

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00387

水稻TFIIIA型锌指蛋白基因ZFP207 的克隆和表达分析

孟繁君, 黄骥, 鲍永美, 江燕, 张红生

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要: 锌指蛋白是一类重要的转录因子, 广泛参与植物的生长发育和胁迫应答过程。文章使用生物信息学方法从水稻中预测并克隆了一个 TFIIIA 型锌指蛋白基因 ZFP207(GenBank 登陆号: AK063147.1), 该基因包含一个 567 bp 的开放阅读框, 编码一条 188 个氨基酸组成的多肽, 其编码产物的预测分子量为 20.72 kDa, 等电点为 9.67。锌指蛋白 ZFP207 含有一个典型的 TFIIIA 型锌指结构, 并且在 C 端含有一个可能具有转录抑制功能的 EAR-motif, 但不具有任何已知的核定位信号。系统发生分析结果表明, ZFP207 与植物中已经发现的单锌指蛋白亲缘关系较近。通过 RT-PCR 方法分析了 ZFP207 基因在成株期水稻不同组织中的表达, 发现 ZFP207 在茎和叶中表达量较高, 而在穗和根中表达量较低。在酵母中的转录激活实验结果显示, ZFP207 在酵母中不具有转录激活功能。

关键词: 水稻; 锌指蛋白; TFIIIA型; ZFP207 基因

Cloning and expression analysis of ZFP207 encoding a TFIIIA-type zinc finger protein in rice

MENG Fan-Jun, HUANG Ji, BAO Yong-Mei, JIANG Yan, ZHANG Hong-Sheng

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The zinc finger proteins consist of a large transcription factor family involved in plant development and responses to environmental stresses. In this paper, a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP207 (GenBank accession number AK063147.1) was cloned from rice variety Jiuciqing by RT-PCR approach. This gene contains an open reading frame (ORF) of 567 bp, which encodes a peptide of 188 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of the protein is 9.67, and its molecular weight is 20.72 kDa. Bioinformatic analysis showed that the ZFP207 protein comprises a typical TFIIIA-type zinc finger domain and an EAR-motif at its C-terminus. However, nuclear localization signals (NLS) commonly existing in TFIIIA-type zinc finger proteins was not found in the ZFP207 amino acid sequence. In addition, based on the alignments of the whole amino acid sequences of some known TFIIIA-type zinc finger proteins in plants, a phylogenetic tree was constructed by the neighbour joining method. The phylogenetic tree showed that ZFP207 and other TFIIIA-type zinc finger proteins with single zinc finger domain were grouped into the same branch. The expression pattern of ZFP207 gene was also investigated in various rice tissues at adult stage by RT-PCR and the results showed that ZFP207 was expressed with high levels in culms and leaves, but lower in roots and spikes. Finally, the trans-activation assay in yeast cells revealed that ZFP207 lacked the trans-activation activity.

Keywords: rice; zinc finger protein; TFIIIA; ZFP207

收稿日期: 2009-09-24; 修回日期: 2009-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30971556, 30971758), 教育部博士点基金项目(编号: 200803070036)和教育部新世纪优秀人才计划(编号: NCET-08-0795)资助

作者简介: 孟繁君(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水稻遗传育种。E-mail: lndream@yahoo.cn

通讯作者: 张红生(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水稻遗传育种。Tel: 025-84396075; E-mail: hszhang@njau.edu.cn

锌指蛋白是真核生物中一类重要的转录因子,广泛参与到基因的转录、翻译、mRNA的运输、细胞骨架构建、细胞支持、蛋白折叠、染色质修饰等过程中^[1,2]。TFIIIA型锌指蛋白的锌指结构域具有CX₂CX₃FX₃QALGGHX₃H的序列特征,自从在矮牵牛中分离了植物中第一个锌指蛋白基因*EPF1* (*ZPT2-1*)^[3]以来,已经在拟南芥、矮牵牛、水稻、大豆、小盐芥和棉花等高等植物中陆续分离了近40个此类基因,这类基因广泛参与调控植物的生长发育和胁迫应答反应^[4]。水稻中目前已报道的TFIIIA型锌指蛋白基因有3个:*ZFP182*、*ZFP245*和*ZFP252*。这3个基因编码产物都含有两个TFIIIA型锌指结构域,并且都与非生物胁迫相关^[5-8]。*ZFP182*基因的表达受高盐、干旱和低温的诱导,在烟草中的异源表达和在水稻中的过量表达均能提高转基因植株对盐胁迫的耐受性^[5]。*ZFP252*受到干旱和高盐胁迫的诱导^[6],*ZFP252*的过量表达增强了转基因水稻植株的耐盐性和耐旱性^[7],而*ZFP245*的表达则受低温和干旱胁迫的诱导^[8]。水稻是单子叶植物的模式植物,也是重要的粮食作物,在水稻中鉴定新的功能基因既可以用于植物遗传改良,也可为其他植物的功能基因研究提供宝贵的借鉴。

本实验室利用水稻中已经发现的一个TFIIIA型锌指蛋白*ZFP245*^[8]的蛋白序列为信息探针,搜索水稻基因组数据库,从水稻中预测了72个具有TFIIIA型锌指蛋白基因^[9]。本文选择了其中一个TFIIIA型锌指蛋白基因*ZFP207*进行了克隆和初步的功能分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料和处理

粳稻(*Oryza sativa* L. subs. *japonica*)品种韭菜青由本实验室保存。取饱满的种子,用0.1%的HgCl₂消毒20 min后,用清水冲洗两次并浸泡,30℃催芽2 d至露白,在28℃培养箱(16 h光照/8 h黑暗)中用水稻营养液^[9]培养至幼苗四叶期。一部分幼苗整株取样,包裹于锡箔纸中液氮速冻,用于总RNA提取和目标基因克隆;另一部分幼苗移栽于南京农业大学牌楼试验站,开花后5 d,取同一株水稻的根、茎

(去除叶鞘和茎节)、剑叶和幼穗样品,于液氮中速冻用于组织表达谱分析。

1.1.2 试剂、载体与菌株

RNA小量快速提取试剂盒购自北京百泰克生物公司;反转录试剂为Ferments公司产品;引物在南京金思特有限公司合成。克隆载体pMD18-T购自日本TaKaRa公司;酵母表达载体pGBKT7购自日本TaKaRa Clontech公司;大肠杆菌菌株JM109和酵母菌株AH109由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和cDNA第一链的合成

水稻组织样品在液氮中速冻并研碎,根据RNA小量快速提取试剂盒和反转录试剂盒的使用说明,用Trizol法提取水稻组织总RNA,经DNase处理去除基因组DNA后逆转录合成cDNA第一链,-20℃保存备用。

1.2.2 *ZFP207*基因的克隆

以TFIIIA型锌指蛋白*ZFP245*^[8]的蛋白序列为信息探针,搜索水稻基因组数据库,从水稻中预测了72个具有TFIIIA型锌指蛋白基因^[9]。本文选择了其中一个基因*ZFP207*进行了克隆和初步的功能分析。根据预测的cDNA序列信息,设计一对特异引物*ZFP207*-F(5'-CCCTAATACACACACAAAG-3')和*ZFP207*-R(5'-CTACAAACTTATAACCGCAG-3')用于基因的克隆。以粳稻品种韭菜青四叶期幼苗cDNA为模板进行PCR扩增,克隆得到目的基因。PCR扩增程序如下:94℃预变性5 min,94℃变性20 s,56℃复性20 s,72℃延伸30 s,27个循环,最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物经纯化,连接到pMD18-T载体上,由南京金思瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析

DNA序列分析和引物设计采用BioXM 2.6和DNAssist 2.2软件进行;蛋白功能域的查找和分析采用SMART(ver.4)程序;多个氨基酸序列的比较采用ClustalX 1.81和GeneDoc软件。进化树的绘制和编辑采用ClustalX 1.81、PHYLP3.67和Treeview32

软件。*ZFP207* 基因的染色体定位, 通过查找水稻基因组数据库中 *ZFP207* 基因所在 BAC 克隆, 再查找相应 BAC 克隆在整合了遗传标记的物理图谱上的位置, 将基因定位到染色体的相应位置。

1.2.4 组织表达分析

水稻组织于液氮中速冻研碎, 采用 Trizol 法提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA 第一链。以水稻组成型表达的 Actin 基因 *Rac1*^[10, 11] 为内参, 通过调整 cDNA 模板的用量, 使 *Rac1* 的 PCR 产物扩增量相对一致。保持 cDNA 模板的用量不变, 使用 *ZFP207* 基因特异引物进行 PCR 扩增, 在 RNA 转录水平上比较 *ZFP207* 基因在各组织中的表达情况。*Rac1* 特异引物为 *Rac1*-F(5'-GGAAGTGGTATGGTCAAGGC-3')和 *Rac1*-R(5'-AGTCTCATGGATAACCGCAG-3')。PCR 扩增程序为: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 53 复性 30 s, 72 延伸 50 s, 28 个循环, 最后 72 延伸 10 min。*ZFP207* 基因特异引物使用基因克隆引物, PCR 反应循环数为 33 个, 其他 PCR 扩增条件同 1.2.2。

1.2.5 转录激活能力分析

构建酵母融合表达载体 pGBKT7-*ZFP207* 和 pGBKT7-*ZFP207N*, 使 *ZFP207* 的整个编码序列和去除 EAR-motif 的编码序列分别与酵母表达载体 pGBKT7 上编码 GAL4 DNA 结合结构域(Binding domain, BD)融合。根据锌指蛋白基因 *ZFP207* 的序列信息, 设计引物, 以克隆基因时保存的测序正确的菌液为模板, 分别扩增得到锌指蛋白 *ZFP207* 的 1~188 位氨基酸(全序列)和 1~182 位氨基酸(去除 EAR-motif)的编码序列。其中引物 *ZFP207TAA*-F(5'-ATCCTAATACACACACACAAAG-3')和 *ZFP207TAA*-R1(5'-CTACAAACTTATAACCGCAG-3')用于扩增 1~188 位氨基酸编码序列, 引物 *ZFP207TAA*-F(5'-ATCCTAATACACACACACAAAG-3')和 *ZFP207TAA*-R2(5'-TTAAAGATCTTCTCCGTGCGCTTCTTC-3')用于扩增 1~182 位氨基酸编码序列。PCR 扩增程序均为: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 53 复性 30 s, 72 延伸 50 s, 28 个循环, 最后 72 延伸 10 min。经纯化的 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体上, 提取阳性单克隆的质粒 DNA, 用 *EcoR* 和

Pst 两种内切酶酶切获得基因片段, 并与同样进行酶切的 pGBKT7 质粒 DNA 片段连接, 获得阳性单克隆。阳性质粒 DNA 转化酵母 AH109 感受态细胞。阳性菌液分别均匀涂于 YPDA 完全培养基、SD/Trp⁻ 单缺陷培养基和 SD/Trp⁻/His⁻ 双缺陷培养基上, 观察转化子的生长情况, 判断融合蛋白能否激活下游报告基因的表达。

2 结果与分析

2.1 *ZFP207* 基因的克隆与序列分析

根据预测和拼接的 *ZFP207* 的 cDNA 序列信息^[9] 设计特异引物, 通过 RT-PCR 的方法, 从粳稻品种韭菜青中分离了目标基因 *ZFP207* (GenBank 登录号: AK063147.1)。*ZFP207* 基因的完整开放阅读框为 567 bp, 不包含内含子, 编码 188 个氨基酸残基, 起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA (图 1A)。通过查找 *ZFP207* 基因所在 BAC/PAC 克隆号, 并整合遗传标记的物理图谱, 发现 *ZFP207* 基因位于在水稻 7 号染色体的长臂上 (图 1B)。使用 BioXM 软件对锌指蛋白 *ZFP207* 预测分析发现, 锌指蛋白 *ZFP207* 的等电点为 9.67, 预测分子量为 20.72 kDa。与来自于拟南芥、大豆、矮牵牛以及水稻 TFIIIA 型锌指蛋白的氨基酸序列比对显示, 锌指蛋白 *ZFP207* 仅含有一个锌指结构域, 并具有 CX₂CX₃FX₃QAL GGHX₃H 的序列特征 (图 1C), 在 C 端含有一个具有 DLSRL 序列的 EAR-motif (图 1D), 已有报道表明具有 EAR-motif 结构域的锌指蛋白一般具有转录抑制活性^[11~13]。将锌指蛋白 *ZFP207* 与植物中已经报道的 TFIIIA 型锌指蛋白进行比对并绘制系统发生树, 结果表明 *ZFP207* 与其他的单锌指蛋白属于同一亚类, 与大豆单锌指蛋白 GmZFP1^[14] 的亲缘关系最近, 而与具有双锌指结构的锌指蛋白亲缘关系较远 (图 1E)。

2.2 *ZFP207* 的组织表达分析

在水稻开花后 5 d, 取同一植株的根、茎、叶和幼穗, 提取 RNA 并逆转录得到 cDNA 第一链, 用于分析 *ZFP207* 基因的表达模式。利用组成型表达的 Actin 基因 *Rac1*^[11] 作为内参基因。半定量 RT-PCR

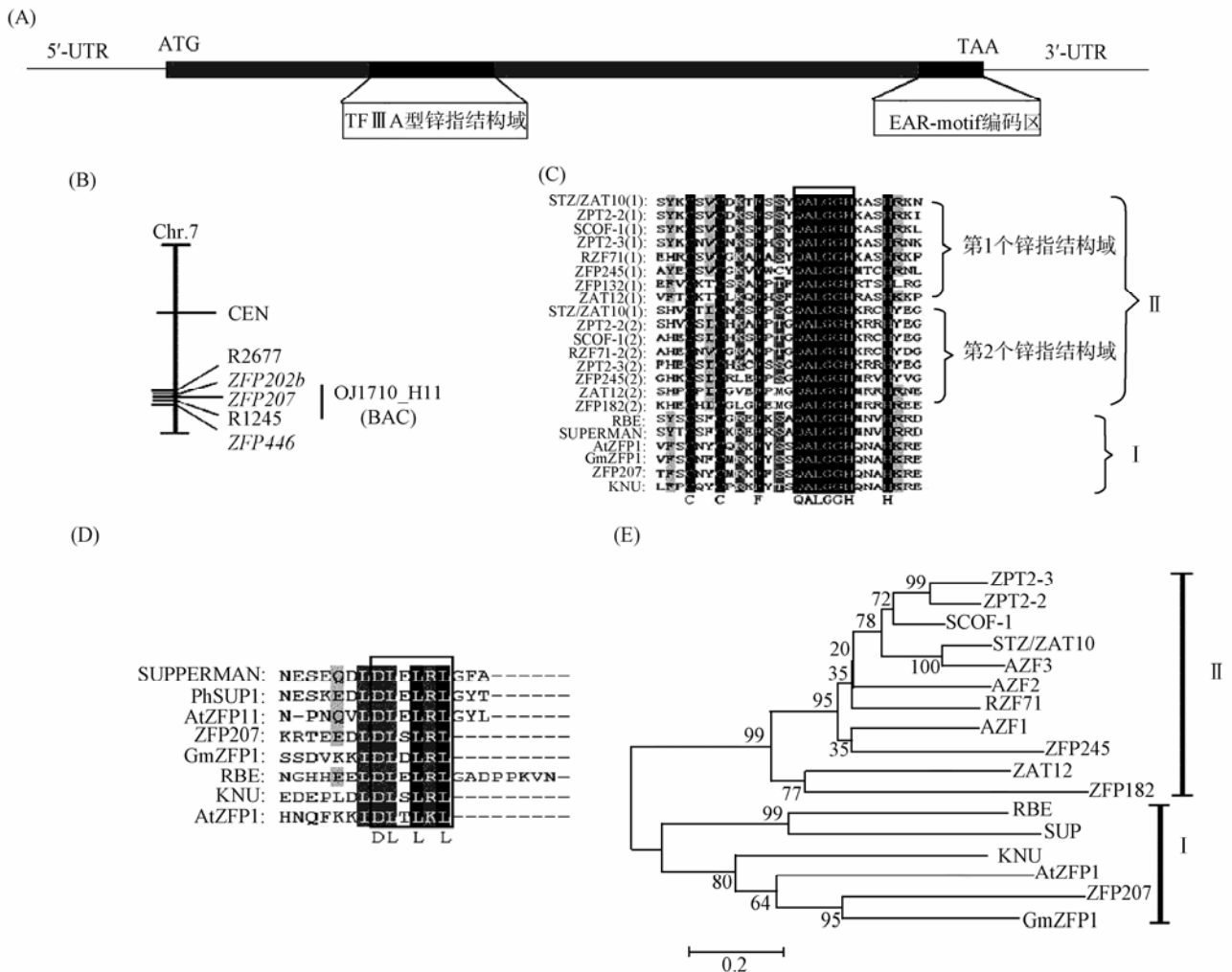


图 1 *ZFP207* 基因的序列分析

(A): *ZFP207* 基因结构示意图, 该基因不含有内含子, TF IIIA 型锌指结构域和 EAR-motif 的编码区用黑色标出; (B): *ZFP207* 的染色体定位, R2677 和 R1245 为 RFLP 标记, *ZFP202b* 和 *ZFP446* 为其他两个 TF IIIA 型锌指蛋白基因; (C): *ZFP207* 与其他植物 TF IIIA 型锌指蛋白锌指结构域的序列比较分析。保守的氨基酸残基用黑色标注, QALGGH 结构域用黑框标出, 蛋白名称后括号内的 1 和 2 表示双锌指蛋白的第 1 和第 2 个锌指结构域; (D): *ZFP207* 和其他植物 TF IIIA 型锌指蛋白 EAR-motif 的序列比较分析。EAR-motif 用黑框标出; (E): 植物中 TF IIIA 型锌指蛋白的 N-J 系统发生树分析, 自展值设为 1 000 次。亚群 I 为单锌指蛋白, 亚群 II 为双锌指蛋白。图 C、D、E 中用于序列比对和进化树分析的蛋白对应的基因分别来自于拟南芥(*STZ*, *ZAT12*, *RBE*, *SUPERMAN*, *AtZFP1*, *KNU*, *AtZFP11*, *AZF1*, *AZF2*, *AZF3*)、矮牵牛(*ZPT2-2*, *ZPT2-3*, *PhSUP1*)、大豆(*GmZFP1*, *SCOF1*, *SUP*)和水稻(*RZF71*, *ZFP245*, *ZFP182*, *ZFP207*)。

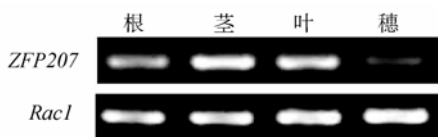


图 2 *ZFP207* 在不同水稻组织中的表达

结果表明, *ZFP207* 基因在成株期水稻植株的根、茎、叶和幼穗中都有表达, 茎中表达量最高, 叶中表达量稍低, 而在根和幼穗中表达量相对较低(图 2)。

2.3 *ZFP207* 的转录激活活性分析

序列分析发现, 锌指蛋白 *ZFP207* 在 C 端含有一段具有 DLSSLRL 序列的 EAR-motif, 目前报道的含有 EAR-motif 的 TF IIIA 型锌指蛋白大多数具有转录抑制活性。在酵母中进行 *ZFP207* 以及去除 EAR-motif 之后的 *ZFP207* 的转录激活实验, 结果表明, 4 种菌株都可以在 YPDA 培养基和 SD/Trp⁻培养基上正常生长, 而在 SD/Trp⁻/His⁻培养基上, 则只有

图3 锌指蛋白 *ZFP207* 在酵母中的转录激活实验

A: YPDA 培养基; B: SD/Trp 缺陷培养基; C: SD/Trp⁻ His⁻ 缺陷培养基; D: 位置示意图。1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: pGBKT7-*ZFP207*; 4: pGBKT7-*ZFP207N*。

阳性对照可以生长(图3), 这说明锌指蛋白 *ZFP207* 在酵母中不具有转录激活能力。

3 讨论

锌指蛋白广泛参与到拟南芥、矮牵牛和水稻等高等植物的生长发育和胁迫应答反应过程中。相对于拟南芥和矮牵牛, 水稻中TFIIIA型锌指蛋白的功能研究得较少。水稻中已经鉴定的TFIIIA型锌指蛋白都具有双锌指结构, 且都与逆境胁迫相关^[5~8]。本研究从水稻中预测并克隆了一个TF A型锌指蛋白基因*ZFP207*, 是水稻中鉴定的第一个具有单锌指结构的TF A型锌指蛋白, 并对其功能进行了初步分析。

ZFP207 基因定位于水稻第7号染色体长臂上, 在其附近区域内包含6个成簇排列的TFIIIA型锌指蛋白基因, 表明这些成簇分布的TFIIIA型锌指蛋白

基因的表达特征或功能特性可能具有相似性^[9]。生物信息学分析表明, *ZFP207* 的蛋白序列并不包含任何已知的核定位信号或相关序列, 推测*ZFP207* 如果作为DNA结合蛋白, 可能与其他含有核定位信号的蛋白互作而进入细胞核, 或者其本身含有未知的核定位信号, 需要进一步的实验验证。系统发生树分析表明, *ZFP207* 与其他具有单锌指结构的植物TFIIIA型锌指蛋白被分为第 亚类, 与大豆的GmZFP1^[14]亲缘关系最近。目前鉴定的单锌指结构的TFIIIA型锌指蛋白都与植物生长发育相关, 而大多数具有双锌指结构的TFIIIA型锌指蛋白都与胁迫相关, 这预示着*ZFP207* 可能参与到水稻的生长发育过程。然而, 根据Agarwal等^[15]公布的基因芯片数据, 我们发现*ZFP207* 受到多种生物和非生物胁迫的诱导, 因此, *ZFP207* 很可能同时参与水稻的生长发育以及胁迫应答反应, 但这需要进一步的研究来证

实。

转录因子调控基因的表达有两种方式, 转录激活和转录抑制, 对下游基因的转录调控决定了转录因子的功能。通过酵母转录激活系统, 发现ZFP207在酵母中不具有转录激活能力。是否ZFP207作为一个转录抑制子存在还有待一步的实验来证实。目前, TF A型锌指蛋白中鉴定的可能具有转录抑制活性的功能域称为EAR-motif或DLN-box, 已有研究结果表明, 具有EAR-motif的TFIIIA型锌指蛋白具有转录抑制功能, 如拟南芥中的SUPPERMAN^[16]、矮牵牛中的ZPT2-3^[13]; 但是某些具有EAR-motif的TFIIIA型锌指蛋白也可能具有转录激活功能, 如辣椒中发现的CAZFP1^[17]。去除EAR-motif的ZFP207在酵母中都不具有转录激活能力, 表明ZFP207可能不是转录激活因子, 或者ZFP207的转录激活功能需要在植物细胞内进行翻译后修饰。我们拟利用水稻原生质体进行ZFP207在植物体内转录激活或抑制活性的研究。

参考文献(References):

- [1] 刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用. 科学通报, 2000, 45(14): 1465–1474.
- [2] Takatsuji H. Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(6): 582–596.[\[DOI\]](#)
- [3] Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua NH. Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *EMBO J*, 1992, 11(1): 241–249.
- [4] 黄骥, 王建飞, 张红生. 植物 C2H2 型锌指蛋白的结构与功能. 遗传, 2004, 26(3): 414–418.
- [5] Huang J, Yang X, Wang MM, Tang HJ, Ding LY, Shen Y, Zhang HS. A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769(4): 220–227.
- [6] 郭书巧, 黄骥, 江燕, 张红生. 水稻 C2H2 型锌指蛋白基因 *RZF71* 的克隆与表达分析. 遗传, 2007, 29(5): 607–613.
- [7] Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett*, 2008, 582(7): 1037–1043.[\[DOI\]](#)
- [8] Huang J, Wang JF, Wang QH, Zhang HS. Identification of a rice zinc finger protein whose expression is transiently induced by drought, cold but not by salinity and abscisic acid. *DNA Seq*, 2005, 16(2): 130–136.
- [9] 江燕. 水稻和拟南芥 TFIIIA 型锌指蛋白基因家族的鉴定及 *ZFP207* 基因的功能研究[学位论文]. 南京农业大学, 2007.
- [10] Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. Routine procedure for growing rice plants in culture solution. In: *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*, IRRI. Los Banos, the Philippines, 1976, 53–57. [\[DOI\]](#)
- [11] Reece KS, McElroy D, Wu R. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa* L.) actin genes. *Plant Mol Biol*, 1990, 14 (4): 621–624.
- [12] Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song L, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R. The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein *Zat7* plays a key role in the defense response of arabidopsis to salinity stress. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 9260–9268.[\[DOI\]](#)
- [13] Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J*, 2003, 36(6): 830–841.[\[DOI\]](#)
- [14] Huang F, Chi Y, Meng Q, Gai J, Yu D. *GmZFP1* encoding a single zinc finger protein is expressed with enhancement in reproductive organs and late seed development in soybean (*Glycine max*). *Mol Biol Rep*, 2006, 33(4): 279–285.[\[DOI\]](#)
- [15] Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh AK, Singh VP, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi AK. Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(4): 467–485.[\[DOI\]](#)
- [16] Hiratsu K, Ohta M, Matsui K, Ohme-Takagi M. The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett*, 2002, 514(2): 351–354.[\[DOI\]](#)
- [17] Kim SH, Hong JK, Lee SC, Sohn KH, Jung HW, Hwang BK. *CAZFP1*, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum*. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(6): 883–904.