



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103626856 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 12

(21) 申请号 201210305931. 3

C12N 1/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 24

C12N 15/11 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

C12N 15/82 (2006. 01)

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路 1 号院
2 号

C12N 15/84 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

(72) 发明人 张劲松 陈受宜 王晓红 张万科
马彪 林晴 何锬洁

(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 5/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

转录因子 AtGT4 及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种转录因子 AtGT4 及其编码基因与应用。本发明提供的所提供的蛋白，是具
有下述氨基酸残基序列之一的蛋白质：(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
个或多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，发现了一种基因，其具有
耐盐性，对于培育耐逆植物品种，特别是培育耐非
生物胁迫(耐盐)的作物、林草等新品种具有重要
价值，可用于农牧业和生态环境治理所需的耐逆
性植物品种的培育和鉴定，对提高农作物产量具
有重要意义。

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 所述蛋白的基因。

3. 如权利要求 2 所述的基因,其特征在于:所述基因是如下(1)-(4)中任一一的 DNA 分子:

(1) 序列表中序列 1 所示的 DNA 分子;

(2) 序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 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 所述编码基因的重组载体、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 1 所述蛋白的编码基因插入表达载体中,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 所述基因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 所述编码基因或权利要求 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;

所述调节植物耐逆性具体为提高植物耐逆性或降低植物耐逆性;所述耐逆性具体为耐盐性;

所述植物具体为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物进一步具体为拟南芥。

8. 一种培育转基因植物的方法,为将权利要求 1 所述蛋白的编码基因导入目的植物,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:所述耐逆性为耐盐性;

权利要求 1 所述蛋白的编码基因通过权利要求 4 或 5 所述的重组载体导入目的植物;

所述目的植物具体为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物进一步具体为拟南芥;

所述耐盐性进一步具体通过提高存活率体现。

10. 一种降低植物耐逆性的方法,是降低目的植物中权利要求 1 所述蛋白编码基因的表达,得到耐逆性低于所述目的植物的植物;

所述耐逆性为耐盐性;所述耐盐性低于所述目的植物具体体现在莲座直径小于所述目的植物;

所述目的植物为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物一步具体为拟南芥。

转录因子 AtGT4 及其编码基因与应用

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 AtGT4 及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 环境中物理、化学因素的变化,例如干旱、盐碱、低温等胁迫因素对植物的生长发育具有重要影响,严重时会造成农作物大规模减产,因此培育耐逆性高的作物是种植业的主要目标之一。目前,应用基因工程技术进行育种已经成为提高作物耐逆性的重要方法之一。高等植物细胞具有多条途径应答环境中的各种逆境胁迫,其中转录因子起着调控耐逆相关效应基因表达的作用。现已在植物中发现了多类与植物耐逆性相关的转录因子,例如:EREBP/AP2 中的 DREB 类, bZIP, MYB 等等。Trihelix 转录因子是植物特有的一类转录因子家族。Trihelix 转录因子因其蛋白质结构中的 DNA 结合域有 3 个 α -螺旋 (helix-loop-helix-loop-helix) 而得名。该蛋白家族的成员根据其 DNA 结合元件的特异性而划分为 3 个蛋白亚家族,即 GT-1, GT-2 和 GT-3 (Ayadi et al., 2004, Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in Arabidopsis, FEBS Letters 562, 147-154, 2004)。就蛋白质结构中 DNA 结合域数目而言, GT-1 类和 GT-3 类仅在其 N 端有一个 trihelix 域,而 GT-2 类蛋白则具有两个 trihelix 域,分别位于 C 端和 N 端。Trihelix 转录因子调控光应答基因的表达,也参与叶与花器官的正常发育 (Brewer et al., 2004, PETAL LOSS, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the Arabidopsis flower, Development 131, 4035-4046)。

[0003] 目前已发现大豆 Trihelix 转录因子在植物耐受非生物胁迫机制中发挥作用 (Xie ZM, Zou HF, Lei G, Wei W, Zhou QY, Niu CF, Liao Y, Tian AG, Ma B, Zhang WK, Zhang JS*, Chen SY* (2009) Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic arabidopsis. PLoS ONE, . 2009 Sep; 4:4 (9) e6898), 拟南芥中的此类家族与耐逆的相关性尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种转录因子 AtGT4 及其编码基因。

[0005] 本发明所提供的蛋白, 名称为 AtGT4, 来源于 (Arabidopsis thaliana cv Columbia-0, Col-0), 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] 上述耐逆具体为耐盐。

[0009] 其中, 序列表中的序列 2 由 372 个氨基酸残基组成。

[0010] 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。

[0011] 编码上述蛋白 AtGT4 的基因 AtGT4 也属于本发明的保护范围。

[0012] 编码上述蛋白 AtGT4 的基因如下 (1)-(4) 中任一种的 DNA 分子：

[0013] (1) 序列表中序列 1 所示的 DNA 分子；

[0014] (2) 序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0015] (3) 在严格条件下与 (1) 或 (2) 限定的 DNA 序列杂交且编码植物耐逆性相关蛋白的 DNA 分子；

[0016] (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% 同源性且编码植物耐逆性相关蛋白的 DNA 分子。

[0017] 上述耐逆具体为耐盐。

[0018] 上述基因中, 所述严格条件可为如下: 50℃, 在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50℃, 2×SSC, 0.1%SDS 中漂洗; 还可为: 50℃, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50℃, 1×SSC, 0.1%SDS 中漂洗; 还可为: 50℃, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50℃, 0.5×SSC, 0.1%SDS 中漂洗; 还可为: 50℃, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50℃, 0.1×SSC, 0.1%SDS 中漂洗; 还可为: 50℃, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 65℃, 0.1×SSC, 0.1%SDS 中漂洗; 也可为: 在 6×SSC, 0.5%SDS 的溶液中, 在 65℃ 下杂交, 然后用 2×SSC, 0.1%SDS 和 1×SSC, 0.1%SDS 各洗膜一次。

[0019] 其中, 序列表中的序列 1 由 1119 个脱氧核苷酸组成, 本序列为 AtGT4 基因的读码框, 编码具有序列表中序列 2 的氨基酸残基序列的蛋白质。

[0020] 含有上述编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌均属于本发明的保护范围。

[0021] 上述重组载体在本发明的实施例中具体为将上述编码基因 (序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸所示的 DNA 分子) 插入表达载体 pCambia1302 的 BamHI 和 HindIII 识别位点间得到的重组载体。

[0022] 扩增所述基因全长或其任意片段的引物对也属于本发明的保护范围。

[0023] 上述引物对在本发明的实施例中具体可为如下 1) 或 2)：

[0024] 1) 由序列表的序列 3 所示 DNA 和序列表的序列 4 所示 DNA 组成的引物对；

[0025] 2) 由序列表的序列 3 所示 DNA 和序列表的序列 5 所示 DNA 组成的引物对。

[0026] 上述蛋白或其编码基因或上述重组载体、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是本发明保护的范畴。

[0027] 上述应用中, 所述调节植物耐逆性具体为提高植物耐逆性或降低植物耐逆性；

[0028] 所述耐逆性具体为耐盐性；

[0029] 所述植物具体为双子叶植物或单子叶植物, 所述双子叶植物进一步具体为拟南芥。

[0030] 本发明的第二个目的是提供一种培育转基因植物方法。

[0031] 本发明提供的方法是为将所述蛋白的编码基因导入目的植物, 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。

[0032] 在上述方法中,所述耐逆性为耐盐性;上述蛋白的编码基因通过上述的重组载体导入目的植物;

[0033] 上述目的植物为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物进一步具体为拟南芥,在本发明的实施例中采用的是哥伦比亚生态型拟南芥(Col-0);

[0034] 上述耐盐性进一步具体通过提高存活率体现。

[0035] 本发明的第三个目的是提供一种降低植物耐逆性的方法。

[0036] 本发明提供的方法,是降低目的植物中上述蛋白编码基因的表达,得到耐逆性低于所述目的植物的植物;

[0037] 所述耐逆性为耐盐性;所述耐盐性低于所述目的植物具体体现在莲座直径小于所述目的植物;

[0038] 所述目的植物为双子叶植物或单子叶植物,所述双子叶植物一步具体为拟南芥,在本发明的实施例中采用的是哥伦比亚生态型拟南芥(Col-0)。

[0039] 上述方法中的耐逆性低于所述目的植物的植物为 T-DNA 插入突变体 gt4,购自 ABRC, ABRC 编号:salk_095404。

[0040] 上述的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。将所述基因导入目的植物,会使所述蛋白质目的植物中合成,进而是目的植物的耐逆性性状得到改良。

[0041] 上述基因可先进行如下修饰,再导入宿主中,以达到更好的表达效果:

[0042] 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,在保持本发明所述核苷酸序列编码的氨基酸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%,优选为多于 45%,更优选为多于 50%,最优选多于约 60%;

[0043] 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;

[0044] 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;

[0045] 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。

[0046] 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)。

[0047] 在实际操作中,也可以将本发明基因进行细胞靶向定位。可利用本领域现有的技术实现。例如,将来源于靶向细胞器的靶基因序列与本发明基因序列融合,再导入植物细胞

中,就可定位了。

[0048] 携带有所述基因的表达载体可通过使用 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植物细胞或组织,并将转化的植物组织培育成植株。

[0049] 本发明的实验证明,本发明在拟南芥中发现一个新基因 AtGT4,该基因的表达受高盐、300mM 甘露醇模拟干旱和低温诱导,因此 AtGT4 可能与植物对非生物逆境应答的调控相关。将 AtGT4 导入拟南芥 Col0 中,获得了过量表达 AtGT4 基因的纯系株系,将该转基因株系与野生型拟南芥和 AtGT4 的突变体 gt4 相比,其耐盐性有显著提高,而突变体 gt4 的耐盐性则较对照显著下降。说明 AtGT4 基因的过量表达显著提高了植物的耐盐性。从而说明该基因 AtGT4 参与植物对高盐胁迫应答的调控,为培育耐盐植物品种,特别是培育耐盐作物、林草等新品种具有重要价值,可用于农牧业和生态环境治理所需的耐盐植物品种的培育和鉴定,对提高含盐土壤中的作物产量具有重要意义。

[0050] 下面结合附图及实施例对本发明做进一步说明。

附图说明

[0051] 图 1 为 AtGT4 基因在不同处理时的表达模式

[0052] 图 2 为植物表达载体 pCAMBIA1302-AtGT4 的示意图

[0053] 图 3 为 AtGT4 过表达转基因植株的分子鉴定

[0054] 图 4 为 AtGT4 突变体 gt4 的分子和耐盐性鉴定

[0055] 图 5 为 AtGT4 过表达株系、突变体与对照的耐盐性比较

[0056] 图 6 为 AtGT4 过表达株系、突变体和对照经盐胁迫后的存活率统计

具体实施方式

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 下述实施例中的%,如无特殊说明,均为质量百分含量。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,数据为三次重复实验的平均值或平均值 $\pm$ 标准差。

[0060] 所有植物材料均生长于 22° C 每天的光照为 16h/8h(光照 / 黑暗)。

[0061] pCAMBIA1302 载体记载在 Lim HS, Ko TS, Lambert KN, Kim HG, Korban SS, Hartman GL, Domier LL. Soybean mosaic virus helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean. Plant Physiol Biochem. 2005 Oct-Nov; 43(10-11):1014-21, 公众可以从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。

[0062] 农杆菌 GV3101 菌株记载在 Clough-SJ, Bent-AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant-Journal. 1998, 16:6, 735-743 中,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。

[0063] 哥伦比亚生态型拟南芥 (Col-0): 种子购自 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), 以下简称野生型拟南芥。

[0064] 所有植物材料均生长于 22-25° C 每天的光照为 16h/8h (光照 / 黑暗)。

[0065] 实施例 1、大豆 AtGT4 及其编码基因的筛选及其 cDNA 的克隆

[0066] 1、拟南芥 AtGT4 及其编码基因的获得

[0067] 前期的研究表明大豆 Trihelix 类转录因子家族中某些成员参与植物对非生物胁迫的应答反应, 并与植物耐逆性相关, 例如 GmGT2A 和 GmGT2B 等(Xie ZM, Zou HF, Lei G, Wei W, Zhou QY, Niu CF, Liao Y, Tian AG, Ma B, Zhang WK, Zhang JS, Chen SY, Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic arabidopsis. PLoS ONE, 2009Sep;4:4(9)e6898)。通过 Blast 搜索拟南芥基因组数据库, 聚类了拟南芥 Trihelix 类基因, 共有 26 个, 应用 Rt-PCR 方法鉴定了 26 个基因在非生物胁迫, 包括高盐、低温和干旱下的表达特征, 其中 9 个基因的表达受至少一种非生物胁迫的诱导。选取 9 个诱导表达基因中的 AtGT4 作进一步研究。AtGT4 具有序列表中序列 1 的核苷酸序列, 由 1119bp 组成, 编码具有序列表中序列 2 的氨基酸残基的蛋白, 该蛋白命名为 AtGT4, 序列表中序列 2 由 372 个氨基酸残基组成。

[0068] 根据 AtGT4 基因序列设计引物:

[0069] AtGT4F:5' -CGGGATCCATGTTTGTTCGATAAC-3', (序列 3)

[0070] AtGT4R:5' -GGGGTACCCCTCTCATTCTCTGTATAAG-3' (序列 4)

[0071] 应用 RT-PCR 方法, 从拟南芥总 RNA 中扩增 AtGT4 基因, 具体方法如下:

[0072] 取野生型拟南芥叶片, 置于液氮中研碎, 悬于 4mol/L 硫氢酸胍中, 并用酸性苯酚、氯仿抽提, 向上清中加入无水乙醇进行沉淀, 最后将沉淀溶于水中得到总 RNA。取 5 μ g 总 RNA 用反转录试剂盒 (Promega 公司) 按试剂盒的方法进行反转录, 以得到的 cDNA 片段为模板进行 PCR 扩增反应。20 μ l PCR 反应体系为: 1 μ l 一链 cDNA (0.05 μ g)、1 μ l 引物 (20 μ M)、2 μ l 110 $\times$ PCR 缓冲液、0.4 μ l dNTP (10mM) 和 1U Taq DNA 聚合酶, 用超纯水补足 20 μ l, 液面覆盖液体石蜡油。反应在 PE9600 型 PCR 仪上进行, 其程序为 94°C 变性 5min; 再 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min, 共 30 - 32 个循环; 然后 72°C 延伸 10min; 4°C 保存。所获得的 PCR 产物约 1100bp。经回收后序列分析表明, 该 PCR 产物的大小为 1119bp, 具有序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸, 即为 AtGT4 基因。

[0073] 将上述 PCR 产物克隆于 pMD18-T 质粒的多克隆位点, 得到重组载体 pMDAtGT4, 并且测序验证构建成功。

[0074] 2、AtGT4 基因在非生物胁迫下的表达特征

[0075] 对野生型拟南芥进行 300mM 甘露醇模拟的干旱、200mM NaCl 和 0°C 低温处理, 用于分析拟南芥 AtGT4 在非生物胁迫下的表达特征。将拟南芥种子种在盆中, 生长 2 星期后, 对幼苗分别进行下述胁迫处理:

[0076] 干旱处理: 将拟南芥幼苗的根系置于 300mM 甘露醇水溶液中, 分别在光照条件下干旱培养 0 小时、1 小时、3 小时、6 小时和 12 小时后取样。

[0077] 盐处理: 将拟南芥幼苗的根系置于 200mM NaCl 水溶液中, 分别在光照培养 0 小时、1 小时、3 小时、6 小时和 12 小时后取样。

[0078] 低温处理: 将拟南芥幼苗置于 0°C 培养箱中, 分别在光照培养 0 小时、1 小时、3 小时、6 小时和 12 小时后取样。

[0079] 总 RNA 的提取上述 1。应用 RT-PCR 分析 AtGT4 基因在上述处理时的转录特征, 所

用引物同上述。结果如图 1 所示,1A 中从左到右依次为盐处理、干旱处理、低温处理下 AtGT4 基因的 RT-PCR 扩增;1B 为盐处理后 AtGT4 基因的相对表达量;1C 为干旱处理后 AtCT4 基因的相对表达量;可以看出,随着不同的处理时间,AtCT4 基因的表达有变化,表明 AtGT4 参与植物对非生物胁迫的应答反应,可能与植物的耐逆性相关。

[0080] 实施例 2、AtCT4 的应用

[0081] 一、转 AtGT4 拟南芥株系(过量表达 AtGT4 拟南芥株系)的获得

[0082] 1、重组表达载体 pCAMBIA1302-AtCT4 的构建

[0083] 从野生型拟南芥中提取总 RNA,反转录得到 cDNA 为模板(也可以序列 1 为模板),用 Primer-F+ 和 Primer-R- 作为引物进行 PCR 扩增,获得约 1.1Kb 的 PCR 产物,经测序鉴定该 PCR 产物具有序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸。

[0084] Primer-F+:5'-CGGGATCCATGTTTGTTCGATAAC-3'(序列 3,下划线为 BamH I 位点)

[0085] Primer-R-:5'-CCCAAGCTTCTCATTCTGTATAAG-3'(序列 5,下划线为 HindIII 位点)

[0086] 将上述 PCR 产物经 BamH I 和 HindIII 双酶切,得到的该酶切产物与经过同样酶切植物表达载体 pCAMBIA1302 得到的载体骨架连接,得到连接产物。将连接产物转入大肠杆菌中,得到转化子。提取转化子的质粒,送去测序,该质粒为将序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸插入 pCAMBIA1302 的 BamH I 和 HindIII 酶切位点之间得到的载体,将该载体命名为 pCAMBIA1302 - AtGT4,且序列表中序列 1 自 5' 末端第 1-1116 位核苷酸位于 CaMV35S 启动子之后。重组表达载体 pCAMBIA1302 - AtCT4 结构示意图如图 2 所示。

[0087] 2、转 AtCT4 拟南芥株系的获得及鉴定

[0088] 将重组载体 pCAMBIA1302 - AtGT4 用电击转化法导入农杆菌 GV3101 中,得到重组菌,提取重组菌的质粒,测序,结果为该质粒为 pCAMBIA1302 - AtGT4,含有该质粒的重组菌命名为 GV3101/pCAMBIA1302-AtGT4。

[0089] 挑取 GV3101/pCAMBIA1302 - AtGT4 的单菌落在 5ml LB 培养基中,于 28℃ 培养 8 小时,再转接到 200ml LB 中继续培养 3 小时,收菌后重悬于 LB 培养基中得到转化液。将野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col-0 的花浸泡于转化液中 10 秒,取出后放入 MS 培养基中避光培养 8 小时,获得 T₀ 代转化种子,将其播于含卡那霉素(50mg/L)的 MS 培养基上,获得 54 株过表达的 T₀ 代转 AtGT4 拟南芥。

[0090] 提取上述 54 个单株 T₀ 代转 AtGT4 拟南芥植株叶的 RNA,并反转录获得 cDNA,进行 Real Time PCR 鉴定,探针为:

[0091] AtGT4-Real+:5'-CGGGATCCATGTTTGTTCGATAAC

[0092] AtGT4-Real-:5'-GGGGTACCCCTCTCATTCTGTATAAG

[0093] 以野生型拟南芥(col-0)为对照。

[0094] 结果如图 3 所示,可以看出,在 54 个转基因株系中,有 53 个株系的 GmGT4 的相对表达量明显大于野生型对照,为阳性 T₀ 代转 AtGT4 拟南芥;筛选 2 个 T₀ 代转 AtGT4 拟南芥株系命名为 GT4-3 和 GT4-47 作进一步研究。

[0095] 将 T₁ 单株收获种子,此为 T₂ 代种子,各单株种子分别播种,用卡那霉素继续筛选以观察 T₂ 代的分离情况,如此重复筛选,直至 T₃ 代获得遗传稳定的转基因株系,共获得稳定遗传的转 AtGT4 基因株系。其中包括用以进行进一步实验的 T₃ 代转 AtGT4 拟南芥 GT4-3 和

T₃ 代转 AtGT4 拟南芥 GT4-47。

[0096] 采用同样的方法将空载体 pCambia1302 转入野生型拟南芥中,得到 T₀ 代转空载体拟南芥,采用上述引物进行鉴定,未得到目标片段,说明该 T₀ 代转空载体拟南芥构建正确;播种筛选如此重复直至得到 T₃ 代转空载体拟南芥。

[0097] 二、AtGT4 突变体 gt4 的分子及耐盐性鉴定

[0098] T-DNA 插入突变体 gt4 购自 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC 编号:salk_095404,已经证明仅 AtGT4 基因失活,其他基因与野生型一致)。

[0099] 将野生型拟南芥和 gt4 突变体种子在培养皿生长 2 周后移栽(生长于 22° C 每天的光照为 16h/8h(光照/黑暗))至盆中待开花后,取全株提取 RNA 做 RT-PCR 鉴定。引物同 Primer-F+ (序列 3) 和 Primer-R- (序列 5)。

[0100] 结果如图 4A 所示,突变体 gt4 中未能检测出 AtGT4 基因的转录,进一步验证该突变体为 AtGT4 基因的突变。

[0101] 将萌发后 5 天的野生型对照和突变体 gt4,分别置于含 0、100、125 和 150mM NaCl 的 MS 培养基中培养,各处理 15 株,生长 18 天后统计莲座直径。

[0102] 表型观察结果如图 4B 所示,可以看出,随着 NaCl 的浓度增加,突变体 gt4 的生长明显差于野生型。

[0103] 统计莲座直径结果如图 4C 所示,在正常条件下生长(未含 NaCl 的 MS 培养基)的野生型对照和突变体莲座直径分别约为 1.63cm 和 1.7cm;在含有 125mM NaCl 的 MS 培养基中野生型对照和突变体莲座直径分别约为:1.0cm 和 0.78cm;在 150mM NaCl 的 MS 培养基中野生型对照和突变体莲座直径分别约为 0.95cm 和 0.63cm;结果表明,盐胁迫下,突变体莲座直径明显小于对照。

[0104] 三、转 AtGT4 拟南芥株系的耐盐鉴定

[0105] 实验样本为作为对照的野生型拟南芥 Col0、T₃ 代纯系转 AtGT4 拟南芥 GT4-3、T₃ 代纯系转 AtGT4 拟南芥 GT4-47、T₃ 代转空载体拟南芥和 AtGT4 突变体 gt4。每个株系 15 粒种子。

[0106] 将各个株系植株的种子同时播种在 MS 平板上,萌发后 10 天后将幼苗分别移栽到含有 0、125mM 和 150mM NaCl 的蛭石中生长 35 天,比较表型。

[0107] 表型观察结果如图 5 所示,A 为正常条件生长的各个株系(0mM NaCl),B 为 125mM 和 150mM NaCl 的蛭石生长的各个株系;可以看出,正常条件下各株系的生长无显著差异。在 NaCl 处理后,各株系的幼苗生长均受到严重抑制,突变体萎蔫严重,对照次之,而 AtGT4 过表达株系基本仍然存活。

[0108] 存活率统计结果如图 6 所示,正常条件下(0mM NaCl),各株系存活率均约为 100%,在 125mM NaCl 处理时,GT4-3、GT4-47、gt4 和 Col0 的存活率分别约为 56%、59%、8%、48%,当蛭石中 NaCl 浓度为 150mM 时,GT4-3、GT4-47、gt4 和 Col0 的存活率分别约为 50%、38%、0% 和 27%。结果表明,过表达株系(T₃ 代纯系转 AtGT4 拟南芥)在高盐胁迫下的存活率显著或极显著高于对照,而突变体 gt4 的存活率极显著低于对照。

[0109] T₃ 代转空载体拟南芥和野生型拟南芥结果无显著差异。

[0110] 上述结果表明 AtGT4 基因的表达与植物的耐盐性相关,其过表达明显提高了转基因植株的耐盐性。

[0001]

序列表

<110>中国科学院遗传与发育生物学研究所

<120>转录因子 AtGT4 及其编码基因与应用

<160>5

<210> 1

<211> 1119

<212> DNA

<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 1

```

atgtttgttt ccgataacaa caatccttca cgggacataa acatgatgat cggcgatggt    60
acatcaaaacg gagatctaca gccacaccag atcatcctcg gagaaagcag tggaggagag    120
gatcatgaga tcatacaaac accaaagaaa cgagcagaga catgggcaca agacgagact    180
cgaaacctaa tctcattacg gagagaaatg gacaatcttt tcaacacttc caaatctaac    240
aaacatctct gggacacagat ttctaagaaa atgagagaga aagggtttga togatcacca    300
tctatgtgta cggacaagtg gaggaacata ttgaaagagt ttaagaaaac taagcaaat    360
gaagataaag caacaagtgg aggatcaacg aagatgtctt attacaatga gattgaagat    420
atthtcagag aaagaaagaa gaaagtggca ttctataaga gtctgtgtac tactacacca    480
tctctgtgta aagttgattc ctttatgcaa ttacagata aagggtttga agatactggg    540
atttcattta catctgttga agctaattgg aggccaacgc taaatcttga aacggagctt    600
gatcatgatg gtctctctct cccattgtgt gctgatecca tcacagcaaa tggagttoct    660
ccttgaattt ggagagacac ccttgaaat ggcttgatg gtcagccatt tgcctggagg    720
atcataacgg tgaattttgg agattacaca agacgagttg ggattgatgg tactgtgtaa    780
gcaattaagg aagcatcag atccgcgttt agattgagaa caagacgagc tttttggcta    840
gaagatgaag aacaggttat tgcctctctt gaccgagaca tgcctttagg gaactatata    900
ctccgcattg atgaagggat agcgtttaga gtgtgccact atgatgaato tgcctcggtt    960
ccagtccttc aagaggagaa gatattctac accgaagaag attacgaga tttcttggct    1020
cgacgaggat ggacatgtct gagagagttt gacgcgtttt aaaacataga caatattggc    1080
gagcttcaat ccggtcgctt atacagagga atgagatga    1119

```

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213>拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 2

Met Phe Val Ser Asp Asn Asn Asn Pro Ser Arg Asp Ile Asn Met Met

1

5

10

15

[0002]

Ile Gly Asp Val Thr Ser Asn Gly Asp Leu Gln Pro His Gln Ile Ile
20 25 30

Leu Gly Glu Ser Ser Gly Gly Glu Asp His Glu Ile Ile Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Lys Arg Ala Glu Thr Trp Ala Gln Asp Glu Thr Arg Thr Leu Ile
50 55 60

Ser Leu Arg Arg Glu Met Asp Asn Leu Phe Asn Thr Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Lys His Leu Trp Glu Gln Ile Ser Lys Lys Met Arg Glu Lys Gly Phe
85 90 95

Asp Arg Ser Pro Ser Met Cys Thr Asp Lys Trp Arg Asn Ile Leu Lys
100 105 110

Glu Phe Lys Lys Ala Lys Gln His Glu Asp Lys Ala Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ser Thr Lys Met Ser Tyr Tyr Asn Glu Ile Glu Asp Ile Phe Arg Glu
130 135 140

[0003]

Arg Lys Lys Lys Val Ala Phe Tyr Lys Ser Pro Ala Thr Thr Thr Pro
145 150 155 160

Ser Ser Ala Lys Val Asp Ser Phe Met Gln Phe Thr Asp Lys Gly Phe
165 170 175

Glu Asp Thr Gly Ile Ser Phe Thr Ser Val Glu Ala Asn Gly Arg Pro
180 185 190

Thr Leu Asn Leu Glu Thr Glu Leu Asp His Asp Gly Leu Pro Leu Pro
195 200 205

Ile Ala Ala Asp Pro Ile Thr Ala Asn Gly Val Pro Pro Trp Asn Trp
210 215 220

Arg Asp Thr Pro Gly Asn Gly Val Asp Gly Gln Pro Phe Ala Gly Arg
225 230 235 240

Ile Ile Thr Val Lys Phe Gly Asp Tyr Thr Arg Arg Val Gly Ile Asp
245 250 255

Gly Thr Ala Glu Ala Ile Lys Glu Ala Ile Arg Ser Ala Phe Arg Leu
260 265 270

Arg Thr Arg Arg Ala Phe Trp Leu Glu Asp Glu Glu Gln Val Ile Arg

[0004]

275	280	285
Ser Leu Asp Arg Asp Met Pro Leu Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Asp		
290	295	300
Glu Gly Ile Ala Val Arg Val Cys His Tyr Asp Glu Ser Asp Pro Leu		
305	310	315 320
Pro Val His Gln Glu Glu Lys Ile Phe Tyr Thr Glu Glu Asp Tyr Arg		
325	330	335
Asp Phe Leu Ala Arg Arg Gly Trp Thr Cys Leu Arg Glu Phe Asp Ala		
340	345	350
Phe Gln Asn Ile Asp Asn Met Asp Glu Leu Gln Ser Gly Arg Leu Tyr		
355	360	365
Arg Gly Met Arg		
370		

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

[0005]

<400> 3

cgggatccat gtttgtttcc gataac

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 4

ggggtagccc tctcattcct ctgtataag

29

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 5

cccaagcttt ctcattoctc tgtataag

28

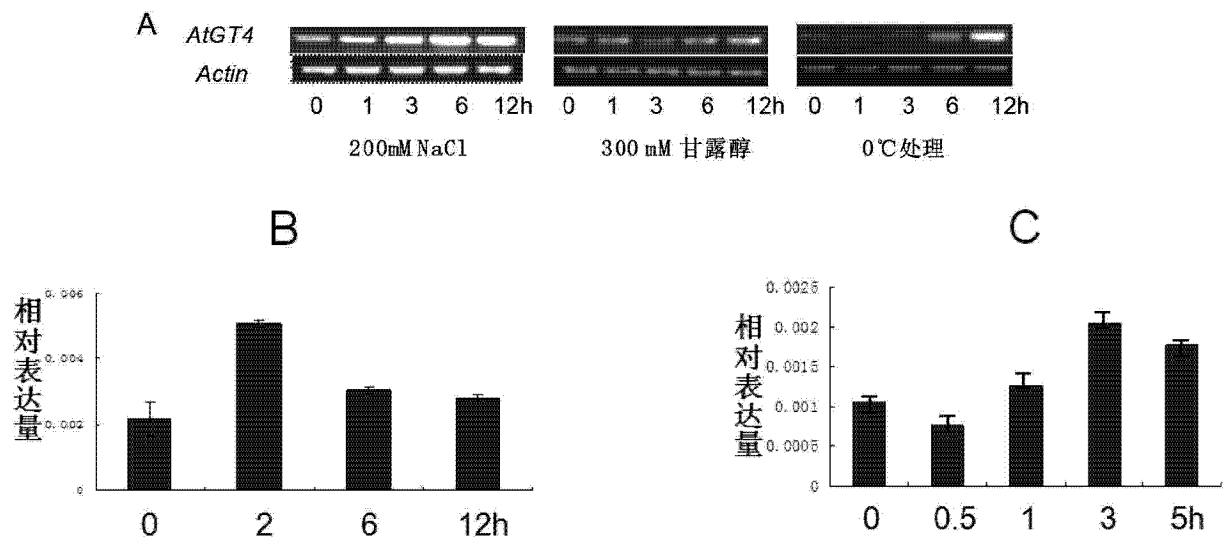


图 1

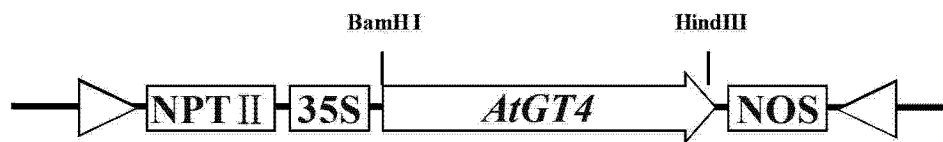


图 2

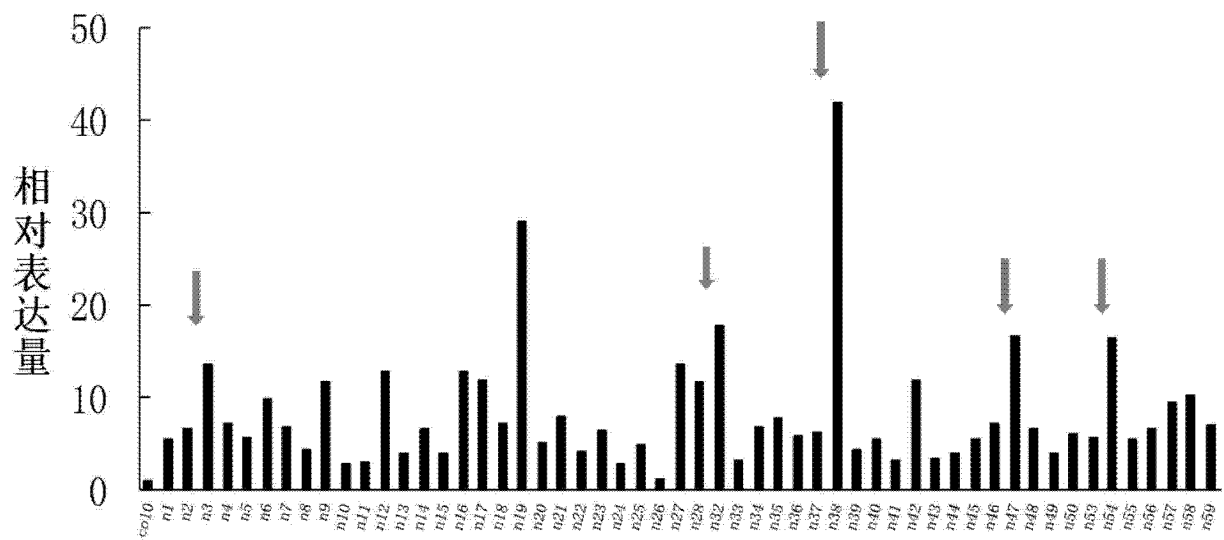


图 3

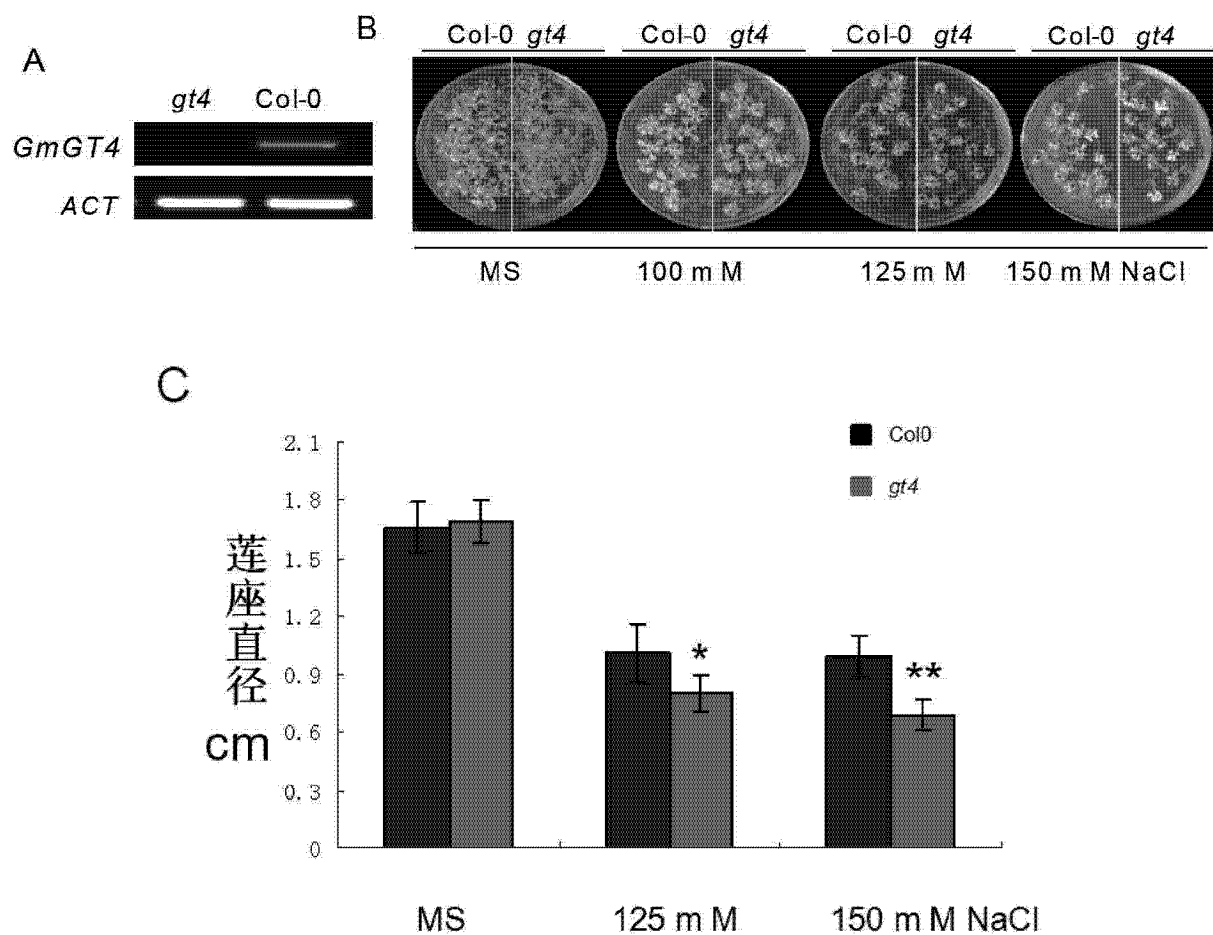


图 4

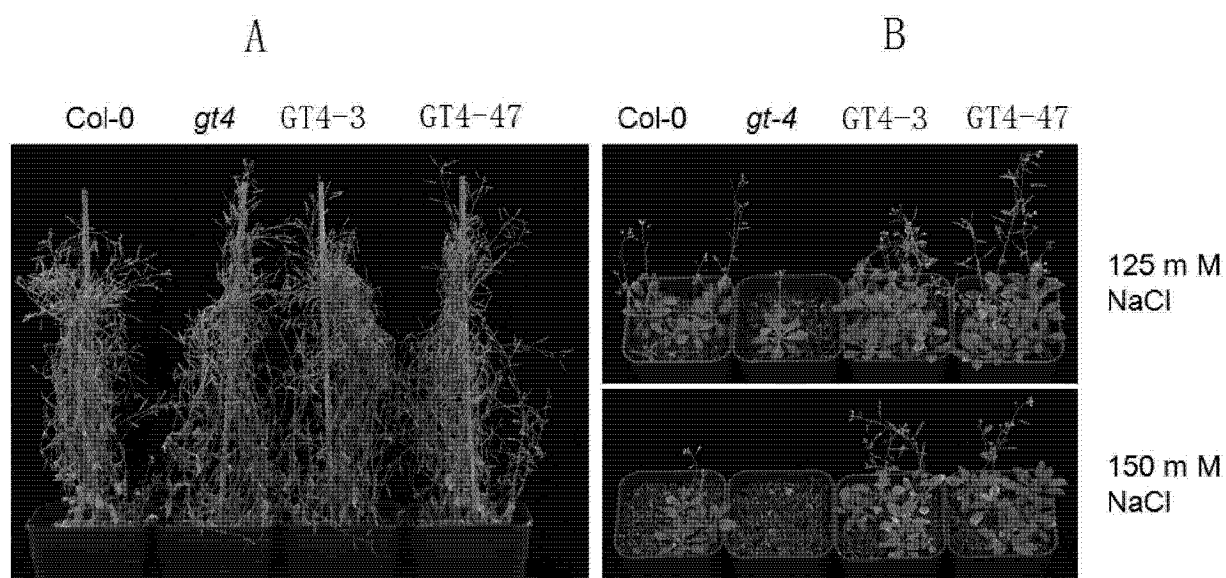


图 5

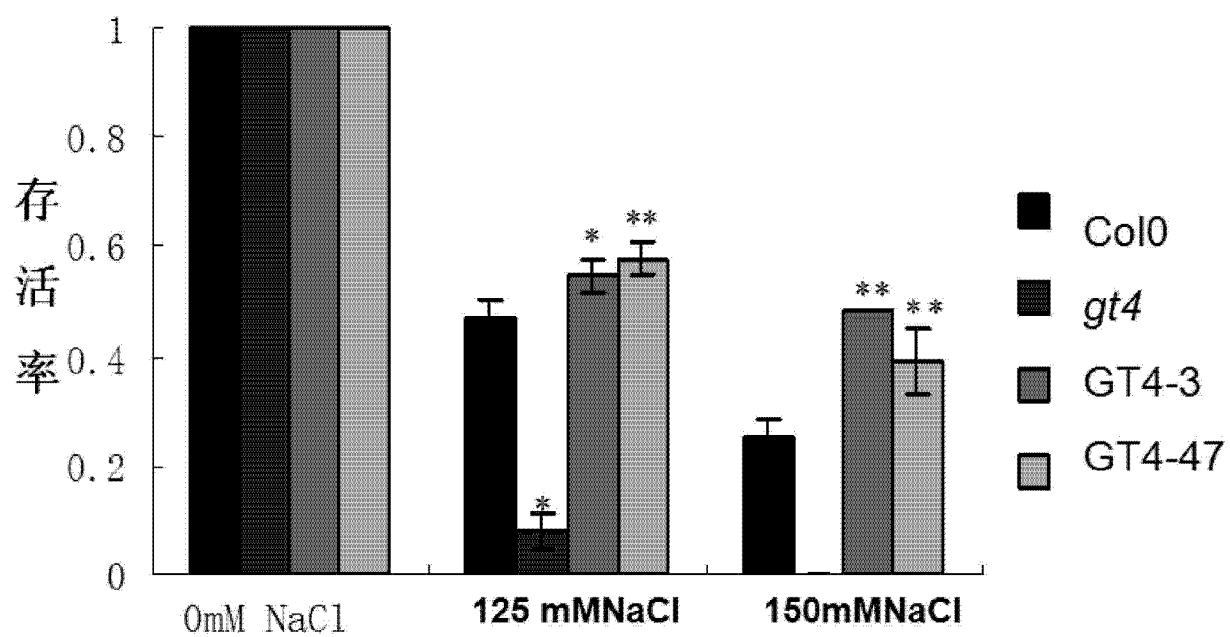


图 6