

• 药材与资源 •

白桦 BpTRX 基因和启动子克隆及 H₂S 处理后的表达模式

王紫晴, 黄雅婷, 聂婷婷, 范桂枝*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 研究白桦硫氧还蛋白 (*Betula platyphylla* thioredoxin, BpTRX) 基因全长和启动子序列及其编码结构和性质, 揭示其在硫化氢(H₂S)处理下 BpTRX 的表达模式。方法 通过 PCR 手段克隆 BpTRX 基因, 应用染色体步移技术获得 BpTRX 启动子区序列, 并对 BpTRX 基因、启动子及其编码蛋白进行生物信息学分析, 构建 BpTRX 系统进化树。利用实时荧光定量 PCR 定量分析 BpTRX 基因在 H₂S 外源胁迫处理下的表达模式。结果 BpTRX 基因全长 351 bp, 编码了由 117 个氨基酸组成的蛋白。BpTRX 基因与蓖麻、大豆、苜蓿和葡萄 TRX-H 型蛋白亲缘关系紧密。获得的 BpTRX 启动子区序列为 873 bp, 包含了转录必备的元件以及大量的胁迫响应和激素响应元件等。结论 获得 BpTRX 基因的全长和部分启动子序列, BpTRX 基因对 H₂S 处理的响应趋势为双峰形式, 即先增加后降低、再增加再降低。

关键词: 白桦; 硫氧还蛋白; 硫化氢; 生物信息学分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0414-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.023

Cloning of BpTRX gene and promoter and expression pattern analysis under H₂S treatment in *Betula platyphylla*

WANG Zi-qing, HUANG Ya-ting, NIE Ting-ting, Fan Gui-zhi

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the full-length, promoter sequences and its coding structure and properties of thioredoxin (Trx) gene of *Betula platyphylla* (BpTRX), and reveal the expression pattern of BpTRX under H₂S treatment. **Methods** The BpTRX gene was cloned by PCR, and the promoter region sequences of BpTRX was obtained by using chromosome walking technique. The BpTRX gene, the promoter and its encoded protein were analyzed by bioinformatics software. The phylogenetic tree of BpTRX was constructed. The expression patterns of BpTRX gene under H₂S exogenous stress were analyzed by quantitative real-time PCR. **Results** The full-length of BpTRX gene is 351 bp, encoding 117 amino acids. The BpTRX gene was closely related to the TRX-H protein of castor bean, soybean, alfalfa and grape. The obtained BpTRX promoter region sequences are 873 bp, which contains the essential elements of transcription and a large number of stress response and hormone response elements. **Conclusion** The full length and partial promoter sequences of the BpTRX gene were obtained. The response trend of BpTRX gene to H₂S treatment was in the form of bimodal, which was first rises, then decreases, then rises and then declines.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; thioredoxin; hydrogen sulfide; bioinformatic analysis; quantitative real-time PCR

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是一类极小的, 相对分子质量为 12 000~14 000 的热稳定硫醇蛋白, 其作为二硫氧化还原酶, 广泛分布于包括植物、动物、酵母及细菌的各种生物体内, 并通过其氧化还原功能, 参与到各种生命进程的调控中^[1]。每个 TRX 蛋白都含有 1 个保守的氨基酸序列 CXXC (其中 X 表示可变残基), 该基序是 1 个具有氧化还原

活性的二硫键, 还原状态下, TRX 能够降低其靶蛋白中的二硫键数量。早期的研究表明, 在大肠杆菌中, TRX 作为氢载体参与了核糖核苷酸还原作用, 同时, TRX 蛋白可以为包含硫醇的抗氧化蛋白提供还原力, 进而参与氧化胁迫的调控作用。此外, TRX 能够直接减少靶蛋白的二硫键数量, 进而调控其活力^[1-2]。植物的 TRX 系统十分复杂, 其主要分为 f、

收稿日期: 2017-08-12

基金项目: 中央高校基本科研业务专项基金项目(2572015DY02); 黑龙江省自然科学基金资助项目(C2016005)

作者简介: 王紫晴(1996—), 女, 本科在读, 主要研究方向为植物基因工程。Tel: (0451)82191752 E-mail: wangziqing1001@126.com

*通信作者 范桂枝(1974—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为植物细胞工程。Tel: (0451)82191752 E-mail: gzf325@126.com

m、h、o、x 和 y 6 类, 定位于包括叶绿体, 线粒体、细胞质在内的多个区域^[3-4]。在叶绿体中, TRX 参与光合作用的碳同化过程, 调控三羧酸循环、C4 途径等; 在线粒体中, TRX 能够抑制凋亡信号调节激酶-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK-1) 的作用, 维持细胞氧化还原能力; 在细胞质中, TRX 能够促进细胞增殖、种子发芽时酶的活性^[5-7]。研究表明, 在干旱条件下, 小麦 *Triticum aestivum* L. TRX 超家族中 TaNRX 基因发生了 2 种等位变异, 说明干旱胁迫下 TRX 基因的表达受到调控^[8]。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 的研究中, NaCl、NaHCO₃、ABA、H₂O₂ 4 种胁迫处理下, TRXO1 过表达植株中根的伸长量与野生型相比有所增长, 且 Northern 杂交结果显示不同逆境处理下变化趋势不同^[9], 这些结果都说明了 TRX 系统参与并响应了各种胁迫反应的应答。此外, 在 TRX 与次生代谢产物积累研究中, 酵母双杂交实验证明, 怪柳 *Tamarix chinensis* Lour. 硫氧还蛋白基因能够与黄酮醇合酶互作, 这也说明了 TRX 基因同样参与了植物次生代谢产物的积累^[10]。白桦 *Betula platyphylla* Suk. 为桦木科 (Betulaceae) 桦木属植物, 分布广泛, 主要分布于北半球, 适应能力强, 是一种落叶乔木。其树皮呈灰白色, 可用于提取桦油, 木材在民间可用于制作器具^[11]。白桦的次生代谢产物主要包括三萜类、多酚类和黄酮类物质, 均具有抗菌、抗病毒、提高机体免疫力、抗肿瘤和抗 HIV 活性, 因此作为一种天然的药物而逐渐受到重视^[12-14]。

在拟南芥中, TRX-h 型在从发芽到幼苗的发育过程都起到重要调控作用, 并且参与了硫酸盐的吸收作用^[15]。因此, 本实验对白桦中拟南芥 TRX-h1 基因 (AT3G51030.1) 同源基因的编码区和启动子区进行了克隆, 获得了白桦 TRX 基因序列, 命名 BpTRX。并进行了一系列生物信息学分析, 同时对其在 H₂S 处理下的 BpTRX 基因表达量进行了测定。本实验室前期研究表明, 在胁迫处理条件下, 白桦悬浮细胞中次生代谢物含量增加, H₂S 处理可提高白桦悬浮细胞中多胺和次生代谢物含量, H₂S 与多胺共同处理可进一步促进次生代谢物的累积^[16]。但 TRX 的功能以及其与白桦次生代谢物的关系尚不明确, 本研究为揭示 BpTRX 基因的功能和其在 H₂S 胁迫下的作用奠定了分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 取材于东北林业

大学实验林场, 取白桦新鲜叶片, 液氮冻存后使用。

外源 H₂S 处理以白桦悬浮细胞为实验材料, 利用 NT 固体培养基进行白桦组培苗茎段愈伤组织的诱导, NT 固体培养基包括 0.1 mg/L 6-BA 和 0.01 mg/L TDZ, 20 g/L 蔗糖, 5.3 g/L 琼脂, pH 6.0~6.5。每 20~25 天继代 1 次, 多次继代后将松散愈伤组织接入不加琼脂的 NT 液体培养基中悬浮培养, 250 mL 摇瓶中盛有 90 mL 培养液, pH 5.5~6.0, 每瓶接种 4 g 鲜质量的愈伤组织, 每隔 15 d 继代 1 次, 培养温度为 25~27 °C, 光照强度为 2 000 lx, 每天光照 16 h, 摇床转速为 120 r/min。

将不同浓度的 H₂S 供体硫氢化钠添加到培养 8 d 的白桦悬浮细胞中, 使培养液终浓度为 0.1、0.5、1、5 mmol/L。分别在处理 3、6、12、24、48、96 h 后取材用于后续实验。对照组加入等体积无菌水, 每种处理 3 次重复。

1.2 试剂与载体

Primer star Taq 酶、凝胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒、Genome Walking Kit 染色体步移试剂盒购于宝生物工程 (大连) 有限公司, pEASY-T5 载体、Trans1-T1 感受态细胞, 购于北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司、扩增引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 BpTRX 基因编码区全长的克隆

以白桦新鲜叶片为材料, 用 CTAB 法提取白桦总 RNA^[17]。应用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。根据拟南芥 TRX1 基因 (AT3G51030.1) 使用本研究室前期获得的白桦转录组数据库 local blast 比对进而确定 TRX 基因序列 5' 和 3' UTR 区设计特异引物 (表 1)。以白桦叶片 cDNA 为模板, 进行基因编码区克隆 (PCR 扩增)。应用凝胶回收试剂盒对特异性扩增产物回收纯化, 纯化产物与 pEASY-T5 载体连接, 转化克隆进入 Trans1-T1 感受态细胞, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.4 BpTRX 基因启动子区序列的克隆

以白桦新鲜叶片作为材料, 应用 CTAB 法提取总 DNA^[18], 对 BpTRX 基因上游启动子区, 以白桦叶片的 DNA 为模版, 应用染色体步移方法进行 PCR 扩增, 设计 3 个下游引物 (表 2) 与试剂盒中的 AP 随机引物配对, 通过 3 次巢式 PCR 反应, 应用凝胶回收试剂盒对第 3 轮扩增产物回收纯化, 纯化产物

表 1 克隆 BpTRX 基因编码区对应引物

Table 1 Primer sequences used for gene BpTRX cloning

引物名称	引物序列
BpTRX-F	5'-CAAATGGGTGACTTGATGGTAAAT-3'
BpTRX-R	5'-CATAACCGCACGCTGTTTCG-3'

表 2 克隆 BpTRX 基因启动子对应引物

Table 2 Primer sequences used for promoters of gene BpTRX cloning

引物名称	引物序列
BpTRX-SP1	5'-CACCAGTTTCTTGACTCGTTTTTC-3'
BpTRX-SP2	5'-CCGCCATTTTCTCTGATTCC-3'
BpTRX-SP3	5'-CGACATTACCATCAAGTCACCC-3'

与 pEAZY-T5 载体连接, 转化克隆进入 Trans1-T1 感受态细胞, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 BpTRX 基因编码区和启动子序列的生物信息学分析

用 DNAMAN 软件, 分析所获得的 BpTRX 基因的核苷酸序列, 并推测氨基酸序列^[19]。通过在线分析工具 GENSCAN^[20], 分析 BpTRX 基因的核苷酸序列; 在线软件 Protparam 分析 BpTRX 蛋白的理化性质^[21]; 在线软件 ProtScale 中的 Kyte and Doolittle 算法分析 BpTRX 蛋白亲疏水性^[22]; TMPred 预测跨膜结构^[23]; COILS 在线预测 BpTRX 蛋白卷曲螺旋^[24]; 在线工具 wolf psort 分析 BpTRX 蛋白的亚细胞定位^[25]; GOR4 分析 BpTRX 蛋白的二级结构^[26]; NCBI 数据库 Conserved Domain Search Service (CD Search) 在线分析软件分析 BpTRX 的保守结构域^[27]; NCBI 数据库 Blastp 对 BpTRX 基因序列以及推测的编码蛋白进行同源序列比对, 搜索不同物种中的同源基因及蛋白^[28]; 利用 MEGA 5.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 算法构建系统发育进化树^[29-30]。

利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 BpTRX 基因启动子序列^[31]。

1.6 BpTRX 基因在 H₂S 胁迫处理下的表达分析

以白桦微管蛋白基因 (tubulin, Tu) 作为内参基因^[32], 引物见表 3。PCR 反应体系如下: 模板 cDNA 2 μ L, Master Mix 10 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 用 ddH₂O 补足至总体积 20 μ L。利用 Applied Biosystems7500 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应程

表 3 实时荧光定量 PCR 采用的引物序列

Table 3 Primers for quantitative real-time PCR

引物名称	引物序列
Tu-F	5'-TCAACCGCCTTGCTCTCAGG-3'
Tu-R	5'-TGGCTCGAATGCACTGTTGG-3'
qBpTRX-F	5'-TTGCTAAGAAGACGCCCGATG-3'
qBpTRX-R	5'-CCCAATCCTCAGCCACAGA-3'

序: 95 $^{\circ}$ C、30 s; 95 $^{\circ}$ C、5 s; 60 $^{\circ}$ C、34 s (共 40 个循环); 95 $^{\circ}$ C、15 s; 60 $^{\circ}$ C、1 min; 95 $^{\circ}$ C、15 s。每份样品重复 3 次。目标基因表达水平运用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[32]。

2 结果与分析

2.1 BpTRX 基因编码区全长和启动子序列的鉴定

以白桦叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 连接 pEAZY-T5 载体, 转化克隆进入 Trans1-T1 感受态细胞并测序后, 获得了包含了部分 5' 和 3' UTR 区的 BpTRX 序列 561 bp, 通过与 NCBI 数据库 blastn 比对, 确定获得了 TRX 基因序列, 并命名 BpTRX。经过 ORF 分析, 获得的 BpTRX 基因编码区全长为 351 bp。经过比对, 与胡桃 *Juglans regia* L. 硫氧还蛋白 H 型核苷酸序列 (XM_018965535.1) 的一致性为 85%; 与蓖麻 *Ricinus communis* L. 硫氧还蛋白 H 型核苷酸序列 (XM_002510410.2) 的一致性为 83%; 与大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 硫氧还蛋白 H 型核苷酸序列 (XM_003527856.3) 的一致性为 80%。

通过 DNAMAN 软件分析和预测所获得的 BpTRX 基因编码区全长, 推测的氨基酸序列长度为 116 个氨基酸, 如图 1 所示。

2.2 BpTRX 蛋白质一级结构的分析

2.2.1 氨基酸序列理化性质分析 通过在线分析软件 Protparam 分析 BpTRX 基因氨基酸序列的理化性质。BpTRX 蛋白相对分子质量为 12 899.00, 编码 116 个氨基酸。等电点 (pI) 为 5.20; 不稳定系数为 24.62 (不稳定系数小于 40 时, 预测蛋白质稳定, 反之则不稳定), 为稳定类蛋白; 总平均疏水性为 -0.009, 说明该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 疏水区域/亲水区域预测 亲疏水性氨基酸的组成是蛋白质折叠主要的驱动力, 亲疏水性可以反映蛋白质的折叠情况^[33]。通过在线分析工具 ProtScale 中的 Kyte and Doolittle 算法分析 BpTRX 蛋白亲疏水性 (>0.5 的区域为疏水区, <-0.5 的

```

10      20      30      40      50      60
1  ATGGCGGAAGAGGGCCAAGTGATTAGCTGCCACACCGTTGAAGCTTGAAGGAGCATCTC
1  M A E E G Q V I S C H T V E A W K E H L
61  CAGAAGGAAAACGAGTCCAAGAACTGGTGGTGGATTTCACGGCTTCATGGTGTGCA
21  Q K E N E S K K L V V V D F T A S W C A
121 CCATGCCGTTTAATGGCCCCAATTCTGGCAGATTTTGCTAAGAAGACGCCCCGATGTCACA
41  P C R L M A P I L A D F A K K T P D V T
181 TTCCTGAAGGTTGATGTGGATGAATTGAAGTCTGTGGCTGAGGATTGGGCTGTGGAGGCC
61  F L K V D V D E L K S V A E D W A V E A
241 ATGCCAACCTTTATATTCATCAAAGAAGGCAAATTAGTGGACAAGGTGTGGGTGCAAAAG
81  M P T F I F I K E G K L V D K V V G A K
301 AAAGAGGAGTTGCAGCTGACTATAGCAAAGTATGCCACTGCTGCTTCTTGA
101 K E E L Q L T I A K Y A T A A S *
    
```

图 1 BpTRX 基因序列全长及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Gene coding region sequences and speculative amino acid sequences of BpTRX

区域为亲水区, +0.5~-0.5 为两性区域)。结果表明, BpTRX 蛋白共有 12 个疏水区和 7 个亲水区(图 2)。

2.2.3 跨膜结构的预测和分析 跨膜结构是蛋白质序列中跨越细胞膜的一段氨基酸片段, 其由蛋白质与膜内在蛋白的静电相互作用和氢键键合相互作用引起, 通常由 20~25 个疏水性氨基酸残基组成, 主要形成 α -螺旋结构^[34]。通过在线工具 TMPred 分析 BpTRX 蛋白的跨膜结构。结果表明, BpTRX 蛋白有 1 个跨膜结构域, 位置如图 3 中箭头所示。其中, 由内到外(i→o)的跨膜结构域有 1 个, 位于 31~50 位, 分数为 675 (分数>500 为显著跨膜结构); 由外到内(o→i)的跨膜结构域有 1 个, 位于 31~47 位, 分数为 423, 其由内到外的跨膜结构域与由外到内的跨膜结构域基本重合。经 N-terminus outside 模型分析表明, 其中 i→o 的 31~50 位具有

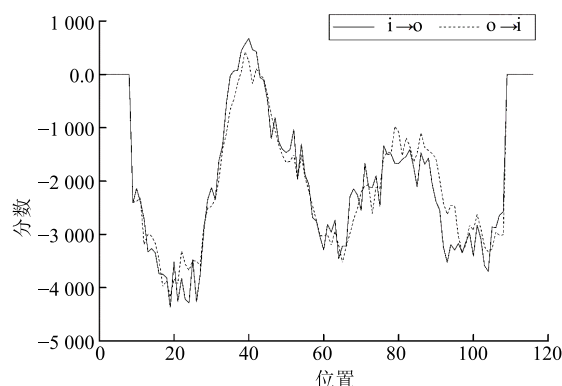


图 3 BpTRX 蛋白跨膜结构域预测和分析

Fig. 3 Transmembrane domain prediction of BpTRX protein

强烈的跨膜螺旋结构。据此分析, BpTRX 蛋白既有由内到外的跨膜能力, 又有由外到内的跨膜能力。

2.2.4 亚细胞定位预测 采用生物信息学方法, 分析蛋白亚细胞定位, 并结合其信号肽、跨膜结构及亲疏水性等分析, 更有利于揭示蛋白的功能, 了解蛋白间相互作用。为了解 BpTRX 蛋白的亚细胞定位, 通过在线分析工具 WoLF PSORT, 分析 BpTRX 蛋白亚细胞定位。预测结果以及预测分值通过软件给出, 预测分值越高表明预测结果越准确。结果表明, BpTRX 蛋白在细胞质基质得分为 9, 在叶绿体得分为 3, 在线粒体得分为 1。说明 BpTRX 蛋白可能主要存在于细胞质基质中。

2.3 BpTRX 蛋白质二级结构的预测和分析

通过 GOR4 分析 BpTRX 蛋白的二级结构。BpTRX 蛋白由 α 螺旋、延伸链、无规卷曲组成的, 且分布于整个蛋白。BpTRX 蛋白由 44.83%的 α 螺旋、34.48%的无规卷曲和 20.69%延伸链组成(图 4)。

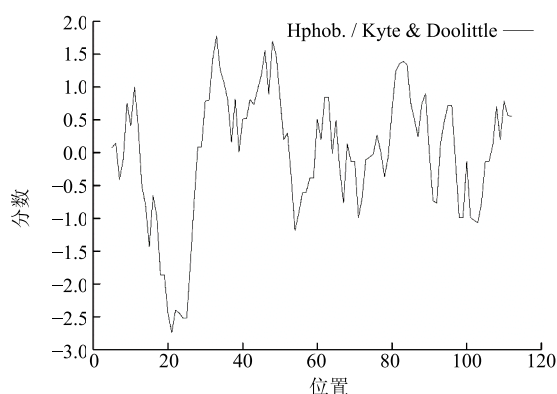
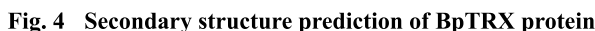


图 2 BpTRX 蛋白的亲水/疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity/phydrophilicity prediction of BpTRX protein



(XP_007046793.1)、苜蓿 *Medicago sativa* L. (AAZ32865.1)、核桃 *Juglans regia* L. (XP_018809255.1)、苹果 *Malus pumila* Mill. (XP_008338022.1)、芝麻 *Sesamum indicum* L. (XP_011083162.1)、甘蓝 *Brassica oleracea* L. var. *oleracea* (XP_013602897.1)、棉花 *Gossypium hirsutum* L. (XP_016678610.1)、烟草 *Nicotiana glauca* L. (XP_009778392.1)、大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (XP_003527904.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NP_190672.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (ADN96593.1) 和巨桉

Eucalyptus grandis Hill (KCW56688.1) 硫氧还蛋白 H 型同源性较高, 一致性分别 81%、77%、79%、78%、75%、78%、76%、75%、73%、79%、75%、73%、70% (图 7)。

蛋白质结构域是蛋白质中一段保守的氨基酸序列, 具有特异的结构和独立的功能。介于二级结构和三级结构之间, 一般会形成稳定的折叠, 形成近球状的空间结构。蛋白质结构域通常有 100~400 个氨基酸残基组成, 通常会形成功能元

件。不同的蛋白中可能存在相同的结构域。目前, 蛋白质结构域分析广泛应用于预测蛋白质功能。通过 NCBI 数据库在线分析工具 Conserved Domain Search Service (CD Search)^[37], 根据其催化残基、辅酶结合位点、底物结合位点、抑制剂结合位点、四聚体接口预测白桦 BpTRX 蛋白保守结构域。结果表明, 该编码蛋白属于 TRX 家族, Thioredoxin-like 超家族 (图 8), 与前面的多序列比对结果一致。

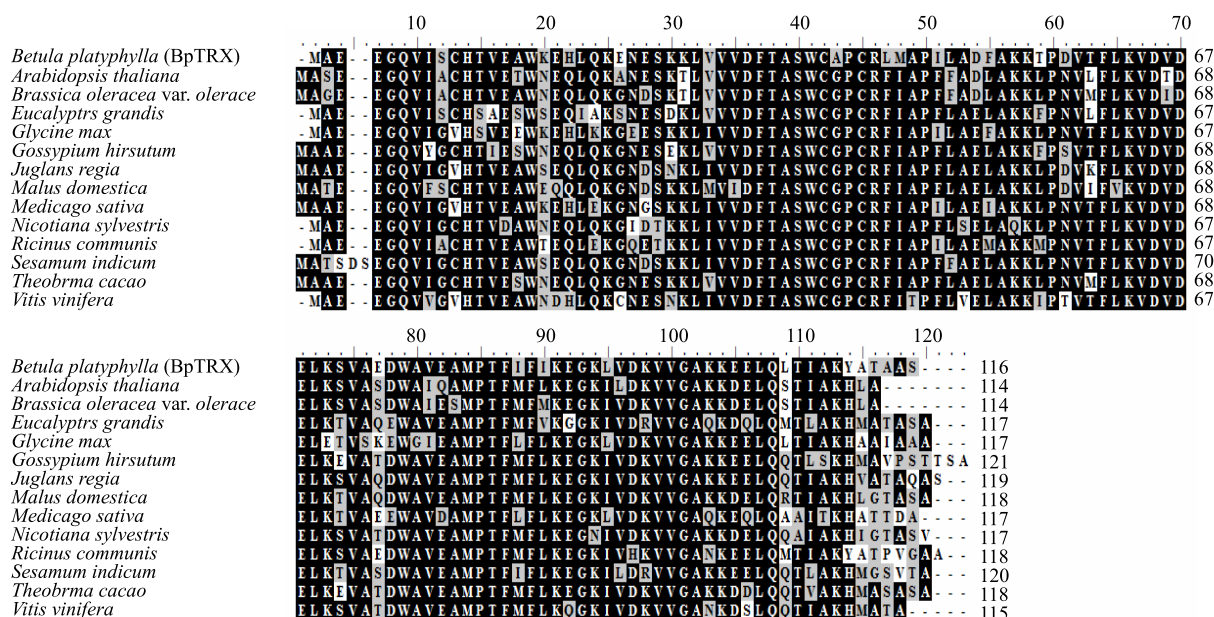


图 7 BpTRX 的氨基酸序列比对
Fig. 7 Amino acid sequences alignment of BpTRX

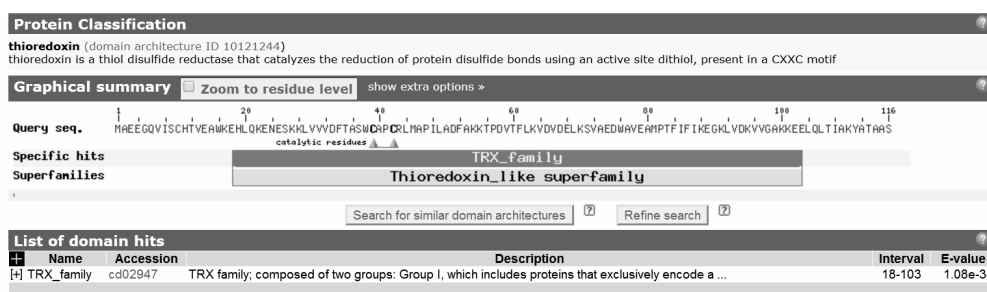


图 8 BpTRX 保守结构域预测
Fig. 8 Prediction of conserved domain of BpTRX protein

2.6 BpTRX 蛋白系统进化树的构建

系统进化树是物种的进化史, 又称为系统发生树。所构建得系统进化树可根据物种的共同祖先描述其物种间的进化关系^[38]。首先采用 ClustalX 在线分析工具对 NCBI 比对的氨基酸序列进行多序列比对的分析, 然后通过 MEGA 5.0 软件, 采用

Neighbor-Joining 算法构建系统进化树 (图 9)。结果表明, 这 14 个物种的 TRX 蛋白保守性较高, 总体上聚为 3 类, 其中, 拟南芥、甘蓝、苹果、芝麻和核桃聚为一类; 白桦 BpTRX 蛋白与蓖麻、大豆、苜蓿和葡萄 TRX-H 型蛋白亲缘关系紧密, 聚为一类; 葡萄和烟草聚为一类。

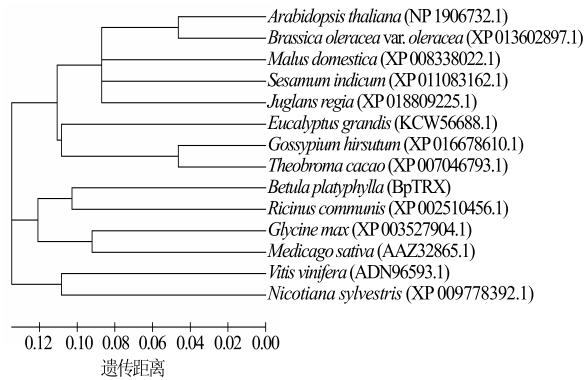


图 9 BpTRX 蛋白的系统进化树的构建

Fig. 9 Phylogenetic tree of BpTRX protein

表 4 BpTRX 基因启动子顺式调控元件分析

Table 4 Analysis of cis-regulatory elements of BpTRX promoter

功能类别	顺式调控元件	顺式作用元件出现频次	生物学功能
转录调控	CAAT-BOX	30	启动子增强原件
	TATABOX	73	TATABOX
压力响应	CCAAT-box	1	MYBHv1 结合位点
	HSE	3	热压力响应元件
激素响应	TC-rich repeats	3	防御和压力响应元件
	ABRE	2	脱落酸响应调控
	CGTCA-motif	3	MeJA 响应元件
	ERE	1	乙烯响应元件
	GARE-motif	1	赤霉素响应元件
	TGA-box	1	生长素响应元件
	TGACG-motif	3	MeJA 响应元件
	ATCC-motif	1	光信号响应元件
光信号转导	Box 4	2	光信号响应元件
	Box I	2	光信号响应元件
	G-box	2	光信号响应元件
	GA-motif	1	部分参与光响应
	GAG-motif	2	部分参与光响应
	GATA-motif	1	部分参与光响应
	GT1-motif	1	光信号响应元件
	CAT-box	2	分生组织表达
组织特异性表达	CCGTCC-box	1	分生组织激活元件
	GCN4_motif	1	胚乳表达元件
	Skn-1_motif	1	胚乳表达元件
	as-2-box	1	根特异表达、响应光信号
	O2-site	2	新陈代谢调节元件

2.8 BpTRX 基因在不同浓度 H₂S 处理下的表达特性

通过实时荧光定量 PCR 技术,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析白桦 BpTRX 基因在 H₂S 处理下的相对表达量。横坐标代表不同时间点,纵坐标代表各类关键基因的相对表达水平,以同一时间点未处理组的数据为基准点,检测 BpTRX 基因在不同浓度 H₂S 处理下的表达特性(图 10)。结果表明,BpTRX 的表达随着处理时间的增长,其表达量呈现出先上升再下降,再上升再下降的双峰特征。随着 H₂S 浓度的增加其

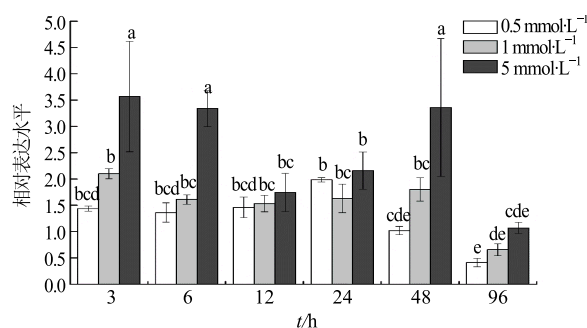
2.7 BpTRX 基因启动子中含有的顺式作用元件的鉴定及分析

以白桦叶片 DNA 为模板应用染色体步移试剂盒进行 PCR 扩增,获得的 TRX 基因启动子序列为 873 bp,通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线工具分析 BpTRX 基因启动子序列。BpTRX 基因可能含有的重要转录调控元件如表 4 所示。结果表明在 BpTRX 基因启动子中有转录必备的 RNA 聚合酶结合 TATA box、CAAT box 以及一些压力响应元件(如热压力响应元件)和激素响应元件(如脱落酸、赤霉素等的调控元件),此外,还有一些光调控元件等(表 4)。

双峰的特征更加明显,其表达量在 3 h 达到最高,并于 48 h 达到第 2 个峰值。BpTRX 基因的表达量,在 H₂S 处理 96 h 时达到最低值。结果表明 BpTRX 基因在 3 h H₂S 短时间处理时,对 H₂S 有明显的响应,接着,随着时间增长,长时间的 H₂S 处理,也会调控 BpTRX 的表达,说明 BpTRX 响应了 H₂S。

3 结论与讨论

本实验对 TRX 基因进行了克隆,并通过生物信息学方法,分析并预测了 BpTRX 蛋白的一系列特



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

Different letters means significant difference, $P < 0.05$

图 10 BpTRX 不同时间点的表达特征

Fig. 10 Relative expression level of BpTRX at different time point

性。结果表明, BpTRX 蛋白为亲水性蛋白质, 不存在信号肽。既存在由外到内的跨膜能力, 又具有由内到外的跨膜能力, 亚细胞定位表明 BpTRX 蛋白可能主要存在于细胞质中, 二级结构分析表明, BpTRX 蛋白由 α 螺旋、延伸链、无规卷曲组成的。同时, 对 BpTRX 蛋白三级同源结构建模进行了建模预测 (图 5)。葡萄硫氧还蛋白基因 (VvTrx) 同样为非分泌性蛋白, 且无信号肽结构, 与 BpTRX 基因结果相一致^[39]。普通小麦中硫氧还蛋白基因 (TsNRX) 编码蛋白也为稳定蛋白, 不存在信号肽, 但为脂溶性蛋白且不含跨膜结构^[8]。预测结果不同可能是物种间差异导致的。

通过 NCBI 网站的 Blastp 比对 BpTRX 的氨基酸序列, 结果表明, BpTRX 蛋白与蓖麻、可可、苜蓿、核桃、苹果、芝麻、甘蓝、棉花、烟草、大豆、拟南芥、葡萄和巨桉硫氧还蛋白 H 型同源性较高。并运用比对结果构建了系统进化树。进化树结果显示, 白桦 BpTRX 蛋白与蓖麻、大豆、苜蓿和葡萄 TRX-H 型蛋白亲缘关系紧密, 聚为一类, 表明其进化亲缘关系较近。

本研究中同时克隆并分析了 BpTRX 基因上游启动子, 通过使用在线分析工具, 表明 BpTRX 基因启动子含有启动转录的必要元件及与激素调控、光调控和代谢相关元件。其启动子区含激素响应元件和光响应元件, 说明 BpTRX 可能受到植物激素的调控, 并参与了植物的生长发育过程。本实验室前期研究表明, 植物激素等处理下, 可促进白桦悬浮细胞中次生代谢物含量的积累。此外, 其启动子区含有大量逆境调控元件, 这很可能与 BpTRX 在逆境条件下, 调控植物次生代谢产物积累有关。

本实验室前期研究表明, 在胁迫处理条件下, 白桦悬浮细胞中次生代谢物含量增加。H₂S 的处理可提高白桦悬浮细胞中多胺和次生代谢物含量, H₂S 与多胺共同处理可进一步促进次生代谢物的累积^[15]。同时发现, 亚硝基硫醇介导了硫化氢促进白桦三萜的合成, 且 TRX 是去亚硝基化的关键酶之一^[38]。因而为明确 BpTRX 基因是否能够响应 H₂S 的处理, 本实验克隆了白桦 BpTRX 基因, 并分析了 BpTRX 基因在不同浓度 H₂S 处理下的表达特性。结果表明 BpTRX 基因在 3 h H₂S 短时间处理下, 对 H₂S 有明显的响应, 随着时间延长, 长时间的 H₂S 处理, BpTRX 的表达水平也发生了变化, BpTRX 基因表达水平随着 H₂S 的处理呈现出双峰的特征, 说明 BpTRX 响应了 H₂S 的胁迫处理。在此之外, 应用生物统计分析分析了 H₂S 处理下 BpTRX 基因的表达量与白桦次生代谢产物, 包括三萜、黄酮、多酚和多胺的含量的相关性, 遗憾的是, 没有获得 BpTRX 的表达量与白桦次生代谢产物的含量具有直接的相关性的结果。在前人的研究中, 通过酵母双杂交实验证明了怪柳硫氧还蛋白基因能够与黄酮醇合酶互作, 说明了 TRX 参与了植物次生代谢产物的积累^[10]。结合本研究结果, 猜测白桦 BpTRX 基因也可能并非直接参与调控了白桦次生代谢产物的积累, 而是通过调控白桦次生代谢产物合成通路中的关键酶间接参与次生代谢产物的合成, 而且, TRX 家族成员众多且可能存在功能冗余。

综上所述, BpTRX 基因参与了白桦 H₂S 的响应, BpTRX 在调控白桦次生代谢产物合成中起到的具体作用和分子机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Buchanan B B, Balmer Y. Redox regulation: a broadening horizon [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56(56): 187-220.
- [2] Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, et al. The plant thioredoxin system [J]. *CMLS*, 2005, 62(1): 24-35.
- [3] Meyer Y, Reichheld J P, Vignols F. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants [J]. *Photosynth Res*, 2005, 86(3): 419-433.
- [4] Meyer Y, Siala W, Bashandy T, et al. Glutaredoxins and thioredoxins in plants [J]. *Cell Res*, 2008, 1783(4): 589-600.
- [5] Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, et al. Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin [J]. *Plant J*, 2001, 25(2): 127-135.

- [6] 张小莹, 唐玉瑾, 王 刚, 等. 葡萄硫氧还蛋白基因 (*VvTrx*) 的克隆, 表达和原核表达 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(9): 1131-1140.
- [7] 莘冰茹. 外源 NADPH 对盐胁迫下番茄 Trx 系统及光合碳同化的影响 [D]. 石河子: 石河子大学, 2016.
- [8] 张 帆, 蒋 雷, 鞠丽萍, 等. 一个普通小麦 Trx 超家族新基因 *TaNRX* 的克隆与抗旱相关标记开发 [J]. 作物学报, 2014, 40(1): 29-36.
- [9] 夏德习. 拟南芥硫氧还蛋白基因在逆境胁迫下的功能解析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [10] 姜 波. 柞柳硫氧还蛋白过氧化酶基因耐盐功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [11] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [12] Pisha E, Chai H, Lee I S, *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1046.
- [13] Jia Q, Liu X, Wu X, *et al.* Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(8): 744-750.
- [14] 范桂枝, 詹亚光. 白桦酯醇的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1591-1594.
- [15] Mouaheb N, Thomas D, Verdoucq L, *et al.* *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 1998, 95(6): 3312-3317.
- [16] 周文洋. H_2S 诱导白桦悬浮细胞中次生代谢物累积的激素生理机制的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [17] 曾凡锁, 南 楠, 詹亚光. 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取 [J]. 植物生理学报, 2007, 43(5): 913-916.
- [18] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [19] Huang Y, Zhang L. Rapid and sensitive dot-matrix methods for genome analysis [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(4): 460-466.
- [20] Burge C B, Karlin S. Finding the genes in genomic DNA [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(3): 346-354.
- [21] John M W. *The Proteomics Protocols Handbook* [M]. Totowa: Humana Press, 2005.
- [22] 梁楠松. 小黑杨 bHLH 转录因子基因的克隆及遗传转化 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [23] Hofmann K, Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments [J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, 374(1): 1-3.
- [24] Lupas A, Van D M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences [J]. *Science*, 1991, 252(5009): 1162-1164.
- [25] Horton P, Park K J, Obayashi T, *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(2): 585-587.
- [26] Sen T Z, Jernigan R L, Garnier J, *et al.* GOR V server for protein secondary structure prediction [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(11): 2787-2788.
- [27] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B, *et al.* CDD: A conserved domain database for the functional annotation of proteins [J]. *Nucl Acids Res*, 2011, 39(1): 225-229.
- [28] 李 军, 张莉娜, 温珍昌. 生物软件选择与使用指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [29] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [30] 罗 静, 刘正富, 武 峥, 等. 桃水孔蛋白基因克隆及序列分析 [J]. 经济林研究, 2012, 30(1): 77-80.
- [31] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* Plant CARE, 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(1): 325-327.
- [32] 尹 静, 任春林, 詹亚光, 等. 可用于实时荧光定量 PCR 标准化的白桦内参基因 [J]. 植物生理学报, 2010, 46(10): 1061-1066.
- [33] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [34] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [35] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [36] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb viewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [37] Marchler-Bauer A, Bryant S H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(2): 327-331.
- [38] Jill H C, Langdale J A. A step by step guide to phylogeny reconstruction [J]. *Plant J*, 2006, 45(4): 561-572.
- [39] 黄雅婷, 菅 端, 詹亚光, 等. 白桦悬浮细胞 S-亚硝基硫醇比色和荧光测定方法的初步优化 [J]. 植物生理学报, 2016, 52(7): 1110-1116.