

小麦叶片内几个抗冷相关基因 cDNA 片段的克隆

康国章, 岳彩凤, 沈丙权, 刘超, 王永华, 郭天财*
(河南农业大学 国家小麦工程技术研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 运用 RT-PCR 法, 从小麦叶片中克隆出 SOD、CAT、APX、GR、CBF、GI 等几个抗冷相关基因的 cDNA 片段, 序列比对结果显示, 这些基因与 GenBank 上已登录的大麦、小麦、玉米、水稻等相关基因的同源性较高, 表明克隆出了上述几个小麦抗冷相关基因, 其中的 APX 和 GR 为普通小麦中首次报道。

关键词: 小麦; 抗冷基因; 克隆

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)05-0020-04

Cloning of Some Genes Related to Cold-tolerance in Wheat Leaves

KANG Guo-zhang, YUE Cai-feng, SHEN Bing-quan,
LIU Chao, WANG Yong-hua, GUO Tian-cai*

(Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Partial cDNA sequences of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), C-repeat binding factor (CBF) and GIGANTEN (GI) were isolated from wheat leaves using RT-PCR. Sequence analysis showed that these genes had high identity to relevant genes from wheat, barley, maize and rice registered in GenBank, implying that these cloned fragments were really the cold-tolerant genes. Among them, APX and GR were firstly isolated from common wheat (*Triticum aestivum* L.).

Key words: *Triticum aestivum* L.; Cold-tolerant genes; Cloning

小麦是一种越冬作物, 相对于其他主要作物(水稻、玉米等)而言, 其抗冷性(抗寒性与抗冻性)较强, 故有关小麦抗冷性的研究较少。但近年来, 冬季极端严寒和春季倒春寒等低温灾害性天气频繁出现, 加上抗冷性较差的春性与弱春性小麦品种种植面积的不扩大, 使低温对小麦生产造成越来越大的影响, 因此, 深入研究小麦冷害机理并提高其抗冷性具有重要意义^[1]。

在低温胁迫下, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等在清除细胞内积累的活性氧(O_2^- 、 $^{\circ}OH$ 、 H_2O_2 等)过程中发挥着重要作用^[2]; 谷胱甘肽还原酶(glutathione

reductase, GR)则调控了谷胱甘肽的合成, 也具有清除活性氧的作用^[3]; CBF 转录因子(C-repeat binding factor)则在低温胁迫下能激活下游含有 CRT/DRE (C-repeat/Dehydration responsive element)顺式作用元件的冷调节(COR, cold-regulated)基因的表达^[4]。此外, 一些研究认为, 小麦的抗低温能力还与春化进程有关, GI(GIGANTEN)基因参与了小麦与大麦的低温春化过程^[5]。

本研究克隆了小麦叶片中 SOD、CAT、APX、GR、CBF、GI 等几个抗冷基因的 cDNA 片段, 旨在为从分子水平上研究这些基因在小麦抗冷过程中的作用奠定基础。

收稿日期: 2008-10-24

基金项目: 中国博士后科学基金(20060390773); 河南省教育厅自然科学基金(2006210007)

作者简介: 康国章(1971-), 男, 河南伊川人, 博士, 主要从事作物分子生理研究。E-mail: zkang_g@163.com

通讯作者: 郭天财(1953-), 男, 河南济源人, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦高产栽培生理研究。E-mail: gmzx-guo@371.net

1 材料和方法

在 2006 年冬季严寒来临期间(12 月 26 日), 取抗寒性较强小麦品种豫农 949 的幼嫩心叶, 液氮速冻并研磨成粉末状, 用 Trizol 法提取总 RNA, cDNA 合成参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit(MBI 公司)操作步骤进行。

根据 GenBank 上的大麦 APX(AJ006358)、一粒小麦 SOD(TAU72212)、大麦 GR(AY364467)、小麦 CBF(A Y785901)、小麦 GI(A Y679114)和小麦 CAT(X94352)基因的核苷酸序列设计引物对(引物均由北京奥科生物技术有限公司合成)。APX: 5'-GCCCTCTTGTGGAGAAATA-3' 和 5'-CTGACAGCGTTCAAGGTAT-3'(扩增片段预期为 250 bp); SOD: 5'-GAAGCACCACGCCACCTAG-3' 和 5'-CCAACACGCGGAACTCAA-3'(扩增片段预期为 580bp); GR: 5'-AGATGAGAACGTTGTGG-3' 和 5'-TTGGGTTGAACTTGATGTG-3'(扩增片段预期为 498bp); CAT: 5'-CCACCACAACAACCAC-TACGA-3' 和 5'-TGCCGATAAGAGG-GAAGAAC-3'(扩增片段预期为 437bp); GI: 5'-GCTACCTCCGCCGACAA-3' 和 5'-CAGCAAT-ACCAGCCCTC-3'(扩增片段预期为 311bp); CBF: 5'-GGACAACCGATGACGAG-3' 和 5'-TCACAATGAACGAGCACA-3'(扩增片段预期为 332bp)。

PCR 扩增体系: 10×PCR 缓冲液 3μL、10mmol/L dNTP 0.6μL、10μmol/L 引物各 1μL、2U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5μL、cDNA 模板 1μL、无菌双蒸水 21.9μL。PCR 扩增程序: 95℃变性 5min; 95℃50s, 56℃1min, 72℃1.5min, 30 个循环; 72℃延伸 10min。

将获得的 PCR 产物纯化后, 经 T₄(MBI 公司)连接酶与 pMD20-T(大连宝生物公司)连接后, 转化大肠杆菌 DH5α, 经菌落 PCR 和质粒酶切鉴定为阳性的单克隆进行测序, 重复 3 次。

将上述阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)上进行同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 小麦叶片抗冷相关基因的克隆

由图 1 可见, 所提取小麦叶片总 RNA 的 28S、

18S 和 5S 3 条带完整清晰, 且 28S 的亮度是 18S 的 2 倍左右, 表明所提取总 RNA 完整性较好, 没有降解。紫外分光光度法测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值介于 1.8~2.0, 表明总 RNA 的纯度较高, 没有糖、蛋白质等污染。

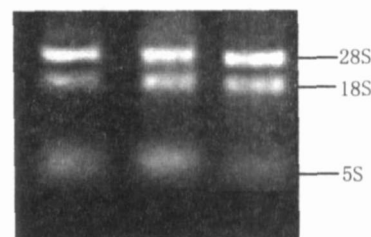
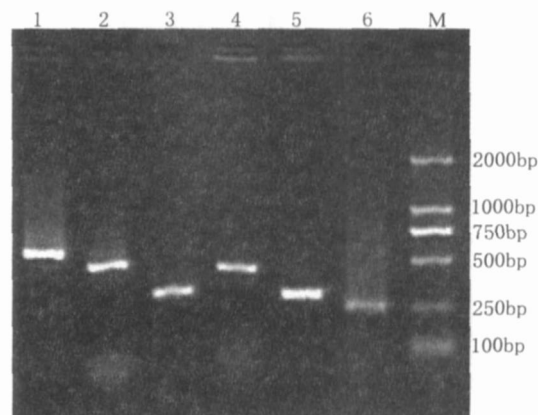


图 1 小麦叶片 RNA 的电泳

在 MMLV 反转录酶的作用下, 把上述总 RNA 反转录成 cDNA, 以此作模板, 用材料与方法中所设计的引物, 分别扩增小麦叶片中 SOD、GR、CAT、CBF、GI、APX 等基因的部分 cDNA 序列, 电泳结果显示扩增片段与预期长度相似(图 2)。将这些扩增产物进行纯化回收后连接到 pMD20-T 载体中, 并转化到 DH5α 大肠杆菌中进行菌落培养, 挑白斑进行菌落 PCR 检测, 对经检测无误的阳性菌斑进行摇菌后送至上海生物工程技术公司测序。



M: DNA 分子量标准; 泳道 1、2、3、4、5 和 6 分别代表 TaSOD、TaGR、TaCAT、TaCBF、TaGI、TaAPX 基因的 cDNA 序列

图 2 小麦叶片中 TaSOD、TaGR、TaCAT、TaCBF、TaGI、TaAPX 基因 cDNA 片段的扩增

2.2 小麦抗寒基因的测序结果

测序结果显示, 扩增的小麦叶片 SOD、GR、CAT、CBF、GI、APX 基因的长度分别为 581bp、500bp、437bp、319bp、311bp 和 251bp, 与预期结果基本相同, 暂命名为 TaSOD、TaGR、TaCAT、TaCBF、TaGI 和 TaAPX(图 3)。

TaSOD:

GAAGCACCAC GCCACCTACG TCGCCAATA CAACAAGGCG CTCGAGCAGC TCGACGCCG CGTCGCCAAG GGGGACGCGT
CCGCCGTCGT CCACCTCCAG AGCGCCATCA AGTTCAACGG CGCGGTCAT GTTAACCATT CAATCTTCTG GAAGAACCTC
AAGCCTATCA GTGAGGGTGG TGGTGAAGCA CCTCATGGCA AACTTGCTG GGCATTGAT GAGGATTTTG GTTCTATTGA
GAAACTTATA AAGAAGATGA ATGCAGAGGG TGCTGCTTTA CAAGGATCTG GATGGGTGTG GCTTGCTTTG GATAAAGAGG
CCAAAAGGCT TTCAGTTGAA ACTACTCCTA ATCAGGACCC TCTTGAGACC AAAGGGTCAA ACCTGCATCC TTTGTTGGGA
ATTGATGTCT GGGAGCATGC GTACTACCTG CAGTACAAGA ACGTGAGGCC GGACTACCTG ACCAACATCT GGAAGGTGGT
GAACTGGAAG TATGCTGGAG AAGAGTATGA AAAAGTGCTT GCGTGATTG TCTGATGAGT AGACAGACAG TACTTGCTC
GCTCTTGAGT TTCCCGCTGT T

TaGR:

TAGATGAGAA CGGTTGTGGC AAGTAACCTT GAAGGAAGGG GAATCCGATT GCATCCAGGG ACAAATTGA CTGAGTTGAG
TCAAACAGCC GATGCATTA AGTTGTGAC AGATAAGGA GATGAGCTCA TTGCAGATGT TGTCTTTTT GCCACAGGTC
GTGCGCCGAA CTCGAATAGG CTGAACCTGG AAGCTGTTGG TGTGAGGTT GATCAAATAG GAGCCATCAA GGTGATGAA
TACTCCCGTA CATCAGTTCC AAGTATATGG GCTGTGGGTG ATGTAACAAA TCGGATTAAC CTAACACCTG TTGCTCTGAT
GGAGGCTACT TGCTTCGCTA AAAGTGTGT TGGTGGCCAG ACAGTTAAGC CTGATTATA AGATGTACCT TGTGCTGTTT
TCTGCATTCC ACCGCTATCT GTCGTCGGAC TCAGCGAACA AGAGGCTTTG GCGGAAGCCA AGAATGATCT TCTTGTTTAC
ACATCAAGTT TCAACCCAAA

TaCAT:

CCACCACAAC AACCACTACG ACGGGCTCAT GAATTCATG CACCGCGACG AGGAGGTGCA CTAATTCCC TCCAGGTTCC
ACCCCGCCAA GCACGCGCC CGCTACCCCA TCCCTCCC CACCTCAAC GGCGCCGCG AGAAGACGGT GATCGAGAAG
GAGAACAAC TCAAGCAGCC CGGGGAGAGG TACCGCTCCA TGGACCCGGC AAGGCAGGAG CGATTTCATCA ACAGATGGAT
CGATGCGCTG TCCGACCCCG GCTCACCCA CGAGATCAAG GCCATCTGGC TCTCCTACTG GTCTCAGGCT GACAAGTCTC
TCGGCCAGAA GCTCGCGTTC CGTCTCAGCT CGAAGCCGAG CATGTAAGAT CAGTCCATGG AGTGCGCAAA TCAGAAATCT
GCTTCAGGGC CGTCCAAGTT CTTCCTCTT ATCGGCA

TaCBF:

GGACAACCGA TGACGAGAAG GAAATCGATG GCTCGCCGGC GCCGAGCGCC CTGTCCATGT CCAGCGAGCT GTTGAATGAG
CACTGGTTTG GCGGCATGGA TGCCGGATCG TGCTACTCGG AGTTCATGGA GTCGCCGAC ACCAGACCGT GCGGGGAAGA
CTTTGAGCTC GGTGCGCTG AGACACCGCC ATGGAGCTAC TTGTTGACT AAGCAGTTAA AAGTTTTAG ACGGTTTCTC
TGCTTCTGTT CCACCAATA TGGAGGAAA CAGAAGGGAA TATTTTCCC ATATGTCCAT ATGTGCTCGT TCATTGTGA

TaGI:

GCTACCTCCG CCGACAACAC CCTTGATGA GCATTGCTG GCAGGGCTAC CCCCTCTCGA ACCATACGCT CGTTGTTTC
ATAGATACTA CGCAATTGCC ACACCAAGTG CTACGCAAAG ATTGCTTTTT GGTCTTCTTG AAGCACCACC GTCATGGCT
CCAGATGCAC TTGATGCAGC AGTTCAGCT GTTGAATCC TTCGGGCAGC TGAATAATTAT GCTACTGGCA TCGGCTTCC
AAAAAATTGG TTGCATCTTC ATTTCTTGGC TGGGATTGGA ACTGCAATGT CTATGAGGGC TGGTATTGCT G

TaAPX:

GCCCTCTTGT GGAGAAATAT GCTCGGATG AGAAGGCTTT CTTTGAGGAC TACAAGGAGG CACACCTCAG GCTCTCGAA
CTGGGGTACG CTGAAGCATA AGAGGCGTGT CTACTACTGC TGCTACTATG TGCGATCAGA GTGATCTTGT TCTGCGTCTA
GACTAGGGGT CAGTATGGAC CAGCAGACTG CTAAGTAATC TTCTCCGTAA TAATGTCCGT TGGCTTGAGG CCATACCTTG
AACGCTGTCA G

图 3 克隆的小麦叶片的 TaSOD、TaGR、TaCAT、TaCBF、TaGI、TaAPX 基因的核苷酸序列

2.3 克隆基因序列的同源性比较分析

将上述所测序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 上进行同源性比较,结果显示,所克隆的 TaSOD 与 AF092524 (小麦)、U72212 (小麦)、AK210543 (大麦)、L19463 (玉米)、L34039 (水稻)和 L19461 (玉米)等的同源性分别为 97%、97%、95%、89%、88%和 87%。TaCAT 与 D86327 (小麦)、AK248618 (大麦)、X54819 (玉米)等的同源性分别为 97%、94%、87%。

TaAPX 与 AK251765 (大麦)、AJ006358 (大麦)、AF411227 (大麦)、BT017015 (玉米)和 EF495352 (谷子)的同源性分别为 94%、94%、94%、68%和 62%。且此 TaAPX 为普通小麦中首次报道。

TaGR 与 AY364467 (一粒小麦)、AK251978 (大麦)、AB277097 (大麦)和 AB063249 (大麦)等的同源性分别为 99%、96%、95%和 95%。且此 TaGR 为普通小麦中首次报道。

TaCBF 与 AY951948 (一粒小麦)、EF02877 (小

麦)、EU076382(一粒小麦)、DQ151545(大麦)和DQ095159(大麦)的同源性分别为100%、99%、100%、91%和91%的同源性。

TaGI 与 AY679115(小麦)、AF411229(大麦)AY740523(大麦)、BK006299(玉米)和 DQ534010(黑麦草)的同源性分别为99%、98%、97%、89%和92%。

3 结论

运用 RT-PCR 法,从普通小麦品种中克隆出 SOD、CAT、APX、GR、CBF 和 GI 等几个抗冷相关基因的 cDNA 片段,测序结果经 Blast 比较,发现与已报道的大麦、小麦、玉米、水稻等禾本科作物上相应基因的同源性较高,表明克隆出了目的基因。下一步的工作是研究低温胁迫期间,这些基因在不同抗冷性的小麦品种间表达,以探讨这些基因在小麦抗冷过程中的作用。此外,SOD、CAT、APX、GR 和 CBF 等在植物抗干旱、高温、盐渍等逆境胁迫中也发挥着重要作用^[6,7],因此,这些基因的克隆也为从分子水平上研究它们在小麦干旱、高温、盐渍等逆境胁迫中的作用奠定了一定基础。

参考文献:

[1] 赵广才.小麦冬春冻害的影响及对策[J].作物杂志,

2007(6): 85—86.

- [2] Prasad T K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance; changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities [J]. Plant J, 1996, 10: 1017—1026.
- [3] Kocsy G, Brunner M, Rueggsegger A, et al. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivity to chilling [J]. Planta, 1996, 198: 365—370.
- [4] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P. Overexpression of *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 1854—1865.
- [5] Dunford R P, Griffiths S, Christodoulou V, et al. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) homologue of the *Arabidopsis* flowering time regulator GIGANTEA [J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 925—931.
- [6] 武维华. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 426—461.
- [7] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(3): 287—291.

(上接第 19 页)

- [32] Benson L L, Lamboy W F, Zimmerman R H. Molecular identification of *Malus hupehensis* (tea crabapple) accessions using simple sequence repeats [J]. HortSci, 2001, 36(5): 961—966.
- [33] 张靖国. 湖北海棠遗传多样性的 SSR 分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [34] 宋烨, 翟衡, 姚玉新, 等. 苹果加工品种遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 139—144.
- [35] Malliepaard C, Alston F H, van Arkel G, et al. Aligning male and female linkage map of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allele marker [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97(12): 60—73.
- [36] Kenis K, Keulemans J. Genetic linkage maps of two apple cultivars based on AFLP and microsatellite markers [J]. Mol Breed, 2005, 15: 205—219.
- [37] Silfverberg-Silworth E, Matasci C L, van Kaauwen M P, et al. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome [J]. Tree Genetics & Genomes, 2006, 2(4): 202—224.
- [38] Hemmat M, Weeden N F, Conner P J, et al. A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a

simple sequence repeat [J]. J Am Soc Hortic Sci, 1997, 12: 347—349.

- [39] 田义轲, 王彩虹, 戴洪义, 等. 与苹果 Co 基因紧密连锁的 RAPD 标记的筛选及 SCAR 标记转换 [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 919—925.
- [40] Patocchi A, Bigler B, Koller B, et al. Vr2: a new apple scab resistance gene [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1087—1092.
- [41] James C M, Clarke J B, Evans K M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene Pfd in apple [J]. Theor Appl Genet, 2004, 110(1): 175—181.
- [42] Cevik King J. High resolution genetic analysis of the Sd-1 resistance locus in *Malus* spp [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105(23): 346—354.
- [43] King G J, Alston F H, Brown L M, et al. Multiple field and glasshouse assessments increase the reliability of linkage mapping of the source of scab resistance in apple [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 699—708.
- [44] 姚玉新, 翟衡, 赵玲玲, 等. 苹果果实酸/低酸性状的 SSR 分析 [J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 244—248.