



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102952182 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 06

(21) 申请号 201210517562. 4

A01H 5/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 05

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 李天红 赵凯 沈欣杰 廖雄

王琪 刘琳琳

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 14/415(2006. 01)

C12N 15/29(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

序列表 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

来源于新疆野苹果的蛋白质及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了来源于新疆野苹果的蛋白质及其编码基因与应用。本发明所提供的蛋白质是如下 a) 或 b) 的蛋白质 ;a) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质 ;b) 将 SEQ ID No. 2 中的一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长相关的由 a) 衍生的蛋白质。该蛋白及其基因具有调控植物非生物胁迫抗性和调控植物生长的功能。

1. 一种蛋白,是如下 a) 或 b) 的蛋白质:
 - a) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质;
 - b) 将 SEQ ID No. 2 中的一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长相关的由 a) 衍生的蛋白质。
2. 编码权利要求 1 所述蛋白的核酸分子。
3. 根据权利要求 2 所述的核酸分子,其特征在于:所述核酸分子为如下 1)-4) 中任一所述的基因:
 - 1) 编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子;
 - 2) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 151-1347 位核苷酸的 DNA 分子;
 - 3) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 分子杂交且编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子;
 - 4) 与 1) 限定的 DNA 分子具有 90% 以上的同源性且编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子。
4. 下述 1)-4) 中的任一种生物材料:
 - 1) 含有权利要求 2 或 3 所述核酸分子的表达盒;
 - 2) 含有权利要求 2 或 3 所述核酸分子的重组载体;
 - 3) 含有权利要求 2 或 3 所述核酸分子的重组微生物;
 - 4) 含有权利要求 2 或 3 所述核酸分子的转基因细胞系。
5. 权利要求 1 所述的蛋白质在调控植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长中的应用;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种;所述生长为营养生长和 / 或生殖生长。
6. 权利要求 2 或 3 所述的核酸分子在调控植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长中的应用;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种;所述生长为营养生长和 / 或生殖生长。
7. 权利要求 4 所述的生物材料在调控植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长中的应用;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种;所述生长为营养生长和 / 或生殖生长。
8. 培育抗非生物胁迫和 / 或生长增加的转基因植物的方法,包括向受体植物中导入权利要求 3 所述核酸分子得到所述转基因植物的步骤;所述转基因植物与所述受体植物相比,对非生物胁迫的抗性提高和 / 或生长增加;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种;所述生长为营养生长和 / 或生殖生长。
9. 扩增权利要求 2 或 3 所述的核酸分子全长或其任一片段的引物对。

来源于新疆野苹果的蛋白质及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及来源于新疆野苹果的蛋白质及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 在自然环境中,植物生长在开放的系统中,经常会遇到冷、热、旱、涝、盐碱、大气污染等不良环境的影响。不良环境作用于植物,将会引起植物体内发生一系列的生理代谢反应,表现为代谢和生长的可逆性抑制,严重时甚至引起不可逆伤害,导致整个植株死亡。在各种环境胁迫中,干旱、低温、高热和高盐等非生物胁迫对植物的影响尤为突出,表现为不同程度地对植物体内水分状况的影响,因此又成为水分胁迫,是制约植物生长和农作物产量的最主要非生物性逆境因子。植物在长期的进化中,逐渐形成了一系列应答逆境胁迫的生理、代谢以及防御系统。从植物中克隆与调控植物非生物胁迫抗性相关的基因将为提高植物对非生物胁迫的抗性奠定物质基础。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供一个调控植物非生物胁迫抗性和/或调控植物生长的蛋白质及其编码基因与应用。

[0004] 本发明所提供的蛋白质,名称为 MsDREB2C,来源于新疆野苹果(*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.),是如下 a) 或 b) 的蛋白质:

[0005] a) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质;

[0006] b) 将 SEQ ID No. 2 中的一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物非生物胁迫抗性和/或植物生长相关的由 a) 衍生的蛋白质。

[0007] 其中, SEQ ID No. 2 由 398 个氨基酸残基组成。

[0008] 为了使上述(a)中的蛋白便于纯化,可在由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表 1 所示的标签。

[0009] 表 1 标签的序列

[0010]

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为 5 个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为 6 个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

[0011] 上述(b)中的 MsDREB2C 可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。上述(b)中的 MsDREB2C 的编码基因可通过将 SEQ ID No. 1 的第 151-1347 位核苷酸所示的 DNA 序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和 / 或进行一个或几个碱基对的错义突变,和 / 或在 其 5' 端和 / 或 3' 端连上表 1 所示的标签的编码序列得到。

[0012] 编码 MsDREB2C 的核酸分子也属于本发明的保护范围。

[0013] 其中,所述核酸分子可以是 DNA,如 cDNA、基因组 DNA 或重组 DNA ;所述核酸分子也可以是 RNA,如 mRNA 或 hnRNA 等。

[0014] 所述核酸分子具体可为如下 1) 或 2) 或 3) 或 4) 所示的基因:

[0015] 1) 编码 MsDREB2C 的 DNA 分子;

[0016] 2) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 151-1347 位核苷酸的 DNA 分子;

[0017] 3) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 分子杂交且编码 MsDREB2C 的 DNA 分子;

[0018] 4) 与 1) 限定的 DNA 分子具有 90% 以上的同源性且编码 MsDREB2C 的 DNA 分子。

[0019] 上述严格条件可为用 6×SSC, 0.5%SDS 的溶液,在 65℃ 下杂交,然后用 2×SSC, 0.1%SDS 和 1×SSC, 0.1%SDS 各洗膜一次。

[0020] 其中,SEQ ID No. 1 由 1438 个核苷酸组成,其编码序列是第 151-1347 位,编码 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质。

[0021] 下述 1) -4) 中的任一种生物材料也属于本发明的保护范围:

[0022] 1) 含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的表达盒;

[0023] 2) 含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的重组载体;

[0024] 3) 含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的重组微生物;

[0025] 4) 含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的转基因细胞系。

[0026] 上述生物材料中,1) 所述的含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的表达盒,是指能够在宿主细胞中表达 MsDREB2C 的 DNA,该 DNA 不但可包括启动 MsDREB2C 基因转录的启动子,还可包括终止 MsDREB2C 转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。2) 所述的含有编码 MsDREB2C 的核酸分子的重组载体具体可为在载体 pCB302-3 的多克隆位点插入 MsDREB2C 编码基因得到的表达 MsDREB2C 的重组表达载体。3) 所述重组微生物具体可为细菌,酵母,藻和真菌。其中,细菌可来自埃希氏菌属(*Escherichia*), 欧文氏菌 (*Erwinia*), 根癌农杆菌属(*Agrobacterium*), 黄杆菌属(*Flavobacterium*), 产碱菌属(*Alcaligenes*), 假单胞菌属(*Pseudomonas*), 芽胞杆菌属(*Bacillus*)等。4) 所述的转基因细胞系不包括植物的繁殖材料。

[0027] 本发明还保护编码 MsDREB2C 的核酸分子、编码 MsDREB2C 的核酸分子或上述任一种生物材料在调控植物非生物胁迫抗性和 / 或植物生长中的应用 ;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种。

[0028] 本发明还提供了一种培育抗非生物胁迫和 / 或生长增加的转基因植物的方法。

[0029] 本发明所提供的培育抗非生物胁迫和 / 或生长增加的转基因植物的方法,包括向受体植物中导入编码 MsDREB2C 的核酸分子得到所述转基因植物的步骤 ;所述转基因植物与所述受体植物相比,对非生物胁迫的抗性提高和 / 或生长增加 ;所述非生物胁迫为热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫中的至少一种。

[0030] 上述应用和方法中,所述植物可为单子叶植物或双子叶植物。所述生长可为营养

生长和 / 或生殖生长。所述营养生长可为根系的生长、茎的生长和 / 或叶的生长。

[0031] 所述根系的生长具体可体现在主根长度和 / 或侧根数量上,所述叶的生长具体可体现为叶面积上(叶长和 / 或叶宽增加)。所述植物为种子植物,所述生殖生长可体现在种子重量上。

[0032] 在本发明的一个实施例中,所述调控植物非生物胁迫抗性为调控拟南芥非生物胁迫抗性,所述调控植物生长为调控拟南芥生长。所述转基因植物为转基因拟南芥。所述生殖生长体现在花薹高度、花薹数量和 / 或种子重量上。

[0033] 上述方法中,所述受体植物可为拟南芥,所述生长增加为花薹数量增加和 / 或种子重量增加。

[0034] 其中所述 MsDREB2C 基因可先进行如下修饰,再导入受体植物中,以达到更好的表达效果:

[0035] 1) 根据实际需要进行修饰和优化,以使基因高效表达;例如,可根据受体植物所偏爱的密码子,在保持本发明所述 MsDREB2C 基因的氨基酸序列的同时改变其密码子以符合植物偏爱性;优化过程中,最好能使优化后的编码序列中保持一定的 GC 含量,以最好地实现植物中导入基因的高水平表达,其中 GC 含量可为 35%、多于 45%、多于 50%或多于约 60%;

[0036] 2) 修饰邻近起始甲硫氨酸的基因序列,以使翻译有效起始;例如,利用在植物中已知的有效的序列进行修饰;

[0037] 3) 与各种植物表达的启动子连接,以利于其在植物中的表达;所述启动子可包括组成型、诱导型、时序调节、发育调节、化学调节、组织优选和组织特异性启动子;启动子的选择将随着表达时间和空间需要而变化,而且也取决于靶物种;例如组织或器官的特异性表达启动子,根据需要受体在发育的什么时期而定;尽管证明了来源于双子叶植物的许多启动子在单子叶植物中是可起作用的,反之亦然,但是理想地,选择双子叶植物启动子用于双子叶植物中的表达,单子叶植物的启动子用于单子叶植物中的表达;

[0038] 4) 与适合的转录终止子连接,也可以提高本发明基因的表达效率;例如来源于 CaMV 的 tml,来源于 rbcS 的 E9;任何已知在植物中起作用的可得到的终止子都可以与本发明基因进行连接;

[0039] 5) 引入增强子序列,如内含子序列(例如来源于 Adh1 和 bronzel)和病毒前导序列(例如来源于 TMV, MCMV 和 AMV)。

[0040] 所述 MsDREB2C 基因可通过 MsDREB2C 基因表达盒或含有所述 MsDREB2C 基因表达盒的 MsDREB2C 基因表达载体导入目的植物。

[0041] 本发明中所述 MsDREB2C 基因表达盒均可含有所述 MsDREB2C 基因和启动所述 MsDREB2C 基因转录的启动子。本发明中所述 MsDREB2C 基因表达盒均指能够在宿主细胞中表达 SEQ ID No. 2 所示的 MsDREB2C 的 DNA,该 DNA 不但可包括启动所述 MsDREB2C 基因转录的启动子,还可包括终止所述 MsDREB2C 基因转录的终止子。进一步,所述 MsDREB2C 基因表达盒还可包括增强子序列。可用于本发明的启动子包括但不限于:组成型启动子,组织、器官和发育特异的启动子,和诱导型启动子。启动子的例子包括但不限于:花椰菜花叶病毒的组成型启动子 35S;来自西红柿的创伤诱导型启动子,亮氨酸氨基肽酶("LAP", Chao 等人(1999)Plant Physiol120:979-992);来自烟草的化学诱导型启动子,发病机理相关

1 (PR1) (由水杨酸和 BTH (苯并噻二唑-7-硫代羧酸 S-甲酯) 诱导); 西红柿蛋白酶抑制剂 II 启动子 (PIN2) 或 LAP 启动子 (均可用茉莉酮酸甲酯诱导); 热休克启动子 (美国专利 5,187,267); 四环素诱导型启动子 (美国专利 5,057,422); 种子特异性启动子, 如谷子种子特异性启动子 pF128 (CN101063139B (中国专利 200710099169.7)), 种子贮存蛋白质特异的启动子 (例如, 菜豆球蛋白、napin, oleosin 和大豆 beta conglycin 的启动子 (Beachy 等人 (1985) EMBO J. 4:3047-3053))。此处引用的所有参考文献均全文引用。合适的转录终止子包括但不限于: 农杆菌胭脂碱合成酶终止子 (NOS 终止子)、花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 终止子、tm1 终止子、豌豆 rbcS E9 终止子和胭脂氨酸和章鱼氨酸合酶终止子 (参见, 例如: Ode11 等人 (1985) Nature 313:810; Rosenberg 等人 (1987) Gene, 56:125; Guerinneau 等人 (1991) Mol. Gen. Genet, 262:141; Proudfoot (1991) Cell, 64:671; Sanfacon 等人 Genes Dev., 5:141; Mogen 等人 (1990) Plant Cell, 2:1261; Munroe 等人 (1990) Gene, 91:151; Ballad 等人 (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891; Joshi 等人 (1987) Nucleic Acid Res., 15:9627)。在本发明的实施例中, 所述 MsDREB2C 基因表达盒中启动所述 MsDREB2C 基因转录的启动子为花椰菜花叶病毒的组成型启动子 35S, 终止所述 MsDREB2C 基因转录的终止子为 NOS 终止子。

[0042] 可用现有的植物表达载体构建含有所述 MsDREB2C 基因表达盒的重组表达载体。所述植物表达载体包括二元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等。如 pROKII、pBin438、pCambia1302、pCambia2301、pCambia1301、pCambia1300、pBI121、pCambia1391-Xa 或 pCambia1391-Xb (Cambia 公司) 等。所述植物表达载体还可包含外源基因的 3' 端非翻译区域, 即包含聚腺苷酸信号和任何其它参与 mRNA 加工或基因表达的 DNA 片段。所述聚腺苷酸信号可引导聚腺苷酸加入到 mRNA 前体的 3' 端, 如农杆菌冠瘿瘤诱导 (Ti) 质粒基因 (如胭脂合成酶 Nos 基因)、植物基因 (如大豆贮存蛋白基因) 3' 端转录的非翻译区均具有类似功能。使用本发明的基因构建植物表达载体时, 还可使用增强子, 包括翻译增强子或转录增强子, 这些增强子区域可以是 ATG 起始密码子或邻接区域起始密码子等, 但必需与编码序列的阅读框相同, 以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的, 可以是天然的, 也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选, 可对所用植物表达载体进行加工, 如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因 (GUS 基因、萤光素酶基因等)、抗生素的标记基因 (如赋予对卡那霉素和相关抗生素抗性的 nptII 基因, 赋予对除草剂膦丝菌素抗性的 bar 基因, 赋予对抗生素潮霉素抗性的 hph 基因, 和赋予对 methatrexate 抗性的 dhfr 基因, 赋予对草甘膦抗性的 EPSPS 基因) 或是抗化学试剂标记基因等 (如抗除草剂基因)、提供代谢甘露糖能力的甘露糖-6-磷酸异构酶基因。

[0043] 在本发明的实施例中, 所述选择标记基因为赋予对抗生素潮霉素抗性的潮霉素 B 磷酸转移酶 (hph) 基因 hyg。在本发明的实施例中, 所述 MsDREB2C 基因通过含有所述 MsDREB2C 基因表达盒的 MsDREB2C 基因表达载体导入目的植物。所述 MsDREB2C 基因表达载体是载体 pCB302-3 的多克隆位点插入 MsDREB2C 编码基因得到的表达 MsDREB2C 的重组表达载体 pCB302-3-MsDREB2C。

[0044] 所述 MsDREB2C 基因表达载体可通过使用 Ti 质粒, 植物病毒载体, 直接 DNA 转化, 微注射, 电穿孔等常规生物技术方法导入植物细胞 (Weissbach, 1998, Method for

Plant Molecular Biology VIII, Academy Press, New York, pp. 411-463; Geiserson and Corey, 1998, Plant Molecular Biology (2nd Edition)。

[0045] 所述目的植物可为单子叶植物或双子叶植物。当所述目的植物为拟南芥等双子叶植物时,所述转基因植物与受体植物相比,具有如下 1)-11) 中的至少一种特性:1) 抗热胁迫;2) 抗干旱胁迫;3) 抗冷胁迫;4) 主根长度增加;5) 侧根数量增加;6) 叶长增加;7) 叶宽增加;8) 叶片重量;9) 花薹数量增加;10) 种子重量增加;11) 花薹高度降低。

[0046] 所述方法还包括从导入 SEQ ID No. 2 所示的 MsDREB2C 的编码基因的植株中筛选表达所述编码基因的植株,得到所述转基因植物的步骤。

[0047] 所述转基因植物理解为不仅包含将所述基因转化目的植物得到的第一代转基因植物,也包括其子代。对于转基因植物,可以在该物种中繁殖该基因,也可用常规育种技术将该基因转移进入相同物种的其它品种,特别包括商业品种中。所述转基因植物包括种子、愈伤组织、完整植株和细胞。

[0048] 实验证明,导入 SEQ ID No. 2 所示的 MsDREB2C 的编码基因的转基因拟南芥与受体拟南芥相比,具有如下 1)-11) 的特性:1) 抗热胁迫;2) 抗干旱胁迫;3) 抗冷胁迫;4) 主根长度增加;5) 侧根数量增加;6) 叶长增加;7) 叶宽增加;8) 叶片重量;9) 花薹数量增加;10) 种子重量增加;11) 花薹高度降低。说明 MsDREB2C 及其编码基因可用于调控植物非生物胁迫抗性以及植物生长。

附图说明

[0049] 图 1 为 pCB302-3-MsDREB2C 重组质粒酶切验证电泳图谱。

[0050] M 为 DNA Marker III, 1, 2 为重组质粒 pCB302-3-MsDREB2C 酶切结果。

[0051] 图 2 为转基因拟南芥的 PCR 鉴定图谱。

[0052] M 为 DNA Marker III; WT: 哥伦比亚生态型拟南芥; V: 拟南芥 col/pCB302-3; 1, 2, 3, 4 为拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系。

[0053] 图 3 为 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 中 MsDREB2C 基因表达检测。

[0054] WT: 哥伦比亚生态型拟南芥。

[0055] 图 4 为 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 在 1/2MS 培养基中培养的表型分析。

[0056] 在 1/2MS 培养基中生长 11 天,测量主根长度,侧根数量(B, D, E),其中,侧根数量为每厘米主根长度上的侧根数;在 1/2MS 培养基中生长 21 天,测量植株高度和鲜重(C, F, G)。平均值和标准差取自 3 次重复,每次重复至少 20 株幼苗(Student's t-test, **P<0.01, *P<0.05); WT: 哥伦比亚生态型拟南芥。

[0057] 图 5 为 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 在土壤中培养的表型分析。

[0058] 植株在 1/2MS 培养基中生长 11 天后转移至土中生长 11 天(A), 24 天(B), 60 天(C)。24 天测量叶长, 叶宽, 叶重(D, F, H) 以及 60 天测量花薹高度, 花薹数量, 种子重量(E, G, I)。转基因株系及野生型拟南芥平均值及标准差取自 20 棵植株(D, E, F, G); 平均值及标准差来自三次重复, 每次重复选取 10 片叶子称重和 10 棵植株称种子重量(Student's

t-test, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$); WT: 哥伦比亚生态型拟南芥。

[0059] 图 6 为 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 对非生物胁迫抗性照片。

具体实施方式

[0060] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0061] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。其中, *Prybest* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、RNase-Free DNase I、限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Xba* I, T4DNA 连接酶,购自 TAKARA 公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, DNA Marker 购自中科瑞泰北京生物技术有限公司。氨基青霉素、硫酸卡钠酶素、利福平购自北京新经科生物技术有限公司。离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京汇天东方科技有限公司,离心柱型质粒小量提取试剂盒购自北京博大泰恒生物技术有限公司。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 购自北京博大泰恒生物技术有限公司。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 购自北京博大泰恒生物技术有限公司。哥伦比亚生态型拟南芥 (Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. NATURE. VOL 408. 14 DECEMBER 2000. www.nature.com)、二元植物转化载体 pCB302-3 (Chengbin Xiang. et al. A mini binary vector series for plant transformation. Plant Molecular Biology 40:711 - 717, 1999) 公众可从中国农业大学获得,以重复本申请实验。

[0062] 实施例 1、MsDREB2C 基因的克隆及转基因载体的构建

[0063] 一、MsDREB2C 基因的克隆

[0064] 以新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.) 水培苗为材料, CTAB 法提取其叶片总 RNA, 以 RNA 为模板, 反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板, 在 5' 和 3' 非编码区设计特异引物扩增新疆野苹果 MsDREB2C cDNA 全长。

[0065]

引物名称	引物序列
P1-F	5'- <u>GGATCCTTGGTGTATTTGGGTCTTGT</u> -3' (下划线为酶切位点 <i>Bam</i> H I)
P1-R	5'- <u>TCTAGAAATCTGTTTCTTTGCTTTCG</u> -3' (下划线为酶切位点 <i>Xba</i> I)

[0066] PCR 反应体系如下:

[0067] 在 200u1 离心管中加入下列组分 (25u1 体系):

[0068]

试剂	用量
10× Ex Taq Buffer	2.5 ul
Prybest (5 U/ul)	0.5 ul
dNTP (2.5 mM)	2 ul
cDNA	3 ul
P1-F (10 uM)	1 ul
P1-R (10 uM)	1 ul
ddH ₂ O	15 ul

[0069]

[0070] PCR 反应程序:94℃预变性 5min;94℃变性 30sec,56℃退火 30sec,72℃延伸 2min,扩增 30 个循环;72℃延伸 10min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,加“A”纯化后与 pMD18-T 克隆载体连接后测序。其中,加 A 反应体系如下:在 200ul 离心管中加入下列组分(10ul 体系):

[0071]

试剂	用量
10× Buffer	1 ul
Taq (5 U/ul)	1 ul
dATP (10 mM)	1 ul
PCR 产物	7 ul

[0072] 温度程序:70℃反应 30min。

[0073] 将测序结果表明含有 SEQ ID No.1 的 DNA 分子的重组载体命名为 pMD18-T-MsDREB2C。MsDREB2C 的 cDNA 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No.1 所示,其编码序列是第 151-1347 位核苷酸,其编码氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No.2 所示的蛋白质 MsDREB2C。

[0074] 二、MsDREB2C 基因表达载体的构建

[0075] BamH I 与 Xba I 双酶切 pMD18-T-MsDREB2C 回收 MsDREB2C 基因片段并与 BamH I 与 Xba I 双酶切的 pCB302-3 植物表达载体连接,得到 MsDREB2C 基因表达载体 pCB302-3-MsDREB2C。pCB302-3-MsDREB2C 的 BamH I 与 Xba I 双酶切鉴定结果如图 1 所示,pCB302-3-MsDREB2C 经 BamH I 与 Xba I 酶切后得到 1400bp 左右的片段。

[0076] 实施例 2、培育转 MsDREB2C 基因拟南芥

[0077] 本实施例的实验证明,导入 SEQ ID No.2 所示的 MsDREB2C 的编码基因的转基因拟南芥与受体拟南芥相比,具有如下 1)-11) 的特性:1) 抗热胁迫;2) 抗干旱胁迫;3) 抗冷胁迫;4) 主根长度增加;5) 侧根数量增加;6) 叶长增加;7) 叶宽增加;8) 叶片重量;9) 花薹数量增加;10) 种子重量增加;11) 花薹高度降低。说明 MsDREB2C 及其编码基因可用于调控植物非生物胁迫抗性以及植物生长。具体的实验方法和实验结果如下:

[0078] 一、转基因拟南芥的获得

[0079] 将 pCB302-3-MsDREB2C 重组质粒转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞,采用拟南芥浸花法(Clough and Bent 1998, Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16:735 - 743) 转化哥伦比亚生态型拟南芥(受体植物),待果荚成熟时收获 T0 代种子。将 T0 代种子播于土钵中,有两片真叶长出时,喷施 0.1% 的除草剂筛选,提取阳性苗用 P1-F 和 P1-R 进行 PCR 鉴定。将鉴别出的 PCR 阳性苗继续培养收获 T1 代种子,播种、喷施除草剂筛选,选取经卡方检验符合孟德尔遗传定律 3:1 分离比的植株,单株收获 T2 代种子,播种、喷施除草剂,选取未分离的植株收种,即为 T3 代单拷贝纯合转基因种子,将其命名为拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 作为后期表型分析及功能验证的材料。同时按照上述方法将 pCB302-3 转入哥伦比亚生态型拟南芥,得到转 pCB302-3 的纯合植株,命名为拟南芥 col/pCB302-3,作为空载体对照。T0 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 和 col/pCB302-3 的 PCR 鉴定结果如图 2 所示,哥伦比亚生态型拟南芥(受体植物)和 col/pCB302-3 均没有 MsDREB2C 基因的 PCR 产物,4 个拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系中均得到 MsDREB2C 基因的 PCR 产物。

[0080] 分别提取其中的 3 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 植株的总 RNA,在 oligo(dT) 引导下反转录成第一链 cDNA,以上述 P1-F 和 P1-R 为引物进行 PCR 检测在转基因拟南芥中 MsDREB2C 基因的表达水平,同时将 AtACTIN2 作为内参照基因,其扩增引物为:Forward 5'-TTGACTACGAGCAGGAGATGG-3';Reverse 5'-CAAACGAGGGCTGGAACAAG-3'。结果如图 3 所示,3 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 中均表达 MsDREB2C 基因。

[0081] 二、MsDREB2C 转基因拟南芥表型分析及功能鉴定

[0082] 1、MsDREB2C 调控植物生长

[0083] 将 3 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3、哥伦比亚生态型拟南芥、T3 代拟南芥 col/pCB302-3 的种子接入 1/2MS 培养基中,在 22℃ 中培养,11 天时测量主根长度、侧根数量,21 天时(成株期),测量植株高度和鲜重。其中,侧根数量的测定方法是侧根总数除以主根长度。

[0084] 将在上述条件下在 1/2MS 培养基培养 11 天的拟南芥植株转移至土壤中培养 60 天至种子成熟,于转入土壤中培养 11 天观察叶片;于转入土壤中培养 24 天测量叶长,叶宽,叶重;于转入土壤中培养 60 天测量花薹数量、花薹高度和种子重量。其中,叶长为叶柄加叶片的长度;叶宽为叶片最宽处的长度;叶重为最初 10 片叶的总重量;种子重量:10 棵植株的种子总重。

[0085] 结果表明 3 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3 转基因植株在主根长度,侧根数量,植株高度和鲜重指标上均高于哥伦比亚生态型拟南芥(图 4 和图 5);叶长,叶宽,叶重,花薹数量,种子重均高于野生型拟南芥,而花薹高度低于野生型(图 4)。拟南芥 col/pCB302-3 和哥伦比亚生态型拟南芥的上述表型均相同。说明 MsDREB2C 蛋白及其基因具有调控植物营养生长(根的生长、茎的生长和叶的生长)和生殖生长(花薹的生长和种子的生长)的功能。

[0086] 2、MsDREB2C 调控植物非生物胁迫抗性

[0087] 将 3 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1、L-2 和 L-3、哥伦比亚生态

型拟南芥、T3 代拟南芥 col/pCB302-3 的种子种入土壤中,在正常生长条件下培养至 21 天,分别进行下述五种处理:对照,整个实验过程中均在正常生长条件下培养;热胁迫,56℃ 光照培养箱放置 3h;干旱胁迫,植株 2 个星期不浇水;冷胁迫,植株在 -6℃ 放置 2 天;盐胁迫,植株每两天浇 200mM NaCl 溶液,持续 16 天。以上处理完成后,所有的植株返回正常生长条件下,7 天后统计成活率 (χ^2 -test, **P<0.01, *P<0.05)。实验设三次重复,每次重复 30 粒种子。

[0088] 结果表明 2 个 T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-2 和 L-3 转基因植株在热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫方面的抗性得到显著增强, T3 代拟南芥 col/pCB302-3-MsDREB2C 株系 L-1 在热胁迫和干旱胁迫方面的抗性得到显著增强(图 6)。图 6 中的对照为拟南芥在正常生长条件下培养 21 天的照片,其它处理为经相应胁迫处理的植株返回正常生长条件下培养 7 天的照片;图中的百分数为存活率。拟南芥 col/pCB302-3 和哥伦比亚生态型拟南芥的上述表型均相同。说明 MsDREB2C 蛋白及其基因具有调控植物非生物胁迫(热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫方面)抗性的功能。

[0001]

序 列 表

<110> 中国农业大学

<120> 来源于新疆野苹果的蛋白质及其编码基因与应用

<130> CGGNAR123193

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1438

<212> DNA

<213> 新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.)

<220>

<221> CDS

<222> (151).. (1347)

<400> 1

ggatccttgg tgtatttggg tcttgtctgt gtataaaacc caaaggtgct tgtgtgattg 60

gaaccgcaat ttgcttttga gaatttctgt acccagttct taatggaatt tggttcgtgt 120

[0002]

ttactgcaga ttgtgcataa tagaggagca atgggagctt atgatcaagg cgctaacatg	180
tcattctctgc cettggatgc ttcaaggaag aggaagacgc ggagcaggcg agatgggaac	240
tctgttgctg agacactaga aaagtggaaa gagtataata agaaactgga atcggttaat	300
aacgagggga aaacgcgtaa agtgcccgcc aaggggtcga agaaaggctg tatgaaaggc	360
aagggagggc ctgagaatgc acgttgcaat tacagaggctg tgaggcaaag gacttggggc	420
aagtgggtcg ccgagattcg ggagccagac aggggaagca ggctttggtt gggtaacttt	480
cccactgccc ttgatgctgc cettgcgtat gatgaggctg cgaaggccat gtatggtact	540
ggtgctcgcc tcaacctccc gcatcgcgcc aattatcacc catcgcttc actggagact	600
tcttcagttg caacaccacc aggtcttct gcagtggcaa ctccaggatg ctctacttcc	660
acttcaacct caagtcgctc tgagatttgt ggagacgagg attccaaget ttttettaat	720
gtgaaaaagg aggatggtga gggcgaatca aggatgtacc cgtggtctac tgcggtccct	780
caagccagtg gtatggttaa gccagaaacc attgaggatt tcaactatga ttatcttctg	840
aataatcaac aacaacctgt cgtcaaaccg gaagcaggag ttgaggatca taattggaat	900
ggcggagaag gttttattgg ggattattca gagaacttca caaccgacga gttgtttgat	960
atggatgaga tgtttgatgt aatgaactg ttgatgcctt cagatgatat tccctttgc	1020
aattcaggat cggagcaagt ttggagagct gacgttggc agtcgggcat ggagactctc	1080
agcagtgaga ggccatcaaa ttatcgtae cagctgcagt ttccagacgc caagctgctc	1140
gggagtctgc agcacatgga gcatgcccc ttgaacttcg aatacggttt tgatttcaag	1200
aagcaagaaa aggaggggag taatcatacc ggccaagatg atcaagggtt cttcaatctg	1260
ggattgtctg acttagattt ggaaggattc acaggaggaa taacacaacc cggagatgga	1320
ggttacaact attcgatgga aatgtgaagg ccaagtiggg tgggggtcta ttagtcttcc	1380
ccatgaactc gctgtaaacc gctcccgat tccgaaagca aagaaacaga tttctaga	1438

[0003]

<210> 2

<211> 398

<212> PRT

<213> 新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.)

<400> 2

Met Gly Ala Tyr Asp Gln Gly Ala Asn Met Ser Ser Leu Pro Leu Asp

1

5

10

15

Ser Ser Arg Lys Arg Lys Thr Arg Ser Arg Arg Asp Gly Asn Ser Val

20

25

30

Ala Glu Thr Leu Glu Lys Trp Lys Glu Tyr Asn Lys Lys Leu Glu Ser

35

40

45

Val Asn Asn Glu Gly Lys Thr Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys

50

55

60

[0004]

Lys Gly Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ala Arg Cys Asn

65

70

75

80

Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Thr Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile

85

90

95

Arg Glu Pro Asp Arg Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr

100

105

110

Ala Leu Asp Ala Ala Leu Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr

115

120

125

Gly Thr Gly Ala Arg Leu Asn Leu Pro His Ala Ala Asn Tyr His Pro

130

135

140

Ser Ser Ser Leu Glu Thr Ser Ser Val Ala Thr Pro Ser Gly Ser Ser

145

150

155

160

[0005]

Ala Val Ala Thr Pro Gly Cys Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ser Ser Arg

165

170

175

Ser Glu Ile Cys Gly Asp Glu Asp Ser Lys Leu Phe Leu Asn Val Lys

180

185

190

Lys Glu Asp Gly Glu Gly Glu Ser Arg Met Tyr Pro Trp Ser Thr Ala

195

200

205

Val Pro Gln Ala Ser Gly Met Val Lys Pro Glu Ile Ile Glu Asp Phe

210

215

220

Thr Met Asp Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Gln Gln Pro Val Val Lys Pro

225

230

235

240

Glu Ala Gly Val Glu Asp His Asn Trp Asn Gly Gly Glu Gly Phe Ile

245

250

255

[0006]

Gly Asp Tyr Ser Glu Asn Phe Thr Thr Asp Glu Leu Phe Asp Met Asp

260

265

270

Glu Met Phe Asp Val Asn Glu Leu Leu Met Pro Ser Asp Asp Ile Ser

275

280

285

Leu Cys Asn Ser Gly Ser Glu Gln Val Trp Arg Ala Asp Val Gly Gln

290

295

300

Ser Gly Met Glu Thr Leu Ser Ser Glu Arg Pro Ser Asn Leu Ser Tyr

305

310

315

320

Gln Leu Gln Phe Pro Asp Ala Lys Leu Leu Gly Ser Leu Gln His Met

325

330

335

Glu His Ala Pro Leu Asn Phe Glu Tyr Gly Phe Asp Phe Lys Lys Gln

[0007]

340

345

350

Glu Lys Glu Gly Ser Asn His Thr Gly Gln Asp Asp Gln Gly Tyr Phe

355

360

365

Asn Leu Gly Leu Ser Asp Leu Asp Leu Glu Gly Phe Thr Gly Gly Ile

370

375

380

Thr Gln Ser Gly Asp Gly Gly Tyr Asn Tyr Ser Met Glu Met

385

390

395

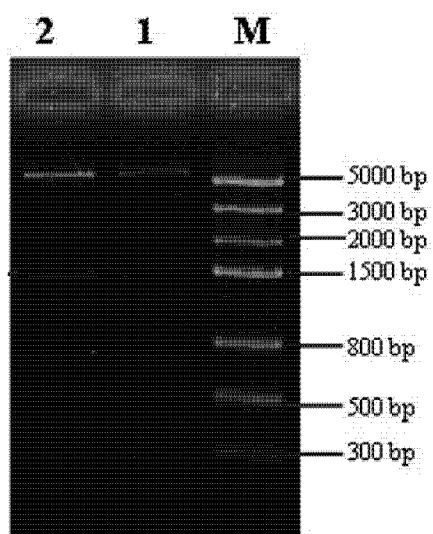


图 1

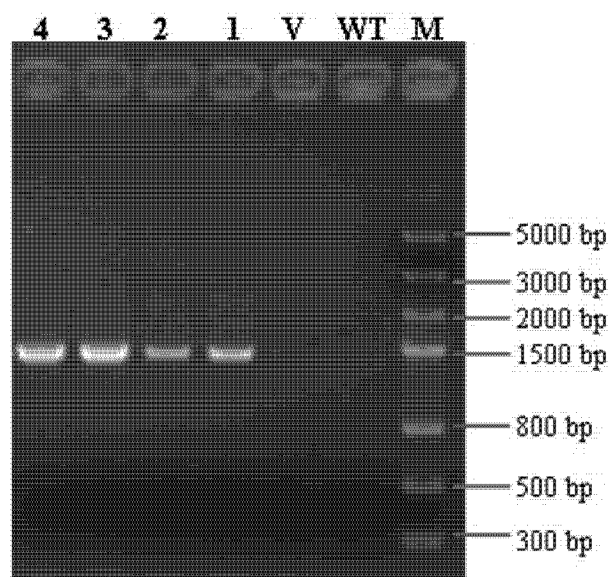


图 2

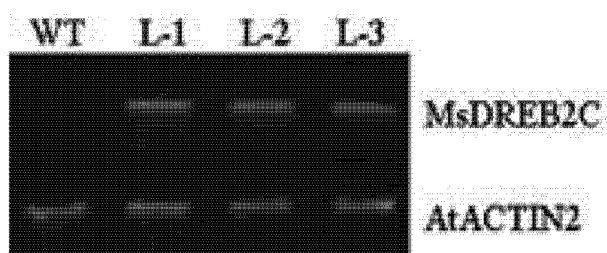


图 3

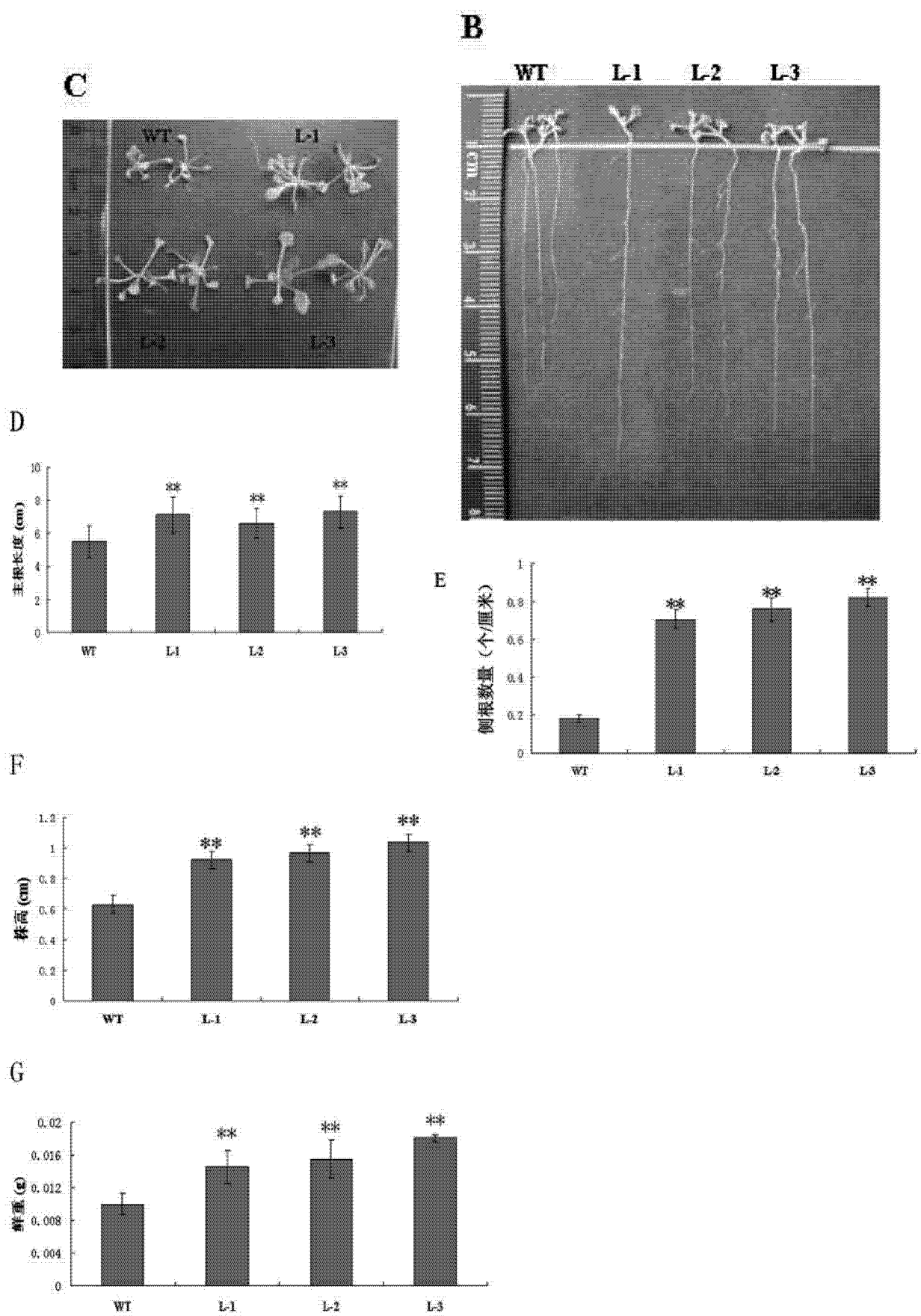


图 4

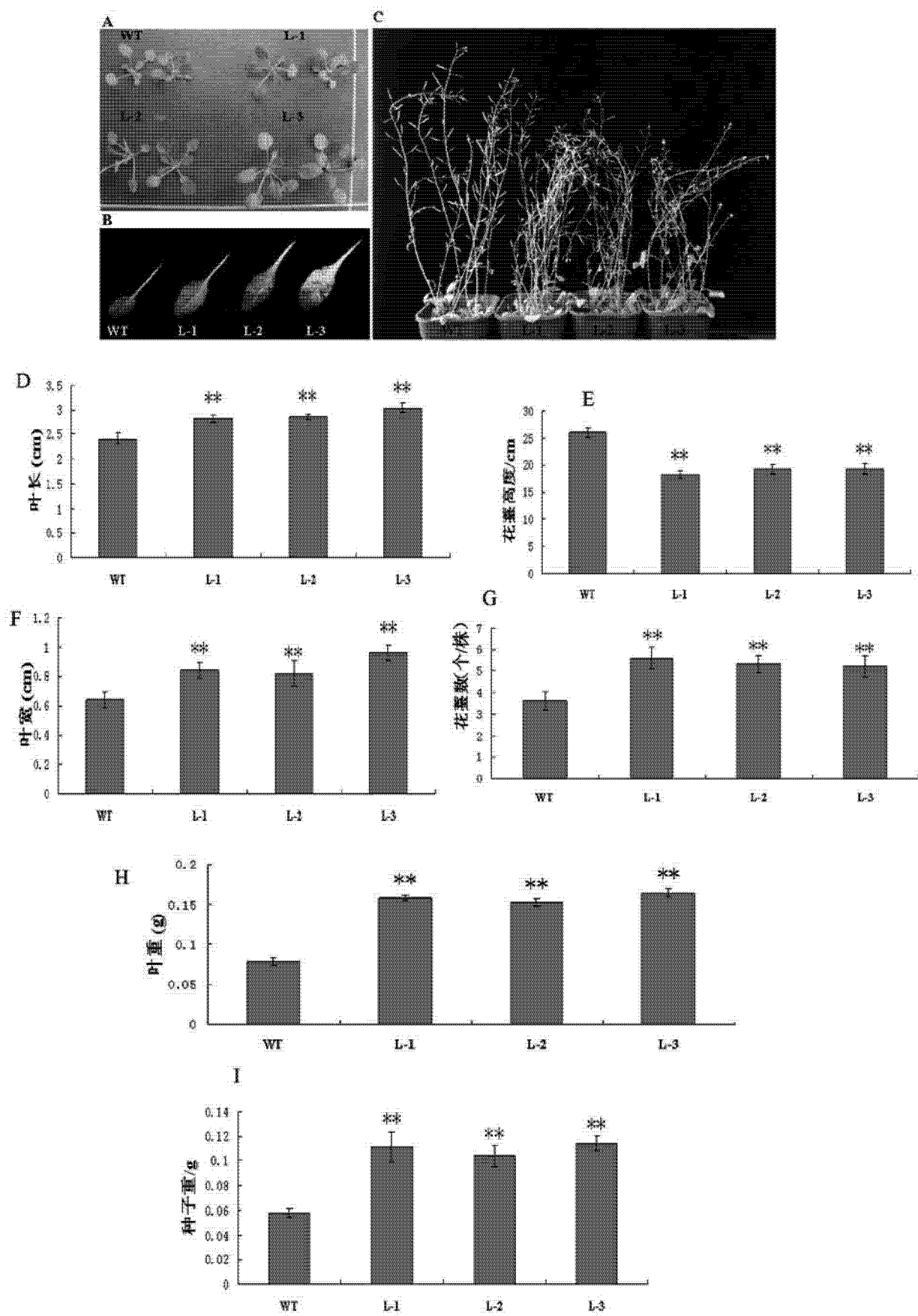


图 5

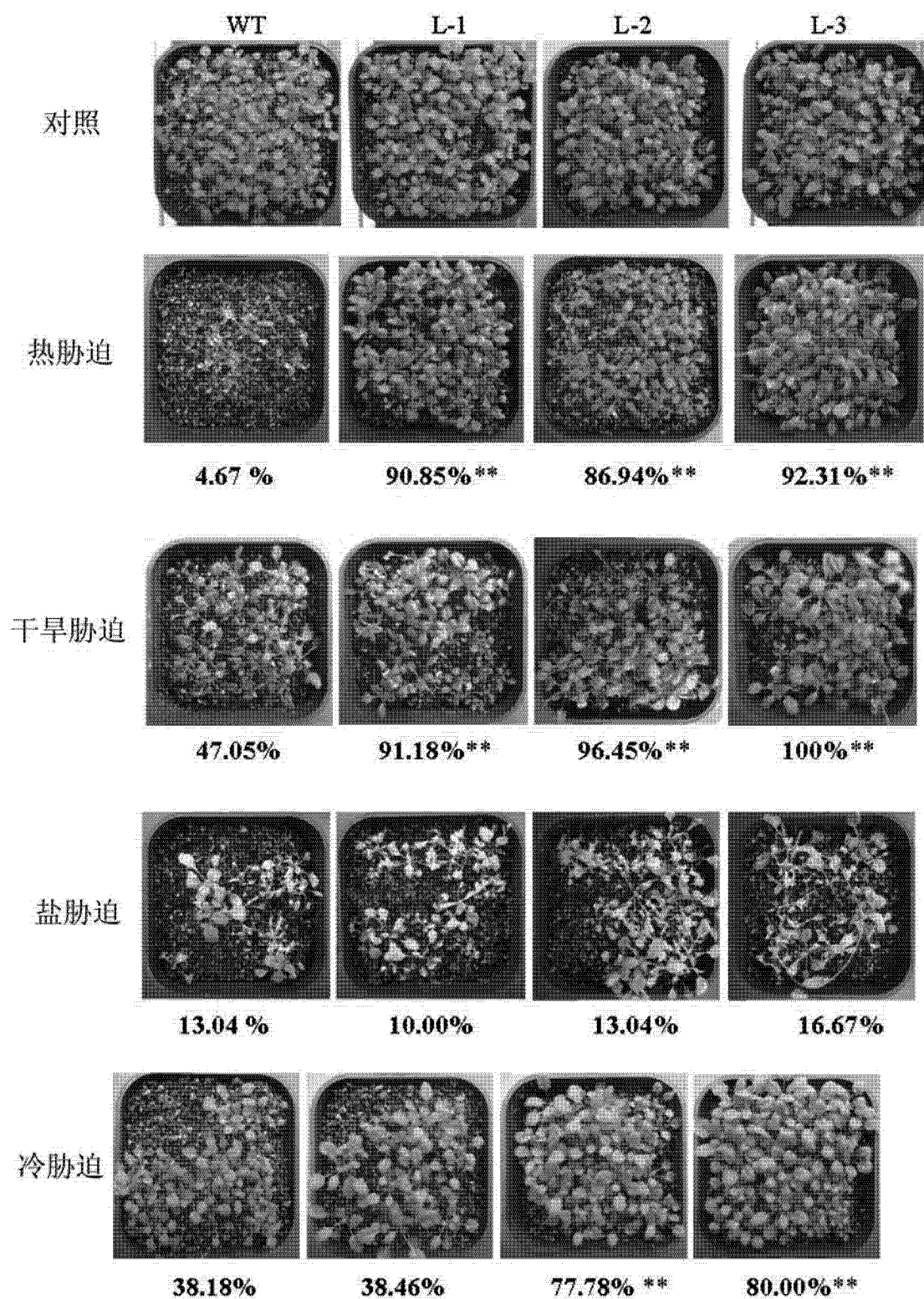


图 6