

# 拟南芥 *NCED4* 基因的克隆及初步功能鉴定

郭 涛<sup>1,2</sup>, 晁 跃 辉<sup>2</sup>, 杨 青 川<sup>2</sup>, 金 洪<sup>1</sup>, 张 铁 军<sup>2</sup>, 康 俊 梅<sup>2</sup>

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘 要:**以拟南芥为试材, 采用 PCR 及 DNA 重组技术, 从野生型拟南芥中克隆出 *NCED4* 基因, 并构建植物表达载体 pBI-*NCED4*, 最终获得具有卡那霉素抗性的转基因拟南芥植株, 研究 *NCED4* 基因超表达对植物体的影响, 并对其中 4 个再生植株进行 PCR 和荧光定量 RT-PCR 分析。结果表明: 目的基因转入拟南芥基因组中, 并在转基因拟南芥中成功过量表达; *NCED4* 基因受外源激素的影响较为敏感, 其作用可能与激素的调控有关。

**关键词:**拟南芥; *NCED4*; 脱落酸; 转化

**中图分类号:**Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0105-06

脱落酸(Absciscic acid, ABA)作为植物的五大激素之一, 广泛分布于高等植物中, 其功能众多, 不仅可以抑制种子萌发, 还能促进果实贮藏物质的积累, 提高植物的抗旱力和耐冻力<sup>[1-5]</sup>, 在农业生产上有广阔的应用前景, 能产生巨大的经济效益和社会效益。ABA 的合成与 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, *NCED*)有着密切的关系<sup>[6]</sup>。*NCED* 在 ABA 的合成途径中, 充当整个合成反应的限速酶。

*NCED* 基因以基因家族的形式存在于植物体中<sup>[7]</sup>, 表达的部位和功能也有所不同<sup>[8]</sup>, 如: 拟南芥 *NCED3* 基因的高表达提高了内源 ABA 的水平<sup>[9]</sup>; 拟南芥 *NCED6* 可以被不同浓度的葡萄糖上调表达, 且突变体的种子对葡萄糖不敏感<sup>[10]</sup>; 根据 *NCED6*、*NCED5*、*NCED9* 三种突变体植株在特定时间和组织的表型分析, 显示 *NCED5* 与 *NCED6*、*NCED9* 共同作用于诱导种子休

眠<sup>[11]</sup>。而关于 *NCED4* 基因的专项研究相对较少。拟南芥中的 *NCED4* 基因全长 1 785 bp, 编码 595 氨基酸, 且不受干旱胁迫的诱导<sup>[12]</sup>。最新的研究表明, 在生菜中, *NECE4* 的沉默改变了与 ABA、赤霉素、乙烯合成有关的基因的表达, 改变了相关的信号途径<sup>[13]</sup>。该试验以拟南芥为试材, 通过 PCR 方法克隆了 *NCED4* 基因, 并将其插入到植物表达载体 pBI121 上, 构建了超表达 *NCED4* 基因的表达载体 pBI-*NCED4*, 再通过农杆菌花序浸泡法转化拟南芥获得转化植株; 通过实时定量的方法研究该基因在激素诱导下的基因表达水平, 为该基因更深入的功能分析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

该试验所用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型种子由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供。克隆载体 pEASY-T1、DNA Marker 购自北京全式金生物科技有限公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Primescrip 反转录酶、RNase 酶购自 TaKaRa 公司, RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒、基因组 DNA 快速提取试剂盒和凝胶电泳 DNA 回收试剂盒等购自博迈德公司; 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、实时定量染料 UltraSYBR Mixture 购自康为世纪生物科技有限公司; 农杆菌 GV3101 以及载体 pBI121 为该实验室保存; 其它试剂采用进口分装或国产分析纯。

**第一作者简介:**郭涛(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物资源利用与保护。E-mail: yushen0002008@126.com.

**责任作者:**金洪(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向为草业科学。E-mail: jinhong915@163.com.

**基金来源:**国家“十二五”科技支撑子课题资助项目(2011BAD17B01-01-3); 国家牧草产业体系资助项目(CARS-35-04, 201); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费资助项目(2014ywf-zd-2)。

**收稿日期:**2014-03-25

isozymes were synthesized, content increased rapidly, marked the seeds begin to germinate. In the later stage(6~9 d), radicle continued elongating, cotyledon unfolded gradually, embryo began to grew, SOD and POD isozymes content decreased, but the type of each isozyme unabated, new enzyme was synthesized. The changes of those isozymes could be used as an important sign in each stage of *Handeliendendron bodinieri* seed germination.

**Keywords:** *Handeliendendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.; peroxidase isozymes; superoxide dismutase isozymes; seed germination

## 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI 上提供的目的基因序列(登录号:NM\_118036.2),设计了4对引物(表1),其中 NCED4-1 和 NCED4-2 用于 NCED4 基因全长克隆, NCED4-r 和 NCED4-f 用于表达载体的构建, NCED4-RT-1 和 NCED4-RT-2 用于荧光定量 PCR 分析, pBI-f 和 pBI-r 为植物表达载体 pBI121 上的通用引物。划横线部分分别为限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点。

1.2.2 生物信息学分析 利用 MEGA5.0 软件对克隆出的 NCED4 基因进行生物信息学分析,将拟南芥中分离出的 NCED4 基因与其它物种的该基因进行同源性分析。在 ExPaSy 网站([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))预测等电点和分子量。在 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)网站预测是否存在信号肽。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of primers

名称 Name	序列 Sequence
NCED4-1	5'-AGCAATGGACTCTGTTTCTTCTCT-3'
NCED4-2	5'-TATCTATTAACATGTCAGTTACC-3'
NCED4-f	5'-TCTAGAAATGGACTCTGTTTCTTCTTCTCC-3'
NCED4-r	5'-CCCGGGTTAAAGCTTATTAAGGTCACCTTC-3'
NCED4-RT-1	5'-CACCGAACTCGACACAGAA-3'
NCED4-RT-2	5'-TCAACGGAAGGACGTGAAGG-3'
pBI-f	5'-AGTTTTTTTGATTTACAGGGTGGGG-3'
pBI-r	5'-ACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCT-3'

1.2.3 实时定量分析基因功能 以生长 15 d 的野生型拟南芥幼苗全株为对象,用外源脱落酸(ABA)、赤霉素进行诱导,诱导时间分别为 1、3、6、12 h,以不做诱导为对照。利用总 RNA 试剂盒,提取拟南芥植株的总 RNA。利用 DNase 酶去除基因组 DNA 污染后,使用 Primescrip 反转录酶获得第一链 cDNA,以 cDNA 为模板, NCED4-RT-1 和 NCED4-RT-2 为引物,实时定量分析进行检测。反应程序为:95℃ 预变性 10 min;94℃ 变性 30 s,68℃ 退火、延伸 1 min,40 个循环。以拟南芥看家基因 *Actin* 作为内参, NCED4 基因相对表达量通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[14]</sup>测定。

1.2.4 pEASY-NECD4 重组子的构建 以生长 15 d 的野生拟南芥全株为材料,通过基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA。目的基因没有内含子,只能以总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。以 NCED4-1 和 NCED4-2 为引物,扩增含有 NCED4 完整开放阅读框的 DNA 片段,反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min;4℃ 保温。取 5  $\mu$ L 的 PCR 产物,用 1% 的琼脂糖电泳分析。将 PCR 产物经凝胶回收试剂盒纯化后,连接到

pEASY-T1 载体,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂布于含有 50 mg/L Kanamycin(卡那霉素)的 LB 固体培养基上,37℃ 过夜培养。挑选菌株,进行菌体 PCR 检测,将含有目的条带的阳性克隆送北京天一辉远生物技术有限公司测序。提取含有正确开放阅读框的质粒,以质粒为模板,利用引物 NCED4-f 和 NCED4-r 进行 PCR 扩增。反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,25 个循环;72℃ 延伸 5 min;4℃ 保温。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳分析,将 PCR 产物纯化后,连接到 pEASY-T1 载体,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂布于含有 50 mg/L Kanamycin 的 LB 固体培养基上,37℃ 过夜培养。挑选菌株,进行菌体 PCR 检测,将含有目的条带的阳性克隆送北京天一辉远生物技术有限公司测序。

1.2.5 超表达载体 pBI-NCED4 的构建 以含有目的基因的 pEASY-NCED4 和 pBI121 空载体为对象,用 *Xba* I 和 *Sma* I 进行双酶切,经过凝胶电泳检测后利用凝胶电泳 DNA 回收试剂盒分别回收目的片段。将回收的目的片段用 T4 DNA 连接酶 16℃ 下连接 6 h,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂布到含有 50 mg/L Kanamycin 的 LB 固体培养基上。挑选菌株,以 NCED4-f 和 NCED4-r 为引物,进行菌体 PCR 检测,将含有目的条带的阳性克隆送北京天一辉远生物技术有限公司测序。

1.2.6 拟南芥的转化 利用质粒小提试剂盒提取 pBI-NCED4 质粒,用  $\text{CaCl}_2$ -冷冻法转化方法导入农杆菌 GV3101 中,通过 PCR 方法鉴定出阳性克隆。利用花序浸泡法,对处于花蕾期的野生型拟南芥进行农杆菌介导的转化,具体步骤为:用含有 pBI-NCED4 的农杆菌菌液对已经长出腋生花序的拟南芥植株进行侵染,约浸泡 2 min,罩上塑料薄膜保持湿度,遮光处理 1 d 后放置在恒温箱中培养,每 7 d 重复 1 次,待拟南芥长大成熟。收集拟南芥种子,在无菌条件下,将拟南芥种子用 75% 酒精消毒后,均匀撒在含有 50 mg/L 卡那霉素 1/2 MS 培养基上。培养 15 d 后,选取能够在含有卡那霉素的培养基上正常生长的拟南芥幼苗,移栽到培养土中,继续生长。

1.2.7 再生植株检测 由于野生型拟南芥基因组中存在 NCED4 基因序列,所以使用植物表达载体 pBI121 通用引物 pBI-f 和 pBI-r 进行 PCR 鉴定。利用基因组 DNA 快速提取试剂盒提取再生植株基因组 DNA,以 pBI-f 和 pBI-r 为引物,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测。利用总 RNA 试剂盒,提取 15 d 的转基因拟南芥( $T_2$  代)植株的总 RNA。利用 DNase 酶去除基因组 DNA 污染后,使用 Primescrip 反转录酶获得第一链 cDNA,以 cDNA 为模板, NCED4-RT-1 和 NCED4-RT-2 为引物,实时定量分析进行检测。

### 1.3 数据分析

利用 Applied Biosystems 7300 system v1. 4. 0 对试验结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时定量数据分析

由图 1 可知,随着外源 ABA 诱导时间的延长,野生型拟南芥 *NCED4* 基因的相对表达量先升高后降低,处理 1 h 基因相对表达量达到最高,处理 12 h 最低,其中 1 h 和 3 h 明显高于对照;由图 2 可知,随着外源赤霉素诱导时间的延长,拟南芥 *NCED4* 基因的表达量呈现明显下降趋势。

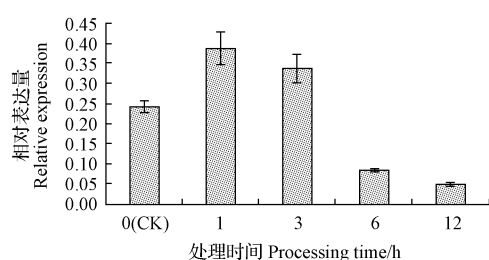


图 1 不同时间外源 ABA 处理对 *NCED4* 基因的相对表达量的影响

Fig. 1 The effect of different exogenous ABA processing time on *NCED4* relative expression

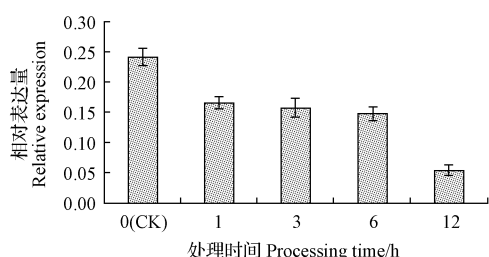
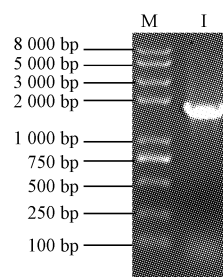


图 2 不同时间外源赤霉素处理对 *NCED4* 基因的相对表达量影响

Fig. 2 The effect of different exogenous  $GA_3$  processing time on *NCED4* relative expression

### 2.2 *NCED4* 基因编码区序列的克隆

以拟南芥基因组 DNA 为模板, *NCED4*-1 和 *NCED4*-2 为引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳显示得到大约 2 000 bp 的片段(图 3)。将该片段连接到克隆载体 pEASY-T1 上, 并转化大肠杆菌, 进行菌体 PCR 之后, 选取阳性克隆进行测序, 测序结果表明, 所选阳性克隆片段含有完整的拟南芥 *NCED4* 开放阅读框, 能够进行下一步的克隆试验, 并命名为 pEASY-*NCED4*。提取大肠杆菌质粒, 以 pEASY-*NCED4* 为模板, *NCED4*-f 和 *NCED4*-r 为引物, 进行 PCR 扩增, 产物进行 1% 的琼脂



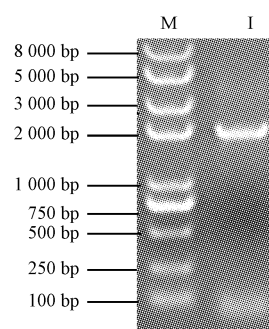
注: I: *NCED4* 基因; M: DNA Marker Trans 2 000 plus II。

Note: I: *NCED4* gene; M: DNA Marker Trans 2 000 plus II.

图 3 *NCED4* 基因的 PCR 克隆

Fig. 3 PCR amplification of *NCED4* gene

糖凝胶电泳分析, 结果表明获得了大约 2 000 bp 的片段(图 4), 将目的片段连接到克隆载体, 转化大肠杆菌, 进行菌体 PCR 检测, 选取阳性克隆进行测序, 测序结果表明, 所选克隆含有完整 *NCED4* 序列, 没有发生碱基突变或移码突变, 说明成功克隆到了该基因的编码区, 可以用作构建植物表达载体。



注: I: 带酶切位点的 *NCED4* 基因; M: DNA Marker Trans 2 000 plus II。

Note: I: *NCED4* gene with restriction site; M: DNA Marker Trans 2 000 plus II.

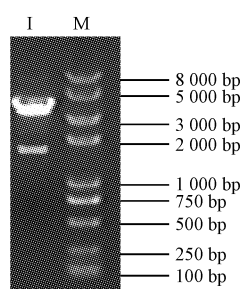
图 4 *NCED4* 基因的 PCR 克隆

Fig. 4 PCR amplification of *NCED4* gene

### 2.3 构建表达载体 pBI-*NCED4* 及转化农杆菌

提取质粒 pEASY-*NCED4*, 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 凝胶电泳表明在接近 2 000 bp 处有 1 条带, 与目的基因大小一致(图 5)。目的片段经凝胶电泳纯化回收后, 连接到 pBI121 载体, 并转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取单菌落菌体 PCR 后, 经凝胶电泳分析得知, 能够成功扩增出与目的基因大小一致的 DNA 条带(图 6)。挑取阳性单菌落提取质粒, 用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳得到 1 条约 2 000 bp 的条带(图 7), 与预期大小相符, 表明植物超表达载体构建成功, 并命名为 pBI-*NCED4*。利用  $CaCl_2$  转化法, 将 pBI-*NCED4* 转化农杆菌 GV3101 感受态细胞。经菌液 PCR 鉴定证明获得阳性克隆(图 8), 可进一步转化拟南芥。



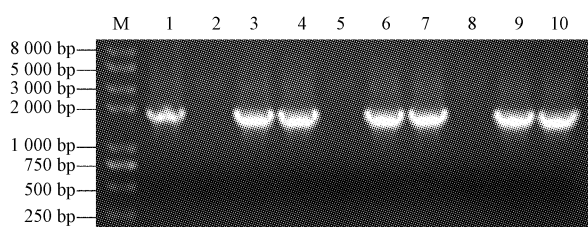


注: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; I; *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切 pEASY-NCED4。

Note: M; DNA Marker D Trans 2 000 plus II; I; pEASY-NCED4 digested with *Xba* I and *Sma* I.

图 5 pEASY-NCED4 酶切鉴定

Fig. 5 Enzyme analysis of pEASY-NCED4

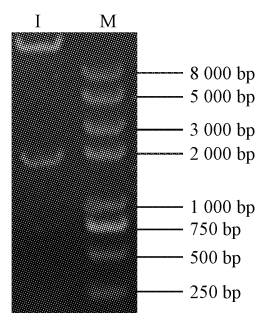


注: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~10; pBI-NCED4 菌体 PCR。

Note: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~10; PCR amplification of pBI-NCED4.

图 6 pBI-NCED4 大肠杆菌 PCR 分析

Fig. 6 PCR analysis of *E. coli* harboring pBI-NCED4



注: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; I; *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切 pBI-NCED4。

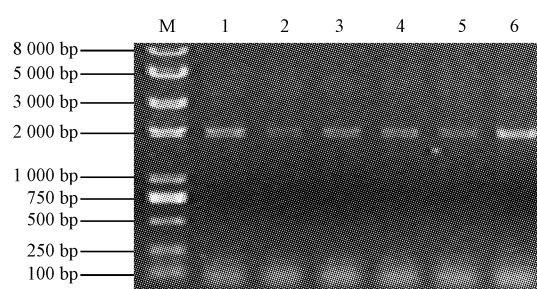
Note: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; I; pBI-NCED4 digested with *Xba* I and *Sma* I.

图 7 质粒 pBI-NCED4 酶切鉴定

Fig. 7 Enzyme analysis of pBI-NCED4

## 2.4 拟南芥再生植株的转化与 PCR 检测

用已经制备好的已转化了 pBI-NCED4 植物表达载体质粒的农杆菌菌液,对已经长出腋生花序的拟南芥植株进行侵染,侵染后的拟南芥通过抗生素筛选获得了 4 株抗性苗,进行 PCR 检测。提取抗性苗的基因组 DNA 作为模板,将质粒 pBI-NCED4 和野生型拟南芥的



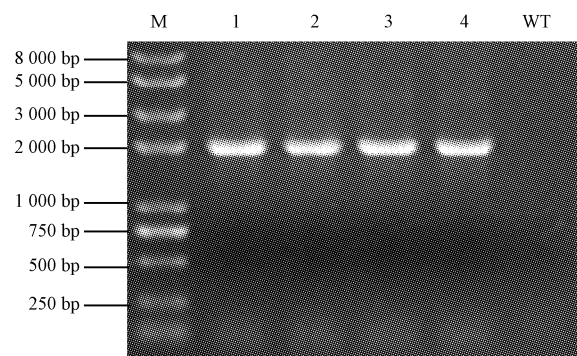
注: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~6; pBI-NCED4 菌体 PCR。

Note: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~6; PCR amplification of pBI-NCED4.

图 8 pBI-NCED4 农杆菌 PCR 分析

Fig. 8 PCR analysis of *Agrobacterium tumefaciens* harboring pBI-NCED4

基因组 DNA 分别作为阳性和阴性对照组,以 pBI-f 和 pBI-r 为引物进行 PCR 扩增。1%的琼脂糖凝胶电泳结果显示,所选的株抗性拟南芥苗均可以扩增得到约 2 000 bp 的片段(图 9),大小与预期一致,说明 NCED4 基因已经成功整合到拟南芥的基因组中,初步确定这 4 株抗性苗为成功转化的转基因拟南芥。



注: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~4; 转基因拟南芥; WT: 野生型拟南芥。

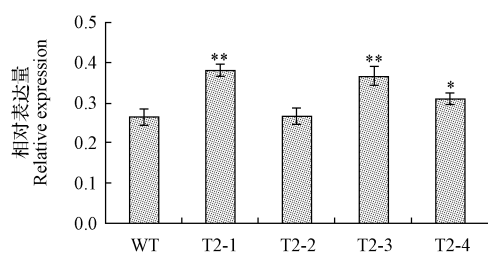
Note: M; DNA Marker Trans 2 000 plus II; 1~4; Transgenic *Arabidopsis thaliana*; WT: Wild type *Arabidopsis thaliana*.

图 9 转基因拟南芥 PCR 检测

Fig. 9 PCR analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana*

## 2.5 转基因拟南芥荧光定量 PCR 检测

从 T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥苗中选出的 4 株提取总 RNA,反转录得到第一链 cDNA,以野生型拟南芥的 cDNA 作为对照,以 NCED-RT-f 和 NCED-RT-r 为引物进行基因表达分析,荧光定量分析得知,其中 3 株转基因拟南芥中,NCED4 基因表达量明显高于野生型拟南芥的表达量,结果表明,NCED4 基因在转基因拟南芥中过量表达成功。



注: WT: 野生型拟南芥; T2-1~T2-4: 转基因拟南芥。

Note: WT: Wild type *Arabidopsis thaliana*; T2-1~T2-4: Transgenic *Arabidopsis thaliana*.

图 10 转基因拟南芥荧光定量 PCR 检测

Fig. 10 RTFQ PCR analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana*

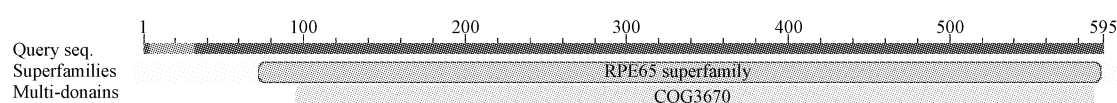


图 11 NCED4 保守结构域分析

Fig. 11 Conserved domain sequence analysis of NCED4

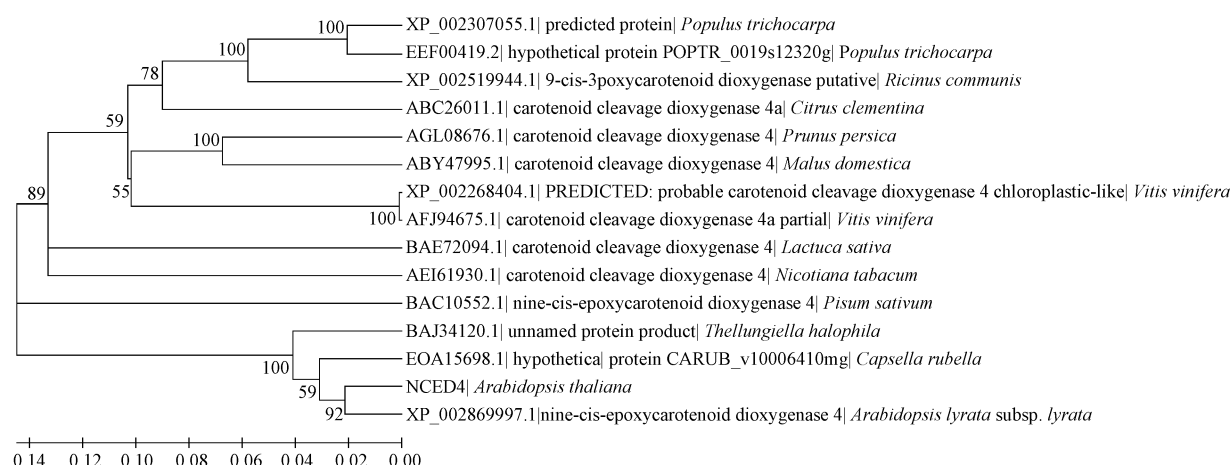


图 12 NCED4 及同源蛋白进化树分析

Fig. 12 Phylogenetic analysis of NCED4 and orthologs

### 3 讨论

鉴于 NCED 基因在内源 ABA 合成过程中的关键作用,近年来国内关于 NCED 基因方面的研究做了大量工作,研究对象较为广泛,在拟南芥、粮食作物以及花卉等都有涉及<sup>[16-18]</sup>。NCED 以基因家族的形式存在,其中拟南芥中所有的序列均已被分离出,且各序列的功能及作用方式已被证实存在差异<sup>[19-20]</sup>。试验结果表明,从拟南芥中克隆出的 NCED4 蛋白与从其它物种中分离出的具有较高的同源性和相似的保守区。同时,NCED4 氨基酸序列中不具有信号肽<sup>[21]</sup>。

pBI-NCED4 超表达载体的构建使得可以通过 PCR 扩增的方式在目的基因开放阅读框两端分别引入 *Xba*I 和 *Sma*I 酶切位点,在连接过程中可以确保插入方向的

### 2.6 生物信息学分析

利用 MEGA 5.0 软件对克隆出的 NCED4 基因进行生物信息学分析表明,从拟南芥中分离出的 NCED4 蛋白与其它物种的同源蛋白相比,该基因具有较高的同源性和相似的保守区(图 11、12),这与以前的研究一致<sup>[15]</sup>。在 ExPaSy 网站([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))。预测等电点和分子量,分别为 6.42/65 601.73。经 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测,不存在信号肽。

正确<sup>[22]</sup>。将分离到的基因构建表达载体转入拟南芥中进行过量表达,得到成功转化的转基因苗后,进行外源激素诱导处理,初步推测 NCED4 基因的功能。这也是进行基因功能检测的常规方法<sup>[23-24]</sup>。该研究采用农杆菌介导的方法转化拟南芥,通过 PCR 反应检测 NCED4 基因完整开放阅读框的方法来检测目的片段是否已经成功插入拟南芥基因组中,结果显示所选的 4 株再生植株全部能够扩增出目的片段,而未转化植株却无法扩增出目的片段,证实目的基因已转入拟南芥基因组中,荧光定量分析显示,其中 3 株转基因拟南芥植株中 NCED4 表达量明显高于野生型中 NCED4 表达量,证明 NCED4 基因在转基因拟南芥中成功过量表达。

在外源激素的处理下,NCED4 基因相对表达量的变化说明了该基因可能与脱落酸、赤霉素等激素的调控

有关且在激素处理下受负调控作用影响<sup>[13]</sup>。该试验为后续对 *NCED4* 基因功能的鉴定提供了依据和试验基础。

### 参考文献

- [1] Da Silva E A, Peter E T, Andre A M, et al. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination[J]. Annals of Botany, 2008, 102(3): 425-433.
- [2] Sarath G, Hou G, Baird L M, et al. ABA, ROS and NO are key players during switchgrass seed germination[J]. Plant Signal Behav, 2007, 2(6): 492-493.
- [3] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Plant genes induced by drought stress and ABA[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1992, 37(7): 1190-1199.
- [4] Li Y, Pan H C, Li D Q. Responses of ABA and CTK to soil drought in leafless and leafy apple tree[J]. Journal of Zhejiang University Science, 2003, 4(1): 101-108.
- [5] Ricardo A, Maria del M A, Paolo V, et al. Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (sitians) [J]. Microb Ecol, 2008, 56(4): 704-719.
- [6] Seo M, Koshiba T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 41-48.
- [7] Yang J, Guo Z. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (SgNCED1) from *Stylosanthes guianensis* and its expression to abiotic stresses[J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 1383-1390.
- [8] Lefebvre V, North H, Frey A, et al. North, Functional analysis of Arabidopsis *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy[J]. The Plant Journal, 2006, 45: 309-319.
- [9] 魏开发, 贾文锁, 林子英, 等. *NCED3* 基因雌二醇诱导表达对 ABA 合成酶基因和代谢酶基因表达的影响[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2009, 27(1): 70-80.
- [10] 朱国辉, 徐慰盈, 吴丹, 等. 拟南芥 ABA 生物合成基因 *NCED6* 对葡萄糖诱导其种子萌发延迟的作用[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(2): 139-142.
- [11] Frey A, Effroy D, Lefebvre V. Epoxycarotenoid cleavage by *NCED5* fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other *NCED* family members[J]. Plant Journal, 2012, 70(3): 501-512.
- [12] Iuchi S, Kobayashi M. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis[J]. Plant Journal, 2001, 27: 325-333.
- [13] Huo H, Dahal P, Kunusoth K, et al. Expression of 9-cis-EpoxyCarotenoid Dioxygenase4 is essential for Thermoinhibition of lettuce seed germination but not for seed development or stress tolerance[J]. Plant Cell, 2013, 25(3): 884-900.
- [14] 程强, 张新叶, 黄敏仁. 实时定量 RT-PCR 技术及在植物基因表达分析中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2005, S1: 82-86.
- [15] Zhang M, Leng P, Zhang G, et al. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(12): 1241-1252.
- [16] 朱海生, 李永平, 花秀凤, 等. 草莓 9-顺式-环氧胡萝卜素双加氧酶基因 *FaNCED* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(1): 40-48.
- [17] 王晓庆, 张超, 王彦杰, 等. 牡丹 *NCED* 基因的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 2033-2034.
- [18] 迟晓雪, 孙洁峰, 方程. 结缕草种子中 *NCED* 基因和 *CYP707A* 基因的克隆及其克隆及其表达动态[J]. 草地学报, 2012, 20(1): 146-147.
- [19] 万小荣, 莫爱琼, 潘家辉, 等. 拟南芥 *AtNCED2* 基因启动子区域序列克隆及其活性分析[J]. 生物技术, 2010, 20(6): 18-23.
- [20] 贾娟娟, 孟秀萍, 刘蕊, 等. 拟南芥 *NCED3* 基因在水稻中的过量表达可以提高水稻的干旱胁迫耐受性[J]. 复旦学报(自然科学版), 2008, 47(3): 288-294.
- [21] 于奎军, 许志斌, 李新, 等. 玉米 *NCED* 基因的序列特征及生物信息学分析[J]. 宁夏农林科技, 2010(5): 14-17.
- [22] 张怡, 康俊梅, 杨青川, 等. 紫花苜蓿 *MsPOD* 基因的克隆及对拟南芥的转化[J]. 中国草地学报, 2013, 35(3): 6-10.
- [23] 陆平, 田跃胜, 王名雪, 等. 枸杞脱落酸生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 303-310.
- [24] 李康, 聂小军, 方桂英, 等. 普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因的克隆及其表达分析[J]. 西北农业学报, 2010, 19(6): 55-59.

## Cloning and Transformation of *NCED4* Gene from *Arabidopsis thaliana*

GUO Tao<sup>1,2</sup>, CHAO Yue-hui<sup>2</sup>, YANG Qing-chuan<sup>2</sup>, JIN Hong<sup>1</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2</sup>, KANG Jun-mei<sup>2</sup>

(1. College of Ecology and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019; 2. Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

**Abstract:** Taking *Arabidopsis thaliana* as material, a gene which was named as *NCED4* was cloned by PCR technique. *NCED4* gene was inserted into plasmid and resulting a plant expressing vector pBI-*NCED4* with DNA recombination technology. Transgenic *Arabidopsis* plants with kanamycin resistance were obtained finally, and this were the basis of researching that the effect of *NCED4* gene overexpression on plant. The results showed that, PCR and Real Time RT-PCR analysis of 4 kanamycin resistant plants showed that the target gene was inserted into the genomes of the *Arabidopsis thaliana* and *NCED4* gene was over-expressed in transgenic *Arabidopsis* successfully; the expression levels of *NCED4* genes were changed obviously when exogenous hormones were added, and these results showed that *NCED4* gene may play an important role in hormone biosynthesis and regulation.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*; *NCED4*; abscisic acid; transformation