



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115927371 B

(45) 授权公告日 2023.06.23

(21) 申请号 202210880304.6

C12N 15/81 (2006.01)

(22) 申请日 2022.07.25

C12N 1/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A01H 5/00 (2018.01)

申请公布号 CN 115927371 A

A01H 6/20 (2018.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.04.07

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国科学院华南植物园

CN 110643618 A, 2020.01.03

地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号

审查员 留盛鹏

(72) 发明人 张美 简曙光 王峥嵘

(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 曾风云

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

C07K 14/415 (2006.01)

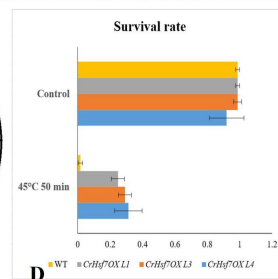
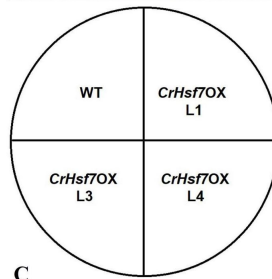
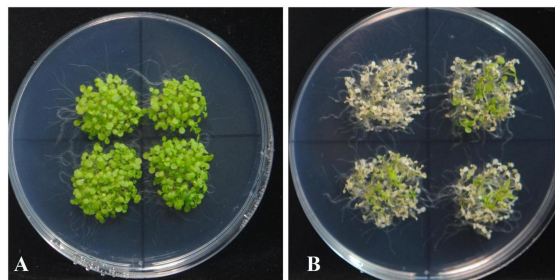
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

海刀豆CrHsf7基因及其转录因子和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种海刀豆CrHsf7基因及其转录因子和应用,所述海刀豆CrHsf7基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQIDNO.1所示;或编码如SEQIDNO.2所示的氨基酸序列。在本发明中,发明人获得了一个编码热激转录因子的CrHsf7基因,并发现:CrHsf7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;CrHsf7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CrHsf7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*CrHsf7*基因,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf7*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;或所述海刀豆*CrHsf7*基因编码如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

2. 一种海刀豆*CrHsf7*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。

3. 权利要求1所述的海刀豆*CrHsf7*基因、或权利要求2所述的海刀豆*CrHsf7*基因编码的转录因子在提高海刀豆或拟南芥耐高温胁迫或提高酿酒酵母抗氧化胁迫中的应用。

4. 权利要求1所述的海刀豆*CrHsf7*基因、或权利要求2所述的海刀豆*CrHsf7*基因编码的转录因子在提高海刀豆或拟南芥对高温的耐受性或提高酿酒酵母对氧化胁迫的耐受性的遗传育种中的应用。

5. 一种插入有权利要求1所述的海刀豆*CrHsf7*基因的酿酒酵母重组表达载体,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf7*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;或所述海刀豆*CrHsf7*基因编码如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

6. 一种转化有权利要求5所述的酿酒酵母重组表达载体的转基因工程菌。

7. 一种插入有海刀豆*CrHsf7*基因的过表达载体,其特征在于,所述海刀豆*CrHsf7*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;或所述海刀豆*CrHsf7*基因编码如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

8. 权利要求5所述的酿酒酵母重组表达载体、或权利要求6所述的转基因工程菌在提高酿酒酵母抗氧化胁迫中的应用。

9. 权利要求7所述的过表达载体在提高海刀豆或拟南芥耐高温胁迫中的应用。

10. 一种提高海刀豆或拟南芥耐高温胁迫的生物制剂,其特征在于,所述生物制剂的活性成分为权利要求7所述的过表达载体。

11. 一种提高海刀豆或拟南芥耐高温胁迫的方法,其特征在于,所述方法包括提高海刀豆*CrHsf7*基因在植物中的表达,所述海刀豆*CrHsf7*基因的cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;或所述海刀豆*CrHsf7*基因编码如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

海刀豆CrHsf7基因及其转录因子和应用

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.) CrHsf7 (heat shock transcription factor 7) 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] 随着全球气候变暖,高温天气带来的作物减产现象频频出现,特别是作物开花和种子发育期的高温胁迫,是导致谷类作物减产的主要原因之一。高温胁迫对植物的直接伤害是蛋白质分子变性、生物膜结构破损、自由基和活性氧化物累积、体内生理生化代谢紊乱。

[0003] 热激转录因子家族(heat shock transcription factors, Hsfs)在缓解高温对植物的伤害中发挥重要的作用。Hsfs基因广泛存在于所有真核生物中,根据结构特点,Hsfs被分为A、B、C三大家族,Class A Hsfs (HsfAs)在其C端通常存在两个保守的转录激活结构域AHA,该结构域负责转录复合体蛋白结合,从而激活转录;而Class B Hsfs (HsfBs)和Class C Hsfs (HsfCs)的C末端都不包含转录激活结构域AHA。部分HsfBs在其C末端靠近核定位NLS处有一抑制结构域,是由高度保守的四肽LFGV motif形成。HsfCs的C末端功能未知。

[0004] 根据以往研究,Hsfs不仅参与植物抵御高温胁迫的调控过程,还参与植物抗旱、抗盐、抗氧化、抗重金属和抗高渗透胁迫过程。大部分Hsfs家族成员是通过调控一系列热激蛋白,分子伴侣,活性氧清除酶和其他功能蛋白基因发挥抗逆作用的。Hsfs通过与下游基因启动子区域的热激元件(heat shock element, HSE)结合而调控下游基因的表达。

[0005] 研究表明,植物Hsf基因不仅参与植株耐热性调控,还介导多种逆境胁迫响应过程,而多数抗逆调控过程与植物的抗氧化性密切相关。植物HsfA2广泛参与调控植物体对热、盐、渗透压、缺氧、高光、氧化胁迫、非生物胁迫记忆的应答(Andrási N et al, J Exp Bot. 2021. doi:10.1093/jxb/eraa576)。牧草高羊茅A2亚家族基因FaHsfA2c在拟南芥和高羊茅中超表达均能够提高这两种植物对高温胁迫的耐受性(Wang et al, Plant Biotechnol J. 2017. doi:10.1111/pbi.12609)。玉米A2亚家族基因ZmHSA2在拟南芥中超表达能够促进棉子糖的积累而提高转基因拟南芥对高温胁迫的耐受性(Gu et al, Plant J. 2019. doi:10.1111/tpj.14434)。小麦A2亚家族基因TaHsfA2-1在拟南芥中超表达不仅能够促进拟南芥在正常环境中的生长状况,而且还能够显著提高转基因拟南芥对高温胁迫的耐受性(Liu et al, J Plant Physiol. 2020. doi:10.1016/j.jplph.2020.153135)。

[0006] 在热带珊瑚岛礁极端气候环境中,存在一些特殊生境的乡土适生植物。特殊生境适生植物因其长期的适应性进化,其分子水平肯定发生了一系列的变化使其基础逆境耐受性提高,而其抗逆基因在表达调控或分子功能方面也可能优于普通植物抗逆基因的生物学功能。这些特殊生境植物具有丰富的耐热和抗旱、耐盐基因。利用基因工程技术,克隆出这些优良的抗逆基因,通过基因转化提高植物抗逆性,对提高耐热性、耐盐碱和耐干旱性,增加农作物产量,改善植物对不良生态环境的适应性,具有非常重要的科学意义和应用前景。

[0007] 海刀豆 (*Canavalia rosea*) 是一种泛热带亚热带分布红树伴生植物, 具有极强的抗逆性, 而其耐热性和抗盐碱性尤为显著。目前关于海刀豆基因资源的开发利用方面还未见报道。Hsf基因家族作为重要的抗逆调节因子, 必然在调控植物抗逆性发挥重要作用。因此, 开发利用海刀豆Hsf基因资源非常有意义。

发明内容

[0008] 基于此, 本发明的目的之一是提供一种海刀豆CrHsf7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。

[0009] 实现上述发明目的的具体技术方案包括如下:

[0010] 一种海刀豆CrHsf7基因, 其cDNA阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示; 或所述海刀豆CrHsf7基因编码如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

[0011] 在其中一些实施例中, 所述海刀豆CrHsf7基因是以SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的引物对扩增得到的。

[0012] 本发明还提供了一种海刀豆CrHsf7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。

[0013] 本发明还提供了上述海刀豆CrHsf7基因或上述海刀豆CrHsf7基因编码的转录因子在提高植物耐高温胁迫中的应用。

[0014] 本发明还提供了上述海刀豆CrHsf7基因或上述海刀豆CrHsf7基因编码的转录因子在提高植物抗氧化胁迫中的应用。

[0015] 本发明还提供了上述海刀豆CrHsf7基因或上述海刀豆CrHsf7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。

[0016] 本发明还提供了一种插入有海刀豆CrHsf7基因的酿酒酵母重组表达载体。

[0017] 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。

[0018] 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。

[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抗氧化胁迫中的应用。

[0020] 本发明还提供了一种插入有海刀豆CrHsf7基因的过表达载体。

[0021] 在其中一些实施例中, 所述过表达载体为插入有CrHsf7基因的pBIm质粒。

[0022] 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。

[0023] 本发明还提供了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为上述酿酒酵母重组表达载体、转基因工程菌或过表达载体。

[0024] 本发明还提供了一种提高植物耐高温胁迫的方法, 该方法包括提高海刀豆CrHsf7基因在植物中的表达。

[0025] 与现有技术相比, 本发明具有以下有益效果:

[0026] 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CrHsf7基因, 并进一步对该基因进行了应用性探索后发现: CrHsf7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; CrHsf7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CrHsf7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

[0027] 图1为本发明实施例1中酿酒酵母重组表达载体CrHsf7-pYES2的结构示意图。

[0028] 图2为本发明实施例2中超表达CrHsf7基因的CrHsf7-pYES2与未表达CrHsf7基因的pYES2对高温胁迫的耐受性结果图。

[0029] 图3为本发明实施例2中超表达CrHsf7基因的CrHsf7-pYES2(对H₂O₂敏感的突变株skn7 Δ)与未表达CrHsf7基因的pYES2(对H₂O₂敏感的突变株skn7 Δ)对高温胁迫的耐受性结果图。

[0030] 图4为本发明实施例2中超表达CrHsf7基因的CrHsf7-pYES2(对H₂O₂敏感的突变株yap1 Δ)与未表达CrHsf7基因的pYES2(对H₂O₂敏感的突变株yap1 Δ)对高温胁迫的耐受性结果图。

[0031] 图5为本发明实施例2中超表达CrHsf7基因的CrHsf7-pYES2(对H₂O₂敏感的突变株skn7 Δ)与未表达CrHsf7基因的pYES2(对H₂O₂敏感的突变株skn7 Δ)对氧化胁迫的耐受性结果图。

[0032] 图6为本发明实施例2中超表达CrHsf7基因的CrHsf7-pYES2(对H₂O₂敏感的突变株yap1 Δ)与未表达CrHsf7基因的pYES2(对H₂O₂敏感的突变株yap1 Δ)对氧化胁迫的耐受性结果图。

[0033] 图7为本发明实施例3中超表达载体CrHsf7-pBI1m的结构示意图。

[0034] 图8为本发明实施例3中超表达CrHsf7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CrHsf7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CrHsf7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CrHsf7的纯合体株系的排布;D为野生型拟南芥WT和三个超表达CrHsf7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

[0035] 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。

[0036] 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(NewYork: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。

[0037] 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CrHsf7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。

[0038] SEQ ID NO.1(海刀豆CrHsf7基因)

[0039] ATGAAGGGAGTTACAGTGAAAAGTGAAGAGACAGTGGCATATGGTGGTGGTGCAGCAGGTCATGCTTCT
GCTTCAAGCTCTTCTTATTCTTCTTCAACTTCTTCAACCTTCTCTCCCAACCTATGGAAGGTTTGCACGAGGT
GGGTCCTCCTCCATTCTCACAAAACCTTCGAAGTCGTGAAGACCCATCCACCGACTCCATTGTATCGTGGAGCA
AAGCACGCAACAGCTTCGTCGTTTGGGATTCTCATCAATTCTCTACCACCATCTTACCTCGTTACTTCAAACACTGC
AATTTCTCCAGCTTCGTTTCGTCAACTTAATACCTATGGATTTAGGAAAATTGATCCTGATCGATGGGAATTCGCGAA
TGAAGGGTTTTTGGCAGGACAGAAGCACCTGTTGAAGACGATAAAGAGAAGAAGGAACGTGACACAGTCACAGTCAC
AGGCACAGGGTGGGGCTTGTATTGAATTGGGGGAATTTGGGTTTGAAGGTGAGATTGAGAGGTTGAGGAGGGATAGG
ACGGTGTGATGGCAGAGATTGTGAGGTTGAGGCAGCAACAGCACAATTCAAGGGAACAATTGTTGACCATGGAGTC
TAGACTGCAAGCCACTGAGAGGAAGCATCAACAGATGATGACTTTCCTCGCCAAAGCACTCAGCAATCAAACCTTTTG
TCCAAAACCTTCTCCACAGGAATGCTCAGAACAAGGAACTGCAAGGAGTTAGGAGAAAGCGGAGACTCACAGCTAGC
CCAAGTGTGGAGAATCTACAACAGGATCCTGTGATTGGCACTGTGCCAATTGATGAAGAACAAGAAGAAGAATTGGC
GACAACCTATTGAATCCCAGATGGAGTCTTTTTTCTCTGCTGCTTGTGATGATGAATCAAGCACCGAAATCAAGGACC
CCGTATCGAGTGCAGTTTCCAACCTGCAAGTGGGAGTGATTTGGGTTTCGGTCTGGGAGGACTTGCTGAACCAAGACTTG
GTTGCTGGGAATCCTGCGGATGAAGTTGTGATTGGTGATTTTTCACAAATTGATGTTTCTGTGGAGGATTTGGCAGC
AAAGGCTGATGATGATTGGACTGAGGACTTGCAGAGCCTTGTGGATCATATGGGTTATCTTGGCTCCAGACCGTAG

[0040] SEQ ID NO.2(海刀豆CrHsf7基因编码的转录因子)

[0041] MKGVTVKVEETVAYGGGAAGHASASSSSYSSSSTSSTFSPQPM EGLHEVPPPFLKTFEVVEDPSTDS
IVSWKARNFSVWVDSHQFSTTILPRYFKHCNFSFVRQLNTYGRKIDPDRWEFANEGFLAGQKHLKTIKRRRN
TQSQSQAQGGACIELGEFGFEGERLRRDRTVLMAEIVRLRQQQHNSREQLLTMESRLQATERKHQQMMTFLAKAL
SNQTFVQNFLHRNAQNKELQGVRRKRRLTASPSVENLQQDPVIGTVPIDEEQEEELATTIESQMESFFSAACDESS
TEIKDPVSSAVPTASGSDLGSVWEDLLNQDLVAGNPADEVVIGDFSQIDVVPEDLAAKADDDWTEDLQSLVDHMGYL
GSRP

[0042] 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。

[0043] 在本发明的第二个方面,构建了插入有海刀豆CrHsf7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CrHsf7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。

[0044] 在本发明的第三个方面,构建了插入有海刀豆CrHsf7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CrHsf7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。

[0045] 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。

[0046] 实施例1海刀豆CrHsf7基因的获得及酵母重组表达载体的构建

[0047] 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CrHsf7基因,再构建插入有CrHsf7基因的酵母重组表达载体。包括以
下步骤:

[0048] 1、海刀豆全长cDNA的制备

[0049] 海刀豆种子采集于海南海滩(16°83'93"N,112°34'00"E)。种子经表面消毒后,用

自来水反复冲洗,浸泡吸胀12h后,于28℃培养箱中催芽一周,之后种植于湿润的蛭石中(26℃,16h光照/8h黑暗)约2~3周成长至幼苗。

[0050] 以海刀豆幼苗为材料提取总RNA,按照Magen公司HiPure Plant RNA Kits (R4151)的操作说明书提取叶片总RNA。对提取的叶片总RNA进行NanoDrop2000核酸蛋白检测仪检测浓度。

[0051] 取大约1μg的海刀豆总RNA,采用两步法以总RNA为模板进行逆转录反应获取cDNA第一链。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。

[0052] 以海刀豆的总cDNA为模板,利用SEQ ID NO.3(5'-TACCGAGCTCGGATCCATGAAGGGAGTTACAGTG-3')和SEQ ID NO.4(5'-GATATCTGCAGAATTCCTACGGTCTGGAGCCAAG-3')作为引物对,使用高保真DNA聚合酶Probest™ DNA Polymerase 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 CrHsf7YEF 1μL,10μM CrHsf7YER 1μL,Probest™ DNA Polymerase 0.5μL,cDNA模板2μL,ddH₂O 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。

[0053] PCR产物通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测,可获得单一的DNA条带(约1150bp),即为PCR扩增得到的CrHsf7基因片段。CrHsf7的PCR片段依照Magen公司HiPure Gel Pure DNA Kits说明书进行琼脂糖凝胶电泳回收。

[0054] 2、海刀豆CrHsf7基因的酵母重组表达载体的构建

[0055] 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CrHsf7的PCR片段和线性化pYES2载体的浓度,采用TaKaRa公司的In-Fusion® HD Cloning Kit进行DNA片段和载体的同源重组连接。

[0056] 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CrHsf7-pYES2(即重组质粒)如图1所示。

[0057] 经测序分析后,CrHsf7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。

[0058] 实施例2 CrHsf7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

[0059] 将实施例1中构建得到的含有CrHsf7基因的CrHsf7-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 Δ 和yap1 Δ,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 Δ 和yap1 Δ)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H₂O₂含量为0.4mM和0.5mM的培养基上测试转基因酵母skn7 Δ 和yap1 Δ 的抗氧化性。

[0060] 具体步骤如下:

[0061] 1、CrHsf7-pYES2转化酵母菌株

[0062] 将测序结果得到验证的CrHsf7-pYES2重组质粒调整浓度至0.1μg/μL,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H₂O₂敏感的酵母突变株yap1 Δ 和skn7 Δ。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。

[0063] 酵母转化采用的方法为醋酸锂转化法,具体步骤如下:

[0064] 1) 接种待转化的酵母突变菌株skn7 Δ , yap1 Δ 和WT的单菌落于5mL YPD液体培养基中,于30℃恒温摇床(200rpm),培养过夜达到饱和。

[0065] 2) 按照1:100比例转移上述培养物到20mL YPD液体培养基中于30℃恒温摇床(200rpm)继续培养,摇3-5h至菌液OD₆₀₀值达0.4-0.6。

[0066] 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。

[0067] 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):

[0068] 表1

	成分	体积
[0069]	10×TE 缓冲液, pH 7.5	100 μ L
	10×乙酸锂储液	100 μ L
[0070]	无菌 dd H ₂ O	800 μ L

[0071] 5) 将2 μ L待转化质粒(约500ng/ μ L)和10 μ L变性鲑鱼精DNA一起加入1.5mL离心管中混匀。

[0072] 6) 往每个离心管中加入100 μ 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。

[0073] 表2

	成分	体积
[0074]	50%PEG4000	800 μ L
	10×TE 缓冲液, pH 7.5	100 μ L
	10×乙酸锂储液	100 μ L

[0075] 7) 于42℃热激15min,室温下离心5s,细胞沉淀用200 μ 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 2、CrHsf7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

[0079] 挑取野生型酵母株系WT中转化空载体pYES2的单克隆,和转化CrHsf7基因的超表达载体CrHsf7-pYES2的单克隆,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OD₆₀₀值达到2。

[0080] 取100 μ L分别转化空载体pYES2和CrHsf7-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2 μ l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。

[0081] 结果如图2所示,从图2可知,超表达CrHsf7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SDG培养基平板上生长;而未表达CrHsf7的酵母(转化空载体pYES2)则不能生长,表明CrHsf7基因在酵母中的表达能够提高酵母对热胁迫的耐受性。

[0082] 3、CrHsf7基因在H₂O₂敏感突变株中表达可以提高转基因酵母的耐热性

[0083] 挑取对H₂O₂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CrHsf7基因的超表达载体CrHsf7-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。

[0084] 结果如图3和图4所示,从图3和图4可知,超表达CrHsf7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SDG平板上生长,且生长状况良好;而未表达CrHsf7基因的酵母(转化空载体pYES2)则不能生长,表明CrHsf7基因在酵母中的表达能够提高H₂O₂敏感突变株skn7 Δ 和yap1 Δ 对热胁迫的耐受性。

[0085] 4、CrHsf7基因在对H₂O₂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

[0086] 挑取对H₂O₂敏感的酵母突变株yap1 Δ 和skn7 Δ 转化空载体pYES2的单克隆,和CrHsf7基因的超表达载体CrHsf7-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中,30℃恒温摇床(200rpm)培养至菌液OD₆₀₀值达到2。

[0087] 按照1:10、1:100、1:1000将菌液进行逐级稀释,分别吸取2 μ l逐级稀释的菌液滴至添加有0.4mM和0.5mM的H₂O₂的酵母极限固体培养基(SDG培养基)平板上。30℃培养2至4天,观察酵母生长情况。

[0088] 结果如图5和图6所示,超表达CrHsf7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 H₂O₂的培养基平板上生长;而未表达CrHsf7基因的酵母skn7 Δ (转化空载体pYES2)则几乎不能生长(图5)。同样,超表达CrHsf7基因的转基因酵母yap1 Δ 也能够添加0.4mM和0.5mM H₂O₂的培养基平板上生长;而未表达CrHsf7基因的酵母yap1 Δ (转化空载体pYES2)则几乎不能生长(图6)。

[0089] 这些结果表明CrHsf7基因在H₂O₂敏感酵母突变株skn7 Δ 和yap1 Δ 中的表达能够提高酵母对氧化胁迫的耐受性。

[0090] 实施例3CrHsf7基因在拟南芥中超表达提高拟南芥的耐热性

[0091] 本实施例首先构建得到了超表达载体CrHsf7-pBI_m,再采用CaCl₂的方法将超表达载体CrHsf7-pBI_m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。

[0092] 具体步骤如下:

[0093] 1、超表达载体CrHsf7-pBI_m的构建

[0094] 以实施例1构建得到的插入有海刀豆CrHsf7基因的酵母表达载体CrHsf7-pYES2重

组质粒为模板,以SEQ ID NO.5(5'-GGACTCTAGAGGATCCATGAAGGGAGTTACAGTG-3')和SEQ ID NO.6(5'-TCCGAGCTCACTCGAGCTACGGTCTGGAGCCAAG-3')为引物,采用高保真的Taq酶通过PCR扩增CrHsf7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 DNAKits说明书。回收得到CrHsf7的cDNA阅读框PCR片段。

[0095] pBIm质粒经BamHI单酶切处理,回收线性化质粒。回收后的CrHsf7的cDNA阅读框PCR片段和线性化pBIm质粒经Nanodrop2000紫外分光光度计测定浓度,采用TaKaRa(Clontech)公司的In-Fusion®HD Cloning Kit进行DNA片段和载体的同源重组连接。

[0096] 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CrHsf7-pBIm备用。CrHsf7-pBIm重组质粒(即超表达载体CrHsf7-pBIm)的结构如图7所示。

[0097] 2、拟南芥超表达植株的获取

[0098] 采用冻融法将超表达载体CrHsf7-pBIm转化进入农杆菌GV3101中,得到重组农杆菌。

[0099] 然后利用重组农杆菌,通过花浸泡法(Clough SJ,BentAF.1998.Floral dip:a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.Plant J.16:735-743)将CrHsf7基因导入哥伦比亚生态型(Col)拟南芥,得到T1代种子。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 3、超表达CrHsf7基因的转基因植株后代的耐热性检测

[0103] 随机选取三个转基因植株纯合株系(CrHsf7 OX L1、CrHsf7 OX L3和CrHsf7 OX L4)的T3代种子(每个株系约50粒),以野生型拟南芥(WT)的种子(约50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。

[0104] 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CrHsf7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CrHsf7基因能够提高拟南芥植物对热胁迫的耐受性。

[0105] 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。

[0106] 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,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

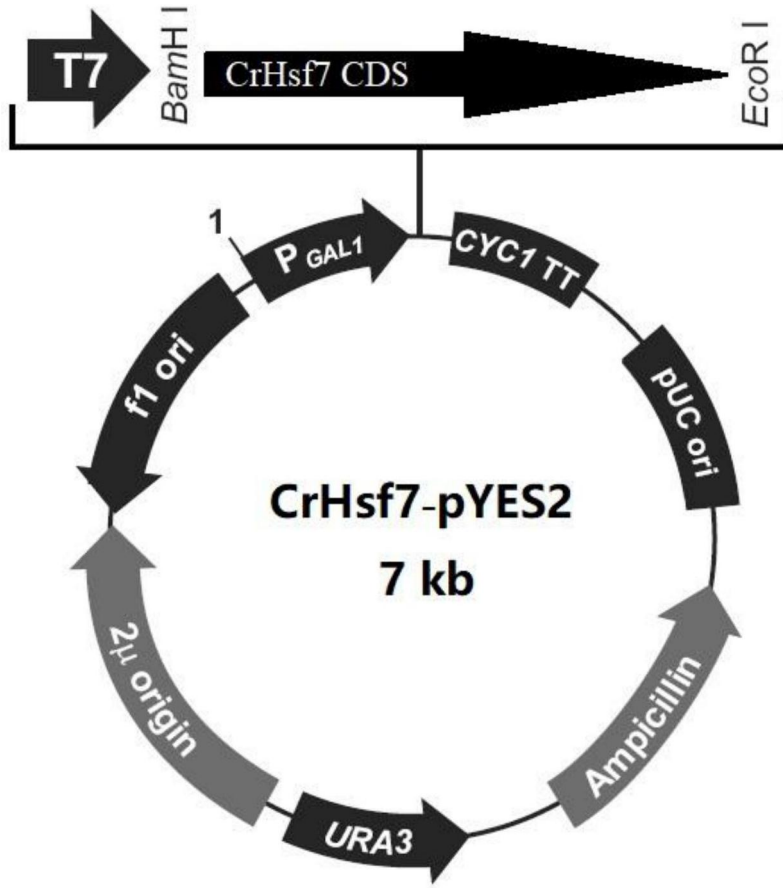


图1

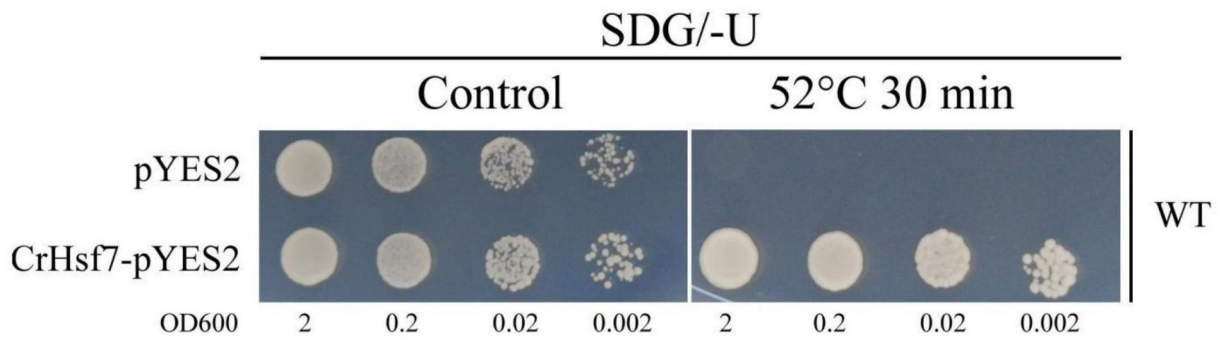


图2

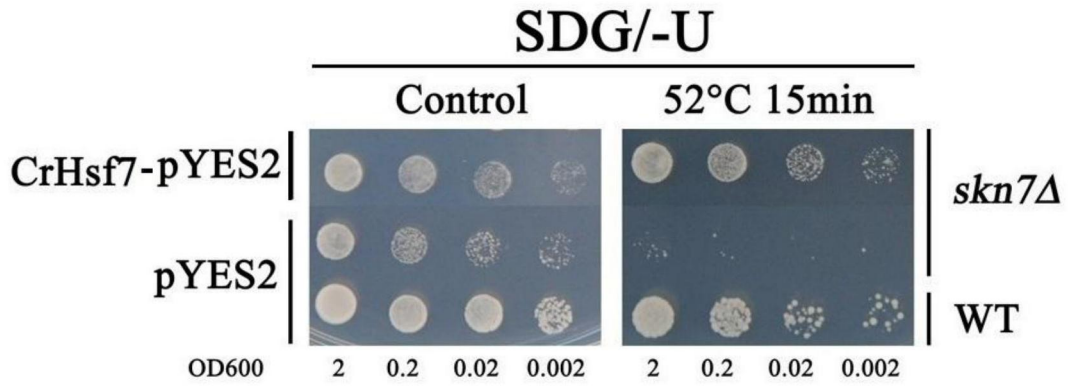


图3

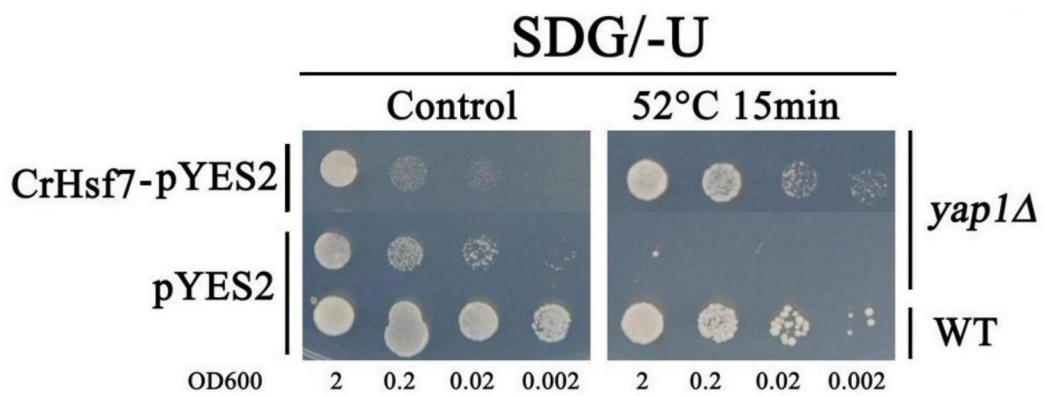


图4

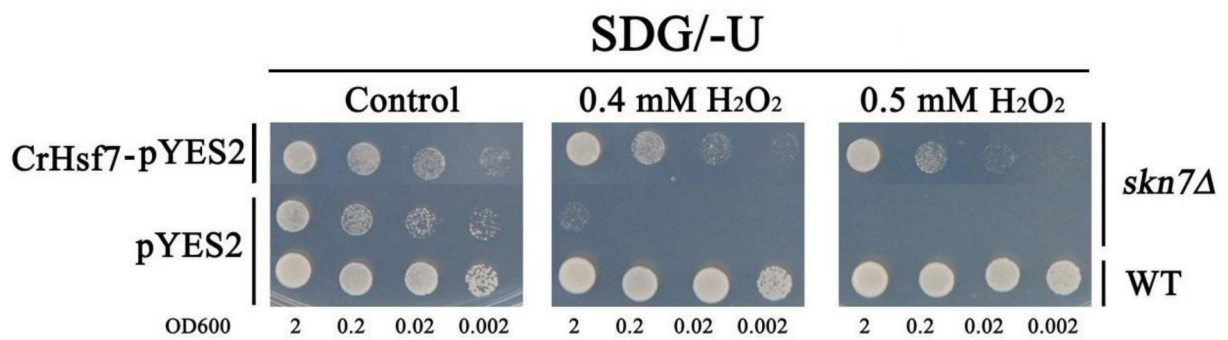


图5

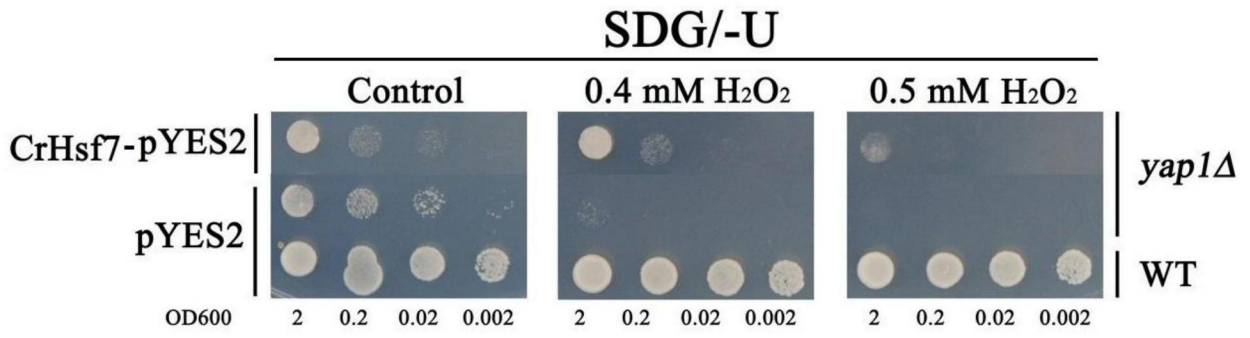


图6

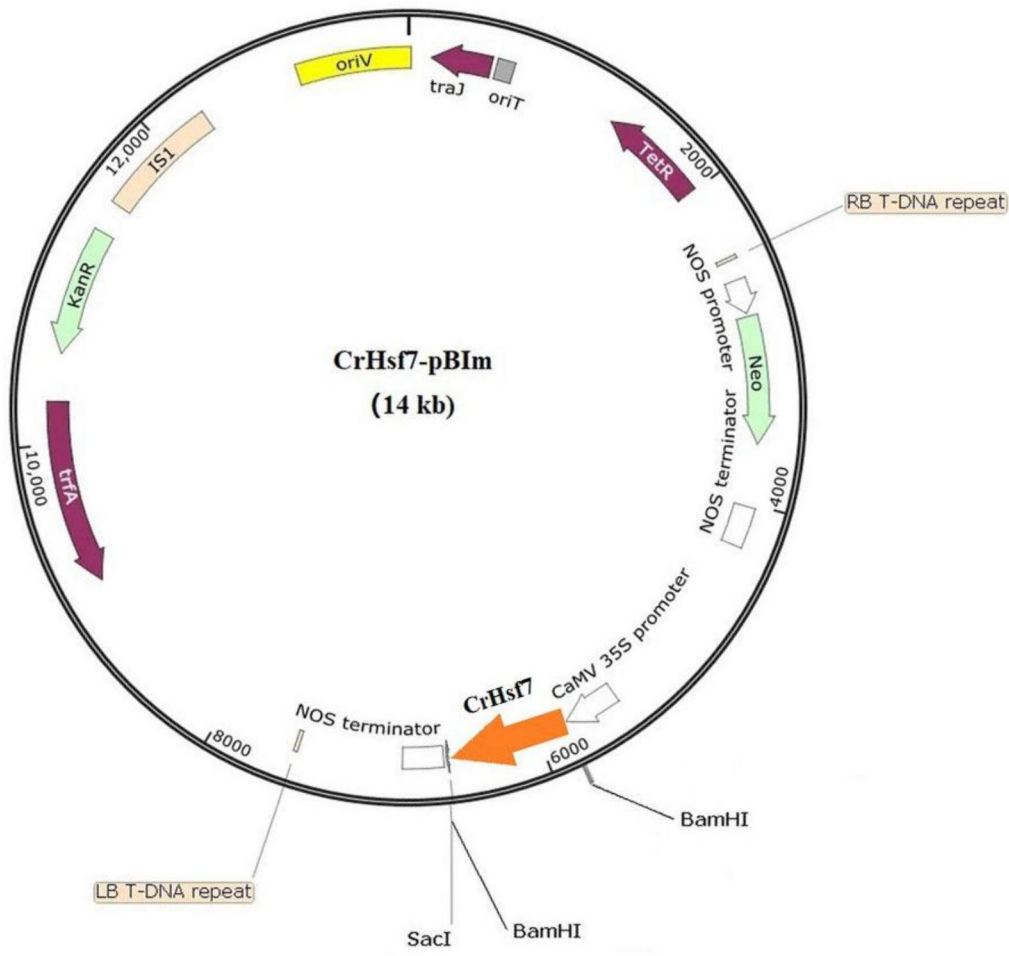


图7

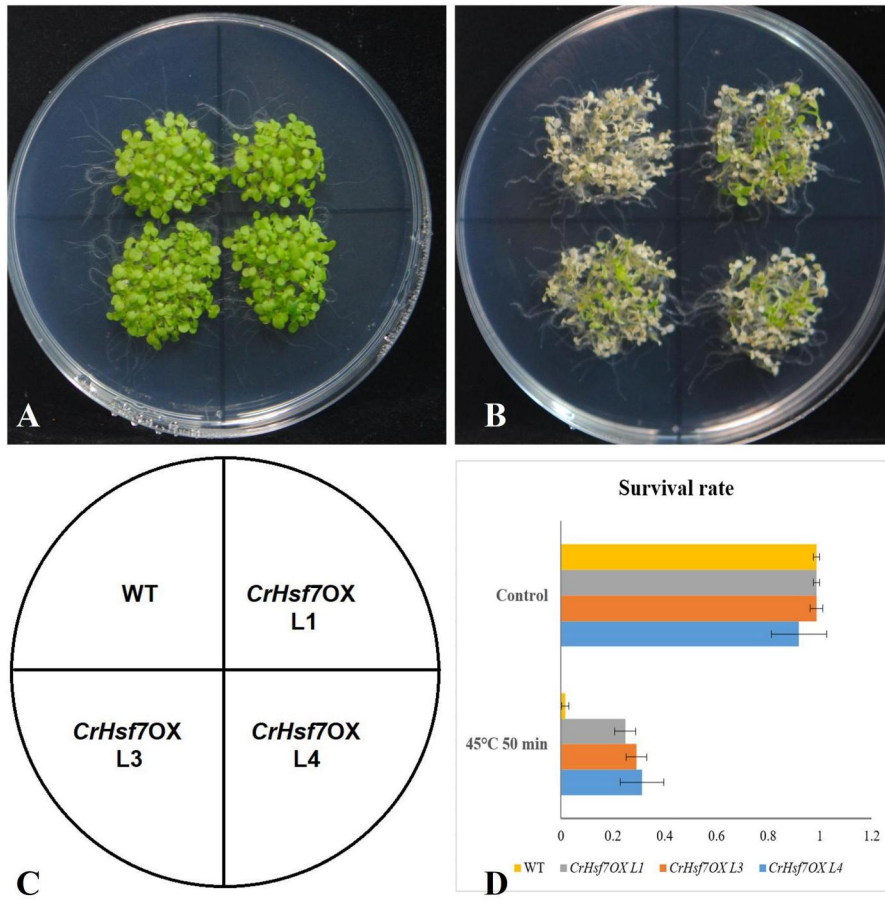


图8