## 苹果中新抗旱相关基因 GR - RBPs 的 克隆与表达分析

王顺才<sup>1,2</sup>,梁 东<sup>2</sup>,师守国<sup>2</sup>,马锋旺<sup>2</sup>,束怀瑞<sup>2</sup>

(1.天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 748100; 2.西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:在构建楸子叶片 SSH cDNA 文库及 EST 分析的基础上,通过电子克隆(in silico cloning)和 RT-PCR 方法 分别从楸子和平邑甜茶叶片中各克隆得到了 1 个富含甘氨酸 RNA 结合蛋白(CR-RBP)基因,分别命名为 MpCR-RBP1(HM042682)和 MhGR-RBP1(HQ380209)。它们的 cDNA 全长分别为 781 和 558 bp,ORF 分别编码 171 和 164 个氨 基酸的多肽。 MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因编码蛋白均含有一个 RNA 识别结构域(RRM)和一个富含甘氨酸区 (glycine-rich region)。生物信息学分析表明,MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 蛋白属于植物 GR-RBPs蛋白家族。定量 PCR 分析表明,MpGR-RBP1 和 MhCR-RBP1 基因在根、茎和叶中均有表达;在干旱胁迫下,它们的表达量增加,而楸子 MpGR-RBP1 表达水平明显高于平邑甜茶 MhGR-RBP1。结果表明,MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 可能参与植物对干旱 胁迫的响应反应,并推测抗旱蛋白结构的差异可能对植物的抗旱性有影响。

关键词:苹果;富含甘氨酸 RNA 结合蛋白;干旱;基因表达 中图分类号: S661.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7601(2011)05-0075-07

富含甘氨酸 RNA 结合蛋白(glycine-rich RNAbinding proteins, GR-RBPs)是 RNA 结合蛋白(RNAbinding proteins, RBPs)家族中的一个亚家族。它们 是一类广泛存在于生物体内的小分子蛋白(16~17 kDa),其分子组成最重要的特点是 N-端存在 RNA 识 别结构域(RNA recognition motifs, RRM),在C-端有一 个富含甘氨酸区(glycine-rich region)<sup>[1,2]</sup>。自从第一 个 GR-RBP 基因从玉米未成熟胚中分离出来后<sup>[3]</sup>, 其他编码富含甘氨酸 RNA 结合蛋白的基因相继从 不同植物中分离和鉴定出来,如小麦 WhGRP-1<sup>[4]</sup>、 烟草 ngRBP<sup>[5]</sup>、马铃薯 SCRGP-1<sup>[6]</sup>、黑麦草 Lp-GRP1<sup>[7]</sup>和烟草 NtGRP1<sup>[8]</sup>等。另外,有些 GR-RBP 除 了含有 RRM 和甘氨酸重复序列区域外,在 C-端富 含甘氨酸区还含有 CCHC-类型的锌指结构 (CCHC zinc-fingers),被命名为 RZ 蛋白(图 1)<sup>[9]</sup>。RZ 蛋白也 已被发现存在于烟草<sup>[10]</sup>、拟南芥<sup>[11]</sup>及水稻<sup>[12]</sup>等多 种植物中。需要一提的是,有一类植物富含甘氨酸 蛋白质(glycine-rich proteins, GRPs)与 GR-RBPs 蛋白 在序列结构上十分相似,它们主要由富含甘氨酸的 高度重复序列组成,是一类结构简单的细胞壁结构 蛋白<sup>[13]</sup>,而植物 GR-RBPs 蛋白定位于细胞质及细胞 核中,参与包括 pre-mRNA 剪切、编辑、运输、稳定性 保持和降解等基因表达调控过程[14.15]。为了区分

这两类蛋白, Lorković and Barta<sup>[9]</sup>把含有 RNA 结合结 构域(RRM)的 GRPs 蛋白重新命名为 GR-RBPs 蛋 白。



注:RNA 识别结构域; GR:富含甘氨酸区; Zn:锌指结构。

Note: RRM, RNA recognition motifs; GR, Glycine-rich region; Zn, CCHC zinc finger.

图 1 GR-RBP和RZ蛋白的图解模型

Fig.1 Schematic model of the GR-RBP and RZ proteins

拟南芥是一种重要的系统研究植物基因组及基因表达方式的双子叶模式植物。现已报道,拟南芥基因组中有编码 200 多种不同的 RBPs 蛋白,其中有 8 种 RBPs 蛋白(AtGR-RBP1 至 AtGR-RBP8)已经被证 实为 GR-RBPs 蛋白<sup>[9.16]</sup>。水稻是世界上最重要的粮食作物,作为一种主要的模式植物也被用来研究植物(特别是单子叶植物)功能基因组<sup>[17]</sup>。水稻基因组大小为 389 Mb,至少编码 6 个不同的 GR-RBP 蛋白(OsGRP1 ~ OsGRP6)。水稻 OsGRPs 基因序列高度同源,在它们 N-端 RRM 结构域都含有 RNP1 和 RNP2 保守序列,但它们 C-端富含甘氨酸结构域的长度大小不等<sup>[12]</sup>。

研究发现,有许多 GR-RBPs 基因参与植物生长

通讯作者: 马锋旺(1964一), 男, 山东济宁人, 教授, 主要从事果树逆境生理研究。 E-mail: fwm64@ sina.com。

收稿日期:2011-05-10

基金项目:国家科技部重大转基因"863"项目(2008AA10Z157)

作者简介:王顺才(1975一),男,甘肃陇西人,博士,主要从事果树生物技术研究。E-mail:wscai001@nwsuaf.edu.en。

发育<sup>[1,18,19]</sup>、抗逆性<sup>[13]</sup>等代谢过程。在低温、高盐、 脱水和氧化胁迫等逆境条件下,拟南芥 AtCR-RBPs 基因在转录后调控中起重要作用<sup>[11,20~25]</sup>。水稻 OsCRPs 和 OsRZs 基因也被证明在逆境条件下发生 响应反应,尤其是对低温<sup>[12,24]</sup>。尽管拟南芥、水稻 及烟草等植物 GR-RBPs 基因被证实参与环境胁迫 反应,但是,迄今为止,在重要果树作物苹果中,有关 GR-RBPs 基因参与逆境反应的报道很少<sup>[26]</sup>。

楸子(Malus prunifolia (Willd.) Borkh.)又名海 棠果,是苹果优良砧木之一,抗旱性强。在干旱诱导 的楸子叶 SSH cDNA 文库中进行筛选和 ESTs 分析 时,发现一个 EST 序列与码富含甘氨酸 RNA 结合蛋 白基因高度同源,在此基础上通过电子克隆(in silico cloning)和 RT-PCR 方法分别从楸子和平邑甜茶 (M. hupehensis Rehd.)叶片中克隆 GR-RBP 基因,经 分析它们与已知的其他植物 GR-RBPs 基因有很高 的同源性,并对其序列特征和干旱胁迫表达特性进 行了比较分析。

1 材料与方法

#### 1.1 材料

干旱处理的楸子叶片 SSH cDNA 文库,西北农 林科技大学果树逆境生物学实验室构建保存。

以两年生的楸子和平邑甜茶幼苗为材料,采自 西北农林科技大学园艺场苹果资源圃。盆栽幼苗通 过控水干旱处理 12 d,直至幼苗叶片萎蔫。隔天采 样,取样后迅速放入液氮中冷冻,然后置-80℃保存 备用。

#### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 合成 总 RNA 提取 采用改良 CTAB-LiCl 法<sup>[27]</sup>进行,总 RNA 用 RNasefree DNase (Takara, China) 37℃处理 30 min 后用于 cDNA 合成。以 Oligo d(T)<sub>18</sub> 为反转录引物,用 M-MLV 反转录酶 (Invitrogen, USA)试剂盒合成 cDNA 第一链,用于基因克隆。

1.2.2 秋子和平色甜茶 *CR-RBPs* 基因全长 cDNA 克隆 通过 PCR 筛选楸子 SSH cDNA 文库及测序发 现,一个大小为 371 bp 的 EST 序列与编码富含甘氨 酸 RNA 结合蛋白基因的相似性很高。以此为种子 序列进行电子拼接和延伸后,由原来的 371 bp 延伸 至 805 bp,经 ORF finder 软件分析发现在该序列 56 .~571 bp 之间包含一个最大的开放阅读框(ORF), 大小为 516 bp。以该电子延伸的全长 cDNA 序列为 基础,设计跨越 ORF 的一对特异引物来扩增 *GR-RBP* 基因全长 cDNA,引物序列如下: pF1:5'-GTCCCATITGTCACTAGGGTTACTG-3';

pR1:5'-ATCTCAAAAGTCCCAAACCACCTAA-3'。

反应程序为:94℃ 5 min,(94℃ 45 s,57℃ 30 s, 72℃ 1 min)35 个循环,72℃延伸 10 min。

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,切下约 560 bp 的目的条带,用 PCR 纯化试剂盒(TaKaRa)回 收(按试剂盒说明方法进行)。将扩增的 DNA 片段 连接到 pMD19-T 载体上进行双向测序。

1.2.3 生物信息学分析 测序结果利用 DNAMAN 和 DNAStar 软件进行序列拼接和校对,获得基因的 cDNA 全长序列信息, 然后利用 NCBI (http://ncbi. nlm.nih.gov/)的 ORF finder 软件预测 ORF,利用 BLAST 分析工具对 GenBank 的非冗余蛋白数据库序 列进行比对分析。使用 ExPAsy 网站的 Compute pL/ MW tool(http://www.expasy.org/tools/pi\_tool.html)计 算蛋白质的等电点及分子量;利用 ProtScale(http:// expasy. org/tools/protscale. html)和 ProtParam(http:// expasy.org/tools/protparam.html)进行疏水性/亲水性 预测。使用 TargetP(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 预测蛋白质信号肽。采用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED form. html)进行氨基酸跨膜预测。采用 Psort (http:// psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html)预测亚细胞定位。 采用 SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/ change\_mode.pl)预测蛋白保守功能域。使用 3Djigsaw(http://bmm.cancerresearchuk.org/3djigsaw/) 和 SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org/) 预 测和分析蛋白质空间结构及同源建模。

1.2.4 楸子和平邑甜茶 GR-RBPs 基因表达的定量 分析 采用改良 CTAB-LiCl 法提取叶片、根系和茎 的总 RNA,用 Dnase I 处理 RNA 样品中混入的基因 组 DNA,经苯酚/氯仿抽提、醇沉淀 RNA 后,溶于 30 µL DEPC 水中备用。RNA 浓度和纯度用 NanoDrop<sup>™</sup> 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳来检测。cDNA 第一 链合成采用 SYBR(r) PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR 试剂盒Ⅱ (TaKaRa)进行。采用 SYBR Green gPCR 试剂盒 (TaKaRa)进行定量分析。定量 PCR 反应程序为: 95℃ 3 min,然后 95℃ 20 s、58℃ 20 s、72℃ 20 s 进行 40个循环,每个循环结束时采集荧光信号。40个循 环后 PCR 扩增产物进行溶解曲线分析 (58℃~ 95℃)。利用 iQ5.0 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad, USA) 自带软件分析实时定量 PCR 数据。用苹果 EF-1a 和 Actin 作为内参基因确定目标基因的相对表达量 (表1)。

-	-
7	7

基因 Gene name	序列号 Accession number	引 物 Primer sequences(5'-3')	产物大小(bp) Amplicon size
<i>EF</i> -1α DQ341381	DQ341381	(F) ATTCAAGTATGCCTGGGTGC	174
	(R) CAGTCAGCCTGTGATGTTCC		
Actin GQ339778	GQ339778	(F) CCAAAGGCTAATCGGGAGAA	105
	(R) ACCACTCGCGTAGAGGGAAAG		
<i>MpGR-RBP</i> 1 HM042682	(F) CGTCGTGAGGGTGGCTATG	. 119	
		(R) AAAGTCCCAAACCACCTAACAC	
MhGR-RBP1	HQ380209	(F) CGTCGTGAGGGTGGCTATG	119
		(R) AAAGTCCCAAACCACCTAACAC	

#### 表1 GR-RBPs 目的基因及内参基因的定量 PCR 引物

2 结果与分析

#### 2.1 楸子 GR-RBP 基因全长 cDNA 的分离

筛选干旱诱导下楸子 SSH cDNA 文库,获得一 包含 poly(A) 尾巴的 371 bp 长的基因片段(EST) 与 已知的植物 GR-RBPs 基因有很高的相似性。该 EST 序列经电子拼接和延伸后,由原来的 371 bp 延伸至 805 bp,该电子延伸序列末端含有真核生物特有的 polyA 尾巴结构。经 NCBI 网站的 ORF finder 程序预 测发现,该序列含有一个完整的 ORF。以 pF1 和 pR1 为特异引物,以干旱处理的楸子叶片总 RNA 为 模板进行 RT-PCR 扩增得到一条与电子延伸序列 ORF 相似性极高的核苷酸序列,大小为 579 bp(图 2)。将该序列与大小为 371 bp 的 EST 序列拼接(重 叠序列大于 40 bp),得到一个 781 bp 的全长 cDNA 序列,该 cDNA 序列起始密码子 ATG 处含有 GC-CATCG 序列,符合 KOZAK 规则,即 A/GXXATCG<sup>[28]</sup>。 经ORF finder 软件分析该序列包含一个 516 bp 的 ORF,5'-UTR 有 31 bp,3'-UTR 有 234 bp,其 ORF 编码 生成一条 171 个氨基酸的多肽,该氨基酸序列含有 一个 RRM 结构域和富含甘氨酸区。

在 NCBI 网站进行序列比对后发现,该氨基酸 序列与其他植物来源的 GR-RBPs 蛋白具有很高的 同源性,该序列与甜樱桃 GR-RBP 蛋白(AAL13082) 同源性最高,为 93.0%<sup>[29]</sup>,与大豆(86.0%, AAD48471)、天竺葵(84.9%, AAB63581)、烟草 (84.3%, ACD03270)、马铃薯(82.9%, ABB87126)、柑 橘(82.6%, BAA92156)和拟南芥(80.2%, AAM62447)等 GR-RBPs 蛋白也高度同源。可见,该 cDNA 序列为楸子 *GR-RBP* 基因,命名为 *MpCR-RBP*1(GenBank 登录号为 HM042682),其编码多肽在 GenBank 登录号为 ADG96008。



M:DNA 分子量 DL2000; 1:楸子 CDS 序列 M: DL2000 DNA Marker; 1: CDS PCR product from *M. prunifolia* 图 2 楸子 GR-RBP 基因 PCR 扩增电泳图谱 Fig.2 PCR amplification of the GR-RBP gene in leaves from *M. prunifolia* 

#### 2.2 平邑甜茶 GR-RBP 基因全长 cDNA 的克隆

以 pF1 和 pR1 为引物,以干旱处理的平邑甜茶 叶片总 RNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物 与克隆载体连接、转化感受态细胞后,对所得阳性克 隆进行双向测序,该 cDNA 序列大小为 558 bp(图 3)。经 ORF finder 软件分析发现,该序列包含一个 495 bp 的 ORF,编码 164 氨基酸残基,该氨基酸序列 含有一个 RRM 结构域和富含甘氨酸区,与其他植物 GR-RBPs 蛋白也高度同源。可见,该序列为平邑甜 茶 *CR-RBP* 基因的全长 cDNA,命名为 *MhGR-RBP*1 (GenBank 注册号为 HQ380209),其编码多肽在 Gen-Bank 登录号为 ADQ08684。





经 ExPAsy 网站 Compute pI/MW tool 软件预测,

*MhGR-RBP*1 和 *MpGR-RBP*1 基因编码蛋白的相对分子质量分别为 16.19 和 16.69 kDa,理论等电点均为 6.36。氨基酸序列比对结果显示,平邑甜茶 MhGR-RBP1(ADQ08684)与楸子 MpGR-RBP1(ADG96008)同源性最高,达 96.3%,与甜樱桃 Pa-RRM-GRP1 (AAL13082)和拟南芥 AtGR-RBP7(AAM62447)的同源性分别为 87.6% 和 80.2%(图 4)。由图 4 可知,四种同源蛋白在 N-端 RRM 结构域保守性较高,C-端区域的保守性较低。

#### 2.3 疏水性/亲水性的预测和分析

采用 ProtScale 和 ProtParam 对 MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 氨基酸序列进行疏水性/亲水性预测。结果表明,两者多肽链第45 位的 Thr 具有最低分值 - 2.878,亲水性最强,第14 位的 Ala 具有最高的分值 1.689,疏水性最强。MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 整个多肽链前端疏水,中间部位和后端区域为亲水 区域,两种蛋白的总平均亲水性值(Grand average of hydropathicity,GRAVY)分别为 - 0.753 和 - 0.762, GRAVY 正值表明此蛋白为疏水蛋白,负值表明为亲 水蛋白,这说明两者整体上都表现为亲水蛋白。



注:平邑甜茶、楸子、甜樱桃和拟南芥 GR-RBP 同源蛋白序列比对由 DNAMAN 软件完成。RRM 与富含甘氨酸区分别用红线和黑线表示。 一致序列用绿色背景表示,强相似性和弱相似性序列分别用紫色和黄色背景表示。插入空格用小圆点表示。RNPI 和 RNP2 用黑框标记。数 字代表氨基酸位置。

Note: Deduced amino acid sequences were compared via DNAMAN. RRM at N-terminus and glycine-rich domain within C-terminus are indicated by red and black lines, respectively, above sequences. Identical amino acid residues are shaded in green. Strongly conserved residues and weakly conserved residues are show in purple and yellow, respectively. Gaps introduced to optimize alignment are indicated by dots. RNP1 and RNP2 motifs are indicated with black boxes. Numbers refer to amino acid positions.

#### 图 4 氨基酸序列同源性比对

Fig.4 Alignment of deduced amino acid sequences for *M. hupehensis* (MhGR-RBP1, ADQ08684), *M. prunifolia* (MpGR-RBP1, ADG96008), *Prunus avium* (Pa-RRM-GRP1, AAL13082), and *Arabidopsis* (AtGR-RBP7, AAM62447)

2.4 MpCR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因在不同组织 中的表达分析 子 MpGR-RBP1 和平邑甜茶 MhGR-RBP1 基因进行定量分析(图 5)。

以苹果 EF-1α 和 Actin 基因为内参对照,对楸

结果表明,楸子 MpGR-RBP1 基因在茎中表达量

最高, 叶和根中次之; 而平邑甜茶 MhGR-RBP1 基因 在叶中表达最强, 其次是茎, 根最弱(图 5)。可见, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因在植物不同器官中的表达不同,这可能与各自生长发育的调控有关。



图 5 MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因在不同组织中的表达分析

Fig.5 Expression analysis of MpGR-RBP1 and MhGR-RBP1 in various tissues of M. prunifolia and M. hupehensis

2.5 MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因在干旱胁迫 下的表达分析

利用定量 RT-PCR 分析方法,以苹果 EF-1a 和 Actin 为内参基因,分析楸子和平邑甜茶叶片 GR-RBPs 在干旱胁迫下的基因表达模式(图 6)。





分析表明,在干旱处理 8 d 时, 楸子幼苗叶片 MpGR-RBP1 的表达量达到峰值,比对照增加了 26.6 倍;随后逐渐降低,12 d 时仍高于对照表达水平。而 平邑甜茶叶片 MhGR-RBP1 在干旱处理 6 d 时,其表 达水平达到最大值,比对照增加了 5.2 倍;然后逐渐 恢复到原来的表达水平(图 6)。从以上结果可知, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因受到干旱诱导后均 上调表达,但基因表达时序和水平各不相同。

3 讨 论

植物 GR-RBPs 是一类含有一个或多个 RRM 及

一个富含甘氨酸区的小分子蛋白,现已发现广泛存 在于裸子植物、双子叶植物和单子叶植物中,包括烟 草、拟南芥和大麦等<sup>[2]</sup>。到目前为止,已经有大量的 植物 GR-RBPs 基因及 cDNA 序列被分离鉴定出来, 并对 GR-RBPs 的一级结构、结构域、细胞定位以及 基因表达和调控进行了分析。在本试验中,序列分 析发现, 楸子 MpGR-RBP1 和平邑甜茶 MhGR-RBP1 氨基酸的同源性达 96.3%, 都具有 RRM 结构域及 甘氨酸富含区。RRM 结构域在蓝藻细菌、真菌、植 物和动物中都普遍存在<sup>[2]</sup>,其中 RNP1 和 RNP2 保守 序列是 RNA 结合的关键部位<sup>[30]</sup>,它们在转录后水 平调节基因表达调控中起重要作用,在植物中决定 着组织特异性和发育调控<sup>[2,31]</sup>。在植物 GR-RBPs 蛋白家族中, C-端富含甘氨酸序列数量和长度变化 较大,这与蛋白质之间的互作有关<sup>[32]</sup>。本研究发 现, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 蛋白 N-端 RRM 结构 域的同源性达到 100%,含有 RNP1 和 RNP2 保守序 列,但它们 C-端富含甘氨酸区的长度大小不等(图 4)。经 SMART 预测表明,两种蛋白 N-端 RRM 保守 功能区均由 2 个 α-螺旋和 4 个反向平行的 β-折叠组 成拓扑结构(β1α1β2β3α2β4),这在甜樱桃、拟南芥、水 稻等 GR-RBPs 蛋白的二级结构预测中也有类似的 结果。经 SignalP 3.0 和 TMpred 预测表明, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 蛋白均无 N-端信号肽和跨膜结 构;由 Psort 预测表明,它们分布在细胞核的可能性 较大,两种蛋白定位于细胞核的可能性分别为 73% 和 67%。据此笔者推测, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 蛋白可能具有相似的功能。

通过序列比对发现,MhGR-RBP1 蛋白 C-端富含 甘氨酸区包含三个高度保守重复序列-Gly-Gly-Gly-

Gly-Gly-Gly-Gly-Tyr (GGGGGGGGY), 而 MpGR-RBP1 含 有四个相同的重复序列。同源建模预测分析表明, MhGR-RBP1 三级结构与人类 A18 hnRNP 蛋白(PDBcode = 1x5sA)空间结构高度相似,三级结构一致性 达到 47.1%, 而 MpGR-RBP1 与人类 RNA 结合蛋白 TIA-1(PDB-code = 3bs9B)最匹配,三级结构一致性达 38.5%。研究表明, TIA-1 基因参与调控细胞核中 pre-mRNA的选择性剪接及细胞质中 mRNA 的翻 译<sup>[33]</sup>。A18 hnRNP,即冷诱导 RNA 结合蛋白 CIRP, 属于 RNA 结合蛋白(RBP)家族的 hnRNP 亚族。A18 hnRNP不同于大多数 hnRNPs 蛋白,它由一个 RRM 结构域和一个包含精氨酸和甘氨酸残基的(RGG boxes)的附属基序(auxiliary domain)组成<sup>[34]</sup>。大多 数 hnRNPs 蛋白基因是组成型表达, 而 A18 hnRNP 蛋 白及 mRNA 水平可由低氧、紫外辐射等胁迫诱导表 达<sup>[34,35]</sup>。有研究报道, 拟南芥 AtGR-RBP7 和 AtGR-RBP8同源性达 76.9%,它们可能具有相似的功 能<sup>[16,36]</sup>。但 AtGR-GRP7 与 AtGR-GRP2 及 AtGR-GRP4 的差异较明显,因为 AtGR-GRP7 具有较短的 N-端区域和较长的 C-端结构<sup>[22]</sup>。笔者推测由于 MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 的氨基酸多肽链存在差 异,导致其蛋白空间结构和生物功能也可能存在一 定程度的不同。由于不同物种编码 GR-RBPs 蛋白 的基因存在变异,所以对每一个 GR-RBP 基因需要 进一步研究其功能。

研究报道, 拟南芥 AtGR-RBP1、AtGR-RBP2、At-GR-RBP3、AtGR-RBP4、AtGR-RBP8 和 AtRZ-1a 都受 冷胁迫强烈诱导<sup>[11,37]</sup>。干旱和盐胁迫可使 AtGR-RBP1 基因转录增强,但使 GR-RBP4 和 AtGR-RBP7 转录缓慢减弱<sup>[37]</sup>, AtRZ-1a 在干旱处理下表达量有 所下降<sup>[11]</sup>,而 AtGR-RBP5 和 AtGR-RBP6 在冷胁迫、 干旱和盐胁迫下的表达都没有改变<sup>[37]</sup>。水稻 Os-GRP4 基因受热激、干旱和盐胁迫诱导表达,但受热 激诱导最为明显<sup>[38]</sup>。烟草 NtGRP1 受水胁迫强烈诱 导,而高温、低温、干旱、高盐、ABA 和机械伤害均能 诱导该基因表达,但表达量很低<sup>[8]</sup>。本研究中,楸子 MpGR-RBP1 和平邑甜茶 MhGR-RBP1 基因在根、茎、 叶组织中均有表达,但 MpGR-RBP1 在茎中的表达量 最大,而 MhGR-RBP1 以叶的表达水平最高。此外, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基因均受干旱胁迫诱导 表达,而 MpGR-RBP1 表达量明显高于 MhGR-RBP1 表达量。笔者推测, MpGR-RBP1 和 MhGR-RBP1 基 因可能参与植物对干旱胁迫的响应反应,植物通过 提高 GR-RBP 基因表达水平来适应或抵抗干旱逆境 的影响,而表达水平的高低差异可能与两种苹果砧

木抗旱性的强弱有关。

近年来,尽管人们对部分拟南芥、烟草及水稻等 GR-RBPs 蛋白功能做了一些研究,使人们对其在植物生长发育和抵御逆境等生理过程中的功能有了初步的认识,但对其他植物 GR-RBPs 功能研究的并不 是很深入,植物 *GR-RBPs* 基因是如何调控植物参与 逆境反应的分子机制尚不十分清楚<sup>[16,36]</sup>,仍有大量 的工作需要进一步探讨。

#### 参考文献:

- Bandziulis R J, Swanson M S, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as developmental regulators[J]. Genes Dev, 1989, (3):431-437.
- [2] Albà M M, Pagès M. Plant proteins containing the RNA-recognition motif[J]. Trends Plant Sci, 1998, (3):15-21.
- [3] Gómez J, Sánchez M D, Stiefel V, et al. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein[J]. Nature, 1988,334:262--264.
- [4] Guiltinan M J, Niu X P. cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv Chinese Spring) glycine-rich RNA-binding protein[J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(6); 1301-1306.
- [5] Naqvi S M S, Park K S, Yi S Y, et al. A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco[J]. Plant Mol Biol, 1998,37(3):571-576.
- [6] Baudo M M, Meza-Zepeda L A, Palva E T, et al. Isolation of a cDNA corresponding to a low temperature-and ABA-responsive gene encoding a putative glycine-rich RNA-binding protein in *Solanum commersonii* [J]. J Exp Bot, 1999, 50: 1867-1868.
- [7] Shinozuka H, Hisano H, Yoneyama S, et al. Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation [J]. Mol Genet Genom, 2006, 275(4): 399-408.
- [8] Lee M O, Kim K P, Kim B G, et al. Flooding stress-induced glycinerich RNA-binding protein from *Nicotiana tabacum* [J]. Mol Cells, 2009,27(1):47-54.
- [9] Lorkovi C Z J, Barta A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30 (3):623-635.
- [10] Hanano S, Sugita M, Sugitra M. Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells[J]. Plant Mol Bio, 1996,31 (1):57-68.
- [11] Kim Y O, Kim J S, Kang H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana [J]. Plant J, 2005, 42(6): 890-900.
- [12] Kim J Y, Kim W Y, Kwak K J, et al. Zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein in Oryza sativa has an RNA chaperone activity under cold stress conditions [J]. Plant Cell Environ, 2010,33(5):759-768.

- [13] Sachetto-Martins G, Franco L O, de Oliveira D E. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? [J]. Biochim Biophys Acta, 2000,(1):1-14.
- [14] Ziemienowicz A, Haasen D, Staiger D, et al. Arabidopsis transportinl is the nuclear import receptor for the circadian clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7[J]. Plant Mol Biol, 2003, 53:201-212.
- [15] Fusaro A F, Bocca S N, Ramos R L, et al. AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development[J]. Planta, 2007,225(6):1339-1351.
- [16] Lorkovic Z J. Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization[J]. Trends Plant Sci, 2009, 14(4):229-236.
- [17] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) [J]. Sci, 2002, 296:92-100.
- [18] Staiger D, Zecca L, Wieczorek Kirk D A, et al. The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA[J]. Plant J, 2003,33:361-371.
- [19] Schöning J C, Streitner C, Page D R, et al. Autoregulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation[J]. Plant J, 2007,52(6):1119-1130.
- [20] Kim Y O, Kang H. The role of a zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein during the cold adaptation process in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Cell Physiol, 2006,47(6):793-798.
- [21] Kim J S, Park S J, Kwak K J, et al. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from Arabidopsis thaliana can promote the cold adaptation process in Escherichia coli [J]. Nucleic Acids Res, 2007,35(2):506-516.
- [22] Kim J S, Jung H J, Kim K A, et al. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in Arabidopsis thaliana [J]. Plant J, 2008,55:455-466.
- [23] Kim J Y, Park S J, Jang B S, et al. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions[J]. Plant J, 2007, 50(3):439-451.
- [24] Kim J Y, Kim W Y, Kwak K J, et al. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa during cold adaptation process [J]. J Exp Bot, 2010, 61: 2317-2325.
- [25] Schmidt F, Marnef A, Cheung M K, et al. A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced Arabidop-

sis thaliana RNA-binding proteins ATGRP7 and ATCRP8[J]. Mol Biol Rep, 2010,37(2):839-845.

- [26] Wang S, Liang D, Shi S, et al. Isolation and characterization of a novel drought responsive gene encoding a glycine-rich RNA-binding protein in *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. [J]. Plant Mol Biol Rep, 2011,29:125-134.
- [27] Chang S, Puryear J, Cairney J. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993,11:113-116.
- [28] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [29] Stephen J R, Dent K C, Finch-Savage W E. A cDNA encoding a cold-induced glycine-rich RNA binding protein from Prunus avium expressed in embryonic axes[J]. Gene, 2003,320;177-183.
- [30] Burd C G, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA binding proteins[J]. Sci, 1994,265:615-621.
- [31] Siomi H, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as regulators of gene expression[J]. Curr Opin Genet Dev, 1997,7(3):345-353.
- [32] Fusaro A, Mangeon A, Rocha C, et al. Classification, expression pattern and comparative analysis of sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding glycine rich proteins (GRPs)[J]. Gen Mol Biol, 2001, 24:263-273.
- [33] Kumar A O, Swenson M C, Benning M M, et al. Structure of the central RNA recognition motif of human TIA-1 at 1.95 Å resolution
  [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367:813-819.
- [34] Yang R, Weber D J, Carrier F. Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleoprotein A18
  [J]. Nucleic Acids Res, 2006,34(4):1224-1236.
- [35] Wellmann S, Buhrer C, Moderegger E, et al. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism[J]. J Cell Sci, 2004,117(9):1785-1794.
- [36] Fu Z Q, Guo M, Jeong B R, et al. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity[J]. Nature, 2007,447:284-288.
- [37] Kwak K J, Kim Y O, Kang H. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress[J]. J Exp Bot, 2005, (56): 3007-3016.
- [38] Sahi C, Agarwal M, Singha A. Molecular characterization of a novel isoform of rice (*Oryza sativa* L.) glycine rich-RNA binding protein and evidence for its involvement in high temperature stress response [J]. Plant Sci, 2007, 173(2):144-155.

(英文摘要下转第86页)

### Effects of *Glomus mosseae* on the growth of wheat seedlings under different phosphorus concentration

CAO Cui-ling<sup>1</sup>, YANG Jian-hong<sup>1</sup>, FAN Shu-jun<sup>2</sup>, LI Xue-jun<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Abstract: In order to investigate the influence of inoculation of *Glomus mosseae* on the wheat growth under low phosphorus level (1  $\mu$ mol/L) and high phosphorus level (400  $\mu$ mol/L), a single-spore inoculation method was used, and during training sunbags was used to cover the whole pot in order to avoid the influence caused by other fungi. The wheat was cultvated in sand supplied with Hogland solution containing different P concentration, and wheat seedlings were inoculated with the spore of *Glomus mosseae*. The results showed that: compared with the uninoculated wheat, the inoculation increased the height, root dry weight and plant dry weight of wheat seedings. Whether high phosphorus level or low phosphorus level, inoculated with G. mosseae fungi, the water potential of leaf was lower than that of uninoculation; the root activity was increased by 196% (1  $\mu$ mol/L P) and 89% (400  $\mu$ mol/L); and content of chlorophyll was added; and content of soluble protein was increased clearly in root and leaf. Our conclusion was that wheat and G. mosseae fungi could form good symbiont.

Keywords: Glomus mosseae; single-spore inoculation; airtight bagged; wheat seedling; growth

(上接第 81 页)

# Cloning and expression analysis of two novel drought-tolerance genes coding glycine-rich RNA-binding proteins in *Malus* plants

WANG Shun-cai<sup>1,2</sup>, LIANG Dong<sup>2</sup>, SHI Shou-guo<sup>2</sup>, MA Feng-wang<sup>2</sup>, SHU Huai-rui<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 748100, China;

2. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Two Malus (apple) drought-related genes, MpGR-RBP1 (HM042682) and MhGR-RBP1 (HQ380209), were successfully identified from the drought stress-treated *Malus prunifolia* and *M. hupehensis*, respectively, using library screening, in silico cloning and RT-PCR. The proteins of two homologous genes, MpGR-RBP1 and MhGR-RBP1, were consisted of 171 and 164 amino acids, respectively. Their deduced amino acids contain a N-terminal RNA recognition motif (RRM) and a C-terminal glycine-rich domain, a structure which was found in stress-induced GR-RBP protein family in other plants. Bioinformatics analysis confirmed that both MpGR-RBP1 and MhGR-RBP1 proteins belong to the plant GR-RBP family, members of which play important roles in post-transcriptional regulation of gene expression under various stress conditions. The expression profiles of the two apple *GR-RBP* transcripts were detected by quantitative realtime RT-PCR. *MpGR-RBP1* and *MhGR-RBP1* were expressed in various plant tissues including roots, shoots, and leaves. Both *MpGR-RBP1* and *MhGR-RBP1* were up-regulated under drought stress, with expression levels in the former being higher than in the latter. These results indicated that *MpGR-RBP1* and *MhGR-RBP1* might be involved in apple plants response to drought stress, and it suggested that differential configuration of drought-tolerant proteins may be contributed to capability of drought resistance in apple plants.

Keywords: Malus; glycine-rich RNA-binding protein; drought stress; gene expression