

# 拟南芥血红蛋白 1 (AtGLB1) 超量表达载体 和 RNAi 表达载体的构建及转化\*

杨礼香 王正询\*\* 柯德森 巫锦雄

广州大学生命科学学院, 广州 510006

**摘要** 为研究拟南芥血红蛋白 1 基因 (*AtGLB1*) 的功能, 将 *AtGLB1* 基因构建入超表达载体 pMD 和 RNAi 载体 pZYI 中, 并采用花序浸染法将重组质粒转化拟南芥 *Columbia* 得到了转基因植株。对超表达株系和 RNAi 株系的纯合体进行 Northern 分析, 结果表明: 超量表达的拟南芥株系中 *AtGLB1* 的表达水平比野生型高很多, 而表达被抑制的 RNAi 株系中几乎检测不到 *AtGLB1* 基因的表达。这些 *AtGLB1* 表达水平不同的拟南芥株系的获得可为该基因功能的后续研究以及在农业生产中的应用奠定一定基础。

**关键词** 拟南芥血红蛋白 1; 超表达; RNAi

**中图分类号** Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0413-04

血红蛋白存在于整个生物界。植物中的血红蛋白至少有 3 类: 共生的血红蛋白、非共生的血红蛋白、截短的血红蛋白<sup>[1]</sup>。非共生的血红蛋白可以分为 2 类, 血红蛋白 1 (Hb1) 和血红蛋白 2 (Hb2)。Hb1 几乎存在于整个植物界, 生物和非生物胁迫都可以诱导 Hb1 的表达, 如细菌侵染、低氧胁迫、渗透胁迫、寒冷胁迫、营养缺乏等<sup>[2-4]</sup>。非共生血红蛋白 1 具有过氧化物酶类似活性并参与 NO 的代谢, 因此在许多生物中的功能都是与 NO 的代谢或清除相关<sup>[5]</sup>。拟南芥中的非共生血红蛋白 1 (*AtGLB1* 或 *AHb1*) 在低氧胁迫中的作用已经研究得比较清楚。*AtGLB1* 通过与低氧胁迫下大量产生的一氧化氮 (NO) 反应形成 S-亚硝基血红蛋白, 从而清除了 NO, 减少了低氧胁迫下 NO 的释放<sup>[6-7]</sup>。同时, 在低氧胁迫下 *AtGLB1* 有助于提高过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 清除系统的活性, 从而降低了细胞中  $H_2O_2$  的含量, 减少了低氧对植物细胞的伤害<sup>[8]</sup>。然而, *AtGLB1* 在其他胁迫反应中的作用机理还不是太清楚。在许多生物和非生物胁迫中都产生活性氧和 NO, 因此 *AtGLB1* 可能也参与调节那些产生活性氧和 NO 的胁迫反应。研究 *AtGLB1* 在其他胁迫反应中的作用具有重要的意义, 尤其是与农业生产密切相关的胁迫 (如寒冷、盐、干旱、虫害等)。为此, 本研究通过转基因方法获得了不同 *AtGLB1* 表达水平的拟

南芥株系, 旨在阐明植株对寒冷、盐、干旱、虫害等胁迫的耐受性与 *AtGLB1* 表达水平间的关系, 并对 *AtGLB1* 在农业生产中的应用进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、GV3101 菌株, pBlue-script II SK(-)、pMD、pZYI 质粒, 拟南芥 cDNA 文库为笔者所在实验室保存。质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司, 限制性内切酶、连接酶、DNA 分子质量标准等购自大连宝生物公司, 其它化学试剂为国产分析纯。

### 1.2 pBluescript II SK(-)/*AtGLB1* 的构建

根据 *AtGLB1* 序列设计 5' 端引物 *AtGLB15* (5' CGGGATCC ATGGAGAGTGAAGGAAAGATTGTG 3') 和 3' 端引物 *AtGLB13* (5' CGGGATCC TTAGTTG-GAAAGATTTCATTCAGCTTT 3'), 两端引物均带有 *Bam*H I 的酶切位点。利用上述 2 个引物从 cDNA 文库 (PRL-2) (Biological Resource Center at Ohio State, USA) 中扩增 *AtGLB1* 的开放阅读框 (94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min)。用 *Bam*H I 酶切后, 将目的基因连接到 pBluescript II SK(-) 上, 得到 pBluescript II SK(-)/*AtGLB1*。质粒 pBlue-

收稿日期: 2009-11-19; 修回日期: 2010-01-18

\* 广东省自然科学基金项目 (8451009101001243) 和广州市属高校科技计划项目 (08C029) 资助

\*\* 通讯作者. E-mail: wangzhengxun@163.com

杨礼香, 女, 1972 年生, 博士, 讲师. 研究方向: 植物发育分子生物学. E-mail: yanglx@gzhu.edu.cn.

script II SK(-)具有 Ampicillin (Amp) 抗性, T3 和 T7 启动子分别位于其多克隆位点的两侧(图 1-a)。用 *AtGLB15* 引物分别和 T3 (5' ATTAACCCTCACTAAAGGGAA 3')、T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3')引物一起,以单菌落为模板,菌落 PCR 筛选程序同扩增 *AtGLB1*。*AtGLB15* 和 T3 能扩增出的为反向插入,*AtGLB15* 和 T7 能扩增出的为正向插入。选取具有正向插入的阳性克隆进行酶切鉴定后,测序鉴定。

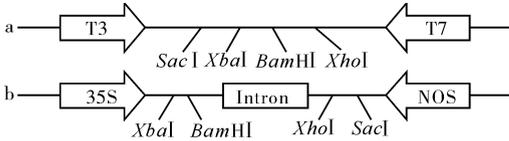


图 1 pBluescript(a)和 pZYI(b)质粒中的酶切位点

Fig. 1 Digestion sites of vector pBluescript(a) and pZYI(b)

### 1.3 pMD/ *AtGLB1* 植物表达载体的构建

将测序鉴定后的重组质粒 pBluescript II SK(-)/*AtGLB1* 转入大肠杆菌中大量扩增质粒,然后再用 *Bam*H I 酶切,得到 *AtGLB1* 酶切片段;将 pMD 用 *Bam*H I 酶切后,去磷酸化。将 *Bam*H I 酶切的 *AtGLB1* 片段与酶切并去磷酸化后的 pMD 连接,将连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。菌落 PCR 筛选含有正向插入的重组质粒 pMD/*AtGLB1* 的菌落,接菌提质粒后,进行酶切鉴定。

### 1.4 RNAi 载体的构建

RNAi 载体的构建是在同一个载体 pZYI 中插入一个正向和一个反向的目的基因拷贝。首先插入第 1 个拷贝:用 *Bam*H I 酶切 pBluescript II SK(-)/*AtGLB1* 后回收片段,并用同样的酶酶切 pZYI 载体并去磷酸化;将两者连接后转化,用正向引物为 CaMV35S (5' GAAACCTCCTCGGATTCCAT 3') 和 *AtGLB13* 进行菌落 PCR,筛选含有正向插入的重组质粒 pZYI/ *AtGLB1* 的菌落。接菌提质粒后用 *Bam*H I 酶切鉴定。因为 pBluescript II SK(-) 上的 *Xho* I 和 *Sac* I 酶切位点排列顺序与 pZYI 上的刚好相反(图 1),用 *Xho* I 和 *Sac* I 从 pBluescript II SK(-)/ *AtGLB1* 上双酶切下的片段插入 pZYI 后,其方向则为反向。因此,为确保 2 个拷贝的插入方向刚好相反,第 1 个拷贝的插入方向就应为正向。然后插入第 2 个拷贝:用 *Xho* I 和 *Sac* I 双酶切 pBluescript II SK(-)/ *AtGLB1* 后回收片段,并用这 2 个酶酶切已经连接有第 1 个拷贝的 pZYI/*AtGLB1* 重组质粒。将两者连接后转化,PCR 筛选含有正确插入的重组质粒 pZYI/*AtGLB1*/*AtGLB1* 的

菌落。接菌提质粒后用 *Xho* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定。

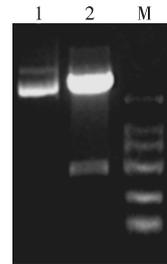
### 1.5 拟南芥转化和鉴定

拟南芥转化采用的方法是花蕾浸泡法<sup>[9]</sup>。收获转化后的拟南芥种子,并用卡那霉素 (Kan 50 mg/L) 对转基因拟南芥植株逐代进行鉴定和筛选,得到纯合株系。用 TRIzol 法提取拟南芥幼苗的总 RNA,用紫外分光光度计测定  $D_{260\text{ nm}}$  和  $D_{280\text{ nm}}$  值来确定 RNA 的浓度和纯度。将 RNA 变性后在琼脂糖凝胶中电泳,将电泳后的胶置于转膜装置中将 RNA 转到硝酸纤维素膜上。转膜 10~16 h 后,取出杂交膜,并用铅笔做好标记,放在紫外交联仪上交联。交联好的膜放入杂交炉中进行 Northern 杂交后,将杂交膜取出清洗后用保鲜膜包好置于磷屏夹内放射自显影。磷屏扫描,分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 pBluescript II SK(-)/*AtGLB1* 的鉴定

菌落 PCR 筛选出含有具有正向插入的阳性克隆后,提取重组质粒进行酶切鉴定。*Bam*H I 酶切重组质粒 pBluescript/*AtGLB1* 后,结果显示酶切出 1 条 500 bp 左右的带(图 2),表明目的片段 *AtGLB1* 已插入到相应的克隆位点。测序后与 GeneBank 中的 *AtGLB1* 序列相比较,序列完全正确。



1. 未经酶切的重组质粒 pBluescript/*AtGLB1* Recombinant plasmid pBluescript/*AtGLB1*; 2. *Bam*H I 消化后的重组质粒 pBluescript/*AtGLB1* Recombinant plasmid pBluescript/*AtGLB1* digested by *Bam*H I; M. DNA 分子质量标准 DNA marker (DL 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp)。

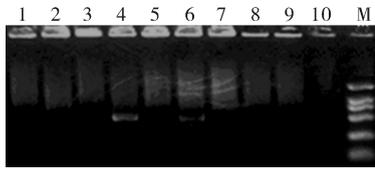
图 2 重组质粒 pBluescript/*AtGLB1* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant construction pBluescript/*AtGLB1* with enzyme digestion

### 2.2 pMD/ *AtGLB1* 的鉴定

以转化了连接产物的单菌落为模板,用正向引物 35S 和 *AtGLB13* 扩增,10 个菌落中有 2 个单菌落(4<sup>#</sup>, 6<sup>#</sup>)能扩增出 500 bp 左右的带(图 3),表明其中含有 pMD/ *AtGLB1* 质粒,且 *AtGLB1* 片段是

正向插入。从 4<sup>#</sup>, 6<sup>#</sup> 单菌落中任意挑选 1 个, 接菌提质粒后, 用 *Bam*H I 酶切, 能切下 1 条 500 bp 左右的带(图 4), 表明 *AtGLB1* 的插入正确。

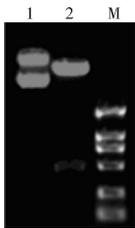


1~10. PCR 扩增产物 PCR products of *AtGLB1* gene; M. DNA 分子质量标准 DNA marker (DL 2000).

图 3 重组质粒 pMD/*AtGLB1* 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant construction

pMD/*AtGLB1* with PCR



1. 未经酶切的重组质粒 pMD/*AtGLB1* Recombinant plasmid pMD/*AtGLB1*; 2. *Bam*H I 消化后的重组质粒 pMD/*AtGLB1* Recombinant plasmid pMD/*AtGLB1* digested by *Bam*H I; M. DNA 分子质量标准 DNA marker (DL 2 000).

图 4 重组质粒 pMD/*AtGLB1* 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant construction

pMD/*AtGLB1* with enzyme digestion

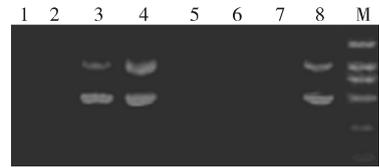
### 2.3 RNAi 载体的鉴定

pZYI/*AtGLB1*/*AtGLB1* 的构建也是以 pBlue-script II SK(-)/*AtGLB1* 的构建为基础的。

1) 第 1 个拷贝的插入鉴定。以转化了 pZYI/*AtGLB1* 质粒的单菌落为模板, 将用正向引物 35S 和 *AtGLB13* 菌落 PCR 筛选到的阳性克隆扩大培养提质粒, 用 *Bam*H I 酶切能切下 1 条 500 bp 左右的带, 表明 *AtGLB1* 片段已正向插入到 pZYI 中。

2) 第 2 个拷贝的插入鉴定。挑取转化了 pZYI/*AtGLB1*/*AtGLB1* 质粒的单菌落为模板, 用引物 35S 和 *AtGLB13* 扩增, 8 个菌落中有 3 个单菌落 (3<sup>#</sup>, 4<sup>#</sup>, 8<sup>#</sup>) 能扩增出 2 条带, 分别为 500 bp 和 1 000 bp 左右(图 5)。pZYI 载体中的 Intron 长度为 500 bp 左右, 所以 PCR 检测时扩增的 500 bp 和 1 000 bp 左右的带分别为正向插入的第 1 个拷贝 *AtGLB1* 基因和第 1 个拷贝加上载体上的 Intron。阳性克隆接菌提质粒后, 用 *Bam*H I 或 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切重组质粒, 均能切下 1 条 500 bp 左右的

带。表明 *AtGLB1* 已经插入到 2 个酶切位点且插入方向正好相反。



1~8. PCR 扩增产物 PCR products; M. DNA 分子质量标准 DNA marker (DL 2000).

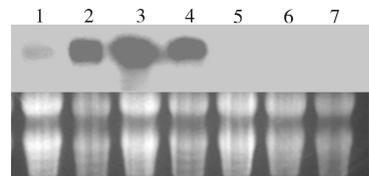
图 5 重组质粒 pZYI/*AtGLB1*/*AtGLB1* 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant construction

pZYI/*AtGLB1*/*AtGLB1* with PCR

### 2.4 转基因植株的获得和鉴定

获得转基因拟南芥种子后, 逐代筛选出具有卡那霉素抗性的纯合的转基因拟南芥。选取几个拟南芥株系提取其幼苗总 RNA, 进行 Northern 杂交, 分析各个株系的 *AtGLB1* 表达量。3 个株系 (35S : *AtGLB1*、RNAi : *AtGLB1* 和野生型) 中 *AtGLB1* 的含量差别很大。超表达株系中的 *AtGLB1* 表达水平明显高于其它株系, 而在 RNAi 株系中几乎检测不到 *AtGLB1* mRNA 的存在(图 6)。这表明 RNAi 导致了基因表达活性的丧失。



1. 野生型 Wild type *Arabidopsis*; 2~4. *AtGLB1* 超量表达株系 *AtGLB1* overexpressing *Arabidopsis*; 5~7. RNAi 抑制株系 *AtGLB1* suppressed *Arabidopsis*.

图 6 Northern 杂交分析 *AtGLB1* 在各株系中的表达

Fig. 6 Northern blot analysis of *AtGLB1* expression

## 3 讨论

在植物中, 通过增强型启动子上调和通过 RNAi 技术下调特异基因的表达, 已被广泛用于植物基因的功能研究中<sup>[10-11]</sup>。本研究中所用的 pZYI 质粒是一种含有内含子的 ihpRNA (intron-containing hairpin RNA) 表达质粒载体, 已有研究发现其沉默效率比不含内含子的 hpRNA 质粒要高很多<sup>[12]</sup>。其工作原理是针对靶基因, 设计将反向重复序列构建到内含子的 pZYI 质粒中, 然后利用农杆菌介导转化整合到植物染色体中, 通过反向重复序列转录形成含发夹结构的双链 RNA, 进而诱导 RNAi 的产生。在本研究中, RNAi 的效果显著。

拟南芥 *AtGLB1* 在低氧胁迫中的作用方式已经非常明确<sup>[13]</sup>。最近,又有研究表明在拟南芥中超量表达棉花的血红蛋白 1 增强了植株的抗病能力和对 NO 的耐受性。而且棉花的血红蛋白 1 在拟南芥中的超量表达诱导了防卫基因 *PR-1*、*PDF1.2* 的组成型表达<sup>[14-15]</sup>。这表明棉花的血红蛋白 1 在植物抵抗病原体入侵的防御反应中起着非常重要的作用。拟南芥的血红蛋白 1 与棉花的血红蛋白 1 有 82% 的同源性,因此拟南芥的血红蛋白 1 很可能也有相似的功能。下一步将利用本研究所获得的不同 *AtGLB1* 表达水平的拟南芥株系对 *AtGLB1* 在各种胁迫,尤其是农业相关胁迫中的作用进行系统深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] DORDAS C, RIVOAL J, HILL R D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress[J]. *Ann Bot*, 2003, 91: 173-178.
- [2] LIRA-RUAN V, SARATH G, KLUCAS R V, et al. Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions[J]. *Plant Science*, 2001, 161: 279-287.
- [3] ZHAO L, GU R, GAO P, et al. A non-symbiotic hemoglobin gene from maize, *ZmHb*, is involved in response to submergence, high-salt and osmotic stresses[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, 95: 227-237.
- [4] WANG Y H, KOCHIAN L V, DOYLE J J, et al. Two tomato non-symbiotic haemoglobin genes are differentially expressed in response to diverse changes in mineral nutrient status[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 673-680.
- [5] CHRISTOS D. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants[J]. *Plant Science*, 2009, 176: 433-440.
- [6] TREVASKIS B, WATTS R A, ANDERSSON C R, et al. Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12230-12234.
- [7] HUNT P W, KLOK E J, TREVASKIS B, et al. Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 17197-17202.
- [8] YANG L X, WANG R Y, REN F, et al. *AtGLB1* enhances the tolerance of *Arabidopsis* to hydrogen peroxide stress[J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(8): 1309-1316.
- [9] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16: 735-743.
- [10] 朱龙付, 张献龙. RNAi 及其在植物遗传改良中的应用[J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23(4): 472-477.
- [11] 张鹏, 廖玉才, 黄涛, 等. 禽流感病毒 HA 基因在拟南芥中的表达[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(4): 386-389.
- [12] HELLIWELL C, WATERHOUSE P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30: 289-295.
- [13] PERAZZOLLI M, DOMINICI P, ROMERO-PUERTAS M C, et al. *Arabidopsis* non-symbiotic haemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1-10.
- [14] QU Z L, WANG H Y, XIA G X. *GhHb1*: a nonsymbiotic hemoglobin gene of cotton responsive to infection by *Verticillium dahliae* [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Exp*, 2005, 1730: 103-113.
- [15] QU Z L, ZHONG N Q, WANG H Y, et al. Ectopic expression of the cotton non-symbiotic hemoglobin gene *GhHb1* triggers defense responses and increases disease tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1058-1068.

## Construction and Transformation of Over-Expression Vector and RNAi Vector of *AtGLB1*

YANG Li-xiang WANG Zheng-xun KE De-sen WU Jin-xiong  
School of Biological Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

**Abstract** The over-expression and RNAi constructs of *AtGLB1* were constructed and transformed into *Arabidopsis* plants with floral dipping method. Northern blot analysis of *AtGLB1* expression in homozygous T3 lines of transgenic *Arabidopsis* showed that *AtGLB1* mRNA were not identified in lines expressing the *AtGLB1* RNAi construct, while lines over-expressing *AtGLB1* showed a substantially high level of *AtGLB1* mRNA compared with the wild-type. The study laid foundation for further researches on the function and application of *AtGLB1* gene in agriculture.

**Key words** *AtGLB1*; over-expression; RNAi

(责任编辑:张志钰)