

葡萄 F-box 基因 *VvF-box5* 的基因结构与表达分析

于兰芳^{1,2}, 周 硕², 张双喜³, 纪玉洁⁴, 刘永伟²

(¹河北省威县林业局, 威县 054700; ²河北省农林科学院遗传生理研究所/河北省植物转基因中心, 石家庄 050051;

³宁夏农林科学院农作物研究所, 永宁 750105; ⁴南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: F-box 蛋白广泛存在于真核生物中, 主要参与细胞周期调控、凋亡及多种激素信号转导等过程; 近几年发现, F-box 蛋白还介导了植物对逆境胁迫的应答响应, 对维持植物正常生长发育至关重要。干旱等非生物逆境胁迫严重影响了葡萄正常生长发育和果实品质, 克隆并分析干旱响应基因对改良葡萄的抗性有重要意义。本研究根据葡萄干旱转录组分析结果, 发现 11 个 F-box 基因在干旱胁迫下表达量明显上调; 其中, *VvF-box5* 基因位于葡萄第 19 条染色体上, 对干旱胁迫的响应明显高于其他 F-box 成员; *VvF-box5* 基因含有 5 个外显子和 4 个内含子, 内含子均含有保守的 GT...AG 序列; *VvF-box5* 基因包含 1824 bp 的开放阅读框, 编码 607 个氨基酸, 氨基酸序列的 N 端含有 1 个保守的 F-box 结构域, C 端包含 1 个 FBD 和 2 个 LRR 结构域。启动子元件分析表明, *VvF-box5* 基因含有多种逆境应答元件, 包括 GA 响应元件 GARE-motif、MeJA 响应元件 CGTCA-motif、干旱胁迫相关元件 ERE、HSE 和 LTR、光应答顺式作用元件 ACE、Box4 和 Sp1 以及与细胞周期调节和发育相关的元件等。实时荧光定量 PCR 结果显示, 在干旱、高盐、ABA 和 MeJA 处理下, *VvF-box5* 基因的表达量明显升高; 亚细胞定位结果显示, *VvF-box5* 蛋白主要定位于洋葱表皮细胞的细胞核中; *VvF-box5* 的过表达明显提高了转基因拟南芥在干旱处理下的成活率。另外, 本研究利用原核表达系统诱导 6 × His-*VvF-box5* 融合蛋白的表达, 并使用蛋白标记亲和层析柱纯化获得了 6 × His-*VvF-box5* 融合蛋白, 为下一步深入研究 *VvF-box5* 的功能奠定基础。

关键词: 葡萄; F-box 蛋白; 干旱; 表达模式; 亚细胞定位

Gene Structure and Expression Analysis of F-box Gene *VvF-box5* in Grapevine (*Vitis vinifera* L.)

YU Lan-fang^{1,2}, ZHOU Shuo², ZHANG Shuang-xi³, JI Yu-jie⁴, LIU Yong-wei²

(¹Weixian Forestry Administration of Hebei Province, Weixian 054700; ²Institute of Genetics and Physiology,

Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051;

³Institute of Crop Science, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yongning 750105;

⁴College of veterinary medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: F-box proteins, widely existing in eukaryotes, were involved in cell cycle regulation, apoptosis and multiple hormone signal transduction. Recently, it was showed that F-box proteins mediated the responses to abiotic and biotic stresses, and they were crucial to maintain the normal growth and development for plant. Drought and other abiotic stresses seriously affected plant growth and development. It is urgent to solve the problem which enhances the drought resistance of plant at present. The Grapevine, one of important fruit trees, was widely cultivated worldwide. Drought stress severely affected the plant growth and dramatically reduced the fruit quality of grapevine. Therefore, it has a great meaning to isolate the drought-responsive genes and analyze its functions for stress-resistant improvement in grapevine. Based on the transcriptome dataset, we found 11 F-box genes significantly up-regulated under drought stress. Pfam software analysis showed these F-box genes encode amino acid sequences

收稿日期: 2017-08-21 修回日期: 2017-09-18 网络出版日期: 2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0900.016.html>

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX0800916B); 河北省农林科学院基本科研业务费 (494-0401-JBN-8X6P); 宁夏农林科学院科技创新先导资金 (NKYJ-1513)

第一作者研究方向为林果栽培与繁育。E-mail: yulanfang2020@sina.com

通信作者: 刘永伟, 研究方向为植物抗逆分子生物学。E-mail: liuywmail@126.com

having a complete F-box domain. Among them, *VvF-box5* on the 19th chromosome exhibited higher expression level compared with other genes. This gene consists of exons and 4 introns according to gene sequence analysis, and its open reading frame is 1 824 bp. *VvF-box5* protein contains 1 F-box domain in its N terminal and a fibrinogen-like domain (FBD) and two leucine-rich repeat (LRR) in its C terminal. Protein secondary structure prediction analysis showed that the *VvF-box5* contains 15 α -helixs and 14 β -pleated sheets. The promoter element analysis showed that the promoter of *VvF-box5* contains multiple stress-responsive elements, such as GA response element GARE-motif, MeJA response element CGTCA-motif, Drought stress related components ethylene-responsive element (ERE), heat stress-responsive element (HSE) and low temperature responsive element (LTR), light response cis elements ACE, Box 4 and Sp1 and other element related to cell cycle regulation and development. Real-time qRT-PCR showed that *VvF-box5* responded to under the treatments of drought, salt, ABA and JA. Subcellular localization showed that *VvF-box5* was mainly located in nucleus in onion epidermis cells. Overexpression of *VvF-box5* clearly improved the drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. In addition, the fusion protein 6 \times His-*VvF-box5* was produced in prokaryotic expression system and purified by Ni-NTA Resin, laying foundation for studying *VvF-box5* functions.

Key words: grapevine; F-box protein; drought; expression pattern; subcellular localization

为了适应不断变化的环境,植物进化出自身防御系统以减少环境胁迫对植株本身造成的伤害^[1]。F-box 家族蛋白广泛存在于真核生物中,与多种植物激素信号通路有关,能够参与植物对逆境胁迫的应答等,对维持植物正常生长发育具有重要意义,在调节植物光形态建成、对逆境胁迫的响应中起到重要作用^[2]。F-box 蛋白是 E3 泛素连接酶的组成部分,是 SCF 复合体的一个亚基,与底物的特异性识别有关。据报道,为了能够与 Skp1 结合,每个 F-box 蛋白的 N 端都含有至少 1 个保守的 F-box 基序(大约有 40 ~ 50 个氨基酸),从而促进与 Cullin1 的互作;而 F-box 蛋白的 C 端含有多种与蛋白互作相关的结构域,例如亮氨酸拉链(LRR)、Kelch、WD40 等^[3]。

最初发现的植物 F-box 蛋白主要参与光形态建成、调节生物钟以及开花时间等^[4-7]。UFO (Unusual Floral Organs) 是首次被报道的 F-box 蛋白,与植物花分生组织与花器官的建成有关^[8-11]。后来发现, F-box 蛋白还参与了激素的信号传导。例如,赤霉素信号通路可以通过 F-box 蛋白负调节因子 SLEEPY1 (SLY1) 调节,从而解除 DELLA 对 GA (Gibberellin) 信号传导途径的抑制^[12-13]。拟南芥 F-box 基因 *MAX2* (more axillary branches 2) 参与独角金内酯激素调控途径抑制植物分枝,是调节分枝途径的关键作用基因,其作用机理有可能也是通过 SCF 复合体直接作用的^[14]。

近年来,越来越多的证据表明 F-box 蛋白还与植物对非生物胁迫应答响应有关。拟南芥 F-box 基

因 *MAX2* 能正调控植物的抗旱反应, *max2* 突变体对干旱非常敏感,在干旱条件下气孔关闭慢;在独脚金内酯途径中,只有 *MAX2* 基因参与了植物对干旱及对 ABA 的反应,说明 *MAX2* 基因在植物逆境胁迫反应中起重要作用^[15]。拟南芥 F-box 基因 *DOR1* (drought tolerance repressor 1) 在叶片保卫细胞中特异性表达;与野生型相比, *dor* 拟南芥突变体中含有更高浓度的 ABA,导致气孔关闭,从而增加植株的抗旱性^[16],进一步分析发现 *DOR1* 在依赖 ABA 和不依赖 ABA 两条通路上都起作用。据报道,谷子中含有 525 个 F-box 家族成员,霍冬英等^[2]根据谷子干旱处理的转录组测序结果,从中鉴定出了 19 个能够上调表达的 F-box 基因;并发现 *SiF-box18* 基因对干旱、高盐、ABA、SA 和 JA 均有响应,表明 F-box 蛋白可能参与植物对非生物胁迫的响应,提高植物的抗逆性。

葡萄作为重要果树在世界范围内广泛栽培,干旱等非生物逆境胁迫严重影响着葡萄生长发育、果实品质和产量。挖掘逆境胁迫相关基因,解析其抗逆机理,对改良普通葡萄品种的抗逆性具有重要的理论意义和应用价值。然而,目前关于 F-box 蛋白的研究主要集中在模式植物拟南芥和作物水稻中^[2],葡萄中尚未见过系统的报道。本研究对葡萄进行了转录组测序分析,获得 11 个受干旱诱导上调表达的 F-box 基因,根据葡萄幼苗对干旱胁迫的响应程度,选出了 *VvF-box5* 基因做进一步研究,为分析 F-box 家族基因的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因结构、保守域预测与进化树分析

葡萄基因组和 cDNA 数据均下载于葡萄数据库 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/401?genome_assembly_id=214125)。利用 GSDS 在线工具 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 制作基因外显子-内含子结构示意图。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线工具分析蛋白结构域。用 MEGA 6.06 进行不同物种间蛋白序列比对并构建系统发育树。

1.2 启动子元件分析

从葡萄基因组数据库 EMBL-EBI 中选取葡萄 *VvF-box5* 基因起始密码子上游 1815 bp 序列作为启动子区,利用植物顺式作用元件数据库 PlantCARE 分析基因的顺式作用元件。

1.3 目的基因克隆

根据葡萄 *VvF-box5* 基因 (LOC104877736) 的序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物。用 Primer Script (TakaRa) 反转录试剂盒获得第一链 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 *VvF-box5* 基因编码序列。引物: F: 5'-ATGGGTTTCAGAGTATGAAGAAAGC-3'; R: 5'-TTAAATTGAAAATAAATAGCTGAAG-3'。

1.4 材料处理和实时荧光定量 PCR 分析

葡萄品种宝石无核 (Ruby Seedless) 的幼苗在人工气候箱中培养 (25 °C/光照培养 16 h, 20 °C/暗培养 8 h), 培养 40 d 后分别进行模拟干旱 (12% PEG6000)、盐 (NaCl, 200 mmol/L)、茉莉酸 (MeJA, 200 μmol/L)、脱落酸 (ABA, 200 μmol/L) 处理,并于 0 h、12 h、24 h 和 48 h 分别取幼苗相同部位的叶片,立即冻存 -80 °C,用于提取幼苗总 RNA。其中,在进行模拟干旱和盐处理时,分别将葡萄的根部浸泡在 12% PEG6000 和 200 mmol/L NaCl 的溶液中;而在进行激素处理时,分别用配制好的 200 μmol/L MeJA 和 200 μmol/L ABA 溶液喷施葡萄的叶片,并按上述指定的时间进行取样、保存。用实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism 7300), 通过 SYBR Green 染料法进行实时荧光定量 PCR。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *VvF-box5* 在不同处理下基因表达量,进行表达模式分析。

1.5 基因枪转化洋葱表皮细胞

通过酶切、连接将 *VvF-box5* 构建到 16318hGFP 载体上,获得 *VvF-box5*-16318hGFP 融合基因表达载

体。DNA 的金粉包埋按照 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System 的方法,采用 Bio-Rad PDS-1000/He 基因枪进行轰击洋葱表皮。转化后继续培养 16 ~ 24 h,于激光共聚焦显微镜 (Leica Microsystem) 下观察细胞中的绿色荧光。

1.6 原核表达诱导及蛋白纯化

将 *VvF-box5* 构建到 pCold 载体上,转化到大肠杆菌感受态 Trans1-T1 (全式金,北京) 中。将含有重组质粒的菌液按照 1:100 的比例转接到 100 mL LB (含 100 mg/L 的 Amp) 液体培养基中,37 °C 培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.6 后,加入 0.1 mol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (终浓度为 1 mmol/L) 16 °C 诱导过夜培养,15000 r/min,4 °C 离心收集菌体。加入 3 mL 1 × PBS 重悬,取 20 μL 重悬液加入 6 × protein loading buffer,沸水浴加热 10 min;剩下的重悬菌体按 100:1 加入菌液裂解酶,用 1 μL/mL Dnase I 消化残留的 DNA。室温放置 15 min,冰融法反复冻融 10 次,12000 r/min 离心 10 min,吸取上清液。将收集的上清液用亲和层析柱 (Ni-NTA Resin) 方法纯化。SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化情况。

1.7 拟南芥转化及功能鉴定

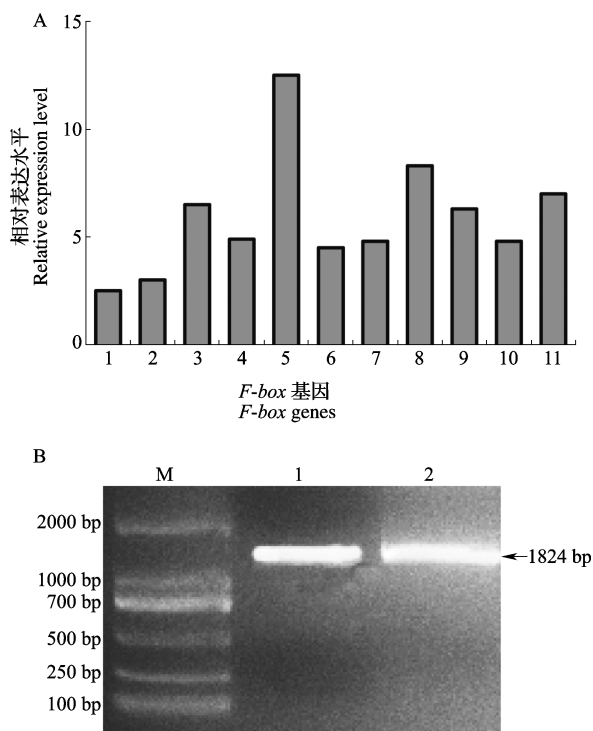
将 *VvF-box5* 构建到 pBI121 载体上并转化农杆菌 (GV3101),通过花序浸染法转化到拟南芥中。将收获的种子在含有卡那霉素的 MS0 培养基中筛选阳性植株。T3 代株系用于检验 *VvF-box5* 基因在转基因拟南芥中的作用。将转基因拟南芥幼苗移植到土中 (营养土:蛭石 = 1:1) 进行干旱处理。干旱处理 12 d 后复水 3 d,观察复水后幼苗的生长情况。

2 结果与分析

2.1 葡萄 F-box 家族成员转录组结果分析及 *VvF-box5* 基因的克隆

本研究根据 F-box 的保守区在 NCBI 网站中进行 Blast 检索,得到 159 个葡萄 F-box 基因家族成员,通过对葡萄干旱转录组测序分析,发现有 11 个 F-box 基因与未处理葡萄中这 11 个基因的表达量相比其是上调表达的 (大于 2 倍),用 Pfam 软件分析这些 F-box 基因编码的氨基酸序列都具有完整的 F-box 结构域。

干旱转录组数据分析表明,受干旱诱导上调表达量大于 2 倍的 *F-box* 基因有 11 个 (图 1A),其中 *VvF-box1/2/4/6/7/10* 的表达量介于 2 ~ 5 倍之间;



A: 葡萄 F-box 基因转录组测序分析; 1~11 代表 *VvF-box1*...*VvF-box11*; B: *VvF-box5* 基因的克隆
A: Transcriptome analysis of F-box genes in grapevine, 1-11 represent *VvF-box1*...*VvF-box11*; B: The cloning of *VvF-box5*
图 1 葡萄 F-box 基因转录组测序分析及 *VvF-box5* 基因的克隆

Fig. 1 Transcriptome analysis of F-box genes in grapevine and the cloning of *VvF-box5*

VvF-box3/8/9/11 基因的表达量介于 5~10 倍之间; 高于 10 倍的只有 *VvF-box5* 基因, 因此选择 *VvF-box5* 基因做下一步分析。根据 *VvF-box5* 基因序列从葡萄 cDNA 中扩增得到葡萄 *VvF-box5* 基因(图 1B)。

2.2 葡萄 *VvF-box5* 基因结构及蛋白结构域分析

根据葡萄基因位置信息分析 F-box 家族基因在葡萄染色体上的定位, 发现 *VvF-box5* 基因 (GenBank No. AM463584.2) 位于葡萄第 19 条染色体上。对 *VvF-box5* 基因组序列进行分析, 发现 *VvF-box5* 基因包含 1824 bp 的开放阅读框, 含有 5 个外显子和 4 个内含子, 外显子和内含子交替分布。4 个内含子分别有 114 个、3836 个、81 个和 370 个碱基, 两端含有保守的 GT...AG 序列(图 2A)。

葡萄 *VvF-box5* 基因的 1824 bp 的开放阅读框序列编码 607 个氨基酸, 分子量为 69.6 kD, 等电点为 5.03。Pfam 软件分析表明, *VvF-box5* 基因编码的氨基酸序列具有完整的 F-box 结构域, 位于 N 端, 此外, C 端还含有与蛋白互作相关的结构域, 如 fibrinogen-like domain (FBD) 和 leucine-rich repeat (LRR) (图 2B)。

对 *VvF-box5* 氨基酸的二级结构进行预测, 发现该蛋白含有 15 个 α 螺旋以及 14 个 β 折叠(图 3), 这有助于氨基酸序列折叠成正确的蛋白结构。

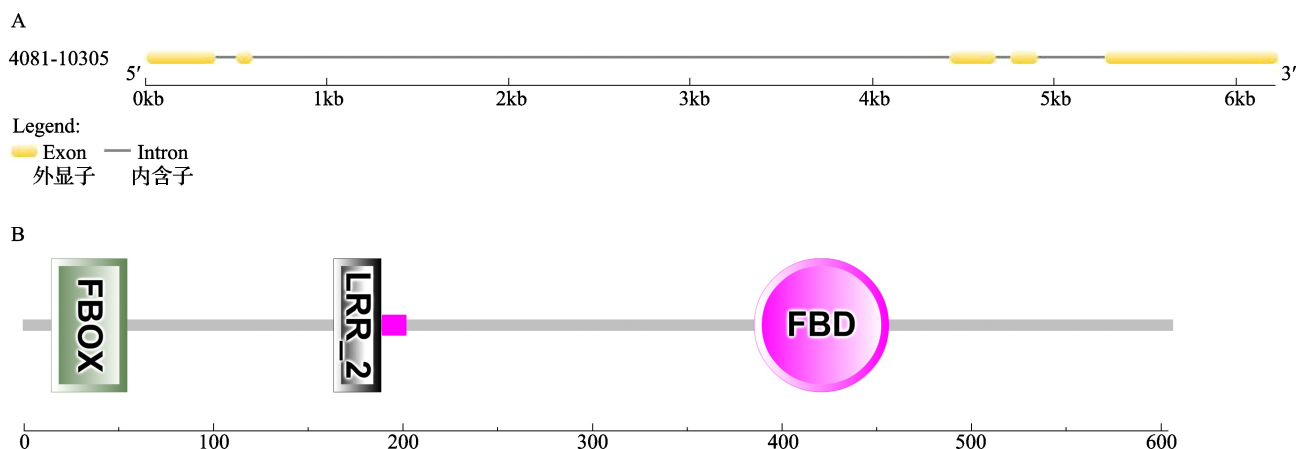


图 2 葡萄 *VvF-box5* 基因结构及编码蛋白的保守结构域

Fig. 2 The gene structure of grapevine *VvF-box5* and its conserved domain

2.3 进化树分析

以 *VvF-box5* 蛋白在 UniProt 数据库进行 BLAST 搜索, 发现不同物种中有若干具有 F-box、LRR 和 FBD 保守域的蛋白, 选取相似度高的 13 个蛋白序列和

VvF-box5 构建系统发育树(图 4), 包括麻疯树(*Jc*, *Jatropha curcas* L.)、甜橙(*Cs*, *Citrus sinensi* (L. Osbeck))、甜菜(*Bv*, *Beta vulgaris* L.)、克莱门柚(*Cc*, *Citrus clementina* Hort.)、可可(*Tc*, *Theobroma cacao*

L.)、小麦(*Ta*, *Triticum aestivum* L.)、罗布斯塔咖啡豆(*Rc*, *Robusta coffee*)、菠菜(*So*, *Spinacia oleracea* L.)等,都含有保守的 F-box 结构域。采用 MEGA 6.06 进行氨基酸同源比对,用邻接法构建系统发育树,步长设置为 500。结果表明,葡萄 *VvF-box5* 蛋白与其他物种进化距离较远,说明 F-box 蛋白基因在进化中发生分歧。

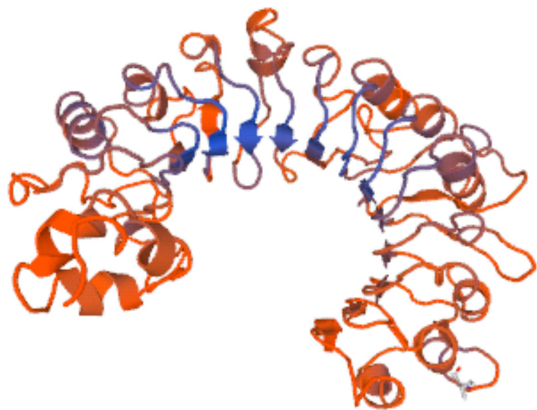


图3 *VvF-box5* 蛋白的二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure prediction of *VvF-box5*

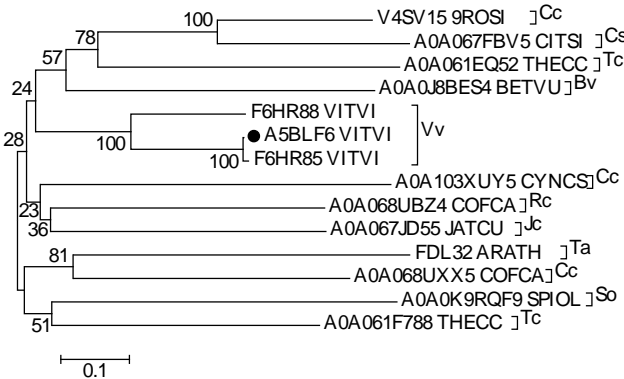
2.4 启动子顺式作用元件分析

为了解析 *VvF-box5* 基因的表达调控机理,本研究对 *VvF-box5* 基因的启动子区顺式作用元件进行了分析。选取 *VvF-box5* 基因 ATG 上游 1815 bp 片段,经 PlantCARE 数据库分析显示,葡萄 *VvF-box5* 基因上游启动子区含多个胁迫相关顺式作用元件,

表1 *VvF-box5* 基因启动子逆境相关顺式作用元件分析

Table 1 Distribution of *cis*-acting elements in grapevine *VvF-box5* gene promoter

元件 Elements	核心序列 Core sequences	功能 Functions
ACE	AAAACGTTTA	光应答顺式元件 <i>cis</i> -acting element involved in light responsiveness
AT1-motif	AATTATTTTTTATT	参与光响应模型 part of a light responsive module
Box 4	ATTAAT	参与光应答 involved in light responsiveness
Box 1	TTTCAAA	光响应元件 light responsive element
CAT-box	GCCACT	分生组织表达顺势启动元件 <i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression
ERE	ATTTCAAA	乙烯应答元件 ethylene-responsive element
GAG-motif	AGAGAGT	光应答原件 part of a light responsive element
HSE	AAAAAATTTC	热激响应元件 element involved in heat stress responsiveness
LTR		低温响应 low-temperature responsiveness
MSA-like	TCAAACGGT	细胞周期调节 cell cycle regulation
Nodule-site2	CTTAAATTATTTATTT	节结特异性结合位点 nodule specific factor binding site
O2-site	GATGACATGA	醇溶蛋白代谢调节 zein metabolism regulation
Skn-1_motif	GTCAT	胚乳表达 endosperm expression
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应元件 light responsive element



Jc: *Jatropha curcas* L., Cs: *Citrus sinensi*(L.) Osbeck,
Bv: *Beta vulgaris* L., Cc: *Citrus clementina* Hort.,
Tc: *Theobroma cacao* L., Ta: *Triticum aestivum* L.,
Rc: *Robusta coffee*, So: *Spinacia oleracea* L.

图4 F-box 蛋白进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of F-box genes in different species

包括与干旱胁迫相关的元件主要有 ERE(ethylene-responsive element)、HSE(heat stress-responsive element)、LTR(low temperature responsive element)、大量的光应答顺式作用元件,如 ACE、Box 4 和 Sp1 等(表 1)。其中,光信号相关元件有 5 个;热激、低温和乙烯激素逆境应答相关元件有 3 个;除此之外,还有与细胞周期调节和发育相关元件。启动子分析结果说明 *VvF-box5* 基因可能参与了植物对干旱等逆境胁迫的应答响应。

2.5 *VvF-box5* 基因在各种逆境胁迫下的表达

VvF-box5 基因的启动子区包含多种非生物胁迫响应元件,说明 *VvF-box5* 基因可能参与多种非生物胁迫响应。为了进一步分析 *VvF-box5* 基因对不同逆境胁迫的响应,本试验分别对葡萄幼苗进行干旱、盐、脱落酸 (ABA) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 等胁迫处理,并在处理的不同时间段取样提取 RNA,进行实时荧光定量 PCR 检测 (图 5)。在干旱处理条件下,

VvF-box5 基因的表达量先升高再降低,其中在 12 h 达到最高,是未处理的葡萄中 *VvF-box5* 基因表达量的 12 倍;盐胁迫处理和干旱处理类似,*VvF-box5* 的表达量也是先升高再降低,在 12 h 达到最高表达量 (是未处理的葡萄中 *VvF-box5* 基因表达量的 15 倍)。在外源激素 ABA 和 MeJA 处理下,*VvF-box5* 基因均在 48 h 就达到最高表达量,分别是未处理的葡萄中 *VvF-box5* 基因表达量的 7 倍和 5 倍。

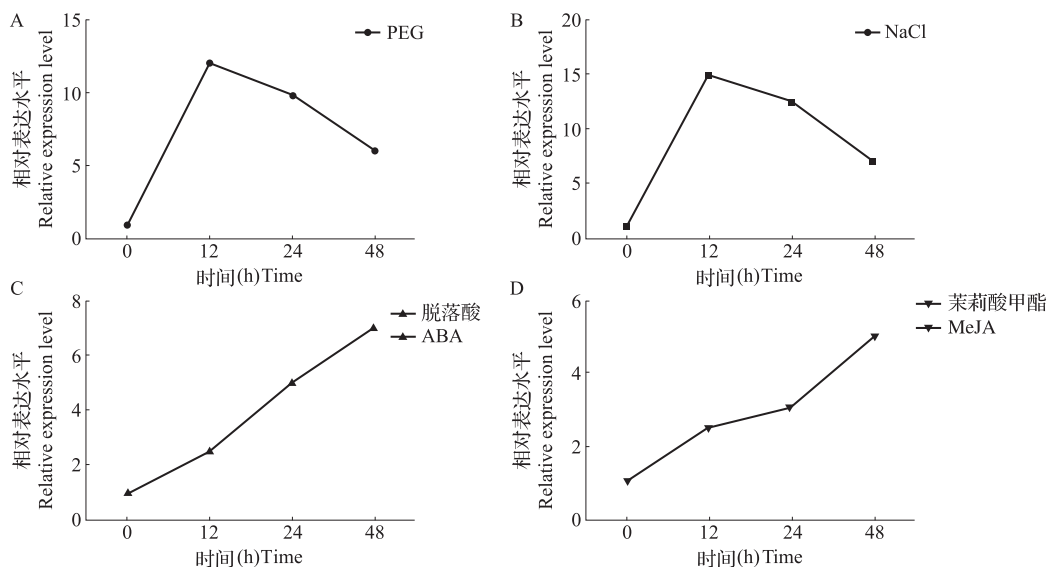


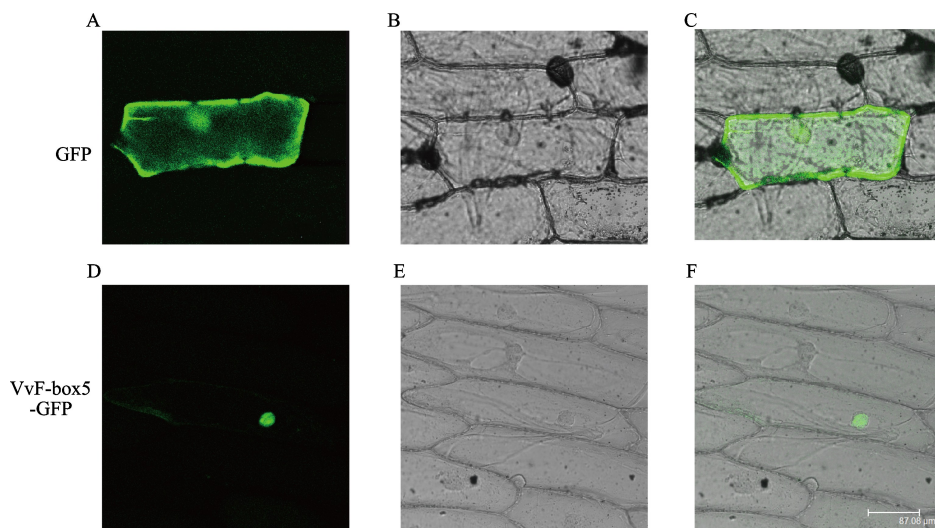
图 5 *VvF-box5* 基因在不同胁迫下的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of the *VvF-box5* gene under various treatments

2.6 亚细胞定位

将完整的 *VvF-box5* 基因片段构建到荧光表达蛋白 16318hGFP 的 N 端,将 *VvF-box5*-hGFP 融合表

达载体转入洋葱表皮细胞,在激光共聚焦显微镜下观察 *VvF-box5*-hGFP 融合表达蛋白在细胞中的定位情况 (图 6)。结果显示,空 GFP 融合蛋白在洋葱表



A, D: 绿色荧光下的图片; B, E: 可见光下的图片; C, F: 两者的叠加图片

A, D: the dark field for green fluorescence, B, E: the bright light for the morphology of the cells, C, F: combination

图 6 *VvF-box5* 编码蛋白的亚细胞定位

Fig. 6 The subcellular localization of *VvF-box5* protein

皮的细胞核、细胞质和细胞膜中都显现绿色荧光,表明其在洋葱表皮各个部位都有表达;而 VvF-box5-hGFP 融合表达蛋白仅在洋葱表皮细胞的细胞核中显现绿色荧光,在细胞膜和细胞质中并没有荧光信号,表明 VvF-box5 蛋白定位在细胞核,主要在细胞核中发挥功能。

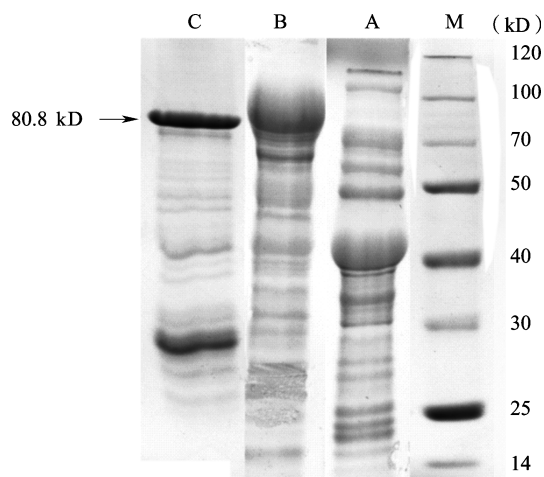
2.7 *VvF-box5* 基因原核表达及编码蛋白的纯化获得

为了进一步研究 *VvF-box5* 基因编码蛋白的活性及功能,将 *VvF-box5* 基因构建到原核表达载体 pCold 上,用 IPTG 诱导以获得有活性的 VvF-box5 蛋白。本研究通过液氮反复冻融法分离蛋白的上清液和沉淀,经 SDS-PAGE 电泳分析发现, VvF-box5 以可溶性蛋白的形式存在于上清液中,分子量大小介于 70 ~ 100 kD 之间,与预期结果相同(图 7)。

将分离出的上清用 Ni 亲和层析柱纯化蛋白,电泳检测结果显示获得了一条清晰的蛋白主带,另有轻微杂带,证明已得到纯化后大小为 80.8 kD 的目的条带(图 7C),可以进行下一步实验。纯化后的目的蛋白有少许杂带,可能是因为 VvF-box5 蛋白与大肠杆菌中的蛋白有互作,多次洗脱也未能洗脱掉杂蛋白。

2.8 *VvF-box5* 的过表达提高了转基因拟南芥在干旱处理下的成活率

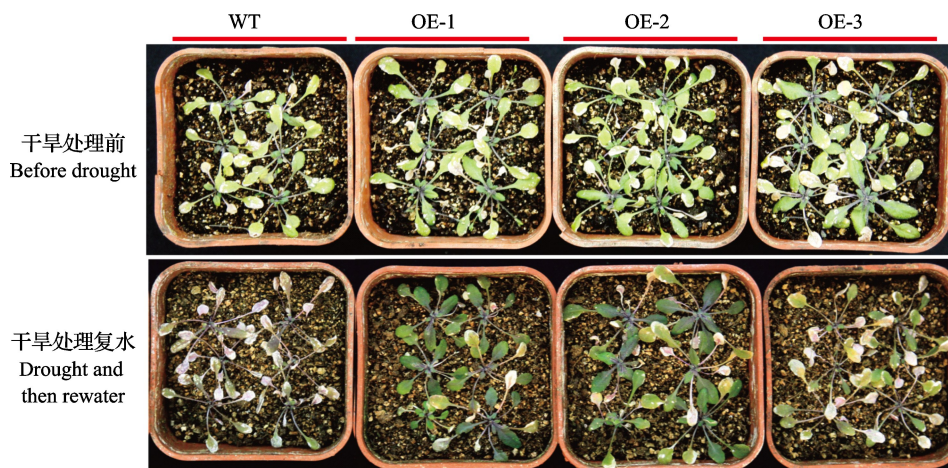
为了进一步研究干旱对 *VvF-box5* 基因功能的影响,本研究获得了过表达 *VvF-box5* 转基因拟南



M: 蛋白标记; A: 对照(未加 IPTG 诱导);
B: 加 IPTG 诱导 6 × His-VvF-box5 融合蛋白表达;
C: 纯化的 6 × His-VvF-box5 融合蛋白
M: Blue Plus II Protein Marker, A: control (without IPTG),
B: 6 × His-VvF-box5 fusion protein induced by IPTG,
C: purified fusion protein 6 × His-VvF-box5

图 7 重组 6 × His-VvF-box5 蛋白融合蛋白的诱导与纯化
Fig. 7 The induction and purification of 6 × His-VvF-box5 recombination protein

芥,并对其在干旱条件下的生长情况进行分析(图 8)。在干旱处理下,转基因植株和野生型植株的生长都受到了一定程度的抑制,但是这种抑制在野生型植株中表现的更为严重,甚至导致死亡。例如,在干旱处理 12 d 后,再复水 3 d,野生型植株几乎全部死亡,而转基因植株大部分存活下来。



WT: 野生型; OE-1 ~ OE-3: *VvF-box5* 转基因拟南芥植株

WT: wild type, OE-1 ~ OE-3: *VvF-box5* transgenic plants

图 8 干旱处理对 *VvF-box5* 转基因拟南芥植株生长的影响

Fig. 8 The effect of drought on growth of *VvF-box5* transgenic plants

3 讨论

作为世界范围内广泛栽培果树之一,干旱等非生物胁迫逆境严重影响了葡萄的生长发育。F-box 蛋白介导了植物对逆境胁迫的应答响应,对植物正常生长发育至关重要。F-box 蛋白广泛存在于真核生物中,植物中有大量的 F-box 蛋白存在。据报道,拟南芥中有 694 个 F-box 基因,这些家族基因根据 C 端结构域的不同又被分为 19 个亚族^[17],水稻和玉米中分别含有 687 和 359 个 F-box 基因,可分别分为 10 个和 13 个亚族^[18-19];最近研究表明,谷子中有 525 个 F-box 基因^[2]。本研究对葡萄干旱转录组进行分析,发现 11 个 F-box 基因受干旱胁迫的诱导表达,并对干旱响应最强烈的 *VvF-box5* 基因进行了进一步的鉴定。

近期发现拟南芥 F-box 基因 *MAX2* 促进了拟南芥对细菌植物病原体的抗性^[20]。另外,*MAX2* 蛋白的 N 端含有 1 个保守的 F-box 结构域,C 端含有 1 个 LRR 结构域,而葡萄 *VvF-box5* 的蛋白序列也含有 F-box 和 LRR 结构域。LRR 是亮氨酸 leucine 重复单元,能够参与植物体内信号传导,与 DNA 修复、重组、转录以及抗病等功能相关^[21],这表明受逆境胁迫诱导表达的葡萄 *VvF-box5* 基因可能同样与信号传导、抗病相关。

F-box 基因不仅与植物信号传导有关,还能够参与植物对干旱等非生物胁迫的响应^[15,22]。本研究在葡萄中发现 11 个受干旱诱导表达的 F-box 基因,并从中鉴定出干旱响应最强烈的 *VvF-box5* 基因。进一步分析发现,*VvF-box5* 基因的启动子区包含多种与干旱等相关的非生物胁迫响应元件(表 1),实时荧光定量 PCR 结果表明,*VvF-box5* 基因受干旱和高盐胁迫的诱导表达(图 5)。植物对干旱等非生物胁迫的响应是一个复杂的过程,受不同信号传导途径的调控。根据基因的表达是否依赖 ABA,分为依赖 ABA 和非依赖 ABA 两种途径。另外,对 ABA 胁迫也有不同程度的响应,例如,在 ABA 处理条件下,*F-box* 基因表达升高,促使 *DOR* 表达量下降,对 ABA 起负向调控作用。本研究发现 *VvF-box5* 基因受外源 ABA 的诱导表达(图 5),因此,*VvF-box5* 基因可能通过依赖 ABA 途径参与葡萄对非生物胁迫的响应。

据报道,F-box 蛋白参与了 JA、生长素等植物激素的信号传导。*AtFBDL1* 参与了生长素信号的传导,与具有典型顶端分生组织调节功能的基因共同

作用,影响植物顶端的形成与分化^[23]。拟南芥 JA 防御信号通路需要 F-box 蛋白 COI1 的介导发挥功能^[24]。在本研究中,对葡萄幼苗施加外源激素 Me-JA 时,发现 *VvF-box5* 基因的表达升高(图 5),说明 *VvF-box5* 基因可能参与了 JA 信号途径,在植物抵御外界刺激中起作用。

随着全球水资源短缺,对耗水等果树进行节水遗传改良,已成为目前研究的一个热点。对 *VvF-box5* 等 F-box 类家族成员的研究,明确其在葡萄抗性中的作用对改良葡萄等果树或作物的抗旱等非生物胁迫抗性育种具有重要意义,也是本研究一个重要的出发点。对 F-box 类家族还需要更深入的研究,以期解析其作用机理,为葡萄等育种提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 李盼松,郑炜君,周永斌,等. 短柄草 Hsf 家族全基因组鉴定、分类和高温响应[J]. 中国农业大学学报,2015,20(1):8-18
- [2] 霍冬英,郑炜君,李盼松,等. 谷子 F-box 家族基因的鉴定、分类及干旱响应[J]. 作物学报,2014,40(9):1585-1594
- [3] Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine[J]. Nat Rev Mol Cell Bio,2004,5:739-751
- [4] Nelson D C, Lasswell J, Rogg L E, et al. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis* [J]. Cell,2000,101(3):331-340
- [5] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F G, et al. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. Science,2005,309:293-297
- [6] Takase T, Nishiyama Y, Tanihigashi H, et al. LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1 [J]. Plant J,2011,67(4):608-621
- [7] Suetsugu N, Wada M. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome [J]. Plant Cell Physiol,2013,54:8-23
- [8] Levin J Z, Meyerowitz E M. UFO: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development[J]. Plant Cell,1995,7:529-548
- [9] Hepworth S R, Klenz J E, Haughn G W. UFO in the *Arabidopsis* inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression[J]. Planta,2006,223:769-778
- [10] Sasaki K, Yamaguchi H, Aida R, et al. Mutation in *Torenia fournieri* Lind: UFO homolog confers loss of TILFY interaction and results in a petal to sepal transformation [J]. Plant J,2012,71:1002-1014
- [11] Wang Z, Chen J, Weng L, et al. Multiple components are integrated to determine leaf complexity in *Lotus japonicus* [J]. J Integr Plant Biol,2013,55:419-433
- [12] Itoh H, Matsuoka M, Steber C M. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling [J]. Trends in Plant Science,2003,8(10):492-497
- [13] Aizumi T, Hauvermale A L, Nelson S K, et al. Lifting DELLA repression of *Arabidopsis* seed germination by nonproteolytic gibberellin signaling [J]. Plant Physiol,2013,162:2125-2139
- [14] 熊国胜,李家洋,王永红. 植物激素调控研究进展 [J]. 科学通报,2009,54(18):2718-2733

- [15] Bu Q, Lv T, Shen H, et al. Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164: 424-439
- [16] Zhang Y, Xu W, Li Z, et al. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148: 2121-2133
- [17] Xu G, Ma H, Nei M, et al. Evolution of F-box genes in plants; different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification [J]. *PNAS*, 2009, 106(3): 835-840
- [18] Jain M, Nijhawan A, Arora R, et al. F-box proteins in rice. Genomewide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1467-1483
- [19] Jia F, Wu B, Li H, et al. Genome-wide identification and characterisation of F-box family in maize [J]. *Molecular Genetics & Genomics* Mgg, 2013, 288(11): 559-577
- [20] Piisilä M, Keceli M A, Brader G, et al. The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 53
- [21] Andrade M A, Perez-Iratxeta C, Ponting C P. Protein repeats: structures, functions, and evolution [J]. *J Struct Biol*, 2001, 134: 117-131
- [22] Koops P, Pelsner S, Ignatz M, et al. EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 62(15): 5547-5560
- [23] 李建波, 张进, 刘伯斌, 等. 拟南芥 AtFBDL1 在植物顶端生长调节中的作用 [J]. *林业科学研究*, 2015, 28(1): 1-7
- [24] Xie D X, Feys B F, James S, et al. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility [J]. *Science*, 1998, 280(5366): 1091-1094