丹参 ERF 转录因子 *SmERF1* 基因的表达分析和亚细胞定位

吴文燕[1]，蒋喜红[1]，刘春生[1]，黄璐琦[2*]，申业[2*]
（1. 北京中医药大学 中药学院，北京 100029；
2. 中国中医科学院 中药资源中心，北京 100070）

[摘要] 目的：对前期已经克隆的丹参 *SmERF1* 基因进行聚类分析，分析 *SmERF1* 基因在不同诱导子处理后不同时间的表达情况；并对其进行亚细胞定位分析。方法：利用 MEGA5 软件对 *SmERF1* 基因及拟南芥 ERF 基因家族进行聚类分析；利用半定量 RT-PCR 方法，分析 *SmERF1* 基因在不同诱导子处理后不同时间的表达情况；将 *SmERF1* 与 *GFP* 融合，在洋葱表皮瞬时表达，以确定 SmERF1 蛋白表达部位。结果：丹参 SmERF1 属于 ERF 家族第Ⅶ亚族；YE + Ag^+ 诱导对 *SmERF1* 基因的表达没有影响，ABA 和 MeJA 可以抑制该基因的表达，而水杨酸诱导会出现先抑制，后随处理时间加长，*SmERF1* 基因表达又恢复；亚细胞定位确定 *SmERF1* 基因在细胞核内特异表达。结论：*SmERF1* 是一个 AP2/ERF 转录因子，属于 AP2/ERF 家族第Ⅶ亚族，其表达受 ABA，SA，MeJA 等激素调节控制。

[关键词] 丹参；ERF 转录因子；表达分析；亚细胞定位

AP2/ERF（APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor）转录因子家族是一类大的植物特异的转录因子家族，依据所含有的结构域不同将 AP2/ERF 转录因子分成 4 个主要的亚家族：AP2，RAV，ERF，DREB 亚家族[1]。AP2 亚家族转录因子蛋白中包含 2 个 AP2/ERF 结构域，RAV 亚家族包含 1 个 AP2/ERF 结构域和 1 个 B3 结构域，ERF 亚家族和 DREB 亚家族包含 1 个 AP2/ERF 结构域[2-3]。AP2/ERF 结构域是 AP2/ERF 转录因子家族最主要的特征，它由 60～70 个氨基酸序列构成的 DNA 结合结构域[4]。

AP2/ERF 转录因子家族在植物生长和发育过程中起重要的调控作用：AP2 亚家族参与调控植物的生长，比如花的发育和胚芽的发育等；RAV 亚家族成员参与乙烯和油菜素甾醇等激素的应答；ERF 亚家族参与激素信号传导和新陈代谢调控；DREB 亚家族参与了植物对生物和非生物胁迫的响应等[2]。报道表明 ERF 转录因子参与调控长春花中长春花碱的生物合成[5]，青蒿中的 2 个 AP2/ERF 家族成员分别调控了青蒿素生物合成中的 2 个关键酶 ADS 和 CYP71AV1 的表达[6]。

本文在实验室前期克隆的一个丹参乙烯应答因子结合蛋白 *SmERF1* 基因的基础上[7]，对已经克隆的丹参 *SmERF1* 基因进行聚类分析，结果发现 *SmERF1* 属于 AP2/ERF 家族第Ⅶ亚族；分析了 *SmERF1* 基因在不同诱导子处理中不同时间的表达情况，其表达受 ABA，SA，MeJA 等激素调节控制；将 *SmERF1* 与 *GFP* 融合，在洋葱表皮瞬时表达，并对其进行了亚细胞定位分析，确定 *SmERF1* 在细胞核内特异表达，进一步证实 *SmERF1* 是一个 AP2/ERF 转录因子，初步明确 *SmERF1* 基因在丹参中的调控模式。

1 材料

1.1 丹参毛状根

利用发根农杆菌 ATCC15834（由中国林业科学学院邱有德研究员惠赠，本实验保存）感染丹参（陕西商洛）无菌植株的叶片获得，6，7-Ⅴ 液体培养基，80 r·min^{-1} 摇床黑暗培养扩繁。

1.2 菌种及载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH 5α 购自宝生物工程（大连）有限公司，pE3025 质粒由中国农业大学生物学院董江丽副教授惠赠。

[稿件编号] 20130219005
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项（2009ZX09301-005）

[通信作者] * 申业，Tel：（010）64014411-2955，E-mail：shenyemoon@yahoo.com.cn；* 黄璐琦，Tel：（010）64014411-2955，E-mail：huangluqi@263.net

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 试剂

RNA 提取试剂 Trizol(Cat. No. 15596-018) 购自 Invitrogen 公司; RevertAid H Minus Reverse Transcriptase 逆转录酶, RiboLock RNase Inhibitor 和 Oligod(T)$_{18}$ Primer, *Taq* DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司; 胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶(M0202S) 、限制性内切酶 *Kpn* I, *EcoR* I 购自 NEB(纽英伦生物技术北京有限公司) ; 金粉和基因枪耗材均购自美国伯乐公司(bio-rad) ; 其他化学试剂均购自国产或者进口分析纯试剂。

2 方法

2.1 丹参总 RNA 提取

以培养 19 d 的生长状态良好的丹参毛状根为材料, 用 Trizol 法提取总 RNA, 具体操作参照 Invitrogen 公司产品说明书, RNA 保存在 75% 乙醇, -80 ℃低温冰箱中备用。

2.2 *SmERF1* 基因在诱导子处理下的半定量表达分析

2.2.1 诱导子制备 酵母提取物(yeast extract) 生物诱导子的制备: 取 25 g 酵母提取物溶于 125 mL 蒸馏水中, 加入 100 mL 无水乙醇, 置于 4 ℃冰箱静置 4 d, 倾去上清液, 胶状沉淀溶于 125 mL 蒸馏水中, 加入 500 mL 无水乙醇 2 次沉淀, 离心去上清, 沉淀溶于 100 mL 蒸馏水中, 121 ℃灭菌 20 min, 冷却后置于 4 ℃冰箱备用。银离子诱导子(Ag^+) : 取 5.096 9 g $AgNO_3$ 溶于 100 mL 蒸馏水中, 制备得 3 mmol·L^{-1}的 Ag^+。茉莉酸甲酯(MeJA) , 购自 Sigma 公司(392707) , 终浓度为 100 μmol·L^{-1}。脱落酸(ABA) , 母液浓度 10 mmol·L^{-1}, 终浓度为 50 μmol·L^{-1}。水杨酸(SA) , 母液浓度为 10 mmol·L^{-1}, 终浓度为 100 μmol·L^{-1}。向培养 19 d 的丹参毛状根培养基(含 50 mL 6,7-V 液体培养基) 中分别加入诱导子: YE + Ag^+ 组合(YE 2 mL, Ag^+ 66.7 μL) , SA, ABA, MeJA 进行诱导处理, 每个处理 3 个重复, 置黑暗下摇床培养, 分别于处理后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 收获毛状根, 吸干水分后, 液氮速冻, 于 -80 ℃冰箱保存, 用于总 RNA 提取。

2.2.2 半定量表达分析 RT-PCR 反应体系: RNA 1 μg, Oligod(T)$_{18}$ 1 μL, RiboLock RNase Inhibitor 0.5 μL, 10 mmol·L^{-1} dNTP 1 μL, RiboLock RNase Inhibitor 1 μL, 5 × Reaction buffer 5 μL。逆转录条件: 42 ℃ 60 min; 65 ℃ 15 min。将合成双链 cDNA 放于 -20 ℃保存, 备用。PCR 扩增条件为: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 40 个循环; 72 ℃ 10 min。

2.3 亚细胞定位

2.3.1 载体构建 根据 *SmERF1* 基因和载体 pE3025 的酶切位点分析, 选择 *Kpn* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ2 个限制性内切酶构建融合表达载体, 设计引物为: SmERF1-S-L: CGgaattcATGTGTGGTGGTTCAAtAATTTC, SmERF1-S-R: GGggtaccGGAAGAACACACTA TTGTTTTG。引物在上海生物工程有限公司合成。分别将 *SmERF1* 基因和载体 pE3025 进行双酶切, 将酶切产物切胶回收, T4 DNA 连接酶 4 ℃连接过夜, 取 1 μL 连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 菌液 PCR 阳性检验, 将阳性单克隆菌液测序。

2.3.2 质粒提取 取 50 mL 含有阳性重组质粒的菌液, 提取质粒, 用无菌水将其稀释至 1 g·L^{-1}, 以满足基因枪试验的要求。

2.3.3 子弹制作 向金粉中加入 0.05 mol·L^{-1}亚精胺 100 μL, 涡旋震荡, 超声 3 ~ 5 s 打碎金团, 加入 50 μL 重组质粒, 涡旋震荡 5 s, 中速涡旋下加入 1 mol·L^{-1} $CaCl_2$ 100 μL, 室温沉淀 10 min, 离心去上清, 用 1 mL 无水乙醇洗涤 3 次, 3.5 mL PVP 溶液重悬。在无菌操作台上, 将制备台安装好, 打开氮气, 剪下约 75 cm 长管, 把混匀的金粉悬液迅速的导入至长管中, 放平长管, 放置 5 min, 将管中的液体导出, 打开氮气阀, 在旋转管子的同时 0.35 ~ 0.40 L PM 干燥管子, 待干燥充分后, 将管子切成约 1 cm 的子弹, 备用。

2.3.4 洋葱表皮 用刀片在切取洋葱内层表皮, 并用镊子小心的剥取内表皮(大小约为 2 cm × 2 cm) , 于 MS 固体培养基(1% 琼脂, pH 为 5.8) 25 ℃培养过夜备用。

2.3.5 基因枪轰击 超净工作台中, 将子弹安装在基因枪的正确位置, 打开氮气, 在气压 160 Pa 条件下, 用基因枪对准培养好的洋葱表皮中部轰击, 将处理完的洋葱表皮放在新的 MS 培养基中 25 ℃培养过夜。

3 结果与分析

3.1 丹参 *SmERF1* 聚类分析

丹参 *SmERF1* 基因的 cDNA 编码由 231 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量约为 26.3 kDa, pI

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7.51。根据 *ERF* 基因家族的分类方法[2]，从拟南芥 AP2/ERF 家族 11 个亚族中每个亚族选择的 2 个基因，与丹参的 *SmERF1* 基因氨基酸，用软件 MEGA5 进行聚类分析，结果见图 1。显示 *SmERF1* 基因属于 ERF 家族第 Ⅶ 亚族。根据文献报道，拟南芥中 ERF 转录因子第 Ⅶ 亚族成员，与基因的转录后调控有关；葡萄中第 Ⅶ 亚族成员与葡萄成熟的早期阶段有关[3]。

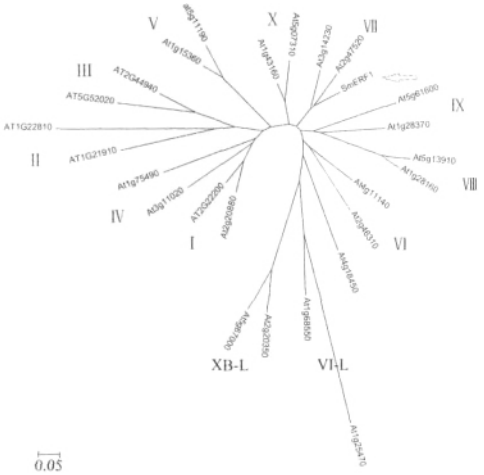


图 1 SmERF1 蛋白系统进化树比较

Fig. 1 Phylogenic comparison of the SmERF1 protein and some AP2/ERF-related protein sequences from *Arabidopsis thaliana*

3.2 *SmERF1* 基因在诱导子处理下的表达分析

分别将 YE + Ag^+ 组合诱导子、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)处理后的各个时间点的丹参毛状根提取总 RNA，利用半定量 RT-PCR 的方法，检测 *SmERF1* 基因的表达情况，见图 2。YE + Ag^+ 诱导子处理后的毛状根中，*SmERF1* 基因的表达没有明显的差异。加入水杨酸(SA)后，*SmERF1* 基因的表达受到明显的抑制，到 12 h 已经基本没有表达，但在 24 h 开始恢复表达，并在 36 h 恢复正常水平。在脱落酸(ABA)处理组，*SmERF1* 基因的表达也受到了比较明显的抑制，并且抑制效果直到处理后 36 h 也没有得到恢复，*SmERF1* 的表达保持较低的水平，说明脱落酸可以长期的抑制 *SmERF1* 基因的表达。在茉莉酸甲酯(MeJA)处理组可以看出，*SmERF1* 基因在短时间内表达的差异不是很明显，在处理 2，4，8，12 h 并没有显著性差异，但从 24 h 开始，*SmERF1* 基因表达开始下降，在 36 h 时已经显著降低。

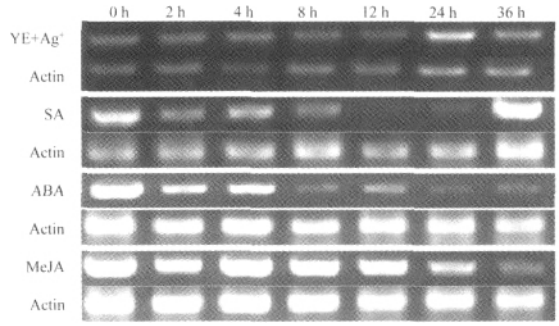


图 2 *SmERF1* 基因在不同诱导子处理下的表达

Fig. 2 Expression of the *SmERF1* gene in response to different elicitors

3.3 亚细胞定位分析

3.3.1 载体构建 以 SmERF1-S-L 和 SmERF1-S-R 为引物，已经克隆的 pGEM-SmERF1 为模板，采用 NEB 公司 high-fidelity PCR kit 试剂盒进行 PCR 扩增，PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，得到约 1 kb 的特异性条带，见图 3。

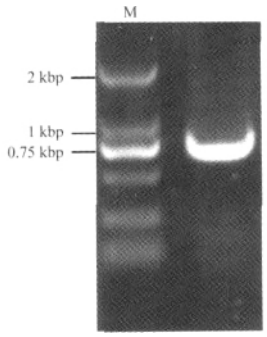


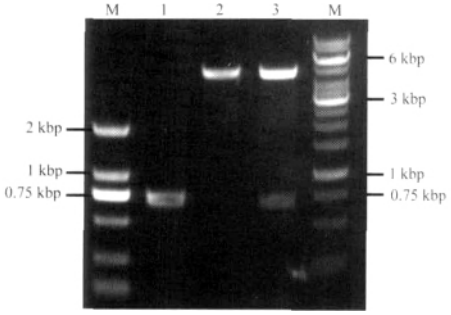
图 3 高保真酶扩增 *SmERF1* 基因全长

Fig. 3 The full length of *SmERF1* cDNA was obtained by high-fidelity polymerase

将 PCR 产物与质粒 pE3025 分别用 *EcoR* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ内切酶进行双酶切，取 2 μL 酶切结果进行琼脂糖电泳检测，见图 4。显示 pE3025 载体呈现出单一条带，证明双酶切成功，将酶切产物分别进行纯化，纯化后的 PCR 产物和 pE3025 载体，4 ℃过夜连接。取 1 μL 连接产物与 50 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态混匀，热激法转化，涂布于 Amp 抗性的 LB 固体培养基上，37 ℃过夜培养，挑取单克隆菌落，PCR 检验，将阳性结果送华大基因公司测序，测序结果与 *SmERF1* 基因序列一致，并成功的整合入载体 pE3025 中，位置方向均正确。将阳性菌液提取重组

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质粒，用 *EcoR* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ内切酶进行双酶切验证，图显示有 2 个条带（图 4 中的 3），并且这 2 个条带分别与空载体双酶切和 PCR 产物双酶切结果大小一致，证明重组载体构建成功。



1，2. 质粒 pE3025 分别用 *EcoR* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ内切酶进行双酶切；3. 阳性菌液提取重组质粒，用 *EcoR* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ内切酶进行双酶切验证；M. maker。

图 4　重组质粒 pE3025-SmERF1 的双酶切鉴定

Fig. 4　The recombination plasmid of pE3025-SmERF1 was digested

3.3.2　结果观察　经基因枪转化的洋葱表皮在 25 ℃培养 24 h 左右后，将洋葱表皮制片，置于荧光显微镜下观察，见图 5。在蓝色激发光下，pE3025-GFP（空白载体对照）的荧光遍布于整个洋葱表皮细胞（图 5 中 b），而 *SmERF1*-GFP 融合蛋白的荧光信号非常强烈地集中在细胞核内，在细胞的其他位置没有分布（图 5 中 e）。同时，在亮视野下，可以清楚地观察到洋葱表皮的细胞轮廓（图 5 中 a，d），而将 2 种视野叠加后的图像可以很明显地看到 *SmERF1*-GFP 融合蛋白与空白对照的区别（图 5 中 c，f），通过上述的对比，可以判断出 *SmERF1*-GFP 融合蛋白只定位于细胞核内。

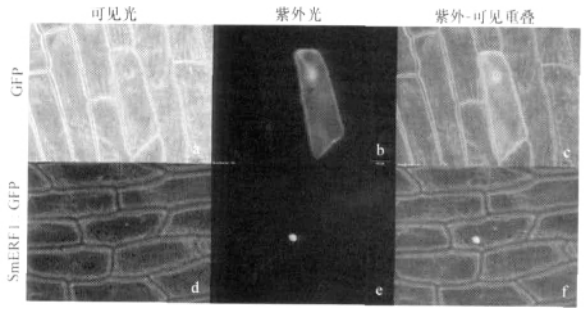


图 5　*SmERF1* 蛋白在洋葱表皮细胞的亚细胞定位分析

Fig. 5　Nuclear localization of the *SmERF1* protein in onion epidermal cells

4　讨论

AP2/ERF 转录因子家族主要调控植物的生长发育、繁殖、对激素的应答、以及对生物和非生物胁迫的适应过程等。由系统进化分析结果可知，*SmERF1* 基因属于 AP2/ERF 转录因子家族第 Ⅶ 亚族，这个亚族的特点是具有 1 个 MCGGAI 结构域，并且这个亚族的成员在它的 AP2/ERF 结构域的 5′端都具有一个单独的内含子。第 Ⅶ 亚族是一个较小的亚族，它在拟南芥、葡萄、杨树、水稻中分别只有 5，3，6，15 个成员。第 Ⅶ 亚族在葡萄中参与了葡萄成熟的早期过程的调控，在拟南芥中参与了基因的转录后调控，其成员 AtEBP 与一个 bZIP 转录因子家族成员 OBF4 在体外相互作用[2-3]。

诱导子诱导表达结果分析，*SmERF1* 基因在 YE + Ag^+ 诱导子处理 36 h 内表达没有明显差异。从水杨酸（SA）诱导后表达结果来看，*SmERF1* 基因的表达在短时间内受到较大的抑制作用，到第 12 个小时基本没有表达，但在随后的时间里面，可能是由于水杨酸有效浓度的降低，*SmERF1* 基因的表达逐渐升高，并在 36 h 恢复正常，说明一定浓度的水杨酸可以抑制 *SmERF1* 基因的表达。从 ABA 诱导的结果来看，*SmERF1* 基因的表达也是逐步的下调，但与 SA 不同的是，它在第 36 小时依然保持非常低的水平，没有表现出恢复的迹象，可能是由于 ABA 抑制 *SmERF1* 基因表达所需的浓度较低。在 MeJA 处理组，*SmERF1* 基因在 24 h 内表达差异不是很明显，但在 24 h 后表达急剧下降，到 36 h 已经具有非常明显的差异，推测 MeJA 调控 *SmERF1* 基因的表达是通过间接的方式的，它通过影响 ABA 和 SA 的调控网络来进一步的调控 *SmERF1* 基因的表达，所以表现出调控的延迟性。

亚细胞定位结果显示，*SmERF1* 基因只在细胞核内特异性的表达，认为它在细胞核中参与调控基因的转录过程，即调控目标基因 mRNA 的合成。如果将 *SmERF1* 基因进行 RNAi 干扰和过表达分析，可以进一步确定 SmERF1 转录因子在丹参中的调控机制。

[参考文献]

[1] J Mizoi, K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. BBA-Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819: 86.

[2] Toshitsugu Nakano, Kaoru Suzuki, Tatsuhito Fujimura, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in arabidopsis and rice

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[1] . Plant Physiol, 2006, 140: 411.
[3] Federico M Giorgi, Sara Zenoni. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 719
[4] Wessler S R. Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain [J]. Trends in Plant Sci, 2005, 10: 54.
[5] van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. Science, 2000, 289: 295.
[6] Yu Zongxia, Li Jianxu, Yang Changqing, et al. The jasmonate-responsiv AP2/ERF transcription factor AaERF1 and AaERF2 positivly regulat Artemisinin biosynthesis in *Artemisi annua* L [J]. Mol Plant, 2011, 5(2): 353.
[7] 胥彬, 黄璐琦, 毛莹, 等. 丹参功能基因组研究Ⅳ——丹参乙烯应答因子(ERF)基因的分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2564.
[8] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 诱导子对丹参毛状根中丹参酮类成分积累影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 976.

Expression analysis and subcellular localization of an ERF transcription factor from *Salvia miltiorrhiza*

WU Wen-yan[1], JIANG Xi-hong[1], LIU Chun-sheng[1], HUANG Lu-qi[2*], SHEN Ye[2*]
(1. *School of traditional Chinese Medicine Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*;
2. *National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100700, *China*)

[Abstract] **Objective:** A SmERF1 gene was isolated from *Salvia miltiorrhiza*, and expression patterns to different stress condition were analysed in the root tissues of *S. miltiorrhiza*. **Method:** The cDNA of *SmERF1* gene from *S. miltiorrhiza* was isolated by RT-PCR, and the phylogenetic tree using the neighbour-joining tree method in Mega 5 was obtained. To confirm the protein is likely to localize in the nucleus, the SmERF1 coding region was fused to the N-terminus of the GFP gene under the control of the CaMV 35S promoter and transferred into onion epidermal cells using the particle bombardment method. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed different expression pattern of *SmERF1* gene in response to exogenous ABA, MeJA and SA. **Result:** The phylogenetic tree analysis revealed that SmERF1 is most similar to AP2/ERF Ⅶ subgroup members. The transient expression of the SmERF1::GFP fusion protein indicated that the SmERF1 was exclusively localized to the nucleus. The transcript of *SmERF1* highly accumulated when the plants were treated with MeJA, while accumulated slightly in response to exogenous ABA, salicylic acid. **Conclusion:** These results suggest hormone such as ABA, MeJA and SA signaling pathways can be involved in the activation and inhibition of the *SmERF1*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; ERF; expression analysis; subcellular localization

doi: 10.4268/cjcmm20130705

[责任编辑 吕冬梅]

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net