

# 玉米 *ZmMSRB5* 基因的克隆及功能分析

吴旭洋, 黄鸿儒, 蒋元, 董海潇, 苏胜忠, 单晓辉,  
李世鹏, 刘宏魁, 原亚萍

(吉林大学植物科学学院/吉林省作物生物技术育种工程研究中心, 长春 130062)

**摘要:** 玉米易受到低温冷害等非生物胁迫侵袭。春季低温冷害会导致东北地区玉米产量降低, 挖掘玉米耐冷基因、研究基因功能和分析其调控网络就显得尤为重要。从耐冷玉米自交系 W9816 中成功克隆到 *ZmMSRB5* (GRMZM2G577677) 基因, 并将其在拟南芥中异源表达。4℃处理后, *ZmMSRB5* 过表达拟南芥株系(*ZmMSRB5-OE*)萌发率高于野生型; -8℃冻处理 5 h, 恢复 3 d 后, *ZmMSRB5-OE* 株系存活率也明显高于野生型。此外, 在 4℃条件下, *ZmMSRB5-OE* 株系的 PRO 含量、SOD 和 CAT 活力都明显高于野生型, 丙二醛含量显著低于野生型。说明 *ZmMSRB5* 基因可增强拟南芥对冷胁迫的耐受力, 在拟南芥响应冷胁迫中起着重要作用。

**关键词:** 玉米; *ZmMSRB5*; 功能分析

**中图分类号:** S513.035.3

**文献标识码:** A

## Cloning and Functional Analysis of *ZmMSRB5* Gene in Maize

WU Xu-yang, HUANG Hong-ru, JIANG Yuan, DONG Hai-xiao, SU Sheng-zhong, SHAN Xiao-hui,  
LI Shi-peng, LIU Hong-kui, YUAN Ya-ping

(College of Plant Science, Jilin University / Jilin Engineering Research Center for Crop Biotechnology Breeding,  
Changchun 130062, China)

**Abstract:** Maize is particularly susceptible to abiotic stresses such as low temperature, which could cause maize production decreased in Northeast China during spring. Therefore, it is particularly important to mine cold-tolerant gene, verify the gene function and analyze its regulatory network. In this study, *ZmMSRB5* (GRMZM2G577677) was successfully cloned from the cold-tolerant maize inbred line W9816 and heterogeneously expressed in Arabidopsis. After 25 days of treatment at 4℃, the germination rate of *ZmMSRB5* overexpressing Arabidopsis lines(*ZmMSRB5-OE*) was higher than WT. After 5 hours of freezing treatment at -8℃ and 3 days of recovery, the survival rate of *ZmMSRB5-OE* lines was also significantly higher than WT. Additionally, the proline content, and the activities of SOD and CAT in *ZmMSRB5-OE* lines were significantly higher than WT at 4℃, while the MDA content was significantly lower than WT. These findings indicated that *ZmMSRB5* could enhance the cold tolerance and play an important role in the response to cold stress in Arabidopsis.

**Key words:** Maize; *ZmMSRB5*; Functional analysis

低温是限制农作物生长的主要因素之一<sup>[1]</sup>。冷胁迫对不同生长阶段植物均能够造成严重影响。播

种后遇到低温冷害会影响种子萌发, 造成缺苗断条; 幼苗期遭受冷胁迫会严重影响植株生长发育, 表现为叶片萎蔫、黄化, 甚至死亡<sup>[2]</sup>; 生殖期遭受冷胁迫, 会严重影响其结实率。低温会导致植物产生冷驯化, 在驯化过程中植物体内的转录因子及酶类, 包括 *CBFs*、*SnRK2.6/OST1* 和 *MKK2* 等基因受到冷诱导, 产生不同的冷响应机制, 来应对所处的低温环境<sup>[3-5]</sup>。

本研究前期对玉米耐冷自交系 W9816 进行了蛋白质组学分析, 发现冷诱导后玉米甲硫氨酸亚砷还原酶(MSR)家族蛋白上调表达, MSR 家族基因可

录用日期: 2023-12-06

基金项目: 吉林省科技发展计划重大科技专项(20210302003NC)、吉林省科技发展计划重点研发项目(20230202001NC)

作者简介: 吴旭洋(1995-), 河南开封人, 硕士, 从事玉米抗逆相关基因功能研究。Tel: 18604317032

E-mail: Wuxuyang1012@163.com

刘宏魁和原亚萍为本文通信作者。

E-mail: pony2246@126.com

E-mail: yuanyanp@jlu.edu.cn

能参与玉米冷响应机制<sup>[6]</sup>。当植物受到胁迫产生过多的活性氧而不能被有效清除时,甲硫氨酸等含有硫原子的氨基酸容易被氧化成甲硫氨酸亚砷。MSR可以将甲硫氨酸亚砷还原为甲硫氨酸,恢复其所在蛋白活性,使机体维持正常代谢和生命活动。

根据甲硫氨酸在细胞中存在的状态和位置,生物体中MSR家族分为MSRA和MSRB两种类型的甲硫氨酸亚砷还原酶<sup>[7]</sup>。其中,最早在原核生物中发现的MSRA是细胞内一类比较小的还原酶,它的作用是清除细胞内被氧化的S型甲硫氨酸亚砷<sup>[8-11]</sup>。MSRB相对于MSRA发现较晚。最初的研究表明,对于ROS清除过程,MSRB作用相比于MSRA较小,更重要的是MSRB只能对结合态Met-R-SO进行还原,对于游离的亚砷,MSRB还原能力较低<sup>[12]</sup>。近年来,拟南芥和水稻中MSR家族研究较多,大部分MSR家族基因能够减少植物由非生物胁迫包括盐胁迫<sup>[13]</sup>、重金属<sup>[14-16]</sup>和冷胁迫<sup>[17-18]</sup>等引起的氧化损伤。在玉米中MSR家族研究较少,*ZmMSRB1*、*ZmMSRA2/5*基因均在氧化胁迫和耐盐耐旱方面起重要作用<sup>[19]</sup>。*ZmMSRB1*能够与*ZmGSTF8*互作共同调控氧化应激以及干旱、盐等非生物胁迫响应过程<sup>[20]</sup>。本研究通过对耐冷玉米自交系W9816中*ZmMSRB5*基因进行克隆并在拟南芥中异源表达,在冷胁迫条件下对*ZmMSRB5*基因在拟南芥中的功能进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

耐冷玉米自交系W9816、拟南芥Columbia野生型(*Arabidopsis thaliana*)、*atmsrb5*(CS925318)拟南芥突变体。突变体购于拟南芥生物资源中心(<https://abrc.osu.edu/>)。

### 1.2 拟南芥低温萌发率统计

取适量拟南芥种子于1.5 mL离心管中,用灭菌蒸馏水清洗3次后1%次氯酸钠清洗7 min,然后用灭菌蒸馏水再清洗5遍。用接种针将消毒后种子接种在1/2MS培养基上。置于4℃黑暗培养3 d,将培养皿置于4℃中培养,16 h光照8 h黑暗。4℃下培养25、50 d后观察表型并统计萌发率。

### 1.3 拟南芥冷冻处理表型分析

取适量野生型与转基因拟南芥种子,消毒后4℃培养3 d,点种于营养土中(土:蛭石=3:1),23℃培养,16 h光照/8 h黑暗,培养至4周。移至-8℃冷冻处理5 h后转移至23℃正常培养3~5 d,统计其死亡率。

### 1.4 拟南芥叶绿素含量测定

选择3周龄长势一致的拟南芥,取0.1 g叶片,切碎后将其置于干净的50 mL离心管中;加入0.5 mL丙酮,混匀,再加入12 mL 80%的丙酮,轻轻地旋转混匀,置于黑暗处过夜浸提;第2天将离心管取出,用80%的丙酮定容至25 mL,25℃、12 000 r/min、离心4 min,用紫外分光光度计进行测定。比色测定方法为吸取200 μL上清叶绿素提取液,加入比色杯中,用分光光度计分别测定在波长645、663和652 nm下的吸光度,所有测定均以80%的丙酮作为空白对照。结果计算分别按以下公式计算叶绿素a和叶绿素b的浓度(mg/L)。

$$\text{Chl a} = 12.72 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645},$$

$$\text{Chl b} = 22.88 \times A_{663} - 4.67 \times A_{645}.$$

### 1.5 拟南芥生理生化指标测定

使用植物丙二醛(MDA)试剂盒(微管法)测定MDA含量;用过氧化氢酶(CAT)试剂盒(可见光法)测定CAT含量;用脯氨酸(Pro)试剂盒(比色法)测定脯氨酸含量;用总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(羟胺法)测定SOD活力值,以上各生理指标具体测定方法按使用说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ZmMSRB5*基因克隆及植物表达载体构建

以玉米自交系W9816的cDNA为模板,克隆*ZmMSRB5*基因全长,琼脂糖凝胶电泳检测*ZmMSRB5*基因大小为466 bp。通过BP反应将目的DNA片段连接到入门载体pDONR207上,并转化DH5α大肠杆菌感受态,对pDONR207::*ZmMSRB5*进行菌液PCR检测并测序,其中编号1~10均为阳性克隆。挑选阳性菌液扩播并提取质粒,将质粒通过LR反应连接到表达载体pEarlygate101上,并重新转化DH5α,挑取单菌落扩播、菌检获得含有pEarlygate101::*ZmMSRB5*重组质粒的阳性菌,PCR检测结果显示,1~5均为阳性克隆(图1)。

### 2.2 *ZmMSRB5*基因在拟南芥中异源表达

将pEarlygate101::*ZmMSRB5*重组质粒转入GV3101农杆菌感受态,利用蘸花侵染法分别侵染WT、*atmsrb5*植株获得过表达和恢复系T<sub>0</sub>代种子,选用0.5%的Basta溶液对转化拟南芥进行筛选。将拟南芥种子播于营养土上,待拟南芥生长至两片真叶时喷洒Basta,大约喷洒3~4 d后非转基因拟南芥出现比较明显的枯萎表型,转基因植株保持绿色及良好的生长状态。非转基因植株死亡,转基因植株则正常生长。经过筛选,获得*ZmMSRB5*过表达株系

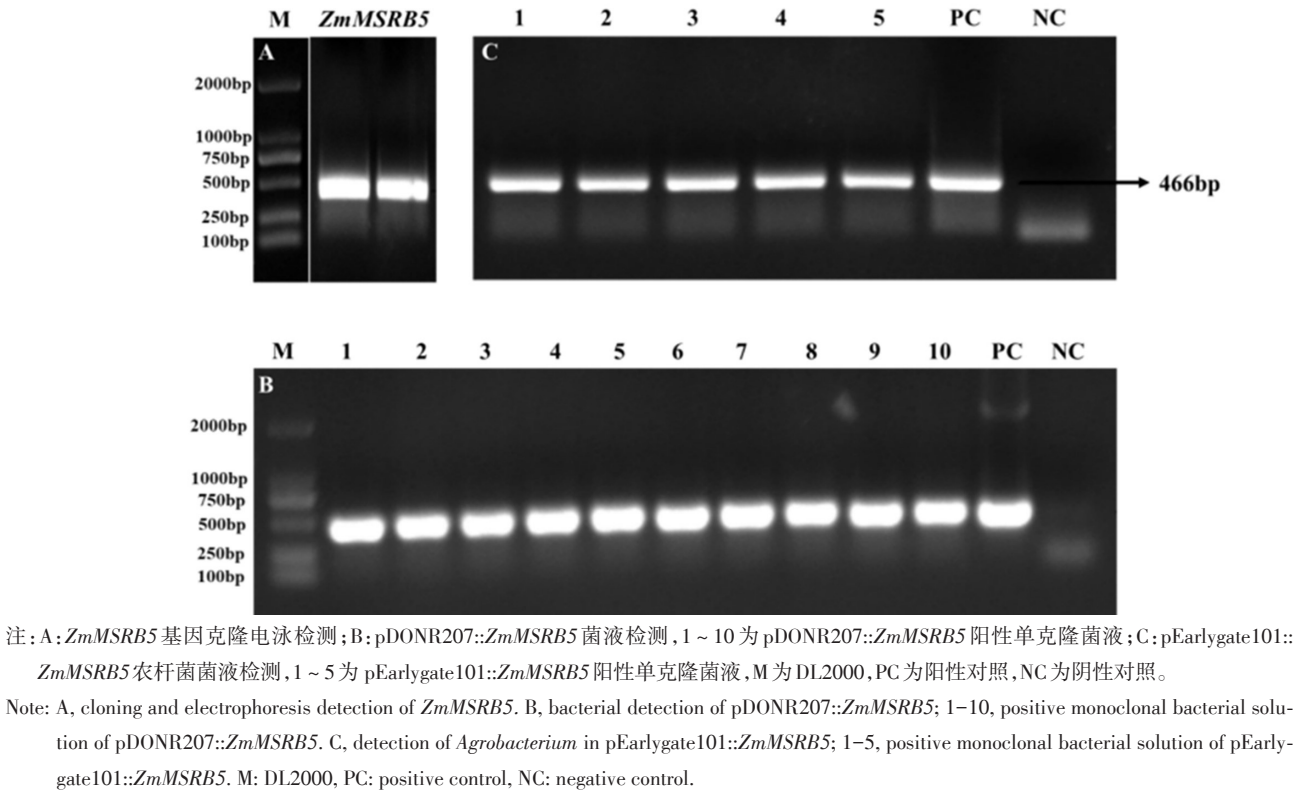


图1 *ZmMSRB5*基因克隆及表达载体构建

Fig.1 Cloning and construction of expression vector of *ZmMSRB5*

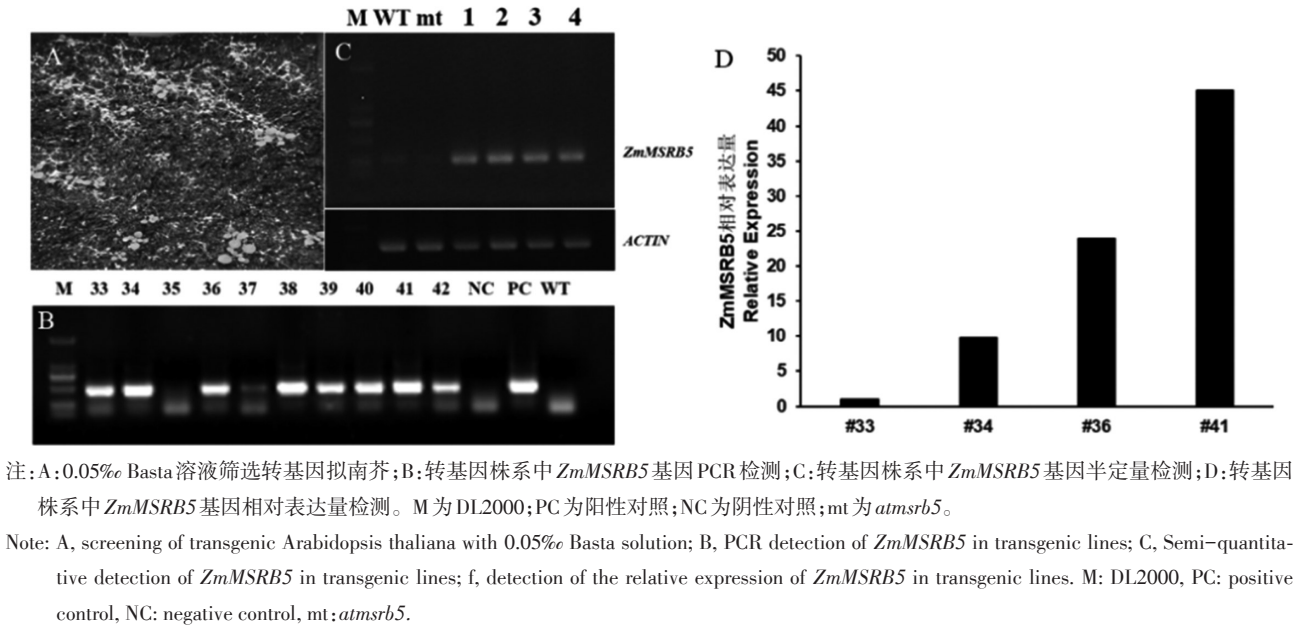


图2 *ZmMSRB5*转基因拟南芥植株筛选

Fig.2 Screening of *ZmMSRB5* transgenic *Arabidopsis* plants

10个。此外,获得3个转 *MSRB5* 恢复系。提取转基因株系与野生型拟南芥 DNA,扩增 *ZmMSRB5* 基因片段,经 PCR 检测得到42株转基因阳性 T1 代株系,继续自交获得纯合转基因株系。以 *ACTIN* 作为

内参,转基因拟南芥株系进行 *ZmMSRB5* 基因表达量检测,选取基因表达量高的作为后续实验株系(图2)。



### 2.3 *ZmMSRB5*基因耐冷与抗冻性研究

为了研究 *ZmMSRB5* 基因功能,将野生型和 *ZmMSRB5* 拟南芥过表达株系点种于 1/2MS 培养基上,分别置于 23 ℃ 与 4 ℃ 低温培养 25 d。23 ℃ 条件下野生型拟南和转基因拟南芥长势相同,没有明显差异;4 ℃ 条件下培养 25 d 后 *ZmMSRB5* 过表达株系生长速度与大小明显优于野生型。过表达株系的叶片颜色明显更绿,野生型拟南芥的叶片颜色则大多

数发黄。此外过表达株系出现两片子叶时,野生型子叶尚未完全展开,这表明在幼苗生长初期,受到冷胁迫后,过表达株系具有更强的耐受能力。将 4 周龄的野生型和过表达拟南芥-8 ℃ 冷冻处理 5 h,恢复培养 3 d 后, *ZmMSRB5* 过表达株系的存活率显著高于野生型(图 3),说明冷冻处理后,过表达植株具有更强的抗冻性,表明 *ZmMSRB5* 基因过表达增强了拟南芥的抗冻能力。

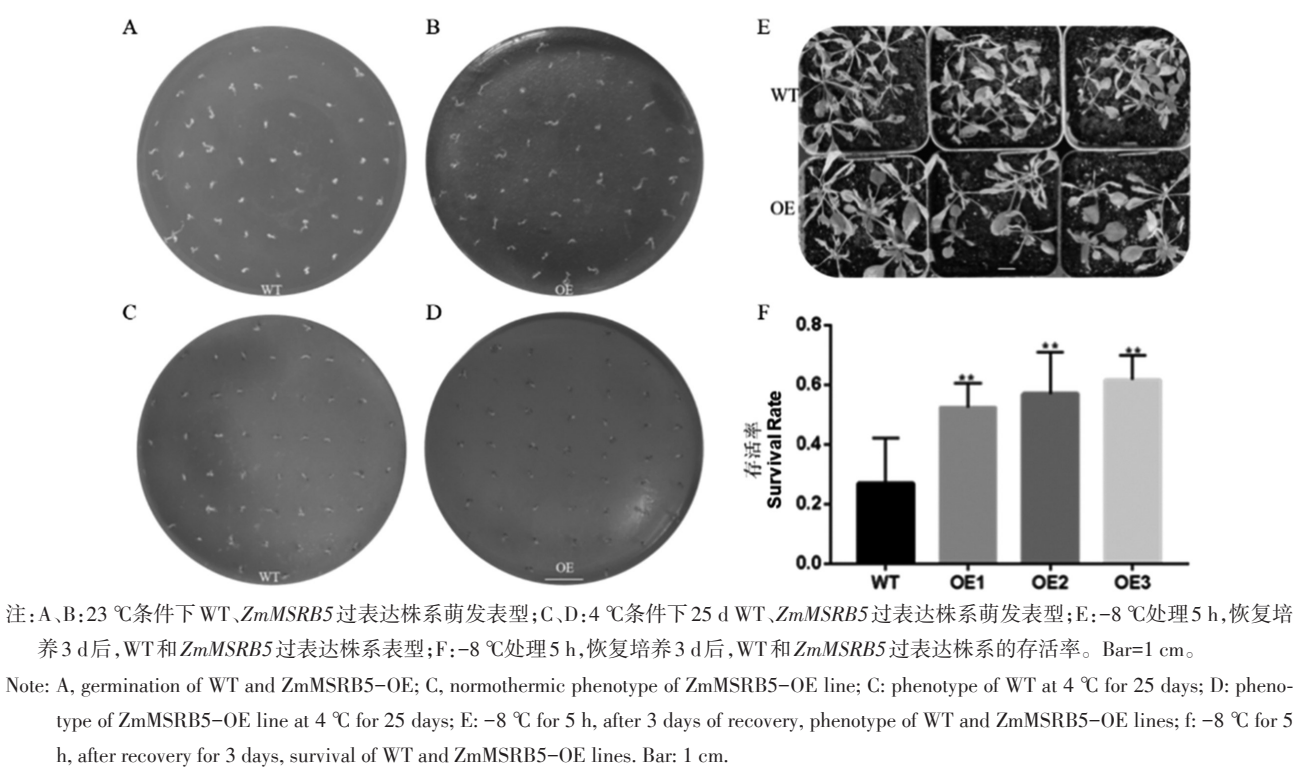


图3 *ZmMSRB5*过表达拟南芥株系萌发与存活率

Fig.3 Germination rate and survival rate of overexpression Arabidopsis of *ZmMSRB5*

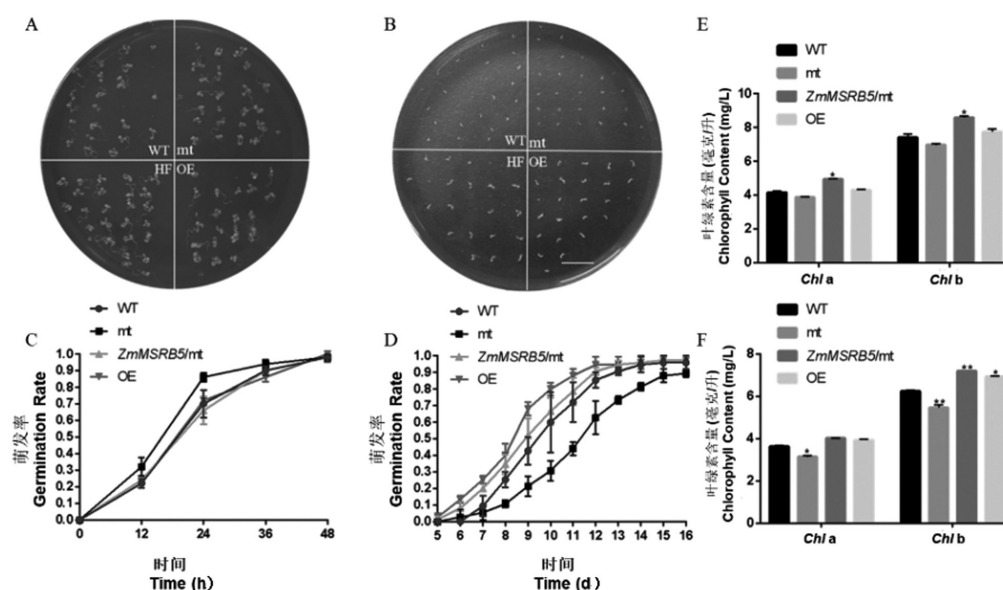
### 2.4 *ZmMSRB5*过表达拟南芥株系提高种子低温萌发率及植株叶绿素含量

将 WT、*atmsrb5* 突变体、*atmsrb5* 恢复系、*ZmMSRB5* 过表达株系点种在 1/2MS 培养基上,统计常温(23 ℃)以及 4 ℃ 培养条件下种子的萌发情况,结果显示, *ZmMSRB5* 过表达系和恢复系在 4 ℃ 条件下的萌发率显著高于野生型和突变体,在 23 ℃ 条件下萌发率无明显差异,表明在冷胁迫条件下, *ZmMSRB5* 基因能提高拟南芥种子的萌发率。此外,23 ℃ 和 4 ℃ 处理后的拟南芥过表达系叶片叶绿素含量均高于野生型和突变体,表明过表达 *ZmMSRB5* 基因可以提高拟南芥莲座叶叶绿素含量(图 4)。

### 2.5 *ZmMSRB5*转基因拟南芥株系耐冷相关生理生化指标变化

为了进一步分析 *ZmMSRB5* 基因耐冷功能,对

23 ℃ 和 4 ℃ 处理 36 h 后过表达系与野生型拟南芥进行生理生化指标测定。在 23 ℃ 及 4 ℃ 处理后, *ZmMSRB5* 过表达系和恢复系的 MDA 含量显著低于野生型,突变体显著高于野生型,这表明 *ZmMSRB5* 基因可以减少细胞的氧化损伤。此外,23 ℃ 或 4 ℃ 处理后, *ZmMSRB5* 过表达系及恢复系拟南芥 SOD 活力显著高于野生型,表明 *ZmMSRB5* 基因在 23 ℃ 和 4 ℃ 下均能提高 SOD 活力。23 ℃ 下 *ZmMSRB5* 过表达系、野生型、突变体及恢复系的 PRO 含量无明显差异。4 ℃ 处理后, *ZmMSRB5* 过表达系及恢复系 PRO 含量显著高于野生型,突变体 PRO 含量显著低于野生型,表明在冷胁迫下, *ZmMSRB5* 过表达系提高了拟南芥的脯氨酸含量。在 23 ℃ 和 4 ℃ 处理后, *ZmMSRB5* 过表达系及恢复系 CAT 活力值均显著高于野生型,突变体均显著低于野生型(图 5),表明

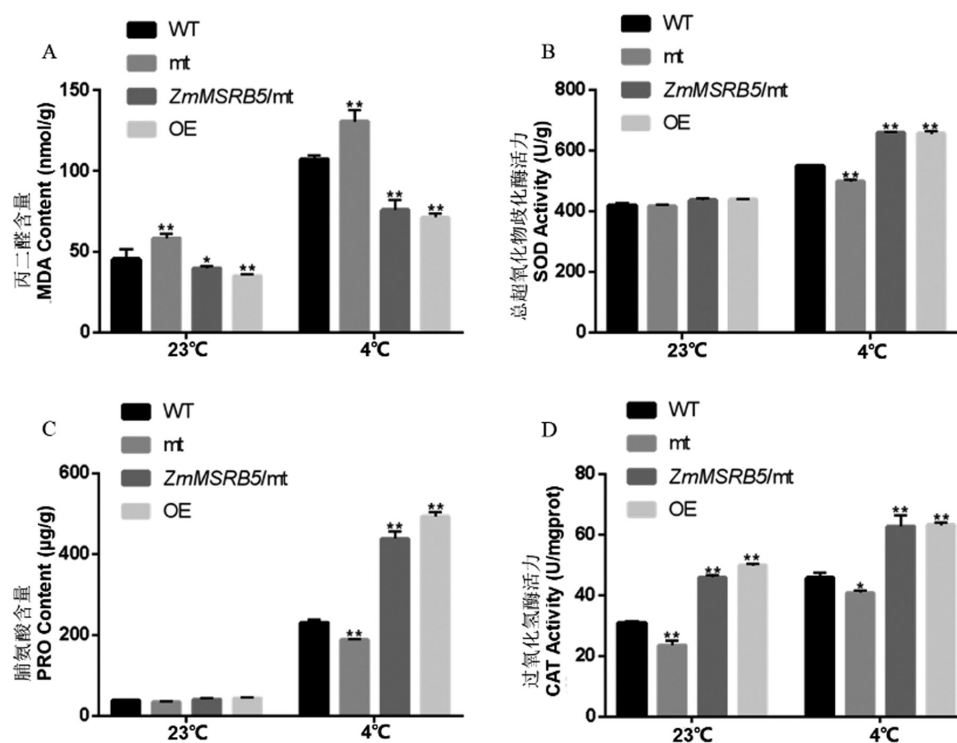


注:A:23 °C下 *ZmMSRB5* 转基因拟南芥株系萌发;B:4 °C下萌发表现;C:23 °C下萌发率;D:4 °C下萌发率;E:23 °C下莲座叶叶绿素含量;F:4 °C下莲座叶叶绿素含量。*mt*: *atmsrb5*; HF: *atmsrb5* 恢复系。各数值代表3次生物学重复的平均值±标准差;\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; Bar: 1 cm。下图同。

Note: A, germination of *ZmMSRB5* transgenic Arabidopsis lines at 23 °C; B, germination of at 4 °C; C, germination rate at 23 °C; D, germination rate at 4 °C; E, chlorophyll contents of rosette leaves at 23 °C; F, chlorophyll contents of rosette leaves at 4 °C (values represent the mean ± standard deviation of three biological replicates, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , Bar: 1 cm). *mt*: *atmsrb5*; HF: *atmsrb5* restorer line.

图4 *ZmMSRB5*转基因拟南芥株系萌发率及叶绿素含量

Fig.4 Germination rate and chlorophyll contents of *ZmMSRB5* transgenic Arabidopsis lines



注:A:丙二醛含量测定;B:过氧化氢酶活力测定;C:脯氨酸含量测定;D:总超氧化物歧化酶活力测定。

Note: A, determination of MDA content; B, determination of SOD activity; C, determination of PRO content; D, determination of CAT activity.

图5 *ZmMSRB5*拟南芥转基因株系耐冷相关生理生化指标测定

Fig.5 Determination of physiological and biochemical indicators related to cold tolerance of *ZmMSRB5* transgenic Arabidopsis lines

*ZmMSRB5* 基因可以提高拟南芥中 CAT 的活性。以上结果表明,过表达 *ZmMSRB5* 基因能够增加拟南芥在低温条件下的抗氧化能力。

### 3 结论与讨论

细胞中,甲硫氨酸(Met)的氧化还原反应经常发生,ROS 将 Met 氧化成 Met-SO 后可被 MSR 还原,该可逆反应是维持细胞内 ROS 水平的重要环节,是植物抵御非生物胁迫的重要过程。

本文通过对 *ZmMSRB5* 基因的功能研究,发现在低温或者冷冻胁迫下 *ZmMSRB5* 基因起到了正调控作用。4℃低温萌发结果显示,*ZmMSRB5* 过表达株系的萌发率显著高于野生型和突变体,并且过表达株系的萌发时间较野生型和突变体提前了 3 d 左右,表明过表达株系对冷害的耐受力更高。此外,该基因过表达株系在冷冻处理后的存活率显著高于其他株系。综上,*ZmMSRB5* 基因能够增加拟南芥的抗冷能力。相关研究表明,拟南芥叶片变绿速度和 JAZ (Jasmanate ZIM-domain protein) 蛋白密切相关<sup>[21]</sup>。*ZmMSRB5* 基因启动子中含有丰富的茉莉酸响应元件,表明这些基因可能和茉莉酸存在潜在的联系,这方面功能有待进一步探究。通过玉米 *ZmMSRB5* 基因在拟南芥中的异源表达分析表明,该基因在抗冷、抗冻及种子萌发中有着重要作用,这些功能对于玉米的生长至关重要的,尤其在东北地区,玉米春季遭受低温冷害,耐冷基因的克隆及功能研究将为今后耐冷玉米分子育种奠定坚实的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] FOWLER D B, CHAUVIN L P, LIMIN A E, et al. The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(4): 554-559.
- [2] ANDERSON M D, PRASAD T K, MARTIN B A, et al. Differential gene expression in Chilling-Acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance[J]. *Plant Physiol*, 1994, 105(1): 331-339.
- [3] NORÉN L, KINDGREN P, STACHULA P, et al. Circadian and plastid signaling pathways are integrated to ensure correct expression of the CBF and COR genes during photoperiodic growth[J]. *Plant Physiol*, 2016, 171(2): 1392-1406.
- [4] LIANG S, LU K, WU Z, et al. A link between magnesium-chelatase H subunit and sucrose nonfermenting 1(SNF1)-related protein kinase SnRK2.6/OST1 in Arabidopsis guard cell signalling in response to abscisic acid[J]. *J. Exp Bot*, 2015, 66(20): 6355-6369.
- [5] TEIGE M, SCHEIKL E, EULGEM T, et al. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis[J]. *Mol Cell*, 2004, 15(1): 141-152.
- [6] 王晓宇. 玉米冷响应相关基因的克隆、功能鉴定及定量蛋白质组学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [7] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, et al. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nat Rev. Microbiol*, 2017, 15(7): 385-96.
- [8] MOSKOVITZ J, BERLETT B S, POSTON J M, et al. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo[J]. *Proc. Natl Acad Sci. U S A*, 1997, 94(18): 9585-9589.
- [9] BROT N, WEISSBACH L, WERTH J, et al. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide[J]. *Proc. Natl Acad Sci. U S A*, 1981, 78(4): 2155-2158.
- [10] MOSKOVITZ J, WEISSBACH H, BROT N. Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins[J]. *Proc. Natl Acad Sci. U S A*, 1996, 93(5): 2095-2099.
- [11] LOWTHER W T, BROT N, WEISSBACH H, et al. Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(44): 13307-13312.
- [12] GRIMAUD R, EZRATY B, MITCHELL J K, et al. Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase[J]. *J. Biol. Chem*, 2001, 276(52): 48915-48920.
- [13] LAUGIER E, TARRAGO L, COURTEILLE A, et al. Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light[J]. *Plant Cell Environ*, 2013, 36(3): 670-682.
- [14] MENDEZ A A, PENA L B, BENAVIDES M P, et al. Priming with NO controls redox state and prevents cadmium-induced general up-regulation of methionine sulfoxide reductase gene family in Arabidopsis[J]. *Biochimie*, 2016, 131: 128-136.
- [15] 李 香. 甲硫氨酸亚砷还原酶在水稻抗逆性中功能的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [16] 肖腾伟. 甲硫氨酸亚砷还原酶在水稻响应过量铜和甲基紫精诱导的氧化胁迫中的作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [17] KWON S J, KWON S I, BAE M S, et al. Role of the methionine sulfoxide reductase MsrB3 in cold acclimation in Arabidopsis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(12): 1713-1723.
- [18] OH J E, HONG S W, LEE Y, et al. Modulation of gene expressions and enzyme activities of methionine sulfoxide reductases by cold, ABA or high salt treatments in Arabidopsis[J]. *Plant Science*, 2005, 169(6): 1030-1036.
- [19] 张玉华. 玉米甲硫氨酸亚砷还原酶基因 *ZmMSRA2* 和 -A5.1 的抗逆功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [20] 王广令. 玉米甲硫氨酸亚砷还原酶 *ZmMSRB1* 的功能及作用机制[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [21] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. *Annu Rev. Plant Biol*, 2002, 53: 247-273.

(责任编辑: 朴红梅)