

植物凝集素 *MNBI* 基因启动子表达载体的构建及鉴定分析

陈 峰, 宋 慧, 樊婷婷, 曹树青*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009)

摘 要: 近年来植物受逆境胁迫的影响日益严峻, 而逆境胁迫是造成现代农作物减产的重要因素之一。*MNBI* 基因是拟南芥中与甘露糖高度特异性结合的植物凝集素, 具有多种生物学功能, 对植物的生长发育及逆境胁迫的应答有着至关重要的调控作用。以拟南芥为试验材料, 利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术成功构建了 *ProMNBI:GUS* 植物表达载体, 结合浸花法, 成功将 *ProMNBI:GUS* 载体转化到拟南芥中, 最终通过 PCR 鉴定分析获得 *ProMNBI:GUS* 阳性植株, 为研究逆境胁迫下 *MNBI* 基因的功能及其转录水平的变化提供了重要的依据。

关键词: 逆境胁迫; *MNBI* 基因; 启动子; 拟南芥; 聚合酶链式反应 (PCR)

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)05-0789-04

Construction and identification of plant expression vector of lectin *MNBI* gene promoter

CHEN Feng, SONG Hui, FAN Tingting, CAO Shuqing

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

Abstract: In recent years, plants are increasingly affected by stress, which is one of the important factors to reduce the yield of modern crops. *MNBI* gene is a highly specific mannose binding lectin in *Arabidopsis thaliana*. Based on its multiple biological functions, *MNBI* gene is predicted to play a crucial role in regulating plant growth and development as well as responses to stress. In this study, *Arabidopsis thaliana* was used as the experimental material, and polymerase chain reaction was conducted to construct the binary vector containing plant expression cassette of *ProMNBI:GUS*. The vector was successfully introduced into *Arabidopsis* by the floral dip method. Finally, transgenic plants carrying *ProMNBI:GUS* cassette were obtained, and the transgene presence in the transgenics was PCR confirmed, which would provide an important basis for the study of the function and transcription level of *MNBI* gene under stress.

Key words: stresses; *MNBI* gene; promoter; *Arabidopsis thaliana*; polymerase chain reaction (PCR)

植物在生长发育过程中会受到各种逆境胁迫, 包括生物胁迫与非生物胁迫。非生物胁迫, 如低温胁迫、干旱胁迫、盐胁迫等都会对植物的生长状态造成极大影响, 因此受到广泛关注^[1-2]。其中重金属胁迫也是近年来研究较多的非生物胁迫之一, 随着现代化工农业的发展, 大量废弃物中的重金属通过各种途径进入到环境中, 导致土壤重金属污染越来越严重。被重金属污染的土壤, 会对生长在其上的植物造成极大危害。这些植物体内会积累较多的重金属, 并通过食物链对取食的人畜造成很大的伤害^[3]。重金属镉作为毒性最大的重金属之一, 对植物的生长发育造成极大危害,

当植物体内积累到一定量时, 植物表现出生物量减少、叶片萎黄、根系生长受到抑制和形态改变, 严重者还会导致植物死亡^[4-5]。植物体内积累的重金属还会通过食物链在人体内富集, 引起慢性中毒, 对人类肾、肝、脑、骨髓等器官造成严重危害^[6]。因此研究植物对重金属的耐受机制对于治理重金属污染土壤具有重要意义。植物凝集素是一类能特异性结合糖类的蛋白质, 在植物的防御反应中发挥重要作用^[7]。研究表明^[8-9], 植物凝集素 *MNBI* 蛋白能够与甘露糖特异性结合, 而甘露糖在植物对重金属镉的响应中起着重要作用。因此, 作者构建拟南芥

收稿日期: 2020-02-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31872803) 资助。

作者简介: 陈 峰, 硕士研究生。E-mail: 1220884064@qq.com

* 通信作者: 曹树青, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: shuqing.cao@163.com

ProMNBI:GUS 植株材料, 为研究 *MNBI* 基因在重金属胁迫下的表达模式以及进一步了解其功能提供材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 本研究以生态型为哥伦比亚 (*Columbia*, Col) 背景的野生型拟南芥作为试材 (*Arabidopsis thaliana*), 记作 WT(wild-type), 购自于美国拟南芥种质资源中心 (TAIR), 后由本实验室自行繁殖培育。

1.1.2 菌株与质粒载体 大肠杆菌 DH5 α , 农杆菌 GV3101, 植物表达载体 pART27 (GUS 载体)。

1.1.3 主要试剂 EasyTaq DNA Polymerase, 普通 DNA 纯化试剂盒; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒; 质粒小提试剂盒购自 TransGen 公司; Prime STAR HS DNA Polymerase, T4-DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 等购自 NEB 公司。

1.2 方 法

1.2.1 构建 *ProMNBI:GUS* 表达载体 在拟南芥 TAIR 网站 (www.arabidopsis.org) 上查询到长度为 2 008 bp 的 *MNBI* 基因 (*At1g78830*) 的启动子序列。利用 Primer premier 5.0 软件设计目的片段引物 *ProMNBI-F*: 5'-CGGGGTACCCAGTGGTTACCCG TGGAGTT-3', *ProMNBI-R*: 5'-CCGCTCGAGGAT TTT GTTTTCTT-GTGTGAG-3', 该引物酶切位点为 *Kpn* I/*Xho* I, 由上海生工生物工程有限公司合成。用 CTAB 法提取拟南芥野生型 WT 的基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 反应扩增目的片段, PCR 反应体系为 50 μ L, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。所用试剂为高保真 DNA 聚合酶 Prime STAR HS DNA Polymerase。通过限制性内切酶 *Kpn* I/*Xho* I, 对目的片段和 GUS 载体进行双酶切; 利用 T4-DNA Ligase 连接切好的目的片段与 GUS 载体, 16 $^{\circ}$ C 过夜。通过热激法将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α , 挑取单菌落进行鉴定、测序, 最后通过电击法将测序成功的重组载体转化到农杆菌 GV3101, 挑取单菌落进行鉴定。

1.2.2 浸花法侵染拟南芥 将阳性克隆接种于 LB 液体培养基 (50 mg \cdot L $^{-1}$ Spec-壮观霉素, 50 mg \cdot L $^{-1}$ Gen-庆大霉素), 28 $^{\circ}$ C、220 r \cdot min $^{-1}$ 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.5~0.8, 5 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。按照表 1 配方配置侵染缓冲液, 重悬沉淀, 5 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 重复 1 次。加入适量缓冲液,

将菌液稀释至 *OD*₆₀₀ 为 0.5~0.8, 再按比例加入终浓度为 0.02%~0.03% 的 SilwetL-77, 混匀。选取 6 周左右、生长状态良好的野生型拟南芥植株, 提前去除果荚并给植株浇足水以保持足够湿度。将花置于侵染缓冲液中侵染 20 s, 使植株表面浸有一层水膜, 侵染完成后, 将植株避光培养 24 h, 于正常光照环境中继续培养。一周后进行二次侵染, 无需去除果荚。

表 1 侵染缓冲液
Table 1 Infection buffer

试剂 Reagent	浓度 Concentration
Sucrose	50 g \cdot L $^{-1}$
VB5	0.5 mg \cdot L $^{-1}$
MES	0.5 g \cdot L $^{-1}$
SilwetL-77	300 μ L \cdot L $^{-1}$

表 2 GUS 染色缓冲液
Table 2 GUS of staining buffer

试剂 Reagent	浓度/ μ L Concentration
X-Glu	20
磷酸钠缓冲液 (PBS)	500
10% Triton-X100	20
20 mmol \cdot L $^{-1}$ Ferri-铁氰化钾	100
20 mmol \cdot L $^{-1}$ Ferro-亚铁氰化钾	100

注: 总体积 1 mL。Note: 1 mL in total.

1.2.3 GUS 染色 将筛选获得的 *ProMNBI:GUS* 纯合体植株种子点在含 50 mg \cdot L $^{-1}$ kan 的 1/2 MS 平板上, 春化 3 d 后置于恒温光照培养箱培养 2 周, 取出幼苗, 进行胁迫处理后, 利用 GUS 染色液将幼苗置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 6 h 观察染色, 后用 75% 的乙醇进行 24 h 脱色, GUS 染色缓冲液配方见表 2。

2 结果与分析

2.1 *ProMNBI:GUS* 表达载体的构建

2.1.1 目的片段克隆 提取野生型植株基因组 DNA, 利用已设计好的引物进行目的片段克隆。克隆结果如图 1 所示, M 代表 Marker, 1 代表目的片段, 条带大小约 2 000 bp, 与所选取的启动子区域长度基本一致。

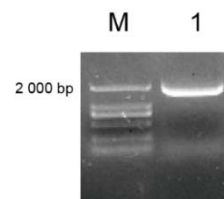


图 1 *proMNBI* 基因全长扩增

Figure 1 The amplified full-length of *proMNBI* gene

2.1.2 重组载体的连接与转化 通过限制性内切酶 *Kpn I/Xho I* 分别对克隆的目的片段和 *GUS* 空载进行双酶切, 电泳结果如图 2 所示。其中, M1 代表 2 kb Marker, 1 代表酶切后的目的片段, M2 代表 10 kb Marker, 2 代表酶切后的载体。

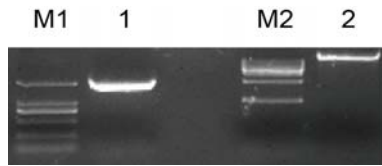


图 2 酶切后的目的片段与载体

Figure 2 The target fragment and vector after digestion

通过 T4-DNA Ligase 连接纯化后的目的片段和载体, 转化到大肠杆菌, 从抗性平板上挑取单菌落进行菌落 PCR。鉴定结果 (图 3) 显示, 随机选取的 12 个菌落中, 1、4、5、7、8、9、11 和 12 号显示出明亮条带, 选取 1 号和 4 号进行测序。测序结果表明, 克隆获得的序列正是拟南芥 *MNBI* 启动子的目标片段。

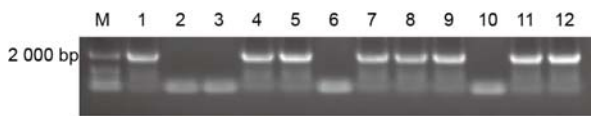


图 3 大肠杆菌阳性克隆鉴定结果

Figure 3 *E. coli* positive clone identification results

2.2 *ProMNBI:GUS* 表达载体转化农杆菌及侵染

将测序成功的质粒通过电击法转化至农杆菌, 从抗性平板上挑取单菌落进行菌落 PCR。鉴定结果 (图 4) 表明, 随机选取的 12 个菌落中, 1、3、4、5、6、7、8、9、11 和 12 号显示出明亮条带, 对比 Marker (M), 可确定这些菌落为重组阳性单菌落。选取阳性单菌落, 通过浸花法侵染至野生型植株中。

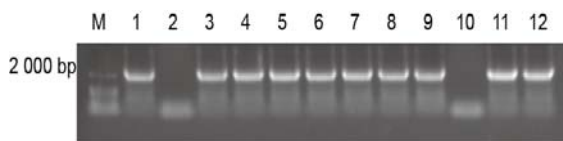


图 4 农杆菌阳性克隆鉴定结果

Figure 4 *Agrobacterium* positive clone identification results

2.3 *ProMNBI:GUS* 阳性植株的筛选鉴定

将侵染后的野生型植株所收的种子点在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kan 的 1/2 MS 平板上, 春化 3 d 后置于恒温光照培养箱培养 2 周, 筛选结果如图 5 所示。

将能够正常生长的植株幼苗移栽至土壤培养, 约 20 d 后提取 DNA, 进行 PCR 鉴定。将鉴定正确

的阳性植株继续于土壤培养至收取种子, 收取的种子分株土壤培养, 作为第二代, 通过 PCR 鉴定阳性植株, 并对其进行单株收种, 选取 25~30 颗种子, 点在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kan 的 1/2 MS 平板上, 培养 2 周。结果 (图 6) 显示, 第二代阳性植株除 3 号外, 1、2 和 4 号均存在不能正常生长的幼苗, 因此, 3 号阳性植株可能为纯合体, 之后通过逐代繁殖进行进一步确定。



图 5 *ProMNBI:GUS* 阳性植株的抗性筛选

Figure 5 Screening for resistance to *ProMNBI:GUS* positive plants

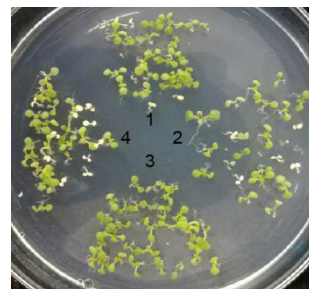


图 6 *ProMNBI:GUS* 阳性植株的纯合体筛选

Figure 6 Screening of homozygotes for *ProMNBI:GUS* positive plants

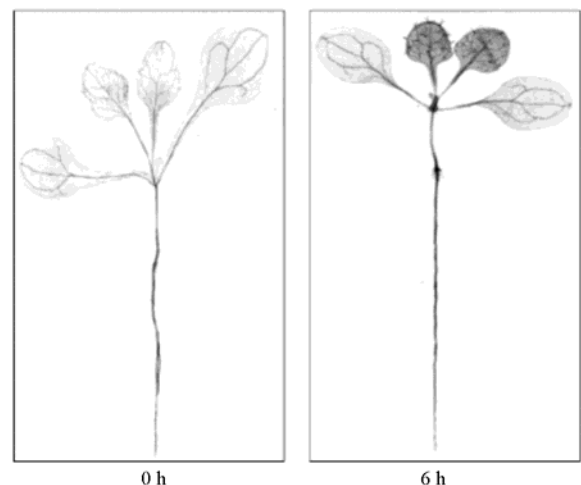


图 7 *ProMNBI:GUS* 植株的 GUS 染色

Figure 7 GUS staining of *ProMNBI:GUS* lines

2.4 在镉诱导下 *MNBI* 基因的表达模式

为探究 *MNBI* 基因对镉胁迫的响应, 将筛选获

得的疑为纯合体的3号 *ProMNBI:GUS* 植株种子点在含 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kan 的 1/2 MS 平板上, 春化 3 d 后置于恒温光照培养箱培养 2 周, 取出幼苗, 将幼苗放置于含有 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液中分别诱导处理 0 h 和 6 h, 处理后幼苗进行 GUS 染色, 结果如图 7 所示。通过对幼苗的根和叶的观察, 发现 6 h 镉诱导处理下的蓝色明显要比不做处理的 0 h 的蓝色要深, 表明 6 h 镉处理条件下 GUS 活性显著高于不做处理 0 h 的 GUS 活性, 这一结果进一步验证了 *MNBI* 基因对镉胁迫的响应, 这将为 *MNBI* 基因对镉胁迫响应的研究提供了有力的科学依据。

3 讨论与结论

本试验中, 以野生型拟南芥为试验材料, 通过构建 *ProMNBI:GUS* 表达载体, 利用浸花法成功将 *ProMNBI:GUS* 表达载体侵染至野生型拟南芥植株中, 最终获得 *ProMNBI:GUS* 阳性植株材料。

GUS 表达载体是一种常用的分析基因表达的载体。GUS 表达载体中的报告基因 GUS(葡萄糖苷酸酶)是从大肠杆菌中克隆的, 由于在几乎所有的高等植物尤其是常用于实验的拟南芥和烟草中都仅有很少甚至几乎没有 GUS 活性, GUS 作为一种基因融合标记被广泛地应用在基因表达调控等分子遗传学研究中^[10]。GUS 的存在十分稳定, 在环境条件变化较大的情况下仍然具有活性, 在长期储存的组织提取物中也表现出高水平的活性。GUS 可以通过催化合适的底物来产生肉眼可见显色的产物或者可用于荧光分析的产物, 借此了解植物根茎叶等组织中的 GUS 表达情况^[11]。

本试验中, *ProMNBI:GUS* 植株在 6 h 镉处理条件下 GUS 活性明显增强, 表明 *MNBI* 基因的表达与镉胁迫的响应有关。因此在后续对 *MNBI* 在重金属镉胁迫下分子响应机制的研究中, 通过 *ProMNBI:GUS* 阳性植株材料可以研究 *MNBI* 在植

物体内各组织的表达情况和不同胁迫条件下的诱导表达。同时, 对于研究调控 *MNBI* 表达的作用元件, 建立完整的胁迫响应信号通路有重要作用。

参考文献:

- [1] ATKINSON N J, URWIN P E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(10): 3523-3543.
- [2] CUSHMAN J C, BOHNERT H J. Genomic approaches to plant stress tolerance[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(2): 117-124.
- [3] XIE L P, HAO P F, CHENG Y, et al. Effect of combined application of lead, cadmium, chromium and copper on grain, leaf and stem heavy metal contents at different growth stages in rice[J]. *Ecotoxicol Environ Safe*, 2018, 162: 71-76.
- [4] YADAV S K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants[J]. *S Afr N J Bot*, 2010, 76(2): 167-179.
- [5] LIN Y F, AARTS M G M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(19): 3187-3206.
- [6] 时萌, 王芙蓉, 王棚涛. 植物响应重金属镉胁迫的耐性机理研究进展[J]. *生命科学*, 2016, 28(4): 504-512.
- [7] 鲍锦库. 植物凝集素的功能[J]. *生命科学*, 2011, 23(6): 533-540.
- [8] VAN DAMME E J M, LANNOO N, PEUMANS W J. Plant lectins[M]//Advances in botanical research. Elsevier, 2008: 107-209.
- [9] CHEN J, YANG L B, GU J, et al. MAN3 gene regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytol*, 2015, 205(2): 570-582.
- [10] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [11] 韦莉莉, 樊妙姬, 陈丽梅. GUS 基因概述[J]. *基因组学与应用生物学*, 1998, 17(3): 299-301.