

网络出版时间:2017-03-31 16:08

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.05.024

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170331.1608.048.html

拟南芥抗寒基因 *ICE1* 的克隆及功能分析

刘 双,陈沼汀,董昭旭,孙国旭,李 晖,关淑艳

(吉林农业大学 植物生物技术中心,吉林 长春 130118)

[摘 要] 【目的】从野生型拟南芥中克隆抗寒基因 *ICE1*,通过农杆菌介导法将 *ICE1* 基因转到烟草中,对其功能进行研究。【方法】以三叶一心期拟南芥幼苗为材料,提取其总 RNA,通过 RT-PCR 扩增得到 *ICE1* 基因的完整开放阅读框序列;构建以抗除草剂 *Bar* 基因为筛选标记的植物表达载体 pCAMBIA3301-*ICE1*,通过农杆菌介导法转入到烟草中,对阳性植株进行 PCR 检测和生化指标测定,并对 *ICE1* 基因在转基因烟草植株中的表达特征进行分析。【结果】成功克隆了拟南芥抗寒基因 *ICE1*,其完整开放阅读框长 1 485 bp。系统进化树表明,拟南芥 *ICE1* 基因与其他物种的 *ICE1* 基因差别较大。用农杆菌介导法得到 4 株阳性烟草植株,Southern blotting 检测证明,*ICE1* 基因已经以单拷贝的形式整合到烟草基因组中。实时荧光定量 PCR 检测表明,*ICE1* 基因在转基因烟草植株的根、茎和叶片中均有表达,且在叶片中的相对表达量最高。4 ℃低温环境下,与未转化植株相比,转 *ICE1* 基因烟草植株叶片的相对电导率降低了 12.00%~17.65%,脯氨酸含量增加了 13.28%~24.10%,丙二醛含量减少了 7.09%~14.52%,过氧化物酶活性提高了 9.39%~22.54%。【结论】克隆获得了拟南芥 *ICE1* 基因的完整开放阅读框序列,在烟草中转入 *ICE1* 基因可提高其耐寒性。

[关键词] *ICE1* 基因;植物表达载体;耐寒性

[中图分类号] S572;Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)05-0175-08

Cloning and functional analysis of *Arabidopsis thaliana* cold resistance gene *ICE1*

LIU Shuang, CHEN Zhaoting, DONG Zhaoxu, SUN Guoxu, LI Hui, GUAN Shuyan

(Plant Biotechnology Center, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】The cold resistance gene *ICE1* from wild type *Arabidopsis thaliana* was cloned and transferred to tobacco by Agrobacterium mediated method for function analysis. 【Method】The *Arabidopsis thaliana* seedlings were used to extract the total RNA, and the *ICE1* gene was amplified by RT-PCR for the development of the reading frame sequence. The recombinant plant expression vector pCAMBIA3301-*ICE1* was constructed and transferred into tobacco through Agrobacterium mediated transformation. PCR detection, physiological and biochemical indexes were used to detect the expression characteristics of *ICE1* gene in transgenic tobacco plants. 【Result】*ICE1* was cloned from *Arabidopsis thaliana* successfully and the length of its complete open reading frame was 1 485 bp. Phylogenetic tree showed that the *ICE1* gene of *Arabidopsis thaliana* was different from other species. A total of 4 positive plants were obtained by Agrobacterium mediated method and the gene was integrated into the tobacco genome in single copy way by Southern blotting. The mRNA of *ICE1* existed in root, stem and leaf of the transferred tobacco based on real time fluorescent quantitative PCR assay (qRT-PCR). The expression of *ICE1* in leaves

[收稿日期] 2016-03-04

[基金项目] 吉林省省级粮食生产发展专项资金项目(2015001);吉林农业大学启动基金项目(201242)

[作者简介] 刘 双(1990—),女,吉林长春人,硕士,主要从事作物生物技术研究。E-mail:995025619@qq.com

[通信作者] 关淑艳(1971—),女,吉林长春人,教授,博士,主要从事生物技术与基因工程研究。E-mail:458194095@qq.com

was the most abundant. Compared with the non-transformed plants under low temperature environment (4 °C), and the relative conductivity of transgenic tobacco was reduced by 12.00%–17.65%. The proline content was increased by 13.28%–24.10%, MDA content was reduced by 7.09%–14.52%, and peroxidase activity was increased by 9.39%–22.54%. 【Conclusion】 The *ICE1* gene of *Arabidopsis thaliana* was cloned and the sequence of open reading frame was obtained. The transfer of *ICE1* gene can improve the cold resistance of tobacco.

Key words: *ICE1* gene; plant expression vector; cold tolerance

低温冷害是影响植物生长和发育的重要非生物胁迫逆境形式,在植物中转入一个抗逆相关的转录因子可以调控一系列抗逆相关功能基因的表达,较单个功能基因更加有效。早在 1998 年, Gilmour 等^[1]推测,植物细胞中存在一种 *CBF* 基因表达诱导物 *ICE* (inducer of *CBF* expression), 其对 *CBF*/*DREB1* 基因的表达起重要调控作用。*ICE1* 基因 cDNA 全长为 2 046 bp, 其中包括长度为 1 485 bp 的开放阅读框序列, 编码蛋白质含有 494 个氨基酸, 分子质量为 53.5 ku。*ICE1* 基因编码一种 bHLH 蛋白, 在整个 bHLH 基因家族中的编号为 bHLH116^[2]。*ICE1* 的磷酸化、脱磷酸化、泛素化或类泛素化等转录后的修饰过程对 *ICE1* 蛋白活性至关重要。*HOS1* (high expression of osmotically responsive genes) 泛素 E3 连接酶可作用于 *ICE1*, 并对其进行蛋白酶降解, 这对 *ICE1* 的活性起着负调控作用^[3]。在植物遭受冷胁迫时, *SIZ1* SUMO E3 连接酶对 *ICE1* 蛋白的 K393 氨基酸进行类泛素化, 抑制了 *ICE1* 的降解, 对 *ICE1* 的活性起到了正调控作用^[4]。

常温条件下 *ICE1* 基因在植物体内以钝化形式存在, 无法激活转录, 但当植物遭受低温胁迫时, 则被激活, 能够调控 *CBF*/*DREB1* 基因与 *DRE*/*CRT* 元件结合, 形成 *ICE1*-*CBF*/*DREB1*-*COR* 级联反应, 提高植物自身的抗寒性^[4]。本试验从拟南芥中克隆得到植物抗寒转录因子 *ICE1*, 并构建了以抗除草剂 *Bar* 基因为筛选标记的植物表达载体 pCAMBIA3301-*ICE1*, 通过农杆菌介导的叶圆盘法转化烟草, 以期对提高烟草抗寒性及研究烟草的抗逆机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 野生型拟南芥、烟草、大肠杆菌 DH5 α 菌株、农杆菌 EHA105 菌株、克隆载体 pMD-18T 和基础表达载体 pCAMBIA3301, 均由吉林农业大学植物生物技术中心提供与保存。

1.1.2 试验试剂及仪器 PCR 扩增试剂、DNA Marker、*Nco* I、*Bst*E II、*Bam*H I, MBI 公司; 无缝连接试剂盒, CE Design 公司; λ *Hind* III DNA Marker, 百奥莱博公司; DIG DNA Labeling and Detection Kit I 试剂盒, 罗氏公司; SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒, TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯。Mx 3000P 荧光定量 PCR 仪, 吉泰生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥 *ICE1* 基因的克隆 将拟南芥种子在 4 °C 冰箱中春化 3 d, 取出后用体积分数 70% 酒精消毒 2 min, 再用体积分数 5% 次氯酸钠消毒 5 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 遍。吸干多余水分后, 将种子播种于 Ms 培养基中, 待其长至三叶一心时, 在 0 °C 环境下冷处理 12 h, 然后摘取拟南芥嫩叶提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 根据 GenBank 中拟南芥 *ICE1* 基因序列 (GenBank 登录号为 NM_113586.3) 和植物表达载体 pCAMBIA3301 序列, 设计 1 对带有载体同源臂的特异性引物 P1S 和 P1AS (表 1)。以 cDNA 为模板, 扩增目的基因编码区。PCR 反应体系为 20 μ L: 2 $\times$ Es Taq MasterMix 10 μ L, P1S 1 μ L, P1AS 1 μ L, cDNA 2 μ L, dd H₂O 6 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 后延伸 10 min。将 PCR 产物纯化回收, 然后与 pMD-18T 克隆载体连接, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 涂布于 LB-Amp 固体培养基, 随机挑取单克隆菌落至含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中摇菌过夜, 提取菌液质粒, 将检测结果为阳性的质粒送至长春库美公司测序。

1.2.2 拟南芥 *ICE1* 基因的进化树分析 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载芥菜 CBF1 诱导蛋白基因、芥蓝转录因子 *ICE1*、2 个预测芥蓝转录因子 *ICE1-like*、拟南芥转录激活因子、山嵛 *salsugineum* 蛋白基因、盐芥 mRNA、山嵛 *salsugineum* *ICE1-like*、菘蓝 CBF1 诱导蛋白基

因、白菜转录因子 *ICE1-like*、芥菜型油菜 *ICE1*、甘
蓝型油菜转录因子 *ICE1-like*、芜菁亚种羊草
ICE1、甘蓝型油菜 *ICE1* 和芜菁亚种羊草 *ICE4* 的

基因序列,利用 clustalx 1. 83 程序与拟南芥 *ICE1*
基因序列比对,用 MEGA 4 软件的邻接算法构建系
统进化树,Bootstrap 重复设为 1 000 次。

表 1 本研究所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	酶切位点 Enzyme cleavage site
P1S	<u>ACGGGGGACTCTTGACCATGGAGTTCAGACTTTGGGGTA</u>	下划线处为带有 <i>Nco</i> I 酶切位点及 pCAM- BIA3301 序列的同源臂序列 Underlined is the sequence of <i>Nco</i> I enzyme cleavage site and homologous arms with pCAMBIA3301
P1AS	<u>GGGGAAATTCTGAGCTGGTCACCTGCTTCAACAGATGCTTA</u>	下划线处为带有 <i>Bst</i> E II 酶切位点及 pCAM- BIA3301 序列的同源臂序列 Underlined is the sequence of <i>Bst</i> E II enzyme cleavage site and homologous arms with pCAMBIA3301
P2S	AGGTTTCAGACTTTGGGGTA	
P2AS	CTGCTTCAACAGATGCTTA	
P3BarS	TCAAATCTCGGTGACGGGC	
P3BarAS	ATGAGCCCAGAACGACGC	
P4S	TTAGTAGTAACCAACCACATC	
P4AS	GAGAACAAGAAGAAGAAGATC	
P5S	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	
P5AS	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC	

1.2.3 表达载体的构建与鉴定 pCAMBIA3301-
ICE1 的构建利用无缝克隆连接技术,以 P1S 和
P1AS 为引物扩增克隆载体质粒 pMD18T-ICE1,
PCR 反应体系与条件同 1. 2. 1。将表达载体
pCAMBIA3301 质粒用 *Nco* I 和 *Bst*E II 双酶切,37
℃反应 3 h,再 65 ℃反应 20 min 后终止。分别纯化
回收 PCR 产物和酶切产物,然后按照无缝连接试剂
盒体系说明,取载体酶切回收产物 50~200 ng,目的
片段 PCR 回收产物 10~50 ng,5×buffer 4 μL,连
接酶 2 μL,ddH₂O 补至 20 μL,37 ℃反应 30 min,0
℃反应 5 min。将连接产物转至大肠杆菌 DH5α 感
受态细胞中,涂布于 LB-Kan 固体培养基上,挑取单
菌落摇菌过夜,提取菌液质粒,进行 PCR 和双酶切
鉴定,将检测结果为阳性的质粒送至长春库美公司
测序。

1.2.4 农杆菌介导的烟草遗传转化 采用农杆菌
介导的叶圆盘法转化烟草,在无菌条件下将烟草叶
片切成 1 cm×1 cm 左右的大叶盘(去主脉,切边
缘),与 OD₆₀₀ 为 0. 4~0. 6 的含有重组质粒 pCAM-
BIA3301-ICE1 的农杆菌菌液混合,侵染时间为 8
min。在无菌滤纸上吸干菌液后将烟草叶片摆在预
培养基(MS+2 mg/L 6-BA+0. 2 mg/L IAA)中,
培养 2 d 后,转至筛选培养基(MS+2 mg/L 6-BA+
0. 2 mg/L IAA+100 mg/L Kan+100 mg/L Cb+
100 mg/L Bar+100 mg/L Cef)中;培养 15 d 后,将

生长正常的烟草转至分化培养基(MS+2 mg/L 6-
BA+0. 2 mg/L IAA+100 mg/L Bar)中;培养 15 d
后,切除畸形部分将烟草幼苗转至生根培养基(1/2
MS+100 mg/L Bar+100 mg/L Kan+125 mg/L
Cef)中;15 d 后移栽到土中,待其长至 5~6 叶时进
行分子检测与抗寒鉴定。

1.2.5 转基因烟草的检测 (1)PCR 检测。采取
CTAB 法^[5]提取烟草植株的基因组 DNA,以其为模
板进行 *ICE1* 基因和 *Bar* 基因的 PCR 检测,并以未
转化的受体烟草叶片基因组作为阴性对照,重组质
粒为阳性对照。使用 primer 5. 0 软件根据已知序列
分别设计引物 P2S、P2AS 和 P3BarS、P3BarAS(表
1),*ICE1* 基因 PCR 反应体系和条件同 1. 2. 1。*Bar*
基因的反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性
30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,32 个循环;72
℃后延伸 10 min。

(2)转基因植株的 Southern blotting 检测。提
取 PCR 检测为阳性的转化烟草植株叶片的基因组
DNA,用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切,以纯化的
ICE1 基因与含有生物素和 DIG 标记的 λ *Hind* III
DNA Marker 作为探针,使用 DIG DNA Labeling
and Detection Kit I 试剂盒,按照说明书进行
Southern blotting 检测。

(3)生理生化指标的测定。将阳性植株和受体
植株分别置于 4 ℃低温条件下处理 0,24,72 h 后,

先观察植株的生长情况,再测定植株叶片中的相对电导率、脯氨酸(Pro)含量、丙二醛(MDA)含量和过氧化物酶(POD)活性。3 次重复,取平均值。相对电导率测定采用王学奎^[6]的方法,Pro 含量测定采用茚三酮显色法,MDA 含量测定采用硫代巴比妥(TBA)比色法,POD 活性测定采用愈创木酚法^[6]。

(4)转基因植株的荧光定量 PCR 检测。将经 Southern blotting 检测为阳性的转基因植株于 4 ℃ 下处理 24 h,分别提取其根、茎和叶片的总 RNA,反转录成 cDNA,4 倍稀释备用。设计荧光定量 PCR 引物 P4 S 和 P4 AS(表 1)。选择肌动蛋白 β -actin 基因(GenBank 登录号:NM_001252731. 2)为内参基因,设计定量 PCR 引物 P5S 和 P5AS(表 1)。使用 Mx 3000P 荧光定量 PCR 仪对烟草根、茎和叶片组织总 RNA 进行分析。按照 SYBR Premix Ex TaqTM试剂盒说明操作,PCR 扩增体系为 20 μ L: 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 聚合酶 10 μ L,P4S 2 μ L,引物 P4AS 2 μ L,模板 2 μ L,无菌水补至 20 μ L。快速两步法 PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 反应 30 s,40 个循环。根据公式计算:每个样本间的差异倍数=2^{- $\Delta\Delta$ CT},分析目的基因

的相对表达量^[7]。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 ICE1 基因的克隆

以野生型拟南芥为材料,提取总 RNA(图 1),反转录成 cDNA 后,与 pMD-18T 克隆载体相连,以测序结果正确的 pMD18T-ICE1 质粒为模板,以 P1S、P1AS 为引物,扩增 ICE1 基因的编码区序列,获得了一条长 1 641 bp 的扩增条带,与预期结果一致。

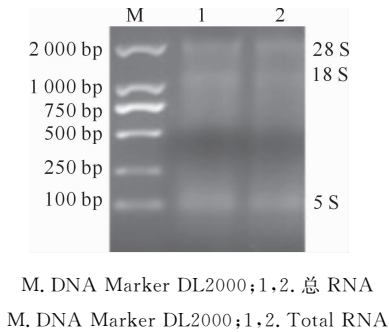
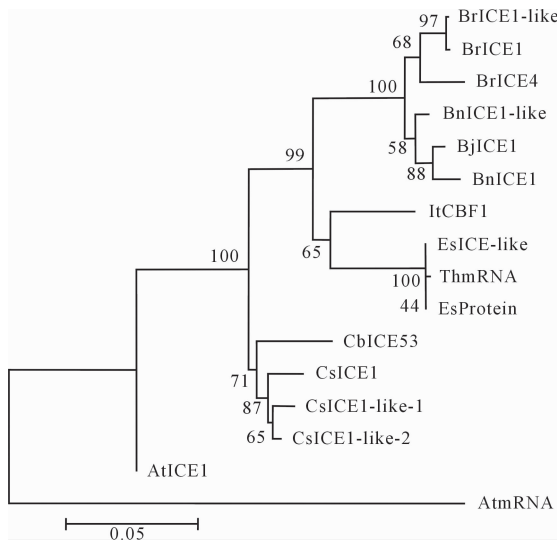


图 1 拟南芥 RNA 提取电泳图

Fig. 1 RNA extracted from *Arabidopsis thaliana*

2.2 拟南芥 ICE1 基因的进化树分析

拟南芥 ICE1 基因的进化树分析结果见图 2。



BrICE1-like. 白菜;BrICE1. 芜菁亚种羊草;BrICE4. 芜菁亚种羊草;BnICE1-like. 甘蓝型油菜;BjICE1. 芥菜型油菜;BnICE1. 甘蓝型油菜; ItCBF1. 菘蓝 CBF1 诱导蛋白;EsICE-like. 山嵛;ThmRNA. 盐芥 mRNA;EsProtein. 山嵛 salsugineum 蛋白;CbICE53. 芥菜 CBF1 诱导蛋白; CsICE1. 芥蓝;CsICE-like-1. 预测;芥蓝;CsICE-like-2. 预测;芥蓝;AtICE1. 拟南芥;tmRNA. 拟南芥转录激活因子

BrICE1-like. *Brassica*;BrICE1. *Brassica rapa* subsp. *chinensis*;BrICE4. *Brassica rapa* subsp. *chinensis*;BnICE-like. *Brassica napus*;BjICE. *Brassica juncea*;BnICE1. *Brassica napus*;ItCBF1. *Isatis tinctoria* cultivar Songlan 1 inducer of CBF expression 1 protein;EsICE-like. *Eutrema salsugineum*;ThmRNA. *Thellungiella halophila* mRNA;EsProtein. *Eutrema salsugineum* hypothetical protein;CbICE53. *Capsella bursa-pastoris* inducer of CBF expression 1 protein (ice53);CsICE1. *Camelina sativa*;CsICE-like-1. PREDICTED;*Camelina sativa*;CsICE-like-2. PREDICTED;*Camelina sativa*;AtICE1. *Arabidopsis thaliana*;AtmRNA. *Arabidopsis thaliana* mRNA for putative transcriptional activator

图 2 拟南芥与其他植物 ICE1 基因序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ICE1 gene from *Arabidopsis thaliana* and other plants

为检测拟南芥与其他植物中 *ICE1* 基因的亲缘关系,将其基因全长序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对并进行系统进化树分析,结果(图 2)表明,拟南芥与其他物种的 *ICE1* 基因差别较大。

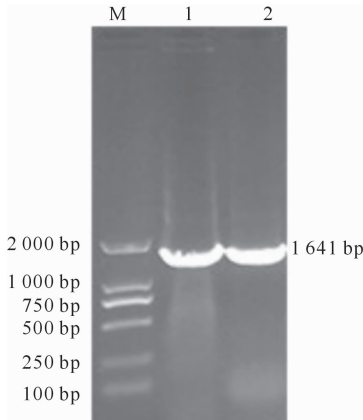
2.3 pCambia3301-ICE1 重组植物表达载体的构建及鉴定

以重组植物表达载体 pCambia3301-ICE1 质粒为模板,进行 PCR 检测(图 3)和 *Nco* I、*Bst*E II 双酶切验证(图 4),结果分别在 1 641 bp 处获得了特异性条带,质粒测序结果与 GenBank 中已发表的 *ICE1* 基因

完整开放阅读框序列相似度为 100%,表明已成功构建植物重组表达载体 pCambia3301-ICE1(图 5)。

2.4 农杆菌介导的烟草植株遗传转化

利用农杆菌介导法将重组质粒 pCAM-BIA3301-ICE1 导入受体材料烟草中,通过对烟草叶片的筛选培养(添加除草剂 *Bar* 基因)、分化培养和生根培养后,初步获得了具有抗除草剂 *Bar* 基因特性的抗性植株(图 6),待植株长至 4~5 叶时进行移栽,进一步对转化植株进行分子检测。

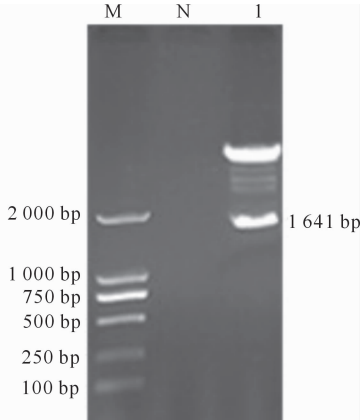


M. DNA Marker DL2000;1,2. 重组质粒

M. DNA Marker DL2000;1,2. Recombinant plasmid

图 3 PCR 检测重组载体 pCambia3301-ICE1

Fig. 3 PCR validation recombinant vector pCambia3301-ICE1



M. DNA Marker DL2000;N. 水;1. 重组质粒

M. DNA Marker DL2000;N. Water;1. Recombinant plasmid

图 4 双酶切检测重组载体 pCambia3301-ICE1

Fig. 4 Double enzyme digestion verified recombinant vector pCambia3301-ICE1

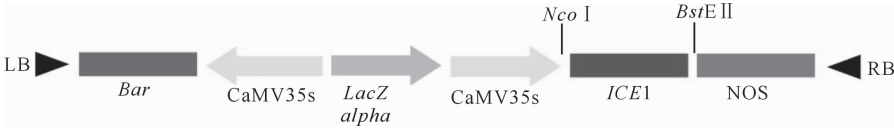
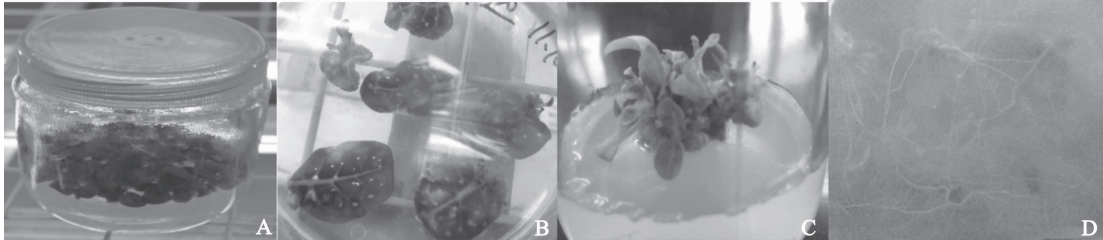


图 5 重组植物表达载体 pCambia3301-ICE1 的 T-DNA 区结构图

Fig. 5 T-DNA region structure of recombinant plant expression vector pCambia3301-ICE1



A. 野生型烟草种子的萌发培养;B. 除草剂 *Bar* 基因筛选培养;C. 分化培养;D. 生根培养

A. Germination cultivation of wild type tobacco seeds;B. Screening of herbicide *Bar* gene;C. Differentiation culture;D. Rooting culture

图 6 农杆菌介导的烟草植株遗传转化

Fig. 6 Genetic transformation of tobacco plants mediated by Agrobacterium

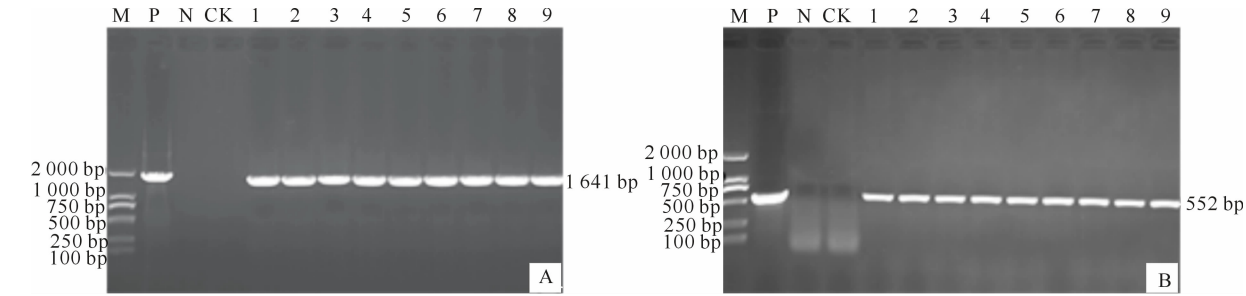
2.5 转基因植株的检测

2.5.1 转基因植株的 PCR 检测 将重组表达载体 pCambia3301-ICE1 转入野生型烟草受体材料,经

PCR 检测得到 9 株阳性植株,提取基因组 DNA,利用 *ICE1* 基因(图 7A)和抗除草剂 *Bar* 基因(图 7B)特异性引物进行 PCR 检测,以含重组表达载体

pCAMBIA3301-ICE1 的质粒 DNA 为阳性对照,未转化的烟草受体材料作为阴性对照,分别在1 641

bp 和 552 bp 处获得了目的条带。



M. DNA Marker DL2000;P. 阳性对照;N. 水;CK. 未转化植株基因组;1~9. 转基因阳性植株基因组

M. DNA Marker DL2000;P. Positive control;N. Water;CK. Non-transformed plant genome;1-9. Transgenic positive plant genome

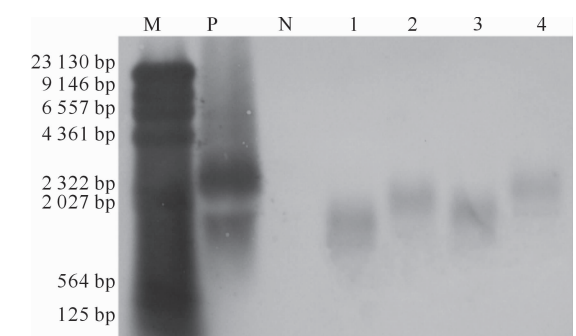
图 7 阳性烟草植株 ICE1 基因(A)与 Bar 基因(B)的 PCR 检测

Fig. 7 PCR detection of ICE1 gene (A) and Bar gene (B) in positive plants

2.5.2 阳性植株的 Southern blotting 检测 分别提取 PCR 检测为阳性的植株基因组 DNA,用限制性内切酶 BamH I 酶切 20 h,以 ICE1 基因与含有生物素和 DIG 标记的 λ Hind III DNA Marker 作为探针,进行 Southern blotting 检测,结果见图 8。如图 8 所示,未转化植株没有出现杂交信号,备测的 9 株转基因植株中有 4 株(分别为 1,2,7,9 株系)出现明显的杂交信号。这表明 ICE1 基因以单拷贝的形式整合到受体烟草基因组中,且整合位点不同。

2.6 转基因烟草植株的抗寒能力

2.6.1 抗寒能力的直观表现 将 1 株烟草阳性植株与 1 株野生型烟草植株置于 4 ℃ 低温环境下处理 0,24 和 72 h,发现阳性植株在低温环境下的萎蔫程度明显弱于未转化植株(图 9)。



M. λ Hind III DNA Marker;P. 阳性对照;N. 未转化植株基因组;1~4. 阳性植株基因组

M. λ Hind III DNA Marker;P. Positive control;N. Non-transformed plant genome;1-4. Transgenic positive plant genome

图 8 阳性烟草植株的 Southern blotting 检测

Fig. 8 Southern blotting detection of positive plants

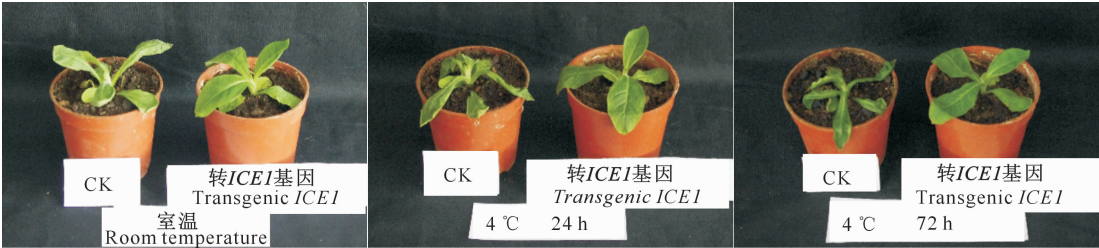


图 9 阳性烟草植株的耐寒能力鉴定

Fig. 9 Cold tolerance of tobacco plants

2.6.2 相关生理指标的变化 植物组织外渗液电导率的变化状况可以反映细胞膜受伤害的状况和植株对逆境抗性的强弱,植物受到的伤害越大越容易导致电导率增大^[8]。脯氨酸作为植物细胞中重要的有机渗透调节物质,在植物遭受逆境胁迫时会引起其在植物体内的累积,其可反映细胞抗逆性及受害程度^[9]。丙二醛含量的高低可以反映细胞膜质的过氧化程度和对逆境胁迫反应的强弱。过氧化物酶

(POD)是植物体内清除活性氧自由基的关键酶之一,其活性高低可用于衡量植物对逆境抗性的强弱。将 1 株未转化植株(CK)与 4 株经 Southern blotting 检测结果为阳性的植株置于 4 ℃ 下处理 0,24 和 72 h 后,分别测定其叶片的相对电导率、脯氨酸含量、丙二醛含量和过氧化物酶活性的变化,结果见表 2。由表 2 可知,常温环境中,转 ICE1 基因植株叶片与未转化植株叶片的生理生化指标无显著差

异。4℃处理24和72 h后,转化株系1、2、7、9叶片的相对电导率分别较0 h平均提高了6.54%,9.81%,6.53%,9.12%和15.64%,20.15%,17.27%,19.21%,未转化株系CK叶片的相对电导率分别提高了24.96%和40.12%;转化株系1、2、7、9叶片24和72 h后的脯氨酸含量平均为17.08和20.08 μg/g,明显高于未转化株系CK的13.82和17.54 μg/g;24和72 h后丙二醛含量平均为

0.048 1和0.050 2 μmol/g,明显低于未转化株系CK的0.051 9和0.058 5 μmol/g;24和72 h后POD活性呈现先上升后下降趋势,转化植株的平均POD活性比未转化植株分别提高了9.39%~22.54%。4℃处理24和72 h后,转化与未转化株系以上指标差异均达到显著水平,说明转基因株系叶片受到低温逆境的伤害程度较轻。

表2 低温处理不同时间转 *ICE1* 基因烟草叶片相对电导率、脯氨酸含量、丙二醛含量和过氧化物酶活性的变化

Table 2 Changes in relative electrical conductivity,proline content,MDA content and peroxidase activity in low temperature treatment

株系 Plants	相对电导率 Relative electrical conductivity			脯氨酸含量/(μg·g ⁻¹) Pro content		
	0 h	24 h	72 h	0 h	24 h	72 h
1	22.63±0.28 a	24.11±0.47 b	26.17±0.05 a	10.79±0.04 a	16.99±0.03 b	19.95±0.05 b
2	22.63±0.10 a	24.85±0.16 b	27.19±0.22 b	10.83±0.07 a	17.08±0.07 b	19.87±0.09 b
7	22.52±0.29 a	23.99±0.68 b	26.41±0.32 a	10.83±0.07 a	17.15±0.07 c	20.12±0.07 c
9	22.59±0.13 a	24.65±0.17 b	26.93±0.16 ab	10.82±0.06 a	17.08±0.04 d	20.37±0.08 d
CK	22.68±0.13 a	28.34±0.26 a	31.78±0.62 c	10.77±0.04 a	13.82±0.14 a	17.54±0.01 a

株系 Plants	丙二醛含量/(μmol·g ⁻¹) MDA content			过氧化物酶活性/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)) POD activity		
	0 h	24 h	72 h	0 h	24 h	72 h
1	0.044 3±0.000 2 a	0.047 9±0.000 1 a	0.050 0±0.000 2 a	14.67±0.47 a	25.33±1.25 b	20.67±0.47 b
2	0.044 2±0.000 1 a	0.048 2±0.000 2 a	0.050 1±0.000 3 a	15.00±0.82 a	24.33±1.70 b	20.00±0.82 b
7	0.044 2±0.000 1 a	0.048 1±0.000 1 a	0.050 0±0.000 2 a	14.67±0.47 a	23.67±0.94 b	19.33±0.47 b
9	0.044 2±0.000 2 a	0.048 1±0.000 2 a	0.050 6±0.000 2 b	15.00±0.82 a	25.00±1.41 b	19.67±0.94 b
CK	0.044 2±0.000 1 a	0.051 9±0.000 2 b	0.058 5±0.000 1 c	15.00±0.82 a	20.67±0.47 a	17.67±0.47 a

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Difference lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$).

2.7 ICE1 基因在转基因烟草植株中的表达特征

以SYBR Green I为染料,对经Southern blotting检测为阳性的4株转基因烟草植株进行qRT-PCR检测。如图10所示,ICE1基因在转基因烟草植株1、2、7、9根部的相对表达量分别为2.75,2.63,3.07,3.73,茎部的相对表达量分别为6.80,5.34,4.55,4.35,叶片中相对表达量分别为9.96,6.77,8.87,9.60,可见叶片中ICE1基因的mRNA相对表达量最高。

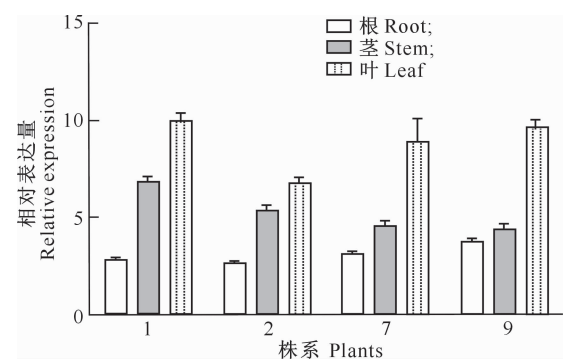


图10 ICE1 基因在转基因烟草植株中的表达特征
Fig.10 Expression characteristic of *ICE1* gene in transgenic tobacco plants

3 结论与讨论

植物对低温胁迫的响应是一个积极主动的适应过程,植物抗逆基因工程一般是将诱导基因转入到目标受体植物中,通过异源过量表达来提高植物的抗逆性。在正常生长环境中,1个ICE1基因的过表达对转基因植物的影响较小,如转ICE1基因的水稻^[10]、番茄^[11]、拟南芥^[4]、甜杨^[12]和柠檬^[13]植株大部分都表现出正常的生长状态,仅有极少数出现了株型变异和矮化现象,这表明ICE1基因能够减弱CBF/DREB1基因对转基因植株的不良影响。因此,过量表达ICE1基因可能对提高植物的抗逆性更加有效。但是,Liu等^[14]研究报道,过表达ICE1基因导致转基因黄瓜植株出现了植株矮小、每节雌花数量降低和节间缩短的现象。

本试验克隆了拟南芥ICE1基因,采用快速无缝克隆连接技术构建了pCAMBIA3301-ICE1植物表达载体,通过农杆菌介导的叶圆盘法转化烟草,并获得了9株阳性植株,Southern blotting检测阳性植株结果表明,9株中共有4株出现了杂交信号,表明目的基因已以单拷贝形式整合到基因组中;实时

荧光定量 PCR 检测发现,4 ℃ 环境下 *ICE1* 基因在转基因烟草植株的根、茎和叶片中均有表达,且在叶片中表达最高。低温胁迫处理后,转入 *ICE1* 基因能够降低植株的相对电导率和丙二醛含量,增加脯氨酸含量和过氧化物酶活性,这与向殿军^[15]和张玉等^[11]的研究结果一致,表明低温环境诱导了 *ICE1* 基因的表达,提高了植物的耐寒性;常温条件下,转化植株与未转化植株叶片的生理指标表现几乎一致,表明 *ICE1* 基因在常温条件下无活性,这与 Chinnusamy^[16]的研究结果一致。通过观察转化后的植株生长状态发现,其并未出现矮小、发育慢等现象,表明 *ICE1* 基因对烟草转基因植株的生长发育影响较小,但转 *ICE1* 基因的烟草植株对低温胁迫的耐受性以及能否在后代中稳定遗传,还需要进一步的研究。

[参考文献]

[1] Gilmour S J,Zarka D G,Stockinger E J,et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J*,1998,16(4):433-442.

[2] Juan J X,Yu X H,Jiang X M,et al. Agrobacterium-mediated transformation of tomato with the ICE1 transcription factor gene [J]. *Genet Mol Res*,2015,14(1):597-608.

[3] Zhan X,Zhu J K,Lang Z. Increasing freezing tolerance: kinase regulation of ICE1 [J]. *Dev Cell*,2015,32(3):257-258.

[4] Miura K,Jin J B,Lee J,et al. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Online*,2007,19(4):1403-1414.

[5] 高 玲. 水稻长护颖突变体基因图位克隆 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2005.

Gao L. Cloning of the rice mutant gene of long guard [D]. Yangling,Shaanxi:Northwest A&F University,2005.

[6] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社,2006.

Wang X K. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiment [M]. Beijing: Higher Education Press,2006.

[7] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta

Delta C(T)) method [J]. *Methods*,2001(4):402-408.

[8] Ashraf M,Ali Q. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) [J]. *Environmental and Experimental Botany*,2008,63(1/2/3):266-273.

[9] 胡文河,于 飞,谷 岩,等. 低温对孕穗期玉米根系生理特性的影响 [J]. 华南农业大学学报,2014(4):26-30.

Hu W H,Yu F,Gu Y,etal. Effect of low temperature on physiological characteristics of maize roots at booting stage [J]. *Journal of South China Agricultural University*,2014(4):26-30.

[10] 向殿军,满丽莉,殷奎德. 拟南芥 ICE1 基因转化水稻的进一步研究 [J]. 生物技术通报,2008(6):87-90.

Xiang D J,Man L L,Yin K D. Further study on transformation of *Arabidopsis thaliana* ICE1 gene into rice [J]. *Biotechnology Bulletin*,2008(6):87-90.

[11] 张 玉,蒋欣梅,于锡宏. ICE1 基因表达载体的构建及对番茄的转化 [J]. 中国蔬菜,2010(18):27-33.

Zhang Y,Jiang X M,Yu X H. Construction of ICE1 gene expression vector and transformation of tomato [J]. *China Vegetables*,2010(18):27-33.

[12] 林元震,张志毅,刘纯鑫,等. 甜杨抗冻转录因子 ICE1 基因的 in silico 克隆及其分析 [J]. 分子植物育种,2007(3):424-430.

Lin Y Z,Zhang Z Y,Liu C X,et al. Cloning and analysis of silico in of the antifreeze transcription factor ICE1 gene from *Populus* [J]. *Molecular Plant Breeding*,2007(3):424-430.

[13] Huang J Q,Sun Z H. Agrobacterium-mediated transfer of *Arabidopsis* ICE1 gene into lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F. cv. Eureka) [J]. *Agricultural Sciences in China*,2005(9):714-720.

[14] Liu L,Duan L,Zhang J,et al. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) over-expressing cold-induced transcriptome regulator ICE1 exhibits changed morphological characters and enhances chilling tolerance [J]. *Scientia Horticulturae*,2010,124(1):29-33.

[15] 向殿军. ICE1-like 转录因子的克隆及其转化水稻的抗冷效果评价 [D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.

Xiang D J. Cloning of ICE1-like transcription factor and evaluation of its anti cold effect on rice [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2012.

[16] Chinnusamy V. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Genes & Development*,2003,17(8):1043-1054.