

文章编号:1001-1498(2011)02-0256-07

刚毛柽柳富含甘氨酸 RNA 结合蛋白 *ThGRP1* 基因克隆与表达分析

姜波, 高彩球, 王玉成, 于丽丽, 杨传平*

(东北林业大学林学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

关键词: 刚毛柽柳; 富含甘氨酸 RNA 结合蛋白; 基因克隆; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: S793.5

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of A Glycine-rich RNA-binding Protein Gene from *Tamarix hispida*

JIANG Bo, GAO Cai-qiu, WANG Yu-cheng, YU Li-li, YANG Chuan-ping

(Key Laboratory of Forest Tree Genetic improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The full-length cDNA of a presumed glycine-rich ribonucleic acid (RNA) binding protein (*ThGRP1*) gene was isolated from a cDNA library of *Tamarix hispida* leaves. The *ThGRP1* gene with 800 bp in length contains 432-base pair (bp) open reading frame (ORF) and encodes a 143-amino-acid polypeptide with a predicted molecular weight of 14.95 kDa and pI of 5.36. Expression of *ThGRP1* in roots, stems and leaves of *T. hispida* with PEG, NaCl, NaHCO₃ or CdCl₂ treatments was studied using real-time PCR. The results showed that *ThGRP1* can be induced by these stresses. Especially, the expression of *ThGRP1* in roots of *T. hispida* was induced under all stresses at 6, 12, 24, 48 and 72 h.

Key words: *Tamarix hispida*; *ThGRP1*; gene clone; real time RT-PCR

在有机体的生长和发育过程中, 基因表达在转录、转录后和翻译水平都受到严格地调控。转录调控是基因表达调控的第一步, 曾被认为是基因表达的主要调控机制, 但是随着对转录后调控机制越来越多的了解, 发现转录后调控在基因表达调控中同样起着重要作用。转录后的调控决定着基因表达最终产物的种类和表达量。转录后水平的基因表达调控主要是通过 RNA 结合蛋白 (RBPs) 直接完成, 或通过 RBPs 控制其它转录因子间接完成的^[1]。

目前已知的 RNA 结合蛋白中, 研究最多的一类是具有 RRM (RNA recognition motif) 的 RNA 结合蛋白。该类 RBPs 的 N-末端是 RRM, 它参与目标 RNA 分子的识别和结合; C-末端包含一些其它的辅

助结构域, 它们可能是在 RBPs 蛋白与其它蛋白因子互动中起作用。在 RBPs 中, N-末端包含 RRM, C-末端包含富含甘氨酸识别区的蛋白为富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白 (glycine-rich RNA-binding proteins; GRPs)。自 Gomez 等^[2]首次从玉米中克隆到该蛋白基因以来, 目前已陆续从多种植物中分离获得了编码该蛋白的基因, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn) ^[3-4]、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) ^[5-6]、大麦 (*Hordeum vulgare* L.) ^[7-8]、油菜 (*Brassica napus* L.) ^[9]、多叶南瓜 (*Euphorbia esula* L.) ^[10]、白云杉 (*Picea glauca* (Moench) Voss) ^[11]、甜樱桃 (*Cerasus avium* (Linn.) Moench) ^[12] 和紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) ^[13] 等。目前对 RRM RNA 结合蛋白功能

收稿日期: 2010-07-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30972386); 东北林业大学研究生科技创新项目 (000-41110710)

作者简介: 姜波 (1984—), 女, 黑龙江集贤人, 在读硕士。主要研究方向: 林木遗传育种。E-mail: jiangbo198437@163.com

* 通讯作者, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 林木遗传育种。E-mail: yangcp@nefu.edu.cn

的了解还不够深入,但是已经知道这一类蛋白参与 RNA 前体的剪接、RNA 的细胞定位、RNA 维持稳定等多种转录后调控过程,可以在转录后水平进行基因的调控。*GRP* 基因表达被多种胁迫诱导,编码蛋白能增强植物的抗逆性^[12]。毛红柳(刚毛柽柳) (*Tamarix hispida* Willd.) 是柽柳属 (*Tamarix* L.) 中耐盐性很强的一种灌木,能在含盐量 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的盐碱地上形成天然群落,并可作为盐碱土指示植物和风景树^[14],是研究基因抗逆性的理想材料之一。本研究从刚毛柽柳中克隆了富含甘氨酸 RNA 结合蛋白基因 *ThGRP1*,并对其在几种非生物胁迫逆境 (NaCl 、 NaHCO_3 、PEG 和 CdCl_2) 下的表达进行了分析,这为以后深入了解 *ThGRP1* 基因的功能及其在植物抗逆中的作用奠定了基础。

1 材料与方 法

供试材料均为大棚中 2 个月生的盆栽刚毛柽柳幼苗。

1.1 GRP 基因的克隆

用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 溶液浇灌刚毛柽柳幼苗,胁迫处理 52 h 后,取叶部组织提取总 RNA,应用试剂盒 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit 构建 cDNA 文库,对文库克隆进行随机测序获得了一个编码 *GRP* 基因的 EST 序列^[15]。根据 EST 序列设计引物,PCR 法克隆获得 *GRP* 基因全长 cDNA 序列 (*ThGRP1*)。对获得的 *ThGRP1* 基因序列用 ORF founder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>) 程序确定其开放读码框。用 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 软件计算推导的蛋白质分子量及理论等电点;对该基因推导的氨基酸序列用 BlastP 程序查找蛋白保守区。利

用 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 检测其有无信号肽序列。利用 Blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行序列同源性搜索,选择与其相似程度高的其他 7 种不同植物的 *GRP* 蛋白氨基酸序列,用多序列联配程序 Clustalx (1.83) 进行多序列比对。应用该软件构建了基于 *GRP* 基因编码的氨基酸序列的系统进化树。用 Predictprotein (<http://www.predictprotein.org>) 预测二级结构。以序列相似性为基础,采用同源建模的方法预测三级结构,采用瑞典生物信息研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics) 的 ExPASy proteomics server 服务器上的 GENO3D 软件在线预测 (http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html);同源建模的模板全部来源于蛋白质三维结构数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) 的蛋白结构。使用 SPDBV 软件浏览预测的三级结构。

1.2 材料处理及 cDNA 的合成

用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 、 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 、20% (W/V) PEG6000、 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 胁迫处理刚毛柽柳,每种胁迫分别处理 6、12、24、48、72 h。采用 CTAB 法^[16] 分别提取对照(非胁迫处理)和胁迫处理的各个时间段的刚毛柽柳根、茎、叶三个组织的总 RNA,经 DNase I (Promega) 消化除去 DNA。以 $0.5 \mu\text{g}$ 总 RNA 为起始材料,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa),按照试剂盒说明进行 cDNA 合成。将合成的第一链的 cDNA 稀释 10 倍,用作定量 RT-PCR 模板。

1.3 实时定量 PCR 分析

根据序列特异性分析,设计实时定量 RT-PCR 引物,引物序列见表 1。

表 1 实时定量 RT-PCR 基因及内参引物序列

基因	基因序列号	正向引物(5' - 3')	反向引物(5' - 3')
<i>ThGRP1</i>	GQ202202	TTCTCTTCTACCCCTATTCTC	CTTTTGCATCAGTCACTTCACC
<i>Actin</i>	FJ618517	AAACAATGGCTGATGCTG	ACAATACCGTGCTCAATAGG
α - <i>tubulin</i>	FJ618518	CACCCACCGTTGTCCAG	ACCGTCGTCATCTTCACC
β - <i>tubulin</i>	FJ618519	GGAAGCCATAGAAAGACC	CAACAAATGTGGGATGCT

实时定量 RT-PCR 反应试剂盒为 SYBR Green Realtime PCR Master mix (Toyobo)。用 α -*tubulin* (FJ618518), *Actin* (FJ618517) 和 β -*tubulin* (FJ618519) 3 个基因作为内参基因。反应体系为: $10 \mu\text{L}$ $2 \times$ SYBR premix ExTaq, P1、P2 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1 \mu\text{L}$, $2 \mu\text{L}$ 稀

释的各处理时期的 cDNA 模板,加去离子水补足 $20 \mu\text{L}$ 。定量 PCR 反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 12 s , $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s ; $78.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 读板 1 s , 共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行基因的相对定量分析^[17],用 Graphpad Instat 3.0 软件进行基因表达

数据的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *ThGRP1* 基因全长 cDNA 及其推导的氨基酸序列

通过对构建的桤柳叶部 cDNA 文库的 EST 分析,获得了 *ThGRP1* 基因的全长 cDNA 序列,该基因 cDNA 长 800 bp。经 NCBI 的 ORF finder 确定该基因

的开放阅读框(ORF)长 432 bp,编码含 143 个氨基酸的蛋白质,5' 非翻译区(UTR)74 bp,3' 非翻译区(UTR)294 bp(图 1)。该 *ThGRP1* 基因的 cDNA 序列已经提交 GenBank 注册,登录号为 GQ202202。ProtParam 预测编码蛋白的分子量为 14.95 kDa,理论等电点(pI)为 5.36,此蛋白为一酸性蛋白。该蛋白中相对含量最多的氨基酸是甘氨酸 Gly(25 个,占总氨基酸数 17.5%),其次是丝氨酸 Ser(21 个,占总氨基酸数 14.7%)。信号肽预测结果表明:该基因不含信号肽序列。

3	GGC TTC CAA AAT AAT CTT CTC TTC TAC CCT ATT CTC GCT CAG GCT	47
48	ACT AGA AGT AAG ATT TAA CAT ACA TAA ATG GCA TTC TGC AAT AGA	92
	M A F C N R	5
93	ATT GGC AGC CTT ATT AGG CAG ACT GTT TCC CAG AAC AGT GCG CCT	137
6	I G S L I R Q T V S Q N S A P	20
138	ATA GAT TCT ATG CTT AAT TCC ATT CGG TGC ATG TCT TCT TCT AGA	182
21	I D S M L N S I R C M S S S R	35
183	CTC TTT GTT GGA GGT CTT TCT TGG GGA ACC GAC GAC CAG TCT TTG	227
36	L F V G G L S W G T D D Q S L	50
228	AAG GAC GCC TTT TCT AGC TTT GGT GAA GTG ACT GAT GCA AAA GTG	272
51	K D A F S S F G E V T D A K V	65
273	ATT ACT GAC AGA GAA ACT GGA AGA TCC CGT GGA TTT GGA TTT GTT	317
66	I T D R E T G R S R G F G F V	80
318	AAC TTT GTT GAC AAT GAG GCT GCT GGT TCT GCA TTG TCA TCC ATG	362
81	N F V D N E A A G S A L S S M	95
363	GAT GGT GTG GAG TTG AAT GGG CGA AGC ATT AGG GTG AGT TTT GCT	407
96	D G V E L N G R S I R V S F A	110
408	CAG GAG AGA TCC AGC GGT CCT CGA CCT GGC GGT GGT GGG TTC CGT	452
111	Q E R S S G P R P G G G G F R	125
453	GGA AAT GAT GGG GGT TTC GGT GGT CCA TCC GGT GGA TAT GGT GAT	497
126	G N D G G F G G P S G G Y G D	140
498	GGA TAT TAG GTG CAG CAT TCC TGC TGA ATC CAC TAG ATT TGG ATG	542
141	G Y *	
543	CAG GAA ACT GGT TCT TGG ATA AGG AGA GAT TGG TAC TAG CTT TTA	587
588	TTT ATC CAC TTT ATG TTT AGG GTT TGT TTT GAT GCA TAA TGT TTG	632
633	GGG ATT GAA GTC TGA TCT ATT GGG TCT CTT ATC TGC GCT CTC TCC	677
678	TAC GTG GTT TCC TGC TTT TTA GGT CAA CAG TGA ACT ATC CGC CCA	722
723	TTT CTT TAT GTT TAG ATT CTA TAA GTC ACC GGC AGC TGA TAT TCT	767
768	GAT AAT GTA GTG CAA ACA AAG AGA AAC GAG CCT	800

图 1 刚毛桤柳 *ThGRP1* 基因的 cDNA 及由此推导的氨基酸序列(*表示终止密码子)

2.2 *ThGRP1* 基因的氨基酸序列分析与系统进化树分析

利用 BlastP 对 *ThGRP1* 基因的蛋白保守区进行预测。与 *ThGRP1* 匹配的保守区是 RRM-1,与其对应的蛋白质家族为 pfam00076,该家族的 COG 分类为 COG0724,为含有 RRM(RNA recognition motif, RNA 识别基序)的 RNA 结合蛋白。

对 *ThGRP1* 基因进行 Blastx 分析,发现该基因与 GenBank 中其他物种的富含甘氨酸 RNA 结合蛋白序列相似性较高。选取与桤柳富含甘氨酸 RNA 结合蛋白相似程度高的其它 7 种植物的富含甘氨酸

RNA 结合蛋白的氨基酸序列,进行 Clustal X 分析。这 7 种植物分别为马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、美花烟草(*Nicotiana sylvestris* Speg.)、豌豆(*Pisum sativum* L.)、截形苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.)、拟南芥、水稻(*Oryza sativa* L.)和小立碗藓(*Physcomitrella patens* Subsp.)。

ClustalX 分析结果如图 2。从多序列比对结果可以看出:这 8 种植物富含甘氨酸 RNA 结合蛋白的氨基酸序列都包含一个 RRM 结构域(在刚毛桤柳中是 37~108 位)(用下划线标示),在 C 段有一段富含甘氨酸的基序(在刚毛桤柳中是 121~143 位)。

在 RRM 结构域中有 2 个非常保守的基序:8 个保守氨基酸的 RNP-1 (Eukaryotic putative RNA-binding region RNP-1 signature) (刚毛柃柳的 76 ~ 83 位的氨基酸残基 RGFGFVNF) 和 6 个保守氨基酸的 RNP-2 (Eukaryotic putative RNA-binding region RNP-2 signature) (刚毛柃柳的 36 ~ 42 位的氨基酸残基 LFVG-

GL)。

从构建的 8 种植物 *GRP* 基因的系统进化树(图 3)可看出:柃柳 *GRP* 基因与豌豆、截形苜蓿和拟南芥亲缘关系比较近;与水稻、小立碗藓、马铃薯和梅花烟草的亲缘关系比较远。

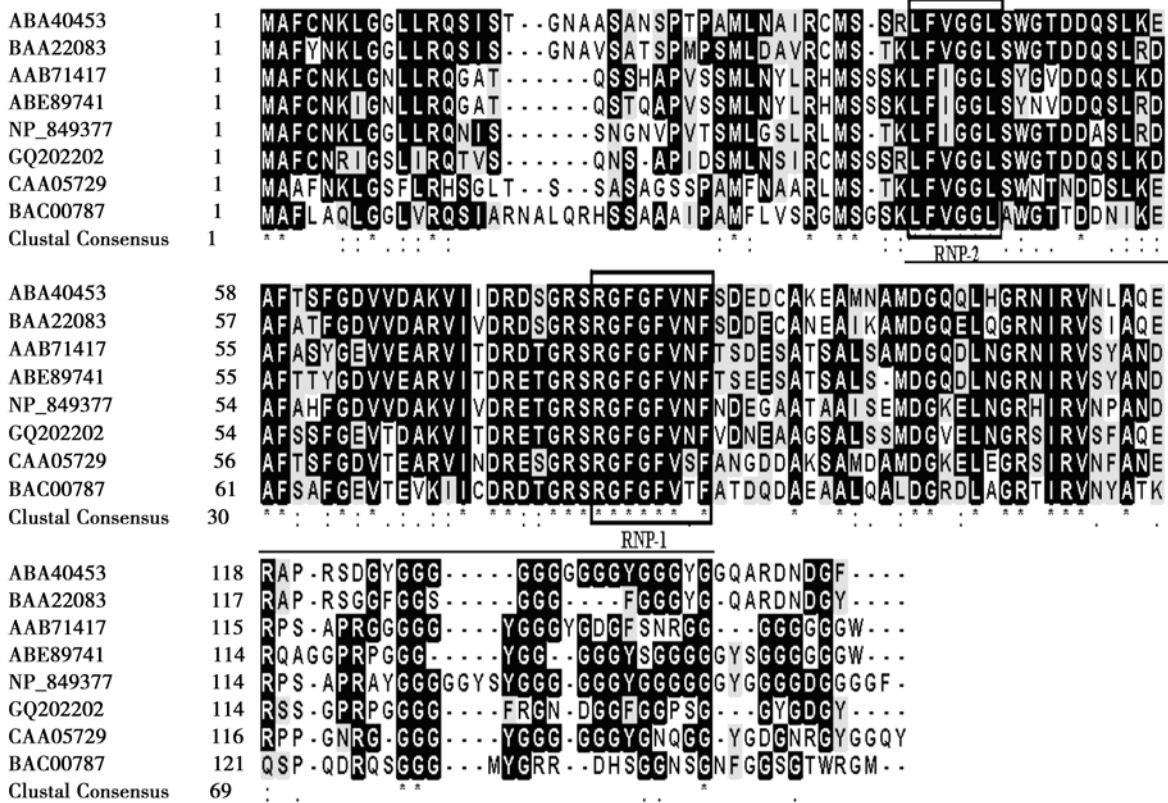
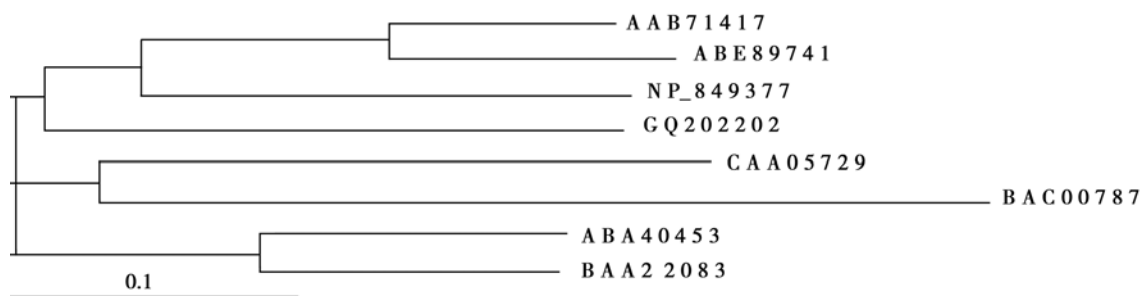


图 2 8 种植物的 GRP 蛋白多序列比对(黑色表示氨基酸的统一性和相似性,灰色表示保守残基。)



GQ202202:(*T. hispida* L.); ABA40453:(*S. tuberosum* L.); BAA22083:(*N. sylvestris* Speg.); AAB71417:(*P. sativum* L.); ABE89741:(*M. truncatula* Gaertn.); NP_849377:(*A. thaliana* (L.) Heynl); CAA05729:(*O. sativa* L.); BAC00787:(*P. patens* Subsp.)

图 3 基于 8 种植物 *GRP* 基因编码的氨基酸序列构建的系统进化树

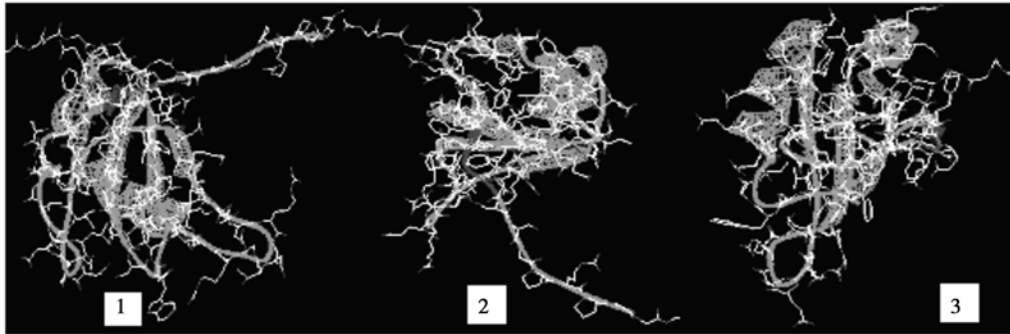
2.3 *ThGRP1* 蛋白的高级结构预测

用 Predictprotein 中的 PHDsec 分析软件对 *ThGRP1* 蛋白的二级结构进行预测,利用同源建模的方

法对其三级结构进行预测(图 4),同源建模选用的模板分别为:pd2dgoA、pd1po6A 和 pd1u1mA。结果表明:*ThGRP1* 蛋白的二级结构模式为 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$,

该二级结构形成4条反向平行 β 片层结构,2个 α 螺旋与 β 片层结构的方向相垂直。2个非常保守的

基序RNP1和RNP2位于 β_3 和 β_1 片层结构的中间位置。



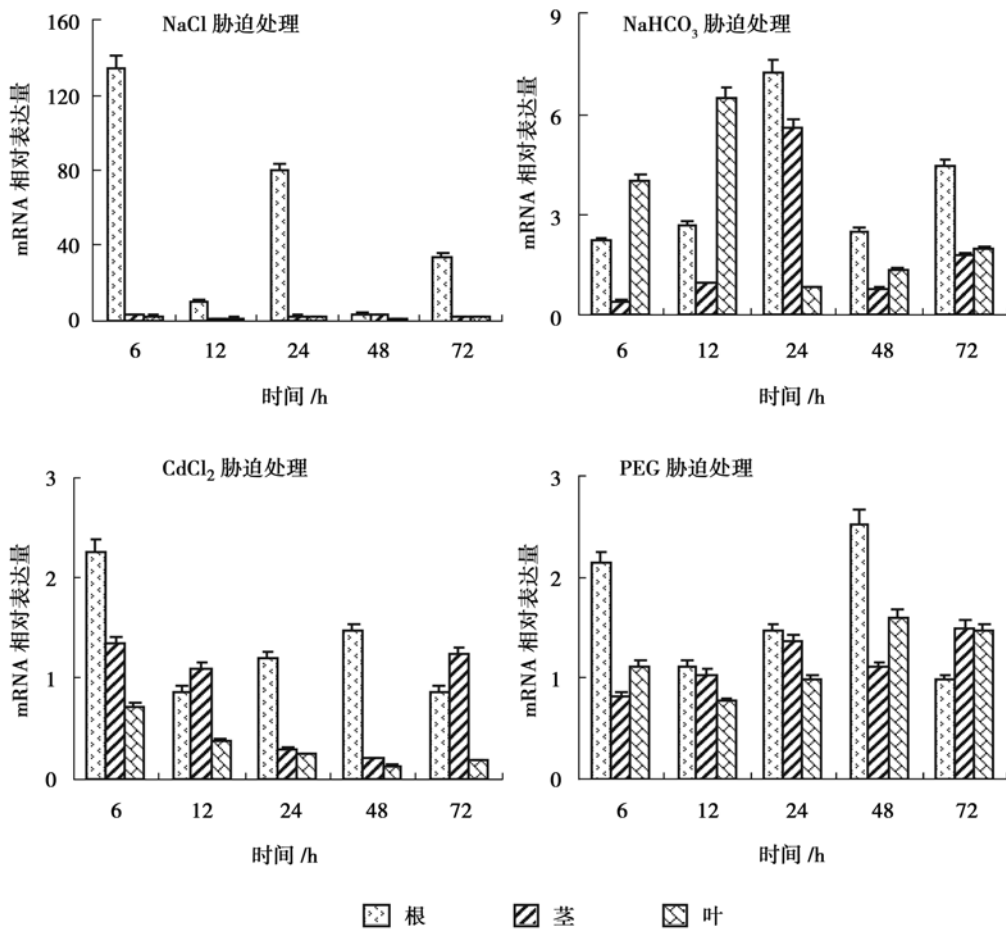
1,2,3 分别为三维图像的不同侧面结果

图4 ThGRP1 蛋白三级结构预测

2.4 *ThGRP1* 基因的表达特征分析

为了研究柽柳 *ThGRP1* 基因与逆境胁迫的应答关系,采用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了 NaCl、

NaHCO₃、PEG 和 CdCl₂ 等4种逆境胁迫下柽柳根、茎、叶中该基因的表达情况。结果表明(图5):NaCl胁迫下,根中 *ThGRP1* 基因在所有时间点的表达都



相对表达水平 = 处理后转录水平 / 对照转录水平 (0 h)。图中值为平均值 ± 标准误,标准误来源于定量 RT-PCR 的多个重复。

图5 4种逆境胁迫下柽柳中 *ThGRP1* 基因的表达模式

显著高于对照($P < 0.01$),其中,胁迫处理 6 h 后表达量最高,是对照(1)的 134.4 倍;胁迫 48 h 表达量最低,仍为对照的 3.7 倍。在叶中,*ThGRP1* 基因在所有胁迫时间点的表达也显著高于对照,但与根相比,表达量相对较低;在茎中,该基因除胁迫 12 h 表达量与对照差异不显著($P > 0.05$)外,其余时间点的表达量也均高于对照。说明 NaCl 胁迫可以诱导 *ThGRP1* 基因在根、茎、叶中的表达,尤其是在根中,受强烈诱导。NaHCO₃ 胁迫后,*ThGRP1* 基因在根中明显受诱导表达;茎中,表达量在胁迫初期(6 h)受明显抑制($P < 0.01$),随后增加,24 h 达最大(5.6 倍);叶中,该基因的表达除 24 h 与对照差异不明显外,其余时间点受明显诱导。PEG 胁迫前期,*ThGRP1* 基因在根中的表达受明显诱导,至 72 h 后,表达量又恢复到胁迫处理前;在茎中,该基因的表达先受抑制,随后表达量增加,72 h 后达最高水平;在叶中,胁迫前期(24 h 内)该基因的表达变化不明显,随后受诱导表达。CdCl₂ 胁迫后,该基因在根中的表达受胁迫诱导;而在茎中,该基因先被轻微诱导表达,随后明显被抑制;在叶中,该基因的表达受明显抑制,而且表达量随胁迫时间的延长而减少。这些结果表明:*ThGRP1* 基因能对 NaCl、NaHCO₃、PEG 和 CdCl₂ 胁迫做出应答,尤其在根中,全部为诱导表达。

3 讨论

植物中存在两大类 GRP 蛋白,一类在 N 端具有典型的真核生物信号肽序列,信号肽序列使合成的蛋白质导向内质网并最终经细胞分泌系统定位于质膜外的细胞壁中;另一类在 N 端含有 80~100 个氨基酸组成的 RNA 结合区的共有序列,包括 RNP-1 和 RNP-2,它们定位于细胞核中,可与新生 mRNA 前体分子结合,参与形成异源核糖核蛋白复合体^[18]。根据序列分析可以看出,本研究从刚毛柽柳中克隆的富含甘氨酸 RNA 结合蛋白基因(*ThGRP1*),其不含信号肽序列,而具有 RRM 结构域(有 2 个非常保守的基序:8 个保守氨基酸的 RNP-1 和 6 个保守氨基酸的 RNP-2)和富含甘氨酸结构域,RRM 的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 的二级结构形成 4 条反向平行 β 片层结构,2 个 α 螺旋与 β 片层结构的方向相垂直(图 4)。

近年来研究发现,植物中 GRPs 基因的表达可受盐、旱、冷、机械损伤、植物激素、病菌侵染、紫外辐射和重金属等多种因素的诱导^[19-20],表明 GRPs 基因可能参与了一些重要的抗逆生理过程,其表达可能

增强了植物抵抗这些胁迫的能力。如:Kwak 等^[1]利用实时荧光 RT-PCR 研究了拟南芥中分离的 8 个 GRP 基因在胁迫后的表达情况,结果表明 GRP1 基因受干旱和盐胁迫的诱导。Kim 等^[21]证实拟南芥中 GRP2 能加速冷胁迫和盐胁迫下种子萌发和植株生长,增加拟南芥植株的冷冻忍受能力。Kim 等^[22]进一步研究证实,在另一个 GRP 蛋白 GRP7 能增强转基因拟南芥的抗旱、高盐和冷适应能力。拟南芥中的另一个含有 CCHC-锌指结构域的 GRP 蛋白 RZ-1a,也能增强拟南芥植株抗冷(冻)忍受能力^[23]。

除模式植物拟南芥外,在其他植物中也进行了一些研究,如 Aneeta 等^[24]从高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)中分离了一个 GRP 基因,该基因在 NaCl(500 mmol·L⁻¹)和 ABA(10 mmol·L⁻¹)诱导下上调 4.7 倍,说明它们在植物抗盐及其他逆境过程中起作用。Stephen 等^[12]从野樱桃(*Prunus avium* L.)非休眠胚轴 cDNA 文库中分离到一个 GRP 基因,该基因在低温打破休眠处理过程的胚轴中受冷胁迫诱导表达,随着低温处理时间延长,表达量下降,当冷胁迫间断恢复到室温(20℃)后,该基因的表达减少到对照水平。Nomata 等^[25]从小立碗藓中分离了 3 个 GRP 蛋白基因,发现这 3 个 GRPs 的转录和蛋白表达量在冷处理后都表现为上调表达。Shinozuka 等^[26]从多年生黑麦草(*perennial ryegrass* L.)冷胁迫 cDNA 文库中分离到一个 GRP 基因,该基因在黑麦草的根、花冠和叶等组织中可以被冷胁迫、ABA 和干旱所诱导。

本研究的实时定量 RT-PCR 结果也证明,柽柳 *ThGRP1* 基因对 NaCl、NaHCO₃、PEG 和 CdCl₂ 胁迫具有应答反应,说明该基因不仅具有以往研究认识的抗旱、耐盐等功能,还具有良好的抗辐、抗盐碱胁迫(CdCl₂、NaHCO₃)。在 NaCl 胁迫中,*ThGRP1* 基因在根、茎、叶中的表达受明显诱导,尤其是在根中,NaCl 胁迫 6 h 后的 *ThGRP1* 基因表达量最高,是未胁迫处理的 134.4 倍(图 5)。*ThGRP1* 基因的强烈诱导表达说明其参与柽柳的盐胁迫应答,其大量表达可能提高了柽柳的耐盐能力。NaHCO₃ 胁迫后,*ThGRP1* 基因总体也表现为明显受诱导表达,但在各组织中的表达趋势与 NaCl 胁迫相比有很大差异。这可能是由于 NaHCO₃ 胁迫实际上是一种盐碱胁迫;同时具有盐和碱双重胁迫。二者间的差异正反映了盐和盐碱胁迫在某方面的差异。

参考文献:

- [1] Kwak K J, Kim Y O, Kang H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(421): 3007-3016
- [2] Gómez J, Sánchez-Martínez D, Stiefel V, *et al.* A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein [J]. *Nature*, 1988, 334(6179): 262-264
- [3] Van Nocker S, Vierstra R D. Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 21(4): 695-699
- [4] Carpenter C D, Kreps J A, Simon A E. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm [J]. *Plant Physiology*, 1994, 104(3): 1015-1025
- [5] Hirose T, Sugita M, Sugiura M. cDNA structure, expression and nucleic-acid binding properties of three RNA-binding proteins in *tabacco*; occurrence of tissue alternative splicing [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(17): 3981-3987
- [6] Moriguchi K, Sugita M, Sugiura M. Structure and subcellular localization of a small RNA-binding protein from *tabacco* [J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(1): 215-212
- [7] Dunn M A, Brown K, Lightowers R, *et al.* A lowtemperature-responsive gene from barley encodes a protein with single-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated *in vitro* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(5): 947-959
- [8] Molina A, Mena M, Carbonero P, *et al.* Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(5): 803-810
- [9] Bergeron D, Beauseigle D, Bellemare G. Sequence and expression of a gene encoding a protein with RNA-binding and glycine-rich domains in *Brassica napus* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1216(1): 123-125
- [10] Horvath D P, Olson P A. Cloning and characterization of coldregulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(4): 531-538
- [11] Richard S, Drevet C, Jouanin L, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a putative white spruce glycine-rich RNA binding protein [J]. *Gene*, 1999, 240(2): 379-388
- [12] Stephen J R, Dent K C, Finch-Savage W E. A cDNA encoding a cold-induced glycine-rich RNA binding protein from *Prunus avium* expressed in embryonic axes [J]. *Gene*, 2003, 320(27): 177-183
- [13] Ferullo J M, Ve'zina L P, Rail J, *et al.* Differential accumulation of two glycinerich proteins during cold-acclimation alfalfa [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(4): 625-633
- [14] 冯 纓, 尹林克. 柃柳属植物镜下器官特征描述及分类学意义 [J]. *干旱区研究*, 2000, 17(3): 40-45
- [15] 高彩球. NaHCO₃ 胁迫下刚毛柃柳基因表达谱的建立及相关基因的克隆 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007
- [16] 王玉成, 杨传平, 姜 静. 紫丁香、糖槭总 RNA 的快速提取方法 [J]. *东北林业大学学报*, 2003, 29(6): 90-91
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [18] 陈万利, 刘宗旨, 李文华. 植物富含甘氨酸蛋白质 (GRP) 及其基因研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2005, 36(4): 512-519
- [19] Ringli C, Keller B, Ryser U. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(10): 1430-1441
- [20] Lorkovic Z J. Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization Trends [J]. *Plant Sci*, 2009, 14(4): 229-236
- [21] Kim J Y, Park S J, Jang B, *et al.* Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions [J]. *Plant J*, 2007, 50(3): 439-451
- [22] Kim J S, Jung H J, Lee H J, *et al.* Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2008, 55(3): 455-466
- [23] Kim Y O, Kim J S, Kang H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2005, 42(6): 890-900
- [24] Aneeta, Sanan-Mishra N, Tuteja N, *et al.* Salinity- and ABA-induced up-regulation and light-mediated modulation of mRNA encoding glycine-rich RNA-binding protein from *Sorghum bicolor* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5): 1063-1068
- [25] Nomata T, Kabeya Y, Cloning S N. characterization of glycine-rich RNA-binding protein cDNAs in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(1): 48-56
- [26] Shinozuka H, Hisano H, Yoneyama S, *et al.* Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation [J]. *Mol Genet Genomics*, 2006, 275(4): 399-408