

宋 刚,方志刚,王玉龙,等. 柳枝稷 *BiP* 基因的鉴定、表达分析和抗逆境功能[J].江苏农业学报,2022,38(4):889-899.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.004

柳枝稷 *BiP* 基因的鉴定、表达分析和抗逆境功能

宋 刚^{1,2}, 方志刚³, 王玉龙², 蔡庆生²

(1.江苏农林职业技术学院茶与食品科技学院,江苏 句容 212400; 2.南京农业大学生命科学学院,江苏 南京 210095; 3.喀什大学生命与地理科学学院,新疆 喀什 844099)

摘要: 有害环境条件对植物生长发育有不利影响,并会引起蛋白质变性或错误折叠。分子伴侣之一的绑定蛋白(BiP)通过减轻错误折叠蛋白质引起的内质网应激发挥重要的保护作用。柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)是一种原产于北美、多年生 C4 型禾本科植物。由于其生物量大、适应性强,近年来被作为能源植物研究和利用。为明确柳枝稷中 *BiP* 基因及其在逆境下的表达和功能,本研究通过对柳枝稷基因组数据本地 BLAST 比对,结合具有 *BiP* 保守结构域和内质网驻留信号序列(HDEL)特征筛选的条件,共在柳枝稷基因组中鉴定出 4 个 *BiP* 基因,命名为 *PvBiP1a*、*PvBiP1b*、*PvBiP2*、*PvBiP3*,分别位于 1 号和 5 号染色体上。多物种序列比对和进化分析结果表明,*PvBiPs* 具有 BiP 蛋白典型功能结构域,*PvBiP1a* 和 *PvBiP1b* 聚成一个进化枝,并与水稻 *OsBiP1* 聚为一类,都含有 7 个内含子结构;*PvBiP2* 与 *PvBiP3* 聚为另一进化枝,无内含子结构。上游 2 kb 启动子序列分析结果表明,*PvBiPs* 主要包括胁迫防御和激素应答顺式作用元件。*PvBiPs* 受内质网胁迫诱导剂二硫苏糖醇诱导表达,在 NaCl、PEG、ABA 和 CdCl₂ 胁迫下表现出上调表达,*PvBiP2* 相对表达量的峰值最高。将 *PvBiP1a*、*PvBiP2* 与 *PvBiP3* 克隆至 pGAD426 载体并转化酵母,在 CdCl₂、NaCl 和甘露醇胁迫下进行耐性验证,结果显示,3 个基因对镉和盐胁迫都有耐性,对甘露醇胁迫无耐性。本研究结果将为深入挖掘柳枝稷 *BiP* 基因功能、提升柳枝稷在逆境下尤其是对重金属镉胁迫的耐性提供理论基础。

关键词: 柳枝稷; *BiP*; 表达分析; 胁迫; 酵母转化

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)04-0889-11

Identification, expression analysis and function in adverse environment of *BiP* in switchgrass

SONG Gang^{1,2}, FANG Zhi-gang³, WANG Yu-long², CAI Qing-sheng²

(1. College of Tea and Food Science and Technology, Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844006, China)

Abstract: Adverse environmental conditions have detrimental impact on plant growth and development, and can cause protein denaturation or misfolding. As one of molecular chaperones, the binding protein (BiP) plays an important protective effect by alleviating endoplasmic reticulum (ER) stress induced by misfolded proteins. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) is a kind of perennial C4 plant of grass family originated from North America, it has been studied and utilized as one of the energy crops in recent years due to the characteristics of high biomass yield and strong adaptability. To identify *BiP* genes of switchgrass

and their expression and function in adverse environment, local BLAST of switchgrass genomic data was carried out, combined with screening conditions with characteristics of *BiP* conserved domain and ER retention signal sequence HDEL, four *BiP* genes named *PvBiP1a*, *PvBiP1b*, *PvBiP2* and *PvBiP3* were identified from the genome of switchgrass, which located on chromosome 1 and 5, respectively. Results

收稿日期:2021-12-16

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31372359);江苏省教育厅面上项目(19KB180015)

作者简介:宋 刚(1978-),男,江苏盐城人,博士,副教授,主要从事植物环境生理和快繁技术的研究。(E-mail) songgang@jsafe.edu.cn

通讯作者:蔡庆生,(Tel)025-84395187;(E-mail) qscal@njau.edu.cn

of multi-species sequence analysis and evolutionary analysis showed that, PvBiPs had the typical functional domain of BiP, PvBiP1a and PvBiP1b clustered into a clade, and clustered into a category with rice OsBiP1, both PvBiP1a and PvBiP1b contained seven introns. PvBiP2 and PvBiP3 clustered into another clade, and neither of them had intron. Analysis results of upstream 2 kb promoter sequences showed that, the *PvBiPs* mainly consisted of cis-elements of stress defense and hormone response. Expressions of *PvBiPs* were induced by ER stress inducer dithiothreitol and were up-regulated under NaCl, polyethylene glycol, ABA and CdCl₂ stresses. Among them, *PvBiP2* had the highest peak value of relative expression level. *PvBiP1a*, *PvBiP2* and *PvBiP3* were then cloned into pGAD426 vector and the vector was used to transform yeast to verify the tolerance under CdCl₂, NaCl and mannitol stresses. The results showed that, *PvBiPs* were tolerant to Cd stress and salt stress, but were not tolerant to mannitol stress. The results of this study can provide theoretical base for further exploring of the function of *BiP* gene in switchgrass and improvement of tolerance to adverse situation (especially under Cd stress) of switchgrass.

Key words: switchgrass; *BiP*; expression analysis; stress; yeast transformation

内质网(Endoplasmic reticulum, ER)是所有真核生物细胞中蛋白质的分泌场所,其介导了蛋白质合成、折叠和组装,负责调节新生蛋白质的质量^[1]。在 ER 腔体空间内,由驻留的分子伴侣蛋白执行这些任务和功能,如属于热激蛋白 70 家族(Hsp70)的免疫重链结合蛋白(BiP)。为了维持 ER 功能的精确性,细胞演化出一种蛋白质监控信号通路——未折叠蛋白应答途径(UPR)^[2-4]。ER 系统在遭受外来胁迫(如高温、干旱、盐害等)时,细胞内会积累大量未折叠蛋白或错误折叠蛋白,发生 ER 胁迫,此时细胞会启动 UPR^[5]。为恢复体内蛋白质合成的平衡,植物细胞需要通过上调编码内质网分子伴侣和折叠酶的基因来重建蛋白质折叠能力和需求之间的平衡,*BiP* 即为这些基因之一^[6]。类似 Hsp70 家族中其他同源蛋白,*BiP* 具有 2 个保守结构域: N 端相对分子质量大约 44 000 的 ATP 结合结构域(ABD), C 端相对分子质量大约 16 000 的多肽结合结构域(PBD)。PBD 结构域负责与未折叠蛋白质底物结合,并受与 ABD 结构域结合的核苷酸调控^[7]。*BiP* 还包括一个 C 端 ER 驻留信号(ER retention signals),功能是使蛋白质留在 ER 内腔,在植物中其氨基酸序列通常是“HDEL”,在哺乳动物中是“KDEL”^[8]。*BiP* 在酵母和哺乳动物中是单个存在的,但在高等植物中是小且高度保守的基因家族并且分散在基因组内,如大豆中含 2 个^[9],拟南芥^[10]、小麦^[11]和辣椒^[12]中都含有 3 个,烟草^[13]和水稻^[14]中则均含有 6 个。研究表明,过表达 *BiP* 能增强植物对环境胁迫的耐受性。大豆 *BiP* 在烟草^[15]和大豆^[16]中的过表达,通过防止内源性氧化应激,赋予转基因植物抗旱性。过表达辣椒 *CaBiP1* 的拟南芥转基因植株自身降低了活性氧积累量,增加了

保水性,刺激 UPR 通路和相关应激基因的表达,提高了对多个环境胁迫的耐受性,包括热、渗透、盐和干旱^[17]。此外,枸杞 *LcBiP* 在烟草中过表达提升了烟草对重金属 Cd 的耐受性^[18]。

柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)为原产于北美的多年生暖季 C4 型禾本科植物,根系发达,抗旱能力强,产量高,适合在边际土地中生长^[19-20]。由于低成本和高生物量,尤其纤维素含量高,使其成为理想的生物质能源植物^[21]。研究指出,在重金属污染尤其是 Cd 污染土地上种植柳枝稷为代表的能源植物可实现生物质资源开发与污染土地利用的双赢^[22],因此提升柳枝稷对重金属 Cd 的耐受性就显得尤为重要。植物 *BiP* 基因在细胞中响应 UPR,逆境条件下表现出多样化功能,可作为柳枝稷提升耐性的候选基因,但关于柳枝稷 *BiP* 基因的研究还未见报道。本研究对柳枝稷 *BiP* 基因进行鉴定,分析非生物胁迫下 *BiP* 基因的表达模式和功能,为柳枝稷分子改良,提升其对重金属尤其 Cd 的耐受性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和试验处理

选取大小一致、均匀饱满的柳枝稷品种 Alamo 种子在 50% 的硫酸中浸泡(摇床振荡)20 min,用去离子水冲洗干净,再用 70% 乙醇溶液浸泡 30 min,用去离子水冲洗干净,播种于盛有去离子水的培养盒水面的塑料滤网上发芽,培养温度为(25±2)℃,相对湿度 70%,光照每天 12 h。待柳枝稷发芽生长至 3 张幼叶时,将大小一致的健壮幼苗转移至塑料烧杯中水培,培养条件设置为:温度 30℃(日)/20℃(夜),光周期 14 h(日)/10 h(夜)。培养过程中每隔 1 d 调整烧杯的位置,降低边缘效应^[23]。

待植株生长至 5 张全展叶时用 0.1 mmol/L 脱落酸 (ABA) 和 15.0 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 喷施处理,以正常生长植株为对照,在喷施处理后 0 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 分别采集叶片为样品。对幼苗分别用 200 mmol/L NaCl、200 g/L 聚乙二醇 (PEG)、50 μ mol/L CdCl₂ 水溶液培养,进行盐胁迫、干旱渗透胁迫和重金属 Cd 胁迫处理,处理后在 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 6 个时间点进行全株采样^[24]。样品经液氮速冻后存放于 -80 °C 用于 RNA 提取。本试验每个处理设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复。

1.2 试验试剂、菌株和载体

实时荧光定量 PCR 试剂盒 Roche SYBR GREEN Master (ROX) 购自罗氏 (Roche) 公司, T4 连接酶、限制性内切酶购自 NEB 公司, 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自原平皓 (天津) 生物技术有限公司, 植物 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 OMEGA 公司, 其他化学试剂与耗材统一购自南京寿德实验器材有限公司。

大肠杆菌菌株 DH5 α 、酵母菌株 YCF1、G19、HOG1 以及入门载体 pEND-linker 和酵母表达载体 pGAD426 均由南京农业大学草业学院草坪生理生化实验室馈赠。

1.3 生物信息学分析

柳枝稷参考基因组数据下载自植物基因组网站 Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>, *Panicum Virgatum*_516_V5.1), 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索 BiP 蛋白并下载序列, 将下载序列与柳枝稷蛋白质序列进行本地 BLAST 比对。比对上的序列通过 CDD (Conserved Domain Database) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 检索是否具有 GPR78/BiP/KAR2 保守结构域 (KOG 数据库编号 KOG0100)^[25], 如有则为 BiP 候选序列。再检查候选序列 C 端是否含有 ER 驻留信号序列“HDEL”以确定 BiP。使用在线工具 PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测分析 BiP 蛋白质编码氨基酸序列大小、相对分子质量、等电点和氨基酸残基的疏水性。用 WOLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 预测蛋白质亚细胞定位, 用 SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质信号肽位点。

多序列比对采用 MEGA 7.0 完成, 通过 MEGA 7.0 构建多物种系统发育树 (Neighbor-joining method, *bootstrap* = 1 000)。使用 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 网站鉴定 PvBiPs 的保守基序 (motif), motif 的最大数目设定为 10 个, motif 长度为 6~100 个氨基酸, 其他参数默认设置。从柳枝稷基因组注释文件中提取出 *BiP* 基因的注释信息, 导入 Gene Structure Display Server (GS-DS) 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析基因的外显子-内含子结构。提取 *PvBiPs* 上游 2 kb 启动子序列, 使用 PlantCARE v1.0 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库进行顺式作用元件分析。

1.4 植物基因组 DNA 和总 RNA 提取、cDNA 合成与实时荧光定量 PCR

取柳枝稷新鲜植物组织 0.1 g, 用植物基因组 DNA 提取试剂盒 [原平皓 (天津) 生物技术有限公司产品] 提取 gDNA。取柳枝稷幼苗全株样 100 mg 并用液氮速冻, 使用 OMEGA E.Z.N.A.[®] plant RNA Kit 提取植物总 RNA。以 2 μ g 总 RNA 为模板, 使用 RNA 反转录试剂盒反转录合成 cDNA。

利用在线引物设计工具 (<http://www.genscript.com/tools.html#biology>) 设计扩增引物, 引物序列见表 1, 内参基因使用 *PvFTSH4*^[26], 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。qRT-PCR 反应体系: 2 \times SYBR Green I Master 10.0 μ l、cDNA 2.5 μ l、Genen specific primers (F/R) 2.5 μ l, 添加 ddH₂O 至 20.0 μ l。反应程序: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 荧光信号检测, 40 个循环。试验在 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上进行, 每个处理设置 3 次独立生物学重复和 2 次技术重复取样, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.5 柳枝稷 *PvBiP* 基因克隆、酵母异源表达与抗性分析

根据 *PvBiP* 基因编码序列 (Coding sequence, CDS), 设计合成引物 (表 1), 以 gDNA 为模板, 通过 Q5 高保真 DNA 聚合酶扩增获得目的基因片段, PCR 反应体系为: Q5 Reaction buffer 10.0 μ l、Q5 GC Enhancer 10.0 μ l、dNTPMix 4.0 μ l、Template gDNA 4.0 μ l、F + R (2.5 μ l + 2.5 μ l)、Q5 high-fidelity DNA polymerase 0.5 μ l, 添加 ddH₂O 至 50.0 μ l。反

应程序为: 98 ℃ 预变性 3 min; 98 ℃ 变性 30 s, 63 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min, 10 ℃, 10 min。用 E.Z.N.A Gel Extraction Kit-Spin 试剂盒回收产物。将双酶切后的入门载体 pEND-linker 与 *PvBiP* 目的基因片段连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 挑取阳性克隆进行 PCR 检测。选取与目标条带大小一致的菌液提取质粒, 送南京擎科生物科技有限公司测序。

提取测序结果正确的阳性克隆质粒, 用限制性内切酶 *Pvu* I 进行线性化处理。将目的片段与表达载体 pGAD426 进行 LR 重组反应, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 挑取阳性克隆, 根据载体大小和通过

PCR 检测的情况, 确定重组反应得到正确的表达载体并提取阳性克隆质粒。制备盐敏感酵母菌株 G19、Cd 敏感酵母菌株 YCF1 和早敏感酵母菌株 Δ HOG1 感受态细胞并加入表达载体 pGAD426-*PvBiP* 质粒和 pGAD426-*GUS* 对照质粒进行酵母转化。将转化后的含 *PvBiP1a*、*PvBiP2* 和 *PvBiP3* 的酵母菌株单一克隆在液体培养基中培养至平台期 ($OD_{600} = 1$), 然后使用无菌水将菌液按 10 倍、100 倍和 1 000 倍梯度稀释, 分别取 5 μ l 菌液按浓度依次点在对照和处理平板上培养, 胁迫处理分别使用 300 mmol/L NaCl、0.5 mol/L 甘露醇和 100 μ mol/L CdCl₂。5~6 d 后观察酵母表型并采集照片。

表 1 本试验所用引物序列

Table 1 Primer sequences for experiment

类别	基因 ID	引物序列(5'→3')
内参基因	<i>PvFTSH4</i> _qpcr	F: TGGATGGCTTTAAGCAGAATGA R: CAAAACGCCAGGTCTGACT
<i>PvBiPs</i> 非生物胁迫表达量检测	<i>PvBiP1a</i> _qpcr	F: TGGAAAGCTGAGGAGGGAAG R: GTTGTTTCAGCTCCTCGAACC
	<i>PvBiP1b</i> _qpcr	F: ACAACGGTGTGTTTGAGGTG R: CCCTCCTCAGCTTTCCAAGA
	<i>PvBiP2</i> _qpcr	F: AAGATCACCATCACCAGCGA R: CGTACGTCTCCAGCTTGTTG
	<i>PvBiP3</i> _qpcr	F: ACGTCTACCAGGTCAAGAGC R: TCCTTGTGTCAGCATCCGAGTT
<i>PvBiP</i> 基因克隆	<i>PvBiP2</i> _CDS	F: ATGGCGATGCTGGCTCGCG R: AAGCTCATCATGATCATCCTC
	<i>PvBiP3</i> _CDS	F: ATGGCGCTGCTAGCTCGCGTGT R: AAGCTCATCATGATCATCCTCTTCTT
	<i>PvBiP1a</i> _CDS	F: ATGGATCGGGTTCGCGGATCCG R: CAGCTCATCATGGTCGTCATCAAC

2 结果与分析

2.1 柳枝稷 *PvBiP* 基因的鉴定

在 NCBI 网站共检索并下载到 23 个不同物种(烟草、拟南芥、水稻、玉米、大豆、石榴等)中报道的 BiP 蛋白序列, 与柳枝稷参考基因组数据进行本地 BLAST 比对, 候选序列有多个转录本的取 1 号转录本, 再经“KOG0100”结构域和“HDEL”2 个筛选条件, 共筛选出 4 个 *BiP* 基因, 分别位于柳枝稷基因组

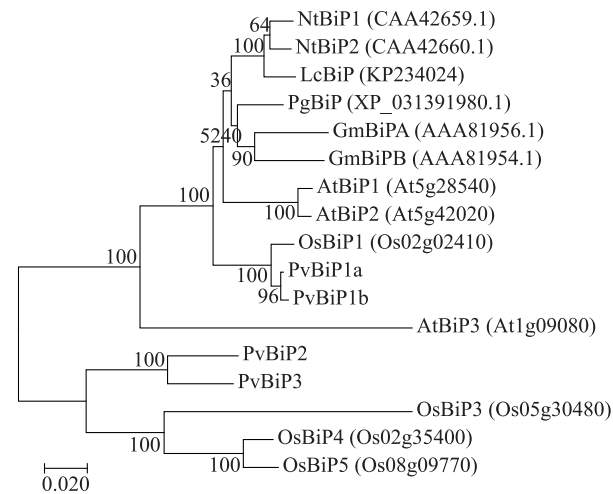
chr01K、chr01N、chr05K、chr05N 染色体上, 蛋白质理化信息及亚细胞定位预测信息见表 2。由于 Pavir.1KG020800.1 和 Pavir.1NG010600.1 的蛋白质序列、理化参数完全一致, CDS 也只有微小差异, 因此将它们分别命名为 *PvBiP1a* 和 *PvBiP1b*, 分别把 Pavir.5KG300400.1 与 Pavir.5NG387200.2 命名为 *PvBiP2* 和 *PvBiP3*。亚细胞定位预测结果显示, 4 个基因均定位在 ER, 所含信号肽(Signal peptide, SP)分别由 23 个、25 个、23 个和 27 个氨基酸残基组成。

表 2 柳枝稷 *BiP* 基因特征和亚细胞定位信息Table 2 Characteristics and subcellular localization information of *BiP* genes identified in switchgrass

基因组 ID	基因名称	染色体定位 (5'→3')	蛋白质				信号肽氨基酸残基数 (个)
			长度 (aa)	相对分子质量	等电点 (PI)	疏水性	
Pavir.1KG020800.1	<i>PvBiP1a</i>	Ch1K;2101289~2105333	665	73 400	5.11	-0.485	23
Pavir.1NG010600.1	<i>PvBiP1b</i>	Ch1N;1172132~1176358	665	73 400	5.11	-0.485	25
Pavir.5KG300400.1	<i>PvBiP2</i>	Ch5K;54167853~54170070	665	73 080	5.18	-0.397	23
Pavir.5NG387200.2	<i>PvBiP3</i>	Ch5N;54033788~54035621	667	73 150	5.05	-0.377	27

2.2 柳枝稷 *PvBiP* 基因的生物信息学分析

使用水稻^[14]、拟南芥^[10]、枸杞^[18]、大豆^[9]、石榴^[14]、烟草^[14]等 *BiPs* 与 *PvBiPs* 蛋白构建系统发育进化树(图 1)。进化树显示, *PvBiP1a* 和 *PvBiP1b* 聚为一个分支,这与 2 个基因编码相同的氨基酸序列相吻合。另外,它们与水稻 *OsBiP1* 的进化关系最近。*PvBiP2*、*PvBiP3* 与水稻 *OsBiP3*、*OsBiP4*、*OsBiP5* 的遗传距离较近。



bootstrap = 1 000, 括号内为 GenBank 登录号。

图 1 Neighbor-joining 法构建的柳枝稷与不同植物 *BiP* 同源蛋白质的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *BiP* homologous proteins between different plant species and switchgrass by neighbor-joining method

多物种同源序列比对结果(图 2)显示,4 个 *PvBiPs* 与 7 个同源 *BiPs* 的保守结构域 domain1~domain5 以及 5 个高度保守氨基酸残基组成上高度一致, domain 6 (HDEL)组成全部一致。motif 分析发现,在 4 个 *PvBiPs* 中 10 个 motif 的分布完全相同(图 3a), domain1 序列“TVIGIDLGTYSYSC”是 Hsp70 家族成员中普遍存在的高

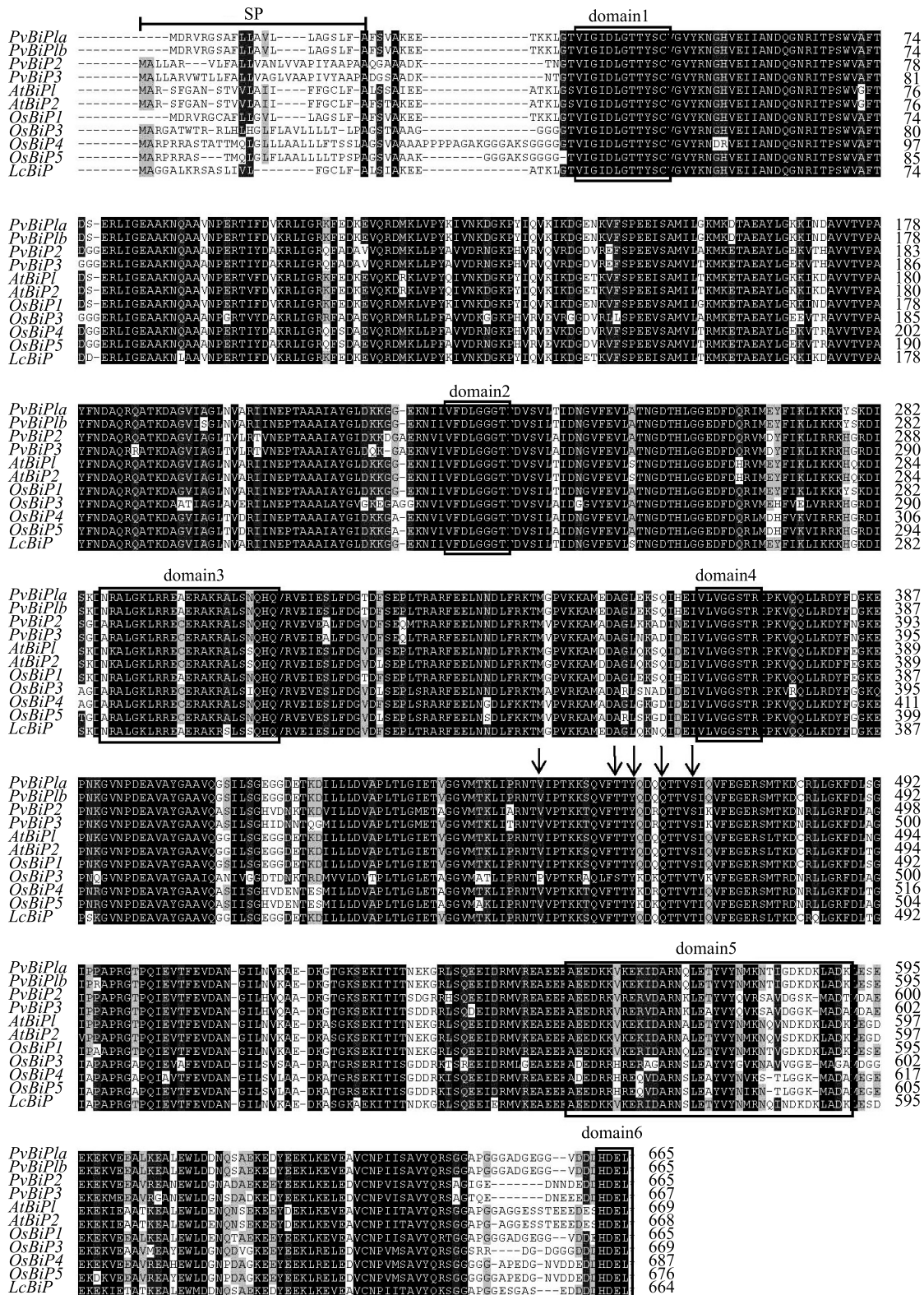
度保守序列^[27],位于 motif 2 N 端,为 β -磷酸化结合功能区。Domain 2 序列对应 motif 4 N 端,为 γ -磷酸化结合功能区, domain 3(腺苷酸结合功能区)位于 motif 3 N 端, domain 4(钙调素蛋白结合功能区)位于 motif 5 N 端^[25]。C 端 5 个高度保守的氨基酸残基,能促进与多肽底物氢键的结合^[5-6],还有重要的 α 或 β 多肽底物结合基序 domain 5(位于 motif 7 和 motif 9),能确保初始多肽底物不从结合位置脱落释放^[11]。综上, *PvBiPs* 具有 *BiP* 结构域且高度保守。

基因结构(图 3b)显示, *PvBiP1a*、*PvBiP1b* 具有 7 个内含子, *PvBiP2*、*PvBiP3* 没有内含子。 *PvBiPs* 上游 2 kb 启动子序列分析结果(表 3)显示,它主要包括响应非生物胁迫相关和激素应答 2 类顺式作用元件,这些元件包括:响应低温胁迫的 LTR 元件、响应干旱胁迫的 MBS 元件、与机械损伤有关的 WUN-motif 元件、植物响应胁迫和防御的 TC-rich repeats 元件、响应脱落酸作用的 ABRE 元件、参与厌氧诱导调节的 ARE 元件、与缺氧特异性诱导有关的增强因子 GC-motif 元件、响应生长素的 TGA-element 元件、参与水杨酸反应的 TCA-element 元件、参与赤霉素响应调节的 TATC-box 元件、参与生长素响应调节的 AuxRR-core 元件、参与茉莉酸甲酯响应调节的 CGTCA-motif 元件和 TGACG-motif 元件。

2.3 非生物胁迫对柳枝稷 *BiP* 基因表达的影响

二硫苏糖醇(DTT)是一种内质网诱导剂,能引起被处理对象发生内质网胁迫而激发 UPR^[28]。通过 qPCR 检测柳枝稷幼苗经 15 mmol/L DTT 喷施处理后 0~24 h *PvBiPs* 的相对表达量,结果(图 4)表明, *PvBiPs* 相对表达量总体呈现先下降后上升然后又下降的趋势,到 24 h 时降至接近 0 h 的水平。各基因对 DTT 的响应存在差异, *PvBiP1a* 与 *PvBiP1b* 的相对表达量峰值出现在 12 h, *PvBiP2*、*PvBiP3* 的

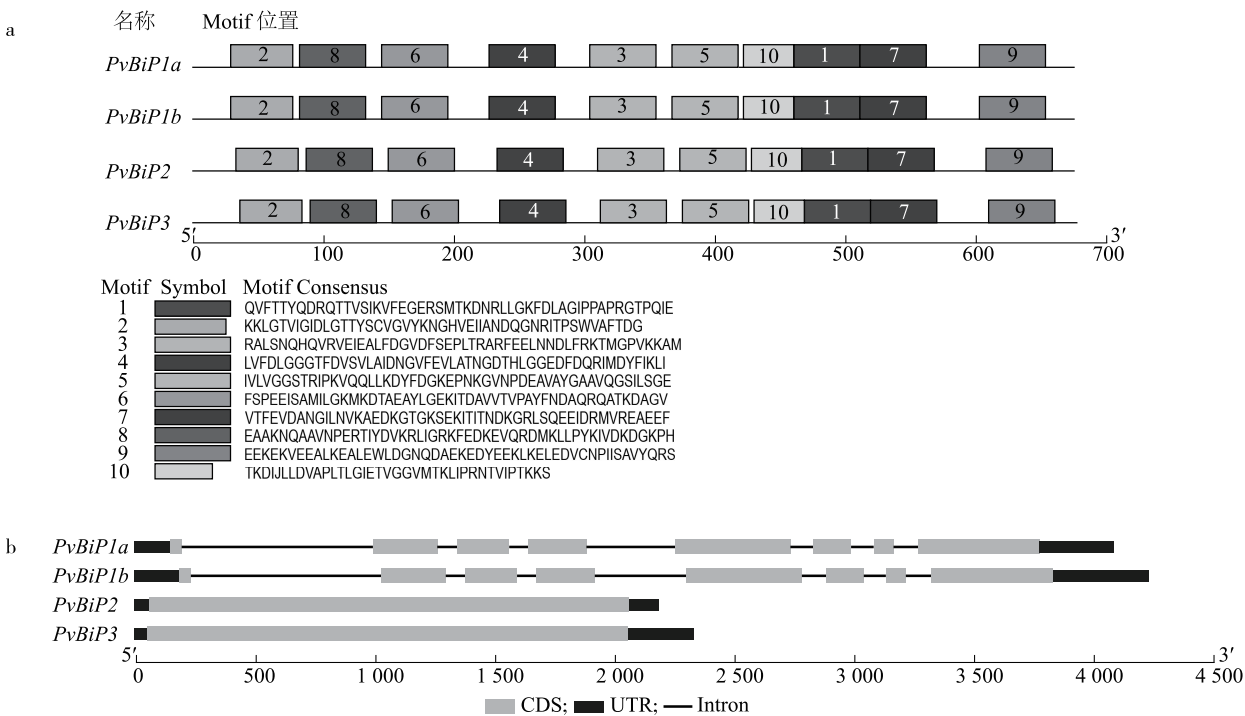
相对表达量在 3 h 达到峰值,且与 *PvBiP1a*、*PvBiP1b* 的相对表达量相比更高,最高的是 *PvBiP2*。



方框表示所对应 domain 的氨基酸序列范围,箭头所指为高度保守氨基酸残基。

图 2 柳枝稷 BiP 与拟南芥、水稻和枸杞中同源蛋白多序列比对

Fig.2 Multiple alignment of the BiP of switchgrass with BiP homologous proteins of *Arabidopsis*, rice and *Lycium chinense*



CDS: 编码序列; UTR: 非翻译区; Intron: 内含子。

图3 柳枝稷 *BiP* 基因保守基序分布 (a) 和基因结构 (b)

Fig.3 Distribution of conserved motifs (a) and gene structure (b) of *BiPs* in switchgrass

表3 柳枝稷 *BiP* 基因启动子区胁迫和激素相关顺式作用元件

Table 3 Stress and hormone related cis-acting elements in the promoter region of *BiP* genes of switchgrass

基因名称	ARE	TC-rich repeats	LTR	MBS	GC-motif	WUN-motif	TCA-element	TGA-element	TATC-box	AuxRR-core	ABRE	CGTCA-motif	TGACG-motif
<i>PvBiP1a</i>	2	0	0	2	0	0	1	3	0	0	6	0	6
<i>PvBiP1b</i>	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	4	0	4
<i>PvBiP2</i>	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	8	3	3
<i>PvBiP3</i>	2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	3	6	8

LTR: 低温胁迫响应元件; MBS: 干旱胁迫响应元件; WUN-motif: 机械损伤响应元件; TC-rich repeats: 胁迫和防御响应元件; ABRE: 脱落酸作用响应元件; ARE: 参与厌氧诱导调节元件; GC-motif: 缺氧特异性诱导增强因子元件; TGA-element: 生长素响应元件; TCA-element: 水杨酸反应元件; TATC-box: 赤霉素响应调节元件; AuxRR-core: 生长素响应调节元件; CGTCA-motif/TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应调节元件。

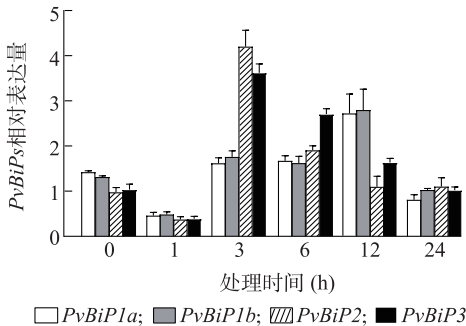


图4 二硫苏糖醇 (DTT) 诱导内质网胁迫下柳枝稷 *BiP* 基因的表达

Fig.4 Expression of *BiPs* in switchgrass under endoplasmic reticulum stress induced by dithiothreitol (DTT)

用 NaCl、PEG、ABA 和 CdCl₂ 处理柳枝稷幼苗 24 h, 不同时间点 *PvBiPs* 相对表达量的变化如图 5 所示。总体上 *PvBiPs* 的相对表达量是先上调后下降的趋势。NaCl 胁迫下, 各基因相对表达量峰值基本出现在 12 h。PEG 渗透胁迫下, *PvBiP1a* 相对表达量峰值出现在 6 h, 比 0 h 处理上调 6.2 倍, *PvBiP1b* 相对表达量上调 5.6 倍; *PvBiP2* 相对表达量峰值表现在 3 h, 上调 4.0 倍, *PvBiP3* 相对表达量峰值在 12 h, 上调 4.7 倍。ABA 处理下, *PvBiP2* 相对表达量的峰值在 12 h, 上调 9.0 倍, 明显高于其他基因。CdCl₂ 处理下, *PvBiP2* 相对表达量峰值仍然出现在处理 12 h, 上调 9.0 倍, *PvBiP3* 相对表达量的峰值在 6 h, 达到 8.0 倍。

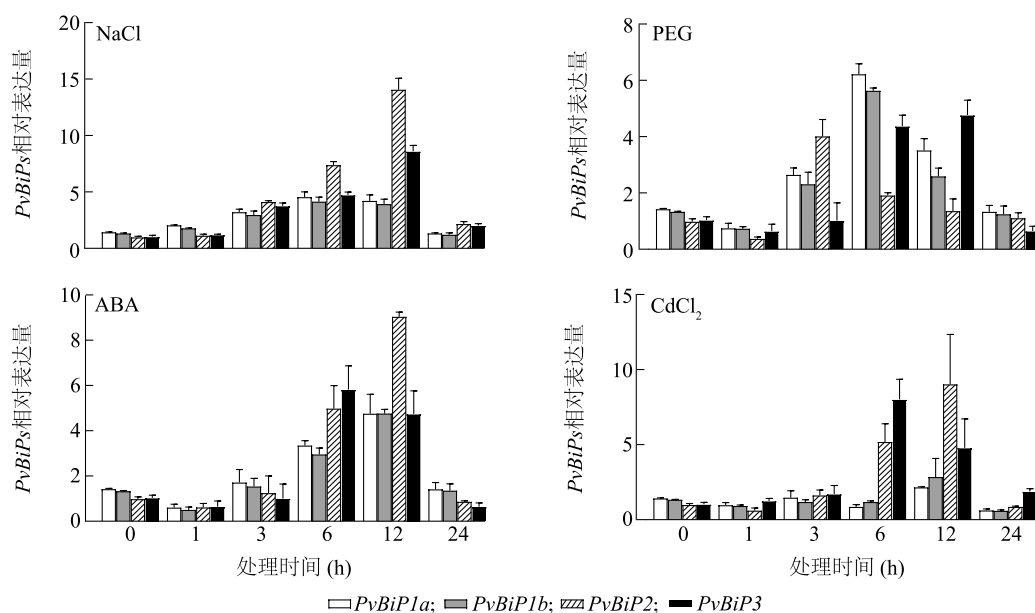


图5 NaCl、ABA、PEG 和 CdCl₂胁迫处理下柳枝稷 *BiP* 基因的表达

Fig.5 Expression of *BiPs* in switchgrass under NaCl stress, ABA stress, PEG stress and CdCl₂ stress treatments

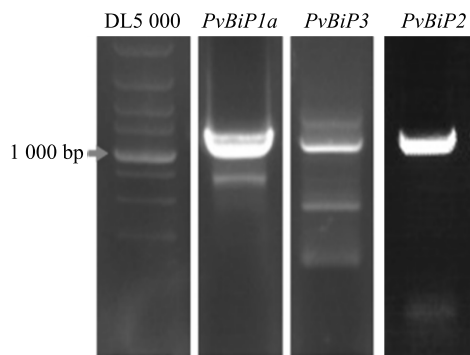
2.4 柳枝稷 *BiP* 基因克隆与酵母功能验证

通过 PCR 扩增得到 *PvBiP1a*、*PvBiP2* 和 *PvBiP3* 全长,扩增产物见图 6。

将扩增的 *PvBiP1* (实际按 *PvBiP1a* 扩增)、*PvBiP2* 和 *PvBiP3* 产物经同源重组分别连接到 pGAD426 酵母表达载体上,转化酵母菌株。在 100 μmol/L CdCl₂ SD/-Ura 选择培养基平板上,与对照 pGAD426-*GUS* 菌株比较, *PvBiP1a*、*PvBiP2* 和 *PvBiP3* 过表达酵母菌株的生长显著增强(图 7a), 呈现出一定的耐 Cd 表型。在 300 mmol/L NaCl SD/-Ura-His 平板上,3 个基因相比于对照盐胁迫表现出明显耐性,尤其 *PvBiP1a* 和 *PvBiP2* 的耐盐表型更明显(图 7b)。而 0.5 mol/L 甘露醇胁迫处理表型与对照间没有明显差异(图 7c),说明柳枝稷 *BiP* 基因可能对甘露醇模拟干旱胁迫响应敏感。上述结果表明,酵母过表达 *PvBiPs* 后具有耐盐和耐 Cd 胁迫的能力,但对渗透干旱胁迫较敏感,与对照表型基本一致。

3 讨论

四倍体柳枝稷具有 2 套亚基因组 K 和 N,据推测它们来自 1.00×10⁶ 年前同源四倍体化事件的 2 个近亲祖先^[29-30]。本研究在柳枝稷基因组中共鉴定了 4 个 *BiP* 基因,分布在 chr01K、chr01N 和 chr05K、

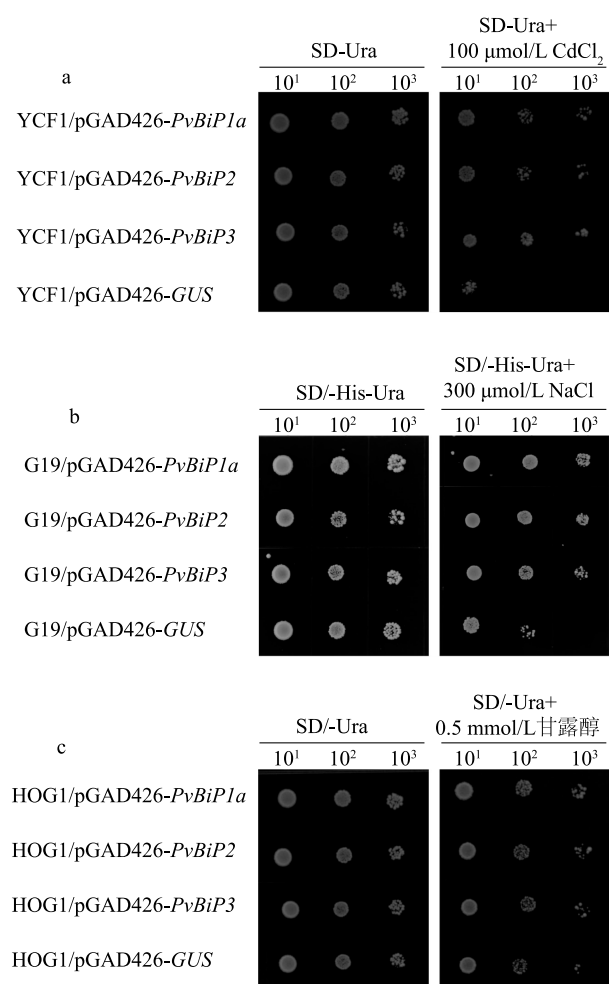


M: DL5 000 DNA Marker。

图6 PCR 扩增的 *PvBiP1*、*PvBiP2*、*PvBiP3* 基因的产物条带

Fig.6 Amplified product strips of *PvBiP1*, *PvBiP2* and *PvBiP3* genes amplified by PCR

chr05N 2 对同源染色体上。序列比对结果表明,它们彼此相似度很高,尤其 *PvBiP1a* 和 *PvBiP1b* 编码的氨基酸序列完全一致,可能是基因复制形成。柳枝稷 *BiPs* 和其他物种 *BiP* 序列高度相似,体现在具有相同保守结构域,如 domain 4 是钙调素结合基序,能与 Ca²⁺ 结合蛋白质起作用,调节 N 端 ATP 酶活性^[11],使 ATP 水解产能驱动 *BiP* 在新生蛋白质组装过程中结合未折叠或错误折叠的多肽底物^[31]。另一必需腺苷结合功能域 domain 3 (motif 3 N 端)和 C 端 5 个氢键结合氨基酸位点 (V-T-Y-Q-S) 则高度一致。基因内含子结构有 3 种模式:无内含子、1 个



a: CdCl_2 胁迫; b: NaCl 胁迫; c: 甘露醇胁迫。YCF1/pGAD426-*GUS* 为空白对照 Cd 敏感酵母菌株, G19/pGAD426-*GUS* 为空白对照盐敏感酵母菌株, ΔHOG1 /pGAD426-*GUS* 为空白对照干旱敏感酵母菌株, 其余为相应处理转基因酵母菌株。

图7 柳枝稷 *BiP* 基因在非生物胁迫下的酵母功能验证

Fig.7 Yeast function verification of *BiPs* in switchgrass under abiotic stresses

内含子、超过1个内含子^[32], 研究结果证明, 内含子通过外显子重组驱动进化^[33], 对于含多个内含子的基因, 通过可变剪接实现单个基因的多个蛋白质翻译, 对基因功能具有重要影响^[34-35]。如辣椒 *CaBiP1*、*CaBiP2* 有7个内含子, *CaBiP3* 有6个内含子, *CaBiP3* 的整体表达水平远远低于 *CaBiP1*、*CaBiP2*, 在盐 and 高温胁迫下, *CaBiP3* 受诱导, 表达量显著高于 *CaBiP1*、*CaBiP2*^[17]。柳枝稷 *PvBiP1a*、*PvBiP1b* 内含子为7个, *PvBiP2*、*PvBiP3* 无内含子, 暗示它们可能存在功能分化上的差别。

研究结果表明, 植物 *BiPs* 表达受组织特异性和

生长发育调节^[17,25,36]。分析数据库 (<https://switchgrassgenomics.noble.org>) 中柳枝稷 RNA-seq 表达量数据发现, *PvBiP2* 在授粉后形成种子阶段的表达量要明显高于其他组织或发育阶段, 这与小麦 *TaBiP* 在种子中高表达、在茎叶器官中低表达^[11] 的结果相近, *PvBiP2* 可能在种子发育过程中扮演重要的调控角色。基因启动子分析发现, *PvBiPs* 中普遍存在响应干旱胁迫的作用元件 MBS、脱落酸作用反应元件 ABRE、茉莉酸甲酯作用元件 TGACG-motif, 低温响应元件 LTR、机械损伤响应元件 wun-motif 只在 *PvBiP2*、*PvBiP3* 中检测到, 顺式作用元件的差异预示 *PvBiPs* 面对非生物胁迫时会有不同响应。在 DTT 与 NaCl 、PEG、ABA、 CdCl_2 处理下, *PvBiP* 基因均表现为随胁迫时间先上调表达后逐渐下降至本底表达水平的变化趋势。*PvBiP1a* 和 *PvBiP1b* 由于蛋白质序列完全一致, 其相对表达量变化趋势和峰值大小也基本一致。尽管 *PvBiP2* 与 *PvBiP3* 的变化趋势类似, 但峰值大小存在差异。*PvBiP2* 在 DTT、 NaCl 、ABA 和 CdCl_2 胁迫处理下表达峰值都是最高的, *PvBiP1a* 和 *PvBiP1b* 仅在 PEG 渗透胁迫下表现出高于 *PvBiP2*、*PvBiP3* 的上调表达量。非生物胁迫下 *BiP* 基因表达量的差异, 涉及胁迫信号传导复杂的调节网络, 反映了转录水平和蛋白质合成水平的不同。由于 *BiP* 不仅能体现响应 UPR 的分子伴侣活性, 还可以作为内质网胁迫调节因子起到调节作用^[37-38], 所以上调表达最高的 *PvBiP2* 可能是 *BiPs* 中主要的胁迫调节因子。进一步在酵母中异源过表达3个 *PvBiP* 基因 (*PvBiP1a* 与 *PvBiP1b* 编码的蛋白质序列一致, 只研究 *PvBiP1a*), 结果显示, *PvBiP* 基因有耐 Cd 和耐盐表型, 对渗透胁迫敏感。在 *PvBiP* 基因中, *PvBiP2* 在 CdCl_2 胁迫下 (1~12 h) 持续上调表达, 表达量也最高, 其耐镉调控作用值得进一步研究。

4 结论

本研究在柳枝稷基因组中共鉴定了4个定位于内质网的 *BiP* 基因, 命名为 *PvBiP1a*、*PvBiP1b*、*PvBiP2*、*PvBiP3*, 分别位于柳枝稷的1号和5号染色体上。多物种序列比对和进化分析结果表明, *PvBiPs* 具有 *BiP* 蛋白典型功能结构域, *PvBiPs* 启动子序列主要包括胁迫防御和激素应答顺式作用元件。*PvBiPs* 受 DTT 诱导表达, 在 NaCl 、PEG、ABA 和

CdCl₂胁迫下都上调表达,其中 *PvBiP2* 的相对表达量峰值较高。酵母异源转化耐逆功能验证结果显示, *PvBiPs* 对镉和盐胁迫有耐性表型,对甘露醇渗透胁迫较敏感。 *PvBiP2* 可作为镉胁迫响应基因进行深入研究。

参考文献:

- [1] WOEHLBIER U, HETZ C. Modulating stress responses by the UPORosome: a matter of life and death [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2011, 36(6): 329-337.
- [2] SHORE G C, PAPA F R, OAKES S A. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2011, 23(2): 143-149.
- [3] MERKSAMER P I, PAPA F R. The UPR and cell fate at a glance [J]. Journal of Cell Science, 2010, 123(2): 1003-1006.
- [4] BUCHBERGER A, BUKAU B, SOMMER T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms [J]. Molecular Cell, 2010, 40(2): 238-252.
- [5] RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(7): 519-529.
- [6] WAN S, JIANG L W. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants [J]. Protoplasma, 2016, 253(3): 753-764.
- [7] MUENCH D G, WU Y, ZHANG Y, et al. Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue [J]. Plant & Cell Physiology, 1997, 38(4): 404-412.
- [8] FORWARD B S, MISRA S. Characterization and expression of the Douglas-fir luminal binding protein (PmBiP) [J]. Planta, 2000, 212(1): 41-51.
- [9] ZHANG L, ZHAO H K, DONG Q L, et al. Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 773.
- [10] NOH S, KWON C, OH D, et al. Expression of an evolutionarily distinct novel *BiP* gene during the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana* [J]. Gene, 2003, 311(1): 81-91.
- [11] ZHU J T, HAO P C, CHEN G X, et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis, and expression profiling of endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP genes from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 260.
- [12] GUO M, LIU J H, MA X, et al. Genome-wide analysis of the Hsp70 family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional identification of CaHsp70-2 involvement in heat stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 252: 246-256.
- [13] DENECKE J, GOLDMAN M H S, DEMOLDER J, et al. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family [J]. Plant Cell, 1991, 3(9): 1025-1035.
- [14] SARKAR N K, KUNDNANI P, GROVER A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*) [J]. Cell Stress & Chaperones, 2013, 18(4): 427-437.
- [15] ALVIM F C, CAROLINO S M B, JÚLIO CM, et al. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress [J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 1042-1054.
- [16] VALENTE M A S, FARIA J A Q A, SOARES-RAMOS J R L, et al. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(2): 533-546.
- [17] WANG H, NIU H H, ZHAI Y F, et al. Characterization of BiP genes from pepper (*Capsicum annuum* L.) and the role of CaBiP1 in response to endoplasmic reticulum and multiple abiotic stresses [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1122-1136.
- [18] GUAN C, JIN C, JI J, et al. *LcBiP*, a endoplasmic reticulum chaperone binding protein gene from *Lycium chinense*, confers cadmium tolerance in transgenic tobacco [J]. Biotechnology Progress, 2015, 31: 358-368.
- [19] PIMENTEL D, PATZEK T W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower [J]. Natural Resources Research, 2005, 14(1): 256-261.
- [20] TORREZ V C, JOHNSON P J, BOE A. Infestation rates and tiller morphology effects by the switchgrass moth on six cultivars of switchgrass [J]. Bioenergy Research, 2013, 6(2): 808-812.
- [21] SANDERSON M A, ADLER P R, BOATENG A A, et al. Switchgrass as a biofuels feedstock in the USA [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2006, 86(5): 1315-1325.
- [22] PANDEY V C, BAJPAI O, SINGH N. Energy crops in sustainable phytoremediation [J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2016, 54: 58-73.
- [23] LIU C, LOU L, DENG J, et al. Morph-physiological responses of two switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars to cadmium stress [J]. Grassland Science, 2016, 62(2): 92-101.
- [24] 汪 虎. 辣椒 *BiP* 家族基因特性分析及 *CaBiP1* 在非生物胁迫中的功能鉴定 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [25] GUIMARÃES, RONEY F, CAMILLO L R, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the molecular chaperone binding protein *BiP* genes in Citrus [J]. Tree Genetics & Genomes, 2018, 14(6): 1-11.
- [26] HUANG L K, YAN H D, JIANG X M, et al. Valuation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in switchgrass under various abiotic stress conditions [J]. Bioenergy Research, 2014, 7(4): 1201-1211.
- [27] FIGUEIREDO J E F, CASCARDO J C M, SÔNIA M C, et al. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean *BiP* gene family [J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 1997, 9(2): 103-110.

- [28] LIU J X, HOWELL S H. bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010(22):782-796.
- [29] OKADA M, LANZATELLA C, SAHA M C, et al. Complete switchgrass genetic maps reveal subgenome collinearity, preferential pairing and multilocus interactions [J]. *Genetics*, 2010, 185(3):745-760.
- [30] YUAN S, XU B, ZHANG J, et al. Comprehensive analysis of CCCH-type zinc finger family genes facilitates functional gene discovery and reflects recent allopolyploidization event in tetraploid switchgrass[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):1-16.
- [31] BOSTON R S, VIITANEN P V, VIERLING E. Molecular chaperones and protein folding in plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(1/2):191-222.
- [32] WEI J, GAUT J R, HENDERSHOT L M. *In vitro* dissociation of BiP-Peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(44):26677-26682.
- [33] LONG M, SOUZA S. Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1995, 5(6):774-778.
- [34] MANIATIS T, TASIC B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans[J]. *Nature*, 2002, 418(6894):236-243.
- [35] LAXA M. Intron-mediated enhancement: a tool for heterologous gene expression in plants? [J] *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7:1977.
- [36] BERTOLOTTI A, ZHANG Y, HENDERSHOT L M, et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(6):326-332.
- [37] SHEN J S, CHEN X, HENDERSHOT L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals [J]. *Developmental Cell*, 2002, 3(1):99-111.
- [38] WANG T, YUAN Y, ZOU H, et al. The ER stress regulator Bip mediates cadmium-induced autophagy and neuronal senescence [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:38091.

(责任编辑:陈海霞)