



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104017061 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201310065802. 6

C12N 1/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 01

C12N 1/21 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村 20
号中国科学院植物研究所

(72) 发明人 邓馨 杨艳歌 吕维涛

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006. 01)

C12N 15/29 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表8页 附图3页

(54) 发明名称

转录因子 ZmbZIP17 及编码基因与其在响应逆境中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种转录因子 ZmbZIP17 及编码基因与其在响应逆境中的应用。本发明提供的基因,称为 ZmbZIP17,来源于玉米 (*Zea mays* L.), 是如下 (a) 或 (b): (a) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质; (b) 将序列表中序列 2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与植物耐逆性相关的由序列 2 衍生的蛋白质。本发明的实验证明, ZmbZIP 是与植物耐旱及抗内质网胁迫相关的基因; 对于培育耐旱性及内质网胁迫抗性提高的作物、林草等新品种具有重要的理论及实际意义, 可用于农牧业和生态环境治理所需的抗性植物品种的培育与鉴定。

1. 一种蛋白,是如下(a)或(b):
 - (a) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
 - (b) 将序列表中序列 2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与植物耐逆性相关的由序列 2 衍生的蛋白质。
2. 编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子。
3. 如权利要求 2 所述的 DNA 分子,其特征在于:所述 DNA 分子是如下(1)-(4)中任一种的 DNA 分子:
 - (1) 编码区为序列表中序列 1 自 5' 末端第 120-1811 位核苷酸所示的 DNA 分子;
 - (2) 编码区为序列表中序列 3 自 5' 末端第 1128-2819 位核苷酸所示的 DNA 分子;
 - (3) 在严格条件下与(1)或(2)限定的 DNA 序列杂交且编码与植物耐逆性相关蛋白的 DNA 分子;
 - (4) 与(1)或(2)限定的 DNA 序列至少具有 70%、至少具有 75%、至少具有 80%、至少具有 85%、至少具有 90%、至少具有 95%、至少具有 96%、至少具有 97%、至少具有 98% 或至少具有 99% 同源性且编码与植物耐逆性相关蛋白的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。
5. 如权利要求 4 所述的重组载体,其特征在于:

所述重组载体为将权利要求 2 或 3 所述 DNA 分子插入表达载体中,得到表达权利要求 1 所述蛋白的重组载体。
6. 扩增权利要求 2 或 3 所述 DNA 分子全长或其任意片段的引物对。
7. 权利要求 1 所述蛋白、权利要求 2 或 3 所述 DNA 分子或权利要求 4 所述重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌在调节植物耐逆性中的应用;

所述耐逆性具体为耐内质网胁迫或耐旱性;

所述植物具体为双子叶植物或单子叶植物。
8. 一种培育转基因植物的方法,为将编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子导入目的植物,获得转基因植物,所述转基因植物的耐逆性高于所述目的植物。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于:所述耐逆性为耐内质网胁迫或耐旱性;

所述编码权利要求 1 所述蛋白的 DNA 分子通过权利要求 4 或 5 所述的重组载体导入目的植物。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于:

所述目的植物为双子叶植物或单子叶植物。

转录因子 ZmbZIP17 及编码基因与其在响应逆境中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种转录因子 ZmbZIP17 及编码基因与其在响应逆境中的应用。

背景技术

[0002] 随着全球水资源的缺乏和极端气候事件频率的不断上升,干旱对作物的产量和品质的负作用日趋显著。植物遭受逆境后会引引起内质网中未折叠和错误折叠蛋白的积累,从而导致内质网胁迫(ER stress)。脱落酸(ABA)是一个响应胁迫信号转导的关键调控因子。在胁迫条件下,ABA 可调控气孔关闭和基因表达,进而调控植物的耐逆性。玉米是重要的粮食、饲料和能源作物,然而许多玉米产区干旱和盐渍化等问题严重影响其生长和产量。因此,通过分子操作技术提高玉米及其他作物的耐旱性以及内质网胁迫变得日趋重要。

[0003] 在植物防卫反应和逆境胁迫应答过程中转录因子扮演着非常重要的角色。操纵一个转录因子就可通过它促使多个功能基因发挥作用,从而达到使植株性状获得综合改良的效果,因此导入或改良一个转录因子是提高作物抗逆性的非常有效的途径。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供转录因子 ZmbZIP17 及编码基因。

[0005] 本发明提供的蛋白,称为 ZmbZIP17,来源于玉米(*Zea mays*),是如下(a)或(b):

[0006] (a) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0007] (b) 将序列表中序列 2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物耐逆性相关的由序列 2 衍生的蛋白质。

[0008] 上述蛋白中,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加是指不多于十个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0009] 编码上述蛋白的 DNA 分子也是本发明保护的范围。

[0010] 上述 DNA 分子是如下(1)-(4)中任意一种的 DNA 分子:

[0011] (1) 编码区为序列表中序列 1 自 5' 末端第 120-1811 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0012] (2) 编码区为序列表中序列 3 自 5' 末端第 1128-2819 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0013] (3) 在严格条件下与(1)或(2)限定的 DNA 序列杂交且编码与植物耐逆性相关蛋白的 DNA 分子;

[0014] (4) 与(1)或(2)限定的 DNA 序列至少具有 70% 以上同源性且编码与植物耐逆性相关蛋白和/或 RNA 的 DNA 分子。

[0015] 上述严格条件下为在 $6\times\text{SSC}$, $0.5\%\text{SDS}$ 的溶液中,在 65°C 下杂交,然后用 $2\times\text{SSC}$, $0.1\%\text{SDS}$ 和 $1\times\text{SSC}$, $0.1\%\text{SDS}$ 各洗膜一次。

[0016] 上述序列表中的序列 1 由 1914 个碱基组成,其开放阅读框架(ORF)为自 5' 末端第 120-1811 位碱基,编码具有序列表中序列 2 的氨基酸序列的 ZmbZIP17。

[0017] 含有上述 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌也是本发明保护

的范围。

[0018] 上述重组载体为将上述 DNA 分子插入表达载体中,得到表达上述蛋白的重组载体。

[0019] 上述重组载体具体为将编码上述蛋白的 DNA 分子的表达盒(序列 3)插入表达载体中,得到表达上述蛋白的重组载体。

[0020] 在本发明的实施例中,表达载体具体为 pLee1a;上述重组载体为将编码上述蛋白的 DNA 分子表达盒插入 pLee1a 的 attR1 和 attR2 重组位点间得到的载体;编码上述蛋白的 DNA 分子表达盒的核苷酸序列为序列表中的序列 3。

[0021] 用于构建所述植物表达载体的出发载体可为任意一种双元农杆菌载体或可用于植物微弹轰击的载体等,如 pBin19、pBI121、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301、pCAMBIA1300 或其它衍生植物表达载体。

[0022] 使用 ZmbZIP17 基因构建重组表达载体时,可在其转录起始核苷酸前加上任何一种增强型、组成型、组织特异型或诱导型启动子,如花椰菜花叶病毒(CAMV) 35S 启动子、泛生素基因 Ubiquitin 启动子(pUbi)等,它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用;此外,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。

[0023] 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可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因(GUS 基因、GFP 基因、萤光素酶基因等)、具有抗性的抗生素标记物(庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等)或是抗化学试剂标记基因(如抗除草剂基因)等。从转基因植物的安全性考虑,可不加任何选择性标记基因,直接以逆境筛选转化植株。

[0024] 扩增上述 DNA 分子全长或其任意片段的引物对也是本发明保护的范围。

[0025] 在本发明的实施例,引物对由如下序列所示的引物组成: 5'-CACCAGATCGGCTGAGCCAAGG-3' 和 5'-CAGACCTAAAGGTGAGGGCTATGG-3'。

[0026] 上述蛋白、上述 DNA 分子或上述重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌在调节植物耐逆性中的应用也是本发明保护的范围;在上述应用中所述调节植物耐逆性具体为提高植物耐逆性;所述耐逆性具体为耐内质网胁迫或耐旱性;

[0027] 上述植物具体为双子叶植物或单子叶植物,上述双子叶植物进一步具体为拟南芥。

[0028] 本发明的另一个目的是提供一种培育转基因植物的方法,为将编码上述蛋白的 DNA 分子导入目的植物,获得转基因植物,所述转基因植物的耐逆性高于所述目的植物。

[0029] 上述方法中,所述耐逆性为耐内质网胁迫或耐旱性;

[0030] 上述编码上述蛋白的 DNA 分子通过上述的重组载体导入目的植物。

[0031] 上述方法中,所述目的植物为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物具体为拟南芥。

[0032] 上述耐内质网胁迫通过如下 1) 或 2) 体现:

[0033] 1)通过 DTT 胁迫作用下转基因植物的叶片大于所述目的植物体现 ;具体为转基因植物的叶片宽度大于所述目的植物。

[0034] 2)通过 DTT 胁迫作用下转基因植物的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 基因至少一个的表达量大于所述目的植物体现。

[0035] 上述耐旱性通过如下 a) 或 b) 体现 :

[0036] a) 通过 PEG 胁迫作用下转基因植物的存活率高于大于所述目的植物体现 ;

[0037] b) 通过 ABA 胁迫作用下转基因植物的 ADH1、Rab18、RD29A 基因至少一个的表达量高于所述目的植物体现。

[0038] 携带有本发明的与植物耐旱、内质网应激相关蛋白编码基因 ZmbZIP17 的植物表达载体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化到植物细胞或组织中。被转化的植物宿主既可以是水稻、小麦、大豆、烟草、玉米、油菜、高粱、棉花等农作物,也可以是苜蓿、三叶草、冰草等牧草以及草莓、西红柿等果蔬花卉植物。

[0039] 本发明的实验证明,本发明从玉米中筛选到一个响应内质网应激以及受 ABA 诱导表达的 ZmbZIP17 基因,将该基因导入野生型拟南芥,得到转 ZmbZIP17 拟南芥,与野生型拟南芥相比,该转 ZmbZIP17 拟南芥的内质网胁迫应激能力以及耐旱性明显提高,同时可以诱导和提高胁迫相关的 Marker 基因的表达。说明 ZmbZIP17 是与耐内质网胁迫和耐旱性相关的蛋白,参与胁迫响应。因此 ZmbZIP 是与植物耐旱及耐内质网胁迫相关的基因 ;对于培育耐旱性及耐内质网胁迫的作物、林草等新品种具有重要的理论及实际意义,可用于农牧业和生态环境治理所需的抗性植物品种的培育与鉴定。

[0040] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。

附图说明

[0041] 图 1 为 ZmbZIP17 基因在玉米中经干旱、ABA、及内质网应激过程中的表达

[0042] 图 2 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的 RT-PCR 检测表达量的结果

[0043] 图 3 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的耐 PEG 鉴定结果

[0044] 图 4 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的耐内质网胁迫鉴定结果

[0045] 图 5 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的 ABA 胁迫后响应基因的表达

[0046] 图 6 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的内质网胁迫后响应基因的表达

具体实施方式

[0047] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0048] 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。

[0049] 实施例 1、ZmbZIP17 基因的获得及在玉米胁迫处理中的表达

[0050] 1、ZmbZIP17 基因的克隆

[0051] 提取三叶一心期的玉米自交系 B73 (*Zea mays* L. ;ZmbZIP60mRNA is spliced in maize in response to ER stress,BMC Research Notes (2012)5:144. ;公众可从中国科学院植物研究所获得。)叶片的总 RNA 并以其为模板, RNase 抑制剂(购自 Takara 公司),反转录酶 SuperScript™ III Reverse Transcriptase(购自 Invitrogen 公司)。反转录反

应体系为：

[0052] (1) DNA 消化：

[0053] 10ul 体系

[0054]

Total RNA	2 μ g
10 \times DNase buffer	1ul
DNaseI (50U/ul)	0.4ul
Rnase inhibitor	0.1ul
DEPC-H2O	3.5ul

[0055] 条件 :37 $^{\circ}$ C 30min

[0056] (2) 反转录 :25ul 体系

[0057] 充分解链,加入 Total RNA 10ul

[0058] OligodT 1ul

[0059] DEPC-H2O 2.5ul

[0060] 条件 :70 $^{\circ}$ C 温育 5min,冰上放置 5min。

[0061]

然后加入 5 \times buffer	5ul
2mM dNTP	5ul
Rnase inhibitor	0.5ul
Reverse Transcriptase	1ul

[0062] 条件 :42 $^{\circ}$ C 温育 1h

[0063] 反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍作为模板,用引物 5'-CACCAGATCGGCTGAGCCAAGG-3', 5'-CAGACCTAAAGGTGAGGGCTATGG-3', Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(NEB)进行基因全长的扩增,反应条件为 :先 98 $^{\circ}$ C 预变性 45sec,然后 98 $^{\circ}$ C 变性 10sec,54 $^{\circ}$ C 退火 20sec,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,共 40 个循环 ;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果得到大小为 1690bp 左右的 PCR 产物 ;回收该 PCR 产物条带。

[0064] 将 PCR 产物与载体 pENTR/D-TOPO (购自 Invitrogen 公司)连接,获得中间载体 ZmbZIP17-pENTR。

[0065] 经过测序,该 PCR 产物具有序列中序列 1 中自 5' 末端第 100-1816 位核苷酸,该 PCR 产物所示的基因命名为 ZmbZIP17,该基因的编码区为序列 1 中自 5' 末端第 120-1811 位核苷酸,该基因编码的蛋白命名为 ZmbZIP17,该蛋白的氨基酸序列为序列中的序列 2。该中间载体为将序列 1 中自 5' 末端第 100-1816 位核苷酸导入含有拓扑异构酶的线性载体 pENTR/D-TOPO 得到的载体。

[0066] 2、ZmbZIP17 基因在玉米胁迫处理中的表达

[0067] 对三叶一心期的玉米苗进行几种处理：

[0068] 将新鲜玉米苗在含有 100 μ M ABA、或 2mM DTT、或 2 μ g/mL TM 的 MS 培养基中培养 0h、2h、6h、12h；

[0069] 根据干旱程度将干旱处理分为 4 种 :CK、轻度(FA)、中度(MD)和重度(SD)。新鲜

玉米植株自然脱水,通过监测土壤水分含量确定干旱程度。CK 表示土壤水分含量在 40-50% 之间,FA 表示土壤水分含量在 15-20% 之间,MD 表示土壤水分含量在 7-10% 之间、SD 表示土壤水分含量在 3-5% 之间。

[0070] 以未经任何处理的新鲜植株(CK)为对照。

[0071] 分别各种处理的玉米的地上部总 RNA、反转录获得 cDNA。用基因特异性引物 Primer1F :5' GAAGCATGTATAGGGAGGAGG3' 和 Primer1R :5' TCTTGAGTGAAGTTCTGTGACG3' 进行 qPCR 扩增。并以 β -tubulin 基因为内参,扩增引物为 5' GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA3' 和 5' CGCCAAACTTAATAACCCAGTA3'。反应体系为 :cDNA1 μ l, 10 μ l 2 \times SYBR Green Master Mix, 引物各 0.5 μ l, ddH₂O 8.5 μ l。程序为 :95 $^{\circ}$ C 预变性 30sec, 95 $^{\circ}$ C 变性 5sec, 55 $^{\circ}$ C 退火 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20min, 共 40 个循环。

[0072] 结果如图 1 所示, (a) 为 DTT 处理, (b) 为 TM 处理, (c) 为 ABA 处理, (d) 为干旱处理, 其中 d, 轻度(FA), 中度(MD), 重度(SD) 处理 ;可以看出该基因明显受 ABA、TM、DTT 诱导, 说明 ZmbZIP17 可能响应 ER stress 以及 ABA 信号。

[0073] 实施例 2、转 ZmbZIP17 拟南芥的获得及其功能研究

[0074] 一、转 ZmbZIP17 拟南芥的获得

[0075] 1、重组载体 pLeela-ZmbZIP17 的获得

[0076] 将实施例 1 的 1 构建的中间载体 ZmbZIP17-pENTR 通过 LR 反应(LR 克隆酶, 购自 Invitrogen 公司) 将实施例 1 的 PCR 产物导入植物表达载体 pLeela (A novel role for histone methyltransferase KYP/SUVH4 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy, New Phytologist(2012)193:605-616 ;公众可从中国科学院植物研究所获得。), 同源重组得到重组载体。

[0077] 经过测序, 该重组载体为将序列表中序列 3 所示的 DNA 分子插入植物表达载体 pLeela 的 attR1 和 attR2 重组位点间得到的载体, 该重组载体受 35S 启动子驱动, 命名为 pLeela-ZmbZIP17。

[0078] 序列表中序列 3 所示的 DNA 分子为 ZmbZIP17 基因表达盒, 包括 CaMV35Sq 启动子、ZmbZIP17 基因和 pA35S 终止子, 其中, CaMV35Sq 启动子为序列 3 自 5' 末端第 1-698 位核苷酸、ZmbZIP17 基因为序列 3 自 5' 末端第 1128-2819 位核苷酸(对应序列 1 自 5' 末端第 120-1811 位核苷酸)、pA35S 为序列 3 自 5' 末端第 2824-3042 位核苷酸。

[0079] 2、重组农杆菌的获得

[0080] 将上述重组载体 pLeela-ZmbZIP17 转化到农杆菌 Gv3101 (pMP90RK) (Agrobacterium tumefaciens strain GV3101(pMP90RK);公众可从中国科学院植物研究所获得, 记载在如下文献中 :Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, M Bevanin, Nucleic Acids Research (1984) 12 :8711-8721.)

[0081] 细胞中, 用含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素、50 μ g/ml 庆大霉素、50 μ g/ml 利福平、50 μ g/ml 的羧苄霉素的 YEB 培养基进行筛选, 得到重组菌 Gv3101 (pMP90RK) / pLeela-ZmbZIP17

[0082] 提取重组菌的质粒送去测序, 结果该质粒为 pLeela-ZmbZIP17, 说明为阳性重组菌。

[0083] 3、转 ZmbZIP17 拟南芥的获得及筛选

[0084] 1) 转 ZmbZIP17 拟南芥的获得

[0085] 将重组菌 Gv3101 (pMP90RK) /pLeela-ZmbZIP17 采用花序浸泡法转化野生型拟南芥 Col-0 (ecotype columbia, *Arabidopsis thaliana*; 公众可从中国科学院植物研究所获得, 记载在如下文献中: *Arabidopsis, a useful weed*. Meyerowitz EM, *Cell* (1989) 56: 263-270.), 得到 T0 代转 ZmbZIP17 拟南芥。

[0086] 2) 转 ZmbZIP17 拟南芥的筛选

[0087] 取 T0 代转 ZmbZIP17 拟南芥种子播种于含有 100 μ g/ml 羧苄青霉素钠的 MS 培养基上, 将具有抗性的成活幼苗移至温室培养(培养温度 22 $^{\circ}$ C, 光周期 16/8 小时), 收集 15 株 T1 代转 ZmbZIP17 拟南芥种子并播种于含 100 μ g/ml 羧苄青霉素钠的 MS 培养基中, 选取 3 株分离比为 3:1 的 T1 代转 ZmbZIP17 拟南芥的成活幼苗(5-10 棵) 移至温室培养, 收集 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥种子并播种于含 100 μ g/ml 羧苄青霉素钠的 MS 培养基中, 不发生分离转基因拟南芥即纯合体。T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥纯合体株系为: 2-2 (OE-2)、10-6 (OE-10)、12-4 (OE-12)。

[0088] 3) 检测转基因拟南芥中 ZmbZIP17 的表达

[0089] 将 3 周苗龄的 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥提取 RNA, 反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍作为模板(方法同实施例 1 的 1), 引物同 qPCR。以野生型拟南芥(WT) 为对照。

[0090] 反应体系(10 μ l):

[0091]

Template	0.5 μ l
2 \times Taq mix	5 μ l
Primer1F 10 μ M	0.3 μ l
Primer1R 10 μ M	0.3 μ l
ddH ₂ O	3.9 μ l

[0092] 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 55 $^{\circ}$ C 退火 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20sec, 共 35 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0093] 并以 Actin1 基因为内参, 扩增引物见表 1。

[0094] 检测结果如图 2 所示, OE-2、OE-10 和 OE-12 为 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的 3 个株系, WT 为野生型拟南芥, Actin1 为内参; 可以看出, 未转基因的野生型烟草(WT) 中没有扩增出目的条带, T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系: OE-2、OE-10、OE-12 中, 皆有 192bp 的目的条带, 说明 ZmbZIP17 在这 3 个株系均表达, 而野生型没有 ZmbZIP17 表达。

[0095] 二、转 ZmbZIP17 拟南芥耐旱研究

[0096] 1、耐旱和耐内质网胁迫(ER stress)

[0097] 将 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系: OE-2、OE-10、OE-12 和野生型拟南芥(WT) 种子播于 MS 培养基上, 4 $^{\circ}$ C 春化 3 天后, 培养在 22 $^{\circ}$ C、50% 湿度、光照 16h 和黑暗 8h 的条件下, 3 天后将小苗进行分别转移至含 40%PEG 的 MS 培养基和含有 2mM 二硫苏糖醇(DTT) 的 MS 培养基上, 分别模拟干旱胁迫和内质网胁迫, 4 周后拍照记录结果。每个株系 6 株, 实验共三次重复。

[0098] 在 40%PEG 模拟的干旱胁迫条件下, 结果如图 3 所示, 野生型拟南芥全部死亡, 存活

率为 0 ;T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-2、OE-10、OE-12 存活率分别为 16.67%、50.0%、33.3%。

[0099] 在 DTT 诱导的内质网胁迫下,结果如图 4 所示,a 为表型,b 为叶宽的定量结果 ;可以看出,野生型拟南芥的叶宽为 0.76cm,T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-2、OE-10、OE-12 的叶宽分别为 2.00cm、2.19cm、2.06cm ;可以看出,T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥叶片比野生型大。

[0100] 以上结果说明,T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥比野生型拟南芥具有明显的耐旱和耐内质网胁迫(ER stress)优势,说明 ZmbZIP17 过表达可以引起植物耐旱和耐内质网胁迫(ER stress)优势。

[0101] 2、ABA 胁迫和内质网胁迫响应的 Marker 基因在转 ZmbZIP17 拟南芥的表达

[0102] 干旱胁迫 :将 3 周苗龄的 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-10、野生型拟南芥(WT)种子播于 MS 培养基上,4℃春化 3 天后,培养在 22℃、50%湿度、光照 16h 和黑暗 8h 的条件下,3 天后将小苗进行转移至含 100 μ M ABA 的 MS 培养基上培养处理 3h,模拟干旱胁迫。每个株系 20 株,实验共三次重复。以未进行任何胁迫的为对照组(CK)。

[0103] 内质网胁迫 :将 3 周苗龄的 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-2、OE-10 和野生型拟南芥(WT)种子播于 MS 培养基上,4℃春化 3 天后,培养在 22℃、50%湿度、光照 16h 和黑暗 8h 的条件下,3 天后将小苗进行转移至含有 2mM 二硫苏糖醇(DTT)的 MS 培养基上培养 3h,模拟内质网胁迫。每个株系 20 株,实验共三次重复。以未进行任何胁迫的为对照组(CK)。

[0104] 提取上述各组的植物株系的 RNA,反转录得到的 cDNA 后稀释 10 倍作为模板(方法同实施例 1 的 1),用表 1 所示的引物进行 PCR 扩增,反应体系同本实施例的一的 3 的 3);用来检测 ABA 胁迫响应 Marker 基因 ADH1、Rab18、RD29A (3 个基因是已知的与 ABA 及抗旱相关的基因)的相对表达量和内质网胁迫响应 Marker 基因 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 (7 个基因是已知的与内质网胁迫相关的基因)的相对表达量。以拟南芥 Actin1 基因为内参。

[0105] 表 1 为内质网胁迫和 ABA 胁迫响应 mark 基因引物

[0106]

基因	基因号	引物名称	序列
<i>BiP2</i>	At5g42020	qBiP2-F	5' TTGGGAGGTGAGGACTTTG 3'
		qBiP2-R	5' CTTGGTGCTGACTGCTTAGAG 3'
<i>BiP3</i>	At1g09080	qBiP3-F	5' CACGGTTCAGCGTATTTCAAT 3'
		qBiP3-R	5' ATAAGCTATGGCAGCACCCGTT 3'
<i>BiP1</i>	At5g28540	qBiP1-F	5' TCACTTGGGAGGTGAGGACTTT 3'
		qBiP1-R	5' CTCACATTCCCTTCGGAGCTTA 3'
<i>CNX1</i>	At5g61790	qCNX1-F	5' ATGAGACAACGGCAACTATTTTCC 3'
		qCNX1-R	5' CCATAATCCTCATGTCCCTTCACT 3'
<i>CRT1</i>	At1g56340	qCRT1-F	5' AGACCTTAGTCTTCCAATTCTC 3'
		qCRT1-R	5' CCATTGTAAGTAAGGATAGCATG 3'
<i>ERdj3A</i>	At3g08970	qERdj3A-F	5' CAAGGTATCCCAGAAATCACTC 3'
		qERdj3A-R	5' GAATGTAGCAAACCTTACCTCGT 3'
<i>GRP94</i>	At4g24190	qGRP94-F	5' TTCATTAACCTCCCTATCTCCC 3'

[0107]

		qGRP94-R	5'	TTTCTCACCATCTTCCTCCT	3'
<i>β tubulin</i>	X74654	<i>β tubulin</i> -F	5'	GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA	3'
		<i>β tubulin</i> -R	5'	CGCCAAACTTAATAACCCAGTA	3'
<i>Actin1</i>	At2g37620	Actin-F	5'	CATCAGGAAGGACTTGTACGG	3'
		Actin-R	5'	GATGGACCTGACTCGTCATAC	3'
<i>RD29A</i>	At5g52310	rd29A-F	5'	GTGAAGATGACTATCTCGGTGGTC	3'
		rd29A-R	5'	GCCTAACTCTCCGGTGTAACTAG	3'
<i>Rab18</i>	At1g43890	rab18-F	5'	ATGACGAGTACGGAAATCCGATGG	3'
		rab18-R	5'	TATGTATACACGATTGTTCCAAGC	3'
<i>ADHI</i>	At1g77120	ADHI-F	5'	TCCACGTATCTTCGGCCATG	3'
		ADHI-R	5'	TAGCACCTTCTGCAGCGCC	3'

[0108] 1) ABA 胁迫响应 Marker 基因在 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的表达

[0109] 结果如图 5 所示 :a 为 ADHI、b 为 Rab18、c 为 RD29A

[0110] 未进行任何胁迫对照组 (CK) 中 :

[0111] 将野生型拟南芥的 ADHI、Rab18、RD29A 基因的相对表达量分别视为本底表达量 1 ;

[0112] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 OE-10 的 ADHI、Rab18、RD29A 的相对表达量分别是野生型中相应基因表达量的 29.45、1.44、30.91 倍。

[0113] ABA 胁迫组中 :

[0114] 野生型拟南芥的 ADHI、Rab18、RD29A 的相对表达量分别为 221.32、2.17、2091.02 ;

[0115] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-10 的 ADHI、Rab18、RD29A 的相对表达量分别为 533.74、5.21、6165.49。

[0116] 2) DTT 胁迫响应 mark 基因在 T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥的表达

[0117] 结果如图 6 所示 :a 为 BiP1、b 为 BiP2、c 为 BiP3、d 为 CNX1、e 为 ERdj3A、f 为 CRT1、g 为 GRP94 ;

[0118] 未进行任何胁迫对照组 (CK) 中 :

[0119] 将野生型拟南芥的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 基因的相对表达量分别视为本底表达量 1 ;

[0120] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-2 的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 的相对表达量分别为 5.45、2.14、4.06、3.31、1.69、2.44、5.31 ;

[0121] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-10 的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 的相对表达量分别为 3.64、2.95、53.16、4.22、2.75、2.77、6.66。

[0122] DTT 胁迫组中 :

[0123] 野生型拟南芥的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 的相对表达量分别为 4.93、8.95、15.77、4.04、1.54、2.53、2.06 ;

[0124] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-2 的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 的相对表达量分别为 62.03、23.84、77.17、28.35、9.38、3.41、28.35 ;

[0125] T2 代转 ZmbZIP17 拟南芥株系 :OE-10 的 BiP1、BiP2、BiP3、CNX1、ERdj3A、CRT1、GRP94 的相对表达量分别为 93.20、124.57、2272.20、78.35、16.45、10.89、102.77。

[0126] 可以看出转 ZmbZIP17 拟南芥明显受 ABA、DTT 诱导,可以引起参与 ABA 途径的胁迫

和内质网胁迫相关基因表达量的提高,说明 ZmbZIP17 参与 ABA 途径的胁迫和内质网胁迫。
[0127] 综上所述,ZmbZIP17 过表达植株的耐旱性及耐内质网胁迫明显优于未转基因的植株,说明 ZmbZIP17 是与植物耐旱及耐内质网胁迫相关的蛋白。

[0001]

序列表

<110>中国科学院植物研究所

<120>转录因子 ZmbZIP17 及编码基因与其在响应逆境中的应用

<160> 3

<210> 1

<211> 1914

<212> DNA

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 1

ctcegcacaaec gcaacecegt cgtcggcgtg cgcgateccg agaggcccag ccatcagctt	60
ccttggcggg gtgtgtatgc gcgtacgtcg gccgtgacca gatcggctga gccaaaggcca	120
tggcggaaacc ggcctctctc gcgccggacc ccttcgcgga ectecccctt cccgaatttc	180
aggcgcccacat cgacggcgac agcttcgcgc tegaggactt cgatctggag gatctggacc	240
tggaegtgga cttegacctc gacctcttcg ectcggacgg gcaaccctcg caacegcccc	300
cgctcgcgac ctctctctc teggcgggt ctcggttgg aggetctctc tcttcgggtg	360
ccgtcgggga cggcggagg ctgaggaatg aggagtcttc ggagtcgtct tegaggagcg	420
ccagcggcac ggatgceagc ggcaaggga agggggagga ggacgaagcg aagcggcgcg	480
cgcggcaggt acgcaaccgc gagagcgcgc acctgtcgcg gcagaggaag aagcagtagc	540
tggaggagtt agagggtatg gtgaaggcca tgcagccac cctcgcgac ctctccgcca	600
ggatctctctg cgtcaccgcc gagaacgcc cctcctcaaca gcagctgggt ggcgctgctg	660
gggcgcgcgc gccgcgatg ccgatgacc ccgcgatgta tctcttgcgc atgcgctgga	720
tgcacccatc gtatccatg cgtggatcgc aggtgccgct cgtgccatt cctcggctga	780
aacccccgca gcttgcacct gctgtagcag agccaccgca caagaaggct aggaagacca	840
agaaggttgc aagtgttagt ctctcgggtg tgatttgcgt tgcaatgctt tgtgggtggt	900
tgattctctg agtaaatcgg atgtatgact ctgttgatgc tggagaaggc gctgcatacg	960
gtccatctca tcttgggagg gtgctggctg ttgaggggcc tcatgataat gtttcagatg	1020
gtgtcgatcc aaagccgcca cagcgtgcca gtgagacgct tccagcactg ttgtatctac	1080
caaagaatgg gaagcatgct aagattaatg ggaatcttgt tattaagtcg attgttgcta	1140
gtgagaaagc ttcattgcag atgtctggct atgatgggaa gcgtctctca aaccaagagg	1200
atgagaactag actggcaatt cctggetatg tgactccatt gaaagctgga gaggttatgg	1260
aatcaaccaa agaatgatg aacaatgaac tgttggcggt agctcctgca gatggaagca	1320
tgtataggga ggaggatgga ttgtgccc acgtggtttag tgaagcaatg tctgccc	1380
tgtctgagctc agaatgtgc actgaagttt tccagttcga tgtgtcccca tcatcagctc	1440

[0002]

atccaaatgg catcattcct gctattcca atgceatgtc aaactcgtca cagaacttca 1500
 etcaagatct cccccctgct cgtgttegea eggteaagaa cagaaggatt ttgtactcgg 1560
 aggecattec tetgagaggt tcaacatcca acgacactga gcacctcaag agcttttgca 1620
 gtaegaagcc tgtttcgtea gtggtcgtct ctgtgctggc tgateccaga gaggetggcg 1680
 atggggatgg tgagggaagg atctettcaa aatcattgtc ccgeatetta gttgtcgttc 1740
 ttatagatag tgtaagtat gttacgtaet cttgtgtcct gccgttcaaa agccatagcc 1800
 ctcaccttta ggtctgggtt ttggacgtga gttgataaag ctgacctata cattttatag 1860
 cagaagaggt gtaagacagc tgcctttggt catttattca agttttgtgt getc 1914

<210> 2

<211> 563

<212> PRT

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 2

Met Ala Glu Pro Ala Leu Leu Ala Pro Asp Pro Phe Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Glu Phe Gln Ala Pro Ile Asp Gly Asp Ser Phe Ala Leu Glu
 20 25 30

Asp Phe Asp Leu Glu Asp Leu Asp Leu Asp Val Asp Phe Asp Leu Asp
 35 40 45

Leu Phe Ala Ser Asp Gly Gln Pro Ser Gln Pro Pro Pro Leu Ala Thr
 50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ala Gly Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 65 70 75 80

[0003]

Gly Ser Gln Val Pro Leu Val Pro Ile Pro Arg Leu Lys Pro Pro Gln
 210 215 220

Pro Ala Pro Ala Val Ala Glu Pro Pro Ala Lys Lys Ala Arg Lys Thr
 225 230 235 240

Lys Lys Val Ala Ser Val Ser Leu Leu Gly Leu Ile Cys Val Ala Met
 245 250 255

Leu Cys Gly Cys Leu Ile Pro Ala Val Asn Arg Met Tyr Asp Ser Val
 260 265 270

Asp Ala Gly Glu Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Ser His Arg Gly Arg Val
 275 280 285

Leu Ala Val Glu Gly Pro His Asp Asn Val Ser Asp Gly Val Asp Pro
 290 295 300

Lys Pro Pro Gln Arg Ala Ser Glu Thr Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Leu
 305 310 315 320

Pro Lys Asn Gly Lys His Val Lys Ile Asn Gly Asn Leu Val Ile Lys
 325 330 335

[0005]

Ser Ile Val Ala Ser Glu Lys Ala Ser Leu Gln Met Ser Gly Tyr Asp
 340 345 350

Gly Lys Arg Pro Gln Asn Gln Glu Asp Glu Thr Arg Leu Ala Ile Pro
 355 360 365

Gly Tyr Val Thr Pro Leu Lys Ala Gly Glu Val Met Glu Ser Thr Lys
 370 375 380

Gly Met Met Asn Asn Glu Leu Leu Ala Leu Ala Pro Ala Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Met Tyr Arg Glu Glu Asp Gly Leu Leu Pro Gln Trp Phe Ser Glu Ala
 405 410 415

Met Ser Gly Pro Leu Leu Ser Ser Gly Met Cys Thr Glu Val Phe Gln
 420 425 430

Phe Asp Val Ser Pro Ser Ser Ala His Pro Asn Gly Ile Ile Pro Val
 435 440 445

Tyr Ser Asn Ala Met Ser Asn Ser Ser Gln Asn Phe Thr Gln Asp Leu
 450 455 460

Pro Pro Ala Arg Val Arg Thr Val Lys Asn Arg Arg Ile Leu Tyr Ser

[0006]

gtctcagaag accagagggc tattgagact ttccaacaaa ggtaatatc gggaaacctc	60
ctcggattcc attgcccage tatctgtcac ttcacgaaa ggacagtaga aaaggaagat	120
ggctttctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga atgectctac	180
cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggaac atcgtggaaa aagaagacgt	240
tccaaccaag tcttcaaage aagtggattg atgtgataac atgggtggage acgacactct	300
cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctccagaagac cagagggcta ttgagacttt	360
tcaacaaagg glaatalcgg gaaacctcct cggattccat tgcaccageta tcgtcactt	420
catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg	480
aaaggctatc gttcaagaat gctctaccg acagtggctc caaagatgga cccccacca	540
cgaggaacat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat	600
gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt	660
cctctatata aggaagttca ttccatttgg agaggacctc gagaaagagg atccacctga	720
ggcctcctgt ccatgggcta gaagcttctc ctctctgtct aacgtaagcc tctctgtttt	780
ttttctctgt tctttttgaa atgaatccaa ttagtgaiga taatctgtgt ttgatgtatc	840
attgatttaa catcttgaca atgaatcgtg atcggaaagt ataaagtat gggteaacgg	900
tttcaaagag agagaaagac ttttagagtc aactctcgac tctttcttaa ttatgttatt	960
getatttgtc tcttttcttg aagtctgaac aattcttggg attgttttgc agttctage	1020
ttctccaacc acaggaatc atgccccggg actgggttat caacaagttt gtacaaaaaa	1080
gcaggctcgg cggccgeccc ctccaccaga tcggctgagc caaggccatg gcggaaccgg	1140
ccctctctgc gccggacccc ttccgggacc tccccctccc cgaatttcag gcgcccateg	1200
acggcgacag ctccgcgctc gaggacttcg atctggagga tctggacctg gacgtggact	1260
tcgaacctga cctcttcgcc tcggacgggc aacctcgea accgcccccg ctccgcacct	1320
cgctctctc ggccgggtct ccggttggag getcgtctc ttccggtgce gtcggggacg	1380
gcggagggct gaggaatgag gactcttcgg agtcgtcttc gaggagcgcc agcggeacgg	1440
atggcagcgg caaggggaag ggggaggagg acgaagcgaa gcggcgcgcg cggcaggtac	1500
geaacgcga gacgcgcac ctgtcgcgce agaggaagaa gcaglacgtg gaggagttag	1560
agggtaaggt gaaggccatg caggccacca tcgccacct ctccgceagg atctctgcg	1620
tcaccgccga gaacgccct ctcaaacagc agctgggtgg cgctgtgagg gccgcgccgc	1680
cgccgatgce gatgtacccc gcgatgtatt ctttgcgat gccgtggatg caacctcgt	1740
atcccatgcg tggatcgcag gtgccgctcg tgccaatcc tcggctgaaa cccccgacg	1800
ctgcacctgc tgtagcagag ccaccggcca agaaggetag gaagaccaag aaggttgeaa	1860
gtgttagtct cctggggttg atttgcgttg caatgetttg tgggtgttg attcctgcag	1920

[0008]

taaatcggat gtatgactct gttgatgctg gagaagggtgc tgcatacggg ccatctcate	1980
gtgggagggt getggctggt gaggggecte atgataatgt ttcagatggt gtegatccaa	2040
agcegcccaca gcgtgccagt gagacgcttc cagcaactggt gtatctacca aagaatggga	2100
ageatgtcaa gattaatggg aatcttggtta ttaagtcgat tgttgctagt gagaaagett	2160
cattgcagat gtctggctat gatgggaage gteetcaaaa ccaagaggat gagactagac	2220
tggcaattcc tggetatgtg actccattga aagctggaga ggttatggaa tcaaccaaaag	2280
gaatgatgaa caatgaactg ttggcgttag ctectgcaga tggaagcatg tatagggagg	2340
aggatggatt getgecacag tggtttagtg aagcaatgtc tggeccctg ctgagctcag	2400
gaatgtgcac tgaagtttcc cagttcgatg tgtecccatc atcagctcat ccaaattgca	2460
tcattctctgt ctattccaat gccatgtcaa actcgtcaca gaactteact caagatctcc	2520
ccctgeteg tgttegcacg gtcaagaaca gaaggatttt gtactceagag gccattcctc	2580
tgagagggtc aacatccaac gaaactgagc acctcaagag ctttggecgt acgaagcctg	2640
ttlegtcagt ggtcgtctct gtgctggctg atcccagaga ggctggcgat ggggatggtg	2700
agggaaggat ctcttcaaaa tcattgtccc gcactctagt tgcgttctt atagatagtg	2760
ttaagtatgt tacgtactct tgtgtectgc cgttcaaaaag ccatagccct cacctttagg	2820
tctgtctaga gtccgcaaaa atcaccagtc tctctctaca aatctatctc tctctatctt	2880
tctecagaat aatgtgtgag tagttcccag ataaggaat tagggttctt atagggtttc	2940
gctcatgtgt tgageatata agaaaccctt agtatgtatt tgtatttgta aaatacttet	3000
atcaataaaa ttctaatcc ctaaaaccaa aatccagtga cc	3042

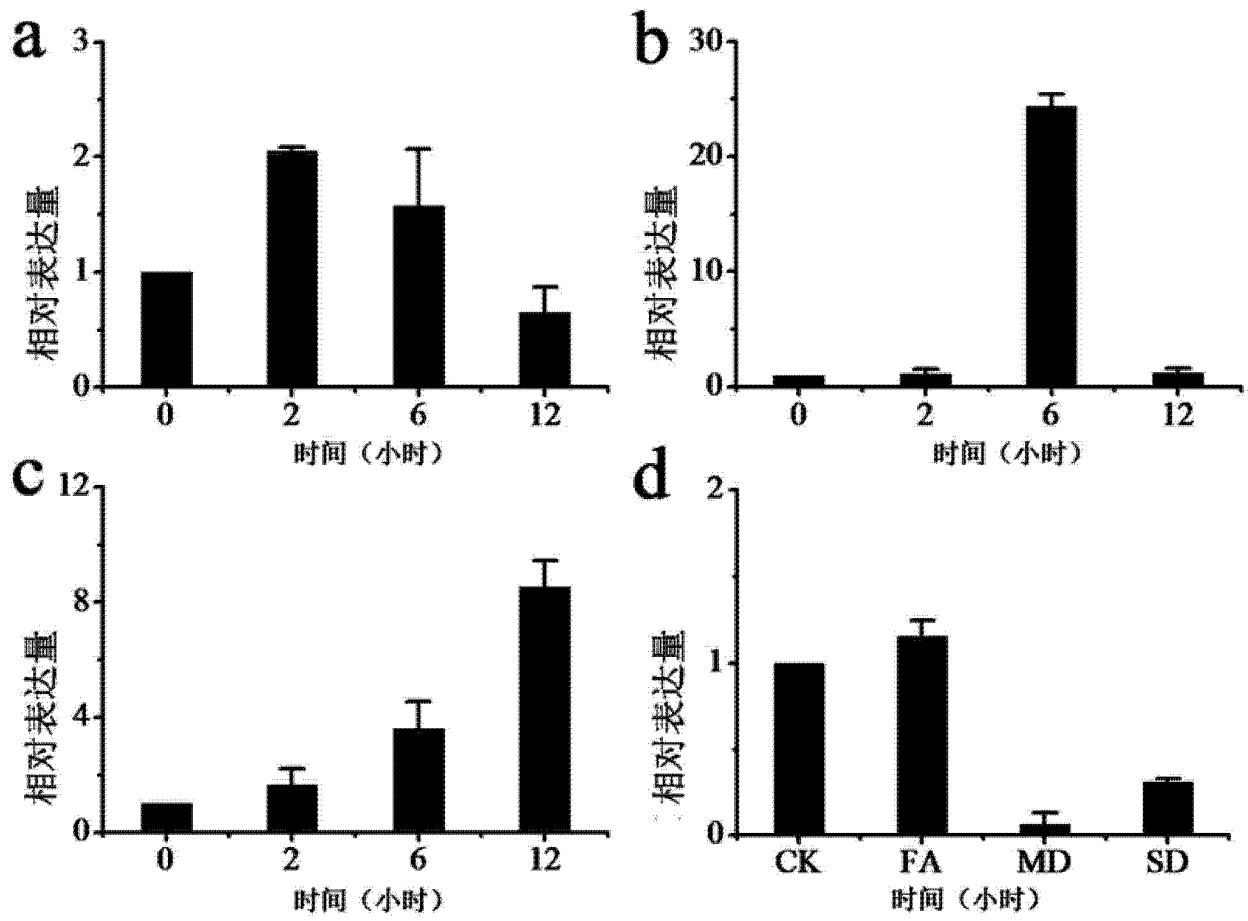


图 1

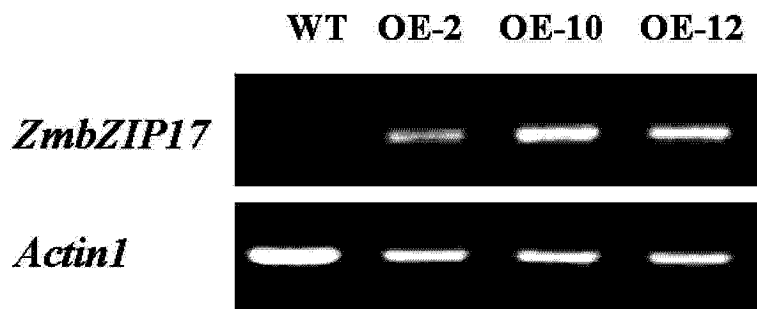


图 2

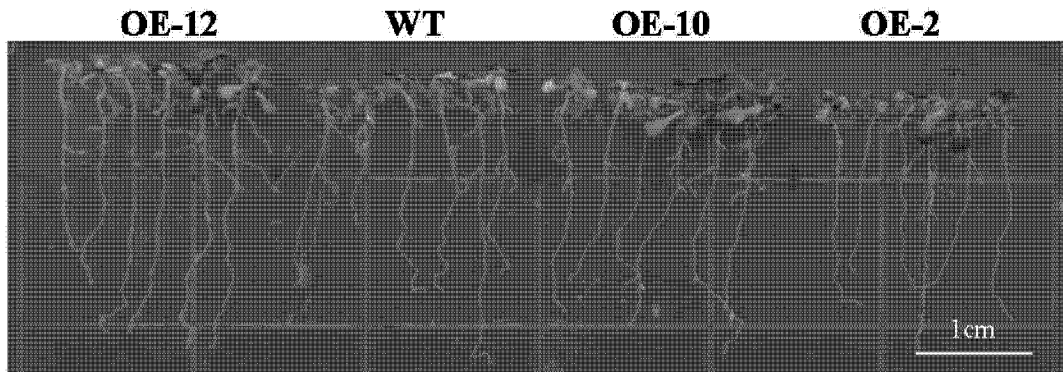


图 3

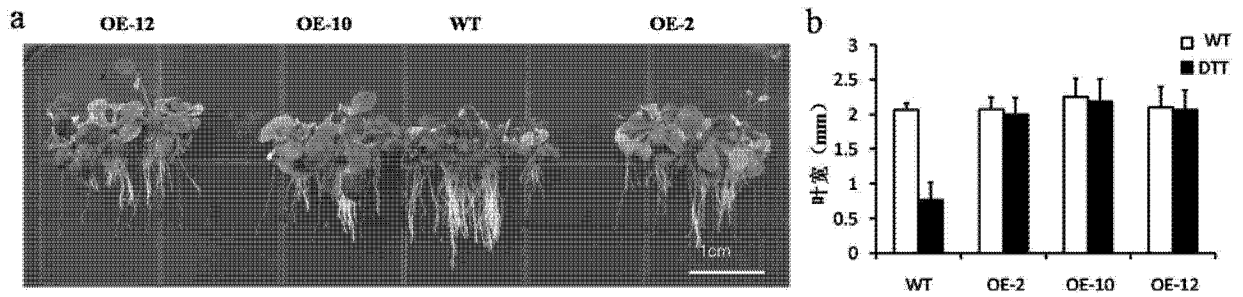


图 4

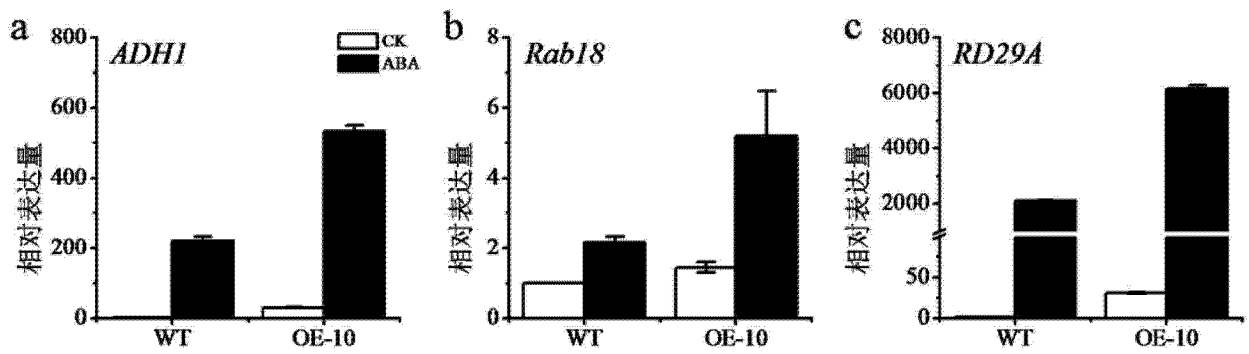


图 5

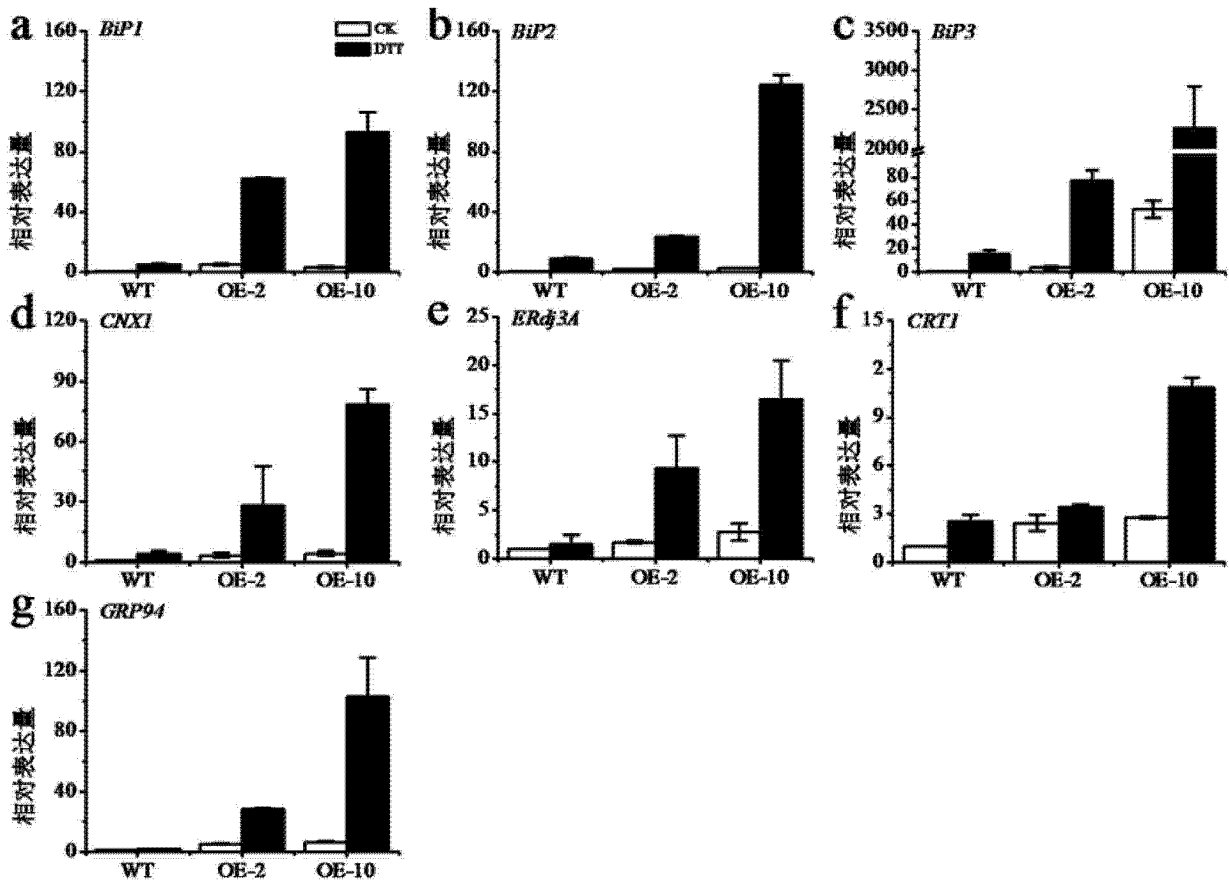


图 6