

丝瓜多聚泛素基因(*LcUBQ*)的克隆及表达分析

陈敏氩 王 彬 朱海生* 温庆放*

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 泛素是一种逆境响应蛋白, 所介导的泛素/26S蛋白酶体途径在植物适应逆境过程中发挥重要作用。为探究丝瓜(*Luffa cylindrica*)泛素基因的功能, 采用RT-PCR(reverse transcription-PCR)和RACE(rapid-amplification of cDNA ends)技术从丝瓜中克隆到多聚泛素基因(polyubiquitin gene), 命名为*LcUBQ*(GenBank登录号: KR349345), 该基因cDNA全长1 579 bp, 包含一个1 371 bp的完整开放阅读框, 编码457个氨基酸组成的蛋白质, 预测其分子量和等电点分别为51.26 kDa和7.05, 未发现信号肽和跨膜结构, WoLF PSORT预测其亚细胞定位于细胞质, 二级结构中 α -螺旋、延伸带和无规卷曲各占24.73%、22.54%和52.74%。进化树分析表明, 丝瓜*LcUBQ*蛋白质与黄瓜、甜瓜等葫芦科植物亲缘关系较近。荧光定量PCR分析发现, *LcUBQ*基因在丝瓜的不同组织皆有表达, 其中在根和叶中表达量最低, 高温(40 °C)、低温(4 °C)以及弱光[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]均能诱导叶片中*LcUBQ*基因的高表达, 尤其是低温胁迫。低温胁迫下, *LcUBQ*基因的表达量呈现先升高再下降的趋势, 与其对应的泛素水平的变化基本一致, 并且无论是低温或弱光处理, *LcUBQ*基因的表达量及对应的泛素水平均在前2 h增加得最为明显, 推测*LcUBQ*基因可能参与丝瓜的早期胁迫信号转导及低温、弱光胁迫应答过程。

关键词 丝瓜; 多聚泛素基因; 表达分析; 逆境胁迫

Cloning and Expression Analysis of Polyubiquitin Gene (*LcUBQ*) in *Luffa cylindrica*

Chen Mindong, Wang Bin, Zhu Haisheng*, Wen Qingfang*

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences; Vegetable Research Center;

Fujian Academy of Agricultural Sciences; Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

Abstract Ubiquitin is a stress responses protein which mediates ubiquitin/26S proteasome pathway and plays an important role in plant adaptation to various environmental stresses. To investigate the function of polyubiquitin gene in *Luffa cylindrica*, *LcUBQ* was isolated from luffa by using RACE (rapid-amplification of cDNA ends) and RT-PCR (reverse transcription-PCR) techniques (GenBank accession number was JN979372). It was 1 579 bp, which contained a 1 371 bp open reading frame (ORF) that encoded 457 amino acids, with a predicted molecular weight of 51.26 kDa and a hypothetical isoelectric point of 7.05. This protein

收稿日期: 2017-08-03 接受日期: 2017-10-17

福建省自然科学基金(批准号: 2017J01062)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队项目(批准号: STIT2017-1-2)、福建省农业科学院科技创新项目(批准号: PC2017-7)、福建省农业科学院作物所青年开放基金(批准号: 2015QN-1)、福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2017R1026-6)和福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

Received: August 3, 2017 Accepted: October 17, 2017

This work was supported by Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2017J01062), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), Fujian Academy of Agricultural Sciences Scientific and Technological Innovation Project (Grant No.PC2017-7), Crop Research Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences Youth Open Fund Project (Grant No.2015QN-1), Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2017R1026-6), and Fujian Academy of Agricultural Sciences “Youth Science and Technology Talents Program” Project

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

网络出版时间: 2018-01-08 17:23:21

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180108.1723.004.html>

lacked the signal peptides and membrane-spanning domains and the WoLF PSORT protection indicated that it was located in cytoplasm. The secondary and tertiary protein structures were predicted, which consisted of 24.73% α -helices, 22.54% extended strands, and 52.74% random coils. Phylogenetic analysis illustrated that *LcUBQ* had high similarity to the *UBQ* of *Cucurbitaceae* plants such as *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*. The results of fluorescence quantitative PCR analysis revealed that *LcUBQ* was expressed in roots, stems, leaves, flowers and fruits, and the lowest expression was found in roots and leaves. *LcUBQ* could be induced in leaves by high temperature (40 °C), low temperature (4 °C) and low light (20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) stresses, especially low temperature stress. Under low temperature stress, the expression of *LcUBQ* presented as an increased at first and then decreased trend, and the trend was consistent with the changes in the corresponding ubiquitin protein levels. Moreover, the levels of *LcUBQ* and ubiquitin protein were markedly elevated after stress for 2 h whether low temperature or low light. The results suggested that *LcUBQ* might be involved in early stress signal transduction and low temperature and low light stress response process in *Luffa cylindrica*.

Keywords *Luffa cylindrica*; polyubiquitin gene; expression analysis; stress

逆境胁迫下, 细胞内无功能及异常蛋白质大量累积, 及时处理这些蛋白质成为生物适应逆境的重要方式^[1]。泛素/26S蛋白酶体途径(ubiquitin/26S proteasome pathway, UPP)是目前已知的最重要的蛋白质降解途径^[2-3]。在此途径中, 泛素起着重要的枢纽作用, 异常蛋白质只有被泛素标记才能被识别, 进而降解^[4]。泛素基因属于多基因家族, 可分为C-端延伸泛素基因(C-terminal extension genes)和多聚泛素基因(polyubiquitin genes, *UBQ*), 其中, *UBQ*基因主要参与蛋白质的降解^[5]。对于*UBQ*基因的研究最早来自于酵母, Finley等^[6]研究表明, 酵母中的多聚泛素基因(*UBI4*)能够响应热胁迫。Watt等^[7]进而发现, *UBI4*基因在多种胁迫, 如酒精胁迫、 H_2O_2 及冷处理等过程中均能被诱导增强表达。因此, 泛素可能是生物体响应逆境机制中的重要组分, *UBQ*基因主要用于合成并提供泛素。近年来, 随着泛素研究的深入, 越来越多的文献报道*UBQ*基因能够参与植物对多种逆境的适应过程。例如, 在拟南芥^[8]、菜豆^[9]、橡胶树^[10]等植物中, 高温、干旱等胁迫均能诱导*UBQ*基因上调表达。Li等^[11]在木榄中过量表达多聚泛素基因*BgUBQ10*, 发现转基因植株的耐盐性明显高于野生型, 而反义表达*BgUBQ10*基因因其耐盐性受到抑制。Guo等^[12]研究还表明, 在烟草中转入*UBQ*基因不仅能增强植株的抗旱性, 而且还能提高植株对多种逆境胁迫的综合抗性, 因此, 改善泛素系统可以提高植物对逆境胁迫的适应性。此外, 表达*UBQ*基因还能影响植物抗逆性的生理生化机制, 包括保护PSII光系统和生物膜的完整性、减轻

膜蛋白的损伤以及增强抗氧化酶类的活性。由此可见, 研究*UBQ*基因对进一步探索植物对逆境的应答机制具有重要意义。

丝瓜(*Luffa cylindrica*)原产自印度, 喜高温、潮湿气候。在丝瓜的早春栽培中, 低温、弱光成为制约其生长的关键因素, 因此, 进行丝瓜低温、弱光胁迫方面的研究尤为关键。目前对于这方面的报道多见于生理、生化水平^[13-14]。研究发现, 低温、弱光胁迫会造成丝瓜幼苗叶绿素降解、膜透性增强、脂质过氧化等伤害, 但与此同时, 幼苗中的脯氨酸和可溶性蛋白质含量显著升高^[15-16], 由此可见, 丝瓜自身可能存在应对逆境的调控机制。迄今为止, 国内外对于丝瓜抗逆境机制研究得较少, 其中与泛素相关的部分尚未见报道。本研究以丝瓜为材料, 克隆*UBQ*基因, 分析序列特征, 并初步探讨丝瓜*UBQ*基因在不同组织以及温度、光胁迫下的表达特性, 为研究丝瓜*UBQ*基因的功能、揭示其与植株抗逆性的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

实验于2016~2017年在福建省农科院作物所实验室进行。供试丝瓜为自主选育并通过福建省认定的杂交新品种‘福研1号’。

选择饱满的种子, 用湿布包裹后放入30 °C的恒温箱中催芽, 待80%左右种子发芽后, 播种于营养钵(规格为10 cm×10 cm), 常规水肥管理。待丝瓜幼苗长出6~7片真叶, 选择健壮且长势相同的幼苗, 将其

分为5组, 每组3株, 置于人工恒温气候箱中进行以下不同形式的胁迫处理。分别为: (1)温度处理; 依次设为4 °C、15 °C、25 °C(对照)、35 °C、40 °C, 处理2 h; (2)光强处理; 依次设为弱光[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, low light, LL]、中光[100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, moderate light, ML]、强光[500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, high light, HL], 处理2 h; (3)低温处理; 4 °C分别处理0、1、2、5、10、24 h; (4)弱光处理; 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 分别处理0、1、2、5、10、24 h。取胁迫处理后的叶片作为材料, 同时选取正常生长的丝瓜在同一时期的各组织器官(根、茎、叶、花和果实), 以上样品均做3次独立重复, 样品全部置于液氮速冻并于-70 °C保存, 用于后续的荧光定量分析和泛素水平测定。

1.2 丝瓜总RNA的提取和cDNA的克隆

采用通用植物RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取丝瓜果实总RNA。利用逆转录试剂盒PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit [宝生物工程(大连)有限公司]合成cDNA第一链。逆转录引物AP为: 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T)17-3'。搜索比较GenBank其他*UBQ*基因序列, 设计一对简并引物克隆丝瓜*UBQ*基因保守区, 上游为: 5'-ATG CA(A/G) AT(C/T/A) TT(C/T) GTI AA-3'; 下游为: 5'-(A/G)C CAC CIC G(C/G/A)A GIC-3'。PCR扩增体系为: 模板cDNA 1 μL (80 ng), 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 正反引物各1 μL , 0.15 mmol/L dNTP 0.5 μL , 1 U Taq DNA聚合酶0.2 μL , 1.5 mmol/L 10 \times PCR Buffer缓冲液2.5 μL , 加入灭菌的超纯水至25 μL 。扩增程序为: 94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。依据保守区序列设计3'端引物, 引物序列为: 5'-CTT GTG TTG CGT CTT CGT GG-3', 与通用引物AUAP(5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3')配对, 扩增3'端序列。扩增体系同上, 扩增程序为: 94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。设计5'端序列的特异引物Nest1为: 5'-CCT GAG ACG AAG CAC CAA GT-3'; Nest2为: 5'-CGT TGT CAA TGG TGT CCG AA-3'。以Nest1为引物合成cDNA第一链, 同聚物加尾并作为模板, 以Nest2和AUAP为引物, 扩增5'端序列。扩增体系同上, 扩增程序为: 94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。拼接保守序列、3'端序列和5'端序列获得基因cDNA全长并

验证, 全长引物上游为: 5'-GTA ATC GTC AAT TGT GCT TCG AA-3', 下游为: 5'-TCG GGA GAA ATC AAT TTT ATT TGA-3'。PCR产物利用1%的琼脂糖电泳进行检测, 经过胶回收试剂盒Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0[宝生物工程(大连)有限公司]回收纯化并连接pMD18-T载体, 转化大肠杆菌DH5 α , PCR检测后送测序。

1.3 丝瓜*UBQ*基因的生物信息学分析

用NCBI的ORF Finder软件寻找基因的开放阅读框。用BlastP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行氨基酸同源性搜索。应用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析氨基酸基本理化特性。用DNAMAN软件进行序列比对。用MEGA6.0软件构建进化树。用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质跨膜区结构和信号肽。用KinasePhos(<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>)和NetPhos 2.0服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测磷酸激酶位点。蛋白质的二级与三级结构采用CFSS(<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>)和SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)进行预测。WoLF PSORT在线软件进行亚细胞定位预测(<https://psort.hgc.jp/>)。

1.4 丝瓜*UBQ*基因的荧光定量PCR分析

设计丝瓜*UBQ*基因荧光定量引物, 上游为: 5'-TTT TAG ATG GTG GTG GGT GT-3', 下游为: 5'-TCG GGA GAA ATC AAT TTT AT-3'。以丝瓜18S rRNA为内参基因, 上游引物为: 5'-GTG TTC TTC GGA ATG ACT GG-3', 下游为: 5'-ATC GTT TAC GGC ATG GAC TA-3'。利用ABI7500实时定量PCR仪(Applied Biosystems, 美国), 按照荧光定量PCR试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™[宝生物工程(大连)有限公司]进行PCR扩增, 反应体系为: 2 \times SYBR® Premix Ex Taq 10 μL , 100 ng cDNA模板2 μL , 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 正、反引物0.4 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , 补超纯水至20 μL 。反应程序为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火34 s, 40个循环。反应结束后, 采用ABI7500分析软件分析实验结果, 每个样品做3个重复。

1.5 泛素水平的测定

选取1.1中(3)低温处理和(4)弱光处理后的样品进行泛素水平的测定。准确称取0.5 g样品, 加入1 mL PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2), 研磨成浆, 12 000 r/min

离心10 min, 取上清, 按照植物泛素(Ub)ELISA试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)的操作步骤, 利用多功能酶标仪SpectraMax® Paradigm®(Molecular Devices, 美国)在450 nm下测定泛素的浓度, 每个样品重复3次。

1.6 数据处理

采用SPSS 17.0软件进行数据的统计分析。数据以平均值形式表示, 进行单因素方差分析和差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

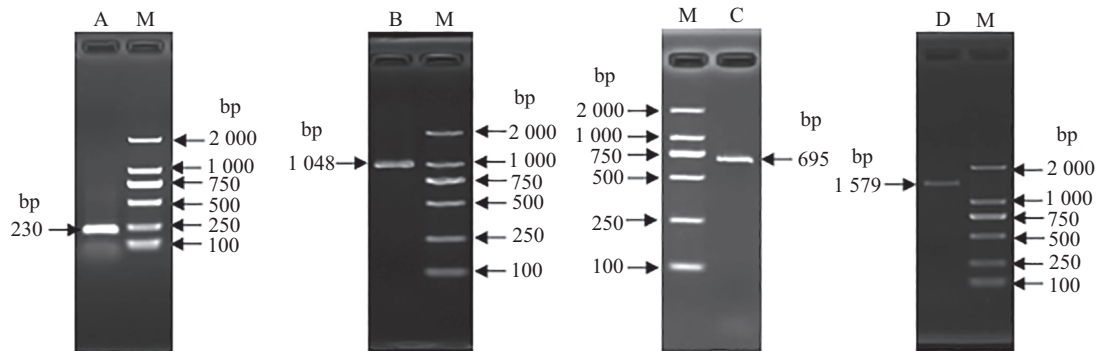
2 结果

2.1 丝瓜UBQ基因全长cDNA序列的克隆

丝瓜UBQ基因保守区序列230 bp(图1A), 5'端序列1 048 bp, 3'端序列695 bp(图1B和图1C), 拼接出全长cDNA序列1 579 bp(图1D)。经BLAST比对发现, 该基因与黄瓜、水稻、甜瓜UBQ基因的同源性分别为91%、86%、85%, 证实获得丝瓜UBQ基因, 命名为LcUBQ, GenBank登录号为KR349345。

2.2 LcUBQ基因序列分析

LcUBQ基因cDNA序列全长1 579 bp, 开放阅读框为1 371 bp, 编码457个氨基酸组成的蛋白质, 5'端非编码区和3'端非编码区分别为44 bp和164 bp, 预测相对分子量和等电点分别为51.26 kDa和7.05, 亲水性-0.430, 为疏水蛋白质。采用TMHMM和SMART软件均未发现LcUBQ具有信号肽和跨膜结构, NetPhos 3.1 Server预测含有丝氨酸磷酸化位点14个[unsp(19/95/250/323)、CKII(20/96/171/248/324/399)、PKA(65/141/293/445)], 苏氨酸磷酸化位点18个[PKC(7/9/83/85/159/161/235/237/311/313/387/389)、unsp(22/98/326/402/326/402)], 酪氨酸磷酸化位点5个[EGFR(59/135/211/287/439)]。对LcUBQ的二级结构进行分析可知, α -螺旋占24.73%、延伸链占22.54%、无规卷曲占52.74%, 表明无规卷曲属于该蛋白质的主要二级结构。三级结构如图2所示。采用WoLF PSORT预测表明, 其亚细胞定位于细胞质上。氨基酸序列保守结构



M: DL2000 DNA marker; A: LcUBQ保守区产物; B: 5' RACE产物; C: 3' RACE产物; D: LcUBQ全长产物。

M: DL2000 DNA marker; A: conserved region product of LcUBQ; B: 5' RACE product; C: 3' RACE product; D: the full length product of LcUBQ.

图1 丝瓜LcUBQ基因的PCR扩增

Fig.1 PCR amplification of LcUBQ gene in *Luffa cylindrica*

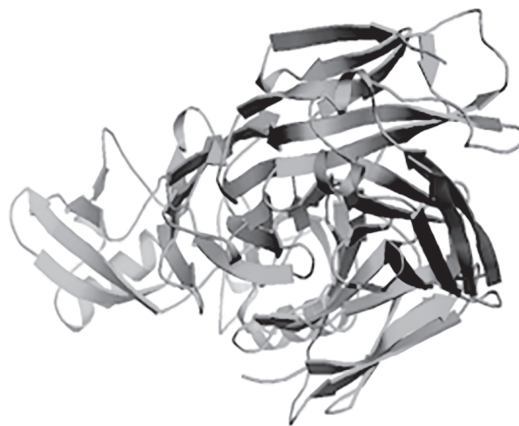


图2 推定的LcUBQ蛋白质的三级结构

Fig.2 Putative tertiary structure of LcUBQ protein

域预测发现, 该蛋白含有6个UBQ superfamily结构域(即泛素单体), 每个单体长度为76个氨基酸, 并且都包括Ubq-E2、Ubq-UCH、Ubq-CUE作用位点(图3)。用Clustalw软件对6个泛素单体的碱基及氨基酸序列进

行分析发现, 每个泛素单体都含有7个Lys功能位点, 分别为Lys-6、Lys-11、Lys-27、Lys-29、Lys-33、Lys-48和Lys-63, 以及1个Gly-76位点。6个泛素单体对应碱基不完全一致的地方有79处, 氨基酸序列有3处不同(图4)。

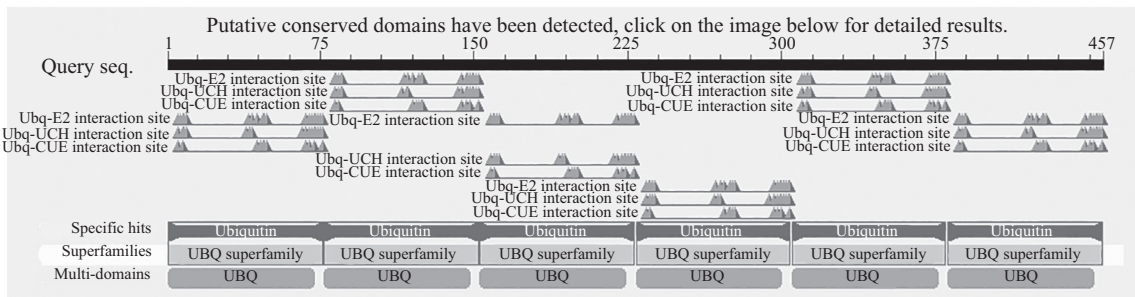


图3 LcUBQ保守结构域

Fig.3 Conserved domain of LcUBQ protein

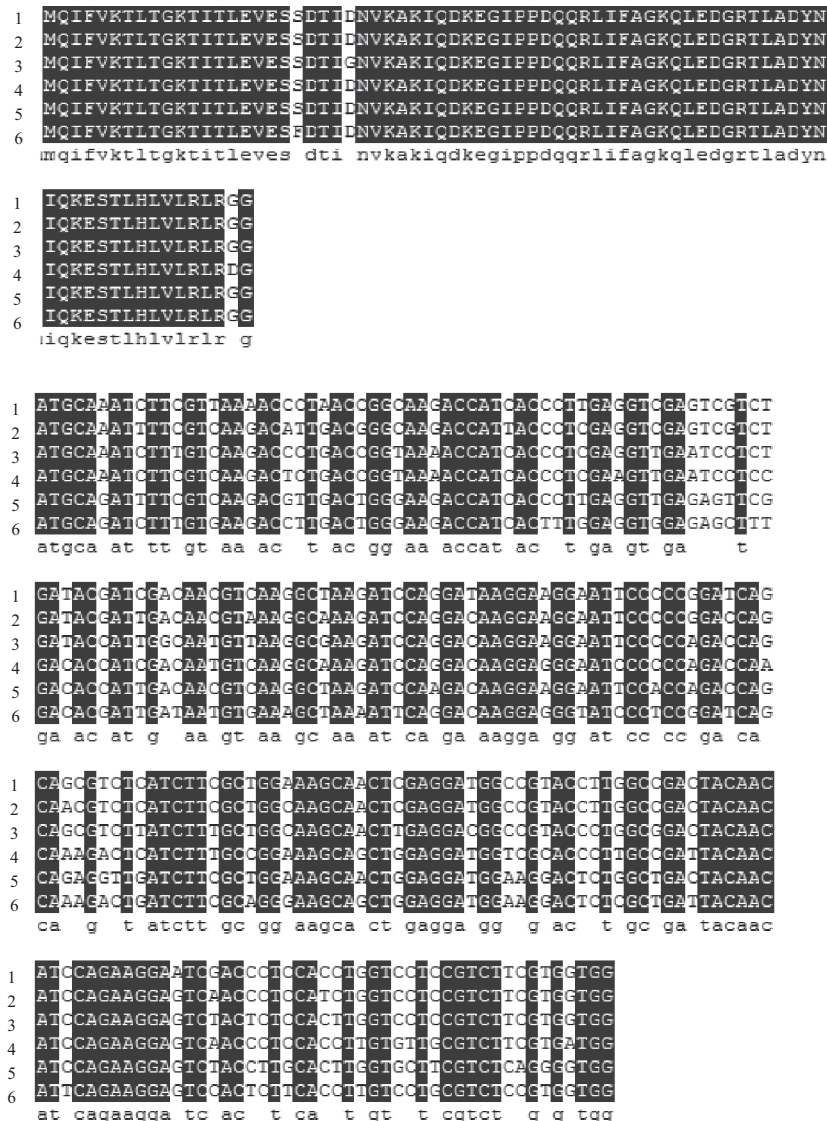


图4 6个泛素单体的氨基酸和碱基序列比对

Fig.4 Comparison of base sequences of 6 UBQ superfamily domains

2.3 同源性及进化树分析

在NCBI中对*LcUBQ*基因编码的氨基酸序列进行BLAST分析,结果表明,丝瓜*LcUBQ*基因与黄瓜、甜瓜、水稻、桃和梅等植物的同源性均在85%以上,其中与黄瓜泛素一致性高达91%。

选用13个UBQ蛋白质序列作系统进化树,进一步研究其进化关系(图5)。这些UBQ可分为两大类,黄瓜、丝瓜、甜瓜、巨尾桉和水稻的UBQ在进化树中聚为一类,大豆、烟草、马铃薯、番茄、桃、梅和苹果的UBQ在进化树中聚为另一类。同科属作物UBQ亲缘关系较近,如丝瓜UBQ与同属于葫芦科的黄瓜和甜瓜归为一类,蔷薇科的梅、桃和苹果,茄科

的马铃薯、番茄和烟草也各自聚为一类。

2.4 丝瓜*LcUBQ*基因在不同组织中的表达

利用荧光定量PCR技术分析*LcUBQ*基因在丝瓜不同组织中的表达,结果表明,在丝瓜根、茎、叶、花和果实中均有*LcUBQ*基因的表达,但表达量差异显著($P<0.05$),依次为果实>花>茎>叶>根。*LcUBQ*基因在根和叶中表达量最低,茎和花中略有增加,果实中表达量最高,达到根和叶的7.6倍和4.8倍(图6)。

2.5 不同温度对丝瓜*LcUBQ*基因的表达影响

我们通过荧光定量PCR研究了丝瓜幼苗*LcUBQ*基因在不同温度下的表达。结果显示,丝瓜*LcUBQ*基因在4℃、15℃、25℃、35℃、40℃这5种处理

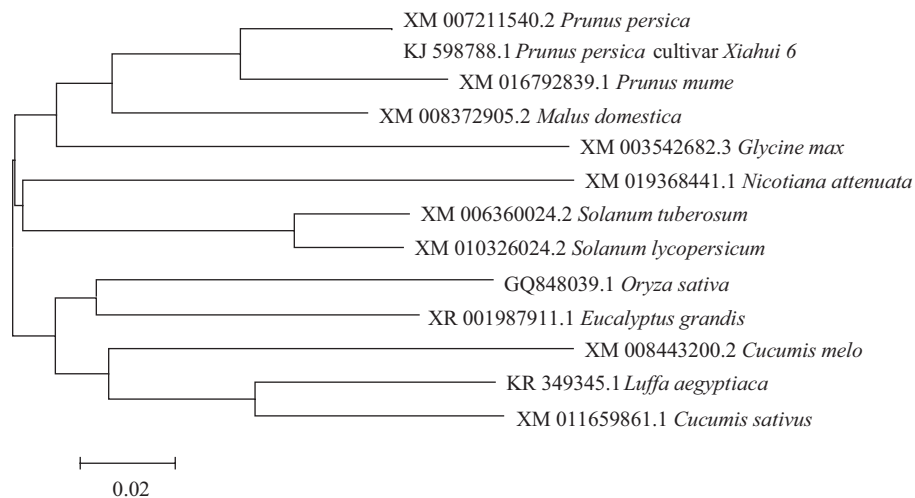
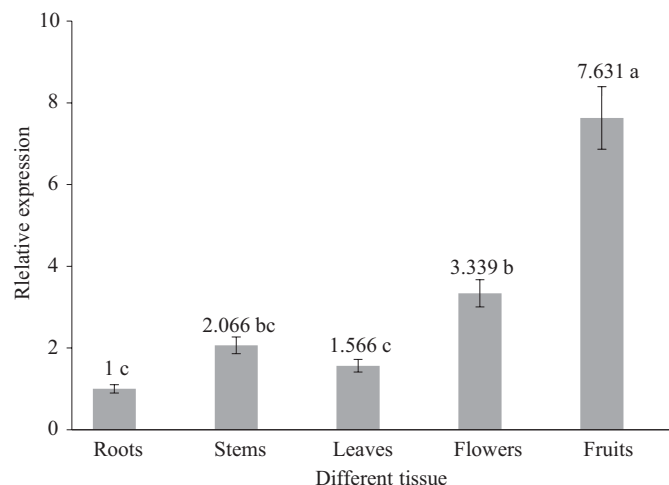


图5 UBQ蛋白质的进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of UBQ proteins



不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$),下同。

The different small letters indicate significant differences at the 0.05 level, the same below.

图6 *LcUBQ*基因在丝瓜不同组织中的表达

Fig.6 Expressions of *LcUBQ* gene in different issues of *Luffa cylindrica*

下均有表达, 但表达量有明显差异($P < 0.05$)。 *LcUBQ* 基因在对照25 °C条件下表达量最低, 升高或降低处理温度都能诱导*LcUBQ*基因表达升高, 其中在4 °C条件下其表达量最高(图7)。

实验分析了*LcUBQ*基因和泛素蛋白水平在4 °C低温胁迫下的表达动态, 结果如图8、9所示, *LcUBQ* 基因的表达量在低温处理过程中呈现先升高再下降

的趋势($P < 0.05$)。4 °C冷处理最初2 h内, *LcUBQ* 基因的表达量显著升高, 处理5 h达到最大值, 随后立即下调表达, 至24 h降到最低。低温诱导泛素蛋白水平先增加再减少, 在胁迫前2 h泛素水平出现明显上调, 随后开始下降, 至24 h降到最低。

2.6 不同光照强度对丝瓜*LcUBQ*基因的表达影响
实验设置3个光强处理, 即弱光[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$],

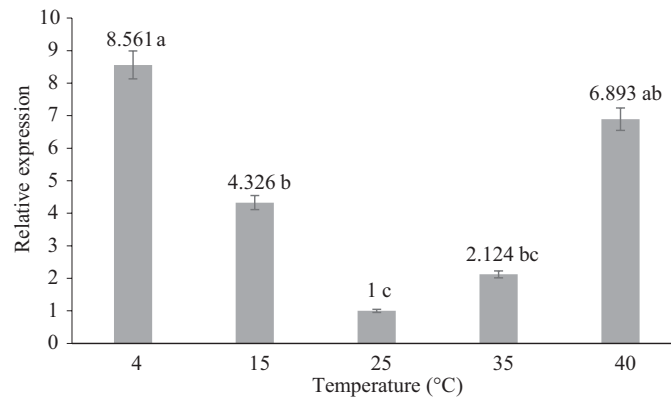


图7 *LcUBQ*基因在不同温度条件下的表达

Fig.7 Expressions of *LcUBQ* gene in different temperature conditions

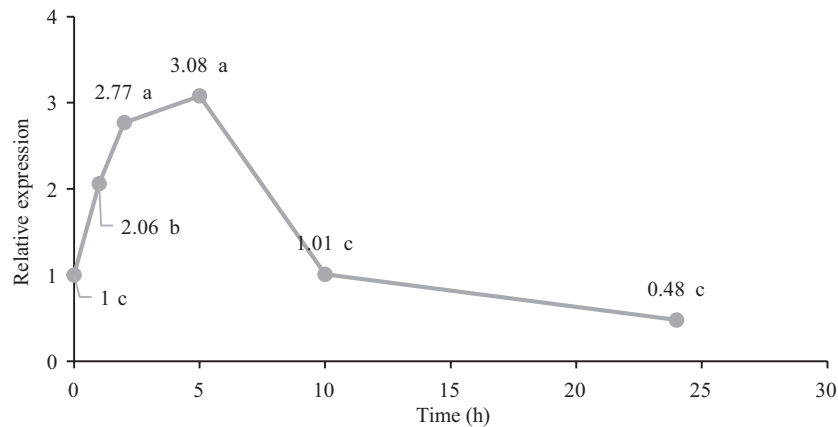


图8 *LcUBQ*基因在4 °C条件下表达量的变化

Fig.8 Change of *LcUBQ* gene expression in 4 °C

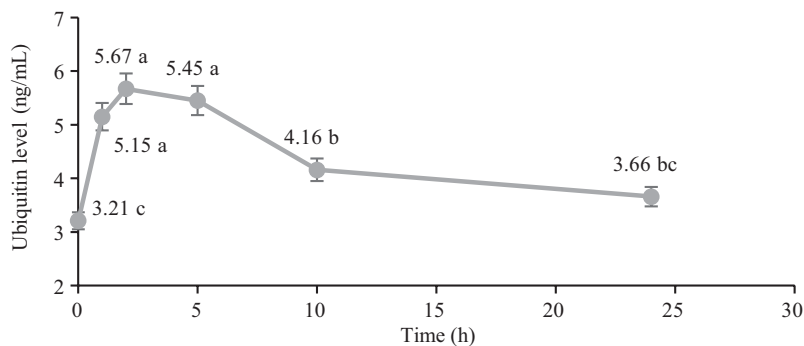


图9 泛素水平在4 °C条件下表达量的变化

Fig.9 Change of ubiquitin level in 4 °C

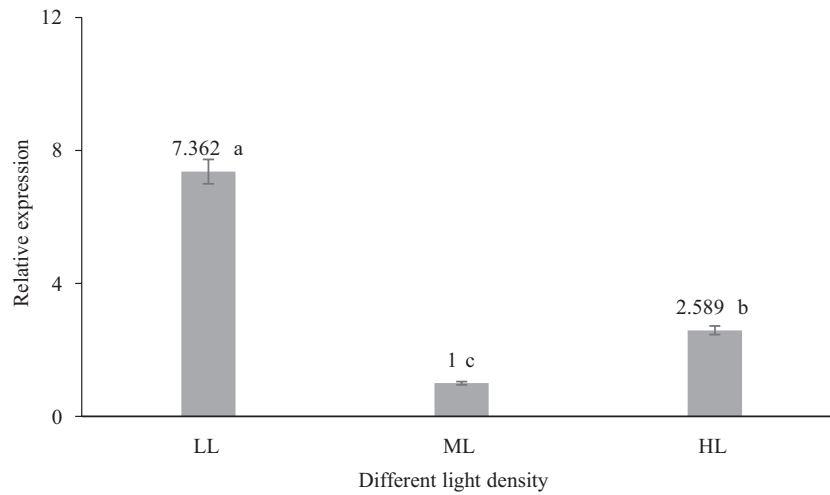
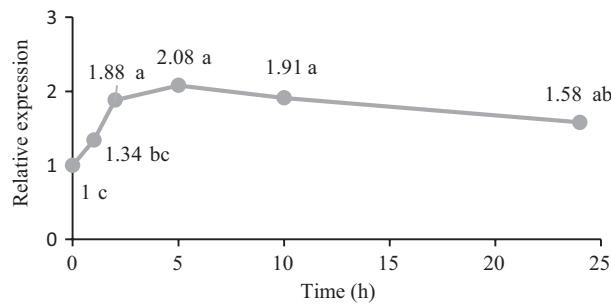
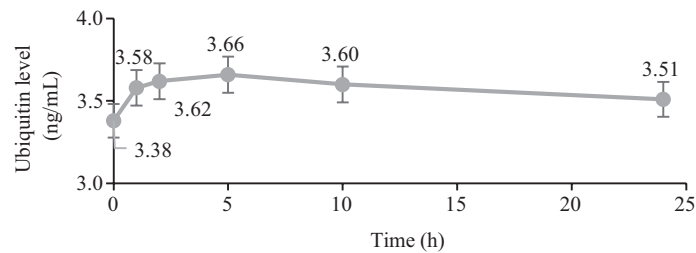
图10 *LcUBQ*基因在不同光照条件下的表达Fig.10 Expression of *LcUBQ* gene in different light conditions图11 *LcUBQ*基因在弱光条件下表达量的变化Fig.11 Change of *LcUBQ* gene expression in low light conditions

图12 泛素水平在弱光条件下表达量的变化

Fig.12 Change of ubiquitin level in low light conditions

中光[100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]、强光[500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]，研究丝瓜 *LcUBQ* 基因在不同光强下的表达。结果显示，丝瓜 *LcUBQ* 基因在不同光强下呈现差异表达 ($P < 0.05$)。中光条件下 *LcUBQ* 基因表达量最低，强光和弱光均能明显诱导 *LcUBQ* 基因上调表达，其中，弱光条件下表达量最高，约为中光的7.4倍(图10)。

实验分析了 *LcUBQ* 基因和泛素水平在弱光胁迫下的表达动态，结果如图11、12所示，*LcUBQ* 基因在弱光胁迫下呈现上调表达。处理最初2 h内，*LcUBQ* 基因的表达量升高较为明显 ($P < 0.05$)，到5 h达到最大

值，随后出现些许下降。弱光胁迫也能诱导泛素蛋白水平的升高，然而上升幅度并不明显。

3 讨论

本研究从丝瓜中克隆得到多聚泛素基因 *LcUBQ*。该基因cDNA全长1 579 bp，包含一个1 371 bp的完整开放阅读框，编码457个氨基酸组成的蛋白质。结构域分析可知，*LcUBQ* 含有6个泛素单体，长度均为76个氨基酸，并且每个泛素单体都包含Ubq-E2、Ubq-UCH、Ubq-CUE作用位点以及1个Gly-76功能位点和

7个Lys功能位点, 与其他物种中报道的泛素单体特征一致^[17-18], 说明丝瓜*LcUBQ*基因是个典型的六聚泛素。每个泛素单体上的7个Lys位点(Lys-6、Lys-11、Lys-27、Lys-29、Lys-33、Lys-48和Lys-63)均能进行泛素链的连接, 且不同位点上连接的泛素链具有不同功能^[19], 推测通过泛素Lys-48连接的多聚泛素化修饰主要介导丝瓜的特定蛋白通过泛素蛋白酶体途径降解^[20-21], 而其他Lys位点连接的泛素化不参与蛋白质的降解, 为非典型泛素化修饰, 其中连接Lys-63位点可能参与DNA损伤修复、蛋白质间的互作及蛋白酶的活化等过程^[22-23]。此外, 丝瓜泛素的Gly-76位点可能连接泛素结合酶、活化酶以及靶蛋白的活性位点, 使靶蛋白与泛素结合^[24]。将丝瓜6个单体泛素的碱基及氨基酸序列进行比对发现, 碱基的相似性为88.45%, 有79处不完全一致, 相比之下, 编码的氨基酸只有3处不同, 相似性高达98.1%, 并且差异的碱基大多数是编码氨基酸的第3位密码子, 这一现象与在桑树^[17]、擎天凤梨^[18]上所报道的类似。可见, 泛素基因在进化过程中核苷酸的变异程度远高于氨基酸, 但由于存在简并密码子使得变异的碱基编码成原来的氨基酸。

泛素是一种重要的逆境应答蛋白, 受干旱^[25]、盐渍^[26]、热激^[27]等多种非生物胁迫诱导。本实验分析了丝瓜*LcUBQ*基因在温、光胁迫下的表达情况, 结果表明, 高温(40 °C)、低温(4 °C)以及弱光[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]均能诱导*LcUBQ*基因的高表达, 其中4 °C条件下*LcUBQ*基因的表达量最高, 约为对照的8.5倍, 推测丝瓜泛素基因*LcUBQ*可能参与温、光胁迫响应过程, 尤其是低温胁迫。Von等^[28]报道, 衣藻在4 °C条件下, *UBQ*基因表达量增加7倍。Gindin等^[29]认为, 低温诱导*UBQ*基因高表达是为了补充泛素水平。本实验进一步研究了*LcUBQ*基因以及泛素水平在低温胁迫下的表达动态, 结果发现, 低温胁迫下*LcUBQ*基因的表达量呈现先升高再下降的趋势, 与其对应的泛素水平的变化基本一致, 表明低温胁迫下丝瓜*LcUBQ*基因可能参与调控泛素的累积。植物体内的泛素可通过介导泛肽途径将低温造成的变构蛋白降解, 从而抵御低温伤害^[30]。冯雅楠等^[31]发现, 过量表达泛素基因*Ta-Ub2*可以提高转基因烟草的泛素库水平, 加快泛素/26S蛋白酶体的周转速度, 从而增强植株的低温耐性。康菡菡等^[32]将*Ta-Ub2*基因转化短柄草, 结果表明, 过量表达*Ta-Ub2*不仅提高转基因短柄

草的低温胁迫耐性, 同时也提高了其盐胁迫和干旱胁迫耐性。因此, 在本研究中丝瓜*LcUBQ*基因在低温胁迫前5 h表达水平明显提高可能是应答低温胁迫的过程, 而之后出现表达量的下降, 可能与泛素合成代谢受到冷害胁迫、植物自身发生了负反馈调节有关。除此之外, 本研究还发现, 无论是低温还是弱光处理, *LcUBQ*基因的表达量和对应的泛素水平均在前2 h内增加得最为明显, 推测丝瓜泛素可能属于早期响应胁迫蛋白, 若利用*LcUBQ*基因表达上调标记逆境胁迫下的异常蛋白质将有利于其快速降解, 对于提高植物的抗逆性具有重要意义。

本研究克隆了丝瓜多聚泛素基因*LcUBQ*, 并初步探讨其在不同组织、温度及光胁迫下的表达特性。研究表明, *LcUBQ*为典型的六聚泛素, 在丝瓜不同组织(根、茎、叶、花和果实)中均有表达, 其中根和叶片中表达量最低。高温(40 °C)、低温(4 °C)以及弱光[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]均能诱导*LcUBQ*基因在叶片中的高表达, 尤其是低温胁迫。低温胁迫下, *LcUBQ*基因的表达量呈现先升高再下降的趋势, 与其对应的泛素水平的变化基本一致, 并且无论是低温还是弱光处理, *LcUBQ*基因的表达量及对应的泛素水平均在前2 h增加得最为明显。我们推测, *LcUBQ*基因可能参与丝瓜的早期胁迫信号转导及低温、弱光胁迫应答过程。

参考文献 (References)

- 1 Stone SL, Callis J. Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10(6): 624-32.
- 2 陈默, 于丽杰, 金晓霞, 朱宏, 付畅. 植物泛素/26S蛋白酶体途径的研究进展. *中国生物工程杂志*(Chen Mo, Yu Lijie, Jin Xiaoxia, Zhu Hong, Fu Chang. *Advances in ubiquitin /26S proteasome pathway in plants. China Biotechnology*) 2014; 34(4): 118-26.
- 3 黄海杰, 陈雄庭. 植物泛素/26S蛋白酶体途径研究进展. *中国生物工程杂志*(Huang Haijie, Chen Xiongtong. *Advances in ubiquitin/26S proteasome pathway in plants. China Biotechnology*) 2008; 28(7): 127-32.
- 4 吴慧娟, 张志刚. 泛素-蛋白酶体途径及意义. *国际病理科学与临床杂志*(Wu Huijuan, Zhang Zhigang. *Ubiquitin-proteasome pathway and its significance. International Journal of Pathology and Clinical Medicine*) 2006; 26(1): 7-10.
- 5 Wang HM, Zhu CH. Ubiquitin proteasome pathway in reproductive tissues. *Prog Biochem Biophys* 2002; 29(1): 31-4.
- 6 Finley D, Ozkaynak E, Varshavavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell* 1987; 6(48): 1035-46.
- 7 Watt R, Piper PW. *UBI4*, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces*

- cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control. *Mol Gen Genet* 1997; 253(4): 439-47.
- 8 Burke TJ, Callis J, Vierstra RD. Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 1988; 213(2/3): 435-43.
- 9 张玉秀, 张延红, 高华, 柴团耀. 菜豆泛素基因在生物和非生物胁迫下的表达. *西北植物学报*(Zhang Yuxiu, Zhang Yanhong, Gao Hua, Cai Tuanyao. Gene expression analysis of ubiquitin from bean under biotic and abiotic stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2002; 22(3): 505-10.
- 10 彭世清, 陈守才. 巴西橡胶树多聚泛素在蛋白基因的表达分析. *热带作物学报*(Peng Shiqing, Chen Shoucai. Expression analysis of polyubiquitin protein genes in Brazil rubber tree. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2002; 23(3): 32-5.
- 11 李谊, 胡文军, 叶波平. 木槿多聚泛素基因*BgUBQ10*转化拟南芥及转基因植株耐盐功能分析. *药物生物技术*(Li Yi, Hu Wenjun, Ye Boping. Transformation of *bruguiera* *gymnorhiza* polyubiquitin gene *BgUBQ10* into *Arabidopsis* and functional analysis of salt tolerance in transgenic plants. *Pharmaceutical Biotechnology*) 2013; 20(2): 100-5.
- 12 Guo QF, Zhang J, Gao Q, Xing SC, Li F, Wang W. Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. *J Plant Physiol* 2008; 165(16): 1745-55.
- 13 赵永彬, 王娇阳, 吴伟, 冯春梅, 陈海平. 丝瓜亲本材料苗期耐低温试验. *浙江农业科学*(Zhao Yongbin, Wang Jiaoyang, Wu Wei, Feng Chunmei, Chen Haiping. Low temperature tolerance test of luffa parent material at seedling stage. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*) 2015; 56(5): 705-7.
- 14 蒋晓婷, 梁双贤, 林碧英, 黄枝. 不同光质补光对丝瓜幼苗生长及生理生化特性的影响. *福建农林大学学报(自然科学版)*(Jiang Xiaoting, Liang Shuangxian, Lin Biying, Huang Zhi. Effect of supplemental lighting of different light quality on growth and physiological and biochemical characteristics of loofah seedlings. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University, Natural Science Edition*) 2015; 44(3): 250-5.
- 15 蒋晓婷, 林碧英, 林义章. 弱光胁迫对丝瓜幼苗生长及生理生化特性的影响. *北方园艺*(Jiang Xiaoting, Lin Biying, Lin Yizhang. Effects of low light stress on growth and physiological and biochemical characteristics of luffa seedlings. *Northern Horticulture*) 2015; 9: 14-8.
- 16 方基建, 裴孝伯. 不同浓度的钾处理对丝瓜幼苗抗寒性的影响. *热带作物学报*(Fang Jijiang, Pei Xiaobo. Effects of different concentrations of potassium treatment on cold resistance of luffa seedlings. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2010; 31(4): 561-5.
- 17 陆小平, 肖靓, 陈正凯, 王利芬, 楼程富. 桑树多聚泛素基因的克隆及序列分析. *蚕业科学*(Lu Xiaoping, Xiao Liang, Chen Zhengkai, Wang Lifen, Lou Chenfu. Cloning and sequence analysis of polyubiquitin gene from mulberry, *Morus monglica* S. *Canye Kexue*) 2006; 32(3): 301-6.
- 18 刘建新, 沈福泉, 张智, 田丹青, 葛亚英. 擎天凤梨泛素基因的克隆与序列分析. *分子植物育种*(Liu Jiangxin, Shen Fuquan, Zhang Zhi, Tian Danqing. Ge Yaying. Cloning and sequence analysis of ubiquitin gene from guzmania. *Molecular Plant Breeding*) 2009; 7(5): 1021-6.
- 19 Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003; 21(8): 921-6.
- 20 Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 35857-60.
- 21 董雯, 郭宁, 宋伦. 蛋白质的泛素化修饰在细胞应激反应中的作用. *生物技术通讯*(Dong Wen, Guo Ning, Song Lun. Role of protein ubiquitination in mediating the cellular stress response. *Letters in Biotechnology*) 2010; 21(5): 727-30.
- 22 Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(3): 169-78.
- 23 Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004; 379(3): 513-25.
- 24 Bedford L, Layfield R, Mayer RJ, Peng J, Xu P. Diverse polyubiquitin chains accumulate following 26S proteasomal dysfunction in mammalian neurones. *Neurosci Lett* 2011; 491(1): 44-7.
- 25 O'Mahony PJ, Oliver MJ. The involvement of ubiquitin in vegetative desiccation tolerance. *Plant Mol Biol* 1999; 41(5): 657-67.
- 26 Zhang J, Guo QF, Feng YN, Li F, Gong JF, Fan ZY, *et al.* Manipulation of monoubiquitin improves salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Biol* 2012; 14(2): 315-24.
- 27 Garbarino JE, Rockhold DR, Belknap WR. Expression of stress-responsive ubiquitin genes in potato tubers. *Plant Mol Biol* 1992; 20(2): 235-44.
- 28 von Kampen J, Nielander U, Wettem M. Expression of ubiquitin genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: involvement in stress response and cell cycle. *Planta* 1995; 197(3): 528-34.
- 29 Gindin E, Borochoy A. Ubiquitin conjugation to protein increases following chilling of *Clerodendrum* leaves. *Plant Physiology* 1992; 100(3): 1392-5.
- 30 侯学文, 郭勇. 泛素与植物逆境响应. *植物生理学通讯*(Hou Xuewen, Guo Yong. Ubiquitin and plant stress response. *Plant Physiology Communications*) 1998; 34(6): 474-8.
- 31 Feng YN, Zhang M, Guo QF, Wang GK, Gong JF, Xu Y, *et al.* Manipulation of monoubiquitin improves chilling tolerance in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Physiol Biochem* 2014; 75: 138-44.
- 32 Kang HH, Zhang M, Zhou SM, Guo QF, Chen FJ, Wu JJ, *et al.* Overexpression of wheat ubiquitin gene, *Ta-Ub2*, improves abiotic stress tolerance of *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci* 2016; 248: 102-15.