

文章编号: 1000-5692(2004)03-0243-04

诱导型启动子 *Rd29A* 引导的植物表达载体的构建

卓仁英¹, 孙宗修²

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 中国水稻研究所
国家水稻生物学重点实验室, 浙江 杭州 310006)

摘要: 全球 20% 的耕地和近半数的灌溉土地都受到不同程度的盐害威胁, 抗盐育种具有重要意义。针对常规育种周期长等明显的局限性, 利用抗盐转基因可以迅速获得抗盐材料, 明显缩短育种周期。利用 PCR 技术克隆获得 *Rd29A* 这一干旱、盐碱等逆境诱导表达的特异性启动子, 与叶绿体转运肽和甜菜碱醛脱氢酶基因构建 pBinRdMCS 重组质粒, 用于林木转化。通过克隆 *Rd29A* 启动子构建逆境诱导的高效表达载体, 可对林木抗盐转基因育种提供理论指导。图 5 参 8

关键词: 林木; 抗盐; *Rd29A* 启动子; *BADH*

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A

土壤盐渍化对农林业的影响是一个全球性的问题。全球 20% 的耕地和近半数的灌溉土地都受到不同程度的盐害威胁, 所以植物对盐胁迫的应答机制、植物耐盐性的提高、盐渍土的治理和开发以及培育抗盐品种一直是抗性育种研究的热点^[1]。采用传统的方法选育耐盐碱的植物品种固然简便可行, 但进展缓慢。而利用转基因技术可以明显缩短育种周期^[2]。林木转基因研究始于 20 世纪 80 年代。自从 1986 年 Parson 等成功进行杨树 *Populus* 遗传转化, 并使外源基因在林木细胞内得以表达以来, 林木转基因研究已经取得了很大进展。1987 年 Fillatti 等^[3] 利用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 将 NPT II 基因导入杨树, 这是以树木为受体首次进行转化并获得的转基因植株。林木基因工程中所使用的启动子基本为 *CaMV* 35S 启动子, 它是一种组成型启动子, 在植物体不同发育阶段、不同部位表达, 这样浪费了大量光合产物, 而且会导致畸形和不育。*Rd29A* 启动子是一个干旱、盐碱、低温诱导表达的启动子, 仅在胁迫诱导下表达^[4]。因此本文通过克隆 *Rd29A* 启动子, 并构建含叶绿体转运肽和 *BADH* 基因的载体, 为林木转基因奠定基础。该基因已在 GENE BANK 上注册, 登录号为 AY577523。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株为 DH5a。根癌农杆菌菌株为 EAH105。含 *BADH* 基因的质粒 pBin438 由中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室提供。pPspTSS2-1 质粒含叶绿体转运肽序列由台湾中央研究院分子生物学研究所胡秀敏博士赠送。pBI101 质粒为中国水稻研究所国家水稻生物学重点实验室保存。pMD18-T 载体, Hind III, Pst I, BamH I, T4 DNA 连接酶均购自 Takara 公司。

收稿日期: 2003-10-20; 修回日期: 2004-05-17

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目(ZA0204)

作者简介: 卓仁英(1969-), 男, 福建莆田人, 博士后, 从事林业生物技术研究。E-mail: zrying@263.net

1.2 实验方法

1.2.1 Rd29A 启动子基因的克隆 根据GeneBank上公布的Rd29A启动子序列设计PCR引物,并在引物两侧引入Hind III酶切位点, P1: 5'-CTGCAAGAATCTCAAACACG-3'. P2: 5'-TCCAATAGAAGTAATCAAACC-3'. PCR扩增反应体系: 拟南芥Arabidopsis thaliana基因组DNA (50 g°L⁻¹) 3.0 μL, 反应缓冲液4.0 μL, Mg²⁺ 2.5 μL, dNTP 2.5 μL, 引物各3.0 μL, 最后加重蒸水至25.0 μL. PRC扩增反应程序: 在PE9600型PCR基因扩增仪中, 先进行95 °C预变性5 min, 然后94 °C变性30 s, 48 °C退火40 s, 72 °C延伸90 s, 30个循环, 最后72 °C反应10 min. 取10 μL PCR扩增产物在8 g°kg⁻¹琼脂糖凝胶上电泳分析, 恒压100 V, 至指示剂电泳到凝胶前沿停止. EB染色30 min, 紫外灯下观察, 拍照, 并利用Takara公司的PCR产物回收试剂盒进行回收.

1.2.2 连接反应 将T载体分别与回收的Rd29A基因的PCR产物按下列比例混合: 取1 μL的T载体, 1 μL PCR回收产物, 3 μL 无菌水, 然后加入5 μL (等体积) 连接溶液I, 16 °C反应12 h, 将所有连接产物全部用于转化. 将10 μL连接产物加入装有200 μL感受态大肠杆菌的Eppendorf管中, 冰

```

Rd29A                                     AATTTCTGCAAGAATCTCAAACAC
                                           |||
Rd29A promoter.....CTGCAAGAATCTCAAACAC
GGAGATCTCAAAGTTTGAAAGAAAATTTATTTCTCGACTCAAAACAAACTTACGAAAT
|||
GGAGATCTCAAAGTTTGAAAGAAAATTTATTTCTCGACTCAAAACAAACTTACGAAAT
TAGGTAGAACTTATATACATTATAT.TGTAATTTTTTGTAACAAAATGTTTTATATTA
|||
TAGGTAGAACTTATATACATTATATGTGTAATTTTTTGTAACAAAATGTTTTATATTA
TTATAGAATTTTACTGGTTAAATTAATAATGAATAGAAAAGGTGAATTAAGAGGAGAGAG
|||
TTATAGAATTTTACTGGTTAAATTAATAATGAATAGAAAAGGTGAATTAAGAGGAGAGAG
GAGGTAACATTTTCTTCTATTTTTCATATTTTCAGGATAAATTATGTAAAAGTTTAC
|||
GAGGTAACATTTTCTTCTATTTTTCATATTTTCAGGATAAATTATGTAGAAGTTTAA
AAGATTTCCATTTGACTA.GTGTAAATGAGGAATATCTCTAGTAAGATCATTATTCAT
|||
AAGATTTCCATTTGACTAAGTGTAATGAGGAATATCTCTAGTAAGATCATTATTCAT
CTACTTCTTTTATCTTCTACCAGTAGAGGAATAAACAATATTTAGCTCCTTTGTAATAC
|||
CTACTTCTTTTATCTTCTACCAGTAGAGGAATAAACAATATTTAGCTCCTTTGTAATAC
AAATTAATTTTCTTCTTGACATCATTCAATTTTAATTTACGTATAAAAATAAAGATCA
|||
AAATTAATTTTCGTTCTTGACATCATTCAATTTTAATTTACGTATAAAAATAAAGATCA
TACCTATTAGAACGATTAAGGAGAAATACAATTCGAATGAGAAGGATGTGCCGTTTGTTA
|||
TACCTATTAGAACGATTAAGGAGAAATACAATTCGAATGAGAAGGATGTGCCGTTTGTTA
TAATAAAGCAGCCACGACGTAACGTAATAATGACCACATGATGGGCCAATAGACATGGA
|||
TAATAAAGCAGCCACGACGTAACGTAATAATGACCACATGATGGGCCAATAGACATGGA
CCGACTACTAATAATAGTAAGTTACATTTTAGGATGGAATAAATATCATACCGACATCAG
|||
CCGACTACTAATAATAGTAAGTTACATTTTAGGATGGAATAAATATCATACCGACATCAG
TTTTGAAAGAAAAGGGAAAAAAGAAAAAATAAATAAAGATATAC TACCGACATGAGTT
|||
TTTTGAAAGAAAAGGGAAAAAAGAAAAAATAAATAAAGATATAC TACCGACATGAGTT
CCAAAAGCAAAAAAAGATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGAGCAAAATGACTTT
|||
CCAAAAGCAAAAAAAGATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGAGCAAAA.GACTTT
GACGTCACACCAGAAAACAGACGCTTCA TACGTGCCCTTTATCTCTCTCAGTCTCTCT
|||
GACGTCACACCAGAAAACAGACGCTTCA TACGTGCCCTTTATCTCTCTCAGTCTCTCT
ATAAACTTAGTGAGACCCCTCTCTGTTTACTCACAAATATGCAAAC TAGAAAACAATCA
|||
ATAAACTTAGTGAGACCCCTCTCTGTTTACTCACAAATATGCAAAC TAGAAAACAATCA
TCAGGAATAAAGGGTTTGATTACTTCTATTGGAAAGAAAAAATCTTTGGAAAATGGATC
|||
TCAGGAATAAAGGGTTTGATTACTTCTATTGGA.....

```

图1 Rd29A基因与克隆产物pRd29A测序结果对比图

Figure 1 Nucleotide sequence of Rd29A and pBin Rd29A

浴 5 min, 然后 37 °C 热激 90 s, 再加入 1 mL LB 液体培养基, 37 °C, 180 r·min⁻¹ 振荡培养 1 h, 最后转入加有 50 g·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体培养基中, 铺平板, 37 °C 过夜培养, 挑取单菌落, 利用 PCR、测序进行鉴定及培养 (图 1, 图 2)。

1.2.3 表达载体构建 将 pPspTSS2-1 质粒用 Hind III/Pst I 2 个限制性内切酶进行酶切, 回收转运肽片段 MCS, 同时将 PBI101^{A+} 同样用 Hind III/Pst I 进行酶切, 回收大片段, 将这 2 个片段用 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建中间载体 pBMCS^{k+}, 将 pBMCS 和 pBin438^{k+} 同时用 Hind III/Xba I 进行酶切, 回收 MCS 和大片段通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建中间载体 pBADHMCS^{k+}, 再将 pBADHMCS 用 Hind II 酶切, 再去磷酸化, 与 *Rd29A* 启动子用 Hind III/Bam H I 双酶切的回收产物进行连接, 再用核酸酶去除粘末端, 最后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得重组质粒 pBinRdMCS^{k+}。利用设计的 *Rd29A* 基因的引物, 以重组质粒为模板进行检测, 并利用限制性内切酶 Hind III/Bam H I 酶切重组质粒, 检测 *Rd29A* 启动子。

1.2.4 冻融法转化根癌农杆菌 将 2 μL 重组质粒 DNA 加入装有 200 μL 感受态农杆菌的 Eppendorf 管中, 冰浴 5 min, 液氮冷冻 5 min, 然后 37 °C 热激 5 min, 再加入 800 μL YM 培养基, 28 °C 振荡培养 4 ~ 5 h, 最后转入加有 50 g·L⁻¹ 卡那霉素和 25 g·L⁻¹ 利福平的 YM 固体培养基中, 过夜培养, 挑取单菌落进行鉴定及培养。

2 结果与分析

2.1 *Rd29A* 基因克隆

PCR 产物电泳结果分析表明, 扩增产物为 890 bp 的片段, 利用 pMD 18-T 载体连接后获得 pBin*Rd29A*, 并进行测序, 结果与 Yamaguchi-Shinozaki 等 (1992) 公布的基因序列完全一致, 证明该扩增产物为 *Rd29A* 启动子基因。

2.2 植物表达载体 pBinRdMCS 的构建

利用上述设计的 PCR 引物, 以重组质粒 pBinRdMCS 为模板进行检测, 凝胶电泳分析结果表明, 1 ~ 9 号菌株质粒 DNA 的 PCR 产物中都含有一条 890 bp 的扩增产物 (图 3); 利用限制性内切酶 Hind III/Bam H I 双酶切重组质粒 pBinRdMCS, 电泳分析酶切产物同样可以发现一条 890 bp 的片段 (图 5), 可见 *Rd29A* 启动子已经整合进重组质粒中。

2.3 冻融法转化根癌农杆菌

挑选转化的农杆菌单菌落, 加入 5 mL YM 培养基, 28 °C 振荡培养 2 d, 提取质粒 DNA, 用设计的 PCR 引物进行扩增鉴定, 结果如图 5, PCR 产物中含有目的条带, 说明 pBinRdMCS 重组质粒已经转化到农杆菌中, 可以用于植物转化。

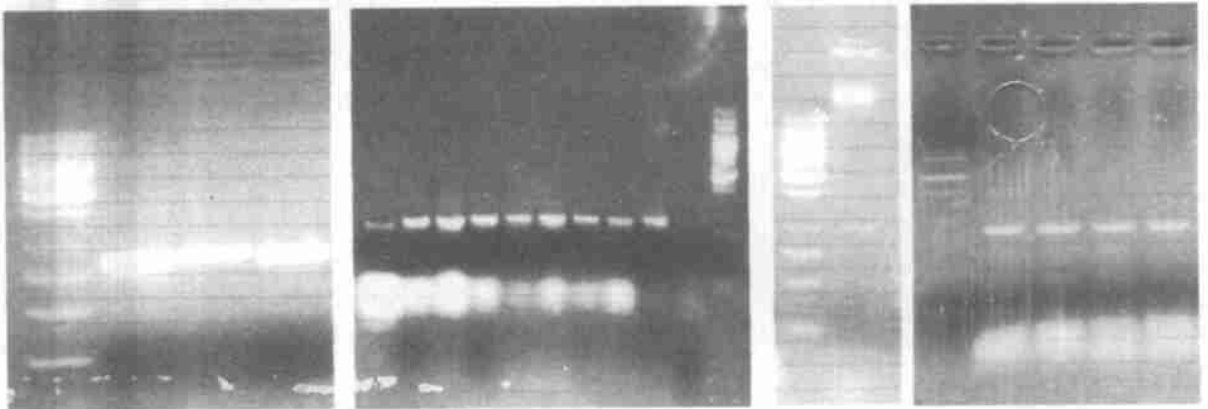


图 2~5 2. *Rd29A* 的 PCR 产物; 3. 重组质粒中启动子 PCR 检测; 4. *Rd29A* 启动子酶切结果; 5. 农杆菌 PCR 鉴定结果 (图中所用的 DNA 标记物为 1 kb 梯度)

Figure 2~5 2. *Rd29A* PCR cloned; 3. PCR analysis of *Rd29A*; 4. restriction analysis of pBinRdMCS; 5. PCR analysis of pBinRdMCS (DNA marker is 1 kb ladder)

3 讨论

近几年,林木耐盐生物技术研究取得了可喜进展,特别是通过超量表达和积累低分子量化合物及渗透保护性蛋白等,赋予了转基因林木一定的耐盐性。然而,盐碱胁迫对林木生长发育的影响是非常复杂的,它不仅与林木本身的遗传背景相关,还包括植物生理、代谢和细胞结构等多方面的因素。仅将单个抗盐基因导入植物获得的抗盐性还是不能达到满意的效果。尽管转基因改良林木胁迫耐性已取得一些进展,一些转基因林木已进入田间试验,但目前仍存在许多困难。

外源基因表达量不足往往是得不到理想的转基因植物的重要原因。目前在植物表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子,组成型启动子控制外源基因在转基因植物的时空都表达,这样不但造成浪费,还会影响植物的生长发育。因此人们越来越重视对特异表达启动子的研究。*Rd29A*启动子序列中含有2个DRE顺式作用元件,其核心序列为CCGAC,在一些同样受干旱、高盐或低温诱导的植物中也发现有D元件或DRE核心序列的元件^[4~7]。

本研究利用PCR克隆并构建了含高盐低温诱导表达的*Rd29A*启动子和*BADH*基因的植物表达载体,用于木本植物抗盐转基因育种研究,并在*BADH*基因序列前引入叶绿体转运肽序列,从而构建了可以在盐碱、干旱胁迫条件下诱导*BADH*基因表达,并通过转运肽将表达产物转移到叶绿体中,维持胁迫条件下叶绿体结构和功能的完整性。采用拟南芥盐诱导表达基因*Rd29A*启动子,使其在盐碱、干旱胁迫条件下调控*BADH*基因高效表达,在植物体内大量积累甜菜碱,维持植物的正常生长发育,而在正常条件下基本不表达,从而节约能量,不影响植物的正常生长^[8],这对于逆境条件下林木的生长发育具有重要意义。

参考文献:

- [1] 汪香梅, 黄敏仁, 王明麻. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2001, 25(5): 57-62.
- [2] 王敏杰, 卢孟柱. 林木基因工程育种现状与发展趋势[J]. 世界林业研究, 2002, 15(3): 7-13.
- [3] Fillatti J J, Sellmes J, McCown B, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus* [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 206: 192-199.
- [4] Nausaka Y, Nakashima K, Shimwar Z K, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high salinity stresses [J]. *Plant J*, 2003, 34(2): 137-148.
- [5] 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. 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): 11-15.
- [6] Yamaguchi S K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Novartis Found Symp*, 2001, 236: 176-186.
- [7] Yamaguchi S K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(2): 251-264.
- [8] Yamaguchi S K, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *Rd29A* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants [J]. *Molecular Gen Genet*, 1993, 236(2-3): 331-340.

Rd29A gene cloning and plant expression vector constructed

ZHUO Ren-ying¹, SUN Zong-xiu²

(1. The Research Institute of Subtropical Forest, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. The State Key Laboratory of Rice Biology, Chinese National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China)

Abstract: It was global problem that effected of saline on forest and agriculture soil, about 20% plowlands and half of irrigated soils had been affected by saline. It's important to speeded salt-tolerance breeding course. Transgenic breeding can fasted the salt-tolerance pace, and shorten breeding cycle significantly. So we designed the primer and cloning *Rd29A* promoter by PCR, constucted pBinRdMCS plasmid that *BADH* gene can be induced by salt and drought, then it was transit to chloroplast. The results analysis by PCR and restriction show that the plasmid include aim gene. The plasmid will be used for tree transgenic breeding. [Ch, 5 fig, 8 ref.]

Key words: forest tree; salt tolerance; *Rd29A* promoter; *BADH*