

甘蔗锌指蛋白基因 *ShSAPI* 的克隆与表达模式

李晓君^{1,3}, 蔡文伟¹, 张树珍¹, 许莉萍², 陈萍³, 王俊刚¹

1 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所甘蔗研究中心, 海口 571101

2 福建农林大学 农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 福州 350002

3 海南大学农学院, 儋州 571737

摘要: 植物中具有 A20/AN1 锌指结构域的蛋白与逆境应答密切相关, 在甘蔗热带种 *Saccharum officinarum* 拔地拉 Badila 中克隆到一个具有 A20/AN1 锌指结构域的锌指蛋白基因 *ShSAPI*。为研究 *ShSAPI* 的基因结构和表达特性, 采用 PCR 和 Southern blotting 分析了 *ShSAPI* 的基因组结构, 通过半定量 RT-PCR 对 *ShSAPI* 在甘蔗不同部位、不同胁迫和不同激素处理下的表达模式进行了分析。结果表明, *ShSAPI* 的 5'UTR 区有两段内含子, 大小分别为 202 bp 和 1 052 bp, 在 Badila 中有 1~2 个拷贝; *ShSAPI* 在甘蔗成熟植株根茎叶中均有表达, 在茎秆中的表达量随着茎节成熟而递增; 在幼苗阶段, *ShSAPI* 的表达能被高盐、模拟干旱、GA₃、ABA 和 ET 诱导增强。以上结果表明, *ShSAPI* 可能在甘蔗成熟与逆境应答中具有重要作用。

关键词: 甘蔗, SAP, A20/AN1 锌指蛋白, *ShSAPI*, 非生物胁迫

Cloning and expression pattern of a zinc finger protein gene *ShSAPI* in *Saccharum officinarum*

Xiaojun Li^{1,3}, Wenwei Cai¹, Shuzhen Zhang¹, Liping Xu², Ping Chen³, and Jungang Wang¹

1 Sugarcane Research Center, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

2 Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 College of Agronomy, Hainan University, Danzhou 571737, China

Abstract: In plants, proteins with A20/AN1 zinc finger domain are involved in stress responses, named as "Stress Associated Protein" (SAP) gene family. Based on Expressed Sequence Tag (EST) sequences information in Badila *Saccharum officinarum* mature related cDNA library, we cloned an SAP gene from sugarcane full length cDNA library, named *ShSAPI* (GenBank: Accession No. HM991960). To characterize *ShSAPI*, we analyzed its genome structure and expression pattern.

Received: September 18, 2010; **Accepted:** December 3, 2010

Supported by: Special Fund for the Industrial Technology System Construction of Modern Agriculture (No. nycytx-24), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. ITBBZD1023), 948 Ministry of Agriculture Project (No. 2010-C21).

Corresponding author: Shuzhen Zhang. Tel: +86-898-66987509; E-mail: zhangsz.2007@yahoo.com.cn

Liping Xu. E-mail: xlpmail@yahoo.com.cn

现代农业产业技术体系建设专项基金 (No. nycytx-24), 中央级公益科研院所基本科研业务费专项资金 (No. ITBBZD1023), 农业部 948 项目 (No. 2010-C21) 资助。

Southern blot analysis showed *ShSAP1* was present as one or two copy in the genome of Badila. Comparison of *ShSAP1* 1 008 bp full length cDNA with a genomic fragment (2 241 bp) generated by PCR amplification and sequencing, revealed the presence of two introns (202 bp and 1 052 bp) located in the 5'UTR region. Semiquantitative RT-PCR analysis found *ShSAP1* expressed in leaves, roots and stalk in mature sugarcane. Compared with immature stems, *ShSAP1* expressed higher in mature stalk. *ShSAP1* was induced by different types of treatments, such as salt (200 mmol/L NaCl), drought (10% PEG 6 000), GA₃ (200 mg/L), ABA (100 μmol/L) and ET (1 mmol/L) during sugarcane seedling stage. These results indicated that *ShSAP1* may function in sugarcane maturation and abiotic stress response processes.

Keywords: sugarcane, SAP, A20/AN1 zinc finger protein, *ShSAP1*, abiotic stress

在动物中, 具有 A20/AN1 锌指结构域的蛋白已被广泛研究, 该类蛋白作为免疫性炎症和细胞凋亡的负调因子, 在免疫应答中具有重要的调控作用^[1-3]。植物中, 具有 A20/AN1 锌指结构域的蛋白与逆境应答密切相关, 研究者将其定义为 SAP (Stress associated protein) 家族^[4-6]。研究发现, 水稻所有 SAP 家族成员的表达能被干旱、高盐和冷冻中的一种或多种胁迫诱导增强^[6]。对番茄进行冷冻、热激、盐胁迫、干旱、机械伤害、ABA、氧胁迫和细胞膜伤害处理, 利用 real-time PCR 分析其 13 个 SAP 家族成员在进行处理前后的表达模式发现, 所有 SAP 成员都与一种或多种逆境应答相关^[7]。

甘蔗 *Saccharum officinarum* 是一种重要的糖料作物, 也是重要的能源作物。非生物胁迫, 尤其是高盐与干旱, 是全球作物减产的主要原因^[8]。2010 年中国南方干旱造成云南、广西、广东、海南等地甘蔗大规模减产。研究甘蔗自身的抗逆基因功能, 对研究甘蔗的抗逆机制及抗逆分子育种具有重要意义。本研究于甘蔗热带种 Badila 茎秆成熟与未成熟抑制差减文库中筛选到一个具有完整阅读框的 EST, 其推导蛋白具有 A20/AN1 锌指结构域, 通过 Smart Race 法获得了基因全长, 命名为 *ShSAP1* (*Saccharum stress-associated protein 1*)。通过甘蔗基因组 DNA 扩增 *ShSAP1* 基因以确定基因内是否具有内含子, 并通过 Southern blotting 分析了 *ShSAP1* 在 Badila 内的拷贝数, 从而对 *ShSAP1* 基因结构进行分析; 通过半定量 RT-PCR 对 *ShSAP1* 基因在甘蔗 Badila 不同部位、不同茎节及高盐胁迫、模拟干旱、

脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA₃)、乙烯利 (ET) 处理下的 mRNA 表达量进行了分析, 以期对 *ShSAP1* 在甘蔗成熟与逆境应答中的功能进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甘蔗热带种拔地拉 (Badila), 为本实验室基地种植。

1.2 主要试剂

RNA plant kit、DNA 消化酶购自 Biomega 公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas; Southern blotting 试剂盒为 Roche 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit I; Taq DNA 聚合酶、PMD18-Vector 及限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素 (Amp)、琼脂糖购自 Sigma 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Biomega 公司; 大肠杆菌 DH5α 感受态购自天根生物; ABA、ET、GA₃ 购自上海生工; 常用的化学试剂为国产分析纯。本研究所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.3 表达分析材料及处理方法

甘蔗不同部位表达分析材料: Badila 成熟植株。不同胁迫和激素处理组的表达分析材料: 四叶期甘蔗无菌组培苗, MS 培养基培养。24 h 处理组: 高盐胁迫和模拟干旱处理, 将幼苗接入中含有 200 mmol/L NaCl, 10% (W/V) PEG6000 的 MS 培养基中; 激素处理, 分别用 100 μmol/L ABA, 200 mg/L GA₃, 1 mmol/L ET 喷施幼苗叶片; CK 不

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primers sequences (5'-3')	Purpose
ShSAPP3	AGATGATAATGAAGCA GGAGC	Clone 3' of <i>ShSAP1</i>
PTR3	TAATACGACTCACTATA GGG	Clone 3' of <i>ShSAP1</i>
P1	ACGCGGGGCCGTTTCG AAG	Amplify full <i>ShSAP1</i> from DNA
P2	AGACGGACAGTTGCA GCTTACTA	Amplify full <i>ShSAP1</i> from DNA
GADPH1	TCACACTTTCTACAAT GAGCT	Amplify <i>GADPH</i>
GADPH2	GATATCCACATCACAC TTCAT	Amplify <i>GADPH</i>
ZP1	TTCAT(C)CCGAGTTA AGGAAGCC	Amplify <i>ShSAP1</i>
ZP2	TGAGCCAACCGTAGG AAACC	Amplify <i>ShSAP1</i>

做任何处理, 处理后将幼苗于人工培养箱中光照培养, 16 h 光照 28 °C/8 h 黑暗 24 °C, 24 h 后提取叶片 RNA。激素时间梯度处理组: 选取大小一致的幼苗, 用 100 μmol/L ABA、200 mg/L GA₃、1 mmol/L ET 进行喷施处理, 处理时间分别为 3 h、6 h、12 h, 处理开始于 12 h 处理组, 同时对 CK 喷施同体积的无菌水, 隔 6 h 进行第 2 批处理, 隔 9 h 进行第 3 批处理, 处理期间全程光照培养, 12 h 后同时提取叶片 RNA。

1.4 核酸提取及反转录

RNA 提取参照 Biomega RNA Plant kit 说明书, 取 5 μg RNA 按照 Fermentas 反转录试剂盒说明书进行反转录, DNA 提取依照 CTAB 法。

1.5 *ShSAP1* 的克隆

由本实验室茎秆成熟相关 cDNA 文库中获得 *ShSAP1* 的 EST 序列 (716 bp), 具有完整的 ORF, 经同源序列的分析比对确定 5'端完整, 以获得的 *ShSAP1* 5'端设计引物 ShSAPP3, 全长 cDNA 文库噬菌体臂上的序列设计引物 PTR3, 以本实验室全长 cDNA 文库库液为模板扩增 *ShSAP1* 3'端 cDNA 序列。PCR 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 45 s, 72 °C 1 min, 4 个循环; 94 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 1 min, 8 个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C

1 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。

1.6 *ShSAP1* 基因组全长的获得及 *ShSAP1* 的拷贝数确定

于 *ShSAP1* 拼接序列 5'末端和 3'末端设计引物 P1 和 P2, 以 Badila cDNA 及 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。以 *ShSAP1* cDNA 全序列为模板, 依照 DIG DNA Labeling and Detection Kit I 合成探针, DNA 提取如前介绍, DNA 酶切电泳和转膜方法参照文献[9], 杂交及显色参照 Roche DIG DNA Labeling and Detection Kit I 试剂盒说明书进行。

1.7 半定量 RT-PCR 分析 *ShSAP1* 的表达模式

半定量 RT-PCR 反应中的内参基因 *GADPH* 引物为 GADPH1 和 GADPH2, *ShSAP1* 的扩增引物: ZP1 和 ZP2。先用内参基因 *GADPH* 将模板调整至基本一致, 选取平台期之前的循环作为半定量 RT-PCR 的循环数, 内参基因和目的基因的 PCR 反应条件均为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min, X 个循环; 72 °C 10 min。X 表示循环数, 不同部位和 24 h 处理组的为 27 个循环, 12 h 处理组中 ABA 小组为 27 个循环, ET 和 GA3 小组为 30 个循环。每组 PCR 重复 3 次。

1.8 生物信息学分析

ShSAP1 氨基酸序列经 NCBI PSI-BLAST (Position-specific iterated BLAST), 选择有研究报道的相近序列进行同源性分析, 使用 DNAMAN 和 MEGA4 进行 A20/AN1 结构域比较和系统发育树构建。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 *ShSAP1* 基因的的克隆

以本实验室全长 cDNA 文库库液为模板, 用 ShSAP-P3 和 PTR3 两条引物采用降落 PCR 扩增 *ShSAP1* 的 3'端, 得到 900 bp 左右的条带, 结果如图 1 所示, 经测序, 该片段核苷酸序列长度为 872 bp, 含有 25 个 PolyA 尾, 将 3'端获得序列与差减文库中

得到的 5'端 716 bp 序列进行拼接, 得到 cDNA 全长 1 008 bp, 命名为 *ShSAP1*, GenBank 登录号为: HM991960, *ShSAP1* 基因起始密码子 ATG 位于 127 bp 处, 终止密码 TAG 位于 642 bp 处, 阅读框为 516 bp, 推导 171 个氨基酸, 具有 A20/AN1 锌指结构域。

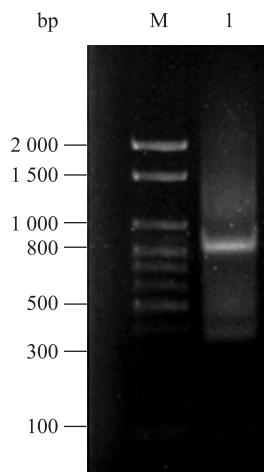


图 1 Smart Race PCR 扩增 *ShSAP1* 3'序列
Fig. 1 Amplification of the 3' sequence of *ShSAP1* gene by Smart Race PCR. M: DNA maker DL2000; 1: 3' PCR products of *ShSAP1*.

2.2 *ShSAP1* 与其他植物 SAP 家族基因的锌指结构域比较与系统进化分析

SAP 蛋白家族具有 A20/AN1 锌指结构域特征, A20 结构位于蛋白的 N 端, 具有 Cys2/Cys2 锌指结构, 首次发现于人类血管内皮细胞中的一个 TNF α -诱导蛋白中^[10], Linnen 等在爪蟾的受精卵动物半球母系来源 RNA 编码蛋白中首次鉴定 AN1 锌指结构域^[11], 经典的 AN1 结构模式为 CX(2)CX(9-12)CX(1-2)CX(4)CX(2)HX(5)HXC, X 为任意氨基酸, 后来的研究中把 CX(4)CX(9-12)CX(1-2)CX(4)CX(2)HX(5)HXC 也定义为 AN1 锌指。AN1 和 A20 结构都参与了免疫反应, AN1 与 A20 锌指常常相互连接^[1,12]。OSiSAP1 是植物中首次发现同时具有 AN1 和 A20 锌指结构域的蛋白, 研究表明 OSiSAP1 与逆境应答相关, 并能增强转化烟草的抗逆性^[13], 随后水稻、拟南芥和番茄等植物的 A20/AN1 锌指蛋白也

被研究, 结果发现 A20/AN1 锌指蛋白与植物的逆境应答相关^[6-7]。

ShSAP1 编码蛋白 N 端具有一个 Cys2/Cys2 锌指, 位于 14~40 个氨基酸之间, C 端 112~149 氨基酸序列间具有 AN1 锌指结构域, 其锌指序列模式为 CX(2)CX(10)CX(1)CX(4)CX(2)HX(5)HXC, 具有相同结构的蛋白往往行使相似的功能, 为此, 我们将甘蔗的 *ShSAP1* 同目前研究较清楚的其他植物 SAP 家族基因进行了氨基酸序列比较及同源进化树分析, 结果见图 2。*ShSAP1* 具有 SAP 家族基因的保守锌指结构, 与甘蔗的 *Sc-zf* 和水稻的 OSiSAP8 亲缘关系最近。*ShSAP1* 推导氨基酸序列与刘金仙等^[14]于福农 22 中分离得到的甘蔗锌指蛋白基因 *Sc-zf* 氨基酸序列基本一致, 而两端非编码区核酸序列却有明显差异, 经 DNAMAN 分析 *ShSAP1* 与 *Sc-zf* 的 cDNA 序列相似性为 81.57%, 推测 *ShSAP1* 与 *Sc-zf* 为同源基因。

2.3 *ShSAP1* 基因结构

以引物 P1、P2 从 Badila cDNA 与基因组 DNA 中扩增 *ShSAP1*, 以验证拼接结果的正确性, 并分析 *ShSAP1* 的基因结构。由 cDNA 扩增得到 1 000 bp 左右的片段 (图 3A), 而从基因组 DNA 中可以扩增得到 2 300 bp 左右的片段 (图 3B), 片段测序结果经分析后发现由 cDNA 扩增得到的序列与之前的拼接结果吻合, 由基因组 DNA 扩增片段的大小为 2 241 bp, 为 *ShSAP1* 的基因组序列, 经 GSDS 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析发现 *ShSAP1* 有两段大小分别为 202 bp 和 1 052 bp 的内含子位于 5'UTR 区, 而其阅读框则是连续的 (图 3C)。为了确定 *ShSAP1* 的拷贝数, 我们以 *ShSAP1* 的 cDNA 序列合成探针对 Badila 基因组进行了 Southern blotting 分析, 结果如图 3D 所示, *ShSAP1* 的拷贝数为 1~2 个, 为低拷贝基因。

2.4 *ShSAP1* 的表达分析

刘金仙等对甘蔗 Funong 22 中克隆得到的 *Sc-zf* 进行了表达分析, 发现 *Sc-zf* 在黑穗病菌 *Ustilago scitaminea*、水杨酸 (SA)、H₂O₂、NaCl 和 PEG 胁

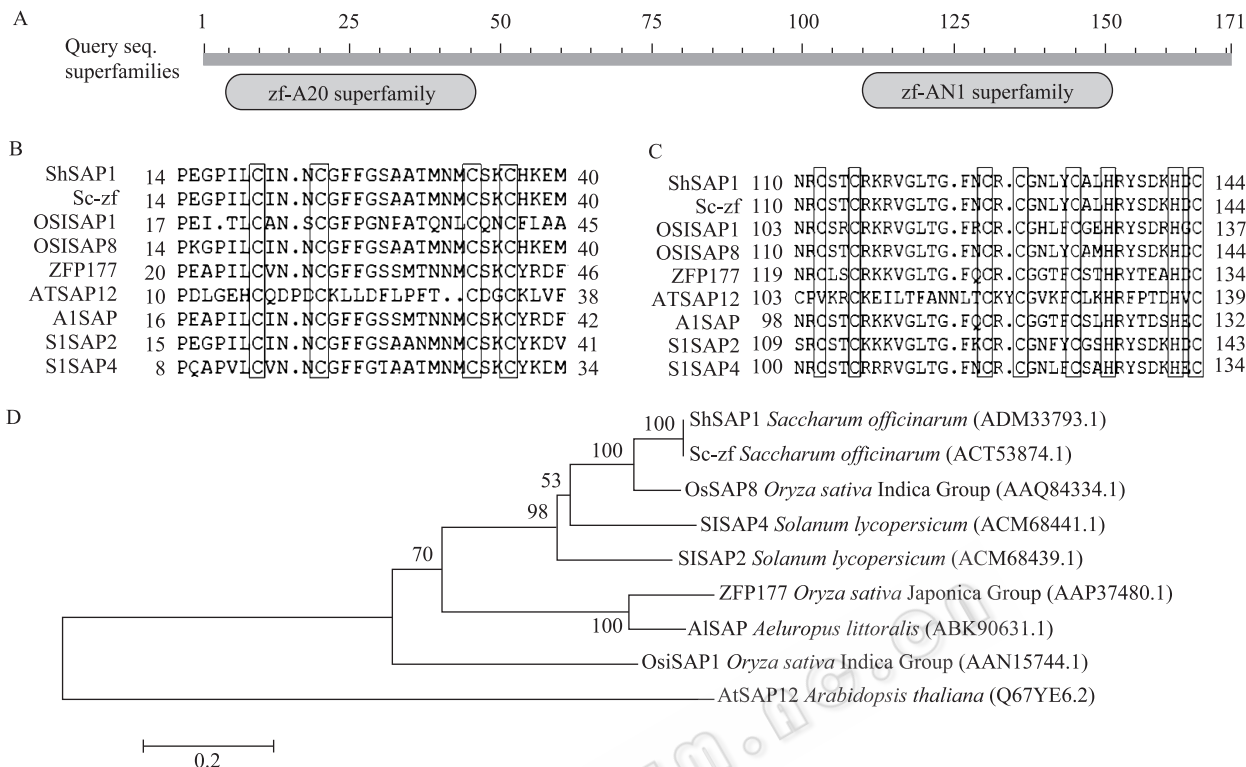


图 2 *ShSAP1* 推导蛋白与其他 A20/AN1 型锌指蛋白的氨基酸序列比较及系统发育树分析

Fig. 2 Comparison of *ShSAP1* A20 and AN1 zinc finger domain with other zinc-finger protein and phylogenetic tree analysis. Conserved cysteine and histidine are indicated in box. (A) Putative functional domains of *ShSAP1*. (B) N-terminal A20 type zinc-finger. (C) C-terminal AN1-type zinc-finger. (D) phylogenetic tree of the related zinc finger proteins. proteins used in this analysis have been studied and have A20 and AN1 zinc finger domains. Protein accession number are showed in the bracket.

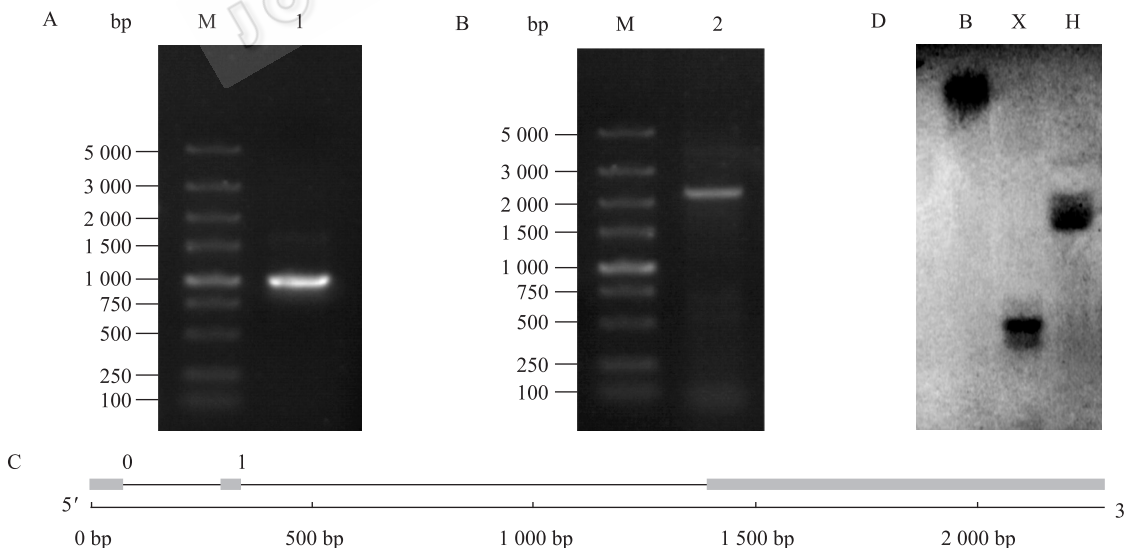


图 3 *ShSAP1* 的基因结构 (A、B、C) 与甘蔗基因组 Southern blotting 分析

Fig. 3 Gene structure (A, B, C) and genome Southern blotting (D) of *ShSAP1*. (A) M: DL5000 DNA marker; 1: PCR product of *ShSAP1* from cDNA. (B) M: DL5000 DNA maker; 2: PCR product of *ShSAP1* from genomic DNA. (C) Two introns (indicated by line) located in the 5' UTR region of *ShSAP1* (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). (D) Results of genome Southern blotting. Total genomic DNA was digested by *Hind* III (H), *Xba* I (X), *Bam* H I (B).

迫下表达特性不同, 受到黑穗病菌和 NaCl 的诱导, PEG 的抑制, 但也受 SA 和 H₂O₂ 的影响^[14], 这与前人所做的 SAP 家族基因在逆境下的表达特性存在差异。*ShSAP1* 由甘蔗 Badila 成熟与未成熟茎秆抑制差减文库中筛选而出, 为了分析 *ShSAP1* 与 Badila 成熟的关系, 我们选取 Badila 成熟植株不同部位和不同茎节进行了表达分析, 结果如图 4-A 所示, *ShSAP1* 在 Badila 叶片、茎及根部均有表达, 随着茎秆成熟度增加, *ShSAP1* 的表达量也随之升高。甘蔗 3~4 节为快速生长部位, 同时有少量蔗糖的积累, 7~8 节为正在成熟的茎节, 13~14 节为成熟茎节, 糖分趋于饱和, 21~22 茎节的糖分已经饱和^[15], 甘蔗在成熟过程中, 糖分不断累积, 渗透物质不断增加, 抗

逆性不断增强, 我们推测 *ShSAP1* 基因与甘蔗的成熟和糖分累积存在一定的关系。

在无菌条件下对 Badila 组培苗进行不同激素、干旱及盐胁迫下 *ShSAP1* 的表达分析发现, Badila 幼苗 *ShSAP1* 的表达能被 ABA、ET、GA₃、模拟干旱及盐胁迫诱导增强 (图 4B)。在 ABA、ET 和 GA₃ 处理下, *ShSAP1* 的表达水平随着处理时间延长持续增加, 12 h 内基本达到较高水平 (图 4C)。ET 和 GA₃ 是植物成熟和茎节伸长的 2 种重要激素, *ShSAP1* 可能与甘蔗成熟与茎节生长有关。根据 *ShSAP1* 在模拟干旱、盐胁迫及 ABA 处理下的表达模式, 我们推测 *ShSAP1* 可能参与了甘蔗依赖于 ABA 的早期逆境应答过程。

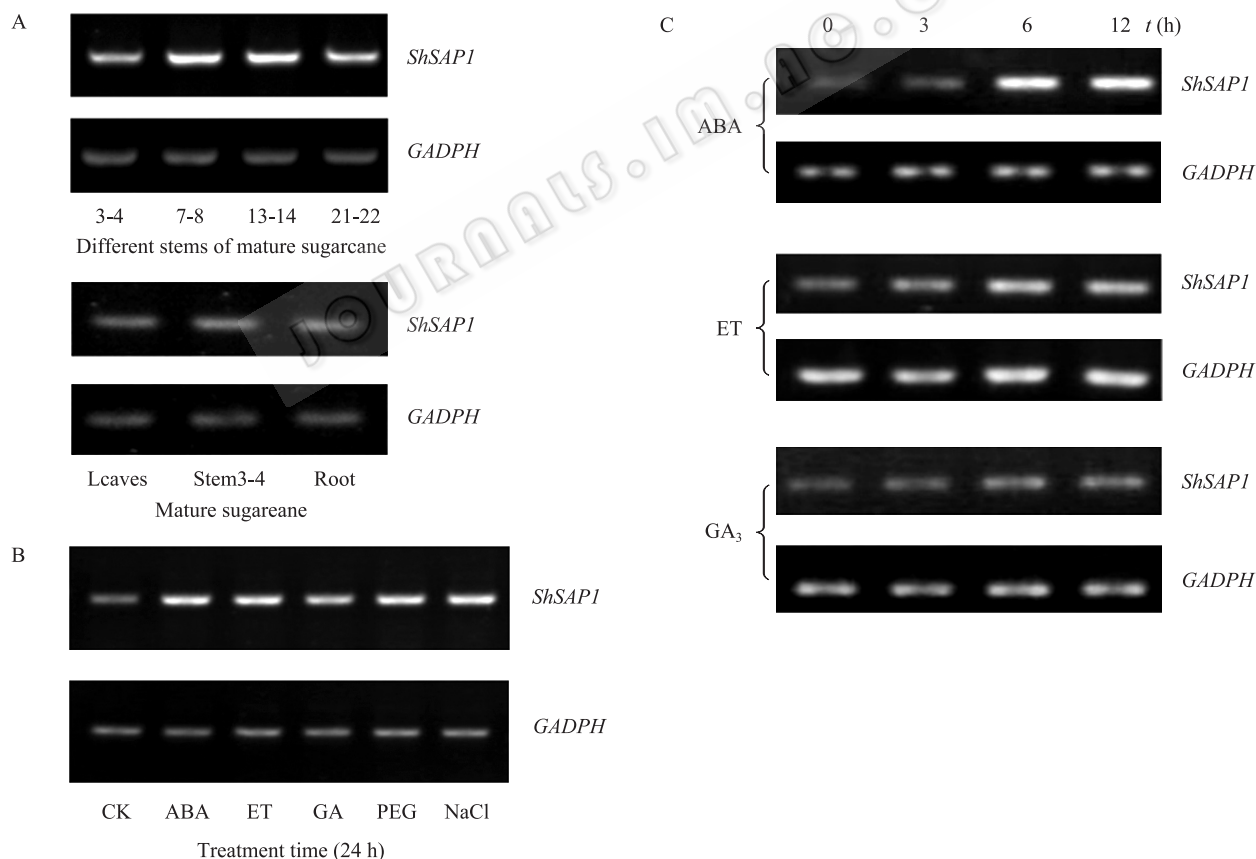


图 4 *ShSAP1* 的表达模式分析

Fig. 4 Expression analysis of *ShSAP1*. *GADPH* was used as internal control. (A) The expression level of different part and stalks in sugarcane. (B) Expression of *ShSAP1* in sugarcane seedlings under salt (200 mmol/L), drought (10% PEG6000), GA₃ (200 mg/L), ABA (100 μmol/L) and ET (1 mmol/L) after 24 h treatment. (C) Changes of *ShSAP1* expression level in sugarcane seedlings under ABA (100 μmol/L), ET (1 mmol/L) and GA₃ (200 mg/L) treatment within 12 h.

3 讨论

A20/AN1 锌指蛋白因在动物免疫应答中具有重要作用而被广泛研究, 转录因子 NF- κ B (Nuclear factor kappa enhancer binding protein) 在细胞凋亡、免疫和炎症反应中起着相当作用^[16]。A20 锌指 N 端具有去泛素化酶活性, C 端具有泛素连接酶活性, I κ B 是核因子 NF- κ B 的抑制子。A20 锌指一方面通过泛素连接酶与 I κ B 激酶 IKK 作用使其降解, 阻止 I κ B 磷酸化; 另一方面通过去泛素化 I κ B-26S 蛋白酶复合体, 阻止 I κ B 降解, 从而抑制 NF- κ B 的活性, 降低过敏性反应及细胞凋亡^[2,10-12,17]。植物中的 SAP 家族, 目前研究较为深入的有水稻的 OsiSAP1、ZFP177、OsiSAP8、拟南芥的 AtSAP12、獐毛的 AISAP^[13,18-21], 上述水稻的 SAP 基因均参与了水稻逆境应答, 应答模式有所差异, SAP1 和 SAP8 与干旱和盐胁迫密切相关, 在烟草和水稻中过表达 OsiSAP1 和 OsiSAP8 能显著提高转化植株的抗盐抗旱性, OsiSAP8 定位于细胞质, 酵母双杂交表明 OsiSAP8 的 A20 与自身和 AN1 具有相互作用^[18]; ZFP177 则在高温和冻害应答中起作用, 亚细胞定位于细胞质, 过表达 ZFP177 能提高转基因烟草的抗冻抗高温能力^[19]。研究者推测水稻 SAP 家族可能通过泛素蛋白酶途径降低逆境对植物造成伤害, 如通过降解细胞凋亡中的关键因子来增强植物抗逆性^[18]。AtSAP12 具有 2 个 AN1 结构域, 在冻害和盐胁迫下表达增强, 其蛋白构象能被氧化还原剂改变, 研究者推测 SAP12 是一个氧化还原剂感应器, 通过构象变化与蛋白结合, 作为激活子或抑制子来调控信号传递^[20]。盐土植物獐毛 AISAP 的表达水平能被高盐、干旱、冷冻、高温及 ABA 和 SA 诱导增强, 过表达 AISAP 可提高烟草的抗旱和抗盐能力, 转化植株的 ROS 清除系统和渗透保护的基因表达也相对增强^[21]。A20/AN1 锌指蛋白可能属于植物逆境信号通路中的上游调控因子, 通过抑制或激活信号传递相关蛋白进而调控下游基因表达, SAP 家族基因在

植物抗逆基因过程中具有很好的应用前景, 但其作用的分析机制仍然需要进一步研究。

甘蔗在成熟过程中, 伴随着糖分等渗透物质的不断累积, 抗逆性不断增强, *ShSAP1* 可能参与了甘蔗成熟相关如可溶性糖累积等过程。根据 *ShSAP1* 在 ET、GA₃、ABA、干旱和盐胁迫的表达分析结果, 我们推测 *ShSAP1* 可能参与了 ET、GA₃ 的信号转导, 在干旱和盐胁迫下参与了早期依赖于 ABA 的信号转导从而调控下游基因的表达。*ShSAP1* 在甘蔗成熟与逆境应答中的功能及其调控机制仍需要进一步的研究, 包括下游调控基因网络及转基因分析等。本文对 *ShSAP1* 的基因结构及表达模式进行了分析, 为 *ShSAP1* 的功能研究打下了基础。

REFERENCES

- [1] Huang J, Teng L, Li LX, et al. ZNF216 is an A20-like and I κ B kinase γ -interacting inhibitor of NF κ B activation. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16847-16853.
- [2] Heyninck K, Beyaert R. A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(1): 1-4.
- [3] Hishiya A, Iemura S, Natsume T, et al. A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J*, 2006, 25(3): 554-564.
- [4] Jin Y, Wang M, Fu JJ, et al. Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. *Genomics*, 2007, 90(2): 265-275.
- [5] Vij S, Tyagi AK. A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics*, 2008, 8(3): 301-307.
- [6] Vij S, Tyagi AK. Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. *Mol Gen Genomics*, 2006, 276(6): 565-575.
- [7] Solanke AU, Sharma MK, Tyagi AK, et al. Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato. *Mol*

- Gen Genomics, 2009, 282(2): 153–164.
- [8] Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotech*, 2005, 16(2): 123–132.
- [9] Wang GL, Fang HJ. *Plant Genetic Engineering*. Beijing: Science Press, 2002.
王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科技出版社, 2002.
- [10] Opiari AW Jr, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem*, 1990, 265(25): 14705–14708.
- [11] Linnen JM, Bailey CP, Weeks DL. Two related localized mRNAs from *Xenopus laevis* encode ubiquitin-like fusion proteins. *Gene*, 1993, 128(2): 181–188.
- [12] Evans PC, Ovaa H, Hamon M, et al. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem J*, 2004, 378: 727–734.
- [13] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi AK. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6309–6314.
- [14] Liu JX, Que YX, Zheng YF, et al. Molecular cloning of sugarcane zinc finger protein gene and its expression analysis. *J Agri Biotechnol*, 2009, 17(4): 707–712.
刘金仙, 阙友雄, 郑益凤, 等. 甘蔗锌指蛋白基因的克隆和表达分析. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 707–712.
- [15] Rae AL, Perroux JM, Grof CPL. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta*, 2005, 220(6): 817–825.
- [16] Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(8): 758–765.
- [17] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kB signaling by A20 Through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, 2010, 327(5969): 1135–1139.
- [18] Kanneganti V, Gupta AK. Overexpression of *OsiSAP8*, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Mol Biol*, 2008, 66(5): 445–462.
- [19] Huang J, Wang MM, Jiang Y, et al. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance. *Gene*, 2008, 420(2): 135–144.
- [20] Ströher E, Wang XJ, Roloff N, et al. Redox-dependent regulation of the stress-induced zinc-finger protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2009, 2(2): 357–367.
- [21] Saad RB, Zouari N, Ramdhan WB, et al. Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger “*ALSAP*” gene isolated from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Plant Mol Biol*, 2009, 72(1/2): 171–190.