

许奕, 李羽佳, 魏卿, 等. 香蕉 *MaAQPI* 启动子诱饵载体及干旱胁迫酵母单杂交 cDNA 文库的构建 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (10): 1078–1085.

XU Y, LI Y J, WEI Q, et al. Constructions of Banana *MaAQPI* Bait Vector and Drought-resistance cDNA Library [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (10): 1078–1085.

香蕉 *MaAQPI* 启动子诱饵载体及干旱胁迫酵母单杂交 cDNA 文库的构建

许奕^{1,2}, 李羽佳¹, 魏卿¹, 王安邦¹, 王笑一¹, 宋顺^{1,2}, 李敬阳^{1*}

(1. 中国热带农业科学院海口实验站/海南省香蕉遗传改良重点实验室, 海南 海口 571101;

2. 海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南 三亚 572000)

摘要: 【目的】香蕉 *MaAQPI* 能够提高植物的耐旱性, 研究香蕉 *MaAQPI* 的相关特性可为了解其干旱胁迫响应机制奠定基础。【方法】通过克隆 *MaAQPI* 的启动子, 将启动子构建到 pHIS2 诱饵质粒上, 转化酵母菌构建诱饵表达载体, 同时构建干旱胁迫的香蕉 (*Musa acuminat* L. AAA group cv. Brazilian) cDNA 文库。【结果】克隆获得 1 362 bp 的启动子序列, 通过分析其顺式作用元件, 结果显示启动子序列中共有 72 个顺式作用元件, 包括了 TATA-box 和 CAAT-box 核心元件, ABA 响应元件、MYB 元件、MYC 元件、ERE 元件、MeJA 响应元件、光响应元件以及分生组织响应元件等; 成功构建了 *MaAQPI* 诱饵载体和干旱胁迫条件下的 cDNA 文库, 文库库容为 1.25×10^7 CFU, 插入片段平均在 1 200 bp 左右。【结论】本研究克隆获得了香蕉 *MaAQPI* 启动子并构建了干旱胁迫酵母单杂交 cDNA 文库, 为下一步运用酵母单杂交筛选 *MaAQPI* 互作的转录因子、解析 *MaAQPI* 响应干旱胁迫的作用机制奠定了基础。

关键词: 香蕉; 干旱; *MaAQPI*; 诱饵载体; cDNA 文库

中图分类号: S 668.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 10-1078-08

Constructions of Banana *MaAQPI* Bait Vector and Drought-resistance cDNA Library

XU Yi^{1,2}, LI Yujia¹, WEI Qing¹, WANG Anbang¹, WANG Xiaoyi¹, SONG Shun^{1,2}, LI Jingyang^{1*}

(1. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Key Laboratory of Banana Genetic Improvement, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572000, China)

Abstract: 【Objective】To clone *MaAQPI* from a drought stressed banana plant using a constructed bait vector, and establish a cDNA library of the transformed drought-resistance gene from single-hybrids yeast cells. 【Method】The promoter of *MaAQPI* from a banana plant (*Musa acuminat* L. AAA group cv. Brazilian) under draught-stress was constructed on the pHIS2 plasmid as the bait to be transformed into yeast cells for the gene cloning. A cDNA library of *MaAQPI* in the yeast was subsequently established for the study. 【Result】The *MaAQPI* bait vector was successfully constructed. The sequence of the 1 362 bp promoter was cloned and analyzed to show 72 cis-acting TATA-box and CAAT-box core elements as well as elements of MYB, MYC, ERE, and MeJA as well as those of ABA, light, and meristem responses, etc. A drought-resistance cDNA library of 1.25×10^7 CFU in capacity with an average insert size of about 1 200 bp was established. 【Conclusion】The results provided a basis for screening transcription factors of the cloned *MaAQPI* in the yeast single-hybrids to decipher the mechanism of *MaAQPI* in response to drought for improving the stress resistance of plants.

Key words: Banana; drought; *MaAQPI*; bait vector; cDNA library

收稿日期: 2020-06-15 初稿; 2020-07-29 修改稿

作者简介: 许奕 (1985-), 女, 硕士, 研究方向: 作物遗传育种 (E-mail: lukydog163@163.com)

* 通信作者: 李敬阳 (1976-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 作物遗传育种 (E-mail: jingyanglee@163.com)

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项项目 (1630092020002); 国家自然科学基金项目 (31501371); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项项目 (1630092020007)

0 引言

【研究意义】香蕉 (*Musa acuminat* L. AAA group cv. Brazilian) 是热带地区的重要经济作物之一, 被联合国粮农组织 (FAO) 定位为发展中国家仅次于水稻、小麦、玉米之后的第四大粮食作物。然而其根系浅生, 易受旱, 干旱胁迫极大地伤害香蕉正常的生理代谢活动, 造成香蕉减产和品质下降, 是香蕉产业中亟需解决的关键问题。【前人研究进展】香蕉水通道蛋白 (Aquaporin, AQP) 是生物体内广泛存在的一类位于各种细胞膜上 24~34 kD 的小分子跨膜蛋白^[1-2], 隶属于 MIP (Major intrinsic protein, MIP) 超家族, 能够调节水分以及甘油、硼、二氧化碳等小分子物质的运输^[3-4]。AQP 在植物的生长发育中起着重要的作用^[5-7], 如种子萌发、细胞伸长、种子发芽、生殖生长和气孔运动等^[8]。越来越多的研究表明, AQP 能够维持植物中水的稳态响应各种非生物胁迫^[4], 主要包括冷害、盐害、旱害等。近年来的研究表明 AQP 能够提高植物的抗旱性, 在植物中过表达 *OsPIP1*、*OsPIP2*、*VjPIP1*、*BnPIP1* 能够增加植物对渗透胁迫或干旱胁迫的耐受性^[4]。过表达 *TaAQP7* 提高了转基因烟草的抗旱性^[9]。用小麦 *TaTIP2; 2* 转化拟南芥提高了转基因植物的抗旱能力^[10]。【本研究切入点】前期试验表明了 *MaAQP1* 提高了转基因拟南芥的抗旱性^[11], 而其提高植物抗旱性的作用机制仍未有报道。【拟解决的关键问题】本试验通过对干旱胁迫的香蕉进行 cDNA 合成及文库构建, 克隆 *MaAQP1* 启动子并构建其诱饵载体, 为进一步进行酵母单杂等研究 *MaAQP1* 响应干旱胁迫的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 将 5 叶 1 心的巴西蕉 (*Musa acuminat* L. AAA group cv. Brazilian) 进行干旱胁迫处理^[11], 当土壤含水量为 45% 时取根、茎、叶一起混合冻样。

1.1.2 试验试剂 Plasmid Maxi Kit 购自德国 Qiagen 公司, TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司, 1 kb DNA Ladder 和超纯琼脂糖购自上海海科生物技术有限公司, Taq DNA 聚合酶等购自宝生物工程有限公司。cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司; Adenine Sulfate (Ade) 为 Amresco 公司产品。各种工具酶、Marker 购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成和测序由华大完成。

1.2 试验方法

1.2.1 *MaAQP1* 启动子克隆及序列分析 在香蕉全基

因组测序^[12]的基础上通过香蕉 A 基因组网址 (<http://banana-genome.cirad.fr/>) 获得 *MaAQP1* 的 ATG 起始密码子的 2 kb 的 5' 侧翼区域。通过引物从香蕉基因组 DNA 扩增序列, 最后获得 *MaAQP1* 的翻译起始位点 (ATG) 的 1 362 bp 视为全长启动子, 将其构建到 pMD19-T 载体上并测序确认。利用启动子顺式作用元件预测软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对该启动子元件进行预测分析。

1.2.2 pHIS2-p*MaAQP1* 诱饵载体构建 根据 *MaAQP1* 启动子序列分别在其两端添加 *Eco* RI 和 *Sac* I 的酶切位点序列设计引物, 引物序列 p*MaAQP1*-FAAGAATT CCTGCGACGGTTCGTAAAGAG; p*MaAQP1*-R: GGG AGCTCTGAGTGGAGGAATCAGGGTG, 从 pMD19T-p*MaAQP1* 上进行扩增, 将扩增条带回收, 和 pHIS2 表达载体分别用 *Eco* RI 和 *Sac* I 进行双酶切, 酶切产物分别纯化回收后进行连接, 连接产物转化到 E.coli DH5 α 感受态细胞中, 活化后涂布于 LB 固体培养基上 (内含 30 ng·mL⁻¹ Amp), 37 °C 过夜培养后挑取单菌落摇菌, 提取质粒进行酶切鉴定, 然后选取阳性单克隆送华大基因测序, 测序正确的即为诱饵载体 pHIS2-p*MaAQP1*。

1.2.3 诱饵载体转化酵母菌株及自激活检测 将诱饵质粒 pHIS2-p*MaAQP1*、阳性和阴性对照分别转化到酵母菌 Y187 感受态中, 并涂布于平板 SD-Trp-Leu-His + 50 mmol·L⁻¹ 3AT 上生长。从 SD-T 平板中挑取单菌落于 50 mL 液体培养基中, 在温度 30 °C、转速 225 r·min⁻¹ 培养 18 h。将菌液转接于 500 mL 液体 YPDA 培养基中, 使初始 OD₆₀₀ = 0.2, 30 °C, 转速 824 r·min⁻¹ 条件下培养 4~5 h, 至 OD₆₀₀ = 0.6。在转速 1 737 r·min⁻¹ 下离心 5 min 集菌。依次用 30 mL 无菌 H₂O, 转速 1 000 r·min⁻¹, 室温下 5 min 集菌并弃上清。依次用 20 mL 0.1 mol·L⁻¹ LiAc, 10 mL 0.1 mol·L⁻¹ LiAc 重复上一步骤, 离心集菌弃上清。向离心管中依次加入 1.44 mL 1 mol·L⁻¹ LiAc, 9.6 mL 50%PEG3350, 25 μ g 文库质粒 DNA, 300 μ L ssDNA (10 mg·mL⁻¹) 剧烈振荡 1 min 至完全混匀。在 30 °C 水浴中孵育 30 min。42 °C 水浴热激 25 min。重复 30 °C 水浴 1 h。在室温下转速 1 453 r·min⁻¹ 离心 5 min 离心集菌弃上清。每个转化用 200 μ L 无菌 H₂O 重悬菌体, 温和混匀, 并涂布于相应的缺陷型平板中, 在 30 °C 中培养 3~4 d。

分别从表 1 中各转化的平板上各随机挑取 3 个单菌落, 稀释后涂板至对应的不添加 histidine、添加不同浓度 (25、50 mmol·L⁻¹) 3AT 的缺陷型平板上 (3AT 是酵母 HIS3 蛋白合成的竞争性抑制剂, 用于

表 1 酵母转化反应
Table 1 Yeast transformation reaction

反应 Reaction	AD质粒 AD plasmid	BD质粒 BD plasmid	转化平板 Conversion plate	检测平板 Detection plate	检测内容 Test content
1	——	pHIS2-pMaAQP1	SD-T	SD-TH+3AT	自激活检测 Self-activation detection
2	pGAD53m	pHIS2	SD-TL	SD-TLH+3AT	阴性对照 Negative control
3	pGAD53m	pHIS2-p53	SD-TL	SD-TLH+3AT	阳性对照 Positive control

抑制 His3 基因的泄漏表达), 30 ℃ 恒温培养 3 d。记录每块平板上的克隆数, 并计算每个转化反应在缺陷平板上的转化子数量和生长率。

1.2.4 用于构建文库的 cDNA 合成 用 CTAB 法提取干旱胁迫处理的香蕉组织, 使用 Oligotex mRNA Kits (Qiagen) 分离纯化样本的 mRNA。用 Supscript double stand cDNA Kit 分别进行 cDNA 第一链和第二链的合成, 加 5'接头 (3 个读码框, 每个读码框连接一份, 共 3 份), 使用 1% 浓度的低熔点琼脂糖胶, 电泳 cDNA 产物, 切胶回收 1 000 bp 以上的片段, 用 14 μL 的 DEPC 水溶解回收产物。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 酵母单杂交文库构建

(1) cDNA 与载体的连接 使用同源重组的方式, 将 7 μL cDNA 与 3 μL 的经酶切处理线性化的 pGADT7-Rec2 (单杂交) 载体, 5 μL 的 Infusion 重组酶和 5 μL 的 H₂O 混匀。于 50 ℃ 反应 1 h, 加入 2 μL 灭活的 Proteinase K 重组酶, 78 μL 无菌 H₂O 至总体积为 100 μL, 加入 1 μL Glycogen (20 μg·μL⁻¹), 375 μL 100% ethanol, 50 μL 7.5 mol·L⁻¹ NH₄OAc, 混匀并于 -80 ℃ 1 h, 在 4 ℃ 下, 转速 6 948 r·min⁻¹ 离心 30 min。弃上清, 加入 150 μL 70% 乙醇, 在 4 ℃ 下, 转速 6 948 r·min⁻¹ 离心 3 min, 重复此步骤一次, 去尽上清, 在室温下将 cDNA 晾干 5~1 min。用 10 μL DEPC H₂O 重悬 cDNA, 瞬离 2 s 收集 cDNA, 置冰上。

(2) 电转化大肠杆菌感受态细胞 每 2.5 μL 的重组产物转化 50 μL 感受态细胞, 将 1 mm 电转杯 (Bio-Rad) 置于 -80 ℃ 预冷 30 min。将 2.5 μL 重组产物和 50 μL 感受态细胞加入电转杯, 置冰上 45 min。于电转化仪 (Bio-Rad) 上电击, 电击后迅速向电转杯中加入 LB 培养基 1 mL, 然后取入到新的 15 mL 离心管, 补足体积到 5 mL, 置于 37 ℃, 824 r·min⁻¹~868 r·min⁻¹ 离心培养至少 1 h。培养结束后, 将培养物依次稀释 10、100、1 000、10 000 倍, 分别取 10 μL 稀释液涂平板, 剩余培养物可 4 ℃ 保存过夜, 或者加入甘油至终浓度 20% 存于 -80 ℃。

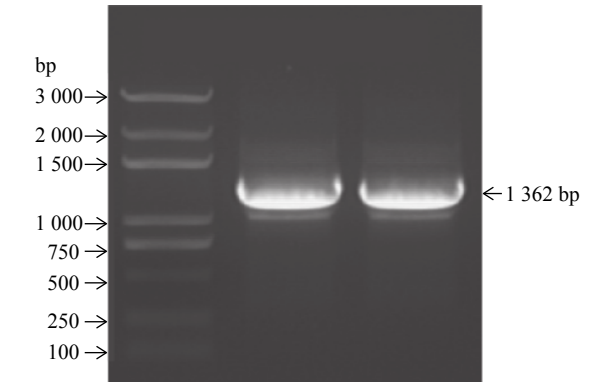
(3) 构建文库质量鉴定 库容量的鉴定: 取转

化后菌原液 10 μL 稀释 1 000 倍后, 从中取出 10 μL 涂布 LB 平板 (含氨苄抗性), 第 2 d 计数。库容量 (CFU·mL⁻¹) = 平板上的克隆数/10 × 1 000 × 10³, 文库总库容量 (CFU) = 库容量 × 文库菌液总体积。插入片段大小鉴定: 挑取平板上的单克隆, PCR 扩增, 电泳检测 PCR 产物大小。

2 结果与分析

2.1 基因启动子的克隆

如图 1 所示, 根据香蕉 A 基因组网站 (<http://banana-genome.cirad.fr>) 设计启动子的引物进行扩增, 扩增长度为 1 362 bp。



注: 泳道 1-2 分别为随机挑取的 2 个启动子的 PCR 扩增产物, M 为 DNA Marker。

Note: Lanes 1-2 are the PCR amplification products of 2 promoters picked at random, M is DNA Marker.

图 1 MaAQP1 启动子的 PCR 鉴定
Fig. 1 PCR identification of MaAQP1 promoter

2.2 基因启动子的序列分析

通过 plantcare 和 PLACE (www.dna.affrc.go.jp) 分析其顺式作用元件, 结果显示了 1 362 bp 的启动子序列中共有 72 个顺式作用元件, 包括了 TATA-box 和 CAAT-box 核心元件, ABA 响应元件 ABRE、MYB 元件、MYC 元件、ERE 元件、MeJA 响应元件、BOX II、G-box、GT1-motif、I-BOX 等光响应元件, 以及分生组织响应元件等 (表 2)。

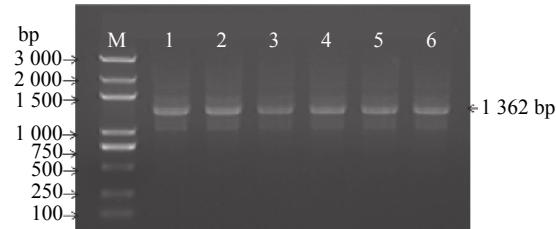
2.3 诱饵载体的构建

取转化了诱饵载体的大肠杆菌菌液进行 PCR

表 2 *MaAQPI* 启动子元件分析
Table 2 Element analysis on *MaAQPI* promoter

序号 Number	结合位点 TFBs	元件功能 Function of the motif	器官 Organism	序列 Sequence	位置 Position
1	AAGAA-motif	LRE	燕麦 <i>Avena sativa</i>	GAAAGAA/gGTAAAGA AA	-1 172,-1 178
2	ABRE	脱落酸响应 Absciscic acid responsiveness	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	ACGTG	-55,-863
3	AT~TATA-box	LRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TATATA	-319,-343,-331,-355,-327,-353,-339,-363, -323,-347,-335,-359,-329,-351,-341,-321, -345,-333,-325,-337,-357,-349,-361
4	Box II	光响应元件 light responsive element	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	TGGTAATAA	-32
5	CAAT-box	核心启动子 Core promoter	烟草/拟南芥/豌豆 <i>Nicotiana glutinosa/Arabidopsis thaliana/Pisum sativum</i>	CAAT	-43,-459,-315,-316,-125,-583,-1 197, -208,-725,-421,-471,-158
6	CAT-box	分生组织表达 meristem expression	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	GCCACT	-254
7	CCAAT-box	结合位点 MYBHv1 binding site MYBHv1	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	CAACGG	-935
8	CGTCA-motif	响应 MeJA-responsiveness MeJA	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	CGTCA	-1 088
9	ERE	烯响应元件 ethylene-responsive element	烟草 <i>Nicotiana glutinos</i>	ATTTTAAA	-377,-775
11	GT1-motif	乙烯响应元件 light responsive element	燕麦 <i>Avena sativa</i>	GGTTAAT	-65
12	I-box	光响应元件 light responsive element	小麦/棉花 <i>Triticum aestivum/ Gossypium hirsutum</i>	AAGATAAGGCT/AGAT AAGG	-611,-612
13	MYB	SRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAACCA	-151
14	MYB recognition site	SRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CCGTTG	-878
15	MYC	SRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CATTTG/CATGTG	-111,-264
16	TATA-box	核心启动子元件 Core promoter element	甘蓝/拟南芥 <i>Brassica napus/ Arabidopsis thaliana</i>	ATATAT/TATATA/taTA TAAAtc/ATTATA	-318,-326,-323,-320,-328,-324,-332,-319, -327,-322,-321,-325,-330,-329,-333,-334, -335,-336,-343,-344,-345,-346,-347,-348, -349,-350,-351,-352,-353,-354,-355, -356,-357,-358,-359,-363,-364,-365, -389,-391,-837,-838
17	TGACG-motif	MeJA响应 MeJA-responsiveness	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	TGACG	-58,-226
18	Unnamed__1	未知 unknown	玉米 <i>Zea mays</i>	CGTGG	-864,-1 274
19	Unnamed__4	未知 unknown	欧芹 <i>Petroselinum hortense</i>	CTCC	-28,-1 016,-1 009,-1 353,-913,-1 255, -1 013,-1 261,-922
20	as-1	LRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TGACG	-58,-226

扩增，将产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。并对扩增得到阳性条带的克隆质粒抽提和测序。测序结果正确，同时其菌落 PCR 结果如图 2，条带正确，说明 *MaAQP1* 启动子片段连接到了表达载体 pHIS2 上。



注：M 为 DNA Marker，泳道 1~6 分别为随机挑取的 6 个 pHIS2-A 启动子菌落的扩增产物。

Note: M is DNA Marker, Lanes 1~6 are the amplification products of 6 randomly selected pHIS2-A starter colonies.

图 2 诱饵质粒 pHIS2-MaAQP1 菌落 PCR 鉴定
Fig. 2 PCR results of bait plasmid pHIS2-MaAQP1 colony

2.4 诱饵载体转化酵母菌株及自激活检测

分别从 3 个不同转化反应的平板上各随机挑取

3 个单菌落，稀释后涂板至相应的不添加 Histidine（组氨酸），添加不同浓度（25、50 mmol·L⁻¹）的 3AT（3-ami,2,4-triazole）缺陷型平板上，在 30℃ 下培养 3 d，结果如表 3 和图 3 所示。阳性对照随着 3AT 浓度增加，生长率会降低，与阴性对照有明显差别。阴性对照由于 HIS3 报告基因未被激活，在添加 3AT 的平板上生长明显减少，随着 3AT 浓度升高，转化子数量减少。自激活检测结果显示，在不添加 3AT 时，平板上的生长菌落 3 424 个，在分别添加了 25 mmol·L⁻¹ 和 50 mmol·L⁻¹ 3AT 的平板上，转化子的生长明显受到抑制，其生长比例与阴性对照的生长比例基本一致，表明其未激活 HIS3 报告基因。当添加 25 mmol·L⁻¹ 3AT 时，其生长受到抑制，菌落个数为 408 个，与对照的生长比例为 11.9%，而当添加了 50 mmol·L⁻¹ 3AT 时，其菌落个数为 68 个，与对照的生长比例为 1.9%。因此，后续试验可以用 50 mmol·L⁻¹ 3AT 进行。

表 3 自激活检测结果
Table 3 Results of self-activation test

反应 Reaction	转化平板 Conversion plate	检测平板 Detection plate	检测内容 Test content	3AT/ (mmol·L ⁻¹)				
				0	25	50		
				生长数目 Growth number	生长数目 Growth number	25/0 生长比例 25/0 Growth ratio	生长数目 Growth number	50/0 生长比例 50/0 Growth ratio
1	SD-T	SD-TH	自激活检测 Self-activation detection	3 424	408	11.9%	68	1.9%
2	SD-TL	SD-TLH	阴性对照 Negative control	3 968	1 376	34.6%	31	0.7%
3	SD-TL	SD-TLH	阳性对照 Positive control	5 024	5 136	102.2%	4 160	82.8%

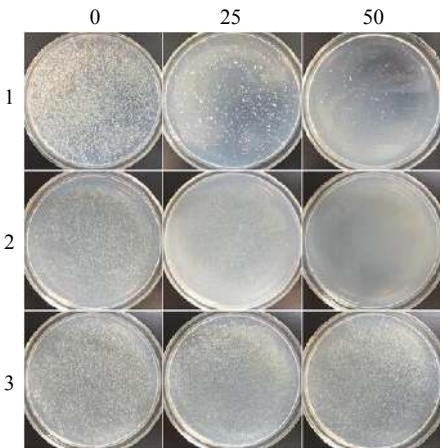
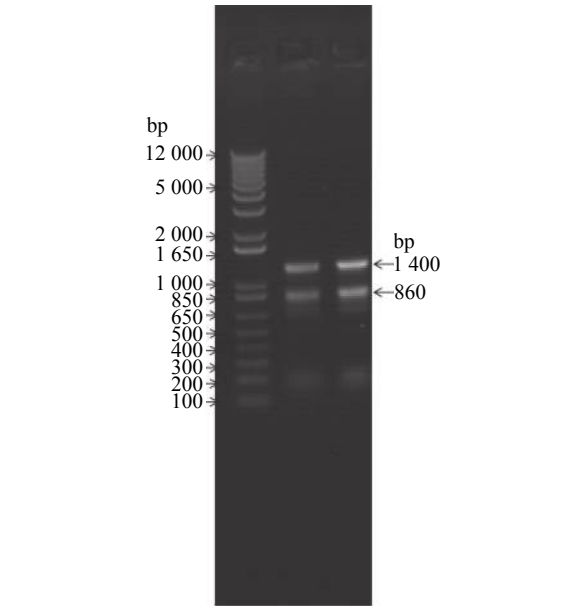


图 3 诱饵自激活检测结果
Fig. 3 Detection by self-activation bait

2.5 cDNA 文库的构建

将提取的干旱胁迫处理的香蕉总 RNA，琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 4 中显示，总 RNA 的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰，条带 28S 亮度约为 18S 的 2 倍，说明总 RNA 质量较好，并无发生降解和污染。将 RNA 进行 mRNA 分离纯化，如图 5 所示，mRNA 条带呈弥散状分布，分布均匀，mRNA 总量为 4.5 μg，可以满足建库需要。

使用同源重组的方法，将线性化的香蕉 cDNA 与经酶切处理线性化的 pGADT7-Rec2（单杂交）载体混合共转化至大肠杆菌感受态中，取原液稀释后涂布于 LB 平板上（含氨苄抗性），第 2 d 计数，如图 6 所示，插入片段集中在 500~2 000 bp，平均插



注：M 为 DNA Marker，泳道 1~2 分别为提取的 RNA 扩增产物。
Note: M is DNA Marker; Lanes 1-2 are the RNA amplification products.

图 4 RNA 提取结果
Fig. 4 Results of RNA extraction

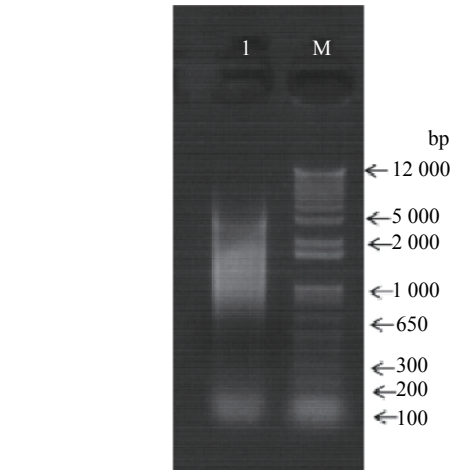


图 5 电泳检测 mRNA 条带
Fig. 5 Electrophoretic detection of mRNA bands

入片段大于 1 200 bp，阳性率为 100%。在 10 μ L 菌液稀释 100 倍后，取 10 μ L 涂板，共生长了约 250 个克隆，其库容量为 2.5×10^6 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ ，共计 5 mL 的转化后原始菌液，则总库容量为 1.25×10^7 CFU。

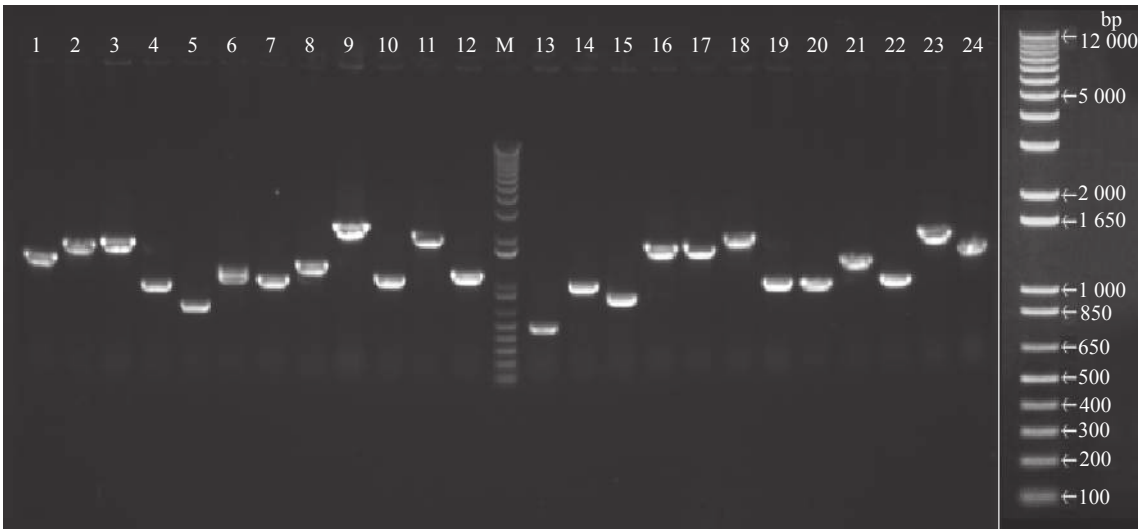


图 6 cDNA 文库插入片段电泳图
Fig. 6 Electrophoresis of insert fragment in cDNA library

3 讨论与结论

香蕉是大水大肥作物，干旱胁迫严重影响其生长发育及品质。目前的研究表明，水通道蛋白基因（*AQP*）作为膜蛋白能够增加植物的水分运输能力，提高植物的耐旱性。在拟南芥中，将 *AtPIP1*; 2 和 *AtPIP2*; 2 沉默会降低拟南芥抵御干旱的耐受性^[13-14]。在水稻中过表达 *OsPIP1*、*OsPIP2* 和 *OsPIP1*; 3 能够增强植物对于干旱胁迫的耐受性^[15-16]。在烟草中过表达 *TaAQPI* 和 *TaAQPI* 8 可以提高植物对于干旱的耐受性^[3,9]。因此，研究 *AQP* 响应干旱胁迫的作用机制，

对于进一步通过生物技术提高香蕉的耐旱能力具有重要的理论意义。本研究通过克隆干旱胁迫下的香蕉 cDNA，构建用于酵母单杂交的 cDNA 文库，通过克隆香蕉水通道蛋白基因 *MaAQPI* 启动子，构建酵母诱饵表达载体，为下一步利用酵母单杂交筛选与香蕉 *MaAQPI* 互作的转录因子奠定了基础。

启动子在时间和空间意义上对于启动基因转录和调节基因表达都很重要。靶向基因及其启动子的遗传修饰可用于增强作物生长性能^[17]。顺式元件与转录因子（TFs）之间的相互作用在转录的协调调控中对激活或抑制靶基因的表达起关键作用^[18-19]。目

前,可用于作物遗传改良的启动子很少。植物中最常见的启动子类型是 35 s 启动子 CaMV35S,它可以在标记植物中驱动高水平的基因表达,而玉米泛素启动子则在单子叶植物中驱动基因表达。这些启动子能够在几乎所有组织和发育阶段的标志物或单子叶植物中驱动高水平的基因表达^[20-22]。在特定条件下或某些组织中,诱导型或组织特异性启动子调节靶基因的表达。迄今为止,已经报道了一些植物的组织特异性和胁迫诱导型启动子。例如,拟南芥中的 *rd29A* 和 *rd29B* 启动子对高盐度和干旱有反应^[23]。在小麦中, *Dreb2* 启动子响应干旱胁迫^[24]。来自芥菜植物的 *BjSOS2* 基因启动子在高盐,干旱和非生物胁迫以及其他形式的胁迫下起作用^[25]。硬粒小麦基因 *TdPIP2;1* 水稻及其启动子区域响应非生物胁迫^[26]。本研究通过 PlantCARE 应用程序分析了 *MaAQPI* 启动子的顺式作用元件,元件包含了多个 TATA-box 和 CAAT-box 核心元件,以及与 ABA 和 MeJA 响应, MYB, MYC 和光响应相关元件。TATA 盒是在转录起始位点表达基因的核心启动子元件。CAAT-box 是具有增强子活性的启动子中常见的顺式作用元件。但是,在 *MaAQPI* 启动子中未发现与干旱胁迫相关的反应元件。本研究发现 ABRE 是脱落酸 (ABA) 的顺式作用元件。研究表明 ABA 是一种重要的植物激素,参与许多重要的生物过程和反应,包括非生物胁迫。启动子的克隆及元件分析为下一步运用酵母单杂交鉴定直接调节 *MaAQPI* 启动子的转录因子,以及靶向转录因子调节 *MaAQPI* 表达的分子机制奠定了基础。

酵母单杂交 cDNA 文库的构建是酵母单杂交试验进行的基础,文库的质量好坏直接影响筛库过程。而 cDNA 文库的质量又是由转录成 cDNA 的 mRNA 决定的,因此必须对其质量进行严格的把关。本研究利用 CTAB 法提取香蕉组织 RNA, RNA 条带清晰无降解,进一步利用试剂盒分离纯化 mRNA,合成香蕉 cDNA,构建的 cDNA 文库,符合进一步试验的要求。另外,库容量以及插入片段的大小也直接影响到后期利用 cDNA 文库进行互作基因筛选的效率及结果,相关的研究表明,构建的木薯 cDNA 文库库容为 1.5×10^6 CFU,插入片段大小为 250~3 000 bp,能够为进一步的酵母单杂交筛选奠定良好的基础^[27]。在本研究中,构建的文库库容为 1.25×10^7 CFU,插入片段平均在 1 200 bp 左右,完全满足试验的要求。

参考文献:

- [1] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T, et al. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 595-624.
- [2] MAUREL C, BOURSIAC Y, LUU D T, et al. Aquaporins in plants [J]. *Physiological Reviews*, 2015, 95 (4): 1321-1358.
- [3] HU W, YUAN Q Q, WANG Y, et al. Overexpression of a wheat aquaporin gene, TaAQP8, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53 (12): 2127-2141.
- [4] KAPILAN R, VAZIRI M, ZWIAZEK J J. Regulation of aquaporins in plants under stress [J]. *Biological Research*, 2018, 51 (1): 1-11.
- [5] ZWIAZEK J J, XU H, TAN X, et al. Significance of oxygen transport through aquaporins [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 40411.
- [6] WANG R, WANG M, CHEN K, et al. Exploring the roles of aquaporins in plant-microbe interactions [J]. *Cells*, 2018, 7 (12): 267.
- [7] PAWŁOWICZ I, MASAJADA K. Aquaporins as a link between water relations and photosynthetic pathway in abiotic stress tolerance in plants [J]. *Gene*, 2019, 687: 166-172.
- [8] XU Y, HU W, LIU J H, et al. An aquaporin gene MaPIP₂-7 is involved in tolerance to drought, cold and salt stresses in transgenic banana (*Musa acuminata* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 147: 66-76.
- [9] ZHOU S Y, HU W, DENG X M, et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e52439.
- [10] XU C H, WANG M, ZHOU L, et al. Heterologous expression of the wheat aquaporin gene TaTIP2;2 compromises the abiotic stress tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11): e79618.
- [11] XU Y, HU W, LIU J H, et al. a banana aquaporin gene, MaPIP₁;1, is involved in tolerance to drought and salt stresses [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14 (1): 1-14.
- [12] D'HONT A, DENOEUDE F, AURY J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. *Nature*, 2012, 488 (7410): 213.
- [13] JANG J Y, LEE S H, RHEE J Y, et al. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64 (6): 621-632.
- [14] KALDENHOFF R, GROTE K, ZHU J J, et al. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14 (1): 121-128.
- [15] GUO L, WANG Z Y, LIN H, et al. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family [J]. *Cell Research*, 2006, 16 (3): 277-286.
- [16] LIAN H L, YU X, YE Q, et al. The role of aquaporin RWC₃ in drought avoidance in rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45 (4): 481-489.
- [17] POTENZA L, CUCCHIARINI L, PIATTI E, et al. Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs [J]. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25 (5): 352-355.
- [18] PTASHNE M. Regulation of transcription: From lambda to

- eukaryotes [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30 (6) : 275–279.
- [19] WEHNER N, WEISTE C, DRÖGE-LASER W. Molecular screening tools to study *Arabidopsis* transcription factors [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2: 68.
- [20] SINHA N R, WILLIAMS R E, HAKE S. Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates [J]. *Genes & Development*, 1993, 7 (5) : 787–795.
- [21] CHEON B Y, KIM H J, OH K H, et al. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: Retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis* [J]. *Transgenic Research*, 2004, 13 (6) : 541–549.
- [22] ZHAO J S, REN W, ZHI D Y, et al. *Arabidopsis* DREB1A/CBF₃ bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26 (9) : 1521–1528.
- [23] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants [J]. *Molecular & General Genetics*, 1993, 236 (2/3) : 331–340.
- [24] TAVAKOL E, SARDARO M L S, SHARIATI J V, et al. Isolation, promoter analysis and expression profile of Dreb2 in response to drought stress in wheat ancestors [J]. *Gene*, 2014, 549 (1) : 24–32.
- [25] KAUR C, KUMAR G, KAUR S, et al. Molecular cloning and characterization of salt overly sensitive gene promoter from *Brassica juncea* (BjSOS₂) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, 42 (6) : 1139–1148.
- [26] AYADI M, MIEULET D, FABRE D, et al. Functional analysis of the durum wheat gene TdPIP2; 1 and its promoter region in response to abiotic stress in rice [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 79: 98–108.
- [27] 廖文彬, 李雅韵, 杨义伶, 等. 木薯干旱胁迫下离区发育相关基因 MeAP2-2 酵母单杂交文库构建及其上游调控基因的筛选 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31 (9) : 119–127.
- LIAO W B, LI Y Y, YANG Y L, et al. Yeast one-hybrid library construction and upstream gene analysis of MeAP2-2 in cassava under drought condition [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31 (9) : 119–127. (in Chinese)

(责任编辑：张梅)