

谢琦. 日本结缕草耐盐基因 *ZjbHLH106* 的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(14): 46-49.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.14.005

日本结缕草耐盐基因 *ZjbHLH106* 的克隆及序列分析

谢琦^{1,2}

[1. 深圳大学生命与海洋科学学院/广东省植物表观遗传学重点实验室, 广东深圳 518060;

2. 深圳大学光电工程学院/光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东深圳 518060]

摘要: *bHLH106* 隶属于 Basic helix-loop-helix (bHLH) 超家族成员, 是一类耐盐相关的转录因子。以日本结缕草为研究对象, 通过将拟南芥 *AtbHLH106* 与日本结缕草基因组的同源序列比对, 鉴定到了日本结缕草 *ZjbHLH106* 基因 (Zjn_sc00014.1.g08160.1.sm.mk), 利用 RT-PCR 法, 从日本结缕草中克隆出该基因序列。结果显示, *ZjbHLH106* 基因编码区 (CDS) 的长度为 747 bp, 有 2 个外显子和 1 个内含子; 蛋白序列包含了 1 个典型的 bHLH 结构域; 启动子区域包含了多种生物进程相关转录因子靶位点, 包括生物胁迫、非生物胁迫、生长素调控等; *ZjbHLH106* 基因响应盐胁迫诱导, 参与了结缕草盐胁迫相关的生物学反应。对 *ZjbHLH106* 基因的克隆和研究可为日本结缕草耐盐相关的研究提供理论依据。

关键词: *bHLH106*; 日本结缕草; 盐胁迫; 表达分析

中图分类号: S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)14-0046-04

盐胁迫是影响植物生长、发育的重要生物胁迫之一, 植物应对盐胁迫的生物学反应, 在细胞、分子和生理水平上都已经有了较为清晰的阐述。盐胁迫调控是一个复杂的过程, 涉及诸多因素包括脱落酸水平的增加, 渗透保护剂、抗氧化剂和保护蛋白的积累等^[1-2]。胁迫诱导的基因产物不仅与耐受胁迫相关, 同时也参与到基因表达调控、信号转导等^[3-4]。转录因子 (TF) 是植物体内重要的基因, 很多类转录因子能特异响应外界环境的胁迫, 调控逆境相关基因的表达, 影响或者启动植物抗逆相关的生物学进程^[5]。在植物体内, 已经鉴定出非常多的转录因子参与到植物的非生物胁迫调控路径^[6]。bHLH (basic helix-loop-helix) 是一类重要的转录因子家族, 其成员众多, 在植物体内仅次于 MYB 转录因子家族^[7]。拟南芥中鉴定出了 162 个 bHLH 成员^[8], 在水稻中也鉴定出了 167 个 bHLH 成员^[9]。bHLH 结构域约含 60 个氨基酸, 包含了 2 个功能不同的结构域。DNA 结合区域位于 N 端, 约含有 15 个氨基酸^[10], HLH (helix-loop-helix) 区域主要由

疏水残基组成, 形成 2 个两亲的 α 螺旋, 由 1 个可变长度的环区隔开, 该区域位于结构域的 C 末端, 以二聚体形式起作用^[11-12]。bHLH 转录因子通常识别和结合 E-box 序列 (CANNTG), 如 G-box 序列 (CACGTG)^[13-14]。bHLH 家族基因与很多非生物类胁迫相关, 例如 *AtICE1* 基因 (MYC-like bHLH) 与植物的抗冻胁迫相关^[15], *AtbHLH92* 参与了渗透胁迫相关的生物学反应^[16], *OsbHLH1* 参与了寒冷胁迫^[17], *OsRERJ1* 响应损伤及干旱胁迫^[18]。在拟南芥鉴定到了 1 个耐盐基因 *bHLH106* 基因, 该基因在拟南芥未分化的愈伤组织响应盐胁迫的诱导, 并且缺失了 *AtbHLH106* 的拟南芥突变体对 NaCl 敏感, 且过表达的 *AtbHLH106* 株系对盐胁迫的抗性增强^[19]。

本研究通过同源序列比对在结缕草基因组中鉴定和获得了 *ZjbHLH106* 基因, 通过 RT-PCR 获得了该基因编码序列 (CDS), 保守结构域分析发现该基因具有典型的 bHLH 结构域, 并且通过盐胁迫处理以及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 研究该基因在盐胁迫下的表达量变化。鉴定和研究 *ZjbHLH106* 基因有助于研究和阐述结缕草耐盐相关的分子机理, 并且为结缕草耐盐相关的分子改良育种工作提供了优质的候选基因。

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31801080); 广东省创新创业团队项目 (编号: 2014ZT05S078)。

作者简介: 谢琦 (1987—), 男, 江西上饶人, 博士, 助理研究员, 主要从事禾本科植物及兰花分子生物学研究。E-mail: xiel1185566@szu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料准备

日本结缕草种子来源于北京林业大学草坪研究所,将日本结缕草种子放入水中浸泡 24 h 进行催芽处理,之后播种于直径 15 cm 的花盆中培养,营养土与蛭石体积比为 3 : 1。植物发芽后培养 4 周时间,之后用 200 mmol/L 的 NaCl 溶液浇灌处理,选取 30 min、1 h、2 h、4 h、24 h 及 48 h 的结缕草根,迅速放于超低温冰箱(-80 ℃),以备后续试验使用。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

取 200 mg 结缕草根系样品,在液氮中充分研磨,通过 TRIzol 法(The Invitrogen™ TRIzol™ Plus RNA Purification Kit)提取样品的总 RNA。取 1 μg 的总 RNA,利用 TAKARA 的反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit),反转录成单链的 cDNA,用于后续试验。

1.3 基因序列的分析及克隆

在拟南芥基因组中(<https://www.arabidopsis.org/>)中下载 *bHLH106* 基因序列(ID: AT2G41130),

通过同源序列比对在日本结缕草中鉴定 *ZjbHLH106* 的序列。利用 NCBI 在线引物设计程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)设计日本结缕草 *ZjbHLH106* 基因的引物(表 1),通过聚合链式反应(PCR)克隆目标基因。

1.4 启动子区域分析

根据日本结缕草提供的序列基因信息,将基因开放阅读框前 2 000 bp 序列作为启动子序列进行下载。利用在线软件 PlantPAN 3.0(<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/promoter.php>)分析基因的启动子序列。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

根据 NCBI 在线引物设计程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>),对目标序列进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的引物设计(表 1)。利用 TOYOBO 公司的 SYBR Green 试剂盒(SYBR® Green Realtime PCR Master Mix)对 *ZjbHLH106* 基因进行 qRT-PCR 试验,内参序列选用 Actin 序列(表 1)。

表 1 引物序列及信息

引物名称	序列 (5'→3')	序列长度 (bp)	用途
bHLH_F	TGCTCTCTCTCCGGTCCAT	1 120	逆转录 PCR
bHLH_R	ATTAACGGCGCCATCACAAG		
qRT_F	AGATAGACAAGCGTCGCTG	166	实时荧光定量 PCR
qRT_R	CAGACAGAGGCTCGAACAC		
Actin_F	GTTTAGGTGCCAGAGGTCC	156	实时荧光定量 PCR
Actin_R	AACATTGTCGAACCTCCGCT		

2 结果与分析

2.1 日本结缕草 *bHLH106* 基因的扩增

拟南芥的 *AtbHLH106* 基因响应盐胁迫诱导,可能在盐胁迫中参与了重要的作用。本研究通过登陆拟南芥网站(<https://www.arabidopsis.org/>),下载拟南芥 *AtbHLH106* 序列(AT2G41130),通过同源比对分析,在结缕草的基因组(<http://zoysia.kazusa.or.jp/>)中进行同源序列比对,获得日本结缕草的 *ZjbHLH106* 序列(Zjn_sc00014.1.g08160.1.sm.mk)。根据所提供的序列设计特异性引物(表 1 中的 bHLH_F 和 bHLH_R),通过 RT-PCR 扩增出了包含完整编码区(CDS)的序列,测序发现总长度为 1 120 bp,与目标序列基本一致(图 1)。

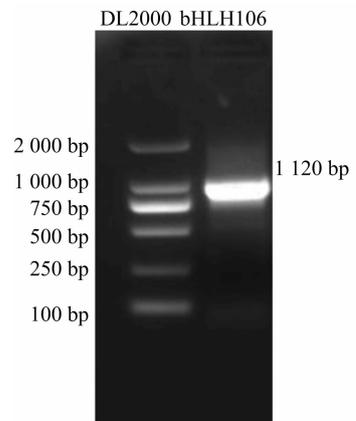


图 1 RT-PCR 产物的凝胶电泳分析

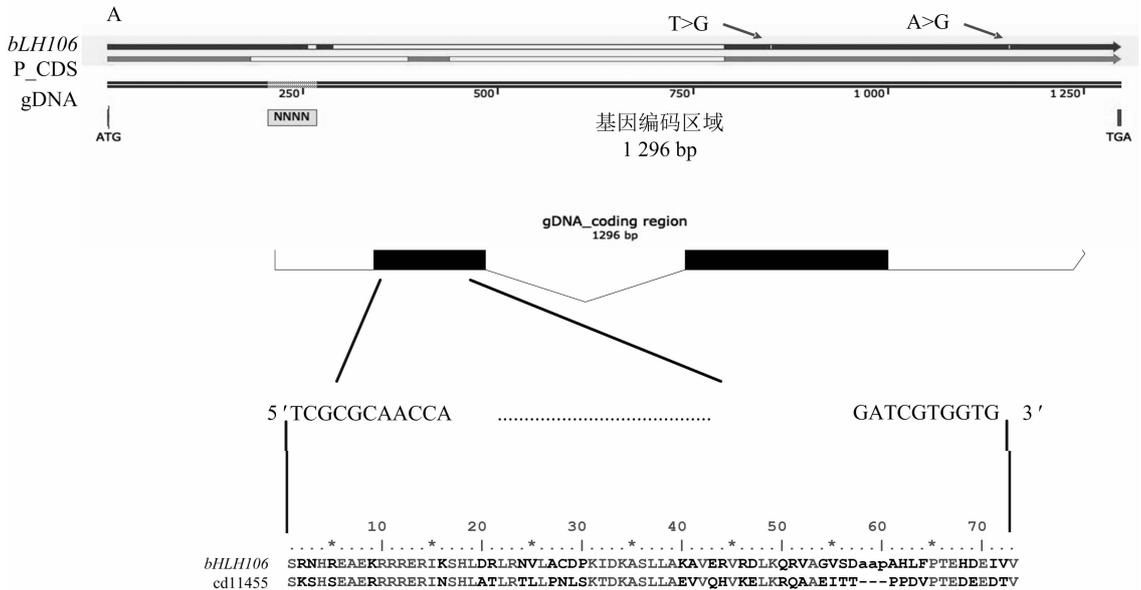
2.2 *ZjbHLH106* 基因序列分析

在结缕草的参考基因组中,*bHLH106*(结缕草基

因 ID:Zjn_sc00014.1.g08160.1.sm.mk) 编码区内出现了 63 bp 未测通的序列(图 2 - A 标注 NNNN 的区域),这部分序列的遗失可能影响了该基因开放阅读框(ORF)的预测结果。测序结果发现,基因实际的 CDS 区域与基因组预测的 ORF 区域确实存在一定的差异,实际序列具有 2 个外显子和 1 个内含子,而基因组预测得到的 ORF 序列存在 3 个外显子和 2 个内含子。

除去这 63 bp 序列的差异,实际克隆的

ZjbHLH106 在 CDS 区域第 340 个碱基出现了 T 变成了 G(亮氨酸 L 变成了缬氨酸 V),第 646 个碱基出现了 A 变 G 的情况(苏氨酸 T 变成了丙氨酸 A),这 2 个位点可能是 SNP 位点。通过 NCBI 保守结构域寻找,在第 1 个外显子区域发现了 bHLH 的保守结构域(cd11455:bHLH_AtAIG1_like),突变的位点存在于第 2 个外显子区域,可能该区域氨基酸的变化并不影响该蛋白功能。



图中选取的是基因编码区域, *bHLH106* 表示实际克隆测序得到的序列信息, P_CDS(Predicted_CDS)表示预测得到的 CDS 序列, gDNA 表示基因组中的序列, NNNN 表示基因组测序过程中未能测通的序列, T > G 表示基因组中的为 T(胸腺嘧啶), 而实际测序得到的是 G(鸟嘌呤), A > G 表示基因组中的 A(腺嘌呤), 而实际测序得到的是 G(鸟嘌呤)

图2 结缕草 *ZjbHLH106* 基因序列特性分析

2.3 *ZjbHLH106* 基因启动子序列分析

在日本结缕草基因组中下载了 *ZjbHLH106* 基因 CDS 区域前 2 000 bp 作为启动子区域,通过 PlantPAN 3.0 在线软件分析,发现较多的启动子结合区域,并且存在很多比较典型的区域,比如花期相关的 Dof、FAR1,生长素相关的 Aux/IAA、ARF,花发育相关的 MADS、SBP,非生物胁迫相关的 bHLH、MYB、NAC 等(表 2)。启动子区域的分析预示着该基因可能在植物体内很多的生物学进程中受到了调控作用,直接或间接地参与到相关的生物学途径中。

表 2 日本结缕草 *bHLH106* 启动子区域分析

启动子区域 (bp)	PlantPAN 3.0(启动子分析软件)
1 ~ 2 000	α - amylase、AP2、ARID、Sox、AT - Hook、Aux/IAA、B3、ARF、BBR - BPC、BES1、bHLH、bZIP、C2H2、C3H、Dehydrin、Dof、EIN3、EIL、ERF、FAR1、GATA、GeBP、GRAS、GRF、HD - ZIP、LEA、MADS、MYB、Myb/SANT、MYB - related、NAC、SBP、TCP、WRKY、ZF - HD

2.4 盐胁迫处理对日本结缕草 *ZjbHLH106* 表达的影响

本研究对结缕草进行盐胁迫处理,提取盐胁迫处理后 0 min (CK)、30 min、1 h、2 h、4 h、24 h 和 48 h 的结缕草根系的 RNA,反转录成单链 cDNA,通过 qRT - PCR(引物见表 1)分析该基因的表达量水平,3 个生物学重复取自不同单株的结缕草根系,每组试验进行 3 个技术重复。结果(图 3)显示,日本结缕草 *ZjbHLH106* 也在盐胁迫的作用下,出现了表达量升高的现象。在 30 min ~ 1 h 的增幅较为明显,2 h 时出现了较大幅度的升高,到 4 h 的时候达到了峰值,之后表达量开始下调,尽管 48 h 的时候表达量下调了很多,但是相比于未进行盐处理的对照(CK),*ZjbHLH106* 的表达量依然出现显著性的增加。初步研究表明 *ZjbHLH106* 响应盐胁迫诱导,可能直接或间接参与结缕草耐盐胁迫相关的生物学进程。

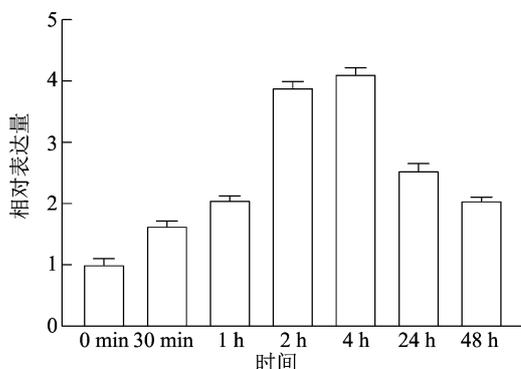


图3 盐胁迫下ZjbHLH106的表达量分析

3 讨论与结论

日本结缕草是一类耐旱、抗盐的禾本科草坪草类植物,但是对于结缕草耐盐基因功能系统的研究工作较少,在分子生物学调控方面所知甚少。发掘和研究结缕草的抗逆基因有助于理解植物对逆境环境的抗性研究,也有助于结缕草本身的分子育种相关工作。拟南芥 *AtbHLH106* 是一类耐盐相关的基因,该基因与拟南芥的耐盐性呈现正相关。本研究根据序列相似性原理,从日本结缕草中鉴定出了 *ZjbHLH106* 基因,通过 RT-PCR 扩增出了该基因的 CDS 序列,该序列包含有 bHLH (cd11455: bHLH_AtAIG1_like) 的保守结构域,启动子分析发现了很多典型的转录因子结合结构域,表明该基因参与了体内很多生物学进程。对日本结缕草进行盐胁迫处理,发现该基因响应盐胁迫诱导。植物在受到胁迫后,ROS 会出现大量积累,因此 ROS 相关的基因可能会出现一个激增的现象。*ZjbHLH106* 在盐胁迫处理 30 min ~ 1 h 并没有出现一个大幅度的激增,表明该基因可能与植物的 ROS 途径并无直接的关联。随着盐离子在植物体内的积累,*ZjbHLH106* 的表达量逐渐升高,在 4 h 达到了峰值后出现了下降,很可能是因为植物逐渐适应了现有的盐胁迫环境,因此 *ZjbHLH106* 表达逐渐下调。本研究克隆了日本结缕草耐盐基因 *ZjbHLH106*,为日本结缕草耐盐的分子理论研究提供了思路和参考,也为植物耐盐相关分子育种提供了优质的候选基因。

参考文献:

[1] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247-273.
 [2] Shinozaki K, Yamaguchi - Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 221-227.

[3] Bray E A. Plant responses to water deficit[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(2): 48-54.
 [4] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 463-499.
 [5] Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24: 23-58.
 [6] Jolma A, Yin Y M, Nitta K R, et al. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity[J]. Nature, 2015, 527(7578): 384-388.
 [7] Feller A, Machemer K, Braun E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. The Plant Journal, 2011, 66(1): 94-116.
 [8] Bailey P C, Martin C, Toledo - Ortiz G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Cell, 2003, 15(11): 2497-2502.
 [9] 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.
 [10] Nair S K, Burley S K. Recognizing DNA in the library[J]. Nature, 2000, 404(6779): 715-717.
 [11] Murre C, McCaw P S, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins[J]. Cell, 1989, 56(5): 777-783.
 [12] Ferré - D'amaré A R, Pognonec P, Roeder R G, et al. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(1): 180-189.
 [13] Carretero - Paulet L, Galstyan A, Roig - Villanova I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 1398-1412.
 [14] Fernández - Calvo P, Chini A, Fernández - Barbero G, et al. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses[J]. The Plant Cell, 2011, 23(2): 701-715.
 [15] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Genes & Development, 2003, 17(8): 1043-1054.
 [16] Jiang Y Q, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the *Arabidopsis* bHLH92 transcription factor in abiotic stress[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 282(5): 503-516.
 [17] Wang Y J, Zhang Z G, He X J, et al. A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(8): 1402-1409.
 [18] Kiribuchi K, Jikumaru Y, Kaku H, et al. Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(5): 1042-1044.
 [19] Ahmad A, Niwa Y, Goto S, et al. bHLH106 integrates functions of multiple genes through their G-box to confer salt tolerance on *Arabidopsis*[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126872.