

# 胡杨锌指蛋白基因克隆及其结构分析

王俊英,尹伟伦,夏新莉

(北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083)

**摘要:** 锌指蛋白属于核转录因子家族,在原核生物与真核生物基因转录调控中发挥作用。分析了耐盐锌指蛋白 *Alfin-1* 基因在苜蓿与拟南芥中的保守性后,设计了一对引物。以胡杨水培叶片为材料,从总 RNA 中通过 RT-PCR 分离得到一个锌指蛋白基因,其 cDNA 长 924 bp。分析其氨基酸序列表明,存在一个典型的 Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> 锌指结构,从第 556 位开始有一个富含 G 的启动子结合位点 GTGGGG。由于具有相同功能的转录因子在结构和 DNA 结合区的氨基酸序列上具有保守性,因此,从结构分析上可以推测该基因与 *Alfin-1* 在功能上是有一定的相关性。

**关键词:** 胡杨; 锌指蛋白; 基因克隆

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)02-0245-04

## Cloning and Structure Analysis of Zinc Finger Protein Gene in *Populus Euphratica* Oliver

WANG Jun-Ying, YIN Wei-Lun, XIA Xin-Li

(College of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Zinc finger proteins belong to a family of nuclear transcription factors which function is to regulate gene expression in both prokaryotic and eukaryotic cells. A pair of primers was designed after analyzing the conservation of salt-tolerant zinc protein *Alfin-1* in such diverse plants as alfalfa and *Arabidopsis*. The zinc finger protein gene is isolated from total RNA with RT-PCR in aquaculture leaves of *Populus euphratica*. Its full cDNA length is 924 bp. Analysis of its amino acid sequence showed it has a typical Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> zinc finger structure and a G-rich promoter binding site GTGGGG, starting from position 556. Since transcriptional factors which have the same function show conservation in structure and amino acid sequence of DNA binding region, the structure analysis in this paper indicates the cloned zinc finger protein gene may have functional correlation to *Alfin-1*.

**Key words:** *Populus euphratica*; zinc finger protein; gene cloning

锌指(Zinc finger, ZFs)是识别核酸的一种普遍性蛋白结构元件,它通过一对半胱氨酸和一对组氨酸与 Zn<sup>2+</sup> 络合,自我折叠成一种手指状的蛋白结构。典型的锌指结构为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指,此外还发现有 Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub> 型锌指以及 His/Cys<sub>3</sub> 型结构,包含有该序列的蛋白质通常属于核转录因子家族,在原核

生物与真核生物基因转录调控中发挥作用。

迄今为止,为 NaCl 干旱胁迫调控的基因中仅有很少量的转录因子被确定<sup>[1~3]</sup>,已经发现的大多数植物转录调控因子属于螺旋-环或 Leu 拉链基序。矮牵牛花 EPF1 因子<sup>[4]</sup>是存在于植物中的第一个 Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> 型锌指蛋白。苜蓿 *Alfin-1* 最早从耐盐苜

收稿日期:2004-02-12;修回日期:2004-05-24

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(编号:2004AA212123,2002AA2Z4011)、国家自然科学基金项目(编号:30271096,30371143)和教育部重点项目(编号:02022,104242)[Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2004AA212123,2002AA2Z4011), National Natural Science Foundation of China(No. 30271096,30371143) and Key Program Project of Ministry of Education(No. 02022,104242)]

作者简介:王俊英(1971—),内蒙古人,在读博士,研究方向:植物生物技术。Tel:010-62338128; E-mail:cauhzq@sina.com

通讯作者:尹伟伦(1945—),北京人,教授。Tel:010-62338080; E-mail:yinwl@bjfu.edu.cn

蓿细胞中作为盐诱导的转录物被克隆了出来,鉴别出该 cDNA 编码一个锌指调控蛋白,其表现的基因特性是由于长期耐盐性的增长造成的。苜蓿 *Alfin-1* 基因编码的富 Cys 序列,包含一个 Cys<sub>4</sub> 锌指和另一个 His/Cys<sub>3</sub> 结构,这使它成为植物体内一个新型类型的核酸结合蛋白,并且这个序列是富 Cys 序列家族中的第一个植物成员,在植物中起转录因子的作用。*Alfin-1* 基因的超量表达表现为植株的耐盐性增加,并影响其他基因的调控作用。

胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) 长期生长在盐渍化和干旱的土壤中,对高盐和干旱形成了很强的适应能力,是典型的耐盐抗旱植物。我们分析了 *Alfin-1* 在苜蓿与拟南芥中的保守序列,设计了一对引物,从胡杨总 RNA 中分离出一个编码锌指蛋白的基因,希望以此为基础研究胡杨丰富的耐盐抗旱基因资源及其调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) 采自于新疆的二年生苗,在室内水培,待其枝条抽叶后,放入 0.7% 的 NaCl 溶液中盐处理 48 h,取其叶片。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 胡杨总 RNA 提取

采用 CTAB 法提取。材料经液氮研磨后,加入 65 °C 预热的 CTAB 提取缓冲液,充分振荡混匀,65 °C 温育 3~5 min;加等体积的酚充分振荡,离心;取上清,加等体积的氯仿/异戊醇混匀离心。取上清,加 1/4 体积 10 mol/L 的 LiCl, -20 °C 沉淀 3 h,4 °C 离心;2 mol/L LiCl 洗沉淀,DEPC 水溶解;加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇沉淀,70% 的乙醇洗涤,吹干,DEPC 水溶解。

#### 1.2.2 PCR 引物

根据苜蓿、拟南芥 *Alfin-1* 基因序列设计了正、反向引物(由上海生工生物工程公司合成)。

#### 1.2.3 基因的分离

以胡杨总 RNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增。根据 TaKaRa 公司的 mRNA Selective PCR Kit 试剂盒说明书进行。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳分离后,用回收试剂盒回收。

#### 1.2.4 基因克隆和测序

将回收的目的片段与 pMD18-T 载体连接,经

蓝白筛选后用碱裂解法提取质粒,以质粒为模板进行酶切反应鉴定重组质粒。测序由上海博亚公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的片段扩增

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,显示扩增条带大小在 947 bp 左右,而测序结果表明此条带大小为 924 bp。

### 2.2 重组质粒鉴定

经蓝白斑初步筛选后,以质粒为模板进行酶切鉴定,结果显示酶切片段大小与 RT-PCR 扩增出的片段大小是一致的,说明所鉴定的质粒为重组质粒。

### 2.3 cDNA 序列及预测的氨基酸序列(图 1)

### 2.4 结果分析

#### 2.4.1 测序结果的序列分析

克隆得到的胡杨锌指蛋白 cDNA 长 924 bp,分析其氨基酸序列表明,存在一个典型的 Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> 锌指结构,序列为 Cys-X<sub>3</sub>-Cys-X<sub>7</sub>-His-X<sub>3</sub>-His,与苜蓿 *Alfin-1* 编码富 Cys 序列 Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>11</sub>, -Cys-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>9</sub>-His-X<sub>5</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys 结构<sup>[5]</sup>相比有一定的差异。从第 556 位开始有一个富含 G 的启动子结合位点 GTGGGG。*Alfin-1* 在体外以一种序列特异方式结合 DNA,其与启动子结合的 DNA 一致序列为 GTG(G/N)NG<sup>[6]</sup>,由于植物耐盐性是一种功能耐盐性,而转录因子基因的调控作用也是与其结构密切相关的,相同类型转录因子的 DNA 结合区的氨基酸序列较为保守,具有相同功能的转录因子在结构上具有保守性。因此,从结构分析上可以推测该基因与 *Alfin-1* 在功能上是有一定的相关性的。

#### 2.4.2 测序结果的同源性检索分析(表 1)

我们从 GenBank 库中用 Blast 搜索碱基序列比较同源性结果显示:与拟南芥、甜菜、小麦、水稻、月见草有较高的同源性。

对检索结果分析显示:与甜菜的同源性最高,其次是拟南芥、月见草,与水稻和小麦的同源性较低。由于锌指蛋白属于转录因子家族,功能相同的转录因子并不一定是同源的,因此,与耐盐锌指蛋白 *Alfin-1* 基因的同源性有一定的差异。

```

1   GGACAAGGTGCAACCTGTGGCCACGCCTCTATTGTTTCAGGGCGGGCGCGCTGAACCTC
   TGATTCGATCCGGGTATTCAATCCC GCCGCTGAGATGCTCAGTTGACTCCTTAACCTTGA
121  TAGGAAGATGGCTTATTCAATAATTCGTGCATAAGGGTAAGGAACCTTTGGAATGACTAAT
                                     M T N
181  GCGAATGGGTGTAAGCTTCGCTGCTCGGAAACACCCAGTGCTGACCACACTGAGAGACAC
   A N G C K L R C S E T P S A D H T E R H
241  GAAAGCGCAGGTAACGCCAGTTGGCGAAGTGGCGTTAAGCATCCCATGCGGTACGAAAAG
   E S A G N A S W R S G V K H P M R Y E K
301  AGAGGTCGTGATGATATCATCTATGTCCGTACCGCTCCTCGTGGAGTAGATCCCGCGTCC
   R G R D D I I Y V R T A P R G V D P A S
361  ACCCAAGTCTTTGACCAGGGAACGGGAAAATCCCACTACCGCTGGCAGGCCAGCCGGGC
   T Q V F D Q G T G K F P L P L A G Q P G
421  CGTGAGCGCGGTGGGAACGGACTTCCAAAAAGCCAGCCCCGGGCCGGGGTCAGCATAGA
   R E R G G N G L P K K P A P G R G Q H R
481  ATGAAGGGGATGGCTCTAACTAATGTTGTGTCGGCTTTGCCAACTTCTTTGGGTTACGGGC
   M K G M A L T N V V S A L P T S W V T G
541  GGAGAAAGAGCGGACGTGGGGACTCGGGTCCGGGGCGCAGCCTAACGAAGAGAGCCATTCC
   G E R A D V G T R V G A Q P N E E S H S
601  ATTTGGGCGAGACAGAATGGGCGGGCAGGACGGTCTGGTGTCCGATGGTCAGACGACG
   I L G E T E W A G T S G L V S D G Q T T
661  ACTACTTCATTTATTAGATTAGTCTTACCGCCTATCCCGAATGAAATGGAATAGAAGG
   T T S F I R L V L P A Y P G M K W N R R
721  AACGCGAAGCGCTATAGGATTGGTTTTTTTTTTGGGGGGGGGATAAGCTTGCTTCTTCA
   N A K R Y R I G F F F W G G D K L A S S
781  CAAGTCCGCCCCGACCGGCAGCTGCTGGGTCTCCCATCTCTCTAAACTTCCCCCGGT
   Q A P P R P A A A G S P H L L *
841  CTTCCGGCCCGAGCTGTATGAGGCAGAAACTCGTCTCACGTACGGTTCGGAGGCCGAGCCC
901  CACCCAGCAGGACGAATTAGTGG

```

图 1 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1 The full cloned cDNA sequence and its amino acid sequence

表 1 同源性检索分析

Table 1 Alignment of cloned fragments in GenBank database

基因序列号 Assession No.	物种 Specices	Score (bits)	同源性(%) Identities
Y08501.1	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	1072	71.34
AC006225.3	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1070	71.2
AP000396.2	甜菜 <i>Beta vulgaris subsp</i>	1015	71.72
X78036.1	月见草 <i>O. berteriana</i>	954	65.37
AB076665.2	水稻 <i>Oryza sativa</i>	741	48.61
AY500223.1	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	708	48.28

### 3 讨 论

各种植物的耐盐性,特别是高等植物,它是一种功能耐盐性,它需要一系列的整体适应性,是细胞、

组织、系统的协调统一的适应机理。植物的耐盐性是由位于不同染色体上的多基因控制的,转入一个或两个抗盐基因对提高高等植物的抗盐性效果不是显著。而转录因子同时可以调控多个基因的表达,对研究耐盐植物的信号传导和耐盐机制、提高转基因植物的抗旱耐盐性都有一定的意义。

胡杨是典型的抗旱耐盐植物,其优良的基因资源已受到了全世界的广泛关注。胡杨具有较强的抵抗渗透胁迫的能力,分室渗透调节在胡杨细胞抵御盐胁迫过程中起了至关重要的作用<sup>[7]</sup>。在盐胁迫下,胡杨细胞将大部分盐离子积累在液泡中,这样植物细胞不但可以避免脱水,而且可以在高浓度的土壤溶液中吸收水分,同时也提高了其抗旱性。那么,胡杨在受到盐胁迫时,是通过怎样的途径将外界信号传递给细胞内部并最终引发了基因的调控、以及调控胡杨耐盐的主要有哪些基因,目前还未见报道。

我们克隆到的此基因与拟南芥和甜菜中细胞色素 C 氧化酶基因、小麦细胞色素 C 成熟酶 Fc 亚基基因、月见草中 ABC 型血红素转运蛋白基因都有一定的同源性,甜菜和月见草都属于耐盐植物。细胞色素 C 氧化酶在胞外电子受体存在时,电子传递可以活化质子泵,引起质子运动并诱导膜电位的显著下降及钾离子吸收,酶释放质子到胞外的同时传递电子给胞内的氧,产生部分膜电位。膜电位的变化可能进一步引起膜上多种离子通道活性改变,导致离子的跨膜流动如胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流。这在跨膜信号转导中极为重要,同时为溶质的跨膜运输提供了能量;ABC 型血红素转运蛋白也是利用 ATP 和血红素的氧化还原提供能量进行离子转运的。而胡杨进行区域化作用主要由液泡膜上质子泵、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白和离子通道调控的,这说明此锌指蛋白可能的调控机制是通过提高与能量代谢有关的酶的基因表达量来提高胡杨的耐盐性的。并且胡杨细胞在受到盐胁迫时其线粒体和质体的含量显著增加<sup>[8]</sup>,这也说明胡杨通过调节其能量代谢来调节其耐盐能力是一条很重要的途径。

虽然,克隆到的此胡杨锌指蛋白基因所编码翻译的多肽功能仍需明确,但是它包含有一个氨基酸特性的核酸结合蛋白在基因调控中却很重要。现在还不了解此基因产物在耐盐细胞或植物中发挥的作用,目前已构建好了工程菌,正在进行烟草的转化以确定其功能,将进一步报道转基因烟草中耐盐性的变化以及该基因的表达调控机制。

## 参考文献(References):

- [1] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377~403.
- [2] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327~334.
- [3] Winicov I, Bastola D R. Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiol Plant*, 1997, 19: 435~449.
- [4] Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua N H. Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *EMBO J*, 1991, 11: 241~249.
- [5] Winicov I. cDNA encoding putative zinc finger motifs from salt-tolerant alfalfa cells. *Plant Physiol*, 1993, 102: 681~682.
- [6] Bastola D R, Pethe V V, Winicov I. Alfin-1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene. *Plant Mol Biol*, 1998, 38: 1123~1135.
- [7] LIU Qun-Lu, ZHANG Xu-Jia, LI-Yi, WANG Sha-Sheng, JIANG Xiang-Ning. Studies on the proton pumping activity of  $\text{H}^+$ -ATPase in tonoplast vesicles of *Populus euphratica*. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(5): 495~500.  
刘群录, 张旭家, 李义, 王沙生, 蒋湘宁. 胡杨液泡膜微囊  $\text{H}^+$ -ATPase 质子泵活性研究. *植物学报*, 2001, 43(5): 495~500.
- [8] GU Rui-Sheng, JIANG Xiang-Ning, GUO Zhong-Chen. Structure characteristics associated with salt tolerance of *Populus euphratica*. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(6): 576~579.  
谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 胡杨细胞和组织结构与其耐盐性关系的研究. *植物学报*, 1999, 41(6): 576~579.