

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.02.015

# 拟南芥 *AtCHiC* 基因启动子表达载体的构建及鉴定

于鑫, 宋慧, 胡敏, 陈逸凡, 叶敏, 江力

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**土壤重金属镉污染造成作物产量和品质的下降, 严重威胁人类健康。*AtCHiC* 基因编码拟南芥 GH-18 家族中的一种几丁质酶是否参与植物镉胁迫响应的调控尚不清楚。文章利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术克隆 *AtCHiC* 启动子区域, 构建 *ProAtCHiC-GUS* 融合表达载体, 并通过浸花法将该融合表达载体转化到野生型拟南芥中, 鉴定出纯合阳性转基因植株。进一步对转基因植株进行重金属镉胁迫处理, 发现其显著诱导植株 GUS 活性的提高, 表明 *AtCHiC* 基因可能参与拟南芥镉胁迫响应的调控。该研究为进一步研究非生物胁迫下 *AtCHiC* 基因功能提供重要依据。

**关键词:**拟南芥; *AtCHiC* 基因; 镉胁迫; 载体构建; GUS 染色

**中图分类号:** Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2025)02-0241-04

## Construction and identification of promoter expression vectors for *Arabidopsis AtCHiC* gene

YU Xin, SONG Hui, HU Min, CHEN Yifan, YE Min, JIANG Li

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

**Abstract:** Heavy metal cadmium pollution in soil leads to the decline of crop yield and quality, which seriously threatens human health. *AtCHiC* gene encodes a chitinase in GH-18 family of *Arabidopsis thaliana*, and it is unclear whether it participates in the regulation of cadmium stress response in plants. In this study, the promoter region of *AtCHiC* was cloned by polymerase chain reaction (PCR), and the *ProAtCHiC-GUS* fusion expression vector was constructed. The fusion expression vector was transformed into wild-type *Arabidopsis thaliana* by floral dip method, and homozygous positive transgenic plants were identified. Further, the transgenic plants were treated with heavy metal cadmium stress, and it was found that it significantly induced the increase of GUS activity in plants, which indicated that *AtCHiC* gene might be involved in the regulation of cadmium stress response in *Arabidopsis thaliana*. This study provides an important basis for further studying the function of *AtCHiC* gene under abiotic stress.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; *AtCHiC* gene; cadmium stress; vector construction; GUS staining

随着工业化的加速进程, 人类活动对自然环境造成巨大破坏。含镉农药、化肥的滥用以及工业废弃物不规范排放使得土壤镉污染日益加剧, 已成为世界严峻性问题<sup>[1-3]</sup>。据调查结果显示<sup>[4]</sup>, 全国农田土壤平均镉质量比为 0.23  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 这不仅直接导致作物的减产甚至死亡, 还严重影响着

人类和其他动物的身体健康。在植物中, 土壤中过多的镉元素会使植物叶绿体和线粒体受到破坏, 从而破坏植物的光合作用和呼吸作用, 保卫细胞中的水分和离子迁移受到较大影响, 造成叶片发黄以及整个植株缺水、萎蔫, 导致植株死亡。镉被植物吸收后随着食物链流向食物链顶端, 在人

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-06-06

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (1508085QC50)

作者简介: 于鑫 (1998—), 女, 山东平度人, 合肥工业大学硕士生;

江力 (1964—), 女, 福建长汀人, 博士, 合肥工业大学教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: lijia@hfut.edu.cn.

类体中富集。镉对人体造成多种危害,包括致癌风险和致非致癌风险<sup>[5]</sup>。镉中毒主要表现为恶心、流涎、呕吐、腹痛、腹泻,继而引起中枢神经中毒症状,严重者可致死。此外,长期摄入含镉食品可使肾脏发生慢性中毒,导致蛋白尿、氨基酸尿和糖尿,从而引起一系列损害或病变。

*AtChiC* 基因编码一种拟南芥中 GH-18 家族的几丁质酶。研究表明<sup>[6]</sup>,生物胁迫和非生物胁迫均可诱导 *AtChiC* 基因的表达,如 *AtChiC* 基因可由植物胁迫相关激素茉莉酸(JA)、脱落酸(ABA)以及氯化钠等诱导表达。本文构建拟南芥 *ProAtChiC-GUS* 植株材料,分析其对重金属镉胁迫的响应,为研究 *AtChiC* 在重金属镉胁迫下表达模式以及进一步了解其功能提供材料支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试材料

本研究以模式植物拟南芥中哥伦比亚型(Columbia, Col)为实验对象,记野生型(wild-type, WT),购于美国种质资源中心(TAIR),后期由本实验室自行繁殖培育。

#### 1.1.2 菌株和质粒载体

构建重组载体所需菌株为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、农杆菌 GV1301;植物表达载体为 PART27(GUS 载体)。

#### 1.1.3 试剂

本实验所用试剂如下:PrimeSTAR MAX premix(TaKaRa)、限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *EcoR* I (NEB)、Taq PCR Master Mix(Sangon Biotech)、ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme Biotech)、质粒小提试剂盒(TIAN-GEN)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Sangon Biotech)、GUS Blue Kit(华越洋)、表面活性剂 silwet-77 (Solarbio)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 野生型拟南芥的种植与 DNA 的粗提取

将黑土高温高压灭菌后与蛭石、珍珠盐按照 3:9:1 的质量比混匀成拟南芥土培所需营养土,分装至有孔花盆中,底部托盘加水使营养土全部浸湿,将野生型拟南芥种子点种于营养土上。封上保鲜膜保温保湿,将其置于植物恒温培养架上,22 $^{\circ}\text{C}$ ,每天光照 16 h,7 d 后揭膜。将生长 2 周左右的叶片研磨至粉末状,加入已预热的 60  $\mu\text{L}$  十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

加入 60  $\mu\text{L}$  酚氯仿剧烈混匀,离心取上清,加入 1 mL 无水乙醇,上下颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h。室温下 12 000 r/min 离心 10 min 弃上清后加入 75%乙醇,再次离心弃上清,除尽乙醇。加入 40  $\mu\text{L}$  无菌水溶解 DNA,获得 DNA 溶液。加入 DNA 提取液于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 15 min,冰浴 2 min,随后 12 000 r/min 离心 2 min,上清即为拟南芥的总 DNA。

#### 1.2.2 基因片段的克隆

在拟南芥网站(TAIR)查询到长度为 2 005 bp 的 *AtChiC* 基因启动子序列,通过 Primer premier 软件设计目的片段引物。上游引物为 FP:5'-ACGCGTTGGGAGCTCGGTACCCATGGTGTCTCACAGACGCCAAGAATC-3';下游引物为 RP:5'-CCTAGGTGCGGCCCGCTCGAGTTTCGAGTTGCTGTGAAAAACAGAGATGG-3'。两引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,酶切位点为 *Kpn* I/*EcoR* I。以野生型拟南芥总 DNA 为模板,使用高保真酶 PrimeSTAR MAX premix 进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目的基因,反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,条件如下:98 $^{\circ}\text{C}$ 预热 1 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变形 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 36 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。目的条带通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化。

#### 1.2.3 重组质粒的获取

对携带有 PART27-GUS 的 DH5 $\alpha$  大肠杆菌菌株进行质粒提取,随后将提取得到的 GUS 质粒用限制性核酸内切酶 *Kpn* I/*EcoR* I 进行双酶切,条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h,通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化。使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将纯化得到的目的片段与酶切质粒进行同源重组,体系为 10  $\mu\text{L}$ ,其中:质粒 4  $\mu\text{L}$ ;目的片段 3  $\mu\text{L}$ ;5 $\times$ CE II Buffer 2  $\mu\text{L}$ ;Exnase II 1  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.4 热激法转化大肠杆菌

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态置于冰上,将重组产物加进感受态中,轻轻吸打均匀后于冰上静置 30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s,结束后立即冰浴 2 min,加入 700  $\mu\text{L}$  无抗性液体 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 1 h,将菌液涂布于含壮观霉素固体 LB 培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。PCR 鉴定后将阳性菌液质粒送测序,序列比对正确即载体构建成功。

#### 1.2.5 电击法转化农杆菌

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出农杆菌 GV3101 感受

态置于冰上,取 5  $\mu\text{L}$  质粒加入感受态中,轻轻吸打均匀后转移到干净的电击杯中,进行电击转化,加入 700  $\mu\text{L}$  无抗性液体 LB 培养基,28  $^{\circ}\text{C}$  摇床中培养 4 h,将菌液涂布于含庆大霉素和壮观霉素固体 LB 培养基上,28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h,挑菌鉴定阳性菌落,甘油保菌。

### 1.2.6 转基因拟南芥的获取

将阳性农杆菌接种至 10 mL 含庆大霉素和壮观霉素液体 LB 培养基中,28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 震荡培养至  $A_{600}$  为 0.6~0.8,取 4 g 蔗糖和 20  $\mu\text{L}$  silwet-77 加入菌液,加水定容至 50 mL,摇晃均匀。提前去除拟南芥果荚,将其花序置于菌液侵染 25 s,用保鲜膜裹住植株保湿,避光培养 18 h 后放置于正常光照恒温培养架上。1 周后再次侵染以保证重组载体成功转入拟南芥中,成熟后收种。

### 1.2.7 转基因拟南芥的筛选与鉴定

将种子无菌处理后培养在含有卡那霉素抗性的固体 1/2 MS 培养基上,春化 3 d 后平放在恒温培养箱中培养 2 周左右,将长势好的绿色幼苗移栽进行土培。提取 DNA 鉴定转基因阳性植株,单株收种后继续筛选得到纯和阳性苗。

### 1.2.8 辐处理下的转基因植株 GUS 染色

阳性苗种子点种于 1/2 MS 上,春化 3 d 后置于恒温培养箱培养 14 d。将幼苗浸泡于 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  溶液中诱导 6 h,对照组不做处理。将全部幼苗置于 GUS 染色液中,37  $^{\circ}\text{C}$  下避光静置 2 h,随后用 75% 的乙醇脱色,观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ProAtCHiC-GUS* 载体的构建

#### 2.1.1 启动子片段克隆

本文以野生型拟南芥 DNA 为模板,利用设计好的上、下游引物扩增目的基因,克隆结果如图 1a 所示,图 1a 中, M 表示 Marker,片段大小在 2 000 bp 左右,与选取的启动子区域大小一致。通过限制性核酸内切酶 *Kpn* I/*EcoR* I 对 GUS 空载质粒进行酶切,电泳结果如图 1b 所示。

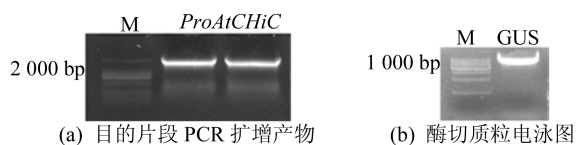


图 1 目的片段及酶切后的质粒电泳图

#### 2.1.2 重组载体的转化

本文利用 ClonExpress II One Step Cloning

Kit 中的试剂将纯化后的质粒与载体重组,随后转化到大肠杆菌中,挑取单克隆菌落进行菌落 PCR,鉴定结果如图 2 所示。图 2 中: M 表示 Marker;泳道 1~泳道 9 表示选取的大肠杆菌单菌落。测序结果与选取的 *AtCHiC* 启动子序列比对结果一致。

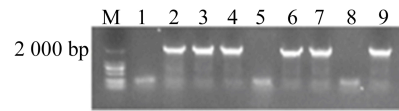


图 2 大肠杆菌阳性克隆鉴定结果

### 2.2 农杆菌转化及拟南芥侵染

将测序正确的质粒通过电击法转入到农杆菌中,挑取单克隆菌落进行菌落 PCR,结果如图 3 所示。图 3 中: M 表示 Marker;泳道 1~泳道 9 表示选取的农杆菌单菌落。选取阳性菌落,通过浸花法侵染拟南芥花序,1 周后再次侵染。

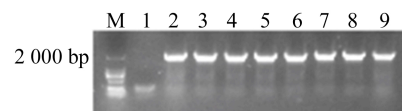


图 3 农杆菌阳性克隆鉴定结果

### 2.3 *ProAtCHiC-GUS* 转基因阳性苗筛选鉴定

侵染后的植株收种,种子无菌处理后撒种在含 50 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 筛选板上,置于恒温培养架培养 2 周左右,筛选结果如图 4 所示。

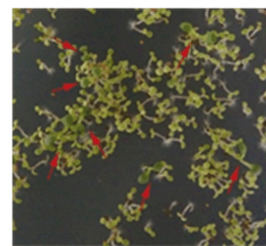


图 4 *ProAtCHiC-GUS* 阳性植株的筛选

将绿色且长势茁壮的幼苗移到营养土中进行土培,2 周后进行 DNA 鉴定,筛选出阳性植株并对其进行单株收种,标记号码以区分不同株系。将不同株系的种子无菌处理后点播于含 50 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 筛选板上,每个株系 25 颗,恒温光照培养箱中培养 2 周左右,筛选结果如图 5 所示。图 5 中,1、2、3、4 为不同株系的 *ProAtCHiC-GUS* 阳性植株,可以看出,2 号幼苗全部呈现绿色且长势强壮,为纯合体。

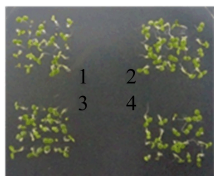


图 5 *ProAtChic-GUS* 阳性植株的纯合体筛选结果

#### 2.4 镉诱导下转基因材料 GUS 染色

本文为探究 *AtChic* 对镉胁迫诱导的响应, 将筛选出的 2 号纯合体株系点种于 MS 培养基上, 春化 3 d 后置于恒温培养箱中培养 14 d, 将幼苗浸泡于  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  溶液中诱导 6 h, 对照组不做处理。对幼苗进行 GUS 染色, 观察染色情况, 如图 6 所示。由图 6 可知, 通过对根和叶的观察, 发现 6 h 镉诱导处理下的幼苗比对照组的蓝色深, 表明 6 h 镉诱导处理条件下的 GUS 活性高于未进行镉诱导处理时 GUS 活性, 也进一步说明 *AtChic* 参与了拟南芥耐重金属镉胁迫的响应, 这为 *AtChic* 基因响应镉胁迫完整信号通路的探究提供了理论依据。

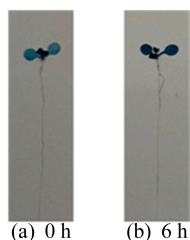


图 6 *ProAtChic-GUS* 植株的 GUS 染色情况

### 3 讨 论

拟南芥中的几丁质酶可水解几丁质的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 根据 CAZy 数据库 (<http://www.cazy>) 将几丁质酶分类为 GH-18 和 GH-19 家族。在植物中, 各种类型的几丁质酶都是组成性的或可诱导产生的<sup>[7]</sup>, 其中一些具有几丁质结合结构域, 而其他一些则没有; 此外, 这些几丁质酶的分子大小也有所不同<sup>[8]</sup>。因此, 有学者提出另一种针对植物几丁质酶的分类系统, 根据其氨基酸序列相似性将其分为 I、II、III、IV、V 5 类<sup>[9-11]</sup>。I、II、IV 类属于 GH-19 家族, III、V 类属于 GH-18 家族。*AtChic* 编码一种 V 类家族的几丁质酶。本实验以哥伦比亚拟南芥为材料, 构建出 *ProAtChic-GUS* 载体, 结合农杆菌侵染花序将载体转入拟南芥中, 使该载体在拟南芥中表达, 为

探究 *AtChic* 在拟南芥镉胁迫中的响应打下基础。通过对镉处理后的转基因植株进行 GUS 染色发现, 镉诱导使得转基因植株 GUS 活性升高, 表明 *AtChic* 的表达受到镉胁迫的影响, 参与了对镉胁迫的响应, 这将丰富植物 *AtChic* 基因在镉胁迫途径中的研究, 为培育低积累作物和超积累 Cd 污染土壤修复植物提供理论依据。

#### [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] MOULIS J M, THEVENOD F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction [J]. *Biometals*, 2010, 23 (5): 763-768.
- [4] LIU X, TIAN G, JIANG D, et al. Cadmium (Cd) distribution and contamination in Chinese paddy soils on national scale [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(18):17941-17952.
- [5] 龚伟群, 潘根兴. 中国水稻生产中 Cd 吸收及其健康风险的有关问题 [J]. *科技导报*, 2006, 24(5):43-48.
- [6] UMEMOTO N, OHNUMA T, MIZUHARA M, et al. Introduction of a tryptophan side chain into subsite +1 enhances transglycosylation activity of a GH-18 chitinase from *Arabidopsis thaliana*, *AtChic* [J]. *Glycobiology*, 2013, 23(1):81-90.
- [7] TAKENAKA Y, NAKANO S, TAMOI M, et al. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(5):1066-1071.
- [8] TAIRA T. Structures and antifungal activity of plant chitinases [J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2010, 57 (3): 167-176.
- [9] COLLINGE D B, KRAGH K M, MIKKELSEN J D, et al. Plant chitinases [J]. *The Plant Journal*, 1993, 3(1):31-40.
- [10] MELCHERS L S, GROOT M A D, VAN DER KNAAP J A, et al. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity [J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(4):469-480.
- [11] NEUHAUS J M, FRITIG B, LINTHORST H, et al. A revised nomenclature for chitinase genes [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1996, 14(2):102-104.

(责任编辑 闫杏丽)