

# 菜豆重金属响应基因 *PvSR2* 在烟草中的表达及镉抗性分析\*

柴团耀<sup>①\*\*</sup> 陈琼<sup>①</sup> 张玉秀<sup>②</sup> 董娟<sup>①</sup> 安成才<sup>③</sup>

(①中国科学院研究生院生物系, 北京 100039; ②中国矿业大学化学与环境工程学院, 北京 100083;

③北京大学生命科学院蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

**摘要** 重金属特异诱导基因 *PvSR2*(*Phaseolus vulgaris* stress-related)是从法国菜豆中克隆出来的, 为了研究该蛋白能否提高植物的抗重金属能力, 将 *PvSR2* 基因插入到植物转化中间载体 pCAMBIA2301 中 CaMV 35S 启动子的下游, 用根癌农杆菌介导的叶盘法将其导入烟草中, 在含有 100 mg/L Kan 的 MS 培养基上筛选, 获得了转基因植株。PCR 和 Southern 杂交结果表明 *PvSR2* 已整合在烟草基因组中, GUS 和 Northern 分析表明 *PvSR2* 在转基因烟草中获得表达。重金属抗性实验表明: 与野生型烟草相比, *PvSR2* 转基因烟草具有较高的抗重金属镉(Cd)的能力。组织 Cd 含量分析显示: 在低浓度 Cd(0.5~0.75 mmol/L)处理时, Cd 在 *PvSR2* 转基因烟草与野生型烟草根中的累积量没有明显的差别, 而在高浓度 Cd(0.1 mmol/L)胁迫下, 转基因烟草根中 Cd 的累积量低于野生型烟草, 说明 *PvSR2* 的表达能够提高植物的抗重金属能力, 同时表明 *PvSR2* 可能与重金属在植物中的运输和积累有一定关系。

**关键词** *PvSR2* 基因 镉抗性 烟草

Cd, Hg, Pb 和 Se 等重金属污染日益成为世界范围内的环境问题。重金属及一些非金属离子对动植物的毒性, 主要是由于其对金属敏感酶结构的破坏, 从而导致生物生长受到抑制, 甚至死亡<sup>[1]</sup>。土壤的重金属污染, 不管是自然因素, 还是人类生产活动所致, 都会对植物造成显著的影响, 导致产生金属富集植物和耐重金属植物。目前已提出许多耐受机制, 包括植物金属螯合肽(phytochelatin, PC)的螯合机制、区域化过程, 以及其他基于细胞壁固定、细胞膜外排、胁迫蛋白、胁迫乙烯、过氧化物酶和金属硫蛋白(metallothionein, MT)的防御机制等<sup>[1,2]</sup>。

植物中的 PC 和重金属转运蛋白在重金属积累、运输和解毒过程中起重要作用<sup>[1,3]</sup>。一些金属抗性相关基因在细菌、酵母和植物中过量表达可以提高转化株的金属抗性<sup>[4~6]</sup>。*PvSR2*(*Phaseolus vulgaris* stressed-related) 基因是通过差别筛选法从 HgCl<sub>2</sub> 胁迫下的菜豆 cDNA 文库中分离出来的, 并能在重金属胁迫条件下特异表达, 其预测氨基酸序列与 GenBank 中注册的金属转运蛋白、PC 以及 MT 等没有同源性, 是一种新的重金属胁迫特异响应蛋白, *PvSR2* 转化细菌进一步显示出明显的 CdCl<sub>2</sub> 抗性<sup>[7]</sup>。为了评价 *PvSR2* 在植物抗重金属过程中的作用,

2003-01-29 收稿

\* 科学技术部转基因植物研究与产业化开发专项课题(批准号: J00-A-008-03)、国家自然科学基金(批准号: 39970070)、中国科学院创新青年科学家小组和中国科学院院长特别支持基金资助项目

\*\* E-mail: tychai@gscas.ac.cn

采用农杆菌转化方法将 *PvSR2* 基因转入烟草中，并使之过量表达，分析转 *PvSR2* 基因烟草对 Cd 的抗性。本文报道 *PvSR2* 在转基因烟草中的表达及其在提高植物 Cd 抗性中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒构建

对 pFF19 质粒进行 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切，得到包含 CaMV 35S 启动子、35S 增强子、多克隆位点和 35S polyA 的 DNA 片段，将其插入到用同种酶切的植物表达载体 pCAMBIA2301 中(苑华毅博士提供)。对 pKS-PvSR2 载体进行 *Kpn* III 和 *Pst* I 双酶切，得到含有 5' 不翻译区、全部阅读框及 3' 不翻译区的 *PvSR2* cDNA 片段，长约 750 bp，然后连接到用同种酶切的 pCAMBIA2301 载体中的 35S 启动子和 35S polyA 之间的多克隆位点上，得到一个重组质粒 pCPN-PvSR2。pCAMBIA2301 载体中含有对转基因植株进行筛选鉴别的 NPT II 基因和 GUS(β-葡萄糖苷酸酶)报告基因(图 1)。通过热激法，把 pCPN-PvSR2 载体转化到农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 菌株中，然后，转化菌在含有 30 μg/mL 利福平和 50 μg/mL 卡那霉素的培养基上筛选，并且利用 *PvSR2* cDNA 探针进行斑点杂交鉴定。

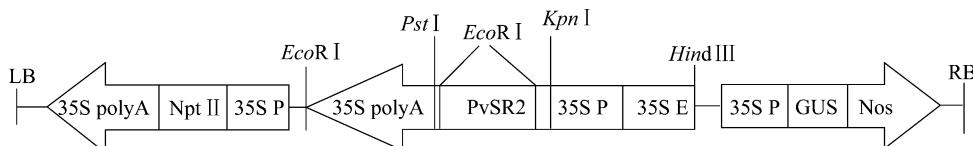


图 1 农杆菌中 pCPN-PvSR2 二元载体的 T-DNA 区域

*PvSR2* 基因由 CaMV35S 启动子和 35S polyA 调控

### 1.2 烟草转化

叶盘法转化烟草<sup>[8]</sup>。将含有 pCPN-PvSR2 载体的农杆菌 LBA4404 与红花大金元烟草 (*Nicotiana tabacum* c.v.) 叶圆片进行共培养，然后在含有卡那霉素培养基上进行筛选和植物再生，筛选培养基是含有 0.5 mg/L IAA, 2 mg/L BA(benzyladenin), 500 mg/L 琼脂培养基和 100 mg/L 卡那霉素等的 MS 琼脂培养基。在 28℃, 16 h/8 h 的光暗周期下培养 2~3 个月后，将转基因小苗转移到含有 100 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上，使其生根。最后，将再生的烟草苗移到温室中继续培养。

### 1.3 Southern blot 杂交分析

CTAB 法提取烟草叶片的总 DNA。根据 Sambrook 等人<sup>[9]</sup>描述的方法进行 Southern blot 杂交。将 20 μg 总 DNA 用 *Eco* R I 和 *Pst* I 或 *Hind* III 消化，经电泳分离转移到尼龙膜上，根据 Bio-Rad 公司标准方法进行杂交和检测。以 *PvSR2* cDNA 作模板，用 DNA 标记试剂盒(Prime-a-Gene Labeling System, Promega Corporate)进行 <sup>32</sup>P 随机引物标记探针。

### 1.4 Northern blot 杂交分析

利用异硫氰酸胍法从 10 d 大的小苗中抽提总 RNA<sup>[9]</sup>。将 20 μg RNA 经电泳转移到尼龙膜上，根据 Bio-Rad 公司介绍的方法进行杂交和检测。

### 1.5 GUS 活性的组织化学染色

根据 Jefferson 等人<sup>[10]</sup>描述的方法进行 GUS 染色。将转基因烟草和野生型烟草的叶片或小苗浸泡在 Glux 缓冲液(X-Gluc 0.5 mg/L PBS)中进行染色，37℃ 培养箱染色过夜，然后用 70%

(v/v)乙醇脱色.

## 1.6 重金属抗性分析

**1.6.1 幼苗根长分析** 转基因植株 CPN2 和野生型植株 WT 的 T1 种子用 95% 酒精消毒 30 s, 然后在 1% 次氯酸钾溶液中浸泡 30 min, 接着用无菌去离子水清洗 10 min, 重复清洗 5 次. 大约 50 粒种子种在含有 100 mg/mL 卡那霉素和不同 CdCl<sub>2</sub> 浓度(0, 0.15、0.20 和 0.25 mmol/L) 的 MS 培养基的培养皿中. 在 25℃、持续光照下培养 10 d 后收获小苗, 用去离子水冲洗, 去掉黏着的培养基, 测量每株小苗的根长.

**1.6.2 幼苗生长实验** 将生长 15 d 的 CPN2 和 WT 幼苗转移到含有不同 CdCl<sub>2</sub> 浓度(0.05, 0.075 和 0.10 mmol/L) 的 MS 培养基上, 在 25℃、16 h 长光照周期的条件下培养 20 d 后, 收集植株, 用去离子水清洗, 除去附着于根部的微量元素, 对 CdCl<sub>2</sub> 处理前后的幼苗整株分别称鲜重. 烟草叶片和根组织分别在 70℃ 下干燥 3 d, 干组织用于植株内 Cd 浓度分析实验.

## 1.7 植株内 Cd 浓度分析

根据 Zarcinas 等人<sup>[11]</sup>的方法, 对干燥研磨后的幼苗组织样品进行酸消化, 用 AAS 法测量样品中的 Cd 浓度. 标准样和空白样用于质量控制, 未经 Cd 处理的烟草植株作为阴性对照.

## 2 结果

### 2.1 *PvSR2* 转基因植株的鉴定

用 GUS 染色方法最初筛选出 5 个卡那霉素抗性烟草株系, 分别命名为 CPN1, CPN2, CPN3, CPN4 和 CPN5. 根据 *PvSR2* 编码区序列设计一对特异引物(正义引物为 5'-GTCCAGGAATTC-CATGCGTTGCGCCATCCTCTA-3', 反义引物为 5'-GATATCCTGCAGGTCGACGATCAATTCCACTG-3'), 分别以转基因烟草和野生型烟草叶片基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增. PCR 结果显示 5 个株系的转基因烟草 CPN1~5 均含有预期的 520 bp 的 *PvSR2* cDNA 扩增片段, 而在未转化野生型植株中没有观察到(图 2), 表明具有卡那霉素抗性的 5 个转基因烟草株系的基因组中均整合有 *PvSR2* 基因. 这些转基因植株在温室内生长正常, 表型与野生型植株相比没有差异.

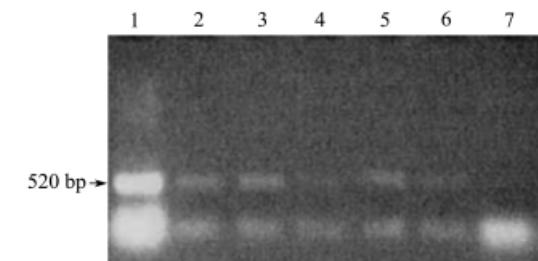


图 2 PCR 产物的电泳结果

1 示阳性对照 pKS-PvSR2; 2~6 示 CPN1~CPN5; 7 示阴性对照的 WT; 箭头示 *PvSR2* 的片段

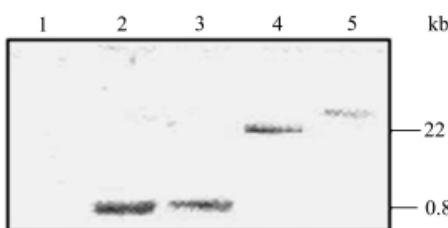


图 3 *PvSR2* 转基因烟草的 Southern blot 分析

1~3 示 WT 和 CPN2, CPN5 转基因烟草基因组 DNA 用 EcoR I 和 Pst I 双酶切; 4 和 5 示 CPN2 和 CPN5 转基因烟草基因组 DNA 用 Hind III 酶切

为了确证 *PvSR2* 基因是否完整地整合在转基因烟草基因组中, 对转基因植株和 WT 进行了 Southern blot 分析. CPN2, CPN5 转基因植株和 WT 的基因组总 DNA 用 *Hind* III, 或 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行消化后, 与 *PvSR2* cDNA 探针进行杂交. Southern blot 分析显示 CPN2, CPN5 植株均含有一条单一的杂交条带, 而 WT 没有(图 3). 另外, 该结果显示 CPN2 和 CPN5 基因组 DNA 用 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行酶切后得到一条约 0.8 kb 的杂交条带, 其大小与 *PvSR2* cDNA 片段一致(750 bp), 原因是 *PvSR2*

cDNA 片段的两端都有一个 *EcoR I* 的酶切位点(图 1), 所以无论 *EcoR I* 单酶切, 或 *EcoR I* 和 *Pst I* 双酶切都能得到 750 bp *PvSR2* cDNA 片段, 表明 *PvSR2* 基因完整地整合在烟草基因组中。当用 *HindIII* 分别消化 CPN2 和 CPN5 的基因组 DNA 时, 出现另一长度不同的单一片段, 表明 *PvSR2* 基因可能整合在烟草染色体的不同位点中。

## 2.2 *PvSR2* 在转基因幼苗中的表达

CPN2 和 CPN5 转基因植株以及 WT 幼苗 GUS 组织化学染色分析表明: 转基因植株 CPN2 和 CPN5 均显示出强 GUS 活性, 而 WT 无 GUS 活性(图 4)。此外, CPN5 的 GUS 活性强于 CPN2, 表明 *PvSR2* 在 CPN2 和 CPN5 中的表达水平不同。

Northern blot 分析结果(图 5)表明: CPN2 和 CPN5 两个转基因植株中均能检测出 *PvSR2* mRNA, 而 WT 中没有, 表明 *PvSR2* 基因在转基因烟草幼苗中已转录表达。

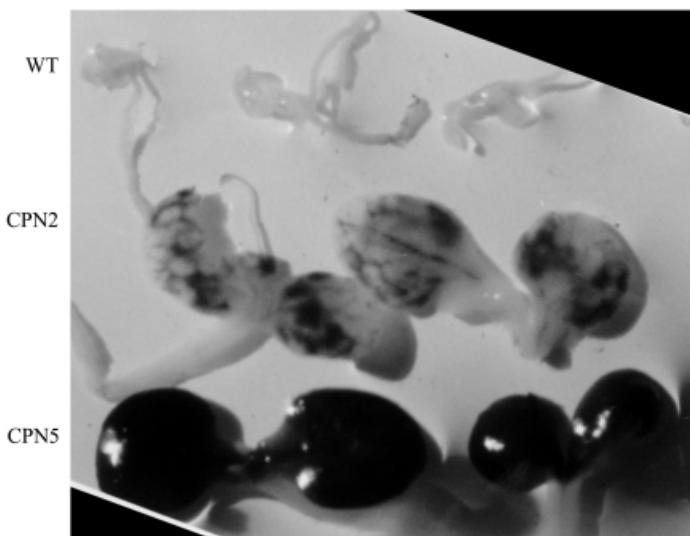


图 4 转基因烟草和 WT 烟草的 GUS 活性分析

## 2.3 *PvSR2* 转基因烟草的 Cd 抗性

对转基因烟草和 WT 幼苗进行 Cd 胁迫处理, 分析其对 Cd 抗性。根长被认为是植物重金属抗性评价中的一个有效参数<sup>[12]</sup>, 所以将转基因烟草和 WT 种子在 Cd 胁迫条件下进行萌发

培养 10 d 后, 测量分析其根长。结果显示(图 6), CPN2 和 WT 幼苗在不含 CdCl<sub>2</sub> 的 MS 培养基中生长良好, 二者根长没有明显差异, 随着 Cd 浓度的依次升高 (0.15, 0.20 或 0.25 mmol/L), 幼苗根延伸速度降低, 但是在同一浓度的 CdCl<sub>2</sub> 处理下, CPN2 的根长显著大于 WT, 尤其是在 Cd 浓度为 0.25 mmol/L 时, CPN2 的根长比 WT 长 1.5 倍。表明 CPN2 转基因烟草幼苗与 WT 相比其对 Cd 的抗性明显提高。

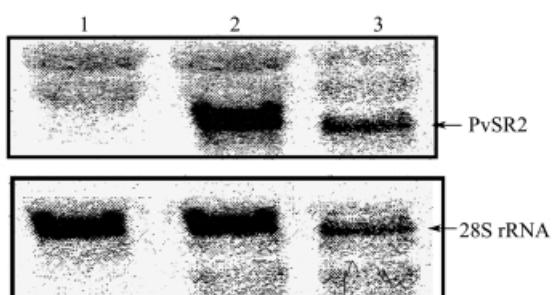


图 5 *PvSR2* 基因在转基因烟草植株中的表达  
1 示 WT; 2 示 CPN2; 3 示 CPN5; 每一泳道总 RNA 为 10 μg, 下面是 28S rRNA

CPN2 和 WT 烟草幼苗分别在含有 0.05, 0.075 或 0.10 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 的 MS 培养基上生长 20 d 后, 生长均受到明显抑制(图 7 和 8), 但是 CPN2 植株的生物量显著高于同种浓度 CdCl<sub>2</sub> 胁迫下的 WT。表明转基因 CPN2 幼苗 Cd 的抗性提高是由于 *PvSR2* 基因的表达所致。在高浓度的 CdCl<sub>2</sub>(0.1 mmol/L)胁迫下, 尽管 CPN2 植株高度仍然明显高于 WT(图 8), 叶片比 WT 大, 颜色比 WT 绿, 但该浓度下的 Cd 已经导致叶片失绿, 生长发育严重减缓。

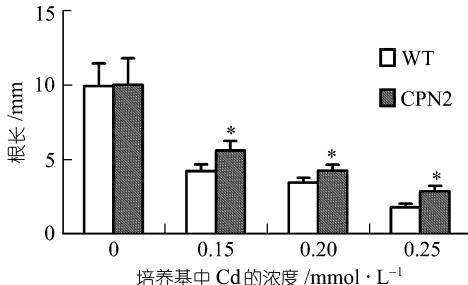


图 6 Cd 对烟草幼苗根长生长的影响

烟草种子分别播种在含有 0, 0.15, 0.20 和 0.25 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 的 MS 培养基上萌发 10 d。数据所示 50 株烟草幼苗根长的平均值 ± SE。\* 示与 WT 相比有显著差异( $P < 0.05$ )

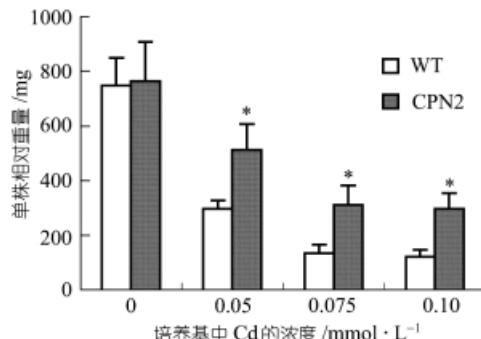


图 7 Cd 对转基因烟草植株生长的影响

15 d 苗龄的烟草幼苗转移在含有 CdCl<sub>2</sub> (0.05, 0.075 或 0.10 mmol/L) 的 MS 培养基上生长 21 d。所示数据为 10 株重量的平均值 ± SE。相对生长量为收获时植株鲜重减去处理前的植株鲜重。\* 示与 WT 植株差异显著( $P < 0.05$ )

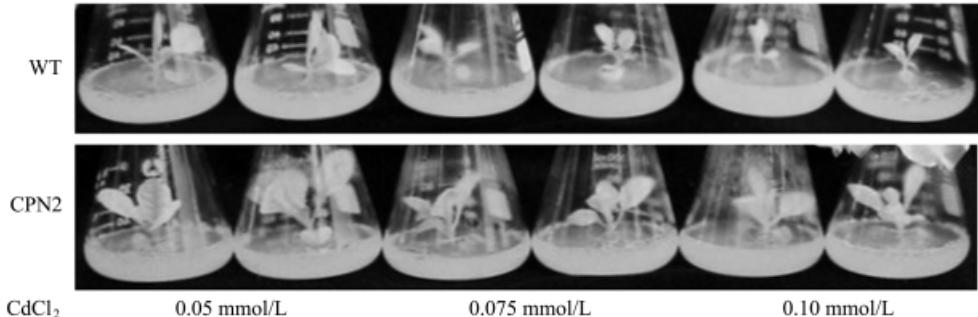


图 8 转基因烟草 CPN2 的 Cd 抗性分析

CPN2 和 WT 烟草植株用 0.05, 0.075 或 0.10 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 分别胁迫处理 21 d

## 2.4 Cd 在转基因烟草幼苗中的累积

在 0.05, 0.075 或 0.10 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 胁迫下, 烟草幼苗的根和叶中均积聚了大量的 Cd (图 9)。在 Cd 浓度从 0.05 增加到 0.1 mmol/L 时, WT 植株根和叶中的 Cd 含量急剧增加, 而 CPN2 植株却显示了不同的 Cd 累积方式, 其 Cd 含量呈缓慢增长趋势。在 0.05 或 0.075 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 处理下, CPN2 植株和 WT 相比, 根中的 Cd 含量差异不大, 但是当 CdCl<sub>2</sub> 浓度提高到 0.1 mmol/L 时, CPN2 植株根中的 Cd 含量明显低于 WT (图 9(a))。叶片中 Cd 的累积与根相似, CPN2 和 WT 植株中的 Cd 含量在 0.075 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 处理时没有差异, 但是当 CdCl<sub>2</sub> 浓度增加到 0.1 mmol/L 时, CPN2 中的 Cd 含量略低于 WT (图 9(b))。这些结果表明, *PvSR2* 在高浓度的 CdCl<sub>2</sub> (0.1 mmol/L) 胁迫下对于降低根部 Cd 的累积过程起重要作用, 而在低浓度 CdCl<sub>2</sub>(0.05~0.75 mmol/L)下作用不明显。

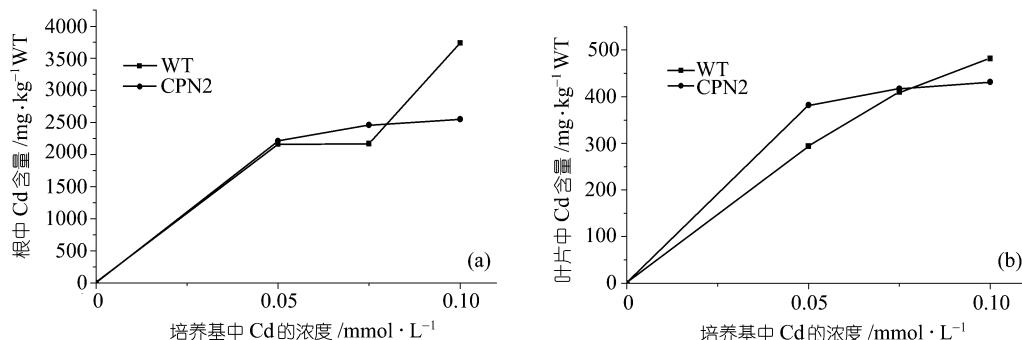


图 9 Cd 在根部((a))和叶片((b))中的累积

CPN2 和 WT 烟草植株在不同浓度的 Cd 胁迫处理 21 d. 数据显示 10 株烟草植株 Cd 含量的平均值

### 3 讨论

利用农杆菌转化方法将 CaMV 35S 启动子控制的 *PvSR2* 基因导入烟草中, PCR 和 Southern blot 分析表明 *PvSR2* 基因完整地整合到烟草的基因组中, GUS 染色和 Northern blot 分析表明 *PvSR2* 基因在转基因幼苗中已获得表达。*PvSR2* 基因( $P_{RL}$  启动子控制)在细菌 DH5α 中的表达能明显提高转化菌的 Cd 抗性<sup>[7]</sup>。转基因烟草 Cd 抗性分析表明 *PvSR2* 提高了烟草幼苗的 Cd 抗性, 因为在 Cd 胁迫条件下转基因烟草 CPN2 植株的根长和生物量都比 WT 大, 表明 *PvSR2* 基因过量表达可能有助于植物和细菌的重金属抗性及体内的解毒作用。PC 和 MT 等金属螯合物能与重金属螯合形成复合物, 从而使金属离子失活, 降低毒性, 这是植物抵抗重金属毒害的主要防御机制之一<sup>[1]</sup>。另外, 涉及在金属吸收、转运和积累过程的金属转运蛋白也能提高植物的重金属抗性<sup>[3]</sup>。在高浓度 Zn 暴露条件下, 拟南芥中 Zn 转运蛋白的表达可以增强 Zn 的抗性, 并大大提高植物根中的 Zn 含量<sup>[6]</sup>。*PvSR2* 与已注册的重金属相关蛋白没有明显的序列相似性, 是一种新的重金属诱导蛋白<sup>[7]</sup>, 因此, *PvSR2* 可能不具有螯合重金属离子的作用。进一步研究结果显示, 在 0.05 和 0.75 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 胁迫条件下, *PvSR2* 转基因烟草 CPN2 和 WT 根中积累的 Cd 含量差异不大, 表明在低 Cd 胁迫下 *PvSR2* 并不直接参与金属的摄入和运输, 但是, 在高 Cd (0.1 mmol/L) 浓度下, CPN2 根中 Cd 含量明显低于 WT 植株, 表明 *PvSR2* 能够降低 Cd<sup>2+</sup> 的摄入和转运过程。拒绝吸收重金属离子是植物抗重金属重要途径之一, 借此可以降低细胞内重金属离子的浓度, 防止其毒害作用<sup>[1]</sup>。在 0.1 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 条件下, *PvSR2* 的表达能够降低烟草根中 Cd 的含量, 提高烟草的抗 Cd 性, 表明 *PvSR2* 可能与金属转运蛋白相互作用, 参与金属离子的摄入和积累过程。

### 参 考 文 献

- Zhang Y X, Chai T Y, Burlard G. Heavy metal tolerance mechanisms in plants. *Acta Bot Sin*, 1999, 41(5): 453~457
- Mejáre M, Bülow L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotech*, 2001, 19(2): 67~73
- Guerinot M G. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica Biophysica Acta*, 2000, 1456(1-2): 190~198
- Odawara F, Kauraski M, Suzuki-Kurasaki M, et al. Expression of human metallothionein-2 in *Escherichia coli*: Cadmium tolerance of transformed cells. *J Biochem (Tokyo)*, 1995, 118(6): 1131~1137

- 5 Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet*, 1997, 17(3): 292~297
- 6 Van der Zaal B, Neuteboom L W, Pinas J E, et al. Overexpression of novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 1047~1055
- 7 Zhang Y X, Chai T Y, Zhao W M, et al. Cloning and expression analysis of the heavy-metal responsive gene *PvSR2* from bean. *Plant Science*, 2001, 161(4), 783~790
- 8 Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227(7): 1229~1231
- 9 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 10 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M. Gus-fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901~3907
- 11 Zarcinas B A, Cartwright B, Spouncer L R. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1987, 18(3): 131~146
- 12 Murphy A, Taiz L. A new vertical mesh transfer technique for metal-tolerance studies in *Arabidopsis*: ecotypic variation and copper-sensitive mutant. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 29~38