

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.09.009

拟南芥 35S:SOS2/WRKY12-OE5 转基因株系的构建

马倩, 樊婷婷, 吴席, 贾亚峰, 张震, 宋慧

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为探究 SOS2 与 WRKY12 在拟南芥响应盐胁迫时的遗传关系,文章以野生型拟南芥 RNA 反转录产生的 cDNA 为模板扩增出 SOS2 片段,将质粒 pART27 和 SOS2 片段利用 *Kpn* I 和 *Xho* I 进行双酶切,使用 T4 连接酶将 pART27 与 SOS2 片段连接。连接产物转化至制备好的大肠杆菌感受态中,涂布至抗性板上,挑取单菌落进行阳性菌株的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 鉴定与测序。从测序正确的单克隆阳性菌株中提取重组质粒,转化至制备好的农杆菌感受态 GV3101 中,并涂布至双抗平板上,挑取单克隆菌株进行 PCR 鉴定与测序,进而获得阳性单克隆菌落。浸花侵染拟南芥野生型,筛选鉴定阳性植株以获得纯合的 35S:SOS2/WT,再将获得的 35S:SOS2 和 WRKY12-OE5 转基因株系进行杂交,通过筛选鉴定获得 35S:SOS2/WRKY12-OE5 转基因株系,为进一步研究 SOS2 基因与 WRKY12 基因之间的遗传关系奠定基础。

关键词:拟南芥;WRKY12 基因;SOS2 基因;重组质粒;转基因植株

中图分类号:Q943.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2025)09-1213-05

Construction of 35S:SOS2/WRKY12-OE5 transgenic line of *Arabidopsis thaliana*

MA Qian, FAN Tingting, WU Xi, JIA Yafeng, ZHANG Zhen, SONG Hui

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

Abstract: To investigate the genetic relationship between SOS2 and WRKY12 in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*, the cDNA produced by reverse transcription of wild-type *Arabidopsis thaliana* RNA was used as a template to amplify the SOS2 fragment, then pART27 and SOS2 fragment were double digested using *Kpn* I and *Xho* I, and pART27 was ligated to SOS2 fragment using T4 ligase. The ligated products were transformed into the prepared *Escherichia coli* receptor state and coated onto resistance plates, and single colonies were picked for polymerase chain reaction (PCR) identification and sequencing of positive strains. Fragments of recombinant plasmids were extracted from the correctly sequenced positive monoclonal strains, transformed into the prepared *Agrobacterium* receptor state GV3101, and coated onto the double antibody plates. Monoclonal colonies were selected for PCR identification and sequencing, thereby obtaining positive monoclonal colonies. Floral dip transformation was performed on wild-type *Arabidopsis thaliana*, followed by screening and identification of positive plants to obtain homozygous 35S:SOS2/WT. The resulting 35S:SOS2 and WRKY12-OE5 transgenic lines were then crossed, and through screening and identification, the 35S:SOS2/WRKY12-OE5 transgenic line was obtained, laying the foundation for further investigation into the genetic relationship between SOS2 gene and WRKY12 gene.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; WRKY12 gene; SOS2 gene; recombinant plasmids; transgenic plants

土壤盐渍化是限制农业发展的一项重要生态因素^[1]。由于持续影响植物生长与发育的整个周期,对植物造成不可逆转的伤害,破坏了植物正常

代谢,特别是高浓度的盐离子影响了细胞膜的通透性。植物的渗透性降低,难以吸收水分,易处于生理干旱状态,严重时会导致植物死亡^[2]。因此

收稿日期:2023-05-25;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(JZ2023HGQB0167)

作者简介:马倩(1998—),女,安徽亳州人,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:fantingting@hfut.edu.cn

寻找响应植物盐胁迫应答的基因,并阐明其功能和作用机制具有重要意义。

自然界中,植物已经进化出一系列复杂的调节网络来应对盐胁迫^[3]。盐激活的盐过敏感(salt overly sensitive, SOS)途径是盐胁迫抗性的一个经典且重要的途径^[4]。有大量研究表明蛋白激酶 SOS2 响应盐胁迫应答^[4]。而 WRKY12 与 SOS2 基因是否存在遗传学关系并不清楚。本文通过构建 35S: SOS2/WT 和 35S: SOS2/WRKY12-OE5 转基因植株,为进一步研究 WRKY12 与 SOS2 基因之间的遗传关系及两者在植物盐胁迫响应中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

植物材料是哥伦比亚(Columbia, col)遗传背景的野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),购于美国拟南芥种质资源中心;WRKY12-OE5 转基因植株由合肥工业大学植物分子生物学实验室制作与繁殖所得。载体构建所用质粒有 pART27、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101。

1.1.2 主要试剂及酶类

主要试剂及酶有:Plasmid miniprep Kit (TIANGEN)、T4-DNA Ligase(NEB)、限制性内切酶 *Kpn* I (NEB)、*Xho* I (NEB)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)、2 \times San Taq PCR (Sangon Biotech)、DNA loading buffer、异丙醇、无水乙醇氯仿、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris-HCl、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)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 200 mL 锥形瓶中,加入双蒸水后,通过 pH 计调节 pH 值至 5.8,使用高温高压灭菌锅高压蒸汽灭菌 20 min (121 $^{\circ}$ C, 101 kPa),灭菌后在超净台中倒入一次性培养皿中紫外灭菌,等其凝固;之后使用过滤灭菌的 0.1%氯化汞清洗种子 3 min,用双蒸水清洗 5 次,进行灭菌消毒。将种子均匀整齐点在培养基上,用封口膜将其包紧密封,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱,春化 2 d,再于光照培养箱中 22 $^{\circ}$ C、16 h 光照垂直培养 14 d。

1.2.2 拟南芥 RNA 提取及反转合成 cDNA

实验前将实验所需试剂异丙醇、无水乙醇、氯

仿均放置于-20 $^{\circ}$ C 冰柜中预冷。清洗研钵,烘干后用锡箔纸包裹,于 180 $^{\circ}$ C 烘箱烘 4.5 h,待其冷却至室温后放置于-20 $^{\circ}$ C 冰柜中预冷。

将样品置于预冷的研钵中,加液氮研磨,充分研碎后,加入 1 mL Trizol 溶液,继续研磨至完全融化;转移至无酶 1.5 mL 离心管中,冰上静置 5 min,充分裂解后离心 10 min (1 200 r/min, 4 $^{\circ}$ C);将上清转移至新 EP 管中,加入 200 μ L 氯仿,震荡混匀,冰上静置 5 min,离心 15 min (1 200 r/min, 4 $^{\circ}$ C),取 400 μ L 上层液体至新的离心管中,加入等量的异丙醇,振荡混匀静置 5 min,离心 10 min (1 200 r/min, 4 $^{\circ}$ C),弃上清;缓慢加入 800 μ L 70%乙醇溶液,离心 5 min,弃上清;超净台内倒置 30 min,加入 40 μ L DEPC 水,65 $^{\circ}$ C 水浴,混匀后检测纯度与浓度。按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书反转合成 cDNA,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 拟南芥 DNA 的提取

将样品置于预冷研钵中,加入液氮充分研磨组织至粉末状,转移至 1.5 mL 离心管,加 400 μ L SDS DNA 提取液,离心 10 min (12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C);取 200 μ L 上清至新的离心管中,取等量的异丙醇,12 000 r/min 离心 10 min,去上清;加入 800 μ L 70%乙醇溶液,离心 5 min,弃上清;超净台内倒置 30 min,加入 40 μ L 超纯水,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 SOS2 的 CDS 区域基因片段的克隆

利用 Oligo 7.0 软件设计以下引物进行 SOS2 编码序列(coding sequence, CDS)区域基因片段的克隆,上游引物序列为:5'-ATGACAAA GAAAATGAGAAGAGTGGG-3',下游引物序列为:5'-ATGACAAAGAAAATGAGAAGGT GGG-3',以野生型拟南芥 RNA 反转录成的 cDNA 为扩增模板进行克隆。

1.2.5 大肠杆菌的转化

从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出大肠杆菌 DH5 α 感受态,放置于冰上自然溶解。吸取 5 μ L 连接产物加入感受态细胞中,吹打混匀,冰上放置 30 min,42 $^{\circ}$ C 金属浴中热激 50 s,再放置于冰上冷激 2 min。冷激后加入 600 μ L 无抗性液体 LB 培养基,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中 200 r/min 振荡培养 1 h。涂布于壮观霉素的固体 LB 培养皿中,菌液干燥后,倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜,次日挑取单菌落接种至壮观霉素的液体培养基内,聚合酶链式

反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定后选取阳性菌落测序比对,得到具有重组质粒的大肠杆菌菌株。

1.2.6 农杆菌的转化

从-80℃冰箱中取出农杆菌GV3101感受态,放置于冰上自然溶解。吸取5μL重组质粒至感受态细胞中,吹打混匀,冰上放置30min,液氮冷激1min,37℃水浴5min,加入700μL无抗性液体LB培养基,于28℃恒温摇床培养3~4h,涂布于庆大霉素与壮观霉素双抗性固体LB培养基至培养皿中,倒置于28℃培养箱培养2d,挑取单菌落接种至庆大霉素与壮观霉素双抗性的液体LB培养基内,PCR鉴定后选取阳性菌落,得到具有重组质粒的农杆菌菌株。

1.2.7 浸花侵染法侵染转基因拟南芥

将阳性农杆菌接种于50mL的庆大霉素与壮观霉素双抗性的液体LB培养基中,振荡培养至 A_{600} 为1.2~1.4,离心去上清,用侵染缓冲液重悬至溶液 A_{600} 为0.8~1.2,每4mL重悬缓冲液加1μL的表面活性剂L-77后混匀,侵染花序,黑暗处理12h。1周后进行2次侵染。

1.2.8 转基因拟南芥杂交

选取未开放的花作为母本,用镊子将多余的花蕾移除,一般保留最佳的5个左右花蕾;将花蕾固定,用消毒后的镊子拨松花苞,去除绿色花萼,撑开花瓣,夹掉淡黄色的雄蕊(共6个),留1个柱头,套袋,以免被飘散的花粉污染;选择已经完全开放的花作为父本,用镊子从杂交父本上摘取花药,涂抹至去雄的柱头上,授以父本的花粉,做标记;3d后柱头伸长,则杂交成功;杂交成功后,将母本植株上未杂交的花蕾去除,2周左右收集杂交种子。

1.2.9 转基因阳性植株的鉴定

将侵染与杂交所得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,4℃春化2d,光照培养箱培养7d,将幼苗移栽至土质培养基中,7d后提取DNA,经PCR鉴定正确后,即获得转基因阳性植株。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 SOS2 CDS 区域的克隆

为确定SOS2与WRKY12在响应盐胁迫中的遗传关系,构建35S:SOS2过表达载体。本文以cDNA为模板,采用PCR技术扩增片段,得到SOS2片段,结果如图1所示。图1中,M表示DNA Marker。从图1可以看出,SOS2的克隆片

段大小与SOS2的实际大小一致。

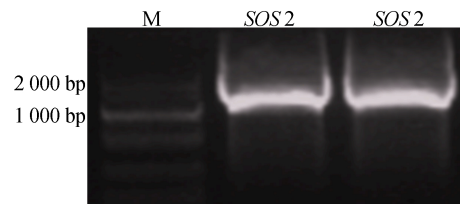


图1 SOS2 CDS片段的克隆

2.2 目的片段和质粒双酶切

使用Kpn I和Xho I这2种限制性内切酶对SOS2的CDS片段以及pART27质粒进行双酶切,鉴定结果如图2所示,图2中,M表示DNA Marker。图2表明得到了具有相同黏性末端的片段和质粒。

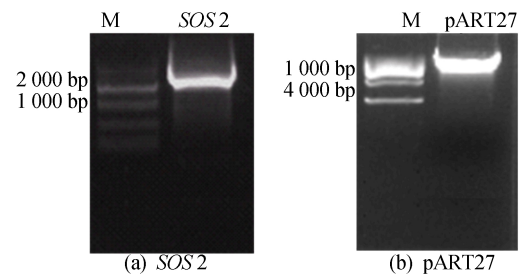


图2 SOS2和pART27的双酶切

2.3 大肠杆菌转化后阳性克隆鉴定

使用T4连接酶连接具有相同黏性末端的片段与质粒,转化至大肠杆菌感受态中,涂布培养过夜,从壮观霉素抗性LB培养皿中挑取单克隆菌落,使用SOS2的CDS片段引物进行PCR鉴定,挑取阳性菌株进行测序,以供进一步实验使用。鉴定结果如图3所示,除泳道2外,其他泳道有明亮条带且大小正确。图3中:M表示DNA Marker;泳道1~泳道7表示大肠杆菌菌落的PCR结果。

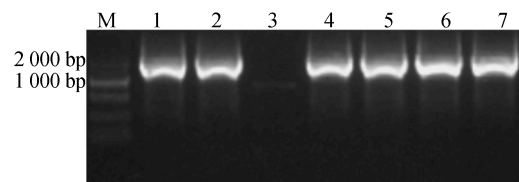


图3 大肠杆菌鉴定结果

2.4 农杆菌鉴定

得到测序正确具有重组质粒的大肠杆菌后,使用质粒小提试剂盒提取质粒,转入农杆菌感受态中,得到具有重组质粒的阳性农杆菌菌株,选取菌株在28℃进行培养,浸花侵染至拟南芥野生

型中,鉴定结果如图 4 所示。图 4 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 7 表示农杆菌菌落的 PCR 结果。

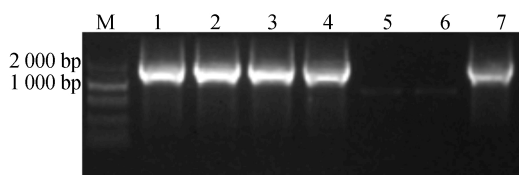


图 4 农杆菌鉴定结果

2.5 WRKY12-OE5 过表达植株纯合体鉴定

为确保实验准确性,在进行杂交之前对拟南芥 WRKY12-OE5 过表达植株进行 PCR 鉴定,鉴定结果如图 5 所示,图 5 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 7 所有植株均为阳性植株。

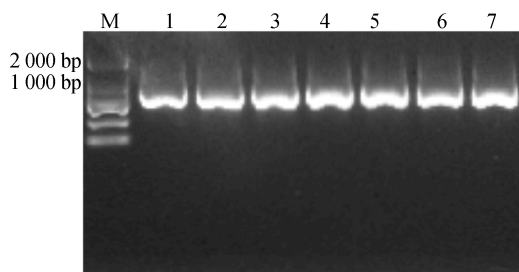


图 5 WRKY12-OE5 过表达植株鉴定结果

2.6 转基因植株的筛选和鉴定

收取 T0 代种子后,均匀点播在含有卡那霉素抗性的 1/2MS 培养基中,2 周后选取叶片较大、根茎较长的幼苗移栽至土培中,1 周后提取 DNA 进行 PCR 鉴定,结果如图 6、图 7 所示。挑选阳性幼苗进行培育收种。图 7 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 7 表示基因的 PCR 结果。

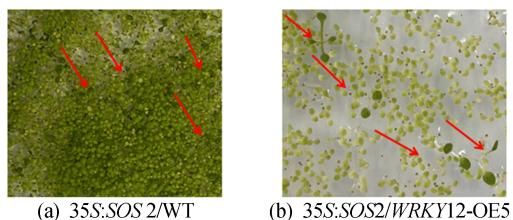
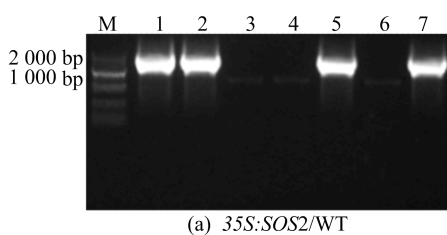
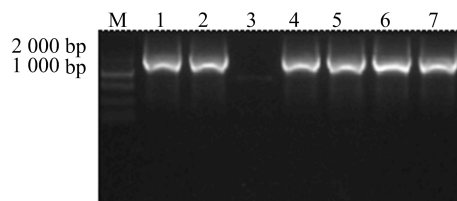


图 6 阳性植株的筛选



(a) 35S::SOS2/WT



(b) 35S::SOS2/WRKY12-OE5

图 7 转基因植株 PCR 鉴定

2.7 纯合体的筛选

收取 T1 代种子后,使用抗性分离比筛选阳性菌株,进一步筛选出纯合体以供研究 WRKY12 基因与 SOS2 基因在拟南芥耐盐性胁迫的遗传学关系,结果如图 8 所示。

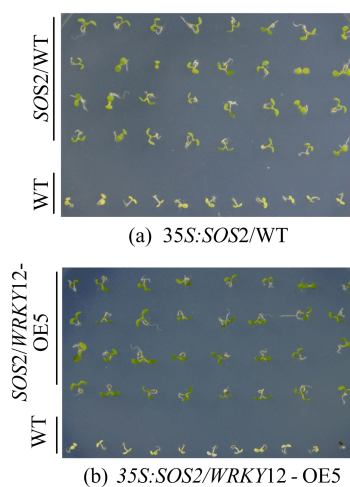


图 8 转基因植株的抗性分离比

通过抗性分离,WT 植株在卡那霉素抗性培养基上黄化,无明显根长,11 株 WT 植株均不能在卡那霉素抗性培养基上生长;35S::SOS2/WT 与 35S::SOS2/WRKY12-OE5 在卡那霉素抗性培养基上均生长正常,叶片较绿、根长较长,32 株均为阳性植株。

3 讨 论

土壤盐渍化主要有 2 个方面的因素:① 自然因素,地下水位升高、雨季水位上涨都会发生土壤盐渍化;② 由于人类不合理的开发灌溉导致水位升高,使用污水灌溉,常年使用农药化肥等,都会造成并加快土壤盐渍化的进程^[5]。粮食安全问题、人类的生存与生活质量息息相关,因此研究响应植物盐胁迫基因之间的关系,并阐明其功能具有重要意义。

在大豆中,WRKY 家族转录因子 *Gm*-WRKY12 具有耐盐性和抗旱性^[6];蛋白激酶

SOS2 参与到拟南芥的盐胁迫中^[4],拟南芥 SOS2 基因编码一种耐盐性所需的蛋白激酶^[7],其能够与 SCABP8/CBL10 相互作用,保护拟南芥的茎免受盐胁迫^[8],EIN3 和 SOS2 协同调节植物的耐盐性^[9]。但有关 WRKY12 与 SOS2 基因之间的关系与功能尚不清楚。因此研究植物盐耐受性,寻找并阐明响应盐胁迫应答的 WRKY12 与 SOS2 基因之间的关系及其功能具有重要的理论及实践意义。研究表明,WRKY12 基因参与了植物对盐胁迫的响应,为了进一步研究基因 WRKY12 与 SOS2 基因在拟南芥响应盐胁迫应答之间的关系,通过基因工程技术构建 35S:SOS2 重组载体,将其转入野生型拟南芥中,并和 WRKY12-OE5 过表达植株双杂交,从而获得 35S:SOS2/WT 和 35S:SOS2/WRKY12-OE5 转基因植株。为研究基因 WRKY12 和 SOS2 在植物体中响应缺铁胁迫的遗传关系奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] ZHU J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2001,6(2):66-71.
- [2] JULKOWSKA M M, TESTERINK C. Tuning plant signaling and growth to survive salt[J]. Trends in Plant Science, 2015,20(9):586-594.
- [3] DEINLEIN U,STEPHAN A B,HORIE T,et al. Plant salt-tolerance mechanisms[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(6):371-379.
- [4] GUO Y, HALFTER U, ISHITANI M, et al. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance[J]. The Plant Cell,2001,13(6):1383-1400.
- [5] LAKHDAR A, RABHI M, GHNAYA T, et al. Effectiveness of compost use in salt-affected soil[J]. Journal of Hazardous Materials,2009,171(1/2/3):29-37.
- [6] SHI W Y, DU Y T, MA J, et al. The WRKY transcription factor *GmWRKY12* confers drought and salt tolerance in soybean[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018,19(12):4087.
- [7] GONG D, GUO Y, JAGENDORF A T, et al. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance[J]. Plant Physiology,2002, 130(1):256-264.
- [8] QUAN R, LIN H, MENDOZA I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress[J]. The Plant Cell,2007,19(4):1415-1431.
- [9] QUAN R, WANG J, YANG D, et al. EIN3 and SOS2 synergistically modulate plant salt tolerance[J]. Scientific Reports,2017,7(1):44637.
- [11] LIU Z, CAO Y, WANG Y, et al. Computer vision-based concrete crack detection using U-net fully convolutional networks [J]. Automation in Construction, 2019, 104: 129-139.
- [12] 李原,李燕君,刘进超,等.基于改进 Res-UNet 网络的钢铁表面缺陷图像分割研究[J].电子与信息学报,2022, 44(5):1513-1520.
- [13] ZHANG Z, LIU Q, WANG Y. Road extraction by deep residual u-net[J]. IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters,2018,15(5):749-753.
- [14] 蓝金辉,王迪,申小盼.卷积神经网络在视觉图像检测的研究进展[J].仪器仪表学报,2020,41(4):167-182.
- [15] GAN J, LI Q, WANG J, et al. A hierarchical extractor-based visual rail surface inspection system[J]. IEEE Sensors Journal,2017,17(23):7935-7944.
- [16] 赵凯琳,靳小龙,王元卓.小样本学习研究综述[J].软件学报,2021,32(2):349-369.
- [17] ZHAO H, SHI J, QI X, et al. Pyramid scene parsing network[C]//Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. [S. l. : s. n.], 2017: 2881-2890.
- [18] VOULODIMOS A, DOULAMIS N, DOULAMIS A, et al. Deep learning for computer vision: a brief review[J]. Computational Intelligence and Neuroscience,2018,1:7068349.
- [19] CHEN F, WANG Y, XU S, et al. Style transfer network for complex multi-stroke text [J]. Multimedia Systems, 2023,29(3):1291-1300.
- [20] LIN T Y, GOYAL P, GIRSHICK R, et al. Focal loss for dense object detection[C]//Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. [S. l. : s. n.], 2017:2980-2988.
- [21] SUN K, XIAO B, LIU D, et al. Deep high-resolution representation learning for human pose estimation [C]//Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. [S. l. : s. n.], 2019: 5693-5703.
- [22] CHEN L C, ZHU Y K, PAPANDREOU G, et al. Encoder-decoder with atrous separable convolution for semantic image segmentation [C]//Proceedings of the European Conference on Computer Vision (ECCV). [S. l. : s. n.], 2018:801-818.

(责任编辑 吴 亮)

(责任编辑 张 镛)

(上接第 1200 页)