

受光调节的拟南芥锌指蛋白 DBB (Double B-Box) 亚家族基因的转录表达

汪启明, 屠小菊, 赵小英, 唐冬英, 刘选明*

湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 长沙 410082

摘要: 整合微阵列数据和采用实时荧光定量PCR分析拟南芥锌指蛋白DBB亚家族中8个基因在不同光周期和不同光质条件下转录表达的结果表明, 在长日和短日照条件下该家族中6个基因的转录都具有光周期节律性, 并且其中4个基因的表达受光诱导, 有1个基因的表达受光抑制, 1个基因的表达不受光调节。

关键词: 拟南芥; 光周期; 锌指蛋白; 生物钟节律

Transcription of Zinc Finger Protein DBB (Double B-Box) Subfamily Respond to Light in *Arabidopsis thaliana*

WANG Qi-Ming, TU Xiao-Ju, ZHAO Xiao-Ying, TANG Dong-Ying, LIU Xuan-Ming*

Bioenergy and Biomaterial Research Center, Institute of Life Science and Technology, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: The transcripts expression of eight members of DBB (double B-box) subfamily in *Arabidopsis* under different photoperiods or light quality conditions were investigated using microarray and real-time quantitative PCR. The results showed that the transcription of six members of DBB genes were under the control of circadian clock: four of them were up-regulated, one was down-regulated and one wasn't regulated in responded to light.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; photoperiod; zinc finger protein; circadian clock rhythms

光周期和不同光质光都对拟南芥的生长有作用, 并调控其基因的表达。这种调节由植物体内各种转录因子完成。拟南芥中已发现了大约1 600种转录因子(Riechmann等2000), 归纳为不同的亚族, 其中锌指蛋白 B-box 家族是最为重要的一种(Klug和Schwabe 1995; Mackay和Crossley 1998; Sanchez-Garcia和Rabbitts 1994; Laity等2001)。CO (*constans*)是最具代表性的一个基因(Putterill等1995), 它是植物光信号传导途径调控开花的关键因子(Robson等2001; Valverde等2004)。CO蛋白N端有2个B-box 锌指结构, C端为CCA结构。另外还有一个与CO同源的DBB蛋白亚族基因, 它们不具有C端CCT结构, 但其N端有2个B-box结构, 并且这2个B-box结构域为8~15个氨基酸隔开。在拟南芥中DBB亚家族主要包括以下8个基因: *DBB1a* (At2g21320)、*DBB1b* (At4g38960)、*DBB2* (At4g39070)、*DBB3* (At1g78600)、*DBB4* (At4g10240)、*STO* (At1g06040)、*STH* (At2g31380)和*STH2* (At1g75540) (Kumagai等2008)。

至今已发现DBB家族中有4个基因在光介导

的植物生长发育中起作用, *STO*是耐盐的基因, 其蛋白在光敏色素和蓝光信号途径中起负调控作用(Indorf等2007)。*STH*与*STO*类似, 都与*COPI*相互作用(Datta等2007)。*DBB3*和*STH2*都调节下胚轴的伸长、叶绿体的早期形成和花青素的积累, 在拟南芥去黄化过程中起正调控作用。它们能与*HY5*和*COPI*相互作用且蛋白的表达受*HY5*调节, 并为*COPI*降解(Datta等2007, 2008; Chang等2008)。中日照情况下DBB亚家族部分基因与生物钟节律相关(Kumagai等2008), 但这个家族基因在不同光周期下的转录表达节律性和受不同光质光的调节情况, 仍不清楚。

本文通过综合Diurnal、Genevestigator和ExpressionBrowser等网站的生物信息学信息和采用实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR)技术检测和分析DBB亚家族基因感应光的转录表达

收稿 2009-05-27 修定 2009-06-22

资助 国家自然科学基金(30600368, 30770200)。

致谢 美国加州大学洛杉矶分校林辰涛先生曾给予指导。

* 通讯作者(E-mail: sw_xml@hnu.cn; Tel: 0731-8821721)。

和研究该家族基因受光调控的转录表达特征。

材料与方法

用生物软件 ClustalW (www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp)对DBB亚家族基因蛋白序列进行分析比较,画出DBB亚家族基因的聚类分析图。Diurnal网站(<http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>)是由美国俄勒冈州立大学基因组及生物计算研究中心建立,综合多个实验室的基因芯片结果,提供了拟南芥基因的生物节律性表达情况。登录Diurnal网站,分别将DBB家族的所有基因的基因编号(如At2g21320)都输入Diurnal search tools的对话框中,收索得到长日照和短日照条件下该家族各个基因的转录水平表达情况。Genevestigator网站(<https://www.genevestigator.ethz.ch>)综合数百个基因芯片结果,为研究者提供了广泛的拟南芥基因受胁迫调控的表达信息,登录Genevestigator网站输入DBB家族各个基因的基因编号,得到在不同的光质培养下这些基因的转录表达量。黑暗条件(对照)下的基因表达量设定为1,不同光质光下培养的基因转录表达量与对照的转录表达量作对比后得到的比值绘成柱状图。ExpressionBrowser (www.expression-browser.com)网站综合142个Affymetrix的拟南芥微阵列实验结果,得到拟南芥中所有的基因表达和蛋白质共调节的信息,登陆该网站,寻找光信号和生物钟信号途径中受DBB亚家族调控的基因。

实验的材料为野生型拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] Col-4, 属于哥伦比亚生态型。拟南芥种子用70%的乙醇表面灭菌30 s,以10%次氯酸钠灭菌10 min,然后用无菌水冲洗4~5次,播种于含有0.8%琼脂的MS培养基上。播种后将其放入4 °C下处理4 d,然后分别放在长日照(16 h光照,8 h黑暗)和短日照(8 h光照,16 h黑暗)条件下培养10 d,从第1天起以不同光周期培养,后2 d放在全日照下培养,每隔3 h取拟南芥幼苗样品,前后72 h共取24次样品。此外,取4 °C冰箱冷处理4 d后的拟南芥种子,先放在黑暗条件下生长8 d,再分别转移到白光、蓝光、红光和远红光下处理1 d后取样(Zhao等2007)。光源分别为:LED-蓝光(波长为470 nm,半幅宽为30 nm),LED-红光(波长为660 nm,半幅宽为20 nm),LED-远红光(波长为740 nm,半幅宽为25 nm,光照强度为6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

和白色荧光灯(飞利浦)。蓝光(光照强度为80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、红光(光照强度为28 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、远红光(光照强度为6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和白光(光照强度为80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的光照强度用Li-250量子光度计测量。

采用安比奥公司生产的RNA提取试剂盒,提取总RNA。按照Promega试剂说明书在总RNA溶液中加入适量的RNase free DNase I得到去DNA的RNA,然后,用核酸浓度测定仪测定所提取RNA的浓度及纯度。取约2 μg 的总RNA用M-MLV逆转录酶转录得到cDNA(李妍等2008)。用实时荧光定量PCR技术检测基因的表达量。实时荧光定量PCR采用JumpStart Taq Ready Mix Kit (Sigma公司),荧光染料为SYBR Green I (Invitrogen公司)和Rox (Invitrogen公司),在Mx3000P Q-PCR System (Stratagene公司)仪器上完成。PCR条件为:95 °C预变性10 min;95 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,57 °C时采集荧光数据,共40个循环(部分基因的延伸温度和读数温度有所改变)。以ACT7和ACT2基因作为内参基因,通过Mx3000P软件分析结果。每个定量PCR结果至少重复3次,Q-PCR的体系如表1所示,所用的PCR引物如表2所示。

表1 实时荧光定量PCR的反应体系

Table 1 The system of real-time quantitative PCR

试剂	体积/ μL
去离子水	20.25
JumpStart Taq Ready Mix (2 \times)	25
25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl ₂	0.75
SYBR Green I (20 \times)	1.25
Rox	0.25
正向引物(25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.25
反向引物(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.25
cDNA	2
总体积	50

结果与讨论

1 DBB家族基因的聚类分析

通过生物软件ClustalW对DBB亚家族基因蛋白序列进行分析比较(图1),DBB家族基因按蛋白序列同源性高低可分为3类:STO、STH与DBB3为一类;DBB4、DBB1a与DBB1b为一类;STH2与DBB2为一类。

表2 实时荧光定量PCR引物序列

Table 2 Primer sequences used in real-time quantitative PCR analysis

基因名称	正向引物序列	反向引物序列
<i>DBB1a</i>	5'-CTCTCCATCTTCCGCTTCA-3'	5'-TTTTTACTCAAACGATTAGTCTCAC-3'
<i>DBB1b</i>	5'-CCGTTTTTTTTTCCTTCCTTCTG-3'	5'-ACAACATAAACCTTCCCTCTTCAAC-3'
<i>DBB2</i>	5'-GACATTACCGGTTGGAGAGT-3'	5'-ACCATCATAAACCTATAAGACTCAC-3'
<i>DBB3</i>	5'-TTCCACAGATTCAGTCTCCACCTA-3'	5'-GCCGTTTCCCAACCCCTTT-3'
<i>STO</i>	5'-GGATCAAAGTAGCTCTGACCTC-3'	5'-GTTGTTGGAAGGCTCAGGTT-3'
<i>STH</i>	5'-CACTTGATTGCGCATAGTCTTC-3'	5'-TTAGCCTGCTACTTACAGTGATA-3'

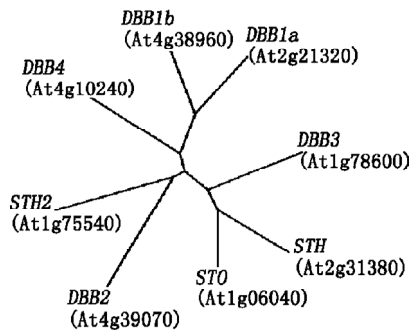


图1 锌指蛋白DBB亚家族的聚类分析
Fig.1 Cluster analysis of DBB subfamily

2 不同光质光 and 不同光周期下DBB家族基因的表达

为了了解不同光质光和不同光周期下DBB家族的转录表达,通过Genevestigator网站得到的结果显示, *DBB1a*、*DBB3*、*STO* 和 *STH* 的表达受光诱导,而 *DBB2*、*DBB4* 和 *STH2* 的表达受光抑制,只有 *DBB1b* 在光处理后的表达无明显变化,并且在各种光质光下的各个基因的表达变化趋势相同(图2);通过 Diurnal 网站搜索的结果显示,长日照和短日照条件下 *DBB1a*、*DBB1b*、*DBB2*、*DBB3*、

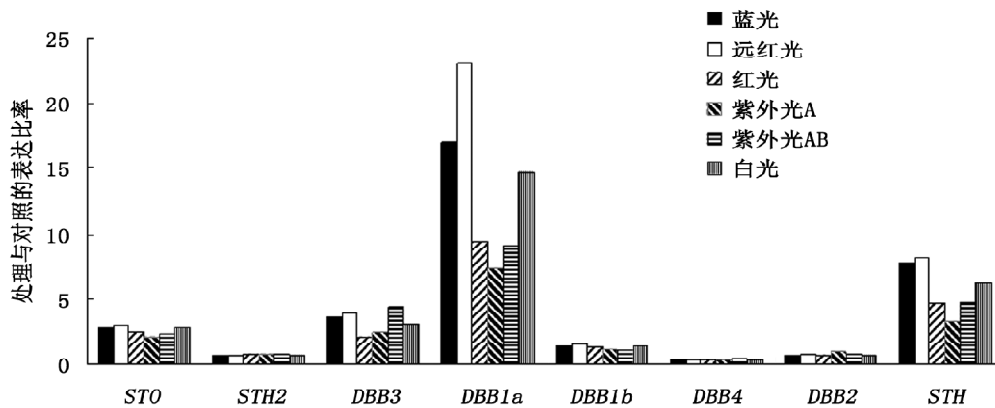


图2 不同光对DBB基因亚族基因转录的影响

Fig.2 Graphic analysis of transcript levels of DBB subfamily under different lights

结果为不同光质光处理与黑暗条件表达量的比率。这些微阵列结果来自 Genevestigator 数据库(<http://www.genevestigator.ethz.ch/>)。

STO 和 *STH* 这6个基因均表现出生物钟节律。

3 不同光周期下DBB家族基因节律表达的实时荧光定量PCR检测

为了验证生物芯片的结果,提取长日照和短日照下培养的拟南芥中的RNA,实时荧光定量PCR检测的结果显示,实时荧光定量PCR的结果与生物芯片的结果相似度较高,长短日照培养条件下

DBB1a、*DBB1b*、*DBB2*、*DBB3*、*STO* 和 *STH* 这6基因的转录表达都具有节律性,但是各个基因的表达量峰值不完全相同,其中光照后14h与长短日照下 *DBB2* 的表达量峰值不在同一个时间点,其余的5个基因均集中在光照后的前6h,并且长短日照下同一基因的表达量峰值均在同一个时间点(图3)。

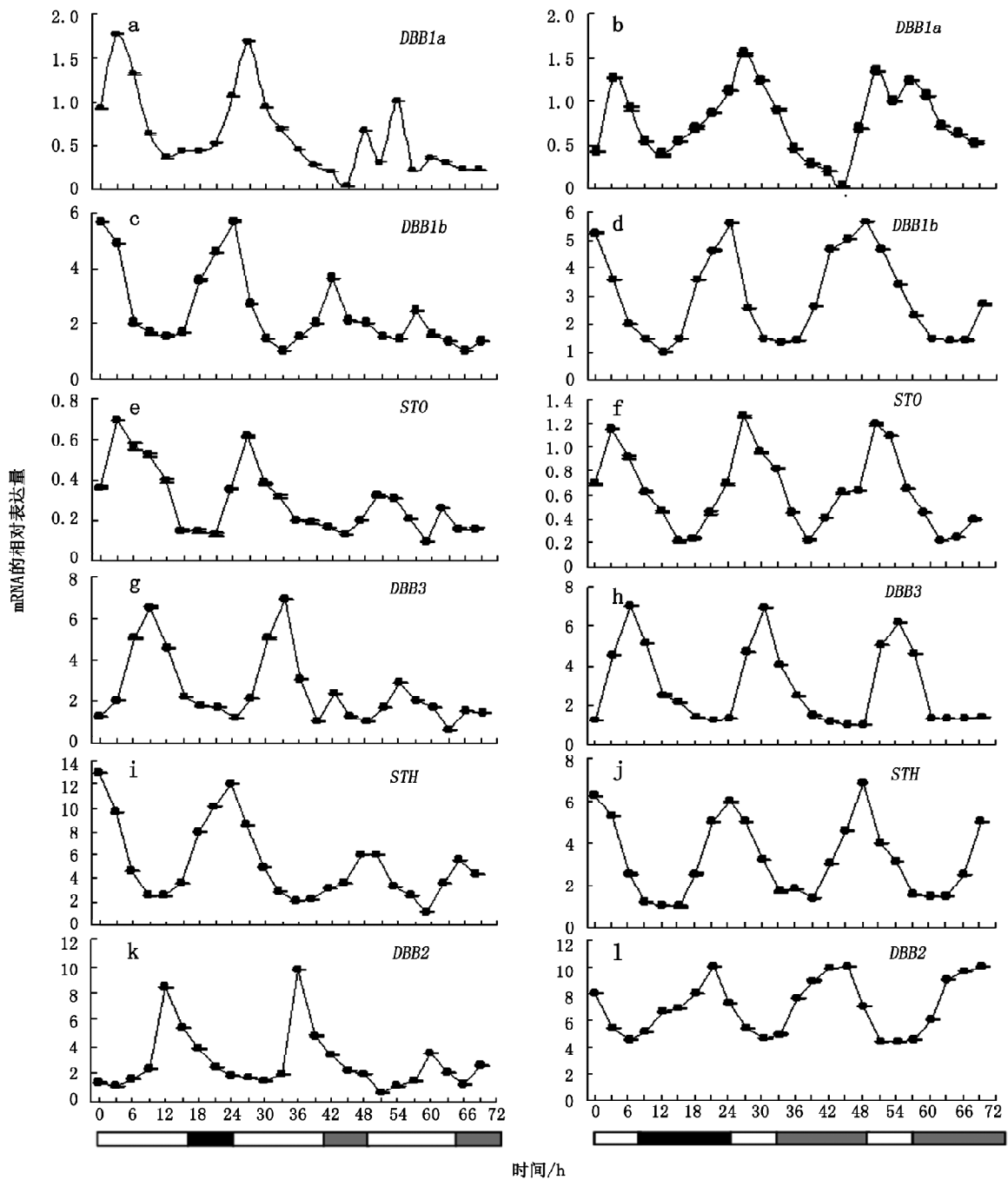


图3 长、短日照下DBB亚家族基因表达的定量PCR检测

Fig.3 Q-PCR analysis of expression of DBB subfamily genes under LD and SD day

图中a、c、e、g、i和k分别是在长日照下DBB1a、DBB1b、STO、DBB3、STH和DBB2的mRNA表达情况；b、d、f、h、j和l分别是在短日照下DBB1a、DBB1b、STO、DBB3、STH和DBB2的mRNA表达情况。图下白色/黑色棒代表光/暗周期，白色/灰色棒代表连续光照。将第一天光照时开始取样的时间点定位0h。

4 不同光质培养条件下DBB家族基因节律表达的实时荧光定量PCR检测

光照是植物维持生物钟节律的重要因素 (Somers 等 1998), 通过实时荧光定量PCR检测不

同光质光下培养的具有生物节律的DBB亚家族的6个基因表达的结果与Genevestigator芯片的结果基本相似。图4结果显示, 具有生物节律性的DBB家族基因的转录表达受光调控的状态不同, 其中

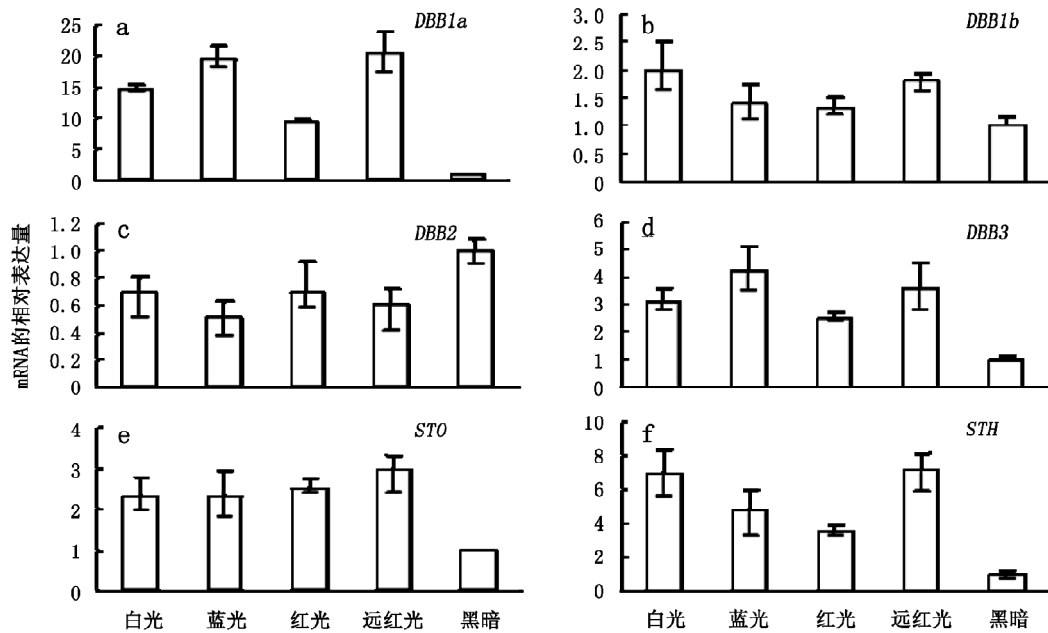


图4 不同光质光下 DBB 亚家族基因表达的定量 PCR 检测

Fig.4 Q-PCR analysis of mRNA expression of DBB subfamily genes under various lights

DBB1a、*DBB3*、*STO* 和 *STH* 受光的诱导, *DBB1a* 受光诱导的幅度最大; *DBB2* 受光的抑制; *DBB1b* 不受光调控; 这些结果也表明, 不同光质光对基因表达的影响不大, 它们的变化趋势都相同。

结合基因家族的聚类分析, 可以看到具有较高蛋白同源性的 DBB 家族基因受光调控的转录表达变化并不完全一致, 如 *DBB1a* 和 *DBB1b*, 可能与两者分别受不同转录因子转录有关。在不同的光照周期下, 各个基因的表达量峰值也不完全相同, 这可能是该家族基因在生物体内的生物钟信号传递过程中的功能不同。从 ExpressionBrowser 网站的结果显示, DBB 亚家族中 *DBB1a*、*DBB1b*、*DBB3*、*STO* 和 *STH* 这 5 个基因参与调控光信号传导途径中的 *HY5*、*COPI* 和 *CHS*, 以及生物钟信号途径中的 *CCA1*、*LHY*、*ELF3*、*TOC1* 等关键基因表达, 此外, DBB 亚家族内部的各个基因之间也有相互调控关系。根据这些结果可以推测 DBB 亚家族中有多个基因参与光调控的生物钟节律信号传导途径。

在今后的研究中, 我们将对该家族基因进行系统的遗传学分析, 确定各个基因突变体的表型和筛选各个单基因突变体杂交后的多基因突变体, 并从蛋白表达水平上确定该家族基因的表达情况, 从而深入了解该家族基因的生物功能, 特别是在光信

号传导途径中的作用, 并寻找与这些基因相互作用的蛋白, 从而进一步了解光信号传导途径, 以实现用光信号途径中的分子原件运用于调节植物生长发育的目的。

参考文献

- 李妍, 赵小英, 郭明, 李旭, 黄绿红, 唐冬英, 郭新红, 刘选明(2008). *GA2ox8* 基因过量表达诱导蓝光下拟南芥光形态建成. 植物生理学通讯, 44 (3): 421~425
- Chang CJ, Li YH, Chen LT, Chen WC, Hsieh WP, Shin J, Choi G, Hu JM (2008). *LZF1*, a *HY5*-regulated transcriptional factor, functions in *Arabidopsis* de-etiolation. *Plant J*, 54: 205~219
- Datta S, Hettiarachchi C, Johansson H, Holm M (2007). *SALT TOLERANCE HOMOLOG2*, a B-box protein in *Arabidopsis* that activates transcription and positively regulates light-mediated development. *Plant Cell*, 19: 3242~3255
- Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Irigoyen ML, Desai M, Rubio V, Holm M (2008). *LZF1/SALT TOLERANCE HOMOLOG3*, an *Arabidopsis* B-box protein involved in light-dependent development and gene expression, undergoes *COPI*-mediated ubiquitination. *Plant Cell*, 20: 2324~2328
- Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, Rodriguez-Franco M (2007). Salt tolerance (*STO*), a stress-related protein, has a major role in light signaling. *Plant J*, 51 (4): 563~574
- Klug A, Schwabe JW (1995). Protein motifs 5. zinc fingers. *FASEB J*, 9: 597~604
- Kumagai T, Ito S, Nakamichi N, Niwa Y, Murakami M, Yamashino T, Mizuno T (2008). The common function of a novel subfamily of B-box zinc finger proteins with reference to

- circadian-associated events in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (6): 1539~1549
- Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11: 39~46
- Mackay JP, Crossley M (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci*, 23: 1~4
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80: 847~857
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR et al (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105~2110
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J*, 28: 619~631
- Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc – finger-like proteins. *Trends Genet*, 10: 315~320
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 282: 1488~1490
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, 303: 1003~1006
- Zhao XY, Yu X, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendehakku KT, Xiang J, Weller JL, Liu X, Reid JB et al (2007). A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiol*, 145: 106~118