

矮牵牛B-box型锌指蛋白基因*PhBBX8*的克隆与表达分析

宁露云, 李 蓓, 李 佩, 包满珠, 张 蔚*

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘 要: 利用矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 基因表达谱芯片筛选出应答低温胁迫的相关基因, 从中发现 1 个 B-box 型锌指蛋白基因 *PhBBX8*。通过 RT-PCR 克隆得到该基因的编码区序列 (CDS), 为 1 242 bp, 预测其编码氨基酸 413 aa, N 端含有 2 个 B-box 盒, C 端含有 1 个 CCT 结构域。系统进化树分析发现, *PhBBX8* 与拟南芥 *AtBBX8* 等聚类为一支。利用半定量 RT-PCR 检测其在根、茎、叶和花中的表达特性, 结果表明该基因在花中表达量较高, 其次为根, 而在茎和叶中表达较弱; 利用实时定量 PCR 检测了在低温、干旱、ABA、MeJA、高盐和高渗胁迫处理下矮牵牛叶片中 *PhBBX8* 的诱导表达情况, 结果表明, *PhBBX8* 表现出不同程度的上调, 其中除干旱胁迫外, 其他胁迫下上调倍数都较高, 初步推测该基因与矮牵牛应答低温等非生物逆境相关。

关键词: 矮牵牛; B-box; 锌指蛋白; 非生物逆境; 表达分析

中图分类号: S 681.9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 12-2437-09

Cloning and Expression Analysis of a B-box-type Zinc-finger Protein Gene *PhBBX8* in *Petunia hybrida*

NING Lu-yun, LI Bei, LI Pei, BAO Man-zhu, and ZHANG Wei*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education), College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Gene expression microarray of petunia was applied to select cold responsive gene, from which a B-box-type zinc-finger protein gene *PhBBX8* was discovered. The full length of the coding region of *PhBBX8* amplified by RT-PCR was 1 242 bp, and the product of *PhBBX8* gene was predicted to consist of 413 amino acid residuals containing two B-box domains at the N-terminal and one CCT domain at the C-terminal. The phylogenetic tree analyses showed that *PhBBX8* was clustered in the same branch with *AtBBX8* in *Arabidopsis*. By semi-quantitative RT-PCR, *PhBBX8* was found to express differentially in all the tissues detected, including root, stem, leaf and flower. Stress induced expression analysis by real-time quantitative PCR showed that the expression of *PhBBX8* could be induced not only by cold, but also by drought, ABA, MeJA, salt and hypertonic stresses in different degrees, suggesting *PhBBX8* gene was associated with the responses of cold and other abiotic stresses.

收稿日期: 2014-07-31; **修回日期:** 2014-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101576); 中央高校基本科研业务费专项基金项目 (2013PY090); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20110146120040)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangw@mail.hzau.edu.cn)

Key words: *Petunia hybrida*; B-box; zinc-finger protein; abiotic stress; expression analysis

锌指蛋白最早是在 1985 年由 Miller 等 (1985) 在非洲爪蟾卵母细胞转录因子 TFIIIA 中发现, 随后陆续在包括人类 (Bond et al., 2004; Jones et al., 2006) 的哺乳动物、植物、果蝇 (Liang et al., 2008)、酵母 (Mazauric et al., 2010) 和病毒 (Morellet et al., 2006) 中鉴定出大量的锌指蛋白。Berg (1993) 根据锌指蛋白序列与功能的不同将其分为 9 大类: C2H2、C8、C6、C3HC4、C2HC、C2HC5、C4、C4HC3 和 CCCH (C 和 H 分别代表半胱氨酸和组氨酸)。Iuchi (2001) 对目前所发现的锌指蛋白结构进行分析, 结果表明, 大部分锌指蛋白都属于 C2H2 型。还有一些转录因子虽然不含有经典的锌指结构域, 但含有类似的锌指结构域。Greb 等 (2007) 发现 PHD 锌指结构域能够特异性识别并结合组蛋白 H3K4 的甲基化密码 (修饰), 发挥基因转录调控功能, 参与植物多种生长发育以及非生物逆境胁迫响应等过程。B-box 蛋白在 N 端含有 1 个或多个 B-box 盒作为结构特征与锌离子稳定地结合 (Klug & Schwabe, 1995)。目前, 植物蛋白 B-box 结构域的具体生化特征尚不清楚, 但可能参与锌指蛋白与其它蛋白之间的互作。Dinkins 等 (2003) 通过片段缺失分析, 确定了拟南芥单锌指蛋白 *AtZFP11* 的 B-box, 即核定位信号区 (RRDRAKLR), 缺失该序列的 *AtZFP11* 的 N 端融合 GFP 之后并不能将 GFP 定位在核内。另外, 一些 B-box 基因还含有其他结构域, 但这些结构域是否赋予该基因不同的功能还有待进一步的研究 (Khanna et al., 2009)。在拟南芥中, B-box 家族由 32 个基因组成 (Riechmann et al., 2000; Robson et al., 2001; Chang et al., 2008; Kumagai et al., 2008), 按照亲缘关系, Khanna 等 (2009) 将其统一命名为 *AtBBX1* ~ *AtBBX32*。Putterill 等 (1995) 通过图位克隆的方法在拟南芥中分离得到 B-box 家族的第 1 个基因——*CO* (*CONSTANS*)。CO 基因 C 端含有由 45 个碱性氨基酸组成的与 CO 蛋白核定位有关 CCT 结构域 (Griffiths et al., 2003)。CO 是植物光信号传导途径调控开花的关键因子。光和生物钟调控 CO-like 的转录水平及 CO 蛋白的稳定性, 而 CO 是光周期途径中的主要调控因子, 直接诱导下游基因 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 和 *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*) 的表达, 进而调控植物开花 (Mas, 2008)。

迄今为止, 尚未发现关于矮牵牛 B-box 类锌指蛋白明确的生化特性及生物学功能的报道。本研究中利用矮牵牛基因表达谱芯片筛选出 1 个应答低温胁迫的含 2 个 B-box 锌指结构域的 *PhBBX8* 基因, 在分离获得该基因 CDS 序列并进行序列分析的基础上, 研究了 *PhBBX8* 在不同组织和不同非生物逆境胁迫下的表达情况, 以期揭示 *PhBBX8* 在矮牵牛对非生物胁迫响应中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本课题在前期研究中, 对收集、保存以及创制的矮牵牛种质进行田间自然霜冻和人工气候箱冷冻筛选, 从中获得了较为耐寒的矮牵牛株系 (代号 H)。为了保证芯片试验的可靠性, 减少由于材料个体间差异带来的不准确数据量, 本研究中建立了 H 株系的快繁体系, 获得了遗传背景完全一致的无性系群体。本课题组前期定制的矮牵牛 Roche NimbleGen 表达谱芯片所用植物材料即为 H 的无性系, 后续胁迫处理均采用该株系的组培苗, 单株鲜样质量约 1.8 ~ 2.5 g。

本课题组与荷兰、美国等多个国家的相关研究单位联合发起国际矮牵牛基因组项目 (PGP, *Petunia Genome Project*), 分别对两个矮牵牛野生种, 腋花矮牵牛 (*Petunia axillaris*) 和膨大矮牵牛 (*P. inflata*) 进行全基因组测序。在项目进展过程中, 又增加了转录组测序结合蛋白质组分析的内容。在前期的研究中发现, 从矮牵牛 (*P. hybrida*) 克隆得到的基因中, 确实有一些基因的序列和已

测序的两种矮牵牛在序列组成上存在部分碱基差异。但本研究中的 *PhBBX8* 基因经过测序, 和矮牵牛数据库里的转录组数据完全一致。

1.2 非生物胁迫处理

低温处理: 将组培苗放入 22 ℃, 14 h 光照/10 h 黑暗的光照培养箱适应 1 d, 之后将温度降为 2 ℃, 分别于 0、1、3、6、12 和 48 h 后取叶片。

干旱处理: 将组培苗从培养基中拔出, 轻轻洗去根上的培养基, 室温条件下置于滤纸上, 分别于 0、3、6、12 和 24 h 后取叶片。

ABA 和 MeJA 处理: 分别用浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 溶液和 MeJA 溶液对培养瓶中组培苗进行喷施, 直到叶片滴水为止, 分别于 0、3、6、12 和 24 h 后取叶片。

高盐和高渗处理: 将组培苗从培养基中拔出, 轻轻洗去根上的培养基, 水培 2 d 后分别换到 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液和 400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇溶液中, 高盐处理于 0、3、6、12、24 和 48 h 后取叶片, 高渗处理于 0、3、6、12 和 24 h 后取叶片。

上述叶片样品取后立即储存于 -80 ℃ 备用, 用于总 RNA 的提取。每个时间点均设 3 个生物学重复, 每个生物学重复均用 3 株叶片混样。

1.3 总RNA的提取和反转录

总 RNA 的抽提采用艾德莱公司生产的 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒, 按照说明书进行。总 RNA 的反转录反应采用 TaKaRa 公司生产的 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂, 按照说明书进行。

1.4 引物设计

根据矮牵牛数据库中获得的基因序列, 用 Primer Premier 5 软件设计 1 对含部分 UTR 区的特异引物 (*PhBBX8*-F1/R1), 并根据实时定量 PCR 引物要求设计 1 对特异引物 (*PhBBX8*-F2/R2)。实时定量 PCR 以矮牵牛 *GAPDH* (GenBank: X60 346.1) 为内参, 扩增引物为 *PhGAPDH*-F/R。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 被检测基因的引物序列
Table 1 Sequences of primers for the genes tested

引物名称 Primer's name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	产物大小/bp Product's size
<i>PhBBX8</i> -F1	CGGTAGACTGGTTCCTAAGATTATTGAG	1 322
<i>PhBBX8</i> -R1	CGTCCTTTGTTTCCTATACATATGGT	
<i>PhBBX8</i> -F2	TCTGGAACAAAAGGCTCAACACTAT	156
<i>PhBBX8</i> -R2	GCCATCAATGTCTTCATCTCAAAT	
<i>PhGAPDH</i> -F	CAAGGCTGGAATTGCTTTGAG	125
<i>PhGAPDH</i> -R	CACCACTTTACTCCACTGATGCA	

1.5 *PhBBX8* 的克隆

以本课题组前期定制的表达谱芯片数据中获得的一段 389 bp 的 EST 序列为信息探针, 在矮牵牛数据库中分别与基因组序列和转录组序列进行比对, 分析获得该基因的 CDS 序列。根据分析结果, 设计一对特异性外侧引物 (*PhBBX8*-F1/R1)。以 cDNA 为模板, 扩增程序如下: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 62 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。目的条带经胶回收纯化后连接到 pMD-18T 载体 (购自 TaKaRa 公司) 中, 转化大肠杆菌 DH5 α (购自 TaKaRa 公司), 测序由生工生物工程 (上海) 技术服务有限公司完成。

1.6 生物信息学分析

cDNA 序列分析采用 DNAMAN 6.0 软件; 氨基酸的多序列比对和系统发生树的分析采用 ClustalX 软件和 Mega5.0 程序实现; 矮牵牛基因组序列分析依据矮牵牛基因组数据库; 氨基酸的保守性结构域、同源性和理化性质分析分别利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 PROTPARAM(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 进行分析预测。

1.7 半定量与实时定量PCR

以根、茎、叶和花反转录得到的 cDNA 稀释后作为模板, 引物为 *PhBBX8*-F2/R2, 通过半定量 PCR 扩增检测 *PhBBX8* 在各组织中的本底表达。扩增程序如下: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。以矮牵牛 *GAPDH* 为内参, 进行扩增: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。

实时定量 PCR 反应在 ABI7500fast 荧光检测系统中进行。将不同样品的 RNA 反转录产物 10 倍, 作为 real-time PCR 的模板。操作过程按照 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒使用说明完成。反应体系为 10 μL, 其中 1 μL 的模板、0.2 μL 正反向引物、5.2 μL SYBR Premix Ex Taq™ (2×)、ddH₂O 补足 10 μL。实时定量 PCR 以矮牵牛 *GAPDH* 为内参, 数据处理按照内参的 ΔCT 法分析 (Livak & Schmittgen, 2001)。每个样品设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 *PhBBX8* 的克隆与序列分析

PCR 扩增后在 1 000 ~ 1 500 bp 间有亮带 (图 1), 连接测序结果与矮牵牛转录组数据库中的序列完全一致 (GenBank: KM189192)。目的基因的 CDS 序列为 1 242 bp, 编码 413 个氨基酸。预测其编码产物相对分子量为 45.3 kD, 等电点为 5.91。

目的基因的氨基酸序列保守结构域分析表明, 在氨基酸 4 ~ 47 和 48 ~ 90 残基间存在 2 个 B-box 锌指蛋白结构域, 359 ~ 400 残基间存在 1 个 CCT 结构域 (图 2)。将目的基因的氨基酸序列在拟南芥数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 中比对, 发现其氨基酸序列与拟南芥中命名为 BBX8 (即 *COL10*) 的亲缘性最高, 其次为 BBX7 (即 *COL9*), 根据 Khanna 等 (2009) 在 2009 年提出的 B-box 类锌指蛋白家族成员的新命名规则, 将该基因命名为 *PhBBX8*。

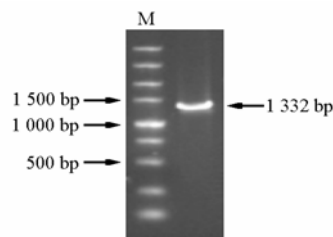


图 1 *PhBBX8* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR amplification of *PhBBX8*

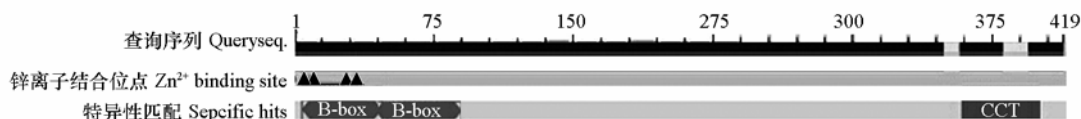


图 2 *PhBBX8* 的结构域分析

Fig. 2 Conservative domain analysis of *PhBBX8*

通过 NCBI 中 BLAST 查找 GenBank 中已登录的同源序列, 结果显示矮牵牛 *PhBBX8* 编码区的氨基酸序列与马铃薯和番茄中的 COL 锌指蛋白的同源性最高, 覆盖率均达到 100%, 相似性均高达 82%。将 *PhBBX8* 与其它物种中已报道的含 B-box 盒的锌指蛋白进行亲缘关系比对, 系统发生树(图 3)结果显示, 所有这些蛋白可划分为 4 个分支。其中 *PhBBX8* 与大豆 *GmCOL4*(张清哲 等, 2010), 拟南芥 *AtBBX8* (Khanna et al., 2009) 的亲缘关系较近, 聚为 1 组; 大豆 *GmCOL11* (Jiang et al., 2011) 和烟草 *NtCO1* (陆莹 等, 2013), 高羊茅 *FaCONSTANS* (王小利 等, 2010) 聚为 1 组; 水稻 *OsBBX25* (刘焱 等, 2012), 拟南芥 *AtBBX24/25* (Khanna et al., 2009), 以及青蒿 *AaBBX22* (高尔娣 等, 2013) 聚为 1 组; 另外, 除了含 B-box 盒还有两个典型的 C2H2 结构域的拟南芥 *AtAZF2* (Sakamoto et al., 2000), 位于离 *PhBBX8* 最远的分支中, 单独聚为 1 组。

Cheng 和 Wang (2005) 报道, *AtBBX8* (*AtCOL10*) 与其高度相似的 *AtBBX7* (*AtCOL9*) 在拟南芥的开花调控上起着抑制因子的作用; 在大豆中, *GmCOL4* 表达主要受生物节律的影响, 受光的调节作用较弱, 且主要在大豆叶片中表达(张清哲 等, 2010); *OsBBX25* 受盐、干旱和 ABA 诱导表达, 异源表达 *OsBBX25* 的转基因拟南芥与野生型相比对盐和干旱的耐受性增强(刘焱 等, 2012); *AaBBX22* 可能参与青蒿的耐盐和耐旱调控(高尔娣 等, 2013); *AtAZF2* 受干旱、高盐、ABA 的诱导(Sakamoto et al., 2000)。

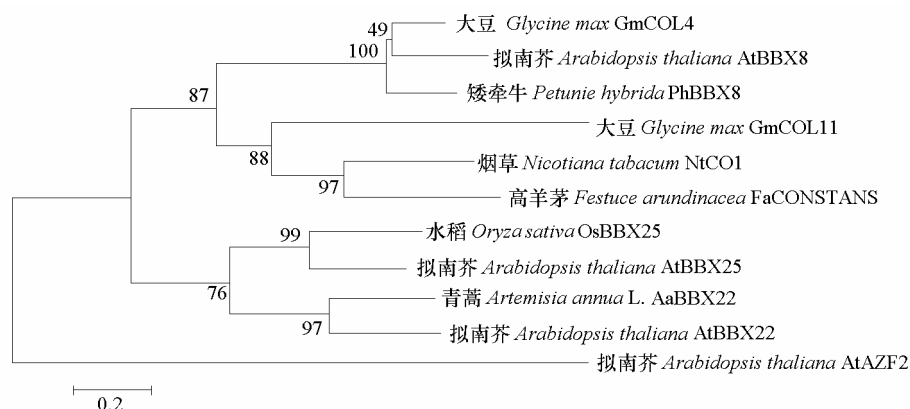


图 3 *PhBBX8* 与其它物种中 B-box 型锌指蛋白的系统发生树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analyses of *PhBBX8* and B-box-type zinc-finger proteins in other species

2.2 *PhBBX8* 的组织表达模式分析

以矮牵牛不同组织(根、茎、叶和花)的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果(图 4)显示, *PhBBX8* 在不同组织中的表达强弱依次为花、根、茎、叶。

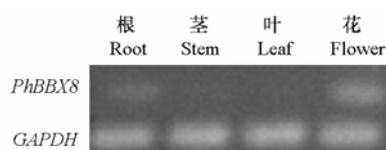


图 4 *PhBBX8* 在矮牵牛不同组织中的表达

Fig. 4 Expression of *PhBBX8* in various petunia tissues

2.3 *PhBBX8* 的非生物逆境诱导表达分析

为了研究矮牵牛 *PhBBX8* 对非生物逆境胁迫的应答, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析其

在低温、干旱、ABA、MeJA、高盐和高渗处理下表达水平的变化。结果(图 5)表明, 在不同非生物逆境胁迫下, *PhBBX8* 的表达水平呈现相似的变化趋势。

低温胁迫下, *PhBBX8* 在处理中后期, 即处理 12 h 表达水平有所上调, 约为对照的 3.5 倍, 随后在后期 48 h 表达量显著增加, 约为对照的 24.5 倍。干旱胁迫相较其他处理, 对 *PhBBX8* 的表达量

影响较弱,从中期 6 h 到 12 h 表现为递增,并在 12 h 达到峰值,此后上调趋势表现为递减。*PhBBX8* 显著受到 ABA 诱导,在中期,即处理 6 h,表达水平为未处理时的 34 倍左右,并在中后期 12 h 达到峰值,约为对照的 90 倍,而后迅速下降,几乎与未处理时表达水平一致。*MeJA* 胁迫、高盐胁迫以及高渗胁迫下,*PhBBX8* 在叶中表达趋势和 ABA 胁迫下几乎一致,仅表达量上调倍数有差异,但表达水平均高于对照。

以上结果表明 *PhBBX8* 在植物逆境胁迫处理的中期阶段其表达水平才逐渐产生变化,推测在植物感受逆境之后 *PhBBX8* 在中后期参与到植物的逆境应答反应。*PhBBX8* 作为转录因子,可能直接或间接参与了植物逆境应答反应中下游基因的转录调控。另外,*PhBBX8* 同时在多种胁迫条件下的表达水平变化趋势较一致,似乎表明它在植物不同逆境应答途径的交叉现象中发挥作用。

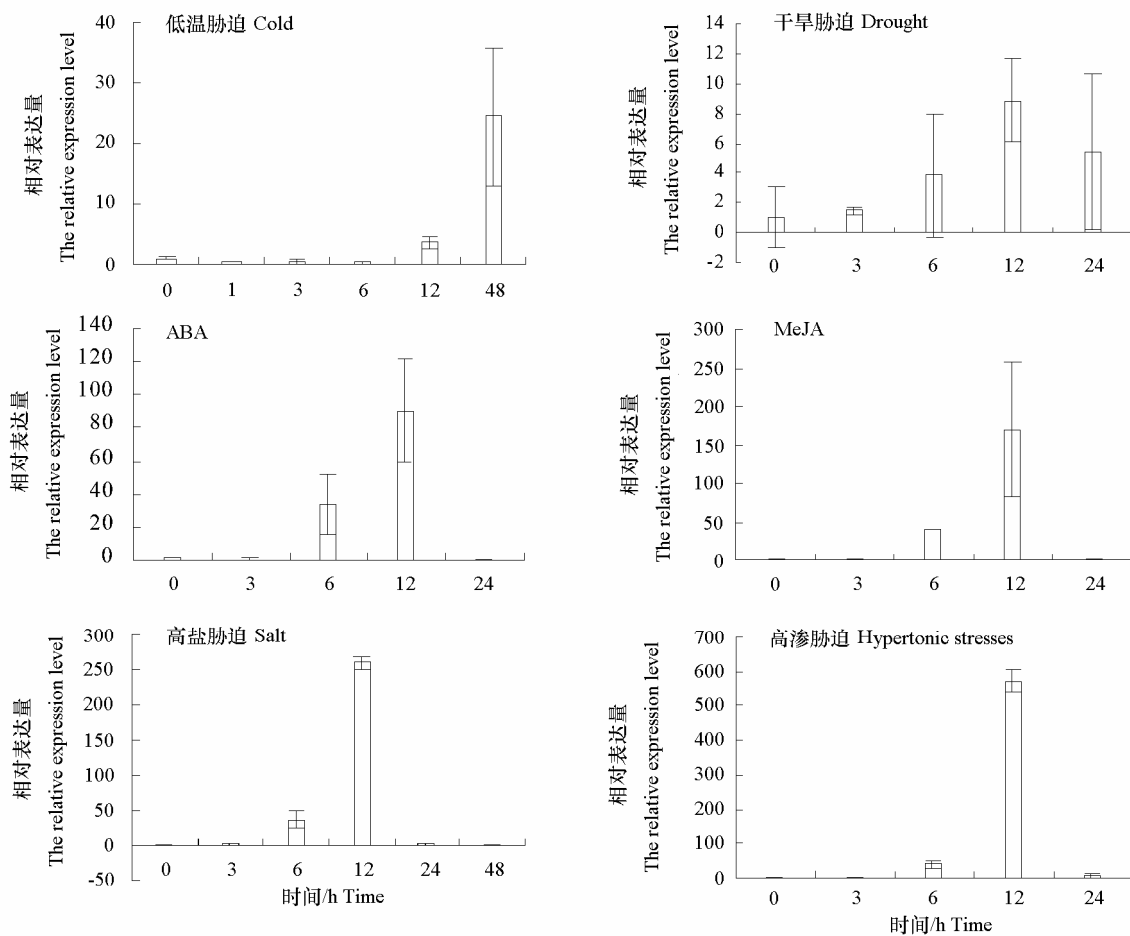


图 5 非生物逆境胁迫下 *PhBBX8* 的诱导表达分析

Fig. 5 Induced expression analysis of *PhBBX8* under different abiotic stresses

3 讨论

本研究中利用矮牵牛基因表达谱芯片筛选出应答低温胁迫的关键基因,从中发现 1 个含 B-box 盒的锌指蛋白基因 *PhBBX8*,分离获得该基因对应的矮牵牛全长 cDNA。通过氨基酸序列保守结构域分析表明,矮牵牛 *PhBBX8* 基因 N 端含有 2 个 B-box 锌指蛋白结构域, C 端含有 1 个 CCT 结构域(图 2)。在拟南芥中 B-box 类锌指蛋白分为 3 个亚家族,其中最大的 1 个亚家族包括 17 个基因,这些基因在其 C 端的氨基酸序列中都含有 CCT (CO, CO-like, TOC1) 结构域。*STO*, *STH1*, *STH2*

等以及另外 5 个基因组成第 2 个亚家族, 它们在 N 端含有 2 个高度同源的 B-box 结构域。第 3 个亚家族只有 5 个基因, 它们在 N 端只有 1 个 B-box 结构域 (Griffiths et al., 2003; Datta et al., 2008)。根据矮牵牛 *PhBBX8* 的氨基酸序列特征分析, 认为 *PhBBX8* 与拟南芥 B-box 类锌指蛋白中第一个亚家族关系更为紧密。Cheng 和 Wang (2005) 研究表明, 超量表达 *AtCOL9* 的拟南芥转基因植株中, *CO* 和 *FT* 基因的表达水平降低从而表现出延迟开花。*AtCOL9* 有 4 个外显子 (长度分别为 528、172、292 和 128 bp) 和 3 个内含子 (长度分别为 102、93 和 96 bp)。本试验尚未对 *PhBBX8* 的基因组 DNA 序列做进一步的分析, 在后续试验中将对 *PhBBX8* 的外显子和内含子进行探讨, 探讨 *PhBBX8* 是否由于序列结构上的差异而在功能上表现出与其它基因 (如 *AtCOL9*) 的不同。

前人的研究表明, 不同的表达部位在一定程度与其功能有相关性。如高尔娣等 (2013) 的研究结果显示 *AaBBX22* 基因在青蒿根中表达量最高, 而在茎、叶、初期花蕾、后期花蕾和花中表达量较低, 盐和干旱处理都能显著诱导该基因的表达, 推测该基因可能参与青蒿的耐盐和耐旱调控。尽管大豆中的 *GmCOL11* 基因在不同组织器官中有组成性表达, 但在不同发育阶段各器官中的表达也不尽相同, 在花期的根、茎、叶、花中表达量较低, 荚中随着荚的发育逐渐降低, 在开花期复叶中表达量较高, 尤其在开花期第 3 复叶中表达量达到峰值, 推断 *GmCOL11* 可能与开花调控有关 (马锦花, 2010; Jiang et al., 2011)。本研究中的 *PhBBX8* 基因在矮牵牛花中的表达量最高, 其次为根, 而在茎和叶中的表达较弱。在不同非生物胁迫处理后发现, *PhBBX8* 在叶中的表达水平相较于对照上调倍数极高, 对各胁迫在处理中期 6 h 表现出极强的响应。但是就 *PhBBX8* 基因在不同胁迫处理下, 在不同组织中的表达情况还值得进一步研究。

目前对植物 B-box 型锌指蛋白的研究, 如拟南芥 (Griffiths et al., 2003; Cheng & Wang, 2005; Kumagai et al., 2008; Khanna et al., 2009), 水稻 (Nemoto et al., 2003; Kim et al., 2008; Huang et al., 2012) 等模式植物, 油菜 (艾育芳, 2011), 大豆 (张清哲 等, 2010) 等农作物, 以及高羊茅 (王小利 等, 2010), 小立碗藓 (Zobell et al., 2005) 等园艺植物主要集中在开花调控, 花发育, 光形态发生以及光周期调控等方面, 而在逆境胁迫方面的研究报道较少。Lippuner 等 (1996) 利用酵母钙神经蛋白突变体对盐敏感的表型, 从拟南芥 cDNA 文库中筛选到的 *STO* 基因 (*AtBBX24*), 除了可以互补酵母的盐敏感表型之外, 还可以互补酵母与钙神经蛋白缺陷相关的表型。*AtSTO* (*AtBBX24*) 的表达可以互补钙调磷酸酶缺失突变体酵母的功能。Nagaoka 和 Takano (2003) 的研究结果表明, 尽管 *AtSTO* 不受高盐胁迫诱导, 但在拟南芥中超量表达后能提高转基因植株的耐盐性。此外, Indorf 等 (2007) 利用 T-DNA 插入突变, 超量表达以及 RNAi 基因敲除等方法研究 *AtSTO* 的其它未知功能, 结果表明 *AtSTO* 在光信号传导过程中有重要作用。Huang 等 (2012) 通过综合生物信息学分析从水稻中鉴定出 30 个 BBX 基因, 除了 *OsBBX1*、*OsBBX14* 和 *OsBBX19* 基因, 大部分 BBX 基因都有响应激素的顺式元件, 据此推断这些基因可能有激素调节作用。有 29 个 BBX 基因至少含有一个胁迫响应顺式元件 (ARE、W-box、GC-motif、Box-W1、HSE 或 MBS), 表明这些基因可能在生物胁迫以及非生物胁迫响应中起作用。刘焱等 (2012) 对水稻中一个编码含有 B-box 锌指结构域蛋白的 *OsBBX25* 基因进行了功能分析, 结果表明 *OsBBX25* 受盐、干旱和 ABA 诱导表达。异源表达 *OsBBX25* 的转基因拟南芥与野生型相比对盐和干旱的耐受性增强, 且在盐胁迫条件下转基因植物中 *KIN1*、*RD29A* 和 *COR15* 的表达上调, 干旱胁迫下 *KIN1*、*RD29A* 和 *RD22* 的表达上调。从而推测 *OsBBX25* 可能作为转录调控的辅助因子调节胁迫应答相关基因的表达, 进而参与植物对非生物胁迫的响应。青蒿 *AaBBX22* 基因在盐和干旱处理都能显著被诱导表达, ABA、MeJA 和低温处理显著抑制了该基因的表达, 伤害处理在一定程度上抑制了该基因的表达, 推断 *AaBBX22* 基因可能参与青蒿的耐盐和耐旱调控 (高尔娣 等, 2013)。为研究矮牵牛 *PhBBX8* 基因对非生物逆境胁迫的响应, 本研究利用实时定量 PCR 对 *PhBBX8* 在干旱、低温、ABA、MeJA、高盐和高渗胁迫下的表达量变化进行了分析。

结果显示, *PhBBX8* 受多种非生物逆境胁迫诱导表达。其中, *PhBBX8* 在除干旱胁迫外的其它胁迫下表达量的变化极为显著, 并且, *PhBBX8* 受低温胁迫诱导表达结果与课题组前期的表达谱芯片数据基本吻合, 进一步验证了芯片结果。

综上所述, 矮牵牛 *PhBBX8* 基因可能在多种信号转导过程中起重要作用, 初步推断该基因参与了矮牵牛抵抗非生物胁迫的防御反应。在后续的研究中可以利用超量表达以及基因敲除等策略对其功能进行验证, 以进一步揭示其功能。

References

- Ai Yu-fang. 2011. Preliminary study on flowering mechanism of early and late maturing of oilseed rape (*Brassica napus* L.) [Ph. D. Dissertation] . Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 艾育芳. 2011. 早晚熟油菜成花机理的初步研究 [博士论文] . 福州: 福建农林大学.
- Berg J M. 1993. Zinc finger proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 3 (1): 11 - 16.
- Bond H M, Mesuraca M, Carbone E, Bonelli P, Agosti V, Amodio N, Venuta S. 2004. Early hematopoietic zinc finger protein (*EHZF*), the human homolog to mouse Evi3, is highly expressed in primitive human hematopoietic cells. *Blood*, 103 (6): 2062 - 2070.
- Chang C J, Li Y H, Chen L T, Chen W C, Hsieh W P, Shin J, Wu S H. 2008. *LZF1*, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in *Arabidopsis* de-etiolation. *The Plant Journal*, 54 (2): 205 - 219.
- Cheng X F, Wang Z Y. 2005. Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 43 (5): 758 - 768.
- Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Holm M. 2008. *STH2* has 2B there an insight into the role of B-box containing proteins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 3 (8): 547 - 548.
- Dinkins R D, Pflipsen C, Collins G B. 2003. Expression and deletion analysis of an *Arabidopsis SUPERMAN-like* zinc finger gene. *Plant Science*, 165 (1): 33 - 41.
- Gao Er-di, Lu Xu, Shen Qian, Tang Ke-xuan. 2013. Cloning and expression analysis of *AaBBX22* encoding B-box-type zinc finger protein from *Artemisia annua* L. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agriculture Science*, 31 (5): 20 - 25. (in Chinese)
- 高尔娣, 陆 续, 沈 乾, 唐克轩. 2013. 青蒿 B-BOX 型锌指蛋白基因 *AaBBX22* 的克隆及表达分析. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 31 (5): 20 - 25.
- Greb T, Mylne J S, Crevillen P, Geraldo N, An H, Gendall A R, Dean C. 2007. The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis* FLC. *Current Biology*, 17 (1): 73 - 78.
- Griffiths S, Dunford R P, Coupland G, Laurie D A. 2003. The evolution of *CONSTANS* like gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131 (4): 1855 - 1867.
- Huang J, Zhao X, Weng X, Wang L, Xie W. 2012. The rice B-box zinc finger gene family: Genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. *PLoS One*, 7 (10): e48242.
- Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, Rodríguez F M. 2007. Salt tolerance (*STO*), a stress-related protein, has a major role in light signaling. *The Plant Journal*, 51 (4): 563 - 574.
- Iuchi S. 2001. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58 (4): 625 - 635.
- Jiang Y, Han Y Z, Zhang X M. 2011. Expression profiles of a *CONSTANS* homologue *GmCOL11* in *Glycine max*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58 (5): 928 - 935.
- Jones D C, Wein M N, Oukka M, Hofstaetter J G, Glimcher M J, Glimcher L H. 2006. Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science*, 312 (5777): 1223 - 1227.
- Khanna R, Kronmiller B, Maszle D R, Coupland G, Holm M, Mizuno T, Wu S H. 2009. The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *The Plant Cell Online*, 21 (11): 3416 - 3420.
- Kim S K, Yun C H, Lee J H, Jang Y H, Park H Y, Kim J K. 2008. *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of FT like genes under SD conditions in rice. *Planta*, 228 (2): 355 - 365.
- Klug A, Schwabe J W. 1995. Protein motifs 5. zinc fingers. *The FASEB Journal*, 9 (8): 597 - 604.

- Kumagai T, Ito S, Nakamichi N, Niwa Y, Murakami M, Yamashino T, Mizuno T. 2008. The common function of a novel subfamily of B-box zinc finger proteins with reference to circadian associated events in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (6): 1539 – 1549.
- Liang H L, Nien C Y, Liu H Y, Metzstein M M, Kirov N, Rushlow C. 2008. The zinc finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature*, 456 (7220): 400 – 403.
- Lippuner V, Cyert M S, Gasser C S. 1996. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild type yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (22): 12859 – 12866.
- Liu Yan, Xin Li-jing, Li Jun-hua, Dai Shao-jun. 2012. Rice B-box zinc finger protein *OSBBX25* is involved in the abiotic response. *Chinese Bulletin of Botany*, 47 (4): 366 – 378. (in Chinese)
- 刘 焱, 邢立静, 李俊华, 戴绍军. 2012. 水稻含有 B-box 锌指结构域的 *OsBBX25* 蛋白参与植物对非生物胁迫的响应. *植物学报*, 47 (4): 366 – 378.
- 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.
- Lu Ying, Liu Yan-hua, Ren min, Mu Jian-min, Zhang Xing-wei, Sun Yu-he, Wang Zhi-de. 2013. Molecular cloning and analysis of a *CONSTANS* homolog from *Nicotiana tabacum*. *Chinese Tobacco Science*, (3): 15. (in Chinese)
- 陆 莹, 刘艳华, 任 民, 牟建民, 张兴伟, 孙玉合, 王志德. 2013. 烟草 *CONSTANS* 同源基因的克隆与分析. *中国烟草科学*, (3): 15.
- Ma Jin-hua. 2010. Clone and time-space expression analysis of *GmCOL* genes [M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Henan Agriculture University. (in Chinese)
- 马锦花. 2010. *GmCOLs* 基因的克隆与时空表达分析 [硕士论文]. 郑州: 河南农业大学.
- Mas P. 2008. Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: Time beyond transcription. *Trends in Cell Biology*, 18 (6): 273 – 281.
- Mazauric M H, Dirick L, Purushothaman S K, Björk G R, Lapeyre B. 2010. Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (24): 18505 – 18515.
- Miller J, McLachlan A D, Klug A. 1985. Epitopic zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO Journal*, 4 (6): 1609.
- Morellet N, Meudal H, Bouaziz S, Roques B X. 2006. Structure of the zinc finger domain encompassing residues 13 – 51 of the nucleocapsid protein from simian immunodeficiency virus. *Biochem J*, 393: 725 – 732.
- Nagaoka S, Takano T. 2003. Salt tolerance related protein *STO* binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 54 (391): 2231 – 2237.
- Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, Yano M, Ogihara Y. 2003. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *The Plant Journal*, 36 (1): 82 – 93.
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80 (6): 847 – 857.
- Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Keddie J, Adam L, Yu G L. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: Genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105 – 2110.
- Robson F, Costa M M R, Hepworth S R, Vizir I, Reeves P H, Putterill J, Coupland G. 2001. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *The Plant Journal*, 28 (6): 619 – 631.
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M. 2000. Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc finger protein gene family under water stress. *Gene*, 248 (1): 23 – 32.
- Wang Xiao-li, Liu Xiao-xia, Yang Yi-cheng, Chen Wei, Li Wan-chen, Wu Jia-hai. 2010. Cloning and analysis of *CONSTANS* gene from tall fescue, photoperiodic regulation gene. *Molecular Plant Breeding*, (1): 45 – 52. (in Chinese)
- 王小利, 刘晓霞, 杨义成, 陈 伟, 李晚忱, 吴佳海. 2010. 高羊茅光周期调控基因 *CONSTANS* 的克隆与分析. *分子植物育种*, (1): 45 – 52.
- Zhang Qing-zhe, Ma Jin-hua, Chen Xin-jian, Fu Yong-fu. 2010. Cloning and analysis of *GmCOL4* gene in *Glycine max* L. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (4): 539 – 548. (in Chinese)
- 张清哲, 马锦花, 陈新建, 傅永福. 2010. 大豆 *GmCOL4* 基因的克隆与分析. *作物学报*, 36 (4): 539 – 548.
- Zobell O, Coupland G, Reiss B. 2005. The family of *CONSTANS-Like* genes in *Physcomitrella patens*. *Plant Biology*, 7 (3): 266 – 275.