

小黑杨环锌指蛋白基因的克隆与表达分析

王雷, 周博如, 吴丽丽, 吕澈妍, 曲跃军, 郑威, 姜廷波*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 用 cDNA-AFLP 技术从小黑杨中克隆与盐胁迫反应相关的 cDNA 片段, 进一步应用 RACE 技术克隆出具有完整开放读码框的小黑杨环锌指蛋白基因(*PsnRZF*), 该基因全长 1 061 bp, 其中 5' 非翻译区为 184 bp, 3' 非翻译区为 82 bp, 开放读码框为 795 bp, 编码 264 个氨基酸, 预测蛋白的分子量为 30.25 kDa, 理论等电点为 8.04。实时定量 PCR 检测的结果显示, 正常生长条件下该基因在根、茎、叶中都表达; NaCl 胁迫下, 该基因在根、茎、叶中的表达量升高。在叶中的表达量随着处理时间的延长而逐渐升高, 胁迫处理后第 6 天表达量达到最高。

关键词: 小黑杨; 环锌指蛋白; RACE; 实时定量 PCR

Cloning and Expression Analysis of a Ring Zinc-Finger Gene in *Populus simonii*×*P. nigra*

WANG Lei, ZHOU Bo-Ru, WU Li-Li, LÜ Che-Yan, QU Yue-Jun, ZHENG Wei, JIANG Ting-Bo*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forest University, Harbin 150040, China

Abstract: For studies of differential gene expression, cDNA-AFLP was applied in *Populus simonii*×*P. nigra* under salt-stress. The 1 061 bp full length cDNA of ring zinc-finger gene was isolated by rapid amplification of cDNA ends (RACE), including a 184 bp 5' untranslated region, an 82 bp 3' untranslated region and a 795 bp open reading frame encoding 264 amino acid residues. The molecular weight of deduced protein was 30.25 kDa with a theoretical pI of 8.04. Real-time PCR revealed that *PsnRZF* gene was expressed in roots, stems and leaves under normal growth, and the expression level was increased under salt-stress. The expression level of *PsnRZF* gene in leaves was increased gradually and the peak value was appeared at the 6th day under NaCl stress.

Key words: *Populus simonii*×*P. nigra*; ring zinc finger; RACE; real-time PCR

锌指蛋白(zinc finger protein, ZF)最早于 1985 年在非洲爪蟾卵母细胞的转录因子中发现(Miller 等 1985), 现已证实其广泛存在于植物、动物和真菌中。锌指蛋白除具有转录因子(如 C2H2 型、C4 型、C6 型)的功能以外, 还参与 mRNA 的成熟剪接和降解。此外, 锌指蛋白(如 C2HC5 型、C4HC3 型、C3HC4 型)还可作为蛋白适配器特异地介导蛋白间的互作(Berg 和 Shi 1996), 在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育和增强植物抗逆性中都有作用。环锌指蛋白(ring zinc finger protein, RZF)最早由 Lovering 等(1993)发现的, 它具有典型的 C3HC4 保守序列, 保守区由 40~60 个氨基酸组成, 富含半胱氨酸和组氨酸, 可结合两个锌原子。由于此蛋白的性质不稳定, 容易聚合, 对其功能的研究尚不深入, 初步研究表明, 此蛋白可与其他蛋白相互作用, 参与信号转导或蛋白质泛素化降解(Borden 2000; Aravind 等 2003)。迄今人们已在水稻(Ma 等 2009)

和巴西橡胶树(Zhu 等 2006)中克隆了 C3HC4 型环锌指蛋白基因。Zeba 等(2009)报道, 大多非生物胁迫因素均可诱导甜椒环锌指蛋白的表达, 将甜椒中的 C3HC4 型环锌指蛋白基因导入烟草后, 转基因植株的生长量明显高于非转基因植株。Schumann 等(2007)的研究表明, 拟南芥中的一种 C3HC4 型环锌指蛋白(PEX10)在光呼吸的过程中也起作用。

小黑杨是小叶杨与欧洲黑杨的杂交种, 1959 年由中国林科院培育, 现在在黄河流域及其以北的广大地区均有栽植。小黑杨生长快, 轻度耐盐碱, 材质细密, 可用于造纸、民用建筑等, 是平原地区绿化和造林树种。小黑杨的研究早期多集中于引种与栽培(刘志明 1988; 朴志勇等 2004), 近些年关注

收稿 2009-09-08 修定 2009-11-30

资助 黑龙江省重点科技攻关项目(GB06B303-5)。

* 通讯作者(E-mail: tbjiang@yahoo.com; Tel: 0451-82190607)。

的热点多集中于采用转基因的技术提高小黑杨抗病性(张福丽 2006)、抗虫性(常玉广 2004; 范海娟等 2006)和耐盐性(刘桂丰等 2006)的研究。本文用 cDNA-AFLP (cDNA amplified fragment length polymorphism) 技术研究 NaCl 胁迫下小黑杨基因的表达, 以及与小黑杨盐应答密切相关的基因, 并以此为基础, 克隆小黑杨环锌指蛋白 (*Populus simonii* × *P. nigra* ring zinc finger protein, PsnRZF) 基因的全长 cDNA, 进一步研究该基因在根、茎、叶中的表达以及 NaCl 胁迫过程中的表达变化, 以供研究小黑杨盐胁迫下基因应答机制和环锌指蛋白的功能时参考。

材料与方法

植物材料为小黑杨 (*Populus simonii* × *P. nigra*)。将从温室中取材的同一无性系小黑杨穗条进行水培, 于人工气候室中培养, 昼/夜温度为 26 °C/22 °C, 光照 16 h·d⁻¹, 光照强度 175 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度约 75%。生长 40 d 左右, 长出新的根和叶片, 将其分成两组, 一组作为对照于正常条件下培养, 另一组用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 进行胁迫处理, 分别在胁迫开始时(第 0 天)和胁迫后的第 1、2、4、6、8 天中取小黑杨的根、茎、叶, 每组重复 3 次, 用蒸馏水清洗, 拭干后置于液氮中, 于 -70 °C 中保存备用。

用 SDS 法(王玉成 2005)分别提取小黑杨根、茎、叶中的 RNA, 按照 Reverse Transcriptase M-MLV 进行反转录。胁迫处理后第 2 天小黑杨的 RNA 按照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit (大连宝生物工程有限公司)合成双链 cDNA 后, 进行 cDNA-AFLP 和差异条带的扣除, 方法见 LI-COR 4300 AFLP Expression Analysis Kit。

扣除的差异条带回收后重新进行选择扩增, PCR 产物纯化后与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 在含有 Amp/IPTG/X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆进行 PCR 检测后, 送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序结果进行 Blast 比对。

采用 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) 方法对盐胁迫下小黑杨差异 cDNA 片段 88 号进行 5' 和 3' 克隆。用 SYBR Premix ExTaq 试剂盒(购于大连宝生物工程有限公司)进行实时定量 PCR

(Real-time PCR) (黄留玉 2005; Wang 等 2006), 所得数据利用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析 Duncan 检验(林杰斌等 2002)。

结果与讨论

1 NaCl 胁迫下的小黑杨 cDNA-AFLP 分析

采用 64 对引物组合进行叶片 cDNA-AFLP 分析的结果(图 1)表明: 从 LI-COR4300 检测的图像上可以看到, 共获得 4 407 条片段, 其中差异片段 2 027 条, 随机挑选 145 条差异片段进行回收和二次扩增, 其中成功扩增、克隆和测序的有 96 条。Blast-X 比对结果表明, 与已知基因同源的片段有 72 条, 占测序数的 75%; 编码未知功能蛋白的基因有 14 条, 约占测序数的 14.6%; 另有 10 条片段与已知基因或序列无任何同源性, 约占测序数的 10.4%。图 1 箭头所指为第 88 号差异片段, 引物组合为 T2M1 (T-TG/M-CT)。

2 小黑杨环锌指蛋白基因全长 cDNA 的克隆

在所获得的差异片段中, 88 号差异片段长度为 326 bp, 经 Blast 比对发现, 该片段具有典型的环锌指蛋白保守序列, 将含此片段的基因命名为 *PsnRZF* 基因, 对此 cDNA 片段设计特异引物, 分别采用 5'/3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 的方法扩增 *PsnRZF* 基因的 5'/3' 端, 3' RACE 得到一条 630 bp 的条带(图 2), 5' RACE 得到一条 404 bp 的片段(图 3)。

3 小黑杨环锌指蛋白的基因及其推导编码蛋白的生物信息学分析

经电子拼接获得带有 PolyA 的全长 cDNA 序列为 1 061 bp (图 4)。采用 NCBI 中的 ORF 程序显示 5' 非翻译区为 184 bp, 3' 非翻译区为 82 bp, 开放读码框为 795 bp, 编码 264 个氨基酸。

经过 ProtParam 计算 *PsnRZF* 基因编码的蛋白质分子量为 30.25 kDa, 理论等电点为 8.04, 此基因编码的 264 个氨基酸中 Leu 最多, 占氨基酸总数的 10.6%。带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)有 26 个, 带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)共有 28 个。不稳定系数为 47.18, 该蛋白是不稳定蛋白。SignalP3.0 预测该蛋白没有信号肽, 为非分泌型蛋白。用 NCBI 的保守功能区域(conserved domains)分析程序预测基因的保守区, 结果表明该基因为环锌指蛋白超家族基因, 保守区位于第 58~104 氨基酸之间。经

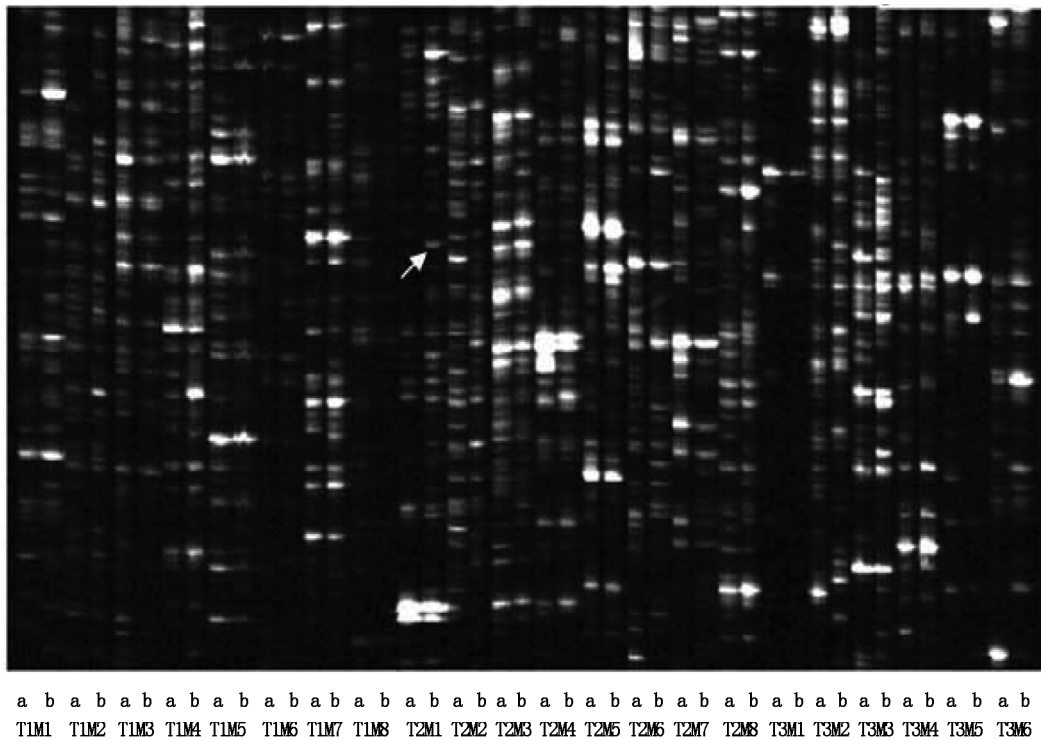


图1 NaCl胁迫下的小黑杨cDNA-AFLP分析

Fig.1 cDNA-AFLP analysis of *P. simonii* × *P. nigra* under NaCl stress

T/M 为不同的引物组合; a 和 b 分别为小黑杨对照组和处理组叶片; 箭头所指为第 88 号差异片段(T2M1)。

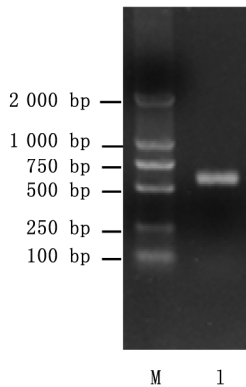


图2 *PsnRZF* 3' RACE 扩增产物

Fig.2 3' RACE product of *PsnRZF* cDNA

M: DL2000 分子量标准; 1: 3' RACE 扩增产物。

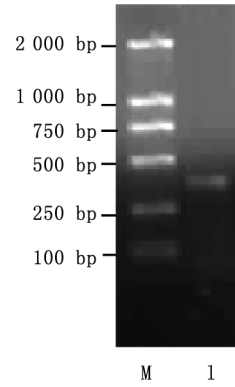


图3 *PsnRZF* 5' RACE 扩增产物

Fig.3 5' RACE product of *PsnRZF* cDNA

M: DL2000 分子量标准; 1: 5' RACE 扩增产物。

Motif Scan 程序分析此蛋白具有 6 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site)、4 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site)、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)和 2 个 N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site)。PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>)亚细胞定位预测的结

果显示: 小黑杨环锌指蛋白定位于质膜的可信度为 0.6, 定位于高尔基体的可信度为 0.4, 定位于叶绿体类囊体膜的可信度为 0.385, 定位于内质网膜的可信度为 0.3。通过 TMHMM Service 2.0 预测该蛋白第 1~169 氨基酸和第 222~264 氨基酸在膜的内部, 第 170~189 氨基酸和第 199~221 氨基酸为跨膜

	1 G GGG ACT GCG AGA AAA GAG GGA	22
23	GGT GGT CTT CCT TGT CTG CTG AAA GGA AGG AGC TTT TTT AAT GTA CAT GAT TTT	76
77	TTA TTT CAA GGG GAC TAT AGT GGA GAA GAA CAG CTT GGT TTT GGG CTT GGA GTT	130
131	CCT GAA CAT TGA TTG AGA TTT CAT CAA TTG TTG GCT GTC TTT GAG AAT TGG AGG	184
185	ATG GGG GAT CAC TTT GTA TTG CTG GTG AAT CGT TTG ATA ACT GAA TCC ACC TTG	238
	M G D H F V L L V N R L I T E S T L	
239	GAA GCT GCA ATT GAG AGC AGA AAC CTG TCG ATG CAA GCC ACA GCG TCT GAC ACA	292
	E A A I E S R N L S M Q A T A S D T	
293	AAA ATT GAT AAA TCT TTC CAG AAA CTG GAT TTT GGG GAT ATA TCA ACT CCG AGA	346
	K I D K S F Q K L D F G D I S T P R	
347	AAA TTG GTG GAG TGC AGG ATA TGC CAG GAT GAG GAT GAA GAT TCT AAT ATG GAG	400
	K L V E C R I C Q D E D E D S N M E	
401	ACA CCA TGT TCT TGT TGT GTT AGT TTG AAG TAT GCT CAT GCG AGG TGT ATA CAG	454
	T P C S C C G S L K Y A H R R C I Q	
455	AGG TGG TGT AAT GAG AAG GGT AAC ACT ATA TGT GAG ATA TGC CTC CAG GAG TTC	508
	R W C N E K G N T I C E I C I L Q E F	
509	AAG CCT GGT TAT ACA GCA CCA CCA CCC CTG TTC CAA ATT GGG TTT CCA ATG AAC	562
	K P G Y T A P P P L F Q I G F P M N	
563	TTT AGG GGA AAT TGG GAG ACG TCT AGA AGG AAG TTA AAT GGT CCT CGC TTC ATA	616
	F R G N W E T S R R K L N G P R F I	
617	GCA GTG GTC TCA TCT GAA CAT AAC TTC CTG AAT ACT GAC TAT TAT GAG TAT TCA	670
	A V V S S E H N F L N T D Y Y E Y S	
671	GCT TCA ACT ACA AGA AAC ACA ATC TAC TGT CGC TTG ATT GCT GTG ATT TTC ATG	724
	A S T T R N T I Y C R L I A V I F M	
725	GTT CTT TTA ATT CTA AGG CAC ACT CTT CTT CTC ATT CTT AAT GGA ACC AAC AAC	778
	V L L I L R H T L P L I L N G T N N	
779	ATC TCA TTC CCA GTG TTT ATG TTG TTA TTT CTA CGA ATT GCT GGG ATT ATT CTT	832
	I S F P V F M L L F L R I A G I I L	
833	CCA ATC TAT GTC ATG TTA AAA GCA CTA ACT GCT CTC CAG CGT CGC CGC CTC CAT	886
	P I Y V M L K A L T A L Q R R R L H	
887	CAG GCG CCT CCA AAT TCA TCA ATT CAT TCA TAT GAT GAA GAT GCT GAG CAT TCA	940
	Q A P P N S S I H S Y D E D A E H S	
941	ACC CTG CAG CCT CGG CCA CAT ATA ATA AAT GTT CAT TAG ACT CCG CCA ATC GTC	994
	T L Q P R P H I I N V H *	
995	AAG TTA CTA TTT TGT TTC AAG ATA GAT GGA GAT ACT TTC ATT GTC AAC TGT AAA	1 048
1 049	AAA AAA AAA AAA A	

图4 小黑杨 *PsnRZF* 基因 cDNA 核苷酸序列及其推测的氨基酸序列Fig.4 The nucleotide and deduced amino acid sequence of *PsnRZF* cDNA from *P. simonii* × *P. nigra*

区, 第190~198位氨基酸暴露于膜外, 在其跨膜区和膜外区存在着糖基化位点, 膜内部区域含有酪氨

酸激酶II磷酸化位点和蛋白激酶C磷酸化位点, 这些位点都与信号转导密切相关。

锌指蛋白种类繁多,根据与锌离子结合的保守性氨基酸残基 Cys 和 His 的不同组合,人们把锌指结构分为 C2H2、C4、C6、C4HC3、C3HC4、C2HC、C3H以及联合型等多种类型(Gamsjaeger等2007)。BlastP 比对表明小黑杨环锌指蛋白与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) C3HC4 型环锌指蛋白(NP_671763)同源率为 73%,与蓖麻(*Ricinus communis*, XP_002534507)、玉米(*Zea mays*,

NP_001148808)、水稻(*Oryza sativa*, BAD87554)环锌指蛋白的同源性分别为 78%、57%、52% (图5)。用 ClustalX1.83 构建锌指蛋白系统进化树,从图6构建的进化树中也可看到,小黑杨环锌指蛋白与拟南芥、蓖麻 C3HC4 型环锌指蛋白亲缘关系较近,与拟南芥其他类型锌指蛋白的亲缘关系较远,推测小黑杨 *PsnRZF* 基因编码的蛋白质可能为 C3HC4 型环锌指蛋白。

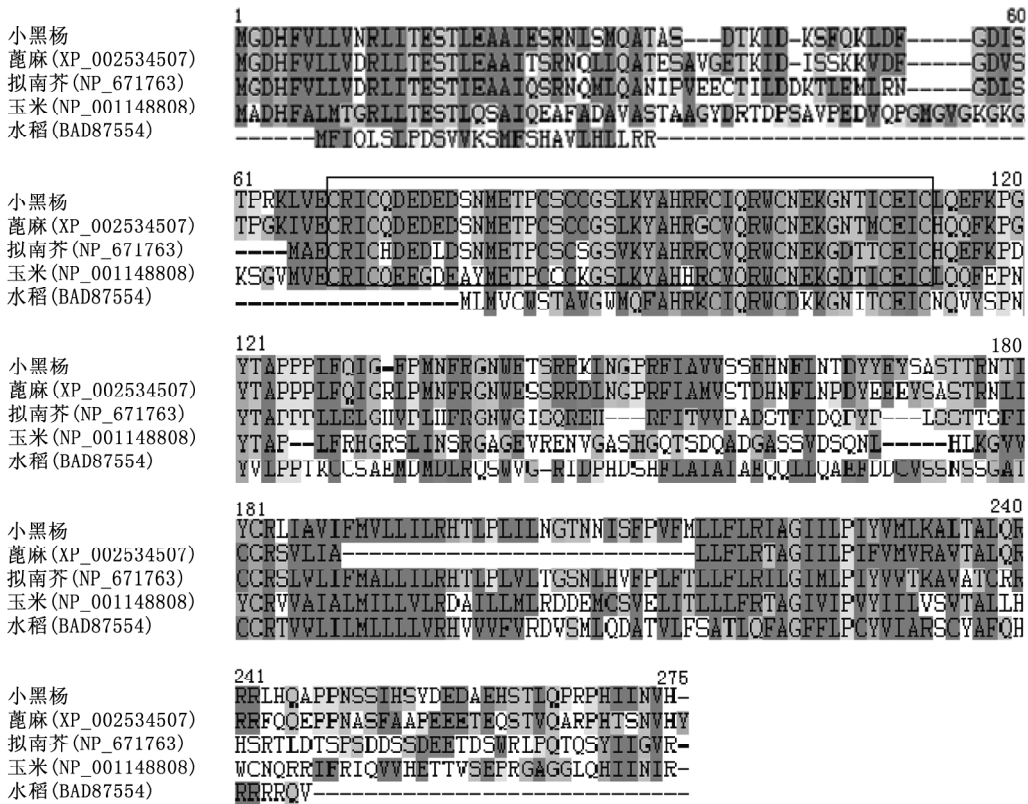


图5 小黑杨环锌指蛋白与其他植物环锌指蛋白的序列比较

Fig.5 Alignment of the amino acid sequences of RZF protein between *P. simonii* × *P. nigra* and other plants

图中黑框区域为环锌指蛋白的保守区。

4 NaCl胁迫下小黑杨环锌指蛋白基因的表达分析

为研究小黑杨环锌指蛋白基因在盐胁迫下的应答,用 Real-time PCR 检测 NaCl 胁迫前后 *PsnRZF* 基因在根、茎、叶中表达的结果(图7)表明:在正常生长状态下, *PsnRZF* 基因在根、茎、叶中均表达。在 NaCl 胁迫条件下, *PsnRZF* 基因表达量在根、茎、叶中均升高,在根中表达量变化并不显著,随着胁迫时间的延长, *PsnRZF* 基因在茎和叶中的表达量逐渐升高。此基因在叶中表达量的变化

最为明显,在胁迫后第2和4天显著高于对照($P < 0.05$),在胁迫后的第6天,此基因的相对表达量达到最高,极显著地高于对照($P < 0.01$)。胁迫后的第4、6、8天, *PsnRZF* 基因在茎中的相对表达量显著高于对照($P < 0.05$)。

小黑杨 *PsnRZF* 基因在不同器官中表达量变化存在差异,这可能是由于此基因编码的环锌指蛋白参与的很多生理反应主要是在叶中进行,如光呼吸(Schumann等2007),所以 *PsnRZF* 基因在叶中的

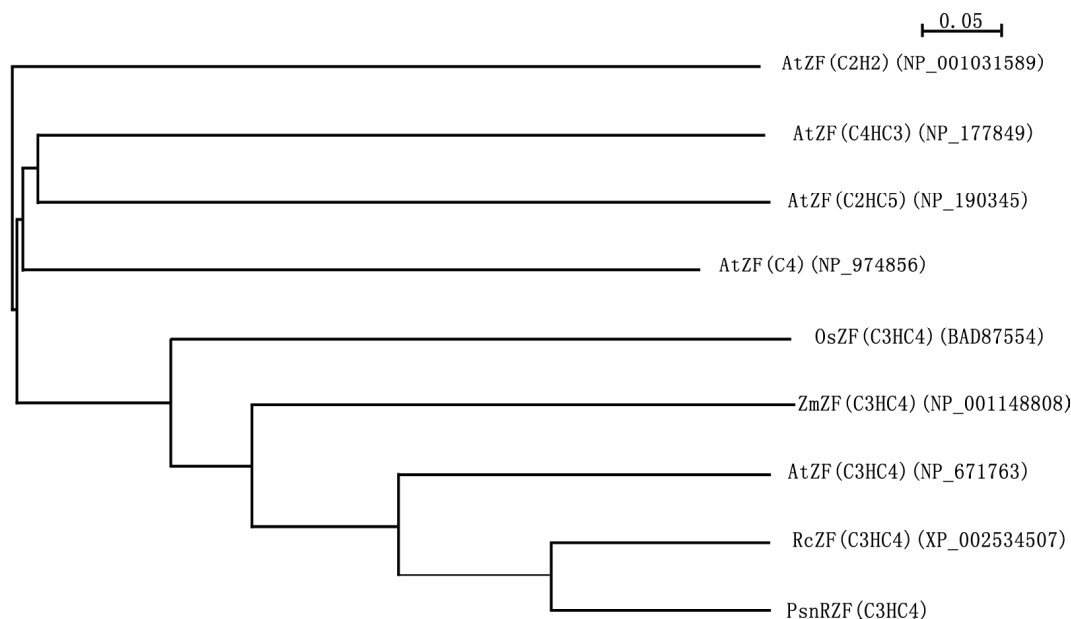
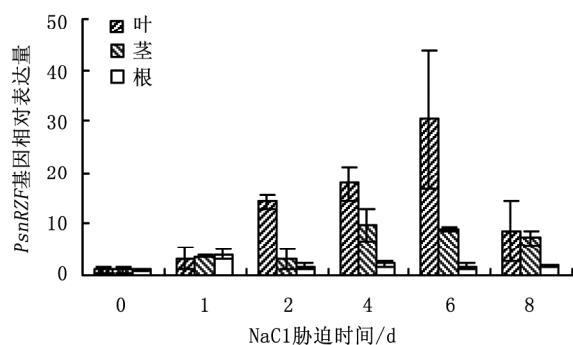


图6 锌指蛋白的进化树

Fig.6 The phylogenetic tree of ZF

图7 NaCl胁迫下小黑杨 *PsnRZF* 基因在根、茎、叶中的表达Fig.7 The expression levels of *PsnRZF* gene in roots, stems and leaves under NaCl stress

表达量变化最为明显。随着NaCl胁迫时间的延长, *PsnRZF* 基因的表达量也随之升高, 说明盐胁迫影响了该基因的表达, *PsnRZF*可能在盐胁迫应答过程中发挥作用。植物在逆境胁迫时, 体内会积累很多物质, 如信号分子ABA, 有研究表明环锌指蛋白可能参与ABA介导的信号转导过程(Ma等2009)。随着盐胁迫时间的延长, 体内信号分子不断积累, *PsnRZF*基因表达量升高, 作为信号受体的*PsnRZF*数目增多, *PsnRZF*作为信号受体与信号分子互做, 从而调控盐应答基因的表达。但小黑杨环锌指蛋

白(*PsnRZF*)与哪类信号分子互作, 以及这种互作调控哪些基因的表达都有待进一步研究。

参考文献

- 常玉广(2004). 小黑杨花粉植株转抗虫基因的研究[硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 范海娟, 胡春祥, 王志英, 刘桂丰(2006). 转蜘蛛杀虫肽与Bt毒蛋白C肽基因小黑杨对杨扇舟蛾的抗性. 昆虫学报, 49 (5): 780~785
- 黄留玉(2005). PCR最新技术原理、方法及应用. 北京: 化学工业出版社, 131~157
- 林杰斌, 陈湘, 刘明德(2002). SPSS11.0统计分析实务设计宝典. 北京: 中国铁道出版社, 245~248
- 刘桂丰, 杨传平, 蔡智军, 程贵兰, 詹立平(2006). 转*betA*基因小黑杨的耐盐性分析及优良转基因株系的选择. 林业科学, 42 (7): 33~36
- 刘志明(1988). 农田防护林主要树种小黑杨生长规律的研究. 林业科技, 5: 14~16
- 朴志勇, 赵存玉, 王晓娟, 唐翠, 朴志焕, 梁淑娟(2004). 小黑杨引种及山地速生丰产栽培技术. 东北林业大学学报, 32 (4): 9~11
- 王玉成(2005). 桤柳抗逆分子机理研究与相关基因的克隆[博士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 张福丽(2006). 小黑杨抗真菌病的研究[硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- Aravind L, Lyer LM, Koonin EV (2003). Scores of RINGs but No PHDs in ubiquitin signaling. Cell Cycle, 2 (2): 123~126
- Berg JM, Shi YG (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. Science, 271: 1081~1085
- Borden KLB (2000). RING domains: master builders of molecular

- scaffolds? *J Mol Biol*, 295: 1103~1112
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci*, 32 (2): 63~70
- Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 2112~2116
- Ma K, Xiao JH, Li XH, Zhang QF, Lian XM (2009). Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger gene family in rice. *Gene*, 444: 33~45
- Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 4 (6): 1609~1614
- Schumann U, Prestele J, O'Geen H, Brueggeman R, Wanner G, Gietl C (2007). Requirement of the C3HC4 zinc RING finger of the *Arabidopsis* *PEX10* for photorespiration and leaf peroxisome contact with chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (3): 1069~1074
- Wang YM, Zhu W, Levy DE (2006). Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods*, 39: 356~362
- Zeba N, Isbat M, Kwon NJ, Lee MO, Kim SR, Hong CB (2009). Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco. *Planta*, 229: 861~871
- Zhu JH, Liu HL, Tu FZ, Tian WM, Peng SQ (2006). Cloning and molecular characterization of a RING zinc finger gene of *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 32 (6): 627~633