

研究报告 Original Papers

胡杨*PeECT8*基因的克隆及功能分析

张洲嘉, 帅鹏, 苏艳艳, 尹伟伦, 夏新莉*

北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 北京100083

摘要: *ECT*基因家族已在拟南芥中被发现并报道, 然而它们是否参与植物在逆境胁迫下的响应过程却鲜有报道。为研究胡杨*PeECT8*基因的功能, 从胡杨叶片cDNA中克隆出*PeECT8*基因, 构建CaMV 35S::*PeECT8*植物表达载体, 利用花序浸染法转化拟南芥, 经GUS组织化学染色和PCR检测, 获得转基因植株, 进而测定不同浓度盐(NaCl)和甘露醇胁迫下转基因拟南芥种子的萌发率、生长势和根长。测序结果表明, 该基因编码区长度为1 821 bp, 可编码606个氨基酸。蛋白序列比对发现, *PeECT8*基因与毛果杨*PtrECT8*同源基因所编码的氨基酸一致性达93.42%, *PeECT8*蛋白包含一个YT521-B-like保守结构域。相比于野生型, 过量表达*PeECT8*的拟南芥在不同浓度NaCl胁迫下萌发率降低, 在D-甘露醇胁迫下萌发率没有明显变化。在NaCl和D-甘露醇胁迫下, 转基因拟南芥根的伸长长度小于野生型。这表明*PeECT8*基因在盐胁迫和渗透胁迫下发挥负调控的作用。

关键词: 胡杨; *PeECT8*; 胁迫; 转基因

Cloning and Functional Analysis of *PeECT8* in *Populus euphratica*

ZHANG Zhou-Jia, SHUAI Peng, SU Yan-Yan, YIN Wei-Lun, XIA Xin-Li*

College of Biological Sciences and Technology, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *ECT* gene family were found in *Arabidopsis*, but it is unknown whether they were involved in the pathway of the plant in response to stress or not. In order to study the function of *PeECT8* homologous gene in poplar, the *PeECT8* gene was cloned by RT-PCR from *Populus euphratica*. Sequencing results indicated that the length of *PeECT8* is 1 821 bp encoding 606 amino acids. Blast analysis showed that *PeECT8* shares over more than 93% homology in amino acid sequence with *PtrECT8* homologue. The deduced amino acid sequence contained one conserved domain (YT521-B-like). Based on sequence analysis, the *PeECT8* was fused to CaMV 35S promoter to characterize gene function. Transgenic *Arabidopsis* was obtained by floral dip method and analyzed by GUS detection and PCR. The results showed that the germination percentage of transgenic *Arabidopsis* was reduced under NaCl stress and was not affected by D-mannitol; the root length of transgenic *Arabidopsis* was shorter than that of wild type under NaCl and D-mannitol stresses. It indicates that the *PeECT8* gene plays a negative role in response to stress condition.

Key words: *Populus euphratica*; *PeECT8*; stress; transgenic

光、致病菌、激素和非生物胁迫等环境都会导致植物细胞内钙离子的浓度变化。植物在逆境胁迫下产生钙信号后, 再通过下游的钙结合蛋白进行转导, 从而在细胞内引起一系列的生理生化反应(Berridge等1998)。与逆境胁迫相关的钙信号转导的结合蛋白有钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)、钙调素(calmodulin, CaM)、钙调神经磷酸酶B类似蛋白(calci-neurin B-like protein, CBL)。对CBL功能的研究是植物逆境胁迫信号转导研究领域的热点。有研究

表明, CBL只能和与其互作的蛋白激酶(CBL-interacting protein kinase, CIPK)蛋白家族相互作用, 才能将信号向下游传递(Kim等2000; Batistic和Kudla 2004)。CBL-CIPK之间存在多种信号传递模型, 目前, 已经阐明多条CBL-CIPK信号途径的支路, 它们分别参与高盐、干旱、低钾、糖和ABA等非生

收稿 2014-05-17 修定 2014-08-25

资助 国家自然科学基金(31070597和31270656)。

* 通讯作者(E-mail: xiaxl@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62336400)。

物胁迫信号的转导, 另外, CBL-CIPK信号途径对质膜H⁺-ATP酶也具有重要的调节作用(Ludwig等2005; MacRobbie 2006)。

在模式植物拟南芥中, 对CBL-CIPK信号途径的研究较为深入。Ok等(2005)研究发现拟南芥中存在两个与CIPK1有着密切联系的蛋白——ECT1和ECT2, 受CBL-CIPK信号途径的调节, 这两个蛋白含有一个非常相似的C-端结构域, 这个结构域是ECT1和ECT2蛋白与CIPK1结合及其蛋白与核膜结合这两个生理过程所必需的, 这种C-端结构域也同样存在于单子叶植物和动物的某些蛋白中。ECT蛋白可能是CBL-CIPK钙离子信号途径中的一部分元件, 也可能是一种将细胞质Ca²⁺信号转导到核的候选分子。

胡杨作为我国西北沙漠地区唯一能够生存的高大乔木, 生命力顽强, 具有极强的耐高温、耐盐碱、耐贫瘠以及抗旱和抗寒能力。胡杨在进化过程中形成了多种适应非生物逆境胁迫的分子和生理调节机制, 具有丰富的抗逆境基因资源(Li等2009)。目前, ECT基因在植物领域的研究仍仅限于拟南芥中有报道, 而在其他植物物种中鲜有报道, 作用机制也依然未知。因此, 研究与胡杨抗逆相关的ECT基因, 将有助于更加深入地了解胡杨的抗逆分子机制。本文从胡杨中克隆了PeECT8基因, 对PeECT8编码的蛋白进行了一系列生物信息学分析, 构建CaMV 35S::PeECT8植物表达载体并转化拟南芥, 对转基因拟南芥进行了GUS组织化学染色和PCR分析, 以及逆境胁迫下的萌发率和根伸长等表型分析。

材料与方法

1 实验材料

胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)采自新疆阿尔泰山地区; 野生型哥伦比亚拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV-3101、植物表达载体pCAMBIA1301由北京林业大学林木育种国家工程实验室保存; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态Top10购自北京天根生化科技公司, 克隆载体pGEM-T Easy Vector购自Promega公司。

2 主要试剂

LA Taq酶、核酸分子量标记(DNA marker)、

T₄ DNA连接酶、限制性内切酶NcoI和BgIII等购自TaKaRa公司; 引物合成及DNA序列测定由上海生工完成。

3 胡杨PeECT8基因的克隆

取胡杨叶片, 采用CTAB法提取总RNA, 合成cDNA第一链。根据毛果杨(*Populus trichocarpa*)同源基因PtrECT8 (Phytozome v9.1 number: Potri.010G175500.1)序列, 使用Primer 5.0设计引物。扩增引物为: P1F, 5'-ATGGCTCAACAACAACAACAACAAC-3'; P1R, 5'-TCATTCTTTTGTGTTGTCTCCAACC-3'。反应体系为20 μL, 含2 μL 10×LA PCR缓冲液、1.6 μL (2.5 mmol·L⁻¹) dNTP、2 μL第一链cDNA稀释产物、0.4 μL 10 μmol·L⁻¹上游引物P1F、0.4 μL 10 μmol·L⁻¹下游引物P1R、0.2 μL LA Taq DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹)、13.4 μL ddH₂O。反应条件为94 °C预变性5 min; 94 °C变性2 min, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 共进行35个循环; 最后再72 °C延伸5 min。PCR产物经凝胶回收后, 将纯化产物与pGEM-T Easy Vector连接, 然后进行PCR和限制性内切酶(NcoI和BgIII)双酶切鉴定。阳性克隆委托上海生工有限公司进行测序。

4 胡杨PeECT8基因的生物信息学分析

蛋白等电点和分子量预测使用ExPASy软件; 基因结构及染色体定位使用Phytozome v9.1毛果杨基因组数据库(Goodstein等2012); 保守结构域分析使用Conserved Domains Database (NCBI); 序列同源性分析使用ClustalX 1.83和BioEdit软件; 毛果杨PtrECT8同源基因的功能预测使用PopGenIE网站。

5 植物表达载体的构建

将pCAMBIA1301质粒和PeECT8-T重组质粒同时进行NcoI和BgIII双酶切, 回收纯化目的片段, 通过T₄ DNA连接酶连接, 并将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞Top10, 新的重组质粒经100 mg·L⁻¹氨苄霉素(ampicillin)和PCR筛选后, 进行双酶切验证, 获得CaMV 35S::PeECT8植物表达载体。

6 拟南芥遗传转化

将CaMV 35S::PeECT8的重组质粒导入根癌农杆菌GV3101, 采用农杆菌介导的花序侵染法转化拟南芥(Zhang等2006)。将转基因的拟南芥T₀代种子播种在1/2MS+7 g·L⁻¹琼脂糖+6 mmol·L⁻¹甘露糖的筛选培养基上, 待抗性苗长出两片子叶时, 即

可将其移栽到培养基质中, 等其长大后, 取拟南芥植株的少量叶片用于检测。

7 转基因拟南芥的检测

7.1 GUS组织化学法染色鉴定

将待测转基因T₁代拟南芥幼苗及野生型对照浸入适量染色液中, 真空抽滤12 h, 37 °C染色过夜后, 再用酒精脱色, 肉眼观察染色结果并拍照。染色液为100 mmol·L⁻¹磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 内含0.5 mg·mL⁻¹ X-GluC、1% Triton X-100、10 mmol·L⁻¹ EDTA和1% DMSO。

7.2 转基因植株的PCR检测

取筛选出来的少量拟南芥植株的叶片, 采用CTAB法提取基因组DNA, 以P1F和P1R为引物进行PCR检测, 分别以质粒DNA和野生型拟南芥基因组DNA为模板的PCR产物, 作为阳性和阴性对照。

8 过表达*PeECT8*基因拟南芥的表型分析

选取转基因拟南芥T₃代株系L1、L2和L3, 观察并统计它们在1/2MS、盐胁迫(1/2MS+NaCl 50、100、150、200 mmol·L⁻¹)和渗透胁迫(1/2MS+D-甘露醇100、150、200、250、300 mmol·L⁻¹)培养基中的萌发情况, 以及转基因拟南芥在1/2MS、1/2MS+150 mmol·L⁻¹ NaCl和1/2MS+300 mmol·L⁻¹ D-甘露醇培养基中的根伸长情况。

实验结果

1 *PeECT8*基因的克隆与测序

*PeECT8*基因的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段约1 800 bp。将目的条带回收纯化, 并与pGEM-T Easy Vector连接, 获得重组质粒*PeECT8*-T。进一步进行PCR检测和双酶切验证, 阳性克隆送公司测序。测序结果表明, *PeECT8*编码区长度为1 821 bp, 编码606个氨基酸(图1)。与参照的毛果杨*PtrECT8*基因的编码区一致性为96.61%, 与毛果杨*PtrECT8*氨基酸一致性为93.42%。

2 *PeECT8*基因的生物信息学分析

2.1 基因结构

利用毛果杨基因组数据库(Phytozome v9.1)绘制的基因结构图显示, *PtrECT8*含有9个外显子, 9个内含子(图2-A)。染色体定位显示*PtrECT8*位于10号染色体上(图2-B)。

2.2 蛋白质分子特征

软件分析显示, *PeECT8*编码的蛋白质理论等电点为6.19, 分子式为C₂₉₈₈H₄₅₅₁N₈₁₁O₉₂₉S₁₇, 分子量为67.24 kDa。为了预测*PeECT8*基因的功能, 我们在Conserved Domains Database (NCBI)中对氨基酸保守结构域进行了分析, 发现这个基因编码的蛋白质含有一个YT521-B-like保守结构域, 证实*PeECT8*蛋白为YTH家族的成员。

2.3 序列同源性分析

序列分析表明, *PeECT8*蛋白与毛果杨*PtrECT8* (Potri.010G175500.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtECT8* (AT1G79270.1)、巴旦木(*Prunus persica*) *PpECT8* (ppa003664m)、橙子(*Citrus sinensis*) *CsECT8* (orange1.1g048663m)和水稻(*Oryza sativa*) *OsECT8* (LOC_Os01g48790.2)所编码的氨基酸一致性分别为: 93.42%、42.08%、55.95%、45.60%、43.93%。*PeECT8*蛋白含有YT521-B-like保守结构域(图3)。

2.4 毛果杨*PtrECT8*同源基因的功能预测

RNA测序数据显示, 毛果杨*PtrECT8*同源基因(Popgenie网站: <http://popgenie.org/gene?id=Potri.010G175500#expression>)受生物胁迫(虫害)和非生物胁迫(干旱和机械胁迫)诱导表达。

3 *CaMV 35S::PeECT8*的植物表达载体构建

为研究*PeECT8*基因功能, 将本实验室改造的pCAMBIA1301载体与引入酶切位点的*PeECT8*-T重组质粒分别进行*Nco*I和*Bg*III双酶切, 再将载体片段与目的片段用T₄ DNA连接酶连接, 新的重组质粒经双酶切验证(图4-A), 获得*CaMV 35S::PeECT8*的植物表达载体。采用液氮冻融法, 将其转入根癌农杆菌GV3101感受态细胞中, 经菌落PCR鉴定, 获得阳性克隆, 完成工程菌制备。

4 转基因拟南芥的检测

对筛选出的转基因拟南芥T₁代幼苗进行GUS组织化学染色检测, 结果显示, 经GUS染色后转基因植株呈现蓝色, 而野生型的对照植株没有蓝色出现, 初步证明转基因成功(图5)。

取T₁代拟南芥植株的少量叶片, 利用CTAB法提取基因组DNA并进行PCR检测, 结果显示75%以上的植株出现大小约为1.8 kb的特异性条带, 部分株系的检测结果如图5-E所示。结果表明*PeECT8*基因已经整合到拟南芥基因组中。

```

1 ATGGCTCAACAACAACAACAACAATCCCCTCATAAACCAATTGAAGAAATGATGAGGAATCTTAAGGTTGATCCTTCTAGAACTC
1 M A Q Q Q Q Q Q S P H K P I E E M M R N L K V D P S L E L
91 TCCGAATCTAATACGGTCTTTCAAGGATGGGAGCCCATCAGATGCAACGTCGTGTATTCTTCGGCAGGAGATACTACTGGGAGTGC
31 S E S N T V L S K D G S P S D A T S C I S S A G D T T G S V
181 AAAGAAGATGATGTCTCGATCATGATCCCTGACTACAGATCGGGCCTTGGCGTATCCAGCTGAGAACTACTTACGGATATTACTAT
61 K E D D V L D H D S L T T D R A L P Y P A E N Y F Y G Y Y Y
271 CCAGGTTATGATGCTACTTTGGAGGAGGTCTAATGACCAACTATACTATGTGGCTGGTGTGGAACAGAACTTCAATACCCCTGTTATG
91 P G Y D A T F G G G S N D Q L Y Y V A G D G T E L Q Y P V M
361 CAGGCAGATAATGGGCTTTGATCCACTTTCACAGGATACACCATAATTACAGCTCTTACAGCGCTTACATGCCTGTAAGCATGATT
121 Q A D N G S L I H F I P G I H H N Y S S Y S A Y M P V S M I
451 GGTGTGATGGACAATTGTGCTCAATCACCATATTCACCAAGCTCCATGTTCCAACCATCCATTCCTCCCTGGATATATCCAAC
151 V L E I P R T K P N R S S P S S M F Q P S I P S P G Y I P T
541 CCTGTCCCTATGGAGAGTTTTTACCACACCTATGGGACCCATCTGTTTTGCTGGGGATGGAACATTAGGGAATTATGCCACAGCGGA
181 P V P Y G E F L P H L W D P S V F A G D G T L G N Y G H S G
631 GTTCTGGAATTCAGAACTAACTAACAGGTCTTACCTAGTAACCCCTCGTGGTCTGTACCAAAAAAGGCACTGCCTTCTGACTTA
211 G A M L Y P N N T I K A N A R G W G S N E K L K T R S K T N
721 AGCAATCGTTAGAACTAAGACTTCCCTCCAGCACTGGATGCTCTATGTTCTGGCATGCGTAACCAGTTAAAATTACCTGGCAAG
241 S K S L E T K T S L P A L D V S S V R G M R N Q L K L P G K
811 GCTTCACAGATGCTCTTCCATCCAGTCAGATGACTGGGCGAAGGGTATTTTCCATTTCAAAGTTTCCATCTATAATCCAAGGAAG
271 A S Q H V S S F Q S D V L G E G Y F P F S K F P S Y N P R K
901 GGTGCCATGCTCTATCCGAATAACACTATTAAGGCAATGCAAGGGGTTGGGAAGCAATGAAAACTGAAAAACAAGAAGCAAGCAACT
301 G A M L Y P N N T I K A N A R G W G S N E K L K T R S K T N
991 GGCATCAATGATGCATTGCTTAATGAGCAGAATCATGGTCCCAGGACAACCAAGTGCAAAAGTTCTGTGGCATTGGAGGTACTGCTGCT
331 G I N D A L L N E Q N H G P R T T S A K G S V A F G G T A A
1081 GAATCTTTGGCTCTGATGGGAACGGAAACAGTAACAGCATAACTTCAGTTATTAGCAGGGATCAATATAACCTTCTGACTTCCAACC
361 E S L A P D G N G N S N S I T S V I S R D Q Y N L P D F P T
1171 AACTACGATCATGCATTTTCTTTGTCATCAATCTTATATTGAAGATGATATTCATAAAAAGCATCAAGTACAATGTGTGGCCAGTACT
391 N Y D H A F F F V I K S Y I E D D I H K S I K Y N V W A S T
1261 CCTAATGGAATAAGAGGCTGGACAGTGCATATCTAGATTGCGAACAGAAGATAGCACAGAAGGGCTGCAGTTGCCCTGTGTTTCTTTTC
421 P N G N K R L D S A Y L D S Q Q K I A Q K G C S C P V F L F
1351 TTTTCGGTAAATGCAAGTGCCAGTCTGTGGAATTGCAGAAATGATGGTTCATGTTGATTCAATAAAAAACATGGATTCTGGCAACAG
451 F S V N A S G Q F C G I A E M I G H V D F N K N M D F W Q Q
1441 GAGAAGTGAATGGTTATTCCAGTCAAGTGGCATAATCATTAAAGATATCCAAACCCCAACTACGACATATAATACTTGAAAATAAT
481 E K W N G Y F P V K W H I I K D I P N P Q L R H I I L E N N
1531 GAGAACAAAGCCGTAACAAATAGCAGAGACACACAGGAGTAAAATTTCTCAAGGTATTGAAATTCGGACATATCAAGAATATGTT
511 E N K P V T N S R D T Q E V K F P Q G I E I L D I F K N Y V
1621 TCAAAGACATCAATATTGGATGACTTCGATTTTTATGAAAGTTGCCAGAAGGCGATGCATGTGAGAAGACCAAGGTCATTGATATCCCAT
541 K T S I L D D F D F Y E S C Q K A M H V R R P R S L I S H
1711 TTTGATCACAACAGAAAACAAATGAATTGATCACTGGTTTTTCAGTCGATAGATATATCTGCTACAAAAACAAGGTGGACTCTCGGGTT
571 F D H K Q K T N E L I T G F Q S I D I S A T K N K V D S R V
1801 GGAGACAACACAAAAGATGA
601 G D N T K E *
    
```

图1 *PeECT8*基因的cDNA序列及推测的氨基酸序列
 Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *PeECT8*
 *表示终止密码子。

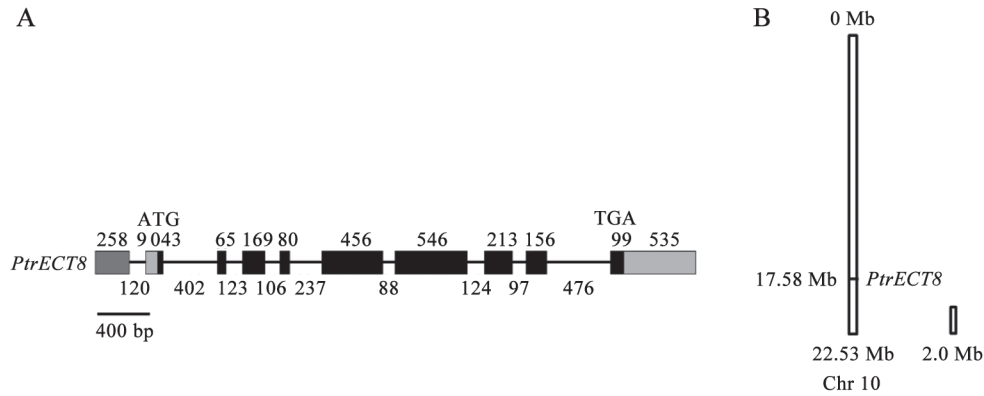


图2 *PtrECT8*基因结构(A)及染色体定位(B)
 Fig.2 The structure (A) and chromosome location of *PtrECT8* (B)
 黑色方框表示外显子, 灰色方框表示非编码区(UTRs), 方框之间的直线表示内含子。

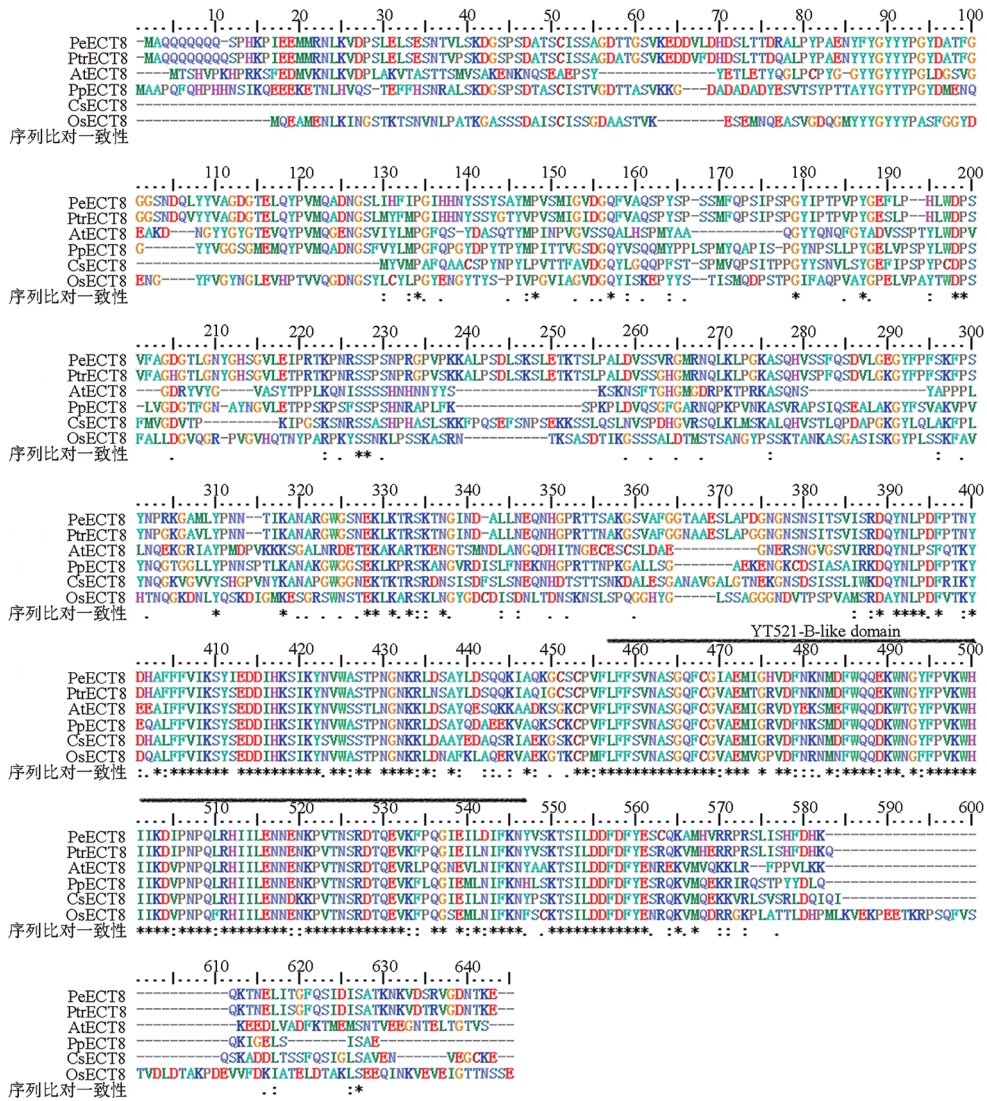


图3 *PeECT8*与其他植物ECT8蛋白氨基酸序列的比对

Fig.3 Alignment of amino acid sequence of *PeECT8* with homologous proteins of other plants

黑线表示YT521-B-like保守结构域。

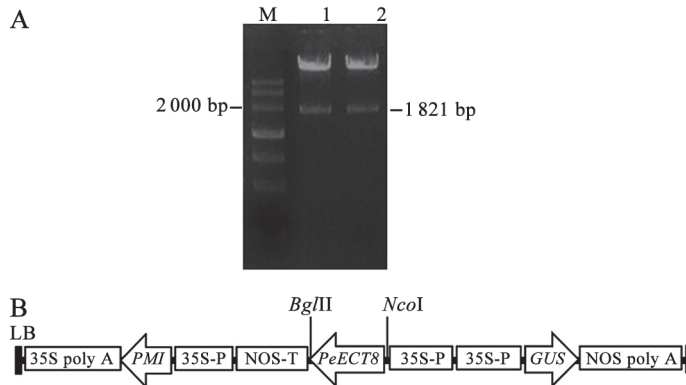


图4 *CaMV 35S::PeECT8*植物表达载体的构建

Fig.4 Construction of *CaMV 35S::PeECT8* expression vector

*CaMV 35S::PeECT8*植物表达载体的*NcoI*和*BglII*双酶切鉴定(A)和结构示意图(B)。M: DNA分子量标记; 1和2: 酶切产物。

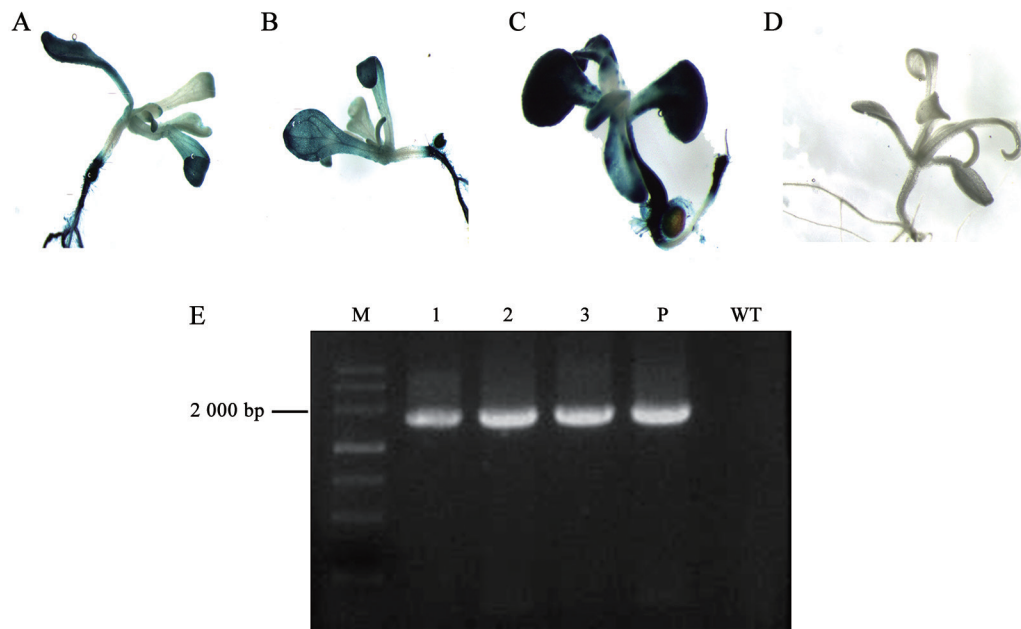


图5 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥的GUS组织化学染色和PCR检测

Fig.5 GUS assay and PCR analysis of transgenic *CaMV 35S::PeECT8 Arabidopsis*

A~C: 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥; D: 野生型; E: PCR检测。M: DNA分子量标记; 1~3: 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥; P: *CaMV 35S::PeECT8*表达载体质粒; WT: 野生型。

5 过表达*PeECT8*拟南芥的表型分析

将筛选得到的3个T₃代转基因株系L1、L2和L3以及野生型拟南芥种子播到1/2MS、1/2MS+NaCl (50、100、150、200 mmol·L⁻¹)和1/2MS+D-甘露醇(100、150、200、250、300 mmol·L⁻¹)培养基上, 统计种子的萌发情况。结果表明, 在1/2MS培养基中, 野生型与转基因株系萌发率分别为98.75%和97.48%, 差异不明显(图6-A和图7-A); 在含50和100 mmol·L⁻¹ NaCl的培养基上转基因植株萌发率相比野生型植株减少(图6-B和C、图7-A); 在含150 mmol·L⁻¹ NaCl的培养基上, 转基因植株的萌发率比野生型有更显著性的降低, 野生型植株的萌发率为46.67%, 而转基因植株仅为26.11% (图7-A), 尤其是株系L3, 其长势明显弱于野生型(图6-D); 而在含200 mmol·L⁻¹ NaCl的培养基上, 野生型与转基因植株萌发率都很低(图6-E)。方差分析显示, 在含50、100、150 mmol·L⁻¹ NaCl的培养基上, 转基因植株与野生型植株萌发率的差异极显著($P < 0.01$)。然而, 在1/2MS+D-甘露醇(100、150、200、250、300 mmol·L⁻¹)的培养基上, 转基因与野生型植株的萌发率并没有明显变化, 长势几乎一致(图6-F~J和图7-B)。

将转*CaMV 35S::PeECT8*、转空载体和野生型拟南芥植株播种在1/2MS、1/2MS+150 mmol·L⁻¹ NaCl和1/2MS+300 mmol·L⁻¹ D-甘露醇培养基上, 观察它们的根伸长情况。结果显示, 野生型和转基因植株在含NaCl的1/2MS培养基上的生长势和根长均比在不含NaCl培养基上的弱; 而在D-甘露醇胁迫下的野生型和转基因植株的生长势和根长与不经胁迫处理的没有明显差别(图8)。另外, 在3种培养基中, 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥根的伸长小于转空载体和野生型植株, 而转空载体拟南芥和野生型植株根的伸长差异不明显(图9)。方差分析显示, 在NaCl和D-甘露醇胁迫下, 转基因植株与野生型植株根伸长长度的差异极显著($P < 0.01$) (图9)。

讨 论

胡杨*PeECT8*蛋白具有一个C-端保守结构域——YTH结构域, 因此属YTH蛋白家族, 此家族成员可以在有丝分裂的细胞中选择性地删除与减数分裂相关的特异基因转录本; 同时, 在高等真核生物中, YTH家族成员可能在配子发育过程中抑制基因表达。鼠YT521-B蛋白是一个酪氨酸磷酸

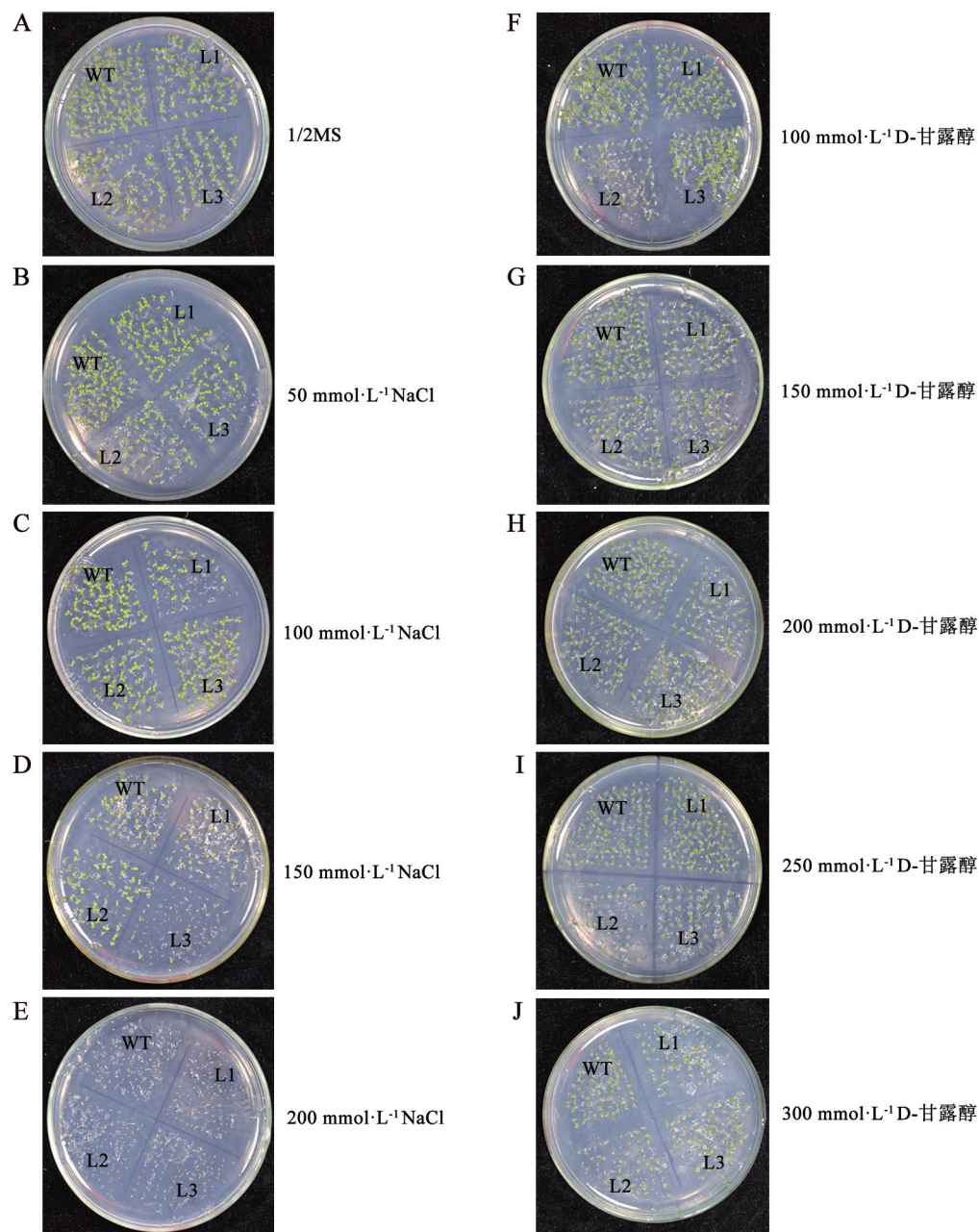


图6 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥在含不同浓度NaCl和D-甘露醇培养基上的萌发情况

Fig.6 Germination of transgenic *CaMV 35S::PeECT8 Arabidopsis* on media with different concentrations of NaCl and D-mannitol
WT: 野生型; L1、L2、L3: 不同转基因拟南芥株系。

化核蛋白,与核转录组分骨架附着因子B和在有丝分裂过程中相关的Sam68蛋白相互作用,体内剪切分析表明,YT521-B在可变剪切位点的选择过程中发挥一定的作用,它受酪氨酸磷酸化作用的调节(Hartmann等1999; Harigaya等2006)。结构分析表明,YTH结构域与PUA结构域相关(Zhang等2010)。YTH家族成员还被证实与一些基因的转录

后调控相关,它可能与基因转录后内含子的剪切和修饰有关并对相关蛋白在细胞中的亚细胞定位起着至关重要的作用(Stoilov等2002; Ok等2005)。

在植物受到环境刺激后,细胞质内的钙离子浓度首先发生变化,但对胞质内钙离子信号转导到细胞核内,最终调节基因表达以适应环境的这一途径仍知之甚少。Ok等(2005)研究拟南芥时发

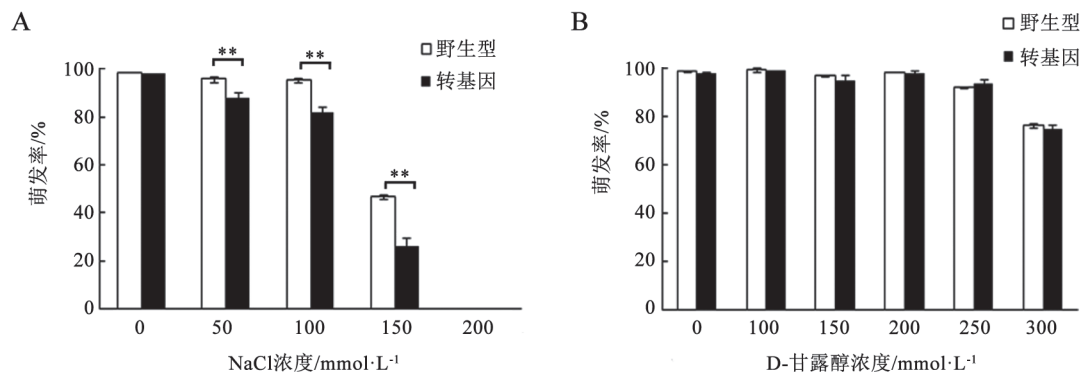


图7 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥在含不同浓度NaCl和D-甘露醇培养基上的萌发率

Fig.7 Germination percentage of transgenic *CaMV 35S::PeECT8 Arabidopsis* on media with different concentrations of NaCl and D-mannitol

** $P < 0.01$.

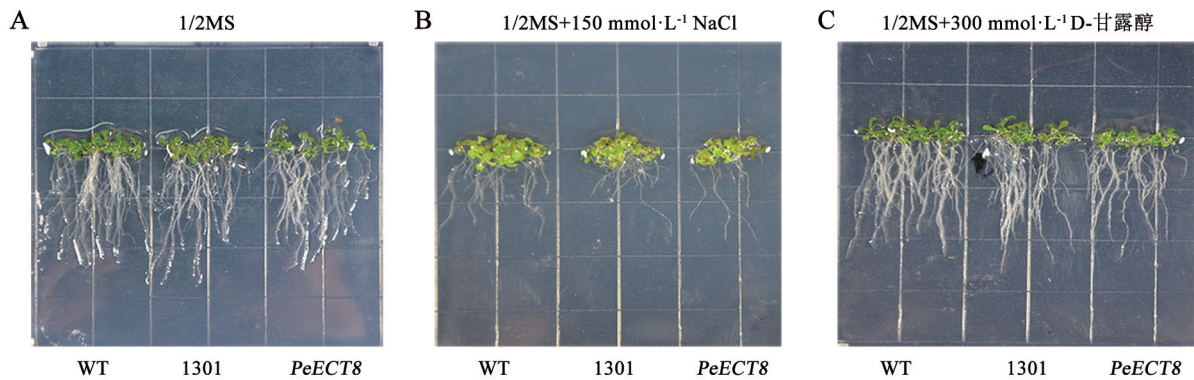


图8 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥在不同浓度NaCl和D-甘露醇培养基中根的伸长情况

Fig.8 Root elongation of transgenic *CaMV 35S::PeECT8 Arabidopsis* in media with different concentrations of NaCl and D-mannitol

WT: 野生型; 1301: 转空载体; *PeECT8*: 转*CaMV 35S::PeECT8*。

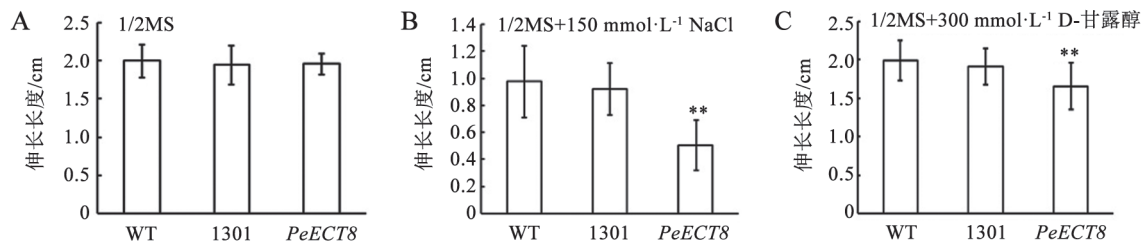


图9 转*CaMV 35S::PeECT8*拟南芥在含不同浓度NaCl和D-甘露醇培养基中根的伸长长度

Fig.9 Root elongation length of transgenic *CaMV 35S::PeECT8 Arabidopsis* in media with different concentrations of NaCl and D-mannitol

WT: 野生型; 1301: 转空载体; *PeECT8*: 转*CaMV 35S::PeECT8*。 ** $P < 0.01$ 。

现了ECT1和ECT2蛋白,它们与一个CIPK成员——CIPK1有着明确的联系,这两个蛋白都具有一个非常相似的C-端保守结构域,即YTH结构域,这个结构域是它们与CIPK1结合及其与核膜结合这两个

生理过程所必需的。YTH结构域同样广泛分布于其他真核生物中,其被证实将在将胞质内钙信号转移到核内,从而调控基因表达这一过程中起重要的作用。由于ECT家族几个成员与CIPK之间存在

明显的相互作用, 这说明逆境条件下该基因家族可能通过钙信号转导途径在基因转录、修饰以及RNA水平调控上发挥作用。

为探究胡杨*PeECT8*基因的功能, 本研究从胡杨叶片cDNA中克隆出*PeECT8*基因, 构建了*CaMV 35S::PeECT8*的植物表达载体并转化拟南芥。相比于野生型, 过量表达*PeECT8*的拟南芥在盐(NaCl)胁迫下萌发率降低, 在渗透(D-甘露醇)胁迫下萌发率没有明显变化; 另外, 在盐和渗透胁迫下, 转基因拟南芥根的伸长长度都小于野生型。本研究初步表明*PeECT8*基因在响应逆境胁迫的过程中起负调控作用, 但*ECT*基因在植物逆境响应中是通过怎样的方式调控生理生化反应, 以及其与CIPK等其他蛋白的互作关系, 都仍需进一步深入的探究。

参考文献

- Batistic O, Kudla J (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*, 219 (6): 915~924
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998). Calcium—a life and death signal. *Nature*, 395 (6703): 645~648
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N et al (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*, 40 (database issue): D1178~D1186
- Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Yamashita A, Yamamoto M (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature*, 442 (7098): 45~50
- Hartmann AM, Nayler O, Schwaiger FW, Obermeier A, Stamm S (1999). The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59^{lyn}. *Mol Biol Cell*, 10 (11): 3909~3926
- Kim KN, Cheong YH, Gupta R, Luan S (2000). Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol*, 124 (4): 1844~1853
- Li B, Yin W, Xia X (2009). Identification of microRNAs and their targets from *Populus euphratica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 388 (2): 272~277
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones JD, Romeis T (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (30): 10736~10741
- MacRobbie EAC (2006). Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (4): 1135~1140
- Ok SH, Jeong HJ, Bae JM, Shin JS, Luan S, Kim KN (2005). Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. *Plant Physiol*, 139 (1): 138~150
- Stoilov P, Rafalska I, Stamm S (2002). YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends Biochem Sci*, 27 (10): 495~497
- Zhang X, Henriques R, Lin S-S, Niu Q-W, Chua N-H (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc*, 1 (2): 641~646
- Zhang Z, Theler D, Kaminska KH, Hiller M, de la Grange P, Pudimat R, Rafalska I, Heinrich B, Bujnicki JM, Allain FH et al (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J Biol Chem*, 285 (19): 14701~14710