

茄子抗逆相关基因 *SmDREB3* 的克隆和表达分析

刘新宇, 葛海燕, 刘 杨, 韩洪强, 陈火英

(上海交通大学农业与生物学院, 上海, 200240)

摘 要: *DREB* (dehydration responsive element binding protein) 基因在植物非生物胁迫的应激反应中具有非常重要的作用, 本研究运用同源克隆的方法从‘YZ-14’紫茄品种中分离克隆得到了一个 *DREB* 基因, 因其与番茄和马铃薯中 *DREB3* 基因的相似度很高, 所以命名为 *SmDREB3*。 *SmDREB3* 基因的 cDNA 全长为 887 bp, 开放阅读框(ORF)长度为 777 bp, 可以编码一个含有 259 个氨基酸的蛋白, 与同科作物马铃薯中 *DREB* 基因序列的相似性高达 90%, 与番茄中 *DREB* 基因序列的相似性也能达到 88%。成熟蛋白等电点为 6.39, 分子量为 28.665 kDa。RT-qPCR 实验结果表明, *SmDREB* 基因在紫茄的各个组织中都会表达, 但表达水平具有组织特异性, 其在果皮中的表达量最高, 其次为叶和果肉, 而在根、花和茎中的表达量相对较低。本研究为深入研究茄子的抗逆机制以及培育抗逆茄子新品种方面提供了理论基础。

关键词: 茄子; *DREB3* 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S 565.1

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of *smDREB3* Related to Stress Tolerance in Eggplant (*Solanum melongena* L.)

LIU Xin-yu, GE Hai-yan, LIU Yang, HAN Hong-qiang, CHEN Huo-ying

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *DREB* has an important role in stress signal transduction pathways in plants. A cDNA fragment, named *SmDREB3*, was isolated from ‘YZ-14’ eggplant species using homology-based cloning method. The full length of cDNA of *SmDREB* is 887 bp, and the ORF is 777 bp, encoding 259 amino acids. It had 90% homologies with the sequence of potato and 88% homologies with the sequence of tomato. The mature protein isoelectric point was at pH 6.39 and molecular weight was 28.665 kDa. RT-qPCR analysis indicated that *SmDREB3* was expressed in all organs. However, the expression level of *SmDREB3* was tissue-specific. It expressed highest in the pericarp, followed by the leaf and sarcocarp, while it expressed relatively low in roots, stems and flowers. This study provides the theoretical basis for further researches on resilience mechanisms and cultivating new varieties that resist adverse environment.

Key words: eggplants; *DREB3* gene; cloning; expression analysis

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471870); 国家青年科学基金项目(31301770); 上海市科技兴农项目[沪农科攻字(2013)第5号]

作者简介: 刘新宇(1989-), 硕士生; 研究方向: 蔬菜种质资源;

陈火英(1962-)为本文通讯作者, 女, 博士, 教授, 研究方向: 蔬菜种质资源. E-mail: chhy@sjtu.edu.cn

植物的抗逆反应是一个由多个基因参与控制且存在多个信号转导途径的复杂网络,参与调控此过程的基因大多为转录因子。DREB 类转录因子属于 AP2/EREBP (APETALA2/ethylene-responsive element binding proteins)转录因子家族,这类转录因子不仅在植物对逆境的胁迫应答反应中起到重要的调节作用,而且在调控植物的生长发育过程中也发挥重要的作用^[1]。DREB 蛋白能特异地与 DRE (dehydration responsive element)顺式作用元件结合,从而调控其下游的多个与逆境相关的基因的表达^[2]。因此可以通过调控 *DREB* 基因的表达来提高植物抵抗各种不利环境的能力,进而获得高品质的作物品种。

目前,*DREB* 基因已经从拟南芥^[3]、玉米^[4]、烟草^[1]、水稻^[5]、棉花^[6]、大豆^[7]、番茄^[8]和马铃薯^[9]等植物中分离克隆出来,但是在茄子中还没有研究报道。茄子是我国栽培最广、历史最悠久的果蔬之一,在我国各个省份均有种植、生产和销售,是城乡居民消费最多的蔬菜品种之一。茄子在生长过程中会受到缺水、高盐和低温等逆境胁迫的影响,这些因素会影响茄子的正常生长,甚至会导致其死亡,从而严重影响茄子的品质和产量。因此,对茄子 *DREB* 转录因子的研究,对提高茄子的抗逆能力,利用基因工程的手段培育新品种具有重要意义。

本研究从茄子中分离克隆了与茄子抗逆相关的 *DREB* 基因,命名为 *SmDREB3*。利用在线工具分析了该基因的核酸以及氨基酸序列,预测了该基因编码的蛋白质的二级结构。同时,利用 Clustalx 8.31和 MEGA5.0 软件,采用邻接法构建不同物种间 *DREB* 基因的系统进化树,从而判断不同物种间 *DREB* 基因进化距离的远近。此外,取茄子的不同组织,如幼根、茎、叶片、花瓣、果皮和果肉进行实时荧光定量分析,从而了解 *DREB* 基因的组织表达模式,为进一步研究 *DREB* 基因的结构和功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验的茄子品种为‘YZ-14’,其表型为无刺,紫色茎,紫色花,紫色果实。先将材料播种于营养钵中,置于光照培养箱中育苗,待其长到四叶一心时,移栽到大棚中种植。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

采用 Trizol 的方法提取不同组织的 RNA,材料为紫茄的幼根、茎、叶片、花瓣(呈 90°)、茄子果皮和果肉。提取后的 RNA 分别用 1.2%琼脂糖电泳和超微量分光光度计检测 RNA 的浓度与质量,之后贮存于一 80 °C 以备后用。cDNA 第 1 链合成反应采用 Takara 公司反转录试剂盒完成。

1.2.2 *SmDREB3* 基因 cDNA 全长的克隆

根据拟南芥中与成花相关 *DREB* 基因的序列信息,在 NCBI 中进行 BLAST 比对后,选取同属于茄科的作物,如马铃薯、番茄和烟草的基因序列,并获得其相应的编码区序列,在其 3’端与 5’端保守区域设计可以扩增出 cDNA 全长的特异引物 *SmDREB-F* 和 *SmDREB-R*(表 1),以反转录后得到的 cDNA 第 1 链作为模板,采用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)的 PrimeSTAR® Max DNA 高保真酶进行扩增。

对 PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,得到预期大小的片段后,利用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。随后对 PCR 产物加 A 尾,此过程采用宝生物公司的 DNA A-tailing Kit 试剂盒,再经 TA 克隆连接到 pMD®19-T Vector 载体上,之后用热击法把重组质粒转化到 DH-5α 大肠杆菌感受态中,产物涂布于含有氨苄抗生素的平板上,12 h 后挑取单克隆摇菌,经将菌液 PCR 以及 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后,与预期片段大小相同的阳性克隆菌液样品送至生工公司进行多次测序。

表 1 本实验所用引物名称及序列

Tab. 1 Primers and sequences used in this experiment

引物名称 Prime name	引物序列(5’-3’) Prime sequence(5’-3’)
<i>SmDREB3-F</i>	ATGAATTCCCAAATCTTTTCA
<i>SmDREB3-R</i>	TTATAGAGAGGCCCAATCAAT
<i>SmAction-F</i>	TTCCTTGATGCTAGTGGTCGTACAA
<i>SmAction-R</i>	CTCAGCACCAATGGTAATAACTTGTCC
<i>SmDREB3-RT-F</i>	GAGCAAGGTGACAGAAGTTGG
<i>SmDREB3-RT-R</i>	TCCGCCATGTCCCAAGTAGA

1.2.3 *SmDREB3* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

利用在线软件对测序得到的 *SmDREB3* 基因的序列进行分析及其蛋白质结构的预测。用 ProtParam 分析蛋白的分子量和等电点;利用在线分析工具 SOMPA 分析 *SmDREB3* 蛋白的二级结构;用在线软件 ProtComp 9.0 对亚细胞定位进行预测。利用 ClustalW2 进行不同物种间基因序列的

比对,并且利用 MEGA5 软件、采用 Neighbour-joining(邻接法)构建不同物种之间 *DREB3* 基因的进化树。

1.2.4 *SmDREB3* 基因表达模式分析

分别选取茄子的不同组织的 RNA,分别检测 RNA 浓度,每个样品取 500 ng 反转录成 cDNA,稀释至使引物工作的最佳倍数。以茄子 *SmAction-F/SmAction-R* 作为内参引物^[10],同时设计特异引物 *SmDREB3-RT-F/SmDREB3-RT-R*。荧光定量 PCR 反应过程采用宝生物公司的 SYBR® Premix Ex Tat (Tile RnaseH Plus)试剂盒,整个加样过程在低温的避免日光或灯光直射的黑暗环境下进行,本实验进行 3 次生物重复,即每个组织都取 3 个样品,分别提取 RNA,得到的相同组织的 3 个 RNA 样品,再用 qPCR 测 3 个 RNA 样品的 Ct 值。

2 结果与分析

2.1 *SmDREB3* 基因的克隆

以茄子 cDNA 为模板,利用设计的特异引物 *SmDREB3-F/SmDREB3-R* 进行聚合酶链式反应,得到了与预期片段大小相同的条带(图 1)。将 PCR 产物进行胶回收、连接到 pMD19-T 载体上、转化到大肠杆菌感受态中、送生物公司测序,最终得到 *SmDREB3* 的完整 cDNA 序列。利用 NCBI 网站的 blastn 将得到的 cDNA 序列进行比对,结果表明, *SmDREB3* 与同属于茄子的作物马铃薯和番茄 *DREB* 基因序列同源性都很高,分别为高达 90% 和 88%。

2.2 *SmDREB3* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 的 ORF Finder 在线工具,在测序所得 *SmDREB3* 基因的 cDNA 序列中找到开放阅读框,其长度为 777 bp,可以编码氨基酸 259 个(图 2),该蛋白的分子量(Mw)为 28.665 kDa,成熟蛋白的等电点为 6.39。 *SmDREB3* 蛋白不具有跨膜结构,不含有信号肽序列,从而表明 *SmDREB3* 蛋白不是分泌蛋白^[11](表 2)。不同物种间 *DREB3* 基因的进化树图谱显示,茄子中的 *SmDREB3* 基因与马铃薯、番茄的 *DREB3* 基因进化距离最近,处于同一分支,而与不同科的葡萄、小麦以及三角叶杨等进化距离较远(图 3)。

利用 SOPMA 在线软件预测 *SmDREB3* 蛋白的二级结构,结果显示,该蛋白的二级结构中含有 α 螺旋、 β 转角、不规则卷曲和延伸链结构。其中,不

规则卷曲所占比例最大,为 45.74%;其次是 α 螺旋和延伸链结构,分别为 32.95% 和 13.57%; β 转角最少,仅为 7.75%(图 4)。利用 NCBI 在线分析预测 *SmDREB3* 蛋白的结构域显示,在其靠近 N 端有一个 DNA 结合位点,同时在 83—141 位是一个由 59 个氨基酸残基组成的典型的 AP2 结构域(图 5)。通过 ProtComp Version 9.0 软件预测蛋白的亚细胞定位, *SmDREB3* 蛋白定位在细胞核中(表 3)。

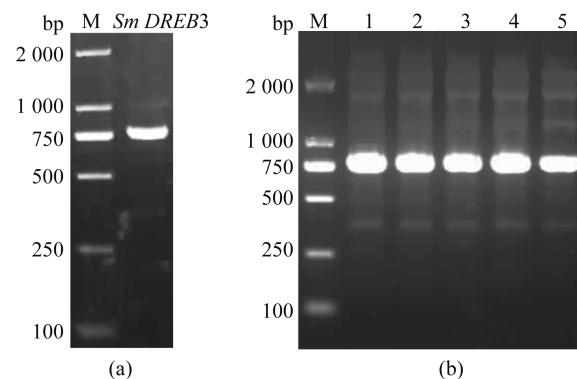


图 1 *SmDERB3* 基因的克隆(a)及 PCR 鉴定大肠杆菌 DH5 α 转化子(b)

SmDERB3; *SmDERB3* 基因 cDNA 全长; 1~4: *SmDERB3* 基因全长 DH5 α 转化子的 PCR 产物; M: DL 2 000 Marker

Fig. 1 Cloning of *SmDERB3*(a) and PCR analysis of transformed DH5 α (b)

SmDERB3; Full length of *SmDERB3* cDNA; 1-4: PCR products of transformed DH5 α of *SmDERB3*cDNA; M: DL 2 000 Marker

2.3 *SmDREB3* 基因在不同部位的表达分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的荧光定量法,对 *SmDREB3* 基因在茄子各个组织中的表达进行分析,结果表明 *SmDREB3* 在根、茎、叶、花、果皮、果肉中均有表达,但在不同组织中的表达水平有显著的差异。 *SmDREB3* 基因在果皮中的表达水平最高,明显高于在其他组织中表达量;在叶和果肉中的表达量也很高,叶中的表达量显著高于果肉;在根、茎和花中的表达量无显著差异,都比较低(图 6)。

3 讨论与结论

本实验采用了同源克隆的方法,通过设计可扩增基因全长的引物,首次从茄子中得到了 *DREB* 基因序列。对其序列进行了初步的分析, *SmDREB3* 基因的 cDNA 全长为 887 bp,开放阅读框为 777 bp,编码 259 个氨基酸。NCBI 序列比对结果显示, *SmDREB3* 与茄科其他作物的 *DREB* 有较高的相似性,与马铃薯、番茄的同源性分别为

3 gtaaacgacggccagtgaattagaactcggtagcgcgggatcttcagagattATGAATTCCCAAACTTTTCAACTGGGTTTCCGGG
M N S Q I F S T G F S G
93 TATGGAATGAGCAACCGGGTTCAATCGGGTTGAATCACTTGACCCCAATCCAGATCCAGCAAATTCAGGCTCAAATCAACTTCCAAAAC
Y G M E Q P G S I G L N H L T P I Q I Q Q I Q A Q I N F Q N
183 CAACAACAACAGCAGCAGATGATGTTACAGAAATGCTACCATGCTTCCTCCATGAACCTTCTTGCTCCAAAGCCGGTTCCGATGAAGCAA
Q Q Q Q Q M M L Q N A H H A S S M N F L A P K P V P M K Q
273 TCTGGGTCGCCACCAAAACCCACTAAGCTCTACAGAGGTGTTAGACAACGCCACTGGGGAAAATGGGTAGCTGAGATCCGATTGCCCAAG
S G S P P K P T K L Y R G V R Q R H W G K W V A E I R L P K
363 AACCGAGCCCGCTTTGGCTTGTACCTTTGACACTGCCGAGAAGCTGCTTTGGCTTATGACAAGCGCGGTATATGCTTCGAGGTGAC
N R T R L W L G T F D T A E E A A L A Y D K A A Y M L R G D
453 TTTGCTAGGCTGAACCTTTCCCAACTCCACCACAACGGCGGCGACTTTGGGGAGTACAATCCATTGCACTTCCCTCCCTTGTATGCTAAGTTA
F A R L N F P Q L H H N G G D F G E Y N P L H S S V D A K L
543 AAAGACATATGCCAGAGCTTGGCACAGGGGAAGAGCATTGACTCCAAGAAGAAGACCAAAGGTCGTCGGCTTCAGCATCGCGCGTG
K D I C Q S L A Q G K S I D S K K K K T K G S S A S A S A V
633 GTGAAGATGGAGGAGGAGAGCAAGGTGACAGAAGTTGATCCGAGAGTGACGGGTCGGGTTCCGGGTCGGGTGATCATCGCCGGTA
V K M E E E E S K V T E V G S E S D G S G S G S G S S P V
723 ACTGAATGACATTTCCAGAGTTCACTGAGGAAGAGTCTACTTGGGACATGCGCGAAAATTCTTGTACAGAAATATCATCTTATGAG
T E L T F P E F T E E E S T W D M A E N F L L Q K Y P S Y E
813 ATTGATTGGCCTCTCTATAAaatcgtcgaacggcaggcgtgcaaaacttggcgtaatcatggtcatagctgtttcct
I D W A S L *

图 2 *SmDREB3* 基因全长 cDNA 顺序及相应的氨基酸顺序

ATG:起始密码子;TAA:终止密码子

Fig. 2 The full length cDNA sequence and amino acid sequence of *SmDREB3*

ATG:indicates the initial codon;TAA indicates the termination codn

表 2 TMHMM 软件跨膜分析结果

Tab. 2 Outcome of transmembrane analyzing by TMHMM software

参数 Parameter	TMHs 数量 Number of TMHs	TMHs 中 AAs 数目 Number of AAs in TMHs	60AAs 期望值 Exp number first 60 AAs	细胞质侧 预测值 N-in
数值	0	0.00157	0.00134	0.01928

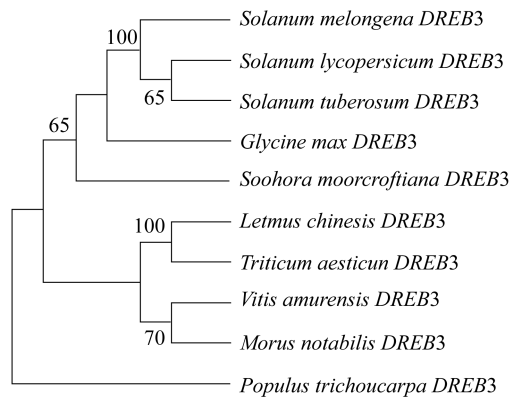


图 3 不同物种的 *SmDREB3* 基因进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees of *SmDREB3* nucleotides sequence from various species

Solanum melongena: 茄子; *Solanum lycopersicum*: 番茄; *Solanum tuberosum*: 马铃薯; *Glycine max*: 大豆; *Sophora moorcroftiana*: 砂生槐; *Leymus chinensis*: 羊草; *Triticum aestivum*: 小麦; *Vitis amurensis*: 葡萄; *Morus notabilis*: 川桑; *Populus trichocarpa*: 三角叶杨

90%和 88%。生物信息学的结果表明,*SmDREB3* 蛋白二级结构以不规则卷曲和 α 螺旋为主,同时含有少量的延伸链和 β 螺旋结构。亚细胞定位预测将 *DREB* 蛋白定位于细胞核内,这与转录因子的作用特征相符合。

DREB 类转录因子在 3'端和 5'端的保守性较低,而在中间有一个非常保守的 AP2 结构域,其大约由 59 个氨基酸残基组成^[11,12]。对 *SmDREB3* 蛋白结构域的分析表明,在其 83-141 位的确有一个由 59 个氨基酸残基组成的典型的 AP2 结构域,而且在靠近 N 端有一个 DNA 结合位点可以与 DNA 特异结合,这证明了该基因确实属于 *DREB* 类转录因子家族。

RT-qPCR 实验结果表明,*SmDREB3* 基因在茄子的各个组织中都有表达,但是在不同组织中的表达量差异很大。在果皮中的表达量最高,其次是叶和果肉,而在根、茎和花瓣中的表达量很低,具有基因的组织表达特异性。这只是该基因在未处理茄子材料中的表达量情况,而对其在低温、干旱以及盐胁迫下的表达量的变化情况还有待进一步研究。本实验对茄子 *SmDREB3* 基因全长的克隆,为今后对其进行功能验证及结合分子育种技术获得抗旱、耐盐碱、耐低温的优良茄子品种提供了理论基础。

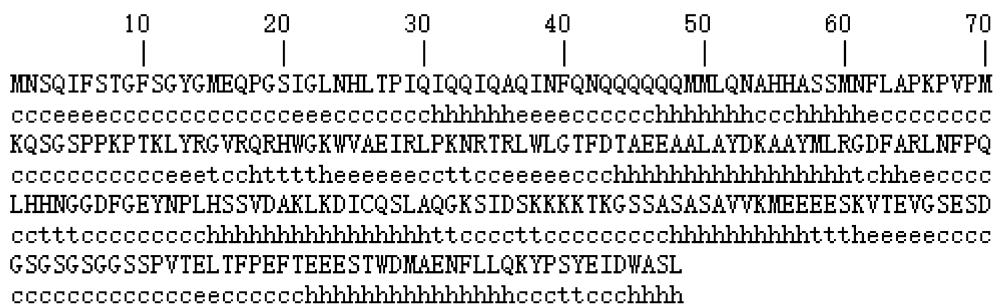


图 4 SmDREB3 蛋白的二级结构

注:h, α 螺旋;t, β 转角;c,无规则卷曲;e,延伸带

Fig. 4 The secondary structure of SmDREB3

Note:h,Alpha helix;t,Beta turn;c,Random coil;e,Extended strand

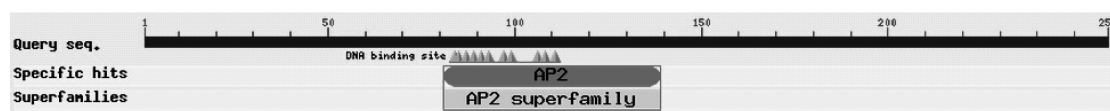


图 5 SmDREB3 蛋白的结构域

Fig. 5 The structure domain of SmDREB3

表 3 SmDREB3 蛋白亚细胞定位结果

Tab. 3 Sub-cellular location of SmDREB3 protein

Location weights 定位权重	LocDB	PotLocDB	Neural Nets	Pentamers	Integral
细胞核 Nuclear	0.0	5.0	0.00	0.80	7.93
质膜 Plasma embrane	0.0	0.0	0.96	0.00	1.44
胞外 Extracellular	0.0	0.0	0.96	0.75	0.02
胞质 Cytoplasmic	0.0	0.0	0.00	2.54	0.02
线粒体 Mitochondrial	0.0	0.0	0.00	0.88	0.00
内质网 Endoplasm. retic.	0.0	0.0	0.00	0.40	0.00
过氧化物酶体 Peroxisomal	0.0	0.0	0.96	0.00	0.17
高尔基体 Golgi	0.0	0.0	0.11	0.21	0.00
叶绿体 Chloroplast	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00
液泡 Vacuolar	0.0	0.0	0.00	0.01	0.42

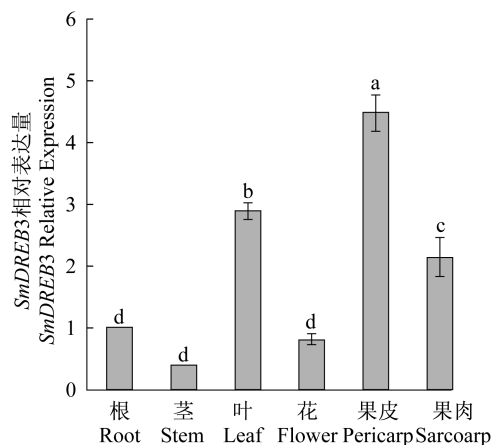


图 6 *SmDREB3* 在茄子植株不同组织的相对表达量

注:不同字母表示差异的显著性(a,b,c)($P \leq 0.05$)

Fig. 6 The relative expression of *SmDREB3* in different tissues of *S. melongena* L

Note: Different letters show significant difference (a, b, c) ($P \leq 0.05$)

参考文献:

- [1] 耿芳,郭伟华,郭玉双,等.烟草 *DREB* 转录因子新基因的克隆与功能分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2011,37(1):22-22.
- [2] 翟俊峰,王法微,王南,等.银中杨 *DREB* 基因的克隆及表达[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012(6):79-85.
- [3] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-contain-

- ning 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]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [4] 王源, 黄丛林, 张秀海, 等. 转录因子基因 *ZmDREB3* 转化玉米的研究[J]. **作物杂志**, 2012(3): 58-61.
- [5] Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, *et al.* Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. **Molecular Genetics and Genomics**, 2010, 283(2): 185-196.
- [6] 李付振, 邱新棉, 刘传亮. 棉花中一个新的类 DREB 转录因子 (*GhDREB2B*) 的克隆, 序列特征及表达分析 [J]. **浙江农业学报**, 2010, 22(5): 564-569.
- [7] Chen M, Xu Z, Xia L, *et al.* Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.) [J]. **Journal of experimental botany**, 2009, 60(1): 121-135.
- [8] Islam M S, Wang M H. Expression of dehydration responsive element-binding protein-3 (DREB3) under different abiotic stresses in tomato [J]. **BMB Reports**, 2009, 42(9): 611-616.
- [9] Behnam B, Kikuchi A, Celebi-Toprak F, *et al.* Arabidopsis rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato [J]. **Plant Cell Reports**, 2007, 26(8): 1275-1282.
- [10] 邵文婷, 刘杨, 韩洪强, 等. 茄子花青素合成相关基因 *SmMYB* 的克隆与表达分析 [J]. **园艺学报**, 2013, 40(3): 467-478.
- [11] 毛彦芝. DREB 转录因子与植物非生物胁迫抗性研究进展 [J]. **生物技术通报**, 2010(10): 26-30.
- [12] 张艳妮, 陈全家, 张桦, 等. 海岛棉 *DREB* 基因的克隆及植物表达载体的构建 [J]. **新疆农业大学学报**, 2010, 33(4): 312-316.



(上接第 51 页)

- [16] 周函羽. 上海城市综合性公园安静休息场地调查研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [17] 汤晓敏, 王云. 景观艺术学—景观要素与艺术原理 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2009: 245-247.
- [18] 毛华松, 詹燕. 关注城市公共场所中的儿童活动空间 [J]. **中国园林**, 2005(9): 14-17.
- [19] 胡洁, 吴宜夏, 安迪亚斯·路卡等. 北京奥林匹克森林公园儿童乐园规划设计 [J]. **风景园林**, 2006(3): 58-63.