

火龙果类锌指蛋白基因片段的克隆及表达分析^①

颜凤霞^{1,2}, 文晓鹏¹, 乔光¹, 刘涛³

1. 贵州大学 农业生物工程研究院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学 林学院, 贵阳 550025;

3. 贵州省果树科学研究所, 贵阳 550006

摘要: 锌指蛋白在原核生物与真核生物基因转录的调控中发挥着重要作用. 根据火龙果抗逆 cDNA 芯片中的一个 EST 设计一对引物, 采用 RT-PCR 克隆火龙果类锌指蛋白基因片段, 生物信息学分析表明, 该片段长 334 bp, 编码 1 中含有 109 个氨基酸残基的肽链, 命名为 *HuZF*. 该基因序列与其它植物锌指蛋白基因核苷酸序列的同源性均在 70% 以上, 推测的氨基酸序列与其它植物锌指蛋白的氨基酸序列的同源性达 60% 以上. RT-PCR 分析表明, 高盐和干旱胁迫下, 火龙果茎中 *HuZF* 的表达增强, 低温胁迫时, *HuZF* 的表达先减弱后增强, 初步推测该基因的表达与火龙果低温、高盐、干旱等逆境胁迫响应相关.

关键词: 火龙果; 类锌指蛋白基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)10-0037-05

锌指蛋白基因是真核生物中总数最大的 DNA 结合蛋白, 是一类重要的转录因子^[1]. 众多研究表明, 锌指蛋白与植物的抗盐^[2-3]、抗旱^[4]和抗冷^[3]等抗逆性相关. 火龙果属于仙人掌科三角柱热带、亚热带水果, 是多年生经济林木果树, 其外形独特, 耐脊, 抗旱, 嗜钙, 病虫害少, 产量高, 营养丰富, 具有很高的经济价值^[5]. 但迄今为止, 火龙果抗逆相关基因克隆及表达分析的研究鲜见报道. 本文克隆了火龙果锌指蛋白基因片段, 并对其序列和表达特性进行分析, 以期为进一步揭示火龙果抗逆机理提供新内容.

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为紫红龙(*Hylocereus undatus* ‘Zihonglong’)组培苗. 采集培养 60 d 的组培苗茎段, 液氮速冻后置于超低温冰箱保存, 用于目的基因克隆, 同时对生根组培苗分别进行高盐(200 mmol/L NaCl)、干旱(10%(w/v)PEG 6000)、低温(-3℃)处理, 并以未实施胁迫处理的生根组培苗作对照. 低温和高盐处理时间为 6, 12, 24, 48 h, 干旱处理时间设置为 12 h, 24 h, 5 d 和 10 d. 分时段收获不同处理及对照材料, 在液氮中速冻后保存于-80℃冰箱, 用于目的基因的表达分析.

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

火龙果茎总 RNA 提取按 Trizol(天根生化科技有限公司, DP405)试剂说明书进行, cDNA 第一链合成参照 Quant cDNA 试剂盒(天根生化科技有限公司, KR103)说明书进行, 完成后取 4 μL PCR 产物, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查, 并用紫外分光光度计检测 cDNA 浓度, 最后将各处理 cDNA 稀释至同一浓度.

① 收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31060256, 31260464); 贵州省重大专项资助项目(20126006-1); 贵州大学研究生创新基金资助项目(研农 2013003); 贵州大学引进人才科研资助项目(2012018).

作者简介: 颜凤霞(1987-), 女, 湖北孝感人, 硕士研究生, 主要从事树木生理与分子生物学的研究.

通信作者: 文晓鹏, 教授.

1.2.2 目的基因片段的克隆

应用 Primer Premier 5.0 软件, 根据火龙果抗逆 cDNA 芯片中的一个 EST 设计一对引物: Primer 1, 5'-CAAAATGGAGAAGAGGCTG-3'; Primer 2, 5'-TTGGTCGGGTAAAGGTAGA-3', 引物合成由上海生工生物技术公司完成.

目的基因扩增采用 50 μL 反应体系: cDNA 模板 5 μL 、2 $\times$ Master Mix25 μL , Primer1 和 Primer2 各为 2.5 μL , H_2O 为 15 μL . 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

按照多功能 DNA 纯化回收试剂盒(天根生物技术有限公司, DP214)回收并纯化目的片段, 将目的片段与 pMD18-T 载体连接, 经蓝白斑筛选后用碱裂解法提取质粒, 将重组质粒进行双酶切鉴定, 并由上海生工生物技术公司测序.

1.2.3 序列的生物信息学分析

在 NCBI 上采用 Blast 程序进行所得序列同源性比对, 采用 DNAMAN6.0 软件进行 cDNA 序列分析、氨基酸序列推导及多序列比对.

1.2.4 胁迫处理基因表达特性分析

以火龙果泛素基因 UBQ 基因为内部参照, 用半定量 RT-PCR 方法检测火龙果锌指蛋白基因在不同胁迫下茎中的表达情况. 半定量 RT-PCR 采用 10 μL 反应体系: cDNA 模板 0.5 μL 、2 $\times$ Master Mix4.5 μL , Primer1 和 Primer2 各为 0.5 μL , H_2O 为 4 μL . 目的基因扩增条件与基因克隆一样. PCR 产物的凝胶成像图片由 Band Leader 3.0 软件处理.

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取

琼脂糖凝胶电泳图和核酸定量检测显示, RNA 电泳图谱带型清晰(图 1), 28 s RNA 的亮度约为 18 s RNA 亮度的 2 倍, OD 值均在 1.85~2.00 mg/L, 由此可见 RNA 样品的完整性较好, 无明显降解, 可以用于进行后续试验.

2.2 锌指蛋白基因克隆

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 进行目的基因片段的 PCR 扩增. 扩增产物经凝胶电泳检测发现, 分别在约 300 bp 处有一亮条带, 与预期的大小一致(图 2), 推测可能是目的基因片段. 将回收纯化的目的片段连接到 pMD-18T 克隆载体上, 转化 *E. coli*. DH5a 感受态细胞. 随机挑取白斑, 分别用引物 Primer 1 和 Primer 2 进行菌落 PCR 检测, 得到的扩增片段大小分别约为 300 bp(图 2), 与 RT-PCR 结果一致, 表明这些克隆为阳性克隆.

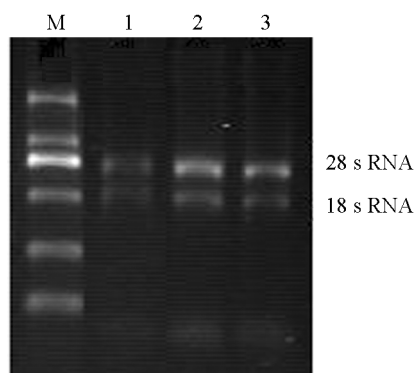
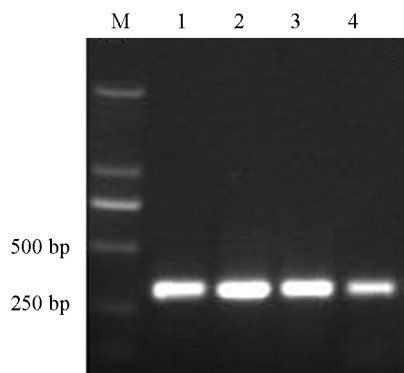


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶检测



注: M: DNA 标记; 1,2,3,4: 锌指蛋白基因.

图 2 火龙果锌指蛋白基因的扩增电泳图

2.3 序列分析

测序结果显示, 所克隆的火龙果锌指蛋白基因为 334 bp, 编码 1 中含 109 个氨基酸残基的蛋白质. 图 3

为碱基序列及所推测的氨基酸序列. Blast 比对结果显示, 该基因片段与其它植物锌指蛋白基因核苷酸同源性均在 70% 以上, 氨基酸同源性绝大部分都在 60% 以上.

将得到的火龙果锌指蛋白基因和其它 6 种植物锌指蛋白基因的氨基酸序列进行多重比较(图 4), 表明所克隆的火龙果锌指蛋白基因片段包含锌指蛋白基因的一个保守区域. 将该基因命名为 *HuZF*. *HuZF* 与水稻(*OsZF*)的同源性最高(70%), 玉米(*ZmZF*)次之(69%), 与蓖麻(*RcZF*)、番茄(*SlZF*)、黄瓜(*CsZF*)的同源性分别为 64%、63% 及 65%, 而与拟南芥(*AtZF*)同源性最低, 为 59%.

```
CAAAATGGAGAAGAGGCTGAAGCTATTCTGGGTATAGCTGGATCCTCCATGTTACCAAAAAGGGTCCGGGT
K M E K R L K L F G L * L D P P C Y Q K g s g s
CATCATCAAGCAACGATCGAGAAGAAAGCACAAATTCATCAACACGGTTTCATCCGTAAATATCGAAGAGA
S s s n d r e e s t n s s n t v s s v n I E E I
TAGAGGGCGATTTTGGGAAAACCAACCATAAATTTGAGTGCCAATATTGTTTCAAAGAGTTCCTCAAACCTCCC
E G D F G K T N H K F E C Q Y C F K E F P N S Q
AGGCATTGGGAGGCCACCAAAAACGCCACAAAAAGGAGAGAATGAAGAATAAGAAAAGGGCTCCAAATCC
A L G G H Q N A H K K E R M K N K K R L Q I Q T
AAACCCGAAAACCCGATAACCTTAATTCTTTCTACCTTTACCCGACCAAA
R K P D N L N S F Y L Y P
```

图 3 火龙果 *HuZF* 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

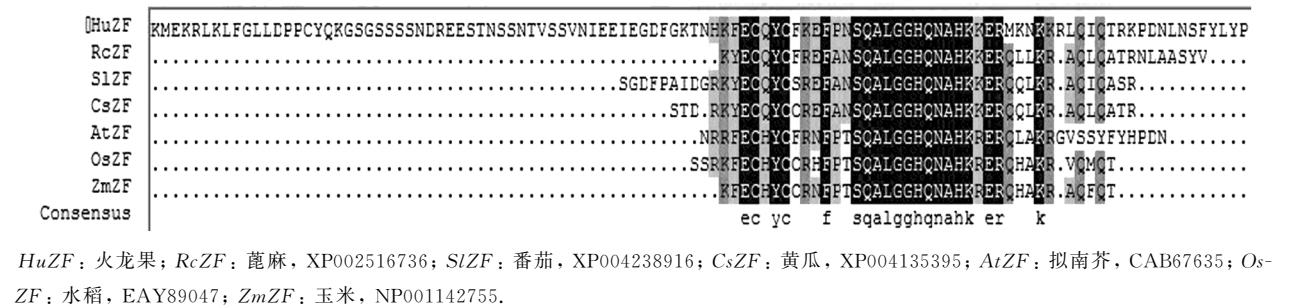


图 4 火龙果 *HuZF* 基因氨基酸序列片段与其他植物的氨基酸序列多重比较

2.4 胁迫处理对 *HuZF* 的表达影响

采用 RT-PCR 检测逆境胁迫对火龙果 *HuZF* 表达的影响, 结果表明(图 5), 干旱(10% PEG6000)胁迫(图 5-A)、高盐(图 5-B)处理后, 表达量增加, 并随处理时间的延长呈持续增加的趋势, 因此, 该基因的表达与干旱和高盐胁迫正相关; 在低温高盐(图 5-C)处理 6 h 后, *HuZF* 的表达水平较对照降低, 12 h 后仍低于对照, 但 24 h 后开始增加, 说明该基因在低温胁迫下表达量先减少后增加, 该基因的表达也与低温胁迫相关.

3 讨论

锌指蛋白最初于 1983 年在非洲爪蟾卵母细胞的转录因子 TFⅢA 中被发现^[6-7], 是迄今在真核生物基因组中分布最广的一类蛋白. 锌指蛋白通过与 Zn²⁺ 结合形成稳定的手指结构, 在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中^[8-9], 特别是在抗逆基因表达调控中起着重要作用^[10]. 有研究从大豆中克隆得到一个锌指蛋白基因 *SCOF-1*, 在拟南芥和烟草中过表达能使二者的抗寒性明显提高^[11]. 胡杨的一个锌指蛋白基因 *PSTZ* 在烟草中过表达使转基因烟草的抗盐性较野生型显著提高^[12], 过表达拟南芥锌指蛋白基因 *AtTZF1* 能显著提高植物的抗寒性和抗旱性^[13].

目前对火龙果的研究大多数集中在生物学特性、栽培技术、贮藏保鲜技术等领域, 对分子生物学的研究相对较少^[14], 尤其是对火龙果耐逆基因的研究更是空白. 本文在火龙果抗逆 cDNA 芯片分析的前期工作基础上, 克隆了火龙果类锌指蛋白基因(*HuZF*), 并采用半定量 RT-PCR, 分析 *HuZF* 在不同胁迫下茎的表达情况, 结果表明在干旱和高盐胁迫下, 火龙果 *HuZF* 表达量逐渐增强; 而在低温胁迫下表达量却先降

低后增强. 推测可能是该基因在逆境信号传递的调控方式不同所致. 因此, *HuZF* 的表达与火龙果应答干旱、高盐及低温等非生物胁迫相关. 有研究表明, 锌指蛋白基因在有些植物中属于依赖于 ABA 信号转导途径中的转录因子, 参与多种非生物胁迫的应答, 通过 SA,JA/ET 信号途径介导植物对生物胁迫的防御反应^[15], 但在火龙果中锌指蛋白是如何发挥作用有待进一步的探究, 同时下一步工作将克隆火龙果锌指蛋白基因全长序列并遗传转化进行功能验证, 进一步明确 *HuZF* 在逆境胁迫反应中的综合作用和意义.

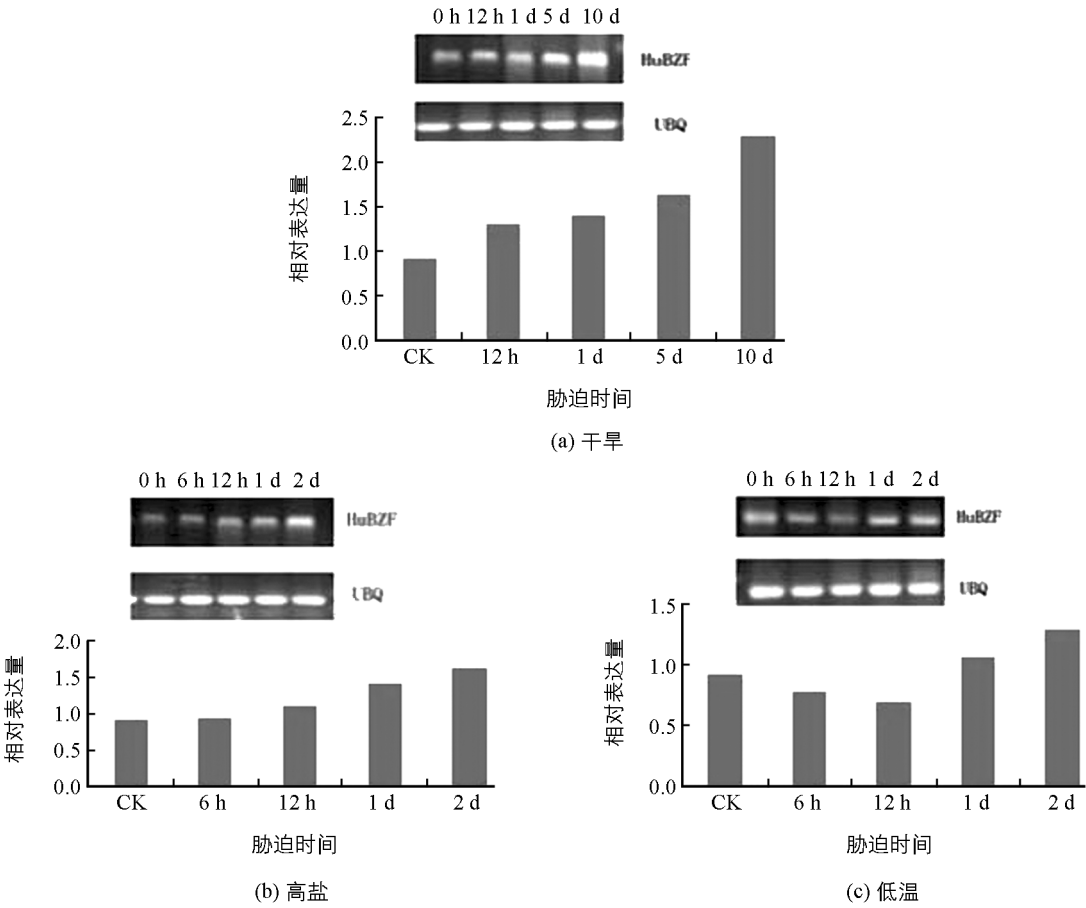


图 5 *HuBZF* 在不同胁迫(A: 干旱; B: 高盐; C: 低温)下的表达分析

参考文献:

[1] TAKATSUJI H. Zinc-Finger Transcription Factors in Plants [J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1998, 54(6): 582—596.

[2] MUKHOPADHYAY A, VIJ S, TYAGI A K. Over Expression of a Zinc-Finger Protein Gene From Rice Confers Tolerance to Cold Dehydration, and Salt Stress in Transgenic Tobacco [J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(16): 6309—6314.

[3] SAKAMOTO H, MARUYAMA K, SAKUMA Y, et al. Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors Under Drought, Cold, and High Salinity Stress Conditions [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 2734—2746.

[4] SUGANO S, KAMINAKA H, RYBKA Z, et al. Stress-Responsive Zinc Finger Gene ZPT2-3 Plays a Role in Drought Tolerance in Petunia [J]. Plant Journal, 2003, 36(6): 830—841.

[5] 蔡永强, 向青云, 陈家龙, 等. 火龙果的营养成分分析 [J]. 经济林研究, 2008, 26(4): 53—56.

[6] MILLER J, MCLACHLAN A D, KLUG A. Repetitive Zinc-Binding Domains in the Protein Transcription Factor III A from Xenopus Oocytes [J]. EMBO J, 1985, 4: 1609—1614.

[7] LEE M S, GIPPERT G P, SOMAN K V, et al. Three-Dimensional Solution Structure of a Single Zinc Finger DNA-Binding Domain [J]. Science (New York, N. Y.), 1989, 245(4918): 635 —637.

[8] GERISMAN H A, PABO C. A General Strategy for Select in High-Affinity Zinc Finger Porteins for Diverse DNA Target Sites [J]. Science, 1997, 275: 657—661.

[9] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc Finger Protein s: New Insights in to Structural and Functional Diversity [J]. Current in ion Structure Biology, 2001, 11(1): 39—46.

[10] LI Z Y, CHEN S Y. Differential Accumulation of the Sadenosy Methionine Decarboxylase Transcript in Rice Seedlings in Response to Salt and Drought Stresses [J]. Theoretical and App lied Genetics, 2000, 100(5): 782—788.

[11] KIM J C, LEE S H, CCHEONG Y H. A Novel Cold-Inducible Zinc Finger Protein from Soybean, SCOF-1, Enhances Cold Tolerance in Transgenic Plants [J]. Plant Journal, 2001, 25: 247 - 259.

[12] WANG Jun-ying, XIA Xin-li, WANG Jun-ping, et al. Stress Responsive Zinc-Finger Protein Gene of Populus Euphratica in Tobacco Enhances Salt Tolerance [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(1): 56 - 61.

[13] LIN P C, POMERANZ M C, JIKUMARU Y, et al. The Arabidopsis Tandem Zinc Finger Protein AtTZF1 Affects ABA-and GA-Mediated Growth, Stress and Gene Expression Responses [J]. The Plant Journal, 2011, 65: 253 - 268.

[14] 邓仁菊, 范建新, 蔡永强. 国内外火龙果研究进展及产业发展现状 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(6): 188—192.

[15] GLAZE BROOK J. Genes Controlling Expression of Defense Responses in Arabidopsis [J]. CurrentOpinion in Plant Biology, 1999, 2(4): 280—286.

Molecular Cloning of Pitaya Zinc Finger Protein Gene and Its Expression Analysis

YAN Feng-xia^{1,2}, WEN Xiao-peng¹, QIAO Guang¹, LIU Tao³

1. Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025, China;
2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025, China;
3. Guizhou Institute of Fruit Science, Guiyang Guizhou 550006, China

Abstract: Zinc finger proteins play important roles in regulating gene expression in both prokaryotes and eukaryotes. In the presnt study, a pair of primers was designed based on EST from cDNA microarray of pitaya (*Hylocereus undulatus* Britt), and a zinc finger protein gene fragment was cloned by reverse tran-scription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Bioinformatics analysis showed that the zinc finger protein gene fragment contained 334 bp nucleotide acids, encoding a peptide chain of 109 amino acids, and was designated as *HuZF*. Homology comparison with the sequences of zinc finger protein genes from other plants showed that they shared over 70% nucleotide sequence and over 60% amino acid sequence. RT-PCR analysis demonstrated that the expression of *HuZF* was up-regulated as exposed to high salt and drought stress, and first down-regulated and then up-regulated under cold stress. It is tentatively speculated that the expression of *HuZF* is associated with the response of the plant to low temperature, high salinity and drought stresses.

Key words: pitaya; zinc finger protein gene; cloning; expression analysis

责任编辑 胡 杨

