

王小云,孙红艳,史 梦,等. 硒诱导的黄瓜耐镉转录本鉴定分析及表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2023,51(11):46-53.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.11.006

# 硒诱导的黄瓜耐镉转录本鉴定分析及表达载体构建

王小云<sup>1</sup>,孙红艳<sup>2</sup>,史 梦<sup>2</sup>,于 佳<sup>2</sup>

(1. 山西农业大学水土保持科学研究所,山西太原 030045; 2. 太原科技大学环境与资源学院,山西太原 030024)

**摘要:**以黄瓜乙烯响应因子 *CsERF7* 转录本为研究对象,通过外源硒缓解黄瓜镉胁迫试验分析其表达及黄瓜生长状况,并克隆 *CsERF7* 基因,构建过表达载体转化拟南芥,同时分析 *CsERF7* 的理化性质和功能。结果表明,外源硒显著升高了镉胁迫引起的黄瓜生长指标的降低,*CsERF7* 在镉处理下的表达丰度是对照的 56%,而镉+硒比单独镉处理上调表达 4.53 倍,与 RNA-seq 结果相符,此基因可能在硒调控黄瓜镉胁迫响应中起作用。同时,成功构建超表达载体 pEGOE35S-H-ERF7-GFP,转化拟南芥获得转基因株系。生物信息学分析表明,黄瓜 *CsERF7* 基因属于 AP2/ERF 家族的 AP2 亚家族,开放阅读框 ORF 长度 588 bp,编码 196 个氨基酸,有 1 个 AP2 结构域;该蛋白属于非跨膜亲水性蛋白,亚细胞定位预测定位在线粒体中,存在 22 个氨基酸磷酸化位点;其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和延伸链构成,与三级结构预测结果高度一致,所得蛋白序列与黄瓜、甜瓜同源性最高。

**关键词:** 黄瓜;ERF;基因克隆;过表达载体构建;生物信息分析

**中图分类号:** S642.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)11-0046-07

黄瓜(*Cucumis sativus*)是世界范围内普遍种植的蔬菜,是我国设施蔬菜主要栽培种之一,在蔬菜产业中的地位十分重要;同时兼具清热利水、健脑安神、润肤美容等多种功效。我国城市食用黄瓜产地多位于城市近郊,这里同时也聚集较多的城市废弃物,以及含重金属的农药、化肥的大量使用,使得我国蔬菜质量问题依然堪忧,其中包括镉在内的重金属污染十分突出。重金属镉具有较高的可转移性,能够被植物的根部吸收,继而转运至地上部分可食器官并在植物中积累<sup>[1]</sup>;并通过食物链富集于人体引发多种疾病,严重威胁人类健康<sup>[2]</sup>。因此,治理土壤镉污染,深入探讨黄瓜镉毒害及耐性的生理与分子机制,发掘耐镉关键基因,培育耐镉新品种已经成为当前农业科学的研究热点。

乙烯响应因子 ERF(ethylene-responsive factor)是植物界的一类转录因子,属于植物 AP2/ERF 转录因子家族,在植物抗病、干旱、低温、高盐等逆境胁迫中具有重要作用,该基因在不同植株中的超表达能够提高其抗性<sup>[3]</sup>。根据其结构域的数

量及其相互间的序列相似性分为 AP2、RAV 和 ERF 3 个主要亚家族<sup>[4]</sup>,其中 AP2 蛋白在调节植物生长发育过程中起着重要作用<sup>[5]</sup>;RAV 家族蛋白在生物和非生物胁迫响应过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>;ERF 亚家族成员对植物的生长发育以及逆境胁迫应答反应有着重要的调控作用,主要包括植物生长、果实发育、低温和干旱胁迫等环境胁迫<sup>[7-8]</sup>。

在黄瓜转录因子 ERF 研究中,张慧敏等报道 *CsERF*(登录号: Csa7M448110)是黄瓜叶片中调控苦味形成的关键转录因子<sup>[9]</sup>; *CsERFs* 和 *CsHDAs* 基因表达水平与黄瓜果实冷害有一定的关系<sup>[10]</sup>;潘健等报道部分 ERF 基因家族成员参与雌花分化初期的基因表达调控<sup>[11]</sup>。至今,ERF 转录因子与镉胁迫相关的研究鲜见报道,因此本研究拟以前期通过转录组学方法筛选获得应答镉胁迫的转录因子 *CsERF7* 为研究对象,验证其与硒和镉的调节作用关系,通过对目的基因的扩增,构建 *CsERF7* 过表达载体,并对其进行生物信息学分析,最后利用农杆菌花序法转化拟南芥获得转基因植株,为 *CsERF7* 功能的深入研究提供依据,为硒介导的黄瓜耐镉机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以黄瓜津研四号为研究材料,其种子购自太原

收稿日期:2022-08-01

基金项目:山西省重点研发计划(编号:201903D221066);国家自然科学基金(编号:31401319)。

作者简介:王小云(1980—),男,山西兴县人,博士,正高级工程师,主要从事农业面源污染方面的研究。E-mail: wxy801227@163.com。

市种子公司;哥伦比亚野生型拟南芥种子、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、农杆菌 GV3101 感受态细胞均由武汉艾迪晶生物科技有限公司提供。所用化学试剂均采用普通分析纯,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

黄瓜幼苗培养及生理指标测定和 RNA 测序试验于 2021 年 10—12 月进行,实时荧光定量 qPCR 验证、过表达载体及重组质粒转化农杆菌、拟南芥遗传转化试验于 2022 年 3—5 月进行,所有试验均在太原科技大学生物工程实验室开展(RNA 测序除外),具体试验处理和方法如下。

## 1.2 黄瓜幼苗的培养及处理

1.2.1 黄瓜种子的处理 先用 2% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将黄瓜种子消毒 20 min,再用蒸馏水冲洗干净,并浸种 2 h 后置于 22 ℃/18 ℃ 生长室内砂床发芽。

1.2.2 黄瓜幼苗水培试验设计及分析测定项目 黄瓜幼苗长至 2 叶 1 心期,选生长均匀一致的黄瓜植株移苗至水培溶液中放置在温室内培养。水培容器为 3 L 水桶,每桶盛培养液 2.5 L,每桶 6 穴,每穴 2 株,海绵固定。营养液 pH 值调至 5.8  $\pm$  0.1,基本培养液预培养 7 d 后进行镉、硒处理:对照(CK,基本培养液)、3  $\mu$ mol/L Se、50  $\mu$ mol/L Cd、50  $\mu$ mol/L Cd + 3  $\mu$ mol/L Se,并分别记作 CK、Se、Cd、Cd + Se,各处理随机排列,重复 3 次;24 h 保持通气,每隔 5 d 更换培养液。处理 10 d 后各处理间有了显著差异,收集叶片,清洗表面灰尘,并在液氮中迅速冷冻后置于 -80 ℃ 超低温冰箱中备用;并分析测定黄瓜株高、根长、SPAD 值和生物量<sup>[12-13]</sup>。

## 1.3 RNA-seq 高通量测序

采用 Illumina HiSeq™ 高通量测序平台在北京诺禾致源科技股份有限公司进行黄瓜叶片 RNA-seq 测序,原始序列过滤后得到 clean reads。选取 HISAT 软件将过滤后的测序序列进行基因组定位分析;经过组装、比较,新转录本预测;最后,采用 HTSeq 软件 union 模型对各样品进行基因表达水平分析,采用 DESeq 软件对构建的基因作差异分析,差异基因筛选的阈值设置为  $q$  值 < 0.005,然后筛选硒和镉处理黄瓜幼苗中差异表达的转录本。结合差异表达转录本的  $q$  值及在叶片中的基因表达丰度值,最终选取 *CsERF7* 作为本研究对象。

## 1.4 实时荧光定量 qPCR 验证

根据 GenBank 中  $\beta$ -actin 基因(登录号:XM\_011659465)和测序后转录本 *CsERF7* 的序列(登录

号:Csa7G432080),利用 Primer BLAST 在线设计特异性荧光定量 PCR 所用引物。引物序列分别为  $\beta$ -actin, F:5'-GAATCCAGCACGATACCA-3', R:5'-TCAACCCAAAGGCTAACA-3',预计扩增长度为 136 bp; *CsERF7*, F:5'-CCGAGCTACCTCGCATACAG-3', R:5'-TCCGAGGTCTAGCAGCTCTT-3',预计扩增长度为 228 bp。引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

总 RNA 的提取采用上述各处理的冷冻叶片,用液氮研磨后采用 Trizol 法提取,琼脂糖凝胶电泳结合超微量紫外可见分光光度计检测浓度、纯度及完整性。cDNA 的合成严格按照反转录试剂盒说明书执行。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,单管含有 12.5  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR green,各 0.2  $\mu$ L 上游和下游引物,11.1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 和 1  $\mu$ L cDNA 模板。荧光定量 PCR 在 CFX 实时荧光 PCR 检测系统(BioRAD)里进行,反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环 40 次。每个样品设置 3 次重复。cDNA 产物用 Actin 引物作参照用于定量 RT-PCR,对照(CK)的表达设为 1。

## 1.5 过表达载体 pEGOEP35S-H-ERF7-GFP 的构建

*CsERF7* 基因引物设计方法和合成公司同上,并在上下游两端分别加上保护碱基和 *EcoR* I、*Hind* III 限制性内切酶酶切位点(下划线处序列)。引物序列为 F:5'-ACTAGGGTCTCGCACC ATGGCT CGTCCACAACAACG-3', R:5'-ACTAGGGTCTCTGCC TGTAATAATTTCGAATGATCCGAGGT-3',预计扩增片段长度为 588 bp。

采用上述引物和 cDNA 模板进行目的片段扩增并回收,与改造后的载体 pEGOEP35S-H 连接,转化大肠杆菌、菌检、提取质粒测序,测序结果序列与目的片段序列比对一致,即为该过表达载体构建成功。

## 1.6 重组质粒转化农杆菌

取 100  $\mu$ L 冰冻的农杆菌感受态细胞 GV3101,加 5  $\mu$ L 上述质粒 DNA;迅速转入 37 ℃ 解冻;在 37 ℃ 温浴 5 min(无振荡);加入 1 mL LB 液体培养基,并转移至 10 mL 离心管中,28 ℃、260 r/min 振荡,预表达 2~4 h;取适当体积均匀涂布于含有抗生素的 LB 平板;28 ℃ 培养 2~4 d,即可观察到转化子。

挑取单菌落克隆到 5 mL LB 培养基中 28 ℃ 培养 24~40 h,作 PCR 验证,挑取阳性 PCR 的克隆 1 个,将此菌液取 100  $\mu$ L 加入 100  $\mu$ L 30% 甘油(提前

灭菌)。充分涡旋混匀,室温放置数小时,每 30 min 到 1 h 混匀 1 次。最后储藏于 -80 ℃ 待用。

1.7 农杆菌介导的拟南芥遗传转化

首先,将哥伦比亚野生型拟南芥播种之后用保鲜膜覆盖达到保温保湿的效果。待拟南芥长出 2 张真叶时移栽,移栽后的苗用保鲜膜保湿 3 ~4 d 即可揭去保鲜膜,1 个月左右莲座叶可以覆盖塑料杯,此时幼苗的浇水量要适中。当生长至第 1 次抽茎产生第 1 轮花蕾时,摘去该花蕾,在短日照的情况下让拟南芥营养生长,在侵染 1 周左右可将其置于长日照下,当其旁支的第 2 花蕾的枝条长 2 ~10 cm 时进行侵染。取出上述 -80 ℃ 保存的含有重组质粒的农杆菌室温解冻后侵染花序,第 1 次侵染前要去掉已长出的角果,第 1 次侵染之后隔 1 周侵染 1 次,侵染 2 ~3 次,侵染之后植株不能缺水;每次侵染后用塑料薄膜套袋 24 h,取掉薄膜后用去离子水洗去残余菌液,大约 3 周后等拟南芥角果泛黄干燥后收种子。

将 T0 种子用 75% 乙醇洗 30 s 左右,之后用无菌水清洗 2 次,再用 30% 次氯酸钠浸泡 10 min 左右,用无菌水洗 2 ~3 次,用无菌水浸泡 1 h 后,用 0.1% 的琼脂水溶液悬浮后,转移至含潮霉素的 MS 筛选培养基。待拟南芥长出 2 张真叶且长势较好时移栽,移栽后的苗用保鲜膜保湿 3 ~4 d 即可揭去保鲜膜,适量浇水,1 个月左右莲座叶可以覆盖塑料

杯。约 1 个月后,待拟南芥长到一定大小之后用 CTAB 法提取 DNA,进行 PCR 检测。

1.8 生物信息学分析

使用 BLAST 对黄瓜 *CsERF7* 基因编码氨基酸序列进行同源性比对;使用 Prot - Param 分析 *CsERF7* 基因基本理化性质;利用在线工具 NCBI - CDS 里的 SMART 软件预测蛋白保守结构域;利用在线软件 NetPhos 3.1 分析 ERF7 蛋白的潜在磷酸化位点;利用 PSORT II 预测 ERF7 蛋白的亚细胞定位;通过 SignalP 4.1 Server 在线工具进行信号肽预测分析,在线软件 TMHMM 2.0 预测跨膜螺旋区,SOPMA 预测二级结构,使用 SWISS - MODEL 进行三级结构预测,使用 ProtScale 分析蛋白质的亲疏水性。利用 MEGA 11 软件,采用 NJ 邻接法构建系统进化树;采用 BioAider V1.423 软件进行序列相似性分析。

2 结果与分析

2.1 RNA - seq 转录组测序结果

由表 1 可知,RNA - seq - *CsERF7* 在镉处理组和镉 + 硒复合处理组中的表达丰度非常高,其中镉处理表达丰度为对照的 2.104 倍,镉 + 硒处理表达丰度为单独镉处理的 5.600 倍,推测其可能在外源硒介导的黄瓜耐镉胁迫中扮演着重要的角色。因此,选择 *CsERF7* 作为后续研究对象。

表 1 RNA - seq - *CsERF7* 的高通量测序结果

登录号	基因注释	表达丰度倍数变化		Mapman 通路
		Cd/CK	Cd + Se/Cd	
Csa7G432080	乙烯应答转录因子 7	2.104	5.600	AP2/ERF 转录因子超家族

2.2 外源硒对镉胁迫下黄瓜幼苗生长的影响

黄瓜幼苗在 50 μmol/L Cd 处理 5 d 后受到了显著的抑制,主要表现为植株矮化,叶片发黄(图 1 - a);根长比对照显著下降 36.64%,地上部和根系干质量分别比对照下降了 31.32% 和 33.57%,其中根长受到的影响尤为严重。3 μmol/L 外源硒(Cd + Se 处理)显著缓解了 50 μmol/L Cd 引起的黄瓜幼苗毒害症状,SPAD 值较单一镉处理上升 9.61%,同时增加黄瓜生物量积累,对根长和根系干质量的缓解效果最为明显;在无镉条件下添加硒对黄瓜幼苗的生长没有显著效应(图 1 - b)。进一步表明,外源亚硒酸钠能显著缓解镉胁迫下黄瓜受到的毒害现象。

2.3 *CsERF7* qPCR 鉴定结果

为验证 RNA - seq 测序结果的准确性,对

*CsERF7* 进行 qPCR 鉴定。由图 2 - a 可知,镉处理 *CsERF7* 表达丰度是对照的 56%;而镉 + 硒复合处理与单独镉处理相比表达丰度显著升高,比单独镉处理上调表达 4.53 倍。此表达结果与 RNA - seq 测序结果完全相符。

2.4 黄瓜 *CsERF7* 基因扩增

提取黄瓜幼苗镉 + 硒处理的叶片总 RNA 反转录成 cDNA,PCR 扩增后电泳检测出约 588 bp 的条带,说明已成功扩增出黄瓜 *CsERF7* 基因编码区序列(图 2 - b)。

2.5 黄瓜过表达载体 pEGOEP35S - H - ERF7 - GFP 的构建

将上述目标基因片段转化感受态细胞 DH5α,提取质粒并使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对表达载体进行

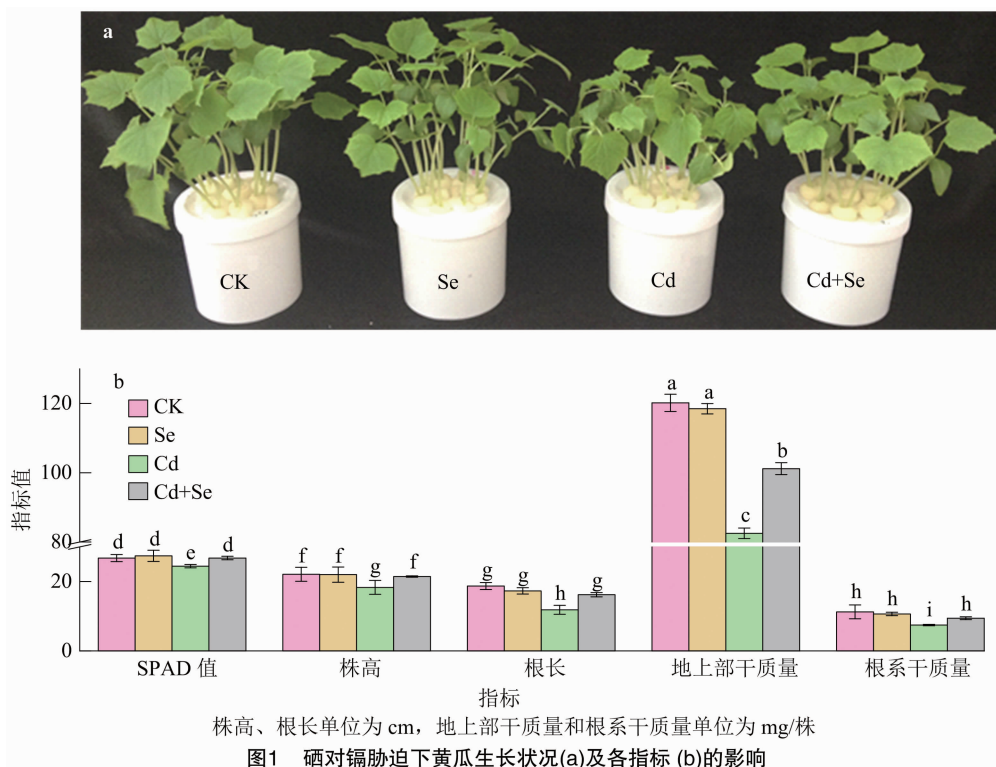
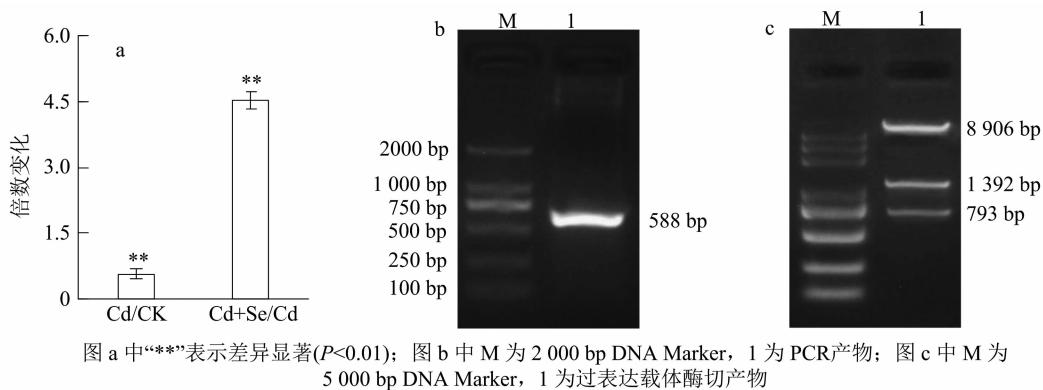


图1 硒对镉胁迫下黄瓜生长状况(a)及各指标 (b)的影响

图2 *CsERF7* 实时荧光定量PCR结果(a)、PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳(b)、pEGOEP35S-H- ERF7-GFP 双酶切鉴定(c)

双酶切鉴定(图2-c);电泳检测后观察到预期目的片段 793 bp 的条带。经测序比对,序列结果与已知的 *CsERF7* 基因序列完全匹配。

## 2.6 拟南芥遗传转化研究

利用冻融法将载体 pEGOEP35S-H-ERF7-GFP 转入农杆菌 GV3101,以花序浸染法进行拟南芥遗传转化,依次经过质粒农杆菌转化子,拟南芥培养、浸染、筛选培养、潮霉素抗性基因的 PCR 检测后获得  $T_1$  代拟南芥转基因种子(图3)。

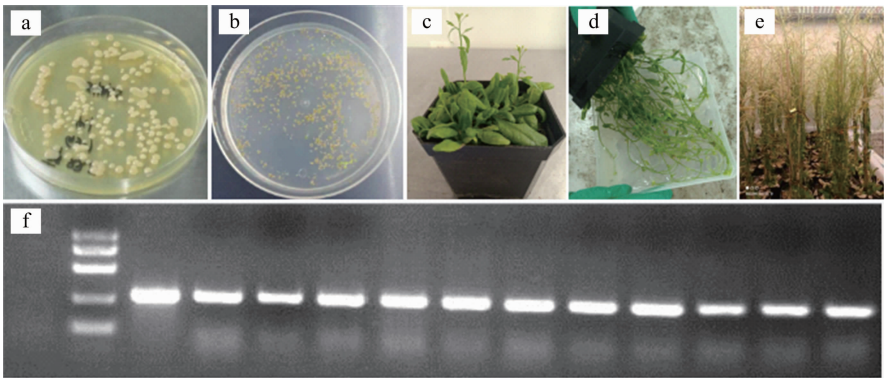
## 2.7 *CsERF7* 生物信息学分析

2.7.1 *CsERF7* 基因编码氨基酸序列分析 序列分析结果表明,*CsERF7* 基因可编码 196 个氨基酸(图4-a),相对分子量为 22 393.94 u;在线 ProtParam

软件预测 *CsERF7* 蛋白理论等电点为 6.35,原子总数为 3 080,分子式为  $C_{980}H_{1503}N_{287}O_{302}S_8$ ,相对分子量为 22 393.94 u,带负电荷残基总数(Asp + Glu)21 个,带正电荷残基总数(Arg + Lys)18 个,脂肪指数 67.81,总平均亲水性预测为 -0.753,属于亲水蛋白,不稳定指数为 53.24,属于不稳定蛋白。

2.7.2 黄瓜 ERF7 蛋白保守结构域预测与分析 对黄瓜 ERF7 蛋白保守结构域预测分析表明,该蛋白属于 AP2/ERF 家族、AP2 亚家族,在多肽链的 N 端第 7~70 位氨基酸之间存在 AP2 结构域,代表 DNA 结合结构域,无其他特征(图4-a)。

2.7.3 黄瓜 ERF7 蛋白质信号肽、跨膜结构预测分析 对黄瓜 ERF7 蛋白进行信号肽分析,发现该蛋



a—农杆菌转化子；b—T<sub>0</sub>种子筛选；c—拟南芥培养；d—浸染；e—拟南芥植株种子收获；f—潮霉素抗性基因 PCR 筛选

图3 拟南芥遗传转化

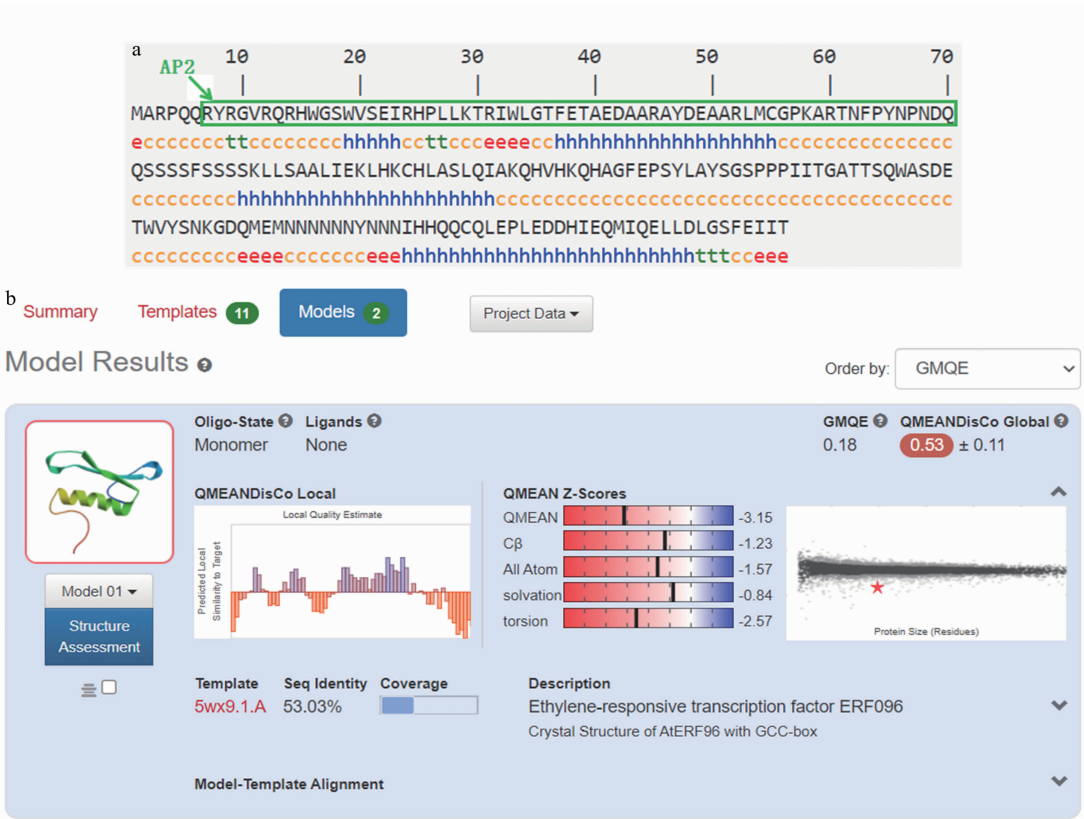


图 a 中绿色框里面的序列为 AP2 结构域，蓝色 h 为  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)，绿色 t 为  $\beta$ -折叠(beta turn)，黄色 c 为无规则卷曲(random coil)，红色 e 为延伸链(extended strand)

图4 CsERF7 氨基酸序列、保守结构域及二级结构(a)和三级结构(b)预测结果

白质无信号肽,属于非分泌型蛋白。利用软件 TMHMM 2.0 对黄瓜 ERF7 蛋白的跨膜螺旋区进行预测,结果未发现跨膜螺旋区,表明该蛋白属非跨膜蛋白。

2.7.4 黄瓜 ERF7 磷酸化位点、亚细胞定位分析  
在黄瓜转录因子 ERF7 蛋白中,共有 22 个磷酸化位点,其中 16 个丝氨酸(S)磷酸化位点、4 个酪氨酸(Y)磷酸化位点、2 个苏氨酸(T)磷酸化位点。黄瓜 ERF7 蛋白的亚细胞定位预测显示,黄瓜 ERF7 蛋白 65.2% 的概率分布在线粒体中,其次分布在细胞核

内,在细胞质和内质网中也有分布(表 2);推测黄瓜 ERF7 转录因子定位于线粒体中。

表 2 CsERF7 蛋白亚细胞定位

亚细胞定位	比例 (%)
线粒体	65.2
细胞核	21.7
细胞质	8.7
内质网	4.3

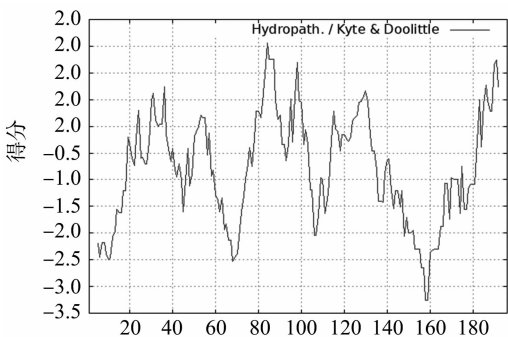
2.7.5 黄瓜 ERF7 空间结构与亲疏水性分析 黄瓜 ERF7 蛋白二级结构分析结果显示,此蛋白包括 103 个无规卷曲,占 52.55%;71 个  $\alpha$ -螺旋,占 36.22%;15 个延伸链,占 7.65%;7 个  $\beta$ -转角,占 3.57% (图 4-a、表 3)。

表 3 黄瓜转录因子 CsERF7 的二级结构预测分析结果

二级结构	氨基酸数目 (个)	占比 (%)
$\alpha$ -螺旋	71	36.22
延伸链	15	7.65
$\beta$ -转角	7	3.57
无规则卷曲	103	52.55
其他结构	0	0

采用 SWISS-MODEL 进行同源建模,在 11 个相关蛋白模板的基础上构建出的三级结构模型见图 4-b,其中螺旋部位代表  $\alpha$ -螺旋,其余部位代表延伸链,结果与二级结构高度一致。从图 4-b 可以看出,此模型的全球性模型质量估测结果 (GMQE 值) 为 0.18,序列相似性为 53.03%,模型结果可信。

采用 ProtScale 分析蛋白质亲疏水性,结果发现,CsERF7 蛋白质的疏水性最大值 1.556 在 84 位点,最小值 -3.256 在 158 和 159 位点,平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.788 (图 5)。根据 GRAVY 数值为负可推测黄瓜 ERF7 蛋白为亲水性蛋白,与理化性质分析结果一致。



图中分数的正、负分别代表疏、亲水性  
图5 CsERF7 蛋白亲/疏水性分析

2.7.6 CsERF7 基因同源性对比分析及系统发育树构建 将黄瓜 CsERF7 基因的编码区 (CDS) 序列同源性相近的 20 个物种 (表 4) 进行系统进化树构建,结果 (图 6) 显示,CsERF7 基因编码区序列与黄瓜 XP\_011659507.1 在系统进化关系上最亲密,其次是甜瓜 KAA0062846.1 和 XP\_008461170.1,在同一分支下的还有南瓜、西葫芦、冬瓜,说明它们之间的亲缘关系较近;其余的赤豆、木豆等亲缘关系较远。

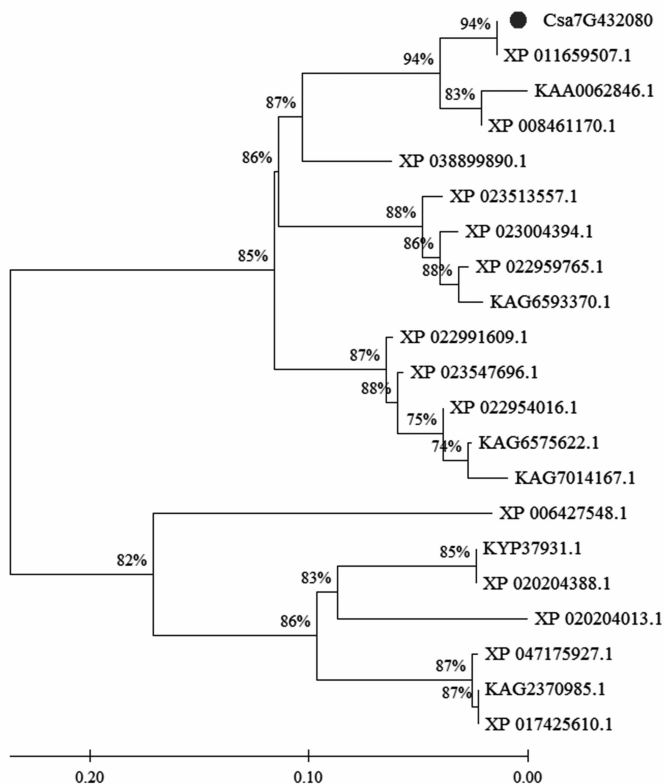
表 4 CsERF7 的 20 种同源基因序列信息

登录号	拉丁名	物种名
XP_011659507.1	<i>Cucumis sativus</i>	黄瓜
KAA0062846.1	<i>Cucumis melo</i> var. <i>makuwa</i>	甜瓜
XP_008461170.1	<i>Cucumis melo</i>	甜瓜
XP_038899890.1	<i>Benincasa hispida</i>	冬瓜
XP_022959765.1	<i>Cucurbita moschata</i>	南瓜
XP_023513557.1	<i>Cucurbita pepo</i> ssp. <i>pepo</i>	西葫芦
KAG6593370.1	<i>Cucurbita argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i>	南瓜
XP_023547696.1	<i>Cucurbita pepo</i> ssp. <i>pepo</i>	西葫芦
XP_023004394.1	<i>Cucurbita maxima</i>	南瓜
XP_022991609.1	<i>Cucurbita maxima</i>	南瓜
XP_022954016.1	<i>Cucurbita moschata</i>	南瓜
KAG6575622.1	<i>Cucurbita argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i>	南瓜
KAG7014167.1	<i>Cucurbita argyrosperma</i> ssp. <i>argyrosperma</i>	南瓜
KYP37931.1	<i>Cajanus cajan</i>	木豆
XP_020204388.1	<i>Cajanus cajan</i>	木豆
XP_006427548.1	<i>Citrus clementina</i>	柑橘
XP_047175927.1	<i>Vigna umbellata</i>	赤小豆
KAG2370985.1	<i>Vigna angularis</i>	赤豆
XP_017425610.1	<i>Vigna angularis</i>	赤豆
XP_020204013.1	<i>Cajanus cajan</i>	木豆

3 讨论与结论

本研究利用前期转录组试验数据库,通过克隆成功获得了 CsERF7 基因的开放阅读框 (ORF) 全长,序列分析结果表明,CsERF7 含有 1 个 AP2 保守结构域,ORF 全长 588 bp,编码 196 个氨基酸,属于 AP2/ERF 家族的 AP2 亚家族;黄瓜 ERF7 有 1 个丝氨酸 (S) 磷酸化位点,推测其在 ERF7 蛋白功能中发挥作用;该基因与黄瓜 XP\_011659507.1 亲缘关系最近,其次是甜瓜 KAA0062846.1 和 XP\_008461170.1。通过转基因技术,将 CsERF7 基因转入拟南芥中,获得了转基因植株。在外源硒对镉胁迫下黄瓜幼苗生长状态的研究中发现,外源硒显著缓解了黄瓜镉胁迫现象;预测黄瓜 CsERF7 可能与解毒、耐镉等生物学功能相关。

目前,有关 ERFs 在黄瓜上的研究有 AP2/ERF 家族转录因子调控黄瓜苦味基因 Bi 的表达<sup>[9]</sup>,也有 ERFs 参与调控黄瓜果实贮藏冷害机制<sup>[10]</sup>,调控黄瓜果实贮藏冷害及其与膜脂代谢关系的研究<sup>[14]</sup>;另外,蒙林平通过转录组学研究发现,ERFs 在油菜素内酯诱导黄瓜幼苗疫病的抗性方面发挥作用<sup>[15]</sup>,随后有报道称 ERFs 在外源油菜素内酯介导的黄瓜耐盐性方面起调控作用<sup>[16]</sup>,ERF VII 在调控黄瓜耐涝性

图6 *CsERF7* 基因系统发育树

的分子机制方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>,但 ERFs 在调控黄瓜耐镉性上鲜见报道。

本研究已完成了 *CsERF7* 基因序列和蛋白分析,*CsERF7* 基因属于 AP2/ERF 家族的 AP2 亚家族,ORF 长度 588 bp,编码 196 个氨基酸,有 1 个 AP2 结构域。该蛋白属于非跨膜亲水性蛋白,亚细胞定位预测定位于线粒体中,存在 22 个氨基酸磷酸化位点。其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和延伸链构成,二级结构与三级结构预测结果高度一致,同源基因进化树分析表明该基因与黄瓜 XP\_011659507.1 亲缘关系最近,其次是甜瓜 XP\_008461170.1,同时成功构建了植物超表达载体 pEGOEP35S-H-ERF7-GFP。本研究克隆得到了黄瓜 *CsERF7* 基因,成功构建过表达载体 pEGOEP35S-H-ERF7-GFP,利用农杆菌花序法转化拟南芥,经 PCR 检测,获得拟南芥转基因植株,该研究结果为该基因功能的深入研究提供了理论依据和基础。

#### 参考文献:

[1] Chang C Y, Yin R S, Zhang H, et al. Bioaccumulation and health risk assessment of heavy metals in the soil-rice system in a typical seleniferous area in central China[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2019, 38(7): 1577-1584.

[2] Clemens S, Aarts M G M, Thomine S, et al. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(2): 92-99.

[3] Gu C, Guo Z H, Hao P P, et al. Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm[J]. Botanical Studies, 2017, 58(1): 6.

[4] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 411-432.

[5] Aya K, Hobo T, Sato-Izawa K, et al. A novel AP2-type transcription factor, SMALL ORGAN SIZE1, controls organ size downstream of an auxin signaling pathway[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(5): 897-912.

[6] Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs[J]. New Phytologist, 2013, 199(3): 639-649.

[7] Hu L F, Liu S Q. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers[J]. Genetics and Molecular Biology, 2011, 34(4): 624-633.

[8] Wang C H, Xin M, Zhou X Y, et al. The novel ethylene-responsive factor *CsERF025* affects the development of fruit bending in cucumber[J]. Plant Molecular Biology, 2017, 95(4): 519-531.

[9] 张慧敏, 张雷, 马永硕, 等. 调控黄瓜苦味基因 *Bi* 的 AP2/ERF 家族转录因子[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 672-680.

[10] 王晓晨. ERFs 参与调控黄瓜果实贮藏冷害机制研究[D]. 广

郑玲,闫晓曼.甜瓜 GRAS 家族全基因组的鉴定与表达分析[J].江苏农业科学,2023,51(11):53-59.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.11.007

# 甜瓜 GRAS 家族全基因组的鉴定与表达分析

郑玲,闫晓曼

(洛阳师范学院生命科学院,河南洛阳 471934)

**摘要:**为了研究甜瓜(*Cucumis melo* L.) GRAS 基因家族的结构特征、进化模式和生长发育过程中的表达模式,对甜瓜 GRAS 全基因组的基本信息、染色体位置、共线性、系统发育树、基因结构、表达模式、顺式元件进行了全面分析。结果表明,从甜瓜中鉴定出 37 个 GRAS 基因;这些基因在甜瓜的 11 条染色体上呈不均匀分布,并在 6、7、8 号染色体上出现串联重复;甜瓜 GRAS 家族可分为 HAM、LS、SCR、SCL3、DELLA、LISCL、SHR、PAT1 8 个亚族;基因结构分析显示,含有 1~3 个内含子的基因有 8 个,没有内含子的基因有 29 个;启动子分析,鉴定到生长素、脱落酸、赤霉素、低温、干旱、光信号响应作用元件以及参与分生组织和胚乳表达的元件;表达模式分析结果表明,HAM、DELLA 亚族的基因几乎在所有组织中都有表达,LS 亚族在根和茎中表达含量较高,PAT1 亚族在甜瓜的整个生长发育过程中发挥着重要作用。得出结论,甜瓜全基因组共获得 GRAS 基因 37 个,共可分为 8 个亚族,不同的亚族具有不同的基因结构、蛋白质结构和表达模式;不同亚族在甜瓜生长发育的不同阶段具有差异性表达,它们共同参与调控甜瓜的发育过程。

**关键词:**甜瓜;GRAS 家族;生物信息学;表达模式

**中图分类号:**S652.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)11-0053-07

GRAS 转录因子可以调控基因的转录<sup>[1]</sup>,其名称来自 GAI、RGA、SCR<sup>[2]</sup>。GRAS 蛋白由 400~770 个氨基酸残基组成<sup>[3-4]</sup>,C 端区域可以分为 5 个基序:LHRI、LHRII、VHIID、PFYRE、SAW,其中 VHIID 是 GRAS 蛋白的核心结构,含有非常保守的 P-N-H-D-Q-L 单位,以 L-R-I-T-G 结尾<sup>[5]</sup>。富亮氨酸基序 LHRI、LHRII 分列于 VHIID 的两侧,PFYRE 基序由 3 对蛋白序列特征 P、FY、RE 组成,

R-E、W-G、W-W 这 3 个保守氨基酸组成 SAW 基序<sup>[6]</sup>。GRAS 转录因子的氨基末端序列差异较大,决定了 GRAS 蛋白在植物体中可以发挥不同的作用<sup>[7]</sup>。

近年来的研究表明,拟南芥有 34 个 GRAS 基因<sup>[8]</sup>,水稻有 57 个<sup>[9]</sup>、番茄有 53 个<sup>[10]</sup>、杨树有 106 个<sup>[11]</sup>、大白菜有 48 个<sup>[12]</sup>、葡萄有 43 个<sup>[13]</sup>、无油樟有 34 个<sup>[14]</sup>、苹果有 127 个<sup>[15]</sup>。GRAS 转录因子在信号转导、根径向伸长、腋生枝分生组织、植物的应激反应过程中发挥着关键作用<sup>[13,16]</sup>。

甜瓜(*Cucumis melo* L.)又称香瓜,在我国广泛种植,具有药用价值和食用价值。甜瓜基因组数据在 2012 年已公布,但对甜瓜 GRAS(CmGRAS)家族全基因组的研究还少之又少<sup>[17]</sup>。本研究对甜瓜 GRAS 转录因子家族在基本信息、染色体定位、共线

收稿日期:2022-08-22

基金项目:洛阳师范学院 2020 年度校级骨干教师培养计划;河南省 2021 年度省级精品在线开放课程“植物学”;2021 年度河南省省派科技特派员计划。

作者简介:郑玲(1981—),女,河南南阳人,硕士,副教授,主要从事植物学研究。E-mail:linda2266@qq.com。

州:华南农业大学,2016:47-48。

[11]潘健,温海帆,何欢乐,等.黄瓜 ERF 基因家族鉴定及其在雌花芽分化中的表达分析[J].中国农业科学,2020,53(1):133-147。

[12]Sun H Y, Dai H X, Wang X Y, et al. Physiological and proteomic analysis of selenium-mediated tolerance to Cd stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 133: 114-126。

[13]Sun H Y, Wang X Y, Wang Y N, et al. Alleviation of cadmium toxicity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings by the application

of selenium [J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2016, 14 (4): e1105。

[14]赵普莹. ERFs 调控黄瓜果实贮藏冷害及其与膜脂代谢关系研究 [D]. 广州:华南农业大学,2018:1-3。

[15]蒙林平. 油菜素内酯诱导黄瓜幼苗疫病抗性的转录组学研究 [D]. 广州:华南农业大学,2018:1-2。

[16]李巧丽. 外源油菜素内酯对黄瓜耐盐性的调控 [D]. 兰州:西北师范大学,2020:1-2。

[17]王凯旋. ERFⅦ调控黄瓜耐涝性的分子机制解析 [D]. 扬州:扬州大学,2021:64-66。