

番茄 ARF2 蛋白的生物信息学分析与亚细胞定位 *

冯媛媛 侯 佩 李颖楠 刘永胜 **

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 水力学与山区河流开发保护国家重点实验室, 成都 610064)

摘要 克隆番茄(*Solanum lycopersicum*) ARF2 基因, 并分析其分子特性和亚细胞定位, 为研究其功能提供基础. 通过生物信息学方法分析 SIARF2 基因编码蛋白的理化性质和分子特性. 采用 RT-PCR 技术从番茄果实 cDNA 中扩增 SIARF2 基因全长, 并构建与黄色荧光蛋白(YFP)融合的 pBA-ARF2-YFP 表达载体, 进而再通过农杆菌介导的遗传转化方法, 将重组质粒转化到野生型番茄中, 将得到的 T1 代转基因种子萌发, 然后取根尖通过荧光显微镜观察了融合蛋白在活细胞内分布的特点. 生物信息学分析结果表明, SIARF2 是富含 Ser、Leu、Gly 和 Pro 以及具有 ARF 家族典型结构域的可溶性蛋白, 其氨基酸序列与葡萄、木薯和拟南芥的同源性分别为 70.08 %、66.94 %和 60.87 %. 经酶切和测序分析证实 pBA-ARF2-YFP 融合表达载体构建成功, 此外, PCR 分析表明融合蛋白在转基因植株中得到表达. 经荧光显微镜观察, ARF2 定位在细胞核中. 表明转录因子 SIARF2 定位在细胞核中, 对番茄果实发育和成熟起重要作用.

关键词 ARF2, 生物信息学分析, 表达载体的构建, 亚细胞定位

学科分类号 Q945

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00197

生长素对植物从胚胎发生到衰老的生长和发育过程至关重要. 这些重要作用主要由生长素调控的基因表达所介导. 生长素应答基因的表达共需两类转录因子家族, 其中一类为生长素应答因子(ARFs)家族^[1].

大量研究表明, ARF2 在植物的细胞分裂、茎和叶的生长、开花与花期、叶片与花的衰老、脱落以及果实与种子发育进程中起重要作用^[2-6]. Okushima 等^[2]和 Ellis 等^[3]发现拟南芥 *arf2* 突变体表现出多种发育表型, 包括大而墨绿的莲座叶、开花期延迟、长而浓密的花序、畸形的花态和早期形成的花不育、器官变大、花器官脱落和角果成熟开裂延迟等. Schruuff 等^[4]和 Hughes 等^[5]观察到拟南芥 *arf2* 突变体的种子大小与重量明显增加, 这是因为突变体的胚珠被进行额外的细胞分裂、导致种皮扩大引起的, 受精前胚珠的生长决定最终种子的大小. 而细胞的额外分裂是因为从细胞增殖期到完全分化期出现了延迟. 研究人员推测, ARF2 是植物地上器官细胞分裂的普遍抑制子, 其功能可能通过负调节与细胞生长和衰老相关的信号通路下游的基

因转录来实现. 而 Lim 等^[6]则认为 ARF2 损伤表现出通过增加生长素敏感性来降低生长素信号的抑制, 从而延迟叶片衰老. 因此, ARF2 起着正调节叶片衰老的作用. 此外, 已有研究报道还指出, ARF2 是植物体中乙烯、光照^[7]、油菜素内酯(BR)信号通路^[8-9]与生长素信号系统整合的重要节点^[10].

目前, 番茄中 ARF2 功能还未见报道. 番茄是研究果实发育与成熟的重要模式植物, 其果实是典型的呼吸跃变型肉质浆果. 对 ARF2 转录因子的研究将为阐明番茄的生长和花的发育以及调控果实的成熟提供理论依据.

本研究通过克隆 SIARF2 全长, 同时运用生物信息学方法分析预测其编码蛋白的理化特征及分子

* 国家杰出青年基金(30825030), 国家自然科学基金(90717110), 国家高新技术研究发展计划(2007AA10Z122)和新疆建设兵团博士基金(2008JC06)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13808030238, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-10, 接受日期: 2011-08-22

特征, 并构建了与 YFP 融合的植物表达载体, 通过农杆菌介导的遗传转化方法获得了转基因番茄植株, 并进而检测 SIARF2 在活细胞内的分布特点, 为 ARF2 在番茄中的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.cv.Ailsa Craig)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株、根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 及植物荧光表达载体 YFP-pBA 均为本实验室保存。限制性内切酶、反转录酶、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, 琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自 Omega 公司。

1.2 ARF2 目的基因的克隆

参照刘志勇等^[1]的方法, 根据不同物种间同源基因的核酸序列相对保守的特点, 将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) ARF2 基因(ID: At5g62000)序列与番茄中该同源基因序列进行比对分析, 在番茄中找到一个同源序列, GenBank 登录号为 DQ340255.1。根据此序列设计如下引物: ARF2-F1 (5' GCTTGTGCGACGAATTCAGATT 3')和 ARF2-R1 (5' CGTTACGTATCGGATCCAGAA 3')。提取野生型番茄幼苗总 RNA, 通过 RT-PCR 方法扩增 ARF2 基因片段, PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 150 s, 34 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物与 pMD18-T 载体连接, 对重组克隆进行 PCR 鉴定。阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序验证。

1.3 ARF2 基因编码蛋白的生物信息学分析

借助 ExPASy 数据库中的 ProtParam 在线工具 (Physico-chemical parameters of a protein sequence, <http://expasy.org/tools/protparam.html>) 对 SIARF2 基因的编码蛋白序列进行基本理化性质分析。利用 ProtScale 在线分析工具 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) 对 ARF2 进行氨基酸的亲 / 疏水性分析。为预测 SIARF2 蛋白在细胞内的定位分别采用了在线蛋白质分析软件 WoLF PSORT: Protein Subcellular Location Prediction (<http://wolfsort.org/>)、Balanced subcellular Location predictor (BaCelLo)

(<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>)和 SubLoc(http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm)。

通过在线分析软件 Sanger 的 Pfam 数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)、SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)及 NCBI 的 CDD(Conserved Domain Database)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对 SIARF2 蛋白序列的保守结构域进行分析。

在 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/> 基因组数据库中通过 BlastP 搜索与 SIARF2 蛋白同源的其他植物序列, 运用 DNAMAN 软件进行相似性分析。使用 MEGA4 软件, 运用 ClustalW 进行多重序列比对, 然后采用 Neighbor-joining 方法, Bootstrap 分析重复数为 1000, 构建系统发育树^[12]。

1.4 ARF2 荧光表达载体构建

按照 SIARF2 基因序列设计含有 Mlu I 和 Aat II 酶切位点的引物, ARF2YFP-F, 5' ACGCGTA-TGGCTGCTTCGGAGGTGTCG 3' 和 ARF2YFP-R, 5' GACGTCAGATTCTGCTTGACCAGATTCAG 3', 用高保真 PCR 扩增获得 ARF2 基因全长编码片段 (去除终止密码子 TAG)。将获得的片段与经限制性内切酶酶切的 YFP-pBA 载体连接, 从而构建出 pBA-ARF2-YFP 融合表达载体。将所得连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 筛选出阳性菌落提取质粒, 经 PCR 及酶切验证后送出测序。

1.5 番茄的遗传转化及转基因植株的鉴定

参照 Fillatti 等^[13]的方法。将重组质粒 pBA-ARF2-YFP 通过冻融法导入农杆菌 EHA105 中备用。用 15%次氯酸钠浸泡野生型番茄种子 10 min, 无菌水清洗 5 次后, 置于 1/2 MS 培养基上暗培养, 露白后转于光照下培养。待子叶展开后, 剪下子叶置于预培养基上培养 2 天。将带有重组质粒的农杆菌置于 28℃ 震荡培养箱中过夜培养, 室温下 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。然后用诱导培养基稀释的农杆菌浸染预培养 2 天的子叶 15 min。将子叶上的多余菌液吸干后, 转到共培养基上培养 2 天, 然后转到含有 100 mg/L 除草剂 Basta 的再生培养基上继代培养, 每 2~3 周更换一次培养基。待不定芽长出后转移到生根培养基上进行生根培养。经 PCR 验证, 将阳性植株移入土壤后放入温室进行培养。

以阳性的番茄转化苗叶片为材料, 提取番茄基因组 DNA. 以 DNA 为模板, YFP-pBA 质粒为阳性对照, 同时用野生型番茄 DNA 作为阴性对照, 用 YFP-F, 5' GCGACGTAAACGGCCACAAGT 3' 和 YFP-R, 5' CAGCTCGTCCATGCCGAGAGT 3' 引物进行转基因植株的 PCR 鉴定, PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 10 min.

1.6 亚细胞定位

参考 Wang 等^[14]的方法. 将 T1 代转基因番茄种子灭菌后置于 1/2 MS 培养基上于黑暗中萌发, 然后取根尖于 0.5 mol/L EDTA 中裂解 5 min, 清水漂洗后于 DAPI 染液里浸染 5 min, 制作临时装片, 放于倒置显微镜(Leica DMI6000 B-Inverted Microscopes)下观察细胞中的荧光.

2 结果与分析

2.1 SIARF2 的理化特性和胞内定位预测

ProParam 预测显示, *SIARF2* 基因共编码 845 个氨基酸, 蛋白质的分子式为 $C_{4118}H_{6436}N_{1180}O_{1278}S_{34}$, 相对分子质量为 96.0135 ku, 理论等电点是 6.30. 理论推导半衰期大于 10 h, 不稳定参数为 54.72, 属于不稳定蛋白质.

ARF2 蛋白中相对含量比较多的氨基酸是 Ser (92 个, 10.9 %)、Leu(65 个, 7.7 %)、Gly(61 个, 7.2 %)、Pro(59 个, 7.0 %)、Val(56 个, 6.6 %)、Ala(53 个, 6.3 %)、Glu(53 个, 6.3 %); 总的带负电荷的残基(Asp+Glu)为 105; 总的带正电荷的残基(Arg+Lys)为 96, 蛋白质的亲水性平均数为 -0.595, 是可溶性蛋白质.

采用 WoLF PSORT、BaCelLo、SubLoc 3 种不同的网络工具进行 *SIARF2* 亚细胞定位预测, 分析结果均指示 ARF2 在细胞中最可能的定位是在细胞核中. SubLoc 显示预测可靠性指数为 3, 准确性为 84%. BaCelLo 预测 ARF2 直接进入细胞核, 或先进入细胞质再进入细胞核.

2.2 ARF2 结构域分析与氨基酸同源性分析

多数生长素应答因子由 3 种典型结构域组成: N 端的 DNA 结合域(DBD), 能跟生长素应答基因启动子序列中的 AuxRE 特异结合, C 端中与 Aux/IAA 蛋白结构域 III 和 IV 相似的 Aux/IAA 结构域, 能使 ARFs 和 Aux/IAA 蛋白形成同源或异源二聚

体, 以及位于两者之间不保守的中间区域(MR)^[1]. Pfam、SMART 和 CDD 数据库的分析结果显示, *SIARF2* 氨基酸序列的 146~248 位是 B3 DNA 结合域(Pfam profile PF02362), 613~812 位是 AUX/IAA 结构域(Pfam profile PF02309). 在 DNA 结合域和 AUX/IAA 结构域之间的不保守中间区域中, 272~354 位是生长素应答因子功能结构域(Pfam profile PF06507, 图 1). *SIARF2* 结构域符合 ARF 家族的典型特征.

在基因组数据库中查找得到与 *SIARF2* 同源的葡萄、蓖麻、木薯、拟南芥和水稻等物种序列, 选取其 *E* 值为 0 的序列【卷柏(*Selaginella moellendorffii*)SM00001G05890 的 *E* 值为 10^{-165} 】应用 DNAMAN 进行氨基酸序列比对分析. *SIARF2* 与葡萄的同源性是 70.08%, 与木薯的同源性是 66.94%, 与蓖麻的同源性是 64.39%, 与拟南芥和梗稻的同源性分别为 60.87%和 54.64%. 图 1 展示部分植物种类 ARF2 比对结果. 从图 1 中可见, 番茄 *SIARF2* 与葡萄、蓖麻、木薯、拟南芥、水稻 ARF2 或 ARF2-like 氨基酸序列在保守区域的同源性很高.

应用 MEGA4.1 软件^[15]对 16 种植物 ARF2 或 ARF2-like 氨基酸序列进行系统发育分析, 得到的结果见图 2. 由图 2 可见, 可以把 ARF2 或 ARF2-like 序列分为三类: 番茄、蓖麻、木薯、毛果杨、葡萄、苹果、百脉根、蒺藜苜蓿、大豆、拟南芥、玉山筷子芥聚为一类, 均为双子叶植物; 高粱、玉米、短柄草、水稻聚为一类, 都是单子叶植物; 处于裸子植物和低等植物之间的卷柏自成一类. 这个分类与形态学分类相一致. 图 3 中显示 *SIARF2* 与拟南芥 ARF2 位于较近的分支点上, 亲缘关系非常密切, 推测 *SIARF2* 功能与拟南芥相似, 其在番茄生长发育进程中起重要作用.

2.3 ARF2 基因 cDNA 编码区的扩增和回收

以测序后含有 *SIARF2* 基因质粒 DNA 为模板, 用带有酶切位点的引物 ARF2YFP-F 和 ARF2YFP-R 进行 PCR 扩增, 得到与预期的 *SIARF2* 基因 cDNA 编码区大小一致的约 2 500 bp 左右的特异条带(图 3), 测序结果表明, 该片段与 *SIARF2* 编码区序列一致, 编码 845 个氨基酸. 采用柱式 DNA 胶回收试剂盒回收条带备用.

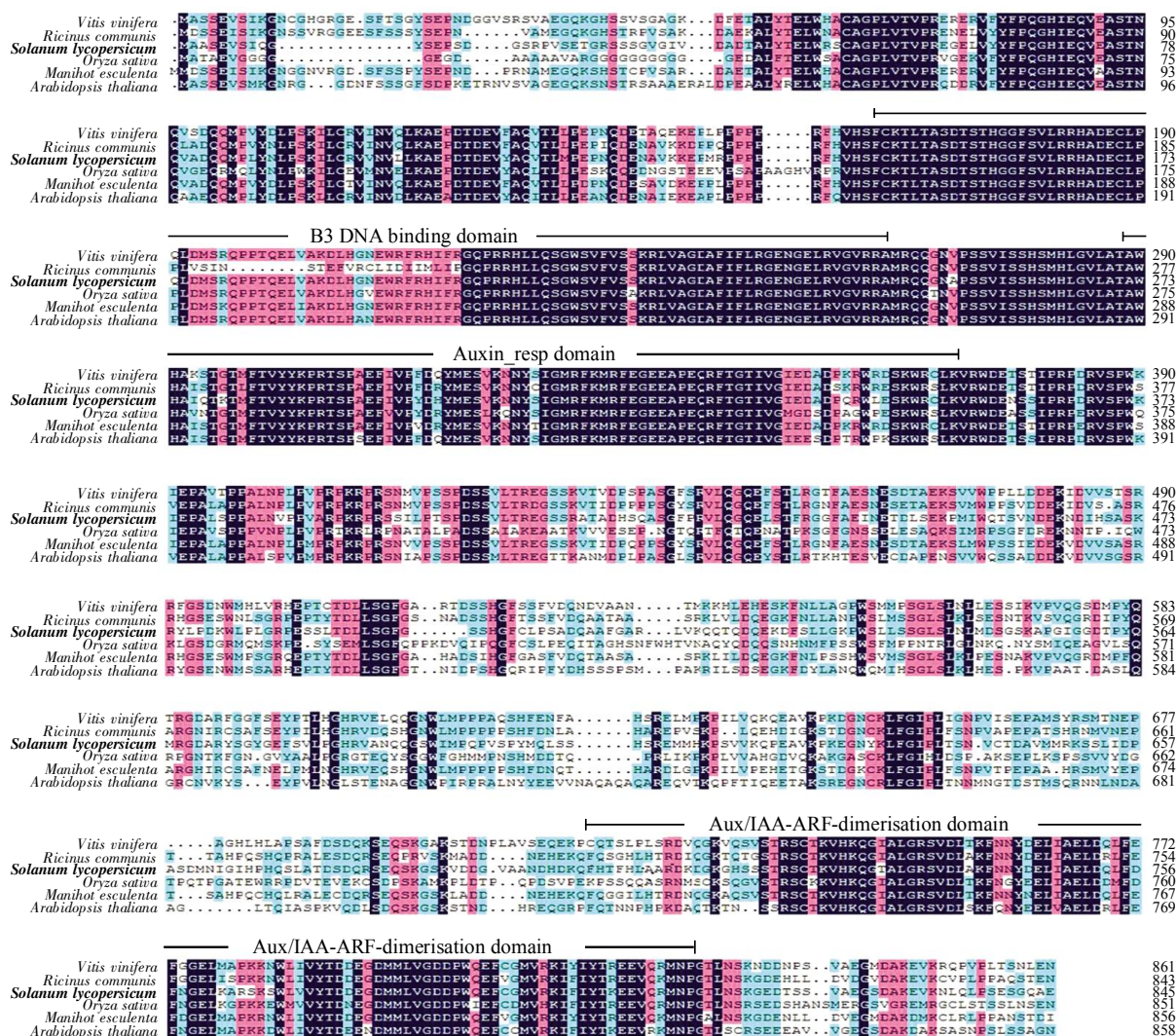


Fig. 1 Multiple sequence alignment of ARF2 in tomato and other plants

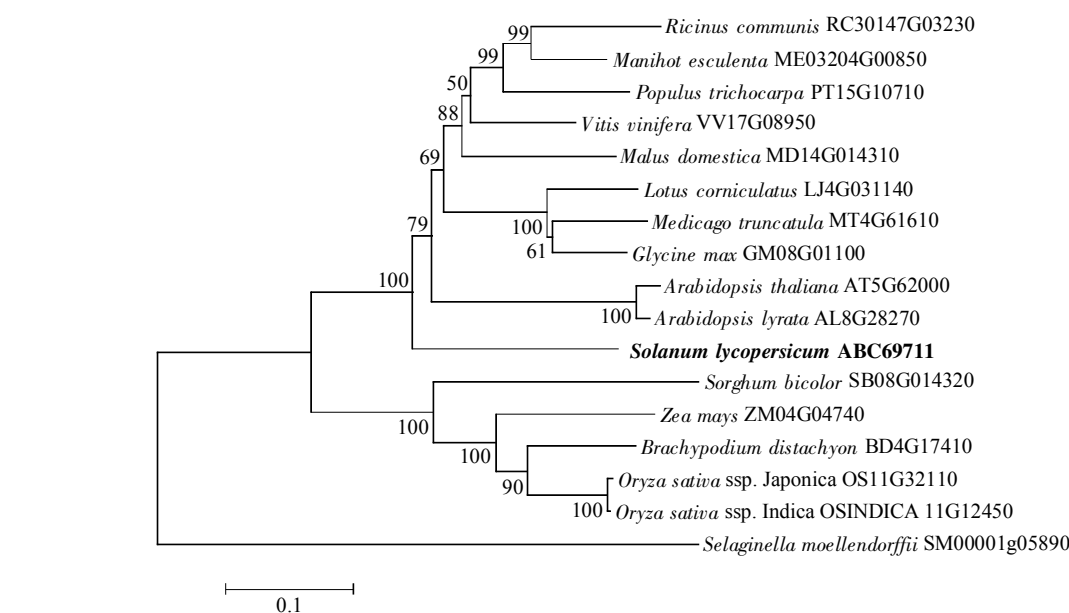


Fig. 2 Phylogenetic analysis of ARF2 proteins

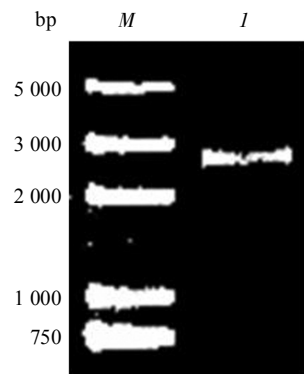


Fig. 3 Amplification of *SlARF2* ORF by PCR
M: DNA marker DL2000 plus; *I*: PCR amplicon of *SlARF2* ORF.

2.4 pBA-ARF2-YFP 融合蛋白表达载体构建

本研究将 YFP 融合到目标基因的下游，使之处于同一个读码框中。将在含除草剂 Basta 的 LB 平板上筛选到的转化子过夜培养，提取重组质粒 pBA-ARF2-YFP，用 *Mlu* I 和 *Aat* II 双酶切和 PCR 扩增进行鉴定，产物经琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示，PCR 扩增和双酶切反应在 2 500 bp 附近都出现单一条带，片段大小与预期 *ARF2* 编码框大小一致(图 4)，说明重组载体构建成功。

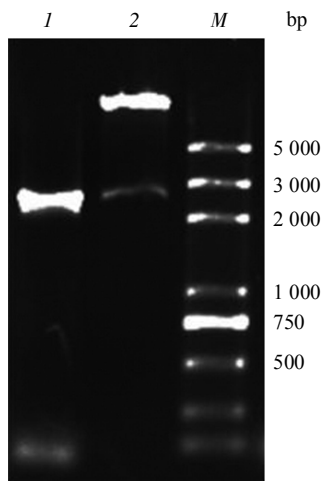


Fig. 4 PCR analysis and restriction analysis of pBA-ARF2-YFP
M: DNA Marker DL2000 plus; *I*: PCR amplification products; 2: Restriction products.

2.5 ARF2-YFP 转基因番茄植株的获得及鉴定

通过冻融法将重组质粒 pBA-ARF2-YFP 转化进农杆菌 EHA105，然后通过农杆菌介导的叶盘法获取番茄转基因植株。转化获得的番茄转基因植株移栽成活后，以叶片为材料提取基因组 DNA，用 YFP-F 和 YFP-R 引物对番茄转基因植株进行 PCR 初步鉴定，检测结果如图 5 所示。由图 5 可见，阳性转基因植株均能扩增出与正对照片段大小一致的特异条带，而作为阴性对照的野生型番茄植株无扩增条带。

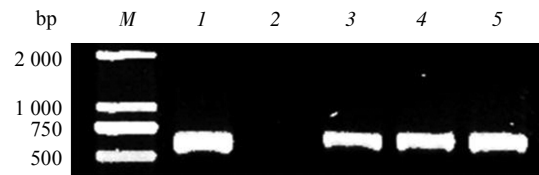


Fig. 5 PCR analysis of transgenic tomato plants
M: DNA marker; *I*: Positive control; 2: Wild type tomato; 3 ~5: Transgenic tomato plants.

2.6 ARF2 的亚细胞定位

将得到的 ARF2-YFP 阳性转基因植株的 T1 代种子于 24℃ 黑暗中萌发后，取根尖裂解、DAPI 染色后置于荧光显微镜下观察，结果如图 6 所示。图 6a, b, c 展示对照空 YFP 在细胞内分布情况，图 6d, e, f 和图 6g, h, i 展示 ARF2-YFP 在细胞中的分布状况。DAPI 是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料，从图 6b, e, h 的 DAPI 染色结果可以看到荧光主要集中在细胞核，表现为蓝色亮点，在质体中也有 DAPI 荧光出现。图 6g 显示空 YFP 的黄色荧光分布在细胞质中，而图 6h, i 则显示 ARF2-YFP 融合蛋白的黄色荧光仅出现在细胞核里。这表明 ARF2 主要定位在细胞核中。

3 讨 论

本研究通过结构域分析发现，*SlARF2* 具有 ARF 家族基因的所有序列特征(DNA 结合域、AUX/IAA 结构域和中间非保守结构域)，表明它属于番茄中 ARF 家族的一个成员。ARF 家族成员的

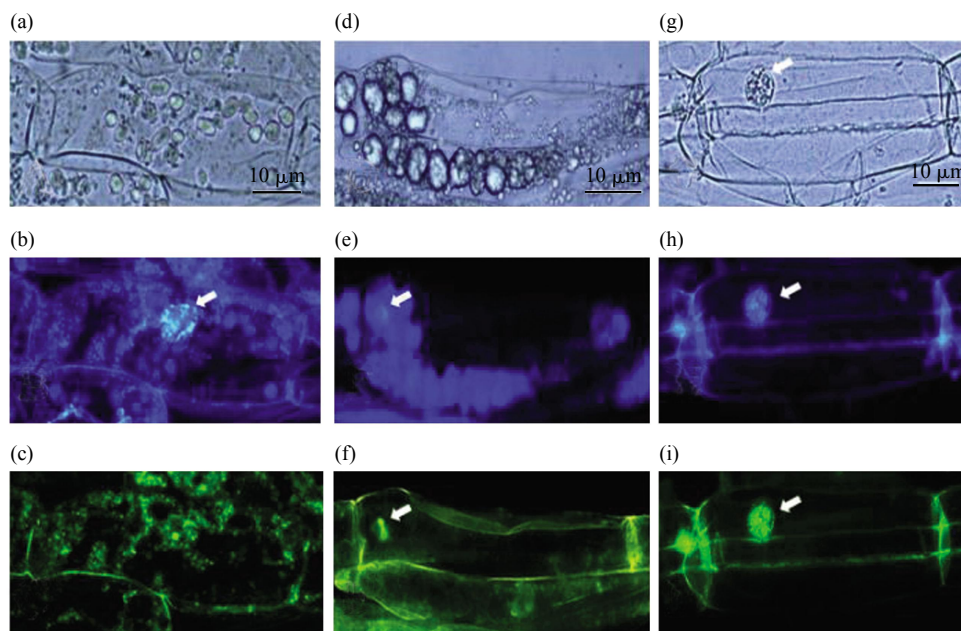


Fig. 6 Subcellular localization of ARF2

(a, b, c) YFP-pBA empty vector. (d, e, f) and (g, h, i) pBA-ARF2-YFP fusion vector. (a, d, g) Visible light micrographs. (b, e, h) DAPI micrographs. (c, f, i) YFP micrographs. Arrow indicates the nucleus.

生物学功能取决于其中间结构域的氨基酸组成，中间区域富含谷氨酰胺时，即起转录激活作用，若该区域富含其他氨基酸(如脯氨酸和丝氨酸)，则起转录抑制作用^[16]。拟南芥 ARF2 因中间区域富含丝氨酸、脯氨酸、亮氨酸和 / 或甘氨酸，而认为其是转录抑制子^[17]。SIARF2 在两个保守域之间拥有富含丝氨酸、亮氨酸、甘氨酸和脯氨酸残基的非保守域，由此推测 SIARF2 可能具有转录因子的抑制功能。

进一步的氨基酸序列相似性分析发现，SIARF2 与拟南芥 ARF2 一致性为 60.87%。系统发育树分析表明，SIARF2 与拟南芥 ARF2 处于同一分支，在进化关系上非常接近。在拟南芥中，ARF2 与多种表型相关，通过负调节生长素信号通路下游基因转录来实现细胞生长和衰老的延迟^[2-5]。由于序列的同源性往往与功能的相似性一致，上述生物信息学分析结果预示 SIARF2 可能与拟南芥 ARF2 具有相似功能。

亚细胞定位预测提示 SIARF2 定位于细胞核中。本研究克隆了 SIARF2 基因，构建了 pBA-ARF2-YFP 融合表达载体，经遗传转化野生型番茄后得到转基因阳性植株，通过荧光定位观察，证实 SIARF2 定位于细胞核内。这与拟南芥 ARF2 亚细

胞定位的结果一致^[4]。

张长青等^[18]通过开发转录调控元件识别工具，构建转录调控模型，发现生长素和油菜素内酯信号在转录因子 ARF 水平上相交。在拟南芥幼苗的光形态建成过程中，Vert 等^[9]研究发现：受 BR 调节的 BIN2 激酶，通过使 ARF2 磷酸化，抑制 ARF2 的 DNA 结合活性，从而调节 ARF2 的转录活性。Li 等^[7]研究发现，ARF2 能使 *hookless1* 突变体幼苗恢复形成顶端弯钩，乙烯会使 ARF2 含量减少，而光照则会增加 ARF2 的含量。由此认为 ARF2 是植物体中多种信号通路中的重要节点^[9-10]。在番茄果实呼吸跃变成熟过程中，乙烯起着非常重要的作用。在拟南芥幼苗的光形态建成过程中，ARF2 受乙烯和光照的拮抗调控。由此我们推测，在呼吸跃变型果实成熟过程中，ARF2 可能因光照和乙烯的影响而调节着番茄的果实成熟。

对番茄 ARF2 生物信息学分析和亚细胞定位观察的结果，为进一步阐释 SIARF2 的生物学功能提供了可资借鉴的信息。后续工作将构建番茄 ARF2 基因的 RNA 干涉载体，由农杆菌介导的叶盘法转入野生型番茄，以期获得转基因阳性植株再进行表型分析，从而进一步明确 ARF2 对番茄果实发育和成熟的调控机制。

参 考 文 献

- [1] Guilfoyle T J, Hagen G. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, **10**(5): 453–460
- [2] Okushima Y, Mitina I, Quach H L, *et al.* Auxin response factor 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J*, 2005, **43**(1): 29–46
- [3] Ellis C M, Nagpal P, Young J C, *et al.* Auxin response factor 1 and auxin response factor 2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 2005, **132**(20): 4563–4574
- [4] Schruff M C, Spielman M, Tiwari S, *et al.* The Auxin response factor 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, 2006, **133**(2): 251–261
- [5] Hughes R, Spielman M, Schruff M C, *et al.* Yield assessment of integument-led seed growth following targeted repair of auxin response factor 2. *Plant Biotechnology J*, 2008, **6**(8): 758–769
- [6] Lim P O, Lee I C, Kim J Y, *et al.* Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Experimental Botany*, 2010, **61**(5): 1419–1430
- [7] Li H, Johnson P, Stepanova A, *et al.* Convergence of signalling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 2004, **7**(2): 193–204
- [8] Nemhauser J L, Mockler T C, Chory J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signalling in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 2004, **2**(9): 1460–1471
- [9] Vert G, Walcher C L, Chory J, *et al.* Integration of auxin and brassinosteroid pathways by auxin response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(28): 9829–9834
- [10] Stewart J L, Nemhauser J L. Do trees grow on money? Auxin as the currency of the cellular economy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, **2**(2): a001420
- [11] 刘志勇, 王孝宜, 高建昌, 等. 番茄 S-腺苷蛋氨酸脱羧酶基因 *SISAMDC1* 的克隆与序列分析. *园艺学报*, 2008, **35**(8): 1137–1146
Liu Z Y, Wang X X, Gao J C, *et al.* *Acta Horticulturae Sin*, 2008, **35**(8): 1137–1146
- [12] 王丽娟, 田颖川, 何朝族. 新基因水稻 *OsLSD1* 的克隆及拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因家族的生物信息学分析. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(3): 268–274
Wang L J, Tian Y C, He C Z. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(3): 268–274
- [13] Fillatti J J, Kiser J, Rose R, *et al.* Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *BioTechnology*, 1987, **5**(7): 726–730
- [14] Wang S H, Liu J K, Feng Y Y, *et al.* Altered plastid levels and potential for improved fruit nutrient content by downregulation of the tomato DDB1-interacting protein CUL4. *Plant J*, 2008, **55**(1): 89–103
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596–1599.
- [16] Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T J. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, 2003, **15**(2): 533–543
- [17] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(10): 5844–5849
- [18] 张长青, 王 进, 朱怀球, 等. *CYP72B1* 基因和 *AUR3* 基因响应光、生长素和油菜素内酯的转录调控机制研究. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1215–1221
Zhang C Q, Wang J, Zhu H Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1215–1221

Bioinformatic Analysis and Subcellular Localization of *Solanum lycopersicum* ARF2*

FENG Yuan-Yuan, HOU Pei, LI Ying-Nan, LIU Yong-Sheng**

(Key Laboratory for Bio-resource and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences
and State Key Laboratory of Hydraulics and Mountain River Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract Auxin response factors (ARFs) are important transcription factors involved in auxin signal transduction pathway. In order to elucidate the function of tomato *ARF2*, we isolated the *SlARF2* gene and analyzed its molecular features, in addition, we observed the subcellular localization of ARF2 in transgenic tomato plants. Physicochemical properties and molecular features of ARF2 were predicted by bioinformatic approaches including physical and chemical properties analysis, hydrophobicity analysis, domain analysis, phylogenetic tree analysis and subcellular localization analysis. Moreover, the full-length of *SlARF2* gene was amplified by RT-PCR, and a binary vector consisting of ARF2 fused with the yellow fluorescent protein (YFP) coding sequence was further constructed. Using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation, the recombinant vector was transformed into wild-type tomato, and the transgenic tomato plants were confirmed by PCR. The roots of transgenic tomato seedlings were observed under a fluorescence microscope. Bioinformatic analysis showed that the *SlARF2* is an unstable soluble protein, which is rich in Ser, Gly, Pro and Leu residues, and it has typical structure and functional domain of ARF family. Tomato ARF2 shares 70.08 %, 66.94 %, and 60.87 % similarity in amino acid sequences with grapes, cassava and *Arabidopsis*, respectively. Analyses of restriction enzyme digestion and sequencing confirmed the expression vector pBA-ARF2-YFP was successfully constructed. PCR results showed the fusion protein was expressed in transgenic tomato plants. The subcellular localization of *SlARF2* was found mostly in the nucleus. *SlARF2* has the key characteristics of transcription factor, which is localized in the nucleus, and it might play a pivotal role in tomato fruit development and ripening. This might provide references for studying the function of *SlARF2* gene.

Key words ARF2, bioinformatic analysis, construction of expression vector, subcellular localization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00197

*This work was supported by grants from The National Science Fund of China for Distinguished Young Scholars (30825030), The National Natural Science Foundation of China (90717110), Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA10Z122) and Doctor Fund of Xinjiang Construction Corps (2008JC06).

**Corresponding author.

Tel: 86-13808030238, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn

Received: May 10, 2011 Accepted: August 22, 2011