

毕氏海蓬子 *SbDREB* 基因的克隆与表达分析研究

孙晓波¹, 刘金兵², 余桂红¹, 张旭¹, 张鹏¹, 马鸿翔¹

(¹江苏省农业科学院江苏省农业生物学重点实验室, 南京 210014;

²江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京 210014)

摘要: 以毕氏海蓬子的基因组为模板, 通过 PCR 技术扩增到一个编码 DREB 蛋白 AP2 保守结构域的基因片段; 根据该片段序列设计引物, 以毕氏海蓬子经 NaCl 处理的植株肉质茎 cDNA 为模板, 应用 RACE 技术获得该基因的 cDNA 全长, 命名为 *SbDREB* (GenBank 登录号: JF894301)。 *SbDREB* 基因 cDNA 全长 1206bp, 包含一个编码 284 个氨基酸的完整开放阅读框。对氨基酸序列比对分析表明, 该蛋白在靠近 N 端具有典型的 AP2/EREBP 保守结构域, 且该结构域与一些高等植物 DREB 类转录因子的 AP2 区域具有高度同源性。进化树分析表明 *SbDREB* 属于 DREB 亚家族中的 A-6 亚族。实时荧光定量 PCR 结果显示: 干旱、高盐和 ABA 能够诱导其表达, 而低温则使其表达下调, 表明该基因在毕氏海蓬子植株对干旱、盐和低温等非生物胁迫的应答中起作用。

关键词: 毕氏海蓬子; DREB 转录因子; 胁迫处理; 实时定量 PCR

Cloning and Expression Characterization of a *SbDREB* Gene from *Salicornia bigelovii* Torr.

SUN Xiao-bo¹, Liu Jin-bing², YU Gui-hong¹, ZHANG Xu¹, ZHANG Peng, MA Hong-xiang¹

(¹Key Laboratory of Jiangsu Province for Agrobiology/Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014;

²Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014)

Abstract: In this study, with *Salicornia bigelovii* Torr.'s genomic DNA as the template, a genetic fragment coding for the conserved AP2 domain of a DREB-like protein was isolated by using PCR technology. With the primers designed on the basis of the genetic fragment sequence, a full-length cDNA, termed as *SbDREB* (GenBank accession number: JF894301), was cloned using its salt-treated stem cDNA as the template and by applying rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. *SbDREB* contained an open reading frame (ORF) of 1206bp long encoding 284 amino acids residues and was classified into DREB A-6 group of DREB protein based on phylogenetic analysis. The alignment analysis with other homologous sequences from higher plants indicated that the predicted protein sequence contained a typical AP2/EREBP DNA-binding domain near the N-terminal region and shared high homology with other proteins within the AP2/EREBP domain. Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) experiments showed that expression level of *SbDREB* was up-regulated after treatment by high salt, dehydration and the phytohormone abscisic acid (ABA), while down-regulated by low temperature. These results suggested that *SbDREB* may play an essential role as a DREB transcription factor in regulation of abiotic stress-responsive signaling in *S. bigelovii* Torr. .

Key words: *Salicornia bigelovii* Torr. ; DREB transcription factor; Abiotic stress; Quantitative real-time PCR

土壤盐渍化是严重影响农业生产和生态环境的非生物胁迫因素之一。因此, 提高作物耐盐性从而

培育耐盐新品种, 对盐碱地的充分利用及提高农业产量具有重要意义。毕氏海蓬子 (*Salicornia bigelovii*

收稿日期: 2011-05-18 修回日期: 2011-08-30

基金项目: 转基因生物新品种培育专项 (2009ZX08002-011B)

作者简介: 孙晓波, 博士, 副研究员, 从事植物生理与分子生物学方向研究。E-mail: sunxiaobojaas@163.com

通讯作者: 马鸿翔, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种与生物技术。E-mail: hxma@jaas.ac.cn

Torr.) 是世界上最耐盐的高等植物之一,其嫩尖可作为蔬菜,其种子可榨油。作为典型的盐生植物,毕氏海蓬子抗盐能力超过海水盐度的 20%~40%,耐盐(NaCl)极限达到 5%,其最适生长环境的 NaCl 盐分高达 200mmol/L^[1]。对毕氏海蓬子的研究表明,其不具备盐腺等特化结构,也不显著积累有机渗透调节剂,因而是研究植物抗盐机理的良好系统。近年来对其生理生化以及生长发育开展了较广泛的研究^[2-4],但从分子水平上对其耐盐机制进行研究的报道还很少^[5-6]。

干旱应答元件结合蛋白(DREB)类转录因子属于乙烯应答元件结合蛋白(AP2/EREBP)家族的一类成员,特异存在于植物中,它能特异结合启动子中含有 DRE/CRT 的顺式作用元件并激活其下游基因的表达。DRE/CRT 顺式作用元件普遍存在于胁迫应答相关基因的启动子中,因此 DREB 转录因子可以通过参与调控许多胁迫相关基因的表达及功能,对干旱、高盐和低温等非生物胁迫产生响应,从而提高植株的抗逆性^[7]。

本研究根据已报道的 DREB 基因的氨基酸保守序列设计简并引物,通过 PCR 与 RACE 技术相结合从毕氏海蓬子中克隆到了一个 DREB 同源基因,分析了其编码蛋白的氨基酸序列结构,并研究了其在逆境胁迫下的表达模式,不但为研究毕氏海蓬子的耐盐机理提供理论基础,同时也为通过基因工程改良植物抗逆性提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用毕氏海蓬子(*Salicornia bigelovii* Torr.)种子取自本所滩涂试验地。种子经 0.1% KNO₃ 浸泡 8h 后,播种于培养钵中,沙土培植,待出苗后生长 30d,取出洗根,置入容器中用 1/2 Hoagland 营养液预培养 3d 后,分别用 250mmol/L NaCl、100μmol/L ABA、20% PEG6000 的 1/2 Hoagland 营养液及 4℃ 进行胁迫处理。分别在胁迫处理 0、0.5、2、4、8、12 和 24h 时取样,液氮处理 2min 后于 -80℃ 保存。

1.2 *SsDREB* 基因片段的同源克隆

毕氏海蓬子基因组 DNA 的提取采用植物基因组提取试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)进行。根据 DREB 类转录因子 AP2 保守区的氨基酸序列 WGWVAAEI 和 YKPLHSSV,设计一对简并引物 Sb-F 和 Sb-R(表 1),以毕氏海蓬子的基因组为模板扩增 AP2 同源序列。

PCR 反应体系(25μl)为:2.5μl 含 MgCl₂ 的 10× PCR 缓冲液,正、反向的引物(10μM/μl)各 1.0μl,1.0μl 的 dNTP(脱氧核苷酸混合物,10mmol/L),1.0μl DNA(浓度 50ng/μl)样品,0.25μl LA-Taq 酶(浓度 5U/μl,宝生物工程(大连)有限公司),18.25μl 双蒸水。PCR 扩增程序为:95℃ 5min;95℃ 30s,55℃ 45s,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 10min。扩增得到了约 200bp 的 DNA 片段。

1.3 *SbDREB* 基因 cDNA 全长克隆与序列分析

取经盐诱导后的毕氏海蓬子肉质茎作为试验材料,采用 SV Total RNA lysis 试剂盒(Promega 公司,美国)提取总 RNA。采用 Invitrogen 公司 3'/5' RACE System(version 2.0)试剂盒克隆基因的末端序列。反转录引物使用 3'AP。根据已获得了 *SbDREB* 基因中间保守片段分别设计 3'和 5' RACE 的特异性引物。将设计的两条 3'端正向扩增嵌套引物 SbD3'GSP1 和 SbD3'GSP2 分别与通用引物 3'AUP 进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 产物稀释 10 倍作为模板进行第 2 轮扩增。设计两条 5'端反向扩增嵌套引物 SbD5'GSP1 和 SbD5'GSP2, SbD5'GSP1 与通用引物 5'AAP 进行第 1 轮 PCR 反应,产物稀释 10 倍作为模板,以 SbD5'GSP2 和通用引物 5'AUP 进行第 2 轮巢式扩增。PCR 反应条件均为:95℃ 预变性 3min 后,94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 1min10s,35 个循环;72℃ 延伸 5min。将所得的中间序列与 3'端和 5'端序列拼接得到基因全长。克隆 *SbDREB* 基因的引物序列见表 1,所用引物均由上海生物工程公司合成。

表 1 本试验涉及的引物序列

Table 1 The primer sequences involved

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
SbD-F	5'-TGGGGG(T) AAG(A) TGGGTC(T) GCC(A / T) GAA(G) ATC(T) CG-3'
SbD-R	5'-ACG(A / T) GA G(A / T) GAG(A) TGG(A / T / C) AGA(T) GGC(T) TTG(A) TA-3'
SbD3'GSP1	5'-CTCGTCTATGGCTCGGAACATTCC-3'
SbD3'GSP2	5'-GATCTCATGTCACCAACCAATTTG-3'
SbD5'GSP1	5'-AGAGACCAAATTGGGTGGTGACAT-3'
SbD5'GSP2	5'-GACGAGTTCGATTCTTAGGCAATC-3'
3'AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
3'AUP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
5'AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGgGGGgGGGgG-3'
5'AUP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

所有扩增得到的特异性 DNA 片段用凝胶回收试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司)按试剂盒提供的

方案进行回收,用 pGEM-T vector 系统(Promega 公司,美国)按试剂盒说明进行克隆,测序由上海生物工程公司完成。氨基酸序列的同源性比较采用 DNAMAN 6.0 完成。开放阅读框(ORF)在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站上用 ORF finder 分析,功能位点用 InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk>)、NCBI 进行分析。

1.4 实时定量 PCR 反应

采用实时定量 PCR 法对 *SbDREB* 基因在非生物逆境胁迫下的表达丰度变化进行分析。采用 SV Total RNA lysis 试剂盒(Promega 公司,美国)提取经胁迫处理与对照的毕氏海蓬子肉质茎总 RNA,采用逆转录试剂盒(Takara)合成 cDNA 第一条链。内标基因选用毕氏海蓬子 actin 基因,引物为:正向 5'-TTT-GAGCAGGAATCAGAAACCGCC-3' 和反向 5'-AGGAC-CTCTGGGCAACGGAATCTC-3', PCR 产物长度为 116bp。选取目的基因 *SbDREB* 的 5' 非翻译区设计一对引物:正向 5'-TGCACAAAACCTTCCAAATCTTC-3' 和反向 5'-TTCCCCCAATGTCTCTGCCTTACT-3', PCR 产物长度为 144bp。本试验在荧光定量 PCR 仪 Light Cycler 2.0(Roche 公司)上进行。采用 Light Cycler 2.0 中的 2- $\Delta\Delta C_p$ 方法进行基因相对表达量分析,检测肉质茎中 *SbDREB* 基因的表达,以对照肉质茎中基

因的表达作为标准,数值设为 1,其余样本为相对于标准 1 的相对表达值,每个样品设置 3 次重复。使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒按照操作说明进行。20 μ l 反应体系包括 1 μ l cDNA, 2 \times PCR mix 缓冲液 10 μ l,上下游引物(5 μ mol/L/ μ l) 分别 1 μ l, 7 μ l H₂O 补足。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 30s; 95℃ 5s, 57℃ 10s, 72℃ 20s, 40 个循环后,做溶解曲线分析。每个样品设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 毕氏海蓬子 *SbDREB* 基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

以毕氏海蓬子基因组 DNA 为模板,利用根据 DREB 亚家族 AP2 保守结构域设计的简并引物进行 PCR 扩增,得到了一条 215bp 的预期片段(图 1-A),经测序分析表明该序列编码的氨基酸序列与 DREB 类蛋白的保守区片段高度同源,为植物 DREB 亚家族的 AP2 保守结构域。因此根据此中间片段的测序结果设计 5'/3' RACE 引物,经过两轮巢式 PCR 扩增,分别得到一条约 500bp(5'端扩增产物)和一条约 900bp(3'端扩增产物)的条带(图 1-B 和 C),与预期片段大小基本相符。

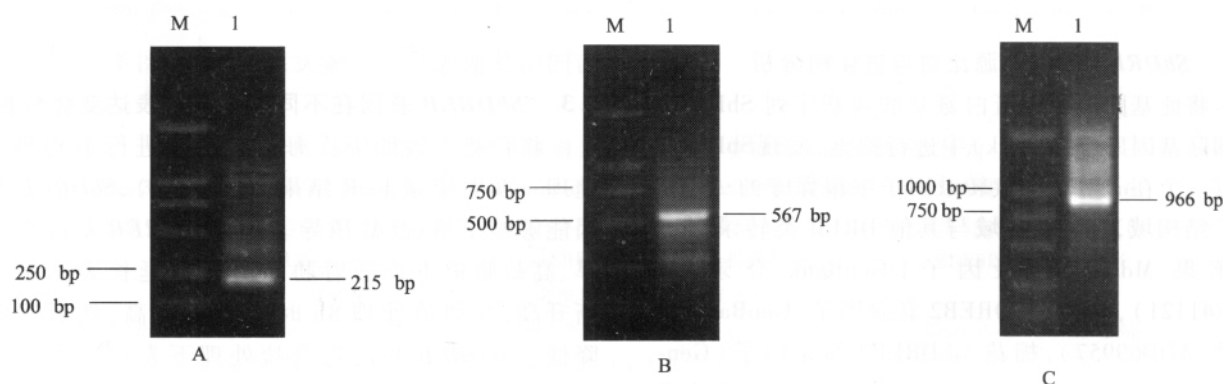


图 1 *SbDREB* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 *SbDREB* gene fragments detected by Electrophoresis

A: *SbDREB* AP2 保守结构域特异片段的电泳检测结果(1: *SbDREB* 特异片段 PCR 产物; M: DNA 标准分子量 DL2000);

B: 5' RACE 扩增产物的电泳检测结果(1: 5' RACE 巢式 PCR 扩增产物) C: 3' RACE 扩增产物的电泳检测结果(1: 3' RACE 巢式 PCR 扩增产物)

A: Electrophoresis result of *SbDREB* gene fragment(1: Electrophoresis result of *SbDREB* fragment; M: DNA DL2000);

B: Electrophoresis result of 5' RACE p roduct(1: The nested PCR p roduct of 5' RACE);

C: Electrophoresis result of 3' RACE p roduct(1: The nested PCR p roduct of 3' RACE)

对克隆到的中间片段和 RACE 产物进行拼接,结果表明:该 cDNA 全长 1206bp,包括起始密码子和多聚 A 尾,开放阅读框长度为 852bp,5'端含有 191bp 的前导序列,第 192~194 位为起始密码子 ATG,第 1044~1046 位为终止密码子 TAA,其后为

161bp 的非编码序列(图 2),将此基因命名为 *SbDREB*,GenBank 的登陆号为 JF894301。DNASTAR 软件分析表明 *SbDREB* 共编码 284 个氨基酸,该蛋白分子量(MW)为 31.9Kda,理论等电点(pI)为 7.71。

```

1      CTCCTGGGGGGGGCCACCGCCCTCCACCTTCTGGGGGCTCCCTCGCCACCCGGCTCC
61     GCGCGACAATACCAATTTCTTCTCTCCCTCATCAACGTTTAACTTGAACCTGATCCTCT
121    TGCTTCATCCCACCTCTTCTGCTTACATAACATATTCAGCTTATTACCGAATAATTT
181    ATCAGAAACTTATGCTGCTGCAATAGATACATATAGTAGCTCCAACAACAATCCCGTTG
      M A A A I D T Y S S S N N N P L
241    TTTTAGATCCTCTAAGTGAGGAGCTAAAGAGAGCATTTGAACCTTTCATCCCTGCTTAC
      V L D P L S E E L K R A F E P F I P A S
301    CACCCACAAACCCACCTTTATACCACTCTTCAAATAACAATCTTTAGATGTTTCTCAAG
      P P T N P P L Y H S S N N N L Y M F S Q
361    GGTTTGATCAAAACATGCGTATTTGCACAAAACCTTCCAAATTTCTCAATGGTTTCTACTC
      G F D Q N M G I A Q N L P N S S M V S T
421    TATGTTTAAAGAAAAACCATGTTTCTTCCCTAAACTAGCAGTAATGAAACAAACA
      L C L K K N H R F L S P K L A V M K Q N
481    AACCCACAAAATTATATAGAGGAGTAAGCAGAGACATTGGGGGAAATGGGTGGCTGAGA
      K P T K L Y R G V R Q R H W G K W V A E
541    TTACATTGCTTAAGAACTGAACTGCTATGCTCGGAACATTCCAAAGTCTGAGAAAG
      I R L P K N R T R L W L G T F Q T A E E
601    CTGCTTAGCCTATGACAAAGCAGCATATAAATCTCGAGGACACTTTGCTCGTCTCAATT
      A A L A Y D K A A Y K L R G H F A R L N
661    TCCACATATGAAGCATAATGATCTCATGTCACCCACCAATTTGCTCTTACAAAGCTC
      F P H M K H N G S H V T T Q F G L Y K P
721    TTCATTCTTCTGTTGATGCTAAACTTGAAGCCATTGCCAAAGCTTGACATCTCTCAAG
      L H S S V D A K L E A I C Q S L D I P Q
781    AACAGGGGAAAACAGAGTACCCCTGTTTCTCTCTGTTTGATGCTGATTCATCTCTG
      E Q G K T E Y P C F S S V C D S D S Y P
841    TTTTGGATACAGTTTACCAACTACTGAGGAGGTTTAAATTCGTAACCCAAAGGTTCCCA
      V L D T V S P T T E E V L I R K P K V P
901    CCGTTGCAGACGACTACCGACTGCTTGTGTTTACCGGAATCTGGACTTAAGTTGTTGG
      T V A D D S P T A S C S P E S G L K L L
961    ATTTCACTAAATCTTGTGGAATGAATCTGATATTCTCTCTTGGATAAGCTCCCTTCCC
      D F T K S C W N E S D I S S L D K L P S
1021   TTGAAATTGACTGGGATTCTCTTTAAATCTTGTAGTTAGTTGGTTTGGGGTTTCATTT
      L E I D W D S L *
1081   CTTTGGCTTAGTTCTTGTTTGGGTTTCTTGTCCCTGCAAATTGGTATTTTGGACATCTG
1141   CAACGACGGGGTGATATTAGGATGCATATCTTGTAAATATTACTATATATTGTGTCAA
1201   AAAAAA

```

图2 *SbDREB* 的 cDNA 核苷酸序列及其翻译的氨基酸序列Fig. 2 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of *SbDREB*

方框中为起始密码子;星号代表终止密码子;阴影部分为一对兼引物的位置

The start code is boxed. An asterisk marks the stop code. Shaded residues indicate the location of the pair of degenerate primers

2.2 *SbDREB* 基因同源比对与进化树分析

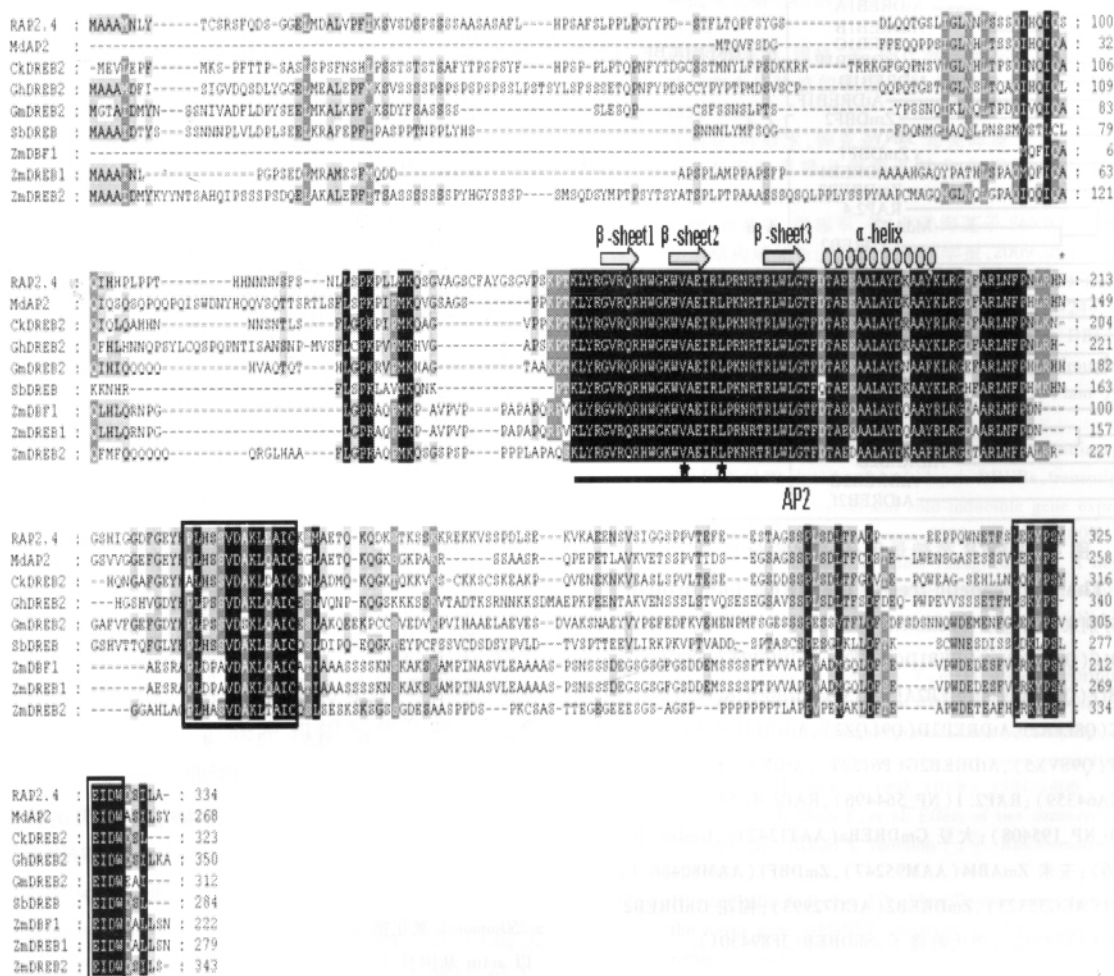
将此基因编码的蛋白氨基酸残基序列 *SbDREB* 在国际基因库 (GenBank) 中进行搜索,发现 *SbDREB* 含有一个在 DREB 亚族转录因子中很保守的 AP2 / ERF 结构域,且该结构域与其他 DREB 类转录因子如苹果 MdAP2 转录因子 (GenBank 登录号: ADE41121) 柠条 Ck DREB2 转录因子 (GenBank 登录号: ADD69957),棉花 GhDREB2 转录因子 (GenBank 登录号: AAT39542),大豆 GmDREB2 转录因子 (GenBank 登录号: AAQ57226),玉米转录因子 ZmDBF1 (GenBank 登录号: AAM80486.1)、ZmDREB1 (GenBank 登录号: ACG35323) 和 ZmDREB2 (GenBank 登录号: ACO72993) 的 AP2 区域具有高度同源性 (图 3)。该 AP2 / ERF 结构域含有 1 个 14 个氨基酸形成的 α 螺旋和 3 个 β 折叠,第 14 位为保守的缬氨酸残基 (V),第 19 位的亮氨酸残基与已报道的 DREB 亚族 A-6 组的保守氨基酸位点相一致。

DREB 亚族的成员被分为 6 个亚族,将代表每个亚族的 DREB 蛋白与 *SbDREB* 进行进化树分析,结果显示 *SbDREB* 属于 DREB 亚族的 A-6 亚组,但

与同组其他成员的亲缘关系均较远 (图 4)。

2.3 *SbDREB* 基因在不同胁迫下的表达变化分析

将长势一致的毕氏海蓬子植株进行不同胁迫处理。实时定量 PCR 结果显示 (图 5), *SbDREB* 基因能够被干旱、高盐诱导表达。*SbDREB* 基因在干旱、高盐胁迫下均随着胁迫时间的延长表达量逐渐升高,在胁迫处理 8h 时表达达到最高,然后逐渐降低。*SbDREB* 基因在高盐处理下表达丰度迅速提高,比干旱处理下的表达提早达到高峰。*SbDREB* 基因在高盐处理下 8h 的表达丰度约是对照的 25 倍,而在干旱下 8h 的表达丰度则为对照的 9.5 倍。与 A-6 亚组的 *ZmDBF1* 基因一样^[8],ABA 能够诱导 *SbDREB* 基因的表达,ABA 处理 0.5 ~ 2h, *SbDREB* 基因的表达量略有升高,而在处理 4h 后,其表达丰度迅速升高,表达量为对照的 16 倍,然后逐渐降低。4℃ 低温处理 0.5h, *SbDREB* 基因表达量基本不变,然而低温处理 2h, *SbDREB* 基因的表达量迅速减少,随着胁迫时间的进一步延长表达量基本保持不变,在低温处理 24h 时,表达量仅为对照的 12%。

图3 *SbDREB* 与其他 A-6 组 DREB 转录因子编码区氨基酸序列比对Fig. 3 Comparison of the deduced amino-acid sequences of *SbDREB* with other DREB A-6 proteins.

阴影表示一致区域; 下划线区为高度保守的 AP2/EREBP 结合域; 星号指 AP2/EREBP 结合域第 14 和第 19 位保守的缬氨酸和亮氨酸; 箭头区为 AP2/EREBP 结合域中 β 折叠区, 圆点区为 AP2/EREBP 结合域中的 α 螺旋区; 方框区为 DREB 亚族 A-6 组的保守结构域

The shading indicates identities; the highly conserved AP2/EREBP domain is underlined. The stars indicate the conserved valine (V) and glutamic acid (E) at the 14th and the 19th position in the AP2/EREBP domain respectively. β -sheets were indicated by the arrows and α -helix by the dots. The conserved domain of A-6 group were boxed

3 讨论

BDREB 类转录因子是植物中可与 DRE 元件结合进而调控植物抗逆胁迫反应的转录因子。DREB 类转录因子属于 AP2/ERF 转录因子家族中一个亚族 (DREB 亚族), Sakuma 等^[9]进一步将该亚族分为 6 个组 (A1 至 A6)。目前对 DREB 亚族成员的研究主要集中在 A-1 和 A-2 组, 而对其他组成员则研究的较少。但根据拟南芥中数据, 其他组成员在整个 DREB 亚族中占据着 75% 的数量^[9], 因此对这些组成员的结构与功能的研究将有助于对整个 DREB 亚

族转录因子的进一步认识。*SbDREB* 基因是本研究自世界最耐盐的植物毕氏海蓬子中分离的一个 DREB 同源基因, 对 *SbDREB* 所编码的蛋白 *SbDREB* 进行序列与同源性分析表明, *SbDREB* 中含有 1 个 AP2/ERF 结构域, 其归为 DREB 亚族的 A-6 组。这个保守的 AP2/ERF 结构域含有 58 个氨基酸残基, 形成 3 个 β 折叠和 1 个 α 螺旋的结构, 在识别胁迫响应基因启动子区域的 BRE/ERF 顺式作用元件中起重要作用^[9-10]。以前的研究结果显示 AP2/ERF 结构域的第 14 位的缬氨酸残基 (V14) 与第 19 位的谷氨酸残基 (E19) 在与 DNA 结合的特异性中起关

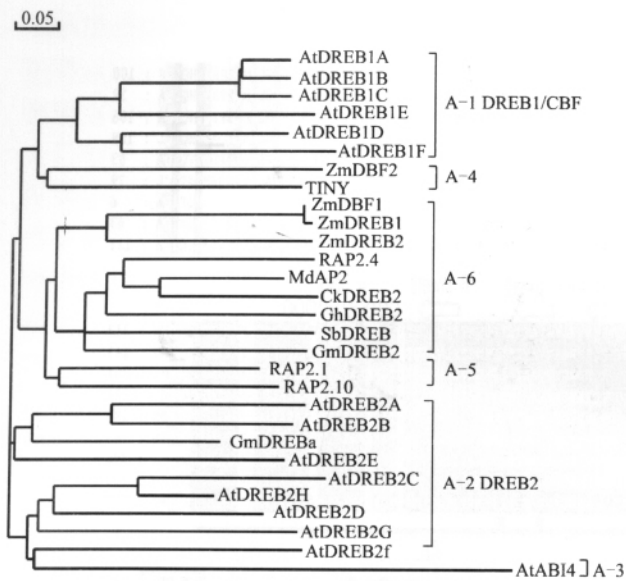


图4 DREB 类转录因子进化树分析

Fig. 4 The phylogenetic tree of the DREB like protein

所用序列分别来自拟南芥 *AtDREB1A* (Q9M0L0), *AtDREB1B* (P93835), *AtDREB1C* (Q9SYS6), *AtDREB1D* (Q9FJ93), *AtDREB1E* (Q9SGJ6), *AtDREB1F* (Q9LN86), *AtDREB2A* (O82132), *AtDREB2B* (O82133), *AtDREB2C* (Q8LFR2), *AtDREB2D* (Q9LQZ2), *AtDREB2E* (O80917), *AtDREB2F* (Q9SVX5), *AtDREB2G* (P61827), *AtDREB2H* (Q9SIZ0); *TINY* (CCA64359); *RAP2.1* (NP_564496), *RAP2.4* (NP_177931), *RAP2.10* (NP_195408); 大豆 *GmDREBa* (AAT12423), *GmDREB2* (AAQ57226); 玉米 *ZmABI4* (AAM95247), *ZmDBF1* (AAM80486.1), *ZmDREB1* (ACG35323), *ZmDREB2* (ACO72993); 棉花 *GhDREB2* (AAT39542); 毕氏海蓬子: *SbDREB* (JF894301)

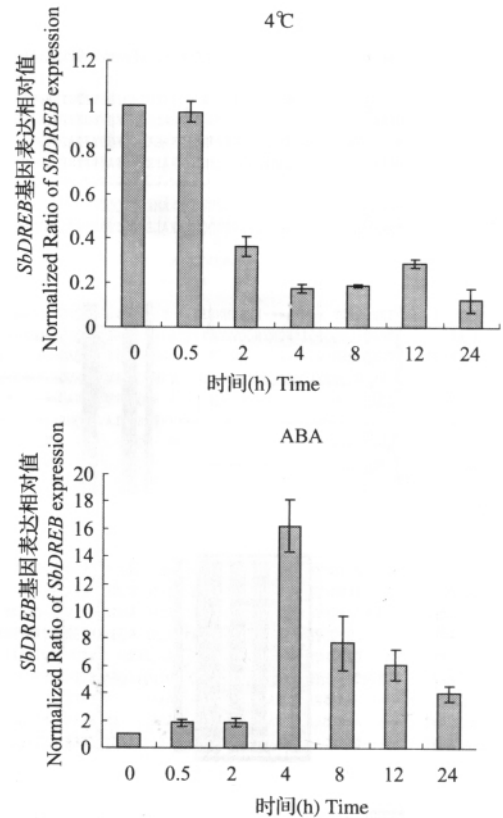
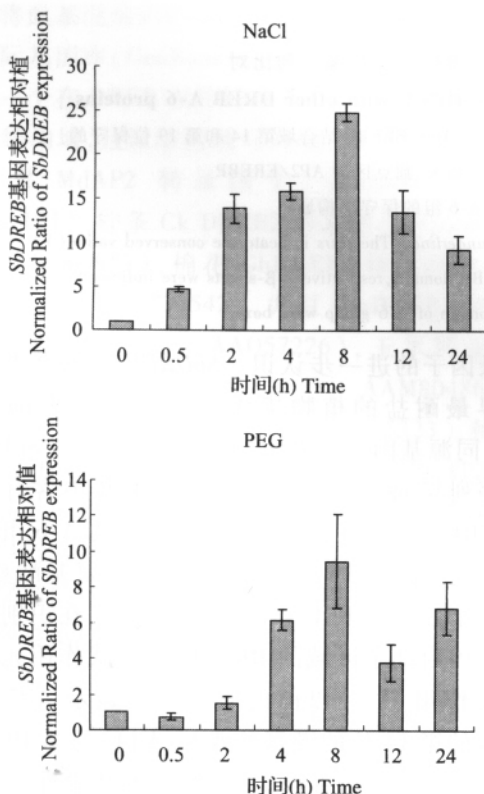


图5 *SbDREB* 基因在不同胁迫下的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *SbDREB* in response to various treatments

a 250mmol/L 氯化钠 b 20% PEG(6000) c 4°C 低温 d 100μmol/LABA, 以 actin 基因作为内参 处理时间分别为 0.5、2、4、8、12 和 24 h
a 250mmol/l NaCl b 20% PEG(6000) c Low temperature(4°C), d 100μmol/l ABA, The actin gene was amplified as a control, The time course of each treatment was 0.5h 2h 4h 8h, 12h and 24h respectively

键性的作用^[9, 11, 12]。然而在 *SbDREB* 的 AP2/ERF 结构域中第 19 位的谷氨酸残基被亮氨酸残基所取代, 同样的取代在大豆、棉花、玉米等的 DREB 转录因子中也出现^[8, 13, 14]。由此可以推测 AP2/ERF 结构域第 14 位的缬氨酸残基在与 DNA 特异性的结合中较第 19 位的氨基酸起更重要的作用。

在本研究中, *SbDREB* 基因在干旱、高盐的胁迫下表达上调, 这与已报道的 DREB 家族 A-6 组的其他成员玉米 *ZmDREB1* 基因^[8]、棉花 *GhDBP2* 基因^[13]、大豆 *GmDREB2* 基因^[14]、芦荟 *AIDREB2* 基因^[16]及柠条 *CkDBF* 基因^[17]的表达模式相似。在低温处理下 *SbDREB* 的表达下调, 而 *ZmDREB1* 不受低温的诱导, *GhDBP2*、*GmDREB2*、*AIDREB2* 和 *CkDBF* 的表达量是上调的, 这个结果说明尽管同属与 A-6 组, *SbDREB* 与 *ZmDREB1*、*GhDBP2*、*GmDREB2*、*AIDREB2* 和 *CkDBF* 在 AP2 结构域有高度的相似

性,有 A-6 组特有的保守序列,但 *SbDREB* 特有的在低温处理下其表达量下调的表达模式显示 *SbDREB* 在耐盐植物毕氏海蓬子中具有不同于与其他 A-6 组非耐盐植物转录因子的作用。

植物激素 ABA 在植物的生长和对逆境胁迫的响应中起关键作用。早期的研究表明拟南芥 *DREB1* 与 *DREB2* 基因的表达是两个独立于 ABA 之外的调控途径^[11],但在随后的研究中发现依赖 ABA 的调控途径中也含有 DRE 顺式元件。Haake 等^[18]发现经干旱处理诱导的 *DREB1D* 表达量在 ABA 缺乏突变体 *aba1-1* 中明显减少,显示 ABA 的合成是干旱诱导 *DREB1D* 的表达所必需的。ABRE(ABRE: ACGTGG/TC) 是 ABA 响应基因启动子中的一个主要顺式调控元件,调控 ABA 响应基因的表达;研究显示 DRE/CRT 能够与 ABRE 互作调控 ABA 响应基因的表达^[19]。此外,外源 ABA 处理也能够诱导玉米 *ZmDBF1* 基因、棉花 *GhDBP2* 基因和柠条 *CkD-BF* 基因的表达^[8,13,17]。这些研究显示 DREB 转录因子与 ABA 途径有一定联系和相互作用。本试验发现 *SbDREB* 基因也能够受外源 ABA 诱导表达,进一步支持 *DREB* 基因在逆境下调控途径可能同 ABA 调控途径是相互联系的结论;同时,在本研究中 *SbDREB* 基因在外源 ABA 处理下的最大表达量出现在处理后的 4h,早于用 PEG 和 NaCl 处理最大表达量出现的时间(两者出现时间均为处理后 8h),这个结果显示 *SbDREB* 基因对干旱和高盐处理的响应可能需要内源 ABA 的累积或与 ABA 调控途径中 ABA 响应基因的互作。

本试验从世界最耐盐的植物毕氏海蓬子中克隆分离得到了一个 DREB 同源基因 *SbDREB*,试验结果表明干旱、高盐和 ABA 能够诱导其表达,而在低温处理下它的表达量下调,进一步对其功能及其所调控的下游基因展开研究,将为进一步探索毕氏海蓬子的耐盐机理奠定基础。

参考文献

- [1] Glenn E P, Brown J J, O'Leary J W. Irrigating crops with seawater [J]. Sci Am, 1998, 279: 76-81
- [2] 王丽燕, 赵可夫. NaCl 胁迫对海蓬子 (*Salicornia bigelovii* Torr.) 离子区室化、光合作用和生长的影响 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(1): 94-98
- [3] 周峰, 周泉澄, 华春, 等. KCl 和 NaCl 对毕氏海蓬子生长和几种抗氧化酶活性的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 51-54
- [4] 华春, 周泉澄, 周峰, 等. 毕氏海蓬子种子萌发及幼苗生长对盐分和水分胁迫的响应 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1852-1855
- [5] 肖前谷, 叶妙水, 钟克亚, 等. 北美海蓬子 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因的克隆及拟南芥转化分析 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(5): 619-624
- [6] 刘钢, 肖前谷, 段瑞军, 等. 北美海蓬子 *SbNHX1* 基因耐盐性及功能结构域分析 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 0874-0881
- [7] 张梅, 刘炜, 毕玉平. 植物中 DREBs 类转录因子及其在非生物胁迫中的作用 [J]. 遗传, 2009, 31(3): 236-244
- [8] Kizis D, Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway [J]. Plant J, 2002, 30: 679-689
- [9] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 998-1009
- [10] Allen M D, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, et al. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA [J]. EMBO J, 1998, 17: 5484-5496
- [11] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an ERF/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1998, 10(8): 1391-1406
- [12] Cao Z F, Li J, Chen F, et al. Effect of two conserved amino acid residues on DREB1A function [J]. Biochemistry, 2001, 66: 623-627
- [13] Huang B, Jin L G, Liu J Y. Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. J Plant Physiol, 2008, 165: 214-223
- [14] Li X P, Tian A G, Luo G Z, et al. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses [J]. Theor Appl Genet, 2005, 110(8): 1355-1362
- [15] Liu Y, Zhao T J, Liu J M, et al. The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 1303-1308
- [16] 张倩, 马婧, 何婧, 等. 中国芦荟 *AIDREB2* 基因的克隆及其胁迫表达 [J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1659-1666
- [17] Wang X, Dong J, Liu Y, et al. A novel dehydration-responsive element-binding protein from *Caragana korshinskii* is involved in the response to multiple abiotic stresses and enhances stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28: 664-675
- [18] Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2002, 13: 639-648
- [19] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses [J]. Plant J, 2003, 34: 137-148