

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.10.013

CTM2-GFP 转基因拟南芥构建及细胞定位研究

李亚平, 曹蕾, 郑朋朋, 樊婷婷

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:通过筛选突变体库发现的镉耐受突变体植株可能参与了植物 Cd 胁迫的调控。文章通过同源重组方法构建 *pART27-CTM2-GFP* 载体, 并将 *pART27-CTM2-GFP* 重组质粒转入农杆菌 GV3101, 采用浸花转染法转入野生型拟南芥植株; 通过抗性筛选和聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 鉴定获得 *CTM2-GFP* 转基因阳性植株, 进行抗性分离鉴定获得纯合转基因植株; 最后通过 qPCR 检测 *CTM2* 基因表达, 筛选最佳的 *CTM2-GFP* 转基因株系; 通过观察 *CTM2-GFP* 转基因植株中绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的荧光发现 *CTM2* 为细胞膜定位蛋白。研究结果为深入研究 *CTM2* 基因在调控植物镉耐受分子机制中的作用提供了遗传材料支撑。

关键词:拟南芥; *CTM2* 基因; 植物表达载体; 转基因植株; 镉耐受

中图分类号: Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2024)10-1377-05

Construction and cellular localization of *CTM2-GFP* transgenic *Arabidopsis thaliana*

LI Yaping, CAO Lei, ZHENG Pengpeng, FAN Tingting

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The mutant plants with cadmium (Cd) tolerance obtained by screening the mutant library may be involved in the regulation of plant Cd stress tolerance. In this paper, *pART27-CTM2-GFP* vector was constructed by homologous recombination method, and the recombinant plasmid of *pART27-CTM2-GFP* was transferred into *Agrobacterium* GV3101 and then into the wild-type *Arabidopsis* plant by floral dip transformation. *CTM2-GFP* transgenic positive plants were obtained through resistance screening and polymerase chain reaction (PCR) identification, and homozygous transgenic plants were obtained through resistance isolation and identification. Finally, *CTM2* gene expression was detected by qPCR to screen the best *CTM2-GFP* transgenic lines. In addition, by observing the green fluorescent protein (GFP) fluorescence in *CTM2-GFP* transgenic plants, it was found that *CTM2* was a cell membrane localization protein. The results provide genetic material support for the in-depth study of the role of *CTM2* gene in regulating the molecular mechanism of plant Cd tolerance.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *CTM2* gene; plant expression vector; transgenic plant; cadmium tolerance

镉 (Cd) 主要来源于自然风化、采矿、铸造和冶炼、污水灌溉、石油燃烧、垃圾填满、车辆排放等

人类活动, 会造成重金属镉污染, 其中农用化学品是造成镉污染的主要人为原因^[1-2]。Cd 是一种对

收稿日期: 2022-04-11; 修回日期: 2022-04-22

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (1508085QC50)

作者简介: 李亚平 (1996—), 女, 山东高青人, 合肥工业大学硕士生;

樊婷婷 (1984—), 女, 内蒙古包头人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: fantting@hfut.edu.cn.

人体毒性极强的非必需元素,多种来源的镉被排放进入土壤并通过食物链进行富集,在微量情况下会引起人体的不良反应^[3-4]。土壤、水以及农作物带来大量的镉污染最终会对人类健康造成威胁^[5-6]。

Cd 主要通过植物根系进入植物,并以不同的比例和浓度在植物体内分布和积累,从而对农作物产量造成影响,使农产品质量恶化^[7]。Cd 最终通过食物链对人类和动物健康构成严重威胁^[8]。土壤重金属镉治理刻不容缓,物理修复和化学修复因成本昂贵、操作复杂、推广范围小且很容易造成二次污染等缺点在很大程度上限制了它们自身在土壤重金属镉污染修复中的开发与应用^[9]。生物修复是目前研究范围最广、最有发展前景的科学学科。植物基因修复工程技术是有效解决土壤重金属污染的途径之一,可从源头上控制农产品食品安全,而植物基因修复技术获得成功的关键在于鉴定植物 Cd 耐受基因,文献^[10]阐明了其作用机理。

前期研究表明 *CTM2* 基因参与调控植物镉耐受,为进一步研究该基因在植物镉耐受中的功能,通过构建 *pART27-CTM2-GFP* 表达载体获得转基因材料,通过检测 *CTM2* 基因表达水平筛选出 2 个最佳的 *CTM2-GFP* 转基因株系,通过亚细胞定位观察 *CTM2* 蛋白位置,为后续 *CTM2* 基因参与调控植物镉耐受提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

植物材料为哥伦比亚(Columbia, Col) 遗传背景的野生型(Col-0)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),购于美国拟南芥种质资源中心,由合肥工业大学植物分子生物学实验室繁殖获得。

1.1.2 载体与菌株

载体所用菌株为大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、载体 pART27-GFP(本实验室贮藏)。

1.1.3 主要试剂

Plasmid mini prep Kit (TIANGEN); Hi Script RT Super Mix for qPCR(Vazyme); Prime STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa), 限制性内切酶 *Kpn* I (NEB); Easy Taq DNA Polymerase(TransGen);同源重组酶(诺唯赞公司);DNA loading buffer, Silwet-77 均购于索莱宝公司;琼脂(货号 A100637)、氯化钠(货号 A501218)、氯仿

(货号 A506401)、异丙醇(货号 A507048)、无水乙醇(货号 A500737)、蛋白胨(货号 A505247)、酵母粉(货号 A604250)、蔗糖(货号 A100335)、壮观霉素(货号 A600901)、庆大霉素(货号 A506614)、卡那霉素(货号 A100408),均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 拟南芥无菌苗培养

配置 1/2MS 固体培养基,进行高压灭菌,使用 0.1%氯化汞对种子杀菌消毒,将种子均匀点在 1/2MS 固体培养基中。4 °C 冰箱春化 3 d,在恒温(22 °C 左右)培养室中光照培养,定期观察拟南芥生长情况。

1.2.2 拟南芥 DNA 提取

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取拟南芥全基因组 DNA,取适量拟南芥样品,研磨破碎,加入 650 μ L 预热的 CTAB,65 °C 水浴 45 min。加入 650 μ L 酚氯仿剧烈混匀,离心取上清,加入 900 μ L 无水乙醇,上下颠倒混匀,-20 °C 沉淀 2 h。离心,弃上清后加入 75%乙醇,离心,弃上清,除尽乙醇。加入 40 μ L 无菌水溶解 DNA,获得 DNA 溶液。

1.2.3 *CTM2* 基因克隆与鉴定

利用 Oligo 7.0 软件设计以下引物进行 *CTM2* 基因的克隆,均以 cDNA 为模板。

上游引物 FP 序列为:

5'-CTCGTAGCGTCCCGGGGCATGCAGAGCAGCTTCAAAC CGTTCCTTTC-3';

下游引物 RP 序列为:

5'-GTCCATTTGTTGGATCCCGTCTCTAGGTCTGGCTAACCATAGAGAGC-3';

鉴定引物 35S 序列为:

TTCGCAAGACCTTCCTCTA。

1.2.4 大肠杆菌转化

从-80 °C 冰箱取出大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,迅速置于冰上解冻;取 5 μ L 连接产物加入感受态细胞中,轻柔吹打混匀后,冰浴 30 min;42 °C 热激 90 s,迅速置于冰上 2 min;加入 750 μ L LB 液体培养基中,于 37 °C 摇床中培养 1 h,将菌液涂布于含有壮观霉素抗性的平板上,在 37 °C 培养箱中培养过夜。

1.2.5 农杆菌转化

从-80 °C 冰箱取出农杆菌 GV3101 感受态细胞,迅速置于冰上解冻;解冻后,取 5 μ L 质粒加入感受态细胞中,轻柔吹打混匀后,加入预冷电击

杯中,调节电脉冲、电压和电阻数值,迅速将电击后感受态细胞加入 750 μL 无菌无抗性 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 4 h,涂布于含有庆大霉素和壮观霉素的平板上,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 2 d。

1.2.6 浸花法转基因

将载体的阳性农杆菌接种于含庆大霉素和壮观霉素的抗性 LB 培养液中,震荡培养置于配制好的浸染缓冲液中,加入一定量的 SilwetL77 混匀,进行花序浸染。浸染完成后黑暗处理 24 h。隔 7 d,再次进行浸染。

1.2.7 转基因阳性植株鉴定

将侵染完成的拟南芥种子置于含有卡那霉素的 1/2MS 固体培养基中进行抗性筛选,长出的具有根且子叶颜色嫩绿的幼苗,即为转基因阳性植株。后续进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)鉴定。

1.2.8 拟南芥 RNA 提取

采用 Trizol 法提取拟南芥总 RNA,取 0.1 g 拟南芥样品,使用无菌研钵研磨破碎,加入 1.0 mL Trizol,室温放置 10 min,使其充分裂解;加入氯仿 200 μL ,剧烈震动 15 s,震荡混匀后室温放置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 15 min;吸取水相层,加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温下放置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清;加入 1 mL 75% 焦碳酸二乙酯(DEPC)温和震荡,8 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,弃上清;除尽乙醇,用 30 μL DEPC 水溶解沉淀,获得 RNA 溶液。

1.2.9 拟南芥 RNA 反转录

在冰上依次加入 RNA 1 μL 、4 \times g DNA wiper Mix 4 μL 、RNase-free water 11 mL 至体积为 16 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min。加入 5 \times HiScript qRT Super Mix 5 μL ,吹打混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 2 min,反转录完成。

1.2.10 数据统计与处理

数据采用 t 检验进行处理,使用 SPSS 13.0 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *pART27-CTM2-GFP* 载体构建

为验证 *CTM2* 基因在拟南芥镉耐受机理中的作用,构建 *pART27-CTM2-GFP* 载体。以拟南芥 cDNA 为模板,通过 PCR 技术扩增 *CTM2* 基因编码序列(coding sequence, CDS),*EcoR* I

酶切 *pART27-GFP* 质粒,采用同源重组的方法将其连接到 *pART27-GFP* 质粒上,从而获得了 *pART27-CTM2-GFP*,如图 1 所示,图 1 中:M 代表 Marker;1~8 代表样品号。从图 1a 可以看出,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 所得片段大小为 1 749 bp,与基因 *CTM2* 的 CDS 长度一致,质粒条带大小一致。采用热激法对连接产物进行大肠杆菌转化,大转化后挑取单菌落进行 PCR 鉴定,由图 1b 可知,菌落 PCR 条带与 *CTM2* 基因条带大小一致,说明该条带可能为阳性克隆。选取 1 号菌液进行测序鉴定,获得了阳性载体 *pART27-CTM2-GFP*。

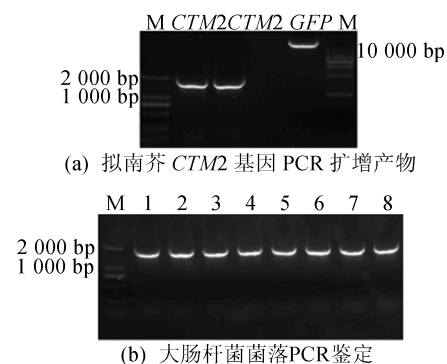


图 1 *pART27-CTM2-GFP* 载体的构建

2.2 农杆菌转化及浸花转染

将测序正确的 *pART27-CTM2-GFP* 载体通过电击法转入农杆菌 GV3101,在含有庆大霉素和壮观霉素抗生素的培养基上培养,挑取单菌落进行 PCR 验证,结果如图 2 所示,图 2 中:M 代表 Marker;1~6 代表样品号。由图 2 可知,所选单克隆菌株均为携带 *pART27-CTM2-GFP* 载体的阳性单菌落,说明农杆菌转化成功。

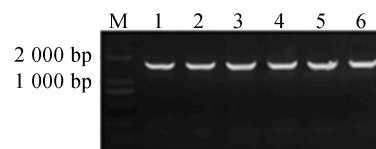


图 2 农杆菌菌落 PCR 鉴定

2.3 *CTM2-GFP* 转基因阳性植株的抗性筛选

为获得 *CTM2-GFP* 转基因植株,通过农杆菌介导的浸花转染法将携带的 *pART27-CTM2-GFP* 载体转化进 WT 植株,待种子成熟收种。对转染后的种子进行 Kana 抗性筛选,筛选获得了生长正常的 *CTM2-GFP* 转基因植株,如图 3a 所示;将生长良好的 *CTM2-GFP* 转基因植株转移到土培培养

基中生长,并进行 PCR 鉴定,成功扩增出 *pART27-CTM2-GFP* 片段,如图 3b 所示。图 3b 中:M 代表 Marker;1~5 代表样品号。结果表明,成功构建了阳性 *CTM2-GFP* 转基因植株。

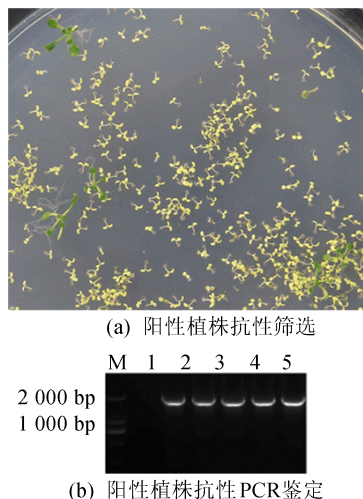


图 3 *CTM2-GFP* 转基因阳性植株筛选

2.4 *CTM2-GFP* 转基因植株的抗性分离

为获得转基因株系纯合体,在加添 Kana 抗性的 1/2MS 培养基上进行 *CTM2-GFP* 转基因材料的抗性分离比实验,判断 *CTM2-GFP* 转基因植株是否为纯合体,抗性分离比实验结果如图 4 所示。由图 4 可知,通过构建 *pART27-CTM2-GFP* 载体、浸花转染、抗性筛选,PCR 鉴定及抗性分离最终获得了纯合体 *CTM2-OE* 转基因植株。

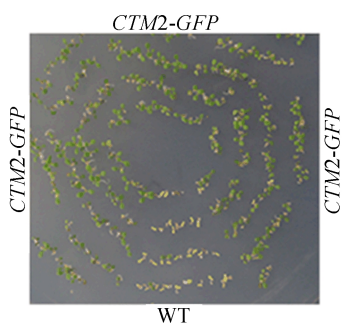


图 4 *CTM2-GFP* 转基因植株抗性分离

2.5 *CTM2* 基因表达水平检测

为了获得最佳的 *CTM2-GFP* 转基因株系,采用 qPCR 检测了 *CTM2-GFP* 转基因纯合体植株中的 *CTM2* 基因的转录水平,结果如图 5 所示,图 5 中横坐标上的 1~8 表示 *CTM2-GFP* 转基因植株的株系号。

由图 5 可知,与 WT 相比,转基因植株中

CTM2 基因表达水平明显升高,其中 *CTM2-GFP6* 和 *CTM2-GFP8* 转基因植株中 *CTM2* 基因的表达水平最高,表达水平比 WT 约高 20 倍,因此,将 *CTM2-OE6* 和 *CTM2-OE8* 转基因植株作为过表达转基因株系的代表进行后续实验。

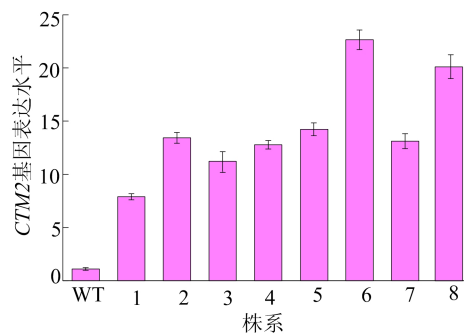


图 5 *CTM2-GFP* 转基因植株中 *CTM2* 基因表达水平

2.6 *CTM2-GFP* 转基因株系荧光的观察

为了进一步验证 *CTM2-GFP* 表达部位,对 *CTM2-GFP* 转基因植株的 6 号和 8 号株系植株中 *CTM2-GFP* 融合蛋白的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光进行观察,发现 *CTM2* 位于细胞膜上,如图 6 所示。

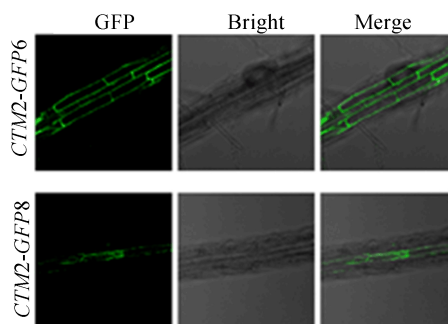


图 6 *CTM2-GFP* 转基因植株中 GFP 荧光分析

3 结 论

镉对人类健康具有极大的危害,阐明植物镉耐受和解毒的分子机制对今后利用基因工程技术解决土壤镉污染具有重要的意义^[10]。前期研究结果显示 *CTM2* 基因可能参与拟南芥镉耐受的调控。因此,本文通过分子生物学技术构建了 *pART27-CTM2-GFP* 重组载体,通过抗性分离和基因表达检测,获得了纯合的 *CTM2-GFP* 转基因植株,并通过亚细胞定位观察发现 *CTM2* 为细胞膜定位蛋白。

(下转第 1411 页)

- [3] 李立峰,吴文朋,胡思聪,等. 考虑氯离子侵蚀的高墩桥梁时变地震易损性分析[J]. 工程力学,2016,33(1):163-170.
- [4] RAHMAN H S,ALIREZA-KREZA G. Application of artificial neural network kriging and inverse distance weighting models for estimation of scour depth around bridge pier with bed sill[J]. Journal of Software Engineering and Applications,2010,3(10):944-964.
- [5] ROY R,HINDUJA S,TETI R. Recent advances in engineering design optimization: challenges and future trends [J]. CIRP Annals-Manufacturing Technology,2008,57(2):697-715.
- [6] 谢延敏. 基于 Kriging 模型和灰色关联分析的板料成形工艺稳健优化设计研究[D]. 上海:上海交通大学,2007.
- [7] 袁万城,王建国,庞于涛,等. 基于 Kriging 模型的桥梁结构易损性分析[J]. 哈尔滨工程大学学报,2016,37(11):1504-1509.
- [8] 李超,李宏男. 考虑氯离子腐蚀作用的近海桥梁结构全寿命抗震性能评价[J]. 振动与冲击,2014,33(11):70-77.
- [9] DURA C. Statistical quantification of the variables in the limit state functions[R]. Britain; The European Union-Brite EuRam3,2000.
- [10] 胡思聪,王连华,李立峰,等. 非一致氯离子侵蚀下近海桥梁时变地震易损性研究[J]. 土木工程学报,2019,52(4):62-71,97.
- [11] DU Y G,CLARK LA,CHAN A H C. Residual capacity of corroded reinforcing bars [J]. Magazine of Concrete Research,2005,57(3):135-147.
- [12] VU K A T,STEWART M G. Structural reliability of concrete bridges including improved chloride-induced corrosion models[J]. Structural Safety,2000,22(4):313-333.
- [13] 王浩杰. 高墩大跨连续刚构桥全寿命周期地震易损性研究[D]. 兰州:兰州交通大学,2021.
- [14] PANG Y,WU X,SHEN G, et al. Seismic fragility analysis of cable-stayed bridges considering different sources of uncertainties[J]. Journal of Bridge Engineering,2014,19(4):111-122.
- [15] 吴文朋. 考虑不确定性的钢筋混凝土桥梁地震易损性研究[D]. 长沙:湖南大学,2016.
- [16] HWANG H,LIU J B,CHUI Y H. Seismic fragility analysis of highway bridges[R]. Memphis; Center for Earthquake Research and Information The University of Memphis,2001.
- [17] 国家铁路局. 铁路桥梁钢支座:TB/T 1853—2018[S]. 北京:中国铁路经济规划研究院有限公司,2018:1-23.
- [18] CORNELL C A,JALAYER F,HAMBURGER R, et al. Probabilistic basis for 2000s AC federal emergency management agency steel moment frame guidelines[J]. Journal of Structural Engineering,2002,128(4):526-533.
- [19] NIELSON B,DESROCHER R. Seismic fragility methodology for highway bridges using a component level approach [J]. Earthquake Engineering & Structural Dynamics,2007,36(6):823-839.

(责任编辑 吴亮)

(上接第 1380 页)

[参 考 文 献]

- [1] KUBIER A,WILKINR T,PICHLER T. Cadmium in soils and groundwater; a review [J]. Applied Geochemistry,2019,108:104388.
- [2] BURGER J. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium [J]. Science of The Total Environment,2008,389(1):37-45.
- [3] GODT J,SCHEIDIG F,GROSSE-SIESTRUP C, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health [J]. Journal of Occupational Medicine and Toxicology,2006,1:22.
- [4] BERNARD A. Cadmium and its adverse effects on human health [J]. Indian Journal of Medical Research,2008,128(4):557.
- [5] NAWAB J,KHAN S,AAMIR M, et al. Organic amendments impact the availability of heavy metal (loid) s in mine-impacted soil and their phytoremediation by *Penisium americanum* and *Sorghum bicolor* [J]. Environmental Science and Pollution Research,2016,23(3):2381-2390.
- [6] BURKE M P,HOGUE T S,KINOSHITA A M, et al. Pre- and post-fire pollutant loads in an urban fringe watershed in Southern California[J]. Environmental Monitoring and Assessment,2013,185(12):10131-10145.
- [7] NAN Z,LI J,ZHANG J, et al. Cadmium and zinc interactions and their transfer in soil-crop system under actual field conditions[J]. Science of The Total Environment,2002,285(1/2/3):187-195.
- [8] LI Z Y,MA Z W,VAN DER KUIJP T J, et al. A review of soil heavy metal pollution from mines in China; pollution and health risk assessment[J]. Science of The Total Environment,2014,468/469:843-853.
- [9] AZUBUIKE C C,CHIKERE C B,OKPOKWASILI G C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2016,32(11):1-18.
- [10] ALI H,KHAN E,SAJAD M A. Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications [J]. Chemosphere,2013,91(7):869-881.

(责任编辑 闫杏丽)