

# 一个耐镉基因过表达载体构建及转基因植株的筛选鉴定

严星星, 欧阳剑, 黄莹, 盛义保, 张乘, 曹树青\* (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要** [目的]进一步研究 *MNB1* 基因在植物应对镉胁迫响应中的功能, 构建拟南芥中 *MNB1* 基因过量表达载体, 通过筛选鉴定最终获得相应的转基因植株。[方法]以野生型拟南芥 cDNA 为模板, PCR 扩增 *MNB1* 基因全长, 将该基因连接到过量表达载体上; 然后将构建成功的重组载体转化至农杆菌菌株 GV3101, 浸花法转化野生型植株; 最后利用转基因筛选与遗传鉴定获得 *MNB1* 转基因阳性植株。[结果]*MNB1* 基因 CDS 全长 1 368 bp, 酶切连接后转化大肠杆菌鉴定得到阳性菌落, 测序结果经比对完全正确。通过抗性筛选及 PCR 电泳检测获得阳性转基因植株。[结论]*MNB1* 基因过表达载体构建成功并获得相应转基因植株, 为进一步研究该基因调控植物镉胁迫响应中的功能及其分子机制奠定基础。

**关键词** 拟南芥; *MNB1* 基因; 过表达; 转基因植株

中图分类号 S 188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)21-0116-03

## Construction of a Cadmium Tolerant Gene Overexpression Vector and Screening and Identification of Transgenic Plants

YAN Xing-xing, OUYANG Jian, HUANG Ying et al (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

**Abstract** [Objective] In order to further study the function of *MNB1* gene in response to cadmium stress in plants, the over-expression vector of *MNB1* gene in *Arabidopsis* was constructed, and the corresponding transgenic plants were finally obtained through screening and identification. [Method] The full-length *MNB1* coding sequence was amplified through PCR from cDNA of *Arabidopsis* (Col-0) using specific primers and cloned into the overexpression vector. Then the resulting construct was transformed into *Agrobacterium* strain GV3101 for transformation into the Col-0 plants by the floral dip method. The transgenic lines were isolated through antibiotic screening and genetic identification. [Result] The full-length CDS of *MNB1* gene was 1 368 bp, which was identified by enzyme digestion and transformed into *E. coli*. The positive clones were identified and the sequencing results were completely correct. Positive transgenic plants were obtained by resistance screening and PCR electrophoresis. [Conclusion] The construction of *MNB1* gene overexpression vector was successful and the corresponding transgenic plants were obtained, which laid the foundation for further study on the function and molecular mechanism of this gene regulating plant stress response to cadmium.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*; *MNB1* gene; Overexpression; Transgenic lines

随着人口快速增长、工业发展、工厂及生活废弃物的排放以及农业化肥、农用药物等施用量的不断增加, 许多有害有毒物质不断进入土壤中, 造成土壤重金属污染, 已经成为世界性严峻的环境问题之一<sup>[1-2]</sup>。其中重金属镉是对动植物具有高度毒性的最危险的污染物之一, 给生态环境和食品安全带来了严重的威胁。镉暴露可引起肺气肿和骨质疏松症, 导致人体肺、肾和骨骼的不可逆损伤<sup>[3]</sup>。在过量的重金属暴露下, 植物也会表现出生物量减少、叶片萎黄、抑制根系生长和形态改变, 常常导致植物过度暴露死亡<sup>[4]</sup>。所以植物对重金属例如镉的耐受性和积累能力在植物修复和粮食安全中的潜在应用激起了人们的兴趣。植物对重金属镉胁迫的响应机制主要包括降低金属生物利用度、控制金属流入、金属螯合、促进金属外排和金属诱导活性氧的解毒等途径。植物通过大量的防御机制, 包括复杂的天然免疫系统来保护自己免受各种各样病原体, 如细菌、真菌、病毒等的侵害<sup>[5]</sup>。植物可以区分自我与非我或检测特定的病原体。通过信号介导的防御反应能导致植物细胞壁的固化, 生产微生物代谢产物和病理相关蛋白等<sup>[6]</sup>。信号分子, 例如 ROS、乙烯、SA 和茉莉酸在激活防御机制的复杂信号网络中扮演着重要的角色<sup>[7]</sup>。

在前期研究的基础上, 发现 *MNB1* 功能缺失突变体表现出对重金属镉敏感的表现, 因此找到 *MNB1* 这个基因作为研

究目标。已有研究表明所有已知的植物凝集素可以分为 12 大凝集素家族<sup>[8]</sup>。植物体中的甘露糖结合凝集素, 即 MNB, 在植物体受到病原体攻击的防御信号传导中起到关键性的作用。笔者拟通过构建 *MNB1* 基因过量表达载体, 筛选并鉴定得到的转基因阳性植株, 以期为进一步研究该基因在植株应对镉胁迫响应中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料。**该试验所用的植物材料是拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚 (Columbia, Col) 生态型, 记作 WT (wild-type, Col-0), 购自美国拟南芥种子资源中心。载体构建所用质粒 pART27, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 农杆菌 GV3101。

**1.1.2 主要试剂。**Easy Taq DNA Polymerase (TransGen); T<sub>4</sub>-DNA Ligase (TaKaRa); PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa); 限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I (NEB); Agar, NaCl, Yeast extract, Tryptone, Gold View, DNA Loading buffer, Marker, dNTPs, 异丙醇, 氯仿, 无水乙醇, 75% 乙醇, 葡萄糖, 蔗糖, Silwet L-77, MES, V<sub>B5</sub> 等。

### 1.2 方法

**1.2.1 Trizol 法提取植物总 RNA。**从培养皿或处理液中用大枪头将拟南芥幼苗样品挑出, 用滤纸将水分吸干, 将样品放入预冷的研钵, 加入适量液氮, 待液氮快干时立即迅速研磨至样品粉碎。

粉碎后均匀加入 1 mL Trizol (存于 4 °C 冰箱), 尽量使粉末被完全覆盖。每次研磨完一个样品应立即置于冰上。研

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (31571250)。

**作者简介** 严星星 (1992—), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。\* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事植物抗逆基因克隆及应用研究。

**收稿日期** 2018-04-23

磨全部结束后室温静置 5 min。在超净工作台向每个样品里快速加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿,剧烈混匀 15 s,可涡旋。室温静置 3 min 后,13 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。离心结束后,取样时保持离心角度不变,缓缓吸取上清液 500  $\mu\text{L}$  至新的 EP 管中,并做好标记。此时应轻轻地加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇,并立即轻轻颠倒混匀 6~8 次。

室温静置 10 min 后,13 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min。倒掉上清,留取沉淀(尽量倒干净)。沿着管壁缓缓加入 1 mL 75%乙醇(事先配好存于-20  $^{\circ}\text{C}$ ),勿吹打沉淀,8 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min。重复洗涤 1 次,倒掉上清,用黄枪头将液体吸取干净,尽量不要触碰到沉淀。在超净台中晾干沉淀,使乙醇完全挥发,约 8 min。加入 30  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解沉淀,并置于 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅内促进溶解。吸取 5  $\mu\text{L}$  样品检测其纯度和浓度。

**1.2.2 大肠杆菌的转化。**从-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出感受态细胞,迅速放在冰上解冻融化 10 min。取 5~10  $\mu\text{L}$  连接产物加入 50  $\mu\text{L}$  感受态细胞中(在冰盒中操作,不可吹打,轻轻快速混匀),冰浴 30 min。之后 42  $^{\circ}\text{C}$  热激 90 s,快速将管取出放在冰上静置 5 min。每管加入 800  $\mu\text{L}$  无菌液体 LB 培养基。在摇床上振荡培养,设置 280 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ 、45 min。4 000 r/min、离心 5 min,弃上清。剩 300~500  $\mu\text{L}$  重悬涂布 LB 固体培养基的平板上,正置 30 min 吹干,再于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,倒置恒温培养过夜。取出培养过夜的平板,在超净工作台挑取单一菌落至 LB 液体培养基,每个 EP 管约 300  $\mu\text{L}$ ,用枪头挑菌。250 r/min、28  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至培养基浑浊,5 h 左右,进行菌落 PCR 鉴定。

**1.2.3 浸花法浸染拟南芥。**将-80  $^{\circ}\text{C}$  保存的菌种在含 50 mg/L Spec、50 mg/L Gen 的固体培养基上接种培养,并划线,挑取单菌落于 500  $\mu\text{L}$  的 LB 培养基(50 mg/L Spec, 50 mg/L Gen)中,28  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜。菌液摇匀后进行 PCR 鉴定,取阳性菌液 200  $\mu\text{L}$  转接到 100 mL LB 液体培养基(50 mg/L Spec, 50 mg/L Gen)中,摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.2~1.6,于 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,配制浸染缓冲液,重悬沉淀,再次离心,重复 1 次。加入适量缓冲液,将菌液稀释至 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.8,再按比例加入 Silwet L-77。

用消毒剪去除已授粉的花、果荚,倒置于装有渗透缓冲液的 5 mL EP 管中浸染 20 s,使植株表面浸有一层水膜即可。将整盆野生型植株浸完后,贴上标签做好标记,覆盖保鲜膜以保持湿度,放在纸盒中避光培养,24 h 后取下浸染后包上的薄膜,于室温中继续培养。

## 2 结果与分析

**2.1 目的基因的扩增** 为了验证 *MNB1* 基因在拟南芥应对镉胁迫调控中的功能,构建了 35S::*MNB1* 过量表达载体。首先进行目的片段扩增,即克隆 *MNB1* 基因。以拟南芥幼苗为材料参照植物总 RNA 提取方法,提取植物的总 RNA,提取时应尽量避免 mRNA 降解,总 RNA 中包括 mRNA、rRNA 和 tRNA,利用其中 mRNA 反转录获得植物的 cDNA。再以 cDNA 为模板扩增所需目的基因,结果见图 1。由图 1 可知,获

得的基因片段与预期大小一致,所需目的片段大小为 1 368 bp。

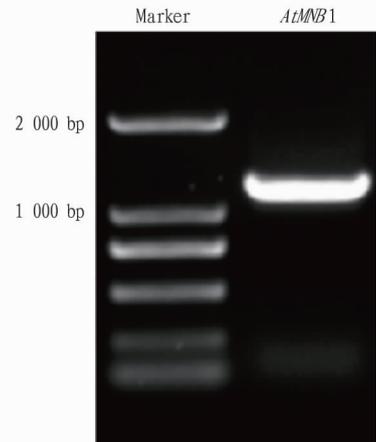


图 1 *MNB1* 基因克隆电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of *MNB1* gene cloning

**2.2 过表达载体的连接与转化** 为构建 *MNB1* 的 35S 过表达载体,通过 2 种限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分别酶切目的片段和 pART27 质粒载体,该试验所用的 pART27 为改造过的质粒,质粒上加入 *Kpn* I 及 *Xho* I 酶切位点。酶切后进行电泳检测,酶切后基因和载体条带清晰、大小正确,方可用于下一步试验。将酶切过的基因和载体用  $T_4$  连接酶进行连接,并用热激法导入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,培养过夜后如图 2 所示。由图 2 可知,初步通过抗性筛选获得了重组质粒单菌落,有待下一步鉴定。

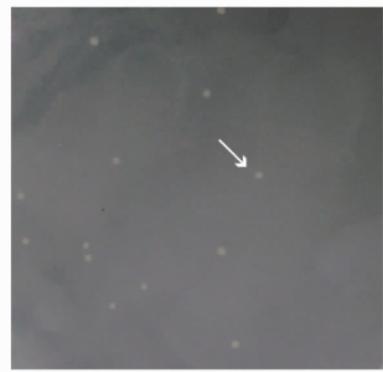


图 2 转化大肠杆菌单菌落

Fig. 2 The single colony of *E. coli*

**2.3 阳性重组质粒的 PCR 鉴定** 为检验克隆的 *MNB1* 基因序列信息是否正确和 *MNB1* 是否连接到重组质粒上,用含相应抗生素(该试验中使用壮观霉素)的 LB 平板筛选阳性单克隆,菌落生长情况如图 2 所示。再进行菌落 PCR,任意挑取 7 个单菌落,在装有 800  $\mu\text{L}$  LB(含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  壮观霉素)的 1.5 mL 离心管中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 h 左右。取 1~2  $\mu\text{L}$  上清液作模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行电泳检测,结果见图 3。除了 5 号菌落,其他 6 个单菌落都是阳性重组质粒。将图 3 中 1 号菌液送到测序公司测序。测序结果通过 NCBI blast 比对后显示,克隆到的 *MNB1* 基因序列完全正确,说明过表达载体构建成功。

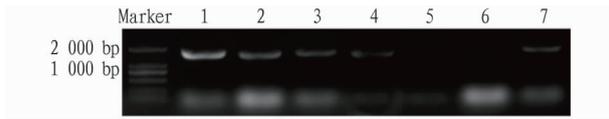


图3 大肠杆菌阳性菌落 PCR 鉴定结果

Fig. 3 Identification of positive colonies by PCR

**2.4 转基因株系的抗性筛选与鉴定** 将测序正确的质粒电击转化到 GV3101 农杆菌菌株,用含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  壮观霉素和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素的 LB 固体培养基,筛选鉴定阳性克隆,挑取单菌落进行菌落 PCR 验证,用转化成功的农杆菌通过浸花法浸染野生型植株,收种。将收获的种子干燥春化后撒到含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 1/2 MS 平板上正常培养 14 d,生长出正常的真叶与根,挑取生长嫩绿且有根的幼苗进行移栽,抗性筛选结果如图 4 所示。

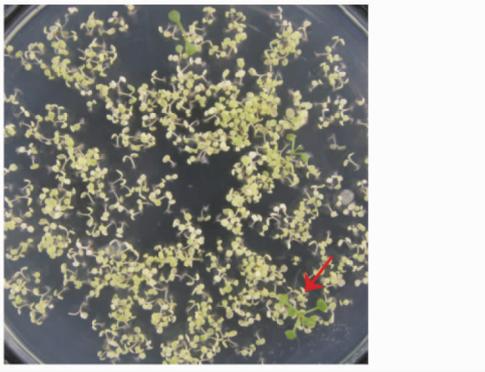


图4 转基因植株的抗性筛选

Fig. 4 Antibiotic resistance screening of transgenic plants expressing

移栽的植株培养到 21 d 左右时,剪取 *MNB1* 转基因植株叶片,提取基因组 DNA。PCR 鉴定 *MNB1* 转基因阳性株系,PCR 鉴定电泳结果如图 5。由图 5 可知,抗性筛选得到的植株都是转基因阳性植株,都成功地过量表达了 *MNB1* 基因,这表明过表达载体构建以及转基因株系的筛选与鉴定都得到了成功。

### 3 结论与讨论

重金属通过在食物链和饮用水中积累,对人体健康和环

(上接第 80 页)

者钢管搭架,布设遮阳网遮阴降温,遮阳网距栽培畦面高度不低于 2.5 m。有条件的地方还可以在畦面的正中间架设喷水水带,以便喷水保湿。畦面两侧用木桩固定挡板,防治沙土垮塌、水分散失。畦边及四周开好排水沟,防涝排湿。

### 3 结论

汉中市是全国天麻的适生区和主产区,目前生产上出现的主要问题是麻种退化和两菌(蜜环菌、明发菌)退化严重、缺乏更新换代的优良天麻共生萌发菌和蜜环菌,栽培方式抗风险能力差。笔者通过设施大棚栽培,改良栽培方式、提纯复壮天麻两菌、改进天麻有性繁殖播种技术等措施,同时采用先进的集约化设施栽培管理技术有效减少空窝,规避风险,并成功地将天麻的适生区由海拔 800~1 200 m 降低到

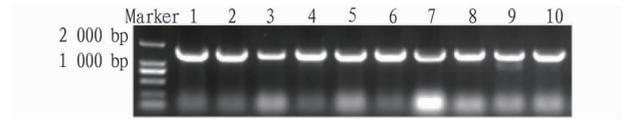


图5 阳性株系的 PCR 鉴定结果

Fig. 5 The identification of positive strains by PCR

境造成潜在威胁<sup>[9-10]</sup>。利用现代分子生物学手段,植物修复技术治理土壤中重金属污染,以及从源头上控制农产品食品安全具有重大意义。该试验自拟南芥种质资源中心获得了拟南芥 *MNB1* 基因功能缺失型突变体,在前期试验基础上发现该突变体对镉胁迫表现敏感。于是通过基因工程技术构建了 *MNB1* 过量表达载体,并通过浸花法转入野生型植株中,筛选得到转基因植株,并进一步进行筛选与鉴定,最终获得了 *MNB1* 过表达转基因阳性植株。这为对 *MNB1* 基因调控植物镉耐受的机理做进一步深入研究奠定了基础,是一项十分有意义的研究性课题。

### 参考文献

- [1] CLEMENS S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis[J]. *Planta*, 2001, 212(4): 475-486.
- [2] HALL J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance[J]. *Journal of experimental botany*, 2002, 53(366): 1-11.
- [3] STRAIF K, BENBRAHIM-TALLAA L, BAAN R, et al. A review of human carcinogens-Part C: Metals, arsenic, dusts, and fibres[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 453-454.
- [4] YADAV S K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants[J]. *South Afr J Bot*, 2010, 76(2): 167-179.
- [5] CHISHOLM S T, COAKER G, DAY B, et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-814.
- [6] DANGL J L, JONES J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection[J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 826-833.
- [7] HAMMOND-KOSACK K E, PARKER J E. Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(2): 177-193.
- [8] VAN DAMME E J M, LANNON N, PEUMANS W J. Plant lectins[J]. *Adv Bot Res*, 2008, 48: 107-209.
- [9] NAWROT T, PLUSQUIN M, HOGERVORST J, et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: A prospective population-based study[J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(2): 119-126.
- [10] ZHAO F J, MA J F, MEHARG A A, et al. Arsenic uptake and metabolism in plants[J]. *New Phytol*, 2009, 181(4): 777-794.

500 m 的校园,突破了平川低海拔地区不能栽培天麻的惯例,并取得了较好的产量,实现了天麻人工栽培稳产高效,扩大天麻适生区域,提供了经济效益,从而使天麻产业成为山区群众脱贫致富的朝阳产业。

### 参考文献

- [1] 宋丽艳. 药用植物栽培技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [2] 张胜友. 中国天麻栽培技术大全[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2010.
- [3] 姚宗凡. 常用中药种植技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1992.
- [4] 冯云利, 程立君, 陈玉惠, 等. 云南昭通天麻共生蜜环菌优良菌株筛选[J]. *西南林学院学报*, 2009, 29(2): 37-39.
- [5] 徐锦堂. 中国天麻栽培学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- [6] 周昌华, 韦会平. 天麻栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2009.
- [7] 程建国. 中草药用植物[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2009.
- [8] 张汉杰. 长白山天麻杂交种及栽培技术[J]. *吉林林业科技*, 2002, 41(4): 49, 56.