

# 两个苹果 RNA 解旋酶基因的基本特征与表达分析

许瑞瑞<sup>1</sup>, 张世忠<sup>2</sup>, 曹 慧<sup>1</sup>, 刘慧莲<sup>1</sup>, 王建波<sup>1</sup>

(1. 潍坊学院, 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东 潍坊 261061;

2. 山东农业大学 国家苹果工程技术研究中心, 山东 泰安 271018)

**摘 要:**利用生物信息学方法对 2 个苹果 RNA 解旋酶基因染色体定位、系统进化关系和氨基酸序列基本特征等进行了预测, 分析了基因在果实成熟期和砧穗互作中的表达差异; 利用 PlantCARE 软件对二者的启动子序列中所包含的响应元件进行了预测和分析; 利用 qRT-PCR 方法分析了 2 个苹果 RNA 解旋酶基因的组织表达模式。结果表明:“金冠”苹果基因组中鉴定了 2 个 RNA 解旋酶基因, 命名为 *Mdhelicase1*、*Mdhelicase2*, 分别分布在苹果第 6、17 条染色体上; 表达谱芯片分析发现, 在苹果果实成熟时期和砧木接穗互作过程中, *Mdhelicase1* 和 *Mdhelicase2* 基因的表达有不同程度的变化; 2 个基因的启动子区域存在多个胁迫响应元件, 如 MBS、HSEs、TC-rich repeat、AREs、ABREs、GARE motif、P box、CGTCA motif、TGACE motif、Light responsive elements 等。*Mdhelicase1*、*Mdhelicase2* 在“平邑甜茶”茎、叶、花、果实中都有表达, 二者分别在茎和叶中的表达量最高。

**关键词:**苹果; RNA 解旋酶; 基因特征; 启动子序列分析; 表达分析

**中图分类号:**S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0091-06

RNA 解旋酶是一类参与 RNA 结构调控并影响 RNA 合成、复制、翻译起始、剪接、rRNA 加工、核糖体组装、核 mRNA 输出及 mRNA 稳定化与降解的蛋白质新家族<sup>[1-2]</sup>。植物细胞中 RNA 解旋酶参与多种代谢过程, 具有广泛的生理意义并且对逆境的适应具有重要作用<sup>[3]</sup>。植物中的 RNA 解旋酶已成为该领域的研究热

点, 越来越多的植物基因组中的 RNA 解旋酶基因被克隆鉴定, 包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[4-8]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[9]</sup>、大麦 (*Hordeum vulgare*)<sup>[10]</sup>、烟草 (*Nicotiana tabacum*)<sup>[11]</sup> 等。

2001 年, Seki 等<sup>[4]</sup>在拟南芥中, 通过对 1 300 个基因的 cDNA 进行微阵列 (Microarray) 分析技术, 首次发现冷害诱导型 DEAD-box 解旋酶基因 AB050574, 这一发现表明解旋酶在植物胁迫应答过程中具有一定的作用, 研究还发现拟南芥的 FL25A4 基因能够忍耐 4℃ 的低温; Gong 等<sup>[5]</sup>利用图位克隆的方法从有较强的耐寒能力的拟南芥突变体中得到 CRYOPHYTE/LOS4 基因, 试验结果显示该基因编码定位于核膜上的 DEAD-box RNA 解旋酶, 对于 mRNA 的输出和植株的生长发育以及逆境响应具有重要的作用; 大麦中的 RNA 解旋酶基

**第一作者简介:**许瑞瑞(1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物逆境基因表达调控。E-mail: xuruirui2006@163.com.

**责任作者:**曹慧(1966-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为果树逆境生理。E-mail: hui5232@163.com.

**基金项目:**山东省自然科学基金资助项目 (Y2007D60); 潍坊市科学技术发展计划资助项目 (20121305, 2012098); 生物化学与分子生物学山东省高校重点实验室 (潍坊学院) 开放课题资助项目 (2012SWKF01)。

**收稿日期:**2013-10-22

**Abstract:** Taking the pollen of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort. as material, effect of the self-pollinated style proteins and the cross-pollinated style proteins on pollen germination and pollen tube growth were compared. The results showed that pollen germination was unaffected by adding self-pollinated style protein and the cross-pollinated style protein, but significantly affected the growth of pollen tube. The growth of pollen tube in those media with the self-pollinated style proteins was restrained, with cross-pollinated style proteins was unaffected. PAGE electrophoresis showed that the pollen tube self style protein processing of the 1 specific protein bands ( $Rf=0.81$ ); tube SDS-PAGE electrophoresis to self styleprotein processing appeared relative molecular weight of 2 specific protein of 35 kD and 37.5 kD band; IEF-PAGE electrophoresis results showed that, in the self style protein treated pollen tube protein in the isoelectric points of 5.85 and 6.20 of the two specificprotein bands.

**Key words:** *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort. ; pollen germination; pollen tube length; style proteins; Gel electrophoresis

因 *HVD1*, 具有明显的耐盐作用, 研究还发现高盐、寒冷和 ABA 处理等条件都能诱导该蛋白的积累<sup>[10]</sup>; *STRS1* (*STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1*) 和 *STRS2* 是 2 个胁迫响应抑制子, 可以负调控拟南芥对多种非生物胁迫的响应<sup>[7]</sup>; Xu 等<sup>[8]</sup> 研究还发现拟南芥的 *DEXD/H-box* RNA 解旋酶 *AtHELPS* 的表达受到多种非生物胁迫的调控, 包括盐胁迫、低钾、冷害等, 其中受低钾胁迫最明显, 并且 *AtHELPS* 可以调节拟南芥植株对低钾胁迫和盐胁迫的耐受性。RNA 解旋酶除了参与调控多种植物的逆境胁迫响应过程外, 对于植物的生长发育也有着重要的调控作用。Wang 等<sup>[11]</sup> 在烟草中研究表明, *VDL* 基因编码一个 *DEAD-box* RNA 解旋酶, 参与叶绿体分化和植物形态发生; 拟南芥 *TEBICHI* 基因已被证实可以调控分生组织的细胞分裂和分化<sup>[6]</sup>; *ISE2* 是一个拟南芥 *DEVH-box* RNA 解旋酶, 定位在细胞质颗粒中, 可以调控胞间连丝的结构形态改变, 导致其功能的变化<sup>[12]</sup>。

但是, 目前 RNA 解旋酶的绝大多数方面研究都是在模式植物和一些作物中, 对于果树尤其是苹果中的 RNA 解旋酶研究较少。“金冠”苹果基因组测序工作的研究由 Velasco 等<sup>[13]</sup> 在 *Nature Genetics* 上发表, 这标志着苹果全基因组序列的测序已经完成。通过生物信息学的方法已经预测分析了苹果 *RING finger* 家族成员、*MdGLRs* 家族基因、*WRKY* 转录因子家族等<sup>[14-16]</sup>。该试验利用生物信息学的方法, 鉴定出了 2 个苹果的 RNA 解旋酶基因, 分析了基因的染色体定位、与拟南芥同源基因的系统进化关系和氨基酸序列基本特征、亲/疏水性、跨膜结构域等; 利用 *PlantCARE* 软件对二者的启动子序列中所包含的元件进行了预测和分析; 并且还分析了“平邑甜茶”苹果不同组织中的表达情况, 以期研究 RNA 解旋酶在苹果逆境胁迫和生长发育, 尤其是果实成熟时期的生长发育以及在砧木接穗互作中的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试苹果品种为“平邑甜茶”(*Malus domestica* Borkh c. v. Starking)。

试验仪器为 Bio-rad CFX 96 实时定量 RCR 仪, 反应体系参照 SYBR® Green Realtime RCR Master Mix 说明书。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *Mdhelicase* 基因在不同组织的表达分析 取“平邑甜茶”苹果的根、茎、叶、花、果实, 取样后液氮冷冻, 采用植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司) 提取总 RNA, 用 DNaseI 除去基因组 DNA 后, 反转录得到 cDNA 用于 qRT-PCR 表达分析。MdACTIN 为内参, 调整各模板浓度使内参 *Ct* 值之差小于 2, 每个基因扩增均有内参

同时扩增, 默认条件下读取 *Ct* 值, 每个样品 3 次重复, *Mdhelicase1* 上游引物 (5'-TGCGATAAGATGCTT-GAGTC-3') 下游引物 (5'-AAACAGGGCGTATTTCTT-3'); *Mdhelicase2* 上游引物 (5'-CAACGATTATCTG-GCACG-3') 下游引物 (5'-ATGGAATCAACCTCGTCAA-3'); *MdACTIN* 上游引物 (5'-ACACGGGGAGGTAGT-GACAA-3') 下游引物 (5'-CCTCCAATGGATCCTCGT-TA-3')。

1.2.2 数据来源及 *Mdhelicase* 基因成员鉴定 该试验从 GDR 数据库下载苹果全基因组 CDS 序列及蛋白序列文件, 通过 2 种方法对 *Mdhelicase* 家族成员进行鉴定: 一是利用 PFAM 网站对苹果全基因组蛋白序列进行蛋白结构预测, 获得全部苹果基因的蛋白结构域信息, 筛选含有 RNA helicase (PF00271), DEAD (PF00270) 及 SNF2 (PF00176) 结构域的基因; 二是以苹果 CDS 序列和蛋白序列构建本地 Blast 数据库, 然后以拟南芥 RNA helicase 家族基因序列执行本地 Blast (1e-003) 搜索。随后合并两部分结果, 利用 Perl 程序去掉重复序列, 所得结果再利用 PFAM, SMART 及 NCBI-CDD 工具进行蛋白结构预测, 删除不属于 RNA helicase 的基因。同时, 利用 ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>), 对 *Mdhelicase* 氨基酸序列进行分子量、等电点预测。利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测了 *Mdhelicase* 蛋白质的三维结构。

1.2.3 *Mdhelicase* 染色体定位、基因结构和系统进化树构建 从 GDR 数据库下载“金冠”苹果基因组信息文件 (Assembly gff3 file), 利用 Perl 程序选取 *Mdhelicase* 基因的染色体位置信息及基因结构信息, 并利用 MapDraw 工具和 GSDS 分别进行染色体定位作图及基因结构绘制。用 MUSCLE 对拟南芥和苹果 RNA helicase 蛋白序列进行比对, 再利用 MEGA5 构建进化树。进化树生成算法采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ), 校验参数 Bootstrap 重复 1 000 次。

1.2.4 芯片分析 从 EBI 芯片数据库中下载果实发育芯片数据 (E-MEXP-2451)、砧木接穗互作芯片数据 (E-GEOD-4762) 及相应的探针序列 (A-GEOD-11164 和 A-GEOD-3715), 分别构建探针序列的本地 blast 数据库, 利用 *Mdhelicase* cds 序列进行比对, 选取匹配探针代表该 *Mdhelicase* 基因。

### 1.3 数据分析

数据分析采用双标准曲线法, 计算平均表达量和相对偏差, 用 Excel 作图。同时利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  大致计算与内参的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 *Mdhelicase* 基因的鉴定

利用生物信息学方法, 从苹果全基因组中鉴定到 2

个 *Mdhelicase* 成员,命名为 *Mdhelicase1*、*Mdhelicase2*,分别分布在苹果第 6、17 条染色体上(图 1)。由表 1 可知,*Mdhelicase* 编码蛋白长度分别为 626 aa 和 968 aa,分子量分别为 71 034.14 D 和 109 582.73 D,等电点分别为 6.34 和 8.54。由图 2 可知,*Mdhelicase* 基因分别包含 16 个和 20 个外显子,*Mdhelicase1* 和 *Mdhelicase2* 基因的内含子长度都较长。另外,利用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org>)在线预测了 *Mdhelicase* 蛋白质的三维结构,如图 3 所示。Fuller-Pase<sup>[17]</sup> 研究表明,RNA 解旋酶的核区域是由 2 个 Domain 组成的,*Mdhelicase2* 完全符合这一规律,而 *Mdhelicase1* 虽然也由 2 个 Domain 组成,但是二者之间界限不很明显。

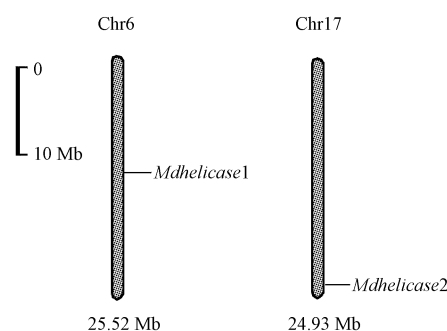


图 1 苹果 RNA 解旋酶基因在染色体上的位置

Fig. 1 Distribution of two RNA helicase genes in apple chromosomes

表 1

苹果 RNA 解旋酶基因的基本特征

Table 1

The basic Characteristics of RNA helicase genes in apple

基因名	基因编号	染色体位置	拟南芥同源基因	相似度	大小	分子量	等电点
Gene name	Gene number	Chromosome location	<i>Arabidopsis</i> homologous gene	Similarity	Size/aa	Molecular weight/D	Isoelectric point
<i>Mdhelicase1</i>	MDP0000186402	chr06:12239050..12245929	AT5G11200.2	72.50	626	71 034.14	6.34
<i>Mdhelicase2</i>	MDP0000199343	chr17:24765753..24773630	AT4G01800.2	74.16	968	109 582.73	8.54

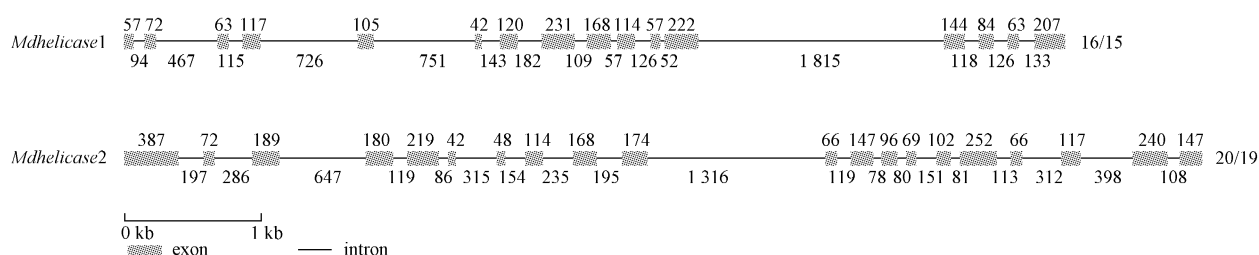


图 2 苹果 *Mdhelicase* 的一级结构(方框代表外显子,横线代表内含子)

Fig. 2 *Mdhelicase* primary structure (boxes represent exons, horizontal lines represent introns)

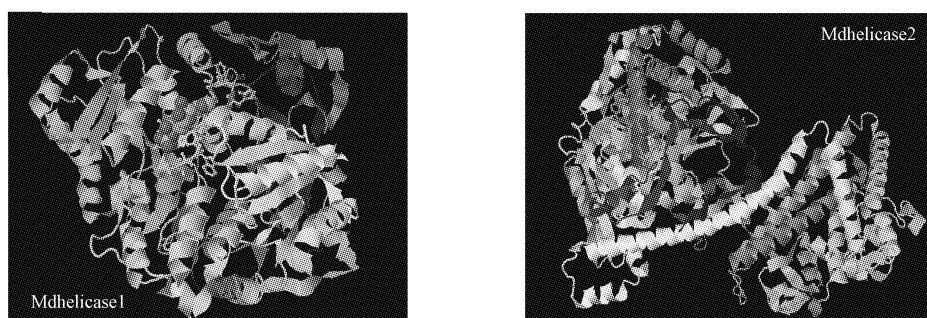


图 3 苹果 *Mdhelicase* 的三维结构

Fig. 3 *Mdhelicase* three-dimensional structure

## 2.2 苹果 *Mdhelicase* 系统进化树分析

研究表明,预测拟南芥基因组中有 100 多个 RNA 解旋酶基因家族成员,其信息可从网站 The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) database (<http://www.arabidopsis.org/>)中获取<sup>[18-19]</sup>。将苹果 RNA 解旋酶基因和拟南芥基因组中的 RNA 解旋酶基因进行系统进化树分析,结果发现,苹果中的 *Mdhelicase1* 基因与拟南芥中的 AT5G11170.1 和 AT5G11200.2、*Mdhelicase2* 与拟南芥中的 AT4G01800.2 在系统进化树中处于较近的分

支,说明它们之间的同源性较高(图 4)。

## 2.3 苹果 RNA 解旋酶基因在砧木接穗互作时期和果实成熟时期的芯片表达分析

为了揭示苹果 RNA 解旋酶可能在砧木接穗互作时期和果实成熟发育时期中所起的作用,进行了砧木接穗互作芯片和果实发育芯片分析,分别绘制出相应的表达量变化图(图 5)。在苹果砧木接穗互作相关的芯片结果中(图 5A),最上面由左到右的数值大小与颜色的深浅表示基因表达量的高低,由左向右依次对应的是不同的砧



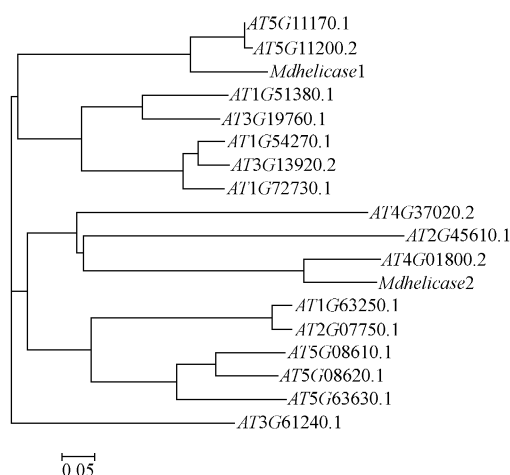


图4 苹果与拟南芥RNA解旋酶基因的系统进化树  
注:每0.05刻度单位代表每个氨基酸的替换率。

Fig. 4 The unrooted neighbor joining phylogenetic tree of RNA helicase genes in apple and *Arabidopsis*  
Note: The scale bar represents 0.05 substitutions per amino acid position.

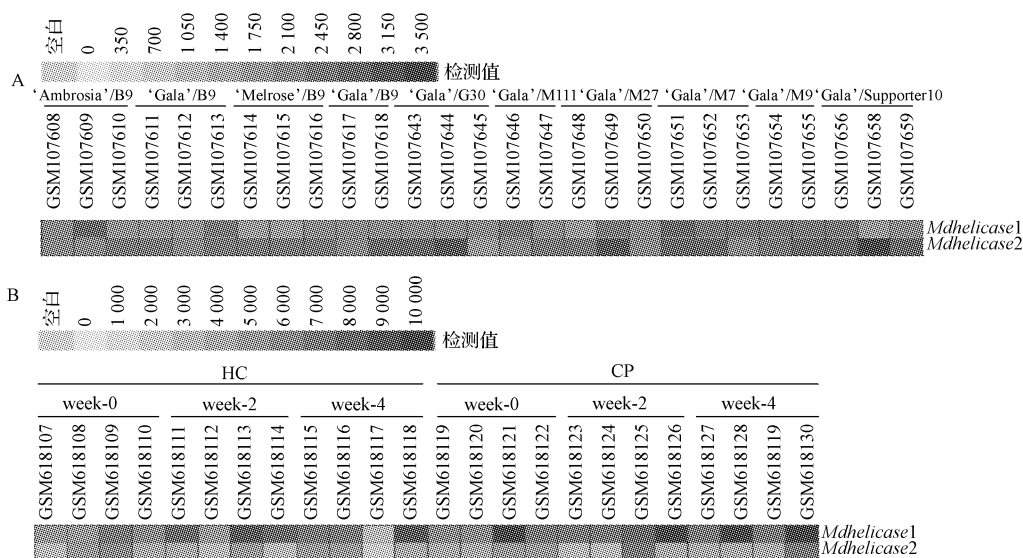


图5 苹果RNA解旋酶基因的砧木接穗互作过程中的表达谱分析(A)和果实成熟过程中的表达谱分析(B)  
Fig. 5 Expression profile of the *Mdhellicase* genes during rootstock-scion interactions process (A) and during fruit development (B) in apple

## 2.4 苹果RNA解旋酶基因的上游启动子序列分析

通常功能基因的表达模式由其上游启动子所决定,在基因启动子区通常存在不同的顺式或反式作用元件。在植物体内,不同的转录因子与这些元件结合从而调控基因表达量的升高或降低。研究发现,RNA解旋酶可能有与功能基因相类似的调控模式,利用PlantCARE软件对它们所包含的元件进行预测和分析,如表2所示,苹果RNA解旋酶基因启动子区域存在多个胁迫响应元件,如MBS (MYB binding site involved in drought-induc-

ibility)、HSEs (Heat stress responsive elements)、TC-rich repeat (Defense and stress responsive elements)、AREs (Anaerobic induction elements)等。另外,一些其它调节元件,如激素响应元件ABREs (ABA-response elements)、GARE motif (gibberellin-responsive element)、P box (gibberellin-responsive element)、CGTCA motif (cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness)、TGACG motif (cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness)以及一些光响

木和不同的接穗组合,每种组合有2~3次的重复,包括‘Ambrosia’/B9、‘Gala’/B9、‘Melrose’/B9、‘Gala’/B9、‘Gala’/G30、‘Gala’/M111、‘Gala’/M27、‘Gala’/M7、‘Gala’/M9和‘Gala’/Supporter 10组砧穗组合。表明*Mdhellicase1*和*Mdhellicase2*基因的表达变化不明显。  
图5B中所示,基因表达量的变化用颜色来表示,颜色越亮就代表基因表达检测值越强,由左向右依次对应的是苹果栽培品种Honey Crisp(HC)的3个时期果实成熟期(week-0)、果实成熟前2周(week-2)、果实成熟前4周(week-4)和苹果栽培品种Crispps Pink(CP)的3个时期果实成熟期(week-0)、果实成熟前2周(week-2)、果实成熟前4周(week-4)的2个*Mdhellicase*基因表达量变化情况。每个时期都有4次重复的结果,依次是GSM618107-GSM618110、GSM618111-GSM618114、GSM618115-GSM618118、GSM618119-GSM618122、GSM618123-GSM618126和GSM618127-GSM618130。2个苹果栽培品种HC和CP在果实成熟前4周到果实成熟的过程中,2个*Mdhellicase*基因的表达有不同程度的变化,其中*Mdhellicase2*基因较*Mdhellicase1*表达量变化明显。

元件(Light responsive elements),也存在于苹果 RNA 解旋酶基因的启动子区域。

表 2 苹果 RNA 解旋酶基因上游序列中富含的胁迫响应元件

Table 2 Kinds and numbers of known stress-related elements in the upstream regions of RNA helicase genes in apple

元件 Element	功能 Function	<i>Mdhelicase1</i>	<i>Mdhelicase2</i>
MBS	Drought	1	4
HSEs	Heat stress	—	2
TC-rich repeat	Defense and stress	1	2
AREs	Stress	3	1
TGA element	Auxin	1	—
GARE motif	GA	—	1
P box	GA	—	1
ABREs	ABA	—	1
CGTCA motif	MeJA	—	2
TGACG motif	MeJA	—	2
Box W1	Fungal elicitor	1	2
Sp1	Light responsive element	2	1
LAMP-element	Light responsive element	1	1
GAG-motif	Light responsive element	1	—
GA-motif	Light responsive element	—	1
G-box	Light responsive element	2	3
Box 4	Light responsive element	3	—
ACE	Light responsive element	—	1
GT1-motif	Light responsive element	1	1
Circadian	Circadian control	—	1

## 2.5 苹果 RNA 解旋酶基因在“平邑甜茶”中的组织表达分析

为分析这 2 个苹果 RNA 解旋酶基因在不同的营养生长器官的表达情况,该课题组利用实时荧光定量 PCR 技术检测了其在“平邑甜茶”的根、茎、叶、花和果实中的表达水平。结果表明,*Mdhelicase1*、*Mdhelicase2* 在茎、叶、花、果实中都有表达,在根中的表达量最低,几乎检测不到表达,并且 2 个基因分别在茎和叶中的表达量最高(图 6)。因此,2 个基因的表达量还是有差异的,不同基因在不同组织中的表达差异,可能是它们在功能上的差异所导致,还需要进一步验证。

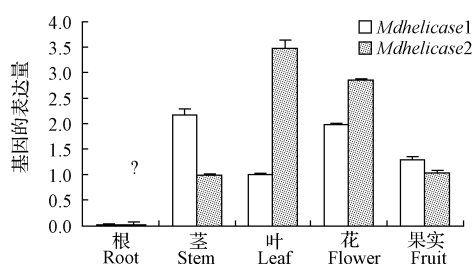


图 6 苹果 *Mdhelicase* 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of the *Mdhelicase* genes in different tissues in apple

## 3 结论与讨论

RNA 解旋酶利用水解 NTP(主要为 ATP)产生的能量修饰 RNA 的结构,它参与了所有涉及到 RNA 的生物化学过程,被认为是 RNA 的最佳伴侣<sup>[20]</sup>。为了能更

好了解苹果 RNA 解旋酶的结构和功能,对苹果中的 2 个 RNA 解旋酶进行了基本特征的预测、启动子序列及表达分析。研究表明,苹果 *Mdhelicase1* 和 *Mdhelicase2* 在苹果砧木接穗互作过程中表达量有上调和下调不同的变化,说明不同砧穗组合时引起了基因的表达量变化,从而可能间接影响嫁接苗的生长,这有待深入研究。另外,该课题组还寻找到 *Mdhelicase1* 和 *Mdhelicase2* 基因在果实成熟发育过程中的表达量有不同程度的变化,它们可能参与调控苹果果实的发育成熟,但其具体功能等还有待于进一步研究。通过对苹果和拟南芥基因组中的 RNA 解旋酶基因进行系统进化树分析,说明 *Mdhelicase1* 基因与 AT5G11170.1 和 AT5G11200.2、*Mdhelicase2* 与 AT4G01800.2 的同源性较高,预测其功能可能会存在相似性。借鉴 3 个同源基因在结构和相关生理生化功能等方面的研究<sup>[21-23]</sup>,AT5G11170 和 AT5G11200 与人类中的 UAP56 同源,参加了植物细胞溶质的新陈代谢过程<sup>[23]</sup>,AT4G01800 参与了叶绿体形成和光调控作用,有助于进一步探索苹果 RNA 解旋酶基因在生长发育和生理过程中的作用,这将是今后课题的重点研究内容。

Aubourg 等<sup>[24]</sup>有研究表明,拟南芥 DEAD-box RNA 解旋酶家族的 32 个基因中多数在根、叶、花和果实中表达;Northern 杂交结果显示拟南芥中的 *PMH1* 和 *PMH2* 主要在花中表达,但 *PMH2* 在根、幼苗和叶中也有少量表达,*PMH1* 则在这些组织中基本检测不到表达<sup>[25]</sup>;半定量 RT-PCR 分析发现紫花苜蓿中的 *MH1* 基因在紫花苜蓿根、茎和叶中都有表达,Northern 杂交实验结果与 RT-PCR 结果一致,说明 *MH1* 基因在紫花苜蓿中的表达没有明显的器官特异性<sup>[26]</sup>;对不同时期的转 *AtHELPS* 基因的转基因植株进行表达量分析得知,在幼苗期,根中的表达较强,主要是在维管束组织中表达,幼叶的叶脉有表达,其它组织中并无表达,当转基因植株从营养生长过度到生殖生长阶段后,在地上部组织表达量很低,几乎无表达,根中的表达仍然很高<sup>[8]</sup>。该研究中的苹果 RNA 解旋酶在“平邑甜茶”根中基本没有表达,而在茎、叶、花和果实中都有不同程度的表达,并且 *Mdhelicase1* 在茎中表达量最高,*Mdhelicase2* 在叶中的表达量最高,不同的组织表达模式暗示着其可能在苹果生长发育中起着不同的作用,这些结果对深入研究苹果 *Mdhelicase* 的功能具有重要的参考价值。

目前,随着对 RNA 解旋酶基因研究的不断深入,越来越多的基因和与其相互作用的基因被鉴定出来,相信对 2 个苹果 RNA 解旋酶基因的基本特征、启动子区域中的元件分析和组织表达模式分析,将有助于探索苹果 RNA 解旋酶如何响应逆境胁迫、在生长发育和新陈代谢等过程中的功能,也将为研究 RNA 解旋酶基因调控苹果的一系列信号途径奠定重要的理论基础。

## 参考文献

- [1] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins; the driving forces behind RNA metabolism [J]. *Nature Reviews Mol Cell Biol*, 2004(5): 232-241.
- [2] Owtrim G. Survey and summary RNA helicases and abiotic stress [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(11): 3220-3230.
- [3] Vashisht A, Tuteja N. Stress responsive DEAD-box helicases; A new pathway to engineer plant stress tolerance [J]. *J Photochem Photobiol B, Biol*, 2006, 84: 150-160.
- [4] Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. *Plant Cell*, 2001(13): 61-72.
- [5] Gong Z, Dong C, Lee H, et al. A DEAD box RNA helicase is essential for RNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005(17): 256-267.
- [6] Inagaki S, Suzuki T, Ohto M, et al. *Arabidopsis* TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems [J]. *Plant Cell*, 2006(8): 879-892.
- [7] Kant P, Kant S, Gordon M, et al. STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-Box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 814-830.
- [8] Xu R, Qi S, Lu L, et al. A DEXD/H-box RNA helicase is important for potassium deprivation responses and tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 2296-2306.
- [9] Li D, Liu H, Zhang H, et al. OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59: 2133-2146.
- [10] Nakamura T, Muramot Y, Takabe T. Structural and transcriptional characterization of a salt-responsive gene encoding putative ATP-dependent RNA helicase in barley [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 63-70.
- [11] Wang Y, Doby G, Purnelle B, et al. Tobacco VDL gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2000(12): 2129-2142.
- [12] Kobayashi K, Otegui M, Krishnakumar S, et al. INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during *Arabidopsis* embryogenesis [J]. *Plant Cell*, 2007(19): 1885-1897.
- [13] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Nature Genet*, 2010, 42: 833-839.
- [14] Li Y, Wu B, Yu Y, et al. Genome-wide analysis of the RING finger gene family in apple [J]. *Mol Genet Genomics*, 2011, 286: 81-94.
- [15] 罗华, 胡大刚, 张连忠, 等. 苹果 MdGLRs 家族基因生物信息学鉴定和表达分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(3): 425-435.
- [16] 许瑞瑞, 张世忠, 曹慧, 等. 苹果 WRKY 转录因子家族基因生物信息学分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(10): 2049-2060.
- [17] Fuller-Pace F. DEXD/H box RNA helicases; multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(15): 4206-4215.
- [18] Poole R L. The TAIR database [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 406: 179-212.
- [19] Umate P, Tuteja R, Tuteja N. Genome-wide analysis of helicase gene family from rice and *Arabidopsis*; a comparison with yeast and human [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 449-465.
- [20] Luking A, Stahl U, Schmidt U. The protein family of RNA helicases [J]. *Biochem Mol Biol*, 1998, 33(4): 259-296.
- [21] Pagnussat G, Yu H, Ngo Q, et al. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2005, 132(3): 603-614.
- [22] Peiffer J, Kaushik S, Sakai H, et al. A spatial dissection of the *Arabidopsis* floral transcriptome by MPSS [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 43-58.
- [23] Ito J, Batth T, Petzold C, et al. Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(4): 1571-1582.
- [24] Aubourg S, Kreis M, Lecharny A. The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 628-636.
- [25] Matthes A, Schmidt-Gattung S, Köhler D, et al. Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis mitochondria* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1637-1646.
- [26] Luo Y, Liu Y, Dong Y, et al. Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment [J]. *J Plant Physiol*, 2009, 166(4): 385-394.

## Essential Characteristics and Expression Analysis of Two RNA Helicase Genes in Apple

XU Rui-rui<sup>1</sup>, ZHANG Shi-zhong<sup>2</sup>, CAO Hui<sup>1</sup>, LIU Hui-lian<sup>1</sup>, WANG Jian-bo<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang University, Weifang, Shandong 261061;  
2. National Research Center for Apple Engineering and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** The chromosome location, basic characteristics of amino acids, phylogenetic analysis, promoter elements of two *Mdhelicase* genes were predicted and analyzed with bioinformatics methods gene expression difference at fruit maturity and rootstockscion interactions were analyzed; with plant CARE database, responsive elements included in promoter sequence of two *Mdhelicase* gene were predicted and analyzed; the expression of *Mdhelicase* gene was analyzed in two RNA helicase gene in apple with quantitative RT-PCR. The results showed that two *Mdhelicase* genes from 'Jinguan' apple, called *Mdhelicase1* and *Mdhelicase2*, were mapped on chromosomes 6, 17, respectively. Microarray analysis showed that the expression levels of the *Mdhelicase1* and *Mdhelicase2* were altered during the ripening process and rootstockscion interactions process. Using the PlantCARE database, several known stress responsive elements were identified, such as MBS, HSEs, TC-rich repeat, AREs, ABREs, GARE motif, P box, CGTCA motif, TGACG motif, Light responsive elements, etc. Expression analysis showed that two *Mdhelicase* genes expressed in stem, leaf, flower and fruit, with the highest expression level in stem and leaf, respectively.

**Key words:** *Malus × domestica*; RNA helicase; gene characterization; promoter sequence analysis; expression analysis