

宋新新, 袁 月, 孙海龙, 等. 葡萄 *VvGW2* 基因的克隆及表达[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 434-440.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.033

## 葡萄 *VvGW2* 基因的克隆及表达

宋新新, 袁 月, 孙海龙, 余晓娟, 陶建敏

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为了从葡萄品种美人指中克隆 *VvGW2* 基因, 并对其结构特征及表达模式进行分析。在 NCBI 中查找与水稻粒形基因 *OsGW2* 同源性最高的葡萄序列, 根据葡萄的 *GW2* 基因序列设计特异引物。采用改良 CTAB 法提取美人指花序中总 RNA, 运用 RT-PCR 技术进行克隆。利用 NCBI 数据库中的 BLASTn 和 BLASTp 程序进行相似性分析; 利用 Bioxm2.6 推测分析蛋白质分子量和等电点; 根据 NCBI 中 Conserved Domains 程序进行蛋白质保守域结构预测; 用 ExPaSy 提供的在线 SOPMA 程序进行蛋白质二级结构预测; 利用实时荧光定量 RT-PCR 研究该基因表达模式。结果显示, 从美人指中克隆得到 1 个 *GW2* 基因同源序列, 命名为 *VvGW2* 基因。*VvGW2* 基因开放阅读框长度为 1 272 bp, 共编码 423 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 46 960, 理论等电点为 4.68。该基因编码的氨基酸具有 *GW2* 蛋白质保守的环指结构域, 该环指蛋白质为 C5HC2 类型。与 GenBank 中登录的其他植物 *GW2* 蛋白质序列相似性为 47% ~ 53%。根据 *VvGW2* 基因所编码的氨基酸序列构建系统进化树, 结果显示, 葡萄与可可聚为一类。实时荧光定量 RT-PCR 分析结果显示, *VvGW2* 基因在美人指花或果实的各时期均有表达, 其中在开花期基因表达量最高。不同葡萄品种中, *VvGW2* 基因的表达量存在差异, 在指形葡萄品种美人指的表达量最高, 在圆形葡萄品种中的表达量很低。表明 *VvGW2* 基因在不同时期和不同品种中的表达量差异可能与葡萄果实形状相关。

**关键词:** 葡萄; *VvGW2* 基因; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0434-07

## Cloning and expression of *VvGW2* gene in grape

SONG Xin-xin, YUAN Yue, SUN Hai-long, YU Xiao-juan, TAO Jian-min

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To isolate the *VvGW2* gene from grape (*Vitis vinifera*) cultivar Manicure Finger, and analyze the structure and expression pattern of the gene, specific primers were designed based on the grape sequence in NCBI, the highest homologue with the rice grain shape gene *OsGW2*. The improved CTAB method was used to isolate total RNA and the *VvGW2* gene was obtained using RT-PCR. BLASTn and BLASTp in NCBI were used to perform the similarity analysis, the protein molecular weight and isoelectric point were speculated using Bioxm2.6, the conserved domain structure of protein was predicted by Conserved Domains program in NCBI, the protein secondary structure was predicted by using SOPMA program. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to determine the expression pattern of *GW2*. The *VvGW2* gene contains a 1 272-bp open reading frame (ORF) which encodes 423 amino acids with a calculated molecular weight of 46 960 and an isoelectric point of 4.68. Protein structure analysis showed that *VvGW2* contained a RING domain and belonged to

C5HC2. Similarity analysis showed that the predicted amino acid sequence of *VvGW2* shared homologies of 53%, 48%, 48%, 48% and 47% with wheat, maize, sorghum, barley and rice, respectively. The phylogenetic tree constructed based on amino acid sequence of *VvGW2* gene revealed that grape was clustered together with cocoa.

收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 国家“948”重点项目(2011-G28)

作者简介: 宋新新(1988-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。(Tel) 15895996856; (E-mail) songxinxin2012@sina.com

通讯作者: 陶建敏, (E-mail) tjm266@sina.com

Quantitative real-time PCR analysis showed that *VvGW2* gene was expressed at each developmental stage of Manicure Finger, and the highest expression took place at anthesis. The expression level of *VvGW2* gene varied in different cultivars, the highest in Manicure Finger, and the lowest in round shape grape. The fruit shape of grape might be responsible for the differential expression of *VvGW2* at different developmental stages and in different cultivars.

**Key words:** grape; *VvGW2* gene; gene cloning; expression analysis

葡萄属于葡萄科葡萄属,为多年生藤本植物<sup>[1-3]</sup>。葡萄果形种类多样,由于消费者喜好的不同,果形很大程度上影响果实经济价值。生产上,主要通过改变管理技术和生长条件来提高葡萄的品质和效益。近年来,随着分子生物学的发展,基因工程手段已成为改变果实形态的重要途径。

果形大多是多基因或 QTL (Quantitative trait locus) 控制的数量性状,目前已有一些 QTL 被定位。水稻第 2 条染色体上的 *GW2* 为控制水稻的粒质量和粒宽的主效 QTL,其功能的缺失可以提高粒质量和粒宽。研究发现,水稻 *GW2* 基因编码一种新型的 RING 蛋白质,其在体外具有 E3 泛素连接酶活性<sup>[4]</sup>。E3 泛素连接酶,作为泛素蛋白质降解途径中决定靶蛋白质特异性识别的关键酶,目前发现主要包括三类: HECT 结构域家族、U-box 蛋白质家族和 RING 结构域家族<sup>[5]</sup>。RING 结构域家族蛋白质广泛存在于动物、植物、酵母、真菌和病毒的基因所编码的蛋白质中<sup>[6-8]</sup>。环指结构域是 RING 结构域蛋白质家族最典型的特点,决定该家族蛋白质具有泛素连接酶的作用<sup>[9]</sup>。RING 结构域是 RING 型 E3 泛素连接酶活性所必需的。拟南芥中, RING 型 E3 蛋白质分为 RING-v、RING-D、RING-S/T、RING-G 和 RING-C2 5 个修饰 RING 结构域和 2 个典型的 C3H2C3 和 C3HC4 RING 结构域<sup>[8]</sup>。一些 RING 型蛋白质通过 E3 泛素蛋白质连接酶功能参与由 26S 蛋白质酶体介导的泛素依赖性靶蛋白质降解途径<sup>[4]</sup>。RING 蛋白质参与调控许多细胞过程,包括转录、信号转导、基因重组和细胞的周期活动等<sup>[10-13]</sup>。研究发现,水稻 *OsGW2* 基因编码 1 个 RING 型 E3 泛素连接酶,负调控水稻颖壳的细胞分裂。水稻宽粒品种中 *GW2* 等位基因第 4 个外显子处 1 个碱基的缺失导致基因表达的提前终止,致使其不能与特异性底物结合,失去了对底物的降解功能,而该底物可促进水稻颖壳细胞的分裂,导致籽粒变宽。*GW2* 等位基因主要通过增加水稻颖壳细胞的数目实现对籽粒宽度的调控,但对细胞的体积影

响较小<sup>[4]</sup>。

本研究在葡萄中克隆 *OsGW2* 的同源基因 *VvGW2*,并对其序列特征及表达情况进行分析,为进一步了解 *GW2* 基因在调控果实形态方面的功能提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 7 个不同葡萄品种,种植于南京农业大学汤山基地,分别于 2012 年 4 月 16 日、4 月 29 日、5 月 13 日、5 月 27 日、6 月 11 日、6 月 24 日和 7 月 8 日采集美人指的花序和幼果及采集玉指、王子指、魏可、红高、红宝石无核、石秋白开花期的花序;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,由南京农业大学果树生物技术实验室收藏;克隆载体 pMD19-T Vector,购自 TaKaRa 公司;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称	引物序列 (5'→3')
F1	ATGGGAATAAGCTGGGGA
R1	CCATTCGCCATACCAATCTC
F2	CGCTGCCACCAACAGATGAAG
R2	ACTATTGCCAACTCCTGTGTGC
F3	TACAATTCCATCATGAAGTGTGATG
R3	TTAGAAGCACTTCTCTGAACAATG

### 1.2 试验方法

1.2.1 葡萄 *VvGW2* 基因片段的克隆 以美人指葡萄幼果为材料,根据已报道的水稻 *OsGW2* 基因,查找葡萄基因组中同源性最高的序列,设计特异引物 F1 和 R1。RNA 的提取参照郑焕等<sup>[14]</sup>的方法, cDNA 第一链的合成参照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 操作说明书进行。以 cDNA

第一链为模板进行 PCR 扩增。25.0  $\mu$ l 反应体系:10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2.0  $\mu$ l,  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ l, 稀释后 cDNA 和上、下游引物各 1.0  $\mu$ l, *rTaq* 酶 0.2  $\mu$ l, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0  $\mu$ l。反应程序:94  $^{\circ}C$  4 min; 94  $^{\circ}C$  30 s, 60  $^{\circ}C$  40 s, 72  $^{\circ}C$  90 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}C$  10 min, 4  $^{\circ}C$  保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 阳性克隆送公司测序。

**1.2.2 葡萄 *VvGW2* 基因的生物信息学分析** 利用 Bioxm2.6 分析基因编码氨基酸序列的蛋白质分子量和等电点。利用 NCBI 中 Conserved Domains 分析蛋白质保守区域, 网站 BLASTn 和 BLASTp 比较同源性。利用 MEG4.0 构建系统进化树。利用 ExPASy 预测蛋白质疏水性、信号肽和跨膜结构。利用在线软件 SOPMA 预测蛋白质二级结构。

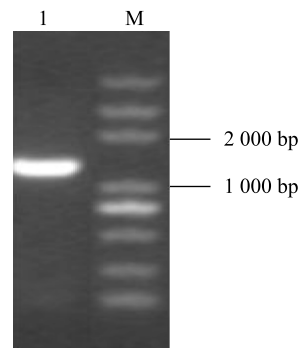
**1.2.3 葡萄 *VvGW2* 基因的表达分析** 根据获得的基因序列设计实时荧光定量表达特异引物 F2 和 R2, 以葡萄 *actin* 基因(引物为 F3 和 R3)作为内参基因。分别提取美人指葡萄开花前 30 d、开花前 15 d、开花期、开花后 15 d、开花后 30 d、开花后 45 d、开花后 60 d 的花或幼果的总 RNA; 分别提取美人指、玉指、王子指、魏可、红高、红宝石无核、石秋白开花期花的总 RNA。参照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 说明书, 以 RNA 为模板反转录成 cDNA。cDNA 稀释后, 首先进行普通 RT-PCR 检测, 然后进行实时荧光定量 PCR 分析。实时荧光定量 PCR 采用 20.0  $\mu$ l 反应体系: 稀释后 cDNA 1.0  $\mu$ l, 正、反引物各 0.2  $\mu$ l, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa) 10.0  $\mu$ l, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20.0  $\mu$ l。反应程序: 95  $^{\circ}C$  3 min; 95  $^{\circ}C$  20 s, 60  $^{\circ}C$  20 s, 72  $^{\circ}C$  40 s, 40 个循环。每个处理重复 3 次, 采用 ABI 7300 system 软件和  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法<sup>[15]</sup> 分析实验数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄 *VvGW2* 基因的克隆

根据水稻 *OsGW2* 基因序列(登录号 EF447275.1), 经 BLAST 检索, 获得 1 个与水稻 *OsGW2* 基因序列同源性最高的葡萄序列(登录号 AM425004.2)。以美人指葡萄幼果 cDNA 为模板,

F1 和 R1 为引物, PCR 扩增获得 1 条 1 000 bp 左右的片段(图 1), 测序结果显示该片段长度为 1 375 bp (图 2)。与葡萄基因组数据库比对发现该片段包含完整的开放阅读框, 长度为 1 272 bp。起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAG。



M: DNA 分子量标记; 1: *VvGW2* 基因片段扩增产物。

图 1 *VvGW2* 基因扩增结果

Fig. 1 Amplification of *VvGW2* gene

### 2.2 葡萄 *VvGW2* 蛋白质的生物信息学分析

**2.2.1 *VvGW2* 蛋白质的理化特性** *VvGW2* 基因所编码蛋白质的基本理化特性通过 Bioxm2.6 和 ExPASy 中的 ProtParam 在线工具进行分析。分析发现, 该基因编码 423 个氨基酸, 其中酸性氨基酸(天冬氨酸+谷氨酸+天冬酰胺+谷氨酰胺) 108 个, 碱性氨基酸(赖氨酸+精氨酸+组氨酸) 47 个; 推测编码产物相对分子质量为 46 960, 理论等电点为 4.68; 蛋白质不稳定系数 61.84, 为不稳定蛋白质; 总平均亲水性为 -0.673。

**2.2.2 葡萄 *VvGW2* 蛋白质的功能域分析** *VvGW2* 基因编码蛋白质的功能域通过 InterProScan 进行分析。结果显示, 第 51 ~ 104 个氨基酸残基位点有典型的环指结构域, 蛋白质属于 RING 蛋白质家族。

葡萄 *VvGW2* 蛋白质与其他植物 GW2 蛋白质进行比对分析。结果显示, 葡萄 *VvGW2* 蛋白质与小麦 (AGS15004.1)、玉米 (ACL93316.1)、高粱 (XM\_002453553.1)、大麦 (ABY51682.1)、水稻 (ABO31101.1) 的氨基酸序列相似性分别为 53%、48%、48%、48% 和 47%。不同植物氨基酸序列比对结果(图 3)显示, GW2 蛋白质含有环指蛋白质结构域, 且在不同物种间较保守。

NCBI 中 BLAST 与葡萄 *VvGW2* 基因编码蛋白质

```

1 bp   ATGGGGAATAAGCTGGGGAGGAGGAGGCAAGTGGTGGAGGACAAGTACACGAGGCCACAA
61 bp  GGGCTGTATCAGCATAAAGATGTGGATCATAAGAAGCTCAGGAAGCTCATACTTGATTC
121 bp AAGCTTGCTCCTTGCTATCCCGGAGACGAAGAGGCCACCAATGATTTCGAAGAATGCCCA
181 bp ATTTGCTTTTGTGTTTATCCAAGTCTGAATCGCTCAAGATGTTGTACGAAAGGCATTTGT
241 bp ACAGAGTGTGTTTCTGCAGATGAAGAACCCTCATTCAACTCGTCCAACGCAATGTCCTTAC
301 bp TGCAAAACAGCAAAATTATGCTGTGGAGTATCGAGGTGTGAAGACAAAGGAAGAAAAGGGC
361 bp ATGGAGCAAATTGAAGAGCAACGGGTTATAGAAGCTAAAATAAGAATGAGGCCAAAAGAA
421 bp ATTCAGGATGAAGAAGAGAGAATGCAGAAAAGACAAGAGATAAGTTCTTCAAGCAGCATT
481 bp TTGGCACAAGGAGAGGTGGAATACAGCACAAACAGCGGTGCCATCTTTCAGATCTCCTGTG
541 bp GAAGGTGATGAAATTCTTTCTTCTCAAGACCCACCTGCTGCATCAATGATCATACAGACT
601 bp TTACCTCCAAGACAGAACAGGGATGAGGAATTTGATCTGGATCTTGAGGATATTATGGTT
661 bp ATGGAAGCTATCTGGCTTTCCATTCAGGATAATGGCAGACACAGAAACCCACTTTATGGT
721 bp GACACTACCACTGCTGAACAATATGTCACAGAAGAACACTACGTCTTGCTGCTATGGCT
781 bp CCACAGGTGAATCATCATCATCCCCCTCTGGTGGGCTTGCATGTGCAATTCTCTCTCT
841 bp GCTGAGCGTCAGCAAATGGGTGGAGAATCCTCTACTAACTATAATGGAATATGCCGGCA
901 bp TTCAACATGCCTCCAGGCTGTAGTAGGTTTTCCAACAGGGTGAGCAATATCCAGAGAAT
961 bp TATCCTCCCATAGAGAGTTCCATGGATGCATTACCTGATGGTGGGTTGGCTGTGACAAAG
1 021 bp TATGTGGAGAATGGGGTGTGGAGTGGGTCAGAGGTGGCTGAAGCAGGGACCAAGACTAT
1 081 bp GCAAGCTCTGATGCAACAGATGAGGCTGGTGGGGTTGCTGCGCTGCCACCAACAGATGAA
1 141 bp GCTGAAGGCAGCTTTCAAAATGTTGGGGTCCCATTGTTCCCTGAGAGTTTTGAGGAGCAG
1 201 bp ATGATGCTGGCCATGGCTGTTTCGCTAGCTGAGGCTCGAGCTAGAACAAGCACACAAGGA
1 261 bp GTTGGCAATAGTCCTAAATCAAGCTACTAAATAACTCTCCTTCTCTCTCTCTCTCT
1 321 bp ATCTCTCCCCCTTCACATGGATGTAAAAGGAACAGAGATTGGTATGGCGAATGG

```

图2 *VvGW2* 基因 cDNA 片段序列Fig.2 Sequence of cDNA fragment of *VvGW2* gene

同源氨基酸序列,通过 MEGA 4.0 构建系统进化树。结果(图4)显示,葡萄与可可亲缘关系最近,聚为一类。

**2.2.3 *VvGW2* 蛋白质的疏水性、亚细胞定位、信号肽和跨膜结构分析** *VvGW2* 基因编码蛋白质的亲疏水性由 ProtScale 进行预测。预测显示,总体上 *VvGW2* 亲水性氨基酸区域面积大于疏水性区域面积。表明 *VvGW2* 蛋白质为亲水蛋白质,这与前面的理化特性分析结果一致。CELLO2.5 预测分析结果显示,*VvGW2* 蛋白质定位于细胞质。综合上述预测分析推断,*VvGW2* 蛋白质定位在细胞质中的可能性较大。*VvGW2* 基因编码蛋白质的信号肽由 SignalP 4.0 进行预测,分值高于平均分 0.5,表明存在信号肽。结果显示,*VvGW2* 基因编码蛋白质无信号肽。*VvGW2* 基因编码蛋白质的跨膜结构由 TMpred 进行预测,得分超过 500 的区域为可能的跨膜区。结果表明,*VvGW2* 蛋白质不具有跨膜区。

**2.2.4 *VvGW2* 蛋白质的二级结构分析** *VvGW2* 基因编码蛋白质的二级结构分析由 SOPMA 进行预测。结果发现,该蛋白质由 60.99% 的随机卷曲(Random coil)、33.57% 的  $\alpha$ -螺旋(Alpha helix)、1.89% 的  $\beta$ -转角(Beta turn)和 3.55% 的  $\beta$ -折叠(Extended strand)组成。其中随机卷曲为 *VvGW2* 蛋白质的主要结构。一般而言,酶活性部位和蛋白

质的特异功能部位经常由随机卷曲构成<sup>[16]</sup>。

### 2.3 葡萄 *VvGW2* 基因的表达分析

提取美人指、玉指、王子指、魏可、红高、红宝石无核、石秋白几个葡萄品种的开花期花的总 RNA,反转录为 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 分析,结果(图5)显示,*VvGW2* 基因在不同葡萄品种中均有表达,美人指葡萄的表达量最高,且与其他几个品种差异明显。

对美人指葡萄不同时期的花及幼果 *VvGW2* 基因的表达进行进一步的分析,结果(图6)显示,*VvGW2* 基因在美人指葡萄不同时期中均有表达,表达量趋势为先升高再降低,在开花期表达量最高,花后 15 d 表达量最低。

## 3 讨论

前人研究发现,水稻 *OsGW2* 基因编码 1 个新型的具有 E3 泛素连接酶活性的 RING 型蛋白质(C5HC2),*OsGW2* 基因过量表达减小籽粒大小<sup>[4]</sup>。拟南芥中 *BIG BROTHER* 基因编码的具有 E3 连接酶活性的 RING 型蛋白质(C3H2C3)逆调控拟南芥花器官的大小<sup>[13]</sup>。玉米中 *ZmGW2* 基因位于玉米百粒质量相关的 QTL 区,其表达量与玉米粒宽呈显著负相关<sup>[17]</sup>,其编码蛋白质具有 E3 泛素连接酶活性的 RING 型功能域<sup>[18]</sup>。小麦中 *TaGW2* 基因在不同



MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	70
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	68
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	66
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	66
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	66
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	66
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	67
MGNRIGGRKPGVFRHTPEGLYEHRTIDOKKIRKLIIFAKIAPCYEGADDAAGGGLDIEECPTICFL	64
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	140
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	138
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	136
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	136
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	136
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	136
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	137
YVESINRSCCCKGICTECFIOMKPTETAPETOCPECKTANYAVEYRGVKTKEERSIOFEECKVIEACL	134
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	210
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	208
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	206
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	206
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	206
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	206
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	207
RMRCCKPCEFFBANKRKOSRCSSTRTTPTTFVYRDICSTSFVSFVCTEQNCGSSPSCSSQANM	198
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	280
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	277
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	274
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	274
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	274
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	274
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	276
RFHSHRHRDNDNMNIEDMMVMBATWESIC.FCGSTGNFVCGSYFVTEPSPRRCFAFVPAAPTFMEHP	267
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	346
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	343
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	328
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	340
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	340
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	340
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	341
...GGSCAVAAATAFRCPSMDFSYMAGSSTYFVDMTRRECNSSG	336

长方形框为环指结构域功能区。

图3 葡萄 VvGW2 与其他植物 GW2 同源性比对

Fig.3 Alignment of the deduced VvGW2 protein from grape and GW2 from other plants

粒质量品种中的序列保守性很强,不同籽粒宽度的物种间基因序列无差异,但是表达量差别很大,在小粒组品种中 *TaGW2* 基因的表达量高于大粒组品种,该基因的相对表达量与小麦的千粒质量呈负相关关

系<sup>[19]</sup>。本试验克隆得到的 *VvGW2* 基因,编码的蛋白质具有典型的环指结构域,且与其他物种比对具有一定的保守性,属于 RING 家族蛋白质。*VvGW2* 基因编码的 RING 蛋白质为 C5HC2 类型,不属于拟

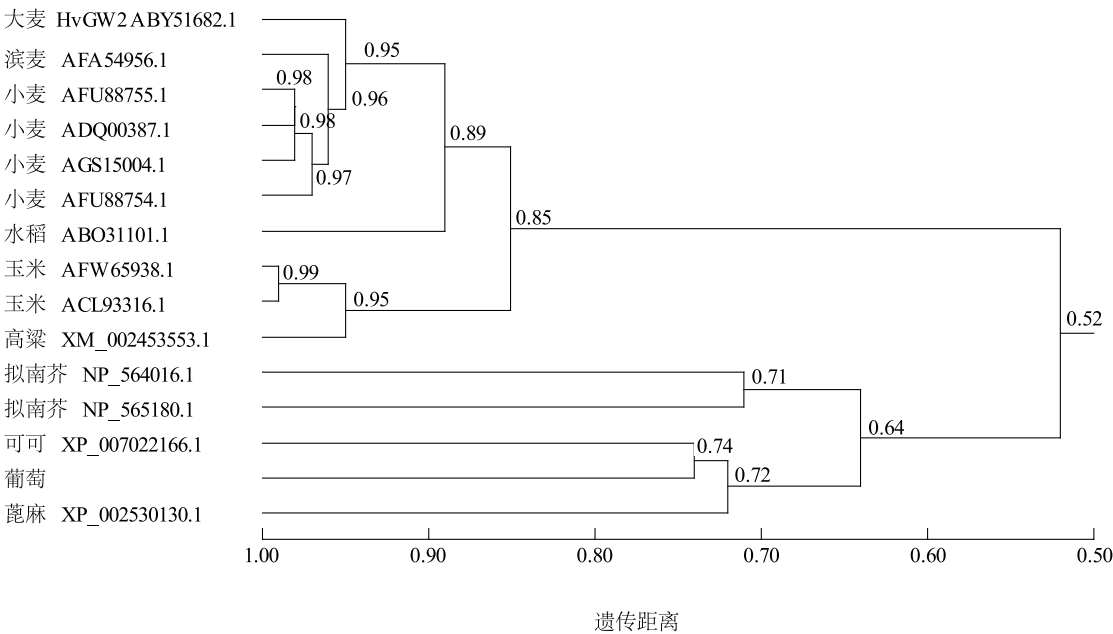
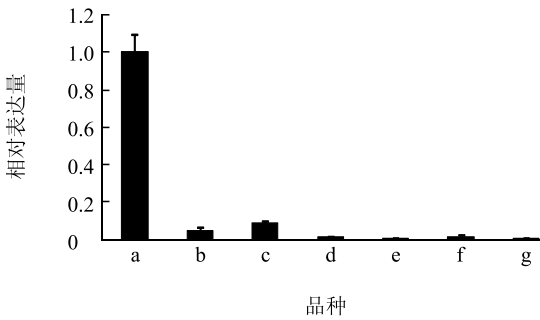


图4 葡萄 *VvGW2* 蛋白质与其他植物 *GW2* 蛋白质的系统进化分析

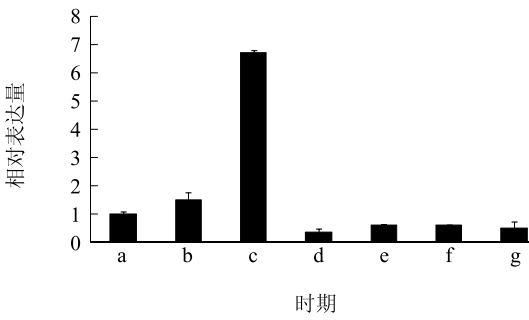
Fig. 4 Phylogenetic analysis of *VvGW2* protein from grape and *GW2* from other plants



a:美人指;b:玉指;c:王子指;d:魏可;e:红高;f:红宝石无核;g:石秋白。

图5 *VvGW2* 基因在不同葡萄品种开花期的表达

Fig. 5 Expression of *VvGW2* at anthesis of different grape cultivars



a:开花前 30 d;b:开花前 15 d;c:开花期;d:开花后 15 d;e:开花后 30 d;f:开花后 45 d;g:开花后 60 d。

图6 *VvGW2* 基因在美人指各时期的表达

Fig. 6 Expressions of *VvGW2* at different development stages of Manicure Finger

南芥 RING 型蛋白质类型,而与水稻的 *OsGW2* 蛋白质属于同一类型。因此推测 *VvGW2* 蛋白质与水稻 *OsGW2* 蛋白质具有相似的功能。实时荧光定量 RT-PCR 分析结果表明, *VvGW2* 基因在美人指葡萄的各时期均有表达,开花期基因表达量最高; *VvGW2* 基因在不同品种中的表达量存在差异,指形葡萄品种美人指的表达量最高,玉指和王子指的表达量次之;在圆形葡萄品种中的表达量很低。推测 *VvGW2* 基因在不同时期和不同品种中的表达量上的差异可

能与葡萄果实形状相关。下一步希望通过基因沉默和过量表达进一步研究 *VvGW2* 基因在葡萄果实发育中的功能。

#### 参考文献:

- [1] 程云,吴欣欣,李百健,等. 外源脱落酸对魏可葡萄果实着色及品质的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):163-166.
- [2] 芮东明,刘亚柏,王敬根,等. 夏黑葡萄标准化栽培技术[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):162-164.

- [3] 张海宁,王亚超,马 辉,等. GC-MS 分析夏黑葡萄中挥发性香气成分[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):294-297.
- [4] SONG X J, HUANG W, SHI M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[J]. Nature Genetics, 2007 (39): 623-630.
- [5] HATAKEYAMA S, YADA M, MATSUMOTO M, et al. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(35): 33111-33120.
- [6] BORDEN K L B, FREEMONT P S. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1996, 6(3): 395-401.
- [7] SAURIN A J, BORDEN K L B, BODDY M N, et al. Does this have a familiar RING? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(6): 208-214.
- [8] STONE S L, HAUKSDÓTTIR H, TROY A, et al. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2005, 137(1): 13-30.
- [9] 杨东叶,刘凯于,余泽华. 泛素连接酶 E3[J]. 中国细胞生物学学报, 2005, 27(3):281-285.
- [10] XIE Q, GUO H S, DALLMAN G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals[J]. Nature, 2002, 419(6903): 167-170.
- [11] SAIJO Y, SULLIVAN J A, WANG H, et al. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity[J]. Genes & Development, 2003, 17(21): 2642-2647.
- [12] DORNAN D, WERTZ I, SHIMIZU H, et al. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53[J]. Nature, 2004, 429(6987): 86-92.
- [13] DISCH S, ANASTASIOU E, SHARMA V K, et al. The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner[J]. Current Biology, 2006, 16(3): 272-279.
- [14] 郑 焕,张计育,王新卫,等. 葡萄雌能花相关基因 VvMS2 的克隆及表达分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2953-2962.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001,25(4): 402-408.
- [16] 汤程贻,殷晶晶,邹爱兰,等. 紫草 *LeEXT-1* 基因的克隆、序列及表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 13-18.
- [17] LI Q, LI L, YANG X, et al. Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 143.
- [18] 刘方方,姜 颖,曹言勇,等. 玉米中 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *ZmGW2* 的表达分析[J]. 玉米科学, 2013, 21(2): 47-51.
- [19] 杨子博. 小麦粒重基因 *TaGW2* 的克隆,原核表达及分子标记的开发[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

(责任编辑:袁 伟)