

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 14/415



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/29 C12N 15/11
C12N 15/63 A01H 1/00

[21] 申请号 02128889.5

[43] 公开日 2004 年 2 月 25 日

[11] 公开号 CN 1477110A

[22] 申请日 2002.8.19 [21] 申请号 02128889.5
[71] 申请人 清华大学
地址 100084 北京市海淀区清华大学生物科
学与技术系
[72] 发明人 程宪国 刘 强 侯玉霞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称 来源于番茄的抗逆性转录因子及其
编码基因与应用

[57] 摘要

本发明公开了来源于番茄的抗逆性转录因子及其编码基因与应用，目的是提供具有较强抗逆特性的来源于番茄的转录因子及其编码基因。本发明所提供的抗逆转录因子名称为 LeDREB2，是具有一系列中序列 2 氨基酸残基序列的蛋白质，或者是将序列 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与序列 2 的氨基酸残基序列相同活性的由序列 2 衍生的蛋白质。抗逆转录因子 LeDREB2 的编码基因，是下列核苷酸序列之一：1) 一系列中序列 1 的 DNA 序列；2) 与一系列中序列 1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性，且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列。本发明的基因对培育抗逆植物品种，特别是培育抗旱、抗寒和抗盐的植物品种，提高农作物产量具有重要意义。

1、抗逆转录因子 LeDREB2，是具有序列表中序列 2 氨基酸残基序列的蛋白质，或者是将序列 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与序列 2 的氨基酸残基序列相同活性的由序列 2 衍生的蛋白质。

2、根据权利要求 1 所述的转录因子，其特征在于：它是具有序列表中序列 2 氨基酸残基序列的蛋白质。

3、根据权利要求 2 所述的转录因子，其特征在于：所述序列 2 中自氮端到碳端第 86—143 个氨基酸残基保守结构域是转录因子 LeDREB2 的 AP2/EREBP 功能保守域。

4、抗逆转录因子 LeDREB2 的编码基因，是下列核苷酸序列之一：

1) 序列表中序列 1 的 DNA 序列；

2) 与序列表中序列 1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性，且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列。

5、根据权利要求 4 所述的基因，其特征在于：所述抗逆转录因子 LeDREB2 的编码基因是序列表中序列 1 的 DNA 序列。

6、根据权利要求 5 所述的基因，其特征在于：该基因的读码框为自 3' 端第 218 到第 1114 位碱基。

7、含有权利要求 4 所述基因的表达载体。

8、根据权利要求 7 所述的载体，其特征在于：所述表达载体为 pBI121-LeDREB2。

9、含有权利要求 4 所述基因的细胞系。

10、权利要求 4 所述基因在培育抗旱、抗寒、抗盐植物品种中的应用。

来源于番茄的抗逆性转录因子及其编码基因与应用

技术领域

本发明涉及植物转录因子及其编码基因与应用，特别是来源于陆地番茄的转录因子及其编码基因与应用。

背景技术

病原、干旱、盐碱、低温、冻害、水涝等生物与非生物环境胁迫因素对植物的生长发育具有重要影响。干旱脱水导致细胞内水分含量以及行为模式发生改变，高盐造成细胞内的渗透胁迫使离子浓度发生改变，低温冻害产生冰晶使细胞受到伤害。提高作物的耐逆性，除了利用传统的育种方法，分子遗传育种已经成为目前科技工作者所关注的领域之一。在逆境胁迫环境下，植物体内通常会发生一系列的生理生化变化。植物先是通过多种途径感受外界环境的变化，并将细胞外的信号转移到细胞内部，经过一系列磷酸化级联式反应将信号传递给转录因子，转录因子再通过其特异性功能氨基酸与目的基因相互作用，启动对逆境胁迫产生应答的目的基因表达，从而提高植物的抗性。已经证实，DREB 类某些转录子能接受环境胁迫信号并启动逆境应答基因，提高植物的耐逆性。在植物中，AP2/EREBP 功能保守域是 DREB 类转录因子的特异性结构。

番茄作为一种重要的食用蔬菜植物，弄清其抗病抗逆机理，进而改善其抗病性及耐逆性，具有重要的理论及现实意义。

发明内容

本发明的目的是提供具有较强抗逆特性的来源于番茄的转录因子及其编码基因。

本发明所提供的抗逆转录因子名称为 LeDREB2，是具有序列表中序列 2 氨基酸残基序列的蛋白质，或者是将序列 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与序列 2 的氨基酸残基序列相同活性的由序列 2 衍生的蛋白质。

序列表中序列 2 氨基酸残基序列是由 299 个氨基酸残基组成的蛋白质。所述序列 2 中自氮端到碳端第 86—143 个氨基酸残基保守结构域是转录因子 LeDREB2 的 AP2/EREBP 功能保守域。

抗逆转录因子 LeDREB2 的编码基因，是下列核苷酸序列之一：

- 1) 序列表中序列 1 的 DNA 序列；
- 2) 与序列表中序列 1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性，且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列。

序列表中序列 1 的 DNA 序列由 1238 个碱基组成，该基因的读码框为自 3' 端第

218 到第 1114 位碱基, 其表达主要受干旱、低温、高盐以及外来脱落酸、乙烯的诱导。

利用任何一种可以引导外源基因在植物中表达的载体, 如 pBIN19 以及由其衍生而来的 pBI101, pBI121 和 pBI221 系列载体 (Bevan, 1984 核酸研究, 12: 8711-8721), 将本发明所提供的编码转录因子 LeDREB2 的基因导入植物细胞, 可获得对干旱、低温和高盐胁迫耐受力得到增强的转基因细胞系及转基因植株。表达载体 pBI121-LeDREB2 是利用常规分子生物学手段构建的带有本发明 LeDREB2 cDNA 的表达载体, 它的基因图谱如图 1 所示。本发明的基因在构建到植物表达载体中时, 在其转录起始核苷酸前可加上任何一种增强启动子或诱导型启动子, 如花椰菜花叶病毒 (CaMV 35S) 以及 Ubiquitin 启动子等。为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选, 可对所使用的载体进行加工, 如加入植物可选择性标记 (GUS 基因、萤光素酶基因等) 或具有抗性的抗生素标记物 (庆大霉素, 卡那霉素等)。携带有本发明 *LeDREB2* 基因的表达载体可通过使用 Ti (Tumor-induced-癌诱导) 质粒、Ri (Root-induced-根诱导) 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、微注射、电导等常规生物技术方法导入植物细胞, 被转化的植物宿主既可以是单子叶植物, 也可以是双子叶植物。本发明的基因对培育抗逆植物品种, 特别是培育抗旱、抗寒和抗盐的植物品种, 提高农作物产量具有重要意义。

附图说明

图 1 为 *LeDREB2* 表达载体的构建。

图 2 为 *LeDREB2* 基因在大肠杆菌中的体外表达。

图 3 为 Southern 杂交分析结果。

图 4 为不同胁迫条件下 Northern 杂交检测的 *LeDREB2* 基因表达特征。

具体实施方式

实施例 1、番茄 *LeDREB2* 转录因子 cDNA 的克隆与序列分析

生长 10 天的番茄幼苗经水洗净后在室温下进行处理。干旱处理是将幼苗置于足够厚度的滤纸上脱水 5 小时, 收集植株于装有液氮的研钵中研磨至精细程度、置于 4mol/L 异硫氰酸胍中, 再用酸性苯酚/氯仿抽提混合物, 取上清液, 用异丙醇沉淀总 RNA, 再重复上述步骤一次, 最后经 75% 的乙醇洗涤干燥后将 RNA 溶于 DEPC 水中, 保存于 -80℃ (Davis 等, 分子生物学的基本方法: [Basic Methods in Molecular Biology], pp. 777, APPLETON & LANCE, Norwalk, Connecticut, USA, 1994)。通过 Promega Technical Manual-PloyATtract® mRNA Isolation Systems (on the internet at www.promega.com) 分离得到 ploy(A)+ mRNA, 经凝胶回收验证分析后, 通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 两个 adaptors 将目的 mRNA 连接到表达载体 pB42AD 相应的多克隆位点, 并

转化到大肠杆菌中扩增，所有程序均按说明书中的要求进行。扩增后的文库滴度检测与 PCR 分析表明，文库达到要求。利用酵母单杂交系统筛选番茄幼苗 cDNA 表达文库分离出一个 cDNA 克隆，命名为 LeDREB2（序列表中的序列 1）。该基因插入片段为 1238bp，含有 897bp 的开放阅读框架（218 起始-1114 终止），编码 299 个氨基酸组成的多肽（序列表中的序列 2），在氨基端和羧基端分别含有一个富含碱性氨基酸的核信号定位保守氨基酸残基序列和一个富含酸性氨基酸的激活域保守氨基酸残基序列，其 5' 端为 217bp，3' 端为 118bp。

实施例 2、用于转化的融合表达载体的构建。

LeDREB2 cDNA 表达载体的构建按常规分子生物学手段进行。将 LeDREB2 编码区域插入在一个 35S 启动子后面，包装于含有 TMV 翻译增强子的 pBI121 双元表达载体上，得到一个融合表达载体 pBI121-LeDREB2（其图谱如图 1 所示），经酶切鉴定插入片段无误后，转化于农杆菌，再提取质粒经酶切确认成功转化于农杆菌中，该复合体可直接通过转基因技术用于植物，特别是番茄的转化。

实施例 3、番茄 LeDREB2 基因在大肠杆菌中的体外表达鉴定

利用一对特异性引物 LeDREB2F- 317 5' -AAAAGAATTCCTTCTTCAGCCACTT-3' 331, LeDREB2R-945 5' -AAACTCGAGCGTAACTCGATCCCA-3' 931 通过 PCR 扩增得到一个包含 AP2/EREBP 结构域的 cDNA 片段 (Size-624bp)，并将该 cDNA 片段插入到蛋白表达载体 pGEX-4T-1 中相对应的 EcoRI 和 XhoI 位点上，然后转化于大肠杆菌中，经 IPTG 在大肠杆菌中诱导，SDS-PAGE 检测表明该基因能够在大肠杆菌中进行体外翻译表达。而未经诱导的菌株却没有蛋白表达带出现。聚丙烯凝胶电泳谱带如图 2 所示，图中，M 是 Marker；1、3 是经诱导的菌株；2 是未经诱导的菌株。从图中可以看出，经诱导的菌株有蛋白条带出现，未经诱导的菌株没有蛋白条带出现。

实施例 4、LeDREB2 基因在番茄基因组中的分析。

利用 LeDREB2 cDNA 作为探针，与经不同限制性内切酶 (E-EcoRI, V-EcoRV, P-PstI 以及 X-XhoI) 消化后的番茄基因组 DNA 在 65℃ 条件下进行杂交，并在高严谨度下洗膜，（高严谨度的条件是：0.5×SSC, 0.1×SDS, 65℃），结果如图 3 所示，除 EcoRI 消化基因组 DNA 呈现微弱两条杂交带外，其它均有多条杂交带出现，表明 LeDREB2 基因在番茄基因组中是一个多拷贝基因，或者在其基因组中存在着低拷贝的 LeDREB2 同源体。

实施例 5、番茄 LeDREB2 基因在逆境胁迫条件下的表达特征。

将生长 2 个星期的番茄幼苗分别置于 4℃ 水，250mM NaCl 水溶液以及 100 μM 脱落酸 (ABA) 溶液中进行光照培养，干旱处理是将生长 2 个星期的番茄幼苗经水洗净后

置于足以吸干水分的滤纸上在室温下脱水，并分别在 1 小时、3 小时、5 小时、7 小时、9 小时、12 小时以及 24 小时取样，提取总 RNA 并利用实施例 3 中所示的引物进行定量 ($1\mu\text{gRNA}$) RT-PCR 扩增目的片段，然后转移到尼龙膜与 LeDREB2 cDNA 探针进行 Northern 杂交分析，并在高严谨度下洗膜。完全相同的步骤用于 LeUbi3 (LeUbi3: 一种番茄中存在的泛蛋白基因) 分析。所用引物为: *LeUbi.3Fd*-1463 5' -GTGAAAGCC AAGATCCAGGAC-3' 1484; *LeUbi.3Re*-1857 5' -CAATCGCCAGCCTCCTTGTTG-3' 1878 (394bp) (Hoffman et al, 1991, Ubi3: accession number-X58253), LeUbi3 用做外部对照。结果如图 4 所示，其中 A 是干旱处理的结果，B 是 4℃ 低温处理的结果，C 是 250mM NaCl 处理的结果，D 是脱落酸处理的结果，从图中可以看出，LeDREB2 的转录主要受低温，盐以及干旱诱导表达，而且外来的脱落酸以及乙烯也可诱导该基因的表达。

序列表

<160>2

<210>1

<211>1238

<212>DNA

<213>番茄属陆地番茄 (*Lycopersicon esculentum* L.)

<400>1

```
tctctctcat caaccctcct ctctctctccc ctctctctct atattctatt ttcacacact 60
aaaacagagc agctcgatcat ttcttcaaca tctctgtgta tacactgcgt tcagtttatt 120
gagagtttcg caaatattaca gacatagttt tttcgcgaaa aaagagagag aagaaaacag 180
agcaaacgta acaaaaaacag agcaacacaa ttcatacatg ataataatgt ctacagagca 240
accaaattgt tcagaaagta ctgaatctag ctgcaactct tcttcttctt cgtcgccttc 300
atcgccatct tccgttcttc ttcagccact tccacaaatc aattcaaaaa atcgactcaa 360
aagatgcaga ggtgaagagg aagtagaaga agaagaagac gtggtcgtta ataatccaaa 420
tccgaagaag atgaataaaa acaacaacaa tggcagcagt actagtgttg tttcttatgt 480
aggtgtacga atgagagcat ggggaaaatg ggtatccgaa atccgtgaac ctaaaaaaaaa 540
atcacggatt tggttaggta cctttgctac cccggaaatg gcggcgcgtg ctacagacgt 600
cgccgccatg tccattaaag gtacctcagc tatactcaat tttccccaat tttcacattt 660
actgccccga cccgtcacgt gctccccacg tgacatccaa aacgccgccg taaaagccgc 720
tcacatggat cacctaaatc caaaattctc aatattaccg gaaacctctg cggcgacgat 780
gacctcatcg tcatcgctgc tgtcgtagt ttcgggcgtt acatcctcct cgtcgtcggt 840
tcaagacgac gaggagtcaa gaccgtcgcc tccggagctg attccggagg cgacggggca 900
gttgagtgag atagtggagc tgccaaaatt gggatcgagt tacgaattgg ttgaatcaac 960
tcagagttta tttgaatcag atgaatggtg ggataataat tatggaaatt gtgaatattt 1020
ttttggacaa gataattata ttagtagtaa tatggaattt acaggattag aaaatgtggt 1080
ttcaaccagt tttgagagtt ttttatggca acattagaat aaaaaaata atgttttttc 1140
ttttgataat taattttaca ctttattttt ttttatgtaa tttaggtgga aattattgat 1200
gaactttata cgtttcttgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1238
```

<210>2

<211>299

<212>PRT

<213>番茄属陆地番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)

<400>2

Met	Ile	Ile	Met	Ser	Thr	Glu	Gln	Pro	Asn	Cys	Ser	Glu	Ser	Thr
				5					10					15
Glu	Ser	Ser	Cys	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Pro
				20					25					30
Ser	Ser	Val	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln	Ile	Asn	Ser	Lys	Asn
				35					40					45
Arg	Leu	Lys	Arg	Cys	Arg	Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Glu
				50					55					60
Asp	Val	Val	Val	Asn	Asn	Pro	Asn	Pro	Lys	Lys	Met	Asn	Lys	Asn
				65					70					75
Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Thr	Ser	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Gly	Val
				80					85					90
Arg	Met	Arg	Ala	Trp	Gly	Lys	Trp	Val	Ser	Glu	Ile	Arg	Glu	Pro
				95					100					105
Lys	Lys	Lys	Ser	Arg	Ile	Trp	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Pro	Glu
				110					115					120
Met	Ala	Ala	Arg	Ala	His	Asp	Val	Ala	Ala	Met	Ser	Ile	Lys	Gly
				125					130					135
Thr	Ser	Ala	Ile	Leu	Asn	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	His	Leu	Leu	Pro
				140					145					150
Arg	Pro	Val	Thr	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ile	Gln	Asn	Ala	Ala	Val
				155					160					165
Lys	Ala	Ala	His	Met	Asp	His	Leu	Asn	Pro	Lys	Phe	Ser	Ile	Leu
				170					175					180
Pro	Glu	Thr	Ser	Ala	Ala	Thr	Met	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu
				185					190					195
Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Gln	Asp
				200					205					210
Asp	Glu	Glu	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Glu	Ala
				215					220					225
Thr	Gly	Gln	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Glu	Leu	Pro	Lys	Leu	Gly	Ser

230	235	240
Ser Tyr Glu Leu Val Glu Ser Thr Gln Ser Leu Phe Glu Ser Asp		
245	250	255
Glu Trp Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asn Cys Glu Tyr Phe Phe Gly		
260	265	270
Gln Asp Asn Tyr Ile Ser Ser Asn Met Glu Phe Thr Gly Leu Glu		
275	280	285
Asn Val Val Ser Thr Ser Phe Glu Ser Phe Leu Trp Gln His		
290	295	299

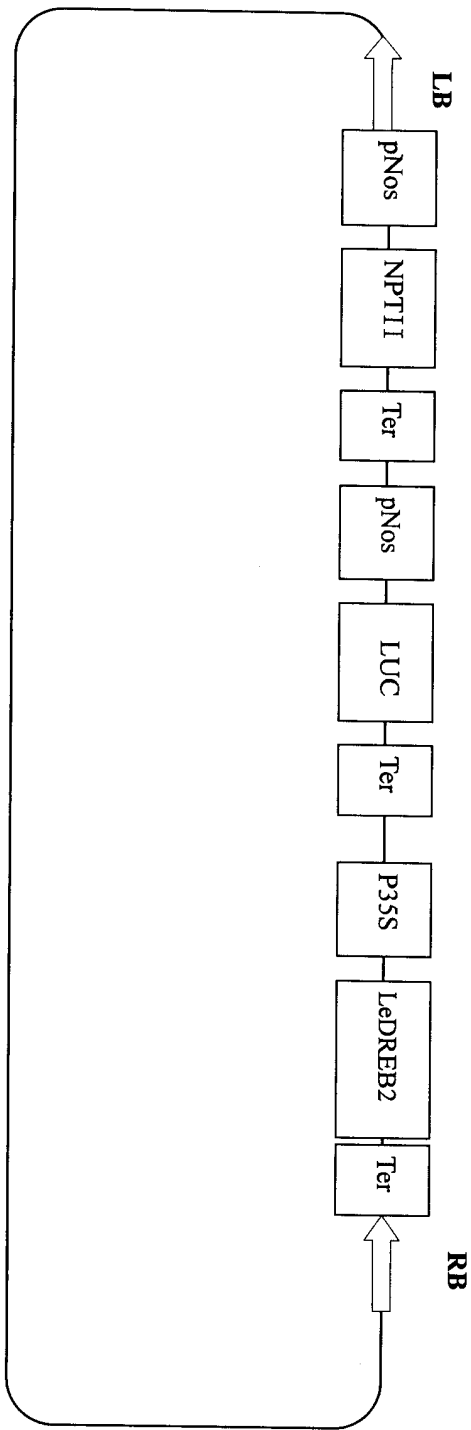


图 1

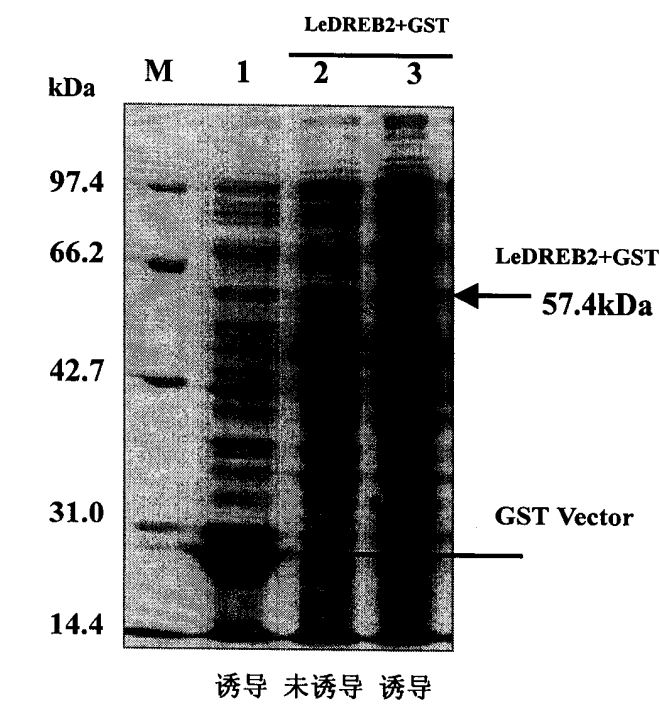


图 2

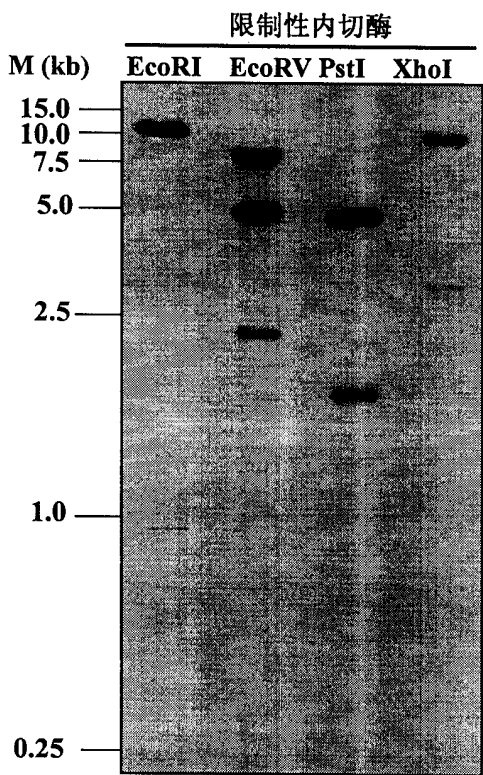


图 3

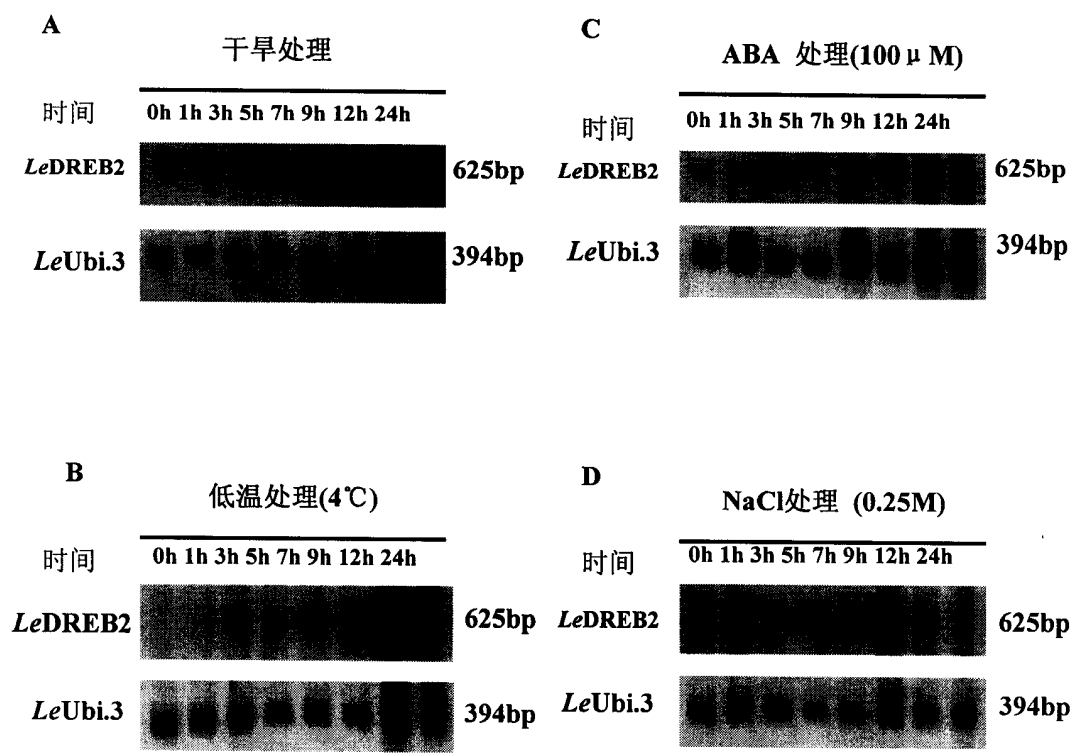


图 4