

拟南芥 *AVP2* 基因转化烟草中吸钾 相关基因的转录分析

郭兆奎¹, 杨 谦¹, 颜培强², 万秀清²

(1 哈尔滨工业大学 生命科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 黑龙江省烟草科学研究所, 黑龙江 牡丹江 157011)

【摘 要】 【目的】了解无机焦磷酸酶对植物钾吸收和相关基因表达的作用。【方法】反转录克隆拟南芥无机焦磷酸酶基因(H^+ -PPase)*AVP2*, 构建植物表达载体, 采用根癌农杆菌介导法将其导入烟草品种 K326, 经分子鉴定, 提取转化烟苗幼根 RNA, 反转录后, 应用荧光定量 PCR 分析外源基因 *AVP2* 和烟草钾通道基因 *NKT1*、钾离子转运体基因 *NtHAK1*、细胞质膜 H^+ -ATPase 基因 *NHA1*、液泡膜 H^+ -ATPase 基因 *VAG1* 和液泡膜 H^+ -PPase 基因 *NVP1* 的 mRNA 转录水平, 并测定转化烟草叶片的内在化学成分。【结果】获得了 GUS 染色和 *AVP2* 序列 PCR 扩增呈阳性的卡那霉素抗性转化烟草 11 株。经 Southern 杂交鉴定, 证实 *AVP2* 基因已成功导入烟草, 在转化烟草幼根中可以检测到外源基因 *AVP2* 的 mRNA, 证实该基因已整合到烟草基因组并成功表达; 与未转化烟草相比, 烟草钾离子转运体基因 *NtHAK1* 的转录水平显著增加, 钾通道基因 *NKT1* 的转录稍有增加, 而烟草液泡膜 H^+ -ATPase 基因 *VAG1* 和液泡膜 H^+ -PPase 基因 *NVP1* 的转录有所降低, 烟草细胞质膜 H^+ -ATPase 基因 *NHA1* 无显著变化; 转化烟草材料烟叶 K^+ 含量较对照显著增加, 而烟碱、还原糖等其他内在化学成分无显著变化。【结论】无机焦磷酸酶基因参与植物的 K^+ 吸收。

【关键词】 拟南芥 *AVP2*; 转基因烟草; 吸 K^+ 基因; 转录

【中图分类号】 Q78

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)09-0058-07

Transcript analysis of K^+ uptake relative genes in *AVP2* transgenic tobacco

GUO Zhao-kui¹, YANG Qian¹, YAN Pei-qiang², WAN Xiu-qing²

(1 Life Sciences & Engineering Dept, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China;

2 Heilongjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

Abstract: 【Objective】 Nutrition uptake has close relations with energy supply in plant cell. The study investigated the effects of H^+ -pyrophosphatase on the expression of plant potassium uptake related genes. 【Method】 The vacuolar H^+ -pyrophosphatase (V - H^+ -PPase) gene *AVP2* which was amplified from *Arabidopsis thaliana* by RT-PCR was inserted into the plant binary expression vector containing intron kanamycin gene and SAR sequence from tobacco and introduced into tobacco variety K326 by Agro-bacterium mediated transformation. Total RNA was isolated from the roots of *AVP2* transformants and normal tobacco without genetic modification. The transcript of six genes including tobacco K^+ transporter gene *NtHAK1*, K^+ channel gene *NKT1*, plasma H^+ -ATPase gene *NHA1*, vacuole H^+ -ATPase gene *VAG1*, vacuole H^+ -PPase gene *NVP1* were analyzed using real-time PCR. 【Result】 Eleven *AVP2* transgenic tobacco plants

* [收稿日期] 2007-09-26
[基金项目] 国家烟草专卖局科技攻关项目(110200101008)
[作者简介] 郭兆奎(1964—), 男, 黑龙江鸡东县人, 研究员, 博士, 主要从事烟草分子生物学研究。
E-mail: guozhaokui@yahoo.com.cn

were obtained and approved GUS dye and AVP2 sequence PCR test. The mRNA of AVP2 were detected in the trans-formant plant roots which confirmed that AVP2 have been transcript and expressed effectively in the modified tobacco. The results showed that the transcript of K^+ transporter gene *NtHAK1* and potassium channel *NKT1* were significantly stimulated, and that of vacuolar $V-H^+-ATPase$ G unit gene *VAG1* and $V-H^+-PPase$ genes *NVP1* were down-regulation. There was no significant alteration can be found in the transcript of plasma proton pumping ($P-H^+-ATPase$) gene *NHA1*. It was found that the potassium contents increased significantly and there were no changes in nicotine, sugar and other chemical contents in the leaves of AVP2 transgenic tobacco T1 generation. 【Conclusion】 The results indicate that AVP2 which encoded the vacuolar H^+ -pyrophosphatase have effects on the potassium uptake in plant.

Key words: AVP2; transgenic tobacco; K^+ uptake; transcript

钾是植物生长必需的大量元素, K^+ 对细胞内多种酶的活性、渗透势和电势平衡等起着重要作用。由于钾矿是不可再生资源, 在保证作物正常生长发育前提下, 通过增强根系吸钾能力来降低钾肥的施用量, 对于环境保护和农业的可持续发展具有重要意义。根系从土壤中吸收 K^+ 是由多个基因家族控制的, 现已分离鉴定了 K^+ 通道、*HKT*、*KUP/HAK/KT* 和 $Na(K)-H^+$ 反向转运体基因。Sze 等^[1] 研究发现, 植物离子吸收、运输与细胞质膜和液泡膜质子泵 $H^+-ATPase$ 和 $H^+-PPase$ 的能量供应有关。 Na^+/H^+ 反向转运体、 Ca^{2+}/H^+ 反向转运体是由液泡膜上的 $V-ATPase$ 和 $V-PPase$ 产生的跨膜质子电化学梯度驱动进行离子运输。Briskin 等^[2] 报道, 细胞质膜 $P-H^+-ATPase$ 与 H^+/K^+ 交换有关, 主要参与植物细胞的钾离子吸收。Ramirez 等^[3] 研究发现, 酵母细胞质膜 $H^+-ATPase$ 基因缺陷型 K^+ 通道的开关特性与细胞内的 ATP 密切相关。Briskin 等^[4] 证实, 细胞钾通道和 K^+ 转运体对 K^+ 的吸收与细胞质膜 $H^+-ATPase$ 的能量供应有直接关系, 细胞质膜 $H^+-ATPase$ 通过 H^+ 梯度变化运送 Ca^{2+} 来激发 K 通道。Apse 等^[5] 发现, 过量表达 *AtNHX1* 的拟南芥转化材料耐盐性显著提高, 其耐盐性与 *AtNHX1* 基因的转录、液泡 H^+ 离子泵活性直接相关。Reinhold 等^[6] 报道, $H^+-ATPase$ 活性的变化可以引起细胞内糖分和离子浓度的改变。Maeshima^[7] 发现, 拟南芥 H^+ 转运无机焦磷酸酶($H^+-PPase$)是单亚基蛋白, 位于植物细胞液泡膜上, 形成跨膜的电化学梯度, 促进 H^+ 从胞质向液泡的转运^[8] 及 K^+ 在液泡中的积累^[9]。盐分处理 *Daucus carota*^[10] 和 *Acer pseudoplatanus*^[11] 可以提高液泡中 $V-H^+-PPase$ 活性, 表明 $V-H^+-PPase$ 与细胞中的离子代谢有关, $H^+-PPase$ 基因仅存在高等植物 (*Nicotiana tabacum*^[12] 和 *Hordeum vulgare*^[13]

等)和藻类的液泡膜上。Yolanda 等^[14] 将无机焦磷酸酶分为对 K^+ 敏感的 AVP1 型和对 K^+ 不敏感的 AVP2 型; Gaxiola 等^[15] 在拟南芥上过量表达 AVP1 发现, 液泡膜跨膜电化学势增强, 液泡中无机离子 Na^+ 和 K^+ 浓度增加, 对盐分的耐性提高, 但对于无机焦磷酸酶转化材料中钾吸收相关基因的转录与表达的影响还未见研究报道。本研究报道了拟南芥 AVP2 基因的克隆、植物双元载体构建及在转化烟草幼根中各基因的转录水平分析, 以了解无机焦磷酸酶对植物钾吸收和相关基因表达的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟南芥哥伦比亚种 (*Arabidopsis thaliana* v. Columbia), 由上海农科院生物技术中心惠赠; 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种 K326, 由黑龙江省烟草科学研究所育种室提供; 引物由上海生物工程公司商业化合成, 纯度 PAGE 级; 其他主要化学试剂为 Sigma 或国产 AR 级试剂。

1.2 拟南芥 AVP2 基因的克隆

用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 提取拟南芥哥伦比亚种幼根总 RNA, 经 DNA 酶 I (Promega) 处理去除烟草基因组 DNA, ImProm-IITM 逆转录试剂盒 (Promega) 反转录合成 cDNA 第一链。再应用拟南芥 AVP2 (AF182813) 阅读框引物 R2989 (5'-AAA GGA TCC AAC AAT GGA TGA AGA TGT TGA GCA GGC CAG TTT G-3', 具 *Sac* I 酶切位点) 和 R2990 (5'-AAA GAG CTC AGA GGA AAA CCG GAG CCA TG-3', 具 *Bam*H I 酶切位点), Ex-Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 对反转录产物进行 PCR 扩增, 将扩增产物切胶回收, 与 pMD18-T (TaKaRa (大连)) 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取阳性菌落质粒进行酶切验证, 经酶

切鉴定正确的克隆进行核苷酸全序列测定。

1.3 AVP2 基因植物表达载体的构建

AVP2 基因植物表达载体是在 pYH455 载体(上海农科院惠赠)的基础上构建而成,通过 *Bam*H I 和 *Sac* I (TaKaRa)双酶切,将 AVP2 基因从克隆载体 pMD18-T(TaKaRa(大连))上切下,利用 T4 连接酶(TaKaRa)插入具有相同酶切位点的 pYH455 载体中,构建 AVP2 基因的植物二元载体 pYF7716,冻融法转化 LBA4404(Clontech)制备工程菌株,并进行菌落 PCR 验证。

1.4 烟草转化

采用叶盘法进行烟草转化。将无菌苗叶片剪成约 5 mm×5 mm 的小块,放入 50 mL OD 值 0.3~0.5 的农杆菌液中感染 5~8 min 后取出,灭菌滤纸吸干,置于 9 cm 培养皿的两层滤纸中间,滴共培养液 MSc(MS_0 +NAA 0.2 mg/L+6-BA 1 mg/L)保湿,22 ℃黑暗条件下共培养 3 d 后,转接到第 1 次筛选培养基 MS_1 (MS_0 +6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+Kanamycin(Km) 50 mg/L+Carbenicillin(Cb) 250 mg/L)上光照培养 20 d,再转到第 2 次筛选培养基 MS_2 (MS_0 +6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+Km 100 mg/L+Cb 250 mg/L)上光照培养 30 d;取少许第 2 次筛选培养后的抗性芽叶片,采用 Jefferson 等^[16]的方法进行 GUS 染色鉴定;切下 GUS 染色阳性芽插入生根培养基 MSr(MS_0 +Km 25 mg/L+Cb 25 mg/L)光照培养 30 d,生根形成转化苗。自然光温下练苗 3~5 d 后移栽到育苗钵中,单株提取烟苗叶片 DNA,应用 AVP2 基因检测引物 AVP2-Z(5'-GTG ATT GGT ATC GCC ATC CTC TAT TCT AC-3')和 AVP2-F(5'-AGG CTC GTG CTT ATA GTC TGT ATA ATA TTT GG-3')进行 PCR 扩增,扩增条件:94 ℃预变性 6 min;94 ℃变性 30 s,62 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,循环 35 次;最后 72 ℃延伸 10 min。剔除检测结果阴性烟苗,阳性烟苗移入温室正常管理。

1.5 Southern 杂交鉴定

用 CTAB 方法提取转基因烟草的基因组 DNA,然后用 *Pst* I 酶切消化,并进行琼脂糖电泳、转膜和杂交,分子探针为³²P 标记的 AVP2 基因,具体操作参考 Sambrook 等^[17]的方法。

1.6 荧光定量 PCR 检测

根据烟草钾离子转运体基因 *NtHAK1*(DQ841950)、钾通道基因 *NKT1*(AB196790)、细胞质膜 H^+ -ATPase 基因 *NHA1*(AAR32129)、液泡

膜 H^+ -ATPase 基因 *VAG1*(AJ005899)、液泡膜 H^+ -PPase 基因 *NVP1*(X83730)和烟草 β actin 基因(AB158612)序列设计阅读框引物,对 AVP2 转化烟苗幼根 mRNA 提取物的 ImProm-IITM 逆转录产物进行 PCR 扩增(方法同 AVP2 基因克隆),扩增产物纯化后,通过紫外分光光度计吸光值 OD₂₆₀ 和 DNA 序列中 4 种核苷酸含量,制备各 DNA 片段拷贝数分别是 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 和 10^6 的倍比稀释液,作为荧光定量 PCR 反应的参比标准模板。利用 MJ Opticon 2 荧光定量 PCR 仪,分别以 AVP2S-F(5'-TCT CGA TGG ACC GGA TAG TT-3'), AVP2S-R(5'-GGC CTA CTC TGC TTA TCA CA-3'); NtHAK1S-F(5'-CCT TAT TGT GCC GTC ATG CC-3'), NtHAK1S-R(5'-CTG AGA TTG CAG GAG TAA GG-3'); NKT1S-F(5'-CAA TCT TGG CCT CAC TGC TT-3'), NKT1S-R(5'-TAC CTC ATC TGG CGA TTC GT-3'); NHA1S-F(5'-GCA AGA GCA GGC ATC CAA GA-3'), NHA1S-R(5'-CCA CAG CCA AGG AAC GAA GA-3'); VAG1S-F(5'-GGC ACG TAA CCA CAG TGA AG-3'), VAG1S-R(5'-AGA AGC AGC CAT GCC TAG TC-3'); TVP1-F(5'-GCT GGA GGA ATA GCT GAG AT-3'), TVP1-R(5'-GTC ATG GCA GAG AAC CAG TA-3'); Act-F(5'-GAT CTT GCT GGT CGT GAT CT-3'), Act-R(5'-ACT TCC GGA CAT CTG AAC CT-3')为引物,应用 SYBR Green I(Sigma)荧光染料,同时对 AVP2 基因烟草转化材料及未转化对照幼根的总 RNA 反转录产物 10 倍稀释液和参比标准模板进行实时定量 PCR 扩增,并以参比 DNA 模板绘制 Ct 值与靶序列拷贝数的标准曲线,以烟草内源 β actin 基因作为看家基因,通过目标基因 mRNA 拷贝数与看家基因拷贝数的比值,标定幼根 RNA 提取物中各目标基因的转录水平,消除 PCR 反应体系中由于所加模板量的差异而引起的误差,试验结果以 3 次重复的“平均值±SE”表示。

1.7 转化植株矿质营养和内在成分的测定

将各转化材料的 T2 代种子育苗,移栽前单株取样提取 DNA 进行 AVP2 基因 PCR 检测,检测结果呈阳性的烟苗移栽至隔离圃(宁安市范家乡黑龙江省烟草科学研究所试验场),每个转化材料种植 30 株,以同品种未转化烟草为对照,烟叶成熟后取第 7~12 片叶烘烤,选烟叶等级为 CLX3 样品,应用烟叶流动分析仪测定烟叶中 K^+ 、还原糖、总糖、烟

碱、蛋白质等内在化学成分。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 AVP2 基因的克隆

经拟南芥幼根总 RNA 提取、纯化、反转录和 AVP2 阅读框引物 PCR 扩增,获得 2 400 bp 左右扩增产物,将该扩增产物切胶回收,与 T-载体 (pMD18-T)连接,进行大肠杆菌转化子的酶切鉴定,并对酶切鉴定正确的 5 个克隆进行插入片段的核苷酸全序列测定,获得测序鉴定正确的克隆 YF6885,其中的插入序列全长 2 403 bp,和 Gen-Bank 上公布的拟南芥 AVP2 基因的核苷酸序列基本一致,仅有 2 个核苷酸的差别,不造成编码氨基酸的改变。

2.2 AVP2 基因植物表达载体的构建

2.2.1 AVP2 基因表达载体的构建 利用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,将测序鉴定正确的 AVP2 基因全长克隆 YF6885 替换 pYH455 质粒上的 *Rdre1BI* 基因,构成 AVP2 基因的植物二元载体 pYF7716,该植物二元载体是 pCambia1201 二元载体的衍生质粒^[18]。由烟草的 *Ubi. U4* 基因启动子控制内含子 *GUS* 基因的表达; AVP2 基因由带 Ω 翻译增强子的双 *CaMV* 35S 启动子和 *nos* 终止子控制,并在 *NHX1* 基因的一侧插入了烟草染色质附着序列 *MAR*,以增强转入基因的稳定性,选择基因是带 *Catalase* 基因内含子的 *Km* 抗性基因,由于基

因内部带有内含子,不能在根癌农杆菌中表达,但可以在转基因植物中正确转录,并翻译出有功能的产物,因此在筛选培养过程中加入 *Km* 即可达到杀菌及筛选转基因植物的双重目的,降低了头孢及羧苄等杀菌抗生素的使用浓度;头孢及羧苄等杀菌抗生素具有类似植物激素的活性,会干扰植物外植体的正常生长和分化,内含子 *Km* 抗性基因的使用可减轻杀菌抗生素对外植体生长和分化的不利影响,明显提高植物的转基因效率;同时,由于内含子 *Km* 抗性基因飘逸至微生物中不能表达出功能产物,所以带有内含子 *Km* 的抗性基因可提高转基因植物的环境安全性。

2.2.2 AVP2 基因表达载体的验证 用构建的 AVP2 基因表达载体 pYF7716 转染大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,选择白斑菌株提取质粒,经 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶,切获得了酶切片段长度约为 2.4 kb 的 DNA 片段,与设计的 AVP2 基因目标片段长度相符(图 1),证实载体构建正确,再将鉴定正确的表达载体质粒转化根癌农杆菌 LBA4404,制备 AVP2 工程菌株 YH5121,并应用 AVP2-Z 和 AVP2-F 引物进行菌落 PCR 验证,结果见图 2。由图 2 可以看出,泳道 3、5 和 6 的根癌农杆菌菌株的菌落 PCR 均可以扩增出片段长度为 2.4 kb 的特异性产物,证实表达载体 pYF7716 已成功转化根癌农杆菌制成工程菌株。

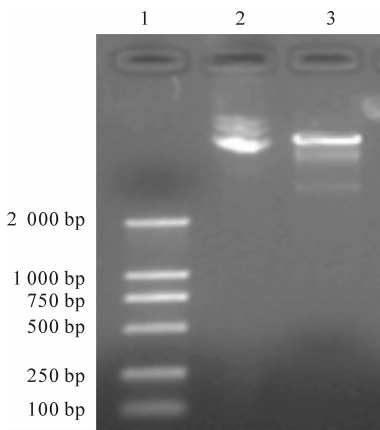


图 1 表达载体 pYF7716 的酶切验证

1. DNA 分子量标记 DL2000;2. pYF7716 质粒;
3. *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pYF7716 质粒

Fig. 1 Restriction analysis of pYF7716

1. DNA Marker DL2000;2. pYF7716 vector;3. *Sac* I 和 *Bam*H I digested pYF7716 vector

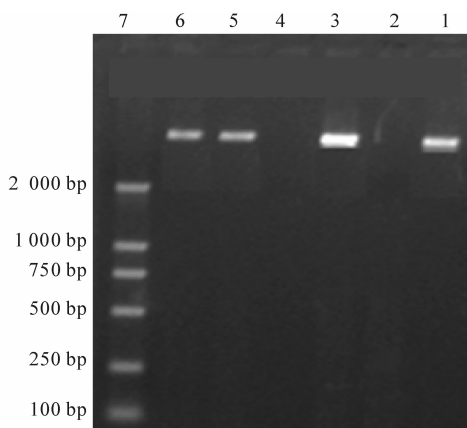


图 2 工程菌株 YH5121 的菌落 PCR 验证

1. 含有 pYF7716 质粒的 DH5 α ;2~6. 转化 LBA4404 菌株;
7. DNA 分子量标记 DL2000

Fig. 2 Colony PCR analysis of YH5121 的菌落 PCR 分析

1. DH5 α containing pYF7716 vector;2~6. Transformed LBA4404;7. DNA Marker DL2000

2.3 AVP2 转化烟草的鉴定

2.3.1 PCR 鉴定 通过根癌农杆菌介导的 AVP2 基因遗传转化,共获得 Km 抗性转基因烟草 71 株,其中 GUS 染色阳性转基因烟草 11 株,以抽提的 GUS 染色阳性的转基因烟草植株总 DNA 为模板,以 AVP2-Z 和 AVP2-F 为引物,通过 PCR 扩增检测转基因植株中的 AVP2 基因。PCR 扩增结果显示,7 株 GUS 染色阳性的烟草植株的总 DNA 中都可扩

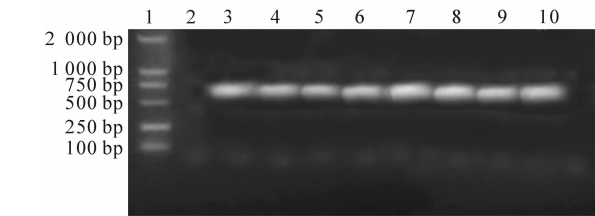


图 3 转 AVP2 基因烟草植株的 PCR 扩增结果
1. DNA 分子量标记 DL2000;2. 非转基因烟草;
3. 含 AVP2 的阳性对照;4~10. 转化烟草植株
Fig. 3 PCR analysis of AVP2 transformed tobacco plants
1. DNA Marker DL2000;2. Nontransformed tobacco plants;
3. Positive control(AVP2 gene);4-10. Transgenic tobacco plants

2.4 转化材料中 AVP2 基因的转录水平

随机从 PCR 扩增和 GUS 染色阳性的不同转化材料中取 6 个转化单株,将其烟苗幼根总 RNA 的反转录产物与拷贝数为 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 和 10^6 标准参比 DNA 和未转化 DNA 提取物同时进行荧光定量 PCR 扩增,扩增曲线如图 5 所示。

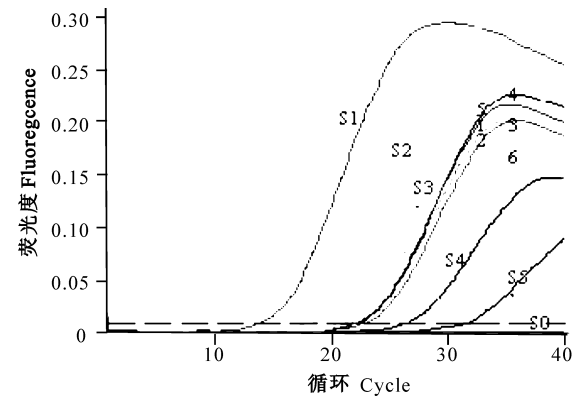


图 5 转化烟草植株幼根中 AVP2 转录水平的荧光定量 PCR 扩增曲线
S0~S5. DNA 模板标准参比;1~6. 转化烟草幼根 cDNA
Fig. 5 Testing curves of AVP2 transcript in the transgenic roots by real-time PCR
S0—S5. Standard conference DNA template;1-6. cDNA
1 from 6 samples of transgenic tobacco roots
根据标准参比 DNA S1、S2、S3、S4、S5 和 S0 所

增出 700 bp 左右的 AVP2 基因片段(图 3)。
2.3.2 Southern 杂交鉴定 提取 GUS 染色和 AVP2 基因 PCR 扩增均呈阳性的各抗性烟苗基因组 DNA,经 *Pst*I 酶切,以 32 P 标记的 AVP2 基因(*Bam*H I 和 *Sac* I 的酶切片段)为探针进行 Southern 杂交,结果如图 4。由图 4 可见,GUS 染色阳性的转基因烟草植株都有杂交带出现,证实 AVP2 基因已成功导入烟草。

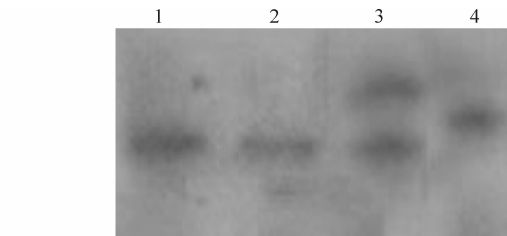


图 4 转 AVP2 基因烟草植株的 Southern 杂交鉴定结果
1~4. AVP2 基因烟草转化株
Fig. 4 Southern blot of AVP2 transformed tobacco plants
1-4. AVP2 trans-formants

建立的 Ct 值与 DNA 拷贝数对数值的直线回归方程为 $Y = -0.25X + 8.85$,相关系数 $r^2 = 0.995$,同时建立看家基因 $\beta actin$ 拷贝数与反应 Ct 值的标准曲线和回归方程,由此计算出目标基因 AVP2 和看家基因 $\beta actin$ 的拷贝数,为消除由于模板量造成的误差,利用各转化烟草材料幼根中 AVP2 与看家基因的比值来估测 AVP2 基因的相对转录量,结果见图 6。由图 6 可以看出,导入的 AVP2 基因在 6 个转化烟草材料的 T1 代幼根中,均有 mRNA 转录,证实 AVP2 基因已转入烟草基因组中,并成功转录为 mRNA,但不同转化材料的转化水平有所不同。

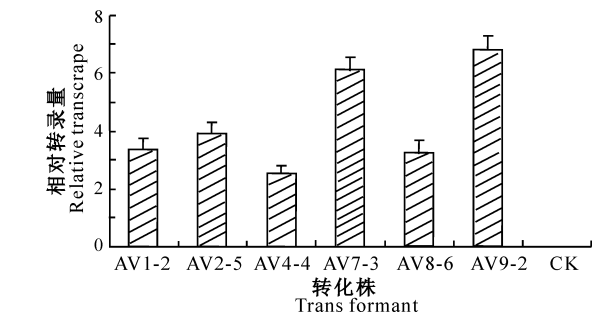


图 6 各转化烟草材料中 AVP2 转录 mRNA 的分析
AVm-n. AVP2 转化烟草的 T1 株系 AVP2;CK. 未转化烟草
Fig. 6 mRNA analysis of AVP2 in transgenic roots
AVm-n. Tobacco transformant T1 generation;CK.
Wild type tobacco

2.5 转化烟草 K⁺ 吸收相关基因的转录分析

分别提取转化株 AV9-2 和未转化材料幼根总 RNA,反转录后分别应用烟草钾通道基因 *NKT1*、钾离子转运体基因 *NtHAK1*、细胞质膜 H⁺-AT-Pase 基因 *NHA1*、液泡膜 H⁺-ATPase 基因 *VAG1* 和液泡膜 H⁺-PPase 基因 *NVP1* 的实时 PCR 引物,进行荧光定量分析,结果见图 7。由图 7 可以看出,

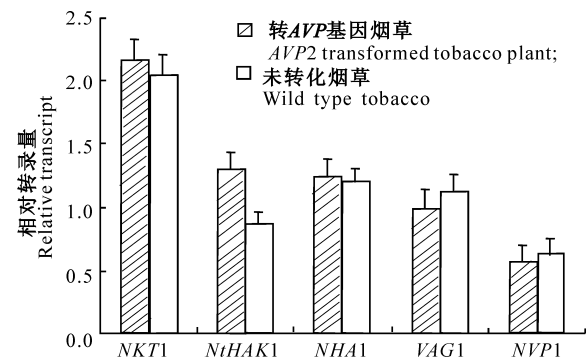


图 7 转 AVP2 基因烟草 K⁺ 吸收相关基因的转录
Fig. 7 AVP2 transcription of genes relative to K⁺ uptake

2.6 转化烟叶的含钾量分析

经 AVP2 基因 PCR 鉴定结果为阳性的 T2 代转化烟苗,移栽到中间试验隔离圃,正常管理,并用标签标注采收中部叶片,烘烤后测定烟叶内在化学成分,对转化烟草材料烟叶的内在化学成分的分析发现,与对照相比,除烟叶含钾量外,其他内在化学成分均无显著变化,各转化材料烟叶含钾量化验结果见图 8。由图 8 可以看出,与同品种未转化对照相比,AVP2 基因转化烟草 T2 代材料烟叶含钾量显著增加,不同转化材料中烟叶含钾量有较大差异,其中 3 个转化材料 V2-5-4、V7-3-5 和 V9-2-6 烟叶含钾量超过 2.0%,较对照增加了 30%以上。

3 结论与讨论

植物中的钾主要存在于细胞质和液泡,液泡中 K⁺ 浓度的变化与植物组织 K⁺ 含量变化相一致,而细胞质中 K⁺ 保持恒定,细胞质中 K⁺ 浓度仅在液泡内 K⁺ 浓度低到一定程度时才表现降低^[19]。细胞质中的 K⁺/Na⁺ 对于细胞的生理功能非常重要,当植物处于必需营养元素缺乏或盐胁迫环境时,为维持正常的生理代谢,细胞将通过相关基因转录和翻译

与未转化烟草对照相比,转拟南芥 AVP2 基因烟草幼根中,烟草液泡膜 H⁺-ATPase 基因 *VAG1* 和液泡膜 H⁺-PPase 基因 *NVP1* 的转录水平有所降低,烟草钾离子转运体基因 *NtHAK1* 显著增加,而烟草钾通道基因 *NKT1* 稍有增加,细胞质膜 H⁺-AT-Pase 基因 *NHA1* 无显著变化。

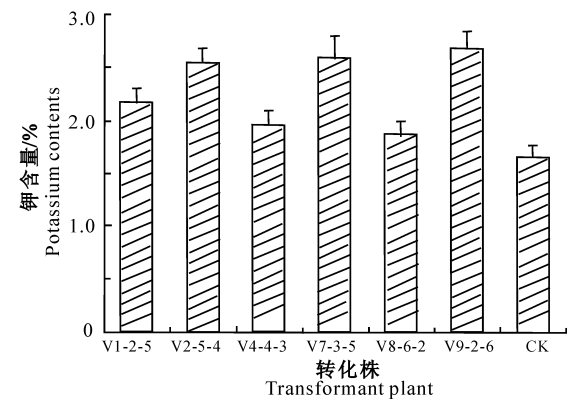


图 8 AVP2 基因转化材料烟叶的含钾量
Vm-n-o. AVP2 转化烟草的 T2 代株系;CK. 未转化烟草
Fig. 8 The potassium contents of AVP2 transformed tobacco leaf
Vm-n-o. AVP2 tobacco transformants T2 generation;
CK. Wild type tobacco

来调控多种跨膜运输、渗透势和电化学机制^[20]。通过质膜和液泡膜对 K⁺/Na⁺ 离子的选择性运输,使细胞质中各种离子浓度稳定在一定范围内,与动物细胞不同,植物细胞不具有 Na⁺/K⁺-ATPase,只能依靠 H⁺-ATPase 和 H⁺-PPase 形成的跨膜电化学势,来驱动 K⁺ 和其他离子的吸收与代谢^[21];经盐胁迫处理的烟草培养细胞 H⁺-ATPase 转录增加^[22],H⁺-ATPase 水解 ATP 或 PPi 把质子泵出质膜外或液泡膜内,使跨膜的质子电化学势发生改变,进而影响 K⁺ 离子的次级运输途径,如钾通道或 H⁺/K⁺ 协同转运体,各种离子的转运机制(离子转运、通道蛋白、反向转运体等)发生相应变化,维持细胞内的离子平衡。本研究通过提取拟南芥总 RNA,RT-PCR 反转录克隆拟南芥 AVP2 基因,并完成全序列测定,经根癌农杆菌介导法,将从拟南芥中克隆的 AVP2 基因导入烟草品种 K326 中,得到了 AVP2 基因的转化烟草。以同品种未转化烟草为对照,应用荧光定量 PCR 分析了 AVP2 转化烟草幼根中各 K⁺ 吸收相关基因的转录水平。结果证实,与未转化对照相比,在 AVP2 转化烟草幼根中,通过带有增强子的 35S 启动子引导拟南芥液泡膜 H⁺-PPase 基

因 *AVP2* 的过量表达,增加了 H^+ -PPase 的能量供应,改变了液泡膜跨膜质子电化学势,这可能是烟草细胞中钾离子转运体基因 *NtHAK1* 和钾通道基因 *NKT1* 转录增加的原因。由此可以推测,钾离子转运体基因及钾通道基因的转录和表达,与液泡膜上 H^+ -PPase 的能量供应有关,同时发现,转 *AVP2* 基因烟草幼根中,烟草液泡膜 H^+ -ATPase 基因 *VAG1* 和液泡膜 H^+ -PPase 基因 *NVP1* 的转录水平较正常烟草有所降低,细胞质膜 H^+ -ATPase 基因 *NHA1* 无显著变化。

【参考文献】

- [1] Sze H, Ward J, Lai S. Vacuolar H^+ -translocating ATPase from plants: structure, function, and isoforms [J]. J Bioenerg Biomemb, 1992, 24: 371-381.
- [2] Briskin D P, Hanson J B. How does the plant plasma membrane H^+ -ATPase pump protons [J]. J Exp Bot, 1992, 43: 269-289.
- [3] Ramirez J A, Vacata V, McCusker J H, et al. ATP-sensitive K^+ channels in the plasma membrane H^+ -ATPase mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 20: 7866-7870.
- [4] Briskin D P, Gawienowski M C. Role of the plasm membrane H^+ -ATPase in K^+ transport [J]. Plant Physiol, 1996, 111: 1199-1207.
- [5] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis* [J]. Science, 1999, 285: 1256-1258.
- [6] Reinhold L, Kaplan A. Membrane transport of sugars and amino acids [J]. Annu Rev Plant Physiol, 1984, 36: 45-83.
- [7] Maeshima M. Vacuolar H^+ -pyrophosphatase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465: 37-51.
- [8] Drozdowicz Y M, Rea P A. Vacuolar H^+ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6: 206-211.
- [9] Davies J M, Poole R J, Rea P A, et al. Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase [J]. PNAS, 1992, 89: 11701.
- [10] Colombo R, Cerana R. Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota* [J]. Journal of Plant Physiology, 1993, 142: 226-229.
- [11] Zingarelli L, Anzani P, Lado P. Enhanced K^+ -stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudo-platanus* [J]. Physiologia Plantarum, 1994, 91: 510-516.
- [12] Lerchl J, König S, Zrenner R, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29: 833-840.
- [13] Fukuda A, Chiba K, Maeda M, et al. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H^+ -pyrophosphatase, H^+ -ATPase subunit A, and Na^+/H^+ antiporter from barley [J]. J Exp Bot, 2004, 55: 585-594.
- [14] Yolanda M D, Jessica C K, Philip A R. *AVP2*, a sequence-divergent, K^+ -insensitive H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2000, 123: 353-362.
- [15] Gaxiola R A, Rao R I, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *Avp1* can function in cation detoxification in yeast [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1999, 96: 1480-1485.
- [16] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [17] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Third edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [18] Peng R H, Huang X M, Li X, et al. Construction of a plant binary expression vector containing intron kanamycin gene and transformation in *Nicotiana tabacum* [J]. Acta Phytophysiological Sinica, 2001, 27(1): 55-60.
- [19] David R, Colette T R, Wojciech S, et al. Cloning of the V-ATPase subunit G in plant: functional expression and sub-cellular localization [J]. FEBS Lett, 1998, 437(3): 287-292.
- [20] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6: 441-445.
- [21] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 463-499.
- [22] Reuveni M, Bressan R A, Hasegawa P M. Modification of proton transport kinetics of the plasma membrane H^+ -ATPase after adaptation of tobacco cells to NaCl [J]. J Plant Physiol, 1993, 142: 312-318.