

## 簇毛麦 *Dvb1t101* 基因及其启动子的克隆与序列分析

何华纲<sup>1</sup>, 潘薇<sup>1</sup>, 任新龙<sup>1</sup>, 孙卫红<sup>1</sup>, 朱姗颖<sup>2</sup>, 别同德<sup>3</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏大学环境学院, 镇江 212013;

3. 扬州市农业科学研究院, 扬州 225007)

**摘要:** BLT101 家族是一类高度保守的小分子质膜蛋白, 在植物抗寒、耐旱、耐盐、脱落酸 (ABA) 应答等过程中起重要作用。利用 PCR 技术从抗寒、耐旱的簇毛麦中克隆了 *Dvb1t101* 基因及其启动子。结果表明, *Dvb1t101* cDNA 全长 422 bp, 具有完整的开放阅读框 (ORF), 编码一条 54 个氨基酸残基的多肽, 并具有 2 个保守的跨膜结构域; *Dvb1t101* 基因长为 754 bp, 含有 2 个外显子和 1 个内含子, 启动子区域具有 2 个干旱/冷应答核心元件 (DRE/CRT)、2 个 MYC 结合位点和 3 个 ABA 应答元件 (ABRE), 该基因对低温、干旱等逆境及 ABA 可能存在广泛的应答。本研究为进一步揭示 BLT101 家族在簇毛麦抗逆过程中的作用机理奠定了基础。

**关键词:** 簇毛麦; *Dvb1t101* 基因; 启动子; 序列分析

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)02-0269-04

### Cloning and sequence analysis of the *Dvb1t101* gene and its promoter from *Dasypyrum villosum*

HE Hua-gang<sup>1</sup>, PAN Wei<sup>1</sup>, REN Xin-long<sup>1</sup>, SUN Wei-hong<sup>1</sup>, ZHU Shan-ying<sup>2</sup>, BIE Tong-de<sup>3</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

2. School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

3. Yangzhou Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225007)

**Abstract:** BLT101 family, a kind of conserved low molecular protein sublocalized in plasma membrane, play important roles in cold acclimation, drought tolerance and abscisic acid (ABA) response in plant. By PCR method, a *Dvb1t101* gene and its promoter were cloned from *Dasypyrum villosum*, a closely relative to common wheat. *Dvb1t101* cDNA is 422 bp in length with an open reading frame (ORF) encoding 54 amino acid residues, which contains two conserved transmembrane domains. The genomic DNA of *Dvb1t101* gene is 754 bp in length with two exons and one intron. In the promoter region, two DRE/CRT, two MYC-binding sites and three ABA response elements (ABRE) are predicted. *Dvb1t101* gene of *D. villosum* might be widely response to low temperature, drought, ABA and other abiotic stresses. These results could contribute to the understanding of abiotic stress tolerance mechanism in *D. villosum*.

**Key words:** *Dasypyrum villosum*; *Dvb1t101* gene; promoter; sequence analysis

BLT101 家族最早发现于大麦<sup>[1]</sup>, 近年来发现该家族广泛存在于细菌、酵母、线虫和植物中<sup>[2]</sup>。植物 BLT101 家族包括大麦 *b1t101* 基因<sup>[1]</sup>, 长穗偃麦草 *ESI3* 基因<sup>[3]</sup>, 拟南芥 *RCI2A*、*RCI2B* 基因<sup>[4]</sup>, 小麦 *wpi6* 基因<sup>[5]</sup>, 水稻 *OsLti6a*、*OsLti6b* 基因<sup>[6]</sup>, 羊草 *AcPMP3-1*、*AcPMP3-2* 基因<sup>[7]</sup>, 星星草 *PutPMP3-1*、*PutPMP3-2* 基因<sup>[8]</sup>等。BLT101 家族基

因与植物的抗逆性密切相关, 可在低温、干旱、脱水、高盐等多种胁迫下增强表达, 并受植物激素脱落酸 (ABA) 的诱导, 但不同基因对逆境和 ABA 的应答模式存在一定差异<sup>[1-8]</sup>。

BLT101 家族蛋白是一类小分子多肽, 分子量约为 5.9 ku, 由 54 个左右的氨基酸残基组成<sup>[1]</sup>, 多序列比对分析发现它们都具有 2 个高度保守的跨膜

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX09B\_211Z), 江苏省自然科学基金项目 (BK2009175、BK2010344), 现代农业产业技术体系项目 (NYCYTX-03) 和江苏高校优势学科建设工程资助项目共同资助。

作者简介: 何华纲, 男, 讲师。E-mail: hghe@ujs.edu.cn

结构域<sup>[7]</sup>, 采用绿色荧光蛋白 (GFP) 标签技术已证实 BLT101 家族蛋白能够定位于细胞膜, 推测 BLT101 家族蛋白可能在胁迫条件下对细胞膜起保护作用<sup>[5,7-8]</sup>, 但其机理尚不明确。

簇毛麦是小麦的一个野生近缘物种, 具有抗病、抗寒、耐旱、耐盐等多种优良性状, 是小麦品种改良的重要种质资源之一<sup>[9]</sup>。本研究利用 PCR 技术克隆了簇毛麦 BLT101 家族基因——*Dvblt101* 基因及其启动子, 并对基因结构和启动子模序进行了分析, 为该基因的深入研究与应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

簇毛麦 (*Dasypyrum villosum*, VV,  $2n=2x=14$ ) 由南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室提供; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株由本实验室保存; pMD18-T 载体、Ex Taq 酶、dNTP、T4 连接酶、反转录试剂盒等购自 TaKaRa 公司; TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 根据簇毛麦 BLT101 家族基因的 2 个表达序列标签 (EST) 设计引物:

P1: 5'-ATGGGCTCGGCAACAGT-3'

P2: 5'-TTAAGCCACCAGCACATAC-3'

用于扩增其开放阅读框 (ORF); 根据小麦 *wpi6* 基因启动子和大麦 *blt101* 基因启动子 (GenBank 数据库的登录号分别为 AB370199 和 AB370200) 的保守序列, 设计上游引物 P3 (5'-TGCCGACATGCATGGATACA-3'), 并根据簇毛麦 EST 设计下游引物 P4 (5'-GACATGCTGTCTTCAACCAGACA-3'), 利用 P3 和 P4 可从基因组 DNA 中扩增基因及启动子。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

**1.2.2 基因组 DNA 提取、总 RNA 提取与反转录** 选取 30 粒种子放在培养皿中, 室温培养 10 d, 剪取叶片在液氮中研磨成细粉, 采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取基因组 DNA。用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液处理簇毛麦幼苗 12 h, 采用 TRIZOL 试剂提取总 RNA, 取 1  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录<sup>[11]</sup>。

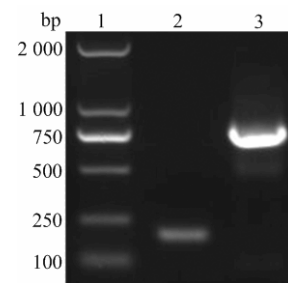
**1.2.3 PCR 扩增** PCR 反应总体积为 50  $\mu$ L, 其中含 10 $\times$ Ex Taq PCR Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (各 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, 2 条引物 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 各 1  $\mu$ L, Ex Taq 酶 (5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.4  $\mu$ L, 基因组 DNA 200 ng 或反转录产物 1  $\mu$ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

**1.2.4 PCR 产物的克隆、测序与分析** PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 进行胶回收和纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株, 蓝白斑筛选阳性克隆, 送上海生工测序。采用 BLAST 程序对 DNA 序列及推导的蛋白质序列进行同源性分析, 采用 ClustaW 软件进行多序列比对, Genescan 软件用于内含子分析, PLACE 软件用于启动子模序分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Dvblt101* 基因 ORF 的克隆与序列分析

将报道的 2 个 EST 进行拼接, 得到 1 条完整的 cDNA, 全长为 422 bp, 与小麦 *wpi6* 基因、大麦 *blt101* 基因的 cDNA 序列一致性分别为 90% 和 87%, 因而该基因属于 BLT101 家族, 将其命名为 *Dvblt101* 基因。为了证实拼接的 cDNA, 本研究提取簇毛麦总 RNA, 对其进行反转录, 用引物对 P1/P2 进行 PCR 扩增, 得到 1 条约为 170 bp 的产物 (图 1), 经胶回收、T/A 克隆和测序, 所得 ORF 的长度为 165 bp, 其序列与拼接的 cDNA 完全一致, 可编码 54 个氨基酸残基的多肽 (图 2), 推测的分子量为 5.9 ku, 等电点为 6.3, 具有 2 个跨膜结构域, 可能定位于细胞膜。



1. DNA Marker; 2. 扩增 *Dvblt101* ORF; 3. 扩增 *Dvblt101* 基因组 DNA

1. DNA Marker; 2. Amplification products of *Dvblt101* ORF; 3. Amplification products of *Dvblt101* gene from genomic DNA

图 1 *Dvblt101* 基因的 PCR 扩增

Figure 1 PCR products of *Dvblt101* gene

### 2.2 *Dvblt101* 基因及启动子的克隆与序列分析

以簇毛麦基因组 DNA 为模板, 用引物对 P3/P4 进行 PCR 扩增, 产物为 754 bp (图 1), 与小麦 *wpi6* 基因、大麦 *blt101* 基因分别具有 90%、84% 的序列一致性。生物信息学分析发现, 簇毛麦 *Dvblt101* 基因具有 2 个外显子和 1 个内含子, 其中内含子的长度与小麦 *wpi6* 基因的内含子一致, 都是 98 bp, 但序列存在较大的变异 (图 2)。所调查的 *Dvblt101*

基因启动子为 312 bp, 与小麦相似的是, *Dvb1t101* 基因启动子中也没有大麦所特有的 *Xumet* 元件<sup>[2]</sup>。

这些结果表明, 簇毛麦 *Dvb1t101* 基因与小麦 *wpi6* 基因具有更近的亲缘关系。

Table with 3 columns: Gene name (b1t101, wpi6, Dvb1t101), Sequence type (genomic c, cDNA, amino acid), and Sequence alignment. The table shows the alignment of genomic DNA and cDNA for three genes, with amino acid translations provided below the cDNA sequences.

氨基酸序列位于对应的密码子下方; 星号表示终止密码子

Amino acid is below its correspondent codon. The asterisk represents the stop codon  
图 2 *Dvb1t101*、*wpi6* 和 *b1t101* 基因组 DNA 及 cDNA 序列的比对  
Figure 2 Alignment of genomic DNA and cDNA of *Dvb1t101*, *wpi6* and *b1t101* gene

Table showing promoter motif analysis for Dvb1t101, wpi6, and b1t101. It includes genomic DNA (pram) and cDNA sequences with various motifs highlighted: DRE/CRT (boxed), ABRE (shaded), MYB binding sites (boxed and shaded), MYC binding sites (underlined with dot lines), and TATA boxes (underlined with solid lines). An arrow points to the Xumet element in the barley b1t101 promoter.

加框表示 DRE/CRT; 阴影表示 ABRE; 阴影加框表示 MYB 结合位点; 虚下划线表示 MYC 结合位点; 实下划线表示 TATA 盒; 箭头所指“X”表示大麦 *b1t101* 基因启动子所特有的 *Xumet* 元件

DRE/CRTs are boxed. ABREs are shaded. MYB binding sites are boxed and shaded. MYC binding sites are underlined by dot lines. TATA boxes are underlined by solid lines. “X” pointed by an arrow indicates *Xumet* element of barley *b1t101* promoter

图 3 *Dvb1t101*、*wpi6* 和 *b1t101* 基因启动子模序分析

Figure 3 Analysis of promoter motifs of *Dvb1t101*, *wpi6* and *b1t101* gene

启动子模序分析发现, *Dvb1t101* 基因启动子除了具有 1 个 TATA 盒 (TATATAA) 之外, 还有多种转录因子识别模序, 包括 2 个干旱/冷应答核心元件 (DRE/CRT, 核心序列为 RCCGAC, 其中 R=G/A)、2 个 MYC 结合位点 (核心序列为 CANNTG, 其中

N=A/T/G/C)、3 个 ABA 应答元件 (ABRE, 核心序列为 ACGTG) (图 3), 推测 *Dvb1t101* 基因对低温、干旱等逆境以及 ABA 存在广泛的应答。

### 3 讨论

BLT101 家族是一类高度保守的小分子质膜蛋白,对维持细胞膜的稳定性具有重要作用,可提高植物对低温、干旱、高盐等逆境的抵御能力<sup>[5]</sup>。在对簇毛麦 *Dvblt101* 基因的研究中发现,推导的 DvBLT101 与小麦 WPI6、大麦 BLT101 仅最后一位氨基酸存在差异,即在簇毛麦中为丙氨酸(A),在小麦和大麦中为缬氨酸(V),两者均为疏水性氨基酸,由此推测,该位点氨基酸序列的变化可能并不影响 DvBLT101 的亚细胞定位及相关功能。

对启动子序列的比较分析表明,簇毛麦、小麦和大麦 BLT101 家族基因的启动子都具有 MYC 结合位点、干旱/冷应答核心元件和 ABA 应答元件,但其数量不同。在小麦和大麦中,均有 1 个 MYC 结合位点、1 个干旱/冷应答核心元件和 2 个 ABA 应答元件,而在簇毛麦 *Dvblt101* 启动子中,这 3 种应答元件依次为 2、2 和 3 个。此外,在小麦和大麦中都有 1 个 MYB 结合位点(核心序列为 CNGTTR,其中 N=A/T/G /C, R=G/A),但在簇毛麦 *Dvblt101* 基因启动子中没有预测到。因此,*Dvblt101* 基因对低温、干旱、ABA 等环境因子的应答模式可能存在一定区别,而且在应答强度上也可能存在差异。BLT101 家族基因应答模式和应答强度的差异,可能使簇毛麦表现出比小麦、大麦更强的抗逆性,这一点尚需通过比较试验进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Goddard N J, Dunn M A, Zhang L, et al. Molecular analysis and spatial expression pattern of a low-temperature-specific barley gene, *blt101*[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 871-879.
- [2] Koike M, Kato H and Imai R. Diversification of the barley

and wheat *blt101/wpi6* promoters by the *Xumet* element without affecting stress responsiveness [J]. *Mol Gen Genomics*, 2008, 280: 41-47.

- [3] Gulick P J, Shen W and An H. *ESI3*, a stress-induced gene from *Lophopyrum elongatum*[J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 799-800.
- [4] Capel J, Jarillo J A, Salinas J, et al. Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 569-576.
- [5] Imai R, Koike M, Sutoh K, et al. Molecular characterization of a cold-induced plasma membrane protein gene from wheat [J]. *Mol Gen Genomics*, 2005, 274: 445-453.
- [6] Morsy M R, Almutairi A M, Gibbons J, et al. The *OsLti6* genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature [J]. *Gene*, 2005, 344: 171-180.
- [7] Inada M, Ueda A, Shi W, et al. A stress-inducible plasma membrane protein 3 (AcPMP3) in a monocotyledonous halophyte, *Aneurolepidium chinense*, regulates cellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> accumulation under salt stress[J]. *Planta*, 2005, 220: 395-420.
- [8] Zhang C, Shunsaku N, Liu S, et al. Characterization of two plasma membrane protein 3 genes (*PutPMP3*) from the alkali grass, *Puccinellia tenuiflora*, and functional comparison of the rice homologous, *OsLti6a/b* from rice[J]. *BMB Rep*, 2008, 41(6): 448-454.
- [9] Blanco A, Resta P, Simeone R, et al. Chromosomal location of seed storage protein genes in the genome of *Dasyphyrum villosum* (L.) Candargy [J]. *Thero Appl Genet*, 1991, 82: 358-362.
- [10] Murray M G and Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*. 1980, 8(19): 4321-4325.
- [11] Nylander M, Heino P, Helenius E, et al. The low-temperature- and salt-induced *RC12A* gene of *Arabidopsis* complements the sodium sensitivity caused by a deletion of the homologous yeast gene *SNA1* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45: 341-352.