

引用格式:

邹杰, 刘媛. 水稻 *OsRZFP34* 基因逆境表达特征及其启动子的克隆与分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 670–678.

ZOU J, LIU Y. Expression patterns of *OsRZFP34* under diverse stress treatments and its promoter's cloning and characterization[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(6): 670–678.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



# 水稻 *OsRZFP34* 基因逆境表达特征及其启动子的克隆与分析

邹杰<sup>1,2</sup>, 刘媛<sup>3</sup>

(1.宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2.江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000; 3.宜春职业技术学院, 江西 宜春 336000)

**摘要:** 采用 qRT-PCR 技术分析水稻 *OsRZFP34* 在高温(42 °C)、低温(4 °C)、10%聚乙二醇(PEG)6000 模拟干旱、高盐(100 mmol/L NaCl)和脱落酸(ABA)处理(100 μmol/L)下的表达模式; 克隆 *OsRZFP34* 基因启动子, 并利用在线软件 New PLACE 和 PlantCARE 对其序列进行顺式作用元件分析 构建 *OsRZFP34*pro::GUS 表达载体并转化水稻; 通过组织化学染色和 GUS 酶活性检测, 分析在不同胁迫处理条件下 *OsRZFP34* 启动子驱动 *GUS* 基因表达的活性。qRT-PCR 分析结果表明, 上述 5 种处理均能不同程度地诱导 *OsRZFP34* 的表达, 其中高温胁迫对其表达的诱导程度最强, 而 ABA 对其表达只有微弱的诱导。顺式作用元件分析结果表明, 该启动子上包含有多个与逆境响应、激素响应以及  $Ca^{2+}$  信号转导相关元件。GUS 组织化学染色和荧光分析结果显示, *OsRZFP34* 基因启动子的活性受到高温、低温、PEG、盐和 ABA 的调控, 表明该启动子是受多种逆境诱导的诱导型启动子。

**关键词:** 水稻; *OsRZFP34* 基因; 逆境诱导; 表达特征; 启动子; 顺式作用元件

中图分类号: S511; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2020)06-0670-09

## Expression patterns of *OsRZFP34* under diverse stress treatments and its promoter's cloning and characterization

ZOU Jie<sup>1,2</sup>, LIU Yuan<sup>3</sup>

(1.College of Life Science and Environmental Resources, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China; 2.Jiangxi Provincial Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation, Yichun, Jiangxi 336000, China; 3.Yichun Vocational Technical College, Yichun, Jiangxi 336000, China)

**Abstract:** In this study, qRT-PCR was used to analyze the expression patterns of *OsRZFP34* under various conditions including the high temperature (42 °C), low temperature (4 °C), simulated drought with 10% polyethylene glycol (PEG) 6000, salt (100 mmol/L NaCl) and ABA (100 μmol/L) treatments. The promoter of *OsRZFP34* was cloned and its sequence was analyzed using online software New PLACE and PlantCARE; The *OsRZFP34*pro::GUS expression vector was constructed and transformed into rice; The activities of *OsRZFP34* promoter driving *GUS* gene expression under different stress conditions were analyzed by histochemical assay and GUS enzyme detection. The results of qRT-PCR showed that the expression of *OsRZFP34* could be induced by the above treatments. High temperature stress had the strongest induction on the expression of *OsRZFP34*, while ABA had only a weak induction on its expression. The results of the *cis*-regulatory element analysis show that, the promoter sequence contains a number of elements related to stress response, hormone response and  $Ca^{2+}$  signal transduction. The results of histochemical assay and quantitative GUS fluorescence analysis showed that the activity of *OsRZFP34* promoter was regulated by high temperature, low temperature, PEG, salt and ABA treatments, which indicated that *OsRZFP34* promoter was a multi-stress-inducible promoter.

收稿日期: 2019-11-26

修回日期: 2020-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460061); 江西省自然科学基金项目(20142BAB214014)

作者简介: 邹杰(1981—), 男, 广西贺州人, 博士, 讲师, 主要从事作物分子遗传育种和抗逆生理研究, [jietzou@126.com](mailto:jietzou@126.com)

**Keywords:** rice; *OsRZFP34*; stress inducible; expression pattern; promoter; *cis*-regulatory elements

环锌指蛋白(RING zinc finger protein, RZFP)是一类在植物的非生物逆境响应中发挥重要作用的转录因子<sup>[1-2]</sup>。沙蒿(*Artemisia desertorum*) *AdZFP1*的过表达,提高了转基因烟草对于干旱胁迫的耐受性<sup>[3]</sup>。玉米ZmXerico1通过调节脱落酸(abscisic acid, ABA)的稳态,赋予转基因拟南芥的耐旱性<sup>[4]</sup>。水稻*OsSRFP1*的过表达,通过提高游离脯氨酸含量和抗氧化酶活性来增强植物的抗寒性<sup>[5]</sup>。也有一些环锌指蛋白负调控植物的非生物胁迫抗性。相对野生型而言,拟南芥*atrzfl*突变体降低了植物对于干旱的敏感性,而*AtRZF1*过表达提高了植株对于干旱的敏感性<sup>[6]</sup>。*OsSADR1*的过表达削弱了转基因拟南芥的抗盐能力<sup>[7]</sup>。

启动子是基因上游重要的DNA序列,其类型包括组成型、组织特异型和诱导型3种<sup>[8]</sup>。在植物的抗逆基因功能研究中,由于使用组成型启动子会连续驱动下游基因(包括外源基因)的转录和表达,可能会导致植物生长速度过快、植株矮小、早花、迟花和减产等不良性状,而使用诱导型启动子则能有效改善或规避这些不良性状<sup>[9-10]</sup>。因此,诱导型启动子的开发利用在植物抗逆基因的功能研究和应用中具有重大意义。

有研究<sup>[11]</sup>表明, *OsRZFP34* 是1个环锌指蛋白编码基因,其表达受到高温胁迫和ABA处理的诱导; *OsRZFP34* 可能通过参与调控ABA、Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>信号相关基因的表达,介导气孔张开,参与水稻叶片的蒸腾冷却。本研究中,采用qRT-PCR技术分析了*OsRZFP34*在高温(42℃)、低温(4℃)、10%PEG6000、100 mmol/L NaCl和100 μmol/L ABA处理下的表达模式;克隆*OsRZFP34*启动子并进行了顺式作用元件分析;通过GUS组织染色和GUS酶

活性定量检测,分析了该启动子在不同胁迫下的表达活性,旨在为进一步研究*OsRZFP34*基因在非生物胁迫应答中的功能,以对逆境诱导型启动子的改良和应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

水稻材料‘日本晴’(*Oryza sativa* L. spp. *Japonica* cv. ‘Nipponbare’)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) Top10感受态细胞、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105感受态细胞和表达载体pCambia-1305.1为江西省作物生长发育调控重点实验室保存提供。

RNA提取试剂RNAiso Plus、逆转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser及qRT-PCR试剂盒TB Green® Premix DimerEraser™购于宝日医生物技术(北京)有限公司;限制性内切酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA Marker、超强高保真PCR试剂盒、质粒小提试剂盒、Universal DNA纯化回收试剂盒及EasyGeno快速重组克隆试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;GUS染色试剂盒、4-甲基伞形酮(4-MU)和4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(4-MUG)购于中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻 *OsRZFP34* 基因表达特征的分析

基因部位表达和逆境响应表达分析参考邹杰等<sup>[12]</sup>的方法进行。胁迫处理样品的取样时间点为0、0.5、1、2、4、8、24 h。试验所用引物如表1所示。

表1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in the study

引物名称	序列(5'—3')	用途
OsRZFP34-P	F attcgagctcggtaccCGTCCTGATCCACTCCACCTCC	载体构建
	R accctcagatctaccatggCTTGAATGTTTTGCACCACAAAA	载体构建
UBQ5-RT	F GGAAGTAAGGAAGGAGGAGGAA	qRT-PCR
	R CAGAGGTGATGCTAAGGTGTTC	qRT-PCR
OsRZFP34-RT	F CTTTGCTCTAAATCTGTCTGCG	qRT-PCR
	R CTGGCGGGTGTTGTAGGA	qRT-PCR
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	测序

序列中的小写字母部分为载体同源序列。

试验设置 3 个生物学重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[13]</sup> 计算基因相对表达量。试验结果运用 SPSS 25.0 进行统计分析; 采用 Tukey 多重比较检验( $P < 0.05$ ) 进行差异显著性分析; 利用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

### 1.2.2 *OsRZFP34* 启动子的克隆和表达载体的构建

根据 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 中 *OsRZFP34* 基因(Transcript ID: Os01t0719100-04) 上游启动子序列, 设计特异的 PCR 引物 *OsRZFP34*-P F/R (表 1), 以水稻基因组 DNA 为模板, 使用超强高保真 PCR 试剂盒扩增 *OsRZFP34* 基因起始密码子上游 1 951 bp 启动子区域。PCR 反应体系为 30  $\mu$ L, 含 DNA 模板 0.5  $\mu$ L, 15

$\mu$ L 2 $\times$ UltraHiFi Mix, 上、下游引物 *OsRZFP34*-P F/R 各 0.75  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 34 个循环; 68  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收。

利用 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒将回收的 PCR 产物与经 *Kpn* I 和 *Nco* I 线性化的 pCambia-1305.1 载体进行基因重组, 用 *OsRZFP34* 启动子替换 35S 启动子, 构建 *OsRZFP34pro::GUS* 植物表达载体(图 1)。重组子分别用 *Kpn* I + *Bgl* II 和 *Kpn* I + *Xba* I 双酶切验证后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

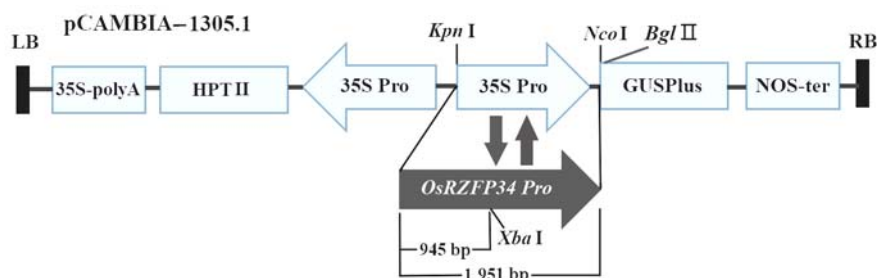


图 1 *OsRZFP34pro::GUS* 植物表达载体构建示意结果

Fig.1 Schematic representation of the *OsRZFP34pro::GUS* construction

### 1.2.3 *OsRZFP34* 启动子序列分析

运用数据库 New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 PCR 扩增的启动子区域存在的顺式作用元件。

### 1.2.4 GUS 组织化学染色分析和 GUS 酶活性检测

为进一步研究 *OsRZFP34* 启动子在不同组织中的表达活性, 以及在不同胁迫处理下的诱导活性, 对正常生长条件下 T<sub>1</sub> 代 *OsRZFP34pro::GUS* 转基因水稻的根、茎、叶片、叶枕、幼穗和谷粒等组织进行 GUS 染色分析; *OsRZFP34pro::GUS* 转基因水稻种子萌芽后在培养箱中用 Yoshida 营养液培养 7 d, 参照 1.2.1 的处理方法处理 4 h 后, 进行 GUS 染色分析和 GUS 酶活性检测。GUS 组织染色参照中科瑞泰 GUS 染色试剂盒的使用说明进行。37  $^{\circ}$ C 保温过夜后, 用 75% 的乙醇脱色 3~5 次, 至阴性对照材料无绿色、脱色液无色为止, 观察并拍照记录结果。称取逆境处理 4 h 后的水稻幼苗 100 mg 样品(地上部分), 于 GUS 提取液中研磨匀浆, 离心收集上清

液, 上清液即为 GUS 蛋白粗提取液。GUS 活性测定参照文献<sup>[14]</sup>的方法, 以 4-MUG 为底物, 进行酶促反应, 测定反应产物在激发光 365 nm、发射光 455 nm、狭缝 10 nm 条件下的荧光值。GUS 活性以生成的 4-MU 的量与总蛋白的量和时间的比值表示。检测设置 3 个生物学重复。试验结果采用 SPSS 25.0 进行统计学分析; 显著性差异检测采用 Tukey 法进行多重比较( $P < 0.05$ ); 使用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

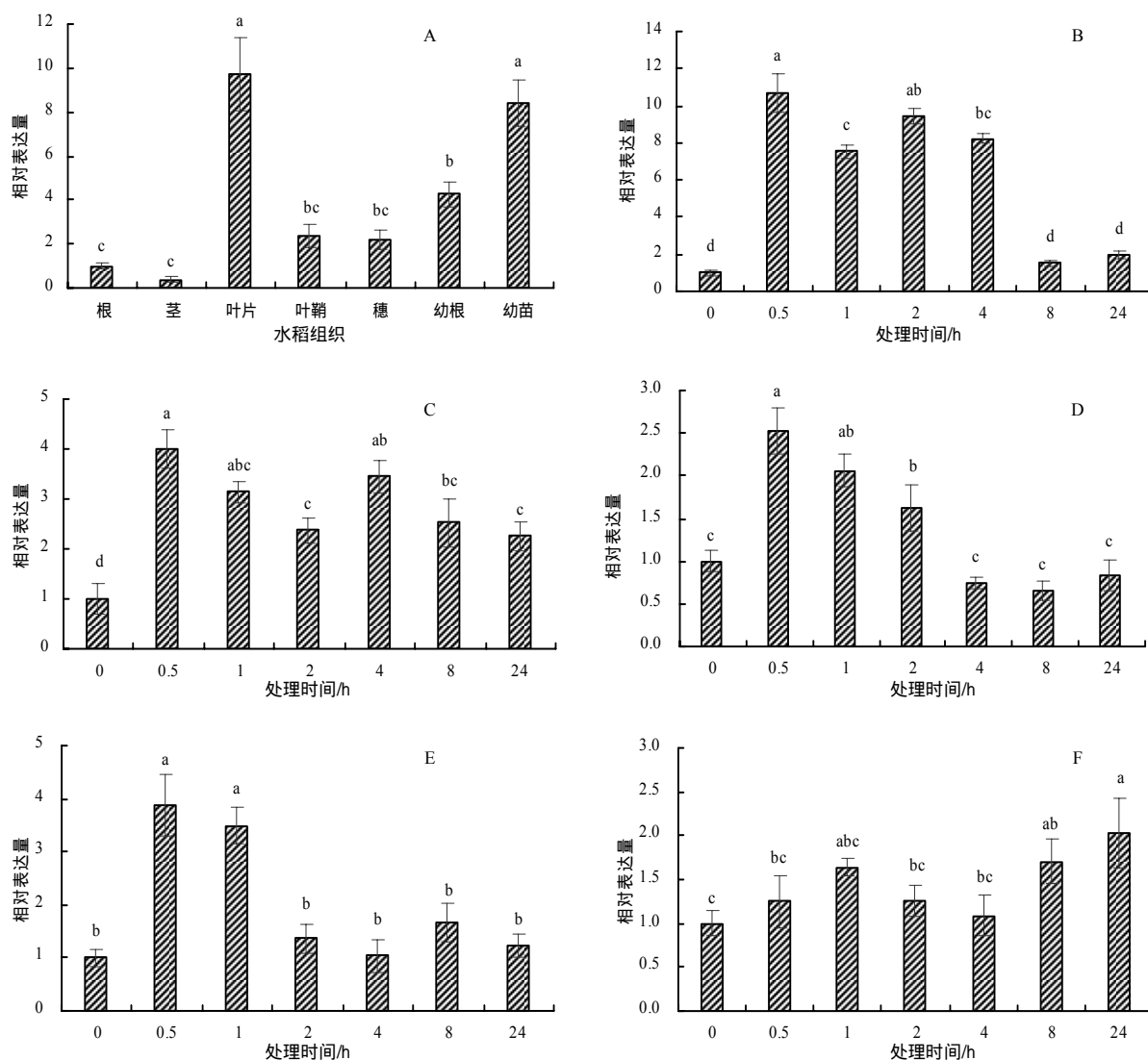
## 2 结果与分析

### 2.1 *OsRZFP34* 基因在水稻不同组织和胁迫诱导下的表达模式

本研究中, 利用 qRT-PCR 检测了 *OsRZFP34* 在三叶期水稻的根和苗(地上部分)以及孕穗期水稻的根、茎、叶、叶鞘、幼穗组织中的相对表达量。qRT-PCR 的结果显示, *OsRZFP34* 在叶片和幼苗中表达较强, 其次是在幼根中, 在其他部位的表达较弱, 在茎中的表达量最低(图 2-A)。

利用 qRT-PCR 检测了 *OsRZFP34* 受不同胁迫处理诱导表达的情况。结果显示, 高温(42 °C)、低温(4 °C)、模拟干旱(10% PEG6000)、高盐(100 mmol/L NaCl)和 ABA (100  $\mu$ mol/L) 处理均能不同程度地诱导 *OsRZFP34* 的表达, 其中, 高温胁迫对 *OsRZFP34* 的诱导程度最强, 在处理 0.5 h 后其表达水平即升高至处理前的 10.5 倍左右, 并在 4 h 内保持较高水平(> 7 倍), 8 h 后与初始水平无显著差异(图 2-B)。在低温处理的 24 h 内, *OsRZFP34* 的表

达均上调, 上调幅度为 2~4 倍(图 2-C)。在 PEG 处理的前 2 h, *OsRZFP34* 的表达水平上调, 在 0.5 h 时达到最高值, 为初始值的 2.6 倍(图 2-D)。在 100 mmol/L NaCl 处理的 0.5 h 和 1 h, *OsRZFP34* 的表达分别上调 3.8 倍和 3.4 倍, 2 h 后其表达水平恢复到初始值(图 2-E)。经 100  $\mu$ mol/L ABA 的处理, *OsRZFP34* 的表达水平在 24 h 内呈微弱上调, 上调幅度小于初始值的 2 倍(图 2-F)。



A 在不同水稻组织中的表达情况; B、C、D、E、F 分别表示在高温、低温、模拟干旱、高盐、ABA 处理条件下的表达情况。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

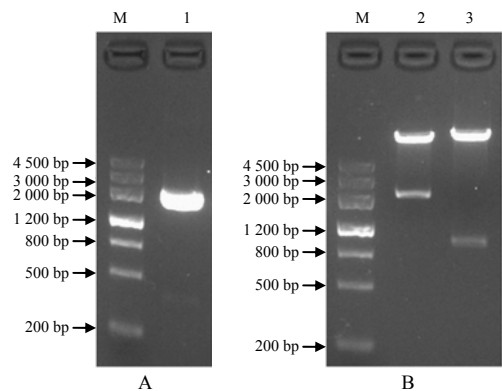
图 2 *OsRZFP34* 在水稻不同组织和不同胁迫处理下的相对表达量

Fig.2 Expression level of *OsRZFP34* in different tissues of rice and under different stress treatments

## 2.2 *OsRZFP34* 启动子克隆和植物表达载体的构建

以水稻基因组 DNA 为模板, *OsRZFP34*-P F/R 为引物, 进行 PCR 扩增。电泳结果显示, 在接近 2 000 bp 区域出现单一清晰条带, 大小与预期一致

(图 3-A)。采用无缝重组试剂盒(EasyGeno)将纯化的目的片段连接到植物表达载体 pCambia-1305.1 上。重组质粒分别用 *Kpn* I + *Bgl* II 和 *Kpn* I + *Xba* I 双酶切验证, 电泳结果(图 3-B)显示, 可以切出预期大小的片段, 初步判断 *OsRZFP34* 启动子已



M DNA Marker ; 1 *OsRZFP34* 启动子扩增产物 ; 2 *OsRZFP34pro::GUS* 载体经 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切产生的条带 ; 3 *OsRZFP34pro::GUS* 载体经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切产生的条带。

图3 *OsRZFP34* 启动子扩增及重组载体酶切检测结果  
Fig.3 Amplification of *OsRZFP34* promoter and restriction enzyme digestion of recombinant vector

替换了 pCAMBIA-1305.1 载体中的 35S 启动子。测序证明 *OsRZFP34* 启动子成功替换了载体中的 35S 启动子，构建成功的植物表达载体命名为 *OsRZFP34pro::GUS*。通过冻融法将 *OsRZFP34pro::GUS* 载体质粒转入农杆菌 EHA105，用农杆菌介导法转化水稻‘日本晴’，获得转基因植株。

2.3 *OsRZFP34* 启动子顺式作用元件分析

通过 New PLACE 和 PlantCARE 在线分析 *OsRZFP34* 启动子区域 1 951 bp 序列，发现该启动子区域包含了大量与胁迫响应、激素响应相关的顺式作用元件(表 2)。这些元件主要包括参与热激响应和调控的元件 CCAAT-box(CCAAT)10 个和 GATA-motif(WGATAR)6 个；参与低温胁迫响应的相关元件 MYCCONSUSAT(CANNTG)6 个、

表 2 *OsRZFP34* 启动子上与逆境响应相关的主要顺式作用元件

Table 2 The main cis-acting elements associated with adversity response in the *OsRZFP34* promoter

顺式作用元件	核心序列	位置	数量	功能
ABRE	ACGTG	791(-),1544(+),1919(+)	3	ABA 响应元件
ABRERATCAL	MACGYGB	274(-), 790(-)	2	Ca <sup>2+</sup> 响应元件
ACGT-element	ACGT	792(+),1422(+),1437(+), 1544(+),1919(+)	5	参与脱水响应
AuxRR-core	GGTCCAT	893(+)	1	参与生长素响应
CAREOSREP1	CAACTC	638(-)	1	调节 GA 诱导基因表达
CATATGGMSAUR	CATATG	823(+)	1	参与生长素响应
CBFHV	RYCGAC	1737(+)	1	参与低温响应
CCAAT-box	CCAAT	549(-),810(+),1063(-), 1093(-),1128(-),1239(+),1296(-),1446(-),1726(-), 1912(-)	10	协同 HSEs 增强热激响应
CGCG-box	VCGCGB	33(+),35(+),70(+),75(+), 274(+)	5	钙调素结合位点，参与热、冷、 干旱、受伤等多种信号的转导
CGTCA-motif	CGTCA	849(+),690(-),131(+), 1484(+)	4	参与茉莉酸甲酯响应
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	111(-),157(-),567(+), 1895(-)	4	参与 ABA 响应
CRT/DRE	RCCGAC	1737(+)	1	脱水响应元件
GARE-motif	TCTGTTG	363(+),1904(+)	2	赤霉素响应元件
GATA-motif	WGATAR	510(+),781(-),1214(+), 1472(-)1690(+), 1922(+)	6	参与植物耐热调节
GCCCORE	GCCGCC	65(-),79(+)	2	调节茉莉酸甲酯响应基因的表达
GT1GMSCAM4	GAAAAA	163(-),456(-),939(+), 1497(-),1504(-),1510(-)	6	参与病菌和盐胁迫响应
LTRECOREATCOR15	CCGAC	1738(+)	1	参与低温响应
MYBIAT	WAACCA	395(-),624(-),807(+),1236(+),1461(+),1824(-)	6	参与脱水响应
MYBCORE	CNGTTR	364(+),905(+),1386(+), 1539(+), 1905(+)	5	参与脱水响应
MYCATERD1	CATGTG	556(+)	1	干旱响应元件
MYCCONSUSAT	CANNTG	556(+),823(+),1393(+), 1530(+),1595(+),1895(+)	6	参与冷胁迫响应
STRE	AGGGG	726(+)	1	胁迫响应元件
T/GBOXATPIN2	AACGTG	791(-),1918(+)	2	参与茉莉酸甲酯响应
TGA-element	AACGAC	1433(+)	1	生长素响应元件
W-box	TGACY	292(+),1176(-)	2	参与受伤响应

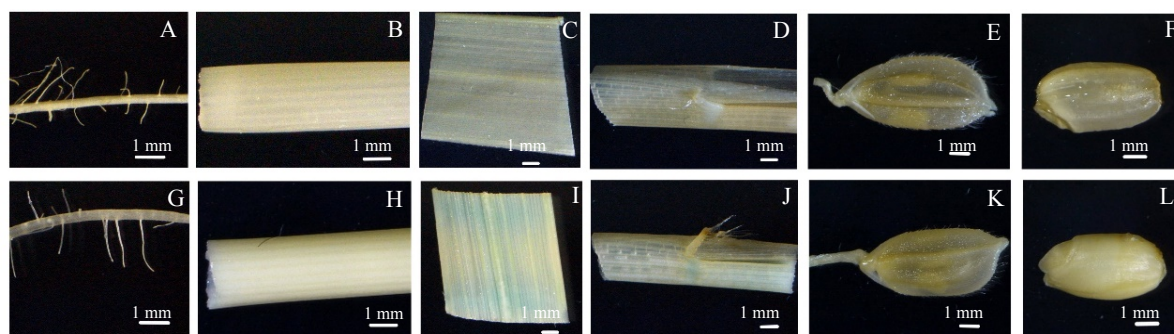
核心序列中 B 代表 C、G、T；N 代表 A、C、G、T；M 代表 A、C；R 代表 A、G；V 代表 A、C、G；W 代表 A、T；Y 代表 C、T。“+”表示正链；“-”表示负链。

LTRECOREATCOR15(CCGAC)和CBFHV(RYCGAC)各1个;参与干旱/脱水胁迫响应的元件MYB1AT(WAACCA)6个,ACGT元件(ACGT)和MYBCORE(CNGTTR)各5个,CRT/DRE(RCCGAC)和MYCATERD1(CATGTG)各1个;参与ABA响应的元件ABRE(ACGTG)3个和DPBFCOREDCDC3(ACACNNG)4个;参与病菌和盐胁迫响应的元件GT1GMSCAM4(GAAAAA)6个;与茉莉酸响应相关的顺式元件CGTCA-motif(CGTCA)4个、GCCCORE(GCCGCC)和T/GBOXATPIN2(AACGTG)各2个;与生长素响应相关的元件AuxRR-core(GGTCCAT)、CATATGGM SAUR(CATATG)、TGA-element(AACGAC)各1个;GA响应相关元件CAREOSREP1(CAACTC)1个和GARE-motif

(TCTGTTG)2个;参与 $\text{Ca}^{2+}$ 信号转导相关的元件CGCG-box(VCGCGB)5个和ABRERATCAL(MACGYGB)2个;此外,还存在1个损伤胁迫响应相关元件W-box(TGACY)和1个胁迫响应元件STRE(AGGGG)。

## 2.4 转基因水稻 GUS 组织表达分析

取非胁迫条件下生长的 *OsRZFP34*pro::GUS 转基因水稻的根、茎、叶片、叶枕、颖花和种子进行 GUS 组织化学染色,结果(图 4-G、H、I、J、K、L)显示,只在叶片和叶枕部能够观察到微弱的蓝色,说明在非胁迫条件下 *OsRZFP34* 启动子活性很弱,在大多数组织中不表达。此结果和 *OsRZFP34* 基因 qRT-PCR 表达分析的结果(图 2-A)相印证。



A、B、C、D、E、F 分别示野生型水稻根、茎、叶片、叶枕、颖花和种子的 GUS 染色结果;G、H、I、J、K、L 分别示 *OsRZFP34*pro::GUS 转导水稻的根、茎、叶片、叶枕、颖花和种子的 GUS 染色结果。

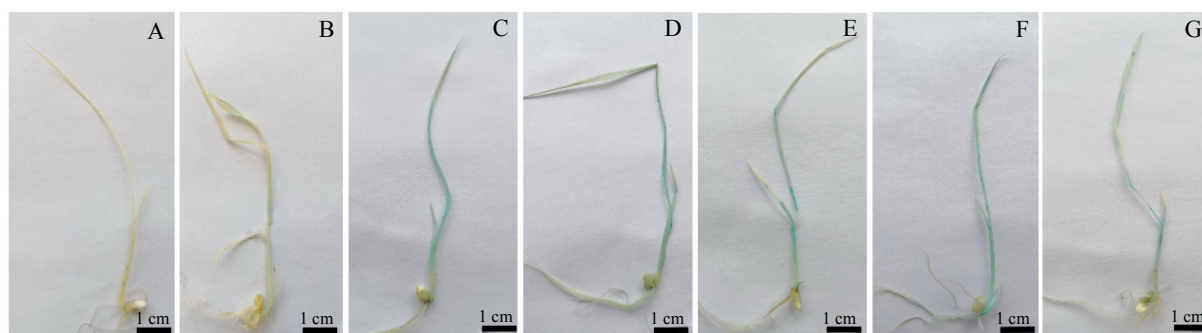
图 4 *OsRZFP34*pro::GUS 转基因水稻不同组织的 GUS 染色结果

Fig.4 GUS staining results in different tissues of *OsRZFP34*pro::GUS transgenic rice

## 2.5 不同胁迫处理对 *OsRZFP34* 启动子活性的影响

*OsRZFP34*pro::GUS 转基因水稻幼苗在不同胁迫条件下处理 4 h 后,进行 GUS 组织化学染色和 GUS 酶活性定量检测。结果(图 5)显示:对照组(28 °C)水

稻幼苗经 GUS 染色后,仅在幼苗叶片、叶鞘和胚芽鞘中呈现较弱的浅蓝色,而经胁迫处理的幼苗地上部分均呈现较深的蓝色,其中高温(42 °C)处理的幼苗呈现的蓝色最深,ABA 处理的幼苗呈现的蓝色最



A WT 野生型;B CK(28 °C);C 42 °C 高温处理;D 4 °C 处理;E 10% PEG6000 处理;F 100 mmol/L NaCl 处理;G 100 μmol/L ABA 处理。

图 5 *OsRZFP34*pro::GUS 转基因水稻幼苗在不同胁迫处理下的 GUS 染色结果

Fig.5 GUS staining results of *OsRZFP34*pro::GUS transgenic rice under different stresses



浅。GUS 酶活性定量检测的结果(图 6)与 GUS 染色结果一致,高温处理后的 GUS 酶活性最高,约为对照组(136.273)的 3.3 倍,经低温、PEG、高盐和 ABA 处理的转基因幼苗的 GUS 酶活性分别为对照组的 2.6 倍、2.2 倍、2.4 倍和 1.7 倍,并具有显著性差异。以上结果表明,*OsRZFP34* 启动子是受多种胁迫诱导的诱导型启动子。

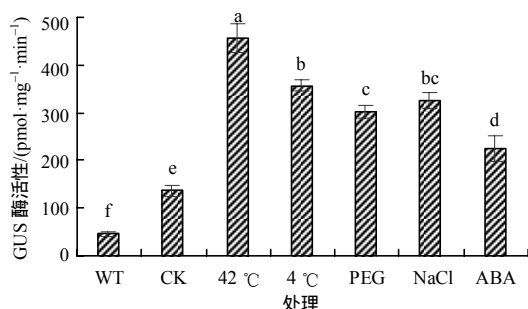


图 6 *OsRZFP34pro::GUS* 转基因水稻幼苗在不同胁迫处理下的 GUS 酶活性

Fig.6 GUS enzyme activity of *OsRZFP34pro::GUS* transgenic rice under different stresses

### 3 结论与讨论

研究表明,许多环指蛋白基因受逆境胁迫诱导表达,并通过 ABA 依赖的途径在植物的逆境胁迫响应过程中起重要作用<sup>[15-16]</sup>。白菜(*Brassica rapa*) *BrRZFP1* 的表达受到低温、盐和 ABA 的诱导,过表达 *BrRZFP1* 的转基因烟草提高了对低温、盐和脱水胁迫的耐受力<sup>[17]</sup>。前人<sup>[11]</sup>研究发现,高温胁迫和 ABA 处理均能诱导 *OsRZFP34* 的表达,*OsRZFP34* 的过表达是通过增大高温胁迫下转基因水稻植株气孔的张开程度来降低叶片温度。本研究中,*OsRZFP34* 的表达不但受高温和 ABA 诱导,也能被低温、PEG 和高盐诱导,说明 *OsRZFP34* 是多逆境诱导基因,可能通过 ABA 依赖途径在植物多种逆境响应的过程中发挥作用,这为后续的研究提供了参考方向。

HSE 是热激转录因子结合的顺式作用元件,调控植物的热激响应。在热激响应基因的启动子上可能存在完美型的 HSE 元件,也可能存在非完美型的 HSE 元件<sup>[18-19]</sup>。在一些高温诱导基因的启动子上,CCAAT-box 与 HSEs 协同作用,增强启动子的活性<sup>[20-21]</sup>。在嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) *HSP70-1* 启动子上,除了存在 2 个常规的 HSEs 外,还存在 GATA-motif 簇,后者对该基因的热激响应至关重要<sup>[22]</sup>。本

研究中,*GUS* 组织染色分析和 *GUS* 酶活性检测的结果显示,*OsRZFP34* 启动子活性受高温的诱导。但序列分析结果显示,*OsRZFP34* 启动子上不存在上述形式的 HSE 元件,可能在其启动子上存在某种尚未鉴定的非完美形式的 HSE 元件。此外,*OsRZFP34* 的启动子上存在 10 个 CCAAT-box 和 6 个 GATA-motif,可能与其高温诱导性密切相关。

本研究结果表明,低温、干旱和盐胁迫能够提高 *OsRZFP34* 启动子调控的 *GUS* 酶活性,可能与其序列上存在多种与逆境胁迫响应相关的顺式作用元件(CRT/DRE、MYCCONSUSAT、ACGT-element、MYBIAT、MYBCORE 和 MYCATERD1)相关。CRT/DRE 元件是 CBFs 转录因子结合位点,在植物的低温响应中起重要作用<sup>[23-26]</sup>。此外,CRT/DRE 元件也参与植物的干旱/脱水响应<sup>[25]</sup>。MYCCONSUSAT 元件与玉米 *ZmCBF3* 启动子的低温诱导相关<sup>[27]</sup>。MYBCORE 基序参与白桦的盐渗透胁迫响应<sup>[28]</sup>。MYCCONSUSAT 和 MYBIAT 元件与白桦 *BpZFP4* 启动子的干旱诱导活性相关<sup>[29]</sup>。此外,*OsRZFP34* 启动子上存在有 6 个 GT1GMSCAM4 元件,可能对 *OsRZFP34* 在盐胁迫下的诱导表达起到调控作用。研究表明,GT1GMSCAM4 元件在甜瓜 *CmLOX08*<sup>[30]</sup> 和白桦 *BpZFP4*<sup>[29]</sup> 启动子盐胁迫条件下诱导 *GUS* 报告基因的表达中起作用。

ABA、茉莉酸(JA)、赤霉素(GAs)和生长素是调控植物逆境胁迫响应的重要植物激素<sup>[31-35]</sup>,并且各种植物激素之间还存在相互联系和制约,产生交叉效应,共同调控植物的逆境胁迫响应<sup>[36-37]</sup>。*OsRZFP34* 基因启动子上分布有与 ABA 信号、JA 信号、GA 响应和生长素响应相关的元件,意味着 *OsRZFP34* 可能通过参与这些激素信号的转导,调节植物的非生物胁迫响应,这还需要后续的试验进行验证。

此外,STRE<sup>[18,38]</sup>、W-box<sup>[39-40]</sup>、CGCG-box<sup>[41]</sup> 和 ABRERATCAL<sup>[42]</sup> 都是与植物逆境应答相关的重要顺式作用元件,可能对 *OsRZFP34* 基因启动子在逆境胁迫下活性的诱导起作用。

综上,*OsRZFP34* 是多逆境诱导基因,其启动子是受多种逆境胁迫诱导的诱导型启动子,在正常条件下只有微弱活性,可作为诱导型启动子用于科

研与生产实践。

# 参考文献:

- [1] 陆瑜. 植物中 RING 型锌指蛋白研究进展[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(8): 36–39.  
LU Y. Research progress of RING-type zinc finger protein in plants[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2017, 23(8): 36–39.
- [2] SUN J H, SUN Y H, AHMED R I, et al. Research progress on plant RING-finger proteins[J]. Genes, 2019, 10(12): 973.
- [3] YANG X H, SUN C, HU Y L, et al. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*[J]. Journal of Biosciences, 2008, 33(1): 103–112.
- [4] BRUGIÈRE N, ZHANG W J, XU Q Z, et al. Overexpression of RING domain E3 ligase ZmXerico1 confers drought tolerance through regulation of ABA homeostasis[J]. Plant Physiology, 2017, 175(3): 1350–1369.
- [5] FANG H M, MENG Q L, ZHANG H S, et al. Knock-down of a RING finger gene confers cold tolerance[J]. Bioengineered, 2016, 7(1): 39–45.
- [6] JU H W, MIN J H, CHUNG M S, et al. The *atrzf1* mutation of the novel RING-type E3 ubiquitin ligase increases proline contents and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Science, 2013, 203/204: 1–7.
- [7] PARK Y C, CHAPAGAIN S, JANG C S. A negative regulator in response to salinity in rice: *Oryza sativa* salt-, ABA- and drought-induced RING finger protein 1(*OsSADR1*)[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(3): 575–589.
- [8] 李田, 孙景宽, 刘京涛. 植物启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015(2): 18–25.  
LI T, SUN J K, LIU J T. Research advances on plant promoter[J]. Biotechnology Bulletin, 2015(2): 18–25.
- [9] LI F, HAN Y Y, FENG Y N, et al. Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(3): 281–291.
- [10] PINO M T, SKINNER J S, PARK E J, et al. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic *AtCBF* expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(5): 591–604.
- [11] HSU K H, LIU C C, WU S J, et al. Expression of a gene encoding a rice RING zinc-finger protein, *OsRZFP34*, enhances stomata opening[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86(1/2): 125–137.
- [12] 邹杰, 李生强, 刘显军, 等. 水稻 *OsERF103* 基因生物信息学分析、亚细胞定位及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(12): 2130–2139.  
ZOU J, LI S Q, LIU X J, et al. Bioinformatics analysis, subcellular localization and expression analysis of *OsERF103* gene in rice(*Oryza sativa*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(12): 2130–2139.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [14] 黄真池, 卢向阳, 曾富华, 等. 受病原物诱导的植物启动子 *PPPs* 在转基因辣椒中的活性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(3): 270–273.  
HUANG Z C, LU X Y, ZENG F H, et al. Activation of pathogen-inducible plant promoters (*PPPs*) in transgenic pepper[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2008, 34(3): 270–273.
- [15] RYU M Y, CHO S K, KIM W T. The *Arabidopsis* C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress[J]. Plant Physiology, 2010, 154(4): 1983–1997.
- [16] XIA Z L, LIU Q J, WU J Y, et al. ZmRFP1, the putative ortholog of *SDIR1*, encodes a RING-H2 E3 ubiquitin ligase and responds to drought stress in an ABA-dependent manner in maize[J]. Gene, 2012, 495(2): 146–153.
- [17] JUNG Y J, LEE I H, NOU I S, et al. BrRZFP1 a *Brassica rapa* C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-type RING zinc finger protein involved in cold, salt and dehydration stress[J]. Plant Biology, 2013, 15(2): 274–283.
- [18] GUO L H, CHEN S N, LIU K H, et al. Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(9): 1306–1315.
- [19] MITTAL D, ENOKI Y, LAVANIA D, et al. Binding affinities and interactions among different heat shock element types and heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. The FEBS Journal, 2011, 278(17): 3076–3085.
- [20] KHURANA N, CHAUHAN H, KHURANA P. Wheat chloroplast targeted sHSP26 promoter confers heat and abiotic stress inducible expression in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54418.
- [21] RIEPING M, SCHÖFFL F. Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco[J]. Molecular & General Genetics, 1992, 231(2): 226–232.



- [22] BARCHETTA S , LA TERZA A , BALLARINI P , et al . Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation[J] . Eukaryotic Cell , 2008 , 7(2) : 379–386 .
- [23] WANG P J , CHEN X J , GUO Y C , et al . Identification of CBF transcription factors in tea plants and a survey of potential CBF target genes under low temperature[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2019 , 20(20) : 5137 .
- [24] LI M , XIE C H , SONG B T , et al . Construction of efficient, tuber-specific, and cold-inducible promoters in potato[J] . Plant Science , 2015 , 235 : 14–24 .
- [25] JIN R , KIM B H , JI C Y , et al . Overexpressing *IbCBF3* increases low temperature and drought stress tolerance in transgenic sweetpotato[J] . Plant Physiology and Biochemistry , 2017 , 118 : 45–54 .
- [26] LI M , XIE C H , SONG B T , et al . Construction of efficient, tuber-specific, and cold-inducible promoters in potato[J] . Plant Science , 2015 , 235 : 14–24 .
- [27] LIU J L , WANG F T , YU G , et al . Functional analysis of the maize C-repeat/DRE motif-binding transcription factor CBF3 promoter in response to abiotic stress[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2015 , 16(6) : 12131–12146 .
- [28] WANG Y M , WANG C , GUO H Y , et al . BpMYB46 from *Betula platyphylla* can form homodimers and heterodimers and is involved in salt and osmotic stresses[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2019 , 20(5) : 1171 .
- [29] 秦琳琳, 张曦, 姜骋, 等 . 白桦 *BpZFP4* 基因启动子克隆和逆境响应元件功能分析[J] . 植物研究 , 2019 , 39(6) : 917–926 .
- QIN L L , ZHANG X , JIANG C , et al . Cloning and functional analysis of *BpZFP4* promoter from birch (*Betula platyphylla*)[J] . Bulletin of Botanical Research , 2019 , 39(6) : 917–926 .
- [30] WANG C , GAO G , CAO S , et al . Isolation and functional validation of the CmLOX08 promoter associated with signalling molecule and abiotic stress responses in oriental melon, *Cucumis melo* var. *makua* Makino[J] . BMC Plant Biology , 2019 , 19(1) : 75 .
- [31] ULLAH A , MANGHWAR H , SHABAN M , et al . Phytohormones enhanced drought tolerance in plants : a coping strategy[J] . Environmental Science and Pollution Research International , 2018 , 25(33) : 33103–33118 .
- [32] COLEBROOK E H , THOMAS S G , PHILLIPS A L , et al . The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J] . The Journal of Experimental Biology , 2014 , 217(Pt 1) : 67–75 .
- [33] BLAKESLEE J J , SPATOLA ROSSI T , KRIECHBAUMER V . Auxin biosynthesis : spatial regulation and adaptation to stress[J] . Journal of Experimental Botany , 2019 , 70(19) : 5041–5049 .
- [34] RUAN J J , ZHOU Y X , ZHOU M L , et al . Jasmonic acid signaling pathway in plants[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2019 , 20(10) : 2479 .
- [35] AGARWAL P K , JHA B . Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling[J] . Biologia Plantarum , 2010 , 54(2) : 201–212 .
- [36] VERMA V , RAVINDRAN P , KUMAR P P . Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J] . BMC Plant Biology , 2016 , 16 : 86 .
- [37] KU Y S , SINTAHA M , CHEUNG M Y , et al . Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2018 , 19(10) : 3206 .
- [38] WATANABE M , TAMURA K , MAGBANUA J P , et al . Elevated expression of genes under the control of stress response element (STRE) and Msn2p in an ethanol-tolerance sake yeast *Kyokai no. 11*[J] . Journal of Bioscience and Bioengineering , 2007 , 104(3) : 163–170 .
- [39] JIANG J J , MA S H , YE N H , et al . WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J] . Journal of Integrative Plant Biology , 2017 , 59(2) : 86–101 .
- [40] SHI W Y , DU Y T , MA J , et al . The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2018 , 19(12) : 4087 .
- [41] YANG T B , POOVAIAH B W . A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants[J] . Journal of Biological Chemistry , 2002 , 277(47) : 45049–45058 .
- [42] KAPLAN B , DAVYDOV O , KNIGHT H , et al . Rapid transcriptome changes induced by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients reveal ABRE-related sequences as  $\text{Ca}^{2+}$ -responsive cis elements in *Arabidopsis*[J] . The Plant Cell , 2006 , 18(10) : 2733–2748 .

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正