

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.09.010

拟南芥 *AtRBOHD* 基因表达载体构建及鉴定分析

叶敏, 樊婷婷, 宋慧, 张景, 陈逸凡

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: *AtRBOHD* 基因作为植物体内重要的 NADPH 氧化酶基因, 可将氧催化生成活性氧以响应逆境胁迫, 但其是否参与植物重金属镉胁迫的调控尚不清楚。文章以拟南芥为实验材料, 利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术克隆出 *AtRBOHD* 基因的启动子区域, 成功构建 *ProAtRBOHD;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, 通过抗性筛选、PCR 鉴定、抗性分离鉴定筛选出纯合阳性转基因植株。进一步对获得的转基因材料进行镉胁迫处理, 发现经处理后的转基因材料 GUS 活性提高。为初步研究镉胁迫下 *AtRBOHD* 基因功能和转录水平变化提供重要依据。

关键词: 拟南芥; 镉胁迫; *AtRBOHD* 基因; 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)09-1218-05

Construction and identification of *AtRBOHD* gene expression vector in *Arabidopsis thaliana*

YE Min, FAN Tingting, SONG Hui, ZHANG Jing, CHEN Yifan

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

Abstract: As an important NADPH oxidase gene in plants, *AtRBOHD* gene can generate reactive oxygen species by catalyzing oxygen in response to adversity stress, but whether it participates in the regulation of plant heavy metal cadmium stress is unclear. In this study, using *Arabidopsis thaliana* as experimental material, the promoter region of *AtRBOHD* gene was cloned by polymerase chain reaction (PCR) technology, and the *ProAtRBOHD;GUS* fusion expression vector was successfully constructed. The fusion expression vector was transformed into wild-type *Arabidopsis thaliana* by floral dip method, and homozygous and positive transgenic plants were screened out by resistance screening, PCR identification and resistance isolation identification. Furthermore, cadmium stress was performed on the obtained transgenic materials, and it was found that the GUS activity of the treated transgenic materials increased. This study provides an important basis for the preliminary research on the function and transcription level of *AtRBOHD* gene under cadmium stress.

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

0 引言

随着工业化进程的加快, 重金属对土壤污染已成为全球最严峻的生态问题之一^[1]。镉 (Cd) 是植物非必需重金属, 而且不易被降解, 易在植物

体内富集, 影响植物的生理代谢过程, 造成农作物产量下降等结果。同时镉会通过食物链进入人体, 对人体造成多种危害, 主要表现在造成肾损害, 还可引起消化道吸收障碍、动脉硬化、癌症等^[2]。因此改善土壤镉污染现状, 保证农作物产

收稿日期: 2023-05-19; 修回日期: 2023-06-14

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 (JZ2023HGQB0167)

作者简介: 叶敏 (1997—), 女, 安徽六安人, 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: fanting@hfut.edu.cn

量,是当前土壤和环境领域研究的热点。

已有研究表明,当植物在受重金属污染的土壤中生长时,植物细胞能接收到邻近细胞和远处组织给予的信号并作出相应反应,许多细胞在受到重金属胁迫刺激后的早期阶段一般都会产生活性氧,而活性氧是植物响应逆境胁迫过程中的重要信号分子^[3]。植物体内有多种酶系统参与合成和代谢活性氧,其中,NADPH氧化酶又称呼吸爆发氧化酶同源蛋白(respiratory burst oxidase homologs,RBOH),是一类以胞质中的NADPH为电子供体,可以将氧催化生成活性氧的多酶复合物,是植物体内合成活性氧的主要途径^[4]。经研究发现,拟南芥基因组包含10个NADPH氧化酶,分别命名为*AtRBOHA-J*。不同的*AtRBOHs*基因在植物的生长发育和对环境胁迫的应答过程中表现出不同的表达模式^[5]。

文献^[6]研究发现,拟南芥中*AtRBOHD*基因在其生长发育及应答逆境胁迫时发挥作用。*AtRBOHD*和*AtRBOHF*基因被证明参与了病原体感染期间活性氧的产生;*AtRBOHD*和*AtRBOHF*基因在盐胁迫下参与调节拟南芥中 Na^+/K^+ 平衡,影响拟南芥对盐胁迫的耐受性^[7],但其对植物镉胁迫响应的报道并不多。本研究通过构建拟南芥 *ProAtRBOHD*:*GUS* 植株材料,为后续探究其在重金属镉胁迫下的功能提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本实验以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型(Columbia,col)为实验材料,购于美国拟南芥种质资源中心,由本实验室繁殖获得。

1.1.2 质粒载体与菌株

构建载体所用菌株有大肠杆菌DH5 α 、农杆菌GV3101、载体pART27-*GUS*(本实验室贮藏)。

1.1.3 主要试剂及酶类

PrimeSTAR MAX premix 购于 TaKaRa;限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *EcoR* I 均购于 NEB; Taq PCR Master Mix 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;表面活性剂 SilwetL-77 购于索莱宝公司;*GUS* Blue Kit 购于华越洋公司;异丙醇(A507048)、无水乙醇(A500737)、琼脂(A100637)、氯化钠(A501218)、蛋白胨(A505247)、酵母粉(A604250)、蔗糖(A100335)、

壮观霉素(A600901)、庆大霉素(A506614)、卡那霉素(A100408)、质粒小提试剂盒(TIANGEN)、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥的种植和 DNA 的粗提取

将经 120 °C、20 min 高温灭菌过的黑土、蛭石、珍珠盐以 3 : 9 : 1 的比例混匀后,分装至花钵,花钵置于托盘中,加水至托盘将营养土浸湿,将拟南芥种子点种至营养土上。在恒温光照培养架上培养 2 周左右后,取叶片至提前预冷的研钵中研磨至粉末状,加入 400 μL 的 SDS DNA 提取液,充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中,离心取上清后加入 200 μL 异丙醇,上下颠倒混匀,离心弃上清后,加入 800 μL 70%乙醇,再次离心弃上清,将离心管置于通风橱中除尽乙醇。加入 40 μL 无菌水溶解 DNA 后置于一 20 °C 冷冻保存。

1.2.2 重组载体构建

利用 Oligo 7.0 软件设计以下引物进行 *AtRBOHD* 基因的克隆。上游引物序列为:5'-ACGCGTTGGGAGCTCGGTACCGTGAACCTACCACAATTTTGATAGCAGTGG-3',下游引物序列为:5'-CCTAGGTGCGGCCGCCTCGAGCGAATTCGAGAAACCAAAAAGATCTC-3'。酶切位点为 *Kpn* I / *EcoR* I,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以野生型全基因组 DNA 为模板,用高保真酶 PrimeSTAR MAX premix 扩增片段。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)反应体系 50 μL ,条件为:95 °C 预热 5 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,36 个循环;72 °C 10 min。扩增的产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收纯化。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,将连接产物通过热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,经过挑菌鉴定后获得阳性菌株。

1.2.3 大肠杆菌转化

从 -80 °C 冰箱取 50 μL 大肠杆菌 DH5 α 感受态至冰上融化,加入 5 μL 连接产物,轻柔吹打混匀后,冰上放置 30 min;42 °C 热激 60 s,迅速置于冰上 2~5 min;加入 700 μL 无抗性液体培养基,于 37 °C 摇床中培养 1~2 h,将菌液涂布于含有壮观霉素抗性的固体 LB 培养基上,在 37 °C 培养箱中培养过夜。

1.2.4 农杆菌转化

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 农杆菌GV3101感受态细胞,迅速置于冰上解冻,加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 重组载体质粒,轻柔吹打混匀后,加入预冷电击杯中,调节电转仪参数电压为 $1\text{ }800\text{ V}$,进行电击转化。电击结束,迅速将感受态细胞加入到 $700\text{ }\mu\text{L}$ 无菌无抗性液体LB培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 $4\sim 6\text{ h}$,将转化后菌液涂布于含有壮观霉素和庆大霉素的固体LB培养基上 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 左右,挑选单菌落进行PCR鉴定,获得阳性菌落进行甘油保菌。

1.2.5 浸花法侵染拟南芥

将阳性农杆菌液接至 100 mL 含庆大霉素和壮观霉素的液体LB培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 200 r/min 震荡培养至 A_{600} 为 $0.5\sim 0.8$,积菌后用配置好的侵染试剂重悬,加入一定量的表面活性剂L-77混匀。提前剪去野生型拟南芥的果荚,将其花序置于侵染液中 20 s 左右,保鲜膜封存,黑暗避光处理 18 h 后放置于正常光照恒温培养架上。 1 周后再次侵染保证侵染成功,待成熟后收种。

1.2.6 转基因阳性植株鉴定

侵染后的植株收种,烘干、春化后将其置于含有卡那霉素的 $1/2\text{MS}$ 固体培养基中,而后在恒温培养架中培养 2 周,选取叶片嫩绿且根系较长的植株进行移栽。 2 周后提取植株DNA进行阳性植株鉴定,将子代种子点在含有卡那霉素的 $1/2\text{MS}$ 固体培养基上进行抗性分离,筛选纯阳性植株。

1.2.7 GUS染色

将筛选获得的 $ProAtRBOHD;GUS$ 纯合体植株种子点在 $1/2\text{MS}$ 固体培养基上,春化 3 d 后,恒温光照培养 7 d ;将 $1/2$ 的幼苗置于 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 溶液中,在光照培养箱中诱导 6 h ;将全部幼苗置于GUS染色液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光处理 $1\sim 24\text{ h}$,用 75% 乙醇进行脱色,观察结果。

2 结果与分析

2.1 $ProAtRBOHD;GUS$ 载体的构建

为探究 $AtRBOHD$ 基因在拟南芥镉耐受机理中的作用,构建 $ProAtRBOHD;GUS$ 载体。以野生型拟南芥DNA为模板扩增目的基因,克隆结果如图1所示。图1中,M表示DNA Marker。由图1可知,目的条带大小在 $2\text{ }000\text{ bp}$ 左右与所选取的启动子区域片段大小相同;用限制性内切酶 $Kpn\text{ I}$ 和 $Xho\text{ I}$ 酶切GUS空载质粒后条带

清晰,条带大小与预期大小相符。

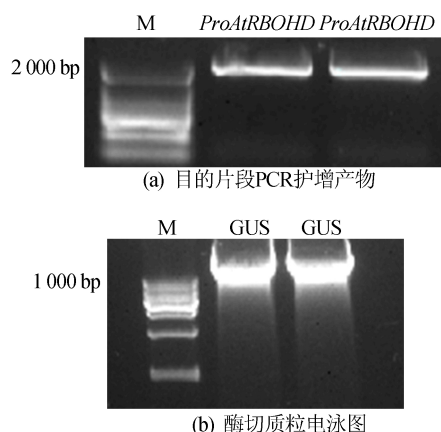


图1 目的片段与酶切后的质粒

2.2 重组载体的连接和转化

将获得的目的片段与酶切载体回收纯化后,利用ClonExpress II One Step Cloning Kit中的同源重组酶和buffer进行同源重组连接,随后通过热激法转化到大肠杆菌DH5 α 感受态中,挑取单菌落进行PCR鉴定,鉴定结果如图2所示。图2中:M表示DNA Marker;泳道1~泳道12分别为所挑取不同菌落的PCR结果。从图2可以看出,菌落PCR条带与所选取的 $AtRBOHD$ 基因启动子区域片段大小一致,说明该条带可能为阳性克隆。选取1号阳性菌落送测序,获得阳性载体 $ProAtRBOHD;GUS$ 。

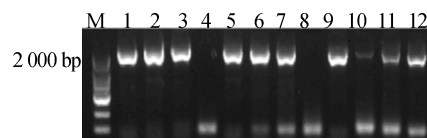


图2 大肠杆菌阳性克隆鉴定结果

2.3 农杆菌转化分析

将测序正确的重组载体通过电击法转入农杆菌GV3101感受态中,挑取单菌落进行PCR鉴定,鉴定结果如图3所示。

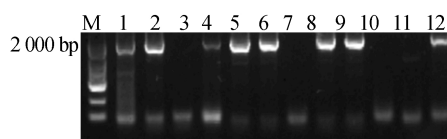


图3 农杆菌阳性克隆鉴定结果

图3中:M表示DNA Marker,泳道1~泳道12分别为所挑取不同菌落的PCR结果。菌落

PCR 条带与所选取的 *AtRBOHD* 基因启动子区域片段大小一致,获得阳性菌株。

2.4 转基因阳性植株的筛选

为获得 *ProAtRBOHD:GUS* 转基因植株,选取阳性农杆菌通过浸花法感染野生型拟南芥,随后获得感染植株的种子,将其撒在含 50 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 培养基筛选板上,置于恒温培养架培养 2 周。筛选结果如图 4 所示。

选取生长状态良好,叶片嫩绿且根系较长的植株进行移栽。20 d 后提取 DNA,对鉴定结果呈阳性的植株进行单株收种,标记号码以作区分。将所获得的不同株系种子分别选取 25 颗点种于含 50 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 固体培养基上,置于恒温培养架培养 2 周左右,发育植株如图 5 所示,发现 2 号幼苗叶片嫩绿、长势强壮。根据遗传分离定律,可判定 2 号阳性植株为纯合的转基因植株。

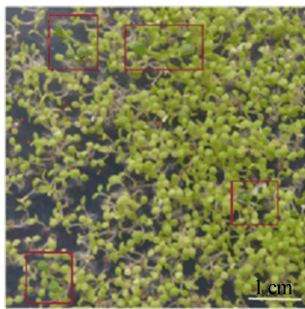


图 4 *ProAtRBOHD:GUS* 阳性植株的筛选

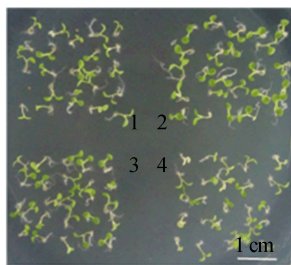


图 5 *ProAtRBOHD:GUS* 阳性植株纯合体筛选

2.5 镉胁迫下的 GUS 组织染色结果

为探究 *AtRBOHD* 基因是否响应镉胁迫,将前期获得的 2 号 *ProAtRBOHD:GUS* 转基因纯合体植株点种于 1/2MS 培养基上,春化 3 d 后置于恒温光照培养箱垂直生长 2 周。培养 2 周后,幼苗置于 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 溶液中在光照培养箱中诱导 6 h,置于 1/2MS 培养基的幼苗作为对照,随后分别对 2 组材料进行 GUS 组织染色,结果如图 6 所示。

从图 6 可以看出,经镉液处理的幼苗进行

GUS 染色后,其根和叶均比对照组的蓝色深,表明经镉液处理的幼苗 GUS 活性比未经镉液处理的幼苗高,也进一步说明了植物 *AtRBOHD* 基因受到镉胁迫诱导,在镉胁迫下其转录水平增加。这一结果初步验证了 *AtRBOHD* 基因对镉胁迫有响应,这将为 *AtRBOHD* 基因对植物重金属胁迫的研究提供有力科学依据。

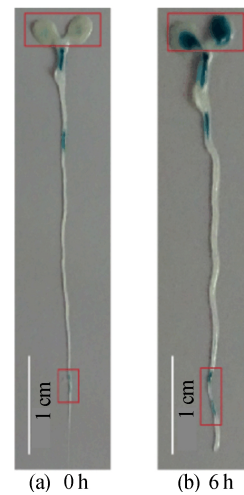


图 6 *ProAtRBOHD:GUS* 转基因植株的 GUS 染色分析

3 讨 论

自然环境中,植物会遇到各种逆境胁迫,在应对逆境胁迫时,植物会做出一系列的响应机制,比如花期提前、气孔关闭、更发达根系的建立等,这些响应都是由体内一系列紧密相连的信号途径调控完成的,而活性氧就是其中很重要的信号分子^[8]。NADPH 氧化酶(RBOHs)是胞内活性氧的主要来源,这就预示着其在植物应对逆境胁迫时将发挥作用,如 *AtRBOHB* 参与种子成熟^[9], *AtRBOHC* 调节成毛细胞中 ROS 的集中产生并调节根毛的形成^[10]。但是对于 *AtRBOHs* 介导的逆境胁迫过程方面的研究仍有许多空白。本实验构建了 *ProAtRBOHD:GUS* 转基因材料,并通过 GUS 染色实验探究 *AtRBOHD* 基因在拟南芥镉胁迫下的表达情况。结果表明,镉胁迫诱导使得 *ProAtRBOHD:GUS* 转基因植株 GUS 活性升高,拟南芥 *AtRBOHD* 基因的表达受到镉胁迫的影响,表达水平上调。说明拟南芥 *AtRBOHD* 基因参与拟南芥应对镉胁迫的响应,这将为研究 *AtRBOHD* 基因响应镉胁迫的作用机制提供重要依据。

(下转第 1242 页)

[参 考 文 献]

- [1] 陈金晓,陈剑. 从优化到重塑:大变局中的供应链高质量发展[J]. 系统工程理论与实践,2022,42(3):545-558.
- [2] 半月谈网. 产品、服务转型升级 看顺企因“疫”思变化危为机[EB/OL]. (2020-03-16) [2022-12-20]. <http://www.banyuetan.org/jj/detail/20200316/1000200033136091584349533670233879.1.html>.
- [3] 刘冬冬. 全球价值链嵌入是否会驱动中国制造业升级:基于工艺升级与产品升级协调发展视角[J]. 产业经济研究,2020(5):58-72.
- [4] 李四杰,邵灵芝. 考虑消费者策略行为的供应商产品升级策略[J]. 中国管理科学,2018,26(4):1-10.
- [5] 程明宝,张景凌,于秀丽. 考虑消费者购买历史的两阶段定价策略研究[J]. 系统工程理论与实践,2021,41(11):2902-2912.
- [6] SHAO L Z. The pricing decision and channel choice of upgraded products in the presence of strategic consumers[J]. *Mathematical Problems in Engineering*,2021,2021:1-10.
- [7] 陈俊霖,王山. 双渠道供应链中紧俏产品升级成本分担演化博弈分析[J]. 中国管理科学,2022,30(10):224-235.
- [8] 崔庆安,孙艺. 基于制造商行为偏好的零件质量升级努力与定价策略研究[J]. 工业工程,2023,26(1):8-18,51.
- [9] QIAN Z F, CHAI J W, LI H Y, et al. Implications of product upgrading confronting supplier remanufacturing[J]. *International Journal of Production Research*,2020,58(19):5870-5892.
- [10] LIU G M, SHAO X F, LANG X. On the interaction of technology upgrade and buyer entry in a supply chain[J]. *International Journal of Production Economics*,2020,221:107478.
- [11] XIONG Y, ZHAO P, XIONG Z K, et al. The impact of product upgrading on the decision of entrance to a secondary market [J]. *European Journal of Operational Research*,2016,252(2):443-454.
- [12] 杨光勇,计国君. 基于战略顾客行为的进入威慑策略研究[J]. 中国管理科学,2015,23(11):153-162.
- [13] 李良,刘芷言,李增禄,等. 供应不确定下制造商的采购策略:回收或双渠道采购[J]. 工业工程与管理,2020,25(2):74-81.
- [14] DONG L X, TOMLIN B. Managing disruption risk: the interplay between operations and insurance[J]. *Management Science*,2012,58(10):1898-1915.
- [15] HE B, YANG Y G. Mitigating supply risk: an approach with quantity flexibility procurement[J]. *Annals of Operations Research*,2018,271(2):599-617.
- [16] 陈崇萍,陈志祥. 供应商产出随机与供应中断下的双源采购决策[J]. 中国管理科学,2019,27(6):113-122.
- [17] 舒磊,吴锋. 不可靠供应下的风险厌恶采购单阶段模型[J]. 系统管理学报,2015,24(4):602-609.
- [18] 牛保庄,许浩涛,李启洋,等. 考虑供应中断的关键进口零部件本土替代及采购策略调整[J]. 系统工程理论与实践,2022,42(11):2881-2890.

(责任编辑 李 凯)

(上接第 1221 页)

[参 考 文 献]

- [1] WANG W Z, XU W H, ZHOU K, et al. Research progress of present contamination of Cd in soil and restoration method[J]. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*,2015,20(5):430-444.
- [2] 张盛楠,黄益宗,李颜,等. Cd 胁迫下不同外源植物激素对水稻幼苗抗氧化系统及 Cd 吸收积累的影响[J]. 环境科学,2021,42(4):2040-2046.
- [3] NGELES P M, YOSEF F, SARA I Z, et al. ROS and redox regulation of cell-to-cell and systemic signaling in plants during stress[J]. *Free Radical Biology & Medicine*,2022,193:354-362.
- [4] JORGE M, YASUHIRO K, CYRIL Z, et al. The Arabidopsis NADPH oxidases *RbohD* and *RbohF* display differential expression patterns and contributions during plant immunity[J]. *Journal of Experimental Botany*,2016,67(6):1663-1676.
- [5] 刘秋圆,贺浩华,胡丽芳. 植物 *Rboh* 基因功能及其活性调节机制的研究进展[J]. 生物技术通报,2013,(11):8-13.
- [6] TORRES M A, DANG J L, JONES J D G, et al. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2002,99(1):517-522.
- [7] MA L, ZHANG H, SUN L, et al. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* function in ROS-dependent regulation of Na^+ / K^+ homeostasis in Arabidopsis under salt stress[J]. *Journal of Experimental Botany*,2012,63(1):305-317.
- [8] TORRES M A, DANGL J L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*,2005,8(4):397-403.
- [9] KERSTIN M, CATHARINA C A, ADA L, et al. The NADPH-oxidase *AtrbohB* plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening[J]. *The New Phytologist*,2009,184(4):885-897.
- [10] FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL J H F, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. *Nature*,2003,422(6930):442-446.

(责任编辑 吴 亮)