

李 健,李 曦,农艳丰. 芒果 bZIP 转录因子基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(21):29-36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.21.005

芒果 bZIP 转录因子基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

李 健,李 曦,农艳丰

(百色学院农业与食品工程学院/广西芒果生物学重点实验室/亚热带特色农业产业学院,广西百色 533000)

摘要:碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子在调控植物生长发育及抵抗非生物胁迫过程中具有重要作用。本研究通过 RACE 技术,获得了全长 1 317 bp 的芒果 bZIP 转录因子基因(*MibZIP46*)。系统进化树分析结果表明,*MibZIP46* 与同样是漆树科的阿月浑子的 bZIP 亲缘关系最为接近,同源性最高,与甜橙的同源性次之。构建了原核表达重组质粒 pCZN 1 - *MibZIP46*,经 0.2 mmol/L IPTG 诱导,目的蛋白以包涵体的形式表达,经镍柱纯化,获得高纯度(90%)的目的蛋白并成功进行 Western blotting 鉴定;*MibZIP46* 蛋白的亚细胞定位分析结果表明,融合的目的蛋白在烟草叶片细胞中定位于细胞核;实时荧光定量 PCR 分析结果表明,200 mmol/L NaCl、15% PEG 和 0.1 mmol/L ABA 胁迫处理,均能不同程度诱导 *MibZIP46* 的表达。本研究为进一步挖掘利用芒果的抗逆相关基因提供了理论依据。

关键词:芒果;碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子;基因克隆;基因表达;胁迫处理

中图分类号:S667.701 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)21-0029-07

转录因子在植物应对各种环境胁迫下的调节和生物过程中起着至关重要的作用,是决定胁迫条件下植物能否存活和产量高低的关键因素^[1]。碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子家族成员是真核生物中最多样和最大的转录因子之一,是一类独特的转录因子,具有 bZIP 结构域和 2 个结构特征:亮氨酸拉链结构域和碱性 DNA 结合结构域^[2]。bZIP 蛋白在植物界中广泛存在,参与种子萌发、花朵发育、植物衰老、非生物胁迫反应和脱落酸(ABA)信号转导等多种生理过程^[3]。拟南芥及其他植物的 bZIP 类转录因子基因家族成员大致分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 S 类共 10 个亚家族,*bZIP46* 基因属于 S 亚族,主要是参与逆境胁迫和糖类信号代谢,但目前有关 *bZIP46* 基因的具体功能还鲜有报道。目前已经研究发现一些植物的 bZIP 基因能够增强其植株对非生物胁迫的耐受性,在拟南芥中,*AtbZIP24* 和 *AtbZIP1* 是植物对非生物胁迫耐受性的正调节因子^[4-5];在水稻中,*OsbZIP23* 和 *OsbZIP72* 增加了对

非生物胁迫的耐受性^[6-7]。*GmbZIP44*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 赋予转基因拟南芥耐盐性和抗冻性^[8]; *GmbZIP1* 增加了转基因拟南芥对盐、低温和干旱的耐受性,并提高了转基因小麦的耐旱性^[9]; *ZmbZIP72* 赋予转基因拟南芥盐和干旱耐受性和 *ZmABP9* 增强了转基因棉花的耐盐性和耐旱性^[10-11]。

干旱胁迫响应基因一般被划分成 ABA 依赖型基因和非 ABA 依赖型基因^[12]。ABA 依赖型基因先与 ABRE、MYB、NAC 和 MYC 等顺式作用元件结合,然后通过启动含有此类元件下游基因的表达来提高植物的抗旱性。ABA 可以调节植物体内大量重排基因的表达,例如拟南芥有超过 10% 的基因可以响应 ABA,数量远远超过生长素和赤霉素等其他激素。响应 ABA 的这些基因在增强植物的抗旱能力上起着关键的作用,一些植物的 bZIP 转录因子基因已被证实是 ABA 依赖型基因,这类基因对 ABA 较为敏感,通过调控其表达量来参与 ABA 信号途径^[13]。

芒果(*Mangifera indica* L.)原产于热带,是深受大众喜爱的一种水果,我国是仅次于印度的世界第二大芒果生产国。广西是我国最大的芒果生产基地,芒果产业已经成为广西的重要农业产业,种植芒果是许多当地农民主要的收入来源。芒果虽然相对于广西种植的其他果树来说其抗旱性较强,但由于广西处于石山地区,大部分芒果种植于缺乏灌

收稿日期:2023-03-15

基金项目:广西自然科学基金(编号:2018GXNSFBA050026);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(编号:2019KY0743、2020KY19025)。

作者简介:李 健(1986—),男,广西百色人,博士,研究方向为植物抗逆生理与分子生物学。E-mail:337375159@qq.com。

通信作者:农艳丰,硕士,高级实验师,研究方向为植物生物技术。E-mail:1477078570@qq.com。

溉条件且地势较陡的山地和旱坡地上,整个生育期所需的水分只能依靠自然降水来供应。芒果在不同生育阶段都有可能受到干旱的影响,干旱常常威胁着芒果的正常生长及发育,严重制约了芒果产业的稳定发展。芒果抗旱基因的挖掘,对于实现芒果抗旱分子育种这一目标具有重要的参考意义。

本研究以台农 1 号芒果为材料,通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得了 1 个芒果的 *bZIP* 转录因子基因(*MibZIP46*),对基因序列进行生物信息学分析,在大肠杆菌中进行原核表达并纯化了表达的蛋白,进行了免疫印迹,同时采用实时荧光定量 PCR 分析其不同胁迫处理(15% PEG、0.1 mmol/L ABA、200 mmol/L NaCl)下的表达模式,以期为深入研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料采自百色学院实验基地种植的台农 1 号芒果品种,采集其顶端嫩叶后用干净的湿布清洗表面杂质,置于冰盒中并迅速转移至实验室,用蒸馏水冲洗干净,吸干水分后立即提取总 RNA。

1.2 试验时间及地点

试验于 2021 年 5 月至 2022 年 1 月在百色学院农业与食品工程学院试验地及实验室进行。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

将芒果叶片样品用液氮研磨后,采用 Trizol 法提取总 RNA,并使用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)反转录成 cDNA。

1.4 引物设计和 PCR 扩增

根据 NCBI 上其他植物的 *bZIP* 基因序列, BLAST 同源基因,比对分析后确定同源保守区间,尝试设计多对简并引物(表 1)。

以 cDNA 为模板,使用 Phanta Maxfidelity DNA Polymerase(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行扩增。PCR 反应程序为 95 ℃ 30 s;95 ℃ 15 s, 45~55 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min,39 个循环;72 ℃ 5 min。并对扩增出的产物经电泳检测获得单一明亮条带,切胶回收后以 F 端引物测序。根据确认的基因序列,分别设计目的基因的 5'RACE 和 3'RACE 巢式 PCR 引物(表 2)。

表 1 简并引物列表

引物名称	引物序列(5'→3')	熔解温度(T_m , ℃)	引物功能
<i>MibZIP46</i> - ZJF	TTTGTGVTCAATGAACATGG	47	扩增基因可能的保守序列上游引物
<i>MibZIP46</i> - ZJR	ACYAACMATBYCATTCTCTC	46	扩增基因可能的保守序列下游引物
<i>MibZIP46</i> - ZJR2	GTTGBCYTGHHGGYAHATT	50	扩增基因可能的保守序列下游引物
<i>MibZIP46</i> - ZJR3	CCTTGYCTYTGYYAATTCCC	47	扩增基因可能的保守序列下游引物
<i>MibZIP46</i> - ZJR4	ACYAACMATBCCCATTCCTC	48	扩增基因可能的保守序列下游引物

表 2 5'和 3'RACE 巢式 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'→3')	T_m (℃)	引物功能
<i>MibZIP46</i> - 3GSP1	AACCAACTCTGGGGGAGATGAC	59	3'RACE 第 1 轮扩增
外引物	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT		
<i>MibZIP46</i> - 3GSP2	GCTGCTGGGTAATCGTGAATAG	55	3'RACE 第 2 轮扩增
内引物	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCATATAGG		
<i>MibZIP46</i> - 5GSP1	CCCCAGACTTGTTGCCTTTGCGG	66	5'RACE 第 1 轮扩增
通用引物	TAATACGACTCACTATAGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
<i>MibZIP46</i> - 5GSP2	CGAGGCAAAGTTAAGATCCTTGTC	58	5'RACE 第 2 轮扩增
短引物	CTAATACGACTCACTATAGGGC		

采用宝日医生物技术(北京)有限公司的 3' Full Race Core Set with PrimeScript RTase 进行 3'RACE,SMARTer RACE 5'/3' Kit 进行 5'RACE。将 5'RACE、3'RACE 序列及已验证的核心序列进行拼接,获得 *MibZIP46* 基因的全长。根据 RACE 获得

的预测基因序列,设计全长扩增引物:*MibZIP46* - F 为 ATGGGATCTTACATGAAGCTTC、*MibZIP46* - R 为 TACCAAGGACCTGTCAGTG。将扩增出来的 PCR 产物切胶回收,将该产物加 A 尾后连接 T 载体(pMD19 - T),转化大肠杆菌,PCR 检测阳性克隆,

并测序。

1.5 生物信息学分析

获得的 *MibZIP46* 基因经测序获得序列后进行相关分析。其中 *MibZIP46* 推导的氨基酸序列的基本理化性质用 ExPASy (<http://expasy.org/tools/>) 在线工具进行分析;用 HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析其跨膜结构;用 ProtScale 工具分析发现该蛋白的疏水性;在 NCBI 上进行蛋白序列比对,以及用 Motif Scan 和 SMART 软件分析 *MibZIP46* 蛋白的主要功能域;*MibZIP46* 与其他植物的 bZIP 转录因子基因的系统进化树则用 MEGA 6 软件来构建。

1.6 *MibZIP46* 蛋白的原核表达、纯化及免疫印迹鉴定

以 pCZN1 为原核表达载体,提取重组菌株 PMD - *MibZIP46* 和 pCZN1 的质粒,经双酶切后将 *MibZIP46* 和载体片段连接并转化到大肠杆菌 (DE3) 细胞中,重组菌株在液体 LB 培养基中用 0.2 mmol/L 异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 15 ℃ 诱导过夜。经超声波处理器 VCX750 (美国 Sonics & Materials 公司) 处理 (脉冲 5 s, 暂停 5 s, 20 min) 裂解,然后离心细胞裂解物以沉淀细胞碎片,将上清液转移到新鲜的微量离心管中,用镍柱进一步纯化,然后收集洗涤分级并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分析。用于进行免疫印迹 (Western blotting) 的一抗为 His 单克隆抗体,二抗为山羊抗鼠抗体 (北京康为世纪生物科技有限公司),稀释倍数为 2 000 倍。将膜置于 Fluor Chem HD2 (protein simple) 中曝光 1 ~ 10 min,通过电化学发光 (ECL) 法显影。

1.7 *MibZIP46* 蛋白的亚细胞定位

利用农杆菌介导瞬时表达体系,以 pSuper1300 - GFP 为载体,在烟草叶片上进行 *MibZIP46* 蛋白的亚细胞定位分析^[14]。将目的基因序列连接到 pSuper1300 - GFP 载体上,得到重组质粒后转化农杆菌,鉴定合格后的农杆菌经扩大培养合格后侵染烟草,侵染后的烟草于培养室 (28 ℃) 培养 2 ~ 3 d 后,用激光共聚焦显微镜观察共表达部位。

1.8 不同胁迫处理下 *MibZIP46* 基因的表达分析

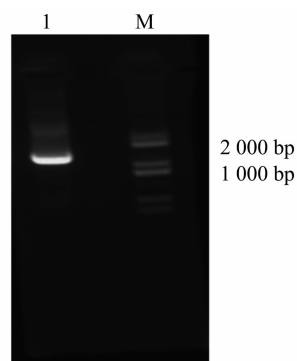
以不同胁迫处理 (15% PEG、0.1 mmol/L ABA、200 mmol/L NaCl) 的芒果顶部完全叶的 cDNA 为模板,处理方法参照文献^[15]。以芒果 *MiActin1* 为内参基因,设计荧光定量引物,上游引物序列:5' - TCC

TTATGTGATTGGCCGGG - 3',下游引物序列:5' - TG CCTCCTACCTCCGTAGTG - 3',进行荧光定量 PCR 试验^[16]。所用仪器为 LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) 荧光定量 PCR 仪。反应体系为 cDNA (50 ng/ μ L) 2 μ L,上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L,SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L,灭菌蒸馏水补足至总体积为 20 μ L,各样品均重复 3 次。参照 Niu 等的方法进行荧光定量 PCR 反应及计算^[17]。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆

首先对基因的保守片段进行克隆,测序结果经与其他植物的 *bZIP* 基因序列比对,确认为目的基因的序列。随后将 3' RACE 第 2 轮扩增获得的单一条带切胶回收,并测序 (测序引物为 *MibZIP46* - 3GSP2),5' RACE 结果也获得了单一明亮条带后,将 5' RACE、3' RACE 序列及已验证的核心序列进行拼接,获得预测 *MibZIP46* 基因的全长参考序列 (共 1 317 bp),再次以 cDNA 为模板,用上述引物对进行同样的 PCR 扩增,获得大小相符的单一特异性条带 (图 1)。



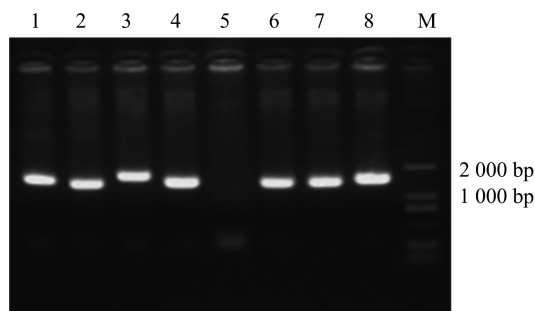
M—DL2000 DNA Marker; 1—PCR 扩增产物

图1 目的基因的扩增条带

将 PCR 产物切胶回收,将该产物加 A 尾后连接 T 载体 (pMD19 - T),转化大肠杆菌,并将阳性克隆进行 PCR 检测 (图 2)。将 3 个阳性克隆送去测序 (测序引物为通用引物 M13 - 47 和 M13 - 48)。测序结果经比对有 1 个克隆与预测的基因序列相符。

2.2 基因的生物信息学分析

克隆获得的 *MibZIP46* 基因全长为 1 317 bp,为完整的开放阅读框,共编码 438 个氨基酸,其编码的蛋白质分子量为 47.32 ku,等电点为 9.69,属于碱性蛋白;ProtScale 工具分析发现该蛋白的疏水性最



M—DL2000 DNA Marker; 1~8—PCR 扩增产物

图2 阳性克隆检测结果

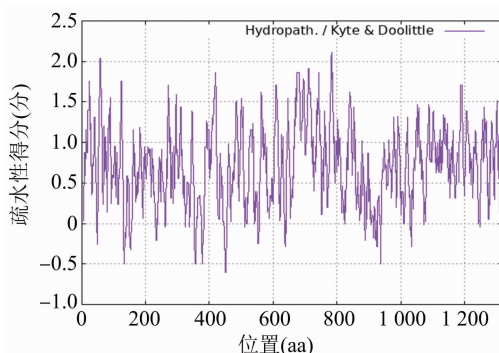


图3 MibZIP46 蛋白的疏水性预测结果

大值为 1.578, 最小值为 -2.767, 无明显疏水区(图 3)。用 HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进一步分析显示其不含跨膜结构(图 4)。用 WoLF PSORT 亚细胞定位预测显示 MibZIP46 蛋白定位于细胞核的概率较大。用 SOSMI signal 在线软件分析得出 MibZIP46 蛋白不含信号肽; SOPMA 预测的 MibZIP46 二级结构中, 该蛋白含有 134 个 α -螺旋、8 个 β -转角、248 个无规则卷曲和 48 个延伸链, 分别占 30.59%、1.83%、56.62% 和 10.96%。

在 NCBI 上使用 CD-Search 工具来鉴定该基因序列的保守结构域表明, 该基因包括 coiled coil 结构域, DNA 结合位点, 多肽结合位点以及 bZIP 超家族的特异位点。

2.3 系统进化树分析

用 MEGA6 软件构建的 MibZIP46 基因与其他

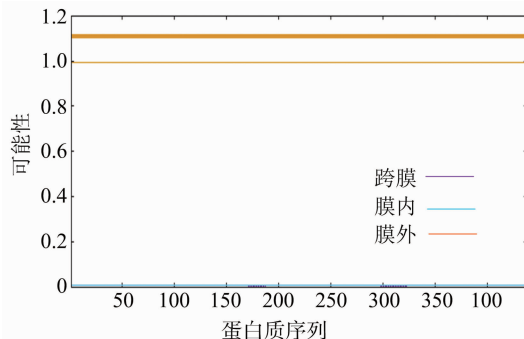


图4 MibZIP46 基因所编码的氨基酸的跨膜区域分析结果

的 bZIP 核苷酸序列进行系统进化树分析(图 5), 发现 MibZIP46 与同样是漆树科的阿月浑子的 bZIP 亲缘关系最为接近, 同源性最高, 与甜橙的同源性次之, 是 bZIP 基因家族成员; 与巨桉、桃金娘、酸枣等禾木本植物的 bZIP 也有很近的亲缘关系; 与鹰嘴豆、四季豆、油菜、白桦、拟南芥等植物的亲缘关系则相对较远。

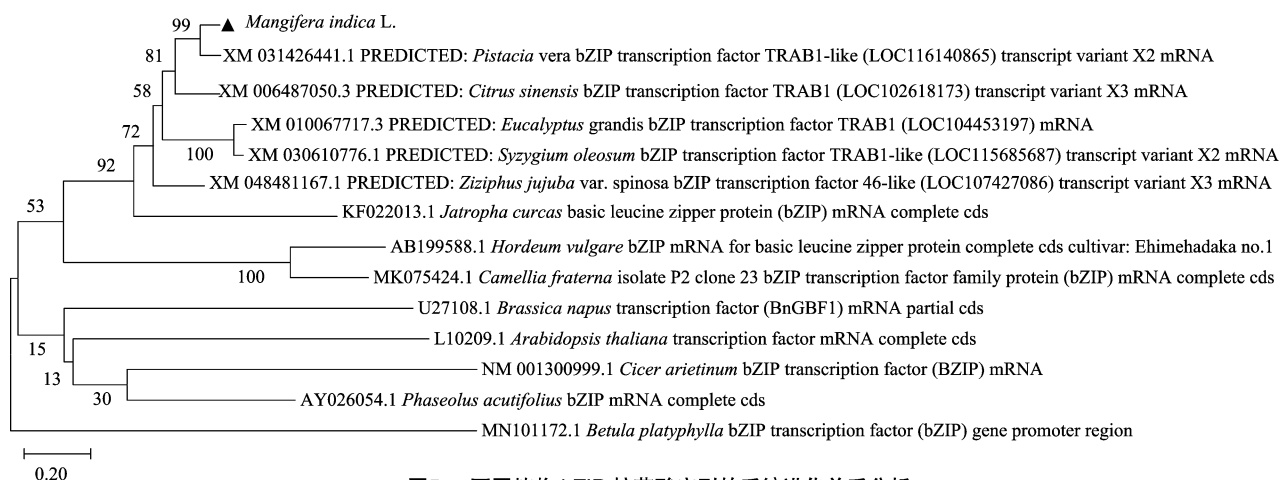


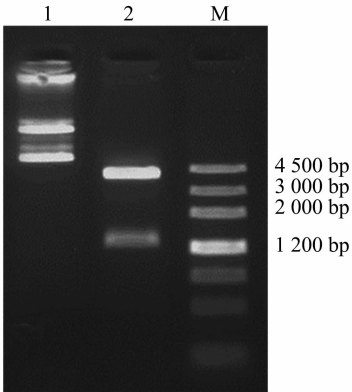
图5 不同植物 bZIP 核苷酸序列的系统进化关系分析

2.4 MibZIP46 蛋白的原核表达、纯化及 Western blotting 鉴定

2.4.1 原核表达载体的构建 以“1.3”节中的 cDNA 为模板, 在上下游引物分别添加 *Nde* I 和 *Xba* I

I 位点进行 PCR 扩增, 产物经测序确定序列正确后进行胶回收纯化, 目的片段与 pCZN 1 质粒用 *Nde* I 和 *Xba* I 分别进行双酶切, 经胶回收纯化后再用 DNA 连接试剂盒进行连接, 获得重组质粒, 命名为

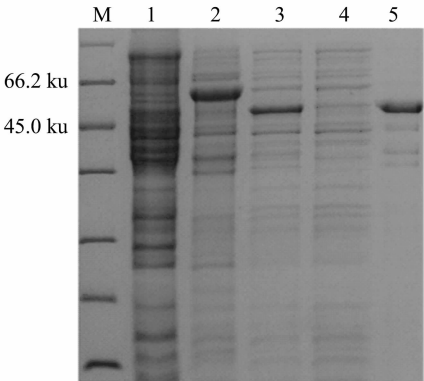
pCZN 1 - *MibZIP46*。将 pCZN 1 - *MibZIP46* 经 *Nde* I 和 *Xba* I 双酶切验证,从结果(图 6)可以看出酶切后所得的 2 条条带符合预期的条带,表明原核表达载体构建成功。



M—DNA 分子质量标准; 1—酶切前; 2—酶切产物

图6 重组质粒的双酶切验证

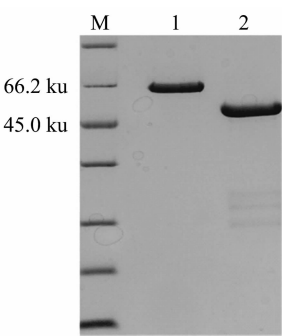
2.4.2 蛋白表达、纯化与 Western blotting 鉴定 SDS - PAGE 分析结果显示,经 0.2 mmol/L IPTG 诱导,目的蛋白以包涵体的形式表达(图 7)。原核表达的 *MibZIP46* 蛋白经超声波破碎后用镍柱进行纯化,纯度明显提高,最后用 PEG 20000 对蛋白进行包埋浓缩处理,获得浓度较高的蛋白,且纯度超过 90%(图 8)。纯化的目的蛋白也成功进行 Western blotting 鉴定,蛋白分子量与理论分子量一致(图 9),表明已得到符合要求的蛋白。



M—蛋白质分子质量标准; 1—pCZN1 诱导; 2—无 IPTG 诱导; 3—IPTG 诱导; 4—IPTG 诱导上清; 5—IPTG 诱导沉淀

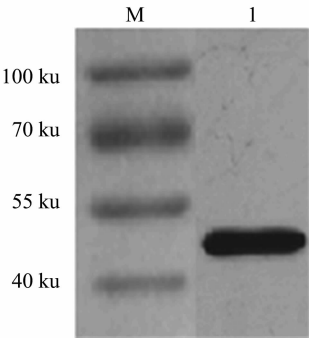
图7 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析结果

2.4.3 *MibZIP46* 的亚细胞定位分析 构建的融合表达载体和空载体分别转入农杆菌后,注射烟草下表皮,培养 2 ~ 3 d 后,即可制成玻片在激光共聚焦显微镜观察绿色荧光信号的分布。结果显示:融合的 *MibZIP46* 蛋白在烟草叶片细胞核中观察到绿色荧光(图 10),表明 *MibZIP46* 定位于细胞核。



M—蛋白质分子质量标准; 1—0.5 mg/mL 牛血清蛋白; 2—纯化浓缩后样品

图8 纯化并浓缩的 *MibZIP46* 蛋白



M—蛋白质分子质量标准; 1—纯化后的 *MibZIP46* 蛋白

图9 *MibZIP46* 蛋白的 Western blotting 鉴定结果

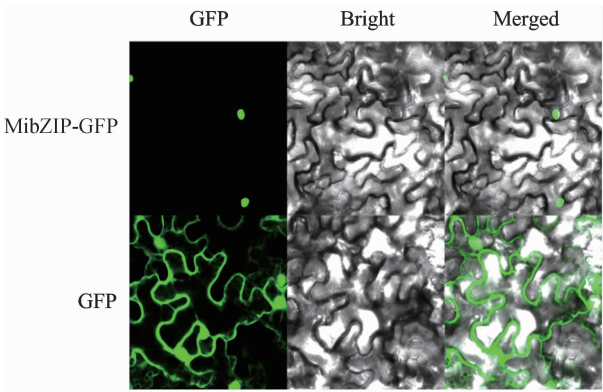
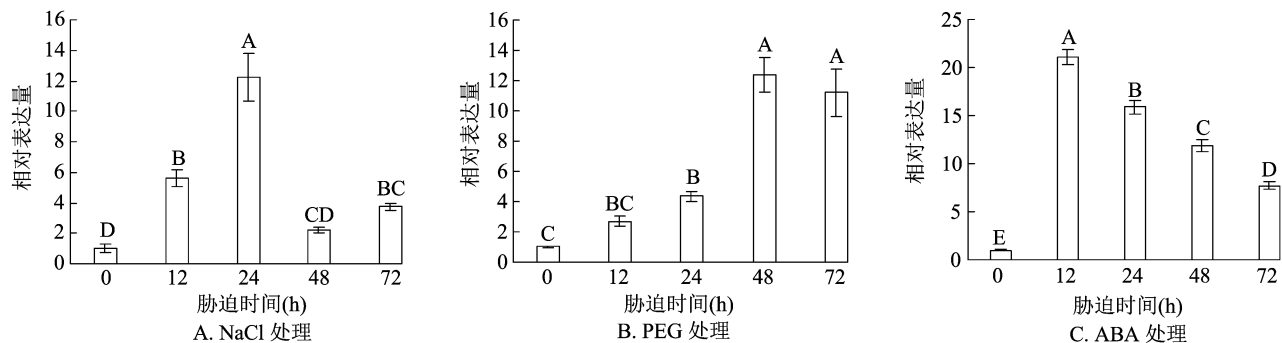


图10 *MibZIP46* 蛋白在烟草中的亚细胞定位

2.4.4 不同处理下 *MibZIP46* 基因的表达分析 实时荧光定量分析结果表明,在 200 mmol/L NaCl 处理下,芒果叶片中 *MibZIP46* 在 12 h 时表达量已经急剧增加,达到对照的 5.6 倍,到 24 h 时达到最高,为对照的 12.25 倍,随后随着胁迫时间的延长又比峰值显著降低,但也仍是对照的 2 ~ 3 倍(图 11 - a)。在 15% PEG 胁迫下,*MibZIP46* 的表达水平随着胁迫时间的延长逐渐增加,在 48 h 时达到峰值,达到对照的 12.36 倍,在 72 h 也依旧维持在较高水平(图 11 - b)。而对于 0.1 mmol/L ABA 的胁迫处理,则是在 12 h 时 *MibZIP46* 的相对表达量已经达

到顶峰,为对照的 21.02 倍,随后逐渐下降,但也仍

维持在高于对照 5 倍以上的水平(图 11-c)。



柱上不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)
图 11 *MibZIP46* 基因在不同处理下的表达特性

3 讨论与结论

干旱缺水是很多国家和地区作物生产面临的重大问题,是制约全球农业生产和发展的重要因素,解决干旱缺水对作物造成危害,提高作物产量和品质是保障国家农业持续健康发展的需要,其中最有效、最经济的途径是培育抗旱性强的作物品种,随着基因工程技术的发展,利用分子育种协助传统的杂交育种可加速育种的进程缩短育种年限,但是想要取得重大突破仍具有许多难点。为了应对干旱等环境胁迫,植物通过感应并整合错综复杂的信号网络来协调其体内胁迫应答基因的表达,形成了应对干旱等环境胁迫的形态生理和生物化学的一系列策略^[18]。植物适应干旱等逆境胁迫时,其机制非常复杂,通常是多基因共同控制的。随着研究技术的进步,特别是高通量测序技术的发展,许多干旱胁迫诱导型基因已在各植物物种中被成功鉴定出,也使得通过遗传和分子操作来提高作物抗逆性的目的变得更容易实现^[19]。

转录因子作为基因表达的调节因子,是提高作物抗逆性和产量的关键因素。*bZIP* 转录因子基因在很多植物上已经被证实能够提高其对干旱、寒冷、高盐等环境的耐受能力。*bZIP* 基因家族已经在拟南芥、水稻、大豆、高粱等植物基因组中被全面鉴定或预测^[20-23]。*bZIP* 基因是一个较为庞大的基因家族,经过长期的进化过程,它们在功能上具有多样性,但它们推定的蛋白质依然共享许多保守的基序^[24]。本研究克隆的芒果 *MibZIP46* 基因,含有植物 *bZIP* 基因家族特有的保守结构域,属于 *bZIP* 转录因子基因家族成员,并且与同为漆树科的阿月浑子的 *bZIP* 基因同源性最高,显示了其在进化过程中具有高度的保守性。

相对于原核表达中使用最为广泛的 pET 系表达载体,pCzn1 质粒是具有低温诱导特色的原核表达载体,携带冷激蛋白 *cspA* 基因启动子,能够在 11 ℃ 低温诱导,促进蛋白溶解,增加可溶性蛋白表达概率。虽然本研究将诱导的温度降到了 15 ℃,目的蛋白依旧以难溶的包涵体形式表达,使蛋白的纯化变得困难^[25]。由于蛋白质沉积和清除之间的不平衡,细菌包涵体的形成是常见的^[26]。IPTG 的浓度、培养和诱导的温度及时间都可能影响重组蛋白的表达模式,而且在很多情况下,筛选和优化这些条件仍然不能消除包涵体的形成^[27]。尽管本研究也努力优化了其表达条件,但重组蛋白仍以包涵体的形式积累,经过一系列的纯化步骤,也获得了纯度较高的目的蛋白。pCzn1 质粒带有 His 标签,His-Tag 分子量较小,对蛋白结构几乎无影响,Western blotting 分析结果也表明目的蛋白能够特异识别 His 抗体,可被有效检测。

以往的研究中,不少蛋白往往定位在不同的亚细胞结构里,此类蛋白可能在不同细胞器间存在穿梭过程,*MibZIP46* 蛋白的亚细胞定位显示其定位于细胞核,这与在其他植物上的研究一致,表明该蛋白主要在细胞核里发挥稳定的生物学功能^[28-29]。当然,本研究的亚细胞定位分析是在烟草细胞内进行的,芒果细胞里不同蛋白间的特异性相互作用有可能影响到其定位模式,但就目前来讲,多数的研究表明其主要定位于细胞核。

植物的许多抗逆相关基因可以被干旱、低温和高盐等非生物胁迫所诱导。有研究表明,在干旱和高盐胁迫下,这类基因的表达显著上调^[30]。本研究在 15% PEG 处理模拟干旱及 200 mmol/L 高盐胁迫下,均能显著诱导其表达,但其出现峰值的时间有差异,且随胁迫时间的延长,

其表达趋势不一,在高盐胁迫下,其表达水平在短期内已急剧增加,24 h 时已经达到顶峰,而 15% PEG 模拟干旱胁迫下则是胁迫后期才表现出较高的表达量,说明 *MibZIP46* 对高盐的反应较为敏感,应对干旱胁迫时其调控周期相对较长,可能也是触发的反馈机制有差异导致的。本研究中,外源 ABA 可强烈诱导 *MibZIP46* 的表达,且在短期(12 h)内其表达量已经达到顶峰,在其他时间段也依旧保持了较高的表达水平,表明 *MibZIP46* 可能受 ABA 依赖性应激信号途径控制,是 ABA 依赖型基因。

参考文献:

- [1]Nutan K K,Kushwaha H R,Singla - Pareek S L,et al. Transcription dynamics of Saltol QTL localized genes encoding transcription factors, reveals their differential regulation in contrasting genotypes of rice [J]. Functional & Integrative Genomics,2017,17(1):69-83.
- [2]Nijhawani A,Jain M,Tyagi A K,et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice[J]. Plant Physiology,2008,146(2):323-324.
- [3]Alves M S,Dadalto S P,Goncalves A B,et al. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review [J]. International Journal of Molecular Sciences,2013,14(4):7815-7828.
- [4]Yang O,Popova O V,Süthoff U,et al. The *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factor *AtbZIP24* regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance[J]. Gene,2009,436(1/2):45-55.
- [5]Sun X L,Li Y,Cai H,et al. The *Arabidopsis* *AtbZIP1* transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. Journal of Plant Research,2012,125(3):429-438.
- [6]Xiang Y,Tang N,Du H,et al. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice[J]. Plant Physiology,2008,148(4):1938-1952.
- [7]Lu G J,Gao C X,Zheng X N,et al. Identification of *OsbZIP72* as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice[J]. Planta,2009,229(3):605-615.
- [8]Liao Y,Zou H F,Wei W,et al. Soybean *GmbZIP44*,*GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta,2008,228(2):225-240.
- [9]Gao S Q,Chen M,Xu Z S,et al. The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. Plant Molecular Biology,2011,75(6):537-553.
- [10]Ying S,Zhang D F,Fu J,et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor,*ZmbZIP72*,confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta,2012,235(2):253-266.
- [11]Wang C L,Lu G Q,Hao Y Q,et al. *ABP9*, a maize bZIP transcription factor, enhances tolerance to salt and drought in transgenic cotton[J]. Planta,2017,246(3):453-469.
- [12]Hirayama T,Shinozaki K. Perception and transduction of abscisic acid signals;keys to the function of the versatile plant hormone ABA [J]. Trends in Plant Science,2007,12(8):343-351.
- [13]武立伟,徐志超,王 清,等. 响应 ABA 胁迫的甘草 bZIP 转录因子的系统筛选与分析[J]. 药学报,2022,57(3):818-830.
- [14]蒋 军,岳明星,於立刚,等. 小麦 *TaCTSB* 基因在小麦-条锈菌互作中的功能研究[J]. 麦类作物学报,2022,42(7):781-789.
- [15]Li J,Phan T T,Li Y R,et al. Isolation, transformation and overexpression of sugarcane *SoP5CS* gene for drought tolerance improvement[J]. Sugar Tech,2018,20(4):464-473.
- [16]Luo C,He X H,Chen H,et al. Molecular cloning and expression analysis of four actin genes (*MiACT*) from mango [J]. Biologia Plantarum,2013,57(2):238-244.
- [17]Niu J Q,Wang A Q,Huang J L,et al. Isolation, characterization and promoter analysis of cell wall invertase gene *SoCINI* from sugarcane (*Saccharum* spp.) [J]. Sugar Tech,2015,17(1):65-76.
- [18]Wang F B,Tong W J,Zhu H,et al. A novel *Cys2/His2* zinc finger protein gene from sweetpotato, *IbZFPI*, is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta,2016,243(3):783-797.
- [19]徐冰沁. 基于转录组和蛋白质组学的谷子(*Setaria italica* L.)幼苗对干旱的响应机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020:6.
- [20]Zou M J,Guan Y C,Ren H B,et al. A bZIP transcription factor, *OsABI5*, is involved in rice fertility and stress tolerance[J]. Plant Molecular Biology,2008,66(6):675-683.
- [21]Lee S C,Choi H W,Hwang I S,et al. Functional roles of the pepper pathogen - induced bZIP transcription factor, *CabZIP1*, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses [J]. Planta,2006,224(5):1209-1225.
- [22]Huang X S,Liu J H,Chen X J. Overexpression of *PtrABF* gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress - responsive genes [J]. BMC Plant Biology,2010,10:230.
- [23]Kim J S,Mizoi J,Yoshida T,et al. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress - responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought - inducible genes in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology,2011,52(12):2136-2146.
- [24]Li H J,Chen J,Zhao Q,et al. Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor genes and their responses to drought stress in ginseng,*Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. BMC Genomics,2021,22:316.
- [25]Nahálka J,Mislovičová D,Kavcová H. Targeting lectin activity into inclusion bodies for the characterisation of glycoproteins [J]. Molecular BioSystems,2009,5(8):819-821.
- [26]Carrió M M,Villaverde A. Protein aggregation as bacterial inclusion

鲁明秋, 龚小见, 刘林娅, 等. 红阳猕猴桃蔗糖转运蛋白基因 *AcSUT2* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(21): 36–43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.21.006

红阳猕猴桃蔗糖转运蛋白基因 *AcSUT2* 的克隆及表达分析

鲁明秋^{1,2}, 龚小见¹, 刘林娅², 龙彩凤^{1,2}, 赵超¹, 黄亚成²

(1. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州贵阳 550000;
2. 六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州六盘水 553000)

摘要:蔗糖转运蛋白(SUTs)能够介导蔗糖由源组织到库组织的装载、运输和卸载。以红阳猕猴桃为材料, 克隆得到红阳猕猴桃蔗糖转运蛋白基因 *AcSUT2*, 并对序列进行生物信息学分析。结果表明, 该基因含有 1 479 bp 的开放阅读框, 编码 492 个氨基酸, 分子量和理论等电点分别为 53 ku 和 8.82, 包含 12 个跨膜结构域, 属于 MFS 家族成员和 GPH 超家族成员。氨基酸序列比对显示, *AcSUT2* 与山茶中蔗糖转运蛋白 *CsSUT2* 同源性为 84%。进化树分析结果表明, *AcSUT2* 属于蔗糖转运蛋白的 SUT4 亚家族。组织表达分析显示, *AcSUT2* 在红阳猕猴桃各个组织中均有表达, 但在雌花中表达量最高。在果实中, *AcSUT2* 在发育的早中期(花后 18~88 d)保持较高的表达量, 发育后期表达量下降; CPPU 能够显著上调 *AcSUT2* 的表达。在叶片中, *AcSUT2* 在叶肉中的表达丰度最高, 且随着叶片的发育, 在古铜期后表达量逐渐递增。说明蔗糖转运蛋白基因 *AcSUT2* 在红阳猕猴桃叶片中蔗糖的装载和果实中蔗糖卸载转运中起着重要作用。

关键词:红阳猕猴桃; 蔗糖转运蛋白; *AcSUT2* 基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号:S663.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)21-0036-08

猕猴桃又名奇异果, 质地柔软, 口感酸甜, 含有丰富的维生素 C、微量元素、有机物和氨基酸, 具有

滋补强身等功效, 有着“水果之王”的美称, 深受广大消费者喜爱, 具有极高的经济效益^[1-5]。猕猴桃作为贵州省的特色农业产业和乡村振兴战略的重要抓手, 种植面积一直在逐年增加。其中, 2019 年贵州省猕猴桃种植面积为 3.5 万 hm^2 ^[6], 而 2022 年猕猴桃在贵州种植面积超过 4 万 hm^2 ^[7]。对于果树而言, 获得高产和高品质的果实一直都是果树学科研究的热点和核心问题, 因此挖掘果实产量和品质形成的关键基因并进行功能研究对猕猴桃的分子育种具有重要意义。

蔗糖作为光合作用的主要产物, 其运输和分配与作物的产量和品质息息相关^[8]。蔗糖转运蛋白(sucrose transporters or carriers, SUTs or SUCs)是一种典型的膜结合蛋白, 属于 MFS (major facilitator

收稿日期: 2023-02-25

基金项目: 贵州省科学技术基金(编号: 黔科合基础[2020]1Y115、黔科合基础[2019]1445 号); 贵州省六盘水市科技计划(编号: 52020-2022-PT-03, 52020-2022-PT-20); 六盘水师范学院高层次人才科研启动基金(编号: LPSSYKYJJ201705、LPSSYKYJJ202205); 六盘水师范学院科学研究计划(编号: LPSSYLPY202213)。

作者简介: 鲁明秋(1995—), 男, 内蒙古巴彦淖尔人, 硕士研究生, 研究方向植物生物化学与分子生物学。E-mail: 871463532@qq.com。

通信作者: 黄亚成, 博士, 副教授, 研究方向为植物生物化学与分子生物学, E-mail: yachenghuang1314@126.com; 赵超, 硕士, 正高级实验师, 研究方向为中药化学成分与药物代谢, E-mail: chaozhao@126.com。

bodies is reversible[J]. FEBS Letters, 2001, 489(1): 29–33.
[27] Xue Z Q, Chao Y P, Wang D X, et al. Overexpression of a recombinant amidase in a complex auto-inducing culture: purification, biochemical characterization, and regio- and stereoselectivity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1931–1938.
[28] Wu S Y, Zhu P H, Jia B W, et al. A *Glycine soja* group S2 bZIP transcription factor *GsbZIP67* conferred bicarbonate alkaline tolerance in *Medicago sativa*[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1):

1–10.
[29] Manzoor M A, Manzoor M M, Li G, et al. Genome-wide identification and characterization of bZIP transcription factors and their expression profile under abiotic stresses in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*)[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21: 1–16.
[30] Wei C, Cui Q, Zhang X Q, et al. Three *P5CS* genes including a novel one from *Lilium regale* play distinct roles in osmotic, drought and salt stress tolerance[J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(5): 456–466.