

刚毛柽柳 ThbHLH1 转录因子识别的 顺式作用元件的鉴定

及晓宇, 李子义, 卢惠君, 聂显光, 王玉成*

(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: [目的] 本研究拟对 ThbHLH1 所识别的顺式作用元件进行鉴定, 进一步揭示 ThbHLH1 调控抗逆基因表达的机理。[方法] 利用以转录因子为中心的酵母单杂交系统鉴定 ThbHLH1 所识别的顺式作用元件; 将元件与报告基因融合构建报告载体 (pCAM-Cis), 通过基因枪法将报告载体与效应载体 35S: ThbHLH1 共转化烟草叶片, 在盐、干旱胁迫下比较 GUS 酶活。[结果] 鉴定出 2 段能够与 ThbHLH1 转录因子结合的 DNA 序列: 分别为 CCGAAA (LTRE1) 和 TGAC (WRKY710S)。[结论] 在盐或干旱胁迫下, ThbHLH1 通过与 LTRE1 或 WRKY710S 元件作用来激活基因表达。

关键词: 刚毛柽柳; bHLH 转录因子; 非生物胁迫; 酵母单杂交; 基因表达调控

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)05-0042-08

Identification of Cis-acting Elements Recognized by ThbHLH1 Transcription Factor of *Tamarix hispida*

Ji Xiao-yu, Li Zi-yi, Lu Hui-jun, Nie Xian-guang, Wang Yu-cheng

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

Abstract: [Objective] To further study the mechanism of ThbHLH1 overexpression on improving the salt and drought tolerance of *Tamarix hispida*. [Method] The cis-acting elements recognized by ThbHLH1 were identified with the transcription factor-centered yeast one hybridization (TF-centered Y1H) method. To confirm the results of TF-centered Y1H, the effector construct 35S: ThbHLH1 was co-transformed with each reporter constructs pCAM-Cis into tobacco leaves with the particle bombardment method, and then the GUS activity was determined under salt or drought stress. [Result] ThbHLH1 could recognize LTRE1 (CCGAAA) and WRKY710S (TGAC) Cis-acting elements. [Conclusion] The results show that ThbHLH1 activates gene expression under salt or drought stress by interacting with LTRE1 or WRKY710S motifs.

Keywords: *Tamarix hispida*, bHLH transcription factor, abiotic stress, yeast one hybrid, gene expression regulation

bHLH (basic Helix-Loop-Helix, 碱性螺旋-环-螺旋) 转录因子是植物中广泛存在的一类大的转录因子家族, 其结构域由约 60 个氨基酸组成, 包含 N 端碱性区域和 C 端螺旋-环-螺旋区域^[1-3]。目前研究发现, bHLH 转录因子主要通过识别 E-box

(CANNTG) 来调控下游靶基因, E-box 的形式多种多样, 其中, G-box (CACGTG) 最常见^[4-5]。已有研究表明, bHLH 转录因子在植物生长发育、逆境反应、信号转导等一系列过程中起重要作用^[1, 6], 如, bHLHs 参与雌蕊发育^[7]、花期控制^[8]、根毛的分

收稿日期: 2017-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500535); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2572017DA01)

作者简介: 及晓宇, 女, 副教授, 硕士生导师. 主要研究方向: 林木遗传育种. E-mail: jixy0219@163.com

* 通讯作者: 王玉成, 教授, 博士生导师. 主要研究方向: 林木遗传育种. E-mail: wangyucheng@ms.xjb.ac.cn

化^[9]、花器官和叶腋分生组织形成^[10]、光信号途径^[11]、油菜素内酯和脱落酸信号传导^[12]。其中, bHLH 对抗逆的调控作用尤其值得关注, 目前已经发现和鉴定了多种环境胁迫应答的 bHLH 转录因子, 并发现 bHLH 转录因子在植物抗逆方面的调控作用, 如, 拟南芥 bHLH122 能够调控气孔的开度, 抑制水分散失速率, 同时抑制 ABA 的分解, 能够调控拟南芥的抗旱、耐盐能力^[2]; 拟南芥 bHLH92 转录因子参与调控干旱和渗透胁迫响应^[13]; 拟南芥 *ICE1* 基因正向调控冷害响应过程^[14]。bHLH 蛋白 (JAM1) 可负调控茉莉酸 (JA) 信号途径, 在 JA 介导的植物应激反应中起到举足轻重的作用^[15]。水稻 *OsbHLH148* 基因在抗旱过程中作为一个起始应答因子调节受 JA 调节的基因的表达^[16]。拟南芥中过表达 *OrbHLH2* 或 *OrbHLH001* 基因提高了拟南芥的耐盐、抗冷和渗透胁迫能力^[17]。小麦 *TabHLH1* 基因主要通过 ABA 依赖途径在植物的抗渗透胁迫中起到至关重要的作用^[18]。上述研究表明, bHLH 转录因子在调控植物抗逆过程中起重要作用。

刚毛怪柳 (*Tamarix hispida* Willd.) 属怪柳科怪柳属植物, 是盐生木本植物, 灌木或小乔木。怪柳具有很强的耐盐碱、干旱和高温能力, 是研究木本植物抗逆分子机理, 分离重要耐盐功能基因的理想物种之一。前期研究工作表明, 刚毛怪柳 *ThbHHLH1* 基因 (GenBank 登录号: KM101094) 能够响应盐、干旱等非生物胁迫, 且在根、茎及叶器官的表达模式不同; 过表达 *ThbHHLH1* 能够提高怪柳的耐盐、抗旱能力; 利用酵母单杂交技术, 鉴定出 *ThbHHLH1* 转录因子能够识别 G-box 元件, 并且在盐或干旱胁迫下, *ThbHHLH1* 通过结合 G-box 来激活基因表达的能力显著增强^[19]。为了进一步研究 *ThbHHLH1* 转录因子还可以通过识别哪些元件来调控基因的表达, 笔者我们利用以转录因子为中心的酵母单杂交技术 (TF-centered Y1H)^[20], 通过对随机 DNA 文库的筛选, 来鉴定 *ThbHHLH1* 转录因子识别的新元件。本研究将为鉴定 *ThbHHLH1* 转录因子直接调控的下游靶基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

刚毛怪柳种植于沙与草炭土混合物中 (比例为 3:1), 取 2 月苗龄植株用于实验研究。小叶烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 种植于草炭土: 蛭石: 珍珠岩

混合物中 (比例为 3:1:1), 取 6 周苗龄植株用于实验研究。植物材料置于温度 (22 ± 2) °C、相对湿度 65%~75%、光照强度 400 μmol · m⁻² · s⁻¹、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗的人工气候室培养。

1.2 *ThbHHLH1* 酵母表达载体的构建

在 *ThbHHLH1* 基因的 5' 端和 3' 端分别引入 *Sma* I 线性化的 pGADT7-Rec2 载体的同源序列, 设计引物 (表 1)。以怪柳 cDNA 为模板, 扩增出含有 pGADT7-Rec2 载体同源序列的 *ThbHHLH1* 基因, 将其用同源融合方法连接到 pGADT7-Rec2 载体上, 构建 pGADT7-Rec2-*ThbHHLH1* 酵母表达载体。

表 1 构建 pGADT7-Rec2-*ThbHHLH1* 载体引物序列
Table 1 Primer sequences used in construction of the recombinant vector pGADT7-Rec2-*ThbHHLH1*

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')
Rec2- <i>ThbHHLH1</i> F	<u>AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTGGCCATTA</u> <u>TGGCCATGGCTAATAATCCAGGAG</u>
Rec2- <i>ThbHHLH1</i> R	<u>TCTAGAGGCCGAGGCCGCCGACATGTTATGA</u> <u>AAGGGATTGTCT</u>

注: _ 为 pGADT7-Rec2 载体的同源序列。

Note: _ represents the homologous sequences of pGADT7-Rec2 vector.

1.3 随机 DNA 文库的构建

根据酵母单杂交系统 (BD Matchmaker™ One-Hybrid Library Construction & Screening Kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA) 中酵母报告载体 pHis2 的序列, 设计 Y1 和 Y2 两条简并引物, 一条特异性引物 Y3 (表 2), 分别以 Y1 和 Y2 为模板, Y3 为引物进行 PCR 扩增 (图 1)。将扩增产物连接到 pHis2 载体上, 构建随机 DNA 文库, 具体方法见参考文献 [20]。

表 2 构建随机 DNA 文库引物序列

Table 2 Primers used in constructing a random short DNA sequence insertion library

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')
Y1	<u>CTCACTATAGGGCGAATTC</u> <u>CCANNNNNCGGGAGCTC</u> <u>ACGGTTGCGGA</u>
Y2	<u>CTCACTATAGGGCGAATTC</u> <u>CYNNNNNCGGGAGCTC</u> <u>ACGGTTGCGGA</u>
Y3	<u>CGCGAACGCTGAGCTC</u>

注: _ 为 *Sma* I 线性化 pHis2 载体两端的序列, ~ 为随机 DNA 序列, N: A/G/C/T; Y: C/T

Note: _ represents the sequences on both ends of the *Sma* I linearized pHis2 vector, ~ represents the random DNA sequences, N: A/G/C/T; Y: C/T

1.4 酵母表达载体与随机 DNA 文库共转化酵母

按照酵母单杂交系统操作说明书进行 Y187 酵

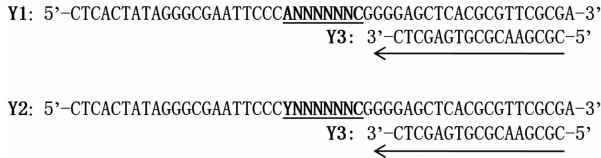


图1 随机 DNA 序列构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of constructing a random DNA sequence.

母感受态细胞的制备。将效应载体 pGADT7-Rec2-ThbHLH1 和随机 DNA 文库共转化 Y187 酵母感受态细胞,筛选柾柳 ThbHLH1 转录因子识别的顺式作用元件。具体方法如下:向 500 μL Y187 酵母感受态细胞中加入 2 μg 效应载体 pGADT7-Rec2-ThbHLH1 和 1.5 μg 随机 DNA 文库质粒,共转化 Y187 酵母感受态细胞。将转化后的产物分别涂布于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Leu/-Trp (DDO) 和 SD/-His/-Leu/-Trp(TDO) + 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT 的筛选培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3~5 d。

1.5 阳性克隆的互作分析

挑取 TDO + 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT 筛选培养基上的阳性克隆菌落,于 TDO 液体培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 (250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 1~2 d;提取酵母质粒,转化大肠杆菌,提取质粒进行测序。测序结果与 pHIS2 载体序列进行比对,获得 pHIS2 载体插入的 DNA 序列,然后通过 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析插入序列中是否含有已知的顺式作用元件。

将顺式作用元件及其突变元件的寡核苷酸片段 3 次串联,构建到 pHIS2 载体上,引物见表 3。将构建好的效应载体 (pGADT7-Rec2-ThbHLH1) 和重组报告载体 (pHIS2-Cis) 共转化 Y187 酵母感受态细胞,转化后的酵母分别涂布于 DDO 和 TDO + 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT 固体培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3~5 d。挑取阳性克隆菌落,于 TDO 液体培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 1~2 d,将菌液分别稀释 10、100、1 000、10 000 倍,取 2 μL 点于 TDO + 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT 培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d,拍照。

1.6 报告载体与效应载体的构建

将顺式作用元件及其突变元件的寡核苷酸片段 3 次串联,与 CaMV 35S minimal promoter (46 bp) 连接,引入 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点,进行 DNA 序列合成。将合成的序列定向连接到 pCAMBIA1301 载体上,分别构建报告载体 pCAM-LTRE1、pCAM-LIM7、pCAM-WRKY710S 和 pCAM-WM7 (图 2A,引物见表

表 3 构建酵母报告载体 pHIS2-Cis 引物序列

Table 3 Primer sequences used in constructing pHIS2-Cis

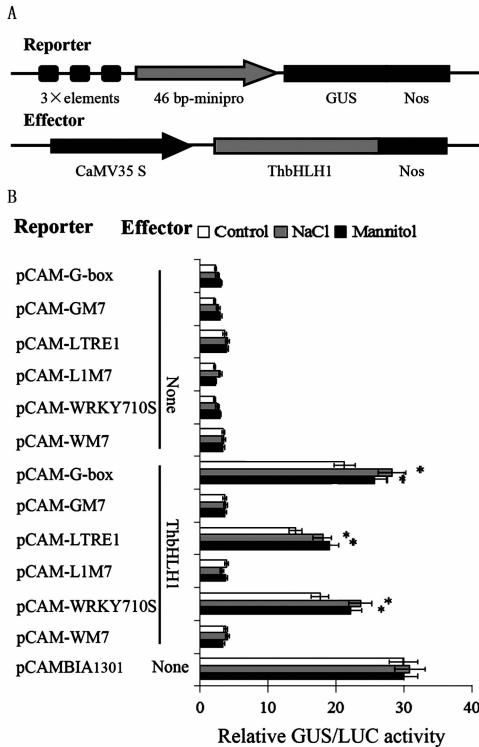
yeast reporter vectors	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')
pHIS2-LTRE1F	<u>AATTC</u> CGGAAACCGAAACCGAAAGAGCT
pHIS2-LTRE1R	CTTTGGTTCGGTTTCGGG
pHIS2-LIM1F	<u>AATTC</u> AAGAAAAAGAAAAAGAAAGAGCT
pHIS2-LIM1R	CTTTCTTTTCTTTTCTTC
pHIS2-LIM2F	<u>AATTC</u> CAAAACCAAAACCAAAAGAGCT
pHIS2-LIM2R	CTTTTGGTTTTGTTTGGG
pHIS2-LIM3F	<u>AATTC</u> CCGCCACCGCCACCGCCAGAGCT
pHIS2-LIM3R	CTGGCGGTGGCGGTGGCGGG
pHIS2-LIM4F	<u>AATTC</u> CCGAACCCGAACCCGAACGAGCT
pHIS2-LIM4R	CGTTCGGTTCGGTTCGGG
pHIS2-LIM5F	<u>AATTC</u> AAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCT
pHIS2-LIM5R	CTTTTTTTTTTTTTTTTTT
pHIS2-LIM6F	<u>AATTC</u> CGCCCGCCCGCCCGCCGAGCT
pHIS2-LIM6R	CGGGCGGGCGGGCGGG
pHIS2-LIM7F	<u>AATTC</u> AAACCCAACCCAACCCGAGCT
pHIS2-LIM7R	CGGGTTGGGTTTGGGTTG
pHIS2-WRKY710SF	<u>AATTC</u> TGACTGACTGACGAGCT
pHIS2-WRKY710SR	CGTCAGTCAGTCAG
pHIS2-WM1F	<u>AATTC</u> CGACCGACCGACGAGCT
pHIS2-WM1R	CGTCGTCGGTCCG
pHIS2-WM2F	<u>AATTC</u> TAACTAACTAACGAGCT
pHIS2-WM2R	CGTTAGTTAGTTAG
pHIS2-WM3F	<u>AATTC</u> TGCCTGCCTGCCGAGCT
pHIS2-WM3R	CGGCAGGCAGGCAG
pHIS2-WM4F	<u>AATTC</u> TGAATGAATGAAGAGCT
pHIS2-WM4R	CTTCATTCATTCAG
pHIS2-WM5F	<u>AATTC</u> CAACCAACCAACGAGCT
pHIS2-WM5R	CGTTGGTTGGTTGG
pHIS2-WM6F	<u>AATTC</u> TGCATGCATGCAGAGCT
pHIS2-WM6R	CTGCATGCATGCAG
pHIS2-WM7F	<u>AATTC</u> CACACACACACAGAGCT
pHIS2-WM7R	CTGTGTGTGTGTGG

注: _ 为粘性末端。 Note: _ represents the sticky ends.

4), pCAM-G-box、pCAM-GM7 载体为本实验室构建保存,上述报告载体统称为 pCAM-Cis。将 *ThbHLH1* 基因定向连接到 pROK II 表达载体上,构建效应载体 pROK II-ThbHLH1 (图 2A,引物见表 4)。

1.7 瞬时转化烟草验证 ThbHLH1 与顺式作用元件结合

选取约 2 cm × 2 cm 大小的烟草叶片,背面向上平铺于 1/2 MS 培养基上,暗培养 2 d,备用。将构建的报告载体 (pCAM-Cis)、效应载体 (35S:ThbHLH1) 及 35S:LUC 质粒混合 (2:2:1),按照 PDS-1000 基因枪操作法瞬时转化烟草叶片,将转化后的烟草置于人工气候室中暗培养 48 h,分别测定 GUS 和 LUC 酶活,计算 GUS/LUC 比值,方法参见 Jefferson 等^[21]。



A: 报告载体及效应载体构建示意图; B: GUS 酶活分析盐及干旱胁迫下 *ThbHLH1* 对 G-box、LTRE1 及 WRKY710S 元件的识别能力。

A: Diagram of the reporter and effector vectors used in GUS activity analysis. B: GUS activity assay of the binding affinity of *ThbHLH1* to G-box, LTRE1 or WRKY710S in response to salt or drought stress.

图 2 盐、干旱胁迫下 *ThbHLH1* 对 G-box、LTRE1 及 WRKY710S 元件的识别能力

Fig. 2 The binding affinity of *ThbHLH1* to G-box, LTRE1 or WRKY710S in response to salt or drought stress.

2 结果与分析

2.1 酵母表达载体与随机 DNA 文库的获得

ThbHLH1 基因用同源融合的方法连接到 pGADT7-Rec2 载体上。菌落 PCR 结果显示:扩增条带特异且大小与预期一致(图 3)。用 pGADT7-Rec2F/R 载体引物进行测序,确定 pGADT7-Rec2-*ThbHLH1* 酵母效应载体构建成功。

根据酵母报告载体 pHIS2 序列设计的 Y1 和 Y2 引物中包含 7 碱基序列:“ANNNNNN”、“TNNNNNN”、“CNNNNNN”和“GNNNNNN”(反补序列为 Y2 中的“NNNNNNC”);也包含 8 碱基序列:“ANNNNNNC”、“CNNNNNNC”和“TNNNNNNC”。因此,理论上利用酵母单杂交系统筛选上述随机 DNA 文库,能鉴定出 *ThbHLH1* 转录因子所识别的

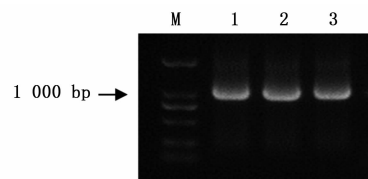
表 4 构建报告载体及效应载体引物序列

Table 4 Primer sequences used in constructing reporter and effector vectors

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')
pCAM-LTRE1F	AGCTTCCGAAACCGAAACCGAAAACCCCTTC CTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAG AGAACACGGC
pCAM-LTRE1R	CATGGCCGTGTTCTCTCCAAATGAAATGAA CTTCCTTATATAGAGGAAGGGTTTTCCGGTTT CGGTTTCGGA
pCAM-L1M7F	AGCTTAAACCCAAACCCAAACCCACCCTTCC TCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGA GAACACGGC
pCAM-L1M7R	CATGGCCGTGTTCTCTCCAAATGAAATGAAAC TTCTTATATAGAGGAAGGGTGGGTTTGGGT TTGGGTTTA
pCAM-WRKY710SF	AGCTTTGACTGACTGACACCCCTTCTCTATA TAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACA CGGC
pCAM-WRKY710SR	CATGGCCGTGTTCTCTCCAAATGAAATGAA CTTCCTTATATAGAGGAAGGGTTCACGTCA GTCAA
pCAM-WM7F	AGCTTCACACACACACAACCCCTTCTCTATA TAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACA CGGC
pCAM-WM7R	CATGGCCGTGTTCTCTCCAAATGAAATGAAAC TTCTTATATAGAGGAAGGGTGTGTGTGT GTGA
pROK II- <i>ThbHLH1</i> F	CTCTAGAGGATCCCCATGGCTAATAATCCAG GAGATG
pROK II- <i>ThbHLH1</i> R	TGCAGCTCGGTACCCTTATGAAAGGGGATT GTCTCAG

注: _ 为粘性末端, ~ 为 *Sma* I 线性化 pROK II 载体两端的序列。
Note: _ represents the sticky ends, ~ represents the sequences on both ends of the *Sma* I linearized pROK II vector.

不超过 7 或 8 个碱基的任意 DNA 序列。将 PCR 产物连接到 pHIS2 载体上,收集所有阳性克隆提取质粒,即为随机 DNA 文库。



M: DL2000 标准分子量; 1~3: 阳性转化子

M: Marker DL2000; 1~3: Positive transformants

图 3 pGADT7-Rec2-*ThbHLH1* 载体构建菌落 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of the *Escherichia coli* containing pGADT7-Rec2-*ThbHLH1* vector

2.2 DNA 文库筛选和识别序列鉴定

为了鉴定 *ThbHLH1* 转录因子识别的 DNA 序列,将酵母效应表达载体(pGADT7-Rec2-*ThbHLH1*)

与随机 DNA 文库质粒共转化酵母,通过酵母单杂交系统进行筛选,在 TDO + 30 mmol · L⁻¹ 3-AT 培养基上共获得 6 个阳性克隆菌落,经 TDO + 50 mmol · L⁻¹ 3-AT 培养基进一步筛选后,有 2 个克隆可正常生长,且长势与阳性对照 (p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53) 的长势一致,即克隆 2 和 5;其余 4 个克隆则无法正常生长(图 4)。因此,笔者进一步研究这 2 个阳性克隆。通过酵母质粒提取试剂盒提取酵母质粒,将其转化大肠杆菌感受态细胞,选取阳性克隆进行测序,将测序结果与 pHIS2 载体序列进行比对,获得 2 个插入 DNA 序列。通过 PLACE 和 PlantCARE 对获得序列进行顺式作用元件预测,来分析 ThbHLH1 转录因子所识别的顺式作用元件,结果见表 5,其中,“CCCCCGAAACGGG”包含 LTRE1 元件 (CCGAAA);“CCCCGCTGACCGGG”包含 WRKY710S 元件(TGAC)。

2.3 酵母单杂交鉴定 ThbHLH1 转录因子所识别的顺式作用元件

将效应载体 (pGADT7-Rec2-ThbHLH1) 分别和 pHIS2-LTRE1、pHIS2-WRKY710S 及其突变载体 (pHIS2-L1M1-7、pHIS2-WM1-7) 共转化酵母,通过 DDO 和 TDO + 30 mmol · L⁻¹ 3-AT 固体培养基 30℃ 倒置培养 3 ~ 5 d。挑取 DDO 或 TDO + 30 mmol · L⁻¹ 3-AT 上生长的酵母菌落接种于 DDO 或 TDO 液体培养基中,30℃ 震荡培养至 OD₆₀₀ = 0.8 ~ 1.0,菌液适当稀释后取 2 μL,分别点于 DDO 和 TDO + 50 mmol · L⁻¹ 3-AT 固体筛选培养基上,30℃ 倒置培养 2 ~ 3 d,结果(图 5A、B)表明:pGADT7-Rec2-ThbHLH1 分别与 pHIS2-LTRE1 或 pHIS2-WRKY710S 共转化的酵母在含有 50 mmol · L⁻¹ 3-AT 的 TDO 筛选培养基上可正常生长,且长势与阳性对照

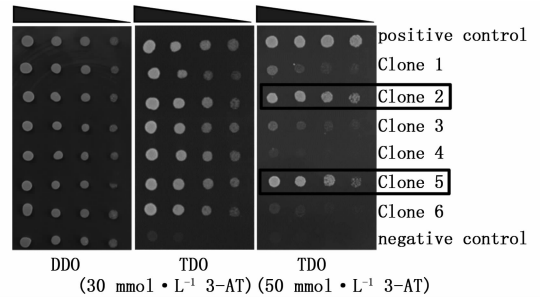
表 5 ThbHLH1 转录因子识别的插入序列分析

Table 5 Analysis of the insertion sequences bind to ThbHLH1

随机 DNA 插入序列 (5' - 3')	元件预测	参考文献
Random DNA insertion sequences (5' - 3')	Motif prediction	References
CCCCCGAAACGGG	LTRE1: “CCGAAA”	[22]
CCCCGCTGACCGGG	WRKY710S: “TGAC”	[23]

注: _ 为文库的插入序列,左侧的 CCC 及右侧的 GGG 为载体侧翼序列,因为载体序列也可能和插入序列形成新的元件,所以要考虑左右两端各 3 个碱基的插入序列。

Note: _ represents the insertion sequences of the library, the left CCC and the right GGG are the vector flanking sequences, the insertion sequences of the three bases on the left and right sides should be considered, because the vector sequence may also form new motifs with the insertion sequences.



positive control: p53HIS2/ pGADT7-Rec2-p53;

negative control: p53HIS2/ pGADT7-Rec2-ThbHLH1.

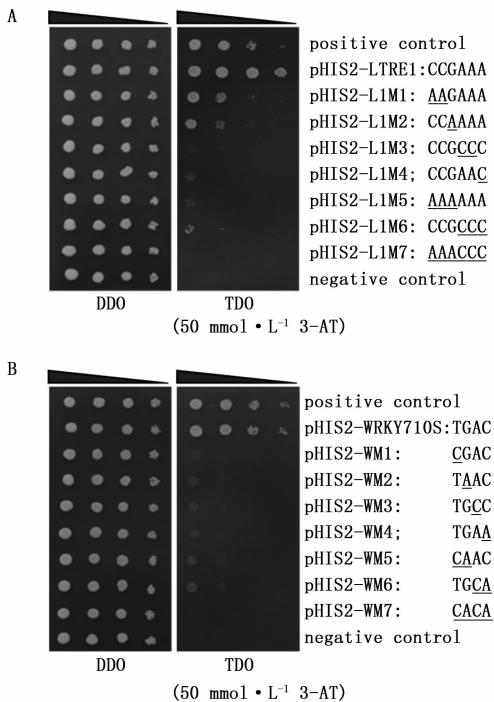
图 4 ThbHLH1 转录因子筛选随机 DNA 文库结果

Fig. 4 Interaction of ThbHLH1 with the random DNA sequence insertion library.

(p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53) 的长势一致。LTRE1 元件不同碱基位点突变的报告载体 (pHIS2-L1M1-7) 与 pGADT7-Rec2-ThbHLH1 共转化的酵母在含 50 mmol · L⁻¹ 3-AT 的 TDO 筛选培养基上均长势较弱或无法正常生长;而 WRKY710S 元件不同碱基位点突变的报告载体 (pHIS2-WM1-7) 与 pGADT7-Rec2-ThbHLH1 共转化的酵母在含 50 mmol · L⁻¹ 3-AT 的 TDO 筛选培养基上均无法正常生长。上述结果表明:ThbHLH1 转录因子可识别 LTRE1 和 WRKY710S 顺式作用元件。

2.4 瞬时转化烟草鉴定 ThbHLH1 转录因子所识别的顺式作用元件

为了验证在植物体内 ThbHLH1 转录因子对 LTRE1 和 WRKY710S 元件的识别能力,通过基因枪法将报告载体 (pCAM-Cis)、效应载体 (35S: ThbHLH1) 及 35S-LUC 质粒共转化烟草叶片,通过测定 GUS 和 LUC 酶活性,计算 GUS/LUC 比值来均一化遗传转化效率,结果见图 2B。效应载体 (35S: ThbHLH1) 分别与报告载体 pCAM-G-box、-LTRE1 及 -WRKY710S 共转化烟草叶片,其 GUS/LUC 的比值较高,且在盐和干旱胁迫条件下,GUS/LUC 比值显著增加,与阳性对照值(单独转化 pCAMBIA1301)相比,说明 GUS 基因大量表达;而 pROKII-ThbHLH1 分别与上述元件的突变元件共转化烟草,则 GUS/LUC 值较低,且在盐和干旱胁迫条件下 GUS/LUC 值无明显变化,与阴性对照值(单独转化报告载体 pCAM-Cis)基本一致,说明 GUS 基因未表达。上述结果表明:在盐和干旱胁迫条件下,ThbHLH1 能够识别 G-box、LTRE1 和 WRKY710S 元件来激活基因的表达,而不能与其突变元件结合来激活基因的表达(图 2B),该结果与酵母单杂交结果一致,说明在植物体



A: ThbHLH1 对 LTRE1 及其突变元件的识别。

positive control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53.

negative control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-ThbHLH1.

B: ThbHLH1 对 WRKY710S 及其突变元件的识别。

positive control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53.

negative control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-ThbHLH1.

A: Interaction of ThbHLH1 with the LTRE1 and mutant motifs.

positive control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53.

negative control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-ThbHLH1.

B: Interaction of ThbHLH1 with the WRKY710S and mutant motifs.

positive control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-p53.

negative control: p53HIS2/pGADT7-Rec2-ThbHLH1.

图5 ThbHLH1 对 LTRE1 和 WRKY710S 元件的识别结果

Fig. 5 Interaction of ThbHLH1 with the LTRE1 and WRKY710S motifs.

内 ThbHLH1 转录因子除识别 G-box 元件外,还可识别 LTRE1 和 WRKY710S 元件。

3 讨论

转录因子在响应由环境因素引起的基因表达调控方面发挥着重要的作用^[24]。它能够通过特异的 DNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质之间的相互作用,调节下游靶基因的表达,从而抵御外界环境胁迫^[25-26]。bHLH 转录因子通过识别 G-box 元件参与植物非生物胁迫的应答,在植物的抗逆过程中起重要作用^[4-5],而对 bHLH 转录因子识别 LTRE1 和 WRKY710S 元件参与植物非生物胁迫的应答未见报道。在前期的研究工作中,笔者鉴定出柽柳 Th-

bHLH1 转录因子可识别 G-box 元件,并且在盐或干旱胁迫下,ThbHLH1 通过结合 G-box 元件来激活基因表达的能力显著增强^[19]。本研究通过 TF-Centered Y1H 技术^[20]鉴定出 ThbHLH1 转录因子可识别 LTRE1 和 WRKY710S 顺式作用元件(图 5),为了验证在植物体内 ThbHLH1 转录因子能够识别上述元件,本研究利用共转化 reporter 和 effector 法对烟草叶片进行瞬时转化。在盐或干旱胁迫条件下,进行 GUS 酶活测定及分析,发现 ThbHLH1 与 G-box 元件结合后对基因的转录激活能力最强,与 LTRE1 元件结合后对基因的转录激活能力最弱(图 2B)。这些数据表明,在植物体内 ThbHLH1 转录因子可通过识别 G-box、WRKY710S 及 LTRE1 顺式作用元件来激活基因表达。

Dunn 等^[22]鉴定出大麦(*Hordeum vulgare* L.)低温响应基因(*blt4.9*)启动子中的 LTRE1 (CCGAA)元件,该元件参与大麦 *blt4.9* 基因的低温应答。Xue^[27]研究发现,HvCBF1 转录因子通过结合 LTRE15 (CCGAC)和 LTRE1 (CCGAA)元件来调控大麦中的冷应答基因。Matton 等^[23]鉴定出马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)病程相关基因 *STH-2* 启动子中含有 WRKY710S (TGAC)元件,该元件参与马铃薯 *STH-2* 基因的调控。本研究鉴定出 ThbHLH1 转录因子除识别 G-box 元件外,还可识别 LTRE1 和 WRKY710S 元件。目前,大量研究表明,bHLH 转录因子通过识别相应的顺式作用元件来参与植物耐寒途径的调控,如 Feng 等^[28]从苹果中分离鉴定的一个低温响应基因 *MdCibHLH1*,该基因能特异结合到拟南芥 CBFs 启动子的 MYC 识别位点并激活其表达。Huang 等^[29]从枳 *PtrbHLH* 中克隆到受低温诱导的基因,发现 *PtrbHLH* 可以结合 *POD* 基因启动子区域中的 E-box 元件,通过调控 *POD* 介导的 H₂O₂ 清除参与植物对冷胁迫信号的应答,来提高过表达烟草或柠檬的耐寒性。鉴于上述工作,我们推测柽柳 ThbHLH1 转录因子不仅通过识别 G-box 元件参与植物耐盐、抗旱途径调控,还可能通过与 LTRE1 或 WRKY710S 元件结合来调控耐寒、抗病等相关途径。在后续试验中,笔者将开展 ThbHLH1 转录因子耐寒、抗病等相关研究工作,同时进行逆境胁迫下过表达及野生型柽柳的转录组测序,找出 ThbHLH1 转录因子调控的下游靶基因。通过分析靶基因启动子中是否含有 G-box、LTRE1 及 WRKY710 顺式作用元件,来鉴定 ThbHLH1 转录因子直接调控的下游靶

基因。

4 结 论

本研究通过 TF-Centered Y1H 技术鉴定出刚毛柞柳 ThbHLH1 转录因子除识别 G-box 元件外,还可识别 LTRE1 及 WRKY710S 顺式作用元件。利用共转化 reporter 和 effector 法对烟草叶片进行瞬时转化,在盐或干旱胁迫条件下,进行 GUS 酶活测定及分析,发现 ThbHLH1 与 G-box 元件结合后对基因的转录激活能力最强,与 LTRE1 元件结合后对基因的转录激活能力最弱。结果表明,在植物体内 ThbHLH1 转录因子可通过识别 G-box、WRKY710S 及 LTRE1 顺式作用元件来激活基因表达。本研究为研究 ThbHLH1 转录因子抗逆功能提供了新思路,为进一步揭示柞柳 ThbHLH1 转录因子抗逆分子调控机制奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] Peng H H, Shan W, Kuang J F, *et al.* Molecular characterization of cold-responsive basic helix-loop-helix transcription factors MabHLHs that interact with MaICE1 in banana fruit [J]. *Planta*, 2013, 238 (5): 937 - 953.
- [2] Liu W, Tai H, Li S, *et al.* bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism [J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1192 - 1204.
- [3] Feller A, Machemer K, Braun E L, *et al.* Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factor [J]. *Plant Physiology*, 2011, 66(1): 94 - 116.
- [4] Robinson K A, Koepke J I, Kharodawala M, *et al.* A network of yeast basic helix-loop-helix interactions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(22): 4460 - 4466.
- [5] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (8): 1749 - 1770.
- [6] Reguera M, Peleg Z, Blumwald E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 186 - 194.
- [7] Heisler M G, Atkinson A, Bylstra Y H, *et al.* SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein [J]. *Development*, 2001, 128(7): 1089 - 1098.
- [8] Ito S, Song Y H, Josephson-Day A R, *et al.* FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2012, 109(9): 3582 - 3587.
- [9] Zhao H, Wang X, Zhu D, *et al.* A single amino acid substitution in IIIf subfamily of basic helix-loop-helix transcription factor AtMYC1 leads to trichome and root hair patterning defects by abolishing its interaction with partner proteins in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 14109 - 14121.
- [10] Reymond M C, Brunoud G, Chauvet A, *et al.* A light-regulated genetic module was recruited to carpel development in *Arabidopsis* following a structural change to SPATULA [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(7): 2812 - 2825.
- [11] Leivar P, Tepperman J M, Cohn M M, *et al.* Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(4): 1398 - 1419.
- [12] Zhang L Y, Bai M Y, Wu J, *et al.* Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(12): 3767 - 3780.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Nakata M, Mitsuda N, Herde M, *et al.* A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(5): 1641 - 1656.
- [16] Seo J S, Joo J, Kim M J, *et al.* OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice [J]. *Plant Journal*, 2011, 65(6): 907 - 921.
- [17] Zhou J, Li L, Wang J L, *et al.* Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt-and osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(12): 1296 - 1306.
- [18] Yang T, Yao S, Hao L, *et al.* Wheat bHLH-type transcription factor gene TabHLH1 is crucial in mediating osmotic stresses tolerance through modulating largely the ABA-associated pathway [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(11): 2309 - 2323.
- [19] Ji X Y, Nie X G, Liu Y J, *et al.* A bHLH gene from *Tamarix hispida* improves abiotic stress tolerance by enhancing osmotic potential and decreasing reactive oxygen species accumulation [J]. *Tree Physiology*, 2016, 36(2): 193 - 207.
- [20] Ji X Y, Wang L Q, Nie X G, *et al.* A novel method to identify the DNA motifs recognized by a defined transcription factor [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(4-5): 367 - 380.
- [21] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: betagluconuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3901 - 3907.
- [22] Dunn M A, White A J, Vural S, *et al.* Identification of promoter elements in a low - temperature-responsive gene (*bt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38 (4): 551 - 564.

- [23] Matton D P, Prescott G, Bertrand C, *et al.* Identification of cis-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene STH-2 in potato [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22 (2): 279–291.
- [24] Chen Y Y, Li M Y, Wu X J, *et al.* Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix family transcription factors and their role in responses to abiotic stress in carrot [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35: 125.
- [25] 杨鹏程, 周波, 李玉花. 植物花青素合成相关的 bHLH 转录因子 [J]. *植物生理学报*, 2012, 48(8): 747–758.
- [26] 光杨其, 宋桂成, 张金凤, 等. 1 个新棉花 bHLH 类基因 *Gh-bHLH130* 的克隆及表达分析 [J]. *棉花学报*, 2014, 26(4): 363–370.
- [27] Xue G P. An AP2 domain transcription factor HvCBF1 activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1577: 63–72.
- [28] Feng X M, Zhao Q, Zhao L L, *et al.* The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdCibHLH1 encodes an ICE-like protein in apple [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 22.
- [29] Huang X S, Wang W, Zhang Q, *et al.* A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 1178–1194.

(责任编辑:张研)

欢迎订阅 2019 年《中国农业科学》

《中国农业科学》是由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办的综合性学术期刊,是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国精品科技期刊、CSCD Q1 区期刊、中国权威学术期刊 A+ 期刊、中国最具国际影响力学术期刊,是了解中国农业相关领域科研进展的首选期刊。《中国农业科学》以研究论文、综述、简报等形式报道农牧业基础科学和应用基础科学最新成果。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;食品科学与工程;畜牧·兽医·资源昆虫等栏目。读者对象为国内外农业科研院(所)、大专院校的科研、教学与管理人

员。《中国农业科学》大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发售。每期 200 页,定价 49.50 元,全年定价 1188.00 元。国内统一连续出版物号:CN11-1328/S,国际标准连续出版物号:ISSN 0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》全国各地邮局均可订阅,也可直接向编辑部订购。

邮编:100081;地址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话:010-82109808,82106281;传真:010-82106247

网址:www.ChinaAgriSci.com;E-mail:zgnykx@caas.cn

联系人:林鉴非