

枣转录因子 *ERF* 3'端序列克隆及生物信息学分析

陈莹莹¹, 苑 赞¹, 赵 锦², 刘孟军¹

(1. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以枣为试材,根据 GenBank 中登录的苹果、拟南芥等植物 *ERF* 保守序列设计引物,采用同源克隆法克隆出该基因 3'端序列并对其编码的蛋白进行了生物信息学分析。结果表明:该试验克隆获得 1 条长度为 959 bp 的条带;经过序列分析,该序列包含典型的 AP2/EREBP 保守结构域,与桑树、欧洲山毛榉和欧洲栗 *ERF* 基因序列相似度分别为 79%、78%、77%;系统进化树分析显示,枣的 *ZjERF* 与可可树、陆地棉和海岛棉的 AP2/EREBP 亲缘关系较近,属于 *ERF* 家族的 B2 亚群;此外,还用 Swiss Model 程序(<http://au.expasy.org/tools/>)预测了 *ZjERF* 基因编码蛋白的三维结构。

关键词:枣; *ZjERF*; 3'端序列克隆; 生物信息学分析

中图分类号:Q 785; S 665 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0093-05

AP2/EREBP 转录因子在植物的生长、发育以及多种生理生化反应的信号转导中发挥重要的作用,分为 5 个分支: *DREB*、*ERF*、*AP2*、*RAV* 和其它类别^[1]。近年来已经从拟南芥^[2]、烟草^[3]、番茄^[4]、大豆^[5]等植物中分离出了 AP2/EREBP 类转录因子。参与植物发育的 AP2/EREBP 蛋白,如 AP2 主要参与花器官特性的特化,花分生组织特性的确立以及对花分生组织不确定性的抑制和胚珠与种皮的发育^[6]。而且还发现 AP2 对种子的质量有调控作用^[7]。另外, *ERF* 类蛋白也参与调节植物的生长发育。Shen 等^[8]利用酵母单杂交方法从水稻中克隆的 *ERF* 类蛋白 *O₂EBP-89* 基因在胚乳、维管束韧皮部有表达,在靠近茎节和居间分生组织部分表达水

平比较高。在植物体中, *ERF* 能够受到病原菌的诱导表达,并且在转录因子基因超表达时,不仅能够提高转基因植物对病原真菌的抗性,还能提高其抗病毒以及抗菌的能力^[9-11],超表达 *GbERF2* 转录因子,增强了转基因烟草对假单胞菌的抗性^[12];转基因辣椒中 *Tsi1* 基因的异位表达增强了辣椒对病毒和细菌的抗性^[13]。

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是我国特色优势果树和第一大干果树种,目前还没有枣树 AP2/EREBP 基因的报道。枣疯病(Jujube witches' broom)是由植原体引起的,是在枣树生产上发生最普遍、危害最严重的传染性病害^[14-15]。课题组前期构建了高抗枣疯病品种‘星光’在植原体胁迫下的 SSH 文库,获得了一条 AP2/EREBP 同源片段^[16],在此基础上,该试验利用同源序列克隆方法,进行该基因的 3'端序列克隆,并通过生物信息学方法分析该基因的序列特征,以期为今后深入研究 *ERF* 在枣生长发育中的功能提供数据参考,同时也为枣抗逆分子育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自河北省赞皇县试验点,品种为该课题组选育品种‘星光’,采样时间为 2013 年 6 月。在田间采

第一作者简介:陈莹莹(1987-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为果树活性物质与功能性食品。E-mail: wanying-1202@163.com.

责任作者:刘孟军(1965-),男,河北保定人,博士,教授,研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: lmj1234567@aliyun.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2013BAD14B030106);河北省科技支撑计划资助项目(11230606D-6)。

收稿日期:2014-07-16

Abstract: Taking the resistant lines ‘WMR-29’ and the susceptible strain ‘Jiashi’ (JS), ‘Queen’ (HH) of the backcross population as experiment materials. The location of *Podosphaera xanthii* race 1 resistance gene was performed by BSA (Bulked Segregation Analysis) and linked SSR (Simple Sequence Repeat) makers technology. The results showed that the resistance gene to powdery mildew in melon ‘WMR-29’ strains was controlled by two dominant genes, and it was located on LGII, LGIII, and also found one marker was linked to powdery mildew resistant gene of melon.

Keywords: melon; ‘WMR-29’; powdery mildew; SSR

集新鲜的叶片后迅速放入冰盒,带回实验室-80℃保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 利用天根公司 RNA 提取试剂盒 DP441 提取供试材料的总 RNA, -80℃保存,通过 Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000C 和琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和纯度。按照 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix AT301 说明合成 cDNA 第 1 链。

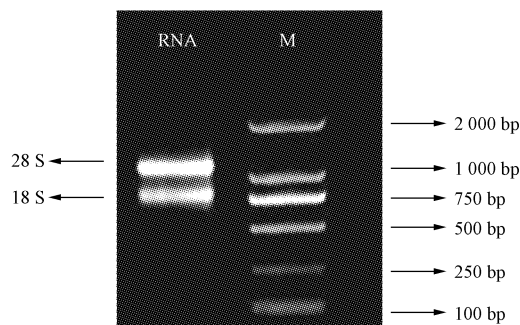
1.2.2 枣 *ZjERF* 基因的克隆 根据 NCBI 公布的与枣已知中间片段同源性较高的 AP2/EREBP 序列保守区,运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 erf-s:5'-GGCTC-TACAAATGTGAAGTCTGTG-3'; erf-a:5'-GAGGGAT-TCAAACTCAC TAAACATG-3'。PCR 反应体系为: cDNA 1.0 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 4.0 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, Buffer (10 ×) 5 μL, *Taq* 酶 0.25 μL 和 ddH₂O 33.75 μL。反应程序为 95℃ 5 min; 95℃ 40 s, 53℃ 50 s, 72℃ 2 min, 40 个循环; 72℃ 10 min。将克隆获得的产物切胶回收,与 pMD19-T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5α,在含有 Ampicillin 抗性的固体 LB 培养基上 37℃ 过夜培养,挑取单菌落,在 Ampicillin 抗性的液体 LB 培养基上 37℃ 摇菌 6 h,经菌液 PCR 验证后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 枣 *ZjERF* 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 网站的 BLASTX 程序和 DNAMAN 软件进行同源序列比对;用 ORF Finder 在线分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 寻找开放阅读框;用 BioXM2.6 预测氨基酸序列;用 Inter ProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)进行蛋白保守域预测;利用 SWISS-MODEL 在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质三维结构预测;利用 MEGA 5 软件进行系统进化树分析。

2 结果与分析

2.1 枣叶片总 RNA 的提取

将提取的枣叶总 RNA 用紫外分光光度计检测,结果表明,其 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间,用 1% 琼脂糖电泳进行检测(图 1),获得的 RNA 中 28S rRNA 和 18S rRNA 2 条带清晰完整,基本无拖尾,说明该试验所提取获得的 RNA 较完整、无降解。说明 RNA 的含量和纯度可以满足后续试验要求。



注:M 为 DL 2 000 marker 分子量标准,下同。

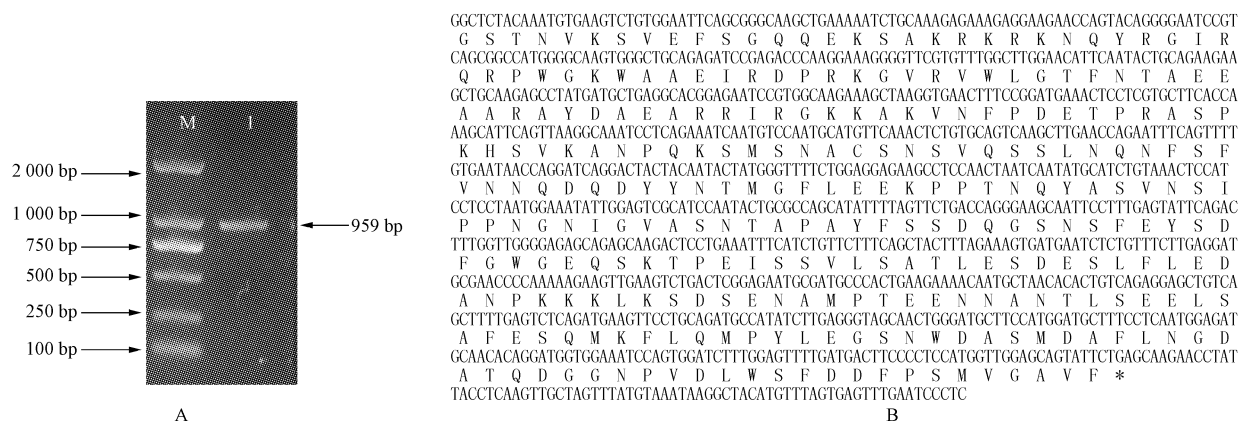
Note: M; DL 2 000 marker, the same below.

图 1 提取 RNA 的电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis result of extracted RNA

2.2 枣 *ZjERF* 基因克隆

以前期 SSH 文库获得的枣 *ERF* 基因片段,根据桑 (*Morus alba*, GQ162103.1)、水青冈 (*Fagus sylvatica*, AJ606475.1)、欧洲栗 (*Castanea sativa*, JF755969.1) 的 *ERF* 序列设计简并 5' 引物,根据枣 *ERF* 已知片段设计特异的 3' 引物,克隆转化测序后和已知片段拼接得到 959 bp 的序列,根据拼接序列设计两端引物 erf-s 和 erf-a,以枣 cDNA 进行扩增并测序,结果如图 2。经 NCBI-BLAST 比对发现和桑 *ERF* 基因(GQ162103.1)序列相似度为 79%,初步证明获得序列为枣 *ERF* 基因序列,命名为 *ZjERF*。



注:A 是 *ERF* 基因的 RT-PCR 产物电泳图谱;A1:RT-PCR 扩增产物;B:*ERF* 基因推断的氨基酸序列。

Note: A; Electrophotogram of RT-PCR products of *ERF*; A1; Amplification products by RT-PCR; B; the deduced amino acid sequence of *ERF*.

图 2 枣 *ERF* 基因编码区扩增结果和推测的氨基酸序列

Fig. 2 Electrophoresis result of CDS and deduced amino acid sequence of *ZjERF*

2.3 枣 *ZjERF* 基因的生物信息学分析

利用 InterProScan 进行保守结构域的预测,由图 3 可知,*ZjERF* 包含 AP2/ERF 结构域和 DNA 结合位点,进一步表明获得序列为枣的 *ERF*/AP2 基因。通过 SWISS-MODEL 对 *ZjERF* 的氨基酸序列三级结构进行了预测,由图 4 可知,*ZjERF* 含有典型 AP2/EREBP 类

转录因子的 DNA 结合区,有 3 个反向平行的 β 折叠和 1 个 α 螺旋,其中 3 个反向平行的 β 折叠对于识别及结合各类顺式作用元件起关键作用。

从 GenBank 数据库中下载不同类型的 *ERF* 氨基酸序列与枣 *ZjERF* 推导的氨基酸序列进行了保守序列的比对,从图 5 可以看出,该试验所获得的枣 *ZjERF* 含有

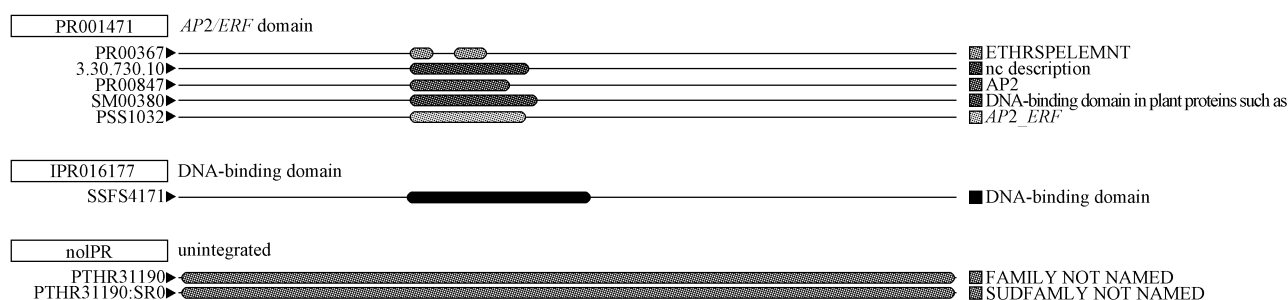
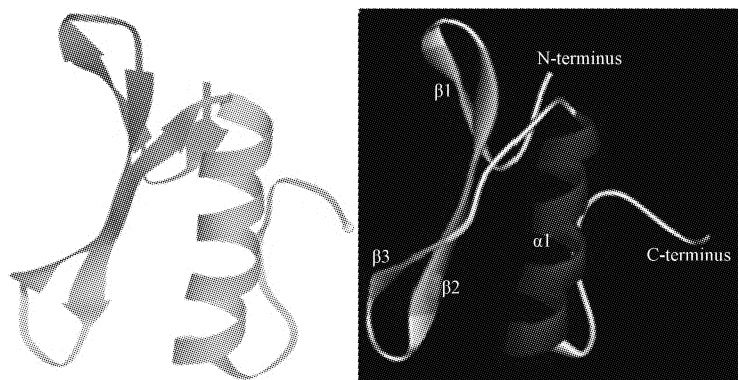


图 3 *ZjERF* 蛋白保守结构域预测

Fig. 3 Prediction of conserved domains of *ZjERF* protein

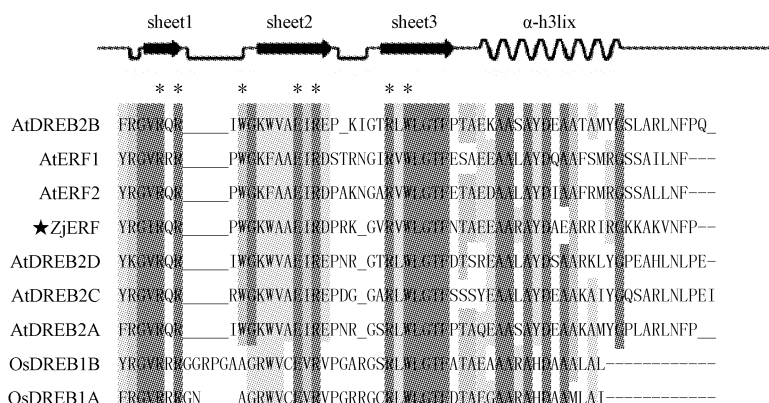


注:左图为 *ZjERF* 蛋白三级结构,右图为水稻 AP2 蛋白级结构模型。

Note: Left figure is protein tertiary structure of *ZjERF*, right figure is protein tertiary structure of rice AP2.

图 4 *ZjERF* 同源建模

Fig. 4 *ZjERF* homology modeling



注:3 个 β 片层,3 个 β 转角和 α 螺旋在顶部表示,与 DNA 结合的氨基酸残基用星号表示。

Note: Three β sheet, three β turn and an α helix were shown on the top, DNA-binding amino acid residues indicated with asterisk. AtDREB2A (O82132), AtDREB2B (BAA36706), AtDREB2C (Q8LFR2), AtDREB2D (Q9LQZ2), AtERF1 (NP_188965), AtERF2 (AAM64544), OsDREB1A (AAN02486), OsDREB1B (AAN02488).

图 5 *ZjERF* 蛋白保守域序列与其它植物 AP2 类转录因子保守域序列比

Fig. 5 Comparison of the conserved domains sequence of *ZjERF* with AP2 transcription factor from other species

AP2/EREBP 类转录因子特有的约 60 个氨基酸残基组成的 3 个平行 β 折叠和 1 个双亲性的 α -螺旋。

利用 MEGA 5.0 软件最大似然法,将 *ZjERF* 预测氨基酸序列与 GenBank 上登录的不同物种的 *ERF* 进行系统进化树分析,图 6 表明,枣 *ZjERF* 与可可树(*JERF1*,

EOY27368.1)、陆地棉(*GhERF2*, *AAX07458.2*)、海岛棉(*GbERF*, *AAT77192.1*) *ERF* 蛋白的亲缘关系较近,属于植物 *ERF* 转录因子家族的 B2 亚群,这一亚群的基因在植物逆境胁迫反应中起着重要作用^[17]。

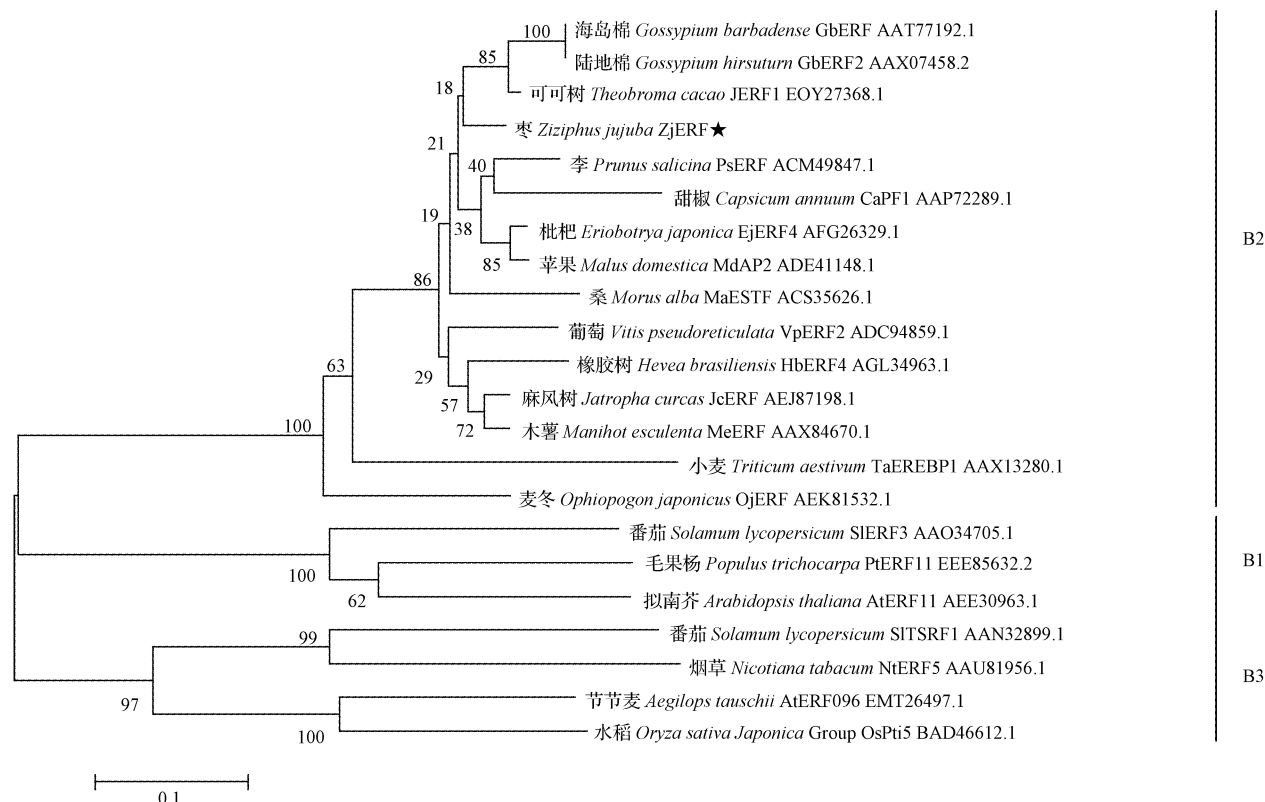


图 6 *ZjERF* 与其它植物 *ERF* 蛋白的系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of *ZjERF* and *ERF* protein from other species

3 讨论

该课题组前期从植原体胁迫下的抗病品种 SSH 文库中得到了一条枣 *ERF* 的 EST 序列,证明其与植原体的胁迫相关,在此基础上,该研究采用同源序列克隆法,首次获得了长度为 959 bp 的枣 *ERF* 基因片段包含编码区的 3'端,命名为 *ZjERF*。该基因编码的蛋白质含有一个保守的 AP2/*ERF* 结构域,属于 AP2/*EREBP* 家族的 *ERF* 亚家族转录因子。同源比对发现,*ZjERF* 的 AP2/*ERF* 保守域序列与其它 *ERF* 转录因子的 AP2/*ERF* 保守域序列具有较高的一致性,该研究以包括 *ZjERF* 在内的 22 个物种的蛋白质氨基酸序列构建系统进化树,结果发现,该基因属于 *ERF* 亚家族的 B2 亚群并且进化具有一定的种属特性。

当受到病原胁迫时,植物产生感应信号,通过一系列复杂途径传递到转录因子并将其激活,通过转录因子与启动子相结合启动靶基因的转录表达,进而做出防御应答,使植株表现出抗病性。抗病应答过程中,转录因

子起着枢纽作用^[18],一方面调控下游基因的转录,另一方面参与植物抗病信号传递。*ERF* 类转录因子是植物特有的而且与细胞的发育、抗病、低温及高盐、干旱等信号传递有关。当 *ERF* 超表达时可与 CRT/DRE 元件结合,提高植株的抗逆性^[19],例如小麦 *TiERF1* 基因过量表达可以增强对纹枯病菌抗性^[20],茶树 *ERF* 基因受低温、乙烯、脱水、NaCl 等上调表达^[21]。Park 等^[22] 研究表明,*ERF* 类转录因子是 ET 和 JA 信号途径中的下游成分,而且在 2 个防卫反应基因调控信号途径交织点处起着重要的作用。另外 *ERF* 基因对疾病相关刺激,如乙烯、茉莉酸、水杨酸和致命与弱毒性病原菌等信号都有响应^[23]。所以,该研究率先开展枣 *ZjERF* 基因的克隆及分析,为下一步深入研究该基因的功能及转基因育种提供了基础数据和可靠的参考。

参考文献

- [1] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-Binding specificity of the ERFAP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression[J]. Biochemical and Biophysical

Research Communications, 2002, 290(3):998-1009.

[2] Jofuku K D, Den Boer B G, van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2[J]. The Plant Cell Online, 1994, 6(9):1211-1225.

[3] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. The Plant Cell Online, 1995, 7(2):173-182.

[4] Gu Y Q, Wildermuth M C, Chakravarthy S, et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell Online, 2002, 14(4):817-831.

[5] Zhang G, Chen M, Chen X, et al. Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2):809-818.

[6] Okumuro J K, Caster B, Villarroel R, et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(13):7076-7081.

[7] Ohto M, Fischer R L, Goldberg R B, et al. Control of seed mass by APETALA2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(8):3123-3128.

[8] Shen H, Wang Z Y. Expressional analysis of an EREBP transcription factor gene OsEBP-89 in rice[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2004, 36(1):21-26.

[9] Zhang G, Chen M, Li L, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(13):3781-3796.

[10] Zhou J, Zhang H, Yang Y, et al. Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(3):645-652.

[11] Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several

necrotrophic fungi[J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2002, 29(1):23-32.

[12] Zuo K J, Qin J, Zhao J Y, et al. Over-expression *GbERF2* transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes[J]. Gene, 2007, 391(1-2):80-90.

[13] Shin R, Park J M, An J M, et al. Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2002, 15(10):983-989.

[14] 周俊义, 刘孟军, 侯保林. 枣疯病研究进展[J]. 果树科学, 1998, 15(4):354-359.

[15] 刘孟军, 赵锦, 周俊义. 枣疯病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.

[16] 王洋. 植原体胁迫下枣 SSH 文库的构建及表达序列标签分析[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2012.

[17] 庄静. 大白菜和甘蓝型油菜 AP2/ERF 家族转录因子的克隆与分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.

[18] 金慧, 栾雨时. 转录因子在植物抗病基因工程中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10):99-104.

[19] Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41):26857-26861.

[20] Chen X, Guo Z. Tobacco OPBP1 enhances salt tolerance and disease resistance of transgenic rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(12):2601-2613.

[21] 陈林波, 房超, 王郁, 等. 茶树抗逆相关基因 ERF 的克隆与表达特性分析[J]. 茶叶科学, 2011, 31(1):53-58.

[22] Park J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco [J]. Plant Cell, 2001, 13:1035-1046.

[23] 秦捷, 王武, 左开井, 等. AP2 基因家族的起源和棉花 AP2 转录因子在抗病中的作用[J]. 棉花学报, 2005, 17(6):366-370.

Cloning and Bioinformatic Analysis of the 3'-end of *ERF* Gene in *Ziziphus jujuba*

CHEN Ying-ying¹, YUAN Zan¹, ZHAO Jin², LIU Meng-jun¹

(1. Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001; 2. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking *Ziziphus jujuba* as material, the fragment of *ERF* gene contained 3'-end of *ZjERF* was first isolated by homologous gene cloning method on the basis of the homologous genes of *Malus domestica*, *Arabidopsis thaliana* and others in GenBank. The results showed that a 959 bp fragment was amplified. Conservation analysis of *ZjERF* showed that it had a typical zone of AP2/EREBP; similarity analysis showed that the protein had highly homologous to the *ZjERF* of *Morus alba*, *Fagus sylvatica* and *Castanea sativa* with homologous of 79%, 78% and 77% respectively; Phylogenetic analysis showed that *ERF* of species in jujube had a closer relationship with *Theobroma cacao*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense* and *ZjERF* belonged to B2 group of *ERF* family. Tertiary structure of *ZjERF* was speculated by Swiss Model program (<http://au.expasy.org/tools/>).

Keywords: *Ziziphus jujuba*; *ZjERF*; the 3'-end of *ZjERF* cloning; bioinformatic analysis