

文章编号 :1000-582X(2007)10-0134-04

拟南芥转录因子 CBF1 基因杂交狼尾草的转化

王凭青 李志中 晁跃辉 鲁 浪 张宝云

(重庆大学 生物工程学院 重庆 400030)

摘 要 :CBF1 转录激活因子是一类存在于拟南芥中受低温诱导的反式作用因子 ,能有效提高植物抗低温、抗干旱的能力。因此以拟南芥叶片为材料 ,通过 PCR 方法成功地克隆 CBF1 转录因子基因 ,并将其连接到植物表达载体 pBI121 上 ,通过农杆菌介导法转化杂交狼尾草叶片 ,成功获得转基因再生植株。

关键词 :CBF1 基因 ;抗性 ;转化 ;杂交狼尾草
中图分类号 :Q943.2

文献标志码 :A

低温是限制植物地理分布及生物产量的重要因素 ,也是危害农业生产的主要自然灾害之一 ;干旱则是限制牧草生长的最重要因素。近年来 ,随着植物生理、细胞和分子生物学理论及方法的日益完善 ,植物冷驯化和抗寒、抗旱分子机理的研究取得了显著进展。

拟南芥抗冻转录激活因子基因 CBF 家族在近几年被深入研究 ,很多研究证明 ,它能明显地提高植物的脯氨酸含量和耐低温能力^[1-3]。CBF 基因家族包括 CBF1、CBF2、CBF3 和 CBF4 4 个基因^[4-6]。

Stockinger 等在研究拟南芥低温驯化期间如何调节 COR(cold regulated)基因表达的分子机理时 ,分离鉴定了一种编码转录因子的 cDNA ,这种转录因子含有 AP2/EREBP 的 DNA 结合域 ,能识别 COR 基因中的 CRT/DRE 元件并与之结合 ,故命名为 CBF1(CRT/DRE binding factor 1) ,即 CRT/DRE 结合因子^[5]。随后 ,CBF1 转录激活因子受到广泛而深入的研究 ,经实验证明该因子能特异地与 CRT/DRE (C-repeat dehydration-responsive element)DNA 调控元件结合 ,激活启动子中具有这一调控元件的冷诱导和(或)脱水诱导基因的表达 ,从而引起植物体内的多种生理生化变化 ,并产生一定的抗寒和抗旱能力。

自发现 CBF1 基因以来 ,国内外研究机构已有很

多关于利用导入该转录因子来提高植物的抗性成功的报道。现在 ,CBF1 基因已在水稻、小麦、胡杨等植物中成功表达^[7-9] ,但在牧草植物上的应用还有待探讨。因此 ,以拟南芥叶片为材料 ,通过 PCR 方法对其 cDNA 扩增 ,成功地克隆了 CBF1 转录因子基因 ,并将其插入到植物表达载体 pBI121 上 ,构建了超表达 CBF1 基因的表达载体 pBI-CBF ,再通过农杆菌介导法转化杂交狼尾草的叶片 ,获得转化植株 ,为下一步改良牧草植物抗性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料拟南芥(*Arabidopsis*)为哥伦比亚野生型。

杂交狼尾草来源于重庆大学生物工程学院在重庆地区选育的品种。

大肠杆菌 DH5 α 菌株(博大泰克公司)。

农杆菌 LBA4404 菌株由北京市农林科学院生物中心李瑞芬博士提供。

克隆载体 pEGM-T Easy 购自 Promega 公司。

真核表达载体 PBI121 由中国农业大学陈叶苗博士提供。

收稿日期 2007-06-07

基金项目 重庆市科技攻关资助项目(CSTC 2005AC1021)

作者简介 王凭青(1962-)男 ,重庆大学博士 ,教授 ,主要从事生物医学工程 ,农业生物工程研究 (Tel)023-65112753 ;
(E-mail)wang_pq@21cn.com。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据拟南芥 CBF1 基因序列设计一对引物, 其序列分别为:

上游引物 (cbfF1) 5'-GC TCTAGA GTACTCTGAT-CAATGAACTC-3';

下游引物 (cbfR1) 5'-CGGATCCCTATCGAATATT-AGTAACTCC-3'.

阴影部分分别为限制性内切酶 Xba I 和 BamH I 酶切位点。

1.2.2 表达载体的构建

1) 以拟南芥低温胁迫 cDNA 为模板, 用引物 F1 和 R1 进行扩增, 回收 PCR 产物, 连接 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 DH5, 阳性克隆鉴定, 摇菌, 提取质粒, 该质粒命名为 pMDCBF。

2) 酶切质粒 pMDCBF 和表达载体 PBI121。酶切的反应体系为: pM 8 μ L, XbaI 1 μ L, BamHI 1 μ L, 10xBuffer K 2 μ L, ddH₂O 8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 6 h, 回收目的片段。

3) 将酶切的目的基因片段和载体片段进行连接, 连接的反应体系为: PBI121 3 μ L, CBF1 9 μ L, 10xBuffer 2 μ L, ligase 1 μ L, ddH₂O 5 μ L, 16 $^{\circ}$ C 保温 16 h, 连接产物在 -20 $^{\circ}$ C 保存或用于转化。

1.2.3 农杆菌感受态的制备

1) 挑取根癌农杆菌单菌落于 3 mL 的含利福平 50 μ g/mL 的 YEB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

2) 取过夜培养菌液 500 μ L 接种于 50 mL YEB (含相应抗生素) 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD600 为 0.5。

3) 5 000 r/min, 离心 5 min。

4) 加 10 mL 0.15 mmol/L NaCl 悬浮农杆菌细胞, 5 000 r/min, 离心 5 min。

5) 1 mL 预冷的 20 mmol/L CaCl₂ 悬浮细胞, 冰浴, 24 h 内使用, 或分装成每管 200 μ L, 液氮中速冻 1 min, 置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 农杆菌转化及鉴定

1) 取 200 μ L 感受态细胞, 加入 1 μ g 构建好的质粒 DNA, 液氮中速冻 1 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 然后加入 1 mL YEB 培养基, 28 $^{\circ}$ C 慢速振荡培养 4 h。

2) 1 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 加入 0.1 mL YEB 培养基重新悬浮细胞, 涂布于含有 100 μ g/mL 卡那和 50 μ g/mL 利福平的 YEB 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养约 48 h。挑取平板上长出的单菌落, 接种于 YEB 液体培养液 (含有 100 μ g/mL Kna 和 50 μ g/mL Rif) 中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

3) 少量提取质粒 DNA, 以质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增鉴定。阳性质粒命名为 PBICBF, 并将其测序。

1.2.5 杂交狼尾草的转化

1) 将含有植物表达载体的 LBA4404 农杆菌接种于 YEB 液体培养液 (含有 100 μ g/mL Kan 和 50 μ g/mL Rif) 中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD600 为 0.6 ~ 0.8。

2) 1 000 r/min, 室温离心 10 min, 用 MS 盐溶液 (pH7.0) 重新悬浮菌体, 使用时采用 MS 盐溶液稀释至原体积的 20 ~ 50 倍。

3) 无菌的杂交狼尾草嫩叶以横向切成 2 mm 宽的小条。

4) 切好的外植体在农杆菌菌液中浸泡 10 min。

5) 用无菌滤纸吸干植物材料表面的菌液, 转入上铺一层滤纸的 MS 基本培养基, 28 $^{\circ}$ C 暗培养。

6) 3 d 后, 将材料转到含有抗生素的分化培养基中进行培养。

7) 抗性芽生长至 2 ~ 3 cm 高时转入生根培养基中诱导生根。

1.2.6 杂交狼尾草基因组 DNA 的少量提取 (CTAB 法)

1) 取 3 片小叶, 放入液氮致冷、研磨。

2) 加入 65 $^{\circ}$ C 的 2 \times CTAB (2% CTAB, 2 mol/L Tris, HCl, 0.5 mol/L EDTA, 5 mol/L NaCl) 提取液 900 μ L。

3) 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 ~ 20 min。

4) 冷却后加入 500 μ L 氯仿, 异戊醇 (24 : 1), 6 000 ~ 8 000 r/min 下离心 10 min。

5) 取上清液, 重复 4) 步。

6) 取上清液, 加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠和等体积的异丙醇, 摇匀至出现絮状沉淀。

7) 12 000 r/min 下离心 5 min, 倒掉上清液。

8) 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 干燥后溶于适量 TE 或水中。

9) 取少许 DNA, 琼脂糖凝胶上检查其质量并进行 DNA 量的标定, 其余 DNA 样品保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.7 转基因植株的 PCR 检测

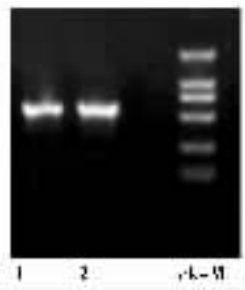
用 CBF 基因引物 (cbfF 和 cbfR) 对转基因再生植株进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出了 CBF1 转录因子基因片段。

2 结果与分析

2.1 CBF1 基因的克隆及序列分析

自拟南芥低温胁迫的 cDNA 中扩增出 1 个 664bp 的片段 (图 1), 对该基因进行序列测定, 将该序列与 GenBank 登录的基因序列进行 DANMAN 序列比较分

析。结果显示:同源性可达100%,说明成功克隆出CBF1基因。



ck 阴性对照;1 2: 基因片段;M:Marker DL2000
图1 CBF1基因的PCR扩增

2.2 表达载体的构建

表达载体的构建关键在于将CBF1基因的完整阅读框正确地插入到表达载体PBI121相应位点,整个载体构建的过程如图2。

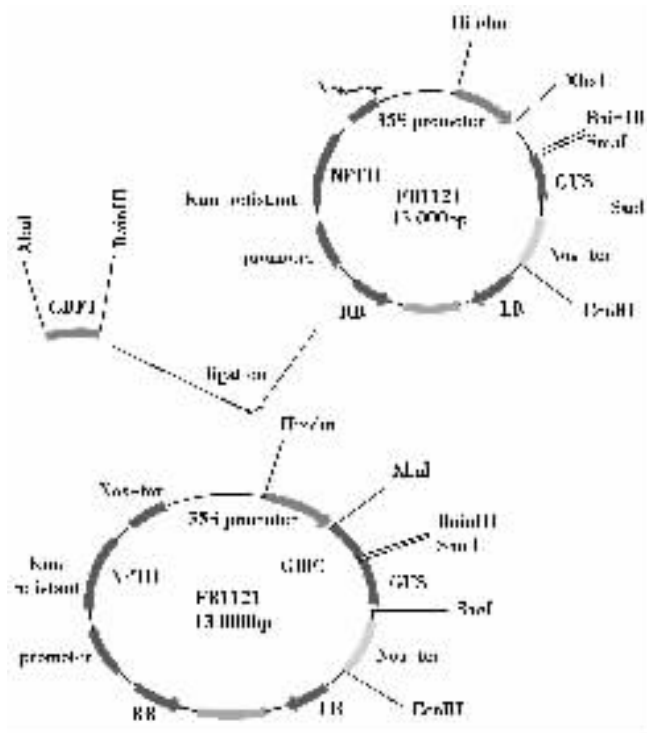


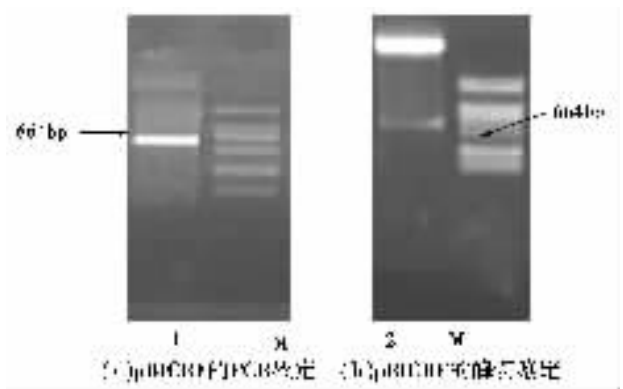
图2 CBF1基因表达载体的构建流程

2.3 重组载体的鉴定

筛选出阳性克隆后,提取质粒DNA,进行PCR及酶切鉴定,均可以得到目的条带(如图3),进一步测序证明整个阅读框没有发生移码突变。说明载体构建成功。

2.4 再生植株的获得

用农杆菌浸染的杂交狼尾草叶转至培养基(SH + K₂SO₄ 4.35 g/L + proline 288 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.2 mg/L + 100 mg/L Kan + 50 mg/L Amp)进行黑暗培养,约两周以后即可看到愈伤组织产生,抗性愈伤

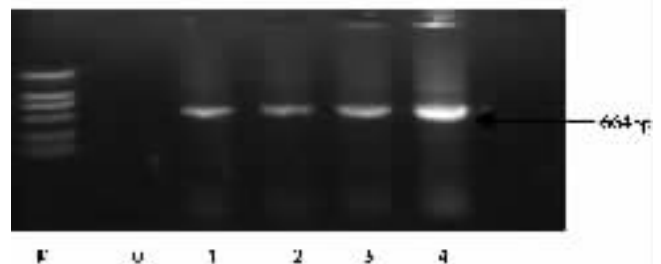


1 PCR扩增pBICBF 2 双酶切pBINHX M DNA分子量标准
图3 重组表达载体pBICBF的鉴定

组织经胚状体直接分化出抗性芽。抗性芽生长至2~3 cm时,转到生根培养基(MS + 100 mg/L Kan + 50 mg/L Amp)中诱导生根,约两周后即可生出细嫩小根,逐渐成苗。

2.5 转基因植株的PCR检测

以再生杂交狼尾草基因组DNA为模板,用引物cbfF和cbfR进行PCR检测,扩增CBF1基因片段。发现所选的植株的DNA中都能扩出目的条带(如图4),从而初步确定它们为转基因阳性植株。



0 阴性对照 1 2 3 转化植株 4 阳性对照 M DNA分子量标准
图4 转基因杂交狼尾草植株的PCR鉴定

3 结语

低温和干旱是限制和危害中国农林生产的重要因素,而拟南芥抗冻转录激活因子基因CBF家族在近几年研究中被证明能明显地提高植物的脯氨酸含量和耐低温能力,并且已在小麦、水稻等农作物中得到成功的应用。笔者构建了CBF1转录激活因子基因的超表达载体,并通过农杆菌介导法将其导入了杂交狼尾草,经PCR检测显示目的基因已经整合到再生植株的基因组中,并成功获得了转基因再生植株。目前,关于CBF1转录激活因子是否在再生植株中具有功能效应的深入研究正在进行之中。

参考文献:

[1] GILMOUR S J, ZARKA D G, STOCKINGER E J, et al.

- Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J* ,1998 ,16 :433.
- [2] JAGLO-OTTOSEN K R , GILMOUR S J , ZARKA D G , et al. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance [J]. *Science* ,1998 ,280 (5360) :104-106.
- [3] MEDINA J , BARGUES M , TEROL J , et al. 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 [J]. *Plant Physiol* ,1999 ,119 :463.
- [4] SHINWARI Z K , NAKASHIMA K , MIURA S , et al. An arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,1998 ,250(1) :161-170.
- [5] STOKINGER E J , GILMOUR S J , THOMAS M F. 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]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,94(3) :1035-1040.
- [6] HAAKE V , COOK D , RIECHMANN J L , et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol* ,2002 ,130(2) :639-648.
- [7] LEE S C , HUH K W , AN K , et al. Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor , CBF1/DREB1b , in transgenic rice [J]. *Mol Cells* ,2004 ,18(1) :107-114.
- [8] BADAWI M , DANYLUK J , BOUCHO B , et al. The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs [J]. *Mol Genet Genomics* ,2007 ,277(5) :533-554.
- [9] BENEDICT C , SKINNER J S , MENG R , et al. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway , regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp [J]. *Plant Cell Environ* ,2006 ,29(7) :1259-1272.

Transformation of Transcription Activator CBF1 Gene of Arabidopsis into Hybrid Pennisetum

WANG Ping-qing , LI Zhi-zhong , CAO Yue-hui , LU Lang , ZHANG Bao-yun

(College of Bioengineering , Chongqing University , Chongqing 400030 , China)

Abstract : Transcription activator CBF1 is a trans-activating factor in Arabidopsis , which can be induced by low temperature. The CBF1 gene is cloned , which is derived from Arabidopsis with PCR. Then CBF1 cDNA and plant expression vector pBI121 are conjugated to construct the recombinant plasmid pBI121-CBF1. With Agrobacterium-mediated transgene technique , the authors successfully introduce the Arabidopsis transcriptional factor gene CBF1 into hybrid Pennisetum , and reproduce the transgenic hybrid Pennisetum.

Key words : CBF1 gene ; tolerance ; transform hybrid Pennisetum

(编辑 张 苹)