

山葡萄转录因子基因*VaDREB*的克隆及其抗逆功能分析

周伟^{1,2,*}, 吴宪^{1,3,*}, 贾承国¹, 胡瑞雪², 杜茜³, 李启云³, 潘洪玉^{1,**}

¹吉林大学植物科学学院, 吉林长春130062; ²大庆市农业技术推广中心, 黑龙江大庆163311; ³吉林省农业科学院, 吉林长春130124

摘要: DREB/CBF (dehydration-responsive element binding protein/C-repeat binding factor)转录因子能特异的与DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat)顺式作用元件结合, 在植物干旱、高盐 and 低温等非生物胁迫应答中起着重要的调控作用。本研究从山葡萄中克隆得到了一个*VaDREB*转录因子基因(登录号XM_002283076.1), 并对其进行了序列分析、亚细胞定位分析以及酵母和拟南芥中的功能鉴定。序列分析表明, *VaDREB*开放阅读框全长459 bp, 编码152个氨基酸, 预测蛋白质分子量为17 kDa, 等电点为8.67, 包含一个AP2/ERF结合域。氨基酸序列比对和系统进化分析结果表明, 该基因属于DREB/CBF转录因子A-5亚类。亚细胞定位结果表明*VaDREB*蛋白定位于细胞核中。重组酵母菌株与表达*VaDREB*基因的转基因拟南芥株系均表现出明显增强的盐、干旱、低温和高温胁迫耐受性表型, 基因表达分析结果表明, 转基因拟南芥株系中抗逆相关功能基因的表达量出现了明显上调, 这些结果证明*VaDREB*转录因子在植物抗逆调控过程中起着重要作用。
关键词: DREB/CBF转录因子; 逆境胁迫; 亚细胞定位; 转基因拟南芥; 山葡萄

Cloning and Analysis of Resistance Function of *VaDREB* Transcription Factor from *Vitis amurensis*

ZHOU Wei^{1,2,*}, WU Xian^{1,3,*}, JIA Cheng-Guo¹, HU Rui-Xue², DU Qian³, LI Qi-Yun³, PAN Hong-Yu^{1,**}

¹College of Plant Science, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China; ²The Daqing City Agro-Tech Extension and Service Center, Daqing, Heilongjiang 163311, China; ³Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124, China

Abstract: The transcription factors DREBs/CBFs specifically interact with the DRE/CRT *cis*-acting element and play important roles in tolerance response to drought, high-salinity and low temperature in plant. In this study, we isolated a gene encoding DREB transcription factor from *Vitis amurensis* (GenBank No. XM_002283076.1) and analyzed its sequence, subcellular localization and function in recombinant yeast cells and T₃ generation transgenic *Arabidopsis*. The DNA sequences of *VaDREB* comprised a 459 bp ORF, encoding a putative protein of 152 amino acids with a predicted molecular mass of 17 kDa and isoelectric point (pI) of 8.67. The deduced amino acid sequences of *VaDREB* contained a highly conserved AP2/ERF domain. Sequence comparison and phylogenetic analysis revealed that *VaDREB* belonged to the A-5 subgroup of the DREB/CBF subfamily. The results of subcellular localization analysis suggested that the *VaDREB* protein was targeted to the nucleus. The recombinant yeast cells and transgenic *Arabidopsis* gained higher tolerance to salt, drought and cold stress. But also, the expression level of some stress responsive genes were significantly upregulated in transgenic *Arabidopsis* compared with those in the wild-type *Arabidopsis*. These results suggest that *VaDREB* may play a vital regulatory role in abiotic stress responses in *Vitis amurensis*.

Key words: DREB/CBF transcription factor; stress tolerance; subcellular localization; transgenic *Arabidopsis*; *Vitis amurensis*

在陆地环境下, 低温、干旱和高盐等环境因子经常成为影响植物生存和生长的主要因素。由于植物生存环境固定, 很难逃避变化不定的灾害性气候因子, 所以在长期的进化过程中, 植物本身建立起了一套完整的胁迫应答机制(Mizoi等2012), 来保证植物体在不良环境中的正常生长。研究发现许多基因在转录水平响应非生物逆境胁迫, 这

些基因的产物可能参与胁迫应答反应(Ingram和

收稿 2014-05-28 修定 2014-08-23

资助 农业部转基因生物新品种培育重大项目(2013ZX08004004)、
“十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD19B04)和吉林省玉米产业技术体系岗位科学家(201203-1)。

* 共同第一作者

** 通讯作者(E-mail: panhongyu@jlu.edu.cn; Tel: 0431-87836251)。

Bartels 1996; Thomashow 1999; Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki 2000)。大量研究表明, DREB/CBF转录因子在提高植物的抗逆性方面具有重要作用(Liu等2000; Agarwal等2006)。DREB/CBF转录因子包含一个保守的AP2/ERF结合域, 由大约60个氨基酸构成(Stockinger等1997), 通过AP2/ERF结合域能够与启动子中的DRE/CRT顺式作用元件发生特异性结合, 从而调控基因的表达。DRE/CRT元件的核心序列是A/GCCGAC, 存在于很多环境胁迫相关基因的启动子中(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 1994; Stockinger等1997; Liu等1998)。在拟南芥中共有145个AP2/ERF转录因子, Sakuma等(2002)根据其AP2/ERF结合域特征将它们分成了AP2、RAV、DREB、ERF和一个特异基因AL079349五个亚家族。DREB亚家族成员在AP2/ERF结合域中都有2个保守的氨基酸, 分别是第14位的缬氨酸和第19位的谷氨酸(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 1994)。对DREB蛋白的这两个保守氨基酸定点突变, 通过电泳迁移率变动分析表明, 第14位的缬氨酸在蛋白-DNA特异结合中起主要作用(Sakuma等2002), 但是对于第19位的谷氨酸在DREB蛋白中最主要的生物学作用目前仍不清楚。DREB/CBF转录因子基因广泛存在于不同的植物中, 自从第一个DREB/CBF转录因子CBF1从拟南芥中克隆得到后(Stockinger等1997)。在水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)、胡杨(*Pobulus euphratica*)和柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)中也都克隆得到了DREB/CBF转录因子基因。在植物中过量表达DREB/CBF转录因子基因都能明显的提高植株的胁迫耐受性(Liu等2000; Agarwal等2006)。研究发现, 在番茄中组成型过量表达拟南芥DREB1B/CBF1基因, 明显地增强了其过氧化氢酶活性, 减少了H₂O₂积累, 并且也提高了转基因植株的抗旱能力(Hsieh等2002a, b)。将大豆GmDREB基因导入小麦中后, 转基因小麦的T₁代植株相对于野生型植株, 抗旱、抗盐能力明显提高(Gao等2005)。另外, 在玉米中过量表达耐盐植物盐芥TsCBF1基因, 转基因玉米植株体内的相对水分含量升高, 溶质积累量增多, 抗旱性明显增强。而且, 转基因玉米植株的花期抽丝间隔缩短, 在干旱条

件下比野生型的谷物产量高很多(Zhang等2010)。在水稻、油菜、草莓、大麦和山丁子植物中过量表达DREB/CBF基因, 同样也得了抗逆性增强的转基因植株。

山葡萄也称东北山葡萄, 是葡萄科葡萄属落叶藤本植物。山葡萄是葡萄属中最抗寒的一个种, 是葡萄抗寒、抗病育种的宝贵资源(沈育杰等2006)。用山葡萄浆果酿造的葡萄酒, 品质优良, 是我国东北地区葡萄酒工业的主要原料。本研究以葡萄(*Vitis vinifera*)中DREB序列为依据, 从山葡萄中克隆得到了序列完全相同的DREB基因, 命名为VaDREB。并对该基因做了亚细胞定位分析, 同时将其在酵母和拟南芥中过量表达, 对其抗逆功能进行了分析, 并通过qRT-PCR分析了VaDREB对下游抗逆相关功能基因的激活活性。

材料与方法

1 材料

山葡萄(*Vitis amurensis* L.)植株叶片采自吉林大学和平校区葡萄园。大肠杆菌DH5 α 、根癌农杆菌EHA105、pCHF-1301、pYES2均由本实验室保存。pMD18-T克隆载体、RNAiso Plus和反转录试剂盒(PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser)购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司。胶回收试剂盒购自生工生物公司。DEPC(焦碳酸二乙酯)购自宝泰克大连有限公司。引物由生工生物公司合成。测序由华大基因公司完成。

2 方法

2.1 VaDREB基因的克隆及序列分析

根据目的基因的序列, 设计并合成特异性PCR扩增引物。上游引物: 5' ATGGAGGGAGGACAGGAGTG 3', 下游引物: 5' TCAGAGATGATAGTGTGGTC 3', 以山葡萄cDNA为模板进行PCR扩增, PCR产物回收后与pMD18-T载体连接, 16 °C连接过夜, 然后热击转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性(Amp^r) LB平板上筛选阳性重组子。经酶切鉴定后送华大基因公司测序。山葡萄RNA的提取和反转录参照试剂盒说明书。质粒的小量制备、酶切、连接、转化等方法参照文献(奥斯伯等1998)。

2.2 亚细胞定位

根据VaDREB和eGFP的序列设计并合成物异

性PCR扩增引物。*VaDREB*基因引物为: P1 5' CGAGCTCATGGAGGGAGGACAGGAGTG 3', 下划线为*SacI*酶切位点, P2 5' CACCATGGTGGC-GACCGGTGGGAGATGATAGTGGTGGTCATC 3'; *eGFP*基因引物: P3 5' CATCTCCCACCGGTCGC-CACCATGGTGGAGCAAGGGCGAG 3', P4 5' TC-CCCCGGGTTACTTGTACAGCTCGTC 3', 下划线为*SmaI*酶切位点。以*VaDREB*和*eGFP*为模板, 分别以P1和P2, P3和P4为引物, 通过PCR扩增得到相应的目的基因片段, 再以回收的*VaDREB*和*eGFP*为融合片段, 以P1和P4为引物, 通过overlapping PCR获得*VaDREB-eGFP*融合片段。将融合基因*VaDREB-eGFP*连入植物表达载体pCHF-1301。将PCR和酶切验证正确的重组载体转化农杆菌EHA105, 采用农杆菌介导法转化洋葱表皮细胞, 25 °C暗培养36 h后, 用激光共聚焦显微镜观察VaDREB蛋白在细胞中的定位。

2.3 酵母表达载体的构建及其重组酵母的胁迫处理

为了构建植物表达载体, 重新设计并合成了相应的PCR扩增引物, 上游引物: 5' CCGGAAT-TCATGGAGGGAGGACAGGAGTG 3', 下划线为*EcoRI*酶切位点, 下游引物: 5' CCGCTCGAGTCA-GAGATGATAGTGGTGGTC 3', 下划线为*XhoI*酶切位点。将*VaDREB*连入酵母表达载体pYES2, PCR和酶切验证正确后用醋酸锂化学转化法转化酿酒酵母INVScl (*Saccharomyces cerevisiae*)菌株中, 并转化pYES2空载体作为对照, 重组酵母分别命名为INVScl (pYES2-*VaDREB*)和INVScl (pYES2)。

挑取酵母INVScl (pYES2-*VaDREB*)和INVScl (pYES2)菌液, 接种于SC-U液体培养基(葡萄糖终浓度为2%)中, 30 °C、200 r·min⁻¹震荡培养24 h (潘妍等2010), 测量菌液OD₆₀₀值, 并将其OD₆₀₀值调为0.4, 取5 mL菌液, 5 000×g离心2 min, 弃上清, 加入5 mL诱导培养基(SC-U+2%半乳糖)重悬菌体, 30 °C, 200 r·min⁻¹振荡培养24 h, 测量其OD₆₀₀值, 并将两种重组酵母的浓度统一调整为OD₆₀₀=2; 取等量的酵母, 8 000×g离心1 min, 弃上清。对这两种酵母进行不同的胁迫处理, 每组实验重复3次。处理如下。

(1) NaCl和KCl处理: 将菌体重悬于5 mol·L⁻¹ NaCl溶液和5 mol·L⁻¹ KCl溶液中, 混匀后30 °C放置24 h进行胁迫处理; (2) Na₂CO₃和NaHCO₃处理: 将菌体分别重悬于6%和8%的Na₂CO₃溶液混匀后

30 °C放置2 h, 分别重悬于6%和8%的NaHCO₃溶液, 混匀后30 °C放置3 h; (3)干旱处理: 将菌体重悬于40%的PEG6000和5 mol·L⁻¹的山梨醇中, 混匀后30 °C放置24 h进行胁迫处理; (4)低温处理: 将菌体重悬于SC-U液体培养基, 低温(-20 °C)胁迫24 h, 其间每隔6 h把菌体冻融一次; (5)高温处理: 将菌体重悬于SC-U液体培养基, 53 °C处理1 h; (6)百草枯处理: 将菌体重悬于含有4 mmol·L⁻¹百草枯SC-U培养基中, 30 °C处理24 h。将不同非生物胁迫处理后的菌体分别稀释10²、10³、10⁴和10⁵倍, 取2 μL点样在SC-U (含2%半乳糖)固体培养基上, 30 °C培养48 h, 比较两种菌的菌落生长差异。

2.4 植物表达载体的构建及其拟南芥遗传转化

根据植物表达载体pCHF-1301的多克隆位点设计并合成含有*SacI*和*SmaI*酶切位点的引物, 上游引物: 5' CGAGCTCATGGAGGGAGGACAG-GAGTG 3', 下划线为*SacI*酶切位点, 下游引物: 5' TCCCCCGGGTCAGAGATGATAGTGGTGGTC 3', 下划线为*SmaI*酶切位点。将基因*VaDREB*连入植物表达载体pCHF-1301中。将PCR和酶切验证正确的重组植物表达载体转化农杆菌EHA105, 采用农杆菌介导的方法转化拟南芥植物。将收获的T₀代种子在含有30 mg·L⁻¹潮霉素的MS培养基上进行筛选。对筛选得到的拟南芥植株进行PCR验证。将验证为阳性的每个拟南芥转基因株系继续进行筛选、培养, 直到得到每个转基因株系的T₃代种子。

2.5 拟南芥盐胁迫处理

过量表达*VaDREB*的拟南芥植株及野生型(对照)在正常条件下[16 h光照(22 °C)/8 h黑暗(20 °C), 湿度80%]培养, 生长3周后, 用含有350 mmol·L⁻¹ NaCl的Hoagland营养液浇灌, 定期观察拟南芥的表型变化。

2.6 电导率测定

种植野生型拟南芥植株和*VaDREB*转基因拟南芥, 在正常条件下培养3周左右, 分别进行干旱和冷冻处理。干旱处理: 将拟南芥植株从土中拔出, 洗掉根上携带的土后放在吸水纸上, 然后在正常光照、温度条件下放置2.5 h。冷冻处理: 将拟南芥植株放置在-6 °C处理3 h; 并以野生型拟南芥做对照, 每个株系5次重复。分别称取0.1 g胁迫处理的转基因植株和野生型拟南芥植株叶片, 加入到装有0.4 mol·L⁻¹甘露醇溶液的试管中; 将管放在

摇床上, 23 °C, 100 r·min⁻¹轻轻振荡3 h (Fan等1997); 用电导率测定仪逐管测定。然后将管放入沸水中煮沸10 min; 待冷却至室温后, 再次逐管测定电导率。根据公式相对电导率=起始电导率/总电导率×100%, 计算叶片的相对电导率。

2.7 转基因拟南芥中抗逆基因在转录水平上的qRT-PCR分析

分别提取了野生型和*VaDREB*转基因拟南芥植株的叶片总RNA, DNA酶处理后将其反转录成cDNA[®] (PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒, Takara)。并采用qRT-PCR分析了野生型和*VaDREB*转基因拟南芥植株中*AtRD29A*、*AtRD29B*、*AtCOR15A*、*AtCOR15B*、*AtERD1*、*AtERD10*、*AtRD17*、*AtKIN1*和*AtKIN2*这些功能基因在转录水平上的变化, 内参基因为拟南芥*Actin2* (登录号AK230311)基因。基因登录号及其引物序列如表1所示。反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 58 °C 40 s, 40个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s; 每个处理均设了3次重复, 基因的相对表达量计算采用2^{-ΔΔC_t}法。

实验结果

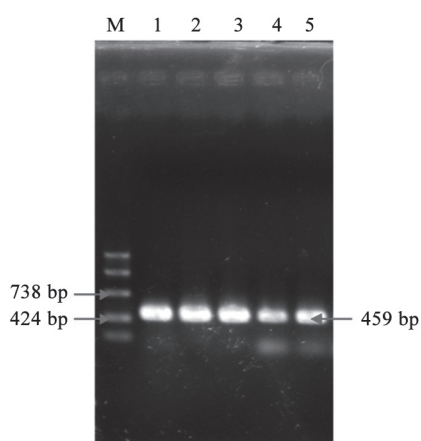
1 山葡萄*VaDREB*基因的克隆及生物信息学分析

根据葡萄*DREB*基因序列, 设计了特异引物, 采用RT-PCR方法从山葡萄中克隆得到了开放阅读框全长为459 bp的*VaDREB*基因片段(图1), 序列分析表明该基因编码152个氨基酸, 预测蛋白质分子量为17 kDa, 等电点为8.67。Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线软件预测结果显示, *VaDREB*蛋白包含一个由64个氨基酸残基组成的AP2/ERF结合域, 其中的第14位和第19位氨基酸残基分别为缬氨酸和谷氨酸(图2), 说明此基因为典型的DREB/CBF转录因子。在线软件BaCello (<http://gpcr.bio-comp.unibo.it/bacello/>)预测该基因编码蛋白定位于细胞核中。将*VaDREB*基因与其它植物的DREB/CBF转录因子氨基酸序列进行了系统进化分析, 并用MEGA 5软件构建了系统进化树, 结果(图3)表明该基因属于DREB/CBF转录因子A-5亚类。将*VaDREB*与DREB/CBF转录因子A-5亚类的其它4个转录因子进行了序列比对, 结果(图4)显示, *VaDREB*蛋白序列与棉花GhDBP1蛋白序列的全序

表1 qRT-PCR分析所用基因及其引物序列

Table 1 Genes and the primer sequence of qRT-PCR

基因名称	基因登录号	引物序列
<i>VaDREB</i>	XM_002283076.1	F: 5' AGGAAGTGGGGGAAGTGGGT 3' R: 5' TCTCAGGTGAAAGACGCGCG 3'
<i>AtActin2</i>	AK230311	F: 5' GGAAGGATCTGTACGGTAAAC 3' R: 5' TGTGAACGATTCCTGGACCT 3'
<i>AtRD29A</i>	D13044.1	F: 5' AGCCAAAACAGAGCACTTACACA 3' R: 5' CTTCTCATCAACAGTCCCGC 3'
<i>AtRD29B</i>	D13044.1	F: 5' TGAAAGTAGAGAGTGGATTGGGA 3' R: 5' TTGGGACGAGATAGTTCTGGTG 3'
<i>AtCOR15A</i>	NM_180040.3	F: 5' TTCTTCCACAGCGGAGCCA 3' R: 5' TGTTGCCGTCACCTTAGCG 3'
<i>AtCOR15B</i>	NM_129814.2	F: 5' GAAGCCAATGAAACTGCGACT 3' R: 5' TACCCTCTACGAAGTCAAGCCG 3'
<i>AtERD1</i>	NM_124486.2	F: 5' CCGCAGAATAAAAAACAACCC 3' R: 5' TCAAGAGAAATCCAGGAGCACT 3'
<i>AtERD10</i>	NM_180616.2	F: 5' TTCACAAGTCGTCAACACCACAC 3' R: 5' CCATAAATCCCTTCTCTCCTCC 3'
<i>AtRD17</i>	NM_101894.3	F: 5' ACCAACGGTCGCAACAGAG 3' R: 5' CTTCCCAAGAAATCAAACAAT 3'
<i>AtKIN1</i>	NM_121601.2	F: 5' CAATGTTCTGCTGGACAAGGC 3' R: 5' CAATGTTCTGCTGGACAAGGC 3'
<i>AtKIN2</i>	AY114545.1	F: 5' CAATGTTCTGCTGGACAAGGC 3' R: 5' CCTGTTGCGCGGAAGCT 3'

图1 *VaDREB*的PCR扩增结果Fig.1 PCR products of *VaDREB*M: DNA marker; 1~5: *VaDREB* PCR扩增结果。

列相似性为56.44%, 与大豆GmDREB2蛋白序列的全序列相似性为56.47%, 5个蛋白在AP2/ERF结合域氨基酸序列相似性非常高。

2 亚细胞定位分析

通过生物信息学预测*VaDREB*蛋白定位于细胞核中, 为了获取该基因在细胞中的准确定位信息, 我们将*VaDREB*基因融合到*eGFP* (绿色荧光蛋白)基因的5'端, 并将*VaDREB-eGFP*融合基因连入植物表达载体pCHF-1301, 采用农杆菌介导的遗传转化法将空载体pCHF-1301和重组载体pCHF-1301-*VaDREB-eGFP*分别转化到洋葱表皮细胞中。激光共聚焦显微镜扫描结果(图5)显示, 在转单个*eGFP*基因的洋葱表皮细胞中, 绿色荧光蛋白分布在整个细胞中; 而在转*VaDREB-eGFP*融合基因的洋葱

```

1  ATGGAGGGAGGACAGGAGTGTGTTTCGAGCAGAGAGACGAGGAAGAGGGTGACGGGGCAA
1  M E G G Q E C C S S R E T R K R V T G Q
61  GGTGAGAAGCGGTACAAGGGGATAAGGATGAGGAAGTGGGGGAGTGGGTGGCTGAGATT
21  G E K R Y K G I R M R K W G K W V A E I
121 AGAGAACCCAACAAGAGGTCACGCATATGGCTGGGCTCCTACTCCACACCGGTGGCCGCT
41  R E P N K R S R I W L G S Y S T P V A A
181 GCCCGTGCTTACGACACCGCGCTTTCACCTGAGAGGACCGTCGGCGAGGCTCAACTTC
61  A R A Y D T A V F H L R G P S A R L N F
241 CCGGAGTACCTGGTGGGAGAAGGTGGGCTCCACGACACCTCCGCTGCGTCTATACGAAA
81  P E Y L V G E G G L H D T S A A S I R K
301 AAAGCTACGGAGGTGGGGCGACAGTACGCTATAGAAATGTGCCAGGACGGCTTCCAAC
101 K A T E V G A T V D A I E C A R T A S N
361 CAATACAARTCCTGCGCCTTCTCTGAGAAACCCGACCTCAATAAAGAACCGGATCCTGAA
121 Q Y K S C A F S E K P D L N K E P D P E
421 AATTCGGATGTTGACGATGACCACCACTATCATCTCTGA
141 N S D V D D D H H Y H L *

```

图2 *VaDREB*的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *VaDREB*

阴影部分: AP2/ERF结合域; *: 终止密码子。

表皮细胞中, 只在细胞核中观察到绿色荧光蛋白的分布。这表明, *VaDREB*是一个细胞核蛋白。

3 重组酵母*INVSc1*的抗逆性分析

将已验证为阳性的携带pYES2-*VaDREB*重组质粒和pYES2空载体的酿酒酵母*INVSc1*用半乳糖诱导, 并分别对其进行了胁迫处理, 之后取2 μ L稀释了不同倍数的菌液点样在SC-U (含2%葡萄糖) 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C培养48 h后, 对两种菌的生长

差异进行了比较分析。结果(图6)显示, *INVSc1* (pYES2-*VaDREB*)在NaCl、KCl、Na₂CO₃、NaHCO₃、PEG6000、低温和高温胁迫处理下的存活率都高于对照*INVSc1* (pYES2), 说明*VaDREB*基因的表达增强了酵母*INVSc1* (pYES2-*VaDREB*)对盐碱胁迫和极端温度的耐受能力, 也表明*VaDREB*基因具有一定的抗干旱功能。另外, 在百草枯胁迫处理后, *INVSc1* (pYES2-*VaDREB*)的存活率也高于对照IN-

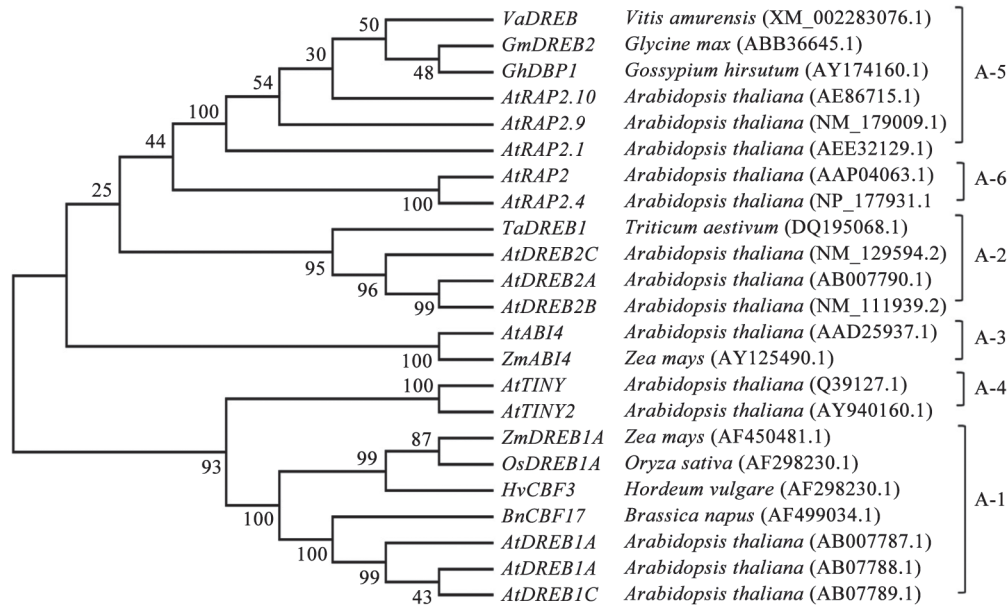


图3 VaDREB的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of VaDREB

VaDREB	MEGGQECSSRET.....RKRVTGQGEKRYKGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	59
GhDBP1	MELGDCCLTSSEAS..GEKRKLHRTQQKEKPPFRGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	64
GmDREB2	MEEAGLGCCSNTTITRKSEKRRKQ..HQQQEKPYRGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	68
AtRAP2.1	MEREQEESTMRRKRRQPPQE.EVENHVATRKYRGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	65
AtRAP2.9	MVIQYKRRQEFEMVKEGMVMEKPKRNLISSNEKRYKGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	70
AtRAP2.10	METATEVATVVTSTAVTV..AAVATRKRDKPYRGIIRKRWGKVVAEIREFNKRSRIWLGSYSTFVA	64
VaDREB	AAAYDIAVFFLRGPSARINFEYIVGE.....GGLH.....DTSAASTRKKAATEVGAIVDAIECART	117
GhDBP1	AAAYDIAVFFLRGPSARINFDLIFQE.....DELR.....DISAASIRKKAATEVGAIVDALQTSFH	122
GmDREB2	AAAYDIAVFFLRGPSARINFEELLSQD.....DDVSTQQGKMSADSIRKKAATEVGAIVDALQTSFH	131
AtRAP2.1	AAAYDIAVFFLRGPSARINFDLLQE.....EDHLSAATTADMEAAIIRKKAATEVGAIVDALLASAA	129
AtRAP2.9	AAAYDIAVFFLRGPSARINFEVFKD.....GNGGEGLG..GDMSPTLIRKKAATEVGAIVDA.....	127
AtRAP2.10	AAAYDIAVFFLRGPSARINFEELLAGVTVTGGGGGGVNGG..GDMSAATIRKKAATEVGAIVDALEAAGA	132
VaDREB	ASN.....QYKSCAFS.EKEDLNKEEDPENSEVDDDDHHYH	151
GhDBP1	HAS.....ASSESSNPTFVFRKEDLNKYEDSSDED	153
GmDREB2	QSS.....STHSISSS.HVSYEKEDLINEYKPKPED	159
AtRAP2.1	P.....SMAHSTPEVIKEDLNQIPESGDI	153
AtRAP2.9ELRLNRNVENIDNKLPEAYGL	150
AtRAP2.10	GGNRHHHHQHQRGNHDYVDNHSYRINDDIMECSKKEGFKRCNGSLERVDLNKLPDPETS..DDD	196

图4 DREB/CBF氨基酸序列比对

Fig.4 Alignment of the DREB/CBF proteins

黑色阴影部分: 序列保守区; 下划线: AP2/ERF结构域; 双下划线: 保守氨基酸; VaDREB: 山葡萄; GhDBP1: 棉花; GmDREB2: 大豆; AtRAP2.1、AtRAP2.9和AtRAP2.10: 拟南芥。

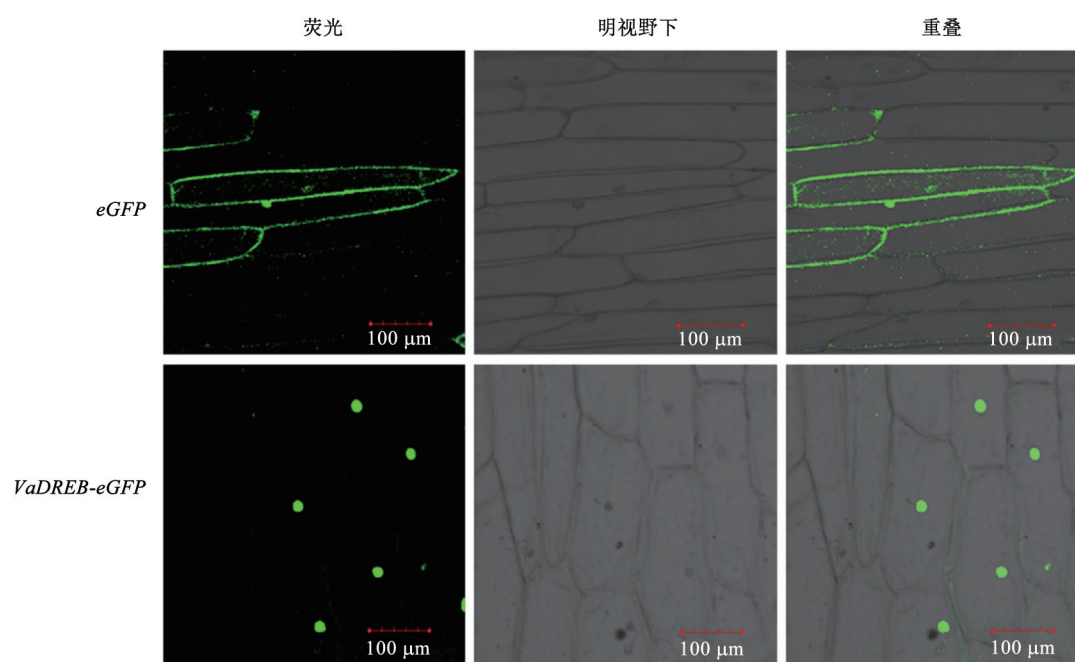
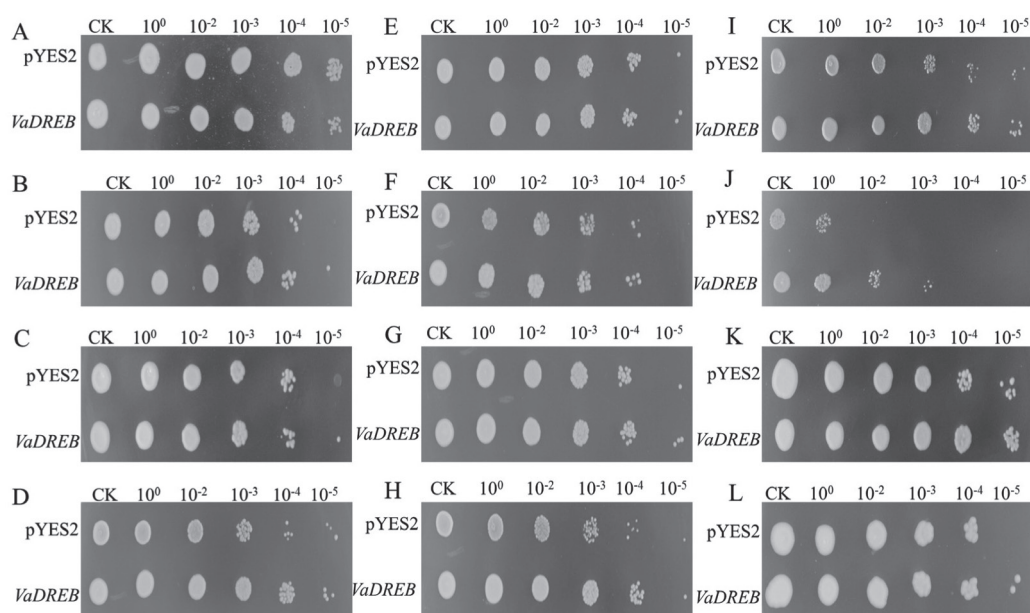
VSc1 (pYES2), 表明VaDREB基因的表达也增强了重组酵母清除活性氧的能力。

4 VaDREB转基因拟南芥植株抗逆分析

4.1 转基因拟南芥的耐盐性分析

对野生型拟南芥和VaDREB转基因拟南芥植株用盐溶液进行浇灌, 2 d后, 拟南芥植株叶片开始黄化, 但转基因拟南芥植株大部分仍保持绿色。5

d后, 野生型拟南芥植株的叶尖部位开始枯萎, 并不断向叶的中部延伸, 但转基因植株的叶片没有出现这种症状, 并且转基因植株的叶片黄化程度仍然较低, 一直到7 d后大部分植株叶片还保持绿色。10 d后, 野生型拟南芥叶片出现大面积枯萎, 甚至整棵植株死亡, 而转基因拟南芥植株仍然保持较好的生长状态, 植株几乎全部存活(图6)。这

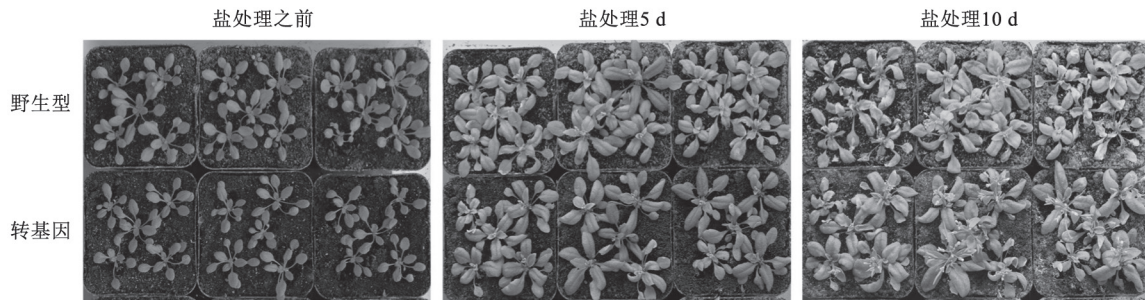
图5 *VaDREB*的亚细胞定位Fig.5 Subcellular localization of the *VaDREB* protein图6 *VaDREB*在酵母中的抗逆功能分析Fig.6 Resistance function analysis of *VaDREB* in yeast INVSc1

A: 对照; B: NaCl胁迫; C: KCl胁迫; D: 百草枯胁迫; E和F: 6%和8%的 Na_2CO_3 胁迫; G和H: 6%和8%的 NaHCO_3 胁迫; I: 冷冻胁迫; J: 高温胁迫; K: PEG6000胁迫; L: 山梨醇胁迫; CK: 未进行胁迫处理。

些结果表明, 过量表达*VaDREB*基因增强了转基因拟南芥植株对盐胁迫的耐受性。

4.2 电导率测定

对于干旱和冷冻处理后的野生型拟南芥和转基因

图7 *VaDREB*转基因拟南芥耐盐性分析Fig.7 Analysis of salt tolerance of *VaDREB* transgenic *Arabidopsis*

因拟南芥进行了电导率测定。结果(图8)表明,在冷冻和干旱处理后,转基因植株的相对电导率低于野生型植株,说明*VaDREB*基因的表达使得转基因植株在低温和干旱胁迫下,细胞膜的受损程度降低,胁迫耐受能力得到了提高。

4.3 T₃代*VaDREB*转基因拟南芥中抗逆相关基因表达量分析

为了研究*VaDREB*的转录调控作用,用qRT-PCR在转录水平上对野生型拟南芥植株和转基因拟南芥植株中的9个功能基因的表达量进行了定量分析。结果(图9)表明,在转基因拟南芥中,抗逆相关功能基因的表达量都出现了不同程度的上调,特别是*KIN1*、*KIN2*和*COR15B*基因,其在转基因拟南芥植株中表达量比在野生型中的表达量高出很多,最高的达到40多倍,这表明*VaDREB*转录因子

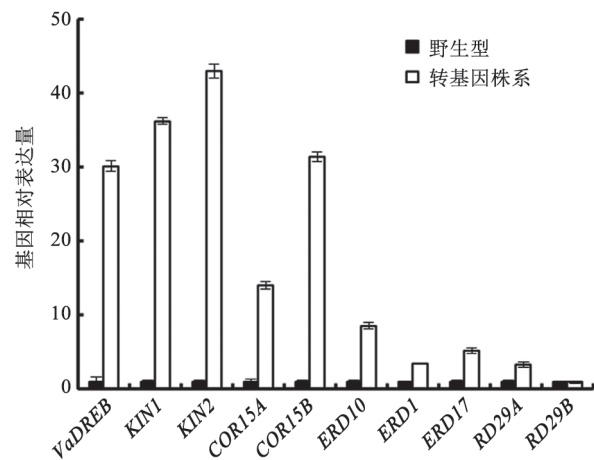
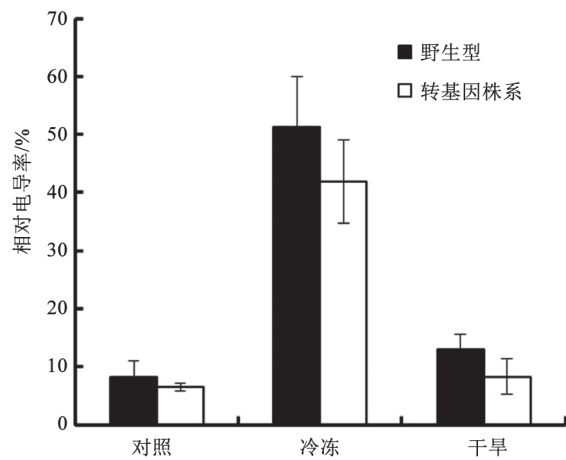
图9 T₃代*VaDREB*转基因拟南芥中抗逆相关基因的qRT-PCR分析Fig.9 Expression analysis of stress-regulated genes in T₃ *VaDREB* transgenic *Arabidopsis* plants by qRT-PCR

图8 冷冻和干旱处理下拟南芥叶片的电导率测定

Fig.8 Measurement of electrolyte leakage in *Arabidopsis* leaves with cold and drought treatment

的过量表达,激活了拟南芥植株中下游功能基因的表达使其表达量上调。

讨 论

DREB转录因子是植物体胁迫应答中十分关键的调控因子。本研究根据葡萄的*DREB*序列,采用RT-PCR的方法从山葡萄中克隆得到了一个序列完全相同的*VaDREB*转录因子基因,这说明葡萄(Zhao等2014)与山葡萄在基因组成上高度相似。*VaDREB*包含一个由64个氨基酸残基组成的AP2/ERF结合域,其中第14位和第19位分别为保守的缬氨酸,这两个氨基酸与DREB蛋白的DNA识别及特异性结合相关(Sakuma等2002)。通过与绿色荧光蛋白(eGFP)融合表达证实*VaDREB*是一个核蛋白。

研究基因的抗逆功能时,真核生物酿酒酵母是一个理想的模式生物,具有快速、准确的优点(Posas等2000; Rausell等2003)。并且其细胞结构更适合于研究真核生物基因功能。我们以潘妍等(2010)的相关研究为依据,用酿酒酵母表达系统研究了山葡萄转录因子基因*VaDREB*的抗逆功能。转*VaDREB*基因酵母在各种逆境胁迫下的抗逆分析结果(图6)显示,*VaDREB*基因的表达不同程度的增强了酵母对盐碱、低温、高温和干旱的耐受性。另外,也用百草枯对转基因酵母的活性氧清除能力进行了分析。因为研究表明,环境中各种胁迫因子会对植物体细胞中活性氧产生与清除系统造成影响,导致植物细胞遭受氧化胁迫(蒋明义等1994)的损伤,百草枯能诱导酵母产生活性氧,转基因酵母对百草枯的抗性分析一定程度上反映了*VaDREB*基因对各种非生物胁迫的抗性功能。

为了更进一步研究*VaDREB*的功能,我们将该基因在模式植物拟南芥中进行了过量表达,转基因拟南芥植株表现出了明显的盐胁迫耐受性(图7)。但*VaDREB*过量表达并没有导致拟南芥植株的生长出现延滞。类似的研究报道也出现在别的基因的研究结果中。Chen等(2007)在烟草中过量表达大豆*GmDREB2*基因后,明显的提高了转基因植株的耐盐性,但没有对植株的生长产生负面影响。Oh等(2005)将拟南芥*AtDREB1A*基因在水稻中过量表达后,也没有观察到转基因水稻植株出现生长延滞的表型。但是在转基因研究中,为了避免基因的过量表达造成植物体的能量浪费,常用胁迫诱导型启动子*rd29A*代替组成型启动子调控基因在转基因植株中的表达,并且发现*rd29A*启动子能有效的调控基因表达,提高转基因植株的胁迫耐受性,而不会导致转基因植株出现生长延滞等不正常表型(Pino等2007; Zhao等2007)。电导率常被作为衡量植物细胞膜受损程度的一个指标(Gilmour等1998; Vannini等2004),灵敏,并且测定简单。我们对胁迫处理后的转基因拟南芥和野生型拟南芥植株叶片的电导率进行了测定,转基因拟南芥植株的电导率都低于野生型。同时也发现低温对植物细胞膜的损伤程度高于干旱的。

转录因子对植物的抗逆作用主要是通过开启或关闭信号通路,激活和调控下游功能基因的表

达来实现的。早期的研究中,通过对不同*DREB1/CBF*转基因拟南芥植株的cDNA微阵列分析,鉴定了40多个*DREB1/CBF*下游调控基因,并且研究发现这些基因大多编码胁迫相关蛋白(Nakashima等2009)。我们选取了9个功能研究比较清楚、与植物抗逆相关的功能基因,在转录水平上对它们进行了定量分析。9个基因中除了*RD29B*之外,其它几个基因的表达量都出现了不同程度的上调,特别是*KIN1*、*KIN2*和*COR15B*基因,其在转基因拟南芥植株中的表达量比在野生型拟南芥植株中的表达量高出很多,这表明,*VaDREB*转录因子的过量表达,激活了拟南芥植株中下游功能基因的表达,其对拟南芥植株抗逆性的增强可能主要是通过调控这些功能基因的表达实现的。对水稻*OsDREB1A*基因的研究发现,该转录因子更容易与DRE/CRT元件核心序列为GCCGAC的启动子结合,由于*KIN1*、*KIN2*和*ERD10*三个基因启动子中DRE/CRT元件核心区仅包含ACCGAC序列,在过量表达*OsDREB1A*基因的转基因拟南芥植株中,这三个基因的表达量并没有出现上调(Cong等2008)。在*VaDREB*转基因拟南芥植株中,*KIN1*和*KIN2*这两个基因的表达量明显上调,表明*VaDREB*转录因子更容易与DRE/CRT元件核心区为ACCGAC序列的启动子结合,或者是与包含ACCGAC或GCCGAC序列的启动子都能发生结合,具体情况还有待进一步研究。这几个表达量出现上调的基因中,其启动子区都含有DRE元件,而*RD29B*基因的启动子区不包含DRE元件序列,只包含一个ABRE元件序列(Yang等2011)。Liu等(2007)曾研究发现DREB转录因子家族A-5亚家族*PpDBF1*基因的表达受ABA调控。Cong等(2008)对转录因子基因*BiDREB1B*研究发现该基因与ABA依赖性及其非依赖性信号调控通路都有关联。由于转录因子对功能基因的调控并不都是直接作用,很多调控作用是通过调控网络间接实现的,所以对于*VaDREB*基因是否参与ABA信号调控通路还有待于进一步研究。

在拟南芥中过量表达*ZmDREB1A*、*DREB1A/CBF3*和*OsDREB1A*都对植株的胁迫耐受性产生了明显的增强作用(Liu等1998; Dubouzet等2003; Qin等2004)。本研究中我们也分析了*VaDREB*在拟南芥中过量表达后对植物抗逆方面的作用,并且发

现其明显的增强了拟南芥植物对高盐胁迫的耐受性, 并且研究结果也表明该基因在植物干旱、低温等胁迫应答中起着重要的调控作用。这为进一步研究山葡萄的抗逆机制奠定了理论基础, 也为以后利用植物基因工程手段提高作物的抗逆性提供了有效的基因资源。

参考文献

- 蒋明文, 杨文英, 徐江, 陈巧云(1994). 渗透胁迫诱导水稻幼苗的氧化伤害. 作物学报, 20 (6): 733~738
- 奥斯博主编(1998). 金由章译. 精编分子生物学实验指南. 第5版. 北京: 科学出版社
- 潘妍, 王玉成, 张大伟, 杨传平(2010). 二色补血草*LbGRP*基因的克隆及抗逆能力分析. 遗传, 32: 278~286
- 沈育杰, 赵淑兰, 杨义明, 李晓红, 宋润刚, 路文鹏(2006). 我国山葡萄种质资源研究与利用现状. 特产研究, 3: 53~57
- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25: 1263~1274
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ (2007). *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Bioph Res Co*, 353: 299~305
- Cong L, Zheng HC, Zhang YX, Chai TY (2008). *Arabidopsis DREB1A* confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in tobacco. *Plant Sci*, 174: 156~164
- 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: 751~763
- Fan L, Zheng S, Wang X (1997). Antisense suppression of phospholipase *Da* retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 9: 2183~2196
- Gao SQ, Xu HJ, Cheng XG, Chen M, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Du LP, Hao XY, Ma YZ (2005). Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*). *Chinese Sci Bull*, 50: 2714~2723
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold- induced *COR* gene expression. *Plant J*, 16: 433~442
- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002a). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol*, 130: 618~626
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT (2002b). Heterology expression of the *Arabidopsis c-repeat/dehydration response element binding factor 1* gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol*, 129: 1086~1094
- Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 47: 377~403
- Liu N, Zhong NQ, Wang GL, Li LJ, Liu XL, He YK, Xia GX (2007). Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta*, 226: 827~838
- 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
- Liu Q, Zhao N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Sci Bull*, 45: 970~975
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA- Gene Regul Mech*, 1819: 86~96
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol*, 149: 88~95
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005). *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol*, 138: 341~351.
- Pino MT, Skinner JS, Park EJ, Jeknić Z, Hayes PM, Thomashow MF, Chen TH (2007). Use of a stress inducible promoter to drive ectopic *AtCBF* expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Bio J*, 5: 591~604
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem*, 275: 17249~17255
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*, 45: 1042~1052
- Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R, Ros R (2003). The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *Plant J*, 34: 257~267
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002). DNA-Binding specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-Inducible gene expression. *Biochem Bioph Res Co*, 290: 998~1009
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 217~223
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:

- 1035~1040
- Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 50: 571~599
- Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I (2004). Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 37: 115~127
- Yang W, Liu XD, Chi XJ, Wu CA, Li YZ, Song LL, Liu XM, Wang YF, Wang FW, Zhang C et al (2011). Dwarf apple *MbDREB1* enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta*, 233: 219~229
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251~264
- Zhang S, Li N, Gao F, Yang A, Zhang J (2010). Over-expression of *TsCBF1* gene confers improved drought tolerance in transgenic maize. *Mol Breeding*, 26: 455~465
- Zhao J, Ren W, Zhi D, Wang L, Xia G (2007). *Arabidopsis DREB1A/CBF3* bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep*, 26: 1521~1528
- Zhao T, Xia H, Liu J, Ma F (2014). The gene family of dehydration responsive element-binding transcription factors in grape (*Vitis vinifera*): genome-wide identification and analysis, expression profiles, and involvement in abiotic stress resistance. *Mol Biol Rep*, 41: 1577~1590