DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20240018

山葡萄基因 VaEXO11 及其启动子的克隆与序列分析

尹 晓,许文娣,李 娟,马登辉,刘成敏,单守明*

(宁夏大学葡萄酒与园艺学院,银川 750021)

摘 要:【目的】探究欧洲葡萄基因 VvEXO11 在山葡萄中的同源基因 VaEXO11 的表达及功能,为揭示葡萄抗寒分子通路、培育新的抗寒葡萄品种提供理论依据。【方法】克隆并分析 VaEXO11 及其启动子 Praexon 序列,通过瞬时转化烟草探 究 Praexon 与低温胁迫的关系。【结果】从 VaEXO11 克隆到的 cDNA 序列全长为957 bp,其中 ORF 为957 bp,编码 318 个氨基酸。该基因仅由1个外显子构成,其蛋白含有一个高度保守的 Phi_1 结构域和一个信号肽,丝氨酸含量丰富,经预测为疏水脂溶性蛋白。对克隆到的 Praexon 进行顺式作用元件预测,分析结果表明,Praexon 不仅含有 CAAT-box、TATA-box 等核心启动子元件,还具备参与干旱胁迫、昼夜节律调控和创伤响应等功能响应元件。瞬时转化结果表明,低温激活 Praexon 的活性, VaEXO11 的相对表达量迅速上升,直接或间接促进细胞内抗氧化酶的产生。【结论】VaEXO11 除了参与低温调控,还可能参与多种逆境相关的调控,从而响应多种生物与非生物胁迫。

关键词:山葡萄; VaEXO11; 启动子; 序列分析

中图分类号:S663.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2024)07-1285-12

Cloning and sequence analysis of *VaEXO11* and its promoter in *Vitis amu*rensis

YIN Xiao, XU Wendi, LI Juan, MA Denghui, LIU Chengmin, SHAN Shouming^{*} (College of Enology and Horticulture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract: [Objective] Low temperature is one of the important climatic factors affecting crop yield and quality. It is urgent to study the mechanisms of low temperature at the molecular and genetic levels and to find ways to improve plant cold resistance. According to the previous transcriptome analysis, it was found that six members of the VvEXO family in Muscat were up-regulated under low temperature conditions, among which VvEXO11 was found to be the most significantly up-regulated. The analysis of the expression profile of VvEXO showed that VvEXO11 responded to low temperature stress in grapevines at early stage, and its role in the response to low temperature stress needed to be further studied. Vitis amurensis has been widely studied in cold resistance breeding. In this study, VvEXO11 and its promoter sequence in V. amurensis were cloned and analyzed by bioinformatics methods, and the function of VaEXO11 was preliminarily predicted, thus providing clues for further gene function verification, and revealing the new cold-resistant grape varieties. [Methods] Using V. amurensis as the test material, DNA and total RNA were extracted using DNAsecure novel plant genomic DNA extraction kit and RNAprep Pure polysaccharide and polyphenol plant total RNA extraction kit produced by Tiangen Biochemical Technology Co. The total RNA and DNA were extracted according to the product instructions. Using qualified total RNA as template, TransScript one-step gDNA removal and cDNA synthesis kit was used to reverse-transcribe the RNA into cDNA according to the instructions. The cDNA obtained by reverse transcription of V. amurensis RNA and extracted V. amurensis DNA were used as templates,

收稿日期:2024-01-11 接受日期:2024-04-25

基金项目:宁夏科技厅重点研发计划项目(2022BBF03019);宁夏自然科学基金项目(2022AAC03010)

作者简介:尹晓,男,讲师,博士,主要从事果树分子育种教学和相关研究。E-mail:yinxiao90@nxu.edu.cn

^{*}通信作者 Author for correspondence. E-mail: fxssm@163.com

respectively, based on the EXORDIUM sequence fragments obtained by sequencing the V. amurensis transcriptome and combined with the design of primers VaEXO11-F/VaEXO11-R, P_{VaEXO11}-F/P_{VaEXO11}-R for the amplification of ORF and promoter of the target gene. The PCR amplification products were detected by 1.2% agarose gel electrophoresis and DNA Marker DL2000. The amplified DNA fragments were recovered and ligated to the cloning vector, and then the connected products were transformed into the receptor state of DH5a Escherichia coli by heat shock method. After antibiotic screening and colony PCR detection, positive clones were selected for sequencing. The promoter sequence of VaEXO11 gene in grape was firstly cloned and then analyzed by the Plant CARE (http://bioinformatics.psb.ugent. be/webtools/plantcare/html/) to predict promoter cis element. The relationship between promoter PraExoll and low temperature stress was investigated by transient transformation of tobacco. [Results] The cD-NA sequence of VaEXO11 gene cloned from the grapevine was 957 bp, and its open reading frame was 957 bp, encoding 318 amino acids, DNA sequence analysis of VaEXO11 revealed that VaEXO11 consisted of only one exon, which had only 6 nucleotides different from VvEXO11. The conserved domain analysis of VaEXO11 protein showed that VaEXO11 protein contained only one conserved domain, Phi 1 domain. VaEXO11 and VvEXO11 protein sequence comparison revealed that there were only 3 amino acid differences between them. The basic physical and chemical properties of VaEXO11 protein were analyzed by Protparam. The molecular weight of VAEXO11 protein was 33855.58 Da and the theoretical isoelectric point (pI) was 9.15. In amino acid composition, serine (Ser) content was the highest, reaching 12.3%, followed by leucine (Leu) and glycine (Gly), which were 11.3% and 8.8%, respectively. The instability index (II) was 31.75, indicating that the protein was stable. The Grand average of hydropathicity (GRAVY) is -0.082 and the Aliphatic index is 85.03, indicating that it was a hydrophobic fat-soluble protein. Analysis of grape genome data showed that EXL11 was present on the 18th chromosome of grape. Grape P_{VaEXOI1} promoter contained multiple action elements. In addition to core promoters like CAAT-box and TATA-box, some functional response elements were also found, including hormone response elements, action elements involved in drought stress, circadian rhythm regulation and trauma response elements. Phylogenetic analysis showed that besides V. vinifera and V. riparia, Tripterygium wilfordii was closely related to VaEXO11. Transient transformation result in tobacco showed that low-temperature activation of promoter activity induced a rapid increase in the relative expression of VaEXO11, directly or indirectly promoting the production of intracellular antioxidant enzymes, thereby reducing the damage of low-temperature to cells and improving cold resistance. [Conclusion] In this study, VaEXO11 gene was cloned from V. amurensis. The similarity of VaEXO11 sequence with VvEXO11 sequence in Pinot Noir was 99.37%, and the similarity of protein sequence with VvEXO11 sequence was 98.75%. The protein contained a highly conserved Phi 1 domain and a signal peptide, which was predicted to be a hydrophobic fat-soluble protein. The cis-acting elements was predicted in cloned promoter sequence, and it was found that the promoter region contained a variety of elements related to stress, indicating that the gene may participate in response to a variety of biological and abiotic stresses. Then, the relationship between VaEXO11 and low temperature was explored, and it was preliminarily speculated that low temperature could activate the promoter activity and induce the relative expression of VaEXO11 to increase rapidly, directly or indirectly promoting the production of antioxidant enzymes in cells, and thereby reducing the damage of low temperature to cells and improving cold resistance.

Key words: Vitis amurensis; VaEXO11; Promoter; Sequence analysis

EXO(EXORDIUM)是一个能促进植物生长并 响应油菜素内酯(BR)诱导的基因,在拟南芥中被首 次发现并命名^{III},EXO的过量表达可以使野生型植 物的芽和根生长更强四。基因启动子通常认为是基 因结合转录因子的位点,位于结构基因5'端上游的 DNA 序列,能活化 RNA 聚合酶,使之与模板 DNA 准确地结合并具有转录起始的特异性^[3]。启动子包 含两大区域,一是含有核心启动子元件(TATA-box) 和转录起始位点(TSS)的核心区;二是调控元件区, 包括应答顺式作用元件和增强元件。启动子上的顺 式作用元件可以和转录因子基因结合,调控下游基 因的转录。基因发挥功能的第一步是转录为 mRNA,而启动子与转录因子调控特定基因表达是 植物发挥自身调控能力最重要的方式之一^[4]。Farrar等¹⁹克隆了拟南芥中EXO基因及启动子,并验证 了二者的活性。EXO是一种细胞外蛋白,蛋白质组 学方法确定拟南芥 EXO/EXL 蛋白家族的成员,如 EXO、EXL1、EXL2、EXL3和EXL4蛋白是细胞壁蛋 白组的一部分^[6-9]。目前还没有关于 EXO/EXL 基因 家族对低温胁迫或其他非生物胁迫反应的详细报 道。Wei 等¹⁰¹分析了桑寄生[Taxillusi chinensis (DC.) Danser]种子在低温胁迫下的转录组,在普遍 上调的基因中发现了3个共同上调表达的编码EX-ORDIUM的基因。在拟南芥中, EXL3在低温胁迫时 上调表达; EXL1 和 EXO 在干旱胁迫时上调表达, EXL6下调表达;此外,EXL5在两种胁迫下都上调表 达,EXL2、EXL4下调表达,表明EXO/EXL基因家族 对非生物胁迫有反应,并且还参与了干旱和低温胁 迫共表达网络的调控^[11]。然而,关于该蛋白家族在 葡萄中的成员数量,EXO蛋白的功能以及对低温胁 迫反应的表达模式,目前还没有系统的报道。

葡萄是世界上栽培范围广、经济效益高的水果 之一。葡萄产业的稳定和可持续发展持续受到各种 外部环境压力的挑战,包括生物和非生物胁迫。其 中,低温成为影响葡萄的生长和发育、果实品质和产 量的主要因素。因此,提高葡萄的抗寒性被视为育 种计划的一个重要目标,以防止冬季严重的冷害或 者冻害。山葡萄(*Vitis amurensis*)是常见的野生葡 萄种类,可以承受-40 ℃的低温,已被广泛用于传统 育种和培育耐寒栽培品种^[12]。然而,由于葡萄的生 命周期长,酿酒葡萄的遗传背景复杂,通过传统的杂 交育种来改善葡萄种质面临挑战^[13],基因工程在育 种过程中提供了另一种可行策略。为此,明确山葡萄抗寒性的冷反应机制,并研究有价值的冷反应基因,在葡萄遗传改良中具有重要作用。通过对笔者实验室前期研究结果分析发现,在低温条件下,玫瑰香葡萄中有6个 VvEXO家族成员上调表达,其中 VvEXOI1上调最为显著。对 VvEXO的表达谱分析 发现,VvEXOI1在葡萄中能对低温胁迫做出快速反应,可以进一步研究其在相应低温胁迫中的作用。 山葡萄作为一个抗寒性极强的葡萄种类被广泛研 究,因此克隆山葡萄中 VaEXOI1 基因及其启动子序 列并进行生物信息学分析,对 VaEXOI1 的功能做出 初步预测,从而为进一步的基因功能验证提供线索。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料为中国科学院武汉植物园园艺作 物逆境生物学课题组保存的山葡萄组培苗,培养 基为1/2 MS培养基+30g·L⁻¹蔗糖+7g·L⁻¹琼脂+ 0.1 mg·L⁻¹ IAA,光周期为16h光照/8h黑暗,光照度 为100 µmol·m⁻²·s⁻²,培养温度为26℃。

本氏烟草种子保存在4℃冰箱中,使用前将其 取出播种至蛭石与泥炭土1:2(体积比)的花盆中, 盖上薄膜黑暗培养2h后在16h光照/8h黑暗的光 周期条件下生长,培养温度为25℃,随后用于LUC 检测的瞬时转化。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、总 RNA 提取与 cDNA 合成 以山 葡萄为试材,使用天根生化技术有限公司生产的 DN-Asecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒和 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒分别提 取 DNA 和总 RNA,按产品说明书进行操作并稍作改 动。以检测合格的葡萄总 RNA 为模板,采用全式金 生物技术有限公司生产的 TransScript 一步法 gDNA 去除及 cDNA 合成试剂盒并按说明书将 RNA 反转录 为 cDNA。反转录体系为:RNA样品 1 μ g(根据测得的 RNA 浓度计算所用 RNA 体积),oligo(dT)18 1 μ L,2× TS Reaction Mix 10 μ L, TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μ L, gDNA Remover 1 μ L, RNase-free Water 补 足到 20 μ L,42 °C孵育 50 min,85 °C加热 5 s 使逆转 录酶失活。提取的 DNA 和合成的 cDNA 在-20 °C存 储备用。

1.2.2 引物合成 以中国科学院武汉植物园园艺作

物逆境生物学课题组未发表的山葡萄转录组数据库 中得到的 VaEXO11 序列片段为基础,结合已公布的 黑比诺葡萄基因组注释信息,运用 Primer Premier 5.0软件设计扩增 VaEXO11 编码区全长的引物和编 码区 ATG上游 2000 bp 启动子引物,引物合成与测 序均由北京擎科生物科技有限公司(武汉)完成。本 文所用到的引物如下:

含有 EcoR I 同源臂的扩增 VaEXOII 编码区的 引物:

VaEXO11- F: GACACTAGTGGATCCAAAGA-ATTCATGGCATCTTTCGTTCCTACTCAAT,

VaEXO11-R: TCCCTCGAGAAGCTTTTTGAA-TTCGACCAGAGTAGAACAGGTGGAAGTT。

含有 Spe I 同源臂的扩增 VaEXO11 启动子 P_{VaEXO11}的引物:

P_{VaEXOII}- F: CCCGGGGGGATCCACTAGTTCATA-TATTAGTCCCACCGATATCC,

P_{VaEXO11}- R: GGCCGCTCTAGAACTAGTGGCA-GTTAGGACTTAAGAGTGCAGT。

1.2.3 PCR 扩增与质粒提取 分别以山葡萄 RNA 反转录得到的cDNA 和提取的山葡萄 DNA 为模板, 根据山葡萄转录组测序得到的 EXORDIUM 序列片 段并结合设计引物 VaEXOI1-F/VaEXOI1-R, PVaEXOI1-R, F/P_{VAEXOII}-R进行目的基因ORF和启动子的扩增。克 隆该基因全长用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 DNA Marker DL2000 检测 PCR 扩增产物,将扩增得到的 DNA和cDNA片段回收并连接克隆载体,然后利用 热激法将连接产物转化到DH5α大肠杆菌感受态 中,经抗生素筛选和菌落PCR检测,挑取阳性克隆 送往北京擎科生物科技有限公司(武汉)进行测序。 将测序正确的菌液接种于10 mL含10 µL Spe/Kan (100 mg·L⁻¹)的LB液体培养基中,在37 ℃、220 r·min⁻¹ 摇床上振荡培养12~14h,利用质粒小提试剂盒提取 质粒,操作参考说明书并稍作改动。用1.2%琼脂糖 凝胶电泳检测质粒质量,将合格的质粒置于-20℃ 储存备用。

1.2.4 序列生物信息学分析 采用SMART 7(https:// smart.embl.de/) 和 Pfam (http://pfam-legacy.xfam. org/)确认 VaEXO11 蛋白的结构域,采用 ExPASy-ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) 分析 VaEXO11 蛋白的物理化学特性。使用基因结构显 示服务器 2.0(http://gsds.gao-lab.org/)分析 VaEXO11 基因内含子/外显子结构。采用 SignalP-6.0(https:// services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/)预测 信号肽种类。利用 NetPhos 3.1 Server(https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos- 3.1/)预测 VaEXO11蛋白磷酸化位点。通过 DNAMAN9进行 DNA 和氨基酸序列比对分析,利用 MEGA11 构建系 统进化树。利用 BDGP(https://fruitfly.org/seq_tools/ promoter.html)分析核心启动子。通过网络分析工 具 PlantCare(https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)分析 VaEXO11 起始密码子上游 启动子序列中的顺式作用元件。最后,采用 TBtools10软件分析可视化启动子序列的顺式作用元 件。

1.2.5 *P*_{VaEXOII} 启动子瞬时表达分析 用冻融法将获 得的重组质粒 pGreen 0800 - P_{VaEXOII}-LUC 和空载 pGreen 0800-LUC转入根癌农杆菌 GV3101,并检测 LUC 荧光活性,将检测正确的阳性克隆用于烟草瞬 时转化,瞬时转化主要参考 Sheludko等^[14]的方法。将 瞬时转化得到的烟草置于低温光照培养箱中8℃处 理2h,室温恢复15 min 后进行 LUC 观察。以1:200 (体积比)配置荧光素酶钾盐溶液3 mL,用毛笔涂在 烟草叶片背面,背面朝上,放入多功能成像系统中拍 照,选择化学发光,曝光时间为5 min。

2 结果与分析

2.1 VaEXO11 和 PvaEXO11 序列的获得

分别以山葡萄RNA 反转录得到的 cDNA 和提 取的山葡萄DNA 为模板,根据山葡萄转录组测序 得到的 EXORDIUM 序列片段并结合设计引物 VaEXO11-F/VaEXO11-R, PvaEXO11-F/PvaEXO11-R, PvaEXO11-R, PvaEXO11-R, PvaEXO11-R, PvaEXO11-R, 进行目 的基因 ORF 和启动子的扩增,得到该基因全长和 启动子(图1)。经测序分析, PCR 扩增得到的目的 基因的序列长度为 957 bp,利用 DNAMAN9进行 序列比对,发现该基因与 Phytozome 上葡萄基因组 中编号为 *VvEXO11* 的基因序列相似度高达 99.37% (图2),蛋白相似度达 98.75%(图3)。启动子长度 为 1938 bp,与 *VvEXO11* 启动子序列相似度达 65.02%(图4),与预测结果基本一致,故将山葡萄 中扩增得到的目的基因命名为 *VaEXO11*,其启动子 为 PvaEXO11。

2.2 VaEXO11基因序列特征分析

该基因的 cDNA 序列全长为 957 bp, 开放阅读











图 3 VvEXO11 和 VaEXO11 氨基酸序列比对



框为957 bp,编码318个氨基酸。对VaEXO11的 DNA序列分析发现,VaEXO11仅由1个外显子(exon)构成,与VvEXO11序列比对发现,二者仅有6个 核苷酸差异(图2)。对VaEXO11蛋白进行保守结构 域分析表明,该蛋白仅含有一个保守结构域,即Phi_1 结构域(Phosphate-induced protein 1 domain),同时, 该蛋白前25个氨基酸形成一个信号肽Sec/SPI,是 一种由Sec转座运输并由信号肽酶 I (Lep)裂解的 "标准"分泌性信号肽(图5),裂解点位于A25~A26 之间(图6-A)。通过NetPhos 3.1 Server 预测该蛋白 共71个磷酸化位点(图6-B),其中阳性结果36个, 包括丝氨酸(Serine)25个,苏氨酸(Threonine)9个和 酪氨酸(Tyrosine)2个。VaEXO11与VvEXO11蛋白 序列比对发现,二者仅有3个氨基酸差异(图3)。 用 Protparam 对 VaEXO11蛋白的基本理化性质分 析,结果显示,该蛋白的分子质量为33 855.58 Da, 理论等电点(pI)为9.15;在氨基酸组成上,丝氨酸 (Ser)含量最高,达12.3%,其次为亮氨酸(Leu)和甘



图 4 P_{VVEXOI1}和 P_{VAEXOI1}启动子核苷酸序列比对 Fig. 4 Nucleotide sequence alignment of promoters of VvEXO11 and VaEXO11



A. VaEXOII 基因核苷酸序列分析结果;B. VaEXO11 蛋白氨基酸序列结构域分析结果。红框代表信号肽(Sec/SPI), Phi_1 代表结构域。

A. Results of nucleotide sequence analysis of *VaEXO11* gene; B. Results of structural domain analysis of amino acid sequence of VaEXO11 protein. The red box represents the signal peptide (Sec/SPI), and Phi_1 represents the structural domain.

图 5 VaEXO11 基因和蛋白序列分析

Fig. 5 Gene and protein sequence analyses of VaEXO11

氨酸(Gly),分别为11.3%和8.8%;不稳定系数(instability index,II)为31.75,表明该蛋白稳定性较好; 平均疏水性系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.082,脂溶指数(aliphatic index)为 85.03,表明其为疏水性脂溶蛋白。另外,对葡萄基 因组数据分析显示, EXL11存在于葡萄第18条染色体上。

2.3 VaEXO11 系统发育分析

为了探究山葡萄中VaEXO11蛋白与其他物种的EXO蛋白的关系,用VaEXO11蛋白在NCBI进行



blastn,选择不同物种中相似度最高的序列,共筛选 到27个EXO11蛋白序列。对已克隆的VaEXO11与 27个其他物种的EXO11基因的氨基酸序列进行多 序列比对分析,并构建系统发育树。通过氨基酸序 列比对发现(图7),包括VaEXO11在内的28个 EXO11氨基酸长度相近,序列相似度达77.99%,均 含有相似的结构域,序列较为保守,尤其是N端 FAYIWVGNSETQCFGQCAWPFHQFIYGFQ比例极 高。从系统发育分析来看(图8),与VaEXO11关系 较近的除了酿酒葡萄(V. vinifera)和河岸葡萄(V. riparia)外,还有雷公藤(Tripterygium wilfordii)。

2.4 低温处理下 VaEXO11 的表达分析

转录组的结果表明, VvEXOII 能被低温诱导表达,为了进一步研究其详细的表达模式,笔者利用荧光定量 PCR 对山葡萄中 VaEXOII 在低温处理 24 h内的表达模式进行分析(图9)。山葡萄 VaEXOII 基

因在4℃低温下不同冷处理时间点的定量 RT-PCR 分析表明,冷处理早期(0~2 h),该基因的表达量就 发生明显的变化,并且在2h达到最高值,约为0h的 4250倍,说明 VaEXOII 基因能够快速响应冷胁迫。 RNA-Seq与qRT-PCR 获得的基因表达模式高度一 致,表明本研究中 VaEXOII 基因可能在山葡萄的低 温响应中发挥作用。

2.5 启动子 PvaEX011 序列分析

以山葡萄转录组数据库中的 VaEXO11 基因上 游一段-2000 bp 序列为模板设计引物,以提取的山 葡萄 DNA 为模板扩增 VaEXO11 的启动子 Praexon,得 到一段长 1938 bp 的 DNA 序列,与 VvEXO11 起始密 码子上游-2000 bp 启动子比对(图4)发现,二者相似 度达 65.02%。核心启动子分析表明(图 10),其位 于-1833~1883 bp 之间,转录起始位点在-1873 bp 处,进一步证明克隆的 VaEXO11 基因 cDNA 序列的



VaEXL11 (*Vitis amurensis*) XP 027332488.1 (*Abrus precatorius*) XP 028094268.1 (*Camelila sinensis*) KAE8056923.1 (*Carpinus fangiana*) XP 04290928.1 (*Cary alinoinensis*) MCE5166408.1 (*Datura stramonium*) MCE5166408.1 (*Catura stramonium*) MCE5166408.1 (*Catura stramonium*) XP 0217313.1 (*Durio a brasiliensis*) XP 021245115.1 (*Heva brasiliensis*) XP 021265125.1 (*Heva brasiliensis*) XP 0121067894.1 (*Jatropha curcas*) XP 0121067894.1 (*Jatropha curcas*) XP 012067894.1 (*Jatropha curcas*) XP 01206789.1 (*Jatropha curcas*) XP 01206789.1 (*Jatropha curcas*) XP 01206789.1 (*Jatropha curcas*) XP 01206789.1 (*Jatropha curcas*) XP 013941683.1 (*Populus a basiliensis*) KAH5908749.1 (*Populus cubrotica*) XP 0030947730.1 (*Quercus sobur*) XP 0503757.1 (*Potencus robur*) XP 0503757.1 (*Daturas communis*) XP 00521394.1 (*Rosa chinensis*) KAJ6681810.1 (*Satix koryranga*) PONS036.1 (*Irpan cornata*) XP 00387102943.1 (*Triptersytum wilfordii*) XP 038702943.1 (*Irpitersytum wilfordii*) XP 03871643.1 (*Vitis vinfera*) XP 03287516.1 (*Utris vinfera*)





Tree scale <u>0.6</u>



图 8 不同物种中 EXO 系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic analysis of EXO proteins from different species

5'端是完整的。

通过Plant CARE(http://bioinformatics.psb.ugent. be/webtools/plantcare/html/)预测启动子顺式作用元 件,结果表明,VaEXOII的启动子Praexon含有激素响 应元件如P-box(赤霉素元件)、TGACG-motif(茉莉 酸甲酯元件)、TCA(水杨酸元件)、ERE(乙烯元件)、 AAGAA-motif(脱落酸元件),胁迫响应元件如 MYB(MYB响应元件)、MYC(MYC响应元件)、Wbox(WRKY转录因子结合位点)、STRE(胁迫响应 元件)、WUN-motif(创伤响应元件)等,另外还有参 与昼夜节律调控顺式调节元件和无氧诱导所必需的 顺式调节元件,相关预测结果如表1所示。

2.6 启动子瞬时表达分析

为了探究启动子是否响应低温胁迫,将构建好的pGreen 0800-P_{VAEXOII}-LUC重组载体和pGreen0800-LUC空载进行农杆菌(GV3101)转化,将空载和包 含重组载体的农杆菌液注射本氏烟草叶片,用Dual-LUC报告系统评估转录活性。研究结果如图11所 示,4℃处理后pGreen 0800II -P_{VAEXOII}活性大于空载, 说明低温能激活 VAEXO11 启动子活性。



Fig. 9 Relative expression of VaEXO11 in V. amurensis under low temperature treatment

1	TCATATATTA	GTCCCACCGA	TATCCAATTT	ACTTGGCATG	AATTTATTCT	ATAAACTTCA	TTTTCCTAAT	AAACATGAAG	AAAGAATCAC	AGAAATATGA
101	GGAAATTTCA	TTATTTTTTT	GAAATATATA	AATTTTTTCAT	GTTATTAAAA	AAATCAAGAG	AATCAAGATA	TTATTGAAAA	TAAGAGAAAA	TAATATTTAG
201	AATGCATGCC	CAAAATAAGT	GGCAACACAA	GTTTATTTTT	TTGAAAAATA	GATTTTATTG	CCTAAAGATA	TCTAGGATAA	AATTTAAAAG	CGGTGACTAT
301	TTCAGTTGAA	AATAGATTTG	AAAATTTAAT	TTAAAAACTG	TAAACTCTCA	CAAAAGGGTG	GAGTGTCACC	GCAAGAGGAG	AGTGGAAGCG	CTGAAGGTAG
401	CCAAGCAAGC	CGAGCAGAAG	TGGGCCCCAG	GGTGCAAGGT	ATTGGTGATT	GTAGCCTCAG	GGAAAAGTGG	GACGACAATT	TTTAAAAATA	ATTTCTAATC
501	TATTATAGTT	TTGTTGAAAT	AAGAAAGAGA	AAATAATTTA	TAAGTGAAAA	ATCATCTCTT	CAAGAGATGA	ттталалала	ATAAAAATAT	AAAATAAAAC
601	AAAGTGAGAA	ATCGTCTTTT	AAAAAGACAA	TTTCAATATA	TATATATATG	AGAAATTCTC	ACTTAAAAGA	алалалала	AACCAAGTGG	AAAATCGTAT
701	TTTCAAAATA	CGATTTCCAT	ACTITITAAGA	GCGAGAACAT	CTTCATGTTT	AAATATAATA	AGTTTAAATA	TAAATAATTT	ATTATTTAAG	TATATTTTTA
801	AATTTCAATA	ATTTAATAGT	TTTTAATTAA	ATTAAAAAGT	алалалала	TTATAATTAA	AATATCAGTT	ATAAATTACA	GCTTAAAAGT	ATACTATTAA
901	TTCGTTAAAG	ATAAATTTAT	CATAATACAA	ATAAATTAAT	ATTCTAAAAA	ATAACAAATT	AAATATCTTA	AATTAATAAA	TTATATAATT	TTATATATTA
1001	TTTATTTATT	ATATAAGTTT	ATTATTTTAA	TATTATTAAT	TTATTAATAA	ATAAAATATT	TATTTATAAT	ATCTTTTATT	TATCAATTTA	TATTTATTGA
1101	AGTAATACTA	GATTTTTAAA	TTTAAATATA	AATAATTTAT	TATTTAAGTA	TATTTTAAAA	TTTTAATCAT	AAATTGTAAT	TTAATAATTT	TTAATTAAAT
1201	TTTTAATTTT	AAAAAATAAT	TAACTAAAGT	TTTAATTGGC	AACTGCAGTT	TTAGTTTAAA	AATGAAATCG	TAGTTAATAA	CTATGACTIT	AGTTCAAAAA
1301	ATAAAGTCGC	AGTTGACAAT	TGCGGCTTTA	ATTAAAATGA	CGAAAAAAA	TTATTTTTTA	ATAATATGGT	ATTTATGTGG	CATAAAAAAT	GTCAATTTAA
1401	ATATAAGTTT	TAAAGAGCGG	TTAGATTTTA	CTCTTTTGAT	TTTGACCCAA	AACTCTATTT	TTTAAATCTG	GTTTTCAAAA	CAATCATGGA	GGATGATGAG
1501	TIGTICICCA	AAGACGTTCA	AATAAATGTA	TTTATAATTT	AGAAAATGGT	алалалала	алаласалал	TGGAAGAAAA	ATAATAAAGA	AAAGAAAAGT
1601	TTGACGATGA	TAAAAAGTCA	CCCCTAGGCT	CTTAATGTCC	TTAGCTGTAA	ACGTAGAGTT	TTTGATTTTT	CACAGCGAAA	GACAGATCCG	CACTCAACCA
1701	GATTAATTTC	GAACGCGCTG	TTGAGCTGGC	ATTCGCTTCG	CTTTTCGCCT	TTTCCCTTCC	TTCTCGGCAC	TTTCATTCAT	ACCCTCTCCC	TCGCTCCTCT
1801	CACGCTGTAG	GTCACACTCT	CCCCACTGCC	TA TTTTACTA	TATATATGAA	ACCCCCAATT	CATCTTCTCC	TCACTCCAAA	CCCCCCCCAR	AGCCATCTCT
1901	ACAGCTTAGC	TTCACTGCAC	TCTTAAGTCC	TAACTGCC				1		

红色方框代表核心启动子区域,黑色箭头代表转录起始位点。

The red box represents the core promoter region and the black arrow represents the transcription start site.

图 10 PvaEX011 核心启动子分析

Fig. 10 Core promoter analysis of P_{VaEX011}

表1 PvaEX011 启动子顺式作用元件预测

Table 1 Prediction of promoter cis-acting elements

元件名称	序列	位置	功能
Element name	Sequence	Position	Function
P-box	CCTTTTG	350-	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
MBS	CAACTG	302-,1239+,1309-	参与干旱诱导MYB结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
TGACG-motif	TGACG	1337+,1601+	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TCA	TCATCTTCAT	763+	参与水杨酸反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
Myb	CAACTG, TAACTG	865-,1930+	MYB响应元件 MYB response element
Мус	ТСТСТТА	180-	MYC响应元件 MYC response element
MYC	CAATTG	1316-	MYC响应元件 MYC response element
W-box	TTGACC	1441+	WRKY转录因子结合位点 WRKY transcription factors binding site
STRE	AGGGG	1620-	胁迫响应 Stress responsiveness

1293

1294		果树学	老 报 第41卷
		表1(续) Table 1	(Continued)
元件名称	序列	位置	功能
Element name	Sequence	Position	Function
ERE	ATTTTAAA	1151+,1153-,1205+	乙烯响应
			Ethylene responsiveness
WUN-motif	AAATTTCCT	99-	创伤响应元件
			Wound-responsive element
AAGAA-motif	GAAAGAA, gGTAAAGAAA	79+,1547+	参与脱落酸反应顺式作用元件
	-		Cis-acting element involved in the abscisic acid responsive
MYB	CAACCA, CAACAG	1694+,1717-	MYB响应元件
			MYB response element
Circadian	CAAAGATATC	262+	参与昼夜节律调控顺式调节元件
			Cis-acting regulatory element involved in circadian control
TCA	TCATCTTCAT	781+,1555-	参与水杨酸反应的顺式作用元件
			Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
ARE	AAACCA	679+,1468-	无氧诱导所必需的顺式调节元件
			Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction



图 11 在烟草中瞬时表达分析启动子活性 Fig. 11 Transient expression analysis of promoter activity in tobacco

3 讨 论

利用生物信息学手段对克隆到的基因序列与不同物种中的已知基因进行比对分析,可以对新基因的功能做出初步预测,通过系统进化树推测其进化过程,从而为进一步的基因功能验证提供线索。张字等^[15]克隆了双红*F3'H*基因并进行生物信息学分析,发现该基因与双丰中的*F3'H*基因序列相似性达到99.67%。Farrar等^[5]克隆了拟南芥中长度为945 bp的*EXO*基因,编码314个氨基酸,生物信息学分析发现该蛋白的N端存在一个信号肽,与烟草中的PHI-1蛋白在氨基酸水平上有76%的同源性。将桉树中EgPHI-1氨基酸序列和其他43个同源氨基酸序列进行比对,表明这些序列高度保守,EgPHI-1与水稻(*Oryza sativa*)的AAM08535有64%的相似性,与酿酒葡萄(*V. vinifera*)的CAO61694有75%的相似性^[16]。笔者从山葡萄中克隆到*VaEXO11*基因,仅由

1个外显子(exon)构成,与黑比诺中的*VvEXOII*序列相似度达99.37%,蛋白序列相似度达98.75%,其蛋白含有一个高度保守的Phi-1结构域和一个信号肽,丝氨酸含量丰富,经预测其为疏水脂溶性蛋白。与其他27个物种的*EXOII*蛋白序列比对分析,发现氨基酸长度相近,序列相似度达77.99%,均含有相似的结构域,序列较为保守。系统发育分析表明,与*VaEXOII*关系较近的除了酿酒葡萄和河岸葡萄外,还有雷公藤。

启动子包含两大区域,一是含有核心启动子元件(TATA-box)和转录起始位点(TSS)的核心区;二是调控元件区,包括应答顺式作用元件和增强元件,调控元件的种类和数量直接影响基因的表达模式和表达强度^[17]。张宇等^[15]克隆了双红*F3'H*基因上游1051 bp启动子序列并预测启动子可能存在的顺式作用元件,分析发现,*F3'H*基因启动子除含有典型的TATA-box、CAAT-box和参与光反应的顺式作用

元件GT1-motif、TCCC-motif、Box4外,还有参与缺 氧特异性诱导性的增强子元件(GC-motif),以及与 分生组织表达有关的顺式作用调控元件(CATbox)、参与水杨酸反应的顺式作用元件(TCA-element)和伤口反应元件(WUN-motif)等。薛竟一 等[18] 克隆了酿酒葡萄 VvMT2 上游 783 bp 启动子序 列,顺式作用元件预测分析表明,序列中有TATAbox、CAAT-box、ARE、GAG-motif、Box-4等12个可 能的启动子上游调控元件,推测将参与响应胁迫与 激素等过程。据报道,AtEXLI的启动子区域也存在 受光照、昼夜节律周期和厌氧条件调控的顺式元件, 同时发现其在低辐照度、长期黑暗和缺氧条件下表 达量升高[19]。将本试验克隆到的启动子序列进行顺 式作用元件预测,发现葡萄 PraExon 启动子含有多个 作用元件,除了CAAT-box、TATA-box等核心启动子 外,还有一些功能响应元件,包括激素类响应元件、 参与干旱胁迫的作用元件、参与昼夜节律调控的元 件和创伤响应元件等。葡萄 VaEXOII 基因的启动 子含有多种顺式作用元件,推测 VaEXO11 基因参与 葡萄复杂的调控网络,与葡萄生长发育及逆境响应 等多种生命活动有密切联系。

植物在遭受低温胁迫时会产生各种生理和分子 变化,包括影响某些蛋白质、代谢物和植物激素水平 的转录、翻译和代谢变化^[20]。Zheng等^[21]和Degenkolbe等^[22]分析山葡萄在低温胁迫下转录组数据,发 现有1000多个转录本的表达量在低温胁迫下上调, 同时还发现膜脂质成分的动态变化,而膜的稳定性 是低温胁迫条件下细胞生存的必要条件。以前的研 究已经注意到EXO对植物细胞的重要性[2,5]。EXO 基因家族的成员已被证明在拟南芥中执行其他功 能,拟南芥中的EXO定位于细胞壁并介导细胞扩 张,而exo突变体的叶片大小、根长和生物量减少, 外生叶尺寸减小是由于表皮细胞和薄壁细胞的扩张 减少11。有研究表明,拟南芥在合成培养基中的低 糖供应条件,土壤中的有限光照、延长黑暗期以及缺 氧条件下,其正常生长离不开EXL1,该基因促进拟 南芥在上述生长条件下对新陈代谢和生长进行全面 的适应^[23]。然而 EXO 基因家族在低温胁迫下的研 究还未见报道。

通过对笔者实验室前期研究结果分析,发现在低温条件下,玫瑰香葡萄中有6个VvEXO家族成员上调表达,其中VvEXOI1上调最为显著。山葡萄是

耐寒性极强的葡萄种类,通过研究 VvEXOII 在山葡 萄中的同源基因 VaEXO11 的表达及功能,以期为揭 示葡萄抗寒分子通路、培育新的抗寒葡萄品种提供 理论依据。经测序分析,笔者发现了一个有趣的现 象,即PCR扩增得到的目的基因的序列长度为957bp, 利用 DNAMAN9 进行序列比对,发现该基因与 Phytozome上葡萄基因组中编号为 VvEXO11 的基因序 列相似度高达99.37%,蛋白相似度达98.75%;但是 克隆得到的启动子 PvaEXOII 长度为 1938 bp, 与启动子 Pivexoul序列相似度只有65.02%。分析发现,克隆得 到的启动子序列靠近起始密码子 ATG 的 500 bp 启 动子序列相似性达93.3%,其余部分差异较大,可能 是葡萄种间进化的差异所造成的^[24]。通过LUC验证 了低温能激活 VaEXO11 的启动子 PvaEXO11 的活性,因此 推测,低温通过激活 VaEXOI1 上游启动子的活性来 提高VaEXO11的表达量,从而提高葡萄的耐寒性。

4 结 论

笔者初步推测低温能够激活启动子活性从而诱导 VaEXOI1 的相对表达量迅速上升,直接或间接促进细胞内抗氧化酶的产生,减轻低温对细胞的伤害,提高葡萄抗寒性。研究还发现 Praexoil 含有多种与逆境胁迫相关的元件,说明该基因可能参与多种逆境胁迫的调控。

参考文献 References:

- SCHRÖDER F, LISSO J, LANGE P, MÜSSIG C. The extracellular EXO protein mediates cell expansion in *Arabidopsis* leaves[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9:20.
- [2] COLL-GARCIA D, MAZUCH J, ALTMANN T, MÜSSIG C.
 EXORDIUM regulates brassinosteroid- responsive genes[J].
 FEBS Letters, 2004, 563(1/2/3):82-86.
- [3] 周浩. 钩藤 STR 基因及其启动子的克隆与分析[D]. 贵阳:贵州大学,2022.

ZHOU Hao. Cloning and analysis of *STR* gene and its promoter from *U. rhynchophylla*[D]. Guiyang:Guizhou University,2022.

- [4] THALLINGER B, PRASETYO E N, NYANHONGO G S, GUEBITZ G M. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(1):97-109.
- [5] FARRAR K, EVANS I M, TOPPING J F, SOUTER M A, NIELSEN J E, LINDSEY K. EXORDIUM: A gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2003,33(1):61-73.
- [6] BORDERIES G, JAMET E, LAFITTE C, ROSSIGNOL M,

- [7] FEIZ L, IRSHAD M, PONT-LEZICA R F, CANUT H, JAMET E. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: A new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls[J]. Plant Methods, 2006, 2:10.
- [8] JAMET E, CANUT H, BOUDART G, PONT-LEZICA R F. Cell wall proteins: A new insight through proteomics[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(1):33-39.
- [9] BAYER E M, BOTTRILL A R, WALSHAW J, VIGOUROUX M, NALDRETT M J, THOMAS C L, MAULE A J. Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology[J]. Proteomics, 2006, 6(1): 301-311.
- [10] WEI S G, MA X J, PAN L M, MIAO J H, FU J E, BAI L H, ZHANG Z L, GUAN Y H, MO C M, HUANG H, CHEN M S. Transcriptome analysis of *Taxillusi chinensis* (DC.) danser seeds in response to water loss[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169177.
- [11] SHARMA R, SINGH G, BHATTACHARYA S, SINGH A. Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203266.
- [12] WAN Y, SCHWANINGER H, LI D, SIMON C, WANG Y J, ZHANG C H. The eco-geographic distribution of wild grape germplasm in China[J]. Vitis, 2008, 47:77-80.
- [13] GRAY D J, LI Z T, DHEKNEY S A. Precision breeding of grapevine (*Vitis vinifera* L.) for improved traits[J]. Plant Science,2014,228:3-10.
- [14] SHELUDKO Y V, SINDAROVSKA Y R, GERASYMENKO I M, BANNIKOVA M A, KUCHUK N V. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007,96(3):608-614.
- [15] 张宇,徐智慧,任邵琦,杨铭慧,陈蒙,刘海峰.山葡萄F3'H基 因及其启动子的克隆与表达分析[J].农业生物技术学报, 2021,29(11):2099-2108.

ZHANG Yu, XU Zhihui, REN Shaoqi, YANG Minghui, CHEN Meng, LIU Haifeng. Cloning and expression analysis of *F3'H* gene and promoter from *Vitis amurensis*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(11): 2099-2108.

- [16] SOUSA A O, CAMILLO L R, ASSIS E T C M, LIMA N S, SIL-VA G O, KIRCH R P, SILVA D C, FERRAZ A, PASQUALI G, COSTA M G C. *EgPHI-1*, a *PHOSPHATE-INDUCED-1* gene from *Eucalyptus globulus*, is involved in shoot growth, xylem fiber length and secondary cell wall properties[J]. Planta, 2020, 252(3):45.
- [17] RUSHTON P J, REINSTÄDLER A, LIPKA V, LIPPOK B, SOMSSICH I E. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and

wound-induced signaling[J]. The Plant Cell, 2002, 14(4): 749-762.

[18] 薛竟一,代伟娜,王玲,刘静,张静茹,张朝红. 葡萄 VvMT2 基因和启动子的克隆及表达分析[J]. 农业生物技术学报,2018, 26(11):1856-1864.

XUE Jingyi, DAI Weina, WANG Ling, LIU Jing, ZHANG Jingru, ZHANG Chaohong. Cloning and expression analysis of *VvMT2* gene and promoter in grape (*Vitis vinifera*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(11): 1856-1864.

- [19] SCHRÖDER F, LISSO J, MÜSSIG C. Expression pattern and putative function of *EXL1* and homologous genes in *Arabidopsis*[J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(1):22-27.
- [20] NAKAMINAMI K, MATSUI A, NAKAGAMI H, MINAMI A, NOMURA Y, TANAKA M, MOROSAWA T, ISHIDA J, TAKA-HASHI S, UEMURA M, SHIRASU K, SEKI M. Analysis of differential expression patterns of mRNA and protein during coldacclimation and de-acclimation in *Arabidopsis*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2014, 13(12): 3602-3611.
- [21] ZHENG G W, TIAN B, ZHANG F J, TAO F Q, LI W Q. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: Remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels[J]. Plant, Cell & Environment, 2011, 34(9): 1431-1442.
- [22] DEGENKOLBE T, GIAVALISCO P, ZUTHER E, SEIWERT B, HINCHA D K, WILLMITZER L. Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2012, 72(6): 972-982.
- [23] SCHRÖDER F, LISSO J, MÜSSIG C. EXORDIUM-LIKE1 promotes growth during low carbon availability in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2011, 156(3): 1620-1630.
- [24] DONG Y, DUAN S C, XIA Q J, LIANG Z C, DONG X, MAR-GARYAN K, MUSAYEV M, GORYSLAVETS S, ZDUNIĆ G, BERT PF, LACOMBET, MAULE, NICK P, BITSKINASHVI-LI K, BISZTRAY G D, DRORI E, DE LORENZIS G, CUNHA J, POPESCU C F, ARROYO- GARCIA R, ARNOLD C, ERGÜL A, ZHU Y F, MA C, WANG S F, LIU S Q, TANG L, WANG C P, LI D W, PAN Y B, LI J X, YANG L, LI X Z, XIANG G S, YANG Z J, CHEN B Z, DAI Z W, WANG Y, ARAKELYAN A, KULIYEV V, SPOTAR G, GIROLLET N, DELROT S, OLLAT N, THIS P, MARCHAL C, SARAH G, LAUCOU V, BACILIERI R, RÖCKEL F, GUAN P Y, JUNG A, RIEMANN M, UJMAJURIDZE L, ZAKALASHVILI T, MAGHRADZE D, HÖHN M, JAHNKE G, KISS E, DEÁK T, RAHIMI O, HÜBNER S, GRASSI F, MERCATI F, SUNSERI F, EIRAS-DIAS J, DUMITRU A M, CARRASCO D, RODRI-GUEZ-IZQUIERDO A, MUÑOZ G, UYSAL T, ÖZER C, KA-ZAN K, XU M L, WANG Y Y, ZHU S S, LU J, ZHAO M X, WANG L, JIU S T, ZHANG Y, SUN L, YANG H M, WEISS E, WANG S P, ZHU Y Y, LI S H, SHENG J, CHEN W. Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution[J]. Science, 2023, 379(6635): 892-901.