

珠眉海棠(*Malus zumi* Mats)盐应答 *MzSTO* 基因的克隆与表达分析

蒋玉妆 李凌子 赵宇 李擎天 梁占锋 孔瑾*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 通过微阵列芯片(Microarray)分析,从珠眉海棠盐胁迫 cDNA 文库中分离得到 *MzSTO*(Salt tolerance protein)全长基因。结果表明:*MzSTO* 基因 cDNA 全长 1 066 bp,开放阅读框共 729 bp,5'-UTR 和 3'-UTR 的长度分别是 49 bp 和 288 bp;*MzSTO* 编码 242 个氨基酸,N 端有 2 个保守的 B-box 锌指结构域(CX2CX8CX7CX2CX4HX8H);半定量 RT-PCR 表明 *MzSTO* 基因受到盐和干旱胁迫抑制,受冷处理诱导,并响应 ABA(abscisic acid)。以上结果表明 *MzSTO* 基因可能通过依赖 ABA 的途径参与非生物逆境胁迫。

关键词 珠眉海棠; *MzSTO*; 非生物胁迫; RT-PCR

中图分类号 S 661.4

文章编号 1007-4333(2013)01-0088-06

文献标志码 A

Cloning and expression analysis of salt stress *MzSTO* gene from *Malus zumi* Mats

JIANG Yu-zhuang, LI Ling-zi, ZHAO yu, LI Qing-tian, LIANG Zhan-feng, KONG Jin*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The full-length cDNA sequence of *MzSTO* gene was isolated from a cDNA library of *Malus zumi*. The full-length cDNA of *MzSTO* was 1 066 bp. The 5'-UTR and the 3'-UTR were 49 and 288 bp respectively. Its open reading frame of 729 bp encoded a protein of 242 amino acids. There were two B-box zinc-finger domains (CX2CX8CX7CX2CX4HX8H) near N-terminal. *MzSTO* was induced by low temperature stress and repressed by high-salinity and drought treatment, which was, also responsive to ABA (abscisic acid) treatment by semi-quantitative RT-PCR. All the results showed that *MzSTO* was involved in response of abiotic stresses including salt, drought and cold stresses through a possible ABA-dependent pathway in *Malus zumi*.

Key words *Malus zumi* Mats; *MzSTO*; abiotic stresses; RT-PCR

在盐胁迫下,植物感知盐胁迫、进行信号转导并通过基因表达的调控来响应盐胁迫。植物感受盐胁迫进行信号转导是一个非常复杂的过程。在拟南芥的逆境信号转导中, Ca^{2+} 是重要的第二信使^[1],盐胁迫使细胞内 Ca^{2+} 水平迅速增加,同时 Ca^{2+} 依赖型蛋白激酶的表达式增加^[2-3]。在酵母细胞中,依赖 Ca^{2+} 的钙调神经磷酸酶(CaN)在盐胁迫响应中能调控胞内 Na^+ 的含量,酵母 *can* 突变体不能在含盐的培养基上生长^[4]。超表达 *CaN* 基因增加了转基因

烟草的抗盐性^[5],CaN 在植物中的同源蛋白 SOS3 在盐胁迫中也起到重要的作用^[6-7]。

1996年,Lippuner等^[8]利用钙调神经磷酸酶(*CaN*)基因为诱饵,从拟南芥 cDNA 文库中筛选分离了耐盐 *STO* 基因,该基因表达的蛋白 N 端有 2 个典型的 B-box 锌指结构。*STO* 可以使酵母 *can* 突变体恢复耐盐能力。拟南芥的 *STO* 基因不受盐胁迫的诱导,但是超表达 *STO* 基因的拟南芥耐盐性增强^[9]。*STO* 与 *CEO1/RCD1* 互作,而 *CEO1/*

收稿日期:2012-04-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171940);北京市自然科学基金资助项目(6112012)

第一作者:蒋玉妆,硕士研究生,E-mail:285995465@qq.com

通讯作者:孔瑾,副教授,主要从事果树逆境生理与分子生物学研究,E-mail:jinkong@cau.edu.cn

RCD1 通过与 SOS1 的互作参与盐胁迫响应^[10], 因此, *STO* 很可能在植物中通过 SOS 途径响应盐胁迫。植物的非生物逆境包括高盐、干旱和冷冻等多种胁迫, 植物在对多种逆境响应的机制上往往存在着交叉。植物对非生物逆境的响应主要是通过依赖和不依赖 ABA 的途径进行^[11]。

苹果是中国产量第一的果树, 有很高的经济附加值。在次级盐害日益严重的苹果主产区, 苹果的生产受到盐胁迫的影响。珠眉海棠是一种耐盐性很强的优良苹果砧木, 能在全盐含量为 0.6% 的土壤中生长期^[12], 是研究苹果属植物耐盐机理的理想试材。构建了盐胁迫下的珠眉海棠 cDNA 文库, 并进行 Microarray 研究。分离出 *MzSTO* 基因的全长 cDNA 序列^[13], 对其进行了序列分析, 并在非生物逆境(盐、干旱和冷)胁迫下对 *MzSTO* 基因的表达模式进行研究, 旨在为进一步研究 *MzSTO* 基因的功能提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

试验于 2010—2011 年在中国农业大学进行。珠眉海棠组培苗在生长培养基 (MS + 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L IBA) 上生长至茎木质化后转移至生根培养基 (1/2 MS + 1.0 mg/L IBA)。待根长长至 3~4 cm 后转移至 1/2 霍格兰氏营养液^[14] 中, 2 周后移到全营养液中。日光灯恒定光源, 光强 15 000 lx, 温度 20~23 °C, 光周期 12 h/d 条件下生长。培养至苗高 10 cm 左右, 长出 10~12 片真叶后进行处理。

以未经处理的全营养液水培苗作为对照, 在全营养液中加入 20% PEG, 150 mmol/L NaCl, 100 μmol/L ABA 进行处理, 对于冷处理, 将全营养液水培苗移至 4 °C 培养箱(光照 12 h/d) 中。在处理 0、1、2、4、8、12 和 24 h 后分别收集叶片及根部样品, 液氮速冻后存放于 -80 °C 冰箱保存备用。每个点取 3 颗苗, 重复 3 次。

1.2 珠眉海棠总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用改进的 CTAB 法^[15] 分别提取珠眉海棠根和叶的总 RNA, 经 RNase-free DNase I (Takara, 日本) 消化去除 DNA。取 0.5 μL RNA, 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性; 取 1 μL RNA 用

UnicPC-2102 型紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 的光密度值, 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值, 估计 RNA 的纯度, 并通过 OD₂₆₀ 的值计算每个样 RNA 含量。每个样品取 2 μg RNA, 按照 Promega M-MLV 反转录试剂盒说明书合成单链 cDNA, 稀释 5 倍用作半定量 RT-PCR 的模板。

1.3 *MzSTO* 基因的半定量 RT-PCR

采用 *MzSTO* 基因特异性引物(上游引物 5'-GGAGGATACGTTGGAGATGA-3', 下游引物 5'-CATGCCGATGGATCAAAT-3') 和内参 *MzACTIN* 引物(上游引物 5'-CAATGTGCCTGCCATGTATG-3', 下游引物 5'-CCAGCAGCTTCCATTCCAAT-3') 进行扩增, 产物分别是为 899 和 437 bp。PCR 体系为: 取 cDNA 0.5~1.0 μL, 2×PCR Mix (康为世纪, 北京) 5 μL, 上、下游引物(10 mmol/L) 各 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30~34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。*MzACTIN* 基因采用 30 个循环, *MzSTO* 基因采用 34 个循环。取 5 μL PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro analyzer 凝胶定量分析软件读取 RT-PCR 产物电泳条带的光密度值, 根据基因 RT-PCR 产物与同批 *MzACTIN* 的光密度比值, 计算各基因的转录值。

1.4 *MzSTO* 基因的序列分析

珠眉海棠盐胁迫 Microarray 中表达有较高变化的 cDNA 单克隆在华大基因进行测序^[8]; 所得 *MzSTO* 基因的 cDNA 序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 中进行序列比对; 利用 http://web.expasy.org/compute_pi/ 分析 *MzSTO* 基因的氨基酸理论分子量和等电点 (PI); 利用 <http://smart.embl-heidelberg.de> 进行基因编码蛋白质的结构功能域分析; 采用 ClustalW 和 Mega5 软件进行基因氨基酸序列同源比较及进化树分析。采用邻位相连法 (Neighbor-Joining 法) 构建无根进化树。

2 结果与分析

2.1 *MzSTO* 基因的序列分析

MzSTO 基因是利用 Microarray 方法从珠眉海棠盐胁迫 cDNA 文库中分离出的盐应答基因。*MzSTO* 基因 cDNA 全长 1 066 bp, 其中包含 729

bp的完整开放阅读框,5'-UTR和3'-UTR的长度分别是49和288 bp,在3'-UTR区中1 031~1 066

bp有典型的poly(A)加尾信号(图1)。其编码的蛋白MzSTO由242个氨基酸残基组成,相对分子

```

1  GGGGGAAACATTCAAGAGGAGATAGAGGAGGAGGAGGATACGTTGGAG 49.
50  ATGAAAATTCAGTGCATGTGTGTGAGAAGGCTCAGCGCAGGTTGATTGCTGGCCGATGAGCGCGCTGTCCGCAAAATGTGACGTG.
    M K I Q  C D V C E K A Q A T V I C C A D E A A L C A K C D V .
140 GAAGTACATGCAGCGAATAAGCTTGAAGCAAGCACCAGAGGCTTCTCCTCGAGTGTCTCTCAAAGTCAAACAACTCCCTAGATGTGAC.
    E V H A A N K L A S K H Q R L L L E C L S K S N K L P R C D .
230 ATATGCCAAGACAAGGCAGCTTTTATATTCTGCTGCAAGACAGAGCCCTCATTTGTCAGGATTGCGACGAATCGAATTCATTCAGCGAAT.
    I C Q D K A A F I F C V E D R A L I C Q D C D E S I H S A N .
320 AGCCGCGCTGCAAACCACCAGAGGTTCTTACTGCAATCCGAGTGCATTGAACCTCCGGTGTCTTAAAGACGCTGAACCGAATAGC.
    S R A A N H Q R F L A T G I R V A L N S G C S K D A E P N S .
410 TTGGAGCCACCCAGTGGTTACAGCTCACACACGATCGTTTCAACAAAAGTCCAACACCACAGGCTTCTGGTTTCTGCTCCCTTGGGT.
    L E P P S G Y S S H T I V S T K V P T P Q A S G F S S P W G .
500 GTTGATGACTTGTGCAATTATCCGATTTTGAATCTCCGACAAGAAAGAGTCTTTTGTGTTGGTGTGAGCTTGAATGGATAGCAGATATG.
    V D D L L Q L S D F E S S D K K E S F E F G E L E W I A D M .
590 GGTATTTTCGGCTGAGAGCAATTTCTCAGAAAGCGTTGCGCAGCTGAAGTTCTCAGCTTCCACGCTGCGAGGCAACCAATTTTACC.
    G I F G V E Q F P Q K A L A A A E V P Q L P P S Q A T N F T .
680 TCTTATAGACCTGCCAAATCGAACAGTCCATACAAGAAGCTCGAATCGAAATGCTGGAGGAGATGATGATTATTTACTGTCCCTGAT.
    S Y R P A K S N S P Y K K P R I E M L E D D D D Y F T V P D .
770 CTGGCTGA 778.
    L G * .
779 TTTTAAAAGCATATCAACTGGTTTCATGGTATTAGTTGACACGTTGAATTATATAATGCCCATACAAAGTAAATGCTTGTATGCATTTAT.
869 GTATGTGTACAAGAATTTATAATGOGTTTTTGGGATTACCATTTTATTGATCCATCGGCATGTAATTTCCGCTCTTTTGGCAACAGA.
959 CCGTACTCCATAGAAACATATGCTGTTATTTTGTGATGTCGATTGAAAATAAACTGTTGTGGTAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.
1049 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1066+

```

下划线为保守的B-box结构域。

B-box domain is underlined in black.

图1 MzSTO基因全长cDNA序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of MzSTO gene

量为26.52 kU,理论等电点为4.86。

在TAIR上进行BLASTx分析,发现该基因与拟南芥的STO和STH同源性较高。序列比对表明,MzSTO核苷酸编码区序列与拟南芥的STO和STH分别具有60.32%和61.54%的同源性,而编码的蛋白质序列分别有61.75%和57.14%的同源性。

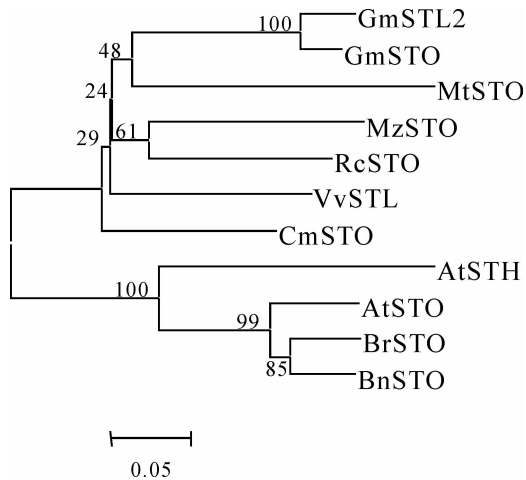
2.2 MzSTO基因的同源性比对与聚类分析

在NCBI上进行BLASTx分析表明,MzSTO基因编码的蛋白属于BBOX超级家族。MzSTO蛋白N端有2个B-box锌指结构的保守域,分别位于

该蛋白质的第4~42个、第58~96个氨基酸区域。MzSTO与其他很多物种中的STO、STL(Salt tolerance-like protein)和STH(Salt tolerance homologs)同源性较高。蛋白质结构比对分析发现,不同物种中的STO基因具有相同的特征,在N末端均具有2个保守的B-box结构域。其中5'端2个B-box区域的同源性达到88.35%,其典型结构为CX2CX8CX7CX2CX4HX8H,其中X代表任意氨基酸。

用MEGA5.0软件的Neighbor-Joining法构建了MzSTO与其他植物中的STO、STL(Salt

tolerance-like protein) 和 STH (Salt tolerance homologs) 的系统进化树(图 2)。该进化树显示 $MzSTO$ 和蓖麻的 STO 亲缘关系最近,氨基酸的比对结果表明, $MzSTO$ 和 $RcSTO$ 氨基酸序列同源性达 72.02%。



Gm 为大豆(*Glycine max*); Mt 为苜蓿(*Medicago truncatula*); Mz 为珠眉海棠(*Malus zumi* Mats); Rc 为蓖麻(*Ricinus communis*); Vv 为葡萄(*Vitis vinifera*); Cm 为甜瓜(*Cucumis melo* subsp. *melo*); At 为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); Br 为大白菜(*Brassica rapa*); Bn 为油菜(*Brassica napus*)。

图 2 $MzSTO$ 与其他物种中同源基因的系统谱系分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of $MzSTO$ and its homologs in other species

2.3 $MzSTO$ 基因在非生物胁迫下的表达分析

通过半定量 RT-PCR 分析了 $MzSTO$ 基因在盐、干旱和冷胁迫下的表达模式(图 3)。在盐胁迫下, $MzSTO$ 基因的表达在叶中下调,8 h 时表达量最低;而在根中表达几乎不变。在 PEG 模拟干旱条件下,根和叶中的表达模式与盐处理下的比较接近,在根中 $MzSTO$ 基因的表达量变化不大,而在叶中, $MzSTO$ 基因在处理下表达受到抑制,并在 12 h 是达到最低值。在冷胁迫下,根和叶中的 $MzSTO$ 基因的表达模式基本一致, $MzSTO$ 基因都受冷胁迫的诱导。在根中, $MzSTO$ 基因受到明显诱导,在 12 h 达到最高峰,表达量是处理前的 3 倍以上;而在叶中表达峰值出现在处理后 8 h,诱导水平略低于根。

2.4 $MzSTO$ 基因在 ABA 处理下的表达分析

同样,利用半定量 RT-PCR 的方法,分析了

$MzSTO$ 基因在 ABA 处理条件下不同处理时间的诱导表达模式(图 3)。发现 $MzSTO$ 基因在根中和叶中的表达模式有明显的差别。在根中,与对照相比, $MzSTO$ 基因受 ABA 的诱导。在处理 12 h 前 $MzSTO$ 基因的表达量上升幅度较小,从 12 到 24 h 表达量上升加快,到 24 h 达到峰值,比对照的表达量增长 2 倍多。在叶中, $MzSTO$ 基因在 ABA 处理下表达量一直下调,在 12 h 达到最低峰,约是处理前表达量的 1/9,后在 24 h 恢复到处理前水平。

3 讨论

本研究从耐盐苹果砧木珠眉海棠中克隆了 $MzSTO$ 基因,其编码的蛋白具有两个 B-box 锌指结构的保守域,B-box 锌指结构通常可以和 RING 锌指、NHL、coiled-coil 和 RFP 等蛋白结构域相结合,介导蛋白质之间互作^[16]。SOS 途径是拟南芥中重要的盐胁迫应答途径, STO 很可能作为蛋白复合体中的成员^[10],在植物中通过 SOS 途径响应盐胁迫。根是盐胁迫应答的主要器官,在拟南芥中 STO 基因不受盐胁迫诱导。在珠眉海棠中,本试验半定量 RT-PCR 的结果表明 $MzSTO$ 在根中不受诱导,与拟南芥的结果一致。但 $MzSTO$ 在盐胁迫的叶中受到短暂的抑制,持续抑制的时间只有 8 h 左右。这说明木本和草本植物的抗盐机理可能存在一些差别。相对于感盐砧木,在盐胁迫下,珠眉海棠有很强的将茎叶中 Na^+ 向根部运输的能力,因此推测叶中表达的短暂抑制可能与多年生木本植物的应激相关,但是响应机理仍有待发掘。在 PEG 模拟干旱条件下 $MzSTO$ 基因的表达模式和盐胁迫相似,盐和干旱胁迫都是渗透胁迫, $MzSTO$ 基因可能以相似的机制响应盐胁迫和干旱胁迫。在冷胁迫下, $MzSTO$ 基因的表达模式与在盐和旱处理下的不同,在根中其受到冷处理诱导表达,而在叶中基因表达稳定,表明 $MzSTO$ 基因响应冷胁迫的机制可能与渗透胁迫有所区别。

植物响应非生物胁迫的途径主要有依赖 ABA 和不依赖 ABA 2 种^[11],半定量 RT-PCR 的结果表明 $MzSTO$ 基因有可能通过依赖 ABA 的途径响应非生物胁迫。珠眉海棠 $MzSTO$ 基因的克隆和表达研究为基因功能研究打下了基础,并通过分子育种培育抗盐新品种提供支撑。

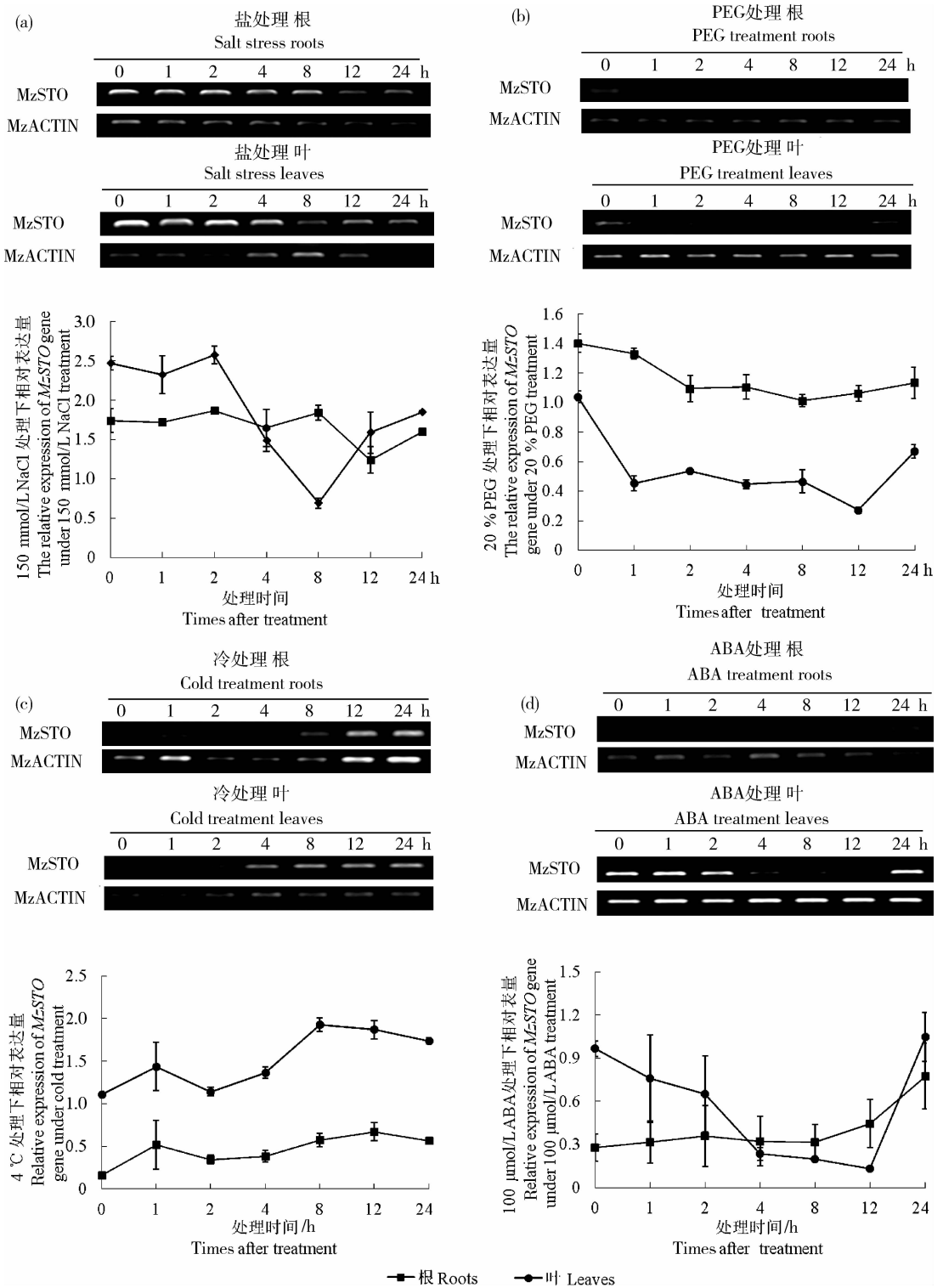


图3 MzSTO基因在非生物胁迫和ABA处理下的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of the MzSTO gene under abiotic stresses and ABA treatment

参 考 文 献

[1] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. Plant

Physiology, 1997, 115: 327-334
 [2] Poovaiah B W, Reddy ASN. Calcium and signal transduction in plants [J]. Critical Reviews in Plant Science, 1993, 12: 185-211
 [3] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with

- Calcium[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11: 289-298
- [4] Nakamura T, Liu Y, Hirata D, et al. Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt-stress conditions[J]. *EMBO Journal*, 1993, 12: 4063-4071
- [5] Pardo J M, Reddy M P, Yang S, et al. Stress signaling through Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95: 9681-9686
- [6] Liu J, Zhu J K. An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 14960-14964
- [7] Liu J, Zhu JK. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance[J]. *Science*, 1998, 280: 1943-1945
- [8] 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: 12859-12866
- [9] Nagaoka S, Takano T. Salt tolerance-related protein *STO* binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis[J]. *Exp Bot*, 2003, 391: 2231-2237
- [10] Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, et al. Salt tolerance (*STO*), a stress-related protein, has a major role in light signaling[J]. *The Plant Journal*, 2007, 51: 563-574
- [11] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature; differences and cross-talk between two stress signalling pathways[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000(3): 217-223
- [12] 顾迺良, 赵惠祥, 马继龙, 等. 珠美海棠对盐碱地适应范围及应用[J]. *天津农学院学报*, 1996, 3(3): 48-52
- [13] 刘佳, 李擎天, 孔瑾, 等. 苹果砧木珠美海棠盐胁迫应答基因的微阵列研究[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(5): 61-67
- [14] Hoagland D R, Arnon D I. The water-culture method for growing plants without soil [C]. *California Agricultural Experiment Station*, 1950, 347: 2-32
- [15] 张玉刚, 成建红, 韩振海, 等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J]. *生物技术通报*, 2005(4): 50-53
- [16] Torok M and Etkin L D. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins[J]. *Differentiation*, 2001, 67(3): 63-71

责任编辑: 王燕华