

羽衣甘蓝胁迫应答基因 *BoRS1* 转化烟草的初步研究

The Study of Transformation of Tobacco with the Stress Responsible Gene *BoRS1* from *Brassica oleracea* var. *acephala*

唐东芹^{1,2}, 钱虹妹², 赵凌侠², 唐克轩^{2*}, 黄丹枫^{1*}

TANG Dong-Qin^{1,2}, QIAN Hong-Mei², ZHAO Ling-Xia², TANG Ke-Xuan^{2*} and HUANG Dan-Feng^{1*}

1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101

2. 上海交通大学复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200030

1. School of Agricultural and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 20110, China

2. FUDAN-SJTU-NOTTINGHAM Plant Biotechnology R&D Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

摘要 将克隆于羽衣甘蓝的胁迫应答基因 *BoRS1* 连入中间载体 p35S-2300::gus::noster 相应位点, 成功地构建了含 *BoRS1* 基因的植物双元表达载体 p35S-2300::BoRS1::noster, 并通过农杆菌介导法对烟草进行了遗传转化。PCR 检测结果表明目的基因 *BoRS1* 已成功导入并整合到烟草基因组中。RT-PCR 分析显示, 在不同的转基因烟草植株中 *BoRS1* 表达量存在差异。转 *BoRS1* 烟草的耐干性和甘露醇胁迫研究表明, *BoRS1* 基因的表达对提高植物抗干旱胁迫能力有一定的作用。

关键词 *BoRS1* 基因, 烟草, 干旱胁迫

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0489-04

Abstract Transgenic tobacco plants expressing a stress responsive gene *BoRS1*, isolated from *Brassica oleracea* var. *acephala*, under the control of the 35S promoter of the Cauliflower mosaic virus were produced. Some plants were further used to test the effect of high level *BoRS1* expression on drought stress resistance. The presence of transgene in putative transgenic plants was confirmed by PCR analysis. Thirty-six among 130 transformants showed amplification of predicted fragment of *BoRS1* while no amplification was observed in the control. Some transgenic lines confirmed by PCR analysis were analyzed through semi-quantitative one-step RT-PCR for the expression of *BoRS1* gene. Amplification of 1.4 kb cDNA product revealed transcription of *BoRS1* gene. Meanwhile, differential intensity of the cDNA band indicated variable expression levels of the transgene among different transformed lines. The water loss of detached leaves from the transgenic plants was slower than that of the control. Transgenic tobaccos and the non-transgenic controls were used for further drought stress experiments by using different concentration of mannitol. The transformants showed higher tolerance to drought stress than non-transgenic plants and different transgenic lines exhibited different tolerance during drought stress. These results showed that the *BoRS1* gene probably play role in enhancing the ability to drought stress.

Key words *BoRS1* gene, tobacco, drought stress

Received: December 27, 2004; Accepted: February 25, 2005.

* Corresponding author. TANG Ke-Xuan Tel: 86-21-62932002; E-mail: kxtang@sjtu.edu.cn.

HUANG Dan-Feng Tel: 86-21-64787808; E-mail: hdf@sjtu.edu.cn

环境逆境严重地影响着作物的产量和品质,特别是水资源短缺和土壤盐渍化严重地制约着农业生产和发展,已引起了人们的极大关注并上升为全球性问题。因而了解植物抗逆的分子机制,进而提高植物的抗逆能力已经成为现代植物育种工作急需解决的关键问题之一,而植物抗旱、耐盐相关基因的挖掘已成为目前植物遗传资源与品种改良研究的热点^[1-6]。

植物在胁迫环境下能诱导一系列基因表达,从而提高抗逆能力^[7],越来越多的与植物逆境胁迫过程相关的基因被克隆^[8,9]。同时,日趋成熟的基因转化技术使得改良植物的抗逆性逐渐变为现实,通过遗传转化研究抗逆基因的性质与功能取得了一定成绩^[10,11]。但是,由于对逆境相关基因的功能了解并不全面,在众多基因中具有显著生物学作用的并不多。因此,对这些基因重要性还认识不足,分离这些基因、鉴定其功能、明确其在植物抗逆性方面的角色,一直是研究植物抗逆性的一个工作重点。而且由于环境胁迫对植物作用的复杂性使得植物抗逆基因工程的系统性要求更加强烈,全面系统地阐述植物在逆境中的信号传导分子机制及其基因表达的途径,继续从自然界中丰富的植物基因资源中挖掘新的高效抗逆基因并对之进行系统研究依然任重而道远。

前期研究表明,在 mRNA 水平上羽衣甘蓝胁迫应答 *BoRS1* 基因能为盐、渗透剂、冷等多种胁迫条件所诱导;推导的 *BoRS1* 多肽具有很高的亲水性(含亲水性氨基酸高达 79%)且含 62% 的无规线圈。同时,其最主要的二级结构形式是无规线圈和 α -螺旋^[12]。研究表明,在脱水过程中,无规线圈可以方便地调节自身的形状,夹在细胞组分之间,提供一层稳定的粘质层,减少因脱水而形成的晶体间的相互伤害^[13]。*BoRS1* 多肽的这种结构有利于与水分子结合,使得植物在受到逆境胁迫时,*BoRS1* 基因产物能够较大幅度地结合水分而使细胞免受逆境造成的水分亏缺影响,这与 LEA 蛋白及 RD29 蛋白有着一定的相似性^[14,15]。根据基因序列分析及其表达模式的研究,初步认为 *BoRS1* 蛋白有可能在水分胁迫中发挥一定的作用。为了进一步了解该基因具体的生物学作用,本文通过农杆菌介导的叶盘转化法将 *BoRS1* 基因转入到烟草中,在 CaMV35S 启动子驱动下使该基因在转基因烟草中得到超量表达。对获得的转基因阳性烟草植株进行了干旱胁迫试验,结果初步证实该基因对提高植物的抗干旱胁迫能力有一定作用,为今后应用于植物抗逆基因工程提供了科学证据。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105, 植物表达中间载体 p35S-2300 :: *gus* :: *noster* (赵凌侠博士惠赠) 由复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心实验室保存。

1.1.2 植物材料及培养基: 烟草 (品种为“百日红”) 由复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心实验室保存。

农杆菌培养基为 LB + 利福平 (40mg/L) + 链霉素 (25mg/L) + 卡那霉素 (75mg/L)。

植物培养基采用固体形式,每升培养基中加植物凝胶 2.6g/L、蔗糖 30g/L、MS 粉 (Sigma) 4.41g/L, pH 值调至 5.8。共培养基 MS₁ 附加 NAA 0.1mg/L 和 6-BA 0.5mg/L, 分化培养基 MS₂ 附加 NAA 0.1mg/L、6-BA 0.5mg/L、Cef 250mg/L 和 Kan 50mg/L, 生根培养基 MS₃ 附加 NAA 0.1mg/L、Cef 250mg/L 和 Kan 25mg/L。

1.1.3 酶、试剂与试剂盒: T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准 DL-2000 和 T-easy-vector 购自 TaKaRa 公司。Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司。胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。常规试剂购自上海化学试剂有限公司。细菌培养基、植物 DNA 抽提缓冲液以及各种抗生素贮存液按《分子克隆实验指南》上的方法配制。

1.2 实验方法

1.2.1 植物表达载体 p2300⁻-*BoRS1* 的构建: 用 *Bam* H I 和 *Sac* I 顺序酶切经改造过的中间载体 p35S-2300 :: *gus* :: *noster*, 回收其大片段。以 RSF1 (5'-GAAGA TCTAA ATGGA TTTGA CACGT CCT-3', 5' 包括酶切位点 *Bgl* II) 和 RSR1 (5'-CGAGC TC CCC AGATT CTC AA AGTTG TT-3', 3' 包括酶切位点 *Sac* I) 为引物克隆获得 5' 端和 3' 端含酶切位点的目的基因, 将之连入 T-easy-vector 中, 然后用 *Bgl* II (*Bam* H I 同位酶) 和 *Sac* I 双切 pT-easy-*BoRS1*, 将目的片段连接到酶切好的 p35S-2300 :: *noster* 大片段上, 构建适于双、单子叶转化的植物表达载体 p35S-2300 :: *BoRS1* :: *noster*。

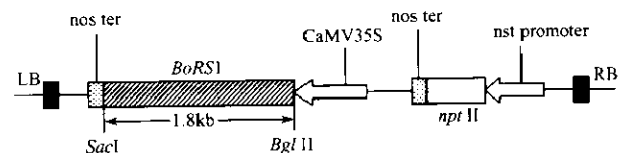


图 1 重组质粒 p35S-2300 :: *BoRS1* :: *noster* 的 T-DNA 区段示意图

Fig. 1 Structure of T-region in the plasmid p35S-2300 :: *BoRS1* :: *noster*

CaMV 35S; 35S promoter of cauliflower mosaic virus; NPT II: the region for kanamycin resistance; nos: terminator of nopaline synthetase; *BoRS1*: cDNA; RB, LB: right and left borders of T-DNA respectively.

经测序确认插入位点正确后, 抽提重组质粒 p35S-2300 :: *BoRS1* :: *noster*, 用冻融法转化到感受态农杆菌 EHA105 菌株中。培养阳性单克隆的后代用于转化烟草。将阳性单克隆置于 2 mL 农杆菌培养基中 28℃ 过夜培养; 取其中 1 mL 加入 50 mL 农杆菌液体培养基, 28℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$; 然后将培养物离心, 收集菌体, 用液体 MS₁ 重悬并使菌液 $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$ 。

1.2.2 叶盘法转化烟草及植株再生: 取烟草无菌苗的幼嫩健壮叶片, 去主脉后剪成 0.8 cm × 0.8 cm 左右的叶盘, 放入农杆菌培养液中, 于 150 r/min 转速的 28℃ 摇床上摇 10 min 后取出叶盘并用无菌纸吸干多余菌液, 将叶盘平放在 MS₁ 培养基上, 置于 25℃ 左右的暗培养。3 d 后转移至 MS₂ 培养

基,于25℃左右14 h光照培养。约2周后,切下带芽的叶缘插入MS₂中继续培养。4周后,切下幼芽插入MS₃培养基中于25℃左右14 h光照条件下诱导生根。一个月后,大部分苗已长出繁茂的根,将PCR抗性苗移入珍珠岩中,将植株恢复生长,长出新根后移入土中栽培。

1.2.3 转基因烟草的PCR检测:用SDS法少量抽提转基因植株总DNA作为模板用于PCR检测。PCR反应体系为:2.5μL 10×PCR缓冲液,1.5μL MgCl₂,2mmol/L dNTP混合物,10μmol/L引物RSF1和RSR1各1μL,1u Taq酶,加ddH₂O至总体积25μL。将上述溶液混匀,在PCR仪上94℃预变性3min后进行35个循环,每个循环为94℃变性1min,58℃退火1min,72℃延伸2min,最后,样品在72℃延伸10min。取15μL PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后用凝胶成像系统拍照。

1.2.4 转基因烟草的半定量一步PCR分析:随机选取PCR阳性苗(编号为14、17、24、28、37、44、54、70、71、77、90、95、130),用上海华舜“植物叶小量叶总RNA提取试剂盒”从幼叶中提取总RNA(经DNase处理)。以野生型烟草RNA为阴性对照。用1μg总RNA作为半定量一步RT-PCR(One-step RNA PCR试剂盒,TaKaRa)的模板,以RSF2(5'-ATGGA TTTGACACGT CCTTC-3')和RSR2(5'-TCTGC CGCCT CGTAT CTTGTC-3')作为引物进行PCR反应。模板在50℃条件下反转录30min,95℃变性2min,然后在(95℃ for 30s, 59℃ for 30s, 72℃ for 2min)扩增25循环,最后72℃延长10min。用看家基因actin的上下游引物actF(5'-CTGAC AATGC AACTG GAATC G-3')和actR(5'-AGACG GAGGA TAGCG TGAGG-3')同时进行RT-PCR反应作为对照。10μL PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离并在凝胶成像系统下拍照。

1.2.5 转基因烟草耐干性分析:将PCR检测呈阳性的部分植株(编号为13、18、37)和阴性苗进行微繁殖获得相应无性苗,栽于培养土生长1个月后,分别摘取顶部第2~4片新鲜叶片用于耐干性分析,每个株系各测定三株。叶片摘下后放在一个通风良好的地方让其自然干燥,在0 h,1 h,2 h,3 h,6 h,12 h,24 h,36 h,48 h,72 h,96 h和120 h时分别称重测定,并将其换算成鲜重比进一步分析,考察不同植株的叶片失水和抗干燥能力。

1.2.6 转*BoRS1*基因烟草的甘露醇胁迫试验:配制100 mmol/L、200 mmol/L、250 mmol/L和300 mmol/L甘露醇水溶液,分别处理生长至6~8片真叶时期的PCR阳性苗以及阴性苗(均栽于珍珠岩中):100 mmol/L处理阳性苗(6号,37号)和阴性苗共3株,200 mmol/L处理阳性苗(106号,37号)和阴性苗共3株,250 mmol/L处理阳性苗(116号,37号)和阴性苗共3株,300 mmol/L处理阳性苗(54号,37号)和阴性苗共3株。先自基质上面浇灌,然后在托盘中倒满溶液,任其自然吸收。

2 结果与讨论

2.1 转基因烟草抗性苗的获得及PCR检测

经工程菌浸染后的烟草叶盘经共培养、选择培养及生根

诱导后,共得到无菌抗性苗138棵,其中130株苗生根,生根率约为94.2%。将生根良好的抗性苗先移入珍珠岩中栽培一个月后再移入土中,置温室栽培,用于试验分析。

用SDS法少量抽提抗性苗植株的总DNA,以2μL总DNA为模板进行PCR扩增,共检测烟草无菌苗130棵,其中有36棵检测到了特异性条带为PCR阳性苗,转化率为27.7%(图2)。结果初步证实该基因已整合到部分转基因烟草基因组中。

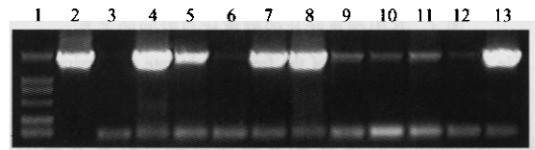


图2 转基因烟草PCR检测

Fig.2 The PCR analysis of transgenic tobaccos

1:DL2000 DNA marker; 2:p2300⁺-*BoRS1*; 3:WT control; 4~13:transgenic plants.

2.2 *BoRS1*基因在转基因抗性植株的表达分析

随机选取部分PCR检测呈阳性的抗性烟草苗,用1μg幼叶中总RNA为模板,以RSF2和RSR2作为引物进行一步RT-PCR反应以检测该基因整合到基因组后的mRNA表达水平。结果表明,*BoRS1*基因在p35S启动子驱动下能在转基因烟草(编号为37、77及95等植株)叶中表达,同时不同株系的表达量存在一定差异(图3)。

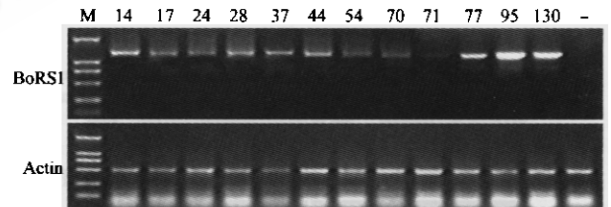


图3 半定量一步RT-PCR检测结果

Fig.3 The result of one step RT-PCR analysis

1:DL2000 DNA marker; 2~13:transformants; 14:WT control.

2.3 转基因烟草耐干性试验

将摘取的转基因烟草植株新鲜叶片数克,至室温下任其自然干燥,定时称鲜重,并据此计算相应的鲜重比,得出不同植株鲜重比随时间的变化关系(图4)。

从图中可以看出,转基因烟草叶片的鲜重随干燥时间的延长都同样呈现下降趋势,在开始的12h下降速度几乎相同,无明显区别。随着实验时间的延长,阴性植株失水速率较快;而阳性植株都表现出失水较慢。统计分析表明,与对照相比,转基因株系的鲜重比达到显著差异,但不同转基因株系间差异不显著。这一结果初步说明*BoRS1*基因的表达能延缓转基因烟草叶片的失重,基因产物的合成在一定程度上提高了植物的抗干燥性能。

2.4 转*BoRS1*基因烟草的甘露醇胁迫试验

为了考察不同转基因株系对于干旱胁迫的耐受能力,用不同浓度的甘露醇溶液对不同转基因烟草进行了干旱胁迫试验。结果显示:100 mmol/L甘露醇处理下所有植株几乎不受

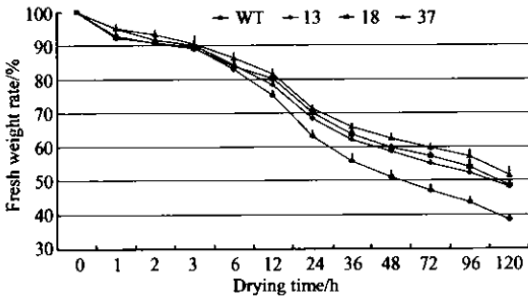


图4 基因烟草叶片的鲜重比与时间的关系

Fig.4 The relationship of the fresh weight rate and drying time for transgenic tobacco leaves(LSD_{0.05} = 1.91)

影响。200 mmol/L 处理后 30 h 阴性苗部分叶片开始出现萎蔫现象, 3 d 后该阴性苗全部萎蔫, 10 d 后枯死; 而所有阳性苗无明显变化。250 mmol/L 和 300 mmol/L 处理 1 d 后就发现阴性苗出现萎蔫现象, 阳性苗无明显变化; 4 d 后, 阴性苗几乎停止生长, 阳性苗部分叶片呈现出轻微萎蔫现象; 7 d 后, 阴性苗枯死, 250 mmol/L 处理的两株阳性苗都呈现出轻微萎蔫, 300 mmol/L 浓度 37 号呈现出轻微萎蔫, 另一株系生长良好。图 5 为在 250 mmol/L 和 300 mmol/L 甘露醇处理下烟草苗在不同时间的生长情况。这一结果表明转基因阳性植株与非转基因植株相比表现出更高的耐干旱胁迫的能力, 其胁迫能力的增强可能是由于 *BoRS1* 基因导入到基因组中改善了其光合作用, 促进了细胞中叶绿素合成的缘故。而且实验中还发现不同的转基因株系之间表现出不同的耐受能力, 这可能与该基因在不同转基因株系中的表达程度有关。

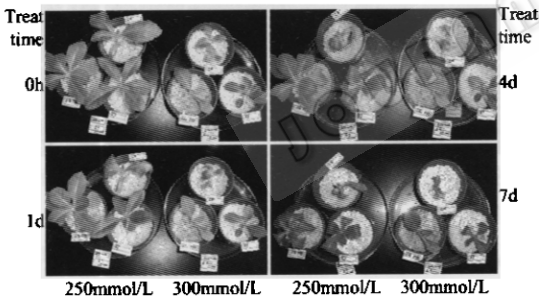


图5 甘露醇胁迫试验

Fig.5 The mannitol stress experiment

Left in each photo: un-transgenic WT, positive line (116), positive line (37) from above by anticlockwise; Right in each photo: un-transgenic WT, positive line (54), positive line (37) from above by anticlockwise.

综合以上研究结果, 笔者认为, *BoRS1* 基因在一定程度上能够增强植株的耐水分胁迫能力。但是, 由于植物在水分胁迫中的反应是一个受多基因控制的复杂的数量性状, 它受植物种类、品种基因型、形态性状和内部生理生化反应等诸多因素影响^[4]。*BoRS1* 基因在胁迫条件下表现出了一定的作用, 但要最终阐明其对植物的生理功能以及它在植物胁迫反应链中的地位还有待更深入的研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 48-54
- [2] Kuai BK(蒯本科), Gu HY(顾红雅). Plant signals induced by osmotic stresses and cloning of related genes. proposed basis, background and trajectories on basic study and development of state key projects. *Resource Sci* (资源科学), 1999, 21(5):42-45
- [3] Holmstrom KO. Engineering plant adaption to water stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47:377-403
- [4] Manuela MC, Joán PM, João SP. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 2003, 30(3):239-264
- [5] Mittle R, Zilinskas BA. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during drought stress and following recovery from drought. *Plant J*, 1994, 5: 397-405
- [6] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327-334
- [7] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y *et al.* Two transduction factors, DREB1 and DREB2, with an DREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathway in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391-1406
- [8] Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi K, Urao S *et al.* Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*. 1992, 33: 217-224
- [9] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant Physiol*, 1993b, 101: 1119-1120
- [10] Xu DP, Duan XL. Expression of a late embryogenesis abundant protein, HVA1, from barley confers tolerance to deficit water. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249-257
- [11] Bhattacharya RC, Maheswari M, Dineshkumar V *et al.* Transformation of *Brassica oleracea* var. *capitata* with bacterial *betaA* gene enhances to tolerance to salt stress. *Scientia Horti*, 2004, 100: 215-227
- [12] Tang DQ, Qian HM, Yu SW *et al.* cDNA cloning and characterization of a new stress-responsive gene *BoRS1* from *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Physiologia Plantarum*, 2004, 121: 578-585
- [13] Close TJ. Dehydrins: a common/Lonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 1997, 100:291-296
- [14] Baker J, Steele C, Dure LM. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and genes from cotton. *Plant Mol Biol*, 1998, 11:277-291
- [15] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 1993, 236:331-340