

枣树ZjAPX基因植物表达载体构建与功能验证

曹秋芬*, 孟玉平, 郝子琪, 张晓娟, 郭慧娜

(山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031)

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 是植物为防御氧化胁迫而建立的清除活性氧体系——抗坏血酸—谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环中的关键酶。有研究表明 APX 在高等植物中清除活性氧时对底物抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 有极高的专一性, 且能够在较低水平的 AsA 下发挥作用。为了进一步研究枣树 ZjAPX 在植物体内的功能, 构建了 ZjAPX 的植物表达载体, 并将其导入拟南芥, 进行了功能验证和分析。

枣树抗坏血酸过氧化物酶基因 (ZjAPX) cDNA 序列从本课题组构建的壶瓶枣结果枝 cDNA 文库中筛选获得。大肠杆菌 DH5 α 菌株、农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 PEZR (K) -LNY [含黄色荧光蛋白 (YFP) 报告基因] 由本研究室保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Sma* I、*Hind*III、*Bam*H I、DNA Ligation Kit、RNA 酶、*Taq* 酶、dNTP Mixture、PrimeScriptTM RT reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM II, 琼脂糖凝胶 DNA Fragment Purification 试剂盒等均购自大连 TaKaRa (宝生物) 工程有限公司。拟南芥株系由本研究室保存。

(1) ZjAPX 植物表达载体的构建与转基因拟南芥的获得: 根据已获得的枣树抗坏血酸过氧化物酶基因 ZjAPX 的 cDNA 序列设计并合成特异性引物, PCR 扩增出 ZjAPX 基因片段, 并将其构建于植物表达载体 PEZR(K)-LNY。冻融法将植物表达载体转入根癌农杆菌 LBA4404, 获得工程菌 PEZR (K) -LNY-ZjAPX-L; 工程菌株转化拟南芥, 经过筛选获得了 24 株转 ZjAPX 基因的拟南芥植株。

(2) ZjAPX 在拟南芥体内的表达: 对筛选获得的拟南芥植株进行 PCR 鉴定, 对鉴定为转基因植株的拟南芥种子进行 NaCl 胁迫, 在相同胁迫条件下转 ZjAPX 基因的拟南芥种子在萌发期的存活率较野生型高, 且萌发后幼苗根系也比野生型发达; 生长期分别进行 NaCl 和干旱胁迫胁迫: 转 ZjAPX 基因的拟南芥植株均具有比野生型植株较强的耐盐和耐干旱胁迫的能力。采集胁迫处理过的转基因拟南芥植株叶片, 利用荧光定量分析, 结果表明: 转基因株系 ZjAPX 的基因表达量均较对照高。

(3) ZjAPX 在枣树组织培养苗体内的表达: 对辣椒枣组培苗继代和生根培养后, 选取长势较好、基本一致的生根幼苗进行 NaCl 和干旱 (PEG) 胁迫。采集胁迫后的幼苗进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 在 50、100 和 200 mmol \cdot L⁻¹ NaCl 胁迫下, ZjAPX 基因的表达量呈先升高后降低的趋势, 均在 6 h 时表达量最大, 300 mmol \cdot L⁻¹ NaCl 胁迫时, 在 3 h 时表达量最大; 在 PEG 的胁迫下, ZjAPX 基因的表达量均表现出先降低后升高的趋势, 0.5 MPa 处理时, 24 h 表达量最大, 0.8 和 1.2 MPa 处理均是在 7 h 时表达量最大。说明 ZjAPX 基因的表达受 NaCl 和干旱胁迫的诱导。

关键词: 枣; ZjAPX 基因; 植物表达载体; 功能鉴定

中图分类号: S 665.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2496-01

收稿日期: 2011-08-01

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (2010011038-2)

* E-mail: caoqiufeng@yahoo.com.cn; Tel: 0351-7965529