

转金属硫蛋白 $\alpha\alpha$ 突变体基因的矮牵牛 对铅的抗性及其积累的研究*

李伟 张竞 张晓钰 单龙 茹炳根**

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 利用农杆菌介导的方法将 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因导入矮牵牛中. 转基因植株对铅 (Pb) 的抗性及其吸收能力明显高于对照. 转 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因的植株分别能在 150 及 200 $\mu\text{mol/L}$ Pb 中正常生长, 而对照只能在 50 $\mu\text{mol/L}$ Pb 中正常生长. 转 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因植株后代种子萌发与对照相比表现出明显的抗 Pb 优势. Pb 的吸收实验表明转 MT、 $\alpha\alpha$ 基因的植株对 Pb 的吸收分别比对照提高了 28% 和 35%.

关键词 金属硫蛋白, 重组体蛋白 $\alpha\alpha$, 转基因矮牵牛, 铅, 抗性, 吸收

学科分类号 Q789

随着现代工业和农业的发展, 重金属污染日趋严重. 铅 (Pb) 是一种非常普遍的重金属污染物^[1]. 对生物体而言, 摄入微量的 Pb 就会对肌体造成严重的毒害^[2]. 因此, 如何有效地消除 Pb 对环境的污染成为人们普遍关注的问题.

目前, 人们清除重金属污染主要是利用物理、化学等方法. 但由于其成本过高而无法大规模推广^[3]. 生物技术的发展为大规模清除重金属污染带来了希望. 利用植物来清除重金属污染是一门新兴的技术^[3]. 人们不断发现自然界存在一些对重金属有较高耐受性和吸收能力的植物, 在污染地区种植这些植物可以减少土壤中重金属的含量^[4].

对植物的深入研究发现, 它们耐受重金属的机理大多是依靠体内的金属螯合肽 (phytochelatins)、有机酸等将重金属螯合并隔离于细胞质以外, 从而达到解毒的目的^[5]. 但是植物自身对重金属的耐受能力及吸收量终究是有限的^[6]. 80 年代末期已有实验室将哺乳动物的金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 基因转入植物, 试图提高植物对重金属的抗性^[7]. 金属硫蛋白是生物界广泛存在的一类小分子金属结合蛋白, 在哺乳动物体内有解毒重金属的功能. 已知的各类 MT 中, 哺乳动物的 MT-I 具有最强的金属结合能力^[8]. 已有实验证明在植物中大量表达这种蛋白质可提高植物对重金属的耐受性^[7]. 金属硫蛋白含有 α 、 β 两个结构域. 利用蛋白质工程的方法对其进行分子改造, 发现每个结构域可以独立发挥作用, 其中 β 结构域主要结合锌、铜等离子, 而 α 结构域则优先结合镉、铅、汞等离

子^[8]. 本实验室熊焱等构建了 α -KKS- α ($\alpha\alpha$) 重组体蛋白, 并在体外证明其稳定性与天然 MT 蛋白相同, 而对镉 (Cd) 等的结合力则强于天然 MT (熊焱博士论文).

本实验将 $\alpha\alpha$ 蛋白基因导入矮牵牛, 得到对 Pb 具有高耐受性和吸收能力的转基因植物, 并发现它们比天然 MT 基因转化的矮牵牛具有更高的重金属抗性和吸收能力.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种、质粒及植物: 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 菌株、根癌土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 菌株、辅助质粒 pRK2013 为本室保存, 植物表达载体 pGBd35S-MT 和 pGBd35S- $\alpha\alpha$ 为本室构建^[9]. 矮牵牛 (*Petunia hybrida*, Vilm389) 购自中国科学院北京植物研究所.

1.1.2 酶和生化试剂: DNA 限制性内切酶购自 Promega 公司; 地高辛 (Digoxigenin) 标记、检测试剂盒及分子质量标准购自德国宝灵曼 (Boehringer) 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 及二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂为华美公司产品; 各种抗生素、植物激素及其他试剂均为国产分析纯.

* “863” 计划资助项目 (863-103-21-09).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2000-07-13, 接受日期: 2000-09-28

1.2 实验方法

1.2.1 转基因植株的获得: 利用三亲接合的方法^[10]将植物表达载体 pGPTVd35S-MT/ $\alpha\alpha$ 导入农杆菌中, 通过农杆菌介导的叶盘法^[10]转化矮牵牛, 利用除草剂 (3 mg/L) 进行筛选, 得到再生植株。

1.2.2 转基因植株的 DNA 印迹鉴定: 植物总 DNA 的提取参考文献 [11], 植物总 DNA 的 DNA 印迹实验参考文献 [12], 其中探针的标记及杂交、显影均按照宝灵曼公司产品操作指南进行。

1.2.3 转基因植株的蛋白质印迹鉴定: 取新鲜的植物叶片在液氮中研成粉末, 加入 1:1 (体积质量比) 的蛋白提取缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT) 研成匀浆, 12 000 g 离心, 将上清液在 80℃ 下加热 5 min, 12 000 g 再次离心, 最后测定上清总蛋白含量 (参照 Bio-Rad 公司产品说明)。取等量的蛋白质样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。SDS-PAGE 的分离胶浓度为 18%。电泳完毕后进行电转移、抗体结合及显色, 以上步骤均参考文献 [12]。其中一抗为本实验室用人肝 MT 免疫家兔后提取的多克隆抗血清。

1.2.4 转基因植株对 Pb 的抗性: 将对照及转基因植株移植到含有不同浓度 Pb 的 MS' 培养基^[13]上 (由于 MS 培养基中 K_2HPO_4 会与 Pb 生成沉淀, 因此使用不含 K_2HPO_4 的 MS 培养基即 MS' 培养基, 下同), 每个株系的每个浓度作三次重复。一个月后观察其生长状况。

1.2.5 T_1 代种子对 Pb 的抗性: 将转基因植株自交的后代种子及对照植株自交的后代种子灭菌后放在含有不同浓度 Pb 的 MS' 培养基上萌发, 每个株系的每个浓度萌发 60 粒种子。一个月后测量幼苗的根长、茎长及鲜重。

1.2.6 转基因植株对铅的吸收特性的研究: 将对照及转基因植株移到 MS 培养基中, 生长一个月后再移到含有不同浓度 Pb 的 MS' 培养基上, 每个株系的每个浓度作三次重复。一个月后分别取植物的根、茎、叶置烘箱内 80℃ 烤干 48 h 后研成粉末, 过筛, 取 50 mg 样品用 3 ml 浓硝酸消化 3 d, 然后加 1 ml 高氯酸消化 3 d。消化样品加蒸馏水定容至 5 ml, 用原子吸收法测定样品中 Pb 含量。

2 实验结果

2.1 转基因植株的 DNA 印迹鉴定

根据表达载体 pGBd35S-MT/ $\alpha\alpha$ 中的限制性酶

切位点^[9], 选择不同的内切酶对植物基因组进行消化。图 1 证明 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因都已整合到矮牵牛基因组中。

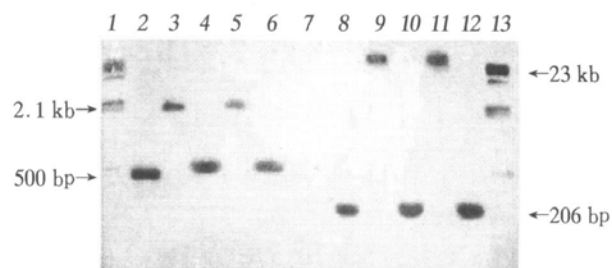


Fig. 1 Southern blotting analysis of total DNA from transgenic *Petunia*

1, 13: DNA marker (λ DNA digested with *Hind* III); 2, 4, 6: plasmid pGBd35S- $\alpha\alpha$, transformants No. 1, 3 by $\alpha\alpha$ gene digested with *Eco*RI; 3, 5: transformants No. 1, 3 by $\alpha\alpha$ gene digested with *Bam*HI; 7, 8, 10, 12: negative control, transformants No. 2, 6 by MT gene, plasmid pGBd35S-MT digested with *Xba*I / *Sac*I; 9, 11: total DNA of transformants No. 2, 6 by MT gene.

2.2 转基因植株的蛋白质印迹鉴定

转 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因植株样品在 13 ku 左右位置有显色信号, 而对照所得到的蛋白质样品没有出现相应的显色反应, 这说明 MT 及 $\alpha\alpha$ 蛋白在矮牵牛中均有表达。图 2 中的样品显色条带对应分子质量大于 MT 标准蛋白, 这主要是因为 MT、 $\alpha\alpha$ 蛋白都易发生聚合, 从植物中提取的 MT 或 $\alpha\alpha$ 蛋白聚合成了二聚体。

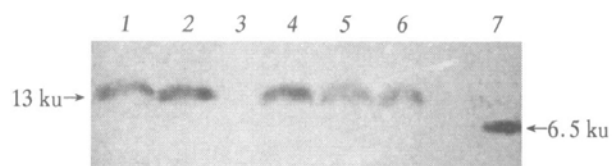


Fig. 2 Western blotting analysis of transgenic *Petunia*

1, 2: transformants No. 2, 6 by MT gene; 3: non-transformants; 4, 5, 6: transformants No. 3, 2, 1 by $\alpha\alpha$ gene; 7: rabbit-liver MT.

2.3 转基因植株对 Pb 的抗性

实验发现, 在 Pb 浓度为 50 μ mol/L 时, 对照与转基因植株的生长状态无明显差别。在 Pb 浓度为 100 μ mol/L 时, 对照的生长受到抑制: 生根缓慢, 根系短而粗, 植株矮化, 叶片与茎都变黄, 明显受到毒害; 而转基因植株仍能正常生长。当 Pb 浓度升高到 200 μ mol/L 时, 对照已无法生根, 茎、叶则逐渐枯死; 转 MT 基因的植株也开始表现出

受胁迫的症状,但仍可生长;而转 $\alpha\alpha$ 基因的植株生长基本未受影响(图3).由此可以看出,MT、 $\alpha\alpha$ 蛋白的表达使矮牵牛对Pb的抗性有所提高,其中 $\alpha\alpha$ 蛋白对矮牵牛抗Pb能力的影响更大.

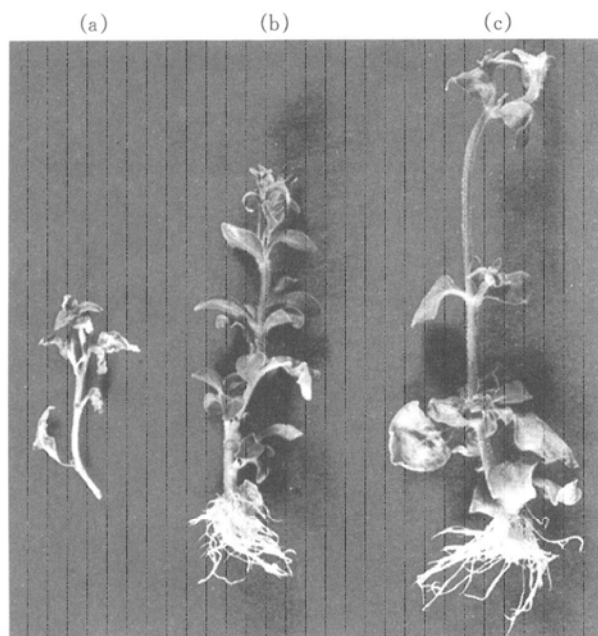


Fig. 3 Pb effect on the growth of the shoots of *Petunia*
(a) control; (b) MT; (c) $\alpha\alpha$. Pb concentration: 200 $\mu\text{mol/L}$.

2.4 T_1 代种子对 Pb 的抗性

通过种子萌发抗 Pb 实验,发现转基因植株子一代有基因分离现象.根据根长的测量值将 Pb50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 中的幼苗分为两组:抗 Pb 组(各株幼苗的测量值大于对照的平均值)、非抗 Pb 组(各株幼苗的测量值小于或等于对照的平均值).对这两组幼苗的数量统计后发现符合 3:1 的分离比,说明 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因均以单拷贝的方式整合到植物基因组中.将抗 Pb 组的平均值与对照的平均值比较;对于 Pb 0、250 $\mu\text{mol/L}$ 中的幼苗则以所有植株的平均值与对照比较.图 4 表明,随着 Pb 浓度的提高,对照及转基因幼苗的生长状态差异逐渐显著:对照的根长迅速减小,在 Pb 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上时萌发后几乎不能生长;而转基因幼苗的根长虽然也受到了 Pb 的影响,但降低幅度较对照小得多,尤其是转 $\alpha\alpha$ 基因的幼苗出现胁迫症状时的 Pb 浓度要明显高于对照,与转 MT 基因的幼苗相比也有一定的提高.另外,从幼苗的茎长和鲜重也可得到同样的结果(此处未显示).

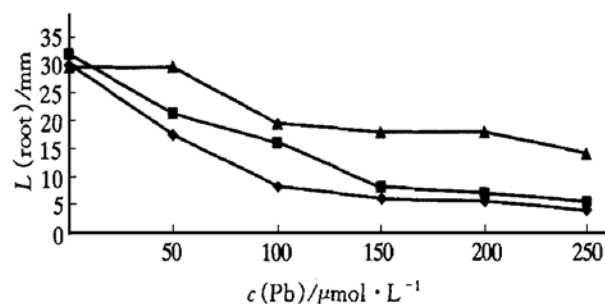


Fig. 4 Pb effect on the growth of T_1 seedlings of *Petunia*

◆: control; ■: MT; ▲: $\alpha\alpha$.

2.5 转基因植株对 Pb 的吸收特性的研究

实验发现,无论是对照还是转基因植株对 Pb 的吸收都表现为: Pb 浓度较低时,随 Pb 浓度的提高植物对 Pb 的积累量也增加;对照及转基因植株分别在 Pb100 及 150 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大吸收;当 Pb 浓度继续提高时,植物对 Pb 的吸收量则逐渐下降.在最大 Pb 吸收时,转基因植株整体的 Pb 含量 [植株整体 Pb 的含量 $(\text{Pb}/W)_T$ 的计算: $(\text{Pb}/W)_T = (\text{Pb}_L + \text{Pb}_S + \text{Pb}_R) / (W_L + W_S + W_R)$ 其中 Pb_L 、 Pb_S 、 Pb_R 分别为同一株植物的叶、茎、根中 Pb 的绝对量; W_L 、 W_S 、 W_R 分别为同一株植物的叶、茎、根的干重.] 高于对照:转 MT 及 $\alpha\alpha$ 基因植株分别提高了约 28% 及 35%. 并且, Pb 在植物体内的分布也有所变化:转基因植株叶中的 Pb 含量要低于对照,而茎和根中的 Pb 含量则远高于对照(图 5).

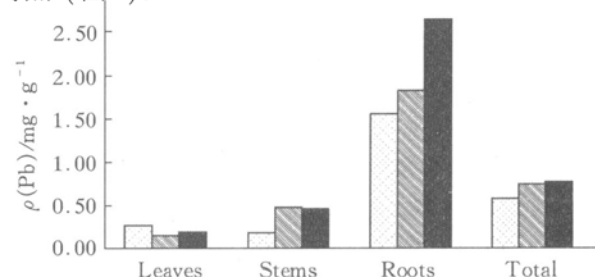


Fig. 5 Pb concentration in *Petunia* and its leaves, stems and roots

□: control; ▨: MT; ■: $\alpha\alpha$.

3 讨 论

金属硫蛋白在矮牵牛中的表达可以提高植物对 Pb 的抗性.其机理可能是:金属硫蛋白对 Pb 的螯合作用使细胞质内游离 Pb 的浓度降低^[8];以前已有实验证明植物体中的小分子金属螯合肽可以将螯合的重金属运输到液泡中加以隔离^[5],哺乳动物

金属硫蛋白是否也有相同的转运作用还有待研究. 细胞质中游离 Pb 的减少可使对重金属敏感的酶免于失活^[14], 提高植物对 Pb 的抗性.

分析转基因植株各器官 Pb 的含量, 发现其分布有了变化 (图 5). 由于 CaMV 35S-CaMV 35S 是一种组成型表达的启动子, 在它的控制下, 蛋白质的表达并无组织特异性^[15], 因此推测: Pb 在植物体内的分布变化可能是因为茎和根细胞中表达的金属硫蛋白固定了进入植物体内的大部分 Pb; 而随着蒸腾液流的上升, 还未被螯合的 Pb 则进入了叶片, 所以在叶片内仍有一定的积累, 但和对照植株的叶片相比有明显的减少, 这样在较高浓度 Pb 的培养基上生长, 转基因植株叶片仍成绿色 (图 3). 实验中, 发现未转化的矮牵牛根系中 Pb 的含量较叶片和茎要高出 6 倍以上 (图 5), 说明根细胞中存在某种机理使 Pb 由根进入植物体后主要被隔离在根部, 很难继续向上迁移^[16].

体外实验证实金属硫蛋白重组体 $\alpha\alpha$ 对 Cd 等的结合力强于 MT 蛋白 (熊焱博士论文). 本实验使 MT、 $\alpha\alpha$ 分别在相同的遗传背景下表达, 结果表明转 $\alpha\alpha$ 基因的矮牵牛对 Pb 的抗性及其吸收能力与转 MT 基因的植株相比有一定的提高. 由于植物对 Pb 的抗性和吸收能力与体内金属结合蛋白的含量及其对重金属的结合力有关, 因此说明, 在植物体内 $\alpha\alpha$ 蛋白对 Pb 的结合能力强于天然 MT 蛋白.

矮牵牛作为一种观赏型的花卉植物已经在城市中大量种植. 金属硫蛋白的表达使矮牵牛对 Pb 的吸收能力有所提高. 因此, 期望将它用于城市土壤中重金属 Pb 污染的治理.

致谢 感谢何笃修教授在实验及论文写作过程中的具体指导及耐心帮助, 感谢李令媛教授、肖传英老师在实验中的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Watanabe M A. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ Sci Technol*, 1997, **31** (4): 182~ 186
- 2 Knigge T, Köhler H R. Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp 70) level in Porcellio scaber (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environmental Pollution*, 2000, **108** (2): 209~ 217
- 3 Salt D E, Blaylock M, Nanda K, *et al.* Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 1995, **3** (13): 468~ 474
- 4 Baker A J M, Brooks R R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1989, **1** (2): 81~ 126
- 5 Meagher B R. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, **3** (2): 153~ 162
- 6 Chaney R L, Malik M, Li Y M, *et al.* Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, **8** (3): 279~ 284
- 7 Lefebvre D D, Miki B L, Laliberte J F. Mammalian metallothionein functions in plants. *Bio/Technology*, 1987, **5** (10): 1053~ 1056
- 8 Vallee B L. Introduction on metallothionein. *Meth Enzymol*, 1991, **205** (1): 3~ 7
- 9 张晓钰, 李 伟, 张 竞, 等. 金属硫蛋白突变体的植物高效表达载体的构建及其在烟草中的表达. *中国生物化学及分子生物学报*, 1999, **15** (6): 888~ 892
Zhang X Y, Li W, Zhang J, *et al.* *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, **15** (6): 888~ 892
- 10 Maliga P, Klessing F D, Cashmore R A, *et al.* *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. 37~ 52
- 11 施苏华, 章 群, 陈月琴, 等. 一种简易的植物核酸提取方法. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1996, **35** (2): 103~ 105
Shi S H, Zhang Q, Chen Y Q, *et al.* *Acta Sci Natu Uni Sunyatseni*, 1996, **35** (2): 103~ 105
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474~ 898
- 13 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, **15** (6): 473~ 497
- 14 Van A F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ*, 1990, **13** (3): 195~ 206
- 15 Odell J, Nagy F, Chua N H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 1985, **313** (6005): 810~ 812
- 16 Muller D H, Oort V F, Gélle B, *et al.* Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 2000, **109** (2): 231~ 238

Pb Tolerance and Accumulation of *Petunia* Transformed by Metallothionein Recombinant $\alpha\alpha$ Gene*

LI Wei, ZHANG Jing, ZHANG Xiao-Yu, SHAN Long, RU Bing-Gen**

(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Science,
Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract MT and $\alpha\alpha$ genes were introduced into *Petunia* by *Agrobacterium*-mediated transformation. Transformants, especially the ones transformed by $\alpha\alpha$ gene, displayed the obviously higher resistance and accumulation of Pb than control plants. The growth of the roots and shoots of plants transformed by MT and $\alpha\alpha$ genes was unaffected by up to 150 $\mu\text{mol/L}$ Pb and 200 $\mu\text{mol/L}$ Pb, respectively; whereas control seedlings showed severe inhibition of roots' and shoots' growth and leaves' wither under 100 $\mu\text{mol/L}$ Pb. After the transformants were selfed, the seedlings of offspring from MT and $\alpha\alpha$ positive plants were tested for resistance to Pb. It was found that the transformants could tolerate higher concentration of Pb. The detection of accumulation of Pb in the transformed plants by MT and $\alpha\alpha$ genes showed 28% and 35% more than non-transformants, respectively. The results of these experiments indicated that the ornamental plant: *Petunia* could be used for treatment of the toxic heavy metal Pb pollution in soil.

Key words metallothionein, recombinant $\alpha\alpha$, transgenic *Petunia*, lead, tolerance, accumulation

* This work was supported by a grant from "863" (863-103-21-09) program of China.

** Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

Received: July 13, 2000 Accepted: September 28, 2000