



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115927370 B

(45) 授权公告日 2023.06.27

(21) 申请号 202210878098.5

A01H 6/20 (2018.01)

(22) 申请日 2022.07.25

C12R 1/865 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115927370 A

(56) 对比文件

WO 2013033571 A1, 2013.03.07

CN 107674873 A, 2018.02.09

US 2018320192 A1, 2018.11.08

CN 103290025 A, 2013.09.11

(43) 申请公布日 2023.04.07

Mei Zhang等.Functional

(73) 专利权人 中国科学院华南植物园

地址 510000 广东省广州市天河区兴科路  
723号

Characterization of Heat Shock Factor (CrHsf) Families Provide Comprehensive Insight into the Adaptive Mechanisms of *Canavalia rosea* (Sw.) DC. to Tropical Coral Islands. *Int J Mol Sci* ..2022, 第23卷 (第20期), 1-25.

(72) 发明人 张美 简曙光 王峥峰

(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务  
所(普通合伙) 44365

专利代理师 曾凤云

李春光, 陈其军, 高新起, 祁碧菽, 陈乃芝, 许守明, 陈珈, 王学臣. 拟南芥热激转录因子 AtHsfA2 调节胁迫反应基因的表达并提高热和氧化胁迫耐性. *中国科学C辑*. 2005, (05), 398-407.

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/84 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

审查员 门思琦

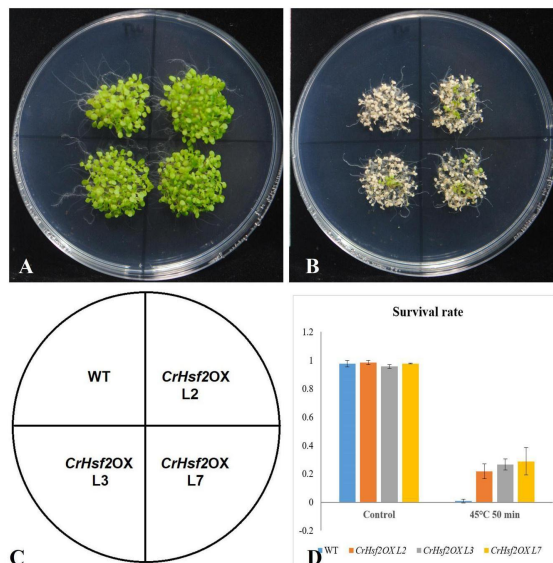
权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图4页

## (54) 发明名称

海刀豆CrHsf2基因及其应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种海刀豆CrHsf2基因及其应用,所述海刀豆CrHsf2基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。在本发明中,发明人获得了一个编码热激转录因子的CrHsf2基因,并发现:CrHsf2基因在酿酒酵母中的超量表达能够提高酵母对高温和氧化胁迫的耐受性;CrHsf2基因在拟南芥中的超量表达能够提高拟南芥对高温胁迫的耐受性。因此,海刀豆CrHsf2基因的发现,为作物针对高温或氧化的抗逆分子育种提供了相关的基因资源,可应用于针对高温或氧化胁迫的遗传工程育种中,具有很大的应用价值。



1. 一种海刀豆*CrHsf2*基因,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf2*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的海刀豆*CrHsf2*基因,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf2*基因是以SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的引物对扩增得到的。

3. 一种海刀豆*CrHsf2*基因编码的转录因子,其特征在于,所述转录因子的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

4. 权利要求1或2所述的海刀豆*CrHsf2*基因、或权利要求3所述的海刀豆*CrHsf2*基因编码的转录因子在提高植物耐高温胁迫或提高植物抗氧化胁迫中的应用;所述植物为海刀豆或拟南芥。

5. 权利要求1或2所述的海刀豆*CrHsf2*基因、或权利要求3所述的海刀豆*CrHsf2*基因编码的转录因子在提高植物对高温或氧化的耐受性的遗传育种中的应用;所述植物为海刀豆或拟南芥。

6. 一种插入有权利要求1或2所述的海刀豆*CrHsf2*基因的酿酒酵母重组表达载体,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf2*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

7. 一种转化有权利要求6所述的酿酒酵母重组表达载体的转基因工程菌。

8. 一种插入有海刀豆*CrHsf2*基因的过表达载体,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf2*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

9. 权利要求6所述的酿酒酵母重组表达载体、或权利要求7所述的转基因工程菌、或权利要求8所述的过表达载体在提高植物耐高温胁迫或抗氧化胁迫中的应用;所述植物为海刀豆或拟南芥。

10. 一种提高植物耐高温胁迫的方法,其特征在于,所述方法包括提高海刀豆*CrHsf2*基因在植物中的表达,所述海刀豆*CrHsf2*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述植物为海刀豆或拟南芥。

## 海刀豆CrHsf2基因及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体地说,本发明涉及一种海刀豆(*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) CrHsf2 (heat shock transcription factor 2) 基因、及其编码的转录因子,以及在提高植物对高温胁迫和氧胁迫的耐受性中的应用。

### 背景技术

[0002] 植物通常会不可避免地遭受诸如干旱、盐碱、极端温度和病虫害等胁迫因素的影响,从而在进化过程中发展出一套精巧的调控机制来应对自然界中的各种环境和生物胁迫,并维持其正常的生长发育和世代交替。植物基因表达的分子调控网络十分复杂,包括转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平等多个层次。转录因子介导的转录水平上的调控对于基因表达调控发挥着至关重要的作用,转录因子与靶基因启动子区的顺式元件相互作用来调控下游基因的表达。

[0003] 热激转录因子(heat shock transcription factor, Hsf)是真核生物中广泛存在的一类转录因子,通过识别启动子区域的热激元件(heat shock element, HSE)调控基因表达,从而参与植物的各种生命活动。植物Hsf数量众多、功能多样、调控机制复杂精巧,不仅能够影响植物对高温、干旱、盐碱、重金属等胁迫的抗性以及植物的抗病性,还参与了对植物形态发育和器官发生等过程的调控。

[0004] 在真核生物中热激转录因子结构上通常包含N端DNA结合结构(DNA-binding domain, DBD)、寡聚化结构域(oligomerization domain, OD或HR-A/B),在C端包含核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、核输出信号(nuclear export signal, NES)和C端转录激活结构域(C-terminal domain, CTD)等结构域。根据其基本的结构域,植物热激转录因子可分为三类:HsfA、HsfB、HsfC。

[0005] 在非生物逆境,尤其是热激逆境下,A类热激转录因子在调节热激蛋白的表达起着重要作用。非生物逆境胁迫,尤其是热胁迫,通常会直接或间接造成植物体内蛋白质的错误折叠,错误折叠的蛋白质会形成较大的聚集体,从而对正常细胞造成代谢阻碍。热激蛋白(Hsp)作为分子伴侣协助蛋白的重新折叠、稳定、胞内运输和降解,以阻止受损蛋白的累积,维护细胞内环境的稳定。而热激蛋白的表达是通过热激转录因子(Hsfs)结合于热激蛋白基因的启动子的热激元件HSE上,以募集其它转录因子而形成转录复合体,促进热激蛋白基因的表达。

[0006] 研究表明,提高热激转录因子的表达能够提高植物的多种非生物和生物胁迫抗性,是优异的作物品种改良基因资源。拟南芥热激转录因子AtHsfA6超表达能够提高转基因植物对高温的抗性和盐旱胁迫的耐受性(Hwang et al, Plant Cell Environ. 2014. doi: 10.1111/pce.12228)。小麦热激转录因子TaHsfA6b在大麦中超表达能够提高转基因大麦的耐热性(Poonia AK et al, Planta. 2020. doi: 10.1007/s00425-020-03457-4)。苹果热激转录因子MdHSFA8a在苹果植株中超表达能够提高黄酮类物质的合成,以及清除活性氧,从而提高苹果植株对干旱胁迫的耐受性(Wang et al, Plant Physiol. 2020. doi: 10.1104/

pp.20.01106)。大豆B族GmHSFB2b热激转录因子基因在大豆中超表达能够通过促进异黄酮类物质的合成,从而提高大豆的耐盐性(Bian et al,New Phytol.2020.doi:10.1111/nph.16104)。

[0007] 对农作物而言,逆境胁迫的扰动通常会影响到作物的产量和品质。目前,采用多种育种手段提高农作物的抗逆性是现代农业科学面临的重要问题。作物转基因功能育种为抗逆育种提供了一种行之有效的便捷手段,但该技术需要提供具有抗逆生物学功能的候选操作基因,而分离和鉴定该类功能基因已成为植物基因工程的研究焦点之一。野生植物是重要的自然资源和环境要素,而在自然选择的压力下,极端逆境下的适生植物必然具有较强的抗逆遗传资源,其抗逆功能基因的挖掘和鉴定也是野生植物资源保护和开发利用的一个重要方面。

[0008] 海刀豆(*Canavalia rosea*)是一种泛热带亚热带分布型滨海植物,具有极强的抗逆性,其耐热性尤为显著。目前关于海刀豆基因资源的开发利用方面还未见报道。

### 发明内容

[0009] 基于此,本发明的目的之一是提供一种海刀豆CrHsf2基因,其是在海刀豆中发现的一种编码热激转录因子的基因。

[0010] 实现上述发明目的的具体技术方案包括如下:

[0011] 一种海刀豆CrHsf2基因,其cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 在其中一些实施例中,所述海刀豆CrHsf2基因是以SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的引物对扩增得到的。

[0013] 本发明还提供了一种海刀豆CrHsf2基因编码的转录因子,所述转录因子的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0014] 本发明还提供了上述海刀豆CrHsf2基因或上述海刀豆CrHsf2基因编码的转录因子在提高植物耐高温胁迫中的应用。

[0015] 本发明还提供了上述海刀豆CrHsf2基因或上述海刀豆CrHsf2基因编码的转录因子在提高植物抗氧化胁迫中的应用。

[0016] 本发明还提供了上述上述海刀豆CrHsf2基因或上述海刀豆CrHsf2基因编码的转录因子在提高植物对高温和/或氧化的耐受性的遗传育种中的应用。

[0017] 本发明还提供了一种插入有海刀豆CrHsf2基因的酿酒酵母重组表达载体。

[0018] 本发明还提供了一种转化有上述酿酒酵母重组表达载体的转基因工程菌。

[0019] 本发明还提供了上述酿酒酵母重组表达载体或转基因工程菌在提高植物耐高温胁迫中的应用。

[0020] 本发明还提供了上述酿酒酵母重组表达载体或转基因工程菌在提高植物抗氧化胁迫中的应用。

[0021] 本发明还提供了一种插入有海刀豆CrHsf2基因的过表达载体。

[0022] 在其中一些实施例中,所述过表达载体为插入有CrHsf2基因的pBIm质粒。

[0023] 本发明还提供了上述过表达载体在提高植物耐高温胁迫或抗氧化胁迫中的应用。

[0024] 本发明还提供了一种提高植物耐高温胁迫的生物制剂,实现上述发明目的的具体技术方案包括如下:

[0025] 一种提高植物耐高温胁迫的生物制剂,所述生物制剂的活性成分来源于插入有海刀豆CrHsf2基因的酿酒酵母重组表达载体或过表达载体。

[0026] 本发明还提供了一种提高植物耐高温胁迫的方法。

[0027] 实现上述发明目的的具体技术方案如下:

[0028] 一种提高植物耐高温胁迫的方法,该方法包括提高海刀豆CrHsf2基因在植物中的表达。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0030] 在本发明中,发明人从海刀豆幼苗cDNA文库中进行筛选,获得了一个编码热激转录因子的CrHsf2基因,并进一步对该基因进行了应用性探索后发现:CrHsf2基因在酿酒酵母中的超量表达能够提高酵母对高温和氧化胁迫的耐受性;CrHsf2基因在拟南芥中的超量表达能够提高拟南芥对高温胁迫的耐受性。因此,海刀豆CrHsf2基因的发现,为作物针对高温或氧化的抗逆分子育种提供了相关的基因资源,可应用于针对高温或氧化胁迫的遗传工程育种中,具有很大的应用价值。

## 附图说明

[0031] 图1为本发明实施例1中酿酒酵母重组表达载体CrHsf2-pYES2的结构示意图。

[0032] 图2为本发明实施例2中超表达CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2与未表达CrHsf2基因的pYES2对高温胁迫的耐受性结果图。

[0033] 图3为本发明实施例2中超表达CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株skn7 Δ)与未表达CrHsf2基因的pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株skn7 Δ)对高温胁迫的耐受性结果图。

[0034] 图4为本发明实施例2中超表达CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株yap1 Δ)与未表达CrHsf2基因的pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株yap1 Δ)对高温胁迫的耐受性结果图。

[0035] 图5为本发明实施例2中超表达CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株skn7 Δ)与未表达CrHsf2基因的pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株skn7 Δ)对氧化胁迫的耐受性结果图。

[0036] 图6为本发明实施例2中超表达CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株yap1 Δ)与未表达CrHsf2基因的pYES2(对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的突变株yap1 Δ)对氧化胁迫的耐受性结果图。

[0037] 图7为本发明实施例3中超表达载体CrHsf2-pBI1m的结构示意图。

[0038] 图8为本发明实施例3中超表达CrHsf2的转基因拟南芥植株耐热性功能验证图;其中,A为野生型拟南芥WT和三个超表达CrHsf2的纯合体株系萌发10天后在正常生长条件下生长的表型;B为野生型拟南芥WT和三个超表达CrHsf2的纯合体株系萌发后,在正常生长条件下生长5天后,经45℃热激处理50min后,取出放于正常条件下继续生长5天后的表型;C为野生型拟南芥WT和三个超表达CrHsf2的纯合体株系的排布;D为野生型拟南芥WT和三个超表达CrHsf2的纯合体株系在正常生长条件下以及经45℃热激处理50min后继续生长5天的存活率统计。

## 具体实施方式

[0039] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0040] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0041] 在本发明的第一个方面,发明人以抗逆植物海刀豆为研究对象,从海刀豆幼苗cDNA文库中进行筛选,获得了一个编码热激转录因子的CrHsf2基因。其cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,编码的转录因子的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0042] SEQ ID NO.1 (海刀豆CrHsf2基因)

[0043] ATGGATGAAGCGCAGGGTAGTTCAAGTCTCTGCCTCCATTTCTGGCAAAGACTTATGAGATGGTGGATGATCCTTCCACGGATTTCGATTGTTTCATGGAGTGTCACTAACAAAAGTTTTATTGTATGGAATCCCCAGACTTTGC AAGAGATTTGCTGCCTAGATTCTTTAAGCACATAACTTCTCAAGTTTCATCAGGCAGCTCAACACATATGGATTTA AAAAGATTGACCCAGAACAATGGGAATTTGCCAATGATGATTTTGTAAAGAGGGCAGCCTCATCTTATGAAGAACATA CATAGACGGAAGCCAGTTCATAGCCATTCTTTGCAGAATCTTCAAGCACAAAGTCCCGTTGGCCGACTCAGAAAGGCA GAGTTTTACCCATGAAATAGAGAAGCTTAAACATGATAAAGAACAACCTTCTTGTGGAGTTACGCAGACATCAACATG AGTGGCAATCTTATGAGATACAAATACATTGCTCAAAAGATCGGTTGAAAAGTTGGAACAGAAGCAAGAAAGGATG GTTTCTTCTGTCTCTCAAGTGTTCAGAAAGCCTGCGATTGCTGTAAATATCTTGCCACTGACTGAAACTATGGATAG AAAACGAAGTTGCCAAGAAGTGGCTACTTTAATGATGAAGCTAGTATCGAAGATGCTGATGAAACTTCCCAAATGT TACTGAGAGAAAATGCAGAGAATACCTCAGTTTTGACGTTGAACATGGGGCGATTGGATCAGCTTGAATCATCTGTG GCATTTTGGGAGGCCATTGCACAGGATCTTGGTGTATGCCTTCTCTCAAATTCAGTCAAACATGGATTTTGTATGAATC TACAAGTTGTCCTGATAGTCCGTCCATATCTTGTGCGCACTAGATGTTGAAGTTCGGCCCAAGTCATCTGGAATTG ACATGAACTCAGAGCCAACCTGCAGCTGCTATTCTTGAGCCTGTTGCATCAAAAGAACAACCTGTGGGAACCACTGTT GCAGCAACTGGTGTAAATGATGTATTCTGGGAACAATCTTGACAGAGGATCCTGGTGCATCTGAAGCACAGAAGT GCAGTCAGAAAGAAAAGATTATGATGGCCAAAAGAATGAAGGAAAACCTAGTGAGCTTGGCAAATTTTGGTGGAAACA TGCGGAACGCCAATAATCTTCCAGAACAGATGGGGCATGTTGGTCAAGCAGAAAAAACTTAG

[0044] SEQ ID NO.2 (海刀豆CrHsf2基因编码的转录因子)

[0045] MDEAQGSSSSLPPFLAKTYEMVDDPSTDSIVSWSVTNKSFIVWNPPDFARDLLPRFFKHNNFSSFIRQL NTYGFKKIDPEQWEFANDDFVRGQPHLMKNIHRRKPVHSHSLQNLQAQVPLADSERQSF THEIEK LKHDK EQLLVEL RRHQHEWQSYEIQIHCSKDRLEKLEKQKQERMVSSVSQVLQKPAIAVNILPLTETMDRKRRLPRSGYFNDEASIEDAD ETSQMLLRENAENTSVLTLNMGRLDQLESSVAFWEAIAQDLGDAFSQIQSNMDFDESTSCPSPSISCAQLDVEVRP KSSGIDMNSEPTAAAIPPEPVASKEQPVGTTVAATGVNDVFWEQFLTDPGASEAQEVQSERKDYDGQKNEGKPSSELG KFWWNMRNANNLPEQMGHVQA EKT

[0046] 应当理解,考虑到密码子的简并性,在不改变氨基酸序列的前提下,对以下实施例中涉及到的碱基序列进行修改,也属于本发明的保护范围。

[0047] 在本发明的第二个方面,构建了插入有海刀豆CrHsf2基因的酿酒酵母重组表达载体,将该重组酵母菌导入酿酒酵母中,获得了插入有海刀豆CrHsf2基因的转基因酵母。通过

半乳糖诱导该基因在酵母中的超表达,能够在过氧化氢胁迫处理下,提高酵母对氧化胁迫的耐受性;同时,在热胁迫处理下,提高酵母对高温胁迫的耐受性。

[0048] 在本发明的第三个方面,构建了插入有海刀豆CrHsf2基因的过表达载体,将该过表达载体通过农杆菌介导的花序侵染法导入拟南芥中,获得了超表达海刀豆CrHsf2基因的转基因拟南芥,在热胁迫处理下,提高拟南芥对高温胁迫的耐受性。

[0049] 以下结合具体实施例和附图对本发明作进一步详细的说明。

[0050] 实施例1海刀豆CrHsf2基因的获得及酵母重组表达载体的构建

[0051] 本实施例以海刀豆幼苗为材料,提取总RNA,并将总RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板,设计引物扩增得到CrHsf2基因,再构建插入有CrHsf2基因的酵母重组表达载体。包括以下步骤:

[0052] 1、海刀豆全长cDNA的制备

[0053] 海刀豆种子采集于海南滨海区域。种子经表面消毒后,用自来水反复冲洗,浸泡吸胀12h后,于28℃培养箱中催芽,根长1~2厘米时种植于蛭石中,置于温室中(26℃,16h光照/8h黑暗)培养2~3周。

[0054] 取2g等量的海刀豆叶片、叶芽、藤及幼根,在预冷的研钵中用液氮研磨成粉末,将粉末适量移至多个RNase-free的1.5mL离心管中,每个离心管加入1mL Trizol Reagent,迅速震荡混匀,并按照试剂说明书操作,获得海刀豆不同组织的总RNA混合样。

[0055] 利用柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒(上海生工),提取海刀豆的总RNA,cDNA单链的合成依照全式金公司TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix的说明书进行。

[0056] 利用SEQ ID NO.3(5'-TACCGAGCTCGGATCCATGGATGAAGCGCAGGGTAG-3')和SEQ ID NO.4(5'-GATATCTGCAGAATTCCTAAGTTTTTCTGCTTGACC-3')作为引物对,使用高保真酶PrimerStar(Takara公司)进行基因扩增,PCR反应体积为50μL。PCR扩增反应体系为:10x PCR Buffer 5μL,10mM dNTP Mixture 4μL,10μM CrHsf2YEF 1μL,10μM CrHsf2YER 1μL,Probest<sup>TM</sup> DNA Polymerase 0.5μL,cDNA模板2μL,ddH<sub>2</sub>O 36.5μL。各种成分混匀后置于PCR仪上进行反应。反应程序为:94℃预变性5min;94℃变性30s、56℃退火45s、72℃延伸60s,30个循环;最后72℃延伸10min。对分子量大约为1200bp清晰目标片段进行切胶并回收凝胶(使用Magen公司HiPure Gel Pure DNA Micro Kit),即为CrHsf2的PCR片段。

[0057] 2、海刀豆CrHsf2基因的酵母重组表达载体的构建

[0058] 酿酒酵母表达载体pYES2经BamHI和EcoRI双酶切处理,回收线性化载体。使用NanoDrop2000紫外分光光度计,测定回收后CrHsf2的PCR片段和线性化pYES2载体的浓度,采用TaKaRa公司的In-Fusion<sup>®</sup>HD Cloning Kit进行DNA片段和载体的同源重组连接。

[0059] 按照说明书的方法将反应产物转化大肠杆菌JM109(TaKaRa公司)感受态菌株。挑取单克隆,提取质粒,经测序鉴定为正确的阳性克隆后,保存质粒备用。构建好的酿酒酵母重组表达载体CrHsf2-pYES2(即重组质粒)如图1所示。

[0060] 经测序分析后,CrHsf2基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所编码的转录因子的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0061] 实施例2 CrHsf2基因在酵母中超表达提高酵母对高温和氧化胁迫的耐受性

[0062] 将实施例1中构建得到的含有CrHsf2基因的CrHsf2-pYES2重组质粒转化野生型酵

母菌株WT和氧化胁迫敏感的酵母突变株skn7  $\Delta$  和yap1  $\Delta$  ,得到转基因酵母,以转化酵母表达载体pYES2空载体的三种酵母菌为对照。将各酵母菌液进行52℃热击处理15分钟(sk n7  $\Delta$  和yap1  $\Delta$  )或30分钟(WT)后,观察转基因酵母的存活能力,从而检测转基因酵母的耐热性。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量为0.4mM和0.5mM的培养基上测试转基因酵母skn7  $\Delta$  和yap1  $\Delta$  的抗氧化性。

[0063] 具体步骤如下:

[0064] 1、CrHsf2-pYES2转化酵母菌株

[0065] 将测序结果得到验证的CrHsf2-pYES2重组质粒调整浓度至0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L,采用醋酸锂法的方法分别转化野生型酵母株系WT,以及转化对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的酵母突变株yap1  $\Delta$  和skn7  $\Delta$  。同时采用酵母表达载体空载体pYES2做对照,分别转化上述酵母株系。

[0066] 酵母转化采用的方法为醋酸锂转化法,具体步骤如下:

[0067] 1) 接种待转化的酵母突变菌株skn7  $\Delta$  , yap1  $\Delta$  和WT的单菌落于5mLYPD液体培养基中,于30℃恒温摇床(200rpm),培养过夜达到饱和。

[0068] 2) 按照1:100比例转移上述培养物到20mLYPD液体培养基中于30℃恒温摇床(200rpm)继续培养,摇3-5h至菌液OD<sub>600</sub>值达0.4-0.6。

[0069] 3) 培养液在室温条件下4000g离心5min,收集细胞。细胞用10mL无菌超纯水重悬,再于室温下5000-6000g离心5min,沉淀细胞。

[0070] 4) 细胞用1mL锂盐溶液重悬,锂盐溶液按照表1配制(现配现用):

[0071] 表1

成分	体积
10×TE 缓冲液, pH 7.5	100 $\mu$ L
10×乙酸锂储液	100 $\mu$ L
无菌 dd H <sub>2</sub> O	800 $\mu$ L

[0073] 5) 将2 $\mu$ L待转化质粒(约500ng/ $\mu$ L)和10 $\mu$ L变性鲑鱼精DNA一起加入1.5mL离心管中混匀。

[0074] 6) 往每个离心管中加入100 $\mu$ L用锂盐溶液重悬的细胞悬液,再加入0.6mL新鲜配制的PEG溶液。PEG溶液的配方如表2所示。30℃摇荡温育30min。

[0075] 表2

成分	体积
50%PEG4000	800 $\mu$ L
10×TE 缓冲液, pH 7.5	100 $\mu$ L
10×乙酸锂储液	100 $\mu$ L

[0077] 7) 于42℃热激15min,室温下离心5s,细胞沉淀用200 $\mu$ L 1×TE缓冲液(从10×储液新鲜配制)重悬,并涂布在添加了2%半乳糖的SDG固体培养基平板上。30℃培养2-5天,直到出现转化子。

[0078] 液体YPD培养基的配方为:酵母浸出物10g/L,蛋白胨20g/L,葡萄糖20g/L;液体SDG



培养基的配方为:未添加氨基酸的酵母氮源(YNB,BD Difco,USA) 6.7g/L,半乳糖20g/L, pH6.8,组氨酸20mg/L,亮氨酸60mg/L,甲硫氨酸20mg/L。相应的固体培养基为液体培养基中添加20g/L的琼脂粉,115℃,高温高压灭菌15分钟。

[0079] 2、CrHsf2基因在野生型菌株WT中表达可以提高转基因酵母的耐热性

[0080] 挑取野生型酵母株系WT中转化空载体pYES2的单克隆,和转化CrHsf2基因的超表达载体CrHsf2-pYES2的单克隆,接种于0.5ml添加了半乳糖的酵母极限液体培养基(SDG培养基)中,30℃恒温摇床(200rpm)培养至菌液OD<sub>600</sub>值达到2。

[0081] 取50μL分别转化空载体pYES2和CrHsf2-pYES2的酵母菌液,于52℃水浴锅中加热30min后,立即取出,置于室温10min。将高温处理和未处理的菌液按照1:10、1:100、1:1000将菌液进行逐级稀释,分别吸取2μl逐级稀释的菌液滴至酵母极限固体培养基(SDG培养基)平板上。30℃培养3天,观察酵母生长情况。

[0082] 结果如图2所示,从图2可知,超表达CrHsf2基因的转基因酵母相比较于转化空载体pYES2的酵母菌株WT而言,经52℃热击处理30min后,能够在培养基平板上生长;而未表达CrHsf2的酵母(转化空载体pYES2)则不能生长,表明CrHsf2基因在酵母中的表达能够提高酵母对热胁迫的耐受性。

[0083] 3、CrHsf2基因在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感突变株中表达可以提高转基因酵母的耐热性

[0084] 挑取对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的酵母突变株skn7 Δ和yap1 Δ转化空载体pYES2的单克隆,和转化CrHsf2基因的超表达载体CrHsf2-pYES2的单克隆,按照上述步骤2的方法进行液体培养基培养,并经52℃热击处理15min后,和未经热击处理的酵母菌液,经逐级稀释后滴至极限固体培养基(SDG培养基)平板上。30℃培养3天,观察酵母生长情况。

[0085] 结果如图3和图4所示,从图3和图4可知,超表达CrHsf2基因的转基因酵母相比较于转化空载体pYES2的skn7 Δ(图3)和yap1 Δ(图4)酵母突变株而言,能够在极限培养基平板上生长,且生长状况良好;而未表达CrHsf2基因的酵母(转化空载体pYES2)则不能生长,表明CrHsf2基因在酵母中的表达能够提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感突变株skn7 Δ和yap1 Δ对热胁迫的耐受性。

[0086] 4、CrHsf2基因在对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的酵母突变株skn7 Δ和yap1 Δ中表达均可以提高转基因酵母对氧化胁迫的耐受性

[0087] 挑取对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的酵母突变株yap1 Δ和skn7 Δ转化空载体pYES2的单克隆,和CrHsf2基因的超表达载体CrHsf2-pYES2的单克隆,同时也挑取野生型酵母WT转化空载体pYES2的单克隆作为对照,将上述克隆分别接种于2ml添加了半乳糖的酵母极限液体培养基(SDG培养基)中,30℃恒温摇床(200rpm)培养至菌液OD<sub>600</sub>值达到2。

[0088] 按照1:10、1:100、1:1000将菌液进行逐级稀释,分别吸取2μl逐级稀释的菌液滴至添加有0.4mM和0.5mM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的酵母极限固体培养基(SDG培养基)平板上。30℃培养3至7天,观察酵母生长情况。

[0089] 结果如图5和图6所示,超表达CrHsf2基因的转基因酵母相比较于转化空载体pYES2的yap1 Δ酵母突变株而言,能够在添加0.4mM和0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基平板上生长;而未表达CrHsf2的酵母skn7 Δ(转化空载体pYES2)则几乎不能生长(图5)。同样,超表达CrHsf2基因的转基因酵母yap1 Δ也能够在添加0.4mM和0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基平板上生长;而未表达CrHsf2的酵母yap1 Δ(转化空载体pYES2)则几乎不能生长(图6)。

[0090] 这些结果表明CrHsf2基因在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感酵母突变株skn7  $\Delta$  和yap1  $\Delta$  中的表达能够提高酵母对氧化胁迫的耐受性。

[0091] 实施例3 CrHsf2基因在拟南芥中超表达提高拟南芥的耐热性

[0092] 本实施例首先构建得到了超表达载体CrHsf2-pBI<sub>m</sub>,再采用CaCl<sub>2</sub>的方法将超表达载体CrHsf2-pBI<sub>m</sub>转化进入农杆菌GV3101感受态菌株中,通过拟南芥花序侵染法转化拟南芥植株,通过Kan抗性筛选获得转基因后代,对转基因拟南芥后代进行耐热性检测。

[0093] 具体步骤如下:

[0094] 1、超表达载体CrHsf2-pBI<sub>m</sub>的构建

[0095] 以实施例1构建得到的插入有海刀豆CrHsf2基因的酵母表达载体CrHsf2-pYES2重组质粒为模板,以SEQ ID NO.5 (5'-GGACTCTAGAGGATCCATGGATGAAGCGCAGGGTAG-3')和SEQ ID NO.6 (5'-TCCGAGCTCACTCGAGCTAAGTTTTTCTGCTTGACC-3')为引物,采用高保真的Taq酶通过PCR扩增CrHsf2基因的cDNA阅读框全长。采用的PCR体系参考TaKaRa公司PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer说明书。扩增的DNA片段依照Magen公司HiPure Gel Pure DNA Kits说明书。回收得到CrHsf2的cDNA阅读框PCR片段。

[0096] pBI<sub>m</sub>质粒经BamHI单酶切处理,回收线性化质粒。回收后的CrHsf2的cDNA阅读框PCR片段和线性化pBI<sub>m</sub>质粒经Nanodrop2000紫外分光光度计测定浓度,采用TaKaRa (Clontech)公司的 **In-Fusion**<sup>®</sup>HD Cloning Kit进行DNA片段和载体的同源重组连接。

[0097] 按照说明书的方法将反应产物转化大肠杆菌JM109感受态菌株。挑取单克隆,提取质粒,经测序鉴定为正确的阳性克隆后,保存质粒CrHsf2-pBI<sub>m</sub>备用。CrHsf2-pBI<sub>m</sub>重组质粒(即超表达载体CrHsf2-pBI<sub>m</sub>)的结构如图7所示。

[0098] 2、拟南芥超表达植株的获取

[0099] 采用冻融法将超表达载体CrHsf2-pBI<sub>m</sub>转化进入农杆菌GV3101中,得到重组农杆菌。

[0100] 然后利用重组农杆菌,通过花浸泡法(Clough SJ,Bent AF.1998.Floral dip:a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.Plant J.16:735-743)将CrHsf2基因导入哥伦比亚生态型(Col)拟南芥,得到T1代种子。

[0101] T1代种子收获后在MS培养基(含有50mg/L卡那霉素)中筛选抗性植株,将抗性植株移栽到土中,收获T2代种子。将T2代种子培育为植株(T2代植株),提取叶片的基因组DNA,用引物对SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6进行PCR鉴定,PCR鉴定为阳性的植株即为T2代转基因植株。

[0102] T2代转基因植株自交产生T3代种子,对T3代种子进行卡那霉素抗性筛选,全部具有卡那霉素抗性的即为纯合体。随机选取三个转基因纯合体株系的T3代种子进行耐热性的鉴定。

[0103] 3、超表达CrHsf2基因的转基因植株后代的耐热性检测

[0104] 随机选取三个转基因植株纯合株系(CrHsf2 0X L2、CrHsf2 0X L3和CrHsf2 0X L7)的T3代种子(每个株系约40粒),以野生型拟南芥(WT)的种子(约40粒)为对照,分别进行如下耐热性鉴定:将各个株系植株的种子同时播种在MS培养基平板上,置于4℃冰箱(无光照)均一化处理两天后,置于22℃光照培养箱(16小时光照/8小时黑暗)中,萌发5天后,放入

45℃的培养箱处理50min,取出放于正常条件下培养,观察并记录拟南芥长势以及存活率。

[0105] 结果如图8所示,从图8可知,经过高温处理(45℃,50min)后,与野生型相比,超表达CrHsf2基因的转基因株系幼苗的存活率均显著高于野生型拟南芥幼苗,表明超表达CrHsf2的能够提高拟南芥植物对热胁迫的耐受性。

[0106] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0107] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

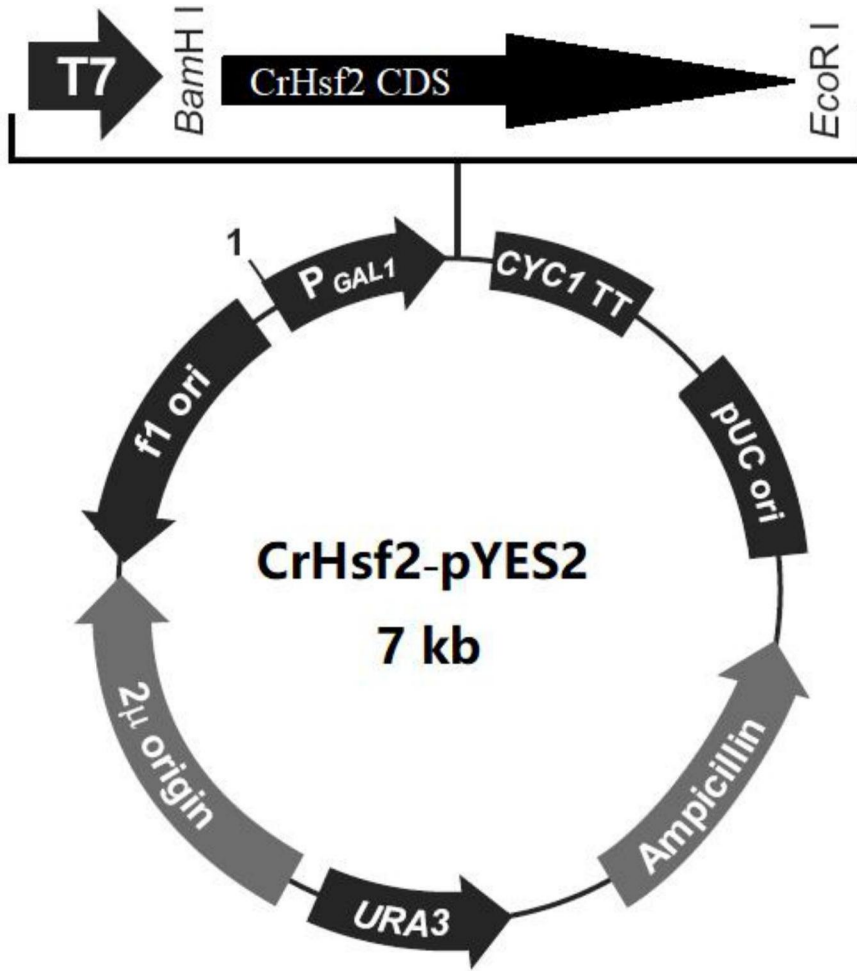


图1

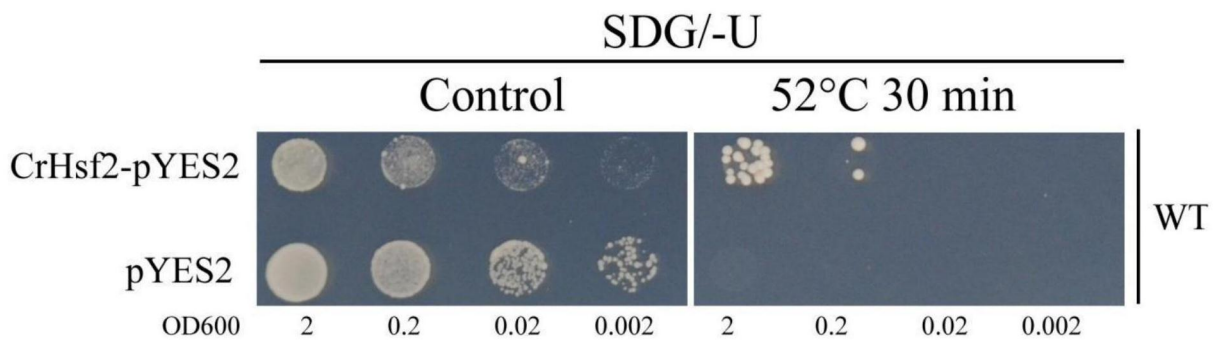


图2

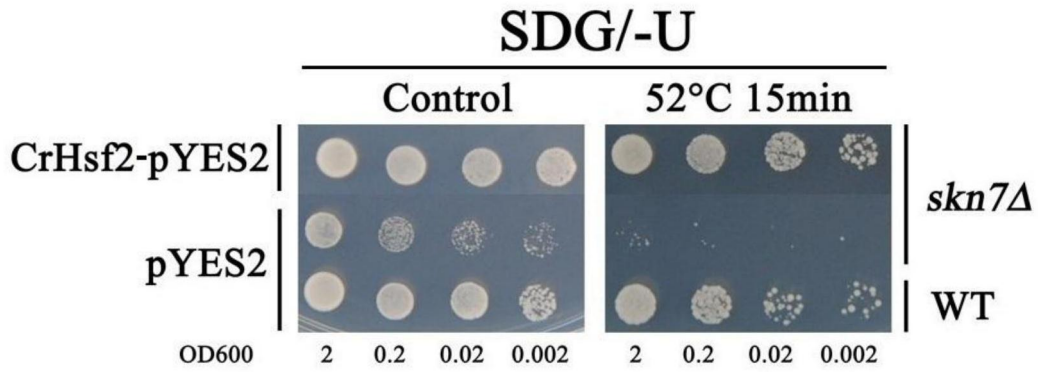


图3

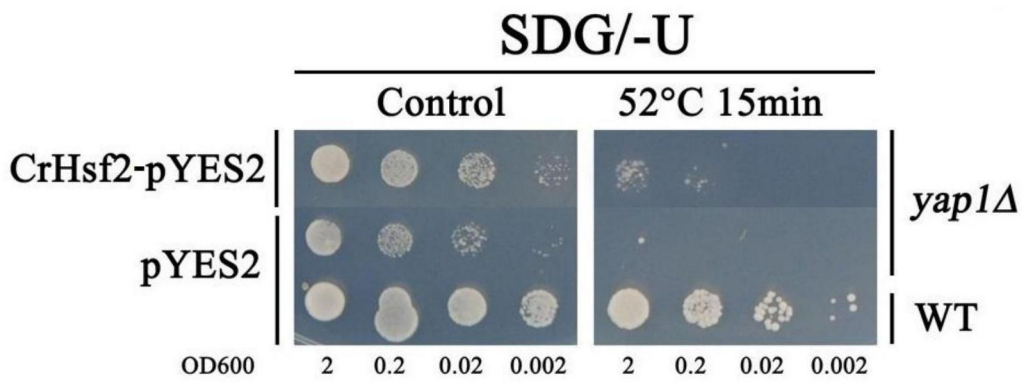


图4

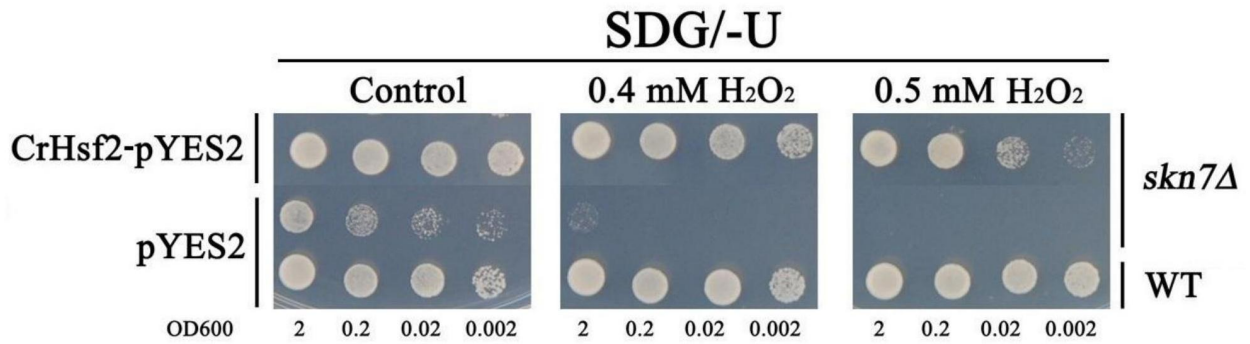


图5

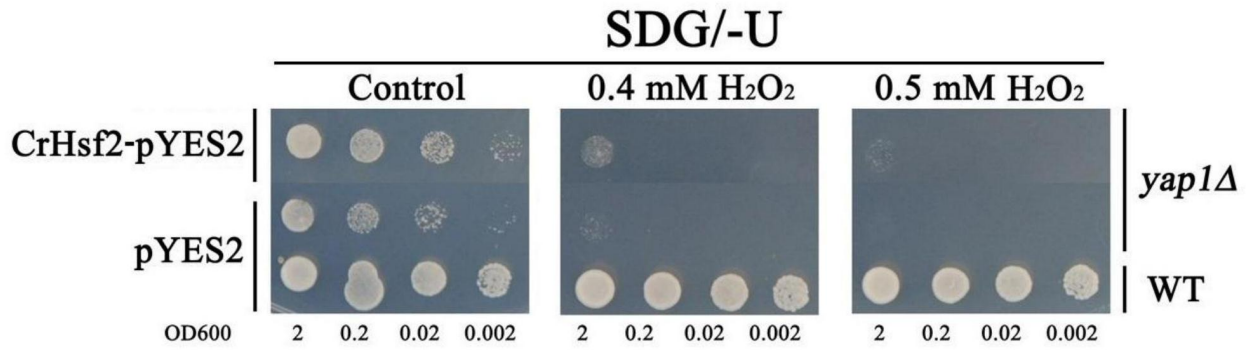


图6

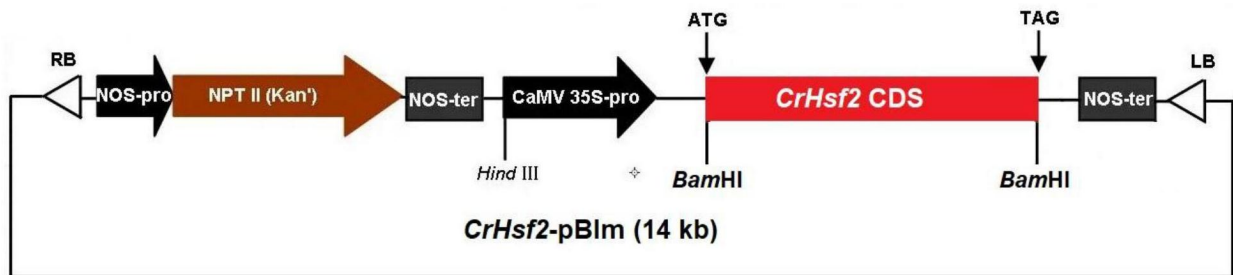


图7

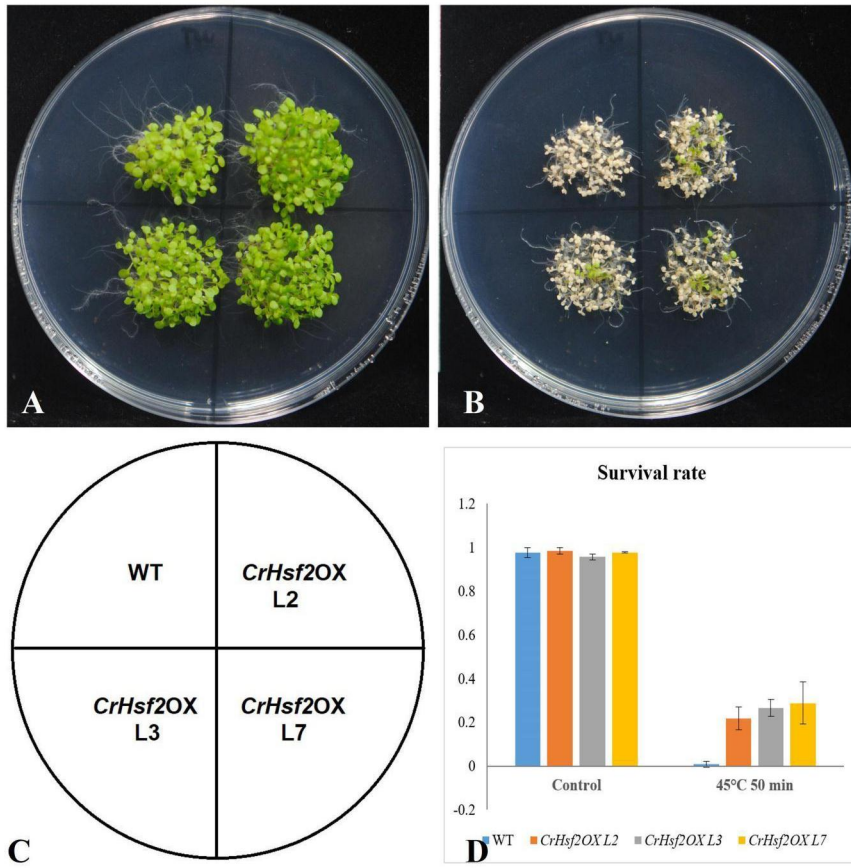


图8