

番茄两个盐胁迫响应基因的 cDNA 克隆及其表达分析

杨荣超, 蔡玉静, 邓春婷, 欧阳波*, 叶志彪

(华中农业大学园艺林学学院, 华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心, 武汉 430070)

摘 要: 根据前期耐盐芯片研究提供的两条 EST 序列设计引物, 利用 RACE 技术从番茄耐盐品种 Edkawi 中克隆了其 5' 和 3' 片段, 并拼接成全长 cDNA, 分别命名为 *SISRG1* 和 *SISRG2*。两个基因序列在 GenBank 中的登录号为 EU670751 和 EU670752, 其大小分别为 1300 bp 和 1810 bp, 编码蛋白分别为 309 和 499 个氨基酸。半定量 RT-PCR 表明 *SISRG1* 在番茄茎、叶、花中表达较强, 在所检测的其它组织中表达很弱, *SISRG2* 在叶和花中表达量最高, 其次为茎和根, 在果实中表达微弱。盐胁迫表达谱结果显示 *SISRG1* 在盐处理的 Edkawi 中缓慢增强, *SISRG2* 则在盐胁迫后表达迅速增强, 在未进行盐胁迫的对照中, 两个基因的表达趋势均为减弱。本研究为番茄抗逆研究提供了新的候选基因资源。

关键词: 番茄; 耐盐; *SISRG1*; *SISRG2*; 基因表达

中图分类号: Q943.2; S641.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0178-05

Cloning of Two Salt-responsive Genes and Their Expression Analysis in Tomato

YANG Rong-Chao, CAI Yu-Jing, DENG Chun-Ting, OUYANG Bo*, YE Zhi-Biao

(College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University; National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Based on the ESTs derived from previous microarray results under salt stress, the full-length cDNAs of two salt-inducible genes (*SISRG1*, *SISRG2*) were isolated from a salt tolerant tomato cultivar, Edkawi, using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The accession numbers of *SISRG1* and *SISRG2* in GenBank are EU670751 and EU670752, respectively. The corresponding cDNAs are 1300 bp and 1810 bp in length and the deduced proteins contain 287 and 499 amino acids, respectively. Tissue expression profile analysis using semi-quantitative RT-PCR showed that *SISRG1* was expressed mainly in the stem, leaf and flower, while *SISRG2* was expressed at a very high level in the leaf and flower. Upon salt stress, *SISRG1* was induced slowly, while *SISRG2* was induced rapidly in Edkawi; however, the general trend of their expression in the untreated control was declining. These two genes are potential novel candidates for abiotic tolerance research in tomato.

Key words: Tomato; Salt tolerance; *SISRG1*; *SISRG2*; Gene expression

盐害是影响农作物生长、产量和品质的主要非生物逆境之一。植物在应对盐胁迫逆境的过程中, 能够诱导体内大量基因的表达和功能蛋白的积累, 这些功能蛋白主要包括转录因子、分子伴侣、渗透调节蛋白、离子通道蛋白、转运蛋白、抗氧化蛋白等^[1,2]。番茄在遇到盐胁迫时, 同样会诱导大量基因表达, 包括转录因子、热激蛋白、脱毒酶

类等多种类型的编码基因^[3,4]。在本实验室前期耐盐芯片研究中, 发现有大量的未知功能基因受盐胁迫诱导, 其中 RT-PCR 初步验证了两个未知基因^[3]。本研究根据这两个基因的 EST 序列设计 RACE 引物, 扩增得到 5' 和 3' 片段, 拼接成全长 cDNA, 并利用 RT-PCR 研究了其组织表达谱和盐胁迫表达谱。

收稿日期: 2010-05-21, 修回日期: 2010-07-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400299, 30771461)。

作者简介: 杨荣超 (1979 -), 男, 硕士, 从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: bouy@mail.hzau.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 植物材料

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 耐盐品种 Edkawi, 从番茄遗传资源中心 (Tomato Genetics Resource Center, TGRC) 获得; 盐敏感番茄品种中蔬 5 号 (ZS-5) 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

对于 cDNA 克隆和盐胁迫表达谱研究, 番茄采用水培, 苗龄 35 d 时进行 300 mmol/L NaCl 胁迫处理, 具体方法同 Ouyang 等^[3]。收集盐处理 0、0.25、0.5、1、2、6、12 和 24 h 的根组织, 液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱备用。

对于组织表达谱研究, Edkawi 植株种植于田间, 正常管理, 收集根、茎、叶、花、绿果和红熟果的组织样品, 保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 RACE 及全长 cDNA 拼接

根据番茄耐盐芯片分析所获得的 EST 序列设计 RACE 引物, 利用 RACE 扩增 5' 和 3' cDNA 片段。使用 TriZOL (Invitrogen 公司) 提取盐胁迫不同时期的根组织样品, 具体操作按产品说明书进行。总 RNA 用 DNase I 处理后, 等量混合, 分别取 1 μg 反转录为 5'-和 3'-RACE 第一链 cDNA 池, 操作按照 BD Biosciences Clontech 公司 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒说明书进行。

以获得的 5'-和 3'-RACE 第一链 cDNA 池为模板分别进行 5'-和 3'-RACE 扩增反应, 扩增 5'-和 3'-末端。RACE 的扩增体系 25 μL, 内含 1 × PCR buffer, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 2.5 μL BD's 通用混合引物 (Universal Primer Mix, UPM), 10 μmol/L 的基因特异引物 0.5 μL, 0.5 μL advantage 2 Taq 聚合酶 (Clontech 公司) 和 1 μL 200 倍稀释的 5'-和 3'-RACE 第一链 cDNA 池模板。引物 SISRG1-F 和 SISRG1-R 分别用于 *SISRG1* 的 3'-和 5'-RACE 扩增, 引物 SISRG2-F 和 SISRG2-R 分别用于 *SISRG2* 的 3'-和 5'-RACE 扩增 (表 1)。扩增反应为 94℃ 预变性 1 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。扩增产物用含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖胶分离, 特异扩增产物挖胶后用 EZ 柱 DNA 凝胶回收试剂盒 (BioBasic 公司) 回收, 克隆到 Takara 公司的 pMD 18-T 载体上。克隆产物转化大肠杆菌 DH5α, 重组克隆经菌落 PCR 验证

后送上海生工生物工程技术有限公司测序。全长 cDNA 由 5' 和 3' 端序列拼接成, CDS 区域通过设计全长基因特异引物利用高保真酶扩增并克隆和测序验证, 分别命名为 *SISRG1* 和 *SISRG2*。

表 1 各实验所用引物列表
Table 1 List of primers used in different experiments

引物名 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
SISRG1-F	TGTTCTCCTGCCCTGCTTC	3'-RACE, RT-PCR
SISRG1-R	TGGAGCTCTAACAGTTGCCCTATC	5'-RACE, RT-PCR
SISRG2-F	TCCGGGATGCCAAATGTAGG	3'-RACE, RT-PCR
SISRG2-R	CACAGCAAGCCCCAATACC	5'-RACE, RT-PCR
EF 1α-F	TGCTTGCTTTCACCCCTTGG	RT-PCR reference gene
EF 1α-R	TGGCAACGAGTTGGGTCTT	
Actin-F	AATGGAAGTGAATGGTCAAGGT	RT-PCR reference gene
Actin-R	TCCCATATCATCCAGTTGTCTAC	

1.3 盐胁迫表达谱分析

从耐盐番茄品种 Edkawi 和盐敏感品种 ZS-5 盐处理不同时间和未处理对照 (0、0.25、0.5、1、2、6、12、24 h) 的样品中提取总 RNA, 经 DNase I 处理后, 取 5 μg 用 Toyobo 公司的 ReverTra Ace 反转录酶进行反转录, 操作按产品说明书进行。RT-PCR 按照有关文献的方法进行^[3], *SISRG1* 的引物为 SISRG1-F 和 SISRG1-R, *SISRG2* 的引物为 SISRG2-F 和 SISRG2-R (表 1)。番茄延伸因子 1α 编码基因 (GenBank 登录号: X53043.1) 作为内参基因。RT-PCR 重复 3 次, 扩增产物用含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖胶分离, 凝胶成像系统照相。

1.4 组织表达谱分析

提取 Edkawi 根、茎、叶等各组织总 RNA, DNase I 处理后取 1 μg 进行反转录和 RT-PCR 分析, 方法同上。不同之处是内参基因为 β-actin 基因 (GenBank 登录号: U60478.1)。

1.5 序列分析

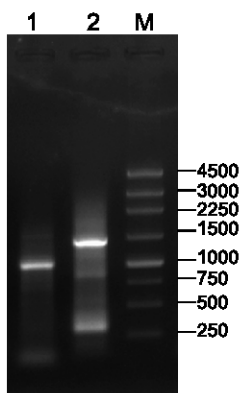
以拼接的 cDNA 序列为种子序列在番茄基因组数据库 (<http://solgenomics.net>) 中通过 BLAST 分析获取番茄基因组序列和启动子序列信息。通过 GenScan^[5] 和 Blast 2 sequences^[6] 分析基因组序列的外显子和内含子以及对氨基酸序列进行推导。利用 ExPASy 网站 (<http://expasy.org>) 的 pI/Mw 工具分析蛋白质基本理化性质, 通过 Motif Scan 和 Prosite 对 cDNA 序列所编码的蛋白质进行结构域搜索, 利用 WoLF PSORT^[7] 对蛋白质亚细胞定位进行预测。通过 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm>

nih.gov/BLAST)将基因所编码的氨基酸序列与其他物种进行同源性的比较。通过 PlantCARE^[8] 分析上游 1.5 kb 启动子区段顺式作用元件。

2 结果与分析

2.1 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的 cDNA 克隆

根据有关 EST 序列设计引物扩增得到其 5' 和 3' cDNA 片段 (图 1, 图 2)。克隆测序后拼接得到全长 cDNA 序列, 分别命名为 *SISRG1* 和 *SISRG2*。*SISRG1* 全长为 1300 bp, 包含 139 bp 的 5' 非翻译区和 231 bp 的 3' 非翻译区, 其开放读码框共编码 309 个氨基酸, GenBank 的登录号为 EU670751。*SISRG2* 全长为 1810 bp, 包含 65 bp 的 5' 端非翻译区和 178 bp 的 3' 端非翻译区, 共编码 499 个氨基酸, GenBank 的登录号为 EU670752。

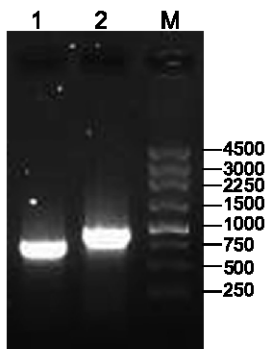


1: *SISRG1* 的 5'-RACE; 2: *SISRG2* 的 5'-RACE; 3: Takara 250 bp 分子量标记。

Lane 1: 5'-RACE for *SISRG1*; Lane 2: 5'-RACE for *SISRG2*; Lane 3: Takara 250 bp DNA ladder.

图 1 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的 5'-RACE 扩增

Fig. 1 5'-RACE of *SISRG1* and *SISRG2*



1: *SISRG1* 的 3'-RACE; 2: *SISRG2* 的 3'-RACE; 3: Takara 250 bp 分子量标记。

Lane 1: 3'-RACE for *SISRG1*; Lane 2: 3'-RACE for *SISRG2*; Lane 3: Takara 250 bp DNA ladder.

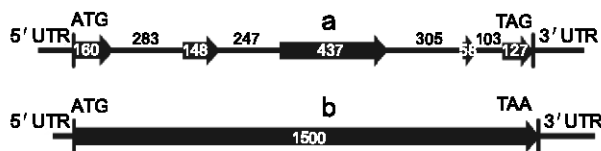
图 2 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的 3'-RACE 扩增

Fig. 2 3'-RACE of *SISRG1* and *SISRG2*

2.2 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的基因结构和启动子分析

以 *SISRG1* 的 cDNA 序列为种子, 搜索番茄基因组数据显示, 该 cDNA 与测序支架 04007 (scaffold04007) (The International Tomato Genome Sequencing Consortium) 以及 BAC 克隆序列 C03HBa0159C06.1 和 C03HBa0121O11.1 相匹配, 表明该基因位于番茄第三染色体。cDNA 和基因组序列比对表明该基因含有 5 个外显子和 4 个内含子 (图 3:a)。从基因组序列中提取启动子区段, PlantCARE 分析 *SISRG1* 上游 1.5 kb 区段, 结果显示该启动子区域含有对 ABA 响应的 ABRE 元件 (TACGTG), 厌氧反应元件 ARE (TGTTT), 脱水胁迫诱导元件 MBS (TAACTG), 对防御和胁迫响应的富含 TC 重复元件 (GTTTCTTAC), 对水杨酸响应的 TCA 元件 (GAGAAGAATA), 这些元件均与抗逆有关。此外, *SISRG1* 的启动子区域还含有受生物钟调控的保守序列 (CAANNNNATC)。

以 *SISRG2* 的 cDNA 序列为种子检索番茄基因组, 发现该 cDNA 与测序支架 07309 (scaffold07309) 匹配。序列比对显示该基因没有内含子 (图 3:b)。PlantCARE 分析显示该基因上游 1.5 kb 启动子区域含有 ABRE 元件、真菌诱导子诱导表达元件 W1 盒 (TTGACC)、茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA 和 TGACG) 和热休克元件 HSE (AAAAAATTC 和 AGAAAATTCG), 以及富含 TC 重复元件等。



黑色箭头框表示外显子, 框内数字为外显子大小 (bp), 外显子之间的连线表示内含子, 其上的数字为内含子大小 (bp)。ATG 示起始密码子, *SISRG1* 和 *SISRG2* 的终止密码子分别为 TAG 和 TAA。

Exons are represented as black boxes. Numbers in boxes indicate exon size in base pairs (bp). Introns are shown as lines linking exons and their sizes are shown in base pairs. The start codon is shown as ATG, and stop codon is TAG for *SISRG1* and TAA for *SISRG2*.

图 3 *SISRG1* (a) 和 *SISRG2* (b) 的基因结构

Fig. 3 Gene structure of *SISRG1* (a) and *SISRG2* (b)

2.3 *SISRG1* 和 *SISRG2* 蛋白质序列分析

SISRG1 基因编码蛋白质的预测分子量为 33.67 kD, 等电点为 8.46。结构域分析表明氨基酸序列中 108-143 处有一个 TIFY 结构域 (KEP-

KAAQLTMFYDGKIVFDDFPADKARAVM LLASK)^[9], 可能与花发育有关。另外, 该蛋白中含有多个磷酸化位点。BLAST 分析显示 *SISRG1* 与数据库中的蛋白同源性都比较低, 为功能未知的蛋白。WoLF PSORT 预测该蛋白定位于细胞核。

SISRG2 基因编码蛋白质的分子量为 57.2 kD, 等电点为 6.33。结构域分析表明, *SISRG2* 在 439.446 位点处存在一个磷脂酶 A2 组氨酸活性位点 (Phospholipase A2 histidine active site, PA2_HIS), 同时 *SISRG2* 中含有若干磷酸化位点。通过氨基酸序列比对结果表明, 该蛋白与阿拉比卡咖啡 (*Coffea arabica*) 的未知蛋白 R111 (GenBank acc: ABC86705.1) 的同源性达到 66%, 另与蓖麻 (*Ricinus communis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、白杨 (*Populus trichocarpa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 等众多物种的未知蛋白同源性均较高。蛋白亚细胞定位预测表明该蛋白定位于细胞核。

2.4 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的组织表达谱分析

通过半定量 RT-PCR 方法分析各基因分别在根、茎、叶、花、幼果、成熟果实中的表达, 结果表明, *SISRG1* 在茎、叶、花特别是花中表达强, 在其他器官中表达量低。*SISRG2* 在叶和花中表达很强, 其次是根和茎, 在果实中表达弱 (图 4)。

2.5 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的盐胁迫表达谱

RT-PCR 分析 *SISRG1* 和 *SISRG2* 在盐胁迫条件下 7 个时间点的表达结果显示, *SISRG1* 在 Edkawi 盐胁迫处理 0~6 h 中表达缓慢增强, 6 h 后基本稳定, 该基因在盐胁迫处理的 ZS-5 中的表达基本上表现出增强—减弱—再增强的趋势。*SISRG1*

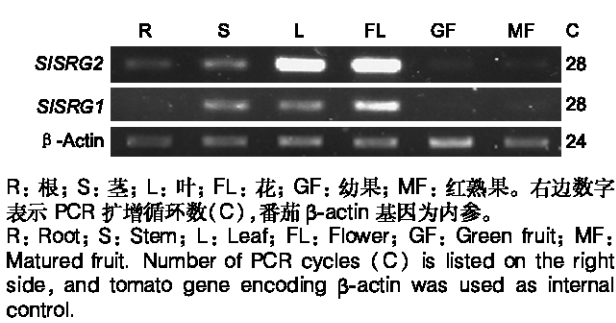


图 4 *SISRG1* 和 *SISRG2* 的组织表达谱分析
Fig. 4 Tissue expression profile of *SISRG1* and *SISRG2*

在 Edkawi 和 ZS-5 无盐胁迫对照中均表现为逐渐减弱。与 *SISRG1* 不同, *SISRG2* 在盐胁迫处理的 Edkawi 中诱导很快, 在 15 min 内就有明显增强, 而在盐胁迫的 ZS-5 中该基因表达没有增强的趋势。在两个品种的未处理对照中, 二者的趋势类似即表达均缓慢下调 (图 5)。

3 讨论

本研究中, 我们从耐盐番茄品种 Edkawi 上克隆了 2 个盐胁迫响应基因的全长 cDNA, 分别命名为 *SISRG1* 和 *SISRG2*, 并对它们进行了组织表达谱和盐胁迫诱导表达谱分析。

分析表明 *SISRG1* 和 *SISRG2* 均为功能未知基因。*SISRG1* 与 GenBank 中的核酸序列同源性低, 而 *SISRG2* 与一批来自不同物种的基因序列同源性都较高, 但这些基因均为未知功能基因。*SISRG1* 和 *SISRG2* 仅在耐盐番茄品种 Edkawi 均表现为盐胁迫诱导表达, 但二者在未胁迫的对照中基本表现为减弱 (图 5), 说明其调控不仅仅受盐胁迫的影响, 还可能与厌氧胁迫、生物钟等多种因素有关, 启动子

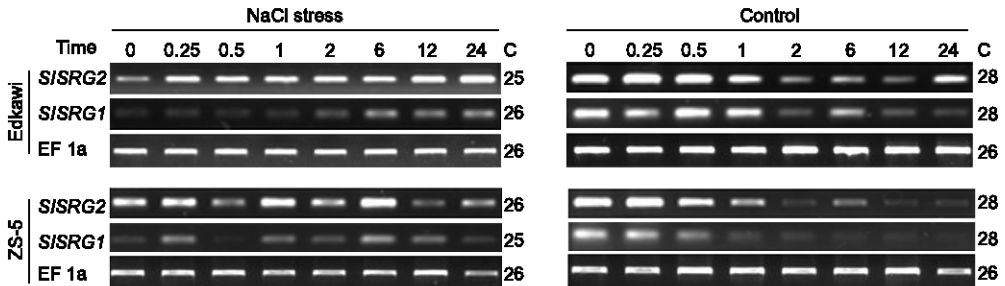


图 5 *SISRG1* 和 *SISRG2* 在 300 mmol/L 盐胁迫的 Edkawi 和 ZS-5 的表达分析
The number on the top indicates different time points (h) after treatment. Number of PCR cycles (C) is listed on the right side. Tomato gene encoding elongation factor 1 α was used as internal control.

图 5 *SISRG1* 和 *SISRG2* 在 300 mmol/L 盐胁迫的 Edkawi 和 ZS-5 的表达分析
Fig. 5 Expression of *SISRG1* and *SISRG2* in Edkawi and ZS-5 upon 300 mmol/L salt stress

分析表明两个基因的启动子区域含有众多的不同调节元件。

从 *SISRG1* 预测的编码蛋白来看,该蛋白含有一个 TIFY 结构域。含有该结构域的拟南芥蛋白 TIFY1 与植物花发育有关^[10,11],最近研究表明 TIFY 结构域在 JA 信号传导中具有重要作用^[12]。研究表明 TIFY 类基因直接参与植物抗逆过程,水稻中的 20 个 TIFY 类基因表达受干旱、盐胁迫、低温等逆境中的一种或者多种诱导,超表达其中的 *OsTIFY11a* 使水稻抗旱和耐盐能力增强^[13]。本研究中的 *SISRG1* 含有该结构域并且在耐盐番茄品种 Edkawi 中表现为受盐胁迫诱导,其启动子也包括 ABRE 等众多与抗逆有关的元件,其中 ABRE 对干旱、高盐和 ABA 都有响应^[14],可以推测这个基因在番茄抗非生物逆境中可能具有重要作用。

序列分析表明 *SISRG2* 与众多其他植物中的未知蛋白同源程度较高,表明其在植物中可能比较保守。通过 Geneinvestigator (<http://www.geneinvestigator.ethz.ch>) 的芯片数据可以看出,与 *SISRG2* 同源的拟南芥基因 AT5G12010 其表达受干旱、低温、盐胁迫等诱导;而通过拟南芥盐敏感突变体 *sos3* 的基因表达分析也表明 AT5G12010 与盐胁迫相关^[15]。*SISRG2* 的启动子区段也含有 ABRE 等抗逆有关的元件,这与其表达在耐盐品种中受盐胁迫诱导是一致的。这些均表明 *SISRG2* 可能与番茄的抗逆有关。目前,这两个基因的进一步生物学功能鉴定正在进行之中。

参考文献:

- [1] Jiang Y, Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 25.
- [2] Jiang Y, Yang B, Harris N S, Deyholos M K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3591–3607.
- [3] Ouyang B, Yang T, Li H, Zhang L, Zhang Y, Zhang J, Fei Z, Ye Z. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 507–520.
- [4] Chen S, Gollop N, Heuer B. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous ap-

plication of glycinebetaine [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60: 2005–2019.

- [5] Burge C, Karlin S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA [J]. *J Mol Bio*, 1997, 268: 78–94.
- [6] Tatusova T A, Madden T L. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 174: 247–250.
- [7] Horton P, Park K J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C J, Nakai K. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W585–587.
- [8] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325–327.
- [9] Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G. The tify family previously known as ZIM [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12: 239–244.
- [10] Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T. Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 1402–1409.
- [11] Shikata M, Matsuda Y, Ando K, Nishii A, Takemura M, Yokota A, Kohchi T. Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 631–639.
- [12] Chung H S, Howe G A. A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 131–145.
- [13] Ye H, Du H, Tang N, Li X, Xiong L. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71: 291–305.
- [14] Yoshihiro N, Kazuo N, Zabta K S, Yoh S, Takashi F, Hiroshi A, Mari N, Kazuo S, Kazuko Y S. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses [J]. *Plant J*, 2003, 34: 137–148.
- [15] Gong Z, Koiwa H, Cushman M A, Ray A, Bufford D, Kore-eda S, Matsumoto T K, Zhu J, Cushman J C, Bressan R A, Hasegawa P M. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (*sos*) mutants [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 363–375.