

矮牵牛冷响应锌指蛋白基因 *PhTZF1* 的分离与表达分析

宁露云 李蓓 包满珠 张蔚

园艺植物生物学教育部重点实验室/华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 利用矮牵牛基因表达谱芯片筛选出应答低温胁迫的关键基因, 从中发现 1 个 CCCH 型的锌指蛋白基因 *PhTZF1*。通过 RT-PCR 分离获得该基因的 cDNA 全长为 2 085 bp, 预测其编码 694 个氨基酸, 含有 2 个 CCCH 型锌指蛋白保守结构域。系统进化树分析发现, *PhTZF1* 与拟南芥 *AtSZF1* 相似度最高。利用半定量 RT-PCR 检测其在根、茎、叶和花中的表达特性发现, 正常生长条件下该基因在各组织中的表达都较弱; 利用实时定量 PCR 检测其在低温、干旱、ABA、MeJA、高盐和高渗胁迫处理下的表达情况发现, *PhTZF1* 表现出不同程度的上调, 其中对低温胁迫最为敏感且上调倍数最高, 初步推测该基因与矮牵牛应答低温、干旱等非生物逆境相关。

关键词 矮牵牛; CCCH 型; 锌指蛋白; 非生物逆境; 基因表达谱

中图分类号 S 681.91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0024-07

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 被喻为“世界花坛花卉之王”, 是重要的园林观赏植物, 喜温暖和阳光充足的环境, 不耐霜冻, 怕雨涝。它的生长适温为 13~18 °C, 冬季温度在 4~10 °C, 如低于 4 °C, 植株生长停止。如何提高矮牵牛的抗寒性, 是扩大其栽培面积和延长观赏时间的核心所在, 对提高其园林应用价值具有重要的指导意义。

锌指蛋白 (zinc-finger protein) 是转录因子中研究得较为深入的类型^[1], 因其具有可以结合锌离子的指状结构域——锌指结构域 (zinc-finger domain) 而命名。根据锌指蛋白序列与功能的不同将其分为 9 大类: C2H2、C8、C6、C3HC4、C2HC、C2HC5、C4、C4HC3 和 CCCH (C 和 H 分别代表半胱氨酸和组氨酸)^[2]。锌指蛋白主要通过与核酸的相互作用来发挥不同的功能, 如促进转录、抑制转录、与单链 DNA、tRNA 结合或与 RNA/DNA 双向结合^[3]。近年来, 国内外研究者在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum* Linn)、玉米、葡萄和番茄等植物中陆续分离了多个抗逆相关锌指蛋白基因。Kodaira 等^[4]报道拟南芥中 *AZF1* (*Arabidopsis* zinc-finger

protein 1) 和 *AZF2* 编码一种双锌指结构的 C2H2 型锌指蛋白, 在非生物胁迫下作为转录抑制子抑制植物生长。郑恒等^[5]对水稻中含有一个 CCCH 型锌指结构域的基因 *OsC2HC* 进行了研究, 结果表明该基因与抗盐碱性及抗氧化性有关。Min 等^[6]发现, 小麦中一个 CCCH 型锌指蛋白基因 *TaZnFP* 的表达受低温、高盐、干旱以及 ABA 的诱导, 在拟南芥中超量表达 *TaZnFP*, 转基因株系的耐旱和耐盐能力都得到了提升, 因此, 推测 *TaZnFP* 可能作为一个响应非生物胁迫的正调控因子起作用。迄今, 研究者们对锌指蛋白参与植物低温胁迫应答的重要性已有了较为广泛的共识。

笔者所在课题组前期利用矮牵牛基因表达谱芯片筛选出一个应答低温胁迫的 CCCH 型锌指蛋白基因 *PhTZF1*, 本研究在获得其 cDNA 全长并进行序列分析的基础上, 探讨 *PhTZF1* 在不同组织和不同非生物逆境胁迫下的表达情况, 以期阐明矮牵牛抗寒分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

课题组前期定制的矮牵牛 Roche NimbleGen

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101576); 中央高校基本科研业务费专项 (2013PY090); 教育部高等学校博士学科点专项 (20110146120040)

宁露云, 硕士研究生, 研究方向: 园林植物分子遗传育种. E-mail: nly.tsrj@163.com

通信作者: 张蔚, 博士, 讲师, 研究方向: 园林植物分子遗传育种. E-mail: zhangw@mail.hzau.edu.cn

表达谱芯片所用植物材料为基于矮牵牛自交系(代号 H,由笔者所在实验室保存)所建的无性系,后续胁迫处理均采用该自交系的组培苗(鲜质量约1.8~2.5 g)。

1.2 非生物胁迫处理

1)低温处理。将组培苗放入 22 °C、14 h 白天/10 h 黑夜的光照培养箱适应 1 d,之后将温度降为 2 °C,分别于 0、1、3、6、12、48 h 后取叶片。

2)干旱处理。将组培苗从培养基中拔出,轻轻洗去根上的培养基,室温条件下置于滤纸上,分别于 0、3、6、12、24 h 后取叶片。

3)ABA 处理。在培养瓶中用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 溶液对组培苗进行喷施,直到叶片滴水为止,分别于 0、3、6、12、24 h 后取叶片。

4)MeJA 处理。在培养瓶中用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 溶液对组培苗进行喷施,直到叶片滴水为止,分别于 0、3、6、12、24 h 后取叶片。

5)高盐处理。将组培苗从培养基中拔出,轻轻洗去根上的培养基,水培 2 d 后换到浓度为 200 mmol/L 的 NaCl 溶液中,分别于 0、3、6、12、24、48 h 后取叶片。

6)高渗处理。将组培苗从培养基中拔出,轻轻洗去根上的培养基,水培 2 d 后换到浓度为 400 mmol/L 的甘露醇溶液中,分别于 0、3、6、12、24 h 后取叶片。

取样后将样品立即储存于 -80 °C 备用,用于总 RNA 的提取。每个时间点均设 3 个生物学重复,每个生物学重复均用 3 株叶片混样。

1.3 总 DNA、RNA 的提取和反转录

总 DNA 的提取采用 CTAB 法。称取 0.1 g 幼嫩的叶片,转入磨样管中,加入 700 μL 65 °C 预热的 CTAB 溶液(用前加入 2% 的巯基乙醇),用组织破碎仪磨碎后 65 °C 水浴 30 min;冷却至室温,加入 700 μL 的氯仿:异戊醇(V:V,24:1),混匀,12 000 r/min 离心 10 min;吸上清,装入新离心管,加入等体积的氯仿:异戊醇(V:V,24:1),混匀,12 000 r/min 离心 10 min;吸上清,转入新离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,轻摇后静置 20 min,12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,向离心管中加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤 2 次,置于吸水纸上倒置晾干后加入 30 μL 双蒸水溶解,并加入 1 μL RNA 酶 37 °C 温浴 30 min。

总 RNA 的抽提采用艾德莱公司生产的

EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒,按照说明书进行。总 RNA 的反转录反应采用 TaKaRa 公司生产的 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂,按照说明书进行。

1.4 引物设计

根据矮牵牛数据库中获得基因全长,用 Primer Premier5 软件设计 1 对外侧引物(PhTZF1-F1/R1),并根据实时定量 PCR 引物要求设计 1 对特异引物(PhTZF1-F2/R2)。实时定量 PCR 以矮牵牛 *GAPDH*(GenBank: X60346.1)为内参,扩增引物为 PhGAPDH-F/R。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

表 1 被检测基因的引物序列

Table 1 Sequences of primers for the genes tested

引物名称 Primer's name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product's size
PhTZF1-F1	GCGATGTGTTTTGGTTCCAGAGAGTAAA	2 093
PhTZF1-R1	GGAAACTGATTAAGCCACGATCCGCT	
PhTZF1-F2	CCCATTCCACTACGGTCAATAAAA	192
PhTZF1-R2	AGGGCTTCAGATGCGACAAAAC	
PhGAPDH-F	CAAGGCTGGAATTGCTTTGAG	125
PhGAPDH-R	CACCACTTTACTCCACTGATGCA	

1.5 *PhTZF1* 基因的分离

以课题组前期的表达谱芯片数据中获得的一段 439 bp 的 EST 序列为信息探针,在矮牵牛数据库中对并获取该基因的序列全长,根据该序列设计 1 对特异性外侧引物(PhTZF1-F1/R1)。比对发现该基因无内含子,以基因组 DNA 为模板,扩增程序如下:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s,62 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 2.5 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。目的条带经胶回收纯化后连接到 pMD-18T 载体(购自 TaKaRa 公司)中,转化大肠杆菌 DH5 α (购自 TaKaRa 公司),测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.6 生物信息学分析

cDNA 序列分析采用 DNAMAN6.0 软件;氨基酸的多序列比对和系统发生树的分析采用 Clustal X 软件和 Mega 5.0 程序实现;矮牵牛基因组序列分析依据矮牵牛基因组数据库(<http://petuni-asp.sgn.cornell.edu/blast/fastacmd.html>)进行;氨基酸的保守性结构域、同源性和理化性质分别利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 PROTPARAM(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)进行分析预测。

CaKR1^[12] 及水稻 *OsGZF1*^[14] 的亲缘关系较近, 分布于分支 I 中。水稻中的 *OsTZF1*^[9,15] 与 *OsDOS*^[16] 很好地聚在一起, 黄瓜中的 *CsSEF1*^[10] 以及拟南芥中的 *AtC3H49* 和 *AtC3H20*^[17] 均聚为一簇, 它们都分布于分支 II 中。棉花 (*G. hirsutum*) 中 *GhZFP1*^[11] 与拟南芥中的 *AtTZF4, 5*^[13] 表现出很高的同源性, 分布于分支 III 中。水稻中的 *OsC3H12*^[18] 与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中

的 *MtC3H2*^[19] 位于分支 IV 中, 离 *PhTZF1* 最远。

在前人的报道中, *AtSZF1*、*AtSZF2* 在拟南芥中作为正调控因子响应高盐胁迫; *AtTZF6* 只在未成熟胚中表达, 在茉莉酸甲酯胁迫下还能以其特有的形式整合到胚胎的 mRNA 加工小体和应激颗粒中; 在甜椒中, *CaKR1* 可能与生物及非生物逆境胁迫响应均有关; *OsGZF1* 在水稻中有调控 *GluB-1* 启动子的功能, 并在生长过程中控制谷蛋白的积累。

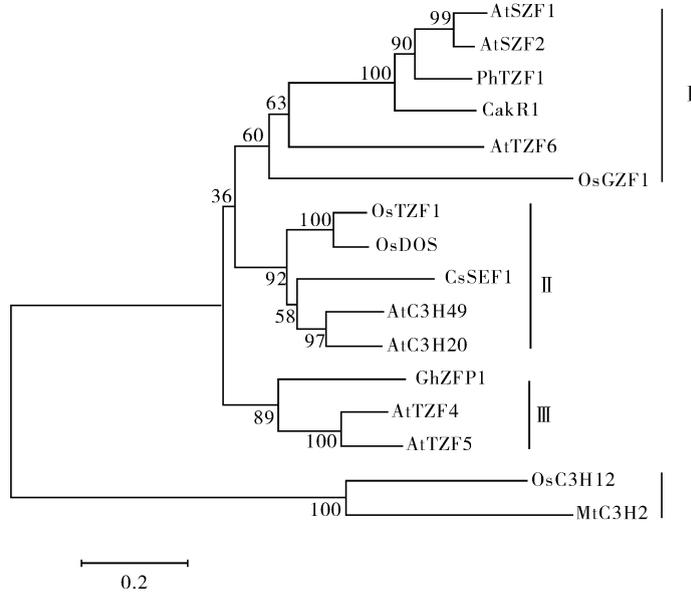
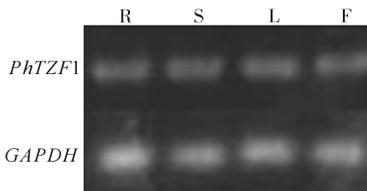


图 4 *PhTZF1* 与其他物种中 CCCH 型锌指蛋白的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analyses of *PhTZF1* and CCCH-type zinc-finger proteins in other species

2.2 *PhTZF1* 的组织表达模式分析

以矮牵牛不同组织(根、茎、叶和花)的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果显示, *PhTZF1* 在根、茎、叶和花中均有表达, 但表达都较弱(图 5)。



R:根 Root; S:茎 Stem; L:叶 Leaf; F:花 Flower.

图 5 *PhTZF1* 在矮牵牛不同组织中的表达

Fig. 5 Expression of *PhTZF1* in various petunia tissues

2.3 *PhTZF1* 的非生物逆境诱导表达分析

为了研究矮牵牛 *PhTZF1* 基因对非生物逆境胁迫的应答, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析其在低温、干旱、ABA、MeJA、高盐和高渗处理下表达水平的变化, 结果表明, 在不同非生物逆境胁迫下, *PhTZF1* 的表达水平呈现不同程度的变化趋势

(图 6)。 *PhTZF1* 显著受低温胁迫诱导表达(图 6A), 在早期, 即处理 3 h 后达到峰值, 并在中期 6 h 仍保持这一较高水平, 为未处理时的 14 倍左右; 随后表达水平有所下降, 但在晚期 48 h 仍维持在对照表达水平的 8 倍左右。干旱胁迫下(图 6B), *PhTZF1* 在叶片中的表达量在早期 3 h 较对照提高了约 3 倍, 此后表达近乎平稳, 直至后期 24 h 仍大致保持这一相对表达水平。ABA 胁迫下(图 6C), *PhTZF1* 在叶片中的表达量在早期 3 h 达到最大, 约为对照的 3 倍, 此后相对对照保持在较低水平。MeJA 胁迫下(图 6D), *PhTZF1* 在叶中表达量逐渐增加, 在中期 12 h 表达量最高, 约为未处理条件下表达量的 3.5 倍。高盐胁迫相较其他处理, 对 *PhTZF1* 基因的表达量影响不大(图 6E), 仅在中期 12 h 时其表达水平有较大提升, 而后迅速下降, 几乎与未处理时表达水平一致。高渗胁迫下(图 6F), *PhTZF1* 在叶片中的表达上调, 在早期 3 h 比正常条件下提高约 3.5 倍, 此后一直保持在这一水平。

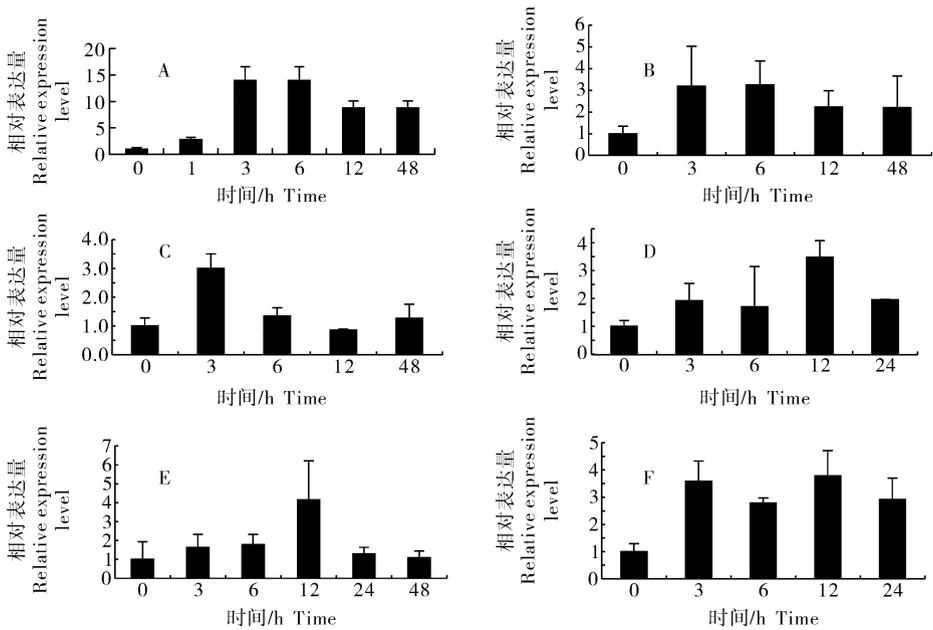


图 6 低温(A)、干旱(B)、ABA(C)、MeJA(D)、高盐(E)及高渗(F)胁迫诱导下 *PhTZF1* 的表达情况

Fig. 6 Induced expression analysis of *PhTZF1* under stresses of cold (A), drought (B), ABA(C), MeJA(D), salt(E) and hypertonic(F)

综上, *PhTZF1* 在植物逆境开始的早期阶段其表达水平已产生变化, 也暗示在植物感受逆境之初 *PhTZF1* 就参与到植物的逆境应答反应。 *PhTZF1* 作为转录因子, 可能参与了植物逆境应答反应中下游基因的转录调控。另外, *PhTZF1* 同时在多种胁迫条件下产生表达水平的变化, 似乎表明它在植物不同逆境应答途径的交叉现象中发挥作用。

3 讨论

目前对植物 CCCH 型锌指蛋白的研究主要集中在拟南芥中, 在其他植物中的进展还十分有限。本研究利用矮牵牛基因表达谱芯片筛选出应答低温胁迫的关键基因, 从中发现 1 个 CCCH 型的锌指蛋白 *PhTZF1*, 分离获得该基因对应的矮牵牛全长 cDNA。通过矮牵牛 *PhTZF1* 基因与其他物种中 CCCH 型锌指蛋白的保守结构域保守性比较后发现, 它们有一段相似性很高的区域, 即 2 个相邻的 CCCH 型锌指蛋白结构域, 该区域在不同物种间是比较保守的。CCCH 型锌指蛋白能够识别并结合 RNA^[20-22]。与 *PhTZF1* 同源性较高的水稻 *OsTZF1* 蛋白^[9] 可以和 mRNA 富含 U 的 3' 非翻译区结合, 并可能通过这种方式控制胁迫相关基因 mRNA 的翻译。这说明 *PhTZF1* 基因也可能通过该锌指结构来实现与 RNA 结合的活性, 在后续的试验中, 将对这一活性进行进一步的研究。

在植物中, Wang 等^[23] 在拟南芥和水稻中分别鉴定到 68 个和 67 个 CCCH 基因, 这些 CCCH 型锌指蛋白在不同的组织中都有表达, 但组织表达模式不同。根据表达模式的差异可以将 CCCH 基因分为 3 类。第 1 类基因在所有 4 种检测的组织(根、叶、花和种子)都有表达, 这类基因在拟南芥中有 33 个, 在水稻中有 36 个; 第 2 类包括拟南芥中的 18 个基因和水稻中的 12 个基因, 这些基因只是在部分组织而不是在全部组织中表达; 第 3 类的 17 个基因是组织特异表达基因。本研究中的 *PhTZF1* 基因在矮牵牛根、茎、叶和花中都有较弱表达, 可归至第 1 类。 *AtTZF6* 只在未成熟胚中表达, *AtTZF4, 5* 在干燥的成熟种子中特异性表达, 而在种子吸胀萌发时表达量逐渐降低; 在功能上, *AtTZF4/5/6* 均与光、ABA、GA₃ 介导的种子萌发有关^[13]。在系谱树分析中与 *PhTZF1* 聚在一起的 *AtSZF1* 和 *AtSZF2*, 在幼苗期主要在根中表达; 在花器官中, 它们在成熟花药中的表达明显高于其他部位; 在功能上, 它们对提高拟南芥的耐盐性有重要作用^[8]。水稻中的 *OsDOS* 在叶原基、子叶和顶端分生组织中的表达很高, 而在老叶中的表达很弱, 研究表明它对于延缓水稻叶片衰老有重要作用, 并且可能还参与调节小穗发育和授粉受精过程^[16]。 *OsTZF1* 主要在愈伤组织、胚芽鞘、幼叶、穗组织中表达, 可能是一个水稻幼苗光形态建成的负向调节子, 参与光敏色

素介导的光应答^[9,15]。*OsGZF1* 在水稻正在发育的种子中表达很高, 研究结果发现它在生长过程中控制谷蛋白的积累^[14]。综合前人的研究, 不同的表达部位在一定程度上与其功能都有相关性。本研究虽然对 *PhTZF1* 基因在矮牵牛不同组织间的表达差异进行了初步研究, 但是 *PhTZF1* 基因在不同胁迫处理下不同组织中的表达情况还值得进一步研究。

目前, 研究最多的一类锌指蛋白是 C2H2 类锌指蛋白, 而 CCCH 型锌指蛋白研究较少。CCCH 型锌指蛋白约占所有锌指蛋白的 0.8%^[24-25]。近年来, 越来越多的研究结果表明, CCCH 型锌指蛋白在植物生长发育过程中或响应生物胁迫与非生物胁迫中有重要作用。*OsTZF1* 是一个串联锌指蛋白, 过表达植株 *Ubi:OsTZF1-OX* 表现出种子萌发延迟、苗期生长迟缓、叶衰老延缓, 而 RNAi 敲除植株 *OsTZF1-RNAi* 表现出种子萌发提前、苗期生长旺盛、叶提前早衰。*Ubi:OsTZF1-OX* 植株提高了对高盐胁迫和干旱胁迫的抗性, 反之, *OsTZF1-RNAi* 植株抗性降低; *OsTZF1* 正向调节 ABA 应答, 全基因组表达分析表明其可能也作用于其他激素和逆境应答^[9]。*OsDOS* 则是一个新的定位在细胞核内的 CCCH 型锌指蛋白, *OsDOS RNAi* 植株在营养生长期与野生型无明显差异, 孕穗期时叶片开始发黄, 灌浆期时叶片明显发黄。过量表达 *OsDOS* 的转基因植株生长严重延迟, 株高变矮, 抽穗期变晚, 叶龄延长, 出现包穗表型, 严重不育, 可能通过或至少部分通过将发育信号与茉莉酸甲酯信号传导通路进行整合来延缓叶片的衰老^[16]。Wang 等^[23] 对拟南芥进行高盐、低温、甘露醇、ABA 等胁迫处理发现, IV 亚分类的 11 个 CCCH 型锌指蛋白受到不同程度的激活或抑制表达, 这与他们的微阵列数据相符, 推断这些基因与拟南芥的抵抗生物胁迫或非生物胁迫有关。黄瓜中的 *CsSEF1*^[10] 可能在从光合物质积累受到限制到黄瓜果实停止生长的途径中起到传导相关信号的作用。在拟南芥中超量表达 *AtC3H49* 或 *AtC3H20* 表现出对 ABA 的过度敏感, 蒸腾作用减弱, 而抗旱性增强, *AtC3H49* 和 *AtC3H20* 的蛋白复合体在体外表现出 RNA 酶的活性, 据此推断它们可能与 mRNA 的转运有关^[17]。蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中的 *MtC3H2* 功能暂未被报道, 但它含有 5 个 CCCH 型锌指蛋白结构域^[19]。水稻中的 *OsC3H12* 同样含有 5 个 CCCH 型锌指蛋白结构域, 与水稻细胞—白叶枯病菌互作有关, 能提高水稻抗白叶枯病的能力^[18]。为研究矮牵牛 *PhTZF1* 基

因对非生物逆境胁迫的响应, 本研究利用实时定量 PCR 对 *PhTZF1* 在干旱、低温、ABA、MeJA、高盐和高渗胁迫下的表达量变化进行了分析, 结果显示, *PhTZF1* 受多种非生物逆境胁迫诱导表达, 其中, *PhTZF1* 在低温胁迫下表达量的变化较干旱等其他胁迫更为显著, 并且, *PhTZF1* 受低温胁迫诱导表达结果与课题组前期的表达谱芯片数据基本吻合, 进一步验证了芯片结果。

综上, 矮牵牛 *PhTZF1* 基因可能在多种信号转导过程中充当重要角色, 初步推断该基因参与了矮牵牛抵抗非生物胁迫的防御反应。在后续的研究中可以利用超量表达以及基因敲除等策略对其功能进行验证, 以进一步揭示其功能。

参 考 文 献

- [1] YANG Z R, WANG X C, LI X M. Advance on the study of transcription factors in higher plants[J]. Hereditas Review, 2004, 26(3): 403-408.
- [2] BERG J M. Zinc-finger proteins[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1993, 3(1): 11-16.
- [3] LAITY J H, LEE B M, WRIGHT P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(1): 39-46.
- [4] KODAIRA K S, QIN F, TRAN L S P, et al. *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate abscisic acid-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions[J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 742-756.
- [5] 郑恒, 管清杰, 柳参奎. 水稻 *OsC2HC-1* 锌指蛋白基因的表达分析及对盐碱逆境的响应[J]. 分子植物育种, 2013, 11(2): 152-162.
- [6] MIN D H, ZHAO Y, HUO D Y, et al. Isolation and identification of a wheat gene encoding a zinc finger protein (TaZnFP) responsive to abiotic stresses[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(5): 1597-1604.
- [7] LIVAL K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] SUN J, JIANG H, XU Y, et al. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*[J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(8): 1148-1158.
- [9] JAN A, MARUYAMA K, TODAKA D, et al. *OsTZF1*, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes[J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1202-1216.
- [10] TAZUKE A, ASAYAMA M. Expression of *CsSEF1* gene encoding putative CCCH zinc finger protein is induced by defoliation and prolonged darkness in cucumber fruit[J]. Planta, 2013, 237(3): 681-691.
- [11] GUO Y H, YU Y P, WANG D, et al. GhZFP1, a novel CCCH-

- type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5[J]. *New Phytologist*, 2009, 183(1): 62-75.
- [12] SEONG E S, CHOI D, CHO H S, et al. Characterization of a stress-responsive ankyrin repeat-containing zinc finger protein of *Capsicum annuum* (CaKR1) [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 40(6): 952.
- [13] BOGAMUWA S, JANG J C. The *Arabidopsis* tandem CCCH zinc finger proteins AtTZF4, 5 and 6 are involved in light-, abscisic acid- and gibberellic acid-mediated regulation of seed germination[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(8): 1507-1519.
- [14] CHEN Y, SUN A, WANG M, et al. Functions of the CCCH type zinc finger protein OsGZF1 in regulation of the seed storage protein GluB-1 from rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84(6): 621-634.
- [15] ZHANG C, ZHANG F, ZHOU J, et al. Overexpression of a phytochrome-regulated tandem zinc finger protein gene, *OsTZF1*, confers hypersensitivity to ABA and hyposensitivity to red light and far-red light in rice seedlings[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(7): 1333-1343.
- [16] KONG Z, LI M, YANG W, et al. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1376-1388.
- [17] LEE S, JUNG H J, KANG H, et al. *Arabidopsis* zinc finger proteins AtC3H49/AtTZF3 and AtC3H20/AtTZF2 are involved in ABA and JA responses[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(4): 673-686.
- [18] DENG H, LIU H, LI X, et al. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 876-889.
- [19] ZHANG C, ZHANG H, ZHAO Y, et al. Genome-wide analysis of the CCCH zinc finger gene family in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(10): 1543-1555.
- [20] CARRICK D M, LAI W S, BLACKSHEAR P J. The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis [J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2004, 6: 248-264.
- [21] HUDSON B P, MARTINEZ-YAMOUT M A, DYSON H J, et al. Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, 11(3): 257-264.
- [22] BARREAU C, PAILLARD L, OSBORNE H B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(22): 7138-7150.
- [23] WANG D, GUO Y, WU C, et al. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 44.
- [24] BROWN R S. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(1): 94-98.
- [25] HALL T M T. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(3): 367-373.

Cloning and expression analysis of a cold responsive zinc-finger protein gene *PhTZF1* in *Petunia hybrida*

NING Lu-yun LI Bei BAO Man-zhu ZHANG Wei

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Gene expression profile of *Petunia hybrida* was used to screen cold responsive gene, then one CCCH-type zinc-finger protein gene *PhTZF1* was identified. Its corresponding full length cDNA in *Petunia hybrida* was amplified via RT-PCR. The full length of the coding region was 2 085 bp, putatively encoding 694 amino acid residuals, and contained 2 CCCH-type zinc-finger domains. The analyses of phylogenetic tree showed that the *PhTZF1* was similar to the *AtSZF1* in *Arabidopsis thaliana*. Through analyzing expression profile of tissues with Semi-Quantitative RT-PCR, the *PhTZF1* was found to express in root, stem, leaf and flower, but with very low level. The results of real-time PCR showed that *PhTZF1* gene was up-regulated in different degrees under cold, drought, ABA, MeJA, salt and hypertonic stresses, while it was most sensitive to cold stress, indicating that the *PhTZF1* gene was related with the responses to cold, drought and other abiotic stresses.

Key words *Petunia hybrida*; CCCH-type; zinc-finger protein; abiotic stress; gene expression profile

(责任编辑:张志钰)