

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.04.029

拟南芥锌指结构域 *ABRv1* 基因的功能研究

杨东波, 邓亚男, 刘志斌, 杨毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为了分析拟南芥脱落酸响应蛋白 RING-V1 基因(*ABRv1*)的功能, 构建了高表达载体 pBII21-*ABRv1*, 经农杆菌转化, 花序浸染后得到 T0 代转基因种子, 并经卡那霉素板筛选得到转基因苗, 再经过两代的筛选获取了纯合的高表达株系 *ABRv1*。通过 DNA 及 RNA 水平鉴定了 *ABRv1* 基因的 T-DNA 插入突变体 *abr v1*。对突变体、高表达转基因株系及野生型进行 ABA 诱导处理, 突变体的萌发率不足 10%, 野生型萌发率为 40%, 而过表达株系萌发率为 67%; 突变体株系气孔几乎全部关闭, 过表达株系气孔关闭不明显, 大小是突变体株系的 2~3 倍。结果表明 *ABRv1* 基因在拟南芥的 ABA 信号应答响应中可能起负调控作用。

关键词: *ABRv1*; 锌指 E3 连接酶; 脱落酸; 拟南芥

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0839-06

Primary analysis of the function of *Arabidopsis thaliana* RING finger *ABRv1*

YANG Dong-Bo, DENG Ya-Nan, LIU Zhi-Bin, YANG Yi

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-Resources an Eco-Environment of MOE, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In an effort to analyze the function of Abscisic acid responsive RING-v protein 1(*ABRv1*) in *Arabidopsis thaliana*, this paper performed abscisic acid (ABA) stress experiments on the wild-type, the *ABRv1*-overexpressing lines and the T-DNA insertion mutants *abr v1*. The overexpressing lines were acquired through transfection by *Agrobacterium* with *ABRv1* embedded plasmids (pBII21-*ABRv1*). The mutants obtained were identified by DNA and RNA analysis. With ABA treatment, the mutants germination rate was less than 10%, while the wild-type was 40% and the overexpressing lines was 67%. Little stomatal closure was observed in the overexpressing lines whereas obvious closure was discovered in the mutants. Stoma size of overexpressing lines was twice or triple of the mutants. The wild-type showed a closure status in between. These phenotypic analysis revealed that *ABRv1* might participate in the plant response to ABA as a negative regulator.

Keywords: *ABRv1*; RING finger E3 ligase; Abscisic acid; *Arabidopsis thaliana*

1 引言

植物中许多含有锌指(RING finger)结构域的蛋白具有 E3 连接酶活性, 参与植物体内蛋白质降解及信号传导过程, 因而对该蛋白家族的研究成为

目前非常热门的研究领域之一。植物体内被预测存在有大量 RING finger E3, 目前已报道表明它们广泛参与植物的发育, 蛋白和激素信号传导, DNA 损伤以及逆境信号和植物防御应答等过程^[1]。可见 RING finger E3 家族在植物生长代谢和外界环境

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(31171586); 973 计划(2015CB755702)

作者简介: 杨东波(1991-), 男, 土家族, 重庆石柱人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: 413079573@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@vip.sina.com

适应过程中发挥至关重要的作用。

ABA 是植物生长发育过程中的一种重要的植物激素,同时也是应对各种逆境胁迫的一个重要信号分子^[2,3]。ABA 在提高植物的抗性方面作用显著,ABA 信号途径在冷害、盐害和干旱反应中都起着重要的作用。因而,响应 ABA 的基因可能参与 ABA 介导的植物逆境应答。随着生物信息学的发展,分子生物学及生物化学的方法不断成熟,近年来,关于 RING 型 E3 的研究越来越受到关注,特别是和植物逆境胁迫相关的 E3 被筛选出来。到目前为止,一些参与 ABA 信号途径 E3 泛素连接酶功能已得到证实。例如,在 ABA 信号通路中,RHAZa 与 ABI5 作用平行,而 SDIR 则作用于 ABI3,4,5 的上游,负调控 ABA 信号途径^[4,5]。由于 ABA 不仅可以调控植物的生长发育,同时作为植物响应逆境胁迫的信号参与调控植物对逆境胁迫的应答^[6]。因而对 ABA 信号通路相关的 E3 连接酶功能研究,对阐明植物响应逆境胁迫的分子机制具有十分重要的意义。

本实验室前期发现了受 ABA 诱导 E3 连接酶 ABRv1,为了研究其功能,通过构建了高表达载体 pBI121-ABRv1,经农杆菌转化,筛选获取了三个纯合的高表达株系 ABRv1-OE-1, ABRv1-OE-4 和 ABRv1-OE-7。通过 DNA 及 RNA 水平鉴定了该基因的 T-DNA 插入纯合突变体 *abr*v1。同时检测了 ABA 胁迫下突变体、过表达株系与野生型的萌发率情况和气孔关闭情况,对 ABRv1 基因在 ABA 信号应答响应中的作用进行初步探索,为进一步解释该基因的功能提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚生态型 (Columbia) 植株由本实验室保存, ABRv1 基因 T-DNA 插入突变体 SALK_119330c 种子购买于 ABRC,突变体的背景为 Columbia 生态型。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 及 pBI121 载体由本实验室保存。

多种限制性内切酶、T4 DNA ligase 及 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自 Omega 公司, RNA 提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒购自天根公司, q-PCR mix-SYBR Green 购于

Bio-Rad 公司。

2.2 方法

2.2.1 同源基因系统进化树构建 Clustal X 进行完全序列比对并进行进化树绘制,选择菜单中模块 Trees 中的功能。利用这个功能可以绘制一个相当精确的进化树。

2.2.2 高表达转基因载体构建 依照 TIANGEN RNA 提取试剂盒说明提取野生型植株 RNA,按 TAKARA Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA,对其利用表 1 所示引物进行扩增,反应程序为:94℃ 4min; 94℃ 30s, 58℃ 35s, 72℃ 50s, 30 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物依照 TIANGEN 胶回收试剂盒说明进行回收纯化。回收片段经酶切后克隆到 pUCm-T Vector (Fermentas)。通过测序证实后再克隆到含 35S 启动子的高表达载体 (pBI121)。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers sequence

序列	引物用途
LP: 5'-AACCACCTTTTTGTCTTGCG-3'	<i>abr</i> v1 突
RP: 5'-AATCAAGATGCCTTTCCACC-3'	变体 PCR
LB1: 5'-ATTTTGCCGATTCGGAAC-3'	鉴定
F:5'-CCTCTAGAATGGCTGATGATCAGAGTTC-3'	ABRv1
R:5'-GGCCCGGGCTGCGGTGAAGCTTCAGGTG-3'	片段 PCR
F:5'-CAAGCCTGTCTACTACTAA-3'	扩增
R:5'-GGTTCCTCTTCATCATCA-3'	ABRv1q
TUB2-F: 5'-GTTCTCGATGTTGTTTCGTAAG-3'	RT-PCR
TUB2-R: 5'-TGTAAGGCTCAACCACAGTAT-3'	

2.2.3 拟南芥的转化及阳性植株分子鉴定 利用冻融法将 pBI121- ABRv1 载体转化 EHA105 农杆菌,通过菌落 PCR 鉴定出阳性克隆。利用花序浸染法将转化农杆菌浸染野生型花序,收取的种子经含有潮霉素的 1/2MS 培养基筛选 T₁,对阳性苗提取 DNA 进行 PCR 鉴定,并继续用潮霉素 1/2MS 培养基筛选 T₂ 及 T₃ 代,获得纯合过表达株系。依照 Bio-Rad q-PCR mix-SYBR Green 使用说明,以所获得的 cDNA 为模板通过 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 系统进行反应,定量内参用 TUB2 使用引物见表 1, q-PCR 实验程序:95℃ 5min; 95℃ 10s, 60℃ 10s, 72℃ 20s, 40 个循环。

2.2.4 纯合突变体的分子鉴定 取培养 4 周左右的突变体叶片提取总 DNA,野生型 DNA 作为对照。分别用特异基因上下游引物 LP, RP 和中间引物 LB1 进行 PCR 扩增,野生型拟南芥只有上下游引物能扩增出一条相对较大的条带,突变体却只能用中间引物和下游引物扩增才有条带。PCR 反应

程序为: 94°C 4min'; 94°C 30s, 59°C 35s, 72°C 1min, 30 个循环; 72°C 10min.

按照 TIANGEN RNA 提取试剂盒说明提取植物材料 RNA, 所提的 RNA 按照 TAKARA Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, 以野生型 cDNA 为负对照, 内参基因 TUB2 作为对照基因, 反应程序为: 94°C 4min'; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 35s, 30 个循环; 72°C 10min.

2.2.5 ABA 处理下萌发率表型实验 将突变体、野生型, 及高表达株系拟南芥种子经 NaClO 溶液消毒后置于含 0.1 μM 的 1/2MS 培养基, 0.5 μM 的 1/2MS 培养基和对照组 1/2MS 培养基中, 每个株系点种约 60 颗种子, 置于 4°C 冰箱春化 2 天打破种子休眠, 移入 22°C 长日照条件的组培室, 3d 后对其萌发状况进行观察, 检测 ABA 处理下对以上株系种子萌发率的影响, 重复实验 3 次.

2.2.6 气孔关闭实验 取相同条件下生长 4 周的突变体、野生型及高表达株系拟南芥成熟叶片用于

气孔观察. 离体叶片在强光照条件下用相同体积的气孔开放液 (10 mM KCl, 100 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH6.1) 孵育 2h^[7], 然后在气孔开放液中加入 10 μM ABA, 黑暗条件下处理 2h. 然后剥取叶反面表皮细胞在显微镜下观察气孔关闭程度, 测量气孔的宽和长比值. 每个株系测量超过 60 个气孔保卫细胞.

3 结果分析

3.1 *ABRv1* 进化树和结构域分析

生物信息学分析表明, *ABRv1* 编码一个 307 个氨基酸组成的蛋白质, 预测其相对分子量为 33.7KD. *ABRv1* 包含一个保守的 C₄H₃-RING finger 结构域^[8], 同时还有两个跨膜结构域 (图 1A). 在不同物种中 Blast 分析发现该基因, 特别是十字花科植物如簇子芥 (*Arabidopsis lyrata*), 山葵 (*Eutrema salsugineum*), 芜菁 (*Brassica rapa*) 和芥菜 (*Capsella bursa*) 中均有其直系同源基因的存在, 序列比对结果显示一致性高达 91% (图 1B).

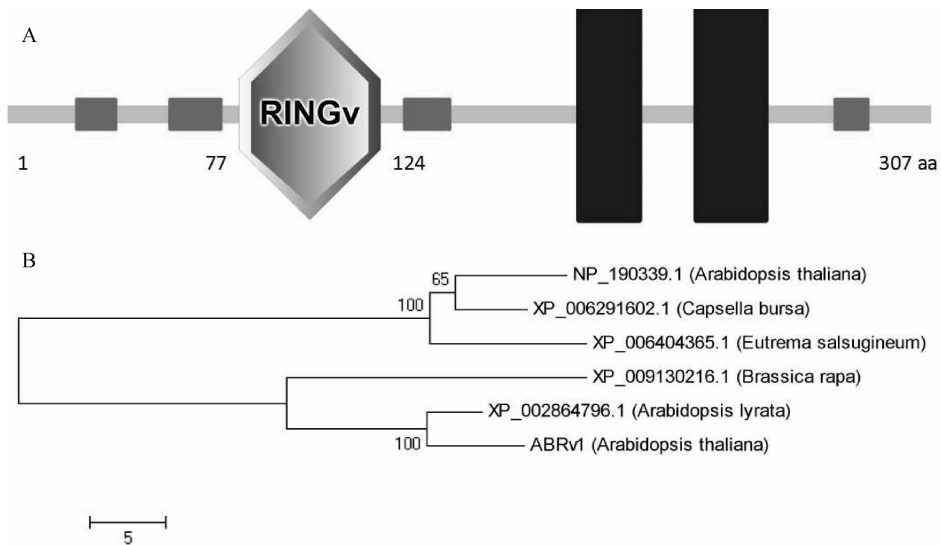


图 1 *ABRv1* (At5g62460) 和其他物种中的同源基因比对及结构域分析

A. *ABRv1* 的蛋白结构, ■为跨膜结构域; B. 同源基因的系统进化树

Fig. 1 Comparison of homologues *ABRv1* in higher plants and domain analysis

A. Protein domains configuration of the full-length *ABRv1* protein. ■ indicate the transmembrane domain. B. Phylogenetic tree of *ABRv1* with their homologues in other plants.

3.2 *abr*v1 纯合突变体鉴定

arbv1 突变体结构示意图 (图 2A). 为鉴定 *arbv1* 纯合突变体, 我们分别用 LP+RP, LB1+RP 做引物 (引物见表 1) 对基因组 DNA 进行扩增 (如图 2B), 野生型 DNA 用 LP+RP 引物扩增获得目的

条带, 而用 LB1+RP 扩增无条带; 纯合突变体 DNA 用 LP+RP 引物扩增未获得目的条带, 而用 LB1+RP 扩增有条带. 为了进一步验证这个 T-DNA 插入纯合突变体, 确实造成了基因表达受阻. 我们提取植株的 RNA 进行 RT-PCR 实验, 结果显

示野生型中 *ABRv1* 基因正常表达,而在突变体中检测不到目的基因的表达,说明 T-DNA 的插入成功抑制了该基因在植株内的表达.说明 T-DNA 插入成功打断了 *ABRv1* 的转录,突变体材料可用于后续分析.

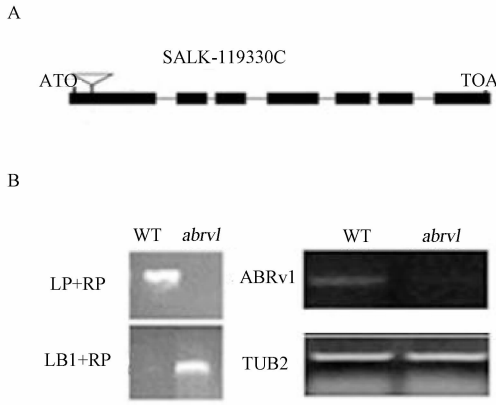


图 2 *abrv1* 突变体的分子鉴定

A. *abrv1*(SALK_119330C)突变体 T-DNA 插入位置示意. 三角形示 T-DNA 插入位置,黑色框为外显子. B. 利用基因组 PCR 及反转录 PCR 对野生型和突变体分别进行 DNA 水平与 RNA 水平鉴定.

Fig. 2 Identification of the *abrv1* mutant.

A. Schematic of T-DNA insertion in the mutant DNA sequence. The triangle indicates the insertion location.

B. Genotyping PCR and RT-PCR analysis of wild-type and *abrv1* plants at DNA and RNA levels, respectively.

3.3 *ABRv1* 高表达株系的筛选

构建表达载体如图 3 所示. 首先构建了高表达载体 pBI121-*ABRv1*, 经农杆菌转化^[9], 花序浸染后得到 T0 代转基因种子, 并经卡那霉素板筛选得到转基因苗. 移苗生长得到 T1 代的种子后, 将 T2 代播种在卡那板上, 可以观测分离得到的纯合株系. 将纯合株系幼苗移苗生长 4 周后, 提取叶片 RNA 检测转基因株系中 *ABRv1* 的表达量并将其中表达量最高和相对较高的株系用于后续的研究. 如图 3 所示, *ABRv1* 的表达量在转基因株系分别有 10~400 倍不等的提高. 我们选择其中较高和最高的株系 1 和 4 以及提升较弱的 7 来做进一步的表型分析.

3.4 ABA 处理下的萌发率分析

将野生型、突变体、过表达株系种子播种在含有 0, 0.1 μ M, 0.5 μ M ABA 的 1/2 MS 培养基上, 并每天统计萌发率情况. 图 3A、B 显示, 在缺少 ABA 时, 野生型、突变体和过表达株系的种子萌发没有明显差异; 在添加 ABA 后, 突变体的种子萌发率比同期的野生型低, 而过表达株系则表现出更快的萌发. 如在 0.1 μ M ABA 上萌发 3d, WT 和过

表达种子的萌发率分别达 40% 和 67%, 然而突变体种子的萌发率不超过 10%. 当在 0.5 μ M ABA 上萌发 3d, WT 和过表达种子的萌发率分别达 10% 和 30%, 而突变体则几乎未见有萌发. 说明 ABA 对种子萌发的抑制作用在突变体中更为严重. 相反的, 过表达株系则表现出对 ABA 抑制的种子萌发非常不敏感, 如在 0.5 μ M ABA 上萌发 3d, WT 的萌发率不超过 10%, 而过表达株系 4 已达到 35%.

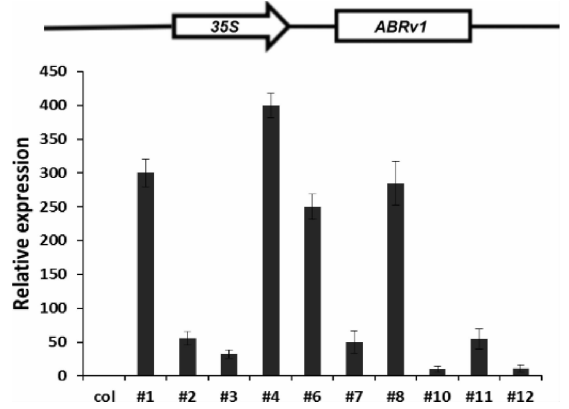


图 3 *ABRv1* 过表达株系的筛选

Fig. 3 Identification of the *ABRv1* overexpressing lines.

3.5 气孔关闭分析

气孔关闭有助于限制干旱胁迫下失水, 是 ABA 调控过程中一个重要的因素^[10]. 为了研究 *ABRv1* 在 ABA 介导气孔关闭中的功能, 我们测量了突变体, WT 和过表达三个株系在 ABA 处理下的气孔大小. 相同条件下生长 4 周的突变体、野生型及过表达株系拟南芥成熟叶片在气孔开放液中处理 2h 后气孔均已完全开放(图 5A), 再加入 10 μ M ABA 处理 2h 后, 可以看到过表达株系叶片气孔大小为突变体的 2~3 倍, WT 叶片气孔大小则介于突变体和过表达之间(图 5B).

4 讨论

通过蛋白结构域分析 *ABRv1* 蛋白属于 RING-v 家族, RING-v 因为其变异的 RING finger 结构, 即由典型的 C3HC4 变成了 C4HC3, 且其成员之间也有其特异性, 如保守区的第 2 和第 3 个 Cys 之间有较长的间隔区, 暗示该类家族成员可能是在植物进化过程中被选择出来的特异结构而发挥保守的功能^[5]. 与其他锌指结构不同的是, RING finger 中的锌配位是交错的, 产生的是刚性, 球形的结构可进行蛋白-蛋白间相互作用^[11].

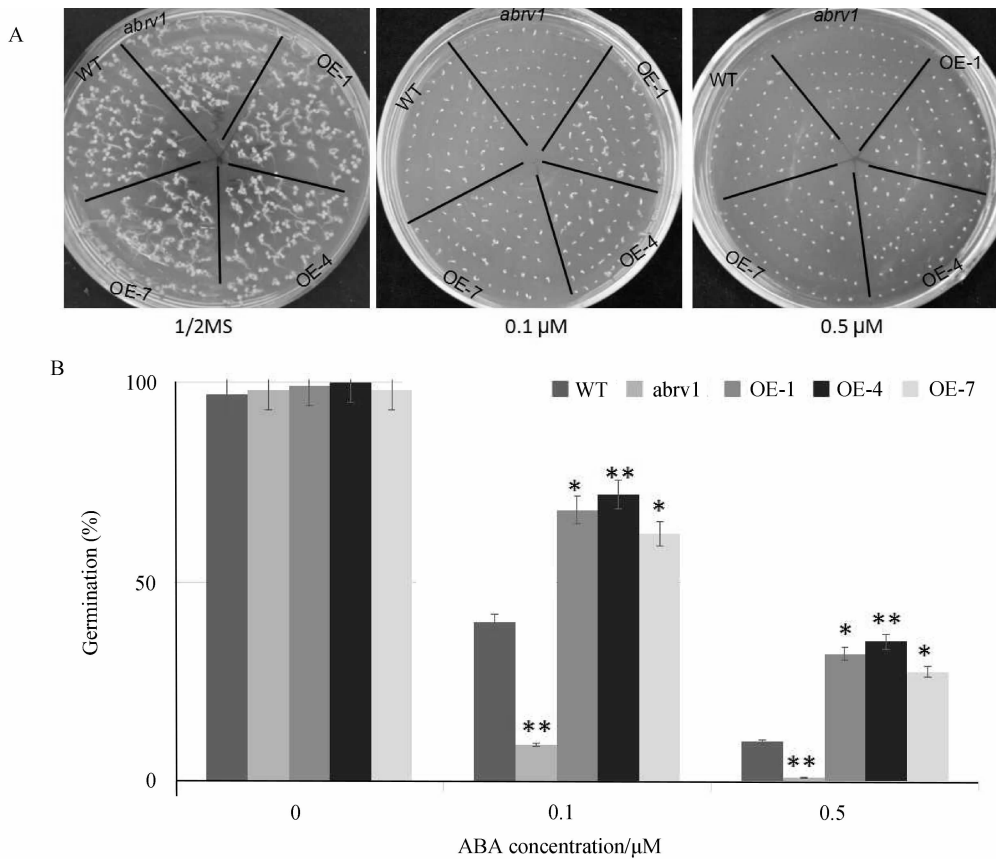


图 4 野生型、突变体及过表达株系在 ABA 处理下种子萌发率

1. 野生型, 突变体及三个过表达转基因株系在萌发期对 ABA 的敏感度表现。B. 各株系种子在 1/2 MS, 0.1 μM ABA 和 0.5 μM ABA 培养基上的萌发率统计。图 B 中星号表示显著差异性 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$), 通过和野生型植株比较 t 检测得到。

Fig. 4 Seed germination rate of wild-type, mutant and overexpressing lines in response to ABA.

A. Phenotype of the wild-type(WT), mutant and transgenic plants at germination stage under ABA treatment. B. Seeds germination percentage on 1/2 MS medium with various ABA concentrations. Asterisks in (B) indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's t-test compared with the wild-type plants.

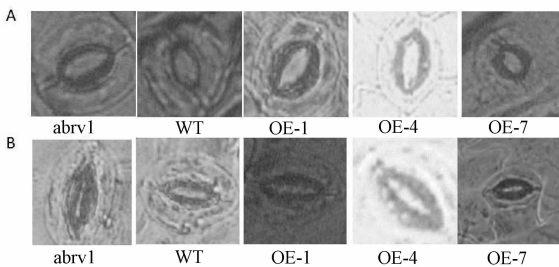


图 5 野生型, 突变体和 *ABRv1* 过表达株系在 ABA 处理下的气孔关闭情况

A. 成熟叶片在气孔开放液中处理后气孔完全张开。B. 加入 ABA 后三个株系气孔关闭情况。

Fig. 5 Stomatal closure status of the WT, abrv1 mutant and *ABRv1* overexpressing plants under ABA treatment.

A. Obvious opening status was observed in all thestoma samples of mature leaves with stomatal opening solution treatment. B. Stomatal closure levels of the three lines after the introduction of ABA into the system.

是 E3 泛素连接酶^[12]。已有研究表明 E3 连接酶广泛参与到植物各类非生物胁迫的应答中, 包括盐、干旱、冷及热胁迫。

前期研究表明 *ABRv1* 受 ABA 诱导表达, 进一步实验发现了突变体植株在 ABA 诱导下, 萌发率明显降低相对于野生型和过表达株系(图 4), 突变体成熟叶片在 ABA 处理下的气孔关闭敏感(图 5)。证明了 *ABRv1* 突变后造成突变体种子在萌发和萌发后生长阶段都对 ABA 超敏感, 而高表达株系则表现出对 ABA 抑制的种子萌发和后期生长的影响都不敏感, 从而表明 *ABRv1* 在 ABA 调控的种子萌发及萌发后生长阶段可能起负调控作用。

目前已经发现有很多 E3 连接酶参与调控 ABA 信号通路, 如 PUB12/13 可以和 ABI1 相互作用调节植物的生长发育^[13]; KEG 可降解 CIPK26, ABI5, ABF1, ABF3 等多个 ABA 信号通路中的重要基因, 参与 ABA 信号通路的调节^[14];

大多数的 RING finger 蛋白都被认为作为 E3 泛素连接酶, 目前拟南芥中预测有 1400 个基因编码的

RIFP1 可以降解 ABA 受体 RCAR3 调控植物的干旱胁迫^[15]. 由此表明了 E3 连接酶通过调节 ABA 信号通路中关键基因从而响应 ABA 信号应答. 我们对 ABRv1 的研究结果也显示, ABRv1 可能是 ABA 信号途径中的负调控因子, 而其在 ABA 信号通路中的具体作用机制, 需要找到其作用底物. 我们下一步工作将是通过酵母双杂交实验和双分子荧光互补实验筛选和鉴定 ABRv1 相互作用蛋白.

参考文献:

- [1] Liu K, Wang L, Xu Y, *et al.* Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice [J]. *Planta*, 2007, 226: 1007.
- [2] Liu K, Wang L, Xu Y, *et al.* Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice [J]. *Planta*, 2007, 226: 1007.
- [3] Suzuki M, Wu S, Li Q, *et al.* Distinct functions of COAR and B3 domains of maize VP1 in induction of ectopic gene expression and plant developmental phenotypes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 85: 179.
- [4] Barlow PN, Luisi B, Milner A, *et al.* Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc finger [J]. *J Mol Biol*, 1994, 237: 201.
- [5] Lee H J, Xiong L M, Gong Z Z, *et al.* The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 912.
- [6] Borden K L B, Freemont P S. The RING finger domain: A recent example of a sequence-structure family [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6: 395.
- [7] Yang L, Liu Q, Liu Z, *et al.* *Arabidopsis* C3HC4-RING finger E3 ubiquitin ligase AtAIRP4 positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling [J]. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 67.
- [8] Stone S L, Hauksdottir H, Troy A, *et al.* Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137: 13.
- [9] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16: 735.
- [10] Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 199.
- [11] 陈存, 唐天元, 杨虹伟, 等. 油菜中一未知 BnRCH 蛋白的 E3 连接酶活性分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2012, 49: 1159.
- [12] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503.
- [13] Kosarev P, Mayer K F X, Hardtke C S. Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome [J]. *Genome Biol*, 2002, 3: RESEARCH0016.
- [14] 杨皓, 刘志斌, 李旭锋, 等. 拟南芥 AtHHR2 基因的功能初步研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 945.
- [15] Kong L, Cheng J, Zhu Y, *et al.* Degradation of the ABA co-receptor ABI1 by PUB12/13 U-box E3 ligases [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8630.
- [16] Chen Y T, Liu H, Stone S, *et al.* ABA and the ubiquitin E3 ligase KEEP ON GOING affect proteolysis of the *Arabidopsis thaliana* transcription factors ABF1 and ABF3 [J]. *Plant J*, 2013, 75: 965.
- [17] Li Y, Zhang L, Li D, *et al.* The *Arabidopsis* F-box E3 ligase RIFP1 plays a negative role in abscisic acid signalling by facilitating ABA receptor RCAR3 degradation [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 571.