

王海波, 代冬琴, 郭俊云. 小桐子 14-3-3 基因家族的鉴定及低温胁迫应答[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1007-1015.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.008

小桐子 14-3-3 基因家族的鉴定及低温胁迫应答

王海波^{1,2}, 代冬琴^{1,2}, 郭俊云¹

(1. 曲靖师范学院云南高原生物资源保护与利用研究中心/生物资源与食品工程学院, 云南 曲靖 655011; 2. 曲靖师范学院云南省高校云贵高原动植物遗传多样性及生态适应性重点实验室, 云南 曲靖 655011)

摘要: 14-3-3 蛋白家族在真核生物中广泛存在且高度保守, 以同源/异源二聚体形式与 2 个靶蛋白或 1 个靶蛋白的两个磷酸化 Ser/Thr 模体结构域结合来发挥其调控作用。以拟南芥 14-3-3 蛋白为探针序列, 对小桐子蛋白质数据库进行搜索, 共鉴定到 9 个 14-3-3 基因, 其中 ε 类 4 个、非 ε 类 5 个, 并对其理化性质、系统进化、基因结构、顺式作用元件及低温胁迫表达等进行了分析。结果显示, 小桐子 14-3-3 基因在进化上较为保守, 存在该家族中典型的 9 段 α -螺旋结构, ε 类基因结构包含 7 个外显子, 非 ε 类包含 4~5 个外显子。另外, 在 9 个 14-3-3 基因上游调控区都鉴定到多个激素与逆境胁迫应答元件。qRT-PCR 分析结果显示, 包含有低温应答元件的 *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 基因在小桐子的各组织器官中都有表达, 但存在组织表达特异性, 都在茎中表达量较高, 其次是根, 而在叶中表达量相对较低。同时, *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 基因都属于低温诱导表达基因, 分别在茎与根中低温胁迫 0.5~3.0 h 达到最大表达量, 与小桐子的抗冷性形成直接相关。本研究为小桐子 14-3-3 基因家族的克隆与功能验证提供了参考。

关键词: 小桐子; 14-3-3 蛋白; 基因组; 低温胁迫应答

中图分类号: S794.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1007-09

Genome-wide identification and chilling stress response of 14-3-3 gene family in *Jatropha curcas*

WANG Hai-bo^{1,2}, DAI Dong-qin^{1,2}, GUO Jun-yun¹

(1. Center for Yunnan Plateau Biological Resources Protection and Utilization/College of Biological Resource and Food Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China; 2. Key Laboratory of Yunnan Province Universities of the Diversity and Ecological Adaptive Evolution for Animals and Plants on YunGui Plateau, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

Abstract: The family of 14-3-3 proteins, which acts as homodimers or heterodimers, exists in all eukaryotic organisms with highly conserved sequence. The regulatory function of 14-3-3 proteins is mainly mediated by phosphoserine/phosphothreonine motifs with two targeting proteins or two different domains in one targeting protein simultaneously. Based on the conserved domains of *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein as probe sequences, nine 14-3-3 genes including 4 ε -type and 5 non- ε type were identified from the *Jatropha curcas* protein database, and the physical and chemical characteristics, evolutionary relationship, gene structure, cis-elements, and chilling stress response were systematically analyzed. The result showed that 14-3-3 protein in *J. curcas* were highly conserved and classical 9- α -helix were found in all 14-3-3 proteins' secondary structures. Seven exons were included in ε -type gene structure and 4~5 exons were in non- ε type. Multiple cis-elements responsive to different hormones and environmental stresses were found in upstream sequences of each 14-3-3 genes

收稿日期: 2017-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460179)

作者简介: 王海波(1980-), 男, 山西长治人, 博士, 副教授, 研究方向为植物逆境分子生物学。(E-mail) bocai0406@163.com

in *J. curcas*. Quantitative RT-PCR revealed that *Jc14-3-3b* and *Jc14-3-3h* were expressed differently in different tissues, abundant in stem and root, scarce in leaf. Chilling responsive genes *Jc14-3-3b* and *Jc14-3-3h* reached the

highest expression level in stem and root after 0.5–3.0 h chilling stress induction.

Key words: *Jatropha curcas*; 14-3-3 protein; genome; chilling stress response

小桐子已成为世界公认的,未来最有可能替代化石能源并具有巨大开发潜力的能源植物树种,中国在“十五”、“十一五”、“十二五”能源发展纲要中都把发展小桐子产业列为可再生能源中长期发展规划的重点^[1]。小桐子(*Jatropha curcas* L.)属大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属(*Jatropha*)多年生落叶灌木或小乔木,原产中南美洲地区^[2],喜炎热温暖气候,对土壤质地要求不高,耐干旱贫瘠,抗逆性强,目前自然分布遍及赤道南北纬 23~25°的热带和亚热带地区及中国南方诸省的干热河谷地带^[3]。作为新兴开发的油料植物,小桐子种子含油量高达 35%~60%,是加工生物柴油的优质原料。作为化工原料,小桐子可以制造单宁酸及染料,同时,植物体含有多种生物活性成分,既可入药也可用于生物防治,榨油的油饼富含蛋白质,经过脱毒后可作为高营养的动物饲料。该植物的经济效益和生态效益高,具有极为广阔的开发前景^[4-5]。

14-3-3 蛋白又称为酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶激活蛋白(Tyrosine 3-monooxygenase /Tryptophan 5-monooxygenase activation protein),属细胞质蛋白,作为一种桥梁蛋白或衔接蛋白,能够在细胞质和细胞核之间自由穿梭^[6]。Moore 与 Perez 在 1967 年首次从牛脑细胞中发现一种酸性且可溶的同源/异源二聚体蛋白,并根据其经二乙氨基纤维素柱层析后所分离组分的片段数及淀粉凝胶中的迁移率命名为 14-3-3 蛋白^[7]。14-3-3 蛋白广泛分布于真核生物中,在哺乳动物中根据高效液相色谱中的洗脱顺序分为 7 个亚型,即 $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon/\eta/\sigma/\tau/\theta/\delta/\xi$,之前被鉴定出的动物 14-3-3 蛋白根据其功能和特征赋予了不同的命名,如蛋白激酶 C 抑制蛋白(Kinase C inhibitor protein, KCIP)、胞吐刺激蛋白 Exo1(Exocytosis stimulating protein)、线粒体输入刺激因子(Mitochondrial import stimulation factor, MSF)等。1992 年发现在植物中也有 14-3-3 蛋白广泛分布^[8],且至少有 15 种亚型,根据内含子插入位置的不同,分为 β 型和非 β 型,又根据氨基酸序列及基因结构不同,分为 ϵ 类和非 ϵ 类。目前研究较深入的是拟南芥 G 盒结合因子 14(G-box binding factor 14, GF14)系列 14-3-3 蛋白。研究结果表明,动物与植物 14-3-3 蛋白虽然存在 50%以

上的序列相似性,但没有进化同源性^[9]。

所有的 14-3-3 蛋白的三维结构都极其相似,均由 2 个同源/异源二聚体组成杯状/C 字型钳状结构,14-3-3 蛋白的每个单体都可以结合 1 个靶蛋白或 1 个靶蛋白的 2 个结构域^[10]。每个单体均由从 N 端到 C 端的 9 段反平行 α -螺旋组成(αA - αI),每个 α -螺旋间由 1 个突环连接,其中 αC 与 αD 氨基酸序列最长(30~34 aa),跨越整个单体,并与 αA 形成高度保守的带负电荷的高疏水性兼性沟槽,作为与配体相互作用的结构域。14-3-3 蛋白在植物体中具有广泛的蛋白结合谱,已经鉴定到其配体蛋白有 300 余种,其结合主要通过配体中的磷酸化 Ser/Thr 序列模体 R(S/Ar)(+)p(S/T)XP、RX(Ar)(+)p(S/T)XP 及 C 端结合模体 PSX_{1,2}-COOH^[11-12] 而实现,但也有报道 14-3-3 蛋白可通过非磷酸序列模体 Gly-His-Ser-Leu (GHSL)^[13]、Trp-Leu-Asp-Leu-Glu (WLDLE)^[14] 结合靶蛋白,如植物的质膜 H⁺-ATP 酶。14-3-3 蛋白作为细胞内蛋白相互作用的核心因子,可以调控众多信号转导途径中的信号分子,又由于其结构域可以同时结合 2 个不同的信号分子,具有连接与协调不同信号转导通路形成网络的功能。参与蛋白激酶(PK)与蛋白磷酸化酶(PP)的活化以及 PK/PP 介导的信号转导通路,在植物代谢关键限速酶活性调节,如硝酸还原酶(NR)、磷酸蔗糖合成酶(SPS)^[15]、植物激素信号转导(GA 信号通路^[16]、ABA 信号通路^[17-18]、BR 信号通路^[19-20]、ETH 信号通路等^[21]、光信号应答^[22-23])、细胞周期调控^[24]、物质运输调控^[25]、营养代谢调控^[26]及抗逆生理^[27]等方面起重要作用。

目前,研究者已经对拟南芥^[9]、水稻^[28]、大豆^[29]以及番茄^[30]等植物在基因组范围内进行了 14-3-3 基因的鉴定,与模式植物相比,14-3-3 蛋白在能源植物上的研究仍然很少,而对于小桐子 14-3-3 家族的基因组鉴定及分析还未见报道。本研究基于小桐子基因组信息,利用生物信息学方法鉴定到 9 个小桐子 14-3-3 基因,并对其理化性质、基因结构、编码的蛋白基序及低温表达进行了分析,以期为研究小桐子 14-3-3 基因家族的生物学功能及抗逆信号转导机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试验设计

供试小桐子种子取自云南省楚雄州元谋县。选取饱满的小桐子种子,用 1.5% CuSO₄ 消毒 20 min,无菌水漂洗 5 次,于 26 ℃ 的恒温培养箱中吸涨 24 h^[31]。将吸涨的种子在无菌水中漂洗 3 次,播于垫有 5 层滤纸的白磁盘(24 cm×16 cm)中,于相对湿度 75%、温度 26 ℃/20 ℃(昼夜温度)、光周期 16 h/8 h(昼夜时间)的恒温培养箱中萌发 5 d。将发芽的种子播于消毒的培养土中并于恒温培养箱(条件同上)中生长 15 d 至第二片真叶展开,每天用无菌水润湿培养土。将生长 15 d 的小桐子幼苗置于相对湿度 75%、温度 12 ℃、光周期 16 h/8 h 的低温培养箱中进行低温胁迫处理,分别取低温胁迫 0.5 h、3.0 h、6.0 h、12.0 h、24.0 h、48.0 h 与对照(正常培养)小桐子幼苗的第二片真叶、茎及根,液氮速冻后置于-80 ℃冰箱中用于 RNA 的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 小桐子 14-3-3 蛋白激酶家族的鉴定 从 GenBank 下载小桐子最新注释蛋白质数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/915>, 28 814 条),利用 NCBI 的 Makeblastdb 程序将该数据库本地化,根据模式植物拟南芥中已经鉴定出的 15 个 14-3-3 基因(图 1),利用 NCBI Blast 程序对小桐子蛋白质数据库进行本地 BlastP 相似性比对(阈值 $E < 1e-10$, 序列相似性 > 50%),得到候选的小桐子 14-3-3 蛋白质氨基酸序列,并手工去除重复序列。将非冗余的候选序列利用 Pfam 与 GenBank CDD 在线工具分析 14-3-3 蛋白结构域做进一步筛选,得到小桐子 14-3-3 家族蛋白氨基酸序列。

利用 ExPaSy 提供的在线工具 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对得到的小桐子 14-3-3 蛋白氨基酸序列进行基本参数的分析。利用 NPS(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsa_sopm.html)分析蛋白质的二级

结构。利用 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)在线分析工具对 14-3-3 蛋白氨基酸序列进行 motif 分析(参数设置:最优氨基酸残基宽度 6~200;任意数量的重复次数;最多预测 25 个 motif)。将鉴定的小桐子 14-3-3 蛋白氨基酸序列与拟南芥和水稻的 14-3-3 蛋白氨基酸序列利用 ClustalX (Version 2.0)进行序列相似性比对,然后用 MEGA6.0 软件通过邻接法(NJ)构建系统进化树,并采用自展法(Bootstrap)进行检验。

1.2.2 小桐子 14-3-3 基因家族序列分析 将获得的小桐子 14-3-3 家族蛋白氨基酸序列对 GenBank 小桐子基因组序列(Annotation release 101, JatCur_1.0)进行 tblastn 检索得到其基因碱基序列与编码区序列(Coding sequence, CDS),利用软件 Spidey 进行 14-3-3 CDS 序列与基因碱基序列比对以确定基因内含子与外显子的结构,并利用 GSDS(Gene structure display server, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制基因结构图。根据 14-3-3 的 CDS 对小桐子基因组进行 blastn 相似性检索得到各 14-3-3 基因起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的调控序列,并通过 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对其顺式作用元件进行鉴定。

1.2.3 小桐子 14-3-3 基因家族的差异表达分析 利用 TransGen 公司的 TransZol Up 试剂提取材料的总 RNA,并利用 DNase I 消化 RNA 中的残余基因组 DNA,得到纯化的总 RNA。分别取 3 μg 总 RNA,以 Random primer 为逆转录引物,利用 TransGen 公司的 TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix 合成第一链 cDNA,引物序列见表 1。以 18S rRNA 为内参,进行 14-3-3 基因的 qRT-PCR 扩增,20 μl 反应体系,每个样品重复 3 次,检测系统为罗氏 LightCycler 96。扩增条件为:94.0 ℃ 预变性 30 s;94.0 ℃ 变性 10 s,53.5 ℃ 退火 15 s,72.0 ℃ 延伸 15 s,45 个循环,之后增加熔解曲线程序:95.0 ℃ 10 s,65.0 ℃ 60 s,97.0 ℃ 1 s,连续检测信号。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析。

表 1 小桐子 14-3-3 基因 qRT-PCR 扩增引物序列

Table 1 Quantitative RT-PCR primers for 14-3-3 gene in *Jatropha curcas*

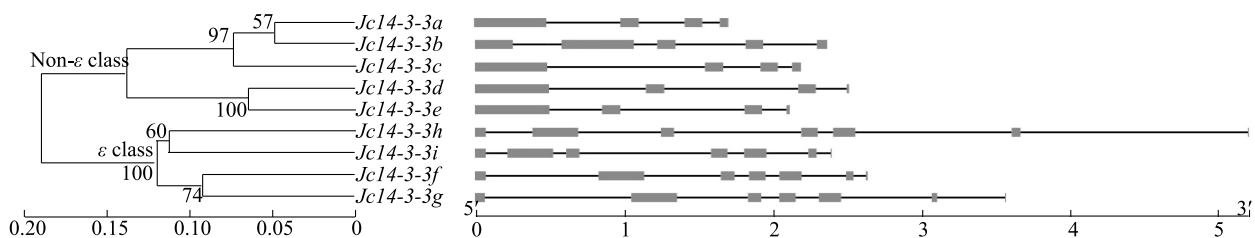
基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	扩增长度(bp)
<i>Jc14-3-3b</i>	GGAAATGCTGAGTTTATGG	AGGCAGAGGGAATGAGATG	281
<i>Jc14-3-3h</i>	CATTCGGCTGGGTTTAG	TGTCAGAGGTCCACAAGG	200
18S rRNA	AGAAACGGCTACCACATC	CCAAGGTCCAACCTACGAG	245

2 结果与分析

2.1 小桐子 14-3-3 的鉴定及系统进化分析

以拟南芥 15 个 14-3-3 蛋白为查询序列对小桐子蛋白质数据库进行 BlastP 相似性检索,共鉴定到 9 个小桐子 14-3-3 蛋白氨基酸序列(表 2),利用 Pfam 与 CDD 对 9 个蛋白氨基酸序列进行蛋白保守结构域分析发现,均具有 14-3-3 家族保守结构域。同时,利用基因组数据库得到蛋白氨基酸序列对应的 CDS 序列与基因碱基序列。将小桐子 9 个 14-3-3

蛋白氨基酸序列通过邻接法构建系统进化树(图 2),发现小桐子 14-3-3 蛋白明显分为 2 类,其中 ε 类包括 Jc14-3-3h、Jc14-3-3i、Jc14-3-3f、Jc14-3-3g 4 个,非 ε 类包括 Jc14-3-3a、Jc14-3-3b、Jc14-3-3c、Jc14-3-3d、Jc14-3-3e 5 个。与拟南芥、水稻 14-3-3 蛋白共同构建系统进化树,显示小桐子 4 个 ε 类 14-3-3 蛋白与拟南芥、水稻 ε 类蛋白聚类在一起,而非 ε 类的 Jc14-3-3d 与 Jc14-3-3e 作为外类群单独聚类成一支。



小桐子 14-3-3 基因内含子/外显子结构,线条表示内含子,框代表外显子。

图 1 小桐子 14-3-3 基因家族的基因结构分析

Fig.1 Gene structure analysis of 14-3-3 family in *J. curcas*

2.2 小桐子 14-3-3 的理化性质及结构特征分析

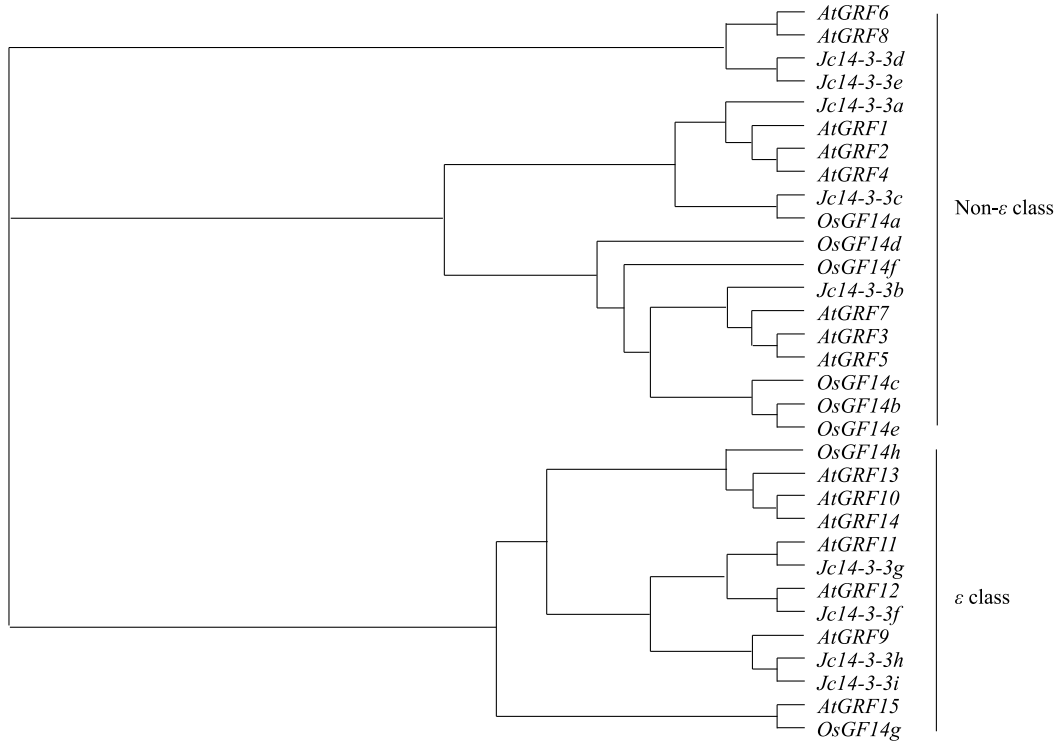
小桐子 9 个 14-3-3 蛋白单体序列长度为 253~264 aa,等电点为 4.69~4.88,属于典型的酸性蛋白家族。将小桐子 9 个 14-3-3 基因 CDS 序列定位到基因组序列,利用 GSDS 分析基因结构,结果显示 5 个非 ε 类 14-3-3 基因,除 Jc14-3-3b 包含 5 个外显子外,其它都包含 4 个外显子,且第 1 外显子较其他 3

个外显子都长,而 4 个 ε 类 14-3-3 基因都包含 7 个外显子,且 7 个外显子长度分布一致,另外,第 7 个外显子都较短,存在明显的亚家族特异性(图 1、表 2)。MEME 分析同样显示 ε 类与非 ε 类 14-3-3 蛋白基序存在显著的区别,非 ε 类 14-3-3 蛋白在最大的 2 个基序之间存在 2 个小型基序,而 ε 类 14-3-3 蛋白在同样位置却仅存在 1 个(图 3)。

表 2 小桐子 14-3-3 蛋白的理化性质分析

Table 2 Physical and chemical properties of *J. curcas* 14-3-3 proteins

基因类型	基因名称	GenBank 基因 登录号	CDS 长度 (bp)	氨基酸数目 (aa)	分子量	等电点	外显子数目
Non- ε class	Jc14-3-3a	105630641	783	260	29 340	4.69	4
	Jc14-3-3b	105638710	795	264	29 860	4.76	5
	Jc14-3-3c	105631597	786	261	29 430	4.76	4
	Jc14-3-3d	105641669	753	250	28 380	4.75	4
	Jc14-3-3e	105630684	762	253	28 580	4.87	4
ε class	Jc14-3-3h	105649664	789	262	29 730	4.84	7
	Jc14-3-3i	105639213	780	259	29 660	4.74	7
	Jc14-3-3f	105630532	789	262	29 900	4.88	7
	Jc14-3-3g	105630618	762	253	28 910	4.77	7



序列 GenBank 登录号:拟南芥: *Arabidopsis thaliana* (At), AAA96323.1、AAA32798.1、AAA32799.1、AAB06231.1、AAB06585.1、AAB08482.1、AAB49335.1、AAA79700.2、AAB49334.2、AAA79699.1、AAG47840.1、AAF98570.1、AAG52105.1、AAF87262.1、AAD28654.1; 水稻: *Oryza sativa* (Os), AA072553.1、AAB07456.1、AAB07457.1、AAB07458.1、CAB77673.1、AAX95656.1、BAD73105.1、ABA94733.1。

图2 通过 ClustalX 序列比对 MEGA6.0 邻接法构建的 14-3-3 进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of 14-3-3 protein in *J. curcas*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* by MEGA6.0 based on ClustalX alignments

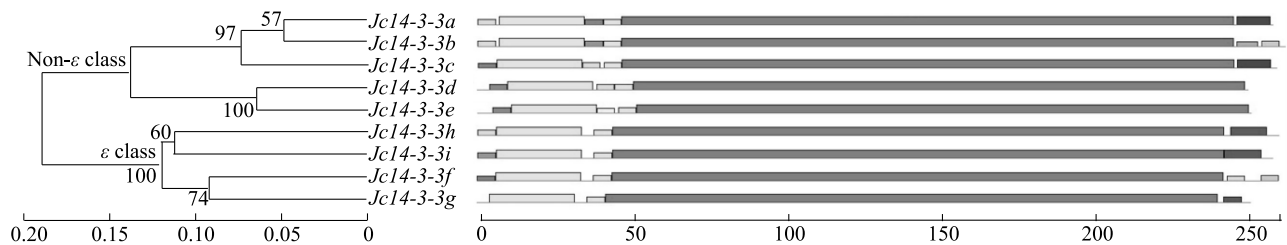


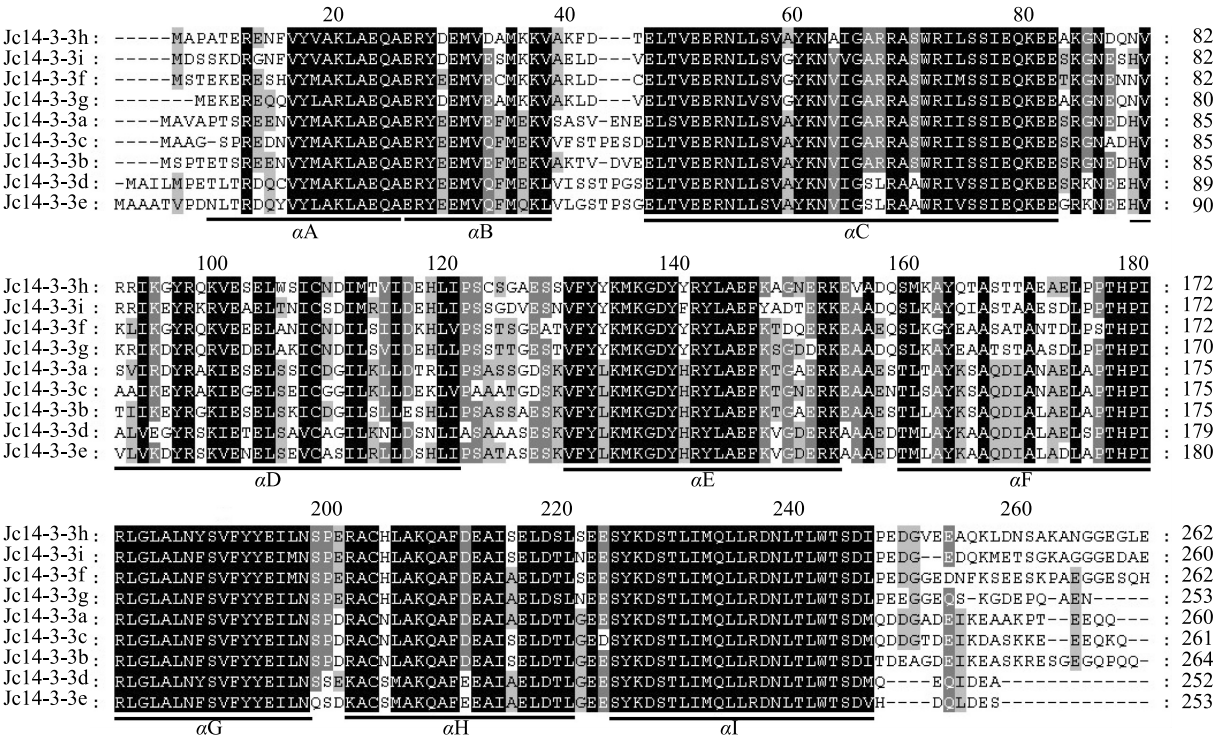
图3 小桐子 14-3-3 家族蛋白的 motif 分析

Fig.3 Conserved motifs of 14-3-3 proteins in *J. curcas*

对小桐子 9 个 14-3-3 蛋白进行多序列比对发现,该家族蛋白在 N 端与 C 端都有较大变异,而在中间部位序列相似性较高,相对较为保守(图 4)。14-3-3 蛋白的 9 个典型 α -螺旋(分别用 $\alpha A \sim \alpha I$ 表示)结构分布在中间部位,其中, αC 、 αD 序列最长, αA 、 αC 、 αE 、 αG 、 αH 及 αI 序列高度保守,而 αB 、 αD 及 αF 保守性相对较低。小桐子 14-3-3 蛋白二级结构显示,非 ϵ 类 5 个成员在 C 末端都存在 1~2 个 α -螺旋,而 ϵ 类 4 个成员除 Jc14-3-3h 外在 C 末端都没有 α -螺旋结

构的分布,较多的 α -螺旋结构分布在 N 端(图 5)。

文献报道,14-3-3 蛋白家族是与植物抗逆性密切相关的蛋白家族,多种非生物胁迫可以诱导不同类型 14-3-3 基因的表达。利用 PlantCARE 工具对小桐子 9 个 14-3-3 基因的上游调控序列进行了顺式作用元件的鉴定。结果(表 3)表明,小桐子 14-3-3 基因的调控元件存在明显的差异,响应不同的非生物胁迫。非 ϵ 类 14-3-3 基因鉴定到较多的激素调控元件包括水杨酸应答元件、赤霉素应答元件及



横线表示 14-3-3 蛋白的 9 个 α -螺旋区 ($\alpha A \sim \alpha I$)。

图 4 小桐子 14-3-3 蛋白多重序列比对及保守结构域分析

Fig.4 Sequence alignment and conserved motifs of 14-3-3 proteins in *J. curcas*

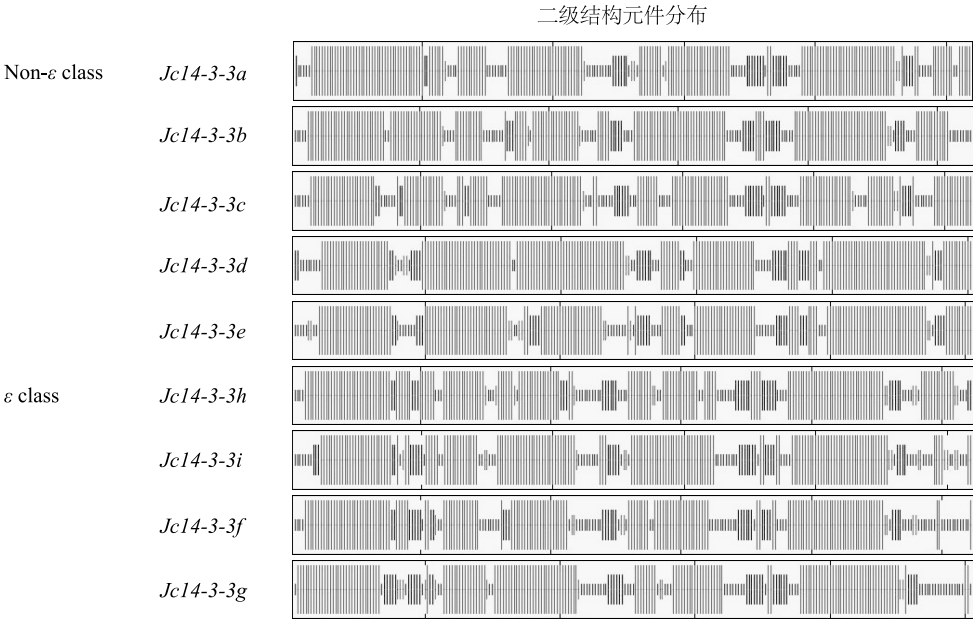


图 5 小桐子 14-3-3 蛋白的二级结构分析

Fig.5 The secondary structure analysis of 14-3-3 proteins in *J. curcas*

乙烯应答元件,其中分布较多的是防御与胁迫应答 元件,除 *Jc14-3-3d* 之外,5 种非 ϵ 类 14-3-3 基因都

有分布。另外, *Jc14-3-3b* 鉴定到的顺式作用元件最多, 暗示其在小桐子抗逆响应中的重要性, 而 *Jc14-3-3c* 的作用元件最少, 仅鉴定到防御与胁迫应答元件。ε 类 14-3-3 基因中, 发现非生物胁迫响应元件

如低温、干旱及高温相对较多, 说明其在小桐子抵抗外界逆境环境中扮演重要的角色, 其中 *Jc14-3-3h* 与 *Jc14-3-3i* 响应元件较多, 而 *Jc14-3-3g* 最少, 仅包含 1 个赤霉素应答元件。

表 3 小桐子 14-3-3 基因顺式作用元件分析

Table 3 Cis-element analysis of 14-3-3 genes in *J. curcas*

基因类型	基因名称	顺式作用元件(个)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Non-ε class	<i>Jc14-3-3a</i>	-	2	2	1	-	-	2	4
	<i>Jc14-3-3b</i>	1	1	1	1	1	1	-	3
	<i>Jc14-3-3c</i>	-	-	-	-	-	-	-	2
	<i>Jc14-3-3d</i>	-	-	1	1	-	-	-	-
	<i>Jc14-3-3e</i>	-	2	-	1	-	1	4	4
ε class	<i>Jc14-3-3h</i>	3	2	-	1	1	-	2	1
	<i>Jc14-3-3i</i>	3	-	-	3	-	1	1	1
	<i>Jc14-3-3f</i>	-	2	-	1	-	1	2	4
	<i>Jc14-3-3g</i>	-	1	-	-	-	-	-	-

A: ABA 应答元件 (ABRE); B: 赤霉素应答元件 (GARE-motif/P-box/TATC-box); C: 乙烯应答元件 (ERE); D: 水杨酸应答元件 (TCA-element); E: 低温胁迫应答元件 (LTR); F: 干旱胁迫应答元件 (MBS); G: 高温胁迫应答元件 (HSE); H: 防御与胁迫应答元件 (TC-rich repeats); “-” 表示没有。

2.3 小桐子 14-3-3 基因家族的组织表达分析

基因结构分析结果表明, *Jc14-3-3b* 是小桐子非 ε 类 14-3-3 基因中唯一包含 5 个外显子的基因, *Jc14-3-3h* 是小桐子 ε 类 14-3-3 基因中最长的基因 (表 2, 图 1)。另外, 表 3 显示, *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 分别是小桐子非 ε 类和 ε 类 14-3-3 基因中包含激素响应元件与非生物胁迫元件最多的 2 个基因, 且只有这 2 个基因鉴定到低温响应元件 (LTR)。基于以上分析结果, 通过实时荧光定量试验, 对 *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 进行组织差异与低温胁迫表达分析。结果表明, *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 在小桐子的各组织器官中都有表达, 但存在组织表达特异性, 其中, 2 个基因都在茎中表达量较高, 其次是根, 而在叶中表达量相对较低, 且 *Jc14-3-3h* 的表达量在各器官中都高于 *Jc14-3-3b* (图 6)。对 *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 在高表达器官茎与根中进行低温胁迫表达研究, 结果 (图 7) 显示, *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 基因在小桐子茎与根中表现出相同的低温诱导表达趋势。*Jc14-3-3b* 在根中低温胁迫 0.5 h 达到最大表达量, 较对照上调表达 8.00 倍, 而 *Jc14-3-3b* 在茎以及 *Jc14-3-3h* 在茎与根中, 都在低温胁迫 3.0 h 达到最大表达量, 分别较对照上调表达 1.99、3.15、4.24 倍, 但到低温胁迫 12.0 h 时, 都快速下调表达, 且都低于对照的表达量, 之后随着低温胁迫的持续, 又上调表达且保持

比对照高的表达量。说明, *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 基因都属于小桐子低温胁迫诱导基因, 与小桐子的抗冷性形成直接相关, 且存在低温下持续诱导表达特性。

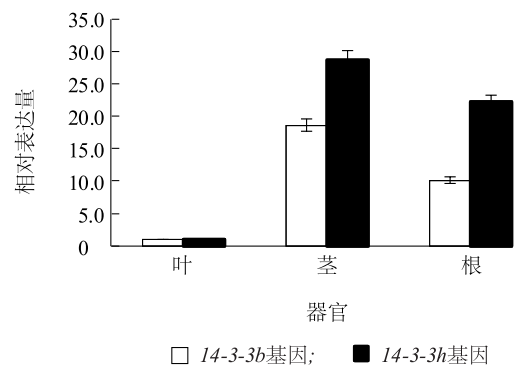


图 6 小桐子不同器官中 14-3-3b 与 14-3-3h 基因的差异表达分析

Fig.6 Differential expressions of genes 14-3-3b and 14-3-3h in different organs

3 讨论

通过全基因组分析, 已经对多种模式植物的 14-3-3 基因进行了鉴定及分析, 拟南芥中有 15 个 (*GRF1* ~ *GRF15*)^[9], 水稻中有 8 个 (*OsGF14a* ~ *OsGF14h*)^[28], 大豆中有 18 个 (*SGF14a* ~ *SGF14p*)^[29], 棉花中有 25 个^[32], 大麦中有 5 个^[33], 番茄中有 12 个 (*TFT1* ~ *TFT12*)^[30]。不同物种的

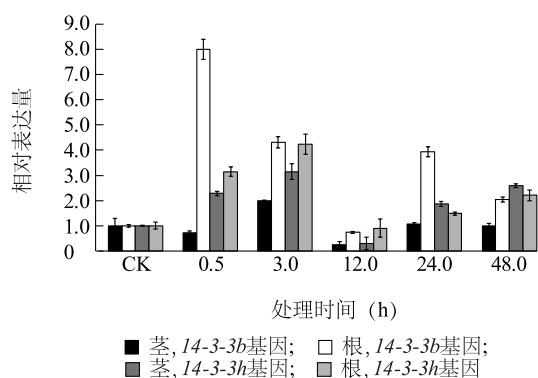


图7 小桐子 14-3-3b 与 14-3-3h 基因在低温胁迫下的表达分析

Fig.7 Relative expression levels of *J. curcas* 14-3-3b and 14-3-3h genes under chilling stress

14-3-3 基因家族成员的表达存在明显的器官特异性,拟南芥中 15 个 14-3-3 基因有 12 个具有转录活性,只有 *GRF1* 与 *GRF2* 在所有的器官中都有表达,而大部分 14-3-3 基因的表达具有明显的组织特异性,如 *GRF14* 仅在生殖器官中表达^[9]。本研究中小桐子 *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 都在茎中表达量较高。同时 14-3-3 基因在植物的不同发育时期其表达也表现出特异性,大豆中鉴定到的 18 个 14-3-3 基因有 16 个具有转录活性,其中 *SGF14p* 基因在种子发育的早期表达量较高,随着种子的成熟其表达量逐渐下降^[29]。另外,多种非生物胁迫(如盐害,低温)能诱导不同 14-3-3 基因的表达,盐胁迫下番茄幼根中 *TFT1*、*TFT4*、*TFT7*、*TFT10* 基因上调表达显著^[30],水稻 *OsGF14b* 与 *OsGF14g* 可以被所有非生物胁迫与激素诱导表达,有 6 个 14-3-3 基因可以被水杨酸(Salicylic acid, SA)诱导表达,而所有水稻 14-3-3 基因都可以被低温诱导,与水稻 *OsGF14* 基因的启动子区域鉴定到低温响应元件的结果相吻合^[28]。小桐子中 9 个 14-3-3 基因只有 *Jc14-3-3b* 与 *Jc14-3-3h* 在其基因调控序列鉴定到低温响应元件,而 qRT-PCR 试验结果也表明这 2 个基因属于低温诱导基因。

14-3-3 蛋白通过结合磷酸化 Ser/Thr 的靶蛋白发挥其调控作用,其中 H^+ -ATP 酶、硝酸还原酶、磷酸蔗糖合成酶是植物体内作用范围最广且受 14-3-3 蛋白调控的关键酶。 H^+ -ATP 酶作为植物生命活动的“主宰酶”,存在于植物的所有外膜与内膜系统中,通过建立跨膜的电化学梯度维持细胞内外环境的离子渗透势的平衡,参与植物气孔的开闭、营养物

质的运输及多种胁迫的响应等生理过程。14-3-3 蛋白是 H^+ -ATP 酶的主要调节因子,通过结合 H^+ -ATP 酶的 C 末端自抑区的磷酸化序列而提高 H^+ -ATP 酶的活性,在拟南芥中,质膜 H^+ -ATP 酶 Thr⁹⁸⁰ 磷酸化后,14-3-3 蛋白通过结合 884 位氨基酸残基从而提高其活性^[34],而在菠菜中, C 末端的 Ser⁹⁴⁸ 磷酸化后 14-3-3 蛋白的结合也可以提高其活性^[35]。研究发现,在此过程中,壳梭孢素(FC)能够稳定 14-3-3 蛋白与靶蛋白复合体,从而进一步提高与维持 H^+ -ATP 酶的活性^[36],而 5'-AMP 却通过抑制 FC 的形成,间接影响复合体的稳定性,从而抑制 H^+ -ATP 酶的活性^[37]。通过 NetPhos 分析小桐子质膜 H^+ -ATP 酶(GenBank 登录号:XP_012075128.1) C 末端自抑区的潜在磷酸化位点显示,其包含 Ser⁸⁴⁹、Thr⁸⁶⁴、Thr⁸⁶⁵、Ser⁹⁰²、Ser⁹⁰⁷、Thr⁹²⁷ 可能磷酸化位点,这些位点的磷酸化可以诱发小桐子 14-3-3 家族蛋白的结合从而提高质膜 H^+ -ATP 酶的活性,但具体诱发磷酸化位点、14-3-3 蛋白结合位点以及参与的 14-3-3 蛋白类型有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] MAKKAR H P S, BECKER K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts[J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2009, 111(8): 773-787.
- [2] YANG C Y, FANG Z, LI B, et al. Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China [J]. Renew Sust Energ Rev, 2012, 16(4): 2178-2190.
- [3] LIN J, ZHOU X, TANG K X, et al. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* L. [J]. J Trop Subtrop Bot, 2004, 12(3): 285-290.
- [4] 何璐,虞泓,范源洪,等. 麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 植物学研究进展[J]. 长江流域资源与环境, 2010, 19(S1): 120-127.
- [5] 王海燕,文明富,刘石生,等. 麻疯树生物学研究进展及其开发利用[J]. 热带作物学报, 2010, 31(4): 670-675.
- [6] PAULETTE M. 14-3-3 proteins-an update[J]. Cell Res, 2005, 15(4): 228-236.
- [7] MOORE B W, PEREZ V J. Specific acidic proteins of the nervous system[M]. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1968: 343-359.
- [8] RANDT J, THORDAL-CHRISTENSEN H, VAD K, et al. A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator[J]. Plant J, 1992, 2(5): 815-820.
- [9] WU K, ROONEY M F, FERL R J. The *Arabidopsis* 14-3-3 multi-gene family[J]. Plant physiol, 1997, 114(4): 1421-1431.
- [10] YANG X W, LEE W H, SOBOTT F, et al. Structural basis for

- protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family[J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(46): 17237-17242.
- [11] GANGULY S, WELLER J L, HO A, et al. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205[J]. P Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1222-1227.
- [12] COBLITZ B, WU M, SHIKANO S, et al. C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins[J]. FEBS Lett, 2006, 580(6): 1531-1535.
- [13] ANDREWS R K, HARRIS S J, MCNALLY T, et al. Binding of purified 14-3-3 ζ signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex[J]. Biochem, 1998, 37(2): 638-647.
- [14] PETOSA C, MASTERS S C, BANKSTON L A, et al. 14-3-3 ζ binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove[J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16305-16310.
- [15] COMPAROT S, LINGIGH G, MARTIN T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism[J]. J Exp Bot, 2003, 54(382): 595-604.
- [16] ISHIDA S, FUKAZAWA J, YUASA T, et al. Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator repression of shoot growth by gibberellins[J]. Plant Cell, 2004, 16(10): 2641-2651.
- [17] DEL VISO F, CASARETTO J A, QUATRANO R S. 14-3-3 proteins are components of the transcription complex of the ATEM1 promoter in *Arabidopsis*[J]. Planta, 2007, 227(1): 167-175.
- [18] VAN DEN WINGAARD P W, SINNIGE M P, ROOBEK I, et al. Abscisic acid and 14-3-3 proteins control K channel activity in barley embryonic root[J]. Plant J, 2005, 41(1): 43-55.
- [19] GAMPALA S S, KIM T W, HE J X, et al. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*[J]. Dev Cell, 2007, 13(2): 177-189.
- [20] RYU H, CHO H, KIM K, et al. Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling[J]. Molecular Cells, 2010, 29(3): 283-290.
- [21] SOLANO R, ECKER J R. Ethylene gas: perception, signaling and response[J]. Curr Opin Plant Biol, 1998, 1(5): 393-398.
- [22] FOLTA K M, PAUL A L, MAYFIELD J D, et al. 14-3-3 isoforms participate in red light signaling and photoperiodic flowering[J]. Plant Signal Behav, 2008, 3(5): 304-306.
- [23] HAYASHI M, INOUE S, TAKAHASHI K, et al. Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(7): 1238-1248.
- [24] PIGNOCCHI C, DOONAN J H. Interaction of a 14-3-3 protein with the plant microtubule-associated protein EDE1[J]. Ann Bot, 2011, 107(7): 1103-1109.
- [25] KANCZEWSKA J, MARCO S, VANDERRMEEREN C, et al. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 protein converts a dimer into a hexamer[J]. P Natl Acad Sci USA, 2005, 102(33): 11675-11680.
- [26] SHIN R, ALVAREZ S, BURCH A Y, et al. Phosphoproteomic identification of targets of the *Arabidopsis* sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes[J]. P Natl Acad Sci USA, 2007, 104(15): 6460-6465.
- [27] KIDOU S I, UMEDA M, KATO A, et al. Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the bovine brain-specific 14-3-3 protein gene[J]. Plant Molar Biol, 1993, 21(1): 191-194.
- [28] YAO Y, DU Y, JIANG L, et al. Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*[J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(3): 349-357.
- [29] LI X Y, DHAUBHADEL S. Soybean 14-3-3 gene family: identification and molecular characterization[J]. Planta, 2011, 322(3): 569-582.
- [30] XU W F, SHI W M. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt and potassium and iron deficiencies in young tomato(*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR[J]. Ann Bot, 2006, 98(5): 965-974.
- [31] 李忠光, 龚明. 不同化学消毒剂对小桐子种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 种子, 2010, 30(2): 4-7, 12.
- [32] SUN G, XIE F, ZHANG B. Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton(*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Funct Integr Genomics, 2011, 11(4): 627-636.
- [33] YAN J Q, HE C X, WANG J, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 λ in cotton leads to a 'Stay-Green' phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(8): 1007-1014.
- [34] MAGNUS A, PAUL C, SEHNKE, et al. Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(9): 1202-1210.
- [35] JAHN T, FUGLSANG A T, OLSSON A, et al. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase[J]. Plant Cell, 1997, 9(10): 1805-1814.
- [36] OLSSON A, SVENNELID F, EK B, et al. A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding[J]. Plant Physiol, 1998, 118(2): 551-555.
- [37] YANG Z M, NIAN H, SIVAGURU M, et al. Characterization of aluminum-induced citrate secretion in aluminum tolerant soybean (*Glycine max* L.) plants[J]. Physiol Plantarum, 2001, 113(1): 64-71.

(责任编辑:陈海霞)