

文章编号:1674-7054(2010)01-0008-04

At NUDT8 过量表达的拟南芥转基因植株

张秀春^{1,2}, 李文彬¹, 夏亦芥¹, 彭明^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101;
2. 农业部转基因植物及植物用微生物环境安全监督检验测试中心, 海南 海口 571101)

摘 要: 从拟南芥基因组中克隆 *AtNUDT8*, 并与 pCHF3 相连构建了植物表达载体 pCHF8, 采用农杆菌 GV3101 介导的渗透法转化野生型拟南芥, 通过卡那霉素筛选获得了一批经 Northern blot 检测证实的过量表达 *AtNUDT8* 的转基因拟南芥植株。

关键词: *AtNUDT8*; 过量表达; 拟南芥; 遗传转化

中图分类号: Q 785

文献标志码: A

Nudix (nucleoside diphosphates linked to some moiety X) 水解酶是需要 Mg^{2+} 的一类酶, 广泛存在于包括病毒、细菌、真核生物 (包括植物和人类) 在内的 250 多种生物中; 它催化与其他基团 ($-X$) 结合的核苷二磷酸 (NDPX) 的水解, 产物为 $NMP + P - X$ 。这类酶的共同特征是含有高度保守的由 23 个氨基酸残基组成的 Nudix 基序 (motif/box)。该酶的底物包括核苷三磷酸、二核苷多磷酸、核苷-糖复合物、加帽 mRNA 和二核苷辅酶 (如 CoA) 等^[1]。目前, 国内外对细菌和人类 Nudix 水解酶的研究表明: 大肠杆菌 MutT 具有抑制突变的作用^[1]; 人类 *NUDT1* 的突变容易导致癌症发生; 人类 *NUDT21* 可以水解加帽 mRNA; 细菌和人类 Nudix 水解酶至少具有两大功能, 一是清除细胞内产生的有害的代谢产物; 二是调节各生化途径的中间代谢产物的积累^[1-3]。与人类和大肠杆菌相比, 植物 Nudix 水解酶基因家族的研究起步比较晚, 但对拟南芥基因组全序列进行分析已发现拟南芥存在 24 个 Nudix 水解酶基因 (命名为 *AtNUDTs*)^[4], 分布于细胞质 (*AtNUDT1-11*)、叶绿体 (*AtNUDT12-18*) 和线粒体 (*AtNUDT19-24*) 中。目前对 Nudix 水解酶基因家族的了解还不够充分甚至在某些认识上存在矛盾^[5-11]。拟南芥细胞质中多种 *AtNUDT* 水解酶的生物功能还不明确, 值得进一步深入研究。为此, 笔者拟从拟南芥基因组中克隆 *AtNUDT8*, 并构建植物表达载体进而转化野生型拟南芥, 希望获得过量表达 *AtNUDT8* 的转基因拟南芥, 为进一步研究 *AtNUDT8* 的功能提供全新的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚生态型, 本实验室提供。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 和载体 pCHF3 由本实验室提供; pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 试剂 分子生物学实验用各种限制性内切酶、连接酶等购自 TaKaRa 公司, 生化试剂购自 Sigma 公司, 地高辛标记检测试剂盒购自 Roche 公司。

收稿日期: 2009-06-14

基金项目: 中国热带农业科学院热带生物技术研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助 (ITBBZX0811)

作者简介: 张秀春 (1972-), 女, 福建永定人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所副研究员。

通信作者: 彭明 (1956-), 男, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所所长, 研究员。

1.1.4 引物合成 所用 DNA 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

AtNUDT8 基因克隆引物序列如下:

47240N; 5' - TGAGCTCTTCTTGATCTACAATGGATTCTG - 3'

Sac I

47240C; 5' - ATCTAGAAATCGAACCACCTTGATTTGGTTC - 3'

Xba I

1.2 方法

1.2.1 质粒提取、DNA 片段克隆、重组质粒鉴定 操作均参照分子克隆实验指南^[13]。

1.2.2 DNA 片段回收 采用 TIANGEN 公司回收试剂盒,并按其说明书进行操作。

1.2.3 拟南芥总 DNA 提取 采用 CTAB 法提取^[13]。

1.2.4 拟南芥的转化 采用渗透法转化拟南芥。将含重组质粒农杆菌在 28 ℃ 摇菌过夜至 OD600 值为 1.0~2.0, 8 000 r·min⁻¹ 离心 8 min, 弃上清收集菌体。沉淀用含质量浓度为 50 g·L⁻¹ 的蔗糖, pH 值 5.7 的 MS 培养基重悬至 OD600 值约为 0.5, 并加入 $\varphi=0.02\%$ Silwet70, 充分混匀后将拟南芥花序浸入其中, 每隔 2 min 搅拌菌液, 10 min 后取出平放并保湿 12~24 h, 4 周后收集种子。

1.2.5 抗性植株的筛选 收集的拟南芥种子晒干后, 用 $\varphi=75\%$ 乙醇(含 $\varphi=0.2\%$ 吐温 20)消毒 10 min 后, 弃上清, 然后用无水乙醇漂洗 10 s 后, 置于无菌滤纸上吹干 30 min, 播种于含 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 MS 培养基中。经 4 ℃ 暗培养 24 h 后, 于光照 8 h、黑暗 16 h 的光照培养箱培养 14 d。

1.2.6 过量表达植株 Northern 检测 提取经卡那霉素筛选的抗性植株和野生型植株幼嫩叶子的总 RNA, 在质量浓度为 10 g·L⁻¹ 的甲醛变性胶上进行电泳分离, 转膜后与 *AtNUDT8* 基因探针进行 Northern 杂交检测, 具体实验步骤参见 Roche 公司产的地高辛标记检测试剂盒使用说明书。

2 结果与分析

2.1 *AtNUDT8* 的分离、克隆和测序 根据 GENE BANK 登录号 AB018117.1 序列, 设计该基因的特异引物 47240N 和 47240C, 以基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 产物经质量浓度为 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳分离, 得到 1 700 bp 左右的特异扩增产物, 大小与预期一致(如图 1 所示)。将其连接到 pMD18-T 载体后在含 X-gal 和 IPTG 的固体 LB 培养基上进行重组子的筛选, 并对其中的 2 个白斑进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 结果如图 1 所示, 以 47240N 和 47240C 为引物, 从 2 个白斑提取的质粒为模板的 PCR 扩增产物与以基因组 DNA 为模板的 *AtNUDT8* PCR 扩增产物大小相同, 均在 1 000 bp 和 2 000 bp 之间出现一条明亮条带(图 1), 说明待鉴定质粒含有与基因组扩增产物相同的片段。重组质粒双酶切鉴定如图 2 所示, *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切下与预期大小一致的片段。经测序确认与 GENE BANK 完全一致(图略), 得到含 *AtNUDT8* 的克隆载体, 命名为 *pNDUT8*。

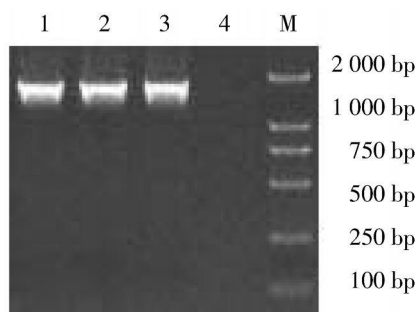


图1 *AtNUDT8* PCR 扩增和重组质粒 *pNDUT8* PCR 鉴定
1: 以基因组 DNA 为模板的 *AtNUDT8* PCR 扩增产物; 2~3: 以质粒 *pNDUT8* 为模板的 PCR 扩增产物; 4: 以质粒 ddH₂O 为模板的 PCR 扩增产物; M: DNA Marker

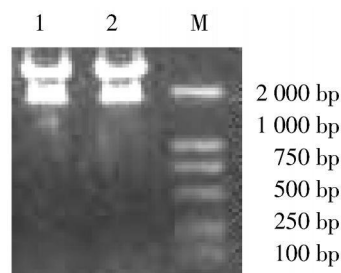


图2 重组质粒 *pNDUT8* 酶切鉴定
1~2: 重组质粒 *pNDUT8*/*Sac* I + *Xba* I; M: DNA Marker

2.2 植物表达载体的构建 将克隆载体 *pNDUT5* 用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切,回收 1 700 bp 的目的片段,与经同样双酶切的 *pCHF3* 相连,获得的重组质粒以 47240N 和 47240C 为引物,进行 PCR 鉴定并以用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定该重组子,结果如图 3、4 所示。PCR 和酶切结果均证明重组质粒的构建是正确的,经上海生物工程有限公司测序确认后获得 CaMV35S 启动子驱动的植物表达载体,命名为 *pCHFN8*。

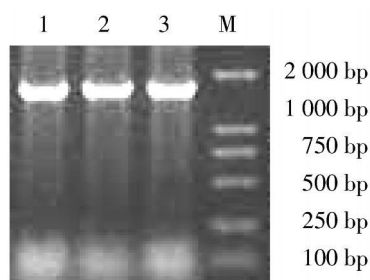


图 3 重组质粒 *pCHFN8* PCR 鉴定

1: 以质粒 *pNDUT8* 为模板的 PCR 扩增产物;
2~3: 以质粒 *pCHFN8* 为模板的 PCR 扩增产物;
M: DNA Marker。

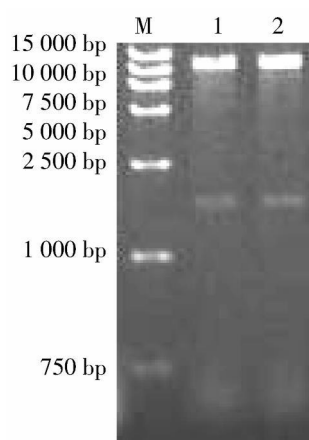


图 4 重组质粒 *pCHFN8* 酶切鉴定

M: DNA Marker; 1~2: *pCHFN8*/Sac I + Xba I

2.3 过量表达植株 Northern 检测 采用电击法将重组表达载体 *pCHFN8* 转化根癌农杆菌 GV3101,在确认阳性克隆后,通过渗透转化法将 *AtNUDT8* 转入拟南芥,经卡那霉素抗性筛选获得 56 株抗性植株。 T_1 代种子经卡那霉素筛选任意挑选存活比率为 3:1 的 6 个株系,取幼嫩的叶片提取 mRNA 进行 Northern blot。结果如图 5 所示,抗性植株有杂交信号而野生型植株没有,说明本研究已获得了过量表达 *AtNUDT8* 的拟南芥转基因植株。

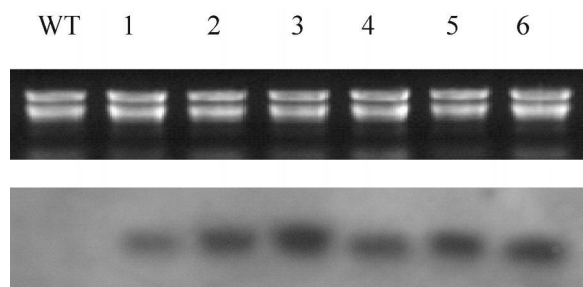


图 5 过量表达 *AtNUDT8* 植株 Northern blot 检测

WT: 拟南芥野生型植株;1~6: 拟南芥转 *AtNUDT8* 抗性植株

参考文献:

- [1] MCLENNAN A G. The Nudix hydrolase superfamily[J]. Cell Mol Life Sci. 2006,63(2):123-143.
- [2] BESSMAN M J, Frick D N, O'HANDLEY S F. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes[J]. J Biol Chem. 1996,271(41):25059-25062.
- [3] MCLENNAN A G, CARTWRIGHT J L, GASMI L. The human NUDT family of nucleotide hydrolases. Enzymes of diverse substrate specificity[J]. Adv Exp Med Biol. 2000,486:115-118.
- [4] OGAWA T, UEDA Y, YOSHIMURA K, et al. Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in Arabidopsis thaliana [J]. J Biol Chem. 2005,280(26):25277-25283.
- [5] KLAUS S M, WEGKAMP A, SYBESMA W, et al. A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants[J]. J Biol Chem. 2005,280(7):5274-5280.

- [6] YOSHIMURA K, OGAWA T, UEDA Y, *et al.* At-NUDX1, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol.* 2007, 48:1438 – 1449.
- [7] OLEJNIK K, KRASZEWSKA E. Cloning and characterization of an *Arabidopsis thaliana* Nudix hydrolase homologous to the mammalian GFG protein [J]. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1752(2):133 – 141.
- [8] JAMBUNATHAN N, MAHALINGAM R. Analysis of *Arabidopsis* Growth Factor Gene 1 (GFG1) encoding a nudix hydrolase during oxidative signaling [J]. *Planta.* 2005(3):1 – 11.
- [9] BARTSCH M, GOBBATO E, BEDNAREK P, *et al.* Salicylic Acid-Independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Signaling in *Arabidopsis* Immunity and Cell Death Is Regulated by the Monooxygenase FMO1 and the Nudix Hydrolase NUDT7 [J]. *Plant Cell.* 2006, 18:1038 – 1051.
- [10] OGAWA T, ISHIKAWA K, HARADA K, *et al.* Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis* plants [J]. *The Plant Journal.* 2009, 57:289 – 301.
- [11] DE BLOCK M, VERDUYN C, DE BROUWER D, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance [J]. *Plant J.* 2005, 41:95 – 106.
- [12] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚基, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 27 – 30.

Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants Over-expressing *AtNUDT8*

ZHANG Xiu-chun^{1, 2}, LI Wen-bin¹, XIA Yi-ji¹, PENG Ming^{1, 2}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences,

Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China;

2. Environmental Safety Supervision and Inspection Centre for Genetically Modified Plants and Microorganisms used in Plants,
Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China.)

Abstract: *AtNUDT8* was cloned by PCR from *Arabidopsis thaliana* and inserted into pCHF3 to form a recombinant expressing vector, pCHFN8. *Agrobacterium tumefaciens* mediating method was used to transform this vector into wide type *A. thaliana*. And a batch of transgenic *A. thaliana* over-expressing *AtNUDT8* was obtained through kanamycin screening and confirmed by Northern blot.

Key words: *AtNUDT8*; over-expression; *Arabidopsis thaliana*; transformation