

文章编号: 1000-5641(2009)02-0096-09

# 一个拟南芥 C2H2 锌指蛋白的结构域分析

唐洪波, 杨扬, 孙越, 张亮, 王洋, 李小方, 许玲

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** At3g23140 是拟南芥中仅含有一个 C2H2 锌指结构的转录因子, 主要含有 N 端的 C2H2 锌指结构和 C 端的类似 EAR 两个结构域. 将 At3g23140 中仅含 C2H2 锌指结构区域不同长度的两个基因片段 A1 (240 bp), A2 (410 bp) 克隆到植物表达载体 pMON530 35S 启动子的下游, 并转化野生型拟南芥. 经过筛选得到稳定遗传的 T<sub>3</sub> 代纯合转化子. 对转基因植株研究表明, 35S::A2 转基因植株的内源乙烯释放量明显低于野生型, 这与 At3g23140 插入失活突变体 *cs16966* 的表型是一致的, 而 35S::A1 转基因植株的内源乙烯释放量与野生型没有明显区别. 表明 A2 片段的过量表达产生了显性抑制的作用, 这种显性抑制效应很可能是由于 A2 蛋白片段与 At3g23140 表达产物所调控的核酸序列竞争结合所导致. 而 A2 片段 C 端所含有的非锌指结构域是 At3g23140 蛋白与靶基因序列结合所必需的.

**关键词:** 拟南芥; 锌指蛋白; 转录因子; 竞争抑制

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A

## Domain function analysis of an *Arabidopsis* C2H2 zinc finger protein

TANG Hong-bo, YANG Yang, SUN Yue, ZHANG Liang,  
WANG Yang, LI Xiao-fang, XU Ling

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** At3g23140 is a transcription factor with one single C2H2 zinc finger domain, containing C2H2 zinc finger domain in N-terminal regions and a C-terminal EAR-motif-like sequence. Two different fragments of At3g23140 that only contain the C2H2-type zinc-finger domain were inserted downstream of 35S promoter in the plant expression vector pMON530, and introduced into wild-type *Landsberg erecta* (*Ler*). Independent homozygous transgenic lines were obtained after selection of T<sub>3</sub> progenies. Ethylene detection results showed that endogenous ethylene value of 35S::A2 transgenic plants was less than that of the control, which was consistent with the phenotype of *cs16966*, but endogenous ethylene value of transgenic plant 35S::A1 has no significant difference with that of the wild-type. It indicated that repression was caused by over-expression of A2, which may due to A2 competing for the DNA sequence regulated by At3g23140, and non-C2H2 zinc finger domain of the C-terminal regions of A2 is essential for At3g23140 integrating with targeted DNA.

收稿日期: 2008-09

基金项目: 国家自然科学基金(30570159); 863 项目(2006AA10Z109)

第一作者: 唐洪波, 女, 硕士研究生.

通讯作者: 孙越, 女, 副教授, 研究方向为植物发育与分子生物学. E-mail: ysun@bio.ecnu.edu.cn.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; zinc finger protein; transcription factor; competition

## 0 引 言

转录因子,也称反式作用因子,是指那些具有同真核生物启动子特定序列结合活性的蛋白质分子,或者是具有已知 DNA 结合域结构特征的蛋白质分子,其主要功能是激活或抑制基因的转录效应<sup>[1]</sup>. 锌指蛋白(zinc finger protein)是一个庞大的转录因子家族,负责调控基因的表达<sup>[2]</sup>. 其中,C2H2 型锌指蛋白研究较多.C2H2 型锌指蛋白最初在爪蟾卵母细胞中的 TFIIIA (transcription factor IIIA) 家族中发现<sup>[3]</sup>,在含有 C2H2 锌指结构的锌指蛋白中,高度保守的 QALGGH 序列对于结合靶 DNA 是至关重要的<sup>[4,5]</sup>.

研究表明,在与干旱、低温等非生物胁迫诱导的基因表达有关的 ERF(ethylene-responsive-element-binding factor)家族中, NtERF3, AtERF3, AtERF4 同属于 ERFII,它们是具有抑制功能的转录因子<sup>[6-8]</sup>. 进一步研究表明, ERFII 家族成员的 C 端区域都包含着 EAR 保守序列(L/FDLNL/FXP),并且 C 端包含 EAR 保守序列的区域对于转录因子的抑制功能是必需的<sup>[9]</sup>. 许多 TFIIIA 家族锌指转录因子,如小麦中的 WZF1,拟南芥中的 ZAT1, ZAT5, STZ/ZAT10, ZAT11 以及矮牵牛中的许多 ZPT 家族成员(除了 ZPT3-1 和 ZPT4-1)的 C 端区域也包含 EAR 保守序列<sup>[10-13]</sup>. Ohta<sup>[9]</sup>通过氨基酸的删减表明,C 端区域包含 EAR 保守序列的锌指转录因子具有抑制功能,并且它们的抑制功能区域位于 C 端包含 EAR 保守序列的区域.

SUPERMAN 作为 TFIIIA 家族锌指转录因子仅含有一个 C2H2 锌指结构<sup>[14]</sup>. SUP 的 C 端也含有类似 EAR 的保守序列. Hiratsu<sup>[15]</sup>等研究表明, SUP 是一个具有抑制功能的转录因子,并且 SUP 中具有抑制功能的部位位于 C 端包含类似 EAR 保守序列的区域. 在拟南芥中过量表达 SUPERMAN 中删减了 C 端抑制功能区域而保留 C2H2 锌指结构区域的基因片段 SUP $\Delta$ RD,所得到的 35S:: SUP $\Delta$ RD 转基因植株表型与 superman 极为相似. 表明过量表达的 SUP $\Delta$ RD 依赖它所含有的 C2H2 锌指结构与 SUP 蛋白所调控的靶基因序列竞争结合,从而丢失了抑制功能.

At3g23140 也是仅含有一个 C2H2 锌指结构的转录因子. 并且 At3g23140 的 C 端也含有与 SUP 极为相似的类似 EAR 的保守序列,本文将 At3g23140 中仅含 C2H2 锌指结构区域不同长度的两个基因片段 A1 (240bp), A2 (410bp)构建到过量表达载体 pMON530 上,转化野生型拟南芥. 对 At3g23140 的竞争抑制转化植株研究表明, 35S:: A2 转基因植株的内源乙烯释放量明显低于野生型,这与 At3g23140 插入失活突变体 *cs16966* 的表型是一致的. 表明 A2 片段的过量表达产生了显性抑制的作用,这种显性抑制效应很可能是由于 A2 蛋白片段与 At3g23140 蛋白所调控的靶基因序列竞争结合所导致. 35S:: A1 转基因植株内源乙烯释放量和野生型并没有明显差别,暗示转入的过量表达的 A1 可能并未起到与 At3g23140 竞争的目的,表明在 At3g23140 中, A2 片段 C 端所含有的非锌指结构域 A2- A1(81-136 氨基酸位点)是 At3g23140 与靶 DNA 结合所必需的.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、菌株和试剂

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 的 Landsberg *erecta* (Ler) 生态型, No-0 野生型, 以及 *cs16966* (No-0 背景)。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由华东师范大学吴自荣教授提供, 农杆菌 GV3101 由本实验室保存。

Taq 酶购自于天根生物公司, 限制性内切酶和连接酶购自于 Takara, TOYOBO 反转录试剂盒购自于朝瑞生物公司。

## 1.2 *At3g23140* 相关片段 A1 及 A2 的克隆及过量表达载体的构建

本实验所使用的植物表达载体为 pMON530, 它是一个能在植物体中过量表达目的基因的质粒, 它含有强启动子 35 S, 它可以使外源基因在植物生长发育的任何阶段、任何组织器官中表达, 在原核细胞中有壮观霉素和链霉素抗性基因, 在真核即植物体内具有卡那抗性筛选基因。

以拟南芥基因组 DNA 为模板, 设计引物 (A<sub>1f</sub>: GGTACCATGAAC CACCGGGA-CAAAC A<sub>6r</sub>: GAATTCGGTTTGTGAAGTTTGTGGAGG A<sub>4r</sub>: GAATTCGGATC-CGAGCCCTAAGCTC), PCR 扩增目的片段 A1 (240 bp) 及 A2 (410 bp)。将 PCR 扩增并测序正确的目的基因片段以 KpnI 和 EcoRI 克隆位点插入 pMON530 上, 抽出质粒做酶切验证以确保外源片断插到 pMON530 上。将构建好的表达载体用电击法转化农杆菌 GV3101。将 50 或 100 L 的农杆菌感受态细胞与 1  $\mu$ g 的重组质粒混匀放入电击杯中, 冰上放置 5 min。将电击杯放入电击仪中, 在电阻为 25 k $\Omega$ , 电压为 1.8 MV 的条件下电击数秒。加 1 mL LB 于电击杯中, 然后将电击杯中的液体移入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 28  $^{\circ}$ C 恢复 2 h。取 400  $\mu$ L 体积菌液涂布于含有壮观霉素/链霉素 50  $\mu$ g/mL, 利福平 20  $\mu$ g/mL 的 LB 平板上。于 28  $^{\circ}$ C 暗培养 36~48 h。待长出单克隆后, 提质粒, 将质粒转入 *E. coil* 中, 进行酶切和 PCR 鉴定。

## 1.3 植物生长条件

植物材料种植在含有蛭石、黑土和珍珠岩 (比例为 7:2:1) 的混合机质中, 或者种植在 1/2 MS (Murashige and Skoog 不含糖) 培养基上。植物种子消毒采用 70% 乙醇浸泡 8 min, 随后用蒸馏水冲洗 3 次。种子经过 4  $^{\circ}$ C 低温处理 3 d 后, 置于 23  $^{\circ}$ C 24 h 光照条件下培养。

## 1.4 拟南芥的遗传转化及转化子的筛选

当拟南芥刚抽出花序时, 去除其顶生花序。转化必须在去除顶生花序 4 d 后进行。用无菌的牙签挑取农杆菌单克隆置入 10 mL 的含有 50  $\mu$ g/mL 壮观霉素/链霉素, 20  $\mu$ g/mL 利福平的 LB 培养基中, 28  $^{\circ}$ C 振荡培养 36~48 h。1/50 至 1/100 体积重新接种于 LB 培养基中, 28  $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.2~1.6。4 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体。将菌体用相应体积的渗透培养基 (1/2 MS, 蔗糖 5%, 1 mg/mL 的 6-BA 母液 10  $\mu$ L/L, Silwet-77 400  $\mu$ L/L, 定容后调 pH 至 5.8) 重悬, 混合均匀, 至 OD<sub>600</sub> 值为 0.8。用喷雾器将农杆菌喷洒在待转化的植株上, 移入恒温室培养, 每隔 6 d 喷 1 次, 喷 2~3 次, 以获得更高的转化率。在 12 cm 的平板上倒入含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 1/2 MS 培养基, 凝固后, 将经过 75% 酒精消毒的 T<sub>0</sub> 转化子混入 0.1% 的琼脂中均匀涂布于平板上。4  $^{\circ}$ C 低温处理 3~4 d 后放入温室中培养。利用植物表达载体赋予转基因植株的卡那霉素抗性, 转基因植株幼苗为绿色, 未转基因的植株幼苗由于不具卡那霉素抗性, 逐渐黄化死亡。将具有卡那霉素抗性的幼苗移出培养, 成熟后单株收获并种植 T<sub>1</sub> 代, 单株收获 T<sub>1</sub> 代的种子 T<sub>2</sub> 代, 将 T<sub>2</sub> 代种植在含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 1/2 MS 的培养基中进行筛选, 全部为绿色的转基因幼苗的 T<sub>2</sub> 株系为纯合子, 种植 T<sub>3</sub> 代纯合子品系, 进行相关生理测验。

### 1.5 RT-PCR

取 1 μg RNA 于 70 °C 温育 10 min,迅速短暂离心,置于冰上.在 Eppendorf 管中加入 RNA(1 μg)及 TOYOBO 反转录试剂盒中以下试剂:5 × buffer 4 μL,dNTP mixture (10 mmol/L) 2 μL,Rnase Inhibitor 1 μL,逆转录酶 1 μL,Oligo(dT)<sub>15</sub> 1 μL,Nuclease-free water 补足到 20 μL.42 °C 温育 60 min,95 °C 温育 5 min,0~5 °C 放置 5 min.

样品模板浓度的调节:以第一链 cDNA 为模板,PCR 扩增 actin 基因,PCR 循环数为 25,不断的调整模板量直至扩增的 actin 基因的产量基本一致.然后,以同样的模板浓度 PCR 扩增目的基因(A1 及 A2),循环数为 27~28 cycles.

### 1.6 内源乙烯测定

将 30 粒种子种植在含有 1/2 MS 培养基的 10 mL 小瓶中,置于 23 °C 24 h 光下生长数天,密闭 40 h,抽取 1 mL 气体,采用气相色谱法(GC-MS)测定.并同时称取所测植株鲜重.

## 2 实验结果

### 2.1 At3g23140 相关片段 A1 及 A2 过量表达载体的构建

At3g23140 与 SUP 类似,也是仅含有一个 C2H2 锌指结构的转录因子,它们的锌指结构区具有较高的同源度(见图 1).另外,At3g23140 的 C 端也包含与 SUP 极为相似的类似 EAR 的保守序列(L/FDLNL/FXP)(见图 2).At3g23140 包含 C2H2 锌指结构区域以及位于 C 端类似 EAR 保守序列的区域(见图 3),以拟南芥基因组 DNA 为模板,PCR 扩增目的片段 A1(240 bp)及 A2(410 bp).其中,A1(1-80 氨基酸位点)及 A2(1-136 氨基酸位点)仅包含 C2H2 锌指结构区域但删减了 C 端类似 EAR 保守序列的区域(见图 3).将 PCR 扩增并测序正确的目的基因片段以 KpnI 和 EcoRI 克隆位点插入植物表达载体 pMON530 上,抽出质粒做酶切验证以确保外源片断插到 pMON530 上.将构建好的表达载体用电击法转化农杆菌 GV3101.

### 2.2 转基因拟南芥的筛选及鉴定

将构建好的 A1 及 A2 的表达载体转入农杆菌中,并用农杆菌转化野生型拟南芥,收获农杆菌侵染的拟南芥的种子,在含有 50 g/mL 卡那霉素 1/2 MS 平板上筛选获得 T<sub>0</sub> 代转化子.筛选得到的阳性植株(即 T<sub>0</sub> 代)自交后,单株收获并种植 T<sub>1</sub> 代种子,这些种子有纯合子也有杂合子,单株收获即为 T<sub>2</sub> 代,种植 T<sub>2</sub> 代在卡那霉素的 1/2 MS 的培养基中进行筛选,选择种植 T<sub>3</sub> 代纯合子品系进行分子生物学指标分析和生理测试.

为了检测转基因植株中外源基因的表达情况,本文采用了半定量 RT-PCR 法.以转基因植株的 cDNA 为模板扩增出的片段的条带要比以相同量的野生型的 cDNA 为模板扩增出的条带要亮的多(见图 4).表明转基因植株中所转入的 At3g23140 的相关片段 A1 及 A2 的确进行了过量表达.



图 1 SUPERMAN 与 At3g23140 的锌指结构区的氨基酸序列比较

Fig. 1 Alignment of amino acids in C2H2-type zinc-finger regions of SUPERMAN and At3g23140

(L/FDLNL/FXP)

SUPERMAN	NDEIISLELEIIGLINESSEQDLDLELR LG.FA.
At3g23140	DDDTHRSPPEITGGSQPQDGDLDLRLRGHRH

图2 SUPERMAN 与 At3g23140 的 C 端包含类似 EAR 保守序列的氨基酸序列比较  
 Fig.2 Alignment of amino acids in the carboxy-terminal regions that contain an EAR-motif-like sequence of SUPERMAN and At3g23140

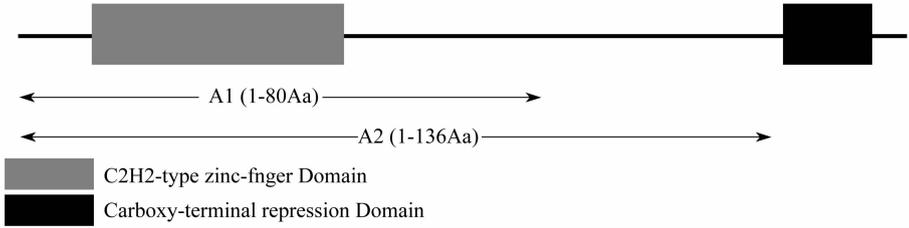


图3 At3g23140 包含 C2H2 锌指结构区域和位于 C 端抑制功能区域  
 Fig.3 At3g23140 containing C2H2-type zinc-finger Domain and Carboxy-terminal repression Domain  
 注: A1 containing 1-80 amino acid sequences of At3g23140 and A2 containing 1-136 amino acid sequences of At3g23140 which both only contain C2H2-type zinc-finger Domain

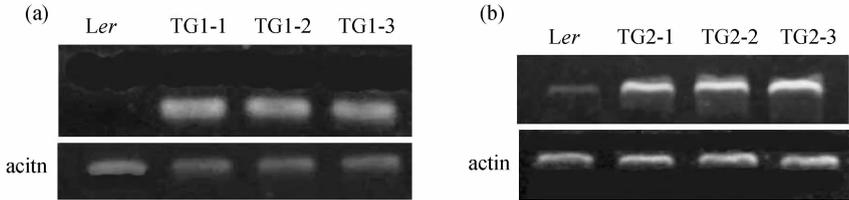


图4 RT-PCR 验证转基因植株  
 Fig.4 Transgenic plants confirmed by RT-PCR  
 (a)为 A1 在转基因植株中的过量表达情况 (b)为 A2 在转基因植株中的过量表达情况

### 2.3 *cs16966* 的内源乙烯释放量低于野生型

拟南芥突变体 *cs16966* 从美国种子中心库获得,它是由 DS 转座子单插入 *At3g23140* 造成 *At3g23140* 失活的突变体<sup>[16]</sup>. 乙烯作为一种重要的植物激素参与调节植物生长发育的过程. 本文定量测定了 *cs16966* 的内源乙烯释放量,采用 GC-MS 测定了萌发后两周的 *cs16966* 内源乙烯的释放量. 发现 *cs16966* 的内源乙烯释放量明显低于野生型(见图 5),表明 *cs16966* 中乙烯的合成途径可能发生了改变.

### 2.4 35S:: A2 转基因植株内源乙烯释放量低于野生型

本文同样采用 GC-MS 测定了 35S:: A2 转基因植株萌发后两周的内源乙烯释放量,结果如图 6 所示. 发现 35S:: A2 转基因植株的内源乙烯释放量也明显低于野生型. 表明在内源乙烯合成方面,35S:: A2 转基因植株与 *cs16966* 表现出一致的表型.

### 2.5 35S:: A1 转基因植株内源乙烯释放量和野生型相似

定量测定 35S:: A1 转基因植株萌发后两周的内源乙烯释放量,结果如图 7 所示,发现 35S:: A1 转基因植株内源乙烯释放量和野生型并没有显著区别. 表明转入的过量表达的 A1 可能并未起到与 *At3g23140* 竞争的目的.

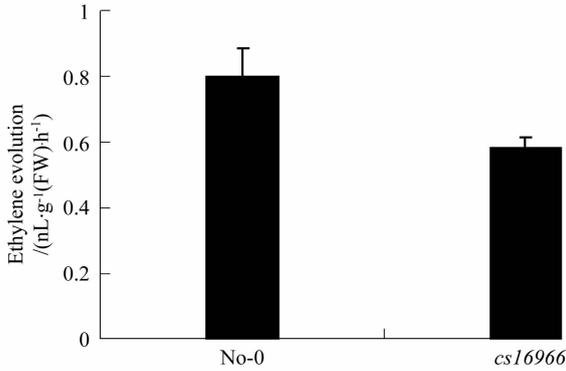


图 5 *cs16966* 的内源乙烯释放量

Fig. 5 Endogenous ethylene value of *cs16966*

注:SPSS 分析结果(*F* 检验)显示 *cs16966* 与 No-0 野生型的内源乙烯释放量差异显著( $P < 0.05$ ), 乙烯放量单位中的 FW 即 Fresh Weight 鲜重的意思,下同

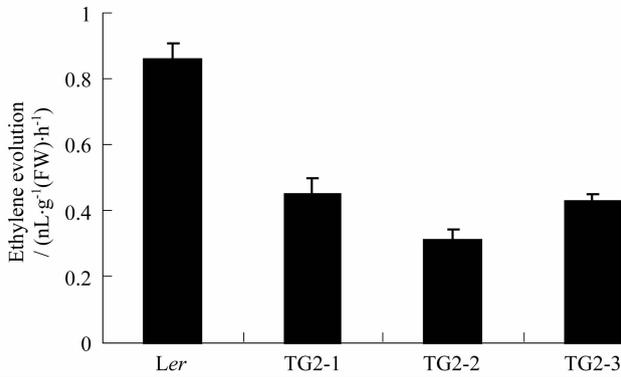


图 6 35S::A2 转基因植株的内源乙烯释放量

Fig. 6 Endogenous ethylene value of 35S::A2 transgenic plants

注:SPSS 分析结果(*F* 检验)显示野生型与转基因植株的乙烯释放量差异显著( $P < 0.05$ )

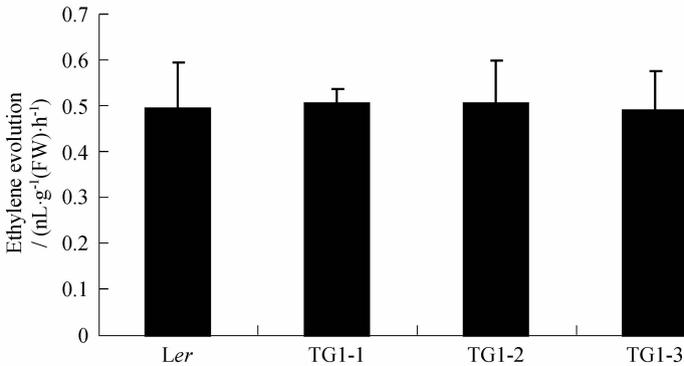


图 7 35S::A1 转基因植株的内源乙烯释放量

Fig. 7 Endogenous ethylene value of 35S::A1 transgenic plants

### 3 讨 论

转录因子在高等植物的生长发育及其对外界环境的反应中起着重要的调控作用<sup>[1]</sup>. 植物界中具有许多含有 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构的转录因子, 自从在矮牵牛中分离了第一个植物 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指蛋白基因 ZPT2-1<sup>[17]</sup>以来, 已经在矮牵牛、拟南芥、小麦、棉花和水稻等植物中相继分离了 50 多个植物 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白基因<sup>[2]</sup>. 锌指结构区包含(F/Y)XCX<sub>2-5</sub>CX<sub>3</sub>(F/Y)X<sub>5</sub>ΨX<sub>2</sub>HX<sub>3-5</sub>H, 其中, 两个 Cys 和两个 His 与锌原子形成配位键, 进而形成一个包含 β 发夹和一个 α 螺旋结构的紧密空间结构<sup>[2, 18-20]</sup>. 对矮牵牛中 ZPT2-1, ZPT2-2 双锌指结构蛋白研究表明, ZPT2-1, ZPT2-2 中的双锌指结构可以识别含有两个 AGC 核心位点的 DNA 序列, 核心位点间的距离决定对靶序列的识别<sup>[4]</sup>. 而仅含有一个锌指结构的 SUP 可对靶序列 DNA 进行独立的转录调节, 并且锌指区域及位于两侧的 N 端和 C 端(15-78 位点氨基酸)是 SUP 结合靶 DNA 所必需的, 将 SUP 位于锌指区的第 63 位甘氨酸突变成天冬氨酸, SUP 则失去结合靶 DNA 的能力<sup>[21]</sup>.

转录因子的主要功能是激活或抑制基因的转录, 研究表明, ERFII 转录因子及许多 TFIIIA 家族锌指转录因子都是具有抑制功能的转录因子, 并且具有抑制功能的部位位于 C 端包含 EAR 保守序列(L/FDLNL/FXP)的区域<sup>[9]</sup>. SUP 的 C 端也具有类似 EAR 保守序列, Hiratsu 等研究表明 SUP 是一个具有抑制功能的转录因子. 删减 SUP 的 C 端包含 EAR 保守序列区域(保留 1-174 氨基酸位点), 发现 SUP 的抑制效率大大降低, 而将 SUP 中仅保留 C 端 EAR 保守序列区域(保留 175-204 氨基酸位点)发现抑制效率甚至高于 SUP(1-204 氨基酸位点)全长时的抑制效率, 表明抑制功能区域位于 C 端包含类似 EAR 保守序列的区域. SUP 参与维持花器官中雄蕊和心皮边界的形成. *Superman* 中, SUP 基因发生突变, 雄蕊细胞大量分化, 阻止了心皮的发育, 最终在心皮位置便形成了雄蕊<sup>[22]</sup>. 在拟南芥中过量表达 SUP 中保留 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构区域而删减 C 端具有抑制功能区域的部分 SUP 片段 SUP $\Delta$ RD(1-174 氨基酸位点), 所得到的 35S::SUP $\Delta$ RD 转基因植物的表型与 *superman* 的表型极为相似, 表明过量表达的 SUP $\Delta$ RD 依赖它所含有的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构与 SUP 蛋白所调控的靶基因序列竞争结合, 从而丢失了抑制功能. 转基因植物与 *superman* 的相似表型表明 SUP 的 C 端具有抑制功能的区域对于正常花发育是必需的<sup>[15]</sup>.

At3g23140 与 SUP 类似, 也是仅含有一个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构的转录因子, 它们的锌指结构区具有较高的同源度. 并且 At3g23140 的 C 端也含有与 SUP 极为相似的类似 EAR 的保守序列, 将 At3g23140 删减了 C 端包含类似 EAR 保守序列区域而保留 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构区域的 A1(240 bp), A2(410 bp)构建到过量表达载体 pMON530 上, 转化野生型拟南芥, 经过筛选得到可以稳定遗传的 T<sub>3</sub> 代纯合子转基因拟南芥品系. 通过 RT-PCR 检测证明我们所转入的 At3g23140 的两个部分片段 A1 和 A2 在转基因植株中的确进行了过量表达. 内源乙烯测定表明, 35S::A2 转基因植株的内源乙烯释放量明显低于野生型, 这与 At3g23140 插入失活突变体 *cs16966* 的表型是一致的. 表明 A2 片段的过量表达产生了显性抑制的作用. A2(1-136 氨基酸位点)包含着对于结合靶基因序列所必需的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构区域, 这种显性抑制效应很可能是由于过量表达的 A2 蛋白片段与 At3g23140 蛋白所调控的核酸序列竞争结合所导致. 并且, At3g23140 的 C 端包含类似 EAR 的保守序列的区域对于 At3g23140 的功能是必需的. 此外, 35S::A2 转基因植株表现出内源乙烯合成的异常, 暗示着

At3g23140 中的 C 端可能参与抑制植物体内调节乙烯合成的相关基因的转录。

测定结果显示,35S::A1 转基因植株内源乙烯释放量和野生型并没有明显差别。暗示过量表达的 A1 蛋白片段可能并未与 At3g23140 蛋白所调控的核酸序列竞争结合。与 A2 蛋白片段相比,A1 也包含了 C2H2 锌指结构区域,这一区域是保证锌指蛋白与靶基因结合所必需的<sup>[4,14]</sup>。但是,A1 却缺少了 A2-A1(81-136 氨基酸位点),表明在 At3g23140 中,除了 C2H2 锌指结构区域是结合靶基因所必需的,A2 蛋白片段 C 端所含有的非锌指结构域 A2-A1(81-136 氨基酸位点)也是 At3g23140 与靶基因序列结合所必需的。

在植物体内,存在着许多包含 EAR 保守序列及类似 EAR 保守序列的转录因子<sup>[9]</sup>,我们构建并获得了 At3g23140 的竞争抑制转基因植株,研究表明 C2H2 锌指结构的转录因子 At3g23140 的 C 端包含类似 EAR 的保守序列的区域对于 At3g23140 的功能是必需的,并且 A2 蛋白片段 C 端所含有的非锌指结构域是 At3g23140 蛋白与靶基因序列结合所必需的。我们的研究结果将为进一步研究这类转录因子的功能提供线索。

### [参 考 文 献]

- [1] 杨致荣,王兴春,李西明,等. 高等植物转录因子的研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(3): 403-408.  
YANG Z R, WANG X C, LI X M, et al. Advance on the study of transcription factors in higher plants[J]. Hereditas, 2004, 26(3): 403-408.
- [2] 黄骥,王建飞,张红生. 植物 C2H2 型锌指蛋白的结构与功能[J]. 遗传, 2004, 26(3): 414-418.  
HUANG J, WANG J F, ZHANG H S. Structure and function of plant C2H2 zinc finger protein[J]. Hereditas, 2004, 26(3): 414-418.
- [3] MILLER J, MCLACHLAN A D, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor II-1A from *Xenopus oocytes*[J]. EMBO J, 1985(4): 1609-1614.
- [4] KUBO K, SAKAMOTO A, KOBAYASHI A, et al. Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(2): 608-615.
- [5] ENGLBRECHT C C, SCHOOF H, BOHM S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome[J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 39.
- [6] SINGH K B, FOLEY R C, ONATE-SANCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses arm[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002(5): 430-436.
- [7] FUJIMOTO S Y, OHTA M, USUI A, et al. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression[J]. Plant Cell, 2000(12): 393-404.
- [8] OHTA M, OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions[J]. Plant J, 2000, 22: 29-38.
- [9] OHTA M, MATSUI K, HIRATSU K, et al. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. The Plant Cell, 2001, 13: 1959-1968.
- [10] SAKAMOTO A, MINAMI M, HUH G H, et al. The putative zinc-finger protein WZF1 interacts with a cis-acting element of wheat histone genes[J]. Eur J Biochem, 1993, 217: 1049-1056.
- [11] LIPPUNER V, CYERT M S, GASSER C S. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 12859-12866.
- [12] MEISSNER R, MICHAEL A J. Isolation and characterization of a diverse family of *Arabidopsis* two- and three-fingered C2H2 zinc-finger protein genes and cDNAs[J]. Plant Mol Biol, 1997, 33: 615-624.
- [13] KOBAYASHI A, SAKAMOTO A, KUBO K, et al. Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia[J]. Plant J, 1998, 13: 571-576.
- [14] TAKATSUJI H. Zinc-finger transcription factors in plants[J]. Cell Mol Life Sci, 1998, 54: 582-596.
- [15] HIRATSU K, OHTA M, MATSUI K, et al. The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-ter-

- minimal repression domain is required for the development of normal flowers[J]. FEBS Letters, 2002, 514:351-354.
- [16] RAINA S, MAHALINGAM R, CHEN F, et al. A collection of sequenced and mapped *Ds* transposon insertion sites in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50: 93-110.
- [17] TAKATSUJI H, MORI M, BENFEY P N, et al. Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings[J]. EMBO J, 1992, 11(1): 241-249.
- [18] KLUG A, SCHWABE J W R. Protein motifs 5. zinc finger[J]. FASEB J, 1995(9):597-604.
- [19] WOLFE S A, NEKLUDOVA L, PABO C O. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins[J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000, 29: 183-212.
- [20] LAITY J H, LEE B M, WRIGHT P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity [J]. Curr Opin Struct Biol, 2001(11):39-46.
- [21] DATHAN N, ZACCARO L, ESPOSITO S, et al. The *Arabidopsis* SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30 (22): 4945-4951.
- [22] SAKAI H, MEDRANO L J, MEYEROWITZ E M. Role of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries[J]. Nature, 1995, 378: 199-203.

(上接第 95 页)

- [5] 楼宝,毛国民,骆季安,等. 饲喂频率对黑鲟生长及体生化成分的影响[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6):19-24.  
LOU B, MAO G M, LUO J A, et al. Effects of feeding frequency on growth and body biochemical composition of *Sparus macrocephalus*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 19-24.
- [6] 潘庆,刘胜,梁桂英. 投喂频率对草鱼鱼种的生长、鱼体和组织营养成分组成的影响[J]. 上海水产大学学报, 1998(7)(增刊):186-190.  
PAN Q, LIU S, LIANG G Y. The effect of feeding frequency on growth, body and tissue composition of juvenile grass carp[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1998(7)(Suppl.): 186-190.
- [7] HARMON J S, EILERTSON C D, SHERIDAN M A, et al. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose injected trout [J]. Am J Physiol, 1991, 291(3): R609-R613.
- [8] 蔡春芳,刘影,陈立侨,等. 异育银鲫口服不同剂量葡萄糖后的代谢反应[J]. 水生生物学报, 2003(6): 602-606.  
CAI C F, LIU Y, CHEN L Q, et al. Metabolic responses of *Allogynogenetic* gibel carp after oral administration of different doses of glucose [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003(6): 602-606.
- [9] FURUICHI M, YONE Y. Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrate metabolism of fish in glucose and insulin-glucose tolerance tests[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1982, 48:463-466.
- [10] FURUICHI M, YONE Y. Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red sea bream[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1982, 48:945-948.
- [11] HUNG S S O, FYNN-AIKINS K F, LUTES P B, et al. Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate source[J]. J Nutr, 1989, 119(5):727-733.
- [12] MOON T W. Review, glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction[J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2001, 129(2-3): 243-249.