

中国野葡萄锌指蛋白基因的克隆及生物信息学分析

文志丰,赵素平,王西平,王 倩

(西北农林科技大学 园艺学院,农业部西北园艺植物种质资源应用重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**在受白粉病菌侵染的中国野葡萄叶片中克隆锌指蛋白基因全长,研究葡萄抗白粉病的分子机制。**【方法】**在前期采用 mRNA 差异显示技术获得的中国野葡萄华东葡萄株系白河 35-1 抗白粉病基因表达差异 cDNA 片段 T₁₁ GG/B0324-292 的基础上,利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆了该 cDNA 全长序列,并结合生物信息学方法对所获取的序列进行分析。**【结果】**该 cDNA 全长 2 663 bp(GenBank 登录号 HM008621),具有完整的开放阅读框,基因全长 2 223 bp,编码 1 个由 740 个氨基酸组成的锌指蛋白(Zinc finger protein),5'和 3'非翻译区长度分别为 395 和 44 bp。多重比较分析表明,该基因推导的氨基酸序列与拟南芥、蒺藜苜蓿、水稻的 C₃H 亚型 CCCH 型锌指蛋白的同源性分别为 61%,70%和 60%。**【结论】**利用 RACE 技术获得了锌指蛋白基因全长,为进一步研究锌指蛋白基因与葡萄抗白粉病的关系奠定了基础。

[关键词] 中国野葡萄;白粉病;锌指蛋白;转录因子;RACE;生物信息学

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)10-0131-07

Cloning and bioinformatic analysis of zinc finger protein gene in Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*

WEN Zhi-feng, ZHAO Su-ping, WANG Xi-ping, WANG Qian

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Key Laboratory of Northwest Horticulture Plant Germplasm and Application of Agricultural Department in China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**A full length cDNA of a zinc finger protein gene was cloned in Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* which were infected by *Uncinula necator* (Schw.) Burr, and the molecular mechanisms of grape resistant to powdery mildew were studied. **【Method】**This article was based on T₁₁ GG/B0324-292 cDNA fragment of Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* Baihe 35-1, the cDNA fragment came from mRNA differential display technology, the full-length cDNA of the fragment was cloned by rapid amplification of cDNA ends(RACE) technique. Concurrently bioinformatic methods were applied to analyze the obtained sequence. **【Result】**The cDNA sequence consisted of 2 663 bp(GenBank accession number HM008621) and had an open reading frame (ORF) of 2 223 bp, encoded a zinc finger protein of 740 amino acids, the non-translation of 5' and 3'-terminal region was 395, 44 bp respectively. The multiple comparison sequence analysis showed that the deduced amino acid sequences shared identity to 61%, 70% and 60% with *A. thaliana*, *M. truncatula* and *O. sativa*, respectively. **【Conclusion】**The full-length zinc finger protein gene has been cloned by RACE technique, which lays the foundation for further research on the relationship between the gene and grape resistance to powdery mildew

Key words: Chinese wild grape; powdery mildew; zinc finger protein; transcription factor; RACE; bioin-

* [收稿日期] 2010-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871701, 30671446);教育部新世纪优秀人才支持计划项目

[作者简介] 文志丰(1982—),男,湖南东安人,在读硕士,主要从事果树种质资源与生物技术研究。E-mail: zhifengwen@126.com

[通信作者] 王西平(1968—),男,陕西蒲城人,教授,博士生导师,主要从事果树种质资源与生物技术研究。

E-mail: wangxiping@nwsuaf.edu.cn

formatics

葡萄白粉病(*Uncinula necator* (Schw.) Burr) 是危害世界葡萄生产的主要真菌病害之一, 每年给世界葡萄生产造成了很大的经济损失。近年来, 随着分子生物学理论和分子技术的快速发展, 研究者借助现代生物技术手段进行葡萄抗病性研究。目前, 对葡萄白粉病的研究主要是通过葡萄抗病基因的分子标记、抗病基因的定位与遗传作图、构建白粉病胁迫下的 cDNA 文库、抗病标记分子辅助育种和抗病基因同源类似物的克隆等途径, 寻找和筛选葡萄的抗白粉病相关基因。王跃进等^[1]利用 RAPD 技术进行了中国野生葡萄抗白粉病分子标记研究, 获得了中国野生葡萄抗白粉病基因的 3 个 RAPD 标记。Dalbo 等^[2]对葡萄抗白粉病基因(*PM*)和抗黑痘病基因(*BE*)进行了 QTL 遗传定位作图研究, 并认为葡萄抗白粉病是多基因控制的。Raymond 等^[3]研究认为, 在白粉病病原菌胁迫下, 抗白粉病葡萄品种自身所引发的防卫反应, 可引起编码 WRKY 等转录因子基因表达量明显的提高。特别是 2007 年以黑比诺为试材的葡萄基因组图谱的成功绘制, 极大地推动了葡萄抗病相关基因的研究^[4]。

目前, 世界上主要的鲜食葡萄和酿酒葡萄品种都属欧亚品种(*Vitis vinifera* L.), 其突出的特点是品质好, 但对白粉病、霜霉病等真菌病害缺乏抗性。中国是世界葡萄属植物重要的起源地之一, 我国野生葡萄种质资源丰富且多数对白粉病具有较高抗性, 由于其和欧亚葡萄杂交亲和性好, 因而可以有效地将中国野生葡萄白粉病抗病基因与欧亚栽培品种优良品质基因进行结合^[5], 培育优良的抗病葡萄新品种, 这无疑对中国野葡萄抗白粉病基因研究具有重要的理论意义和实践价值, 但目前尚未见这方面的研究报道。本试验在本课题组前期研究获得的中国野葡萄华东葡萄株系白河 35-1 抗白粉病基因表达差异 cDNA 片段的基础上, 利用 RACE 技术从中国野葡萄华东葡萄株系白河 35-1 中克隆出含该片段的全长 cDNA 序列, 并结合生物信息学方法对所获得的锌指蛋白基因的 cDNA 全长进行分析, 以期今后葡萄抗病基因功能分析和功能研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为中国野葡萄华东葡萄株系白河 35-

1, 取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃。

1.2 主要试剂

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒, 购自 Clontec 公司; pGEM-Teasy Vector、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 均购自 Promega 公司; 大肠杆菌 DH5 α 、DL2000 Maker、Taq 酶、dNTP, 均为天根公司产品。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取及纯化 在田间选取高感葡萄白粉病叶片, 采用压片法进行白粉病人工孢子接种, 接种后套袋, 接种 5 d 后采集新鲜叶片放入液氮中保存。采用改良型 SDS/酚法提取接种葡萄白粉病病原菌 5 d 后的叶片总 RNA^[6]。提取的总 RNA 中痕量 DNA 用 DNaseI (Promega, USA) 去除。纯化后的总 RNA 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外分光光度计分析总 RNA 的纯度。

1.3.2 锌指蛋白基因的 5'RACE 和 3'RACE 的扩增 以接种葡萄白粉病病原菌 5 d 后的叶片总 RNA 为模板, 参照 Clontec 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行反转录, 分别合成 5'RACE 和 3'RACE cDNA 第一链。

根据已获得的中国野葡萄华东葡萄株系白河 35-1 抗白粉病基因表达差异 cDNA 片段 T₁₁ GG/B0324-292^[5], 设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物, 分别为 GSP1: 5' TCAGCGTGAGAAGCAGCAC CAGCA 3' 和 GSP2: 5' AGCAGCCAACCCATTTCA TTT CAT 3', 2 条引物间重叠序列为 263 bp。3'RACE 和 5'RACE PCR 的扩增体系参照 Advantage® 2 PCR Kit 说明书进行。PCR 扩增循环参数为: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 70 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.3 RACE 扩增片段的克隆及生物信息学分析

5'RACE 和 3'RACE PCR 扩增产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收特异条带, 连接 pGEM-Teasy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 放大培养后用 M13⁺ 和 M13⁻ 引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增循环参数为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将扩增出的目的片段菌液送上海生工生物技

术有限公司测序。

利用 DNASTar 软件分析该基因的全长序列,在 NCBI 站点里进行相似性比较和氨基酸序列推测,并将推测出来的氨基酸序列递交 NCBI,利用 DNAMAN 软件进行多序列比对,用 Protparam 预测蛋白的理化性质(<http://au.expasy.org>),用 Predict-Protein 程序预测蛋白质二级结构(<http://www.predictprotein.org>),用 WOLF PSORT 程序进行亚细胞定位(<http://wolfsort.org>)。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及纯化

图 1 显示,28 S 和 18 S RNA 条带清晰,亮度接近 2 : 1。紫外分光光度计检测结果显示 OD_{260 nm}/OD_{280 nm}为 1. 90,说明提取的中国野葡萄叶片总 RNA 完整性好,纯度高,可用于后续试验。

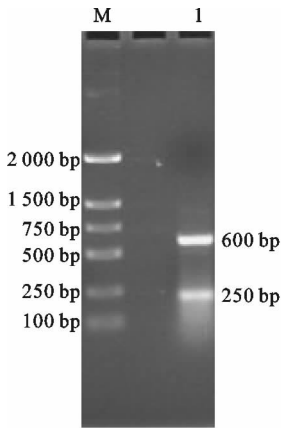


图 2 中国野葡萄锌指蛋白基因 3'RACE 的电泳结果
M. DL2000 Marker;1. 3'RACE 反应产物

Fig.2 Electropherogram result of zinc finger protein gene 3'RACE product from Chinese wild *V. pseudoreticulata*
M. DL2000 Marker;1. 3'RACE product

2.2 锌指蛋白基因 5'RACE 和 3'RACE 片段的扩增及克隆

以接种葡萄白粉病病原菌 5 d 后的中国野葡萄华东葡萄株系白河-35-1 叶片总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA 第一链,然后分别以引物 GSP1、GSP2 和 Advantage[®] 2 PCR Kit 试剂盒中的 UPM 为引物对,进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。图 2 和 3 显示,3'RACE PCR 扩增得到 2 条大小分别约为 600 和 250 bp 的 DNA 条带,根据引物设计的位置可知 250 bp 的 DNA 条带为非特异性扩增条带,将 600 bp 的片段回收测序。5'RACE PCR 扩增得到 1 条大小约为 2 300 bp 的条带。

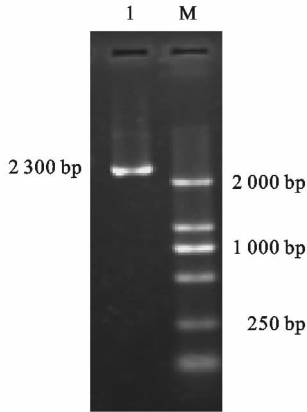


图 3 中国野葡萄锌指蛋白基因 5'RACE 的电泳结果
1. 5'RACE 反应产物;M. DL2000 Marker

Fig.3 Electropherogram result of zinc finger protein gene 5'RACE product from Chinese wild *V. pseudoreticulata*
1. 5'RACE product;M. DL2000 Marker

2.3 锌指蛋白基因的生物信息学分析

测序结果显示,3'RACE 扩增条带的 cDNA 实际长度为 560 bp,5'RACE 扩增条带的实际长度为 2 366 bp。由于 3'RACE 和 5'RACE 扩增条带有 263 bp 的重叠序列,拼接后的 cDNA 全长为 2 663 bp。Blast 分析结果(图 4)表明,该 cDNA 具有完整的开放阅读框架,5'端非编码区长 395 bp,3'端非编码区长 44 bp,基因全长 2 223 bp,编码 1 个包含 740 个氨基酸的锌指蛋白。多重比较分析结果(图 5)表明,该基因编码氨基酸序列与蛋白质数据库中的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) CCCH 型锌指蛋白

(768 个氨基酸)有 476 个氨基酸相似,同源性的 61%;与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) CCCH 型锌指蛋白(724 个氨基酸)有 514 个氨基酸相似,同源性的 70%;与水稻 (*Oryza sativa*) CCCH 型锌指蛋白(734 个氨基酸)有 444 个氨基酸相似,同源性为 60%。

对中国野葡萄锌指蛋白结构的分析发现,在 307~331 氨基酸处有 1 个 C-x8-C-x5-C-x3-H 型锌指结构域,在 119~153 氨基酸处有 1 个锚蛋白家族结构域(Ankyrin domain ANK)。此外,该蛋白的氨基酸序列还有 2 个 6-磷酸果糖激酶 II (PFK-2)和 1

个果糖 2,6-二磷酸酶。从蛋白质分子结构而言,中国野葡萄锌指蛋白属于锚蛋白兼锌指蛋白。

1	AGCAGCCAACCCATTTCAATTTCAATTTCAATTTCTAGACGTTACTCTCTCTCTAAC	
61	ACTTTCTCTCTCTACTTTCTCCGCTTTCTCGCTCTTTCTCGGTAGTATCGATTCCGGGCG	
121	AGGTTATCAACGCCACCTTTGCTGTCCCTCTTTCTCTCTCTATCTCTGTGAATGGAGAT	
181	GAACGCCATTTGCTTCCGATTTCGTCGCGATTTTCCCGCTCTCTTCTCGTGTTGCGTT	
241	CCAGGTCTCGTTCTCCTTAGATCGCTGAATGCCTTTTTCGGTTTGTTCGATCTAGATCT	
301	GTGGACTTCTAACGCTTCAGATTCTTCTGATTGCTGGATCTAATTATTGAATGGGGCTAT	
361	GCTTTTTTTGTGCTTGAGCTCCAGCTGATCAAAGCATGTCAGTGTCGGAGCAATCAA	
		M C S G P E Q S K 9
421	AAACCAAGTCATCTTTCATCTCCATCTTCTACAGAAAGCAAACTAACACCATAGATATGA	
	T K S S S S P S S T E S K T N T I D M N	29
481	ATCATCTAACTGTTGAAACTGAAGATTCTTTTTCCAGTTTACATGAGCTTGCTGCCAACA	
	H L T V E T E D S F S L H E L A A A N N	49
541	ATGATGTTGATGCTTTAAGCTATCTTTAGAGCGCGATGCTTCTGCAATCAACGAGGTTG	
	D V D G F K R S L E R D A S A I N E V G	69
601	GCCTCTGGTATGGCCGGCAGAAAGGGGTCAAACAAATGTTCTCGAGCATAGAACTCCGA	
	L W Y G R Q K G S K Q M V L E H R T P M	89
661	TGATGTGGGCTACCTATGGTAGTGTGAGGTTCTGAAGCTGATACATCACTGCTG	
	M V A A T Y G S V E V L K L I L S R S D	109
721	ATGCTGATGTGAATATCTCATGTGGACCAGACAAAAGCACTGCTCTTCAATTGTGCTGCAT	
	A D V N I S C G P D K S T A L H C A A S	129
781	CTGGTGGATCTGTTAATGCTGTGGATGTTGTTAAGCTGCTTTTGCAGCGGGTGCCGATC	
	G G S V N A V D V V K L L L S A G A D P	149
841	CAAATTCTATGGATGCAAATGGCCATTTTCCAGTTGACGTAATTGTGTCCCTCCAAAGC	
	N S M D A N G H F P V D V I V V P P K L	169
901	TTCCGAGCATGAGAGTTGCCCTCGAAGAACTCCTTGTAACGGTCTTGTGATGGCTCTG	
	P S M R V A L E E L L V N G A S D G S V	189
961	TTGGTGAGCGCAATTTGCGGATCTCCATCACTAGTTCGAATTCCAACCTCCAACCTACCCG	
	G E R N L R I S I T S S N S N S N S P P	209
1 021	CTCTCTTTCATCGCCTGAAAATGGGTCTCCCTTCGCTTCAGATTCTGTGTCATCACCAA	
	L S S S P E N G S P F A S D S V S S P M	229
1 081	TGGCTTTATCAAAGTTTAGTGACCAACCTGTGACATTGGCTTCAGAGAAGAAAGAATACC	
	A L S K F S D Q P V T L A S E K K E Y P	249
1 141	CAATTGATCCATCTCTCCGATATCAAGAACAGCATTATGCAACAGATGAGTTCGGAA	
	I D P S L P D I K N S I Y A T D E F R M	269
1 201	TGTTTTCTTTCAAGGTCGCCCTTGTTCCTGCTTATTTCCCATGATTGGACTGAGTGCC	
	F S F K V R P C S R A Y S H D W T E C P	289
1 261	CCTTTGTTACCCTGGGGAATAAGCTCGAAGGAGAGACCCTCGGAAGTTCCACTACAGCT	
	F V H P G E N A R R R D P R K F H Y S C	309
1 321	GTGTGCCTTGCCCTGATTTCCGAAAGGGGGCTTGTAGACGAGGAGATTATGTGAATATG	
	V P C P D F R K G A C R R G D L C E Y A	329
1 381	CCCATGGAGTTTTTGTGTGCTGGCTCCACCCTGCGCAGTACCGAAGCTCGGCTCTGCAAGG	
	H G V F E C W L H P A Q Y R T R L C K D	349
1 441	ATGGACGAACTGTGCAAGACGGGTCTCTTTTTGCAACACATCCGAGGAGCTTCGGC	
	G T N C A R R V C F F A H T S E E L R P	369
1 501	CCTTGACTTATCGACTGGGTCTGCCGTCCCTTCTCCTCGTGCATCTGGACCTGCTAATG	
	L Y L S T G S A V P P S P R A S G P A N A	389
1 561	CAATGGATATGGCAGCTGCTTTGAGCCTGTTACCTGGCTCTCCATCATCTGTCTCTGCA	
	M D M A A A L S L L P G S P S S V S V M	409
1 621	TGTCTCCTTCTCCATTTGCACAGCCCATGTCTCCATCAGCGAATGGCATTTCACACTCAT	
	S P S P F A Q P M S P S A N G I S H S S	429
1 681	CTGGAGCTTGGCCTCAGCCTAATGTTCTACCCTTAATCTTCTGGAAGCAACTTTCAGT	
	G A W P Q P N V P T L N L P G S N F Q S	449
1 741	CCAGTCGCTGAGGTATCCCTTAATGTAGAGATATTCACCTGAGGATTTCAACATGT	
	S R L R S S L N A R R D I P P E D F N M L	469
1 801	TGCTGGATTTTGTGCTCAGCAGCCTTCTCAATGACTGTGAGCTGTTTCTCAGCCAA	
	L D F D A Q Q Q L L N D L S C F S Q P R	489
1 861	GGACCAATGCTGCTTCTTGAGCCGTTCTGCTCGGTCTAAAACACTGACTCCTTCAAACC	
	T N A A S S L S R S A R S K T L T P S N L	509
1 921	TCGAAGAGCTATTTTCTGCTGAGATCTCATCTCCCGTTACTCTGACTCTTCTGCGAG	
	E E L F S A E I S S S P R Y S D S S A V	529
1 981	TTTTCTCCCATCACACAAATCAGCTATTCTCAATCAATTCCAACAGCAGCAACAGAGTA	
	F S P S H K S A I L N Q F Q Q Q Q S M	549
2 041	TGTTGTCACCTATAAATACAAATGTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
	L S P I N T N V F S P K N V E H P L L Q	569
2 101	AGGCTTCTTTTGGTATCTCATCTCTCTGGGAGAAATGTCACCTAGAAGCATGGAGCCCATCT	
	A S F G I S S P G R M S P R S M E P I S	589

2 161	<u>CCCCAATGGGCCCAAGGCTTTCTGCGATTGCTCAGCGTGAGAAA</u> <u>CAGCACCAGCAGCTAC</u>	
	P M G P R L S A I A Q R E K Q H Q Q L R	609
2 221	<u>GGAGCCTTAGCTCCCGTGACCTTGATCCAACAACCTGCCTCTGTTGTTGGGTC</u> <u>CCCTG</u>	
	S L S S R D L G S N N P A S V V G S P V	629
2 281	<u>TGAATTCTTGGTCGAAGTGGGGTTCCCAACTGGGAAATTAGACTGGTCAGTTAATGGG</u>	
	N S W S K W G S P T G K L D W S V N G D	649
2 341	<u>ATGAAATGGGTCGCCTGAAAAGGTC</u> ATCGTCATTGAGCTTGGAAACAATGGTGAGGAGC	
	E M G R L K R S S S F E L G N N G E E P	669
2 401	CGGACCTGTCATGGGTCAGTCTTTAGTCAAGGAATCTCCACCTGAGATGATGAAAGAGA	
	D L S S W V K E S P P E M M K E K	689
2 461	AGCTTGCAGCCCCGGTGTCTGCTTCTGCATCGTCCGGTGAGGGTTGAATTCTAACTCTC	
	L A A P V S A S A S S G E G L N S N S Q	709
2 521	AAATTGAATCCAATTCTAATTCTCAAATTGATTCTGTTGATCATTCCGTTATTGGAGCTT	
	I E S N S N S Q I D S V D H S V I G A W	729
2 581	GGCTCGAGCAGATGCAGCTTGATCAGCTGTAGTCTAGTGAAAAGGCATTCAATTTTATG	
	L E Q M Q L D Q L V V *	740
2 641	CATTGGGATAGGAACAACCGTA	

图 4 中国野葡萄锌指蛋白基因序列及推导的氨基酸序列

单下划线为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG),双下划线为锌指保守域,加框处为重叠序列区

Fig. 4 Full-length sequences of zinc finger protein gene and its deduced amino acid sequence from Chinese wild *V. pseudoreticulata*

The start coden ATG and the stop coden TAG were labeled by single-underlined respectively,the conserved zinc-finger domains were labeled by double underline,the overlapping sequences were labeled by pane

锌指蛋白的 Protparam 理化性质预测表明,该锌指蛋白的分子式可能为 $C_{3450}H_{5443}N_{9917}O_{1123}S_{36}$,相对分子质量为 80 010. 3,等电点为 6. 01,理论推导的半衰期大于 30 h,不稳定参数为 60. 88,属于不稳定蛋白。该蛋白中相对含量较多的氨基酸有 Ser (25 个,占 17. 0%)、Pro(62 个,占 8. 4%)、Ala(54 个,占 7. 3%)。总的带正电荷的残基(Arg + Lys)数为 67,总的带负电荷的残基(Asp + Glu)数为 76,亲水性数为-0. 461,预测该蛋白为水溶性蛋白。蛋白质二级结构的 Predict-Protein 预测显示,该蛋白质中 α 螺旋占 23. 92%, β 折叠占 5. 27%,其他无规则卷曲占 70. 81%;WOLF PSORT 亚细胞定位研究表明,锌指蛋白在细胞中定位的可能性为细胞核>细胞质,推测该锌指蛋白可能位于细胞核中。

3 结论与讨论

锌指蛋白转录因子是真核生物普遍存在的一类转录因子,在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等方面具有重要的作用^[7-13]。近年来的研究还证实,植物锌指蛋白还参与植物的生殖生长,特别是生殖器官如花和胚珠的发育^[14]。目前,对锌指蛋白的研究多集中在植物干旱、低温、盐胁迫等非生物逆境胁迫方面。研究表明,盐胁迫可以明显提高烟草锌指蛋白基因 ZFP188 在烟草自身的表达水平,并提高转基因植株的抗盐性^[15]。低温和干旱胁迫时,水稻中的锌指蛋白基因通过调节脯氨酸的水平和清除自身活性氧,来提高对低温和干旱逆境下的抗性^[16]。

烟草中的锌指蛋白转录因子参与调节精胺介导的信号转导过程^[17]。

根据锌指蛋白半胱氨酸(C)和组氨酸(H)残基数的不同,可以将锌指蛋白转录因子分为 C_2H_2 、 C_2C_2 、 C_3H 、 C_3H_4 和 C_3H_5 等 5 个亚类^[18-19]。CCCH 型锌指蛋白属于 C_3H 亚型锌指蛋白,其广泛存在于动植物及酵母中^[20], C_3H 型锌指蛋白是目前研究较少的一类锌指蛋白。目前只有少数植物中分离出了 CCCH 型锌指蛋白基因,如拟南芥、水稻、蒺藜苜蓿。对拟南芥的 CCCH 型锌指蛋白基因的研究表明,CCCH 型锌指蛋白基因直接调节拟南芥心型胚的发育和形成,并且参与调节拟南芥的开花时间和花器官的形成^[20-22]。对水稻 CCCH 型锌指蛋白基因的研究发现,该基因调节水稻叶片的衰老^[23]。最新的研究表明,CCCH 型锌指蛋白是一类与 RNA 结合的蛋白,可调节 mRNA 代谢^[24],并具有转录激活功能^[25-26],推测其在植物不同组织及不同发育阶段具有多种功能^[21,23,27],且对其结构和功能的深入研究,将有助于揭示真核生物的基因调控机理^[28]。本研究在白粉病菌诱导下克隆的 C_3H 亚型 CCCH 型锌指蛋白基因,是果树中第一个报道的锌指蛋白基因,结合 CCCH 锌指蛋白的结构及功能预测,以及参照其在拟南芥和水稻中的功能,该 CCCH 型锌指蛋白可能参与中国野葡萄的生殖、发育及抗逆性等过程。葡萄白粉病诱导下的 CCCH 锌指蛋白基因的表达分析及其功能研究将是下一步研究的主要内容。

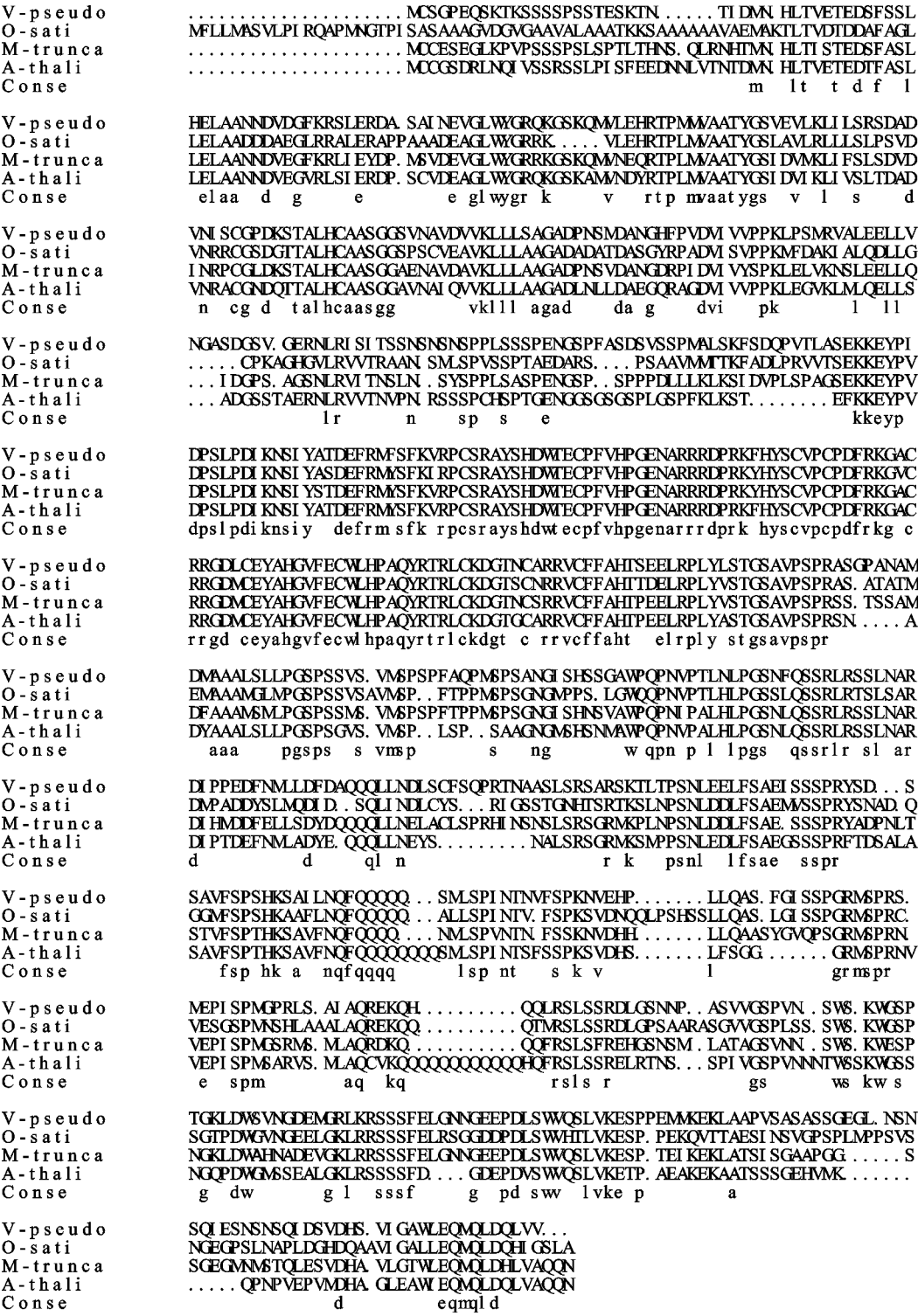


图 5 中国野葡萄锌指蛋白与其他植物锌指蛋白转录因子的多重比较

V-pseudo. 中国野葡萄; A-thali. 拟南芥; M-trunca. 蒺藜苜蓿; O-sati. 水稻

Fig. 5 Multiple comparison sequence of zinc finger protein in Chinese wild

V. pseudoreticulata and from other plant species

V-pesudo. *Vitis pseudoreticul*; A-thali. *Arabidopsis thaliana*; M-trunca. *Medicago truncatula*; O-sati. *Oryza sativa*

RAPD 标记 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2001, 29(1):1-5.

Wang Y J, Zhang J X, Zhou P, et al. RAPD marker of resistance

[参考文献]

[1] 王跃进, 张剑侠, 周 鹏, 等. 中国野生葡萄抗白粉病基因的

- gene to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* [J]. Journal of Northwest University Sci-Tech of Agriculture and Forestry: Nat Sci Ed, 2001, 29(1): 1-5. (in Chinese)
- [2] Dalbo M A, Weeden N F, Reisch B I. QTL analysis of disease resistance in interspecific hybrids grapes [J]. Acta Horticulture, 2001, 1: 215-220.
- [3] Raymond W M F, Martin G, Csaba F, et al. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine [J]. Plant Physiology, 2008, 146: 236-249.
- [4] The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla [J]. Nature, 2007, 449: 463-468.
- [5] 王西平. 中国葡萄属野生种抗白粉病基因克隆与序列分析 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- Wang X P. Cloning and analysing for the gene sequences of resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2004. (in Chinese)
- [6] 张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究 [J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178-181.
- Zhang J J, Wang Y J, Wang X P, et al. An improved method for rapidly extracting total RNA from *vitis* [J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(3): 178-181. (in Chinese)
- [7] Lina M, Francesca F, Rossella D C, et al. The Krüppel-like zinc-finger protein ZNF224 represses aldolase A gene transcription by interacting with the KAP-1 co-repressor protein [J]. Gene, 2005, 305: 35-43.
- [8] Willemijn M G, Hidde J H, Marianne G R. Engineering zinc finger protein transcription factors: The therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command [J]. Molecular Biology, 2005, 354: 507-519.
- [9] Andrew C J, Bo G, Thomas J, et al. Controlling gene expression in *Drosophila* using engineered zinc finger protein transcription factors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 34(8): 877-879.
- [10] 王雷, 周伯如, 吴丽丽, 等. 小黑杨环锌指蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1160-1166.
- Wang L, Zhou B R, Wu L L, et al. Cloning and expression analysis of a ring zinc-finger gene in *Populus simonii* × *P. nigra* [J]. Plant Physiology Communications, 2009, 45(12): 1160-1166. (in Chinese)
- [11] Liu L, White M J, Macrae T H. Transcription factors and their genes in higher plants function domains, evolution and regulation [J]. Eur J Biochem, 1999, 262: 247-257.
- [12] Nagaoka M, Sugiura Y. Artificial zinc finger peptides: creation, DNA recognition and gene regulation [J]. Inorg Biochem, 2000, 82(1-4): 57-63.
- [13] Jamieson A C, Miller J C, Pabo C O. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins [J]. Nature Rev Drug Discovery, 2003, 2: 361-368.
- [14] 杨祥燕, 蔡元波, 吴青松, 等. 菠萝锌指蛋白基因 AcRCHY1 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1589-1596.
- Yang X Y, Cai Y B, Wu Q S, et al. Cloning and expression analysis of a zinc finger protein gene AcRCHY1 from pineapple [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(11): 1589-1596. (in Chinese)
- [15] Ji H, Xia Y, Wang M M, et al. A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1769: 220-227.
- [16] Ji H, Shu J S, Dong Q X, et al. Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 389: 556-561.
- [17] Yoshiko M, Yoshihiro T, Yukiko U, et al. Identification of a novel Cys2/His2-type zinc-finger protein as a component of a spermine-signaling pathway in tobacco [J]. Plant Physiology, 2007, 16(4): 785-793.
- [18] 赵楠, 赵飞, 李金花. 锌指蛋白结构及功能研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 131-134.
- Zhao N, Zhao F, Li J H. Advance in research on zinc finger protein [J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(1): 131-134. (in Chinese)
- [19] 刘梅芳, 周淑芬, 徐桂磊, 等. 一个水稻 CCCH 型锌指蛋白基因的表达模式分析 [J]. 福建农业学报, 2008, 23(3): 225-230.
- Liu M F, Zhou S F, Xu G L, et al. Expression analysis of a rice CCCH-type zinc finger gene [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2008, 23(3): 225-230. (in Chinese)
- [20] Li Z, Thomas T L. PEI 1, an embryo specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10(3): 383-398.
- [21] Schmitz R J, Hon L, Michals S, et al. Frigida essential interacts genetically with frigida and frigida-like to promote the winter annual habit of *Arabidopsis thaliana* [J]. Development, 2005, 24(132): 5471-5478.
- [22] Li J, Chex X H. A regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein [J]. Plant Cell, 2001, 13(10): 2269-2281.
- [23] Kong Z, Li M, Yang W, et al. A novel nuclear 2 localized CCCH2 type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1376-1388.
- [24] Lai W S, Kennington E A, Blackshear P J. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA; non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs [J]. Biol Chem, 2002, 277: 9606-9613.
- [25] Batchelder C, Dunn M A, Choy B, et al. Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1 [J]. Genes Dev, 1999, 13: 202-212.