

柑橘半胱氨酸蛋白酶基因 *CsCysP* 的分离、亚细胞定位及表达分析

马岩岩¹, 张 军¹, 陈 娇¹, 张凌云¹, 朱世平¹, 闫树堂¹, 钟广炎^{2,*}

(¹西南大学园艺园林学院/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400715; ²广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

摘 要: 以‘奥林达’夏橙 [*Citrus sinensis* (L.) ‘Olinda’] 为材料, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从果萼离层中分离到 1 个半胱氨酸蛋白酶类基因, 命名为 *CsCysP* (GenBank 登录号: KJ093387)。该基因的 cDNA 全长为 1 485 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 083 bp, 推测可编码 360 个氨基酸残基的多肽。其基因组序列与 cDNA 比对后显示有 3 个内含子。分析发现, *CsCysP* 属于 papain-like (木瓜蛋白酶, C1A) 家族的半胱氨酸蛋白酶, 与拟南芥、大豆、烟草、杨树等的同源蛋白有 73%~83% 的相似性。亚细胞定位结果显示 *CsCysP* 蛋白定位在细胞壁上。qRT-PCR 结果表明 *CsCysP* 在老叶、成熟果实果萼离层和花中的表达量明显高于幼苗的根、茎、叶。*CsCysP* 的表达被脱落酸、高盐和 PEG6000 诱导, 低温、乙烯、芸苔素内酯、水杨酸和甲基茉莉酸可抑制其表达。利用基因工程手段获得了柑橘过表达 *CsCysP* 的 5 个转基因株系。

关键词: 柑橘; 半胱氨酸蛋白酶; 逆境; 基因表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0621-10

Isolation, Subcellular Localization and Expression Analysis of a Citrus Cysteine Protease Gene, *CsCysP*

MA Yan-yan¹, ZHANG Jun¹, CHEN Jiao¹, ZHANG Ling-yun¹, ZHU Shi-ping¹, YAN Shu-tang¹, and ZHONG Guang-yan^{2,*}

(¹College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400715, China; ²Institution of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A cysteine protease gene, *CsCysP* (KJ093387), was cloned from the fruit abscission zone of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) ‘Olinda’] using RT-PCR and RACE. The 1 485 bp full-length cDNA of *CsCysP* contains a 1 083 bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 360 amino acid residues. Comparison between cDNA and genomic DNA sequences showed that the gene contains three introns. The phylogenetic analysis placed the gene into papain-like (C1A) group. BLASTp analysis showed that *CsCysP* protein shared 73% – 83% amino acid identities with CPRs from *Arabidopsis thaliana*, soybean, tobacco, *Populus trichocarpa* and other species. Transient expression of a 35S-*CsCysP*-GFP fusion gene

收稿日期: 2014-01-13; 修回日期: 2014-03-17

基金项目: 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201203075-07); 重庆市科技攻关计划项目 (CSTTC, 2007AA1018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gy_zhong@163.com)

in onion epidermal cells revealed that CsCysP protein was localized in cell wall. Quantitative Real-time PCR results showed that the expression of *CsCysP* was higher in senescent leaves, fruit abscission zone cells and flowers than in leaves, stems and roots of young seedlings. *CsCysP* was induced by salt, PEG6000 and ABA but repressed by low temperature, ethylene(ET), brassinolide(BR), methyl jasmonic acid (MeJA) and salicylic acid (SA). Five transgenic citrus lines overexpressing *CsCysP* were also obtained in this study and will be further characterized.

Key words: citrus; cysteine protease; stress; gene expression

半胱氨酸蛋白酶(CPR)是一类重要的蛋白水解酶(van der Renier et al., 2004),主要参与植物生长和发育进程中蛋白的降解,在种子萌发(Toyooka et al., 2000)、果实发育和成熟(Priolo et al., 2000)、器官衰老与脱落(Smart et al., 1994)中起重要作用。半胱氨酸蛋白酶也参与植物对外界生物和非生物胁迫的响应以及细胞程序性死亡(Esteban-García et al., 2010)。Rawlings等(2010)把半胱氨酸蛋白酶大致分为15个家族,分属于5大类。包括C1: Papain, 木瓜蛋白酶; C2: Calpain, 钙依赖半胱氨酸蛋白酶; C12: 催化蛋白去泛素化的半胱氨酸蛋白酶; C13: Legumain, 豆类天冬氨酸蛋白内切酶; C14: 天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶; C19: 蛋白酶体(Basset et al., 2002; 闫龙凤等, 2005; Rawlings et al., 2010)。

Papain-like 蛋白家族(C1A)是植物半胱氨酸蛋白酶的主要成员,定位在液泡或者细胞壁上(闫龙凤等, 2005)。近年来在拟南芥(Beers et al., 2004; Watanabe & Lam, 2005)、大豆(Nong et al., 1995; Esteban-García et al., 2010)、烟草(Beyene et al., 2006)和水稻(Lee et al., 2004)等植物中对这类基因已有大量研究,但是在多年生木本植物中报道较少。Papain-like 半胱氨酸蛋白酶主要是从衰老器官中分离,如老化的叶片(Drake et al., 1996)、花(Eason et al., 2002)和成熟的果实(Priolo et al., 2000)等。Beyene等(2006)在烟草成熟叶片中分离到了C1A家族基因*NtCP2*,并研究了该基因在不同逆境下的差异性表达,发现其可能在程序性死亡过程中起作用。

本试验以‘奥林达’夏橙[*Citrus sinensis* (L.) ‘Olinda’]果萼离层细胞为材料,通过RT-PCR和RACE技术获得了1个半胱氨酸蛋白酶基因,研究了该基因在不同非生物胁迫和外源激素处理条件的表达模式,还利用洋葱表皮细胞瞬时转染技术对该基因的蛋白进行了亚细胞定位。同时还获得了柑橘过表达该基因的转基因植株。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

于2012年4—5月在中国农业科学院柑桔研究所资源圃,取多年生‘奥林达’夏橙植株的花、老叶(前1年秋梢叶片)和成熟果实(切取果萼离层),并将由种子萌发生长1个月的幼苗分离为根、茎、叶,速冻于液氮中并在-80℃下保存备用。

‘奥林达’种子依次用1 mol·L⁻¹的NaOH处理30 min, 3%次氯酸消毒30 min、无菌水清洗3~5遍,然后将种子播于MS培养基上,在28℃、16 h光照/8 h黑暗条件下培养4周。

分别用20 μmol·L⁻¹ BR、20 μmol·L⁻¹ GA₃、2 mmol·L⁻¹ MeJA和100 μmol·L⁻¹ SA处理幼苗12 h。取幼苗放入含约20 mg·L⁻¹乙烯的密闭容器(50 L)中处理4、12、24、48 h。

另外取幼苗分别用100 μmol·L⁻¹ ABA、4℃低温、250 mmol·L⁻¹ NaCl、20%的PEG6000处理0、2、4、8、12和24 h。每个处理重复3次。

收集上述各处理的幼苗并立即用液氮速冻、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

用于转基因试验的‘奥林达’种子按上述方法消毒处理, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的黑暗条件下培养 3 周, 然后在 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 1 周备用。

1.2 DNA 和 RNA 的提取与 cDNA 的合成

利用 CTAB 法提取‘奥林达’夏橙叶片的 DNA (Cheng et al., 2003)。使用天根公司 RNAPrep pure Kit 试剂盒提取‘奥林达’夏橙植株的花、老叶、果萼离层, 1 个月龄幼苗的根、茎、叶及处理后幼苗的总 RNA。使用 TaKaRa 公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 基因克隆与序列分析

根据本实验室前期工作分析得到的柑橘基因组芯片数据 (Citrus Genome Array, Affymetrix), 发现 1 个半胱氨酸蛋白酶类似基因的表达 (探针号为 Cit.4078.1.S1-at) 受乙烯抑制 (张凌云, 2010)。利用 HarvEST Citrus1.25 EST 数据库中查找该探针号对应的 EST 序列, 根据 EST 序列设计基因特异性引物 A1 和 B1 (表 1), 并结合 5'和 3'RACE 技术扩增获得该基因的全长, 操作过程按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的说明进行。

用 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析氨基酸序列同源性。用在线软件 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 分析蛋白保守结构域。用 DNASTar 分析蛋白的相对分子量和等电点。多重序列比对分析使用 MEGA5.1。

1.4 实时荧光定量分析

CsCysP 基因表达模式分析采用该基因特异引物 C1/C2, 用作内参的基因为柑橘 *Actin*, 引物为 D1/D2 (表 1)。定量实时 PCR 使用 SYBR Premix Ex *Taq*TM II (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连) 试剂盒, 在 iCycler[®] Thermal Cycler 荧光定量 PCR 仪 (Bio-RAD, USA) 上进行。PCR 反应体系 (20 μL) 包含 10 μL Premix Ex *Taq* (2 \times)、0.5 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、0.5 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、1 μL 总 cDNA。PCR 反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 90 s 后按如下参数循环 40 次: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 循环完成后在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下延伸 90 s。分析溶解曲线, 以检测引物是否可用。设置 3 次生物学重复和 3 个计数重复。数据分析按照公式: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{CsCysP}} - \text{Ct}_{\text{Actin}}$ 计算。使用 Spass19.0 软件进行数据统计分析。

1.5 亚细胞定位载体的构建和定位分析

根据 *CsCysP* 的 ORF 序列 (去除终止密码子) 设计分别含有 *Bam*H I, *Sam* I 酶切位点的引物 E1/E2 (表 1), 利用双酶切把该片段插入到含有报告基因 *GFP* 的 PBI121 载体中, 构成含有 35S-*CsCysP*-*GFP* 的融合表达载体, 把该载体转化到农杆菌 LBA4404 中。

采用 Sun 等 (2007) 报道的农杆菌介导洋葱表皮细胞瞬时表达蛋白定位方法, 将上述带融合载体的农杆菌侵染洋葱表皮, 并将侵染后的洋葱表皮置于 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下黑暗培养 36 h 左右, 然后在荧光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白的亚细胞定位。

1.6 过量表达载体构建以及转基因检测

使用 pFGC5941 来构建 *CsCysP* 的超表达载体。将 *CsCysP* 的全长 cDNA 利用 *Sam* I, *Asc* I (克隆引物 F1/F2 上的酶切位点) (表 1) 处理, 正向插入到同样消化后的载体中。

用冻融法把构建好的载体导入农杆菌 LBA4404 中, 转化奥林达无菌苗茎段 (Boscariol et al., 2003), 用 $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘磷除草剂 (PTT) 筛选转基因再生芽。将抗性芽嫁接到砧木上, 待植株长

出 4~5 片新叶后提取叶片 DNA，用 PCR 检测是否含有 T-DNA 插入区的 Bastar 抗性位点序列（引物 G1/G2），及 qRT-PCR 检测 *CsCysP* 在转基因植株中的表达量。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Use
A1	CCTCAACGATTCCCAGAACCAAAGC	5'RACE
B1	GCAACAAACCCAACAGGACCTTCAG	3'RACE
C1	TTGGTTCTGGGAATCGTTGAG	qRT-PCR
C2	TTGTAAGGCTTGTCATCTTGTTAG	qRT-PCR
D1	CCCCATCGTTACCGTCCAG	qRT-PCR
D2	CGCCTTGCCAGTTGAATATCC	qRT-PCR
E1	<u>GGATCC</u> GCCAGGTCGTTCTTGCCAGTATCAGCC	<i>CsCysP</i> ORF
E2	<u>CCCGGG</u> GAGCTCATCCTTAGGATAATCTGAAGGTCCTGTG	<i>CsCysP</i> ORF
F1	<u>GGCGCGCC</u> GCCAGGTCGTTCTTGCCAGTATCAG	过表达载体构建 Overexpression vector construct
F2	<u>CCCGGG</u> AAGCCAAAGACAATAGTGAACCGTG	过表达载体构建 Overexpression vector construct
G1	ACAAAGACAGATAAAGCCACGCACA	转基因植物鉴定 Identified transgenic plants
G2	GCACCATCGTCAACCACTACATCG	转基因植物鉴定 Identified transgenic plants

注：下划线部分 GGATCC、CCCGGG 和 GGCGCGCC 分别添加 *Bam*H I、*Sam* I 和 *Asc* I 酶切位点。

Note: The underlined sequences ‘GGATCC’, ‘CCCGGG’ and ‘GGCGCGCC’ in the primers represent restriction enzyme sites of *Bam*H I, *Sam* I and *Asc* I, respectively.

2 结果与分析

2.1 奥林达夏橙果萼离层 *CsCysP* 基因克隆及序列分析

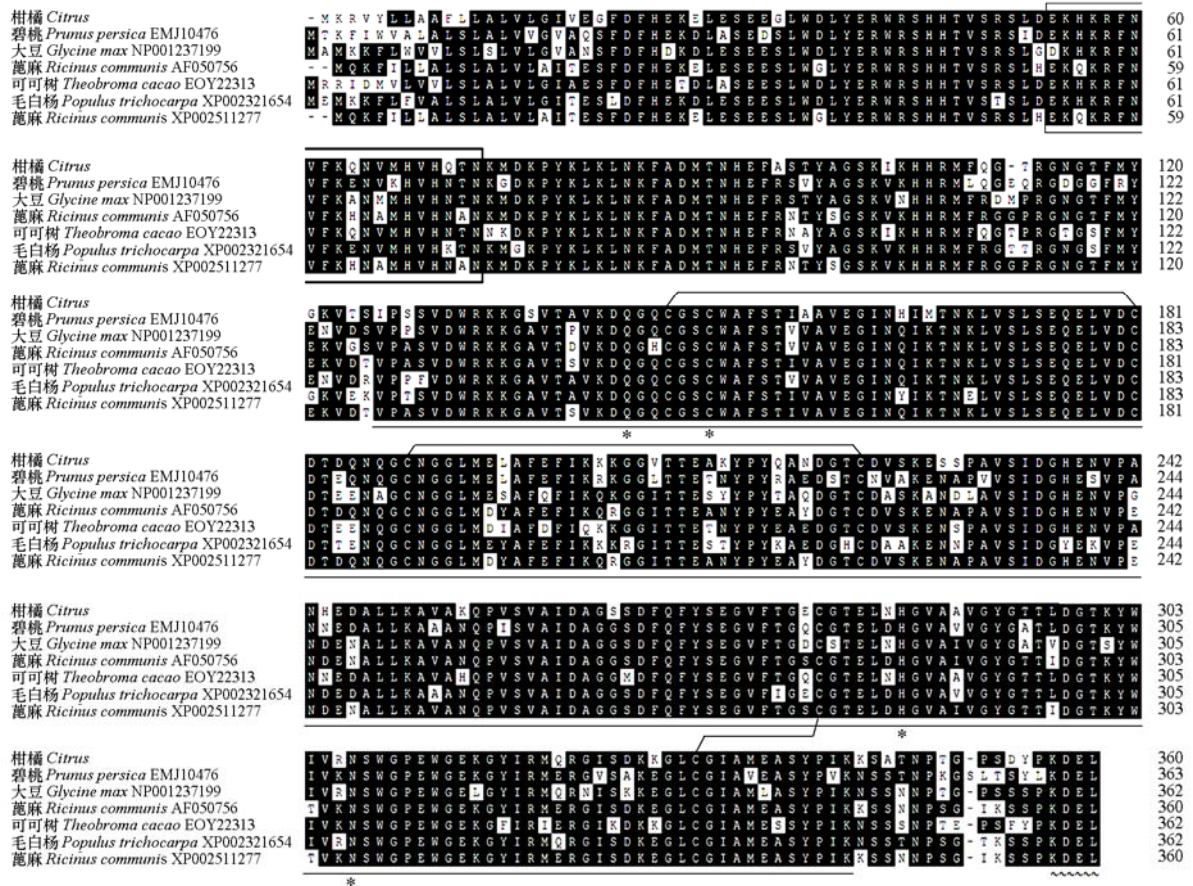
根据前期工作中柑橘基因组芯片数据，发现一个半胱氨酸蛋白酶类似基因的表达受乙烯抑制，其探针号为 Cit.4078.1.S1-at(张凌云, 2010)。根据探针号信息在柑橘数据库(HarvEST Citrus1.25 EST)找到对应的 EST 序列，利用 EST 序列结合 RACE 技术获得该基因的 cDNA 全长，并命名为 *CsCysP* (GenBank 登录号: KJ093387)。*CsCysP* 的 cDNA 全长是 1 485 bp，开放阅读框长 1 083 bp，预测所编码的蛋白含 360 个氨基酸残基，分子量 39.9 kD，等电点 6.8。*CsCysP* 的 cDNA 的序列与基因组序列比对发现，其含有 3 个内含子（图 1）。



图 1 *CsCysP* 基因组序列结构
Fig. 1 The genomic structure of the *CsCysP* gene

生物信息分析显示，*CsCysP* 蛋白不但含有半胱氨酸家族的保守区域，而且还含有 Papain-like 蛋白家族共有的 4 个活性位点相关氨基酸残基 Gln-Cys-His-Asn/Asp，以及 ERFNIN 和 KDEL-tail 保守位点（图 2）。

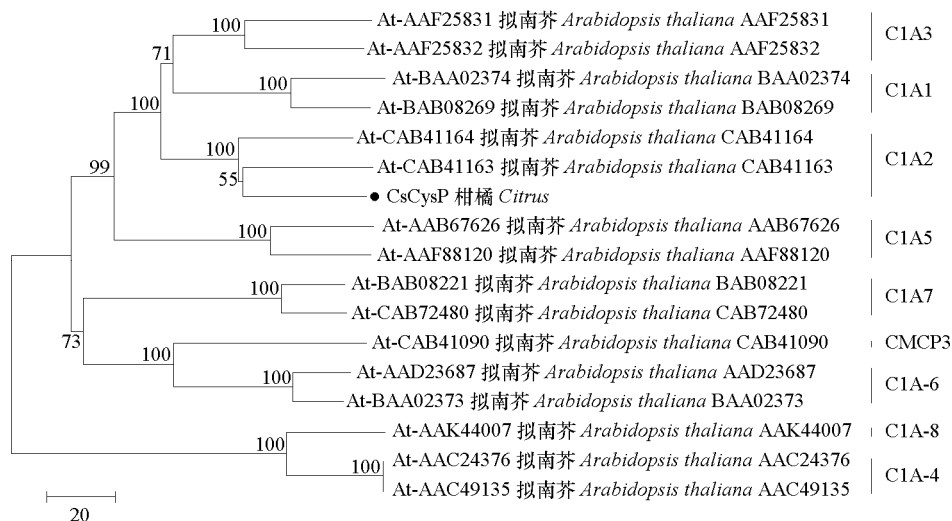
使用 MEGA5.1 构建 *CsCysP* 蛋白和拟南芥 C1A 类蛋白的氨基酸序列进化树，显示 *CsCysP* 聚类到 C1A-2 组（图 3）。

图2 *CsCysP* 与其他物种半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列比对

下划线: 保守区; * 催化位点; 方框: ERFNIN 保守区; 折线: 半胱氨酸残基形成二硫键桥连接位置; 波浪线: C 端 KDEL 保守位点。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment between *CsCysP* and its homologous cysteine protease proteins from other species

The underlined is the conservative region; * indicates catalysis pocket; Rectangular box represents the ERFNIN motif; Connecting lines showed the cysteine residues involved in the formation of disulfide bridges. Break line: KDEL domain in C terminus.

图3 柑橘 *CsCysP* 与拟南芥相似蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

分支处的数值表示支持率; 标尺为分支长度标准。

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Citrus CsCysP* and its homologs from *Arabidopsis thaliana*

Numbers beside the branches indicate the support rate; The scale indicates the branch length standard.

2.2 CsCysP 蛋白的亚细胞定位

35S-*CsCysP*-*GFP* 融合表达载体转化细胞的细胞壁有激发荧光, 而表达 35S-*GFP* 载体的细胞在整个细胞中都有分散荧光信号 (图 4), 说明 *CsCysP* 蛋白定位在细胞壁上。

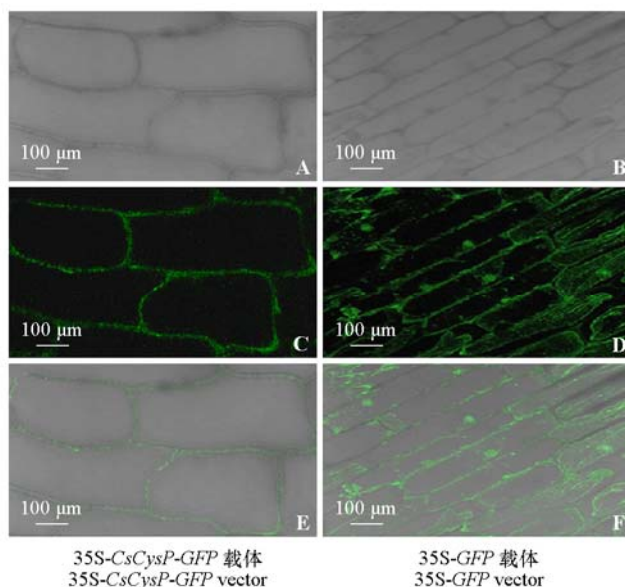


图 4 *CsCysP* 和 *GFP* 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

A, B: 白光下; C, D: 荧光显微镜下, *CsCysP*-*GFP* 和 *GFP* 蛋白的绿色荧光信号; E: A 和 C 的重叠图像; F: B 与 D 的重叠图像。

Fig. 4 The transient expression of *CsCysP* and *GFP* in onion cells

A, B: Bright-field images; C, D: Fluorescent images of the cells expressing *CsCysP*-*GFP* and *GFP* respectively;

E: Image overlaying A and C; F: Image overlaying B and D.

2.3 *CsCysP* 基因表达分析

2.3.1 *CsCysP* 在各个组织器官的表达特异性和外源激素处理对 *CsCysP* 表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *CsCysP* 在柑橘不同组织中的表达, 结果 (图 5) 显示 *CsCysP* 在成熟果实的果萼离层、老叶和花中表达量较高, 而在 1 个月龄幼苗的根、茎、叶中的表达很低。

甲基茉莉酸 (MeJA)、水杨酸 (SA)、芸薹素内酯 (BR) 处理 12 h 在一定程度上抑制了 *CsCysP* 的表达, 而赤霉素 (GA_3) 对 *CsCysP* 的表达没有明显的影响 (图 6)。

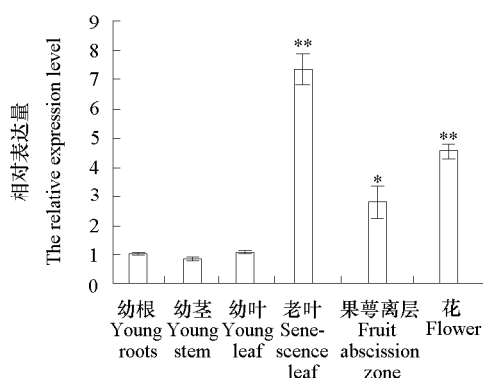


图 5 *CsCysP* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *CsCysP* gene in different tissues

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

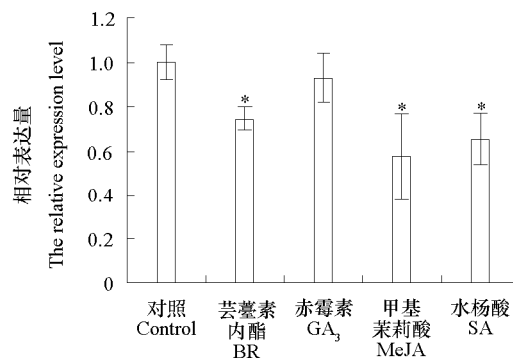


图 6 *CsCysP* 基因在不同外源激素处理下的表达量

Fig. 6 Changes in expression of *CsCysP* gene under treatments of exogenous plant hormones

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

如图 7 所示, *CsCysP* 表达在乙烯处理 4 ~ 24 h 时被明显抑制, 48 h 时恢复到正常水平; 脱落酸 (ABA) 处理, *CsCysP* 的表达迅速上升, 12 h 升至最高, 并维持该水平至 24 h。

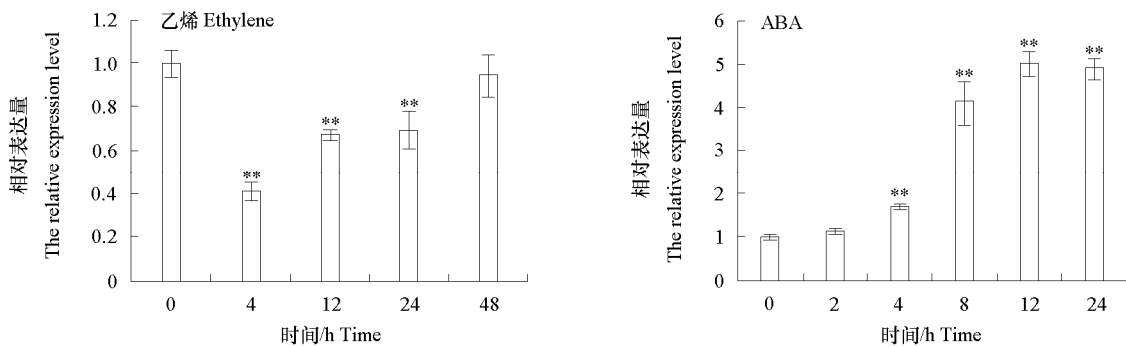


图 7 *CsCysP* 在乙烯和 ABA 处理下的表达量

Fig. 7 Changes in expression of *CsCysP* gene under treatments of ethylene and ABA

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3.2 外界非生物胁迫条件下 *CsCysP* 的表达

在 4 °C 冷害胁迫下, *CsCysP* 表达在 4 h 降至最低, 至 12 h 后恢复正常 (图 8)。在脱水胁迫 (20% PEG6000) 下, *CsCysP* 在前 8 h 内小幅下降, 12 h 骤然升高并维持至 24 h。在 250 mmol · L⁻¹ 的 NaCl 处理下, *CsCysP* 响应在前期较慢, 8 h 后大幅升高, 较对照上升 4 倍, 处理至 24 h 时还呈上升趋势。

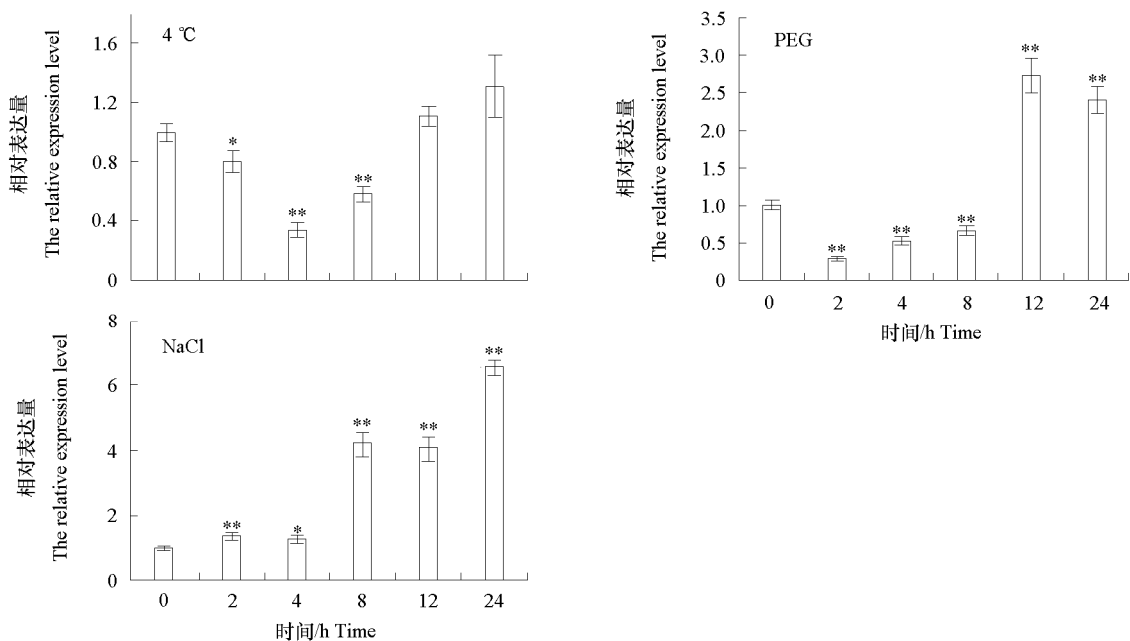


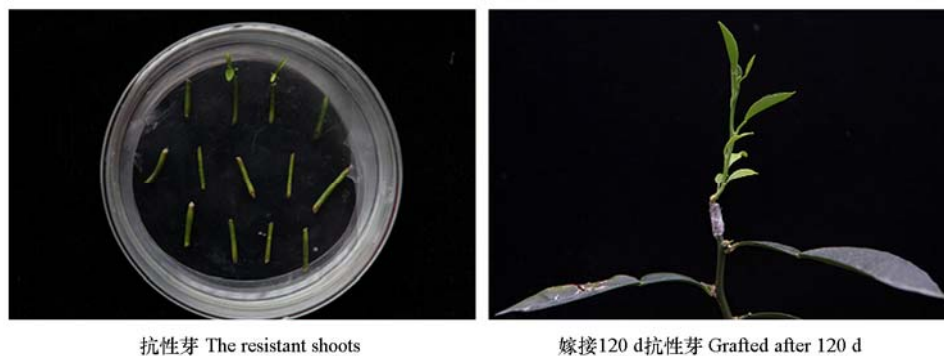
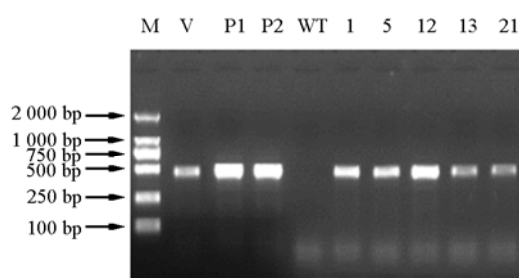
图 8 非生物胁迫下 *CsCysP* 的相对表达量

Fig. 8 Changes in expression of *CsCysP* gene under various abiotic stresses

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 *CsCysP* 转基因植株的鉴定和表达分析

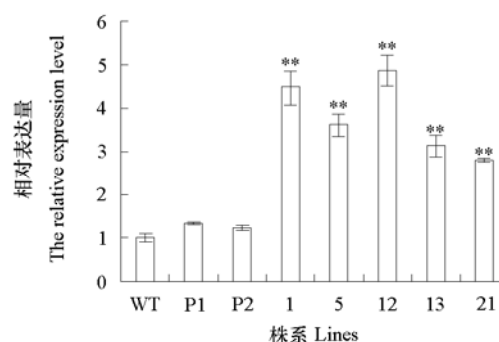
为了进一步了解 *CsCysP* 的功能, 构建了 *CsCysP* 的超表达载体, 通过农杆菌介导转化, 获得 28 个嫁接成活的抗性芽 (图 9)。PCR 检测结果显示 5 株呈转基因阳性, 转化率在 10% ~ 20% 之间 (图 10)。实时荧光定量 PCR 分析显示, 与非转基因株系 (WT) 相比, 转基因株系中的 *CsCysP* 表达量显著提高 (图 11)。

图9 *CsCysP* 转基因柑橘植株Fig. 9 *CsCysP* transgenic plants by PCR and the expression of *CsCysP* gene in transgenic plants图10 *CsCysP* 转基因柑橘植株的PCR鉴定

P1和P2是空载转基因株系，V代表载体质粒对照，WT是非转基因植株，1、5、12、13、21是阳性转基因株系，下同。

Fig. 10 Identification of *CsCysP* transgenic plants by PCR

P1/P2: Lines transformed with empty vector; V: Plasmid as PCR control; WT: Non-transgenic plant; 1, 5, 12, 13, 21: Transgenic lines containing *CsCysP* transgene. The same below.

图11 转基因柑橘植株中 *CsCysP* 的表达

以WT株系的数据作为基数进行比较;

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig. 11 The expression of *CsCysP* gene in transgenic plants

The data of WT line was used as basis for relative comparison;

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

本试验中得到的 Papain-like 半胱氨酸蛋白酶的 cDNA 全长，其氨基酸序列具有 Papain-like 蛋白的保守结构，且与木本植物毛果杨中半胱氨酸蛋白酶 CPR 的相似性最高，达到 83%。植物界中的 Papain-like 半胱氨酸蛋白酶可以划分为 9 个亚家族 (Richau et al., 2012)，*CsCysP* 属于 C1A-2 亚组。

C1A-2 类蛋白的主要特点是在 C-端含有 KDEL 保守序列，KDEL 是内质网 (ER) 滞留信号 (Okamoto et al., 2003)。CPRs 蛋白多被报道定位在液泡或细胞壁上。本试验证实 *CsCysP* 定位在细胞壁上，表明该蛋白酶的作用位点在胞外，但这与带 KDEL 的蛋白在蛋白分拣时回流内质网的一般规律似乎矛盾。最近有报道，*Lilium longiflorum* LICYP 蛋白在幼叶中的确定位在细胞壁上，但在花衰老时定位在液泡，故液泡是 LICYP 的作用位点，删除 KDEL 后叶片表现早衰 (Battelli et al., 2014)。

Papain-like 半胱氨酸蛋白酶基因家族成员众多，表达的组织特异性强 (Ling et al., 2003; Richau et al., 2012)。茄属中的 *SmCP* 在叶片衰老、果实脱落、珠心细胞退化以及其他的衰老过程中都有表达 (Xu & Chye, 1999)。Beyene 等 (2006) 报道两个烟草 C1A 亚家族基因 *NtCP1* 和 *NtCP2* 在不同组织中差异表达，*NtCP1* 被认为是衰老特异基因，主要在老化的叶片中表达，而 *NtCP2* 的表达只在成熟的绿叶中检测到，被认为有可能与细胞程序性死亡相关。与 *CsCysP* 一样，*NtCP2* 含有 KDEL，

属于 C1A-2 家族。本研究中的 qRT-PCR 结果显示 *CsCysP* 在老叶、成熟的花瓣和脱落果萼离层中表达量较高,而在幼苗中表达量低,说明 *CsCysP* 应是一个衰老或者程序性死亡相关的蛋白酶基因,可能在器官脱落中起重要作用。

Papain-like 半胱氨酸蛋白酶基因不仅与植物的衰老相关,同时也参与信号传导响应外界环境中的生物和非生物胁迫(Grudkowska & Zagdanska, 2004; Chen et al., 2010; Parrott et al., 2010; Martínez et al., 2012)。拟南芥 *RD19* 的表达受高盐和渗透胁迫的强烈诱导(Koizumi et al., 1993; Xiong et al., 2002; Bernoux et al., 2008), *RD19* 的同源基因 *BoCP4* 也强烈应答脱水胁迫,但是受水淹胁迫和高糖的抑制(Coupe et al., 2003)。甘薯的 Papain-like 基因 *SPCP2* 被认为与衰老相关,过表达该基因的拟南芥植株表现出营养生长到生殖生长的进程加快,伴有耐盐和耐旱能力的增强(Chen et al., 2010)。在本试验中, *CsCysP* 同样受高盐和脱水胁迫诱导,但受冷处理抑制。激素是重要的信号传导诱发因素,如甘薯 *SPCP2* 被 ET、ABA 和 SA 诱导(Chen et al., 2010)。在本试验中 *CsCysP* 强烈响应 ABA 信号,但是被 ET、SA 和 MeJA 抑制,说明 *CsCysP* 可能通过正调控或者负调控参与多重信号传导途径。

CsCysP 在幼嫩组织或细胞中基本不表达,只有在细胞衰老时才大量表达,对逆境也有积极响应,其蛋白又定位在细胞壁,表明其可能参与衰老进程中的蛋白质降解,但具体功能仍不甚明了。今后将利用已获得的柑橘转基因植株研究 *CsCysP* 的功能。

References

- Basset G, Raymond P, Malek L, Brouquisse R. 2002. Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. Evidence for an *in vivo* oxidation of the proteasome. *Plant Physiology*, 128 (3): 1149 – 1162.
- Battelli R, Lombardi L, Picciarelli P, Lorenzi R, Frigerio L, Rogers H J. 2014. Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant Science*, 214: 38 – 46.
- Beers E P, Jones A M, Dickerman A W. 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 65 (1): 43 – 58.
- Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Brière C, de Wit P J, Marco Y, Deslandes L. 2008. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *The Plant Cell Online*, 20 (8): 2252 – 2264.
- Beyene G, Foyer C H, Kunert K J. 2006. Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57 (6): 1431 – 1443.
- Boscariol R L, Almeida W A B, Derbyshire M T V C, Mourao Filho F A A, Mendes B M J. 2003. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Reports*, 22 (2): 122 – 128.
- Chen H J, Su C T, Lin C H, Huang G J, Lin Y H. 2010. Expression of sweet potato cysteine protease *SPCP2* altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Journal of Plant Physiology*, 167 (10): 838 – 847.
- Cheng Y J, Guo W W, Yi H L, Pang X M, Deng X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21 (2): 177 – 178.
- Coupe S A, Sinclair B K, Watson L M, Heyes J A, Eason J R. 2003. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during postharvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 54 (384): 1045 – 1056.
- Drake R, John I, Farrell A, Cooper W, Schuch W, Grierson D. 1996. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 30 (4): 755 – 767.
- Eason J R, Ryan D J, Pinkney T T, O'Donoghue E M. 2002. Programmed cell death during flower senescence: Isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca*. *Functional Plant Biology*, 29 (9): 1055 – 1064.
- Esteban-García B, Garrido-Cárdenas J A, Alonso D L, García-Maroto F. 2010. A distinct subfamily of papain-like cysteine proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *Journal of Plant Physiology*, 167 (13): 1101 – 1108.

- Grudkowska M, Zagdanska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (3): 609 – 624.
- Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K. 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 129 (2): 175 – 182.
- Lee S, Jung K H, An G, Chung Y Y. 2004. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, *OsCP1*, using T-DNA gene-trap system. *Plant Molecular Biology*, 54 (5): 755 – 765.
- Ling J Q, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H. 2003. Cloning of two cysteine proteinase genes, *CysP1* and *CysP2*, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Structure and Expression*, 1627 (2): 129 – 139.
- Martínez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaría M E, Díaz I. 2012. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum*, 145 (1): 85 – 94.
- Nong V H, Becker C, Müntz K. 1995. cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Structure and Expression*, 1261 (3): 435 – 438.
- Okamoto T, Shimada T, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Minamikawa T. 2003. C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiology*, 132 (4): 1892 – 1900.
- Parrott D L, Martin J M, Fischer A M. 2010. Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: A family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist*, 187 (2): 313 – 331.
- Priolo N, del Valle S M, Arribère M C, López L, Caffini N. 2000. Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of Protein Chemistry*, 19 (1): 39 – 49.
- Rawlings N D, Barrett A J, Bateman A. 2010. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38 (suppl 1): 227 – 233.
- Richau K H, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya T C, Niessen S, Stüber K, van der Hoorn R A. 2012. Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology*, 158 (4): 1583 – 1599.
- Smart C M. 1994. Tansley review No. 64. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, 126 (3): 419 – 448.
- Sun W, Cao Z, Li Y, Zhao Y, Zhang H. 2007. A simple and effective method for protein subcellular localization using *Agrobacterium*-mediated transformation of onion epidermal cells. *Biologia*, 62 (5): 529 – 532.
- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T. 2000. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum – derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *The Journal of Cell Biology*, 148 (3): 453 – 464.
- van der Hoorn R A, Leeuwenburgh M A, Bogyo M, Joosten M H, Peck S C. 2004. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiology*, 135 (3): 1170 – 1178.
- Watanabe N, Lam E. 2005. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (15): 14691 – 14699.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu J K. 2002. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABAI* locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (10): 8588 – 8596.
- Xu F X, Chye M L. 1999. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *The Plant Journal*, 17 (3): 321 – 327.
- Yan Long-feng, Yang Qing-chuan, Han Jian-guo, Liu Zhi-peng. 2005. Summary of cysteine protease in plants. *Acta Prataculturae Sinica*, 14 (5): 11 – 19. (in Chinese)
- 闫龙凤, 杨青川, 韩建国, 刘志鹏. 2005. 植物半胱氨酸蛋白酶研究进展. *草业学报*, 14 (5): 11 – 19.
- Zhang Ling-yun. 2010. Transcriptome profiling of genes involved in ethylene-induced fruit abscission, cloning and characterization of ethylene-regulated genes in *Citrus sinensis* [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 张凌云. 2010. 乙烯诱导柑橘果实脱落的转录基因组学研究及乙烯诱导基因的克隆和鉴定 [博士论文]. 重庆: 西南大学.