

拟南芥中 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *AtGW2* 的克隆和功能分析

姜颖^{1,2}, 曹言勇², 路运才¹, 唐保军², 王利锋², 李会勇²

(¹黑龙江大学农作物研究院, 哈尔滨 150080; ²河南省农业科学院粮食作物研究所/
河南省玉米生物学重点实验室, 郑州 450002)

摘要:水稻 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *OsGW2* 在调控水稻产量性状方面起着十分重要的作用。根据 *OsGW2* 的 cDNA 序列, 通过 RT-PCR 方法从拟南芥中克隆了一个与 *OsGW2* 同源的基因, 命名为 *AtGW2*。序列分析表明, 该基因编码一个 RING-C2 型 E3 泛素连接酶蛋白, 含有 401 个氨基酸。通过构建 *AtGW2* RNA 干扰植物表达载体并转化拟南芥, 结果表明, 获得的转基因后代植株的子粒较野生型大, 并且转基因拟南芥子粒千粒重高于野生型, 这表明 *AtGW2* 负调控拟南芥子粒大小及粒重。

关键词:拟南芥; *AtGW2*; RING 型 E3 泛素连接酶; RNAi; 粒重

Cloning and Functional Analysis of *Arabidopsis thaliana* *AtGW2*, a RING-type E3 Ubiquitin Ligase Protein

JIANG Ying^{1,2}, CAO Yan-yong², LU Yun-cai¹, TANG Bao-jun², WANG Li-feng², LI Hui-yong²

(¹Institute for Crop Research, Heilongjiang University, Harbin 150080; ²Henan Provincial Key Laboratory for
Maize Biology/Cereal Crop Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Abstract: *OsGW2* (RING type E3 ubiquitin ligase) plays important roles in regulating rice yielding traits. According to the *OsGW2* cDNA sequences, the homolog of *OsGW2* was isolated from *Arabidopsis thaliana* by RT-PCR and designated as *AtGW2*. The predicted *AtGW2* protein has 401 amino acids, and has a RING-type domain. The grain size and kilo kernels weight of wild-type *Arabidopsis* plants were lower than those of *AtGW2* RNA interference transgenic plants. These results suggested that *AtGW2* negatively regulates the grain size and weight in *Arabidopsis*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *AtGW2*; RING-type E3 ubiquitin ligase; RNAi; Grain weight

泛素蛋白酶体途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径^[1], 泛素化修饰途径涉及泛素激活酶 E1、结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 的一系列反应, 其中, 泛素连接酶 E3 决定靶蛋白的特异性识别, 在泛素途径中具有重要的作用^[2]。目前发现鉴定的泛素连接酶 E3 主要有 3 大类: HECT 结构域家族、RING 结构域家族和 U-box 蛋白家族^[3]。RING 结构域家族最典型的特点是具有环指结构域 (ring finger domain), RING 结构域是此家族具有泛素连接酶作用的重要因素^[1], RING 结构域的氨基酸序列为 Cys-X₂-Cys-

X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His-X_(2,3)-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys (其中 X 代表任意的氨基酸)^[4]。在拟南芥中, 预测存在 500 个以上的 RING 蛋白, 然而只有极少数 RING 蛋白的生物学功能得到了阐明或预测。

RING 型 E3 泛素连接酶 (简称 RING E3 蛋白) 参与调控拟南芥营养成分吸收信号途径。拟南芥编码的 *SIS3* (SUGAR-INSENSITIVE 3) 在幼苗早期生长过程中正调控糖信号途径^[5]。拟南芥的另一个 RING E3 蛋白 *NLA* (Nitrogen limitation adaptation) 正调控氮缺乏情况下拟南芥的生长发育^[6]。

RING E3 蛋白同样也参与调控植物衰老机制。

收稿日期: 2010-10-21 修回日期: 2011-01-13

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08003-004, 2009ZX08009-061B)

作者简介: 姜颖, 在读硕士。E-mail: bazhujiangying@126.com

通讯作者: 李会勇, 副研究员, 主要从事玉米种质资源和功能基因组学研究。E-mail: lihuiyong1977@126.com

在拟南芥中,已鉴定出一种阻止早衰的因子,即 SAUL1 (SENESCENCE-ASSOCIATED E3 UBIQUITIN-LIGASE 1),该因子与甲醛氧化酶互作并介导该酶的泛酸化降解,进而影响脱落酸的水平,从而延缓拟南芥的衰老^[7]。拟南芥中另一个 RING E3 蛋白 RHA2a(RING-H2)则正调控脱落酸介导的种子休眠和幼苗早期生长发育^[8]。

RING E3 蛋白也参与调控逆境胁迫信号途径。拟南芥中的 *HOS1* 基因编码一个有功能的 RING-finger 蛋白,在低温处理下转运至核内积累,具有泛素 E3 的连接酶(Ubiquitin ligases)活性,催化特定的信号蛋白水解^[9],能够与低温胁迫响应关键因子 ICE1 (INDUCER OF CBF (C-repeat (CRT)-binding factors) EXPRESSION 1) 互作,并负调控 ICE1 介导的低温胁迫信号途径^[10]。RING E3 泛素连接酶 Rma1H1 和 Rma1 通过降低水通道蛋白的表达水平来调控拟南芥的干旱胁迫反应^[11]。在拟南芥中发现 DREB2A-Interacting Proteins (DRIP),含有一个保守的 N-端 C3HC4 型 RING 指区域,在细胞核中,与 DREB2A (The Dehydration-Responsive Element Binding Protein2A) 蛋白相互作用,DRIP 可以调解 DREB2A 蛋白质泛素化,在早期干旱胁迫下,DRIP 过表达负调控 DREB2A 基因的表达^[12]。

RING E3 泛素连接酶也参与了植物的抗病防卫反应^[13]。在拟南芥中鉴定出 2 个分别与抗病蛋白 RPM1 和 RPS2 互作的酶,RING E3 泛素连接酶 RIN2 和 RIN3,RIN2 和 RIN3 通过降解调控 RPM1 或 RPS2 介导的过敏性坏死反应信号途径中的某些关键因子,来影响植物的抗病防卫反应^[14]。拟南芥另一种 E3 RING 蛋白 RRE1 (Rapid responses to elicitor 1)通过调控水杨酸在植物体内的累积来介导植物免疫反应^[15]。NLA 除了参与调控拟南芥的氮缺乏适应信号途径,也与另一个 RING 蛋白 BAH1 (Benzonic acid hypersensitivi 1)一起共同参与调控拟南芥在受到病原物侵染或苯甲酸诱发的水杨酸累积和细胞过敏性坏死等植物抗病反应^[16]。

在水稻中,Song 等^[17]发现了一个新的 RING 型 E3 泛素连接酶是控制水稻粒宽和粒重的主效基因(命名为 *OsGW2*),定位细胞质中,并且在不同的组织中表达。*OsGW2* 基因的功能是通过泛素介导的蛋白质水解调控细胞分裂,该基因缺失可导致水稻穗壳宽度增加,并且加速子粒灌浆的速率,引起子粒宽度、重量和产量增加。

本研究拟在拟南芥中克隆 *OsGW2* 的同源基因

AtGW2,并对该基因在调控产量性状方面的功能进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

将野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) 种子用 NaClO 消毒处理 5 ~ 10min,然后用无菌水洗 4 ~ 5 次。灭菌处理后的种子播种于 MS (Murashige-Skoog) 固体培养基 (pH 5.8 ~ 6.0) 上,4℃ 春化 2 ~ 3d,然后置于 22℃ 人工气候箱中,16h 光照/8 h 黑暗交替,光照度为 4000lx,空气相对湿度 70% ~ 80%,7d 左右将小苗移到装有草炭和蛭石(按 1:1 的比例混匀)的花盆中,用保鲜膜封住保湿,2 ~ 3d 后揭去保鲜膜,每周用 MS 液体培养基浇灌 1 次,以保证幼苗健壮^[18-20],待拟南芥生长至花期,获取整株材料,立即用液氮冷冻,-80℃ 保存,供提取总 RNA。

1.2 *AtGW2* 的克隆及分析

根据 *OsGW2* (GenBank 登录号,EF447275.1) 的氨基酸序列,在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行比对分析,在拟南芥中获得一个与其同源(相似性为 57%)的基因序列,命名为 *AtGW2*。设计扩增引物 (*AtGW2*ApaF: 5'-GGGCCCATGGTA-ATAAGTTGGGAAG-3', *AtGW2*SacR: 5'-GAGCTCT-TATTGCCAGGTAAGTTCAGTTG-3')。

用 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) 提取拟南芥花期整株总 RNA,并用 DNase I (TaKaRa) 处理以去除基因组 DNA 污染,以纯化后的总 RNA 为模板,利用 First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO) 合成第一条链 cDNA,以第一链 cDNA 为模板,用引物 *AtGW2*ApaF/*AtGW2*SacR 进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物并与 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,选取部分克隆 PCR、酶切验证正确后测序。

DNASar (DNASTAR, Inc.) 推导 *AtGW2* 的氨基酸序列,在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质的功能结构域。利用在线 CLUSTALW 工具 (<http://align.genome.jp/>) 将 *AtGW2* 与其他物种同源 cDNA 序列进行比对,并生成进化树。

1.3 *AtGW2* RNA 干扰载体的构建

利用 *AtGW2* 的 cDNA 序列设计 *AtGW2* RNA 干扰载体的引物,共有两对:*AtGW2*ihpISaF (5'-CGAGTCGAC TCCAATTTGTTTTCTGTAC-3') 和 *AtGW2*ihpIHindR (5'-TATAAGCTTTCTCTCGCTCCCTGTTTC-3'), *At*

GW2ihpIIISacF (5'-CGAGAGCTCTCCAATTTGTTTTCT-GTAC-3') 和 AtGW2ihpIIIEcoR (5'-TATGAATTCCTCTC-TGCCGCTCCCTGTTTC-3')。这两对引物分别含有 *Sal* I/*Hind* III 和 *Sac* I/*Eco* R I 的酶切位点。

以拟南芥的第一链 cDNA 为模板,用引物对 AtGW2ihpIISalF/AtGW2ihpIIHindR, AtGW2ihpIISacF/AtGW2ihpIIIEcoR 扩增同一段 cDNA 序列,回收纯化 PCR 产物,并分别用 *Sal* I/*Hind* III, *Sac* I/*Eco* R I 酶切处理,回收酶切产物,并依次连接到用 *Sal* I/*Hind* III, *Sac* I/*Eco* R I 酶切处理的 pBS (由河南省农业科学院粮食作物研究所玉米种质资源研究室构建) 上,构建成中间载体 pBSihpAtGW2。中间载体 pBSihpAtGW2 质粒 DNA 经 *Sal* I/*Sac* I 酶切处理后,回收目的片段,并连接到经相同酶切处理的植物转化载体 pSuperCAMBIA1300 (+) 上,经验证正确后即构建成 *AtGW2* RNA 干扰载体 pSuperCAMBIA1300 (+) ihpAtGW2。

1.4 拟南芥转化及鉴定

提取 pSuperCAMBIA1300 (+) ihpAtGW2 质粒,转化农杆菌 EHA105 感受态细胞。验证正确后,挑取携带 pSuperCAMBIA1300 (+) ihpAtGW2 的农杆菌单菌落,转接到 LB 液体培养基 (利福平, Rifampicin, 75mg/L 和卡那霉素, Kanamycin, 60 mg/L) 中扩大培养,28℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.8;4℃ 5000r/min,离心 15min 收集菌体;用等体积的渗入缓冲液 (1/2MS 大量元素,5% 蔗糖) 重悬,然后加入 Silwet L-77 (0.03%);生长 4 周刚开花去除角果的拟南芥倒置于悬浮液中进行侵染 30s;将侵染好的拟南芥植株用保鲜袋包裹植株保湿,移入恒温培养箱 (22℃) 避光培养,24h 后正常生长,生长一段时间后,按单株收获种子。

经过 4℃ 处理的拟南芥 T₀ 种子在含有潮霉素 B (hygromycin B, Hyg. B, 5mg/L) 的 MS 培养基上进行筛选,并在苗期对筛选得到的转基因植株进行 PCR 鉴定,检测 Hyg. B 抗性基因潮霉素磷酸转移酶基因 (Hygromycin B phosphotransferase gene, *Hpt*) 的表达,所用引物为 Hpt1293S: 5'-TCTGCTGCTCCATA-CAAGCCAACC-3', Hpt1628A: 5'-GCCCATTCGGAC-CGCAAGGA-3',扩增目的片段长度为 336bp。对 *Hpt* 检测为阳性的植株,进一步提取植株总 RNA,通过半定量 RT-PCR 检测目的基因 *AtGW2* 在转基因植株中的 mRNA 表达水平,通过引物设计软件 Premier 5.0 和 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计目的基因 *AtGW2* 和内参基因的引物,*AtGW2* 的引

物序列为, sqGW2F: 5'-TCCAATTTGTTTTCTGTAC-3', sqGW2R: 5'-TCTCTGCGTCCCTGTTTC-3'。本试验选用的内参基因为拟南芥肌动蛋白 (actin) 基因,引物序列为, sqActinF: 5'-CATCAGGAAGGACTTGTACGG-3', sqActinR: 5'-GATGGACCTGACTCGTCATAC-3'。

收获鉴定为阳性 T₁ 转基因种子,对子粒大小和千粒重进行检测。

2 结果与分析

2.1 *AtGW2* 的克隆及序列分析

以拟南芥的 cDNA 为模板,利用引物 AtGW2ApaF 和 AtGW2SacR 进行 PCR 扩增,以电泳检测扩增产物,得到预期大小的泳带 (图 1)。将 PCR 产物回收后,连接到 pMD18-T 载体上 (pAtGW2),双酶切鉴定 (图 2)。获得的阳性克隆进行测序。

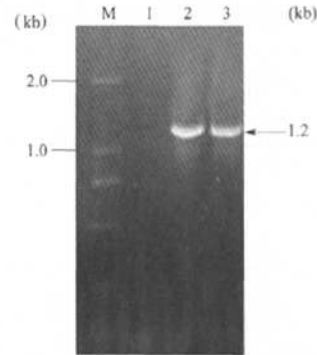


图 1 *AtGW2* 全长 cDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *AtGW2* full length cDNA
M: 分子量标准 D2000; 1: 阴性对照 (ddH₂O); 2-3: PCR 产物
M: D2000 DNA ladder; 1: negative control (ddH₂O); 2-3: PCR products

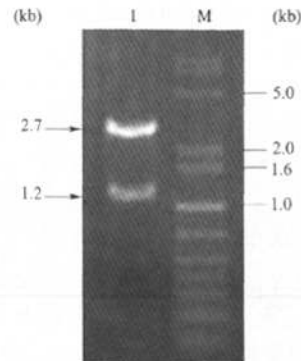


图 2 pAtGW2 (*Apa* I/*Sac* I) 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pAtGW2 construct
M: 分子量标准 1kb plus DNA ladder; 1: pAtGW2 (*Apa* I/*Sac* I) 酶切
M: 1 kb plus DNA ladder; 1: pAtGW2 (*Apa* I/*Sac* I) restriction enzyme digestion result

对获得的 cDNA 序列进行生物信息学分析,结果表明,该基因阅读框全长为 1206bp,编码 401 个氨基酸(图 3),蛋白质分子量为 45kd,理论等电点 $pI = 5.22$ 。通过蛋白质的结构功能域分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测发现:在一个含有 401 个氨基酸的蛋白质序列中,在 59 ~ 101 位之间为 RING 区域,这是起主要功能的区域也是该基因的重要部分,E3 泛素蛋白连接酶活性是 RING 区域的本质特征,该 RING 型 E3 泛素连接酶的结构为 RING-C2。

```

1 ATGGGTAATAAGTTGGGAAGGAGGCAAGCTGGTGGAGAAAGGTATACAAGGCTCAA
1 M G N K L G R K R Q V V E E R Y I K P Q
61 GGTTGTATG TGAATAAAGATG TGAAGCTTAAAGAGCTCAGAAAAGCTGATG TGGAGTCT
21 G L Y V N K D V D V K K L R K L I V E S
121 AAGCTGCTCTGCTATCTCTGAGACAGATGAAGAGCTGTCATGATCTTGAAGAAATGTCOA
41 K L A P C Y P G D D E S C H D L E E C P
181 ATTGTGTTCTGTAAGTATCTAGCTCAATAGATCAAGATGTTGCATGAAAAGCAITGTT
61 I C F L Y Y P S L N R S R C C H K S I C
241 ACAGAGTGTITTTGCAAAATGAAGAATCTAAATTCAGCTGGGCCACTCAGTGCCTTTT
81 T E C F L Q M K N P N S A R P T Q C P F
301 TGTAAAACCTCCCACTACTGCTGTTGAGTATG TGGAGTCAAGTCAAGGAGGAAAAGGGC
101 C K I P N Y A V E Y R G V K S K E E K G
361 ATTGAACAGTTG AAGAGCAAGCGGTAAATGAACCCAAAATAGGATGAGGCGAAGAA
121 I E Q V E E Q R V I E A K I R M R Q K E
421 ATGCAGGATGATG AAGAGAAAATGCAAGAAAGTCTTGAATCATGTTCTTCTAGCAAGC
141 M Q D D E E K M Q K R L E S C S S S T S
481 GCAAAGACTGGGAGATGGAATATG TTCAGCTTCAAGCCATATCTATTAAGTCTCCTCATG
161 A M I G E M E Y G S T S A I S Y N S L M
541 GATGACGGGGAAAATGCTCCATGCAAGCAAGCACTGTGTGTAGACAACATTCOCGCGG
181 D D G E I A P S Q N A S V V R Q H S R P
601 CGAGCAACAGGGAGATGAGGTTGAGCTTGAAGTGAAGAAATGATGCTATGGAAGCA
201 R G N R E D E V D V D L E E L M V M E A
661 ATATGGCTCTCTGTTTACGAAACAGGAGCAGAGAAAATTCAGCTTTCAGGGGAAAATAC
221 I W L S V Q T E T G T Q R N S A S G E I T
721 TCTTCTAGGCAGTATGTAACAGATAAATCATAGTATGTTTCTTCCACCACAGGAGTACT
241 S S R Q Y V I D N H S Y V S S P P R V I
781 CCAATGTTAGAACAGCAACAGCTCTTCAATCATCTGGTGGGCTTCTTGTGCAATCTCC
261 P I V E P A T P S S S S G G L S C A I S
841 GCACCTGCTGAACGCCAAAATGGTTGGGGAATCTCCAGTCACAAATCATATCAGCAATGTC
281 A L A E R Q M N V G E S S H N H H N H V
901 AAGCTTCTTCAATACAGTATGCTTCCCGAAAATGTTGACAGTTACTACGACATAGAACAA
301 N V S S Y S M L P G N C D S Y Y D I E Q
961 GAGGTAGATGGCATAGACAACATCATCATATGTCATCATTAAGAGATGGGAGAAACA
321 E V D G I D N H H H H R H H Y E M G E T
1021 GGAAGCAGCAACAGCTATGTAAGTCTTACATGACAGGCGAGGGCTTCCACACTTTCCT
341 G S S N S Y V S S Y M T G E G F H N F P
1081 CCTCTCCACCTCTGGTCAATGTTCCAGAGAGTTTGAAGGAACAGATGATGAGGCTATG
361 P P P P L V I V P E S F E E Q M M M A M
1141 GCTGTGCTATGGCAGAGTTATGCTCCAGCAGCAGATGTCACCAACTGAAAGTTACCTGG
381 A V S M A E V H A T T I T C A P T E V I W
1201 CAATAA
401 Q *

```

图 3 *AtGW2* 可读框核苷酸序列及氨基酸序列
 Fig. 3 The nucleotide and amino acid sequences of *AtGW2* open reading frame

AtGW2 的 cDNA 序列与其他物种中的同源 cDNA 序列进行 CLUSTALW 分析并生成进化树,结果表明,*AtGW2* 与单子叶植物大麦、水稻、玉米、小麦、高粱同源 cDNA 在核苷酸水平上的相似性分别为 73%、57%、65%、57%、56%;与双子叶植物蓖麻、茄属同源 cDNA 在核苷酸水平上的相似性分别为 63%、69% (图 4)。

2.2 *AtGW2* RNA 干扰载体的构建

在 *AtGW2* 阅读框中的序列选取一小段序列 (520bp),该序列中含有 RING 指结构,设计带有酶切位点的引物。以测序正确的 *AtGW2* 全长 cDNA 为模板,两次 PCR 扩增该目的片段并回收 PCR 产物,然后分别进行 *Sal* I/*Hind* III, *Sac* I/*Eco*R I 酶切,酶切产物依次连接到经相同酶切处理的 pBS 上,酶切验证正确后构建成中间载体 pBSihp*AtGW2* (图 5-A), pBSihp*AtGW2* 经 *Sal* I/*Sac* I 处理后,切胶回收目的酶切产物,酶切产物连接到经相同酶切处理的 pSuperCAMBIA1300(+)载体上,进行酶切鉴定 (图 5-B),至此构建成 pSuperCAMBIA1300(+) ihp*AtGW2*。具体构建过程如图 6 所示。

2.3 拟南芥转化及转基因植株分析

2.3.1 *AtGW2* RNA 干扰转基因植株的获得及检测

通过农杆菌介导的方法,获得的 T_0 转基因种子经 Hyg. B 在 MS 培养基上筛选,对经 Hyg. B 筛选表现抗性的转基因拟南芥 T_1 植株,提取其叶片基因组总 DNA,通过特异性引物检测 Hyg. B 抗性基因 *Hpt* 的表达,扩增 *Hpt* 片段长度为 336bp,同时以野生型拟南芥植株和表达载体 pSuperCAMBIA1300(+) ihp*AtGW2* 作为对照。随机选取 11 株 T_1 转基因植株进行检测,如图 7 所示,3 ~ 13 泳道检测的转基因植株株系 ihp*GW2*-7、ihp*GW2*-8、ihp*GW2*-10、ihp*GW2*-16、ihp*GW2*-22、ihp*GW2*-25、ihp*GW2*-33 和表达载体 pSuperCAMBIA1300(+) ihp*AtGW2* 均能检测出预期大小片段,而野生型对照植株中不能扩增出目的片段(图 7)。在 *Hpt* 检测为阳性的株系中,随机选取部分株系通过半定量 RT-PCR 检测目的基因 *AtGW2* 的 mRNA 水平,其中株系 ihp*GW2*-7、ihp*GW2*-8、ihp*GW2*-16 中 *AtGW2* 的 mRNA 水平较野生型株系和 PS1300(转化 pSuperCAMBIA1300(+) 空载体的转基因株系)有明显降低,而在株系 ihp*GW2*-10、ihp*GW2*-22 中变化不明显(图 8)。

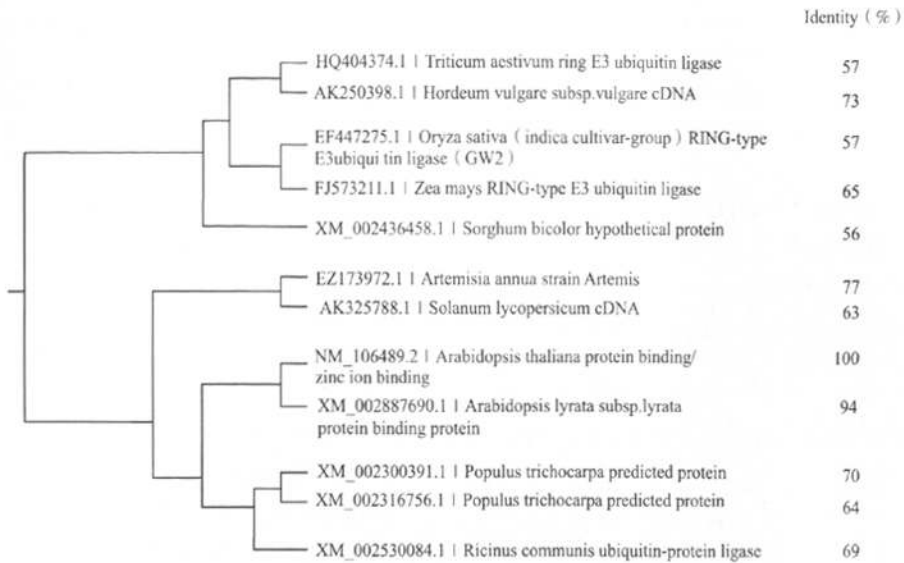


图4 *AtGW2* 核苷酸序列与其他物种同源 cDNA 序列 CLUSTALW 结果

Fig. 4 The alignment of *AtGW2* sequence and other homologous cDNA sequences by the on line CLUSTALW tool (<http://align.genome.jp/>)

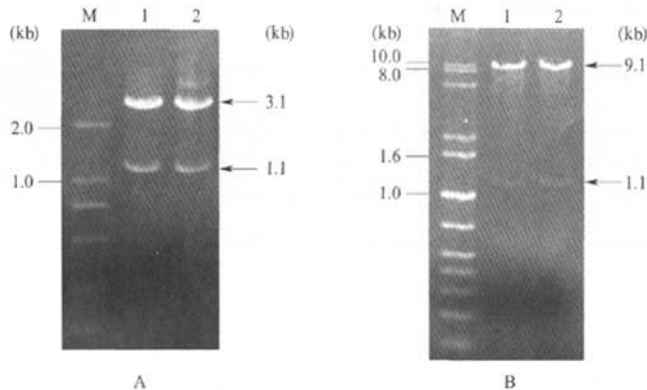


图5 *AtGW2* RNA 干扰植物转化载体 pSuperCAMBIA1300(+)ihpAtGW2 的构建

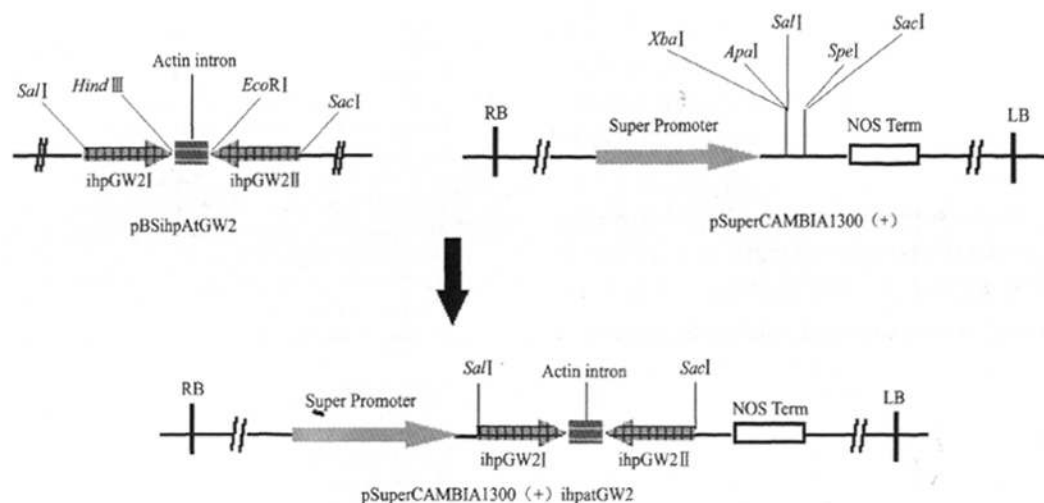
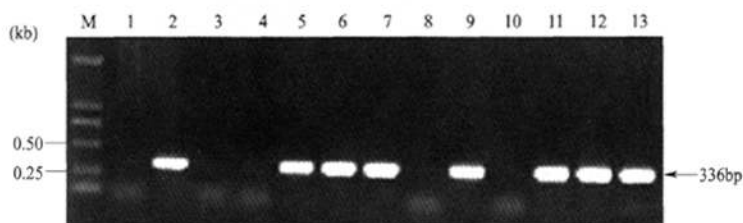
Fig. 5 Construct of *AtGW2* RNA interference transformation vector

A: 中间载体 pBSihpAtGW2 质粒 *Sal I/Sac I* 酶切鉴定。M: 分子量标准 D2000 DNA ladder; 1-2: pBSihpAtGW2 质粒 (*Sal I/Sac I*) 酶切后结果。B: *AtGW2* 植物转化载体 pSuperCAMBIA1300(+)ihpAtGW2 质粒 *Sal I/Sac I* 酶切鉴定。M: 分子量标准 1 kb plus DNA ladder; 1-2: pSuperCAMBIA1300(+)ihpAtGW2 质粒 *Sal I/Sac I* 酶切结果

A: Construct pBSihpAtGW2 *Sal I/Sac I* enzyme digestion identification. M: D2000 DNA ladder; 1-2: pBSihpAtGW2 plasmid *Sal I/Sac I* restriction enzyme digestion result. B: Construct *AtGW2* transformation vector pSuperCAMBIA1300(+)ihpAtGW2 restriction enzyme digestion identification. M: 1 kb plus DNA ladder; 1-2: pSuperCAMBIA1300(+)ihpAtGW2 plasmid *Sal I/Sac I* restriction enzyme digestion result

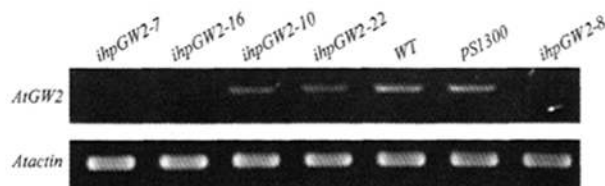
2.3.2 转基因拟南芥子粒大小及千粒重 对检测为阳性的转基因株系 *ihpGW2-7*、*ihpGW2-8*、*ihpGW2-16*, 收获 T_1 转基因植株的种子。随机选取 1000 粒野生型拟南芥和 T_1 转基因拟南芥种子, 结果发现,

T_1 转基因植株子粒比野生型植株子粒大, 且转基因拟南芥种子的千粒重明显高于野生型拟南芥, T_1 转基因拟南芥种子的平均千粒重为 25.3mg, 而野生型拟南芥种子的千粒重为 19.0mg。

图 6 *AtGW2* RNA 干扰植物转化载体的构建过程Fig. 6 Schematic diagram of the *AtGW2* RNA interference transformation vector constructs图 7 部分转基因植株 *Hpt* PCR 检测结果Fig. 7 PCR assay results of the transgenic *Arabidopsis* plants

M: 分子量标准 D2000 DNA ladder; 1: 野生型植株提取的 DNA 为模板 PCR 扩增作对照; 2: 表达载体 pSuperCambia1300(+) ihpAtGW2 为模板 PCR 扩增检测结果; 3-13: 转基因株系 *ihpGW2-1*、-5、-7、-8、-10、-15、-16、-22、-24、-25、-33 提取的 DNA 为模板 PCR 扩增检测结果

M: D2000 DNA ladder; 1: the result of PCR amplification using the DNA extracted from wild-type *Arabidopsis* plants as template; 2: PCR amplification using pSuperCambia1300(+) ihpAtGW2 as template; 3-13: PCR amplification using the DNA extracted from transgenic *Arabidopsis* line *ihpGW2-1*, -5, -7, -8, -10, -15, -16, -22, -24, -25, -33 as template

图 8 半定量 RT-PCR 检测转基因植株中 *AtGW2* mRNA 水平Fig. 8 The assay results of relative mRNA level of *AtGW2* in transgenic plants through semi-quantitative RT-PCR

3 讨论

通过 RT-PCR 的方法在拟南芥中克隆了 *AtGW2* 基因的 cDNA 全长 (1206bp), 编码 401 个氨基酸, 蛋白质分子量为 45kD, 理论等电点 $pI = 5.22$ 。序列分

析表明 *AtGW2* 编码的蛋白含有一个 RING 结构域, 带有 E3 泛素连接酶活性。构建 RNA 干扰载体并转化拟南芥, 通过观察转基因后代植株子粒大小和统计子粒千粒重, 初步表明 *AtGW2* 可能参与调控子粒大小及粒重。

本研究从拟南芥中克隆了一个与 *OsGW2* 同源的基因 *AtGW2*, 通过 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 预测该基因的蛋白质结构功能域发现, 该基因中有一个内在的 RING 指区域 (RING-C2), 并带有 E3 泛素连接酶活性。

转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 是研究植物目标基因生物学功能的一种非常有效的方法, 通过转基因或其他转化方法将目标基因的自身反向重复序列导入植物细胞, 整合到植物基因组中后, 该序列的转录产物会形成双链 RNA 或自我互补的发卡状双链 RNA (hairpin RNA, hpRNA), 被植物 RNA 干扰机制识别后引起目标基因的 RNA 干扰, 从而干扰靶基因的正常表达^[21-22]。Wesley 等^[23] 的研究表明, 利用编码区序列, 400 ~ 800nt 的双链 RNA 长度均可达到稳定和有效的干扰效果, 目的片段被内含子 (intron) 连接后, 在转录过程中更为稳定, 更能有效的被植物 RNA 干扰机制识别。本研究利用克隆的 *AtGW2* 部分序列构建 RNA 干扰载体, 通过中间载体 pBS 在内含子两端加入尾尾相连被内含子衔接的 (intron-spliced hairpin) *AtGW2* 同一段 cDNA 序列 (ihp*AtGW2*), 所用的序列长度为 520bp。通过检测部分 T₁ 转基因株系中 *AtGW2* 的 mRNA 水平来研究该基因是否得到有效的沉默, 结果发现, *AtGW2* 在部分转基因株系中的 mRNA 水平有明显降低; 在这些株系中, 该基因的表达被有效的干扰。

本文获得的 *AtGW2* RNA 干扰 T₁ 转基因植株子粒明显大于野生型植株, 这初步表明 *AtGW2* 可能通过某种机理负调控子粒的大小。

参考文献

- [1] 杨东叶, 刘凯于, 余泽华. 泛素连接酶 E3 [J]. 中国细胞生物学学报, 2005, 27(3): 281-285
- [2] Deshaies R J, Joazeiro C A P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases [J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 399-434
- [3] Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, et al. U-box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases [J]. Biol Chem, 2001, 276: 33111-33120
- [4] Borden K L, Freemont P S. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family [J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6(3): 395-401
- [5] Huang Y, Li C Y, Pattison D L, et al. SUGAR-INSENSITIVE3, a RING E3 Ligase, is a new player in plant sugar response [J]. Plant Physiol, 2010, 152: 1889-1900
- [6] Peng M S, Hannam C, Gu H, et al. A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the asaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation [J]. Plant J, 2007, 50: 320-337
- [7] Raab S, Drechsel G, Zarepour M, et al. Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2009, 59: 39-51
- [8] Bu Q, Li H, Zhao Q, et al. The *Arabidopsis* RING finger E3 Ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development [J]. Plant Physiol, 2009, 150: 463-481
- [9] Lee H, Xiong L, Gong Z, et al. The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning [J]. Genes Dev, 2001, 15(7): 912-924
- [10] Dong C H, Agarwal M, Zhang Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21): 8281-8286
- [11] Lee H K, Cho S K, Son O, et al. Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Plant Cell, 2009, 21: 622-641
- [12] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, et al. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress - responsive gene expression [J]. Plant Cell, 2008, 20: 1693-1707
- [13] Craig A, Ewan R, Mesmar J, et al. E3 ubiquitin ligase and plant innate immunity [J]. J Exp Bot, 2009, 60(4): 1123-1132
- [14] Kawasaki T, Nam J, Boyes D C, et al. A duplicated pair of *Arabidopsis* RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response [J]. Plant J, 2005, 44: 258-270
- [15] Perricone A. RRE1: an *Arabidopsis* E3 Ligase Involved in plant defense [J]. J Sci & Health Univ Ala, 2009, 7: 29-32
- [16] Yaeno T, Iba K. BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000 [J]. Plant Physiol, 2008, 148: 1032-1041
- [17] Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. Nat Genet, 2007, 39: 623-630
- [18] 王爱荣, 刘丽, 周洁, 等. 拟南芥室内简易栽培和田间大规模种植的方法 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(2): 252-254
- [19] 陈敏, 白书农. 拟南芥菜培养经验点滴 [J]. 植物生理通讯, 1995, 31(6): 436-438
- [20] Shi D Q, Liu J, Xiang Y H, et al. SLOW WALKER1, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis [J]. Plant Cell, 2005, 17: 2340-2354
- [21] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(9): 4985-4990
- [22] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing [J]. Nat Rev Genet, 2003, 4: 29-38
- [23] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. Plant J, 2001, 27: 581-590

拟南芥中RING型E3泛素连接酶基因AtGW2的克隆和功能分析

作者: 姜颖, 曹言勇, 路运才, 唐保军, 王利锋, 李会勇, JIANG Ying, CAO Yan-yong, LU Yun-cai, TANG Bao-jun, WANG Li-feng, LI Hui-yong
作者单位: 姜颖, JIANG Ying(黑龙江大学农作物研究院, 哈尔滨, 150080; 河南省农业科学院粮食作物研究所/河南省玉米生物学重点实验室, 郑州, 450002), 曹言勇, 唐保军, 王利锋, 李会勇, CAO Yan-yong, TANG Bao-jun, WANG Li-feng, LI Hui-yong(河南省农业科学院粮食作物研究所/河南省玉米生物学重点实验室, 郑州, 450002), 路运才, LU Yun-cai(黑龙江大学农作物研究院, 哈尔滨, 150080)
刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2011, 12(3)

参考文献(23条)

1. Wesley S V;Helliwell C A;Smith N A Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants 2001
2. Waterhouse P M;Helliwell C A Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing[外文期刊] 2003(1)
3. Chuang C F;Meyerowitz E M Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana[外文期刊] 2000(09)
4. Shi D Q;Liu J;Xiang Y H SLOW WALKER1, essential for gametogenesis in Arabidopsis, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis[外文期刊] 2005(8)
5. 陈敏;白书农 拟南芥菜培养经验点滴 1995(06)
6. 王爱荣;刘丽;周洁 拟南芥室内简易栽培和田间大规模种植的方法 2005(02)
7. Song X J;Huang W;shi M A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[外文期刊] 2007(5)
8. Yaeno T;Iba K BAHI/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to Pseudomonas syringae DC3000 2008
9. Perricone A RREI: an Arabidopsis E3 Ligase Involved in plant defense 2009
10. Kawasaki T;Nam J;Boyes D C A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response 2005
11. Craig A;Ewan R;Mesmar J E3 ubiquitin ligase and plant innate immunity[外文期刊] 2009(04)
12. Qin F;Sakuma Y;Tran L S P Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression 2008
13. Lee H K;Cho S K;Son O Drought stress-induced Rmal H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic Arabidopsis plants 2009
14. Dong C H;Agnirwal M;Zhang Y The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1[外文期刊] 2006(21)
15. Lee H;Xiong L;Gong Z The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning 2001(07)
16. Bu Q;Li H;Zhao Q The Arabidopsis RING finger E3 Ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development 2009

17. [Raab S;Drechsel G;Zarepour M Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis](#) 2009
18. [Peng M S;Hannam C;Gu H A mutation in NLA, which en-codes a RING-type ubiquitin hgase, disrupts the asaptability of Arabidopsu to nitrogein limitation](#) 2007
19. [Huang Y;Li C Y;Pnttim D L SUGAR-INSENSITIVE3-a RING E3 Ligase, is a new player in plant sugar response](#) 2010
20. [Borden K L;Freemont P S The RING finger domain:a recent example of a sequence-structure family](#)[外文期刊] 1996(03)
21. [Hatakeyumu S;Yada M;Matsumoto M U-box proteins as a Hew family of ubiquitin-protein ligases](#) 2001
22. [Deshaies R J;Joazeim C A P RING Domain E3 Ubiquitin Ligases](#) 2009
23. [杨东叶;刘凯于;余泽华 泛素连接酶E3](#) 2005(03)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201103019.aspx