

## 镉处理下不同富集镉花生营养器官 *AhMT II* mRNA 表达变化

李春娟<sup>1</sup>, 单世华<sup>1</sup>, 杨志艺<sup>1</sup>, 闫彩霞<sup>1</sup>, 张廷婷<sup>1</sup>, 范仲学<sup>2</sup>, 万书波<sup>2</sup>

(1. 山东省花生研究所 山东 青岛 266100; 2. 山东省农业科学院 济南 250100)

**摘要:**利用含镉( $\text{Cd}^{2+}$ )营养液培养花生幼苗,取不同营养器官用以检测 *AhMT II* mRNA 表达量的变化。构建了 PMD18T-*AhMT II* 和 PMD18T-actin 重组质粒,用 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法精确分析了花生 *AhMT II* mRNA 表达水平。研究表明,花生幼苗期不同营养器官间 *AhMT II* mRNA 表达量差异显著( $P < 0.01$ ):根 > 叶 > 茎,低富集镉花生品种 XD<sub>1</sub>011 根部 *AhMT II* mRNA 表达量显著低于高富集镉花生品种 XA004。*AhMT II* mRNA 表达与镉处理水平具有高度相关性,尤其是根部和叶部,在 0~50  $\mu\text{mol/L}$  镉处理水平间,品种 XD<sub>1</sub>011 和品种 XA004 根部相关系数分别为 0.977 和 0.96,品种 XD<sub>1</sub>011 叶部相关系数为 0.91,而品种 XA004 在 0~200  $\mu\text{mol/L}$  镉处理水平间相关系数为 0.959。该结果可为筛选低富集镉花生品种提供理论与技术支持。

**关键词:**实时定量 PCR;花生;*AhMT II*;镉

**doi:**10.3969/j.issn.1008-0864.2011.01.04

**中图分类号:**S565.2,Q786

**文献标识码:**A

**文章编号:**1008-0864(2011)01-0020-05

## *AhMT II* mRNA Expression Changes of Peanut Nutritorium (*Arachis hypogaea* L.) with Different Cadmium Absorption under Cadmium Treatment

LI Chun-juan<sup>1</sup>, SHAN Shi-hua<sup>1</sup>, YANG Zhi-yi<sup>1</sup>, YAN Cai-xia<sup>1</sup>,  
ZHANG Ting-ting<sup>1</sup>, FAN Zhong-xue<sup>2</sup>, WAN Shu-bo<sup>2</sup>

(1. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100; 2. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

**Abstract:** Different vegetative organs of peanut seedlings cultured with nutrient solution containing  $\text{Cd}^{2+}$  were collected for testing the changes of metallothionein type II (*AhMTII*) mRNA level. PMD18T-*AhMT II* and PMD18T-actin plasmids were constructed, and then *AhMT II* mRNA level was analyzed using SYBR Green I real-time quantitative PCR. The result indicated that the *AhMT II* mRNA level of different tissues showed significant ( $P < 0.01$ ) difference: root > leaf > stem, and the *AhMT II* mRNA content in root of low cadmium accumulation peanut variety XD<sub>1</sub>011 was obviously lower than that in cadmium accumulation peanut variety XA004. *AhMT II* mRNA expression had high correlation with cadmium levels, especially in the roots and leaves. Under 0~50  $\mu\text{mol/L}$  cadmium levels, the R<sub>2</sub> of XA004 and XD<sub>1</sub>011's roots were 0.977 and 0.96, respectively and the R<sub>2</sub> of XD<sub>1</sub>011's leaf is 0.91; the R<sub>2</sub> of XA004 in leaf is 0.959 under 0~200  $\mu\text{mol/L}$  cadmium level. The above results would provide theoretical and technical support for screening peanut varieties with low cadmium absorption.

**Key words:** real time quantitative PCR; peanut; *AhMT II*; cadmium

花生(*Arachis hypogaea* L.)是我国重要的油料作物和经济作物,随着近年来食品安全重视程度增加,花生籽粒镉含量超标问题日益引起关注<sup>[1]</sup>。有效解决花生重金属镉污染的重要途径

之一是选育低富集镉的花生品种,而建立花生富集镉水平的技术方法是筛选育种资源的前提条件。金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是植物细胞中最重要的重金属结合配体之一,分子量较小、

收稿日期:2010-09-26;接受日期:2010-11-08

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD21B04);国家自然科学基金项目(30771361);现代农业产业技术体系建设专项资金项目资助。

作者简介:李春娟,助理研究员,主要从事花生品种资源研究。通讯作者:万书波,研究员,博士生导师,主要从事花生生理生态研究。E-mail:shhshan@sina.com

富含 Cys, 可与重金属等胁迫条件诱发产生的自由基、ROS 发生氧化还原反应, 从而降低氧化损伤<sup>[2]</sup>。SYBR Green I 实时定量 PCR 技术具有特异性强、灵敏度高的特点, 在基因表达检测中应用日益广泛<sup>[3~5]</sup>。植物 *MT* 基因表达具有组织器官特异性和发育阶段特异性, *MT I* 与 *MT II* mRNA 通常在根与地上部差异表达, *MT III* 多在香蕉、苹果等果实成熟过程中高水平表达, *MT IV* 仅限于发育中的种子中表达。花生 *AhMT II* 基因是植物金属硫蛋白基因家族的一种, 前期研究表明 *AhMT II* 基因可能在花生的重金属脱毒和活性氧的清除中发挥作用, 但该基因表达与其发挥作用的机理仍不清楚。本研究应用 SYBR Green I 实时定量 PCR 技术, 建立检测花生金属硫蛋白 *AhMT II* mRNA 表达水平的方法, 分析其在不同镉处理水平下花生不同营养器官以及不同品种间的表达差异, 对于阐明 *AhMT II* 基因的表达机理, 选育低富集花生品种具有一定的理论价值和指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高富集镉花生品种 XA004 和低富集镉花生品种 XD<sub>1</sub>011 均由山东省花生研究所提供。

SYBR Green I 荧光定量试剂盒、MMLV 反转录试剂盒、PCR 试剂盒和 PMD18-T 载体连接试剂盒购于宝生物工程有限公司; 植物 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于美国 OMEGA 生物技术公司; TOP10 感受态细胞购于北京天根生物公司; PCR 引物合成和质粒测序由南京金思特生物公司完成; 蛋白胨 (tryptone) 和酵母提取物 (yeast extract) 购自北京鼎国公司; 氨苄青霉素 (Amp) 购自 Sigma 公司; 琼脂糖为西班牙进口分装; LightCycler2.0 实时荧光定量 PCR 仪购自德国罗氏公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 营养液培养花生幼苗** 花生种子经 75% 乙醇处理 1 min, 0.1% 氯化汞消毒处理 15 min, 去离子水冲洗 3~4 遍。恒温 25℃ 浸种 12 h, 摆放于塑料盆中的尼龙网上, 每盆 20 粒, 用 Hongland 营养液在人工气候箱下培养, 28℃ 光照培养 16 h/d, 26℃ 黑暗培养 8 h/d。每 2 d 换一次营养液。

试验设对照组和镉处理组: 对照组营养液中不添加镉, 镉处理组在营养液中分别添加 10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L 和 200 μmol/L 浓度的 Cd<sup>2+</sup> (CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O 溶液)。培养 6 d 后, 取幼苗不同营养器官用于实验。

**1.2.2 构建重组质粒** 提取花生幼叶总 RNA, 反转录成 cDNA, 并进行 PCR 反应。

*AhMT II* 基因上游引物 5'-GAAGGTGCT-GAAATGGGTGT-3', 下游引物 5'-CAATTGGATTT-GCCTGAGGT-3'。

*actin* 基因上游引物 5'-GAGCTGGTCTTGGCT-GTCTC-3'; 下游引物 5'-GCCACACAGTCCCATC-TAT-3'。

扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化回收后, 与 PMD18-T 载体连接, 在 LB 培养液中扩增阳性菌落, 提取质粒经双酶切鉴定后测序<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 建立实时定量 PCR 检测方法** 标准曲线制备: 检测重组质粒 A<sub>260</sub> 值, 计算分子拷贝数, 将重组质粒 (标准品) 稀释 10 倍制作不同梯度。

实时定量 PCR 反应体系为 25 μL, 包括上、下游引物各 0.5 μL, 重组质粒模板 2 μL, 2 × SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 15 s, 58℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 45 个循环。参照张华等<sup>[6]</sup> 方法绘制扩增动力曲线和回归曲线及测定熔解曲线和实时定量 PCR 特异性分析。

**1.2.4 检测花生幼苗 *AhMT II* mRNA 表达水平**

提取花生幼苗不同营养器官的总 RNA, 反转录获得 cDNA。将同浓度 cDNA 样品作为模板进行实时定量 PCR, 反应条件同 1.2.3, 利用标准曲线计算样品中 *AhMT II* cDNA 的精确拷贝数。选用内参 *actin* 作为对照, 结果用 *AhMT II* 拷贝数/*actin* 拷贝数 (*K* 值) 表示。

**1.2.5 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件, 对不同处理采用一维方差分析及多重性分析比较, 取  $P < 0.01$  为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生重组质粒构建

花生幼苗总 RNA 经 RT-PCR, *AhMT II* 和 *actin*

基因片段 PCR 扩增出的产物分别为 229 bp 和 223 bp, 与目的片段大小一致(图 1)。将目的基因片段与 PMD18-T 载体连接, 转化 TOP10 感受态细胞。菌落 PCR(图 2-A) 及质粒双酶切(图 2-B) 产物符合 *AhMT II* 和 *actin* 基因片段的预期大小。测序鉴定证明序列完全正确, 表明重组质粒构建成功。

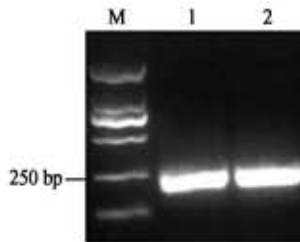


图 1 花生基因 *AhMT II* 和 *actin* 的扩增产物

Fig. 1 RT-PCR product of *AhMT II* and *actin*.

M: DNA maker(DL2000); 1: *AhMT II*; 2: *actin*.

## 2.2 实时荧光定量 PCR 检测方法建立

以重组质粒为模板进行实时荧光定量 PCR 反应。从图 3 和图 4 看出, 荧光信号强度和质粒初始拷贝数高度线性相关, 相关系数均  $R^2 > 0.99$ 。 *AhMT II* 基因和 *actin* 基因的线性范围分别为  $10^7 \sim 10^{12}$  和  $10^5 \sim 10^{12}$ 。 溶解曲线(图 5) 峰专一, 无非特异性信号干扰, 表明所获得的实时荧光定量 PCR 产物纯度高, 具有良好的特异性。

## 2.3 花生幼苗 *AhMT II* mRNA 表达水平检测结果

表达水平  $K$  值结果如表 1 所示, 对照组中花

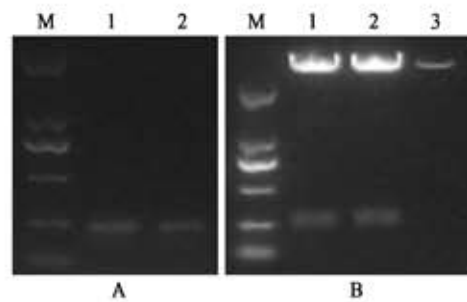


图 2 重组载体的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombination plasmid.

M: DNA marker (DL2000); A: 1 和 2 分别为 PMD18-*AhMT II* 和 PMD18-*actin* 的菌落 PCR 鉴定结果; B: 1, 2 和 3 分别为 PMD18-*AhMT II*、PMD18-*actin* 和空载体的双酶切鉴定结果

M: DNA marker (DL2000); A: 1 and 2 indicate the colony PCR product of PMD18-*AhMT II* and PMD18-*actin*, respectively; B: 1, 2 and 3 indicate the double digestion product of PMD18-*AhMT II*, PMD18-*actin* and control vector.

生幼苗不同营养器官 *AhMT II* mRNA 表达水平  $K$  值为幼根  $>$  叶  $>$  茎; 统计分析表明, 不同营养器官之间差异极显著, 且高富集镉品种 XA004 根部表达水平显著大于低富集镉品种 XD<sub>1</sub>011 ( $P < 0.01$ )。在试验镉处理水平范围内, 茎部的 *AhMT II* mRNA 表达水平  $K$  值变化不显著, 而根部和叶的  $K$  值则呈现出先增后减的抛物线趋势。根部的  $K$  值在镉处理水平为  $50 \mu\text{mol/L}$  时达到最大值, 且在  $0 \sim 50 \mu\text{mol/L}$  之间镉处理水平与品种 XA004 和 XD<sub>1</sub>011 的  $K$  值相关系数  $R^2$  分别为 0.977 和 0.96。品种 XA004 叶的  $K$  值在镉处理水平  $100 \mu\text{mol/L}$  时达最大值, 镉处理水平与  $K$  值相关系数

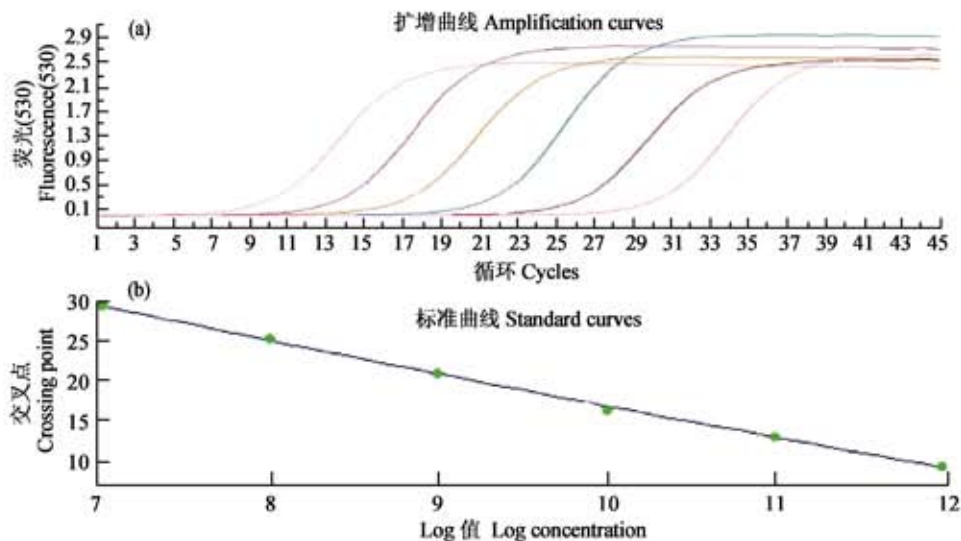


图 3 PMD18T-*AhMT II* 的扩增动力曲线 (a) 和回归曲线 (b)

Fig. 3 The dynamical curve (a) and the regression curve (b) for PMD18T- *AhMT II* amplification.

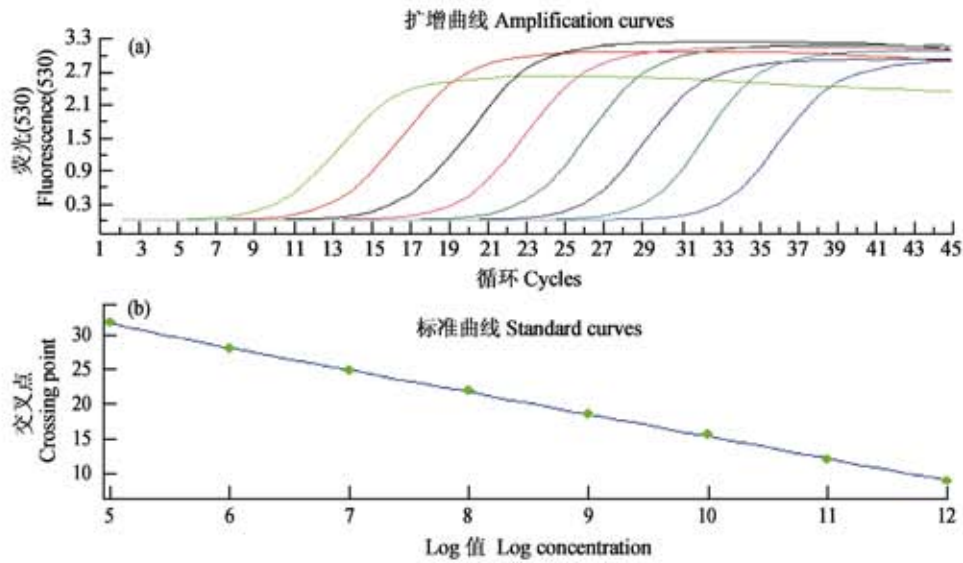


图 4 PMD18T-actin 的扩增动力曲线 (a) 和回归曲线 (b)

Fig. 4 The dynamical curve (a) and the regression curve (b) for PMD18T-actin amplification.

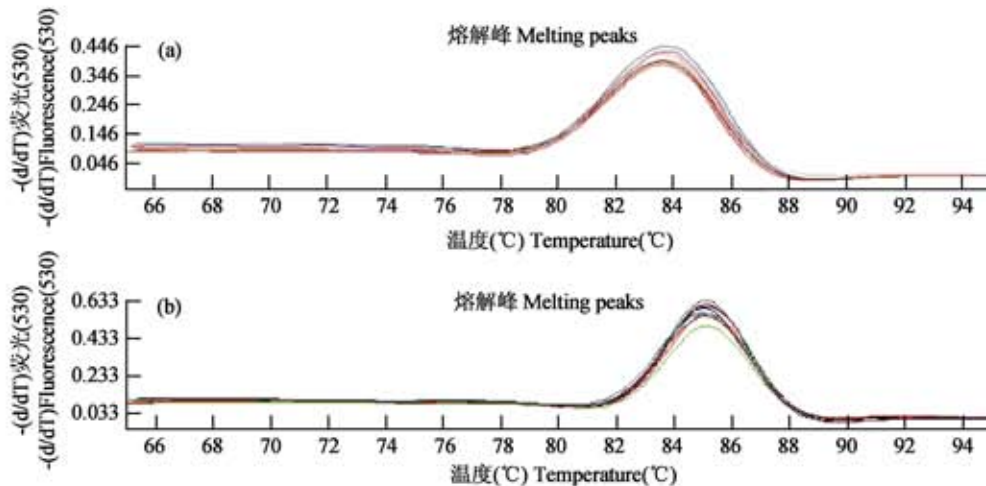


图 5 PMD18T-*AhMT II* (a) 和 PMD18T-actin (b) 扩增产物的熔解曲线

Fig. 5 The melting curve of the PMD18T-*AhMT II* (a) and PMD18T-actin (b) in the real time PCR.

表 1 镉处理对花生幼苗 *AhMT II* mRNA 表达水平 *K* 值的影响

Table 1 Effect of Cd on *AhMT II* mRNA expression level *K* value.

品种 Varieties	营养器官 Vegetative organs	镉处理水平 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Cd concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		0	10	50	100	200
XA004	根 Roots	$3.44 \pm 0.22\text{A}$	$3.58 \pm 0.34$	$4.17 \pm 0.48$	$3.08 \pm 0.42$	$2.89 \pm 0.32$
	叶 Leaves	$1.14 \pm 0.19\text{B}$	$1.61 \pm 0.13$	$2.57 \pm 0.24$	$2.81 \pm 0.31$	$2.7 \pm 0.29$
	茎 Stems	$0.09 \pm 0.05\text{C}$	$0.07 \pm 0.06$	$0.13 \pm 0.08$	$0.08 \pm 0.04$	$0.07 \pm 0.03$
XD <sub>1</sub> 011	根 Roots	$2.1 \pm 0.11\text{A}$	$2.87 \pm 0.16$	$3.66 \pm 0.23$	$3.09 \pm 0.27$	$1.76 \pm 0.14$
	叶 Leaves	$1.02 \pm 0.09\text{B}$	$1.69 \pm 0.16$	$2.17 \pm 0.25$	$2.0 \pm 0.21$	$2.08 \pm 0.18$
	茎 Stems	$0.08 \pm 0.03\text{C}$	$0.09 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.09$	$0.13 \pm 0.07$	$0.1 \pm 0.08$

注:表中值为 3 次重复试验的均值和标准偏差。在同一列数据中,不同字母表示在  $P < 0.01$  水平上差异显著。

Note: Each value is the mean of three individual triplicates  $\pm$  SD, different letters in the same row mean significantly differences at 1% level.

$R^2$  为 0.959; 而品种 XD<sub>1</sub>011 叶的  $K$  值在镉处理水平 50  $\mu\text{mol/L}$  达最大值, 镉处理水平与  $K$  值相关系数  $R^2$  为 0.91。由此推测, 在一定镉浓度处理范围内, *AhMT II* mRNA 表达水平受镉胁迫诱导而升高, 随着镉浓度持续增加, 植物细胞伤害逐渐加重, *AhMT II* mRNA 表达受到影响而减弱, 而茎对此反应不敏感。

### 3 讨论

花生是我国净出口农产品之一, 但近年来由于工业废水排放等造成农田环境污染日益加重, 使得重金属镉含量超标问题困扰我国花生出口, 影响出口企业和农民收入。而检测花生镉富集能力的技术方法迄今为止尚鲜见报道。金属硫蛋白 (MT) 可通过巯基与金属离子结合, 降低重金属离子的毒害作用<sup>[7,8]</sup>。Iiasagawa 等<sup>[9]</sup> 将酵母 *MT* 基因 (*CUP1*) 转入花椰菜中, 发现转基因花椰菜对镉的耐性和富集性都要高于未转基因植株, 尤其是在上部叶片中。Ma 等<sup>[10]</sup> 用  $\text{Cd}^{2+}$  分别处理紫羊茅 24 h, *mcMT1* 表达也大大增强。花生 *AhMT II* 基因是植物金属硫蛋白基因家族的一种, 将其构建原核表达载体和植物表达载体分别转化大肠杆菌和拟南芥, 转化菌表现出较高的  $\text{Cd}^{2+}$  耐受性和累积量<sup>[11]</sup>。传统的荧光相对定量方法操作比较简便, 但结果准确率相对偏低<sup>[12,13]</sup>。本实验采用与重金属镉吸收密切相关的金属硫蛋白 *MT II* 基因克隆技术, 通过构建 *PMD18T-AhMT II* 和 *PMD18T-actin* 重组质粒, 成功建立了检测花生 *AhMT II* mRNA 表达水平的 SYBR Green I 实时定量 PCR 实验方法, 该方法可用于快速筛选鉴定不同镉富集花生基因型用于育种等研究工作。

前期研究已经表明, 不同浓度镉胁迫下花生不同器官富集水平存在显著差异<sup>[14,15]</sup>, 本研究检测了不同浓度镉处理花生幼苗的不同营养器官 *AhMT II* mRNA 表达差异, 研究发现花生幼苗期不同营养器官 *AhMT II* mRNA 表达水平  $K$  值差异显著 ( $P < 0.01$ ), 根部和叶部表达水平  $K$  值与镉

处理水平间具有较高相关性, 不同镉处理水平与花生幼苗 *AhMT II* mRNA 表达具有高度相关性, 不同花生基因型间也存在差异, 推测与镉胁迫浓度间存在显著相关性, 其分子机制尚有待于进一步分析。研究结果可为后期筛选低富集镉花生品种提供理论和技术支持。

### 参 考 文 献

- [1] 万书波, 单世华, 李春娟, 等. 我国花生安全生产现状与策略[J]. 花生学报, 2005, 34(1): 1-4.
- [2] 常团结, 朱 祯. 金属硫蛋白研究进展(二)植物 *MT* 基因的表达特征及其功能[J]. 生物技术通报, 2002, 3: 5-10.
- [3] 朱 捷, 杨成君, 王 君. 荧光定量 PCR 技术及其在科研中的应用[J]. 生物技术通讯, 2009, 2: 73-76.
- [4] 欧阳松应, 杨 冬. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74-76.
- [5] 王梁燕, 洪其华. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 2(2): 62-67.
- [6] 张 罕, 吕 喆, 李冬妹, 等. 实时定量 PCR 分析小鼠树突状细胞 TLR4 mRNA 表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 3: 221-224.
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C (T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(9): 883-887.
- [9] Iiasagawa I, Emiko T, Michio S. Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUP1*) [J]. Plant Soil, 1997, 196: 277-281.
- [10] Ma M, Lau P S, Jia Y T, et al. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin [J]. Plant Sci., 2003, 164: 51-60.
- [11] 全先庆. 花生金属硫蛋白基因的克隆及 *AhMT2 $\alpha$*  基因的功能鉴定[D]. 山东: 山东师范大学, 博士学位论文, 2007.
- [12] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. Ann. Rev. Plant Biol., 2002, 53: 159-182.
- [13] 张晓钰, 茹炳根. 植物类 MT 与植物络合肽[J]. 生命科学, 2000, 12(4): 170-175.
- [14] 单世华, 范仲学, 万书波, 等. 镉处理对不同基因型花生产量及品质的影响[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(3): 102-108.
- [15] 范仲学, 单世华, 杨志艺, 等. 重金属镉在 5 类花生不同部位的分布特征及其对产量的影响[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(5): 102-107.