

刘 骥,王 燕,郭建华,等. 盐胁迫诱导的 *TabZIP60* 转录因子的筛选与分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):18-22.

# 盐胁迫诱导的 *TabZIP60* 转录因子的筛选与分析

刘 骥<sup>1</sup>,王 燕<sup>1</sup>,郭建华<sup>1</sup>,刘晓兰<sup>1</sup>,孔秀英<sup>2</sup>

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院,黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 中国农业科学院作物研究所,北京 100081)

**摘要:**筛选与鉴定耐盐相关基因是培育抗盐品种的基础。植物转录因子在植物的生长发育及其对外界环境的反应中起着重要作用。利用小麦转录因子全长 cDNA 文库,运用 Re-Northern 和半定量 RT-PCR 相结合的方法,从小麦全长转录因子 cDNA 文库的 526 个转录因子进行了盐胁迫筛选,获得了与小麦抗盐相关的转录因子 *TabZIP60*,分析这个转录因子的序列并进行了功能分析,获得如下结果:*TabZIP60* 的长度是 1 741 bp,编码 338 个氨基酸;*TabZIP60* 受高盐诱导后表达量明显升高;GFP 亚细胞定位表明该转录因子是一个核定位蛋白。

**关键词:***TabZIP60*;盐胁迫;转录因子;序列分析

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0018-04

盐胁迫可以导致植物的生理干旱,对植物的生长发育有显著的影响。植物对盐胁迫的应答,表现为体内的生理生化变化,这是由植物中大量与耐盐相关基因的表达水平变化而引起的<sup>[1-2]</sup>。基因在转录水平上的调控是植物盐胁迫应答过程中极为重要的一环。当植物细胞感受到外界高盐信号时,一些跨膜受体蛋白接受胞外信号,并随即引发相应的信号传导途径,使相关基因表达,形成相关的网络信号途径。当胁迫信号传递到转录因子后,转录因子能与某一类或某基因启动子区域中的特异顺时作用序列结合,激活 RNA 聚合酶转录复合物,从而促使或增强基因在胁迫条件下的转录表达<sup>[3-4]</sup>。然后通过基因产物的作用对外界信号在生理生化等方面做出适合的调节反应。有许多转录因子参与这一调节过程,如: *MYC*、*DREB*、*MYB*、*bHLH*、*NAC*、*bZIP*、*C2H2* 等<sup>[5-6]</sup>。*bZIP* (basic-region leucine zipper) 是一类碱性亮氨酸拉链转录因子,是真核生物转录因子中分布最广泛、最保守的一类转录因子<sup>[7-8]</sup>。研究表明,*bZIP* 转录因子参与植物的生长发育<sup>[9]</sup>、光信号的传递、生物与非生物胁迫的应答反应、种子贮藏基因的表达等<sup>[10]</sup>。我们利用小麦转录因子全长 cDNA 文库筛选到了 *TabZIP60*,并对其进行了抗盐功能验证。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

植物材料:以盐敏感小麦品种中国春和耐盐小麦品种茶淀红为试验材料。本试验中,将中国春和茶淀红种子播于 96 孔板中,用液体 MS 培养基培养,在 22 ℃ 培养室中长达至 2 叶 1 心时,经 250 mmol/L NaCl 处理,于 0、3、6、9、12、24、32 h 取样。

收稿日期:2013-04-07

基金项目:引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划)(编号:2005-247)。

作者简介:刘 骥(1983—),男,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,助教,主要从事植物分子生物学方面研究。E-mail:liuji83@163.com。

通信作者:孔秀英,博士,研究员,研究方向为植物分子生物学。E-mail:xykong@mail.caas.net.cn。

### 1.2 方法

**1.2.1 cDNA 宏阵列膜的制备** 从中国农业科学院小麦遗传资源实验室小麦全长 cDNA 转录因子数据库中搜索得到 *bZIP* 转录因子基因序列 76 条,将其命名为 *TabZIP1* 至 *TabZIP76*。然后从全长 cDNA 文库中挑选相应的 cDNA 克隆并提取质粒,将质粒浓度调整至约为 100 ng/μL,保存于 384 孔板中。利用 Q-Pix (GENETIX) 将质粒转移到 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜 (Amersham Biosciences 公司) 上,每个克隆点 4 个重复,形成边长为 1.75 mm 的正方形,不同克隆间距离为 2.25 mm。以小麦 *Tubulin* 基因作为阳性对照,水作为阴性对照,与 *bZIP* 转录因子的质粒同时点到尼龙膜上。自然风干后,放在变性液 (0.4 mol/L NaOH, 1 mol/L NaCl) 中变性 15 min,再在中和液 [0.5 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.2), 1 mol/L NaCl] 中浸泡 15 min,最后用蒸馏水漂洗 3 min。将膜放到滤纸上晾干,4 ℃ 保存备用。

**1.2.2 cDNA 宏阵列杂交和扫描** 取 250 mmol/L NaCl 处理后不同时间段的茶淀红小麦根提取总 RNA,利用反转录法标记探针。反转录反应体系总体积为 20 μL,在 0.2 mL 离心管中加入 1 μL 500 μg/mL Oligo(dT)<sub>18</sub>, 1 μg 总 RNA,加 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 至 8 μL。将上述混合物吹吸混匀,65 ℃ 水浴 5 min,冰水浴中速冷。然后依次加入 4 μL 5×First-Strand Buffer, 2 μL DTT (0.1 mol/L), 1 μL dNTP 混合物 (含有 dATP、dTTP、dGTP,均为 10 mmol/L), 1 μL RNasin (40 U/μL), 3 μL α-[<sup>32</sup>P]dCTP (10 μCi/μL) (北京福瑞生物工程公司), 1 μL SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase (200 U/μL) (Invitrogen),小心用枪头吹吸几次混匀,短暂离心后,42 ℃ 温浴 1 h。在上述混合物中加入 30 μL 1×TE,然后加入 5 μL 3 mol/L NaOH 变性 5 min,随后转至冰水浴中并加入 2.5 μL 的 1 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.2) 和 5 μL 的 3 mol/L HCl。置探针于冰水浴中直至使用。

将点有转录因子的尼龙膜放到杂交管中,加入 10 mL Church Buffer 预杂交液 [1% BSA, 10 mmol/L EDTA (pH 值 7.0), 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Buffer (pH 值 7.2), 7% SDS] 和变性鲑鱼精 DNA (终浓度为 100 μg/mL)。在杂交炉中 65 ℃ 预杂交 6 h。然后加入变性的探针,65 ℃ 杂交 16 h。杂交后的

尼龙膜分别放在  $2 \times \text{SSC}$ ,  $0.5\% \text{ SDS}$ ;  $1 \times \text{SSC}$ ,  $0.5\% \text{ SDS}$ ;  $0.5 \times \text{SSC}$ ,  $0.5\% \text{ SDS}$  中  $65^\circ\text{C}$  下各洗涤 2 次, 每次 5 min。洗涤完毕后放入暗盒中覆盖磷屏曝光 2~3 d, 用 Molecular Imager FX (Bio-Rad) 扫描磷屏。

**1.2.3 *TabZIP60* 的表达分析** 分别取茶淀红和中国春根提取总 RNA, 采用 SuprScript II 反转录酶合成 cDNA 第一链。采用  $25 \mu\text{L}$  半定量 RT-PCR 体系, 取  $1 \mu\text{L}$  cDNA 作模板, 所用引物为: F—ACTAGTATGACGCCGCTGCCG; R—CACGTGTTACCAAGGGCCCGT。扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $95^\circ\text{C}$  30 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  40 s, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  5 min。以小麦 *Tubulin* 基因作为内参, 反应程序运行 30 个循环, 其他条件同上。

**1.2.4 *TabZIP60* 转录因子的聚类分析** 利用生物信息学手段, 进行电子克隆分析。

**1.2.5 *TabZIP60* 亚细胞定位分析** 亚细胞定位所用表达载体为 pJIT163-PEG, 该载体通过 35S 启动子驱动目标基因与绿色荧光蛋白 (GFP) 基因融合表达, 实现目标基因的亚细胞定位。设计引物 34-GFP-F: 5'-AAGCTTATGTCCTCCTC-

CACGGG-3' (前 6 个碱基为 *Hind* III 酶切位点) 和 34-GFP-R: 5'-GGATCCGACAGGAGCGACTCGAC-3' (前 6 个碱基为 *Bam* HI 酶切位点), 扩增 *TabZIP60* 基因的编码区序列, 经测序验证后, 进行 *Hind* III 和 *Bam* HI 的双酶切, 回收产物与同样进行双酶切的 pJIT163-PEG 载体连接, 并转化大肠杆菌感受态细胞, 挑单克隆进行质粒提取, 经酶切、测序验证后用于后续转化试验。将含有目标基因的融合表达载体和空载体 pJIT163-PEG 通过基因枪 (Bio-Rad) 轰击转化洋葱表皮细胞, 转化后的洋葱表皮细胞避光培养 24 h, 用激光共聚焦显微镜观察照相 (Leica)。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦茶淀红 RNA 提取与检测

提取总 RNA 后,  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳 15 min 左右, 经 SMA3000 检测,  $D_{280\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$  在 1.9~2.1 之间, 符合要求。如图 1 所示, 可以看出 RNA 无降解。

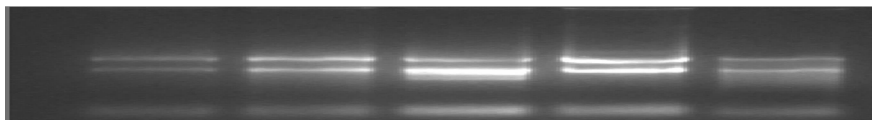


图1 1%琼脂糖凝胶电泳检测茶淀红RNA

### 2.2 盐胁迫诱导的小麦转录因子的筛选

用  $250 \text{ mmol/L NaCl}$  处理不同时间段的茶淀红根的总 RNA 反转录后作探针, 与点有小麦转录因子的尼龙膜进行杂交, 可以看出盐胁迫后 *TabZIP60* 表达量显著上调, 在 9 h 表达量达到最高。用 Quantity one (Bio-Rad) 软件进行表达量

变化分析, *TabZIP60* 在 9 h 相对于 0 h 表达量上调超过 3 倍, 其他转录因子表达量变化都不如 *TabZIP60* 显著 (图 2)。

从 0 h 到 3 h 到 9 h 筛选到 *TabZIP60* 转录因子, 随着时间的增加, 其表达量逐渐上调, 认为其可能在盐胁迫下起到了抵抗作用。

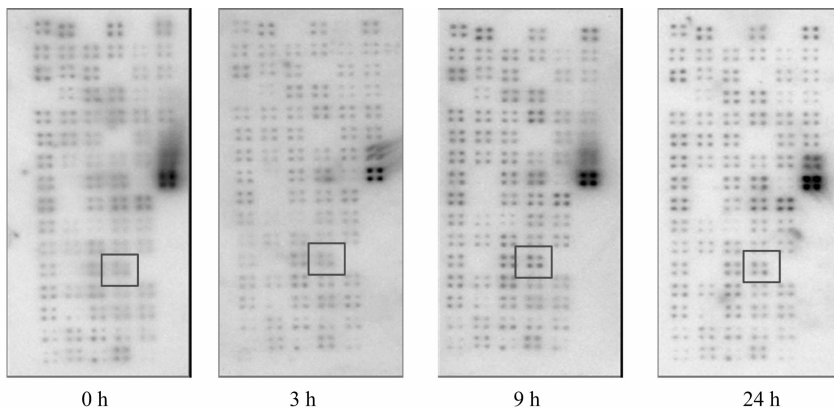


图2 盐诱导的不同时间段以根反转录产物为探针的 cDNA 宏阵列杂交 (方框内为 *TabZIP60*)

### 2.3 半定量 RT-PCR 的验证结果

为了进一步研究 *TabZIP60* 在抗盐中的作用, 利用耐盐材料茶淀红与不耐盐材料中国春做了半定量 RT-PCR 分析, 由图 3 可以清晰地看出 *TabZIP60* 在 2 种材料中的表达量变化趋势基本相同, 但在抗盐材料中的表达量高于盐敏感材料。这与 cDNA macroarray 杂交结果一致。

### 2.4 *TabZIP60* 转录因子在盐胁迫下的表达分析

以 *TabZIP60* 基因的全长 cDNA 为模板设计引物, *GAPDH* 基因为内参, 对不同胁迫条件 ( $250 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $50 \mu\text{mol/L ABA}$ ) 下提取小麦总 RNA 进行实时定量 PCR 分析。在  $\text{NaCl}$  处理下, *TabZIP60* 的表达量在耐盐品种中一直比盐敏感品

种表达量高, 9 h 表达量达到最高 (图 4)。外源 ABA 处理下, *TabZIP60* 表达量增加很快, 9 h 达到最高水平, 且趋势与在盐胁迫下一致 (图 5)。在盐胁迫下, 以耐盐品种茶淀红和盐敏感品种中国春为材料进行实时定量 PCR 分析发现, 随着时间的增加 *TabZIP60* 在耐盐品种茶淀红中表达量逐渐增加, 9 h 达到最高峰; 在不耐盐品种中国春中 *TabZIP60* 表达也表现出相同的趋势, 但表达强度弱, 这个结果与 Real-time Northern 的结果和半定量 RT-PCR 的结果是一致的, 证实 *TabZIP60* 这个基因起到了耐盐作用。

### 2.5 *TabZIP60* 序列分析

**2.5.1 *TabZIP60* 与其他抗盐基因序列分析** *TabZIP60* 共有

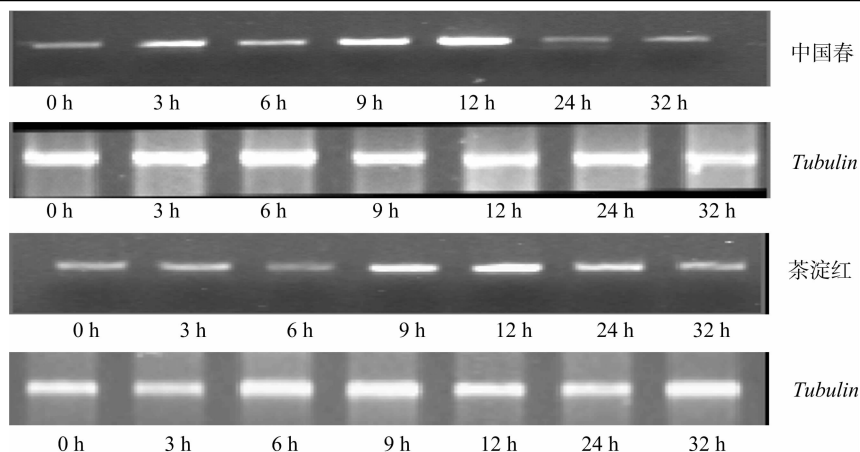


图3 盐诱导的 *TabZIP60* 在小麦耐盐品种的和不耐盐品种中的表达量

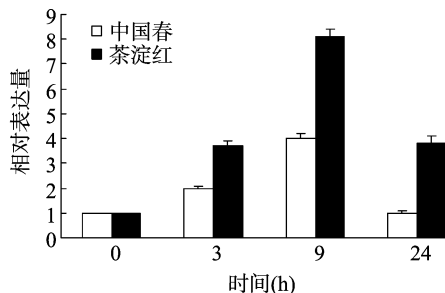


图4 *TabZIP60* 在盐胁迫下的表达模式

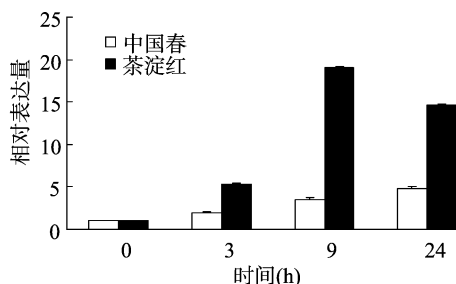


图5 *TabZIP60* 在ABA胁迫下的表达模式

1 741 bp 的长度,根据 Softberry 预测其中编码区长度为 1 016 bp,共编码 338 个氨基酸。将有抗盐功能的拟南芥、水稻、玉米、大豆、大麦 *bZIP* 基因<sup>[11]</sup>,与 *TabZIP60* 进行了聚类分析,发现其与玉米中 *ABi5*<sup>[12]</sup> 的同源关系很近,相似性达到了 83% (图 6)。由于序列相似,其功能也可能相似,这也意味着 *TabZIP60* 可能在小麦的抗盐中发挥着重要作用。

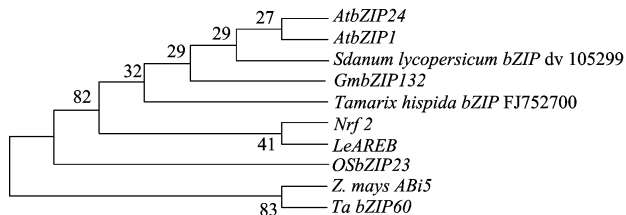


图6 *TabZIP60* 与其他具有抗盐功能 *bZIP* 成员的聚类分析

**2.5.2 *TabZIP60* 序列与拟南芥序列比对分析** 将 *TabZIP60* 与拟南芥全部 *bZIP* 家族进行聚类分析,发现 *TabZIP60* 与 *AT1G45249.1* 相似性高达 99% (图 7)。通过 NCBI 比对发现, *AT1G45249.1* 是在依赖 ABA 诱导条件下具有抗盐能力的

一个基因。

## 2.6 *TabZIP60* 亚细胞定位分析

通过构建亚细胞定位 *TabZIP60* 表达载体,将含有目标基因的融合表达载体与空载体 pJIT163 - *GFP* 通过基因枪 (Bio - Rad) 轰击转化洋葱表皮细胞,在洋葱表皮中瞬时表达融合 *GFP* 基因的 *TabZIP60*。结果显示 *TabZIP60* 和 *GFP* 的融合蛋白定位于细胞核中 (图 8),而空载体对照 *GFP* 则分布于整个细胞中 (图 9),表明 *TabZIP60* 只在细胞核中表达。

## 3 讨论

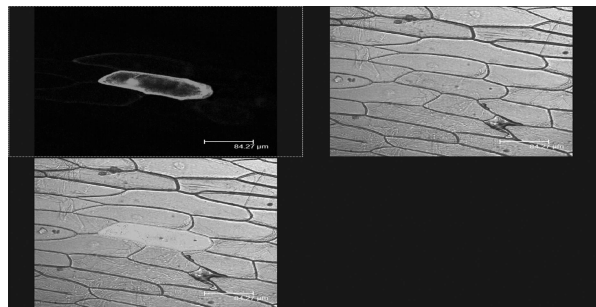
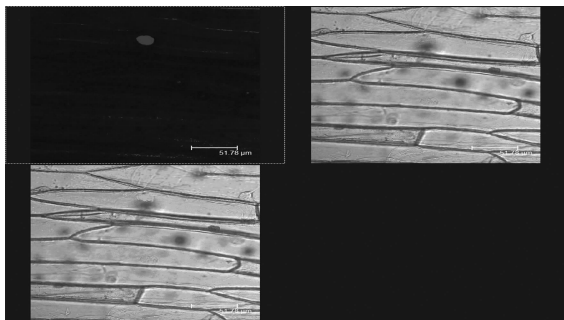
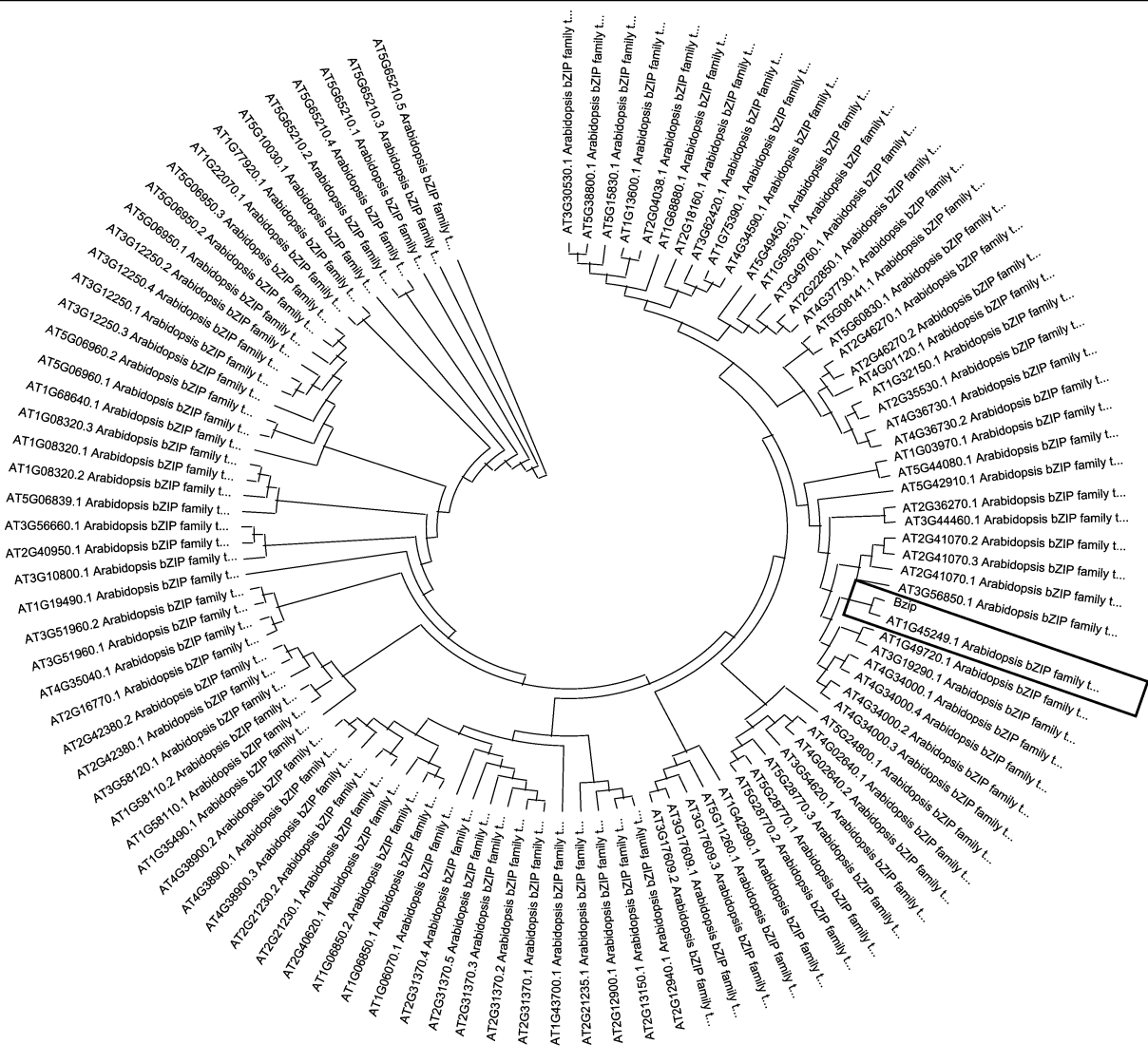
植物在受到外界盐胁迫以后,会迅速启动自身的生化防卫系统。转录因子是一类上游调控基因,会调控下游基因,形成一个网状调控途径<sup>[13]</sup>。通过进化树分析表明, *TabZIP60* 与玉米 *ABi5* 的同源性很高,而玉米中的这个基因是已经报道过的具有耐盐性的一个基因<sup>[14]</sup>。一些抗盐基因的表达依靠 ABA 调控,外源 ABA 能够同时调节许多胁迫反应,这说明植物对各种胁迫的反应存在着某些共同的机制,如水稻中的 *OsZIP23*,就是依赖 ABA 诱导表达的具有耐盐功能的一个基因<sup>[15]</sup>。该基因序列与拟南芥中的 *AT1G45249.1* 同源性很高<sup>[16]</sup>, *AT1G45249.1* 基因是受 ABA 诱导表达的,通过实时定量 PCR 分析 *TabZIP60* 在 ABA 处理后的表达模式与在盐胁迫后的表达模式一致。初步说明 *TabZIP60* 是受 ABA 诱导表达来行使抗盐功能的一个基因。

## 4 结论

从中国农业科学院小麦遗传资源实验室小麦转录因子文库中筛选了 1 个抗盐相关转录因子 *TabZIP60*,该基因全长 1 741 bp,其中编码区长度为 1 016 bp,共编码 338 个氨基酸。它与拟南芥抗盐转录因子 *AT1G45249.1* 具有很高的同源性。*TabZIP60* 基因的表达受高盐、ABA 诱导。通过 GFP 亚细胞定位分析发现, *TabZIP60* 定位在细胞核中。

## 参考文献:

- [1] Hu H, Dai M, Yao J, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103 (35): 12987 - 12992.



- [2] Kiran M D, Akiyoshi D E, Giacometti A, et al. OpuC – an ABC transporter that is associated with *Staphylococcus aureus* pathogenesis [J]. The International Journal of Artificial Organs, 2009, 32 (9) : 600 – 610.
- [3] Tang W, Newton R, Li C, et al. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper *CaPFI* gene is associated with the polyamine biosynthesis [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26 (1) : 115 – 124.
- [4] Hu H, You J, Fang Y, et al. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67 (1) : 169 – 181.
- [5] Tong Z, Hong B, Yang Y, et al. Overexpression of two chrysanthemum *DgDREB1* group genes causing delayed flowering or dwarfism in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71 (1) : 115 – 129.

李 珺,马力通. 马铃薯淀粉体表达载体的构建及其转基因植物的培养[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):22-24.

# 马铃薯淀粉体表达载体的构建及其转基因植物的培养

李 珺,马力通

(内蒙古科技大学生物工程与技术研究所,内蒙古包头 014010)

**摘要:**以 pCAMBIA1305-1 载体为基础,构建融合了淀粉体转运肽 GB77 及淀粉粒结合肽 GB20 编码序列的马铃薯淀粉体定向表达载体 pCAMBIA1305-GB77-GB20,并通过马铃薯块茎专一性 *GBSS I* 基因启动子启动其表达。将构建的载体经农杆菌介导转化蜡质马铃薯突变植株,PCR 证实了融合基因已经整合到马铃薯基因组中。研究为探讨马铃薯淀粉体定向表达外源蛋白、进一步开发马铃薯淀粉体细胞器生物反应器奠定了基础。

**关键词:***GBSS I* 基因启动子;马铃薯;淀粉体;生物反应器

**中图分类号:** Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0022-03

随着基因工程的不断发展,植物生物反应器已经成为具有重要经济价值的外源蛋白的生产体系。如何提高外源蛋白的表达量并降低蛋白提取、加工等过程中的成本是外源蛋白能否进行产业化的关键。使用启动子、增强子等特异表达的调控序列,使外源蛋白靶向定位于叶绿体、油体、淀粉体等细胞器中是解决上述问题的有效途径<sup>[1]</sup>。

淀粉体是贮藏组织中淀粉合成的场所,是积累淀粉的一种质体,其形态表现为形成团粒结构——淀粉粒<sup>[2]</sup>。淀粉粒形态大小因植物种类不同而具有很大差异性,同时具有种专一性,是决定不同内源淀粉性质的重要因素之一。淀粉粒表面或内部紧密结合的蛋白是淀粉粒结合蛋白(starch granule-associated proteins,SGAPs)。颗粒结合型淀粉合成

酶 I (granule-bound starch synthase, GBSS I) 也称 Waxy 蛋白,是目前研究较为深入的一种淀粉粒结合蛋白,GBSS I 类基因的显著特征之一是其编码的 GBSS 蛋白质能够与淀粉粒结合而表现出活性,具有延长直链的特殊功能。在研究谷类作物 *waxy* 突变体、马铃薯 *amf* 突变体、豌豆 *lam* 突变体以及马铃薯 *GBSS I* 反义突变体的过程中发现,随着 *GBSS I* 活性的下降或丧失,植物贮藏器官中的直链淀粉合成量会下降或根本不合成,由此说明 *GBSS I* 是唯一决定合成代谢贮藏器官中直链淀粉的基因<sup>[3]</sup>。

马铃薯 *GBSS I* 基因为单拷贝基因,它的结构基因长约 3 kb,有 13 个内含子,14 个外显子,其中第一内含子在不停翻译的前导区<sup>[4]</sup>。马铃薯 *GBSS I* cDNA 长 1 821 bp,编码 607 个氨基酸组成的未成熟的 GBSS I 多肽,其中位于 N 末端的转运肽由 77 个氨基酸组成,C 末端序列有 20 个氨基酸的延伸,使得它能够结合在淀粉粒上并延伸淀粉粒上的直链淀粉<sup>[5]</sup>。研究表明,马铃薯 *GBSS I* 的启动子是块茎专一性启动子<sup>[6]</sup>。

收稿日期:2013-01-17

基金项目:内蒙古科技大学创新基金(编号:2011NCL005)。

作者简介:李 珺(1979—),女,宁夏石嘴山人,硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:star1979@126.com。

- [6] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(3): 106-111.
- [7] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. The Plant Journal, 2007, 50(1): 54-69.
- [8] Dai X, Xu Y, Ma Q, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [9] Liao Y, Zhang J, Chen S, et al. Role of soybean GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(2): 221-230.
- [10] Liu J, Srivastavar, Howell S, et al. Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell & Environment, 2008, 31(12): 1735-1743.
- [11] Holm M, Hardtke C S, Gaudet R, et al. Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1 [J]. EMBO J, 2001, 20(1/2): 118-127.

- [12] Armstrong G A, Weisshaar B, Hahlbrock K, et al. Homo-dimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores [J]. Plant Cell, 1992, 4(5): 525-537.
- [13] Terzaghi W B, Bertekap R L Jr, Cashmore A R, et al. Intracellular localization of GBF proteins and blue light-induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured *Arabidopsis* and soybean cells [J]. Plant J, 1997, 11(5): 967-982.
- [14] Huang J, Yang m, Liu P, et al. GhDREB1 enhances abiotic stress tolerance, delays GA-mediated development and represses cytokinin signalling in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(8): 1132-1145.
- [15] Martinez-Garcia J F, Moyano E, Alcocer M J, et al. Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors [J]. Plant J, 1998, 13(4): 489-505.
- [16] Huang X, Chao D, Gao J, et al. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control [J]. Genes & Development, 2009, 23(15): 1805-1817.