

# 蒙古沙冬青 *AmDREB2.1* 表达载体构建及其结合活性鉴定

夏波林, 高 飞, 韦善君, 王 雪, 周宜君

(中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081)

**摘 要:**以蒙古沙冬青为试材,以 *AmDREB2.1* 为研究对象,采用构建植物表达载体和叶盘法进行了 *AmDREB2.1* 转烟草研究,采用 Gateway 和酵母单杂交技术研究了 *AmDREB2.1* 转录因子的结合活性。结果表明:以 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点成功构建了 pPZP212-*AmDREB2.1* 表达载体,通过叶盘法获得了 T<sub>0</sub> 转 *AmDREB2.1* 烟草株系。成功构建了 pDEST22-*AmDREB2.1* 的酵母单杂交载体,分别转化 YH4271-mDRE 和 YH4271-wDRE 2 种酵母菌株,在 Trp<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> 三缺培养基(3-AT 浓度为 0、20 mmol·L<sup>-1</sup>)上筛选获得了阳性克隆,检测其 β-半乳糖苷酶活性为阳性,显示 *AmDREB2.1* 具有转录因子的结合活性。

**关键词:**蒙古沙冬青;*AmDREB2.1*;植物表达载体;酵母单杂交载体;结合活性

**中图分类号:**S 792.189 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)01-0095-06

转录因子也称反式作用因子,是能够与真核生物基因启动子区的顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白,通过二者间以及与其它相关蛋白质间的相互作用,激活或抑制基因的转录<sup>[1]</sup>。转录因子可通过与启动子特异结合调控目标基因的表达,在提高植物抗逆性方面具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。转录因子种类很多,其中 DREB/CBF 类转录因子广泛存在于有花植物中,属于 AP2/EREBP 转录因子家族,具有保守的 AP2/EREBP 结构域<sup>[4]</sup>。关于 DREB 转录因子基因研究较多,在植物抗逆中的作用受到广泛关注<sup>[5]</sup>。

转录因子由物理和功能上独立的 DNA 结合区(DNA-binding domain, BD)和转录激活区(activation domain, AD)组成,通过执行不同的功能启动下游基因的表达。由酵母双杂交系统衍生的酵母单杂

交系统是研究 DNA 与蛋白质间相互作用的新型系统<sup>[6]</sup>。构建目的基因与酵母 AD 的融合表达载体,在酵母中表达融合蛋白,根据下游报告基因的表达情况可判断目的基因作为转录因子的活性。由于转录因子蛋白在总蛋白中含量很低极难纯化,酵母单杂交技术可解决这个难题,用于研究转录因子活性。

蒙古沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.) 属豆科沙冬青属,是古老的第三纪残遗种,在我国仅分布于内蒙古和新疆荒漠地区,因其鲜艳的黄色花也被称为蒙古黄花木。蒙古沙冬青具有极强的耐旱、耐寒能力<sup>[7]</sup>,对保护土地资源、防治土地荒漠化具有重要作用,成为人类利用和改造荒漠的先锋和优良灌木之一<sup>[8]</sup>。蒙古沙冬青具有重要的科研价值,不仅是研究植物抗逆机理的材料,也是筛选抗逆基因的重要资源植物。前期研究表明,蒙古沙冬青 *AmDREB2.1* 能在根、叶中表达,但对于旱、低温响应不同,*AmDREB2.1* 主要参与根的干旱胁迫应答<sup>[9]</sup>。该研究通过构建转基因表达载体,获得转 *AmDREB2.1* 烟草植株;通过酵母单杂交技术,研究 *AmDREB2.1* 的结合活性特点,以期为进一步研究 *AmDREB2.1* 在逆境应答中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的蒙古沙冬青 (*A. mongolicus*) 种子采自于

**第一作者简介:**夏波林(1990-),男,湖北来凤人,硕士研究生,研究方向为植物抗逆分子生物学。E-mail:xiabolin@muc.edu.cn.

**责任作者:**周宜君(1964-),女,福建福州人,博士,教授,现主要从事植物抗逆分子生物学等研究工作。E-mail:zhouyijun@muc.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31370356);中央民族大学一流大学一流学科资助项目(YLDX01013,2015MDTD08C)。

**收稿日期:**2016-10-08

宁夏回族自治区中卫县。

pPZP212 植物表达载体由植物分子生物学实验室保存;pDonor221、pDEST22 载体购自 Clontech 公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  购自北京博迈德科技发展有限公司;pGEM-T 载体购自 Promega 公司;野生型烟草 K326、根癌农杆菌 LBA4404、*E. coli* DE3.1、酵母菌株 YH4271-mDRE、YH4271-wDRE 均由植物分子生物学实验室保存。

Trizol 试剂、BP 反应与 LR 反应试剂盒购自 Invitrogen 公司;FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒和 PCR Master Mix 购自天根公司;胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;质粒小量提取试剂盒购自百泰克生物科技有限公司;T4 DNA ligase 购自 Promega 公司;*Bam*H I 和 *Sac* I 购自 Thermo 公司;酵母感受态细胞试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据植物分子生物学实验室前期获得的 *AmDREB2.1* 序列<sup>[9]</sup>,采用 Primer 5.0 软件设计引物序列。根据植物表达载体和目标基因的结构特点,在引物上游加入 *Bam*H I 酶切位点,下游加入 *Sac* I 酶切位点。引物序列为 5'-CGCGGATCCGGCGGTGGTGTGATAAACTC-3' (划线部分为 *Bam*H I 酶切位点)/5'-CGCGAGCTCATGCACACAACACACGATT-3' (划线部分为 *Sac* I 酶切位点),分别命名为 A-P2.1F 和 A-P2.1R。基于 Gateway 技术,根据酵母单杂交载体和目标基因的结构特点,在 *AmDREB2.1* 编码区两端设计上游含 attB1、下游含 attB2 的引物。引物序列为 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGAAGAAAGAGAGTG-3'/5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA CACACGATTCATGGATAGCT-3' (划线处为 Gateway 特征序列 attB1 和 attB2 位点),分别命名为 B-P2.1F 和 B-P2.1R。

1.2.2 蒙古沙冬青的培养 蒙古沙冬青种子播种于珍珠岩与蛭石(1:1)混合的基质中,每 4 d 浇 1 次 1/2 Hoagland 营养液,保证培养基质维持在半干状态。4 周后,取植物的根组织,称量后迅速放入液氮中。用于基因克隆。

1.2.3 *AmDREB2.1* 表达载体的构建与鉴定 1) 含酶切位点 *AmDREB2.1* 基因的扩增。采用改良 Trizol 法提取蒙古沙冬青根中的总 RNA<sup>[10]</sup>。逆转录获得 cDNA,以 A-P2.1F 和 A-P2.1R 为引物进行 *Am-*

*DREB2.1* 的 PCR 扩增,反应体系(40  $\mu$ L)为 2 $\times$  Taq PCR Master Mix 20  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L,模板 cDNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。反应条件 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,62  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 35 s,共 38 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4  $^{\circ}$ C 保存。胶回收 *AmDREB2.1* 基因片段,与 pGEM-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取单克隆进行菌落 PCR 检测,筛选阳性克隆送至北京华大基因公司测序。2) *AmDREB2.1* 表达载体的构建与鉴定。选取 pPZP212 表达载体,以 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切含有 *AmDREB2.1* 的 pGEM-T 载体和 pPZP212 表达载体,分别胶纯化回收目的片段。连接 2 个目的片段,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。在含有壮观霉素(Spectinomycin, Spec, 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的 LB 固体培养基上筛选转化菌落,提取质粒并用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行单酶切和双酶切验证。

1.2.4 叶盘法转化烟草 将重组质粒 pPZP212-*AmDREB2.1* 导入根癌农杆菌(感受态) LBA4404 中,扩繁经鉴定带有重组质粒的农杆菌。取生长 6 周的野生型烟草无菌苗的幼嫩、健壮叶片,去主脉,在叶片上切出若干伤口,在含有 pPZP212-*AmDREB2.1* 的农杆菌 LBA4404 菌液中浸泡 3 min,用灭菌的滤纸吸干水分,转入共培养基(MS 固体培养基+6-BA 0.5  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>+NAA 0.05  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>+蔗糖 15 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>+琼脂粉 6.5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, pH 5.8)中,24  $^{\circ}$ C 黑暗中共培养 3 d,转到含硫酸卡那霉素(Kanamycin, Kan, 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的筛选培养基中,24  $^{\circ}$ C 光照培养,待芽长至 2 cm 时,转至生根培养基中,长出不定根再培养 15 d 后,移栽到土壤(营养土:珍珠岩:蛭石=2:1:1)中,30 d 后提取 T<sub>0</sub> 代烟草叶片基因组进行 PCR 验证。

1.2.5 *AmDREB2.1* 的酵母单杂交载体的构建与鉴定 1) 含 attB 位点 *AmDREB2.1* 基因的扩增。以逆转录获得的 cDNA 为模板,以 B-P2.1F 和 B-P2.1R 为引物进行 PCR 扩增,反应体系(40  $\mu$ L):2 $\times$  Taq PCR Master Mix 20  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L,模板 cDNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 34 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4  $^{\circ}$ C 保存。胶回收含 attB 位点的 *AmDREB2.1* 基因。2) BP 反应并转化大肠杆菌。含 attB 位点的 *AmDREB2.1* 基因与 pDonor221 载体进行 BP 反应。反应体系(10  $\mu$ L):attB-PCR product 1.0  $\mu$ L,pDonor221 1.0  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6.0  $\mu$ L,BP Clonase II 2.0  $\mu$ L。反应条

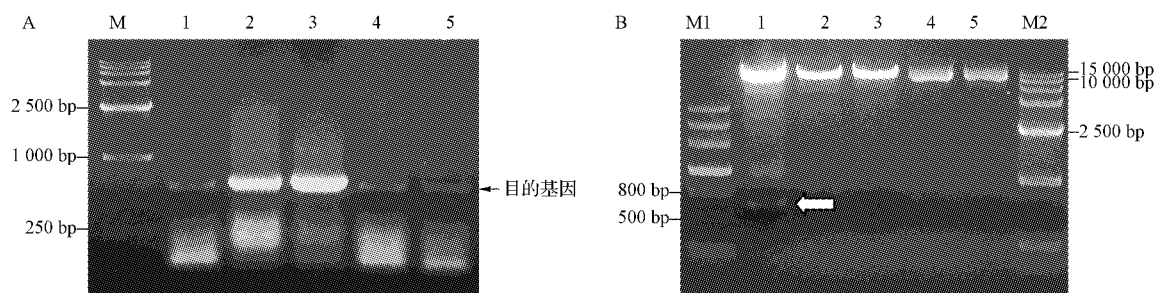
件:室温连接过夜后,加入 1.0  $\mu\text{L}$  Proteinase K 终止连接反应。连接产物转化 *E. coli* DB3.1,复苏后涂布于含 Kan( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB 平板上。随机挑取菌斑接种到含 Kan( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB 培养液中 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡过夜培养,菌液进行 PCR 鉴定。挑取阳性克隆送至北京六合华大基因科技有限公司测序进一步验证。3) LR 反应并转化大肠杆菌。将 BP 反应后提取的入门载体与 pDEST22 载体进行 LR 反应。反应体系(10  $\mu\text{L}$ ):pDEST22 1.0  $\mu\text{L}$ ,入门载体 1.0  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 6.0  $\mu\text{L}$ ,LR ClonaseII 2.0  $\mu\text{L}$ 。反应条件:室温连接过夜,加入 1.0  $\mu\text{L}$  Proteinase K 终止连接反应。将连接产物转化 *E. coli* DB3.1 感受态细胞,复苏后涂布于含氨苄青霉素(Ampicillin, Amp,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB 平板上。随机挑取菌斑接种到含 Amp( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡过夜培养。转化 *E. coli* DB3.1 感受态细胞,菌液进行 PCR 扩增,取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$  经 1% 琼脂糖电泳鉴定。4)转化酵母感受态细胞,在单缺、三缺平板上筛选阳性克隆。将通过 LR 反应获得的 *AmDREB2.1*-pDEST22 重组质粒转化到 YH4271-mDRE 和 YH4271-wDRE 酵母感受态细胞中,将其涂板到 Trp<sup>-</sup> 单缺培养基上,筛选阳性克隆,以空质粒为阴性对照。将在 Trp<sup>-</sup> 的单缺培养基筛选的 YH4271-mDRE 和 YH4271-wDRE 阳性克隆转接到含有 3-AT

(浓度分别为 0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 Trp<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> 三缺培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d,观察酵母菌的生长情况。5) $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测。在 Trp<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> 三缺培养基筛选菌落,通过印迹法将酵母菌转移到膜上。将滤膜放入液氮中冰冻处理 10 s,室温下自然融解,反复冻融 3 次。再将膜放入含有 Z buffer/X-gal 溶液中,30  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h 观测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AmDREB2.1* 表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切含有 *AmDREB2.1* 的 pGEM-T 载体和 pPZP212 表达载体,用 T4 DNA ligase 连接回收的 2 个目的片段,获得的重组载体 pPZP212-*AmDREB2.1* 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,在含有 Spec 的 LB 固体培养基上筛选转化菌落。以 A-P2.1F 和 A-P2.1R 为上下游引物,以含有 pPZP212-*AmDREB2.1* 的菌液为模板,扩增得到约 600 bp 的 *AmDREB2.1* 特异条带(图 1-A)。选取 2 个单克隆(2 和 3)的菌液,提取质粒双酶切,结果见图 1-B,其中 1 为双酶切产物,大片段长度约为 10 kb;小片段大小约为 600 bp,2 和 3 分别为 *Bam*H I 和 *Sac* I 的单酶切产物,大小约为 10 kb,4 和 5 为重组质粒 pPZP212-*AmDREB2.1*。证明 *AmDREB2.1* 已经与表达载体大片段连接。



注:A. 含酶切位点 *AmDREB2.1* 的验证,M. Marker;1~5. *AmDREB2.1*。B. pPZP212-*AmDREB2.1* 表达载体的验证,M1、M2 为 Marker;1 为 pPZP212-*AmDREB2.1* 双酶切(箭头为目的基因);2 为 pPZP212-*AmDREB2.1* 的 *Bam*H I 单酶切,3 为 pPZP212-*AmDREB2.1* 的 *Sac* I 单酶切,4~5 为 pPZP212-*AmDREB2.1* 重组质粒。

Note: A. Verifying of *AmDREB2.1* with restriction enzyme sites. M indicates Marker, 1~5 indicate *AmDREB2.1*. B. Verifying of pPZP212-*AmDREB2.1*. M1 and M2 indicate Markers, 1 indicates digestion of pPZP212-*AmDREB2.1* with *Bam*H I and *Sac* I (the arrow indicates the target gene), 2 indicates digestion of pPZP212-*AmDREB2.1* with *Bam*H I, 3 indicates digestion of pPZP212-*AmDREB2.1* with *Sac* I, 4~5 indicate pPZP212-*AmDREB2.1*.

图 1 pPZP212-*AmDREB2.1* 表达载体的构建与验证

Fig. 1 Constructing and verifying of pPZP212-*AmDREB2.1*

### 2.2 叶盘法转化烟草

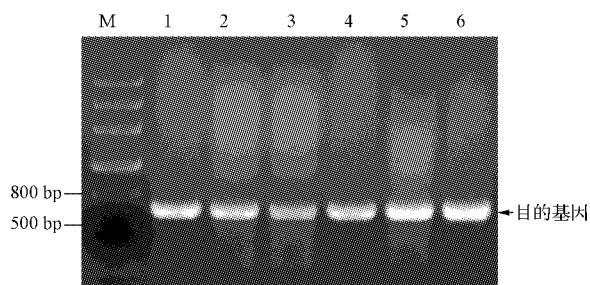
2.2.1 重组质粒转化农杆菌 LBA4404 将 pPZP212-*AmDREB2.1* 转化农杆菌 LBA4404,培养

后挑取抗 Spec 菌落进行菌液 PCR,结果见图 2,1~6 均为目的基因 *AmDREB2.1*,约为 600 bp 左右,证明目的片段已经转入农杆菌 LBA4404 中。

2.2.2 *AmDREB2.1* 转化烟草 选取烟草无菌苗叶片,采用叶盘法转化,经过愈伤组织形成、抗性芽筛选、生根培养及移栽,初步获得了转 *AmDREB2.1* 的烟草株系(图 3)。选取 5 株待鉴定转 *AmDREB2.1* 烟草提取基因组 DNA,以 A-P2.1F 和 A-P2.1R 为引物进行 PCR 扩增,以野生型烟草为阴性对照。由图 4 可知,1 泳道为野生型烟草无扩增条带,3~6 泳道有一条约为 600 bp 的条带出现,说明有可能转入了 *AmDREB2.1*。

### 2.3 酵母单杂交验证结合活性

2.3.1 基于 Gateway 技术构建酵母单杂交载体 以带有 Gateway 特征序列 attB1、attB2 与保护碱基的引物(B-P2.1F 和 B-P2.1R)扩增 *AmDREB2.1*,

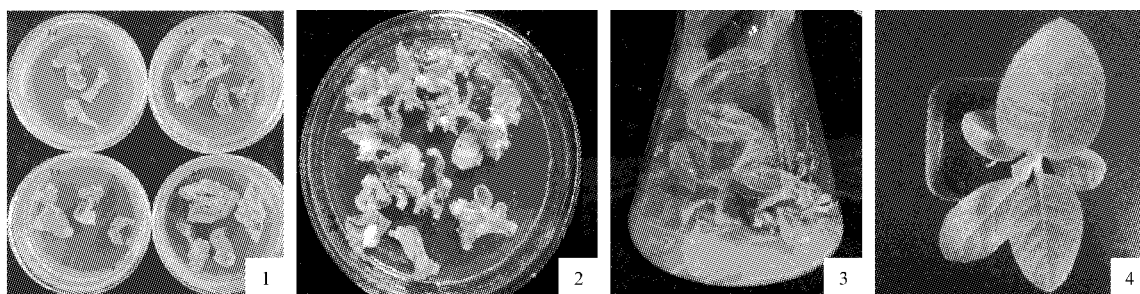


注:M 为 Marker,1~6 为目的基因 *AmDREB2.1*。

Note:M indicates Marker,1-6 indicate *AmDREB2.1*.

图 2 pPZP212-*AmDREB2.1* 转化农杆菌 LBA4404 的验证

Fig. 2 Verifying of *pPZP212-AmDREB2.1* after transformed to *Agrobacterium*

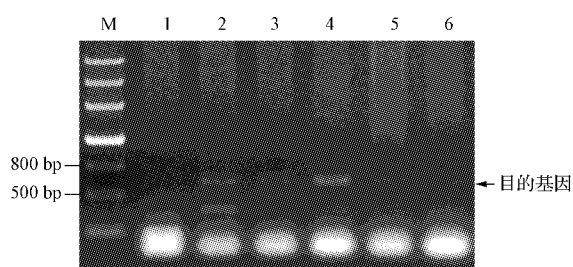


注:1 为叶盘法转 *AmDREB2.1* 6 d 后的烟草叶片,2 为抗性平板中的愈伤组织,3 为生根培养基上转 *AmDREB2.1* 植株,4 为转 *AmDREB2.1* 植株。

Note:1 indicates transgenic tobacco leaves by leaf disc method after 6 days;2 indicates transgenic tobacco callus on the resistant medium;3 indicates transgenic tobacco on the root medium;4 indicates transgenic tobacco.

图 3 转 *AmDREB2.1* 烟草无菌苗的培养与筛选

Fig. 3 Cultivating and screening of *AmDREB2.1* aseptic seedling of transgenic tobacco

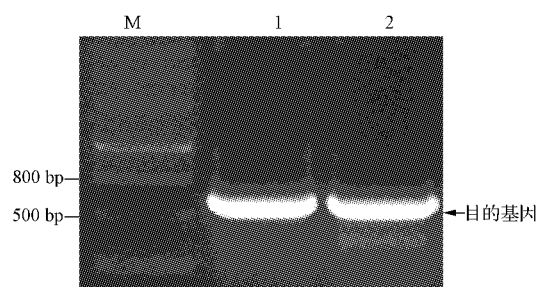


注:M 为 Marker,1 为野生型烟草,3~6 为转 *AmDREB2.1* 烟草。

Note:M indicates Marker;1 indicates wild type tobacco;3-6 indicate *AmDREB2.1* transgenic tobacco.

图 4 转 *AmDREB2.1* 烟草株系的鉴定

Fig. 4 Identification of *AmDREB2.1* transgenic tobacco PCR 产物电泳结果见图 5,测序结果表明 *AmDREB2.1* 的大小为 635 bp。电泳结果与预期相符。将 PCR 胶回收产物与 pDonor 221 进行 BP 反应,转化 *E. coli* DB3.1 感受态细胞,培养后挑取抗性菌落扩



注:M 为 Marker,1~2 为目的基因 *AmDREB2.1*。

Note:M indicates Marker,1-2 indicate *AmDREB2.1*.

图 5 *AmDREB2.1* 的扩增

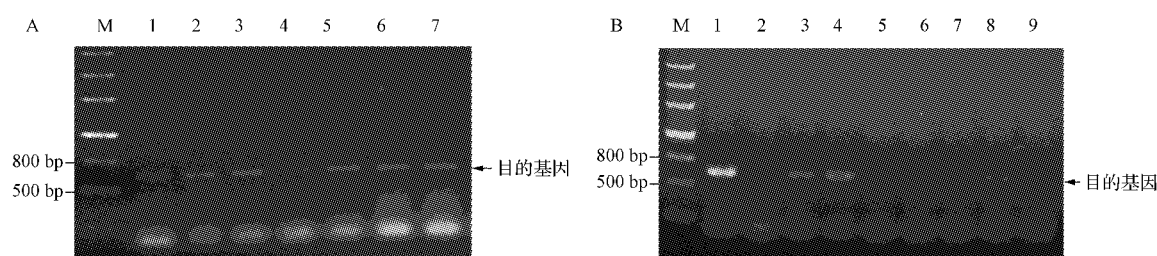
Fig. 5 Amplification of *AmDREB2.1*

繁,进行菌液 PCR 验证,结果如图 6-A 所示,2~7 泳道为阳性克隆。阳性克隆经测序验证,表明已经将目的基因 *AmDREB2.1* 导入 pDonor 221 中,成功构建了入门载体。将 BP 反应后提取的入门载体与 pDEST22 载体进行 LR 反应,转化 *E. coli* DB3.1 感

受态细胞,培养后挑取抗性菌落扩繁,进行菌液 PCR,结果如图 6-B 所示,已经成功将目的基因 *AmDREB2.1* 连入酵母单杂交载体 pDEST22 中。

2.3.2 三缺平板上检测阳性克隆的转录因子活性 将在单缺培养基( $\text{Trp}^-$ )筛选出来的阳性克隆涂板于对应的三缺培养基( $\text{Trp}^- \text{His}^- \text{Ade}^-$ )上,30 °C 培养 3 d,得到的阳性克隆进行报告基因  $\beta$ -Gal 活性检测。由图 7 可知,在未加入 3-AT 的  $\text{Trp}^- \text{His}^- \text{Ade}^-$  三缺培养基上,转入目的基因的 YH4271-

mDRE 和 YH4271-wDRE 的阳性克隆均能够正常生长。在加入了能够抑制基本启动子的 3-AT 的  $\text{Trp}^- \text{His}^- \text{Ade}^-$  三缺培养基上,转入目的基因的 YH4271-mDRE 的阳性克隆不能正常生长,而转入目的基因的 YH4271-wDRE 阳性克隆能正常生长,且检测出  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。由此可以判定,*AmDREB2.1* 编码产物可以专一性地识别 DRE 元件并与之结合,激活报告基因 *lacZ* 的表达。

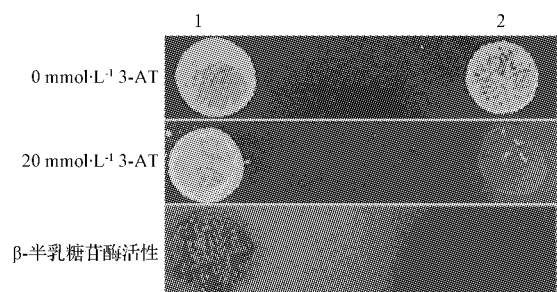


注:A. BP 反应验证,M 为 Marker,2~7 为目的基因 *AmDREB2.1*;B. *AmDREB2.1* 的 LR 反应验证,1、3、4、6~9 为 pDEST22-*AmDREB2.1*。

Note: A. Verifying of BP reaction. M indicates Marker;2~7 indicate target gene *AmDREB2.1*; B. Verifying of LR reaction. 1,3,4,6~9 indicate pDEST22-*AmDREB2.1*.

图 6 *AmDREB2.1* 的酵母单杂交载体构建与验证

Fig. 6 Constructing and verifying of yeast one-hybrid vector pDEST22-*AmDREB2.1*



注:1 为 YH4271-wDRE 表型,2 为 YH4271-mDRE 表型。

Note: 1 indicates phenotype of YH4271-wDRE; 2 indicates phenotype of YH4271-mDRE.

图 7  $\text{Trp}^- \text{His}^- \text{Ade}^-$  三缺平板筛选阳性克隆及  $\beta$ -半乳糖苷酶活性鉴定

Fig. 7 Screening positive clones and activity of  $\beta$ -galactosidase on selective medium ( $\text{Trp}^- \text{His}^- \text{Ade}^-$ )

### 3 结论与讨论

进行基因的异源表达是验证基因功能的重要方式之一,而选择合适的酶切位点构建表达载体是进行异源表达研究的前提。一般根据基因的结构和选取的表达载体,选取较常用的酶切位点,且尽量选取粘末端的酶切位点,可提高连接反应效率。在该试验中,经过对 *AmDREB2.1* 的编码区和 pPZP212

序列进行分析,选取了 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点,成功构建了植物表达载体。采用叶盘法转化烟草,经过初步鉴定得到了  $T_0$  代转 *AmDREB2.1* 基因烟草植株,为异源表达研究 *AmDREB2.1* 的功能奠定了基础。

典型的转录因子都有 DNA 结合区与激活区(或抑制区),在特定的时间、部位或特定条件下,特定的转录因子与靶基因启动子的顺式作用元件特异结合并相互作用,进而激活或抑制靶基因的表达<sup>[11-12]</sup>。酵母单杂交技术是一种根据酵母细胞内 GAL4 转录因子的 DNA 结合结构域和转录激活结构域可完全独立地发挥作用的特性,以待检测蛋白与 GAL4 转录因子的其中一个结构域构建融合蛋白,进而研究蛋白质与特定 DNA 序列互作的技术<sup>[13]</sup>,这种方法也是在胞内(*in vivo*)验证转录因子的 DNA 结合活性的常用方法。由于在胞内与 DNA 结合的待检测蛋白质为自然构象,因此酵母单杂交体系的灵敏性很高。而融合基因在胞内如果不能正常、稳定地表达,或融合蛋白不能正常折叠,或表达了毒性蛋白,将对融合蛋白与靶 DNA 互作产生影响,从而导致假阴性的结果<sup>[14]</sup>。

DRED 类转录因子是植物中特有的一类转录因

子,能够与 DRE(dehydration-responsive element)结合并激活下游基因的表达<sup>[15]</sup>。酵母菌株 YH4271-wDRE 是酵母中 Gal4 转录因子 BD 基因失活的酵母单杂受体菌株,YH4271-mDRE 是 YH4271-wDRE 的突变体。该研究将构建的 pDEST22-*AmDREB2.1* 转化到酵母菌株中,表达的 *AmDREB2.1* 和酵母的 Gal4 转录因子 AD 结构域在空间上足够接近时,表现出完整的转录因子活性,启动了下游筛选基因(*Trp*、*His* 和 *Ade*)和报告基因 *lacZ* 的表达,通过催化乳糖的水解为  $\beta$ -gal,用 X-Gal 为底物进行染色时呈现了蓝色。该研究运用酵母单杂交技术筛选得到符合预期的能在三缺培养基上生长的阳性克隆,可以初步判定 *AmDREB2.1* 具有转录因子的结合活性。

### 参考文献

- [1] 王平荣,邓晓建,高晓玲. DREB 转录因子研究进展[J]. 遗传, 2006,28(3):369-374.
- [2] 薛华,张红岩,李小艳,等. 油菜矮秆突变 WRKY 转录因子 cDNA 克隆及表达分析[J]. 西北植物学报,2008,28(3):452-458.
- [3] ZHOU Y J,GAO F,RAN L,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):266.
- [4] 王舟,刘建秀. DREB/CBF 类转录因子研究进展及其在草坪草和牧草抗逆基因工程中的应用[J]. 草业学报,2011,20(1):222-236.
- [5] 冯军,郑彩霞. DREB 转录因子在植物非生物胁迫中的作用及应用研究[J]. 植物生理学报,2011,47(5):437-442.
- [6] 王琪,朱延明,王冬冬. 酵母单杂交系统在植物抗渗透胁迫转录因子研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(9):91-96.
- [7] 周宜君,刘春兰,冯金朝,等. 沙冬青抗旱、抗寒机理的研究进展[J]. 中国沙漠,2001,21(3):312-315.
- [8] 郭生祥,刘志银,郝昕. 沙冬青的研究进展[J]. 甘肃林业科技, 2005,30(4):5-8.
- [9] 李章磊,高飞,曹玉震,等. 蒙古沙冬青 *AmDREB2.1* 基因的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报,2015,31(3):108-114.
- [10] 陈静,高飞,周宜君,等. 改良 Trizol 法提取蒙古沙冬青总 RNA [J]. 生物技术通报,2013,29(10):87-92.
- [11] YANAGUCHI-SHINOZAKI K,SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annual Review of Plant Biology,2006,57(1):781-803.
- [12] SIMON A,DALMAILS B,MORGANT G,et al. Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys2His2 transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters[J]. Fungal Genetics and Biology,2013,52:9-19.
- [13] 张开慧. 酵母单杂交技术的原理及应用[J]. 宁夏农林科技, 2012,53(2):31-32.
- [14] 廖文彬,李雅韵,杨义伶,等. 木薯干旱胁迫下离区发育相关基因 MeAP2-2 酵母单杂交文库构建及其上游调控基因的筛选[J]. 中国农学通报,2015,31(9):119-127.
- [15] 刘卫群,冯峰,郭红祥,等. DREB1A 类转录调控域中对转录激活功能起关键作用的氨基酸[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008,24(2):134-141.

## Constructing of Expressing Vector and Identifying of Binding Activity of *AmDREB2.1* in *Ammopiptanthus mongolicus*

XIA Bolin,GAO Fei,WEI Shanjun,WANG Xue,ZHOU Yijun

(College of Life and Environmental Sciences,Minzu University of China,Beijing 100081)

**Abstract:** *Ammopiptanthus mongolicus* was used as material, the *AmDREB2.1* transformation to tobacco was investigated via expression vector construction and leaf disc method, and the binding activity of *AmDREB2.1* was studied with Gateway technique and the yeast one-hybrid assay. The results showed that pPZP212-*AmDREB2.1* expression vector was constructed with *Bam*H I and *Sac* I, and then successfully transformed to the tobacco. The pDEST22-*AmDREB2.1*, the yeast one-hybrid vector, was constructed, and then were converted into two yeast strains YH4271-mDRE and YH4271-wDRE, respectively. Positive clones were obtained with the '*Trp*<sup>-</sup> *His*<sup>-</sup> *Ade*<sup>-</sup>' selective media (the concentration of 3-AT was 0 mmol · L<sup>-1</sup> and 20 mmol · L<sup>-1</sup>), and the activity of  $\beta$ -galactosidase was detected and it indicated that *AmDREB2.1* could bind to DRE *cis*-element.

**Keywords:** *Ammopiptanthus mongolicus*; *AmDREB2.1*; plant expression vector; yeast one-hybrid vector; binding activity