

诱导型和组成型表达的冷诱导转录因子 CBF1 基因表达载体的构建

杨志如¹, 云锦凤¹, 魏建华³, 徐春波²

(1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 中国农科院 草原研究所,
内蒙古 呼和浩特 010010; 3. 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 为研究冷诱导转录因子 CBF1 (C-repeat binding factor) 基因对我国优良豆科牧草)) 苜蓿的抗寒性的改良作用, 试验从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中利用 PCR 方法分离了 CBF1 基因及其启动子, 分别构建了 CaMV 35S 启动子和来源于拟南芥的 CBF1 启动子驱动的农杆菌介导的植物转化表达载体, 为下一步研究利用 CBF1 基因改良苜蓿抗逆性奠定了基础。

关键词: 拟南芥; CBF1; CBF1 启动子; 表达载体构建

中图分类号: S637 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2009)03- 0041- 05

Construction of Constitutive and Cold-inducible Plant Expression Vector of CBF1 Gene

YANG Zhiru¹, YUN Jinfeng¹, WEI Jianhua³, XU Chunbo²

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Huhhot 010010, China; 3. Beijing Agrobiotechnology Research Center, Beijing 100097, China)

Abstract: To improve the cold resistance in China alfalfa, gene of CBF1 transcription factor and its promoter were isolated from *Arabidopsis thaliana* by PCR method. Two vectors for CBF1 expression in plant were constructed, one is inducible which is driven by CBF1 promoter, another is constitutive which is driven by CaMV 35S promoter. This lay the foundation for improve the cold resistance in by transgenic transformation.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; CBF1; CBF1 promoter; Construction of expression vector

紫花苜蓿是一种优质、高产、适应性强的多年生栽培牧草, 号称“牧草之王”。它不但饲用价值高, 营养丰富, 适口性好, 家畜喜食, 同时也是一种优良的改土培肥植物, 在干旱、半干旱地区具有重要的生态价值^[1-6]。但我国许多人工草地多受到各种环境因子的胁迫, 低温和干旱是植物所面临的主要逆境因子^[7-9]。因此选育高抗优质的苜蓿品种具有重要意义, 传统的育种方法虽然应用广泛, 但效率低, 育种年限长。近年来随着的生命科学的飞速发展, 植物基因工程技术的不断成熟, 获得转基因苜蓿的研究报道也在不断增多, 给我们进行苜蓿育种工作带来了新的研究方向。

现已知植物的抗寒性是由复杂的多基因控制的数量性状。通过导入单一的功能基因虽然在一定程度上提高了植物的抗寒性, 但效果不是很明显。而 CBF 转录因子的发现则为基因工程改良植物耐逆性提供了一种全新的技术途径^[10-12]。CBF (C-repeat binding factor) 转录激活因子是一类受低温特异诱导的反式作用因子, 它们可以调控多个抗寒基因启动子区上的顺式作用元件(即 CRT/DRE 顺式作用元件), 促进启动子中含有这一调控元件的多个冷诱导和脱水诱导基因的表达, 从而激活植物体内的多种耐逆机制^[13]。因此, 该转录因子在植物耐逆性的综合改良中具有广泛的应用前景和极大的利用价值。

收稿日期: 2009- 03- 20

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国农业科学院草原研究所)资助项目(2006- 1- 01); 内蒙古自治区草原重大科技项目资助(20071923)

作者简介: 杨志如(1982-), 女, 内蒙古鄂尔多斯市人, 在读硕士, 主要从事牧草种质资源与遗传育种工作。

通讯作者: 徐春波(1979-), 女, 内蒙古扎兰屯人, 助理研究员, 硕士, 主要从事牧草种质资源、遗传育种与生物技术研究工作。

研究冷诱导转录因子 CBF1 在牧草抗寒中的作用机制, 能为提高牧草的抗寒性, 培育抗寒牧草新品种提供新方向。目前国内外许多研究机构已经通过导入该转录因子来提高植物的抗寒性、抗旱性, 并且获得一定的成功, 如甄伟等^[14]的转化油菜烟草和金万梅等^[15]转化草莓, 其转基因植物的抗寒性都有不同程度的提高, 但在我国牧草上的研究应用还有待进一步探讨^[16, 17]。

本试验通过克隆逆境诱导型启动子 CBF12PRO 和 CBF1 转录因子并分别构建了花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子和逆境诱导型启动子 CBF12PRO 启动子驱动的 CBF1 基因表达载体, 为下一步转化紫花苜蓿, 利用 CBF1 基因改良其抗逆性提供了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 由北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心提供, 并在该中心温室栽培。本试验材料拟南芥生态型为哥伦比亚生态型。

宿主菌大肠杆菌(*E. coli*) DH5A 由北京市农林科学院生物技术研究中心园林实验室保存。质粒载体: 构建载体过程中所需要的质粒载体 pGEM2T 载体购自上海生物工程有限公司, 植物表达载体 PBI121 由生物技术研究中心保存。

试验中所用的各种限制性内切酶, RNase A、Taq 酶、dNTP、T4 连接酶、IPTG 和 X2gal 均购自 TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒、T 载体连接试剂盒购自 Promega 公司; Marker 购自 Takara 公司; 乙醇、氯仿、酚、异丙醇、盐酸、甘油、琼脂、CTAB 等均购自北京经科宏达生物技术公司。

PCR 引物合成、DNA 测序工作均由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.2 拟南芥基因组 DNA 的提取

取拟南芥叶片 2 g, 用 CTAB 法^[15]提取拟南芥叶片总 DNA。

1.3 目的基因的克隆

1.3.1 PCR 扩增 CBF1 基因 根据 NCBI GenBank CBF1 基因序列设计引物 (CBF12BamHI2up: 5c2 TCTGGGATCCATGAACCTATTTTCAC23c; CBF12SacII down: 5c2TCTGGAGCTCTTAGTAACTCCAAAGCG23c), 并在上下游引物分别加 BamH I 和 Sac I 酶切位点, 从拟南芥基因组 DNA 克隆 CBF1 基因, PCR 扩增, 反应体系 20 LL, 反应条件: 95 e 预变性 5 min; 94 e

30 s, 55 e 30 s, 72 e 1 min, 35 个循环, 72 e 延伸 10 min; 18 e 反应结束。PCR 产物连接 T2Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5A 感受态, 在含有 IPTG 和 X2gal 的 LB+ Amp 固体平板上筛选白色菌落, 对重组子进行菌液 PCR 鉴定, 验证正确后由北京奥科生物技术有限责任公司完成测序。

1.3.2 PCR 扩增 CBF12PRO 启动子 根据 GenBank 上所登录的 CBF1 基因序列, 在其表达框架前选择 1 447 bp 的序列定为 CBF12PRO 启动子, 根据引物设计基本原则, 应用 DNAMAN 软件设计引物: (CBF12PRO2Sse8387I2up: 5c2TACCTGCAGGCCACGAACATATCAT23c; CBF12PRO2 BamH I2down: 5c2TACCGGATCCCTGATCAGAGTACTCT23c) 上下游引物 5c 端分别加 Sse8387I 和 BamH I 酶切位点, 进行逆境诱导型启动子 CBF12PRO 的 PCR 扩增, PCR 反应体系 20 LL, 反应条件: 95 e 预变性 5 min; 94 e 30 s, 55 e 30 s, 72 e 1.5 min 30 s, 35 个循环, 72 e 延伸 10 min; 18 e 反应结束。PCR 产物连接到 T2Easy 载体上, 转化大肠杆菌 DH5A 感受态, 在含有 IPTG 和 X2gal 的 LB+ Amp 固体平板上筛选白色菌落, 对重组子进行菌液 PCR 鉴定, 正确后由北京奥科生物技术有限责任公司完成测序。

1.4 植物表达载体的构建

1.4.1 植物表达载体 PBI1212CBF1 载体的构建 质粒 PBI121 带有 CaMV35S 启动子和 GUS 基因, 其 35S 启动子下游具有多克隆位点, 可供外源基因插入并使其在植物中表达。本试验将质粒 PBI121 和质粒 T2CBF1 同时经双酶切回收载体片段和 CBF1 基因片段, 将两个片段进行连接转化 DH5A 感受态细胞, 在含有 Kna 抗性的 LB 培养基平板上筛选阳性菌落, 挑单菌落进行菌液 PCR, 在 PCR 鉴定为阳性的克隆中选择 1 个菌株, 用 BamH I 和 Sac I 进行双酶切鉴定, 将重组质粒命名为 PBI1212CBF1。

1.4.2 植物表达载体 PB12PRO2CBF1 载体的构建 质粒 PB12CBF1 带有 CaMV35S 启动子和 CBF1 基因, 其 35S 启动子下游具有多克隆位点, 可供外源基因插入并使其在植物中表达。本试验将质粒 PB12CBF1 和质粒 T2CBF12PRO 同时经双酶切回收载体片段和 CBF12PRO 基因片段, 将两个片段进行连接转化 DH5A 感受态细胞, 在含有 Kna 抗性的 LB 培养基平板上筛选阳性菌落, 挑单菌落进行菌液 PCR, 在 PCR 鉴定为阳性的克隆中选择 1 个菌株, 用 Sse8387 I 和 Bam H I 进行双酶切鉴定, 将重组质粒命名为 PB12PRO2CBF1。

2 结果与分析

2.1 CBF1 基因片段的克隆及序列分析

从拟南芥基因组 DNA 中扩增出 1 个 642 bp 的片段(图 1), 将该序列与 GenBank 登陆的 CBF1 基因序列进行 DANMAN 序列比较分析结果显示: 同源性可达 99.84%, 在 460 bp 的碱基 A 替换成 T, 2 个碱基的替换导致了一处氨基酸的差异, 但这一氨基酸并不在基因的功能结构域上, 推测其不会影响基因功能。因而产物应具有正常的生理功能, 认为该基因可用。

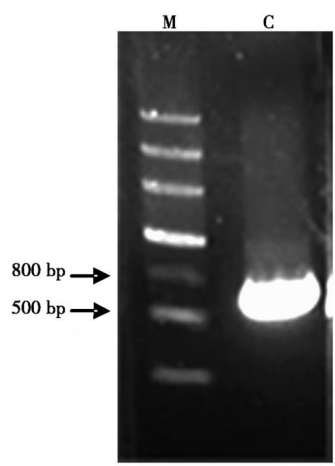


图 1 CBF1 基因片段的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of CBF1 gene fragment

2.2 CBF12PRO 启动子片段的克隆及序列分析

自拟南芥基因组 DNA 中扩增出 1 个 1 447 bp 的片段(图 2), 测序结果与 GenBank 上所登录的 CBF12 PRO 序列比对。结果同源性为 99.79%, 经分析后认为并不会影响片段的功能。

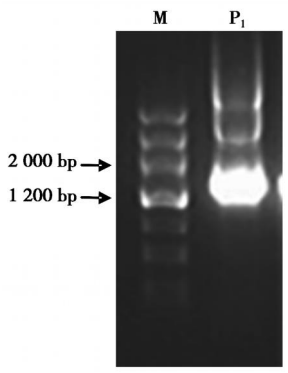


图 2 CBF12PRO 基因片段的 PCR 扩增
Fig. 2 PCR amplification of CBF12 PRO gene fragment

2.3 植物表达载体的构建

2.3.1 PBI1212CBF1 植物表达载体的构建 构建的 PBI1212CBF1 植物表达载体图谱(图 3), 用 BamH I 和 Sac I 对构建好的 PBI1212CBF1 质粒载体进行酶切鉴定, 重组质粒的双酶切鉴定(图 4)。经过 PCR 扩增、连接与酶切过程, 在 PBI1212CBF1 重组载体中

增加了 1 个 BamH I 位点和 1 个 Sac I 酶切位点, 根据载体上这两种酶的酶切位点的特点, 用 BamH I 和 Sac I 进行双酶切鉴定, 得到两个片段, 一个为 CBF1 基因大约为 642 bp, 另一个为载体, 约为 12.9 kb。从电泳检测的结果来看, 证明所构建的 PBI2CBF1 表达载体正确。

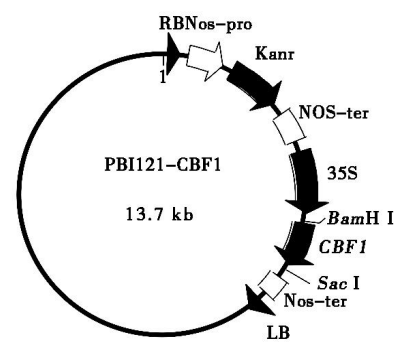


图 3 植物表达载体 PBI1212 CBF1 物理图谱
Fig. 3 Map of plant expression vector PBI1212CBF1

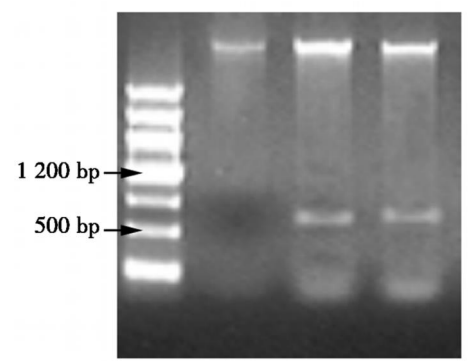


图 4 植物表达载体 PBI1212CBF1 的酶切鉴定
Fig. 4 Identification of plant expression vector PBI1212CBF1

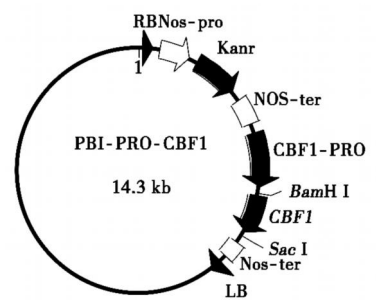


图 5 植物表达载体 PBI2PRO2CBF1 物理图谱
Fig. 5 Map of plant expression vector PBI2PRO2CBF1

2.3.2 PBI2PRO2CBF1 植物表达载体的构建 构建的 PBI2PRO2CBF1 植物表达载体图谱(图 5), 用 Sse8387 I 和 BamH I 对构建好的 pBI2PRO2CBF1 质粒载体进行酶切鉴定, 重组质粒的双酶切鉴定(图 6)。经过 PCR 扩增、连接与酶切过程, 在 PBI2PRO2CBF1 重组载体中增加了 1 个 Sse8387 I 位点和 1 个 BamH I 酶切位点, 根据载体上这两种酶的酶切位点的特点, 用 Sse8387 I 和 BamH I 进行双酶切鉴定, 得到两个片段, 一个为 CBF12PRO 启动子片段大约为 1 447 bp, 另一个为载体, 约为 1411 kb。从电泳检测的结

果来看,证明所构建的 PB2 PRO 2CBF1 表达载体正确。

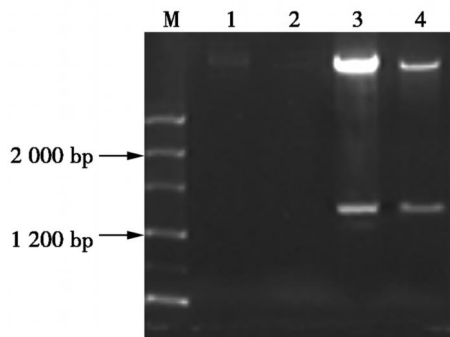


图 6 植物表达载体 PB2PRO2CBF1 的酶切鉴定

Fig.6 Identification of plant expression vector PB2PRO2CBF1

3 讨论

低温已经成为苜蓿产业化的重要限制因子之一。培育抗寒能力强的品种一直是苜蓿生产中的一个重要课题。而植物基因工程的发展则为苜蓿抗寒品种提供了一条崭新的途径,植物经过冷驯化可以提高其抗寒性。研究者目前发现,在拟南芥上已发现冷驯化是 CBF (C-repeat binding factor)/DREB (dehydration responsive element binding, DREB) 基因冷应激途径的激活^[18,20]。CBF/DREB 转录因子是一系列 COR (Cold regulated) 基因如 LTI (Low temperature induced)、CAS (Cold acclimation specific)、Kin (Cold induced)、RD (Responsive to desiccation)、COR15 等基因的分子开关,控制着冷调节基因的表达^[15]。CBF1 其表达量的增加将会诱导植物体内的 COR (Cold regulated) 基因的表达,从而提高植物对寒冷的耐受性^[19,21,23]。无论在单子叶植物中还是双子叶植物中均存在冷调节途径。CBF1 基因虽然是在拟南芥中被发现的,但研究结果证明, CBF 冷反应途径的组成因子在开花植物中是高度保守的,而且不只是局限于能够冷驯化的植物^[24]。蛋白质和核酸数据库的搜索结果也显示,许多植物中均存在有潜在的 CBF 同源基因^[25]。这说明 CBF 基因及其在植物抗逆反应中的调控机理可能广泛地存在于双子叶及单子叶植物中,同样可以推断苜蓿植物中也存在 CBF1 基因冷调节途径。因此,在苜蓿植物耐逆性的综合改良中具有广泛的应用前景和极大的利用价值。

本试验以拟南芥叶片为材料,成功地克隆了 CBF1 基因和特异性诱导启动子 CBF1 2PRO,经序列分析,所克隆的 CBF1 基因所编码的蛋白质应该具有 CBF1 转录因子的生理功能,并且克隆的 CBF1 2PRO 启动子是 CBF1 基因序列前面大约 1.47 kb 的

序列,该序列很可能具有启动 CBF1 基因表达的功能,通过酶切连接分别构建了组成性启动子和特异性诱导型启动子调控下的 CBF1 基因的植物表达载体,用于以后转化苜蓿植物。35S 为非特异性表达的组成型启动子,它的表达具有持续性,不表现时空特异性,也不受外界因素诱导^[26],虽然 CBF 转录激活因子可以明显提高转基因的耐逆性,但是否对苜蓿也有很好的效果还是个未知数,对其在苜蓿中的应用仍有待进一步探讨。现正进行 2 种启动子调控下的 CBF1 转录因子转化紫花苜蓿品种研究,以期获得抗逆性强质量好的苜蓿新品种。

参考文献:

- [1] 万素梅,胡建宏,王龙昌,等.不同紫花苜蓿品种特性分析[J].干旱地区农业研究,2004,22(2):59-62.
- [2] 刘东海.紫花苜蓿栽培技术[J].内蒙古农业科技,1995(6):23-27.
- [3] 张连庆,李万春.退耕还草的首选)紫花苜蓿[J].内蒙古农业科技,2002(专辑):43.
- [4] 范霞,那顺.紫花苜蓿栽培技术及应用[J].内蒙古农业科技,2001(5):47.
- [5] 赵淑芬,陈志远.内蒙古自治区农牧交错带紫花苜蓿优质高产栽培关键技术[J].华北农学报,2004,19(专辑):131-133.
- [6] 刘众,杨华.紫花苜蓿的价值及其栽培利用[J].内蒙古农业科技,2005(4):42-43.
- [7] 张丽君,白占雄,关文彬,等.我国苜蓿属植物栽培品种的地理分布[J].华北农学报,2005,20(专辑):99-103.
- [8] 王莹,杨惠玲.紫花苜蓿品种引种试验[J].内蒙古农业科技,2005(3):34-35.
- [9] 于井瑞,张继林,李瑞英,等.沙化干旱地区苜蓿引种试验[J].内蒙古农业科技,2008(5):47-48.
- [10] 张微微,车代弟,张兴,等.CBF1 转录因子基因的克隆及两种启动子调控下的植物表达载体的构建[J].分子植物育种,2005,3(2):493-497.
- [11] 曹丽霞,马有志,杨俊英.应答非生物胁迫的植物转录因子[J].内蒙古农业科技,2005(5):10-14.
- [12] 高银.植物抗逆机制与基因工程研究进展[J].内蒙古农业科技,2007(5):75-78.
- [13] 刘强,赵南明.DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J].科学通报,2000,45(1):11-16.
- [14] 甄伟,陈溪,孙思洋,胡鸢雷,林忠平.冷诱导基因的转录因子 CBF1 转化油菜和烟草及抗旱性鉴定[J].自然科学进展,2000,10(12):1104-1108.
- [15] 金万梅,董静,尹淑萍,闫爱玲,陈梅香.冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓及其抗寒性鉴定[J].西北植物学报,2007,27(2):0223-0227.
- [16] 杨凤萍,梁荣奇,张立全,等.抗逆调节转录因子 CBF1 基因提高多年生黑麦草的抗旱能力[J].华北农学报,

2006, 21(1): 14- 18.

[17] 姚 觉, 于晓英, 邱 收, 等. 植物抗旱机理研究进展 [J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 51- 56.

[18] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors DREB1 and DREB2, with an EREBP/ AP2 DNA binding do2main separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression, re2spectively in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391- 1406.

[19] Jaglo2ttosen K R, Gilmour S J, Zarka Daniel G, et al. Ara2bidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and en2hances freezing tolerance[J]. Science, 1998, 280: 104 - 106.

[20] Thomshow M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. Ann Rev Plant Physiol Mol Biol, 1999, 50: 571- 599.

[21] Stockinger E J, Gilmou S J, Thomashow M F. Arabdopsis thaliana CBF1 encodes anAP2 domain2containing transcrip2tional activator that binds to the 2repeat/ DRE, aci2acting DNA regulatory element that stimulates transcription in re2sponse to low temperature and water deficit [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 1035- 1040.

[22] Hsieh T H, Lee J T. Heterology expression of the Arabidopsis 2repeat/ dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato[J]. Plant Physiol, 2002, 129(3): 1086- 1094.

[23] Chinnusamy V, Ohta M, Kanra S, et al. ICE1: aregulator of cold2induced transcriptome and freezing tolerance in Ara2bidopsis[J]. Genes Dev, 2003, 17(8): 1043- 1054.

[24] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, et al. Compo2nents of the Arabidopsis 2repeat/ dehydration2responsive element bind2ing factor cold2response pathway are conserved in. Brassica napus and other plant species[J]. Plant Physiol, 2001, 127: 910- 917.

[25] Thomashow M F. So what's new in the field of plant colda2climation Lots[J]. Plant Physiol, 2001, 125: 89- 93.

[26] 李 晶, 朱延明, 李 杰. 转录因子 DREB1A 基因的克隆与植物表达载体的构建[J]. 植物研究, 2004, 24(2): 211- 214.