

过表达柠条锦鸡儿*CkRNF185*基因减弱拟南芥对渗透胁迫的耐受性

岳文冉¹, 王茜², 于秀敏³, 杨杞¹, 韩晓东¹, 王瑞刚¹, 李国婧^{1,*}

¹内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古农业大学植物逆境生理与分子生物学自治区重点实验室, 呼和浩特010018

²中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京100101

³中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特010018

摘要: RING (really interesting new gene)型E3泛素连接酶在植物逆境胁迫和生长发育过程中起关键作用。本研究利用RACE技术从柠条锦鸡儿中克隆得到一个RING型E3泛素连接酶基因*CkRNF185* (*Caragana korshinskii* RING-finger 185), 其cDNA序列全长1 112 bp, 包含了696 bp的开放阅读框, 编码232个氨基酸。实时荧光定量PCR检测发现, *CkRNF185*基因的表达受NaCl和脱水处理的诱导。同时构建pCanG-*CkRNF185*过表达载体并转化野生型拟南芥, 得到转基因拟南芥过表达纯合体株系。通过对转基因拟南芥的研究, 发现在甘露醇处理条件下转*CkRNF185*植物植株变小且叶片提前变黄坏死, 叶绿素和脯氨酸含量皆降低。利用体外泛素化实验对*CkRNF185*进行检测发现该蛋白具有E3泛素连接酶活性。这些实验结果表明过表达E3泛素连接酶编码基因*CkRNF185*降低了拟南芥对渗透胁迫的耐受性。

关键词: E3泛素连接酶; 柠条锦鸡儿; *CkRNF185*; 渗透胁迫; 拟南芥

干旱、高盐、低温、高温和盐碱等非生物胁迫过程是影响植物减产的主要因素之一(Xiong等2002; Zhu 2002), 当植物处于逆境环境时会通过不同的生理代谢过程和信号转导途径来适应非生物胁迫过程(Knight和Knight 2001)。泛素化能够通过降解目标蛋白进而影响植物的多种生长发育过程(Smalle和Vierstra 2004), 通过调控功能蛋白的数量和活性, 在调控植物适应逆境胁迫过程中起到重要作用(黄海杰和陈雄庭2008)。

泛素在泛素活化酶E1、泛素结合酶E2和泛素连接酶E3的共同作用下结合到目标蛋白上, 其中泛素连接酶E3在底物蛋白的选择性降解过程中起到主要的作用(杨东叶等2005)。拟南芥基因组中预测得到最多的E3是RING型E3, 有469个RING型的E3编码基因(Kraft等2005), 水稻中有378个(Liu等2008), 白杨中有399个(Du等2009)。RING结构域家族最典型的特点是具有环指结构域, 由70个氨基酸中的8个氨基酸(半胱氨酸和组氨酸)通过与锌离子螯合作用形成C3H2C3 (RING-H2)或C3HC4 (RING-HC)等构型(Kosarev等2002)。

研究表明RING型E3泛素连接酶参与植物生长、发育、生物和非生物胁迫等过程, 尤其在植物干旱胁迫调控过程中起到关键作用。*XERICO*基因是拟南芥中最早鉴定出参与干旱胁迫响应的

RING finger型E3泛素连接酶基因(Ko等2006)。*SDIR1* (salt and drought-induced RING finger1)通过26S蛋白酶体途径降解SDIRIP1参与ABA相关的胁迫信号转导, 它通过增加ABA诱导的气孔关闭, 来增强对干旱的耐受力(Zhang等2007, 2015)。*AtAIRP1* (*Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive RING protein 1)与*AtAIRP2*基因在ABA依赖的干旱胁迫响应中起到组合的作用(Ryu等2010; Cho等2011)。*AtAIRP3*基因受干旱、高盐和ABA的诱导, 正调控ABA介导的干旱和盐胁迫响应(Kim和Kim 2013)。*AtAIRP4*基因正调控ABA介导的干旱胁迫响应(Yang等2015)。除了这些参与ABA信号通路调控干旱胁迫相关的RING型E3泛素连接酶基因以外, 还有一些RING型E3泛素连接酶通过调控功能蛋白或转录因子参与干旱胁迫应答。如*Rma1H1* [a hot pepper (*Capsicum annuum*) homolog of a human RING membrane-anchor 1]基因能够增强拟南芥对干旱的耐受

收稿 2018-11-13 修定 2019-03-21

资助 内蒙古自治区科技创新引导资金项目(KCJ2018012)和呼和浩特市科技计划重大项目(2017-社-重-4)。

致谢 本文的体外泛素化实验在中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究员实验室完成, 实验室所有同学对实验提供了不同程度的帮助。

* 通讯作者(liguoqing@imau.edu.cn)。

力(Lee等2009)。DRIP1 (DREB2A-interacting protein1)和DRIP2是C3HC4 RING型E3泛素连接酶,通过泛素化DREB2A使其被降解来负调控干旱胁迫响应(Qin等2008)。

柠条锦鸡儿为荒漠沙生、早生的多年生高大灌木,具有抗旱、抗风、耐沙埋等特点,近年来已成为西北地区生态环境建设、防沙治沙、发展畜牧业的优选灌木植物(Xu等2012)。本研究从柠条锦鸡儿干旱胁迫抑制性削减杂交文库中,找到一条*CkRNF185*基因的部分基因序列,利用RACE技术克隆得到该基因的全长cDNA序列,实时荧光定量结果发现*CkRNF185*基因受NaCl和脱水胁迫诱导,可能参与柠条锦鸡儿抗渗透胁迫响应;同时构建了柠条锦鸡儿*CkRNF185*基因过表达载体并转化野生型拟南芥,对转基因拟南芥在甘露醇渗透胁迫下表型实验进行分析,以期为进一步研究*CkRNF185*基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii* Kom.)种子采自于内蒙古自治区乌兰察布市四子王旗;大肠杆菌Trans T1感受态细胞和BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;改造后pET30-TEV/LIC (含Mbp和His标签)载体由本实验室保存。野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia-0生态型(Col-0)由本实验室保存,植物表达载体pCanG-HA由中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究员惠赠。泛素(Ub)、泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、Ub和Mbp抗体由中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究员提供。His标签的抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, Ni-NTA Resin购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 柠条锦鸡儿处理方法

选取种质较好的柠条锦鸡儿种子,播种于营养土和蛭石(1:2)的混合土中,置于22°C、16 h光照/8 h黑暗的温室中进行培养。选1个月苗龄长势一致的植物进行脱水、NaCl和ABA溶液处理。将苗从土中小心取出,洗净,分别置于滤纸、含300 mmol·L⁻¹

NaCl、100 μmol·L⁻¹ ABA的1/2MS培养溶液中处理,分别在处理后的0、1、3、6、12、24和48 h进行取样,每个时间点取3株植物的地上部分,液氮速冻,-80°C保存。

1.2.2 总RNA提取与实时荧光定量PCR

利用天根总RNA提取试剂盒提取柠条锦鸡儿和拟南芥总RNA,利用全式金AT311-03试剂盒进行cDNA第一链的合成,具体实验方法见说明书。利用LightCycler 480实时荧光定量PCR仪进行扩增,反应体系为: SYBR Premix Ex Taq 10 μL,上下游引物(见表1)各0.4 μL (10 μmol·L⁻¹),稀释的模板5 μL, DEPC水4.2 μL,总体积20 μL。反应程序为: 95°C预变性5 min; 95°C变性5 s, 60°C退火15 s, 72°C延伸30 s, 40个循环,实验结果用2^{-ΔΔCt}方法计算。

1.2.3 基因克隆与表达载体构建

提取柠条锦鸡儿总RNA,利用宝生物公司3'和5' RACE试剂盒处理得到cDNA模板,利用巢式PCR进行扩增,所用引物见表1,具体实验方法参考说明书。得到拼接后全长cDNA片段并对其序列正确性进行验证。使用基因特异引物(CkRNF185-F和CkRNF185-R),进行PCR扩增,反应体系为: 98°C预变性3 min; 98°C变性10 s, 63°C退火10 s, 72°C延伸1 min, 72°C补充延伸10 min, 30个循环。表达载体构建方法参考于秀敏等(2017)文献。

原核表达载体构建:用特异引物(CkRNF185-Y-F和CkRNF185-Y-R)进行PCR扩增目的片段。回收目的片段,进行T4 DNA聚合酶处理。*SspI*酶切原核表达载体pET30-TEV/LIC并进行T4 DNA聚合酶处理。将处理好的目的片段与载体连接,转化大肠杆菌DH5α,筛选阳性菌株,对阳性菌株进行*XhoI*和*XbaI*酶切验证,将验证正确的菌株进行测序。本实验所用引物及测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2.4 甘露醇处理方法

拟南芥种子先用75%乙醇灭菌10 min,然后再用无水乙醇灭菌10 min,晾干后种在1/2MS培养基中,4°C春化3 d,取出置于22°C、16 h光照/8 h黑暗的温室中进行培养。生长第4天将其移到含有400 mmol·L⁻¹甘露醇和1/2MS培养基中培养,观察生长

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

名称	序列(5'→3')	用途
CkRNF185-3'-1	TCACGCCTTCCACTGCTT	3' RACE
CkRNF185-3'-2	CAAGAGTGTCCCGTTTGTAAG	3' RACE
CkRNF185-5'-1	GCCTTACAAACGGGACACT	5' RACE
CkRNF185-5'-2	CAGTGAAGGCGTGAAGTT	5' RACE
CkRNF185-F	gcGTCGACATCCGAGGGATTAGACAAATG	基因ORF扩增
CkRNF185-R	gcGAGCTCAGACACAGTAAGCTCAAAACCA	基因ORF扩增
CkRNF185-Y-F	TACTTCCAATCCAATGCCCGAGGGATTAGACAAATGG	原核表达
CkRNF185-Y-R	TTATCCACTTCCAATGCTAAACAAAAATAACAGTAAGAA	原核表达
CkRNF185-Q-F	GTACCATGGGTTTGATTGATGGGG	qRT-PCR
CkRNF185-Q-R	GAATGTTGAGCAAGGATGGGAT	qRT-PCR
qCiEF1 α -F	CAAAAAGTCCCCTCGTTGTCTC	qRT-PCR
qCiEF1 α -R	AGCAATCGTTCCTAATGATCTAA	qRT-PCR
qAtEF1 α -F	AGAAGGGTGCCAAATGATGAG	qRT-PCR
qAtEF1 α -R	GGAGGGAGAGAGAAAGTCACAGA	qRT-PCR

情况。甘露醇处理根长实验方法, 将生长48 h之内的拟南芥移到含有400 mmol·L⁻¹甘露醇和正常1/2MS 垂直平板中, 22°C、16 h光照/8 h黑暗的温室中进行培养, 第7天进行根长统计。

1.2.5 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)处理方法

拟南芥种子表面灭菌后种在含100 μ mol·L⁻¹ ACC的1/2MS培养基中, 4°C春化3 d, 取出置于22°C、16 h光照/8 h黑暗的温室中进行培养, 观察生长情况。另一部分取出置于22°C、黑暗的培养箱中培养, 7 d后观察生长情况。

1.2.6 蛋白表达与纯化

将构建成功的质粒转化大肠杆菌表达菌株BL21 (DE3), 挑取阳性菌落于含有卡那霉素的LB培养基中, 37°C、180 r·min⁻¹摇菌14~16 h。按2%的接菌量转接于含卡那霉素的500 mL LB培养基中, 37°C、180 r·min⁻¹摇菌, 当OD值达到0.6~0.8时加入IPTG, 使其终浓度达到0.5 mmol·L⁻¹, 16°C、130 r·min⁻¹诱导15 h。收集诱导后菌体沉淀, 冰浴超声破碎细胞, 收集上清液, 沉淀-80°C冰箱保存。

将得到的细胞破碎液的上清液, 加入平衡好的Ni柱中使其穿过Ni柱, 收集穿透液, 分别用含20、60、80、100和200 mmol·L⁻¹咪唑的洗脱缓冲液依次对结合在镍柱上的蛋白进行洗脱。收集洗脱液, 用SDS-PAGE对纯化结果进行检测。

1.2.7 体外泛素化实验

E3活性检测体系如下: 50 ng E1、100 ng E2、200 ng E3和2 μ g Ub在反应缓冲液中 30°C、900 r·min⁻¹反应1 h。反应结束后向管中加入4×Loading, 42°C孵育10 min, 然后用SDS-PAGE分离样品, 并用Ubiquitin抗体和Mbp抗体进行Western blot检测。体外泛素化实验在谢旗研究员实验室完成。

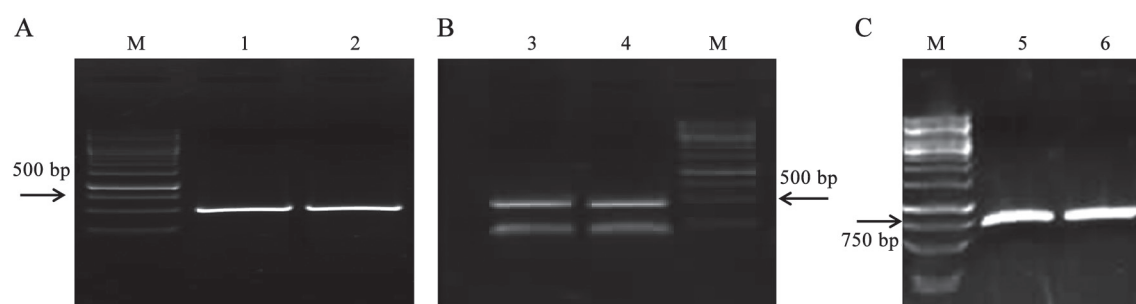
2 实验结果

2.1 *CkRNF185*基因的克隆

从柠条锦鸡儿SSH文库中, 找到一条*CkRNF185*基因的部分基因序列, 利用RACE技术, 克隆得到该基因3' RACE片段序列(图1-A)和5' RACE片段序列(图1-B)。将克隆得到的RACE片段序列与文库中的序列拼接得到该基因的全长cDNA序列, 对此序列正确性进行验证。该基因cDNA序列(图1-C)全长1 112 bp, 起始密码子ATG, 终止密码子TAA, 包含了696 bp的开放阅读框, 编码232个氨基酸(图2)。

2.2 *CkRNF185*系统进化分析

利用MEGA6软件中邻近相接法对*CkRNF185*蛋白和其他物种的同源蛋白进行系统进化分析(图3), *CkRNF185*蛋白与木豆(*Cajanus cajan*)、毛黧豆(*Mucuna pruriens*)、2个大豆(*Glycine max*)和绿豆(*Vigna radiate* var. *radiate*)的蛋白聚为一支, 氨基酸

图1 *CkRNF185*基因克隆的电泳结果Fig.1 Gel electrophoresis of amplification of *CkRNF185*

A: *CkRNF185* 3' RACE电泳结果; B: *CkRNF185* 5' RACE电泳结果; C: *CkRNF185* cDNA扩增。M: DL5000 marker。

```

1  GAAATAGAATTCCAGAAAAATCCTGGAATCTTCCACAAGGTTTTCGGTGACAACCAAATT
61  TAGGGCTTTTCATCACTCGAGGATTAACCATTCCAACCAAACTTTTCTGTATTTCTCT
121  ACCAATGCATTTCCCTCAAGGCCTCAACCGAATCGGTTTCGTTTCGCATTTATAGTTGAT
181  TTTGTTGGTACATCTGAAGATCCGAGGGATTAGACAAATGGCGAGTGGTTTTGGGGAAT
                                     M A S G F G E
241  CAACAACGAGAGCGTCTACAGCGAGCTCATCATGCTCAGGGAACAGTTCCAATGACGCTG
    S T T R A S T A S S S C S G N S S N D A
301  GCGATTCGAATGCAACATATGCTTCGATTTGGCACAGGACCCTGTGATCACTCTCTGTG
    G D F E C N I C F D L A Q D P V I T L C
361  GTCATTTATTCTGTTGGCCATGCCTTTATAGATGGCTCCACCATCACTCTCATTCTCAAG
    G H L F C W P C L Y R W L H H S H S Q
421  AGTGTCCCGTTTGAAGGCCCTTGTGCAGGAAGAGAAATTGGTTCCCCTTTATGGGAGGG
    E C P V C K A L V Q E E K L V P L Y G R
481  GAAAATCACAGACTGATCCAAGGACCAATCATATCCTGGAATGGAGATCCCTCACCGTC
    G K S Q T D P R T K S Y P G M E I P H R
541  CTTCCGGGCAGAGGCCTCAAACGGCGCCCCCGCCTCCTCCGGAAGGGAATCCATTG
    P S G Q R P Q T A P P P P P P E G N P F
601  GGAATTATGGGTTTGGATTGATGGGGGATTCATCCCATGGCAACTGCTCGGATTGGAA
    G N Y G F G L M G G F I P M A T A R I G
661  ACTTCAGCCTTCCACTGCTTTTGGTGGTTTTATCCCATCCTTGCTCAACATCACTGTC
    N F T P S T A F G G F I P S L L N I H L
721  ATGGCCTCCAGGATGCCACTGTTTATGGGACAACGTCTGTTATCCCTTTGGGTTTAAAC
    H G L Q D A T V Y G T T S G Y P F G F N
781  CATTTCATGGTGGGAACACTAGAGGCTTTTCGAGGCGCAACCGGCAAGTGCAGCGGC
    P F H G G N T R G F S Q A A T G Q V Q R
841  AGGAGGACAATGTTTGAAGAATTTGCTATTGTTGATTGGATTCTGGTACTTCTACTG
    Q E D N V L K N L L L L I G F L V L L T
901  TTATTTTGTGTTGGTAATATCATTGGTTTTGAGCTTACTGTGTCTTTTTTGTGTTGCTC
    V I F V W *
961  CTCTTCTAGAGGAGTATTGTGTGTGTACATATTTTAGTTGGCTTCAAGAGGAAATTGTAT
1021  GCTTGAGAATGCTGCCTGTTTGGCTCTTTATCAACTGTATTATAAACATCTGCAATGAAC
1081  TTGAATGTTTCTGTTTGGCTCAAAAAAAAAA

```

图2 *CkRNF185*基因cDNA序列及氨基酸序列Fig.2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *CkRNF185*

*表示终止密码子。

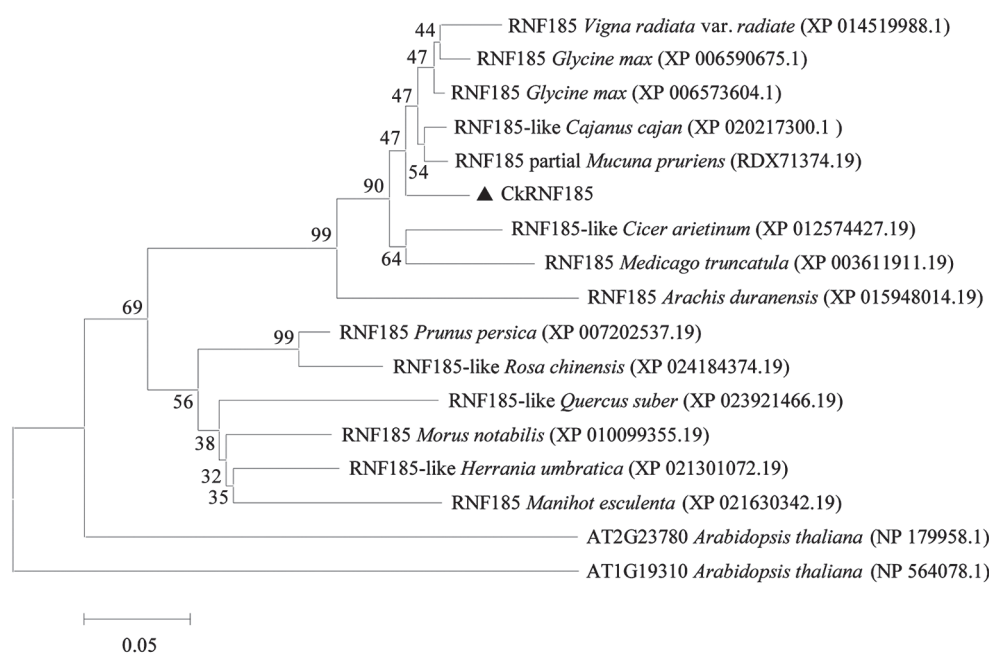


图3 CkRNF185系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of CkRNF185

图中括号里为氨基酸登录号, 各物种名称如下, *Glycine max*: 大豆; *Vigna radiata* var. *radiata*: 绿豆苗(辐射变种); *Cajanus cajan*: 木豆; *Mucuna pruriens*: 毛黧豆; *Cicer arietinum*: 鹰嘴豆; *Prunus persica*: 水蜜桃; *Morus notabilis*: 桑树; *Rosa chinensis*: 月季; *Quercus suber*: 栓皮栎; *Herrania umbratica*: 哥伦比亚锦葵; *Arachis duranensis*: 蔓花生; *Manihot esculenta*: 木薯; *Medicago truncatula*: 蒺藜苜蓿; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥。

序列的相似性分别为93.97%、93.49%、93.53%、92.24%和90.95%, 与拟南芥E3泛素连接酶蛋白(AT2G23780)氨基酸序列的相似性为62%。

2.3 *CkRNF185*基因表达模式分析

利用荧光定量PCR技术对NaCl、脱水胁迫和ABA处理下柠条锦鸡儿中*CkRNF185*基因的表达模式进行分析(图4)。随着脱水处理时间的增长, *CkRNF185*基因的表达量也随之升高, 48 h时达到最高, 为对照的4.5倍; 在NaCl处理下, 1 h达到2.1倍, 之后开始下降; *CkRNF185*基因对ABA处理响应不明显, 处理1 h表达量达最高, 为对照的1.7倍, 之后开始下降基本达到对照组表达水平。以上结果说明NaCl和脱水胁迫能够诱导*CkRNF185*基因的表达, *CkRNF185*基因可能参与柠条锦鸡儿对渗透胁迫的响应。

2.4 过表达*CkRNF185*基因降低了拟南芥对甘露醇的耐受性

将正确的重组表达质粒利用电转化法转入农

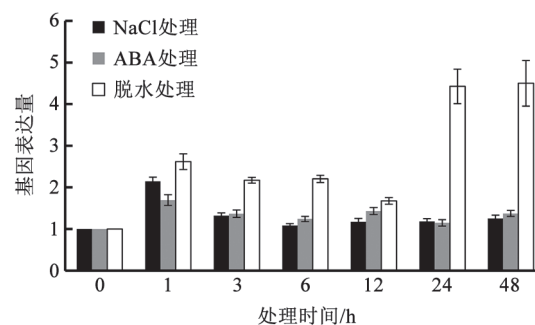


图4 柠条锦鸡儿不同胁迫处理条件下*CkRNF185*基因的表达
Fig.4 The expression of *CkRNF185* in *Caragana korshinskii* under different treatments

杆菌GV3101, 利用浸花法转化野生型拟南芥。筛选到T₃代纯合体株系, 通过RT-PCR扩增检测目的基因表达情况(图5-A)。利用qRT-PCR对转基因拟南芥中*CkRNF185*基因表达量进行检测(图5-B), 选取T₃-32、T₃-35和T₃-47三个株系进行后续实验。

将在1/2MS培养基上正常生长第4天的转空载

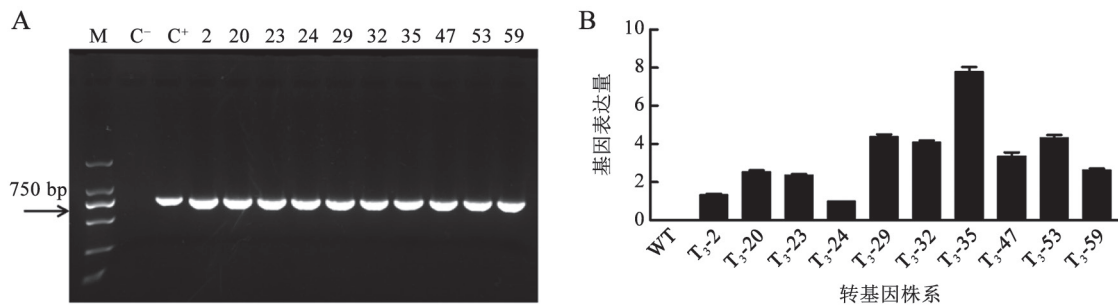


图5 *CkRNF185*转基因株系验证与表达水平检测

Fig.5 Identification and expression level analysis of *CkRNF185* transgenic *Arabidopsis thaliana* lines

A: RT-PCR鉴定*CkRNF185*转基因株系; M: DNA Marker DL2000; C⁻: 阴性对照(拟南芥cDNA); C⁺: 阳性对照(柠条锦鸡儿cDNA)。B: qRT-PCR分析*CkRNF185*转基因株系基因表达。

体的植株和过表达株系移到含有 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的1/2MS培养基中, 观察生长情况。在生长20 d后, 对照1/2MS培养基中转空载体的植株和过表达株系生长情况基本一致(图6-A); 而在含有 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的培养基中, 与转空载体的植株相比, 3个过表达株系植株更小且出现叶片变黄现象(图6-B), 但根长没有变化(图6-C)。检测叶绿素含量(图6-D)和植株鲜重(图6-E), 发现在对照培养基

中转空载体的植株与3个过表达株系的叶绿素含量和鲜重基本一致, 没有显著性差异; 但是在含有 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇培养基中3个过表达株系的叶绿素含量与鲜重均低于转空载体的植株并达到显著性水平, 与表型一致。同时, 在甘露醇处理后过表达株系脯氨酸的含量明显低于转空载体的植株, 达到显著水平(图6-F)。为了排除乙烯对植株生长的影响, 我们检测了 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACC处理植株的

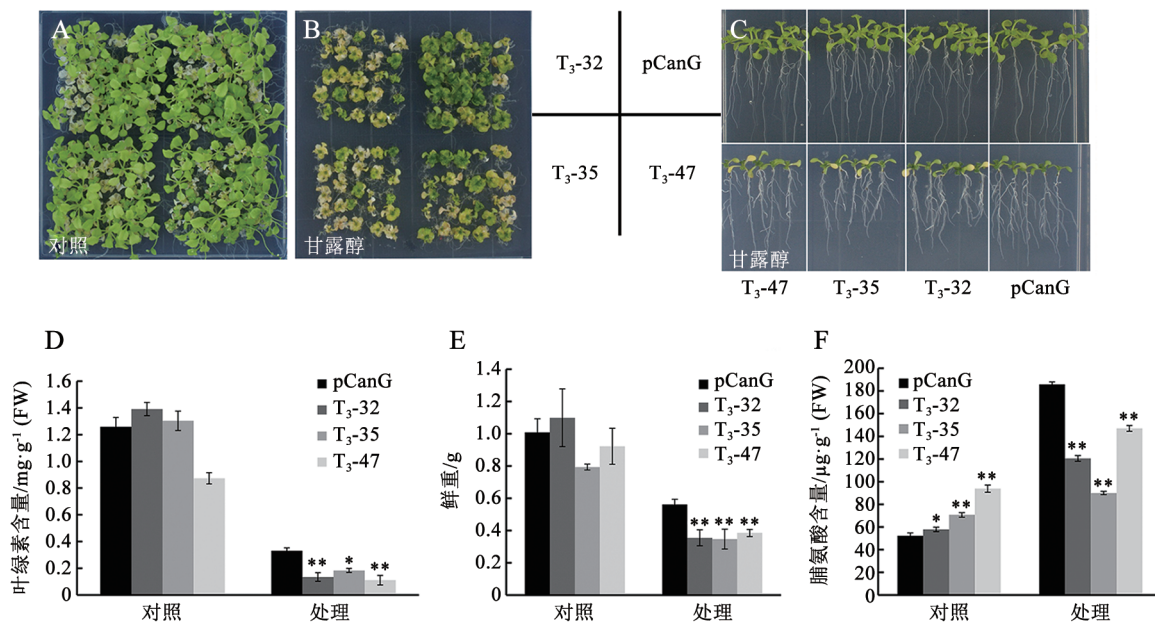


图6 转*CkRNF185*基因拟南芥幼苗对甘露醇处理敏感

Fig.6 Seedlings of *CkRNF185* overexpressing lines are sensitive to mannitol treatment

A: 在1/2MS培养基上生长20 d拟南芥植株; B: $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇处理20 d拟南芥植株; C: 甘露醇处理7 d的根长图片; D: 叶绿素含量测定结果; E: 植株鲜重测量结果; F: 脯氨酸含量测定结果。*表示显著性水平, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, 图7同此。

生长情况。黑暗培养条件下, ACC处理后植株的下胚轴生长受到抑制, 但是过表达株系的下胚轴长度明显比转空载体的下胚轴长(图7-C和D)。在正常光照培养条件下ACC处理后也没有出现过表达植株提前变黄衰老的情况(图7-A和B)。以上结果说明, 过表达株系对乙烯不敏感, 因此排除了乙烯造成植株黄化的现象, 说明过表达*CkRNF185*基因降低了拟南芥对甘露醇的耐受力。

2.5 CkRNF185蛋白表达与纯化

CkRNF185蛋白约25 kDa, 加上标签序列分子量约70 kDa。16°C下IPTG过夜进行诱导, 次日收集菌液, 超声裂解, 收集上清液与沉淀, SDS-PAGE电泳检测发现上清与沉淀中均有目的蛋白表达(图8-A)。利用Ni柱对上清液中目的蛋白进行纯化, 不同咪唑浓度进行梯度洗脱, 由图8-A可以看出100和200 mmol·L⁻¹咪唑能够将目的蛋白洗脱。选取200 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液进行浓缩纯化(图8-B), 将得到浓缩后的蛋白进行Western blot验证, 得到目的大小蛋白条带(图8-C), 说明蛋白纯化成功。

2.6 CkRNF185融合蛋白的泛素连接酶活性分析

为了分析*CkRNF185*蛋白是否具有E3泛素连接酶活性, 进行了体外泛素化实验进行鉴定。由图9可以看出, 在Ub、E1 (ATE1)、E2 (UBC8)和E3 (CkRNF185)都存在条件下, 利用Ub和Mbp抗体进行Western blot检测, 结果发现能看到多聚泛素化修饰条带; 而缺少任何一种蛋白的情况下都没有修饰发生, 说明该蛋白具有E3泛素连接酶活性。

3 讨论

干旱和盐害等非生物胁迫是影响植物生长发育的主要因素, 植物为了应对已经进化出一系列的防御机制(Hou等2009)。目前已经有很多和抗逆相关的基因被克隆研究用于提高植物对逆境的耐受性, 其中已证明E3泛素连接酶在抗逆过程中发挥重要作用, 但是关于*RNF185*基因功能的报道还很少。柠条锦鸡儿对干旱和高盐等逆境胁迫具有很强的抗逆性, 在西北地区种植广泛, 具有很大的经济价值, 是研究抗逆机制的理想材料。本研究利

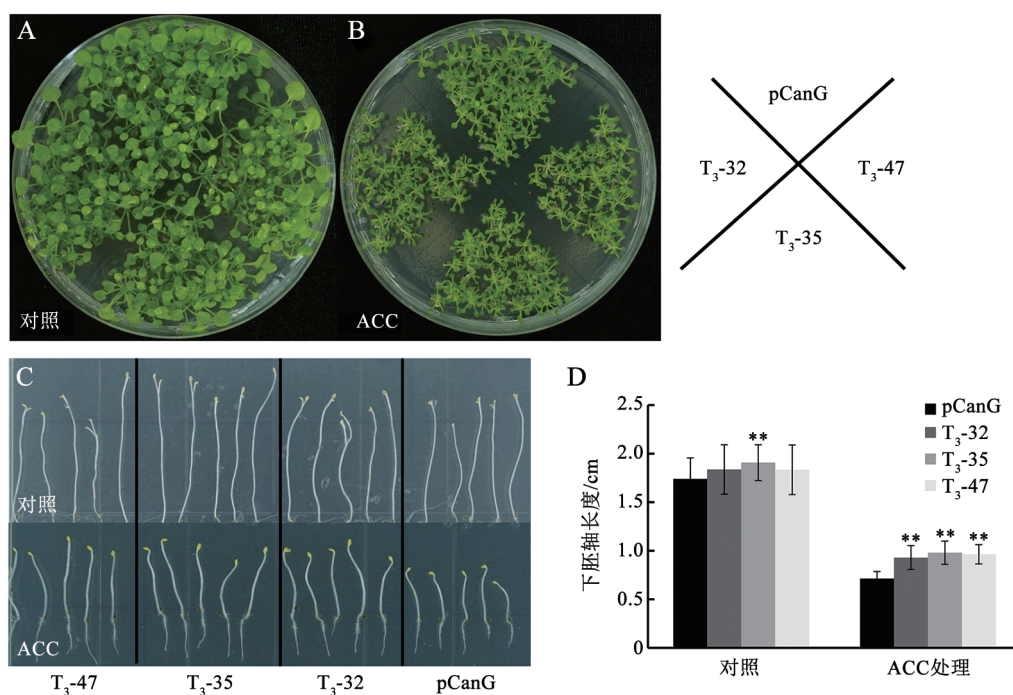


图7 转*CkRNF185*基因拟南芥幼苗对ACC处理不敏感

Fig.7 Seedlings of *CkRNF185* overexpressing lines are insensitive to ACC treatment

A、B: ACC处理16 d对照和ACC处理植株; C: 黑暗处理7 d对照和ACC处理植株生长情况; D: 黑暗处理7 d对照和ACC处理植株下胚轴长度统计结果。

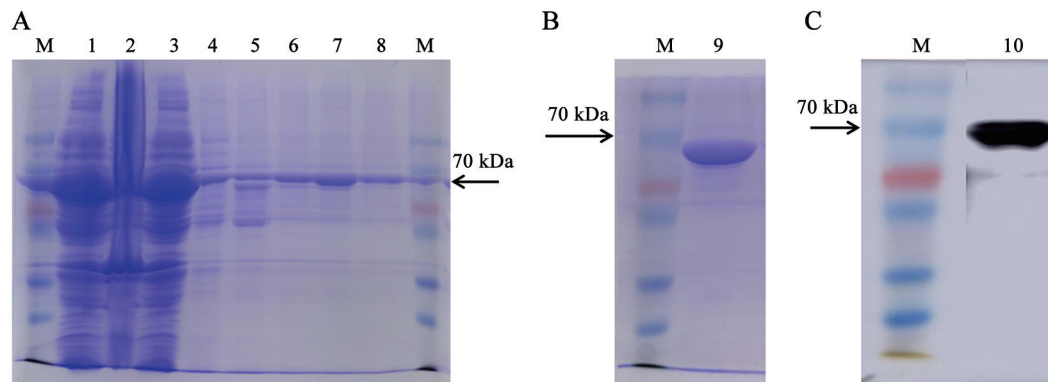


图8 CkRNF185蛋白诱导表达与纯化

Fig.8 Induced expression and purification of recombinant CkRNF185

A: CkRNF185蛋白纯化结果, 泳道1: 诱导后上清; 泳道2: 诱导后沉淀; 泳道3: 穿透液; 泳道4-8: 分别为NTA-20、60、80、100和200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液SDS-PAGE电泳检测结果。B: CkRNF185蛋白浓缩后结果(泳道9)。C: CkRNF185蛋白Western blot验证结果(泳道10)。各图中M: Marker (14~100 kDa)。

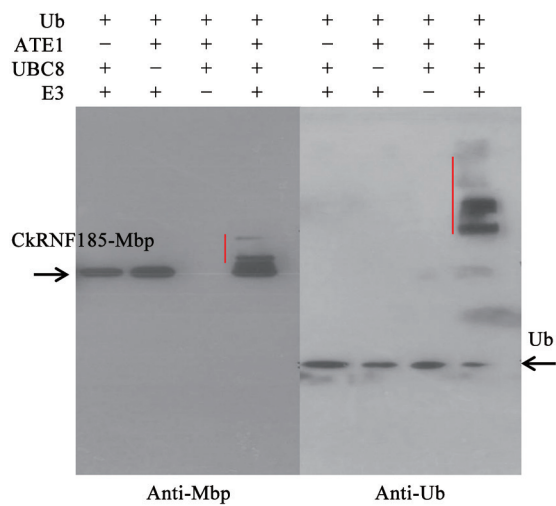


图9 CkRNF185体外泛素化分析

Fig.9 *In vitro* ubiquitination of CkRNF185

Ub: Ubiquitin [UBQ14 (At4g02890)]; ATE1: UBA2 (At5g-06460); UBC8: ubiquitin conjugating enzyme 8 (AT5G41700); E3: CkRNF185。

用RACE技术, 克隆得到柠条锦鸡儿*CkRNF185*基因, 属于RING型E3泛素连接酶基因。其编码的蛋白与木豆、毛黧豆、两个大豆和绿豆的蛋白聚为一支, 氨基酸序列的相似性分别为93.97%、93.49%、93.53%、92.24%和90.95%, 与拟南芥E3泛素连接酶蛋白(AT2G23780)氨基酸序列的相似性为62%。本实验还通过体外泛素化实验对CkRNF185蛋白

酶活性进行了分析, 发现CkRNF185蛋白具有E3泛素连接酶活性。*CkRNF185*表达受脱水和NaCl的诱导, 对ABA响应不明显。说明*CkRNF185*基因可能参与柠条锦鸡儿的抗渗透胁迫过程。

甘露醇是常用的脱水剂, 本研究利用甘露醇处理拟南芥幼苗, 观察在甘露醇处理后拟南芥的生长情况。实验发现在甘露醇处理后过表达株系提前出现叶片黄化、坏死的现象, 叶绿素含量降低。同时植株也要比转空载体的植株小, 但是甘露醇处理后对拟南芥的根长没有影响。脯氨酸含量增加可提高植物对渗透胁迫的耐受能力, 在植物抗逆过程中起着重要作用(陈琴等2015; 邓辉茗等2017)。通过检测脯氨酸含量, 与转空载体的植株相比, 甘露醇处理后过表达株系的脯氨酸积累量降低, 综合以上结果表明: 过表达*CkRNF185*基因降低了拟南芥对渗透胁迫的耐受性。

气态激素乙烯在植物生长发育和逆境胁迫反应中起到重要作用, 如种子萌发、开花、叶片衰老和果实成熟等过程(Bleecker和Kende 2000)。其中乙烯在诱导叶片衰老过程中起到关键作用。为了排除乙烯对植物叶片黄化的影响, 本研究检测了ACC处理后在正常光照培养和黑暗条件下拟南芥的生长情况。结果发现在正常光照培养下, ACC处理后植株没有出现叶片黄化的现象, 在黑暗培养条件下, 过表达株系的下胚轴比转空载体植株的下

胚轴长, 说明过表达植株对乙烯不敏感。甘露醇处理后过表达株系叶片提前黄化现象与乙烯无关。以上结果表明过表达*CkRNF185*基因降低了拟南芥对渗透胁迫的耐受性, 但是具体作用机制还需要进一步实验验证, 该结果为进一步研究*CkRNF185*基因在抗逆过程中的功能奠定了基础。

参考文献(References)

- Bleecker AB, Kende H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: 1–18
- Chen Q, Li XX, Tong T, et al (2015). Influence of drought stress on transgenic *CpHRD* gene in tobacco. *Plant Physiol J*, 51: 715–720 (in Chinese with English abstract) [陈琴, 李星星, 童婷等(2015). 干旱胁迫对转*CpHRD*基因烟草的影响. *植物生理学报*, 51: 715–720]
- Cho SK, Ryu MY, Seo DH, et al (2011). The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid-mediated drought stress responses. *Plant Physiol*, 157: 2240–2257
- Deng HM, Long CY, Cai SZ, et al (2017). Effects of physiological characteristics of *Cirsium japonicum* leaves on simulated drought stress by PEG-6000. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 37: 959–964 (in Chinese with English abstract) [邓辉茗, 龙聪颖, 蔡仕珍等(2017). PEG-6000模拟干旱胁迫对大蓟叶片生理特性的影响. *西北植物学报*, 37: 959–964]
- Du Z, Zhou X, Li L, et al (2009). plantsUPS: a database of plants' ubiquitin proteasome system. *BMC Genomics*, 10: 227
- Huang HJ, Chen XT (2008). The progress on the ubiquitin 26S proteasome pathway in plants. *Chin Biotechnol*, 28: 127–132 (in Chinese with English abstract) [黄海杰, 陈雄庭(2008). 植物泛素/26S蛋白酶体途径研究进展. *中国生物工程杂志*, 28: 127–132]
- Hou X, Xie K, Yao J, et al (2009). A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 6410–6415
- Kim JH, Kim WT (2013). The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP3/LOG2 participates in positive regulation of high-salt and drought stress responses. *Plant Physiol*, 162: 1733–1749
- Knight H, Knight MR (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci*, 6: 262–267
- Ko JH, Yang SH, Han KH (2006). Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J*, 47: 343–355
- Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS (2002). Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biol*, 3: research0016
- Kraft E, Stone SL, Ma L, et al (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 1597–1611
- Lee HK, Cho SK, Son O, et al (2009). Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 21: 622–641
- Liu H, Zhang H, Yang Y, et al (2008). Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol*, 68: 17–30
- Qin F, Sakuma Y, Tran LS, et al (2008). *Arabidopsis* DRE-B2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 20: 1693–1707
- Ryu MY, Cho SK, Kim WT (2010). The *Arabidopsis* C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. *Plant Physiol*, 154: 1983–1997
- Smalle J, Vierstra RD (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 555–590
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14 Suppl: S165–S183
- Xu DH, Fang XW, Su PX, et al (2012). Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. *Photosynthetica*, 50: 541–548
- Yang DY, Liu KY, Yu ZH (2005). E3 ubiquitin ligase. *Chin J Cell Biol*, 27: 281–285 (in Chinese with English abstract) [杨东叶, 刘凯于, 于泽华(2005). 泛素连接酶E3. *中国细胞生物学学报*, 27: 281–285]
- Yang L, Liu Q, Liu Z, et al (2015). *Arabidopsis* C3HC4-RING finger E3 ubiquitin ligase AtAIRP4 positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling. *J Integr Plant Biol*, 58: 67–80
- Yu XM, Yue WR, Zhang YN, et al (2017). Cloning and functional characterization of *CkLEA4-2* from *Caragana korshinskii*. *Plant Physiol J*, 53: 94–105 (in Chinese with English abstract) [于秀敏, 岳文冉, 张燕娜等(2017). 柠条锦鸡儿*CkLEA4-2*基因的克隆与功能分析. *植物生理学报*, 53: 94–105]
- Zhang H, Cui F, Wu Y, et al (2015). The RING finger ubiquitin E3 ligase SDIR1 targets SDIR1-interaction protein 1

- for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27: 214–227
- Zhang YY, Yang CW, Li Y, et al (2007). SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 1912–1929
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247–273

Overexpression of *CkRNF185* from *Caragana korshinskii* reduces osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*

YUE Wen-Ran¹, WANG Qian², YU Xiu-Min³, YANG Qi¹, HAN Xiao-Dong¹, WANG Rui-Gang¹, LI Guo-Jing^{1,*}

¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Plant Stress Physiology and Molecular Biology, Hohhot 010018, China

²Institute of Genetics and Development Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³Institute of Grassland Research of CAAS, Hohhot 010018, China

Abstract: RING (really interesting new gene) type E3 ubiquitin ligase plays a crucial role in regulation plant growth and development and stress response. In this study, the full length cDNA sequence of *CkRNF185*, an E3 ubiquitin ligase gene, was cloned using seedlings of *Caragana korshinskii*. Full length of *CkRNF185* cDNA was 1 112 bp, containing 696 bp open reading frame (ORF) which encoding 232 amino acids. Quantitative real time PCR analysis showed that *CkRNF185* was regulated by dehydration and NaCl treatment at the transcript level. Furthermore, expression vector pCanG-*CkRNF185* was constructed and transformed into the wild-type *Arabidopsis thaliana*. Transgenic *A. thaliana* overexpressing *CkRNF185* were generated for further analysis. Compared with the empty vector transgenic plants under mannitol osmotic stress, the overexpressed plants became smaller, yellowish in the leaves, and the chlorophyll and proline content decreased. *In vitro* ubiquitination assays showed *CkRNF185* possessed E3 ubiquitin ligase activity. These results indicated that *CkRNF185* decreased tolerance of the transgenic *A. thaliana* to osmotic treatments.

Key words: E3 ubiquitin ligase; *Caragana korshinskii*; *CkRNF185*; osmotic stress; *Arabidopsis thaliana*

Received 2018-11-13 Accepted 2019-03-21

This work was supported by the Science and Technology Innovation Guiding Fund of Inner Mongolia Autonomous Region (KCBJ2018012), and Major Science and Technology Projects of Hohhot (2017-She-Zhong-4).

*Corresponding author (liguojing@imau.edu.cn).