

银新杨中与 DRE 元件结合的转录因子的克隆及鉴定分析

Isolation and Characterization of a DRE-binding Transcription Factor from Yinxin Poplar (*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*)

秦红霞^{1 2 3}, 贾志平², 张海超², 刘敬梅^{2*}, 宋玉霞^{3*}

QIN Hong-Xia^{1 2 3}, JIA Zhi-Ping², ZHANG Hai-Chao², LIU Jing-Mei^{2*} and SONG Yu-Xia^{3*}

1 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021

2 北京扬华生物科技有限公司, 北京 100101

3 宁夏农业生物技术重点实验室, 银川 750002

1 College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2 Beijing Yanghua Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100101, China

3 Ningxia Agricultural Bio-technological Lab, Yinchuan 750002, China

摘 要 DREB 类转录因子特异地与 DRE 元件结合, 在植物感受非生物逆境(干旱、高盐和低温)胁迫时, 激活一系列逆境应答基因的表达。我们选用银新杨(*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*)为材料, 通过 PCR 和同源 EST 搜索的方法克隆得到了一个类 DREB 的基因, 命名为 PaDREB2。酵母单杂交实验表明, 该基因编码的蛋白能特异地与 DRE 元件结合并激活下游报告基因的表达。用 RT-PCR 的方法研究了 PaDREB2 的表达模式, 结果表明 PaDREB2 受低温、干旱和高盐的胁迫诱导。

关键词 DREB 转录因子, 脱水应答元件(DRE), PaDREB2

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0906-05

Abstract Dehydration-Responsive Element Binding (DREB) transcription factors, specifically binding with dehydration responsive element (DRE), activate a variety of stress-responsive genes in plants under abiotic stresses (dehydration, high salt and low temperature). Using PCR and homologous EST search, we isolated a DREB-like gene from Yinxin poplar (*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*) named PaDREB2. Yeast One-hybrid experiment demonstrated that PaDREB2 protein could function as a DREB transcription factor activating target gene expression by specifically binding to DRE cis-element. To study the expression pattern of PaDREB2, RT-PCR was carried out. And the results showed that PaDREB2 is induced by low temperature, drought and high salt.

Key words DREB transcription factor, dehydration responsive element (DRE), PaDREB2

DREB (Dehydration-Responsive Element Binding) 转录因子是一类植物特有的, 在非生物逆境胁迫应答中起重要作用的调控因子。该类转录因子含有一个 AP2/EREBP 结构域 (简称为 AP2 结构域)^[1]。AP2 结

构域约由 58 个氨基酸组成, 负责与 DRE (Dehydration-Responsive Element)/CRT (C-repeat) 元件的相互作用, 从而实现 DREB 转录因子对一系列干旱、高盐和低温胁迫应答基因的表达调控^[2-3]。

DRE 元件或其核心序列广泛地存在于干旱、高盐和低温胁迫应答基因的启动子区,并参与这些基因的诱导表达调控^[4-7]。1998 年 Liu 等^[8]从拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中分离得到了 5 个与 DRE 元件结合的转录因子,分别命名为 DREB1A、DREB1B、DREB1C 和 DREB2A、DREB2B,这 5 个转录因子分属于 DREB1 和 DREB2 两个亚类。DREB1A、DREB1B、DREB1C 分别对应着 Thomashow 研究小组分离得到的 CBF3、CBF1 和 CBF2^[9-10]。DREB1 类受低温诱导,而 DREB2 类受干旱或高盐的诱导^[8],但这 5 个基因的共同点是都不受外源 ABA 的诱导^[8]。

自 DREB 转录因子被首次报道以来受到了广泛的关注,目前除拟南芥外,还从水稻(*Oryza sativa* L.)^[11]、油菜(*Brassica napus* L.)^[12]、玉米(*Zea mays* L.)^[13]等多种植物中分离得到了 DREB 类转录因子。同时屡见报道将 DREB 基因用于改良植物抗逆性的基因工程中,并获得了抗逆性状得到改善的转基因植株^[8,14-16]。这些结果表明 DREB 类转录因子广泛存在于植物体内,并有望成为植物抗逆基因工程育种中重要的目的基因。

杨树分布广、适应性强、生长速度快,是我国重要的造林和用材树种。但在一些水资源缺乏、土地盐渍化严重的地区,杨树的生长受到很大影响,急需培育一批抗逆性强的优良品种。因此研究与杨树抗逆性相关的基因,并开展杨树抗性育种是杨树育种的一个重要方面。银新杨(*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*)是经过人工杂交育种培育出的生长速度快、抗旱、抗寒能力强的品种。本研究选用银新杨为材料,从中分离得到类 DREB 基因,期望能使 DREB 基因在改良杨树抗逆性的基因工程中得到应用。该研究目前还未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

银新杨试管苗和 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。酵母单杂交系统(单杂交酵母 YM4217、表达载体 YepGAP112 和 *AtDREB1A* 质粒)为清华大学刘强教授惠赠。pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司;Real Time One Step RNA PCR Kit 和 3'-Full RACE Core Set 购自 TaKaRa 公司;TRIZOL REAGENT 购自 Invitrogen 公司;SD/His⁻, Trp⁻, Ura⁻ 和 One-Hybrid System 购自 Clontech 公司。

1.2 材料的准备及总 RNA 的提取

选取 20d 左右的生根无菌苗分别进行多种胁迫

处理:盐处理(250mmol/L NaCl 溶液)、4℃低温处理和干旱处理。在逆境条件下,DREB 基因可在 15min 内开始积累转录^[8],所以分别在材料处理 1、3、5、7、12、24 和 48h 时收集植物材料,用 TRIZOL 法提取总 RNA。

1.3 AP2/EREBP 保守区的获得

DREB 类转录因子具有高度同源的 AP2 结构域,根据该特点设计 AP2 保守区的简并引物:5'T(TT/A)C,AG(A/C),GGG,ATA(A/C)GG,ATG(A/C)G 3'和 5'GGA,AC(A/C)G(T),TT(A/T),AC(G/A)C(A),CT(G)A,GCA,T 3'。选用 Real Time One Step RNA PCR Kit 进行扩增,反应条件:50℃ 30min,94℃ 2min,94℃ 30s/51.7℃ 30s/72℃ 30s(33 个循环),72℃ 10min。

1.4 5'端获得

使用 NCBI(美国国立生物技术信息中心)提供的 BLAST 服务,搜索与克隆得到的 AP2 保守区同源的 EST 序列。

1.5 3'RACE 扩增

用 DNAMAN 软件拼接克隆得到的 AP2 保守区和搜索得到的 EST 序列,并设计 3'RACE 引物:5'CAGAGGAGTGAGACAGAGGAC 3'和 5'TCGGGAACCA AACAAAGG 3',采用 3'-Full RACE Core Set 进行嵌套式 3'RACE 扩增。反应分两步进行:①RT 反应:30℃ 10min/50℃ 30min/95℃ 5min/5℃ 5min;②PCR 反应:94℃ 30s/55℃ 30s/72℃ 90s(33 个循环),72℃ 10min。

1.6 基因全长的获得

将得到的 3'端序列和 EST 序列用 DNAMAN 软件进行分析拼接,并设计引物:5'TGTAGTTTGGCTGTACTGGG 3'和 5'TCCCTTCTAAACCATG CG 3'。仍使用 Real Time One Step RNA PCR Kit 进行扩增。反应条件:50℃ 30min,94℃ 2min,94℃ 30s/55℃ 30s/72℃ 90s(30 个循环),72℃ 10min。

1.7 RT-PCR 分析

采用上述胁迫处理方法对植物材料进行处理,并分别于 0、1、3、5、8、12、24 和 48h 时取样,用同上的方法提取总 RNA。用 β -actin 做为内参,引物序列如下:5'GAC(A/C)ACCAC(A/T)GCTGAACG 3'和 5'TCTGCTGGAAGGTGCTAAGG 3'。并使用扩增基因全长的引物、试剂盒和反应条件对目的基因在干旱、高盐和低温胁迫下的表达进行了分析。

1.8 酵母单杂交

将目的基因构建到 YepGAP112 载体的合适酶

切位点上,并转化含 DRE 或 mDRE 的 YM4217 酵母细胞,同时选用 *AtDREB1A* 质粒和 YepGAP112 载体转化酵母细胞,分别作为阳性和阴性对照。酵母转化方法及步骤参照 One-Hybrid System 说明进行。

2 结果

2.1 *PaDREB2* 基因的克隆及序列分析

根据已报道的 AP2 结构域的序列设计简并引物,通过 RT-PCR 的方法从盐处理 10h 的材料中得到了 173bp 的 DNA 片段,通过 NCBI 的 BLAST 工具搜索得到一个与该片段高度同源的序列号为 gi|24103730|gb|BU892665.1|BU892665 的 EST 片段。分析发现该 EST 片段具有 *DREB* 基因的 AP2 保守序列和比较完整的 5' 端编码区。采用 3'RACE 技术

获得该基因的 3' 末端,并进一步克隆得到该基因的全序列,命名为 *PaDREB2*,并在 GenBank 数据库中注册,注册号为 AY954291。*PaDREB2* 基因全长 1181bp,包含一个 819bp 的开放读码框,51bp 的 5'-URT 和 311bp 的 3'-URT,编码一个由 272 个氨基酸组成的蛋白。比较 *PaDREB2* 蛋白与已报道的 *DREB* 蛋白的氨基酸序列,发现 *PaDREB2* 蛋白含有一个保守的 AP2 结构域,及该结构域中保守的氨基酸:第 14 位的缬氨酸(14V)和第 19 位的谷氨酸(19E)(图 1),并且这些蛋白 AP2 保守区以外的氨基酸序列没有明显的同源性。这些特点符合 *DREB* 类转录因子的特征。另外,从系统发生上看 *PaDREB2* 基因与 *AtDREB2A* 基因具有相对较近的亲缘关系(图 2)。

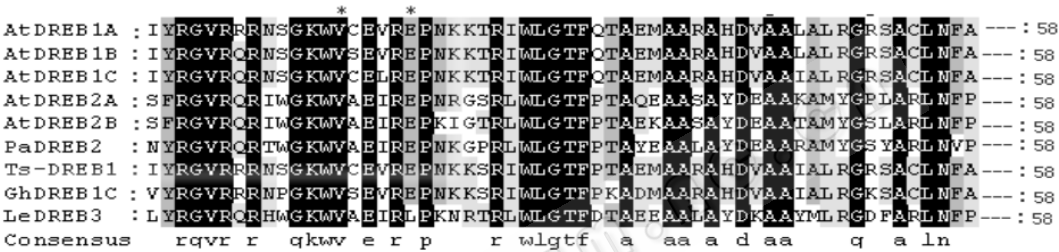


图 1 *PaDREB2* 与已知 *DREB* 蛋白的 AP2 结构域氨基酸序列同源性比较

Fig. 1 The AP2 domain alignment of *PaDREB2* with other *DREB* proteins

The above proteins include *PaDREB2*; *AtDREB1A* (AB007787), *AtDREB1B* (AB007788), *AtDREB1C* (AB007789), *AtDREB2A* (AB007790), *AtDREB2B* (AB007791) in *Arabidopsis thaliana*; *Ts-DREB1* (AAS00621) in *Thellungiella salsuginea*; *GhDREB1C* (AAQ98869) in *Gossypium hirsutum*; *LeDREB3* (AAO13360) in *Lycopersicon esculentum*. The black background represents perfectly conserved amino acid residues. The partially conserved residues are shaded. The highly conserved amino acid 14V and 19E are asterisked.

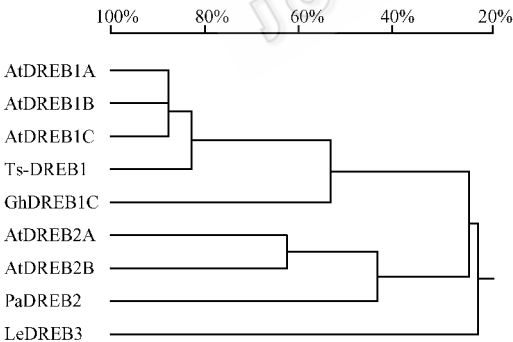


图 2 *PaDREB2* 与已知 *DREB* 蛋白的系统发生分析

Fig. 2 phylogenetic relationship of *PaDREB2* and some known *DREB* proteins

2.2 *PaDREB2* 蛋白转录激活功能的检测与分析

通过酵母单杂交的方法分析 *PaDREB2* 蛋白的转录激活功能。在转化的酵母细胞中,一旦目的转录因子结合到 DRE 元件上,便可以激活下游报告基因的表达,从而使酵母转化细胞能够在 SD 培养基(SD/His⁻, Trp⁻, Ura⁻)上生长,并产生对 3-AT(3-aminotriazole, HIS 表达的抑制剂)的抗性。如图 3 所示在转化的 DRE 酵母细胞中由于 *PaDREB2* 或

AtDREB1A 蛋白特异地结合 DRE 序列,并激活下游报告基因的表达,使转化的 DRE 酵母细胞能够在含 20mM 3-AT 的 SD 培养基中生长,但转化的 mDRE 酵母细胞并不能在同样的 SD 培养基中生长。由此结果可以推测, *PaDREB2* 蛋白具有特异地结合 DRE 元件并激活下游报告基因表达的功能,因此符合 *DREB* 类转录因子的转录激活特性。

2.3 *PaDREB2* 基因的表达分析

用 RT-PCR 的方法分析 *PaDREB2* 基因在低温、干旱和高盐胁迫下的表达情况。结果表明,该基因在逆境诱导条件下,1h 就已经明显地积累转录。在低温诱导下 *PaDREB2* 基因的表达持续上升,达到高峰的时间在 8h 左右,而在干旱、高盐胁迫诱导下,可持续相对较长时间,在 24h 左右达到高峰(图 4)。

3 讨论

本研究克隆得到的 *PaDREB2* 含有与 *DREB* 转录因子高度同源的 AP2 结构域,并且该结构域的第 14 位和第 19 位的氨基酸分别是缬氨酸和谷氨酸,

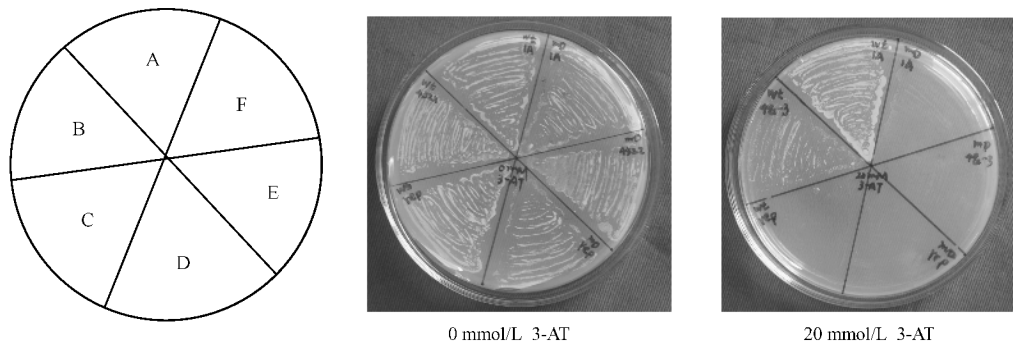


图 3 PaDREB2 在酵母报告细胞中激活 HIS 报告基因的表达
Fig. 3 Activation of HIS gene in yeast reporter cells by PaDREB2

The yeast reporter cells carrying wild DRE cis-element (DRE) were transformed by *AtDREB1A* (as a positive control) (A) , *PaDREB2* (B) and *YEeGAP112* (as a negative control) (C) . And the yeast reporter cells carrying mutant DRE cis-element (mDRE) were transformed by the same three plasmids : *AtDREB1A* (D) , *PaDREB2* (E) and *YEeGAP112* (F) , respectively .

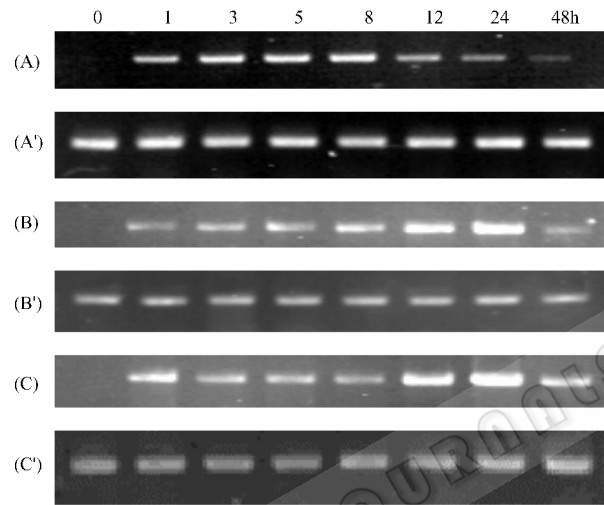


图 4 RT-PCR 分析 PaDREB2 的表达模式
Fig. 4 RT-PCR analysis of expression pattern of PaDREB2
The materials for RT-PCR were treated by low temperature (4℃) (A) , dehydration (B) , high salt (250mmol/L NaCl solution) (C) . Picture (A ') , (B ') , (C ') show the same amount of mRNA used for RT-PCR respectively .

这两个氨基酸在 DREB 类转录因子与 DNA 的结合中起关键作用 , 尤其是第 14 位的缬氨酸^[13-17]。PaDREB2 蛋白的 N 端富含起核定位信号作用的精氨酸和赖氨酸 , C 端富含起转录激活作用的酸性氨基酸 , 并且 AP2 结构域下游的一段序列中存在着多个丝氨酸和苏氨酸 , 可能是丝氨酸、苏氨酸磷酸化位点 , 起到对蛋白的转录后磷酸化修饰作用。蛋白磷酸化修饰作用对转录因子的活性起非常重要的调节作用 , 不仅调节转录因子进入细胞核的过程 , 还可以调节转录因子的活性或与 DNA 的结合能力^[18]。通过酵母单杂交实验分析 PaDREB2 蛋白的转录激活功能 , 结果发现 PaDREB2 蛋白特异地与 DRE 元件结合并激活下游报告基因的表达。因此证明 PaDREB2 蛋白是一个具有转录激活作用的 DREB 类转录因

子。
PaDREB2 基因和其他的 *DREB* 基因的表达都受胁迫信号的调控 , 并且都在短时间内引起转录的积累 , 例如有报道指出拟南芥 *DREB1* 和 *DREB2* 基因在逆境胁迫 15min 内开始积累转录^[8] , RT-PCR 的方法也证实了 *PaDREB2* 基因在逆境处理 1h 时转录已明显积累。因此 PaDREB2 蛋白可能与其他的 DREB 类转录因子具有类似的表达调控机制。有研究报道 , 在植物体内存在着一个调控 *DREB* 基因表达的转录因子 (inducer of CBF expression , ICE)^[19] , 并且这个转录因子组成型存在于植物体内 , 受到逆境刺激后被活化而行使功能 , 直接或间接地调控 *DREB* 基因的转录。

DREB 转录因子在植物的抗逆过程中起关键作用 , 它可以激活一系列抗逆功能基因的表达 , 并能提高脯氨酸和蔗糖的含量 , 从而综合提高植株的抗逆性^[2-3, 9]。例如在拟南芥中受 DREB 转录因子调控的基因 *kin1* 和 *cor6.6* 编码的蛋白在结构上与富含丙氨酸的鱼类抗冻蛋白极为相似^[5] ; *cor47* 和 *erd10* 基因编码的蛋白属于 LEA 蛋白中的第二类^[20] ; *cor78* 基因编码与 LEA 蛋白非常相似的亲水蛋白 , LEA 蛋白出现在胚发育后期 , 具有高度的亲水性 , 可以保护细胞免受水分胁迫的伤害^[19]。因此在提高植物对环境胁迫抗性的分子育种中 , 改良或增强一个 DREB 转录因子的调控能力与导入或改良个别功能基因来提高某种抗性的传统方法相比是更为有效的方法和途径。本研究结果的意义首先在于证明了杨树中存在有 *DREB* 基因 , 因而推测也存在有 DREB 转录因子调控的耐逆机制 , 其次证明了 PaDREB2 蛋白是具有转录激活功能的 DREB 类转录因子 , 这为利用 *DREB* 基因进行杨树耐逆性的基因工程改良奠

定了基础。这部分工作已在本实验室开展,但还在进行中。

REFERENCES(参考文献)

[1] Okamoto JK, Caster B, Villarreal R *et al.* The AP2 domain of APETALA2 define a large new family of DNA binding protein in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 7076 – 7081

[2] Thomashow M F. So what 's new in the field of plant cold acclimation? lots!. *Plant Physiol*, 2001, **125**(1): 89 – 93

[3] Kasuga M, Liu Q(刘强), Miura S *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 287 – 291

[4] Iwasaki T, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K *et al.* The dehydration-inducible *rd17(cor47)* gene and its promoter region in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 1287

[5] Wang H, Datla R, Georges F *et al.* Promoters from *kin1* and *cor6.6*, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol Biol*, 1995, **28**(4): 605 – 617

[6] Jiang C, Iu B, Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 1996, **30**: 679 – 684

[7] Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. The 5' region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold, drought and ABA regulated gene expression. *Plant Mol Biol*, 1994, **24**: 701 – 713

[8] Liu Q(刘强), 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*. *Plant Cell*, 1998, **10**: 1391 – 1406

[9] Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J*, 1998, **16**: 433 – 442

[10] Medina J, Bagues M, Terol J *et al.* The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing

proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 463 – 470

[11] Dubouzet JC, 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. *Plant J*, 2003, **33**(4): 751 – 763

[12] Gao MJ, Allard G, Byass L *et al.* Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 2002, **49**(5): 459 – 471

[13] Qin K(秦峰), Li J(李杰), Zhang GY(张贵友) *et al.* Isolation and Structural Analysis of DRE-Binding Transcription Factor from Maize(*Zea mays* L.). *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2003, **45**(3): 331 – 339

[14] Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, 2000, **124**: 1854 – 1865

[15] Liu LX(刘录祥), Zhao LS(赵林妹), Liang XX(梁欣欣) *et al.* Study on Production of Transgenic Wheat with a Stress-inducible Transcription Factor Gene DREB1A by Microprojectile Bombardment. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2003, **23**(11): 53 – 56

[16] Kasuga M, Liu Q(刘强), Miura S *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 287 – 291

[17] Cao Z F(曹志方), Li J(李杰), Chen F(陈峰) *et al.* Effect of two conserved amino acid residues on DREB1A function. *Biochemistry(Mosc)*, 2001, **66**(6): 623 – 637

[18] Meshi T, Iwabuchi M. Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36**(8): 1405 – 1420

[19] Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J*, 1998, **16**: 433 – 442

[20] Dure L III, Crouch M, Harada J *et al.* Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol*, 1989, **12**: 475 – 486



《生物工程学报》加入“ 万方数据——数字化期刊群 ”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,我刊现已入网“ 万方数据——数字化期刊群 ”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“ 万方数据——数字化期刊群 ”,进入因特网提供信息服务。有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览,并订阅本刊(<http://swgxcb.periodicals.com.cn>)。

《生物工程学报》编辑部