

符东顺,何冠谛,付天岭,等. 植物重金属抗性基因挖掘和作用机制研究进展[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):18-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.005

植物重金属抗性基因挖掘和作用机制研究进展

符东顺¹, 何冠谛¹, 付天岭², 何腾兵^{2,3}

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州大学新农村发展研究院, 贵州贵阳 550025; 3. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025)

摘要:长期生长在重金属环境中的植物为了更好地适应土壤中重金属的胁迫,进化出一套调控机制来响应重金属的胁迫。主要从有关抗重金属品种发现、抗性基因的挖掘以及遗传机制等方面对近年来的研究展开评述。在抗性基因的挖掘中发现,植物间呈现出不同的抗重金属能力,该能力由基因转录的蛋白控制,这些抗性基因的利用在抗性品种的选育和污染土地的修复等方面具有重要价值。此外,对抗性基因的挖掘手段进行一定的展望。

关键词:植物;重金属;抗性基因;基因定位;作用机制

中图分类号:X53;X173 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)10-0018-05

重金属污染是当今世界关注的焦点问题之一^[1],主要表现在重金属对生物和环境的危害性上。一方面,重金属被排入环境后具有永久性,且可在生物体内慢慢累积^[2]。另一方面,大部分重金属并非生物体的必需元素,当重金属元素含量达到某一生物的耐受水平时,过量重金属可以对生物体的结构成分造成破坏,进而威胁生物生存。随着人们对重金属危害这一问题的进一步关注,重金属污染土壤修复技术应运而生。传统的重金属修复手段本身有较大缺陷,如客土、覆土、钝化剂等措施花费巨大但收效甚微,同时可能还会引入新的污染物造成更严重的危害^[3]。生物修复技术因其材料广、价格低、吸附能力强、易于管理等优势成为当前的主流修复技术^[4]。目前生物修复技术以豆科植物根瘤菌协助植物抵御重金属胁迫作为新的研究趋势^[5]。虽然新修复手段能克服传统修复手段中的大部分弊端,但该研究尚处于初步阶段。在种源方面,自然生长状态下豆科植物的根瘤菌几乎无协助植物体抵御重金属吸收的能力或者效果很低,而基因技术获得的高抗性豆科植物在实际中的应用效果并不明确;根瘤菌与植物的共同体是否有活化周围环境中重金属的能力也尚未明确;除植物体吸收的重金属外,剩余的重金属是否对人体和环境造成危害等许多新问题还没得到很好解决。另外,以抗性植物(高累积和低吸收的生物)作为新的土地修复手段从 20 世纪 50 年代^[6-7]后开始受到广泛关注,随着分子水平研究的不断深入发现,植物体在重金属胁迫下不仅外在特征会发生改变,植物体内的抗性基因也可通过表达转录蛋白来响应重金属胁迫。这些植物体内所表现的作用机制及其模型逐渐被探讨并在品种选育以及食品安全和土地修复等领域被运用。总而言之,近些年抗重金属的生物研究主要从抗性基因

的筛选、耐抗基因/数量性状座位(quantitative trait locus,简称 QTL)的定位、基因分离及表达、耐受性的遗传模型分析等方面取得进展,因此本文主要从抗性材料的发现和基因获取、基因定位的方法和技术、抗性基因的作用机制等方面进行论述。

1 抗性材料与筛选方法

植物抗性(plant resistance)是指植物适应逆境的能力。抗性材料的获取在阐释整个生物抗性的研究中具有关键作用。研究发现,生物普遍具有不同程度的抗重金属胁迫能力,如微生物具有生命周期短、适应性强、突变频率高等特点,是抗重金属胁迫试验的首选材料;动物生命周期长,抗性性状不明显,基因突变低,却能稳定遗传,可用来进行特定的研究;植物只须观察胁迫环境下的生存状态就可以被辨认是否具有抗逆性,具有来源广,稳定遗传,且可通过有性和无性生殖来适应不同环境等特点,因此成为科学研究中最常见的试验材料^[8],当前用来研究耐重金属胁迫的植物主要有红景天^[9]、蜈蚣草^[10]、黑麦草^[11]等以及经济作物水稻^[12]、黑麦^[13]等。就植物耐重金属的能力而言,不同科属植物所表现的能力不同,一般来说,木本植物抗重金属胁迫的能力最好^[14]。Mench 等通过研究普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、黄花烟草(*N. rustica*)、玉米等 3 种植物对镉(Cd)胁迫的响应表明,由于生理代谢差异,不同植物对镉的耐受能力不同,其中烟草抗性比玉米强;同一物种由于个体单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,简称 SNP)的不同,其抗性也存在明显差异,普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.)抗镉能力比黄花烟草(*N. rustica*)强^[15]。Mench 等的研究也表明,这 2 种烟草耐镉胁迫强度与重金属活化能力呈正相关关系^[16],因此,可以在不同浓度梯度重金属胁迫下,通过观察不同植物和品种间的耐受情况来筛选抗性品种;也可以通过驯化来培养种源,增强其耐受上限;或者用物理、化学等手段(紫外突变,化学药剂等)诱导生物体基因突变,对突变的材料进行选择培养,从而获得目的材料。

2 抗性基因的挖掘手段

植物表达的抗性主要由基因调控,对抗性性状的深入研究就是对抗性物种基因的研究。在抗性基因的研究中,植物

收稿日期:2017-11-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1612442-6-2);贵州省发改委项目(编号:黔发改高技[2017]950号)。

作者简介:符东顺(1992—),男,海南万宁人,硕士研究生,主要从事环境污染与修复技术研究。E-mail:915699030@qq.com。

通信作者:何腾兵,教授,硕士生导师,主要从事土壤学、环境科学的教学与科研工作。Tel:(0851)88293209;E-mail:hetengbing@163.com。

遗传物质测序是必不可少的。有时为了获取更多的抗性基因信息,在对基因测序的同时还伴随着基因定位。

2.1 抗性基因定位

基因定位(mapping of genes)即利用分子标记和目的基因的关联性来确定目的基因在染色体上的位置和片段的长度。DNA 测定的主要内容是基因测序,并利用遗传分析进行基因定位。在 DNA 测序中,基因混合池和 cDNA 文库等手段的利用能大大提高数据的精确度并降低基因定位的工作量,因此被广泛应用。以集团分离分析法(bulked segregation analysis,简称 BSA)对基因测序为例^[17],该方法的思路是在构建基因混合池后,将基因混合池中的基因打断,构建 cDNA 文库,通过遗传分析进行基因定位,然后对候选基因进行再定位及测序。基因混合池是采用 1 对具有目标基因且表型差异的亲本所产生的任何一种分离群体进行构建的。在利用基因混合池检测 2 组之间的遗传信息差异时,与该性状无关的差异会被消除,这样所研究性状相应遗传信息的差异就被凸现出来了,从而排除其他性状的干扰。高等植物的 DNA 由外显子和内含子 2 部分构成,外显子具有编码蛋白质的功能,内含子目前被普遍认为可能与编码区的表达量相关,但本身不具备编码蛋白的能力。为降低基因测序费用,通常会采用 mRNA 反转录或者其他一些技术来构建不含内含子的 cDNA 文库,同源克隆是其中一种手段。同源克隆是在了解目的生物具有某一功能但其功能基因未知的情况下,寻找有该功能且亲缘关系很近的另一物种,且该物种的功能基因已定位,通过引物设计扩增出该功能基因片段内的 1 段保守编码基因,以该保守基因为模板通过 PCR 进行 cDNA 末端快速克隆(rapid - amplification of cDNA ends),以获取整个目的基因,从目的生物中扩增出同源序列(homologous sequences,简称 RGA)^[18-20]。虽然同源克隆技术的限制因素很多,但在抗病基因作用机制、物种间亲缘度以及环境在植物进化中的影响度等研究中具有很大的潜力。随着分子生物学的快速发展,借助生物信息学与数据库的联用,能在短时间内大规模识别、锁定同源物种中人们所需要的基因,并通过生物技术获取大量的抗逆性 RGA。将这些 RGA 和功能基因比对后,可预测出目的基因的序列、结构及其转录蛋白所参与的抗胁迫反应,保守区域基因频率的变化也可作为物种间亲缘关系远近的依据,同时也能判断不同环境胁迫对物种间的影响。

植物的抗性基因主要有水平抗性(数量性状)和垂直抗性(质量性状)等 2 种类型^[21]。前者的生物抗性性状由多个微效基因累积控制,而后者则由单个主效基因控制。所以在对基因进行定位时,可先进行遗传分析,判断抗性表现型是由主效基因控制还是多个微效基因控制,进而从 1 对具有目标基因且表型差异的亲本所产生后代基因型分离比例来推断抗性类型。另外,还须通过等位性测定来验证目的基因是否已被定位。完成基因测序的前期工作后,即可进行基因的粗定位,通过遗传图谱上的分子标记连锁目的基因,从而找到目的基因在染色体上的位置。分子标记之所以能连锁目的基因是因为基因和遗传标记都位于染色体的基因座位上,每个座位都以 1 个 DNA 片段的形式存在,两者属于同源物质。与其他基因片段相比,它是以个体间核苷酸序列变异为基础的遗传标记,可直接在 DNA 水平上检测生物个体之间的差异,是生

物个体在 DNA 水平上遗传变异的直接反映^[22]。此外分子标记有明显分辨区域,在稳定性、共显性、多样性和数量方面也具有明显优异性^[23],因此具有辅助基因定位的作用。同样在基因定位中,遗传图谱也是必不可少的工具。遗传图谱是某一物种的染色体图谱,功能是显示所知基因或遗传标记的相对位置,可由遗传重组测验结果推算出在 1 条染色体上可以发生的突变位点的直线排列(基因位点的排列)图^[24]。为提高遗传图谱的分辨率和精度,须对作图群体的选择进行严格要求:亲本间的相对性状要表现出明显差异;亲本要有较高的单核苷酸多态性,以便寻找与要定位基因紧密连锁的分子标记;试验材料的种群数量应该满足试验要求,试验材料的相对性状分离要符合孟德尔分离定律;目的基因的基因型由其表现型表达,因此对表现型进行测定也是决定基因定位质量的关键。通过严格筛选出来的分离群体可用来构建遗传图谱。遗传连锁图谱的构建须依靠绘图软件(MapMarker、JionMap 等)进行标记和表型统计,分析分子标记和基因控制的表现型的连锁关系,参照连锁图谱构建的理论基础(染色体的交换与重组),1% 的重组率近似于 1 cM 遗传图距,把已定位的基因片段按连锁关系绘制在软件上。用分子标记作遗传图谱会产生不同的带型,因此只须找到和基因控制的表现型有连锁关系的分子标记在遗传图谱产生的特定带型便能完成主效基因的初定位。性状是由基因和环境共同决定的,微效基因的每个基因只能产生部分影响效果,其性状表现为连续变异。相对主效基因而言,数量性状的表现型由环境条件引起的变异概率更大。所以在分析数量性状的表现型值中,通常先对环境影响进行评估,再算出基因所占的比率,进而评估数量性状遗传力的大小。永久性作图群体、高世代回交 QTL 分析^[25]、次级作图群体^[26]等在 QTL 分析中的应用,能把复杂性状变为简单性状,把多基因分解为符合孟德尔分离定律的单一基因。永久性作图群体在对 QTL 进行分析时具有以下优势:以各个品系作为分离单元,使得数量性状的测量更加精准;易于进行重复试验,以减少试验误差;可通过多点测试来评价基因与环境的互作关系。高世代回交 QTL 分析(advanced backcross QTL,简称 AB - QTL)是用回交 2 代(BC2)或回交 3 代(BC3)进行微效基因定位的分析方法之一,该方法能很好地从野生型等非优良材料中筛选优良的 QTL,为优良品系的育种服务。AB - QTL 分析的优点:在低世代远源杂交的群体中,通常会出现一些不良的性状(如落花、落果等)影响数量性状的测量。相对于低世代群体(F2、BC1 等),在 AB 群体的发展过程中,逐步淘汰一些来自供体的不良性状;在高代回交群体中,个体表现型与优良的轮回亲本更加相似,AB 群体的数量性状表现更加正常,从而提高优异数量性状的测定;AB 群体中供体的基因频率很小,因此供体基因型之间的相互作用(上位性作用)基本可以消除,所以供体中的 QTL 转移到受体后,其效应值变化不大;随着回交次数的不断增加,更容易地获得近等基因系和进行重复的田间试验。由于多次回交可使优良性状基因在减数分裂过程中的重组概率更大,容易打破 QTL 与不良基因之间的连锁关系,因此可更好地进行 QTL 分析。次级作图群体由近等基因系(near - isogenic line,简称 NIL)、导入系(introgression line,简称 IL)、染色体片段代换系(chromosomal segment substitution line,简称 CSSL)等次级品

系发展而来。次级作图群体在 QTL 分析中之所以能得到广泛利用是因为它具有明显的优势:首先次级作图群体具有永久性群体的特点,能够被反复使用,且能排除环境的影响;其次每个品系与轮回亲本的遗传背景十分相似,所以无遗传背景的干扰,因此 QTL 表型分析的结果较准确;最后各个品系只含有供体亲本很小部分的遗传物质,通常只含有 1 个或少数几个基因片段,所以能把控制同一数量性状的多个 QTL 进行分解,即把多基因分解为符合孟德尔定律的单一因子,使复杂性状简单化,从而大大提高 QTL 分析的准确度和可靠性。总之基因粗定位就是通过找出与目的基因有关联的分子标记来确定基因在染色体上的位置,而精细定位则是利用更小的标记分子大幅度缩小候选基因的范围。

2.2 基因测序

基因定位对研究植物的抗性是远远不够的,植物响应重金属胁迫一般是以基因为主导的行为变化,通过功能基因的碱基序列编码蛋白来调节植物生理,从而适应环境胁迫,因此还须了解已定位基因的碱基序列。从 1977 年第一代 DNA 测序技术(Sanger 法)应用至今,短短几十年内,基因测试技术已发展到第三代。Sanger 双脱氧链终止法原理是在新合成的 DNA 链中加入双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)这种特殊核苷酸底物后,由于在脱氧核糖的 3'位置缺少 1 个羟基,不能形成磷酸二酯键,从而无法与其他正常核苷酸连接^[27];将此片段和其他参与 DNA 合成的材料一起保温,可形成许多以双脱氧核苷酸 ddx(dd 表示双脱氧,x 表示 A,C,G,T)残基为 3'端结尾的基因片段,再将这些基因片段平行地点加在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳板上,通过跑胶进行分离,从而得到相应的放射性自显影图谱,进而确定 x 的信息。但一代测序的定位时间长、价格高、低通量等特点导致其无法大规模地流行,二代测序由于具有高通量的特点,因此目前依然占有很大的市场。目前的二代测序平台主要有基于焦磷酸测序原理的 454(GS-FLX),以 DNA 簇和可逆性末端终止为核心技术的 Solexa-Illumina Genome Analyzer^[28],基于双碱基编码原理的 SOLiD^[29]和以连接反应进行 DNA 序列分析的 Polonator^[30]。但二代测序技术存在读取长度短、样品制作难等缺陷。三代测序是一种纳米单孔测序技术,其测序过程无须进行基因的扩增。其中 PacBio SMRT 技术^[31]采用边合成边测序的策略,以 SMRT 芯片为测序载体,使 DNA 聚合酶和模板结合 4 色荧光标记的 4 种碱基,在碱基配对阶段,随着不同碱基的加入所产生的不同光就会被捕获,这样就能依据光的波长和峰值来判定进入的碱基种类。三代测序相对于二代测序来说,准确度偏低,但所产生的误差都是随机误差,可以通过多次试验进行消除,还能利用零模波导孔(zero mode waveguide hole,简称 ZMW)消除孔外过多的游离核苷酸单体产生的荧光,从而降低背景值;也可通过相连 2 个碱基的测序时间来检测一些基因的修饰情况,避免传统测序手段中对甲基化基因组进行的重亚硫酸盐(bisulfite)处理。DNA 定位和测序完成后即可得出目的基因的位置和碱基序列,通过基因比对找到突变基因, QTL 定位还须对每个基因的贡献度进行评估。相对而言,表达水平的抗性基因研究省去了基因定位环节,只须提取某种细胞在特定生理条件下产生的 mRNA 并直接对其进行测序,再用 Q-PCR 验证差异表达基因,也可以采用 RNA 干扰

(RNA interference,简称 RNAi)干扰技术启动正向验证,或者通过过表达目标基因进行功能验证,基因验证后即可得到目的基因的全部信息或者基因序列的信息,同时也可获得该基因所转录的蛋白质信息,进而根据表达蛋白质的类型和所涉及的功能等来阐述基因的作用机制。

3 植物抵抗重金属的作用机制

重金属对植物的毒害是由重金属的吸收位点、植物细胞中对重金属结合位点的竞争、重金属离子的特性和有效性以及各种化学作用等一系列因素决定的^[32]。重金属胁迫对生物的作用是相对的,一方面重金属胁迫对植物水分代谢、光合作用、呼吸作用、碳水化合物代谢、氮素代谢、核酸代谢产生直接伤害,另一方面为适应不良的生存环境,植物已建立起一系列以基因表达为主导的生理机制,通过多种离子通道运输转录蛋白参与自身生理活动,使植物作出一系列调整(渗透调节、脱水保护、抗氧化防御)来响应重金属的胁迫,从而更好地适应逆境^[33]。重金属胁迫首先被各种受体感知,这种感知通常以渗透胁迫的形式传递到细胞受体,再通过各种信使传导引起胞内网络级联反应的响应,以避免或者减轻重金属胁迫的危害。在胁迫应答过程中,基因转录调节起关键性作用。

3.1 植物外部在重金属胁迫下的变化

植物体可通过改变自身的形态结构来更好地适应重金属胁迫环境。叶和根既是主要吸收重金属的器官又是抵御多余重金属毒害的第一道防线。部分植物的叶片绒毛有利于抵御空气中重金属离子进入气孔,且在低浓度的重金属环境中,重金属主要富集在新叶,但在高浓度的环境中,重金属能从新叶迁移到老叶并以脱落的形式达到降低体内重金属含量的目的^[34];而根际表面的多糖黏液与 Cd、铝(Al)等重金属有很强的亲和性,能把重金属阻止在根部外;同时,在重金属的诱导下,根部产生有机酸,这些有机酸可通过改变土壤的理化性质形成根际效应来减少根部对重金属的吸收。通过 Al 刺激不同品种小麦发现,有机酸先从小麦根尖阴离子通道^[35-37]释放出去,这些不同基因型的小麦产生的有机酸含量与该品种抗重金属的能力成正比^[38-41],往 Al 敏感品种中加入有机酸(苹果酸盐、柠檬酸盐或草酸盐)能提高敏感品种抗 Al 的能力^[42]。这种情况在 Mench 等的研究中也大量体现^[15],他们还计算出了 Cd 与分泌物络合的稳定常数和最大吸附量呈正相关关系,表明 Cd 可与根分泌物形成配位化合物,且这些化合物不会被运往膜内或被根吸收^[43-44];研究还发现,有机酸阴离子的释放与植物体受到重金属胁迫的时间一致^[45],在受 Al 胁迫后的几个小时内,参与合成有机酸的关键酶(PEP 羧化酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、柠檬酸合成酶)一直处于活跃状态;同时还发现,在 Al 胁迫下小麦根尖组织外排的有机酸和基因有关,将细菌内合成柠檬酸的基因转录到马铃薯中,能促进柠檬酸的合成并明显提高马铃薯的抗性。植物体除了通过老叶外排重金属来减轻重金属危害外,通过研究植株各个部分的重金属富集情况发现,植物体还可通过将大部分重金属集中在地下部分,有效防止重金属迁移到地上部分,从而减轻地上部分受到的伤害。这种植物体不吸收环境中高含量的重金属从而免受毒害的现象被称为避性。在这种避性作用下,植物体内的重金属浓度并不高,且能维持自

身在重金属污染环境较正常的生长。

3.2 植物体内细胞在重金属胁迫下的变化

3.2.1 细胞壁在重金属胁迫下的变化 细胞壁是由多糖(纤维素和果胶)、蛋白质和脂类等组成的网状结构;其中多糖含有羟基、羧基和磷酸根等各种离子基团和一定的负电荷,这些结构决定了细胞壁具有吸附多种重金属的能力。研究表明,处理后的镉作用于某些植物后,部分植物的细胞壁上含有大量可溶性镉^[46],另外密毛厥细胞壁能固定 70% ~ 90% 的铜、锌、镉,通过显微镜能观察到外部的重金属含量高于细胞内部,但不是所有植物都能出现这种现象^[47]。重金属要进入细胞内必须先通过根尖细胞的细胞壁,且通过胞外途径和胞内途径运往细胞内时至少还须再经过 1 层细胞壁,所以细胞壁可以作为阻挡重金属进入植物的第一道屏障。

3.2.2 质膜在重金属胁迫下的变化 细胞膜是最重要的分隔细胞内和细胞外不同介质和组分的界面,同时是重金属胁迫信号的接收器,也是基因转录调节的关键。当重金属与细胞壁的结合达到饱和时,就必须经过跨膜运输运往原生质体,此时部分重金属会与磷脂双分子层上的离子络合,如膜上 Ca^{2+} 能与砷结合形成砷酸盐和亚砷酸盐沉淀。在非生物胁迫下,信号先被膜受体感知,再被跨膜蛋白上的酶联反应放大,通过转录因子激活下游功能基因的表达从而转录成各种调节蛋白,这些蛋白质可通过各种离子通道进行转运,以调节重金属外排和络合重金属等方式来减少植物体内重金属有效态。最具有代表性的是脱落酸(abscisic acid,简称 ABA)的合成,ABA 是一种重要的参与逆境响应的植物激素^[48]。当细胞膜上的受体感应到重金属胁迫信息时,ABA 合成酶的相关基因会被激活,通过各种细胞器合成 ABA。ABA 可诱导、活化大部分功能基因启动子,从而诱导抗重金属基因的表达,因此 1 个功能蛋白的被转录可能是多个基因相互表达的结果。如玉米的 *ZmUBP* 基因与 Cd^{2+} 的胁迫响应有关^[49]。泛素特异蛋白酶(ubiquitin-specific protease,简称 VSP)^[50]存在于真核生物中,经组织表达模式分析发现,柃柳的 *ZmVBP* 和 *ZmVBP a/b/c* 基因可响应脱落酸与重金属胁迫,在 ABA 胁迫下这些基因的转录蛋白活跃表达,通过转基因技术将这些基因转入拟南芥中,可提高拟南芥对 ABA 的敏感性和重金属的抗性,研究还发现,*ZmVBP16a* 基因的过量表达可引起 3 个抗氧化功能基因表达量的上调,经过双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation,简称 BiFc)分析得出,*Zmtcp15b* 和 *Zmtcp15a* 在植物体内外相互作用,因此 *Zmvp14* 与 *Zmtcp15* 家族蛋白可能在逆境响应上具有协同作用,同样运用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术也验证柃柳能响应 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{4+} 的胁迫^[50]。受到胁迫时,柃柳 *Lea* 基因过量表达会引起植物内的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)、过氧化物酶(peroxisome,简称 POD)活性上升,脯氨酸含量以及可溶性蛋白的增加,丙二醛(malonaldehyde,简称 MDA)减少,说明 *Lea* 基因能辅助其他抗重金属功能基因的表达,但是 *Lea* 本身有顺式反应元件,所转录的蛋白质有稳定细胞膜、作为分子屏障、与重金属离子结合和防止细胞氧化等功能,有些像柃柳 *Les* 基因一样,本身就具有抗重金属的能力,这部分基因的 5'非翻译区通常含有与重金属胁迫相关的顺式原件,从而直接响应重金属的胁迫

迫^[50]。如重金属进入细胞内能产生活性氧自由基,使细胞内的生物大分子受到损伤,而植物体内的 SOD、POD、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone,简称 GSH)等抗氧化物能够消除部分重金属侵害植物时随之产生自由基过多的问题^[51]。拟南芥中编码谷胱甘肽合成酶的 *ATGC*、*ATGCS* 基因能直接响应重金属胁迫,进而催化产生 GSH 和植物螯合肽(phytochelatin,简称 PC),这些物质能与被吸收的重金属通过沉淀、络合、吸附等形成无毒稳定的化合物并固定在相对无害的区域^[52]。同样,紫花苜蓿的 *AtATM3* 基因(编码色素氧化酶)能与 ATP 结合盒转运 *b* 基因来增强 GSH 和 PC 的合成来响应重金属胁迫^[53]。细胞除了能消除重金属胁迫带来的细胞氧化、络合作用以及无毒区域固定化的功能外,还具有外排重金属的功能。在耐铝品种的研究中,在小麦细胞外液 pH 值为 4.0 ~ 4.5,细胞质内 pH 值为 7.0 的体系中,铝离子通过质外体运至细胞质后能和苹果酸、柠檬酸结合,形成的络合物再通过细胞膜上的通道运出^[13]。总而言之,植物体消除重金属胁迫主要依赖外排、内解作用。

4 总结

植物抗性的研究起步早,各种基因定位方法和作用机制随着时间推移形成了从浅到深,从点到面的发展体系。现有的抗性基因研究已能够全面深入地阐释植物体如何通过基因转录的蛋白调控自身生理活动,如何通过编码特殊的组织蛋白响应重金属毒害,以适应逆境。这些理论同时也揭示了不同植物体之间由于基因上的差异导致的结构和生理上的差异,致使植物体呈现不同抗重金属的能力,这为抗性品种的选育和环境的重金属污染治理提供一定的理论和技术支撑。然而现有技术的不完善和使用上的受限加之大部分的抗逆能力是由多种微效基因加持而来,很少由主效基因直接控制,使得抗性基因和抗性植物在土地修复中难以运用。目前研究的主要障碍有 2 个方面:(1)抗性植物在修复重金属污染的过程中,部分已被植物体吸收的重金属又会以残枝落叶的形式回归土壤,而回收植物体生长各个时期的枯枝落叶消费巨大,回收后的物质也难资源化;自然界中以重金属为植物生理代谢所需元素的品种较少,即使找到该品种,在修复污染土壤的问题上,它只作为转换重金属价态的介质,植物体从土壤中吸收的重金属同样面临着资源化的问题。总体而言,不管抗性基因还是抗性品种都存在资源大却难以利用的局面,但是随着科技的发展,相信新的技术能把植物体吸收和外排重金属的特性和化学纯化重金属原理结合,从而资源化这些放错位的重金属资源。例如,是否可以利用离子通道载体蛋白吸收特定的重金属,使其以一种螯合物的形式富集起来,再结合化学中的可逆反应,通过改变反应条件使重金属与载体蛋白分离,从而使重金属纯化。(2)基因测序和转录组测序同是研究抗性性状的一种手段,但两者的侧重点不同,基因测序大部分通过检索目的基因编码区域突变位点来阐述作用机制,而转录组测序则关注于某种胁迫下全部 cDNA 的表达。2 种技术就像按源头和按过程处理问题一样,相辅相成。转录组作为一种过程来研究抗性基因,结果应该以一种动态的、连续的状态进行表现,而不是以点的形式表达。这样就能避免在非生物胁迫下,一部分抗性基因由于点式的测样而未能被记录。

笔者认为,转录组测序过程中动态检测最难的是不断往测序系统中输入 RNA,在测序系统前添加多个自动、独立、高效提取 RNA 的提取器或许能解决这一问题。这样构建系统测得的结果就能以动态谱线的形式呈现出来。

参考文献:

- [1] Yajima I, Zou C, Li X, et al. Analysis of heavy – metal – mediated disease and development of a novel remediation system based on fieldwork and experimental research [J]. *Nihonseigaku Zasshi Japanese Journal of Hygiene*, 2015, 70(2): 105.
- [2] 骆旭添. 水稻苗期耐镉胁迫的 QTL 定位及其与环境互作效应分析[D]. 福州:福建农林大学, 2007.
- [3] 刘春早, 黄益宗, 雷鸣, 等. 重金属污染评价方法 (TCLP) 评价资江流域土壤重金属生态风险[J]. *环境化学*, 2011, 30(9): 1582 – 1589.
- [4] 刘志培, 刘双江. 我国污染土壤生物修复技术的发展及现状[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(6): 901 – 916.
- [5] 韦革宏, 马占强. 根瘤菌 – 豆科植物共生体系在重金属污染环境修复中的地位、应用及潜力[J]. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1421 – 1430.
- [6] 贾玉华. 三种植物对重金属 Cd 和 Pb 抗性及其修复潜力的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2008.
- [7] Thurman D A. Mechanism of metal tolerance in higher plants[J]. *Pollution Monitoring*, 1981, 2: 239 – 249.
- [8] Baker A J M. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry[J]. *Biorecovery*, 1989, 1: 81 – 126.
- [9] 吴彬艳. 广义景天属和蝇子草属耐受与富集重金属种质筛选及蝇子草属杂交初探[D]. 北京:北京林业大学, 2016.
- [10] 邓 滔. 井栏边草和蜈蚣草对 As – Pb 胁迫的富集作用[D]. 南京:南京林业大学, 2008.
- [11] 杨 园, 王艮梅, 曹 莉, 等. 生物炭和猪粪堆肥对 Cd 污染土壤上黑麦草生理生化的影响[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(13): 196 – 200.
- [12] 邵国胜. 水稻镉耐性和积累的基因型差异与机理研究[D]. 杭州:浙江大学, 2005.
- [13] Kochian L V, Pence N S, Letham D L D, et al. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals[J]. *Plant and Soil*, 2002, 247(1): 109 – 119.
- [14] 王志香. 重金属胁迫对三种木本植物影响的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2007.
- [15] Mench M, Morel J L, Guckert A, et al. Metal – binding with root exudates of low – molecular weight[J]. *Journal of Soil Science*, 1988, 39(4): 521 – 527.
- [16] Mench M, Martin E. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. [J]. *Plant and Soil*, 1991, 132(2): 187 – 196.
- [17] Xue H B, Shi T, Wang F F, et al. Interval mapping for red/green skin color in Asian pears using a modified QTL – seq method[J]. *Horticulture Research*, 2017, 4: 17053.
- [18] 曹 鑫. 小麦 *TaTAC1* 基因同源克隆及表达分析[D]. 雅安:四川农业大学, 2016.
- [19] 陶吉寒, 招雪晴, 苑兆和, 等. 石榴 *DFR* 基因的同源克隆及分析[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(4): 22 – 24.
- [20] Arenhart S, Silva J V Jr, Flores E F, et al. Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral diarrhea virus cDNA clones[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(4): 993 – 999.
- [21] 王 翠. 马铃薯对镉、铅胁迫响应与富集的基因型差异[D]. 雅安:四川农业大学, 2010.
- [22] 闫华超, 高 岚, 李桂兰. 分子标记技术的发展及应用[J]. *生物学通报*, 2006, 41(2): 17 – 19.
- [23] 谭孟君, 肖层林. 分子标记在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用[J]. *作物研究*, 2006, 20(增刊 1): 409 – 412.
- [24] 石 鹏. TN DH 群体高密度遗传图谱构建及其控制重要农艺性状 QTL 的再定位[D]. 武汉:华中农业大学, 2013.
- [25] 曾庆力, 蒋洪蔚, 刘春燕, 等. 利用高世代回交群体对大豆小粒性状的基因型分析及 QTL 定位[J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(5): 473 – 477.
- [26] 席章营. 作物次级作图群体的研究进展[C]//2004 全国玉米种质扩增、改良、创新与分子育种学术会议论文集. 北京, 2004.
- [27] Smith L M, Fung S, Hunkapiller M W, et al. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(7): 2399 – 2412.
- [28] 王晓梅, 杨秀荣. DNA 分子标记研究进展[J]. *天津农学院学报*, 2000, 7(1): 21 – 24.
- [29] 张小珍, 尤崇革. 下一代基因测序技术新进展[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2016, 42(3): 73 – 80.
- [30] 朱大强, 李 存, 陈 斌, 等. 四种常用高通量测序拼接软件的应用比较[J]. *生物信息学*, 2011, 9(2): 106 – 112.
- [31] 温永平, 侯强川, 张和平. 自然发酵酸马奶对人体肠道菌群的影响——基于 PacBio SMRT 测序技术[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(2): 4 – 7.
- [32] 李春烨, 丁国华, 刘保东. 重金属影响植物细胞超微结构和功能的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013(18): 114 – 118.
- [33] Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, et al. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) [J]. *Plant and Soil*, 1998, 200(2): 241 – 250.
- [34] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(1): 92 – 99.
- [35] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Characterisation of Al – stimulated efflux of malate from the apices of Al – tolerant wheat roots[J]. *Planta*, 1995, 196(1): 103 – 110.
- [36] Ryan P R, Delhaize E, Jones D L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52(1): 527 – 560.
- [37] Delhaize E, Craig S, Beaton C D, et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum – aestivum* L) I. uptake and distribution of aluminum in root apices[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(3): 685 – 693.
- [38] Ma Z, Miyasaka S C. Oxalate exudation by taro in response to Al [J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(3): 861 – 865.
- [39] Pellet D M, Grunes D L, Kochian L V. Organic acid exudation as an aluminum – tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Planta*, 1995, 196(4): 788 – 795.
- [40] Zheng S J, Ma J F, Matsumoto H. High aluminum resistance in buckwheat I. Al – induced specific secretion of oxalic acid from

贡莎莎,孟庆玲,乔 军,等. 少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-801 基因的分子特征分析及其多克隆抗体制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):23-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.006

少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-801 基因的分子特征分析及其多克隆抗体制备

贡莎莎¹, 孟庆玲¹, 乔 军¹, 钟文强¹, 陈 英¹, 才学鹏²

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃兰州 730046)

摘要:为了研究捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌几丁质酶的生物学功能,对少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶 AO-801 基因进行克隆和分子特征分析,通过大肠杆菌表达 AO-801 重组几丁质酶,利用镍柱纯化技术纯化目的蛋白,免疫小鼠后制备 AO-801 几丁质酶多克隆抗体。结果显示,几丁质酶 AO-801 基因序列与少孢节丛孢菌标准株 [*Arthrobotrys oligospora* Fres., 美国模式培养物集存库 (American type culture collection, 简称 ATCC) 24927] 的核苷酸序列同源性为 95.96%, 氨基酸序列的同源性为 97.34%。几丁质酶 AO-801 属于糖苷水解酶 18 家族,具有典型的几丁质酶催化区保守序列 SIGGW 和 LDGVDVDWE,无信号肽序列,其二级结构以无规则卷曲、 α 螺旋和 β 折叠为主要结构元件,三级结构中有 $(\alpha/\beta)_8$ 的圆桶形结构。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western Blot) 分析表明,重组几丁质酶蛋白的分子量约为 59ku,与预期大小一致,与少孢节丛孢菌阳性血清能发生特异性反应。间接酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, 简称 ELISA) 法的检测结果显示,获得的抗 AO-801 多克隆抗体血清效价达到 1:25 600。

关键词:少孢节丛孢菌;几丁质酶;原核表达;蛋白纯化;多克隆抗体

中图分类号: S432.4⁺5; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0023-05

现有的研究发现,捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌产生的侵染性胞外蛋白酶在其侵染线虫时能够发挥重要作用^[1-5]。然而,以往的研究多集中在探讨捕食线虫性真菌胞外酶丝氨酸蛋白酶的机制和功能上,鲜有对捕食线虫性真菌

少孢节丛孢菌的几丁质酶的相关报道。Yang 等已经从少孢节丛孢菌 (*Arthrobotrys oligospora*) 全基因组中鉴定出 16 个开放阅读框 (ORF) 编码假定的几丁质酶^[5],对其进行功能结构域、分子量和转录分析表明,大多数几丁质酶在碳源缺乏、含有几丁质底物或植物病原真菌时表达量上调,提示少孢节丛孢菌几丁质酶可能发挥重要作用。

少孢节丛孢菌是目前研究最多的一种捕食线虫性真菌,在自然界中广泛分布^[2]。2011 年, Yang 等首次对捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌进行了全基因组测序^[4],对基因组编码的侵染性胞外蛋白酶进行了生物信息学分析,共发现和鉴定出 16 个几丁质酶,然而这些几丁质酶的生物学功能尚未

收稿日期:2017-08-21

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31460654, 31260601); 新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目 (编号:XJGR12015038)。

作者简介:贡莎莎 (1991—), 女, 新疆博乐人, 硕士研究生, 主要从事动物寄生虫学研究。E-mail:1558560806@qq.com。

通信作者:孟庆玲, 博士, 教授, 主要从事动物寄生虫学研究。E-mail:xjmlqj@163.com。

root tips[J]. Plant Physiology, 1998, 117(3):745-751.

[41] Papernik L A, Bethea A S, Singleton T E, et al. Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat [J]. Planta, 2001, 212(5/6):829-834.

[42] Pellet D M, Papernik L A, Kochian L V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat (roles of root apical phosphate and malate exudation) [J]. Plant Physiology, 1996, 112(2):591-597.

[43] Akeson M A, Munns D N. Lipid bilayer permeation by neutral aluminum citrate and by three α -hydroxy carboxylic acids [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 984(2):200-206.

[44] Shi B, Haug A. Aluminum uptake by neuroblastoma cells [J]. Journal of Neurochemistry, 1990, 55(2):551-558.

[45] Zhang W H, Ryan P R, Tyerman S D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots [J]. Plant Physiology, 2001, 125(3):1459-1472.

[46] Nishizono H, Ichikawa H, Suzuki S, et al. The role of the root cell

wall in heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* [J]. Plant and Soil, 1987, 101(1):15-20.

[47] Malone C, Koeppe D E, Miller R J. Localization of lead accumulated by corn plants [J]. Plant Physiology, 1974, 53:388-394.

[48] Kim S Y. Recent advances in ABA signaling [J]. Journal of Plant Biology, 2007, 50(2):117-121.

[49] 金 晶. 玉米逆境响应相关基因 *ZmUBP* 的功能鉴定与 *WRKY* 基因家族进化分析 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2016.

[50] 潘 妍. 柞柳 *Lea* 基因抗重金属功能及与 *eIF5A* 共转化山新杨的研究 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2010.

[51] 唐东民, 伍 钧, 唐 勇, 等. 重金属胁迫对植物的毒害及其抗性机理研究进展 [J]. 四川环境, 2008, 27(5):79-83.

[52] 刘大丽. 谷胱甘肽合成相关酶在重金属污染生物修复中的分子机制及比较研究 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2013.

[53] 范兆乾. *AtATM3* 和 *CYP2E1* 基因增强转基因紫花苜蓿抗重金属和有机物能力研究 [D]. 青岛:青岛科技大学, 2013.