

doi:10.11937/bfyy.20172087

罗布麻 *eIF-5A* 基因功能

王 雷^{1,2}, 孙 尧², 李 瑶², 吴 琼², 夏新莉¹

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 黑龙江省科学院 高技术研究院, 黑龙江 哈尔滨 150020)

摘 要:以罗布麻为试材, 采用农杆菌介导法将罗布麻 *eIF-5A* 基因导入烟草, 分别对正常生长条件和 NaHCO_3 胁迫下转 *AveIF-5A* 基因烟草和非转基因烟草的过氧化氢酶(POD)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量进行测定, 以期对罗布麻 *eIF-5A* 基因功能研究提供参考。结果表明: 正常生长条件下, 转 *AveIF-5A* 基因烟草和非转基因烟草 POD 活性和 MDA 含量差异不显著, 转基因植株 SOD 活性显著高于非转基因植株; 在 NaHCO_3 胁迫下, 转 *AveIF-5A* 基因烟草 POD 活性和 SOD 活性均极显著高于非转基因植株, 而 MDA 含量极显著低于非转基因植株。 *AveIF-5A* 基因过量表达可以提高转基因烟草的耐盐能力。

关键词:罗布麻; 真核细胞蛋白翻译起始因子; 烟草; 抗逆性

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0190-04

罗布麻(*Apocynum venetum* L.)属夹竹桃科罗布麻属多年生植物, 在我国新疆、青海、甘肃、宁夏、山东等省区均有分布^[1]。罗布麻药用价值极高, 其叶中含有芸香甙、槲皮素等成分^[2-3], 对高血压、高血脂、感冒、咳嗽有很好的疗效。罗布麻具有很高的纤维价值, 其纤维柔韧细长、有光泽、抗拉力强, 品质优于长绒棉、亚麻、苧麻、大麻^[4]。罗布麻抗逆性极强, 耐寒、耐旱、抗风、耐盐碱、耐高温, 适于多种气候和土质^[5-6]。目前, 关于罗布麻的研究多集中于药用成分和作用机理的研究, 对其抗逆分子生物学研究相对较少^[7]。

eIF-5A (eukaryotic translation initiation factor)是真核细胞蛋白翻译起始因子, 在真核细胞内普遍存在。 *eIF-5A* 与细胞中的许多生命活动相关, 例如蛋白质翻译、翻译后的折叠修饰、

mRNA 降解、细胞增殖、细胞周期转化等^[8-9]。关于 *eIF-5A* 的研究在人体^[10]、动物^[11]和酵母^[12]中报道较多, 在植物中的研究相对较少。虽已从柽柳^[13]、月季^[14]、小麦^[15]等植物中克隆获得了 *eIF-5A* 基因, 但是 *eIF-5A* 在植物生长发育、抗逆胁迫过程中的生物学功能并不十分清楚。

该研究从抗逆性极强、且具有药用价值和经济价值的植物—罗布麻中克隆 *eIF-5A* 基因(*AveIF-5A*)的基础上, 为进一步验证 *eIF-5A* 基因的功能, 构建 *eIF-5A* 基因植物表达载体, 通过农杆菌介导法转化烟草, 对转基因植株进行分子生物学检测和抗逆性分析, 确定 *eIF-5A* 基因过量表达对植物抗逆性的影响, 从而对该基因的功能进行鉴定。该研究为进一步揭示罗布麻 *eIF-5A* 基因在逆境条件下的生物学功能奠定基础, 也为该基因在抗逆基因工程育种中的应用提供参考依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为烟草(*Nicotiana tobacom* L.)种

第一作者简介:王雷(1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为植物抗逆生理和分子生物学。E-mail: wleileiyu@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31400576); 林木遗传育种国家重点实验室开放基金资助项目(K2013102)。

收稿日期:2017-07-18

子。用 10% NaClO 浸泡烟草种子 3 min, 无菌水冲洗 3~4 遍, 接种于 MS 培养基上, 昼/夜温度为 26 °C/22 °C, 光照 16 h · d⁻¹, 黑暗 8 h · d⁻¹。待长出无菌苗后, 挑选长势良好的幼苗用于遗传转化。

1.2 试验方法

1.2.1 转 *AveIF-5A* 基因烟草获得及分子检测

前期工作中, 课题组已从罗布麻叶片中克隆获得 *AveIF-5A* 基因全长 cDNA 序列^[16], 将其构建到植物表达载体 pBI121 上, 转化农杆菌 EHA105, 采用农杆菌介导的叶盘法对烟草进行遗传转化, 具体操作过程见李凤娟^[17]的方法。对 T₀ 代的转基因烟草进行 PCR 和 RT-PCR 检测, PCR 产物进行测序。对 T₀ 代阳性植株的种子进行回收, 并将其接种于含有 100 mg · L⁻¹ 卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 的 MS 培养基上进行抗性筛选, 获得的 T₁ 代 Kan 抗性苗进行 PCR 和 RT-PCR 检测, PCR 产物测序正确的转基因烟草移栽到营养土: 蛭石: 珍珠岩 (4: 1: 2) 的营养基质中培养, 30 d 后用于逆境胁迫试验。

1.2.2 转 *AveIF-5A* 基因烟草生理指标检测

将 T₁ 代转 *AveIF-5A* 基因烟草 (T-1~T-5) 和非转基因烟草 (SR) 同时用 0.25 mol · L⁻¹

NaHCO₃ 进行胁迫处理, 2 周后对正常生长和 NaHCO₃ 胁迫的转基因植株和非转基因植株进行 POD、SOD 活性及 MDA 含量测定, 每株系重复 3 次。

1.3 项目测定

采用愈创木酚法测定罗布麻叶片 POD 活性, 采用氮蓝四唑 (NBT) 光化学还原法测定 SOD 活性, 采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量^[18-19]。

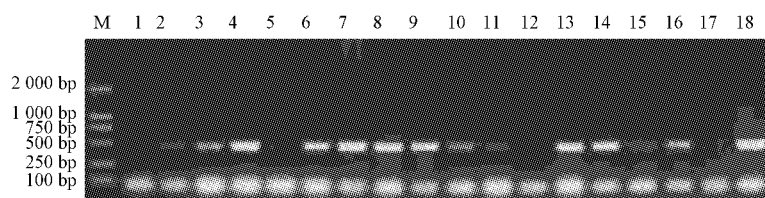
1.4 数据分析

利用 SPSS 16.0 统计软件对试验数据进行单因素方差分析^[20]。

2 结果与分析

2.1 转 *AveIF-5A* 基因烟草分子检测

提取 Kan 抗性植株的 DNA 并进行 PCR 检测, 对 PCR 检测为阳性的植株进行总 RNA 提取, 反转录为 cDNA 后, 进行 RT-PCR 的检测, PCR 产物测序。由图 1 可知, RT-PCR 片段大小与预期插入载体中的目的基因大小一致, RT-PCR 产物测序结果表明该序列为罗布麻 *eIF-5A* 基因序列。



注: M. DL 2 000, 1~16. 待测样本, 17. 空白对照, 18. 阳性对照。

Note: M. DL 2 000, 1-16. Sample, 17. Blank control, 18. Positive control.

图 1 转 *AveIF-5A* 基因烟草 RT-PCR 检测

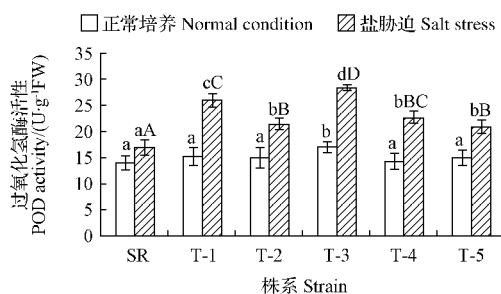
Fig. 1 RT-PCR detection of transgenic *AveIF-5A* tobacco

2.2 NaHCO₃ 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 POD 活性的影响

由图 2 可以看出, 在正常生长条件下, 除 T-3 外, 其它转 *AveIF-5A* 基因烟草与非转基因烟草的 POD 活性差异不显著。在 NaHCO₃ 胁迫条件下, 转 *AveIF-5A* 基因烟草和非转基因烟草 POD 活性均升高, 并且 5 个转基因株系的 POD 活性均极显著高于非转基因植株 ($P < 0.01$)。

2.3 NaHCO₃ 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 SOD 活性的影响

由图 3 可知, 在正常生长条件下, 转 *AveIF-5A* 基因植株 SOD 活性高于非转基因植株, 其中 T-2 株系 SOD 活性显著高于非转基因株系 ($P < 0.05$), T-1、T-3、T-4 株系 SOD 活性极显著高于非转基因株系 ($P < 0.01$); 在 NaHCO₃ 胁迫条件下, 转 *AveIF-5A* 基因植株和非转基因植株 SOD



注:SR 为非转基因植株,T-1~T-5 为转 *AveIF-5A* 基因烟草。大小写字母分别表示差异达极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 水平。下同。

Note: SR, non-transgenic tobacco, T-1 — T-5, transgenic *AveIF-5A* tobacco. Upper-and lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively. The same below.

图2 NaHCO_3 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 POD 活性的影响

Fig. 2 POD activity of transgenic *AveIF-5A* tobacco under NaHCO_3 stress

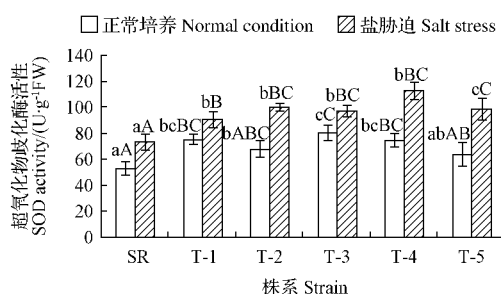


图3 NaHCO_3 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 SOD 活性的影响

Fig. 3 SOD activity of transgenic *AveIF-5A* tobacco under NaHCO_3 stress

活性均升高,并且转基因植株 SOD 活性均极显著高于非转基因植株 ($P < 0.01$)。

2.4 NaHCO_3 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 MDA 含量的影响

由图 4 可以看出,在正常生长条件下,转基因植株和非转基因植株 MDA 含量差异不显著;在 NaHCO_3 胁迫条件下,非转基因植株的 MDA 含量急剧升高,转基因植株 MDA 含量则下降,并且转基因植株 MDA 含量均极显著低于非转基因植株 ($P < 0.01$)。

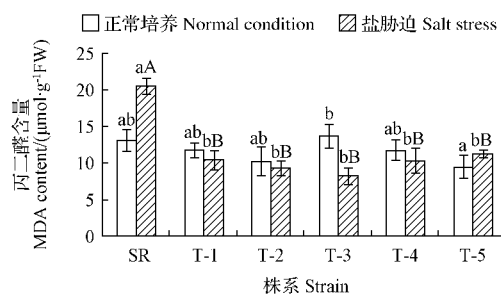


图4 NaHCO_3 胁迫对转 *AveIF-5A* 基因烟草 MDA 含量的影响

Fig. 4 MDA content of transgenic *AveIF-5A* tobacco under NaHCO_3 stress

3 讨论与结论

盐胁迫是影响植物生长与发育的重要环境因子,在盐胁迫下,植物生长缓慢,代谢受到抑制,严重时甚至死亡。如何培育出普适性强的抗盐新品种是解决作物盐害胁迫的关键问题。现代分子生物学及基因工程技术的飞速发展,使人们对植物性状形成的分子基础有了深入的了解,克隆获得了很多抗逆相关基因,对抗逆基因功能的研究为植物分子育种奠定了基础。该研究是在克隆获得罗布麻 *eIF-5A* 基因的基础上,采用反向遗传学的方法将 *AveIF-5A* 导入到烟草中,对正常生长和 NaHCO_3 胁迫条件下转 *AveIF-5A* 基因烟草的 POD、SOD 活性和 MDA 含量进行测定。结果表明,在正常生长条件下,转 *AveIF-5A* 基因烟草和非转基因烟草 POD 活性和 MDA 含量差异不显著,转基因植株的 SOD 活性显著高于非转基因植株;但在 NaHCO_3 胁迫条件下 *AveIF-5A* 基因在烟草中的过量表达,可以极显著增强转基因烟草 POD、SOD 活性,提高转基因烟草清除活性氧的能力。在 NaHCO_3 胁迫下,非转基因烟草 MDA 含量迅速升高,这说明由于 NaHCO_3 胁迫,非转基因植株体内积累大量的活性氧而无法得到有效的清除,使得非转基因植株受到了活性氧的伤害,造成细胞膜脂的过氧化程度加重^[21]。转 *AveIF-5A* 基因烟草 MDA 含量低于未胁迫的水平,这是由于 *AveIF-5A* 基因在烟草中的过量表达,POD、SOD 活性增强,有效清除活性氧,使得转 *AveIF-5A* 基因烟草膜脂免受活性氧的伤害。

综上所述,罗布麻 *eIF-5A* 可能直接或间接地影响 POD、SOD 的活性, *AveIF-5A* 基因的过量表达可以提高植物的耐盐性,是基因工程育种中良好的基因资源。

参考文献

- [1] 张卫明,肖正春,顾龚平,等. 罗布麻资源利用与罗布麻植物分类问题[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(2): 15-19.
- [2] KAMATA K, SEO S, NAKAJIMA J. Constituents from leaves of *Apocynum venetum* L. [J]. J Nat Med, 2008, 62: 160-163.
- [3] 孙仁爽,梁廷. HPLC 法测定复方罗布麻颗粒中槲皮素的含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5160, 5198.
- [4] 李欢,孟家光,李争显,等. 罗布麻功能性纺织品的特性与应用[J]. 国际纺织导报, 2013(6): 10-12.
- [5] 方学良,廖代富. 罗布麻的耐旱、耐盐和耐砂性[J]. 土壤通报, 1979(1): 39-41.
- [6] 王雷,黄国庆,李瑶,等. 逆境胁迫下罗布麻生理响应研究[J]. 北方园艺, 2014(23): 136-138.
- [7] CHEN J, WAN S, LIU H, et al. Overexpression of an *Apocynum venetum* DEAD-Box helicase gene (*AvDHI*) in cotton confers salinity tolerance and increases yield in a saline field[J]. Front Plant Sci, 2016(6): 1227.
- [8] 时广红,王彦珍,魏建华. *eIF-5A* 与 DHS 功能研究及应用进展[J]. 生物技术通报, 2009(5): 21-26.
- [9] SCHMIDT C, BECKER T, HEUER A, et al. Structure of the hypusinated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 44(4): 1944-1951.
- [10] LEE Y B, JOE Y A, WOLFF E C, et al. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A(eIF5A) precursor[J]. Biochem J, 1999, 340: 273-281.
- [11] 王利凤,黄向炜,林浴霜. 文昌鱼 *eIF5A* 基因的克隆和进化分析[J]. 山东大学学报(理学版), 2004, 39(6): 112-115.
- [12] VALENTINI S R, CASOLARI J M, OLIVEIRA C C, et al. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling[J]. Genetics, 2002, 160: 393-405.
- [13] 王留强. 柞柳真核起始因子 5A(eIF5A)基因的功能研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2012.
- [14] 徐健遥. 月季真核生物起始因子 5A(eIF5A)基因的功能研究[D]. 上海:复旦大学, 2010.
- [15] 周建平,杨足君,冯娟. 小麦蛋白翻译起始因子 5A 基因(*eIF5A*)的克隆与分析[J]. 遗传, 2006, 28(5): 571-577.
- [16] WANG L, HUANG G Q, SUN Y, et al. Cloning and expression analysis of *eIF-5A* gene in *Apocynum venetum* [J]. Biotechnol Biotech EQ, 2016(4): 1-8.
- [17] 李凤娟. 植物铁蛋白基因表达载体的构建及对烟草和杨树的遗传转化[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2007.
- [18] 郝建军,刘延吉. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳:辽宁农业科学技术出版社, 2001: 71-73, 144-145, 180-181.
- [19] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2003: 123-124, 268-269, 274-276.
- [20] 朱洪文,宋力. 应用统计[M]. 北京:高等教育出版社, 2004: 188-199.
- [21] STOHS S J, BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 18(2): 321-336.

Function of *eIF-5A* Gene in *Apocynum venetum* L.

WANG Lei^{1,2}, SUN Yao², LI Yao², WU Qiong², XIA Xinli¹

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. Institute of Advanced Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150020)

Abstract: To understand the effect of *eIF-5A* gene in response to salt stress, the *eIF-5A* cDNA fragment containing an ORF from *Apocynum venetum* was transformed into tobacco by *Agrobacterium*-mediated method. The POD activity, SOD activity and MDA content were measured between transgenic *AveIF-5A* tobaccos and wild type under normal condition and NaHCO₃ stress. The results showed that there was no significant difference in POD activity and MDA content between transgenic and non-transgenic plants under normal condition but SOD activity of transgenic plants increased significantly. Under salt stress, transgenic tobacco over-expressing *AveIF-5A* gene showed an increase in POD and SOD activity, compared to wild lines. In contrast, transgenic tobacco displayed a decrease in MDA content under NaHCO₃ stress. Overall, these results indicated that *AveIF-5A* gene played a critical role in salt tolerance in transgenic tobacco.

Keywords: *Apocynum venetum*; *eIF-5A*; tobacco; stress resistance