



转 *DAS/DAK* 基因天竺葵甲醛 代谢途径与吸收能力研究

周升恩, 肖素勤, 韩 双, 轩秀霞, 孙 振, 李昆志, 陈丽梅*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明 650500)

摘 要:以天竺葵(*Pelargonium* sp. Frensham)为材料,通过在天竺葵的叶绿体中过量表达来自甲基营养型酵母同化甲醛(HCHO)途径的关键基因二羟基丙酮激酶基因(*DAS*)和二羟基丙酮合酶基因(*DAK*),获得具有 *DAS/DAK* HCHO 同化途径的转基因天竺葵,利用¹³C-NMR 技术对液体 H¹³CHO 胁迫下野生型和转基因天竺葵 H¹³CHO 代谢产物进行了比较分析,并测定了气体 HCHO 胁迫下野生型和转基因天竺葵的生理生化指标。结果显示:(1)2 mmol · L⁻¹ 液体 H¹³CHO 胁迫下,过表达 *DAS/DAK* 基因增强了卡尔文循环在转基因天竺葵 H¹³CHO 代谢中的作用,使糖类物质生成量增加约 2.85 倍,同时改变了天竺葵中原有 HCHO 代谢途径。(2)48 μg · L⁻¹ 的气体 HCHO 胁迫下,转基因天竺葵叶片中 H₂O₂、丙二醛和蛋白羧基的含量显著小于野生型。(3)在环境污染气体 HCHO 的胁迫下,转基因天竺葵叶片的 HCHO 吸收效率和气孔传导率显著高于野生型。研究表明,过表达 *DAS/DAK* 基因能够有效地提高天竺葵净化环境中污染气体 HCHO 的能力。

关键词:*DAS/DAK* 基因;转基因天竺葵;HCHO 代谢;生理特性

中图分类号:Q789

文献标志码:A

Metabolic Pathways and Absorptive Capacity of Formaldehyde in Geranium Introduced *DAS/DAK* Genes

ZHOU Sheng'en, XIAO Sunqin, HAN Shuang, XUAN Xiuxia, SUN Zhen, LI Kunzhi, CHEN Limei*

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: This study overexpressed dihydroxyacetone synthase (*DAS*) and dihydroxyacetone kinase (*DAK*) genes, which are two key genes for formaldehyde (HCHO) assimilation in methylotrophic yeasts, in chloroplasts of geranium to obtain transgenic geranium with *DAS/DAK* HCHO assimilation pathway. The metabolites of wild type and transgenic geranium under liquid H¹³CHO stress were comparatively analyzed by ¹³C-NMR, and the physiological and biochemical indexes of wild type and transgenic geranium under 48 μg · L⁻¹ gaseous HCHO stress were measured. The results showed that: (1) Under 2 mmol · L⁻¹ liquid H¹³CHO stress, overexpression of *DAS/DAK* genes enhanced the role of Calvin cycle during the H¹³CHO metabolism in transgenic geranium, thereby the yield of sugars increased approximately 2.85-fold, and simultaneously changed the original HCHO metabolic pathways of geranium. (2) Under 48 μg · L⁻¹ gaseous HCHO stress, the contents of H₂O₂, malondialdehyde and protein carbonyl in transgenic geranium leaves were much less than those of wild type. (3) Under environment-polluted gaseous HCHO stress, the absorptive capacity of HCHO and stomata conductance in transgenic geranium leaves remained significantly higher than those of wild type. These results suggest that overexpression of *DAS/DAK* genes can effectively improve the ability of geranium to purify the environmental-polluted gaseous HCHO.

Key words: *DAS/DAK* genes; transgenic geranium; HCHO metabolism; physiological characteristics

收稿日期: 2014-11-19; 修改稿收到日期: 2015-01-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30970263)

作者简介: 周升恩 (1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物代谢基因工程研究。E-mail: zhoushengen90@163.com

* 通信作者: 陈丽梅, 教授, 博士生导师, 主要从事植物代谢途径基因工程研究。E-mail: chenlimeikm@126.com

甲醛(HCHO)污染以其来源广、污染重、治理难而成为一个重要的环境问题。在众多治理HCHO污染的方法中,生物净化法以其简单自然、经济、科学以及持久有效等优点受到广泛关注。对生物净化法的机理研究发现微生物和植物都能吸收和代谢HCHO^[1-5]。虽然植物能够吸收并代谢HCHO,但环境中极低浓度的气体HCHO就会对植物产生胁迫,导致叶片气孔传导率下降,无法快速有效吸收HCHO供植物代谢^[6]。在植物体中过量表达HCHO同化途径的相关酶能够提高植物吸收和代谢HCHO的能力^[7-10]。甲基型营养酵母的木酮糖单磷酸途径(XuMP)能够同化HCHO,在该途径中同化HCHO的关键酶是二羟基丙酮激酶(DAS)和二羟基丙酮合酶(DAK),在DAS作用下,5-磷酸木酮糖(Xu5P)可以固定HCHO,生成三磷酸甘油醛(GAP)和二羟基丙酮(DHA),DHA对细胞有毒,但可以通过DAK的作用形成无毒的磷酸二羟基丙酮(DHAP)^[11]。该HCHO固定途径中的Xu5P、GAP和DHAP是植物卡尔文循环途径中的关键中间代谢产物。因此,如果在植物叶绿体中过量表达来自于甲基型营养酵母中的DAS/DAK基因,也许可以在植物叶绿体中构建一条光合HCHO

同化途径(图1)。为此,Xiao等^[12]在模式植物烟草的叶绿体中过量表达DAS/DAK基因,结果表明该途径能够在烟草的叶绿体中发挥作用,并提高了转基因烟草吸收和同化HCHO的能力。

天竺葵以其娇艳的花色、多变的花瓣和较长的花期而逐渐成为室内装饰及露天花坛使用的主要材料之一。它能够通过组织培养快速繁殖,常被用作转基因操作的材料。本研究以天竺葵为材料,在野生型天竺葵的叶绿体中过量表达DAS和DAK基因,利用¹³C-NMR技术对液体H¹³CHO胁迫下野生型和转基因天竺葵叶片H¹³CHO代谢产物进行比较分析,并通过测定气体HCHO胁迫下野生型和转基因天竺葵的生理生化指标,分析其对天竺葵HCHO抗性、HCHO吸收效率以及气孔传导率的影响,为利用DAS/DAK基因开发转基因观赏植物治理气体HCHO污染的技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 天竺葵的转化和培养

无菌野生型天竺葵在MS培养基(pH 5.7)上培养。天竺葵的转化参照Song等^[10]的方法进行。含有pKm-35S-PrbcS*-T-DAK-PROLD-PrbcS*-T-DAS^[12]表达载体的农杆菌[*Agrobacterium tumefaciens* C58C1(pMP90)]培养于含有100 μg·mL⁻¹ Spe液体LB培养基中。天竺葵的转化采用农杆菌介导的叶柄共培养方法^[13]。在含有50 μg·mL⁻¹卡那霉素(Km)的MS(含有1%蔗糖,W/V)培养基上筛选转基因天竺葵小苗。

为了得到天竺葵的无菌苗,抗性芽首先在含有50 μg·mL⁻¹ Kan的MS培养基上筛选,然后转移到含有3%蔗糖的MS培养基,并且在25℃ 100 μmol·m⁻²·s⁻¹恒定光照下培养。将筛选到的具有Km抗性的天竺葵小苗转移到含有3%蔗糖的MS培养基上继续培养,获得无菌转基因天竺葵幼苗。此外,获得的具有Km抗性且生根的天竺葵小苗转移到含有1/2珍珠岩和1/2有机土的花盆中培养,获得土壤栽培的转基因天竺葵植株。

1.2 基因组PCR和Western blot分析

用CTAB法^[14]从野生型和T₁代转基因株系叶片中提取基因组DNA作为模板。分别用DAS的上下游引物(DAS-F:5'-CATTATCTAGACAT-GAAGTTCCAC-3'/DAS-R:5'-TAAATGATTTT-GATCATGTTTTGG-3')和DAK的上下游(DAK-F:5'-CTGAAGGAAAGCTTGATCTC-3'/DAK-R:

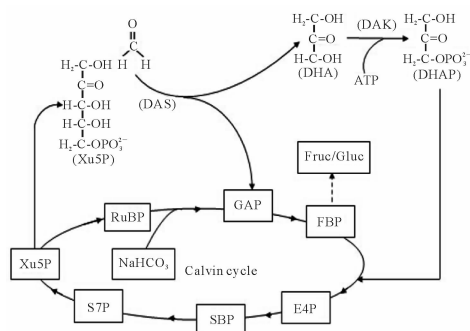


图1 在植物叶绿体中过表达DAS/DAK基因安装光合HCHO同化途径策略

Xu5P. 5-磷酸木酮糖;DHA. 二羟基丙酮;DHAP. 磷酸二羟基丙酮;
RuBP. 核酮糖-1,5-二磷酸;GAP. 3-磷酸甘油醛;FBP. 果糖-1,6-二磷酸;E4P. 赤鲜糖-4-磷酸;SBP. 景天庚酮糖-1,7-二磷酸;
S7P. 景天庚糖酮糖-7-磷酸;Gluc. 葡萄糖;Fruc. 果糖

Fig.1 Diagram of strategy for installation of a photosynthetic HCHO-assimilation pathway by over-expressing DAS/DAK genes in chloroplasts of plant
Xu5P. Xylulose-5-phosphate;DHA. Dihydroxyacetone;
DHAP. Dihydroxyacetone phosphate;RuBP. Ribulose 1,5-bisphosphate;GAP. Glyceraldehyde3-phosphate;FBP. Fructose-1,6-bisphosphate;E4P. Erythrose-4-phosphate,
SBP. Sedoheptulose-1,7-bisphosphate,S7P. Sedoheptulose-7-phosphate;Gluc. Glucose;Fruc. Fructose

5'-CTACAACTTGGTTTCAGATTTG-3')进行PCR扩增,检测 DAS 和 DAK 基因在转基因株系基因组的整合情况。

用 Plant Total Protein Extraction kit(Sigma)提取野生型和转基因株系新鲜叶片组织的总蛋白。取 15 μg 总蛋白通过 SDS-PAGE(浓度为 12%)分离后转移至 PVDF-P 膜上。分别以假丝酵母(*Candida boidinii* S2)和毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)制备的粗蛋白(5 μg)为阳性对照(PCK),随后用 *C. boidinii* S2 和 *P. pastoris* GS115 的 DAS 和 DAK 蛋白的鼠抗^[12]作一抗孵育过夜,再用辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗室温孵育 2 h,洗膜后加入 1 mL Luminol/Enhancer solution 和 1 mL CL Peroxide solution(PIERCE),混匀,浸润整个 PVDF 膜,在凝胶成像系统上用 ChemidocXRS(BIO-RAD)观测结果。

1.3 H^{13}CHO 、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 标记与 ^{13}C -NMR 分析

H^{13}CHO 和 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 购于美国 CIL 公司,液体 H^{13}CHO 和 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 处理在组培瓶中进行,从无菌培养的天竺葵植株上分别取叶片 2 g,用 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体 H^{13}CHO (含 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KHCO_3 , 0.1% MES, W/V)处理野生型天竺葵(H^{13}CHO /WT)和转基因天竺葵植株 PSK5(H^{13}CHO /PSK5)叶片 4 h,用 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (含 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KHCO_3 , 0.1% MES)溶液处理野生型天竺葵($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ /WT)叶片 4 h,以未经过 H^{13}CHO 处理的野生型天竺葵叶片为对照(CK)。在整个处理期,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的组培室中,24 h 光照下摇床振荡(100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养,处理结束后,分别用预冷无菌蒸馏水冲洗叶片 4~5 次,去除叶片表面残留的 H^{13}CHO 和 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$,无菌吸水纸吸干叶片表面残留水分,液氮速冻,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

^{13}C -NMR 分析如下:取-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存的叶片,在液氮中研磨,加 3 mL 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液(KPB, pH 7.4)抽提可溶性代谢产物,经沸水浴加热处理 3 min 使酶失活,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 g 离心 20 min。上清液经真空冷冻干燥后,用 0.5 mL 的 KPB 缓冲液溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 g 离心 3 min,取上清装入核磁管,并加入适量甲酰胺做内参和 5% $^2\text{H}_2\text{O}$ (V/V)。 ^{13}C -NMR 分析在布鲁克核磁共振仪(DRX 500-MHz)上进行,使用相关参数如下:宽带质子去耦,5-ms(90°)脉冲,谱宽 37 594 Hz,采样时间 0.5 s,延滞时间 1.2 s,样品温度保持在 25 $^{\circ}\text{C}$,每个样品采集 32 000 个数据点,扫描 1 200 次,处理数据时线宽为 4 Hz。 H^{13}CHO 标记样品中化学位移

时参照甲酰胺碳原子共振峰(166.66 ppm)。NMR 谱中共振峰通过和已知化合物 ^{13}C -NMR 谱进行比较鉴定。在计算不同样品中各代谢物的相对含量时目标共振峰以甲酰胺为内参进行积分。

1.4 测定项目和方法

1.4.1 天竺葵对 HCHO 抗性分析 将野生型和转基因植株 PSK5 幼苗置于含有 MS 固体培养基的培养瓶内,25 $^{\circ}\text{C}$ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 持续光照培养 2 周后,在其中加入一个去盖的 500 μL 的离心管,吸取 30 μL 37% 的 HCHO 溶液至该离心管中。由于 HCHO 极易挥发,HCHO 气体很快充满密闭空间,使整个瓶中的 HCHO 浓度达到 48 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养 15 d 后观察天竺葵的生长状态并采集图片。

1.4.2 丙二醛(MDA)、 H_2O_2 和蛋白羧基(PC)含量测定 将野生型和转基因植株 PSK5 幼苗置于含有 MS 固体培养基的密封盒(370 mL)内 25 $^{\circ}\text{C}$ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 持续光照培养 3~4 周生根后,在其中加入一个去盖的 500 μL 离心管,吸取 30 μL 37% HCHO 溶液,使 HCHO 浓度达到 48 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,处理 24 h 后收集叶片,液氮速冻,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。参照 Gurel 等^[15]的方法测定 MDA 和 PC 含量。参照 Gay 等^[16]的方法测定 H_2O_2 含量。

1.4.3 气体 HCHO 胁迫下天竺葵 HCHO 吸收效率和气孔传导率的测定 将温室条件下盆栽培养的生长良好、株龄和长势一致的野生型和转基因植株放入一个三面由压缩板材(59 \times 40 \times 48 cm)组成、一面有玻璃门的柜子里进行 24 h HCHO 胁迫处理,分别于 8:00、13:00、18:00 和次日 8:00 用便携式甲醛检测仪(PPM400 HTV,英国)测定柜子内的 HCHO 浓度,以未放入植株的空柜为对照(CK₁),同时用光合作用测量系统(CI-340,美国)测定叶片的气孔传导率,以相同光照和温湿度条件的柜外野生型植株为对照(CK₂)。

1.5 数据的统计分析

所有生理生化指标分析均进行 3 次重复。用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据处理和作图,用 DPS 7.05 软件进行方差分析和多重比较(Duncan 法);用 F 检验差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 转基因天竺葵的鉴定

为了检测具有 Km 抗性的天竺葵植株基因组中是否含有目的基因,以野生型和筛选出的转基因株系(PSK1、PSK4 和 PSK5)基因组为模板进行 PCR

分析,结果表明,转基因株系(PSK1、PSK4 和 PSK5)可以扩增出与阳性对照(DAS/DAK cDNA 编码区)相同的条带(约 0.5 kb),而野生型则没有扩增出任何条带(图 2, A、B),说明 DAS 和 DAK 基因均已插入到转基因株系的基因组中。

为检测目的基因在转基因株系中的表达水平,Western blot 分析结果表明,3 株 PCR 阳性植株和阳性对照(PCK)中都能检测到非常强的 77.4 kD 的 DAS 和 66.7 kD 的 DAK 信号条带,而野生型中没有检测到相应的信号条带(图 2, C、D)。这 3 个转基因株系中 PSK5 中目的基因的表达水平最高,PSK4 次之,最弱的是 PSK1。以上结果说明 DAS/DAK 基因在这 3 个转基因株系中能正常表达,因此可以将这 3 个转基因株系进行继代用于后续实验。

2.2 转基因天竺葵的 $H^{13}CHO$ 代谢产物分析

为了考察过表达 DAS 和 DAK 基因所形成的 HCHO 同化途径是否在转基因天竺葵中引导 HCHO 代谢流进入卡尔文循环,以及其发挥作用时是否改变天竺葵原有 HCHO 代谢途径, ^{13}C -NMR 分析比较了 $H^{13}CHO$ /WT、 $H^{13}CHO$ /PSK5 及 $NaH^{13}CO_3$ /WT 处理叶片的代谢谱,并以未经任何处理的野生型天竺葵抽提物作为对照(CK)检测叶片的背景 ^{13}C -NMR 信号水平,通过积分的方法计算代谢产物的相对含量。由于过量表达 DAS/DAK 基因所形成的 HCHO 同化途径与卡尔文循环偶联, $H^{13}CHO$ /PSK5 和 $NaH^{13}CO_3$ /WT 处理叶片的代谢谱应该相似。实验结果表明(图 3), $H^{13}CHO$ /PSK5 与 $NaH^{13}CO_3$ /WT 代谢产物相对含量的变化趋势相似。此外,对 $[U-^{13}C]$ Gluc(葡萄糖)和 $[U-^{13}C]$ Fruc(果糖)相对含量分析结果显示(图 3, A),与 CK 相比, $H^{13}CHO$ /WT 处理叶片中 $[U-^{13}C]$ Gluc 和 $[U-^{13}C]$ Fruc 相对含量都下降了,以 $[U-^{13}C]$ Gluc 下降最为明显($P < 0.05$),下降为 CK 的 57%,可见

野生型天竺葵叶片通过消耗内源性 Gluc 和 Fruc 来响应 HCHO 胁迫。而 $H^{13}CHO$ /PSK5 处理叶片中 $[U-^{13}C]$ Gluc 和 $[U-^{13}C]$ Fruc 的相对含量分别增加为 $H^{13}CHO$ /WT 处理的 1.86 和 12.19 倍,说明过表达 DAS 和 DAK 基因成功将 $H^{13}CHO$ 的 ^{13}C 代谢流引入卡尔文循环,使得糖类物质的生成量为 $H^{13}CHO$ /WT 处理的 2.85 倍。

进一步对 $H^{13}CHO$ 代谢重要产物分析结果显示,与 CK 相比, $H^{13}CHO$ /WT 处理叶片中 $[U-^{13}C]$ Cit(柠檬酸)相对含量与 CK 没有显著性差异($P > 0.05$,图 3, B)。但是 $H^{13}CHO$ /PSK5 处理叶片中 $[U-^{13}C]$ Cit 的相对含量比 $H^{13}CHO$ /WT 处理和 CK 呈显著性地降低($P < 0.05$,图 3, B)。 $[1-^{13}C]$ Gly(甘氨酸)的变化趋势与 $[U-^{13}C]$ Cit 相似,说明过表达 DAS/DAK 基因削弱了转基因天竺葵通过 $H^{13}CHO$ 代谢合成 $[U-^{13}C]$ Cit 和 $[1-^{13}C]$ Gly 的途径。相反,在 $H^{13}CHO$ /PSK5 处理叶片中产生了 $[2-^{13}C]$ Gly, $[2-^{13}C]$ Mal(苹果酸)、 $[3-^{13}C]$ Ser(丝氨酸)、 $[2-^{13}C]$ Glu(谷氨酸)、 $[3-^{13}C]$ Asp(天冬氨酸)以及 $[3-^{13}C]$ PA(丙氨酸)等有机酸(图 3, C),而在 $H^{13}CHO$ /WT 处理叶片和 CK 中大多没有检测到这些有机酸,说明转基因天竺葵中通过 $H^{13}CHO$ 代谢产生这些有机酸的途径得到增强。

2.3 气体 HCHO 胁迫下转基因天竺葵的抗性和抗氧化能力分析

环境中 HCHO 污染主要以气体形式存在。为了考察过表达 DAS/DAK 基因对天竺葵气体 HCHO 抗性的影响,用 $48 \mu g \cdot L^{-1}$ 气体 HCHO 处理野生型和转基因植株 PSK5 的无菌苗 15 d,结果表明转基因植株的生长状态比野生型的好,叶片白化现象较轻(图 4),这表明过表达 DAS/DAK 增强了转基因植株对气体 HCHO 的抗性。

H_2O_2 、MDA 和 PC 是细胞氧化损伤的产物,在

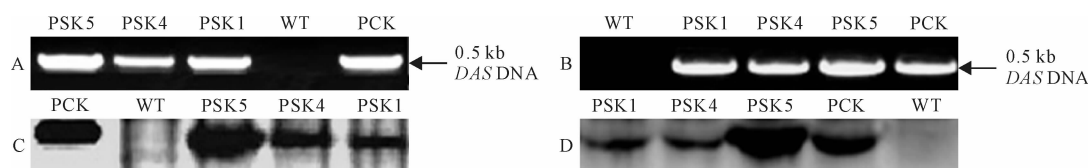


图 2 DAS 和 DAK 基因在转基因株系中整合与表达的分析

A、B 表示基因组 PCR 检测 DAS(A)和 DAK(B)基因在转基因株系中的整合情况;C、D 表示 Western blot 分析 DAS(C)和 DAK(D)基因在转基因株系中的表达情况;WT: 野生型;PSK1、PSK4、PSK5: 不同转基因株系;PCK: 阳性对照

Fig. 2 Analysis of the integration and expression of DAS and DAK genes in transgenic lines

Genomic PCR analysis to detect the integration of DAS (A) and DAK (B) genes in transgenic lines;

Western blot analysis to detect the expression of DAS (C) and DAK (D) genes in transgenic

lines; WT: Wild type; PSK1, PSK4, PSK5: Different transgenic lines; PCK: Positive control

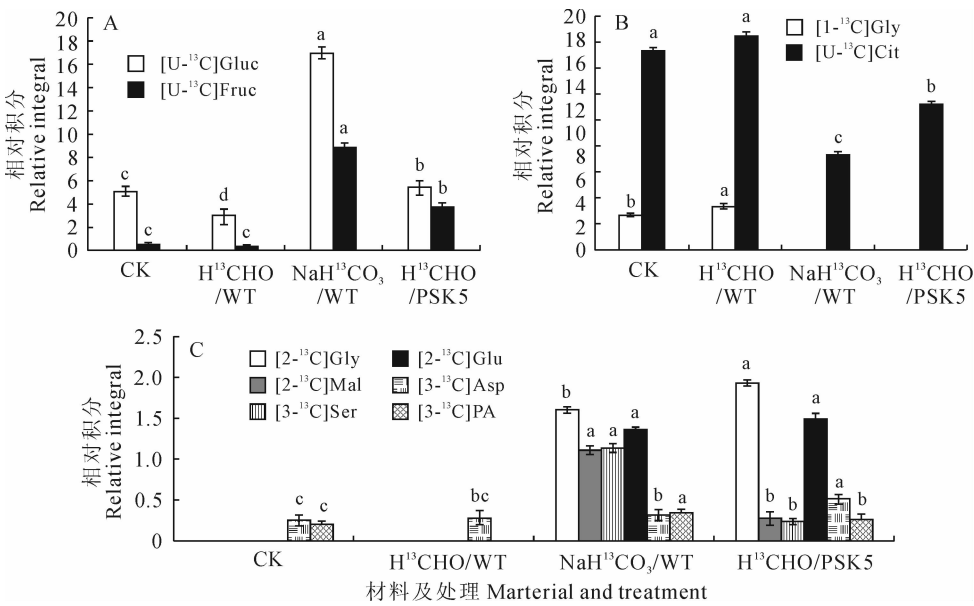


图 3 ^{13}C -NMR 分析野生型和转基因植株 $H^{13}CHO$ 和 $NaH^{13}CO_3$ 代谢产物

CK. 野生型; $H^{13}CHO/WT$. $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体 $H^{13}CHO$ 处理野生型;
 $NaH^{13}CO_3/WT$. $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体 $NaH^{13}CO_3$ 处理野生型; $H^{13}CHO/PSK5$. $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体
 $H^{13}CHO$ 处理转基因植株 PSK5; 不同字母表示在 0.05 水平有显著性差异; 下同

Fig. 3 ^{13}C -NMR analysis of $H^{13}CHO$ and $NaH^{13}CO_3$ metabolites in wild type and transgenic plant

CK. Wild type; $H^{13}CHO/WT$. Wild type treated with $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ liquid $H^{13}CHO$;
 $NaH^{13}CO_3/WT$. Wild type treated with $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ liquid $NaH^{13}CO_3$;
 $H^{13}CHO/PSK5$. Transgenic plant PSK5 treated with $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ liquid $H^{13}CHO$;
Different letters indicate significant difference at the 0.05 level. The same as below

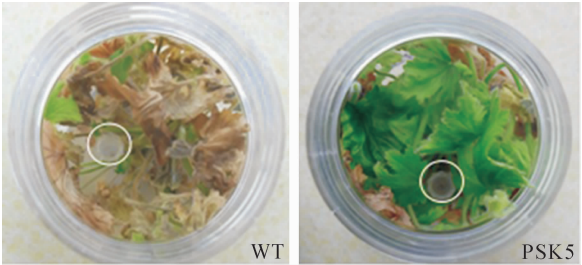


图 4 气体 $HCHO$ 胁迫下野生型和
转基因植株的生长状态

WT. 野生型; PSK5. 转基因植株

Fig. 4 The growth statue of wild type and
transgenic plant under gaseous $HCHO$ stress

WT. Wild type; PSK5. Transgenic plant

植物受到环境胁迫时其含量会明显增加。可作为氧化胁迫的指标,反映植物抗氧化能力的强弱。对野生型和转基因植株 PSK5 叶片中 H_2O_2 含量的分析结果显示,在 $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 气体 $HCHO$ 胁迫下,野生型和转基因植株叶片中 H_2O_2 含量明显升高(图 5),说明气体 $HCHO$ 对天竺葵叶片产生氧化胁迫,但是转基因植株叶片中 H_2O_2 含量升高的幅度小于野生型,说明过表达 *DAS/DAK* 基因可以缓解气体

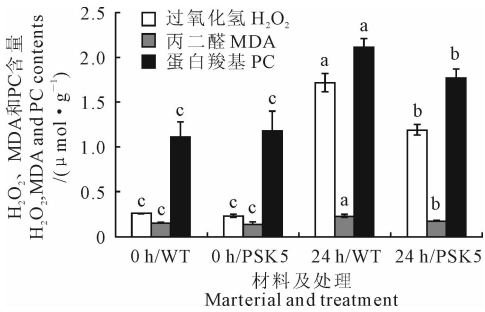


图 5 气体 $HCHO$ 胁迫下野生型和转基因植株
叶片 H_2O_2 、MDA 和 PC 含量变化

0 h/WT. 野生型; 0 h/PSK5. 转基因植株; 24 h/WT. $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
气体 $HCHO$ 处理 24 h 的野生型; 24 h/PSK5. $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
气体 $HCHO$ 处理 24 h 的转基因植株 PSK5

Fig. 5 Changes of the H_2O_2 , MDA and PC
contents in the leaves of wild type and transgenic
plant under gaseous $HCHO$ stress

0 h/WT. Wild type; 0 h/PSK5. Transgenic plant; 24 h/WT. Wild
type treated with $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ gaseous $HCHO$ for 24 h;
24 h/PSK5; Transgenic plant treated with
 $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ gaseous $HCHO$ for 24 h

$HCHO$ 胁迫下天竺葵叶片受到的氧化胁迫。 $48\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 气体 $HCHO$ 胁迫还引起野生型和转基因天竺

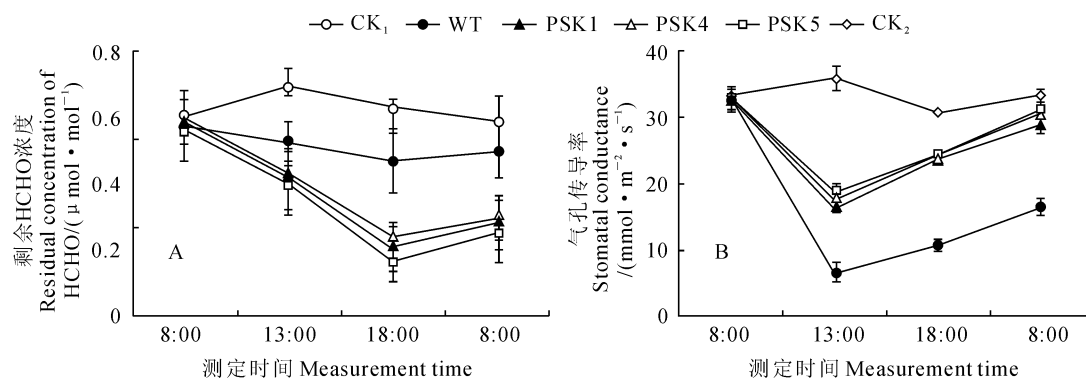


图6 野生型和转基因株系 HCHO 吸收能力(A)和气孔传导率(B)分析

A. 野生型和转基因株系吸收柜内气体 HCHO 能力分析; B. 柜外处理野生型以及柜内处理野生型和转基因株系气孔传导率分析; CK₁. 空柜; CK₂. 柜外处理野生型; WT. 野生型; PSK1、PSK4、PSK5. 不同转基因株系

Fig. 6 Analysis of the HCHO-uptake capacity (A) and stomatal conductances of wild type and transgenic lines (B)

A. Analysis of the HCHO-uptake capacity of wild type and transgenic lines in cabinet; B. Analysis of the stomatal conductance of wild type out-cabinet and wild type and transgenic lines in cabinet; CK₁. Empty cabinet;

CK₂. Wild type placed out-cabinet; WT. Wild type; PSK1, PSK4, PSK5. Different transgenic lines

葵叶片中 MDA 和 PC(图 5)含量的显著升高,说明气体 HCHO 胁迫引起天竺葵叶片中膜脂和蛋白质的过氧化,但是 MDA 和 PC 的含量在转基因植株叶片中上升的幅度比野生型小,说明过表达 DAS/DAK 基因减轻了气体 HCHO 胁迫下转基因植株叶片中膜脂和蛋白质的过氧化作用。

2.4 转基因天竺葵吸收环境污染气体 HCHO 能力的分析

压缩板在家具家装中的使用非常广泛,压缩板中使用的树脂脲醛,是室内排放 HCHO 的最大来源。用压缩板材做成的柜子内有一定浓度的 HCHO 污染。为了考察过表达 DAS/DAK 基因天竺葵吸收家具中释放的气体 HCHO 的能力,对野生型和转基因植株吸收家具中释放的气体 HCHO 的能力进行了检测。结果发现,柜内的 HCHO 浓度从 8:00 至 18:00 处理期间,空柜内 HCHO 浓度(CK₁)先随温度上升而升高,到晚上温度下降时回落至接近早上的水平(图 6, A)。放入天竺葵后柜内 HCHO 浓度在各个测定时间点都下降了。当放入转基因植株 PSK1、PSK4 和 PSK5 时,柜子内 HCHO 浓度在 18:00 分别下降到野生型的 63%、69%和 58%(图 6, A),可见转基因植株比野生型具有更强的吸收柜内 HCHO 的能力。

叶片对气体 HCHO 的吸收主要通过气孔进行,用光合测量系统测定了野生型和转基因植株叶片的气孔传导率,结果表明(图 6, B),8:00 时柜内野生型和 3 个转基因株系叶片的气孔传导率与柜外野生型(CK₂)差别不大($P>0.05$),13:00、18:00 和次日 8:00 测得的转基因株系 PSK1、PSK4 和 PSK5

叶片气孔传导率均明显高于野生型,而以 13:00 时差别最明显,转基因株系 PSK1、PSK4 和 PSK5 叶片的气孔传导率分别是野生型的 2.5、2.7 和 2.8 倍,说明气体 HCHO 胁迫下,过表达 DAS/DAK 基因使转基因植株叶片的气孔传导率得以恢复。

3 讨论

Song 等^[10]和 Xiao 等^[12]的研究发现,在植物体中引入与卡尔文循环相偶联的代谢途径,能够促进植物通过该途径代谢 HCHO,生成大量的糖类物质。本研究也发现,在 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 液体 H^{13}CHO 处理下,转基因天竺葵糖类质的生成量大约是野生型的 2.85 倍,说明过表达 DAS/DAK 基因所形成的 HCHO 同化途径成功将 HCHO 代谢流引入卡尔文循环。但是,目前没有研究报道与卡尔文循环相偶联的代谢途径的引入是否改变植物原有的 HCHO 代谢途径。本研究通过分析了其他重要 HCHO 代谢产物在转基因天竺葵叶片中含量的变化发现,转基因天竺葵叶片中的 $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Cit}$ 和 $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Gly}$ 生成量显著低于野生型,并且产生了 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Gly}$ 、 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Mal}$ 、 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Ser}$ 、 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Glu}$ 、 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Asp}$ 以及 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{PA}$ 等有机酸。研究表明,进入植物体的 HCHO 首先在 HCHO 脱氢酶(FALDH)催化 HCHO 下氧化为 HCOOH ,该反应是可逆的,且不能直接以游离 HCHO 为底物, HCHO 需要和谷胱甘肽(GSH)结合为加合物 S-羧甲基谷胱甘肽(HM-GSH)才能被 FALDH 催化,虽然 FALDH 对 HM-GSH 的 K_m 值很小,但 HM-GSH 的浓度由细胞内 GSH 控制^[17]。而 DAS 催化 HCHO 和 5-磷酸

木酮糖的反应是不可逆的,DAS 可以游离 HCHO 为底物,HCHO 的 K_m 值约为 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,反应不需要任何辅助因子参与就可以启动^[18]。由于 DAS 和 FALDH 催化反应的生化特性不同,使得二者在同时竞争结合进入细胞中的 HCHO 时,DAS 催化的反应更有优势,使得过表达 DAS/DAK 基因所形成的 HCHO 同化途径发挥作用,增加了 H^{13}CHO 的 ^{13}C 代谢流进入卡尔文循环的量,从而降低 H^{13}CHO 进入其它代谢途径的量。据此推测 $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{Cit}$ 和 $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Gly}$ 可能是由 FALDH 催化的下游代谢途径所产生,而 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Gly}$ 、 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Mal}$ 、 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Ser}$ 、 $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Glu}$ 、 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Asp}$ 以及 $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{PA}$ 是卡尔文循环的下游途径产生的,至于这两条途径的下游途径有待进一步的研究。

Song 等^[10]研究表明,在天竺葵叶绿体中过量表达 *rm pAB* 编码的 HPS/PHI 融合蛋白基因,可以

增强转基因天竺葵对 HCHO 的抗性和吸收效率,Xiao 等^[12]在烟草叶绿体中过量表达 DAS 和 DAK 基因也得到了类似的结果,且 HCHO 吸收效率是 Song 等^[10]的 1.6 倍。本研究发现,在 $48 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 气体 HCHO 胁迫下,转基因植株的生长状态优于野生型, H_2O_2 、MDA 和 PC 含量均低于野生型,同时吸收家具释放的气体 HCHO 的能力也高于野生型,气孔传导率得以恢复,说明过表达 DAS/DAK 基因提高了转基因天竺葵对 HCHO 的抗性和吸收能力,这与前人的研究结果一致。本研究的结果再次证实了在植物叶绿体中过量表达来自于甲基型营养酵母中的 DAS/DAK 基因,构建一条光合 HCHO 同化途径提高植物吸收和代谢 HCHO 能力的策略是可行的,这为今后开发转基因观赏植物治理气体 HCHO 污染的技术奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] YURIMOTO H, KATO N, SAKAI Y. Genomic organization and biochemistry of the ribulose monophosphate pathway and its application in biotechnology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, **84**(3): 407—416.
- [2] WOLVERTON B C, DONALD R C, WATKINS E A. Foliage plants for removing indoor air pollution from energy-efficient homes[J]. *Economic Botany*, 1984, **38**(2): 224—228.
- [3] GIOSSMAN D. Pollution indoors[J]. *Technology Review Cambridge*, 1989, **92**(4): 2—13.
- [4] GIESE M, BAUER-DORANTH U, LANGE-BARTELS C, et al. Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures[J]. *Plant Physiology*, 1994, **104**(4): 1 301—1 309.
- [5] AYDOGANA A, MONTOYA L D. Formaldehyde removal by common indoor plant species and various growing media[J]. *Atmospheric Environment*, 2011, **45**(16): 2 675—2 682.
- [6] ACHKOR H, DIAZ M, FERNANDEZ M R, et al. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, **132**(4): 2 248—2 255.
- [7] TADA Y, KIDU Y. Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from golden pothos (*Epipremnum aureum*) and the production of formaldehyde detoxifying plants[J]. *Plant Biotechnology*, 2011, **28**(4): 373—378.
- [8] NIAN H J, MENG Q C, ZHANG W, et al. Overexpression of the formaldehyde dehydrogenase gene from *Brevibacillus brevis* to enhance formaldehyde tolerance and detoxification of tobacco[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169: 170—180.
- [9] CHEN L M, YURIMOTO H, LI K Z, et al. Assimilation of formaldehyde in transgenic plants due to introduction of the bacterial ribulose monophosphate pathway genes[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2010, **74**(2): 629—635.
- [10] SONG Z B, ORITA I, YIN F H, et al. Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastri* MB19 in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate HCHO[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, **32**(10): 1 541—1 548.
- [11] YURIMOTO H, KATO N, SAKAI Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism[J]. *Chemical Record*, 2005, **5**: 367—375.
- [12] XIAO S Q, SUN Z, WANG S S, et al. Overexpression of dihydroxyacetate synthase and dihydroxyacetone kinase in chloroplasts install a novel photosynthetic HCHO-assimilation pathway in transgenic tobacco using modified Gateway entry vector[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, **34**(5): 1 975—1 985.
- [13] KRISHNARAJ S, BI Y M, SAXENA P K. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham')[J]. *Planta*, 1997, **201**(4): 434—440.
- [14] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**(19): 4 321—4 325.
- [15] GUREL A, COSKUN O, ARMUTCU F, et al. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: Biochemical and histological studies[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2005, **29**(3): 173—178.
- [16] GAY C A, GEBICKI J M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, **315**(1): 29—35.
- [17] HASLAM R, RUST S, PALLETT K, et al. Cloning and characterisation of S-formylglutathione hydrolase from *Arabidopsis thaliana*: a pathway for formaldehyde detoxification[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**: 281—288.
- [18] WAITES M J, QUAYLE J R. Dihydroxyacetone synthase: a special transketolase for formaldehyde fixation from the methylotrophic yeast *Candida boidinii* CBS 5777[J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**(4): 935—944.