

白木香 *AsERF1* 基因的克隆、亚细胞定位与表达分析

李铁铮^{1#}, 郑一哲^{1#}, 戎玉清¹, 魏胜利², 王晓晖^{1,2*}, 屠鹏飞^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院中药资源与鉴定系, 北京 100029)

摘要: 乙烯响应因子(ethylene-response factor, ERF) 是 AP2/ERF 家族中的亚家族, 在植物信号转导、生长发育和植物防御反应中起到重要作用。本研究以白木香 (*Aquilaria sinensis*) 为材料, 设计特异性引物, 克隆了白木香的 *AsERF1* 基因的 cDNA 序列, 并进行氨基酸序列分析、原核表达和纯化、亚细胞定位、组织特异性分析、非生物胁迫诱导表达分析研究。白木香 *AsERF1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 691 bp, 编码 229 个氨基酸, 其蛋白分子质量为 25.36 kD。AsERF1 蛋白含有 1 个保守的 AP2 区域, 系统进化树分析表明 AsERF1 与毛果杨的 ERF2 蛋白亲缘性最高。利用本生烟瞬时表达系统研究表明 AsERF1 主要定位于植物细胞核中。构建原核表达载体 pET28a-AsERF1, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中成功表达 AsERF1 重组蛋白, 纯化得到可溶性重组蛋白。实时荧光定量 PCR 结果显示 AsERF1 在叶中的表达量最高, 茎次之, 根和茎尖最低。盐、干旱、低温和重金属胁迫能够诱导 *AsERF1* 的表达, 其中干旱胁迫对 *AsERF1* 的表达水平影响最显著。本研究为揭示 ERF 基因在白木香防御反应和沉香形成过程中的作用机制奠定基础。

关键词: 白木香; 乙烯响应因子; 原核表达; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1957-08

Gene cloning, subcellular localization and expression analysis of the *AsERF1* gene from *Aquilaria sinensis*

LI Tie-zheng^{1#}, ZHENG Yi-zhe^{1#}, RONG Yu-qing¹, WEI Sheng-li², WANG Xiao-hui^{1,2*}, TU Peng-fei^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Department of Resources and Identification of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Ethylene-response factors, which are a subfamily of the AP2/ERF family, play an important role in ethylene signal transduction, plant growth and plant resistant. In this study, a full-length cDNA of the *AsERF1* gene was cloned from *Aquilaria sinensis*. Sequence analysis, prokaryotic expression and purification, subcellular localization, tissue-specific analysis and expression analysis under different abiotic stresses was performed. The open reading frame (ORF) of the *AsERF1* gene was 691 bp, encoding a protein of 229 amino acids with a predicted molecular mass of 25.36 kD. The AsERF1 protein contained the conserved AP2 sequence of ERF protein. A phylogenetic analysis indicated that the AsERF1 protein showed greatest sequence similarity with ERF2 from *Populus trichocarpa*. The recombinant AsERF1 protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells using the prokaryotic expression vector pET28a-AsERF1 and the recombinant AsERF1 protein was purified. Agrobacterium-

收稿日期: 2020-02-25; 修回日期: 2020-03-13.

基金项目: 北京中医药大学青年教师项目 (2019-JYB-JS-014).

#并列第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-64286180, E-mail: wangxhui2014@163.com;

Tel: 86-10-64286180, E-mail: pengfeitu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0176

mediated protein expression experiments demonstrated that *AsERF1* mainly localized to the nucleus. Expression analysis indicated that *AsERF1* was primarily observed in leaves. The *AsERF1* expression level was induced by salt, drought, low temperature and CdCl_2 treatment, while the abundance of *AsERF1* was most significantly induced by drought stress. These results provide valuable insights into the role of *AsERF1* in plant defense and the mechanism of agarwood formation.

Key words: *Aquilaria sinensis*; ethylene-response factors; prokaryotic expression; subcellular localization; expression analysis

乙烯响应因子 (ethylene-response factor, ERF) 是属于 AP2/ERF 家族的亚家族, 是植物特有的一个转录因子家族, 位于乙烯信号转导途径的下游, 含有高度保守的 AP2 区域, 该区域是由 58 或 59 个氨基酸组成, 可形成 1 个 α -螺旋和 3 个反平行链构成的 β -折叠结构^[1]。ERF 基因与乙烯诱导基因启动子的 GCC-box 结合, 其过表达能够促进乙烯合成反应, 因此 ERF 基因是乙烯合成反应的转录调控因子^[2]。最近的研究表明植物中的 ERF 基因在植物防御反应过程中起到重要作用。如在小麦感染白粉病早期, *TaERF3* 通过激活防御基因的表达, 提高植物对病原菌的抗性^[3]。在拟南芥中, *ERF6* 和 *ERF11* 共同维持植物生长和抵御胁迫之间的平衡^[4,5]。在大豆中, *GmERF75* 基因表达水平受到干旱和盐胁迫的诱导, 过表达 *GmERF75* 增强植物抗盐性^[6]。野生大豆中, *ERF71* 通过上调 H^+ -ATP 酶及改变植物生长素的积累, 增强植物对碱性胁迫的抗性^[7,8]。

白木香 (*Aquilaria sinensis*) 是我国名贵药材沉香的唯一正品药用植物来源, 目前已经被列为《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II^[9] 和国家濒危二级保护植物^[10]。沉香是我国传统名贵中药, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效, 对于胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急等有显著疗效^[11]。沉香的临床应用广泛, 具有消化系统和中枢神经系统保护等药理作用。沉香是独有龙涎香和檀香混合物香味的一种香料, 融合动物界与植物界的精华, 至今无法复制这种香味, 因而极其珍贵^[12]。健康的白木香并不产生沉香, 只有通过自然因素 (雷劈、火烧等) 或者人为因素 (砍伤、接菌等) 的作用才能够形成沉香, 但是沉香形成的分子机制一直没有揭示, 严重制约高效人工结香技术的建立^[13]。近年来研究表明, 利用真菌提取物、盐胁迫、干旱、伤害胁迫能够诱导白木香的悬浮细胞和愈伤组织产生沉香特征性成分 2-苯乙基色酮类化合物和倍半萜类化合物^[14-18], 因此白木香的防御反应在沉香形成过程中起到重要作用。研究白木香中 ERF 的生物信息学、细胞定位、蛋白原核表达、在非生物胁迫下的表达有利于丰富 ERF 基因在植物防御反应中的重要作用研究, 进一步阐明白木香的结香机制。

材料与方法

材料 白木香种苗是 2019 年 6 月从广州移植, 现种植于北京中医药大学中药现代研究中心温箱, 成活后于 2019 年 6 月采集白木香的根、茎、茎尖及叶提取总 RNA, 检测 *AsERF1* 基因在不同器官中的特异性表达。利用白木香叶片和茎尖诱导的愈伤组织按照本课题组以前研究进行^[16], 选取长势相同的白木香愈伤组织, 分别经 NaCl (150 mmol·L⁻¹)、低温 (4 °C)、 CdCl_2 (500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、甘露醇 (200 mmol·L⁻¹) 4 种非生物胁迫处理^[19,20], 在处理 0、12、24、36、48 h 提取 RNA 作为样品检测 *AsERF1* 基因在各种处理下的表达差异。所用菌种为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 购自天根生物科技有限公司; pCambia1300-35S-EGFP 购自武汉转导生物实验室有限公司。

白木香根、茎、叶及愈伤组织中 RNA 的提取和 cDNA 的合成 按照植物 RNA 快速提取试剂盒 (Omega, 中国) 实验操作步骤进行植物总 RNA 提取, 利用 NanoDrop 2000C 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。利用 Sigma 公司的反转录酶 M-MLV 将白木香总 RNA 反转录为第一链 (cDNA), 反转录条件按照说明书进行。

白木香 *AsERF1* 基因序列全长克隆 从白木香转录组高通量测序结果中获得 1 个由表达序列标签拼接而成的序列, 经注释分析发现为具有完整开放阅读框的 *AsERF1* 基因, 依据两端序列利用 Primer 软件设计引物 *AsERF1*-1 和 *AsERF1*-2, 序列见表 1。以白木香总 RNA 的反转录产物为模板, 按照下列体系对白木香中 *AsERF1* 基因进行扩增: cDNA 1 μL , 10 \times LA-Taq buffer 5 μL , dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL , LA-Taq (2.5 U· μL^{-1}) 0.5 μL , 10 μmol 引物各 1 μL , 终体积为 50 μL 。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环, 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 凝胶成像分析系统检测, 目的片段回收和纯化按照胶回收试剂盒说明书进行。将回收后的 PCR 产物与 pMD19-T 连接, 转化到 DH5 α 菌株, 在氨苄抗性的平板上进行筛选, 并经过菌落 PCR 检测后送上

海英滩捷基公司测序。

白木香 *AsERF1* 生物信息学分析 通过在线软件 ProtParam 预测蛋白结构, 分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数; 通过 ExPASy 中的 SOPMA 工具分析蛋白质序列的二级结构; 利用 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件构建蛋白质三级结构模型; 利用软件 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜结构分析; 将所获得的 *AsERF1* 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 对比分析, 利用 DNAMAN 对其他物种 *AsERF1* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析; 通过 MEGA 6.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, 进化距离的计算采用泊松校正法, Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

白木香 *AsERF1* 的蛋白表达 利用引物 AsERF1-3 和 AsERF1-4 扩增 *AsERF1* 基因的全长 (表 1)。利用 Bam HI 和 Xho I 双酶切包含有目的基因的 PCR 产物及表达载体 pET-28a, 酶切产物经过纯化后, 利用 T4 连接酶进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR、测序后提取质粒 pET28a-*AsERF1*, 将质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。挑取单菌落接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 活化过夜, 然后按照 1:100 比例加入新鲜的含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 调节温度为 16 °C, 加入 IPTG 后振荡培养 24 h。之后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心收集大肠杆菌, 悬浮于 40 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ 咪唑) 中。将菌体放置于冰上, 利用超声破碎仪 (Colo Parmer) 破碎细胞, 之后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 以上。取上清液, 利用镍离子亲和色谱纯化 *AsERF1* 蛋白, 以 20 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 500 mmol·L⁻¹ NaCl 和 40 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达。

白木香 *AsERF1* 的亚细胞定位 利用引物 AsERF1-5 和 AsERF1-6 (表 1) 扩增 *AsERF1* 基因全长, 利用 BamHI 和 Sal I 双酶切包含有目的基因 *AsERF1* 的 PCR 产物及双元载体 pCAMBIA1300-35S-EGFP, 酶切产物纯化后, 利用 T4 DNA 连接酶, 将酶切 PCR 产物与酶切载体连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取经过菌落 PCR、测序鉴定正确的单克隆, 提取质粒 pCAMBIA1300-35S-EGFP-*AsERF1*, 将重组质粒转化农杆菌 EHA105 感受态细胞, 28 °C 培养 2~3 天后进行菌落 PCR, 以确定 pCAMBIA1300-35S-EGFP-*AsERF1* 成功转入农杆菌中。将含有重组质粒的农杆菌菌液注射本生烟叶片, 2~3 天后利用激光共聚焦显

显微镜检测本生烟叶片表皮细胞中融合蛋白的分布, 同时利用 DAPI 进行细胞核染色。

白木香 *AsERF1* 基因在不同组织和不同胁迫处理下的表达分析 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的方法检测白木香 *AsERF1* 基因在不同组织中和不同胁迫处理下的表达情况。分析使用 SYBR Green I 荧光染料法, 在 qRT-PCR 仪上进行。选取白木香 *GAPDH* 基因作为目标基因定量表达的内参基因, 引物序列见表 1。每个样品设 3 个重复, 重复 3 次。反应体系中含有 10 μ L STBR Premix Ex Taq 酶, 上下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.4 μ L, 模板 0.5 μ L, 总体系为 20 μ L。反应程序是: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火/延伸 30 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 95 °C 变性 10 s, 65~95 °C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上升, 每个温度停留 5 s。根据熔解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性, 相对定量分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行分析。

Table 1 Primer sequence

Primer role	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Sequence amplification	AsERF1-1	ATGTACACCCAATCCACTCTCGAC
	AsERF1-2	TTATGGTACGGGTTGACCCGAGG
	AsERF1-3	CGCGGATCCATGTACACCCAATCCACTCTCG
	AsERF1-4	CCGCTCGAGTTATGGTACGGGTTGACCCGAG
	AsERF1-5	CGCGGATCCATGTACACCCAATCCACTCTCGAC
	AsERF1-6	ACGCGTCGACTTATGGTACGGGTTGACCCGAGG
qRT-PCR	AsERF1-7	ACCCTTGTTGACCGACA
	AsERF1-8	AGCCGAAAGTGAGAGCATC
	GAPDH-1	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	GAPDH-2	AACCACATCTCTTCGGTGTA

结果与讨论

1 白木香 *AsERF1* 基因全长 cDNA 的克隆

根据白木香愈伤组织的转录组测序结果, 以白木香愈伤组织的 cDNA 为模板进行扩增, 利用 RT-PCR 方法扩增后得到约 700 bp 片段, 扩增结果见图 1, 将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 测序结果经过 NCBI 的 BLAST 比对, 确定该扩增产物是 *ERF* 基因的全长, 基因命名为 *AsERF1*, 其序列长度为 691 bp, 编码 229 个氨基酸。

2 *AsERF1* 的生物信息学分析

2.1 *AsERF1* 理化性质分析和跨膜区域分析 通过 ProtParam 软件预测 *AsERF1* 基因编码的蛋白理化性质。推测 *AsERF1* 编码的蛋白分子式为 C₁₁₂₀H₁₇₄₉N₃₁₉O₃₄₃S₁₄, 相对分子质量为 25 363.50, 理论等电点为 7.75, 不稳定

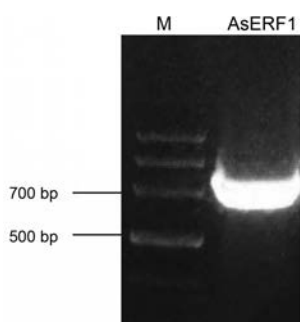


Figure 1 PCR amplification of AsERF1. M: DNA marker

系数为 63.97, 属于不稳定蛋白, 总亲水性为 -0.548, 为亲水性蛋白。利用 TMHMM2.0 预测白木香 AsERF1 蛋白没有跨膜区域。

2.2 AsERF1 蛋白的二级结构分析及三维结构预测
运用 ExPASy 中的 SOPMA 工具预测 *AsERF1* 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示 AsERF1 蛋白的二级结构是由 60.70% 的随机卷曲 (random coil)、24.45% 的 α -螺旋 (α -helices)、7.86% 的延伸链 (extended strand) 和 6.99% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 2A), 推测随机卷曲是其最多二级结构元件, 而 α -螺旋、延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白中。

将白木香 AsERF1 的氨基酸序列通过 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件建立了 AsERF1 的三维结构模型, 选择拟南芥中 AtERF1 的结构模型为模板, 对白木香 AsERF1 的三维结构进行预测, 结果表明, 白木香 AsERF1 与拟南芥中 AsERF1 的相似性为

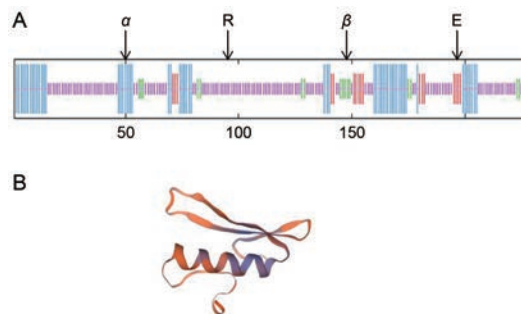


Figure 2 Predicted secondary and three-dimensional structure of AsERF1 protein. A. Predicted secondary structure of AsERF1 protein with SOPMA; B. The deduced three-dimensional structure of AsERF1 protein. α : α -Helices; β : β -Turn; E: Extended strand; R: Random coil

97.1%, 具有参考价值。具体三维结构如图 2B 所示。

2.3 白木香 AsERF1 氨基酸序列分析和系统进化树分析
将白木香 AsERF1 氨基酸序列与 GenBank 中其他植物中的 ERF 氨基酸序列进行比对, 通过 DNAMAN 软件与多种植物 ERF 氨基酸序列进行多序列比对分析 (图 3), 发现 AsERF1 含有保守的 AP2 区域, 与其他植物 ERF 蛋白的 AP2 区域相似性非常高, 在 AP2 区域含有一个保守的 WLG 元件和一个 YRG 元件, 氨基酸序列符合典型的 AP2/ERF 转录因子特征。多重序列比对发现白木香 AsERF1 与毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、棉花 (*Gossypium arboretum*)、可可树 (*Theobroma cacao*)、木槿 (*Hibiscus syriacus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) ERF 氨基酸序列相似性分别为

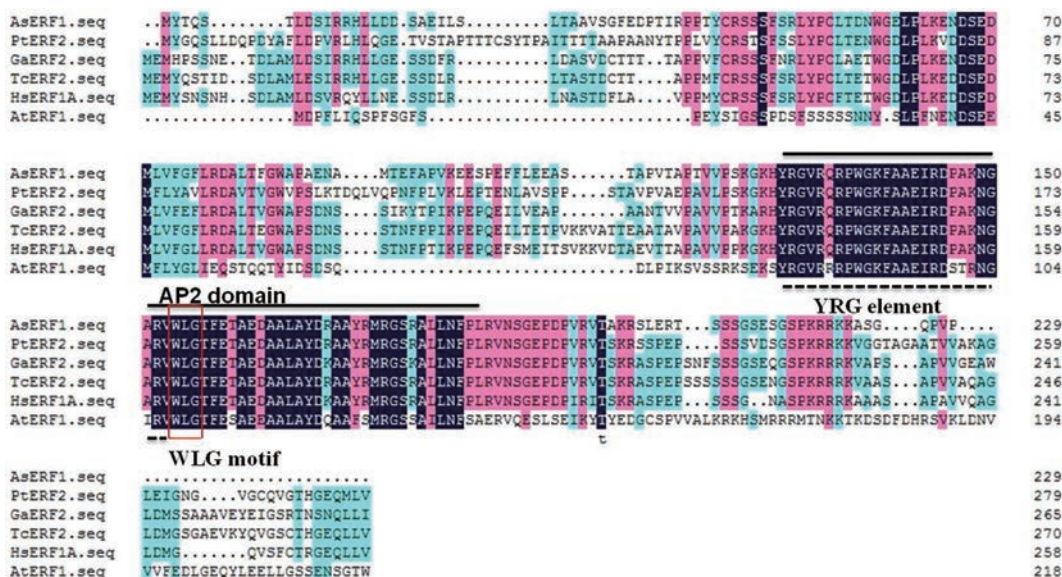


Figure 3 Multiple sequence alignment of AsERF1 and ERF from other plants. Black shading indicates amino acid identities, red and blue shading indicates amino acid with different similarity. The conserved AP2 domain of ERF proteins are shown with black line. The conserved YRG element and WLG motif of ERF proteins are shown with the dotted line and red box, respectively. As: *Aquilaria sinensis*; Pt: *Populus trichocarpa*; Ga: *Gossypium arboretum*; Tc: *Theobroma cacao*; Hs: *Hibiscus syriacus*; At: *Arabidopsis thaliana*

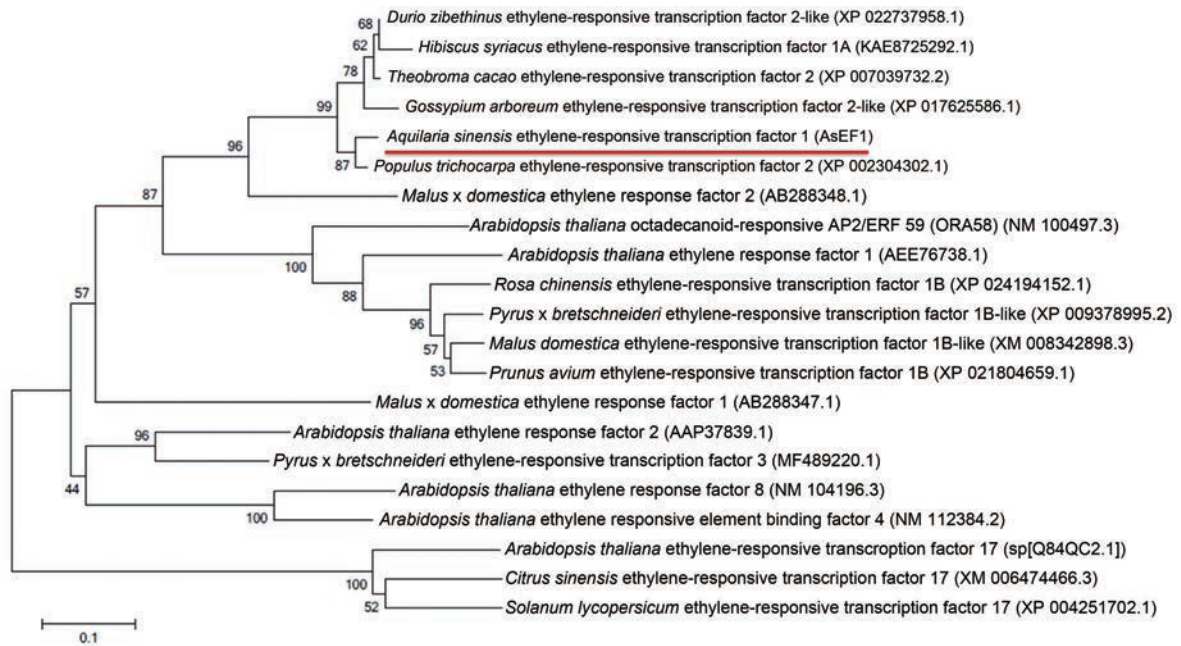


Figure 4 Phylogenetic analysis of ethylene-response factor (ERF) proteins from plants

60.14%、58.15%、53.20%、59.85%、27.27%，说明 *AsERF1* 氨基酸序列除了 AP2 保守区域，与其他植物 ERF 蛋白的氨基酸序列同源性不高。为进一步了解白木香 *AsERF1* 蛋白在植物 ERF 蛋白家族中的进化位置，选取了其他植物的 20 条 ERF 蛋白序列，利用 MEGA6.0 构建系统进化树（图 4）。从图 4 可以看出白木香 *AsERF1* 与毛果杨 ERF2 蛋白的亲缘关系较近。

3 *AsERF1* 原核表达分析

将原核表达载体 pET28a-*AsERF1* 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后，通过预实验探索及 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白是否可溶并确定最佳诱导条件，使用最佳浓度 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 于 16°C 诱导 24 h 的最佳诱导条件进行蛋白的原核表达诱导。由于重组 *AsERF1* 蛋白的氨基酸序列 N 端带有一个 6 个 His（组氨酸）的标签，通过镍离子亲和色谱纯化 *AsERF1* 蛋白，利用 SDS-PAGE 检测发现在 25 kD 左右出现一条 *AsERF1* 蛋白纯化条带（图 5）。

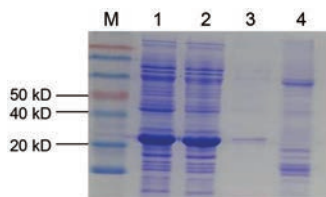


Figure 5 SDS-PAGE analysis of recombinant *AsERF1* protein. M: Marker; 1: Insoluble fraction from the induced *E. coli* containing pET28a-*AsERF1*; 2: Soluble protein from induced *E. coli* containing pET28a-*AsERF1*; 3: The purified recombinant *AsERF1* protein; 4: Uninduced *E. coli* containing pET28a-*AsERF1*

4 *AsERF1* 的亚细胞定位

将含有 pCAMBIA1300-35S-EGFP-*AsERF1* 和 pCAMBIA1300-35S-EGFP 农杆菌注射本生烟叶片，进行瞬时表达。2~3 天后利用激光共聚焦显微镜检测本生烟表皮细胞中融合蛋白的分布，同时利用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 进行细胞核染色，结果显示 GFP: *AsERF1* 融合蛋白主要分布于细胞核中，而含有 *gfp* 基因的 pCAMBIA1300-35S-EGFP 载体注射后荧光分布在细胞核、细胞质和细胞壁上（图 6），这些结果表明 *AsERF1* 主要定位于植物细胞的细胞核中。

5 *AsERF1* 基因在不同组织中的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测 *AsERF1* 基因的组织特异

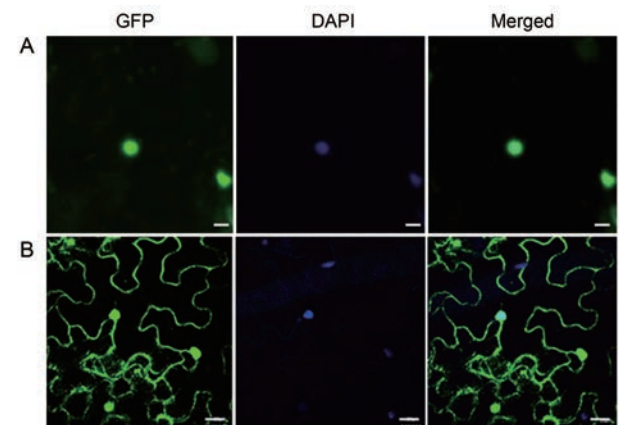


Figure 6 Subcellular localization of pCAMBIA1300-35S-EGFP-*AsERF1* fusion proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. A: pCAMBIA1300-35S-EGFP-*AsERF1*; B: pCAMBIA1300-35S-EGFP. Bars = 10 μm

性表达,结果显示,*AsERF1*在所有的组织中均有表达,在叶中表达量最高,茎次之,在根和茎尖中表达量很低(图7)。

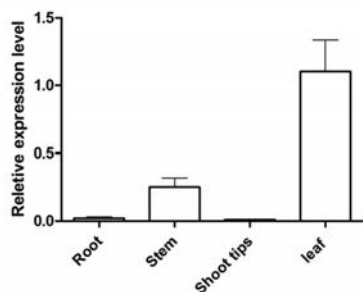


Figure 7 Relative expression level of *AsERF1* gene in different tissues. Repeat 3 samples, each for 3 times

6 *AsERF1*基因在不同非生物胁迫诱导下的表达分析

为验证白木香*AsERF1*基因在植物防御反应中的作用,对白木香愈伤组织分别进行盐、干旱、低温及重金属处理,以相同生长情况下未进行任何处理的愈伤组织作为对照,不同时间点取样提取RNA后进行实时荧光定量PCR分析,检测*AsERF1*的表达水平。盐胁迫下,*AsERF1*的表达水平在12 h内显著升高,12 h表达量达到最高,是对照该基因表达量的3.0倍,随后表达量缓慢降低(图8)。甘露醇诱导产生的干旱胁迫下,*AsERF1*的表达出现双峰现象,在12 h内显著升高,是对照该基因表达水平的10.1倍,随后表达水平降低,在48 h再次显著上升,达到最高,是对照该基因表达水平的12.2倍(图8)。冷胁迫和重金属胁迫下,*AsERF1*的表达水平在36 h内逐渐升高,并在36 h达到最高表达量,分别是对照表达量的3.5倍和2.8倍,随后逐渐降低(图8)。这些实验结果表明盐、干旱、低温和重金属胁迫均可诱导*AsERF1*基因的表达,其中干旱胁迫对*AsERF1*基因的表达水平影响最显著。

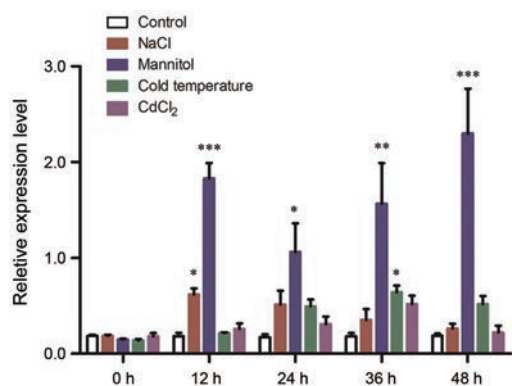


Figure 8 Relative expression level of *AsERF1* gene under different abiotic stresses in *Aquilaria sinensis* Calli. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs Control. Repeat 3 samples, each for 3 times

讨论

APETALA2/ethylene-responsive element binding factor (AP2/ERF)是植物中一个特有的转录因子家族,该转录因子家族通常含有AP2/ERF保守结构域^[21,22],基于序列同源性和AP2保守结构域将其分为5个亚家族,即AP2、RAV、DREB、ERF和其他一些基因家族^[23]。ERF转录因子在植物信号转导、生长发育和胁迫响应中发挥重要作用。目前已经在多种植物中研究了ERF家族基因的功能,但是关于白木香中ERF基因研究的尚未见报道。本研究根据NCBI的序列和愈伤组织转录组测序结果分析,通过RT-PCR从白木香愈伤组织中分离得到*AsERF1*的全长cDNA序列。*AsERF1*含有AP2的保守序列,但是除了AP2保守区域,*AsERF1*与其他物种ERF蛋白的同源性不高。首次在大肠杆菌中表达了白木香的*AsERF1*蛋白,希望能够在蛋白水平上研究白木香中*AsERF1*的生物学功能。通过构建原核表达载体pET28a-*AsERF1*在BL21(DE3)菌株中诱导表达白木香*AsERF1*蛋白,重组蛋白能够以可溶性蛋白存在,为进一步研究*AsERF1*的功能奠定基础。

目前发现大部分植物ERF蛋白定位于植物的细胞核中。例如大麦的ERF蛋白HvRAF定位于植物的细胞核中^[24]。将土豆中ERF3构建到含有GFP的双元表达载体上,烟草瞬时表达系统结果表明其定位于植物细胞核^[25]。将含有大豆GmERF75:GFP的双元载体农杆菌转染洋葱表皮细胞,发现融合蛋白定位于洋葱表皮细胞的细胞核中,并根据以前报道的细胞核定位保守序列K(K/R)X(K/R)推测其核定位序列为KPVKRQRK^[26,27]。本研究将*AsERF1*构建到含有GFP的双元表达载体,利用烟草瞬时表达系统实验证明*AsERF1*主要定位于细胞核,根据进核蛋白核定位信号的保守序列推断*AsERF1*含有可能的核定位信号序列为KRRKKA。

基因在不同组织中的表达模式可为基因功能研究提供初步线索^[28]。ERF在不同植物中具有不同的表达模式。在梨中,大部分的ERF基因能够在梨成熟过程中不同阶段表达,少部分的ERF基因在各组织中均有表达^[29]。芝麻中80%ERF基因在植物各组织中均有表达,但是表达模式各不相同^[30]。大麦中的ERF基因HvRAF在各组织中均有表达,主要分布于植物的根中^[24]。本研究表明白木香*AsERF1*在植物各组织中均有表达,主要表达在植物的叶中,可能在叶生长发育过程中起到重要作用。

白木香只有在受到各种胁迫伤害产生防御反应后才能够产生沉香,因此研究白木香响应胁迫的分子机制对于阐明沉香的结香机制具有重要意义。近期研究结果表明ERF转录因子在植物防御反应过程起到重要作用。小麦*TaERF1*表达水平能够被干旱、盐、低温诱

导, 在拟南芥和烟草中过表达 *TaERF1* 能够提高植物对多种非生物胁迫的抗性^[31]。大豆 *GmERF9* 能够被干旱和盐胁迫的诱导, 过表达 *GmERF9* 烟草具有抗旱性和抗盐性^[32]。拟南芥中过表达大麦 *ERF* 基因 *HvRAF* 能够提高植物对病原菌的抗性和抗盐性^[24]。烟草中 *ERF* 基因 *JERF1* 受到盐和低温胁迫的诱导, 过表达能够提高植物的抗盐和低温能力^[33]。虽然植物中很多 *ERF* 在植物防御反应中的功能被研究, 但是白木香中的 *ERF* 基因功能还没报道。盐、干旱、低温和重金属胁迫是植物生长过程中最常见的非生物胁迫, 本研究发现, *AsERF1* 能够被盐、干旱、低温及重金属胁迫诱导, 盐、干旱和低温均能够显著影响 *AsERF1* 的表达水平, 并且干旱胁迫对 *AsERF1* 基因的表达水平影响最为显著。因此 *AsERF1* 在白木香防御反应过程中起到重要作用, 很可能是植物抵御干旱胁迫的重要基因。 *AsERF1* 基因的蛋白表达、细胞定位及在非生物胁迫下的表达分析为进一步研究 *AsERF1* 在植物胁迫应答和白木香结香过程中的作用机制奠定基础。

作者贡献: 李铁铮主要负责 *AsERF1* 基因克隆、原核表达、表达分析; 郑一哲主要负责 *AsERF1* 生物信息学分析、亚细胞定位和不同胁迫下的表达分析; 戎玉清负责不同胁迫下的表达分析及实验数据的整理; 魏胜利为本研究提供实验指导并对论文初稿进行修改; 王晓晖和屠鹏飞负责设计论文的实验思路, 指导学生实验, 论文撰写及修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

Reference

- [1] Kuluev B, Avalbaev A, Nurgaleeva E, et al. Role of aintegumental-like gene NtANTL in the regulation of tobacco organ growth [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 189: 11-23.
- [2] Jofuku KD, Omidyar PK, Gee Z, et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 3117-3122.
- [3] Rong W, Qi L, Wang AY, et al. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 468-479.
- [4] Dubois M, Van den Broeck L, Claeys H, et al. The ethylene response factors ERF6 and ERF11 antagonistically regulate mannitol-induced growth inhibition in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169: 166-179.
- [5] Koyama T, Nii H, Mitsuda N, et al. A regulatory cascade involving class II ethylene response factor transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence [J]. *Plant Physiol*, 2013, 162: 991-1005.
- [6] Zhao MJ, Yin LJ, Liu Y, et al. The ABA-induced soybean ERF transcription factor gene GmERF75 plays a role in enhancing osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* and soybean [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 506.
- [7] Yu Y, Duan XB, Ding XD, et al. A novel AP2/ERF family transcription factor from *Glycine soja*, GsERF71, is a DNA binding protein that positively regulates alkaline stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 94: 509-530.
- [8] Yao G, Ming M, Allan AC, et al. Map-based cloning of the pear gene MYB114 identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant J*, 2017, 92: 437-451.
- [9] CITES. Amendments to Appendix I and II of CITES [C]. In Proceedings of Thirteenth Meeting of the Conference of the Parties, Bangkok, Thailand, 2004: 2-14.
- [10] State Environmental Protection Administration of China. Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences. List of Rare and Endangered Plants in China (Vol 1) (中国珍稀濒危 保护植物名录: 第一册) [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [12] Li G, Duan LS, Yang CY, et al. Advances in studies on technology of agarwood formation in *Aquilaria sinensis* [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2009, 37: 12012-12013.
- [13] Zhang Z, Yang Y, Wei JH, et al. Advances in studies on mechanism of agarwood formation in *Aquilaria sinensis* and its hypothesis of agarwood formation induced by defense response [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2010, 41: 156-159.
- [14] Xu Y, Zhang Z, Wang M, et al. Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 227-243.
- [15] Qi SY, He ML, Lin LD, et al. Production of 2-(2-phenylethyl) chromones in cell suspension cultures of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2005, 83: 217-221.
- [16] Wang XH, Gao BW, Liu X, et al. Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylethyl) chromones and regulates novel classes of responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* Calli [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 119.
- [17] Wang XH, Dong XJ, Feng YY, et al. H₂O₂ and NADPH oxidases involve in regulation of 2-(2-phenylethyl) chromones accumulation during salt stress in *Aquilaria sinensis* Calli [J]. *Plant Sci*, 2018, 269: 1-11.
- [18] Dong XJ, Gao BW, Feng YY, et al. Production of 2-(2-phenylethyl) chromones in *Aquilaria sinensis* Calli under different treatments [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2018, 135: 53-62.
- [19] Dong XJ, Feng YY, Liu X, et al. Cloning and expression analysis of S-adenosylmethionine synthetase gene from *Aquilaria sinensis* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1743-1752.
- [20] Dong XJ, Li TZ, Feng YY, et al. Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene from *Aquilaria sinensis* [J]. *Acta*

- Pharm Sin (药 学 学 报), 2018, 53: 467-475.
- [21] Zhuang J, Chen JM, Yao QH, et al. Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum* [J]. Mol Biol Rep, 2017, 38: 745-753.
- [22] Liu MY, Sun MJ, Ma ZT, et al. Genome-wide investigation of AP2/ERF gene family in tartary buckwheat (*Fagopyum tatarium*) [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19: 84.
- [23] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 998-1009.
- [24] Jung JW, Won SY, Suh SC, et al. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2007, 225: 575-588.
- [25] Liu MC, Pirrello JL, Kesari R, et al. A dominant repressor version of the tomato Sl-ERF.B3 gene confers ethylene hypersensitivity via feedback regulation of ethylene signaling and response components [J]. Plant J, 2013, 76: 406-419.
- [26] Lange A, Mills RE, Lange CJ, et al. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 5101-5105.
- [27] Kusugi S, Hasebe M, Matsumura N, et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 478-485.
- [28] Li YM, Zhang N, Shen X, et al. Identification and expression analysis of four CIPKs genes from a rare and medicinal plant, *Dendrobium officinale* [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2018, 53: 304-312.
- [29] Li XL, Tao ST, Wei SW, et al. The mining and evolutionary investigation of AP/ERF genes in pears (*Pyrus*) [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18: 46.
- [30] Dossa K, Wei X, Li DH, et al. Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16: 171.
- [31] Xu ZS, Xia LQ, Ma YZ et al. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L ethylene-responsive factor 1 TaERF1 that increases multiple stress tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2007, 65: 719-732.
- [32] Zhai Y, Shao SL, Sha W, et al. Over expression of soybean GmERF9 enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco [J]. Plant Cell Tiss Org, 2017, 129: 607-618.
- [33] Wu LJ, Chen XL, Ren HY, et al. ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco [J]. Planta, 2007, 226: 815-825.