

拟南芥干旱胁迫诱导型启动子 RD29B 驱动 *AtCKX1* 基因植物表达载体的构建

高喜乐, 吴国江, 李美茹*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 从拟南芥基因组中分别克隆 *AtCKX1* 基因和 RD29B 基因 5'-侧翼 1705 bp 启动子区域序列, 生物信息学表明, *AtCKX1* 含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和细胞分裂素的结合位点; RD29B 启动子片段中存在 ABA 响应元件(ABA response element; ABRE)、Myb 结合位点、TATA-盒、CAAT-盒等顺式作用元件。分别将 *AtCKX1* 和 RD29B 插入载体 pCambia1390, 构建了由 RD29B 驱动的 *AtCKX1* 的植物二元表达载体 p1390RD29BA*AtCKX1*。

关键词: RD29B 启动子; *AtCKX1*; 表达载体构建

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0261-04

Construction of plant expression vector harboring *AtCKX1* driven by drought-inducible promoter of RD29B from *Arabidopsis*

GAO Xi-Le, WU Guo-Jiang, LI Mei-Ru*

(South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In this study, the cloning of *AtCKX1* and 5'-flanking promoter sequence of drought-inducible RD29B from *Arabidopsis* was reported. The 1705 bp promoter sequence was analyzed bioinformatically in the database of plant cis-acting regulatory element (PlantCARE). The result showed that there were several important cis-acting elements, including ABRE (ABA response element), Myb binding site, TATA-box, CAAT-box, in the 1705-bp promoter region. The binary vector harboring *AtCKX1* driven by RD29B promoter was further constructed to be used in coming plant transgene.

Key words: RD29B promoter; *AtCKX1*; expression vector construction

AtCKX1 是拟南芥中编码细胞分裂素氧化酶/脱氢酶 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase; CKX; EC 1.5.99.12) 的基因。CKX 是一类以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基, 以氧或人工合成的电子受体为氢受体, 催化裂解细胞分裂素或其核苷腺嘌呤 C6 位上的侧链, 生成腺嘌呤或腺苷和醛类化合物, 不可逆地降解细胞分裂素的酶 (Galuszka 等, 2001;

Frebirtiva 等, 2004; Kopečný 等, 2005)。该酶在调控细胞内或整株细胞分裂素水平中起着重要的作用, 是研究细胞分裂素生物学功能的重要手段 (Houba-Herlin 等, 1999; Morris 等, 1999; Werner 等, 2001, 2003, 2006)。RD29B 为拟南芥脱水诱导基因, 编码亲水蛋白。RD29B 基因启动子序列中含有一些应答逆境的特殊元件, 如逆境激素 ABA 响

收稿日期: 2008-05-15 修回日期: 2009-04-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B20201009); 广东省自然科学基金(07118251)[Supported by the Science and Technology of Guangdong Province (2006B20201009); the Natural Science Foundation of Guangdong Province(07118251)]

作者简介: 高喜乐(1983-), 男, 河南洛阳人, 硕士生, 研究方向为植物耐逆基因工程。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: limr@scbg.ac.cn)

元件(Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993; Nakashima 等, 2006), 该启动子是目前常用的逆境诱导型启动子, 指导靶基因在特定环境条件下表达产生基因产物。

低温、干旱和盐碱是影响植物生长发育的主要的非生物胁迫因子, 培育耐逆作物是提高作物产量的重要途径。植物在遭遇环境胁迫时, 表现为延缓或停止生长(戴开结等, 2006; 韩玉杰等, 2007), 植物延缓生长的目的可能是为了更好地储蓄物质和能量, 以抵御逆境(Achard 等, 2006)。植物延缓生长可能与植物体内激素水平的改变(如降低细胞分裂素水平)有关。干旱或热胁迫均有上调 CKX1 表达的作用(Werner 等, 2006), 胁迫下高水平 CKX1 表达是否是引起细胞内细胞分裂素水平下降的主要原因, 目前还不清楚。另一方面, 超表达 *AtCKX1* 的植株均表现了具有发达的根系(Werner 等, 2001, 2003)。一般而言, 发达根系的植物比弱根系具有更高抵抗营养、干旱胁迫的能力。超表达 *AtCKX1* 植株是否意味着具有高抗逆性, 目前还未见有这方面的研究报道。综上所述, 在逆境时调控植物体内编码 CKX 基因的表达, 提高根系的生长和进一步延缓地上枝条的生长速率可能对提高植株的抗旱性有着积极的作用。

本文构建了 RD29B 启动子驱动的 *AtCKX1* 基因的植物二元表达载体, 为研究 *AtCKX1* 在逆境条件下调控转基因株耐逆性中的作用, 尔后利用该策略改良作物抗逆性积累了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型 Columbia 种子为本实验室保存。种子消毒后接种于 1/2MS 培养基上, 放在温度 22 °C、光照度为 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的培养箱中培养。1 个月后, 取叶片提取 DNA。

1.2 载体、工具酶、试剂盒及其来源

pCAMBIA1390 载体和大肠杆菌 DH5a 为本实验室保存。pMD-T 载体、限制性内切酶、Taq 酶、T4 连接酶及相关试剂盒和试剂购自宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据 *AtCKX1* 基因序列(GeneBank Accession No. NM_129714)设计一对特定引物, *AtCKX1* F: 5'

ATT GGA TCC(*Bam*HI) ATG GGA TTG ACC TCA TCC TTA CGG TTC C 3'; *AtCKX1* R: 5' AAT GAA TTC(*Eco*RI) TTA TAC AGT TCT AGG TTT CGG CAG 3'; 根据 RD29B 启动子序列(GeneBank Accession No. D13044)设计一对引物, PF: 5' TTA GTC GAC(*Sal*I) GCG GAA GCT TCA TTT TCT GCT ACA G 3'; PR: 5' AAA GGA TCC(*Bam*HI) TTT CCA AAG CTG TGT TTT CTC TTT TTC 3'。引物合成委托广州英韦创津生物科技有限公司。

1.4 拟南芥基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 方法(Muhammad 等, 1994)从拟南芥叶片中提取总 DNA。

1.5 *AtCKX1* 基因和 RD29B 启动子片段的克隆、检测及测序

通过 PCR 方法从拟南芥基因组 DNA 分别扩增 *AtCKX1* 基因和 RD29B 启动子片段。PCR 反应条件均为: 94 °C 下变性 3 min, 然后按 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min 进行 35 轮的循环反应, 最后在 72 °C 下延伸 10 min。取 10 μL 反应液, 加入 1 μL DNA 上样缓冲液, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物分别克隆到 pMD 18-T 载体上, 通过 PCR 检测获得阳性克隆。阳性克隆送广州英韦创津生物科技有限公司测序分析, 获得 *AtCKX1* 序列和 RD29B 启动子序列。

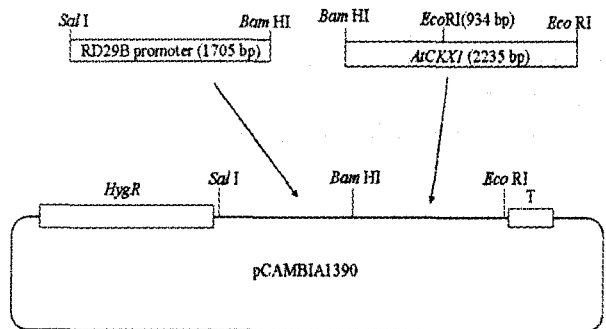


图 1 植物表达载体 p1390RD29BAAtCKX1 构建的示意图
Fig. 1 Construction map of plant expression vector p1390RD29BAAtCKX1
HygR, 潮霉素基因; T, 终止子。

1.6 二元表达载体的构建及检测

以 pCAMBIA1390 为基本植物表达载体, 先将 *AtCKX1* 引入载体中的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点。由于 *AtCKX1* 序列的 934 bp 处有一个 *Eco*RI 位点(图 1),

采用分段的方法将 *AtCKX1* 序列完整插入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点。首先用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 分别双酶切质粒 pCAMBIA1390 和含有 *AtCKX1* 片段的 pMD 18-T (pMD 18-T-*AtCKX1*), 回收酶切片段, 将 *AtCKX1* 部分片段 (934 bp) 与载体 pCAMBIA1390 大片段连接, 构建载体 p1390*AtCKX1*934。随后采用 *Eco*RI 分别酶切该载体和 pMD 18-T-*AtCKX1*, 回收目标片段后, 将 *AtCKX1* 部分片段 (1 301 bp) 插入载体 p1390*AtCKX1*934。通过 PCR 方法选择正确插入 *AtCKX1* 序列的载体 (p1390*AtCKX1*)。接着将 RD29B 启动子序列插入载体 p1390*AtCKX1* 的 *Sal*I 和 *Bam*HI 位点之间, 构建含 RD29B:*AtCKX1* 融合基因的植物表达载体 p1390RD29B*AtCKX1* (图 1)。将该载体送广州英韦创津生物科技有限公司测序分析。

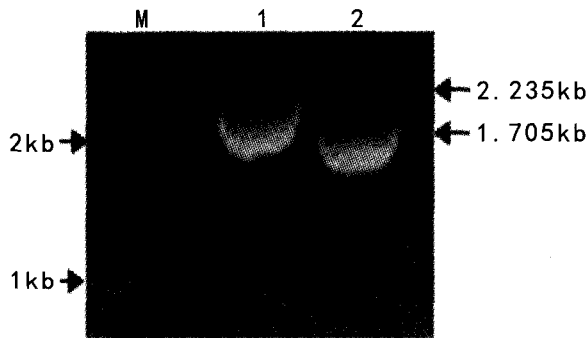


图 2 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增片段

Fig. 2 Agrose gel of electrophoresis of PCR products
M; DL2000 marker; 1; 以 *AtCKX1* F/*AtCKX1* R 为引物的 PCR 扩增产物; 2; 以 PF/PR 为引物的 PCR 扩增产物。

2 结果与分析

2.1 *AtCKX1* 和 RD29B 基因启动子片段克隆与分析

以拟南芥基因组 DNA 为模板, 分别以 *AtCKX1* F/*AtCKX1* R, PF/PR 为引物进行 PCR 扩增, 分别得到一个大片段 (>2 kb) 和一个小片段 (>1.5 kb) (图 2)。将此二片段分别回收后重组到 pMD 18-T 载体上 (重组载体分别命名为 pMD 18-T-*AtCKX1* 和 pMD 18-T-RD29B)。测序结果经 BLAST 分析表明, 大片段为 *AtCKX1* 的 DNA 序列, 大小 2235 bp, 该序列进一步经 NCBI 保守结构域分析, 发现有二个结构域, 一个为 FAD 结合位点, 另一个为细胞分裂素结合位点; 小片段为 RD29B 的启动子片段,

大小为 1705 bp。将这 1705 bp 序列在国际植物顺式作用元件数据库 PlantCARE 中进行生物信息学分析, 搜寻结果表明, 分别在该启动子序列 -575-579、-654-658、-1587-1591 处有典型的 TATA-box; -644-648、-1372--1376 处有典型的 CCAAT-box; -1491-1497 片有一 ABA 响应元件 ABRE, 核心序列为 ACGTGGC; -1472-1477 处有一 Myb 结合位点, 核心序列为 CAACTG。

2.2 RD29B:*AtCKX1* 融合基因的构建

克隆的 *AtCKX1* 序列经 BioEdit 软件分析, 发现在 934 bp 处有一个 *Eco*RI 酶位点 (图 1) 通过分段的方法将 *AtCKX1* 序列完整插入 pCAMBIA1390 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点之间。以 *AtCKX1*F 和 *AtCKX1*R 为引物对含有 p1390*AtCKX1* 载体的转化子进行 PCR 检测, 只有正确连接的载体, 才能扩增出特异的 *AtCKX1* 的片段, 图 3 PCR 实验结果表明“1”是含有正确插入 *AtCKX1* 完全序列的载体 (p1390*AtCKX1*)。

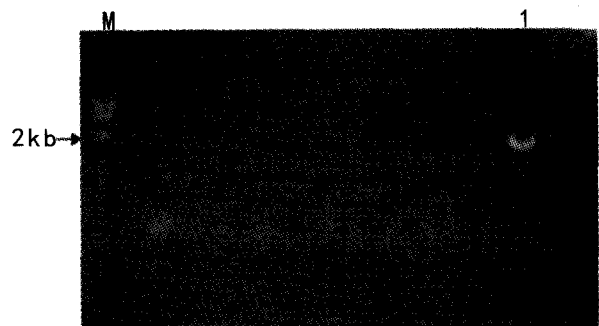


图 3 PCR 检测 p1390*AtCKX1* 载体

Fig. 3 Detection of p1390*AtCKX1* by PCR using *AtCKX1*F and *AtCKX1*R as primers.

M; λ /Hind III marker; 1; p1390*AtCKX1* vector.

将 RD29B 启动子片段插入 p1390*AtCKX1* 载体的 *Sal*I 和 *Bam*HI 位点间, 构建载体 p1390RD29B*AtCKX1*。因在 *AtCKX1* DNA 的 934 bp 处有一个 *Eco*RI 位点, RD29B 启动子片段长 1705 bp, 用 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切 RD29B*AtCKX1*, 可切下三个不同大小的片段 (图 1, 图 4): 2 639 bp 为 RD29B 启动子 1705 bp 加上一段 *AtCKX1* (934 bp), 一段 *AtCKX1* (1301 bp) 和 pCAMBIA1390 (8860 bp), 说明该载体是含有 p1390RD29B:*AtCKX1* 融合基因的植物表达载体。测序结果也表明连接完全正确。

3 讨论

细胞分裂素在植物生长发育、形态建成、叶片衰老、养分运输、细胞分裂、逆境响应等方面起着重要的调控作用(Mok DW & Mok MC, 2001)。细胞分裂素氧化酶/脱氢酶是目前唯一发现的不可逆地降解细胞分裂素、调控组织器官细胞分裂素水平的一个重要酶,因此,该酶是研究细胞分裂素生物学功能的重要工具。该酶在植物中含量很低,40 kg 的玉米粒才能制备微克水平的酶蛋白,酶活性具有组织

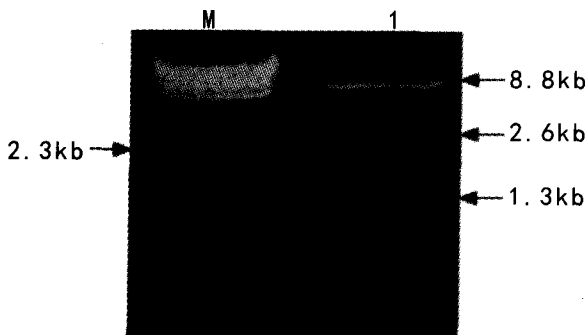


图4 *Sal*I和*Eco*RI双酶切检测
p1390RD29BAAtCKX1载体

Fig. 4 Analysis of p1390RD29BAAtCKX1 by
double digestion with *Sal*I and *Eco*RI

M: λ /Hind III marker; 1: digested p1390AtCKX1.

特异性,其基因受发育调控,同时,受细胞分裂素、非生物或生胁迫因子的诱导(Werner等,2006)。采用非组成型启动子,使细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因在特定时期或组织部位中表达是研究和利用细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因功能和基因资源的重要手段。拟南芥RD29B基因的启动子被证明是干旱和高盐诱导型启动子(Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993; Nakashima等,2006),在逆境时可驱使靶基因的表达,有利于研究或发挥靶基因在逆境条件下的作用,而避免大量的靶基因产物对正常生长条件下转基因植物的负面影响。构建RD29B启动子驱动的AtCKX1基因的植物双元表达载体p1390RD29BAAtCKX1(图4),为研究在逆境条件下细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因在调控转基因株耐逆性中的作用打下基础。

参考文献:

- Achard P, Cheng H, de Grauwe L, et al. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals [J]. *Science*, **311**(5757): 91-94
- Dai KJ(戴开结), He F(何方), Shen YX(沈有信), et al. 2006. Biomass and its allocation of *Pinus yunnanensis* seedlings under phosphorus deficiency(低磷胁迫下云南松幼苗的生物量及其分配)[J]. *Guihaia*(广西植物), **26**(2): 183-186
- Frébertová J, Fraaije MW, Galuszka P, et al. 2004. Catalytic reactions of cytokinin dehydrogenase: preferences for quinines as electron acceptors[J]. *Biochem J*, **380**(Pt1): 121-130
- Galuszka P, Frébert I, Sebela M, et al. 2001. Cytokinin oxidase or dehydrogenase mechanism of cytokinin degradation in cereals [J]. *Eur J Biochem*, **268**(2): 450-461
- Han YJ(韩玉杰), Xu ZF(徐志防), Ye WH(叶万辉), et al. 2007. Characteristics of chlorophyll fluorescence and comparison of drought resistance among different species of karst plants(不同类型喀斯特植物的荧光特征及抗旱性比较)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(6): 918-922
- Houba-Herin N, Pethe C, d'Alayer J, et al. 1999. Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts[J]. *Plant J*, **17**(6): 615-626
- Kopecny D, Pethe C, Sebela M, et al. 2005. High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biochimie*, **87**(11): 1 011-1 022
- Mok DW, Mok MC. 2001. Cytokinin metabolism and action[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**: 89-118
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, et al. 1999. Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**(2): 328-333
- Muhammad AL, Ye GN, Weeden NF, et al. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **12**(1): 6-13
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, et al. 2006. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Bio*, **60**(1): 51-68
- Werner T, Kollmer I, Bartrina I, et al. 2006. New insights into the biology of cytokinin degradation[J]. *Plant Biol*, **8**(3): 371-381
- Werner T, Motyka V, Laucou V, et al. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity[J]. *Plant Cell*, **15**(11): 2 532-2 550
- Werner T, Motyka V, Strnad M, et al. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **98**(18): 10 487-10 492
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants [J]. *Mol Gen Genet*, **236**(2-3): 331-340