

## 突变肠杆菌株 NRS-1 中 5 个草甘膦逆境 应答基因的克隆与功能研究

费云燕 盖钧镒 赵团结\*

(南京农业大学大豆研究所 国家大豆改良中心 农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/  
作物遗传与种质创新国家重点实验室 江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】微生物对草甘膦的抗性受复杂的遗传体系调控,涉及靶基因和大量相关调控基因。对肠杆菌属细菌 NRS-1 突变菌株在高浓度草甘膦逆境下的 5 个重要差异表达基因进行功能研究,以期深入了解非靶标基因在抗草甘膦微生物的作用特点,为发掘优异基因资源,服务抗草甘膦转基因生物育种提供参考。【方法】NRS-1 的差异表达基因可能在蛋白质合成、代谢、细胞膜等水平发挥作用,保护细胞免受高浓度草甘膦逆境,因此分别选取易位酶延伸因子 *fusA*、丁二酸脱氢酶 *sdhA*、胸苷磷酸化酶 *deoA*、鸟氨酸氨甲酰转移酶 *argF*、周质蛋白 *osmY* 进行克隆,采用大肠杆菌原核表达、转化拟南芥实验研究其功能,并通过细菌双杂及 KEGG pathway 分析基因间互作特点。【结果】在明确 5 个基因结构特点基础上,通过大肠杆菌原核表达及转基因拟南芥鉴定,发现这 5 个基因及草甘膦的靶基因 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *aroA* 对提高 2 种生物的草甘膦耐性均有不同程度的作用,其中 *argF*、*deoA* 的抗性较好,与 *aroA* 相当,表明在应对草甘膦逆境时,芳香族、含有胸腺嘧啶氨基酸及精氨酸的合成代谢通路可能起重要作用;利用基因互作与 KEGG 分析发现 5 个基因与靶基因 *aroA* 间形成复杂的调控网络,但无直接的蛋白互作。【结论】NRS-1 的 5 个差异表达基因对草甘膦逆境具有抗性,*argF*、*deoA* 优于其他 3 个基因,其与靶基因 *aroA* 间表现复杂的基因互作关系。

**关键词:** 肠杆菌, 抗草甘膦, 差异表达基因, 基因互作, 调控网络

**Foundation item:** The MOA Special Project for Transgenic Crop Breeding (No. 2014ZX08004001-010); The MOE Program (No. PCSIRT13073); The Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production Program (No. JCIC-MCP); National Natural Science Foundation of China (No. 31571691)

\*Corresponding author: E-mail: tjzhao@njau.edu.cn

Received: September 10, 2015; Accepted: January 12, 2016

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项项目(No. 2014ZX08004001-010); 长江学者和创新团队发展计划项目(No. PCSIRT13073); 江苏省现代作物生产协同创新中心项目(No. JCIC-MCP); 国家自然科学基金面上项目(No. 31571691)

\*通讯作者: E-mail: tjzhao@njau.edu.cn

收稿日期: 2015-09-10; 接受日期: 2016-01-12

## Cloning and functional analysis of 5 glyphosate-response-genes in mutant *Enterobacter* NRS-1 strain

FEI Yun-Yan GAI Jun-Yi ZHAO Tuan-Jie\*

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University, National Center for Soybean Improvement, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of soybean, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract: [Objective]** The mechanism of microbe's tolerance to glyphosate stress is controlled by complex genetic systems including the target gene and many related regulation genes. In the present study, five different expression genes (DEGs) of a mutant *Enterobacter* strain NRS-1 were identified, the function and interaction were investigated to reveal the role of non-target genes on glyphosate resistance. The work intends to provide potential gene resources for transgenic breeding of glyphosate resistance. **[Methods]** DEGs of NRS-1 may play a role on the processes of protein biosynthesis, metabolism, cell membrane etc. Accordingly, five DEGs, encoding elongation factor G (*fusA*), periplasmic protein (*osmY*), ornithine carbamoyltransferase 2, chain F (*argF*), thymidine phosphorylase (*deoA*), succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (*sdhA*), were selected. The sequences of the genes were obtained through T-A cloning, the functions were detected through analyses of prokaryotic expression and transgenic programs. Moreover, the interaction between five genes and the glyphosate-target gene *aroA* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) was also detected using bacteria two-hybrid system and KEGG pathway bioinformatic analysis. **[Results]** The characteristic of five genes was revealed. According to the performance of prokaryotic expression and transgenic *Arabidopsis thaliana*, genes were confirmed to help cell to improve the tolerance to glyphosate. The genes *argF*, *deoA* have better resistance trait than other genes, similar as the target gene *aroA*. It seems that the pathways including the synthesis and metabolism of aromatic amino acids, amine acids containing thymine and arginine might be important for NRS-1 to tolerant to glyphosate. Regulation network showed a complicated relationship between the five selected gene and *aroA*, and no direct interaction was found between them. **[Conclusion]** The selected five genes had positive effects on the resistance to glyphosate stress, among them, *argF*, *deoA* were better than others. Complex gene interaction could be found between genes and *aroA*.

**Keywords:** *Enterobacter*, Glyphosate tolerance, Different expressed genes, Gene interaction, Gene regulatory network

草甘膦为内吸传导型、非选择性的有机磷类除草剂, 对许多一年生和多年生杂草有极强的控制能力<sup>[1]</sup>, 目前全球销量居首位, 其广泛应用大大减少了杂草给农业带来的经济损失, 抗草甘膦转基因育种是推动该类除草剂发展的动力。受 *aroA* 基因编码的 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS) 是草甘膦的靶标酶, 主要参与莽草酸途径, 抗性 *aroA* 主要通过构象的改变使除草剂无法结合而阻止其对生物的伤害。

抗草甘膦生物中非靶基因的研究也受到一定的关注。目前发现调控草甘膦抗性的非靶基因包括

C-N 键氧化裂解基因, 如草甘膦氧化还原酶基因 *GOX*; 参与裂解 C-P 键的 C-P 裂解酶; 磷酸转移酶基因 *glpA*、*glpB* 和 *igrA*, 甘氨酸氧化酶基因 *GO*; 草甘膦 N-乙酰转移酶基因 *GAT* 使草甘膦发生乙酰化, 无法与 EPSPS 结合, 将草甘膦转化为低毒的乙酰草甘膦; 此外转运蛋白能够主动运输某些磷酸化合物, 推测草甘膦也可能被转运蛋白运出细胞外<sup>[2-4]</sup>。

抗草甘膦基因被广泛应用于转基因育种研究, 如 Barry 等将细菌中获得的 *GOX* 转入小麦获得了抗性植株<sup>[5]</sup>; Peñaloza-Vázquez 等也将磷酸转移酶基因转化烟草, 提高了其抗性<sup>[6]</sup>; 谢龙旭等将抗性基

因 *aroAM12* 转入棉花得到抗草甘膦的棉花<sup>[7]</sup>。在目前被挖掘的一系列抗性基因中, 已被用于商业化转基因作物中的有 *aroA-cp4* (根癌土壤杆菌)、*GOX* (人苍白杆菌)、*2mepsps* (玉米的双突变 *EPSPS*)、*gat* (地衣芽孢杆菌)、*epsps (Ag)* (球形节杆菌)、*mepsps* (玉米的经修饰的 *EPSPS*)、*epsps grg23ace5* [人工合成的类似于 *epsps (Ag)* 的基因]。

目前转基因抗草甘膦生物育种所用的基因主要是 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶, 发掘和利用不同类型的抗草甘膦基因一直受到人们重视。一些研究也发现, 微生物对草甘膦的抗性涉及大量调控不同层面抗性的相关基因, 深入研究和利用这些基因具有重要的理论与应用价值<sup>[8]</sup>。本研究对抗草甘膦肠杆菌突变菌株 NRS-1 中 5 个草甘膦应答基因进行克隆研究, 目前对这些基因与草甘膦的抗性研究较少, 因此本实验期望通过相关实验初步了解这些基因在应对草甘膦逆境中的作用和应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 肠杆菌 NRS-1 为草甘膦抗性菌株, 农杆菌 EHA105 为植物表达菌株, 本实验室保藏。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为质粒克隆宿主、大肠杆菌 BL21 为原核表达菌株, 天根(北京)生化科技有限公司。PMDC83 载体为本实验室保藏; PMD19 载体、Pcold 载体, 日本 TaKaRa 公司。

**1.1.2 培养基和抗生素:** 研究中主要使用的培养基包括 LB 培养基<sup>[3]</sup>、YEB 培养基和 MS 培养基<sup>[7]</sup>。主要抗生素包括氨基青霉素 50 mg/L、卡那霉素

50 mg/L、潮霉素 50 mg/L、利福平 50 mg/L。

**1.1.3 主要试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒, 生工生物(上海)工程有限公司; DNA 聚合酶 KOD-Plus, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 细菌双杂交载体试剂盒中所用菌株及质粒, 重庆医科大学张雪梅、尹一兵教授惠赠; 化学试剂过硫酸铵、甘氨酸、溴酚蓝、考马斯亮蓝、硫酸锌、氯化钙等均为国产分析纯或色谱纯, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 应答高浓度草甘膦逆境重要差异表达基因的筛选与克隆:** 根据肠杆菌 NRS-1 在 60 g/L 草甘膦处理下的基因芯片结果<sup>[8]</sup>, 按照预测的目标基因所在通路、作用特点进行筛选, 结果从 43 个差异表达基因中筛选出 5 个基因用于研究, 包括易位酶延伸因子基因 *fusA*、丁二酸脱氢酶基因 *sdhA*、胸苷磷酸化酶基因 *deoA*、鸟氨酸氨甲酰转移酶基因 *argF*、周质蛋白基因 *osmY*。这些基因从不同层面参与抵御草甘膦逆境, *osmY* 作用于细胞最表层, *sdhA*、*deoA* 和 *argF* 属于代谢水平的保护, *fusA* 则是与核糖体相关的保护。草甘膦的靶基因 *aroA*<sup>[8]</sup> 作为参照基因同样用于基因的功能验证。利用 Primer 3 软件<sup>[9]</sup> 进行引物的设计(表 1), DNA 聚合酶 KOD-Plus 用于基因的 PCR 扩增, PCR 反应体系及程序参照高保真聚合酶 KOD-Plus 简介说明书, PCR 产物导入 PMD19 载体, 详细步骤参照 PMD19 载体说明书, 重组载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 详细步骤参照大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态说明书, 获得的单克隆首先用琼

表 1 基因克隆中所用的引物  
Table 1 The sequences of primers used in gene cloning

基因名 Symbol	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
<i>argF</i>	ATTTTCACACACGGACGGG	ATCGGCATAATGCTGGCA
<i>deoA</i>	CACATTTCCCCGATTCC	ATGTGGCCCATGGTATCAG
<i>sdhA</i>	TCGGTTTTTCGCTACCAG	TTCATCCGCTTCCAGGG CGGCG
<i>fusA</i>	ATGACATATGGCTCGTACAACACCCATCG	ATTCTCGAGCTTACCACGGGCTTCGATAACG
<i>osmY</i>	ATGACTATGACAAGACTGAAGATTTTCG	GCGTTAAAAATGATCTGAAAATAAG

脂糖胶检测, 阳性克隆送上海英骏生物技术(上海)有限公司测序, 获得序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对, 若为肠杆菌属的相应基因, 相应单克隆提取重组质粒保留备用, 同时获得的序列提交 NCBI 数据库。

**1.2.2 目的基因原核表达分析:** 将目的基因在大肠杆菌中表达, 以进一步观察它们对细胞抗草甘膦的作用。限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xba* I 对 6 个基因及 *Pcold* 载体进行双酶切, T4 DNA 连接酶对切割后的载体和基因进行连接, 将构建的重组载体转入大肠杆菌 BL21 (详细步骤、体系及注意事项分别参照限制性内切酶、连接酶、大肠杆菌感受态说明书)。阳性单克隆送英骏生物技术(上海)有限公司测序, 提取正确插入基因的重组载体备用。

将构建好的原核表达载体转化大肠杆菌感受态 BL21 细菌, 37 °C、150 r/min 培养至  $OD_{600}=0.6$ , 保存部分菌株作为诱导前样品, 另一部分菌株用 1 mmol/L IPTG 30 °C 诱导 6 h (蛋白质 *fusA*、*sdhA* 较大, 前期预备实验表明高温使蛋白质完全形成无功能的包涵体, 而诱导温度为 28 °C 时诱导 12 h 能够使菌株正常表达可溶性的功能蛋白), 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌液, 一部分作为诱导后总样品, 另一部分 3 s/5 s 间歇超声 10 min, 破碎细胞以释放蛋白质, 5 000 r/min 离心 1 min, 沉淀作为一部分样品, 上清作为可溶性样品, 利用 SDS-PAGE<sup>[10]</sup>对正确含有基因的 4 份大肠杆菌 BL21 样品进行目的

蛋白的可溶性鉴定。对能够可溶性表达功能蛋白的大肠杆菌进行草甘膦的处理( $V_{培养液}:V_{草甘膦}:V_{菌液}=200:1:20$ ), 以空载为对照, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 观察其生长情况, 3 次重复。

**1.2.3 植物表达验证:** 利用 Gateway 技术<sup>[11]</sup>构建植物表达载体, 含有正确基因的植物表达载体 PMDC83 转入农杆菌感受态 EHA105。将含有正确目的基因的植物表达载体的农杆菌接种于 50 mL 含有卡那霉素和利福平的 YEB 培养基中培养, 28 °C、200 r/min 培养过夜, 2 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用侵染液悬浮至  $OD_{600}$  为 1.2–1.6, 利用滴花法<sup>[12]</sup>进行拟南芥的转化。

转化获得的 T0 代种子在含有潮霉素的 MS 固体培养基中培养, 种植筛选获得阳性苗, 重复相同的步骤, 直至转基因拟南芥至 T3 代。对阳性的转基因苗进行基因的 PCR 验证, 并测序。对正确插入基因的拟南芥进行草甘膦耐性表型检测: 对生长约 14 d 的植株进行草甘膦(终浓度 0.5 mmol/L) 48 h 处理, 观察其表型; 用于 qPCR<sup>[13]</sup>的植株处理 24 h, 每隔 6 h 取一次样, Primer 3 软件设计相应的引物<sup>[9]</sup>(表 2), 每个实验 3 次重复。

**1.2.4 应答基因 KEGG 的信息学分析:** 以大肠杆菌基因信息为基准, 利用 ClueGo<sup>[14]</sup>软件对 NRS-1 在 60 g/L 草甘膦处理下的基因芯片结果中包括 5 个目的基因在内的 24 个差异表达基因<sup>[8]</sup>与 *aroA* 的关系进行的信息学分析, 具体步骤见软件说明书, 重

表 2 转基因拟南芥 qPCR 引物  
Table 2 The sequences of primers used in qPCR of transgenic *Arabidopsis*

基因名 Symbol	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
<i>fusA</i>	CTGAAGTAACTGGCGTTAAG	GTGTATGATGCACGACCT
<i>aroA</i>	CGGAAATCGGCACCTATAAC	GCCGTACATTTTCGGATCAAG
<i>osmY</i>	CGACGCTAAAGACACCTC	GGTTTCCACTTTCACCTTG
<i>argF</i>	GAAAGAGTTCGATCTGCACG	CACCATCACCGCCTTAAT
<i>deoA</i>	CGGCCCGATTGTGGATAAA	GATATCGAAGCCCGGAATAG
<i>sdhA</i>	CGTCTGGACGATACCTCA	TTCGGTACGGAAGTTTGC
<i>actin2</i>	GTGGATTCCAGCAGCTTCCAT	GCTGAGAGATTCAGATGCCCA

点分析 5 个目的基因与靶基因可能的相关性及其作用方式(实验结果中为方便观察,未将目的基因以外的其他基因名于图中标注)。

**1.2.5 细菌双杂分析:** 细菌双杂与酵母双杂的原理相似,但 *Escherichia coli* 具有转化效率高及生长速率快的优势,具有高效性<sup>[15]</sup>, 本实验选择细菌双杂来研究基因 *fusA*、*sdhA*、*deoA*、*argF*、*osmY* 与 *aroA* 是否存在互作关系。所用菌株及质粒由重庆医科大学张雪梅,尹一兵教授惠赠。主要以 *aroA* 基因为诱饵基因,选取其他基因为目标基因。利用细菌双杂进一步研究 5 个目的基因与 *aroA* 之间的关系。首先限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I 对载体和基因进行双酶切,利用 T4 DNA 连接酶将 *aroA* 导入诱饵载体 PBT,将 *fusA*、*deoA*、*argF*、*ahpC*、*osmY* 基因导入目标载体 PTRG,将重组载体转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,存活的单克隆进行菌液 PCR,阳性克隆测序验证并提取重组质粒备用。将阳性质粒转入报告菌株,利用 Western blot<sup>[16]</sup>验证蛋白的表达情况,进一步进行基因间的互作实验。细菌双杂的详细步骤包括载体的构建,共转化实验,Western blot 中抗体的选择等参照相关论文<sup>[17]</sup>及说明书(细菌双杂交载体试剂盒)。

## 2 结果与分析

### 2.1 应答草甘膦逆境目的基因的克隆与结构分析

通过 T-A 克隆获得了 *fusA*、*sdhA*、*deoA*、*argF*、*osmY* 5 个目的基因及 *aroA* 基因(图 1)。在 NRS-1 中,其中 *fusA*、*osmY*、*deoA*、*sdhA*、*argF* 基因在高浓度草甘膦处理下为上调表达。其结构特点总结

如下。

基因 *fusA* (GenBank 登录号 KT366019)是易位酶延伸因子,开放阅读框为 2 112 bp,编码 704 个氨基酸残基,等电点为 4.90,帮助蛋白质翻译过程中 tRNA 和 mRNA 转移;在翻译结束时帮助 tRNA 的脱落;该基因还能够增强或抑制翻译过程<sup>[18]</sup>。除了参与蛋白质的合成,研究发现 *fusA* 能够作为分子伴侣<sup>[19]</sup>,具有稳定蛋白质的作用。基因 *osmY* (GenBank 登录号 KT366020)是功能未知的周质蛋白,开放阅读框为 615 bp,编码 205 个氨基酸残基,等电点为 5.16。它能够被高渗透压和生长速率改变表达水平,能够与磷脂相互作用,与质膜的空隙连接,防止胞质的皱缩<sup>[20]</sup>。基因 *deoA* (GenBank 登录号 KT366022)为胸苷磷酸化酶基因,开放阅读框为 1 332 bp;编码 444 个氨基酸残基;等电点为 4.96。它可以将胸腺嘧啶转化成为胸苷,这些胸苷可以被用于合成氨基酸,这是含有胸腺嘧啶氨基酸的来源之一<sup>[21]</sup>。该基因也具有反向的功能,即将胸苷转化为胸腺嘧啶,这个过程帮助降解核苷<sup>[22]</sup>,细胞在遇到逆境时,会发生一些错误,比如核苷合成发生错误,*deoA* 可以帮助降解错误或多余的核苷。

基因 *sdhA* (GenBank 登录号 KT366023)编码丁二酸脱氢酶,开放阅读框为 1 764 bp,编码 588 个氨基酸残基,等电点为 4.91。该酶位于质膜的内层,催化丁二酸和延胡索酸的互相转化<sup>[23]</sup>;参与 TCA 循环和电子传递<sup>[24]</sup>。受细胞分裂和铁离子浓度的影响<sup>[25-26]</sup>;此外高浓度的丁二酸能够降低超氧化物物的浓度<sup>[27]</sup>,因此 *sdhA* 下调或上调都有可能发挥作用。

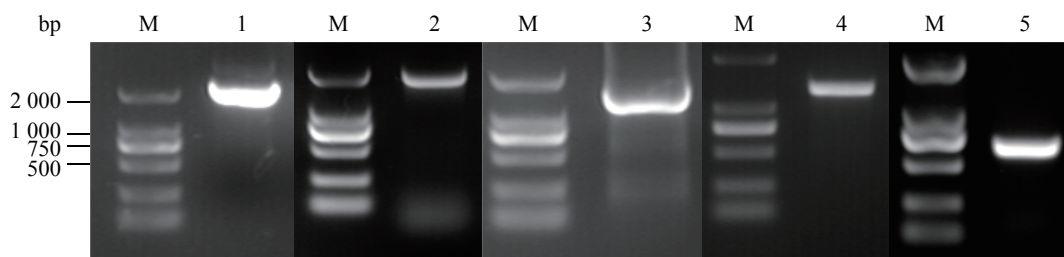


图 1 克隆基因的琼脂糖胶图

Figure 1 The agarose gel pictures of some cloned genes

Note: M: Marker; 1: *fusA*; 2: *sdhA*; 3: *deoA*; 4: *argF*; 5: *osmY*.

基因 *argF* (GenBank 登录号 KT366021) 编码鸟氨酸氨甲酰转移酶, 开放阅读框为 1 002 bp; 编码 334 个氨基酸残基; 等电点为 5.04。该转移酶利用鸟氨酸合成精氨酸, 在各种生长环境中该基因都被反向调节, 过多或过少的精氨酸或其他 C 源都会抑制 *argF* 的表达<sup>[28]</sup>, 该基因的下调一方面能够使鸟氨酸积累, 具有抗渗透的作用, 另一方面可以帮助合成其他氨基酸如脯氨酸、芳香族氨基酸等<sup>[29]</sup>。

基因 *aroA*<sup>[8]</sup> (GenBank 登录号 KT366024) 编码 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶, 开放阅读框为 1 281 bp, 编码 427 个氨基酸残基, 等电点为 4.98。该基因参与莽草酸途径, 与芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)及其衍生物的合成相关, 不仅影响细胞的代谢、蛋白质的合成, 还参与细胞的抗逆。从已知的功能来看, 克隆的 6 个基因都为逆境应答基因。

## 2.2 目的基因原核表达特点

由于在原核表达实验中经常会出现蛋白质的包涵体而使基因失去功能, 因此首先进行 SDS-PAGE 实验验证蛋白质的形成情况。从图 2 可见, 每个基因的第 3 个泳道与第 2 个对照泳道相比都有特异性的条带, 说明基因在表达菌中全部能成功合成相应的蛋白质, *fusA*、*sdhA*、*deoA*、*argF*、*osmY*、*aroA* 基因合成的蛋白大小分别是 77.59、64.23、47.27、36.7、21.35、46.16 kD, 与图 2 中显示的特异性条带大小相似。所有基因在原核表达实验中都能够表达有功能的蛋白, 可用于进一步的功能验证。

对正确含有重组质粒的大肠杆菌进行草甘膦的处理, 24 h 后测定  $OD_{600}$  以观察其生长情况。结果表明含有 6 个基因的菌株  $OD_{600}$  值都比对照大, 对照的值约为 0.14, 而含有基因的菌株的最小值是 *sdhA* 为 0.15, *osmY* 最大, 其  $OD_{600}$  达 0.4, 因此可以推测体外表达这几个基因对微生物抵御草甘膦都有一定的作用, 它们可以通过某种方式发挥作用, 是否与 NRS-1 中的作用方式相同仍需进一步的验证。

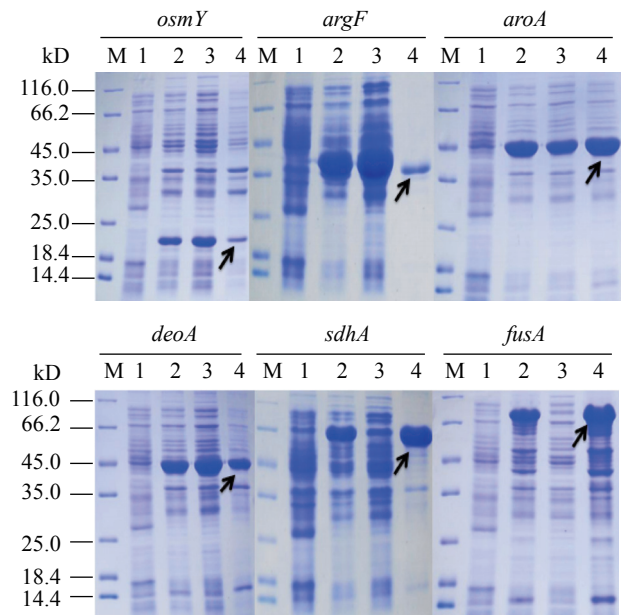


图 2 目的基因在 *E. coli* 中的表达情况

### Figure 2 Genes expression in *E. coli*

注: M: Marker; 1: 诱导前对照; 2: 诱导后菌的总蛋白; 3: 总蛋白经超声波裂解后的沉淀; 4: 总蛋白经超声波裂解后的上清。

Note: M: Marker; 1: The protein of *E. coli* before induction; 2: The protein of *E. coli* after induction; 3: Precipitation of total protein after ultrasonic cracking; 4: Supernatant of total protein after ultrasonic cracking.

## 2.3 转基因拟南芥的性状表现

PCR 及测序结果显示 6 个目的基因已被转到拟南芥基因组上(图 3A)。为验证基因对植物抗草甘膦是否起作用, 对生长约 14 d 的转基因植株进行了草甘膦(终浓度 0.5 mmol/L) 48 h 处理。结果如图 3B 所示, 在草甘膦处理后, 植株叶片出现失绿现象, 但转不同基因拟南芥在草甘膦处理下的形态表现有所不同, 其优劣顺序依次为: *aroA*、*argF*、*deoA*、*sdhA*、*GFP* (空载对照)、*fusA*、*osmY*。其中转 *aroA*、*argF*、*deoA* 基因的表型相差甚小, 说明 *deoA*、*argF* 可能对拟南芥抗草甘膦有重要作用, 转 *fusA*、*osmY* 基因的植株表型较对照组差, 说明基因对拟南芥耐草甘膦无正向积极影响。

对处于草甘膦逆境下的转基因植株进行 qPCR, 检测相应基因的表达情况如图 3C 所示。在草甘膦

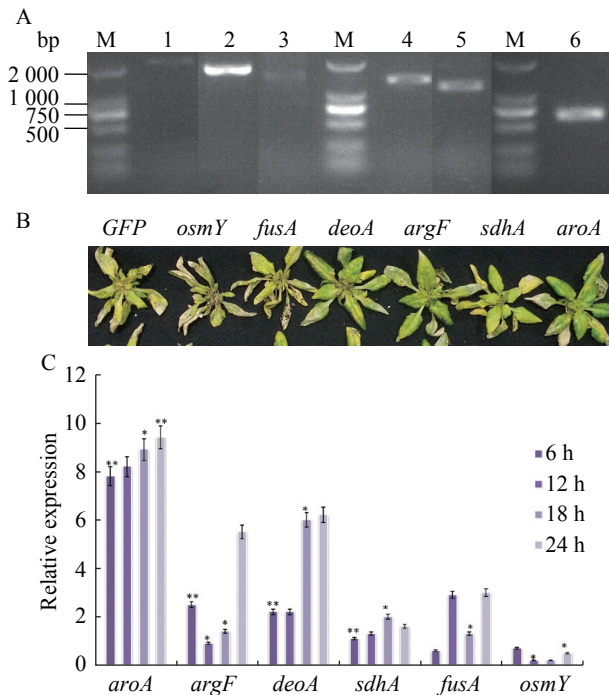


图3 5个基因在植物中的表达

Figure 3 Genes expressed in plants

注: A: 阳性拟南芥的分子鉴定; B: 阳性拟南芥对草甘膦的耐性检测; C: 阳性转基因拟南芥在草甘膦处理下目的基因的表达情况。M: Marker; 1: *fusA*; 2: *sdhA*; 3: *deoA*; 4: *aroA*; 5: *argF*; 6: *osmY*.

Note: A: Molecular identification of positive transgenic *Arabidopsis thaliana*; B: The phenotype of transgenic *Arabidopsis thaliana* in glyphosate stress; C: Genes expression of transgenic *Arabidopsis thaliana* under glyphosate treatment. M: Marker; 1: *fusA*; 2: *sdhA*; 3: *deoA*; 4: *aroA*; 5: *argF*; 6: *osmY*.

处理 12 h 时, 过表达植物中 6 个基因 *aroA*、*argF*、*deoA*、*osmY*、*sdhA* 和 *fusA* 都表现为上调, 将每一个基因的变化对应到基因的功能及其在草甘膦逆境下转基因植株的表型, 含有基因 *fusA* 和 *osmY* 的转基因苗在草甘膦处理后, 受到草甘膦的影响较大, *fusA* 为微生物中的延伸因子, 参与蛋白质转录翻译过程, *osmY* 在微生物中与膜相关, 两个基因可能对物种的特异性较强, 在拟南芥中表达不能产生积极的抗逆效果, 反而对细胞产生负担; 基因 *aroA*、*argF* 和 *deoA* 在草甘膦处理 0 h 到 12 h 之间基因上调量的差异比较是  $aroA > argF \geq deoA$ , 这与草甘膦处理拟南芥后的表型有极大的相似性, 说明 *aroA*、*argF* 和 *deoA* 基因对植物耐草甘膦具有一定的作用。

## 2.4 草甘膦应答基因与 *aroA* 靶基因的互作

**2.4.1 基于 KEGG 分析的基因网络:** 利用 ClueGo 程序进行 KEGG 分析, 图 4 显示了目的基因间的关系, 不同的基因间通过参与不同的代谢途径连接形成一个小型的代谢网络。基因 *argF* 与 *aroA* 的相关性较大, 有代谢的重叠, 表明 *argF* 基因可能除了产物精氨酸对细胞抗草甘膦的作用外, 还能够协助莽草酸途径抵御草甘膦; 而 *aroA* 参与的过程与 *fusA*、*sdhA*、*deoA*、*osmY* 的关系较远, 主要为间接的关系。推测本文获得的基因所参与的途径可能在不同程度上影响芳香族氨基酸及其衍生物的功能, 由于 NRS-1 长期处于草甘膦逆境下, 其耐性进化有着不可预测的一面, 因此不排除基因改变其功能直接与莽草酸途径相关, 从某种程度上说, 这些基因可能帮助 NRS-1 细胞应答草甘膦存在的混合逆境, 以及参与抵御草甘膦的毒性。

**2.4.2 细菌双杂实验结果:** Western blot 验证基因在表达菌中的表达情况, 实验表明所有蛋白能够较好的可溶性表达, 基因能够发挥功能(图 5)。双杂实验检测基因与草甘膦靶标基因 *aroA* 的互作关系, 结果表明阳性对照(PBT-LGF2+PTRG-Gallp)有菌落出现, 阴性对照(PBT-*aroA*+PTRG-blank),

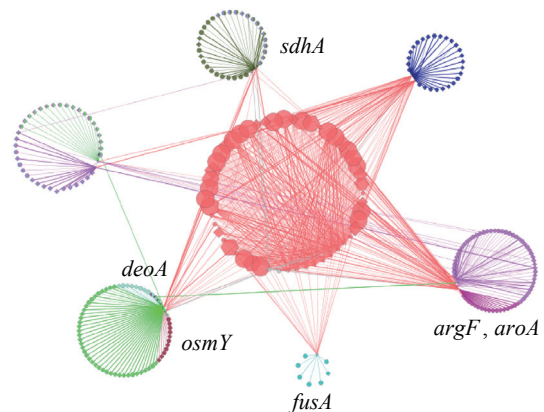


图4 基因芯片中差异基因的关系

Figure 4 The relationships of different expressed genes in Genechip

注: 相同颜色的线条表明代谢途径或生物过程相同。

Note: Lines with same colour mean the identical metabolic pathway or bioprocess.

PBT-blank+PTRG-*fusA*、*deoA*、*sdhA*、*argF*、*osmY*), Blank (表示不含基因) 无菌落出现, 表明所有表达系统均正常, 进行基因互作实验时发现重组试验 (PBT-*aroA*+PTRG-*fusA*、*deoA*、*sdhA*、*argF*、*osmY*) 中未出现菌落, 说明 5 个目的基因与 *aroA* 不存在直接互作的影响, 尽管信息学分析表明它们之间存在某种联系, 但基因间可能主要以代谢途径为依托为 NRS-1 提供抗草甘膦的可能。

### 3 讨论

#### 3.1 NRS-1 突变菌中非靶标基因对草甘膦逆境的作用

在基因芯片中上调表达的 *fusA* 和 *osmY* 在拟南芥中比对照组对草甘膦更敏感<sup>[8]</sup>, 尤其是 *osmY*, 可能是由植物细胞膜或翻译等过程与微生物的差异较大, 另外细胞额外的表达功能不大的基因会浪费细胞资源, 造成细胞的负担。基因 *argF* 和 *sdhA* 在 NRS-1 中表现为下调<sup>[8]</sup>, 但在转基因拟南芥中 *argF* 或 *sdhA* 对植物抵御草甘膦的过程效果较好, 两个基因都为双功能的基因, 不管为何种差异变化, 对抵御逆境都有一定的作用。基因在植物中功能验证的结果说明草甘膦影响到转基因植株氨基酸的合

成或利用, 其中芳香族氨基酸对拟南芥抗草甘膦有较大的作用, 其次是含有胸腺嘧啶的相关氨基酸, 最后是精氨酸。此部分实验直接体现了拟南芥中目的基因对植物抗草甘膦的作用。

#### 3.2 耐草甘膦非靶标基因的利用潜力

抗草甘膦基因可分为靶基因和非靶标基因, 基因资源的获得是抗草甘膦转基因育种的关键。*aroA* 是草甘膦的靶基因, 在细胞对草甘膦的耐性中起着重要作用, 除获得一些抗性的靶基因外, 非靶标基因的研究也有所必要。目前抗草甘膦的非靶标基因挖掘较少, 主要的基因包括 *GAT*、*GOX*、*glpA*、*glpB*、*igrA*、*GO*<sup>[4]</sup>, 其中只有 *GOX*、*gat* 被用于商业化转基因作物。我国在此方面基因的挖掘上有一些研究, 但主要集中于获得高效的靶基因, 为拓宽相关研究领域, 加速抗草甘膦的育种, 对生物抗草甘膦机制进一步的了解, 非靶基因的研究也应该有一定的发展。

本研究中, *fusA*、*sdhA*、*deoA*、*argF*、*osmY* 从功能上看都是逆境应答基因, 参与酸、渗透、氧化胁迫等, 同时作为草甘膦应答基因, 是细胞进入新稳态时调用的逆境特异性的应答基因<sup>[30]</sup>。实验证明

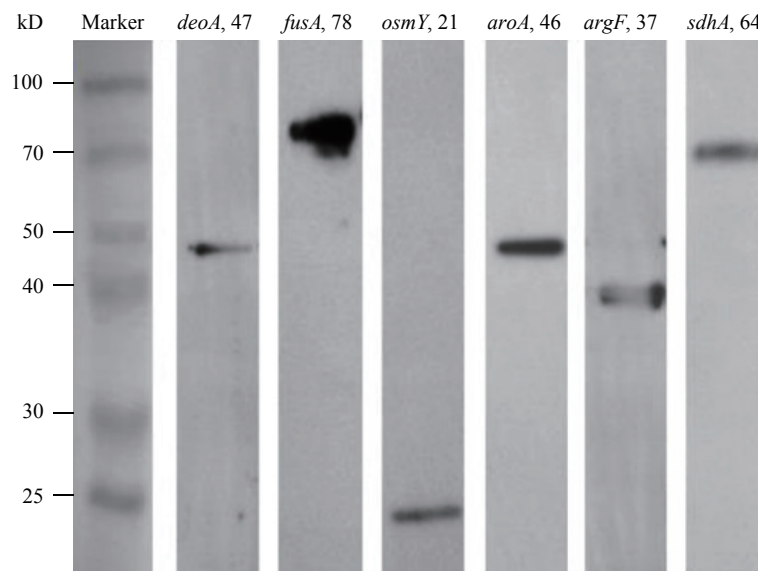


图 5 细菌双杂实验中的 Western blot 图以验证基因能否在表达菌中表达

Figure 5 Western blot of bacterial two hybrid experiments to validate the gene expression in bacteria



克隆获得的 5 个非靶标基因通过复杂的代谢网络, 与草甘膦的靶基因 *aroA* 以间接的方式联系, 通过莽草酸途径参与细胞抗草甘膦的过程。在拟南芥和大肠杆菌中对目的基因进行抗草甘膦的功能验证, 表明这些基因在两种生物中均对细胞抗草甘膦有一定的作用, 可能经过某种改造, 仍能够具有高效抗草甘膦的作用, 更深的调控机制研究仍需进一步的进行。

## 参 考 文 献

- [1] Lorentz L, Beffa R, Kraehmer H. Recovery of plants and histological observations on advanced weed stages after glyphosate treatment[J]. *Weed Research*, 2011, 51(4): 333-343
- [2] Zhu JW. Physiological and biochemical characteristics and glyphosate tolerance of alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) under manganese stress[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2008 (in Chinese)  
朱金文. 高锰胁迫下空心莲子草的生理生化特性和草甘膦耐受性研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2008
- [3] Li L. Characterization of the functional domains among class II EPSP synthases and microarray analysis of the glyphosate stress response in *Escherichia coli*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2010 (in Chinese)  
李亮. II 型 EPSP 合酶的功能域鉴定及大肠杆菌在草甘膦冲击下的基因表达谱分析[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2010
- [4] Pollegioni L, Schonbrunn E, Siehl D. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering[J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(16): 2753-2766
- [5] Barry G, Kishore G, Padgett S, et al. Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants[J]. *Current Topics in Plant Physiology (USA)*, 1992: 139-145
- [6] Peñaloza-Vázquez A, Oropeza A, Mena GL, et al. Expression of the hygromycin B phosphotransferase gene confers tolerance to the herbicide glyphosate[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(8): 482-487
- [7] Xie LX, Li YF, Xu PL. Glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) transformed with *aroAM12* gene via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(2): 173-178 (in Chinese)  
谢龙旭, 李云锋, 徐培林. 根癌农杆菌介导的转 *aroAM12* 基因棉花植株的草甘膦抗性[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(2): 173-178
- [8] Fei YY, Gai JY, Zhao TJ. Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of *Enterobacter*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 349(2): 135-143
- [9] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3-new capabilities and interfaces[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(15): e115
- [10] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16-22
- [11] Karimi M, Inzé D, Depicker A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(5): 193-195
- [12] Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, et al. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(1): 63-70
- [13] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45
- [14] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093
- [15] Joung JK, Ramm EI, Pabo CO. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(13): 7382-7387
- [16] Xu C, Ma X, Chen SW, et al. Bacterial cellulose membranes used as artificial substitutes for dural deflection in rabbits[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(6): 10855-10867
- [17] Cai YY. Screening and identification of DnaJ interacting proteins in *Streptococcus pneumoniae*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2013 (in Chinese)  
蔡莹莹. 肺炎链球菌热休克蛋白 DnaJ 相互作用蛋白的筛选及鉴定[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2013
- [18] Dlugosz M, Huber GA, McCammon JA, et al. Brownian dynamics study of the association between the 70S ribosome and elongation factor G[J]. *Biopolymers*, 2011, 95(6): 616-627
- [19] Len ACL, Harty DWS, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 5): 1339-1351
- [20] Oh JT, Cajal Y, Skowronska EM, et al. Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1463(1): 43-54
- [21] Wheeler PR. Biosynthesis and scavenging of pyrimidines by pathogenic mycobacteria[J]. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136: 189-201
- [22] Spinazzola A, Marti R, Nishino I, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 4128-4133
- [23] Guest JR. Partial replacement of succinate dehydrogenase function by phage- and plasmid-specified fumarate reductase in *Escherichia coli*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1981, 122(2): 171-179
- [24] Johnson AS, van Horck S, Lewis PJ. Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2004, 150: 2815-2824
- [25] Righelato RC. The distribution of iron in iron-deficient toxin-synthesizing and in excess-iron non-toxin-synthesizing *Corynebacterium diphtheriae*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1969, 58(3): 411-419
- [26] Meredith DH, Plank M, Lewis PJ. Different patterns of integral membrane protein localization during cell division in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2008, 154: 64-71
- [27] Franchini AG, Egli T. Global gene expression in *Escherichia coli* K-12 during short-term and long-term adaptation to glucose-limited continuous culture conditions[J]. *Microbiology*, 2006, 152: 2111-2127
- [28] Voellmy R, Leisinger T. Regulation of enzyme synthesis in the arginine biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1978, 109(1): 25-35
- [29] Weglenski P. The mechanism of action of proline suppressors in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1967, 47(1): 77-85
- [30] Kreps JA, Wu Y, Chang HS, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(4): 2129-2141