

研究报告 Original Papers

二色补血草*LbDREB*基因在酵母中的抗逆性分析

王留强, 班巧英, 贺琳, 王玉成*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 利用酵母表达系统研究了二色补血草的*DREB*基因(*LbDREB*)对不同胁迫的抗性。将*LbDREB*构建到酵母表达载体pYES2中, 转化到酿酒酵母INVSc1菌株中, 并以转空pYES2质粒的酵母INVSc1 (pYES2)作为对照, 通过比较两种酵母在不同胁迫下的存活率来研究*LbDREB*基因对NaCl、KH₂PO₄、Na₂CO₃、NaHCO₃、低温、干旱、CuSO₄和CdCl₂胁迫的抗性。结果表明, *LbDREB*转化的酵母在各种胁迫下的存活率均明显高于转空pYES2的对照酵母, 说明*LbDREB*基因除了具有传统认为的抗旱、耐盐、抗寒的作用外, 还具有抗KH₂PO₄、Na₂CO₃、NaHCO₃、CuSO₄和CdCl₂等胁迫的能力。

关键词: 二色补血草; *DREB*基因; 抗逆; 酵母表达

Stress Tolerance Analysis of *LbDREB* Gene from *Limonium bicolor* Kuntze in Yeast

WANG Liu-Qiang, BAN Qiao-Ying, HE Lin, WANG Yu-Cheng*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: To investigate the stress tolerance of *LbDREB*, the recombinant plasmid pYES2-*LbDREB* was constructed by inserting the *LbDREB* gene into the yeast expression vector pYES2. The recombinant plasmid pYES2-*LbDREB* was transformed into yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, and the INVSc1 strain transformed with empty pYES2 was used as the control. The recombinant yeast INVSc1 harboring *LbDREB* (pYES2-*LbDREB*) and the control INVSc1 harboring empty pYES2 were respectively treated with NaCl, KH₂PO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃, freezing, drought, CuSO₄ and CdCl₂, and their survival rates were compared. The results showed that the survival rates of the recombinant yeast INVSc1 (pYES2-*LbDREB*) were obviously higher than those of the control strain under these stress conditions. It indicated that beside the known tolerance to salt, drought and cold, the *LbDREB* was also tolerant to NaCl, KH₂PO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃, freezing, drought, CuSO₄ and CdCl₂ stress.

Key words: *Limonium bicolor*; *DREB* gene; stress tolerance; yeast expression

DREB (dehydration-responsive element binding protein)转录因子能与DRE/CRT顺式作用元件特异性地结合, 进而调控一系列逆境胁迫应答有关基因的表达, 增强植物的抗逆能力(谢永丽等2005)。因此, DREB在植物对干旱、高盐及低温等胁迫的抗性调控中起十分重要的作用(王红蕾2008)。目前, 人们从多种植物中分离克隆了*DREB*基因并对其进行功能研究。例如, Liu等(1998)通过酵母单杂交的方法, 从拟南芥cDNA文库中分离到了3个*DREB*基因*DREB1A*、*DREB1B*和*DREB1C*; 并在干旱处理的拟南芥cDNA文库中克隆到2个受干旱和高盐胁迫诱导的*DREB*基因*DREB2A*和*DREB2B*。随后, 人们对其他植物中的*DREB*类基因家族进行

了不断地深入研究。Jaglo等(2001)分别从油菜(*Brassica napus* L.)、黑麦(*Secale cereale* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)和番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)中分离得到与拟南芥*DREB1B*同源的*DREB*类转录因子, 并对其表达模式作了进一步研究。Shen等(2003)分别从干旱处理的小麦cDNA文库和高盐处理的山菠菜(*Atriplex hortensis* L.) cDNA文库中筛选出*TaDREB1*和*AhDREB1*, 并对其进行了表达模式研究和抗性分析。但目前, 主要

收稿 2010-10-13 修定 2011-01-19

资助 国家自然科学基金(30972387)和教育部新世纪优秀人才计划(NCET-08-0751)。

* 通讯作者(E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82190607)。

针对DREB基因如何参与植物在低温、高盐和干旱时的抗性调控研究,但对于它是否参与了植物对其他胁迫的抗性调控研究得还比较少。

本文从二色补血草中克隆出DREB基因(*LbDREB*),将其构建到酵母表达载体pYES2中,并转化酿酒酵母INVSc1,获得重组酵母INVSc1(pYES2-LbDREB),利用重组酵母对*LbDREB*进行了NaCl、KH₂PO₄、Na₂CO₃、NaHCO₃、低温、PEG6000、CuSO₄和CdCl₂等不同胁迫的研究,为*LbDREB*基因作为植物抗逆工程的理想基因提供依据。

材料与amp;方法

根据二色补血草(*Limonium bicolor* Kuntze) *LbDREB*基因(GenBank登录号FJ872558)序列设计引物,DrSL: 5' GTACGGATCCACCATGGCTACAGCTATTGATATTTAC 3'; DrSR: 5' CTGCGAATTCTCAATCGATCTCCATAGACGGAAAAT 3'。两端引物分别带有BamHI和EcoRI酶切位点,以二色补血草的cDNA为模板,扩增*LbDREB*基因的完整开放阅读框(ORF)序列。与pYES2载体(Invitrogen)连接,构建重组质粒pYES2-LbDREB。将pYES2-LbDREB及空载体pYES2(作为对照)用乙酸锂沉淀法(Sakuma等2002)转化酿酒酵母INVSc1(*Saccharomyces cerevisiae*),分别命名为INVSc1(pYES2-LbDREB)和INVSc1(pYES2)。

挑取INVSc1(pYES2-LbDREB)和INVSc1(pYES2)2种酵母菌株接种于SC-Ura培养基(含有2%葡萄糖)中,30℃摇床振荡过夜培养,然后于SC-Ura培养基(含终浓度2%半乳糖为碳源及诱导底物)诱导培养。INVSc1(pYES2-LbDREB)分别诱导培养12、24、36、48和60 h,以及抑制培养(葡萄糖为碳源)36 h。INVSc1(pYES2)诱导培养36 h及抑制培养36 h作为对照。提取上述处理的菌体总RNA(Sakuma等2002),再利用DIG-dNTP替换普通PCR的dNTP,用引物HybL(5' ATGGCTACAGCTATTGATATTTAC 3')和HybR(5' AAGTCACCTCTCAGCTTGACG 3')对*LbDREB*基因进行PCR扩增,将所得产物作为探针。利用Northern杂交技术研究外源*LbDREB*基因子在不同诱导时间表达,并确定最佳诱导表达时间,其步骤参照分子杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche)使用说明。

挑取酵母INVSc1(pYES2-LbDREB)和INVSc1(pYES2)单克隆于SC-Ura培养基中扩大培养24 h(Northern杂交表明诱导培养24 h时基因表达量最高),离心菌体,将10 mL诱导培养基(SC-Ura培养基+2%半乳糖)中菌体浓度OD₆₀₀调整为0.4,30℃诱导表达24 h后,测其2种酵母的菌体浓度OD₆₀₀值,再统一调整到OD₆₀₀值为2,取2种等量的酵母菌体进行不同的胁迫处理。其中菌体重悬于5 mol·L⁻¹ NaCl溶液中于4℃处理24 h,10% (W/V) KH₂PO₄、300 μmol·L⁻¹ CuSO₄溶液胁迫3 h,20% (W/V) PEG6000、600 μmol·L⁻¹ CdCl₂溶液于30℃胁迫24 h,低温胁迫则将菌体重悬于无菌水中于-20℃放置24 h,其间菌液每隔6 h冻融1次,以上胁迫处理的菌液和未胁迫处理的菌液均依次稀释1、100、1 000、10 000倍。而用6%、8%和10% Na₂CO₃、NaHCO₃溶液30℃分别胁迫0.5 h和3 h,且菌液不稀释。取3 μL菌液直接点样在SC-Ura(含有2%葡萄糖)的固体培养基上,30℃恒温培养48 h,比较INVSc1(pYES2)和INVSc1(pYES2-LbDREB)的生长状态,每种胁迫实验重复3次。

结果与amp;讨论

1 重组酵母INVSc1(pYES2-LbDREB)的转化及检测

将载体pYES2和pYES2-LbDREB转化酿酒酵母INVSc1,用SC-Ura培养基筛选阳性转化子。用引物LbDREBL(5' ATGGCTACAGCTATTGATATTTAC 3')和LbDREBR(5' TCAATCGATCTCCATAGACGG 3')对INVSc1(pYES2-LbDREB)酵母单菌落进行PCR扩增验证,其扩增片段与预期的1 071 bp长度相吻合(图1),证明重组质粒pYES2-LbDREB转化酵母成功。

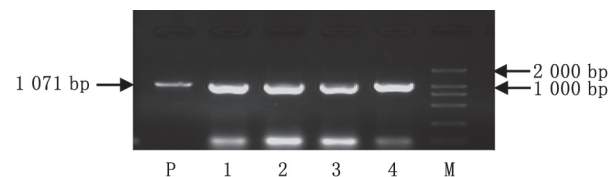


图1 重组酵母INVSc1(pYES2-LbDREB)的PCR鉴定

Fig.1 Identification of expression vector pYES2-LbDREB by PCR

P: LbDREB双酶切产物; 1~4: 重组酵母INVSc1(pYES2-LbDREB) PCR产物; M: DNA分子标记DL2000。

2 外源*LbDREB*基因在酵母中的诱导表达

利用Northern杂交分析外源*LbDREB*基因在不同诱导时间的表达。结果(图2)表明, 酵母INVSc1 (pYES2)没有表达*LbDREB*, 而重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)在诱导培养后*LbDREB*基因明显表达, 且表达量呈现先上升再下降的趋势, 在诱导24 h达到高峰。由此确定, 转基因酵母的最佳诱导培养时间是24 h。

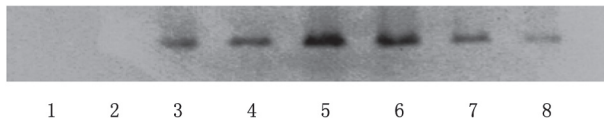


图2 酵母Northern 杂交图谱

Fig.2 Northern blot analysis of recombinant yeast

1: 酵母INVSc1 (pYES2)抑制培养36 h; 2: 酵母INVSc1 (pYES2)诱导培养36 h; 3: 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)抑制培养36 h; 4~8: 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)分别诱导培养12、24、36、48、60 h。

3 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)对逆境胁迫的抗性分析

在未胁迫情况下, 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)和对照酵母INVSc1 (pYES2)生长状态相

当(图3-A), 表明可以比较它们对胁迫的耐受性。

在NaCl和 KH_2PO_4 胁迫下, 两种酵母均能够生长, 但重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)的存活率明显高于对照酵母INVSc1 (pYES2) (图3-B、C)。说明在相同盐胁迫条件下, 二色补血草*LbDREB*基因的表达可明显提高酵母细胞对盐胁迫的耐受能力。

低温胁迫的结果(图3-D)表明, 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)存活率明显高于对照INVSc1 (pYES2)。说明*LbDREB*具有抗低温能力, 它在酵母中表达增强了酵母的抗冻能力。

PEG6000胁迫的结果(图3-E)显示, 胁迫下两种酵母均能够生长, 但重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)生长情况明显优于对照酵母INVSc1 (pYES2), 说明INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)比INVSc1 (pYES2)更能抵抗PEG6000胁迫。

CuSO_4 胁迫的结果(图3-F)表明, 两种酵母均能够生长, 但INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)的存活率明显高于INVSc1 (pYES2)。在 CdCl_2 胁迫下, INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)存活率也明显高于INVSc1 (pYES2) (图3-G)。说明由于*LbDREB*基因在酵母中的表达, 增强了酵母的抗重金属耐受能力。

在 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 胁迫下酵母的生长结果

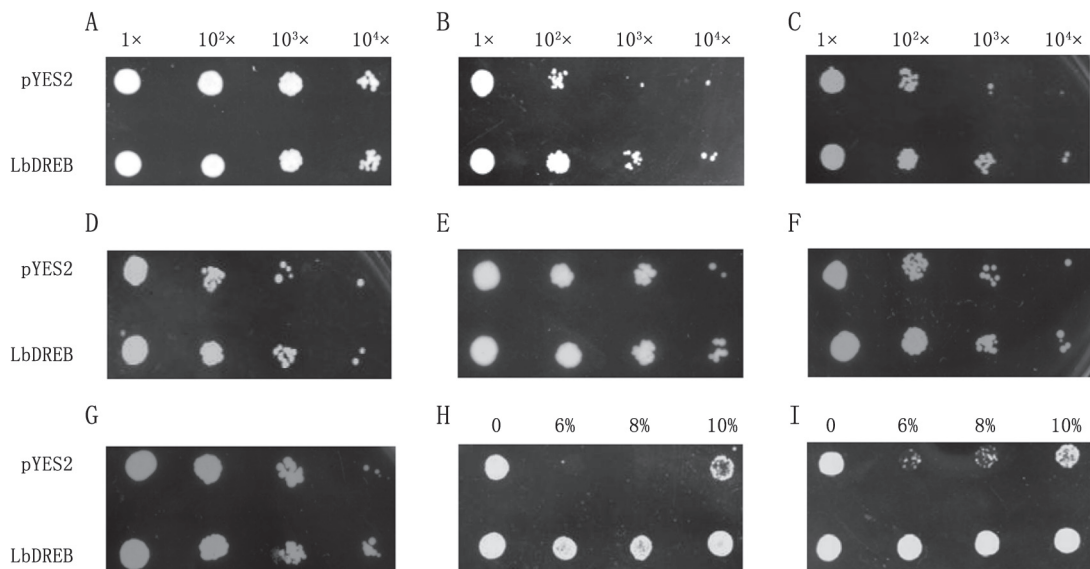


图3 酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*)和INVSc1 (pYES2)在不同非生物胁迫条件下的生长

Fig.3 Growth of INVSc1 (pYES2-*LbDREB*) and INVSc1 (pYES2) yeast under different abiotic stress conditions

1 \times 、10 2 \times 、10 3 \times 、10 4 \times 分别代表稀释0、100、1 000、10 000倍。LbDREB: 重组酵母INVSc1 (pYES2-*LbDREB*); pYES2: 对照酵母INVSc1 (pYES2)。A: 非胁迫; B: 5 mol·L $^{-1}$ NaCl胁迫24 h; C: 10% KH_2PO_4 胁迫3 h; D: 低温(-20 $^{\circ}\text{C}$)胁迫24 h; E: 20% (W/V) PEG6000胁迫24 h; F: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 胁迫3 h; G: 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 胁迫24 h; H: 6%、8%、10% Na_2CO_3 胁迫0.5 h; I: 6%、8%、10% NaHCO_3 胁迫3 h。

(图3-H、I)表明,当 Na_2CO_3 溶液浓度为6%和8%时,INVSc1 (pYES2)几乎无法生长,而INVSc1 (pYES2-LbDREB)却有很高的存活率。说明由于LbDREB基因的表达,使重组酵母INVSc1 (pYES2-LbDREB)对 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 胁迫的耐受能力明显增强。

植物感受干旱、高盐以及低温等逆境胁迫时,体内会发生一系列的生理及生化变化,从而引发细胞内胁迫相关信号通路的激活或抑制,以适应相应的逆境胁迫(谢永丽等2005)。目前,人们对多种不同植物的DREB基因在逆境胁迫下的表达模式及对抗逆的调控进行了研究。我们通过酿酒酵母表达系统研究了LbDREB基因抗逆性的结果表明,LbDREB转基因酵母对不同胁迫处理的抗逆性明显提高,据此推测DREB基因在植物抗逆调控中起重要作用。在低温和高盐胁迫下,LbDREB转基因酵母较对照酵母的存活率明显提高(图3-B、D),这与谢永丽等(2005)研究的抗逆BeDREB1基因在低温诱导时过量表达、BeDREB2基因在高盐诱导时过量表达,以及Dubouzet等(2003)的抗逆水稻OsDREB1A基因诱导超表达,使转基因拟南芥植株对冷冻和高盐胁迫耐性明显增强的结果相似。同时,在PEG6000胁迫下,转LbDREB基因的酵母的生长量明显优于对照酵母(图3-E),这与Qin等(2007)抗逆的转OsDREB1B基因拟南芥的耐旱性有明显提高的结果一致。一个值得注意的现象是,10%的 Na_2CO_3 与 NaHCO_3 处理下的酵母的生长明显优于6%和8% Na_2CO_3 与 NaHCO_3 处理的(图3-H、I),这与其他盐胁迫结果不同。其可能原因是这两种盐与其他盐(如: NaCl 、 KH_2PO_4 等)不同,均为碱性盐,其高浓度可能反而有助于酵母的生长,具体原因还有待研究。我们研究还发现,二色补血草LbDREB基因还具有明显的抗重金属(CuSO_4 、 CdCl_2)能力。以上结果充分证明LbDREB基因具有

优良的抗逆能力,对该基因的深入研究不仅有助于揭示二色补血草的抗逆机理,而且为植物抗逆基因工程育种提供优良的候选基因。

参考文献

- 王红蕾(2008). 植物DREB转录因子的研究进展. 黑龙江农业科学, (3): 22~24
- 谢永丽, 王自章, 刘强, 张淑萍(2005). 草坪草狗牙根中抗逆基因BeDREB的克隆及功能鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 21 (4): 521~527
- Chen JQ, Dong Y, Wang YJ, Liu Q, Zhang JS, Chen SY (2003). An AP2/EREBP2 type transcription-factor gene from rice is cold-inducible and encodes a nuclear-localized protein. Theor Appl Genet, 107: 972~979
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant J, 33 (4): 751~763
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF (2003). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. Plant Physiol, 127 (3): 910~917
- Liu Q, Kaduga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). 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*. Plant Cell, 10: 1391~1406
- Qin QL, Liu JG, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Yao QH, Chen JM (2007). Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor OsDREB1B in *Oryza Sativa* L. Mol Breeding, 19: 329~340
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2001). DNA-Binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochem Biophys Res Commun, 290 (3): 998~1009
- Shen YG, Zhang WK, He JS, Zhang SJ, Liu Q (2003). An EREBP/AP2 type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-transcription factors induced by cold, dehydration and ABA stress. Theor Appl Genet, 106 (5): 923~930