

蜜柚泛素蛋白连接酶 RING-H2 finger 基因的克隆与表达分析

金晓琴, 康 振, 刘伟娜, 潘永娟, 王梨嬛, 郭卫东, 杨 莉*

(浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

摘 要: 在 26S 泛素蛋白酶体途径介导的蛋白质降解过程中, RING finger 蛋白是一类特殊的泛素蛋白连接酶, 参与植物多个生长发育及逆境胁迫响应过程。为探明柚 RING finger 家族成员的序列特征及表达模式, 从红肉蜜柚和琯溪蜜柚果实汁胞中分离出两个 RING finger 基因 cDNA 片段 (*CgRHF1* 和 *CgRHF2*), 采用实时荧光定量 PCR 研究其在不同组织及果实发育不同时期的表达模式。结果表明, 两个基因均属于 RING-H2 finger 家族成员, 且红肉蜜柚与琯溪蜜柚的两个 *CgRHF* 之间碱基序列均无差异; 除根组织外, *CgRHF1* 表达水平较 *CgRHF2* 高, 且在红肉蜜柚茎、叶和花中的表达水平显著高于琯溪蜜柚; *CgRHF2* 在组织及果实发育过程表达水平均较低, 但在果实成熟采摘阶段急剧上升。*CgRHF1* 与 *CgRHF2* 表达模式的差异暗示这两个基因在柚组织及果实发育进程中行使不同的生物学功能, 而非功能互补基因。

关键词: 红肉蜜柚; 琯溪蜜柚; RING-H2 finger 基因; 克隆; 基因表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 08-1689-10

Isolation and Expression Analysis of Two Ubiquitin-protein Ligase RING-H2 Finger Genes from Pommelos [*Citrus grandis* (L.) Osbeck]

JIN Xiao-qin, KANG Zhen, LIU Wei-na, PAN Yong-juan, WANG Li-huan, GUO Wei-dong, and YANG Li*

(College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

Abstract: RING (Real Interesting New Gene) finger proteins specify the substrates in the 26S ubiquitin-proteasome pathway, and play important roles in plant development and stress responses. However, the sequences, expression characteristics and physiological functions of RING finger genes in pommelo are little known. In this study, two RING finger (*CgRHF1* and *CgRHF2*) cDNA fragments were isolated from Red-fleshed and Guanxi pommelo. The results showed that two *CgRHF*s were belonged to RING-H2 finger subfamilies, and there is no DNA base difference in the sequences of two cultivars. Quantitative real-time PCR results showed that gene expression of *CgRHF1* is significantly higher than *CgRHF2*, especially in the stems, leaves and flowers of red-fleshed pommelo. The expression levels of *CgRHF2* were relatively low in the tissues and fruit development of two pommelo cultivars, but dramatically increased at the fruit mature stage. This study has implied that *CgRHF1* and *CgRHF2* may play different roles in the tissues and fruit development of Red-fleshed and Guanxi pommelo, and can not functionally complement.

收稿日期: 2014-03-04; **修回日期:** 2014-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900978); 浙江省自然科学基金项目 (LY14C150001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yangli@zjnu.cn)

Key words: red-fleshed pommelo; Guanxi pommelo; RING-H2 finger gene; clone; gene expression

26S 泛素蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway) 是已知真核生物中主要的蛋白质降解途径, 通过调节功能蛋白周转和降解异常蛋白, 实现对多种代谢过程的调节, 在细胞周期、信号转导、细胞分裂与分化、胁迫反应和细胞程序性死亡等细胞生理活动中起重要作用 (Frescas & Pagano, 2008; Bedford et al., 2009; Hochstrasser, 2009; Navon & Ciechanover, 2009)。泛素蛋白酶体途径的具体过程是: 由 ATP 提供能量, 泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzymes, E1) 激活泛素, 并将泛素转移至泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzymes, E2) 的活性位点半胱氨酸 (Cys), 形成 E2-泛素复合物; 泛素蛋白连接酶 (ubiquitin-protein ligases, E3) 能识别靶蛋白, 将 E2 和靶蛋白在空间上拉近, 促进 E2 将泛素转移至靶蛋白, 或是 E2 将泛素转移至 E3, 由 E3 转移泛素至靶蛋白。当靶蛋白泛素化水平达到一定程度后, 转运至 26S 蛋白酶体进行降解 (Moon et al., 2004; Li et al., 2011; Wang & Deng, 2011)。26S 泛素蛋白酶体途径是目前已知的具有高度选择性的蛋白质降解途径, 是生命过程进行精确时空调控的重要方式 (Hochstrasser, 2009), 拟南芥中约有 5% 的蛋白质参与该途径 (Stone et al., 2005)。

26S 蛋白酶体主要存在于细胞质与细胞核, 识别泛素化的蛋白并将其降解是一非特异性的过程。因此 E3 连接酶在此过程中发挥了至关重要的作用, 决定反应的特异性。在泛素介导的选择性蛋白降解途径中, E3 连接酶是识别靶蛋白 N 端不稳定氨基酸信号的关键酶 (宋素胜和谢道昕, 2006; Budhidarmo et al., 2012)。目前发现的 E3 连接酶主要有 HECT (homologous to E6-AP carboxy terminus) 结构域家族、RING (Real Interesting New Gene) finger 结构域家族和 U-box (Ubiquitin chain elongation factor) 结构域家族 3 大类。其中 RING 结构域家族是一个庞大的蛋白家族, 其环指结构域 (RING finger domain) 是 RING finger 类蛋白具有 E3 连接酶功能的重要结构。标准的 RING finger 蛋白包含 1 个至多个特定位置的 Cys 和组氨酸 (His) 残基组成的锌指结构域, 由两个 Zn^{2+} 和相应的氨基酸残基形成 “cross-brace” 结构, 将 E2 和靶蛋白拉近, 从而使 E2-泛素复合物上的泛素高效地转移至靶蛋白 (Lecker et al., 2006; Metzger et al., 2012)。根据 Zn^{2+} 结合残基 Cys 和 His 的数量与位置不同, RING finger 家族又可分为 RING-HC、RING-H2、RING-v、RING-C2、RING-D、RING-S/T、RING-G、RING-mH2 和 RING-mHC 9 大亚类 (Li et al., 2011)。现有研究表明, RING finger 蛋白家族成员独立或以多亚基复合体的形式在光形态建成、激素反应、生理节奏、胁迫反应、种子粘液、木质化以及花的发育等过程中起到十分重要的作用 (Osterlund et al., 2000; Ma et al., 2002; Molnar et al., 2002; Xu & Li, 2003; Guo & Ecker, 2004; Moon et al., 2004; Seo et al., 2004; Kepinski & Leyser, 2005; Serrano et al., 2006; 刘辉志和韩世平, 2010; 李彦泽, 2011; Wang & Deng, 2011)。Welsch 等 (2007) 发现包含 RING finger 结构域的 SINAT2 (SEVEN in ABSENTIA of *Arabidopsis*2), 可能与转录因子 AtRAP2.2 共同调控拟南芥类胡萝卜素含量, 是否存在其他 E3 连接酶参与调控植物类胡萝卜素的生物合成与代谢尚不清楚。此外, 本实验室前期基因芯片分析发现一个 RING-H2 finger 基因在琯溪蜜柚及其突变体红肉蜜柚中的表达具有较大差异。作者从两种蜜柚中分别分离出两个 RING-H2 finger 基因, 研究其在不同组织及果实不同发育时期的表达规律, 为进一步研究该基因在特异靶蛋白选择性降解过程中的作用, 以及红肉蜜柚果实变异的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为福建省平和县小溪镇锦盛公司育种基地的 10 年生琯溪蜜柚及其红肉早熟突变体红

肉蜜柚。于 2012 年 4 月采集幼嫩的须根, 春梢(茎), 完全伸展的叶片, 盛花期的全花, 以及盛花期后 75、105、135、165 和 195 d 的果实汁胞, 样品用液氮速冻后于 -80°C 贮存备用。

试验所使用的实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 仪为 Applied Biosystem 公司 StepOne PlusTM PCR 仪, FastStart Universal SYBR Green Master 购自 Roche 有限公司, qPCR 8 连管和管盖购自杭州宝诚生物技术有限公司, RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司, NEB (New England Biolabs) Phusion DNA 聚合酶购自上海基因科技有限公司, 限制性内切酶、pMD18-T 载体、DNase I、T4 DNA 连接酶、DNA marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物(表 1)由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

参照徐昌杰等(2004)建立的改良 Bugos 法提取样品总 RNA, DNase I 去除残留的基因组 DNA。提取出的总 RNA 经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测质量与浓度后, 取 $1.5\ \mu\text{g}$ 参照使用说明合成 cDNA 一链和二链, 保存于 -20°C 备用。

1.3 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 的分离

根据 NCBI 数据库 RING finger 基因序列(CK936064.1 与 CX668248.1)为探针, 通过 HarvEST: Citrus 软件(<http://harvest.ucr.edu/>)相应的柑橘 ESTs, 拼接成两条一致性的 RING-H2 finger 序列。根据获取序列分别设计引物, 以柚 DAF105 d 果实汁胞 cDNA 二链为模板, 采用 Phusion DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: cDNA 二链 $0.5\ \mu\text{L}$ (稀释 10 倍), $1\times$ PCR buffer, $0.4\ \mu\text{L}$ 上游和下游引物, $0.6\ \mu\text{L}$ dNTPs ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $1\ \text{U}$ Taq DNA 聚合酶, 添加 ddH₂O 至总体积 $20\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 98°C 预变性 30 s; 98°C 变性 8 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 50 s, 35 次循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物加 A 后经回收、纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 TG1, 蓝白斑筛选、菌落 PCR、质粒提取及酶切验证均参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002)方法操作。阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序验证。

1.4 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 的生物信息学分析

利用 NCBI 网站中的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行两条 *CgRHF*s 序列同源性比对; BioXM 2.6 软件推导其氨基酸序列; 在线软件 ProtParam (<http://www.expasy.org>) 预测编码蛋白的分子量和理论等电点; TMHMM 2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜结构域; DNAMAN 和 MEGA 4.0 软件构建氨基酸序列进化树; STRING 9.1 在线软件 (<http://string-db.org/>) 预测可能的互作蛋白; YLoc 在线软件 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>) 预测亚细胞定位。

1.5 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 在琯溪蜜柚与红肉蜜柚果实发育进程中的表达分析

根据 *CgRHF* cDNAs 测序序列设计 qPCR 引物(表 1), 以柚 β -tubulin 为内参研究 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 基因在红肉蜜柚与琯溪蜜柚不同组织及果实不同发育时期的表达。qRT-PCR 反应体系中分别加入 $2\times$ SYBR Green $10\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ forward primer $0.4\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ reverse primer $0.4\ \mu\text{L}$, $50\times$ ROX Reference Dye II $0.4\ \mu\text{L}$, cDNA 一链 $1\ \mu\text{L}$ (稀释 10 倍), ddH₂O 补足总反应体系至 $20\ \mu\text{L}$ 。每个样品重复 3~6 次, 共 3 个生物学重复。qRT-PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 3 s, 退火及延伸 45 s, 40 次循环。反应结束后进行溶解曲线分析及琼脂糖凝胶电泳鉴定产物特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析 qRT-PCR 数据, 应用 Origin 7.0 软件对数据作图。

表 1 引物序列
Table 1 PCR primers used in this study

靶基因 Target gene	引物序列 Sequence (5' - 3')	引物用途 Comment	预期扩增长度/bp Predicted length
<i>CgRHF1</i>	Forward primer: TGGGCCTCGCTAGTATGCCGTCCG	基因分离	477
	Reverse primer: AAAACACTCTCACCAGAAACAAGA	Gene isolation	
<i>CgRHF1</i>	Forward primer: GTGAAGATGCAGAGCATGACTGTT	基因表达	114
	Reverse primer: CCACTTCTCCAAGCACACTTTAT	Gene expression	
<i>CgRHF2</i>	Forward primer: ATGTGGGGTTCAGGTATGA	基因分离	573
	Reverse primer: CTAATTTCAGGAACAGAGT	Gene isolation	
<i>CgRHF2</i>	Forward primer: CTGTTTGTCGGTTACCATTACAAG	基因表达	128
	Reverse primer: GAAGTCTCAGGACTATCAACAGC	Gene expression	
<i>β-tubulin</i>	Forward primer: TTTTCCGTCTTCCCGTCTCCTA	内参基因	106
	Reverse primer: CACCATACATTATCGGCATT	Reference gene	

2 结果与分析

2.1 柚 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* cDNAs 的分离及序列分析

提取的红肉蜜柚与琯溪蜜柚果实汁胞与组织中总 RNA 条带清晰完整，无蛋白质、多糖、盐或其他杂质的污染（图 1）。

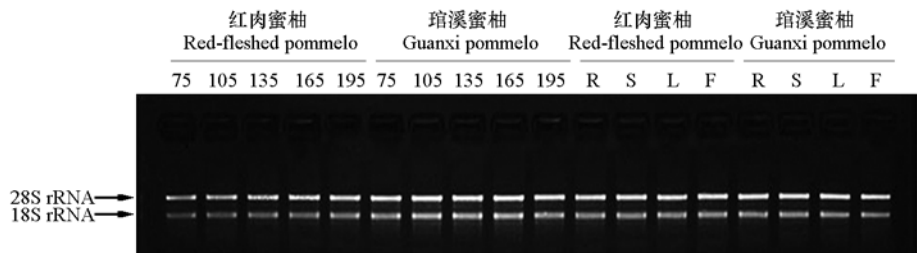


图 1 红肉蜜柚与琯溪蜜柚果实不同发育时期汁胞及组织总 RNA

75、105、135、165 和 195 为花后天数。R：根；S：茎；L：叶；F：花。

Fig. 1 Total RNA extracted from juice sacs of Red-fleshed pommelo and Guanxi pommelo throughout fruit development and different tissues

75, 105, 135, 165 and 195 show days after flowering. R: Root; S: Stem; L: Leaf; F: Flower.

采用生物信息学与同源克隆法，分别从红肉蜜柚和琯溪蜜柚盛花后 105 d 果实汁胞 cDNA 中分离出长约 500 bp 与 600 bp 的条带，回收目的片段，连接 T 载体并转化至大肠杆菌 TG1，筛选阳性克隆，送上海英骏生物有限公司测序，分别命名为 *CgRHF1*（474 bp，编码蛋白含 157 aa，理论分子量约 17.7 kD，pI 4.49）和 *CgRHF2*（573 bp，编码 190 aa，理论分子量约 21.2 kD，pI 7.10）；两个基因编码氨基酸序列 C 端均包含 Cys-X2-Cys-X14（X15）-Cys-X1-His-X2-His-X2-Cys-X11（X10）-Cys-X2-Cys（X 为除 Cys 与 His 之外的任意氨基酸），保守基序为 C3H2C3 型 RING-H2 finger 蛋白家族成员（图 2）。此外，琯溪蜜柚的 *CgRHF1* 与红肉蜜柚的 *CgRHF1*，琯溪蜜柚的 *CgRHF2* 与红肉蜜柚的 *CgRHF2* cDNA 片段完全一致，无碱基差异。*CgRHF1* cDNA 片段与枳 RING-H2 finger 基因 *P11-C02*（*Poncirus trifoliata*, GenBank No. DQ158860.1）相似度达 99%，相邻连接法绘制进化树（图 3）结果显示 *CgRHF1* 推导的氨基酸序列与枳（ABA42952.1）的亲缘关系最近；蛋白 N 端第 9~32 位氨基酸是可能的跨膜螺旋结构，YLoc 软件预测该蛋白定位于叶绿体；STRING 软件以拟南芥 AtXERIC0（GenBank No. NP_178507.1，与 *CgRHF1* 有 56%相似性）为模板分析表明 *CgRHF1* 可能与 ASK1-interacting F-box protein（TLP9）、UBC8（泛素结合酶 8）、RGL2（RGA-Like 2，编码 DELLA 蛋白）、At2g31470（F-box 家族蛋白）等互作（图 4）。*CgRHF2* cDNA 片段与草莓、蓖麻、黄瓜等

RING-H2 finger 蛋白相似度相对较高(图 5, 图 6); 蛋白 N 端第 3~23 位氨基酸是可能的跨膜结构域; YLoc 软件预测该蛋白是一分泌蛋白, 定位于质膜; STRING 软件未获取可能与之互作的蛋白。

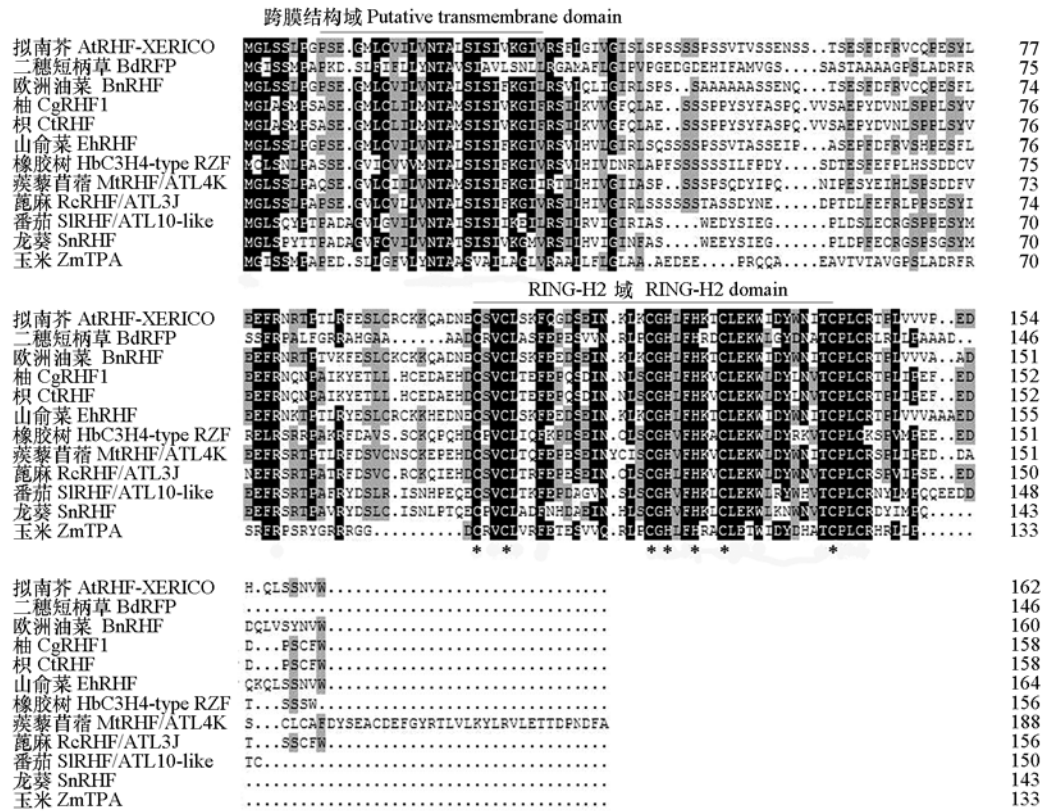


图 2 *CgRHF1* 编码的氨基酸序列同源性比对

Fig. 2 Deduced amino acid sequences comparison of *CgRHF1* with other homologous sequences

AtRHF-XERICO: *Arabidopsis thaliana* NP_178507.1; *BdRFP*: *Brachypodium distachyon* XP_003572327.1; *BnRHF*: *Brassica napus* AEQ19306.1; *CgRHF1*: *Citrus grandis* KF310530; *CtRHF*: *Citrus trifoliata* ABA42952.1; *EhRHF*: *Eutrema halophilum* AAM19707.1; *HbC3H4-type RZF*: *Hevea brasiliensis* AAP46154.1; *MtRHF/ATL4K*: *Medicago truncatula* XP_003601512.1; *RcRHF/ATL3J*: *Ricinus communis* XP_002533895.1; *SIRHF/ATL10-like*: *Solanum lycopersicum* XP_004251547.1; *SnRHF*: *Solanum nigrum* ADW66146.1; *ZmTPA*: *Zea mays* DAA40340.1.

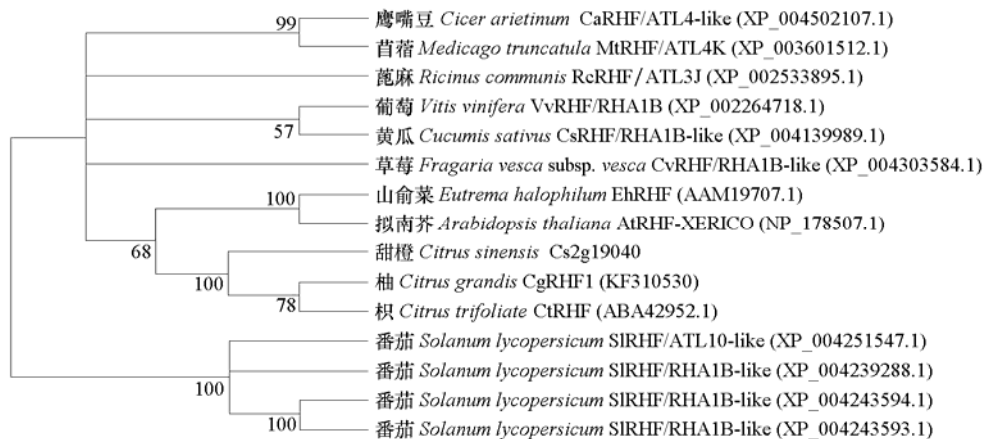


图 3 *CgRHF1* 编码的氨基酸序列系统进化树

分枝上的数值为 1 000 次建树中该位置出现的置信度值。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of *CgRHF1* with other branch homologous sequences

Bootstrapping was done by resampling from the data 1 000 times.

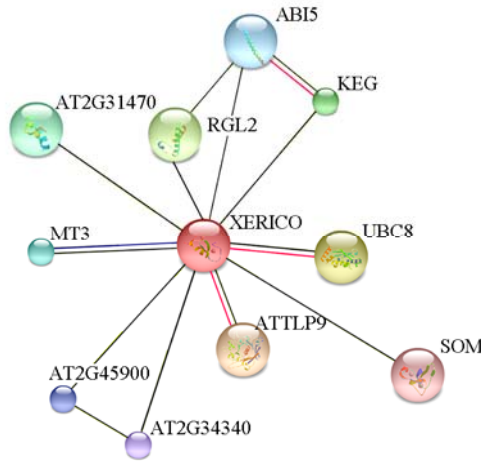


图4 AtXERIC0 (CgRHF1 同源蛋白) 互作蛋白预测

红色直线表示蛋白间经酵母双杂交验证互作。

Fig. 4 Interactive proteins prediction of AtXERIC0 (homologue of CgRHF1)

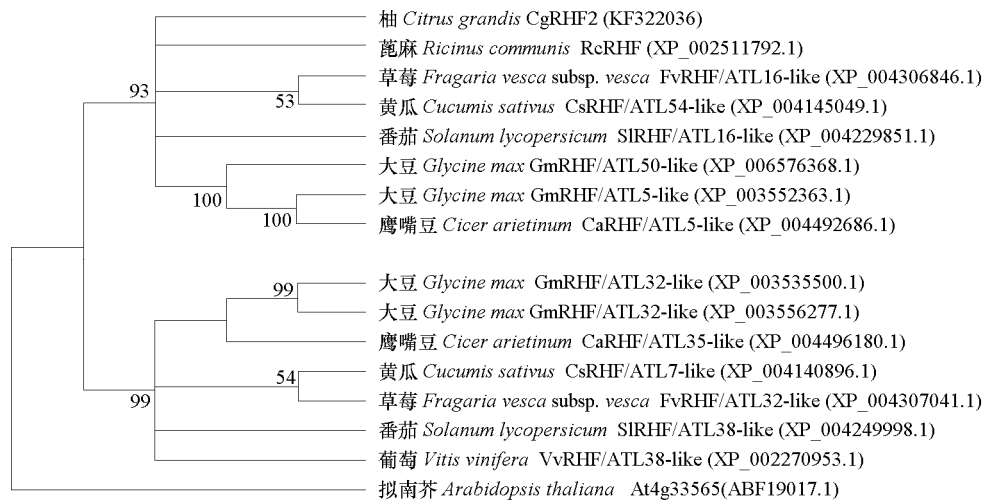
Red lines represent protein-protein interactions identified by yeast two-hybrid assays.

跨膜结构域 Putative transmembrane domain		
拟南芥 At4g33565DEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	32
二穗短柄草 BdRFP/ATL80-likeDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	74
柚 CgRHF2DEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	73
黄瓜 CsRHF/ATL54-likeDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	73
草莓 FvRHF/ATL16-likeDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	71
大豆 GmRHF/ATL51-likeDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	74
蒺藜苜蓿 MtRHFDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	74
水稻 OsRHFDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	78
蓖麻 RcRHFDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	71
番茄 SlRHF/ATL16-likeDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	71
拉尔图小麦 TuRHF/ATL28DEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	76
葡萄 VvRHF/ATL7DEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	67
玉米 ZmRHF/ATL2MDEDGPAFVIND..HINHIITIG..LNFVVISSTKV	72
RING-H2 域 RING-H2 domain		
拟南芥 At4g33565KQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	92
二穗短柄草 BdRFP/ATL80-likeKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	143
柚 CgRHF2KQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	142
黄瓜 CsRHF/ATL54-likeKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	142
草莓 FvRHF/ATL16-likeKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	140
大豆 GmRHF/ATL51-likeKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	143
蒺藜苜蓿 MtRHFKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	143
水稻 OsRHFKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	158
蓖麻 RcRHFKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	140
番茄 SlRHF/ATL16-likeKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	141
拉尔图小麦 TuRHF/ATL28KQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	144
葡萄 VvRHF/ATL7KQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	136
玉米 ZmRHF/ATL2MKQPGV..VGGTICSYCSFEBEBETLRIETCFHFHMLCIDWLRSHNCFHRAET.....	135
拟南芥 At4g33565AGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	92
二穗短柄草 BdRFP/ATL80-likeAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	170
柚 CgRHF2AGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	191
黄瓜 CsRHF/ATL54-likeAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	203
草莓 FvRHF/ATL16-likeAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	189
大豆 GmRHF/ATL51-likeAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	161
蒺藜苜蓿 MtRHFAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	161
水稻 OsRHFAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	191
蓖麻 RcRHFAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	189
番茄 SlRHF/ATL16-likeAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	168
拉尔图小麦 TuRHF/ATL28AGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	171
葡萄 VvRHF/ATL7AGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	184
玉米 ZmRHF/ATL2MAGTPACGTFCLFTLFE..NSVNFTPEWFI.....	135

图5 CgRHF2 编码的氨基酸序列同源性比对

Fig. 5 Deduced amino acid sequences comparison of CgRHF2 with other homologous sequences

At4g33565: *Arabidopsis thaliana* ABF19017.1; BdRHF/ATL80-like: *Brachypodium distachyon* XP_003580356.1; CgRHF2: *Citrus grandis* KF322036; CsRHF/ATL54-like: *Cucumis sativus* XP_004145049.1; FvRHF/ATL16-like: *Fragaria vesca* subsp. *vesca* XP_004306846.1; GmRHF/ATL51-like: *Glycine max* XP_003552363.1; MtRHF: *Medicago truncatula* XP_003623843; OsRHF: *Oryza sativa* AAX92760.1; RcRHF: *Ricinus communis* XP_002511792.1; SlRHF/ATL16-like: *Solanum lycopersicum* XP_004229851.1; TuRHF/ATL28: *Triticum urartu* EMS54905.1; VvRHF/ATL7: *Vitis vinifera* XP_002270058.1; ZmRHF/ATL2M: *Zea mays* NP_001148220.1.

图 6 *CgRHF2* 编码的氨基酸序列系统进化树

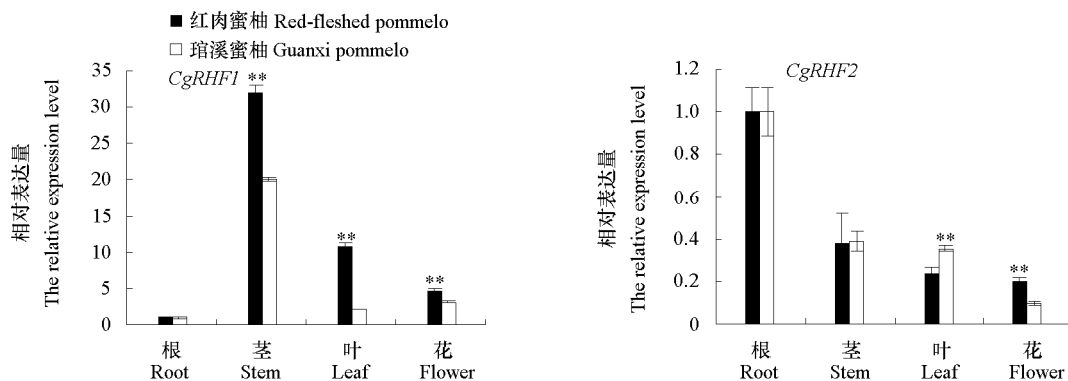
分枝上的数值为 1 000 次建树中该位置出现的置信度值。

Fig. 6 Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of *CgRHF2* with other branch homologous sequences

Bootstrapping was done by resampling from the data 1 000 times.

2.2 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 的表达模式

应用 qRT-PCR 法检测琯溪蜜柚和红肉蜜柚的 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 在根、茎、叶和花 4 个组织以及盛花期后果实 5 个不同发育时期果实汁胞中的表达水平。如图 7 所示, *CgRHF1* 在红肉蜜柚茎、叶和花中的表达显著高于琯溪蜜柚, 其中在茎的表达量最大; *CgRHF2* 在根和茎中的表达红肉蜜柚与琯溪蜜柚间无差异, 在红肉蜜柚叶中的表达低于琯溪蜜柚, 在花中却高于琯溪蜜柚。

图 7 柚不同组织 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 的相对表达量Fig. 7 Expression analysis of *CgRHF1* and *CgRHF2* in different organs of two pummelo species** $P < 0.01$.

除花后 135 d 之外, *CgRHF1* 在红肉蜜柚果实汁胞中的表达水平均高于琯溪蜜柚, 且在果实发育过程中呈逐渐上升趋势。 *CgRHF2* 在整个果实发育进程中表达丰度相对较低, 基本呈上升趋势, 但在成熟采摘阶段 (花后 195 d) 表达急剧提高, 且琯溪蜜柚表达显著高于红肉蜜柚 (图 8)。

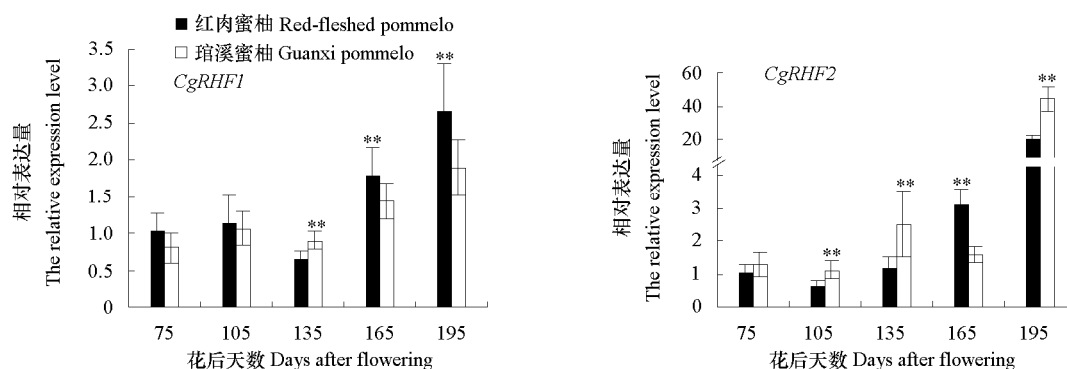


图 8 柚果实发育不同时期 *CgRHF1* 与 *CgRHF2* 的相对表达量

Fig. 8 Expression analysis of *CgRHF1* and *CgRHF2* in fruit development of two pommelo species

** $P < 0.01$.

3 讨论

蛋白质是细胞内最重要的生物大分子之一，主要通过降解来调节主要代谢物的数量，清除错误折叠的蛋白质。植物体内的蛋白质大约每 4~7 d 更新 50%，大多半衰期较短的蛋白质及异常蛋白质的降解是由泛素蛋白酶体途径完成的 (Vierstra, 1996)。由于蛋白酶体识别泛素化的蛋白并将其降解是一个非特异性的进程，因此 E3 在泛素蛋白酶体途径中十分重要，是决定泛素依赖的蛋白质降解特异性的关键因子。每一种 E3 都携带识别底物特异性的信息，只特异地识别一种或一类底物，因此 26S 泛素蛋白酶体途径中 E3 的种类与数量均较 E1、E2 多 (杜国华 等, 2010)。RING finger 是目前 E3 中最为庞大的家族，人体中 RING finger 类蛋白超过 600 种 (Li et al., 2008)，拟南芥、水稻和苹果中分别有 469、488 和 688 个可能的 RING finger (Stone et al., 2005; Lim et al., 2010; Li et al., 2011)，与柚亲缘关系较近的克里曼丁橘和甜橙基因组中 RING-H2 finger 成员分别有 214 与 250 个 (Guzmán, 2014)。目前动物中 RING finger 基因或蛋白相关生物学功能研究较多，在植物中的研究则刚刚起步。

本试验中以琯溪蜜柚及其红肉早熟突变体红肉蜜柚为材料，分离得到两个 RING 基因，均属于典型的 RING-H2 finger 家族成员。琯溪蜜柚与红肉蜜柚 *CgRHF1*、*CgRHF2* 序列完全一致，无碱基差异，暗示这两个 *CgRHF* 并非红肉蜜柚果实成熟期提早及果肉颜色变异的关键调控基因，但变异性状对两个基因的转录存在较大影响。在枳幼苗中，与 *CgRHF1* 基因高度同源的 *PII-C02* 基因响应冷胁迫和干旱胁迫，而在柚幼苗中该基因只对干旱胁迫敏感 (Sahin-Cevik & Moore, 2006)。*CgRHF1* 基因同源性较高的拟南芥 *AtXERIC0* 能够与 E2 酶，以及脱落酸信号转导途径中 *AtTLP9* 等具有互作关系，通过降解 DELLA 蛋白，增加胞内脱落酸水平，提高植株对干旱的耐受性 (Ko et al., 2006)。玉米 *ZmXERIC0* 的表达也受赤霉素和光的调控 (Gao et al., 2012)。本试验中发现除根与处于发育早期的果实 (果实中无明显的红色色素积累) 外，红肉蜜柚各器官中 *CgRHF1* 表达丰度均高于琯溪蜜柚，但是否意味着该基因与红肉蜜柚早熟及果实色泽变异性状有关仍需进一步的试验证据。目前尚无 *CgRHF2* 同源基因相关生物学功能的报道，但分析其序列发现该基因隶属于 ATLs 亚家族 (Serrano et al., 2006)。现有研究表明 ATLs 家族成员在调控防御反应，营养阶段向生殖阶段转变的 C/N 比值，根与胚乳发育进程中的细胞凋亡，以及短日照条件下的开花进程中均起到重要的调控作用 (Guzmán, 2012)。本试验中发现 *CgRHF2* 基因在组织中转录水平相对较低，在果实成熟采摘阶段表达丰度迅速上升，推测该基因可能与果实成熟相关。*CgRHF1* 与 *CgRHF2* 表达模式的差异暗

示这两个基因在柚组织及果实发育进程中行使不同的生物学功能, 并非功能互补基因。

最近, 刘顺枝等 (2013) 以红肉蜜柚与琯溪蜜柚成熟果肉为材料, 采用抑制差减杂交技术分离出 44 个差异表达的 *Unigenes*, 涉及信号转导、蛋白质合成、应激反应、转运等多条代谢途径, 表明红肉蜜柚早熟及果实色泽变异性状受到复杂的调控网络控制。包括 *CgRHF*s 在内的相关基因在柚生长发育过程中的生物学功能仍有待于进一步深入研究。

References

- Bedford L, Paine S, Rezvani N, Mee M, Lowe J, Mayer R J. 2009. The UPS and autophagy in chronic neurodegenerative disease: Six of one and half a dozen of the other- or not? *Autophagy*, 5 (2): 224 - 227.
- Budhidarmo R, Nakatani Y, Day C L. 2012. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends in Biochemical Sciences*, 37 (2): 58 - 65.
- Du Guo-hua, Zhang Li-jun, Fan Jin-juan, Ruan Yan-ye, Liu Chun, Xu Hong-mei. 2010. Protein specific degradation systems in higher plants. *Molecular Plant Breeding*, 8 (3): 567 - 576. (in Chinese)
- 杜国华, 张立军, 樊金娟, 阮燕晔, 刘 淳, 许红梅. 2010. 高等植物蛋白质的特异性降解系统. *分子植物育种*, 8 (3): 567 - 576.
- Frescas D, Pagano M. 2008. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: Tipping the scales of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8 (6): 438 - 449.
- Gao Y, Li H, Deng D X, Chen S Q, Jiang W, Chen J M. 2012. Characterization and expression analysis of the maize RING-H2 finger protein gene *ZmXERICO* responsive to plant hormones and abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 (4): 1529 - 1535.
- Guo H W, Ecker J R. 2004. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (1): 40 - 49.
- Guzmán P. 2012. The prolific ATL family of RING-H2 ubiquitin ligases. *Plant Signaling & Behavior*, 7 (8): 1014 - 1021.
- Guzmán P. 2014. ATLs and BTLs, plant-specific and general eukaryotic structurally-related E3 ubiquitin ligases. *Plant Science*, (215 - 216): 69 - 75.
- Hochstrasser M. 2009. Introduction to intracellular protein degradation. *Chemical Reviews*, 109 (4): 1479 - 1480.
- Kepinski S, Leyser O. 2005. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435 (7041): 446 - 451.
- Ko J H, Yang S H, Han K H. 2006. Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 47 (3): 343 - 355.
- Lecker S H, Goldberg A L, Mitch W E. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17 (7): 1807 - 1819.
- Li W, Bengtson M H, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy V A, Orth A, Chanda S K, Batalov S, Joazeiro C A P. 2008. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS ONE*, 3 (1): e1487.
- Li Y Z, Wu B J, Yu Y L, Yang G D, Wu C G, Zheng C C. 2011. Genome-wide analysis of the RING finger gene family in apple. *Molecular Genetics and Genomics*, 286 (1): 81 - 94.
- Li Yan-ze. 2011. Functional chareacterization of F-box-containing gene *AtPP2-B11* and genome-wide analysis of the RING finger proteins in apple [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shangdong Agricultural University. (in Chinese)
- 李彦泽. 2011. 拟南芥 F-box 基因 *AtPP2-B11* 的功能分析及苹果 RING finger 型泛素连接酶 E3 的家族分析[博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Lim S D, Yim W C, Moon J C, Kim D S, Lee B M, Jang C S. 2010. A gene family encoding RING finger proteins in rice: Their expansion, expression diversity, and co-expressed genes. *Plant Molecular Biology*, 72 (4 - 5): 369 - 380.
- Liu Hui-zhi, Han Shi-ping. 2010. Progress in structural and functional study of ring-finger proteins//Proceeding of Henan Plant Physiological Society. Henan: 5 - 9. (in Chinese)
- 刘辉志, 韩世平. 2010. 泛素 - 蛋白连接酶 (E3) —RING-finger 蛋白的研究进展//河南省植物生理学会 30 周年庆典暨学术研讨会论文集. 河南: 5 - 9.
- Liu Shun-zhi, Huang Zhong, Hu Wei-rong, Jiang Yue-ling, Wang Xiao-lan. 2013. Construction and analysis of suppression subtractive hybridization

- library of red-fleshed sweet pommelo. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (7): 1359 - 1368. (in Chinese)
- 刘顺枝, 黄 忠, 胡位荣, 江月玲, 王小兰. 2013. 琯溪蜜柚及其早熟红肉突变体成熟果实 SSH 文库的构建及初步分析. *园艺学报*, 40 (7): 1359 - 1368.
- Ma L G, Gao Y, Qu L J, Chen Z L, Li J M, Zhao H Y, Deng X W. 2002. Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14 (10): 2383 - 2398.
- Metzger M B, Hristova V A, Weissman A M. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science*, 125 (3): 531 - 537.
- Molnar G, Bancos S, Nagy F, Szekeres M. 2002. Characterization of *BRH1*, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 215 (1): 127 - 133.
- Moon J, Parry G, Estelle M. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell*, 16 (12): 3181 - 3195.
- Navon A, Ciechanover A. 2009. The 26S proteasome-from basic mechanisms to drug targeting. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (49): 33713 - 33718.
- Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, Deng X W. 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405 (6785): 462 - 466.
- Sahin-Cevik M, Moore G A. 2006. Isolation and characterization of a novel RING-H2 finger gene induced in response to cold and drought in the interfertile *Citrus* relative *Poncirus trifoliata*. *Physiologia Plantarum*, 126 (1): 153 - 161.
- Sambrook J, Russell D W. 2002. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Huang Pei-tang, Wang Jia-xi, Zhu Hong-chu trans. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆实验指南. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础译. 北京: 科学出版社.
- Seo H S, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua N H. 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes and Development*, 18 (6): 617 - 622.
- Serrano M, Parra S, Alcaraz L D, Guzman P. 2006. The *ATL* gene family from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* comprises a large number of putative ubiquitin ligases of the RING-H2 type. *Journal of Molecular Evolution*, 62 (4): 434 - 445.
- Song Su-sheng, Xie Dao-xin. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Chinese Bulletin of Botany*, 23 (5): 564 - 577. (in Chinese)
- 宋素胜, 谢道昕. 2006. 泛素蛋白酶体途径及其对植物生长发育的调控. *植物学通报*, 23 (5): 564 - 577.
- Stone S L, Hauksdottir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J. 2005. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137 (1): 13 - 30.
- Vierstra R. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32 (1 - 2): 275 - 302.
- Wang F, Deng X W. 2011. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Research*, 21 (9): 1286 - 1294.
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P. 2007. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: Stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 145 (3): 1073 - 1085.
- Xu Chang-jie, Chen Kun-song, Zhang Bo, Wang Qian-jie, Ye Wei-jia. 2004. A study on methods for RNA extraction from *Citrus* tissues. *Journal of Fruit Science*, 21 (2): 136 - 140. (in Chinese)
- 徐昌杰, 陈昆松, 张 波, 王钱洁, 叶薇佳. 2004. 柑橘组织 RNA 提取方法研究. *果树学报*, 21 (2): 136 - 140.
- Xu R, Li Q Q. 2003. A RING-H2 zinc-finger protein gene *RIE1* is essential for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 53 (1 - 2): 37 - 50.