

刺葡萄 *VdERD6L15* 基因克隆及功能分析

刘 洁¹, 杨盛迪¹, 曾雅婷¹, 白 描¹, 杨国顺¹, 李双江^{1*}

(湖南农业大学园艺学院·湖南省葡萄工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要:【目的】探究 *VdERD6L15* 在刺葡萄果实生长发育中的功能, 从湘刺 1 号中克隆 *VdERD6L15* 基因及其启动子, 进行基因功能研究和启动子活性分析。【方法】克隆 *VdERD6L15* 基因 CDS 序列, 并对 CDS 进行生物信息学分析; 构建 *VdERD6L15* 表达载体, 并通过瞬时转化烟草确定 *VdERD6L15* 基因编码蛋白的亚细胞定位; 同时, 通过在己糖缺陷型酵母菌株 EBY.VW4000 中异源表达 *VdERD6L15* 探究其功能; 此外, 通过启动子截短试验确定 *VdERD6L15* 启动子的核心区域。【结果】成功克隆刺葡萄 *VdERD6L15* 基因编码序列, 该编码序列长 1461 bp, 可编码 486 个氨基酸, 具有膜蛋白特征, 属于单糖转运蛋白家族。亚细胞定位试验确认 *VdERD6L15* 蛋白主要定位于液泡膜上。通过在酵母菌株 EBY.VW4000 中进行异源表达, 验证了 *VdERD6L15* 具有转运葡萄糖的能力。利用 PlantCARE 数据库对 *VdERD6L15* 启动子顺式作用元件进行分析, 发现其主要包含光响应元件、干旱胁迫和激素响应元件。通过 GUS 染色分析, 进一步确定候选基因 *VdERD6L15* 启动子的关键调控区域位于 -500 bp 到 -1000 bp 之间。【结论】*VdERD6L15* 是一个定位在液泡膜上的糖转运蛋白, 具有转运葡萄糖的功能; *VdERD6L15* 启动子的核心元件位于 ATG 上游 500~1000 bp 之间。

关键词:刺葡萄; *VdERD6L15*; 单糖转运蛋白; 亚细胞定位; 启动子活性

中图分类号:S663.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)09-1770-11

Cloning and functional analysis of the *VdERD6L15* gene in *Vitis davidii*

LIU Jie¹, YANG Shengdi¹, ZENG Yating¹, BAI Miao¹, YANG Guoshun¹, LI Shuangjiang^{1*}

(College of Horticulture, Hunan Agricultural University/Hunan Engineering and Technology Research Center for Grapes, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract:【Objective】*Vitis davidii* Foëx. is a key wild grape germplasm resource in southern China, the sugars in the *V. davidii* berry are mainly accumulated in the form of glucose and fructose in the vacuole during the ripening period, and this process is mainly regulated by sugar transporter proteins. The Early- Response to Dehydration six- like (ERD6L) is a subfamily of Monosaccharide Transporters (MSTs), which has been proved as a key regulator in soluble sugar homeostasis. In this study, to investigate the role of *VdERD6L15* gene in the growth and development of *V. davidii* berries, the coding sequence (CDS) and promoter of *VdERD6L15* gene were cloned from Xiangci No. 1, and its function and promoter activity were further analyzed.【Methods】The Pearson correlation coefficients and FDR values of the expression data of *VdERD6L15* gene and the soluble sugar content were calculated using the R packages GGally and ggplot2. The CDS of the *VdERD6L15* gene was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT- PCR), and the sequence was biologically analyzed by ExPasY, TMHMM2.0, and SWISS-MODEL website. After constructing the *VdERD6L15* related expression vector, tobacco was transformed to determine the subcellular localization of *VdERD6L15*, heterologous expression of *VdERD6L15* was observed in yeast strain EBY.VW4000 to determine its function, and the core region of *VdERD6L15* promoter was determined by GUS staining.【Results】Based on the Pearson

收稿日期:2024-05-13 接受日期:2024-07-18

基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFD1200100); 国家自然科学基金项目(32202531); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-29-Zp-9)

作者简介:刘洁,女,在读硕士研究生,主要从事果树品质性状形成调控研究。E-mail:2243853617@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:lishuangjiang000@163.com

correlation analysis of *VdERD6L15* gene expression and sugar content, it was found that the expression of *VdERD6L15* was high in the early stage of berry development and low in the later stage, which was significantly and negatively correlated with the soluble sugar accumulation in the berry of *V. davidii*. The cDNA from the root tissues of *V. davidii* was used as a template, primers were designed by Oligo7 website, and the PCR amplification was performed. Sequence analysis showed that the length of the CDS of the *VdERD6L15* gene was 1461 bp in length, encoding 486 amino acids and belonging to the Monosaccharide Transporter (MST) family. Analysis by ExPASy online website predicted that the protein encoded by *VdERD6L15* had a relative molecular weight of 52 614.73, theoretical isoelectric point of 8.34, fat coefficient of 118.91, and average coefficient of hydrophilicity of 0.628, and it was a class of unstable protein. The results of TMHMM online software analysis indicated that *VdERD6L15* may contain 12 transmembrane structural domains, and it was hypothesized that *VdERD6L15* was a membrane protein. With SOPMA online software to predict the secondary structure of the *VdERD6L15* protein, the results showed that the protein was mainly composed of α -helix 49.18%, β -turn 3.10%, extended strand 18.11% and random coil 26.54%. The prediction of the tertiary structure of this protein was carried out by SWISS-MODEL online software. Observation by Confocal laser scanning microscope revealed that the GFP-*VdERD6L15* protein was a membrane protein and had a typical vesicular membrane invagination structure, whereas RFP-SYP122 labeled cellular membranes did not have invaginations, indicating that *VdERD6L15* was localized to the tonoplast. The heterologous expression of the *VdERD6L15* gene in hexose-deficient yeast strain EBY.VW4000 preliminarily found that the yeast strain transformed with pDR196 null load could grow normally on maltose medium, and failed to grow normally on glucose, fructose and sucrose medium. The yeast strain transformed with *pDR196-VdERD6L15* grew well on glucose-containing medium, while growth was obviously inhibited on fructose and sucrose medium, confirming that *VdERD6L15* was involved in glucose transport. PlantCARE website was used to analyze and predict the cis-acting elements in the promoter of *VdERD6L15*, the result showed that the promoter contained mainly light response components, drought stress and hormone response components. The results by GUS staining experiments showed that the P1 (-3000 bp), P2 (-2200 bp), P3 (-1500 bp) and P4 (-1000 bp) transformed tobacco leaves in the experimental group could be stained normally, and only tobacco leaves transfected with P5 (-500 bp) could not be stained normally, which further confirmed that the core region on the promoter of the *VdERD6L15* was located between -500 bp to -1000 bp. 【Conclusion】 In this study, the CDS and promoter of *VdERD6L15* gene were cloned and its function was analyzed, and it was preliminarily found that *VdERD6L15* was a sugar transporter located on the tonoplast and harbored the glucose transportation function. Through promoter deletion analysis of the *VdERD6L15*, it was found that the core *cis*-acting element of the *VdERD6L15* promoter was located between 500 bp and 1000 bp upstream of the ATG.

Key words: *Vitis davidii*; *VdERD6L15*; Monosaccharide transporters; Subcellular localization; Promoter activity

刺葡萄(*Vitis davidii* Foëx.)属于葡萄科葡萄属东亚种群的一个种,被认定为中国南方地区重要的野生葡萄种质资源^[1],该物种的地理分布主要集中在湖南^[2]、福建^[3]等地。湘刺1号作为湖南农业大学葡萄团队选育的刺葡萄新品种,已在湖南省怀化市中方县等地区成功种植,其果皮呈紫黑色,富含原花

青素、花色苷及黄酮醇等多种生物活性成分^[4]。这些成分为刺葡萄的鲜食和酿酒提供优质原料^[5]。

可溶性糖含量不仅是衡量果实品质的重要指标,也是影响水果经济效益和市场竞争力的关键指标。葡萄作为典型的己糖积累型水果作物^[3],其成熟期糖分主要以葡萄糖和果糖的形式积累于液泡

内,此过程主要受到单糖转运蛋白的调控^[6]。单糖转运蛋白主要包括液泡膜糖转运蛋白(TST)、早期响应干旱类似蛋白(ERD6L)、液泡葡萄糖转运蛋白(VGT)、己糖转运蛋白(STP)、质体葡萄糖转运蛋白(PGICT)、肌醇转运蛋白(INT)及糖醇转运蛋白(PMT)。ERD6L(early response to dehydration six like)是定位在液泡膜上的糖转运蛋白^[7],Kiyosue等^[8]首次在拟南芥中发现第一个ERD6基因。迄今,已在拟南芥中鉴定出多个ERD6L蛋白家族成员,其中Poschet等^[9]通过研究发现AtERD6L6基因突变体中液泡葡萄糖含量显著增加,推断AtERD6L6可能参与从液泡到细胞质的葡萄糖转运。有趣的是,在苹果中过表达MdERD6L-1导致大量葡萄糖流入胞质中,使得MdTST1和MdTST2的表达量上调,从而增加液泡中葡萄糖、果糖、蔗糖的含量^[10-11]。在葡萄中,Breia等^[12]发现VvERD6L13编码的蛋白质定位于细胞的质膜上,能将质外体中的糖类物质转运至葡萄果实细胞中。此外,ERD6L直系同源基因在柑橘^[13]、梨^[14]等水果作物中的表达与果实糖分积累之间的密切相关性也逐步被研究证实。上述表明水果作物中的ERD6L与果实糖的积累密切相关,研究其调控果实发育过程中可溶性糖的分子机制,对理解水果作物的糖分积累调控机制及开展品质改良具有重要的理论意义和应用价值。

已有研究发现,葡萄中存在18个ERD6L家族成员,而目前仅对VvERD6L13完成了功能验证^[12],其他ERD6L功能未知。本研究中,基于前期研究基础,发现VdERD6L15在果实早期表达且与刺葡萄果实糖的积累呈负相关,探究其是否参与刺葡萄果实细胞中糖的转运以及其在果实发育早期发挥何种生物学功能对刺葡萄果实品质改良具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为刺葡萄湘刺1号品种,保存于湖南农业大学长安教学基地。从花后13 d开始每隔7 d采集1次,共采集18个时期的果实,将采集后的果实用液氮速冻研磨成粉末,保存于-80 °C冰箱中备用。本氏烟草种植于25 °C培养室中。

1.2 湘刺1号果实总RNA提取、cDNA合成

使用南京诺唯赞公司植物快速RNA提取试剂盒(FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit)

提取湘刺1号果实的总RNA,通过微量分光光度计(Nano-530)测定RNA浓度,使用TaKaRa公司反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)进行反转录得到cDNA,存放于-20 °C冰箱中备用。

1.3 刺葡萄不同发育时期中VdERD6L15基因的表达分析

根据课题组前期研究基础,提取刺葡萄VdERD6L15基因在果实发育时期的FPKM及糖(葡萄糖、果糖、蔗糖)含量数据,绘制折线图(<https://www.chiplot.online/>),使用R包GGally和ggplot2计算VdERD6L15基因的表达数据和糖(葡萄糖、果糖、蔗糖)含量皮尔逊相关系数及FDR值,并进行可视化处理。

1.4 刺葡萄不同发育时期可溶性糖含量测定方法

将采集的刺葡萄果实用液氮进行快速冷冻研磨处理,称取3 g处理后的样品并向其中加入80%乙醇提取液,35 °C提取20 min,并每隔5 min混匀1次,将混合物在6500 r·min⁻¹的条件下离心15 min,收集上清液。重复提取3次后,将提取得到的上清液合并,并使用超纯水定容至20.0 mL。上清液经0.45 μm水相滤膜过滤后置于1.5 mL进样瓶中,用于高效液相色谱(HPLC)测定葡萄糖、果糖、蔗糖的含量。

1.5 VdERD6L15基因及启动子引物设计

在葡萄基因组数据库(<http://grapegenomics.com>)下载VdERD6L15基因序列(Vitvi04g01302),利用Oligo7软件设计VdERD6L15基因编码区(CDS)特异性引物VdERD6L15-F₁、VdERD6L15-R₁、VdERD6L15-F₂、VdERD6L15-R₂,采用Primer primer5.0软件从翻译起始位点ATG上游3000、2200、1500、1000、500 bp设计特异性引物(表1)。

1.6 VdERD6L15基因克隆及表达载体构建

将提取的刺葡萄根系组织中的RNA逆转录为cDNA并作为模板,用Oligo 7软件设计特异性引物扩增得到VdERD6L15基因CDS序列(表1),PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒(TS-INGKE TSP602-200 Trelief® DNA Gel Extraction Kit)纯化回收,利用Gateway系统(Thermo Fisher Scientific Gateway™ LR Clonase™ II)构建35S:GFP-VdERD6L15载体,并用热激法转入大肠杆菌DH5α,将阳性单菌落送至生工生物工程(长沙)有限公司进行测序。糖转运蛋白在酵母中异源功能验证的载体

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

序列名称 Prime names	引物序列 Prime sequence(5'-3')
<i>VdERD6L15-F₁</i>	GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGAGTTCAAGGAAGAAGAGGATG
<i>VdERD6L15-R₁</i>	GGGGACCACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCTGAAGGACCGCTGAATTTC
<i>VdERD6L15-F₂</i>	TCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGAGTTCAAGGAAGAAGAGGATG
<i>VdERD6L15-R₂</i>	GATAAGCTTGATATCGAATTCTCATCTGAAGGACCGCTGAATTTC
<i>VdERD6L15-pro-R</i>	GGCAGCGTTGGTATCAGCCC
<i>VdERD6L15-pro-3kb-F</i>	AACATGTGTACGGACCAAGATCC
<i>VdERD6L15-pro-2.2kb-F</i>	TGAAGGGTTCATGGGACTCTGA
<i>VdERD6L15-pro-1.5kb-F</i>	TCTCTGAAACAATTATGGGTCCAAG
<i>VdERD6L15-pro-1kb-F</i>	ATGATGTGGCTTGTAGGCTTATT
<i>VdERD6L15-pro-0.5kb-F</i>	AATCTCATCCTCGCCTAAAGGAT

为酵母表达载体 *PDR196*, 带有-Ura筛选标记。酵母表达载体 *pDR196* 通过限制性内切酶 *Eco R I* (New England Biolabs B6004s) 进行酶切并进行胶回收处理, 使用 Tsingke 公司的 In-Fusion® HD Cloning Kit 进行无缝克隆, 并用热激法转入 DH5 α 大肠杆菌, 涂板过夜, 挑取阳性克隆测序比对完全正确后进行质粒提取。

1.7 *VdERD6L15* 生物信息学分析

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询黑比诺 VvERD6L15、苹果 MdERDL6 及拟南芥 AtERDL6 的氨基酸序列, 并采用 TBtools 软件进行多重序列比对; 使用 ExPASY 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *VdERD6L15* 蛋白的理化性质; 使用 TMHMM2.0 网站 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 对 *VdERD6L15* 蛋白跨膜螺旋结构进行预测; 采用 SWISS-MODEL 在线网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *VdERD6L15* 蛋白的二、三级结构。

1.8 *VdERD6L15* 蛋白亚细胞定位

亚细胞定位试验参照 Xie 等^[15]的方法并稍加改进。将测序正确的质粒通过电转法转入农杆菌 EHA105, 以定位于细胞膜的载体 *RFP-SYP122* 作为对照^[16], 将 *GFP-VdERD6L15* 与 *RFP-SYP122* 菌液重悬并混合均匀, 使用 1 mL 一次性注射器吸取重悬液注射于生长健康的本氏烟草叶片背面。光照培养 72 h 后, 使用激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM710) 观察烟草叶片中 GFP 融合蛋白的分布, 并保存图片, GFP 激发光波长为 488 nm, RFP 激发光波长为 562 nm。

1.9 *VdERD6L15* 基因酵母中异源表达

酵母异源表达试验参照毛常清^[17]的方法操作

并稍加改进。将测序比对完全正确的质粒转入到只能在麦芽糖培养基上正常生长的己糖缺陷型酵母菌株 EBY.VW4000 中, 以空载体 *pDR196* 作为阴性对照。培养 3 d 后挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 选取阳性单克隆菌液, 按每次 1:10 体积比稀释菌液, 使菌液终体积比分别为: 原液、1:10、1:100 和 1:1000, 将原液和 3 个比例的稀释菌液各取 5 μ L 分别在 SC/-Ura/Mal、SC/-Ura/Glc、SC/-Ura/Fru、SC/-Ura/Suc 固体培养基上进行点样, 放入 30 °C 培养箱, 倒置培养 3 d, 通过观察不同糖源的培养基上己糖缺陷型酵母菌株 EBY.VW4000 的生长情况, 判断 *VdERD6L15* 的功能。

1.10 *VdERD6L15* 启动子克隆及表达载体构建

从葡萄基因组数据库下载 *VdERD6L15* 基因组序列, 分析获得其上游启动子序列, 将提取刺葡萄组培苗叶片组织的 gDNA 作为模板, 用 Primer primer5.0 软件设计特异性引物并进行扩增(表 1), 扩增长度分别为 3000、2200、1500、1000、500 bp, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收 (TSINGKE TSP602-200 *Trelief*® DNA Gel Extraction Kit)。利用 Gateway 系统 (Thermo Fisher Scientific Gateway™ LR Clonase™ II) 将扩增片段构建到以 GUS 基因为报告基因的植物表达载体 *pKGWS7_0rfa* 中并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 挑选单菌落进行阳性鉴定, 将阳性单菌落送至生工生物工程(长沙)有限公司进行测序。使用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测 *VdERD6L15* 启动子顺式作用元件的功能和位置。

1.11 GUS 染色

GUS 染色试验参照杨静静^[18]的方法操作并稍加

改进。GUS染色液的配置(200 mL): NaH_2PO_4 1.56 g+ Na_2HPO_4 3.58 g+ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.169 g+ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.132 g+EDTA 0.372 g+TritonX-100 200 μL +X-Gluc 0.2 g, 4 °C避光保存。将测序正确的质粒通过电转法转入农杆菌EHA105后,挑取含有重组质粒 $\text{proVdERD6L15:GFP-GUS}$ 的农杆菌于LB液体培养基中,摇菌至 $\text{OD}_{600}=0.6\sim0.8$,弃上清液加入侵染液,用注射器抽取1 mL菌液注射于长势较好且一致的本氏烟草叶片中。注射菌液3 d后,将烟草叶片进行1 cm打孔并置于烧杯中,加入染色液,37 °C培养24 h。先后分别用50%、70%的乙醇漂洗样品,每次漂洗10 min,随后加入100%的乙醇溶液浸泡,每6 h换1次溶液,观察染色情况并拍照。

2 结果与分析

2.1 刺葡萄果实发育时期 *VdERD6L15* 基因表达及糖含量的相关性分析

为检测整个刺葡萄果实发育过程中 *VdERD6L15* 基因的表达情况,从花后第7天开始每隔7 d采集一次直至成熟(共19个采样节点)。通过分析 *VdERD6L15* 基因在刺葡萄果实发育期的FPKM,发现 *VdERD6L15* 在果实发育早期表达量高,在后期

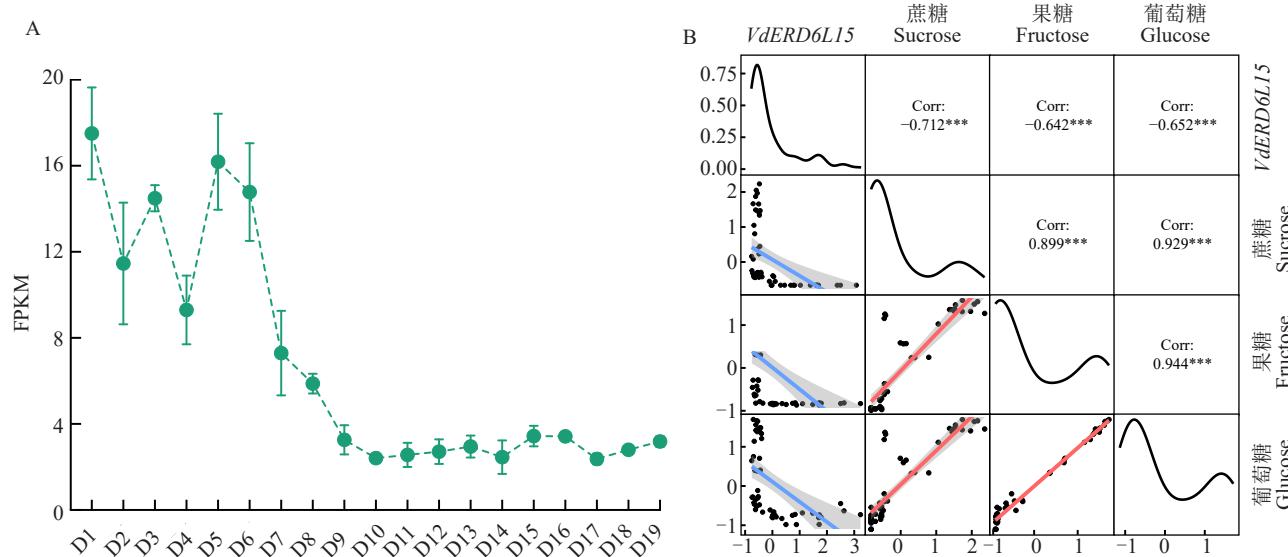
表达量低(图1-A)。对刺葡萄果实采样并进行转录组测序和可溶性糖含量的测定(图1-B),基于 *VdERD6L15* 的基因表达和糖含量的皮尔逊相关性分析,发现其与刺葡萄果实中的可溶性糖(葡萄糖、果糖和蔗糖)积累呈显著负相关(-0.652、-0.642和-0.712)。

2.2 *VdERD6L15* 基因克隆

为探究 *VdERD6L15* 基因在刺葡萄果实发育中的作用,以刺葡萄果实组织中的cDNA作为模板,用特异引物 *VdERD6L15-F* 和 *VdERD6L15-R* 进行PCR扩增,扩增得到片段与预期大小一致(图2-A),经测序发现 *VdERD6L15* 的编码序列区域长为1461 bp,编码486个氨基酸。如图2-B所示,通过对 *VdERD6L15* 与黑比诺 *VvERD6L15*、苹果 *MdERDL6* 及拟南芥 *AtERDL6* 进行氨基酸多重序列比对,发现 *VdERD6L15* 与黑比诺 *VvERD6L15*、苹果 *MdERDL6* 及拟南芥 *AtERDL6* 的同源率分别为100%、82%、78%,均属于单糖转运蛋白家族(monosaccharide transporters, MSTs)蛋白。

2.3 *VdERD6L15* 蛋白生物信息学分析

通过ExPASy在线网站分析,发现 *VdERD6L15* 编码的蛋白含有468个氨基酸,分子式为

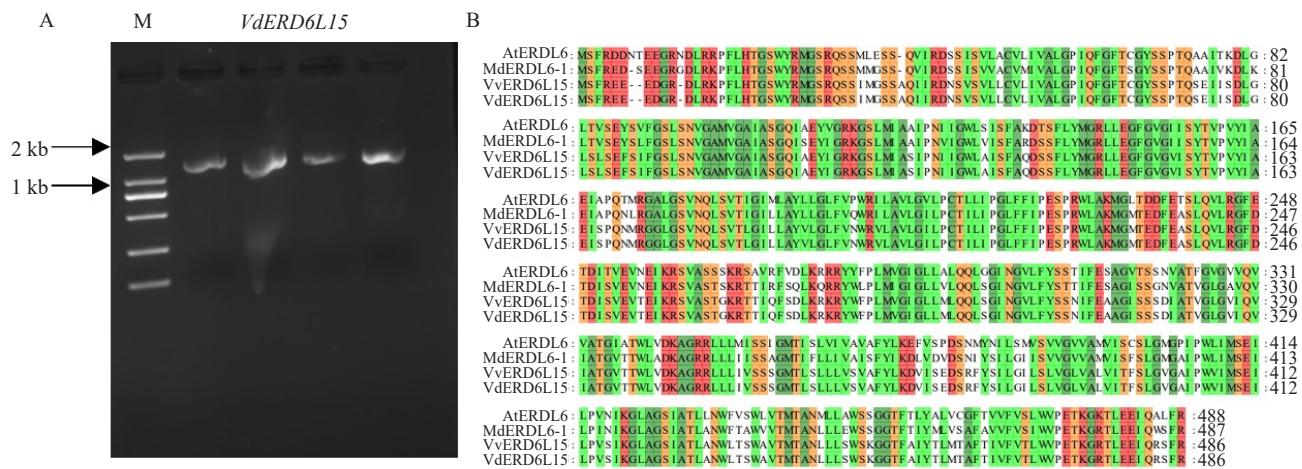


A. *VdERD6L15* 在刺葡萄果实发育过程中表达量分析;B. 刺葡萄果实发育过程中 *VdERD6L15* 的表达量和糖含量的相关性分布矩阵。D1 表示花后第 7 天,D19 表示花后 130 d,每隔 7 d 采一次样;显著性 p-value 小于 0.001、0.01、0.05 分别使用***、**、*表示。

A. Analysis of *VdERD6L15* expression during the fruit development in *V. davidii*; B. Correlation distribution matrix between the expression and sugar content of *VdERD6L15* during fruit development in *V. davidii*. D1 indicates the 7th day after flowering, and D19 indicates 130 days after flowering, and samples are taken every seven days; Significant p-values less than 0.001, 0.01, and 0.05 were indicated by ***, **, and *, respectively.

图 1 刺葡萄 *VdERD6L15* 基因表达量及糖含量的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of *VdERD6L15* gene expression and sugar content in *V. davidii*

A. *VdERD6L15* 基因 RT-PCR 扩增胶图; B. *VdERD6L15* 与黑比诺、苹果及拟南芥同源基因氨基酸多重序列比对。M. DL2000 DNA 标记。

A. RT-PCR amplification gel map of *VdERD6L15*; B. Multiple sequence alignment of amino acids sequence of *VdERD6L15* with homologues from Pinot Noir; *Malus domestica* and *Arabidopsis*. M. DL2000 DNA marker.

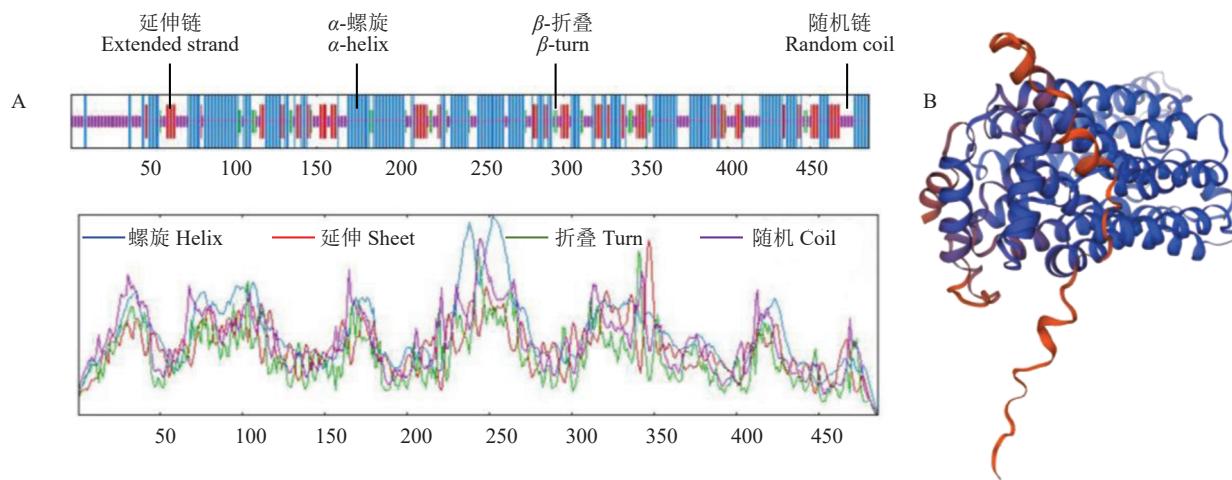
图 2 *VdERD6L15* 基因克隆Fig. 2 The cloning of *VdERD6L15* gene

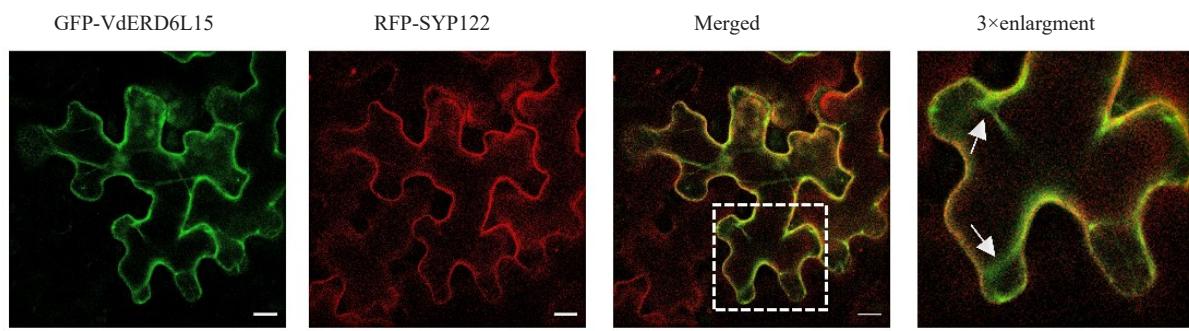
$C_{2413}H_{3839}N_{601}O_{673}S_{18}$, 相对分子质量为 52 614.73, 理论等电点(pI)为 8.34, 脂肪系数为 118.91, 亲水性平均系数为 0.628, 是一个不稳定类蛋白(不稳定性指数为 42.08)。使用 TMHMM 2.0 网站对 *VdERD6L15* 蛋白跨膜结构域进行预测, 发现其可能包含 12 个跨膜结构域, 推测 *VdERD6L15* 是一个膜蛋白。通过分析 *VdERD6L15* 蛋白二级结构发现其由 49.18% 的 α -螺旋、3.10% 的 β -折叠、18.11% 的延伸链和 26.54% 的随机卷曲构成(图 3-A)。利用 SWISS-MODEL 软件对 *VdERD6L15* 蛋白三级结构进行同源建模, 如

图 3-B 所示。

2.4 *VdERD6L15* 蛋白的亚细胞定位分析

为探究 *VdERD6L15* 的细胞定位, 构建 *GFP-VdERD6L15* 载体并转化到 EHA105 农杆菌中, 将活化后含有 *GFP-VdERD6L15* 的农杆菌菌液与含有细胞膜定位的载体 *RFP-SYP122* 农杆菌菌液混合均匀注射到本氏烟草叶片中, 培养 3 d 后, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光分布情况。如图 4 所示, 通过激光共聚焦显微镜观察发现 *GFP-VdERD6L15* 蛋白为膜蛋白, 其定位于膜且具有典型的液泡膜内陷结构

A. Prediction for the secondary structure of *VdERD6L15*; B. Prediction for the tertiary structure of *VdERD6L15*.图 3 *VdERD6L15* 蛋白结构预测Fig. 3 Structural analysis of *VdERD6L15*



激光通道从左自右分别为 GFP 荧光、细胞膜标记 RFP 荧光、合并图和局部图;标尺=20 μm。

From left to right: GFP, RFP, merged channel and local channel; Scale=20 μm.

图 4 VdERD6L15 亚细胞定位分析

Fig. 4 Subcellular localization of VdERD6L15

(如图中白色箭头所示),而 RFP-SYP122 标记的细胞膜不具有内陷,表明 GFP-VdERD6L15 主要定位于液泡膜上。

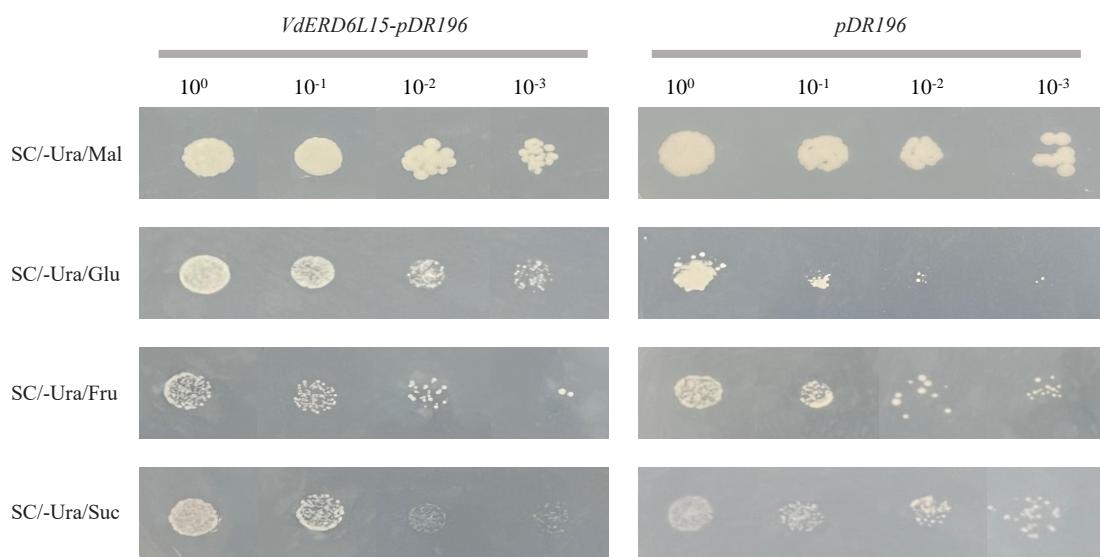
2.5 VdERD6L15 酵母异源表达

为探究 VdERD6L15 是否具有糖转运活性,对在己糖转运蛋白缺陷型酵母菌株 EBY.VW4000 中异源表达的 *VdERD6L15* 进行研究。将含有 *pDR196-VdERD6L15* 质粒的己糖缺陷型酵母菌株点种于含有不同糖源的培养基上,以转化 *pDR196* 空载的己糖缺陷型酵母菌株作为阴性对照,观察酵母生长情况。如图 5 所示,培养 3 d 后,转化 *pDR196* 空载的阴性对照己糖缺陷型酵母菌株在麦芽糖培养基上可以正常生长,在葡萄糖、果糖及蔗糖培养基上都不能够

正常生长;*pDR196-VdERD6L15* 的己糖缺陷型酵母菌株在含有葡萄糖的培养基上生长良好,而在果糖、蔗糖培养基上生长明显受到抑制,表明 VdERD6L15 在酵母中具有一定的葡萄糖转运活性。

2.6 VdERD6L15 启动子顺式作用元件预测及活性分析

使用 PlantCARE 网站对 *VdERD6L15* 启动子进行预测分析,发现 *VdERD6L15* 启动子区域包含了大量顺式作用元件(图 6),如光响应元件 L-box、Box4, MeJA 反应的顺式作用元件 CGTCA-motif, 参与干旱诱导元件 MBS 等,推测 *VdERD6L15* 基因表达可能受光调控。通过 GUS 染色试验分析,发现对照组的烟草叶片无染色,而试验组 P1(-3000 bp)、P2

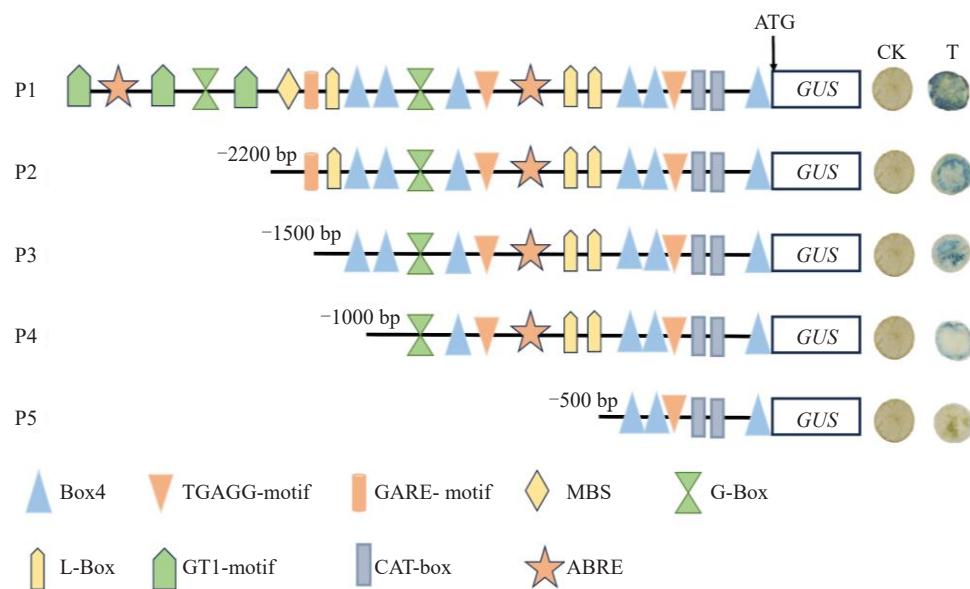


Mal. 麦芽糖; Glu. 葡萄糖; Fru. 果糖; Suc. 蔗糖。

Mal. Maltose; Glu. Glucose; Fru. Fructose; Suc. Sucrose.

图 5 VdERD6L15 基因在己糖缺陷型酵母菌株 EBY.VW4000 中的功能验证

Fig. 5 Functional verification of VdERD6L15 gene in yeast mutant strain EBY.VW4000

P1~P5. 5段启动子缺失片段;CK. 对照;T. *p_{1-p5}VdERD6L15:GUS-GFP*。P1-P5. 5-segment promoter deletion fragment; CK. control; T. *p_{1-p5}VdERD6L15:GUS-GFP*.图 6 *VdERD6L15* 启动子顺式作用元件预测及截短活性分析Fig. 6 Cis-acting element prediction and promoter deletion analysis of *VdERD6L15*

(-2200 bp)、P3(-1500 bp)及P4(-1000 bp)烟草叶片均可正常染色,且颜色随片段长度的截断而变浅(图6),表明4个启动子缺失体都能正常表达,而P5(-500 bp)烟草叶片不可正常染色,由此进一步明确*VdERD6L15*启动子核心区域位于-500 bp到-1000 bp之间。

3 讨论

在果实发育过程中,糖分的积累是决定果实品质和市场价值的关键因素之一。迄今为止,在葡萄^[19-21]、苹果^[22-23]、梨^[24]、菠萝^[25]等水果作物中先后揭示糖转运蛋白与果实中糖分积累之间存在着紧密的相关性。其中,属于单糖转运蛋白家族的ERD6L在果实糖的积累中也发挥着重要功能。笔者在本研究中通过分析刺葡萄果实发育时期*VdERD6L15*的表达量,并关联分析果实发育时期可溶性糖的积累规律,发现*VdERD6L15*在果实早期表达且与刺葡萄果实糖的积累呈负相关。为探究*VdERD6L15*在葡萄果实发育中的作用,笔者在本研究中首次成功克隆*VdERD6L15*的CDS序列,并对其编码的氨基酸序列进行了初步的生物信息学分析。通过氨基酸多重序列比对,发现*VdERD6L15*与黑比诺*VvERD6L15*、苹果*MdERD6*及拟南芥*AtERD6*具有高度同源。已有研究发现,*MdERD6-1*及*AtER-*

*D6*编码蛋白定位于液泡膜^[9,26-27],在果实糖的积累中扮演着重要角色,由此推测与它们同源的*VdERD6L15*可能具有相似生物学功能。本研究中,通过亚细胞定位研究发现*VdERD6L15*也定位于液泡膜中,在己糖转运蛋白缺陷型酵母菌株EBY-VW4000中对*VdERD6L15*异源表达,初步明确了*VdERD6L15*具有葡萄糖转运活性。这一发现与之前对苹果*MdERD6-1*的试验结果一致^[11]。综上,笔者在本研究中初步确定*VdERD6L15*定位于液泡膜中,具有转运葡萄糖的功能。

目前,已有研究发现*MdERD6-1*在苹果果实发育后期表达量与果实中糖的积累呈显著正相关,其可将果实细胞液泡中的葡萄糖转运到细胞质中,激活液泡膜上糖转运蛋白编码基因*MdTST1*的表达,进而促使果实细胞中糖的积累^[26]。然而,笔者在本研究中发现*VdERD6L15*在坐果期早期表达量高,与葡萄果实中糖的积累呈负相关,其在果实发育早期将液泡中的葡萄糖转移到细胞质中以发挥何种生物学功能尚不明确。在果实发育早期,果实快速膨大,果实中大部分可溶性糖通过转运代谢后用于果实细胞生长发育^[28-29]。基于此,推测果实发育早期*VdERD6L15*转运的葡萄糖,可在细胞质中分解代谢成ATP和碳源,用于葡萄果实生长发育,但关于*VdERD6L15*是如何调控刺葡萄果实发育早期细胞

内可溶性糖的动态平衡进而影响果实发育的仍有待进一步探究。

启动子作为基因表达调控的关键序列,包含了大量不同功能的顺式调控元件^[31],这些元件在基因转录调控中扮演着至关重要的角色,因此对启动子中的顺式作用元件进行研究对揭示基因功能具有重要意义^[31-32]。笔者在本研究中借助 PlantCARE 数据库对 *VdERD6L15* 基因 ATG 上游 3000 bp 启动子序列进行了分析,发现其启动子区域包含多种响应元件,如ABA 响应元件、MeJA 反应的顺式作用元件、MYB 结合位点参与干旱诱导响应元件、光响应元件等。通过对 *VdERD6L15* 启动子进行 5' 端缺失克隆,并以 5 段不同长度缺失体为目的片段构建表达载体,进行烟草瞬时转化。通过 GUS 染色试验发现仅启动子缺失体 P5 建立的瞬时表达体系的烟草叶片没有染上蓝色,表明 P5 片段没有启动子活性,从而初步判断 *VdERD6L15* 基因启动子的核心元件的位置在 P4 和 P5 之间(-500 bp~1000 bp)。进一步分析 P4 和 P5 序列的顺式作用元件,发现序列中包含 L-box、G-box 等光响应元件,推测 *VdERD6L15* 通过响应光而参与刺葡萄果实细胞中糖的转运。目前在苹果^[33]、香蕉^[34]、番茄^[35]等水果作物中也先后发现光照会影响果实中糖的积累。但由于启动子与顺式作用元件之间调控机制复杂且多样^[36],*VdERD6L15* 表达是否受光调控进而参与刺葡萄果实细胞中糖的转运和果实的发育仍需进一步研究。

4 结 论

笔者在本研究中首次克隆了刺葡萄 *VdERD6L15* 并对其功能进行了分析,结合前人研究基础,初步发现 *VdERD6L15* 是一个定位在液泡膜上的糖转运蛋白,具有转运葡萄糖的功能;通过对 *VdERD6L15* 启动子不同长度的 5' 端缺失克隆及活性分析,发现其核心元件位置位于 ATG 上游 500 bp 到 1000 bp 之间,以上研究可为解析 *VdERD6L15* 在刺葡萄果实生长发育过程中的功能提供一定的理论基础。

参考文献 References:

- [1] 黎炎夏,罗飞雄,许延帅,李双江,陈文婷,谭君,王美军,徐丰,杨国顺,白描. 刺葡萄新品种湘刺 3 号的选育[J]. 果树学报, 2024, 41(4): 781-785.
- [2] 石雪晖,杨国顺,熊兴耀,刘昆玉,钟晓红,王先荣,倪建军,郭光银. 湖南省刺葡萄种质资源的研究与利用[J]. 湖南农业科学, 2010(19): 1-4.
- [3] SHI Xuehui, YANG Guoshun, XIONG Xingyao, LIU Kunyu, ZHONG Xiaohong, WANG Xianrong, NI Jianjun, GUO Guangyin. Research and utilization status quo of germplasm resources of *Vitis davidii* Foëx. in Hunan[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(19): 1-4.
- [4] 李佳秀,张春岭,刘慧,陈大磊,刘杰超,焦中高. 葡萄汁中糖酸组成分析及在掺假鉴别中的应用[J]. 果树学报, 2019, 36(11): 1566-1577.
- [5] LI Jiaxiu, ZHANG Chunling, LIU Hui, CHEN Dalei, LIU Jiechao, JIAO Zhonggao. Profiles of soluble sugars and organic acids in grape juice and their application for authentication[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(11): 1566-1577.
- [6] 杨梅,潘永杰,杨国顺,石雪晖,刘昆玉,白描,罗飞雄. 刺葡萄新品种湘刺 1 号的选育[J]. 果树学报, 2023, 40(9): 2001-2005.
- [7] YANG Mei, PAN Yongjie, YANG Guoshun, SHI Xuehui, LIU Kunyu, BAI Miao, LUO Feixiong. A new spine grape cultivar Xiangci No. 1 (*Vitis davidii* Foëx.)[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(9): 2001-2005.
- [8] 王静,周广胜. 中国毛葡萄和刺葡萄分布的气候适宜性[J]. 应用生态学报, 2020, 31(1): 97-103.
- [9] WANG Jing, ZHOU Guangsheng. Climatic suitability for the distribution of *Vitis heyneana* and *V. davidii* in China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(1): 97-103.
- [10] SHIRAIHI M, FUJISHIMA H, CHIJIWA H. Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries[J]. Euphytica, 2010, 174(1): 1-13.
- [11] 祝令成. 苹果液泡葡萄糖外排蛋白 MdERDL6 调控糖积累的机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2022.
- [12] ZHU Lingcheng. Mechanism study on an apple tonoplast glucose exporter MdERDL6 in regulating sugar accumulation[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [13] KIYOSUE T, ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. *ERD6*, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1370(2): 187-191.
- [14] POSCHET G, HANNICH B, RAAB S, JUNGKUNZ I, KLEMENS P A W, KRUEGER S, WIC S, NEUHAUS H E, BÜTTNER M. A novel *Arabidopsis* vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects the composition of seed storage compounds[J]. Plant Physiology, 2011, 157(4): 1664-1676.
- [15] WEI X Y, LIU F L, CHEN C, MA F W, LI M J. The *Malus domestica* sugar transporter gene family: Identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of

- fruit sugars[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5:569.
- [11] ZHU L C, LI B Y, WU L M, LI H X, WANG Z Y, WEI X Y, MA B Q, ZHANG Y F, MA F W, RUAN Y L, LI M J. MdERDL6-mediated glucose efflux to the cytosol promotes sugar accumulation in the vacuole through up-regulating TSTs in apple and tomato[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(1): e2022788118.
- [12] BREIA R, CONDE A, CONDE C, FORTES A M, GRANELLA A, GERÓS H. VvERD6L13 is a grapevine sucrose transporter highly up-regulated in response to infection by *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 154:508-516.
- [13] ZHENG Q M, TANG Z, XU Q, DENG X X. Isolation, phylogenetic relationship and expression profiling of sugar transporter genes in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 119(3):609-624.
- [14] LI J M, ZHENG D M, LI L T, QIAO X, WEI S W, BAI B, ZHANG S L, WU J. Genome-wide function, evolutionary characterization and expression analysis of sugar transporter family genes in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(9):1721-1737.
- [15] XIE X B, LI S, ZHANG R F, ZHAO J, CHEN Y C, ZHAO Q, YAO Y X, YOU C X, ZHANG X S, HAO Y J. The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(11):1884-1897.
- [16] VERWEIJ W, SPELT C E, BLIEK M, DE VRIES M, WIT N, FARACO M, KOES R, QUATTROCCHIO F M. Functionally similar WRKY proteins regulate vacuolar acidification in *Petunia* and hair development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(3):786-803.
- [17] 毛常清.玉米糖转运蛋白基因的鉴定、系统发育和表达分析[D].雅安:四川农业大学,2019.
MAO Changqing. Identification, Phylogenetic and expression analysis of sugar transporter gene in maize[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [18] 杨静静.苹果果糖激酶基因MdFRK2在调控糖代谢中的功能研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
YANG Jingjing. Function study of apple fructokinase gene MdFRK2 in regulating sugar metabolism[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.
- [19] BAI Q, CHEN X X, ZHENG Z Z, FENG J J, ZHANG Y J, SHEN Y Y, HUANG Y. Vacuolar Phosphate Transporter1 (VPT1) may transport sugar in response to soluble sugar status of grape fruits[J]. *Horticulture Research*, 2022, 10(2):uhac260.
- [20] CHONG J L, PIRON M C, MEYER S, MERDINOGLU D, BERTSCH C, MESTRE P. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(22):6589-6601.
- [21] CAI Y M, TU W R, ZU Y Y, JING Y, XU Z M, LU J, ZHANG Y L. Overexpression of a grapevine sucrose transporter (VvSUC27) in tobacco improves plant growth rate in the presence of sucrose *in vitro*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:1069.
- [22] FAN R C, PENG C C, XU Y H, WANG X F, LI Y, SHANG Y, DU S Y, ZHAO R, ZHANG X Y, ZHANG L Y, ZHANG D P. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4):1880-1901.
- [23] PENG Q, CAI Y M, LAI E H, NAKAMURA M, LIAO L, ZHENG B B, OGUTU C, CHERONO S, HAN Y P. The sucrose transporter MdSUT4.1 participates in the regulation of fruit sugar accumulation in apple[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 191.
- [24] CHENG R, CHENG Y S, LÜ J H, CHEN J Q, WANG Y Z, ZHANG S L, ZHANG H P. The gene PbTMT4 from pear (*Pyrus bretschneideri*) mediates vacuolar sugar transport and strongly affects sugar accumulation in fruit[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(3):307-319.
- [25] FAKHER B, ASHRAF M A, WANG L L, WANG X M, ZHENG P, ASLAM M, QIN Y. Pineapple SWEET10 is a glucose transporter[J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(10):uhad175.
- [26] ZHU L C, LI Y Z, WANG C C, WANG Z Q, CAO W J, SU J, PENG Y J, LI B Y, MA B Q, MA F W, RUAN Y L, LI M J. The SnRK2.3-AREB1-TST1/2 cascade activated by cytosolic glucose regulates sugar accumulation across tonoplasts in apple and tomato[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(6):951-964.
- [27] KLEMENS P A W, PATZKE K, TRENTMANN O, POSCHET G, BÜTTNER M, SCHULZ A, MARTEN I, HEDRICH R, NEUHAUS H E. Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination[J]. *New Phytologist*, 2014, 202(1):188-197.
- [28] 苏静,祝令成,刘茜,彭云静,马百全,马锋旺,李明军.果实糖代谢与含量调控的研究进展[J].果树学报,2022,39(2):266-279.
SU Jing, ZHU Lingcheng, LIU Xi, PENG Yunjing, MA Baiquan, MA Fengwang, LI Mingjun. Research progress on sugar metabolism and concentration regulation in fruit[J]. *Journal of Fruit Science*, 2022, 39(2):266-279.
- [29] 田晓成,祝令成,邹晖,李白云,马锋旺,李明军.果实可溶性糖的积累模式及其调控研究进展[J].园艺学报,2023,50(4):885-895.
TIAN Xiaocheng, ZHU Lingcheng, ZOU Hui, LI Baiyun, MA Fengwang, LI Mingjun. Research progress on accumulation pattern and regulation of soluble sugar in fruit[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(4):885-895.
- [30] 张春晓,王文棋,蒋湘宁,陈雪梅.植物基因启动子研究进展[J].遗传学报,2004,31(12):1455-1464.
ZHANG Chunxiao, WANG Wenqi, JIANG Xiangning, CHEN

- Xuemei. Review on plant gene promoters[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(12): 1455-1464.
- [31] POTENZA C, ALEMAN L, SENGUPTA-GOPALAN C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2004, 40(1): 1-22.
- [32] 杨晓娜, 赵昶灵, 李云, 李会容, 苏丽, 周燕琼. 启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2010, 25(2): 283-290.
YANG Xiaona, ZHAO Changling, LI Yun, LI Huirong, SU Li, ZHOU Yanqiong. Research advances in the methods of cloning and function-analyzing of promoters[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2010, 25(2): 283-290.
- [33] MEI Z X, LI Z Q, LU X, ZHANG S H, LIU W J, ZOU Q, YU L, FANG H C, ZHANG Z Y, MAO Z Q, CHEN X S, WANG N. Supplementation of natural light duration promotes accumulation of sugar and anthocyanins in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 205: 105133.
- [34] HUANG J Y, XU F Y, ZHOU W B. Effect of LED irradiation on the ripening and nutritional quality of postharvest banana fruit[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98 (14): 5486-5493.
- [35] THWE A A, KASEMSAP P, VERCAMBRE G, GAY F, PHAT-TARALERPHONG J, GAUTIER H. Impact of red and blue nets on physiological and morphological traits, fruit yield and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 264: 109185.
- [36] VAN DER DOES D, LEON-REYES A, KOORNNEEF A, VAN VERK M C, RODENBURG N, PAUWELS L, GOOSSENS A, KÖRBES A P, MEMELINK J, RITSEMA T, VAN WEES S C M, PIETERSE C M J. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOII-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(2): 744-761.