

大白菜 DREB 类转录因子 cDNA 的克隆及植物表达载体的构建

李 妍, 申书兴, 轩淑欣, 李晓峰, 王彦华

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要:以干旱处理的大白菜自交系 85-1 为材料, 利用 RT-PCR 技术获得了大白菜 DREB 类转录因子基因的 cDNA 编码序列, 命名为 *BcDREB1* (GenBank 登录号为: EU924266)。序列分析表明, *BcDREB1* 核苷酸序列长 663 bp, 编码 214 个氨基酸, 含有一个典型的 AP2 结构域, 具有 DREB 转录因子的典型特征。将该基因的 cDNA 编码序列连接到植物表达载体 pCambia2301 中, 成功构建了大白菜 *BcDREB1* 基因的植物表达载体 pCAM-BcDREB1, 为进一步通过转基因技术研究该基因的功能奠定了基础。

关键词:大白菜; DREB 转录因子; 基因克隆; 植物表达载体

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)01-0069-05

Cloning the cDNA of DREB-like Transcription Factor from Chinese Cabbage and Construction of Plant Expression Vector

LI Yan, SHEN Shu-xing, XUAN Shu-xin, LI Xiao-feng, WANG Yan-hua

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The cDNA of DREB transcription factor named *BcDREB1* (GenBank accession number EU924266) was obtained from Chinese cabbage inbred line 85-1 under the drought stress by RT-PCR method. The sequence analysis indicated that the clone was consisted of 663 nucleotides (nt), coding 214 amino acids. The deduced primary structure of *BcDREB1* contained a single AP2 domain and showed the typical characteristics of DREB gene family. A plant expression vector of the *BcDREB1* gene was constructed and named pCAM-BcDREB1, in which the CDS sequence of *BcDREB1* was controlled by the CaMV 35S promoter. This work laid the foundations for future transgenic research on *BcDREB1* gene function.

Key words: Chinese cabbage; DREB transcription factor; Gene cloning; Plant expression vector

DREB (Dehydration responsive element binding) 类转录因子能够特异地与 DRE (脱水应答) 元件结合, 参与调控植物抵抗干旱、低温和高盐等逆境的信息途径, 在植物对逆境胁迫的抗性方面具有重要功能^[1,2]。Liu 等^[3]通过酵母单杂交技术, 从拟南芥中克隆了 3 个受低温诱导表达的转录因子, 定名为 *DREB1A*、*DREB1B* 和 *DREB1C*; 同时, 克隆了 2 个在干旱、高盐胁迫下诱导表达的转录因子, 定名为 *DREB2A* 和 *DREB2B*。后来发现与 Stockinger 等^[4]分离到的 CBF (C-repeat/DRE-binding factor) 家族有对应关系, *DREB1A* 即是 *CBF3*, *DREB1B* 和 *DREB1C* 分别为 *CBF1* 和 *CBF2*。Haake 等^[5]从拟南芥中克隆到一

个 *CBF4*, 而 *CBF4* 是与 *CBF/DREB1* 很相似的同源物。以后相继在甘蓝型油菜^[6]、小麦^[7]、水稻^[8]、大豆^[9]、烟草^[10]、甜瓜^[11]、棉花^[12]、甘薯^[13]、芥菜^[14]等作物中克隆了几十个 CBF/DREB 转录因子基因, 这些编码 CBF/DREB 转录因子的基因分别受低温、干旱或盐的诱导。

由于植物的抗逆性属于复杂的数量性状, 用单一的功能基因转化植物其效果往往有限。而一个 DREB 转录因子可以调控多个与植物抗逆相关功能基因的表达, 因此利用 DREB 转录因子来改良植物抗逆性能获得更为理想的效果^[15]。迄今已获得了多种转不同来源 DREB 基因的转基因植物, 明显提

收稿日期: 2008-10-13

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2006000416); 河北农业大学博士启动基金

作者简介: 李 妍 (1983-), 女, 天津人, 硕士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术方面的研究。

通讯作者: 王彦华 (1970-), 女, 河北易县人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术方面的研究。

高了植物的抗逆性。例如,转拟南芥 *DREB1A* 和 *DREB2A* 基因的拟南芥和水稻^[3,16,17]、转拟南芥 *DREB1A*、*DREB1B* 和 *DREB1C* 基因的油菜^[18]、转水稻 *OsDREB1A* 基因^[8]和玉米 *ZmDREB1A* 基因^[19]的拟南芥、转拟南芥 *DREB1A* 基因的小麦^[20]、转大豆 *GmDREB* 基因的烟草^[21]、以及转拟南芥 *DREB1A/CBF3* 基因的高羊茅^[22]等,这些转基因植株分别表现出对低温、干旱或高盐的较高抗性。

大白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 是我国北方重要的蔬菜作物,近年来随着北方环境的日益干旱及土壤盐渍化的日益加剧,如何提高植物的抗逆性成为现代农业生物技术迫切需要解决的重大课题。现代分子生物学技术的发展,使利用基因工程手段辅助植物抗逆育种成为可能。本研究以干旱处理的大白菜为试验材料,通过 RT-PCR 技术,获得了大白菜 *DREB* 基因 cDNA 序列,对其进行序列测定和分析,并将此基因构建到植物表达载体上,为提高植物的抗逆性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料 本试验所用材料为大白菜自交系 85-1,由河北农业大学白菜育种组提供。基因克隆所用大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株为 DH5,由本实验室保存。改造过的质粒载体 pCambia2301 (插入 CaMV35S 和 nos) 由南京农业大学惠赠。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、*T₄* DNA Ligase、AMV 反转录试剂盒、pMD19-T vector 等均购自 TaKaRa 公司。Trizol RNA 提取液、UNI-Q-10 柱式质粒抽提试剂盒等购自上海生工生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 将大白菜的种子进行表面消毒后,播种于穴盘中,待长出 2~3 片真叶时,用 20% 的 PEG-6000 处理 12 h 后取下叶片, -70℃ 保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 参照已发表的甘蓝型油菜 *DREB* 转录因子基因序列设计引物,上下游引物分别有 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点(下划线部分),并添加了 3 个保护碱基。上游引物 DR-F 序列为: 5'-GTAGGATCCATGACCTCATTTCTACCTTC-3',下游引物 DR-R 序列为: 5'-GCTTCTAGATTAATAACTC-CAAAGGGACAG-3',引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 目的基因的扩增与克隆 以反转录产物 cDNA 为模板,DR-F 和 DR-R 为引物,进行 PCR 扩

增。PCR 反应按标准体系进行,PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳分离后回收纯化,回收片段连接到 pMD19-T vector,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 中,在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,PCR 鉴定出的阳性克隆送上海生工生物工程公司进行测序。

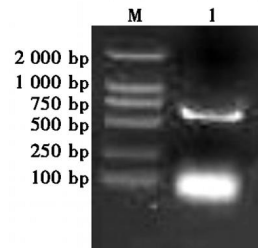
1.2.4 序列分析 开放阅读框 (ORF) 分析在 NCBI 站点上用 ORF finder 进行;相似性比较在 NCBI 站点上用 BLAST 完成;利用 SMART 进行推导蛋白的结构域分析;用 clustal X 软件进行系统树分析。

1.2.5 植物表达载体的构建 采用 UNI-Q-10 柱式质粒抽提试剂盒提取重组质粒 DNA。将已测序鉴定的重组质粒及植物表达载体 pCambia2301 分别经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切回收目的片段和 pCambia2301,用 *T₄* DNA Ligase 进行连接,连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 中,在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选。挑取阳性菌落进行培养,提取质粒,采用双酶切和 PCR 扩增法进行鉴定,阳性质粒命名为 pCAMBcDREB1。

2 结果与分析

2.1 大白菜 *DREB* 基因的克隆及序列分析

以大白菜 cDNA 为模板,用所设计的特异引物扩增出约 660 bp 的条带(图 1),将 PCR 产物回收并进行连接转化。随机挑取 5 个白色菌落进行 PCR 扩增,大部分均扩增出一条 660 bp 左右的条带(图 2)。阳性克隆的测序结果表明,该片段长 663 bp。利用 NCBI 站点的 ORF finder 进行分析发现,该片段包含一个完整的编码序列 (10~651),编码 214 个氨基酸,命名为 *BcDREB1* (GenBank 登录号为: EU924266)。



M. 分子量标准 DL-2000; 1. *BcDREB1* 基因的片段。

M. Marker DL-2000; 1. Fragment of *BcDREB1* gene.

图 1 *BcDREB1* 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of *BcDREB1* gene

BLAST 分析结果表明,该序列与甘蓝型油菜 *DREB2-2* 基因氨基酸序列的同源性分别为 99%;与芥菜 *DREB1B* 基因和烟草 *DREB1* 基因的同源性分

别为 92 %和 91 %;与拟南芥 *DREB1B*、*DREB1C* 和 *DREB1A* 基因的同源性分别为 79 % ,76 %和 75 %。

应用 clustal X 软件将该基因编码的氨基酸序列及与不同植物 *DREB* 基因氨基酸序列进行了系统树分析 ,结果表明 ,大白菜 *BcDREB1* 与甘蓝型油菜 *BnDREB2-2*、烟草的 *NtDREB1* 和芥菜的 *BjDREB1B* 最先聚在一起 ,与拟南芥的 *AtDREB1A*、*AtDREB1B* 和 *AtDREB1C* 的距离较近 ,说明大白菜 *BcDREB1* 与拟南芥的 *DREB1* 蛋白的亲缘关系较近。而与水稻的 *OsDREB1A* 和玉米的 *maDREB1A*、*ZmDREB2A*、大豆的 *GmDREB* 及拟南芥的 *AtDREB2A* 和 *AtDREB2B* 蛋白

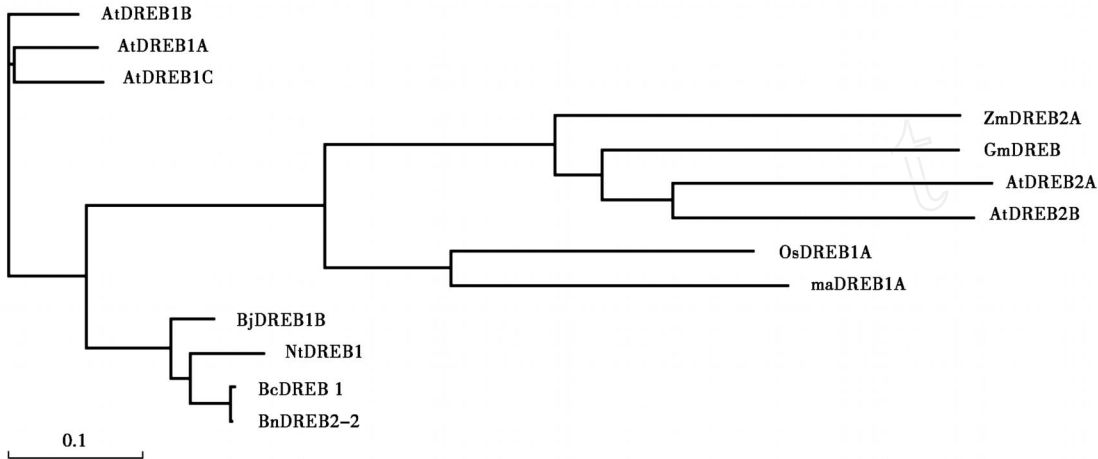


图 3 不同植物 DREB 基因氨基酸序列的系统树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of *BcDREB1* in defferent plants

2.2 大白菜 *BcDREB1* 基因的结构域分析

利用 SMART 进行蛋白结构分析发现 ,*BcDREB1* 基因推导的蛋白第 49 ~ 112 位氨基酸为一个典型 AP2 结构 ,因此具有 AP2/ DREB 类转录因子的基本结构特征 (图 4)。

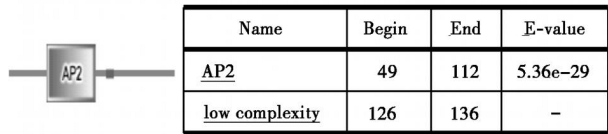


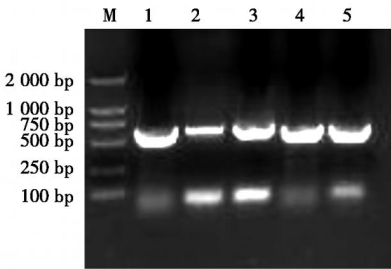
图 4 大白菜 *BcDREB1* 基因氨基酸序列的结构域

Fig. 4 The domain of deduced amino acid sequence of *BcDREB1* in Chinese cabbage

2.3 大白菜 *BcDREB1* 基因植物表达载体的构建与鉴定

用 *Bam*H I和 *Xba* I 分别酶切带有目的基因的 pMD-19T vector 质粒和载体 pCAMBIA2301 ,回收片段用 *T*₄ DNA Ligase 连接 ,构建成重组质粒 pCAM-*BcDREB1*。首先利用目的片段引物对该重组质粒进行了 PCR 扩增验证 ,得到一条长约 660 bp 片段 (图 5) ;然后 ,用 *Bam*H I和 *Xba* I 双酶切重组载体 pCAM-*BcDREB1* ,得到长约 15 000 bp 的 pCAMBIA2301 载体片段和长约 660 bp 的目的片段 (图 6)。说明该植物

的亲缘关系较远 (图 3)。

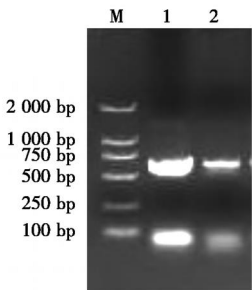


M. 分子量标记 DL-2000 ;1 ~ 5. 阳性克隆。
M. Maker DL-2000 ;1 - 5. Positive clone.

图 2 重组质粒阳性克隆菌液 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of recombinant plasmid

表达载体构建正确。



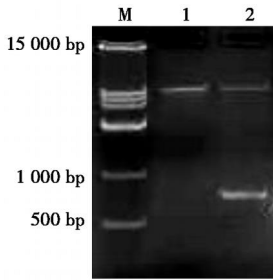
M. 分子量标记 DL-2000 ;
1 ,2. 以 pCAM-*BcDREB1* 为模板的 PCR 产物。
M. Maker DL-2000 ;1 ,2. Product of PCR with template pCAM-*BcDREB1*.

图 5 重组质粒 pCAM- *BcDREB1* 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Detection of recombinant plasmid pCAM- *BcDREB1* by PCR

3 讨论

研究表明 ,已克隆的 *DREB* 转录因子二级结构均具有典型的转录调控因子结构的特点 ,即 :N-末端富含碱性氨基酸 ,属于核定位信号区 ;C-末端富含酸性氨基酸 ,功能是作为转录激活区 ;中间由 60 个氨基酸残基组成的 AP2 结构域 ,可形成 3 个 α -折叠和 1 个 α -螺旋结构 ,其中位于第 2 个 α -折叠中的第 14



M. 分子量标记;1.pCAMBIA2301 载体;2.pCAM-BcDREB1 的双酶切。
M. Maker;1.pCAMBIA2301 vector;2.pCAM-BcDREB1
digested with double-enzymatic.

图6 植物表达载体 pCAM-BcDREB1 的双酶切鉴定

Fig.6 Detection of the expression vector
by double-enzymatic digestion

位的缬氨酸(V)和第19位的谷氨酸(E),特别是第14位的缬氨酸(V),对决定 DREB 转录因子与 DRE 顺式作用元件的特异性结合起关键作用^[23]。本试验通过 RT-PCR 技术,获得了大白菜 *DREB* 基因 cDNA 编码序列,利用生物信息学对大白菜 *BcDREB1* 基因推导的氨基酸序列进行的结构域分析结果表明,在其 AP2 保守区的第14位和第19位的氨基酸分别为缬氨酸(V)和谷氨酸(E),具有 DREB 转录因子家族的典型特征。但是该基因是否具有转录激活活性还有待于进一步的功能验证。

目前已克隆的 *DREB* 转录因子基因几乎均受低温、干旱或高盐的诱导,但是也有例外,如甜椒的 *DREB1* 和大豆的 *GmDREBc* 均受干旱和高盐诱导,却不受低温诱导;而黑麦草的 *LpCBF3* 只受低温诱导,却不受干旱和高盐诱导^[24]。本试验以干旱处理的大白菜为材料,获得了大白菜 *BcDREB1* 基因的 cDNA 编码序列,说明该基因受干旱诱导,但其特异表达模式尚需进一步验证。该基因是否受其他逆境如盐分、低温的诱导,还有待于进一步研究。

为进一步研究大白菜 *BcDREB1* 基因的功能及作用方式,本试验成功构建了该基因的植物表达载体 pCAM-BcDREB1,目前该基因的转化工作正在进行。

参考文献:

[1] Guo Z J, Chen X J, Wu X L, et al. Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 607 - 618.
[2] Tang W, Charles T M, Newton R J. Overexpression of the pepper transcription factor CaPFI in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59: 603 - 617.

[3] 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[J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391 - 1406.
[4] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M E, et al. *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[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 1035 - 1040.
[5] Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 639 - 648.
[6] Gao M J, Allard G, Byass L, et al. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from Brassica napus[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49: 459 - 471.
[7] Shen Y G, Zhang W K, He S J, et al. An EREBP/AP2-type protein in Triticum aestivum was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 923 - 930.
[8] Dubouzet J G, 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[J]. The Plant Journal, 2003, 33: 751 - 763.
[9] Li X P, Tian A G, Luo G Z, et al. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 1355 - 1362.
[10] 刘卫群,王永亮,赵同金,等.烟草 DREB-like 转录因子的克隆与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14: 376 - 380.
[11] Shinji M, Yosuke H, Masatoshi S. Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*) [J]. Plant Science, 2006, 170: 1156 - 1163.
[12] Huang B, Jin L, Liu J. Molecular cloning and functional characterization of a DREB/CBF-like gene (*GhDREB1L*) from cotton[J]. Science in China (Series C, Life sciences), 2007, 50: 7 - 14.
[13] Kim Y H, Yang K S, Ryu S H, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding DRE-binding transcription factor from dehydration-treated fibrous roots of sweetpotato [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46: 196 - 204.
[14] Cong L, Chai T Y, Zhang Y X. Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from Brassica juncea L [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 371: 702 - 706.
[15] 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[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11 - 16.
- [16] Kasuga M, Liu Q, Miura S, *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nature Biotech*, 1999, 17: 287 - 291.
- [17] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, *et al.* Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 1292 - 1309.
- [18] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, *et al.* Components of the *Arabidopsis* C-repeat/Dehydration-responsive-element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 910 - 917.
- [19] Qin F, Sakuma Y, Li J, *et al.* Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45: 1042 - 1052.
- [20] Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, *et al.* Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions[J]. *Genome*, 2004, 47: 493 - 500.
- [21] Chen M, Wang Q Y, Cheng X G, *et al.* GmDREB2, a soybean DRE binding transcription factor, conferred drought and high salt tolerance in transgenic plants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 353: 299 - 305.
- [22] Zhao J S, Ren W, Zhi D Y, *et al.* *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26: 1521 - 1528.
- [23] 王平荣, 邓晓建, 高晓玲, 等. DREB 转录因子研究进展[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 369 - 374.
- [24] 徐 莎, 胡 军, 陈宇红, 等. DREB 转录因子研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(4): 706 - 713.