

长穗偃麦草 DREB 类基因 *EeAP2.2* 的克隆与序列分析

默韶京^{1,2}, 刘桂茹², 郎明林^{1,3}

(¹河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; ²河北农业大学农学院 保定 071001; ³清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要:结合 RACE 和 Genome Walking 技术从十倍体长穗偃麦草中克隆了 AP2 家族的一个全长 cDNA 序列, 命名为 *EeAP2.2*。序列分析表明, 该基因具有一个 837bp 的开放阅读框, 编码 279 个氨基酸残基, 含有一个保守的 AP2 结构域, 是 AP2 大家族的一个新成员。该基因编码的氨基酸序列与 GenBank 已有的普通小麦 AP2 家族两个同源基因编码蛋白 TaDREB1 和 TaDREBW50 (登录号分别为: AAL01124.1 和 AAY44605.1) 具有 98% 的氨基酸序列一致性, 与大麦 AP2 蛋白 HvDREB1-a (登录号 AAY25517.1)、高羊茅 AP2 蛋白 FaDREB2A (登录号 CAG30547.1) 及水稻 OsDREB2.2 (登录号 AY064403) 的氨基酸序列一致性分别为 93%、86% 和 69%。说明该基因与小麦 AP2 家族基因的同源性最高。本研究除获得了长穗偃麦草一个重要抗逆转录因子基因 *EeAP2.2* 的全长 cDNA 序列外, 也提供了一种快速、有效克隆功能基因的方法。

关键词:长穗偃麦草; DREB; RACE; Genome walking; 基因克隆

Cloning and Sequence Analysis of DREB-like Gene *EeAP2.2* in *Thinopyrum Ponticum*

MO Shao-jing^{1,2}, LIU Gui-ru², LANG Ming-lin^{1,3}

(¹College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001;

²College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001;

³College of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: By combining RACE and Genome Walking techniques, a full-length cDNA sequence of AP2 family was cloned from *Thinopyrum Ponticum* (2n=70), and named as *EeAP2.2*. Sequence analysis of *EeAP2.2* revealed a single open reading frame (ORF) of 837bp encoding a protein of 279 amino acids, and a highly conserved AP2 domain. Gene *EeAP2.2* was classified as a new member of AP2 superfamily. Further comparison analysis through NCBI blast showed that *EeAP2.2* has 98% amino sequence identities with TaDREB1 (Accession no. AAL01124.1) and TaDREBW50 (Accession no. AAY44605.1) from *Triticum aestivum*, and its amino sequence identities with HvDREB1-a (Accession no. AAY25517.1) from *Hordeum vulgare*, FaDREB2A (Accession no. CAG30547.1) from *Festuca arundinacea* and OsDREB2.2 (Accession no. AY064403) from *Oryza sativa* are 93%, 86% and 69%, respectively. The result indicates that *EeAP2.2* has the highest homology with AP2 family members from *Triticum aestivum*. This study also provided a fast and effective method for cloning full length cDNA sequences in plants.

Key words: *Thinopyrum Ponticum*; DREB; RACE; Genome walking; Gene cloning

盐碱、干旱等非生物逆境胁迫对植物的生长发育有重大的影响, 是造成农作物减产的直接原因^[1]。研究发现, 在植物中 DREB 类转录因子基因受干旱、高

盐等逆境因子诱导, 并启动下游一系列抗逆功能基因的表达^[2]。将此类基因转入到拟南芥^[3]、烟草^[4]等模式植物中可以显著提高植物对逆境的综合抗性, 显

收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-06-07

基金项目: 中国博士后科学基金 (20060390479); 河北农大博士启动基金 (200805);

转基因生物新品种培育重大科研专项基金 (2009ZX08002-012B)

作者简介: 默韶京, 硕士研究生, 主要从事植物功能基因研究。E-mail: mo_shaojing@yahoo.cn

通讯作者: 郎明林, 博士, 副研究员, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: langminglin@tsinghua.org.cn

示出 DREB 类基因在作物抗逆改良上的巨大应用潜力。在当前生态环境,尤其水资源日益恶化的状况下,开发优良资源植物的 DREB 类转录因子基因,为作物转基因研究提供优质候选基因,进而培育出高抗逆性的作物品种显得尤为重要^[5]。

长穗偃麦草 (*Thinopyrum Ponticum*, $2n = 70$) 属于禾本科小麦族 (*Triticeae* Dumort) 偃麦草属 (*Thinoprurum*) 的多年生野生植物,具有较强的抗旱性、抗寒性和耐盐碱的能力。长穗偃麦草可以与小麦进行杂交,是小麦育种的一种重要远缘亲本,也是小麦抗病育种的重要抗原植物之一,在我国小麦许多大面积推广品种的培育中发挥了重要作用^[6]。应用现代分子生物学技术挖掘长穗偃麦草的优良基因资源,将为小麦转基因育种奠定坚实的物质基础。

RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术是目前公认的一种快速、便捷地获取基因全长 cDNA 的克隆方法^[7]。该方法能够通过已知的部分基因序列快速扩增 cDNA 的 3' 端或 5' 端未知序列区域。但由于某些基因碱基序列特殊性的限制,使得单纯采用 RACE 技术不容易得到这些基因的全序列。此时采用一些其他的克隆技术配合使用,便极为简便、有效。本研究采用 Genome Walking 与 RACE 技术相结合的方法从十倍体长穗偃麦草中成功克隆了 DREB 类转录因子基因 *EeAP2.2*, 并对该方法进行了总结分析。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

植物材料长穗偃麦草受赠于美国国家种质资源实验室 (National Germplasm Resources Laboratory), 索取号 PI340066。大肠杆菌感受态, Peasy-T 载体, Taq DNA 聚合酶购自全式金公司, RNA 提取 kit, 1st strand cDNA 合成 kit 购自天根生物公司, Genome Walking kit 购自 TaKaRa, 引物合成由上海生工完成, 测序由华大基因完成。

1.2 植物材料的准备

将长穗偃麦草种子用清水洗净, 浸种催芽, 播种于含蛭石的花盆中, 置于光照培养室。28℃, 16h 光照/8h 黑暗培养。30d 后, 收获幼苗。将幼苗浸泡于 250mmol/L NaCl 溶液中, 高盐处理 4h 以诱导相关基因的表达。将未作处理和高盐处理后的植物材料速冻于液氮中, 于 -70℃ 保存。

万方数据

1.3 引物设计

根据已报道的长穗偃麦草近缘植物中 DREB 类转录因子保守区氨基酸序列和碱基序列, 设计与保守区两端相应的简并引物 AP2a 和 AP2b (表 1)。用于扩增 3' 端的锚定引物 T₇dT₁₈ 及 T₇, 见表 1。

1.4 RNA 和 DNA 的提取

用 RNA 提取试剂盒提取高盐处理材料的总 RNA, CTAB 法提取未做处理材料的基因组 DNA。

1.5 RT-PCR

RT 反应参照 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行, 以试剂盒提供的 oligo (dT)₁₈ 为反转录引物, 合成长穗偃麦草 cDNA 第一链。

以长穗偃麦草 cDNA 第一链为模板, 用 AP2a/AP2b 引物对扩增长穗偃麦草 DREB 基因。在 20μl 反应体系中加入上述 RT 反应液 1μl, 正向引物 AP2a 和反向引物 AP2b (皆 10 pmol/μl) 各 1μl, 另有 10 × PCR Buffer (含 MgCl₂) 2μl, 200μmol/L dNTP, 1U Taq DNA 聚合酶。循环参数为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物克隆到 pEasy-IT 载体, 进行测序。

1.6 3'-RACE 扩增

根据已克隆的长穗偃麦草 DREB 基因部分序列设计用于扩增基因 3' 端的引物 AP2c (表 1)。参照 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒以 T7dT18 引物代替试剂盒中的 oligo (dT)₁₈ 反转录合成第一链 cDNA, 并以此为模板, 应用 AP2a/T₇, AP2c/T₇ 引物对进行半巢式 PCR, 扩增基因的 3' 端序列。20μl PCR 扩增反应体系同上。第 1 轮扩增循环参数为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 59℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min 20s, 10 个循环; 94℃ 变性 30s, 53℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min 20s, 20 个循环后, 72℃ 延伸 10min。第 2 轮扩增循环参数为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 57℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min 20s, 10 个循环; 94℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min 20s, 20 个循环后, 72℃ 延伸 10min。3' RACE 扩增产物克隆到 pEasy-IT 载体, 进行测序。

1.7 Genome Walking

在获得的 3' 端序列中, 按照 Genome Walking 试剂盒要求设计 3 条用于获得基因 5' 端未知序列的嵌套 GSP 反向引物: GSP1、GSP2 和 GSP3 (表 1)。以提取的长穗偃麦草基因组 DNA 为模板, TaKaRa Genome Walking 试剂盒提供的 4 种兼并引物 AP1、AP2 和

AP3, AP4 为上游引物, 嵌套 GSP 引物为下游引物进行半巢式 PCR。根据试剂盒要求, 以 0.1 ~ 1 μ g 的基因组 DNA 作为模板, 配制 50 μ l 体系的 1st PCR 扩增反应液: 基因组 DNA (317 ng/ μ l) 1.5 μ l, 正向引物 AP1 和反向引物 GSP1 各 1 μ l, 10 $\times$ LA PCR Buffer (含 $MgCl_2$) 5 μ l, 200 μ mol/L dNTP, 2.5 U LA Taq DNA 聚合酶。第 1 轮扩增循环参数为: 94 $^{\circ}C$ 1min; 98 $^{\circ}C$ 1min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 63 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 3min, 5 个循环; 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 25 $^{\circ}C$ 退火 3min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 1 个循环; 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 63 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 63 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 44 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 15 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min。以 1 μ l 1st PCR 扩增反应产物为模板, 正向引物 AP1 和反向引物 GSP2 各 1 μ l, 配制同上的 50 μ l 体系 2nd PCR 扩增反应液。第 2 轮扩增循环参数为: 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 65 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 65 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 44 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 15 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min。以 1 μ l 2nd PCR 扩增反应产物为模板, 正向引物 AP1 反向引物 GSP3 各 1 μ l, 配制同上的 50 μ l 体系 3rd PCR 扩增反应液。第 3 轮扩增循环参数同第 2 轮扩增循环参数。另分别以 AP2、AP3、AP4 为上游引物, 配制同上的 PCR 扩增反应液体系进行 3 轮 PCR 扩增。将第 3 轮 PCR 扩增产物克隆到 pEasy-IT 载体, 进行测序。

1.8 序列分析及 ORF 框的获得

将测序得到的基因序列用 DNAMAN 软件进行序列拼接和分析。Primer5 软件设计扩增基因开放读码框的引物: E2.2F、E2.2R (表 1)。以 oligo (dT)₁₈ 引物反转录获得的第一链 cDNA 为模板, 应用 E2.2F/E2.2R 引物对扩增基因的开放读码框, PCR 扩增产物克隆到 pEasy-T 载体, 测序, 用于以后基因的功能研究。

2 结果与分析

2.1 EeAP2.2 RT-PCR 扩增结果

以长穗偃麦草第一链 cDNA 为模板, 利用 AP2a/AP2b 引物对扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测显示得到一条长约 100bp 的片段 (图 1), 测序结果显示这条片段长 117bp, 且编码的氨基酸序列与已报道的其他植物 DREB 基因保守区序列有很高的同源性 (图 2), 命名该基因为 Ee-AP2.2。

万方数据

表 1 长穗偃麦草 EeAP2.2 基因的克隆引物

Table 1 Primers for cloning EeAP2.2 cDNA from *Elytrigia elongata*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物长度 (bp) Sequence length
AP2a	ARTGGCTRGCTGAGATCCGTG	21
AP2b	GCGCCATACATTGCCCTTGC	20
T ₇ dT ₁₈	ACGACTCACTATAGGGCTTTT-TdT18	40
T ₇	ACGACTCACTATAGGGCTTTT	22
AP2c	GGCTGTGGCTTGGTTCATTC	20
GSP1	TGAAAGTTATCCCTATTGCTCCGCATGAC	29
GSP2	TGGTTGGGATACTTCCAGGCTCTTGTC	28
GSP3	GGAGGTGCCAGCGTGCAACCAGAG	24
E2.2F	CTCGATGGAGACCGGGGCTAGCA	23
E2.2R	CTAATATGAGAAAAGACTAAACCCA	25

R = A/G

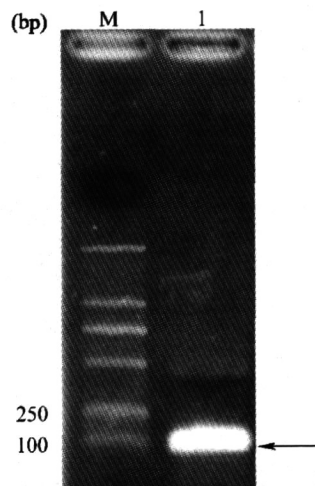


图 1 EeAP2.2 cDNA 部分片段扩增结果

Fig.1 PCR product of EeAP2.2 cDNA fragment

M: DNA 分子量标记 DL-2000; 1: 用 AP2a 和 AP2b 引物对扩增的 PCR 产物

M: DNA marker DL-2000; 1: PCR product amplified using AP2a and AP2b primer pair

2.2 EeAP2.2 3'RACE 扩增结果

以 T₇dT₁₈ 引物反转录获得的第一链 cDNA 为模板, 应用 AP2a/T₇, AP2c/T₇ 引物对进行半巢式 PCR。第 1 轮扩增未得到特异条带, 第 2 轮扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测显示得到一条约 750bp 的片段 (图 3), 经测序片段长 794bp, 包含一个 PolyA 尾。

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
ACY68199.1	dehydration responsive element binding protein 1 [Hordeum vulgare]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
ACY68198.1	dehydration responsive element binding protein 1 [Hordeum vulgare]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
CAG30548.1	putative DREB2A protein [Festuca arundinacea]	58.5	58.5	96%	3e-07	94%	
CAG30547.1	putative DREB2A protein [Festuca arundinacea]	58.5	58.5	96%	3e-07	94%	
AAV44604.1	dehydration responsive element binding protein W73 [Triticum aestiv]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
AAU29412.1	dehydration-responsive element-binding protein 2 [Hordeum brevisut]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
AAS59530.1	putative DRE-binding protein DREB2 [Poa pratensis]	58.5	58.5	96%	3e-07	94%	
AAR11157.1	dehydration-responsive element binding protein 2 [Festuca arundinac]	58.5	58.5	96%	3e-07	94%	
AAU01124.1	AP2-containing protein [Triticum aestivum] >qb AAV44605.1 dehyd	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	G
ABB36800.1	DREB/CBF transcription factor [Saccharum officinarum]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
ABA08426.1	dehydration-responsive element-binding protein [Triticum aestivum]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	
ABA08425.1	dehydration-responsive element-binding protein [Triticum aestivum]	58.5	58.5	96%	3e-07	100%	

图 2 *EeAP2. 2* 基因部分氨基酸序列在 GenBank 中 Blast 比较结果

Fig. 2 The Blast result of partial amino acids sequence of *EeAP2. 2*

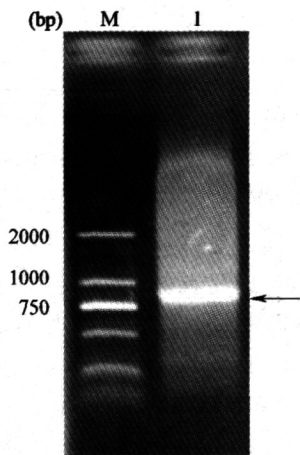


图 3 *EeAP2. 2* 3'RACE 扩增结果

Fig. 3 PCR product of 3'RACE for *EeAP2. 2*

M: DNA 分子量标记 DL-2000; 1:
用 AP2c 和 T₇ 引物对扩增的 3'RACE PCR 产物
M: marker DL-2000; 1: 3'RACE product of
amplified by using AP2c and T₇ primer pair

2.3 *EeAP2. 2* Genome Walking 扩增结果

以基因组 DNA 为模板,参照 Genome Walking 步移试剂盒进行半巢式 PCR 反应,经过 3 轮 PCR 扩增后,将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果显示以兼并引物 AP2 和 AP4 为上游引物进行的扩增得到了比较明显的主带,长约 1200bp (图 4),经测序两个片段序列相同均为 1152bp。

2.4 测序结果的分析、拼接及 ORF 框的扩增

根据上述 RT-PCR、3' RACE 及 Genome Walking 的扩增结果,利用 DNAMAN 软件对测序结果进行电子拼接。测序结果显示 3' RACE 片段与 RT-PCR 扩增得到 cDNA 的序列有 79bp 重叠区,且包含 20bp 的 poly(A) 结构,表明所克隆的片段是长穗偃麦草
万方数据

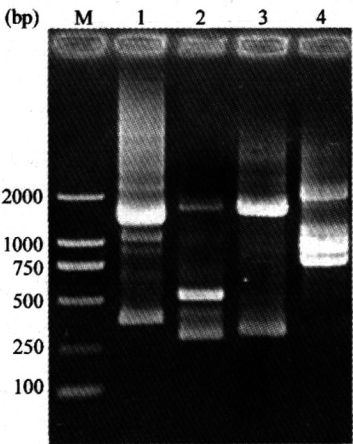


图 4 *EeAP2. 2* Genome Walking 扩增结果

Fig. 4 PCR products of *EeAP2. 2* Genome Walking

M: DNA 分子量标记 DL-2000;
1: 用 AP4/ GSP3 引物对扩增的 PCR 产物;
2: 用 AP3/ GSP3 引物对扩增的 PCR 产物;
3: 用 AP2/ GSP3 引物对扩增的 PCR 产物;
4: 用 AP1/ GSP3 引物对扩增的 PCR 产物
M: marker DL-2000;
1: PCR products amplified by using AP4/ GSP3 primer pair;
2: PCR products amplified by using AP3/ GSP3 primer pair;
3: PCR products amplified, by using AP2/ GSP3 primer pair;
4: PCR products amplified by using AP1/ GSP3 primer pair

EeAP2. 2 基因的 3' 末端。Genome Walking 测序结果在 NCBI 站点进行 BLAST 比对,发现其中包括内含子序列。去掉内含子序列后与 3' 端序列进行拼接,将拼接的序列再次进行 BLAST 比对,并结合 NCBI 的 ORF finder 功能,证明得到了 *EeAP2. 2* 包括开放读码框(ORF)在内的完整基因和 cDNA 序列。通过 NCBI Blast Find “conserved domain” 进行分析,显示该基因为 AP2 家族成员(图 5)。

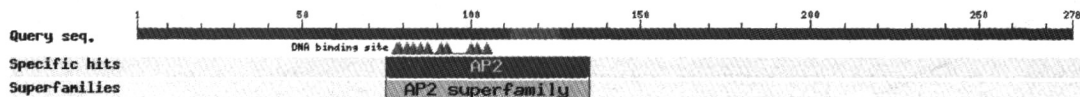


图5 *EeAP2.2* Genome Walking 和 3'RACE 拼接序列的保守功能域分析

Fig. 5 Analysis of the conserved domain of *EeAP2.2* sequences assembled from Genome Walking and 3'RACE

按照拼接的 *EeAP2.2* 全序列设计扩增基因 ORF 区的上下游引物 E2.2F 和 E2.2R (表 1)。以 oligo (dT)₁₅ 引物反转录获得的第一链 cDNA 为模板,应用 E2.2F/E2.2R 引物对进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测显示得到一条约 800bp 的片段 (图 6)。经测序该片段长 837bp,包括起始密码子 ATG 和终止子 TAG,是一个 *EeAP2.2* 完整的开放阅读框。

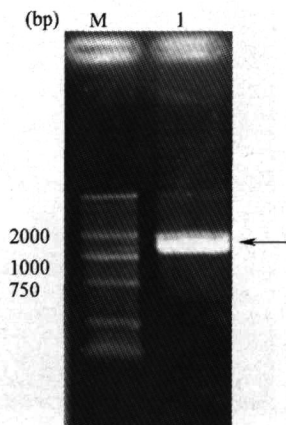


图6 *EeAP2.2* ORF 框扩增结果

Fig. 6 PCR products of amplifying *EeAP2.2* ORF region

M: DNA 分子量标记 DL-2000; 1: 用 E2.2F / E

2.2R 引物对扩增的 PCR 产物

M: marker DL-2000; 1: PCR products amplified by using

E2.2F / E2.2R primer pair

2.5 *EeAP2.2* 与其他植物氨基酸序列同源性的比较

将获得的长穗偃麦草 *EeAP2.2* 基因的全长序列在 NCBI 站点进行 BLAST 比对、序列分析,结果表明,该基因具有一个 837bp 的开放阅读框,编码 279 个氨基酸残基,编码的氨基酸序列与小麦 AP2 家族蛋白 TaDREB1 (登录号 AAL1124.1) 和 TaDREBW50 (登录号 AAY44605.1) 的氨基酸序列一致性为 98%,与大麦 AP2 家族蛋白 HvDREB1-a (登录号 AAY25517.1) 的氨基酸序列一致性为 93%,与高羊茅 AP2 家族蛋白 FaDREB2A (登录号为 CAG30547.1) 的氨基酸序列一致性为 86%,与水稻 AP2 家族基因 OsDREB2.2 (登录号 AY064403) 编码

的氨基酸序列一致性为 69%。以上结果表明,该基因与小麦 AP2 家族的成员同源性最高,接近 100%,而随着与小麦亲缘关系的疏远,其序列一致性也相应降低。由于小麦在进化和培育过程中,或多或少地融入了一些长穗偃麦草的遗传物质,因此,小麦中的 AP2 家族成员有可能来自与长穗偃麦草 *EeAP2.2* 的基因交流。

3 讨论

AP2/EREBP 类转录因子是植物中所特有的一类转录因子。根据 AP2/ERF 结构域的数目,可分为 2 个亚族:EREBP 亚族 (具有 1 个 AP2/ERF 结构域) 和 AP2 亚族 (具有 2 个 AP2/ERF 结构域)^[8]。近年来已有许多研究表明,其家族的各个成员与植物的发育、生物和环境胁迫应答等有密切的关系。而属于 EREBP 亚族的干旱反应元件结合蛋白 DREB 类更是在拟南芥、烟草、水稻^[9]、小麦^[10-11]、玉米^[12]、大豆^[13]、高羊茅^[14] 等多种植物中被克隆和进行功能验证,但在长穗偃麦草中还未见报道。长穗偃麦草是能与小麦进行远缘杂交的一种野生植物,具有优良的抗病性,并且耐寒、耐旱和耐盐碱。因此,从长穗偃麦草中克隆获得的 DREB 类转录因子基因有可能保持了更好的适应严酷环境的调控能力,可以为小麦以及其他作物抗逆基因的遗传转化研究提供优质候选基因。

本试验采用 3'RACE 和 Genome Walking 相结合的技术从 NaCl 诱导的长穗偃麦草中克隆得到了一个 DREB 类的转录因子基因。根据本实验的结果,以及克隆其他基因的经验,总结了获得完整基因 cDNA 全长的方案流程 (图 7)。由于 mRNA 的 3'端含有 polyA 尾,故用一个含有 Oligo (dT) 的接头引物进行反转录合成 cDNA,再用基因特异性引物作为上游引物,以及含有部分接头序列的引物作为下游引物,很容易就扩增获得了 cDNA 3'端序列。本试验也曾尝试 5'RACE 技术获得基因的 5'端序列,采用了末端脱氧核糖核酸转移酶法^[15] 扩增 5'端,但由于接头引物与材料中的其他基因序列有非常高的相似性,扩增得到的都不是目的基因。所以最终采用

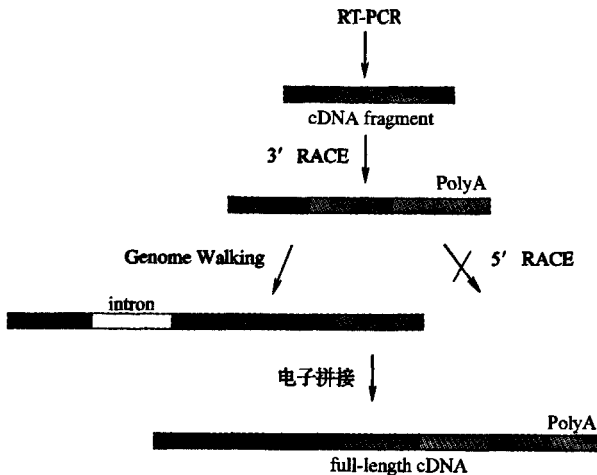


图 7 获得目标基因全长 cDNA 的流程

Fig.7 Flow chart of cloning whole length cDNA of target gene

了 Genome Walking 的方法获得基因的 5' 端未知序列。染色体步移使用的是基因组 DNA 模板, 扩增得到的序列可能会含有内含子序列。根据其他植物中 DREB 类转录因子的研究, 这类基因一般不含有内含子, 或者内含子序列较短。因此, 用染色体步移的方法对该类基因进行克隆, 在理论上是可行的。本实验用染色体步移的方法获得的 5' 端序列就包含一段 713bp 的内含子序列, 但也得到了该基因 5' 端非翻译区和开放读码框上游的一段序列, 使得该基因采用染色体步移的方法获得 5' 端序列获得了成功。该方法用于 cDNA 的全长克隆适用性不是很高, 尤其是包括较长内含子序列的基因。但对于某些基因采用 5' RACE 技术进行克隆遇到问题的时候, 也不失为一种有效的辅助手段来得到基因的全长。

参考文献

- [1] Bray E A. Plant responses to water deficit[J]. Trends Plant Sci, 1997, 2: 48-54
- [2] 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 in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10(8): 1391-1406
- [3] Wang Q Y, Guan Y C, Wu Y R, et al. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67: 589-602
- [4] Linga R G, Arjula R R. Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2008, 68: 533-555
- [5] Liu Q, Zhao N M, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold-tolerance [J]. Chin Sci Bull, 2000, 45(1): 11-16
- [6] 吕伟东 徐鹏彬 蒲训. 偃麦草属种质资源在普通小麦育种中的应用现状简介[J]. 草业学报, 2007, 16(6): 136-140
- [7] 王少丽, 盛承发, 乔传令. cDNA 末端快速扩增技术及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(3): 419-423
- [8] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-Binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(3): 998-1009
- [9] 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]. Plant J, 2003, 33: 751-763
- [10] 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]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 923-930
- [11] 杨学明, 姚金保, 马鸿翔, 等. 普通小麦—簇毛麦 6V 代换系 45S rDNA 和 5S rDNA 位点的 FISH 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 464-467
- [12] Qin F, Li J, Zhang G Y, et al. Isolation and structural analysis of DRE-binding transcription factor from maize (*Zea mays* L.) [J]. Acta Bot Sin, 2003, 45: 331-339
- [13] 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]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353: 299-305
- [14] 阳文龙, 刘敬梅, 刘强, 等. 高羊茅 DREB 类转录因子基因的分离及鉴定分析[J]. 核农学报, 2006, 20(3): 187-192
- [15] 迪芬巴赫 C W, 德瑞克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 268-286

欢迎订阅 2012 年《河北果树》

《河北果树》是河北省果树学会主办的果树专业技术期刊, 主要刊登落叶果树的品种资源、栽培管理、病虫害防治、储藏加工等方面的新成果、新技术、新知识和新信息,

双月刊, 单月 15 日出版, 国际标准大 16 开 64 页, 定价 5 元, 全年 30 元。各地邮局(所)均可订阅, 邮发代号 18-247。也可随时汇款至编辑部订阅。

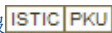
地址: (066600) 河北省昌黎果树研究所《河北果树》编辑部

电话: 0335-2987632(兼传真), E-mail: hbsbjbf@heinfo.net; hbsbjbf@sohu.com

长穗偃麦草DREB类基因EeAP2. 2的克隆与序列分析

作者: 默韶京, 刘桂茹, 郎明林, MO Shao-jing, LIU Gui-ru, LANG Ming-lin

作者单位: 默韶京, MO Shao-jing(河北农业大学生命科学学院, 保定071001; 河北农业大学农学院保定071001), 刘桂茹, LIU Gui-ru(河北农业大学农学院保定071001), 郎明林, LANG Ming-lin(河北农业大学生命科学学院, 保定071001; 清华大学生命科学学院, 北京100084)

刊名: 植物遗传资源学报 

英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources

年, 卷(期): 2011(5)

参考文献(15条)

1. 迪芬巴赫 C W; 德瑞克斯勒 G S PCR技术实验指南 1998
2. 阳文龙; 刘敬梅; 刘强 高羊茅DREB类转录因子基因的分离及鉴定分析 2006(03)
3. Chen M; Wang Q Y; Cheng X-G GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants[外文期刊] 2007
4. Qin F; Li J; Zhang G Y Isolation and structural analysis of DRE-binding transcription factor from maize (Zea mays L.) 2003
5. 杨学明; 姚金保; 马鸿翔 普通小麦一簇毛麦6V代换系45S rDNA和5S rDNA位点的FISH分析 2011(03)
6. Shen Y G; Zhang W K; He S J An EREBP/AP2-type protein in Triticum aestivum was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress 2003
7. Dubouzet J G; Sakuma Y; Ito Y OsDREB genes in rice, Oryza sativa L, encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression[外文期刊] 2003
8. Sakuma Y; Liu Q; Dubouzet J G DNA-Binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression[外文期刊] 2002(03)
9. 王少丽; 盛承发; 乔传令 cDNA末端快速扩增技术及其应用 2004(03)
10. 吕伟东; 徐鹏彬; 蒲训 偃麦草属种质资源在普通小麦育种中的应用现状简介 2007(06)
11. Wang Q Y; Guan Y C; Wu Y R Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice[外文期刊] 2008
12. Liu Q; Kasuga M; Sakuma Y 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 in Arabidopsis 1998(08)
13. Bray E A Plant responses to water deficit[外文期刊] 1997
14. Liu Q; Zhao N M; Yamaguchi-Shinozaki K Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold-tolerance 2000(01)
15. Linga R G; Arjula R R Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance 2008

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201105016.aspx