

张丽丽,李 博,谭燕华,等. 玉米转录因子基因 *ZmASR1* 的克隆及植物表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):16–22.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2016.04.005

玉米转录因子基因 *ZmASR1* 的克隆及植物表达载体构建

张丽丽,李 博,谭燕华,曹 扬,易小平

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:为深入研究玉米转录因子基因 *ZmASR1* 的功能,提高玉米株系的产量和抗逆性,根据 <http://www.maizegdb.org/> 网站上公布的玉米自交系 B73 的 *ZmASR1* 序列和 Cornejo 发表的 Ubiquitin 启动子的序列,设计引物从玉米自交系 B73 的 DNA 序列中克隆了 *ZmASR1* 基因和 Ubiquitin 启动子,并对 *ZmASR1* 基因进行了生物信息学分析。序列分析结果表明,*ZmASR1* 基因 DNA 全长为 1 381 bp,包含 1 个长度为 131 bp 的内含子序列,存在 1 个完整的开放阅读框 417 bp,编码 138 个氨基酸。氨基酸序列分析表明其具有 ASR 家族典型的保守结构域 ABA_WDS(abscisic acid/water deficit stress),氨基酸序列的 N 端有该家族成员所特有的依赖于 Zn^{2+} 的 DNA 结合位点,而 C 端则有 1 个核定位信号,玉米的 *ZmASR1* 与单子叶植物的 *ZmASR1* 亲缘关系较近,而与双子叶植物的 *ZmASR1* 亲缘关系较远。并构建了同时带有该启动子和 *ZmASR1* 基因的植物表达载体。

关键词:玉米;Ubiquitin 启动子;*ZmASR1* 基因;生物信息学;植物表达载体

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2016)04–0016–06

玉米生产在保障我国粮食安全中具有十分重要的战略地位,玉米在世界范围内广泛种植,是我国播种面积最大的农作物,同时也是我国产量第一大粮食作物,是主要的粮食饲料兼用作物,以产量高、营养丰富且用途广泛而被誉为三冠王——高产之王、饲料之王、加工原料之王。玉米的重要性为玉米的发展提供了难得的机遇,但同时我们也必须清醒地认识到玉米生产中遇到的现实困难。粮食产量下降是由各种生物和非生物胁迫的影响造成的,干旱是最重要的环境胁迫,超过任何其他环境因素,严重损害植物的生长和发育,限制植物生产和作物的性能^[1]。玉米是对水分反应敏感的旱地作物,玉米在整个生长发育过程中需水量较大,但其自身的耐旱性较差。我国每年受旱面积大约为种植面积的 40%,干旱一般可使玉米减产 20%~30%,因此,干旱成为制约我国玉米发展的首要不利因素。随着全球气候变暖、水资源的日益匮乏和干旱的日益加剧,耐旱玉米品种在农业生产中的地位显得越来越重要。干旱胁迫对玉米根系的生长发育、籽粒产量和品质都有较大影响,干旱胁迫抑制了玉米植株根系的生长,导致产量降低、品质变差。因此有关玉米干旱胁迫与抗旱性机理及其应用的研究才更加迫切,培育耐旱抗旱的玉米品种才是促进干旱和半干旱地区玉米生产发展的有效措施,同时也是抵御干旱提高产量的有效途径。

ASR(abscisic acid, stress, ripening) 蛋白是一类亲水性小分子量的植物特异性蛋白。ASR 基因在植物响应发育和环境

信号中发挥着重要的作用,包括衰老、果实成熟、花粉成熟和葡萄糖代谢^[2–5]。并且 ASR 基因在 ABA 诱导和响应生物及非生物胁迫时显著上调^[6–11]。大蕉 ASR 基因 *MpAsr* 受镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 诱导而上调表达^[10]。ASR 基因还可以影响果实的产量,玉米 ASR 基因(*ZmASR1*) 的异位表达对玉米产量有很大的影响,这种影响并不受缺水胁迫条件的限制,*ZmASR1* 通过调节支链氨基酸的生物合成基因可能有助于改善玉米的产量^[12]。

由于 ASR 基因在拟南芥中不存在^[9,13],对其功能和调控机制的研究非常有限。有研究表明小麦转录因子基因 *TaASR1* 转入烟草之后通过激活体内的抗氧化系统和胁迫相关基因的表达来赋予其抗旱性^[14]。Ricardi 等在番茄中通过 ChIP–SEQ 技术证明番茄 ASR1 基因可能通过调控番茄细胞壁和水通道蛋白相关靶基因的表达来赋予番茄对干旱胁迫的耐受性^[15]。前期的研究证明^[12],在玉米中 ASR 家族有 9 个成员,是目前 ASR 成员最多的品种,在玉米 ASR 基因家族 9 个成员中,在干旱胁迫条件下 *ZmASR1* 无论在转录水平还是蛋白质组水平上都是表达量最大、变化最为明显的,并且 *ZmASR1* 在玉米中的过量表达可以提高玉米在缺水胁迫下的籽粒产量,但是却没有对 *ZmASR1* 缺水胁迫下的调控机理进行更深入的研究,因此我们选择 *ZmASR1* 来进行抗旱调控机理的研究更有针对性和目的性。在玉米自交系中过表达 *ZmASR1* 基因是研究 *ZmASR1* 基因在植物中如何发挥调控作用的有效途径,对于培育玉米抗旱新品种,促进玉米产业的健康发展具有重要的理论和实践意义。

要想在玉米自交系中过表达 *ZmASR1* 基因,首先要构建植物表达载体,随着植物基因工程技术的发展,我们不仅要把特定的外源基因转入受体植物,更要将外源基因特定而高效地表达才能满足我们的需求。启动子序列中包含许多重要的顺式作用元件,对植物基因的表达水平具有重要作用,使其成为表达调控的关键环节。一般认为 CaMV35S 启动子在双子

收稿日期:2015–11–16

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201403075);中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费专项(编号:ITBB2015ZY14、ITBB2015ZD09)。

作者简介:张丽丽(1984—),女,山东滨州人,博士,助理研究员,主要从事植物分子遗传学研究。E–mail:zhanglili@itbb.org.cn。

通信作者:易小平,博士,副研究员,主要从事作物遗传育种研究。

Tel: (0898) 66988690; E–mail: yixiaoping@itbb.org.cn。

叶植物的遗传转化应用广泛,但在单子叶植物中的活性较低。而 Ubiquitin 启动子来自于玉米多聚泛素蛋白基因,是一个在单子叶植物中有较强表达的组成型启动子,在胁迫条件下,Ubiquitin 基因的表达活性会显著增强^[16]。本研究从玉米自交系 B73 中克隆了 Ubiquitin 启动子和玉米 *ZmASR1* 基因,构建了同时含 Ubiquitin 启动子和 *ZmASR1* 基因的植物表达载体,为后续获得转基因抗旱株系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为玉米自交系 B73,菌株为大肠杆菌 DH5 α 和植物表达载体为 pCambia3301,农杆菌菌株为 GV3101,酶与试剂为快速限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Pml* I 购自 Thermo Scientific 公司,T₄ DNA 连接酶,pMD18-T vector (simple) 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 Cornejo 发表的 Ubiquitin 启动子的序列,和 <http://www.maizegdb.org/> 上公布的 B73 自交系的 DNA 序列获取基因 *ZmASR1* 的序列,用 Primer 5.0 软件设计引物。*ZmASR1*F: 5' - CGGGATCCCGCCAGCTTCCCTCTTCTAGCTCGTTTCATT - 3'; *ZmASR1*R: 5' - GCACGTGTCCTCGTACCACGATCATACAC - 3'; *Ubi*F: 5' - CGGGATCCCTGCAGTGCAGCGTGACCC - 3'; *Ubi*R: 5' - CCAAGCTTCTGCAGAAGTAACACCAACAAC - 3'。

为了构建植物表达载体的方便,在 *ZmASR1* 基因 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点和 *Hind* III 酶切位点,3' 端引入 *Pml* I 酶切位点,在 Ubiquitin 启动子 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点,3' 端引入 *Hind* III 酶切位点。下划线标注的是酶切位点的位置,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.3 Ubiquitin 启动子的扩增及测序

以玉米 B73 自交系的总 DNA 为模板,按常规 PCR 条件扩增:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。将扩增到的 Ubiquitin 启动子的序列连接到载体 pMD18-T vector (simple),连接体系为 10 μ L:Solution I 5 μ L + 质粒 4 μ L + pMD18-T vector (simple) 1 μ L,转化大肠杆菌感受态 Trans5 α Chemically Competent Cell 后,送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序验证。

1.4 目的基因 *ZmASR1* 序列的克隆及测序

以玉米 B73 自交系的总 DNA 为模板,按常规 PCR 条件扩增:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。将扩增到的 *ZmASR1* 的序列连接到载体 pMD18-T vector (simple),连接体系为 Solution I 5 μ L + 质粒 4 μ L + pMD18-T vector (simple) 1 μ L,转化大肠杆菌感受态 Trans5 α Chemically Competent Cell 后,送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序验证。

1.5 玉米 *ZmASR1* 序列的生物信息学分析

根据 NCBI 的 ORF Finder 对 *ZmASR1* 基因全长 DNA 序列进行分析,通过 ProtParam 分析其理化性质,根据 NCBI 的 BLAST[find conserved domains in your sequence (cds)] 对 *ZmASR1* 氨基酸序列的保守结构域进行分析,通过 SubLoc

v1.0 软件对该蛋白的亚细胞定位进行预测。用 TMHMM - 2.0 ([http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM - 2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0)) 对 *ZmASR1* 的氨基酸序列进行分析,看其有无跨膜结构。用 DNAMAN 软件对从 11 种植物中获得 11 个 ASR 家族成员进行氨基酸多序列比对分析。利用 ClustalX 1.81 和 MEGA 3.1 软件分析 *ZmASR1* 核苷酸序列与其他植物的 ASR 核苷酸序列的进化关系,构建分子进化树。

1.6 植物表达载体的构建

先将连接到克隆载体 pMD18-T vector (simple) 上的 *ZmASR1* 的序列用 *Bam*H I 和 *Pml* I 双酶切,酶切体系为 50 μ L:10 \times Fast Digest Green buffer 5 μ L + *Bam*H I 5 μ L + *Pml* I 5 μ L + 质粒 20 μ L + ddH₂O 15 μ L,37 °C 酶切 1 h,然后将 *ZmASR1* 基因回收之后连接到同样用 *Bam*H I 和 *Pml* I 双酶切过的表达载体 pCambia3301 上,连接体系为 25 μ L:10 \times T₄ DNA Ligase buffer 2.5 μ L + 回收的 *ZmASR1* 基因 DNA 片段 15 μ L + pCambia3301 回收片段 1.5 μ L + T₄ 连接酶 1 μ L + ddH₂O 5 μ L,16 °C 连接过夜,之后将表达载体 pCambia3301 进行 *Bam*H I 和 *Pml* I 双酶切验证,酶切体系为 20 μ L:10 \times Fast Digest Green buffer 2 μ L + *Bam*H I 1 μ L + *Pml* I 1 μ L + 质粒 5 μ L + ddH₂O 11 μ L,37 °C 酶切 1 h,以确定 *ZmASR1* 基因已成功连接至表达载体 pCambia3301,然后送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序验证。

然后将连接到克隆载体 pMD18-T vector (simple) 上的 Ubiquitin 启动子序列用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,酶切体系为 50 μ L:10 \times Fast Digest Green buffer 5 μ L + *Bam*H I 5 μ L + *Hind* III 5 μ L + 质粒 20 μ L + ddH₂O 15 μ L,37 °C 酶切 1 h,然后将 Ubiquitin 启动子回收之后连接到同样用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切过的表达载体 pCambia3301 上,连接体系为 25 μ L:10 \times T₄ DNA Ligase buffer 2.5 μ L + 回收的 Ubiquitin 启动子 DNA 片段 15 μ L + pCambia3301 回收片段 1.5 μ L + T₄ 连接酶 1 μ L + ddH₂O 5 μ L,16 °C 连接过夜,之后将表达载体 pCambia3301 进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证,酶切体系为 20 μ L:10 \times Fast Digest Green buffer 2 μ L + *Bam*H I 1 μ L + *Hind* III 1 μ L + 质粒 5 μ L + ddH₂O 11 μ L,37 °C 酶切 1 h,以及 *Bam*H I 和 *Pml* I 双酶切验证,酶切体系为 20 μ L:10 \times Fast Digest Green buffer 2 μ L + *Bam*H I 1 μ L + *Pml* I 1 μ L + 质粒 5 μ L + ddH₂O 11 μ L,37 °C 酶切 1 h,以确定 Ubiquitin 启动子和 *ZmASR1* 基因都已成功连接至表达载体 pCambia3301。然后送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序验证。

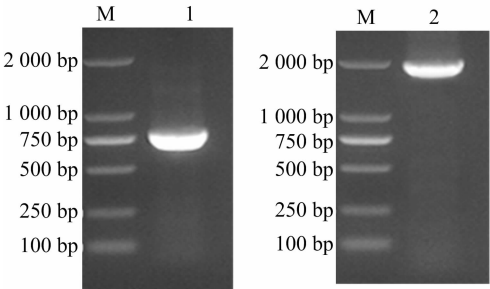
2 结果与分析

2.1 Ubiquitin 启动子的克隆和序列分析

以玉米自交系 B73 基因组 DNA 为模板,根据设计的引物进行 PCR 扩增,取 PCR 产物 5 μ L 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,可得到约 2 kb 的 DNA 扩增产物(图 1)。将 Ubiquitin 启动子连接到 pMD18-T vector (simple) 上,经测序,Ubiquitin 启动子序列长度为 1 993 bp,测序结果与文献报道的序列有 98% 左右的同源性。

2.2 目的基因 *ZmASR1* 的克隆和序列分析

以玉米自交系 B73 基因组 DNA 为模板,根据设计的引物进行 PCR 扩增,取 PCR 产物 5 μ L 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳



M—DNA 分子量标准 DL2000; 1—*ZmASR1* 基因的 PCR 扩增产物; 2—Ubiquitin 启动子的 PCR 扩增产物

图1 目的片段的 PCR 扩增验证

```
1      AACAAGCAAGAACAGCTGTCGATCCAATTGTCACTTGCTCTCCCTCCAACAAGCTAATTA
61     AGGCCGGTCATCCCTCTTCTAGCTCGTTTCATTATCATGCGGAGGAGAAGCACCACCA
1      M A E E K H H H
121    CCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGAGGAGCAGCTCGCCGCCGGCGGTACGGCGA
9      H H L F H H K K D E E Q L A A G G Y G E
181    GTCCGCCGAGTACACGAGGCCACGGTGACGGAGGTGGTGTCCACGGCGGAGAAGCAGTA
29     S A E Y T E A T V T E V V S T G E N E Y
241    CGACGAGTACAAGAAGGAGGAGAAGGAGCACAAGCACAAGCAGCACCTCGCGGAGGCCGG
49     D E Y K K E E K E H K H K Q H L G E A G
301    CGCCATCGCCGCCGCCCTTCGCACTCGTACGTAGTCCGTCGGTCCGATCTCTCTGA
69     A I A A G A F A L
361    GTAGTATATATATATACATACATGAACGAGAAAGAATAATATATATATTAATCGAACGAA

421    CTGAATGACGGTCACCTCGTGTGACGTGGACATGCACAGTACGAGAAGCAGAGGCGAAG
78     Y E K H E A K
481    AAGGACCCGGAGCAGCGCACCGCCACAAGATCGAGGAGGAGTCCGGCGCGCGCGGCC
85     K D P E H A H R H K I E E E V A A A A A
541    GTCGGCTCCGGCGGCTTCGCCTTCCACGAGCACCACGAGAAGAAGGACCACAAGGAG
105    V G S G G F A F H E H H E K K K D H K E
601    GCCGAGGAGGCCGGCGGCGAGAAGAAGCACCATTCTTCGGCTGATTGATCTCCCGTAT
125    A E E A G G E K K H H F F G *
661    CGTCGTCCCTCCCGTGTGCTACGCGTGCCTGTGAGAGTGATATCGAGGCCCGCGTGT
721    TGTGCGCGGTACGTATGTATGCGCTCGTGTGATGCACGAATAAGCGTGGCTACGTAATC
781    TATCGTATGTATACGTGTGTATGCATGTGCTGTGTATGATCGTGGTACGAGGACCGA
841    AAAAATGATGCAACTCTGATTACTTACATGTTTAGTGTTCACGTTTCTCAAAGTA
901    TTAGTACCCATTATGTTATATTTTACTATATTATATTTATTGATTATAACTATGTAT
961    GGATGAAATTACTATTTCAAGCTGGTAGCTAGACCGAGATAAACTCGTCCGTGTTGTTT
1021  TAACGGGTGTATTAATTTTATCCAAGTTAAATATTGTTTACGAACCTAGAGAGAAAAAA
1081  ACACGCACATATAGTATGAATCATATATGTCGGTTTACAAAATGTATACATTTTCTAAA
1141  TATGTGAATCGTATATATATATAGTATATGAGAGTACTGCGGCTAATTAAGCTACCTGT
1201  ACTACTAAGATCAAGAATAACACATATCTAACTGCAAAAAAAGATAGAATAAAACA
1261  CCTTCTAAAAATTTACGTACTCACAAGTTTAGAAAAGGACCACATCTCACAAGTTTTT
1321  TTTTAAAAAGGACCACATACTTGCATTTTATAATTCTAAAAATCATGTTCACATTTA
1381  T
```

方框中 ATG 表示起始密码子; * 表示终止密码子 TGA; 左侧数字分别为核苷酸和氨基酸序号; 下划线代表内含子区域

图2 *ZmASR1* 基因DNA全长序列

通过 Protparam 分析其理化性质,推测 *ZmASR1* 蛋白的分子式 $C_{683}H_{1014}N_{202}O_{216}S_1$,其相对分子量为 15.54 ku,等电点 (pI) 为 5.89。理论推导其半衰期大约为 30 h,不稳定参数为 39.84,蛋白质性质稳定 (标准:40 以下为稳定蛋白)。该蛋白中相对含量较多的氨基酸是谷氨酸 Glu (19.6%, 27 个)、丙氨酸 Ala (15.2%, 21 个)、组氨酸 His (14.5%, 20 个)、赖氨酸 Lys (13.0%, 18 个)、甘氨酸 Gly (9.4%, 13 个)。总的带负电荷的残基 (Asp + Glu) 为 31,总的带正电荷的残基 (Arg + Lys) 为 19。亲水性平均数为 -1.264,预测该蛋白为亲水性蛋白,其脂肪指数为 42.68。

氨基酸序列的保守结构域分析结果 (图 3) 显示,该基因

鉴定,可得到 750 bp 左右的 DNA 扩增产物 (图 1)。将 *ZmASR1* 基因连接到 pMD18 - T vector (simple) 上,经测序,*ZmASR1* 基因序列长度为 765 bp,包含了整个编码区及内含子序列,测序结果与 <http://www.maizegdb.org/> 上公布的 B73 自交系的 *ZmASR1* 基因的序列完全相同,无碱基突变。

2.3 玉米 *ZmASR1* 基因全长 DNA 序列的生物信息学分析

根据 NCBI 的 ORF Finder 分析发现,基因 *ZmASR1* 的 DNA 全长为 1 381 bp,包含 1 个长度为 131 bp 的内含子序列,cDNA 全长为 1 250 bp,包含 97 bp 的 5'非编码区、736 bp 的 3'非编码区和 417 bp 的开放阅读框,编码 1 个含有 138 个氨基酸的蛋白质,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA (图 2)。

具有 *ASR* 家族典型的保守结构域 ABA_WDS (abscisic acid/water deficit stress)。用 TMHMM - 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 对 *ZmASR1* 的氨基酸序列进行分析,没有跨膜结构域,没有信号肽,是一个可溶性蛋白质。

通过 SubLoc v1.0 软件对该蛋白的亚细胞定位进行预测,预测结果为其定位在细胞核。

ZmASR1 是特异存在于高等植物中的一类调控基因,用 DNAMAN 软件对从 11 种植物中获得的 11 个 *ASR* 家族成员进行氨基酸多序列比对分析,结果 (图 4) 显示,*ZmASR1* 的氨基酸序列与香蕉 (MaASR1, 登录号为 AY628102)、葡萄 (VvMSA, 登录号为 AAK69513)、水稻 (OsASR1, 登录号为



图3 ZmASR1氨基酸序列的保守结构域

AAB96681)、番茄 (SlASR1, 登录号为 DQ058745. 1)、百合 (LLA23, 登录号为 AY101194. 2)、甜瓜 (CumASR, 登录号为 AF426403. 1)、杏 (PaASR, 登录号为 U93164. 1)、桃 (PpASR, 登录号为 AF317062)、蓖麻 (RcASR1, 登录号为 XM_002524251. 1)、甘蔗 (SoDIP22, 登录号为 AB071694. 1) 等植

物中的 ASR 氨基酸序列相比,在 N 端和 C 端各有 1 个较为保守的区域。图中位于 N 端的 A 区域编码该家族成员所特有的依赖于 Zn^{2+} 的 DNA 结合位点,而位于 C 端的 B 区域则代表 1 个核定位信号。

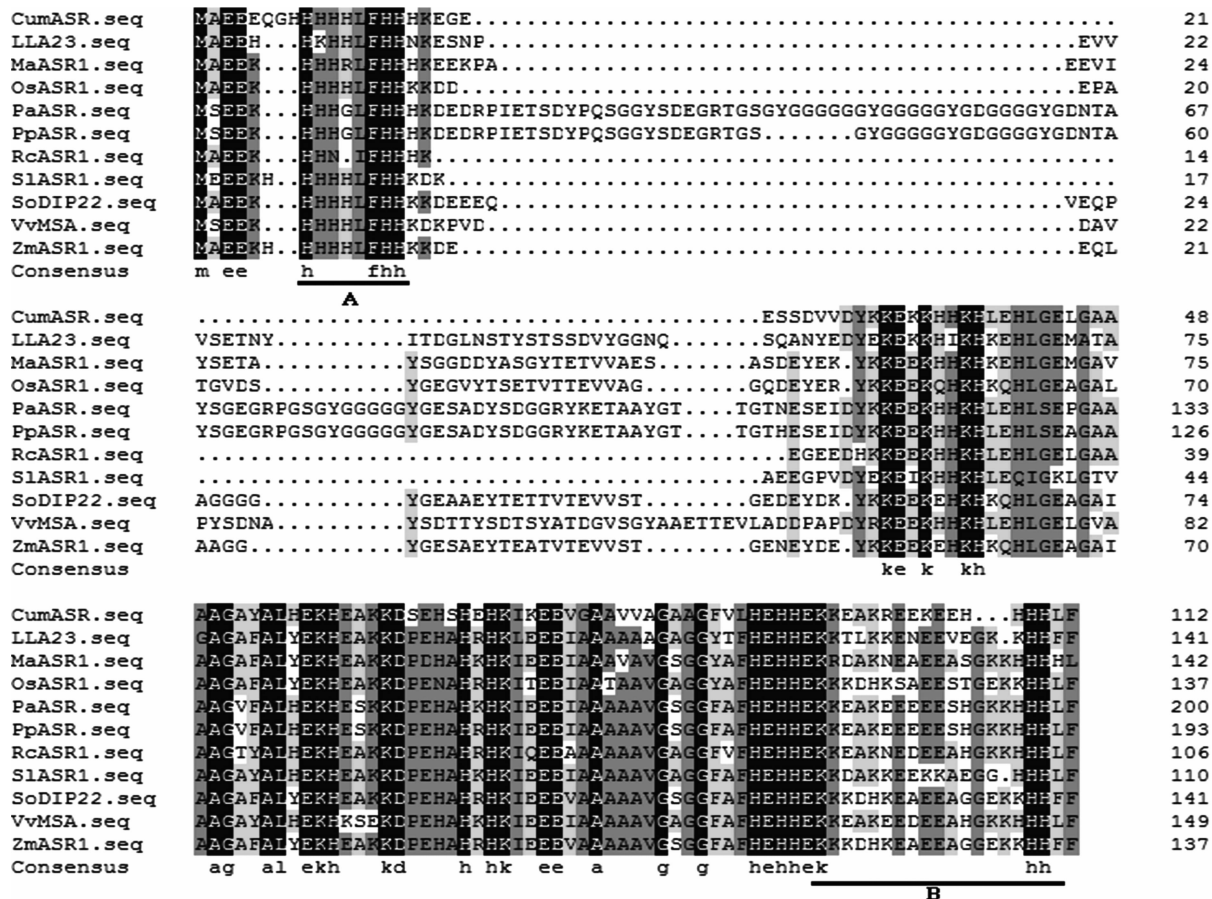


图4 ZmASR1 推导的氨基酸序列的多序列比对

利用 Clustal X1.81 和 MEGA 3.1 软件,将玉米 ZmASR1 核苷酸序列与其他物种中已经报道的 21 个 ASR 基因的核苷酸序列进行比对并绘制系统发生树,结果表明 ZmASR1 与单子叶植物甘蔗的亲缘关系最近,其次与大麦,小麦和水稻等单子叶植物的亲缘关系较近,而与花生、大豆、马铃薯和番茄等双子叶植物的亲缘关系较远(图 5)。

2.4 带有 Ubiquitin 启动子和目的基因 ZmASR1 的植物表达载体的构建

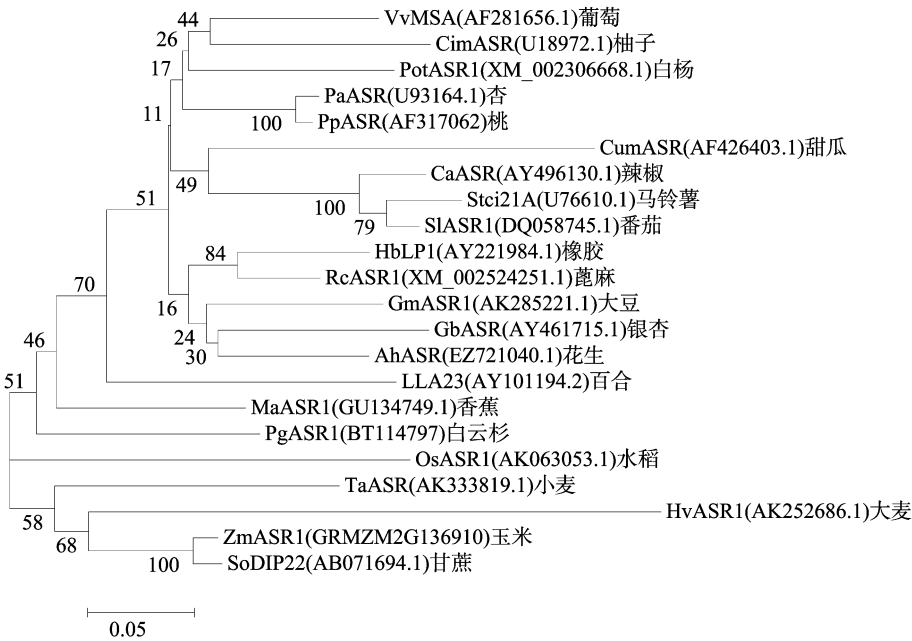
植物表达载体 pCambia3301 的图谱如图 6 所示,根据设计的酶切位点,先用 ZmASR1 基因替换 GUS 基因,之后再用 Ubiquitin 启动子替换 CaMV35S 启动子。

带有 Ubiquitin 启动子和目的基因 ZmASR1 的 pCambia3301 表达载体重组质粒的构建顺序是先将 ZmASR1 基因连接至克隆载体 pMD18-T vector (simple) 上,然后将同时

经过 BamH I 和 Pml I 双酶切的 pMD18-T vector (simple) 得到的 ZmASR1 基因(图 7)和 pCambia3301 表达载体进行连接,经双酶切验证证明 ZmASR1 基因和 pCambia3301 表达载体已成功连接(图 8)。

然后将 Ubiquitin 启动子连接至克隆载体 pMD18-T vector (simple) 上,之后将同时因经过 BamH I 和 Hind III 双酶切的 pMD18-T vector (simple) 得到的 Ubiquitin 启动子(图 7)和 pCambia3301-ZmASR1 表达载体进行连接,经双酶切验证证明 Ubiquitin 启动子和 pCambia3301-ZmASR1 表达载体已成功连接(图 8)。

最后将构建完成的 pCambia3301-Ubiquitin-ZmASR1 表达载体经 BamH I 和 Pml I 双酶切(图 8)和测序验证,证明植物表达载体 pCambia3301-Ubiquitin-ZmASR1 已构建成功,无碱基错配。



各节点处数字代表 bootstrap 值
图5 *ZmASR1* 基因与其他 *ASR* 基因的系统发育树分析

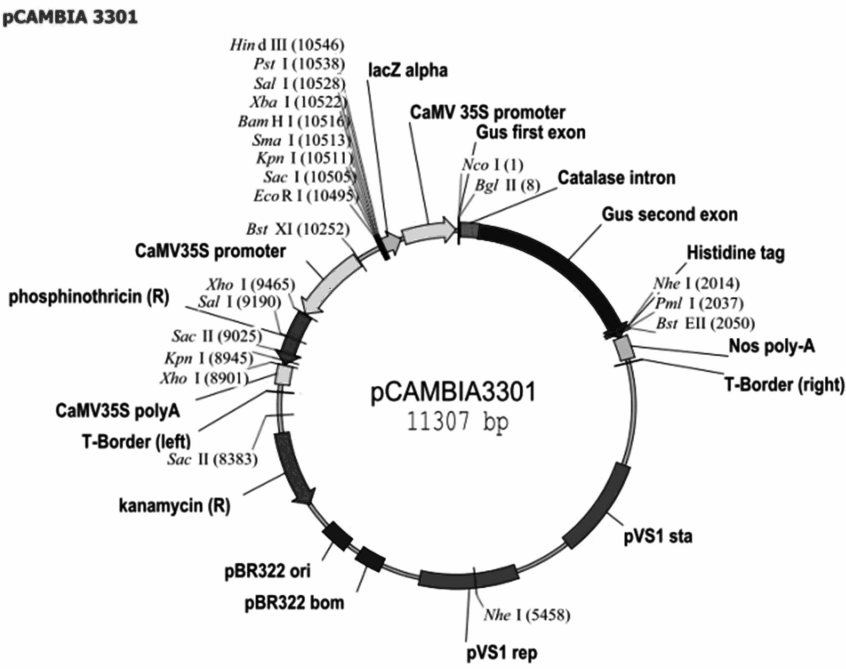


图6 pCambia3301植物表达载体图谱

3 讨论

ASR 是一类亲水性小分子量的植物特异性蛋白。ASR 蛋白在不同的细胞类型中被发现定位在细胞核,可作为转录因子结合特异的 DNA 序列来调控基因的表达。ASR 基因与生物及非生物胁迫有着非常紧密的联系,在糖和 ABA 信号的转导中发挥着重要作用。通过 SubLoc 1.0 软件对 *ZmASR1* 蛋白的亚细胞定位进行预测,预测其定位在细胞核,这与一些已知的 ASR 蛋白的定位^[11,17-18]也是一致的,这与其作为转录因子发挥调控作用是密不可分的。

本研究从玉米自交系 B73 中克隆了 *ZmASR1* 基因,序列分析结果表明,该基因 DNA 全长为 1 381 bp,内含有 1 个长度为 131 bp 的内含子序列,存在 1 个完整的开放阅读框 417 bp,编码 138 个氨基酸。氨基酸序列分析表明其具有 ASR 家族典型的保守结构域 ABA_WDS (abscisic acid/water deficit stress)。内含子作为真核生物基因的一部分,是细胞 DNA 中的间插序列。转录后的前体 mRNA 中包含这些序列,后经过剪接去除,最终形成的成熟 mRNA 分子中不存在这些序列^[19]。但随着分子生物学的发展,越来越多的证据显示,真核 mRNA 内含子在真核基因表达调控中起着重要的作

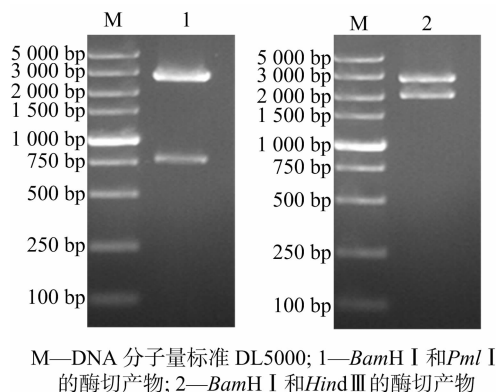


图7 克隆载体重组质粒的酶切鉴定

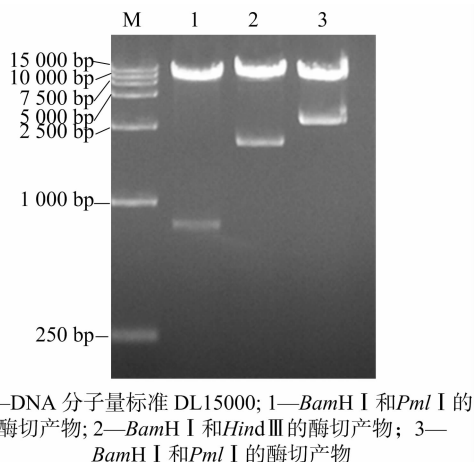


图8 pCAMBIA3301 表达载体重组质粒的酶切鉴定

用^[20],真核 mRNA 内含子的存在都可以大大提高转基因生物体的基因表达^[21],真核 mRNA 内含子已成为提高转基因生物体外源基因表达的重要元件之一。基于内含子可能发挥的重要功能,因此在我们构建的植物表达载体中也包含内含子部分。

本研究根据 Cornejo 发表的 Ubiquitin 启动子序列,设计引物从玉米自交系 B73 中克隆出 Ubiquitin 启动子,测序证明与发表的序列具有 98% 的同源性。Ubiquitin 启动子是目前单子叶植物遗传工程中最常用的启动子之一,Christensen 等研究发现,Ubiquitin 启动子与 CAT 编码区的融合基因 (Ubipro CAT) 在玉米原生质体中的表达强度是 35S 启动子与 CAT 编码区的融合基因 (35S pro CAT) 表达强度的 10 倍。在水稻中,Ubiquitin 启动子指导的 *GUS* 和 *Bar* 基因的表达水平显著高于 35S 启动子,而且对胁迫也有同玉米中一样的表达增强反应^[22]。因此在单子叶植物转基因研究中,构建表达载体一般选用来自玉米的 Ubiquitin 启动子或者来自水稻的 Actin I。

本试验采用在 *ZmASR1* 基因引物序列前引入双酶切位点,基因序列后引入单酶切位点的方法先将该基因连入表达载体,之后再将 Ubiquitin 启动子连入表达载体,然后构建了同时带有该启动子和 *ZmASR1* 基因的植物表达载体,该方法与先将 2 个基因连接在一起再连入表达载体的方法相比简单易行,并且不容易出现碱基错配的情况,也不用调节被引入基因的浓度比例等问题。该表达载体的构建为获得转基因玉米株系并进一步研究玉米 *ZmASR1* 转录因子基因的功能及应用奠定了基础。

4 结论

本研究从玉米自交系 B73 中克隆了 *ZmASR1* 基因,序列分析结果表明,该基因 DNA 全长为 1 381 bp,包含 1 个长度为 131 bp 的内含子序列,cDNA 全长为 1 250 bp,包含 97 bp 的 5'非编码区,736 bp 的 3'非编码区和 417 bp 的开放阅读框,存在 1 个完整的开放阅读框 417 bp,编码 138 个氨基酸;氨基酸序列分析表明其具有 ASR 家族典型的保守结构域 ABA_WDS;没有跨膜结构域,没有信号肽,是一个亲水的可溶性蛋白质;预测其定位在细胞核;在 N 端和 C 端各有 1 个较为保守的区域,位于 N 端的是编码该家族成员所特有的依赖于 Zn^{2+} 的 DNA 结合位点,而位于 C 端的则有 1 个核定位信号;*ZmASR1* 与单子叶植物甘蔗的亲缘关系最近,其次与大麦、小麦和水稻等单子叶植物的亲缘关系较近,而与花生、大豆、马铃薯和番茄等双子叶植物的亲缘关系较远。根据 Cornejo 发表的 Ubiquitin 启动子的序列,设计引物从玉米自交系 B73 中克隆出该启动子,测序证明与发表的序列具有 98% 的同源性,并构建了同时带有该启动子和 *ZmASR1* 基因的植物表达载体。

参考文献:

- [1] Shao H B, Chu L Y, Jaleel C A, et al. Understanding water deficit stress - induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe [J]. Crit Rev Biotechnol, 2009, 29 (2): 131 - 151.
- [2] Cakir B, Agasse A, Gaillard C, et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15 (9): 2165 - 2180.
- [3] Hong S H, Kim I J, Yang D C, et al. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo* [J]. J Exp Bot, 2002, 53 (378): 2271 - 2272.
- [4] Iusem N D, Bartholomew D M, Hitz W D, et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water - deficit and ripening [J]. Plant Physiol, 1993, 102 (4): 1353 - 1354.
- [5] Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen M T, et al. Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus [J]. Febs Lett, 2008, 582 (23/24): 3281 - 3287.
- [6] Schneider A, Salamini F, Gebhardt C. Expression patterns and promoter activity of the cold - regulated gene *ci21A* of potato [J]. Plant Physiol, 1997, 113 (2): 335 - 345.
- [7] Huang J C, Lin S M, Wang C S. A pollen - specific and desiccation - associated transcript in *Lilium longiflorum* during development and stress [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41 (4): 477 - 485.
- [8] Jeanneau M, Gerentes D, Fouellassar X, et al. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *ZmAsr1* gene and increase of water use efficiency by over - expressing C4 - PEPC [J]. Biochimie, 2002, 84 (11): 1127 - 1135.
- [9] Yang C Y, Chen Y C, Jauh G Y, et al. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2005, 139 (2): 836 - 846.
- [10] Liu H Y, Dai J R, Feng D R, et al. Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses [J]. J Integr

葛晓霞. 柑橘 *CuSERK - LIKE* 基因原核表达载体的构建与表达[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 22-24.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.006

柑橘 *CitSERK - LIKE* 基因原核表达载体的构建与表达

葛晓霞

(武汉生物工程学院应用生物技术研究中心, 湖北武汉 430415)

摘要:用 RT-PCR 扩增伏令夏橙体细胞胚发生类受体蛋白激酶(somatic embryogenesis receptor-like kinase, SERK)基因 ORF 区全长, 克隆入载体, 酶切后亚克隆入原核表达载体, 并用 SDS-PAGE 观察 *CuSERK - LIKE* 基因的原核表达情况。结果显示, 成功构建了 pET-*CuSERK1-like* 原核表达重组质粒, 该重组质粒在大肠杆菌中可经 IPTG 诱导表达分子量约为 69 ku 的融合蛋白, 与预测蛋白一致。

关键词:柑橘; *CuSERK1-like*; 表达载体; 构建; 原核表达

中图分类号: S188; S666.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0022-03

植物体细胞胚胎发生作为植物细胞全能性的一种表达方式, 是高等植物合子胚发育早期事件中基因表达调控研究的理想模型^[1]。体细胞胚发生类受体蛋白激酶(somatic embryogenesis receptor-like kinase)是在体细胞胚发生过程中发挥重要作用的一类激酶, 属于 LRR-RLK 亚家族。Schmidt 等首先从胡萝卜悬浮培养的胚性细胞中分离出第 1 个 *SERK* 基因, 并发现它只在胚性细胞内表达且只表达到体细胞胚的球形期^[2]。在其他物种中, 体细胞胚发生过程与 *SERK* 基因紧密地联系在一起, 相继在多个物种中克隆并鉴定了 *SERK* 基因, 如鸭茅^[3]、苜蓿^[4-5]、水稻^[6]、小麦^[7]、马铃薯^[8]、柑

橘^[9-10]、仙客来^[11]、菠萝^[12-13]等。

本研究在前期克隆获得柑橘体细胞胚发生类受体蛋白激酶基因 *CuSERK1-like* 的基础上^[10], 构建了 *CuSERK1-like* 的原核表达载体, 为今后大量表达、纯化 *CuSERK1-like* 蛋白和开展相关的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 pMD-*CuSERK1-like* 克隆载体的获得

根据 GenBank 登录的 *CuSERK - like* 基因序列(登录号为 FJ851422), 设计正反向引物, FP: 5'-ATGAAGACTAAG-GTTTGGGCT-3'; RP: 5'-TCACCTTGGACCAGATAACTC-3'。PCR 反应在 PTC-200 Thermocycler 中进行。20 μL 反应体系为: 0.2 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 U Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa, Japan), 1 × buffer, 正反向引物各 0.4 μmol/L, 50 ng 模板 cDNA。扩增程序为: 94 °C 变性

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 31201611)。

作者简介: 葛晓霞(1981—), 女, 山西阳泉人, 博士, 讲师, 研究方向为柑橘分子育种。Tel: (027) 89645532; E-mail: gexiaoxia15@aliyun.com。

Plant Biol, 2010, 52(3): 315-323.

[11] Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, et al. The water- and salt- stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein [J]. Biochem J, 2004, 381(2): 373-378.

[12] Virilouvet L, Jacquemot M P, Gerentes D, et al. The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions [J]. Plant Physiol, 2011, 157(2): 917-936.

[13] Carrari F, Fernie A R, Iusem N D. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9(2): 57-59.

[14] Hu W, Huang C, Deng X M, et al. TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Cell and Environment, 2013, 36(8): 1449-1464.

[15] Ricardi M M, González R M, Zhong S, et al. Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato *ASR1*, a drought stress-responsive transcription factor [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 29.

[16] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory

manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

[17] Wang H J, Hsu C M, Jauh G Y, et al. A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal [J]. Physiol Plantarum, 2005, 123(3): 314-320.

[18] Konrad Z, Bar-Zvi D. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine [J]. Planta, 2008, 227(6): 1213-1219.

[19] Ke S D, Chasin L A. Intronic motif pairs cooperate across exons to promote pre-mRNA splicing [J]. Genome Biol, 2010, 11(8): R84.

[20] Niu D K, Yang Y F. Why eukaryotic cells use introns to enhance gene expression: splicing reduces transcription associated mutagenesis by inhibiting topoisomerase I cutting activity [J]. Biol Direct, 2011, 6: 24.

[21] 李杨, 苏乔, 安利佳. 基因组的“沙漠区域”内含子及其在植物基因工程中的应用 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(4): 569-573.

[22] Comejo M J, Luth D, Blankenship K M, et al. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice [J]. Plant Mol Bio, 1993, 23(3): 567-581.