

## 甲基紫精胁迫下转 *GLP7* 基因大豆抗氧化性的初步分析

李维娜, 李永光, 盖江南, 王朋朋, 王 涛, 李文滨

(大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室/东北农业大学 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**为探讨 *GLP7* 基因参与植物氧化胁迫的作用机制及其生物学功能,以转 *GLP7* 基因大豆 T<sub>2</sub>代株系及其受体品种垦丰 16 为材料,在氧化剂甲基紫精(MV)胁迫条件下,测定植株叶绿素、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的变化情况。结果表明:相对于非转基因大豆,转基因大豆在 MV 氧化胁迫下 MDA 含量降低,总叶绿素含量增加,SOD、CAT 活性显著提高。初步证明 *GLP7* 的过量表达提高了大豆的抗氧化能力,降低了氧化胁迫对大豆幼苗的损伤。

**关键词:** *GLP7* 基因;大豆;MV;氧化胁迫;叶绿素;抗氧化酶

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2013)02-0149-05

## Analysis of Antioxidant System Activities in Transgenic Soybean Transformed with *GLP7* under Methyl Viologen Stress

LI Wei-na, LI Yong-guang, GAI Jiang-nan, WANG Peng-peng, WANG Tao, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture/Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** To discuss the function mechanism of *GLP7* gene in anti-oxidation stress and its biological function, *GLP7* transgenic lines of soybean and its acceptor cultivar Kenfeng 16 (WT) were used to measure activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), chlorophyll and (MDA) contents under oxidant methyl viologen (MV) stress. The results showed that, compared with non-transgenic soybeans, transgenic soybeans reduced MDA content, increased total chlorophyll content, SOD and CAT activity in MV stress treatment. These results indicated that the over expression of *GLP7* could effectively enhance the activities of antioxidant ability and reduce the damage on the soybean seedlings under oxidative stress.

**Key words:** *GLP7* gene; Soybean; MV; Oxidative stress; Chlorophyll; Antioxidant enzymes

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是植物细胞代谢的产物,在植物信号转导、基因表达等方面起着重要作用。ROS 具有强氧化能力,植物通过抗氧化酶系统及时清除 ROS 以维持其平衡。但在逆境(如干旱、低温、病虫害等)下 ROS 会在细胞内急剧积累,使植物膜脂过氧化加剧,造成细胞损伤<sup>[1-2]</sup>。植物处于逆境胁迫时,其体内的抗氧化酶活性会被诱导升高,如在盐、干旱、病虫害、SO<sub>2</sub>、Hg 等胁迫下,植物 SOD、CAT 活性升高<sup>[3-7]</sup>。现已证实提高植物体内抗氧化酶类活性及增强抗氧化代谢水平是增强植物抗逆性的途径之一。

植物类萌发素蛋白(germin like proteins, GLPs)通常参与干旱、盐渍、病菌等生物胁迫和非生物胁迫反应<sup>[8-12]</sup>。研究表明,大多数 GLPs 具有草酸氧化酶或超氧化物歧化酶活性<sup>[13]</sup>,能够提高植物的抗氧化能力。大豆是重要的粮油兼用作物,逆境胁迫对大豆产量和品质产生严重影响。所以对抗转基因大豆的研究显得尤为重要。本实验室在前期研究中获得了大豆的 21 个 *GLP* 基因,通过转基因烟

草和拟南芥的研究,表明这些基因参与了植物生长、开花等多种生理反应<sup>[14]</sup>,但在植物抗氧化方面尚未报道。

本研究利用甲基紫精(俗名百草枯,以下简称 MV)对大豆进行氧化胁迫,通过对 SOD 和 CAT 活力、丙二醛以及叶绿素含量的测定,初步分析了转 *GLP7* 基因的大豆植株的抗氧化能力,为深入探讨 *GLP7* 参与植物氧化胁迫的作用机制及其生物学功能,以及进一步揭示植物的氧化胁迫机制提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 大豆材料 转 *GLP7* 基因大豆 T<sub>2</sub>代株系以及转基因受体大豆品种垦丰 16,由东北农业大学大豆所提供。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂、SYBP (R) Ex-Script™ RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司。MV(商品名

收稿日期:2012-10-22

基金项目:抗逆转基因大豆新品种培育重大专项(2011ZX08004-002)。

第一作者简介:李维娜(1988-),女,在读硕士,主要从事大豆生物技术研究。E-mail:jiayou880201@163.com。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

克无踪,即 GRAMOXONE),由英国 ZENECA 公司生产。丙酮、氮蓝四唑、核黄素等试剂均为国产分析纯。

## 1.2 转 *GLP7* 基因大豆的分子鉴定

1.2.1 转基因大豆 PCR 鉴定 利用 35 S 启动子和 *bar* 基因特异性引物对 T<sub>2</sub>代转基因大豆进行 PCR 分析,35 S 启动子上游引物序列为 5'-TCATCCCT-TACGTCAGTGGAG-3',下游引物序列为 5'-CCAT-CATTGCCATAAAGGAAA-3',扩增长度为 1 002 bp;*bar* 上游引物序列为 5'-GCGGTACCGGCAGGCT-GAAG-3',下游引物序列为 5'-CCGCAGGAACCG-CAGGAGTG-3',扩增长度为 285 bp。PCR 反应体系:大豆基因组 DNA 50 ng, dNTP (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 0.3 μL, 10× Buffer 2 μL, EX-Taq 0.3 μL, 引物 1 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s;38 个循环,72℃,10 min;4℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.2.2 转基因大豆 qRT-PCR 分析 提取大豆叶片总 RNA,合成 cDNA 第一条链进行 RT-PCR(方法参见 RNAiso,Prime Script II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,TaKaRa)。以大豆看家基因 *Actin4*(AF049106)为内参,上游引物序列为 5'-GTGTCAGCCATACTGTC-CCCATT-3',下游引物序列为 5'-GTTTCAAGCTCTT-GCTCGTAATCA-3',目的基因 *GLP7* 基因扩增片段为 215 bp,上游引物序列为 5'-TGTCCAGCAGTTC-CACCCA-3',下游引物序列为 5'-CAGGCCATTC-CCATCAAGG-3'。PCR 反应体系:cDNA 2 μL,引物 1 μL,2× SYBR (R) Premix Ex Taq TM 10.5 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。PCR 反应条件:95℃,1 min;95℃,10 s;60℃,12 s;72℃,18 s;40 个循环;72℃,5 min;4℃ 保存。采用比较 CT 法(ΔΔCT)比较转基因和非转基因植物中 *GLP7* 的表达差异,相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{\text{样品}} - \Delta CT_{\text{对照}})} = 2^{(CT_{\text{对照}} - CT_{\text{内参}}) - (CT_{\text{样品}} - CT_{\text{内参}})}$ 。

## 1.3 转 *GLP7* 基因大豆植株抗氧化性分析

1.3.1 MV 处理 选取培养 28 d 生长一致的转基因阳性大豆株系和对照植株各 5 株,用 0.02 mmol·L<sup>-1</sup> MV(溶于 0.1% Tween20 中)均匀涂抹于相同叶位的叶

片表面,每株处理 3 次重复,28℃、光照强度为 100 ~ 800 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>(16 h 光照/8 h 黑暗)下培养 4 d,取叶片进行指标测定。

1.3.2 叶片中叶绿素含量的测定 叶绿素含量的测定参考张志良<sup>[15]</sup>和 Arnon<sup>[16]</sup>的方法,取待测叶片,用蒸馏水冲洗干净后用吸水纸吸干,然后将叶片切成 1 cm 左右的小段,准确称量 0.1 g,放入具塞试管中,加 5 mL 80% 的丙酮、5 mL 二甲基亚砜,摇匀,65℃ 下保温,直至叶片变白为止(约 6 h),冷却后加 80% 的丙酮定容至 25 mL,分别测定其在 663 和 645 nm 处的吸光度,用下列公式计算:

$$\text{Chl}(a) = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$$

$$\text{Chl}(b) = 22.9A_{663} - 4.68A_{645}$$

$$\text{Chl}(t) = 8.02A_{663} + 20.21A_{645}$$

以上公式计算出的结果为叶绿素的浓度,根据稀释倍数计算每克鲜重叶片中叶绿素的含量(mg·g<sup>-1</sup>FW)。

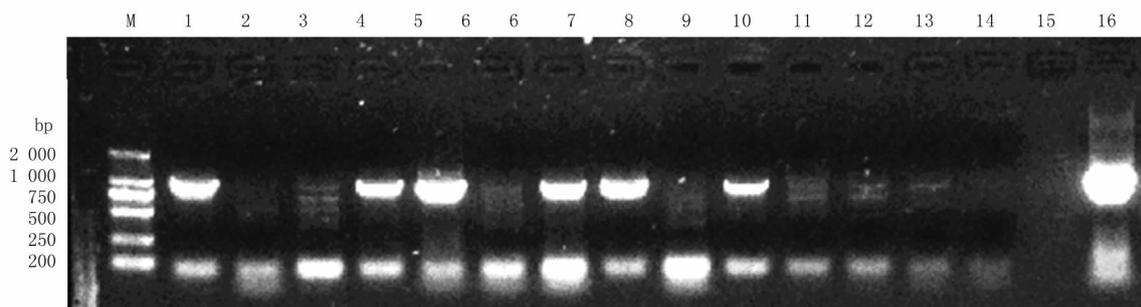
1.3.3 SOD、CAT 活性的测定 取 2.0 g 大豆叶片,加入 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 5 mL (pH 7.8) 于冰浴上研磨,13 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃ 离心 20 min,上清液为酶液。参照邵丛本等的 NBT 光还原方法<sup>[17]</sup>测定 SOD 酶活性,以单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位(U);紫外吸收法<sup>[18]</sup>测定过氧化氢酶(CAT)活性。

1.3.4 丙二醛(MDA)含量测定 采用硫代巴比妥酸法(TBA)测定 MDA 含量<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 转 *GLP7* 基因大豆的分子检测

分别提取 T<sub>2</sub>代转 *GLP7* 基因植株基因组 DNA,琼脂糖电泳检测 DNA 质量及浓度。利用 CaMV35S (1 002 bp) 和 *bar* (285 bp) 两对引物对 18 株 T<sub>2</sub>代转基因植株 PCR 鉴定,11 株检测到 CaMV35S 条带(图 1),其中 9 株同时检测到 *bar* 基因条带(图 2)。

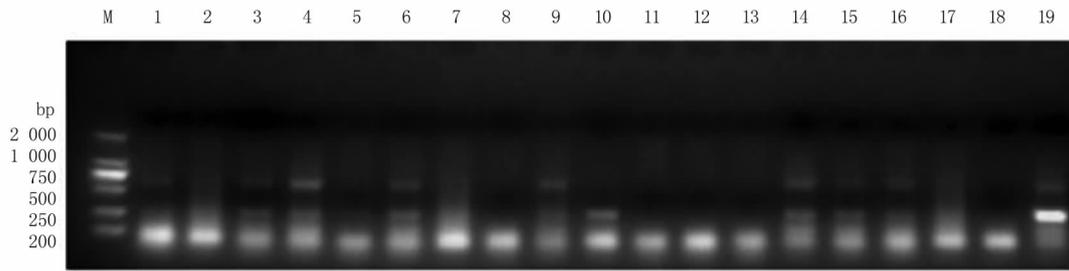


M:DL2000 plus;1~13:转基因植株;14:非转基因对照;15:空白对照;16:质粒

M:DL2000 plus;1-13:Transgenic plants;14:Non-transgenic plant;15:Control group;16:Plasmid

图 1 PCR 检测大豆 CaMV35S 启动子

Fig. 1 The detection of soybean by PCR with primer CaMV35S primers



M:DL2000 plus;1~17:转基因植株;18:非转基因对照 19:质粒

M:DL2000 plus;1-17:Transgenic plants;18:Non-transgenic plant;19:Plasmid

图2 PCR检测大豆 *bar* 基因

Fig. 2 The detection of soybean by PCR with *bar* primer

对 qRT-PCR 和 PCR 鉴定均为阳性的 9 株  $T_2$  代植株进行目的基因 *GLP7* 的表达丰度检测,相对于非转基因对照的基因表达倍数结果见图 3。定量结果表明,在 CaMV 35 S 启动子作用下,9 株转基因植株 *GLP7* 表达丰度是非转基因植株的 15 倍以上,其中株系 4-1、18-1、27-2 表达丰度在 40 倍以上。

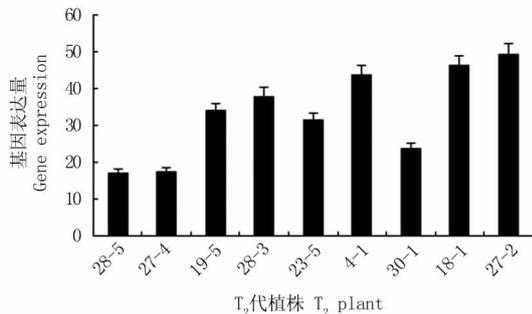


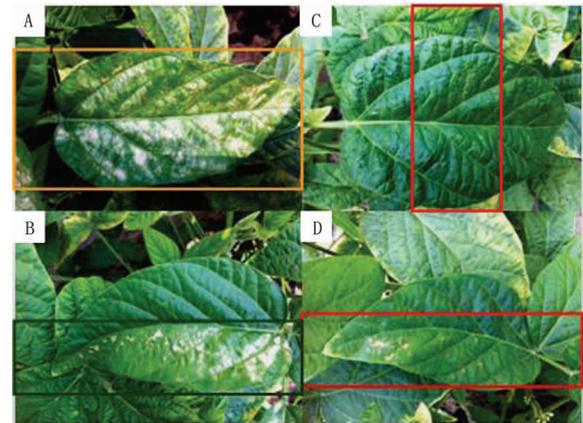
图3  $T_2$ 代植株表达分析

Fig. 3 Gene expression analysis in  $T_2$  transgenic soybean

## 2.2 转 *GLP7* 基因大豆在 MV 胁迫下的抗氧化性

2.2.1 表型分析 MV 能诱发细胞产生过量的超氧化物自由基,从而对植物产生氧化胁迫,使细胞膜受到破坏,叶绿体降解、叶片黄化,最终导致细胞死亡。本试验选择基因表达量倍数较高的 4-1、18-1 和 27-2 株系进行抗氧化性分析。大豆叶片经 MV 处理 1 d 后即在对照植株叶片表面出现轻微伤斑;而转 *GLP7* 植株叶片表面仅观察到轻微的伤害;4 d 后,对照植株叶片表面出现严重的黄化伤斑并大面积扩散(图 4A,B),转 *GLP7* 基因大豆叶片表现出了较强的抗性(图 4C,D)。

2.2.2 叶绿素含量 如图 5 所示,处理前转基因植株与对照植株总叶绿素含量无显著差异;但经  $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MV 处理 4 d 后,对照植株与转基因植株的叶片总叶绿素含量均呈下降趋势,与对照相比转基因植株下降幅度较小,叶绿素含量降低幅度在转基因株系间存在差异,这种差异与基因表达水平呈正相关。表明 *GLP7* 基因能够调节对植物叶绿



A,B:对照;C,D:转 *GLP7* 植株

A, B: Control; C, D: *GLP7* transgenic plants

图4 MV处理4 d后大豆叶片表型

Fig. 4 The transgenic and control plant leaves after 4 days MV treatment

素的保护作用。

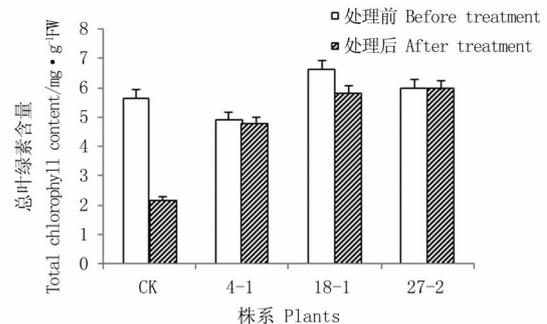


图5 MV处理对大豆叶片总叶绿素含量的影响

Fig. 5 Effect of MV stress on total chlorophyll content in the soybean leaves

2.2.3 MDA 含量 如图 6 所示, MV 处理前,各植株叶片的 MDA 含量相近,转基因株系与对照株系无显著差异。对照植株叶片在 MV 处理后迅速积累,24 h 后 MDA 增加近 2 倍,表明对照叶片膜质过氧化程度受 MV 胁迫变化较迅速,植株抗氧化能力较低;而转基因大豆叶片的 MDA 含量增加相对缓慢,MDA 在处理 0~12 h 无显著积累,12 h 后开始增加,在处理过程中转 *GLP7* 基因植株 MDA 含量始

终低于对照。表明 *GLP7* 能够有效缓解由于 MV 胁迫对大豆幼苗的氧化损伤,提高大豆的抗氧化能力。

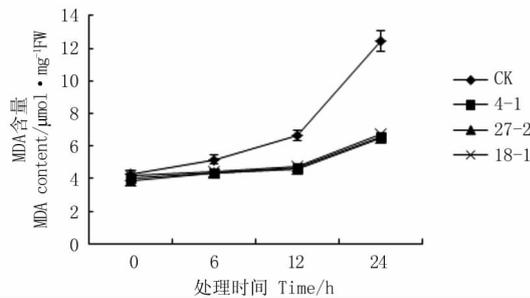


图6 MV处理对大豆叶片MDA含量的影响

Fig. 6 Effect of MV stress on the MDA content of soybean leaves

2.2.4 抗氧化酶活性 由图7可知,无论对照还是转 *GLP7* 基因大豆的CAT活性,在氧化胁迫期间均呈先升后降的变化趋势,MV处理12h时活性最高,且转 *GLP7* 基因大豆的CAT活性均高于对照。转基因与对照的SOD活性均持续上升,24h时转 *GLP7* 基因大豆SOD活性约为对照的1.8倍(图8)。表明 *GLP7* 基因通过参与调节SOD、CAT活性来增强植物活性氧清除系统,提高大豆的抗氧化能力。

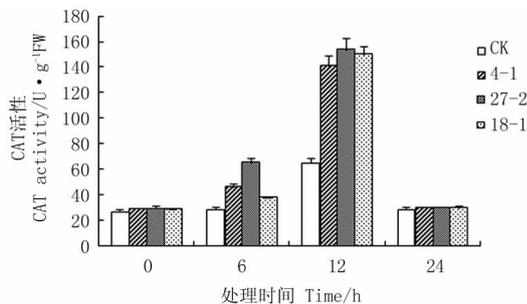


图7 MV胁迫对大豆幼苗CAT活性的影响

Fig. 7 Effect of MV stress on CAT activities of soybean seedlings

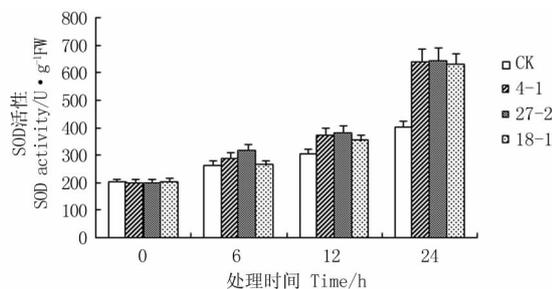


图8 MV胁迫对大豆幼苗SOD活性的影响

Fig. 8 Effect of MV stress on SOD activities of soybean seedlings

### 3 讨论

在氧化胁迫条件下,植物体内往往会产生大量的氧自由基,就会对机体造成氧化胁迫,引起DNA损伤、酶失活、膜脂质过氧化作用,甚至细胞死亡。

氧化胁迫下大豆叶片叶绿素含量降低,其原因是一方面由于氧化胁迫使叶绿素合成受到阻碍,另一方面MDA含量增多使叶绿素发生降解<sup>[20]</sup>,MDA增多会与膜中蛋白结合引起蛋白质分子内和分子间交联,蛋白质分子发生聚合使细胞器的正常结构发生改变<sup>[23]</sup>。抗氧化酶系统作为生物体内消除活性氧的主要保护机制,其特征之一在于生物体内活性氧生成量增加时,其活性成分抗氧化酶的生物合成能力升高,因此抗氧化酶活性的改变可以间接反映环境中存在有毒有害物质的存在,是分子水平上预报有机毒物对生态系统危害的敏感生物标记物<sup>[21-22]</sup>。本研究中,在一定范围内,随着MV胁迫时间的增加,SOD、CAT活性也升高,表明大豆幼苗在受到MV胁迫时自身清除ROS的能力增强;当胁迫严重时,酶活性则可能因为中毒而受到抑制。SOD、CAT作为主要的抗氧化酶类,在保护细胞膜免受氧化损伤中具有特殊重要的意义<sup>[23]</sup>。本研究中转基因植株SOD和CAT两种抗氧化酶活性在开始时持续上升,然后维持在较高的水平。推测 *GLP7* 基因表达产物直接或间接调控了SOD和CAT的过量表达,两种抗氧化酶活性得以提高,从而减轻了膜质过氧化作用,进而保护了细胞膜结构的稳定性。

因此,初步推测 *GLP7* 基因参与了大豆的ROS信号转导途径,调控了活性氧的氧化还原酶系统,降低了转基因大豆细胞中的活性氧的积累,从而提高了植物对氧化胁迫的耐受能力,但 *GLP7* 基因的具体作用途径和基因调控网络有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57: 779-795.
- [2] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399.
- [3] Chen W L, Xu L L. Changes of hydrogen peroxide accumulation and hydrogen peroxides scavenging enzyme activity in the leaves of two barley species under salt stress[J]. Nanjing Agricultural University, 1999, 22: 97-100.
- [4] Hermandwz J A, Almansa M S. Short-term effects of salt on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves[J]. Physiological Plant, 2002, 115: 251-257.
- [5] Madamanchi N R, Donahue J L, Cramer L C, et al. Differential response of Cu, Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26: 95-103.
- [6] Cho U, Parh J. Mercury induced oxidative stress in tomato seedlings[J]. Plant Science, 2000, 156: 1-9.
- [7] Mittler R, Zilinskas B A. Regulation of pea cytosolic ascorbate per-

- oxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought [J]. *The Plant Journal*, 1994, 5:397-405.
- [8] Perl A, Perl T R, Galili S, et al. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85:568-576.
- [9] Doullis A G, Donahue J L, Alscher R G. Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system [J]. *Physiological Plant*, 1998, 102:461-470.
- [10] Halliwell B. Oxygen-derived species and herbicide action [J]. *Physiological Plant*, 1984, 15:21-24.
- [11] Patnaik D, Khurana P. Germins and germin like proteins; Oxalate oxidases and different surface structure in wheat germins [J]. *Biological Chemistry*, 2000, 349:309-321.
- [12] Bernier F, Berne A. Germins and germin-like proteins; plant do all proteins. But what do they do exactly [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 39:545-554.
- [13] Lane B G. Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins [J]. *Biochemical Journal*, 2000, 349:309-321.
- [14] Lyu M, Han Y P, Gao J G, et al. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11:620-626.
- [15] 张志良. 植物生理实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990:88-91. (Zhang Z L. *Acta botanica sinica plant physiology experiment guidance* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990:88-91.)
- [16] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Physiological Plant*, 1990, 24:1-15.
- [17] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean-plants-protective role of exogenous polyamines [J]. *Plant Science*, 2000, 151:59-66.
- [18] Aebi H. Catalase in vitro [J]. *Methods in Enzymology*, 1984, 105:121-126.
- [19] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及膜脂过氧化作用的关系 [J]. *植物学报*, 1984, 26:605-615. (Lin Z F, Li S S, Lin G Z, et al. The relationship between the rice leaves aging with superoxide dismutase and membrane lipid peroxidation [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1984, 26:605-615.)
- [20] Uphem B L. Photooxidative reactions in chloroplast thylakoids; Evidence for a fentotype reaction promoted by superoxide ascorbate [J]. *Photosynthesis Research*, 1986, 8:235-247.
- [21] Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers [J]. *Toxicol Letters*, 1999, 107:33-47.
- [22] Li W M, Yin D Q. Effects of chloricnitroanilinated chemicals on antioxidant enzymes in serum of *Carassius auratus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(2):236-240.
- [23] Berna A, Bernier F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a  $H_2O_2$ -producing enzyme [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(3):539-549.

## 第九届全国大豆学术讨论会通知

为交流近期我国大豆科研进展,加强大豆科研和产业人员之间的交流与合作,促进中国大豆产业的发展,中国作物学会大豆专业委员会计划于2013年5月下旬在湖北省武汉市召开第9届全国大豆学术研讨会。现将会议有关事项通知如下:

### 一、会议组织单位

主办:中国作物学会大豆专业委员会。

承办:中国农业科学院油料作物研究所。

### 二、参会人员

全国从事大豆科研、教学、推广、生产管理的科技人员、企业界人士和管理人员。

### 三、时间地点

时间:2013年5月25日报到,26~28日开会。

地点:湖北省武汉市荷田大酒店,湖北省武汉市东湖新技术开发区华工科技园内。

### 四、会议论文、资料

本次会议计划编辑印刷《第九届全国大豆学术讨论会论文摘要集》,有意提供书面材料的代表,请将论文摘要于2013年4月15日前发至大会筹备处。

本次会议将组织评选大豆青年科技工作者优秀论文,请年龄在35周岁以下青年科技工作者、研究生踊跃投稿。

### 五、联系方式

联系人:中国农业科学院油料作物研究所陈水莲

邮箱地址:chenshuilianjy@163.com,联系电话:15827102336

荷田大酒店联系电话:027-87196888

中国作物学会大豆专业委员会  
2013年2月28日