

# *Prd29A:PaDREB2* 植物表达载体的构建及转化新疆杨的研究

秦红霞<sup>1</sup>, 张海超<sup>2</sup>, 刘敬梅<sup>3</sup>, 宋玉霞<sup>4</sup>

(1. 九江学院 生命科学学院, 江西 九江 730021; 2. 中国药科大学 遗传育种教研室 江苏 南京 210038;

3. 北京未名凯拓农业生物技术有限公司 北京 100085; 4. 宁夏农业生物技术重点实验室 宁夏 银川 750002)

**摘 要:** *PaDREB2* 是从银新杨(*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*) 中克隆得到的 *DREB* 类转录因子, 该研究将逆境诱导型 *rd29A* 基因的启动子和 *PaDREB2* 构建到植物表达载体 *pCAMBIA1301* 上, 并以新疆杨(*Populus alba* var. *pyramidalis*) 试管苗的叶片外植体为受体, 利用根癌农杆菌介导的方法进行遗传转化。筛选得到 110 株潮霉素抗性植株, 经 PCR 检测, 其中 25 株抗性植株存在目的基因 *Prd29A:PaDREB2*。

**关键词:** 新疆杨; *Prd29A:PaDREB2* 基因; 遗传转化; 植物表达载体

**中图分类号:** Q 943.2; S 792.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0160-04

新疆杨是银白杨的变种, 在相同的非盐化灌淤沙壤土条件下, 其生长优于银白杨<sup>[1-2]</sup>。新疆杨适应性强, 耐寒、耐盐碱、抗干旱、抗风、抗烟尘、抗病虫害, 尤其对天牛危害的抗性大大超过了黑杨派、青杨派、胡杨派及其杂种, 现已成为我国三北地区优良树种<sup>[3]</sup>。在陕西、甘肃、宁夏、青海、辽宁等省(区)大量引种栽植, 且生长良好, 有的省(区)将其列为重点推广的优良树种来发展。新疆杨塔形树冠不仅美观, 而且遮荫小, 在我国只有雄树, 不飘絮。所以可作为优美的风景树、行道树及庭院绿化树种, 供城市、厂区及矿区绿化。

干旱、高盐以及低温等极端条件又称为水分胁迫或渗透胁迫, 是植物生长过程中所面临的主要逆境胁迫因子。*DREB* (dehydration-responsive element binding, 与干旱应答元件结合的) 转录因子是植物所特有的, 在植物感受水胁迫时, 能够通过与 *DRE* (dehydration-responsive element) 顺式作用元件或其核心序列特异性结合, 并激活一系列逆境应答基因的表达<sup>[4-7]</sup>。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(如 *kin1* 和 *cor6.6* 等)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。目前屡见报道将 *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<sup>[8-10]</sup>。*PaDREB2* 是九江学院生命科学院实验室从抗寒、抗旱能力较强的银新杨<sup>[11]</sup> 中克隆得到的一个具有转录激活功能的 *DREB* 类转录因子<sup>[12]</sup>。用 *PaDREB2* 作为目的基因, 改良新疆杨的抗逆性, 并使用逆境诱导型 *rd29A* 基因启动子启动 *PaDREB2* 在转基因植物中的表达, 因此在提高植物逆境耐受性的同时, 减少了以往使用 35S 启动子启动目的基因过表达给转基因植物的生长带来的不利影响<sup>[13]</sup>。该研究期望能够进一步改良新疆杨的抗逆品质, 使新疆杨在更大范围内进行推广。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以大田种植的新疆杨(*Populus alba* var. *pyramidalis*) 作为植物材料。

1.1.2 菌种与质粒 根癌农杆菌菌株 GV3101、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、含有筛选标记潮霉素抗性基因(*HPTII*) 的植物表达载体 *pCAMBIA1301*、含有 *rd29A* 基因启动子的质粒 *rd29A-SK* 以及含 *PaDREB2* 基因的质粒 *pGEMT Easy* 均为九江学院实验室保存。

1.1.3 培养基 农杆菌 GV3101 使用 YEB 培养基, 新疆杨组织培养及遗传转化所用培养基见表 1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *Prd29A:PaDREB2* 植物表达载体的构建及农杆菌转化 根据设计的质粒载体构建思路(图 1), 经过一系列限制性内切酶酶切、纯化回收和连接反应, 将 *Prd29A* 和 *PaDREB2* 构建到植物表达载体 *pCAMBIA1301*

第一作者简介: 秦红霞(1981-), 女, 山东鄄城人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物的抗性基因工程育种研究工作。  
E-mail: hongxia4444@163.com.

基金项目: 九江学院科研资助项目(07kj9)。

收稿日期: 2010-03-16



测 用未转化植株基因组 DNA 和 130129APD 质粒分别作为阴性对照和阳性对照。扩增反应的总体积为 20  $\mu$ L, 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min  $\circ$  56  $^{\circ}$ C 1 min  $\circ$  72  $^{\circ}$ C 1 min (35 个循环); 72  $^{\circ}$ C 10 min。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

分析发现, *PaDREB2* 基因内部和 *pCAMIA1301* 载体多克隆位点处各有 1 个 *Bam*HI 酶切位点, 因此提取重组质粒 130129APD 进行限制酶 *Bam*HI 单酶切, 电泳结果如图 2 所示, 其中 1 条分子量大的电泳带与载体 *pCAMBIA1301* 位置相近, 另 1 条分子量小的电泳带则位于约 1.8 kb 处, 与预期的 *Prd29A; PaDREB2* 部分序列大小一致, 表明构建的重组质粒 130129APD 含有 *Prd29A; PaDREB2* 基因 其结构如图 3 所示。130129APD 重组质粒用冻融法转化农杆菌 GV3101, 经质粒提取和 *Bam*HI 单酶切鉴定, 得到了阳性菌株。

2.2 *Hym*<sup>r</sup> 芽的筛选

选择性培养基中添加 *Hym* 的浓度十分关键, 要求既能有效抑制非转化细胞的生长, 使之缓慢死亡, 又不影响转化细胞的正常生长。经 MS3、MS4 筛选, 共获得 100 株生根 *Hym*<sup>r</sup> 植株(图 4)。

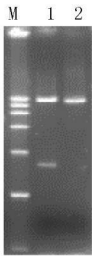


图 2 重组质粒 130129A PD 酶切鉴定  
注: M. DNA Marker DL 15000; 1. 130129APD/ *Bam*HI; 2. *pCAMBIA1301*/ *Bam*HI.

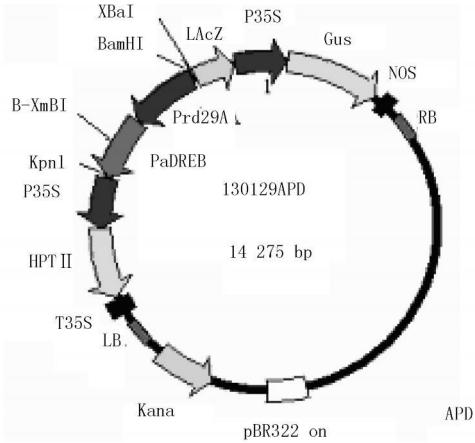


图 3 重组质粒 130129APD 的结构

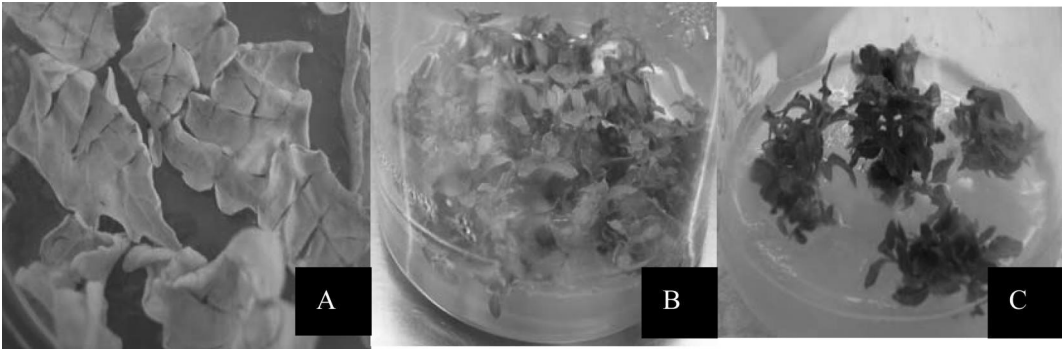


图 4 新疆杨 *Hym*<sup>r</sup> 苗的筛选  
注: A: 负对照 B: 正对照 C *Hym*<sup>r</sup> 芽。

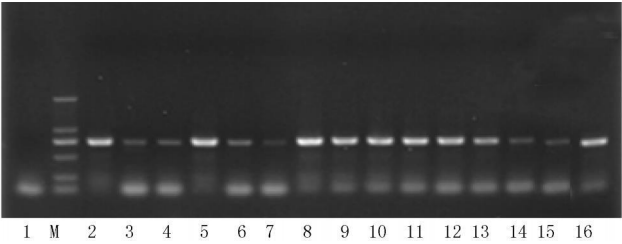


图 5 转基因植株的 PCR 鉴定

注: M: Marker; 1: CK-阴性对照, 未转化植株; 2: CK-阳性对照 130129APD 质粒; 3~16: 转基因植株。

2.3 PCR 检测阳性植株

根据标记基因 *HPTII* 引物的特异性以及 PCR 反应的灵敏性, 用 PCR 初步检测标记基因 *HPTII* 是否整合到了受体植物的基因组中。对 110 个 *Hym*<sup>r</sup> 植株进行 PCR 检测, 其中 25 个 *Hym*<sup>r</sup> 植株扩增得到了预期的目的条带。由电泳结果(图 5)可知阴性对照不能扩增出预期条带, 阳性对照扩增出了预期条带。这表明 25 个 *Hym*<sup>r</sup> 植株可能含有标记基因 *HPTII* 和外源目的基因 *Prd29A; PaDREB2*, 但该基因是否表达并在后代中稳定遗传, 还有待于进一步研究。

### 3 讨论

*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。rd29A 基因的表达受干旱、高盐、低温等逆境胁迫的诱导, 其启动子含有 2 个与逆境胁迫应答有关的 *DRE* 顺式作用元件。即只有当植物感应环境中的逆境胁迫时, 该启动子才会启动目的基因 *PaDREB2* 在植物转化细胞中表达, 可以在提高植物抗逆性的同时降低目的基因过表达给转基因植物的生长带来的不利影响。

正如刘长莉等<sup>[7]</sup>报道的结果, 新疆杨组织培养过程中存在明显的玻璃化现象, 玻璃化苗的组织结构和生理功能异常, 故分化能力低下, 难以增殖成芽, 也难以生根成苗。导致组培苗出现玻璃化的原因包括光照、温度、培养基湿度、 $\text{NH}_4^+$  离子的浓度、激素浓度、继代培养代数等。研究发现以 1/2MS 作为基本培养基, 适当降低了细胞分裂素(6-BA)浓度, 并延长继代培养的时间至 40~45 d, 一定程度上降低了新疆杨试管苗的玻璃化现象。

不同的植物材料对抗生素的敏感性不同, 有效的抗生素筛选浓度能够明显的提高遗传转化的工作效率, 该试验中设置不同的 Hym 浓度, 添加到新疆杨叶片分化和生根培养基中。结果表明新疆杨对 Hym 比较敏感, Hym 3 mg/L 和 2 mg/L 即可作为抑制新疆杨叶片分化和生根的临界浓度。在含有 Hym 2.0 mg/L 的生根培养基上选择而获得的抗潮霉素再生植株, 经 PCR 检测显示阳性者, 初步确定为转 *PaDREB2* 基因的再生植株。但该基因是否表达并在后代中稳定遗传, 还有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 王战, 方振富. 中国植物志[M]. 第 20 卷, 第 2 分册. 北京: 科学出版社, 1984.
- [2] 徐纬英. 杨树[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1988.
- [3] 张永城, 张联珠, 郭永盛, 等. 优良树种—新疆杨[J]. 内蒙古林业科技, 1995(4): 52-56.

- [4] 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): 1391-1406.
- [5] Thomashow M F. So what's new in the field of plant cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(1): 89-93.
- [6] Islam M S, Wang M H. Expression of dehydration responsive element-binding protein 3(*DREB3*) under different abiotic stresses in tomato [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(9): 611-616.
- [7] Li Feng-zhao, Yi Bing-hu, Kang Chong, et al. *ARAG1*, an ABA-responsive *DREB* gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice [J]. *Annals of Botany*, 2010.
- [8] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nat Biotechnol*, 1999(17): 287-291.
- [9] Agarwal P, Agarwal P K, Joshi A J, et al. Overexpression of *Pg-DREB2A* transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes [J]. *Mol Biol Rep* 2010, 7(2): 1125-1135.
- [10] Zhang Y, Chen G, Jin X F, et al. Expression of a rice *DREB1* gene *Os-DREB1D* enhances cold and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(8): 486-492.
- [11] 张宝恩, 张道亮, 胡建军. 银新杨及其栽培技术[J]. 新疆林业, 2006(5): 28-29.
- [12] 秦红霞, 贾志平, 张海超, 等. 银新杨中与 DRE 元件结合的转录因子的克隆及鉴定分析[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 906-910.
- [13] Hsieh T H, Lee T T, Hsieh T H, et al. Heterology Expression of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration Response Element Binding Factor 1 Gene Confers Elevated Tolerance to Chilling and Oxidative Stresses in Transgenic Tomato [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1086-1094.
- [14] 诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 等. 新疆杨植株再生体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(6): 1-4.
- [15] 诸葛强, 王婕琛, 陈英, 等. 新疆杨高效遗传转化体系的建立[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 6-10.
- [16] 宋玉鑫, 马洪爱, 郭生虎, 等. 银河号杨叶外植体再生体系建立[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 661-666.
- [17] 刘长莉, 沈海龙, 张羽, 等. 新疆杨组织培养技术[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 5-7.

## Study on Construction of Plant Expression Vector Carrying *Prd29A*; *PaDREB2* Gene and Its Genetic Transformation in *Populus bolleana*

QIN Hong-xia<sup>1</sup>, ZHANG Hai-chao<sup>2</sup>, LIU Jing-mei<sup>3</sup>, SONG Yu-xia<sup>4</sup>

(1. College of Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000; 2. Department of Genetics and Breeding, Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210038; 3. Beijing Weiming Kaituo Agricultural Biotechnology Limited Company, Beijing 100085; 4. Ningxia Agricultural Biotechnology Lab, Yinchuan, Ningxia 750002)

**Abstract:** *PaDREB2*, a *DREB*-like transcription factor, was cloned from Yinxin populus (*P. alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*). In the study, stress inducible gene promoter *Prd29A* and *PaDREB2* were built into the plant expression vector *pCambia1301*. And we have transformed the explants of *Populus bolleana* leaves by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system. A total 110 resistant plants were gained via strictly selection by hygromycin. Among them 25 positive transgenic plants were verified by PCR analysis.

**Key words:** *Populus bolleana*; *Prd29A*; *PaDREB2* gene; genetic transformation; plant expression vector