

紫花苜蓿逆境胁迫诱导相关转录因子 *MsDREB1* 基因克隆与分析

牛一丁, 哈斯阿古拉*, 张丽, 扈廷茂

内蒙古大学生命科学学院生物工程中心, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 呼和浩特010021

摘要: 利用 RT-PCR 方法, 从紫花苜蓿中扩增得到一个新的转录因子 *MsDREB1* 基因 cDNA, 克隆该 cDNA 并进行序列分析, 结果表明该 cDNA 包含一个长 651 bp 的开放阅读框, 编码一条含 216 个氨基酸的多肽, 分子量约为 24.9 kDa, 等电点为 6.11。蛋白质 Blast 数据显示, 该多肽属于 EREBP/AP2 家族 DNA 结合蛋白的典型成员。进一步克隆了该基因的基因组 DNA, 序列分析表明该基因无内含子。Southern blot 分析表明, 该基因在紫花苜蓿基因组中以 2 拷贝存在。

关键词: 紫花苜蓿; DREB 转录因子; 胁迫

Cloning and Analysis of a New Stress-inducible Transcription Factor *MsDREB1* Gene from Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

NIU Yi-Ding, Hasi Agula*, ZHANG Li, HU Ting-Mao

Inner Mongolia Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Biotechnology Center, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: A new DRE-binding protein gene *MsDREB1* cDNA that encoded an EREBP/AP2 type transcription factor was isolated by RT-PCR from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. The *MsDREB1* had an open reading frame of 651 bp, which encoded 216 amino acid residues. The putative protein was deduced to have a predicted molecular mass of 24.9 kDa and a *pI* of 6.11. The Protein Blast data revealed that this protein could be classified as a typical member of the EREBP/AP2 family of DNA-binding proteins. The comparison of the *MsDREB1* cDNA with the *MsDREB1* gene in genomic DNA showed that the size and nucleotide sequence of the cDNA were the same as that of the genomic DNA. This indicates that the genomic *MsDREB1* gene has no introns. Southern blot analysis indicates that it is a double-copy gene.

Key words: alfalfa (*Medicago sativa* L.); DREB transcription factor; stress

苜蓿是世界上分布范围最广、种植面积最大的多年生豆科牧草, 在我国也是最重要的牧草之一。紫花苜蓿产量高、营养价值丰富、适口性好, 有“牧草之王”的美誉。但紫花苜蓿抗逆性差, 因此对它的抗逆性进行改良具有重要的应用前景。

DREB 类转录因子是植物特有的一类转录因子, 与植物对低温、干旱和高盐胁迫应答关系紧密。Liu 等(1998)分别从低温、干旱诱导的拟南芥中分离得到 2 类共 5 个 DREB 类转录因子, 利用 DREB1A 培育的转基因拟南芥植株的低温耐性比野生型植株显著增强。随后, 关于 DREB 转录因子的研究在国内外广泛开展了, 大麦(Choi 等 2002)、水稻(Dobouzet 等 2003)、高羊茅(Tang 等 2005)、甜瓜(Mizuno 等 2006)、蓝桉(Gamboia 等 2007)、大豆(Chen 等 2007)、棉花(Huang 等 2008)等植物中均有 DREB 类转录因子基因分离鉴定的报

道。本文报道紫花苜蓿的一个 DREB 转录因子基因 cDNA 的克隆与分析。

材料与方法

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种‘阿尔冈金’(Algonquin)由中国农业科学院草原研究所徐柱研究员提供。异硫氰酸胍购自华美生物工程有限公司, 反转录试剂盒 ThermoScript™ RT-PCR System 为 Invitrogen 产品, UNIQ-10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, Taq DNA 聚合酶、dNTP、pMD19-T 载体、DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公

收稿 2008-02-25 修定 2008-04-30

资助 国家自然科学基金(30460058)和内蒙古自然科学基金(200508010503)。

* 通讯作者(E-mail: lshasi@imu.edu.cn; Tel: 0471-4992209)。

司(TaKaRa), 随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 为北京福瑞生物工程公司产品, 尼龙膜 Immobilon-NY⁺ 为 Millipore 产品。 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。

根据本实验室已克隆得到的野生黄花苜蓿逆境胁迫诱导转录因子 *MfDREB1* 基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号 EF654111) 设计基因特异引物: 上游引物 P1: 5'-CAAACCTCTCTCCAATTCCGAC-3', 下游引物 P2: 5'-GGATGAGATGCACTTTATGC-3', 引物由上海生工生物工程公司合成。

以常规异硫氰酸胍法 (Sambrook 和 Russell 2001) 提取经 4 ℃ 冷诱导 12 h 的紫花苜蓿总 RNA, 反转录按照 Invitrogen 公司产品说明书进行。以反转录得到的 cDNA 第一链为模板, P1、P2 为上下游引物进行 PCR 扩增。扩增条件: 94 ℃ 预变性 5 min, 然后进行循环反应, 即 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 循环 30 次, 最后 72 ℃ 保温 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。扩增片段用 UNIQ-10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化。纯化产物与 pMD19-T 载体连接。连接物转化用 CaCl₂ 法制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上挑选白色菌落, 用快速提质粒法筛选出重组子, 用 PCR 方法鉴定阳性克隆。随机挑取 3 个独立的重组克隆进行测序。

取无菌培养的紫花苜蓿幼苗叶片, 用 SDS 法 (安宝燕 2005) 提取总 DNA。取 300 ng DNA 为模板, P1 和 P2 为上下游引物, 按照上述条件进行 PCR 扩增。将扩增片段和 RT-PCR 产物同时经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。同时按照上述方法克隆基因组 DNA, 进行测序。

Southern 杂交时取无菌培养的紫花苜蓿幼苗叶片, 用 SDS 法 (安宝燕 2005) 提取基因组 DNA, 用限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xba*I 分别完全消化 20 μ g 基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳, 用毛细管转移法将 DNA 转移至尼龙膜 Immobilon-NY⁺, 以 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 标记 *MfDREB1* 基因 cDNA 片段作为杂交探针, 按照文献 (Sambrook 和 Russell 2001) 方法进行杂交。

实验结果

1 *MfDREB1* 基因 cDNA 的克隆与序列分析

以反转录得到的 cDNA 为模板, P1、P2 为

引物扩增得到的 PCR 产物长度约为 0.9 kb (图 1)。序列分析表明得到的基因片段长 902 bp, 包含一个 651 bp 的 ORF (开放阅读框)、68 bp 的 5'-UTR (5' 端非编码区) 及 183 bp 的 3'-UTR (3' 端非编码区), 该基因编码一个 216 个氨基酸残基的多肽, 分子量约为 24.9 kDa, 等电点为 6.11, 将得到的基因命名为 *MfDREB1*, 序列提交 GenBank, 注册号为 EU233782 (图 2)。根据推测的氨基酸序列, *MfDREB1* 蛋白含有一个高度保守的 EREBP/AP2 结构域, *MfDREB1* 与其他植物 CBF/DREB 类转录因子氨基酸序列对比结果见图 3。

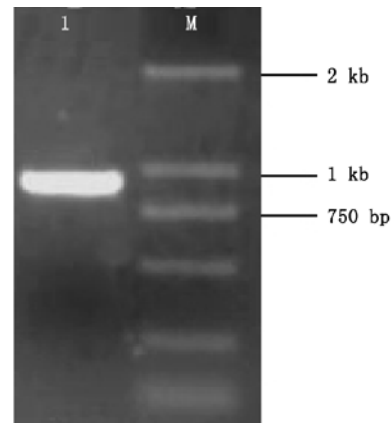


图 1 紫花苜蓿 *MfDREB1* cDNA RT-PCR 扩增
Fig.1 Amplification of *MfDREB1* cDNA by RT-PCR from alfalfa
1: *MfDREB1* cDNA; M: DL-2000 Marker.

2 基因组中 *MfDREB1* 基因的分析

分别用苜蓿基因组 DNA 和 cDNA 为模板, P1、P2 为上下游引物进行 PCR 扩增, 扩增片段同时经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测; 同时将基因组 DNA 测序结果与 cDNA 序列对比。结果显示, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应得到的扩增片段与以 cDNA 为模板进行 PCR 反应得到的扩增片段大小相同 (图 4), 基因组 DNA 序列与 cDNA 序列完全一致, 这说明紫花苜蓿基因组中 *MfDREB1* 基因无内含子。

3 Southern 杂交分析

用限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xba*I 分别完全消化紫花苜蓿基因组 DNA, 毛细管转移法将消化产物转移至尼龙膜 Immobilon-NY⁺, 以 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 标记的 *MfDREB1* 基因 cDNA 片段作为杂交探针进

```

1      CAAACTCTCTCCAATTCGGACTTTGCCTCTCAACACCAATTTCCACTCTATCCAACACATACATATAT
69  ATG  ATT  AAT  ACC  AAC  AAC  TCT  TCC  TAT  TCA  CAC  TCC  ATT  TAC  TCA  AAA  GAT  TTT  TCT  CCC
1  M  I  N  T  N  N  S  S  Y  S  H  S  I  Y  S  K  D  F  S  P
129  TTT  GAC  GCA  TCA  TCA  CCG  GAT  TCT  GAG  GTG  CGG  TTA  GCA  GCA  AGC  AAC  CCG  AAG  AAG  CGA
21  F  D  A  S  S  P  D  S  E  V  R  L  A  A  S  N  P  K  K  R
189  GCA  GGG  AGG  AAG  ATA  TTT  AAG  GAA  ACT  CGC  CAC  CCG  GTC  TAT  AGA  GGT  GTG  AGG  AAG  AGG
41  A  G  R  K  I  F  K  E  T  R  H  P  V  Y  R  G  V  R  K  R
249  AAC  TTA  GAT  AAA  TGG  GTT  TGT  GAA  ATG  AGG  GAA  CCC  AAC  ACG  AAG  ACT  AGG  ATT  TGG  CTA
61  N  L  D  K  W  V  C  E  M  R  E  P  N  T  K  T  R  I  W  L
309  CGA  ACT  TTT  CCA  ACA  CCT  GAG  ATG  GCA  GCC  CGT  GCC  CAC  GAT  GTT  GCC  GCG  ATG  GCA  TTG
81  G  T  F  P  T  P  E  M  A  A  R  A  H  D  V  A  A  M  A  L
369  AGG  GGA  CGC  TAC  GCC  TGT  CTC  AAT  TTC  GCA  GAC  TCG  ATG  TGG  CGC  CTT  CCT  ATT  CCA  GCA
101  R  G  R  Y  A  C  L  N  F  A  D  S  M  W  R  L  P  I  P  A
429  AGT  TCC  TCA  ATA  AAA  GAT  ATT  CAA  AAG  GCA  GCT  ACA  AAA  GCC  GCC  GAA  GCT  TTT  AGA  CCA
121  S  S  S  I  K  D  I  Q  K  A  A  T  K  A  A  E  A  F  R  P
489  GAC  AAT  ACT  TTA  ATG  ACC  AAC  GAC  ATT  GAC  ACT  GTT  GTA  GCT  ACC  GTC  GCC  ACA  AAG  GAG
141  D  N  T  L  M  T  N  D  I  D  T  V  V  A  T  V  A  T  K  E
549  CTG  AAT  ATG  TTT  TGT  GTG  GAA  GTT  GAA  GAA  GAG  CAG  GAA  ATG  TTG  AAT  ATG  CCA  GAG  TTG
161  L  N  M  F  C  V  E  V  E  E  E  Q  E  M  L  N  M  P  E  L
609  TGG  AGG  AAT  ATG  GCG  TTG  ATG  TCC  CCT  ACA  CAT  AGC  TTT  GAG  TAT  CAT  GAG  TAT  GAA  GAT
181  W  R  N  M  A  L  M  S  P  T  H  S  F  E  Y  H  E  Y  E  D
669  ATT  CAT  GTA  CAA  GAC  TTT  CAA  GAT  GAT  GAG  GTA  TCA  CTA  TGG  AAC  TTT  TAA  ATTAATGTCT
201  I  H  V  Q  D  F  Q  D  D  E  V  S  L  W  N  F  *
731  TTAGTTTACITTTCTTTTGGATCGTAGAATAGGAAATGTCTATACTACAACCCITTTAATTAGTAACATAAATACTGCAI
812  ATACATAGGTTGAAATAAAACAGAATTTCITTTTATAGCTTTTTTGTGAATTATTAATCACTAATCAAGCATAAAGTG
893  CATCTCATCC

```

图2 *MsDREB1* 基因 cDNA 核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *MsDREB1* cDNA

虚线下划线部分为引物序列, 实线下划线部分为 EREBP/AP2 结构域。

行 Southern 杂交, 杂交膜在 -80 进行放射自显影 7 d, X 光片经显影、定影处理。杂交结果(图 5)显示, 经 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xba*I 完全酶切后均出现 2 条较明显的杂交条带, 这表明 *MsDREB1* 基因在紫花苜蓿基因组内为 2 个拷贝。

讨 论

通过对紫花苜蓿 *MsDREB1* 基因的 cDNA 及基因组 DNA 进行分析, 证明该基因与其他物种的 *DREB* 基因一样, 基因内无内含子存在。紫花苜蓿为异源四倍体牧草, 遗传背景较为复杂, 其基因组 DNA 分别经 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xba*I 完全酶切后, 与基因探针进行杂交, 均出现 2 条明显的杂

交条带, 该结果表明 *MsDREB1* 基因在紫花苜蓿基因组中以 2 拷贝存在。

国内外许多研究表明 *DREB* 转录因子与植物对干旱、低温、高盐胁迫应答密切相关(刘强等 2000; Choi 等 2002; 刘录祥等 2003; 韩兆雪等 2004; 阳文龙等 2006), 在 *DREB* 转基因植物中, *DREB* 转录因子基因的超表达可以激活下游靶基因的表达, 从而提高植物对低温、高盐、干旱等逆境的耐受性。但是对于紫花苜蓿 *DREB* 基因的研究, 在国内外还未见正式报道。本研究首次从紫花苜蓿中分离得到 *MsDREB1* 基因, 将为改良紫花苜蓿品质, 改善其抗逆性状提供一个候选目的基因。

MsDREB1.seq	MINTNNSYSHSIYSKDFSPFDASSPDSEVRLAASNPKKR	40
TaCBF.seqMDTAAAG.....SPREGHRTVCSEPPKRP	24
FaDREB1A.seqMDAAVAAS.LSLQSGEQEYRTVWSEPPKRP	29
HvCBF.seqMDMGLEVSSSSPSSSSVSSSPEHAARRASPAKRP	34
OsDREB1A.seq	...MCGIKQEMSGESSGSPCSSASAERQHQTVWTAPPKRP	37
AtDREB1A.seq	...MNSFSAFSEMFGSDYESSVSSGGDYIPTLASSCPKKP	37
Consensus	s k	
MsDREB1.seq	AGRKIFKETRHPVYRGVRRK.NLDKWVCEMREPNTK.TRI	78
TaCBF.seq	AGRTKFRRETRHPLYRGVRRRGRLGQWVCEVRVRGAQQYRL	64
FaDREB1A.seq	SGRTKFFQETRHPVYRGVRRRGRAGQWVCEMRVHGTGKSRL	69
HvCBF.seq	AGRTKFRRETRHPVYRGVRRRGNTERWVCEVRVPGKRGARL	74
OsDREB1A.seq	AGRTKFRRETRHPVYRGVRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGCRL	77
AtDREB1A.seq	AGRKKFRRETRHPLYRGVRRR.NSGKWVCEVREPNTK.TRI	75
Consensus	gr f etrh p rgvr r wvce r r	
MsDREB1.seq	WLGTFTPEMAARAHDAAMALR.....GRYACLNFADS	112
TaCBF.seq	WLGTFTTAEMAARAHDSAVLALL.....DRAACLNFADS	98
FaDREB1A.seq	WLGTFDTAEMAARAHDAALALS.....GRDAACLNFADS	103
HvCBF.seq	WLGTYATAEVAARANDAAMLAL.....GGRSATCLNFADS	109
OsDREB1A.seq	WLGTFDTAEGAARAHDAAMLAINAGGGGGGACCLNFADS	117
AtDREB1A.seq	WLGTFTTAEMAARAHDAALALR.....GRSACLNFADS	109
Consensus	wlgt t e aara d a a clnfads	
MsDREB1.seq	MWRLPIPAS.....SSIKDIQKA...ATKAEEAFR	139
TaCBF.seq	AWR.MLPVLAAGSS..RFSSAREIKDA...VAIAVLEFQ	131
FaDREB1A.seq	AWR.MQPVLPAAGAGSVCFGGAQEVKDA...VAAVEAFQ	138
HvCBF.seq	AWLLAVPSALSADLADVRRAAVEAVADFQRREADGSLAIA	149
OsDREB1A.seq	AWLLAVPRSYRTLADVRHVAEAEVEDFFRRRLADDALSAT	157
AtDREB1A.seq	AWRLRIPES.....TCAKDIQKA...AAEAALAFQ	136
Consensus	w p	
MsDREB1.seq	PDNTLMTNDI.....DTVVATVATKELNMF.....	165
TaCBF.seq	RQRPVVTSEMHDGEKDAQSPTPSELSTSSD.....	163
FaDREB1A.seq	EEHHVESTAETAKEES.ALSMSSDLSEHD.....	168
HvCBF.seq	VPKEASSGAPSLSPSSGSDSAGSTGTSEPSANGVFEGPVV	189
OsDREB1A.seq	SSSTTPSTPRTDDDEESAATDGESSSPASD.....	189
AtDREB1A.seq	DEMCDATTDHGFDMETLVEAIYTAEQSENA.....	167
Consensus		
MsDREB1.seq	...VEVEEQEMLNMPELWRNMAELMSPTHSFE...YHE	197
TaCBF.seq	...LLDEHWFGGMDAGSYASLAQGLMEPPS...ART	195
FaDREB1A.seq	...DERWIDGMDAGSYASLAQGLVEPPD...AGA	198
HvCBF.seq	MDSEMFRDLDFPEMDLGSYYMSLAELMDDPPPTATIHA	229
OsDREB1A.seq	...LAFELDVLSDMGWLDYYASLAQGLMEPPS...AA	221
AtDREB1A.seq	...FYMHDEA.MFEMPSLLANMAEG.MLLPLP...SVQ	197
Consensus	a	
MsDREB1.seq	YEDIHVQDFQDDEVSLWNF....	216
TaCBF.seq	WSEDGG.EYSAVYTPLWN....	212
FaDREB1A.seq	WREDG..EHGGVETSLWSYL...	216
HvCBF.seq	YEDNG..DGG.ADVRLWSYSVDM	249
OsDREB1A.seq	LGDDG..DAILADVPLWSY....	238
AtDREB1A.seq	WNHNHEVDGDDDDVSLWSY....	216
Consensus	lw	

图3 MsDREB1与其他植物CBF/DREB类转录因子氨基酸序列对比

Fig.3 Amino acid sequence alignment of MsDREB1 and other CBF/DREB transcription factors
 GenBank 登录号分别为: MsDREB1 (EU233782)、TaCBF (AF376136)、FaDREB1 (AY423713)、HvCBF (AF239616)、OsDREB1A (AF300970)和AtDREB1A (AB007787)。

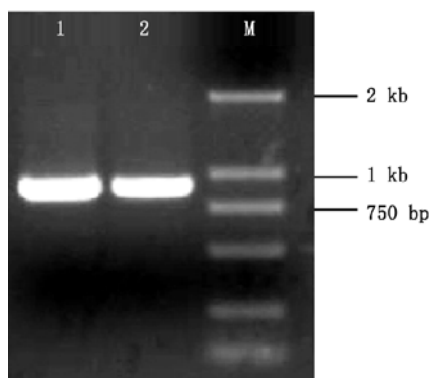


图4 基因组中 *MsDREB1* 基因大小分析

Fig.4 Analysis of the size of the genomic *MsDREB1* gene

1 : 以紫花苜蓿基因组 DNA 为模板时的 PCR 产物 ; 2 : RT-PCR 产物 ; M : DL-2000 Marker。

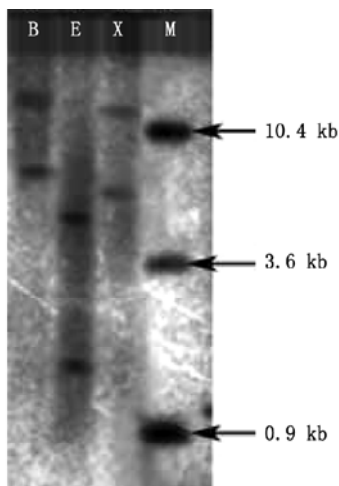


图5 Southern blot 分析

Fig.5 Analysis of the Southern blot

B : *Bam*HI 酶切杂交结果 ; E : *Eco*RI 酶切杂交结果 ; X : *Xba*I 酶切杂交结果 ; M : 分子量标记。

参考文献

安宝燕(2005). 紫花苜蓿 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的分离与鉴定 [学位论文]. 泰安: 山东农业大学
韩兆雪, 曹墨菊, 朱祯, 荣延昭(2004). DREB 基因双 T-DNA 植物表达载体的构建及验证. 分子植物育种, 2 (1): 7~12

刘录祥, 赵林妹, 梁欣欣, 郑企成, 刘强, 王晶, 郭会君, 赵世荣, 陈文华(2003). 基因枪法获得逆境诱导转录因子 DREB1A 转基因小麦的研究. 中国生物工程杂志, 23 (11): 53~56
刘强, 赵南明, Yamaguchi-shinazaki K, Shinozaki K (2000). DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. 科学通报, 45 (1): 11~16
Sambrook J, Russell DW (2001). 黄培棠, 王嘉玺, 朱厚础, 张兆山, 陈惠鹏, 范明, 俞炜源, 贺福初译. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 487~522
阳文龙, 刘敬梅, 刘强, 公衍道, 赵南明(2006). 高羊茅 DREB 类转录因子基因的分离及鉴定分析. 核农学报, 20 (3): 187~192
Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ (2007). *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochem Biophys Res Commun, 353: 299~305
Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ (2002). Barley *cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. Plant Physiol, 129: 1781~1787
Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant J, 33: 751~763
Gamboa MC, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela PDT, Krauskopf E (2007). Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globules*. Plant Physiol Biochem, 45: 1~5
Huang B, Jin LG, Liu JY (2008). Identification and characterization of the novel gene *GhDBP2* encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). J Plant Physiol, 165: 214~223
Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). 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*. Plant Cell, 10: 1391~1406
Mizuno S, Hirasawa Y, Sonoda M, Nakagawa H, Sato T (2006). Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). Plant Sci, 170: 1156~1163
Tang MJ, Lü SY, Jing YX, Zhou XJ, Sun JW, Shen SH (2005). Isolation and identification of a cold-inducible gene encoding a putative DRE-binding transcription factor from *Festuca arundinacea*. Plant Physiol Biochem, 43: 233~239