

胡杨中两个新 *DREB* 类基因的克隆、序列分析 及转录激活功能研究

陈金焕 叶楚玉 夏新莉 尹伟伦

(北京林业大学林木育种国家工程实验室 林木花卉遗传育种教育部重点实验室)

摘要: *DREB* 转录因子(干旱应答元件结合因子)是逆境适应中的关键调节因子。该类转录因子的特点是拥有保守的 AP2/EREBP (APETALA2 /乙烯应答元件结合蛋白)结构域,能够特异性地与抗逆基因启动子上的 DRE 元件相结合,在低温、干旱和盐碱等条件下调节一系列下游逆境应答基因的表达。本研究从胡杨中分离出 2 个编码 *DREB2* 类蛋白的基因 *PeDREB3* 和 *PeDREB4*。*PeDREB3* 和 *PeDREB4* 在胡杨根、茎、叶中都有表达。序列分析显示,*PeDREB3* 和 *PeDREB4* 均含有非典型性 AP2/ERF 结构域,即在 AP2/EREBP 结构域的第 2 个 β 折叠和第 3 个 β 折叠处多出 8 个氨基酸残基,用改进的酵母单杂交技术发现 *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 能够在酵母中激活下游报告基因的表达,具有转录活性。

关键词: 胡杨; *DREB* 转录因子; AP2/EREBP 结构域; 转录活性

中图分类号: Q78 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)05-0027-07

CHEN Jin-huan; YE Chu-yu; XIA Xin-li; YIN Wei-lun. **Isolation, sequence analysis and transcriptional activation study of two novel *DREB* genes from *Populus euphratica* Oliv.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(5) 27–33 [Ch, 16 ref.] National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, 100083 P. R. China.

Dehydration-responsive element binding (*DREB*) transcription factors with a typical AP2/EREBP DNA-binding domain might recognize and bind to DRE *cis*-element, especially and finally activate a lot of stress-responsive genes when plants are under abiotic stresses, including dehydration, high salt and low temperature. Using PCR and homologous *DREB* search, we isolated two *DREB2*-type genes from poplar (*Populus euphratica* Oliv.) named *PeDREB3* and *PeDREB4*. *PeDREB3* and *PeDREB4* distinguished themselves from other *DREBs* with an 8 bp extension sequence between their second and third β -sheets of the AP2 domain. Modified yeast one hybrid analysis reveals that full length coding sequence has transcriptional activation in yeast.

Key words *Populus euphratica* Oliv.; *DREB* transcription factor; AP2/EREBP domain; transcriptional activation

DREB 转录因子(干旱应答元件结合因子)是一类植物特有的,在非生物逆境胁迫应答中起重要作用的调控因子。该类转录因子含有一个 58 bp 的 AP2/EREBP 结构域,该结构域可与耐逆基因启动子

中的 DRE/CRT (C-repeat) 顺式元件相结合,启动耐逆基因的表达,从而实现 *DREB* 转录因子对一系列干旱、高盐和低温应答基因的调控^[1]。

自从 CBF1 用酵母单杂交的方法被分离以

收稿日期:2010-03-22

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD03A01)、国家自然科学基金项目(30730077、30972339)、“863”国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z106)、优秀青年教师科技支撑专项计划项目(YX2010-17)。

第一作者:陈金焕,博士,讲师。主要研究方向:树木分子生物学。电话:010-62336400 Email: chenjh@bjfu.edu.cn 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学 69 号信箱。

责任作者:夏新莉,博士,教授。主要研究方向:林木抗逆生理。电话:010-62336400 Email: xiaxl@bjfu.edu.cn 地址:同上。尹伟伦,教授,博士生导师,院士。主要研究方向:林木抗逆生理。电话:010-62338080 Email: yinwl@bjfu.edu.cn 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学 1 号信箱。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

来^[2],关于植物中 DREB 转录因子的研究日益广泛和深入。DREB 转录因子具有典型的转录因子二级结构的特点,即 N 端含有大量的碱性氨基酸残基,属于核定位信号区;C 端含大量的酸性氨基酸残基,只有少量碱性氨基酸,属于转录激活区^[1]。DREB 家族中 N 端和 C 端的相似性较低,而中间的 AP2/EREBP 结构域则高度保守,此结构域又可分为 2 个保守元件 YRG 和 RAYD。其中 YRG 含有 19~22 个氨基酸,大多数为碱性氨基酸残基,有利于与 DNA 的结合^[3]。而 RAYD 由 42~43 个氨基酸残基组成,含有由 18 个氨基酸组成的双亲 α 融合的核区,RAYD 区可以通过影响 YRG 区的构象或通过与其他蛋白的相互作用来调节 AP2 结构域与 DNA 的结合^[4]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,DREB 分为 6 个亚家族,A-1 组的 *DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C* 在调控冷响应基因的表达方面起重要作用,*DREB1D* 与 *DREB1A* 具有很高的同源性,但它受渗透胁迫的诱导而不是冷诱导,另外 2 个基因 *DREB1F* 和 *DREB1E* 能够被高盐诱导。A-2 组的 *DREB2A* 和 *DREB2B* 类受干旱和高盐的诱导,*DREB2C*、*DREB2D* 和 *DREB2F* 在叶中可以被高盐微弱诱导,*DREB2E* 在根中可以被 ABA 微弱诱导^[5]。DREB2 类蛋白的 AP2/EREBP 结构域的下游含有一段富含丝氨酸和苏氨酸的区域,这段区域有可能通过磷酸化和去磷酸化作用调控 DREB2 类蛋白的活性。Sakuma 等^[6]用拟南芥原生质体表达法鉴定出 *DREB2A* 位于 254~335 残基之间的一段富含酸性氨基酸的转录激活区,同时发现 136~165 位残基的缺失能够将 *DREB2A* 转变成组成性活性形式即 *DREB2A CA*(*DREB2A* 组成活性形式),转 *DREB2A CA* 拟南芥抗性得到提高。

杨属植物中的胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)作为在西北沙漠地区唯一能够生存的高大乔木^[7],能够在高温和高盐环境中生长,在进化过程中形成了适应非生物逆境胁迫的多种生理和分子生物学机制,研究胡杨中抗逆相关的 DREB 转录有助于了解胡杨的抗逆机制。在之前的报道中,Chen 等^[8]在胡杨中克隆到一个具有 DREB2 类典型特征的蛋白基因 *PeDREB2*,*PeDREB2* 在烟草中的表达能够提高烟草幼苗的耐盐性。在本研究中,应用 RT-PCR 技术从胡杨叶中分离到了 2 个新的具有非典型 AP2/EREBP 结构域的 DREB2 类基因,并对其核苷酸和蛋白质序列进行了分析,探讨了这 2 个基因在序列结构上与拟南芥、毛果杨(*P. trichocarpa*)中同源基因的差异,并用改进的酵母单杂交技术分析了它们的转录激活活性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验所用胡杨材料取自内蒙古自治区阿拉善盟 2 年生胡杨苗,运回后直接栽种在北京林业大学苗圃直径为 30 cm 的塑料盆中,塑料盆中 V(沙子):V(营养土):V(珍珠岩)=1:1:1,栽种后 3 d 浇 1 次水,待 2 个月胡杨长出新叶后取材。

1.2 目的基因的分离

基因诱导材料处理:将 2 年生胡杨苗用 300 mmol/L NaCl 溶液处理 6 h 以诱导相关基因的表达,将收获的胡杨叶片速冻于液氮中,采用 CTAB 法提取胡杨总 RNA^[9]。使用 TaKaRa 公司的 1st Strand cDNA Synthesis Kit(D6110A)进行反转录。合成的 1st Strand cDNA 即可用于下一步的 PCR 扩增反应。根据毛果杨中基因组数据库分析结果,设计 2 对引物,分别为:5'-ATGGAAGATTCTGGAGAC-3' 和 5'-CTAGAATTGTAATTCAAGGG-3'(PeDREB3);5'-ATGGAGGATTCTTGAGACAG-3' 和 5'-CTAGAATTGTAATTCAAGGGTAC-3'(PeDREB4)。以盐处理 6 h 的胡杨叶 cDNA 为模板,用上述引物进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系包括 2.5 μL 10 × PCR 缓冲液中,2 μL dNTP(2.5 mmol/L),50 ng 胡杨 cDNA,各 0.5 μL 20 pmol/μL 的正向引物和反向引物,1 μL 的 Ex Taq DNA 聚合酶。反应先在 94℃ 预变性 5 min,然后在 94℃ 变性 45 s,58℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min 条件下进行 34 轮循环,最后在 72℃ 延伸 10 min 4℃ 保存。

PCR 产物回收纯化后插入到 pGEM-T Easy 载体中,筛选阳性克隆送测。

1.3 序列分析和同源性分析

序列比对用 DNAMAN 分析程序进行,数据库检索利用 NCBI 的 Blast 搜索程序。蛋白质折叠状态用 FoldIndex 软件进行分析^[10]。蛋白质的疏水性用 <http://www.expasy.org/> 网站的 ProtScale 程序计算^[11]。进化树构建是以序列的多重比较结果为基础,采用 Clustal X 软件进行多重比较后,用 NJ(邻接法)完成进化树的构建^[12],进化树的运算用 bootstrap 法重复 100 次,图形用 Treeview 软件生成。参与 AP2/EREBP 氨基酸序列进化树构建的蛋白基因,包括已分离的胡杨 DREB 以及其他已知的植物 DREB 转录因子,它们分别是拟南芥中的 *DREB2A*(O82132)、*DREB2B*(O82133)、*DREB2C*(Q8LFR2)、*DREB2E*(O80917)、*ABI4*(AF040959)、*AtDREB1A*(Q9M0L0)、*AtDREB1B*(P93835)、*AtDREB1C*(Q9SYS6)、*DDF1*(Q9LN86)、*DDF2*(Q9SGJ6)、

TINY (CCA64359)、RAP2.1 (NP_564496)、RAP2.4 (NP_177931)、RAP2.10 (NP_195408), 水稻 (*Oryza sativa*) OsDREB2A (AF300971), 棉花 (*Triticum aestivum*) GhDBP2 (AAT39542), 玉米 (*Zea mays*) ZmABI4 (AAM95247)、DBF2 (AAM80485), 山菠菜 (*Atriplex hortensis*) AhDREB1 (AF274033), 蔓藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) MtDREB2A (DQ908959), 盐芥 (*Thellungiella halophila*) TsDREB2A (AY551820) 以及鹰咀豆 (*Cicer arietinum*) CAP2 (ABC49682) 等。

1.4 PeDREB3 和 PeDREB4 转录激活功能分析

1.4.1 含不同缺失片段的酵母表达载体的构建

设计引物以带有 *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 基因的质粒为模板扩增不同的片断, 其中 5'端引物中含有 *Nde* I 酶切位点序列 CATATG, 3'端引物中含有 *Pst* I 酶切位点序列 CTGCAG, 并且在酶切位点的前面各加入 5 和 3 个保护碱基。PCR 扩增后, 将扩增产物用 *Nde* I 和 *Pst* I 酶切消化, 同时与经过 *Nde* I/*Pst* I 酶切消化处理的 pGBK7 载体进行连接、转化。转化产物涂布在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上, 培养 16 h 后, 从平板上挑取单克隆, 用菌落 PCR 法进行阳性克隆的鉴定。

1.4.2 报告子 3-AT 浓度的测定

挑取 SD/-Trp 培养基上正常生长的含 pGBK7 质粒的酵母细胞, 将其悬浮于少量双蒸水中, 涂布在分别含浓度 0.5、1.0 和 30 mmol/L 3-氨基三唑 (3-aminotriazole 3-AT) 的 SD/-His 培养皿上, 培养 4 d, 确定能完全抑制由于 *His3* 报道基因渗漏导致背景生长的 3-AT 浓度, 利用该浓度进行激活活性分析实验。

1.4.3 转录激活活性分析

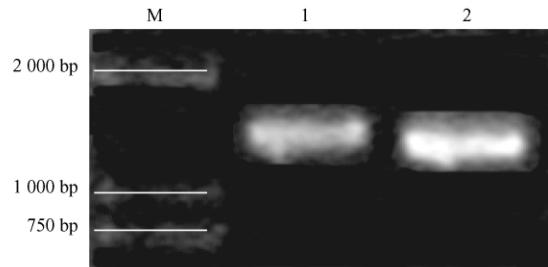
用醋酸锂法将质粒 pGBK7、pDB3-pGBK7、pDB4-pGBK7 转化 AH109 酵母菌中, 转化产物分别涂布于 SD/-Trp、SD/-His + 10 mmol/L 3-AT 平板上, 30℃ 培养 2~3 d, 观察其生长情况。在 SD/-Trp 平板上挑取单克隆, 经菌落 PCR 鉴定后, 用 YPDA 培养基多次活化培养, 并稀释至 OD₆₀₀ 为 0.5, 然后按梯度稀释后取 6 μL 点到 SD/-His + 10 mmol/L 3-AT 平板上, 培养 2~3 d, 观察菌落斑的生长情况。

2 结果与分析

2.1 胡杨 DREB 基因的分离

经 RT-PCR 扩增, 从胡杨叶中分离到 2 条长度约为 1 300 bp 的片段 (图 1)。提取茎和根的 RNA,

反转录后进行 PCR 扩增, 发现这 2 条基因在胡杨根、茎、叶的 cDNA 中均能够分离, 表明它们在根、茎、叶等不同组织中均有表达, 通过将 cDNA 序列与 DNA 序列进行比较, 确定胡杨中的这 2 个 DREB 类基因均不含有内含子。



M. D2000 marker; 1. *PeDREB3*; 2. *PeDREB4*

Fig. 1 Cloning of homologous DREB genes from *P. euphratica*

2.2 胡杨 DREB 基因的序列分析

这 2 个基因的开放阅读框 (ORF) 分别为 1 374 和 1 359 bp, 分别将其命名为 *PeDREB3* 和 *PeDREB4*, 在 GenBank 中注册登记, 登录号分别为 FJ919704、FJ919705。其中 *PeDREB3* 编码含 457 个氨基酸残基, 分子量为 51 356.16 D, pI 值为 5.28 的蛋白 (图 2A), *PeDREB4* 编码含 452 个氨基酸残基, 分子量为 50 801.49 D, pI 值为 5.61 的蛋白 (图 2B), 二者均含有 AP2/EREBP 结构域, 属于 AP2/EREBP 家族成员。

用 DNAMAN 软件分析了 2 个胡杨 DREB 的 DNA 结合结构域, 通过对 *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 蛋白质的二级结构预测发现, 在 AP2/EREBP 结构域有 3 个 β 折叠和 1 个 α 融合螺旋。将 *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 的 AP2 结构域与拟南芥中 DREB2A 和 DREB2B 的 AP2 结构域进行比较, 结果如图 3 所示。由图 3 可看出, *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 编码区域均含有 1 个非典型的 AP2/EREBP 结构域, 即其 AP2/EREBP 结构域的第 2 个和第 3 个 β 折叠处较典型的 AP2/EREBP 结构域多出 8 个氨基酸残基, 在拟南芥中仅有 DREB2E 具有这个特点。这 2 个基因 AP2/EREBP 结构域的第 14 位和第 19 位氨基酸位点分别为能够与 DRE 顺式作用元件结合的 2 个关键氨基酸: 缬氨酸 (V) 和谷氨酸 (E)。除 AP2/EREBP 结构域以外, *PeDREB3* 和 *PeDREB4* 还具有 DREB 转录因子其他的典型特征, 即在它们的 N 端含有 1 个富含碱性氨基酸的核定位信号区, 在它们的 C 端则含有 1 个富含酸性氨基酸的转录激活区。

2.3 蛋白质序列分析

用 Kyte 和 Doolittle 法分别对 *PeDREB3* 和 *PeDREB4*

ATGGAAGATTCGTGAGACAGCTCTCCCTGGTTACCAAGAACAGAAGAC	ATGCCAGATTCTTGAGACAGCTCTCCCTGGTTACCAAGAACAGAAGAC
1 MEDSLRQSSSLGFSKNNKKK	1 MEDSLRQCSLLGFSSED RKR
TGCCAGAGAAGCGGAATGGTGTGAATCAAAGAACTACACTGCAACGCTGAAGAAA	AGCCGAATGGTGTGAATCAAAGAACTGCAAGGCTGAAGAAAACAAACAAA
21 WQRRLRNCCESIERTLARWKK	21 RKNGCRESIERTLARWKKHNK
AACACAAACTCAGATAACCAAGCTTCCAGCCAAAGCTCGAAGMAAGCTTCATGAAA	CTCAAGTGGCAAGGTTCCAGGAAGGGTCAAAGAACGGCTATGAAAGAAAGGT
41 NNKLQITKVPGKGSKGCMK	41 LQVSKVPGKGSKKCCMKCKG
GGAAAAGCTGGGCCAGAGAAATAAGCTGTAAATAAGAGGTGTTACCGAGAGAACTTGG	CCCCCGAGATAAGACTCCAGATAACAGGCTTAGACAGAACACTTCCGCAAGTGC
61 GKGCPENNNSCKYRCVQRWTW	61 GPEENMMNCRYRCVQRWTWCKW
CCCAGCTCCCTCTGAAATTAGAGACCCCTGCAAAAMACCCACCGTAACGNAACAAACCA	CTACCTGAAATCAGAGAACCTGCAATAATGCAAGTTAAATGAAACAAACAGAAGTAGA
81 GKWVABIREPVVKKGSVTNK	81 VAEIREPVNKCSLMNKQGSR
AGAATTAGACTCTGGCTGGTACATTTCCTACTGCTATTGAGCTCTCCGCTTATGAT	CTCTGGCTGGTACATTTCCTACTGCTATTGAGCTCTGGCTTATGATATGCTGCA
101 RIRLWLGLTFSTAIEAAARAYD	101 LWLGLTFSTAIEAAACAYDYAA
TATCTCCAAGACCCATCTATGCTCTTAATCCAACTCAATTCTCCAGACTACTCTCAT	AACCTTTTGACGGCTCTAAATGCCATACTCAATTCTCCAGACTACCGAGTGAATCAGGG
121 YAAARAMYGPNAILNFPDYSH	121 KLLYGPNAILNFPDYPVBSG
GAACCAAGGGGCACTGGATAGCTTATCGCTCTCCGATGACACCAACTGAGCTAAACA	GATCACCTGGATAATACTGGCTCTGGCTTATGCAACTGAGACATCACTCAAGTGAATCT
141 EPGGQLDSLSSSMTATBESKT	141 DHLDNMSSSITATRTSTSRS
ACACTGATAACTATGACGATAACAAACCTTGACAGATGAAAGATGCTTATCTGGCTCA	ACGACACCAATTGGCTAACTACCACCAATAACCTGGCAAAATTAAACATGAACTCATGCT
161 TLDNYEDNKKVERLKMGYCGS	161 RTALGNYEDNKKVDKLMNNHC
AGAGAAGTAAATAACAACTCACTGCTCTCTGGGTTATGCTGCTGAAATGAGGAG	GGCTCTAGAGAAAGAAATAACCAATCAGCTTCTAGGATATGCTGCTGAGGAGATCA
181 REVNKQSCSSGIFYAVNESEE	181 GSREGNNNQSFGFSRICAVDES
CAACTTACAAATTACCTGCGACACACCGTGGCAAGCCACTTCAGGCTGAGGTATCC	GAACAGGAACTTGAGAAACTCAGGTGGCGGAGAGTAGTGCTAGGAGTTGAAGCTGIG
201 EVEKFQVAEASSCRELKAEVW	201 EEEVEKLRVAEASSARELKAV
GATTTAACAAATGATGAGTGGCTCTCATCATGTTGAGCTGAAACCCCGTACTGGAG	GAATGGATTAAACAGATGAAATGGAATCTGCTCATCATATGAAAGCTGAAGCTCTGTA
221 DLTNEWMPSSHHVVAEAPVLR	221 EWNLTDREWKSSSHHEAAAPV
GGAGAAAATGAGGAAACTTCGAGAAATTGGGCTTGTGAACTTGGGCTTGTGATGAC	TTGGGAAAGAAATGGATGAGGAAACTTACCGGAATTGAGATCTGGAGCTTACCGGT
241 GEMDGEELABIVRSWCCYCID	241 LREEMDGEELACILRSWSCYG
GACAAATATGATTTCTCCAGATGAGCTGMAATGAGAAATCACMCTTAAAGATGAG	ATCAAATAACAGATACTGATCTCTCCAGAGATGAGAAATGAAACATAACAAATTG
261 DKYDFLQNETENVEYKLLKNE	261 INNRYGFLQNETEKVRHKKL
ATCCGGMATTCAAGATGGCAACAGGCTCCGGPAACTCTGTTACCTGGACCATGATATG	AAGACGGCTTGGAACTCCAGCATGGCACCAACTCAATGAGCTGAGATTGGAC
281 IAERSRLGNRLRBCLYSDHDM	281 KNEVVVESSSMSTILNECVDS
AGMACTGATGTAATCTCTATGATGCTCAGATGCAATTAAACCCCGAGAACAGT	TAAGATACTGAGACTGATCAAACCTATCTATGATGTTGAGGACCTTAATGAGGAA
301 RTDRKSFYDAQMPLTAGEEF	301 YDMRTDHKPIYDVKEPLMRE
TCACCGTTCAGCTGGAAACTCTAACCACTTGGAGGCCAGGATGATGACATAGACCG	GGACCCACCGGAAAGCTTTCAGGCTGAAATTCCAGGCTTATCAAAGCTATCCCTTACGAC
321 SGLTVGNNSNHFBARHDDIDP	321 AAAGEEFSGLKLKFSSSYNPFT
CCTTTAACAACTCAGAAATTGATATCACCCCTTCTCCAAACGTTCTGAGCTCT	ACCCATGATCACATGAAACCCAGGTTATCCAATCAAGGAATTGATACTAACCTTTATC
341 GLYNPEIDIKPFVQGIPDSS	341 THDHMMNPGLCNQGIDIKPFI
CCTTTAACGGAGAGGGATTATGGGTATGTCACGGGGAGGTACAGCTGAAACGAG	CAAGATACTTCTCACAAATTCTGATCAAAGGACGGGAAATTATGGTTATGATCCAGG
361 PLKGERRDYGYVHGEVQAASQ	361 QDISHNSVSKGCGGNYGYDPR
TTACAGACTGGAAGGCCACCTGMACTCTCTGCACTTACAGACTGGACGGGACCTGAA	AAGCTTGCTTCTGAGACCCACTTACAGATGGAGGCCATCAGGACTCTCCAGGAGCTTG
381 LQSGRPPELSCQLQSGRPPE	381 KVGSADHHLQNGRPSGLSSQL
CTCTCTCCAGTGGCACAGGCCAGGAMCCAATCTACAGGGACCTGAGCTTAATTCAG	CAGACCCCATCAACCAATCTACAGGGAGCTTACAGGAGGAGATATAGGC
401 LSCQLQSPGTNLPGSLSLIQ	401 QTPSTNLPGSLSYFQEADIG
CAGCCACATTACCTGGGGCTGAAATTGATCTGCAACCCAGACATCAACTCGGC	CTGGCTGGAAATTCTGATCATCACACGGGAAATTCAACGGGCTTACTTGGAGACCCA
421 EADLGCCCNFDLSKQDINW	421 LCWNFDPSQQEFPNCCLVCP
TTAGTTGGAGATCCGGMATTCTGATGACCTGGTCTCTGAAATTACAAATTCTAG	CCCTCTTGAATCTGAGTACCTGAAATTACAATTCTAG
441 LVGDPELLDWPWFPELQF*	441 GLLDQWYPBELQF*

A

B

图2 PeDREB3 和 PeDREB4 的核苷酸及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Full-length nucleotide and deduced amino acid sequences of PeDREB3 and PeDREB4

注:方框部分为推测的核定位信号区;下划线部位为AP2/EREBP保守结构域。

AtDREB2A SFRGVQRPIUJKWVVAEIREPN.....RGSRLWLGFPTAQEAISAYDEAAKAMYGPLARLNFP
AtDREB2B SFRGVQRPIUJKWVVAEIREPK.....IGTRLWLGFPTAEKAISAYDEAAKAMYGSLARLNFP
AtDREB2E RFRGVQRWUJKWVVAEIREPVSHRGANSRSKRLWLGFPTAAEAAIAYDRAASVWYGPYARLNFP
PeDREB3 KYRGVRQRPIUJKWVVAEIREPVKGSVTNKRIRLWLGFPTSTAIEAAIAYDVAARAAVGPNAILNFP
PeDREB4 RYRGVRQRPIUJKWVVAEIREPVNKCSLMNKQGSRLWLGFPTSTAIEAAIAYDVAAKLYGPNAILNFP

图3 PeDREB3 和 PeDREB4 与其他 DREB2 类转录因子的 AP2/EREBP 结构域比对

Fig. 3 Sequence alignment of PeDREB3 , PeDREB4 and other DREB-type proteins

进行疏水性/亲水性分析。结果表明这2个胡杨DREB转录因子中亲水性最强的氨基酸残基均出现在N端(图4),而且大部分的氨基酸属于亲水性氨基

酸,因此这2个胡杨DREB转录因子应属于亲水性蛋白。

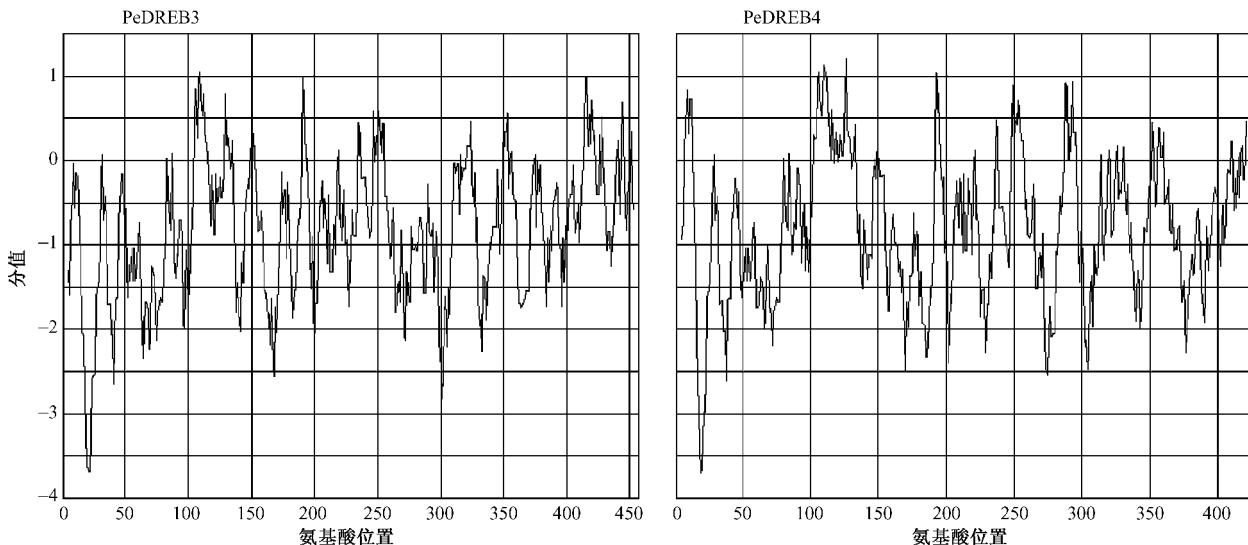


图4 PeDREB3 和 PeDREB4 氨基酸的疏水性/亲水性分析

Fig. 4 Predicted hydrophobicity and hydrophilicity of deduced amino acid sequence of PeDREB3 and PeDREB4

通过FoldIndex软件对PeDREB3和PeDREB4进行折叠无序化分析,结果见图5。PeDREB3的全长氨基酸序列中无序化区域(黑色区域)有2个,最大的无序化区域长度为233个氨基酸(显示为负值的氨基

酸),总的无序化氨基酸数目为345个,无序化的比例为75.5%;PeDREB4的全长氨基酸序列中无序化区域有6个,最大的无序化区域长度为101个氨基酸,总的无序化氨基酸数目为322个,无序化的比例为75.7%。

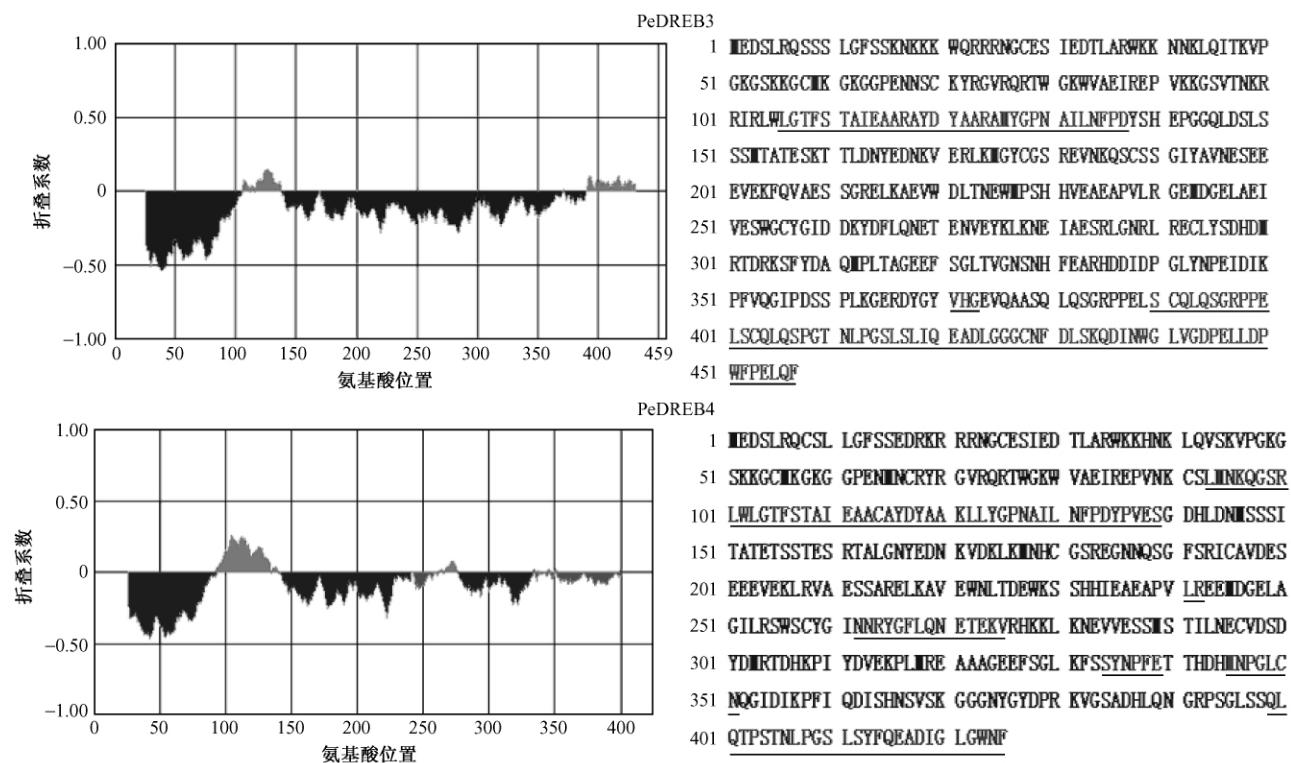


图5 胡杨PeDREB3和PeDREB4的折叠化预测

Fig. 5 Prediction of the folding state of PeDREB3 and PeDREB4

2.4 进化树分析

进化树分析表明,PeDREB3 和 PeDREB4 与拟南芥中的 DREB2E 具有较高的同源性,按照 AP2 /

EREBP 家族基因在拟南芥中的分类方法^[5],应属于 A-2 组成员(图 6)。

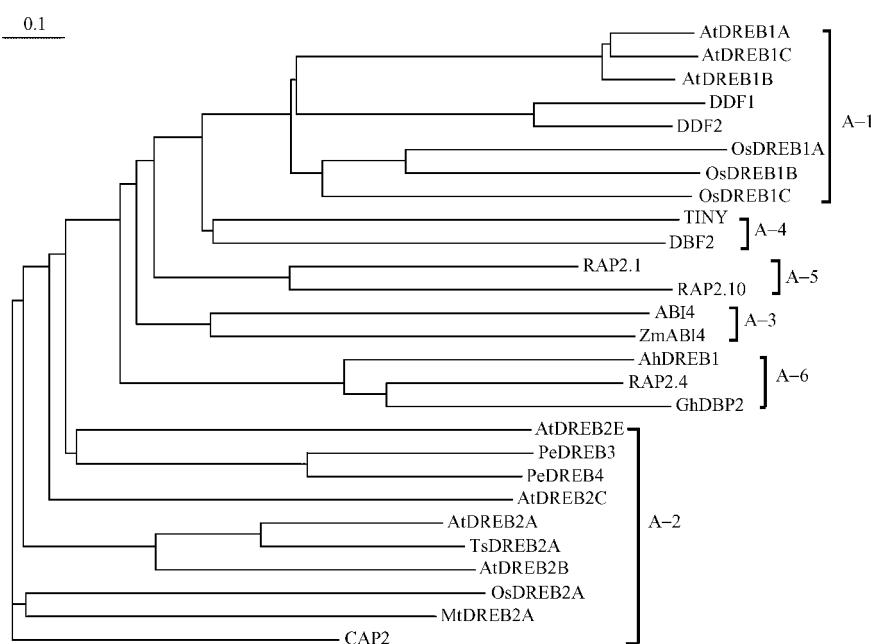


图 6 PeDREB3 和 PeDREB4 与其他 DREB 的进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of PeDREB3 and PeDREB4 with other representative DREB proteins

2.5 PeDREBs 的转录激活功能

将质粒 pGBK7 转入酵母菌株 AH109 中,转化产物涂布于 SD/-His 营养缺陷培养基上,利用 3-AT 竞争性实验对 AH109(pGBK7) 进行本底表达活性检测。结果显示:在不含 3-AT 的 SD/-His 培养基上,酵母可以生长;在 SD/-His + 5 mmol/L 3-AT 培养皿上第 4 天长出 10 多个克隆,而在 10 mmol/L 3-AT 培养皿上 4 d 后依然没有酵母克隆长出,说明 His3 的本底表达活性是低的,10 mmol/L 可以作为抑制背景表达的浓度。

将 pGBK7-PeDREB3、pGBK7-PeDREB4 载体以及对照 pGBK7 质粒转化 AH109 酵母感受态细胞,挑取单克隆测定 OD 值后,点在选择培养基

上,可以看到在含有 10 mmol/L 的 3-AT 的 SD/-His 培养基上,含有 pGBK7-PeDREB3、pGBK7-PeDREB4 的酵母细胞长势良好,而阴性对照 pGBK7 无法在缺失培养基上生长(图 7)。说明 PeDREB3 和 PeDREB4 均能够与 GAL4-BD 结合,激活下游报告基因 His 的表达,使酵母细胞在 His 缺失的培养基上正常生长,即 PeDREB3 和 PeDREB4 具有转录激活功能,且 PeDREB4 的转录活性明显高于 PeDREB3。

3 结论与讨论

本研究从盐诱导的胡杨中克隆得到 2 个新的 AP2/EREBP 类基因,该结构域的第 14 位和第 19 位

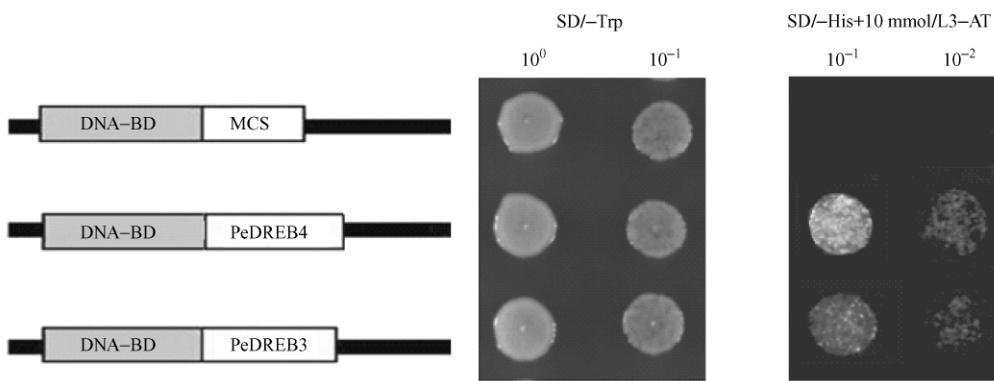


图 7 PeDREB3 和 PeDREB4 激活活性分析

Fig. 7 Transactivation activity assays of PeDREB3 and PeDREB4

是DREB家族高度保守的缬氨酸和谷氨酸,这2个氨基酸尤其是第14位的缬氨酸在DREB转录因子与DRE元件结合的过程中起重要作用^[13],但与其他DREB相比具有非典型的AP2/EREBP结构域,即在AP2/EREBP结构域的第2个β折叠和第3个β折叠处多出8个氨基酸残基。生物信息学分析表明PeDREB3和PeDREB4均属于DREB2组成员,为亲水性蛋白,固有无序化程度小于拟南芥中的DREB2A和DREB2B。将PeDREB3和PeDREB4克隆到酵母表达载体pGKKT7中,转入AH109酵母细胞,转化子可以在SD/-His+3-AT的营养缺陷培养基上正常生长,说明PeDREB3和PeDREB4具有激活基因转录的功能,为开展胡杨DREB家族转录因子进一步的研究奠定基础。

用酵母系统研究转录因子的转录激活作用,方法是将待研究的转录因子与GAL4结合结构域融合,再将融合后的载体转入酵母细胞,如果能够激活酵母体内报告基因的表达,就可以确认此转录因子的转录激活功能。Hu等^[14]从水稻中克隆到1个NAC基因SNAC1(stress-responsive NAC1),并用酵母单杂交实验证明SNAC1具有转录激活功能。Rakesh等^[15]从Chickpea(*Cicer arietinum*)中分离到一个AP2家族转录因子基因CAP2。CAP2蛋白能够与C-repeat/DRE元件在体外特异结合,酵母单杂实验显示其可以激活报告基因,从而表明CAP2具有转录因子的特性。然而,并不是所有克隆出的转录因子都具有相应的转录激活功能。Zhao等^[16]从Brassica napus中克隆到多个受冷诱导的DREB基因,将它们分为group I和group II,它们都能够特异性地与DRE元件结合,进一步用酵母单杂实验检测转录激活功能,发现group I的DREB基因具有转录激活作用而group II的基因不具有该作用。推测这2组DREB基因在冷调控途径的不同时期扮演着不同的角色。本文利用改进的酵母单杂技术,验证了PeDREB2基因具有激活活性,能够行使转录因子的激活功能,为进一步研究DREB在胡杨中的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/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.
- [2] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035–1040.
- [3] ALLEN R D, WEBB R P, SCHAKE S A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 473–479.
- [4] OKAMURO J K, CASTER B, VILLARROEL R, et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7076–7081.
- [5] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, et al. DNA-binding specificity the AP2/EREBP domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(3): 998–1009.
- [6] SAKUMA Y, MARUYAMA K, OSAKABE Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1292–1309.
- [7] TESTER M, DAVENPORT R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants [J]. *Ann Bot*, 2003, 91: 1–25.
- [8] CHEN J H, XIA X L, YIN W L. Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 483–487.
- [9] CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J, et al. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 113–116.
- [10] PRILUSKY J, FELDER C E, ZEEV-BEN-MORDEHAI T, et al. Fold index: A simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(16): 3435–3438.
- [11] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the exPASy server [C]// WALKER J M. *The proteomics protocols handbook*. New York: Humana Press, 2005: 571–607.
- [12] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Bio Evo*, 1987, 14: 406–425.
- [13] CAO Z F, LI J, CHEN F, et al. Effect of two conserved amino acid residues on DREB1A function [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2001, 66(6): 623–627.
- [14] HU H H, DAI M Q, YAO J L, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 12987–12992.
- [15] SHUKLA R K, RAHA S, TRIPATHI V, et al. Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 113–123.
- [16] ZHAO T J, SUN S, LIU Y, et al. Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus* [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(16): 10752–10759.

(责任编辑 董晓燕)