

转录因子DREB1A基因的克隆及植物表达载体的构建

柳 娜, 杨文雄

(甘肃省农业科学院小麦研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 研究转录因子 DREB1A 在植物抗渗透胁迫反应中的作用。根据 GenBank 中登录的 DREB1A 基因的序列设计引物, 用 PCR 方法从拟南芥中克隆 DREB1A 基因, 利用基因重组技术成功构建了植物表达载体 pCAMB1A1300-DREB1A。该结果为进一步利用 DREB1A 基因做遗传转化研究奠定了基础。

关键词: 转录因子; DREB1A 基因; 植物表达载体

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)11-0029-03

[doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.11.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2018.11.009)

Cloning of Transcription Factor DREB1A Gene and Construction of Plant Expression Vector

LIU Na, YANG Wenxiong

(Institute of Wheat, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: To research the function of the transcription factor DREB1A in plant tolerance to osmotic stress, a pair of primers was designed according to the sequence of DREB1A gene in GenBank databases. The DREB1A gene was cloned from *Arabidopsis thaliana* by the method of PCR. By the method of Recombinant DNA Technology, plant expression vector pCAMB1A1300-DREB1A was successfully constructed. The results laid a foundation for further research on genetic transformation using DREB1A gene.

Key words: Transcription factor; DREB1A gene; Plant expression vector

干旱、盐碱和低温等逆境是影响作物生长发育的主要限制因子, 改善环境胁迫的耐受性对提

收稿日期: 2018-04-27; 修订日期: 2018-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560390); 甘肃省科技重大专项(17ZD2NA016-7)资助。

作者简介: 柳 娜(1981—), 女, 甘肃靖远人, 副研究员, 主要从事小麦分子和常规育种。Email: 592905658@qq.com。

通信作者: 杨文雄(1964—), 男, 甘肃会宁人, 研究员, 主要从事小麦育种研究。Email: yang.w.x@263.net。

- [13] 甘 林, 代玉立, 杨秀娟, 等. 木霉菌对番茄病菌的抑制作用[J]. 福建农业学报, 2016, 31(11): 1221-1225.
- [14] 张建华. 长枝木霉 T6 发酵条件优化, 抑菌活性成分分析及其杀线作用测定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016: 10-13.
- [15] 景 芳, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* T6 水分散粒剂的研制[J]. 农药学报, 2016, 18(2): 241-248.
- [16] 薛应钰, 范万泽, 张树武, 等. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及防效[J]. 应用生态学报, 2016, 27(10): 3379-3386.
- [17] 张建华, 徐秉良, 郑宇宇, 等. 长枝木霉 T6 发酵液稳定性及粗提物抑菌活性[J]. 2015, 54(5): 330-333.
- [18] 范万泽, 薛应钰, 张树武, 等. 拮抗放线菌 ZZ-9 菌株发酵液的抑菌普及稳定性测定[J]. 西北农业学报, 2017, 26(3): 463-470.
- [19] 梁巧兰, 王 芳, 魏列新, 等. 深绿木霉 T2 菌株对百合疫霉拮抗作用及机制[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 164-167.
- [20] 钟小燕, 梁妙芬, 甄锡状, 等. 木霉菌对香蕉枯萎病菌的抑制作用[J]. 果树学报, 2009(26): 186-189.
- [21] 武汉琴, 苏经迁, 谢明英, 等. 茶树内生木霉的鉴定及其在植物体内的定植[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 342-348.
- [22] 范万泽, 薛应钰, 张树武, 等. 拮抗放线菌 ZZ-9 菌株发酵液的抑菌普及稳定性测定[J]. 西北农业学报, 2017, 26(3): 463-470.

(本文责编: 郑立龙)

高作物产量具有重要意义^[1-3]。环境胁迫能诱导许多植物基因的表达,有些基因的表达产物可直接增强胁迫耐性,有些可以感应和转导胁迫信号调控基因表达^[4-5]。因此,抗逆相关基因的克隆、表达调控及功能分析等研究,为作物抗逆育种提供了潜在的有效途径。干旱又是制约甘肃小麦生产的首要因素,提高小麦对干旱胁迫的耐受性来增加小麦产量,将极大地提高甘肃应对粮食安全问题的能力。加强具有抗旱基因资源的发掘和创新,开展抗旱生理和遗传学研究,利用基因工程技术实现不同物种间抗旱基因的转移,提高植物的耐旱能力,是目前研究的热点之一^[6]。植物的耐旱性是一个复杂的多基因控制系统,而转录因子有一部分与抗逆性有关,参与渗透胁迫的信号转导和功能基因表达调控,在植物抗渗透胁迫反应中起关键作用^[7-11]。已有的研究表明,DREB是个小基因家族,编码3个相关的转录因子,DREB1A是这个家族的重要成员之一,它对抗渗透胁迫基因的启动起着“主开关”的作用,在逆境胁迫下主动调控相关基因的表达,并在胁迫信号传递中起重要作用。我们从拟南芥中克隆转录因子DREB1A,并构建由CaMV35S启动子调控的植物表达载体,旨在为进一步利用DREB1A基因做小麦遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

哥伦比亚生态型拟南芥幼苗由甘肃省农业科学院小麦研究所种质创新实验室提供。pMD19-T vector、pCAMBIA1300-N-eGFP载体、大肠杆菌菌株DH5a均购自大连宝生物工程有限公司。

Taq酶、氨卞青霉素、卡拉霉素、IPTG、X-gal、T4 DNA连接酶、DNA回收试剂盒等其他试剂均购自TaKaRa公司,引物合成和基因测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥叶片基因组RNA的提取 使用植物基因组试剂盒提取拟南芥叶片基因组RNA,然后通过RT-PCR反转录成cDNA。以反转录的cDNA为模板,用设计好的上下游引物扩增DREB1A基因,采用1%的琼脂糖凝胶检测DNA的完整性。

1.2.2 DREB1A基因克隆及载体构建 根据Genebank中拟南芥DREB1A基因序列(登录号:EF156749),应用Primer Premier 5.0软件分析其内

部酶切位点情况。设计1对引物,并根据后续构建植物表达载体的需要,在上游引物一端加入1个XbaI位点,在下游引物一端加入了BamHI位点。设计PCR引物如下:上游引物D1:5' GCTCTA-GA ATGAACTCATTCTGCT-3' XbaI;下游引物D2:5' GCCCTAGG GTCGCATCACACATCTC 3' BamHI。PCR反应体系总体积为50.0 μL,包括5xbuffer 10.0 μL、10 mmol/L上游引物1.0 μL、下游引物1.0 μL、2.5 mmol/L dNTP 4.0 μL,模板cDNA 1.0 μL,Primer STAR 1.0 μL加ddH₂O至50 μL。PCR反应程序为:94℃预变性2.0 min、94℃30 sec、55℃30 sec、72℃1.0 min。35个循环后72℃延伸10.0 min。PCR产物经1.0%琼脂糖电泳检测后,扩增片段大小为561 bp(图1)。将扩增片段用DNA凝胶回收试剂盒回收纯化(操作程序根据试剂盒说明书进行,回收后的DNA片段加A尾。连接到克隆载体pMD19-T载体,将经PCR检测和XbaI/BamHI双酶切鉴定呈阳性的克隆命名为T-DREB1A,送交北京六合华大基因科技股份有限公司测序,采用DNAMAN软件分析比对测序结果。

1.2.3 拟南芥DREB1A基因表达载体的构建 将测序合适的T-DREB1A载体质粒用核酸内切酶XbaI和BamHI II酶切,回收DREB1A片段。同时将pCAMBIA1300-N-eGFP载体用此2个酶切,回收载体。回收双酶切产物,用T4DNA连接酶将DREB1A片段接到pCAMBIA1300载体中。连接产物转化E.coli DH5α感受态细胞。菌液PCR鉴定构建的DREB1A基因植物表达载体,并将阳性克隆送交北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

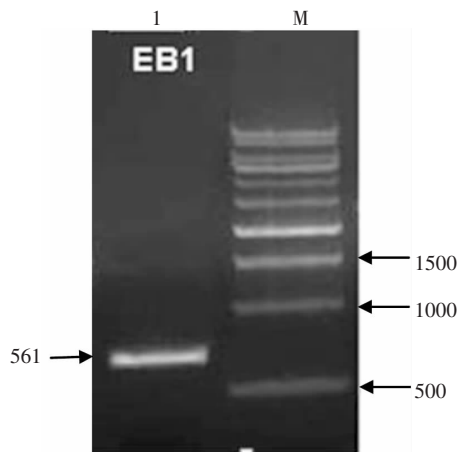
2 结果与分析

2.1 DREB1A基因的克隆与测序结果

分别以D1、D2为上下游引物,以cDNA模板,扩增出561 bp的特异带,与预期的DREB1A基因大小相符(图1)。将扩增片段链接到克隆载体pMD19-T,测序后与GenBank中的拟南芥DREB基因序列进行比对,结果表明2个序列完全一致,说明获得的拟南芥DREB基因编码区是正确的,没有发生碱基变化,可以用来构建植物表达载体。

2.2 植物表达载体p1300-DREB1A构建

用前向带有XbaI和反向带有BamHI酶切位点的拟南芥DREB基因引物,以pMD19-T-DREB质粒为模板,经内切酶切割回收目的片段。目的片段回收纯化后,用XbaI和BamHI酶切,连接



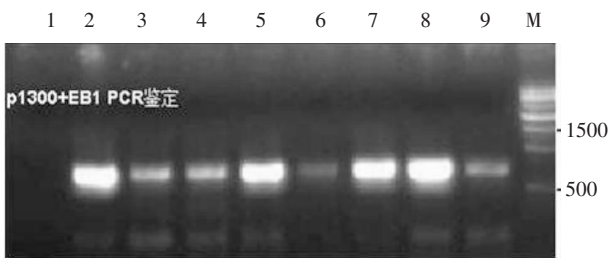
1 为拟南芥 DREB 基因扩增产物；M 为 500 bp DNA Ladder, Marker。

图 1 拟南芥 DREB 基因的 PCR 扩增结果

到用相同酶切回收后的表达载体 pCAMBIA1300 上, 转化 E.coli DH5 α , 获得 pCAMBIA1300-DREB 表达载体(图2)。对重组质粒进行 PCR 鉴定, 扩增出一条长约 561 bp 的目的基因条带(图3)。将阳性克隆测序, 序列比对结果正确, 说明拟南芥 DREB 基因表达载体构建成功。



图 2 拟南芥 DREB 基因植物表达载体结构示意图



M 为 500 bp DNA Ladder, Marker; 1 为水对照; 2-9 为 p1300-DREB1A 重组质粒菌液 PCR 产物

图 3 p1300-DREB1A 重组质粒菌液 PCR 产物

3 结论与讨论

用 PCR 方法从拟南芥中克隆了 DREB1A 基因, 序列分析发现克隆的 DREB1A 基因与已发表的 DREB1A 基因序列(EF156749)的同源性为 99.85%。利用基因重组技术成功构建了由 CaMV35S 启动于调控的植物表达载体 p1300-DREB1A。为进一步利用 DREB 1A 基因综合改良植物抗旱性奠定基础。

植物感受外界干旱、高盐、激素、病害及体内细胞发育等信号, 通过一系列信号传递激发转录因子, 转录因子与基因启动子区域的顺式作用

元件结合后, 激活 RNA 聚合酶 II 转录复合物, 从而启动基因的转录表达, 最后通过基因产物的作用对外界信号在生理生化等方面做出适合的调节反应。DREB 转录因子参与对干旱、高盐 and 低温等逆境胁迫的应答, 介导植物非 ABA 依赖的渗透胁迫信号的传递。DREB 转录因子可以和 DRE 顺式元件或具有 DRE 核心序列的元件特异性结合, 调控下游相关基因的转录表达, 提高对低温、干旱和高盐的抗性。因此, DREB 类转录因子在基因的表达调控方面起着非常重要的作用。目前, 已从不同的作物中克隆到这类转录因子, 并对其功能进行了研究。

参考文献:

- [1] NI Z Y, HU Z, JIANG Q Y, *et al.* GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2013, 82: 113-129.
- [2] 倪志勇, 徐兆师, 李连城, 等. DREB 转录因子在植物逆境胁迫中的作用机理及应用研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2008, 28(6): 1100-1106.
- [3] 张永恩, 李潮海, 王 群. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. *中国农学通报*, 2004, 20(6): 85-88.
- [4] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel cisacting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. *Plan Cell*, 1994, 6(2): 251-264.
- [5] 张腾国, 郭艳峰, 陈琼琼, 等. 油菜 COR 基因的克隆及原核表达[J]. *甘肃农业科技*, 2015(4): 1-4.
- [6] 孙立平, 李德全. LEA 蛋白的分子生物学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2003(6): 5-13.
- [7] 刘 强, 赵南明, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性的作用[J]. *科学通报*, 2000, 45(1): 11-16.
- [8] 王艳青, 陈雪梅, 李 悦, 等. 植物抗逆中的渗透调节物质及其转基因工程进展[J]. *北京林业大学学报*, 2001, 23(4): 66-70.
- [9] 倪志勇, 马文静, 吕 萌, 等. 棉花肉桂醇脱氢酶基因 GhCAD6 的克隆及正义、反义与 RNAi 干扰载体的构建[J]. *华北农学报*, 2009, 24(6): 20-26.
- [10] 贾小霞, 文国宏, 李高峰, 等. 拟南芥 DREB1A 基因的克隆与植物表达载体构建[J]. *甘肃农业科技*, 2011(6): 18-21.
- [11] 奥斯伯 F, 金斯顿 R F, 布伦特 R, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.

(本文责编: 杨 杰)