



过表达桃 *PpCuZnSOD* 基因提高大豆耐盐性研究

杨艳丽, 李大红, 李鸿雁

(黄淮学院 生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000)

摘要: 为研究桃 (*Prunus persica* L.) 自由基清除剂 CuZnSOD 编码基因对于大豆耐盐性的促进作用, 将桃 *PpCuZnSOD* 全长基因克隆到连有 35S 启动子的表达载体上, 并通过农杆菌导入大豆基因组中, 通过 PCR 和 Southern 杂交方法检测阳性转基因植株, 并对 T₂ 代转基因植株进行基因表达量分析和耐盐性评估。结果表明: 转基因植株有较高的耐盐性, 表现为种子萌发率和存活率高, 叶绿素含量高。转基因植株在盐胁迫下存活时间更长, 与非转基因植株相比, 转基因植株的 SOD、POD、CAT 酶活性较高, 而丙二醛含量显著降低。研究结果表明 *PpCuZnSOD* 基因过表达可以显著提高大豆植株的 SOD 活性水平, 缓解盐胁迫对大豆的氧化损伤。

关键词: 过表达; *PpCuZnSOD*; 耐盐性; 大豆

Overexpression of *PpCuZnSOD* Gene Improves Salt Tolerance in Transgenic Soybean

YANG Yan-li, LI Da-hong, LI Hong-yan

(School of Biotechnology and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: In order to study the enhanced effect of CuZnSOD encoding gene of peach on salt tolerance of soybean, a full-length cDNA of a CuZnSOD from peach (*Prunus persica* L.) *PpCuZnSOD* was cloned, and the target gene is introduced into the soybean genome via *Agrobacterium tumefaciens*. The transgenic plants was detected by PCR, Southern blot and quantitative real time PCR. Two transgenic soybean lines of T₂ generation were recruited and treated with 150 mmol·L⁻¹ NaCl, which simulating salt conditions. The results showed that transgenic soybean plants had high salt tolerance. The seed germination rates, survival rate and the contents of chlorophyll were higher than that of wild-type. Transgenic plants had more high SOD, POD and CAT activities, while less MDA content under salt stress compared with wild-type plants. Our results substantiate that increased levels of SOD activity brought about by overexpression of *PpCuZnSOD* gene may play an important role in ameliorating oxidative injury induced by salt stress.

Keywords: Overexpression; *PpCuZnSOD*; Salt tolerance; Soybean

农业生产不断受到环境变化的挑战, 主要表现为土壤高盐、高温或低温、干旱胁迫以及紫外线辐射等, 土壤高盐和干旱胁迫导致植物光合作用、蒸腾作用降低, 从而影响其生长、发育, 导致产量降低^[1]。大豆是一种重要的农业作物, 为人类提供植物蛋白的最大来源, 是植物油的第二大来源, 但大豆的生产也正受到日益恶化的环境影响, 往往在其细胞中积累活性氧 (reactive oxy gen species, ROS), 影响了生长和生产^[2]。ROS 对细胞具有潜在的毒性, 通过脂质、核酸和蛋白质的氧化损伤而严重破坏正常的新陈代谢^[3]。一些研究表明, ROS 在少量存在时, 作为重要的信号分子发挥作用, 参与控制病原体防御、激素信号传导、应激反应和植物生长

发育等过程^[4]。然而, 当活性氧产生增加时, 它们能够损伤甚至杀死植物细胞。因此, 细胞内 ROS 的水平需要受到严格的调控^[5]。ROS 的毒性作用会受到酶和非酶抗氧化系统的影响。抗氧化代谢可保护细胞免受 ROS 引起的氧化损伤, 如膜化合物过氧化、多糖降解、酶变性和 DNA 损伤等^[6]。ROS 活性氧清除系统在细胞功能中起着重要的作用, 因为 ROS 具有极强的细胞毒性。超氧化物歧化酶、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 等是抗氧化系统的一部分, 它可以保护植物免受活性氧的损害^[7]。

收稿日期: 2018-03-31

基金项目: 河南省科技计划项目 (182102110305); 河南省高等学校重点项目 (16A210032)。

第一作者简介: 杨艳丽 (1979 -), 女, 学士, 实验师, 主要从事园林技术及植物生理研究开发工作。E-mail: 1654460639@qq.com。

通讯作者: 李鸿雁 (1967 -), 女, 硕士, 教授, 主要从事园林植物与逆境生理研究工作。E-mail: 1248762303@qq.com。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是参与 ROS 降解的第一个酶,能把超氧阴离子(O_2^-)转换成 H_2O_2 。SODs 已经在所有需氧生物被发现。SOD 有几种异构体,这取决于与活性位点相互作用的金属辅因子,例如锰(MnSODs)、铜/锌(CuZnSODs)、铁(FeSODs)和镍(NiSODs)^[8]。CuZn-SOD 是细胞质、细胞核和线粒体膜间隙中的主要自由基清除剂^[9]。在胁迫状态下,多个研究结果表明 SOD 酶活性和其转录表达增高^[10-11]。有研究表明在盐胁迫下玉米和番茄中 MnSOD 和 CuZnSOD 高水平表达。这些有较高活性抗氧化酶的植物更耐盐或氧化胁迫。已有研究证明盐胁迫能够改变抗氧化酶水平,在很大程度上提高幼苗的抗逆性^[12]。逆境条件下,水稻盐敏感品种 SOD 水平显著高于耐盐品种^[13]。过表达水稻叶绿体 OsCu/Zn-SOD,转基因植株在盐胁迫和 $NaHCO_3$ 胁迫下进行发芽试验,发现其锌超氧化物歧化酶过表达株系发芽率显著优于非转基因(NT)^[14]。Zhou 等^[15]对黄瓜 CsSOD 基因实时荧光定量 PCR 分析表明,该基因可能对热、冷、渗透胁迫和盐胁迫等相关。因而,盐胁迫和干旱胁迫下植物 SOD 活性的增加是缓解逆境损伤的一个步骤^[16]。

这些研究有助于开发能够有效地耐受非生物胁迫的转基因作物。为了研究外源基因应用于提高大豆抗氧化性,本研究把桃 *PpCuZnSOD* 基因通过农杆菌导入大豆基因组中,在盐胁迫条件下检测转基因大豆苗期的耐盐性及其相关的生理指标,以期获得具有一定应用价值的耐盐大豆新种质,为筛选具有育种应用价值的材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料与菌株 大豆品种中黄 13 由驻马店农业科学院提供。大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 EHA105 菌株均由本实验室保存。

1.1.2 载体与试剂 克隆载体 pMD-18 和 DNA 聚合酶购自于 TaKaRa(中国大连)有限公司;pCAM-BIA1301 为本实验室保存;TRIzol 试剂购自 Sigma 公

司;cDNA 合成试剂盒购于 TaKaRa 公司(中国,大连);DNA 回收试剂盒和 T_4 连接酶购于上海生物工程公司;地高辛试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit,Roche,德国);Power Sybr Green PCR 试剂购自 ABI 公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 试验设计

根据 GenBank 中桃基因序列(XP_021817567)设计引物,扩增 *PpCuZnSOD* 基因,通过农杆菌介导转化到大豆中。为检测目的基因过表达对植株表型的作用,经检测后将超表达转基因大豆植株和非转基因大豆植株移到含有砂与土(1:1)基质中栽培 7 d 后,每隔 1 d 用含有 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 的 Hoagland 营养液进行盐胁迫处理,仅用 Hoagland 培养液灌溉作为对照。20 d 后,分别记录大豆在盐处理前后的地上部分和根的长度,测定其在盐胁迫下相关生理变化,测定 SOD 活性、叶绿素含量、POD 活性、MDA 含量和 CAT 活性,至少 6 次重复。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建与转化 根据 GenBank 中桃基因序列(XP_021817567)设计引物 P1: 5'-CGGATC-CATGGTGAAAGCGCTTGCTGTTC-3' 和 P2: 5'-CGAGCTCTCAGTTTGGAGACCAATAATA-3', 下划线为相应酶切位点,正向引物酶切位点为 *Bam*H I, 反向引物酶切位点为 *Sac* I。用 TRIzol 试剂提取 RNA,按说明书方法逆转录 cDNA 第一链及双链 cDNA,以双链 cDNA 为模板,使用 P1 和 P2 引物,退火温度 53°C , 72°C 延长 10 min。扩增所得片段连接到 T 载体上,送上海生工测序,测序结果与 GenBank 序列进行同源性比对。将载有 *PpCuZnSOD* 序列的 T 载体和表达载体 pCAMBIA1301 分别用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切,1.2% 琼脂糖电泳检测。使用 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段和表达载体片段,1.2% 琼脂糖电泳检测回收效果,分别把 50 ng 目的基因片段与 17 ng 载体加入到缓冲液中,加入 $1\text{ }\mu\text{L}$ T_4 连接酶($10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 4°C 过夜连接。重组表达载体结构如图 1 所示。用 PCR 和双酶切法检测质粒是否构建成功,采用冻融法将表达载体转入农杆菌中。

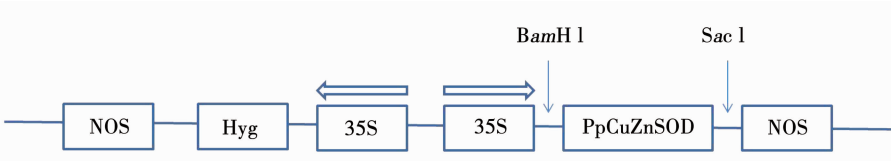


图 1 重组表达载体结构简图
Fig. 1 Construction of transgenic plant expression vector

1.3.2 转基因大豆扩繁 采用农杆菌介导的子叶节转化法^[17]将目的基因转入大豆中。转基因植物用 50 μg·mL⁻¹潮霉素筛选,抗性转基因大豆经练苗后盆栽。

1.3.3 Southern 杂交 参照 Murray 等^[18]的 CTAB 法提取大豆基因组 DNA。使用 P3: 5'-GAATCAT-CAACTTCACCCAG-3' 和 P4: 5'-CCAATAATACCA-CAAGCAAC-3'引物,以大豆基因组 DNA 为模板,复性温度为 55℃。用 *Eco* RI 在 37℃ 酶解大豆基因组 DNA。Southern 杂交采取地高辛随机标记的 *PpCuZnSOD* 基因全长作为探针,具体参照说明书进行。

1.3.4 qRT-PCR 分析 对阳性转基因植株的 *PpCuZnSOD* 基因表达量进行分析。用 Trizol 试剂提取转基因大豆叶片 RNA。用紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 的吸光度比值,计算 RNA 的浓度,参照试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。用 ABI 7500 实时检测系统进行 qRT-PCR 检测。以 P5:5'-GAATCAT-CAACTTCACCCAGGA-3' 和 P6: 5'-CCAATAATAC-CACAAGCAACCC-3'为荧光定量 PCR 引物。以 *Actin* 基因为内参基因,上下游引物序列为:5'-TGATG-GTGTGAGTCACACTGTACC-3' 和 5'-GGACAATG-GATGGGCCAGACTC-3'。反应体系参考文献^[19]。所有的 PCR 为 3 个重复,并用同一个条件进行测试。采用两步法 PCR 扩增标准程序:50℃,2 min;95℃下预变性 10 min;然后 95℃,15 s;60℃,45 s,循环 40 次。采用双标准曲线法^[19]定量计算基因的拷贝数。

1.3.5 转基因大豆耐盐性分析 采用 NBT 还原法测定 SOD 活性,分光光度法测定叶绿素含量,比色法测定 POD 活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,紫外吸收法测定 CAT 活性,具体方法均参照文献^[20]。

1.4 数据分析

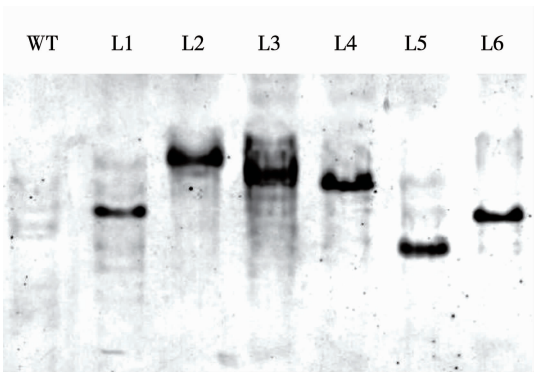
采用 Excel 2013 和 SPSS 17.0 进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 转基因植株分子检测

用特异引物对获得的 6 个转基因株系 L1 ~ L6 进行 PCR 检测,结果显示 6 个转基因株系均为阳性。以 *PpCuZnSOD* 基因的全长序列为探针,通过 Southern 杂交对其进行进一步确认,结果显示各转

基因株系均有 1 个拷贝的 *PpCuZnSOD* 基因序列整合到大豆基因组中(图 2)。



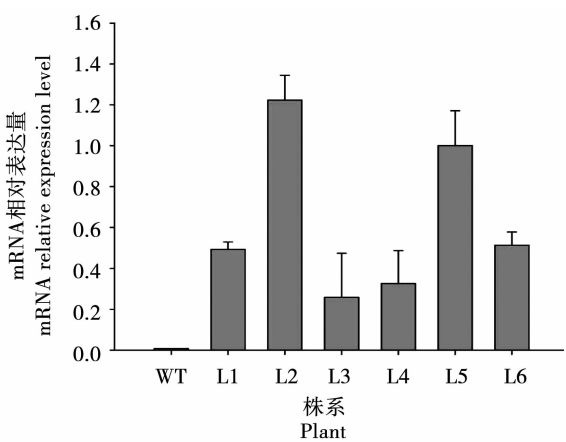
M:分子量标准物; WT:野生型; L1 ~ L6:转基因植物。

M: Ladder marker; WT: Wild type; L1-L6: Transgenic plants.

图 2 转 *PpCuZnSOD* 基因大豆 Southern 杂交分析
Fig. 2 Southern blot analysis of *PpCuZnSOD* transgenic soybean

2.2 转基因各株系 *PpCuZnSOD* 表达量分析

为检测各转基因植株中 *PpCuZnSOD* 基因的表达量,对 6 个转基因阳性植株进行 qRT-PCR 检测(图 3)。各株系均能表达目的基因,但表达量存在较大差异,其中 L2 和 L5 株系过表达 *PpCuZnSOD* 基因,其它株系表达量较低,而非转基因大豆基本没有表达。



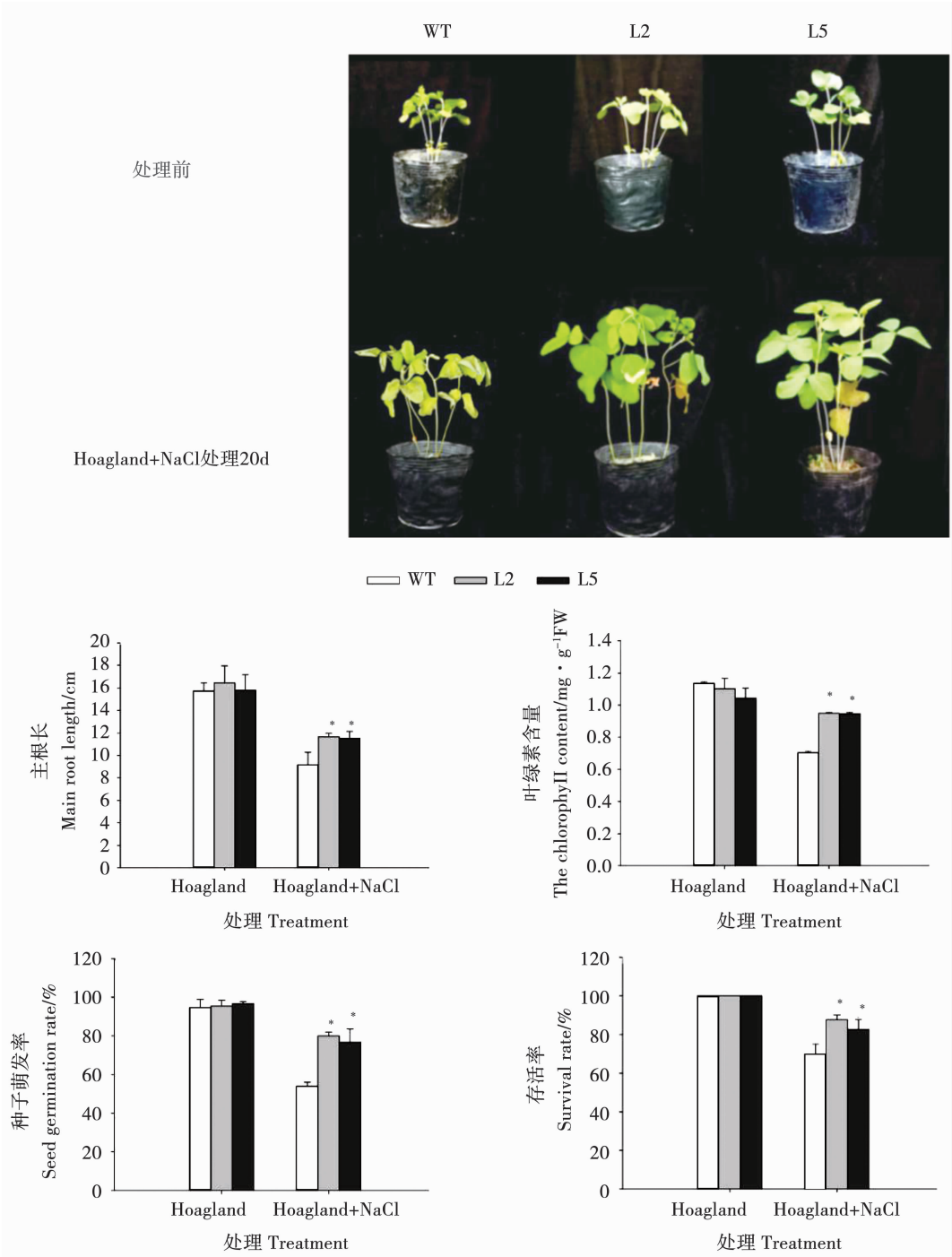
WT:野生型大豆; L1 ~ L6:转基因大豆株系。
WT: Wild type soybean; L1-L6: Transgenic soybean lines.

图 3 转基因大豆各株系盐胁迫下 *PpCuZnSOD* 表达变化
Fig. 3 *PpCuZnSOD* gene expression of transgenic lines under salt stress

2.3 转基因大豆耐盐性分析

高盐胁迫下,转基因大豆长势明显好于对照,主要表现为生根较快,叶绿素含量显著高于对照,

种子萌发率和存活率显著优于对照(图4)。



* :转基因株系与对照存在显著差异($P < 0.05$),下同。
* : Significant difference between transgenic line and control($P < 0.05$), the same as below.

图4 转基因大豆在盐胁迫条件下生长状况

Fig. 4 Related growth status of the transgenic plants under salt stress

15日龄的转基因阳性植株经盐胁迫处理20d后,与非转基因大豆植株的MDA、POD、SOD和CAT活性差异显著。盐胁迫处理条件下,*PpCuZnSOD*的

过表达植株MDA含量显著低于对照,而POD、SOD及CAT高于对照(图5)。结果表明*PpCuZnSOD*过表达导致转基因植物的耐盐性提高。

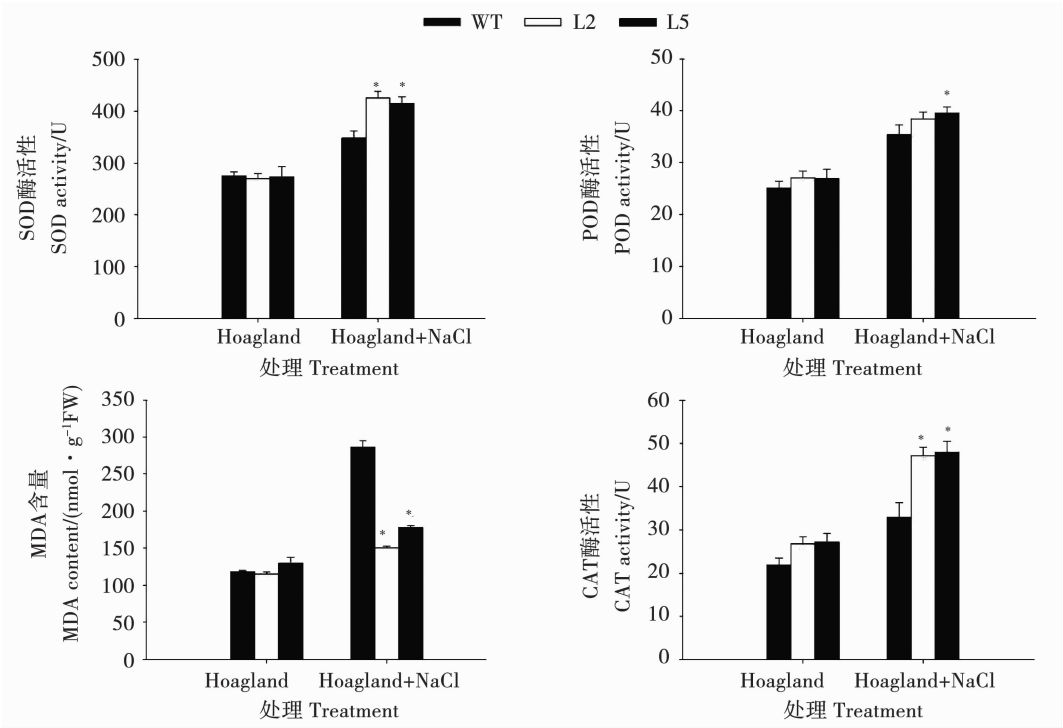


图5 盐胁迫处理后转基因大豆MDA、SOD、POD和CAT活性变化

Fig. 5 Changes of MDA, SOD, POD and CAT activity in seedlings of transgenic soybean under salt stress

NBT和DAB染色结果显示:盐胁迫后,过表达植株的染色明显较非转基因植株浅,表明过表达植株中 O_2^- 和 H_2O_2 的积累明显低于非转基因植株。以上结果表明,150 mmol · L⁻¹ NaCl胁迫下过表达*PpCuZnSOD*可增强大豆细胞内清除活性氧能力,使 O_2^- 和 H_2O_2 的积累减少,从而减少细胞受损或细胞死亡,增强植物的耐盐性。

生理染色试验中也观察到了转*PpCuZnSOD*基因植株对胁迫条件的耐受性显著高于非转基因大豆。叶绿素含量的增加表明*PpCuZnSOD*转基因植株比野生型盐胁迫时具有更好的光合能力。与转基因大豆相比,非转基因大豆植株表现为明显延迟生长,叶片颜色也较对照更黄。

盐胁迫抑制植物生长和发育,植物通过细胞和分子水平的应激反应来耐受各种胁迫。植物对盐胁迫的适应涉及到离子平衡,其相关基因有很多,例如渗透调节物质的合成酶、清除活性氧和抗氧化防御机制的酶等。许多研究表明,抗氧化酶是植物氧化应激防御机制的重要组成部分,抗逆性植物具有较高的抗氧化酶活性,使其能耐受逆境^[22]。抗氧化酶SOD参与ROS的解毒作用,SOD催化超氧阴离子转化为 H_2O_2 ,被认为是植物抵御氧化胁迫的第一道防线^[23]。Leclercq等^[24]研究表明对水分胁迫响应的细胞内SOD活性增加能有效增加植物耐旱性。本研究中,在20 d的盐胁迫条件下,转*PpCuZnSOD*基因株系的SOD活性显著高于非转基因株系,表明转基因大豆中 O_2^- 的清除能力增强。进一步的研究发现盐胁迫条件下转*PpCuZnSOD*基因植株的POD、CAT活性显著升高。Lee等研究结果表明,在非生物胁迫下,抗氧化酶活性增加,可使植物免受胁迫下产生ROS对其进行伤害^[21]。因此,过表达*PpCuZnSOD*植株胁迫条件下可有力清除ROS。

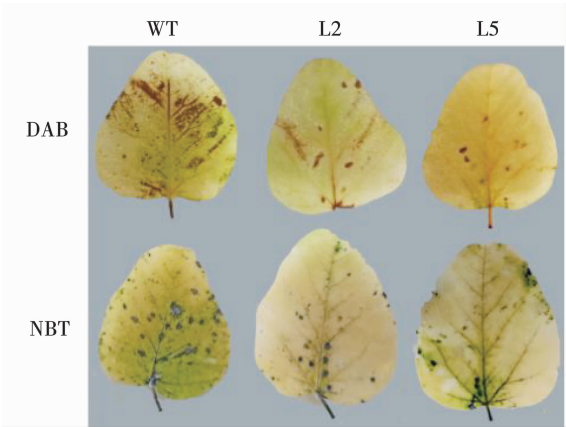


图6 盐胁迫下大豆叶片NBT和DAB染色

Fig. 6 NBT and DAB staining of soybean leaves under salt stress

3 讨论

本研究中转*PpCuZnSOD*基因大豆植株的抗逆性的典型表型和生理参数明显提高,在盐胁迫下转*PpCuZnSOD*基因大豆植株的主根长明显高于非转基因大豆,这与在其它植物上研究的结果类似^[21]。

当活性氧水平超过植物清除能力时,生物膜的脂质过氧化物含量增加。MDA 是脂质氧化修饰的最终产物之一,能造成细胞膜系统损伤,严重的导致细胞死亡^[25]。本研究发现,胁迫下转基因植株 MDA 含量较对照低,表明转基因植物植株能够清除更多活性氧(H₂O₂),转基因植株细胞膜的损伤程度明显低于非转基因植株。此外,DAB、NBT 染色结果表明转 *PpCuZnSOD* 基因植株的过氧化氢和超氧阴离子较非转基因植株低。

4 结 论

本研究分离、克隆了 *PpCuZnSOD* 基因,并转化大豆使其过表达。转 *PpCuZnSOD* 基因植株较非转基因植株更耐盐,种子萌发率、生长参数、叶绿素含量、抗氧化酶活性和渗透调节物质积累增加。在盐胁迫下,转基因植株表现出较少的 MDA 含量、H₂O₂ 和 ROS。上述生理变化可能导致转基因大豆能够维持正常的渗透调节或细胞氧化还原状态的平衡,从而增强大豆对盐胁迫的耐受性。

参考文献

[1] Chen X, Chen Z, Zhao H, et al. Genome-wide analysis of soybean HD-Zip gene family and expression profiling under salinity and drought treatments[J]. *PloS One*, 2014, 9(2): e87156.

[2] Jaspers P, Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling[J]. *Physiology Plant*, 2010, 138(4): 405-413.

[3] Sharma P, Jha A B, Dubey R S, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions[J]. *Journal of Botany*, 2012, 12(24): 1-26.

[4] Negi N P, Shrivastava D C, Sharma V, et al. Overexpression of CuZnSOD from *Arachis hypogaea* alleviates salinity and drought stress in tobacco [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34 (7): 1109-1126.

[5] Yan H, Li Q, Park S C, et al. Overexpression of CuZnSOD and APX enhance salt stress tolerance in sweet potato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109(1): 20-27.

[6] Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, et al. Glutathione in plants: An integrated overview[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35 (2): 454-484.

[7] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909-930.

[8] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. *Trends Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.

[9] Hwang C S, Rhie G, Oh J H, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence[J]. *Microbiology*, 2002, 148(11): 3705-3713.

[10] Hernandez J A, Almansa M S. Short term effects of salt stress on antioxidant system and leaf water relations of pea leaves[J]. *Physiology Plant*, 2002, 115(2): 251-257.

[11] Xu J, Duan X, Yang J, et al. Coupled expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2013, 8(6): 24-25.

[12] Tarchoune I, Sgherri C, Izzo R, et al. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48 (1): 772-777.

[13] Dionisio-Sese M L, Tobita S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress[J]. *Plant Science*, 1998, 135(1): 1-9.

[14] Guan Q, Liao X, He M, et al. Tolerance analysis of chloroplast OsCu/Zn-SOD overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress [J]. *PloS One*, 2017, 12(10): e0186052.

[15] Zhou Y, Hu L, Wu H, et al. Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of cucumber superoxide dismutase (SOD) family in response to various abiotic stresses[J]. *International Journal of Genomics*, 2017, 2017: 1-14.

[16] Shiriga K, Sharma R, Kumar K, et al. Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in Maize[J]. *International Journal of Innovative Research in Science*, 2014, 3 (4): 11333-11337.

[17] Westgate M E, Peterson C M. Flower and pod development in water-deficient soybeans (*Glycinemax* L Merr) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44(258): 109-117.

[18] Murraym G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.

[19] Li D H, Liu H, Yang Y L, et al. Down-regulated expression of *RACK1* gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice[J]. *Rice Science*, 2009, 16(1): 14-20.

[20] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 211-213, 217. (Gao J F. Experimental instruction of plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 211-213, 217.)

[21] Lee Y P, Ahmad R, Lee H S, et al. Improved tolerance of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase expressing transgenic tobacco seeds and seedlings against multiple abiotic stresses [J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2013, 15 (4): 725-730.

[22] Shafi A, Chauhan R, Gill T, et al. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(6): 615-631.

[23] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1331-1341.

[24] Leclercq J, Martin F, Sanier C, et al. Overexpression of a cytosolic isoform of the HbCuZnSOD gene in *Hevea brasiliensis* changes its response to a water deficit[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80 (3): 255-272.

[25] Sharma P, Jha A B, Dubey R S, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions[J]. *Journal of Botany*, 2012, 12(1): 1-26.