

## 野生大豆 (*Glycine soja*) C2H2 型锌指蛋白基因的克隆与序列分析

白晶<sup>1</sup>, 张必弦<sup>2</sup>, 李新玲<sup>1</sup>, 徐香玲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; <sup>2</sup>黑龙江省农业科学院博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**根据大豆 SCOF-1 的 CDs 区设计特异引物, 通过 PCR 和 RT-PCR 从野生大豆 01-197 中克隆到含两个锌指的 C2H2 型锌指蛋白基因, 命名为 *GjC2H2*, GenBank 登录号为 FJ172776。对其进行核苷酸和氨基酸同源性分析及系统发生分析, 结果表明: 该基因内部无内含子, 长度为 702bp, 分子量为 25.13KD, 与其他锌指蛋白基因有很高的同源性, 推测其与植物抗逆性有关。

**关键词:**野生大豆; C2H2 型锌指蛋白; 基因克隆

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)01-0021-05

## Cloning and Sequence Analysis of a C2H2 type Zinc Finger Protein Gene from *Glycine soja*

BAI Jing<sup>1</sup>, ZHANG Bi-xian<sup>2</sup>, LI Xin-ling<sup>1</sup>, XU Xiang-ling<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Life Science and Technology Institute, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang; <sup>2</sup>Post-doctoral Station of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150080, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Specific primers were designed according to the soybean SCOF-1 of CDs from the GenBank, C2H2-type Zinc finger protein gene containing two zinc finger, named *GjC2H2* was cloned through the PCR and RT-PCR from the wild soybean 01-197, and the GenBank accession number was FJ172776. Homogenesis and phylogeny analysis of nucleotide, amino acid sequence showed that there was no intron in the gene, the length of the gene was 702 bps, molecular weight was 25.13 KD, and the gene and other zinc finger protein gene had a high homology. It is presumed that the gene *GjC2H2* is related with stress tolerance in plants.

**Key words:** Wild soybean; C2H2-type zinc finger protein; Gene cloning

高盐、干旱和低温等非生物胁迫对作物的产量及生长发育有很大影响, 因此提高作物的抗胁迫性尤为重要。利用转基因技术向栽培植物导入抗逆基因及与抗逆有关的转录因子, 已成为改良植物耐逆性的主要途径。野生大豆作为优质的种质资源, 其基因组内含有许多抗逆基因和抗逆转录因子<sup>[1]</sup>。研究这些基因和转录因子的结构和功能, 对提高植物抗逆性具有重要意义。

锌指蛋白是一种研究较多的转录因子, C2H2型锌指蛋白是锌指蛋白基因家族的一个亚家族。已有研究表明, 其功能与植物的抗逆性有关<sup>[2-3]</sup>。王东等测序筛选棉花花瓣 cDNA 文库, 发现一个棉花 C2H2 型锌指蛋白基因 *CSTZ*。该基因的表达随棉花幼苗钠盐处理浓度的升高而增强, 并且在花龄期

棉花的叶片、根、花瓣和花药组织中大量表达, 在柱头组织中表达相对较弱<sup>[4]</sup>; 郭书巧等利用生物信息学和 RT-PCR 方法, 从水稻中分离了一个 C2H2 型锌指蛋白基因 *RZF71*, 该基因定位在细胞核内, 可能在植物响应高盐和渗透胁迫过程中, 参与不依赖于 ABA 的信号转导途径<sup>[5]</sup>; Lippuner 等利用酵母盐敏感突变体, 采取基因补偿的方法, 从拟南芥 cDNA 文库中筛选到了一个编码 TFⅢA 型锌指蛋白的基因 *STZ*, 该基因可以补偿因钙调磷酸酶缺陷所导致的酵母盐敏感性<sup>[6]</sup>。目前此类转录因子在大豆中报道较少, 栽培大豆中已报道的有 SCOF-1 基因和 GmC2H2 基因, 野生大豆中目前还未见报道。

从野生大豆中克隆了一个典型的 C2H2 型锌指蛋白基因, 命名为 *GjC2H2*, GenBank 登录号为

收稿日期: 2008-09-22

基金项目: 黑龙江省重大攻关课题资助项目 (GA06B103-10); 哈尔滨师范大学博士科研启动基金资助项目。

作者简介: 白晶 (1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向为基因工程。E-mail: baijing0451@yahoo.com.cn。

通讯作者: 李新玲, 博士, 讲师。E-mail: lixinling2002@126.com。

FJ172776。该基因的克隆对于利用野生大豆拓宽育种的基因资源,促进作物抗逆育种水平的提高,具有重要的理论和实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

野生大豆(*Glycine soja*)龙野 01-197,由黑龙江省农业科学院提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 大豆基因组 DNA 提取** 采用 CTAB 法提取。材料经液氮研磨后,加入适量预热的  $2 \times$  CTAB,混合均匀后,  $65^\circ\text{C}$  水浴 45 min。等体积酚/氯仿抽提后  $13\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心 10 min。取上清等体积氯仿抽提后  $13\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心 10 min。醇沉离心后用去离子水溶解沉淀。

**1.2.2 RNA 的分离与 cDNA 第一条链的合成** 采用 RNAiso 试剂盒提取 RNA。材料经液氮研磨后,加入适量的 RNAiso Reagent,充分混匀后室温静置 5 min。加入  $1/5$  RNAiso Reagent 体积量的氯仿,振荡混匀后室温静置 5 min。  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心 15 min,取上清,加入等体积异丙醇,室温静置 10 min。  $1\text{ mL}$  75% 乙醇清洗沉淀,  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心 5 min,弃上清,沉淀干燥后溶解于适量的 DEPC 水中。取  $2\text{ }\mu\text{g}$  经 DNaseI 处理的总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成,产物作为 RT-PCR 模板。

**1.2.3 *GjC2H2* 的克隆与序列测定** 根据 GenBank 中收录的大豆耐冷锌指蛋白基因 SCOF-1 的 CDs 保守区设计一对特异引物,上游引物 P1 为  $5'\text{GGATC-CATGGCTTTTGAAGCTCTCAACTC3}'$ ,下游引物 P2 为  $5'\text{GAGCTCT CATTGAAATTGGGGGATTTTCG3}'$ ,均由上海英骏生物技术有限公司合成。

以野生大豆龙野 01-197 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,以反转录所得 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,程序均为:  $94^\circ\text{C}$  预变性 3 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $52^\circ\text{C}$  40 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min,总计 32 个循环,最后  $72^\circ\text{C}$  7 min。PCR 产物胶回收后与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,经 X-gal/IPTG 平板培养后,挑取白色菌落进行 PCR 及双酶切(BamHI和 SacI)鉴定。测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GjC2H2* 克隆

提取的 DNA(图 1)、RNA(图 2)如琼脂糖凝胶

电泳图谱所示,可用于试验。PCR 及 RT-PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,显示扩增条带均在 750bp 左右。连接转化后经菌落 PCR(图 3)及 BamH I 和 Sac I 双酶切(图 4)鉴定,大小也均在 750bp 左右。经测序,得到两种 PCR 产物大小相同,均为 702bp,与预期相符。由此也证明此基因内部没有内含子。与刘萌萌<sup>[7]</sup>的报道一致。

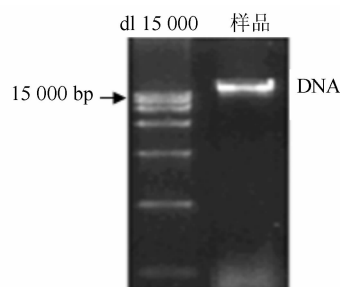


图 1 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA

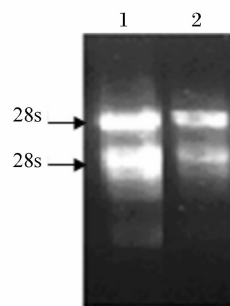


图 2 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RNA

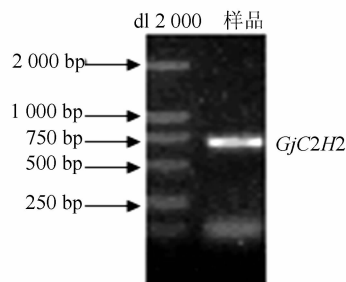


图 3 PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR identification results

### 2.2 *GjC2H2* 基因序列及氨基酸序列分析

克隆得到的 *GjC2H2* 长度为 702bp,其推测的氨基酸序列含有两个典型的  $\text{Cys}_2/\text{His}_2$  锌指结构,序列为  $\text{Cys-X}_2\text{-Cys-X}_{12}\text{-His-X}_3\text{-His}$ ,符合 C2H2 型锌指蛋白的典型结构:  $(\text{Tyr, Phe})\text{-X-Cys-X}_{2-4}\text{-Cys-X}_3\text{-Phe-X}_5\text{-Leu-X}_2\text{-His-X}_{2-6}\text{-His}$  (X 为可变氨基酸)。两锌指之间由 32 个氨基酸区段隔开,主要为疏水性

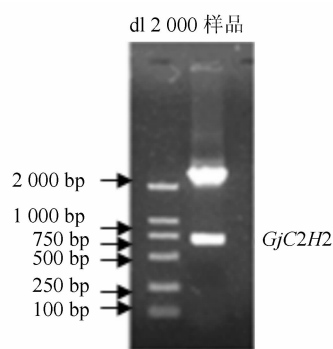


图4 双酶切鉴定结果

Fig.4 Double digestion

和极性氨基酸。两个锌指结构都包含植物所特有的 QALGGH 保守序列(图 5)。用 DNASTAR 对其氨基酸进行分析,结果显示这段氨基酸的分子量为 25.13KD,等电点为 8.549,共有 233 个氨基酸残基,其中包括 26 个碱性氨基酸,21 个酸性氨基酸,56 个疏水性氨基酸,76 个极性氨基酸。

### 2.3 *Gjc2H2* 的同源性检索分析

将 *Gjc2H2* 的氨基酸序列输入 NCBI 进行 BLAST 同源比对,结果表明其与大豆冷诱导蛋白基因 SCOF-1 同源性较高,达 85%,与苜蓿 (CAB77055)的同源性为 60%,与其他非豆科植物

```

ATGGCTTTTGAAGCTCTCAACTCACCAACAACAACCGCCCCATCTTTCCCCTTCGACGAC
M A F E A L N S P T T T A P S F P F D D
CCAATAATTCCATGGGCGAAAAGAAAACGTTCAAAGCGTTGTTACGCGACCAACCTTCG
P T I P W A K R K R S K R C S R D H P S
GAGGAAGAGTACCTCGCTCTCTGCCTCATCATGCTCGCTCGCGCGGCACCAACCCGCCGC
E E E Y L A L C L I M L A R G G T T R R
GTCAGCACTCCACCGCGCAACCGACTCCAGATCCTTCCACCAAGCTCAGTTACAAATGC
V S T P P P Q P T P D P S T K L S Y K C
TCCGTTTGAACAAAAGCTTCCCCTCTTACCAAGCGCTCGGTGGACACAAGGCCAGTCAC
S V C N K S F P S Y Q A L G G H K A S H
CGGAAACTCGCTGCCTCCGGCGGCGAAGACCAACCCACCACCACTCTCCGCCGCCAGC
R K L A A S G G E D Q P T T T S S A A S
TCCGCCAACACCGCCTCCGGAGGTAGGACCCACGAGTGCTCCATCTGCCACAAGTCCTTC
S A N T A S G G R T H E C S I C H K S F
CCCACCGGACAGGCCCTCGGCGGACACAAACGTTGTCACTACGAAGGTAACAGTAATGGA
P T G Q A L G G H K R C H Y E G N S N G
AATAACAACAACAGTAACAGCTCTGTCAACCGCCGCTCGGAAGGCGTGGGGTCCACCCAC
N N N N S N S S V T A A S E G V G S T H
ACCGTGAGTCACGGCCACCACCGCGACTTCGATCTCAACATCCCGGCCTTTCGGGATTTT
T V S H G H H R D F D L N I P A F P D F
TCGACCAAGGTGCGGAGAAGACGAGGTTGAGAGCCCTCACCTGTGATGAAGAAGCCTCGC
S T K V G E D E V E S P H P V M K K P R
C T C T T C G T C A T T C C C A A G A T C G A A A T C C C C A A T T T C A A T G A
L F V I P K I E I P Q F Q -

```

图5 *Gjc2H2* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列(下划线标示 C2H2 锌指区)Fig.5 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for *Gjc2H2* (C2H2 zinc finger motif is underlined)

同源性较低。利用 DNAMAN 将 *Gjc2H2* 与 BLAST 比对结果中的同源蛋白序列进行系统发生分析(图 6),结果显示该基因与大豆亲缘关系最近。将目的基因与几个亲缘物种的 C2H2 型锌指蛋白作同源比对(图 7),分析表明,同源区域除两个锌指区外,还包括氨基酸的 N 端、C 端以及中部区域。两个锌指区内各含一段完全保守的区域,分别为 SYQALG-GHKASHRK 和 TGQALGGHKKRCHY,推测它们是锌指结构的  $\alpha$  螺旋区,其通过插入 DNA 大沟来实现与 DNA 的特异性结合。N 端含有一个与亚细胞定位有关的可能的核定位信号区 B-box,中心序列为

KXKRSKRXR,及一个可能与蛋白质相互作用有关的富含亮氨酸的疏水区 L-box,其中心序列为 EX-EXXAXCLXXL。C 端具一个保守的 FDLN-box,是一个可能的功能抑制区。由此可以确认 *Gjc2H2* 属于锌指蛋白家族的 C2H2 亚家族。

### 3 结论与讨论

C2H2 型锌指蛋白是一种研究较多的转录因子,但在大豆中报道较少,栽培大豆中已报道的有 SCOF-1 基因和 *GmC2H2* 基因,在野生大豆中目前没有见到报道。SCOF-1 是一个耐冷锌指蛋白基

因,而对 *GmC2H2* 的研究表明,其表达受冷和 ABA 的诱导,可能对植物的抗冷性起作用。*GjC2H2* 与

*SCOF-1* 的同源性达 85%,与 *GmC2H2* 的同源性不到 20%。



图 6 *GjC2H2* 与其他同源基因的系统发生分析

Fig. 6 *GjC2H2* with other homologous gene of phylogenetic analysis

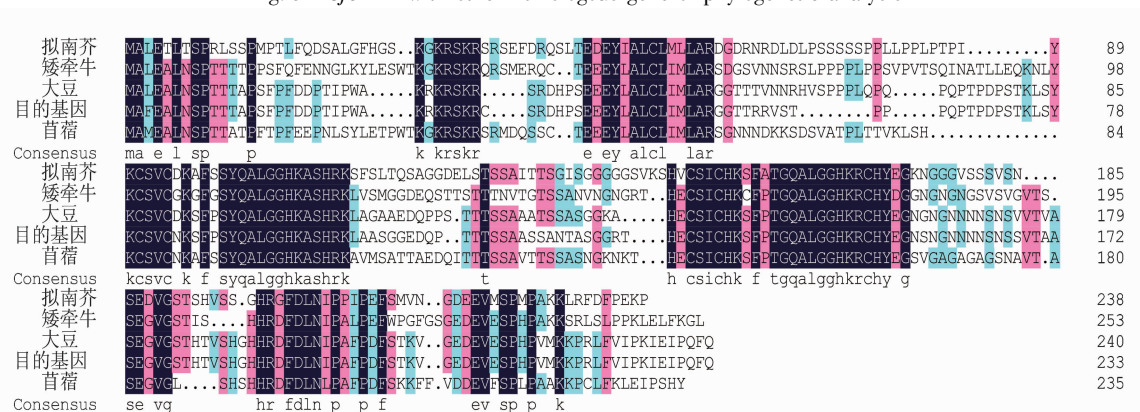


图 7 *GjC2H2* 与拟南芥、矮牵牛、大豆、苜蓿中 C2H2 锌指蛋白的氨基酸序列对比

Fig. 7 Alignment of *GjC2H2* with *Arabidopsis thaliana*, *Petunia*, *Glycine max*, *Medicago sativa* C2H2-type zinc finger proteins

野生大豆主要生长于田边、河岸、沼泽和芦苇丛中,环境的影响使其具有强耐逆性<sup>[8-9]</sup>,目前对其抗逆机制的研究已成为热点<sup>[10]</sup>。在野生大豆对胁迫信号的吸收和传递过程中,必然通过信号转导通路传递信号,这其中转录因子的作用不容忽视<sup>[11]</sup>。因此研究野生大豆中的抗逆转录因子,对提高植物的抗逆性将起到不可估量的作用。

作为大豆中的一个转录因子,*GjC2H2* 的功能有待于进一步研究,现已构建了 *GjC2H2* 的原核表达载体,然后将其原核表达进行研究。

从野生大豆 01-197 中克隆的 *GjC2H2* 基因内部具有典型的 C2H2 锌指结构,含有两个 C2H2 锌指。除两个锌指区外,在 *GjC2H2* 氨基酸的 N 端、C 端以

及中部区域均有保守序列存在<sup>[12-13]</sup>。基因内部还含有可能的  $\alpha$  螺旋区、与亚细胞定位有关的核定位信号区、疏水区 L-box 和可能的功能抑制区 FDLN-box,可以确认该基因是锌指蛋白 C2H2 亚家族的成员<sup>[14-15]</sup>。

## 参考文献

- [1] 王果. 野生大豆(*Glycine soja*)资源的利用研究进展[J]. 滁州学院学报, 2007, 9(3): 74-76. (Wang G. Study on the further processing of wild soybean [J]. Journal of Chuzhou University, 2007, 9(3): 74-76.)
- [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] 黄骥, 张红生. TFⅢA 型锌指蛋白及在提高植物耐逆性中的作用[J]. 遗传, 2007, 29(8): 915-922. (Huang J, Zhang H S. The plant TFⅢA-type zinc finger proteins and their roles in abiotic stress tolerance[J]. Hereditas, 2007, 29(8): 915-922. )
- [4] 王东, 杨金水. 棉花类耐盐锌指蛋白基因的克隆与结构分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 2002, 41(1): 42-45. (Wang D, Yang J S. Cloning and characterization of cDNA encoding cotton STZ-like protein[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2002, 41(1): 42-45. )
- [5] 郭书巧, 黄骥, 江燕, 等. 水稻 C2H2 型锌指蛋白基因 RZF71 的克隆与表达分析[J]. 遗传, 2007, 29(5): 607-613. (Guo S Q, Huang J, Jiang Y, et al. Cloning and characterization of RZF71 encoding a C2H2-type zincfinger protein from rice[J]. Hereditas, 2007, 29(5): 607-613. )
- [6] 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]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(22): 12859-12866.
- [7] 刘萌萌. 大豆 C2H2 型锌指蛋白转录因子基因的克隆与鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007. (Liu M M. Isolation and characterization of C2H2 type zinc finger transcription factor in *Glycine max* (L.) Merrill[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. )
- [8] 王克晶, 李福山. 我国野生大豆(*G. soja*)种质资源及其种质创新利用[J]. 中国农业科技导报, 2000, (6): 69-72. (Wang K J, Li F S. General situation of wild soybean(*G. soja*) germplasm resources and its utilization of introgression into cultivated soybean in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2000, (6): 69-72. )
- [9] 朱俊义, 杨光宇, 赵凤娟, 等. 野生大豆抗盐解剖结构研究[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 2003, 35(4): 106-107. (Zhu J Y, Yang G Y, Zhao F J, et al. Study on salt-resistant structure of *Glycine soja* L[J]. Journal of Northeast Normal University (Natural), 2003, 35(4): 106-107. )
- [10] 吕宪禹, 卢茜, 刘桂琴, 等. 导入野生大豆 DNA 小麦后代的农艺性状研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2002, 35(4): 103-105. (Lu X Y, Lu X, Liu G Q, et al. Study on the agronomic traits of variation lines obtained by introducing *G. soja* DNA into wheat[J]. Journal of Nankai University (Natural), 2002, 35(4): 103-105. )
- [11] 缪颖, 伍炳华. 植物抗逆性的获得与信息传导[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(1): 71-75. (Miao Y, Wu B H. The acquirement of stress response characteristics and signal transduction in plants[J]. Plant Physiology Communications, 2001, 37(1): 71-75. )
- [12] 张杰, 汤浩茹, 罗娅, 等. 枳壳 CBF 转录激活因子基因片段的克隆[J]. 生物技术通报, 2008, (2): 123-126. (Zhang J, Tang H R, Luo Y, et al. Molecular cloning of a gene fragment encoding CBF transcriptional factor from poncirus triflorata[J]. Biotechnology Bulletin, 2008, (2): 123-126. )
- [13] 黄骥, 张红生, 曹雅君, 等. 一个新的水稻 C2H2 型锌指蛋白 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(2): 110-112. (Huang J, Zhang H S, Cao Y J, et al. Cloning and sequence analysis of a new novel C2H2 zinc finger cDNA from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2002, 25(2): 110-112. )
- [14] 王俊英, 尹伟伦, 夏新莉. 胡杨锌指蛋白基因克隆及其结构分析[J]. 遗传, 2005, 27(2): 245-248. (Wang J Y, Yin W L, Xia X L. Cloning and structure analysis of zinc finger protein gene in populus euphratica oliver[J]. Hereditas, 2005, 27(2): 245-248. )
- [15] CAO Q F, Masato W, Meng Y P, et al. Molecular cloning and expression analysis of a zinc finger protein gene in apple[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(9): 1091-1099.

## 立足黑龙江 辐射全中国 聚焦大农业 促进快发展

### 欢迎订阅 2009 年《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。内容丰富、栏目新颖、信息量大、可读性强,读者群大、发行面广,是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被《中国科学引文数据库》《中国核心期刊(遴选)数据库》、CNKI 系列数据库、万方数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和华艺电子出版事业群等多家权威数据库收录。

《黑龙江农业科学》为双月刊,单月 10 日出版,国内外公开发行。国内邮发代号 14-61,每期定价 8.00 元,全年 48.00 元;国外由中国国际图书贸易总公司发行,发行代号 BM8321,每期定价 8.00 美元,全年 48.00 美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数,收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另外,编辑部现有少量 2007 年合订本珍藏版。每册 80.00 元,邮费 10.00 元,共计 90.00 元,售完为止。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《黑龙江农业科学》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86668373 电子函件:nykx13579@sina.com