

杨树类锌指基因 *ZFL* 的功能分析

赵学彩, 郑唐春, 臧丽娜, 曲冠证*

(东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以毛果杨叶片 cDNA 为模板,采用 PCR 技术分离出杨树 *ZFL* 基因,序列分析结果表明该基因序列开放读码框 315 bp,共编码 104 个氨基酸,推导的蛋白质分子量为 11.202 kDa,理论等电点 9.83,命名为 *PtrZFL*。对 *ZFL* 基因进行实时荧光定量 PCR 表达分析,结果表明:甘露醇、NaCl、H₂O₂、ABA、低温胁迫都能诱导 *PtrZFL* 基因的表达,且 *PtrZFL* 表达量在 ABA 处理 3 h 时达到最高,然后随处理时间延长而逐渐降低;低温(4℃)胁迫在 6 h 后能显著诱导 *PtrZFL* 基因表达,并随着低温处理能一直保持较高水平的表达。根据毛果杨基因组信息设计引物,获得了 *PtrZFL* 基因上游 1 000 bp 的启动子序列,序列分析结果表明该启动子包含有多个与胁迫相关的元件,如抗冻、缺水、抗寒、脱落酸响应元件 ABRE、MYB 和 WRKY。GUS 活性检测发现,该启动子在转基因拟南芥整株中都有表达,但在根部和成熟叶片中表达较强,其他位置表达微弱。

关键词:杨树; *PtrZFL*; QRT-PCR; 启动子; 胁迫

中图分类号:Q786 S718.47

文献标识码:A

Functional Characterization of a Zinc-finger-like Gene from *Populus trichocarpa*

ZHAO Xue-cai, ZHENG Tang-chun, ZANG Li-na, QU Guan-zheng

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: In the present study, a zinc-finger-like cDNA (*ZFL*) was isolated from the cDNA of *Populus trichocarpa* leaves, named *PtrZFL*. The open reading frame (ORF) of the gene is 315 bp in length and encodes a predicted polypeptide of 104 amino acids with a molecular weight of about 11.202 kDa, and the theoretical isoelectric point of which is 9.83. The expression of *PtrZFL* in *P. trichocarpa* in response to abiotic stress was studied by QRT-PCR, the results showed that the *PtrZFL* was response to treatments of mannitol, NaCl, H₂O₂, ABA and cold (4℃). The *PtrZFL* expression level was the highest 3 hours after treated by ABA and then decreased. The *PtrZFL* was rapidly and highly induced at the 6th hour when exposed to low temperature of 4℃ and kept high expression level with the continuing treatment. A 1000 bp sequence upstream of *PtrZFL* gene was cloned from the genomic DNA of *P. trichocarpa* by PCR based on the poplar genome sequence. Sequence analysis showed that the promoter of the *PtrZFL* gene contained stress-induced *cis*-acting elements (including cold, dehydration, frozen and ABA responsive elements ABRE, MYB and WRKY). The GUS activity was almost detected in whole plant of transgenic *Arabidopsis*, suggesting that this promoter could control the gene expression in the whole plant. Moreover, strong activity was detected in roots and mature leaves, and only weak expression could be detected in other organs.

Key words: poplar; *PtrZFL*; QRT-PCR; promoter; stress

收稿日期:2012-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31070595)资助。

作者简介:赵学彩(1987—),女,山东临沂人,在读硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。

* 责任作者:主要从事林木遗传育种研究,副教授,E-mail:quguanzheng@yahoo.com.

目前发现的锌指蛋白类型主要有 C2H2, C2HC, C2C2, C2HCC2C2, C3HC, C2C2C2C2, 其中 C2H2 型是真核生物基因组中最大量的锌指蛋白^[1-2]。研究表明,大量植物锌指蛋白参与植物的冷冻、干旱、渗透、强光等非生物胁迫。例如在辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 中克隆到一个对氧化物、甲基紫精、过氧化氢和脱落酸等产生胁迫应答反应的新基因 (*CaAbs1*), 该基因可能在植物创伤和非生物胁迫产生的多基因应答中发挥重要的作用^[3]; 研究人员还从菊花 (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 中分离到一个 C2H2 锌指蛋白基因 (*DgZFP*), 该基因在种子时受 NaCl、干旱、冷冻处理和微弱的 ABA 诱导, 且 *DgZFP* 的过表达能增强转基因烟草的耐盐性^[4]; Sakamoto 等将拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 锌指基因 *AZF1*、*AZF2*、*AZF3* 和 *STZ* 与绿色荧光基因形成融合基因, 进行定位分析, 结果显示这些基因都定位于细胞核, 同时 Northern blotting 显示这些基因在干旱、高盐、冷冻和外源 ABA 的诱导下表达量都有所增高^[5]。类锌指基因 (*ZFL*) 在柽柳 (*Tamarix hispida* Willd.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中的同源基因已经被克隆出来, 亚细胞定位于细胞壁, 过表达植株对 NaCl、甘露醇等非生物胁迫具有抗性^[6-8]。

杨树 (*Populus* spp.) 是世界上分布最广、适应性较强的树种, 同时也是非常重要的用材树种, 具有无性繁殖容易、生长速度快、生产周期短等优点, 发展杨树人工林是解决木材短缺的重要途径之一^[9]。毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 是从美国引进的树种, 属杨属青杨派, 它的基因组序列已于 2006 年测出并公布, 被作为木本转基因植物中的模式植物, 是目前林木树种遗传转化研究中的典型代表种^[10]。因此, 逆境胁迫相关功能基因的开发对杨树基因工程研究与应用具有重要意义。目前对杨树 *ZFL* 基因的克隆尚无报道, 本研究从杨树叶片总 RNA 中分离出 *ZFL* 基因, 研究了该基因在不同非生物胁迫下的表达特性, 并进行了生物信息学分析, 旨在为逆境胁迫下的应答机制、优良基因挖掘及分子育种提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用材料为毛果杨 (*Populus trichocarpa*

Torr. & Gray), 由中国科学院上海生命科学研究院李来庚研究员赠予。拟南芥为 Columbia-0 型; 质粒提取、胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司(美国); PCR 相关试剂、DNA marker、pMD18-T 载体、限制性内切酶、T4 DNA ligase、购自 TaKaRa 公司(日本); 其他实验试剂为进口或国产分析纯。

1.2 杨树 ZFL 基因的克隆及序列分析

根据 NCBI 网站上公布的毛果杨 *PtrZFL* 基因的 mRNA (EF147654.1) 序列, 设计引物 (见表 1), 以毛果杨叶片 cDNA 为模版, 克隆 *PtrZFL* 基因。PCR 反应参数为: 预变性 94℃ 4 min; 变性 94℃ 30 s, 退火 58℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 再延伸 7 min 后中止反应。将 PCR 产物胶回收后连接 pMD18-T 载体, 送北京华大六合公司测序。

表 1 PCR 反应引物汇总

引物名称	引物碱基序列	引物用途
ZFL-F	ATGACAGGAAGGCTAAGCC	ZFL 基因克隆
ZFL-R	TCACTTCTTGCGCTTCCTTTAAC	
ZFL-RT-F	CAAAGGAGATCGCTGCAAAAG	荧光定量检测 ZFL 表达水平
ZFL-RT-R	AAGGGAGTTTTGGGTGTCG	定量内参
Actin-F	AATACCCCATTCAGCACGG	
Actin-R	ACTCACACCATCACCAGAATC	
ZFL-P-F	ATCGAATTC CAAGGATGAAA TTGAAAAGAAAT	ZFL 启动子克隆
ZFL-P-R	ATCCCATGGAATTGCTTCGC TTTGATTTATTGG	(下划线为 <i>EcoRI</i> 、 <i>NcoI</i> 限制性内切酶位点)
P1	CCAATAAATCAAAGCGAAGCAATT	转基因拟南芥检测
P2	CGAAATATTCCCGTGCACTT	

用 NCBI 的 ORF 查找程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找其开放读码框。利用 Expasy (<http://www.expasy.org/tools>) 网站计算蛋白质的分子量及等电点。用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性搜索, 选取与毛果杨 *PtrZFL* 基因相近的 14 个物种的氨基酸序列, 用 ClustalX (1.83) 多序列比较程序 (Docomplete alignment) 进行多序列比较。用 MEGA version4^[11] 进行系统发育树分析。

1.3 杨树 *PtrZFL* 基因在不同胁迫下的表达水平检测

毛果杨组培苗生根后, 转入土壤中生长 45 d 后, 分别进行如下处理: 300 mmol · L⁻¹ 甘露醇, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 10 mmol · L⁻¹ H₂O₂, 100 μmol · L⁻¹ ABA 溶液进行浇灌处理及低温 (4℃) 处理, 分别

处理0、1、3、6、12、24 h后,取适量叶片用液氮冷冻处理并存放在 -80°C 。用EasyPure Plant RNA Kit试剂盒提取植株的总RNA,检测纯度和浓度后,以 $0.5\ \mu\text{g}$ 总RNA为起始材料,采用PrimeScript TM RT reagent Kit试剂盒进行cDNA合成。将合成的第一链cDNA加去离子水稀释10倍,用于定量RT-PCR反应模板。反应体系为: $10\ \mu\text{L}$ $2\times$ SYBR premix Ex Taq,引物ZFL-RT-F($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、ZFL-RT-R($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $1\ \mu\text{L}$, $2\ \mu\text{L}$ 稀释的样品的模板,加去离子水补足 $20\ \mu\text{L}$ 。PCR反应在OPTION II荧光定量PCR仪上完成。反应条件为: 94°C 预变性 $30\ \text{s}$; 94°C 变性 $15\ \text{s}$; 57°C 退火 $30\ \text{s}$; 72°C 延伸 $30\ \text{s}$; 80°C 读板 $1\ \text{s}$,45次循环。用Actin基因(XM_002298674)作为内参,内参引物:Actin-F/Actin-R(表1)。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行基因的相对定量分析^[12]。

1.4 *PtrZFL* 基因启动子的克隆及功能元件分析

利用CTAB法提取毛果杨的总DNA^[13]。以毛果杨*PtrZFL*基因(EF147654.1),进行毛果杨基因组(<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>)的Blast搜索,获取毛果杨*PtrZFL*启动子区域序列设计引物(见表1)。PCR反应参数为:预变性 95°C $5\ \text{min}$; 94°C 变性 $30\ \text{s}$,退火 55°C $30\ \text{s}$,延伸 72°C $1\ \text{min}$,35个循环; 72°C 再延伸 $7\ \text{min}$ 后中止反应。将PCR产物胶回收后连接pMD18-T载体,送北京华大六合公司测序。对测序结果进行拼接对比,用PLACE^[14-15]和PlantCARE^[16]分析启动子序列中的功能元件。

1.5 植物表达载体的构建及遗传转化

将含有杨树启动子的重组质粒pMD18-T-*PtrZFL* promoter和植物表达载体pCAMBIA1301,分别用限制性内切酶EcoR I和Nco I酶切后,经胶回收试剂盒分别回收目的片段,用T₄连接酶过夜连接后转化大肠杆菌DH5 α ,经PCR及酶切检测,筛选阳性重组子p1301-*PtrZFL* promoter::GUS。然后采用液氮冻融法转入农杆菌EHA105菌中,筛选阳性转化子,同时将空载体p1301转入农杆菌EHA105作为阳性对照。利用浸花法侵染野生型拟南芥,收获种子后用潮霉素(使用浓度为 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)筛选阳性幼苗。

1.6 转基因拟南芥的PCR检测及GUS组织化学定位

拟南芥抗性苗生长1个月后,取 $0.1\ \text{g}$ 左右的叶

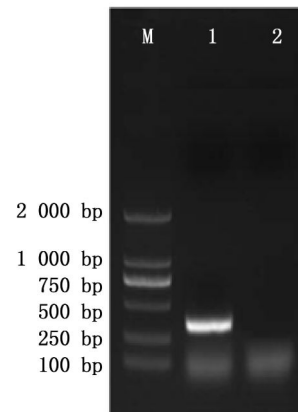
片,用CTAB法提取叶片中基因组DNA,作为模板进行PCR扩增。以重组载体上的*ZFL*启动子部分序列作为上游引物P1、以*GUS*基因部分序列作为下游引物P2(见表1)。PCR反应参数为:预变性 94°C $5\ \text{min}$; 94°C 变性 $30\ \text{s}$,退火 55°C $30\ \text{s}$,延伸 72°C $30\ \text{s}$,35个循环; 72°C 延伸 $7\ \text{min}$ 后中止反应,经1%琼脂糖凝胶电泳,以检测PCR产物。

收获T₂代转基因种子后,在不同时期取材,放入GUS染色液中在 37°C 染色 $10\ \text{h}$,然后用卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1, v/v)脱色并拍照^[17]。GUS染色液配制如下: $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠盐缓冲液pH 7.0, $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷, $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液, $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚铁氰化钾溶液, $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂EDTA和0.1% Triton X-100。

2 结果

2.1 杨树*PtrZFL*基因的克隆及序列分析

根据方法1.2中的PCR反应程序,扩增后经电泳检测有 $300\ \text{bp}$ 左右的单一条带(图1),与预期片段大小相近,克隆至pMD18-T载体,测序结果显示克隆到的基因与NCBI网站上公布的毛果杨cDNA序列(EF147654.1)相同。对获得的毛果杨*ZFL*基因序列进行Blast X分析,结果显示,其与拟南芥中被命名为C2H2型锌指蛋白(AT5G16470, AT3G02790, TAIR)的同源基因具有较高的相似性(氨基酸序列相似性约为75%),C2H2型锌指蛋白是一个转录因子家族,通常具有CX₂₋₄FX₅₋₈X₃₋₅H型氨基酸保守序列^[18],但通过对ExPASy进行Pfam表明,以上基因都不具备锌指蛋白氨基酸序列的保



M: DL2000 DNA Marker;

1: *PtrZFL* 基因 PCR 结果; 2: 阴性对照

图1 毛果杨*PtrZFL*基因的克隆

守区域,这说明此类基因并不属于锌指类基因,而是一种新基因,暂时命名该基因为 *PtrZFL* (*Populus trichocarpa* Zinc finger like gene)。根据 NCBI 提供的毛果杨 cDNA 序列,预测该基因 cDNA 全长为 595 bp,其开放阅读区全长为 315 bp(如图 2),共编码 104 个氨基酸。通过 ExPASy 网站在线分析,推测该基因编码蛋白的分子量大约为 11.202 kDa,等电点为 9.83。

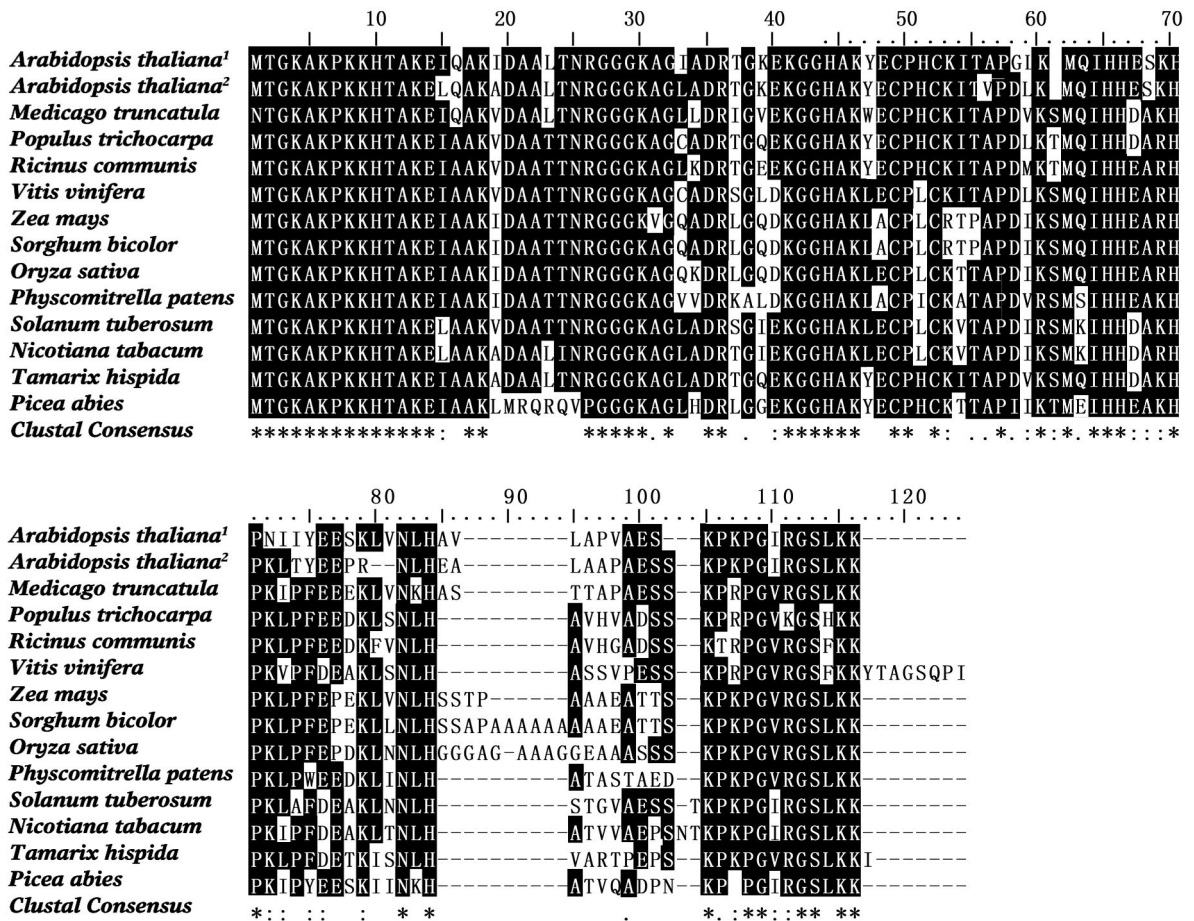
利用 NCBI 数据库中的 Blastp 程序发现此基因与多种植物中的同源基因具有高度的相似性,其中与蓖麻相似性最高,达到 89%,而且与低等植物苔藓也有较高的相似性(74%)(图 3)。从系统发育树上可以看出,毛果杨 *PtrZFL* 基因与蓖麻的亲缘性最近(图 4),与同属于双子叶纲的葡萄聚到一起;1 年生单子叶的草本植物玉米、高粱、水稻位于一个分

```

86 atgacaggggaaggctaagccaagaagcacacagcaaaggagatc
   M T G K A K P K K H T A K E I
131 gctgcaaaagtagatgcgggcacaacaacagaggtggaggaaaa
   A A K V D A A T T N R G G G K
176 gcagggcaagcagacagcagcagccaagaaaaaggaggtcatgcc
   A G Q A D R T G Q E K G G H A
221 aaatatgagtgctcctcactgcaagataacggccccctgatcttaa
   K Y E C P H C K I T A P D L K
266 accatgcagatccatcatgatctgcacaccaaaactcccttt
   T M Q I H H D A R H P K L P F
311 gaggaagacaagctttccaatcttcatgctgttcatgttctgat
   E E D K L S N L H A V H V A D
356 tcttccaacctcgtcctggtgtaaggaagccacaagaagtga 400
   S S K P R P G V K G S H K K *
  
```

图 2 毛果杨 *PtrZFL* 基因的开放阅读框(ORF)

支,进化程度比杨树更高一些;同为双子叶植物的桤柳、马铃薯、烟草等再另一个分枝,与杨树亲缘关系较远;另一个分类簇中;杨树与双子叶植物拟南芥的亲缘关系最远。



Arabidopsis thaliana (拟南芥 NP_566182, 76%、AAO24598, 75%); *Medicago truncatula* (苜蓿 ACJ86042, 79%); *Populus trichocarpa* (毛果杨); *Ricinus communis* (蓖麻 XP_002514854, 89%); *Vitis vinifera* (葡萄 CBI17640, 85%); *Zea mays* (玉米 NP_001131254, 74%); *Sorghum bicolor* (高粱 XP_002437568, 70%); *Oryza sativa* (水稻 EAZ02314, 74%); *Physcomitrella patens* (苔藓 XP_001767162, 73%); *Solanum tuberosum* (马铃薯 ABB29930, 77%); *Nicotiana tabacum* (烟草 FG627709, 77%); *Tamarix hispida* (桤柳 EG971462, 81%); *Picea abies* (云杉 AAX92680, 71%)

图 3 毛果杨 *PtrZFL* 氨基酸序列与其他 14 种物种氨基酸保守序列

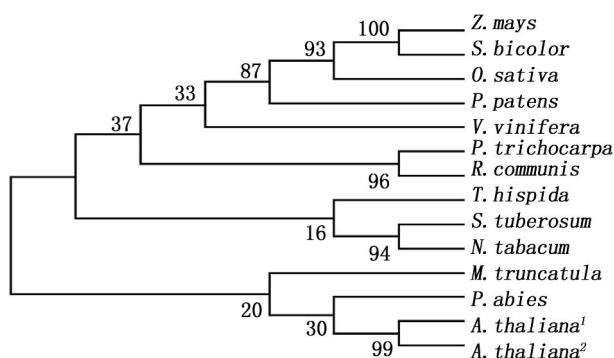


图4 毛果杨 *PtrZFL* 氨基酸序列与其他氨基酸序列的系统进化树

2.2 毛果杨 *PtrZFL* 基因在不同胁迫下的表达模式

为了研究杨树 *ZFL* 基因在非生物胁迫处理下的表达模式,作者进行了 QRT-PCR 表达分析。结果表明,甘露醇、NaCl、 H_2O_2 、ABA、低温胁迫都能诱导 *PtrZFL* 基因的表达(图5)。其中, H_2O_2 能显著诱导 *PtrZFL* 表达,并于 12 h 达到最高,说明 *PtrZFL* 受氧化胁迫诱导。ABA 同样能极显著诱导 *PtrZFL* 表达,于 3 h 达到最高,并随处理时间延长而逐渐降低。结果也显示低温($4^{\circ}C$)胁迫在 6 h 后能显著诱导 *PtrZFL* 基因表达,并随着低温处理能一直保持较高水平的表达,同时一定浓度的甘露醇与 NaCl 也能在一定程度上促进 *PtrZFL* 的表达。以上数据表明, *PtrZFL* 基因的表达受逆境胁迫诱导。

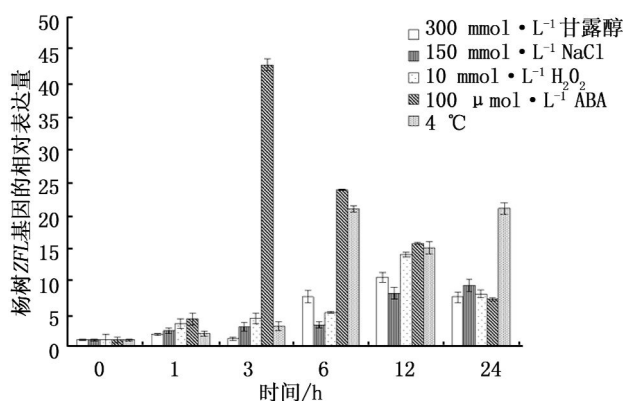
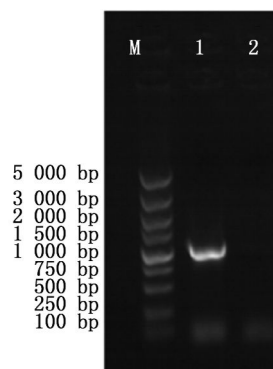


图5 毛果杨 *PtrZFL* 基因在不同胁迫及不同时间下的表达模式

2.3 毛果杨 *PtrZFL* 基因启动子的克隆及序列分析

根据方法 1.4 的 PCR 反应程序,扩增后通过电泳分离出 1 000 bp 左右条带(图6),与预期片段大小相近,克隆至 pMD18-T 载体,菌液 PCR 检测后,用 pMD18-T 载体的通用引物 RV-M、M13-47 测序,将测

序结果用 Bioedit 软件将序列拼接后,获得 1 000 bp 的毛果杨 *PtrZFL* 的启动子序列(图7)。



M: DL 5000 DNA Marker; 1: 毛果杨 *ZFL* 基因启动子 PCR 产物;
2: 阴性对照

图6 毛果杨 *ZFL* 基因启动子的克隆

利用 PLACE 和 PlantCARE 数据库,对获得的毛果杨 *PtrZFL* 启动子序列进行分析(图7)。毛果杨 *PtrZFL* 启动子含有以下元件:(1) TATA-box, RNA 聚合酶 II 结合的位点,是核心的启动子元件;(2) CAAT-box,可能与转录的起始频率有关,有增强基因转录的作用,是真核生物基因启动子典型元件之一;(3) ABRE 元件:脱落酸应答顺式作用元件;(4) CGTCA-motif 和 TGACG-motif:序列中含有 4 个,这两种元件与茉莉酸(MeJA)诱导相关;(5) WRKY 71OS:赤霉素信号通路中的转录阻碍物;(6) HSE 元件:序列中含有 1 个 HSE(heat stress element)元件,与热反应相关;(7) GATA-box、GT1-motif:都是和光作用的顺式元件;(8) CCGTCC-box:分生组织特异性激活的顺式调控元件;(9) ARE 和 ACGT-motif:都和脱水化作用有关(表2)。

2.4 植物表达载体的构建及转基因拟南芥的检测

植物表达载体 p1301 含有 CaMV35S::GUS 融合系统(图8),本实验中将克隆到的毛果杨启动子取代植物表达载体 p1301 上的 CaMV35S,构建表达载体 p1301-*PtrZFL* promoter::GUS。采用液氮冻融法转化农杆菌 EHA105 后,利用浸花法侵染拟南芥,用潮霉素筛选收获的种子,获得 7 株抗潮霉素的幼苗。提取抗性苗的 DNA 作为模版进行 PCR 检测,电泳结果显示,在其中均检测出 400 bp 左右的条带,说明 7 株抗性苗全部为转基因植株(图9)。

AAGGATGAAA TTGAAAAGAA ATTAATAATT GATAAAAGAG CCAAGAATCT AAATTAGAAA TCAAAATATT -931
 AT-rich element
 GAGGGTTAAA CATGTAACAT CATAAAATAA AATGACAAAT TTTATATAGA AATCAAAAGC CAAATGATCA -361
 GTI-mofit AT-rich element
 AATTAAAAAT AATTCGATAT AATTAATAAAA ATAAGGACTA AATATGATAA ACTTAACAAT TAACACACTT -791
 AT1-motif
 TTAATTTTTT GCAAGGGCTT TACATTTTTT AAGGTTACAG AGAAAGAAAAG AAAAGAGGAG GAAAAGAAAA -721
 AACATCGTCG GAGCTCCATC ATGTATGTGG TGGCTATAAG AACCA GACCA TTGTGAAGGG ATAGGCAAGA -651
 TGG-motif MYB
 CACGTCAAAC TCCACCCTAA ATATGGTGT CGGCCACCAG TAGATATTGT ATGTGCCGTC CAAAAGGCAT -581
 CGTCA-motif Spl CCGTCC-box
 AGACAGTTCC CATACTGG TTTGTGCATC ACACGCACCA ATAGCTTTTC ATTTTTCTTT TTTAATTTAA -511
 ARE
 TCCATGCAAA TGTTAAATTG CCCCTGCCCC CTAAAATGTT AACAAAAAAA ACATAATAAA AAAACAAAAA -441
 AAACTCTTAA TTTTAATTTT AGATTAATTA ATTCTAATGA CATTTTAGTA ACTATATTAT GCCAAGAAAA -371
 WRKY71OS
 AATAAAAACC AAAAGCACTC AAGCTTTTAT TGTTAAAGAA ATTTAATTTT TAAAGATATT TTAATATTA -301
 GATA box
 CATCATGCAA TTTAAAAATT AAAAAAAAT ATTTATTCTT ATTTAGATTT GTAATAGTAA ATACCTCAGC -231
 T-Box CGTCA-motif ABRE
 TGAAAAAATT ACATTTCCTT TGAAAGCATC CAATGAAACT TAAATTATTA AGTACAAAAT AATAATTGAA -161
 HSE
 ATAACATGTG GCCCGGTGAA ACACATAGTT GTTTTAGTTT TTCTATAAAT AACCCCGGCC CTCACGCTCA -91
 TATA box
 AGAGTCAAGA CAGCCTCTTA GAAAGCAAAG TCCCTCCTCC TCTAGGGTTT TCGCCATTTA TCCAAGCCAA -21
 TAAATCAAAG CGAAGCAATT ATGACAGGGA AGGCTAAGCC AAAGAAGCAC ACAGCAAAGG

图 7 毛果杨 *PtrZFL* 基因启动子序列及其结构分析

表 2 毛果杨 *PtrZFL* 基因启动子部分顺式作用元件的生物学功能分析

启动子元件	位置	正反方向	序列	功能
AAGAA-motif	(-749, -745, -731, -339)	+	GAAAGAA	未知
ABRE	(-234)	+	CACGTG	脱落酸应答顺式作用元件
ACGT-motif	(-649, 238, 233)	+	ACGT	早期响应脱水化作用
ARE	(-563)	+	TGGTTT	厌氧诱导响应顺式调控元件
AT-rich element	(-947, -885)	+	ATAGAAATCAA	富含 AT 的 DNA 结合蛋白
AT1-motif	(-860)	-	AATTATTTTTTATT	光反应元件
ATCT-motif	(-517)	+	AATCTAATCC	光反应元件
Box 4	(-418, -414)	+	ATTAAT	光反应元件
Box I	(-212)	-	TTTCAAA	胚乳表达模式的顺式作用元件
CAAT-box	(-895, -870, -862, -804, -543, -504, -293, -201, -24)	+	CAAAT	启动子或增强子中的顺式作用元件
CCAAT box	(-543, -201)	+	CCAAT	和 HSE 交互, 增强热激启动子的活性
CCGTCC-box	(-595)	+	CCGTCC	分生组织特异性激活的顺式调控元件
CGTCA-motif	(-648, -237)	+	CGTCA	茉莉酸甲酯应答的顺式作用元件
G-Box	(-234, -650, -234)	+	CACGTG	光反应元件
GATA box	(-970, -845, -815, -661, -608, -316)	+	GATA	和光调控相关
GCN4_motif	(-28)	+	CAAGCCA	胚乳表达模式的顺式作用元件
GTI-motif	(-927)	+	GGTTAA	光反应元件
HSE	(-228)	+	AAAAAATTTT	热激应答的顺式作用元件
MYB	(-681)	+	WAACCA	和脱水化作用相关
P-box	(-590)	-	CCTTTG	赤霉素应答元件
Skn-1_motif	(-899, -404)	-	GTCAT	胚乳表达模式的顺式作用元件
Spl	(-639)	+	CC(G/A)CCC	光反应元件
T-Box	(-272)	+	TTWTWTWT	和细胞骨架相关
TATA-box	(-117)	+	TATAAAT	启动子的核心区域
TGACG-motif	(-648, -237)	-	TGACG	茉莉酸甲酯应答的顺式作用元件
TGG-motif	(-693)	+	TGGTGGCTA	光反应元件
WRKY71 OS	(-898, -403)	+	TGAC	赤霉素信号通路中的转录阻碍物
Unnamed_2	(-108)	+	CCCCGG	未知
Unnamed_4	(-57, -707, -54, -641)	+	CTCC	未知
box S	(-692)	-	AGCCACC	未知
circadian	(-997)	-	CAANNNNATC	生理控制的顺式作用元件

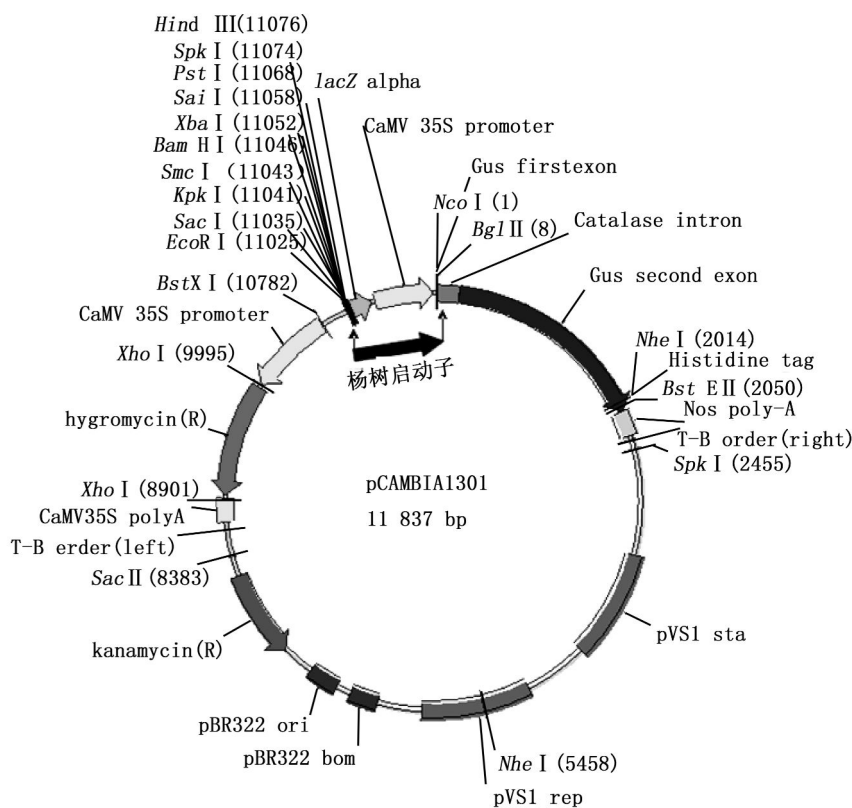
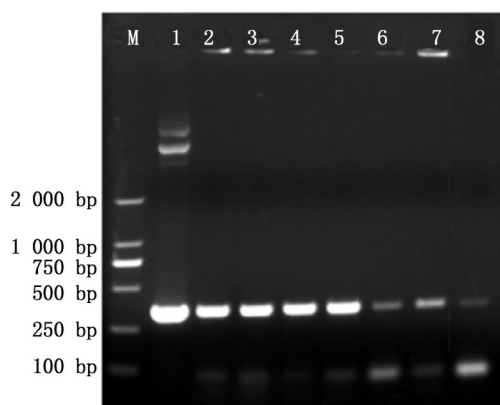


图8 植物表达载体 pCAMBIA1301 图谱



M: DL 2000 DNA Marker; 1: 阳性对照质粒 PCR 产物;

2~8: 潮霉素抗性幼苗的 DNA PCR 产物

图9 转基因拟南芥的 PCR 检测

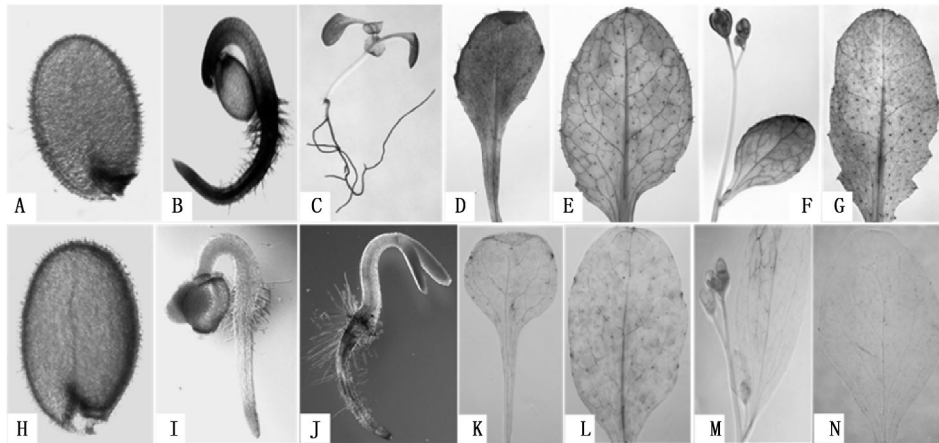
2.5 启动子的 GUS 组织化学定位

为了验证所克隆启动子的功能,对 *PtrZFL* 启动子转化株的种子、幼苗、幼叶、老叶、花序等分别进行 GUS 染色。以转 p1301-35S::GUS 空载体植株做阳性对照(图 10-A~G),GUS 染色结果显示:种子状态下,未检测到 GUS 表达(图 10-H);在幼苗期,在植株的根部成熟区、根尖部分显色最明显,在

两片子叶位置也有稍许显色(图 10-I, G);花器官的部分组织中也有少量显色,但是不明显(图 10-M);全株染色后发现,根部仍然显色最深,说明在整个生长期 *PtrZFL* 基因都有在根部表达,并且表达量最强,在幼叶、老叶、茎生叶中均有表达(图 10-K, L, M, N),但是老叶中的表达量很低,多呈现斑点状分布(图 10-N)。根据对幼叶-成熟叶-老叶的 GUS 染色,染色结果是按浅-深-浅的变化过程,推测 *PtrZFL* 基因在叶片中的表达跟叶片的生理活动强度相一致。

3 结论与讨论

植物锌指蛋白是一类广泛研究的抗逆性蛋白。本研究从杨树叶片 cDNA 中首次克隆出一个新的类锌指基因(*PtrZFL*),通过进一步分析 *PtrZFL* 基因的氨基酸序列发现该基因在多种植物中存在高度相似的同源基因,且 *PtrZFL* 蛋白和其他的同源蛋白都不含有 C2H2 的保守区域,NCBI 数据显示这些基因的功能暂时都是未知的^[19]。杨树 *PtrZFL* 基因在桤柳和烟草中的同源基因的研究结果显示 ZFL-GFP 融合蛋白定位于细胞壁,说明该基因在植物的细胞壁



A~G 阳性对照 35S::GUS 转基因拟南芥 GUS 染色
A 种子;B 萌发的种子;C 幼苗;D 第一片真叶;E 幼叶;F 花序;G 老叶
H~N *PtrZFL* promoter::GUS 转基因拟南芥 GUS 染色
H 种子;I 萌发的种子;J 幼苗;K 第一片真叶;L 幼叶;M 花序;N 老叶
图 10 转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色

中发挥作用^[6-7]。在酵母双杂交的实验中发现柞柳 *ThZFL* 基因不能单独激活报告基因表达,这和已知的锌指基因具有转录活性是相矛盾的,推测 *ThZFL* 基因不是转录因子^[20]。

杨树苗在甘露醇、NaCl、H₂O₂、ABA、低温(4℃)等非生物胁迫下,*PtrZFL* 基因的表达水平都有一定程度的上调(图 5)。其中 ABA 和低温(4℃)能极显著诱导 *PtrZFL* 基因表达,这和柞柳 *ThZFL* 基因在 ABA 诱导下的结果是一致的^[6]。ABA 通常在与植物的抗逆性相关的基因中起重要作用,上述结果推测 *PtrZFL* 基因具有 ABA 应答效应。柞柳 *ThZFL* 在转基因酵母和转基因烟草中,表现出对盐和渗透胁迫具有一定的耐性^[6,8]。通过对杨树 *PtrZFL* 基因上游的启动子功能元件分析,结果显示含有多个茉莉酸甲酯、赤霉素、脱落酸等应答元件,如 ABRE、P-box、CGTCA-motif、TGACG-motif 等,ABRE 是 ABA 反应元件,ABA 对冷诱导基因 *cor* 具有正向调节作用,进而提高了植物的耐冻性^[21];同时脱落酸和茉莉酸甲酯在植物的生长发育和逆境响应中具有重要作用。启动子序列中还含有一个 MYB 和 WRKY 元件,MYB 元件与受干旱、高盐和 ABA 诱导的 MYB 类转录因子的启动子区域相互作用;WRKY 蛋白专一识别 W-box 序列,是一类在植物中起特异作用的转录调控因子,植物 WRKY 转录因子在生物和非生物胁迫中起重要作用^[22]。上述结果说明,杨树 *PtrZFL* 基因可能对非生物胁迫具有应答反应。

杨树是重要的造林绿化树种和工业用材树种,进行杨树功能基因的挖掘、克隆和功能的研究,是当前杨树基因组学的首要任务之一^[23]。本研究表明杨树 *PtrZFL* 基因可能在杨树对非生物胁迫的应答中起重要作用,这不仅对进一步理解植物对非生物胁迫的耐性机制提供适当的参考,同时对研究类锌指蛋白的功能提供一定的指导。

参考文献:

- [1] 黄骥,张红生. TFⅢA 型锌指蛋白及在提高植物耐逆性中的作用[J]. 遗传, 2007, 29 (8): 915-922
- [2] 黄骥,王建飞,张红生. 植物 C2H2 型锌指蛋白结构和功能[J]. 遗传, 2004, 26 (3): 414-418
- [3] Seong E S, Wang M H. A novel *CaAbs1* gene induced by early-abiotic stresses in pepper[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 41 (1): 86-91
- [4] Liu Q L, Xu K D, Ma N, et al. Isolation and functional characterization of *DgZFP*: a gene encoding a Cys2/His2-type zinc finger protein in chrysanthemum[J]. Japanese Journal of Applied Physics, 2010, 37 (2): 1137-1142
- [5] Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, et al. Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions[J]. Plant Physiology, 2004, 136 (1): 2734-2746
- [6] Yan An, Yucheng Wang, Lingling Lou, et al. A novel Zinc-finger-like gene from *Tamarix hispida* is involved in salt and osmotic tolerance[J]. Journal of Plant Research, 2011, 124 (6): 689-697
- [7] 曲冠证,郑唐春,邵龙婷,等. 烟草类锌指基因 *NiZFL* 基因的功能分析[J]. 植物研究, 2012, 32 (4): 430-436
- [8] 曲冠证,郑唐春,杜兆伟,等. 柞柳类锌指基因 *ThZFL* 的功能分

- 析[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40 (7): 6-10, 70
- [9] 卢孟柱, 胡建军. 我国转基因杨树的研究及应用现状[J]. 林业科技开发, 2006, 20 (6): 1-4
- [10] 张红梅, 夏新莉, 尹伟伦. 毛果杨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45 (1): 53
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (8): 1596-1599
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [13] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15
- [14] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27 (1): 297-300
- [15] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. *CABIOS*, 1991, 7 (2): 203-206
- [16] Lescot M, Dehais P, Moreau Y, *et al.* PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Res Database Issue*, 2002, 30 (1): 325-327
- [17] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, 1987, 6 (13): 3901-3907
- [18] Takatsuji H. Zinc-finger transcription factors in plants[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54 (6): 582-596
- [19] 郑唐春, 施晓文, 臧丽娜, 等. 拟南芥类锌指基因 *AT3G02790/AT5G16470* 纯合双突变的筛选及其表型分析[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40 (9): 101-106
- [20] 郑唐春, 臧丽娜, 曲冠证, 等. 柞柳类锌指基因 *ThZFL* 酵母诱饵表达载体的构建及其表达验证[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39 (12): 4-8, 15
- [21] Gilmour S J, Artus N N, Thomashow M F. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18 (1): 13-21
- [22] 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 等. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, 28 (4): 16-20, 30
- [23] 林元震, 张志毅, 林善枝, 等. 运用基因组和 EST 数据库进行电子克隆分离杨树功能基因的策略[J]. 分子植物育种, 2007, 5 (4): 583-587