

## 玉米 *ZmSKIP* 基因的克隆转化

魏巍<sup>1,2</sup>, 钮金波<sup>1</sup>, 李艳华<sup>1</sup>, 程备久<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 海南省现代农业检验检测预警防控中心, 海口 571100)

**摘要:** 随着淡水资源的匮乏, 干旱已成为影响玉米产量众多因素中最主要的非生物因素。而植物的耐旱性又属于数量遗传性状, 这给广大遗传育种工作者带来了一个很大的难题。*SKIP* 基因属于 RNA 调控基因, 它参与调节生物体内多种 RNA 的剪切调控, 进一步调整植物状态, 应对逆境环境。利用 BLAST 搜索玉米基因组, 得到相似度 99% 的玉米基因, 命名为 *ZmSKIP*。对该基因克隆和生物信息学分析, 构建过量表达载体, 使用原位转化法得到过表达该基因的转基因株。对转基因株进行耐旱性实验, 并使用 ELISA 方法检测转基因株的 ABA 含量。结果显示, 转基因株中 ABA 相对野生型上升明显, 具有更高的耐旱性。初步推断 *ZmSKIP* 在玉米中可能调控相应的耐旱基因表达从而调节植物对逆境的适应能力。

**关键词:** 玉米; *ZmSKIP*; 原位转化; 耐旱

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)05-0666-08

### Molecular cloning and transformation of *ZmSKIP* in maize

WEI Wei<sup>1,2</sup>, NIU Jinbo<sup>1</sup>, LI Yanhua<sup>1</sup>, CHENG Beiji<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Modern Agricultural Inspection, Testing & Control Center of Hainan Province, Haikou 571100)

**Abstract:** With the scarcity of fresh water resources, drought has become the most important abiotic factor affecting the yield of corn. The drought-tolerance in plants belongs to quantitative genetic traits and could bring a serious problem to the majority of genetic breeders. The *SKIP* belongs to the RNA regulation. It participates in the regulation of a variety of RNA splicing, adjusts the vegetative state, and copes with adverse environment. In this study, using BLAST search with the maize genome, we got a sequence of 99% similarity with the maize gene, which was named *ZmSKIP*. Cloning and bioinformatics analysis, constructing the overexpression vector of *ZmSKIP*, and using in planta transformation method, we obtained the overexpressing transgenic plants. We conducted drought tolerance experiments on the transgenic plants, and detected ABA content in the transgenic plants by ELISA. The results showed that the ABA content in the transgenic plant increased significantly compared to its wild-type one, which indicated the former with higher drought tolerance. We concluded that *ZmSKIP* in maize may regulate the expression of the corresponding gene, and regulate plant drought stress on adaptability correspondingly.

**Key words:** *Maize*; *ZmSKIP*; in planta transformation; drought tolerance

玉米作为世界第一大作物, 我国第二大粮食作物, 其生长期需水量大, 随着淡水资源的匮乏, 干旱已成为影响玉米产量众多因素中最主要的非生物因素<sup>[1]</sup>。传统意义上, 采取更新灌溉方式、改进新的栽培方法等农业措施这一过程耗费大量淡水资源、人力财力, 代价巨大, 且效果并不明显; 培养耐旱品种的传统育种的方法又存在周期长、偶然性

大, 培育出的品种不稳定等诸多缺点<sup>[2]</sup>。直到 20 世纪 80 年代随着转基因技术的出现, 作物遗传育种得到了前所未有的发展, 利用基因工程技术可以在基因水平上对遗传物质进行改造, 这打破了传统意义上的育种方法, 使定向改造植物的性状成为现实。因此, 利用基因工程技术提高作物的抗旱能力已经成为现代植物育种工作者解决这一问题的主要方法

收稿日期: 2015-08-17

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD20B00) 资助。

作者简介: 魏巍, 硕士。E-mail: weiweiflyhigh@163.com

\* 通信作者: 程备久, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: cbj@ahau.edu.cn

之一。

当植物感受到外界干旱胁迫时, 相关基因的表达要经过 3 个层次的信号传导: 首先, 植物细胞膜上信号受体 (包括组氨酸激酶、G 蛋白偶联受体、离子通道蛋白等) 或者胞内感受器 (感受膨胀压力的变化) 捕获外界胁迫信号<sup>[3]</sup>, 从而产生了可在细胞内传递的第二信使( $\text{Ca}^{2+}$ 、IP<sub>3</sub>、DGA、ROS 等)<sup>[4]</sup>; 第二信使调节胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度水平, 离子钙感受器家族成员感受到  $\text{Ca}^{2+}$  水平变化, 介导下游的蛋白传导信号 (如一些激酶 CIPKs、CDPKs、等磷酸级联反应) 传导信号<sup>[5]</sup>, 一系列转录因子 (如 MYB、bZip、Zinc finger 等) 被激活<sup>[6]</sup>; 转录因子又可以特异性的激活一批抗逆性基因<sup>[7-9]</sup>, 编码产生一些可保护植物细胞免受胁迫伤害的物质<sup>[10]</sup> (如 LEA 类蛋白、伴侣蛋白、mRNA 结合蛋白、通道蛋白、渗透蛋白和抗冻蛋白等), 从而让植株在细胞及生理生化水平上做出胁迫应答。

一直以来, 人们对植物抗逆性的研究集中于相关基因, 蛋白质和物质的积累, 而植物抗旱基因经研究证明属于数量型基因控制<sup>[11-13]</sup>, 这样更增加了人们选育抗旱品种, 提高农业效率的难度。故而研究人员近年来使用多种方法试图从更上游来寻找控制这类基因表达的总开关, 试图开辟一条抗旱品种育种的新途径。miRNA 做为生物体内一种小分子物质, 主要通过调控靶基因的表达参与生物体生命活动的调控。有实验证据表明, miRNA 在植物与环境间的相互作用的过程中有着十分广泛和深远影响<sup>[14]</sup>。Zhou 等的研究表明, miRNA159 受 ABA 诱导过量表达, miRNA393 受干旱胁迫和 ABA 的诱导表达, miR169g 是 14 个 miR169 基因家族中唯一在根和幼苗被干旱诱导后表达变化显著的成员<sup>[15]</sup>。Zhang 等分析了 65 个物种的 EST 序列, 从中鉴定了 338 个新的 miRNA, 其中 123 个受逆境胁迫诱导, 28 个与干旱胁迫有关<sup>[16]</sup>。这些研究表明, miRNA 在植物的抗旱性应答中也起到了重要的调控作用。

SKIP 相关蛋白是一种 RNA 代谢相关蛋白, 参与了 pre-RNA 的剪切, 调控及降解等功能。相关的研究表明其家族成员参与在相当广泛的范围内参与了生物的生长发育及调控过程, 具有十分重要的生物学功能<sup>[17]</sup>。到目前为止, SKIP 家族在许多生物中都有研究<sup>[18-20]</sup>, 但在玉米中研究尚未见报道。所以研究玉米中 SKIP 同源基因的结构、生理生化功能、靶基因及其参与的信号转导途径, 对玉米的改良和育种都具有重要的意义; 此外, 对 RNA 代谢与植物抗逆性相关的研究, 也为广大抗逆性研究者

提供了一条新的思路, 为以后更深入的研究打下基础。

本实验利用 NCBI 中 BLAST 程序搜索获得玉米 SKIP 同源基因并命名为 *ZmSKIP*, 通过过量表达技术和 RNA 干涉技术初步研究此基因在抗逆性方面的作用。并使用生物信息学的分析方法对此基因进行预测性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料** 本实验所用的植物材料玉米 (*Zea mays* L.) B73 号由本实验室保存。14 个玉米自交系 (沈 118、y75、辽 68、齐 319、多黄 29、农大 178、Mo17、昌 72、黄早四、K12、翼 35、3189、803 和郑 58) 植株种植于安徽农业大学生命科学学院实验基地农萃园。再生转基因株也于 2011 年种植于农萃园。

**1.1.2 菌株和载体** 大肠杆菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  菌株, 农杆菌 EH105 菌株保存于安徽农业大学作物生物学省重点实验室; T/A 克隆载体 pMD19-T vector 购于 TaKaRa 公司 (大连宝生物工程有限公司) 提供; 表达载体 CPB 为安徽农业大学作物生物学省重点实验室保存。

**1.1.3 试剂与酶** 实验中所使用的各种限制性内切酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Recombinant *DNase* I、Trizol 试剂等均购自大连宝生物公司, 质粒提取试剂盒 (小提和小量中提)、凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司, 反转录试剂盒购 Promega 公司, 氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、IPTG、及植物凝胶 (phyto-gel) 购自 Sigma 公司, 潮霉素 B (Hygromycin B) 购自 Roche 公司, 其他常用化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 植物表达载体构建

**1.2.1 基因目的片段的获得** 提取玉米叶片的总 RNA 之后使用 Promega 反转录试剂盒进行反转录, 获得的 cDNA 为模板; 根据线性载体 CPB 两端的序列及 *ZmSKIP* 基因序列设计特异性引物, 其中上游引物有 *Spe* I 酶切位点, 下游引物有 *Sac* I 酶切位点 (用小写字母表示)。

*ZmSKIP*-F:

5'-actagtCATGGCGACGCTCAAGGATCTCCTAC-3'

*ZmSKIP*-R:

5'-gagctcGATTCCAAACCTGCAGAAGCAGAGC-3'

使用 TaKaRa 聚合酶进行 PCR 扩增获得

*ZmSKIP* 基因全长插入片段, 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系组分如下: 10 $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 4  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , 玉米叶片 cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , TAKARA 聚合酶 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ 。PCR 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 61 $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物检测后回收, 长约 1875 bp 的片段, 即为 *ZmSKIP* 基因, 反应结束后, 对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 DNA 凝胶回收试剂盒(全式金公司回收试剂盒)进行纯化回收。连接至 T 载体, 构成 pT-*ZmSKIP* 克隆载体, 并送测序。测序结果与 NCBI 公布序列进行比对。

**1.2.2 CPB-*ZmSKIP* 的构建及验证** 将目的基因 *ZmSKIP* 装载于 CPB 载体 CaMV35S 启动子的下游, 使之在 CaMV35S 启动子和 OCS 终止子的调控下进行转录。*ZmSKIP* 基因过量表达载体的构建策略如图 1 所示。

具体步骤如下: 用 *Spe* I、*Sac* I 对 pT-*ZmSKIP* 克隆载体进行双酶切, 用 *Xba* I、*Sac* I 对 CPB 载体进行双酶切; 分别回收带有 *Xba* I、*Sac* I 粘性末端的 CPB 大片段, 带有 *Spe* I、*Sac* I 粘性末端的 *ZmSKIP* 目的基因片段; 后将其进行 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜连接; 将连接产物于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞中进行转化; 取 100  $\mu\text{L}$  转化产物涂布于含 Kan(100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的 LB 固体培养基平板, 倒置平板, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 12~24 h; 挑取单菌落于 5ml LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 8~13 h; 提取质粒并进行酶切验证, 阳性克隆命名为 CPB-*ZmSKIP*。

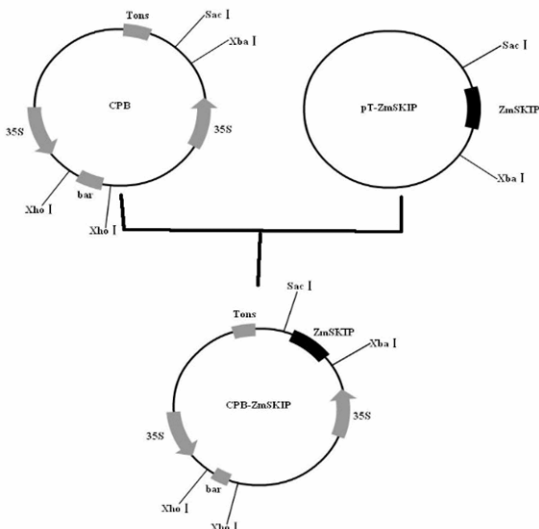


图 1 过量表达载体的构建策略

Figure 1 Construct strategy of *ZmSKIP* gene overexpression vector

### 1.3 *ZmSKIP* 基因过量表达载体的农杆菌转化

取 1  $\mu\text{L}$  质粒加入 200  $\mu\text{L}$  EH105 感受态细胞中, 混匀; 冰浴 5 min 后用液氮中速冻 1 min, 后 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 加入 300  $\mu\text{L}$  YEP 液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、250  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  预表达 4~5 h; 吸取菌液 50~100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于含 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan 和 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  利福平的 YEP 固体平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$  暗培养 1~2 d; 挑取平板上长出的单菌落, 接种于含 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan 和 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  利福平的 YEP 液体培养基中, 220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 1~2 d; 提取质粒, 酶切验证筛选出阳性克隆。

### 1.4 农杆菌介导的玉米原位转化

**1.4.1 农杆菌的制备** 将保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$  的附有载体质粒的农杆菌 EH105 菌液在含有利福平(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和卡那霉素(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 YEB 固体培养基平板上划线培养 2 d。挑取单菌落接种于有相应抗生素的 YEB 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$  震荡培养, 至对数生长期,  $D_{600\text{nm}}$  值大约为 0.8~1.0, 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 后倒掉上清, 菌体用重悬培养基悬浮至  $D_{600\text{nm}}$  值为 0.6, 在侵染前向重悬液中加入乙酰丁香酮(AS, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

**1.4.2 农杆菌介导法进行玉米的原位转化** 待转化玉米吐丝之前, 将雌穗用纸袋套住; 当花丝长至 5~10 cm 后, 于天气晴朗的下午将纸袋拿掉, 第 2 天 10:00—12:00 进行授粉; 授粉后第 2 天下午, 用注射器将 10 mL 工程菌菌液从底部注入到雌穗中; 等玉米成熟后, 将其晒干并脱粒<sup>[21]</sup>。

### 1.5 阳性转基因植株的检测

将经过原位转化获得的 T<sub>0</sub> 代玉米种子, 于当年冬季在海南加代, 按单穗播种成株系, 长至四叶期后, 用 0.01% 的除草剂均匀喷洒以筛选, 每 5d 喷洒 1 次, 共喷洒 3 次。存活的植株, 取其叶片提取基因组。PCR 扩增中间载体自带的 CaMV35S 基因, 初步鉴定转基因植株。

CaMV35S-F:

5'-GGAATTCGCTTCATGGAGTCAAAGATTC-3'

CaMV35S-R:

5'-GGAGCTCGAGTCCCCCGTGTCT-3'

其中 PCR 反应体系如下: 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系组分如下: 10 $\times$ Buffer 5.0  $\mu\text{L}$ , dNTP(10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )4.0  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , 抗性植株基因组 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性反应 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性反应 45 s, 61 $^{\circ}\text{C}$  退火反应 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸反应 2 m, 除第一步外共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  终延伸反应 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保温保存。反应结束后, 对 PCR 产物

进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.6 *ZmSKIP* 基因多态性研究

根据文献报道, 选择抗旱性差异显著的自交系 14 个<sup>[22-28]</sup>。其中具有强耐旱性的品种有: 黄野四、黄早四、Mo17、K12、辽 68、郑 58 和新自 153-2; 具有弱耐旱性的品种有: 沈 118、y75、多黄 29、农大 178、昌 72、冀 35 和 3189。提取基因组 DNA<sup>[29]</sup>, 根据序列使用 Primer Premier 5.0 设计引物, PCR 得到各个自交系的 *ZmSKIP* 基因 (约 1875 bp)。

*ZmSKIP*\_poly-F:

5'- ATGGCGACGCTCAAGGATCTCCTAC -3'

*ZmSKIP*\_poly-R:

5'- TCAGCGCCCCCTTTCAAAGTTGATG -3'

其 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系组分如下: 10 $\times$ Buffer 5.0  $\mu\text{L}$ , dNTP(10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )4.0  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , 植物基因组 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性反应 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性反应 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  退火反应 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸反应 2 m, 除第一步外共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  终延伸反应 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保温保存 1 h。反应结束后, 对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

为保证序列的准确性, PCR 反应使用了 *Pfu* 酶, 扩增得到的基因两端为平末端, 以回收基因为模板用 *Taq* 酶再次 PCR, 使之能与 T 载体连接, 其中 PCR 反应体系如下: 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系组分如下: 10 $\times$ Buffer 5.0  $\mu\text{L}$ , dNTP (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4.0  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , PCR 产物 1.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件同上。反应结束后, 对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物回收后连接 pMD19-T 载体, 转化挑斑细菌并提取质粒进行验证, 得到的阳性克隆, 对应菌株送去测序, 测序结果中加入已全基因组测序的 B73 中 *ZmSKIP* 序列, 使用 ClustalX1.81、MEGA4.0、DnaSPv5 软件进行分析。

## 1.7 植物脱落酸的含量测定

**1.7.1 玉米中激素的提取** 称取 0.5~1.0 g 新鲜玉米叶片, 加 2 mL 样品提取液后冰浴中研磨, 成匀浆后小心转移到 10 mL 的试管中。再用 2 mL 提取液将研钵冲洗干净, 将冲洗液也转移至试管中, 确保所有的样品被转移, 摇匀后放置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中; 4 $^{\circ}\text{C}$  下提取 4 h, 3500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 8 min, 取上清液。于沉淀中加入 1 mL 提取液后, 震荡均匀, 置 4 $^{\circ}\text{C}$  下再提取 1 h, 离心, 合并上清液并记录体积, 残渣弃

去; 将收集到的上清液过 C-18 固相萃取柱。具体步骤是: 80% 甲醇 (1 mL) 平衡柱 $\rightarrow$ 上样 $\rightarrow$ 收集样品 $\rightarrow$ 移开样品后使用 5 mL 100% 甲醇洗柱 $\rightarrow$ 5 mL 100% 乙醚洗柱 $\rightarrow$ 5 mL 100% 甲醇洗脱 $\rightarrow$ 回收得到样品 $\rightarrow$ 循环; 将回收得到的样品转入 5 mL 塑料离心管中, 真空中蒸发干燥或使用氮气吹干 (除去样品中的甲醇), 用样品稀释液定容, 一般 1 g 鲜重用 2 mL 左右定容, 其他依次换算。

**1.7.2 样品测定** (1) 取适量附带标样稀释成所需浓度: IAA, ZR 标准曲线的最大浓度为 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , iPA 的最大浓度为 20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将配置好浓度的标样依次 2 倍稀释成 8 个浓度 (其中包括 0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。将系列浓度的标准样加入 96 孔酶标板的前两行, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 每个浓度加 2 孔作为重复。加待测样: 将待测样加入 96 孔酶标板, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$ , 每样重复加 2 孔。(2) 将一定量的抗体加入 5 mL 样品稀释液, 倍数由标签指示。混匀后每孔加入 50  $\mu\text{L}$ , 将酶标板加入湿盒内开始温度 37 $^{\circ}\text{C}$  时间 0.5 h 竞争 (3) 将反应液倒出、甩干, 置于吸水棉上拍打干净, 加入洗涤液洗板。共洗 4 次。(4) 洗涤后, 将适当的酶标二抗加入 10 mL 样品稀释液中配置成合适的浓度, 混匀后, 在反应孔中每孔加 100  $\mu\text{L}$ , 湿盒内开始反应, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$ , 时间 0.5 h。(5) 再次洗板, 方法同步骤 (3)。(6) 将 10~20 mg 邻苯二胺 (OPD) 溶于 10 mL 底物缓冲液中, 待完全溶解后, 加入 4  $\mu\text{L}$  浓度为 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。混合均匀, 于每个反应孔中加入 100  $\mu\text{L}$ , 在湿盒内进行反应, 肉眼观察, 当可以明显看出标准曲线孔显色呈现明显梯度, 且 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的孔还比较浅时为止。加 50  $\mu\text{L}$  浓度为 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸于每孔中, 终止最后反应。(7) 在酶标仪上依次测定标准物浓度及各样品在 492 nm 处的 *D* 值, 记录。

**1.7.3 结果计算** 使用 logit 曲线计算 ELISA 检测结果。激素标样各浓度 ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的自然对数构成了横坐标, 纵坐标用各浓度显色值的 logit 值表示。计算方法如下:

$$\text{logit}(B/B_0) = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0} = \ln \frac{B}{B_0-B}$$

其中  $B_0$  为 0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  孔的显色值,  $B$  是其他浓度的显色值。待测样品可根据其显色值的 logit 值从图上查出其所含激素浓度 ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的自然对数, 再经过反对数即可知其激素的浓度 ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。求得样品中激素的浓度后, 再按照实验中步骤计算样品中激素的含量 ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW)。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建和鉴定

**2.1.1 玉米中 SKIP 基因的扩增** 从图2可以看出右边有一条 1900 bp 左右的带,与预测基因大小吻合,且无拖带弥散带多带等现象,说明反转录质量较好。将测序结果登录 NCBI 网站 Blast 比对,结果显示与 NCBI 所公布的玉米 *SKIP* 基因同源率为 99%。所克隆基因含有起始密码子 ATG (位于序列的第 54 位) 和终止密码子 TGA (位于序列的第 1885 位),是完整的 *SKIP* 基因。

**2.1.2 表达载体 CPB-ZmSKIP 的酶切验证** 目的片段 *ZmSKIP* 是通过同尾酶原理与 CPB 连接,因此酶切验证时选用了 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切,酶切片段长度为 1200 bp 左右;如图 3 所示。

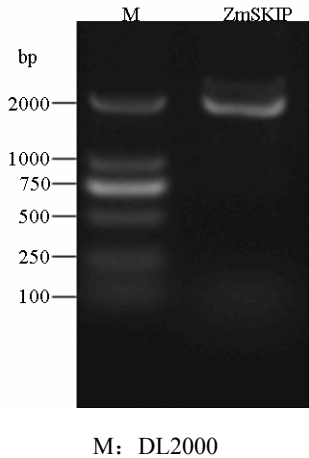


图 2 *ZmSKIP* 基因的 RT-PCR 扩增电泳图

Figure 2 The gel electrophoresis map of RT-PCR amplification by *ZmSKIP*

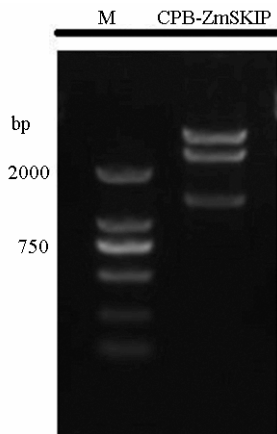


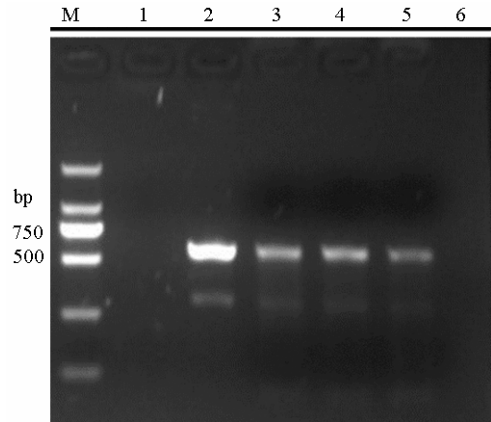
图 3 载体构建酶切验证图

Figure 3 Restriction enzyme analysis of CPB-*ZmSKIP*

### 2.2 转基因玉米的获得

利用原位转化技术将配制的含有目的载体的农

杆菌 MS 悬浮菌液注入玉米棒中,收获的  $T_0$  代种子在当年的冬天送至海南基地加以继代繁殖,待幼苗 4 叶期时用 0.01% 的除草剂筛选,存活下的幼苗加以精心管理,收获  $T_1$  代种子后送回实验室检测。得到过量表达转基因植株  $T_1$  代种子。将  $T_1$  代种子种下,待长到 4 叶期时喷洒 0.01% 的除草剂筛选,存活的幼苗共 3 株。

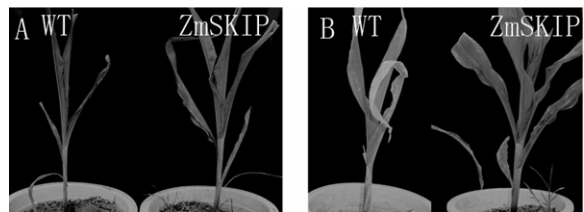


M: DL2000 Marker; 1: 野生型 B73; 2: 阳性质粒; 3-5: 转基因植株; 6:  $H_2O$

M: DL2000 Marker; 1: B73; 2: positive control; 3-5: transgenic plants; 6:  $H_2O$

图 4 转基因玉米的 PCR 检测凝胶电泳图

Figure 4 PCR analysis for transgenic maize



A. 旱胁迫 5d 后; B. 复水 3 d 后

A. after drought for 5 days; B. water recovery for 3 days

图 5 转基因玉米的旱胁迫实验

Figure 5 Drought stress in transgenic maize

### 2.3 转基因植株的分子检测

剪取存活幼苗叶片,提取基因组 DNA。同时剪取野生型的 B73 自交系叶片提取基因组 DNA 做阴性对照 1,阳性对照 2 模板为 CPB 质粒,阴性对照 6 的模板为水。对 *CaMV35S* 基因进行 PCR 检测,结果如图 4。可见阳性对照在 500 bp 左右处有明显的 1 条带,2 个阴性对照没有条带,转基因植株 1~3 有明显的条带,初步说明外源的目的基因成功导入玉米中。

### 2.4 转基因植株抗旱性检验及 ABA 活性检测

将野生型 B73 和转基因植株 1~3 进行干旱胁迫 5 d,之后进行复水 3 d。如图 5 所示,复水后的

转基因株叶片复水良好, 未受影响, 生长健康, 而野生型则有部分叶片枯萎, 生长受到一定程度抑制。

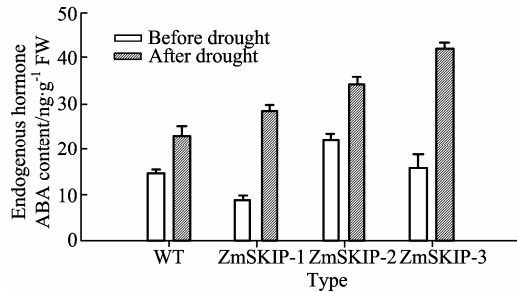


图 6 转基因玉米的 ABA 酶活性分析  
Figure 6 Analysis of ABA in transgenic maize

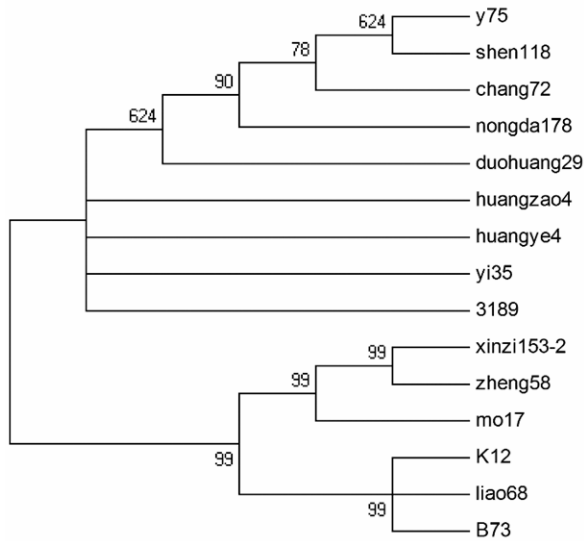


图 7 玉米 *ZmSKIP* 基因的系统进化树分析  
Figure 7 Phylogenetic relationship of *ZmSKIP* gene in maize

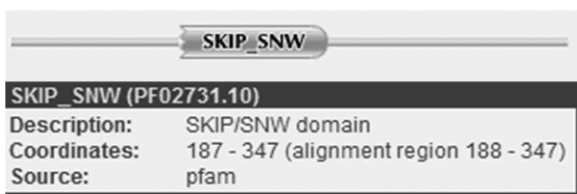


图 8 玉米 *ZmSKIP* 基因的结构域分析  
Figure 8 Putative motifs identified in the *ZmSKIP* gene by Pfam

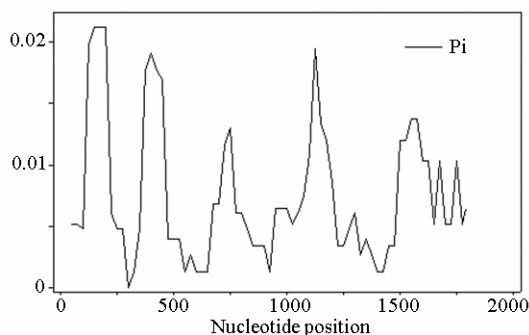


图 9 15 个玉米自交系 Pi 分析  
Figure 9 Pi analysis in 15 self-line maize

分别剪取胁迫前和胁迫后的叶片, 使用酶联免疫吸附分析法测量各样品中 ABA 激素含量。如图 5 可见, 干旱胁迫前, 野生型与转基因株之间因个体差异, ABA 含量虽不同, 但是平均值还在同一水平上。但干旱胁迫后, ABA 含量在转基因株中骤然增加, 特别是转基因株 3, ABA 含量增加了近 2 倍。一种可能的原因是, 胁迫前, ABA 作为调动相关抗逆基因表达的激素, 因为没有外界信号, 故相差不大。但在外界胁迫产生之后, ABA 既作为一种外界信号, 又作为一种植物的应答反应产物, 在相互调控的过程中达到了大量的生产和积累。所以推测, 转基因株较之野生型具有更强的抗逆性。

## 2.5 玉米 *ZmSKIP* 基因多态性分析

**2.5.1 系统进化树分析** 将测序得到的多条序列加上已全基因组测序的玉米 B73 品系的 *SKIP* 基因序列, 使用 Clustal X 软件进行处理, 然后将得到的 aln 文件输入 MEGA4.0 软件, 构建玉米 *ZmSKIP* 在多个品系中的的系统发育进化树 (图 7)。由系统进化树显示, 在已获得序列的 15 个自交系序列中, 新自 153-2、郑 58、Mo17、K12、辽 68 和 B73 亲缘关系较近, 且与文献报道相同, 都有着较强的抗旱性。而 y75、沈 118、昌 72、农大 178、多黄 29、翼 35 和 3189 比较不耐旱, 也聚集于进化树的一端。比较特殊的有黄早四和黄野四。这两个品种在文献报道中具有较好的耐旱性, 但是在进化关系上却趋于耐旱性不显著的一端。一种可能的解释是, 植物耐旱基因是一个多层次, 多调控的庞大系统。这两个自交系可能在别的调控途径中有着较强的耐旱性, 所以在这里并没有表现出来<sup>[22-28]</sup>。

**2.5.2 *ZmSKIP* 基因进化压力分析** 将 *ZmSKIP* 基因输入 Pfam 网站进行 domain 分析。得到结果如图 8 所示, *ZmSKIP* 基因拥有一个 SKIP\_SNW 结构域, 位于 188 氨基酸残基至 347 氨基酸残基处。此区域是其实现功能的结构。将 *ZmSKIP* 基因分为 3 个部分, 结构域左边部分, 从 1~187 氨基酸残基; 结构域部分, 即 188~347 氨基酸残基; 结构域右边部分, 从 348~610 氨基酸残基。所对应的核苷酸序列也被分为 3 个分部, 分别为左侧 1~561 核苷酸, 结构域 562~1041 核苷酸, 右侧 1042~1830 核苷酸。

又使用了 DnaSPv5 软件对这 15 个序列进行了 Pi 计算, 这个值可以说明核苷酸变化的频率, 也反应了相应区域受到进化压力的大小。得到结果如图 9 所示, 可见, 在左侧 1~561 核苷酸区域和右侧 1042~1830 核苷酸区域变化剧烈, 说明这两个区域在进化中相比较而言具有更高的核苷酸多态性, 而

中间结构域 562~1041 核苷酸区域的变化则较小,说明这个区域受到的选择性压力较大。这个结果也符合 *SKIP* 类蛋白的结构, *SKIP* 蛋白的中间结构域严格保守,但是两端却比较多变,这是因为其参与了大量的蛋白互作,而这些多态性为 *SKIP* 类蛋白与不同的蛋白互作提供了进化的支持。

又对这组序列进行了 Tajima Test, Tajima's D 统计将序列分离位点数和两两序列差异平均数的估计进行对比。Tajima's D 统计值为正值时说明序列进化方式为平衡选择,且有一些单倍型分化;负值时为负向选择。得到结果为 Tajima's D 值为 -0.28852。这意味着 *ZmSKIP* 基因是比较保守的。

### 3 讨论

由于玉米作物的特性所致,对玉米采用传统的愈伤组织培养难度很大,本实验采用农杆菌介导的原位转化方法,以玉米幼穗为对象,将目的基因转入玉米,通过对除草剂抗性植株的基因组 DNA 进行 PCR 检测,3 株植株 PCR 检测结果呈现阳性,初步证明 *ZmSKIP* 序列已导入到玉米基因组中。

*ZmSKIP* 基因有 1830 个核苷酸,编码 609 个氨基酸残基,且有 1 个高度保守的 *SKIP/SNW* 结构域。*SKIP* 蛋白在各个物种间高度保守,在人类、酵母、水稻中皆单拷贝表达。本实验同时还构建了 *ZmSKIP* 的干涉载体同时转化,但并没有获得转基因株,因此我们推测作为 *SKIP* 家族中的一员, *ZmSKIP* 基因在玉米的生长发育中起到了重要的作用,缺少 *ZmSKIP* 基因可能对植物是致死性的。近年来,各种研究表明玉米中 *ZmSKIP*、水稻中 *OsSKIP* 和酵母中 *PRP45* 是直系同源<sup>[18,20]</sup>,已有报道显示人类 *SKIP* 可弥补酵母 *PRP45* 缺失突变体的致死表型<sup>[20]</sup>,所以,推测它在玉米中应该也执行着 RNA 调控的功能。但玉米做为 C4 作物,有其特殊性,玉米中 *SKIP* 基因与其他已报道的 *SKIP* 基因的异同还有待研究证明。

根据文献报道和本实验室现有品种,选择了抗旱性差异显著的 14 个品系,分别克隆其 *ZmSKIP* 基因,附加已全基因组测序的 B73 自交系。使用 Clustal X、MEGA4.0、Pfam、Bioedit7.0 及 DnaSPv5 分析表明, *ZmSKIP* 基因在抗旱性品系与不抗旱性品系中有聚类分离的趋势,在 15 个自交系序列中,新自 153-2、郑 58、Mo17、K12、辽 68 和 B73 亲缘关系较近,且与文献报道相同,都有着较强的抗旱性。而 y75、沈 118、昌 72、农大 178、多黄 29、冀 35 和 3189 比较不耐旱,也聚集于进化树的一端<sup>[22-28]</sup>。

可以推测, *ZmSKIP* 基因对玉米的抗旱性有着较为显著的影响。 *ZmSKIP* 基因在多品系中多态性较为显著,但是在蛋白质的变化上并不大,推测其原因,可能为:(1)基因多态性为多变的区域提供了进化动力;(2)在自然选择的压力下, *ZmSKIP* 基因作为一个 RNA 代谢相关蛋白,不能有太大的差异。

作为抗旱性指标之一的 ABA 激素,在转基因植株未受到旱胁迫时与野生型差异并不显著,但是当植株受到旱胁迫时,转基因中的 ABA 含量有了较大幅度的提高,推测这种现象也可能是其抗旱性增强的表现之一。在研究中,发现 *ZmSKIP* 基因可能参与逆境调控。可以结合转基因植株表型分析及相关的生理生化分析,阐明 *ZmSKIP* 基因参与抗旱性调控的机制,为玉米中 *ZmSKIP* 基因参与逆境调控的机制提供有利证据,为抗旱性玉米的育种提供新的思路 and 材料。

### 参考文献:

- [1] 张淑杰, 张玉书, 纪瑞鹏, 等. 东北地区玉米干旱时空特征分析[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(1): 231-236.
- [2] 宗燕. 转基因玉米育种的研究进展与展望[J]. 中国种业, 2010(2): 15-17.
- [3] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(3): 287-291.
- [4] Bahrun A, Jensen C R, Asch F, et al. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(367): 251-263.
- [5] Ribaut J-M, Hoisington D, Deutsch J, et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92(7): 905-914.
- [6] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression[J]. The Plant Cell Online, 1997, 9(10): 1859-1868.
- [7] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. The Plant Cell Online, 1994, 6(2): 251-264.
- [8] Chaves M M, Maroco J P, Pereira J S. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant[J]. Functional Plant Biology, 2003, 30(3): 239-264.
- [9] Beck E H, Fettig S, Knake C, et al. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress[J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(3): 501-510.

- [10] Dai X, Xu Y, Ma Q, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [11] Malosetti M, Ribaut J M, Vargas M, et al. A multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Euphytica*, 2008, 161(1/2): 241-257.
- [12] Sanguineti M, Tuberosa R, Landi P, et al. QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(337): 1289-1297.
- [13] Tuberosa R, Sanguineti M, Landi P, et al. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(5/6): 744-755.
- [14] Barciszewska-Pacak M, Skorupa K, Bielewicz D, et al. Identification of new Arabidopsis thaliana pri-miRNAs and mature miRNAs responsive to drought conditions[J]. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 2013, 94(3): 406-409.
- [15] Zhou Z S, Dell'orco M, Saldarelli P, et al. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(8): 2387-2395.
- [16] Zhang B H, Pan X P, Wang Q L, et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis[J]. *Cell Research*, 2005, 15(5): 336-360.
- [17] Rask L, Andréasson E, Ekblom B, et al. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42(1): 93-114.
- [18] Hou X, Xie K, Yao J, et al. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(15): 6410-6415.
- [19] Leong G M, Subramaniam N, Issa L L, et al. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 1070-1076.
- [20] Figueroa J D, Hayman M J. The human Ski-interacting protein functionally substitutes for the yeast PRP45 gene[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 319(4): 1105-1109.
- [21] 钱叶雄, 江海洋, 韩国民, 等. 农杆菌介导的玉米原位转化方法改良[J]. *激光生物学报*, 2009, 18(2): 250-256.
- [22] 张磊, 耿立格, 王丽娜, 等. 不同玉米自交系萌芽期的抗旱性研究[J]. *玉米科学*, 2010, 18(4): 77-81.
- [23] 李凤海. 常用玉米自交系抗旱性及抗旱性鉴定指标研究[J]. *种子*, 2011, 30(1): 31-34.
- [24] 李凤海, 朱敏, 陈雅彬, 等. 几个常用玉米自交系抗旱性的比较[J]. *玉米科学*, 2008, 16(5): 7-10.
- [25] 成泽云. 10 个常用玉米品种抗旱性的直接鉴定[J]. *内蒙古农业科技*, 2010(4): 44-45.
- [26] 张华永, 崔丽娜, 董树亭, 等. 37 个常用玉米自交系抗旱性筛选[J]. *山东农业科学*, 2010(1): 25-27.
- [27] 杨国航, 白琼岩, 张春原, 等. 玉米抗旱品种筛选鉴定研究[J]. *种子*, 2009(9): 86-88.
- [28] 孙昌禹, 王秀萍, 刘雅辉, 等. 冀东滨海区玉米品种抗旱鉴定[J]. *河北科技师范学院学报*, 2009, 23(1): 20-22.
- [29] 程备久, 凌杏元. 玉米基因组 DNA 的提取[J]. *安徽农业技术师范学院学报*, 1996, 10(4): 27-28.