西北植物学报,2023,43(9):1478-1487
Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.

doi:10.7606/j.issn.1000-4025.2023.09.1478 http://xbzwxb.alljournal.net

蓖麻 *RcbZIP11* 基因克隆及表达特性

李艳肖[1,2],朱贵爽[1,2],张宏宇[3],向殿军[1,2*],刘 鹏[1,2]

(1 内蒙古民族大学 农学院,内蒙古通辽 028000;2 内蒙古民族大学 科尔沁沙地生态农业国家民委重点实验室,内蒙古通辽 028000;3 通辽市农业技术推广中心,内蒙古通辽 028000)

摘 要:为探究蓖麻 *bZIP*(basic leucine zipper)基因在响应非生物胁迫应答过程中的作用,研究基于蓖麻转录组数据,克隆到1条在低温胁迫下显著上调表达的 *bZIP* 基因,并将其命名为 *RcbZIP11*(GenBank No. OQ506490)。*RcbZIP11* 基因的编码区序列全长492 bp,其推导163个氨基酸,预测是1个亲水性蛋白质,具有保守的bZIP_plant_GBF1结构域。蛋白质的多序列对比显示,RcbZIP11蛋白质在进化过程中相对保守,进化树分析显示RcbZIP11与麻风树JcbZIP11蛋白质亲缘关系最近。亚细胞定位显示RcbZIP11蛋白质定位于细胞核,并成功克隆出RcbZIP11启动子序列,预测结果显示,该区域拥有光响应元件、逆境响应类元件和激素诱导类元件。*RcbZIP11* 基因在蓖麻不同组织(真叶、子叶、茎和根)中均有表达,在子叶中相对表达量最高;且该基因在逆境胁迫下(干旱、盐、低温和ABA)的根和真叶中其相对表达量均高于0 h,说明 *RcbZIP11* 基因积极地参与蓖麻的非生物胁迫响应。综上,研究为进一步探究 *RcbZIP11* 基因在蓖麻逆境条件生长过程中的功能奠定基础。

关键词:*bZIP*;蓖麻;基因克隆;非生物胁迫;表达

中图分类号:Q78; S565.6 **文献标志码**:A

Cloning and Expression Characteristics of *RcbZIP11* Gene in Castor

LI Yanxiao[1,2], ZHU Guishuang[1,2], ZHANG Hongyu[3], XIANG Dianjun[1,2*], LIU Peng[1,2]

(1 College of Agriculture Life Science, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 2 Key Laboratory of Ecological Agriculture of Horqin Sandy Land, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 3 Tongliao Agricultural Technology Promotion Center, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract: In order to explore the role of *bZIP* (basic leucine zipper) gene in response to abiotic stress, a bZIP gene significantly up-regulated under low temperature stress was cloned based on the transcriptome data of Ricinus communis, and named as *RcbZIP11* (GenBank No. OQ506490). The coding region sequence of the *RcbZIP11* gene was 492 bp in length, which deduced 163 amino acids. It was predicted to be a hydrophilic protein with a conserved bZIP_plant_GBF1 domain. Multiple sequence alignment showed that RcbZIP11 protein was relatively conservative during evolution. Phylogenetic tree analysis showed that RcbZIP11 had the closest relationship with JcbZIP11 protein. Subcellular localization showed that the RcbZIP11 protein was localized in the nucleus. The promoter sequence of the RcbZIP11 was successfully cloned. The prediction results showed that the region had light response elements, stress response elements, and hormone induction elements. *RcbZIP11* gene was expressed in different tissues (true leaves, cotyledons, stems, and roots) of castor, and the relative expression level was the highest in cotyledons. The relative expression levels of *RcbZIP11* in roots and leaves under stress (drought, salt, low temperature, and ABA) were higher than 0 h, indicating that the *RcbZIP11* gene was actively involved in the abi-

收稿日期:2023-04-16;**修改稿收到日期**:2023-07-09

基金项目:国家自然科学基金项目(32060492);内蒙古自治区自然科学基金项目(2020LH03006,2022MS03057)

作者简介:李艳肖(1998-),男,硕士研究生,主要从事作物分子育种研究。E-mail:2338245452@qq.com

*通信作者:向殿军,教授,硕士生导师,主要从事作物分子育种研究。E-mail:xiandianjun00@163.com

otic stress response of castor. In summary, this study lays a foundation for further exploring the function of the *RcbZIP11* gene in the growth process of castor under stress conditions.

Key words: *bZIP*; castor; gene cloning; abiotic stress; expression

转录因子(transcription factors，TFs)作为调控基因表达的蛋白质分子，在动植物体内通常有着重要的功能，例如在调控植物的生长发育、逆境胁迫响应、信号传导和生理代谢等过程[1-2]。而 1 个结构完整的 TFs 编码蛋白质通常由 4 部分组成：DNA 结合域(DNA binding domain)、转录调节域(transcription regulation domain)、寡聚位点(oligomerization site)和核定位域(nuclear localization signal)[3]。一般情况下，TFs 并不是独立发挥作用的，而是通过 DNA 结合域的作用，与其转录起始上游的启动子区域的顺式作用元件结合，并通过与其他蛋白质的相互作用共同调控植物的生长[4]。

目前，在植物中至少已鉴定出 64 种转录因子家族[5]。其中，碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper，*bZIP*)基因家族是 TFs 家族中成员数量最多的[6]。其特征在于高度保守的 bZIP 结构域，该结构域由 60～80 个氨基酸残基组成，包括碱性区域和亮氨酸拉链(Leu)区域，这 2 个功能区域由铰链区域连接[3]。其中碱性区域是高度保守的，大约由 16 个氨基酸残基组成，高度保守的 N-x_7-R/K-x_9 基序的功能是负责核定位和 DNA 结合[7]；Leu 拉链区域则主要由 Leu 的几个重复序列或其他疏水性氨基酸(如 Ile、Val、Phe 或 Met)组成，具有控制转录激活或转录抑制的功能[8]。*bZIP TFs* 编码基因目前已在植物中被广泛鉴定，包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)[9]、水稻(*Oryza sativa*)[10]、大麦(*Hordeum vulgare*)[11]、高粱(*Sorghum bicolor*)[12]、蓖麻(*Ricinus communis*)[13]和葡萄(*Vitis vinifera*)[14]等植物。

研究表明，*bZIP* 基因参与植物生长发育的重要调控过程，如调节根系发育[15]、促进花青素积累[16]、整合脱落酸和葡萄糖信号[17]。同样，*bZIP* 基因也参与调节植物在胁迫下的生理反应[18-23]。*bZIP* 基因影响许多物种的耐盐性和耐旱性，例如番茄(*Solanum lycopersicum*)[18]、大豆(*Glycine max*)[19]和人参(*Panax ginseng*)[20]等植物。朱芸晔等[21]研究发现番茄在盐、干旱和细菌等胁迫条件下，43 个 *SlbZIP* 基因能够被诱导表达，积极参与番茄的逆境反应；才华等[22]发现野生大豆(*Glycine soja*)*GsbZIP33* 基因响应干旱、低温和盐胁迫，并且在根和叶片组织中有着不同的表达模式；人参的 157 个 *bZIP* 基因中，*PgbZIP99* 和 *PgbZIP78* 在盐胁迫下被诱导表达，*PgbZIP131* 在干旱胁迫下表达值最高[23]。

目前，在蓖麻中共发现了 49 个 *RcbZIP* 基因[13]，但仅对少数基因的功能进行了研究。其中 *RcbZIP11* 基因参与非生物胁迫应答的研究鲜见报道。鉴于蓖麻优良的抗旱和耐盐碱能力及 *bZIP* 基因在植物逆境胁迫中的作用，对蓖麻 *bZIP* 基因资源的挖掘是必要的。本研究基于‘通篦 5 号’叶片转录组信息，克隆出 1 个蓖麻的 RcbZIP 家族成员，对其编码氨基酸进行生物信息学分析和蛋白质亚细胞定位分析，研究基因在不同逆境胁迫下的表达特性，包括干旱、盐、低温和脱落酸胁迫，以期为蓖麻 *RcbZIP11* 基因响应环境胁迫压力的分子机制和对基因功能的研究提供依据。

1　材料和方法

1.1　试验材料

1.1.1　试验材料及处理

‘通篦 5 号’由通辽市农牧研究所提供；野生型拟南芥种子(Columbia 生态型)保存于实验室。蓖麻种子经 75%的酒精消毒后于 28 ℃催芽，发芽后均匀地摆放在发芽盒中进行水培，2 片子叶展开后浇灌 1/2 霍格兰营养液，至四叶龄对其分别进行干旱胁迫(10% PEG 6 000)、高盐胁迫(300 mmol/L NaCl)、冷胁迫(4 ℃)和脱落酸胁迫(100 μmol/L ABA)；拟南芥种子消毒后种植在 3∶1 比例的花土∶蛭石的花盆中。培养条件是(25±1) ℃/16 h 光照和(20±1) ℃/8 h 暗处理交替培养。

1.1.2　主要试剂及仪器

2 x KOD MasterMix 高保真酶和 DNA 提取试剂盒购买于库莱博；第一链 cDNA 合成试剂盒购自莫纳生物公司；SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒和 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购买于生工公司；T-载体、载体连接试剂盒、*Sac* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ内切酶购自 Takara 公司；pCAMBIA2300-*GFP* 载体和大肠杆菌感受态(TOP10)购于青岛艾迪特生物科技公司。植物原生质体分离试剂盒 Plant Protoplasts Isolation Kit 和转染试剂盒 Plant Protoplasts

Transfection Kit 购买于 Beyotime 生物公司。仪器设备由内蒙古民族大学农学院和生命科学与食品学院提供。本试验所需引物均使用 Snapgene 软件设计，生工公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5′→3′)	用途 Use
*RcbZIP*11-CDS-F	CAGGATCTCAGATTTAACTGAGATT	基因克隆 Gene cloning
*RcbZIP*11-CDS-R	GACCATGAACAGGACATCCCTCGTC	
*RcbZIP*11-F	ACTAAACTAAACACTTATGAAAACT	启动子克隆 Promoter cloning
*RcbZIP*11-R	GGAGATATATATATAGTATATATTTAC	
*RcbZIP*11-*Sac* Ⅰ-F	AGAACACGGGGGACGAGCTCATGGCATCCTCTAGTGGGAATTCCT	构建荧光表达载体 Construction of fluorescent expression vector
*RcbZIP*11-*Xba* Ⅰ-R	ACCATGGTGTCGACTCTAGAATATTGAAACAAATCCGGAGATGCC	
*RcbZIP*11-Q-F	TGGCATCCTCTAGTGGGAAT	qRT-PCR
*RcbZIP*11-Q-R	CATCAAGGTGCTGCTGTTTT	
Actin-F	TCCCTCAGTACGTTCCAGCA	内参 Actin
Actin-R	CACCTCCATACTCCTCCCT	

注：表中下划线分别为 *Sac* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点。

Note: The underline in the table is the *Sac* Ⅰ and *Xba* Ⅰ restriction sites, respectively.

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

将蓖麻真叶放入灭菌后提前预冷的研钵中，加入液氮研末至粉末状。使用 TransZol 法提取总 RNA 作为模板，使用第一链 cDNA 合成试剂盒合成模板 cDNA。

1.2.2 *RcbZIP11* 基因全长的克隆及验证

参考蓖麻转录组数据中 *RcbZIP11* 基因的序列信息，设计特异性引物(表 1)。使用上述模板 cDNA 进行 PCR 扩增，扩增体系包括酶 25 μL，上下游引物各 2 μL，模板 5 μL 和 dd H_2O 定容至 50 μL，轻柔吹打混匀后，按照 95 ℃ 6 min；95 ℃ 15 s，53 ℃ 15 s，72 ℃ 10 s，35 个循环；72 ℃ 7 min 进行反应，将扩增产物经 1%电泳检测，符合目标片段后进行胶回收、末端加 A 及纯化。使用载体连接试剂盒将纯化产物连接至 T 载体，热击转化大肠杆菌感受态细胞中，经菌液 PCR 检测合格后进行保菌，并将菌液送至生工公司进行测序。

1.2.3 *RcbZIP11* 基因的生物信息学分析

在 ExPASy(https://web.expasy.org/translate/)网站推导 *RcbZIP11* 基因的编码氨基酸序列；并将氨基酸序列提交至 NCBI conserved domain search(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)预测其结构域；借助 ExPASy-ProtParam tool(https://web.expasy.org/protparam)在线工具预测 RcbZIP11 蛋白质的基本理化性质和亲疏水性；用 SOPMA(https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)工具预测蛋白质的二级结构；在 Phyre2(http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi? id=index)网站预测 RcbZIP11 蛋白质的三级结构，并对预测结果在 SAVES v6.0(https://saves.mbi.ucla.edu/)网站进行打分，下载拉式构象打分图。将 RcbZIP11 蛋白质序列作为探针，使用在线工具 NCBI-Protein Blast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi? PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)进行序列对比并下载，使用 GENEDOC 软件进行蛋白质多序列比对分析，在 MEGA 11.0 软件上进行进化树绘制。

1.2.4 RcbZIP11 启动子序列的克隆及分析

使用 DNA 提取试剂盒提取蓖麻叶片组织的 DNA，1%琼脂糖电泳检测合格后将其作为模板，按照 1.2.2 节中的扩增体系对 *RcbZIP11* 基因转录表达上游 2 000 bp 的启动子序列进行扩增，条带符合预期大小后，对其进行胶回收、末端加 A、纯化、连接 T 载体并转化大肠杆菌感受态，操作步骤同 1.2.2 节，测序由生工公司完成。测序比对结果正确后，将序列提交至 Plant CARE(https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html)网站预测启动子区域中可能存在的顺式作用元件。

1.2.5 RcbZIP11 蛋白质亚细胞定位分析

对 1.2.2 节中测序正确的菌液进行质粒提取，

以其作为模板进行 PCR 扩增（引物见表 1），将产物进行胶回收及纯化，片段检测正确后克隆至 pCAMBIA2300-*GFP* 载体的 *Sac* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点处，构建重组质粒 pCAMBIA2300-*GFP*-*RcbZIP11*，热击转化大肠杆菌感受态细胞，测序正确后提取重组质粒。

使用 Plant Protoplasts Isolation Kit 制备拟南芥原生质体，按照 Plant Protoplasts Transfection Kit 操作步骤分别将 pCAMBIA2300-*GFP* 空载体和融合表达载体 pCAMBIA2300-*GFP*-*RcbZIP11* 转化至原生质体中，使用 DAPI（4′，6 二脒基-2-苯吲哚）对细胞核进行染色，在 22 ℃培养箱中培养 16 h。使用激光共聚焦显微镜（FV1000）观察 RcbZIP11 蛋白质的亚细胞位置。

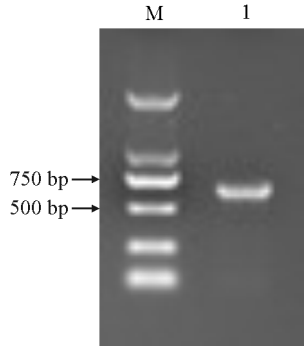
1.2.6　*RcbZIP11* 基因的时空表达特性分析

在 1.1.1 节中，取未处理幼苗的根、茎、真叶和子叶组织进行 *RcbZIP11* 的组织表达模式分析；取胁迫处理 0，6，12，24，36 h 的真叶和根组织检测 *RcbZIP11* 在胁迫处理下的表达模式。同 1.2.1 节操作步骤提取植物组织的总 RNA 并反转录合成 cDNA，*RcbZIP11*-Q-F 和 *RcbZIP11*-Q-R 为基因的荧光表达扩增引物（表 1）。反应体系为正反向引物各 0.2 μL，模板 1 μL，SybrGreen qPCR Master Mix 5 μL 和 ddH_2O 定容至 10 μL。每组处理进行 3 次生物学和技术性重复以保证结果准确。根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 *RcbZIP11* 的相对表达量[24]，并使用 SPSS 和 Excel 软件对数据进行处理，使用 TBtools 软件的 fancy heatmap 程序绘制图片。

2　结果与分析

2.1　*RcbZIP11* 基因的克隆

RcbZIP11 基因全长的克隆结果如图 1 所示，扩增片段大小在 500～750 bp 之间，符合预期片段，测序后发现其 cDNA 全长 643 bp，其中 CDS 有 492 bp，CDS 区内无内含子的存在，共编码 163 个氨基酸，序列信息见图 2。将序列提交至 GenBank，将其命名为 *Ricinus communis bZIP11*（*RcbZIP11*），登录号为 OQ506490。



M. DL 2 000 DNA 分子量标准；1. *RcbZIP*11 基因全长克隆产物。

图 1　*RcbZIP11* 基因全长的扩增

M. DL 2 000 DNA marker；1. The full-length cloning product of *RcbZIP11* gene.

Fig. 1　Amplification of the full length of *RcbZIP11* gene

2.2　*RcbZIP11* 基因的生物信息学分析

2.2.1　RcbZIP11 蛋白质的保守域分析

如图 3，经 NCBI-CD Search 预测后发现，RcbZIP11 蛋白质有 1 个保守的 bZIP_plant_GBF1 结构域，是 bZIP 超家族的一员。

```
atg gca tcc tct agt ggg aat tcc tca ggt tcc tct cag ctt cag aac tca gga tct gaa
 M   A   S   S   S   G   N   S   S   G   S   S   Q   L   Q   N   S   G   S   E
gaa gac atg cag gtt ttg atg gat caa agg aaa agg aag aga atg ctg tca aat aga gaa
 E   D   M   Q   V   L   M   D   Q   R   K   R   K   R   M   L   S   N   R   E
tct gca aga aga tca aga atg aga aaa cag cag cac ctt gat gac ttg atg tca caa gtt
 S   A   R   R   S   R   M   R   K   Q   Q   H   L   D   D   L   M   S   Q   V
tca caa cta agg aaa gac aac agc caa atc ctt aca agc atc aat atc act aca cag cat
 S   Q   L   R   K   D   N   S   Q   I   L   T   S   I   N   I   T   T   Q   H
ttc ctg aat gtt gag gct gaa aac tct att tta agg gca caa atg atg gaa ctt agc cag
 F   L   N   V   E   A   E   N   S   I   L   R   A   Q   M   M   E   L   S   Q
aga ctg gac tct tta aat gag atc ttg aat tat atc aac act aca aca agc aat ggg att
 R   L   D   S   L   N   E   I   L   N   Y   I   N   T   T   T   S   N   G   I
tat gaa att gat cat cct cat cat cat cat caa gat gct act gct gtt gct gct gac agt
 Y   E   I   D   H   P   H   H   H   H   Q   D   A   T   A   V   A   A   D   S
ttc atg aac cca cta aat ttg atc tat ctt aac caa ccc atc atg gca tct ccg gat ttg
 F   M   N   P   L   N   L   I   Y   L   N   Q   P   I   M   A   S   P   D   L
ttt caa tat taa
 F   Q   Y   -
```

图 2　*RcbZIP11* 基因的 CDS 序列及所推导氨基酸序列

Fig. 2　CDS sequence and deduced amino acid sequence of *RcbZIP11* gene

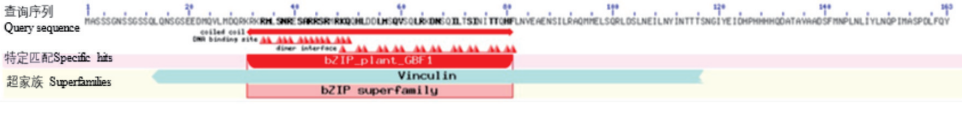


图 3　RcbZIP11 蛋白质的保守域分析

Fig. 3　Conserved domain analysis of RcbZIP11 protein

2.2.2 RcbZIP11 蛋白质的基本理化性质及亲疏水性分析

RcbZIP11 蛋白质的分子式为 $C_{787}H_{1271}N_{243}O_{262}S_{10}$，相对分子质量是 18.65 kD，理论总原子数是 2 573 个，理论等电点是 6.14。

组成 RcbZIP11 蛋白质的 163 个氨基酸残基中，Ser 和 Leu 含量最高，分别有 13.5%和 10.4%，含量最低的是 Phe，有 1.8%；带正电的氨基酸残基（Arg＋Lys）少于带负电的氨基酸残基（Asp＋Glu），分别为 15 个和 18 个。脂肪系数是 77.24，总平均疏水性是－0.722，说明 RcbZIP11 是 1 个亲水性蛋白质（图 4）。

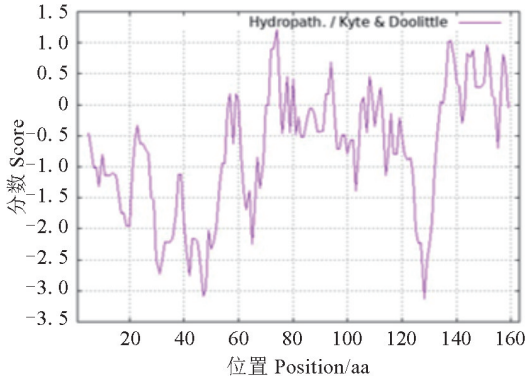
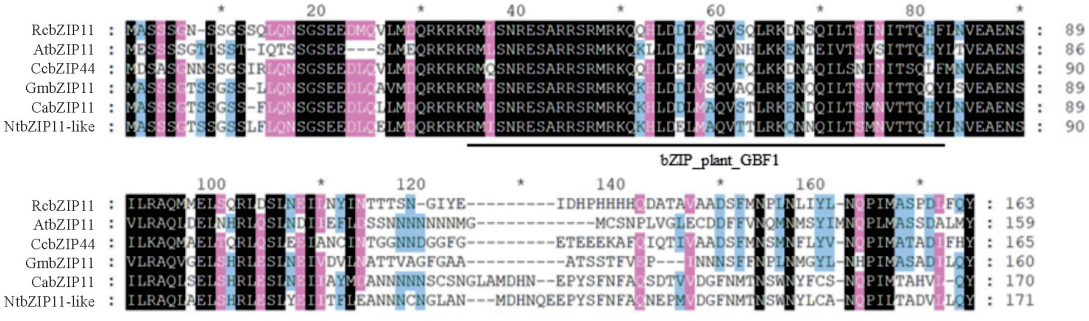


图 4 RcbZIP11 蛋白质的亲疏水性分析

Fig. 4 Hydrophilic and hydrophobic analysis of RcbZIP11 protein



颜色越深代表序列一致性越高；AtbZIP11. 拟南芥（NP_195185.1）；CcbZIP11. 黄瓜（XP_004152685.1）；GmbZIP11. 大豆（KAH1220101.1）；CabZIP11. 辣椒（XP_016539772.1）；NtbZIP11-like. 烟草（XP_009619503.1）。黑色横线是 bZIP_plant_GBF1 结构域。

图 5 RcbZIP11 蛋白质与其他植物的多序列比对

The darker the color, the higher the sequence consistency; AtbZIP11. *Arabidopsis thaliana* (NP_195185.1); CcbZIP11. *Cucumis sativus* (XP_004152685.1); GmbZIP11. *Glycine max* (KAH1220101.1); CabZIP11. *Capsicum annuum* (XP_016539772.1); NtbZIP11-like. *Nicotiana tabacum* (XP_009619503.1). The black horizontal line is bZIP_plant_GBF1 domain.

Fig. 5 Multiple sequence alignment of RcbZIP11 protein with other plants

2.2.3 RcbZIP11 蛋白质的序列分析

将 RcbZIP11 蛋白质同其他植物的 bZIP 氨基酸序列进行比对（图 5），发现不同物种的 bZIP 氨基酸的序列一致性是 68.37%，在 bZIP_plant_GBF1 结构域内氨基酸的一致性较高，而 C 端保守性很弱。在 NCBI 数据库种下载了银白杨（*Populus alba*，XP_034931683.1）、毛果杨（*Populus trichocarpa*，XP_002306888.1）、麻风树（*Jatropha curcas*，XP_012071923.1）、可可树（*Theobroma cacao*，XP_007017624.1）、桃（*Prunus persica*，XP_007223601.1）、黄瓜（*Cucumis sativus*，XP_004152685.1）、葡萄（*Vitis vinifera*，XP_003634372.1）、番木瓜（*Carica papaya*，XP_021905988.1）、拟南芥（NP_195185.1）和水稻（XP_015622690.1）等 10 个物种的 bZIP 蛋白质序列文件，并与蓖麻 RcbZIP11 蛋白质进行进化树构建，发现 RcbZIP11 与麻风树 JcbZIP11 因缘关系最近（图 6）。

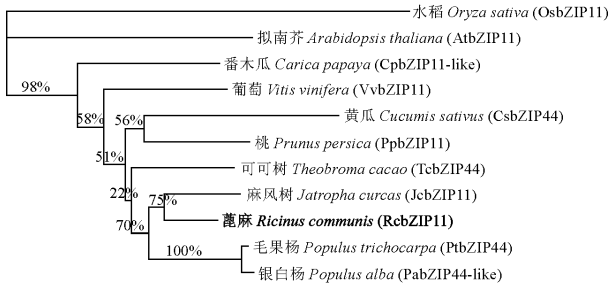


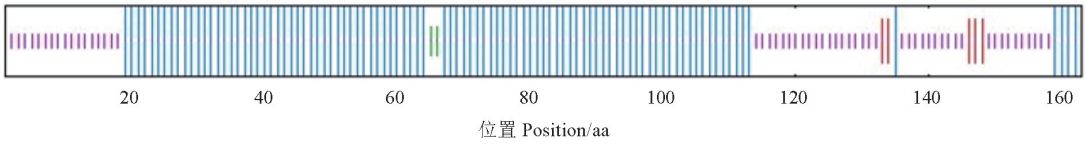
图 6 RcbZIP11 蛋白质的系统发育进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of RcbZIP11 protein

2.2.4 RcbZIP11 蛋白质的二级和三级结构预测

RcbZIP11 蛋白质的二级结构预测结果（图 7）显示，其包含 98 个 α 螺旋、2 个 β 折叠、57 个随机线圈和 6 个延伸链，分别占总氨基酸残基的 60.12%、

1.23%、34.97%和 3.68%。二级结构进一步卷曲折叠形成了 RcbZIP11 蛋白质的三级结构（图 8，A），与模型 c1gd2G 的一致性高达 99.3%（一致性>60%为准确），c1gd2G 模型是 pop1 蛋白 bZIP 结构域的典型结构，再次在结构上验证了 RcbZIP11 蛋白质属于 bZIP 家族；此外，RcbZIP11 蛋白质的拉式构象图预测结果（图 8，B）显示，氨基酸残基在最佳允许区（红色区域：A、B 和 L 区）的数量占比是 100%，说明 RcbZIP11 蛋白质的三级结构预测结果是非常可靠的。

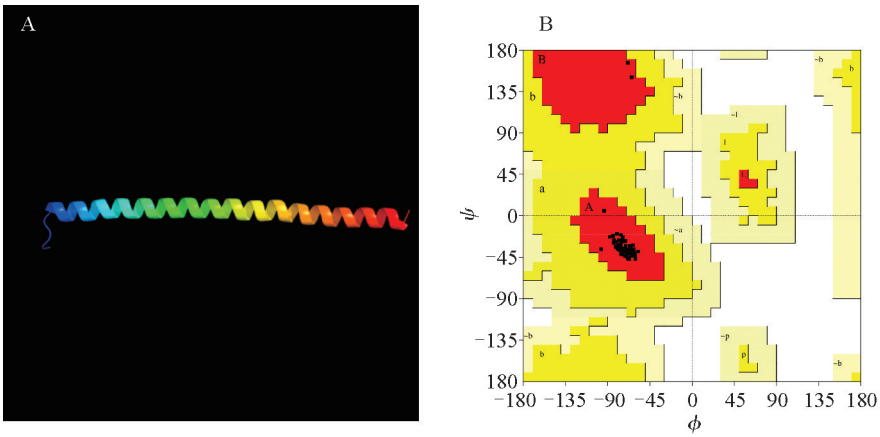


蓝色. α 螺旋；绿色. β 折叠；紫色. 随机线圈；红色. 延伸链。

图 7　RcbZIP11 蛋白质的二级结构

Blue. α helix; Green. β-sheet; Purple. Random coil; Red. Extension chain.

Fig. 7　Secondary structure of RcbZIP11 protein



A. RcbZIP11 蛋白质的三级结构；B. 拉式构象图。

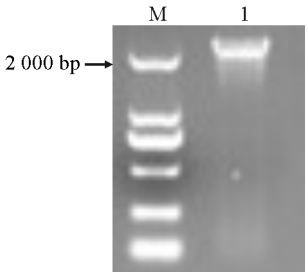
图 8　RcbZIP11 蛋白质的三级结构及打分

A. The tertiary structure of RcbZIP11 protein; B. Pull-type conformation diagram.

Fig. 8　Tertiary structure and grading of RcbZIP11 protein

2.3　RcbZIP11 启动子序列的克隆及分析

如图 9，经 PCR 法克隆出 RcbZIP11 的启动子片段，测序结果与 RcbZIP11 启动子预测序列结果一致，表明成功克隆出 RcbZIP11 启动子序列。



M. DL 2 000 DNA 分子量标准；1. RcbZIP11 启动子克隆产物。

图 9　RcbZIP11 启动子序列克隆

M. DL 2 000 DNA marker; 1. Cloning product of RcbZIP11 promoter.

Fig. 9　Cloning of promoter sequence of RcbZIP11

Plant CARE 数据库预测结果（表 2）显示，该序列除了核心元件（TATA-box 和 CAAT-box）外，还存有光响应元件（GT1-motif 和 G-box）、激素响应类元件（GARE-motif、TCA-element、CGTCA-motif 和 TGACG-motif）和胁迫响应类元件（GC-motif、MBS 和 CCAAT-box），说明 RcbZIP11 启动子可能受到非生物胁迫和激素胁迫的诱导，参与植物的逆境胁迫响应。

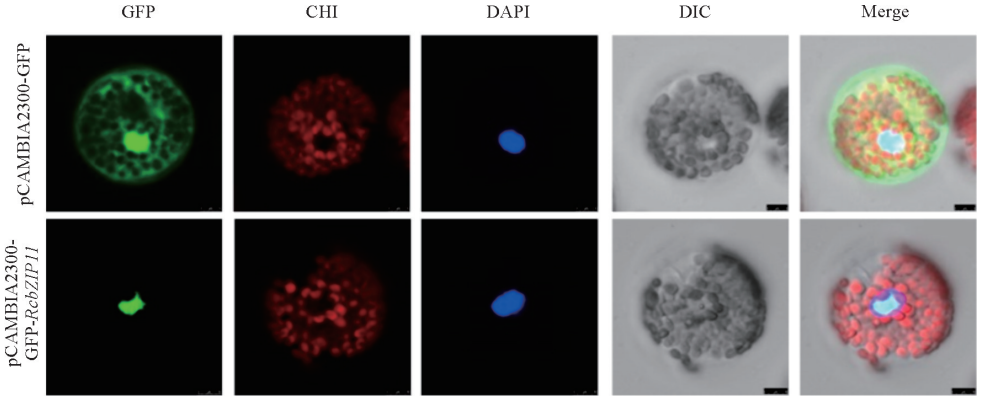
2.4　RcbZIP11 蛋白质亚细胞定位分析

如图 10，激光共聚焦显微镜下的空载体（对照，pCAMBIA2300-GFP）绿色荧光在细胞核和细胞膜均有显示，而转入融合表达载体 pCAMBIA2300-GFP-*RcbZIP*11 的拟南芥原生质体的绿色荧光与细胞核特意标记位置重叠，说明 RcbZIP11 蛋白质定位在细胞核，可能在细胞核中发挥作用。

表 2 RcbZIP11 启动子顺式作用元件预测

Table 2 Prediction of *cis*-acting elements of RcbZIP11 promoter

元件 Element	序列 Sequence	功能 Function	拷贝数 Copy numbers
TATA-box	ATATAT	转录起始点-30 左右的核心启动子元件 Core promoter elements at the transcription start point of about-30	92
CAAT-box	CAAAT	启动子核心元件 Core promoter element	27
GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件 Optical response element	2
G-box	CACGTC	参与光响应的顺式作用调节元件 A *cis*-acting regulatory element involved in light response	1
GARE-motif	TCTGTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin response element	1
TCA-element	CCATCTTTTT	参与水杨酸反应性的顺式作用元件 *Cis*-acting elements involved in salicylic acid reactivity	1
CGTCA-motif	CGTCA	参与 MeJA 响应的顺式作用调控元件 *Cis*-acting regulatory elements involved in MeJA response	1
TGACG-motif	TGACG	参与 MeJA 响应的顺式作用调控元件 *Cis*-acting regulatory elements involved in MeJA response	1
GC-motif	CCCCCG	参与缺氧特异性诱导作用的增强子样元素 Enhancer-like elements involved in hypoxia-specific induction	2
MBS	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding sites involved in drought induction	1
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding sites	1



GFP、CHI、DAPI、DIC 和 Merge 分别代表绿色荧光场(488 nm)、叶绿体自发荧光场(488 nm)、细胞核特异标记、明场和叠加场。Bar=25 μm。

图 10 RcbZIP11 蛋白质亚细胞定位

GFP, CHI, DAPI, DIC and Merge represented green fluorescence field (488 nm), chloroplast autofluorescence field (488 nm), nucleus-specific marker, bright field and superposition field, respectively. Bar=25 μm.

Fig. 10 Subcellular localization of RcbZIP11 protein

2.5 *RcbZIP11* 基因的时空表达特性分析

2.5.1 组织表达模式

图 11 显示,在蓖麻的不同组织中 *RcbZIP11* 基因的表达量不同,*RcbZIP11* 基因在各个组织中均有表达,其中在子叶中 *RcbZIP11* 基因的表达量最高,其次是真叶组织;在根中表达量最低,其次是茎组织;*RcbZIP11* 基因在子叶中的相对表达量是根中表达量的 3.28 倍。

2.5.2 非生物胁迫表达模式

图 12 显示,*RcbZIP11* 基因的时空表达模式会受到干旱胁迫(PEG)、高盐胁迫(NaCl)、冷胁迫(4 ℃)和脱落酸胁迫(ABA)的诱导,且每个时段 *RcbZIP11* 基因的表达量均高于 0 h。

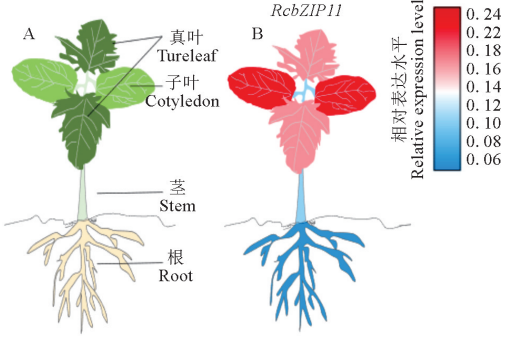
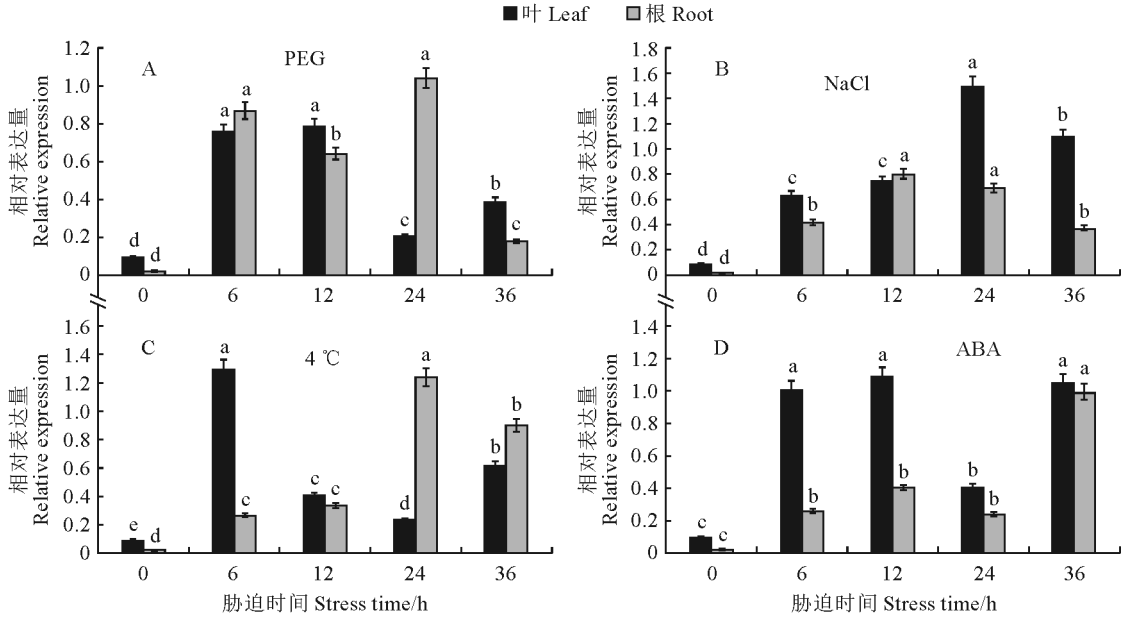


图 11 *RcbZIP11* 基因的组织表达模式

Fig. 11 Tissue expression pattern of *RcbZIP11* gene

在干旱胁迫下（图 12，A），*RcbZIP11* 基因在真叶和根中均呈现双峰表达模式，并且分别在第 12 h 和第 6 h 首次出现表达峰值；在高盐胁迫下（图 12，B），*RcbZIP11* 基因在真叶和根中呈现出先上升后下降的表达趋势，除在第 12 h 时 *RcbZIP11* 基因在根中的表达量高于真叶组织，在其余时间点 *RcbZIP11* 基因均在叶片中高表达；在低温胁迫下（图 12，C），*RcbZIP11* 基因在真叶组织中呈现出双峰表达模式，且分别在第 6 h 和第 36 h 出现表达峰值，在根中呈现出先上升后下降的表达模式，且在第 24 h 出现表达峰值；在 ABA 胁迫下（图 12，D），*RcbZIP11* 基因在根和叶片中表现出相似的时空表达模式，但 *RcbZIP11* 基因在叶片中的表达量要远高于根组织。

综上，*RcbZIP11* 基因能够迅速响应非生物胁迫，积极地参与蓖麻的非生物胁迫调控模式。



组织内不同字母表示胁迫时间之间在 0.05 水平差异显著（$P<0.05$）。

图 12　*RcbZIP11* 基因的非生物胁迫表达模式

Different letters within same tissue indicated significant difference among stress times at 0.05 level ($P<0.05$).

Fig. 12　The abiotic stress expression pattern of *RcbZIP11* gene

3　讨　论

bZIP 基因在高等植物中普遍存在，积极参与调节着植物的生物和非生物胁迫应答及生长发育[1-2,25]。本研究从蓖麻品种‘通篦 5 号’中克隆到 *RcbZIP11* 基因，并对该基因或其所编码的氨基酸序列进行了理化性质分析、表达特性研究和亚细胞定位分析，还克隆了 *RcbZIP11* 转录起始上游 2 000 bp 的启动子序列，分析该区域的顺式作用元件。RcbZIP11 蛋白质的理化性质分析结果显示，与橡胶草（*Taraxacum kok-saghyz*）[26]、马铃薯（*Solanum tuberosum*）[27]和白桑（*Morus alba*）[28]的 bZIP11 蛋白质的理化性质不同，说明 bZIP11 蛋白质在不同物种间的进化存有差异，这可能与其编码基因响应不同的逆境有关[26-28]。研究表明，蓖麻的 49 个 RcbZIP 蛋白质共分为 9 个亚簇，分别是 A～I 簇，其中 E、G 和 H 亚簇所含蛋白质数量最多，分别有 11，9，7 个[13]。RcbZIP30/4/16/37/48/11/44/17/19 隶属于 G 亚簇，该簇的特征结构域是 bZIP_plant_GBF1 结构域[7,13,18]。本研究结果显示，*RcbZIP11* 基因所推导的氨基酸序列中拥有 bZIP_plant_GBF1 结构域，推测其属于 GBF1 类 bZIP 转录因子，与蓖麻 G 亚簇的 RcbZIP30/4/16/37/48/44/17/19 蛋白质可能存在功能上的冗余[13]。研究发现，bZIP 转录因子的在细胞中的位置主要定位于细胞核[29]。辣椒（*Capsicum annuum*）的 CAbZIP1-GFP 融合蛋白瞬时转化拟南芥原生质体，结果显示该蛋白定位于细胞核[30]；小麦（*Triticum aestivum*）的 TabZIP1-GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞中瞬时表达也得了相同结论，TabZIP1 蛋白质同样是 1 个核蛋白[31]。笔者构建了 RcbZIP11 蛋白质的融合蛋白 pCAMBIA2300-GFP-RcbZIP11，在拟南芥原生质体

中瞬时表达，得到的结果与前人研究结果一致。

启动子作为研究基因表达及功能的重要作用元件，可以与 bZIP 转录因子的碱性区域结合，进而调控下游基因的表达[4]。一般地，bZIP 转录因子会优先结合以 ATGC 为核心的顺式作用元件，如 A-box、C-box、G-box 和 ABRE 元件[32-33]。甘薯（*Pomoea batatas*）的 IbbZIP22 启动子区域中就有多个 G-box 和 MBS 元件，还有多个茉莉酸甲酯（MeJA）和 ABA 诱导元件，说明 *IbbZIP22* 转录因子可能会受到 MYB 的调控，基因的表达会受到 MeJA 和 ABA 激素的诱导[34]。RcbZIP11 启动子中也同样有 G-box 核心元件（CACGTC）、MYB 结合位点（CAACTG）、水杨酸诱导元件（CCATCTTTTT）、MeJA 诱导元件（CGTCA 和 TGACG）和赤霉素诱导元件（TCTGTTG），说明 *RcbZIP11* 基因的表达可能会受到激素和干旱诱导的调控，*RcbZIP11* 基因在干旱胁迫（图 12，A）下的表达模式也验证了这一猜想，但是该基因在植物应对干旱胁迫过程中的潜力需进一步验证。研究表明，bZIP 转录因子在植物应对不利环境的应答过程中扮演着重要的角色，包括盐、干旱、低温、渗透胁迫和机械损伤等多种环境压力[21,25,35]，bZIP 通常情况下是通过基因的过量表达来应对上述非生物胁迫的。例如，*MtbZIP2* 和 *MtbZIP26* 基因的过量表达可提高蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）植株在盐胁迫下的适应能力[36]；苹果（*Malus pumila*）的 *MdbZIP2/8/10/39/46/60/69/72/78/79/94/96/99/104/109* 基因在干旱胁迫下的根和叶片组织中特异性表达，说明这 16 个基因对苹果植株应对干旱胁迫有重要意义[37]；大豆的 *GmbZIP44*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 基因在冷胁迫下表达量攀升，促进了大豆叶片脯氨酸的合成，提高了植物在冷胁迫中的存活能力[38]。蓖麻 *RcbZIP11* 基因时空表达模式显示，*RcbZIP11* 基因表达受非生物胁迫的诱导，在干旱、盐、低温和 ABA 胁迫下的基因表达量攀升，均高于 0 h，说明 *RcbZIP11* 基因积极参与蓖麻植株对非生物胁迫的应答，这与前人研究结果[13]一致。

综上，本研究对‘通篦 5 号’*RcbZIP11* 基因和启动子进行克隆，对其进行生物信息学分析和基因的表达模式分析，探讨了 RcbZIP11 蛋白质的结构与功能，再通过构建 RcbZIP11 蛋白质的荧光表达载体，明确其亚细胞定位，为蓖麻 *RcbZIP11* 基因在应对非生物胁迫过程中的功能奠定了基础，后续可构建 *RcbZIP11* 基因的过表达载体，通过转化模式植物进一步明确该基因的具体功能。

参考文献：

[1] HUANG C, ZHOU J, JIE Y, *et al*. A ramie bZIP transcription factor *BnbZIP2* is involved in drought, salt, and heavy metal stress response[J]. *DNA and Cell Biology*, 2016, **35**(12): 776-786.

[2] ZHAO K, CHEN S, YAO W, *et al*. Genome-wide analysis and expression profile of the *bZIP* gene family in poplar[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, **21**: 1-16.

[3] ASADA R, KANEMOTO S, KONDO S, *et al*. The signalling from endoplasmic reticulum-resident *bZIP* transcription factors involved in diverse cellular physiology[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2011, **149**(5): 507-518.

[4] SORNARAJ P, LUANG S, LOPATO S, *et al*. Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat *bZIP* factor and implications of its structure in function[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2016, **1 860**(1): 46-56.

[5] ZHENG Y, JIAO C, SUN H, *et al*. iTAK: A program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases[J]. *Molecular Plant*, 2016, **9**(12): 1 667-1 670.

[6] CORRÊA L G G, RIAÑO-PACHÓN D M, SCHRAGO C G, *et al*. The role of *bZIP* transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes[J]. *PloS One*, 2008, **3**(8): e2944.

[7] 杨 颖，高世庆，唐益苗，等. 植物 *bZIP* 转录因子的研究进展[J]. 麦类作物学报，2009，**29**(4)：730-737.
YANG Y, GAO X Q, TANG Y M, *et al*. Advance of *bZIP* transcription factors in plant[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, **29**(4): 730-737.

[8] CHUANG C F, GUNNING M P, WILLIANMS R W, *et al*. The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein sub-family: Candidates for the ocselement transcription factor[J]. *The Plant Journal*, 1993, **3**(5): 6 692.

[9] MICHAEL R, RANJAN A, KUMAR R S, *et al*. Light-regulated expression of terpene synthase gene, *AtTPS03*, is controlled by the *bZIP* transcription factor, *HY5*, in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, **529**(2): 437-443.

[10] ZOU M, GUAN Y, REN H, *et al*. A *bZIP* transcription factor, *OsABI5*, is involved in rice fertility and stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, **66**: 675-683.

[11] ZHONG X, FENG X, LI Y, *et al*. Genome-wide identification of *bZIP* transcription factor genes related to starch synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Genome*, 2021, **64**(12): 1 067-1 080.

[12] XU F, PARK M R, KITAZUMI A, *et al*. *Cis*-regulatory signatures of orthologous stress-associated *bZIP* transcription factors from rice, sorghum and *Arabidopsis* based on phylogenetic footprints[J]. *BMC genomics*, 2012, **13**(1): 1-15.

[13] JIN Z, XU W, LIU A. Genomic surveys and expression analysis of *bZIP* gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.)[J]. *Planta*, 2014, **239**: 299-312.

[14] LIU J, CHEN N, CHEN F, *et al*. Genome-wide analysis and expression profile of the *bZIP* transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera*)[J]. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 1-18.

[15] LÓPEZ-BERGES M S, RISPAIL N, PRADOS-ROSALES R C, *et al*. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB[J]. *The Plant Cell*, 2010, **22**(7): 2 459-2 475.

[16] AN J P, QU F J, YAO J F, *et al*. The bZIP transcription factor *MdHY5* regulates anthocyanin accumulation and nitrate assimilation in apple[J]. *Horticulture Research*, 2017, **4**: 17 023.

[17] MATIOLLI C C, TOMAZ J P, DUARTE G T, *et al*. The *Arabidopsis bZIP* gene *AtbZIP63* is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals[J]. *Plant Physiology*, 2011, **157**(2): 692-705.

[18] PAN Y, HU X, LI C, *et al*. *SlbZIP38*, a tomato *bZIP* family gene downregulated by abscisic acid, is a negative regulator of drought and salt stress tolerance[J]. *Genes*, 2017, **8**(12): 402.

[19] LI Y, CHEN Q, NAN H, *et al*. Overexpression of *GmFDL19* enhances tolerance to drought and salt stresses in soybean[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(6): e0179554.

[20] LI H, CHEN J, ZHAO Q, *et al*. Basic leucine zipper (*bZIP*) transcription factor genes and their responses to drought stress in ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *BMC Genomics*, 2021, **22**(1): 1-12.

[21] 朱芸晔，薛　冰，王安全，等. 番茄 *bZIP* 转录因子家族的生物信息学分析[J]. 应用与环境生物学报，2014，**20**(5)：767-774.
ZHU Y H, XUE B, WANG A Q, *et al*. Comprehensive bioinformatic analysis of *bZIP* transcription factors in comprehensive bioinformatic analysis of *bZIP* transcription factors in *Solanum lycopersicum*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, **20**(5): 767-774.

[22] 才　华，朱延明，柏　锡，等. 野生大豆 *GsbZIP33* 基因的分离及胁迫耐性分析[J]. 分子植物育种，2011，**9**(4)：397-401.
CAI H, ZHU Y M, BAI X, *et al*. Isolation and tolerance analysis of *GsbZIP33* gene linked to response on stress in *Glycine soja*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, **9**(4): 397-401.

[23] 王思嘉，孙嘉莹，刘美琦，等. 人参 bZIP 基因家族生物信息学分析[J]. 中草药，2022，**53**(9)：2 786-2 794.
WANG S J, SUN J Y, LIU M Q, *et al*. Bioinformatics analysis of bZIP gene family of *Panax ginseng*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, **53**(9): 2 786-2 794.

[24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D L. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

[25] 王　彬，陈敏氡，林　亮，等. 植物干旱胁迫的信号通路及相关转录因子研究进展[J]. 西北植物学报，2020，**40**(10)：1 792-1 806.
WANG B, CHEN M D, LIN L, *et al*. Signal pathways and related transcription factors of drought stress in plants[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(10): 1 792-1 806.

[26] FRICKE J, HILLEBRAND A, TWYMAN R M, *et al*. Abscisic acid-dependent regulation of small rubber particle protein gene expression in *Taraxacum* brevicorniculatum is mediated by *TbbZIP1*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, **54**(4): 448-464.

[27] ZHAO P, YE M, WANG R, *et al*. Systematic identification and functional analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) *bZIP* transcription factors and overexpression of potato *bZIP* transcription factor *StbZIP-65* enhances salt tolerance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, **161**: 155-167.

[28] GUAN Q, YU J, ZHU W, *et al*. RNA-Seq transcriptomic analysis of the *Morus alba* L. leaves exposed to high-level UVB with or without dark treatment[J]. *Gene*, 2018, **645**: 60-68.

[29] ZHANG Y, LI S, CHEN Y, *et al*. Heterologous overexpression of strawberry *bZIP11* induces sugar accumulation and inhibits plant growth of tomato[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, **292**: 110 634.

[30] LEE S C, CHOI H W, HWANG I S, *et al*. Functional roles of the pepper pathogen-induced *bZIP* transcription factor, *CAbZIP1*, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses[J]. *Planta*, 2006, **224**: 1 209-1 225.

[31] LÜ Y, SONG C H, LU Q W, *et al*. The expression characteristics of transcription factors regulated by exogenous ABA in winter wheat (*Triticum aestivum*) under cold stress[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2018, **65**: 842-848.

[32] ZG E, ZHANG Y P, ZHOU J H, *et al*. Mini review roles of the *bZIP* gene family in rice[J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2014, **13**(2): 3 025-3 036.

[33] ALI Z, SARWAT S S, KARIM I, *et al*. Functions of plant's *bZIP* transcription factors[J]. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 2016, **53**(2).

[34] 孟　鑫，王庆美，侯夫云，等. 甘薯 *IbbZIP22* 基因克隆与表达分析[J]. 山东农业科学，2023，**55**(1)：1-7.
MENG X, WANG Q M, HOU F Y, *et al*. Cloning and expression analysis of *IbbZIP22* gene in sweet potato[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, **55**(1): 1-7.

[35] 刘媛媛，申成丞，吕红柳，等. 超重力胁迫下'平邑甜茶'幼苗叶片生理指标及其转录组分析[J]. 西北植物学报，2020，**40**(9)：1 518-1 526.
LIU Y Y, SHEN C C, LÜ H L, *et al*. Physiological indexes and transcriptomic analysis of '*Malus hupehensis*' seedling leaves under hyper-gravity stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(9): 1 518-1 526.

[36] WANG Z, CHENG K, WAN L, *et al*. Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (*bZIP*) transcription factor gene family in six legume genomes[J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**: 1-15.

[37] LI Y Y, MENG D, LI M, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of the *bZIP* gene family in apple (*Malus domestica*)[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2016, **12**: 1-17.

[38] LIAO Y, ZOU H F, WEI W, *et al*. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2008, **228**: 225-240.

（编辑：韦青侠）