

拟南芥 *CTSP3* 基因 GUS 载体构建及转基因植株的筛选鉴定

孟云, 陶曼芝, 吴席, 曹树青, 樊婷婷\* (合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要** [目的]深入研究植物基因 *CTSP3* 的基因表达模式及其对重金属镉胁迫的响应机制,以野生型拟南芥为材料构建 *CTSP3*-GUS 重组质粒及 GUS 转基因植株。[方法]通过提取野生型拟南芥的 DNA,克隆其启动区基因片段,将基因片段和 pART27-GUS 质粒双酶切后连接,转化到大肠杆菌感受态细胞中,菌落 PCR 和测序获得阳性单克隆。然后将 *CTSP3*-GUS 重组质粒转入农杆菌感受态 GV3101,获得阳性单菌落。接着采用浸花法侵染野生型拟南芥,最后通过抗性筛选和 PCR 鉴定获取 *CTSP3*-GUS 转基因植株。[结果]成功克隆 *CTSP3* 启动区基因片段,构建出重组质粒,获得了 *CTSP3*-GUS 转基因植株。[结论]获得 *CTSP3*-GUS 转基因植株,为接下来进一步研究该基因在植物响应镉胁迫机制中的功能奠定了基础。

**关键词** 拟南芥; *CTSP3*; 载体; 转基因植株

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)03-0084-03

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.03.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Construction of *Arabidopsis CTSP3*-GUS Vector and Identification of Transgenic Lines

MENG Yun, TAO Man-zhi, WU Xi et al (School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

**Abstract** [Objective] To study the expression pattern of *CTSP3* gene and its response mechanism to the heavy metal cadmium stress, we build the *CTSP3*-GUS recombinant vector and GUS transgenic plants. [Method] The *Arabidopsis* (wild-type) DNA was extracted, and the promoter region gene fragment was cloned. The gene and pART27-GUS plasmid were digested and ligated into *E. coli* competent cells, positive clones were obtained by colony PCR and sequencing. The *CTSP3*-GUS recombinant plasmid was then transferred into *Agrobacterium* competent GV3101 to obtain a positive single colony. Then, wild-type *Arabidopsis thaliana* was digested by dip flower method, and finally *CTSP3*-GUS transgenic plants were obtained by resistance screening and PCR identification. [Result] The gene fragment of *CTSP3* promoter region was successfully cloned, and the recombinant plasmid was constructed to obtain *CTSP3*-GUS transgenic plants. [Conclusion] The *CTSP3*-GUS transgenic plants were obtained, which laid a foundation for further studying the function of this gene in response to cadmium stress in plants.

**Key words** *Arabidopsis*; *CTSP3*; Vector; Transgenic plant

重金属污染已经成为世界性重大环境问题之一,其中重金属镉污染尤为严重。过多的镉会对动植物细胞组织造成不可逆的损伤<sup>[1-3]</sup>。在重金属镉逆境中,植物通过控制金属流入、促进金属泵出、重金属螯合等途径来应激<sup>[4]</sup>。运用植物转基因技术对植物品种进行优化改良是解决重金属污染的最佳方式<sup>[5]</sup>。研究发现 *CTSP3* 功能缺失突变体对重金属镉胁迫表现出耐受的表型,所以笔者拟通过克隆 *CTSP3* 启动区基因,获得 *CTSP3*-GUS 植株,以进一步研究植物基因 *CTSP3* 的基因表达模式及其对重金属镉胁迫的响应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料。**植物材料是哥伦比亚(*Columbia*, col)遗传背景的拟南芥(*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所得。载体构建所用质粒 pART27-GUS,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,农杆菌 GV3101。

**1.1.2 主要试剂及酶类。**Plasmid miniprep Kit (TIANGEN), T<sub>4</sub>-DNA Ligase (NEB), PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa), 限制性内切酶 *Kpn* I (NEB), *Hind* III (NEB), Easy Taq DNA Polymerase (TransGen), Agar, DNA loading buffer, 异丙醇, 氯仿, 无水乙醇等。

## 1.2 方法

**1.2.1 拟南芥无菌苗培养。**配制 1/2MS 固体培养基,取出存储于 4 °C 冰箱的 1/2MS 培养基,按比例称取蔗糖琼脂和 1/2MS,溶解调 pH 至 5.8,封膜后高压蒸汽灭菌,灭菌结束后倒培养基至玻璃培养皿中。用 0.1% 氯化汞对种子杀菌消毒后,将种子均匀点在已凝固的培养基中。4 °C 冰箱中春化 2 d,在恒温(22 °C 左右)培养室中光照垂直培养 14 d,定期观察拟南芥生长情况。

**1.2.2 拟南芥 DNA 的提取。**将培养皿中的拟南芥取出,放入研钵中,加 650  $\mu$ L 已预热的 CTAB,研磨至溶液状装入管中。65 °C 水浴 45 min 拿出静置到室温,加入 650  $\mu$ L 酚氯仿剧烈混匀,离心吸取上清液,加 900  $\mu$ L 无水乙醇,上下颠倒混匀,-20 °C 沉淀 2 h。离心,弃上清后加 75% 乙醇,离心,弃上清,倒置使残留乙醇完全挥发。加入 40  $\mu$ L 无菌水溶解 DNA,获得 DNA 溶液。

**1.2.3 *CTSP3* 启动区基因片段的克隆。**利用 Oligo 7.0 软件设计以下引物进行 *CTSP3* 启动区基因片段的克隆。上游引物为 FP: 5'-CGGGTCACTCTTCAGTAGTAACGTTGCG-3',下游引物为 RP: 5'-CCCAAGCTTTTCCTCTCTACCTTCTT-3',以 DNA 为模板进行基因克隆。

**1.2.4 大肠杆菌的转化。**取出-80 °C 冰箱中存储的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,置于冰上解冻。解冻后,吸取 10  $\mu$ L 质粒或连接产物加入到感受态细胞中,混匀,冰浴 35 min,42 °C 水浴 60 s,再冰上静置 2 min。加 600  $\mu$ L 无菌未加抗性的 LB 液体培养基,放在 37 °C 摇床中低速振荡培养 1~2 h。

**基金项目** 中央高校基本科研业务费专项(JZ2018HGTB0248)。

**作者简介** 孟云(1994—),女,安徽六安人,硕士研究生,研究方向:分子生物学。\*通信作者,副教授,硕士生导师,从事植物抗逆分子机制研究。

**收稿日期** 2018-10-23

待菌液浑浊后,涂布于 LB+壮观霉素的平板上。平板倒置放在 37 °C 培养箱中培养过夜。过夜培养后挑取培养皿单菌落,接种于 LB+壮观霉素的液体培养基中,浑浊后 PCR 鉴定和测序。

**1.2.5 农杆菌的转化。**取出存储于冰箱中的农杆菌 GV3101 感受态细胞,解冻。取 2  $\mu$ L 质粒加入到感受态细胞中,混匀,吸取至已预冷的 0.1 cm 电击杯中,电击后迅速加入 600  $\mu$ L 无菌未加抗性的 LB 液体培养基,28 °C 摇床培养 1~2 h 至浑浊,涂布于 LB+壮观霉素的平板上,28 °C 培养箱中培养 2 d。培养皿上挑取单菌落接种于 LB+壮观霉素的液体培养基中,28 °C 摇床培养浑浊,PCR 鉴定。

**1.2.6 花序侵染法获取转基因拟南芥。**将阳性农杆菌接种于含壮观霉素的 LB 培养液中,振荡培养至  $OD_{600}=1.2\sim 1.4$ ,离心去上清,用侵染缓冲液重悬至溶液  $OD_{600}=0.8\sim 1.2$ ,最后加入一定量的 SilwetL-77 混匀,侵染花序,黑暗处理 12 h。隔 8 d,再次侵染。

**1.2.7 转基因阳性植株鉴定。**将获得的拟南芥种子置于含有卡那霉素的 MS 固体培养基中进行抗性筛选,培养箱培养 7 d,将具有根且子叶颜色嫩绿的幼苗移栽至土质培养基中,提取 DNA,经 PCR 鉴定正确后,即获得转基因阳性植株。

## 2 结果与分析

**2.1 拟南芥 *CTSP3* 启动区基因片段的克隆** 为了验证 *CTSP3* 基因在拟南芥镉耐受机理中的作用,构建 *CTSP3*-GUS 载体。以野生型拟南芥 DNA 为模板,通过 PCR 技术扩增 *CTSP3* 启动区基因片段,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示,所选取启动区长度 1 928 bp,与 PCR 所得片段大小一致。

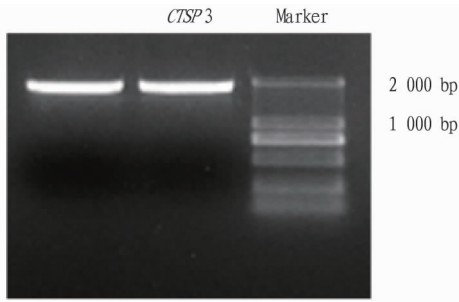


图 1 *CTSP3* 启动区基因的克隆

Fig. 1 Gene cloning of the *CTSP3* promoter region

**2.2 目的片段和质粒双酶切** 基因扩增引物设计时,在上下游引物分别添加了限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 的酶切位点保护碱基,使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 对基因克隆获得 *CTSP3* 启动区基因片段和 pART27-GUS 质粒同时进行双酶切。酶切以后,电泳检测,酶切后的基因片段和载体质粒条带清晰,大小正确(图 2)。

**2.3 连接和大肠杆菌转化后阳性克隆鉴定**  $T_4$  连接酶将酶切后的基因片段与质粒片段连接,连接产物采取热击法导入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,培养过夜后挑取单克隆菌落于加有相应抗性的液体培养基中振荡培养至菌液浑浊。

对上一步所得单克隆菌液 PCR 鉴定,所用引物为 *CTSP3*

启动区片段扩增引物,结果如图 3 所示。除了 2 号与 5 号菌落,其他菌落 PCR 条带与 *CTSP3* 启动区基因片段大小一致,说明其为阳性克隆。选取 1 号菌液进行测序,结果与 *CTSP3* 启动区序列完全吻合,说明成功构建 *CTSP3*-GUS 载体。

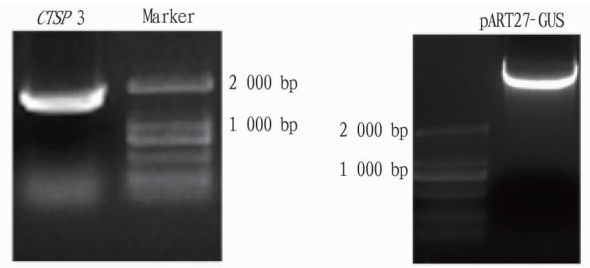


图 2 基因和质粒双酶切

Fig. 2 Bzyme of genes and plasmids

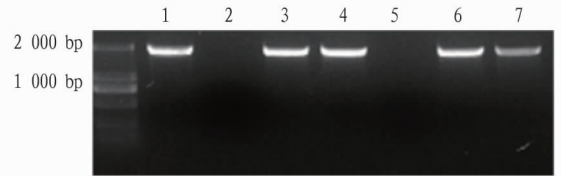


图 3 大肠杆菌菌落 PCR 验证

Fig. 3 PCR validation of *E. coli* colony

**2.4 农杆菌转化及花序侵染** 将测序正确的 *CTSP3*-GUS 重组质粒通过电击法转化入农杆菌 GV3101,培养在庆大霉素和壮观霉素抗生素培养基,挑取单菌落 PCR 验证。电泳结果如图 4 所示,所选单克隆菌株均为阳性单菌落。

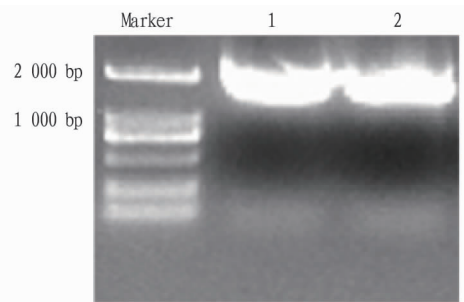


图 4 农杆菌菌落 PCR 验证

Fig. 4 PCR validation of *Agrobacterium* colony

**2.5 *CTSP3*-GUS 转基因植株的抗性筛选** 获取侵染后的拟南芥种子,37 °C 干燥,4 °C 春化后撒在含有卡那霉素抗性的 MS 平板上。恒温光照培养箱中培养 7~10 d,长出来的小苗(具有长根,子叶颜色嫩绿)可能为转基因阳性植株,如图 5 所示。

**2.6 *CTSP3*-GUS 转基因阳性植株的鉴定** 将筛选出阳性植株移栽至土壤中,置于专用培养室中恒温光照培养,20 d 后提取转基因植株 DNA,进行鉴定。PCR 鉴定结果如图 6 所示,筛选所得植株均为转基因阳性植株,即 *CTSP3*-GUS 转基因植株。

## 3 讨论

土壤重金属污染是世界性的重大问题,镉作为基本矿物质元素<sup>[6]</sup>,通过矿物吸收机制进入细胞。土壤镉污染直接危害植物生长、动物和人类的健康<sup>[7]</sup>。目前,植物修复法是治

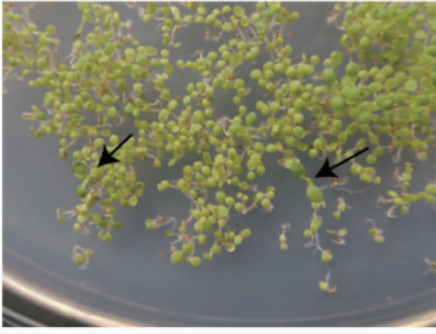


图5 阳性植株抗性筛选

Fig. 5 Screening for resistance of positive plants

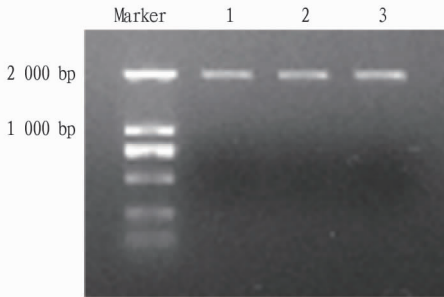


图6 阳性植株 PCR 验证

Fig. 6 PCR validation of positive plants

理镉污染最有效的方法。

该试验自拟南芥种子资源中心获得 *CTSP3* 基因功能缺失突变体<sup>[8-10]</sup>,前期研究结果显示 *CTSP3* 基因参与了植物对镉胁迫的响应,因此通过基因工程技术构建 *CTSP3*-GUS 重组载体<sup>[11-12]</sup>,将其转入野生型拟南芥中,从而获得转基因植株。这为研究 *CTSP3* 基因在植物中的表达模式和镉耐受调节机制中的作用提供了依据,是一个非常关键的课题。

(上接第53页)

密度大、入渗率低等是造成植物长势不良的主要障碍因子。为建设世界一流植物园,辰山园区必须对土壤进行大规模修复与治理,保障植物健康生长。上海辰山植物园通过一期的工程实践,取得了较好的效果,通过土壤修复措施不断增强植物园土壤对外界环境胁迫的抵抗力(resistance)和恢复力(resilience)<sup>[4]</sup>,构建以土壤修复为主的自我演替、循环发展的生态系统。有效的土壤改良不仅是解决植物园现状问题的最好途径,也是推动其可持续发展的重要原动力,这客观验证了土壤修复工程是有效的、可行的,对提升辰山植物园区土壤质量及植物的生长发育会产生良好的效果。

上海辰山植物园绿化种植土壤修复工程有利于实现将辰山植物园建设成世界一流植物园的发展目标,不仅能够提升我国在植物多样性保护及资源植物的利用与研究领域的

## 参考文献

- [1] SHIM D, HWANG J U, LEE J, et al. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice [J]. *Plant cell*, 2009, 21: 4031-4043.
- [2] TAMÁS L, MISTRÍK I, ALEMAYEHU I A. Low Cd concentration-activated morphogenic defence responses are inhibited by high Cd concentration-induced toxic superoxide generation in barley root tip [J]. *Planta*, 2014, 239 (5): 1003-1013.
- [3] CHEN F, WANG F, WU F B, et al. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 48 (8): 663-672.
- [4] STRAIF K, BENBRAHIM-TALLAA L, BAAN R, et al. A review of human carcinogens-Part C: Metal, arsenic, dusts, and fibres [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10 (5): 453-454.
- [5] KÜHNLENZ T, SCHMIDT H, URAGUCHI S, et al. *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 2 is constitutively active *in vivo* and can rescue the growth defect of the *PCS1*-deficient *cad1-3* mutant on Cd-contaminated soil [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65 (15): 4241-4253.
- [6] HALL J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1-11.
- [7] CLEMENS S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis [J]. *Planta*, 2001, 212 (4): 475-486.
- [8] BELHAJ K, CHAPARRO-GARCIA A, KAMOUN S, et al. Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system [J]. *Plant methods*, 2013, 9 (1): 1-10.
- [9] SIEMIANOWSKI O, BARABASZ A, KENDZIOREK M, et al. *HMA4* expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65 (4): 1125-1139.
- [10] YAO J, KONG Q N, ZHU H Y, et al. Content and fractionation of Cu, Zn and Cd in size fractionated municipal solid waste incineration bottom ash [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2013, 94: 131-137.
- [11] ZIENTARA K, WAWRZYNSKA A, ŁUKOMSKA J, et al. Activity of the *AtMRP3* promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by cadmium, nickel, arsenic, cobalt and lead but not by zinc and iron [J]. *J Biotechnol*, 2009, 139 (3): 258-263.
- [12] ZHAI Z Y, 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: 2249-2264.

综合实力,加快上海建设全球卓越城市的步伐。同时,也为城市绿化建设过程中土壤修复提供参考和借鉴。

## 参考文献

- [1] 陈智坤, 从晓峰, 马延康, 等. 机械碾压对新建城市绿地土壤理化性质的影响: 以西安植物园新园区为例 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32 (26): 109-113.
- [2] 伍海兵, 方海兰, 彭红玲, 等. 典型新建绿地上海辰山植物园的土壤物理性质分析 [J]. *水土保持学报*, 2012, 26 (6): 85-90.
- [3] 胡永红. 植物园建设的几个要点 [J]. *中国园林*, 2014 (11): 88-91.
- [4] 谢维垣. 华南植物园土壤肥力特征及其利用改良研究 [J]. *土壤学报*, 1986 (1): 89-92.
- [5] 上海市园林工程有限公司. 上海市辰山植物园绿化种植地下部分改良修复一期工程可行性研究报告 [R]. 2015.
- [6] 上海惠浦工程检测有限公司. 上海辰山植物园绿化种植地下部分改良修复一期工程园林绿化土壤检测报告 [R]. 2017.
- [7] 上海市园林科学规划研究院. 绿化种植土壤: CJ/T 340—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [8] 上海辰山植物园. 上海辰山植物园绿化种植地下部分改良修复一期工程评估报告 [R]. 2017.