

网络出版时间:2024-12-10

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20241210.1107.016

小麦*TaPBF3-5D*的基因克隆及生物信息学分析

邓云颢^{1,2}, 李鲁华^{1,2}, 徐灵^{1,2}, 王忠妮³, 洪鼎立^{1,2}, 邵成江¹, 徐如宏^{1,2}

(1. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025; 2. 国家小麦改良中心贵州分中心, 贵州贵阳 550025;

3. 贵州省农业科学院水稻研究所, 贵州贵阳 550025)

摘要: PBF因子是小麦胚乳特异基因表达调控蛋白因子之一, 在调控小麦种子贮藏蛋白基因表达方面有着重要作用。本研究以小麦种质ZY96-3为材料, 利用RT-PCR技术克隆获得*TaPBF3-5D*的CDS序列, 对其进行了生物信息学和基因表达分析。结果表明, *TaPBF3-5D*基因CDS序列共有909 bp, 编码302个氨基酸; 其编码的蛋白为一个非跨膜的不稳定性亲水蛋白, 无信号肽, 共含36个磷酸位点; 预测其定位于细胞核; 通过系统进化树以及多重序列比对, *TaPBF3-5D*与来自于普通小麦中国春*PBF*的亲缘性上更为接近。经荧光定量分析, *TaPBF3-5D*基因在根、茎、叶和籽粒中均有表达, 以籽粒中表达最高, 其次是叶和茎, 根中表达最低。这进一步说明*TaPBF3-5D*基因参与调控小麦籽粒贮藏蛋白基因表达, 调节籽粒发育。

关键词: ZY96-3; *TaPBF3-5D*; 生物信息学; 基因克隆

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)02-0141-08

Gene Cloning and Bioinformatics Analysis of Wheat *TaPBF3-5D*

DENG Yunhao^{1,2}, LI Luhua^{1,2}, XU Ling^{1,2}, WANG Zhongni³,

HONG Dingli^{1,2}, TAI Chengjiang¹, XU Ruhong^{1,2}

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

2. Guizhou Branch of National Wheat Improvement Center, Guiyang, Guizhou 550025, China;

3. Rice Research Institute of Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: PBF factor is one of the protein factors regulating the expression of wheat endosperm specific gene, and plays an important role in regulating the expression of wheat seed storage protein genes. In this study, the CDS sequence of *TaPBF3-5D* was obtained from wheat germplasm ZY96-3 by RT-PCR, and its bioinformatics and gene expression were analyzed. The results showed that the CDS sequence of *TaPBF3-5D* had a total of 909 bp, encoding 302 amino acids. The encoded protein is a non-transmembrane unstable hydrophilic protein without signal peptide, and it contains 36 phosphoric acid sites. It is predicted to be located in the nucleus. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment showed that *TaPBF3-5D* was more closely related to the *PBF* from common wheat. Quantitative fluorescence analysis showed that *TaPBF3-5D* gene was expressed in roots, stems, leaves, and seeds, with the highest expression in seeds, followed by leaves and stems, and the lowest expression in roots. It indicated *TaPBF3-5D* gene regulating the grain development of wheat through participating in the regulation of wheat grain storage protein gene expression.

Keywords: ZY96-3; *TaPBF3-5D*; Bioinformatics; Gene cloning

收稿日期: 2024-04-01 修回日期: 2024-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360474, 32160456); 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2021]一般272); 贵州省粮油作物分子育种重点实验室项目(黔科合中引地[2023]008); 贵州省高等学校功能农业重点实验室项目(黔教技[2023]007号)

第一作者 E-mail: 953825981@qq.com (邓云颢)

通讯作者 E-mail: xrhgz@163.com (徐如宏)

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是重要的粮食作物, 在世界范围内占有举足轻重的地位^[1]。小麦籽粒蛋白主要在灌浆期间的种子胚乳中形成, 并受到时空上的精准转录调控^[2], 因而发掘、鉴定与利用小麦储藏蛋白相关的主要功能基因, 对小麦遗传改良具有重要意义。

DOF (DNA binding with one finger) 转录因子家族属于锌指蛋白家族的一个亚族, 在植物中起着重要作用^[3]。DOF 蛋白长度通常在 200~400 个氨基酸之间, 它包含两个关键结构域: N-末端的 DNA 结合高度保守结合域和 C-末端的转录调控结构域, 这种特性使得 DOF 蛋白能够在植物的生长发育过程中扮演多样化的调控角色^[4]。小麦醇溶蛋白盒结合因子 (prolamin-box binding factor, PBF) 属于植物特异性转录因子 DOF 类, 含有一种高度保守的锌指 DNA 结合结构域, 被称为 DOF 结构域^[5]。这个结构域包含一个独特的 C2-C2 锌指, 其特点是: 仅有一个锌指蛋白的结构, 通过与储藏蛋白启动子上游的 AAAG 或 CTTT 基序结合, 可以激活转录, 并参与调控储藏蛋白基因的表达^[6]。早在 1995 年, Müller 等^[7] 研究认为, PBF 基因主要参与调控玉米籽粒中贮藏蛋白基因表达, 从而影响贮藏蛋白的积累。1998 年, Mena 等^[8] 利用大麦 PBF 基因同源性, 首次克隆出小麦 PBF 编码基因。Ravel 等^[9] 则利用一些已鉴定的 SNPs 进行物理和遗传作图, 证实小麦 PBF 基因位于小麦同源性第 5 组染色体上的着丝粒附近。之后, 一些学者相继利用玉米和水稻等材料, 广泛开展了 PBF 基因调控功能的研究^[10-11]。大多数的研究表明, PBF 基因在胚乳中不仅可以识别并结合顺式作用元件, 还可以与识别顺式作用元件的一些家族转录因子相结合形成蛋白复合体, 共同参与调控种子贮藏蛋白的表达^[5, 12-14]。也有少部分研究发现 PBF 基因还参与了赤霉素响应等相关基因表达调控过程^[15]。国内一些研究者也对不同小麦的 PBF 基因开展了相关研究。如: 苗红梅等^[16] 对小麦 PBF 启动子在离体胚乳中的特性进行了分析; 牛静勇等^[17] 通过小麦醇溶谷蛋白盒结合因子基因表达特性研究, 认为 PBF 基因的表达是胚乳特异性的, 并在小麦胚乳的整个发育过程中持续表达; 郭丽娜等^[18] 对小麦中国春 PBF 编码基因进行了克隆及序列分析, 发现 PBF 亚基编码序列在中国春小麦中极端保守, 但仍然存在变异; 强琴

琴等^[2] 对节节麦 PBF 基因进行克隆、序列分析及原核表达, 发现 PBF 蛋白具有种属特异性; 胡喜贵等^[19] 的研究表明乌拉尔图小麦 PBF 基因具有较高遗传多样性, 其氨基酸变异位点可能对其 PBF 蛋白的调控功能产生影响。从这些研究可以看出, 小麦 PBF 基因表达是胚乳特异性的, 其不同小麦中也可能存在种属特异性和遗传多样性。因此, 发掘和鉴定来自不同小麦的 PBF 基因, 对进一步研究 PBF 基因调控功能和揭示其籽粒蛋白质的表达调控特性具有重要意义。

本课题组在前期研究中发现, 小麦 ZY96-3 籽粒灌浆前期 *TaPBF3-5D* 基因表达明显上调, 可能对其籽粒灌浆过程有调控作用^[20]。利用课题组前期建立的小麦 ZY96-3 籽粒灌浆期转录组数据库, 通过分析和比对得到 *TaPBF3-5D* 基因序列, 然后以小麦种质 ZY96-3 为材料, 使用 RT-PCR 克隆 *TaPBF3-5D* 基因, 并对其进行生物信息学及基因表达分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以小麦种质 ZY96-3 为试验材料, 种植于国家小麦改良中心贵州分中心温室内, 并取其根、茎、叶以及成熟籽粒作为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 植物总 RNA 提取与 cDNA 的合成

取小麦种质 ZY96-3 15 d 龄幼苗的根、茎、叶以及成熟籽粒, 利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA (Omega, 广州), 用紫外分光光度计 (Genovene) 测定 RNA 的浓度, RNA 质量用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定。利用南京诺唯赞生物科技股份有限公司提供的反转录试剂盒, 合成根、茎、叶以及成熟籽粒的 cDNA。

1.2.2 *TaPBF3-5D* 基因的克隆

从本实验室 ZY96-3 转录组数据库中分析筛选获得 *TaPBF3-5D* 基因, 根据基因数据库已有的基因登录号从 Ensembl Plants 数据库中下载目的基因核苷酸序列, 采用 Primer 5.0 设计特异性引物 (表 1), 并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成引物。以小麦 ZY96-3 的 15 d 龄组培苗 cDNA 作模板, 使用 2×Phanta Max Master Mix 以及特异性引物对该基因进行 PCR 扩增。PCR 产物于 4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 并对扩增产物进行测序。

表 1 特异性引物
Table 1 Specific primers

引物名称 Primer	引物序列 Sequence of primer (5'-3')	用途 Purpose
<i>TaPBF3-5D</i> -F	ATGGAGGAAGTGTTCCTCCGTCAAAC	基因克隆 Gene cloning
<i>TaPBF3-5D</i> -R	TTACATCAGGGAGCTGCTGTTG	
18S	GTTCTACAACGAGCTCCGTGTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
18S	GACATACATTGCTGGGCAAC	
<i>qTaPBF3-5D</i> -F	GGAGGTGGTGGTGGTGTATCAG	
<i>qTaPBF3-5D</i> -R	CCGCTGTCGTTATTGTTGTTGTTG	

1.2.3 生物信息学分析

使用在线软件对 *TaPBF3-5D* 基因进行生物信息学分析。使用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>)、Cell-PLoc2.0 (<http://www.cs-bio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2>)、TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)、NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、SignalP 4.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1>)、Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protscale/>)、NetPhos 3.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 等在线软件,分别对蛋白的理化性质、亚细胞定位、跨膜结构域预测、蛋白进行保守结构域预测等进行分析。BLAST 以获取 *TaPBF3-5D* 的同源氨基酸序列,并对 *TaPBF3-5D* 基因的系统进化树进行构建,筛选出与 *TaPBF3-5D* 基因同源性比较高的序列,最后对其序列进行比对。

1.2.4 组织表达分析

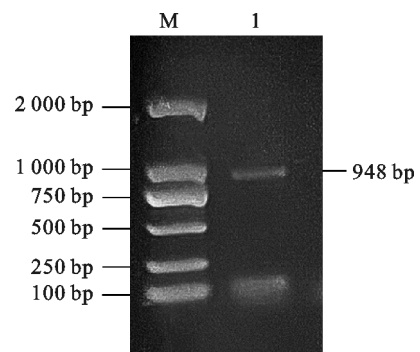
为了检测 *TaPBF3-5D* 在 ZY96-3 不同组织中的表达情况,以小麦种质 ZY96-3 的根、茎、叶以及成熟籽粒的 cDNA 为模板,采用特异性引物 (表 1) 进行 qRT-PCR 检测。反应体系:1 μ L cDNA 模板,10 μ L Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,上下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹),8.2 μ L ddH₂O,总体积为 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,接着进行 40 个循环,每个循环包括:95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 计算各组织中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *TaPBF3-5D* 基因的克隆

以小麦种质 ZY96-3 叶片 cDNA 为模板,设

计引物 *TaPBF3-5D*-F 和 *TaPBF3-5D*-R 进行 PCR 扩增,其扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1) 检测。结果发现,该条带核苷酸序列长 948 bp,分析得到完整的 CDS 序列为 909 bp。



M:DL2000;1:PCR 产物。

M: DL2000; 1: PCR product.

图 1 *TaPBF3-5D* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *TaPBF3-5D*

2.2 *TaPBF3-5D* 编码蛋白的理化性质分析及亚细胞定位

利用 ExPASy-ProtParam 工具对 *TaPBF3-5D* 基因编码蛋白质进行了理化分析。结果显示,该蛋白共编码 302 个氨基酸。其分子式为 C₁₃₂₀H₂₀₄₆N₃₉₄O₄₃₄S₂₀,分子量约为 31 020.34 Da,等电点为 7.58。此蛋白包含 20 个带负电荷的氨基酸残基 (Asp+Glu),21 个带正电荷的氨基酸残基 (Arg+Lys),据分析该蛋白总原子数为 4 214,脂溶性指数为 51.99,而不稳定系数为 47.77。综合推测该蛋白属于不稳定性蛋白。

使用 Cell-PLoc2.0 在线工具进行预测分析,结果显示,*TaPBF3-5D* 基因编码的蛋白定位在细胞核上。

2.3 *TaPBF3-5D* 编码蛋白质性质以及结构预测分析

通过该基因编码蛋白质的跨膜结构域预测 (图 2),发现其没有跨膜结构域,推测该蛋白为非

跨膜蛋白。

NetPhos 3.1 Server 在线工具分析结果(图 3)表明, *TaPBF3-5D* 编码的蛋白共含有 36 个磷酸化位点, 其中有 22 个丝氨酸(serine)、9 个苏氨酸(threonine)和 5 个酪氨酸(tyrosine)磷酸化位点, 这些磷酸化位点可能在调节蛋白质的活性、稳定性和相互作用中发挥重要作用进而实现其功能。

该基因编码蛋白保守结构域预测结果(图 4)显示, 其含有 DOF 锌指蛋白, 该蛋白作为一种转录因子, 可能在植物激素和胁迫反应、开花时间、

发芽和种子贮藏蛋白积累等不同生物过程中发挥作用。该基因编码蛋白包含一个 DOF(DNA 单指结合)结构域, 该结构域包括一个 C2-C2 型锌指基序, 它与序列为 5'-AAAG-3' 的元件特异性结合。

依据 SignalP 4.0 Server 进行的蛋白质信号肽分析结果显示, 编码蛋白信号肽可能性得分为 0.109, 这表明该蛋白没有信号肽。此外, SignalP 3.0 Server 的结果显示 *D* 值为 0.041, 这进一步表明 *TaPBF3-5D* 基因编码的蛋白是非分泌蛋白。

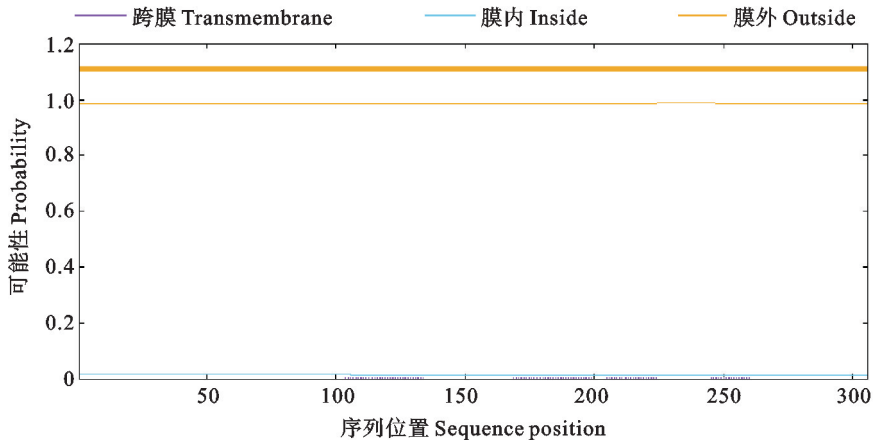


图 2 *TaPBF3-5D* 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 2 Prediction of *TaPBF3-5D* protein transmembrane domain

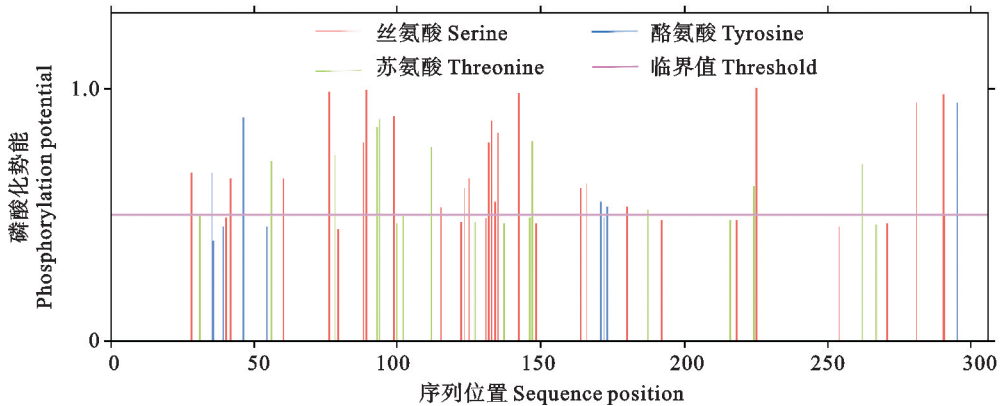


图 3 *TaPBF3-5D* 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 3 Prediction of *TaPBF3-5D* protein phosphorylation sites

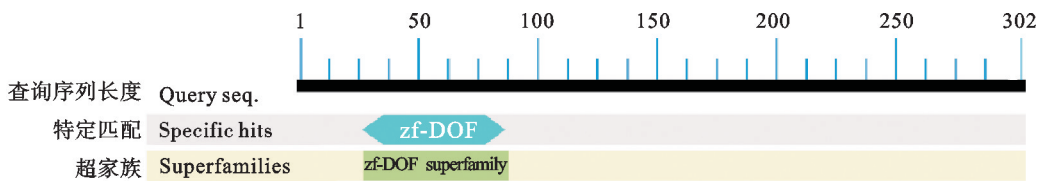


图 4 *TaPBF3-5D* 蛋白保守结构域预测

Fig. 4 Prediction of conserved domains in *TaPBF3-5D*

使用 ExPASy ProtScale 工具对 *TaPBF3-5D* 编码的蛋白进行亲疏水性分析,结果(图 5)显示,该蛋白的序列长度为 302 个氨基酸,在序列中,第 215 个氨基酸表现出最大的疏水性,分值为 1.700,第 13、14、15 个氨基酸表现出最大的亲水性,分值为 -3.111,综合分析该编码蛋白具有较强的亲水性。

使用在线工具 SOPMA 对 *TaPBF3-5D* 编码的蛋白进行二级结构分析(图 6),结果表明,该蛋白共含 302 个氨基酸,其二级结构组成如下: α -螺旋氨基酸有 14 个,占总氨基酸数的 4.64%;无规则卷曲氨基酸有 265 个,占总氨基酸数的 87.75%;延伸链有 23 个,占总氨基酸数的 7.62%。

根据在线工具 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三级结构预测。以一个 PDB 号为 S5MCG7.1.A 的结构为模板建立该蛋白的三维结构,预测其为一种 DOF 锌指蛋白,通过选择性结合特异的靶

结构,使其在基因表达调控等多种生命过程中发挥重要作用。

2.4 *TaPBF3-5D* 基因同源关系分析

在 NCBI-BLAST 中得到普通小麦中国春(*Triticum aestivum* L.)、黑麦(*Secale cereale* L.)、节节麦(*Aegilops tauschii*)、水稻(*Oryza sativa*)等 16 个物种的 PBF 氨基酸序列,使用 MEGA11 工具构建系统进化树。结果(图 7)显示,ZY96-3 的 PBF 氨基酸序列与普通小麦中国春、节节麦、乌拉尔图小麦以及二粒小麦的同源关系较近。

使用 DNAMAN 软件分别让 ZY96-3 与普通小麦中国春、节节麦、乌拉尔图小麦、二粒小麦和水稻的 PBF 氨基酸序列进行同源序列比对,得知(图 8)其相似性分别为 90.30%、88.79%、83.03%、83.03%和 43.94%。综合来看 ZY96-3 与普通小麦中国春在亲缘性上更为接近。

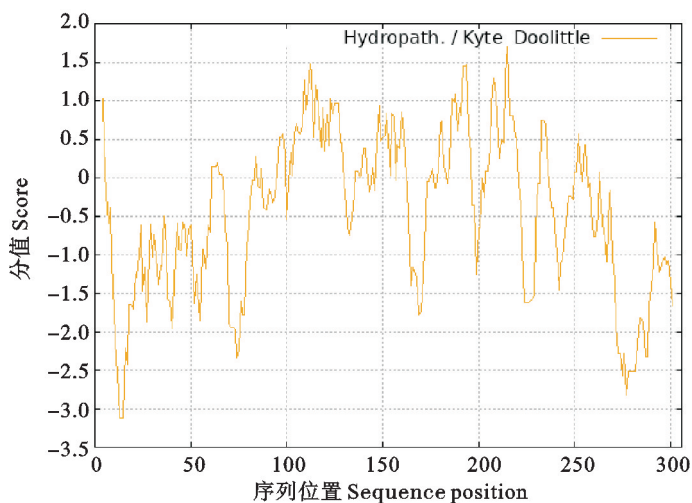


图 5 *TaPBF3-5D* 蛋白亲疏水性预测

Fig. 5 Prediction of hydrophilicity of *TaPBF3-5D*

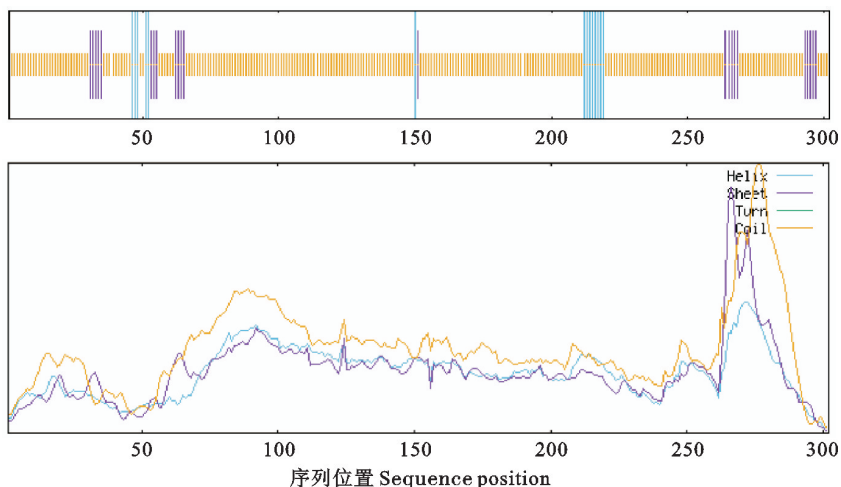


图 6 *TaPBF3-5D* 蛋白二级结构预测

Fig. 6 Prediction of secondary structure of *TaPBF3-5D*

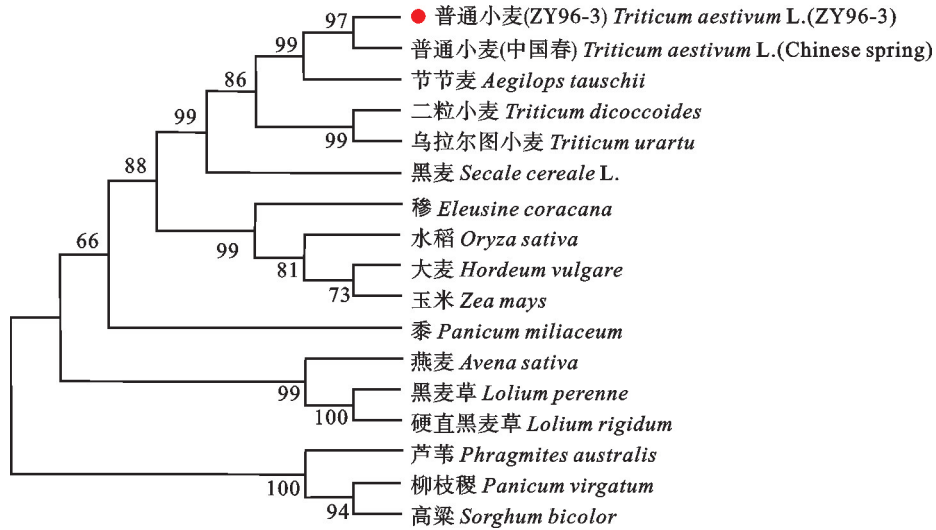


图 7 TaPBF3-5D 基因的进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of TaPBF3-5D gene

ZY96-3MAGEAIAGAEEKKPRKPEQKVECPCKSGNSKFCYYNNYSMSQRYFCKAC	51
中国春 Chinese spring	MEEVFPSNSKSKAGQMAGEAIAGAEEKKPRKPEQKVECPCKSGNTKFCYYNNYSMSQRYFCKAC	66
节节麦 <i>Aegilops tauschii</i>	MEEVYPSNSKSKAQMAGEATAGAEEKKPRKPEQKVECPCKSGNTKFCYYNNYSMSQRYFCKAC	66
二粒小麦 <i>Triticum dicoccoides</i>	MEEVFPSNSKSKAGQMVGEATAAAEEKKPRKPEQKVECPCKSGNTKFCYYNNYSMSQRYFCKAC	66
乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	MEEVFPSNSKSKAQMAGEATSAEEKKPRKPEQKVECPCKSGNTKFCYYNNYSMSQRYFCKAC	66
水稻 <i>Oryza sativa</i>ryfckac	7
Consensusryfckac	
ZY96-3	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSVG	117
中国春 Chinese spring	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSVG	132
节节麦 <i>Aegilops tauschii</i>	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSVG	132
二粒小麦 <i>Triticum dicoccoides</i>	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSAG	132
乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSAG	132
水稻 <i>Oryza sativa</i>	RRYWTHGGSLRNVPICGGCRKPKRSGTSDAHKLGVAASSEPTAVVPPSTCTGMNFANVLPFTFMSGG	73
Consensus	rrywthggslrnvpigggcrkpkrgtsdahklgvasseptavvppsctgmnfanvlpftfmsvg	
ZY96-3	FEIFSSLSLTAFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEAIGSGNG	183
中国春 Chinese spring	FEIFSSLSLTAFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEAIGSGNG	198
节节麦 <i>Aegilops tauschii</i>	FEIFSSLSLTAFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEAIGSGNG	198
二粒小麦 <i>Triticum dicoccoides</i>	FEIFSSLSLTAFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEATGSGIG	198
乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	FEIFSSLSLTAFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEATGSGIG	198
水稻 <i>Oryza sativa</i>	FDIQSSLSLTFGSSSSSNTAAMSPGGTTSFLDLVLRGGAGLLDGSLSQNNGYYYGGEATGSSIG	139
Consensus	f i s s l s l t a f g s s s s n t a a m s p g g t t s f l d l v l r g g a g l l d g s l s q n n g y y y g g e a i g s g n g	
ZY96-3	MLMTPEAVSFGIPVPMQCHGLVVGNGIGAAATASIFQCGATSEEGDDGMGVMGLQWQPQVGNNGG	249
中国春 Chinese spring	MLMTPEAVSFGIPVPMQCHGLVVGNGIGAAATASIFQCGATSEEGDDGMGVMGLQWQPQVGNNGG	264
节节麦 <i>Aegilops tauschii</i>	MLMTPEAVSFGIPVPMQCHGLVVGNGIGAAATASIFQCGATSEEGDDGMGVMGLQWQPQVGNNGG	264
二粒小麦 <i>Triticum dicoccoides</i>	MLMTPEAVSFGIPVPMQCHGLVVGNGIGAAATASIFQCGTGEEDDGTGGVMGLQWQPQVGNNGG	264
乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	MLMTPEAVSFGIPVPMQCHGLVVGNGIGAAATASIFQCGTGEEDDGTGGVMGLQWQPQVGNNGG	264
水稻 <i>Oryza sativa</i>	MLMTPEAVSLQMASPMQCHGLVVGNGIGRTIS.....	173
Consensus	m l m t p e a v s f g i p v p m q c h g l v v g n g i g a a t a s i f q c g a t s e e g d d g m g v m g l q w q p q v g n n g g	
ZY96-3	GGGVSGGVHHLGTGNNVTMGNSNIHNNNNNDSGGDDNNGSSRCYWINNER.....	302
中国春 Chinese spring	GGGVSGGVHHLGTGNNVTMGNSNIHNNNNNDSGGDDNNGSSRCYWINNNGSFPWQSLLNSSSL	329
节节麦 <i>Aegilops tauschii</i>	GGGVSGGVHHLGTGNNVTMGNSNIHNNNNNDSGGDDNNGSSRCYWINNNGSFPWQSLLNSTSL	329
二粒小麦 <i>Triticum dicoccoides</i>	AGVVSAGGVHHLGTGNNVTMGNNIHNHNNNNNSGGDDNNGASSRCYWINNNGSFPWQSLLNSSSL	329
乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	AGVVSAGGVHHLGTGNNVTMGNNIHNHNNNNNSGGDDNNGASSRCYWINNNGSFPWQSLLNSSSL	329
水稻 <i>Oryza sativa</i>	173
Consensus	

图 8 TaPBF3-5D 氨基酸多重序列比对

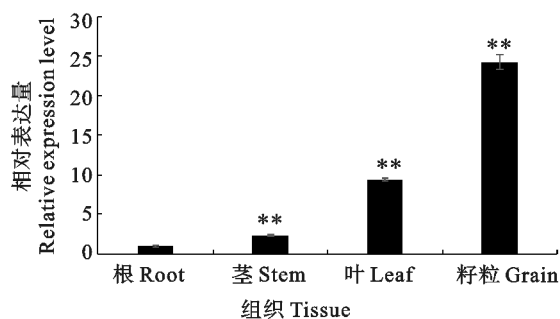
Fig. 8 Multiple sequence alignment of TaPBF3-5D amino acids

2.5 TaPBF3-5D 基因的组织表达分析

为分析TaPBF3-5D基因在小麦ZY96-3不同组织中的表达差异,对TaPBF3-5D基因进行了

qRT-PCR检测。以小麦种质ZY96-3的根、茎、叶以及成熟籽粒的cDNA为模板进行qRT-PCR,以18S为内参基因。结果(图9)显示,TaPBF3-5D基

因在小麦 ZY96-3 的根、茎、叶、成熟籽粒中均有表达,籽粒中表达量最高,其次是叶和茎,表达量最低的为根部。



* * : $P < 0.01$.

图 9 小麦不同组织中 *TaPBF3-5D* 的表达

Fig. 9 Expression of *TaPBF3-5D* in different tissues of wheat

3 讨论

本研究结果表明小麦 ZY96-3 中 *TaPBF3-5D* 基因主要在籽粒中表达,远远高于叶、茎、根的表达,而且 *TaPBF3-5D* 基因编码蛋白包含一个 DOF(DNA 单指结合)结构域,该结构域包括一个 C2-C2 型锌指基序,这与前人^[6]所获研究结果相同,说明 *TaPBF3-5D* 基因能与序列为 5'-AAAG-3'的元件特异性结合,从而激活转录并参与调控小麦 ZY96-3 籽粒灌浆期籽粒储藏蛋白基因的表达,进一步证明 *TaPBF3-5D* 基因是小麦 ZY96-3 胚乳特异基因表达调控蛋白因子之一。

同时,所获 *TaPBF3-5D* 基因 CDS 序列长 909 bp,与胡喜贵等^[19]对乌拉尔图小麦、强琴琴等^[2]对节节麦所获的 *PBF* 基因序列长度不同。*TaPBF3-5D* 基因 CDS 序列编码的蛋白为一个非跨膜的不稳定性亲水蛋白,无信号肽,预测其定位 在细胞核,这些与郭丽娜等^[18]对中国春小麦、强琴琴等^[2]对节节麦的 *PBF* 基因序列分析结果相同。通过对 *TaPBF3-5D* 与相近的多个基因序列的分子进化关系分析发现, *TaPBF3-5D* 与来自于普通小麦中国春的 *PBF* 亲缘性比较接近。这些结果说明 *TaPBF3-5D* 基因序列在不同小麦中相对保守,在小麦生长发育过程中具有类似的调控作用。

本研究发现,小麦 ZY96-3 中 *TaPBF3-5D* 基因 CDS 序列为 909 bp,共编码 302 个氨基酸,这一结果与郭丽娜等^[18]对中国春、强琴琴等^[2]对节节麦、胡喜贵等^[19]对乌拉尔图小麦的研究结果有

所不同。通过生物信息学分析特定基因编码的蛋白质,可以预测其可能的生物学功能^[21]。本研究结果或可成为接下来主要的研究方向,利用小麦 ZY96-3 种质为研究对象,深入探讨 *TaPBF3-5D* 基因与其他不同基因编码氨基酸的差异,以进一步明确 *TaPBF3-5D* 基因在小麦籽粒灌浆期对籽粒储藏蛋白基因表达的调控功能。

参考文献:

- [1] CHEN Y, WANG W, YANG Z, *et al.* Innovative computational tools provide new insights into the polyploid wheat genome [J]. *aBIOTECH*, 2024, 5(1): 52.
- [2] 强琴琴, 杨帆, 陈其皎, 等. 节节麦 *PBF* 基因的克隆、序列分析及原核表达[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(6): 727. QIANG Q Q, YANG F, CHEN Q J, *et al.* Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of *PBF* genes from *Aegilops tauschii* [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2014, 34(6): 727.
- [3] KHAN I, KHAN S, ZHANG Y, *et al.* Genome-wide analysis and functional characterization of the DoF transcription factor family in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2021, 253(5): 101.
- [4] YANAGISAWA S. The DOF family of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(12): 555.
- [5] MARZÁBAL P, GAS E, FONTANET P, *et al.* The maize DOF protein *PBF* activates transcription of γ -zein during maize seed development [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(5): 441.
- [6] UMEMURA Y, ISHIDUKA T, YAMAMOTO R, *et al.* The DOF domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain [J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(5): 741.
- [7] MÜLLER M, MUTH J R, GALLUSCI P, *et al.* Regulation of storage protein synthesis in cereal seeds: Developmental and nutritional aspects [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 145(5-6): 606.
- [8] MONTAÑA M, JESUS VICENTE-CARBAJOSA, ROBERT J, *et al.* An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm [J]. *Plant Journal*, 2010, 16(1): 53.
- [9] RAVEL C, NAGY I J, MARTRE P, *et al.* Single nucleotide polymorphism, genetic mapping, and expression of genes coding for the DOF wheat prolamin-box binding factor [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2006, 6(4): 310.
- [10] VICENTE-CARBAJOSA J, MOOSE S P, PARSONS R L, *et al.* A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(14): 7685.
- [11] KAWAKATSU T, TAKAIWA F. Differences in transcrip-

- tional regulatory mechanisms functioning for free lysine content and seed storage protein accumulation in rice grain [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(12):1964.
- [12] ALBANI D, HAMMOND-KOSACK M C, SMITH C, *et al.* The wheat transcriptional activator SPA a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(2):171.
- [13] DIAZ I, JESÚS VICENTE-CARBAJOSA, ABRAHAM Z, *et al.* The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. [J]. *Plant Journal*, 2010, 29(4):453.
- [14] YAMAMOTO M P, ONODERA Y, TOUNO S M, *et al.* Synergism between RPBPF DOF and RISBZ1 bZIP activators in the regulation of rice seed expression genes [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4):1694.
- [15] MENA M, CEJUDO F J, ISABEL-LAMONEDA I, *et al.* A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1):111.
- [16] 苗红梅, 赵永英, 易明林, 等. PBF 启动子在小麦离体胚乳中的特性分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6):1070.
MIAO H M, ZHAO Y Y, YI M L, *et al.* Characterization of PBF promoter in wheat endosperm *in vitro* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(6):1070.
- [17] 牛静勇, 陈占宽, 贺浩华. 小麦醇溶-谷蛋白盒结合因子基因表达特性的研究[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(6):941.
NIU J Y, CHEN Z K, HE H H. Study on the expression characteristics of wheat prolamin box binding factor [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, 29(6):941.
- [18] 郭丽娜, 高翔. 六倍体普通小麦中国春 PBF 编码基因的克隆及序列分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(11):4740.
GUO L N, GAO X. Cloning and sequence analysis of PBF encoding genes from hexaploid common wheat Chinese spring (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(11):4740.
- [19] 胡喜贵, 吴晓军, 姜小苓, 等. 乌拉尔图小麦 PBF 基因克隆及其序列分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(13):22.
HU X G, WU X J, JIANG X L, *et al.* Cloning and sequence analysis of PBF gene in *Triticum urartu* Tum [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(13):22.
- [20] 杨帅, 任明见, 李振华, 等. 小麦 ZY96-3 籽粒灌浆过程中籽粒发育相关基因的表达分析[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(7):1187.
YANG S, REN M J, LI Z H, *et al.* Expression of grain development related genes in wheat ZY96-3 during grain filling stage [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2020, 57(7):1187.
- [21] 周振国, 孟亚雄, 宋展树, 等. 盐生草基因 *Unigene7547* 片段的克隆与分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(22):7281.
ZHOU Z G, MENG Y X, SONG Z S, *et al.* Cloning and analysis of *Unigene7547* fragment in *Halogeton glomeratus* genes [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(22):7281.