

组成型激活基因 *DREB2A* 载体的构建 及其对烟草的遗传转化*

赵清^{1,2} 王罡^{2**} 季静² 金超²

(1 天津大学化工学院 天津 300072 2 天津大学农业与生物工程学院 天津 300072)

摘要 为探索 *DREB2ACA* 基因(constitutive activate *DREB2A*, 组成型激活 *DREB2A* 基因)在植物抗盐反应中的功能及其在植物抗逆基因工程中的运用,用 SOE-PCR(overlapping extension-PCR, 折叠延伸 PCR)方法克隆了 *DREB2ACA*, 并将其置于盐诱导的 *rd29A* 启动子控制下,构建了植物表达载体,并通过农杆菌介导的方法将目的基因转入烟草。Southern blot 证明了目的基因成功整合到烟草基因组中。RT-PCR 表明,目的基因受盐胁迫诱导表达。在盐处理条件下,转基因烟草比对照具有更好的生长状态,含有较高的光和色素,具有较高的光合速率及较低的 MDA 含量。说明 *DREB2ACA* 的表达提高了植物抗逆能力,该基因在抗盐领域具有广阔的应用前景。

关键词 *DREB2A* 转基因 烟草 抗盐

中图分类号 Q78

植物直接生活在复杂多变的自然环境中。干旱、盐碱、寒冷及高温等逆境会使植物受到生理伤害,严重时甚至导致植物死亡。为适应逆境,植物在漫长的进化过程中演化出了对这些逆境胁迫的应答机制,例如:气孔关闭、细胞膜及胞质成分的改变等^[1]。一般认为,与植物抗病机制不同,植物对干旱、高盐等逆境的抗性受多基因控制,因此,利用基因工程技术导入单个功能基因难以大幅度地提高植物的抗逆性。而强表达信号调控途径中的上游基因,如转录因子,则能诱导下游抗逆相关的许多功能基因的表达,因此利用转录因子成为改良植物抗逆性的重要途径^[2]。

在对逆境胁迫基因启动子区分析的研究中,发现许多基因的启动子区含有保守元件序列:A/GCCGAC,这就是后来称之为脱水应答元件(DRE)的核心序列^[3]。自从1997年,Stocking等^[4]用酵母一元杂交的方法从拟南芥中分离了一个DRE/CRT结合蛋白CBF1以来,已克隆到了许多*DREB*相关基因(*DREB-like*),这些基因产物能够结合启动子区的DRE/CRT元件,启

动一系列下游抗逆基因的表达,并赋予植物耐盐、干旱、寒冷、高温等能力^[5-6]。在植物抗盐基因工程领域,*DREB*家族基因一直备受关注,研究者通过转基因手段将*DREB*导入植物基因组中,得到了许多抗性增强的转基因品种。目前已从多个物种中克隆到*DREB1*基因家族相关基因,这些基因能赋予转基因植物抗旱,抗盐,抗寒冷等多重效应^[7-9]。

与*CBF/DREB1*转录因子相比,*DREB2*亚家族的调控机制及其转基因研究发展较为滞后。在1998年,Liu等^[6]用酵母二元杂交的方法克隆到了*DREB2A*,而对该基因功能详细的描述到2006年才有报道^[10]。Sakuma等^[10]用拟南芥原生质体鉴定出*DREB2A* 136~165位残基的缺失将使它转变成组成性活性形式即*DREB2ACA*(constitutive active *DREB2A*);强表达*DREB2ACA*的拟南芥,抗盐能力要比强表达*DREB2A*的强得多,但这使转基因植株出现了矮化现象,使用*rd29A*启动子后矮化现象消除。之后,该研究组用基因芯片及代谢组学技术,对该基因下游调控作用做了详细分析。发现该基因能上调373个基因,其中包括LEA蛋白,分子伴侣,此生代谢酶,解毒代谢酶等^[11],从而证实了*DREB2A*在植物响应干旱中所起到的重要作用。

收稿日期:2012-07-25 修回日期:2012-08-30

* 国家自然科学基金资助项目(31271419,31271793)

**通讯作者,电子信箱:gangwang@tju.edu.cn

本研究用盐诱导启动子表达 *DREB2ACA* 基因,对转基因植物做分子、生理检测,探讨了 *DREB2ACA* 在植物抗盐中的作用及在植物基因工程中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 启动子、基因的克隆及载体构建

1.1.1 基因组提取及 *rd29A* 启动子的克隆 用 CTAB 法提取拟南芥基因组,用 PCR 方法从基因组中克隆 *rd29A* 启动子,根据 GenBank 中 *rd29A* 启动子序列设计克隆引物(表 1),扩增该启动子,扩增产物长度为

824bp。以 AT 克隆方法构建载体 pBSTII-*Prd29A*,并测序、保存。

1.1.2 克隆 *DREB2A* 基因 使用 RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)提取拟南芥叶片总 RNA,实验步骤参照试剂盒说明书。以拟南芥 RNA 为模板,使用 Reverse Transcription System(Promega)试剂盒进行反转录,合成 cDNA 第一链。取 1μl cDNA 反应液为模板,进行 PCR 反应,用 *DREB* 基因克隆引物扩增(表 1),产物长度应为 1 066 bp。以 AT 克隆方法构建载体 pBSTII-*DREB2A*,并测序、保存。

表 1 实验所用到的引物序列
Table 1 Primer sequences in the study

| 引物名称 | 序列 |
|--------------------|---|
| <i>rd29A</i> 克隆 F | CGACTCAAAACAACTTACG |
| <i>rd29A</i> 克隆 R | AATCAAACCCTTTATTCCTG |
| <i>DREB2A</i> 克隆 F | GGGAAGGAGATGGCAGTTT |
| <i>DREB2A</i> 克隆 R | GTTGTGGGATTAAGGCAAATA |
| <i>DREB2ACA</i> F1 | GAATTCCCTTATGTTTCAGCTTGTTCTG |
| <i>DREB2ACA</i> R1 | GTTTAGATTCACAATCTGGATCAGGGAAATTAAGACGAGCCAAAG |
| <i>DREB2ACA</i> F2 | TTGGCTCGTCTTAATTTCCCTGATCCAGATTGTGAATCTAAACC |
| <i>DREB2ACA</i> R2 | GATATCGTTGTGGGATTAAGGCAAATATC |
| <i>DREB2A</i> 检测 F | TGACGGTACTACTGTGGCT |
| <i>DREB2A</i> 检测 R | TTCTACAATCCCTTGCTCC |

1.1.3 构建 pH7m24GW,3-*Prd29A* 用带有 *Hind* III 和 *Eco*R I 位点的 *Prd29A* 引物(在克隆引物两段加入酶切位点及 6 个保护碱基)从 pBSTII-*Prd29A* 载体扩增 P *rd29A*。然后用 *Hind* III 和 *Eco*R I 分别酶切载 pH7m24GW,3 和 PCR 片段,得到的产物做连接。pH7m24GW,3 双酶切产物与 *Prd29A* 启动子的双酶切产物混合,加 T_4 DNA 连接酶,16℃ 反应 16h。反应产物与大肠杆菌感受态细胞 Top10 混合,做转化试验,并涂布于含 Spe(壮观霉素)的抗性平板上,提取质粒,检测。

1.1.4 用 SOE-PCR 克隆 *DREBCA* 基因并连接植物表达载体 引物设计如表 1(F1 中含有 *Eco*R I 位点,R2 中含有 *Eco*R V 位点,并带有保护碱基),用拟南芥 cDNA 为模板,分别以 F1,R1 和 F2,R2 为引物,用 PFU 酶分别做 PCR。切胶回收以上两种片段然后做融合 PCR,得到连接产物,再用引物 F1,R2 做全长延伸 PCR^[12]。得到片段,用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 酶切以后连接植物表达载体即得到植物表达载体 pH7m24GW,3-*Prd29A-DREB2ACA*。

1.2 烟草转基因 pH7m24GW,3-*Prd29A-DREB2ACA*

将构建植物表达载体 pH7m24GW,3-*Prd29A-DREB2ACA* 及空载体 pH7m24GW,3-*Prd29A*(作为阴性

对照)用电击方法转入农杆菌 C58 中。将烟草叶片去除主脉和叶边缘,然后将叶片切成 1cm×1cm 大小,浸入制备好的农杆菌菌液,浸泡 8~15 min,用无菌的滤纸吸净菌液,接种于共培养基中,25℃ 左右培养 3 天。将叶片转移至筛选培养基中,20 天左右更换一次培养基,当抗性芽从愈伤组织上长到 1cm 左右,切取抗性芽,接种于生根培养基,详细转基因方法参见[13]。将根系生长良好的烟草组培苗种植在蛭石和腐殖土的培养土中,使之在温室中正常生长。在含潮霉素(20mg/L)的 MS 培养基上筛选用花授粉的种子,直到得到 F2 带,用纯合体做生理检测。

1.3 转化植物分子检测

1.3.1 基因组检测 用 CTAB 法提取植物基因组,转基因植物的 PCR 检测分别在 T0,T1 及 T2 进行,PCR 方法参见[14],所用为 *DREB2A* 检测引物(表 1)。做 Southern 的烟草基因组先用 *Eco*R I、*Eco*R V 过夜酶切,然后用 20 微克量进行电泳上样,用地高辛标记法合成探针,试剂为德国 Roche 产品 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I。

1.3.2 表达检测 转基因烟草,用 200mmol 盐(NaCl)处理,在 0,6,24 小时的时候取样,用液氮冻存,提取

RNA, 做 RT-PCR。表达结果用烟草 UBI 基因(看家基因)做内部参照。

1.4 转化植物生理检测

用蛭石培养 F2 代转化植物, 植株发芽一个月后开始浇含 200mmol NaCl 的 1/4MS 液体培养基。每隔 7 天用清水对培养基清洗一次, 防止 NaCl 过度积累。20 天后, 对植物进行生理测定。对每一个品系, 都留一定数目的植株不做盐处理, 同样条件培养, 作为对照。取烟草第五片叶子提取色素、MDA 或进行呼吸速率的测定。色素提取及检测方法按照参见[15], 用 Li6400 便携光合测定仪测定植物的呼吸速率。

1.5 统计分析

实验数据均做三个独立重复, 并用 SPSS 软件进行 ANOVA 分析。

2 结果

2.1 分子克隆

提取拟南芥基因组, 以此 DNA 为模板, 用 *rd29A* 启动子特异引物做 PCR 扩增, 得到 824bp 的条带, 产物用 T₄DNA 连接酶与 pBSTII 载体进行连接反应, *rd29A* 启动子克隆到 pBSTII 载体中。之后用带有酶切位点 *Hind* III 和 *Eco*R I 的引物, 以 pBSTII-Prd9A 为模板扩增, 然后将 PCR 片段及植物表达载体都进行酶切, 胶纯化以后, 用 T₄DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌。在含有 Amp 的平板上, 挑取单菌落, 提质粒, 再用酶切验证, 如图 1a 所示, 载体上切下了 824bp 的片段。说明 *rd29A* 启动子已克隆到植物表达载体 pH7m24GW, 3rc 中。

为了剪除 *DREB2A* 基因内部 90bp 自我抑制序列, 采用 SOE-PCR 的方法。用以拟南芥 cDNA 为模板, 分别用引物对 F1, R1 及 F2, R2 进行扩增, 得到 476bp 及 564bp 的两个条带(图 1b), 他们分别是 *DREB* 基因的上游, 下游两段序列。由于引物 R1, F2 分别带有下游片段及上游片段的部分序列, 因此将这两个 PCR 片段混合, 低退火温度连接 3 个循环, 这样第一个片段的下游引物可退火连接到第二个片段的上游端, 同时第二个片段的上游引物可以退火连接到第一个片段的下游端, 这就可以将两个片段连接上。然后用这个链接片段为模板, 用 F1, R2 为引物做常规 PCR, 就能得到删除内部 90bp 序列的组成型活性的 *DREB2ACA* 基因, 如图 1b 所示, 上下游两段序列用 PCR 连接起来, 得到了 1 040bp 的 *DREB2ACA*。

由于用带有酶切位点的引物扩增 *DREB2ACA*, 可用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 酶分别酶切载体及基因, 然后做链接, 转化大肠杆菌。在含有 Spe 的平板上, 挑取单菌落, 提质粒, 再用酶切验证, 如图 1c 所示, 载体上切下了 1 040bp 的片段。说明 *DREB2ACA* 已克隆到植物表达载体中, 就构建了植物载体 pH7m24GW, 3rc-Prd29A-*DREB2ACA*, 载体结构见图 2a。

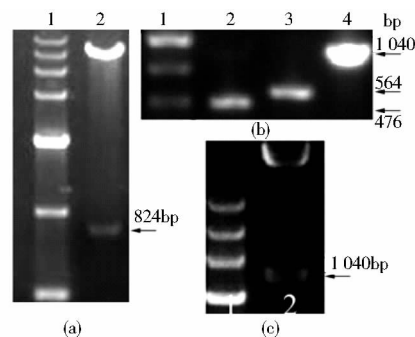


图 1 植物表达载体的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vector

(a) Enzyme digestion of pH7m24GW, 3rc-Pre29A; 1: Marker D15 000; 2: digestion of pH7m24GW, 3rc-Prd29A with *Hind* III and *Eco*R I (b) Cloning *DREB2ACA* using SOE-PCR; 1: DNA MarkerIII; 2: PCR product from primer pairs F1 & R1; 3: PCR product from primer pairs F2 & R2; 4: the merged product from lane 2 and lane 3, producing *DREB2ACA* with 1 040bp (c) Enzyme digestion of pH7m24GW, 3rc-Pre29A-*DREB2ACA*; 1: DNA MarkerIII; 2: digestion of pH7m24GW, 3rc-Prd29A-*DREB2ACA* with *Eco*R I and *Eco*R V

2.2 烟草转基因检测

为探索 *DREB2ACA* 对植物抗逆性的作用, 用农杆菌介导的转基因方法, 对烟草进行转基因。在含有 Hyg (20mg/l) 的 MS 培养基上, 筛选得到了 28 个转基因品系。提取植物的基因组, 进行 PCR 检测, 绝大多数植株得到扩增条带。当植物筛选得到 F2 代纯合体后, 选取一部分 PCR 信号较好的品系的 DNA 作为材料, 用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 酶切, 进行 Southern 检测, 得到了 1 040bp 的阳性条带(图 2a), 说明目的基因已整合进入植物基因组。

为验证 *rd29A* 启动子的功能, 用 200mmol 盐 (NaCl) 处理转基因烟草, 在 0, 6, 24 小时的时候提取叶片 RNA, 做 RT-PCR 检测。结果如图 2c 显示, 在正常条件下, 该启动子并不能引导目的基因的表达, 而在盐处理 6 小时的情况下, 基因开始表达, 到 24 小时的时候, 表达量达到很高水平。该结果说明 *rd29A* 启动子能够诱导目的基因在盐胁迫的条件下表达。

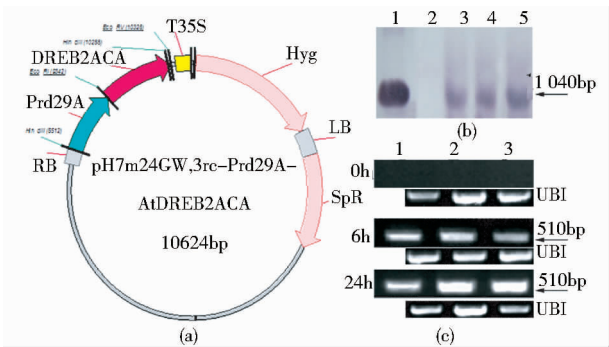


图2 植物表达载体的结构及转基因烟草的分子检测
Fig.2 Plant expression vector and molecular analysis of transgenic lines

(a) Structure of pH7m24GW,3rc-Prd29A-AiDREB2ACA; RB, LB means right board and left board of T-DNA; Prd29A; rd29A promoter; DREB2ACA; constitutive activate DREB2A; T35S; 35S terminator; Hyg; hygromycin resistance box (b) Southern blot of transgenic plants; 1: Positive control using plasmid; 2: Empty vector; 3 ~ 5: transgenic lines (c) RT-PCR test of three transgenic lines

2.3 *DREB2ACA* 对抗盐的作用

为验证 *DREB2ACA* 的表达对植物盐胁迫的作用，将转基因烟草施以 20 天的盐胁迫。同期也在相同条件下栽培相同品系植株作为对照（图 3a、b 分别显示转基因植物盐处理前后的情况）。然后测定这些植物组织的叶绿素，总类胡萝卜素,MDA 及呼吸速率。如表 2 所示,在盐胁迫情况下,无论转基因还是非转基因植物的叶绿素 a、b 及总类胡萝卜素含量都低于正常水平。而在盐胁迫下,转基因植株的三种色素含量均高于对照空载体转化株。这暗示 *DREB2ACA* 可能保护植物膜系统免受损伤,从而保护了结合在膜系统上面的光合色素。由于 MDA 含量反应膜系统损伤情况,测定了 MDA 含量,图 3c 表明,转基因植物的 MDA 水平显著低于对照。于此相应地,转基因植物在逆境下保持有较高的光合速率(图 3d)。

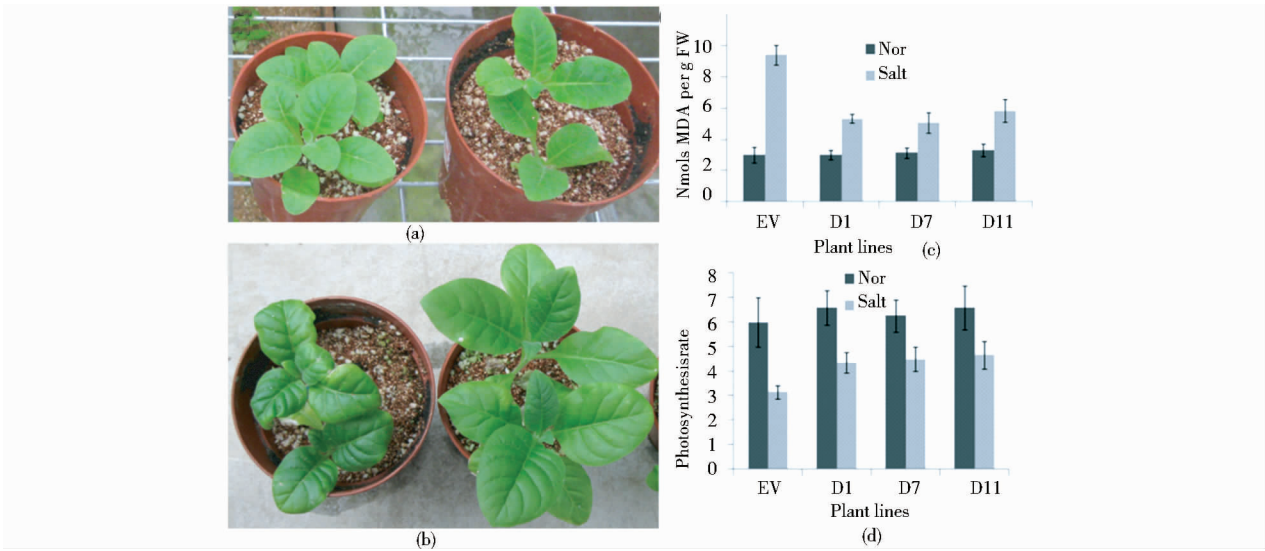


图3 转基因植物的生理检测

Fig.3 Physiological analysis of transgenic plants

(a) Control and transgenic plants before salt treatment (b) Control and transgenic plants after salt treatment (c) MDA content of tobacco plants under normal and salt conditions; EV; Empty vector; D1, D7 and D11 represent three transgenic lines respectively (d) Photosynthesis rate of tobacco plants under normal and salt conditions

3 讨论

干旱、高盐等逆境不仅限制了农作物的生长范围，而且影响其产量,给农业生产造成严重影响。近年来, *DREB* 的研究已成为抗逆研究中的一个热点。该基因家族作为上游的调控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。因此,利用 *DREB* 转录因子来改良植物抗逆性,比单纯使用下游功能基因,更容易获得理想的综合效果。

然而,目前植物基因工程技术所用的多为组成型表达的 35S 启动子,它诱导基因在植物各个发育阶段,各个组织组成型地表达外源基因。这样的表达方式不

表2 盐条件下与正常条件下生长烟草的色素含量

Table 2 Pigments profiles in tobacco under salt and normal conditions

| 处理及品系 | 叶绿素 a | 叶绿素 b | 总类胡萝卜素 |
|--------|---------------|--------------|--------------|
| 未处理 EV | 10.02 ± 0.51 | 2.91 ± 0.04 | 1.97 ± 0.03 |
| D1 | 10.53 ± 0.44 | 2.90 ± 0.01 | 1.95 ± 0.02 |
| D7 | 9.97 ± 0.43 | 2.90 ± 0.03 | 2.01 ± 0.13 |
| D11 | 10.04 ± 0.15 | 2.89 ± 0.03 | 1.99 ± 0.09 |
| 处理 EV | 7.92 ± 0.11a | 2.30 ± 0.01a | 1.56 ± 0.01a |
| D1 | 9.04 ± 0.24b | 2.44 ± 0.04b | 1.81 ± 0.02b |
| D7 | 9.46 ± 0.33bc | 2.68 ± 0.02c | 1.80 ± 0.14b |
| D11 | 9.49 ± 0.05c | 2.67 ± 0.03c | 1.80 ± 0.11b |

仅浪费植物生长发育资源,而且会带来诸多负面效应。在抗逆的研究中,用35S启动子表达DREB家族基因往往导致植物体生长发育减缓、生长迟滞、生长量降低^[10]。因此,研究克隆干旱、寒冷、高盐诱导的rd29A启动子,用于引导转录因子的表达。通过基因组PCR,rd29A启动子序列被克隆到载体PBSTII中,在大肠杆菌中得到保存,并进一步将该启动子克隆到植物表达载体pH7m24GW,3rc中,用于后续的工作(图1a)。

与DREB1的低温诱导表达模式不同,DREB2主要干旱和高盐胁迫所诱导,却不被低温所诱导^[6]。在对DREB2A基因进行的拟南芥转基因研究中发现DREB2A对转基因植株几乎没有生长迟滞的表型变异,后续实验发现该基因中含有的90bp核苷酸序列编码一段30aa的多肽,该多肽由于含有泛素标记位点^[16],被标记后导致给蛋白的降解,因此不能大量积累^[10, 17]。删除这段多肽以后(得到DREB2ACA),蛋白能大量积累,也大幅度提高了植物抗旱、抗盐能力。然而,这也导致了转基因植物的生长受到严重阻碍。基于上述理论研究的工作,我们用逆境诱导性启动子引导DREB2ACA表达,期待该组合即能提高植物抗盐性,又能避开生长受阻的负面效应。

SOE-PCR能够删除DNA内部一段序列^[12],因此用于制备DREB2ACA,该技术须设计两对引物,先分别扩增DNA的上游和下游序列,由于第一段DNA下游引物含有第二段上游序列,同时,第二段DNA上游引物含有第一段下游序列。因此,通过一个无引物PCR,便可将两段DNA连接(图1b)。应用该技术,DREB2ACA被成功克隆,并连接到植物表达载体(图1c,图2a)。

应用农杆菌介导的转基因技术,成功地将目的基因转入烟草(图2b)。在对转基因植物的栽培过程中,

并没有发现有明显生长延迟等负面效应。实验结果也表明,该启动子在正常生长条件下并不表达。而在盐处理情况下,能够诱导DREB2ACA基因的表达(图2c)。在20天的盐胁迫下,对照植物成长严重受阻,叶片皱缩,发黄。与此相比,转基因植物受盐的毒害较轻(图3a,b)。通过色素分析,发现转基因植物含有更高的叶绿素a,叶绿素b和总类胡萝卜素(表2)。该结果暗示,DREB2ACA能有效的保护植物细胞的叶绿体等膜系统。MDA是脂膜过氧化的产物,因此它的含量是膜结构损伤程度的指标^[18]。通过MDA含量测定,发现DREB2ACA确实保护了植物膜结构免受损伤,这也解释了转基因植物有更高的光合效率(图3c,d)。

DREB2A能够结合在许多逆境应答基因的启动子区DRE元件,并激活这些基因的表达。正是借助了这个特性,Liu等^[6]用酵母一元杂交克隆了这个基因。在2006年的报道中,DREB2ACA能直接显著上调21个基因,其中14个的启动子区含有DRE元件,被认为DREB2ACA的直接靶标^[17]。这14个基因中,有9个编码LEA蛋白(late embryo abundant,晚期胚胎丰富蛋白),这些蛋白能发挥分子伴侣的作用,在植物干旱的时候保护细胞内的大分子,脂类免受损伤,从而提高植物对盐、干旱等环境的耐受性。2009年,Maryyama等^[11]用更高通量的芯片及代谢组学技术对DREB2ACA做了分析,发现该基因能上调373个基因,其中除了包括LEA蛋白,分子伴侣,还包括初生代谢酶基因,次生代谢酶,解毒代谢酶等。通过上调初生代谢酶基因,植物能提高在逆境条件下可溶糖类、氨基酸类等小分子的含量,从而减低植物细胞水势,使植物在高渗的环境下不至于失水。通过调节次生代谢酶,解毒代谢酶,提高了植物细胞中抗氧化剂如类黄酮化合物,抗氧化酶的含量,保护植物免受ROS损伤^[19]。除了抗盐、抗旱还有许多证据表明DREB2A与抗高温有关,例如DREB2A在高温下诱导表达,DREB2A能诱导HSAF3表达^[20]。

研究实现了DREB2ACA的盐诱导表达,且提高了植物的抗盐性。在盐胁迫下,转基因烟草具有较高的光合色素含量及光合速率,较完备的膜系统。抗逆能力的提高,推测是由于DREB2ACA提高了植物体内其保护作用的蛋白质及小分子代谢物。具体机制需要更进一步研究以提供更直接的证据。

参考文献

- [1] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants.

- Annu Rev Plant Biol, 2002, 53:247-273.
- [2] Yamaguchi T, Blumwald E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci, 2005, 10(12): 615-620.
- [3] 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. Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [4] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(3):1035-1040.
- [5] 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. Plant Journal, 1998, 16(4):433-442.
- [6] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. 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. Plant Cell, 1998, 10(8):1391-1406.
- [7] Zhang Y, Chen C, Jin X F, et al. Expression of a rice DREB1 gene, OsDREB1D, enhances cold and high-salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Bmb Rep, 2009, 42(8):486-492.
- [8] Hadi F, Gilpin M, Fuller M P. Identification and expression analysis of CBF/DREB1 and COR15 genes in mutants of Brassica oleracea var. botrytis with enhanced proline production and frost resistance. Plant Physiol Bioch, 2011, 49(11):1323-1332.
- [9] Huang B, Jin L G, Liu J Y. Molecular cloning and functional characterization of a DREB1/CBF-like gene (GhDREB1L) from cotton. Sci China Ser C, 2007, 50(1):7-14.
- [10] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, et al. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. Plant Cell, 2006, 18(5): 1292-1309.
- [11] Maruyama K, Takeda M, Kidokoro S, et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. Plant Physiol, 2009, 150(4):1972-1980.
- [12] Jones M L, Barnard R T. Chimerization of multiple antibody classes using splice overlap extension PCR. Biotechniques, 2005, 38(2):181-182.
- [13] Ji J, Wang G, Wang J, et al. Functional analysis of multiple carotenogenic genes from Lycium barbarum and Gentiana lutea L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco. Biotechnol Lett, 2009, 31(2):305-312.
- [14] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (3rd edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 165-188.
- [15] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions. Biochemical Society Transactions, 1983, 11:591-592.
- [16] Qin F, Sakuma Y, Tran L S, et al. Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. Plant Cell, 2008, 20(6):1693-1707.
- [17] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, et al. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(49):18822-18827.
- [18] Davison P A, Hunter C N, Horton P. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis. Nature, 2002, 418(6894):203-206.
- [19] Han H, Li Y, Zhou S. Overexpression of phytoene synthase gene from Salicornia europaea alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic Arabidopsis. Biotechnol Lett, 2008, 30(8):1501-1507.
- [20] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, et al. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(49):18822-18827.

Construction of Plant Expression Vector with Constitutive Activation *DREB2A* and Its Genetic Transformation to Tobacco

ZHAO Qing^{1,2} WANG Gang² JI Jing² JIN Chao²

(1 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin 300072, China)

(2 School of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract In order to investigate the function of *DREB2ACA* in plant salt-tolerance reaction and thus to explore its application value in genetic engineering. *DREB2ACA* was cloned using SOE-PCR, and was constructed in plant expression vector driven by *rd29A* promoter. Tobacco plants were genetically transformed with the vector. Integration of the T-DNA was confirmed using southern blot and expression of the target gene under salt stress were tested using RT-PCR. Compared to the control, transgenic lines had higher photosynthesis pigments, enhanced photosynthesis rate and lower MDA level under salt condition. All results demonstrate that *DREB2ACA* is probably a promising candidate gene for drought improvement in crops.

Key words *DREB2A* Genetic transformation Tobacco Salt tolerance