

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.04.012

# 拟南芥 *ProNAS4-GUS* 转基因植株的构建及表达模式

贾亚峰, 樊婷婷, 吴席, 马倩, 张震, 王婷婷

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:** 为了进一步研究 *NAS4* 基因的表达模式及其在缺铁胁迫下的响应模式, 文章利用从野生型拟南芥中提取的基因组 DNA 作为模板, 克隆获得 *NAS4* 启动子片段, 将片段与 pART27-GUS 质粒进行酶切处理, 然后将片段与质粒进行连接, 将连接产物通过热激转化法转入大肠杆菌中, 通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 鉴定获得阳性菌株。质粒测序正确后将重组质粒通过电击转化法转入农杆菌中, 经过 PCR 鉴定得到阳性菌株后, 用浸花法感染野生型拟南芥; 通过抗性筛选和 PCR 鉴定得到 *ProNAS4-GUS* 转基因植株, 并对获得的转基因植株进行 GUS 染色分析, 发现 *NAS4* 基因在幼苗的根部和叶脉中都有所表达。实验结果为研究 *NAS4* 基因在植物缺铁胁迫下的响应模式奠定了基础。

**关键词:** 拟南芥; *NAS4* 基因; 重组质粒; 转基因植株; GUS 染色分析

**中图分类号:** Q943.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1003-5060(2025)04-0508-04

## Construction and expression pattern of *ProNAS4-GUS* transgenic plants in *Arabidopsis thaliana*

JIA Yafeng, FAN Tingting, WU Xi, MA Qian, ZHANG Zhen, WANG Tingting

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

**Abstract:** In order to further study the expression pattern of *NAS4* gene and its response pattern under iron deficiency stress, DNA extracted from wild-type *Arabidopsis thaliana* was used as template to clone the *NAS4* promoter fragment. Then, the fragment and pART27-GUS were double-digested, the fragment was ligated with the pART27-GUS and transformed into *Escherichia coli* by heat shock method, and the positive strain was obtained by polymerase chain reaction (PCR) identification. After correct sequencing, the recombinant plasmid was transformed into *Agrobacterium* using electroporation transformation method. Identified by PCR positive monoclonal, the positive strain was obtained. Finally, the wild-type *Arabidopsis thaliana* was infected by floral dip method and the *ProNAS4-GUS* transgenic positive plants were obtained through resistance screening, and the obtained transgenic plants were subjected to GUS staining analysis, showing that *NAS4* gene was expressed in the roots and veins of seedlings. It lays a foundation for further exploring the response pattern of *NAS4* gene under iron deficiency stress in plants.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; *NAS4* gene; recombinant plasmid; transgenic plant; GUS staining analysis

铁是植物光合作用所必需的,也是限制植物生长的营养元素<sup>[1]</sup>。铁的缺失会对植物生长和发

育产生有害影响,而植物细胞内过量的铁会导致氧化损伤。因此,植物进化出复杂的调节网络来

**收稿日期:** 2022-10-22; **修回日期:** 2022-12-24

**基金项目:** 安徽省自然科学基金资助项目(1508085QC50); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JZ2018HG TB0248)

**作者简介:** 贾亚峰(1996—),男,河北石家庄人,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.

应对细胞铁浓度的波动<sup>[2]</sup>。虽然土壤中的铁含量丰富,但在大部分土壤中多以氧化铁的形式存在,氧化铁在氧气充足的环境中溶解度差,使土壤中可被植物直接利用的铁离子含量低于植物的需求<sup>[3]</sup>。农作物是人类的主要饮食来源,植物缺铁会影响人类日常的铁元素摄入,会导致缺铁性贫血等一系列疾病,而培育耐缺铁和富铁植物是解决这些问题的理想途径之一,因此了解植物摄取铁和调节铁稳态的分子机制至关重要<sup>[4]</sup>。

烟胺合酶(NAS)是植物铁载体木酮酸家族生物合成途径中的关键酶,催化S-腺苷甲硫氨酸三聚形成一个烟胺分子,这是一种参与铁稳态的非蛋白氨基酸<sup>[5-6]</sup>。研究发现,NAS4基因突变体对缺铁环境表现出明显的敏感表型,但参与植物铁稳态调控的机制并不清楚。为了研究NAS4基因的表达模式及其在缺铁胁迫下表达变化,本文拟通过构建*ProNAS4-GUS*转基因植株并利用GUS染色进行NAS4基因的表达分析,为阐明NAS4基因在缺铁条件下的作用机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料选用哥伦比亚(Columbia, col)遗传背景的野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),从美国拟南芥种质资源中心获得,由合肥工业大学植物分子生物学实验室繁殖;载体构建所用质粒pART27-GUS,大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,农杆菌GV3101。

主要试剂如下:Plasmid miniprep Kit (TIANGEN DP103-02), T4-DNA Ligase (NEB # M0202S), 限制性内切酶 *Kpn* I (NEB # R3142V), *Xho* I (NEB # R0146V), 2 $\times$ San Taq PCR (Sangon Biotech B639295-0080), Prime-STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa # R045), 异丙醇(67-63-0), SDS(151-21-3), Tris-HCl(1185-53-1), 无水乙醇(64-17-5), GUS染色试剂盒(华越洋)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 拟南芥无菌苗的培养

称取MS培养基、蔗糖和琼脂于锥形瓶中,加入双蒸水后,调节pH值至5.8,用高压灭菌锅高压蒸汽灭菌21 min(121  $^{\circ}$ C、101 kPa),灭菌后在超净台中倒入培养皿中等其凝固;用0.1%氯化汞清洗种子1次,再用双蒸水清洗3次对其进行灭菌消毒;将种子点在培养基上,用封口膜将其包裹密封,放入4  $^{\circ}$ C冰箱中春化2 d,放在植物培养

箱中竖直培养14 d。

#### 1.2.2 拟南芥 DNA 的提取

从培养基中取出长到14 d的拟南芥幼苗,放在提前预冷好的研钵中,加入液氮后研磨至泛白的粉末状,将粉末加入一干净EP离心管中,再加入400  $\mu$ L的SDS DNA提取液,然后离心10 min(12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C),离心结束后取200  $\mu$ L上清液于另一新EP管,再加入200  $\mu$ L异丙醇,离心10 min(12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C),弃去上清,再加入800  $\mu$ L70%乙醇,离心5 min(12 000 r/min)。最后弃上清,将带有沉淀的EP管倒置于通风橱中15 min,吹干留于管内的乙醇后,加入40  $\mu$ L的无菌双蒸水,放于-20  $^{\circ}$ C保存。

#### 1.2.3 NAS4 启动子区基因片段的克隆

利用Oligo 7.0软件设计以下引物进行NAS4启动区基因片段的克隆,以提取出的野生型拟南芥DNA为扩增模板进行启动子克隆。

#### 1.2.4 大肠杆菌的转化

从-80  $^{\circ}$ C冰箱中取出大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,放置于冰上自然溶解。吸取5  $\mu$ L连接产物加入感受态细胞中,轻轻吹打混匀,在冰上放置30 min后,在42  $^{\circ}$ C中热激60 s放于冰上静置2 min,加入700  $\mu$ L无抗性的液体LB培养基,再放入37  $^{\circ}$ C恒温摇床中震荡培养1 h。培养结束后,将其涂于含壮观霉素抗性的LB固体培养基中,平板倒置在37  $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养12 h,第2天挑取在培养基上生长的单菌落,接种于含壮观霉素的LB液体培养基,37  $^{\circ}$ C恒温培养12 h进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定,选取阳性菌进行测序,序列正确,得到重组质粒的大肠杆菌。

#### 1.2.5 农杆菌的转化

从-80  $^{\circ}$ C冰箱中取出农杆菌GV3101感受态细胞,放置于冰上自然溶解。吸取1  $\mu$ L重组质粒加到感受态细胞中,轻轻吹打混匀,再将感受态细胞全部吸取到提前预冷好的电击杯中,使用仪器进行电击转化,电击后立刻加入700  $\mu$ L无抗性液体LB培养基,再将其全部吸取至新EP管中,放入28  $^{\circ}$ C恒温摇床中,培养2~3 h后将其涂于含壮观霉素和庆大霉素抗性的固体培养基上,放置于28  $^{\circ}$ C恒温培养箱中倒置培养48 h。从培养皿上挑取生长出来的单菌落并接于含有壮观霉素和庆大霉素抗性的液体LB培养基中,在28  $^{\circ}$ C恒温摇床中培养1~2 d,然后进行PCR鉴定,鉴定成功后获得农杆菌阳性菌株。

### 1.2.6 转基因拟南芥侵染

将农杆菌阳性菌株接种于 100 mL 含抗性液体 LB 的锥形瓶中,在 28 °C 恒温摇床中培养至  $A_{600}$  为 1.2~1.4;离心去上清,按每 4 mL 侵染缓冲液重悬菌加入 1  $\mu$ L 表面活性剂 L-77 后混匀,将花侵入溶液进行侵染,侵染后立即用保鲜膜封上,黑暗处理 12 h。1 周后再次侵染。

### 1.2.7 转基因阳性植株的鉴定

将侵染后植株的种子点于含卡那霉素抗性的固体 MS 培养基中进行抗性筛选,培养箱培养 7 d,将幼苗移至土质培养基中,提取 DNA,经 PCR 鉴定正确后,即获得转基因阳性植株。

### 1.2.8 GUS 染色

将侵染植株的种子点于固体 MS 培养基中,培养 12 d 后取出幼苗放于 1.5 mL EP 管中,加入配置好的 GUS 染色工作液至没过幼苗,用锡箔纸将其包好后置于 37 °C 培养箱中孵育 12 h 后,用 70%乙醇脱去样本的叶绿素,至阴性对照呈白色,GUS 染色阳性的蓝色斑点稳定,即可置于 70%乙醇中保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 *NAS4* 启动子区的克隆

为了确定 *NAS4* 基因在拟南芥缺铁响应中的作用,本文构建了 *ProNAS4-GUS* 载体。以野生型拟南芥 DNA 为模板,通过 PCR 扩增,克隆获得 *NAS4* 的启动子片段,结果如图 1 所示。由图 1 可知,目的条带大小在 2 000 bp 左右,与所选取的启动子区域的片段大小相符。

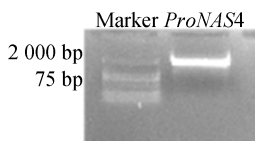


图 1 *NAS4* 启动区的克隆

### 2.2 目的片段和质粒双酶切

使用 *Kpn* I 和 *Xho* I 2 种限制性内切酶对 *NAS4* 启动子片段以及 pART27-GUS 质粒进行酶切,如图 2 所示。

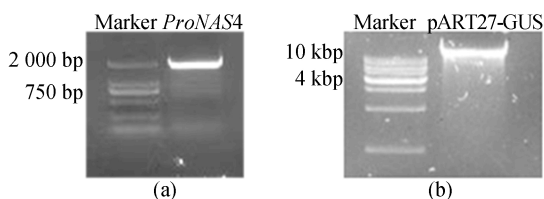


图 2 *NAS4* 和 pART27-GUS 酶切图

由图 2 可知,酶切后得到了具有相同黏性末端的片段和质粒,且条带清晰,条带大小均与预期大小相符。

### 2.3 连接和大肠杆菌转化后阳性克隆鉴定

使用 T4 连接酶连接酶切后的目的片段和质粒,连接条件为 16 °C、12 h,连接后得到重组质粒;然后用热激转化法将重组质粒转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态中,挑取单克隆菌株进行 PCR 鉴定,如图 3 所示。图 3 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 10 表示单克隆鉴定结果。由图 3 可知,泳道 5、10 有明亮的条带且大小正确,跑胶后选取 5 号菌株进行测序。

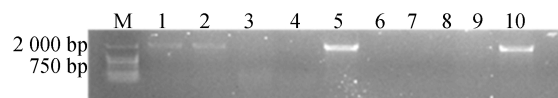


图 3 大肠杆菌鉴定结果

### 2.4 农杆菌转化及花序浸染

将测序正确的重组质粒通过电击转化法转入 GV3101 农杆菌感受态中,挑取单克隆菌株鉴定,结果如图 4 所示。图 4 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 11 表示单克隆鉴定结果。由图 4 可知,泳道 9 有明亮的条带且大小正确,选取 9 号菌株培养,然后侵染拟南芥野生型植株,侵染后收种子用于下一步实验。

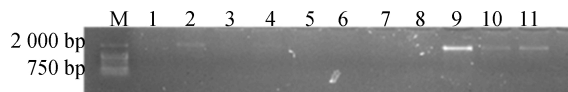


图 4 农杆菌鉴定结果

### 2.5 *ProNAS4-GUS* 转基因植株的筛选和鉴定

将种子均匀地撒在含卡那霉素抗性的 1/2MS 培养基中,2 周后可得阳性植株,移至土质培养基中,提取 DNA 进行鉴定,如图 5 所示。

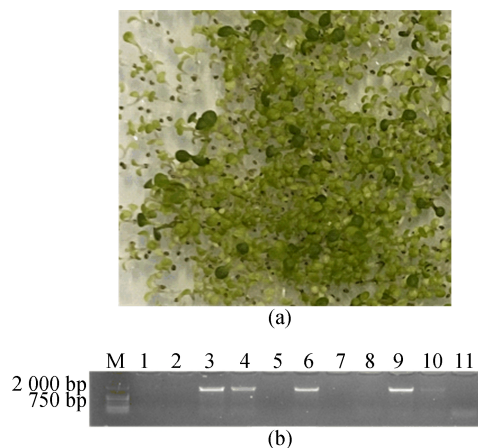


图 5 转基因植株的筛选和 PCR 鉴定结果

图5中:M表示DNA Marker;泳道1~泳道11表示植株鉴定结果。由图5b可知,泳道3、4、6、9有明亮条带且大小正确,然后通过结果选定3号为阳性植株,用于后续实验。

### 2.7 筛选纯合体

每一代植株均采用抗性分离比筛选得到阳性植株后进行土培繁殖,在第3代得到了纯合的 *ProNAS4-GUS* 植株,如图6所示。

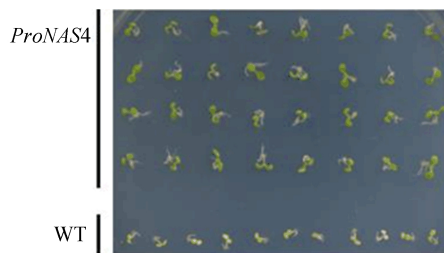


图6 转基因植株的抗性分离比

### 2.8 GUS 染色结果

取出在MS培养基上培养12d的 *ProNAS4-GUS* 植株幼苗进行染色,发现幼苗主要是根部变蓝,确定基因主要在其根部表达,具体 *NAS4* 的表达情况有待进一步确定,如图7所示。



图7 *ProNAS4* 阳性植株的幼苗染色结果

## 3 讨论

铁是植物生长发育的必需元素,参与光合作用、呼吸和氮素同化等重要过程。铁在大多数土壤中是一种丰富的元素,但植物对铁的有效利用率较低,尤其是在石灰性土壤中。缺铁会导致缺铁性黄化,从而影响作物的生产能力<sup>[7]</sup>;同时缺铁是世界上最常见的微量营养素缺乏症<sup>[8]</sup>。铁的运输和再分配对植物体内的铁稳态至关重要,但其调节机制尚不清楚,尤其是在胁迫下<sup>[9]</sup>。因此探索植物铁调控的机制十分重要。

本实验构建的 *ProNAS4-GUS* 重组质粒通

过浸花法转入野生型拟南芥植株中,并筛选获得转基因植株,将获得的阳性转基因植株幼苗染色后发现, *NAS4* 基因在幼苗中的根部和叶脉中均有所表达,但其在受到缺铁胁迫后的表达还需要进一步研究。获得的 *ProNAS4-GUS* 植株采用GUS染色的方法,可以解析 *NAS4* 基因在植物不同器官的表达情况和表达模式;另一方面通过该植株可以探究在不同胁迫条件下 *NAS4* 基因在植物体内的表达变化情况,为研究 *NAS4* 基因在缺铁胁迫下可能存在的调控机制提供了实验依据。

### [参 考 文 献]

- [1] PLAMER C M, GUERINOT M L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(5): 333-340.
- [2] WANG N, CUI Y, LIU Y, et al. Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2): 503-513.
- [3] ROMHELD V, MARSCHNER H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1986, 2: 155-204.
- [4] WANG C, YAO X N, YU D Q, et al. Fe-deficiency-induced expression of bHLH104 enhances Fe-deficiency tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2017, 246(3): 421-431.
- [5] KOEN E, DUC C, ASTIER J, et al. *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure [J]. *Plant Science*, 2013, 209: 1-11.
- [6] HIGUCHI K, SUZUKI K, NAKANISHI H, et al. Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytochelatins [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 471-480.
- [7] ANGULO M, GARCIA M J, ALCANTARA E, et al. Comparative study of several Fe deficiency responses in the *Arabidopsis thaliana* ethylene insensitive mutants ein2-1 and ein2-5 [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(2): 262.
- [8] ZHU X, DONG X Y, WU Q, et al. Ammonium regulates Fe deficiency responses by enhancing nitric oxide signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2019, 250(4): 1089-1102.
- [9] ZHAI Z, GAYOMBA S R, JUNG H I, et al. OPT3 is a Phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(5): 2249-2264.

(责任编辑 闫杏丽)