

文章编号 :1003-8701(2014)02-0025-03

玉米 *ZmbZIP* 基因的克隆及表达模式分析

李横江

(华中科技大学武昌分校,武汉 430067)

摘要:根据玉米碱性亮氨酸拉链(bZIP)基因 EST 序列设计引物,采用 RT-PCR 技术从玉米中克隆了一个 *ZmbZIP* 基因。研究表明:*ZmbZIP* 基因 cDNA 全长 1 300 bp,5'-非编码区长 180 bp,3'-非编码区长 226 bp,编码区长 894 bp,编码 297 个氨基酸,预测分子量为 32.4 KDa,等电点为 9.39。氨基酸同源性分析发现 *ZmbZIP* 与谷子的 bZIP 同源性较高。实时定量 PCR 检测表明,*ZmbZIP* 基因的表达受脱落酸,干旱和高盐胁迫的诱导,不受低温诱导,说明玉米 *ZmbZIP* 基因可能参与玉米对逆境胁迫的应答。

关键词:玉米;*ZmbZIP* 基因;表达模式;逆境

中图分类号:Q786

文献标识码:A

Cloning and Expression Pattern Analysis of *ZmbZIP* in Maize

LI Heng-jiang

(Huazhong University of Science and Technology Wuchang Branch, Wuhan 430067, China)

Abstract: According to EST sequence of *ZmbZIP*, primers were designed. RT-PCR method was used to clone *ZmbZIP* gene. A gene coding for *ZmbZIP* was isolated from maize (*Zea mays*). The full length *ZmbZIP* cDNA is 1300 bp, including a 180 bp 5'-UTR, an ORF of 894 bp, and a 226 bp 3'-UTR. This cDNA sequence encoded a polypeptide of 297 amino acid residues with a predicted molecular mass of 32.4 kDa and a basic isoelectric point of 9.39. The deduced amino acid sequence had a high homology with *bZIP* from *Setaria italica*. Quantitative real-time PCR results showed that the *ZmbZIP* gene expressed was induced by abscisic acid, high salinity, and drought treatment, not induced by low temperature. The expression patterns of *ZmbZIP* under different stresses suggested that this gene might be involved in the regulations of maize to stresses.

Keywords: Maize; *ZmbZIP* gene; Expression patterns; Stress

碱性亮氨酸拉链(basic region/ leucine zipper motif, bZIP) 转录因子是一类较大的转录因子基因家族,几乎存在于所有的真核生物中^[1-2]。不同植物含有的 bZIP 类转录因子的数量不同。植物 bZIP 类转录因子在逆境胁迫应答中具有重要的作用^[2]。bZIP 类转录因子受非生物逆境胁迫,包括干旱、盐害和低温等诱导表达^[3-4]。例如番茄 *LebZIP1* 基因受低温胁迫诱导表达^[5]。刚毛柞柳 *ThbZIP1* 基因的表达受 NaCl、PEG、NaHCO₃ 和 CdCl₂ 诱导^[6]。大豆 131 个 bZIP 基因家族成员,超

过三分之一的成员至少受 ABA、盐、干旱和冷害胁迫的一种胁迫诱导表达^[7]。

玉米(*Zea mays*)是重要的粮食作物和重要的饲料来源。干旱、高盐和低温等逆境胁迫严重影响玉米的分布和产量。通过转基因的方法,将逆境相关基因转入玉米,是提高玉米抗逆性的一种有效方法。本研究利用 RT-PCR 方法从玉米中克隆了一个 *ZmbZIP* 基因并利用实时定量 PCR 方法分析了在不同逆境胁迫下该基因的表达模式,为进一步分析 *ZmbZIP* 基因在逆境胁迫中的功能提供线索。

1 材料与与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-08-30

作者简介:李横江(1981-),女,讲师,硕士,主要从事分子与细胞学研究。

供试材料为玉米品种旱玉 5 号。

1.2 方法

1.2.1 玉米材料处理

种子经 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min, 并用蒸馏水冲洗 3 遍, 播种于装有蛭石的盒子中, 在培养箱中以 28℃, 16 h 光 / 22℃, 8 h 暗的条件培养至三叶期。对三叶期的玉米分别进行脱水干旱、300 mmol·L⁻¹ NaCl, 冷(4℃)和 100 μmol·L⁻¹ 脱落酸(ABA)胁迫处理, 分别取处理 0、1、2、6、12 和 24 h 的叶片, 立即经液氮冷冻, -80℃ 保存, 供提取总 RNA。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

根据 RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen)的操作说明书提取不同胁迫处理的玉米叶片总 RNA, 总 RNA 用 DNase I(Invitrogen)处理, 提取基因组 DNA。按照反转录试剂盒(Invitrogen)的操作步骤合成 cDNA 第一链, 产物作为基因克隆和荧光定量 PCR 的模板。

1.2.3 ZmbZIP 全长 cDNA 的克隆及分析

根据 ZmbZIP 拼接序列设计一对特异引物, ZmbZIP-F 5'-TTTTGGTGCTGAGCTGAGACAGG GAC-3' 和 ZmbZIP-R 5'-ATTTTGTCTCTAC-TACGTACATA-3', 以玉米叶片 cDNA 第一链为模板, 扩增基因全长 cDNA。50 μL 体系^[8]中含 cDNA(20 ng·μL⁻¹)1 μL, 2×GC-PCR buffer 25 μL, dNTP(10 mmol·L⁻¹)2 μL, 引物(25 μmol·L⁻¹)1 μL 和 LA-Taq(5 U·μL⁻¹)0.5 μL(TaKaRa), ddH₂O 补足 50 μL。PCR 程序为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 30 s, 66℃ 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。采用凝胶回收试剂盒(TaKaRa)回收目的片段, 回收产物与 pMD18-T(TaKaRa)载体连接, 阳性克隆送北京奥科公司测序。

利用 DNAMAN 软件和 BLAST 检索 GenBank 进行多重序列比较和同源性分析。

1.2.4 实时定量 PCR 分析

依据 qRT-PCR 引物设计要求, 使用 primer premier 5.0 设计 ZmbZIP 特异引物(ZmbZIP-qF: 5'-AGCAGAATCAGGAAGTGGAGA-3' 和 ZmbZIP-qR: 5'-TCATGGGTTTCATCGCTACACTAT-3'), 扩增长度为 240 bp。玉米内参基因 GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)用于对不同样品 cDNA 模板的均一化, 所用引物 5'-CCCTTCATCACCACG-GACTAC-3' 和 5'-AACCTTCTTGGCACCACCCT-3'。20 μL PCR 扩增体系为 10 μL 2×SYBR

Premix Ex Taq(TaKaRa), 正反向引物各 0.2 μmol·L⁻¹ 和模板 cDNA 50~100 ng。采用实时定量 PCR 专用 8 连管(Axygen), 荧光定量 PCR 仪 ABI7000 (ABI Prism)进行实时定量 PCR 分析, 每个样品 3 次重复。PCR 程序为 95℃ 3 min, 95℃ 5 s, 59℃ 20 s, 72℃ 15 s, 共 45 个循环; 采用 2^{-ΔΔCT} 方法对数据进行分析。试验进行 3 次生物学重复。

2 结果

2.1 ZmbZIP 基因的克隆及分析

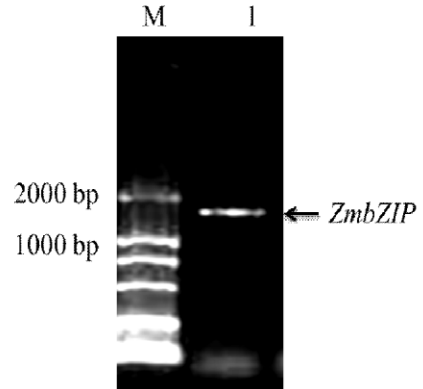


图 1 ZmbZIP 全长 cDNA 序列扩增

M: Marker DL2000; 1: 以 cDNA 为模板的扩增产物

根据拼接序列, 设计一对引物, 采用 RT-PCR 方法从玉米叶片中克隆了一个 ZmbZIP 基因。ZmbZIP 全长 cDNA 长 1300 bp, 5'-非编码(UTR)区长 180 bp, 3'-UTR 长 226 bp, 编码区长 894 bp, 编码 297 个氨基酸(图 1)。ZmbZIP 推测的氨基酸序列预测分子量为 32.4 KDa, 等电点为 9.39。ZmbZIP 蛋白的 C 端区包含一个典型的 bZIP DNA 结合区域, 其他 4 个保守序列分散于 N 端或 C 端(图 2)。

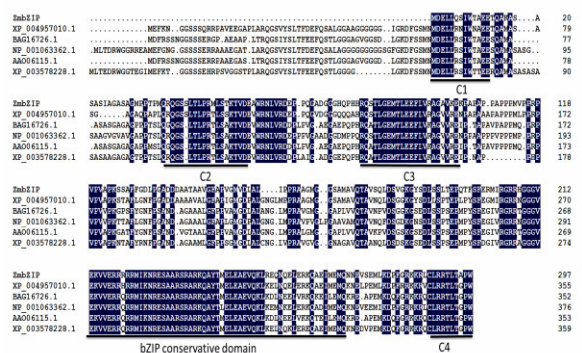


图 2 玉米 ZmbZIP 蛋白与其他植物 bZIP 蛋白氨基酸序列比对

保守区域用单下划线表示。蛋白登录号如下:
谷子: XP_004957010.1; 小麦: BAG16726.1;
水稻: NP_001063362.1; 大麦: AAO06115.1;
二穗短柄草: XP_003578228.1

同源性分析发现, *ZmbZIP* 蛋白与谷子、小麦、水稻、大麦和二穗短柄草中的 bZIP 蛋白高度同源,一致性达到 75%,其中与谷子 bZIP 蛋白的一致性达到 83%(图 3)。

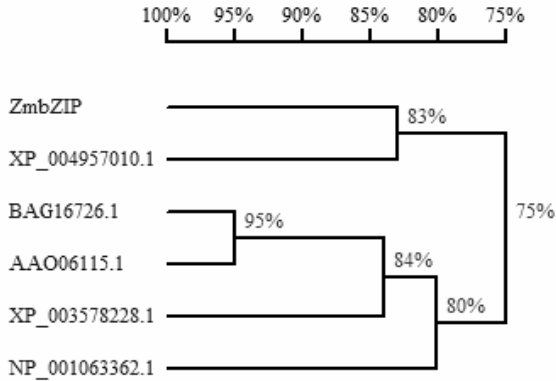


图 3 *ZmbZIP* 与其他植物 bZIP 蛋白全长氨基酸序列的同源性分析

2.2 *ZmbZIP* 基因的表达模式

为了分析 *ZmbZIP* 基因的功能,采用实时定量 PCR 方法分析 *ZmbZIP* 基因在不同非生物胁迫下的表达模式。如图 4 所示,在 ABA 处理条件下, *ZmbZIP* 基因的表达在 1 h 和 2 h 处理的叶片中微弱增加,在处理 6 h 后表达量达到最大值,然后,在处理 12 h 和 24 h 后表达量降低。在高盐胁迫下, *ZmbZIP* 基因的表达在胁迫 1 h 后受诱导上调表达,随后表达量逐渐升高,在处理 24 h 达到最大值。在干旱胁迫下,在胁迫 1 h 后 *ZmbZIP* 基因的表达快速增加,在胁迫 3 h 后达最大值,然后逐渐降低。在冷胁迫下, *ZmbZIP* 基因的表达没有明显表现受冷胁迫诱导。以上这些结果表明 *ZmbZIP* 基因的表达受干旱、高盐和 ABA 诱导,不受冷胁迫诱导,说明 *ZmbZIP* 基因参与玉米对干旱、高盐和 ABA 胁迫的诱导,可能在玉米对逆境胁迫忍耐中发挥作用。

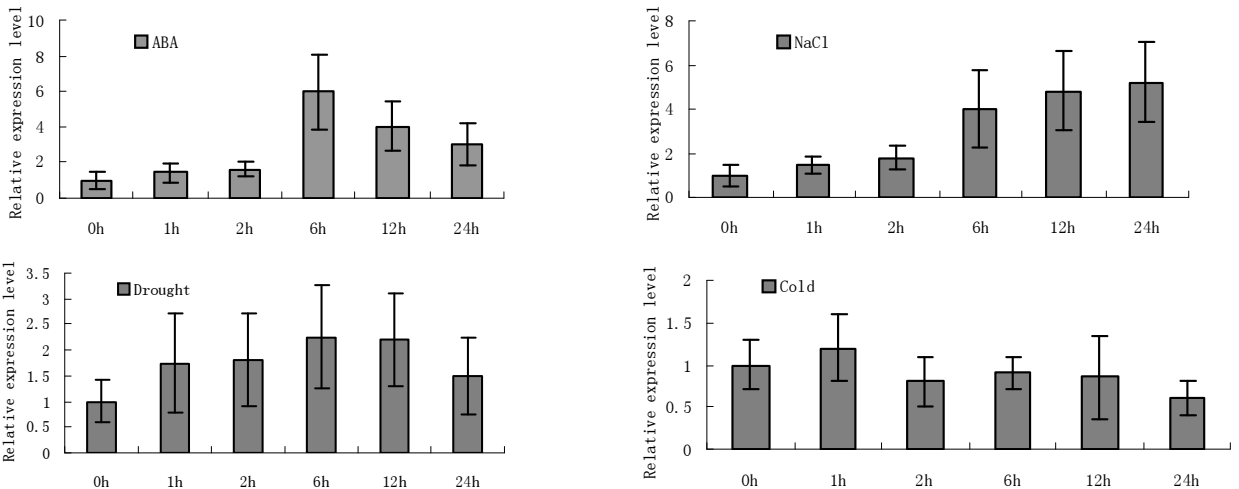


图 4 玉米 *ZmbZIP* 基因的表达模式

玉米 GAPDH 作为内参基因。误差线代表标准偏差 SD(n=3)

3 讨论

干旱、盐碱和低温等逆境胁迫严重影响植物的生长和发育进程^[9]。植物在进化的过程中,为了抵抗不利的外界环境条件,已经在生理、细胞和分子水平上形成了多种防御机制。植物通过改变大量基因的表达来应答各种逆境胁迫。这些表达变化的基因可以分为两类,一类为细胞代谢和抗逆基因;另一类为调控基因,包括转录因子及蛋白激酶^[10]。植物 bZIP 类转录因子通过结合 ABRE 元件调控逆境相关基因的表达,增加植物对逆境胁迫的忍耐能力^[10-11]。例如,在干旱胁迫下, *ZmbZIP37* 表达水平增加,暗示其可能是一个干旱胁迫正调

控子^[12]。水稻 *OsbZIP23* 和 *OsbZIP72* 在 ABA 应答和干旱忍耐中发挥作用^[4,13]。在过表达 *OsbZIP52* 基因的水稻中,干旱相关基因下调表达^[14]。*AtbZIP* 是一个忍耐盐,渗透和干旱胁迫的正调控子^[15]。*ZmbZIP71* 基因受干旱、低温和 ABA 的胁迫诱导上调表达,受盐胁迫下调表达^[16]。本研究克隆了一个玉米 *ZmbZIP* 基因,在干旱、高盐和 ABA 胁迫条件下,玉米 *ZmbZIP* 基因的表达受诱导,但不受冷胁迫诱导,暗示 *ZmbZIP* 基因可能在玉米对干旱、高盐和 ABA 胁迫忍耐中发挥作用。下一步将构建 *ZmbZIP* 基因植物表达载体,转化玉米对该基因在逆境胁迫中的功能进行进一步分析。

(下转第 46 页)

响,多数试验认为有增产作用,少数试验表现为减产。孙伟红^[9]在山东潮上连续 18 年试验,秸秆还田处理的小麦和玉米产量较不施肥区对照增产 55.2%和 25.0%。另外,曾玲玲等^[10]在白浆土上 18 年定位试验,秸秆还田处理较不施肥增产 90.7%,较施氮磷化肥增产 2.3%。本文研究表明,秸秆还田处理全方位深松、高茬还田、粉碎还田和条带覆盖均高于现行耕法,平均增幅分别为 8.27%、13.50%、13.59 和 10.07%,其中粉碎还田和条带覆盖产量表现最高,笔者分析认为,增产主要是由于长期秸秆还田培肥土壤,提高土壤持续生产能力,促进环境综合指标提升,形成良好的生长环境效应,进而促进玉米产量的提高,这也验证了前人的研究结果。

参考文献:

- [1] 钟华平,岳燕珍,樊江文. 中国作物秸秆资源及其利用[J]. 资源科学, 2003, 25(4): 62-67.
- [2] 潘根兴,李恋卿,张旭辉,等. 中国土壤有机碳库量与农业土壤碳固定动态的若干问题[J]. 2003, 18(4): 609-618.
- [3] 孟磊,蔡祖聪,丁维新. 长期施肥对土壤碳储量和作物固定碳的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(5): 771-776.
- [4] 金峰,杨浩,赵其国. 土壤有机碳储量及影响因素研究进展[J]. 土壤, 2000(32): 11-17.
- [5] 陈新锋. 对我国农村焚烧秸秆污染治理的经济学分析[J]. 中国农村经济, 2001(2): 47-52.
- [6] 朴香兰. 吉林省农作物秸秆资源的现状及综合利用[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1): 60-64.
- [7] 王俊峰,王景财,曹礼,等. 玉米秸秆还田对棉花生育及产量的影响[J]. 江西棉花, 1996(5): 14-15.
- [8] 孟凡乔,吴文良,辛德惠. 高产农田土壤有机质养分的变化规律与作物产量的关系[J]. 植物营养与肥料学报, 2000, 6(4): 370-374.
- [9] 孙伟红,劳秀荣,董玉良,等. 小麦-玉米轮作体系中秸秆还田对产量及土壤钾素肥力的影响[J]. 作物杂志, 2004(4): 14-16.
- [10] 曾玲玲,刘德福,洪音,等. 长期定点施肥对土壤养分及作物产量的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(4): 22-26.

(上接第 27 页)

参考文献:

- [1] Landschulz W H, Johnson P F, Mcknight S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins[J]. Science, 1988, 240 (4860):1759 - 1764.
- [2] Ja Koby M, Weisshaar B, Drue-Laser W, et al. The family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7 (3):106 - 111.
- [3] Kang J Y, Choi H I, Im M Y, et al. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2002(14): 343-357.
- [4] Lu G, Gao C, Zhong X, et al. Identification of OsbZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice [J]. Planta, 2009(229): 605-615.
- [5] Stan Kovic B, Vian A, Henry-Vian C, et al. Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA binding protein[J]. Planta, 2000, 212(1): 60 - 66.
- [6] Wang Y C, Gao C, Liang Y, et al. A novel bZIP gene from Tamarix hispida mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167 (3): 222 - 230.
- [7] Liao Y, Zou H F, Wei W, et al. Soybean GmbZI P44, GmbZI P62 and GmbZI P78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. Planta, 2008, 228(2): 225 - 240.
- [8] 于月华,王莉萍,高文伟,等. 小麦盐胁迫相关基因的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1073-1078.
- [9] Chen T H, Murata N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes [J]. Curr. Opin Plant Biol., 2002, 5 (3): 250-257.
- [10] Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, et al. BWMK1, a rice itogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor [J]. Plant Physiol, 2003, 132 (4): 1961-1972.
- [11] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2005(17): 3470-3488.
- [12] Wei K, Chen J, Wang Y, et al. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize [J]. DNA Res, 2012, 19 (6): 463-476.
- [13] Xiang Y, Tang N, Du H, et al. Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice [J]. Plant Physiol, 2008(148): 1938-1952.
- [14] Liu C, Wu Y, Wang X. bZIP transcription factor Os-bZIP52/RISBZ5: a potential negative regulator of cold and drought stress response in rice [J]. Planta, 2012 (235): 1157-1169.
- [15] Sun X, Li Y, Cai H, et al. The Arabidopsis AtbZIP1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. J. Plant Res., 2012 (125): 429-438.
- [16] 刘彦丹,英生,张登峰,等. 玉米逆境胁迫响应基因 *Zm-bZIP71* 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (5): 775-781.