

# 月季乙烯受体基因的全长克隆及原核表达分析

唐红姝<sup>1</sup>, 刘道凤<sup>1</sup>, 薛璟祺<sup>2</sup>, 欧阳琳<sup>1</sup>, 孙翠慧<sup>1</sup>, 马 男<sup>1</sup>, 高俊平<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193; <sup>2</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 利用已构建的月季花朵转录组数据库, 筛选得到了 22 个与乙烯受体同源性较高的 UniGene 片段, 并利用这些片段从月季花瓣中克隆得到了 3 个乙烯受体基因全长, 分别为 *RhETR1*、*RhETR3* 和 *RhETR5*。其中, *RhETR1* 全长为 2 814 bp, 编码一个 595 aa 的肽链; *RhETR3* 全长为 2 468 bp, 编码一个 765 aa 的肽链; *RhETR5* 全长 2 740 bp, 编码一个 742 aa 的肽链。这 3 个基因推定的编码蛋白分别与枣 (*Ziziphus jujuba*) 中的 ZjETR1、杨树 (*Populus trichocarpa*) 中的 PtETR2 和砂梨 (*Pyrus pyrifolia*) 中的 PpERS2 同源性最高, 依次为 85.2%、75.8%和 80.3%。蛋白同源性 & 结构分析表明, *RhETR1* 和 *RhETR5* 分别与拟南芥中的 ERS1 和 ETR1 结构相似, 属于第 1 亚家族成员, *RhETR3* 与 ERS2 结构相似, 属于第 2 亚家族成员。在花朵自然瓶插过程中, 这 3 个基因分别表现为下调、上调和组成型表达。利用原核表达载体, 选择和月季花朵开放最为相关的 *RhETR3*, 获得了和理论分子量一致的重组蛋白, 表明克隆得到的 *RhETR3* 具有完整的读码框。

**关键词:** 月季; 乙烯; 乙烯受体; 基因克隆; 原核表达

**中图分类号:** S 685.12

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 12-2421-10

## The Full-length Cloning of Ethylene Receptor Genes and Prokaryotic Expression of *RhETR3* in Roses

TANG Hong-shu<sup>1</sup>, LIU Dao-feng<sup>1</sup>, XUE Jing-qi<sup>2</sup>, OUYANG Lin<sup>1</sup>, SUN Cui-hui<sup>1</sup>, MA Nan<sup>1</sup>, and GAO Jun-ping<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In this paper, twenty-two UniGene fragments that shared high homology with ethylene receptor genes were obtained from previous-constructed rose flower transcriptome database. Then the full length of three genes, *RhETR1*, *RhETR3*, and *RhETR5*, were cloned from rose petals. The full length and encoded peptide chain of *RhETR1*, *RhETR3*, and *RhETR5* were 2 814 bp and 595 aa, 2 468 bp and 765 aa, and 2 740 bp and 742 aa, respectively. The predicted protein of the three genes shared the highest identity with ZjETR1 in *Ziziphus jujuba* (85.2%), PtETR2 in *Populus trichocarpa* (75.8%), and PpERS2 in *Pyrus pyrifolia* (80.3%), respectively. Further protein homologous and construction analysis indicated that *RhETR1* and *RhETR5* were similar to ERS1 and ETR1 in *Arabidopsis*, belonging to subfamily I; *RhETR3* was similar to ERS2, belonging to subfamily II. During natural vasing life, *RhETR1*, *RhETR3*,

收稿日期: 2012 - 05 - 10; 修回日期: 2012 - 11 - 26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000920, 30900991); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gaojp@cau.edu.cn)

and *RhETR5* showed down-regulated, up-regulated and constitutive expression, respectively. Through a prokaryotic expression system, the recombinant protein of *RhETR3* was obtained, whose molecular weight was similar to that of the theoretical ones, indicating that the cloned full-length of *RhETR3* has a complete open reading frame.

**Key words:** rose; *Rosa hybrida*; ethylene; ethylene receptor; gene clone; prokaryotic expression

乙烯在种子萌发、花朵开放、果实成熟、叶片衰老等各个环节发挥着核心作用 (Abeles et al., 1992; 蔡蕾 等, 2002), 同时还参与一系列生物与非生物胁迫的响应, 如病虫害、水淹胁迫、冷害胁迫等 (Johnson & Ecker, 1998; Bleecker & Kende, 2000)。

通过对模式植物拟南芥的研究发现, 在乙烯信号转导途径中, 位于内质网上的乙烯受体最先感受乙烯信号。乙烯受体能够与乙烯结合, 使其处于失活状态, 释放并激活与受体本身结合的 CTR1, 后者又可以激活下游一系列乙烯转导元件如 EIN2、EIN3、ERF 等, 最终调控乙烯相关蛋白的表达 (Guo & Ecker, 2004; Chen et al., 2005)。研究表明, 乙烯受体在转录和转录后均受到调控, 而 CTR 和 EIN3 等的调控主要发生于转录后的蛋白水平 (Chen et al., 2002, 2005; Gao et al., 2003; Yanagisawa et al., 2003)。因此, 乙烯受体是乙烯在转录水平上的信号转导调控关键组成部分。

目前发现的乙烯受体大多以多基因家族的形式存在。在拟南芥中, 乙烯受体家族一共有 5 个成员, 根据不同的蛋白结构分为了两个亚家族, 其中 *ETR1* 和 *ERS1* 属于第 1 亚家族, *ETR2*、*ERS2* 和 *EIN4* 属于第 2 亚家族 (Guo & Ecker, 2004; Stepanova & Alonso, 2009)。乙烯受体的多基因现象及不同成员之间结构的差异可能与各自行使的功能相关。已经明确, 植物内源乙烯可被自身发育及各种环境因子所诱导, 在这些过程中, 包含了乙烯、ABA、糖代谢等多种信号转导途径, 形成一个复杂的网络结构 (Gazzarrini & McCourt, 2001)。这些调控途径既各自独立又相互影响, 而乙烯受体作为乙烯感受的第一个环节, 其结构的不同被认为是参与不同调控分工与协作的体现。因此, 明确不同乙烯受体之间结构的差异, 有助于系统研究乙烯代谢及调控机制。

在观赏植物中, 乙烯影响花朵开放、柱头可授性、以及花瓣衰老和脱落等过程。研究表明, 这些过程大多与乙烯受体转录调控相关 (Shibuya et al., 2002; Kuroda et al., 2003, 2004)。在月季方面, 目前已经克隆得到了 5 个乙烯受体基因, 初步明确了月季中乙烯受体在花朵开放和衰老过程中的转录调节机制 (Muller et al., 2000a, 2000b; Tan et al., 2006)。但这些报道中均未获得乙烯受体基因全长序列, 不能对其蛋白结构进行完整的预测与分析, 其他相关后续研究也受到了一定的限制。

在本研究中, 利用已构建的月季花朵转录组数据库, 结合 RACE 技术, 获得了 *RhETR1*、*RhETR3*、*RhETR5*, 3 个乙烯受体基因的全长, 同时分析了这些基因推定的蛋白结构与功能域, 并检测了这 3 个基因在花朵开放衰老过程中的表达; 在此基础上, 通过原核表达获得了 *RhETR3* 编码的重组蛋白。这些结果可以为利用新的手段研究月季乙烯受体蛋白提供理论和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2009—2011 年在中国农业大学观赏园艺与园林系采后生理研究室完成。试验所用月季 (*Rosa hybrida*) 切花 ‘Samantha’ 由位于北京市昌平区的月季切花生产基地提供。花材采收后将其基部置于水中, 并在 1 h 之内运回实验室。花材经水剪、去叶、复水 (薛璟祺 等, 2011) 等处理后进行后续试验。

## 1.2 瓶插处理

按照本实验室先前对月季开花级数的定义 (Ma et al., 2005), 花材在开花级数为 1 级 (花苞, 未透色) 时采收。采收后的花材经复水处理后, 重新置于去离子水中, 置于瓶插室内观察。瓶插室内环境保持温度 23~25 °C, 相对湿度 30%~40%, 光/暗周期 12 h/12 h, 光强 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在花材开放过程中, 分别于开花级数为 1~6 级时收集中层花瓣, 经液氮速冻后存于 -80 °C 条件下, 每个取样点至少取 5 朵花, 作为 5 个生物学重复备用。

## 1.3 总 RNA 提取与不同受体基因全长克隆

总 RNA 提取采用本实验室改良的 Hot borate 法 (Wan & Wilkins, 1994)。不同样本的总 RNA 提取后, 利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 试剂盒合成 cDNA, 并根据已知受体基因片段设计特异引物 (表 1, 编号 1~12) 用于 PCR 扩增。扩增产物插入 pGEM T-Easy 载体 (Promega) 后, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 鉴定阳性克隆后送北京三博远志生物技术有限公司测序。序列经分析、拼接后, 利用全长引物 (表 1, 编号 13~18) 获得对应基因全长。

表 1 月季乙烯受体基因全长克隆及表达所用引物

Table 1 Primers used for the full length cloning of ethylene receptor genes and their expression in rose

编号 No.	引物 Primer	引物序列 Primer sequence
1	<i>RhETR1</i> GSP outer forward	5'-CAGACCACTCGTGGGAAGAT-3'
2	<i>RhETR1</i> GSP inner forward	5'-GCCTGATGTCTCTGCGAAAAG-3'
3	<i>RhETR1</i> GSP outer reverse	5'-GGATTGCCAGCTCTGCCTCTC-3'
4	<i>RhETR1</i> GSP inner reverse	5'-TCACTGGCTCGCATAGACTC-3'
5	<i>RhETR3</i> GSP outer forward	5'-ATATTGTCCACAACCCTCTT-3'
6	<i>RhETR3</i> GSP inner forward	5'-GCTAATGCTTGCTCTCACAG-3'
7	<i>RhETR3</i> GSP outer reverse	5'-ATTCCTCCCTTTCAACTCAT-3'
8	<i>RhETR3</i> GSP inner reverse	5'-ATTATCTCAAGTTCCTGGCT-3'
9	<i>RhETR5</i> GSP outer forward	5'-GCGTGATTTCAAGAACTGTGGC-3'
10	<i>RhETR5</i> GSP inner forward	5'-TTCCTGAAGAACAAGGCTGC-3'
11	<i>RhETR5</i> GSP outer reverse	5'-AAGCACCAACACCATCAAAGC-3'
12	<i>RhETR5</i> GSP inner reverse	5'-GTTGGCATCCACAAGGCAC-3'
13	<i>RhETR1</i> FL forward	5'-TTGGCTCAGTCCCTAGTTACTT-3'
14	<i>RhETR1</i> FL reverse	5'-TTGAAGCTAAACCGTATCCATC-3'
15	<i>RhETR3</i> FL forward	5'-TGCATATGGTTGGGAGCCTG-3'
16	<i>RhETR3</i> FL reverse	5'-AGCCCTATTACATCATCTTCGTC-3'
17	<i>RhETR5</i> FL forward	5'-GATGGTCTGGGCAAAGGAT-3'
18	<i>RhETR5</i> FL reverse	5'-AGACACAACCTCGGGTGAGATAG-3'
19	<i>RhETR1</i> RT-PCR forward	5'-TGTGCCATTAGCCTTCCTGTA-3'
20	<i>RhETR1</i> RT-PCR reverse	5'-CCTGATCTGCAACAACATCAAC-3'
21	<i>RhETR3</i> RT-PCR forward	5'-GCTCATCACTCTCATTCCTTGC-3'
22	<i>RhETR3</i> RT-PCR reverse	5'-GCATTGGCATCCGTATTGCAGC-3'
23	<i>RhETR5</i> RT-PCR forward	5'-ATGGCTACTGCCAAGGTTTCA-3'
24	<i>RhETR5</i> RT-PCR reverse	5'-CAGGAATGTGTTTTCCAGCAAT-3'
25	<i>Ubi</i> forward	5'-CACCTCGCCGACTACAA-3'
26	<i>Ubi</i> reverse	5'-AGTGATGGTCTGCCGGTTAAG-3'
27	<i>RhETR3</i> ORF forward	5'-CGGGATCCATGTTAAAGGCATTAGCATCTGGG-3'
28	<i>RhETR3</i> ORF reverse	5'-CCCAAGCTTG CACAATTTGTTTGCCTGCACC-3'

## 1.4 RT-PCR 分析

不同花瓣样品总 RNA 提取后, 利用 Powerscript reverse transcriptase (Clontech) 反转录成 cDNA, 再根据各受体基因全长序列, 选取非保守区设计特异引物 (表 1, 编号 19~24), 用于半定量 RT-PCR 分析。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 28 个

循环,最后 72 ℃延伸 8 min。同时选取 *Ubi* 作为 RT-PCR 内标(表 1, 编号 25、26),扩增条件: 94 ℃预变性 5 min, 然后 94 ℃变性 30 s, 59 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 27 个循环,最后 72 ℃延伸 8 min。PCR 产物经 1.2%的琼脂糖凝胶进行分离后用 GoldView<sup>TM</sup> 染料染色观察,每个时间点样本均设 3 个生物学重复。

### 1.5 原核表达

利用克隆得到的 *RhETR3* 全长,设计特异引物,以获得该基因的开放阅读框(ORF)序列,同时在上下游引物中分别加入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(表 1, 编号 27、28)。PCR 产物首先连接到 pGEM-T Easy 载体(Progenia)中,经测序确认无错配后通过双酶切重新连入 *pET-30a(+)*载体(Novagen)中,并命名为 *pET-ETR3*。将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)-pLys 菌株中,菌液 PCR 和质粒酶切确定阳性质粒。

挑取阳性克隆接种于 LB 液体培养基,37 ℃培养过夜。次日,按 1:100 的比例接种到新鲜的 LB 培养基中,培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8 时,加入 0.6 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 3 h。以刚加入 IPTG 的时间为 0 h,分别在 0 和 3 h 取样。每次取 1.5 mL 菌液,离心收集菌体,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min 以裂解细胞。室温下,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 *RhETR1*、*RhETR3* 和 *RhETR5* 全长克隆及序列分析

对前人构建的含有 60 944 个 UniGene 的月季花朵转录组数据库([http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/rose\\_454/index.cgi](http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/rose_454/index.cgi))进行比对分析,发现其中有 22 个与乙烯受体基因同源性较高。花瓣响应乙烯的基因芯片表达结果表明,这 22 个 UniGene 中,有 13 个受乙烯处理正调控,9 个对乙烯响应不明显(表 2)。

表 2 与乙烯受体相关的 22 个 UniGene 编号及乙烯响应模式  
Table 2 The ID of 22 ethylene receptor related UniGenes and their ethylene response pattern

编号 ID	乙烯处理 Ethylene treatment									
	1 h		6 h		12 h		18 h		24 h	
	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR
RU00182 <sup>#</sup>	2.60	2.99E-05	3.61	3.21E-07	2.50	1.03E-04	3.42	1.04E-06	2.61	1.00E-05
RU07079 <sup>#</sup>	2.60	2.99E-05	3.61	3.21E-07	2.50	1.03E-04	3.42	1.04E-06	2.61	1.00E-05
RU08199	0.89	1.37E-01	1.13	1.25E-01	1.07	4.74E-01	0.78	2.51E-03	0.80	4.01E-03
RU09131	0.98	8.45E-01	1.06	5.80E-01	1.04	7.13E-01	0.86	7.96E-02	0.89	1.76E-01
RU10201 <sup>#</sup>	7.56	3.10E-05	4.44	1.21E-03	1.84	1.46E-01	5.88	2.35E-04	2.91	1.17E-02
RU12664 <sup>#</sup>	4.28	5.34E-06	5.22	4.60E-07	2.53	1.11E-03	8.37	2.45E-08	2.22	1.07E-03
RU14043 <sup>#</sup>	2.56	9.53E-06	4.18	1.78E-08	2.49	4.77E-05	3.99	3.70E-08	3.05	4.24E-07
RU14894 <sup>#</sup>	7.70	1.71E-08	5.65	6.56E-08	2.01	3.53E-03	9.15	2.30E-09	2.11	9.48E-04
RU17625	0.89	6.38E-01	1.07	8.27E-01	1.01	9.64E-01	0.67	2.57E-01	1.03	9.27E-01
RU19694	0.86	1.80E-01	0.94	5.80E-01	1.21	9.18E-02	0.79	3.00E-02	0.78	9.36E-03
RU20979 <sup>#</sup>	4.48	2.07E-06	3.91	2.54E-06	1.74	1.15E-02	7.89	9.17E-09	2.05	1.85E-03
RU23348 <sup>#</sup>	6.96	9.52E-08	5.93	1.75E-07	2.06	3.93E-03	9.72	4.98E-09	2.36	6.15E-04
RU25672	0.81	5.12E-02	0.95	6.80E-01	1.10	3.72E-01	0.86	1.73E-01	0.97	7.88E-01
RU31838 <sup>#</sup>	5.33	5.35E-04	4.02	2.00E-03	2.22	8.97E-02	4.85	7.46E-04	2.55	2.93E-02
RU40711	0.96	5.97E-01	1.03	7.77E-01	1.02	8.32E-01	0.82	7.99E-03	0.92	2.48E-01
RU40717	0.96	5.97E-01	1.03	7.77E-01	1.02	8.32E-01	0.82	7.99E-03	0.92	2.48E-01

续表 2

编号 ID	乙烯处理 Ethylene treatment									
	1 h		6 h		12 h		18 h		24 h	
	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR	比率 Ratio	FDR
RU43444	0.98	7.98E-01	1.07	3.39E-01	1.06	4.46E-01	0.90	1.34E-01	1.02	7.27E-01
RU49080 <sup>#</sup>	4.49	4.08E-04	4.17	9.11E-04	1.44	4.09E-01	2.89	1.26E-02	2.68	1.14E-02
RU49577	0.78	3.15E-03	0.90	1.81E-01	1.26	7.14E-03	0.87	6.22E-02	1.01	9.66E-01
RU52182 <sup>#</sup>	6.67	3.88E-08	6.13	4.83E-08	2.21	1.56E-03	8.27	4.98E-09	2.29	3.75E-04
RU54586 <sup>#</sup>	3.16	2.67E-06	5.23	1.11E-08	3.24	1.16E-05	5.68	4.98E-09	3.30	5.64E-07
RU55344 <sup>#</sup>	6.67	3.88E-08	6.13	4.83E-08	2.21	1.56E-03	8.27	4.98E-09	2.29	3.75E-04

注：比率是指不同 UniGene 在乙烯处理一定时间后其表达与相应对照表达的比值。FDR 代表错误发生率。<sup>#</sup>表示受乙烯正调控。

Note: Ratio means expression of ethylene treatment divided by that of control for each UniGene at different time point. FDR means the false discovery rate. <sup>#</sup> means up regulated by ethylene.

根据以上信息及已发表的月季乙烯受体片段（Muller et al., 2000a, 2000b; Tan et al., 2006），利用 RACE 技术分别获得了 *RhETR1*、*RhETR3* 和 *RhETR5* 的全长。进一步分析表明，以上 3 个基因分别包含 22 个 UniGene 中的 7 个、6 个和 7 个（图 1），另有 2 个属于 *RhETR2* 序列（结果未列出）。其中 *RhETR1* 全长为 2 814 bp，包含一个 1 788 bp 的 ORF，编码一个 595 aa 的肽链，理论分子量为 66.5 kD，等电点为 6.19；*RhETR3* 全长为 2 468 bp，包含一个 2 298 bp 的 ORF，编码一个 765 aa 的肽链，理论分子量为 84.4 kD，等电点为 6.75；*RhETR5* 全长 2 740 bp，包含一个 2 226 bp 的 ORF，编码一个 742 aa 的肽链，理论分子量为 82.8 kD，等电点为 6.69。

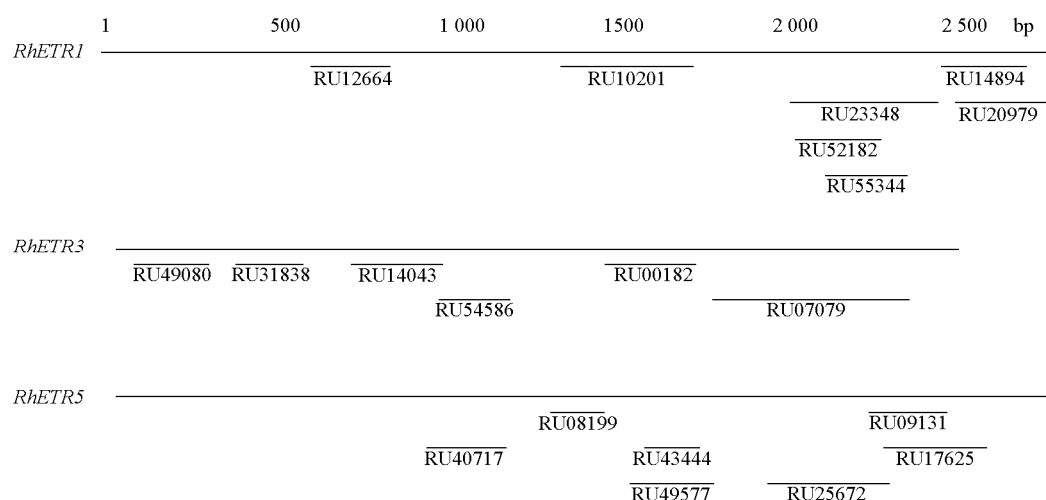


图 1 UniGene 在不同乙烯受体成员中的分布

Fig. 1 Location of UniGene in different ethylene receptor members

## 2.2 *RhETR1*、*RhETR3* 及 *RhETR5* 蛋白结构及功能域分析

通过同源性对比，发现本研究中克隆得到的 3 个乙烯受体基因推定的编码蛋白分别与枣（*Ziziphus jujuba*）中的 ZjETR1、杨树（*Populus trichocarpa*）中的 PtETR2 和砂梨（*Pyrus pyrifolia*）中的 PpERS2 同源性最高，分别达到了 85.2%、75.8%和 80.3%；系统进化树分析表明，*RhETR1* 和 *RhETR5* 分别与拟南芥中的 AtERS1 和 AtETR1 同源性最高，属于第 1 亚家族成员；*RhETR3* 与拟南芥中的 AtERS2 同源性最高，属于第 2 亚家族成员（图 2，图 3）。

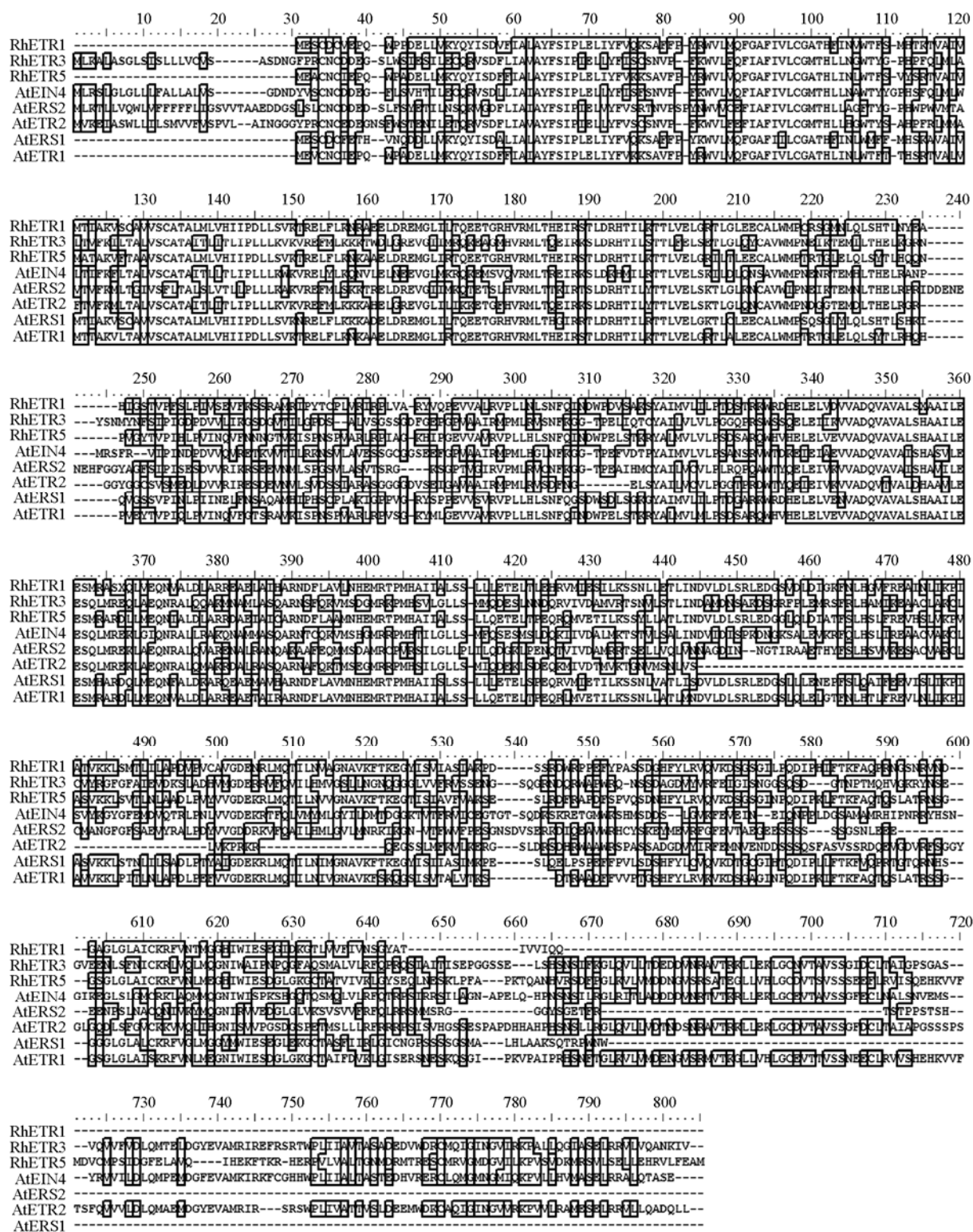


图2 月季与拟南芥中乙烯受体蛋白家族成员序列对比

Fig. 2 Comparison of ethylene receptor amino acid sequences between roses and Arabidopsis

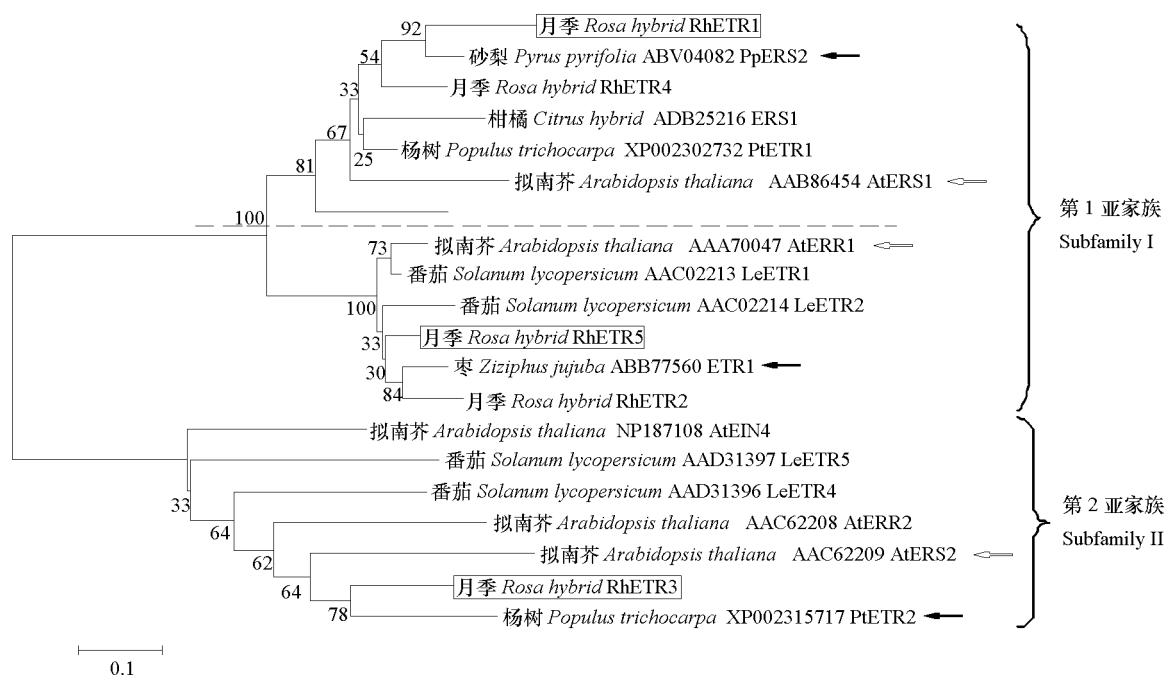


图3 月季乙烯受体与其他同源蛋白系统发育树分析

方框内为本研究中涉及的3个乙烯受体；实心箭头表示其他物种中与之同源性最高的受体蛋白；空心箭头表示拟南芥中与之同源性最高的受体蛋白。

Fig. 3 Phylogenetic tree of rose ethylene receptors and other homologous proteins

The three ethylene receptors studied in this paper are shown in the rectangles. The solid arrows point at the highest homology of rose receptors with that of other plants, and the hollow arrows point at the highest homology of rose receptors with that of *Arabidopsis*.

通过 SMART 软件 (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2012) 对上述 3 个受体基因推测的蛋白结构进行分析, 发现 RhETR1、RhETR3 和 RhETR5 均含有乙烯结合域、GAF 域和激酶域。不同的是, RhETR3 的乙烯结合域含有 4 个跨膜结构 (其中一个跨膜结构包含信号序列); 而 RhETR1 和 RhETR5 含有 3 个跨膜结构。同时, RhETR3 和 RhETR5 的 C 端含有 1 个接受域, RhETR1 则没有 (图 4)。

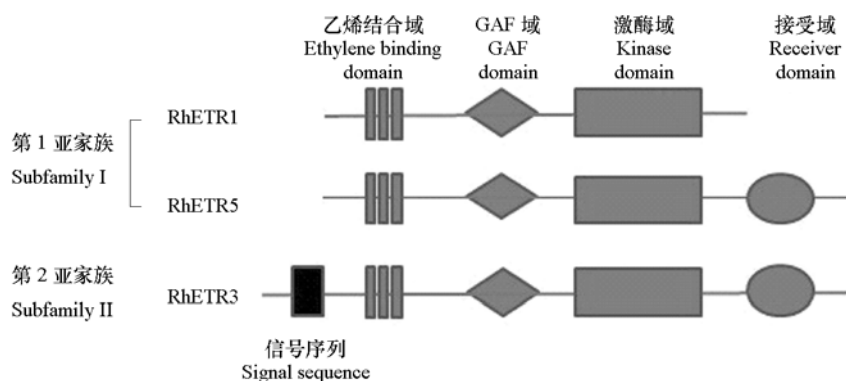


图4 月季乙烯受体不同成员功能域推测

Fig. 4 Putative function domains of different ethylene receptor members in roses

### 2.3 *RhETR1*、*RhETR3* 和 *RhETR5* 在瓶插过程中的表达

乙烯是影响月季切花瓶插品质的最主要因素。因此,在获得月季 3 个乙烯受体基因全长的基础上,利用 RT-PCR 技术检测了瓶插过程中这 3 个基因在花瓣中的表达状况。结果显示,*RhETR1* 在花苞期到初开阶段(1~3 级)表达较强,接近完全开放时(4 级)表达略有降低,并在接下来的完全开放状态中(5~6 级)显著降低。*RhETR3* 在花苞期(1 级)表达较弱,随着花朵的开放表达逐渐增强,到花朵完全开放时(4 级)表达达到最强,并在随后的完全开放状态中(5~6 级)持续这一水平。与前两个受体基因表达不同,*RhETR5* 在整个花朵开放过程中均为组成型表达(图 5)。这些结果表明,*RhETR1* 和 *RhETR3* 基因表达变化与月季花朵开放进程更为密切。

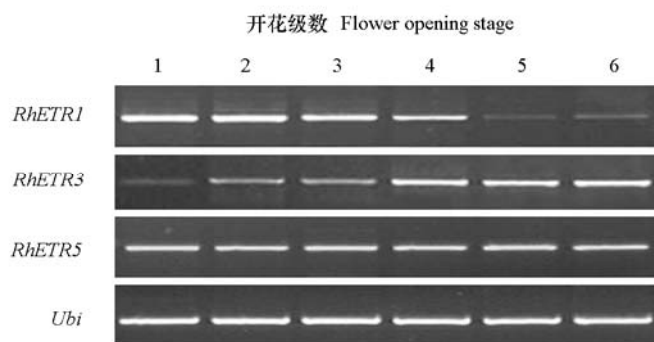


图 5 乙烯受体不同成员在花朵开放进程中的表达变化

Fig. 5 Expression changes of different ethylene receptor members during flower opening process

### 2.4 *RhETR3* 蛋白的原核表达

乙烯受体行使其功能主要是在蛋白水平。为了验证克隆得到的乙烯受体蛋白读码框的完整性,结合先前结果(Ma et al., 2006; Xue et al., 2008),选择 *RhETR3* 这一乙烯受体关键基因,利用原核表达系统,构建了 *pET-ETR3* 表达载体,并在 *E. coli* 中进行了重组蛋白表达。结果表明,经 IPTG 诱导 3 h 后,载体 *pET-ETR3* 在 80~90 kD 处有一个明显的蛋白条带,这与预测的 *RhETR3* 蛋白分子量大小一致,而转化空载体的菌株未见相应蛋白表达(图 6)。这些结果说明本研究中克隆得到的 *RhETR3* 全长具有完整的读码框。

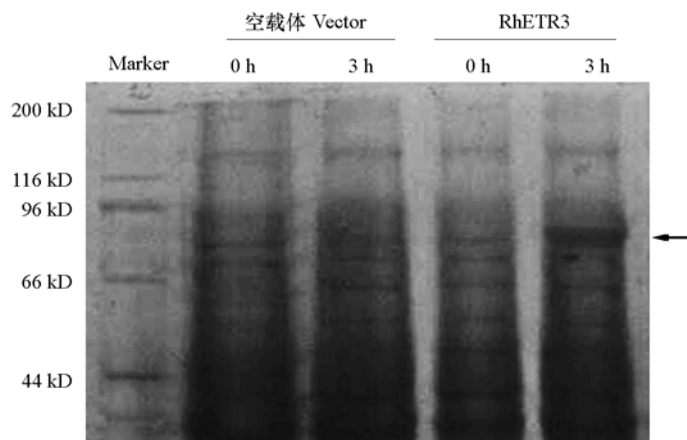


图 6 *RhETR3* 蛋白在 *E. coli* 中的原核表达

Fig. 6 Prokaryotic expression of *RhETR3* in *E. coli*



### 3 讨论

乙烯受体是响应乙烯信号最直接, 也是最重要的元件, 目前发现的乙烯受体大多以多基因家族的形式存在, 这可能与其在乙烯代谢调控中的不同分工有关。在月季方面, 目前已克隆得到 5 个乙烯受体基因, 相关的基因转录调控研究也早在 2000 年就开始了 (Muller et al., 2000a, 2000b)。但到目前为止, 这些研究并未获得任何月季乙烯受体基因全长, 这可能与其序列较长和结构较为复杂有关。在本研究中, 研究者利用已有的月季花朵转录组数据库, 检索得到了 22 个和乙烯受体同源性较高的基因片段, 这为利用 RACE 技术获得相关基因全长提供了便利条件。利用这些信息, 研究者最终克隆得到了 3 个乙烯受体基因全长, 这些结果可为研究月季乙烯受体结构与功能之间的关系, 并为下一步研究蛋白水平的调控模式提供先决条件。

拟南芥中的 5 个乙烯受体成员在蛋白结构方面至少都包含 3 个相同的功能域: (1) N 端响应乙烯的跨膜域; (2) 参与不同类型受体之间互作的 GAF 域; (3) C 端和下游 CTR1 元件结合的激酶域。但个体之间又存在着一定的差异, 根据这些结构差异, 这 5 个成员可细分为两个亚家族, 其中第 1 亚家族 (ETR1、ERS1) N 端有 3 个跨膜域, C 端为组氨酸激酶域; 第 2 亚家族 (ETR2、ERS2、EIN4) N 端有 4 个跨膜域, C 端为丝—苏氨酸激酶域 (Guo & Ecker, 2004; Stepanova & Alonso, 2009)。在本研究中, 从月季花瓣中克隆得到的 3 个乙烯受体基因分属于两个不同的亚家族, 其结构与功能域与拟南芥中对应亚家族成员一致 (图 4)。基于以上结果, 可以根据拟南芥和月季乙烯受体结构的一致性, 充分借鉴前者详尽的乙烯受体研究结果, 用于后者相关调控的研究。

乙烯受体不同成员在结构上存在差异, 在植物中的表达模式也具有明显不同。例如, 番茄中乙烯受体基因 *LeETR1* 在果实发育进程中组成型表达, 基本不受乙烯的诱导, 而 *NR* 则在成熟果实中表达明显增加, 并受乙烯的诱导 (Lashbrook et al., 1998)。在本研究中, 3 个月季乙烯受体基因在花朵开放进程中表达各异, 其中 *RhETR1* 和 *RhETR3* 随花朵开放变化, 而乙烯是影响月季花朵开放最重要的因素之一, 因此, 这两个基因可能与乙烯代谢相关, 但这两个基因表达变化趋势的差异表明它们可能存在不同的调节功能; *RhETR5* 在整个花朵开放进程中表现为组成型表达, 可能在月季花朵开放进程中起到“管家基因”的作用, 为月季快速响应乙烯信号提供基础条件 (图 5)。

在已知的 5 个月季乙烯受体基因中, *RhETR3* 是参与乙烯调控花朵开放最重要的基因之一 (Ma et al., 2006; Xue et al., 2008)。本研究中, 通过原核表达, 获得了 *RhETR3* 的重组蛋白, 其蛋白大小和理论值相一致 (图 6)。这一结果不仅验证了克隆得到的乙烯受体具有完整的编码区, 同时, 也可为后续转录后调节研究奠定基础。

此外, 对于月季中另外两个乙烯受体基因 *RhETR2* 和 *RhETR4*, 由于现有数据库的 UniGene 对其涵盖度不够, 迄今为止未获得其全长。这项工作将作为后续研究的一个方面。

### References

- Abeles F B, Morgan P W, Saltveit Jr M E. 1992. Ethylene in plant biology, 2nd ed. New York: Academic Press.
- Bleecker A B, Kende H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16: 1 - 18.
- Cai Lei, Zhang Xiao-hong, Shen Hong-xiang, Gao Jun-ping. 2002. Effects of ethylene and its inhibitors on flower opening and senescence of cut roses. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (5): 467 - 472. (in Chinese)
- 蔡 蕾, 张晓红, 沈红香, 高俊平. 2002. 乙烯对不同切花月季品种开花和衰老的影响. *园艺学报*, 29 (5): 467 - 472.
- Chen Y F, Etheridge N, Schaller G E. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany*, 95: 901 - 915.
- Chen Y F, Randlett M D, Findell J L, Schaller G E. 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 19861 - 19866.

- Gao Z Y, Chen Y F, Randlett M D, Zhao X C, Findell J L, Kieber J J, Schaller E S. 2003. Localization of the raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 34725 – 34732.
- Gazzarrini S, McCourt P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 387 – 391.
- Guo H, Ecker J R. 2004. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 40 – 49.
- Johnson P, Ecker J R. 1998. The ethylene gas signaling pathway in plants: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics*, 32: 227 – 254.
- Kuroda S, Hakata M, Hirose Y, Shiraishi M, Abe S. 2003. Ethylene production and enhanced transcription of an ethylene receptor gene, *ERS1*, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 812 – 820.
- Kuroda S, Hirose Y, Shiraishi M, Davies E, Abe S. 2004. Coexpression of an ethylene receptor gene, *ERS1*, and ethylene signaling regulator gene, *CTR1*, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 745 – 751.
- Lashbrook C C, Tieman D M, Klee H J. 1998. Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *The Plant Journal*, 15: 243 – 252.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012. SMART 7: Recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 40: 302 – 305.
- Ma N, Cai L, Lu W J, Tan H, Gao J P. 2005. Exogenous ethylene influences flower opening of cut rose (*Rosa hybrida*) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *Science in China, Series C*, 48: 434 – 444.
- Ma N, Tan H, Liu X H, Xue J Q, Li Y H, Gao J P. 2006. Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2763 – 2773.
- Muller R, Lind-iversen S, Stummann B M, Serek M. 2000a. Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 12 – 18.
- Muller R, Stummann B M, Serek M. 2000b. Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. *Plant Cell Reports*, 19: 1232 – 1239.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting C P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 5857 – 5864.
- Shibuya K, Nagata M, Tanikawa N, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S. 2002. Comparison of mRNA levels of three ethylene receptors in senescing flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 53: 399 – 406.
- Stepanova A N, Alonso J M. 2009. Ethylene signaling and response: Where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 548 – 555.
- Tan H, Liu X H, Ma N, Xue J Q, Lu W J, Bai J H, Gao J P. 2006. Ethylene-influenced flower opening and expression of genes encoding *ETRs*, *CTRs*, and *EIN3s* in two cut rose cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 40: 97 – 105.
- Wan C Y, Wilkins T A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Annal Biochem*, 223: 7 – 12.
- Xue Jing-qi, Yang Feng, Zuo Zhi-rui, Gao Jun-ping. 2011. Effect of ethylene and 1-MCP on ethylene production and related gene expression in floral tissues of roses. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 311 – 316. (in Chinese)
- 薛璟祺, 杨 丰, 左志锐, 高俊平. 2011. 乙烯和 1-MCP 的竞争性作用对月季花器官乙烯生成量及相关基因表达的影响. *园艺学报*, 38 (2): 311 – 316.
- Xue J Q, Li Y H, Tan H, Yang F, Ma N, Gao J P. 2008. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2161 – 2169.
- Yanagisawa S, Yoo S D, Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. *Nature*, 425: 521 – 525.