

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.07.005

人源类金属硫蛋白能促进番茄幼苗对锌的积累^①

宋小梅, 陈梦莹, 秦小冬, 金新开,
李金华, 潘宇, 苏承刚, 张兴国

西南大学园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 金属硫蛋白具有抗辐射、抗氧化和对重金属解毒等功能, 对 Zn^{2+} 具有很强的结合能力, 在医药、农业、环境和保健等诸多领域有潜在的应用价值. 将花椰菜花叶病毒 35S 启动子控制的人源类金属硫蛋白基因 *HsMT1L* 导入番茄基因组, 结果显示, 转基因番茄幼苗比野生型材料对 Zn^{2+} 具有更强的耐受性, 并能够富集更多的 Zn^{2+} 离子.

关键词: 人源类金属硫蛋白基因; 番茄; 幼苗; 锌

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)07-0030-06

锌是地球上所有生物体内必需的一种微量元素, 是众多酶的辅助因子, 它参与核酸、蛋白质、碳水化合物和维生素等重要物质的生物合成; 在生长发育、生殖遗传以及人体免疫等重要生理过程中起着极其重要的作用^[1-3]. 当人体缺锌时, 会发生锌缺乏症, 出现味觉差、厌食、免疫力减退、生长缓慢与智力发育低于正常等症状^[4]. 而粮食、水果、蔬菜和肉类等食物是人体锌营养的主要来源^[5].

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是由动物、植物和微生物体内产生的一类富含半胱氨酸残基和具有金属结合能力的低分子量多肽, 具有多种生物学功能^[3]. 在人体中, 类金属硫蛋白(*Homo sapiens* metallothionein-Like, *HsMT-L*)可分为 4 个亚型, 其中亚型 I 的 *HsMT1L* 存在于各种组织和器官中, 尤以肝、肾细胞为主, 起着对重金属解毒、参与人体所必需的微量元素储存和运输, 以及清除自由基等作用^[6-7]. *HsMT1L* 基因已在大肠杆菌和酵母中大量表达^[8-10], 用于开发该基因在医药、保健和护肤等多领域的应用产品. 但在植物上, 该基因的表达研究还少有报道. 本研究将花椰菜花叶病毒 35S 启动子(*CaMV* 35S)控制的人源类金属硫蛋白基因 *HsMT1L* 导入番茄基因组, 初步分析了转基因番茄幼苗对 Zn^{2+} 的耐受与富集能力, 以期为今后培育富 Zn^{2+} 的优异番茄新种质、探讨 *HsMT1L* 对番茄锌代谢的影响、开发利用 *HsMT1L* 蛋白等研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株、载体和引物

采用的普通番茄(*Solanum lycopersicum* L.)品种为 Ailsa Craig(AC), 由本实验室繁殖. 大肠杆菌菌株 XL1-blue、根癌农杆菌菌株 LBA4404 和双元载体 pCAMIBA1301 (GenBank 登陆号为 AF234297)购自鼎国生物技术有限公司. 含有人源类金属硫蛋白基因 *HsMT1L* (GenBank 登陆号为 X76717)的中间载体 pBK-MT1L(图 1(a))由本实验室构建. 表 1 中的引物委托北京六合华大基因科

① 收稿日期: 2016-06-27

基金项目: 科技部“863”项目(2010AA10060705); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201310635019).

作者简介: 宋小梅(1993-), 女, 四川达州人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜生物技术研究.

通信作者: 张兴国, 研究员.

技股份有限公司合成.

表 1 PCR 引物

引物编号	序列(5' 3')	位 点
P1	AACCCGGCAGCTTAGTTGCCGT	位于 LB 外侧
P2	CATGAGCGAAACCTATAGGAACC	位于 T35s 终止子
P3	TGTGCTCGACGTTGTCTACTGAA	位于 nptII 基因上游
P4	GAATTCAGGGAGTCACGTTATGACC	位于 Pnos 启动子上游
P5	ATGACGCACAATCCCACTATCC	位于 CaMV 35S 启动子
P6	GACCCGAAGTCTCCTGCTCGCC	位于 <i>HsMT1L</i> 基因上游
P7	TCAGCTGCAGCAGCTCTTCTTG	位于 <i>HsMT1L</i> 基因下游
P8	ATCGCAAGACCGGCAACAGG	位于 Tipt 终止子

1.2 双元表达载体的构建

采用 Omega 质粒提取试剂盒(Omega 公司)提取质粒 DNA. 采用 Omega 胶回收试剂盒(Omega 公司)纯化电泳分离的 DNA. 采用 Sambrook 等^[14]酶切与连接方法进行载体构建. 通过 PCR 扩增、酶切和测序鉴定重组质粒. 序列测定委托北京六合华大基因科技股份有限公司.

1.3 遗传转化方法

采用冻融法将双元表达载体转化进根癌农杆菌菌株 LBA4404^[12], 并采用图 2(a)和表 1 所示引物进行 PCR 扩增鉴定.

采用农杆菌介导的叶盘方法转化番茄 AC 的离体子叶. 番茄种子经 20% 的次氯酸钠(原液中含 5% 有效氯)表面消毒后, 播种于 MS^[13]附加 10 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂的固体培养基(pH=5.8)上. 切取即将展开的子叶, 在 MS 附加 1.75 mg/L 玉米素(ZT)、30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂的固体培养基上预培养 2 d, 经农杆菌侵染 10 min, 用无菌滤纸吸去外植体上的多余菌液, 接种于 MS 附加 100 mg/L 卡那霉素(Kan)、1.75 mg/L ZT、30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂的固体培养基上共培养 2 天, 转接至 MS 附加 100 mg/L Kan、300 mg/L 羧苄青霉素(Carb)、1.75 mg/L ZT、30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂的筛选培养基上. 早期每 2 周继代一次, 4 代后每 4 周继代一次, 并逐渐降低 Carb 至 100 mg/L. 分化出的 Kan 抗性不定芽长至 2~3 cm 高时, 在 MS 附加 100 mg/L Kan、100 mg/L Carb、30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂的固体培养基上生根. 生根的小苗洗净培养基后移栽至营养土, 在(25±1) °C、50 μmol/(m²·s)光照强度的培养室内进行炼苗和培养, 最后在网室内种植和留种.

1.4 转基因植株的鉴定方法

Kan 抗性小苗移栽成活, 提取新生叶片的 gDNA, 按图 2(a)和表 1 所示引物进行 PCR 扩增鉴定. *HsMT1L* 基因经高保真 PrimSTAR HS DNA 聚合酶扩增后委托北京六合华大基因科技股份有限公司测序鉴定.

1.5 锌处理方法

野生型番茄 AC 的 Zn²⁺ 耐受性实验在(25±1) °C、80 μmol/m²·s 光照强度的培养室内进行. 取相同生长时期的 6 叶 1 心番茄幼苗, 在添加 0~3 mmol/L ZnSO₄ 浓度梯度的 Hoagland 营养液^[14]中进行液体培养; 其间, 每天补充蒸发的营养液以避免离子浓度的改变, 每周换一次液体培养基, 整个水培过程采用氧气泵进行通氧换气. 每天观察并记录番茄植株的根、茎、叶等形态变化, 找出番茄幼苗 Zn²⁺ 致害临界浓度. 采用相同的培养方法, 在 Zn²⁺ 致害临界浓度下处理野生型和转基因番茄植株, 比较分析形态差异.

1.6 锌含量的检测方法

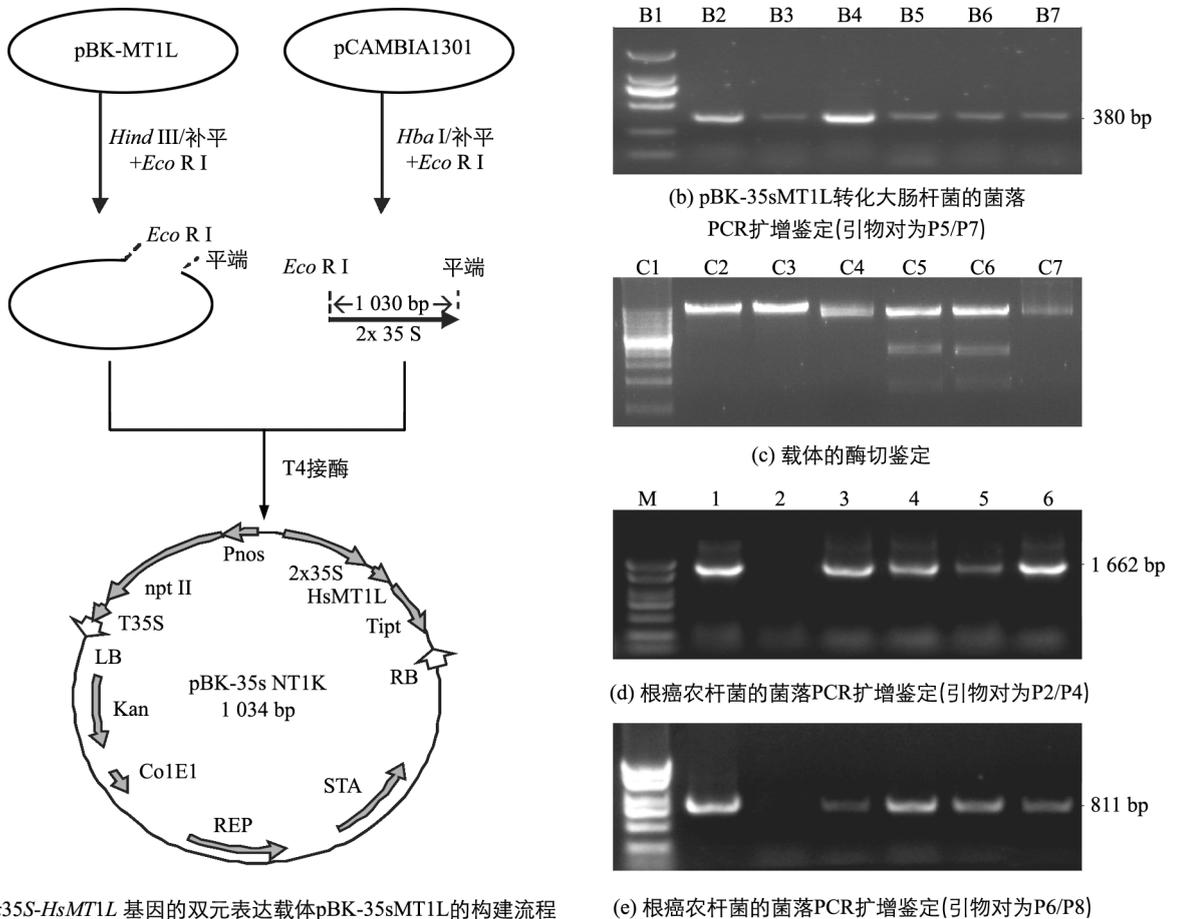
分别取番茄植株的地上部(茎+叶)和根为材料, 采用干灰化法消化材料、原子吸收光谱法^[15]测定锌含量. 采用 SPSS14.0 统计软件进行方差分析, 比较处理间的差异性.

2 结果与分析

2.1 含有人源类金属硫蛋白基因的双元表达载体的构建

中间载体 pBK-MT1L 经 *Hind* III 酶切后, 用 Klenow 酶补平, 再经 *Eco*R I 酶切, 电泳回收 9 306 bp 大片段, 弃 853 bp 小片段. 同时, 双元载体 pCAMBIA1301 经 *Xba* I 酶切后, 用 Klenow 酶补平, 再经

EcoR I 酶切, 电泳回收大小为 1 030 bp 的 2x35S 启动子片段(图 1(a)). 将两个回收片段纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞. 用引物 P5/P7 对获得的 Kan 抗性菌落进行 PCR 扩增鉴定, 得到预期的 380 bp 大小的目标带(图 1(b)). PCR 阳性菌落的质粒 DNA 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别酶切, 得到的 10 355 bp 大小产物, 且比质粒 DNA 电泳滞后, 证实均为单位点; *Xba* I 酶切不开质粒, 证实没有该位点; *Pst* I 酶切得到 806 bp、2 011 bp 和 7 523 bp 的目标条带; *Ase* I 酶切得到 863 bp、1 900 bp 和 7 518 bp 的目标条带(图 1(c)); 所有酶切结果正确. 测序结果(略)也证实为预期. 因此, 构成了含有 2x35S-*HsMT1L* 基因的双元表达载体 pBK-35sMT1L. 经冻融法将该载体转化根癌农杆菌 LBA4404, 用引物对 P2/P4 和 P6/P8 进行 PCR 扩增, 分别得到了 1 662 bp 和 811 bp 预期大小的产物, 筛选到了阳性克隆(图 1(d)和(e)).



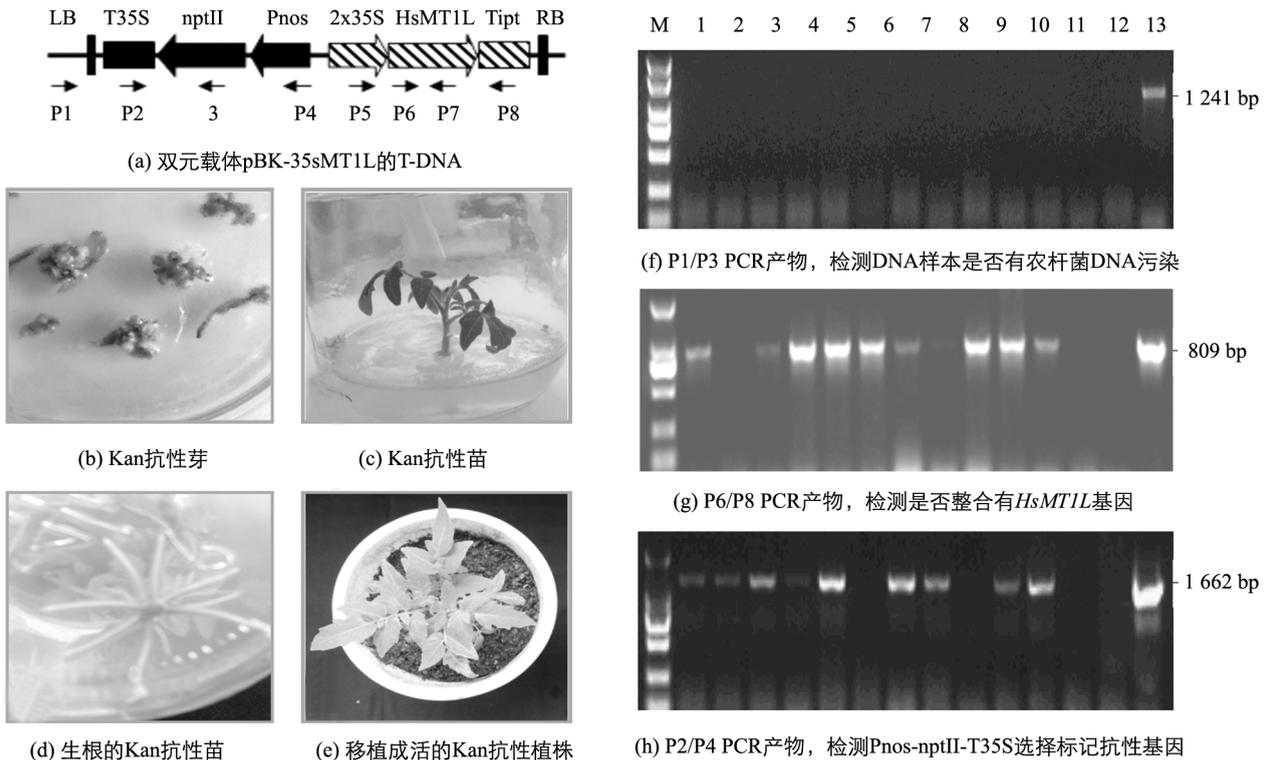
pBK-MT1L: 含 *HsMT1L* 基因的中间载体; pCAMBIA1301: 登陆号为 AF234297, 商业双元载体; *Hind* III, *Xba* I 和 *EcoR* I: 限制性内切酶; 补平: Klenow 酶补平; T4 连接酶; T4 DNA 连接酶; LB 和 RB: T-DNA 左边界和有边界; T35s: *CaMV* 35S 基因的终止子; nptII: 新霉素磷酸转移酶基因; Pnos: 胭脂碱合成酶基因启动子; 2x35S: 2x *CaMV* 35S 启动子; *HsMT1L*: 人源类金属硫蛋白基因 1; Tipt: 根癌农杆菌异戊烯基转移酶基因的终止子; STA: 农杆菌 pVS1 质粒 STA 区; REP: 农杆菌 pVS1 质粒复制子; CoIE1: 大肠杆菌质粒复制子; Kan: 原核卡那霉素抗性基因; B1: DL2000 分子量标记; B2-B7: 大肠杆菌菌落编号; C1: Wand range DNA marker (500~12 000 bp) 分子量标记; C2-C7: *EcoR* I, *Hind* III, *Xba* I, *Pst* I 和 *Ase* I 酶切及质粒 DNA 对照; M: DL2000+1500 分子量标记; 1-6: 根癌农杆菌菌落编号.

图 1 2x35S-*HsMT1L* 基因的双元表达载体的构建与导入根癌农杆菌

2.2 获得了整合有人源类金属硫蛋白基因的番茄材料

经农杆菌介导转化番茄 AC 的子叶外植体, 在筛选培养基上诱导培养 1~2 个月后, 得到大量卡那霉素抗性的不定芽(图 2(b)). 待苗长至 3~5 cm 高时, 在不加任何激素的培养基上诱导生根(图 2(c)和(d)). 生根的小植株移栽至土壤(图 2(e)), 炼苗成活后提取新生叶组织的 gDNA 进行 PCR 鉴定. 以位于 T-DNA 外侧的引物 P1 与位于 T-DNA 内侧 nptII 基因中的引物 P3 进行 PCR 扩增, 结果显示转基因材料未扩增出 1 241 bp 大小的产物, 表明用于检测的转基因材料的 DNA 样本中不含有农杆菌双元载体 pBK-35sMT1L 的污染(图 2(a)和(f)). 用 P6/P8 引物进行 PCR 扩增, 显示 12 棵植株中有 9 棵检测到了

HsMT1L-*Tipt* 基因的扩增产物(图 2(g)), 表明 *HsMT1L* 基因整合进了番茄 AC 的基因组, 而 P2/P4 的 PCR 产物则显示整合了 *Pnos-nptII-T35s* 选择标记抗性基因(图 2(h)).



M: DL2000 DNA 分子量大小标记; 1~11: Kan 抗性植株材料; 12: 阴性对照; 13: pBK-35sMT1L 质粒阳性对照。

图 2 整合有 2x35S-*HsMT1L* 基因的番茄植株获得

2.3 含有人源类金属硫蛋白转基因番茄幼苗对 Zn^{2+} 的吸收和积累能力得到增强

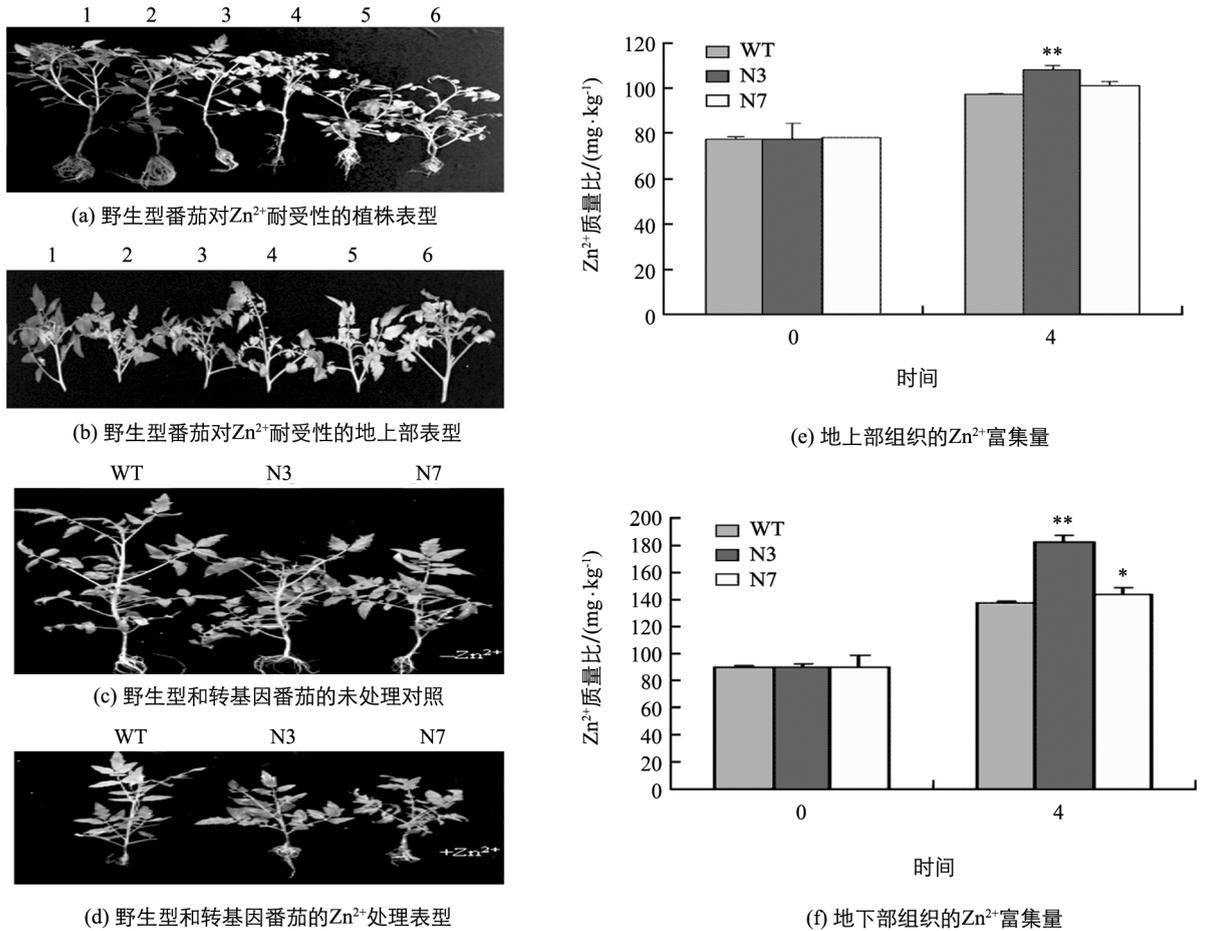
在水培条件下, 野生型番茄 AC 幼苗进行 0~3.0 mmol/L 不同浓度的 $ZnSO_4$ 处理. 结果发现, 0.6 mmol/L $ZnSO_4$ 处理的植株表型与对照的相一致, 显示该浓度的 Zn^{2+} 不影响番茄幼苗生长; 而 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 mmol/L 的 $ZnSO_4$ 处理 4 周后, 番茄植株呈现新叶发黄、叶心皱缩卷曲(图 3(a)和(b))、茎部出现褐斑、侧根减少(图 3(a))等现象, 且随着 $ZnSO_4$ 浓度的增加, 植株更为矮小, 其中 3.0 mmol/L 的 $ZnSO_4$ 处理的番茄植株的株高比对照矮 15% 左右, 表明锌毒害症状随锌浓度的增加而变得更加明显(图 3(a)). 因此, 确定野生型番茄在本试验条件下的 $ZnSO_4$ 临界中毒浓度为 1.2 mmol/L.

未加 $ZnSO_4$ 培养时, 随机挑选的整合有 2x35s-*HsMT1L* 转基因的番茄株系 N3 和 N7 比野生型对照生长的较为矮小(图 3(c)). 经 1.2 mmol/L 的 $ZnSO_4$ 处理 4 周后, N3 和 N7 均未呈现出与野生型相似的失绿发黄的受害症状(图 3(d)), 表明 2x35s-*HsMT1L* 转基因表达的 *HsMT1L* 蛋白赋予了番茄幼苗对 Zn^{2+} 的耐受性. Zn^{2+} 含量测定结果表明, 转基因和野生型植株的地上组织或地下组织中 Zn^{2+} 的含量在处理前没有差别(图 3(e)和(f)), 而处理 4 周后, 无论是转基因植株, 还是野生型材料, 其地下组织的 Zn^{2+} 含量均远高于地上组织(图 3(e)和(f)), 表明根部的吸收和贮藏 Zn^{2+} 的能力强于地上部分; 此外, 转基因番茄株系 N3 的地下和地上组织中的 Zn^{2+} 含量分别比野生型对照高出 35.96% 和 11.34%, 差异均极具有统计学意义, 而转基因番茄株系 N7 仅地下组织的 Zn^{2+} 含量与野生型材料的差异具有统计学意义. 这些结果表明含有转基因 2x35S-*HsMT1L* 的番茄幼苗比非转基因对照更能耐受和富集 Zn^{2+} .

3 讨论

不同植物对 Zn^{2+} 的富集能力存在差异. 传统的富锌植物是指那些在有效锌含量较低的土壤中能够正常生长, 并获得较高产量和较高 Zn^{2+} 含量的植物; 这类植物具有较强的对土壤中 Zn^{2+} 的主动吸收的能力^[16]. 而本研究获得的转基因番茄在富集 Zn^{2+} 的机制上不同于传统的富锌植物. 表现在对照处理上, 转基因番茄与野生型材料之间的 Zn^{2+} 含量差异不具有统计学意义, 仅在施加锌肥的处理上, 转基因番茄的 Zn^{2+} 含量才显著高于野生型材料(图 3). 这表明外源 *HsMT1L* 基因不能增强转基因番茄对 Zn^{2+} 的主动吸收, 而只

是在土壤环境的 Zn^{2+} 浓度高时, 进入植物细胞内的 Zn^{2+} 浓度也高, $HsMT1L$ 蛋白能够整合 Zn^{2+} 而增强细胞对高浓度 Zn^{2+} 的耐受性, 从而呈现出能够积累较多 Zn^{2+} 的特性。



1—6: 0、0.6、1.2、1.8、2.4 和 3.0 mmol/L 等 6 个 $ZnSO_4$ 处理浓度; WT: 野生型番茄; N3, N7: 含 35S- $HsMT1L$ 转基因的番茄株系。

* 和 ** 表示与野生型相比在 $p < 0.05$ 水平上差异具有统计学意义和在 $p < 0.01$ 水平上差异极具有统计学意义。

图 3 转基因番茄对 Zn^{2+} 耐受性和富集性

$HsMT1L$ 的 61 个氨基酸残基中有 20 个半胱氨酸残基, 并以半胱氨酸残基为基础, 构成了 2 个金属硫簇, 可分别整合 4 个和 3 个二价金属离子, 所以 $HsMT1L$ 具有很强的对二价金属离子的结合能力^[2-3]。当进入细胞中 Zn^{2+} 过量时, $HsMT1L$ 即可起到解毒作用, 因此, 含有 $HsMT1L$ 的转基因番茄表现出较野生型番茄更强的对 Zn^{2+} 的耐受性(图 3(d))。此外, 本研究的 $HsMT1L$ 基因由 2x35S 强启动子控制的组成性表达, 在根部和地上部分的茎叶中均会得到大量表达, 但地上部分积累的 Zn^{2+} 含量远低于地下部分的根组织(图 3(e), (f))。这是由于根部优先接触到营养液中的 Zn^{2+} 离子, 大量 Zn^{2+} 离子被根吸收并被优先截留在根组织。该现象与他人的结果相一致^[17]。如果采用叶面施肥的方式提供锌元素, 则可以减少锌肥施用量, 促进转基因番茄地上部分, 尤其是果实, 对 Zn^{2+} 的积累。而富 Zn^{2+} 提高了番茄果实的营养价值, 且无论是鲜食还是干燥后的制品, 均可提供优质的锌蛋白, 满足人们对锌的需求。

MT 具有对重金属解毒和很强的抗辐射、抗氧化能力, 在医药、保健品和护肤品上具有较大的开发利用价值^[3]。目前主要从动物的肾组织中提取 MT, 但存在动物源性污染的担心。在细菌和酵母上发酵制备 MT, 仍存在生产成本较高等问题。植物生物反应器是目前表达有功效的蛋白的研究热点, 具有生产成本低等优势。本研究将人源 $HsMT1L$ 基因在番茄中组成性表达, 有望从高丰量表达的转基因番茄中提取 MT, 促进 MT 的研究与应用。

参考文献:

- [1] 王立芹, 周 侗, 徐淑倩, 等. 锌与金属硫蛋白基因表达的研究进展 [J]. 中国饲料添加剂, 2014(6): 1—4.
 [2] KIMURA T, KAMBE T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspec-

- tive [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 336–358.
- [3] PALMITER R D. The Elusive Function of Metallothioneins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 8428–8430.
- [4] VALLEE B L. Introduction to Metallothionein [J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 205(4): 3–7.
- [5] 常红, 周鑫斌, 于淑慧, 等. 小麦氮锌配施效应研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(11): 49–53.
- [6] 郑军恒, 李海洋, 茹刚, 等. 金属硫蛋白清除羟自由基功能的研究 [J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 1999, 35(2): 573–576.
- [7] PALMITER R D, FINDLEY S D, WHITMORE T E, et al. MT-III, A Brain-Specific Member of the Metallothionein Gene Family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(14): 6333–6337.
- [8] 杜小兵, 翟军鹏, 崔萌, 等. 类植物螯合肽的原核表达与 Zn^{2+} 螯合能力分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(12): 25–29.
- [9] 仪慧兰, 吕品, 吴丽华. 转 MT 工程菌的构建及其对重金属的抗性研究 [J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 2012, (2): 395–399.
- [10] YANG F, ZHOU M, HE Z, et al. High-Yield Expression in *Escherichia coli* of Soluble Human MT2A with Native Functions [J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(1): 186–194.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 237–303.
- [12] CHEN H, NELSON R S, SHERWOOD J L. Enhanced Recovery of Transforms of *Agrobacterium tumefaciens* After Freeze-Thaw Transformation and Drug Selection [J]. *Biotechniques*, 1994, 16(4): 664–670.
- [13] MURASHIGE T, SKOOG F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures [J]. *Physiology Plant*, 1962, 15(3): 473–497.
- [14] 陈红亮, 龙黔, 许华杰. 水培条件下不同浓度镉对辣椒的毒害效应 [J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(6): 12–15.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所. *土壤理化分析* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978: 360–361.
- [16] GRAHAM R D, ASCHER J S, HYNES S C. Selecting Zinc-Efficient Cereal Genotypes for Soils of Low Zinc Status [J]. *Plant and Soil*, 1992, 146(1): 241–250.
- [17] 生吉萍, 李汉臣, 刘开朗, 等. 转小鼠金属硫蛋白(MT)基因烟草不同器官中金属离子铅和锌的分布 [J]. *光谱学与光谱分析杂志*, 2008, 28(10): 2401–2403.

Homo sapiens Metallothionein 1L (HsMT1L) Enhances the Accumulation of Zinc in Tomato Seedlings

SONG Xiao-mei, CHEN Meng-ying, QIN Xiao-dong, JIN Xin-kai,
LI Jin-hua, PAN Yu, SU Cheng-gang, ZHANG Xing-guo

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Metallothionein (MT) has the functions of radio-resistance, oxidation-resistance and heavy-metal detoxification, and has a high binding capacity to Zn^{2+} , and hence it has potential application value in medicine, agriculture, environment protection, health care, and others. In this study, *HsMT1L*, a metallothionein 1-like gene from human, which is controlled by cauliflower mosaic virus 35S promoter containing duplicated enhancer sequence (2x35S), was introduced into the genome of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Ailsa Craig). The results showed that the tomato seedlings containing the 2x35S-HsMT1L exhibited higher Zn^{2+} tolerance and higher Zn^{2+} accumulation in the plant than the wild type.

Key words: *Homo sapiens* metallothionein 1L gene (*HsMT1L*); *Solanum lycopersicum*; seedling; zinc

