

李晓刚,李 慧,杨青松,等. 杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征及对非生物胁迫的转录响应[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):40-45. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.010

杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征 及对非生物胁迫的转录响应

李晓刚,李 慧,杨青松,蔺 经,常有宏

(江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:为探索杜梨(*Pyrus betulaefolia* Bunge)bHLH 转录因子家族的序列特征及表达特点,以 8 叶期杜梨幼苗为材料,克隆获得 2 个 bHLH 转录因子 bHLH122-1 和 bHLH122-2,采用 qPCR 方法研究它们在非生物胁迫下的表达情况。结果表明,bHLH122-1 和 bHLH122-2 开放阅读框为 1 302 bp 和 1 251 bp,编码的蛋白分别含 433 个和 416 个氨基酸残基,分别与苹果的 MdbHLH122 的同源性最高(83.49% 和 93.51%)。bHLH122-1 和 bHLH122-2 主要在叶中表达,盐、干旱以及渗透胁迫均能诱导 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的表达,但它们对 ABA 处理并无转录响应。此外,PbbHLH122-2 对上述逆境的应答要早于 PbbHLH122-1,而 PbbHLH122-1 的表达量大于 PbbHLH122-2。综上所述,bHLH122-1 和 bHLH122-2 均参与杜梨叶片对非生物胁迫的防御机制,该机制不受 ABA 信号调控,并且 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 在逆境条件下发挥的作用可能略有不同。

关键词:杜梨;bHLH122 转录因子;非生物胁迫;表达特征

中图分类号:S661.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)22-0040-06

bHLH(basic Helix-Loop-Helix,碱性-螺旋-环-螺旋)转录因子是真核生物中广泛存在的一大类转录因子,通

收稿日期:2017-04-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372051);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)5018]。

作者简介:李晓刚(1976—),男,江苏睢宁人,博士,副研究员,主要从事果树栽培与育种工作。E-mail:xiaogangli@aliyun.com。

通信作者:常有宏,研究员,主要从事果树栽培与育种工作。

E-mail:cyh@njau.edu.cn。

终制备获得了大量的 proTα,可以省去纯化蛋白的步骤,大大节省了纯化所需的人力、物力和时间。采用 SPP 系统表达的 proTα 经 RP-HPLC 分析,纯度可达 97% 以上。采用 SPP 系统冷休克表达 proTα 工艺简单,整个过程约在 1 周内完成,不需要纯化过程即可获得纯度较高的产品,为利用基因工程方法大量制备 proTα 提供了一种简便而又切实可行的方法。

参考文献:

- [1] Zhang W, Zhang C, Lv Z, et al. Molecular characterization, tissue distribution, subcellular localization and actin-sequestering function of a thymosin protein from silkworm [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31040.
- [2] Goldstein A L, Low T L, McAdoo M, et al. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(2):725-729.
- [3] Li C, Bo L, Liu Q, et al. Thymosin alpha1 based immunomodulatory therapy for sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2015, 33(C):90-96.
- [4] Serafino A, Pierimarchi P, Pica F, et al. Thymosin α1 as a stimulatory agent of innate cell-mediated immune response[J]. Ann N Y Acad

Sci, 2012, 1270(1):13-20.

过特定的氨基酸残基与靶基因相互作用,进而调节相关基因的表达^[1]。bHLH 转录因子家族成员在植物中数量众多,为仅次于 MYB 类转录因子的第二大基因家族^[2]。例如,bHLH 转录因子在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中为 147 个^[3-4],在水稻(*Oryza sativa*)中有 167 个^[5],菜豆中为 155 个^[6]。bHLH 转录因子广泛参与植物叶片花青素合成^[7]、光周期对花期的调控^[8]、果实的发育成熟^[9-10],以及缺铁条件下根的应激反应^[1,11]等多种生命活动。除此之外,研究表明 bHLH 基因家族中部分成员在植物适应逆境过程中发挥重要

- [5] Tuthill C, Rios I, McBeath R. Thymosin alpha 1: past clinical experience and future promise[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1194(1):130-135.
- [6] Billich A. Thymosin alpha1. SciClone pharmaceuticals[J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2002, 3(5):698-707.
- [7] Li J, Liu C H, Wang F S. Thymosin alpha 1: biological activities, applications and genetic engineering production[J]. Peptides, 2010, 31(11):2151-2158.
- [8] Ioannou K, Samara P, Livanou E, et al. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy[J]. Cancer Immunol Immunother. 2012, 61(5):599-614.
- [9] Suzuki M, Zhang J, Liu M, et al. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase[J]. Mol Cell, 2005, 18(2):253-261.
- [10] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1):16-22.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(S1/S2):248-254.

作用,例如,拟南芥的 AtbHLH122 表达受干旱、高盐、渗透等非生物胁迫强烈诱导,超量表达 AtbHLH12 可显著提高转基因植株的抗逆能力^[12];在野生稻 (*Oryza rufipogon*) Dongxiang 中过量表达 OrbHLH001,可显著提升植株耐盐和耐寒能力^[13];分析菜豆 155 个 bHLH 转录因子在高盐条件下的表达情况发现,其中 16 个基因在根部和叶片中的表达量均有显著升高^[6]。

杜梨 (*Pyrus betulaefolia* Bunge) 具备良好的耐旱、耐寒、耐涝等特性,为梨生产中广泛选用的砧木之一,其抗逆分子机制已成为目前的研究热点之一^[14-17],但 bHLH 转录因子在杜梨抗逆机制中的研究尚未见报道。本研究选取杜梨幼苗为材料,克隆获得 2 条与拟南芥 AtbHLH122 同源的 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的 DNA 和 cDNA 序列,并用定量 PCR 分析 2 条基因在不同非生物胁迫条件下的表达情况,探明杜梨 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 对非生物胁迫的转录响应,从而为进一步研究它们在杜梨逆境响应过程中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试杜梨的成熟种子采集于山东泰安,试验所用材料为 8 叶龄杜梨幼苗。脱落酸 (ABA)、氯化钠 (NaCl)、聚乙二醇 (PEG-6000) 和甘露醇 (Mannitol) 购自 Sigma 公司, RNA plant plus Reagent 和 Pfu DNA Polymerase 购自天根生化科技 (北京) 有限公司,SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit、PowerScript II™ 反转录酶和 SYBR® Premix ExTaq™ II 购自宝生物工程 (大连) 有限公司,AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司,所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的克隆 取经 100 mmol/L NaCl 处理 6 h 的杜梨 8 叶龄幼苗,叶片总 RNA 用 RNA plant plus Reagent 提取,基因组 DNA 采用 CTAB 法提取。按照 PowerScript II™ 反转录酶和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书将总 RNA 反转录为 cDNA 第一链。采用 Liu 等报道的在逆境处理中表达量显著提高的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 转录因子 (NCBI 登录号:NP_564583.1) 作为模板^[12],通过 tblastN 方法在 NCBI 数据库中 (将 Organism 限定为 *Pyrus*) 搜索获得 2 条与其高度同源的梨属植物白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) 基因 LOC103967841 和 LOC103963544。根据上述 2 条基因序列,分别设计引物 7841-F (5'-ATGGAATCGGATCTTCAGCAGCAT-3')/7841-S (5'-CTACTGCTGCTTGTGTTGAACAGGT-3') 和 3544-F (5'-ATGGAATCAGATCATCAGCAGCAT-3')/3544-S (5'-CTACTGCTGCTTGTGTTGAGCAAGT-3') 用 Pfu DNA Polymerase 扩增编码区的 cDNA 和 DNA 序列。PCR 反应体系为:buffer 2 μL、cDNA 2 μL 上下游引物各 0.8 μL、ddH₂O 14.2 μL、Pfu DNA Polymerase 0.2 μL,总计 20 μL。PCR 反应参数为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 特异产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收,连接、转化并 PCR 验证阳性菌株

后,送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.2 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的生物信息学分析 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的核苷酸翻译采用 BioXM 软件,利用 Gene StructureDisplay Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 分析内含子和外显子组成^[18]。使用 ExPaSy - ProtParamTool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸基本理化特性。氨基酸序列比对采用 DNAMAN 软件完成,Conserved Domains Search Service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析保守域。用 PSORT (<http://psort.ims.ut-kyo.ac.jp/form.html>) 进行亚细胞定位预测。MEGA 5.0 构建系统进化树。SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD (<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/jakj/dianzi/Bioinf7/Expasy/Expasy8.htm>) 预测蛋白的二级结构,SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测并绘制三维立体结构。所用序列均来自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.2.3 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 表达研究 选择长势健壮、大小一致的杜梨 8 叶龄幼苗分别置于含 100 mmol/L NaCl、10% PEG-6000、180 mmol/L Mannitol 或 20 μmol/L ABA 的 1/4 改良 MS 营养液中,处理 0、0.5、1、3、6、9、12 h 后,分别收集叶片和根,保存于 -70℃ 冰箱待用。以各处理或对照样品的 2 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链,利用 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 跨内含子特异性引物 7841-E-F (5'-GAGCTTGTACCGAACATGGACAAG-3')/7841-E-S (5'-CTACTGCTGCTTGTGTTGAACAGG-3') 和 3544-E-F (5'-AGCTTGTACCAAACATGGACAAG-3')/3544-E-S (5'-CTACTGCTGCTTGTGTTGAGCAAG-3'),在 Bio-rad 荧光定量 CFX96™ PCR 仪进行实时定量 PCR。选用 PbActin 基因引物 qPBactS (5'-AACGGACATCAAGCCAAAAA AA-3')/qPBactA (5'-CAGTTAGCACGCAATTCAGCCA-3') 为内参。反应体系为:SYBR 荧光染料 10 μL、cDNA 2 μL、上下游引物各 0.8 μL、ddH₂O 6.4 μL,总计 20 μL。反应条件为 95℃ 30 s; 95℃ 20 s, 58℃ 30 s, 72℃ 10 s, 40 个循环。按照 2^{-ΔΔC_t} 法计算出待测基因相对表达量,应用 Excel 2003 整理试验数据并制图。

2 结果与分析

2.1 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 基因特征

以经 100 mmol/L NaCl 处理 6 h 的杜梨 8 叶龄幼苗叶片 cDNA 为模板,以 7841-F/7841-S 为引物,克隆获得 1 条长度为 1 302 bp 的 cDNA 序列,编码 1 条含有 433 个氨基酸的多肽,命名为 PbbHLH122-1;以 3544-F/3544-S 为引物,克隆获得 1 条长度为 1 251 bp 的 cDNA 序列,编码 1 条含有 416 个氨基酸的多肽,命名为 PbbHLH122-2。以 DNA 为模板,以 7841-F/7841-S 为引物,克隆获得 1 条长度为 2 105 bp 的 DNA 序列;以 3544-F/3544-S 为引物,克隆获得 1 条 2 056 bp 的 DNA 序列。对扩增得到的 cDNA 序列和对应的 DNA 进行分析发现:PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 基因均由 6 个外显子和 5 个内含子组成 (图 1)。序列比对表明杜梨的 PbbHLH122-1 与白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) 的

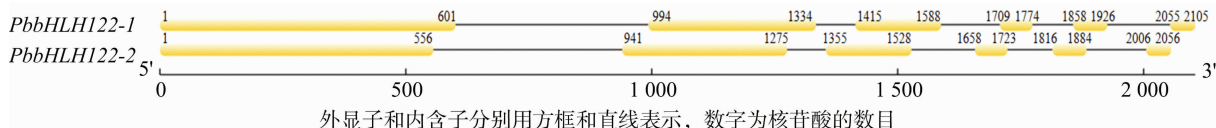


图1 杜梨 *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 的基因结构

LOC103967841 序列完全一致, 而 PbbHLH122 - 2 与白梨的 LOC103963544 序列完全一致, 因此不再登陆新的基因序列。

2.2 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的生物信息学特征

运用 ExPaSy - Protparam Tool 对 PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 编码蛋白的理化性质进行了预测。PbbHLH122 - 1 分子式 $C_{2014}H_{3180}N_{612}O_{669}S_{19}$, 分子量 47.29 ku, 预测的等电点 (pI) 为 6.27, 亲水性为 -0.775, 表明此蛋白为亲水性蛋白, 脂溶性较差。PbbHLH122 - 2 分子式 $C_{1926}H_{3028}N_{580}O_{645}S_{19}$, 分子量 45.23 ku, 预测的等电点 (pI) 为 5.86, 亲水性为 -0.758, 表明此蛋白为亲水性蛋白, 脂溶性较差。由表 1 可见, PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 所编码的多肽相似性为 84.63%。PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 分别与苹果的 MdbHLH122 的同源性最高 (83.49% 和

93.51%)。利用 DNAMAN 对拟南芥(NP_564583)、苹果(XP_008352410)、大豆(XP_003540708)、芝麻(XP_015571362)、枣子(XP_015876019)的 bHLH122 基因编码的蛋白进行多序列比对分析,发现 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 与拟南芥等其他植物的 bHLH122 转录因子在 C 端存在着明显的保守区域。利用 Conserved Domains Search Service(CD Search)对 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 进行保守结构域的分析,PbbHLH122-1 在 C 端 366~417 位氨基酸(PRSIAERVRRTRISERMRLQELVPNMDKQNTSDMLDLAVEYIKDLQTQVQ)存在 1 个 HLH 结构域,而 PbbHLH122-2 在 C 端 349~400 位氨基酸(PRSIAERVRRTRISERMRLQELVPNMDKQAHTSMDMLDLAVEYIKDLQTQVQ)也存在 1 个 HLH 结构域,结果如图 2 所示。

表 1 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 与其他植物 bHLH122 的同源性比对

物种	登录号	基因名称	相似度(%)	
			PbbHLH122-1	PbbHLH122-2
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564583.1	AtbHLH122	38.32	37.77
大豆 <i>Glycine max</i>	XP_003540708.1	GmbHLH122	54.59	54.82
芝麻 <i>Ricinus communis</i>	XP_015571362.1	RebHLH122	52.56	54.71
苹果 <i>Malus domestica</i>	XP_008352410.1	MdbHLH122	83.49	93.51
枣 <i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015876019.1	ZjbHLH122	57.59	58.81
棉花 <i>Gossypium raimondii</i>	XP_012446664	GrbHLH122	51.00	52.74
麻风树 <i>Jatropha curcas</i>	XP_012092769.1	JcbHLH122	50.56	50.23
苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	XP_003597461.1	MtbHLH122	45.70	47.55
杜梨 <i>Pyrus betulaefolia</i>		PbbHLH122-1	100.00	84.63
		PbbHLH122-2	84.63	100.00

PbbHLH122-1	MESDLQCH.....KFCQHMNSGIMFYSAFSSYINILISELYEPFFNFPSFETERILSRFLASEGGGNGGGGGGGEGTEQASQHKVATQVNNQRF..FLVFKVID.FEMVI	109
PbbHLH122-2	MESDLQCHD.....KFCQHMNSGIMFYSAFSSYINILISELCEFLNFPSFETERIFARFLASEGGGNGGGGGGGG..IEEIASQHKVETQINNQQRF.FMVFKVID.FVGV	108
AtcHLH122	MESDFQCHFLFH.....LHQGQRPFRNCLIFYSASFSSYSSFGES..IEEFLDHPHSFETERILSGFLQTITISDNVSLIHHTNSGDEKHKPEEVTEDEDAIEPVVATAIMEVVS	115
GmbHLH122	MESDLRCHPMPFL.DHHHHCQHMNSGIMFYSAFSSYSSIIIEFVYHVENFNFPSFETERILRFVDSLGGGDAADADADSLANTQPFITVAVKVEVNHQFQDNTSMNN.FEVL	117
MdbHLH122	MESDLQCHD.....KFCQHMNSGIMFYSAFSSYINILISEXCEFLNFPSFETERIFSRFLASEGGGNGGGGGGGG..IEEIVSQHKVETQINNQQRF.FMVFKVID.FVGV	108
RcbHLH122	MESDLQHHHFQGHQNCNNSGIMFYSAFSSYSSFGESQKDFVIDFLNFPSFETERIFARFLAN..SGGSITINISNQLGAVIQSFSPVKEAVTQVSCQAHINASMNSDQTRL	119
ZjbHLH122	MESDLQCHHLFGD.....HLQCCQHMNSGIMFYSAFSSYISAMIRFCQCFNFPSFETERIFARFVN.....GGNGGDD.....TGNVVTGTETIDQRTQ.FSISMMNN.ETCVL	101
Consensus	mes h q ns l ry sapsyf xp speter f	
PbbHLH122-1	QQQHQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQSEAKFEELPNC.NLITSNEG.AYSNRGSHIPPMFTGGGVANSINRHSPPAGCFSNVMIL...GCALRGMGNFAR..DSTNEEA	221
PbbHLH122-2	QQQHQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSNMMDA.GYPALRGMGNFAS..NSTSEEA	208
AtcHLH122	GDCE.....LTVN.FEVSIGYVA.SVSRNMFEE.....RDD.RTFVNNLRHNSPPAGCFSSIDVEIA.YAVVMKSGGEGGNSVMSTSTE	194
GmbHLH122	QQQHQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSNMMDI.GYAVRMGCTMGAAANNITFEA	203
MdbHLH122	QQQHQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSNMMDI.GYAVRMGCTMGAAANNITFEA	205
RcbHLH122	HRHQCCQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSSINIEVENVGYVIREGMDFGTG....SSET	216
ZjbHLH122	EQCCQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSSINIDN....GYAVRMGCTMGAAANNITFEA	201
Consensus	QQQHQCCQCCQCCQCCQCCNLNNV..SSVAGCFYQ.FTSKEEELPNC.NLN...EG.AYSNGGSHIPSVFTGGGVANSINRHSPPAGCFSSINIDN....GYAVRMGCTMGAAANNITFEA	
PbbHLH122-1	SFEFASLKNFSSV..EP..STGLSIFSEIGNRMRNSQDAGAFGIGRGNVY..GCFMCSWDISAILGDDISGSGTFR.DIVKAYTIGSESTQTVAGNHPE.TLTFEHSIHK	334
PbbHLH122-2	SFEFASLKNFSSV..EP..STGLSIFSEIGNRMRNSQDAGAFGIGRGNVY..GCFMCSWDISAILGDD...TGFR.DIVKAYTIGSESTQTVAGNHPE.TLTFEHSIHK	317
AtcHLH122	ASLTFEHSKLLF.....FISRAMSEIEVDVMPGFSRLPE.....RILS.GCFMNR.SFGNSESASLMLTARTQS.....GGDQYKTIKEDSARR..TLTFEHSIHK	287
GmbHLH122	NFSPFATMKNFAIN.....SGLMSLRSGIGNSNTANGENGFASQSENEFIPGFPVGFWDIASIMSDMGLTQFR.DIVKPFSSGNSQSGGQSSSARQSSSARQSSS	315
MdbHLH122	SFEFASLKNFSSV..EP..STGLSIFSEIGNRMRNSQDAGAFGIGRGNVY..GCFMCSWDISAILGDD...TGFR.DIVKAYTIGSESTQTVAGNHPE.TLTFEHSIHK	314
RcbHLH122	SYTAGFEL.....FSSGRSEIEPTEIGNARNGNPFDSAGFETRNSVY..GCFMCSWDITAVMSAG..LKRTID..EDRTISGNASENESGEVGNHPE.TLTFEHSIHK	317
ZjbHLH122	ATSSANLKNYNTAGGFELISAGLSPIAEMEPNLAINPDI.....GNYVT..GCFMCSWDISASISITITGLKRIRSLDITKPSFINKSENGNVEVGARPE.TLTFEHSIHK	312
Consensus	s r k g 1 l h slp	
PbbHLH122-1	TASEMAIERFICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	433
PbbHLH122-2	TASEMAIERFICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	416
AtcHLH122	S...LSDIQLIS.DSIEPCIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	379
GmbHLH122	TASEMAIERFICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	415
MdbHLH122	TASEMAIERFICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	413
RcbHLH122	TSIELSPERYICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	417
ZjbHLH122	TSSEMAIERFICQDSCPICIRAKFGCATHISRIAERVFRTERISERMFKLCIVENMDKCTITSDMLDLAVYIKILQCVQVISEHRAKCTGSKNQ	412
Consensus	ie l ds pokirakrgcathisriaervrterisermfkclivemdkctitdmldlav yikilq cv l r c c	

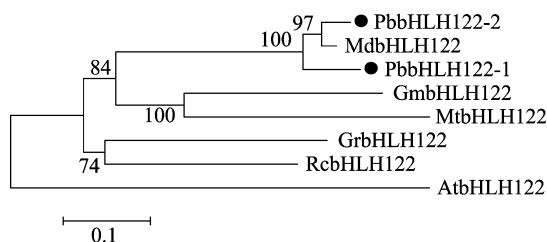
HLH 结构域

图2 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 与其他植物 bHLH122 蛋白序列比对

系统进化分析结果表明, PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 与苹果的 MdbHLH122 的亲缘关系最近, 与豆科的大豆以及苜蓿的 bHLH122 也处于同一个进化分支上, 表明它们有较近的亲缘关系(图3)。二级结构分析表明(图4), PbbHLH122 - 1 中 α 螺旋占 27.94%, 无规则卷曲占 68.59%, 延伸链占 3.46%, 而 PbbHLH122 - 2 中 α 螺旋占 30.53%, 无规则卷曲占 66.11%, 延伸链占 3.37%。PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 在 C 端均有明显的连续 α 螺旋, 与保守结构域的分析完全一致。利用 SWISS - MODEL 自由匹配模板, 预测拟南芥 AtbHLH122、PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 的 C 端保守域的 3 维结构(图5), 可以看到三个蛋白 C 端保守域均含有 1 个螺旋 - 环 - 螺旋结构, 仅在“环”位置上有微小差异, 根据结构决定功能的原理, 推测 PbbHLH122 - 1 和 PbbHLH122 - 2 与拟南芥 AtbHLH122 会有相似的功能。

2.3 *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 的表达特点

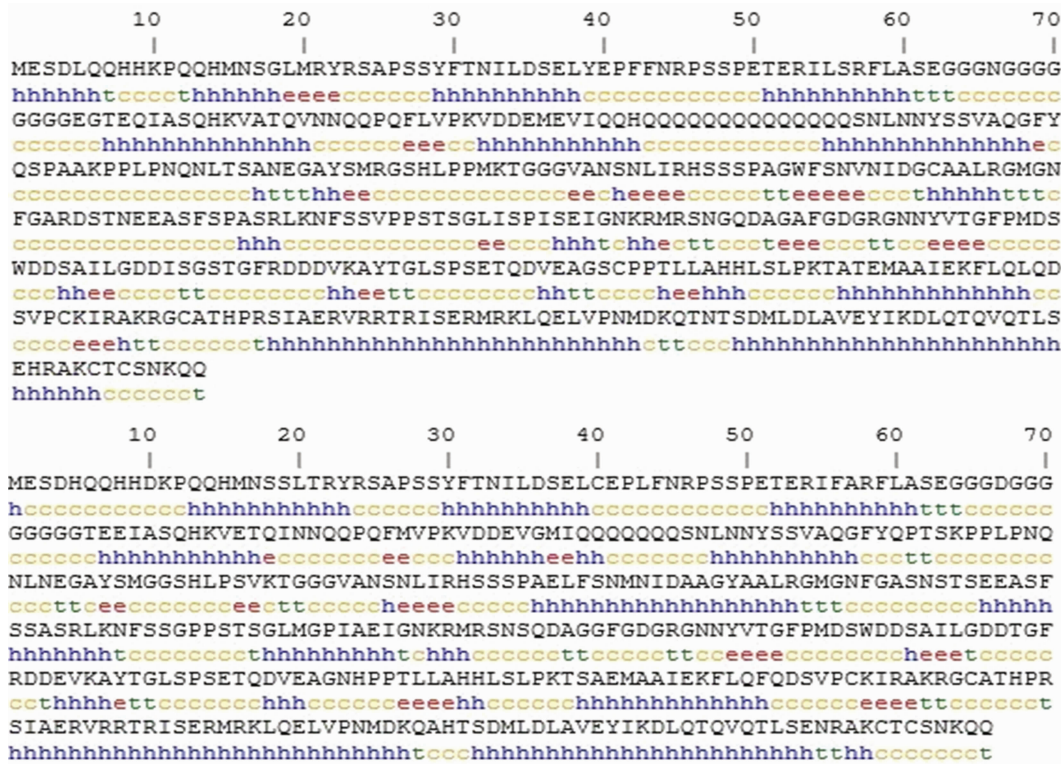
正常生长条件下, *PbbHLLH122-1* 和 *PbbHLLH122-2* 在杜梨的根和叶中都有表达, 其中叶中的相对表达量显著高于根部, 而 *PbbHLLH122-1* 的表达量略高于 *PbbHLLH122-2* (图 6)。盐胁迫条件下, *PbbHLLH122-1* 在 6 h 后达到表达高峰 (图 7-A), 而 *PbbHLLH122-2* 的表达高峰在 1 h 之后便已出



分支上的数值为 1 000 次建树中该位置出现的置信度值；
标尺代表核苷酸的置换距离

图3 植物来源的 bHLH122 转录因子蛋白系统进化树

现(图7-B);PEG-6000模拟干旱胁迫条件下,*PbbHLH122-1*直至12 h才出现表达高峰(图7-C),而*PbbHLH122-2*在3 h出现高峰(图7-D);甘露醇处理条件下,*PbbHLH122-1*于处理9 h后出现表达高峰(图7-E),而*PbbHLH122-2*仍是在3 h就出现表达高峰(图7-F);ABA处理条件下,*PbbHLH122-1*和*PbbHLH122-2*的表达量在12 h内均无显著变化(图7-G、图7-H)。综上所述,盐、干旱以及渗透胁迫均能提高*PbbHLH122-1*和*PbbHLH122-2*的表达量,*PbbHLH122-2*的相对表达量虽然不及*PbbHLH122-1*,但是其到达表达峰值的时间均比*PbbHLH122-1*早,由此表明,2



h 代表 α 螺旋, c 代表无规则卷曲, e 代表延伸链



图5 PbbHLH122蛋白三维结构预测

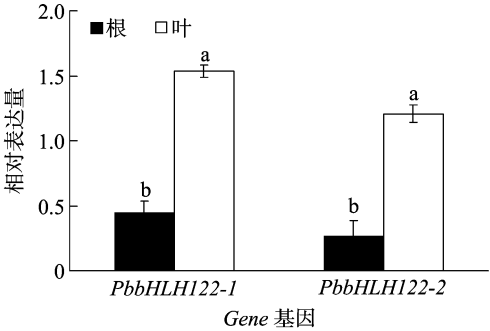


图6 *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 基因在杜梨根和叶中的表达

个基因在杜梨应对非生物胁迫过程中所发挥的作用可能有所区别,并且它们所参与的信号途径不受 ABA 调控。

3 讨论

bHLH 转录因子家族成员蛋白质 C 端都具有螺旋-环-螺旋的碱性保守功能域,该区域由 2 个含有疏水性氨基酸的偶极性 α 螺旋组成,第一个 α 螺旋也称识别螺旋,与识别蛋白结合特异的 DNA 序列有关;第二个 α 螺旋位于第一个 α 螺旋之上,基本上平行于双螺旋链,这种结构有利于氢键形成和范德华力作用,对于 DNA 结合至关重要^[19]。这 2 个 bHLH 蛋白通过结合到下游基因的启动子上来调控下游基因的表达。本研究中克隆获得的 2 个杜梨 bHLH 转录因子,生物信息学分析发现它们所编码的蛋白在 C 端都具有螺旋-环-螺旋保守功能域。然而,并不是所有的 bHLH 基因家族成员只在蛋白质 C 端拥有保守结构域,例如云南红皮梨的 1 个

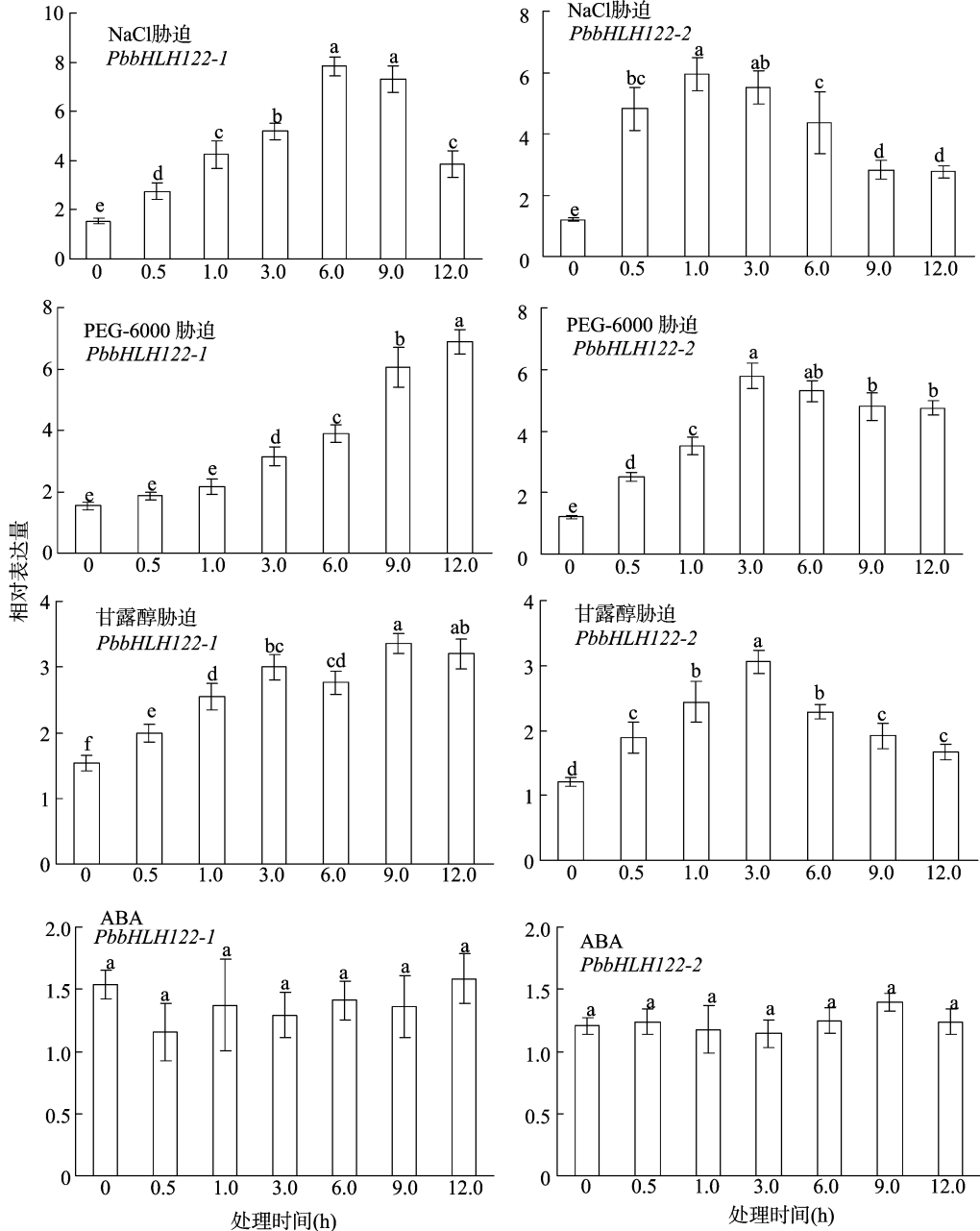


图7 逆境胁迫条件下 *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 在叶片中的表达

bHLH 转录因子(*HM622265*)除了在 C 端具有螺旋-环-螺旋保守功能域外,在 N 端也拥有 bHLH-MYC 保守结构域^[20]。不同的结构决定不同的功能,云南红皮梨 bHLH 转录因子(*HM622265*)主要参与了果实成熟过程中对果皮着色的调控作用,而 *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 则极有可能只参与植株对逆境条件的响应。

bHLH 家族基因在逆境条件下被诱导表达的条件差异很大。例如,棉花的 *GhbHLH130* 在逆境胁迫条件下,显著受高盐、干旱、ABA、低温胁迫的迅速诱导,而 *GhbHLH1* 能够迅速响应 ABA 处理和干旱胁迫,却不受高盐和低温的影响^[21]。本研究中, *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 同源性为 84.63%,在 C 端都具有螺旋-环-螺旋保守功能域,表明其具有相似的功能,其表达规律也相似。然而,其在对逆境响应的过程中仍然具有一些差异。在高盐、干旱以及渗透胁迫条件下, *PbbHLH122-2* 在 1~3 h 内即可达到表达峰值,而 *PbbHLH122-1* 通常需要 6~12 h 才能达到表达峰值。然而,从表达量上来看, *PbbHLH122-1* 在上述条件下的相对表达量要略高于 *PbbHLH122-2*。由此表明, *PbbHLH122-1* 和 *PbbHLH122-2* 在逆境条件下发挥的作用可能略有不同。

在植物中,转录信号的级联在植物激素 ABA 和非生物胁迫的信号通路之间组成了一个复杂的信号网络,转录因子在其中发挥了重要作用^[22-23]。然而,拟南芥中 *AtbHLH122* 显著受高盐、干旱和甘露醇的诱导,而 ABA 则不能诱导其表达,表明其可能直接调控逆境响应基因,而并不是通过 ABA 代谢途径参与植株抗逆活动^[12,24]。本研究中无论是 *PbbHLH122-1* 还是 *PbbHLH122-2* 均对 ABA 胁迫无响应,表明与 *AtbHLH122* 具有相似的功能特点。

参考文献:

- [1] Li X L, Zhang H M, Ai Q, et al. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate Iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(4): 2478-2493.
- [2] Xu W D, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(3): 176-185.
- [3] Bailey, C P. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2497-2501.
- [4] Toledo-Ortiz G H, Quail P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [5] Li X X, Duan X P, Jiang H X, et al. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [6] Kavas M, Baloglu M C, Atabay E S, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(1): 129-143.
- [7] Outchkourov N S, Carollo C A, Gomez-Roldan V, et al. Control of anthocyanin and non-flavonoid compounds by anthocyanin-regulating MYB and bHLH transcription factors in *Nicotiana benthamiana* leaves [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 519.
- [8] Ito S, Song Y H, Josephson-Day A R, et al. FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(9): 3582-3587.
- [9] Tani E. The study of a SPATULA-like bHLH transcription factor expressed during peach (*Prunus persica*) fruit development [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(6): 654-663.
- [10] Groszmann M P, Smyth D R. Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2008, 55(1): 40-52.
- [11] Ling H Q, Bauer P, Berczky Z, et al. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21): 13938-13943.
- [12] Liu W W, Tai H H, Li S S, et al. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism [J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1192-1204.
- [13] Li F, Guo S Y, Zhao Y, et al. Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene (OrbHLH001) from Dongxiang wild rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(9): 977-986.
- [14] 王宏. 耐盐杜梨蛋白磷酸酶基因 *PbPP2C* 的克隆及表达分析 [J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1464-1471.
- [15] 韩金龙. 杜梨 CBL1 和 CBL7 基因对非生物逆境的响应 [J]. *果树学报*, 2014(4): 529-535.
- [16] 李慧. 杜梨 PbPEAMT 的克隆、序列分析及表达特征 [J]. *植物生理学报*, 2012(5): 449-455.
- [17] 李慧, 丛郁, 常有宏, 等. 杜梨 *CPI* 基因的克隆、序列分析及表达 [J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(5): 1070-1077.
- [18] Hu B, Jin J P, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [19] Ding W N, Yu Z M, Tong Y L, et al. A transcription factor with a bHLH domain regulates root hair development in rice [J]. *Cell Research*, 2009, 19(11): 1309-1311.
- [20] 孟富宣, 周军, 辛培尧, 等. 云南红皮梨 bHLH 转录因子的生物信息学分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2013(5): 652-659.
- [21] 光杨其, 宋桂成, 张金凤, 等. 1 个新棉花 bHLH 类基因 *GhbHLH130* 的克隆及表达分析 [J]. *棉花学报*, 2014, 26(4): 363-370.
- [22] 许园园, 李晓刚, 李慧, 等. 梨 *CDPK* 基因家族全基因组序列鉴定分析 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(3): 659-666.
- [23] 田鹏, 苏艳丽, 康保珊, 等. 两个红梨品种花色苷合成相关基因及转录因子 MYB10 表达模式分析 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(1): 166-171.
- [24] 刘明文. bHLH122 提高植物抗逆能力的分子机制初探 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.