

茶树冷诱导基因 *RAV* 的克隆与表达特性分析

陈林波^{1,2}, 李叶云¹, 王琴¹, 高永亮¹, 江昌俊^{1,*}

¹安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 合肥230064; ²云南省农业科学院茶叶研究所, 云南勐海 666201

摘要: 对利用 cDNA-AFLP 技术所获得的茶树低温诱导差异表达片段 TDF, 通过 RACE 方法获得含完整编码区序列的茶树 *RAV* 基因 cDNA 克隆, 其开放阅读框编码 361 个氨基酸, 包含两个保守的结构域 AP2 和 B3, 与多种植物 *RAV* 蛋白具有高度同源性。qRT-PCR 分析表明, 茶树 *RAV* 基因受低温、乙烯、NaCl 等上调表达, 最大表达量分别是诱导前的 5.8、10.0 和 1.9 倍。在成熟叶片、芽、嫩茎中 *RAV* 基因表达量相近, 花蕾和嫩根中表达较低, 而在种子中不表达。推测该基因在组织中的表达受到严格控制以及在响应非生物胁迫中发挥重要作用。

关键词: 茶树; *RAV* 转录基因; 基因克隆; qRT-PCR; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of *RAV* Gene Related to Cold Stress from Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz]

CHEN Lin-Bo^{1,2}, LI Ye-Yun¹, WANG Qin¹, GAO Yong-Liang¹, JIANG Chang-Jun^{1,*}

¹Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230064, China; ²Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Menghai, Yunnan 666201, China

Abstract: For a TDF, which has been gained from genes expressed differentially in tea plant under cold stress using cDNA-AFLP, containing a complete coding sequence cDNA was cloned by RACE, named *CsRAV*, and contains an ORF, which encodes a polypeptide of 361 amino acids including two conserved domains: AP2 and B3. Sequence alignment showed that *CsRAV* protein shared high identity with other plants. qRT-PCR results indicated that *CsRAV* was induced by cold, ethylene and NaCl, and maximum relative expression was 5.8, 10.0 and 1.9 times higher than before treatment, respectively. *CsRAV* gene expression level was closed in leave, bud and stem, and lower in flower and root, not detected in seed. It shows the expression of the *CsRAV* might be strictly controlled in different organs and plays an important role during abiotic stress in tea plant.

Key words: *Camellia sinensis*; *RAV* transcription factor; gene clone; qRT-PCR; expression analysis

低温是典型的环境胁迫因素之一, 不仅对植物生长发育有重要的影响, 而且限制物种的栽种范围。但植物对低温胁迫的响应并非是完全被动的反应, 而是一种积极主动的应激过程(Weiser 1970; Guy 等 1985)。目前已从拟南芥、大麦、苜蓿以及水稻等多种植物中分离鉴定出多个低温诱导基因。在众多冷诱导相关基因中, 转录因子在响应各种逆境胁迫时起着重要作用(李洁 2004)。AP2/EREBP 家族是植物中普遍存在的一类重要转录因子, 广泛参与植物逆境诱导信号转导, 受多种信号分子的诱导, 主要调节植物对激素、病原、低温、干旱及高盐等分子应答反应(Liu 等 1998; Riechmann 和 Meyerowitz 1998; Park 等 2001; Sakuma 等 2002)。

茶树原产于我国西南部, 在温暖湿润、雨量丰沛、日照短的南方气候条件下, 形成了喜温畏寒

的特性。因此, 温度不仅限制了茶树的区域推广, 而且影响茶叶的产量和品质, 尤其是冻害严重时可导致整株死亡。研究茶树对低温胁迫响应的相关基因, 并对重要基因进行克隆和表达分析, 对了解茶树抗寒分子机制和提高茶树抗寒性有着重要意义。*RAV* 是植物特有的一类含有两个不同的 DNA 结合序列的转录因子, 其含有 AP2 结构域和 B3 结构域(Kagaya 等 1999), 被划分为 AP2/EREBP 家族的 *RAV* 亚家族类(Nole 和 Krizek 2000)。目前也在拟南芥、烟草、蓖麻、辣椒等多种植物中得到了克隆(Sohn 等 2006; Chen 等 2009)。本研究对课题

收稿 2010-01-07 修定 2010-02-01

资助 国家科技支撑计划(2008BADC0B03)、国家自然科学基金(30871568)和安徽省自然科学基金(090411014)。

* 通讯作者(E-mail: jiangcj@ahau.edu.cn; Tel: 0551-5786982)。

组前期研究(利用 cDNA-AFLP 筛选茶树冷诱导相关基因, 另文报道)中所获得茶树抗寒相关片段 TDF (transcript derived fragment), 通过 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方法, 获得含完整编码区序列的茶树 *RAV* 基因 cDNA 克隆。用 qRT-PCR (quantitative RT-PCR) 方法对其在各种非生物胁迫过程以及在不同组织中表达特性进行了分析, 为研究 *RAV* 在茶树抗寒分子机理中的作用奠定基础。

材料与方 法

以国家无性系茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz] 良种 ‘舒茶早’ 为实验材料。pMD18-T simple Vector 和 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 为大连宝生物 (TaKaRa) 公司产品; RNAPrep pure Plant Kit 和凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 和 TranStart Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司; 引物合成与测序由上海生工生物工程公司完成。

根据获得的 TDF 片段序列设计 3'/5' RACE 引物 (P1、P2) 和一对特异引物 (P3、P4) 进行验证。按 RACE 试剂盒的方法扩增出 *RAV* 基因的全长。P1: 5'-CAGCCGACCTTGTAACGAGCCAC-3', P2: 5'-GCTGTTTGAAAAAGCCGTCACGCCTA-3', P3: 5'-ATGGATGGTAGTTGCATAGATG-3', P4: 5'-CAAAGCTCCAATTACCTTACT-3'。

将测得的 *CsRAV* cDNA 序列与 NCBI 数据库中推测的氨基酸序列进行 Blast 比对。用开放阅读框 (open reading frame, ORF) 程序应用 BioXM 2.6 软件进行多重序列比较和同源性分析, 预测蛋白的分子量、等电点和氨基酸组成。用 Blast P 和 <http://swissmodel.expasy.org> 网站预测蛋白保守区和二级结构。

qRT-PCR 分析非生物因子诱导基因表达时, 采取安徽农业大学实验园内未受病虫害侵害的同等成熟度的茶树枝条进行如下处理: 4 °C 诱导 (放置于光照培养箱)、乙烯诱导 (喷施 0.1% 乙烯溶液)、高盐诱导 (插入 300 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液培养), 分别于 0、3、6、9、12、24 h 后取样。在分析基因组织表达特异性时, 取茶树成熟叶片、芽、嫩茎、花蕾、果和嫩根, 取样后迅速放入液氮中冷冻, 然后

置 -80 °C 冰箱保存备用。

样品总 RNA 的提取方法: 用 2% CTAB 裂解后 (江昌俊等 2000), 参照 TIANGEN RNAPrep pure Plant Kit 试剂盒说明书进行, 略有改动。用 DU800 紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司) 和 1% 的凝胶电泳, 对总 RNA 进行定量和质量分析。cDNA 合成按试剂盒说明书进行。

qRT-PCR 反应体系 25 μL, 扩增条件为 95 °C 3 min; 94 °C 5 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 72 °C 2 min。按相对定量法进行基因表达量的计算, 相对表达量的比值 = 2^{-ΔΔCt}, 其中 ΔΔCt = ΔCt_(测定样品) - ΔCt_(校准样本), ΔCt_(测定样品) = Ct_(测定样品目标基因) - Ct_(测定样品参照基因), ΔCt_(校准样本) = Ct_(校准样本目标基因) - Ct_(校准样本参照基因)。以 actin 为参照基因, 0 h 样品或叶片为校准样本。qRT-PCR 反应中 P5 (5'-ACTACATCGGCGGCTTCATA-3') 和 P6 (5'-TTAGCTTCCCCACGTCCTA-3') 为扩增 *RAV* 引物, P7 (5'-GCCATCTTTGATTGGAA-TGG-3') 和 P8 (5'-GGTGCCACAACCTTGATCTT-3') 为扩增 actin 引物。

结果与讨论

1 含完整编码区序列的茶树 *RAV* 基因 cDNA 的克隆

以 cDNA 第一链为模板, 分别进行 5' 端和 3' 端的扩增。测序结果可以看出, 由 3' RACE 获得的 688 bp 片段 (图 1-a) 中含有聚腺苷酸加尾信号。由 5' RACE 获得的片段长度为 594 bp (图 1-b), 该序列的第 1 个 ATG 距离该片段的 5' 端为 67 bp, 周围的序列基本符合植物基因起始密码子的特点。将两端序列和中间片段进行拼接得到一个 1 329 bp 的 cDNA 序列。为了验证拼接所获得的基因 cDNA 序列的正确性, 根据拼接得到的 cDNA 序列设计特异

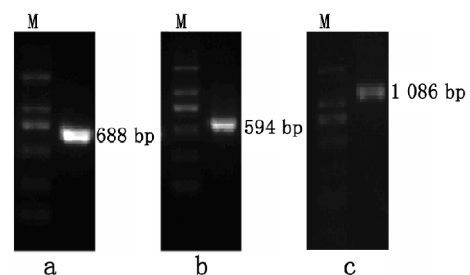


图 1 茶树 *RAV* 基因 3'RACE 及 5'RACE 的扩增
Fig.1 Results of 3' RACE and 5' RACE for *CsRAV*
M: DL2000; a: 3'RACE 产物; b: 5'RACE 产物; c: 验证产物。

引物,经基因扩增与测序,结果与拼接获得的cDNA中所对应的序列完全一致(图1-c),此序列含完整编码区。将获得的 *RAV* 基因序列提交 GenBank, 获取基因登录号为: GQ227992。

2 茶树 *RAV* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列分析

茶树 *RAV* 基因 cDNA 长 1 329 bp, 含有 1 083 bp 的开放阅读框, 编码 361 个氨基酸, 编码蛋白质理论分子量为 40.33 kDa, 等电点(pI) 9.68。在氨基酸序列 N 端的第 69 个氨基酸至 124 个氨基酸之间构成 AP2 的核心结构域, 内含有 RYG 元件、RAYD 元件以及 WAAEIRD 盒子。而在氨基酸序列 C 端有 113 个氨基酸组成的另一个保守序列 B3 结构域(图 2)。结构预测表明, 在 AP2 结构域中含有 3 个 β - 折叠和 1 个 α - 螺旋等二级结构, 在 B3 结构域中含有 7 个 β - 折叠和 3 个 α - 螺旋等二级结构。

氨基酸同源比对显示, 茶树 *RAV* 与多种植物

的 *RAV* 蛋白有高度同源性, 与蓖麻 *RAV1* (GenBank 登录号: EEE38020)、辣椒 *RAV* (GenBank 登录号: AAW83473)、烟草 *RAV* (GenBank 登录号: ACF74549) 和拟南芥 *RAV1* (GenBank 登录号: BAA34250) 同源性分别为 71%、65%、68% 和 63% (图 3)。

3 *RAV* 基因的表达特性分析

为了研究 *CsRAV* 与各种非生物胁迫关系, 分别提取低温、乙烯、高盐处理后茶树新梢成熟叶片的总 RNA, 利用 qRT-PCR 分析 *CsRAV* 基因在上述处理中的表达特性。结果表明, 在低温处理(4 °C) 3 h 后 *RAV* 表达量有所增加, 6~9 h 后表达量提高到处理前的 4 倍, 12 h 表达量达到最大, 提高了 5.8 倍, 随后有所下降, 但在 24 h 仍维持在较高水平(图 4-a)。乙烯喷施处理后 *RAV* 的表达量快速增加, 9 h 到达最大, 为喷施前的 10.0 倍, 但之后逐渐下降,

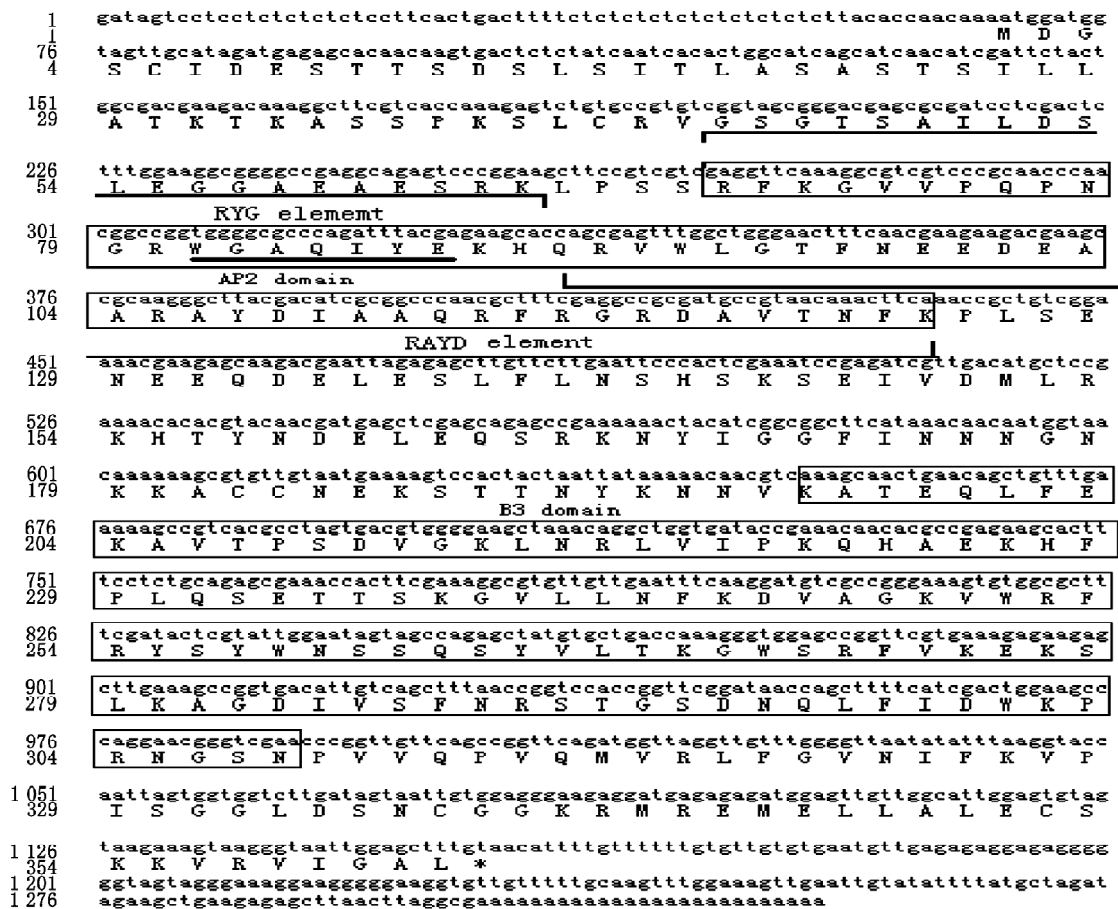


图2 茶树 *RAV* 核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.2 Analysis of sequence of nucleotide and its deduced amino acid for *C. sinensis RAV* gene

方框中为 DNA 结合位点区域 AP2 的结构域和 B3 结构域, 划线部分为 WAAEIRD 盒子, 括号为 RYG 和 RAYD 元件。

```

RcRAV1  --MDGSCIDESTTSDSISITPTSNISSPSSN--PLFSKSPF-SPLLRVSSGTSVWLDSESG
CsRAV   --MDGSCIDESTTSDSLSITLASASTSILL--ATKTKASSPKSLORVSSGTSAILDLSLEG
CaRAV   MEGTSSIDQESTTSDLSIAPAASSSMVVRQQPSMTTTRKPFESLORVSSGTSVLIIDGEN
NiRAV   --MEGSSSIDESTTSDLSIAPAISTSLP-----VMKSPESLORVSSGTS-VIIDAEN
AtRAV1  --MESSVDSEITSTGSGICETPAITPAKKS-----SVGNLVRMSSGSS-VVLDSEN
          * :**** * :**** * :**** * :****
RcRAV1  -IEAESRKLPSKRYKGVVFPQNGRWGAQIYEKQHRVWLGTFFNEEDEAARAYDIAAQRFRG
CsRAV   GAIAESRKLPSRFRKGVVFPQNGRWGAQIYEKQHRVWLGTFFNEEDEAARAYDIAAQRFRG
CaRAV   GVEAESRKLPSKRYKGVVFPQNGRWGAQIYEKQHRVWLGTFFNEENE AARAYDIAAQRFRG
NiRAV   GVEAESRKLPSRYE GVVFPQNGRWGAQIYEKQHRVWLGTFFNEENE AARAYDIAAQRFRG
AtRAV1  GVEAESRKLPSKRYKGVVFPQNGRWGAQIYEKQHRVWLGTFFNEEDEAARAYDIAVHNERR
          ***** : :***** : :***** : :***** : :***** : :*****
RcRAV1  RDAWTFNRPQLTDHQSEDEIETAFVLSHSHSKAEIVDMLRKHTYNDIELEQSKRNYTSNNGR
CsRAV   RDAWTFNRPQLSENE--EQDELESFLVLSHSHSKSEIVDMLRKHTYNDIELEQSRKNYIG--GF
CaRAV   RDAWTFNRPQL-LENQESDDVWELAFVLSHSHSKAEIVDMLRKHTYNDIELEQSKKLPFYTKDG
NiRAV   RDAWTFNRPQL-LENEE-NDDWELAFVLSHSHSKAEIVDMLRKHTYNDIELEQSKRNYGFSKDG
AtRAV1  RDAWTFNRPVDMDED--EVDFVLSHSHSKSEIVDMLRKHTYNEIELEQSKRRRNGNGNM
          *** :**** * :**** * :**** * :**** * :**** * :****
RcRAV1  GDKFQNRNTNMNVGLSGS-----ERLIIMKANEQLFEKAVTPSDVGLNRLVITPQIAEKHF
CsRAV   IINNNGMKACCNEKSTIN----YKNNVKATEQLFEKAVTPSDVGLNRLVITPQIAEKHF
CaRAV   TMAKNKDGLLDISFFGGGGTIDKVNNEVREQLFEKAVTPSDVGLNRLVITPQIAEKHF
NiRAV   KRTYCTKDGLMSSFFSS-----VDKVNKANEQLFEKAVTPSDVGLNRLVITPQIAEKHF
AtRAV1  TRTLLTSGLSNDGVSTTG-----FRSAEALFEKAVTPSDVGLNRLVITPQIAEKHF
          : * :***** : :***** : :*****
RcRAV1  FLQSGSNSTKGVLLNFDLITLTKWVRFYRYSYWNSQSYVLTGWSRFVKEKRLRAGDIVSF
CsRAV   FLQS-ETTSKGVLLNFDLITLTKWVRFYRYSYWNSQSYVLTGWSRFVKEKSLRAGDIVSF
CaRAV   FLQN-GNNSKGVLLNFDLITLTKWVRFYRYSYWNSQSYVLTGWSRFVKEKRLRAGDIVSF
NiRAV   FLQN-GNTSKGVLLNFDLITLTKWVRFYRYSYWNSQSYVLTGWSRFVKEKRLRAGDIVSF
AtRAV1  FLFSSNVSVKGVLLNFDLITLTKWVRFYRYSYWNSQSYVLTGWSRFVKEKRLRAGDIVSF
          ***** : :***** : :***** : :***** : :*****
RcRAV1  LKSTGFIDRLYIDWVRIQLTPT-----VSNPVCVSVQPVQMVRLFGVNIIFKVPFNS-
CsRAV   NPSITGSDRLYIDWVRIQLTPT-----NGSNPVCVSVQPVQMVRLFGVNIIFKVPFISG
CaRAV   QRSTSGDRLYIDWVRIQLTPT-----VSNPVCVSVQPVQMVRLFGVNIIFKVPFNSV
NiRAV   QRSTSGDRLYIDWVRIQLTPT-----ISPTVASQVQVQVQVQVQVRLFGVNIIFKVPFNSV
AtRAV1  SRSTGGDRLYIDWVRIQLTPT-----SGSDDLDAQVRLRFGVNIIFKVPFNSV
          : * :**** * :**** * :**** * :****
RcRAV1  -----HTEG-CNGKRIREMELISLDCIRQRVVIGAL--
CsRAV   -----GLDSNCGGRMREMELISLDCIRQRVVIGAL--
CaRAV   DNNNNNNN--NMANCSGGGRMREMELISLDCIRQRVVIGAL
NiRAV   NNNNNNNNDNMMTSCSGGRMREMELISLDCIRQRVVIGAL
AtRAV1  -----DVVGNIRVNDTEMLSLVCSIRQRFPHAS--
          ***** : :***** : :*****
    
```

图3 茶树 *RAV* 与其他 *RAV* 基因的氨基酸比对

Fig.3 Comparison of amino acid sequences of *CsRAV* with other reported *RAV* proteins

黑框为同源序列, *RcRAV1* 为蓖麻 *RAV1*, *CsRAV* 为茶树 *RAV*, *CaRAV* 为辣椒 *RAV*, *NiRAV* 为烟草 *RAV*, *AtRAV1* 为拟南芥 *RAV1*。

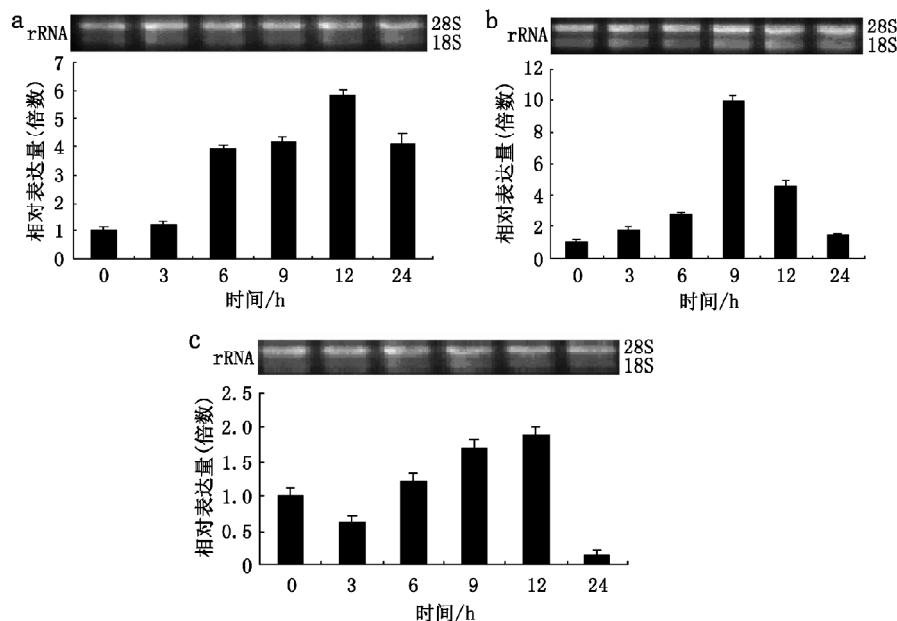


图4 qRT-PCR 分析非生物胁迫下茶树 *RAV* 基因的表达

Fig.4 Analysis of expressions of *CsRAV* gene with qRT-PCR under abiotic stresses

a: 4 °C 对 *CsRAV* 基因的表达影响; b: 0.1% 的乙烯对 *CsRAV* 基因的表达影响; c: 300 mmol·L⁻¹ NaCl 对 *CsRAV* 基因的表达影响。

24 h 几乎又回到喷施前水平(图 4-b)。高盐处理也对 *RAV* 基因表达产生影响, 12 h 之内表达量提高到处理前的 1.9 倍, 24 h 后表达量反而受到抑制, 只有处理前的 1/10 (图 4-c)。

4 *RAV* 基因在不同组织器官中的表达分析

为进一步了解 *RAV* 基因的表达特性, 从茶树成熟叶片、芽、嫩茎、花蕾、种子和嫩根中提取总 RNA, 用 qRT-PCR 分析基因表达差异。如图 5 所示, 茶树 *RAV* 基因成熟叶片、芽、嫩茎表达量相近, 而在花和嫩根中表达较低, 只有叶片的 8% 左右, 在种子中不表达。这说明该基因具有组织特异性, 在组织中的表达受到严格的控制。

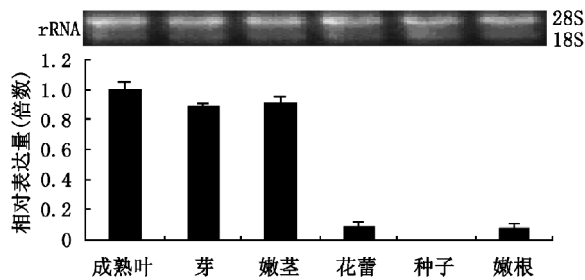


图 5 *RAV* 基因在不同器官的表达分析

Fig.5 Analysis of expressions of *CsRAV* in different organ

总之, 本文中利用 RACE 获得含完整编码区的茶树 *RAV* 基因的 cDNA 序列, 经同源序列分析结果显示, 该基因含有 AP2 和 B3 结构域, 属于 AP2/EREBP 家族的 *RAV* 亚家族类 (Nole 和 Krizek 2000)。qRT-PCR 分析表明, 该基因受多种胁迫诱导, 并具有组织特异性。因此可以推测该基因在组织中的表达受到严格控制以及在响应非生物胁迫中发挥重要作用。同时也证实了 cDNA-AFLP 分析结果是可靠的, 这也表明 *RAV* 基因可能与茶树抗寒性密切相关。Chen 等 (2009) 报道东方山羊豆 (*Galegae orientalis*) *RAV* 基因在低温诱导后表达量稳定增加, 24 h 达到最大, 被高盐诱导后增加不明显, 在茎中表达量最高, 而在根中不表达等, 这可能是不同植物间对外界胁迫响应程度和反应时间不一样。*RAV* 基因也能被病原菌等生物胁迫诱导 (Sohn 等

2006)。尽管 *RAV* 能被低温、高盐等多种生物或非生物胁迫诱导, 但该基因的功能以及所调控的下游基因还不明确, 有待进一步研究。

参考文献

- 江昌俊, 王朝霞, 李叶云 (2000). 茶树中提取总 RNA 的研究. 茶叶科学, 20 (1): 27~29
- 李洁 (2004). 植物转录因子与基因调控. 生物学通报, 39 (3): 9~11
- Chen XF, Wang Z, Wang X, Dong J, Ren JZ, Gao HW (2009). Isolation and characterization of *GoRAV*, a novel gene encoding a *RAV*-type protein in *Galegae orientalis*. Genes Genet Syst, 84: 101~109
- Guy CL, Niemi KJ, Brambl R (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc Natl Acad Sci USA, 82: 3673~3677
- Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T (1999). *RAV1*, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucleic Acids Res, 27: 470~478
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi SY, Shinozaki K (1998). Two transcription factor DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10: 1391~1406
- Nole WS, Krizek BA (2000). DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. Nucleic Acids Res, 28 (21): 4076~4082
- Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH (2001). Overexpression of the tobacco *tsil* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. Plant Cell, 13 (5): 1035~1046
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998). The AP2/EREBP family coordinate gene activity in response to agents that induce of plant transcription factors. Biol Chem, 379: 633~643
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi SK (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochem Biophys Res Commun, 290 (3): 998~1009
- Sohn KH, Lee SC, Jung HW, Hong JK, Hwang BK (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. Plant Mol Biol, 61: 897~915
- Weiser CJ (1970). Cold resistance and injury in woody plants. Science, 169: 1269~1273