

## 与拟南芥抗寒性相关的 *CBF3* 和 *AtGolS3* 基因克隆及其表达载体的构建

钟克亚 叶妙水 胡新文 符少萍 郭建春\*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101

### Cloning and Construction of Expression Vector of *CBF3* and *AtGolS3* Genes Related to Cold Tolerance of *Arabidopsis thaliana*

ZHONG Ke-Ya, YE Miao-Shui, HU Xin-Wen, FU Shao-Ping, GUO Jian-Chun\*

State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

**摘要** 用 RT-PCR 技术从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆到抗寒相关基因 *CBF3*、*AtGolS3*, 序列分析后用 BLAST 软件作同源序列分析的结果显示, 它们的核苷酸序列与 GenBank 中登录的拟南芥 *CBF3* (AF074602)、*AtGolS3* (AB062850) 核苷酸序列完全相同。*CBF3* 和 *AtGolS3* 基因分别与植物表达载体 pVKH 相连构建 pVKH-35S-*CBF3*-pA、pVKH-35S-*AtGolS3*-pA 以及通过中间载体 pRT101, 将 *AtGolS3* 连接到 pVKH-35S-*CBF3*-pA 上, 成为各自带有 35S 启动子及 PolyA 终止子的双价植物表达载体 pVKH-35S-*CBF3*-pA-35S-*AtGolS3*-pA。

**关键词** *CBF3* 基因; *AtGolS3* 基因; pVKH 植物表达载体; 双价表达载体

植物抗寒性受多基因控制, 冷诱导基因表达的产物可以分为 2 类: 一类是调控性蛋白, 调控寒冷信号转导、抗寒基因表达和抗寒蛋白活性; 另一类是与植物抗寒性的提高直接相关的功能性蛋白(Guy等1985)。拟南芥基因 *CBF3* (c-repeat binding factor 3)、*AtGolS3* (*Arabidopsis thaliana* galactinol synthase 3) 分别属于这2种类型。

*CBF3* 是 *CBF* 基因家族中的一员, 定位在拟南芥 4 号染色体的短臂上, 约含 800 个核苷酸, 其基因阅读框架中不含有内含子(Medina 等 1999), 其在植物抗寒中作用机制为 *CBF3* 蛋白中含有 AP2 结构域, 可与 *COR* (cold-regulated) 基因启动子中的 CRT/DRE 结合而激活 *COR15a* 基因表达(Medina 等 1999; Liu 等 1998)。*COR15a* 是拟南芥叶绿体中的低温保护蛋白(Artus 等 1996)。Gilmour 等(2000)报道, 拟南芥中 *CBF3* 基因的过量表达, 不仅能提高 *COR15a* 蛋白的含量, 而且脯氨酸和可溶性糖的含量也大大提高, 而这两者普遍认为是与提高植物抗寒性有关的(Gilmour 等 2000)。可溶性棉子糖(raffinose)在植物抗寒及抗旱中起一定的作用。

肌醇半乳糖苷酶(*GolS*)是催化尿苷二磷酸(UDP)-半乳糖生化合成棉子糖家族反应的第一步。*AtGolS3* 是受冷压迫诱导的, 其启动子中含

有 2 个 CRT/DRE 中心基序和 2 个类似的 CRT/DRE 基序, *CBF3* 结合到这些基序上后即可诱导 *AtGolS3* 表达, 增加植物的抗寒性(Taji 等 2002)。我们根据已经报道的拟南芥 *CBF3* (AF074602)、*AtGolS3* (AB062850) 基因序列设计引物, 采用 RT-PCR 的方法从拟南芥中克隆 *CBF3*、*AtGolS3* 基因, 而后将这 2 个基因单独和串联起来构建植物表达载体。

## 材料与方法

### 1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)人工栽培。

质粒 pVKH-35S-GUS-pA 其特性为 Kan<sup>R</sup> Hygromycin<sup>R</sup> 35S pA; pRT101 的特性为 Amp<sup>R</sup> 35S pA; pGEM-T Easy Vector 的特性为 Amp<sup>R</sup> lacZ。转化受体菌 DH5 $\alpha$  为我院生物技术国家重点实验室保存。Taq DNA 聚合酶为北京华美生物公司产品。各种限制性内切酶及 Klenow 酶为大连宝生物公司产品。Trizol 试剂盒为上海生工生物工程技术

收稿 2005-12-23 修定 2006-05-12

资助 教育部重点项目(204158)、海南省自然科学基金(30406)和中国热带农业科学院自然科学基金(Rky0526)。

\*通讯作者(E-mail: jianchunguoh@163.com, Tel: 0898-66890635)。

有限公司产品。

## 2 方法

**2.1 拟南芥总RNA提取** 取无菌培养的拟南芥幼苗加液氮磨成粉后,用Trizol试剂盒提取拟南芥总RNA(其中*CBF3*基因不含内含子,可以通过提取拟南芥总DNA来作模板;本文中的*CBF3*可以和*AtGo1S3*基因同时用RT-PCR产物为模板,所以不再提取拟南芥总DNA)。

**2.2 RT-PCR反应引物设计** 引物1(CB-3): 5' GTCGGATCCAGTTACCTTATCCAGT 3'; 引物2(CB-4): 5' GCGAAGCTTTAATAACTCCATAACG 3'; 引物3(AT-1): 5' GCGAATTCATGGCACCTGAGATG 3'; 引物4(AT-2): 5' TAGTCGACTCTAAGCCGCGGATG 3'; 引物5(AT-3): 5' TAAGGATCCGATGGCACCTGAGATG 3'; 引物6(AT-4): 5' ATAAGCTTTCTAAGCCGCGGATGG 3'。

其中引物1、2根据Gilmour等(2000)报道的拟南芥*CBF3*基因(GenBank AF074602)序列设计,扩增*CBF3*基因编码区序列,总长约750 bp。其中画线部位为添加于引物上的*Bam*HI和*Hind*III酶切位点。引物3~6根据Taji等(2002)报道的拟南芥*AtGo1S3*基因(GenBank AB062850)序列设计,扩增*AtGo1S3*基因的编码序列,总长约1050 bp,其中划线部位为添加于引物上的*Eco*RI、*Sal*I、*Bam*HI和*Hind*III酶切位点。引物由大连宝生物公司合成。RT-PCR扩增根据TaKaRa RNA PCR kit (AMA) Ver 3.0上的说明进行。

**2.3 基因序列分析** 由上海联合基因有限公司测定。

## 实验结果

### 1 *CBF3*和*AtGo1S3*基因的克隆与序列鉴定

**1.1 *CBF3*和*AtGo1S3*基因的克隆** 以拟南芥总RNA为模板进行RT-PCR反应,扩增出长度分别约为750和1050 bp的DNA片段,凝胶电泳回收DNA,分别与pGEM-T Easy Vector连接,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,挑取蓝色菌斑,筛选阳性克隆,提取质粒后进行*Eco*RI+*Sal*I双酶切鉴定(图1、2)。由图1、2可以看出,T载体上所插入的片段大小与RT-PCR产物相同,这证明RT-PCR目的片段已克隆到T载体上。连有*CBF3*、*AtGo1S3*基因的载体分别命名为T-*CBF3*质粒、T-*AtGo1S3*质粒。

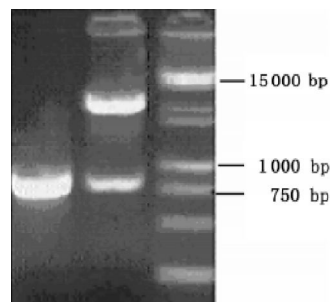


图1 T-*CBF3*质粒PCR和酶切检测  
从左到右依次为PCR、酶切、DNA分子量标记。

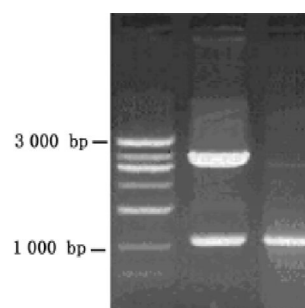


图2 T-*AtGo1S3*质粒PCR和酶切检测  
从左到右依次为DNA分子量标记、酶切、PCR。

**1.2 序列分析** T-*CBF3*质粒和T-*AtGo1S3*质粒由上海联合基因有限公司测序,所测序列在GenBank中采用BLAST程序进行序列同源性分析的结果表明,该序列与GenBank中报道的*CBF3*、*AtGo1S3*基因序列同源性为100%。DNA序列测定结果如下。

*CBF3*基因序列:

```
GTCGGATCCAGTTACCTTATCCAGTTTCTTGAAACA
GAGTACTCTTCTGATCAATGAAGTCAATTTCTGCTT
TTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGTCTTCGG
TTTCCTCAGGCGGTGATTATATTCGACGCTTGCGA
GCAGCTGCCCCAAGAAACCGGCGGGTTCGTAAGAAG
TTTCGTGAGACTCGTCACCCAATATACAGAGGAG
TTCGTCGGAGAACTCCGGTAAGTGGGTTTGTGAGG
TTAGAGAACCAACAAGAAAACAAGGATTTGGC
TCGGAACATTTCAAACCGCTGAGATGGCAGCTCGA
GCTCACGACGTTGCCGCTTTAGCCCTTCGTGGCCGA
TCAGCCTGTCTCAATTTTCGCTGACTCGGCTTGGAGA
CTCCGAATCCCGGAATCAACTTGCGCTAAGGACA
TCCAAAAGGCGGCGGCTGAAGCTGCGTTGGCGT
TTCAGGATGAGATGTGTGATGCGACGACGGATCA
TGGCTTCGACATGGAGGAGACGTTGGTGGAGGCTA
TTTACACGGCGGAACAGAGCGAAAATGCGTTTTATA
TGACGATGAGGCGATGTTTGGAGATGCCGAGTTTG
TTGGCTAATATGGCAGAAGGGATGCTTTTGGCGCT
```

CCGTCCGTACAGTGGAAATCATAATCATGAAGTCGA  
CGGCGATGATGACGACGTATCGTTATGGAGTTA  
TTAAAA

*AtGolS3*基因序列:

TAAGGATCCGATGGCACCTGAGATGAACAACAAGT  
TGAGCTACGGAGAAAAGAAGAGAGCGTACGTTACG  
TTCCTCGCCGGAACCGGAGACTACGTGAAAGGA  
GTGGTTGGTCTGGCTAAAGGGCTAAGGAAAAC  
TAAAAGCAAGTACCATTAGTGGTTGCTGTGTTA  
CCTGACGTGCCGGCCGATCACCGGAGACAGCT  
ATTGGACCAAGGCTGCGTCATCAAGGAGATTCA  
GCCGGTTTACCACCGGATAACCAAACCTCAGTTT  
GCTATGGCTTACTACGTCCTCAACTACTCTAAAC  
TTCGTATTTGGAAGTTTGTAGAGTACAGCAAGCTGA  
TATACTTAGACGGAGACATAACAAGTGTGTTGAGAACA  
TAGATCACTTGTGTTGATCTTCTGACGGCAACTT  
CTACCCGTTAAAGACTGTTCTGCGAGAAGACTTGGAG  
CCACACGCCTCAGTACAAGATTGGCTACTGCCAA  
CAGTGTCCGGACAAGGTGACGTGGCCTGAGTCA  
GAGCTTGGTCCTAAGCCACCGTTGTACTTCAACG  
CCGGCATGTTCTGCTACGAGCCAAGCCTCCCCACTTA  
TTACAACCTTTTGGAGACACTCAAAGTTGTCCCT  
CCCACACCTTTTGTGAACAGGATTTCTTGAACATG  
TACTTCAAAGACATATAACAAGCCTATTCCACCAG  
TTTACAATCTTGTCTTGGCCATGCTCTGGAGGCA  
TCCAGAGAACATAGAGCTTAACGAAGCTAAGGTTG  
TTCATTACTGTGCAGCCGGTGCTAAGCCTTGGAGG  
TTCACAGGCCAAGAAGGAAATATGGAGAGGGAA  
GACATCAAGATGCTTGTAGAGAAATGGTGGGACA  
TTTACAACGACGAGTCTCTTACTACAAAACCTTT  
AATGTGCATTGCGGACAAAAGAAGATGTTTACAG  
GGAAACCGAAAACCCTTCCACAGTTCTTTACAGA  
TTTGTCTGAAGCTGATGTGCTTCAATGTGCCAAA  
GCTCCATCCGCGGCTTAG

划线部分为引物, 字母带阴影部分为起始密码子和终止密码子。

## 2 *CBF3*和*AtGolS3*基因植物表达载体和双价植物表达载体构建

### 2.1 *CBF3*和*AtGolS3*基因植物表达载体构建

以T-*CBF3*质粒、T-*AtGolS3*质粒为模板, 分别以CB-3、CB-4、At-3和At-4为引物, 进行PCR扩增, 得到目的条带的大小分别为750和1050 bp左右的条带, 凝胶电泳后回收。用限制性内切酶 *Bam*HI和 *Hind*III双酶切回收产物 *CBF3*、*AtGolS3*及质粒 pVKH-35S-GUS-pA, 凝胶电泳后回收, T4连接酶连接, 得到表达载体 pVKH-35S-*CBF3*-pA、pVKH-35S-*AtGolS3*-pA (图3、4)。

### 2.2 pVKH-35S-*CBF3*-pA和pVKH-35S-*AtGolS3*-pA植物表达载体的物理学鉴定

以引物CB-3、CB-

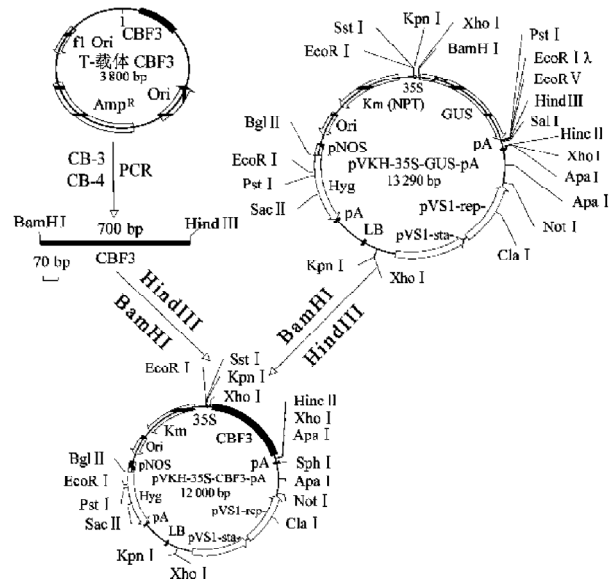


图3 pVKH-35S-*CBF3*-pA植物表达载体构建

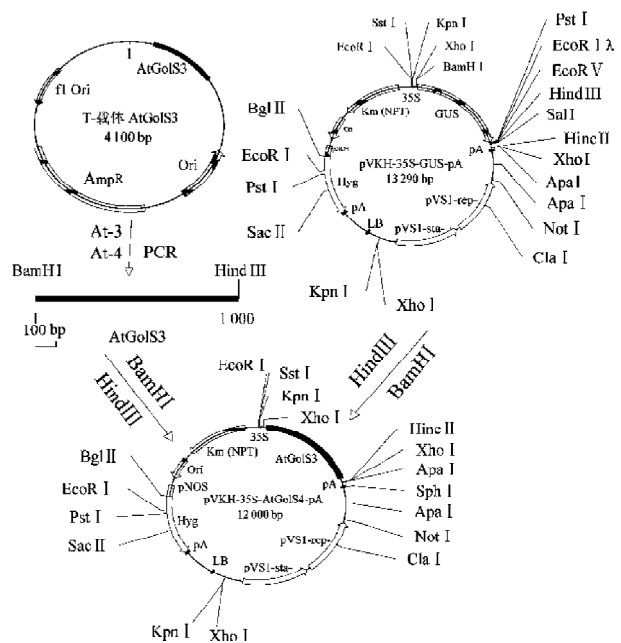


图4 pVKH-35S-*AtGolS3*-pA植物表达载体构建

4、At-3和At-4对质粒 pVKH-35S-*CBF3*-pA、pVKH-35S-*AtGolS3*-pA分别进行PCR反应, 扩增片段大小分别为750和1050 bp左右。用限制性内切酶 *Bam*HI和 *Hind*III对这2个质粒进行双酶切, 酶切后得到的片段分子量约为750和1050 bp。这2个载体的酶切结果和PCR结果都和理论计算的一致, 说明构建的是正确表达载体(图5、6)。

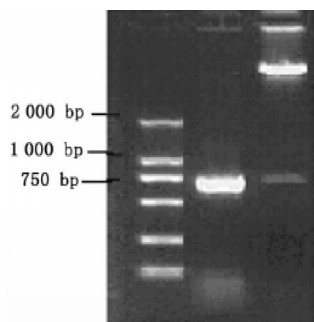


图5 pVKH-35S-CBF3-pA质粒PCR和酶切检测  
从左到右依次为DNA分子量标记、PCR、酶切。

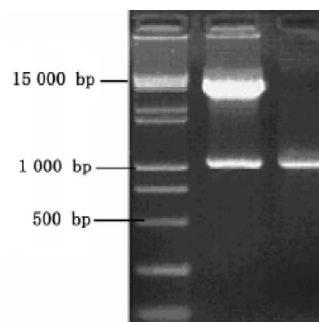


图6 pVKH-35S-AtGolS3-pA质粒PCR和酶切检测  
从左到右依次为DNA分子量标记、酶切、PCR。

### 2.3 pVKH-35S-CBF3-pA-35S-AtGolS3-pA双价植物表达载体构建

以T-AtGolS3质粒为模板, 以At-1、At-2为引物, 进行PCR扩增, 得到的目的片段用SalI进行酶切, 酶切后用Kleonw酶补平, 形成平末端。另一端用EcoRI酶切。同时, pRT101质粒用EcoRI和SamI(形成平末端)进行双酶切。回收后用T4连接酶连接, 得到载体pRT101-AtGolS3。用HindIII酶切载体pVKH-35S-

CBF3-pA和pRT101-AtGolS3, 回收片段后连接, 用BamHI检测方向性, 得到双价植物表达载体pVKH-35S-CBF3-pA-35S-AtGolS3-pA(图7)。

### 2.4 pVKH-35S-CBF3-pA-35S-AtGolS3-pA双价植物表达载体的物理学鉴定

以引物CB-3、CB-4、At-3、At-4对质粒pVKH-35S-CBF3-pA-35S-AtGolS3-pA进行PCR, 扩增得到的片段大小分别为750和1050 bp, 用HindIII酶切, 得到一条约1700 bp

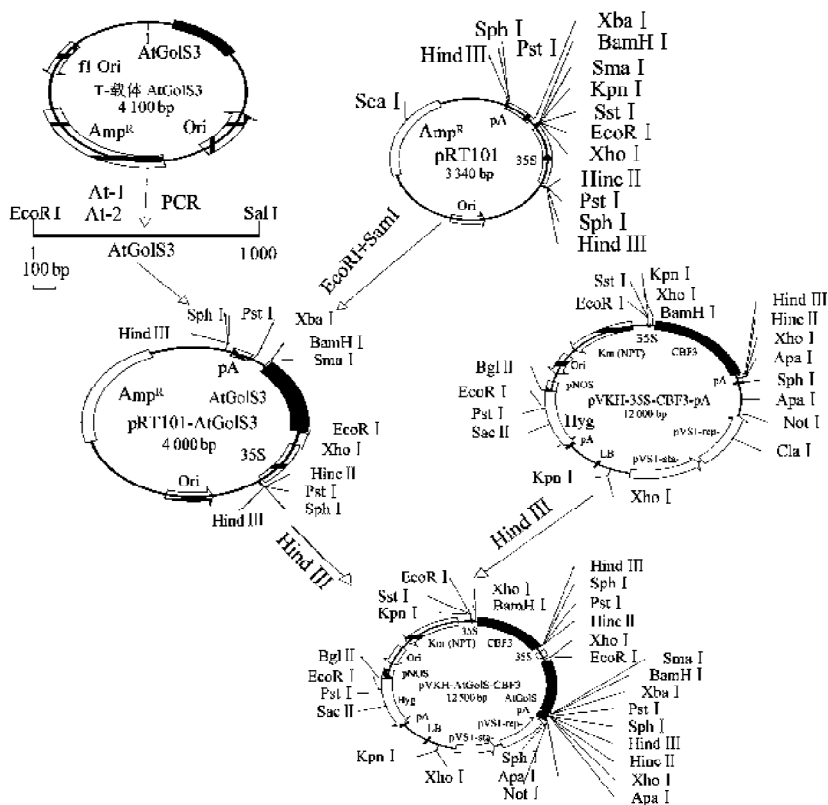


图7 pVKH-35S-CBF3-pA-35S-AtGolS3-pA双价植物表达载体构建

的片段, 用 *Bam*HI 检测方向性, 得到的片段大小约为 2 200 bp, 证明插入方向为 35S-*CBF3*-pA-35S-*AtGolS3*-pA, 所以 pVKH-35S-*CBF3*-pA-35S-*AtGolS3*-pA 双价植物表达载体构建成功(图 8)。

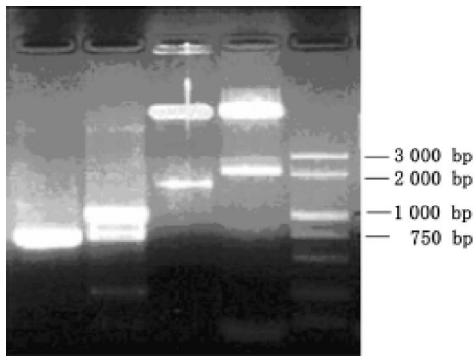


图8 pVKH-35S-*CBF3*-pA-35S-*AtGolS3*-pA 质粒 PCR 和酶切检测

从左到右依次为 *CBF3* PCR、*AtGolS3* PCR、*Hind*III 酶切、*Bam*HI 酶切、DNA 分子量标记。

## 讨 论

以转基因技术改良植物抗寒性的早期研究一般侧重于导入抗寒功能基因, 这些功能基因的导入在一定程度上可以改善植物对低温的耐受性(Zhu 等 1996), 但是植物的抗寒性受多种数量性状基因的调控, 希望导入一二个功能基因就能迅速提高植物的抗寒性是困难的, 其表达调控的机制还需待进一步研究。目前抗寒基因工程的研究更多是从与抗寒相关的调控基因(如 *CBF* 基因家族)入手。本文所构建的 3 个载体: *CBF3* 单价基因载

体、*AtGolS3* 单价基因载体和两者串联的双价基因表达载体, 可能有助于从单个基因转入与双价基因转入的植株抗寒性差异区分的研究。

## 参考文献

- Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13404~13409
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*, 124: 1854~1865
- Guy CL, Niemi KJ, Brambl R (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 3673~3677
- Liu Q, Kasuga 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
- Medina J, Bargas M, Terol J, Pérez-Alonso M, Salinas J (1999). The *Arabidopsis* *CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*, 119: 463~470
- Taji T, Ohsumi C, Hchi S, Oeki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 29 (4): 417~426
- Zhu B, Chen THH, Li PH (1996). Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plant expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta*, 198 (1): 70~77