

王学娟. 山葡萄北冰红冷适应蛋白 *COR413-12* 基因分离及特征分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 17-20.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.004

山葡萄北冰红冷适应蛋白 *COR413-12* 基因分离及特征分析

王学娟

(内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028000)

摘要: 温度是植物种子萌发及生长发育的关键环境因素之一。冷适应蛋白作为植物冷调节的基因, 在植物生命周期中起着重要的作用。以耐寒品种北冰红葡萄叶片为材料, 设计特异性引物, 克隆北冰红冷适应蛋白基因。该基因序列全长 609 bp, 共编码 202 个氨基酸, 将其命名为 *VvCOR413-12*, 该基因编码蛋白的分子量为 22.6 ku, 等电点值为 9.88。氨基酸序列同源性对比结果显示, 该序列与其他植物的 *COR413* 蛋白一致性在 78% 以上。对该蛋白的结构分析显示, 它具有 *WCOR413* 蛋白功能域, 是 *WCOR413* 超家族成员, 二级结构分析该蛋白含有 5 个跨膜结构域。

关键词: 山葡萄北冰红; 冷适应蛋白基因(*COR413*); 基因克隆; 特征分析

中图分类号: S663.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0017-03

低温是影响植物正常生长发育的重要非生物胁迫之一, 不仅限制植物的种植范围, 而且还会造成作物减产和品质的下降^[1]。我国大部分地区位于暖温带和亚热带, 植物对低温的影响非常敏感, 即便是很小的降温幅度, 也会给一些植物造成直接或间接损害^[2]。冷害几乎每年都会对农业生产造成巨大损失, 严重时甚至会绝收^[3]。低温胁迫直接抑制植物细胞内的新陈代谢和多种生理生化反应, 间接引起植物细胞的渗透胁迫、氧化胁迫和其他胁迫, 同时低温能使植物细胞吸水速率降低, 严重时细胞内结冰导致细胞结构的破坏, 这种伤害是不可逆的^[4]。我国东北地区葡萄酒工业产品发展缓慢, 影响其发展的主要因素是酿酒的原料不足。东北地区冬季严寒, 无霜期较短, 有效积温不足, 一些酿酒葡萄品种很难完全成熟, 如赤霞珠葡萄等。因此, 选育出适应寒带地区气候条件的酿酒葡萄新品种, 是我国东北寒带地区葡萄酒工业快速发展的一个重要前提条件。北冰红葡萄是国内推出的适宜酿酒的葡萄新品种, 具有抗寒丰产等特点, 不仅适于大面积的生产果实, 也是良好的观赏植物, 发展前景广阔^[5]。但也有研究表明, 北冰红在吉林省吉林市等地区露地越冬, 植株地上部枝蔓仍会发生冻害, 萌芽率仅为 21.3%, 造成减产^[6], 因此提高葡萄的耐寒性具有现实的意义。

COR 基因家族参与低温胁迫的调节。Breton 等在拟南芥中首次发现并克隆出 *COR413* 基因^[7]。目前已报道的家族成员有 *COR6.6*、*COR15a*、*COR47*、*COR78*、*COR413* 等^[8-9]。*COR413* 蛋白家族为植物所特有, 包括定位于细胞膜上的细胞膜型冷适应蛋白 *COR413-PM* (*COR413-plasma membrane proteins*) 及定位于类囊体膜上的类囊模型冷适应蛋白

COR413-TM (*COR413-thylakoid membrane proteins*) 2 类具有明显区别的蛋白组。研究表明, 编码 *COR413* 蛋白的基因家族在拟南芥和谷类等草本植物的抗冻性形成中发挥着重要的作用^[10]。本研究以耐寒性较强的北冰红葡萄为材料, 利用 PCR 技术, 获取北冰红耐寒基因 *VvCOR413-12*, 并进行分子特征分析, 以期为进一步研究 *VvCOR413-12* 基因的转化和功能验证奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料及试剂

选择山葡萄品种北冰红为试验材料, 由河北昌黎葡萄种植园提供。大肠杆菌感受态细胞 Top10, 由笔者所在实验室保存。RNAiso Plus 试剂盒、PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒、Ex-Taq、pMD-19T Easy Vector, 均购自 TaKaRa 公司。琼脂糖凝胶试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒, 均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 总 RNA 提取和反转录 cDNA

采取北冰红葡萄幼嫩叶片, 按照 RNAiso Plus 试剂盒和 PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取和反转录 cDNA 的合成。

1.3 *COR413-12* 基因引物设计及全长克隆

通过 <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> 检索葡萄 (*Vitis vinifera*) Genoscope.12X 基因组中 *COR413* 基因序列, 并在 NCBI 上检索其他植物 *COR413* 基因序列, 对葡萄基因组中 *COR413* 基因序列进行 Blast 比对, 设计特异性引物。上游引物 *COR413-12-F*: 3'-ATGGGGA AAAAGGGTTACT-TGGCC-5', 下游引物 *COR413-12-R*: 3'-CTATAGGAAGT-GAAGTACCAGAGCC-5', 引物由华大基因合成。

参照 TaKaRa 公司的 Ex-Taq 说明书, 以 cDNA 为模板, 利用 Ex-Taq Buffer, Ex-Taq, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 和引物 *COR413-12-F*/*COR413-12-R* 扩增 *COR413-12* 全长。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 内蒙古民族大学科学研究项目 (编号: NMDYB17152)。

作者简介: 王学娟 (1985—), 女, 内蒙古通辽人, 硕士, 主要从事葡萄抗逆分子生物学与葡萄酒酿造方面研究。E-mail: wangxuejuan555@163.com。

90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测、分析、拍照后, 回收目的片段, 与 pMD19-T Easy Vector 连接, 转化大肠杆菌 Top10 感受态, 将感受态活化培养, 并进行蓝白斑筛选, 挑取阳性菌进行菌液 PCR 检测, 选取 3 个检测为阳性的菌液送至北京华大中生科技发展有限公司进行基因测序。

1.4 生物信息学分析

利用 DNAMAN、TMHMM、Blast、WOLF PSORT 等生物信息学软件对该序列及其编码的氨基酸序列进行分子特征分析和结构分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和检测

RNA 提取电泳结果(图 1)中可见清晰的 3 条条带, 分别为 5S、18S、28S RNA, 纯度检测结果为 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} = 2.10$, 可以进行反转录。

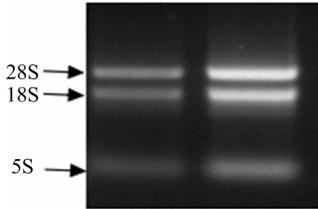


图1 葡萄叶片总 RNA 提取结果

2.2 COR413-I2 基因全长克隆及检测结果

以北冰红葡萄叶片 cDNA 为模板可以扩增出 609 bp 大小的基因片段(图 2), 与葡萄基因组中 COR413 基因大小一致。通过对阳性菌液进行 PCR 检测, 初步推测目的基因成功转化到大肠杆菌感受态中(图 3)。

2.3 VvCOR413-I2 基因及氨基酸分子特征分析

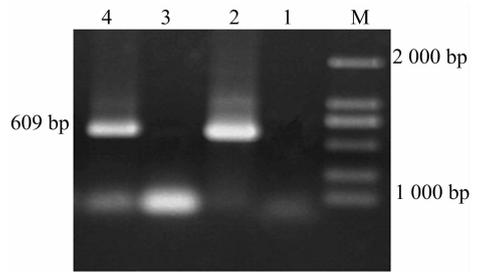
```

1      ATGGGAAAAAGGGTTACTTGGCGATGAGGACTGACACTTATACTACTGATTTGATCAGTTCGATCTCAGAGACCTTGGTAATGCTGCT
1      M G K K G Y L A M R T D T Y T T D L I S S D L R D L G N A A
91     AAGAAGCTTGGCACTCATGCCATTAAGCTTGGTAGTCTGGGCTTTGGCACTACATTTCTTGAGTGGTTGGCTTCTTTTGGCTGCCATTTAT
31     K K L A T H A I K L G S L G F G T T F L E W L A S F A A I Y
181    TTATTAATCTTGGATCGAACAACTGGAAGACAAACATCCTTACGGCACTTCTAATCCCTTACATTTTCTTTAGTCTTCTTCAATAATA
61     L L I L D R T N W K T N I L T A L L I P Y I F F S L P S I I
271    TTCAACCTTCTCAGTGGTCAGGTTGGAAAATGGATTGCTTTTATTGGCCGTAGTGTGCGCCTTCTTCTCCAAAACGTTTCCAGATTGG
91     F N L L S G Q V G K W I A F I A V V L R L F F P K R F P D W
361    CTGGAATGCCTGCAGCTTTGATTCTTCTTATAGTGGTGGCTCCAGCTTGTTTTCGAGCACTATAAGGGATGACTGGATTGGCTCGTA
121    L E M P A A L I L L I V V A P S L F S S T I R D D W I G L V
451    ATATGCTTGAATTTGGGTGTTATTGCTGCAGGAACACATCAGTTCATCTGGTGGGTTTCAGAAATCCTTTACACAGAGGCATGGCATA
151    I C L A I G C Y L L Q E H I R S S G G F R N S F T Q R H G I
541    TCAAACCTCATTTGGATTAATCATTCTGCTGGTCTATCCTGTCTGGGCTCTGGTACTTCACTTCTCTATAG
181    S N S I G L I I L L V Y P V W A L V L H F L *
    
```

图4 VvCOR413-I2的编码区序列及其对应的氨基酸序列

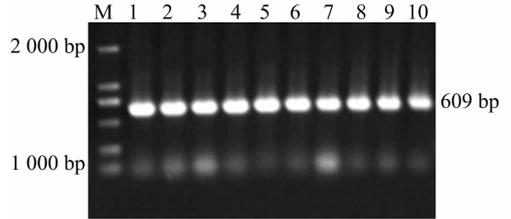
2.4 COR413-I2 蛋白的结构特性

利用 NCBI 的 Conserved Domains 功能对 COR413-I2 蛋白进行分析, 结果显示, VvCOR413-I2 编码的蛋白含有 WCOR413 蛋白的功能域(图 7), 属于 WCOR413 超家族成员; 运用 SOPMA 软件对 COR413-I2 蛋白二级结构预测, 结果显示该蛋白存在 81 个 α 螺旋、17 个 β 转角、43 个延伸链、61 个随机线圈; COR413-I2 蛋白含有 5 个跨膜结构(图 8)。



M为DL 2000 marker; 1、3 为阴性对照; 2、4为COR413-I2 PCR 电泳条带

图2 PCR 扩增电泳



M—DL 2000 marker; 1~10—阳性菌液 PCR 电泳条带

图3 阳性菌液 PCR 检测结果

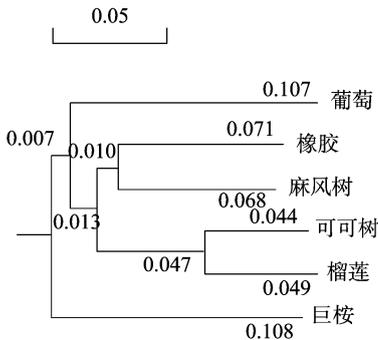
通过测序结果分析, 成功克隆出 VvCOR413-I2 全长(图 4)。该基因编码 202 个氨基酸残基, 编码的蛋白分子量为 22.6 ku, 等电点值为 9.88, pH 值为 7.0 时电荷为 6.88。对 VvCOR413-I2 编码的氨基酸序列与麻风树(Jatropha curcas)、巨桉(Eucalyptus grandis)、可可树(Theobroma cacao)、榴莲(Durio zibethinus)、橡胶(Hevea brasiliensis)等植物的氨基酸序列进行多重序列比对, 发现同源性在 78% 以上。其中与橡胶的同源性最高, 同源性为 85%(图 5)。系统发育树结果表明, VvCOR413-I2 蛋白与上述 5 种植物的 COR413-I2 具有较近的亲缘关系(图 6)。

3 结论与讨论

冷害时常会使植物发生淀粉转化为糖、二氧化碳交换减少、净光合速率降低、叶绿素降解等生理机能失调的现象, 从而导致作物减产甚至死亡^[11]。COR413 蛋白在感应到冷害胁迫信号后, 通过维持植物细胞膜的稳定性来减少冷害对植物细胞的伤害, 其结构与哺乳动物的视紫质类似 G 蛋白偶联受

VvCOR413-12MVKKGYLAMRTDITYTT.....DLI	SSDLRDLGNAARKLA	34	
JcCOR413-1VGGKSYIAMKTDQETMNDL.....AS	DNKDLKNAARKLA	35	
EgCOR413-1MVKRGYLAMRTDREAS.....DQI	GSDLKELGAAARKLA	34	
TcCOR413-1MVGKSYFLAMRAEQEAS.....DLI	SSDFKELVFAARKLA	35	
DzCOR413-2MVGKTYLAMKTEQEAS.....DLI	SSDFKELVFAARKLA	35	
HbCOR413-2	MSISAQSYSRAPTIIVSIVDALQLK	MVGGKSYLAMRTDQETS.....DSI	VSDFKELVFAARKLA	59
VvCOR413-12	THAIKLGSLGFGTTFLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWKTNI LTALLI	PYI FFSLPSTII FNLL	94
JcCOR413-1	NHAI RLGG LGFGTTFLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWRNTNI LTGLLI	PYI FFSLPSTLIFSLF	95
EgCOR413-1	GHAI KLGSLGFGTTFLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWRNTNI LTGLLI	PYI FFSLPSTLIFNVF	94
TcCOR413-1	NHAI KLGSLGFGTSTLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWKTNI LTGLLI	PYI FFSLPSTLIFNLF	95
DzCOR413-2	NHAI KLGSLGFGTSTLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWKTNI LTALLI	PYI FFSLPSTLIFSI F	95
HbCOR413-2	NHAI RLGG LGFGTSTLEWLASFAAI	YLLI LDRTNWRNTNI LTSLLI	PYI FFSLPSTLIFSEF	119
VvCOR413-12	SGQVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPAALI LLI VVAPSLFSSIT	RDDWGLVI CLA	154
JcCOR413-1	RGEFVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPAALI LLI VVAPSLFSSIT	RDSWGVAVI CLV	155
EgCOR413-1	RGEVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPAALI LLI VVAPSLFASIT	RDSWVGVVVI CLV	154
TcCOR413-1	RGEVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPAALI LLI VVAPSLFSSIT	RNDWGVVI CLA	155
DzCOR413-2	SCEVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPAALI LLI VVAPSLFSSIT	RSSWVGEVI CLA	155
HbCOR413-2	RGEVGVWIAFIVAVLRLFFPRRFP	DWLEMPGALII LLI VVAPSLFASIT	RSSWVGVVI CLV	179
VvCOR413-12	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNSI GLI I LLLVYPVWALVLFH		201
JcCOR413-1	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNTI GI VLLVYPAWA VLFH		201
EgCOR413-1	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNTI GI LLLVYPVWGLVYVF		201
TcCOR413-1	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNTVGI I LLLVYPAWALVTDI		202
DzCOR413-2	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNTI GI I LLLVYPAWALVI DI		202
HbCOR413-2	IICAYLLQEHIRASGGFRNSFTQKHGI	SNSI GI I LLLVYPAWALVI DF		226

图5 COR413-12 编码的氨基酸序列与其他植物氨基酸序列同源性对比



氨基酸来源: 葡萄(*Vitis vinifera* L., MG722853)、麻风树(*Jatropha curcas*, XP_012069318.1)、巨桉(*Eucalyptus grandis*, XP_010065426.1)、可可树(*Theobroma cacao*, XP_007041377.1)、榴莲(*Durio zibethinus*, XP_022726109.1)、橡胶(*Hevea brasiliensis*, XP_021643276.1)。

图6 各种植物COR413-12氨基酸编码的氨基酸系统发育树

体(G-protein-coupled receptor, 简称 GPCR) 蛋白家族相似^[4,12],但二者机制是否相似或相同有待进一步研究。现在已有大量研究证明,COR413 蛋白家族在植物应对冷胁迫的机制中起着重要的作用,冷胁迫下丹参、针叶福禄考等植物的COR413 基因表达量明显提高^[13-14]。COR413 基因的异源表达结果表明,将怪柳的冷适应蛋白基因转入粳稻中,转基因粳稻的耐寒性明显高于对照组^[15],转蜡梅COR413 基因的烟草同样表现出较高的耐寒性^[16]。转番茄COR413 基因的烟草不仅在冷胁迫下正常生长,同时在干旱胁迫时表现出更强的适应能力^[17],表明COR413 家族在响应冷胁迫的同时还可以响应干旱胁迫。本研究以耐寒葡萄品种北冰红叶片为试验材料,克隆出VvCOR413-12 基因并对该基因进行了特征分析,为分析该基因的功能及通过基因工程手段选育抗寒葡萄新品种奠定基础。

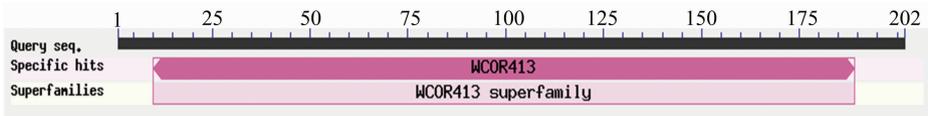


图7 VvCOR413-12 蛋白保守区预测

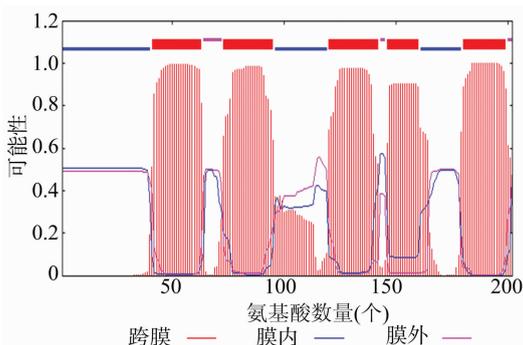


图8 VvCOR413-12 蛋白跨膜结构分析

参考文献:

[1] 赵黎明,李明,郑殿峰,等. 冷害后植物生理变化及外源物质调控研究进展[J]. 中国农学通报,2015,31(12):217-223.
 [2] 檀艳静,张佳华,姚凤梅,等. 中国作物低温冷害监测与模拟预报研究进展[J]. 生态学杂志,2013,32(7):1920-1927.
 [3] 张倩,赵艳霞,王春乙. 我国主要农业气象灾害指标研究进展[J]. 自然灾害学报,2010,19(6):40-54.
 [4] 魏宝东,周爽,郝义. 逐步降温结合1-MCP处理对李果冷害及品质影响[J]. 食品工业科技,2017,38(6):319-323.
 [5] 宋润刚,路文鹏,沈育杰,等. 葡萄酒新品种北冰红的选育[J]. 中国果树,2008(5):1-4.

郭文婷,张鹏飞,李潇玲,等. 棉花 ERF - B3 亚组转录因子基因 *GhERF5 - 1* 的克隆及表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):20 - 24.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2018.19.005

棉花 ERF - B3 亚组转录因子基因 *GhERF5 - 1* 的克隆及表达

郭文婷,张鹏飞,李潇玲,张析,张薇

(石河子大学农学院/新疆绿洲生态农业重点实验室,新疆石河子 832000)

摘要:为海岛棉抗病提供新的基因资源和作物抗病分子育种提供有用的理论依据,以前期获得的枯萎病病菌诱导陆地棉根部基因表达谱中获得差异性表达 ERF 片段为探针,用电子克隆及 RT - PCR 技术,从陆地棉抗枯萎品种中棉所 12 根部 cDNA 克隆得到 1 个新的 ERF 转录因子。通过进化树分析属于 B3 亚组,命名为 *GhERF5 - 1* (登录号:MF145657)。*GhERF5 - 1* 基因的序列分析表明,其 cDNA 全长为 990 bp,编码的氨基酸 329 个,分子量 36.52 ku,等电点为 6.15,含有 1 个保守的 AP2 的结构域。qRT - PCR 分析结果表明,枯萎病病菌侵染后,随着侵染时间的延长,*GhERF5 - 1* 基因的表达趋势是先增加后降低,在处理 2 h 基因的相对表达量达到最大。推断 *GhERF5 - 1* 基因可能参与枯萎病的防御反应。

关键词:棉花;ERF 转录因子;枯萎病病菌;基因克隆;基因表达

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2018)19 - 0020 - 05

枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp.) 是一种真菌性土传病害,由尖孢镰刀菌引起。枯萎病对棉花的生产发展造成了严重的损失。由于枯萎病病菌自身的一些传播特点,传统的防护措施及一些治病方法效果不是很理想,因此培育和种植抗枯萎病品种是一种有效的办法。陆地棉种抗病基因资源较丰

富,因此从陆地棉中分离抗枯萎病相关的基因,通过转基因技术可为海岛棉抗枯萎病育种奠定基础。

当植物被病原菌侵染时会发生一系列的应激防卫反应,其中一些植物的内源性激素发挥重要作用。另外,一些转录因子在植物抗病中扮演着重要角色,它们通过结合下游基因启动子中顺式元件,调节下游防卫基因。AP2/ERF 转录因子中的 ERF 亚家族主要参与了植物体的生物和非生物胁迫下的应答反应。ERF 亚家族转录因子只含有 1 个保守的 AP2/ERF 结构域,一般由 58 ~ 59 个氨基酸残基组成^[1-2]。很多信号分子可以诱导 ERF 转录因子,当病原菌侵染棉花时,棉花自身会发生应激反应而产生许多小分子物质,如乙烯

收稿日期:2017 - 06 - 28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560407)。

作者简介:郭文婷(1991—),女,甘肃人,硕士,研究方向为作物遗传育种。E-mail:18293684620@163.com。

通信作者:张薇,博士,教授,研究方向为棉花分子育种。E-mail:zhw_agr@shzu.edu.cn。

- [6] 宋润刚,路文鹏,沈育杰,等. 冰红葡萄酒新品种“北冰红”的选育研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2008(4):19 - 22.
- [7] Breton G, Danyluk J, Charron J B, et al. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress - regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and arabidopsis[J]. Plant Physiology,2003,132(1):64 - 74.
- [8] Hadi F, Gilpin M, Fuller M P. Identification and expression analysis of *CBF/DREB1* and *COR15* genes in mutants of *Brassica oleracea* var. *botrytis* with enhanced proline production and frost resistance [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2011,49(11):1323 - 1332.
- [9] Jurczyk B, Rapacz M, Budzisz K, et al. The effects of cold, light and time of day during low - temperature shift on the expression of *CBF6*, *FpCor14b* and *LOS2* in *Festuca pratensis* [J]. Plant Science,2012,183(1):143 - 148.
- [10] Ganeshan S, Vitamvas P, Fowler D B, et al. Quantitative expression analysis of selected *COR* genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen [J]. Journal of

Experimental Botany,2008,59(9):2393 - 2402.

- [11] 吴雪霞,查丁石,邵翔. 低温胁迫对茄子幼苗生长、抗氧化酶活性和渗透调节物质的影响[J]. 江苏农业学报,2008,24(4):471 - 475.
- [12] Bockeaert J, Pin J P. Molecular tinkering of G protein - coupled receptors: an evolutionary success [J]. EMBO Journal,1999,18(7):1723 - 1729.
- [13] 徐 鹏,王喆之. 丹参 *COR413* 基因克隆及表达分析[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2010(5):77 - 81.
- [14] 李 洋,曲彦婷,周爱民,等. 针叶福祿考 (*Phlox subulata*) 抗寒基因的克隆及分析[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(9):1917 - 1927.
- [15] 符 楠,殷奎德,郭晓红,等. 转柃柳冷适应蛋白基因水稻的获得及抗冷性分析[J]. 上海农业学报,2016,32(2):14 - 18.
- [16] 秦 华,睦顺照,李名扬,等. 蜡梅 (*Chimonanthus praecox* L.) Link *COR413* 蛋白基因 (*Cpcor413pm1*) 的分子特性与表达分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报,2006,22(7):547 - 552.
- [17] 马晓翠. 番茄冷调控蛋白 SICOR413IM1 的功能分析[D]. 泰安:山东农业大学,2017.