

青稞抗旱基因 *HVUL1H24632.2* 的功能验证

于明寨,杨春葆,巴桑玉珍*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/西藏自治区农牧科学院农科研究所 西藏 拉萨 850032)

摘要:本研究选择水稻为受体材料,通过农杆菌 EHA105 侵染水稻愈伤组织的方法转化水稻,对转基因水稻和非转基因水稻模拟干旱处理,然后对逆境处理下的转基因和非转基因材料叶片进行 POD, SOD, Pro 的检测。结果显示,对照组样品逆境处理下含量明显上升,对于旱胁迫反应敏感,而转基因材料有一定程度上升,上升速度较慢,对于旱胁迫反应不敏感,说明转基因水稻具有一定的抗逆能力。

关键词:青稞;抗旱;功能基因验证

中图分类号:S512.3

文献标志码:A

Functional Verification of Drought Resistance Gene *HVul1H24632.2* of Highland Barley

YU Mingzhai, YANG Chunbao, Basangyuzhen*

(State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement/ Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: This study selected rice as receptor material. Rice was transformed by Agrobacterium EHA105 infecting callus of rice. Drought were simulated for transgenic rice and non-transgenic rice. Then, POD, SOD and Pro were detected in transgenic and non-transgenic rice leaves under stress treatment. The content of POD, SOD and Pro was statistically analyzed, The results showed that the contents of POD, SOD and Pro in CK group increased significantly under stress treatment, which showed non-transgenic rice was sensitive to drought stress response. While the contents of POD, SOD and Pro in transgenic materials increased to a certain extent, but the rise rate was slower, which showed that the transgenic materials was not sensitive to drought stress response. It shows that transgenic rice has a certain ability of stress resistance.

Key Words: highland barley; drought; functional verification

青稞占西藏农作物播种面积的一半以上,是西藏最主要的粮食作物。在青藏高原上,青稞的种植约有 3 500 年的历史,具有广泛的药用以及营养价值,是西藏四宝之首糌粑的主要原料^[1]。因此提高青稞品质产量对西藏农牧民增产增收具有重要意义^[2]。

干旱是威胁世界作物栽培和生产的严重问题之一,是导致农作物减产的最严重制约因素,所造成减产超过其他非生物胁迫的总和。近年来,随着

全球变暖的影响,降雨不规律以及用水不当都会导致全球农作物生产面临越来越严峻的干旱威胁,严重制约全球农业生产发展^[3]。因此,从西藏农业发展以及西藏粮食安全来说,研究青稞对于旱胁迫的响应及机制都有非常重要的意义。

本研究以前序研究得到的转录组数据与全基因组甲基化数据为基础^[4],挖掘其中差异表达的基因,并通过 BLASTP 进行比对,对候选目的基因进行注释,选择水稻为受体材料,探究干旱胁迫对其生理、生化指标表达水平的影响^[5],以期明确 *HVUL1H24632.2* 基因序列的生物学功能。

收稿日期:2021-03-09

基金项目:省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室自主课题(XZNKY-2020-C-007Z10)。

作者简介:于明寨(1986-),男,助理研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:fengyouyuht@126.com;*为通讯作者:巴桑玉珍(1979-),女,副研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:alipulan@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验仪器

试验仪器主要有: NanoDrop™ One/OneC 超微量紫外分光光度计, 冷冻离心机, 凝胶电泳仪, PCR 仪, 恒温水浴锅, 摇床酶标仪(450 nm), 高精度微量加样器及枪头(0.5~10 uL, 2~20 uL, 20~200 uL, 200~1 000 uL), 37 °C恒温箱等。

1.1.2 试验试剂

试验试剂包括: 总 RNA 提取试剂盒, Taq plus DNA 聚合酶, 水饱和酚, cDNA 合成的反转录试剂盒, DNA Marker DL 2000, SYBR®Premix Ex Taq™、植物(Plant)过氧化物酶(POD)-微量测试 Kit, 植物(Plant)超氧化物歧化酶(SOD)-微量测试 Kit, 植物(Plant)脯氨酸(proline)-微量测试 Kit 等。

1.1.3 试验材料

青稞种子、水稻种子; 载体: pBWA(V)BS-CCDB。

1.2 方法

1.2.1 目的基因筛选

通过转录组数据与全基因组甲基化数据, 挖掘其中差异表达基因, 并通过 BLASTP 进行比对, 对候选目的基因进行注释。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

以 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒方法的方法来提取总 RNA(表 1)^[6]。然后以 Roche 公司反转录试剂盒的操作说明反转录获得 cDNA(表 2)^[7]。

表 1 总 RNA 提取

试剂	体积/ μ l
总 RNA	12
oligo(dT)18 锚定引物	1

表 2 反转录获取 cDNA

试剂	体积/ μ l
反转录反应缓冲液(5 \times)	4
RNA 酶抑制剂(RI)(40 U/ μ L)	0.5
dNTP Mix(10 mM)	2
逆转录酶(RT)(20 U/ μ L)	0.5

1.2.3 目的基因的扩增

按照表 3、表 4 中的体系和程序对 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增完的 PCR 产物, 用琼脂糖凝胶电泳进行检测^[8]。然后用 QIAquick®Gel Extraction Kit 试剂盒对目的条带进行切胶回收纯化^[9]。

表 3 PCR 反应体系(20 μ L)

试剂	体积/ μ l
模板 cDNA	0.5 μ l
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
Taq Master Mix(2 \times)	10 μ l
ddH ₂ O	7.5 μ l

表 4 PCR 的反应程序

温度/ $^{\circ}$ C	时间/min	循环数
95	300	1
95	30	35
50	30	
72	90	
72	10	1
4	9 999	1

1.2.4 表达载体构建

用 Eco31I 酶切载体 pBWA(V)BS-CCDB, 扩增的片段用 Eco31I 进行酶切, 回收后连接(表 5)。将连接好的重组产物转化到 DH5 α 感受态细胞中^[10], 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证(表 6)^[11], 最后将验证结果阳性的菌液送去测序。将测序正确的重组表达载体转化农杆菌 EHA105。

表 5 连接反应(10 μ l)

试剂	体积/ μ l
H ₂ O	4
Buffer	1
T4-ligase	1
pBWA(V)BS-ccDB	1
目的片段	3

表 6 菌落阳性验证(20 μ l)

试剂	体积/ μ l
菌液	4
上游引物	1
下游引物	1
Taq Master Mix(2 \times)	10
ddH ₂ O	4

1.2.5 抗性水稻苗的获取

通过农杆菌 EHA105 侵染水稻愈伤组织的方法转化水稻。之后用抗性基因特异引物,常规 PCR 法扩增检测水稻苗是否含有抗性基因。然后对水稻苗进行转基因筛选鉴定^[12]。

1.2.6 转基因幼苗的抗性鉴定

经过转基因阳性筛选,对转基因水稻和对照(非转基因水稻)采用 21% PEG 进行模拟干旱处理。模拟干旱处理 72 h 结束后,取叶片进行 POD、SOD、Pro 的检测。

2 结果与分析

2.1 候选基因分析

根据青稞基因组信息对 *HVUL1H24632.2* 基因序列进行提取,基因序列如下: ATGTCGTCGGAGA AACAGGAGACGACGGCGCGGTGCGCGTGCTGG GCAGATGGCGGAGCCCGTTCGTGATCCGGGTGCT GATAGCCCTTGGGCTCAAGGGCGTCGACCACGAG CTCGTGGAGGAGCGATGGGCAACAAGAGCGAG CTGCTGCTCGCCTCCAACCCGGTGACACAAGATGA TCCCCGTGCTCCTGCACCACGGCAGGCCCGTCTC CGAGTCCCTCATCATCGTCCAGTACGTGACGAG GCCTGGTCTCTCCATGCCCCGGCGCTCCTCCCGTC CGACCCCTACGCCCGGGCGGCCGAGCGGTTCTGG GCGCAGTACGTGACGACAAGTTTCTACGGCGA TCAGGGTGCTGAGGGGAAGGCTGGGCGGAGACA AGGACGAAGCGGCGGTCCAGGTTGCGCGTGCTCT GCAGCGCCTGGAAGTCGCCTTGGTCGAGTGCGGC GGAGGGAAGGATTACTTCGGCGGCGACGGCGTC GGTACCTGGACATTGCTCTGGGGTCGCACCTCG GCTGGATCAGGGCCGTCGAGAGGATCGCTGAACT CAGGCTTCTCGACGAGGCCAAGGTTCTTAAGCTG GCCGCGTGCGCGGATCGGTTCTGCGCCACCCGG CGGTGGCGGACGCGATGCCTGGCGTGAAAGGT TCGTGGAGTTCAGCGTCAAGAATGACGGCGTTCT GAAGGCGGCTAGTGCTAATTCCAAGTGA。对其序列进行 BLAST 分析,同源比对至 *tauschii glutathione S-transferase*(谷胱甘肽转移酶)。谷胱甘肽 S-转移酶普遍参与植物体内干旱、盐、低温、重金属等多种非生物胁迫的调节,是一种植物应对逆境时产生的多功能蛋白酶。当生物体遇到逆境时,谷胱甘

肽转移酶发挥其抗氧化的作用,保护生物体免受逆境的损害,从而提供生物体抗逆能力^[13]。因此同源分析显示该基因对于青稞抗旱具有重要作用。

2.2 重组载体酶切和测序验证

将 PCR 产物与载体框架进行酶切链接,构建重组载体,转化大肠杆菌后挑取菌落经 PCR 鉴定为阳性重组子的单菌落,接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基内,抽提质粒进行酶切鉴定,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 1。重组质粒经酶切后得到片段大小,均与预期大小相符,通过测序比较,序列正确,证明载体构建成功。

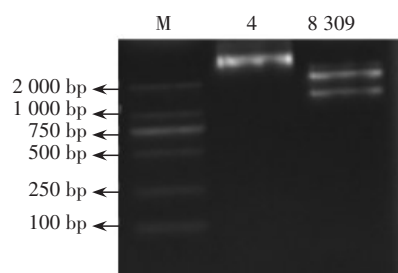


图 1 琼脂糖凝胶电泳

2.3 菌落 PCR 检测

载体构建完成后进行农杆菌转化,对农杆菌进行菌落 PCR 检测,结果如图 2,结果显示已正确进行农杆菌转化。

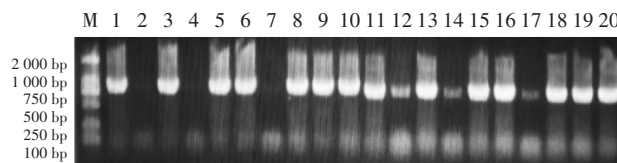


图 2 菌落 PCR 检测结果

2.4 转基因抗性苗筛选基因鉴定

经过诱导转化的转基因株系进行抗性基因的筛选,结果显示转基因苗中都含有潮霉素抗性基因,证明转基因成功(图 3)。

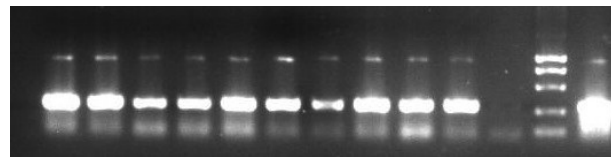


图 3 转基因抗性苗筛选基因鉴定结果

2.5 对转基因 F1 检测

对转基因 T_0 进行自交,收获 F_1 代,进行阳性检测,检测结果如图 4。挑选阳性材料(有条带材料)进行模拟干旱处理。

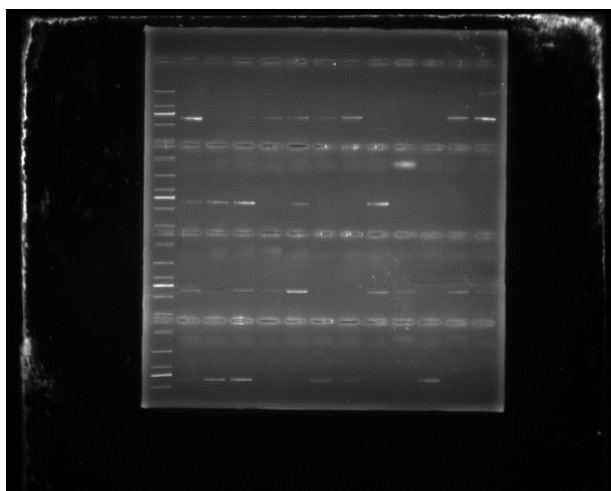


图4 F1代阳性检测结果

2.6 抗逆能力评估

试验对 POD, SOD, Pro 进行测定, 结果显示, 对照(CK)组样品逆境处理下 POD, SOD, Pro 明显上

升, 而转基因材料有一定程度上升, 上升速度较慢, 说明转基因水稻具有一定的抗逆能力(图5)。

3 结论

通过对 *HVULIH24632.2* 基因的序列分析, 评估其与谷胱甘肽转移酶(*tauschii glutathione S-transferase*)同源, 初步评判其具有一定抗旱能力。随后通过载体构建与遗传转化, 对获得的 T0 植株进行检测, 证明 T0 转基因成功。随后通过繁种, 对获得 F1 的 T1 代材料进行阳性检测, 对其中阳性材料进行模拟干旱处理, 结果显示 POD, SOD, Pro 含量上升较慢, 而对照 POD, SOD, Pro 含量上升较快, 表明转基因植株对于干旱胁迫适应能力较强, 植株对于干旱胁迫具有一定抵抗能力, 证明 *HVULIH24632.2* 基因具有一定抗旱能力。

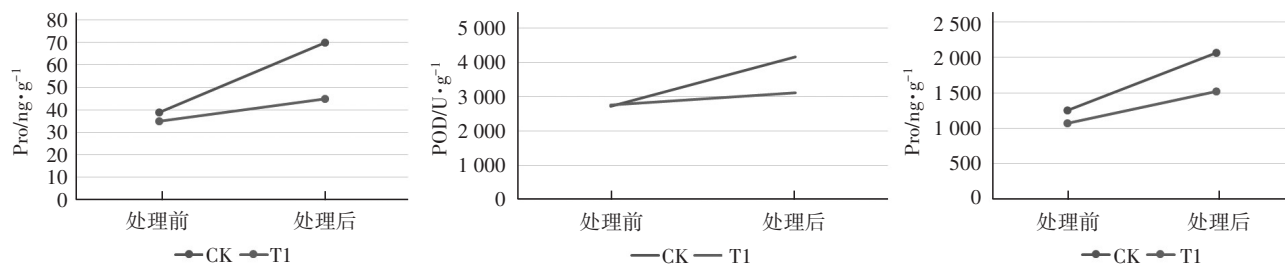


图5 处理前后 POD、SOD、Pro 值的变化

参考文献:

- [1] 马红梅, 尼玛片多, 尼玛普尺, 等. 黑白青稞营养成分分析[J]. 农技服务, 2017, 34(1): 15, 8.
- [2] 程越. 促进西藏农牧民增收问题研究[J]. 中国藏学, 2012(3): 133-137.
- [3] 辛金霞. 一年生黑麦草、高羊茅及杂交羊茅黑麦草抗旱性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [4] 李宁, 李庆贺. 鸡种间基因组甲基化水平的研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(16): 1-3.
- [5] 贺红. 干旱胁迫对水稻育性和抽穗影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [6] 刘小丽, 朱梦晴, 蔡雯洁, 等. 白术根茎的总 RNA 提取方法的比较[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2016, 33(1): 46-49.
- [7] 戴振清. 长非编码 RNA lnc-ALVE1-AS1 表达规律、多态性分析及与鸡抗病表型关联性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [8] 邓慧. 紫杉醇生物合成酶 DBAT 启动子的克隆与植物表达载体的构建[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [9] 张清华. 人 37 LRP 的克隆、表达及多克隆抗体的制备[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2006.
- [10] 黄宁, 曾令兰, 李淑莉. *TGF-β1* 重组腺病毒载体的快速构建及鉴定[J]. 临床消化病杂志, 2007, 19(3): 150-151.
- [11] 杨鑫. 二球悬铃木 AG 基因第二内含子的克隆与功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [12] 魏炘, 黄维藻, 余毅, 等. 水稻 *OsDDB2* 基因过量表达载体的构建及其转化[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2010, 47(5): 1144-1148.
- [13] 雷安平, 陈欢, 黎双飞, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶的功能、应用及克隆表达[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12): 85-91.