

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.10.012

拟南芥 *NHX4* 基因 pXB94 载体的 构建及转基因植株的筛选

王彤, 樊婷婷, 曹君璇

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:土壤盐碱化是制约农作物产量的重要因素,高盐环境对作物生长发育有抑制作用,因此研究响应盐胁迫的基因调控机制具有重要意义。鉴于液泡膜转运蛋白 *NHX4* 可通过储存 Na^+ 增强植物耐盐性和转录因子 *MYBX* 可能在分子水平正向调控 *NHX4* 的表达,为了验证 *MYBX* 与 *NHX4* 之间的调控关系,文章构建 *NHX4* 基因的过表达载体,采用电击法将重组质粒导入农杆菌;利用浸花法将含重组质粒的农杆菌侵染拟南芥突变体 *myba-1*,经抗性筛选获得阳性植株,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定筛选出纯合的转基因植株 *myba-1/35S::NHX4*,为后续验证 *MYBX* 与 *NHX4* 的关系提供实验材料。该研究为进一步明确 *MYBX* 与 *NHX4* 的分子互作机制奠定了基础。

关键词:拟南芥; *NHX4* 基因; 载体构建; 转基因植株; 盐胁迫

中图分类号: Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)10-1378-05

Construction of pXB94 vector of *Arabidopsis thaliana* *NHX4* gene and identification of transgenic plants

WANG Tong, FAN Tingting, CAO Junxuan

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

Abstract: Soil salinization is a crucial factor restricting crop yields. To alleviate the inhibitory effect of high-salt environments on crop growth and development, clarifying the gene regulatory mechanisms in response to salt stress is of great significance for agricultural production. Given that the vacuolar membrane transporter *NHX4* can enhance plant salt tolerance by storing Na^+ , and the transcription factor *MYBX* may positively regulate the expression of *NHX4* at the molecular level, this study aims to further verify the regulatory relationship between *MYBX* and *NHX4*. The laboratory constructed an overexpression vector of the *NHX4* and introduced the recombinant plasmid into *Agrobacterium* using electroporation. Subsequently, *Agrobacterium* containing the recombinant plasmid was used to infect the *Arabidopsis thaliana* mutant *myba-1* via the floral dip method. Positive plants were obtained through resistance screening, and homozygous transgenic plants *myba-1/35S::NHX4* were further screened out by polymerase chain reaction(PCR) identification, providing experimental materials for subsequent verification of the relationship between *MYBX* and *NHX4*. This study establishes a foundation for further clarifying the molecular interaction mechanism between *MYBX* and *NHX4*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *NHX4* gene; vector construction; transgenic plants; salt stress

收稿日期: 2023-06-07; 修回日期: 2023-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31872803); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JZ2018HGTD0248)

作者简介: 王彤(1998—), 女, 河北保定人, 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.

0 引 言

土壤盐碱化是农作物产量降低的主要因素之一,盐碱化土地面积的不断增加,使农作物减产问题日益严重^[1]。高盐胁迫会造成离子毒害,导致植物光合作用的降低,使植物的生长受到阻碍、代谢紊乱,甚至会导致植物的死亡^[2]。转录因子存在于所有生物中,并参与众多生命过程,在环境应答中也扮演着重要的角色。因此,找到响应盐胁迫的关键转录因子及其下游相关基因十分重要^[3]。利用转基因技术提升植物的抗盐能力是解决土壤盐碱化导致的农作物减产问题的优选方法^[4]。

离子稳态和 pH 值调节是植物生长发育以及对环境胁迫响应所必需的基本细胞过程^[5]。 Na^+/H^+ 反向转运蛋白(NHXs)是定位于质膜和内膜区室的整合膜蛋白,可促进 Na^+ 或 K^+ 与 H^+ 的电中性交换,从而维持细胞内 pH 值和阳离子稳态^[6]。但是关于 *NHX4* 在耐盐途径中的上游调控机制仍在探索之中。*MYB* 作为植物体内数量最多、功能最为多样化的转录因子家族之一,在胁迫方面也有着非常重要的作用,例如,苹果中的过表达 *OSMYB4* 基因可以提高苹果对寒冷的耐受性^[7]。但是对于 *MYB* 转录因子在响应盐胁迫中的功能尚不清楚,因此需要进一步的探究。目前已知 *MYBX* 是一个响应盐胁迫的关键转录因子,通过表型实验发现,其功能缺失突变体对于 150 mmol/L 的 NaCl 高度敏感。研究发现,基因 *NHX4* 在突变体 *myba-1* 中的表达量显著降低,在过表达植株中明显升高。因此,本文基于 *MYBX* 正向调控 *NHX4* 基因的表达以及基因上、下游的关系,构建 *NHX4* 的过表达载体,通过侵花浸染法获得 35S:*NHX4* 菌株,成功侵染 *myba-1* 突变体,从而得到 *myba-1/35S:NHX4* 转基因植株。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

1.1.1 材料

模式生物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Col-0 和突变体 *myba-1* 均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所得。宿主和载体有质粒 pXB94-GFP、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101。

1.1.2 主要试剂

主要试剂盒和酶有:Trizol(RNA 提取试剂)、PrimeSTAR 酶(高保真 DNA 聚合酶)、反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit50-preps、OMEGA 琼脂糖胶回收试剂盒 Cycle-PureKit(北京安诺伦生物科技有限公司);DNA-supermix DNA 聚合酶(生工牌)、限制性核酸内切酶 *Kpn* I (NEB # R3142V)、*Xho* I (NEB # R0146V)、T4 连接酶(NEB # M0202S);合成引物(Oligo 软件设计)由生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 拟南芥无菌苗的培养

从 4 °C 冰箱中取出 MS(Murashige and Skoogmedium)培养基,以 150 mL 培养基为例。称取 0.65 g MS 培养基,2.25 g 蔗糖,1.8 g 琼脂粉。加入 150 mL 去离子水,调 pH 值至 5.8;高温灭菌 20 min (121 °C, 101 kPa)后平均分装在培养皿中使其凝固,并吹干其表面水分使种子更好附着在培养基上;用 0.1% 氯化汞将种子洗 1 遍,用灭菌的去离子水冲洗 3 遍,在滤纸上将种子晾干后均匀点在培养基上;在 4 °C 冰箱中春化 2 d 后放置在光照培养箱中,竖直培养 14 d。

1.2.2 拟南芥 RNA 的提取及反转录

将洗净的研钵烘干后用锡箔纸包裹放置于 180 °C 烘箱中 3~6 h,再冻于 -20 °C 冰柜中备用。将氯仿、异丙醇、无水乙醇提前 1 d 放于冰柜中预冷。由于 RNA 极易污染降解,实验台上铺保鲜膜并用 75%乙醇进行消毒。将无菌苗置于预冷研钵中加入液氮磨成粉末后,再加入 1 mL Trizol 继续研磨,直至研磨液变得透亮,转移至 1.5 mL 的 EP 管中冰上静置 5 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min;吸取上清液转移至新的 1.5 mL 的 EP 管中,再加入 200 μL 氯仿,震荡 15 s 后再静置 5 min,12 000 r/min 离心 5 min;取上清至新的 1.5 mL EP 管中,缓慢加入 500 μL 异丙醇,轻柔震荡混匀后冰上静置 15 min,12 000 r/min 离心 15 min 后弃上清,再次缓慢加入 1 mL 75%的乙醇,4 °C、8 000 r/min 离心 5 min;弃上清后得到的沉淀即为提取的 RNA。

放入通风橱中使酒精充分挥发后加入 50 μL DEPC 水,置于 65 °C 水浴锅中加热 10 min,期间轻柔吹打使沉淀充分溶解。测定提取的 RNA 质量浓度和纯度后调整 RNA 的加样量使样品质量

浓度保持一致。使用 Thermo Scientific 公司提供的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒将提取的 RNA 反转合成 cDNA。

1.2.3 DNA 的提取

采取拟南芥幼苗叶片, 装于 1.5 mL EP 管中, 加入玻璃珠, 液氮速冻后摇晃进行叶片粉碎。加入 400 μL SDS DNA 提取液, 离心 10 min (12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取 200 μL 上清液于另一新 1.5 mL EP 管中, 再加入 200 μL 异丙醇, 离心 10 min (12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 弃上清后加入 800 μL 75% 的乙醇, 离心 5 min (12 000 r/min)。最后弃上清, 1.5 mL EP 管倒置, 使酒精挥发, 加入 45 μL 去离子水, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存。

1.2.4 载体的构建

使用 Oligo 引物合成软件设计 NHX4 编码区上、下游的引物。根据载体本身的酶切位点信息及目的基因序列, 选择 *Kpn* I 和 *Xho* I 作为载体构建中的限制性酶切位点。

上游引物为:

5'-CGGGGTACCCTAGTTCTATTGCCCTGTACA-3';

下游引物为:

5'-CGGGGTACCTTCCAAATCTCAGCTTTAAGAGT-3'。

以野生型拟南芥(WT)的 cDNA 为模板进行扩增, 获得 NHX4 的基因片段, 将回收的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物与所提取的质粒一起进行双酶切。将酶切好的基因片段与空载质粒进行琼脂糖凝胶电泳后再回收, 利用 T4-DNA Ligase 连接酶将基因片段与空载质粒进行连接。将连接产物转化进入 DH5 α 感受态细胞中, 获得阳性菌株后进行测序。序列比对成功后再进行重组质粒的提取, 成功构建了相关载体。

1.2.5 大肠杆菌的转化

从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出大肠杆菌感受态, 放置冰上进行自然融解。吸取 5 μL 的连接产物加入到大肠杆菌感受态中, 轻柔吹打混匀, 静置 30 min, 放置在 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中热激 60 s 后快速放于冰上冷激 2 min, 取出后加入 700 μL 无抗性的液体 LB 培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 2 h, 离心去除部分上清液, 将菌体吹打混匀, 均匀涂布在壮观霉素抗性固体培养基上, 平板倒置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 h。将长出的单克隆菌落挑至壮观霉素抗性液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 12 h 后进行 PCR 鉴定, 将阳性菌落进行测序, 最

终得到序列比对正确的含有重组质粒的大肠杆菌。

1.2.6 农杆菌的转化

使用无水乙醇对电击杯冲洗 3 次, 放置烘箱中使无水乙醇蒸发。将电击杯插入冰盒中进行冷却, 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中取出农杆菌感受态, 将 1 μL 质粒加入到农杆菌感受态中, 轻柔吹打混匀后全部吸取到电击杯中。使用电转仪对质粒进行电击转化 2 次, 将 700 μL 无抗液体培养基倒入电击杯, 吹打混匀后全部吸出至新的 1.5 mL EP 管中, 放置在 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 4~6 h。离心去掉部分上清液后将菌体吹打混匀, 均匀涂布在含壮观霉素和庆大霉素抗性的固体培养基上, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 48 h。

1.2.7 转基因拟南芥的获取

提前活化所需的农杆菌, 将过夜培养的菌液取 2 mL 转接至 100 mL 的 LB 中于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中培养 OD 至 1.2~1.6, 然后离心去上清, 用侵染缓冲液重悬菌体沉淀, 最终在 4 mL 菌液中加入 1 μL 表面活性剂 SilwetL-77。剪去需要侵染的拟南芥植株的果夹和白色花朵, 只留下未开花的刚露白的花骨朵, 将花骨朵部分直接浸入菌液中 30 s 左右, 然后取出。处理结束后将整颗拟南芥用保鲜膜包裹住, 避光处理 12 h。1 周后再次进行侵染。

1.2.8 转基因阳性苗的筛选

收集浸花侵染后植株所得的种子, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱进行干燥处理, 随后放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行春化。配制含有 20 mg/mL 潮霉素的 1/2 MS 固体培养基, 配制方法与本文拟南芥无菌苗培养方法中固体培养基配制方法一致。在超净台中将消毒的种子均匀地撒在固体培养基上, 封口放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱春化 2 d, 取出后置于光照培养箱中培养 12 d。筛选出子叶宽大浓绿、根系发达且长度较长的株系进行土培处理, 保鲜膜包裹托盘以营造稳定的培养环境, 无菌苗长出新的子叶后再将保鲜膜揭去, 14 d 后采取叶片提取其 DNA 后进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 目的片段的 PCR 扩增

本实验以无菌苗所提取的 RNA 反转录出的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 得到 NHX4 的启动子片段, 与该序列长度 1 659 bp 一致, 如图 1 所示。因此利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收的

NHX4 基因片段可用于后续的载体构建实验。

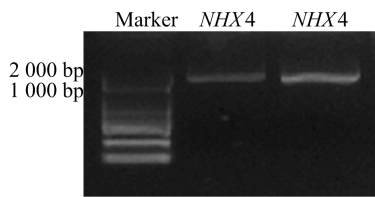


图 1 拟南芥 *NHX4* 基因片段的克隆

2.2 目的片段和质粒双酶切及连接

本文使用 *Kpn* I 和 *Xho* I 2 种限制性内切酶对胶回收后的 *NHX4* 基因片段和 pXB94GFP 质粒进行酶切,使二者具有相同的黏性末端。酶切后的电泳结果如图 2 所示。

使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切产物,利用 T4-DNA Ligase 将酶切后的基因片段和质粒在 16 °C 的金属浴中连接 14 h,得到了连接产物。

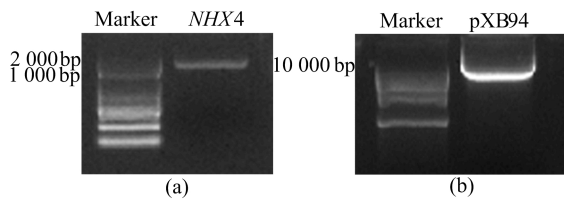


图 2 基因和质粒的双酶切电泳图

2.3 大肠杆菌转化及阳性菌落 PCR 鉴定

连接产物 *NHX4*-GFP 通过热转化法转入 DH5 α 感受态细胞中,将菌液涂布在壮观霉素抗性的固体培养基上,于 37 °C 培养箱中过夜培养后,挑取单克隆菌落在相应抗性液体培养基中进行培养。挑取的单克隆菌落 PCR 鉴定结果如图 3 所示。

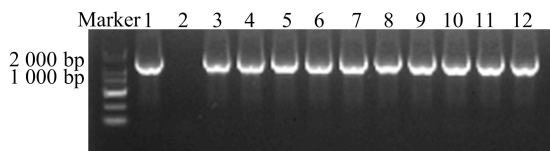


图 3 大肠杆菌菌落 PCR 鉴定结果

图 3 中,除泳道 2 外,其余泳道均为鉴定出的大肠杆菌阳性菌落。从图 3 可以看出,阳性菌落的条带大小与目的基因条带大小基本吻合,经测序比对可知,成功获得了含有目的基因的重组质粒 *NHX4*-GFP。

2.4 农杆菌转化及阳性菌落 PCR 鉴定

将重组质粒通过电转化法转化进入 GV3101 农杆菌感受态细胞中,菌液涂布在壮观和庆大霉素共有的固体培养基上,于 28 °C 培养箱中培养 2 d 后,挑取单克隆菌落于相应抗性液体培养基中进行培养。阳性菌落 PCR 鉴定结果如图 4 所示,图 4 中,泳道 1~泳道 12 为鉴定出的农杆菌阳性菌落。由图 4 可知,条带大小与目的基因条带大小基本一致,说明重组质粒已经成功转化进入农杆菌中,可继续进行突变体植株的侵染实验。

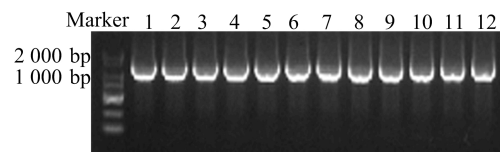


图 4 农杆菌菌落 PCR 鉴定

2.5 转基因阳性植株的筛选和鉴定

将 *NHX4*-GFP 的 GV3101 农杆菌侵染 *myba-1* 突变体收到的种子播撒在含有潮霉素抗性的筛选培养基上。培养 2 周后,未侵染成功的植株无法在含有潮霉素抗性的培养基上生长,表现出黄化甚至不发芽的状态,如图 5 所示。将筛选出的阳性苗移出进行土培培养。

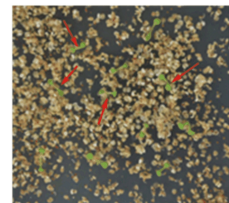


图 5 阳性植株的状态

为进一步确定筛选出的阳性苗是实验所需的 *myba-1/35S::NHX4* 转基因材料,使用载体引物与片段引物 (35S 和 *NHX4* RP) 对其提取的 DNA 进行鉴定,结果如图 6 所示。

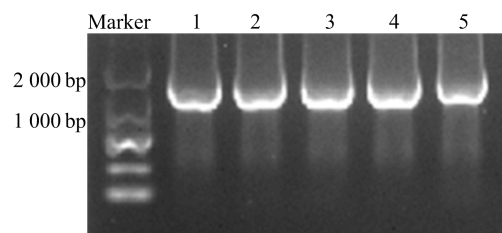


图 6 转基因植株的 PCR 鉴定

图 6 中的条带大小与基因片段条带大小基本

一致,证明转基因材料 *myba-1/35S:NHX4* 构建成功。

2.6 纯合体的筛选

T1 代植株单株收取种子后进行抗性分离比,筛选 T2 代植株,筛选结果如图 7 所示。从图 7 可以看出,共筛选出阳性苗 32 棵,阴性苗 11 棵,符合抗性分离比 3 : 1 的比例,进而推断所得到的阳性苗是实验所需 *myba-1/35S:NHX4* 转基因植株。将阳性苗进行土培培养,收到的种子即为 *myba-1/35S:NHX4* 的 T3 代纯合体植株。

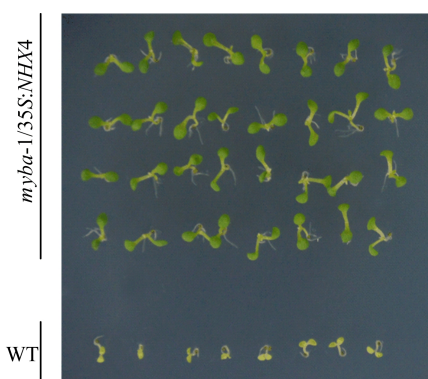


图 7 *myba-1/35S:NHX4* 转基因植株的抗性分离比

3 讨 论

随着世界人口的不断增加,粮食的需求也在不断增加,而人类活动范围的扩大,会使土地盐碱化问题不断加剧^[8]。盐胁迫以及由此引起的次级胁迫会导致植物的生长滞缓,甚至死亡^[9]。我国农作物大多为盐胁迫敏感性植物,而利用基因工程技术培育耐盐性的作物品种是合理开发利用盐渍化土地的根本途径^[10]。为此,深入研究植物的耐盐机制,以期获得高耐盐性的植物资源,从而应对未来的粮食挑战。耐盐相关基因的表达受转录因子的调控,已有研究证明 MYB 转录家族响应盐胁迫,在大米、番茄、甘蓝菜等植物中,MYB 类转录因子直接或间接参与耐盐信号通路^[11]。鉴于前期研究发现,转录因子 MYBX 响应盐胁迫信号,并且可以正向调控 *NHX4* 基因的表达,从而使植物在高盐环境下耐受,因此构建了重组质粒,使用浸花侵染法转入突变体中,筛选得到转基因植株 *myba-1/35S:NHX4*,从而为研究 MYBX-*NHX4* 信号通路以及植物抗盐途径提供了新思

路。同时,在作物耐盐育种过程中对于转运功能蛋白 *NHX4* 相关调控过程的研究,将会为培育耐盐作物新品种提供一定的理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] EVA V Z, YANXIA Z, CHRISTA T. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71(1):403-433.
- [2] SHI H H, ISHITANI M, KIM C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6896-6901.
- [3] KARAM B S, RHONDA C F, LUIS O S. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5): 430-436.
- [4] JIN H, MARTIN C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 41(5):577-585.
- [5] LIN H, DU W, YANG Y, et al. A calcium-independent activation of the *Arabidopsis* *SOS2*-like protein kinase24 by its interacting *SOS3*-like calcium binding protein1 [J]. Plant Physiology, 2014, 164(4):2179-2206.
- [6] ALI A, YUN D J. Salt stress tolerance; what do we learn from halophytes? [J]. Journal of Plant Biology, 2017, 60(5):431-439.
- [7] PASQUALI G, BIRICOLTI S, LOCATELLI F, et al. *Os-myb4* expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27(10):1677-1686.
- [8] BUSOMS S, PAAJANEN P, MARBURGER S, et al. Fluctuating selection on migrant adaptive sodium transporter alleles in coastal *Arabidopsis thaliana*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(52):E12443-E12452.
- [9] WANG Z, LI L. Determination of land salinization causes via land cover and hydrological process change detection in a typical part of Songnen Plain[J]. Journal of Geographical Sciences, 2018, 28(8):1099-1112.
- [10] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. Cell, 2016, 167(2):313-324.
- [11] LI T, SUN J, BI Y, et al. Overexpression of an MYB-related gene *FvMYB1* from *fraxinus velutina* increases tolerance to salt stress in transgenic tobacco [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2016, 35(3):632-645.

(责任编辑 闫杏丽)