

# 茎瘤芥 AP2/EREBP 转录因子基因 *BjABR1* 的克隆和表达分析

向浏欣<sup>1,2</sup>, 夏玉先<sup>1</sup>, 蔡应繁<sup>3,\*</sup>, 付于银<sup>2</sup>, 王小艳<sup>2</sup>, 刘吉军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>重庆大学基因工程研究中心, 重庆 400030; <sup>2</sup>重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 400065; <sup>3</sup>河南大学生命科学学院, 棉花生物学国家重点实验室, 河南开封 475001)

**摘要:** 以茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) ‘永安’为材料, 通过 RACE 和 RT-PCR 技术得到 1 个 AP2/EREBP 转录因子基因的 cDNA 全长序列和基因组 DNA (gDNA) 序列, 该基因与拟南芥 *AtABR1* 基因的氨基酸序列相似性高达 72%, 因此命名为 *BjABR1* (GenBank 登录号: JQ713825.1)。*BjABR1* 基因 gDNA 序列含 1 个内含子; cDNA 序列全长 1 514 bp, 含有 1 个 1 146 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 381 个氨基酸; 其推定编码的蛋白分子量为 41.674 kD, 等电点为 9.11, 具有 14 个磷酸化位点, 含 1 个典型的 AP2 DNA 结合域和 1 个 CMX-1 基序。洋葱表皮细胞的瞬时表达显示, *BjABR1* 蛋白定位于细胞核。荧光定量 PCR 分析结果表明, 该基因在茎瘤芥不同发育时期的根、茎、叶中均有表达, 但在根中表达量极高; 在对茎瘤芥组培幼苗进行高盐、渗透压和低温 3 种非生物胁迫处理后发现, 3 种胁迫均能诱导该基因表达, 但其对高盐的响应更为迅速。

**关键词:** *BjABR1*; 茎瘤芥; 基因克隆; 表达分析; 转录因子

**中图分类号:** S 637.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 01-0089-10

## Cloning and Expression Analysis of an AP2/EREBP Transcription Factor Gene *BjABR1* in *Brassica juncea* var. *tumida*

XIANG Liu-xin<sup>1,2</sup>, XIA Yu-xian<sup>1</sup>, CAI Ying-fan<sup>3,\*</sup>, FU Yu-yin<sup>2</sup>, WANG Xiao-yan<sup>2</sup>, and LIU Ji-jun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Genetic Engineering Research Center, Chongqing University, Chongqing 400030, China; <sup>2</sup>College of Bioinformation, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China; <sup>3</sup>State Key Laboratory of Cotton Biology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China)

**Abstract:** The full length cDNA sequence and genomic DNA (gDNA) sequence of an AP2/EREBP transcription factor family gene were cloned from *Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee ‘Yong’an’ by RACE (rapid amplification of cDNA ends) and RT-PCR. Amino acid sequence alignment showed the gene shared 72% similarity with a known *Arabidopsis thaliana* AP2/EREBP family gene, *AtABR1*, named after *BjABR1* (GenBank accession No. JQ713825.1). *BjABR1* gene contained one intron and putatively encoded 381 amino acids with the protein molecular mass of 41.674 kD, the pI of 9.11, 14 phosphorylation sites and an AP2 DNA-bind domain and a CMX-1 motif. Subcellular localization assays showed that the

**收稿日期:** 2013-08-26; **修回日期:** 2013-11-18

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31071461); 重庆市科技攻关项目 (CSTC, 2011AB1095); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2011AB1095); 重庆市教委科学技术研究项目 (CSTC, KJ130510, KJ110506, KJ130509, KJ130502)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: YingFanCai@gmail.com)

BjABR1 protein appeared in the nucleus. Quantitative real-time PCR analysis revealed that *BjABR1* gene was expressed in root, stem and leaf, and highest in the root. The expression of *BjABR1* was inducible under salt stress, osmotic stress and cold stress, and its transcriptional responses subject to salinity was most sensitive.

**Key words:** *BjABR1*; *Brassica juncea*; gene cloning; expression analysis; transcription factor

APETALA2/ethylene responsive element-binding protein (AP2/EREBP) 蛋白是植物中一类多基因家族转录因子, 数量庞大, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中有 147 个 AP2/EREBP 基因 (Feng et al., 2005), 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 200 个 (Zhuang et al., 2008), 水稻 (*Oryza sativa*) 163 个 (Sharoni et al., 2010), 黄瓜 (*Cucumis sativus*) 131 个 (Hu & Liu, 2011)。此类转录因子的主要特征是含有 1 个或 2 个由 60 ~ 70 个高度保守的氨基酸残基组成的 AP2 DNA 结合域。根据 AP2 DNA 结合域的数量, AP2/EREBP 家族可划分为 AP2、EREBP 和 RAV, 3 个亚家族。其中 AP2 亚家族含 2 个 AP2 DNA 结合域, EREBP 亚家族含 1 个, 而 RAV 亚家族除具有 1 个 AP2 DNA 结合域外还具有一个 B3 DNA 结合域 (Sakuma et al., 2002)。EREBP 亚家族基因数量最多, 占据比重大, 如拟南芥中有 122 个 (Feng et al., 2005), 黄瓜有 103 个 (Hu & Liu, 2011), 由此根据 AP2 DNA 结合域的序列相似性进一步将其划分为 CBP/DREB 和 ERF 两个亚族 (Sakuma et al., 2002), 且 CBP/DREB 亚族蛋白可以识别顺式作用元件 DRE/CRT 基序 A/GCCGAC (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994; Kizis et al., 2001; Agarwal et al., 2006), ERF 亚族蛋白可以识别顺式作用元件 GCC 基序 AGCCGCC (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995; Hao et al., 1998; Zhu et al., 2010)。

前期研究表明 AP2 亚家族蛋白主要参与植物生长发育过程, 如调控花、分生组织、胚珠和种子发育 (Jofuku et al., 1994; Imin et al., 2007; El Ouakfaoui et al., 2010; Kitomi et al., 2011); EREBP 和 RAV 亚家族则主要在植物激素反应、生物或非生物胁迫应答 (如冷、热、高盐、干旱) 等方面起作用, 还调控很多基因的表达, 如非生物胁迫反应基因、乙烯反应基因等 (Nakashima et al., 2000; Sohn et al., 2006; Bihani et al., 2011; Carvallo et al., 2011; Li et al., 2011; Mizoi et al., 2011; Zhuang et al., 2011)。

茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee), 为榨菜的主要原料, 是中国重庆、四川、浙江等地区主要的经济作物之一。AP2/EREBP 蛋白基因在多种植物, 如拟南芥 (Nakashima et al., 2000)、高粱 (Bihani et al., 2011)、番茄 (Li et al., 2011), 水稻 (Kitomi et al., 2011) 中已有克隆和功能研究, 但在茎瘤芥中还未见报道。作者前期对茎瘤芥瘤茎膨大前后的茎进行了转录组测序, 获得了一条被注释为 AP2/EREBP 家族成员的 399 bp 基因片段 (Unigene140028\_num2\_yongan) (Sun et al., 2012), 于是本研究中利用 RACE 和 PCR 技术克隆了此基因的 cDNA 全长序列和基因组 DNA (gDNA) 序列, 并对其进行了洋葱表皮细胞定位、时空表达模式分析和在外界胁迫条件下的反应研究, 为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

茎瘤芥品种‘永安’的种子购于重庆涪陵农业科学研究所。2012 年 10 月初播种于重庆邮电大学校内试验基地, 采集播种后 14 周末膨大和播种后 16 周刚膨大 (即膨大初期) 的茎瘤芥的根、茎、叶, 用无菌水清洗后立即于液氮中速冻, -70 °C 冰箱保存, 每种样品 3 个生物学重复, 用于 *BjABR1*

基因时空表达模式分析。*BjABR1* 基因 cDNA 和 gDNA 克隆的材料为 2011 年播种的茎瘤芥膨大茎。

茎瘤芥种子经消毒后播种于 MS 培养基中室内培养(温度 27 ℃, 光周期昼 14 h/夜 10 h); 1 周后无菌条件下取子叶接种于 MS + 3 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.15 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基上继续培养; 35 d 后无菌条件下取幼苗于 MS + 0.15 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基上诱导生根; 30 d 后对组培苗进行胁迫处理。低温胁迫为将幼苗置于 4 ℃; 高盐胁迫为对幼苗全株喷洒 300 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 溶液; 渗透压胁迫为对幼苗全株喷洒 250 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇(Mannitol)溶液。分别于处理后 0、2、4、6 和 12 h 取幼苗叶片立即于液氮中速冻, -70 ℃冰箱保存, 每种样品 3 个生物学重复, 用于分析胁迫条件下 *BjABR1* 基因的表达。

宿主菌大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、表达载体 pCambia1302 为重庆邮电大学分子生物学实验室保存。Trizol 购自 Invitrogen 公司; 5'-Full RACE Kit 试剂盒、Plant DNA Isolation Reagent 试剂盒、SYBR PrimeScript<sup>TM</sup> Kit 试剂盒、M-MLV Reverse Transcriptase、Premix Ex Taq、pMD19-T 载体和 Dnase I 购自大连宝生物工程有限公司; DNA 纯化试剂盒和 DNA Markers 购自天根生化科技有限公司。引物合成与 DNA 测序委托北京六合华大基因科技股份有限公司。

利用 Trizol 法提取已保存的茎瘤芥各个组织的总 RNA, DEPC 水溶解 RNA, 用分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 数值, 根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值判断 RNA 的质量, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

## 1.2 茎瘤芥 *BjABR1* 基因全长 cDNA 和 gDNA 的克隆

*BjABR1* 基因 3'端序列克隆: 按照 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书以 AP(表 1)为逆转录引物将茎瘤芥膨大茎的总 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链。根据已知片段设计两条 3'RACE 上游特异引物 GSP1 和 GSP2(表 1)。以 cDNA 为模板进行第 1 轮 PCR 反应, 引物为 GSP1 和接头引物 AP1(表 1), 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s, 32 个循环; 72 ℃ 10 min。以第 1 轮产物为模板进行第 2 轮 PCR 反应, 引物为 GSP2 和接头引物 AP1(表 1), 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。

*BjABR1* 基因 5'端序列的克隆: 按照 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书将茎瘤芥膨大茎的总 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链。根据已知片段设计两条 3'RACE 下游特异引物 GSP3 和 GSP4(表 1)。以 cDNA 为模板进行第 1 轮 PCR 反应, 引物为 5'RACE Outer primer(5'-Full RACE Kit 试剂盒提供)和特异引物 GSP3, 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。以第 1 轮产物为模板进行第 2 轮 PCR 反应, 引物为 5'RACE Inner primer(5'-Full RACE Kit 试剂盒提供)和特异引物 GSP4。反应程序: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 80 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

应用 DNAMAN 对 *BjABR1* 基因的已知片段、3'端和 5'端序列进行拼接, 并在 NCBI 网站上预测其 ORF。从两端非编码区序列设计特异引物 GSP5 和 GSP6(表 1)扩增该基因。PCR 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 80 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。

表 1 茎瘤芥 *BjABR1* 基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers used to isolate *BjABR1* gene and analyze its expression in *Brassica juncea*

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	引物名称 Primer name	序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
AP	ATCTTGAGGCACGAGCGCGCGACTAG-d(T)20	GSP1	ATTTTGCCCGTAAGACATGCTTCG
AP1	ATCTTGAGGCACGAGCGCGCGACTAG	GSP2	AGTTACTTGGAGTTGGCTCATCAC
ABR1-F	ATTTGCGAGCGGTTAGTTCT	GSP3	CTGGCTGATTCTGGCTTTGG
ABR1-R	TCGGTATTCGCATTTGGTGT	GSP4	GGTGATGAGCCAACCTCCAAG
18S-F	TCTGACGCAAGCACAATA	GSP5	AACCATCTGATAAACTCTCTCTC
18S-R	TCTTCTCAGCTTTAGCCATT	GSP6	CATTCAATTAAGAGGATGGGCT

按照 Plant DNA Isolation Reagent 试剂盒说明书提取茎瘤芥基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 用特异引物 GSP5 和 GSP6 (表 1) 进行 *BjABRI* 基因的 gDNA 序列扩增。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段, 与 pMD19-T 载体连接并转化 DH5 $\alpha$ , 重组质粒鉴定后测序。

### 1.3 *BjABRI* 基因的生物信息学分析

采用 ProtParam、TMHMM、SignalP、KinasePhos、Psort 等程序对 *BjABRI* 基因进行理化性质和序列结构分析。克隆序列经 GenBank 中的 BLAST 进行同源序列查找, 采用 DNAMAN 软件进行同源性比对; 利用 Clustalx1.83 和 MEGA5.0 软件进行系统进化树的构建。

### 1.4 *BjABRI* - GFP 融合蛋白洋葱表皮细胞亚细胞定位

根据目的基因 *BjABRI* 序列及表达载体 pCAMBIA1302, 设计引物, 上游引物: CATGCCATGG (*Nco* I) ATGCGTGCCTTAAAAG; 下游引物: GAAGATCT (*Bgl* II) TTAAGAGGATGGGCTA 扩增 *BjABRI* 基因。扩增产物用 *Nco* I 和 *Bgl* II 进行双酶切, 同样 pCAMBIA1302 质粒也用相同酶进行双酶切。目的片段回收以后, 利用 T4 连接酶将两个酶切后的目的片段进行连接, 从而完成 pCAMBIA1302-*BjABRI* 表达载体的构建。最后再将所获得的连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 经 PCR 扩增、酶切筛选和测序验证正确后, 筛选阳性克隆并提取质粒。

构建好的表达载体通过基因枪轰击洋葱表皮细胞, 以空载体 pCAMBIA1302 作为对照, 轰击后的洋葱表皮细胞 22 °C 暗培养 24 h 后在荧光显微镜下观察 *BjABRI*-GFP 融合蛋白的表达情况。

### 1.5 荧光定量 PCR 分析茎瘤芥 *BjABRI* 基因的表达

参照荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript<sup>TM</sup> Kit 说明书, 采用 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪, 研究 *BjABRI* 基因在茎瘤芥瘤茎膨大前和膨大初期的根、茎、叶中的时空表达模式, 以及在不同胁迫条件下随时间变化的表达情况。首先按照 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书, 用引物 Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 将提取的用于表达分析的各组织的总 RNA 分别逆转录为 cDNA 第 1 链, 并稀释 10 倍作为荧光定量 PCR 反应模板。根据已克隆的 *BjABRI* 基因 cDNA 序列在非保守区设计 1 对上下游特异引物 ABR1-F 和 ABR1-R (表 1), 目的片段为 106 bp。内参为茎瘤芥 *18S* 基因, 上下游引物分别为 18S-F 和 18S-R (Sun et al., 2012)。荧光定量 PCR 扩增反应体系为: cDNA 模板 2  $\mu$ L, 2 times SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 0.4  $\mu$ L, 50 times ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。PCR 程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 变性 1 min, 58 至 95 °C 做熔解曲线分析, 每个循环增加 0.5 °C, 每个温度停留 10 s。每个样品设 3 次重复。

数据分析得到各个样品的 C<sub>T</sub> 值, 采用  $\Delta\Delta$ CT 法计算相对定量, 目标基因相对定量 =  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001)。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎瘤芥 *BjABRI* 基因的 cDNA 克隆与序列分析

根据已知片段设计引物并经 RACE-PCR 扩增后, 分别得到长度为 1 055 bp 的 5' 末端 (图 1, A) 和 484 bp 的 3' 末端 (图 1, B), 拼接后得到 1 514 bp 全长基因序列; 经 NCBI 的 ORF 预测其 3' utr 和 5' utr 长度分别为 214 bp 和 146 bp, CDS 长 1 146 bp, 包含 381 个氨基酸的开放阅读框; 从 3' utr

和 5' utr 设计引物扩增的片段 (图 1, C) 为 1 299 bp, 与预期大小一致, 且测序结果与拼接序列一致, 说明成功获得该基因全长 cDNA 序列。Blast 在线比对得知其氨基酸序列含 1 个 AP2 DNA 结合域, 且与拟南芥 AP2/EREBP 家族 ERF 亚族 *AtABR1* 基因氨基酸相似性最高, 达 72%, 因此将该基因命名为 *BjABR1* (GenBank 登录号: JQ713825.1)。

对 *BjABR1* 基因编码的氨基酸序列分析如下: ProtParam 程序推测其理化性质, 蛋白分子式为  $C_{1789}H_{2804}N_{546}O_{595}S_6$ , 相对分子量为 41.674 kD, 等电点为 (pI) 9.11; 不稳定参数为 51.7, 属不稳定蛋白 (标准: 40 以下为稳定蛋白); 相对含量较多的氨基酸是丝氨酸 Ser (13.9%, 53 个), 亮氨酸 Ala (8.1%, 31 个), 甘氨酸 Gly (7.3%, 28 个) 和苏氨酸 Thr (7.3%, 28 个); 总的带负电荷残基 (Asp + Glu) 为 37, 总的带正电荷残基 (Arg + Lys) 为 41; 脂肪指数 57.14, 亲水性平均数 -0.812, 为亲水性蛋白。SignalP 程序分析, *BjABR1* 蛋白不存在信号肽; TMHMM 程序推测该蛋白不存在跨膜结构域, 不属于跨膜蛋白; KinasePhos 程序预测其具有 14 个磷酸化位点, 其中 11 个丝氨酸磷酸化位点, 2 个苏氨酸磷酸化位点和 1 个酪氨酸磷酸化位点; Psort 程序分析, 其亚细胞定位最大可能性为细胞核。

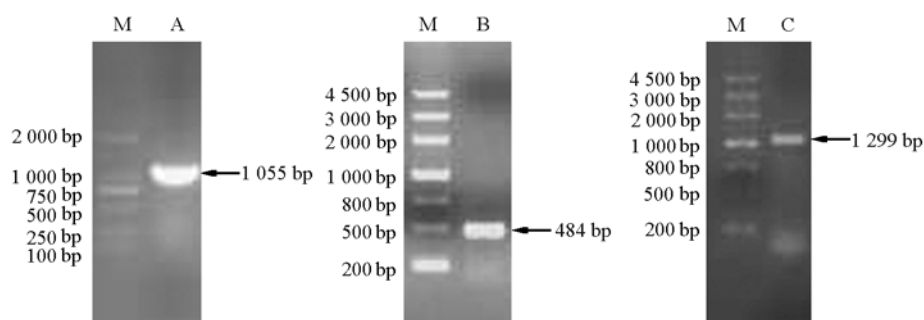


图 1 *BjABR1* 基因的 RT-PCR 和 RACE 扩增结果

M: DNA marker; A: 5'RACE 扩增产物; B: 3'RACE 扩增产物; C: *BjABR1* 编码区 PCR 产物。

Fig. 1 The RT-PCR and RACE amplification result of *BjABR1* gene

M: DNA marker; A: Product of 5'RACE; B: Product of 3'RACE; C: Product of *BjABR1* open reading frame.

## 2.2 茎瘤芥 *BjABR1* 基因的 gDNA 克隆与序列分析

以茎瘤芥基因组 DNA 为模板, *BjABR1* 基因 cDNA 两端非编码区序列设计的引物克隆得到 *BjABR1* 基因的 gDNA 序列。该序列从起始密码子序列 (ATG) 至终止密码子 (TAA) 共 2 000 bp (GenBank 登录号: KF268453), 包含 2 个外显子和 1 个内含子。2 个外显子的长度分别为 415 bp 和 731 bp; 内含子的长度为 854 bp, 位于第 139 个氨基酸密码子的第 1 个碱基之后; 第 2 个外显子含 AP2 DNA 结合域。

## 2.3 茎瘤芥 *BjABR1* 基因氨基酸序列同源性和系统进化树分析

BlastP 比对发现, *BjABR1* 基因与多种植物的 AP2/EREBP 基因具有同源性, 与拟南芥相似性高达 72%, 但与其它植物的相似性较低, 小于 50%。将这些植物的 AP2/EREBP 基因氨基酸序列用 DNAMAN 软件进一步进行多序列比对 (图 2), 发现它们除具有非常保守的 AP2 DNA 结合域 (AP2 Domain) 外, 在 N 端还具有一个保守的氨基酸基序 CMX-1 (CMX-1 Motif), 该基序是在拟南芥 EREBP 亚家族蛋白的结构和进化分析 (Nakano et al., 2006) 中发现, 但功能尚不清楚; 其余部分氨基酸序列变化非常大, 因此导致 *BjABR1* 基因与除拟南芥外的其它植物的 AP2/EREBP 基因氨基酸相似性较低。

利用 Clustalx1.83 和 MEGA5.0 (邻接法) 对 AP2/EREBP 蛋白进行进化分析表明, AP2/EREBP 蛋白的进化具有种属特征 (图 3), 豆科植物苜蓿、百脉根、鹰嘴豆和大豆聚为一支, 其它科属植物聚为另一支, 其中茎瘤芥与拟南芥同为十字花科, 亲缘关系最近, 聚为一类, 与茄科的番茄、蔷薇科的苹果亲缘关系较近。

(1)	...MCVLKVANQEDNVGKKAESIR...DDHRTLSEIDQWLYLFAAEDDHRHSFPTQPPPPSSSSSSLSIGFSREM.BMSATVSAITHVVAENVPOH...	91
(2)	.....MHMCYLKVANRKEKVTNSREDNGGVEEWLYQOPLMTISGLSRER.BMSAMVTLTHVINDDVPPA...	65
(3)	.....MMKNREKGNEDVQSYIQHHSLSMPMFSGFNREK.BMSAMITATRVQVCDYSLV...	56
(4)	.....MCNIVHYKVANSNDNRSSRQ...DDEGINVNTMEQGNINREE.BMSMVVSAITRVVNNHSE...	60
(5)	.....MADPEDNKASEMFINFISREM.BMSAMVSAITHVVAEDTPDR...	40
(6)	...MRALKVANQEGNVGKKAEPPTREDDHRTLSDIDRWLYSFAEDDYLRH...DNSLTPPSSSL...ISREK.BMSATVSAITHVVAENVPT...	86
(7)	.....MSVMVTLTHVVAENVPEAD...	19
(8)	.....MPLPMFPPGSLNREG.BMSAMVSAITHVVICDDQND...	34
(9)	...MCLLKVANQRSSGGGGYDRFGSQNDSDTVDVAVDIDINIVGGVGLSEPPPHQHVLSLPTMFLGYQAATBMSAMVSAITHVVSQRGSDSWG	95
(10)	...MCVLKVANARKSEQLRVEGVDRDEMDGGAAGVMFPGHNRER.BMSAMVTLTHVVAHVSD...	63
(11)	MCFLKVANPSRDRDDRAAAGQNETPQTTEQRDLIEEWLLFEPLFSQQQRRSGGGGGGIMASSMLLLRDRER.BMSAMVSAITHVVTTEEQA...	96
CMX-1 Motif		
(1)	....QGGGGGSGEGTSNSSSSSGQKRRREVEEGG...AKAVKAANTL.....T...VDQYFSG...GSSTSK.....VREAS	151
(2)	....HDSNDFLTLSNEGNCSSSSSAGAKRGREDGY...EFTKLSKQD.....F...LDEFSHA...TENEN.....I	122
(3)	..HNNIDNTNSAIVGGGGDDVNMASGSMPPSSTSLSHGGSVILKRRRD.....DNTSDFLRG...GSFPAILTT.....AEGSS	128
(4)	....NIEN.....HHQNTLISRG...VGEKRGDEV.....L...LHGTNS...HMLSS.....GGEGS	104
(5)	....DASY.....DSTWTSSVSAPAETSALHGGGGYKRGRTLALENGG...S...VSASWSP...SVISGN...SNVV	99
(6)	....QYGG...EGTSNSSSSSGQKRRRELEEGGG...GKDVKAANTL.....T...VDQYFAG...GSSSR...VGEAS	143
(7)	....DSDCISEAFNNQNCAGHDLAKREREEGGG...SEYKRHGRA.....F...GDDFLHG...GSSSAG...RASGK	81
(8)	..GGSDGYNVINQNMNNAFEGDGDIDIKPFSSSTSLSYGGSALKRRREDGG.....FFDNSSSPIQ...IKHQGVES...SNWTN	110
(9)	HVSGGGVTSSFGQLYSSSFPASPLSAFSSASPGPHNVGQKRGREEDLDSASASASAQTQFMESGNRAFRGGYSDYRGTQESPSGGASATVTEEST	195
(10)	....LVNQTSDDPCCLLGSCSWG...AGHKRGRDDQGH...VSESVSTISR.....A...FGDLSHG...GSSSFR...VGEAS	123
(11)	....EVDDLNSSPGGVSGKRGRE...DDGGGGGGGEH...VTESVSLCR.....A...FGDFPQQ...GSSSS...SVLPE	156
AP2 Domain		
(1)	SNMSGPGPTYEYTTATASSETSSFSGDQF.RRRYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKVRPA	250
(2)	ATSTMIIPP...THHTFTPIYEHNESTNREEPTR.KYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPS	219
(3)	TIRRRRANTVYD...YEYRREKVVEEEERARKYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPETLGSDTLR	225
(4)	SIRITREATFIYTNSTNNSIIDESVNNQVR...RRYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPS	202
(5)	IIRPOTGSATVENSVEYEGEITMAEEPARRKYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPS	199
(6)	SNMSGVPTYEYTTATNANETSLSGDGF.QRRYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKVRPA	242
(7)	SIIIMTPAA...TRMAFTPVVEYNETC.RDEPRR.KYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPT	178
(8)	TVTTTTGRSQVEEQIYERTDNNVNKEDQPKRKYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRQ	210
(9)	NFSTATVSATTAVPTPSSTESVSFEETGERKRRYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPS	295
(10)	VINTNTTAASESSLMVPTIYVDTY.RGEPRR.KYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRPS	221
(11)	NSITNRNSTNVTPIQTAYEYRAPQISEQTRRKYRGVQRPMGKAAEI RDEPKAARVWLGTFTDABAAARAYDAAALFRFGNKAALNFPENNVKLRSLP	256
AP2 Domain		
(1)	S....TEAQP.VHQTAARPTQS.RNSGS...TTLLPIRPAQNSQVSHSQPLMQSYN.LSYSEMARQQQFQ...QHQQSLDLYDQMSFP.....	328
(2)	S....SPMTTQLIISDS...SNTLSDPST...AEPPLASQSNHPPHMQNPAETSSNFVNPELVLAGGGY...NQR.QSMSLYDQMLFSSASSTSTSS	306
(3)	....LFRFTCFNFMFLFSHVHYDR.....EPLRSD.....	252
(4)	S....IQQPIYSSPDPAISPYRSNFIIIGH...TSTEVEPIHNTNPNFIEPIAHTSSLYRSNFIERNHMVQ...Q.....EPYFQ.....	273
(5)	T....TESQTHHTNSSPTNTLL.AIPTH...SEPIVSRYPTFNQSSSDASPNFNFSDGOLPPIDMYS...EIHFSSSSSMASSFY.....	279
(6)	S....TTPTLSVPCTAVQRPQL.RNSGS...TSTILVPRHSDQNVHSQLMQSYN.FSYLELAHQQQFQ...HQQQS...LYDQVFP.....	318
(7)	P....NPIANQLTVSDSPSTGLSVPTS...TEAIVHS...QALHHTQN.REISREQVNPQLILGVGG...YQR.QPMSLYDQMLF.....	252
(8)	S....TPTHINISHNSALLSHQRTDP.....DPIVHNETLHTLQSSNKYDYFNGQNFPMASLQTS...VSPSASYSSSYTT.....	282
(9)	P....PPPTLQTNFNSRFTQYAPLQPPPLPQPPQQLYHSQQLFQPSDLDLADYFDYSQLQSSADFPQQQRQQQPSLQKMYN.....	381
(10)	S....GSQATQLAIDS...PETLFSVPY...TNPIVQS...QPLHRSRS.SELPGDYFNYSQNGSSSD.Y...FPR.QPMNLYDQMLA.....	294
(11)	SSAAENNPMTSQPTVSGS...PNALLSPTS...TEAIVHS...HAATSFQ.QRAPMNYDQMLVLSSSS.....PSATTSSTLA.....	329
AP2 Domain		
(1)	...LRFHGTGSGMMQSTSSSSSHSRPLFSPAAPVPPPEASSETGYLQDIQWP...SDKTSNNYNNSPSS.....	391
(2)	HFHSPTTFAAFTSSSPFFHPLFPSPSVNFSTVASQSGAGSGGAGNVLTTPWSDCSGDTSR.....	373
(3)	.....	252
(4)	...AGSTGGGDFHQTNTSS...NSSIYDHPSSSG.....	303
(5)	...SSAGLSNPQFSSSSSSSPVVSLSPPLSFPGRRNSAGINEHYTAGWS...EFFNHAASSG.....	338
(6)	...LRFHGTGSGMTQSTSS...LSRSMFSPAAPVQPKPESASETGHFLDLQSLGKASNNNNYNNSPSS.....	381
(7)	...PPLVSSYPSMSSSTEYSDPMFLPAQQGEIMPATSSQ...SGGEEFLPAWSDISHYTTSSSG.....	312
(8)	...TTFASSFSPPQTSSIPSLTAWPSGSSPSG.....	313
(9)	...SQLASLQSSFLQPASASTPSSALPSSASSASPLFFSEQNQMGFRQPNPNQGGPSDFQAPSWSHSGTIPHHPVDTFMNTFCFLSLF	471
(10)	...SPLQSSSSLSLSSPLGSSSVSSASSSPFPFPFPQPPSAGQSGGADIPAPWSDTSQ.....	352
(11)	...SSVSTSSSPPHVFSRFAIAQSTSPVQLRQAPGDRS...GGADSSMQHQTSSSGHSTSS.....	387

图 2 不同植物 AP2/EREBP 氨基酸序列的比对

(1) 拟南芥; (2) 蓖麻; (3) 大豆; (4) 番茄; (5) 黄瓜; (6) 茎瘤芥; *Brassica juncea*; (7) 毛果杨;  
(8) 苜蓿; (9) 苹果; (10) 葡萄; (11) 草莓。

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of AP2/EREBP from different plants

(1) *Arabidopsis thaliana*; (2) *Ricinus communis*; (3) *Glycine max*; (4) *Solanum lycopersicum*; (5) *Cucumis sativus*;  
(6) *Brassica juncea*; (7) *Populus trichocarpa*; (8) *Medicago truncatula*; (9) *Malus × domestica*;  
(10) *Vitis vinifera*; (11) *Fragaria vesca* ssp. *vesca*.

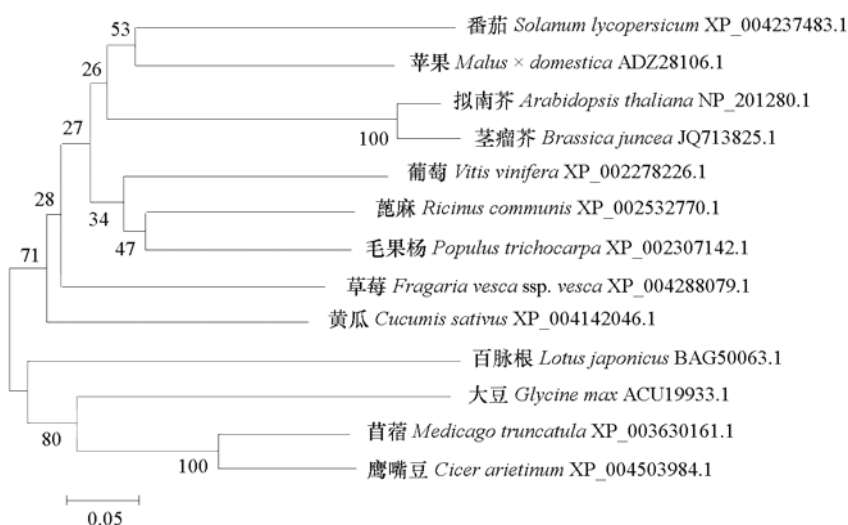
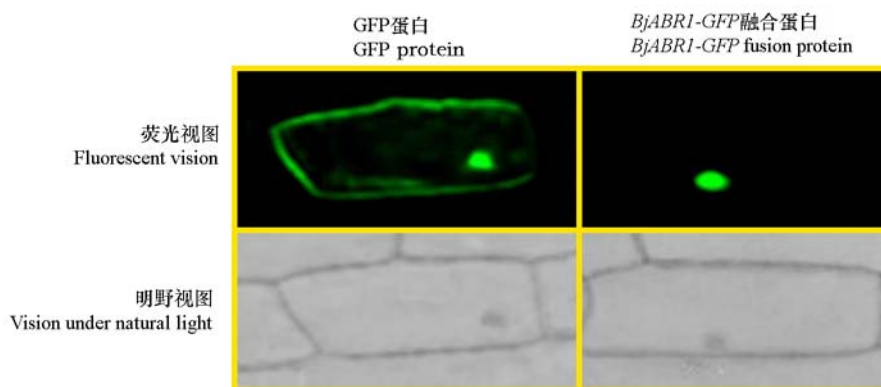


图 3 不同植物 AP2/EREBP 氨基酸序列的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of AP2/EREBP from different plants

## 2.4 茎瘤芥 *BjABR1* 编码蛋白亚细胞定位

利用基因枪轰击洋葱表皮细胞后, 使用共聚焦显微镜观察洋葱表皮细胞内绿色荧光蛋白基因的表达情况。结果显示, 表达 GFP 蛋白的空载体轰击洋葱表皮细胞后, 整个细胞都有绿色荧光; 而表达 *BjABR1*-GFP 融合蛋白的 pCAMBIA1302-*BjABR1* 载体轰击洋葱表皮细胞后, 只在细胞核内有绿色荧光 (图 4), 表明该基因编码蛋白定位于细胞核, 与之前的生物信息学分析结果一致, 符合转录因子的亚细胞定位特征。

图 4 *BjABR1*-GFP 在洋葱表皮细胞中的定位Fig. 4 Subcellular localization of the *BjABR1*-GFP fusion protein in onion epidermal cells

## 2.5 茎瘤芥 *BjABR1* 基因的时空表达模式分析

采用荧光定量 RT-PCR 法, 对 *BjABR1* 基因在茎瘤芥不同发育时期的根、茎、叶中的表达进行相对定量分析。从图 5 可知, *BjABR1* 在茎瘤芥瘤茎膨大前和瘤茎膨大初期的各组织中均有表达, 其中根中的表达量非常高。说明其可能对茎瘤芥的生长发育, 尤其是对根的开发或生理功能具有重要作用。

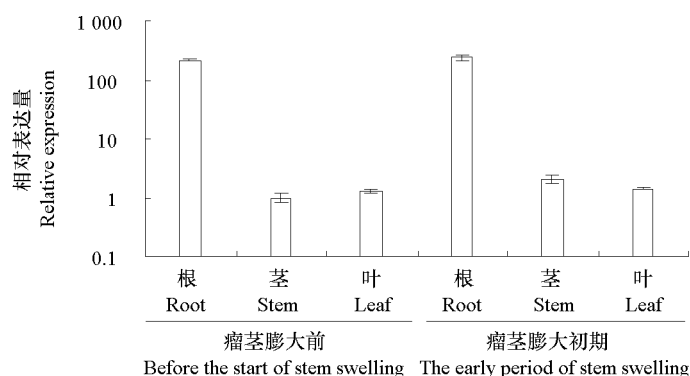


图 5 *BjABR1* 基因的时空表达特性  
Fig. 5 Spatiotemporal expression patterns of *BjABR1* gene

## 2.6 茎瘤芥 *BjABR1* 基因在逆境条件下的表达分析

对茎瘤芥组培幼苗进行盐 (NaCl)、渗透压 (甘露醇) 和低温 (4 °C) 处理后, 采用荧光定量 RT-PCR 法对 *BjABR1* 基因在幼苗叶片中的表达进行相对定量分析。从图 6 可知, *BjABR1* 在各胁迫处理后的表达量均上升, NaCl 处理 2 h 达到最高, 之后逐渐降低; 甘露醇渗透处理 6 h 达到最高, 之后降低; 4 °C 低温处理时间越长表达量越高。说明该基因可能参与茎瘤芥的胁迫反应, 且对 NaCl 的反应更迅速。

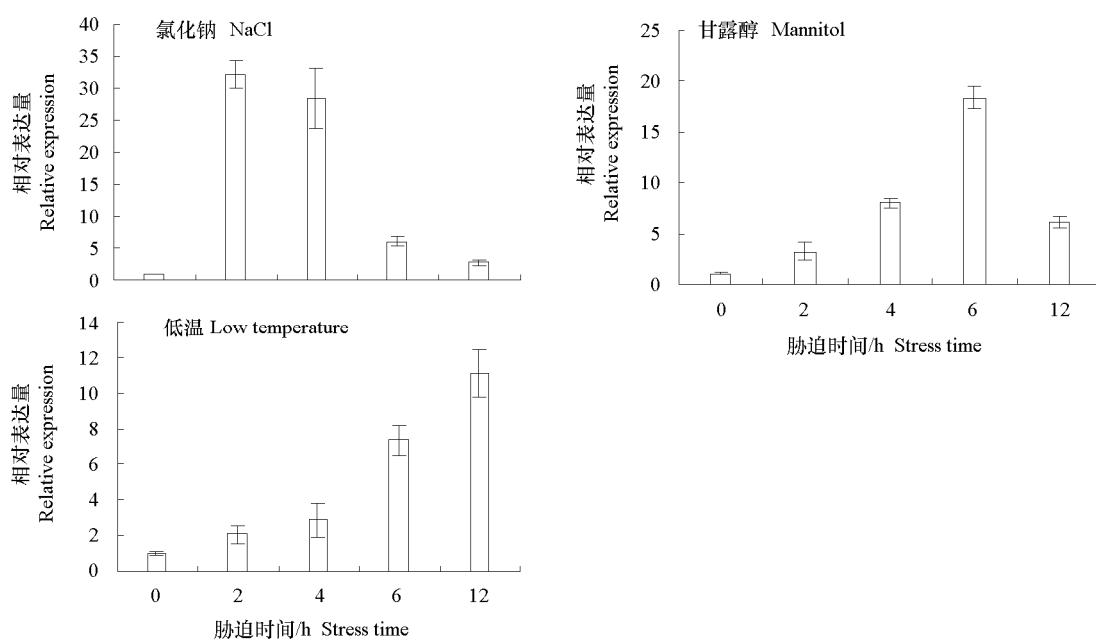


图 6 不同胁迫下 *BjABR1* 的表达分析  
Fig. 6 Expression analysis of *BjABR1* in different stresses

## 3 讨论

AP2/EREBP 转录因子具有重要的生物学功能, 其中 EREBP 亚家族蛋白主要参与植物激素和胁迫



迫反应 (Hao et al., 1998; Nakashima et al., 2000; Feng et al., 2005; Agarwal et al., 2006; Bihani et al., 2011; Mizoi et al., 2011)。本研究从茎瘤芥中克隆了 AP2/EREBP 转录因子家族的 1 个基因 *BjABR1*, 序列比对得知其具有 1 个 AP2 DNA 结合域, 属于 EREBP 亚家族, 与 EREBP 亚家族其它基因氨基酸序列比对显示, AP2 DNA 结合域序列非常保守, 与拟南芥 *AtABR1* 基因相似性最高, 达 72%。

拟南芥 *AtABR1* 基因参与脱落酸 (ABA) 和高盐、高渗透压胁迫反应; *AtABR1* 缺失突变体中 ABA 和 NaCl 反应抗逆蛋白基因如 *RD29A*、*RD29B*、*RD22* 等的表达较野生型高, 且在外源 ABA 和渗透胁迫环境下突变体具有比野生型更高的 ABA 过敏症状, 表现为种子发芽率更低, 发芽后的根及幼苗生长更缓慢 (Pandey et al., 2005)。因此, *AtABR1* 在 ABA 和逆境反应途径中起的是负调控作用, 这是自 *WR11* (Cernac et al., 2006) 以来发现的第 2 个起负调控作用的 AP2/EREBP 基因。本研究中对茎瘤芥组培幼苗进行高盐、渗透压和低温 3 种胁迫处理后发现, 它们均能诱导 *BjABR1* 基因的表达, 说明该基因也参与胁迫反应, 可能对植物的逆境适应过程起作用; 同时, 洋葱表皮细胞瞬时表达显示 *BjABR1* 基因定位于细胞核, 符合转录因子亚细胞定位特征。而 *BjABR1* 基因是否与 *AtABR1* 一样诱导抗逆蛋白基因的转录和在植物逆境反应中起负调控作用呢? 本研究茎瘤芥 AP2/EREBP 转录因子 *BjABR1* 基因的克隆及逆境胁迫下的表达分析为进一步研究该基因在植物逆境反应中的功能和分子机制奠定了基础。

## References

- Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, Sopory S K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25 (12): 1263 - 1274.
- Bihani P, Char B, Bhargava S. 2011. Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation. *J Agric Sci*, 149 (1): 95 - 101.
- Carvalho M A, Pino M T, Jeknic Z, Zou C, Doherty C J, Shiu S H, Chen T H, Thomashow M F. 2011. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 62 (11): 3807 - 3819.
- Cernac A, Andre C, Hoffmann-Benning S, Benning C. 2006. WR11 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiol*, 141 (2): 745 - 757.
- El Ouakfaoui S, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbe H, Han S, Baum B, Laberge S, Miki B. 2010. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol Biol*, 74 (4 - 5): 313 - 326.
- Feng J X, Liu D, Pan Y, Gong W, Ma L G, Luo J C, Deng X W, Zhu Y X. 2005. An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Mol Biol*, 59 (6): 853 - 868.
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. 1998. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem*, 273: 26857 - 26861.
- Hu L, Liu S. 2011. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers. *Genet Mol Biol*, 34 (4): 624 - 633.
- Imin N, Nizamidin M, Wu T, Rolfe B G. 2007. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot*, 58 (3): 439 - 451.
- Jofuku K D, den Boer B G, Van Montagu M, Okamoto J K. 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 6 (9): 1211 - 1225.
- Kitomi Y, Ito H, Hobo T, Aya K, Kitano H, Nakai Y. 2011. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRR1*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J*, 67: 472 - 484.
- Kizis D, Lumberras V, Pages M. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett*, 498 (2 - 3):

187 – 189.

- Li C W, Su R C, Cheng C P, Sanjaya, You S J, Hsieh T H, Chao T C, Chan M T. 2011. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP mediated defense pathway. *Plant Physiol*, 156 (1): 213 – 227.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 86 – 96.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and *rice*. *Plant Physiol*, 140 (2): 411 – 432.
- Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol*, 42 (4): 657 – 665.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H. 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7: 173 – 182.
- Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, Kim B G, Li L, Luan S. 2005. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (3): 1185 – 1193.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (3): 998 – 1009.
- Sharoni A M, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi I R, Omura T, Kikuchi S. 2010. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol*, 52 (2): 344 – 360.
- Sohn K H, Lee S C, Jung H W, Hong J K, Hwang B K. 2006. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 61 (6): 897 – 915.
- Sun Q, Zhou G, Cai Y, Fan Y, Zhu X, Liu Y, He X, Shen J, Jiang H, Hu D, Pan Z, Xiang L, He G, Dong D, Yang J. 2012. Transcriptome analysis of stem development in the tumorous stem mustard *Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee by RNA sequencing. *BMC Plant Biol*, 12: 53.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6 (2): 251 – 264.
- Zhu Q, Zhang J, Gao X, Tong J, Xiao L, Li W, Zhang H. 2010. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor *RAP2.6* participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 457: 1 – 12.
- Zhuang J, Cai B, Peng R H, Zhu B, Jin X F, Xue Y, Gao F, Fu X Y, Tian Y S, Zhao W, Qiao Y S, Zhang Z, Xiong A S, Yao Q H. 2008. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 371 (3): 468 – 474.
- Zhuang J, Sun C C, Zhou X R, Xiong A S, Zhang J. 2011. Isolation and characterization of an AP2/ERF-RAV transcription factor BnRAV-1-HY15 in *Brassica napus* L. *HuYou* 15. *Mol Biol Rep*, 38 (6): 3921 – 928.