

野生大豆 *GsRNF12* 基因的克隆及表达特性研究

张红梅¹, 董俊彤¹, 白云², 邓馨³, 肖莉杰¹, 费志宏⁴, 方淑梅¹, 韩毅强¹, 王北艳¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 大庆市质量技术监督局标准化研究所, 黑龙江 大庆 163319; 3. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093; 4. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 采用 RT-PCR 的方法, 根据栽培大豆的 *RNF12* 基因全长设计特异引物, 从野生大豆克隆到 *GsRNF12* 基因。序列分析表明, 该基因含 723 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 240 个氨基酸, *GsRNF12* 蛋白在 178 ~ 220 氨基酸处有典型的 C4HC3 结构域, 属于 C3HC4 锌指蛋白家族。利用实时荧光定量 PCR 对野生大豆 *GsRNF12* 基因的表达特性进行分析, 结果表明: 野生大豆 *GsRNF12* 基因对高盐、干旱、低温、ABA、SA 胁迫处理均存在不同程度的应答响应; *GsRNF12* 基因在根、茎、叶的表达有差异性, 其中在根中表达量最大。

关键词: 野生大豆; *GsRNF12* 基因; 基因表达; 逆境胁迫

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)06-0750-05

Isolation and Expression Patterns of *GsRNF12* Gene in *Glycine soja*

ZHANG Hong-mei¹, DONG Jun-tong¹, BAI Yun², DENG Xin³, XIAO Li-jie¹, FEI Zhi-hong⁴, FANG Shu-mei¹, HAN Yi-qiang¹, WANG Bei-yan¹

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Daqing Bureau of Quality and Technical Supervision Standardization, Daqing 163319, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 4. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The *GsRNF12* gene from *Glycine soja* was amplified by RT-PCR. Its full length cDNA I was 723 bp and contained a open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 240 amino acid. *GsRNF12* protein in 178-220 amino acid has a typical C4HC3 domain structure, belonging to the C3HC4 zinc finger protein family. The expression patterns of *GsRNF12* gene were analyzed using quantitative real-time PCR. The results indicated *GsRNF12* gene responded differently to salt, cold, drought, ABA and SA; *GsRNF12* had no tissue-specific expression characteristics which expressed in roots, stems and leaves, and the expression in root was higher than that in other tissues.

Key words: *Glycine soja*; *GsRNF12* gene; Gene expression; Stress

干旱和盐碱等非生物逆境胁迫会导致植物发生一系列形态学、生理学和分子水平的变化, 影响植物的生长发育和产量^[1]。针对非生物逆境胁迫, 植物通过感知和传导逆境信号的分子发展了一套复杂而完善的调控网络^[2]。其中锌指蛋白在调节植物自身防卫的基因表达和针对外界逆境产生抗性反应的调控上起着关键作用。锌指结构分为 C2H2、C2C2、C3H2C3、C3HC4 (RING-finger) 4 个亚类^[3-4]。目前研究者对锌指蛋白 C2H2 家族的基因功能研究较深入, 对 C3HC4 型蛋白研究较少。野生大豆具有极强的抗逆性和丰富的遗传多样性, 是大豆育种极为重要的种质资源^[5-6]。我们通过同源克隆的方法得到野生大豆 *GsRNF12* 基因, 该基因 cDNA 序列包含 1 个完整的开放阅读框 (1 ~ 723 bp), *GsRNF12* 蛋白在 178 ~ 220 氨基酸处有典型的 C4HC3 结构域, 属于 C3HC4 锌指蛋白家族。现利用实时荧光定量 PCR 技术, 研究野生大豆 *GsRNF12*

基因在非生物胁迫下的表达特性, 以期为进一步明确该基因功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生大豆 (*Glycine soja*) 龙野 01-97 由黑龙江省农业科学院提供, 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。克隆引物由北京全式金生物公司合成, 实时荧光定量 PCR 引物及测序由上海生物工程有限公司完成。

pGM-T vector 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 限制性内切酶、LA *Taq* 酶、T4-DNA 连接酶、RNA 提取试剂 TRIzol、M-MLV 反转录酶、Oligo (dT) 18 引物、SYBR Premix Ex *Taq*TM 试剂盒、DNA 限制性内切酶、T4 连接酶均购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的片段克隆、测序分析 利用 Takara 公

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 黑龙江省教育厅项目 (11521202)。

第一作者简介: 张红梅 (1969-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物生物技术方面的研究工作。E-mail: zhhm333@126.com。

司 TRIzol 试剂盒提取野生大豆叶片的总 RNA,利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。野生大豆与栽培大豆亲缘关系较近,因此根据 GenBank 登录的栽培大豆的 *RNF12* 基因全长设计特异引物,并在上下游引物的 5'、3'端分别加 *Age* I 和 *Eco*R I 酶切位点序列,引物序列为:

5'-ACCGGTatgacgagcgettcggagc-3';

5'-CCGGAATTCTtagttaattacaactatac-3'

在 RT-PCR 反应体系中,dNTP 1 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 cDNA 1 μ L,LA *Taq* 酶 0.5 μ L,10 \times buffer 2.5 μ L(含 Mg^{2+}),以 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 50 s,55℃ 50 s,72℃ 延伸 1 min,36 个循环,72℃ 延伸 10 min。

利用 DNA 回收试剂盒将 PCR 产物回收,回收产物按 3:1 与载体 pMD18-T 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,经 PCR 及酶切鉴定含有阳性重组质粒的菌株送上海生物工程公司测序。将测序结果经 BLAST 比对,采用 NCBI 的 ORFfinder 确定该基因的开放阅读框,氨基酸多序列比对用 DNAMAN 软件完成。

1.2.2 野生大豆的培养及处理 挑选大小一致的野生大豆种子,用浓硫酸处理 15 min,蒸馏水冲洗干净,然后播种于混合均匀的蛭石草炭土上,室温 25℃ 条件下培养。长出幼苗后用 Hongland 营养液培养,20 d 后对野生大豆进行低温(4℃)、高盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)、干旱(20% PEG6000)、水杨酸(10 μ mol·L⁻¹ SA)、脱落酸 ABA(5 μ mol·L⁻¹)、SA(10 μ mol·L⁻¹) 分别处理 1,3,6,12,24 h 后取样,将植物分解为根、茎、叶后置于液氮中迅速冷冻,然后 -80℃ 保存备用。

1.2.3 Real-Time PCR 分析基因的诱导表达情况

荧光定量 PCR 使用大连宝泰克生物工程公司的 SYBR Premix Ex *Taq*TM 试剂盒,按说明书操作,反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。以稀释 5 倍的 cDNA 为模板,大豆 β -*tublin* 作为对照进行数据的标准化,根据 $2^{-\Delta\Delta CT[7]}$ 计算基因相对表达变化倍数。为确保 Ct 值一致性,包括对照基因在内的每个样品均设置 3 次重复。Real-Time-PCR 引物为:

F:GCATCTTGCGAAGTGGTCTC

R:ACTCGTATCTGTGCGGTTCC

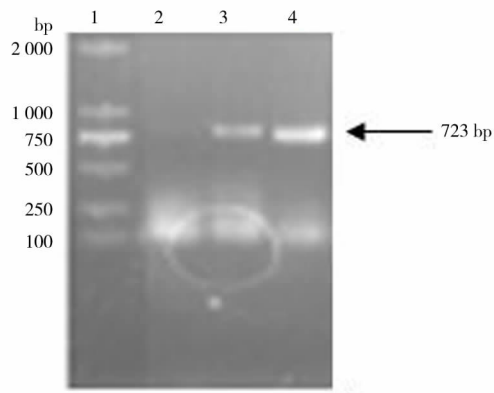
在 Real-Time PCR 反应体系中,2 \times SYBR Premix Ex *Taq* 12.5 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,模板 cDNA 1 μ L,以 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 扩增条件

为:95℃ 预变性 10 s,95℃ 变性 5 s,58℃ 20 s,72℃ 34 s,40 个循环,95℃ 15 s,60℃ 1 min。在冰上进行加样操作。

2 结果与分析

2.1 *GsRNF12* 基因克隆及序列分析

根据大豆 *GmRNF12* 基因 ORF 序列两端设计特异引物,以野生大豆 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,大约在 720 bp 处出现特异性条带(图 1),测序结果表明,所得序列长度为 723 bp。



1:2000 Marker;2:阴性对照;3、4:PCR 产物。

1:Marker DL2000;2:Negative contrast;3,4:PCR products.

图 1 *GsRNF12* 基因扩增

Fig. 1 PCR products of *GsRNF12* gene

2.2 *GsRNF12* 蛋白的氨基酸序列同源性比对及进化树分析

GsRNF12 蛋白氨基酸序列 N 端为含有 12 个氨基酸的信号肽,在 C 端 180~220 氨基酸处有典型的 C3HC4 结构域(图 2),说明 *GsRNF12* 蛋白属于 C3HC4 锌指蛋白家族。利用 PSORT 软件分析 *GsRNF12* 蛋白的细胞定位,表明 *RNF12* 存在于细胞核中。

为进一步研究野生大豆 *GsRNF12* 蛋白与其他物种的进化关系,选用 GenBank 中已登录的栽培大豆、苜蓿等物种的 *RNF12* 氨基酸序列进行分析,发现该蛋白的氨基酸序列与大豆、苜蓿同源性最高,说明它们具有较近的亲缘关系(图 3)。

2.3 *GsRNF12* 基因的表达特性

2.3.1 逆境条件下的诱导表达特性 为了明确 *GsRNF12* 基因对各种逆境的应答响应,通过对野生大豆进行低温、干旱和高盐处理,以实时荧光定量 PCR 技术分析它们的表达情况。结果表明(图 4),低温处理 3 h, *GsRNF12* 基因的表达量降低,而后有所提高,在处理 24 h 时到达最大;干旱处理后,

ACJ83971	MTSASELFPHIRHRLGRNDIDSSFHSSPSSDFHHHRLHDSDDDDSPIRRHYNVFR.....LRHH.ERVSERFDG	70
GmRNF12	MTSASELFHSHRHLGRSALDLGLDT.....ELNAADSLR.....RHHYHLR.....LRHHPERASDRIDG	56
XP_002468309.1	MTSASELFTARRGARGRLSDPDPPDPD...PHADALRDQHGIGGRRRRGCRPRERQLDAAGDVQRHLHTGAPPPRRRG	77
GsRNF12.txt	MTSASELFPHIRHRLGRKALDHT.....ELHAADSLRQLRL.RHHYLF.....RHHHPERASDRIDG	55
AAN03470.1.txt	MTSASELFHTRHRLGRNALDLGLDT.....ELHAADSLRQLRL.RHHYLF.....RHHHPERASDRIDG	58
ACN36890.txt	MTSASELFIAARRAARGRLSDPDPPDPD...PHPVALRDQRLGGRRQRGCRPRERQLDAAGDVQRHLHTGAPPPRRRG	75
Consensus	mtsaseif rr g d l r r h r g	
ACJ83971	RVR...RSLVNEGVSAGESVRGAPRA...SGSERLPVDVRLARERLLQFLRGDPVDRNRQNDRDSEVDE.....	132
GmRNF12	RVR...RSFASVSDEENVRSRLRG...SDSERLPVGVVLARARLLQFLRGEPSTNRQYDRDSFGE.....	118
XP_002468309.1	SYTDQILSYIDMNNIGDSAAARRNRLDRLMFRITNERLPGAVLQAQAVLEFLRGVSLGSSASRPSISLDEFSASDVFRID	157
GsRNF12.txt	RVRE..RAWILKKTREVLGVAAAD...YPSVWFLHGQDSFSG.LSNPLRGEPSTNRQYDRDSFGE.....	117
AAN03470.1.txt	RVR...RSFVSVSDEENVRSRLRG...SSSERLPVGVVLARARLLQFLRGEPSTNRQYDRDSFGE.....	120
ACN36890.txt	SYT...ILSYIDMNNFGDSASARRNRLDRLMFRITNERLPGAVLQAQAVLEFLRGISLGSSASRPSISLDEFSANDVFRID	153
Consensus	y r l r g s e	
ACJ83971	..DQSELSSEVPTEDSLITDLTSQHARFQLLHEQTRKPPGLTQEALNCLHLEVFSSIDTES..ESKVLQDCGICLESFM	208
GmRNF12	..DRESELSNEDPTRASLVSDLTSQHARSQFLQELNTKPPGLTQEALDCLHQEVFSSSGNEIGLESRLVQDCSICLESFT	196
XP_002468309.1	FRNRETREANRPHSSSFHPSSESDEERPTVSSSTNSNRSTGLSKAFLRLQIEIFEASKDDN...REASSECISCLDGFY	234
GsRNF12.txt	..DTESQELSRIRSQGISYVVDIFS...IPDLLAKPPGLTQEALDCL..QVSSSNASEIGLDSRVLQDCSICLESFT	189
AAN03470.1.txt	..DPESESNEDPSGASLVTELTQHARSQFLQELSTKPPGLTQEALDCLHQEVFSSSNASEIGLDSRVLQDCSICLESFT	198
ACN36890.txt	FRNRETREANRPHSSSFHLSSESDEERNVSSVNSNRSTGLSKAFLRLQIEIFEASKDDN...REASPECISCLDGFY	230
Consensus	e gl a l f c i c l f	
ACJ83971	DGDELIRLPCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRCIVVNSHLP.....	251
GmRNF12	DGDELIRLPCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRSIVVIN.....	236
XP_002468309.1	DGDELIRLRCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRCIVVNSHLP.....	274
GsRNF12.txt	DGDELIRLPCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRCITHRCKYSSPHQTSS	239
AAN03470.1.txt	DGDELIRLPCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRCIVVNTSSLNED..	246
ACN36890.txt	DGDELIRLRCGHRFHSVCLDPVIRCGDCPYCRRCIVVNSHLP.....	270

图2 GsRNF12 蛋白的氨基酸序列同源性比对

Fig.2 Alignment of the RNF12 protein amino acid sequence

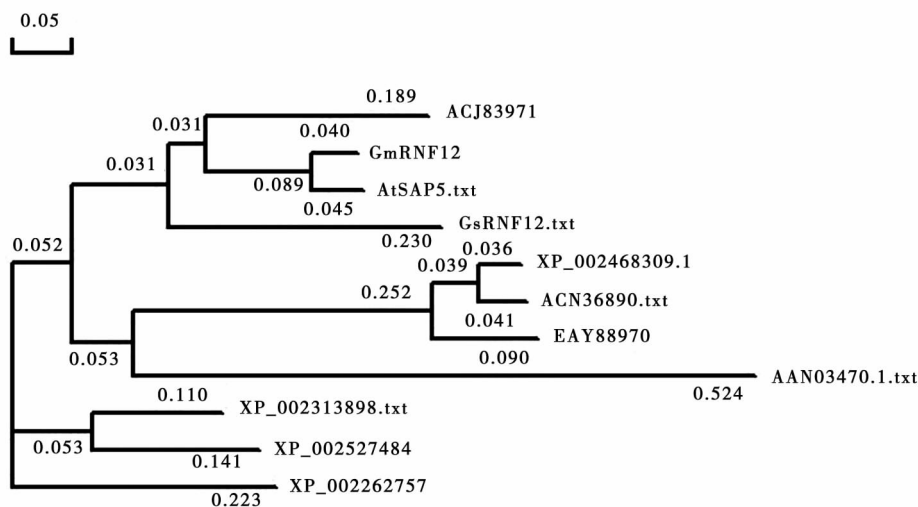


图3 RNF12 基因编码氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of RNF12

GsRNF12 基因的表达量逐步提高,在处理 6 h 达到最大值,之后持续下降;高盐处理后,*GsRNF12* 基因的表达量先上升后下降,在处理 3 h 时表达量达到最大,而后持续下降。

2.3.2 激素诱导表达特性 由图 5 可知,ABA 处理后,*GsRNF12* 的表达量呈波动变化,在处理 12 h 时达最大值;SA 处理后 *GsRNF12* 的表达量先上升后下降,并在处理 12 h 时达最大值。以上结果说明野生大豆 *GsRNF12* 基因的表达受 ABA 和 SA 的诱导,可能参与了 ABA 和 SA 的信号传导途径。

2.3.3 组织表达特性 利用实时荧光定量 PCR 方法对 *GsRNF12* 基因在野生大豆不同组织中的表达进行分析(图 6)。结果表明,*GsRNF12* 在各组织中都有表达,在根中的表达量最高,表达量依次为:根 > 叶 > 茎,不具有组织特异表达性。

以上结果表明 *GsRNF12* 基因对于干旱、高盐、低温非生物胁迫处理均存在不同程度的应答响应,野生大豆 *GsRNF12* 基因的表达受 ABA 和 SA 的诱导。由此推测,*GsRNF* 在应对不同的环境胁迫时可能发挥重要的调控作用,使大豆较好地适应不利的环境条件。

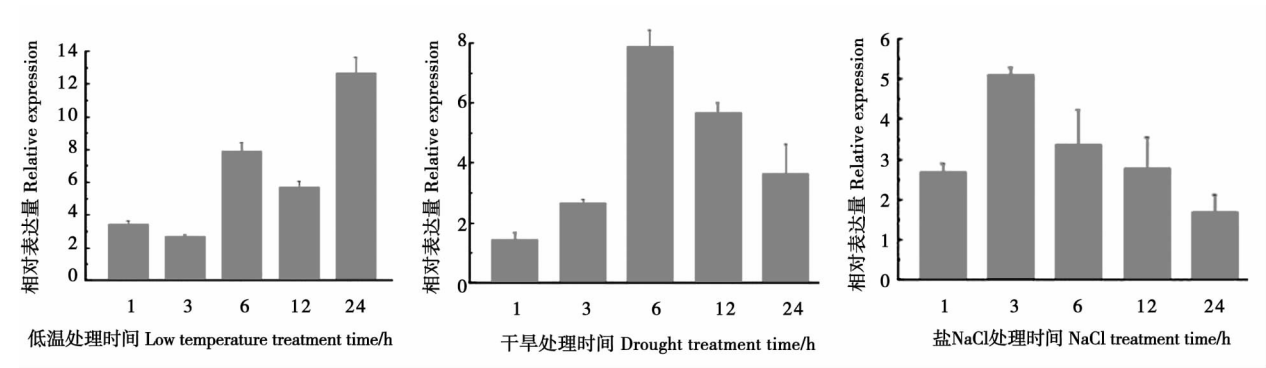


图 4 *GsRNF12* 基因在逆境条件的表达特性

Fig. 4 Expression of *GsRNF12* gene under stress treatment

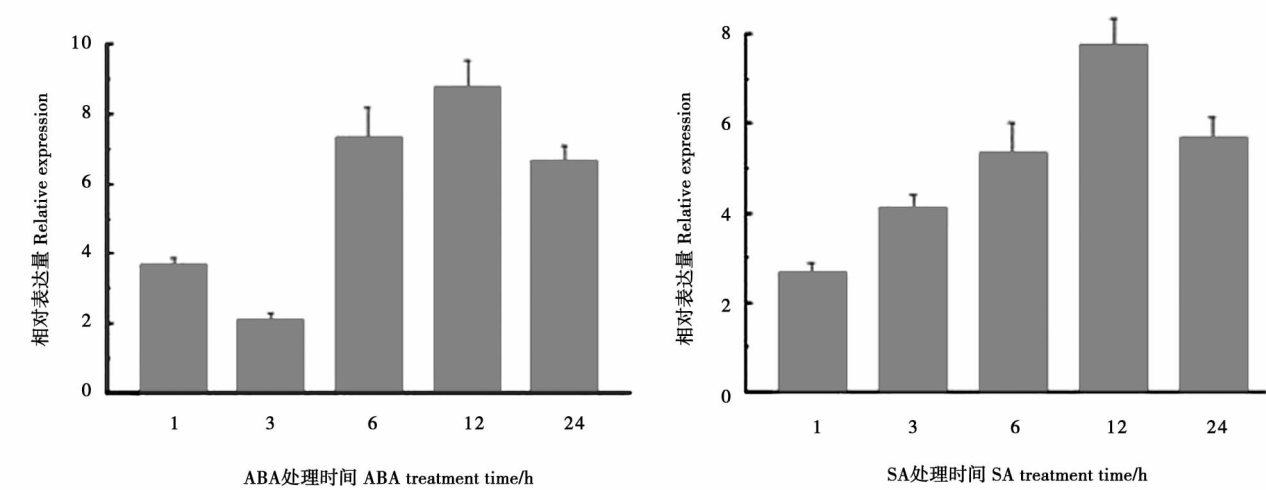


图 5 *GsRNF12* 基因在激素诱导下的表达

Fig. 5 Expression of *GsRNF12* gene under hormone treatment

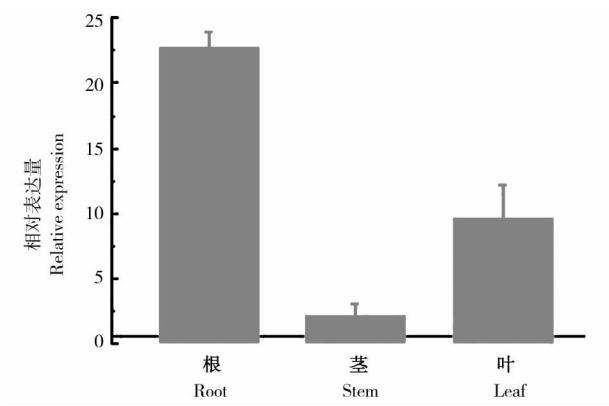


图 6 *GsRNF12* 基因在不同组织的表达

Fig. 6 Expressions of *GsRNF12* gene in various tissues of *Glycine soja*

3 讨论

锌指蛋白在调节植物自身防卫基因的表达和针对外界逆境产生抗性反应的调控上起着关键作用。拟南芥中锌指蛋白基因 *AtSAP5* 受干旱、高盐和低温的诱导,主要在根中表达,*AtSAP5* 的过量表达能够促进其他干旱逆境相关基因的表达,并增强转

基因植株的耐旱性,*AtSAP5* 具有 E3 泛素连接酶活性,是一种逆境响应的正调节物^[8]。我们通过同源克隆的方法克隆到野生大豆 *GsRNF12* 基因,该蛋白在 C 端 180 ~ 220 氨基酸处有典型的 C3HC4 结构域。进化关系分析表明,*GsRNF12* 蛋白与拟南芥的 *AtSAP5* 蛋白亲缘关系较近,因而推测 *GsRNF12* 蛋白可能是泛素连接酶的一种,在清除细胞代谢过程中产生的过多无功能蛋白起着关键作用,*GsRNF12* 蛋白的具体功能需进一步研究确定。

在调节植物发育及抵抗逆境胁迫中,核蛋白发挥着重要的作用^[9]。吴学闯等^[10]利用核蛋白筛选系统(NTT)筛选获得 *GmRZFP1* 锌指蛋白基因,含有 C3HC4 锌指结构域,*RZFP1* 属于 C3HC4 型锌指亚家族。*GmRZFP1* 基因受干旱、高盐、高温、低温、乙烯和 ABA 等胁迫诱导表达,表明该蛋白涉及多种胁迫相关的信号传导途径。Yang 等^[11]分离到 *AdZFP1* 基因,该基因编码蛋白的 C 端具有典型的 C3HC4 型 RING finger 结构域,半定量 PCR 分析表明 *AdZFP1* 基因受外源 ABA 的强烈诱导,在一定程度上受高盐、低温和高温的诱导。本文研究表明

GsRNF12 基因对干旱、高盐、低温、ABA 和 SA 非生物胁迫处理均存在不同程度的应答响应,并且表达没有组织特异性,但在根中的表达量最高,可能是 *GsRNF12* 基因在根部发挥功能。由此推测, *GsRNF12* 在野生大豆应对不同的环境胁迫时可能发挥重要的调控作用,使野生大豆较好地适应不利的环境条件。

参考文献

- [1] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58: 221-227.
- [2] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi A K. Overexpression of a zinc finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration and salt stress in transgenic tobacco[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2004, 101: 6309-6314.
- [3] 刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报, 2000, 45(14): 1465-1474. (Liu Q, Zhang G Y, Chen S Y. Structure and regulation of plant transcription factors[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 101(16): 6309-6314.)
- [4] 向建华, 李灵芝, 陈信波. 植物非生物逆境相关锌指蛋白基因的研究进展[J]. 核农学报, 2012, 26(4): 666-672. (Xiang J H, Li L Z, Chen X B. Progress in the study of abiotic stress-related zinc finger protein genes in plants[J]. Journal of Agricultural Sciences Sinica, 2012, 26(4): 666-672.)
- [5] 王丹阳, 吴铭. 对黑龙江省野大豆保护与利用的研究[J]. 林业勘察设计, 2011(1): 85-86. (Wang D Y, Wu M. Study on protection and utilization of wild soybean in Heilongjiang province[J]. Forest Investigation Design, 2011(1): 85-86.)
- [6] 张春宝, 赵洪锐, 李启云, 等. 野生大豆-吡咯琳-5-羧酸合成酶(P5CS)基因的克隆与序列分析[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 915-920. (Zhang C B, Zhao H K, Li Q Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene in wild soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 915-920.)
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] Kang M, Fokar M, Abdelmageed H, et al. Arabidopsis SAP5 functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75: 451-466.
- [9] Uliaman K S, Powers M A, Forbes D J. Nuclear export receptors: from importin to exportin[J]. Cell, 2000, 90: 967-970.
- [10] 吴学闯, 曹新有, 陈明, 等. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFP1* 克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 343-348. (Wu X C, Cao X Y, Chen M, et al. Isolation and expression pattern assay of a C3HC4-type ring zinc finger protein gene *GmRZFP1* in *Glycine max*(L)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(3): 343-348.)
- [11] Yang X H, Sun C, Hu Y L, et al. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger protein from drought tolerant *Artemisia desertorum*[J]. Journal of Biosciences, 2008, 33: 103-112.

欢迎订阅 2014 年《玉米科学》

《玉米科学》1992 年创刊,由吉林省农业科学院主办。《玉米科学》是我国唯一的玉米专业学术期刊,在国内外玉米界具有较大影响。2004~2012 年连续 3 次入选全国中文核心期刊。

《玉米科学》主要报道:遗传育种、品种资源、耕作栽培、生理生化、生物工程、土壤肥料、专家论坛、国内外玉米科研动态、新品种信息等方面的内容。适合科研、教学、生产及管理方面的人员参考。

《玉米科学》为双月刊,双月 15 日出版。大 16 开本,152 页,每期定价 15 元,全年 90 元。国内外公开发行,邮发代号:12-137,全国各地邮局(所)均可订阅,漏订者可直接向本刊编辑部补订。广告经营许可证号:2200005000005。有意者请与本刊编辑部联系。

电话:0431-87063137 手机:13944003137

E-mail:ymkx@cjaas.com。

地址:吉林省长春市彩宇大街 1363 号 邮编:130033

欢迎订阅 欢迎刊登广告