

# 利用烟草的 cDNA 酵母表达文库 筛选镉胁迫相关基因

李 静<sup>1,2</sup>, 王 晶<sup>1,2</sup>, 张 美<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院 华南植物园/中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广东 广州 510650;  
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为了鉴定烟草在重金属镉胁迫处理下的功能基因, 构建烟草 cDNA 酵母表达文库, 并利用镉敏感的突变株对文库进行初步筛选。首先将烟草幼苗进行重金属胁迫处理, 然后取幼根提取总 RNA 并纯化 mRNA, 采用 SMART 技术反转录成双链 cDNA, 将 cDNA 与入门载体 pDONR222 的同源重组区连接, 再转到酵母表达载体 pDEST22 上, 构建了 Gateway 技术兼容的酵母 cDNA 表达文库。经检测, 构建的 cDNA 酵母表达文库滴度为  $4.32 \times 10^6$  cfu/mL, 库容量为  $0.86 \times 10^7$  cfu, 平均插入片段长度大于 1 kb, 文库质量较高。通过镉敏感酵母突变株  $\Delta ycf1$  筛选烟草重金属镉胁迫相关基因, 获得酵母单克隆 70 个。经分析可知, 其涉及到谷胱甘肽转移酶、铜分子伴侣及甲硫蛋白等 24 个不同蛋白基因, 初步鉴定为烟草应答重金属镉胁迫的候选基因。

**关键词:** 烟草; 重金属; 镉胁迫; cDNA 文库; 功能基因

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)03-0046-04

## Isolation of Cadmium Stress Related Genes in Tobacco with cDNA Expression Library in Yeast Mutant

LI Jing<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Mei<sup>1\*</sup>

(1. South China Botanical Garden/Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;  
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To facilitate the identification of functional genes in tobacco under heavy metal stress, this study constructed a cDNA expression library with Gateway technology. The tobacco seedlings were treated with different heavy metal solutions, and then the roots were harvested and the total RNAs were extracted. After mRNAs were isolated, the reverse transcription assay was performed with SMART technology. Then the ds-cDNAs were cloned into pDONR222 vector and LR reaction was performed to transfer cDNA into yeast expression vector, pDEST22, finally forming the tobacco cDNA expression library. The average titer of this library was  $4.32 \times 10^6$  cfu/mL, and the quality of the destination cDNA library met the requirements of following experiments. The cadmium stress-related genes of tobacco were screened by using cadmium-sensitive yeast mutation strain  $\Delta ycf1$ , and more than 70 clones were obtained, which involved 24 different genes such as the genes coding glutathione S-transferase, copper chaperone and metallothionein. All of these genes were considered as the candidate genes of heavy metal stress-related genes in tobacco.

**Key words:** tobacco; heavy metal; cadmium stress; cDNA library; functional genes

收稿日期: 2012-10-23

基金项目: 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室基金资助项目 (201220zs)

作者简介: 李 静 (1987-), 女, 陕西白水人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: lijing03120312@126.com

\* 通讯作者: 张 美 (1979-), 女, 河南辉县人, 副研究员, 博士, 主要从事植物基因工程及植物发育分子生物学方面的研究。  
E-mail: zhangmei@scbg.ac.cn

随着我国经济的发展和工业“三废”的大量排放,土壤重金属污染问题日趋严重,并因此引发了对农作物的污染,严重影响了农业经济的正常发展和人类健康。目前,我国遭受重金属污染的耕地面积约占总耕地面积的 1/5<sup>[1]</sup>,重金属污染已成为影响国计民生的重大社会问题。

烟草是植物学研究的模式植物之一,同时也是一种重金属富集植物<sup>[2]</sup>,人们不仅在植物生理生化和逆境胁迫等方面对其进行了系统研究<sup>[3]</sup>,同时也将其作为一种重金属污染地区植物修复的模式植物进行了深入探讨<sup>[4]</sup>。烟草还是一类特殊的经济作物,由于很多烟草种植区域受到重金属的严重污染,而重金属极易被烟草根系吸收并在其体内积累,严重影响烟草的产量及烟草制品的安全性<sup>[5]</sup>。目前,国际癌症研究机构将重金属镉归类为已知的生物毒性最强的重金属之一,其能够稳定积累且不易消除,极易被植物吸收,而且能通过食物链等途径进入人体并在人体内积累<sup>[6]</sup>,从而对人体造成危害。因此,对烟草应答镉污染进行研究,将对烟草分子抗逆育种和促进烟草经济发展具有重要理论意义和潜在应用价值。

酵母镉因子 1(yeast cadmium factor 1, YCF1)是 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)超家族的一员,参与介导包括镉在内的多种重金属离子与谷胱甘肽螯合后的转运和脱毒<sup>[7]</sup>。酵母突变株  $\Delta ycf1$  是将酵母的 YCF1 基因进行了缺失突变,其对重金属镉超敏感,在含有一定浓度镉的培养基上无法生长,根据该特性,可以进行镉离子胁迫相关基因的初步筛选。

目前,已在烟草中鉴定出一些与金属离子转运和积累相关的蛋白<sup>[8]</sup>,但烟草中参与应答重金属镉胁迫的机制有待进一步地深入研究。本研究构建烟草幼根 cDNA 酵母表达文库,并通过转化酵母突变株  $\Delta ycf1$ ,筛选能够恢复酵母突变株镉敏感表型的基因,即烟草在镉处理下的功能基因,为进一步了解烟草应答重金属胁迫的分子和生理机制奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及试剂

试验所用烟草品种 SR1 由中国科学院华南植物园植物表观遗传学课题组保存。酿酒酵母镉敏感突变株  $\Delta ycf1$  购于欧洲酿酒酵母功能分析档案馆(Euroscarf),编号 Euroscarf Y04069,其配子型为 MATa,基因型为 his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0;

ura3 $\Delta$ 0; YDR135c::kanMX4。大肠杆菌(*E. coli*) DH10B、总 RNA 提取试剂 Trizol、FastTrack<sup>®</sup> 2.0 Kit、1 kb Plus DNA Ladder、Platinum Taq DNA Polymerase、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR、First Strand Buffer、100 mmol/L dNTP Set、Mini Plasmid DNA Purification Kit 等均购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 植物材料的准备 取烟草品种 SR1 种子播种在蛭石中,于温室内培养长至 1 cm 株高,然后转至烟草水培培养液中,生长 2 周。在水培液中分别添加 0.1 mmol/L CdCl<sub>2</sub>、2 mmol/L Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、1 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 和 2 mmol/L MnSO<sub>4</sub> 胁迫处理 48 h。取处理后幼苗的根,于液氮中速冻后存放于 -80 °C 冰箱中保存,用于构建文库。

1.2.2 RNA 的提取与 mRNA 纯化 取 100 mg 混合幼根样品,在预冷的研钵中用液氮研成粉末,加入 1 mL Trizol 试剂,振荡混匀后,静置放置 5 min 以充分裂解细胞。加入 0.2 mL 氯仿,混合均匀,离心取上清,加入等体积异丙醇沉淀 RNA,然后用 70%乙醇洗涤 2 次,溶解于 50  $\mu$ L DEPC 处理过的水中。然后参照 FastTrack<sup>®</sup> 2.0 Kit 说明书进行 mRNA 纯化。

1.2.3 cDNA 初级文库的构建 取 3  $\mu$ g 烟草 mRNA 溶于 9  $\mu$ L DEPC 水中,加入 biotin-attB2-Oligo(dT) Primer (30  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L、65 °C 5 min,降温至 45 °C,2 min,再加入 5 $\times$ First Strand Buffer 4  $\mu$ L、DTT(0.1 mol/L)2  $\mu$ L、45 °C 2 min,最后加入 SuperScript III RT 酶 3  $\mu$ L、45 °C 60 min,合成第一链;再加入 DNA Ligase、RNaseH、DNA Polymerase I 等合成第二链,并将双链 cDNA 与 attB1 重组接头连接。为保证文库质量,使用分级柱去除分子量小于 500 bp 的小片段 cDNA,然后将所得到的 cDNA 与载体 pDONR222 进行 BP 重组反应,转化大肠杆菌 DH10B,获得初级文库菌液。

取转化后的原始菌液 10  $\mu$ L,稀释 1 000 倍后从中取出 50  $\mu$ L 涂布于 LB 平板(含有氨苄青霉素抗性),第 2 天进行计数分析,检测文库滴度和库容量。随机挑取 24 个克隆进行 PCR 鉴定,检测插入片段长度并计算重组率。

1.2.4 cDNA 表达文库的构建 将构建好的 cDNA 文库摇菌,提取质粒,加入 LR Clonase II Mix 与 pDEST22 进行 LR 重组反应,转化大肠杆菌 DH10B,获得目的文库(二级文库)菌液。取部分菌

液检测文库质量(方法同 1.2.3),剩余培养物加入 20%甘油存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱,此即为 cDNA 表达文库原始菌液。

**1.2.5 烟草 cDNA 文库扩增** 根据文库的滴度,用直径 14 cm 的 LB 平板培养基进行扩增培养。具体步骤如下:将文库菌液均匀地涂布于加有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上,于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中过夜培养至长出肉眼可见的菌落。之后在每个平板上加 3~5 mL 液体 LB 培养基将菌落洗脱下来,提取质粒,该质粒即为文库质粒。

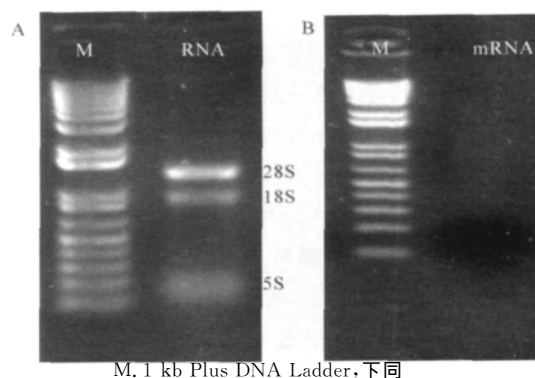
**1.2.6 酵母表达文库质粒转化突变株  $\Delta ycf1$**  将酵母突变株  $\Delta ycf1$  于 YPD 液体培养基中振荡培养至  $\text{OD}_{600}$  约为 0.6,用醋酸锂法将文库质粒转化  $\Delta ycf1$ ,分别涂布于不含  $\text{CdCl}_2$  的 YNB 筛选培养基(对照组)和含  $0.1\text{ mmol/L CdCl}_2$  的 YNB 筛选培养基(试验组)上, $30^{\circ}\text{C}$  倒置培养 5~10 d,直到试验组平板出现转化子,挑取单菌落进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草总 RNA 的提取及 mRNA 分离

提取的烟草总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可以看到清晰的 28S、18S 和 5S 特征条带(图 1A),

表明所提取的总 RNA 纯度和完整性较高。分离的 mRNA 呈现弥散状,无明显区带,但大部分集中在  $1.0\sim 2.0\text{ kb}$ (图 1B),说明 mRNA 纯度较高,无 DNA 污染,满足后续试验要求。



M, 1 kb Plus DNA Ladder, 下同

图 1 重金属胁迫后烟草幼根总 RNA 及分离 mRNA 的电泳检测图谱

### 2.2 烟草 cDNA 文库质量鉴定

**2.2.1 初级 cDNA 文库的质量鉴定** 经检测,初级文库滴度为  $1.5\times 10^6\text{ cfu/mL}$ ,容量为  $0.75\times 10^7\text{ cfu}$ 。随机挑取 24 个克隆进行 PCR 鉴定,电泳结果如图 2,可见重组率大于 91%,平均插入片段长度大于 1 kb,文库质量较好。

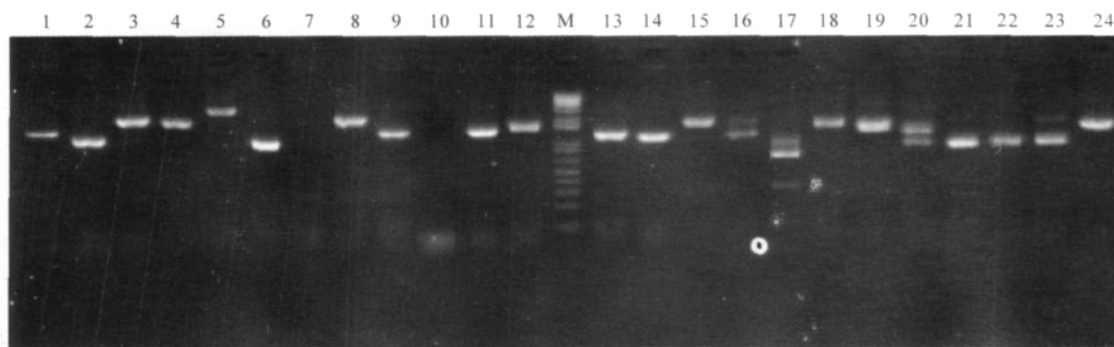


图 2 初级文库插入片段 PCR 鉴定结果

**2.2.2 酵母 cDNA 目的文库的质量鉴定** 经检测,酵母 cDNA 目的文库滴度为  $4.32\times 10^6\text{ cfu/mL}$ ,库容量为  $0.86\times 10^7\text{ cfu}$ 。随机提取 24 个克隆提取质粒,PCR 扩增后电泳结果如图 3,表明重组率

为 98%,平均插入片段长度大于 1 kb。

### 2.3 镉胁迫下功能基因的筛选

利用醋酸锂法将文库质粒转化酵母突变株  $\Delta ycf1$ ,涂布在含有  $0.1\text{ mmol/L CdCl}_2$  的 YNB 筛

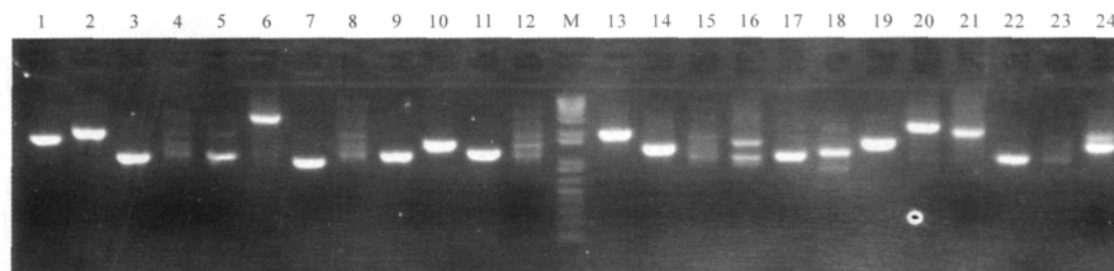


图 3 目的文库插入片段 PCR 鉴定结果

选培养基上培养,获得 70 个能够恢复镉敏感表型的酵母单克隆(图 4),提取质粒后测序,分析发现,其包括谷胱甘肽转移酶、铜分子伴侣、金属硫蛋白以及甲硫蛋白等 24 个不同蛋白基因。目前,这些基因的功能还在进一步的研究中。

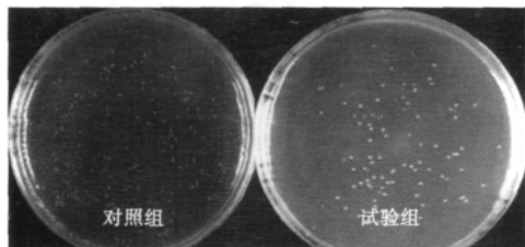


图 4 酵母转化及筛选结果

### 3 结论与讨论

本研究基于 Gateway 克隆技术操作平台<sup>[9-10]</sup>,成功构建了烟草 cDNA 酵母表达文库,经检测,目的文库滴度为  $4.32 \times 10^6$  cfu/mL,库容量为  $0.86 \times 10^7$  cfu,平均插入片段长度大于 1 kb,文库质量较高。利用 Gateway 技术构建酵母表达文库,克服了传统文库构建过程中使用限制性内切酶和连接酶的局限性,并且由于 Gateway 入门载体两端接头不同,实现了定向克隆<sup>[11]</sup>,具有阳性克隆率高、构建快速的特点。

酵母突变株  $\Delta ycf1$  因与重金属运输和脱毒相关的 YCF1 因子发生突变,对一定浓度的镉离子敏感。本研究基于该突变株的特点,利用烟草 cDNA 酵母表达文库,筛选能够恢复突变株镉敏感表型的酵母单克隆,共获得 70 个单克隆,经分析可知,其涉及到谷胱甘肽转移酶、铜分子伴侣以及金属硫蛋白等 24 个不同蛋白基因。通过烟草 cDNA 酵母表达文库初步筛选出的镉胁迫相关功能基因,有些已有相关研究,如甲硫蛋白基因,目前在遏蓝菜属、拟南芥、苜蓿等植物中都有研究和报道<sup>[12-14]</sup>,该基因的超量表达能够提高植物对重金属的耐受性。在烟草中,候选功能基因参与应答重金属胁迫的相关分子机制并不十分明确,还需要进一步深入研究,以找到重金属镉胁迫相关的完整信号通路,阐明烟草应答重金属胁迫的分子和生理机制,从而为烟草分子育种奠定理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Zhou Q X, Song Y F. Principle and methods of contaminated soil remediation [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [2] 杨勇,王巍,江荣风,等. 超累积植物与高生物量植物提

取镉效率的比较[J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2732-2737.

- [3] 岑怡红,沙波. 烟草的抗逆性研究进展[J]. 北京农业研究学报, 2012, 3(1): 44-46.
- [4] McGrath S P, Zhao F J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14: 277-282.
- [5] 张艳玲,周汉平. 烟草重金属研究概述[J]. 烟草科技, 2004, 5(1): 20-27.
- [6] Liu J R, Bhuiyan M S U, Min S R, et al. Overexpression of a yeast cadmium factor 1 (YCF1) enhances heavy metal tolerance and accumulation in *Brassica juncea*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2011, 105(1): 85-91.
- [7] Prévérat S, Ansoborlo E, Mari S, et al. Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine[J]. Biochimie, 2006, 88: 1651-1663.
- [8] Shingu Y, Kudo T, Ohsato S, et al. Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 331: 675-680.
- [9] Gomes M D, Lecker S H, Jagoe R T, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy [J]. PNAS, 2001, 98(25): 14440-14445.
- [10] Walhout A J M, Sordella R, Lu X W, et al. Protein interaction mapping in *C-elegans* using proteins involved in vulval development[J]. Science, 2000, 287: 116-122.
- [11] Suzuki Y, Yoshitomo-Nakagawa K, Maruyama K, et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library [J]. Gene, 1997, 200(1/2): 149-156.
- [12] van der Zaal B J, Neuteboom L W, Pinas J E, et al. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation [J]. Plant Physiology, 1999, 119(3): 1047-1055.
- [13] Persans M W, Nieman K, Salt D E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* [J]. PNAS, 2001, 98(17): 9995-10000.
- [14] Blaudez D, Kohler A, Martin F, et al. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif [J]. Plant Cell, 2003, 15(12): 2911-2928.