



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104017061 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201310065802.6

C12N 1/15(2006.01)

(22)申请日 2013.03.01

C12N 1/19(2006.01)

(73)专利权人 中国科学院植物研究所

C12N 1/21(2006.01)

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

A01H 5/00(2006.01)

审查员 马静

(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)

权利要求书1页 说明书8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,是由序列表中序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质。
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)或(2)所示:
 - (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。
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. 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;所述耐逆性为耐内质网胁迫或耐旱性。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述植物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;所述耐逆性为耐内质网胁迫或耐旱性。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于: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发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%SDS的溶液中,在 65°C 下杂交,然后用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS和 $1 \times \text{SSC}$, 0.1%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
- | | |
|-----------------|------|
| Total RNA | 2 μg |
| 10×DNase buffer | 1ul |
- [0054] DNaseI (50U/ul) 0.4ul
- | | |
|-----------------|-------|
| Rnase inhibitor | 0.1ul |
| DEPC-H2O | 3.5ul |
- [0055] 条件:37°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°C温育5min,冰上放置5min。
- | | |
|------------------------|-------|
| 然后加入 5×buffer | 5ul |
| 2mM dNTP | 5ul |
| [0061] Rnase inhibitor | 0.5ul |
| Reverse Transcriptase | 1ul |

[0062] 条件:42°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°C预变性45sec,然后98°C变性10sec,54°C退火20sec,再72°C延伸1.5min,共40个循环;最后72°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表中的序列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 μM ABA、或2mM DTT、或2 μg/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 l2 \times SYBR Green Master Mix,引物各0.5 μ l,ddH₂O8.5 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)：

Template 0.5 μ l

2 \times Taq mix 5 μ l

[0091] Primer1F 10 μ M 0.3 μ l

Primer1R 10 μ M 0.3 μ l

ddH₂O 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100μM 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' CACGGTTCAGCGTATTTC AAT 3'
		qBiP3-R	5' ATAAGCTATGGCAGCACC CGTT 3'
<i>BiP1</i>	At5g28540	qBiP1-F	5' TCACTTGGGAGGTGAGGACTTT 3'
		qBiP1-R	5' CTCACATCCCTTCGGAGCTTA 3'
<i>CNX1</i>	At5g61790	qCNX1-F	5' ATGAGACAACGGCAACTATTTTCC 3'
		qCNX1-R	5' CCATAATCCTCATGTCCTTCACT 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' TTCATTAACCTTCCCTATCTCCC 3'

[0107]

<i>β tubulin</i>	X74654	qGRP94-R	5' TTTCTCACCATCTTCCCTCCT 3'
		β tubulin-F	5' GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA 3'
<i>Actin1</i>	At2g37620	β tubulin-R	5' CGCCAAACTTAATAACCCAGTA 3'
		Actin-F	5' CATCAGGAAGGACTTGTACGG 3'
<i>RD29A</i>	At5g52310	Actin-R	5' GATGGACCTGACTCGTCATAC 3'
		rd29A-F	5' GTGAAGATGACTATCTCGGTGGTC 3'
<i>Rab18</i>	At1g43890	rd29A-R	5' GCCTAACTCTCCGGTGTAACTAG 3'
		rab18-F	5' ATGACGAGTACGGAAATCCGATGG 3'
<i>ADH1</i>	At1g77120	rab18-R	5' TATGTATACACGATTGTTCCAAGC 3'
		ADH1-F	5' TCCACGTATCTTCGGCCATG 3'
		ADH1-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ADH1、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ADH1、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ADH1、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ADH1、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ADH1、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、C1RP94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、CRRT1、CRP94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iP1、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、GEP94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ZiP1、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

etcegeaacc	geaaecgegt	cgteggegtg	eggateeeg	agaggcccag	ccatcagctt	60
cettggcggg	gtgtgtatgc	gcgtacgtcg	gcegtgacca	gatcggctga	gccaaaggcca	120
tggeggaaacc	ggccctctc	gcgccggacc	cettegcgga	ctctcccttc	cccgaatttc	180
aggegccecat	cgacggcgac	agcttcgege	tcgaggactt	cgatciggag	gatctggacc	240
tggacgtgga	cttcgacctc	gaectcttcg	ctctggacgg	gcaaccctcg	caaccgcccc	300
cgctcgcgac	ctcgtctctc	tcggccgggt	ctccggttgg	aggctcgtcc	tcttcgggtg	360
ccgtcggggga	cgccggaggg	ctgaggaaatg	aggagtcttc	ggagtcgtct	tcgaggagcg	420
ccagcggcac	ggatggcagc	ggcaagggga	agggggagga	ggacgaagcg	aagcggcgcg	480
cgcgccaggt	acgeaacgc	gagagcgcgc	acctgtcgcg	gcagaggaag	aagcagtagc	540
tggaggaglt	agagggttaag	gtgaaggcca	tgcaggccac	catcgcgac	ctctccgcca	600
ggatctctctg	cgtaaccgcc	gagaacgccg	ctctcaaaca	gcagctgggt	ggcgtgctg	660
gggccgcgccc	gccgcgatg	ccgatgtacc	ccgcgatgta	ttctttgccc	atgccgtgga	720
tgcaccctc	gtatcccatg	cgctggatcg	agggtgccc	cgctgccaatt	ctctggctga	780
aaaccccgca	gcctgcacct	gctgtagcag	agccaccggc	caagaaggct	aggaagacca	840
agaaggltgc	aagtgttagt	ctctgggggt	tgatttgcgt	tgcaatgctt	tgtgggtggt	900
tgatctctgc	agtaaatcgg	atgtatgacl	ctgttgatgc	iggagaagggt	gctgcatacg	960
gtccatctca	tcgtgggagg	gtgctggctg	ttgaggggcc	tcatgataat	gtttcagatg	1020
gtgtcgatcc	aaagccgcca	cagcgtgcca	gtgagacgct	tcagcactg	tigtatctac	1080
caaagaatgg	gaagcatgtc	aagattaatg	ggaatcttgt	tattaagtcg	attgttgeta	1140
gtgagaaage	tcattgcag	atgtctggct	atgatgggaa	gcgtctctca	aaccaagagg	1200
atgagactag	actgccaatt	ctggctatg	tgaactcatt	gaaagctgga	gaggttatgg	1260
aatcaaccaa	aggaatgatg	aacaatgaac	tgtttggcgtt	agctctctgca	gatggaagca	1320
tgtataggga	ggaggatgga	ttgctgccac	agtggttttag	tgaagcaatg	cttggecccc	1380
tgtcgagctc	aggaatgtgc	actgaagttt	tcagttcga	tgtgtcccca	tcatcagctc	1440

[0002]

atceaaatgg catcattcct gtctattcca atgceatgte aaactcgtca cagaacttca 1500
 ctaagaalet cccccctgcl cglgttcgea eggteaagaa cagaaggall ttgtactcgg 1560
 aggccattcc tetgagaggt tcaacatcca acgacactga gcacctcaag agctttgcea 1620
 gtaegaagcc tgtttcgtca gttgtcgtct ctgtgctgga tgatcccaga gaggetggcg 1680
 atggggatgg tgaggaagg atctcttcaa aateattgte ccgcatetta gttgtcgtte 1740
 ttatagatag tgtaagtat gttacgtaet cttgtgtcct gccgttcaaa agccatagec 1800
 ctcaccttta ggtctgggtt ttggactga gttgataaag ctgacctata cattttatag 1860
 cagaagaggt gtaagacagc tgcctttggt cattttattca agttttgtgt gctc 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

Ala Val Gly Asp Gly Gly Gly Leu Arg Asn Glu Glu Ser Ser Glu Ser
 85 90 95

Ser Ser Arg Ser Ala Ser Gly Thr Asp Gly Ser Gly Lys Gly Lys Gly
 100 105 110

Glu Glu Asp Glu Ala Lys Arg Arg Ala Arg Gln Val Arg Asn Arg Glu
 115 120 125

Ser Ala His Leu Ser Arg Gln Arg Lys Lys Gln Tyr Val Glu Glu Leu
 130 135 140

[0003]

Glu Gly Lys Val Lys Ala Met Gln Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ser Ala
 145 150 155 160

Arg Ile Ser Cys Val Thr Ala Glu Asn Ala Ala Leu Lys Gln Gln Leu
 165 170 175

Gly Gly Ala Ala Gly Ala Ala Pro Pro Pro Met Pro Met Tyr Pro Ala
 180 185 190

Met Tyr Ser Leu Pro Met Pro Trp Met His Pro Ser Tyr Pro Met Arg
 195 200 205

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

[0004]

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

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

[0005] 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

gtctcagaag accagagggc taitgagact ttccaacaaa gggtaatate gggaaaccte	60
ctcggattcc attgcccage tatctgtcac ttcategaaa ggacagtaga aaaggaagat	120
ggctttetaca aatgccaatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga atgcctctac	180
cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc caccaggaac atcgtggaaa aagaagacgt	240
tccaaccaag tcttcaaagc aagtggattg atgtgataac atgggtggagc acgacactct	300
cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctccagaagac cagagggeta ttgagacttt	360
tcacaacagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt	420
catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg	480
aaaggctate gttcaagaat gcctctaccg acagtggctc caaagatgga cccccacca	540
cgaggaacat cgtggaaaaa gaagaegtcc caaccacgtc tccaagcaa gtggattgat	600
gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatecca ctatecttcg caagacctt	660
cctctatata aggaagtcca ttctatttgg agaggacctc gagaaagagg atccacctga	720
ggcctccgtt ccattgggcta gaagcttctc ctctctcgtc aacgtaagcc tctctgtttt	780
ttttctctgt ttcttttgaa atgaatccaa ttagtgatga taatctgtgt ttgatgtatc	840
attgatttaa catcttgaca atgaatcgtg atcggaagtg ataaagttat gggtaacgg	900
ttccaanagag agagaanagc tttagagtc aactctcgac tttttcttaa ttatgttatt	960
gtattttgtc tcttttcttg aagcttgaac aattcttggg attgttttgc aggttctagc	1020
ttctccaacc acaggaatte atcggccggg actgggttat caacaagttt gtacaaaaaa	1080
gcaggelecg cggecgccc ctaccacaga tcggctgagc caaggecatg gcggaaccgg	1140
ccctctctgc gccggacccc ttgcgggacc tccccctccc cgaatttcag gcgcccctcg	1200
acggcgacag ctctcgcctc gaggacttcg atctggagga tctggacctg gacgtggaet	1260
tcagctcaga cctctctgccc tcggaeggge aacctctgca accgcccccg ctctcgacct	1320
cgctctctc gcgccgggtct ccggttggag gctctctctc ttccggtgcc gtcggggagc	1380
gcggagggct gaggaatgag gactctcgg agtctctctc gaggagcgcc aggggcacgg	1440
atggcagcgg caaggggaag ggggaggagg acgaagcgaa gcggcgcgcg cggcaggtac	1500
gcaaccgcga gagcgcgcac ctgtcgcgge agaggaagaa gcagtacgtg gaggagttag	1560
agggtaaggt gaaggccatg caggeacca tcgcccacct ctccgccagg atctctctgcg	1620
tcaccgccga gaacgccct ctcaaacagc agctgggtgg cgtctctggg gccgcgccgc	1680
cgccgatgcc gatgtacccc gcgatgtatt ctttgcgat gccgtggatg caccatctgt	1740
atcccatgeg tggatcgcag gtgcctctc tgcacatcc tcggtgaaa cccccgcgc	1800
ctgcacctgc tgtagcagag ccaccggcca agaaggetag gaagaccaag aaggttgcac	1860
gtgttagtct cctggggttg atttgcctg caatgccttg tgggtgtttg attctctcag	1920

[0008]

taaateggat gtatgactct gttgatgetg gagaagggtge tgcatacggg ccatctcacc	1980
glgggagggg gctggctgll gaggggeetc atgataatgt ttcagatggt gtcgatccaa	2040
agccgccaca gctgcccagt gagacgette cagcactgtt gtatctacca aagaatggga	2100
agcatgtcaa gattaatggg aatcttgta ttaagtcgat tgttgctagt gagaaagctt	2160
cattgcagat gtctggctat gatgggaagc gtcctcaaaa ccaagaggat gagactagac	2220
tggcaattcc tggetatgtg actceattga aagctggaga ggttatggaa tcaaccaaaag	2280
gaatgatgaa caatgaactg ttggcgtag ctcttcaga tgggaagcatg tatagggagg	2340
aggatggatt gctgccacag tggtttagtg aagcaatgct tggccccctg ctgagctcag	2400
gaatgtgcac tgaagtttcc cagtctgatg tgteccacc atcagctcat ccaaatggca	2460
tcattcctgt ctattccaat gccatgtcaa actegtcaca gaacttcaact caagatctcc	2520
ccccctctg tgttcgcacg gtcaagaaca gaaggatttt gtactccagag gccattcctc	2580
tgagaggttc aacatccaac gacaetgagc acctcaagag ctttggcagt acgaagcctg	2640
ttctgctcagt ggtcgtctct gtgctggctg atcccagaga ggctggcgat ggggatggtg	2700
agggaaggat ctcttcaaaa tcattgtccc gcactctagt tctcttctt atagatagtg	2760
ttaagtatgt tacgtactct tgtgctctgc cgttcaaaaag ccatagccct cacctttagg	2820
tctgtctaga gtcgcacaaa atcaccagtc tctctctaca aatctatctc tctctatitt	2880
tctccagaat aatgtgtgag tagtccagc ataagggaa tagggttctt atagggtttc	2940
gctcatgtgt tgagcatata agaaaccctt agtatgtatt tgtatttgta aaatactct	3000
atcaataaaa ttctaatte ctaaaaccaa aatccagtga cc	3042

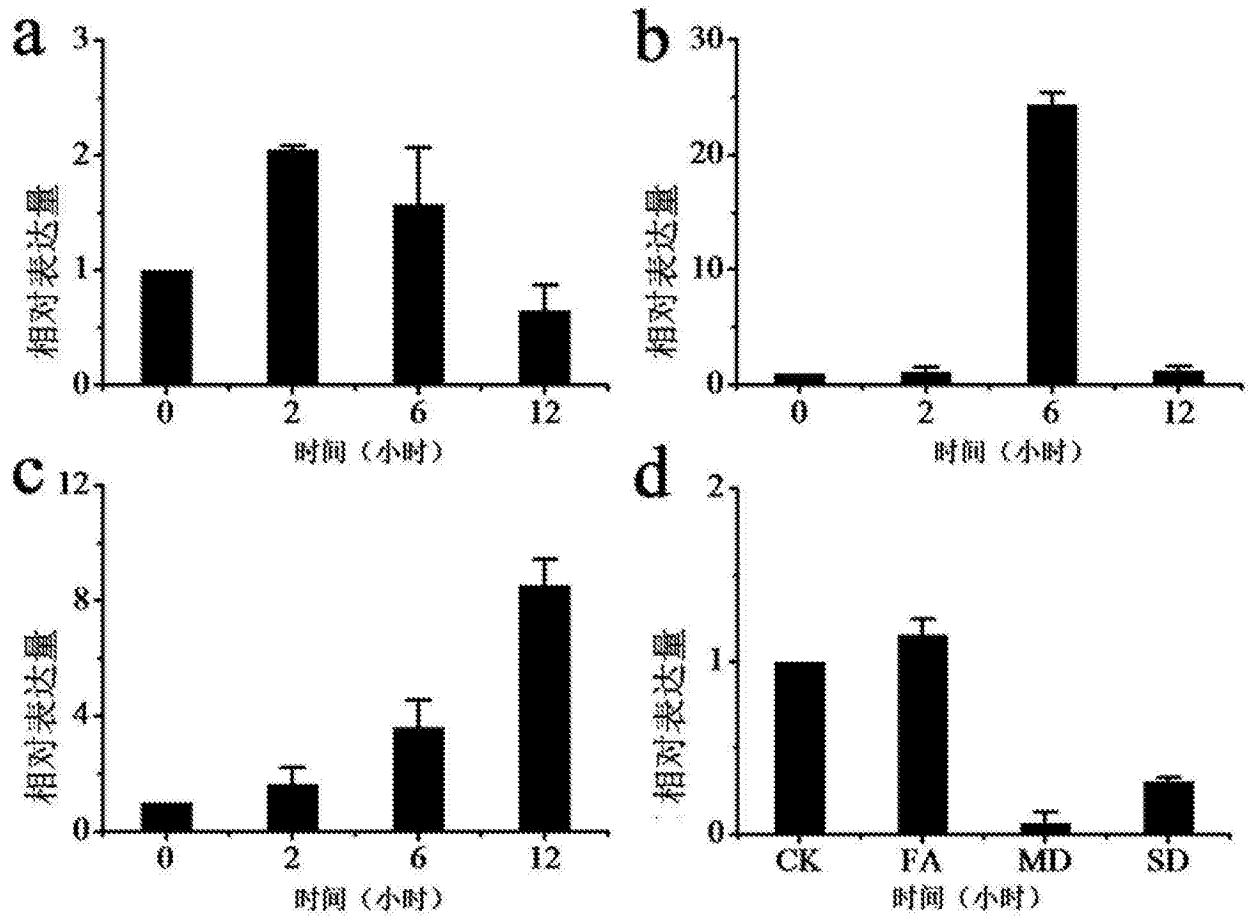


图1

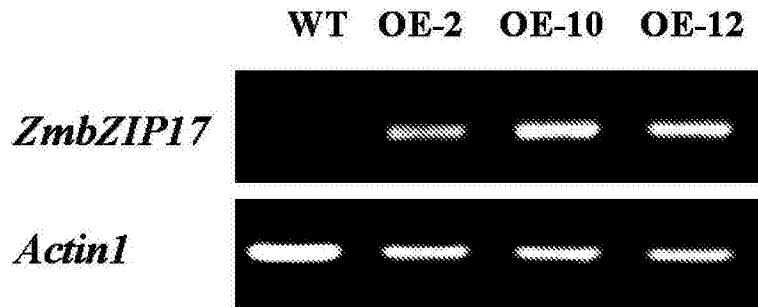


图2

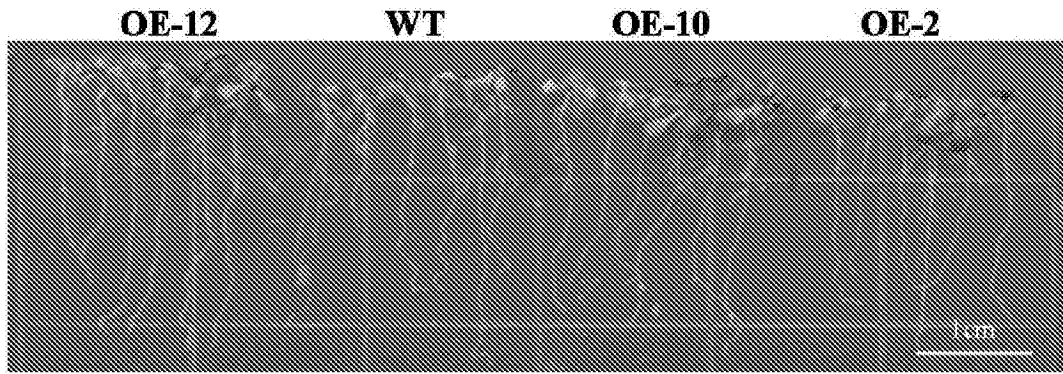


图3

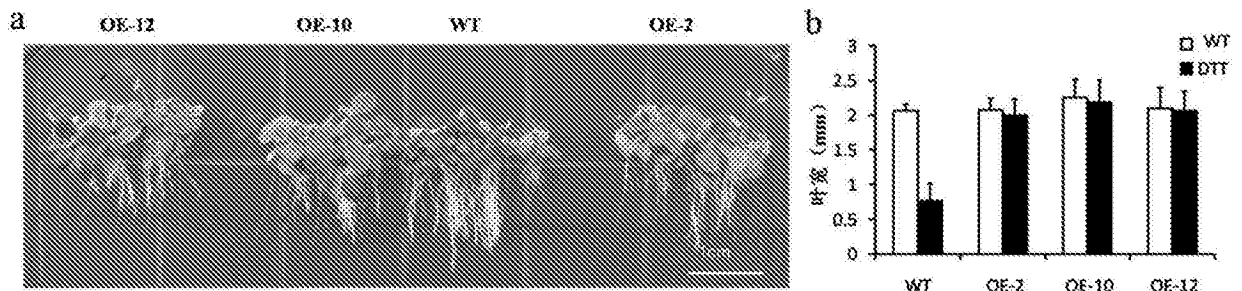


图4

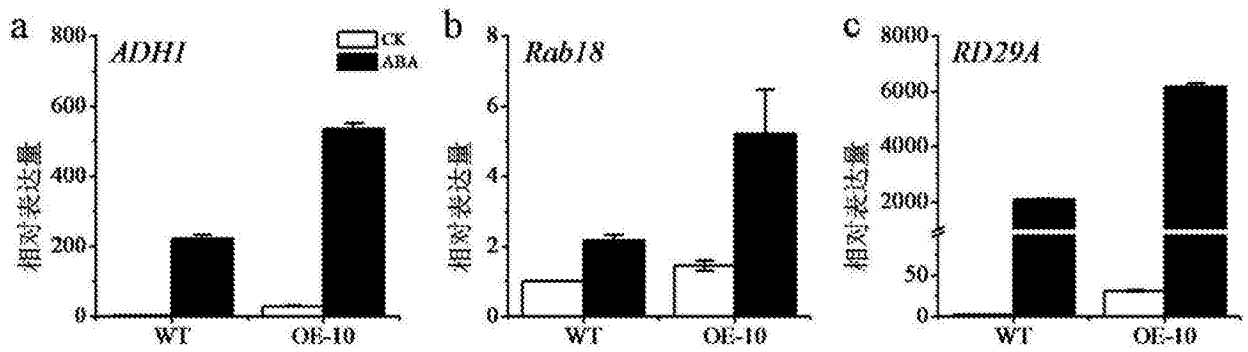


图5

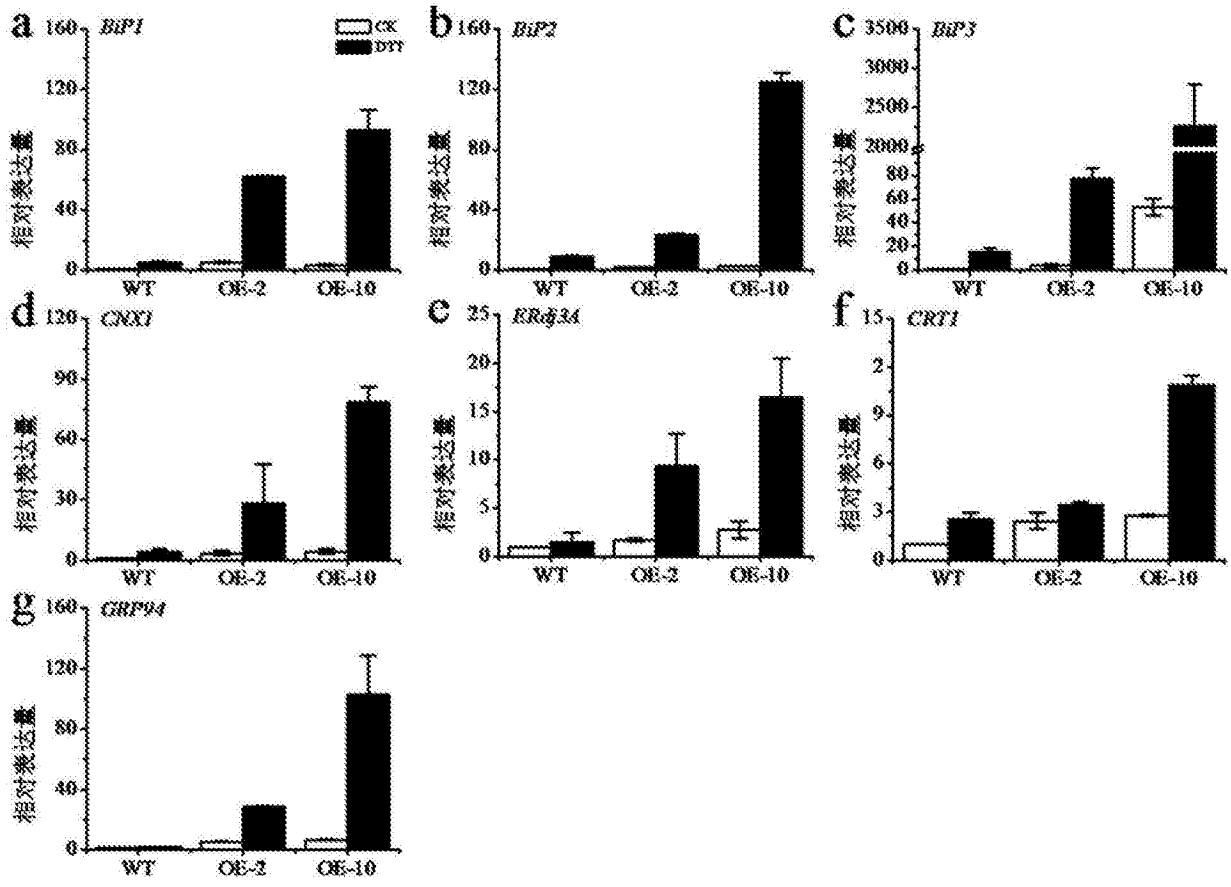


图6