

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220131001

http://www.yykxjz.cn/

曾高雄, 许凯, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添, 王文磊. 坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 克隆和功能验证. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 201-209

ZENG G X, XU K, XU Y, JI D H, CHEN C S, XIE C T, WANG W L. cDNA cloning and functional verification of transcription factor *NhbZIP1* from *Neoporphyra haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 201-209

## 坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 克隆和功能验证\*

曾高雄<sup>1,2,3</sup> 许凯<sup>1,2,3</sup> 徐燕<sup>1,2,3</sup> 纪德华<sup>1,2,3</sup>  
陈昌生<sup>1,2,3</sup> 谢潮添<sup>1,2,3</sup> 王文磊<sup>1,2,3</sup>①

(1. 集美大学水产学院 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心 福建 厦门 361021; 3. 农业农村部东海海水健康与养殖重点实验室 福建 厦门 361021)

**摘要** 高温是制约坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)产业发展的主要因素之一, 阐明坛紫菜高温胁迫应答机理对耐高温品种选育至关重要。人们已分离多个坛紫菜抗逆相关基因, 但尚不清楚这些基因的表达调控机制。本研究通过分子生物学和生物信息学技术分离了坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 基因。该基因开放阅读框长 825 bp, 编码 274 个氨基酸。从开放阅读框推导的氨基酸序列有 5 个低复杂度区域和 1 个 BRLZ 结构。其中, BRLZ 是 bZIP 家族的保守结构域, 含有一个  $\alpha$  卷曲螺旋结构 (121~171 aa)。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测发现, *NhbZIP1* 受高温胁迫显著诱导。为进一步阐明 *NhbZIP1* 的功能, 将其转入莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中。结果显示, 高温胁迫下转基因藻株生物量始终高于野生型, 且随处理时间增加差异越来越显著。转基因藻株中热激蛋白家族和抗氧化系统相关基因的表达量显著高于野生型。研究表明, *NhbZIP1* 激活下游抗逆基因表达, 在坛紫菜应答高温胁迫中发挥重要作用。研究结果有助于阐明 bZIP 调控坛紫菜响应高温胁迫的分子机制, 为耐高温新品种选育提供了基础信息。

**关键词** 坛紫菜; 高温胁迫; bZIP 转录因子; 转基因; 莱茵衣藻

中图分类号 S968.43+1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)01-0201-09

坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)是我国沿海的一种大型经济海藻, 年产量占全国紫菜总产量的 75% 以上, 创造了可观的经济和社会效益(农业农村部渔业渔政管理局等, 2021), 其适宜生长温度为 16~24℃, 最适生长温度约为 21℃(曾呈奎等, 1985)。近年来, 全球变暖导致福建、浙江等地的坛紫菜出现大面积烂苗现象, 对沿海坛紫菜养殖业产生了巨大冲击, 严重影响坛紫菜栽培产业的发展(宋武林, 2009)。因此, 解析坛紫菜响应高温胁迫的分子机理, 挖掘耐高温基

因, 指导坛紫菜耐高温品种选育, 是从根本上解决当前坛紫菜高温烂苗的必经之路。

研究表明, 植物在应答非生物胁迫时, 可以通过转录因子控制下游靶基因以特定的强度在特定的时间和空间表达, 进而调控植物自身的逆境胁迫应答过程。碱性亮氨酸拉链(basic region-leucine zipper, bZIP)家族转录因子作为植物中最庞大、最保守的转录因子家族之一, 在植物响应高温、干旱、渗透等非生物胁迫中发挥着重要作用(Golldack *et al.*, 2014)。bZIP 转录

\* 国家重点研发项目(2018YFD0901500)、福建省重大科技专项(2019NZ08003)和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系共同资助。曾高雄, E-mail: 1135616345@qq.com

① 通信作者: 王文磊, 副教授, E-mail: wlwang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-01-31, 收修改稿日期: 2022-02-24

因子家族含有 2 个结构域,即 N 末端中的碱性区域,可识别基因启动子上的保守序列与之结合;以及 C 末端中的亮氨酸拉链区域(Zulfiqar *et al.*, 2016; E *et al.*, 2014),用于行使激活和抑制功能(刘慧洁等, 2019)。bZIP 已被证实可以通过结合功能基因或调节基因的启动子顺式元件来激活诱导下游基因的表达(Amorim *et al.*, 2017; 孙耀国等, 2021)。例如, Li 等(2020)研究发现,玉米(*Zea mays*) *ZmbZIP60* 直接或间接激活诱导 *ZmHSF6B* 等抗逆基因的表达,从而调控玉米的耐热性; Zong 等(2016)研究发现,水稻(*Oryza sativa*)的 *OsZIP23* 基因在 ABA 介导的抗旱性中起中枢调控作用。迄今为止,已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻、玉米中分别发现了 127、89 和 216 个 bZIP 转录因子(崔荣秀等, 2019)。但目前关于 bZIP 的研究主要集中在模式植物和部分大田作物,大型海藻中尚未有关于 bZIP 的报道。

本课题组前期研究发现,在高温胁迫下,坛紫菜的 *NhbZIP1* 基因显著上调表达,但其响应高温胁迫的分子机制尚不清楚。为此,本研究以坛紫菜全基因组和转录组数据为基础,对坛紫菜 bZIP 转录因子进行筛选和克隆,并分析其结构和表达模式。进一步将坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 基因转入莱茵衣藻中进行基因功能验证,为阐明 bZIP 调控坛紫菜抗逆的分子机制奠定理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验材料选自集美大学坛紫菜种质改良及应用实验室种质资源库。培养条件:温度为(21.0±0.5)℃,光照强度为 50~60 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照周期为 12 L : 12 D,每 2 d 更换一次新鲜 Provasoli's enrichment solution (PES)叶状体培养液。PES 母液配制: NaNO<sub>3</sub> 100 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 20 g 及微量元素,均定容至 1000 mL。培养藻体长度至(15±2) cm,选取生长状态良好、无破损、无扭曲、平面光滑的藻体用于后续实验。

莱茵衣藻选自本实验室培养的细胞壁缺失株系“CC-400 cw15 mt+”。培养条件:温度为(25.0±0.5)℃,光照强度为 50 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照周期为 14 L : 10 D,每 7 d 更换 TAP 培养基进行传代,培养至细胞密度为 1~2×10<sup>6</sup> 个/mL 用于后续实验(Yamano *et al.*, 2013)。

### 1.2 总 RNA 分离纯化和 cDNA 合成

采用 E.Z.N.A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 美国)提取坛紫菜和莱茵衣藻总 RNA。通过 Cary50

紫外分光光度计(Varian, 美国)分别测定 OD<sub>260 nm</sub> 和 OD<sub>280 nm</sub> 值,根据计算结果初步判断 RNA 提取纯度及浓度,后续使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,判断 RNA 完整性和质量。

### 1.3 坛紫菜 *NhbZIP1* 的筛选及克隆

根据课题组前期研究获得的坛紫菜基因组及转录组注释结果,在相关注释信息文件中以“bZIP”、“basic region-leucine zipper”为关键词进行搜索,将搜索获得的基因序列信息在 NCBI 中(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST 比对,最终筛选出 1 条注释结果为粳稻(*Oryza sativa japonica* Group) *OsZIP23* 基因的 Gene000717。扩增体系总体积为 25 μL: 2×Mix (TaKaRa) 12.5 μL, dd H<sub>2</sub>O 9.5 μL, 5'和 3'引物各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL。PCR 扩增程序:预变性 94℃ 30 s;变性 98℃ 10 s,退火 58.6℃ 30 s,延伸 72℃ 2 min,共 35 个循环;最终延伸 72℃ 10 min。将扩增产物回收纯化后进行测序验证,根据测序结果,获得 *NhbZIP1* 基因全长序列。

### 1.4 *NhbZIP1* 生物信息学分析

使用在线软件 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析 *NhbZIP1* 基因核苷酸及氨基酸序列,预测分析开放阅读框位置,获得编码基因的起始密码子和终止密码子。使用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析保守结构域。使用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 *NhbZIP1* 基因所编码蛋白质的一级结构。使用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 *NhbZIP1* 基因所编码蛋白质是否存在跨膜结构域。使用磷酸化位点在线预测网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)和 O-连接糖基化位点在线预测网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)分析 *NhbZIP1* 基因所编码蛋白质潜在的磷酸化和 O-连接糖基化位点。使用在线软件 WoLF PSORT (<http://www.wolfpsort.org/>)对 *NhbZIP1* 基因进行亚细胞定位预测。使用 MEGA6 软件的 Neighbor-Joining 法构建 *NhbZIP1* 系统进化树。

### 1.5 *NhbZIP1* 莱茵衣藻表达载体构建及转化

在目的基因起始密码子和终止密码子两端分别加上 *Kpn* I 和 *Pst* I 2 个酶切位点碱基序列,使用 *Kpn* I 和 *Pst* I 内切酶对目的基因和莱茵衣藻表达载体 pChlamy\_3 分别进行双酶切。双酶切体系:目的基因/pChlamy\_3 载体 2 μg, 10×mol/L 缓冲液 2 μL, *Kpn* I 内

切酶 1  $\mu\text{L}$ , *Pst* I 内切酶 1  $\mu\text{L}$ , 用 dd H<sub>2</sub>O 补足体系。双酶切程序: 37 $^{\circ}\text{C}$  140 min, 65 $^{\circ}\text{C}$  10 min。双酶切后的目的基因和表达载体在 16 $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜连接, 将连接产物转化至感受态细胞 *E.coli* DH5 $\alpha$  中, 挑选含有氨苄抗性的阳性单克隆菌落, 进行 PCR 验证后扩繁培养, 使用去内毒素质粒中量提取试剂盒(TIANGEN)提取质粒, 获得含有目的基因的 pChlamy\_3 莱茵衣藻表达载体。通过玻璃珠转化法(林键章等, 2021)将目的基因转化至莱茵衣藻中, 筛选具有潮霉素抗性品系的单克隆衣藻进行扩繁培养, 用于后续实验。

### 1.6 qRT-PCR 分析 *NhbZIP1* 的表达水平

本研究采用 qRT-PCR 技术检测 *NhbZIP1* 在 32 $^{\circ}\text{C}$  高温处理条件下不同时间点(0、5、10、15、30、60、180 和 360 min)的相对表达水平。根据克隆获得的 *NhbZIP1* 基因序列设计 qRT-PCR 引物(表 1), 分别以

*NhUBC* 和  $\beta$ -*tubulin* 基因作为坛紫菜和莱茵衣藻定量的内参基因。反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ SYBR green master mix (TaKaRa) 10  $\mu\text{L}$ , dd H<sub>2</sub>O 6.8  $\mu\text{L}$ , Rox Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , 5'和 3'引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。扩增程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 退火及延伸 58.6 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环。qRT-PCR 扩增在 Step One Plus 型荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)上进行。

### 1.7 转基因莱茵衣藻抗逆性检测

野生型莱茵衣藻和转基因莱茵衣藻培养至对数生长期, 通过 Cary50 紫外分光光度计(Varian, 美国)测定 OD<sub>750 nm</sub> 值约为 0.3。将野生型和转基因莱茵衣藻同时置于 32 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中, 控制其他相同条件不变。抽取样本通过外观表型观察及检测 OD<sub>750 nm</sub> 值来判断在不同时间处理下(0、24、48 和 72 h)其生物量变化差异。

表 1 实验用到的引物序列  
Tab.1 Primers used in this experiment

引物名称 Primer name	序列(5'~3') Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>NhbZIP1</i> F	CCCCTTTGCGTTGTCGA	PCR 扩增 PCR amplification
<i>NhbZIP1</i> R	AAGGTACGGGCGCATGA	
<i>NhbZIP1</i> QF	TCCCATAGCGTCTCTGAT	荧光定量 PCR 分析 qRT-PCR analysis
<i>NhbZIP1</i> QR	CACCCCATACCCAACGAA	
<i>NhUBCF</i>	TCACAACGAGGATTTACCACC	坛紫菜内参 Reference gene of <i>N. haitanensis</i>
<i>NhUBCR</i>	GAGGAGCACCTTGAAACG	
<i>Tubulin</i> QF	CTCGCTTCGCTTTGACGGTG	莱茵衣藻内参 Reference gene of <i>C. reinhardtii</i>
<i>Tubulin</i> QR	CGTGGTACGCCTTCTCGGC	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆筛选 Positive clone screening
M13R	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	

### 1.8 转基因莱茵衣藻中抗逆相关基因的 qRT-PCR 分析

采用 qRT-PCR 技术检测莱茵衣藻 CAT、SOD 抗氧化酶编码基因及 *HSP70A*、*HSP70B*、*HSP90A*、*HSP90C* 热激蛋白家族基因等相关抗逆基因在 32 $^{\circ}\text{C}$  高温处理条件下不同时间点(0、1、2、3 h)的相对表达水平变化。qRT-PCR 扩增在 Step One Plus 型荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)上进行。

### 1.9 数据处理与分析

所有实验处理均设置 4 个生物学重复。利用软件 SPSS 23.0 和 Excel 对实验数据结果进行统计分析, 并采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较不同数据组间的差异,  $P < 0.05$  表示存在显著差异,  $P < 0.01$  表示差异极显著。用 GpaphPad Prism 8.0 软件作图呈现数据分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *NhbZIP1* 的克隆及序列分析

经 PCR 扩增获得一条长度约为 1000 bp 的产物(图 1a), 经测序和 BLAST 分析比对, 确定该基因为坛紫菜 *bZIP* 基因, 命名为 *NhbZIP1*。该基因开放阅读框起始密码子(ATG)到终止密码子(TAG)共 825 bp, 编码 274 个氨基酸, 包含 1 个碱性区域亮氨酸拉链(basic region leucine zipper, BRLZ, 115~179 aa)结构域(图 1b)。该蛋白不存在信号肽及跨膜结构, 定位于细胞核中。

### 2.2 坛紫菜 *NhbZIP1* 在高温胁迫下的表达模式

高温对坛紫菜 *NhbZIP1* 基因表达水平有显著影响, 具体结果如下: 在高温处理 5 min 时, *NhbZIP1* 基因表达水平显著提高( $P < 0.05$ ), 表达水平是对照组

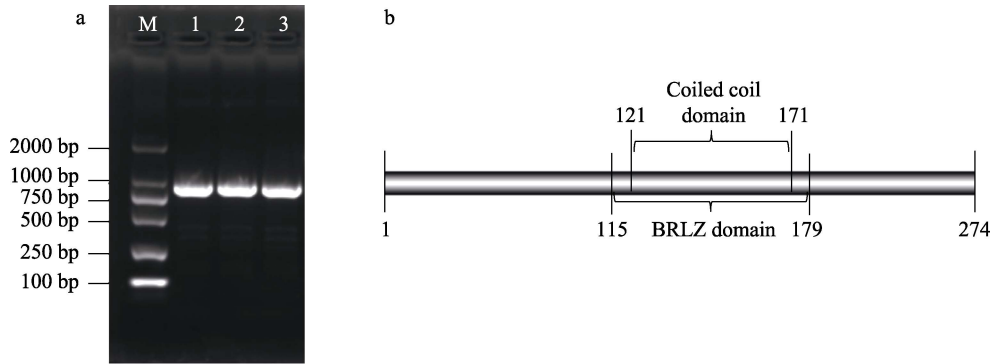


图1 *NhbZIP1* 基因克隆及蛋白结构域分析

Fig.1 Cloning validation and protein domain analysis of *NhbZIP1* gene

a: *NhbZIP1* 基因克隆产物电泳; b: *NhbZIP1* 蛋白保守结构域

a: Agarose electrophoresis of PCR products of *NhbZIP1* gene; b: Protein conservative domain of *NhbZIP1*

的1.6倍。在随后处理的60 min内,基因表达量逐渐降低,甚至降到初始水平以下,而在高温处理的180~360 min,基因表达量又显著提高,在高温处理360 min时表达水平约为初始水平的3.4倍(图2)。

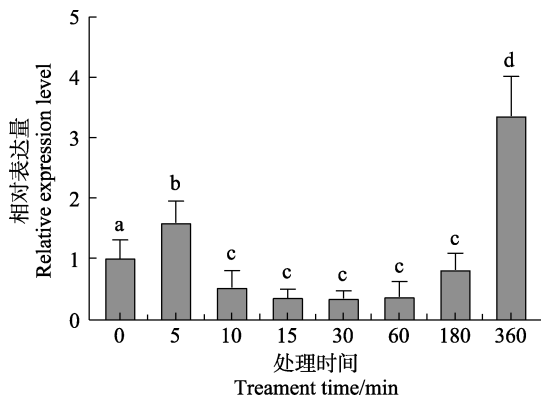


图2 坛紫菜 *NhbZIP1* 基因在 32°C 高温胁迫下的表达模式  
Fig.2 Expression pattern of *NhbZIP1* gene in *N. haitanensis* under high temperature stress at 32°C

不同上标字母表示数据间存在显著性差异( $P < 0.05$ ),下同。  
Different superscript letters indicate significant differences between data ( $P < 0.05$ ), the same as below.

### 2.3 转基因莱茵衣藻的筛选鉴定及 *NhbZIP1* 表达水平分析

转基因实验结果显示,野生型莱茵衣藻未扩增出相应目的基因片段,而转基因莱茵衣藻均检测到阳性PCR产物(图3a),表明已将坛紫菜 *NhbZIP1* 基因成功转化到莱茵衣藻中。选择第1个转基因品系(T1)用于后续实验分析。荧光定量PCR结果显示,高温处理30 min前, *NhbZIP1* 基因表达量相对稳定,而在处理60 min时,基因表达水平显著提高( $P < 0.05$ ),表达水

平是0 min时的1.8倍。在随后的高温胁迫下,基因表达量维持较高水平,在高温处理180 min时,表达水平约为初始水平的2.6倍(图3b)。

### 2.4 转基因莱茵衣藻耐高温能力评价

随着高温处理时间的增加,转基因莱茵衣藻和野生型莱茵衣藻的藻体都逐渐变黄(图4a),表明在32°C高温胁迫下藻体死亡量逐步增加,但转基因莱茵衣藻存活率始终高于野生型(图4b),且随着处理时间增加,差异越为显著。实验结果显示,转基因莱茵衣藻耐热性要高于野生型。

### 2.5 转基因莱茵衣藻中抗逆相关基因的差异表达分析

研究结果显示(图5),抗氧化酶系统的CAT和SOD在高温处理的1~3 h中,转基因株系的转录水平均显著高于野生型。而热激蛋白家族基因也呈现类似现象,处理前期,基因表达量在转基因衣藻中呈现逐步上升趋势, *HSP70A*、*HSP70B*、*HSP90A* 基因在转基因处理组中胁迫1~2 h表达量达到最高水平,转基因株系中基因表达量始终高于野生型。

## 3 讨论

### 3.1 *NhbZIP1* 基因在坛紫菜高温胁迫下的表达水平变化特征

本研究克隆获得了转录因子 *NhbZIP1* 基因,与前人研究对比发现,该基因也存在一个BRLZ结构,在121~171 aa之间是 $\alpha$ 卷曲螺旋结构;同时,该基因定位于细胞核中,符合转录因子的一般特征(邓冰等,2021),表明 *NhbZIP1* 基因为bZIP家族转录因子。本研究发现,在高温处理下该基因显著上调表达,而在

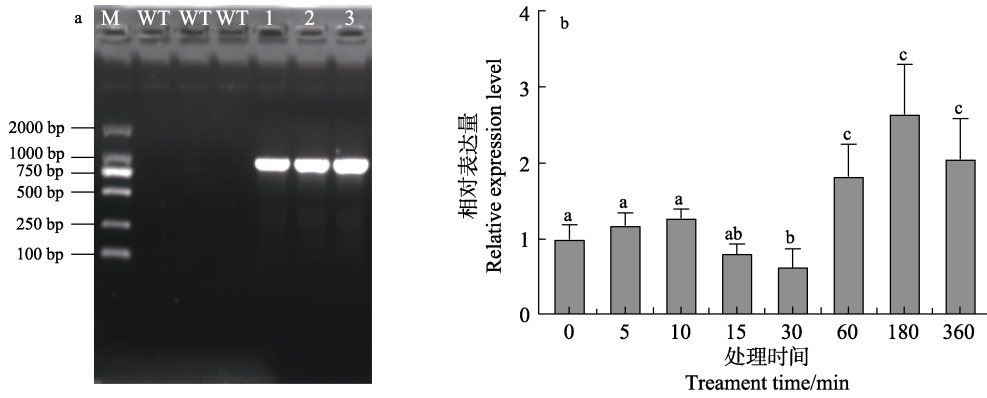


图 3 转化藻株的筛选验证及 *NhbZIP1* 基因表达模式

Fig.3 Screening and validation of algal transformants and expression pattern of *NhbZIP1* gene

a: 野生型莱茵衣藻和转基因莱茵衣藻目的基因 PCR 检测

M 为 DL2000 Marker, WT: 野生型莱茵衣藻, 1~3: 转基因莱茵衣藻, 每个实验组各 3 个重复。

b: 高温 32°C 胁迫下 *NhbZIP1* 基因在莱茵衣藻中的相对表达水平

a: PCR detection of target gene of wild type *C. reinhardtii* and the algal transformants

M: DNA Maker DL2000, WT: Wild type *C. reinhardtii*, 1~3: Genetically modified *C. reinhardtii*.

There were three replicates in each group.

b: Relative expression level of *NhbZIP1* gene in *C. reinhardtii* under 32°C high temperature stress

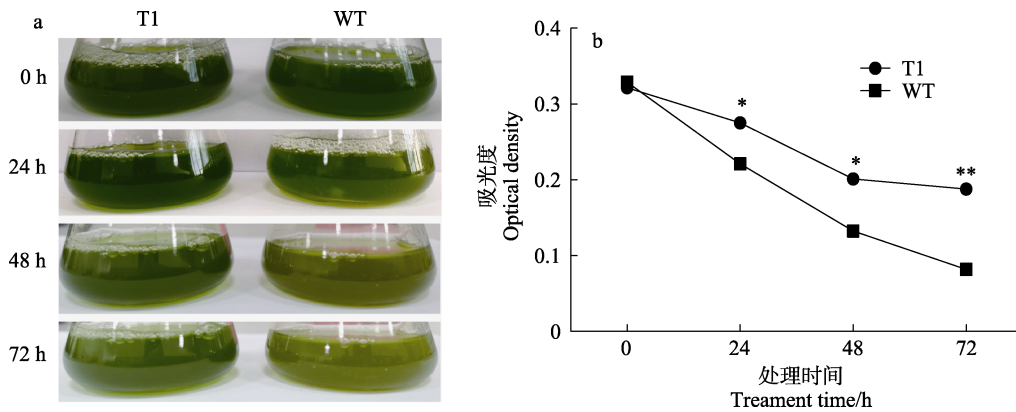


图 4 高温 32°C 胁迫下转基因(T1)和野生型(WT)莱茵衣藻的生物量变化

Fig.4 Biomass of transgenic *C. reinhardtii* overexpressing *NhbZIP1* (T1) and wild type (WT) *C. reinhardtii* under 32°C high temperature stress

\*表示差异显著,  $P < 0.05$ ; \*\*表示差异极显著,  $P < 0.01$ 。下同。

\* indicates significant difference at  $P < 0.05$  level; \*\* indicates highly significant difference at  $P < 0.01$  level. The same as below.

小麦(Geng *et al*, 2018)和水稻(Zong *et al*, 2020)的研究中也发现同样的现象, *TabZIP60* 基因和 *OsbZIP23* 基因的表达量在高温和干旱胁迫前期也显著升高, 推断 *NhbZIP1* 可以快速响应非生物胁迫以激活下游抗逆基因。这一结果也与课题组前期研究结果一致, Wang 等(2018)研究发现, 坛紫菜藻体在应答高温胁迫初期有一个应激反应, 而后在转录水平进行重组, 之后激活众多抗逆通路抵御长期高温胁迫。

### 3.2 *NhbZIP1* 基因调控机制

研究表明, bZIP 激活 HSP 调控植物蛋白折叠稳

态在其抵抗逆境胁迫中发挥着重要作用。玉米 bZIP 转录因子作为未折叠蛋白反应的诱导基因, 可调控下游 *HSFTF13* 基因的表达来诱导 HSPs 合成, 进一步通过激活连接未折叠蛋白反应和热激反应 2 种热胁迫响应系统(Li *et al*, 2020), 促使玉米形成高温胁迫下的自我保护机制。同样, 水稻中的 bZIP 转录因子可与 *OsHsfB2c* 基因启动子的反应元件相结合来调控 HSF 转录因子的表达, 进而诱导体内 HSPs 的大量积累以抵御外界的非生物胁迫(李濯雪, 2015)。本课题组前期研究发现, HSPs 参与维持胞内蛋白合成、折叠和清除, 是坛紫菜适应逆境胁迫的关键基因(Wang

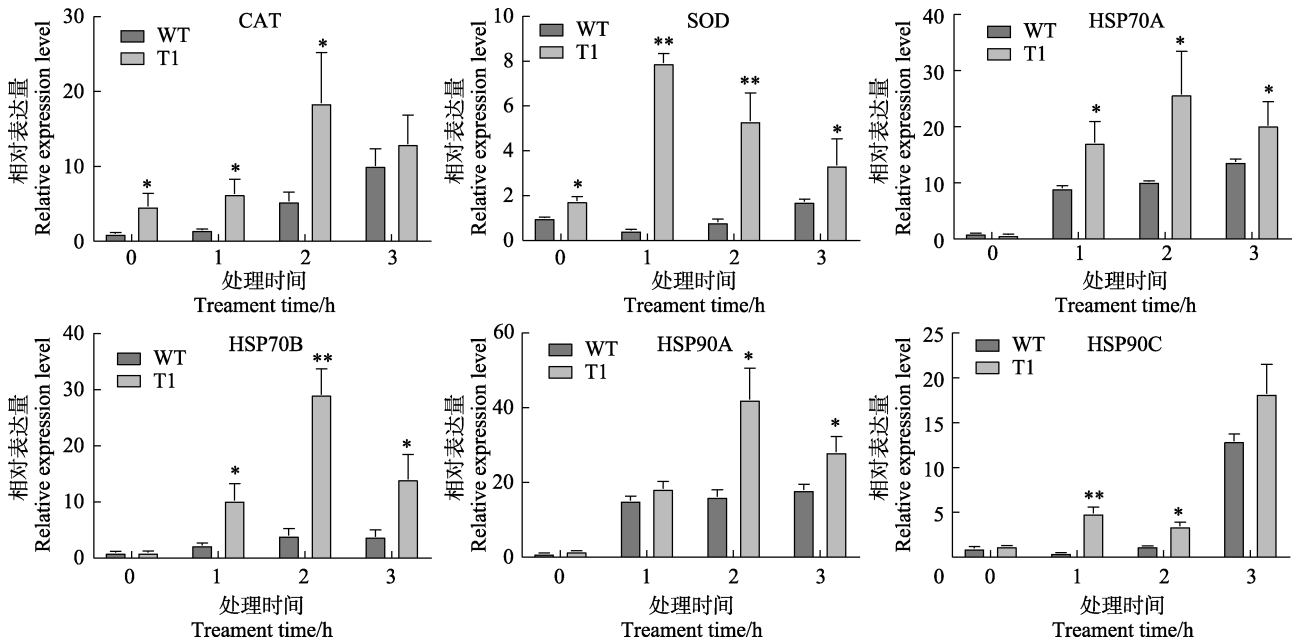


图5 32℃高温胁迫下转基因(T1)和野生型(WT)莱茵衣藻抗氧化酶和热激蛋白基因的相对转录水平

Fig.5 Relative transcript levels of genes encoding antioxidant enzymes and heat shock proteins in transgenic *C. reinhardtii* overexpressing *NhbZIP1* (T1) and wild type (WT) *C. reinhardtii* under 32℃ high temperature stress

*et al.*, 2018、2019、2021; Chang *et al.*, 2021)。进一步研究证实, bZIP 可与下游含有 AGCT 核心基序的 HSP 相关基因结合, 诱导其表达。而在坛紫菜 HSPs 基因启动子中同样含有 ABRE 等顺式元件结合基序(张宛晨等, 2021)。因此, 坛紫菜 *NhbZIP1* 可能通过调节 HSPs 增加藻体的抗性。为了进一步验证这个推测, 本研究将坛紫菜 *NhbZIP1* 基因转化至莱茵衣藻中进行功能验证。本研究发现, 转基因莱茵衣藻中抗逆相关基因的转录水平显著高于野生型莱茵衣藻。同时, Wang 等(2019)研究发现, 坛紫菜 *PhHSP22* 基因可通过调控蛋白质动态平衡等途径增加转基因衣藻的耐高温能力。因此, 推测 *NhbZIP1* 基因可能通过调控 HSP 的转录进而调控藻体应答高温胁迫过程。

除了维持蛋白质动态平衡, 维持氧化还原动态平衡也是坛紫菜响应非生物胁迫的关键过程(张元等, 2011)。坛紫菜在进化和发育过程中形成了一套高效的活性氧清除机制, 即抗氧化系统(张元等, 2011; 林颖辉等, 2018; 徐严等, 2018)。抗氧化酶在紫菜的抗氧化系统中起到不可替代的作用, 例如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等(Wang *et al.*, 2018)。Kranmer 等(2002)研究发现, 过表达 *ThbZIP1* 基因可提高 SOD 等抗氧化酶的活性, 进而加快活性氧的清除, 以增强植株在逆境胁迫下的抗性。同样, 拟南芥转 *CabZIP* 基因植株也可通过调控 CAT 等抗氧化酶清除体内活性氧, 进而提升转基因植株的抗旱性和抗盐

性(曹红利等, 2012)。而本研究与上述研究结果相同, 无论是正常条件下还是高温胁迫条件下, *NhbZIP1* 转基因植株中 CAT 和 SOD 的转录水平均显著高于野生型。因此, 坛紫菜 *NhbZIP1* 激活抗氧化酶编码基因也可能是机体耐高温的另一个重要原因。

## 4 结论

本研究首次在坛紫菜中克隆获取了 bZIP 家族转录因子 *NhbZIP1* 基因, 该基因可以快速响应高温胁迫。转 *NhbZIP1* 基因莱茵衣藻的耐热性显著高于野生型莱茵衣藻, 在高温胁迫下, 转基因株系的热激蛋白家族和抗氧化酶相关基因的表达水平均显著高于野生型。以上结果表明, *NhbZIP1* 在坛紫菜应答高温胁迫中发挥着重要作用。

## 参 考 文 献

- AMORIM LLB, DA FONSECA DOS SANTOS R, NETO JPB, *et al.* Transcription factors involved in plant resistance to pathogens. *Current Protein and Peptide Science*, 2017, 18(4): 335–351
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2021*. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021]

- CAO H L, YUE C, WANG X C, *et al.* Advance in bZIP transcription factors related with plant stress resistance. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(8): 1094–1100 [曹红利, 岳川, 王新超, 等. bZIP 转录因子与植物抗逆性研究进展. *南方农业学报*, 2012, 43(8): 1094–1100]
- CHANG J, SHI J Z, LIN J Z, *et al.* Molecular mechanism underlying *Pyropia haitanensis* PhHsp22-mediated increase in the high-temperature tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(2): 1137–1148
- CUI R X, ZHANG Y W, CHEN X Q, *et al.* The latest research progress on the stress responses of bZIP involved in plants. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(2): 143–155 [崔荣秀, 张议文, 陈晓倩, 等. 植物 bZIP 参与胁迫应答调控的最新研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 143–155]
- DENG B, LIU Z Q, YUAN X W, *et al.* Identification of MYB transcription factor family members of *Flammulina filiformis* and analysis of their expression pattern during fruiting body development. *Acta Edulis Fungi*, 2021, 28(5): 1–11 [邓冰, 刘宗奇, 袁学文, 等. 金针菇 MYB 转录因子家族成员鉴定及其在子实体形成中的表达模式分析. *食用菌学报*, 2021, 28(5): 1–11]
- E Z G, ZHANG Y P, ZHOU J H, *et al.* Roles of the bZIP gene family in rice. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(2): 3025–3036
- GENG X L, ZANG X S, LI H R, *et al.* Unconventional splicing of wheat *TabZIP60* confers heat tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2018, 274: 252–260
- GOLLDACK D, LI C, MOHAN H, *et al.* Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 151
- KRANNER I, BECKETT R P, WORNIK S, *et al.* Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal*, 2002, 31(1): 13–24
- LI Z X, TANG J, SRIVASTAVA R, *et al.* The transcription factor *bZIP60* links the unfolded protein response to the heat stress response in maize. *The Plant Cell*, 2020, 32(11): 3559–3575
- LI Z X. Screening of proteins binding to *OsHsfB2c* promoter by yeast one-hybrid system. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2015 [李濯雪. 利用酵母单杂交方法对 *OsHsfB2c* 启动子结合蛋白的筛选. 湖南农业大学硕士学位论文, 2015]
- LIN J Z, WANG W L, XU Y, *et al.* The cDNA cloning and functional verification of the *PhCUL1* gene from *Pyropia haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 193–200 [林键章, 王文磊, 徐燕, 等. 坛紫菜泛素连接酶 *PhCUL1* 基因克隆与功能验证. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 193–200]
- LIN Y H, WANG W L, XU Y, *et al.* Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Pyropia haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 122–129 [林颖辉, 王文磊, 徐燕, 等. 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及表达特征. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 122–129]
- LIU H J, XU H, QIU W Y *et al.* Roles of bZIP transcription factors in plant growth and development and abiotic stress response. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(7): 1205–1214 [刘慧洁, 徐恒, 邱文怡, 等. bZIP 转录因子在植物生长发育及非生物逆境响应的作用. *浙江农业学报*, 2019, 31(7): 1205–1214]
- SONG W L. Analysis on rotten seedlings of *Porphyra haitanensis* and its prevention method. *Journal of Fisheries Research*, 2009(2): 72–75 [宋武林. 坛紫菜烂苗原因分析及预防对策. *福建水产*, 2009(2): 72–75]
- SUN Y G, CAI T R, JI X Z, *et al.* Genome-wide bioinformatics analysis of *bZIP* gene family in *Pyrus communis*. *Forestry and Ecological Sciences*, 2021, 36(1): 24–34 [孙耀国, 蔡天润, 姬行舟, 等. 西洋梨全基因组 *bZIP* 基因家族生物信息学分析. *林业与生态科学*, 2021, 36(1): 24–34]
- WANG W L, CHANG J, ZHENG H Y, *et al.* Full-length transcriptome sequences obtained by a combination of sequencing platforms applied to heat shock proteins and polyunsaturated fatty acids biosynthesis in *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(2): 1483–1492
- WANG W L, LIN J Z, CHANG J, *et al.* A RING type ubiquitin ligase *PhCULA* is involved in thermotolerance of *Pyropia haitanensis*. *Algal Research*, 2021, 59: 102448
- WANG W L, TENG F, LIN Y H, *et al.* Transcriptomic study to understand thermal adaptation in a high temperature-tolerant strain of *Pyropia haitanensis*. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195842
- XU Y, WANG W L, XU K, *et al.* Effect of different saline stress on physiological indexes of *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Oceanography*, 2018, 37(3): 380–386 [徐严, 王文磊, 许凯, 等. 不同盐度胁迫对坛紫菜叶状体生理指标的影响. *应用海洋学学报*, 2018, 37(3): 380–386]
- YAMANO T, IGUCHI H, FUKUZAWA H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 691–694
- ZENG C K, WANG S J, LIU S J. Marine algae cultivation. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985 [曾呈奎, 王素娟, 刘思俭. 海藻栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985]
- ZHANG W C, ZHU J, YI L F. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *HSP20* gene family in *Pyropia haitanensis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(6): 1527–1535 [张宛晨, 朱静, 易乐飞. 坛紫菜 *HSP20* 基因家族成员的全基因组鉴定及生物信息学分析. *南方农业学报*, 2021, 52(6): 1527–1535]
- ZHANG Y, XIE C T, CHEN C S, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses. *Journal of Fisheries of China*, 2011,

- 35(3): 379–386 [张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应. 水产学报, 2011, 35(3): 379–386]
- ZONG W, TANG N, YANG J, *et al.* Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2810–2825
- ZONG W, YANG J, FU J, *et al.* Synergistic regulation of drought-responsive genes by transcription factor *OsbZIP23* and histone modification in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(6): 723–729
- ZULFIQAR A, SAMARA S S, IHSAN K *et al.* Functions of plant's bZIP transcription factors. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 53(2): 303–314

(编辑 马瑾艳)

## cDNA Cloning and Functional Verification of Transcription Factor *NhbZIP1* from *Neoporphyra haitanensis*

ZENG Gaoxiong<sup>1,2,3</sup>, XU Kai<sup>1,2,3</sup>, XU Yan<sup>1,2,3</sup>, JI Dehua<sup>1,2,3</sup>, CHEN Changsheng<sup>1,2,3</sup>,  
XIE Chaotian<sup>1,2,3</sup>, WANG Wenlei<sup>1,2,3</sup>①

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 2. Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture, Xiamen, Fujian 361021, China; 3. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract** *Neoporphyra haitanensis* is a macroalgae available in the south coast of China, and it is one of the most widely cultivated seaweeds in China. In recent years, due to global warming, the continuously high temperatures following the White Dew solar term, has led to the decomposition of seedlings of *N. haitanensis* in Fujian, Zhejiang and other provinces. This has had a huge impact on the coastal *N. haitanensis* cultivation industry in terms of production and development. Therefore, investigation of the molecular mechanism of high temperature stress response of *N. haitanensis* and the high-temperature resistance related genes is essential, and the results can also lay a foundation for the breeding of high-temperature resistant varieties of *N. haitanensis*. A previous study revealed that the basic region Leucine Zipper (bZIP) family transcription factors are one of the largest and most conserved transcription factor families in plants. The family plays an important role in plant response to abiotic stresses, such as high temperature, drought, and osmosis. bZIP transcription factors regulate plant response to abiotic stress by binding to functional genes or regulatory gene promoter cis-elements to activate and induce downstream gene expression. So far, 127, 89, and 216 bZIP transcription factors have been found in *Arabidopsis*, rice, and maize, respectively. However, previous studies on bZIP have mainly focused on model plants and only some field crops, and the functions of bZIP in macroalgae have not been reported. To this end, *NhbZIP1* was screened based on the whole genome and transcriptomic data of *N. haitanensis*, and the *NhbZIP1* gene was cloned and functionally analyzed by molecular biology and bioinformatics techniques. Its structure and expression pattern were also analyzed. Finally, the *NhbZIP1* gene was transformed into *Chlamydomonas reinhardtii* by the “glass bead transformation” method for gene function verification. In this study, a gene product with a length of approximately 1000 bp was obtained by PCR amplification. After sequencing and BLAST analysis, the gene was identified as the *bZIP* gene of *N. haitanensis* and named *NhbZIP1*. Studies have shown that the open reading frame of *NhbZIP1* gene is 825 bp in

① Corresponding author: WANG Wenlei, E-mail: wlwang@jmu.edu.cn



length and encodes 274 amino acids. There are five low-complexity domains and one BRLZ (115~179 aa) structure. BRLZ is a conserved domain of bZIP family and contains a  $\alpha$ -coiled helix structure (121~171 aa). The molecular formula of *NhbZIP1* is  $C_{1193}H_{1935}N_{339}O_{375}S_7$ , and the predicted molecular weight of *NhbZIP1* is 27 251.95 Da; its theoretical isoelectric point is 5.03, and it contains 32 negative charge residues and 26 positive charge residues in total. Ala (A) content of the protein was 27%, and Arg (R) content was 4.7%. The total average hydrophilic coefficient was 0.089, which indicates that the protein is hydrophilic, and the instability coefficient was 42.68, which indicates that the protein is unstable. There were 15 potential phosphorylation sites and 12 potential O-linkage glycosylation sites in this protein, which had no signal peptide or transmembrane structure. The protein was located in the nucleus and its characteristics were consistent with those of the genes encoding transcription factors, indicating that *NhbZIP1* was a bZIP family transcription factor. Phylogenetic analysis showed that *NhbZIP1* gene was isolated from *Porphyra umbilicalis* and was different from that higher plants, indicating that *NhbZIP1* gene was relatively conserved in *Porphyra* and was genetically distant from higher plants. It is speculated that the *NhbZIP1* gene of *N. haitanensis* has a different evolutionary mode from that of other species. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) showed that *NhbZIP1* gene was significantly induced by high temperature stress, and the expression level of *NhbZIP1* gene was about 3.4 times that of the initial level after 6 h of stress. Under long-term high temperature stress, the heat tolerance of *N. haitanensis* could be enhanced by enhancing the expression of the resistance gene *NhbZIP1*. To further clarify the molecular function of *NhbZIP1* gene, we transformed it into *C. reinhardtii* for functional verification. The results showed that the expression level of *NhbZIP1* gene was relatively stable before 30 min of high temperature treatment, while the gene expression level was significantly increased after 60 min of the treatment, which was 1.8 times that of the initial level. Under subsequent high temperature stress, the gene expression level remained high, which was about 2.6 times that of the initial level after 180 min of high temperature treatment. The biomass of transgenic lines under heat stress was always higher than that of the wild type, and the difference became more significant with the increase of treatment time. The expression levels of heat shock protein family and genes related to antioxidant system in transgenic lines were significantly higher than that of the wild type. The results showed that *NhbZIP1* gene plays an important role in activating the expression of downstream stress-resistant genes in the response to heat stress in *N. haitanensis*, suggesting that *NhbZIP1* gene may enhance the heat tolerance of algae by regulating the expression of HSPs and activating the expression of genes encoding antioxidant enzymes. This study helps to clarify the molecular mechanism of bZIP transcription factor in regulating the response of *N. haitanensis* to high temperature stress and provides theoretical basis for guiding the breeding of new varieties with high temperature tolerance.

**Key words** *Neoporphyra haitanensis*; Heat stress; bZIP transcription factor; Transgenic; *Chlamydomonas Reinhardtii*