

蒙古沙冬青 *AmDREB2C* 基因的克隆及表达分析

郭 婷, 王茅雁, 董 博, 姜晓旭, 武雅琪

(内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 蒙古沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 是中国西北荒漠区唯一的常绿阔叶灌木, 具有很强的抗寒抗旱特性。利用 PCR 方法从该植物克隆到转录因子 *AmDREB2C* 的 cDNA 和基因组 DNA 的全长编码区, 二者均由 1191 bp 组成, 无内含子序列, 编码由 396 个氨基酸残基组成的蛋白, 其中含 1 个 AP2 结构域和 1 个核定位信号。表达分析显示, *AmDREB2C* 的转录受低温和干旱胁迫的诱导。此外, 将该基因编码区 cDNA 成功构建到植物表达载体 pCambia3300-35ST 上, 为后续研究其功能奠定了基础。

关键词: 蒙古沙冬青; DREB; 基因克隆; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of *AmDREB2C* in *Ammopiptanthus mongolicus*

GUO Ting, WANG Mao-yan, DONG Bo, JIANG Xiao-xu, WU Ya-qi

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract: *Ammopiptanthus mongolicus*, the only evergreen broad-leaf shrub in the northwest desert of China, shows very strong resistance to cold and drought stresses. The complete coding region cDNA and genomic DNA fragments of the transcription factor *AmDREB2C* were cloned by PCR approach from *A. mongolicus*. Both the fragments contained 1191 base pairs, therefore *AmDREB2C* was intronless. The predicted *AmDREB2C* protein was composed of 396 amino acid residues, with a conserved AP2 domain and a nuclear localization signal. Expression analysis revealed that the transcription of *AmDREB2C* was induced by cold and drought stresses. Moreover, the cDNA fragment of *AmDREB2C* was successfully inserted into the plant expression vector pCambia3300-35ST, laying a foundation for further functional analysis.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus*; DREB; gene cloning; expression analysis

沙冬青属 (*Ammopiptanthus*) 植物是中国西北荒漠区唯一的常绿阔叶灌木, 仅有蒙古沙冬青 (*A. mongolicus*) 和新疆沙冬青 (*A. nanus*) 2 个种。由于长期生长在冬寒夏热和干旱贫瘠的荒漠地带, 形成了很强的抗寒抗旱等抗逆特性, 成为挖掘抗逆基因的好材料^[1-2]。抗逆基因可分为功能基因和调节基因 2 大类^[3]。近年来, 人们从沙冬青中鉴定出许多抗逆相关基因, 其中多数为功能基因, 其编码蛋白主要在渗透调节、脱水保护和抵抗氧化胁迫等抗逆机

制中发挥作用, 而少数为调节基因, 其编码蛋白主要在逆境信号转导和抗逆功能基因的表达调节中起关键作用^[4-8]。

研究表明, DREB (dehydration responsive element/DRE binding) 类转录因子在植物响应和抵抗低温、干旱和高盐等非生物胁迫中起重要作用^[3, 9-11]。它们属于植物 AP2/EREBP (APETALA2/ethylene-responsive element binding protein) 转录因子大家族中的一个亚族, 在蛋白一级结构中都含有一

收稿日期: 2014-06-30 修回日期: 2014-07-23 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1652.028.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31260256); 内蒙古自然科学基金 (2012ZD02)

第一作者研究方向为植物分子生物学。E-mail: 735516773@qq.com

通信作者: 王茅雁, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: wangmaoyan@163.com

个保守的 AP2 结构域、核定位信号和转录激活域,其中 AP2 结构域通过与抗逆功能基因启动子区的 DRE 或 CRT (C-repeat) 顺式作用元件特异性结合而调节这些基因的表达,从而增强植物的抗逆性^[10-11]。目前已从拟南芥、水稻和大豆等许多种植物克隆到 *DREB* 基因,可分为 *DREB1/CBF* 和 *DREB2* 2 种类型^[10]。拟南芥 *DREB1s/CBFs* 主要参与 ABA 非依赖的低温应答信号转导途径,并且主要受 ICE1 (inducer 1 of CBF expression)、HOS1 (high expression of osmotically responsive gene 1) 和 ZAT12 (zinc-finger activating transcriptor 12) 等上游调节组分的调控,进一步激活许多低温应答基因的表达,从而在植物抵抗寒冷等逆境中起关键作用^[9,11]。而 *DREB2* 型基因主要在响应和抵抗干旱、高盐和(或)热胁迫中发挥功能^[10-11],目前对此类基因的克隆和研究报道较少。

本课题组在前期利用 Illumina 技术对蒙古沙冬青进行了转录组测序和表达谱分析^[12],获得一个受寒旱诱导表达的 *DREB2C* 类转录因子的全长 cDNA 序列,命名为 *AmDREB2C*。本研究对该基因进行了克隆、表达分析和植物表达载体构建,为深入研究其功能和作用机理奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蒙古沙冬青种子由内蒙古自治区巴彦淖尔市磴口县林业局提供; *Escherichia coli* DH5 α 菌株和 pCambia3300-35ST (p3300-35ST) 载体由本实验室保存; RQ1 RNase-Free DNase 和 M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; 2 $\times$ SYBR-Green I RT-PCR Master Mix、*LA Taq* 酶、pMD19-T 载体和 *Xba* I、*Sma* I 限制酶购自 Takara 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根公司。

1.2 方 法

1.2.1 基因表达分析 所用总 RNA 与前期利用 RNA-Seq (RNA-Sequencing) 技术进行低温和干旱胁迫表达谱分析相同^[12]。低温处理是将沙培法培养 3 个月的蒙古沙冬青幼苗放在低温光照培养箱 (BD-PRX-1000A; -10 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$) 中进行梯度降温处理 (4 $^{\circ}\text{C}$ 4 h、2 $^{\circ}\text{C}$ 12 h, 接着在 0 $^{\circ}\text{C}$ 、-2 $^{\circ}\text{C}$ 、-4 $^{\circ}\text{C}$ 和 -6 $^{\circ}\text{C}$ 各处理 2 h), 分别在处理 2 h、8 h 和 24 h 将幼苗从沙土盆中小心取出, 用预冷的自来水漂洗干净, 在液氮中速冻后保存于 -76 $^{\circ}\text{C}$ 。干旱处理是将同样培养的幼苗从沙土盆中取出,

用水漂洗干净, 置于滤纸上于 25 $^{\circ}\text{C}$ 进行自然干燥, 分别在处理 2 h、8 h 和 24 h 取样冻存。取处理前 (0 h) 幼苗作对照 (CK)。将这些样品分别用改进的 Trizol 法^[13] 提取总 RNA, 然后用 RQ1 RNase-Free DNase 进行纯化以去除基因组 DNA 污染。取 1.5 μg 纯化的 RNA 用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链作模板, 用 *AmDREB2C* 特异性上游引物 5'-CTTCGTCTCCTGGGTTTGTGT-3' 和下游引物 5'-CAGCCTACACTTCTGCTCCGC-3' 进行 RT-qPCR (real time quantitative PCR) 反应。反应体系 (20 μL), 由 2 $\times$ SYBR-Green I RT-PCR Master Mix 10 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL 、cDNA 模板 1 μL (稀释 10 倍) 和 ddH₂O 8.2 μL 组成。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s。反应在 Statagene Mx3000 PCR 仪上进行。以蒙古沙冬青 α -tubulin 作为内标基因, 以处理前 (0 h) 样品作为校正样品, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[14] 分析基因的相对表达量。试验重复 3 次, 每个 PCR 反应重复 4 次, SD (standard deviation) 以 error bar 显示。

1.2.2 基因克隆与蛋白预测 用 CTAB 法提取蒙古沙冬青幼苗基因组 DNA。分别以 cDNA 和基因组 DNA 作模板, 用 *AmDREB2C* 编码区上游引物 5'-GTTCTAGACTTGGAAGGTGGTGCTGAT-3' (下划线为 *Xba* I 切点) 和下游引物 5'-CCCCGGGACATCCACATATCCTTAT-3' (下划线为 *Sma* I 切点) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系由 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、dNTP 混合液 (2.5 mmol/L each) 2 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL 、模板 1 μL 、*LA Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.25 μL 和 ddH₂O 18.25 μL 组成, 总体积 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并回收目的片段, 然后与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 检测, 送阳性克隆至北京华大基因公司测序。用 DNAMAN 软件分析蛋白分子量和等电点; 在 <http://psort.hgc.jp/form.html> 网站预测蛋白亚细胞分布; 用 Clustal-X 1.83 和 GeneDoc 程序进行蛋白多序列比对, 均采用默认参数。

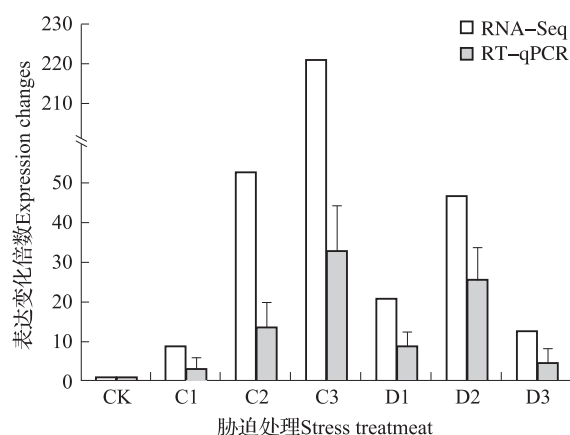
1.2.3 植物表达载体构建 用碱裂解法从 *E. coli* 转化菌株提取重组克隆载体 pMD19-*AmDREB2C* 和植物表达空载体 p3300-35ST 质粒 DNA, 分别用

Xba I 和 *Sma* I 进行双酶切。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收 *AmDREB2C* 和表达载体片段,然后用 T4 DNA 连接酶将二者连接(4 °C, 20 h)。将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆进行菌落 PCR 检测,将阳性克隆进行质粒 DNA 提取和酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 *AmDREB2C* 在低温和干旱胁迫下的表达分析

本课题组在前期用 RNA-Seq 技术对蒙古沙冬青进行了转录组测序和表达谱分析,获得一个受低温和干旱胁迫诱导的 DREB2 型转录因子的全长 cDNA 序列。其完整编码框由 1191 bp 组成,推测编码含 396 个氨基酸残基的蛋白,通过 BLAST 比对与拟南芥和大豆 DREB2C 同源性最高(identities 分别为 46% 和 65%),故命名其为 *AmDREB2C*。RNA-Seq 数据显示该基因在正常条件下有一定量的基础表达,在低温处理 2 h、8 h 和 24 h 后其表达量持续上调至对照的 8.6 ~ 222.9 倍;在干旱处理 2 h 和 8 h 后其表达量分别上调至对照的 21.1 倍和 48.5 倍,在处理 24 h 后虽有所回落但仍为对照的 12.1 倍(图 1)。本研究利用 RT-qPCR 方法对此结果进行验证,获得了基本一致的表达趋势(图 1),表明 *AmDREB2C* 受低温和干旱胁迫的显著诱导,尤其受低温胁迫的诱导较为持久而强烈。



CK:对照(0 h);C1、C2、C3:低温处理 2 h、8 h 和 24 h;

D1、D2 和 D3:干旱处理 2 h、8 h 和 24 h

CK:Control(0 h),C1,C2 and C3:2 h,8 h and 24 h after cold treatment,

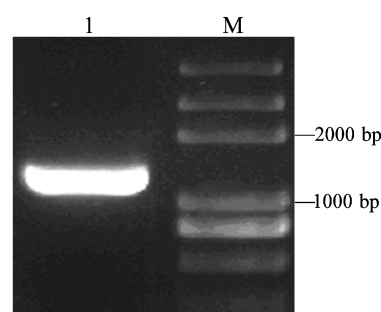
D1,D2 and D3:2 h,8 h and 24 h after drought treatment

图 1 *AmDREB2C* 在低温和干旱处理不同时间点的表达变化

Fig. 1 Expression changes of *AmDREB2C* at different time points after cold and drought treatments

2.2 *AmDREB2C* 基因结构分析

AmDREB2C 全长 cDNA 序列为 1856 bp,通过欧米伽软件分析结合同源序列比对,推测其含有 1191 bp 的完整编码框。为了分析该基因的结构和生物学功能,首先用 RT-PCR 方法对其编码框 cDNA 进行了扩增,获得与预期大小一致的扩增片段(图 2)。将该片段与克隆载体 pMD19-T 连接后转化 *E. coli*,经菌落 PCR 检测获得了阳性克隆并进行了测序验证。本研究相继对 4 个批次的 RT-PCR 产物进行了克隆和序列测定,最终获得一个序列正确的克隆并用于后续试验。



1:RT-PCR 产物;M:Trans 2K Plus DNA Maker

1:RT-PCR product,M:Trans 2K Plus DNA Maker

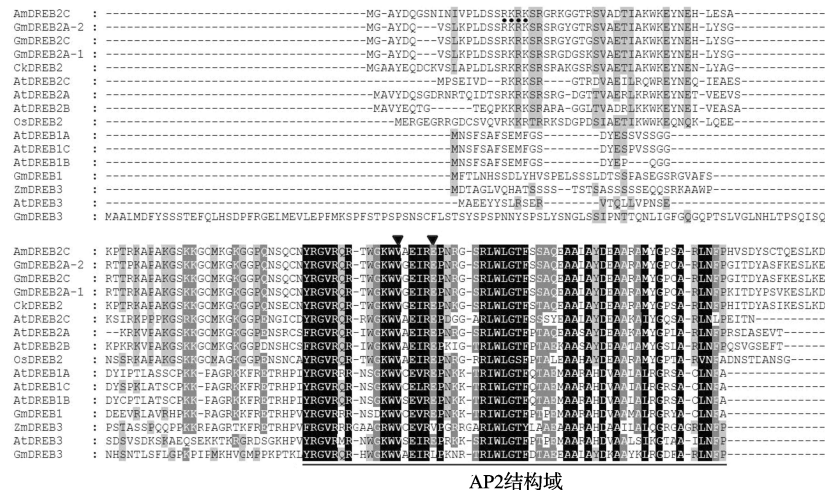
图 2 *AmDREB2C* 编码区 RT-PCR 扩增图谱

Fig. 2 Amplification pattern of *AmDREB2C* coding region by RT-PCR method

以提取自蒙古沙冬青幼苗的基因组 DNA 为模板,用上述 RT-PCR 反应同样的引物进行 PCR 扩增,得到一条与 RT-PCR 产物大小一致的片段。将该片段进行克隆和序列测定,发现其大小和序列与 cDNA 编码区完全相同,由此确定在该基因编码区内无内含子序列。

2.3 *AmDREB2C* 蛋白结构特征分析

已知的 DREB 蛋白均含有 1 个保守的 AP2 结构域以及其中的 2 个保守氨基酸残基,即第 14 位的缬氨酸(V)和第 19 位的谷氨酸(E)^[10-11,15],此外在靠近 N 端还有 1 个核定位信号(NLS,nuclear localization signal)^[16]。为了明确 *AmDREB2C* 蛋白是否具有同样的结构特征,在相关网站对其结构域进行了分析,并与拟南芥、水稻和大豆等植物的 15 个已知 DREB 蛋白进行了多序列比对。结果发现,在其 82 ~ 139 位存在 1 个保守的 AP2 结构域,其中第 14 位和 19 位分别为 V 和 E;在靠近 N 端第 19 ~ 22 位有 1 个碱性氨基酸区域 RKRK,推测为 NLS(图 3)。这些结果表明,*AmDREB2C* 蛋白具备 DREB 家族成员所共有的结构特征。



AP2结构域

黑点 (●) : NLS; 倒三角 (▼) : 保守氨基酸残基

Black dots (●) : NLS; Inverted triangle (▼) : Conserved amino acid residues

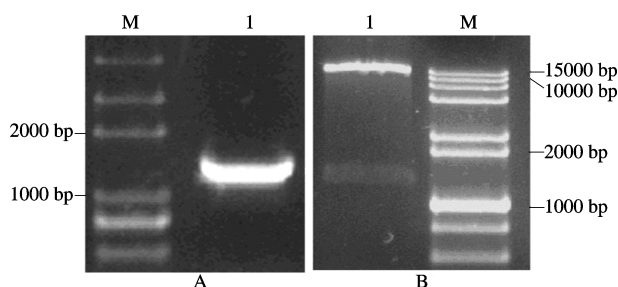
DREBs 在 NCBI 中的接收号: GmDREB2A-2: AFU35563; GmDREB2C: NP_001240942; GmDREB2A-1: AFU35562; CkDREB2: AGI78251; AtDREB2C: NP_565929; AtDREB2A: AED90870; AtDREB2B: AEE74994; OsDREB2: AAN02487; AtDREB1A: BAA33434; AtDREB1C: BAA33436; AtDREB1B: BAA33435; GmDREB1: CCF23020; ZmDREB3: NP_001105651; AtDREB3: AAX38232; GmDREB3: AAZ03388

图 3 *AmDREB2C* 与其他植物已知 DREB 蛋白的多序列比对 (显示部分序列)

Fig. 3 Sequence alignment of *AmDREB2C* with known DREB proteins of other plant species (showed partial sequences)

2.4 *AmDREB2C* 植物表达载体构建

为了验证 *AmDREB2C* 在抗逆性中的功能,本研究构建了其植物表达载体。首先用限制酶 *Xba*I 和 *Sma* I 将 *AmDREB2C* 编码框 cDNA 从克隆载体 pMD19-T 上酶切下来,定向连接到植物表达载体 p3300 的 35S 启动子之后,然后转化 *E. coli*,经菌落 PCR 检测获得阳性克隆(图 4A),初步证明表达载体构建成功。再从阳性克隆提取质粒 DNA 进行酶切鉴定,获得预期大小的目的片段(图 4B),进一步证明表达载体构建成功,可通过农杆菌介导法转化植物进行功能验证。



A: 菌落 PCR 检测, M 为 Trans 2K Plus DNA Marker, 1 为 PCR 产物;

B: 质粒酶切鉴定, 1 为质粒 DNA 酶切产物,

M 为 DL15000 + 2000 DNA Marker

A: Colony PCR detection, M represents Trans 2K Plus DNA Marker,

1 represents PCR product, B: Restriction enzyme digestion of the plasmid,

1 represents the enzyme-digested product of the plasmid DNA,

M represents the DL15000 + 2000 DNA Marker

图 4 *AmDREB2C* 植物表达载体

菌落 PCR 检测和质粒酶切鉴定图谱

Fig. 4 Confirmation of the *AmDREB2C* plant expression vector by colony PCR and restriction enzyme digestion

3 讨论

大量研究表明,植物在遭受干旱、冷冻和高盐等非生物胁迫时均会发生细胞脱水反应,并伴随出现许多基因表达量上调,*DREBs* 即为其中最为重要的一类上调表达基因。这类基因在结构、表达和功能方面存在差异,如目前发现所有的 *DREB1/CBF* 型基因均无内含子序列,而部分 *DREB2* 型基因,如水稻 *OsDREB2B* 含有内含子并存在可变剪接^[11,17];拟南芥 *CBF3/DREB1A* 主要受低温胁迫的诱导^[18],而水稻 *OsDREB2A* 则受干旱、高温和高盐胁迫的诱导^[17];番茄 *LeCBF1* 受低温诱导表达量迅速增加,而 *LeCBF2* 和 *LeCBF3* 对低温胁迫没有响应^[19];拟南芥 *CBF3/DREB1A* 除可显著提高转基因植物的抗寒性外,还可改善其抗旱和耐盐性^[10-11],而水稻 *OsDREB2B* 可增强转基因植物的抗旱和耐热性^[17],拟南芥 *DREB2C* 则在提高转基因植物的耐热性中起关键作用^[20]。

本研究首次从蒙古沙冬青中克隆到一个 *DREB2C* 类基因的 cDNA 和基因组 DNA,命名为 *AmDREB2C*。通过序列分析,发现其编码区内不含内含子,这与大多数已知的 *DREB* 基因一致,表明这类基因在结构上相当保守。此外,在其编码产物中含有 *DREB* 家族成员所共有的 1 个 AP2 结构域和核定位信号及 2 个保守的氨基酸残基 (V 和 E),表明其具备这类蛋白所共有的分子结构基础。从前期

利用 RNA-Seq 和本研究通过 RT-qPCR 获得的表达分析数据来看,均显示 *AmDREB2C* 受低温和干旱胁迫的诱导,尤其在低温胁迫下其诱导表达较为持久而强烈。这与其他植物 *DREB2* 型基因主要受干旱而非低温诱导明显不同^[10-11]。蒙古沙冬青兼具很强的抗寒和抗旱等抗逆特性,*AmDREB2C* 可能在其抵抗寒冷和干旱等恶劣环境,尤其是冬季严寒中发挥功能。本研究成功构建了该基因的植物表达载体,为后续通过转基因植物验证其功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘美芹,卢存福,尹伟伦.珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展[J].应用与环境生物学报,2004,10(3):384-388
- [2] 林清芳,王茅雁,刘佳杰,等.沙冬青细胞与分子生物学研究进展[J].植物遗传资源学报,2010,11(6):793-797
- [3] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 781-803
- [4] 刘佳杰,林清芳,王茅雁,等.蒙古沙冬青冷胁迫 SMART cDNA 文库的构建及序列分析[J].植物遗传资源学报,2011,12(5):770-774
- [5] 林清芳,王雪峰,王茅雁,等.蒙古沙冬青干旱胁迫全长 cDNA 文库构建及序列分析[J].生物工程学报,2012,28(1):86-95
- [6] Zhou Y J, Gao F, Liu R, et al. *De novo* sequencing and analysis of root transcriptome using 454 pyrosequencing to discover putative genes associated with drought tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1):266-278
- [7] Liu M Q, Shi J, Lu C F. Identification of stress-responsive genes in *Ammopiptanthus mongolicus* using ESTs generated from cold- and drought-stressed seedlings[J]. BMC Plant Biol, 2013, 13:88-102
- [8] Pang T, Ye C Y, Xia X L, et al. *De novo* sequencing and transcriptome analysis of the desert shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, during cold acclimation using Illumina/Solexa[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):488-503
- [9] Zhou M Q, Shen C, Wu L H, et al. CBF-dependent signaling pathway: A key responder to low temperature stress in plants [J]. Crit Rev Biotechnol, 2011, 31(2):186-192
- [10] Xu Z S, Chen M, Li L C, et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement[J]. J Integr Plant Biol, 2011, 53(7):570-585
- [11] Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(2):86-96
- [12] Wu Y Q, Wei W, Pang X Y, et al. Comparative transcriptome profiling of a desert evergreen shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, in response to drought and cold stresses [J]. BMC Genomics, 2014, 15:671-687
- [13] 林清芳,王存芳,赵欢欢,等.蒙古沙冬青总 RNA 提取与 mRNA 分离方法的研究[J].植物遗传资源学报,2011,12(3):460-463
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2002, 25(4):402-408
- [15] Yoh S, Liu Q, Joseph G D, 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
- [16] Zhou M L, Ma J T, Pang J F, et al. Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors[J]. Afr J Biotechnol, 2010, 9(54):9255-9279
- [17] Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. Mol Genet Genomics, 2010, 283(2):185-196
- [18] 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(8):1391-1406
- [19] Zhang X, Fowler S G, Cheng H, et al. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2004, 39(6):905-919
- [20] Lim C J, Hwang J E, Chen H, et al. Over-expression of the *Arabidopsis* DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(2):431-436