

菜豆 ANK 基因家族鉴定及 ANK25 的表达模式分析

张 婷^{1,2}, 张双喜³, 裴丽丽², 于太飞², 陈 明²,
李连城², 周永斌², 马有志², 徐 强¹, 徐兆师²

(¹安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081; 宁夏农林科学院农作物研究所, 永宁 750105)

摘要: 锚蛋白重复序列模体是生物体内最普遍的蛋白质序列模体之一, 在多种细胞活动中主要介导蛋白质-蛋白质的相互作用。本研究利用菜豆基因组数据库, 通过生物信息学手段对菜豆 ANK 家族成员及分子生物学特性进行了鉴定。结果显示, 菜豆基因组中含有 30 个 ANK 家族基因, 分布于 9 条染色体上, 其中第 5 条染色体上含有的 ANK 基因最多, 包含 13 个基因。蛋白结构域分析发现, ANK25 除了含有 ANK 结构域外还含有 RING 结构域。亚细胞定位结果显示, ANK25 主要分布在细胞膜上。表达模式分析发现, ANK25 对干旱、盐和 ABA 胁迫有响应。本研究为进一步研究菜豆 ANK 的分类及功能提供了有利的依据。

关键词: ANK 重复序列; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达模式; 菜豆

Genome-wide Analysis of ANK Gene Family and Expression Pattern of the ANK25 Gene in Snap Bean

ZHANG Ting^{1,2}, ZHANG Shuang-xi³, PEI Li-li², YU Tai-fei²,
CHEN Ming², LI Lian-cheng², ZHOU Yong-bin², MA You-zhi², XU Qiang¹, XU Zhao-shi²
(¹ College of Horticulture, Anhui Agricultural University, HeFei 230036; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS)/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; ³ Institute of Crop Sciences, Ningxia Academy of Agricultural Sciences, Yongning 750105)

Abstract: Ankyrin repeats, as one of the most commonly protein motifs, are involved in diverse protein-protein interactions in various life activities. Based on snap bean genome database and bioinformatics method, we obtained snap bean ANK family genes and analyzed their molecular biological characteristics. A total of 30 ANK genes were systematically identified from snap bean and located on 9 chromosomes. The chromosome 5 had 13 genes, which was more than other chromosomes. Protein structure domain analysis showed that ANK25 still contained a RING domain besides an ANK domain. The transient expression in *Arabidopsis* protoplasts displayed that ANK protein mainly contributed in plasma membrane. Expression pattern analysis found that ANK25 was responsive to drought, salt, and exogenous ABA. This study provided valuable information regarding the classification and functions of ANK genes in snap bean.

Key words: ankyrin repeats; bioinformatics; subcellular localization; expression pattern; snap bean

锚蛋白重复序列 (ANK, ankyrin repeat) 是生物体广泛存在的一类蛋白结构。大部分 ANK 蛋白的功能与蛋白互作相关^[1-2], 并在不同功能的蛋白中被发现^[3]。ANK 最早在酵母细胞周期调节因子

收稿日期: 2014-06-12 修回日期: 2014-07-12 网络出版日期: 2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2021.007.html>

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX08002-002, 2014ZX08003-004B)

第一作者主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: 83997524@qq.com; 张双喜为共同第一作者

通信作者: 徐强, 主要从事蔬菜学研究。E-mail: qiang_xu1015@163.com;

徐兆师, 主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: xuzhaoshi@caas.cn

Swi6/Cdc10 及果蝇信号蛋白中发现^[4],在细胞周期的调节、转录等方面扮演着重要的角色^[5]。随后在蛋白骨架中发现了 24 个氨基酸残基的 ANK 序列^[6]。有关动物中锚蛋白重复序列的研究报道很多,其中主要包括细胞骨架形成体(cytoskeletal organizers)、细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(CDPK, cyclin dependent protein kinase)抑制剂、转录调控因子和发育调控因子。膜蛋白等典型的锚蛋白重复序列由 33 个氨基酸残基组成,数量不等的 ANK 单元串联起来形成大的 ANK 结构域^[7-8],行使生物功能。

植物 ANK 蛋白在其生理过程中起到了重要的作用^[9-10]。在模式植物拟南芥中第一个被发现的 ANK 蛋白编码基因是 AKR^[11],受光信号调控,在细胞分化和生长过程中起到调节功能。拟南芥 *TIP1* 编码一个 S-acyl 转移酶,在植物的生长发育过程中影响细胞的生长^[12]。拟南芥 *XBAT32* 编码泛素连接酶,通过乙烯信号转导途径参与侧根的形成^[13-14]。另外,它的同源基因 *XBAT35* 编码蛋白也具有泛素连接酶活性并参与乙烯信号转导途径^[15]。拟南芥中 ANK 蛋白 BOPI 参与叶的形态建成^[16]。

研究发现,锚蛋白还参与植物对生物胁迫和非生物胁迫信号的响应。例如,拟南芥 AKR2 参与非生物胁迫过程中抗氧化物质的代谢^[17];水稻 XB3 参与 XA21 介导的植物免疫过程^[18];辣椒 CaKR1 可同时响应生物胁迫和非生物胁迫过程,结果表明 CaKR1 是一个关键信号分子具有调节植物抗氧化代谢和防御反应的能力^[19]。

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.) 又称芸豆、四季豆,属豆科菜豆属菜豆种植物,是人类主要食用豆类作物之一。干旱、盐害等逆境已成为影响普通菜豆生产的主要限制因素之一。因此,研究普通菜豆抗逆分子机理,发掘并利用抗旱、耐盐基因,改良普通菜豆品种抗逆性,对降低生产成本具有重要理论和现实意义。目前,尚未有菜豆 ANK 基因的相关研究报道。本研究利用生物信息学方法,鉴定菜豆 ANK 家族基因,分析基因结构域序列保守性及其家族进化关系,为进一步研究菜豆 ANK 的分类及功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菜豆品种龙泉 307。培养条件为温度 22 ℃,湿度 65%,每天光照时间为 16 h,黑暗时间为 8 h。

1.2 保守域预测

菜豆基因组数据和 cDNA 数据均来源于菜豆最新数据库版本 Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>)。

1.3 家族进化树构建和蛋白结构域分析

利用 MEGA 5 对 30 个菜豆 ANK 基因进行多序列比对分析,将分析结果用邻接法生成系统进化树,Bootstrap 值设为 1000。

利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线工具分析 ANK 蛋白结构域,利用 DOG 2.0 绘制 30 个 F-box 家族蛋白的功能结构域示意图。

1.4 染色体的分布分析

通过 MapInspect 程序显示每个基因在染色体上的位置,得到各个基因在染色体上分布状况。利用 DNAMAN 分析菜豆中 ANK 家族基因中的重复片段,并将分析结果标注在染色体上。

1.5 启动子顺式作用元件分析

从菜豆基因组数据库 Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>) 中选取菜豆 ANK 基因起始密码子上游 1500 bp 序列作为启动子区,利用植物顺式作用元件数据库 PLACE 26.0 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 分析基因的顺式作用元件。

1.6 基因的扩增

根据菜豆 ANK25 的 CDS 序列,用 Primer Premier 5.0 设计引物 ANK25-F:5'-AGGTGAGGTGAGGTGGTAGAGAG-3' 和 R:5'-AAACATCATACCAAGAA-CAGCATC-3'。采用 Trizol (TianGen 北京) 提取叶片总 RNA,用 Primer script (TakaRa) 反转录试剂盒获得的 cDNA 为模板扩增 ANK25,并将其连接到 pEASY-Blunt 载体上。

1.7 RNA 提取和 real-time PCR 分析

利用 Trizol 试剂盒 (TIANGEN, 北京) 提取总 RNA,以总 RNA 作为模板,采用 SYBR Green 染料法进行荧光定量 real-time PCR。采用实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism 7300) 进行 PCR 扩增。反应体系包括 2 × Taq PCR Master Mix (含荧光染料) 9 μL、10 μmol/L 引物各 0.5 μL、ddH₂O 9 μL 和 cDNA 模板 1 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 变性 15 s,56 ℃ 退火 20 s,68 ℃ 延伸 30 s,35 个循环。PCR 引物序列为: F:5'-CTGAATCTTTTCGTCTGCTGAG-3' 和 R:5'-AGAATGGACAACTGCTGGG-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因表达量。

1.8 亚细胞定位分析

采用 In-Fusion (TakaRa) 单酶切技术 (BamH I)

构建 ANK25:hGFP 融合表达蛋白(F:5'-TATCTCTAGAGGATCCATGGGTCAG-3' R:5'-TGCTCACCATGGATCCTCACTGTTG-3')。取 4 周左右的拟南芥叶片切成细条,放入 15 mL 新鲜的酶解液中,避光,23 ℃抽真空酶解 3 h,制备原生质体。取融合表达的重组质粒转化原生质体。12~16 h 后置于激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 菜豆 ANK 家族成员的鉴定及命名

通过 NCBI 搜索,菜豆 ANK 基因家族有 30 个成员,从 ANK1 到 ANK30(表 1)。采用 Pfam 进行结构域分析发现这 30 个基因编码的蛋白都具有完整的 ANK 结构域(图 1)。这些 ANK 家族成员中蛋白最长有 685 个氨基酸,最短的有 225 个氨基酸,其等电点范围为 4.84~10.15(表 1)。

表 1 菜豆 ANK 家族基因的基本信息

Table 1 Basic information of ANK family genes in *Phaseolus vulgaris*

基因	基因序列号	氨基酸	等电点	分子量(kD)	染色体定位	ANK 保守域位置
Gene	Gene ID number	Amino acid	pI	Molecular mass	Chromosome location	ANK domain location
<i>Phvul. ANK1</i>	Phvul. 011G117400	650	8.98	72.65	11	316~342
<i>Phvul. ANK2</i>	Phvul. 005G046300	679	6.31	76.58	5	335~362,407~427
<i>Phvul. ANK3</i>	Phvul. 005G046900	628	6.44	71.10	5	280~307,352~372
<i>Phvul. ANK4</i>	Phvul. 005G046600	659	4.87	74.40	5	316~343,388~408
<i>Phvul. ANK5</i>	Phvul. 005G047200	439	8.47	49.54	5	87~114,159~179
<i>Phvul. ANK6</i>	Phvul. 005G046700	425	6.38	47.93	5	321~347,393~413
<i>Phvul. ANK7</i>	Phvul. 005G047000	400	8.75	45.14	5	56~83
<i>Phvul. ANK8</i>	Phvul. 005G046400	358	7.09	40.38	5	6~33,78~98
<i>Phvul. ANK9</i>	Phvul. 005G139900	545	9.52	59.53	5	135~159,201~226,235~258
<i>Phvul. ANK10</i>	Phvul. 011G069200	546	9.96	58.93	11	139~163,170~193,205~229
<i>Phvul. ANK11</i>	Phvul. 009G263200	560	10.05	61.65	9	166~189,197~227,266~298
<i>Phvul. ANK12</i>	Phvul. 007G156400	479	7.96	53.47	7	83~109
<i>Phvul. ANK13</i>	Phvul. 007G008900	685	10.15	74.96	7	258~280,325~355,360~384
<i>Phvul. ANK14</i>	Phvul. 001G171700	521	9.52	57.04	1	121~145,152~177
<i>Phvul. ANK15</i>	Phvul. 005G167300	622	8.41	69.20	5	172~193
<i>Phvul. ANK16</i>	Phvul. 005G143200	444	7.33	47.62	5	80~107,113~134,158~188,195~225
<i>Phvul. ANK17</i>	Phvul. 011G211000	438	8.09	49.09	11	80~102
<i>Phvul. ANK18</i>	Phvul. 001G171600	575	10.24	63.40	1	218~247
<i>Phvul. ANK19</i>	Phvul. 006G040100	273	6.44	31.50	6	89~110
<i>Phvul. ANK20</i>	Phvul. 001G113900	522	7.13	56.87	1	172~203,243~270,272~303
<i>Phvul. ANK21</i>	Phvul. 002G068900	242	4.84	25.94	2	86~117,119~150,152~182,185~216
<i>Phvul. ANK22</i>	Phvul. 004G051200	534	9.49	58.37	4	171~201,269~300,304~335,391~422,425~455
<i>Phvul. ANK23</i>	Phvul. 001G259100	648	6.67	70.96	1	241~268
<i>Phvul. ANK24</i>	Phvul. 011G164100	267	10.3	30.48	11	35~65
<i>Phvul. ANK25</i>	Phvul. 011G064600	447	7.62	48.32	11	46~76,80~107,112~134,158~187,195~225
<i>Phvul. ANK26</i>	Phvul. 007G167500	461	6.45	49.65	7	249~279,282~304,372~404,406~431

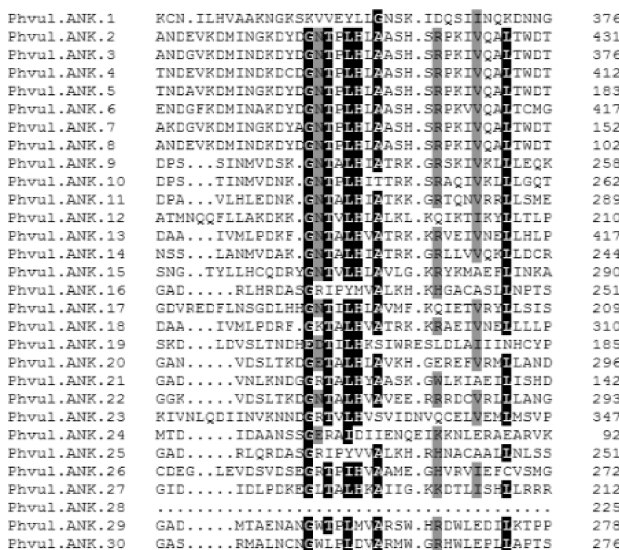


图 1 30 个菜豆 ANK 家族基因保守域

Fig. 1 Conserved domains of ANK in 30 proteins of *Phaseolus vulgaris*

表 1(续)

基因	基因序列号	氨基酸	等电点	分子量(kD)	染色体定位	ANK 保守域位置
Gene	Gene ID number	Amino acid	pI	Molecular mass	Chromosome location	ANK domain location
<i>Phvul. ANK27</i>	Phvul. 006G086600	320	5.94	35.88	6	221 ~ 253, 255 ~ 285
<i>Phvul. ANK28</i>	Phvul. 011G144300	225	6.52	25.56	11	76 ~ 103
<i>Phvul. ANK29</i>	Phvul. 003G150900	508	7.61	55.02	3	52 ~ 81, 84 ~ 114, 117 ~ 138, 179 ~ 209, 222 ~ 252
<i>Phvul. ANK30</i>	Phvul. 004G119800	510	6.81	55.01	4	46 ~ 75, 77 ~ 106, 177 ~ 207, 220 ~ 250

2.2 染色体的分布

根据基因位置信息绘制了 30 个 ANK 家族基因在谷子染色体上的定位图(图 2)。30 个基因分布在 9 条染色体上,其中第 5 条染色体上的 ANK 家族

基因最多,含有 10 个基因;第 2、3 和第 9 染色体上都只有 1 个 ANK 家族基因,其他各染色体上含有 2~6 个 ANK 家族基因。

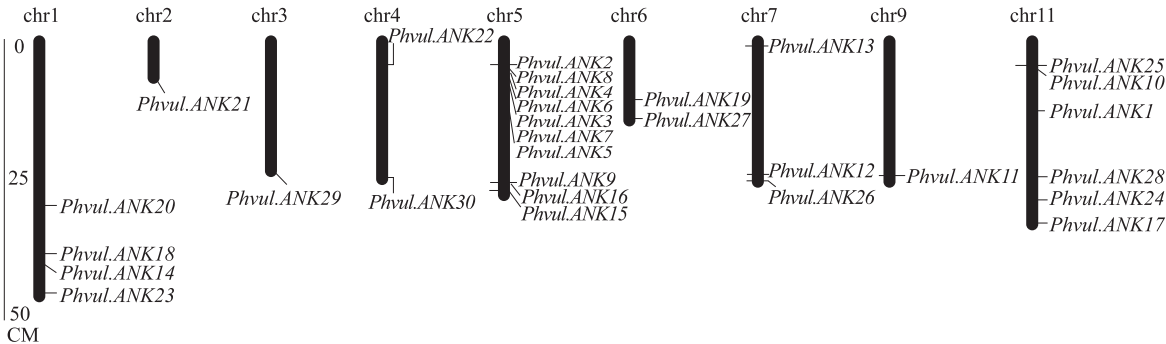


图 2 菜豆 ANK 家族基因的染色体分布

Fig. 2 Chromosome distribution of ANK genes in *P. vulgaris*

2.3 菜豆 ANK 家族成员分类、蛋白结构域分析和进化树构建

对苹果、水稻、拟南芥和菜豆亚家族基因比较结果显示,菜豆亚家族最少,仅含有 4 类(表 2)。其中,从拟南芥 ANK 基因家族 105 个成员中选取与菜

表 2 菜豆、拟南芥、水稻和苹果 ANK 蛋白的分类及数量

豆 ANK 结构域相似性高的 55 个成员进行系统进化分析。其中菜豆 30 个 ANK 基因中含有 ANK-M 亚家族基因 10 个,ANK-TM 亚家族基因 17 个,ANK-RF 亚家族基因 1 个和 ANK-MS 亚家族基因 2 个。对菜豆 30 个 ANK 蛋白与拟南芥基因组中 55 个 ANK

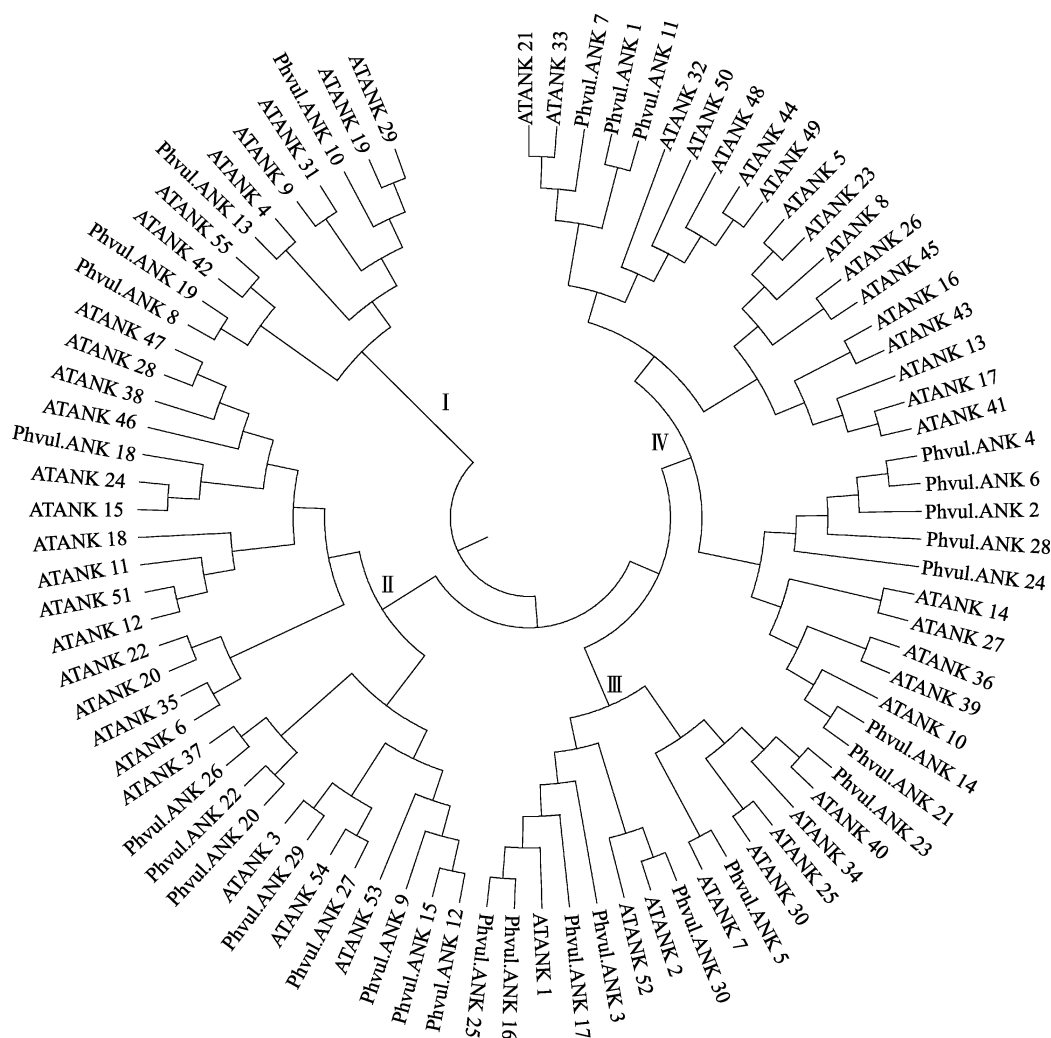
Table 2 The classification and numbers of ANK in *P. vulgaris*, *Arabidopsis*, *Oryza sativa*, and *Malus × domestica*

序号	亚家族	类型	苹果	水稻	拟南芥	菜豆
Number	Subfamily	Description	<i>Malus × domestica</i>	<i>O. sativa</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. vulgaris</i>
1	ANK-M	Proteins with only ankyrin repeats	143	73	18	10
2	ANK-TM	Ankyrin-transmembrane proteins	83	37	40	17
3	ANK-TPR	Protein with TPR or PPR repeats	4	22	1	
4	ANK-RF	Ring finger protein	8	9	5	1
5	ANK-ZF	Zinc finger protein	15	7	6	
6	ANK-BTB	Proteins with BTB domain	8	6	7	
7	ANK-IQ	Calmodulin binding motif-containing protein	12	4	4	
8	ANK-PK	Protein kinases	18	4	7	
9	ANK-BPA	ARF GTPase-activating domain-containing protein	5	3	4	
10	ANK-IT	Potassium channels	10	0	1	
11	ANK-SBP	Protein with SBP doamins	5	0	0	
12	ANK-GPCR	Protein with GPCR_chapero_1 doamins	9	0	0	
13	ANK-MS	Protein with Motile_Sperm doamins	3	1	0	2
14	ANK-KinesinR	Protein with Kinesin-relat doamins	7	0	0	
15	ANK-UBN2	Protein with UBN2_3 doamins	5	0	0	
16	ANK-O	Proteins with other domains	26	10	13	
总数 Total			351	175	105	30

蛋白进行多重序列比对和系统进化分析。分析结果显示,可以划分为 I、II、III、IV 4 类(图 3),每类家族成员中均含有菜豆、拟南芥的基因(图 3)。为了了解 ANK 基因家族在菜豆中可能的结构演变过程,对菜豆 30 个 ANK 基因做了蛋白结构域分析(图 4)。根据图中显示,30 个 ANK 蛋白中,33.3% 的蛋白只含有 ANK 结构域,其他蛋白含有多个功能域,其中 56.7% 的蛋白含有 ANK-TM(跨膜蛋白),2 个蛋白含有 ANK-MSP(major sperm protein),1 个蛋白含有 ANK-RING(指环蛋白)。近来研究表明,RING 指区

域参与特殊的泛素化事件,可能是所有的 RING 指蛋白都如 E3 泛素蛋白质连接酶,参与一系列生物学领域^[45]。泛素使蛋白质达到降解,而且是细胞蛋白质功能一个强大的调节器。

在植物中,RING 蛋白是数量最多的一类 E3 泛素连接酶,通过调节蛋白的泛素化过程参与细胞内的多种生理过程。而只有极少数的 RING 蛋白的生物学功能得到了阐明或预测。因此,本研究对 ANK25 基因进行了进一步研究。



ATANK:拟南芥 ANK 家族;Phvul. ANK:菜豆 ANK 家族

ATANK:ANK family in *Arabidopsis thaliana*, Phvul. ANK:ANK family in *Phaseolus vulgaris*

图 3 菜豆 ANK 家族基因邻接系统树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of the ANK members

2.4 亚细胞定位分析

将 ANK25 构建到荧光表达蛋白 GFP 的 N 端。利用原生质体转化技术,将 ANK25-GFP 融合表达载体和空载体分别转入拟南芥原生质体,在激光共聚

焦显微镜下观察。绿色荧光蛋白在拟南芥原生质体中获得高效瞬时表达,对照 GFP 蛋白在细胞核、细胞膜和细胞质中均有绿色荧光信号;而 ANK25 融合蛋白的绿色荧光信号主要分布在细胞膜上,表明

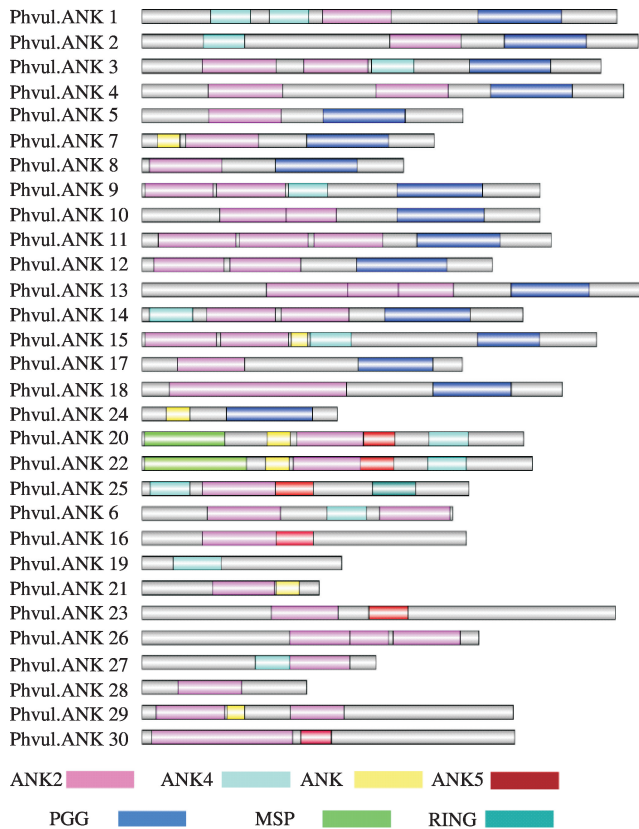


图4 菜豆 ANK 家族基因的保守结构域

Fig. 4 Conserved domain organization of ANK proteins

ANK25 蛋白主要定位在细胞膜上(图5)。

2.5 启动子顺式作用元件分析

目前发现的与胁迫相关的元件有 ABA-respon

sive element (ABRE)、dehydration-responsive element (DRE)、MYB 和 MYC 等元件。本研究选择起始密码子上游 2000 bp 序列作为启动子区,研究 ANK25 基因启动子区元件。结果显示,菜豆 ANK25 家族基因启动子区域含多个 ABRE、DRE、MYB 和 MYC 元件(图6)。ABRE 和 DRE 分别通过与 AREB 和 DREB 转录因子特异结合,对于旱、高盐和低温产生应答;MYB 和 MYC 都属于转录因子,与干旱、ABA 的诱导表达相关。说明 ANK25 基因与植物的逆境胁迫应答具有很强的关联。

2.6 ANK25 基因在各种逆境胁迫下的表达模式分析

为了进一步解析非生物胁迫和外源激素对 ANK25 基因表达的影响,对菜豆幼苗分别进行干旱、NaCl、高温和 ABA 胁迫处理,通过荧光定量 PCR 检测不同处理条件下 ANK25 的表达量。对生长 3 周的菜豆幼苗,分别进行干旱(6% PEG)、NaCl (100 mmol/L)、脱落酸(ABA, 100 μ mol/L)、高温、低温处理,并于 0 h、0.5 h、1 h、2 h、5 h、12 h 和 24 h 分别取样。如图7所示,在干旱胁迫下,ANK25 基因的表达量呈上升趋势并在 24 h 的表达量最高,是对照的 6 倍;NaCl 处理下在 2 h 时表达量达最高,是对照的 20 倍;ANK25 对 ABA 的响应强烈,在 0.5 h 的表达量最高,是对照的 40 倍;在高温处理条件下,ANK25 基因对高温的响应不明显。

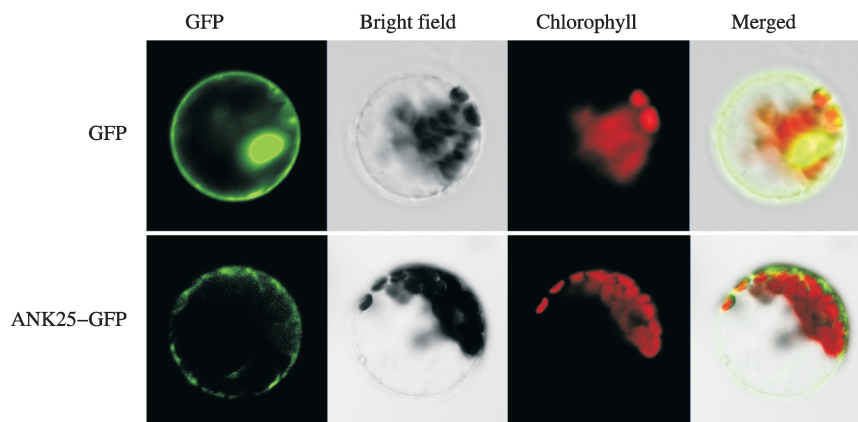


图5 ANK25 蛋白的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of ANK25 protein

3 讨论与结论

ANK 是普遍存在于真核、原核及病毒中的一种蛋白质序列模体^[20],主要参与蛋白质与蛋白质的相互作用,响应多种生物和非生物胁迫反应^[21],调控植物的生长发育等过程。已有研究表明植物 ANK 蛋白的一些家族成员参与了光信号调控、叶的形态

建成、胚胎发育、侧根的形成以及对生物胁迫和非生物胁迫信号的响应等^[22-23]。ANK 基因在植物中分布较广,蛋白种类及数量物种间存在着较大差异。其中,拟南芥 ANK 基因家族有 105 个成员^[24],水稻中有 175 个成员^[25],而在苹果中找到了 351 个 ANK 蛋白^[26]。本研究将菜豆的 ANK 蛋白分为 4 类,第 1 类有 10 个基因,仅含有 ANK 结构域;第 2 类有 17 个,

```

1 → → cgggggacgggacggtacaAAAGgtgatataaaatcgatctatttctggcatcatatcca.
→ → → → → DRE.
61 → → tagttagtgttctcatcatatttagaagctccaactctatatcaaaatcaagggtgatat.
121 → → cgctattatcatcaatatggtcattatcataaataagaaaatccttaggttctttatcca.
181 → → ataactgttcagaaatactataatgAAAGgaaCATATGagtttttgcgaatctctaaatc.
→ → → → → DRE → → MYC.
241 → → aacgatagaataagatccattttgaatctatttaagggtatccttgggttgactgaag.
301 → → aagcaatgtcactogatacttatcaaaactgactgcaatcttttttggatgtgaggatcc.
361 → → cactagaacgcttctacttctaataggctatgaacctaaactctattaaaaattatctt.
421 → → tggaaatctacattatttagacatacttttaattataattagatgattagacaaaaaaAA.
→ → → → → DRE.
481 → → AGttttctgaattgctttttttataaaaaAAAGaagaagactgaaacatccttattttac.
→ → → → → DRE.
541 → → tgtatctattttttatttatgaattatttatgtcattcatatatatatataaacttg.
601 → → ttatatgatcaaaacatttcaaaatttatgttgagagaaaactattogtaotgogtgtga.
661 → → ttatatgctccttgacaatgttattcattgtttttatttaaatcagcatttaatactta.
721 → → tatttaaaaaaaAAAGcaAAAGtatctcattttctattatcatttttactctttttta.
→ → → → → DRE → → DRE.
781 → → aaattttcttttccaaactgacataccataaatttattAAAGtgagCACGTGgctatat.
→ → → → → DRE → MYCABRE.
841 → → agttcaagctcgtGGATAttttaaatgtttcacattcatttttgggctcgattatcatt.
→ → → → → MYB.
901 → → atgtttatacaaggattagggtttttccccaatgcaccaatatctttt CAGTTAaggat.
→ → → → → MYB.
961 → → taaatcttttattaatagtgtattcaagagaaaaacaaattatctatttcatataagc.
1021 → → atttttgttttgttttaagagagAAAGacagaagaCATTTGtttttagactattagtcaga.
→ → → → → DRE → → MYC.
1081 → → ttoggtgctgcccattgttttttatcgtgggctcgtattgggctttttatggaccca.
1141 → → taaggcccatacttaaacactatgttctgtgctttatttctgcaaaaAGattaaAAAGca.
→ → → → → DRE → → DRE.
1201 → → aaacactctccctctttttcaaaattgattttggtagcttgattttgccaccactaaac.
1261 → → taagaatgtgttagaAAAGgtttctttttctctaaaaaatAAAGtgaaattgtcttag.
→ → → → → DRE → → DRE.
1321 → → tttcattgttgacgataaattcgtttgaagagtatttgttacttcaagcaatgtttgtt.
1381 → → gtaACGTGaaatctcagttcaaaogaattattataattattcttagcagtttaattgAAA.
→ → → → → ABRE → → DRE.
1441 → → GagatttgacaataaatatagattgaACGTGagttatatgaatgtaAAAGaagAAAGtaga.
→ → → → → ABRE → → DRE → → DRE.

```

图6 菜豆 ANK 家族基因启动子逆境相关顺式作用元件的数量分布

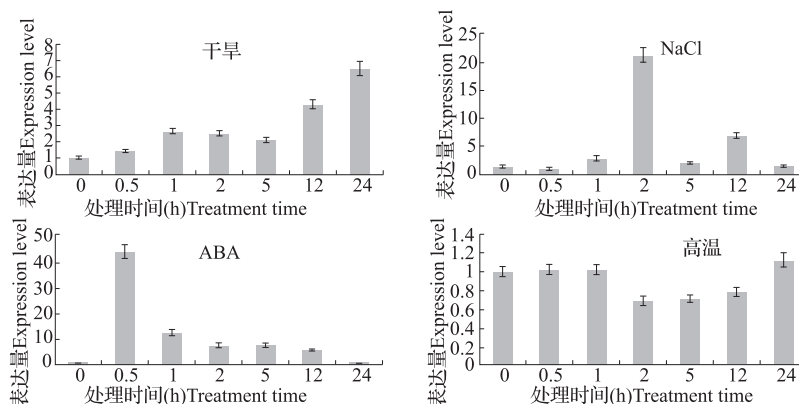
Fig. 6 Distribution of *cis*-acting elements in *Phaseolus vulgaris* ANK gene promoters

图7 ANK25 在各种胁迫下的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of the ANK25 gene under various treatments

除了含有 ANK 蛋白外,还含有 ANK-TM 跨膜结构域;第3类有2个,除了含有 ANK 蛋白外,还含有 ANK-MSP(主要的精子蛋白)结构域;第4类有且仅有1个在含有 ANK 结构域之外还含有 RING(指环蛋白)结构域。植物锚蛋白的研究主要集中在有关信号转导中的发育调控、物质转运及蛋白磷酸化^[27]等。因此,研究 ANK 模体对于认识这类植物蛋白质家族成员的结构和功能具有十分重要的作用,也必定会给植物信号传导的研究带来新的切入点。

泛素介导的蛋白质降解过程主要有3种酶参与,包括泛素活化酶(E1),泛素结合酶(E2)以及泛素连接酶(E3)。在 ATP 供能的情况下,E1 的半胱氨酸残

基与泛素 C 末端的甘氨酸形成高能硫酯键,使得泛素激活,活化的泛素分子被转移到 E2 的丝氨酸残基上,随后 E2 和 E3 共同识别底物蛋白,对其进行泛素化修饰。RING 结构域属于泛素连接酶 E3 的一部分,泛素连接酶 E3 对靶蛋白的特异性识别起到关键的作用^[28]。有研究表明 RING 结构域家族的 E3 (RING E3 s)别构激活泛素结合酶 E2 从而促进由 E2 直接催化的底物 Lys 残基的泛素化^[29],该结构域首先在未知基因编码的蛋白中发现^[30],随后在许多关键的调节蛋白中发现^[31]。其中在菜豆 ANK 家族中仅有 ANK25 含有 RING 结构域,RING 结构域对该类 E3 酶活起着重要作用^[32-33],在蛋白质的翻译后修饰中起着

关键性作用,在植物体内参与多种生物胁迫和非生物胁迫应答反应^[34-35]。

植物对非生物胁迫的响应是一个复杂的过程,受不同分子和细胞通路的调控。ANK 家族在植物响应非生物胁迫的过程中发挥着重要的作用。X. W. Yuan 等^[21]在番茄中的研究发现,ANK 家族基因在盐、干旱等非生物胁迫下被诱导上调表达,能增强植物的抗逆性。本研究中 ANK25 基因对盐、干旱和 ABA 有响应,可能参与了植物的抗逆性,这为今后进一步研究菜豆 ANK 家族基因的功能提供了基础。

30 个菜豆 ANK 基因分为 4 类,分布于 9 条染色体上,其中第 5 条染色体最多。菜豆 ANK25 是唯一一个仅含有 RING 结构域蛋白,主要分布在细胞膜上。ANK25 基因启动子含多个 ABRE、DRE、MYB 和 MYC 等非生物胁迫相关元件,参与干旱、盐和 ABA 的响应。

参考文献

- [1] Michaely P, Bennett V. The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition[J]. Trends Cell Biol, 1992, 2: 127-129
- [2] Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally[J]. Proteins, 1993, 17: 363-374
- [3] Mosavi L K, Cammett T J, Desrosiers D C, et al. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition[J]. Protein Sci, 2004, 13: 1435-1448
- [4] Breeden L, Nasmyth K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila* [J]. Nature, 1987, 329: 651-654
- [5] Sedgwick S G, Smerdon S J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24: 311-316
- [6] Lux S E, John K M, Bennett V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins [J]. Nature, 1990, 344: 36-42
- [7] Rhode K, Bork P. A fast sensitive pattern-matching approach for protein sequences[J]. Comput Appl Biosci, 1993, 9: 183-189
- [8] Mosavi L K, Minor Jr D L, Peng Z Y. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 16029-16034
- [9] Becerra C, Jahrman T, Puigdomenech P, et al. Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*; characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins [J]. Gene, 2004, 340: 111-121
- [10] Huang J, Zhao X, Yu H, et al. The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 71: 207-226
- [11] Zhang H, Scheirer D C, Fowle W H, et al. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1992, 4: 1575-1588
- [12] Hemsley P A, Kemp A C, Grierson C S. The tip growth defective 1 S-acyl transferase regulates plant cell growth in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2005, 17: 2554-2563
- [13] Nodzon L A, Xu W H, Wang Y, et al. The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2004, 40: 996-1006
- [14] Lyzenga W J, Booth J K, Stone S L. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme-1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 [J]. Plant J, 2012, 71: 23-34
- [15] Carvalho S D, Saraiva R, Maia T M, et al. XBAT35, a novel *Arabidopsis* RING E3 ligase exhibiting dual targeting of its splice isoforms, is involved in ethylene-mediated regulation of apical hook curvature [J]. Mol Plant, 2012, 5: 1295-1309
- [16] Ha C M, Jun J H, Nam H G, et al. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45: 1361-1370
- [17] Yan J, Wang J, Zhang H. An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism [J]. Plant J, 2002, 29: 193-202
- [18] Wang Y S, Pi L Y, Chen X, et al. Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance [J]. Plant Cell, 2006, 18: 3635-3646
- [19] Seong E S, Cho H S, Choi D, et al. Tomato plants overexpressing *CaKRI* enhanced tolerance to salt and oxidative stress [J]. Biochem Bioph Res Co, 2007, 363: 983-988
- [20] 韦里俊, 周继业, 陈松, 等. 拟南芥锚蛋白 ANK20 基因表达模式 [J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2009, 32(2): 89-92
- [21] Yuan X W, Zhang S Z, Qing X H. Superfamily of ankyrin repeat proteins in tomato [J]. Gene, 2013, 523: 126-136
- [22] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. The *Arabidopsis* *NPRI* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. Cell, 1997, 88: 57-63
- [23] Albert S, Despres B, Guillemot J, et al. The *EMB 506* gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos [J]. Plant J, 1999, 17: 169-179
- [24] Becerra C, Jahrman T, Puigdomenech P, et al. Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*; characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins [J]. Gene, 2004, 340: 111-121
- [25] 吴利民, 陈键, 田连福, 等. 水稻锚蛋白基因家族分析和锚定膜蛋白的表达模式研究 [J]. 激光生物学报, 2007, 16(1): 55-61
- [26] 许瑞瑞, 张世忠, 宿红艳, 等. 苹果锚蛋白基因 ANK 家族生物学鉴定分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(6): 1021-1032
- [27] Pratelli R, Lacombe B, Torregrosa L, et al. A Grapevine Gene Encoding a Guard Cell K⁺ Channel Displays Developmental Regulation in the Grapevine Berry [J]. Plant Physiol, 2002, 128(2): 564-577
- [28] 杨东叶, 刘凯于, 余泽华, 等. 泛素连接酶 E3 [J]. 细胞生物学杂志, 2005(27): 281-285
- [29] Raymond J. RING domain E3 ubiquitin ligases [J]. Ann Review Biochem, 2009, 78: 399-434
- [30] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif [J]. Cell, 1991, 64: 483-484
- [31] Hardtke C S, Okamoto H, Stoop-Myer C, et al. Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the *Arabidopsis* COP1 interacting protein 8 (CIP8) [J]. Plant J, 2002, 30: 385-394
- [32] Stone S L, Hauksdottir H, Troy A, et al. Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2005, 137: 13-30
- [33] Lorick K L, Jensen J P, Fang S, et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2) dependent ubiquitination [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11364-11369
- [34] Lee J H, Kim W T. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis* [J]. Mol Cell, 2011, 31: 201-208
- [35] Dreher A, Callis J. Ubiquitin hormones and biotic stress in plants [J]. Ann Bot, 2007, 99: 787-822