

缪倩,任春梅,季英华,等. 黄瓜 COP9 信号复合体亚基 CsCSN5b 的亚细胞定位和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 1084-1088

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.04.035

黄瓜 COP9 信号复合体亚基 CsCSN5b 的亚细胞定位和表达分析

缪倩, 任春梅, 季英华, 杨柳, 程兆榜

(江苏省农业科学院植物保护研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培养基地, 江苏 南京 210014)

关键词: COP9 信号复合体; 黄瓜; 亚细胞定位

中图分类号: S642.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2021)04-1084-05

Subcellular location and expression analysis of subunit CsCSN5b from COP9 signaling complex in *Cucumis sativus* L.

MIAO Qian, REN Chun-mei, JI Ying-hua, YANG Liu, CHENG Zhao-bang

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base Co-constructed by Province and Ministry, Nanjing 210014, China)

Key words: COP9 signaling complex; *Cucumis sativus* L.; subcellular location

COP9 信号复合体(Constitutively photomorphogenic signalosome, CSN)是一种在黑暗条件下抑制光形态建成的调节蛋白^[1], 1992 年在研究调控拟南芥的光形态建成的转录因子时被发现, 突变体拟南芥在黑暗条件下, 子叶展开, 下胚轴缩短, 这一表型与野生型拟南芥在光照下幼苗生长的形态一致。CSN 是一种高度保守的多亚基蛋白质复合体, 调控动物、植物的生命活动, 如生长、分化、繁殖。CSN 主要参与调节泛素-蛋白酶体通路(Ubiquitin proteasome system, UPS)^[2], UPS 是蛋白质高效特异性降解的主要途径, 目标蛋白被泛素三酶级联反应, 靶蛋白进行泛素化修饰后, 由 26S 蛋白酶体催化蛋白质降解^[3]。其中 SCF 型泛素连接酶(CRLs)是泛素连接酶 E3 中最大的家族, 该复合体包括 Cull-

in 蛋白、RING 蛋白、调控蛋白以及底物识别蛋白^[4], CSN 可以催化泛素类蛋白 NEDD8 从 Cullin-RING 泛素连接酶上去 Nedd 化导致 CRLs 活性丧失, 实现 CSN 影响蛋白质降解过程^[5]。在高等真核生物中典型的 CSN 蛋白由 8 个不同亚基组成(CSN1 ~ CSN8), 这些亚基通常含有 2 个保守结构域: MPN (MPRI-PADI-N-terminal domain) 和 PCI (Proteasome COP9 signalosome initiation factor 3 domain)^[6]。MPN 结构域是由 3 条 α 螺旋和 9 条 β 线缠绕成 β 片层组成, 一般存在于 CSN5 和 CSN6 中, 主要识别信号因子, 激活下游活动, 调控生物学功能^[6]。PCI 结构域存在于 CSN1、CSN2、CSN3、CSN4、CSN7 和 CSN8 中, 是复合体亚基装配完整的关键部分, 并介导蛋白质的相互作用^[7]。

COP9 信号复合体亚基已经从多种生物中被克隆并分析, 各个亚基的功能也陆续被发现, 如水稻 *OsCSN5B* 基因^[8]、苹果 *MdCSNs* 基因^[9]、甘蓝型油菜 *BnCOP9* 基因^[10]、菊花 *CmCSN1* 基因^[11]、拟南芥 CSN 蛋白^[12]、烟草 CSN4 蛋白^[13] 等。CSN5 结构最为特殊, 它具备完整的催化活性位点和金属离子锌结合位点, 在生物体中以单体或小复合体的形式发挥功能^[14], 有研究结果表明人体内的同源基因 *Jab1* 与癌症密切相关^[15-17]。CSN5 可调控真菌生长发育和代谢, 茶树内生真菌

收稿日期: 2020-10-23

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(19)3108]; 国家公益性行业科研专项(201303028); 国家自然科学基金项目(31501610)

作者简介: 缪倩(1986-), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒研究。(E-mail): miaoqian603@163.com

通讯作者: 程兆榜, (E-mail) onlyone8501@126.com

无花果拟盘多毛基因组中找到的同源基因 *PfcsnE*, 是分生孢子形成的必需条件, 并调控菌株的次级代谢活动^[18]。CSN5 在植物逆境胁迫中扮演重要角色, 双生病毒编码的 C2 蛋白能够与拟南芥的 CSN5A 互作, 影响拟南芥泛素化蛋白质降解^[19]。拟南芥突变体 *csn5* 对盐表现出较高的耐受性, 发现 CSN5B 通过 26S 蛋白酶体途径降解 GDP-甘露糖焦磷酸化酶, 影响植物抵御非生物胁迫的关键因子抗坏血酸 (AsA) 的合成, CSN5B 功能缺失后 AsA 的含量升高, 处于较高水平, 可提高植物对环境胁迫的耐受性^[20]。CSN5 有 2 个编码基因 *CSN5a* 和 *CSN5b*, 现在研究较多的是 *CSN5a* 的功能。

黄瓜是瓜类蔬菜作物中具有重要经济价值的一类, 全国范围内收集的 3 283 份黄瓜疑似病毒病样品中, 黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 检出率为 21.38%。CGMMV 发展形势日趋严峻, 严重影响黄瓜的品质和产量, 使黄瓜产业经济损失达 15%~25%^[21]。本研究首次从黄瓜中克隆到 *CsCSN5b*, 前期研究预测 *CsCSN5b* 与 CGMMV 的 CP 蛋白有互作关系, 猜测 *CsCSN5b* 在黄瓜应答 CGMMV 生物胁迫中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 CGMMV 毒源为本实验室保存的 2012 年采集于海南的具有典型发病症状的西瓜样品上^[22]; 植物材料黄瓜 9930 (*Cucumis sativus* L.) 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 由本实验室保存; 荧光标记载体 35S::YFP 由南京农业大学陶小荣实验室提供。

1.2 植物总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

黄瓜总 RNA 提取参照 RNA 提取试剂盒使用说明书操作, 总 RNA 经 Nanodrop2000 和琼脂糖凝胶电泳检测后, 取 5 μ g RNA 为模板, 按 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 说明书操作得到 cDNA, 将剩余的 RNA 和 cDNA 于 -80 °C 保存, 用于后续试验。

1.3 *CsCSN5b* 基因克隆及其序列分析

根据公开的黄瓜基因组信息, 设计 *CsCSN5b* 基因扩增引物 COP9-bf: 5'-CGGGATCCATGGAGCCGTTTCCATCATC-3' 和 COP9-br_dTGA: 5'-CGGGATCCGCTTTCCACCATTTGGTTCTG-3' (下划线为引入的 *Bam* H I 酶切位点), 以合成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 52 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 70 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 12 °C 保存。纯化产物与 pMD18-T 载体连接, 连接体系参照 pMD18-T 载体试剂盒说明书操作, 16 °C 连接过夜, 连接产物通过热激法转化大肠杆菌感受态 TOP10, 挑取单菌落 PCR 鉴定得到阳性克隆, 送于南京金斯瑞生物公司进行测序。利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 Blast 在线分析工具进行序列分析, 使用 MEGA6 软件的邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树, 进化树的可信度使用 1 000 次自导复制验证。

1.4 *CsCSN5b*-YFP 融合表达载体构建

参照质粒提取试剂盒说明书提取 pMD18-*CsCSN5b* 质粒, 用 *Bam* H I 进行单酶切, 37 °C 酶切 1 h, 酶切产物通过 T4 连接酶连接经 *Bam* H I 单酶切的线性化 35S::YFP, 连接体系参照 T4 DNA Ligase 试剂盒说明书操作, 22 °C 连接 1 h。连接产物通过热激法转化大肠杆菌感受态 TOP10, 送于南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.5 *CsCSN5b* 蛋白的亚细胞定位观察

重组质粒 *CsCSN5b*-YFP 电击法转化农杆菌 GV3101, 以 35S::YFP 空载体为对照, 在 LB 平板 (含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 硫酸卡那霉素) 上筛选培养, 经 PCR 鉴定阳性菌落, 用于后续试验。

将转入 35S::*CsCSN5b*-YFP 农杆菌和 35S::YFP 空载体的农杆菌单菌落用液体 LB (含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 硫酸卡那霉素) 振荡培养, 至 OD_{600} 约为 1.0, 离心收集菌体, 弃上清液, 加入诱导液 [150 μ mol/L 乙醚丁香酮、10 mmol/L MES (pH5.7) 和 10 mmol/L $MgCl_2$] 重悬菌体, 室温避光静止 2 h, 选取 4~6 叶龄健康本氏烟草的叶片, 表皮按压注射菌液。40 h 后取浸润区烟草叶片置于载玻片上, 于激光共聚焦显微镜 (ZEISS LSM710) 488 nm 激发光下观察上表皮细胞中目标蛋白表达情况及其亚细胞定位特征。

细胞核染色采用 DAPI 标记法。取浸润区烟草叶片置于载玻片上, 于激光共聚焦显微镜 360~400 nm 激发光下观察。

1.6 *CsCSN5b* 蛋白 Western blot 分析

按照植物蛋白提取试剂盒 (Solarbio) 说明书提取烟草叶片植物总蛋白质, 加入适量 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 ($\times 5$), 漩涡震荡混匀, 99 °C 金属浴 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用于 Western blot 试验。取 20 μ l 上述蛋白质样品于 12% SDS-PAGE 胶上进行电泳 (80 V, 30 min; 130 V, 1 h) 检测, 转印硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭, 室温 60 r/min 震荡 1 h, 然后以 1:5 000 的 GFP 抗体常温孵育, 60 r/min 震荡 1 h, 经 PBST 洗涤 4 次, 用辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔作为二抗 1:5 000 常温孵育, 60 r/min 震荡 1 h, 用 PBST 洗涤 4 次。显色试剂盒 ECL Western Blotting Substrate 避光显色, 在天能 Tanon 5200 Multi 全自动荧光/化学发光成像分析系统下曝光显影。

1.7 *CsCSN5b* 转录产物的 RT-PCR 检测

浸润区烟草叶片总 RNA 提取参照 RNA 提取试剂盒说明书操作, 取 5 μ g RNA 为模板, 按 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 说明书合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 利用 35S::YFP 上游引物 35Sbgl II-F 和 *CsCSN5b* 基因扩增引物 COP9-br_dTGA 进行 PCR 检测, 为了验证 35S::*CsCSN5b*-YFP 在本氏烟草叶片细胞中是否正常转录。

1.8 基因表达分析

已感染 CGMMV 病毒的西瓜叶为接种病原, 称 0.1 g 新

鲜病叶,加入 10 ml 0.01 mol/L PBS (pH7.0) 缓冲液研磨,在 10 d 苗龄的黄瓜子叶上均匀喷洒少许金刚砂,吸取 500 μ l 接种液滴在子叶上,手指顺着叶脉方向轻轻摩擦叶面,同时以 PBS 缓冲液接种作为对照组 (CK),接种 10 min 后,对接种的叶片喷洒清水保湿。摩擦接种后第 7 d、第 15 d 和第 25 d 采集黄瓜叶片。

提取黄瓜叶片样品的 RNA,第一条链 cDNA 链的合成参考 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书,以反转录得到的 cDNA 为模板,根据克隆得到的黄瓜 *CsCSN5b* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物 QCcCOP9-F: 5'-ACACCTATCTATGGCTGG-3', QCcCOP9-R: 5'-TTGCACCGAGTCGTTTCATAGA-3',以 *QCActin* 为内参基因,进行荧光定量 PCR,检测 *CsCSN5b* 基因在接种 CGMMV 后的表达情况。扩增条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s;变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环,每组试验设 3 次生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 *CsCSN5b* 基因进行相对定量分析, Ct 值为达到检测阈值时的 PCR 循环数。使用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CsCSN5b* 基因克隆

提取黄瓜叶片总 RNA,反转录合成 cDNA 第一条链,以 cDNA 为模板,利用 *CsCSN5b* 全长扩增引物进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,扩增到 1 条大小约 1.2 kb 的特异性条带,与预期的目的基因 (1 098 bp) 大小基本一致。转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,验证重组质粒 pMD18T-*CsCSN5b* 序列准确无误。

2.2 *CsCSN5b* 蛋白的生物信息学分析

黄瓜 *CsCSN5b* 基因核苷酸序列全长 1 098 bp,编码 1 个含有 365 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量大小约 36 700。利用 NCBI Conserved Domain Search 分析保守结构域,发现 *CsCSN5b* 编码的蛋白质属于 COP9 信号复合体 CSN 第 5 亚基家族,含有典型的 MPN 保守功能域,并且有 1 个锌结合位点,很可能与复合体的催化活性有关。MPN 同源蛋白进化树分析结果显示,*CsCSN5b* 与葫芦科植物番南瓜 (*Cucurbita maxima*)、中国南瓜 (*Cucurbita moschata*)、西葫芦 (*Cucurbita pepo*)、甜瓜 (*Cucumis melo*)、小黄瓜 (*Cucumis sativus*) *CSN5b* 的氨基酸序列具有较高的同源性,其中与小黄瓜的亲缘关系最近,与荷花 (*Nelumbo nucifera*)、棕榈 (*Elaeis guineensis*)、玉米 (*Zea mays*) 的亲缘关系较低。

2.3 *CsCSN5b*-YFP 融合表达载体构建

克隆 *CsCSN5b* 基因时在基因的两端加入了 *Bam*H I 酶切位点,因此通过 *Bam*H I 单酶切 pMD18-*CsCSN5b* 获得 2 条片段,其中一条是 pMD18T 载体片段,大小约为 2 000~3 000 bp,另一条大小约 1 200 bp 的条带,与预期的 1 098 bp *CsCSN5b* 基因片段大小相近。对最终筛选的阳性克隆送南

京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序验证的阳性克隆,序列正确的带有 YFP 标签的融合表达载体命名为 35S::*CsCSN5b*-YFP。为了确保插入方向正确,35S::*CsCSN5b*-YFP 融合表达载体进一步用载体引物 35SBgl II-F 和 *CsCSN5b* 基因扩增引物 COP9_bR_dTGA 进行菌落 PCR 筛选,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测得到另一条大小约 1 200 bp 的条带,与预期的 1 098 bp *CsCSN5b* 基因片段大小相近。进一步 *Bam*H I 酶切鉴定,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,有 2 个条带,其中一条是 35S::YFP 载体,大小在 15 000 bp 左右,另一条大小约 1 200 bp,与预期的 1 098 bp *CsCSN5b* 基因片段大小相近。

2.4 *CsCSN5b* 编码的蛋白质亚细胞定位分析

激光共聚焦显微镜观察到绿色荧光蛋白在烟草表皮细胞高效瞬时表达,35S::*CsCSN5b*-YFP 融合蛋白在细胞核和细胞质中均有绿色荧光信号,用 DAPI 处理发现 35S::*CsCSN5b*-YFP 融合蛋白在表皮细胞的细胞核中有荧光信号,所以可以推测 *CsCSN5b* 蛋白的亚细胞定位在细胞核和细胞质中。

2.5 *CsCSN5b*-YFP 的表达检测

浸润 *CsCSN5b*-YFP 的烟草叶片可以扩增到 1 条与 *CsCSN5b* 目的片段大小一致的条带,空载体没有出现对应条带,表明重组蛋白转录正常。

提取浸润处烟草叶片植物总蛋白质,进行 Western Blotting 蛋白质印迹检测,结果显示,63 000 处有单一目的条带,与预期的 *CsCSN5b*-YFP 融合蛋白大小一致,接种 YFP 的烟草在 27 000 处有条带,与预期的 YFP 大小一致。表明提取的植物蛋白质与抗 YFP 抗体发生特异性结合,说明构建的融合蛋白成功表达。

2.6 *CsCSN5b* 基因表达分析

荧光定量 PCR 结果表明,与对照组相比,CGMMV 处理的黄瓜叶片中 *CsCSN5b* 基因相对表达量随着时间的推移升高,CGMMV 处理的第 7 d *CsCSN5b* 基因表达量是对照组的 1.24 倍,第 15 d *CsCSN5b* 基因表达量是对照组的 1.67 倍,第 25 d *CsCSN5b* 基因表达量是对照组的 5.74 倍。说明 *CsCSN5b* 基因能够响应 CGMMV 侵染胁迫,上调表达,该基因可能是 CGMMV 生物胁迫的反应基因。

3 讨论

CSN 首先发现于拟南芥中,相对分子质量为 450 000~550 000^[23],后来在人类、果蝇、酵母等生物中相继发现,不同亚基在不同生物体中的功能和数目有较大的差异^[24]。CSN 主要通过金属蛋白酶活性、去泛素化活性和蛋白激酶活性在生物体内发挥生物学作用^[25-27],参与植物激素信号传导、逆境胁迫应答、次生代谢等活动。*N* 基因是抗烟草花叶病毒 (TMV) 的典型基因,烟草中证实 *NbRar1* 和 *NbSGT1* 对 *N* 基因介导的抗病毒作用是必需的,采用酵母双杂技术和免疫共

沉淀技术发现 NbCOP9 复合物与这 2 种基因有联系,利用 VIGS 技术发现 NbCOP9 复合体表达水平下降导致 *N* 基因介导的 TMV 抗性下降^[28]。双生病毒 C2 蛋白与 CSN5 互作,改变 CSN 复合物的活性,干扰寄主对病毒蛋白泛素化过程。

CSN5 比较特别,它参与各种细胞活动的调控,如细胞的增殖和凋亡^[29],单独或以复合体形式存在都可以发挥功能^[30]。CSN5 的催化中心是 Jab1/MPN/Mov34(JAMM)子结构域,它可以调节降解类泛素化酶的活性,为 CSN 发挥作用提供帮助。2014 年发现拟南芥中 CSN5 是由 2 个同源基因编码的 CSN5a 和 CSN5b 异构体组成,在拟南芥生长过程中突变其中 1 个基因植物能生长,2 个基因同时突变就会产生典型的 *cop/det/fus* 突变体致死表型,说明两者行使了部分重叠功能^[31]。2011 年在 CSN5 基因沉默突变株中发现茉莉酸的合成量大大降低,水杨酸含量无变化^[32];2018 年发现拟南芥 *csn5a* 缺陷型影响表面毛状体和花青素、苯丙素、类胡萝卜素等化合物的合成,从而改变了 TTG1/bHLH/MYB 转录复合物的调控协同性^[33];2017 年在小麦上接种叶锈病菌发现高抗性的宿主体内 *TaCSN5* 转录丰度较高^[34]。

黄瓜是瓜类蔬菜作物中具有重要经济价值的一类^[35-38],近年来 CGMMV 在葫芦科作物上的危害渐趋严重,并已成为危害设施瓜类作物的主要病毒。本研究首次从黄瓜中克隆了 COP9 信号复合体亚基 *CsCSN5b* 基因,该基因 ORF 全长 1 098 bp,编码的蛋白质相对分子质量 36 700,该蛋白质含有 1 个保守的 MPN 功能域,与 CSN5 蛋白结构相似,氨基酸序列比对分析结果发现,*CsCSN5b* 与葫芦科植物的 CSN 亲缘关系较近。本研究构建了带有 YFP 荧光标签的重组表达载体 *CsCSN5b*-YFP,转化农杆菌后浸润接种烟草,进一步研究其亚细胞定位特征,发现带 YFP 标签的 *CsCSN5b* 蛋白成功在烟草细胞核和细胞质中表达,这是首次在黄瓜中克隆 *CsCSN5b* 基因并研究其亚细胞定位特征,为研究其功能提供了基础。在本研究中,CGMMV 侵染黄瓜苗后,*CsCSN5b* 基因表达量逐渐上升,说明该基因参与了病毒胁迫的应答机制,响应 CGMMV 感染胁迫。但是 *CsCSN5b* 基因在黄瓜受 CGMMV 感染后具体表达模式和调控机制尚不明确,需要更深入的探究。

参考文献:

- [1] WEI N, DENG X W. Cop9-a new genetic-locus involved in light-regulated development and gene-expression in arabidopsis [J]. Plant Cell, 1992, 4(12):1507-1518.
- [2] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, et al. The ubiquitin-proteasome system[J]. J Biosci, 2006, 31(1):137-155.
- [3] 古智文,史伟峰. 泛素化酶在病毒感染过程中的调控作用研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015(6):477-480.
- [4] CARDOZO T, PAGANO M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5(9):739-751.
- [5] HANNß R, DUBIEL W. COP9 signalosome function in the DDR [J]. Febs Letters, 2011, 585(18):2845-2852.
- [6] 祖未希,靳 飞,印莉萍. 植物 COP9 信号复合体的结构特征和功能[J]. 植物生理学通讯, 2007(5):961-968.
- [7] 杨 晓,王明爽,李红叶. 真菌中 COP9 信号复合体的研究进展[J]. 生物学杂志, 2018, 35(3):67-71.
- [8] 何 龙,羊 健,张松柏,等. 水稻 CSN5B 蛋白抗血清的制备及其应用[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(4):525-528.
- [9] 刘文武. 苹果 *MdCSNs* 家族的生物信息学和表达分析及 *MdCSN7-1* 基因的遗传转化研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2015.
- [10] 王 政,谭小力,张志燕,等. 甘蓝型油菜 *BnCOP9* 基因的克隆及其环境信号响应分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(3):6-11.
- [11] 韩 霜,陈素梅,蒋甲福,等. 菊花 COP9 信号复合体亚基 *CmCSN1* 的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(4):49-54.
- [12] FRANCIOSINI A, MOUBAYIDIN L, DU K, et al. The COP9 SIGNALOSOME is required for postembryonic meristem maintenance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant, 2015, 8(11):1623-1634.
- [13] 龚 露,钟 杰,高 洁,等. 烟草 *CSN4* 基因的原核表达及纯化[J]. 山地农业生物学报, 2017, 36(2):19-24.
- [14] DUBIEL, DAWADSCHARGAL, ROCKEL B N, et al. Diversity of COP9 signalosome structures and functional consequences [J]. Febs Letters, 2016, 589(19):2507-2513.
- [15] KATO J Y, YONEDAKATO N. Mammalian COP9 signalosome [J]. Genes to Cells, 2010, 14(11):1209-1225.
- [16] MAO L X, LE S, JIN X, et al. CSN5 promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer by stabilization of FOXM1[J]. Experimental Cell Research, 2019, 374(2):274-281.
- [17] SHACKLEFORD T J, CLARET F X. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer[J]. Cell Division, 2010, 5(1):26.
- [18] 郑艳静,王秀娜,章小灵,等. COP9 信号小体亚基 CsnE 对无花果拟盘多毛孢生长发育和次级代谢的影响[J]. 中国科学:生命科学, 2017, 47(7):750-758.
- [19] LOZANO-DURAN R, ROSAS-DIAZ T, GUSMAROLI G, et al. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated de-rubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in arabidopsis thaliana[J]. The Plant Cell, 2011, 23:1014-1032.
- [20] WANG J, YU Y, ZHANG Z, et al. Arabidopsis CSN5B interacts with VTC1 and modulates ascorbic acid synthesis[J]. Plant Cell, 2013, 25(2):625-636.
- [21] 刘 勇,李 凡,李月月,等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019, 52(2):239-261.
- [22] 王 峰,任春梅,季英华,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒海南分离物基因组测定与毒源分析[J]. 植物保护, 2014(6):75-81.
- [23] 刘淑媛,万腊根,高琳琳,等. CSN 复合物在 ATRA 诱导 APL 细胞分化过程中的表达及其意义[J]. 中国实验血液学杂志,

- 2015, 23(5):1277-1281.
- [24] 许红,姚斐,盛清,等. 家蚕 JAB1/CSN5 蛋白的基因克隆表达及亚细胞定位[J]. 蚕业科学, 2009, 35(3):508-515.
- [25] LYAPINA S, COPE G, SHEVCHENKO A, et al. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome[J]. Science, 2001, 292(5520):1382-1385.
- [26] NAUMANN M, BECHOTSCHEIR D, HUANG X, et al. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(50):35297-35300.
- [27] ZHOU C, WEE S, RHEE E, et al. Fission yeast COP9/Signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p[J]. Molecular Cell, 2003, 11(4):927-938.
- [28] YULE L, MICHAEL S, GIOVANNA S, et al. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus[J]. Plant Cell, 2002, 14(7):1483-1496.
- [29] WANG L, NIAN Z, SHENG P. The emerging roles of Jab1/CSN5 in cancer[J]. Medical Oncology, 2016, 33(8):90.
- [30] WEI N, SERINO G, DENG X W. The COP9 signalosome; more than a protease[J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33(12):592-600.
- [31] JIN D, LI B, DENG X W, et al. Plant COP9 signalosome subunit 5, CSN5[J]. Plant Sci, 2014, 224:54-61.
- [32] HIND S R, PULLIAM S E, PAOLA V, et al. The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2011, 65(3):480-491.
- [33] SHU W, XIANG L, GRUBER M Y, et al. COP9 signalosome subunit 5A affects phenylpropanoid metabolism, trichome formation and transcription of key genes of a regulatory tri-protein complex in Arabidopsis[J]. Bmc Plant Biology, 2018, 18(1):134.
- [34] ZHANG H, WANG X, GIROUX M J, et al. A wheat COP9 subunit 5-like gene is negatively involved in host response to leaf rust[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(1):125-133.
- [35] 莫雨杏,王磊,周伟,等. 黄瓜种子胎萌生理特性及相关基因表达分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(9):2090-2096.
- [36] 武娅歌,赵建华,宋晓飞,等. 欧洲温室型黄瓜同源四倍体新种质的创制与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18):141-145.
- [37] 曲继松,张丽娟,朱倩楠,等. 水分胁迫对柠条基质栽培黄瓜幼苗生长及光合特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2):384-390.
- [38] 张功臣,赵征宇,王波,等. 生物质炭和微生物菌剂配施对设施土壤理化特性及黄瓜产量和品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18):155-159.

(责任编辑:陈海霞)