

信息与资料 Information and Data

***Prd29A* 及 *DREB1A* 的克隆和干旱诱导型植物表达载体的构建与鉴定**

押辉远* 秦广雍 霍裕平

郑州大学离子束诱变育种及生物工程重点实验室, 郑州 450052

Cloning of *Prd29A* and *DREB1A* and Construction and Identification of Plant Expressing Vector Induced by Drought

YA Hui-Yuan*, QIN Guang-Yong, HUO Yu-Ping

Key Laboratory of Ion Beam Mutation Breeding and Biotechnology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

提要 从拟南芥中克隆了 *RD29A* 基因的启动子(*Prd29A*)及 *DREB1A* 基因的 DNA 片段, 构建 *Prd29A:DREB1A* 融合基因, 采用合成的接头将该融合基因插入到植物表达载体 pBI121 中, 经鉴定, 确认正确。

关键词 *RD29A* 基因; *DREB1A* 基因; 基因克隆; 抗干旱基因工程

DREB (dehydration responsive element binding protein) 转录因子 (含 AP2/EREBP 结构域) 是与 DRE (dehydration responsive element) 顺式作用元件相结合, 调控对干旱、高盐、低温等逆境应答相关基因表达的蛋白质^[1,2]。很多干旱、高盐、低温诱导的基因的启动子调控区域有 DRE 核心元件 (GCCGAC/ACCGAC), 如 *rd29A*、*rd17*、*kin1*、*cor6*、*cor15*、*erd10*、*BN115* 等基因的启动子调控区域^[3,4]。现在, 有人已经从拟南芥中克隆到 5 个具有高度同源性的水分胁迫诱导的转录因子基因 (*DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C*、*DREB2A*、*DREB2B*), 它们编码的蛋白质调控含有 DRE 元件的启动子所驱动基因转录^[3,4]。已有的实验结果表明, 他们可能是控制对干旱、高盐、低温等逆境应答基因表达的主要转录因子^[3,4]。实验证明, *DREB1s* 由低温诱导表达, 而不为干旱、高盐所诱导^[5]; 与之相反, *DREB2s* 由干旱或高盐所诱导, 而不是为低温诱导表达^[5,6]。

RD29A 是 *DREB1s* 调控的目的基因, 在植物细胞缺水时能够大量表达。*RD29A* 的启动子区域含有 DRE 核心序列和 ABRE (ABA-responsive element, 保守序列: CACGTGGC/ACACGTGGC) 顺式作用元件。植物细胞缺水时, 植物产生的内源 ABA 通过信号传导产生与 *RD29A* 启动子的 ABRE 序列结合的转录因子 (含 bZIP 结构域的蛋白质), 可以启动 *RD29A* 的表达, *DREB1s* 转录因子与

RD29A 启动子 DRE 核心序列结合也可以诱导该基因的表达。但 *RD29A* 在细胞不缺水时并不表达^[7,8], 它是一个干旱诱导型启动子。以 *RD29A* 启动子驱动 *DREB1A* 转录因子在转基因植物中的表达, 在干旱时 *DREB1A* 基因表达, 不干旱的时候不表达, 可以大大减小因基因组成型表达 (如植物基因工程中常用的 35S 启动子驱动下的表达) 给转基因植株带来的不利影响。同时, *DREB1A* 基因的整套表达系统的 DNA 片段很大, 而且, 其表达还需要一系列的信号传递, 不便于进行基因操作和基因的高效率表达, 因此构建 *Prd29A:DREB1A* 融合基因进行基因转移来获得抗干旱、高盐、低温的植物是较为理想的一种策略。

根据 NCBI 核苷酸数据库的序列可知 *DREB1A* 基因的编码框中没有内含子, 因此可以用 PCR 的方法扩增到 *DREB1A* 基因编码框的 DNA 片段。为了表达的需要和便于基因重组操作, 本文从拟南芥中克隆了 *RD29A* 基因的启动子和 *DREB1A* 基因编码框的 DNA 片段, 然后以正确的方向将克隆到的启动子和基因融合在一起, 并插入植物表达载体 pBI121 中。

收稿 2004-07-19 修定 2004-12-10

资助 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA302B-03)。

* E-mail: yahy96@sina.com.cn, Tel: 0371-7767728

材料与方 法

大肠杆菌工程菌株 DH5 α 为本实验室保存, 拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] 哥伦比亚 (Columbia) 生态型, 由中国科学院合肥等离子体研究所惠赠。寡聚核苷酸均由上海生物工程公司合成。Pdreb1a 1: 5' CATGCATCAATGAACTCAT-TTTCTGCTTTTTTTC 3', Pdreb1a 2: 5' CTCTAGACTGAGTTTTAATAACTCCATAACGATAC 3', Prd29A1: 5' GGAATTCTCGAATGAGAAGATG-TGCCG 3', Prd29A2: 5' CATGCATTCCAATA-GAAGTAATCAAACCCT 3', Linker 1: 5' GATT-CAGTCGACTGAGCT 3', Linker 2: 5' GTCA-GCTGAC 3'。ExTaq Premix、PMD18 克隆载体 (TA 克隆载体)、T₄ DNA 连接酶均购自 Takara 公司, 限制性内切酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司, 植物表达载体 pBI121 由中国科学院合肥等离子体研究所余增亮研究员惠赠, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司。

拟南芥总 DNA 的提取方法参照 CTAB 法。

以寡聚核苷酸 Prd29A1、Prd29A2 为引物, 拟南芥总 DNA 为模板, 按照如下 PCR 反应程序扩增到了 *RD29A* 基因的启动子 *Prd29A* (0.42 kb): 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 7 min 结束反应。按照如下 PCR 反应程序扩增到了 *DREB1A* 基因的 DNA 片段 *DREB1A* (0.67 kb): 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 7 min 结束反应。扩增到的 2 个 DNA 片段插入到克隆载体 pMD18 中并转化导入到大肠杆菌工程菌株 DH5 α 中, 在含有 X-gal 和 IPTG 的培养基平板上挑取蓝斑克隆作 PCR 鉴定后, 寄送到上海生物工程公司完成序列测定工作。测序用的通用引物是 M13(+)48 和 M13(-)47。将得到的 2 个重组克隆载体分别命名为 pMDRD 和 pMDDRE。

用限制性内切酶 *Hind*III、*Nis*I 酶切 pMDRD, 回收小片段 DNA (*Prd29A*, 0.42 kb)。用限制性内切酶 *Nis*I、*Bam*HI 酶切 pMDDRE, 回收小片段 DNA (*DREB1A*, 0.67 kb)。用限制性内切酶 *Sac*I、*Hind*III 酶切植物表达载体 pBI121, 回收大片段 DNA。两条寡核苷酸 linker 用无菌水溶解后混合在一起, 70 $^{\circ}$ C 处理 10 min 后, 慢慢降温到 4 $^{\circ}$ C 使

其碱基配对变成双链 DNA 分子。这个双链 DNA 分子两端分别有突出的 *Bam*HI、*Sac*I 的粘性末端, 分别和 *DREB1A* 上的 *Bam*HI、pBI121 上的 *Sac*I 相匹配。在 T₄ DNA 连接酶的作用下, 将上述得到 4 种处理后的 DNA 分子按正确的方向连接在一起, 成为一个 cccDNA 分子。将连接产物导入到大肠杆菌工程菌株 DH5 α 中, 经过 PCR 鉴定和限制性内切酶 (*Hind*III 和 *Nis*I) 酶切鉴定后, 得到的阳性克隆寄送到上海生物工程公司完成测序工作。将获得的重组植物表达载体命名 pRDDRE。用软件 Dnasist2.0 分析了重组后的 pRDDRE 上的酶切位点及融合基因序列的正确性。

实验结果

1 基因的分 离、克隆、测 序

将扩增到的 2 个 DNA 片段插入到克隆载体 pMD18 中, 并转化导入到大肠杆菌工程菌株 DH5 α 中, 经过 PCR 鉴定得到的阳性克隆 (pMDRD) 多个, 经测序后选择与 NCBI 中序列最为相近的一个克隆 pMDRD1 作为备用克隆, 将此质粒称为重组质粒 pMDRD。图 1、2 分别是 pMDRD1~4、pMDDRE1~4 不同阳性克隆的 PCR 检测 (其中, 质粒名称后面的数字代表着不同的克隆)。图 1 中的 4 个克隆中都检测到了 0.42 kb 左右大小的 DNA 片段。图 2 中的 4 个克隆中都检测到了 0.67 kb 左右大小的 DNA 片段。

得到的阳性克隆 pMDRD 经测序, 与 NCBI 核苷酸数据库中的序列相比较, 有 1 个碱基的差别。启动子 DNA 中有 4 个保守的顺式作用元件都完整且核苷酸序列正确, 其中 2 个是 DRE 核心元件, 这些是 DREB 转录因子结合的保守序列; 1 个是 ABRE 顺式作用元件; 1 个是 TATA box 区 (TATAA)。

得到的 pMDDRE 阳性克隆经测序, 选择一个 NCBI 核苷酸数据库中的序列最为相近的阳性克隆 pMDDRE4 做为备用, 将此质粒称为重组质粒 pMDDRE。由该克隆的 *DREB1A* 基因序列推导出所编码蛋白质的氨基酸序列与 NCBI 上公布的氨基酸序列有 2 个氨基酸的差别: 一个是 Y (酪氨酸, 其 R 基不带电荷但有极性) 变成了 H (组氨酸, 其 R 基带正电荷); 另一个是 E (谷氨酸, 其 R 基带负

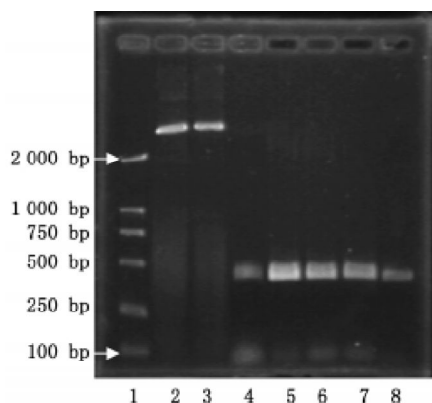


图1 PCR检测pMDRD克隆

泳道1: DL2000 DNA分子对照; 泳道2: pMDRD阳性克隆1的质粒; 泳道3: pMDRD阳性克隆2的质粒; 泳道4: 以阳性克隆1为模板的PCR产物; 泳道5: 以阳性克隆2为模板的PCR产物; 泳道6: 以阳性克隆3为模板的PCR产物; 泳道7: 以阳性克隆4为模板的PCR产物; 泳道8: 以拟南芥总DNA为模板的PCR产物。

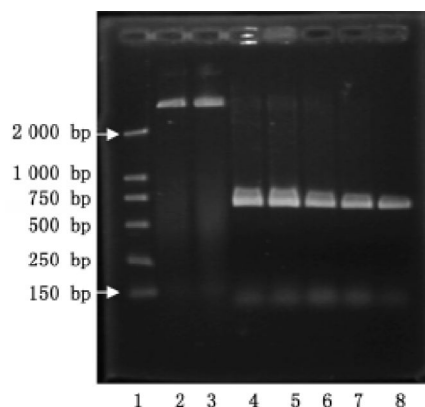


图2 PCR检测pMDDRE克隆

泳道1: DL2000 DNA分子对照; 泳道2: pMDDRE阳性克隆1的质粒; 泳道3: pMDDRE阳性克隆2的质粒; 泳道4: 以阳性克隆1为模板的PCR产物; 泳道5: 以阳性克隆2为模板的PCR产物; 泳道6: 以阳性克隆3为模板的PCR产物; 泳道7: 以阳性克隆4为模板的PCR产物; 泳道8: 以拟南芥总DNA为模板的PCR产物。

电荷)变成了V(缬氨酸, 其R基不带电荷且无极性)。但是这2个氨基酸都不在该蛋白的功能序列AP2/EREBP结构域中, 克隆到的基因编码的蛋白质的AP2/EREBP结构域的保守序列与报道的一致, 可推测该转录因子蛋白能够结合到基因启动子GCC box上面。蛋白质N端的NLS(N端定位序列)与报道的一致, 也可以推测它可以被输送到

细胞核中, 即所克隆到的2个DNA分子可以行使正确的功能。

2 植物表达载体的构建、鉴定、分析

表达载体构建方案如图3, 连接产物转化大肠杆菌工程菌株DH5 α 后, 从平板上挑选卡那霉素抗性的菌落, 进行PCR鉴定, 既能检测到0.42 kb(图4-A箭头指示处)又能检测到0.67 kb(图

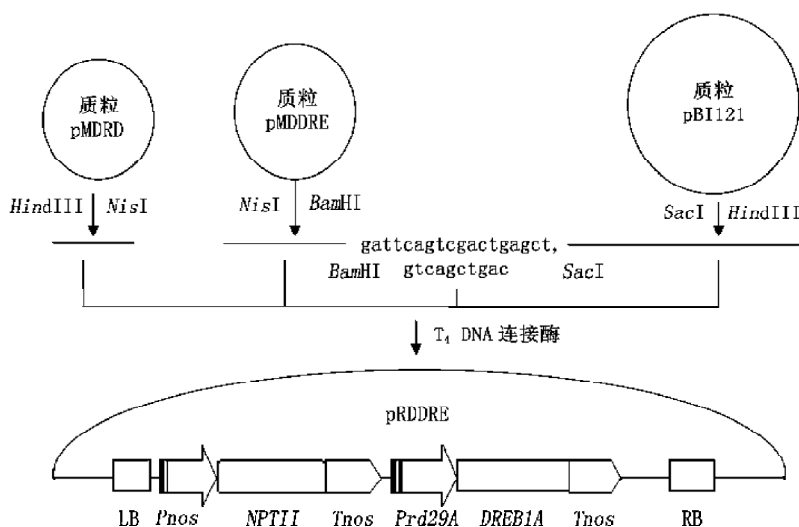


图3 表达载体构建示意

HindIII、*NisI*、*BamHI*、*SacI*为不同的限制性内切酶; LB、RB为植物[表达载体上的左右边界序列元件; *Pnos*、*Tnos*分别为*nos*基因的启动子和终止子; *NPTII*为抗卡那霉素基因, *Prd29A*为克隆的启动子; *DREB1A*为克隆的转录因子基因。

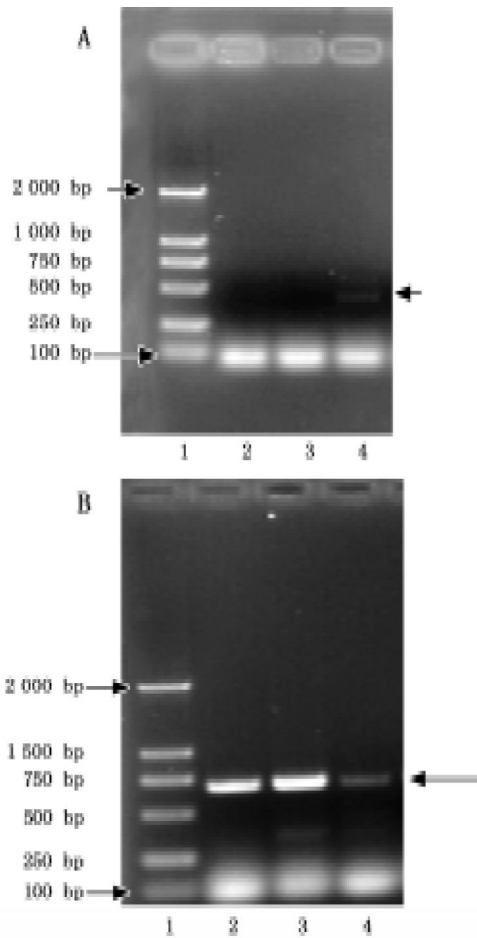


图4 PCR检测 pRDDRE 阳性克隆

泳道1: DNA DL2000 分子对照; 泳道2: 以阳性克隆1为模板的PCR产物; 泳道3: 以阳性克隆2为模板的PCR产物; 泳道4: 以阳性克隆3为模板的PCR产物。

4-B 箭头指示处)的克隆3即为阳性克隆。

阳性克隆3经限制性内切酶(*Hind*III和*Nis*I)酶切(图5)后电泳, 切出0.45 kb左右和0.70 kb左右的DNA片段。由于*DREB1A* 0.27 kb处有一个*Sac*I酶切位点, 所以切出应该是0.45 kb左右和0.70 kb左右的2条DNA片段(因为融合基因两端多出酶切位点和DNA接头, 所以切出的片段比PCR扩增出的片段长出来一些)。同时, 这样的酶切结果也说明融合基因构建的方向的正确性。序列测定由上海生物工程公司完成, 测序是从融合基因的两端测的(用的引物是Prd29A1和Pdreb1a2), 大约为1.1 kb左右, 如果得到的两个序列在融合基因的中间有序列重叠(Prd29A 3'端和*DREB1A* 5'端都有*Nis*I酶切位点), 说明融合基因的拼接是正

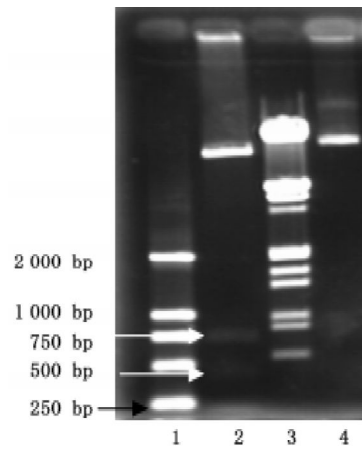


图5 酶切检测 pRDDRE 阳性克隆

泳道1: DL2000 DNA分子对照; 泳道2: *Nis*I和*Sac*I酶切pRDDRE; 泳道3: λ /*Hind*III DNA分子对照; 泳道4: pRDDRE质粒。

确的, 反之则说明试验结果不符合预期。将测定的序列进行拼接、分析与所预期的一样, *Prd29A*启动子与*DREB1A*方向符合基因表达的要求, 并且, *Prd29A*启动子中启动基因表达的基本元件与克隆的pMDRD中的序列相比没有变化, *DREB1A*的DNA序列与克隆的序列也没有变化。

讨 论

运用转基因技术培育抗逆的农作物新品种是一种有效的育种途径, 目前已有通过转化单一基因(如*TPS*、*P5CS*、*BADH*、*Ath-ALDH3*、*Imt1mtLD*、*gutD*、*otsBA*、*bets*)获得了较为抗干旱、高盐的转基因农作物, 但不能使转基因植物获得综合性状较为理想的农艺改良^[7,9~11]。植物的抗逆性是很复杂的基因相互作用的过程, 对于干旱、盐碱、低温的耐性的强弱往往不是取决于单一基因的作用^[11,12], 而是多个基因相互作用的结果。因此, 要提高植物综合的抗逆性, 重要的还是要从一些关键的转录因子着手^[1]。

本文克隆了拟南芥的干旱诱导性启动子和干旱相关转录因子基因, 并构建了其融合基因, 可以在一定程度上改善上述问题。从试验的结果分析来看, 克隆的DNA分子是正确的, 构建的融合载体的构件理论上符合基因表达的要求, 这将为植物的抗干旱转基因奠定了物质基础。现在, 作者正在将构建植物表达载体在离子束的介导下转

化小麦, 希望能得到抗逆性较强的小麦品种以适应干旱、盐渍等中低产田小麦生产的需要。

参考文献

- 1 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6: 251~264
- 2 Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 2003, 33: 751~763
- 3 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. *科学通报*. 2000, 45(1): 11~16
- 4 Yamaguchi-Shinozaki K, Kasugua M, Liu Q et al. Biological mechanisms of droght stress response. Japan International Research Center for Agricultural Sciences Working Report, 2002, 1~8
- 5 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*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391~1406
- 6 Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y et al. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 657~665
- 7 江香梅, 黄敏仁, 王明麻. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2001, 25(5): 57~62
- 8 Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK et al. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14: S165~S183
- 9 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸢雷等. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. *植物学报*, 2000, 46(6): 616~619
- 10 蒯本科, 顾红雅. 渗透胁迫的植物体内信号及相关基因克隆研究. *资源科学*, 1999, 21(5): 42~45
- 11 Sunkar R, Barteles D, Kirch H-H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J*, 2003, 35: 452~464
- 12 余光辉, 李玲, 曾福华. 水分胁迫的基因表达和信号转导. *亚热带植物科学*, 2002, 31(1): 57~62