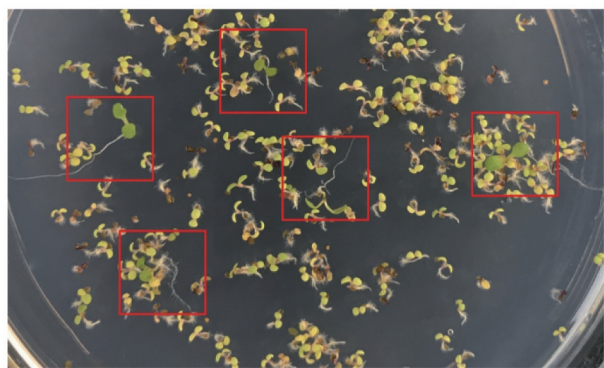


图4 *WRKY47* 过表达植株抗性筛选

Fig.4 Resistance screening of *WRKY47* overexpressed plant

待植株生长14 d后提取DNA,进行PCR扩增鉴定,条带大小约为1500 bp(图5),说明成功筛选出了5个*WRKY47*基因过表达株系。

3 讨论

在试验中通过分子生物学和遗传学方法构建了*WRKY47*过表达载体并成功筛选获得了过表达材料,这一试验成果对于后期研究该基因在耐硒胁迫中的转录调控功能具有重大的意义,为进一步研究此基因的耐硒富硒机制奠定了基础。

硒的有益和有毒作用之间的浓度差异较小^[8],硒是人和

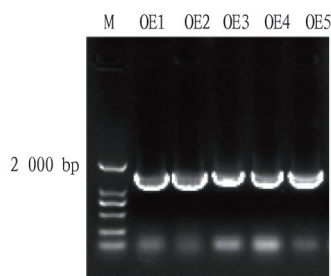


图5 转基因植株筛选鉴定

Fig.5 Screening and identification of transgenic plants

动物必需的14种微量元素之一,具有抗氧化作用、抗癌作用、预防各种疾病作用,还能抵抗人体内有毒金属元素积累。由于动物和人类不能从自然界的土壤中吸收所需要的有机态硒,但能够吸收植物中所含有的有机态硒,植物可吸收和富集有机态硒的这个能力对人们来说是很宝贵的,对植物富集硒的研究不断深入,为保证人体健康提供了保障^[9]。通过分子生物学和遗传学方法研究植物硒代谢积累相关途径已经开始,这将为寻找植物中潜在的参与硒胁迫应答的基因,提高目标植物中的硒含量奠定扎实的理论依据。这一具有生产应用价值的研究将推动富硒功能性食品、保健品等产业的发展,为人体硒营养健康做出重要贡献^[10]。

参考文献

- [1] ZHU Y G, PILONSMITS E A H, ZHAO F J, et al. Selenium in higher plants: Understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation [J]. Trends in plant science, 2009, 14(8): 436-442.
- [2] TERRY N, ZAYED A M, DE SOUZA M P, et al. Selenium in higher plants [J]. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 2000, 51: 401-432.
- [3] SURAI P F, TAYLORPICKARD J A, SURAI P F, et al. Current advances in selenium research and applications [M]. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2008: 189-195.
- [4] TOMLINS A. Assessing micronutrient status in the presence of inflammation [J]. Journal of nutrition, 2003, 133(5): 1649-1955.
- [5] 左银虎. 环境与植物中硒形态研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 378-380.
- [6] MOODY J O, ANTSAKLIS P J. Perrinet supervisors for DES with uncontrollable and unobservable transition [J]. IEEE Transactions on Automatic Control, 2000, 45(3): 461-477.
- [7] IORDACHE U V, ANTSAKLIS P J. Synthesis of supervisors enforcing general linear constraints in petri nets [J]. IEEE Transactions on Automatic Control, 2003, 48(11): 2036-2039.
- [8] GERLA P J, SHARIF M U, KOROM S F. Geochemical processes controlling the spatial distribution of selenium in soil and water, west central South Dakota, USA [J]. Environmental earth sciences, 2011, 62(7): 1551-1560.
- [9] GOODSON C C, PARKER D R, AMRHEIN C, et al. Soil selenium uptake and root system development in plant taxa differing in Se-accumulating capability [J]. New phytologist, 2003, 159(2): 391-401.
- [10] 张华华, 康玉凡. 植物吸收和转化硒的研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2013, 32(3): 270-275.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。