

茶陵野生稻 DREB 类转录因子的克隆及植物表达载体的构建

刘静雅¹, 程建强², 龚建华², 康敏², 洪亚辉^{1*}

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲 412007)

摘要: 采用 RT-PCR 技术获得了茶陵野生稻 DREB 类转录因子的 cDNA 全长。序列分析表明, 此基因核苷酸序列全长为 958 bp, 编码 314 个氨基酸, 该序列与水稻 *DREB* 基因的同源性为 98%。其编码的蛋白与小麦 CRT/DREB4 蛋白的同源性为 93%, 与大麦 CBF2A 蛋白和 CBFIVc-14.1 蛋白的同源性分别为 93% 和 92%。推导蛋白第 43~112 位氨基酸为典型 AP2 结构, 具有 AP2/DREB 类转录因子的基本结构特征, 并构建了茶陵野生稻 *DREB* 基因的植物表达载体 pWM101DREB。

关键词: 茶陵野生稻; DREB 转录因子; 基因克隆; 植物表达载体

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0630-04

Cloning of the DREB-like transcription factor from Chaling wild rice and the construction of plant expression vector

LIU Jing-ya¹, CHENG Jian-qiang², GONG Jian-hua², KANG Min², HONG Ya-hui^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Zhuzhou Institute of Agricultural Science, Zhuzhou, Hunan 412007, China)

Abstract: The cDNA of *DREB* transcription factor was obtained from Chaling wild rice under low temperature by method of RT-PCR. The sequence analysis indicated: The clone consisted of 958 bp, coding 314 amino acids; The homologous of sequence from *Oryza sativa* was 98%, 93% of which came from *Triticum aestivum* CRT/DREB4; The homologous from *Hordeum vulgare* protein CBF2A and CBFIVc-14.1 was 93% and 92%; The deduced primary structure of *DREB* contained a single AP2 domain, showing the typical characteristics of *DREB* gene family. A plant expression vector which is named pWM101DREB of the *DREB* gene was successfully constructed, which laid the foundations for future transgenic research on *DREB* gene function.

Key words: Chaling wild rice; DREB transcription factor; gene cloning; plant expression vector

茶陵县位于北纬 26°50'、东经 113°40', 年平均气温 17.9℃, 极端最低温度 -9℃。茶陵野生稻生长在罗霄山脉五峰山东南麓的山间沼泽地, 在极端温度时地下茎仍保持旺盛的生命力^[1], 说明其对低温环境有较强的耐受性。

脱水响应元件结合因子(DREB)是一类对多个抗逆相关基因表达起调控作用的植物特有的转录因子, DREB类转录因子特异地与DRE顺式作用元

件结合, 在非生物逆境胁迫中激活胁迫诱导基因的表达, 参与调控植物抗旱、抗低温和抗高盐等的信号途径, 在植物对逆境胁迫的抗性方面具有重要的功能^[2-3]。Liu等^[4]通过酵母单杂交技术, 从拟南芥中克隆了 3 个受低温诱导表达的转录因子, 定名为 *DREB1A*、*DREB1B*和*DREB1C*, 与Stockinger等^[5]分离到的CBF家族有对应关系; Dubouzet^[6]在水稻中克隆了多个与拟南芥*CBF/DREB*同源的转录因子,

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 国家发展改革委员会生物育种高技术产业专项(湘财企指[2008]65号)

作者简介: 刘静雅(1986—), 女, 湖南怀化人, 硕士研究生, foguliang@163.com; *通讯作者, yahuihong@vip.sina.com

多数能与 *COR* 基因启动子上的 DRE/CRT 元件特异结合。为更好地利用野生稻资源,笔者以茶陵野生稻为材料,模拟其生活的极端低温条件,通过 RT-PCR 技术,获得了茶陵野生稻 *DREB* 基因的 cDNA 序列,对其序列进行蛋白质结构分析,并将此基因构建到了表达载体上。

1 材料和方法

1.1 材料

茶陵野生稻由湖南株洲农业科学研究所提供。将野生稻幼苗置于 -10°C 冰箱 12 h,取叶片, -70°C 保存。大肠杆菌菌株 DH5 α 以及经改造的质粒载体 pMW101,由湖南农业大学细胞生物学实验室保存。

主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、AMV 反转录试剂盒、PMD-18Vector 购于 TaKaRa 公司,Trizol 购于 Invitrogen 公司,胶回收试剂盒购于博大泰克公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

在 GeneBank 查找拟南芥与水稻同源的 *CBF/DREB* 基因序列,设计引物,上下游引物分别添加 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点。上游引物为 5'-G GGATCCCAACCTCAGCTCAGCTCAAG-3', 下游引物为 5'-GCTCTAGATGAAGCGTGCAAACGTA AATCC-3'。引物合成由 Invitrogen 公司完成。

1.2.2 目的基因的克隆

采用 Trizol 法提取野生稻叶片总 RNA 以 AMV 反转录试剂盒反转产物 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 62°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环, 72°C 终延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳分离后回收纯化,回收片段连接到 pMD18-Tvector,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,在含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上进行筛选,阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.3 序列分析

BLAST 在 NCBI 网站上完成,利用 Smart 软件进行蛋白质结构域的推导和分析。

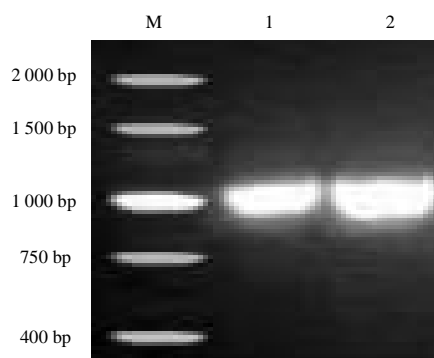
1.2.4 植物表达载体的构建

将已测序鉴定的重组质粒及表达载体 pWM101 分别经 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切,回收目的片段和 pWM101, *T*₄DNA Ligase 进行连接,连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选。挑取阳性菌落进行培养,提取质粒,采用双酶切和 PCR 扩增法进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 *DREB* 基因的克隆

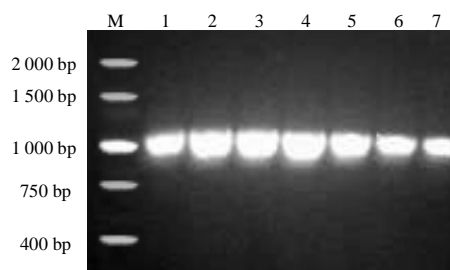
以茶陵野生稻 cDNA 为模板,用所设计的特异引物扩增出约 1 000 bp 的条带(图 1),将 PCR 产物回收并进行连接转化。随机挑取 5 个白色菌落进行 PCR 扩增,大部分均扩增出 1 条 1 000 bp 左右的条带(图 2)。阳性克隆测序结果表明,该片段长 958 bp。



M 分子量标记; 1、2 *DREB* 基因片段。

图 1 *DREB* 基因 RT-PCR 扩增

Fig.1 RT-PCR amplification of *DREB* gene



M 分子量标记; 1~7 阳性克隆。

图 2 菌落 PCR 扩增结果

Fig.2 Colony PCR

2.2 序列及蛋白质结构分析

DREB 测序结果与推导氨基酸序列如图 3 所示。BLAST 分析结果表明,该序列与水稻 *DREB* 基因的

同源性为 98% ,其编码的蛋白与小麦 CRT/DREB4 蛋白的同源性为 93% , 与大麦 CBF2A 蛋白和

CBFIVc-14.1 蛋白的同源性分别为 93%和 92% ,表明已经成功克隆了野生稻中的 DREB 转录因子序列 .

```

1 E P G R S D Q R E S S M E V E E A A Y R
1 GAACCCGGGCGGAGTGACCAGAGAGATCATCCATGGAGGTGGAGGAGGCGGCGTACAGG
21 T V W S E P P K R P A G R T K F R E T R
61 ACGGTGTGTCTCGAGCCGCCGAAGAGCGCGGGAAGGACCAAGTTCAGGGAGACGAGG
41 H P V Y R G V R R R G G R P G A A G R W
121 CACCCGGTGTACCGCGGCGTGC GCGGCGCGGGGGCGGCCGGGCGCGCGGGGAGGTGG
61 V C E V R V P G A R G S R L W L G T F A
181 GTGTGCGAGGTGCGGGTGCCCGGGGCGCGGGCTCCAGGCTGTGGCTCGGCACGTTCGCC
81 T A E A A A R A H D A A A L A L R G R A
241 ACCGCCGAGGCGGCGGCGCGCACGACGCCCGCGCTGGCGCTCCGCGGCAGGGCC
101 A C L N F A D S A W R M P P V P A S A A
301 GCCTGCCTCAACTTCGCCGACTCCGCGTGCGGATGCCGCCCGTCCCCGCTCCGCCGCG
121 L A G A R G V R D A V A V A V E A F Q R
361 CTCGCCGTGCGAGGGGGGTGAGGGACGCCGTGCCGTGGCCGTGAGGCGTTCCAGCGC
141 Q S A A P S S P A E T F A N D G D E E E
421 CAGTCGGCCGCGCCGTCGTCTCCGGCGGAGACCTTCGCCAACGATGGCGACGAAGAAGAA
161 D N K D V L P V A A A E V F D A G A F E
481 GACAACAAGGACGTGTTGCCGGTGGCGGCGGAGGTGTTTCGACGCGGGGGCGTTCGAG
181 L D D G F R F G G M D A G S Y Y A S L A
541 CTCGACGACGGGTTTCAGGTTCGGCGGGATGGACGCCGGGTCGTACTACGCGAGCTTGCG
201 Q G L L V E P P A A G A W W E D G E L A
601 CAGGGGCTGCTCGTCGAGCCGCCGCGGAGCGTGGTGGGAGGACGGCGAGCTCGCC
221 G S D M P L W S Y * S K S R T E K C G Q
661 GGCTCCGACATGCCGCTCTGGAGCTACTAATCAAATCTCGCACTGAAAAGTGTGGACAA
241 I L I L Q K L G E K R E Q S I G E F R T
721 ATTTTGATTCTCCAGAAATTGGGGGAAAAAAGAGAACAGAGTATTGGTGAATTTAGAACA
261 E * A M R L R M N G N F C N F G M C Q I
781 GAGTAGGCAATGAGACTGAGGATGAATGGCAATTTTGTAAATTTTGAATGTGCCAGATT
281 S P S F C D S I * F * M C S Q * I P V N
841 TCTCCCTCCTTTGTGATTCCATCTGATTTTGAATGTGCAGTCAATGAATTCCTGTAAAT
301 L L L L S K E L F W S S L L * F Y G R
901 TTA CTCTCTCTCCAAAGAGCTATTTTGGTCAAGTCTTCTCTGATTTTATGGACGTT

```

图 3 DREB 的核苷酸序列与推测的氨基酸序列

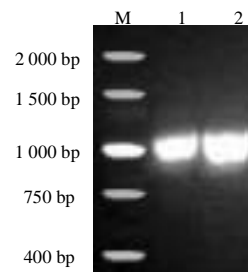
Fig.3 Nucleotide sequence and putative acid sequence of DREB gene

利用 SMART 进行蛋白结构分析发现, DREB 基因推导的蛋白第 43~112 位氨基酸为一典型的 AP2 结构, AP2 亚族包含有 2 个 AP2-DNA 结构域. AP2 结构域, 可形成 3 个 β -折叠和 1 个 α -螺旋结构, 其中位于第 2 个 β -折叠中的第 47 位的缬氨酸(V)和第 136 位的谷氨酸(E), 特别是缬氨酸(V), 对决定 DREB 转录因子与 DRE 顺式作用元件的特异性结合起关键作用. 利用生物信息学对克隆得到的茶陵野生稻 DREB 基因进行蛋白质的分析, 在其第 43~112 位氨基酸为一个 AP2 结构, 表明该基因具有 DREB 转录因子家族的典型特征(图 4).

2.3 茶陵野生稻 DREB 基因植物表达载体的构建

用 BamH I 和 Xba I 分别酶切带有目的基因的 pMD-18T vector 质粒和载体 pWM101, 回收片段用

T₄DNA Ligase 连接, 构建成重组质粒 pWM101DREB.



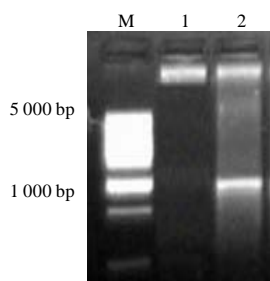
M 分子量标记; 1、2 以 pWM101DREB 为模板的 PCR 产物.

图 4 重组质粒 pCAM-BcDREB1 的 PCR 鉴定

Fig.4 Detection of recombinant

首先利用目的片段引物对该重组质粒进行了 PCR 扩增验证, 得到 1 条长约 1 000 bp 片段, 其次

酶切检测, *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切重组载体 pWM101DREB 得到长约 10 000 bp 的 pWM101 载体片段和长约 1 000 bp 的目的片段. 说明该植物表达载体构建正确.



M 分子量标记; 1 pWM101 载体; 2 pWM101DREB 双酶切.

图 5 植物表达载体 pWM101DREB 的双酶切鉴定

Fig.5 Detection of the expression vector by double-enzymatic digestion

3 讨论

植物在逆境胁迫应答反应中存在着复杂的信号传递途径^[7]. 茶陵野生稻受 *DREB* 基因诱导, 可能在对低温的应答反应中起着重要的作用. 在植物中已经发现很多胁迫诱导的功能基因上游都含有 DRE/CBF 顺式作用元件, 在拟南芥、玉米、烟草、番茄等多种植物中已陆续分离到 *DREB* 基因^[8], 目前已克隆的 *DREB* 转录因子基因几乎均受低温、干旱或高盐的诱导, 但是也有例外, 如甜椒的 *DREB1* 和大豆的 *GmDREBc* 均受干旱和高盐诱导, 却不受低温诱导; 黑麦草的 *LpCBF3* 只受低温诱导, 却不受干旱和高盐诱导^[9].

DREB 转录因子中的 AP2-DNA 结构域保守性很强, 与细胞发育、低温以及干旱、高盐等信号传递相关, 在各种基因表达中起重要的调控作用^[10]. 本研究中低温诱导下克隆而得的 *DREB* 基因具有一个典型的 AP2 结构域, 说明该转录因子与抗冻相关功能基因的表达调控相关.

以低温胁迫的茶陵野生稻为材料, 获得了野生稻 *DREB1* 基因的 cDNA 编码序列, 说明该基因受低温诱导, 但其特异表达模式尚需进一步验证. 该基因是否受其他逆境如盐分、干旱的诱导, 还有待研究.

参考文献:

[1] 雷驰, 刘丽. 湖南野生稻原生境现状及其保护对策

[J]. 作物研究, 2006(2): 187-189.

- [2] Guo Z J, Chen X J, Wu X L, et al. Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 607-618.
- [3] Tang W, Charles T M, Newton R J. Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59: 603-617.
- [4] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature responsive gene expression respectively in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [5] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M E, et al. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 1035-1040.
- [6] Dubouzet J G, Sakuma Y, Kasuga M, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high salt, and cold-responsive gene expression[J]. Plant Journal, 2003, 33(4): 751-763.
- [7] Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M, Liu Q, et al. Biological mechanisms of drought stress response [J]. JIRCAS Working Report, 2002, 105: 1-8.
- [8] Iwasaki T, Kiyosue T, Yamaguchi Shinozaki K, et al. The dehydration inducible rd17 (cor47) gene and its promoter region in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 1287-1292.
- [9] 徐莎, 胡军, 陈宇红, 等. *DREB* 转录因子研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 706-713.
- [10] Mark D A, Kazuhiko Y, Masaru O T, et al. A novel mode of DNA recognition by α -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(18): 5484-5496.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平