

拟南芥 *CBF1* 基因植物表达载体构建及其对野生蕉的遗传转化

刘凯^{1,2}, 胡春华¹, 魏岳荣¹, 易干军^{1*}, 邵秀红¹

(1.广东省农业科学院 果树研究所, 广东 广州 510640; 2.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 从拟南芥中克隆 *CBF1* 基因, 转入到植物表达载体 pBI121 的 *Xba*I 和 *Sac*I 位点, 得到中间重组质粒 pBI121-*CBF1*, 用 *Eco*RI 和 *Hind* III 将 35S 启动子与 *CBF1* 基因从 pBI121-*CBF1* 切下, 转入到植物表达载体 pCambia1301 中, 构建植物表达载体 p1301-*CBF1*。将构建的植物表达载体转入农杆菌 EHA105, 采用农杆菌介导法转化野生蕉胚性悬浮细胞, 经 GUS 组织化学染色和 PCR 鉴定, 证明 *CBF1* 基因已转入野生蕉中。

关 键 词: 拟南芥; *CBF1* 基因; 野生蕉; 遗传转化; 胚性悬浮细胞

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0248-05

Construction of plant expression vector containing *CBF1* and its genetic transformation in wild banana

LIU Kai^{1,2}, HU Chun-hua¹, WEI Yue-rong¹, YI Gan-jun^{1*}, SHAO Xiu-hong¹

(1.Fruit Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China; 2.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The *CBF1* gene (CRT/DRE binding factor 1) was obtained from *Arabidopsis thaliana* by PCR and cloned into pMD18-T. Then *CBF1* gene was sub-cloned into pBI121 vector to obtain the middle recombinant plasmid pBI121-*CBF1* via *Xba*I and *Sac*I restriction enzyme sites. After that, the fragments containing 35S-*CBF1* were digested from recombinant plasmid pBI121-*CBF1* by *Eco*RI and *Hind* III, and directionally linked to the plant expression vector pCambia1301 to get the plant expression vector p1301-*CBF1*. We transformed the embryogenic cell suspensions of wild banana (*Musa itinerans* Cheesm) with p1301-*CBF1* via *Agrobacterium*-mediated transformation. Results from histochemical GUS assay and PCR suggested that *CBF1* gene has been transferred into the wild banana.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *CBF1* gene; wild banana; genetic transformation; embryogenic cell suspensions(ECS)

寒害给香蕉生产造成巨大的经济损失, 培育抗寒优质品种成为香蕉育种的一个重要目标。由于多数香蕉栽培种是三倍体, 具有高度不育特性, 常规育种难以培育抗寒优质品种, 而利用组织培养并结合基因工程技术有望实现这一目标。近年来, 利用转基因技术改良植物性状已取得较多成果^[1-4]。*CBF1* 是从拟南芥中克隆得到的抗寒基因^[5]。已有研究^[6-7]表明, *CBF* 家族基因在植物抗寒、抗旱及抗盐碱方

面起着重要作用, 在拟南芥中过量表达 *CBF1* 或 *CBF3* 基因, 其抗寒性大大提高^[8-9]; 将 *CBF1* 基因转入草莓^[10]和番茄^[11], 转基因植物对低温胁迫的抵抗力明显增强。笔者克隆了拟南芥的 *CBF1* 基因, 并采用农杆菌介导法将其转入野生蕉中, 旨在获得高效的遗传转化体系及再生植株, 通过分析转基因野生蕉的抗寒性, 为进一步将抗寒基因转入香蕉栽培品种提供技术参考。

收稿日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000903); 广东省自然科学基金项目(10451064001006326); 广东省农业科学院院长基金项目(20090104)
作者简介: 刘凯(1982—), 男, 江西宁都人, 博士研究生, 主要从事果树分子育种研究, 胡春华为并列第一作者; *通信作者, yiganjun@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子、野生蕉(*Musa intinerans* Cheesm.)胚性细胞悬浮系、农杆菌 EHA105、植物表达载体 pBI121 以及 pCAMBIA 1301 等,均为广东省热带亚热带果树研究重点实验室保存;克隆质粒 pMD18-T、各种限制性酶购于 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗寒基因 *CBF1* 的克隆

根据 GenBank 公布的拟南芥 *CBF1* 序列设计引物: 5'-gactctagaatgaactcatttcagc-3'和 5'-cggagctctt agtaactccaaagcgac-3', 其中上游引物引入 *Xba*I 内切酶位点并加保护性碱基, 下游引物引入内切酶 *Sac*I 位点并加保护性碱基, 以拟南芥 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得的目的片段经回收后克隆到载体 pMD18-T 上, 筛选阳性克隆提取质粒, 质粒样品送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.2 植物表达载体 p1301-CBF1 的构建

利用限制性酶 *Sac*I 和 *Xba*I 从 pMD18-T 载体上切下 *CBF1* 基因, 将其克隆到植物表达载体 pBI121 的 *Xba*I 和 *Sac*I 位点。重组质粒用 PCR 和双酶切进行鉴定, 鉴定正确的质粒重命名为 pBI121-CBF1。再利用限制性酶 *Eco*RI 和 *Hind*III 完全双酶切 pBI121-CBF1, 回收双酶切小片段(35S-CBF1-NOST), 并将其克隆到经过相同酶切的 pCAMBIA 1301 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 提取质粒, 对重组质粒进行酶切鉴定, 将经过鉴定的重组子命名为 p1301-CBF1。

1.2.3 工程菌的制备、转化、筛选和植株再生

采用液氮冻融法^[12], 将质粒 p1301-CBF1 转化到农杆菌 EHA105 中。挑阳性单克隆农杆菌在含有 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇菌过夜。菌液 6 000 r/min 离心 5 min, 用新鲜 LB (含有相同的抗生素浓度) 重新悬浮, 调节 OD_{600} 约为 0.2, 以相同的条件摇菌至 OD_{600} 约为 0.6~0.8。6 000 r/min

离心 10 min, 收集菌体, 用新鲜的 M2 培养基^[13]重新悬浮菌体, 调整 OD_{600} 约为 0.2, 并加入乙酰丁香酮(AS)至终浓度 100 μ mol/L, 作为工程菌用于转化。

取 50 mg 继代 7 d 的野生蕉胚性悬浮细胞, 加入到 10 mL 已制备的农杆菌中浸染 30 min。液体共培养^[14]后, 用 M2 清除多余的农杆菌, 再转入液体筛选培养基 M2 (含有 300 mg/L 的头孢菌素和 20 mg/L 的潮霉素) 中。每 2 周继代 1 次, 1 个月后转入到含有相同浓度的筛选剂和抗生素的 M3 培养基^[13]中进行胚诱导。胚成熟后, 将胚转入含有抗生素, 筛选剂的终浓度适当降低的 M4^[13]中诱导胚的萌发。萌发后的植株转入 RM^[13]中生根, 获得完整植株, 即为拟转基因植株, 利用 PCR 进行分子鉴定。

1.2.4 转化组织的 GUS 分析及 PCR 验证

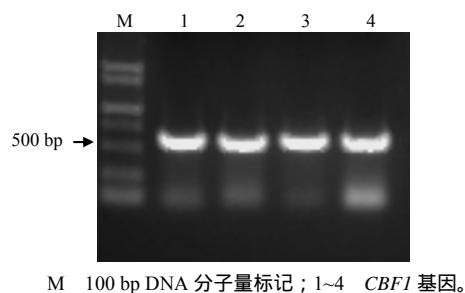
以共培养 3 d 的悬浮细胞和潮霉素抗性成熟胚为材料, 用无菌水清洗干净后, 加入一定量的磷酸缓冲液(含 10 mmol/L 的 EDTA, 1% Triton X-100), 1% DMSO 和 0.5 mg/L 的 X-Gluc 反应底物。混合均匀后, 37 °C 水浴处理 4 h 以上至过夜。以没有转化的悬浮系作为对照。

利用 CTAB 法^[15]提取转化野生蕉叶片基因组 DNA, 以 *CBF1* 基因的特异引物分别对叶片基因组 DNA 及阳性对照质粒 p1301-CBF1 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 双蒸水 14.1 μ L, 10 \times Buffer 2.0 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 0.8 μ L, 引物(10 μ mol/L) 各 0.8 μ L; DNA 1 μ L (约 40 ng); *Taq* 酶 0.5 μ L (1 U)。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

利用设计的引物, 以拟南芥 DNA 为模板的 PCR 扩增, 得到 1 条约 660 bp 的扩增条带 (图 1), 与预期的大小一致, 序列与 GenBank 中登录的拟南芥 *CBF1* (NM_118681) 基因同源性为 100%, 所获得的基因即为 *CBF1* 基因。



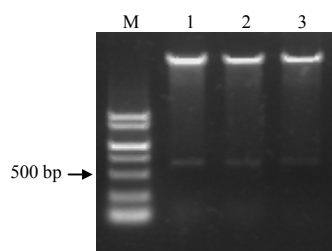
M 100 bp DNA 分子量标记; 1~4 *CBF1* 基因。

图 1 *CBF1* 基因的 PCR 扩增片段

Fig.1 PCR of the *CBF1* with the specific primers

2.2 拟南芥 *CBF1* 基因植物表达载体

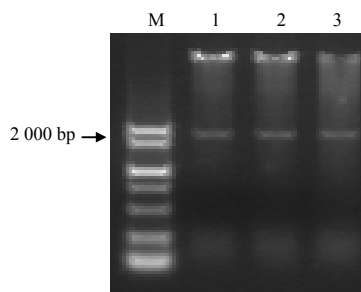
利用酶切获得的 *CBF1* 基因克隆到 pBI121 的 *Xba*I 和 *Sac*I 位点, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 挑阳性菌落摇菌提取质粒, 经双酶切鉴定, 可以释放出 1 条约 660 bp 的条带(图 2)。重组质粒即为植物表达载体 pBI121-*CBF1*。



M 100 bp DNA 分子量标记; 1~3 pBI121-*CBF1* 质粒 *Sac*I 和 *Xba*I 双酶切。

图 2 *Sac* 和 *Xba* 对质粒 pBI121-*CBF1* 的双酶切电泳结果
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pBI121-*CBF1* with digestion

利用 *Eco*RI 和 *Hind* III 对质粒 pBI121-*CBF1* 进行完全双酶切, 将 35S 启动子与 *CBF1* 一起切下, 片段大小为 1 800 bp 左右, 符合预期(图 3)。

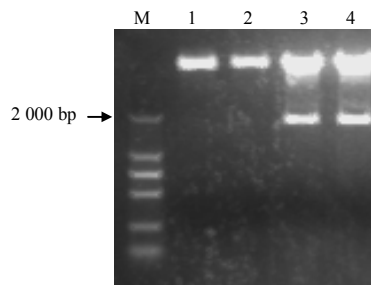


M 100 bp DNA 分子量标记; 1~3 *Eco*RI 和 *Hind* III 对质粒 pBI121-*CBF1* 的双酶切。

图 3 *Eco*RI 和 *Hind* III 对质粒 pBI121-*CBF1* 的双酶切电泳结果

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pBI121-*CBF1* with digestion

将 1 800 bp 左右片段克隆至 pCambia1301 的 *Eco*RI 和 *Hind* III 酶切位点, 酶切鉴定后, 获得了大小一致的片段(图 4), 证明植物表达载体 p1301-*CBF1* 构建成功。



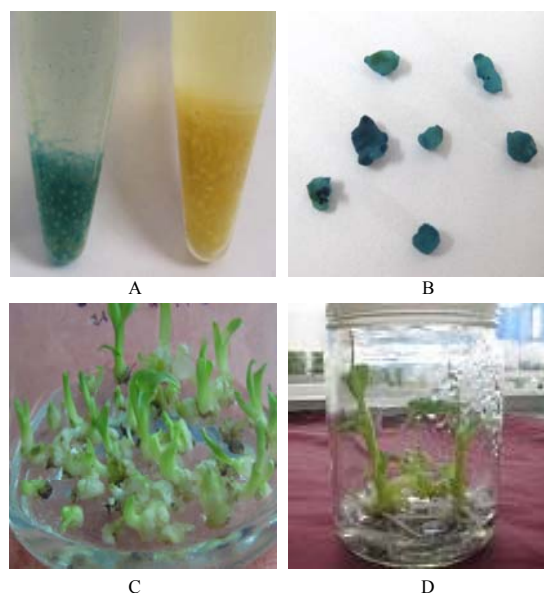
M 100 bp DNA 分子量标记; 1~2 质粒 p1301-*CBF1*;

3~4 *Eco*RI 和 *Hind* III 对质粒 p1301-*CBF1* 的双酶切。

图 4 *Eco*RI 和 *Hind* III 对质粒 p1301-*CBF1* 的双酶切电泳
Fig.4 Identification of recombinant plasmid p1301-*CBF1* with digestion

2.3 抗性植株的获得及组织 GUS 分析

野生蕉胚性悬浮细胞在 10 mL 的农杆菌悬浮液中浸染 30 min 后转入共培养, 共培养至第 3 天后, 取少量进行 GUS 染色(图 5-A)。结果表明, 共培养 3 d 后的大部分胚性悬浮细胞 GUS 染色后呈阳性, 初步表明 *CBF1* 基因已转入到胚性悬浮细胞中。转入液体筛选 4 周后, 再转入 M3 固体培养基中诱导胚的形成, 约 2 个月左右可得到成熟的潮霉素抗性



A 转化 ECS 的 GUS 基因瞬时表达; B 成熟抗性胚的 GUS 染色;

C 抗性胚的萌发; D 完整的转基因苗。

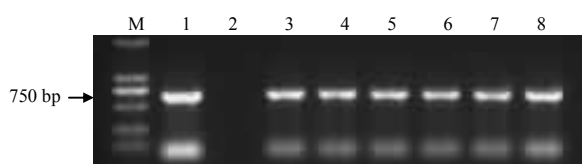
图 5 转化 ECS、抗性胚的 GUS 染色以及转基因苗的再生

Fig.5 GUS gene expression in transformed ECS and mature resistance embryos and regeneration of transgenic plants

体胚,对部分胚进行 GUS 染色分析,发现均为阳性转化(图 5-B)。将得到的抗性胚转入到 M4 固体培养基中,1 个月左右体胚萌发成植株(图 5-C),再将萌发的植株转入到生根培养基中,4 周左右获得了 18 株完整的再生抗性苗(图 5-D)。

2.4 转基因野生蕉的分子鉴定

为了进一步验证 *CBF1* 基因在野生蕉基因组中的整合情况,提取具有 GUS 活性的转基因野生蕉叶片 DNA 用 *CBF1* 基因特异引物进行 PCR 检测。结果发现,转化苗 DNA 均可扩增出 660 bp 左右的目的条带,而对照则无扩增(图 6),说明外源基因已整合到野生蕉基因组中。



M 100 bp DNA marker; 1 质粒 p1301-CBF 的 PCR 扩增; 2 非转基因植株的 PCR 扩增; 3~8 转基因植株的 PCR 扩增。

图 6 部分转基因植株的 PCR 检测

Fig.6 Detection of some transgenic plants by PCR

3 讨论

CBF1 基因是 Stockinger 等^[5]在研究拟南芥低温驯化期间调节 *COR* 基因表达的分子机理时发现的,其编码产物能识别 *COR* 基因启动子区的 CRT/DRE 元件并与之结合,以后又陆续发现了 CBF 家族基因的其他基因 *CBF2* 和 *CBF3*^[6]、*CBF4*^[7]、*CBF5* 和 *CBF6*^[16]。研究表明,CBF 家族基因在调节植物抗寒性方面起着“总开关”的作用。CBF 转录激活因子的过表达能引起许多生理生化反应,包括编码产生 LEA 蛋白或亲水多肽、脯氨酸和多种可溶性糖类的合成积累,这些物质已被证明对植物的低温耐性起重要作用。拟南芥 *CBFs* 基因转化到烟草^[17-18]、小麦^[19]、水稻^[20]等农作物,这些作物的抗寒性得到较大的改善。笔者构建的组成型表达载体,目的是使 *CBF1* 基因在植物体内过表达,GUS 染色证明了 *CBF1* 基因已转入到野生蕉内。表达量的高低有待于进一步的分析。

获得的植物表达载体 pBI121-CBF1 本可以直接

转化农杆菌介导转化胚性悬浮细胞,但由于该载体上的 GUS 报告基因被 *Xba*I 和 *Sac*I 切除,不利于转化过程中的验证,只有在获得植株后通过分子鉴定方知是否为转化植株;因此,笔者以 pBI121-CBF1 作为中间载体,结合质粒 pCambia1301 作进一步的改进,构建了一个既含 GUS 报告基因,又有潮霉素抗性基因的植物表达载体 p1301-CBF1,已获得了较理想的转化效果,不仅提高了转基因植株的阳性筛选率,且减少了分子验证的工作量。

野生蕉与香蕉栽培品种相比,具有较好的耐寒性,但是持续低温也会对野生蕉造成伤害。本研究已获得转 *CBF1* 基因野生蕉,转基因野生蕉与非转基因野生蕉的耐寒性是否有明显的差异,后续工作将进行验证。

参考文献:

- [1] 孟颢光,张朝红,王跃进.抗病基因 VpPR10 转化“砀山酥梨”及转化条件的优化[J].园艺学报,2010,37(10):1567-1574.
- [2] 刘玲,高佳,潘素君,等.*BWMK1* 互作基因 *BWIP4* 对粳稻的转化[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(3):272-275.
- [3] 刘晨曦,李云河,高玉林,等.棉铃虫对转 *Bt* 基因抗虫棉花的抗性机制及治理[J].中国科学:生命科学,2010,40(10):920-928.
- [4] 何业华,吴会桃,罗吉,等.根癌农杆菌介导 CYP1A1 转化菠萝的研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(1):34-38.
- [5] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. *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]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 1035-1040.
- [6] Gilmour S J, Zarka D J, Stockinger E J, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression[J]. The Plant Journal, 1998, 16(4): 433-442.
- [7] Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2002, 130: 639-648.
- [8] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D J, et al.

- Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance[J]. *Science*, 1998, 280: 104–106.
- [9] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, et al. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854–1865.
- [10] 刘燕, 胡莺蕾, 董静, 等. 转基因草莓向栽培草莓中转移 *CBF1* 基因的研究[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(3): 309–313.
- [11] Hsieh Tsai-Hung, Lee Jent-turn, Charng Yee-yung, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618–626.
- [12] Holsters M, Waele D, Depicker A, et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Molecular and General Genetics*, 1978, 183: 181–187.
- [13] 胡春华, 魏岳荣, 易干军, 等. 根癌农杆菌介导的香蕉高效遗传转化系统的建立[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 172–178.
- [14] Huang X, Huang X L, Xiao W, et al. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via a liquid co-cultivation system[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 1755–1762.
- [15] Stewart C N Jr, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. *Bio Techniques*, 1993, 14(5): 748–749.
- [16] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(3): 998–1009.
- [17] Takumi S, Shimamura C, Kobayashi F. Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat *CBF* gene in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46: 205–211.
- [18] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45 (3): 346–350.
- [19] Kobayashi F, Takumi S, Kume S, et al. Regulation by Vrn-1/Fr-1 chromosomal intervals of CBF-mediated *Cor/Lea* gene expression and freezing tolerance in common wheat[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 887–895.
- [20] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(1): 141–153.

责任编辑: 罗慧敏