

转 mMT-I 基因 F₃ 代烟草金属结合特性研究 *

赵亚华

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要 研究表明, 转 mMT-I 基因 F₃ 代烟草金属结合特性有以下 4 点: ①单元素处理转基因烟草元素吸收量远远大于多元素处理, 并且比对照烟草能结合更多的金属; ②混合元素处理的方差分析结果显示, 转基因烟草根及茎叶中的 Cd、Zn 和 Cu 含量均比对照烟草高, 以 Cd 的吸收最显著; ③在酸性土壤中, 转基因烟草吸收 Cd、Zn 的量大于碱性土壤, Cu 则相反, 在中性土壤中吸收量最高; ④转基因烟草结合金属的量随 MT 含量的增高而增加。

关键词 金属硫蛋白; 转基因烟草; 金属结合特性; 生物富集因子

中图分类号 Q 789

金属硫蛋白 (metallothionein, 简称 MT) 是一类低分子量, 高半胱氨酸的金属结合蛋白, 它在体内的主要生物学功能是参与微量元素的贮存、运输和代谢, 对重金属具有解毒作用, 并能拮抗电离辐射和清除各种自由基, 促进细胞和机体生长、发育等 (茹炳根等, 1991; Robinson et al, 1993)。将小鼠金属硫蛋白 (mMT) 基因通过根癌农杆菌介导并由叶盘法转入烟草, 获得了第 1 代转 mMT-I 基因烟草, 从分子水平上证实了该基因具有 MT 的生理功能, 如抗重金属等 (Pan et al, 1994)。对转基因烟草 F₂ 代的分子鉴定及抗性工作业已完成。本文旨在对转 mMT-I 基因 F₃ 代阳性烟草的金属结合特性及重金属抗性和对被污染水的净化做深入的研究, 从理论和实践上证明转 mMT-I 基因在环境保护方面的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为北京大学生命科学院蛋白质与植物基因工程国家重点实验室研制, 并在中科院遗传所试验田收获了转 mMT-I 基因阳性烟草 F₂ 代种子。将该种子在 ρ (卡那霉素) = 10⁵ $\mu\text{g}/\text{L}$ 下能正常发芽生长的幼苗移入中国科学院遗传研究所温室盆栽。每小盆 100 g 土 (干质量), 移入 5 株。对照组为未转基因的烟草。供试土壤分别取自北京、上海、河南等地农田。土壤基本性质由中国农业科学院土肥所分析测定并提供数据。

1.2 实验方法

根据 mMT-I 基因表达的产物 MT 能特异性地与 Cd、Zn、Cu 等元素结合的特点, 本实验采用酸性 (pH 5.4)、微酸性 (pH 6.1)、中性 (pH 6.8)、碱性 (pH 7.9) 的 5 种土壤, 以及每种土壤分别用 Cd²⁺ 质量分数为 0、10、100、500、1 000 mg/kg; Zn²⁺ 质量分数为 0、10、100、500、1 000 mg/kg; Cu²⁺ 质量分数为 0、10、100、500、1 000 mg/kg 进行处理, 选用 L25(5⁶) 正交试验表 (数学手册编

1997—11—19 收稿 赵亚华, 女 42 岁, 副教授, 硕士

* 国家“863”高新技术计划基金资助项目
1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.

写组, 1979). 其中3、4、6列分别为 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 单元素因素, 其余列为一级互作因素, 包括误差因素的影响.

待幼苗长至6~8 cm高时, 以上述 $L_{25}(5^6)$ 正交试验表设置的浓度对土壤同时进行处理. 处理后定期观察生长情况. 40 d后采样分析. 同时用单元素处理(各单元素处理浓度与互交表中的浓度相同), 以便与多元素处理相比较.

转mMT-I基因烟草对水中重金属在 Cd^{2+} 在转基因烟草中的富集速率和释放速率的一级动力学过程(Hamelink et al, 1977):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_p, \quad (1)$$

式中 C_p 为 Cd^{2+} 在转基因烟草中的富集质量分数($\mu\text{g/g}$); C_w 为培养液中 Cd^{2+} 质量浓度($\times 10^3 \mu\text{g/L}$); k_1 为 Cd^{2+} 进入转基因烟草速率常数($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$); k_2 为 Cd^{2+} 释放速率常数($\mu\text{g/(g}\cdot\text{h)}$).

当 C_w 为常数时, 方程(1)的解为:

$$C_p = (k_1/k_2) C_w (1 - e^{-k_2 t}). \quad (2)$$

当 $dC_p/dt=0$, Cd^{2+} 的富集稳定时, 由方程(1)得到:

$$C_p/C_w = k_1/k_2 = BCF, \quad (3)$$

式中的BCF为转基因烟草对 Cd^{2+} 的富集系数. 用最小二乘法对实验值做非线性拟合, 求出 k_1 和 k_2 值, 进而得到BCF值.

1.3 各元素含量测定与MT含量分析

各元素含量测定采用原子吸收法. 火焰原子吸收分光仪为Philips, Holland产品. 采用镉/血红蛋白饱和法测定组织中MT含量. 根据1 mol MT分子能结合7个Cd原子, 计算组织中MT含量(Darid et al, 1991).

2 结果与讨论

2.1 采用单元素处理转基因烟草与对照烟草的元素含量比较

表1中的结果显示无论是哪一种元素单独处理, 转mMT-I基因烟草的金属元素吸收值均大于对照, 其中对 Cd^{2+} 的吸收前者比后者平均高40%, Zn^{2+} 高42%, Cu^{2+} 高57%. 将表1中各项数据分别做线性拟合的结果显示, 转基因烟草与对照烟草中3种单元素的含量均随其处理浓度的增加而呈正相关, 以Cd元素处理的线性拟合结果最好($r=0.9856$), Cu元素的相关性次之($r=0.8811$), Zn元素的相关性再次之($r=0.7448$). 以上结果说明了mMT-I基因在转基因F3代烟草中稳定遗传, 并能在3种元素单独胁迫下结合较多的金属元素. 以往的研究认为烟草中本身存在着与动物类似的金属硫蛋白, 称为类MT(MT-like)(Kaji et al, 1991)以及镉结合蛋白(Cd-BP), 后者是一种非基因编码的酶促产物, 称为植络素(Phytochelation), 它们都具有类似动物体的MT一样的诱导结合重金属元素的功能(Grill, 1985; Robinson et al, 1993). 在本项研究中对照烟草对重金属元素Cd和金属元素Zn和Cu的吸收可能是由于其本身存在的类MT或植络素引起的. 这些元素对类MT和植络素有一定的诱导合成作用, 反过来, 后者对前者有较强的结合能力. 转mMT-I基因烟草在本身存在有类MT和植络素的基础上, 对mMT-I基因进行了表达. 因此它对重金属元素Cd和金属元素Zn, Cu有比对照更多的吸收.

表1 单元素处理转基因烟草与对照烟草的元素含量比较

$w(Cd)$ $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	植株吸收量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		$w(Zn)$ $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	植株吸收量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		$w(\text{Cu})$ $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	植株吸收量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	
	转基因	对照		转基因	对照		转基因	对照
0	0.237	0.228	0	2.05	1.85	0	1.45	1.31
10	12.81	9.12	200	6.73	5.76	20	3.72	1.85
100	25.31	18.31	500	34.20	28.12	100	18.61	9.20
500	36.20	25.10	1000	78.20	42.53	500	34.52	29.32
1000	47.85	32.40	1500	92.57	52.15	1000	58.31	37.28

2.2 转mMT-I基因烟草的根及茎叶对重金属元素吸收的方差分析

对L₂₅(5⁶)正交试验经原子吸收分析获得的数据进行处理后,由表2、表3列出了转基因烟草根及茎叶对Cd²⁺、Zn²⁺的吸收与对照烟草的方差分析结果。

表2 转mMT-I基因烟草和对照烟草的根对Cd、Zn和Cu的吸收量的方差分析

变差来源	$S_{x\text{转}}$	$S_{x\text{对}}$	DE	$S_{x\text{转}}/DF$	$S_{x\text{对}}/DF$	$F_{\text{转}}$	$F_{\text{对}}$	$F_{0.01}$
Cd	176.2423	164.6395	4	44.0606	41.1599	43.2969	40.3199	4.77
Zn	117.0012	102.9885	4	29.2503	25.7471	26.7517	21.4684	4.77
Cu	116.4812	101.9906	4	29.1204	25.4977	26.6329	21.2605	4.77
Cd×Zn	10.9319	8.0184	16	0.6832	0.5012	<1	<1	
Cd×Cu	17.4948	19.1884	16	1.0934	1.1993	1	1	
Zn×Cu	4.5515	9.7188	16	0.2845	0.5449	<1	<1	
总变异	442.7031	405.5440	14					

表3 转mMT-I基因烟草和对照烟草的茎叶对Cd、Zn和Cu的吸收量的方差分析

变差来源	$S_{x\text{转}}$	$S_{x\text{对}}$	DE	$S_{x\text{转}}/DF$	$S_{x\text{对}}/DF$	$F_{\text{转}}$	$F_{\text{对}}$	$F_{0.01}$
Cd	11.7474	13.1756	4	2.9369	3.2939	24.1919	17.3729	4.77
Zn	8.6319	9.1721	4	2.1580	2.2930	17.7759	12.0939	4.77
Cu	6.0555	8.9677	4	1.5139	2.2419	12.4703	11.8244	4.77
Cd×Zn	1.9422	3.0335	16	0.1214	0.1896	<1	<1	
Cd×Cu	0.6648	0.1018	16	0.0416	0.0074	1	1	
Zn×Cu	0.9045	0.3532	16	0.0565	0.0221	<1	<1	
总变异	29.9462	34.8039	14					

表2的结果明确反映了转基因的根比对照烟草的根中Cd、Zn和Cu元素含量高, F 检验表明了3种元素的含量均在1%的水平上显著,即使是在混合元素处理的条件下,Cd元素的吸收量最为显著,其次为Zn和Cu,并且这一顺序与极差检验结果一致。

表3中转基因烟草茎叶Cd、Zn和Cu元素的吸收以及 F 检验等结果与在根中的结果类似,其吸收量的顺序亦与茎叶部分的极差检验结果一致。

2.3 不同pH值的土壤对3种元素吸收的影响

对不同pH值土壤条件下Cd²⁺、Zn²⁺和Cu²⁺的对比统计分析(土壤中3种元素本底值亦统计在内)发现,在酸性土壤中施加质量分数为1000 mg/kg时,Cd²⁺的吸收量比在碱性土壤

中多19%, Zn^{2+} 多11%。当施加质量分数为500 mg/kg时, Cd^{2+} 的吸收量在酸性土壤比在碱性土壤中多8%, Zn^{2+} 多6%。这可能是由于土壤pH值升高时, Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 易形成 $Cd(OH)_2$ 和 $Zn(OH)_2$, 使它们在土壤中的溶出量减少的原因。而 Cu^{2+} 的吸收则是碱性土壤比酸性土壤高13%, 但中性土壤吸收量最多, 比酸性和碱性土壤分别高出23%和19%, 这可能是因为在酸性土壤中有机质含量较高, 大量的 Cu^{2+} 与有机质结合而被吸附, 影响了根系对 Cu^{2+} 的吸收所致。

2.4 单元素处理与多元素混合处理结果差异分析

实验结果已显示了单元素处理后烟草的吸收量远远大于多元素不同浓度配比处理的元素吸收量, 当用质量分数为100 mg/kg单元素处理后吸收量是混合元素(含100 mg/kg)处理后吸收量的18.61倍, 对照为13.56倍; 同上用 Zn^{2+} 处理后的吸收量为2.40倍, 对照为1.99倍; 用 Cu^{2+} 处理后吸收量为5.39倍, 对照为2.12倍。其MT含量随着元素吸收量的多少而增减。各种元素在体内的相互作用远比单纯的化学反应复杂。具有类似的物理和化学性质的元素, 在生物体内的相互拮抗, 主要是因为这些元素的电子构型和生成络合物时的配位数相似, 如 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 。当它们与金属硫蛋白结合时, 相互竞争其键合位点, 从而导致3种元素的吸收量下降。MT是一种金属结合蛋白, 也是一种诱导合成型的蛋白质, 每一分子MT结合某一元素的量是相对恒定的, 当其代谢环境中存在着化学性质类似的Cd、Zn和Cu3种金属离子时, 它们之间相互干扰, 并竞争性地与MT结合, 其结果是吸收总量反而还小于单元素处理时的情况。方差分析结果表明在3种元素中, Cd元素的诱导结合占主导地位, 但吸收值却少于Zn和Cu, 这可能是因为Cd的特殊性质所决定的。Cd对于生物体是有害元素, 而Zn和Cu则是必需的微量元素。 Cd^{2+} 对于MT的诱导结合赋予含MT和转MT基因的动植物以抗重金属镉的特性。但当环境中同时存在着 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 时, 它们对 Cd^{2+} 又存在着明显的取代作用, 并通过内源性的重金属解毒机制降低镉的毒害(王夔, 1991)。Cd单元素处理的吸收是混合元素处理下的19.61倍也充分说明了这一点。可以认为, 随着环境中3种元素含量的变化, 与MT结合力的强弱以及生理代谢的需要, MT与它们结合的种类和数量存在着动态的平衡。本实验测定的数据即是在这种复杂的动态平衡条件下的总结果。

2.5 转mMT-I基因烟草对 Cd^{2+} 污染水的净化

将转基因烟草与对照烟草幼苗同时用含有2 $\mu\text{g/L}$ 的Hongland营养液培育处理, 在不同的时间取样测定植株体内的 Cd^{2+} 含量, 由最小二乘法非线性拟合做出图1: 由图可见, 在处理前, 转基因烟草与对照烟草体内 Cd^{2+} 含量都很低或接近于零。当用2 $\mu\text{g/L}$ Cd处理12 d后, 转基因烟草体内的 Cd^{2+} 质量分数达到56.62 $\mu\text{g/g}$, 对照烟草为49.83 $\mu\text{g/g}$ 。Cd处理下降。从第13 d开始其含量大幅度下降。该图还表明转基因烟草与对照烟草对 Cd^{2+} 的富集随时间变化较好地符合二室模型的解析表达。数值拟合的相关系数均在0.98以上, 并且转基因烟草的 Cd^{2+} 含量较对照烟草随 Cd^{2+} 处理时间的增加而明显增加。由拟合的转基因烟草较对照烟草的 K_1 和 K_2 值计算得到的BCF值分别为33.999 8和28.246 1。从而也表明了转基因烟草较对照烟草对 Cd^{2+} 有更强的富集功能。因此可以认为, 转小鼠金属硫蛋白-I基因烟草对被

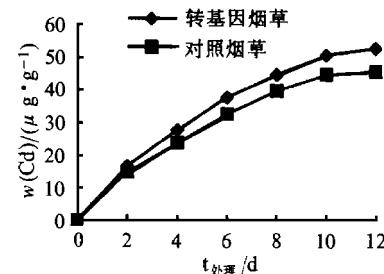


图1 转mMT-I基因烟草 Cd^{2+} 吸收曲线

污染的水域有一定的净化作用, 它在环境保护方面具有重要的应用价值.

参 考 文 献

- 王 蕤. 1991. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社, 133 ~ 148
- 茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 等. 1991. 金属硫蛋白. 生物化学与生物物理进展, 18(4): 254 ~ 259
- 数学手册编写组. 1979. 数学手册. 北京: 人民教育出版社, 1 337
- Pan A, Yang M, Tie F, et al. 1994. Expression of mouse metallothionein—I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology, 24: 341 ~ 351
- Daniel L, Cherian M. 1991. Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay. Methods in Enzymology, 205: 83 ~ 88
- Grill E. 1985. Phytochelations—The principal heavy metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674 ~ 676
- Hamelink J. 1977. Aquatic toxicology and hazard evaluation. In: Meger F, Hamelink J, eds. American Society for Testing and Materials. [s.l.]: [s.n.], 149 ~ 161
- Robison N, Tommey, Kuske G, et al. 1993. Review article plant metallothioneins. J Biochem, 295: 1 ~ 10
- Kagi J. 1991. Overview metallothionein. Methods in Enzymology, 205: 613 ~ 625

METAL COMBINING CHARACTERISTIC OF TRANSGENIC mMT—I F₃ GENERATION TOBACCO PLANTS

Zhao Yahua

(Biotechnology College, South China Agric. Univ., 510642, Guangzhou)

Abstract

There are four aspects of metal combining characteristics of transgenic MT—I F₃ generation tobacco plants. ① The atom absorption of single-element treated transgenic tobacco plants is much more than of the multi-element treated ones. They also combine more metal elements than the controls. ② The result of the mean square deviation analysis of the mixed elements treated show that Cd, Zn and Cu content in the root and stem-leaf of transgenic tobacco plants was more than in controls, the absorption of Cd being the most marked. ③ The quantity of Cd and Zn absorbed in acidic soil was more than in basic soil and the opposite for Cu. ④ The quantity of metal combined by the transgenic tobacco plants increases with the rise of MT content.

Key words metallothionein; transgenic tobacco; metal combine characteristic; bioconcentration

[责任编辑 李玲]