

郭文婷, 张鹏飞, 李潇玲, 等. 棉花 ERF-B3 亚组转录因子基因 *GhERF5-1* 的克隆及表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 20-24.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.005

棉花 ERF-B3 亚组转录因子基因 *GhERF5-1* 的克隆及表达

郭文婷, 张鹏飞, 李潇玲, 张 析, 张 薇

(石河子大学农学院/新疆绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832000)

摘要:为海岛棉抗病提供新的基因资源和作物抗病分子育种提供有用的理论依据, 以前期获得的枯萎病病菌诱导陆地棉根部基因表达谱中获得差异性表达 ERF 片段为探针, 用电子克隆及 RT-PCR 技术, 从陆地棉抗枯萎品种中棉所 12 根部 cDNA 克隆得到 1 个新的 ERF 转录因子。通过进化树分析属于 B3 亚组, 命名为 *GhERF5-1* (登录号: MF145657)。 *GhERF5-1* 基因的序列分析表明, 其 cDNA 全长为 990 bp, 编码的氨基酸 329 个, 分子量 36.52 ku, 等电点为 6.15, 含有 1 个保守的 AP2 的结构域。qRT-PCR 分析结果表明, 枯萎病病菌侵染后, 随着侵染时间的延长, *GhERF5-1* 基因的表达趋势是先增加后降低, 在处理 2 h 基因的相对表达量达到最大。推断 *GhERF5-1* 基因可能参与枯萎病的防御反应。

关键词:棉花; ERF 转录因子; 枯萎病病菌; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0020-05

枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp.) 是一种真菌性土传病害, 由尖孢镰刀菌引起。枯萎病对棉花的生产发展造成了严重的损失。由于枯萎病病菌自身的一些传播特点, 传统的防护措施及一些治病方法效果不是很理想, 因此培育和种植抗枯萎病品种是一种有效的办法。陆地棉种抗病基因资源较丰

富, 因此从陆地棉中分离抗枯萎病相关的基因, 通过转基因技术可为海岛棉抗枯萎病育种奠定基础。

当植物被病原菌侵染时会发生一系列的应激防卫反应, 其中一些植物的内源性激素发挥重要作用。另外, 一些转录因子在植物抗病中扮演着重要角色, 它们通过结合下游基因启动子中顺式元件, 调节下游防卫基因。AP2/ERF 转录因子中的 ERF 亚家族主要参与了植物体的生物和非生物胁迫下的应答反应。ERF 亚家族转录因子只含有 1 个保守的 AP2/ERF 结构域, 一般由 58~59 个氨基酸残基组成^[1-2]。很多信号分子可以诱导 ERF 转录因子, 当病原菌侵染棉花时, 棉花自身会发生应激反应而产生许多小分子物质, 如乙烯

收稿日期: 2017-06-28

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31560407)。

作者简介: 郭文婷 (1991—), 女, 甘肃人, 硕士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 18293684620@163.com。

通信作者: 张 薇, 博士, 教授, 研究方向为棉花分子育种。E-mail: zhw_agr@shzu.edu.cn。

[6] 宋润刚, 路文鹏, 沈育杰, 等. 冰红葡萄酒新品种“北冰红”的选育研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2008(4): 19-22.

[7] Breton G, Danyluk J, Charron J B, et al. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2003, 132(1): 64-74.

[8] Hadi F, Gilpin M, Fuller M P. Identification and expression analysis of *CBF/DREB1* and *COR15* genes in mutants of *Brassica oleracea* var. *botrytis* with enhanced proline production and frost resistance[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2011, 49(11): 1323-1332.

[9] Jurczyk B, Rapacz M, Budzisz K, et al. The effects of cold, light and time of day during low-temperature shift on the expression of *CBF6*, *FpCor14b* and *LOS2* in *Festuca pratensis*[J]. Plant Science, 2012, 183(1): 143-148.

[10] Ganeshan S, Vitamvas P, Fowler D B, et al. Quantitative expression analysis of selected *COR* genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen[J]. Journal of

Experimental Botany, 2008, 59(9): 2393-2402.

[11] 吴雪霞, 查丁石, 邵 翔. 低温胁迫对茄子幼苗生长、抗氧化酶活性和渗透调节物质的影响[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(4): 471-475.

[12] Bockaert J, Pin J P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success[J]. EMBO Journal, 1999, 18(7): 1723-1729.

[13] 徐 鹏, 王喆之. 丹参 *COR413* 基因克隆及表达分析[J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 2010(5): 77-81.

[14] 李 洋, 曲彦婷, 周爱民, 等. 针叶福祿考 (*Phlox subulata*) 抗寒基因的克隆及分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(9): 1917-1927.

[15] 符 楠, 殷奎德, 郭晓红, 等. 转柃柳冷适应蛋白基因水稻的获得及抗冷性分析[J]. 上海农业学报, 2016, 32(2): 14-18.

[16] 秦 华, 睦顺照, 李名扬, 等. 蜡梅 (*Chimonanthus praecox* L.) Link *COR413* 蛋白基因 (*Cpcor413pm1*) 的分子特性与表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 547-552.

[17] 马晓翠. 番茄冷调控蛋白 SICOR413IM1 的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.

(ethyl ene, 简称 ET)、水杨酸 (salicylic acid, 简称 SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, 简称 JA) 等激素, 这些激素发挥信号分子的作用^[3], 此外大多数 ERF 转录因子在植物抗病过程中处于信号交叉途径, 发挥着连接因子的作用^[4]。莫纪波等研究发现转录因子在不同的激素互作中发挥重要作用, 进而激活了植物抗病信号途径中的一些信号通路^[4]。金莉研究发现, *GbERF1* 转录因子基因通过增强抗病相关基因的表达, 从而提高棉花的抗病能力^[5]。刘坤等克隆了 *GbEREB5* 和 *GbEREB6* 这 2 个属 B3 亚组的转录因子基因, 研究发现可以提高 *NiCHI-B*、*NiPR2* 等 PR 蛋白基因的表达量^[6]。在作物中过量表达 ERF 类转录因子基因, 可以使下游的一些抗病基因和一些与抗病相关的基因呈上调表达, 不仅提高了作物对某种单一病害的抗性, 而且增加了作物对多种病害的抗病力^[7]。转录因子在植物抗病中具有更高的应用价值。与转入单一的抗病基因的转基因方式相比, 其能够激活或抑制多个下游基因的表达, 进而获得抗病力更强的转基因植株^[8]。目前, 虽然棉花中 ERF 转录因子数目较多, 但是对它们功能的研究还不是很深入。在海岛棉中, 对抗枯萎病相关的 ERF 转录因子基因的研究有限, ERF 转录因子与植物内源性激素之间的互作尚不明确。本研究用对枯萎病病菌有差异表达的 ERF 为探针, 克隆了 ERF-B3 亚组的转录因子基因 *GhERF5-1*, 利用生物信息学分析 *GhERF5-1* 基因的结构、qRT-PCR 技术分析 *GhERF5-1* 基因在枯萎病病菌处理下的表达模式, 希望能够为海岛棉抗病提供新的基因资源和为作物抗病分子育种提供有用的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为陆地棉品种中棉所 12, 由石河子大学农学院育种教研室保存; 枯萎病病菌菌株为 F430, 由石河子大学农学院植物保护系张莉老师惠赠。将籽粒饱满的种子用 10% 的过氧化氢溶液浸泡 2~3 h 后, 用 ddH₂O 冲洗 6 遍后种植于蛭石中。当棉苗长出第 1 张真叶时, 转移到霍格兰培养液中于 (24±3) °C、光照 16 h、黑暗 8 h 在培养箱中培养。待棉苗

长至 2 叶 1 心时, 选取生长一致的棉苗, 分别浸于浓度为 1×10⁷ 个/mL 的枯萎病病菌孢子悬浮液、1 mmol/L 乙烯、50 μmol/L 水杨酸和 1 mmol/L 茉莉酸甲酯的霍格兰营养液中 40 min, 然后转入霍格兰营养液中。以相同生长条件下用水处理的棉苗作为平行对照 Mock, 分别在 0、1、2、3、6、12、24、48 h 时间点取处理棉苗和对照的根部组织, 液氮冷激后保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 基因全长 cDNA 的克隆 利用笔者所在实验室得到的棉花抗枯萎病表达谱中的 ERF 序列为探针, 在 NCBI 网站用 tBlastn 方式比对搜索, 下载同源性高的 ESTs 序列; 利用 CAP3 拼接软件进行 ESTs 的拼接, 将拼接完整的序列进行分析, 找到其 ORF 后利用 NCBI 寻找其保守域; 利用 MEGA 5.0 构建系统发育树分析所得电子序列与已知 ERFB3 亚组基因的亲缘关系。使用 Oligo 7 设计全长引物 (上游引物 F1: GGGGTACCATGGAAAGTAGCAGTGAAGTGTCT; 下游引物 R1: CGGGATCCGATGACCGTAACCTGTTGAAAGC)。棉花总 RNA 的提取采用 CTAB 法, 通过反转录得到 cDNA 后进行 PCR 扩增, 得到预期大小的基因片段, 连接 pMD19-T 载体后, 利用热激法将质粒转入大肠杆菌, 筛选阳性克隆进行测序。

1.2.2 生物信息学分析 在 NCBI 数据库和 Cottongen 数据库的基础上, 利用生物信息学软件分析 *GhERF5-1* 基因的开放读码框、编码蛋白的理化性质、蛋白亲疏水性、蛋白高级结构等, 多序列比对用 DNAMAN 软件, 用 MEGA 5.0 软件做进化树分析。表 1 为所用的生物信息学分析软件。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 根据目的基因的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 上游引物 Fq: CCTAAGCCCTTTGAATTTACACCT 和下游引物 Rq: CCACTCTACTTTATGCGGTAACGA; 以棉花的持家基因 *GhUBQ7* 作为内参基因, 上游引物 Fu: GAAGACCTACACCAAGCCCAAG; 下游引物 Ru: CGGACTCTACTCAATCCCCACC。试验共设 3 个重复, 最后采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因相对表达量。

表 1 生物信息学分析软件及在线分析工具

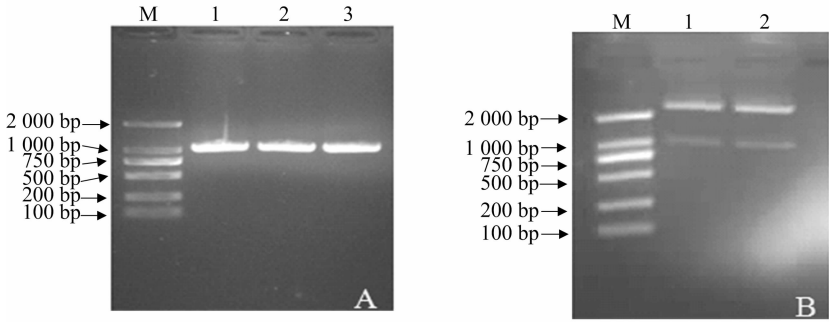
项目	工具	网址
相似性序列搜索	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
序列在线拼接	CAP3	http://pbil.univ-lyon.fr/cap3.php
开放读码框	ORF Finder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf/html
一级结构预测	ExPaSy ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
蛋白二级结构分析	GOR4	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?Page=npsa-gor4.html
结构域分析	SMART	http://smart.embl-heidelberg.de
三级结构的同源建模分析	SWISS-MODEL	http://swiss-model.expasy.org/
蛋白磷酸化位点	NetPhos 3.1 serve	http://www.cbs.dtu.dk/services/DetPhos/
蛋白亲/疏水性	ExPaSyProtScale	http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl

2 结果与分析

2.1 基因全长 cDNA 的克隆

以笔者所在实验室前期获得的枯萎病病菌诱导棉花根部基因表达谱中有明显差异表达的 ERF 数据为基础, 利用电子拼接方法得到 1 条长度为 990 bp 的序列。用 ORF Finder 在线软件分析得出, 该基因开放阅读框 (ORF) 为 990 bp, 根据该

ORF 序列设计全长引物, 以前期获得的中棉所 12 的棉花根部 cDNA 为模板, 扩增出 1 条长度约 1 000 bp 的片段 (图 1), 筛选阳性克隆进行测序, 结果表明, 该基因全长为 990 bp, 与电子克隆序列一致, 通过和拟南芥 ERFB3 亚组基因进行系统进化树分析, 结果发现, 该基因在进化上与拟南芥 B3 亚组的 *AtERF5* 亲缘关系最近, 所以将该基因命名为 *GhERF5-1* (GenBank 登录号: MF145657)。



M—DL2000; 1~3(A)—目的基因扩增片段;1~2(B)—双酶切结果

图1 *GhERF5-1* 基因的 PCR 扩增和双酶切验证

2.2 生物信息学分析

2.2.1 多序列比对及同源进化分析 从 NCBI 下载 10 个已知拟南芥 ERF - B3 亚组的基因进行多序列比对分析,结果发现,*GhERF5-1* 基因编码氨基酸序列在 180 ~ 244 之间,含有构成了 ERF 亚族转录因子典型的 AP2 结构域(图 2)。为了进一步分析 *GhERF5-1* 基因与 ERF 亚族其他转录因子之间

的进化关系,利用 MEGA 5.0 软件,将该基因编码的氨基酸与拟南芥的 ERF - B3 亚组氨基酸序列作同源进化树分析,结果(图 3)表明,*GhERF5-1* 基因编码的蛋白与拟南芥 *AtERF5* 同处于 1 个分支,说明该基因在进化上与拟南芥 ERF - B3 亚组的基因 *AtERF5* 亲缘关系最近,进一步说明 *GhERF5-1* 基因属于 ERF - B3 亚组。

At4g18450_AY560868.1	..MAFGNIQEPDGEILKNWAN.YIG.....IPQDTRTSIH	33
At3g23240 (NC_003074.)	..MDPFLIQSP	9
At2g31230_AY096563.1	..MEYSQ....	5
At1g06160 (BT014958.1)	..MEYQTNFLS	9
At5g61590_AY079321.1	..METFEES..DLVDVIQKHLFEDLMIPDG..FIEDFVFD	34
At4g17490_AY114588.1	..MATPNEVS.ALFLIKKYLLDELSPPT...TATTNRMMND...TTSFDQTGFE	46
At5g51190_AY114590.1	..MSSSDSVNNGVNS..	7
At2g44840_AF325089.1	MYGCNIESDYVALLLESITRHLGGGGE..	23
At5g47220 (BT024470.1)	..MESSESVSSALQYIEQYLLDENQFTPAGLGSFSTANQWINEPIPEVSTSPSQCSCSQTSTSGSCLTSLSNFNCLLDDDDFFNFSPNFFGFSNRRID	37
GhERF5-1	..MESSESVSSALQYIEQYLLDENQFTPAGLGSFSTANQWINEPIPEVSTSPSQCSCSQTSTSGSCLTSLSNFNCLLDDDDFFNFSPNFFGFSNRRID	94
Consensus		
At4g18450_AY560868.1	VPEVSRTEWALPTLDDKPE.....GSKERLPSLDMSMEDQEWTEILDAISFPNKNTHDPLTN.....PTIDSCSLSSRVSCKT.....R	108
At3g23240 (NC_003074.)	FSGEISPEYSIGSSPDSF.....SSSSNNYSLPFNENDSEEMFLYGLIEQSTQOTYIDSD.....SQDLPIKSVSSRKSE.....K	80
At2g31230_AY096563.1	..SSMYSSPSSWSSS.....QESLLWNESCFLDQSSEPAFFCPNYDYSDDFFSFESPEMMI.....KEEIQNGDVSNSEEEKVGIDEER	84
At1g06160 (BT014958.1)	GE..ESPENSSSSSWSS.....QESFLWESFLHQSPDQSFLSSPTDNYCDDFFAFESS..II.....KEEGKEATVAEEEE..K	80
At5g61590_AY079321.1	DTAFVGLWSLEFPNPVPV...KLEPSSPVLDPDSYVQEIQLMEAESSSSSTTTSPVEVTSNVR.....KKTKEFEET.....R	105
At4g17490_AY114588.1	FSEETKPEIIDLITPKPEIFDFVKSEIPSESNDSFTFQSNRPRTVYQSNRKPLKIAPPNRTKWIQFATGNPKPELPVPVVAEEK.....R	135
At5g51190_AY114590.1	..QQEQDQSAIDLITQH.....LLTDFP..SLDTFASTIHCCTSTLSQRKPLPLAIVPTT.....APVQENDQ.....R	70
At2g44840_AF325089.1	NVILNNDWSDLPISVDDSD.....QDMAIYNTLRDAVSSGWTPS.....VPPVTSPEAEN.....KPPATKASGSHAPRQKG.....M	90
At5g47220 (BT024470.1)	SSCTESWGGLPIKENDS.....EDMLVGLLKDFAHFDTSDDLSCFLFFPAVKVEPTENFTAM.....EEKPKKAIPVTETAVKA.....K	115
GhERF5-1	VFEEDSKPQFINITAPK...FEETPQITELSAVKPPTPSSSSSSSSSHNRKPSLKISLPHKVEWQIRKRPDSTKAQPTNSNSEDKN.....K	179
Consensus		
At4g18450_AY560868.1	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDSTRNGVRWLGTETAEAAAMAYDKAEVRIRGTOKAHTNFOLETVIKAMEMDCNPYYIMNNSNTSDPLRSSRKSGWM	205
At3g23240 (NC_003074.)	SYRGVRRFPWCKAAAEIRDSTRNGVRWLGTETAEAAALAYDQAEAFMRG..SAAIINFSAERVQESLSEIKYT...YEDGCSFVVALKKRHSMR	172
At2g31230_AY096563.1	SYRGVRRFPWCKAAAEIRDSTRNGVRWLGTETAEAAALAYDQAEAFATG..SLATINFPVEVVRESLKKMENVN...LHDGGSFPMALKRKHSLRN	177
At1g06160 (BT014958.1)	SYRGVRRFPWCKAAAEIRDSTRNGVRWLGTETAEAAALAYDQAEAFATG..SLAVINFPADVVESLKKMENVN...LNDGESFVIALKKRHSMRN	173
At5g61590_AY079321.1	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETESDIIAARAYDYRAEKLRC..RKAVINFPDLADAGKYDAFVNSCR...KRRTDVPFQQTITTS	196
At4g17490_AY114588.1	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETETAEAAARAYDKAEKLRC..SKATINFPLEVDKWNPRADGR..GLYNKRKRDEGEEVVTMVEKV	229
At5g51190_AY114590.1	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETETAEAAARAYDKAEKLRC..SKATINFPLEAGKHEDLGDNKKITSLKAKRKRQVTEDESQILSRK	166
At2g44840_AF325089.1	QYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETETAEAAALAYDQAEAFMRG..SKATINFPFHILIGSCKYEPVRIK...PRRRSEPSVSDQLTSEQ	181
At5g47220 (BT024470.1)	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETETAEAAALAYDQAEAFMRG..SRALINFPPLRVNSGEPDPVRIIT...SKRSSSSSSSSSSSTS..	204
GhERF5-1	KYRGVRRFPWCKAAAEIRDPKAKGSRWLGTETETAEAAALAYDQAEAFMRG..SKATINFPLEAGKLVDVTAVDGE...RKRRSDDGAGNEKQVKAGKR	272
Consensus	yrgvr rpwgk aaeird g r wlgt aa yd a g a nf	
At4g18450_AY560868.1	RTGKEAIKAYDEVVDGMVENHCALSYCSTKEYSETCGLRGSEETWFDLRKRNRSDNSMCQEVEMQKTVTGEETVCDVFLGFEFFEDLGSYDLETL	300
At3g23240 (NC_003074.)	RMTNNK.....TKDSFDHRSVK.....LDN...VVVFEDLGEQYLEELLGSSSENSGTW.....	218
At2g31230_AY096563.1	RPRGKKRSSSSS...SSSSSSSSSSSSSTSTSRSSSKQSVVK..QESG..TLVVFDLGEAYLEQLLMSSC.....	243
At1g06160 (BT014958.1)	RPRGKKSSSSSTLTSSPSSSSSSSSSSSSSLSSRRKQSVVMTOENNTLLVVLDELGAEYLEELMRSCS.....	244
At5g61590_AY079321.1	SSSSN.....	201
At4g17490_AY114588.1	LKTESYDVDSGG.....ENVESGLTAIDWDNLTFLS...MPLLSF..LSPHPPFGVPOITVV..	282
At5g51190_AY114590.1	AVKREAAQVQAG.....ACPLTPSSWKGFWDGASDKD...MGIFSVPLLSPCPSLGHSQVVT..	221
At2g44840_AF325089.1	KRVSHVDGESS.....LVVPELDTVDQYFDGLSLMDQSECSYDNRI..	226
At5g47220 (BT024470.1)	..SSENGKLKRR...RKAENLTSEVVQKCEVQDETETVDELIVS..	243
GhERF5-1	ANDDVTKARDNG.....DAPLTPSNWTSFLWDNTEKGFIDNMLPSF..LSPHPPFGVPOITVI..	329
Consensus		

方框标注为 AP2 结构域

图2 *GhERF5-1* 的氨基酸序列与拟南芥的 ERF 转录因子氨基酸序列的比对分析

2.2.2 基因编码蛋白的一级结构分析 对该基因编码蛋白的理化性质进行分析可知,该基因编码 329 个氨基酸,蛋白分子量为 36.52 ku,分子式为 C₁₆₁₄H₂₄₈₈N₄₅₀O₅₁₀S₅,理论等电点为 6.15。在组成这个蛋白的所有氨基酸中,所占比例最高的为丝氨酸(Ser),达到 12.5%。甲硫氨酸(Met)含量最低,为 0.6%。蛋白的不稳定指数为 47.38,脂肪指数为 61.12,总平

均亲水性为 -0.701,预测该蛋白为 1 个亲水的不稳定蛋白。
2.2.3 基因编码蛋白磷酸化分析和亲疏水性分析 磷酸化和去磷酸化是蛋白质翻译后修饰中的重要形式之一^[9]。基因的结构决定其功能,蛋白质磷酸化在蛋白结构功能的研究中具有重要的意义。利用 NetPhos 3.1 serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DetPhos/>) 预测该基因编码蛋白的磷酸化

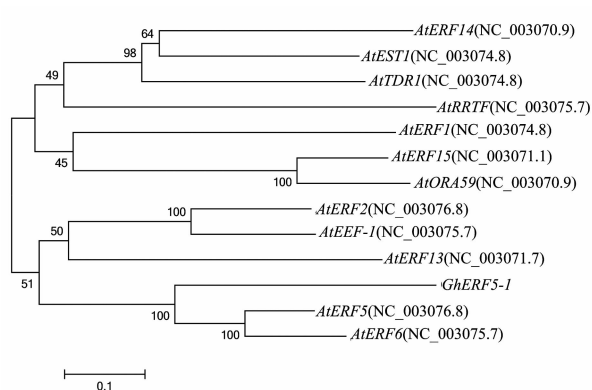


图3 *GhERF5-1* 基因编码氨基酸序列与拟南芥 ERF 转录因子进化树分析

位点(图4),结果显示,该蛋白总共含有 29 个丝氨酸、11 个苏氨酸和 1 个酪氨酸磷酸化位点。因此推测在棉花上,*GhERF5-1* 基因有可能被酪氨酸激酶、丝氨酸激酶、苏氨酸激酶磷酸化修饰后激活调控基因的表达,进而调控蛋白的活性。对 *GhERF5-1* 基因编码的蛋白进行亲/疏水性分析,结果见图 5。在多肽链中,第 258 位的氨基酸亲水性最强,分值为 -3.3;第 310 位的氨基酸疏水性分值最高,为 1.2。说明该蛋白是 1 个亲水蛋白,进一步说明该蛋白是 1 个不稳定蛋白。

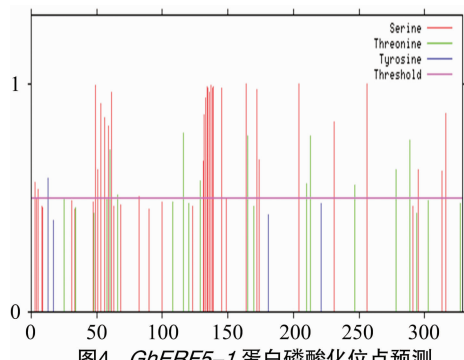


图4 *GhERF5-1* 蛋白磷酸化位点预测

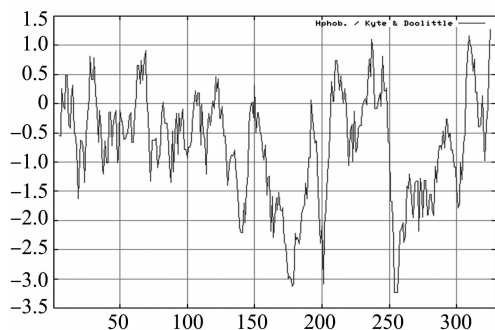


图5 蛋白的亲/疏水性分析结果

2.2.4 蛋白高级结构预测 对该基因编码的蛋白进行二级结构分析,结果见图 6。分析表明,该蛋白二级结构的主要组成元件是 α 螺旋与无规则卷曲, β 折叠只占 15.81%。由图 6 可知,*GhERF5-1* 基因编码的蛋白质二级结构中最主要的结构元件是以无规则卷曲的形式存在, α 螺旋分散在整个蛋白中。蛋白的结构功能域分析结果(图 7)显示,该蛋白在 180~244 之间是个高度保守的 AP2 结构功能域,该结构域是 ERF 亚家族共有的典型结构域。AP2 结构保守域的 C 端序

列是由 18 个氨基酸残基组成的核心序列,形成双亲性的 α 螺旋参与了同 DNA 元件或其他转录因子间的相互作用,N 端的碱性亲水区是由 3 个反向平行的 β -折叠构成^[10]。三级结构的同源建模分析,预测 *GhERF5-1* 转录因子基因的立体结构,结果(图 8)表明,*GhERF5-1* 转录因子的 ERF 结构域与拟南芥的 *AtERF5* 的非常相似,由此推测 *GhERF5-1* 所编码的蛋白可能有与 *AtERF5* 有相同的特性,可以与下游基因启动子中 GCC-box 结合,从而实现了对下游抗病基因的激活。

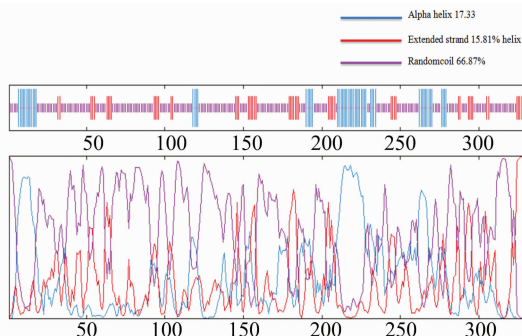


图6 蛋白的二级结构预测结果



图7 蛋白结构域的预测结果

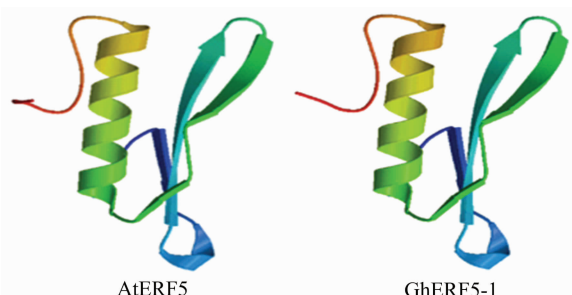


图8 蛋白的三级结构预测结果

2.3 实时荧光定量 PCR 分析

利用 qRT-PCR 分析枯萎病病菌处理后 *GhERF5-1* 基因的表达。结果(图 9)发现,枯萎病病菌处理抗病品种中棉所 12 号后,该基因的相对表达量均高于平行对照 Mock,为上调表达。枯萎病病菌侵染后,随着侵染时间的延长,*GhERF5-1* 基因的表达趋势是先增加后降低,在处理 2 h,该基因的相对表达量迅速增加,达到最大,是 Mock 的 3 倍,随后表达量逐渐降低,48 h 时,其相对表达量与对照 Mock 基本相同。由此可知,*GhERF5-1* 基因对枯萎病有明显的响应,推测该基因在棉花抗病中可能发挥一定的作用。

3 讨论

ERF 亚族作为植物特有的一类转录因子,在植物应激反应中发挥着很大作用。ERF-B3 亚组转录因子通过与其下游 PRs 基因启动子中的 GCC-box 顺式作用元件结合,进一步调控 PRs 基因的表达,如 *AtERF1* 通过结合 PR 基因 *PDF1.2* 启动子中的 GCC-box,从而激活其表达^[11]。郭伟峰

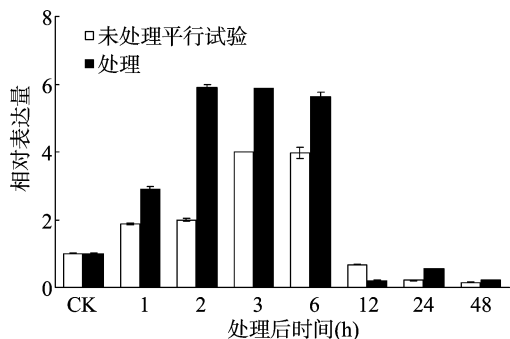


图9 枯萎病菌处理后的 *GhERF5-1* 表达

等从海岛棉品种海 7124 中克隆了乙烯信号路径的 1 个 *ERF*s 类转录因子基因 *GbERF1-like*, 研究发现其参与棉花的抗病反应, 在棉花抗黄萎病中有重要的调节作用^[12]。何兰兰等利用电子克隆技术克隆了 *ERF-B3* 亚组转录因子基因 *GhB301*, 发现其对枯萎病有一定的响应^[13]。本试验利用电子克隆及 RT-PCR 技术, 从棉花抗枯萎病品种中棉所 12 的根部 cDNA 克隆得到 1 个 *ERF* 转录因子 *GhERF5-1*, 序列分析表明, 该基因 cDNA 全长 990 bp, 编码 329 个氨基酸, 无内含子。系统进化树分析表明, *GhERF5-1* 属于 *ERF-B3* 亚组的转录因子。对该基因编码的蛋白序列进行同源比较及结构域分析, 发现该基因在 180~244 之间有 1 个高度保守的 AP2 结构功能域。进一步对该基因进行表达分析, 结果发现, 枯萎病菌诱导后, 该基因对枯萎病有明显的响应, 本试验结果与孟宪鹏对 *EREB1* 基因和 *EREB2* 在受到黄萎病菌的诱导后基因的表达分析结果^[14]一致。

蛋白质翻译后的修饰最常见的是糖基化、磷酸化、甲基化和 ADP 核糖基化, 其中蛋白磷酸化是十分重要的蛋白翻译后修饰^[9]。它是通过蛋白质激酶的作用把磷酸基团转移到丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上的一系列反应^[15]。植物通常通过蛋白之间的相互磷酸化或者自磷酸化来调整蛋白在体内的活性^[16]。研究发现, *ERF* 转录因子基因含相对保守的一些磷酸化位点^[17], 进一步研究认为, *ERF* 转录因子基因的磷酸化修饰可能与转录活性的调控或蛋白稳定性有关^[4]。本研究发现, *GhERF5-1* 基因编码蛋白含有 29 个丝氨酸、11 个苏氨酸和 1 个酪氨酸磷酸化位点, 推测该基因可能通过磷酸化反应参与一些激素的信号通路, 进而响应胁迫。

目前在棉花中对抗病相关的 *ERF-B3* 亚组基因研究不是很多, 本试验克隆得到的基因初步分析对棉花枯萎病有一定的响应, 但是该基因在抗病调控途径中具体的调控机制还不是很清楚, 有待进一步研究。

4 结论

生物信息学分析表明, 该基因的 cDNA 全长为 990 bp, 总共编码 329 个氨基酸, 分子量 36.52 ku, 等电点为 6.15, 编码的蛋白是 1 个亲水的不稳定蛋白。qRT-PCR 分析结果表明, 枯萎病菌侵染后, 随着侵染时间的延长, *GhERF5-1* 基因的表达趋势是先增加后降低, 在处理后的 2 h 基因的相对

表达量是 5.91, 达到最大, 是 Mock 的 3 倍。从 3 h 起, 相对表达量逐渐降低, 12 h 的相对表达量最低, 为 0.19。

参考文献:

- [1] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. Plant Cell, 1995, 7(2): 173-182.
- [2] Gumusel B, Hao Q, Hyman A L, et al. Analysis of responses to adrenomedullin-(13-52) in the pulmonary vascular bed of rats[J]. The American Journal of Physiology, 1998, 274(4 Pt 2): H1255-H1263.
- [3] Guo H, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: new insights[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(1): 40-49.
- [4] 莫纪波, 李大勇, 张慧娟, 等. *ERF* 转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用[J]. 植物生理学报, 2011, 47(12): 1145-1154.
- [5] 金莉. 棉花 *GbERF1* 基因的克隆与功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [6] 刘坤, 单国芳, 李付广, 等. 海岛棉 *ERF* 族转录因子 *EREB6* 基因克隆及特征分析[J]. 河南师范大学学报(自然版), 2011, 39(2): 106-110.
- [7] 刘茜, 王爱云, 荣玮. *ERF* 转录因子在作物抗病基因工程中的研究进展[J]. 种子, 2014, 33(1): 48-53.
- [8] 庄静, 周熙荣, 孙超才, 等. 油菜沪油 15 中 AP2/*ERF-B3* 亚族转录因子的克隆和生物信息学分析[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2008, 41(3): 192-206.
- [9] 郭慧, 金司阳, 刘寒, 等. 甘蓝 AP2/*ERF* 转录因子的克隆和生物信息学分析[J]. 中国药师, 2017, 20(1): 6-10.
- [10] Wiesener M S, Turley H, Allen W E, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Blood, 1998, 92(7): 2260-2268.
- [11] Zarei A, Körbes A P, Younessi P, et al. Two GCC boxes and AP2/*ERF*-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(4/5): 321-331.
- [12] 郭伟锋. 海岛棉乙烯响应因子 *GbERF1-like* 在抗黄萎病反应中的功能解析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 13-21.
- [13] 何兰兰, 柴蒙亮, 韩泽刚, 等. 棉花抗枯萎病相关 *ERF-B3* 亚组转录因子的克隆与表达[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2375-2381.
- [14] 孟宪鹏. 海岛棉抗病相关 *ERF* 转录因子的克隆与鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009: 32-36.
- [15] 张曦, 林金星, 单晓跌. 拟南芥无机氮转运蛋白及其磷酸化调控研究进展[J]. 植物学报, 2016, 51(1): 120-129.
- [16] 赵书平, 谈宏斌, 鹿丹, 等. 植物蛋白激酶介导的非生物胁迫和激素信号转导途径的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(2): 358-366.
- [17] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 411-432.