

3 种渗透剂对转基因烟草根系 枯草芽孢杆菌纤溶酶(BSFE)分泌的调节

王瑞刚^{1,2}, 张艳春², 张子义¹, 吴自荣², 王水平²

(1. 内蒙古农业大学生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 用 0.05% ~ 8.00% 的甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 等 3 种渗透调节剂可提高转枯草芽孢杆菌纤溶酶 (*Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme, BSFE) 转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 根系 BSFE 的分泌表达水平, 其水培液 BSFE 活性在 15 d 内基本呈抛物线型变化趋势。经 3 种渗透剂处理后转 BSFE 基因烟草水培液的 BSFE 活性峰值明显高于对照, 且出现时间比对照相对延迟 1-2 d。甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 可作为该转基因烟草根系 BSFE 分泌表达的有效化学调节剂。

关键词: 枯草芽孢杆菌纤溶酶; 转基因烟草; 渗透调节; 根系分泌

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)02-0001-05

Regulation of three penetrants on secretion of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme from transgenic tobacco's root system WANG Rui-gang^{1,2}, ZHANG Yan-chun², ZHANG Zi-yi¹, WU Zi-rong², WANG Shui-ping² (1. School of Bioengineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(2): 1-5

Abstract: The different concentrations (0.05% - 8.00%) of penetrants such as mannitol, sorbitol and polyethylene glycol 6000 can increase the expression and secretion level of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme (BSFE) from root system of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). The BSFE activity in liquid culture medium took the parabolic change tendency within 15 d cultured. After treated by three penetrants, the peak values of BSFE activity was apparently higher than that of the control, and the peaks appeared 1-2 d later than that of the control. Mannitol, sorbitol and polyethylene glycol 6000 can be used as the effective chemical regulators for BSFE expression and secretion from the transgenic tobacco's root system.

Key words: *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme (BSFE); transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); osmoregulation; secretion of root system

甘露醇、山梨醇和聚乙二醇做为渗透剂, 被广泛应用于医药领域^[1], 在农业生产中常常利用它们改善植物特别是种子的抗水分胁迫能力^[2,3]。另外, 利用聚乙二醇的渗透性增加外源基因在生物组织中的转化频率的技术也已成熟^[4-7]。为此, 本研究利用甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 的渗透性改善转枯草芽孢杆菌纤溶酶 (*Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme, BSFE) 基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 根细胞的 BSFE 分泌能力, 从而寻找植物根系外源蛋白表达系统的有效化学调节途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 野生型烟草: '革新一号' (*Nicotiana tabacum* L.)。转基因烟草: 转枯草芽孢杆菌纤溶酶基因烟草, 背景为 '革新一号'。

收稿日期: 2004-07-02

基金项目: 上海市科学技术委员会重大项目(985419000-3)

作者简介: 王瑞刚(1972-), 男, 内蒙古赤峰人, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学与资源植物化学的有关研究。

1.1.2 水培溶液及试剂 对照:1/10 MS 培养液; 处理:分别配置含 0.05%、0.50%、2.00% 和 8.00% 甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 的 1/10 MS 培养液, pH 6.0。

甘露醇(mannitol)和山梨醇(sorbitol)购于上海化学试剂总厂所属上海试剂二厂,聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000)日本进口,上海化学试剂厂分装。

1.2 方法

实验于 1999 年 9 月—2002 年 5 月在华东师范大学生命科学学院植物分子生物学实验室、分子生物学实验室和生物站完成。

1.2.1 培养方法 将转 BSFE 基因烟草根部分别置于盛有 10 mL 含有上述各浓度渗透剂的 1/10 MS 培养液的小培养皿(直径为 60 mm)内,密闭于内含 20 mL 蒸馏水的透明培养罐(直径 75 mm, 高 95 mm)中。在 25℃, 每天光照 16 h 的环境下培养 15 d, 各处理浓度设 3 个重复, 每个重复为 3 株培养 6 周龄的转基因烟草。对照为 1/10 MS 培养液, 同法培养。分别在培养 1~15 d 内每天各取 200 μ L 培养液进行 BSFE 活性测定, 每次取样后补充等量培养液。

1.2.2 根系体积测定 排水法^[8]。

1.2.3 BSFE 活性测定 用 0.03 mol \cdot L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.8)配置 1 mg \cdot mL⁻¹ 可溶性淀粉溶液, 按

W(猪纤维蛋白):V(可溶性淀粉-磷酸缓冲液) = 1 mg : 1 mL 的比例加入猪纤维蛋白, 充分研磨, 即为底物液。在 721 型分光光度计上于 655 nm 波长下, 以可溶性淀粉-磷酸缓冲液调零, 以 1.35 mL 底物液 37℃ 保温 10 min 后的 OD₆₅₅ 为初始值, 加入 0.15 mL 待测样品混匀, 37℃ 下反应 10 min, 加入 0.087 g \cdot mL⁻¹ 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 30 μ L, 冰浴 5 min 以终止反应, 测 OD₆₅₅ 记为终止值, 根据标准曲线计算 BSFE 活性。

标准曲线为 $y = 42.125 \times (\text{OD}_{655} \text{ 初始值} - \text{OD}_{655} \text{ 终止值}) - 2.069$, $R^2 = 0.994$ 。BSFE 活性即为上述 y 值与根系体积的比值, 即单位根体积单位水培液的 BSFE 纤溶活性, 单位为 U \cdot mL⁻¹。BSFE 活性为 3 次重复的平均值 $\bar{X} \pm SD (n=3)$ 。

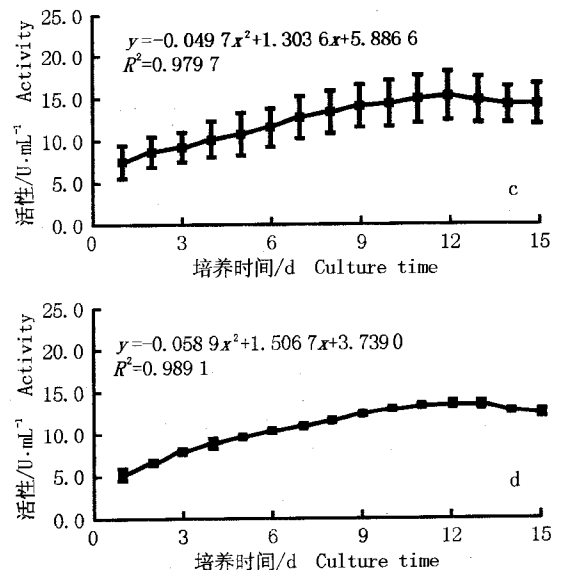
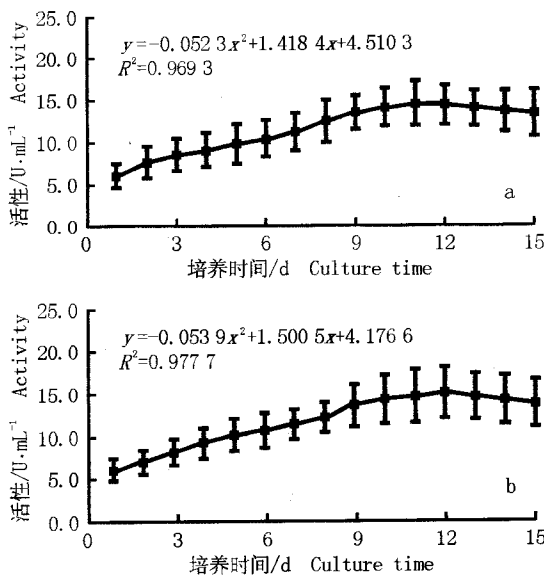
1.3 数据分析

采用 EXCEL 2000 软件做图并进行统计分析。

2 结果和分析

2.1 甘露醇对转 BSFE 基因烟草根系 BSFE 分泌表达的调节

2.1.1 甘露醇处理后水培液中 BSFE 活性的消长规律 用不同浓度甘露醇处理后, 转基因烟草水培液 BSFE 活性呈抛物线型消长趋势(图 1), 与对照



a: 0.05% 甘露醇 0.05% mannitol; b: 0.50% 甘露醇 0.50% mannitol; c: 2.00% 甘露醇 2.00% mannitol; d: 8.00% 甘露醇 8.00% mannitol

图 1 甘露醇处理后转基因烟草水培液中枯草芽孢杆菌纤溶酶活性的消长规律

Fig. 1 The activity changes of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme in liquid culture media of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) after treatments with different concentrations of mannitol

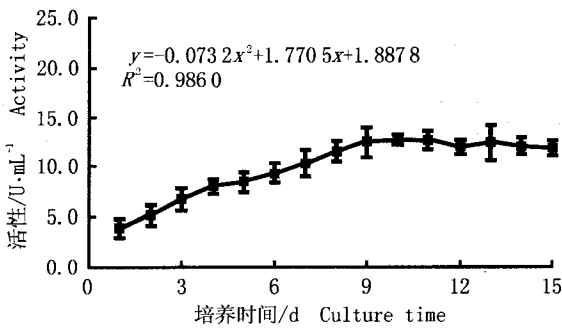


图2 1/10 MS 培养液中枯草芽孢杆菌纤溶酶活性变化
Fig. 2 The activity change of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme in 1/10 MS liquid culture medium of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

(1/10MS 培养液)水培液的 BSFE 活性消长规律基本一致(图2),可模拟为二次回归模型。

2.1.2 转基因烟草根系 BSFE 分泌对不同浓度甘露醇处理的响应 从图1可以看出,对照水培液 BSFE 活性除在培养第9天略高于8.00%甘露醇处理组外,其余均比甘露醇处理组低,说明甘露醇处理可以提高该转基因烟草水培液的 BSFE 活性。

比较4种浓度甘露醇处理组的结果可发现,在较低浓度范围内,水培液中 BSFE 活性随甘露醇浓度升高而增加;超过该浓度后,BSFE 活性则随甘露醇浓度增加而有所降低,其拐点在培养前期(1~9 d)为2.00%,在培养后期(10~15 d)为0.50%,表明甘露醇对该转基因烟草根系 BSFE 分泌表达的调节具有浓度效应。较低浓度甘露醇可促进根系 BSFE 的分泌表达,而高浓度甘露醇处理,尽管也能促进 BSFE 的分泌,但其分泌水平有所降低,这可能与甘露醇产生的渗透胁迫对植物的伤害有关。

另外,对照以及4种浓度甘露醇处理后水培液中 BSFE 活性峰值出现的时间有所不同。1/10 MS 培养液(对照)中 BSFE 峰值出现在培养后的第10天,0.05%甘露醇处理组出现在第11天,而0.50%、2.00%和8.00%甘露醇处理组均出现在第12天,说明甘露醇对促进该转基因烟草根系 BSFE 的分泌和提高水培液中 BSFE 的稳定性有一定作用。

2.2 山梨醇对转 BSFE 基因烟草根系 BSFE 分泌表达的调节

2.2.1 山梨醇处理后水培液中 BSFE 活性的消长规律 不同浓度山梨醇处理后转基因烟草水培液中 BSFE 活性消长规律(图3)与1/10 MS 培养液(对照)的趋势一致,基本表现为抛物线型变化趋势,可

模拟为二次回归模型。

2.2.2 转基因烟草根系 BSFE 分泌对不同浓度山梨醇处理的响应 由图3可见,在1~15 d的培养期内,0.05%、0.50%和8.00%山梨醇处理组的水培液中 BSFE 活性均明显高于对照组(1/10 MS);2.00%山梨醇处理组则表现为培养初期和后期的 BSFE 活性高于对照组,培养中期的第4~10天却低于对照组,这一结果说明,山梨醇处理可促进转基因烟草根系 BSFE 的分泌表达。然而,比较4种浓度的处理效果却发现,在0.05%~2.00%的低浓度范围内,水培液中 BSFE 活性有随山梨醇浓度升高而降低的趋势;而用2.00%~8.00%的较高浓度山梨醇处理后,水培液的 BSFE 活性却有所回升。这说明较低浓度山梨醇可能更适用于对该转基因烟草根系 BSFE 分泌表达的调节,而较高浓度山梨醇可能与其渗透调节作用有关。

另外,山梨醇处理后,水培液中 BSFE 活性峰值明显高于对照,且峰值出现时间较对照延迟1~2 d。这一结果证实了山梨醇在调节该转基因烟草根系 BSFE 分泌表达中的作用。

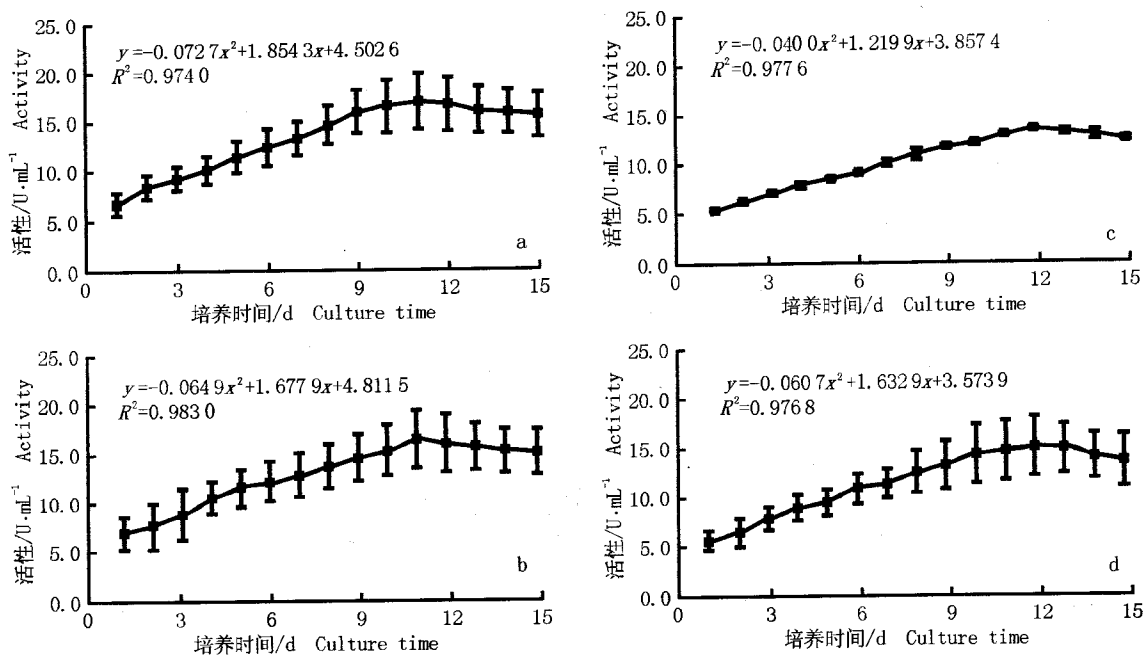
2.3 聚乙二醇6000对转 BSFE 基因烟草根系 BSFE 分泌表达的调节

2.3.1 聚乙二醇6000处理后水培液中 BSFE 活性的消长规律 用不同浓度聚乙二醇6000处理后转基因烟草水培液中 BSFE 活性变化见图4。可以看出,聚乙二醇6000处理后的1~15 d内该转基因烟草水培液中 BSFE 活性呈抛物线型消长规律,与对照(1/10 MS)的 BSFE 活性消长规律一致,可模拟为二次回归模型。

2.3.2 转基因烟草根系 BSFE 分泌对不同浓度聚乙二醇6000的响应 从图4可以看出,除个别时期对照组(1/10 MS)水培液 BSFE 活性略高于0.50%聚乙二醇6000处理组外,其余处理组水培液的 BSFE 活性均较对照组高,说明聚乙二醇6000处理也可对转基因烟草根系的 BSFE 分泌起促进作用。

比较4种浓度聚乙二醇6000的处理结果,发现不同浓度处理组间无显著差异。

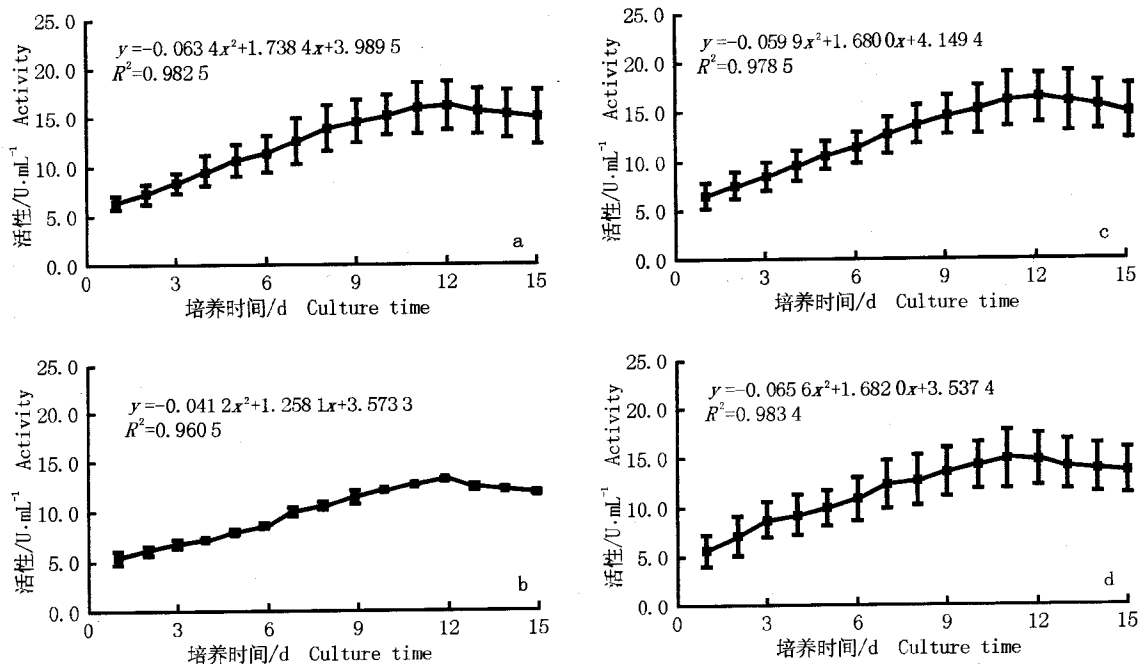
从图4还可以看出,聚乙二醇6000处理后水培液 BSFE 活性峰值明显高于对照,且出现时间比对照延迟1~2 d,说明聚乙二醇6000可能在增加该转基因烟草根系 BSFE 分泌表达及增加溶液中 BSFE 的稳定性中具有积极作用。



a: 0.05% 山梨醇 0.05% sorbitol; b: 0.50% 山梨醇 0.50% sorbitol; c: 2.00% 山梨醇 2.00% sorbitol; d: 8.00% 山梨醇 8.00% sorbitol

图3 山梨醇处理后转基因烟草水培液中枯草芽孢杆菌纤溶酶活性的消长规律

Fig. 3 The activity changes of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme in liquid culture media of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) after treatments with different concentrations of sorbitol



a: 0.05% 聚乙二醇 6000 0.05% PEG 6000; b: 0.50% 聚乙二醇 6000 0.50% PEG 6000;
c: 2.00% 聚乙二醇 6000 2.00% PEG 6000; d: 8.00% 聚乙二醇 6000 8.00% PEG 6000

图4 聚乙二醇 6000 处理后转基因烟草水培液中枯草芽孢杆菌纤溶酶活性的消长规律

Fig. 4 The activity changes of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme in liquid culture media of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) after treatments with different concentrations of PEG 6000

2.4 甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 对水培转基因烟草生长的影响

在含有 0.05% ~ 8.00% 的甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 的 1/10 MS 培养液中经过 15 d 的培养, 转基因烟草表现出不同的生长状态。观察其叶枯萎情况表明, 在含有 0.05% ~ 8.00% 聚乙二醇 6000、0.05% ~ 2.00% 甘露醇以及 0.05% ~ 0.50% 山梨醇的 1/10MS 培养液中, 转基因烟草在 15 d 的处理期内生长正常, 未出现枯死叶片; 而在含有 8.00% 甘露醇和 2.00% ~ 8.00% 山梨醇的 1/10MS 培养液中, 转基因烟草出现叶片枯死现象。推测高浓度的甘露醇和山梨醇已对转基因烟草的生长造成胁迫或伤害。

3 讨 论

研究表明, 在本实验所设置的浓度范围内, 甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 处理均可促进转基因烟草根系 BSFE 的分泌表达, 且其培养液中 BSFE 活性的消长规律与对照组基本一致, 并表现出抛物线型变化趋势, 说明甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 处理并未打破植物本身所固有的代谢规律。

甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 处理后转基因烟草水培液的 BSFE 活性峰值明显高于对照 (1/10 MS), 其出现时间相对延迟 1 ~ 2 d, 说明这 3 种渗透剂具有促进转基因烟草根系 BSFE 分泌表达的作用。由于甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 本身不具有纤溶活性, 因此, 推测它们对转基因烟草生长代谢、调节根系分泌表达、改善根细胞 BSFE 分泌以及增加溶液中 BSFE 稳定性具有一定的作用。

尽管山梨醇和甘露醇均为大分子物质, 但二者均可被细胞吸收, 且甘露醇还可被细胞水解^[9], 因此, 甘露醇和山梨醇对植物生长的影响以及对转基因烟草根系 BSFE 分泌的调节并不仅仅是渗透调节所致。有研究者认为山梨醇对植物生长的有利效应并不是由渗透压变化所致^[9]; 也有研究表明, 山梨醇可以促进细胞的生长和分化^[10]; 还有研究证实 1% 甘露醇可明显促进水稻花药培养愈伤组织的形成^[11]。由此推测甘露醇和山梨醇可能是通过影响

转基因烟草的生长代谢来提高其根系 BSFE 分泌水平的。

有关聚乙二醇对植物生长的调节机理尚不清楚。基于聚乙二醇在植物遗传转化中的渗透调节作用^[12], 推测其主要是通过渗透调节起作用。实验结果表明, 不同浓度聚乙二醇 6000 处理组的 BSFE 活性没有显著差异, 说明聚乙二醇 6000 的作用并不与植物代谢有关。

由此可见, 甘露醇、山梨醇和聚乙二醇 6000 可作为转基因烟草根系 BSFE 分泌表达的化学调节剂。基于 3 种渗透剂处理后转基因烟草的生长情况, 建议在生产中使用较低浓度的上述 3 种渗透剂进行化学调节。

参考文献:

- [1] 罗明生, 高天惠. 药剂辅料大全[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1993. 265-267, 351-353, 759-764.
- [2] 王瑞刚. 旱作直播甜菜栽培技术[A]. 内蒙古教育厅: 农牧业实用技术丛书——农业分册[M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 1999. 32.
- [3] 刘晓艳, 丘泰球, 胡爱军, 等. 几种物理方法对细胞膜通透性的影响[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 48-49.
- [4] 瞿礼嘉, 顾红雅, 胡 苹, 等. 现代生物技术导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1999. 248.
- [5] Negrutiu I, Shillito R D, Potykus I, et al. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions[J]. Plant Mol Biol, 1987, 8(5): 363-373.
- [6] Sahi S V, Chilton M D, Chilton W S, et al. Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(10): 3879-3883.
- [7] Shillito R D, Saul M W, Paszkowski J, et al. High efficiency direct gene transfer to plants[J]. Bio Technology, 1985, 3(12): 1099-1103.
- [8] 华东师范大学生物系植物生理教研室. 植物生理学实验指导[M]. 上海: 人民教育出版社, 1980. 66-67.
- [9] 丁世萍, 严菊强, 季道藩. 糖类在植物组织培养中的效应[J]. 植物学通报, 1998, 15(6): 42-46.
- [10] Pua E C, Chong C. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No. 5[J]. Can J Bot, 1984, 62: 1545-1549.
- [11] 王敬驹, 颜昌敬. 农作物组织培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 495.
- [12] 许智宏, 刘春明. 植物的遗传转化和基因工程[A]. 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 54-76.

(责任编辑: 惠 红)