

文章编号:1003-8701(2014)05-0030-04

# 水稻转录因子 Os1137 的克隆及其耐盐性分析

邢国杰<sup>1</sup>, 马建<sup>2</sup>, 高明<sup>1</sup>, 谭化<sup>1</sup>, 刘艳芝<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林农业大学农学院, 长春 130118)

**摘要:** 通过 PCR 方法从水稻 cDNA 中克隆得到转录因子 Os1137 的编码基因, 构建由 ubi 启动子驱动的该基因的植物表达载体 p3300-Os1137, 并用农杆菌介导法将其导入烟草, 研究不同盐浓度下转基因烟草的生理指标, 分析其抗盐性。结果表明, 将该基因导入烟草植株中能够显著抑制 NaCl 胁迫下植物体内 MDA 含量的增加, 并能够提高植物体内的脯氨酸含量。该基因能够提高转基因烟草植株的抗盐性。

**关键词:** 水稻; 烟草; 耐盐; 非生物胁迫

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

## Cloning of Rice Transcription Factor Os1137 and Analysis on Its Salts Tolerance

XING Guo-jie<sup>1</sup>, MA Jian<sup>2</sup>, GAO Ming<sup>1</sup>, TAN Hua<sup>1</sup>, LIU Yanzhi<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** In this study, the encoded gene of transcription factor Os1137 was isolated from the cDNA of rice by PCR amplification. The gene was driven by Ubi promoter to construct plant expression vector p3300-Os1137, which was introduced into tobacco via agrobacterium-mediated transformation. The salt tolerance of the transgenic plant was analyzed by testing physiological changes of the transgenic tobacco plants under different salt stresses. Results showed that less increment of MDA contents and more of proline contents in the transgenic plants respectively in high salinity were obtained. Quantitative test showed that the salt tolerance of tobacco plants was improved by this gene expression.

**Keywords:** Rice; Tobacco; Salt Tolerance; Abiotic stress

盐碱、干旱、洪涝、高温、严寒等非生物胁迫是抑制植物生长发育, 导致各种农作物减产甚至绝产的主要影响因素。逆境胁迫往往会破坏植物体内各种正常的生理生化途径, 严重影响光合作用、物质代谢、离子平衡、水分平衡等生长发育过程<sup>[1]</sup>。同时影响某些细胞器的形态与功能, 如叶绿体受到逆境胁迫后其形态发生了变化, 在遭受破坏后影响植株的正常光合作用, 直至死亡<sup>[2]</sup>。

在各种非生物胁迫中盐碱、干旱胁迫显得尤为突出, 据统计全球范围内大概有  $9.5 \times 10^8$  hm<sup>2</sup> 土

地面积处于严重的盐渍化<sup>[3]</sup>。目前应对的研究主要集中在以下两个方面, 一方面是通过抗盐植物或盐生植物与农作物之间进行远缘杂交, 并通过分子标记等手段选育抗盐农作物新品种。另一方面是利用遗传工程手段, 将抗逆相关基因如甜菜碱脱氢酶基因 BADH、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白 NHX、6-磷酸海藻糖合成酶基因 TPS 等导入植物基因组中增强表达<sup>[4-7]</sup>, 尽管该方法能够提高转基因植物的相关抗逆能力, 但是仍不能满足生产上的实际需要, 这主要是因为植物应对盐碱胁迫时需要多个基因协同调控表达才能达到理想的抗盐效果。而通过对转录因子的引入或增强表达往往能够达到调节植物体内与之相对应的一系列基因协同调控表达, 从而达到预期的抗性反应<sup>[8-9]</sup>。

本实验分析了《盐碱胁迫下水稻表达谱差异

收稿日期: 2014-04-06

作者简介: 邢国杰(1971-), 女, 助理研究员, 主要从事植物遗传转化研究。

通信作者: 刘艳芝, 女, 硕士, 副研究员, E-mail: liuyz\_g@126.com

分析数据库》并从中选择了与盐碱胁迫呈正相关的转录因子 Os1137, 利用 PCR 方法扩增得到该转录因子的编码基因, 并构建了由 ubi 启动子驱动该基因的植物表达载体 p3300-Os1137, 用农杆菌转化烟草获得再生植株, 并研究了该基因在盐碱胁迫下的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

水稻 (*Oryza sativa*) 种子、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 种子保存于吉林农业大学水稻研究中心。

#### 1.1.2 菌株和质粒

宿主菌 Mach1、pEAZY-Blunt Simple 克隆试剂盒、胶回收试剂盒购自北京全式金生物工程公司, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 及植物表达载体 p3300-GUS 由本课题组保存。

#### 1.1.3 试剂

限制性内切酶、连接酶购自 Promega 公司, TransTaq DNA Polymerase High Fidelity (HiFi) Taq 酶购自北京全式金生物工程公司, 胶回收试剂盒购自北京全式金生物工程公司。分子量标准 200bp ladder 购自加拿大 MBI 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 转录因子 Os1137 编码基因的克隆与序列分析

利用 <http://bioinfoserver.rsbs.anu.edu.au/utills/GeneBins/> 网站对吉林农业大学马景勇研究员提供的《盐碱胁迫下水稻表达谱差异分析数据库》进行水稻基因的功能分类分析, 并从中筛选出由 512 个氨基酸组成, 在第 109-167 位氨基酸含有 bZIP 结构域的转录因子 Os1137。根据基因序列设计的引物扩增, 以水稻 cDNA 为模板。引物序列为 (下划线序列为 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点):

Primer 1: 5'-GAATTCGCCCTACAGCAAATACACGTTCTTA-3'

Primer 2: 5'-AAGCTTCACTGAAGATATAATCTAACTAG-3'

PCR 程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58.5℃ 30 s, 72℃ 90 s, 32 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物纯化后连入克隆载体 pEAZY-Blunt Simple, 交由上海生工生物工程服务有限公司测序, 并用 DNAMAN 和 DNASIS 软件对其进行序列分析。

#### 1.2.2 p3300-Os1137 植物特异性诱导表达载体的构建

用 *EcoR*I、*Hind*III 将 pEAZY-Os1137 的 Os1137 切下, 连接到用相同酶切的 p3300-GUS 大片段上, 经 *EcoR*I、*Hind*III 酶切、PCR 验证正确后, 命名为 p3300-Os1137。

#### 1.2.3 农杆菌介导烟草的遗传转化

利用农杆菌介导的叶盘法转化烟草叶片, 在共培养培养基 (MS 培养基附加 2 g/L MES) 上, 25℃ 暗培养。经 3d 共培养后, 将外植体转入抑菌培养基 (MS 培养基附加 1 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA、500 mg/L 头孢霉素) 上抑菌。7d 后转移到筛选培养基 (MS 培养基附加 1 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA、2 mg/L Basta、250 mg/L 头孢霉素) 上, 每两周继代一次直至不定芽长出 3~4 片小叶后, 将其剪下, 转入生根培养基 (MS 培养基附加 5 mg/L Basta、250 mg/L 头孢霉素) 中。10 d 左右不定芽生根, 获得再生植株。

#### 1.2.4 转化再生植株的 PCR 检测

采用改良的 CTAB 法, 从烟草叶片中提取基因组 DNA, 将其稀释至 100 ng/mL 作为模板, 以 p3300-Os1137 为阳性对照, 以未转化植株为阴性对照, 利用 PRIMER5.0 根据 Os1137 基因的特异性引物 Primer 3、Primer 4 进行 PCR 扩增检测。引物序列为:

Primer 3 :5'-GACCAGCTATCTTCCTACACG-3'

Primer 4 :5'-CACATATATGAATCTATAGAC-3'

PCR 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 90 s, 28 个循环; 72℃ 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统分析。

#### 1.2.5 Os1137 基因活性鉴定

将非转基因植株及经 PCR 鉴定为阳性的转基因植株分别扩繁, 用氯化钠浓度为 0、100、200、300 mM 的 MS 培养基上处理 72 h 后, 分别利用茚三酮法测定 L-脯氨酸含量, 利用硫代巴比妥酸法测定丙二醛 (MDA) 含量, 以研究该基因的表达是否影响植物对盐胁迫的耐受性。

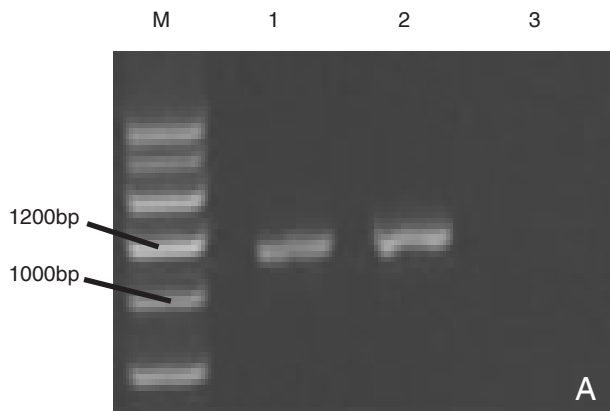
## 2 结果

### 2.1 转录子 Os1137 编码基因的克隆与序列分析

通过 PCR 扩增出了约 1.14k 的 DNA 片段 (图 1A), 连接到全式金的 pEAZY-BS 载体后进行测序。测序结果与数据库中的序列进行比对, 证实该基因为所期望获得的目的片段。进一步用 DNAMAN 软件和 <http://bioinfoserver.rsbs.anu.edu.au/utills/GeneBins/> 网站对该片段分析发现该基因由

379个氨基酸组成,在第102~159位氨基酸含有bZIP结构域(图1B)。将携带该基因的载体命名

为pEAZY-Os1137。



```

MGCTASKVEQEDTVRRCKERRRHMK EAVASRQQLASAHADYLRSPSSSTAS
SSLPPPTLLLPKHQQAPPPPPPTQSHQPPFPVAVRAPRGGERRLKVPHIL
STSSVASPARSSFRKPVVGTPESSSSAWDWENFYPPSPDSEFFDRRKADI
EEANRLREL EEEKARGYLHPHHLKEEDEVDDDDEREEMHCGGWEDDD
DHVASTTTSETRSEE GEMGNRSECGFAARSEYSFVNVVHVVIYTKQAEEMK
IKKRTETYSKELEKKTNSLRAIEKKYYSMSVGLGLPGSGRDGIESHSF
DARDPLAEKKTEIAQCRKVEDEMRHAKAVEVTRSMTLNNIQTGLPGEK
KTMFQAIAGFSGTVVEALDVVCRAGSVR
  
```

图1 Os1137的克隆和分析

A. 转录子 Os1137的扩增 M :DNA 分子量标准 200bp ;1-2 :PCR 产物 ;3 :ddH<sub>2</sub>O  
B. Os1137 基因编码的氨基酸序列 bZIP 结构域用 □ 标出

### 2.2 p3300-Os1137 植物特异性诱导表达载体的构建

如图2所示,通过亚克隆将克隆到的Os1137基因替换p3300-GUS上的smGUS基因。用EcoRI、Hind III分别酶切pEAZY-Os1137和p3300-GUS,分

别回收pEAZY-Os1137酶切产物中的小片段和p3300-GUS酶切产物中的大片段,用T4 DNA连接酶连接转化大肠杆菌。用EcoRI、Hind III酶切鉴定释放出长约1.1k的片段(图4B),最终经测序证实插入方向正确的重组载体命名为p3300-Os1137。

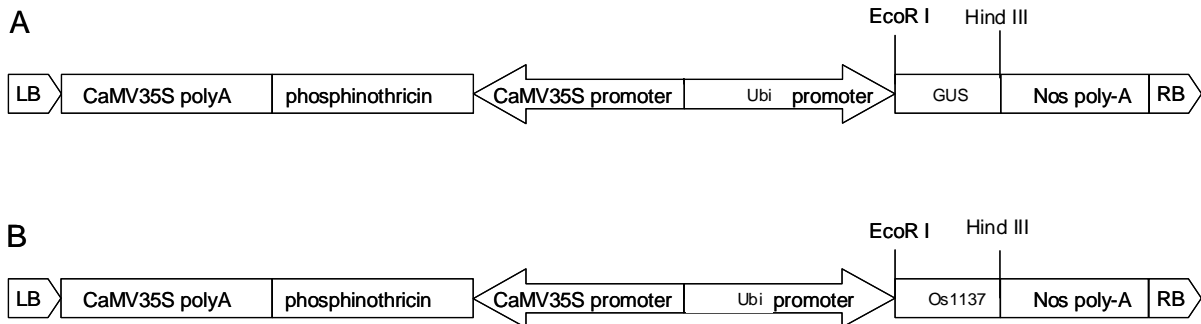


图2 植物表达载体 p3300-GUS(A)、p3300-Os1137(B)的T-DNA 结构

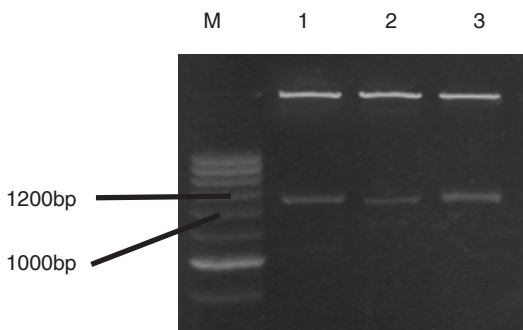
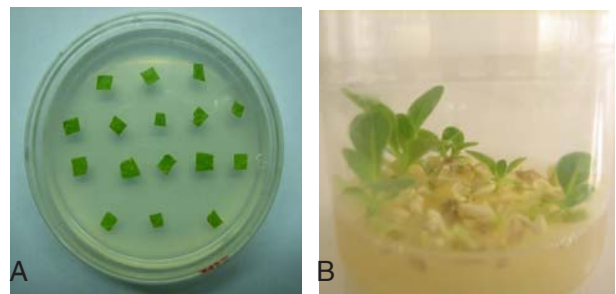


图3 p3300-Os1137的酶切鉴定

M :DNA 分子量标准 200bp ladder ;1-3 :EcoR I Hind III 酶切 p3300-Os1137

### 2.3 转化再生植株的获得及PCR检测

如图5所示,共计获得抗性再生植株31棵。用Primer 3、Primer 4(两者间距离627bp)进行PCR检测,共检测出27棵阳性植株,阳性率为89.5%。



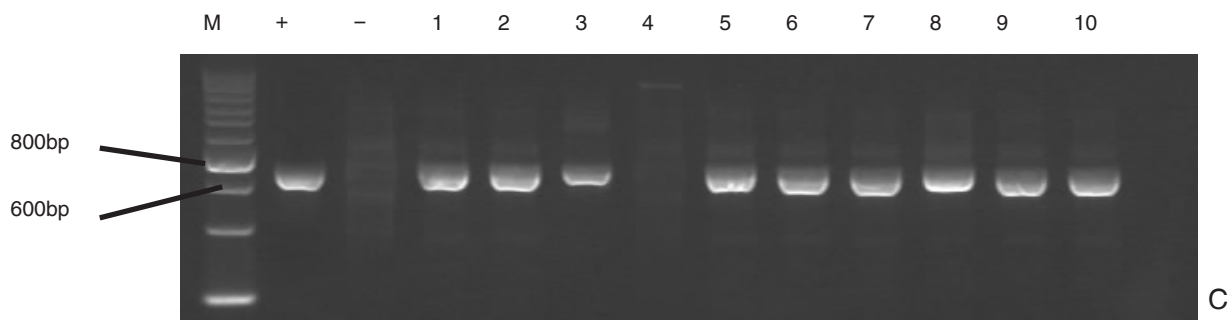


图4 烟草抗性植株的获得及PCR检测

A. 外植物的分化 ;B. 筛选 ;C. PCR 检测 M :DNA 分子量标准 200bp ladder ;+ :质粒 ; - :非转化植株 ;1-10 :部分转化植株

#### 2.4 转 Os1137 基因烟草抗盐性鉴定

由图 5 可知 ,在 NaCl 处理下 ,非转基因烟草植株和转基因烟草植株的 MDA 和脯氨酸含量均呈现上升趋势。尽管在非盐胁迫下转基因植株与非转基因植株 MDA 含量没有明显变化 ,但转基因烟

草植株的 MDA 增加量明显低于非转基因烟草植株 ,尤其是较高盐浓度处理的植株中两者差异非常显著。并且由于 Os1137 基因在烟草植株中表达使得转基因植株即使在非胁迫条件下也能够积累较多的脯氨酸。

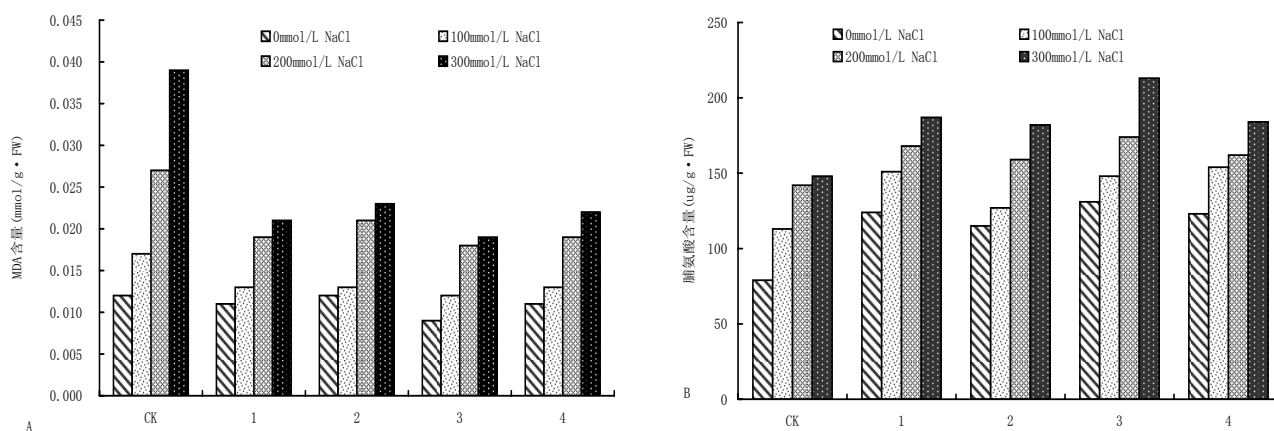


图5 NaCl 处理对非转基因烟草及转基因烟草叶片中 MDA 和脯氨酸含量的影响

### 3 结论

本研究通过 PCR 方法克隆了转录因子 Os1137 的编码基因 ,并构建了由 ubi 启动子驱动该基因的植物表达载体 p3300-Os1137 ,用农杆菌转化烟草获得再生植株 ,并研究了转 Os1137 基因烟草植株与野生型烟草植株在不同盐浓度下叶片中丙二醛和脯氨酸含量差异。

作为细胞膜脂过氧化程度重要的标志物质 ,植物体内 MDA 的含量越高 ,表明细胞膜的氧化程度越高 ,则细胞膜的损伤越严重<sup>[10]</sup>。而植物体内游离的脯氨酸除了作为植物细胞质内渗透调节物质外 ,还在稳定生物大分子结构、降低细胞酸性、解除氨毒以及作为能量库调节细胞氧化还原势等方面起重要作用。因此 ,植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性 ,抗旱性强

的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标<sup>[11]</sup>。因而通过对上述两种物质含量进行测定间接反映出转录因子 Os1137 对提高植物抗盐能力的作用。

#### 参考文献 :

- [ 1 ] Hirayama T, Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future[J]. The Plant Journal, 2010, 61(6): 1041-1052.
- [ 2 ] Zhu X G, Zhang Q D. Advances in the research on the effects of NaCl on photosynthesis[J]. Chin Bull Bot, 1999, 16(4): 332-338.
- [ 3 ] Zhang J F, Zhang X D, Zhou J X, et al. World resources of saline soil and main amelioration measures[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2005, 12 (6): 32-34.
- [ 4 ] Zhang Ning, Si Huai-jun, Wen Gang, et al. Enhanced Drought and Salinity Tolerance in Transgenic Potato Plants with a BADH Gene from Spinach[J]. Plant Biotechnology Reports, 2011, 5(1): 71-77.

(下转第 42 页)

- [ 6 ] 毕于运. 中国秸秆资源综合利用技术[M]. 北京:中国农用科技出版社, 2008 :145-146 .
- [ 7 ] 李少昆, 王克如, 冯聚凯, 等. 玉米秸秆还田与不同耕作方式下影响小麦出苗的因素[J]. 作物学报, 2006, 32(3) :463-465 .
- [ 8 ] 刘武仁, 郑金玉, 罗洋, 等. 玉米宽窄行种植技术的研究[J]. 吉林农业科学, 2007, 32(2) :8-10, 13 .
- [ 9 ] 朴香兰. 吉林省农作物秸秆资源的现状及综合利用[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1) :60-64 .
- [ 10 ] 鲍士旦. 土壤酸化分析[M]. 北京:中国农业出版社, 1981 :101-102 .
- [ 11 ] 张星杰, 刘景辉, 李立军, 等. 保护性耕作对旱作玉米产量及土壤理化性质的影响[A]. 中国农作制度研究进展[C]. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 2008 :374-379 .
- [ 12 ] 赵林萍. 中国种植大观(肥料卷)[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2001 :207-215 .
- [ 13 ] 严洁, 邓良基, 黄剑. 保护性耕作对土壤理化性质和作物产量的影响[J]. 中国农机化, 2005(2) :31-33 .
- [ 14 ] Sommerfeldt T G, Chang G, Entz T. Long-term annual applications increase soil organic matter and nitrogen and decrease carbon to nitrogen ration[J]. Soil Science Society of America Journal, 1988, 52(6): 1668-1672 .
- [ 15 ] 袁家富. 麦田秸秆覆盖节水效应研究[J]. 生态农业研究, 2001, 4(3) :61-65 .
- [ 16 ] 籍增顺, 张树梅, 薛宗让, 等. 旱地玉米免耕系统土壤养分研究 I 土壤有机质酶及氮变化[J]. 华北农学报, 1998, 13(2) :42-47 .

## (上接第22页)

- [ 42 ] Fichtner K, Quick W P, Schulze E-D, et al. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with antisense rbcS[J]. Planta, 1993, 160(1): 1-9 .
- [ 43 ] Stitt M, Schulze E D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology[J]. Plant, Cell and Environment, 1994(17): 465-487 .
- [ 44 ] Matt P, Krapp A, Haake V, et al. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants[J]. The Plant Journal, 2002, 30(6): 663-677 .
- [ 45 ] 秦银林, 方兴, 陶建平, 等. 三峡库区两种阔叶树幼苗对不同光环境的响应[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2009, 26(2) :54-57 .
- [ 46 ] 陈亚军, 张教林, 曹坤芳. 两种热带木质藤本幼苗形态、生长和光合能力对光强和养分的响应[J]. 植物学通报, 2008, 25(2) :185-194 .
- [ 47 ] 袁野. 光氮互作对番茄碳氮代谢的影响[D]. 东北农业大学, 2008 :7-8 .
- [ 48 ] 何欣, 张攀伟, 丁传雨, 等. 弱光下硝铵比对小白菜氮吸收和碳氮分配的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(3) :452-458 .

## (上接第33页)

- [ 5 ] Jin Xi, Luo Bo-xiang, Chen Shou-yi, et al. Breeding and Traits Evaluation of BADH and Bar Gene Transgenic Rice. Life Science Research, 2011, 15(3): 209-217 .
- [ 6 ] Eckardt N A, Berkowitz G A. Functional Analysis of Arabidopsis NHX Antiporters: the Role of the Vacuole in Cellular Turgor and Growth[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3087-3088 .
- [ 7 ] Dong Chun-lin, Zhang Ming-yi, Zhang Yan-qin, et al. Transformation of Trehalose Synthase Gene (TPS Gene) into Corn Inbred Line and Identification of Drought Tolerance[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(68): 15253-15258 .
- [ 8 ] Roy S J, Negrão S, Tester M. Salt resistant crop plants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014(26): 115-124 .
- [ 9 ] Tripathi P, Rabara R C, Rushton P J. A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants[J]. Planta, 2014, 239(2): 255-266 .
- [ 10 ] Gill S S, Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants[J]. Plant Signal Behav, 2010, 5(1): 26-33 .
- [ 11 ] Christou A, Manganaris G A, Papadopoulos I, et al. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways[J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(7): 1953-1966 .