

紫杆柽柳 *MnSOD* 基因在非生物胁迫中的作用

班巧英, 刘桂丰, 姜静, 常万霞, 王玉成*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

提要: 构建了酵母表达载体 pYES2-MnSOD, 并将其转入酿酒酵母 INVSc1, 以转空载体 pYES2 的酵母 INVSc1 为对照, 检测其抗 NaCl、Na₂CO₃、NaHCO₃ 和紫外线胁迫能力。结果表明, 转 *MnSOD* 基因酵母在以上逆境因素胁迫下的存活率有明显提高, 说明 *MnSOD* 基因具有较强的抗 NaCl、Na₂CO₃、NaHCO₃ 和紫外线胁迫能力。

关键词: 紫杆柽柳; 锰-超氧歧化酶; 酿酒酵母; 非生物胁迫

The Roles of *MnSOD* from *Tamarix androssowii* in Abiotic Stress Tolerances

BAN Qiao-Ying, LIU Gui-Feng, JIANG Jing, CHANG Wan-Xia, WANG Yu-Cheng*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Breeding and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In this study, we constructed a yeast expression vector pYES2-MnSOD, transformed it into cells of yeast INVSc1, and yeast transformed with empty pYES2 were used as control to test the abiotic stress tolerance of MnSOD. The results of NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃ and ultraviolet ray tolerance tests showed that *MnSOD* transformed yeast lines displayed obvious high survival rate than control lines. It suggested that the *MnSOD* gene was highly tolerant to the stresses of NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃ and ultraviolet ray.

Key words: *Tamarix androssowii*; MnSOD; *Saccharomyces cerevisiae*; abiotic stress

抗氧化酶类是植物抵抗氧化胁迫的关键因素。盐胁迫下, 植物往往会启动一套保护酶系统 [如: 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)] (沈法富和尹承侗 1993)。它们可消除盐胁迫下产生的活性氧和过氧化物自由基, 以避免这些物质对细胞质膜和脂肪酸的氧化作用, 从而保证质膜的完整性(李玉全等 2002)。其中, SOD 是抗氧化系统中一种在生物体内普遍存在的金属酶, 处于核心地位。植物 MnSOD 与酵母和动物体内的 MnSOD 一样, 都与线粒体密切相关, 由核基因编码, 在细胞质中合成蛋白质前体, 蛋白质前体在线粒体前导肽作用下运输到线粒体内发挥功能(White 和 Scandalios 1987)。其生理功能主要是清除超氧自由基。据报道, 经过 1% 和 3% NaCl 处理后的耐盐大麦品种比不耐盐的小麦品种更能维持相对较高的 SOD 活性, 从而削弱膜脂质过氧化作用和减轻膜伤害(龚明等 1989)。近年来通过 SOD 基因工程改良植物抗干旱和耐盐碱的研究已有所报道。韩利芳和张玉发(2004)采用农杆菌介导的转基因方法, 将烟草 *MnSOD* 基因的 cDNA 序列导入苜蓿中, 成功诱导了转基因植株的再生, 部分转基因植株的 MnSOD 活性有显著提高。Mckersie 等(1993)将烟草的 *MnSOD* 的 cDNA

序列转入苜蓿, 得到的转基因植株其总 SOD 酶活性提高 2 倍, 它的干旱耐受性和下一年的产量均有提高。以后 Mckersie 等(1999)将获得的转基因苜蓿进行田间试验, 进一步证明转基因苜蓿中 *MnSOD* 的表达能通过调控叶绿素荧光、电解质渗漏和茎尖再生以减弱水分亏缺的伤害, 从而增强了苜蓿的抗旱性。*MnSOD* 基因在烟草和玉米叶绿体中的过量表达也可增强两种植物对质膜和光系统的保护作用以及对除草剂引起的氧胁迫耐受性(Bowler 等 1991; Slooten 等 1995; van Breusegem 等 1999)。Tanaka 等(1999)报道, 酵母线粒体 *MnSOD* 在水稻叶绿体中的过量表达可提高转基因植株对盐胁迫的耐受性, 盐胁迫下的转基因植株中 SOD 和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性都提高 1.5~2 倍。本文将从紫杆柽柳中克隆获得的 *MnSOD* 基因构建到酵母表达载体 pYES2 中, 并转化酵母后, 检测了转 *MnSOD* 基因酵母对各种非

收稿 2007-09-26 修定 2008-01-14

资助 教育部科学技术研究重点项目(107037)、国家自然科学基金(30571509)和黑龙江省攻关重点项目(GB06B303-1)。

* 通讯作者(E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191627)。

生物胁迫的抗逆能力。

材料与amp;方法

紫杆柽柳(*Tamarix androssowii* Litw.) *MnSOD* 基因(A_Y573576)为本实验室克隆;大肠杆菌感受态 TOP10;酵母表达载体 pYES2 (含有 URA3 基因、氨苄霉素选择抗性基因、多克隆位点等);酵母菌菌株 INVSc1 (表现型为 Ura⁻);限制性内切酶 *Xba*I 和 *Kpn*I、高保真 Pfu Taq 酶、T4 DNA 连接酶等购自 Promega 公司,胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜公司, Ex Taq、DNA Marker DL2000 和 λ HindIII 购自宝生物工程(大连)有限公司。氨苄霉素(Ampicillin, Amp)购自 Sigma 公司,其他化学试剂等购自国内生产厂家,均为分析纯。根据 *MnSOD* 基因的 cDNA 序列,设计酵母表达引物,引物序列见表 1。

构建酵母表达载体时,用 PCR 的方法引入带酶切位点的 *MnSOD* 全基因,然后将目的片段和 pYES2 酵母表达载体同时用 *Xba*I 和 *Kpn*I 进行酶切,再将酶切后的产物进行纯化(cycle-pure Kit),在 T4 DNA 连接酶的作用下,将 *MnSOD* 基因和 pYES2 连接并转化大肠杆菌 TOP10F' 感受态细胞。随机挑选单克隆转化子提取质粒,用 *Xba*I 和 *Kpn*I 双酶切进一步检测插入位点的正确与否。

重组质粒 pYES2-MnSOD 和载体 pYES2 的酵母遗传转化时,将载有 *MnSOD* 基因的重组质粒(pYES2-MnSOD)和空载体(pYES2)分别转化酵母菌 INVSc1,获得的转化子分别命名为 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和 INVSc1 (pYES2),并接种在 SC-U [0.67% 酵母氮基质(不含氨基酸);2% 葡萄糖;0.01% (腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸、尿嘧啶);0.005% (天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸)] 固体选择培养基上,30℃ 培养 24 h。然后用 PCR 的方法检测是否将 pYES2-MnSOD 质粒转入酵母。以

随机挑选的4个INVSc1 (pYES2-MnSOD)的酵母单菌落总 DNA 为模板,以 MnSODL 和 MnSODR 为引物,对 *MnSOD* 基因是否转入酵母进行 PCR 扩增检测。20 μ L PCR 反应体系:2.0 μ L 10 \times PCR 缓冲液, MnSODL 和 MnSODR 引物各 1.0 μ mol \cdot L⁻¹, 1.6 μ L dNTP (2.5 mmol \cdot L⁻¹), 0.2 μ L Ex Taq (10 U \cdot μ L⁻¹), 加入 200 ng 酵母 DNA。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环;72℃ 保温 7 min。产物检测:PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

为了分析紫杆柽柳 *MnSOD* 基因的抗逆能力,将重组酵母 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 分别用 5 mol \cdot L⁻¹ NaCl、8% 和 10% (W/V) Na₂CO₃、5% (W/V) NaHCO₃ 以及紫外线照射 12 s 和 16 s 的胁迫来观察菌落存活的机率。处理有:(1) NaCl 胁迫:4℃ 条件下,用 5 mol \cdot L⁻¹ NaCl 溶液分别胁迫等摩尔数的 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和 INVSc1 (pYES2), 分别处理 4 h 和 24 h 后,将菌液稀释 1 000 倍接种于 SC-U 固体选择培养基(含 2% 葡萄糖)上,于 30℃ 恒温中培养 40 h 左右直至长出单菌落;(2) Na₂CO₃ 胁迫:配置 8% 和 10% 的 Na₂CO₃ 溶液,于 30℃ 条件下分别胁迫等摩尔数的 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和 INVSc1 (pYES2) 3 h,等量接种于 SC-U 固体选择培养基(含 2% 葡萄糖)上,于 30℃ 恒温中培养 40 h 左右直至长出单菌落;(3) NaHCO₃ 胁迫:用 5% 的 NaHCO₃ 溶液,于 30℃ 条件下分别胁迫等摩尔数的 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和 INVSc1 (pYES2) 4 h 和 24 h 后,将菌液稀释 1 000 倍接种于 SC-U 固体选择培养基(含 2% 葡萄糖)上,30℃ 恒温中培养 40 h 左右直至长出单菌落;(4)紫外线胁迫:将等摩尔数的 INVSc1 (pYES2-MnSOD)和 INVSc1 (pYES2)接种于固体 SC-U 固体选择培养基(含 2% 葡萄糖)上,在紫外线下分别照射 12 s 和 16 s 后,30℃ 恒温中培养 40 h 左右直至长出单菌落。

表 1 构建酵母表达载体所用引物序列

Table 1 The primer sequences used in constructing yeast expression vector

引物名称	引物序列
MnSODL	5' AGTCTCTAGAATGGCGCTTCGCACATTGGCGGCC 3' (下划线为 <i>Xba</i> I 酶切位点)
MnSODR	5' TTGCAGGTACCTTACAGTTGTGGGCACTCCTTGTC 3' (下划线为 <i>Kpn</i> I 酶切位点)

实验结果

1 酵母重组表达载体(pYES2-MnSOD)的获得

用 *Kpn*I 和 *Xba*I 两种限制性内切酶对重组质粒 pYES2-MnSOD 进行双酶切, 于 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳检测, 结果在 5.9 kb 和 699 bp 均得到了特异性条带(图 1), 说明目的基因已正确连接。

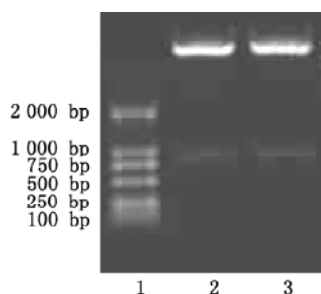


图1 重组质粒双酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid with restrictive enzyme digestion

1: DNA Marker DL2000; 2、3: 重组质粒 pYES2-MnSOD 双酶切产物。

以随机挑选的 4 个 INVSc1 (pYES2-MnSOD) 的酵母单菌落总 DNA 为模板, 以特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳

分析, 其扩增片段与预期的 699 bp 长度相吻合(图 2)。PCR 结果呈阳性证明了重组质粒 pYES2-MnSOD 已经转入酵母 INVSc1。

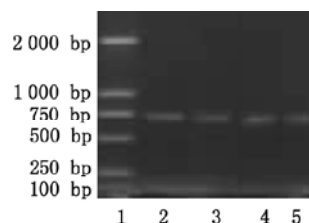


图2 pYES2-MnSOD 转酵母 INVSc1 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of pYES2-MnSOD transformed yeast INVSc1

1: DNA Marker DL2000; 2~5: INVSc1 (pYES2-MnSOD) 的菌落 PCR 产物。

2 酵母的压力实验

在 NaCl 胁迫时, 非胁迫条件下的重组酵母 INVSc1 (pYES2-MnSOD) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 的菌落数量相同, 但 NaCl 胁迫下的菌落存活率明显高于对照酵母 INVSc1 (pYES2), 且胁迫时间越长, 菌落存活的差异越明显。说明在相同盐胁迫条件下, *MnSOD* 基因的表达可明显提高酵母细胞对 NaCl 胁迫的耐受能力(图 3-a); 在

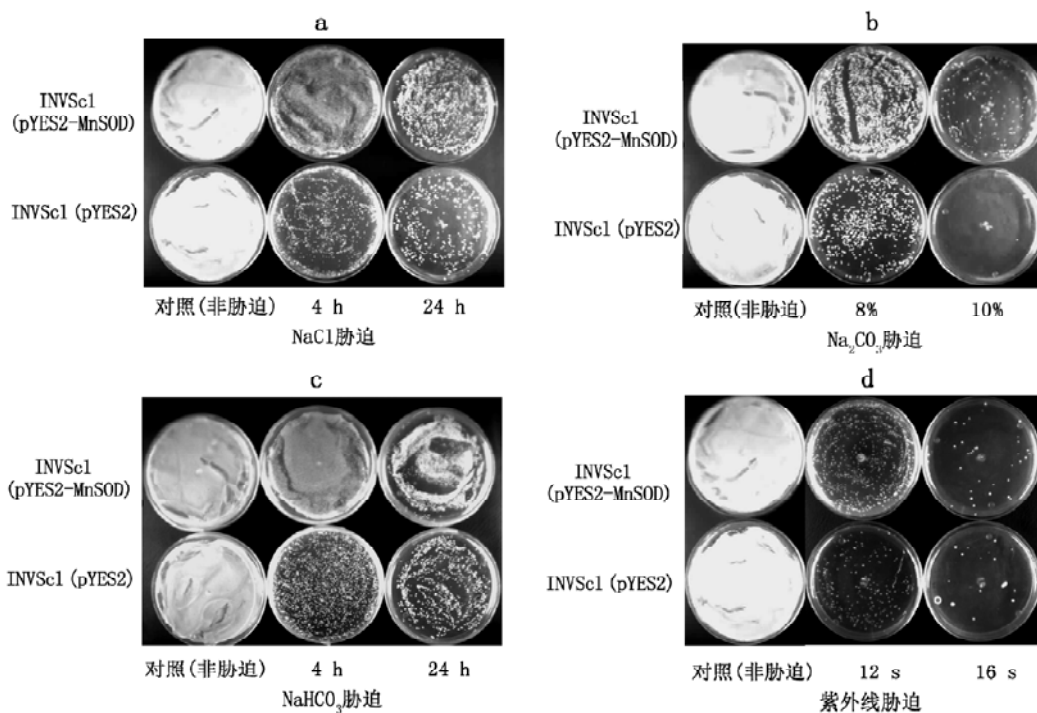


图3 不同胁迫条件下转基因酵母的生长

Fig.3 Growth of transgenic yeast under different stress conditions

Na₂CO₃胁迫下,重组酵母INVSc1 (pYES2-MnSOD)生长量明显优于对照酵母INVSc1 (pYES2),而且,Na₂CO₃溶液浓度达到10%时,INVSc1 (pYES2)几乎全部死亡,而INVSc1 (pYES2-MnSOD)却仍有一定的存活率。说明紫杆怪柳MnSOD基因的表达可明显增强酵母细胞的抗盐碱能力(图3-b);NaHCO₃胁迫下,随着胁迫时间的延长,重组酵母INVSc1 (pYES2-MnSOD)单菌落缓慢减少,而对照酵母INVSc1 (pYES2)单菌落迅速减少,且受胁迫影响明显。说明紫杆怪柳MnSOD有明显的抗NaHCO₃胁迫的能力(图3-c);紫外线胁迫下,虽然酵母生长受到抑制,但紫外线照射12s和16s后,重组酵母INVSc1 (pYES2-MnSOD)的存活数比对照酵母INVSc1 (pYES2)的多,说明INVSc1 (pYES2-MnSOD)比INVSc1 (pYES2)更能抵抗紫外线胁迫(图3-d)。

讨 论

干旱(Dat等2000)、盐碱(Hernandez等1993)、低温或高温(Dat等1998)等,都可以加剧植物活性氧的产生,破坏植物体内活性氧产生和清除之间的平衡,最终导致植物体内活性氧的大量积累,从而对植物产生伤害。因此,采用分子生物学手段,对植物的氧化代谢进行修饰,提高植物抗氧化胁迫的能力,是植物抗性研究的方向之一(秦小琼和贾士荣1997)。超氧化物歧化酶是生物体内的自由基清除剂,其活性高低与植物的抗逆能力密切相关,是生物有机体内清除多余超氧阴离子的一种保护酶。目前已有几种植物的SOD基因得到克隆并用来转化不同的植物,以获得SOD活性增强的转基因植株。SOD在转基因烟草、苜蓿和棉花等植物中的过量表达可以提高它们对氧化胁迫的耐受性(Bowler等1991;秦小琼和贾士荣1997;Foyer等1994)。说明SOD基因在植物抗氧化胁迫过程中是重要的。

MnSOD基因有耐盐能力,已经有较多的报道,如,Tanaka等(1999)的工作表明,酵母线粒体MnSOD在水稻叶绿体中的过量表达可提高转基因植株对盐胁迫的耐受性;Wang等(2004)的工作也表明,MnSOD在拟南芥中的超量表达可提高转基因植株的耐盐能力。但MnSOD具有抵抗Na₂CO₃、NaHCO₃和紫外线胁迫能力的报道迄今尚未见。本文结果表明,紫杆怪柳MnSOD具有良好的抗Na₂CO₃、NaHCO₃和紫外线胁迫的能力,说明MnSOD基因的抗逆能力较为广泛,这对深入

认识MnSOD基因的抗逆性和将该基因用于基因工程育种来说是有参考意义的。

参考文献

- 龚明,丁念诚,贺子义,刘友良(1989). 盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化的关系. 植物学报, 31 (11): 841~846
- 韩利芳,张玉发(2004). 烟草MnSOD基因在保定苜蓿中的转化. 生物技术通报, 1: 39~46
- 李玉全,张海艳,沈法富(2002). 作物耐盐性的分子生物学研究进展. 山东科学, 15 (2): 8~14
- 秦小琼,贾士荣(1997). 植物抗氧化逆境的基因工程. 农业生物技术学报, 5 (1): 14~23
- 沈法富,尹承信(1993). 盐胁迫对棉花幼苗子叶超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响. 棉花学报, 5 (1): 39~44
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, de Rycke R, Botterman J, Sybesma C, van Montagu M, Inzé D (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. EMBO J, 10 (7): 1723~1732
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, van Montagu M, Inzé D, van Breusegem F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci, 57 (5): 779~795
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. Plant Physiol, 116 (4): 1351~1357
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ, 17 (5): 507~523
- Hernandez JA, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA, Sevilla F (1993). Salt-induced oxidation stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiol Plant, 89 (1): 103~110
- McKersie BD, Chen Y, de Beus MD, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol, 103 (4): 1155~1163
- McKersie BD, Bowley SR, Jones KS (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiol, 119 (3): 839~847
- Slooten L, Capiou K, van Camp W, van Montagu M, Sybesma C, Inzé D (1995). Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. Plant Physiol, 107 (3): 737~750
- Tanaka Y, Hibio T, Hayashi Y, Tanaka A, Kishitani S, Takabe T, Yokota S, Takabe T (1999). Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. Plant Sci, 148 (2): 131~138
- van Breusegem F, Slooten L, Stassart JM, Botterman J, Moens T, van Montagu M, Inzé D (1999). Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. J Exp Bot, 50 (330): 71~78
- Wang YH, Ying Y, Chen J, Wang XC (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. Plant Sci, 167 (4): 671~677
- White JA, Scandalios JG (1987). *In vitro* synthesis, importation and processing of Mn-superoxide dismutase (SOD-3) into maize mitochondria. Biochim Biophys Acta, 926 (1): 16~25