



小麦 *TaGAPC1* 基因及其启动子的克隆与功能分析

秦凌月¹ 邓西平² 杨淑慎^{1*}

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 杨凌 712100; 2 中国科学院 水土保持研究所/黄土高原土壤侵蚀和旱地农业重点实验室, 杨凌 712100

*通讯作者, yangshushen2014@163.com

摘要 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解过程中的关键酶。作为GAPDH的亚型,GAPC(cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)催化3-磷酸甘油醛氧化生成1,3-二磷酸甘油酸,但是关于GAPC在非生物胁迫应答中作用的研究却并不充分。本研究从中国春小麦(*Triticum aestivum*)中克隆出了*TaGAPC1*基因(GenBank No. KU246046),其编码337个氨基酸,并克隆出基因上游973 bp的序列,将其命名为P973。通过融合绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因,使用基因枪法瞬时转化洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞进行亚细胞定位,结果显示*TaGAPC1*蛋白定位于细胞膜上。使用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术,分析*TaGAPC1*基因在根、茎、叶中,以及干旱(PEG8000)、盐(NaCl)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和低温(4 °C)非生物胁迫下的表达模式。结果表明*TaGAPC1*基因在叶、根、茎中的表达量依次下降,在PEG8000、NaCl和ABA胁迫下的表达量显著上升,但对4 °C的响应不明显。根据PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)和PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)数据库分析,P973启动子序列中包含响应干旱、ABA、低温和创伤等胁迫的顺式作用元件,如干旱应答元件(drought-responsive element, DRE)、激素应答元件包括ABA应答元件(ABA-responsive element, ABRE)、MYB结合位点(MYB-binding site, MBS)和WUN-motif等。根据顺式作用元件的分布,扩增得到5个启动子5'端缺失片段,分别命名为P844、P738、P605、P475和P256。构建6条启动子序列融合 β -葡萄糖苷酶基因(β -glucuronidase, GUS)的表达载体,并瞬时转化烟草(*Nicotiana glauca*)植株,测定PEG8000、NaCl、ABA和4 °C胁迫下各启动子驱动的GUS酶活。结果表明,-973~-605启动子区域在*TaGAPC1*基因应答PEG8000和NaCl胁迫中具有关键作用,-973~-475启动子区域对应答ABA胁迫至关重要。本研究从分子水平初步阐释了*TaGAPC1*与非生物胁迫应答的关系,为深入探讨其抗逆的分子机制奠定了基础。

关键词 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),非生物胁迫,启动子,顺式作用元件

中图分类号 S512.1 文献标识码 A

Cloning and Function Analysis of *TaGAPC1* Gene and the Promoter in Wheat (*Triticum aestivum*)

QIN Ling-Yue¹ DENG Xi-Ping² YANG Shu-Shen^{1*}

1 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, 712100, China; 2 State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on the Loess Plateau/Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences, Yangling 712100, China

* Corresponding author, yangshushen2014@163.com

Abstract Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a key enzyme in glycolysis, but the role of GAPC (cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), which is a cytosolic GAPDH isoform and catalyzes the conversion of 3-phosphoglyceraldehyde to 1,3-diphosphoglyceric acid, against abiotic stresses is

基金项目:国家自然科学基金(No. 31671609)和黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室专项(No. 10502)

收稿日期:2018-02-02 接受日期:2018-02-26

largely unknown. In this study, the *TaGAPC1* gene encoding 337 amino acids and the *TaGAPC1* promoter named P973 were both cloned. We fused the *TaGAPC1* to green fluorescent protein gene (*GFP*) and transformed it into onion (*Allium cepa*) epidermal cells, the result showed that TaGAPC1 protein localized on the cytomembrane. Quantitative real-time PCR was used to detect *TaGAPC1* expression in leaf, root and stem or under PEG8000, NaCl, ABA, and 4 °C stresses, the results indicated that the expression levels of *TaGAPC1* gene in leaf, root, and stem gradually declined, and *TaGAPC1* expression was induced by PEG8000, NaCl, and ABA treatments, but it did not response to 4 °C treatment. The PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) and PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) database indicated that some *cis*-acting elements responsive to abiotic stress were present in P973 promoter, such as Drought-responsive element (DRE), ABA-responsive element (ABRE), MYB-binding site (MBS) and WUN-motif. Based on the position of *cis*-acting elements in *TaGAPC1* promoter, 5 deletions named P844, P738, P605, P475, and P256 were respectively amplified. After the 6 promoters were fused to β -glucuronidase gene (*GUS*) and transformation into tobacco (*Nicotiana glauca*) was performed, *GUS* activity driven by the 6 promoters under PEG8000, NaCl, ABA, and 4 °C stresses were determined. The result suggested that *TaGAPC1* promoter region from -973 to -605 was essential for the response to PEG8000 and NaCl, the region from -973 to -475 was essential for the response to ABA. The study illustrated the relationship of *TaGAPC1* gene with abiotic stress response at molecular level, and lay foundation for further exploring *TaGAPC1*'s molecular mechanism under stress.

Keywords Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Abiotic stress, Promoter, *Cis*-acting element

小麦(*Triticum aestivum*)是世界上最主要的粮食作物之一,占据着约17%的作物种植面积,为超过30%的人们提供稳定的食物来源(Mayer et al., 2014)。但小麦的产量却长期遭受干旱、低温和高盐等多种非生物胁迫的制约(Bohner et al., 1995)。因此,鉴定小麦中抗逆基因并进一步研究其应答胁迫的分子机制,对于提高小麦抗逆性及产量具有重大的意义。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解过程中的关键酶,在植物细胞内高丰度表达。GAPC (cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)是GAPDH的胞质亚型,将3-磷酸甘油醛氧化生成1,3-二磷酸甘油酸(卢倩等, 2013)。目前为止,GAPC基因已经相继从多种植物中被克隆出来,如玉米(*Zea mays*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、复苏植物 *Craterostigma plantagineum* 和马铃薯(*Solanum tuberosum*)等(Russell, Sachs, 1989; Shih et al., 1991; Velasco et al., 1994; Laxalt et al., 1996)。不同于以往GAPC基因仅作为管家基因的认识,越来越多的研究发现GAPC是一个多功能蛋白,其与干旱、盐和缺氧等非生物胁迫应答紧密相关(卢倩等, 2013)。干旱和脱落酸(abscisic acid, ABA)胁迫下,

复苏植物中GAPC的基因表达量、蛋白含量和酶活上调(Velasco et al., 1994);盐胁迫使拟南芥中 *At-GAPC1* 基因的表达量显著提高(Jiang et al., 2007);在过表达 *OsGAPC3* 的转基因水稻中,植株的盐胁迫抗性显著提高(Zhang et al., 2011);低氧胁迫下,玉米 *GAPC3* 和 *GAPC4* 基因表达量上调,通过构建 *GAPC4* 启动子的瞬时表达系统发现,启动子的顺式作用元件 TGGTTT 和 GCCCGG 是响应低氧胁迫所必需的(Hänsch et al., 2003)。

关于GAPC基因的研究在拟南芥和水稻(*Oryza sativa*)中已经有了较大进展,但在小麦中的研究并不深入。在本实验室前期研究中,小麦的GAPDH家族通过基因组学分析被鉴定出来(Zeng et al., 2016),实时荧光定量PCR(qRT-PCR)表明 *TaGAPC1* (*GAPDH12*)基因对干旱胁迫的响应最为显著,因此选择 *TaGAPC1* 进行深入分析。本研究克隆了小麦 *TaGAPC1* 基因,进行了亚细胞定位和胁迫诱导表达模式分析;同时克隆了 *TaGAPC1* 启动子,并通过瞬时表达至烟草(*Nicotiana glauca*)进行启动子缺失分析,进而确定了特定非生物胁迫下调控基因表达的关键启动子片段,为深入探讨其抗逆的分子机制提供了实验数据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

小麦(*Triticum aestivum*)中国春品种、烟草(*Nicotiana glauca*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 菌种、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌种、16318-GFP(绿色荧光蛋白, green fluorescent protein)定位载体、 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, pC0390-GUS)和 pC35S-GUS 植物表达载体均为本实验室保存, pMD-19T 载体购于 TaKaRa 公司(大连)。

非生物胁迫处理:在干旱、盐和脱落酸胁迫处理中,分别用 20% PEG8000、250 mmol/L NaCl 和 100 μ mol/L 脱落酸(abscisic acid, ABA)溶液浇灌两叶一心期的小麦植株或喷洒 6 周大烟草植株的叶片;在低温胁迫处理中,将两叶一心期的小麦植株或 6 周的烟草植株转移至 4 $^{\circ}$ C 光照培养箱内培养。小麦胁迫后分别在 0、1、3、6、12、24、48 和 72 h 剪取叶片取样,烟草胁迫 24 h 后剪取叶片取样。

表 1 本研究所用引物

Table 1 The sequences of the primers used in this study

| 引物名称 Primer names | 序列(5'~3') Sequences | 用途 Applications |
|------------------------|----------------------------------|---|
| <i>TaGAPC1</i> -5'GSP1 | CCTTGATAGCCTTCTTGATGTCATCA | 5'RACE 实验 |
| <i>TaGAPC1</i> -5'GSP2 | GCTCAGGAAGAACCTTACCAACAGCCTTAGCA | 5'RACE analysis |
| <i>TaGAPC1</i> -3'GSP1 | TGACTACAAGAAGGCTATCAAGG | 3'RACE 实验 |
| <i>TaGAPC1</i> -3'GSP2 | TTGAGGAGGATTTGGTCTCCACCGACTT | 3'RACE analysis |
| <i>TaGAPC1</i> -F | CGAATGGGGTTACAGCAACC | 实时荧光定量 PCR |
| <i>TaGAPC1</i> -R | CGCATAGACAAAGCAGGGACA | Quantitative real-time PCR analysis |
| <i>Actin</i> -F | CGACTCTGGTGATGGTGTGAG | |
| <i>Actin</i> -R | AGCAAGGTCCAAACGAAGGA | |
| <i>TaGAPC1</i> -SL-F | AACTGCAGATGGGCAAGATTAAGATCG | 构建 <i>TaGAPC1</i> -GFP 载体 |
| <i>TaGAPC1</i> -SL-R | GCTCTAGACTGAGTCTTGGCCATGTGG | Construction of <i>TaGAPC1</i> -GFP fusion vector |
| <i>PTaGAPC1</i> -F | CGGCGAGTAAGCAAAGGG | 克隆 <i>TaGAPC1</i> 启动子 |
| <i>PTaGAPC1</i> -R-1 | TCAGCAAAGAACAATCACCATC | Cloning of the <i>TaGAPC1</i> promoter |
| <i>PTaGAPC1</i> -F1 | CCCAAGCTTCGGCGAGTAAGCAAAGGG | 构建 <i>TaGAPC1</i> 启动子及其 5 个缺失片段的植物表达载体 |
| <i>PTaGAPC1</i> -F2 | CCCAAGCTTCGTGATAAATAAGACGACCG | |
| <i>PTaGAPC1</i> -F3 | CCCAAGCTTTCTAGGCGCAATTTGAATG | Construction of expression vectors of <i>TaGAPC1</i> promoter and its 5 deletions |
| <i>PTaGAPC1</i> -F4 | CCCAAGCTTCCCATTGGAGTTGCTCTTAGC | |
| <i>PTaGAPC1</i> -F5 | CCCAAGCTTCCTCGCATTTTATGGGTCCT | |
| <i>PTaGAPC1</i> -F6 | CCCAAGCTTCGTCTGGATTTGTTAGTTTCC | |
| <i>PTaGAPC1</i> -R-2 | TCCCCCGGGTCAGCAAAGAACAATCACCATC | |

下划线部分的核苷酸形成 *Pst* I (CTGCAG)、*Xba* I (TCTAGA)、*Hind* III (AAGCTT)和 *Sma* I (CCCGGG)酶切位点

The underlined nucleotides form *Pst* I (CTGCAG), *Xba* I (TCTAGA), *Hind* III (AAGCTT) and *Sma* I (CCCGGG) restriction sites

1.2 实验试剂

RNA 提取试剂 Trizol、LA *Taq*、dNTP Mixture、T₄ DNA Ligase、5' Full RACE kit with TAP 试剂盒、3' Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex *Taq*™ II 定量试剂盒购于大连 TaKaRa 公司。DNA 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购于北京天根公司, 2 \times *Taq* Master Mix 购于北京康为世纪公司, PCR 引物合成和测序由北京奥科公司进行。 *Pst* I、*Xba* I、*Hind* III 和 *EcoR* I 限制性内切酶、Pierce®R BCA Protein Assay Kit 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、4-甲基伞形酮- β -葡萄糖醛酸苷(4-MUG)、4-甲基伞形酮(4-MU)、葡萄糖苷酸(X-Gluc)购于美国 Sigma 生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 *TaGAPC1* 基因及其启动子的克隆

采用 Trizol 法提取中国春小麦总 RNA 作为基

因克隆的模板。根据 Ensembl 数据库(<http://ensemblgenomes.org/>)中 *TaGAPC1* 基因序列,设计两条上游引物 *TaGAPC1*-5'GSP1、*TaGAPC1*-5'GSP2 用于基因 5'末端扩增,两条下游引物 *TaGAPC1*-3'GSP1、*TaGAPC1*-3'GSP2 用于基因 3'末端扩增(表 1)。5' cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)和 3'RACE 实验参照大连 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行。5'RACE 反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s、57 °C (一轮 PCR)/60 °C (二轮 PCR) 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,25 个循环;72 °C 终延伸 10 min。3'RACE 反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s、55 °C (一轮 PCR)/65 °C (二轮 PCR) 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,25 个循环;72 °C 终延伸 10 min。

采用改良版十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取中国春小麦基因组 DNA。根据 Ensembl 数据库中 *TaGAPC1* 基因的上游序列,设计引物 *PTaGAPC1*-F 和 *PTaGAPC1*-R 用于启动子扩增。PCR 体系:10× LA PCR Buffer 2 μL, dNTP Mixture (2 mmol/L) 1.6 μL, DNA 模板 20 ng, LA Taq 2.0 U, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 以双蒸水补齐至 20 μL。PCR 程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,32 个循环;72 °C 终延伸 10 min。将 PCR 产物纯化回收,克隆至 pMD-19T 载体后,转化 *E.coli* Top10 感受态细胞,阳性克隆送公司测序。

1.3.2 *TaGAPC1* 基因表达模式分析

根据 *TaGAPC1* cDNA 序列,设计引物 *TaGAPC1*-F 和 *TaGAPC1*-R 用于 qRT-PCR 实验,以 β -Actin (GenBank No. AB181991)作为内参基因(表 1)。将小麦根、茎、叶组织,以及 PEG8000、NaCl、ABA 和 4 °C 胁迫下各时间点取得的小麦样品,进行 RNA 提取并反转录获得单链 cDNA。实时荧光定量 PCR 的反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ 5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 以双蒸水补齐至 10 μL。qRT-PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火及延伸 30 s, 40 个循环。每个反应设 3 次重复。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *TaGAPC1* 基因在不同组织及不同胁迫下的相对表达量(Livak, Schmittgen, 2001),以 Origin 9.1 软件作图。

1.3.3 *TaGAPC1* 蛋白的亚细胞定位分析

设计含 *Pst* I (CTGCAG)酶切位点的上游引物 *TaGAPC1*-SL-F、含 *Xba* I (TCTAGA)酶切位点的下游引物 *TaGAPC1*-SL-R(表 1),用于扩增不含终止密码子的 *TaGAPC1* ORF 序列,并将该片段双酶切后连接至 pCaMV35S::GFP 载体中,构建亚细胞定位载体。使用基因枪(PDS-1000, Bio-Rad, 美国)法将 *TaGAPC1*-GFP 重组载体瞬时转化至洋葱表皮细胞,pCaMV35S::GFP 载体作为阳性对照同时转化。转化后的洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞在 MS 培养基上黑暗培养 24 h 后,使用荧光共聚焦显微镜(Zeiss, Obekochen, 德国)进行拍照。

1.3.4 启动子缺失片段的扩增及其表达载体的构建

根据 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo et al., 1999)、PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot et al., 2002)数据库预测的 *TaGAPC1* 启动子中关键顺式作用元件的位置,设计 6 条含 *Hind* III (AAGCTT)酶切位点的上游引物 *PTaGAPC1*-F1、*PTaGAPC1*-F2、*PTaGAPC1*-F3、*PTaGAPC1*-F4、*PTaGAPC1*-F5、*PTaGAPC1*-F6, 及 1 条共同的含 *Sma* I (CCCGGG)酶切位点的下游引物 *PTaGAPC1*-R (表 1),用于扩增长度分别为 973、844、738、605、475 和 256 bp 的启动子片段。PCR 反应以含 *TaGAPC1* 启动子全长的质粒为模板,反应程序参照 1.3.1 启动子扩增程序,扩增得到的启动子片段分别命名为 P844、P738、P605、P475 和 P256。使用 *Hind* III 和 *Sma* I 限制性内切酶对 P973、P844、P738、P605、P475、P256 等 6 个启动子片段进行双酶切后,使用 *T₄* 连接酶连接至 pC0390-GUS 植物表达载体,阳性克隆测序(图 1)。

1.3.5 农杆菌介导的瞬时转化

将 P973、P844、P738、P605、P475 和 P256 的重组质粒分别转化至 EHA105 根癌农杆菌。含 P973、P844、P738、P605、P475 和 P256 重组质粒的农杆菌菌株及 pC35S-GUS 阳性对照菌株、pC0390-GUS 空载体菌株,分别重悬于渗透缓冲液(含 0.5% 葡萄糖, 50 mmol/L MES, 2 mmol/L Na₃PO₄·12H₂O, 0.1 mmol/L 水杨酸),使用不含针头的注射器注入烟草叶片背面进行瞬时转化,参照 Sparkes 等(2006)的方法。转化后的植株按原生长条件培养 24 h 后,分别

取空白对照植株(WT)、pC35S-GUS 阳性载体转化植株、P973-pC0390-GUS 重组载体转化植株的叶片进行组织化学染色, 每组处理重复取样 3 次。剩余植株进行 PEG8000、NaCl、ABA 和 4 °C 胁迫处理, 处理方法参照 1.1, 胁迫持续 24 h, 每 12 h 施加 1 次胁迫, 胁迫后取样, 每组处理重复取样 3 次。

1.3.6 组织化学染色与 GUS 酶活测定

配制 GUS 染色液, 将烟草叶片置于 GUS 染色液中, 37 °C 避光染色 24~48 h, 以 70% 乙醇脱色 6 h, 以 90% 乙醇脱色至叶片完全透明, 拍照记录叶片染色程度。GUS 酶活测定参照 Jefferson(1987) 的方法: 取各处理组的烟草叶片 0.2 g, 以高通量组织研磨仪研磨后进行粗蛋白的提取; 使用 Pierce® R BCA Protein Assay Kit 测定样品蛋白含量, 酶标仪测定 GUS 催化生

成产物 4-MU 的荧光强度。GUS 酶活定义为每分钟每毫克可溶性蛋白产生的 4-MU 的 nmol 数。

1.3.7 数据处理

利用 SPSS 13.0 软件对 qRT-PCR 数据及 GUS 酶活数据进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 *TaGAPC1* 基因序列分析及系统发育分析

RACE 技术克隆出 *TaGAPC1* 基因 5' 端 769 bp 的序列和 3' 端 398 bp 的序列, 将其在 Ensembl 数据库中进行比对, 得到位于小麦 7DL 染色体上的基因全长序列, *TaGAPC1* 全长为 1 326 bp, 包含 1 014 bp ORF 序列、93 bp 5'-UTR 序列和 219 bp 3'-UTR 序列

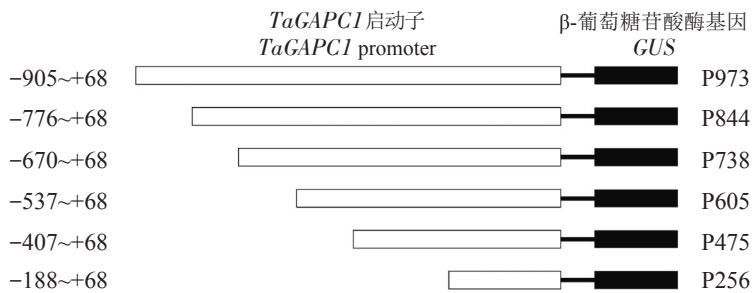


图 1 *TaGAPC1* 启动子及其缺失片段融合 *GUS* 基因

Figure 1 *TaGAPC1* promoter and its deletions fused to *GUS* chimeric genes

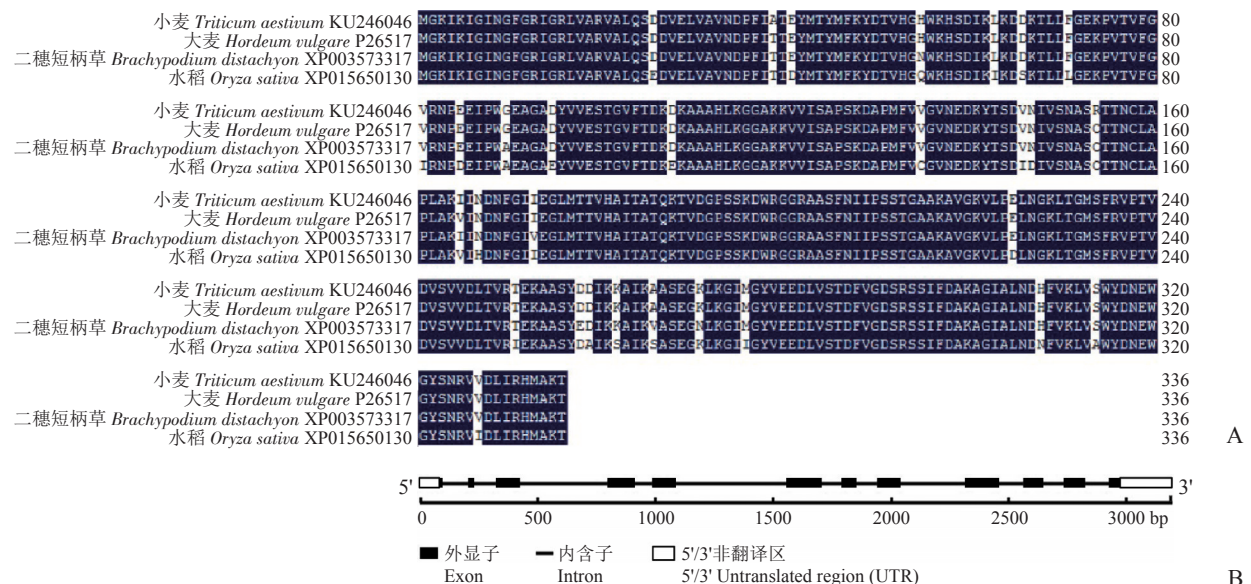


图 2 不同物种间 GAPC 蛋白序列比对(A)及 *TaGAPC1* 基因结构分析(B)

Figure 2 Sequence alignment of GAPC proteins from different species (A) and structure analysis of *TaGAPC1* gene (B)

GAPCs 序列比对中一致的氨基酸残基标注为深色背景

The identical residues in deduced amino acid sequence of GAPCs are shaded deep background

(GenBank 登录号: KU246046)。TaGAPC1 基因编码含 337 个氨基酸的蛋白序列,蛋白分子量为 36.55 kD,等电点为 7.07。将 TaGAPC1 cDNA 序列与基因组 DNA 序列进行比对,发现该基因含有 12 个外显子和 11 个内含子,内含子长度在 74~471 bp 之间(图 2)。

在 GenBank 中比对得到来自多个物种的 TaGAPC1 同源序列,使用 ClustalX 2.0 进行序列比对(Larkin et al., 2007),采用 MEGA 5.0 进行系统发育树构建(Tamura et al., 2011),方法为 Neighbor joining(NJ)法。结果表明,TaGAPC1 蛋白与大麦(*Hordeum vulgare*) HvGAPC1 蛋白的同源性高达 98.9%,与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*) BdGAPC1 的同源性高达 97.4%,但毛果杨(*Populus trichocarpa*) PtGAPC1 与 TaGAPC1 的同源性较低,仅为 85.8%(图 3)。

2.2 TaGAPC1 基因在不同组织和非生物胁迫下的表达模式

通过 qRT-PCR 技术分析 TaGAPC1 基因在小麦根、茎、叶中的表达模式,以基因在茎中的表达量为对照,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析。结果表明,TaGAPC1 基因在茎中的表达量最低,在叶中的表达量最高,约为茎中的 1.5 倍,根中的表达量居中,约为茎中的 1.2 倍(图 4)。

TaGAPC1 基因在干旱(20% PEG8000)、盐(NaCl)、低温(4 °C)和脱落酸(ABA)四种非生物胁迫下的表达分析,均以 0 h 基因表达量为对照,结果如下:20% PEG8000 胁迫下,TaGAPC1 基因表达量在 3 h 显著升高,达到 0 h 的 6 倍左右,在 6 h 时仍保持表达量的较高水平,随后在 12 h 显著下降(图 5A);

NaCl 胁迫下,基因表达量在 3 h 显著升高至最大值,约为 0 h 的 12 倍,随后在 12 h 时下降至低水平(图 5B);4 °C 胁迫下,基因表达量在 1 h 和 3 h 时出现轻微上升,但仅为 0 h 的 2 倍和 1.8 倍,在 12 h 后,基因表达量低于对照组水平(图 5C);ABA 胁迫下,基因表达量在 1 h 显著升高,在 6 h 时达到最高峰,为对照组的 15 倍,在 24 h 时表达量下降至低水平(图 5D)。综上所述,TaGAPC1 基因表达量能被 20% PEG8000、NaCl 和 ABA 胁迫显著诱导,对 4 °C 胁迫略有响应,但并不明显。

2.3 TaGAPC1-GFP 融合蛋白的亚细胞定位分析

使用共聚焦显微镜观察转化的洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞表明:TaGAPC1-GFP 重组蛋白的绿色荧光位于细胞膜,而 pCaMV35S::GFP 载体的绿色荧光则遍布于包含细胞质和细胞核的整个细胞。上述结果提示,TaGAPC1 蛋白定位于细胞膜上(图 6)。

2.4 TaGAPC1 启动子序列分析

使用 PLACE 和 PlantCARE 数据库对 TaGAPC1 启动子 P973 中关键顺式作用元件进行分析,表明 TaGAPC1 启动子中存在大量的光应答元件、激素应答元件和胁迫应答元件。其中,光应答元件包括 Box I、G-box、GT1-motif 和 Sp1(特异性蛋白 1, specificity protein 1),激素应答元件包括 ABA 应答元件(ABA-responsive element, ABRE)(Baker et al., 1994)、生长素应答元件、茉莉酸甲酯应答元件(CGTCA motif 和 TGACG motif)和乙烯应答元件,胁迫应答元件包括干旱应答元件(drought-responsive element, DRE)(Dubouzet et al., 2003)、低温应答元件(low temperature-responsive element, LTRE)

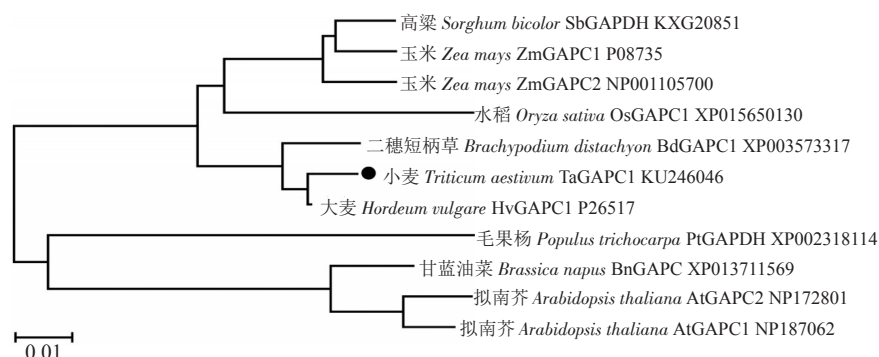


图 3 基于 NJ 法构建 TaGAPC1 蛋白与其同源序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of the TaGAPC1 protein and its homologs by Neighbor-joining method

系统发育树使用 1000 次重复抽样及默认参数构建

The phylogenetic tree was generated with 1000 bootstrap replicates and default parameters

(Baker et al., 1994)、厌氧应答元件、MYB 结合位点 (MYB-binding site, MBS)(Nash et al., 1990) 及防御和胁迫应答元件(TC-rich repeats)(图 7)。

2.5 *TaGAPC1* 启动子驱动的组织化学染色

TaGAPC1-GUS 重组载体转化烟草植株、

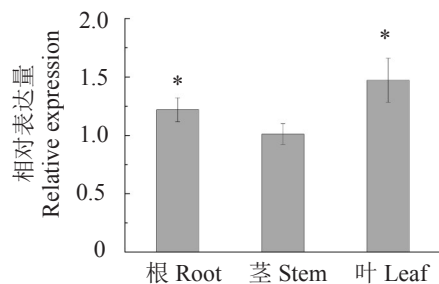


图 4 *TaGAPC1* 基因的组织表达分析

Figure 4 Expression analysis of *TaGAPC1* in different tissues

内参基因: β -Actin; 茎中 *TaGAPC1* 基因的表达量取为 1.0; n=3; *: $P < 0.05$

Reference gene: β -Actin; Transcriptional level of *TaGAPC1* in stem is taken as 1.0; n=3; *: $P < 0.05$

pC35S-GUS 阳性对照载体转化烟草植株、野生型烟草植株(WT)的叶片分别进行 GUS 染色, 结果表明: WT 植株的叶片未被染上颜色, pC35S-GUS 阳性载体侵染的叶片被染成明显的深蓝色, *TaGAPC1*-GUS 重组载体侵染的叶片被染成淡蓝色。上述结果提示, 克隆得到的 *TaGAPC1* 启动子具有驱动下游 GUS 基因表达的能力, 具有启动子活性(图 8)。

2.6 不同非生物胁迫下 *TaGAPC1* 启动子驱动的 GUS 酶活测定

测定全长启动子 P973 在 20% PEG8000、250 mmol/L NaCl、4 °C、100 μ mol/L ABA 等 4 种非生物胁迫下的 GUS 酶活, 结果如图 9 所示: 20% PEG8000 胁迫下, P973 启动子驱动的 GUS 酶活显著升高, 约达到对照 2 倍的水平; NaCl 处理下, GUS 酶活被诱导至对照的 2 倍左右; 4 °C 处理下, GUS 酶活呈现降低的趋势, 约为对照组的 0.75 倍; ABA 处理下, GUS 酶活被显著诱导至对照组的 1.6 倍。概括来说, *TaGAPC1* 启动子活性能被干旱、盐和 ABA

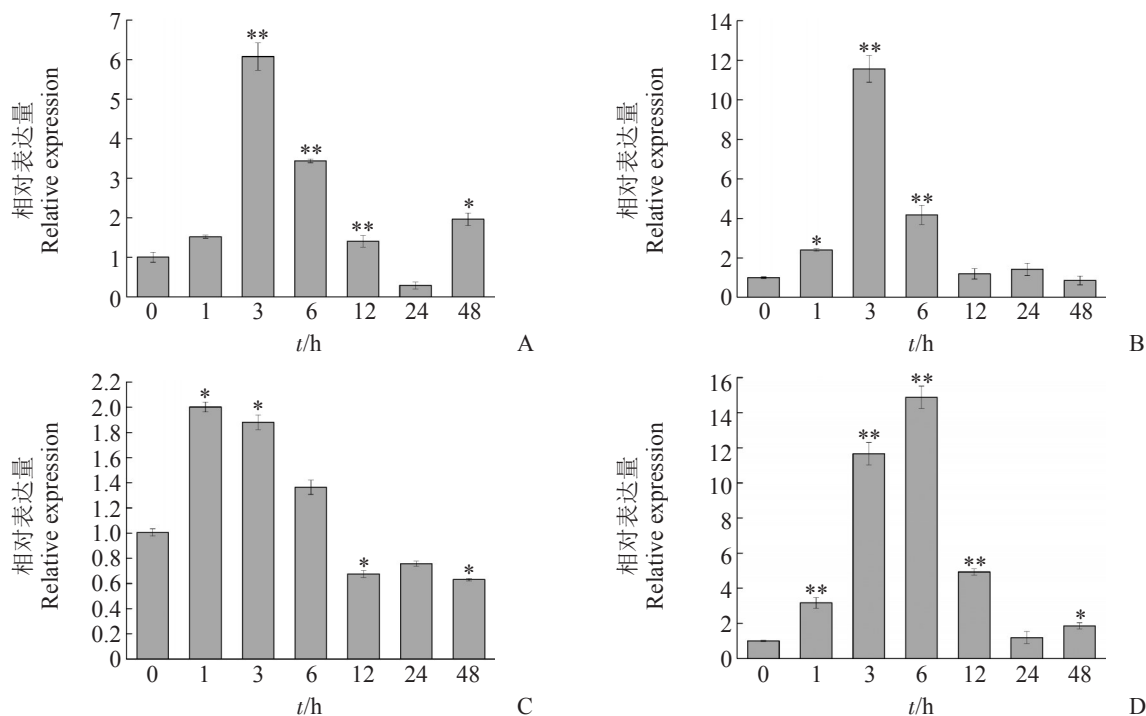


图 5 *TaGAPC1* 基因在 PEG8000 (A)、NaCl (B)、4 °C (C) 和 ABA (D) 胁迫下的表达分析

Figure 5 Expression analysis of *TaGAPC1* under PEG8000 (A), 4 °C (B), NaCl (C), and ABA (D) treatments

内参基因: β -Actin; *TaGAPC1* 的 0 h 表达量取为 1; *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$)

Reference gene: β -Actin; Transcriptional level of *TaGAPC1* at 0 h taken as 1; *: The difference is significant ($P < 0.05$); **: The difference is extremely significant ($P < 0.01$)

胁迫显著诱导。

4种非生物胁迫下, P973、P844、P738、P605、P475和P256等6个启动子片段驱动的GUS酶活水平存在差异(图9): 20% PEG8000处理24 h后, P973和P844启动子片段的GUS酶活相对于对照显著升高, P738的GUS酶活略微升高, P256的活性也被显著诱导, 但P605呈现出GUS活性下降的情况, 由此提示, -973~-605 bp区域中存在的某个顺式作用元件对*TaGAPC1* 应答PEG8000胁迫至关重要; NaCl

胁迫下, P973、P844和P738驱动下的GUS酶活较对照上调, P605的活性显著下降, P475和P256的活性略微高于对照组, 提示-973~-605 bp区域在应答NaCl胁迫中发挥重要作用; 4℃胁迫下, P973、P844、P738、P605和P475启动子片段驱动下的GUS酶活相对于对照均下调, P256启动子的活性与对照组相比无明显差异; ABA胁迫下, P973、P844、P605启动子片段驱动的GUS酶活显著上升, P738和P475略微上升, 但P256的活性略低于对照组, 提示-973~-475 bp区域对启动子应答ABA具有关键作用。综上所述, -973~-605 bp区域对启动子应答PEG8000和NaCl至关重要, 推测这与片段中干旱应答元件DRE和MYB结合位点MBS有关; -973~-475 bp区域对启动子应答ABA很关键, 推测这与其中的ABA应答元件ABRE有关。

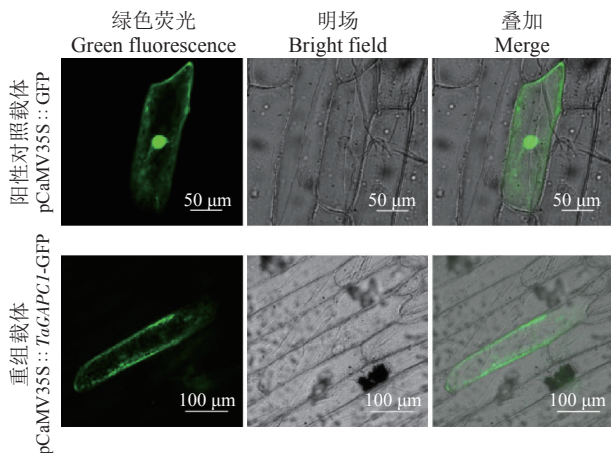


图6 *TaGAPC1* 蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位
Figure 6 Subcellular localization of *TaGAPC1* protein in onion epidermal cell

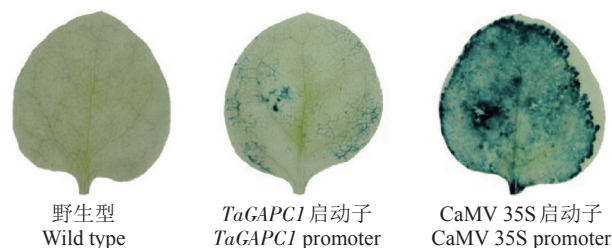


图8 烟草叶片GUS染色分析
Figure 8 GUS staining of tobacco leaves

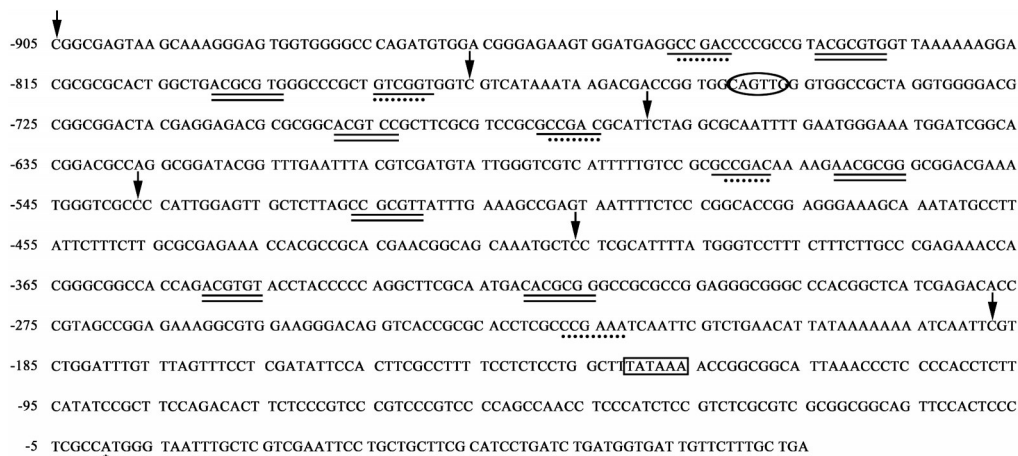


图7 *TaGAPC1* 启动子序列分析
Figure 7 Characterization and sequence analysis of *TaGAPC1* promoter

单下划线和双下划线代表干旱应答元件(DREs)和ABA应答元件(ABREs); 虚线代表低温应答元件(LTREs); 椭圆代表MYB结合位点(MBS); 方框表示TATA框; 星号表示转录起始位点(+1); 箭头标明6个启动子片段的起始位置

Single underlined and double underlined motifs represent dehydration-responsive elements (DREs) and ABA-responsive elements (ABREs); Dotted line represents low temperature-responsive elements (LTREs); Ellipsoid represents MYB binding site (MBS); The boxed sequence indicates the putative TATA box; Asterisk indicates the translational start site (+1); Arrowheads show the 6 start point of the 5'-deleted derivatives

3 讨论

GAPDH是糖酵解过程中的关键酶,前期研究偏向于认为 *GAPDH* 是管家基因(罗聪等,2011),但越来越多研究结果表明,*GAPDH*在植物的非生物胁迫应答中发挥作用(Zaffagnini et al., 2013)。关于 *GAPDH* 基因的研究在小麦中并不深入。本研究从小麦中克隆出了编码337个氨基酸的 *TaGAPC1* 基因全长, qRT-PCR 技术表明该基因能够被 PEG8000、NaCl 和 ABA 胁迫显著诱导。ABA 是重要的内源性激素,干旱胁迫、盐胁迫均可导致植株内 ABA 迅速生成,植株进而调节气孔关闭以增强抗逆性(李长宁等, 2010);同时,施加外源 ABA 能够刺激内源 ABA 的合成,进而提高植株抗逆能力(Ikegami et al., 2009)。可以推测,PEG8000 胁迫、

NaCl 胁迫及外源 ABA 的施加,导致植物体内内源 ABA 迅速合成, *TaGAPC1* 基因作为内源 ABA 调控通路的下游物质发挥作用,进而提高植株抗逆性。前期研究证明,施加 ABA 胁迫后的拟南芥中, GPCs 蛋白与质膜磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 进行互作,在细胞内传递活性氧信号(Guo et al., 2012)。

顺式作用元件是启动子中的特定基序,能够与转录因子结合,调控下游基因的表达,因此被认为在基因表达调控中发挥重要作用。根据 PLACE 和 PlantCARE 数据库分析结果, *TaGAPC1* 启动子中含有 DRE、LTRE、MBS、TC-rich repeats 等多个应答胁迫的顺式作用元件。本研究将 *TaGAPC1* 启动子转化至烟草植株后, GUS 酶活测定说明 *TaGAPC1* 启

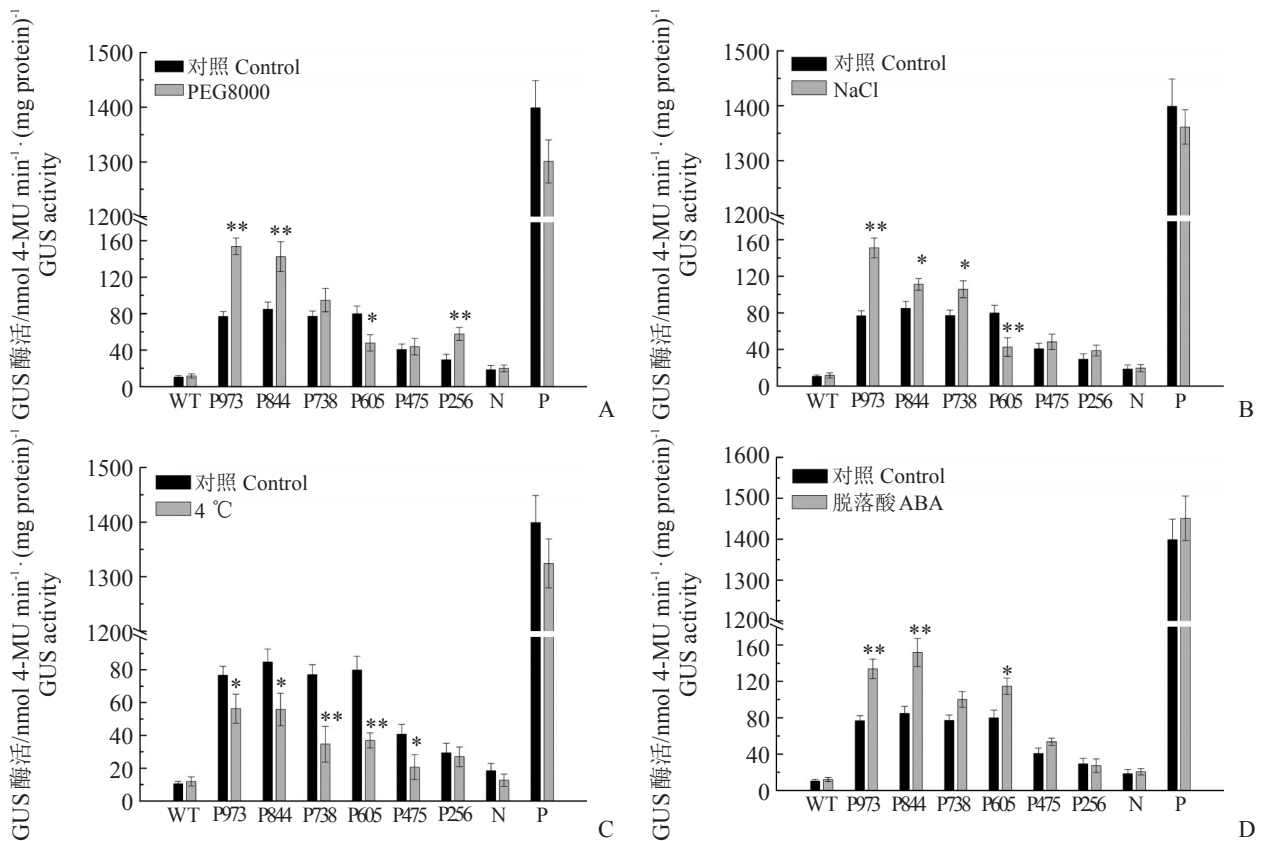


图9 *TaGAPC1* 启动子应答 PEG8000 (A)、NaCl (B)、4 °C (C) 和 ABA (D) 胁迫的缺失分析

Figure 9 Deletion analysis of *TaGAPC1* promoter in response to PEG8000 (A), NaCl (B), 4 °C (C) and ABA (D) treatments

WT: 野生型(无表达); N: 阴性对照(无启动子); P: 阳性对照(CaMV 35S 启动子); P973、P844、P738、P605、P475 和 P256: 6 个 *TaGAPC1* 启动子片段; n=3; *: 差异显著($P < 0.05$); **: 差异极显著($P < 0.01$)

WT: Wild type (no expression); N: Negative control (no promoter); P: Positive control (CaMV 35S promoter); P973, P844, P738, P605, P475, and P256: 6 fragments of *TaGAPC1* promoter; n=3; *: The difference is significant ($P < 0.05$); **: The difference is extremely significant ($P < 0.01$)

动子的活性能被 PEG8000、NaCl 和 ABA 胁迫诱导；同时对启动子进行缺失分析，发现 -973~-605 bp 区域对启动子应答 PEG8000 和 NaCl 至关重要，-973~-475 bp 区域对启动子应答 ABA 很关键。根据顺式元件分析表明 -973~-605 bp 启动子区域中含有 4 个 DRE 和 1 个 MBS 顺式作用元件。DRE 被认为是干旱和盐胁迫下发挥功能的关键顺式作用元件(Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994)，其核心序列 A/GCCGAC 能够特异性结合 DREB 转录因子，进而在应答干旱和盐胁迫的基因表达中发挥功能(Dubouzet et al., 2003)；本研究中，P973、P844 和 P738 启动子中分别含有 4、3 和 2 个 DRE 元件，干旱胁迫下 P973、P844 和 P738 启动子驱动的 GUS 酶活相对于对照均升高，但升高幅度依次降低，由此可推测，DRE 元件能够提高干旱胁迫下 *TaGAPC1* 启动子的启动效率，且 DRE 元件的数目与启动子的效率成正相关。MBS 是转录因子 MYB 的结合位点，被认为是胁迫应答调控网络中的关键因子(Dubos et al., 2010)，可以推测 *TaGAPC1* 启动子中的 MBS 元件在其应答胁迫中发挥作用。-973~-475 bp 启动子区域中存在的 5 个 ABRE 顺式元件，能够在 ABA 依赖性调控通路中发挥作用，调控下游基因表达(Baker et al., 1994)。总结来说，*TaGAPC1* 基因对 PEG8000、NaCl 和 ABA 胁迫的响应与启动子中 -973~-475 bp 区域中的 DRE、MBS 和 ABRE 元件密切相关。

本研究通过基因与启动子两个层面初步阐释了 *TaGAPC1* 基因与干旱、盐和 ABA 非生物胁迫的关系，并从关键顺式作用元件的角度初步探索了 *TaGAPC1* 基因应答胁迫的可能性机制。后续可通过关键启动子区域进行定点突变，通过酵母单杂交筛选转录因子，进一步揭示 *TaGAPC1* 基因应答胁迫的分子机理。这将为提高小麦抗逆性、进而提高小麦产量奠定坚实基础。

4 结论

本研究对 *TaGAPC1* 基因进行非生物胁迫下的表达分析表明，*TaGAPC1* 基因的表达能够被干旱、盐和 ABA 显著诱导；对 *TaGAPC1* 启动子进行 5'端缺失分析，初步确定参与胁迫应答的关键启动子区域：-973~-605 bp 区域参与应答干旱胁迫和盐胁迫，-973~-475 bp 区域参与应答 ABA 胁迫；结合顺式作用元件分析可知，-973~-475 bp 启动子区域的

DRE、MBS 和 ABRE 元件在胁迫应答中发挥作用。本研究初步揭示了 *TaGAPC1* 基因与非生物胁迫应答的关系。

参考文献

- 李长宁, Manoj Kumar Srivastava, 农倩, 等. 2010. 水分胁迫下外源 ABA 提高甘蔗抗旱性的作用机制[J]. 作物学报, 36(5): 863-870. (Li C N, Srivastava M K, Nong Q, et al. 2010. Mechanism of tolerance to drought in sugarcane plant enhanced by foliage dressing of abscisic acid under water stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 36(5): 863-870.)
- 李杰, 张福城, 王文泉, 等. 2006. 高等植物启动子的研究进展[J]. 生物技术通讯, 17(4): 658-661. (Li J, Zhang F C, Wang W Q, et al. 2006. Advance in the study of higher plant promoter[J]. Letters in Biotechnology, 17(4): 658-661.)
- 卢倩, 弭晓菊, 崔继哲. 2013. 植物甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 8(28): 1-6. (Lu Q, Mi X J, Cui J Z. 2013. Research advances on the mechanism of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 8(28): 1-6.)
- 罗聪, 何新华, 胡颖, 等. 2011. 杧果 *MGAPDH* 同源基因的克隆及其表达分析[J]. 果树学报, 28(6): 1019-1024. (Luo C, He X H, Hu Y, et al. 2011. Molecular cloning and expression analysis of a *MGAPDH* homologous gene from mango[J]. Journal of Fruit Science, 28(6): 1019-1024.)
- 万小荣, 莫爱琼, 刘帅, 等. 2011. 粤油 7 号花生 *AhNCED1* 基因启动子克隆及其活性分析[J]. 核农学报, 25(4): 692-699. (Wan X R, Mo A Q, Liu S, et al. 2011. Molecular cloning and GUS -aided activity assaying of promoter sequence of *AhNCED1* gene from *Arachis hypogaea* L. cv. Yueyou 7[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 25(4): 692-699.)
- Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression[J]. Plant Molecular Biology, 24(5): 701-713.
- Bohner H J, Nelson D E, Jensen R G. 1995. Adaptations to environmental stresses[J]. Plant Cell, 7(7): 1099-1111.
- Das M, Chauhan H, Chhibbar A, et al. 2011. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin[J]. Transgenic Research, 20(2): 231-246.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 15(10): 573-581.

- Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression[J]. *Plant Journal*, 33(4): 751-763.
- Guo L, Devaiah S P, Narasimhan R, et al. 2012. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress[J]. *Plant Cell*, 24(5): 2200-2212.
- Hansch R, Mendel R R, Cerff R, et al. 2003. Light-dependent anaerobic induction of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 (*GapC4*) promoter in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*[J]. *Annals of Botany*, 91(2): 149-154.
- Higo k, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. 1999. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999[J]. *Nucleic Acids Research*, 27(1): 297-300.
- Ikegami K, Okamoto M, Seo M, et al. 2009. Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit[J]. *Journal of Plant Research*, 122(2): 235-243.
- Jefferson R A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4): 387-405.
- Jiang Y, Yang B, Harris N S, et al. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 58(13): 3591-3607.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- Laxalt A M, Cassia R O, Sanllorenti P M, et al. 1996. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato[J]. *Plant Molecular Biology*, 30(5): 961-972.
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, et al. 2002. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 325-327.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} method[J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Mayer K F X, Rogers J, Doležel J, et al. 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome[J]. *Science*, 345(6194): 1251788.
- Nash J, Luehrsen K R, Walbot V. 1990. *Bronze-2* gene of maize: Reconstruction of a wild-type allele and analysis of transcription and splicing[J]. *Plant Cell*, 2(11): 1039-1049.
- Russell D, Sachs M M. 1989. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family[J]. *Plant Cell*, 1(8): 793-803.
- Shih M C, Heinrich P, Goodman H M. 1991. Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 104(2): 133-138.
- Sparkes I A, Runions J, Kearns A, et al. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. *Nature Protocols*, 1(4): 2019-2025.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Velasco R, Salamini F, Bartels D. 1994. Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 26(1): 541-546.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 6(2): 251-264.
- Zaffagnini M, Fermani S, Costa A, et al. 2013. Plant cytoplasmic GAPDH: Redox post-translational modifications and moonlighting properties[J]. *Frontiers in Plant Science*, 4(20): 450.
- Zarei A, Korbes A P, Younessi P, et al. 2011. Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 75(4-5): 321-331.
- Zeng L, Deng R, Guo Z, et al. 2016. Genome-wide identification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *BMC Genomics*, 17(1): 240.
- Zhang X H, Rao X L, Shi H T, et al. 2011. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *OsGAPC3* confers salt tolerance in rice[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(1): 1-11.

(责任编辑 杨 芬)