

四翅滨藜 *AcERF1* 基因的克隆及其在酵母中的抗逆分析

孙新华^{**}, 李敬涛^{**}, 刘言志, 贾承国, 潘洪玉^{*}

吉林大学植物科学学院, 长春130062

摘要: ERF (ethylene responsive factor) 转录因子是植物 AP2/ERF 超家族转录因子中一个重要的亚家族, 其 DNA 结合域可与多种病程相关基因启动子区的 GCC-box 特异性结合, 从而激发植物的抗逆应答反应。本研究通过筛选四翅滨藜 (*Atriplex canescens*) cDNA 文库, 获得一个 ERF 的全长 cDNA 序列, 命名为 *AcERF1* (Genbank 序列号为 JN984931), *AcERF1* 基因开放阅读框为 1 161 bp, 编码 387 个氨基酸, 其编码蛋白 N 端含有一个保守的类 MCGGAI (I/L) 基元。为了研究 *AcERF1* 基因的抗逆功能, 将其转入酵母进行盐、碱、干旱、高温、冷冻和活性氧等胁迫, 结果表明, 重组酵母在多种胁迫下的抗逆水平明显高于对照, 特别对高温、强碱和活性氧表现出明显抗性。推测该基因参与了四翅滨藜的抗逆调控过程。

关键词: 四翅滨藜; 酵母表达; *AcERF1*; 抗逆

Cloning and Functional Characterization of An *AcERF1* Gene from *Atriplex canescens*

SUN Xin-Hua^{**}, LI Jing-Tao^{**}, LIU Yan-Zhi, JIA Cheng-Guo, PAN Hong-Yu^{*}

College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: The ethylene responsive factors (ERF) belong to a subfamily of the AP2/ERF superfamily in plants. The ERF subfamily were shown to specifically bind the GCC-box presented in many promoters of pathogenesis related protein (PR) genes, and implicated in various responses to environmental stimuli. In this study, a new member (*AcERF1*) of ERF subfamily was isolated from an *Atriplex canescens* cDNA library. The *AcERF1* contains an open reading frame of 1 161 bp which encodes a protein of 387 amino acid residues with a conserved N-terminal MCGGAI (I/L) -like motif. To investigate its function associated with abiotic and biotic stress, *AcERF1* was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 and treated with saline, alkali, drought, high temperature, freezing, as well as paraquat, heterologous expression of *AcERF1* in transgenic yeast showed a relatively higher stress resistance, particularly in high temperature, alkali and paraquat conditions when compared with control. These results indicated that *AcERF1* may involve in response to environmental stress and exhibit multiple, complex and flexible expression patterns in *A. canescens*.

Key words: *Atriplex canescens*; yeast expression; *AcERF1*; stress tolerance

四翅滨藜 (*Atriplex canescens*) 又称灰毛滨藜, 属藜科滨藜属, 是世界干旱、半干旱地区的典型植物, 有极强的耐干旱、低温、盐、碱等优良特性。适生范围广泛, 可作为优良的的盐碱地改良品种。在盐条件下, 它能将吸收的盐分积累到叶片表面形成一层白色屑状物体, 从而提高对高盐的抗性。四翅滨藜营养丰富, 体内胡萝卜素含量较高, 植株平均粗蛋白含量为 4%, 叶片的粗蛋白含量可高达 18%, 可以作为大部分牲畜的牧草, 特别是在冬天为牲畜提供饲料, 是非常有潜力和应用价值的牧草。目前, 四翅滨藜因其可作为荒漠改良的绿化植被而受广泛关注, 但抗逆相关的分子机制研究较少, 主要集中在基因克隆及转入酵母

进行相关功能验证等方面(李敬涛等 2012; 余刚等 2012; 张勇等 2012)。

AP2/ERF 超家族转录因子是植物中广泛分布的一大类转录因子, 其结构特征是含有由 50~60 个氨基酸编码的 AP2 结构域, 该结构域通过与多种基因启动子区的 DRE/CRT 元件 (DRE: dehydration-responsive element; CRT: C repeat; 上述 2 个元件均

收稿 2013-05-14 修定 2013-07-07

资助 吉林省玉米产业技术体系(201203-1)和国家科技支撑计划项目(2012BAD19B04)。

** 共同第一作者。

* 通讯作者 (E-mail: panhongyu@jlu.edu.cn; Tel: 0431-85167420)。

包含保守序列CCGAC)或GCC-box特异结合而调控下游相关基因的表达进而参与植物信号转导,最终调控植物生长发育及胁迫应答过程(Nakano等2006)。根据AP2保守功能域的数量,AP2/ERF可以分成三大类:第一类AP2 (APETALA2),含有2个AP2/ERF结合域;第二类RAV,含有1个AP2/ERF结合域和1个B3结合域;第三类ERF,只含有1个AP2/ERF结合域。根据AP2/ERF结合域的序列相似性,ERF家族成员可分为ERF亚家族、DREB亚家族和其他三个亚家族。其中ERF亚家族和DREB亚家族又被分别分成了B-1~B-6和A-1~A-6六个亚类。ERF亚家族和DREB亚家族在AP2保守功能域的第14位和第19位氨基酸存在差异,ERF亚族AP2/ERF功能域的第14位和第19位分别是丙氨酸和天冬氨酸,DREB亚族分别是缬氨酸和谷氨酸,这2个氨基酸位点的差异性决定了它们分别与不同的顺式元件结合,即ERF和DREB转录因子参与不同的信号转导途径(Sakuma等2002; Junya等2012)。ERF转录因子的DNA结合域可以和多种病程相关蛋白(pathogenesis related protein)基因启动子区的GCC-box结合从而调控下游基因的表达(Ohme-Takagi和Shinshi 1995)。研究表明ERF基因编码的多功能转录因子通过参与信号转导途径响应多种逆境胁迫,其主要参与调控乙烯信号通路,同时调节水杨酸、茉莉酸、脱落酸、病原菌、低温、干旱及盐害等的分子应答。目前,ERF基因是备受关注的提高作物非生物抗性和生物抗性的候选基因。将ERF转录因子基因转入植物进行过表达,明显提高了转基因植物对多种病原菌的抗性(见Xu等2011的综述)。Gao等(2008)将番茄中的*TERF1*基因转入水稻后,增强了水稻对干旱和高盐的抗性。Zhang等(2009)在烟草中过表达大豆*GmERF3*基因,提高了转基因烟草对盐、干旱及病原菌的抗性。

然而,在目前众多的研究中还没有关于四翅滨藜ERF类转录因子功能研究的相关报道。本研究采用盐生灌木植物四翅滨藜作为研究材料,构建低温(-10 °C)和盐(400 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫下四翅滨藜的全长cDNA文库,通过Gateway技术LR重组到酵母表达载体pYES-DEST52中,对文库质粒进行测序和生物信息学分析后得到*AcERF1*,将

pYES-*AcERF1*转化酵母菌株INVSc1,模拟多种逆境胁迫(盐碱、冻害、高温、SOS胁迫、干旱胁迫)分析*AcERF1*基因的抗逆功能。为*AcERF1*作为植物抗逆基因工程候选基因提供依据,也为四翅滨藜耐生物胁迫和碱、高温等非生物胁迫的分子机制研究提供依据。

材料与方法

1 材料

四翅滨藜(*Atriplex canescens*) cDNA文库大肠杆菌菌株DH10B由本实验室构建并保存;大肠杆菌*E. coli* DH5 α 由本实验室提供;酿酒酵母菌株INVSc1与表达载体pYES-DEST52购自Invitrogen公司;限制性内切酶购自TaKaRa公司。

2 方法

2.1 四翅滨藜*AcERF1*基因全长cDNA的获得及序列分析

以四翅滨藜作为研究材料,通过低温(-10 °C)和盐(400 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫处理,构建全长cDNA文库,通过Gateway技术LR重组到酵母表达载体pYES-DEST52。以载体pYES-DEST52上游引物T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、下游引物R (5'-AGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTC-3')为测序引物,将片段长度超过1 000 bp的文库克隆测序,获得一个四翅滨藜编码AP2/ERF功能域的EST序列。

2.2 *AcERF1*基因转化酵母及检测

运用醋酸锂法转化酿酒酵母INVSc1,分别将质粒pYES-*AcERF1*和空质粒pYES-DEST52转化酵母,涂布在SC-Ura+2%葡萄糖筛选培养基上,以未转化的酵母做对照,30 °C培养2 d后随机挑取单克隆于液体培养基中摇培24 h,把菌液煮沸6 min,冰上放置6 min破碎细胞,以引物T7和R进行PCR验证。

2.3 重组酵母胁迫处理

挑取验证正确的INVSc1 (pYES-*AcERF1*)和INVSc1 (pYES-DEST52)酵母菌液,进行盐胁迫处理(5 mol·L⁻¹ NaCl和4 mol·L⁻¹ KCl)、碱胁迫处理(6%、8% Na₂CO₃和6%、8% NaHCO₃溶液)、干旱胁迫处理(40% PEG 6000和5 mol·L⁻¹山梨醇)、低温胁迫(-20 °C)处理、高温胁迫(53 °C)处理以及

活性氧胁迫处理(4 mmol·L⁻¹百草枯)。每组实验重复3次,详细的实验方法参阅李敬涛等(2012)。

实验结果

1 *AcERF1*基因全长cDNA的获得及序列分析

经测序,获得一个编码四翅滨藜ERF转录因子的cDNA序列,命名为*AcERF1*。序列分析表明*AcERF1*基因由1 576 bp组成,含有一个1 161 bp完整的开放阅读框(open reading frame),同时还提供5'-UTR和3'-UTR序列,开放阅读框的起始密码子为ATG,终止密码子为TAA。在ExPASy网站(<http://us.expasy.org/tools/pitool.htm>)对其编码的氨基酸序列进行分析,表明其由387个氨基酸残基组成,其中含有88个疏水氨基酸,298个亲水氨基酸,亲水性极强;45个碱性氨基酸,60个酸性氨基酸,蛋白质分子量为42.7 kDa,等电点为4.61。运用DNA MAN软件预测,不含信号肽。用蛋白亚细胞定位预测软件WoLF PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>)在线预测*AcERF1*蛋白定位在细胞核中。

利用Pfam (<http://pfam.janelia.org/>)及NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)对*AcERF1*蛋白序列进行比对分析:该蛋白含有一个由57个氨基酸编码的AP2/ERF结构域,其第14位和第19位氨基酸残基分别为A和D,说明此基因编码典型的ERF亚家族转录因子(图1)。利用BioEdit和ClustalW程序对5种不同植物的ERF基因所编码的蛋白质进行多序列比对分析,结果表明该蛋白与其他物种ERF转录因子的AP2/ERF结构域高度保守,其N端含有的序列MCGGAVI,与第四类ERF蛋白特有的N-端基元MCGGAIL高度相似(图1)。将*AcERF1*与已确定功能的其他物种的AP2/ERF氨基酸序列进行进化分析和同源性分析,并用ClustalX和MEGA4软件绘制进化树,结果表明*AcERF1*与华北驼绒藜*CeERF1*编码的蛋白同源性较高,为75%(图2)。

2 转*AcERF1*基因重组酵母的鉴定与抗逆性分析

酿酒酵母菌株INVSc1是尿嘧啶营养缺陷型菌株,运用SC-U培养基初步筛选获得转化子,再随机挑取INVSc1 (pYES2-*AcERF1*)阳性克隆,以引物T7和R进行菌液PCR鉴定,进一步表明重组质粒已成功转化酵母细胞。

模拟各种逆境,对鉴定正确的重组酵母(pYES-*AcERF1*)与转空载体(pYES-DEST52)酵母进行胁迫处理(图3)。

用4 mmol·L⁻¹ KCl、5 mmol·L⁻¹ NaCl两种不同浓度的盐处理24 h后两种酵母均能生长,几乎没有差异(图3-A、B)。

高温处理2 h后,转pYES-*AcERF1*酵母比对照存活率明显要高。从100倍、1 000倍的稀释菌液来看,重组酵母长势优于对照,稀释10 000倍时,对照已完全不能生长,而转pYES-*AcERF1*酵母仍能正常生长(图3-C)。这说明*AcERF1*基因转入酵母细胞后表达,可能使酵母对高温的耐受力增强,表明*AcERF1*基因在耐高温方面可能有一定的作用。

低温处理后,两种酵母均能生长,几乎没有差异(图3-D)。

用6%和8% NaHCO₃分别进行碱处理后,转pYES-*AcERF1*酵母长势明显优于对照(图3-E、F),6%和8% Na₂CO₃进行碱处理后,两种酵母的生长状况有轻微差异(图3-G、H),表明*AcERF1*基因能提高酵母对碱胁迫的抗性。

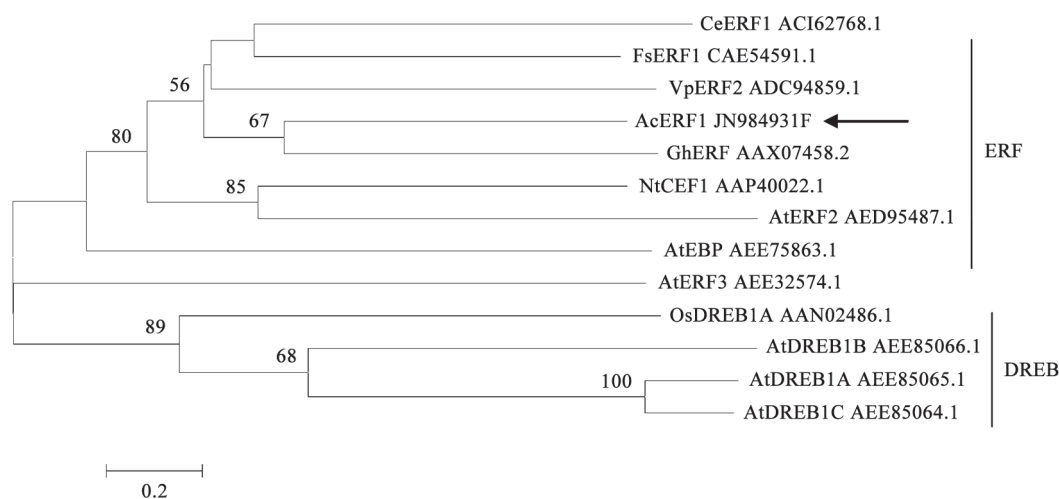
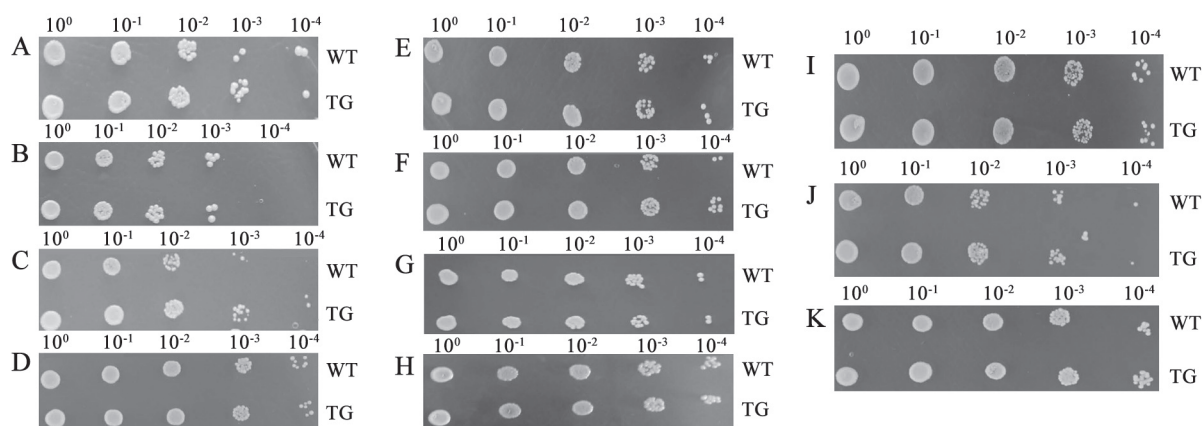
使用40% PEG 6000和5 mmol·L⁻¹山梨醇分别进行干旱处理后,转pYES-*AcERF1*酵母的存活率均高于对照(图3-I、J),其中对山梨醇胁迫处理的响应更为明显,即5 mmol·L⁻¹山梨醇处理后,相比对照,重组酵母的存活率更高,表明*AcERF1*基因的转入表达使重组酵母细胞对于干旱胁迫的耐受力增强。

4 mmol·L⁻¹百草枯处理后,转pYES-*AcERF1*酵母存活率明显高于转空质粒酵母(图3-K),由于百草枯可以产生活性氧模拟植物病原微生物侵染植物过程中产生的活性氧物质从而模拟植物病原菌等生物胁迫,在当植物病原菌侵染植物时,*AcERF1*基因可能提高植物抗氧化的能力,进而增强植物抵抗病原物侵染的能力。

结果表明INVSc1 (pYES-*AcERF1*)对不同的逆境产生不同程度的抗性应答(图3),其中对高温、强碱和活性氧表现出明显抗性,说明*AcERF1*基因可能通过参与不同的信号转导途径来调节对高温、强碱、活性氧、干旱等不同逆境的分子应答。

讨 论

干旱、盐、碱、高温、低温、病原物和昆虫

图2 *AcERF1*与其他植物AP2/ERF构建系统进化树Fig.2 Phylogenetic tree of the *AcERF1* protein and other AP2/ERF proteins箭头代表*AcERF1*在进化树中的位置。图3 酵母INVSc1 (pYES-*AcERF1*)和INVSc1 (pYES-DEST52)在不同胁迫条件下的生长Fig.3 Growth of INVSc1 (pYES-*AcERF1*) and INVSc1 (pYES-DEST52) yeast under different stress conditions

10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 分别代表不稀释和稀释10、100、1 000、10 000倍的菌体。A: KCl胁迫; B: NaCl胁迫; C: 高温(53℃)胁迫; D: 低温(-20℃)胁迫; E: 6% NaHCO₃胁迫; F: 8% NaHCO₃胁迫; G: 6% Na₂CO₃胁迫; H: 8% Na₂CO₃胁迫; I: PEG胁迫; J: 山梨醇胁迫; K: 百草枯胁迫。WT: 指转空载体酵母(pYES-DEST52); TG: 指转*AcERF1*基因重组酵母(pYES-*AcERF1*)。

等环境中的胁迫因子均危害植物的生长及作物产量,植物在生长发育过程中不断接受这些刺激信号,引发一系列信号转导途径,并做出相应的抗逆应答。ERF转录因子是与植物抗逆应答密切相关的一类转录因子家族,可以整合ET、JA、SA等多种信号分子介导的各种抗逆相关的信号通路从而综合提高植物的抗逆性。自Ohme-Takagi和Shinshi (1995)从烟草中分离出第一个可以与GCC-box特异性结合的ERF蛋白以来,已有大量ERF从拟南芥、烟草、水稻、大豆等植物中分离出来。ERF

转录因子在植物应答生物胁迫与非生物胁迫过程中发挥的重要作用也被深入研究(Xu等2011),将编码植物ERF转录因子的基因如烟草*Tsi1*、小麦*TaERF1*和大豆*GmERF3*转入植物过表达后明显提高了植物对生物胁迫及非生物胁迫的耐受力(Park等2001; Tang等2005; Zhang等2009)。大量研究表明在转基因植物获得抗逆性过程中,伴随着植株矮小、形态发生改变、或者生物量减少等不良性状,这样的遗传材料对于通过分子育种改变作物性状没有直接的指导意义。而ERF转录因子是通

过提高光合效能, Rubisco活性以及光合作用进程中关键磷酸糖类的合成等增强代谢的方式来增强植物应对逆境胁迫的能力。Oh等(2009)把水稻中的*AP37*基因转入水稻后不仅增强了水稻对干旱的抗性,还明显提高了水稻的灌浆率和产量(16%~57%),因此*ERF*基因在提高作物对干旱、低温、盐、碱等胁迫耐受力的同时还提高了植物的产量,故可以作为非常好的育种材料。

本研究通过筛选四翅滨藜的全长cDNA文库,获得四翅滨藜抗性EST序列*AcERF1*,该基因编码的蛋白含有一个由57个氨基酸组成的AP2结构域,其第14位和第19位氨基酸分别是丙氨酸和天冬氨酸,表明*AcERF1*基因的编码产物是典型的ERF类转录因子。将*AcERF1*基因编码的氨基酸序列与华北驼绒藜、欧洲山毛榉、李、棉花、模式植物拟南芥的ERF蛋白进行多序列比对表明它们之间保守功能域AP2的同源性为90%,全序列同源性为60.2%。Tournier等(2003)将ERF转录因子分为四个亚类,N段含有MCGGAIL/基元的ERF转录因子归为第四亚类。四翅滨藜*AcERF1*转录因子和华北驼绒藜*CeERF1*转录因子的N段含有一段与该基元极其相似的序列MCGGAVI,它们之间的区别仅是基元第6位氨基酸分别是异亮氨酸和缬氨酸,这可能是藜科植物在进化过程中为适应环境而发生了选择性突变。

用酵母表达系统筛选植物抗逆基因具有原核表达系统不可替代的优越性,它可以体现目的基因在真核细胞内的表达情况。Gao等(2011)将*ThVHAc1*基因转入酵母,对其进行抗盐、干旱、活性氧、重金属、低温、高温等功能分析,证明酵母表达系统是研究抗逆基因功能的良好材料。此研究将四翅滨藜*AcERF1*转入酵母INVSc,进行一系列逆境胁迫处理,通过转*AcERF1*基因酵母与转空载体酵母在逆境环境中的生长差异,表明*AcERF1*基因可以提高酵母INVSc1对高温、强碱和干旱的抗性;同时,也明显增强了由百草枯引起的活性氧抗性。通过酵母表达系统初步表明*AcERF1*参与抗逆应答过程,但其在植物中抗逆胁迫信号转导过程中的作用及机制还需进一步验证。

参考文献

李敬涛,余刚,陈宣明,范臻,刘金亮,潘洪玉(2012). 四翅滨藜

*AcDHN*基因的克隆及其抗逆功能分析. 植物生理学报, 48 (7): 676~682

余刚,李敬涛,孙新华,刘金亮,潘洪玉(2012). 四翅滨藜LRR类受体蛋白激酶基因在酵母中的表达及抗逆分析. 吉林大学学报(理学版), 5 (6): 1257~1263

张勇,余刚,冯俊,毕玉,迪娜·塔布斯,潘洪玉(2012). 四翅滨藜*BADH*基因的克隆、序列分析及其原核表达. 吉林农业大学学报, 34 (6): 618~623

Gao C, Wang Y, Jiang B, Liu G, Yu L, Wei Z, Yang C (2011). A novel vacuolar membrane H^+ -ATPase c subunit gene (*ThVHAc1*) from *Tamarix hispida* confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Rep, 38: 957~963

Gao S, Zhang H, Tian Y, Li F, Zhang Z, Lu X, Chen X, Huang R (2008). Expression of *TERF1* in rice regulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to drought and high salinity. Plant Cell Rep, 27: 1787~1795

Junya M, Kazuo S, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochim et Biophys Act, 1819: 86~96

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006). Genome wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and *rice*. Plant Physiol, 140 (2): 411~432

Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell, 7: 173~182

Oh SJ, Kim YS, Kwon CW, Park HK, Jeong JS, Kim JK (2009). Overexpression of the transcription factor *AP37* in rice improves grain yield under drought conditions. Plant Physiol, 150: 1368~1379

Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH (2001). Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stressing tobacco. Plant Cell, 13: 1035~1046

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (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

Tang W, Charles TM, Newton RJ (2005). Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. Plant Mol Biol, 59: 603~617

Tournier B, Ballesta MT, Jones B, Pesquet B (2003). New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA binding capacity to the GCC box element. FEBS Lett, 550: 149~154

Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ (2011). Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. Integr Plant Biol, 53: 570~585

Zhang GY, Li LC, Xu ZS, Chen XP, Guo JM, Ma YZ (2009). Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. J Exp Bot, 60: 3781~3796