



文章编号: 1000-4025 (2007) 04-0657-05 *

马铃薯 *Alfin1*-like 锌指蛋白基因克隆与序列分析

刘瑞娟^{1,2}, 王海庆^{1*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用紫花苜蓿盐胁迫相关锌指结构蛋白 *Alfin1* 基因 cDNA 序列, 通过电子克隆在 GenBank 中对马铃薯同源 EST 序列进行查询比较和拼接, 获得了 1 个含有完整编码区的 cDNA 序列, 并通过 RT-PCR 成功获得了该序列. 获得的全长 cDNA 序列中包含 1 个 747 bp 的最大读码框, 编码 248 个氨基酸, 将其命名为 *Stfin1*. 氨基酸序列分析表明存在典型的 Cys4-His-Cys3 锌指结构, 与 *Alfin1* 一致性达 93.09%. 从结构分析结果推测 *Stfin1* 与 *Alfin1* 在功能上具有一定的相关性.

关键词: 锌指蛋白; 电子克隆; 马铃薯

中图分类号: Q789; S532 **文献标识码:** A

Cloning and Sequencing of an *Alfin1*-like Zinc Finger Protein Gene in *Solanum tuberosum*

LIU Rui-juan^{1,2}, WANG Hai-qing^{1*}

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A full length cDNA sequence was obtained by in silico cloning. After searching against potato EST database in GenBank using *Alfin1* cDNA sequence from alfalfa. The native cDNA sequence denoted as *Stfin1* (*Solanum tuberosum* *Alfin1*-like protein1) was isolated with RT-PCR amplification. *Stfin1* contains a maximum open reading frame of 747 bp encoding a peptide with 248 amino acids and a stop codon. The *Stfin1*-deduced amino acid sequence showed 93.09% identity and shared a conserved typical Cys4-His-Cys3 zinc finger motif with *Alfin1*. Its sequence conservation and structure similarity with *Alfin1* implied the functional correlation between *Stfin1* and *Alfin1* in development processes and responses to abiotic stresses.

Key words: zinc finger protein; in silico cloning; *Solanum tuberosum*

盐胁迫是影响植物生长发育、地理分布和农业生产的重要限制因子, 植物在感受到盐胁迫信号后, 会启动一系列基因的表达从而对一定水平的胁迫产生适应. 在这些胁迫相关基因的表达调控中, 转录因子发挥着重要功能. 目前报道较多的有与渗透胁迫有关的 CBF 因子, 与脱落酸信号相关的 bZIP 因子

等^[1]. 此外还发现许多植物锌指结构蛋白与逆境胁迫有关, 并且多数为信号通路中的转录因子^[2]. 锌指结构(zinc finger, ZFs)是存在于某些核酸结合蛋白中的一类具有指状结构的结构域, 它通过半胱氨酸和组氨酸残基与 Zn^{2+} 络合, 自我折叠成一种手指状的空间结构. 锌指蛋白负责调控基因的表达, 主要通

* 收稿日期: 2006-11-09; 修改稿收到日期: 2007-02-27

基金项目: 中国科学院“西部之光”项目(110040321)

作者简介: 刘瑞娟(1981-), 女(汉族), 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物. E-mail: Liuruijuan2005@hotmail.com

* 通讯作者: 王海庆, 博士, 助理研究员, 从事生化与分子生物学研究. E-mail: wanghq@nwipb.ac.cn

过与核酸的相互作用显示出不同的功能,如促进转录、抑制转录、结合单链DNA、结合RNA或双向结合RNA/DNA等。

Alfin1 是通过差示技术从紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 耐盐无性系突变体中克隆到的编码具有 Cys4-His-Cys3 锌指结构特点转录因子的基因^[3,4]。*Alfin1* 不仅与根系发育相关基因的转录调节有关,还对盐胁迫相关基因的表达调控发挥功能。在通过反义技术抑制 *Alfin1* 内源基因表达的情况下,苜蓿愈伤组织对盐胁迫的敏感性增加,而且再生植株根系不能发育或发育不良^[5]。*Alfin1* 的过量表达则能使苜蓿愈伤组织耐盐性明显提高,由此获得的再生植株表现出耐盐性提高、根系发达的特点^[6]。进一步分析发现该转录因子的氨基酸序列、蛋白质结构都与现在已经知道的逆境信号诱导的其它转录因子不同,也不具备典型的 ABA 诱导特征,因此代表了一类新的盐胁迫相关转录因子^[1,3]。

已有的研究表明,在水稻、拟南芥与胡杨中也存在与 *Alfin1* 同源的基因序列^[7], *Alfin1-like* 基因在植物中的存在是否具有功能上的普遍性值得探究。本实验采用电子克隆的方法^[8],利用 *Alfin1* 基因序列在 GenBank 中对马铃薯 (*Solanum tuberosum*) EST 序列的查询比较,获得了 1 个含有完整编码区的 cDNA 序列,编码的氨基酸序列和 *Alfin1* 高度同源,并通过 RT-PCR 成功获得了该序列。

1 材料和方法

1.1 材料

马铃薯块茎切块播种于蛭石和营养土等体积混合的培养基质中,于 22、14 h 光照培养条件下生长 2 个月后取叶片和根,液氮速冻后于 -80 保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 分别取马铃薯的叶片和根 0.1 g,加液氮充分研磨后,加入 Invitrogen 公司 Trizol 试剂,按照其说明书提供的方法提取总 RNA,获得的 RNA 溶于 100 μ L DEPC-H₂O 中用于下一步的 RT-PCR 程序。

1.2.2 RT-PCR 扩增 将 4.5 μ L RNA 和 6.0 μ L 100 μ mol/L Oligo(dT)₁₈ 混合,室温孵育 10 min 后,依次加入 200 U/ μ L RNasin 0.5 μ L、5 \times 逆转录缓冲液 4.0 μ L、100 mmol/L dNTP 4.0 μ L 和 MLV 逆转录酶 1 μ L。将该体系混合均匀 37 反应 1.5 h 后冰水浴中冷却 2 min,合成 cDNA 第一链。M-MLV 逆转录酶为 Takara 产品。

以合成的 cDNA 第一链产物为模板,根据 EST 拼接序列信息设计引物 Pst1 (5'-AGTTTGGGTAA-CATGAA GAGGAAA -3') 和 Pst2 (5'-CCGAAA GTA-AGATAACA GAAA GCAA -3') 进行 *Stfin1* 的 PCR 扩增。反应总体积为 50 μ L,其中包括 10 \times PCR Ex-Taq buffer 5.0 μ L,10 mmol/L 引物各 1.0 μ L,2.5 mmol/L dNTP 4.0 μ L,5 U/ μ L Ex-Taq polymerase 0.25 μ L,模板 DNA 1.0 μ L,ddH₂O 37.75 μ L。反应条件为 94 预变性 3 min;94 变性 30 s,45 退火 30 s,72 延伸 1 min,30 个循环;72 延伸 10 min。Ex-Taq polymerase 为 Takara 产品。

1.2.3 RT-PCR 产物的克隆和序列分析 PCR 产物经胶回收纯化后,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化 DH5 感受态细胞,在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基 (4 μ L 1 mol/L IPTG 和 40 μ L 20 mg/mL -gal) 上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落培养,提取质粒进行酶切鉴定和测序确认。pGEM-T Easy 试剂盒为 Promega 产品,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 马铃薯中与 *Alfin1* 同源的 EST 序列的查询与拼接

利用 *Alfin1* 基因序列对 GenBank 中马铃薯的 EST 序列进行查询,从中获得同源 EST 序列片段。通过对比分析,由 EST427774 (登录号为 BE924005) 与 EST725699 (登录号为 CK279620) 拼接获得了 1 183 bp 的 cDNA 序列,其中含有 1 个 750 bp 的最大开放读码框,编码 249 个氨基酸和 1 个终止密码子,而且在起始密码子前存在 1 个终止密码子 (图 1)。由此可见,通过 EST 序列拼接已经获得了含有完整读码框的 cDNA 序列。将此序列命名为 *Stfin1* (*Solanum tuberosum* *Alfin1-like* protein)。

2.2 马铃薯 *Alfin1-like* 锌指蛋白基因序列的克隆

以马铃薯的叶和根为材料提取的总 RNA 为模板,根据由 EST 拼接获得的序列信息设计引物,利用 RT-PCR 进行扩增,获得了约 1.1 kb 的特异条带 (图 2, A),与预测序列大小一致。将获得的 PCR 产物经过切胶纯化,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化大肠杆菌,获得阳性菌落并提取质粒,对其中 2 个质粒 (P₁ 和 P₂) 用 *EcoR* I 进行了酶切鉴定。由于在 pGEM-T Easy 线性化载体两端各存在 1 个 *EcoR* I 酶切位点,同时对拼接获得的 *Stfin1* 序列分析发现在 874 位存在一个 *EcoR* I 酶切位点,因此对连接了

Stfin1 的 p GEM- T Easy 载体用 *EcoR* I 消化将会产生 3.0 kb 的载体片段和约 800、400 bp 条带的目的基因片段. 对酶切产物电泳分析, 与预期结果相符 (图 2 ,B).

2.3 马铃薯 *Stfin1* 基因的序列分析

在上述酶切分析的基础上, 将 P₁ 质粒中的 *Stfin1* 基因序列进行了测序分析, 结果表明实验得到的 *Stfin1* 序列中存在 747 bp 的最大开放读码框, 编码

```

GCTTCTTCTCCTGCTGTTCTCTTCTCTTCTTCTATATCCGTTTCTTACAATTTCTCTACTTCTCACAGTTTCTCATAAAAAATTGAGTTTTT 90
CTCTTTATGAATCTTCATTTTCACAGTACGTAGCAAACATAATTTTAAAGTTTGGGTAACATGAAGAGGAAACCCTAGTCTTGGGGGAA 180
AACCCATAATTTCTTCAACCCACTTCTTGTTTTTCTCAAAGACTCAATTTTTTCTTGTTGGGGTTGTTAGAAATATGGAAAATACGGTA 270
                                     M E N T V 5
CCTAGGACTGTAGAAGAAGTATTCAACGATTTCAAAGGTCGTAGAGCTGGTTTAATCAAAGCACTAACACAGATGTCGAGAAGTTTTAT 360
P R T V E E V F N D F K G R R A G L I K A L T T D V E K F Y 35
CAATCGTGTGATCCTGAAAAGGAGAACTTGTTGCTCTATGGGCTTCTTAATGAAACATGGGAAGTAAACCTCCCTGTAGAGGAGGTGCCT 450
Q S C D P E K E N L C L Y G L P N E T W E V N L P V E E V P 65
CCAGAACTTCGGAGCCAGCATTGGGCATAAACTTCGCACGTGATGGAATGCAAGAGAAAGACTGGTTATCACTTGTGCTGTTACAGT 540
P E L P E P A L G I N F A R D G M Q E K D W L S L V A V H S 95
GATTCATGGTGCTTCTGTTGCACTTCTACTTTGGCGCACGGTTTGGGTTCCGCAAGAGTAAAGGAAGAGGCTTTTCCAAATGACAAAT 630
D S W L L S V A F Y F G A R F G F G K S E R K R L F Q M T N 125
GATCTCCCAACAGTGTGTTGAGGTTGTTACTGGAGCTGCTAAGCAGGCACGGATGCCGCTCACAACAATAGCAGCAAAAGCAAAATCAAGT 720
D L P T V F E V V T G A A K Q A R D A A H N N S S K S K S S 155
GGAAAGCCTCGCAGCCAGAGCCCGCCAGCCCAAGGAAGTAAAGGTGCTCCACCTAAAATGGAGGATGAAAGTGGGGAGGAGGAGGAGAA 810
G K P R Q P E P Q P K E V K V S P P K M E D E S G E E E E E 185
GAAGAAGAAGAACAAGGGCAACTCTCTGTGGAGCTTGTGGTGATAATATGCCACGGATGAATCTGGATTGCTGTGATATTTGT 900
E E E E E Q G A T L C G A C G D N Y A T D E F W I C C D I C 215
GAGAGATGGTTCCATGGCAAATGTGTGAAGATTACCCAGCAAAGCTGAGCATATCAAGCAGTACAAGTGTCTTAGTTGTCAGTAGCAAG 990
E R W F H G K C V K I T P A K A E H I K Q Y K C P S C S S K 245
AGAGCTAGAGTTTAAATTTGTGGCAATTTAGAGCAACATCAATTAAGTGGAGGTGTTGGAAGGTCTAGGACTTTTAGCTCAGTTATCA 1080
R A R V 249
GATGTAATCTATGTCAAAGTTAAATGTTTGTGATGGAATTGGGATGTCCATTTTCATGAACATTTGCTTTCTGTTATCTTACTTTCCGGAT 1170
TGTGTTTTAGATG 1183

```

图 1 EST 序列拼接获得的马铃薯 *Stfin1* 基因序列和编码的氨基酸序列
终止密码子用方框示出;设计引物的序列用下划线标出

Fig.1 *Stfin1* gene sequence obtained by in silico cloning and deduced amino acid sequence
The stop codon is boxed and primer sequences are underlined

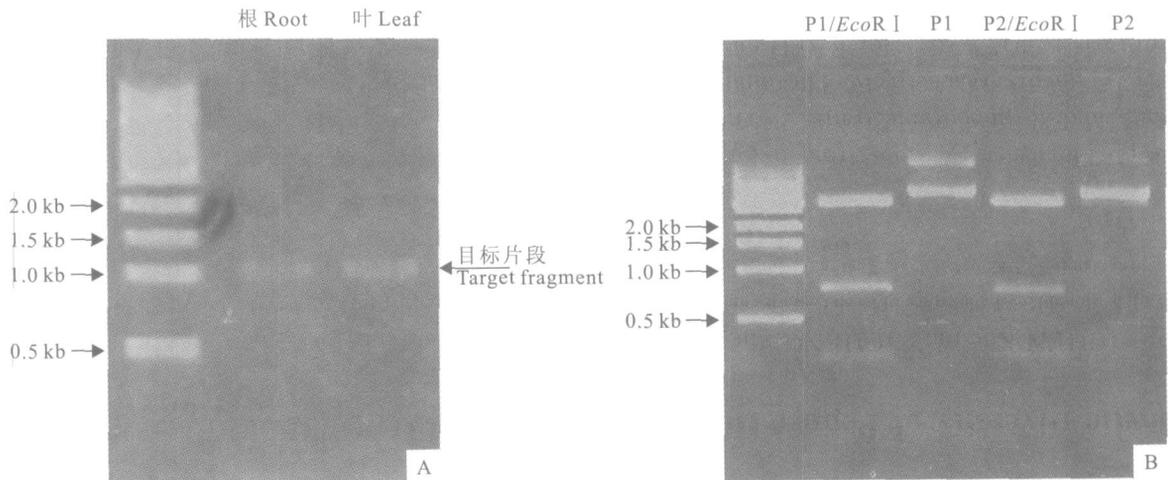


图 2 *Stfin1* 的 RT-PCR 克隆(A)和 p GEM-*Stfin1* 的酶切鉴定(B)

A. *Stfin1* 在马铃薯根、叶片中的 RT-PCR 扩增;B. p GEM-*Stfin1* 质粒的酶切鉴定

Fig.2 RT-PCR amplification of *Stfin1* (A) and enzymatic digestion identification of p GEM-*Stfin1* (B)

A. RT-PCR amplification of *Stfin1* in potato root and leaf;B. Enzymatic digestion of p GEM-*Stfin1* plasmids

248 个氨基酸和 1 个终止密码子(图 3). 实验所得的 cDNA 序列与计算机拼接的序列之间的一致性为 88.58%, 其中 120 个碱基位点和计算机拼接的序列存在差异, 在 5 和 3 非翻译区中存在 8 处 2 个或 2 个以上碱基连续缺失或变异的区域, 有的区域碱基缺失高达 20 bp, 在翻译区存在 56 bp 的变异, 其中除了 2 个区域分别出现 3 个碱基缺失和变异外, 其余均为单个碱基变异(图 3). 因此, 与计算机拼接序列相比, 实

际克隆到的基因序列在非翻译区存在比较大的变异. 由于翻译区的变异, 在编码的氨基酸序列中引起了 17 个氨基酸残基的变化(图 4).

由实验得到的 *Stfin1* 推导出的氨基酸序列和苜蓿 *Alfin1* 氨基酸序列的同源性比较结果表明, 二者的氨基酸序列一致性为 93.09%. 尽管克隆所得 *Stfin1* cDNA 序列与预测的序列存在较大的变异, 但在接近 C-末端区域形成锌指结构区域的 8 个氨

Predicted	GCTTTCTCTCGTGTCTCTTTCTCTTTCTATATCCGTTTCTTACAAITTTCTCTACTTCTCACAGTTTCTCATAAAAAATTGAGITTTT	90
Cloned	0
Predicted	CTCTTTATGAATCTTCATTTTCCAGTACGTAGCAAACAAITTTTAAAGTTTGGGTAAACATGAAGAGGAAACCCFAGTTCITGGGGGAA	180
Cloned AGTTTGGGTAAACATGAAGAGGAAACCTTAAAGTTTGGGGGAA	41
Predicted	AACCTAATTTCTTCAACCCACTTCTGTGTTTTCT.....CAAAGACTCAATTTTTTCTGTGGGGTGTGTAGAAAT.....	255
Cloned	AACCTAATTTATTTCCACCCACTTCTGTGTTTTTTTTTTTTCBAAGACTCAATTTTTTCTGTGGGGTATTAGAAATTTGGCGTG	131
PredictedATGGAAATACGGTACCTAGGACTGTAGAGAGTATTCAACGATTTCAAGGTCTGTAGAGCTGGTTTAAATCAAG	331
Cloned	TAGACAAGGGTAGTATGGAAATTCGGTACCGACTGTAGAAAGTATTCAACGATTTCAAGGTCTGTAGAGCTGGTTTAAATCAAG	221
Predicted	CCTAACTACAGATGTCGAGAAGTTTATCAATCGTGTGATCCTGAAAGGAGAACTTGTGTCTCTATGGGCTTCTAATGAAACATGGG	421
Cloned	CCTTACRCAGATGTTGAGAAGTTTATCAGCAGTGTGATCCTGAAAGGAGAACTTGTGTCTCTATGGGCTTCTAATGAAACATGGG	311
Predicted	AAGTAAACCTCCCTGTAGAGGAGGTGCTCCAGAACTTCGGAGCCAGCATTGGGCATAAACTTCGCACGTGATGGAATGCAAGAGAAAG	511
Cloned	AAGTAAACCTCCCGTGGGAAGAGGTCCCTCCAGAACTTCGGAGCCAGCATTGGGCATAAACTTTCGCACGTGATGGAATGCAAGAGAAAG	401
Predicted	ACTGGTATCACTTGTGCTGTTCCAGTGTATCATGGCTGCTTCTGTTGCATTCTACTTTGGCGCACGGTTTGGGTTGGCAAGAGTG	601
Cloned	ACTGGTATCACTTGTGCTGTTCCAGTGTATCATGGCTGCTTCTGTTGCATTCTACTTTGGTCAAGGTTTGGGTTGGCAAGAGTG	491
Predicted	AAAGGAAGAGGGCTTTCCAAATGCAAAATGATCTCCCAACAGTGTGTTGAGGTTGTTACTGGAGCTGCTAAGCAGGCACGCATGCCCTC	691
Cloned	AAAGGAAGAGGGCTTTCCAAATGATAAATGATCTCCCAACAGTGTGTTGAGGTTGTTACCAGGCTGCTAAGCAGGCACGCATGCCCTC	581
Predicted	ACAACAATAGCACAAGCAAAATCAAGTGGAAAGCCTCGACAGCCAGAGCCCCAGCCCAAGGAAGTAAAGGTGTCTCCACCTAAATGG	781
Cloned	ACAACAATAGCACAAGCAAAATCAAGTGGAAAGCCTCGACAGCCAGAGCCCCAAGGAAGTAAAGGTGTCTCCACCTAAATGG	671
Predicted	AGGATGAAGTGGGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAAAGAAAGAACAGGGGCAACTCTGTGGAGCTTGTGGTGATAAATATGCGACGG	871
Cloned	AGACGACAGTGGGGAGGAGGAGG...ARGAAGAGGAGTGAACAGGAGCAACTCTGTGGAGCTTGTGGTGATAAATATGCGACTG	758
Predicted	ATGAATCTGGATTGCTGTGATATTGTGAGAGATGGTCCATGGCAAAATGTGGAAGATTACCCAGCAAAAGCTGAGCATATCAAGC	961
Cloned	ATGAATCTGGATTGCTGTGATATTGCGAGAGATGGTCCATGGCAAAATGTGGAAGATCACTCCAGCTAAAGCTGAGCATATCAAGC	848
Predicted	AGTACAAGTGTCTAGTTGCACTAGCAGAGAGCTAGAGTTTAAATTTGTTGGCAATTTAGAGCAACATCAATTAAGTGGAGTGTGG	1051
Cloned	AGTACAAGTGTCTAGTTGCACTAGCAGAGAGCTAAAGTCAAAATTTGTTGGCAAG.....AACAA...ATTAAGTGGTGTATGTGG	927
Predicted	AAGGCTAGGACTTTAGCTCAGTTATCAGATGTAATCTATGTCAAAGTTAAATGTTTGTGATGGAATGGGATGTCATTTCATGAAC	1141
Cloned	AAGGCTAGGACTTTAGCTCAATATCAATGTCB.....AAGGTTAAATGTTTGTGATGGAATGGGATGTCATTTCATGAAC	1009
Predicted	ATTGCTTTCTGTTATCTTACTTTCCGGATTGTGTTTAGAT	1182
Cloned	ATTGCTTTCTGTTATCTTACTTTCCGG	1036

图 3 *Stfin1* cDNA 拼接序列和克隆的实际序列的比较
最大读码框以下划线标出, 相同序列处以阴影表示

Fig. 3 Comparisons of in silico cloned sequence with the RT-PCR cloned *Stfin1* cDNA sequence
The maximum open reading frame was underlined and the shaded part showed identical sequences

Predicted	...MENVPRIVEEVFNDFKRRAGLIKALTTDVEKIFYQSCDPEKENLCLYGLPNETWEVNLPEVEVPPPELPEPALGINFARDGMQEKD	86
Cloned	...MENSVPRTVEEVFSDFKSRRAALIKALTTDVEKIFYQSCDPEKENLCLYGLPNETWEVNLPEVEVPPPELPEPALGINFARDGMQEKD	86
<i>Alfin1</i>	MEGMAQHPVPRIVEEVFSDYKRRAGLIKALTTDVEKIFYQLVDPEKENLCLYGFNETWEVNLPEVEVPPPELPEPALGINFARDGMQEKD	90
Predicted	WLSLVAVHSDSWLLSVAFYFGARFGFKSERKRLRFQMHDLPTVFEVVTGAARKQARD...AAHNN.SS.KSKSSGKPRQPEPQPKVEKVS	171
Cloned	WLSLVAVHSDSWLLSVAFYFGARFGFKSERKRLRFQMHDLPTVFEVVTGAARKQARD...PPHNN.SN.KSKSSGKPRQPEPQPKVEKVS	171
<i>Alfin1</i>	WLSLVAVHSDSWLLAVAFYFGARFGFKGNDRKRLRFQMHDLPTVFELATGTAKQSKDQLTAHNN.SNS.KYKSSGKRSQESQTKGVRMSA	180
Predicted	PPKMEDESGEEEEEEEEEQGATLCGACGDNYATDEFWICCDICERWFHGKCVKITPAKAEHIKQYKPCSSSKRARV	249
Cloned	PPKMEDESGEEEEEEDE.QGATLCGACGDNYATDEFWICCDICERWFHGKCVKITPAKAEHIKQYKPCSSSKRAKV	248
<i>Alfin1</i>	PVKEEVDVSGEEEEEDDE.QGAT.CGACGDNYGDEFWICCDICERWFHGKCVKITPAKAEHIKQYKPCGCSIKKPRI	256

图 4 *Stfin1* 编码氨基酸序列和 *Alfin1* 氨基酸序列同源性的比较
形成 C₃HC₄ 锌指结构的氨基酸残基底部由星号标出, 氨基酸相同区域以阴影表示

Fig. 4 Alignment of *Stfin1* and *Alfin1* deduced amino acids sequences
The asterisk indicated the amino acid residues that form C₃HC₄ zinc finger motif, and the shaded part showed identical and conserved amino acid residues

氨基酸残基具有高度的保守性,它们与周围的其它氨基酸残基共同形成了具有典型的 Cys-X₂-Cys-X₁-Cys-Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₂-Cys-X₉-His-X₅-Cys-X₂-Cys 序列特征的 C₄HC₃ 基序^[9](图 4)。作为转录因子,应该存在核定位序列,但是对其氨基酸序列预测分析中没有发现和现在已知的核定位信号相类似的氨基酸序列。

3 讨 论

表达序列标签(expression sequence tag, EST)是指基因经过转录形成的信使 RNA(mRNA)的部分序列,现在已经在多个重要农作物和模式植物中获得了大量的 EST 序列。利用生物信息学手段,通过对已知 EST 序列进行分析、拼接,并由其推导出的氨基酸序列和已知的其它基因比较后,有可能获得一段比较长的甚至是含有完整编码区的 cDNA 序列信息,将此称为基因的电子克隆。在此基础上结合 RACE-PCR 技术,能够快速获得完整的 cDNA 序列,从而避免了以往基因克隆中进行的文库构建、筛选等繁琐的操作过程,而且实验成本也大大降低。以前的研究表明在其它植物如水稻、拟南芥中也存在和 Alfin1 基因同源的基因序列,因此推测这类转录因子在植物中的存在具有普遍性。根据这一推测,本工作利用苜蓿中编码 Alfin1 转录因子的 cDNA 序列为模板,通过对 GenBank 中马铃薯 EST 序列的查询比对,获得了与之存在高度同源性的 EST 序列,在此基础上通过序列拼接,获得了含有编码区的 cDNA 序列,并通过实验得到了验证。

对实验获得的基因序列和拼接获得的序列比较

发现,二者在序列上存在一定的差异,其中以 5 和 3 非翻译区的变异最大,不仅存在碱基替换,甚至存在多达 20 bp 的连续缺失区域。如此高的碱基变异,远非由 PCR 扩增中产生的碱基突变的原因来解释。而且我们在 PCR 扩增中使用了保真性比较高的 Ex-*Taq* DNA 聚合酶,在扩增过程中出现差错的几率远低于普通的 *Taq* DNA 聚合酶,我们以往的实验结果也证明了这一点。因此造成上述差异的原因可能主要是由马铃薯基因型间的遗传差异所造成的,此外也和 EST 序列规模化测序中存在的误差有关。

锌指结构蛋白中的 C₄HC₃ 基序被认为在基因的转录调节中发挥作用。对紫花苜蓿 Alfin1 转录因子研究发现,在体外 Alfin1 的原核表达产物能够和具有 GNGGTG 或 GTGGNG 碱基序列特征的核苷酸片段特异性结合。对根特异性表达的富含脯氨酸细胞壁蛋白基因 *MsPRP2* 的启动子序列中存在被 Alfin1 识别并结合的 3 个上述的碱基序列,Alfin1 在苜蓿中的过量表达可以提高 *MsPRP2* 基因的表达水平,转基因植株表现为根系发达,耐盐性提高^[5]。对 *Stfin1* 所推导的氨基酸序列的分析发现此序列中具有典型的 C₄HC₃ 基序,结果也表明和 Alfin1 具有同源性,其氨基酸序列的一致性程度达 93.09%,由此推测两者在功能上具有一定的相关性。到现在为止,除了以苜蓿和胡杨为材料的研究结果外,还没有其它植物中 Alfin1-like 锌指蛋白基因功能方面的报道。因此,有必要进一步分析 *Stfin1* 基因在盐胁迫下的作用来探讨 Alfin1-like 锌指蛋白功能上的普遍性。

参考文献:

- [1] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plant[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, 53:247 - 273.
- [2] TIAN L M(田路民), HUANG C L(黄丛林), et al. Advances of plant zinc proteins involved in abiotic stress[J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2005, (6):12 - 16(in Chinese).
- [3] DHUNDY R B, VAJJA YNTI V P, IL GA W. Alfin1, A novel zinc-finger protein in alfalfa root that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38:1 123 - 1 135.
- [4] BERG J M. Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge[J]. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1990, 19:405 - 421.
- [5] IL GA W, DHUNDY R B. Transgenic overexpressing of the transcription factor Alfin1 enhances expressing of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plant[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(6):473 - 480.
- [6] IL GA W, BABU V, XUE L R, KENNETH J H. The *MsPRP2* promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of Alfin1[J]. *Planta*, 2004, 219:925 - 935.
- [7] WANG J Y(王俊英), YIN W L(尹伟伦), XIA X L(夏新莉). Cloning and structure analysis of zinc finger protein gene in populus euphratica oliver[J]. *Hereditas* (遗传), 2005, 27(2):245 - 248(in Chinese).
- [8] HUANG J(黄 骥), ZHANG H SH(张红生), CAO Y J(曹雅军), et al. Strategy of in silico cloning of functional genes in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Chinese J. Rice Sci.* (中国水稻科学), 2002, 16(4):295 - 298(in Chinese).
- [9] WINICOV I. cDNA encoding putative zinc finger motifs from salt-tolerant alfalfa cells[J]. *Plant Physiol.*, 1993, 102:681 - 682.