

DREB1A 转录因子蛋白的原核表达

张玉宝¹, 谢忠奎^{1*}, 李同祥^{1,2}, 王亚军¹, 郭志鸿¹, 王志力¹

(1. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所皋兰生态与农业综合试验站, 兰州 730000;

2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要: DREB1A 是 DREB 转录因子的一员, 它们都含有一段与 DNA 结合的保守区域, 由 58 个氨基酸组成, 称为 EREBP/AP2 结构域 (EREBP/AP2 domain)。一个 DREB 转录因子可以调控多个与植物干旱、高盐及低温耐性有关的功能基因表达。从拟南芥中克隆了 DREB1A 转录因子基因, 成功构建了 DREB1A 基因的原核表达载体, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达获得了 DREB1A 蛋白, 但以包涵体形式存在。为以后深入研究 DREB 转录因子与 DRE 顺式作用元件相互作用的具体机制奠定了基础。

关键词: DREB1A; 转录因子; 蛋白; 原核表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)04-0326-05

Prokaryotic Expression of DREB1A Transcription Factor

ZHANG Yu-Bao¹, XIE Zhong-Kui^{1*}, LI Tong-Xiang^{1,2}, WANG Ya-Jun¹, GUO Zhi-Hong¹, WANG Zhi-Li¹

(1. Gaolan Experiment Station for Ecology and Agriculture Research, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, the Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China; 2. School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: DREB1A is a member of the DREB transcription factors. Each DREB protein contains 58 conserved amino acids named as EREBP/AP2 domain, which binds cis-acting element named DRE (for dehydration-responsive element). A DREB transcription factor could regulate multiple functional genes related to dehydration, low temperature and high salt tolerance of plant. We cloned the DREB1A gene from *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype) genome by PCR and constructed the prokaryotic express vector, which was transferred into *E. coli* BL21 (DE3). Expression of the DREB1A protein was induced by 1 mmol/L IPTG, but the target protein obtained in the form of inclusion body. This work provides a foundation for further understanding of the interaction mechanism between DREB transcription factors and DRE cis-acting elements.

Key words: DREB1A; Transcription factor; Protein; Prokaryotic expression

转录因子, 又称反式作用因子, 能够与真核基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用, 通过它们之间以及其他相关蛋白之间的相互作用, 激活或抑制转录^[1]。目前已从植物中分离到了大量的植物转录因子^[2-7]。

植物在受到逆境(干旱、盐碱、低温)胁迫时, 会产生一系列蛋白来保护自己免受伤害, 以维持活力。目前, 转录因子研究已受到广泛关注, 特别是在植物逆境(干旱、盐碱、低温)诱导基因表达调控研究方面, 已成为重要热点。Liu 等^[8]使用 *rd29A* 基因启动子的 DRE 顺式作用元件通过酵母 One-Hybrid 方法, 从拟南芥中克隆了两类共 5 个与 DRE 元件特异结合的 DREB 转录因子, 它们可以在低温、干旱或高盐

胁迫下调控报告基因的表达, 分别命名为 DREB1A/CBF3、DREB1B/CBF1、DREB1C/CBF2、DREB2A 和 DREB2B。在蛋白质结构上, 这 5 个 DREB 转录因子都具备反式作用因子的典型特征, 即 N 末端都有一段核定位信号 (nuclear localization signal, NLS), C 末端都有一段酸性活化区域 (acidic activation region, AAR), 它们都含有一段与 DNA 结合的区域, 该区域非常保守, 由 58 个氨基酸组成, 称为 EREBP/AP2 结构域 (EREBP/AP2 domain)^[9-11]。一个 DREB 转录因子可以调控多个与植物干旱、高盐及低温耐性有关的功能基因的表达^[12]。目前, 在 NCBI 网上公布的各种植物 DREB 转录因子的基因就有 70 个之多, DREB 基因家族不断得到丰富和完善^[13]。

收稿日期: 2007-02-07, 修回日期: 2007-06-04。

基金项目: 中国科学院农业项目办公室课题 (CASN-115-06-08) 资助。

作者简介: 张玉宝 (1981-), 男, 回族, 甘肃平凉人, 硕士, 助工, 主要从事基因芯片研究 (E-mail: smzg532@sohu.com)。

* 通讯作者 (E-mail: wxhcas@lzb.ac.cn)。

虽然通过多年的研究,我们对植物转录因子尤其 DREB 类转录因子有了一定的认识,但是对于逆境抗性相关转录因子的功能及其作用机理,知之甚少;对 DRE 顺式作用元件与 DREB 转录因子的相互作用虽有一定研究^[8],但不够全面,采取的研究方法(如凝胶移位分析方法)周期长,耗时多,在研究中存在一定的缺陷。随着生物芯片技术的发展,dsDNA (ds DNA, double strand DNA) 微阵列芯片已发展成为高通量检测 DNA 结合蛋白的重要技术,已经证明该技术能够非常有效地用于检测序列特异性 DNA 结合蛋白质(转录因子)与大量 DNA 靶点(顺式作用元件)的特异性结合^[14,15],可有效分析生物分子结合作用^[16]。大肠杆菌系统由于其优势而成为表达许多异源蛋白质的首选表达系统^[17]。所以将 DREB1A 基因在大肠杆菌系统中大量表达以得到足够多的蛋白,为下一步利用 dsDNA 芯片技术从生物分子相互作用的角度研究 DREB 转录因子的作用机理,为人为地控制特定基因的表达、综合提高植物抗逆性、培育植物抗逆品种,特别是培育抗旱、抗盐、抗低温的植物品种提供理论支持。

本研究从拟南芥中克隆了 DREB1A 转录因子基因,成功构建了 DREB1A 基因的原核表达载体,转化 *E. coli* BL21 (DE3),经 1 mmol/L IPTG 诱导表达获得了 DREB1A 蛋白,这为以后更广泛深入的研究 DREB 转录因子与 DRE 顺式作用元件相互作用的具体机制奠定了很好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L., Columbia ecotype) 种子由兰州大学生命科学学院提供。

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 由本实验室保存。pUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术服务有限公司。pUCm-T 载体图谱见图 1。

各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自大连宝生物 (TaKaRa) 工程有限公司, DNA 片断回收试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司。卡那霉素、氨苄青霉素等购自 Amresco 公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取无菌培养的拟南芥幼苗叶片 0.1 g, 用 CTAB 法提取植物总 DNA^[18]。

1.2.2 引物设计与合成 根据文献报道的拟南芥 DREB1A 转录因子基因核苷酸序列^[8], 设计合成

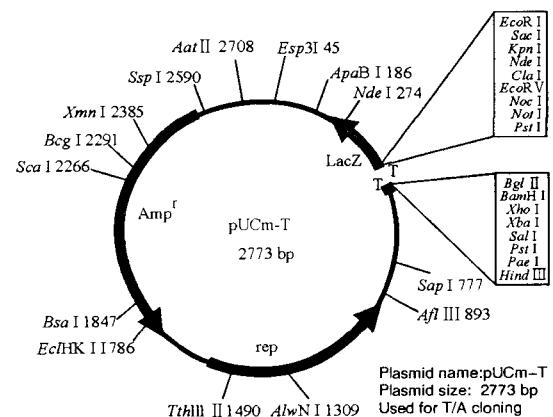


图 1 pUCm-T 载体图谱

Fig. 1 The pUCm-T vector

PCR 两端引物。为便于克隆化基因的表达,在其正向引物上加 *Nco* I 位点,在其反向引物上加 *Hind* III 位点,最终确定引物序列如下:

正向引物: 5'-TA **CCATGG** GCATGAACTCATTTCT-3'; *Nco* I

反向引物: 5'-GC **AAGCTT** ATAACTCCATAACGAT-*Hind* III
ACGTC-3';

以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 质粒 DNA 的提取 参见安徽优晶生物工程有限公司生产的 H. Q. & Q 质粒微量抽提试剂盒说明。

1.2.4 电泳、酶切、大肠杆菌感受态制备、转化 参照参考文献[17]进行。

1.3 PCR 扩增

拟南芥转录因子 DREB1A 基因中无内含子,因而直接以拟南芥基因组为模板,在特异引物的作用下通过 PCR 扩增得到 DREB1A 基因。取 2.5 ng 基因组 DNA, 在普通 *Taq* DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环扩增 30 次, 最后 72℃ 延伸 7 min。

扩增完毕, 取 5 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增片段用 H. Q. & Q 凝胶回收试剂盒 II 纯化。

1.4 DREB1A 转录因子基因的克隆

将经纯化的扩增片段与 pUCm-T 载体直接连接, 连接物转化用 CaCl_2 制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上挑选白色菌落, 用 H. Q. & Q 质粒微量抽提试剂盒抽提质粒, 筛选出重组子。

1.5 DREB1A 重组质粒的酶切分析及序列分析

对于 DREB1A 重组质粒, 分别随机挑取 4 个独立的克隆, 分别用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测正确的重组质粒送交上海生工生物技术服务有限公司测序。将测序证实完全正确的序列命名为 pUCm-T-DREB1A, 保存菌种。

1.6 重组 DREB1A 原核表达载体的构建

取 pUCm-T-DREB1A 质粒, 经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切后, 与经相同双酶切的表达载体 PET-28a (+) 质粒在 *T*₄ DNA Ligase 作用下 16℃ 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 涂布于含卡那霉素的 LB 平板。PCR 筛选阳性克隆, 取阳性菌落用质粒提取试剂盒提取质粒, 进行酶切鉴定。将酶切鉴定为阳性的质粒命名为 PET-28a (+)-DREB1A。

1.7 DREB1A 蛋白的原核表达研究

取鉴定正确的重组表达载体 PET-28a (+)-DREB1A 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株, PCR 鉴定阳性菌落。取阳性菌株接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜。取 0.5 mL 菌液接种于 25 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37℃, 200 r/min 培养 3 h 至 OD 值为 0.6。将培养物分为两部分, 分别观察诱导温度 (37℃ 和 16℃) 对蛋白表达的影响。

37℃ 蛋白表达的情况: 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 继续培养 4 h 后收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳。

16℃ 蛋白表达的情况: 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 16℃ 分别诱导 6、11、20 h, 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳。

16℃ 大量诱导 2L 菌体, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导时间为 20 h, 收集菌体, 超生破碎, 上清和沉淀分别过 His-Tag 亲和纯化柱, 分析 DREB1A 蛋白的可溶性。

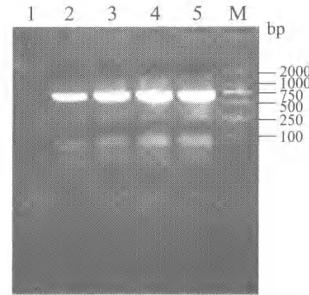
2 结果与分析

2.1 DREB1A 转录因子的 PCR 扩增

以拟南芥基因组为模板进行 DREB1A 转录因子的 PCR 扩增, 电泳检测结果显示, 得到的扩增片段大小约为 0.6 kb, 与预期大小 (648 bp) 一致 (见图 2)。

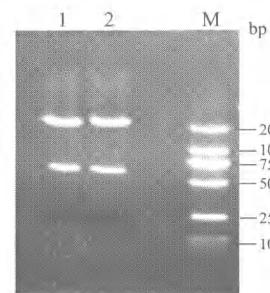
2.2 重组质粒的酶切鉴定

将含有 DREB1A 的重组质粒经 *Nco* I 和 *Hind* III



Lane 1: Negative control; Lane 2-5: PCR product (repeat);
M: TaKaRa DL2000 marker

图 2 DREB1A PCR 产物电泳图
Fig. 2 PCR products of DREB1A gene



Lane 1-2: Double digestion product of the recombinant plasmid;
M: TaKaRa DL2000 marker

图 3 DREB1A 重组质粒的酶切鉴定
Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid of DREB1A by restriction enzyme digestion

双酶切, 分别得到大小为 0.6 kb 和 3 kb 两条带, 与 PCR 产物和 pUCm-T 质粒大小相符 (图 3)。

2.3 测序结果及序列分析

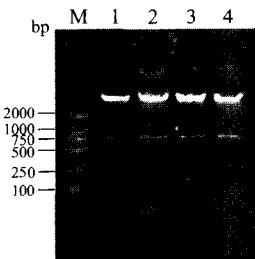
对克隆的 DREB1A 转录因子基因分别从两端进行序列测定, 将得到的序列与 GenBank 中的该基因序列进行序列比较分析。分析结果表明, 得到的序列与 GenBank 中的 DREB1A 基因序列 100% 相同。

2.4 重组 DREB1A 原核表达载体的 PCR 及酶切鉴定

重组质粒经 PCR 扩增得到约 0.6 kb 条带, 经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切分别得到两条带, 大小为 0.6 kb、5 kb 左右, 与 PCR 产物和 PET-28a (+) 质粒大小相符 (图 4)。

2.5 DREB1A 蛋白的原核表达

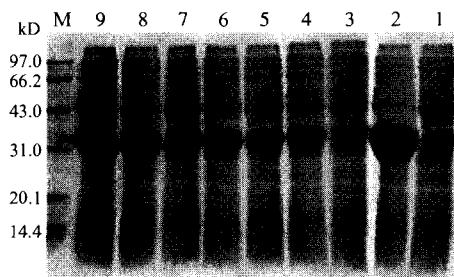
鉴定正确的重组表达载体 PET-28a (+)-DREB1A, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 分析, 观察到有明显诱导表达带, 并且表达量随时间、温度不同而不同 (图 5)。但其分子量较预期大小 (25.9 kD) 稍大, 可能是由于进行 SDS-



Lane 1-4: Double digestion product of the recombinant plasmid;
M: TaKaRa DL2000 marker

图 4 DREB1A 重组表达载体酶切鉴定图

Fig. 4 Identification of the recombination expression vector of DREB1A by restriction enzyme digestion



1,3: 未插入靶片断的空质粒诱导表达产物; 2: 37℃诱导4 h 目标蛋白表达产物; 4,5: 16℃诱导6 h 目标蛋白表达产物; 6,7: 16℃诱导11 h 目标蛋白表达产物; 8,9: 16℃诱导20 h 目标蛋白表达产物; M: 低分子量蛋白 Marker
1,3: Expression of PET-28a(+) plasmid; 2: DREB1A protein induced for 4 h at 37℃; 4,5: DREB1A protein induced for 6 h at 16℃; 6,7: DREB1A protein induced for 11 h at 16℃; 8,9: DREB1A protein induced for 20 h at 16℃; M: low molecular weight protein marker

图 5 不同温度、不同时间诱导 DREB1A 蛋白的表达

Fig. 5 DREB1A protein induced at different temperature and time

PAGE 的时候蛋白的净电荷影响了迁移率, 另外 DREB1A 蛋白中富含 9 个脯氨酸, 也会使蛋白在 SDS-PAGE 胶中移动变慢。此外, 在不同温度诱导下, DREB1A 蛋白的表达量随温度增高而增多。在 16℃ 低温诱导时, 随诱导时间的延长表达量也增多。将 16℃ 低温诱导 20 h 的菌体, 超生破碎, 上清和沉淀分别过 His-Tag 亲和纯化柱, 发现目的蛋白几乎都存在于沉淀中, 说明即使在低温条件下, DREB1A 蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中是以包涵体的形式存在。

3 讨论

植物感受外界干旱、高盐、激素、病害及体内细胞发育等信号, 通过一系列信号传递激发转录因子, 转录因子与基因启动子区域的顺式作用元件结合后, 激活 RNA 聚合酶 II 转录复合物, 从而启动基因

的转录表达, 最后通过基因产物的作用对外界信号在生理生化等方面做出适合的调节反应^[1]。DREB 转录因子识别 DRE 顺式作用元件, 当植物受到外界环境胁迫时, DREB 转录因子与 DRE 顺式作用元件结合, 犹如一个开关被打开一样, *rd17*、*rd29A*、*kin1*、*erd10*、*cor6.6*、*cor15a* 等相应的胁迫耐受基因得到表达, 最终使植物的抗逆性获得增强^[12]。据 Seki^[19]研究, DREB1A 的超表达将激活至少 40 个逆境应答基因的表达, 其产物包括一些转录调控因子、糖转运蛋白、碳水化合物代谢相关蛋白、胚胎发育晚期丰富蛋白、冷诱导蛋白、渗透保护生物合成蛋白等, 通过这些基因产物的表达以及协同作用综合提高植物对逆境的抵抗能力。所以 DREB 类转录因子在基因的表达调控方面起着非常重要的作用。

低温诱导获得可溶性蛋白的量增多, 可以避免由于蛋白变性、复性引起的蛋白活性丢失, 有利于蛋白的纯化、维持目的蛋白的天然空间结构和保持蛋白的活性。DREB1A 蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中是以包涵体的形式存在, 可能是由于表达速度太快, 蛋白表达量过高的缘故; 也可能是由于大肠杆菌内还原性过高导致二硫键不能正确形成, 从而使表达产物不溶。据此可以降低 IPTG 浓度, 从而降低表达速度, 也可以使用基本培养基有助于可溶性表达; 或者将表达菌株更换为 Novagen 的促进二硫键形成与溶解性增强的 *E. coli* Rosetta-gamiTM 2 菌株, 希望得到的蛋白以可溶的形式和有活性的形式出现。

本研究从拟南芥中克隆了 DREB1A 转录因子基因, 成功构建了 DREB1A 基因的原核表达载体, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达获得了 DREB1A 蛋白, 这为以后更广泛深入的研究工作奠定了基础。但是, 如何获得可溶形式和有活性形式出现的蛋白, 还需进一步摸索和验证。

参考文献:

- [1] 刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构和调控作用 [J]. 科学通报, 2000, 45(14): 1465-1474.
- [2] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plant [J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 247-273.
- [3] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K, Bohnert H J. Plant cellular and molecular responses to high salinity [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 463-499.
- [4] Thomas H M F. Plant cold acclimation; freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 571-599.
- [5] Chandler P M, Roberson M. Gene expression regulated by abscisic

- acid and its relation to stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant physiolol Plant Mol Biol*, 1994, **45**: 113 - 141.
- [6] Schenk P M, Kazan K, Wilson L, Anderson J P, Richmond T, Somerville S C, Manners J M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 11655 - 11660.
- [7] Shinwari Z K, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250**: 161 - 170.
- [8] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, **10**: 1391 - 1406.
- [9] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, **6**: 251 - 264.
- [10] Jofuku K D, den Boer B G, van Montagu M, Okamuro J K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2 [J]. *Plant Cell*, 1994, **6**: 1211 - 1225.
- [11] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 173 - 182.
- [12] 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用 [J]. *科学通报*, 2000, **45** (1): 11 - 16.
- [13] 王平荣, 邓晓建, 高晓玲, 陈静, 万佳, 姜华, 徐正君. DREB 转录因子研究进展 [J]. *遗传*, 2006, **28** (3): 369 - 374.
- [14] Drobyshev A L, Zasedatelev A S, Yershov G M, Mirzabekov A D. Massive parallel analysis of DNA-Hoechst 33258 binding specificity with a generic oligodeoxyribonucleotide microchip [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (20): 4100 - 4105.
- [15] Krylov A S, Zasedateleva O A, Prokopenko D V, Rouviere Y J, Mirzabekov A D. Massive parallel analysis of the binding specificity of histone-like protein HU to single-and double-stranded DNA with generic oligodeoxyribonucleotide microchips [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: 2654 - 2660.
- [16] Church G M, Bulyk M L, Choo Y. Analysis of Binding Interactions: International Patent Application, WO 02/18648 A2 [P/OL]. 2002-03-07. http://the_brain.bwh.harvard.edu/PCT2002.pdf.
- [17] 萨姆不鲁克 J, 拉赛尔 D W 著. 分子克隆实验指南 (第 3 版) [M]. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 布伦特 R, 穆尔 D D, 塞德曼 J G, 斯特拉尔 K, 史密斯 J A 著. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [19] Seki M, Narusaka M, Yamaguchi-Shinozaki K, Caminie P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. *Arabidopsis encyclopedia using full-length cDNAs and its application* [J]. *Plant physiology and Biochemistry*, 2001, **39**: 211 - 220.

更 正

本刊 2007 年第 25 卷第 3 期第 267 页右半栏, 李志能作者文章的“结果与分析”部分;

- (1) 第 16 行 “ $A_{260/280}$ 值约为 1.9”, 改为 “ $A_{260/280}$ 值约为 1.75”;
- (2) 第 18 行 “产量分别为 186 $\mu\text{g/g}$ 和 198 $\mu\text{g/g}$ ”, 改为 “产量分别为 166 $\mu\text{g/g}$ 和 178 $\mu\text{g/g}$ ”。
- 特此更正。