

· 中药资源研究 ·

青天葵 *F-box* 基因的克隆及其与 ASK1 蛋白互作分析

黎斯敏, 左紫梅, 詹若挺, 何瑞(广州中医药大学中药学院, 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 从濒危药用植物青天葵(*Nervilia fordii*)中克隆 *F-box* 基因, 为寻找解决青天葵资源紧缺的方法提供依据。**方法** 从青天葵转录组中筛选得到 2 个 *F-box* 基因的核心片段, 以 RACE 技术获得基因的全长并克隆其编码区; 通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)进行组织表达模式分析; 利用酵母双杂交实验验证 *F-box* 蛋白的 *F-box* 区域与拟南芥 ASK1 蛋白的互作情况。**结果** 从青天葵中克隆到 *F-box* 基因 *NfFBL3* 和 *NfFBL4*, 它们的开放阅读框(open reading frames, ORF)分别长 1 974、1 833 bp, 分别编码 657、611 个氨基酸。二者均包含 *F-box* 保守功能结构域, C 端具有多个重复亮氨酸序列(Leucine rich repeats, LRRs); *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 蛋白均为不稳定的疏水蛋白, 定位于细胞核, 无信号肽及切割位点。系统进化分析表明, *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 分别与 *F-box*/LRR-repeat protein 3 蛋白、*F-box*/LRR-repeat protein 4 蛋白聚在一起。二者均在青天葵的块茎中表达量较高。酵母双杂交实验中 *NfFBL3* 的 *F-box* 区域能与拟南芥 ASK1 蛋白互作, 而 *NfFBL4* 不与 ASK1 蛋白互作。**结论** 该研究从青天葵中克隆得到 2 个 *F-box* 基因, 其中 *NfFBL3* 编码的蛋白可与拟南芥 ASK1 蛋白发生互作, 为进一步研究青天葵中 Skp1-Cullin-*F-box*(SCF)复合体的功能提供科学依据。

关键词: 青天葵; *F-box*; 生物信息学; 表达模式分析; RACE 技术; 酵母双杂交实验

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0845-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.014

Cloning of *F-box* Genes from *Nervilia fordii* and Analysis of Their Interaction with ASK1 Protein

LI Simin, ZUO Zimei, ZHAN Ruoting, HE Rui (Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, School of Pharmaceutical Science; Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To clone *F-box* genes from the endangered medicinal plant *Nervilia fordii*, and provide a certain scientific basis for finding a solution for the resource shortage of *N. fordii*. **Methods** The core fragments of two *F-box* genes were screened from the transcriptome of *N. fordii*, the full length of the genes were obtained by RACE technique and their coding regions were cloned; the tissue expression patterns were analyzed by fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR). The yeast two-hybrid experiment was used to detect the interaction between the *F-box* regions domains of the proteins and the *Arabidopsis* ASK1 protein. **Results** The *F-box* genes *NfFBL3* and *NfFBL4* were cloned from *N. fordii*. Their open reading frames (ORFs) were 1 974 bp and 1 833 bp, encoding 657 and 611 amino acids, respectively. *NfFBL3* and *NfFBL4* contain *F-box* conserved functional domains and leucine rich repeats (LRRs). They were both unstable hydrophobic proteins, located in the nucleus and none of them had signal peptides or cleavage sites. Phylogenetic analysis showed that *NfFBL3* and *NfFBL4* clustered with *F-box*/LRR-repeat

收稿日期: 2020-12-14

作者简介: 黎斯敏, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源可持续利用与开发研究。Email: 1456794816@qq.com。通信作者: 何瑞, 女, 博士, 研究方向: 中药资源可持续利用与开发研究。Email: ruihe@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省省级乡村振兴战略(农业科技创新及推广体系建设)专项——广东省现代南药产业技术体系创新团队(粤财农[2020]100 号)。

protein 3 and F-box/LRR-repeat protein 4, respectively. Both of them expressed highly in the tubers of *N. fordii*. The F-box domain of NfFBL3 could interact with ASK1 protein from *Arabidopsis thaliana*, but NfFBL4 could not interact with ASK1 protein in yeast two-hybrid experiment. **Conclusion** In the current study, two *F-box* genes were cloned from *N. fordii*, and the protein encoded by *NfFBL3* could interact with ASK1 protein from *Arabidopsis thaliana*, providing a scientific basis for further study on the function of SKP1-Cullin-F-box (SCF) complex in *N. fordii*.

Keywords: *Nervilia fordii*; *F-box*; bioinformatics analysis; expression pattern analysis; RACE; yeast two-hybrid experiment

泛素化是调控真核生物许多生理过程的关键环节,该过程涉及到泛素化连接酶 E3 (ubiquitin ligase, E3)。E3 可分为几个大的蛋白家族,其中 Skp1-Cullin-F-box 复合体(SCF)是最大的且研究较为透彻的家族。而 F-box 蛋白是 E3 连接酶复合体中的关键蛋白之一,在 SCF 复合体中负责结合 SKP1/ASK1 蛋白和特异性识别底物^[1]。研究发现 F-box 蛋白能参与植物激素信号转导、光信号传导、调控侧根和分枝的形成、叶片衰老及花的发育等生长发育过程,且在干旱、盐、重金属等生物或非生物胁迫应答等方面发挥重要作用^[2-5]。迄今为止已从人^[6]、果蝇^[7]、线虫^[8]等中鉴定出大量的 F-box 蛋白。植物中的 F-box 蛋白数量很多,目前已在拟南芥中发现 1 400 多个 F-box 蛋白^[9],水稻中有 600 多个^[10],谷子中有 500 多个^[11]。随着研究的深入,已陆续从其他物种如小麦^[12-14]、铁皮石斛^[15]、紫花苜蓿^[16]、葡萄^[17-18]、胡杨^[19]、沙田柚^[20]等植物中发现 F-box 蛋白并对其进行不同程度的研究,为研究非模式植物中的 F-box 蛋白提供了参考。

多年生兰科植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.] 又称青天葵,其叶或全草为岭南药材青天葵的来源,具有清热润肺、解毒消肿等功效,临床上常用于治疗小儿呼吸道感染等肺部疾病^[21]。青天葵多适合生长在石灰岩地带的荫蔽、潮湿的环境,其种子无胚乳,一般以块茎进行无性繁殖,繁殖系数极低。因过度采挖和生态环境恶化,青天葵的野生资源日渐匮乏,已成为稀有濒危物种^[22-23]。由于 F-box 蛋白能参与 SCF 复合体的形成,调控植物的激素信号转导、分枝的形成和生物及非生物胁迫等过程,研究青天葵中的 F-box 蛋白在生长发育过程中的功能,可为解决青天葵的资源紧缺问题提供一定的思路。在前期已获得青天葵转录组数据^[24]的基础上,本实验通过 RACE 技术克隆青天葵两个 *F-box* 基因,

并通过生物信息学分析、qRT-PCR 和酵母双杂交技术,研究青天葵两个 *F-box* 基因的组织表达模式及其编码蛋白的基本特性和互作蛋白,以期能明确青天葵 F-box 蛋白是否参与该植物中的 SCF 复合体的形成,从而为研究青天葵中 SCF 复合体调控青天葵的生长发育和激素传导奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所用植物材料青天葵为广西壮族自治区中医药研究院中药资源研究所黄云峰副研究员采集并鉴定为兰科植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.], 于广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心实验室培育。

1.2 试剂 Y2HGold Competent Cell(上海唯地生物技术有限公司,货号:YC1002);质粒小提试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit,货号:DP105)、pLB 背景快速克隆试剂盒(Lethal Based Fast Cloning Kit,货号:VT205)、通用型 DNA 纯化回收试剂盒(Universal DNA Purification Kit,货号:DP214)均购自天根生化科技(北京)有限公司;iScript™ cDNA Synthesis Kit(货号:1708891)购自美国 Bio-Rad 公司;SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(美国 Clontech 公司,货号:634858);DNA Markers(货号:3427A、3428A)、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(货号:6210A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus,货号:RR820Q)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 *E. coli* DH5α 感受态细胞(货号:9057),均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;OminiPlant RNA Kit(北京康为世纪生物科技有限公司,DNase I,货号:CW2598);SD/-Trp(货号:YGM003A-2)、SD/-Leu(货号:YGM003A-5)、SD/-Trp-Leu(货号:YGM003A-7)、SD/-Trp-Leu-Ade-His(货号:YGM003A-9)均购自北

京泛基诺科技有限公司; 金担子素 A (AbA, 货号: 60231ES03) 购自上海翊圣生物科技有限公司; X- α -Gal 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃半乳糖苷 (货号: MF2003-25MG) 购自上海懋康生物科技有限公司。

1.3 仪器 Gel View 1500 Pro 全自动凝胶成像系统 (广州博鹭腾生物科技有限公司); HE33、HE99X、SE250 电泳装置 (美国 Amersham 公司); OSE-260 微量分光光度计 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; VS-840-1 洁净工作台 (中国上海傅讯公司); D-1 高压灭菌锅 (北京发恩科贸公司); 5418EG822426 小型快速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 297806116 ProFlex™ PCR 仪器 (赛默飞世尔科技公司); MPPG02001 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 2-16KL 冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); DW-HL528 超低温冷冻储存箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); BG-25 干热恒温仪 (杭州朗基公司); HZQ-F100 全温度振荡培养箱 (江苏华美生化公司); GHP-9050 隔水式恒温培养箱 (上海一恒公司); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 青天葵 *F-box* 基因 cDNA 全长序列的克隆

1.4.1 青天葵 *F-box* 基因已知序列的扩增 从青天葵转录组中筛选得到与水稻 *D3*、拟南芥 *MAX2* 同源性较高的 2 条 *F-box* 序列, 分别将其命名为 *NfFBL3* 和 *NfFBL4*。参照 OminiPlant RNA Kit (DNase I) 说明书提取青天葵叶片总 RNA, 参照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录, 获得 cDNA。设计基因特异性引物 (见表 1), 扩增 *F-box* 已知片段序列, 反应体系为 cDNA 0.3 μ L; 上下游引物各 0.25 μ L; PrimeSTAR 5 μ L; ddH₂O 4.2 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。*NfFBL3* 和 *NfFBL4* 片段经回收纯化后连接至 pLB 载体, 转化至 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后, 挑取阳性菌液送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

1.4.2 青天葵 *F-box* 基因 5' 和 3' 端序列 RACE 扩增 根据克隆得到的 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 序列设计用于 RACE 扩增的 PCR 引物 (见表 1), 采用 SMARTer RACE 5/3 Kit 获得 5- 和 3-RACE-Ready cDNA。分别以 5- 和 3-RACE-Ready cDNA 为模板, 扩增 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 基因的 5' 端和 3' 端序列, PCR 体系参考说明书, PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物稀释 20 倍, 作为一轮巢式 PCR 的模板, 反应体系为: 模板 1 μ L; UPM Short 0.5 μ L;

5' NGSP (3' NGSP) 0.5 μ L; PrimeSTAR 5 μ L; ddH₂O 1.9 μ L。Touchdown PCR 程序为: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 5 个循环; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 75 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 10 个循环 (每个循环降 1 $^{\circ}$ C); 98 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。目的片段经回收纯化后连接至 pLB 载体, 转化至 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后, 挑取阳性菌液送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

1.4.3 青天葵 *F-box* 基因的开放阅读框扩增 用 DNAMAN 软件拼接 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 全长, 用 NCBI ORF Finder 预测开放阅读框 (Open reading frames, ORF), 设计相应的基因特异性引物扩增 ORF (见表 1)。PCR 体系及程序参照 “1.4.1” 项下, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C。目的片段经回收纯化后连接至 pLB 载体, 转化至 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后, 挑

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5'-3')	用途
NfFBL3-F	TGCTGCGGATTCTTGACAACATC	已知片段扩增
NfFBL3-R	CGGTTTGCCACCCATCGAATC	
NfFBL4-F	CATCTCGTCGCTGCATCTTC	
NfFBL4-R	CCTTGCCCTTCTCTACAAGAAGC	
5'-NfFBL3	ACGAGCTTCACGTCTTGCAAGCATCTC	5' RACE 扩增
5'-NGSP3	CAGCGTCATCGACGAAAAGCATCG	
5'-NfFBL4	GCTCTGGGCAACCTCTAGCAATGGCAG	
5'-NGSP4	CAAGGGCTTCATCACCAACCTATCAC	
3'-NfFBL3	TCACTGATCTGGGAATGGAGAGTCTC	3' RACE 扩增
3'-NGSP3	TGCTATAGGGATCGCATCGATCGC	
3'-NfFBL4	ACATTTGAATGTAAGCGGATGCCATC	
3'-NGSP4	ATTGCTAGAGGTGGCCAGAGCTC	
NfFBL3-F1	TCCGTAATGAAGCGAATCAGCCCT	ORF 扩增
NfFBL3-R1	ACTCGGATTTGCGACAATTGGGAC	
NfFBL4-F1	ATGAGGGGACCGATCTGATTAACA	
NfFBL4-R1	CTAAAGGTCGACACAAAGATATGAGAGG	
qNfFBL3-F	CTCCGTTTCGAGGCTCTACC	荧光定量 PCR
qNfFBL3-R	CGGCGAAGTCTCAACCACTA	
qNfFBL4-F	ACCTGTCTCTGGACTCGGA	
qNfFBL4-R	ACAGCCACGAGCAACTGATT	
actin-F	GGTGCCCTGAGGTCTGTT	内参基因
actin-R	AGGAACCAACCGATCCAGACA	
BD-AKS1-F	AGGAGACCTGCATATGATGTCTGCGAAG-AAGATTGTTGAAG	载体构建
BD-AKS1-R	GCAGTTCGACGGATCCGCTGCTTTTGATTCTTCTCTGAAGATCA	
AD-NfFBL3-F	CAGATTACGCTCATATGCTTTCCGTGGACATCTGGTGC	
AD-NfFBL3-R	CGAGCTCGATGGATCCGGAAGAGAGCGCGCG	

取阳性菌液送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

1.5 青天葵 F-box 蛋白的生物信息学分析 采用 ExPASy-ProtParam 在线工具计算目的基因编码蛋白的分子量、等电点等理化性质；分别用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测蛋白质的 2 级结构和 3 级结构；采用 Cell-PLoc 2.0 package 软件对蛋白进行亚细胞定位预测；用 SignalP 4.1 Server 和 TMHMM Server v 2.0 在线软件预测蛋白的信号肽和跨膜结构域；利用 NCBI 的 BLASTP 和 DNAMAN 对氨基酸序列进行同源检索，并用 ClustalW2 进行多序列比对，应用软件 MEGA 7.0 构建系统进化树。

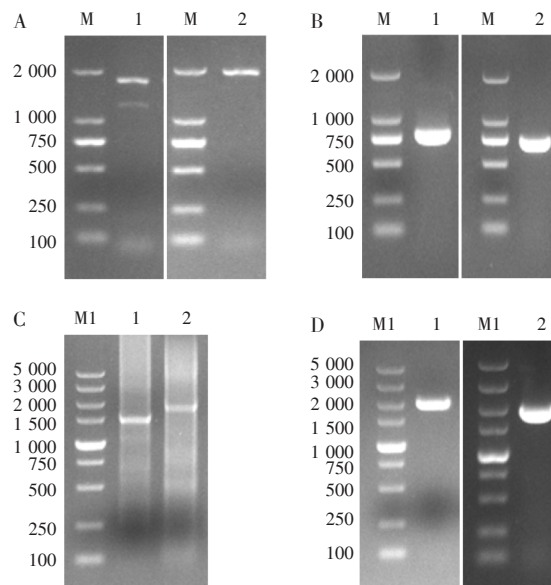
1.6 青天葵 F-box 基因的表达模式分析 利用 NCBI 设计基因特异性引物(见表 1)，按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)说明书进行 qRT-PCR 反应，从而分析 F-box 在青天葵不同组织部位中的表达模式。qRT-PCR 反应条件如下：95 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环，95 ℃ 10 s。熔解曲线条件设置为 56~95 ℃，5 s，每升高 0.5 ℃收集 1 次荧光。以青天葵 *actin* 基因作为内参，根据公式 $Q=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到相对表达量(Q)。所有样本均设 3 个技术和生物学重复，采用 SPSS 20 软件对结果进行独立样本 *t* 检验。

1.7 酵母双杂交验证 扩增含有 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点的拟南芥 *ASK1* 基因和 *NfFBLs* 基因的 F-box 结构域，分别插入 pGBKT7 和 pGADT7 载体，构建 pGBKT7-ASK1 和 pGADT7-NfFBL3-F-box 重组质粒。pGADT7-NfFBL4-F-box 由广州天一辉远基因科技有限公司合成。将重组质粒分别按说明书转化至 Y2HGold 感受态细胞，分别涂布在 SD/-Trp 和 SD/-Leu 缺陷培养基上。待板上长出菌落，点涂于 SD/-Trp、SD/-Trp+AbA、SD/-Trp+AbA+X-α-Gal 和 SD/-Leu 缺陷培养基上，观察菌落生长情况及形态，进行毒性检测和自激活检测。随后分别将诱饵质粒和捕获质粒共转入 Y2HGold 感受态细胞中进行共转验证，点涂于 SD/-Trp-Leu(DDO)、SD/-Trp-Leu-Ade-His(QDO)、SD/-Trp-Leu-Ade-His+AbA(QDO+A)、SD/-Trp-Leu-Ade-His+AbA+X-α-Gal(QDO+A+X)缺陷培养基上，确认其互作情况。

2 结果

2.1 青天葵 F-box 基因 cDNA 全长序列的克隆 见图 1。扩增得到 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 的核心长度分别为 1 892、1 732 bp 条带。利用 RACE 技术进行末端

克隆，*NfFBL3* 获得 242 bp 的 3' 端与 307 bp 的 5' 端；而 *NfFBL4* 获得 270 bp 的 3' 端与 103 bp 的 5' 端。利用 DNAMAN 软件拼接得到 NfFBL3 的全长为 2 441 bp，包含 1 974 bp 的开放阅读框，共编码 657 个氨基酸；NfFBL4 的全长为 2 105 bp，包含 1 833 bp 的开放阅读框，编码 611 个氨基酸。



注：M. DL 2 000 marker，M1. DL 5 000 marker；A-1. *NfFBL3* 已知片段扩增，A-2. *NfFBL4* 已知片段扩增；B-1. *NfFBL3* 3' RACE 扩增，B-2. *NfFBL4* 3' RACE 扩增；C-1. *NfFBL3* 5' RACE 扩增，C-2. *NfFBL4* 5' RACE 扩增；D-1. *NfFBL3* ORF 扩增，D-2. *NfFBL4* ORF 扩增

图 1 青天葵 F-box 扩增琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of F-box amplification from *N. fordii* leaves

2.2 青天葵 F-box 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 青天葵 F-box 蛋白的基本理化性质 NfFBL3 和 NfFBL4 是不稳定的疏水蛋白，见表 2。

表 2 青天葵 NfFBLs 基本理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of F-box proteins from *N. fordii*

蛋白名称	分子量/kDa	等电点	稳定性系数	脂肪系数	总平均亲水性
NfFBL3	72.1	8.56	41.77	108.68	0.107
NfFBL4	66.5	7.33	41.80	108.71	0.168

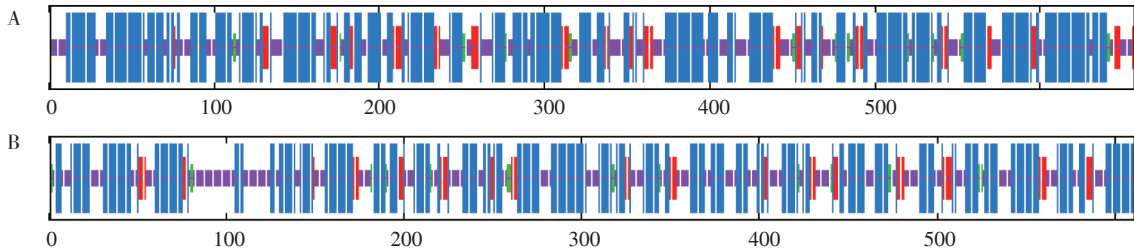
2.2.2 青天葵 F-box 蛋白的功能域预测和亚细胞定位预测 利用 NCBI 预测二者的保守功能结构域，发现二者均包含 F-box 保守功能结构域，其中 NfFBL3 具有 21 个重复亮氨酸序列 (Leucine rich repeats, LRRs) 结构域，NfFBL4 具有 16 个 LRRs 结构域。亚细胞定位预测结果表明，NfFBL3 和 NfFBL4 蛋白均

定位于细胞核。

2.2.3 青天葵 F-box 蛋白的 2 级结构、3 级结构预测 见图 2 和图 3。NfFBL3 和 NfFBL4 2 级结构的组成元件均在所占比例上由大至小依次为 α -螺旋(Alpha helix)、无规卷曲(Random coil)、延伸链(Extended strand)、 β 转角(Beta turn)。3 级结构预测结果表明, NfFBL3 以 3c6o.1 为模板建模, 一致性均在

26.1%左右, 覆盖度为 0.76; 而 NfFBL4 以 3ogl.1.B 为模板建模, 一致性为 27.35%左右, 覆盖度为 0.73。

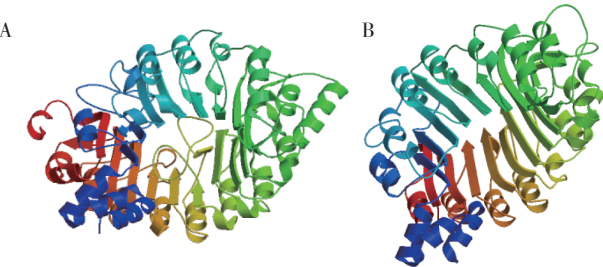
2.2.4 青天葵 F-box 蛋白的信号肽和跨膜结构域预测 青天葵 F-box 蛋白均不具信号肽和跨膜区, 为非分泌蛋白, 也是膜外蛋白。NfFBL3 和 NfFBL4 的信号肽平均值分别为 0.001 4 和 0.174 0, 不具有信号肽及切割点。



注: A. NfFBL3; B. NfFBL4

图 2 青天葵 F-box 蛋白 2 级结构预测

Figure 2 Predicted secondary structures of two F-box proteins from *N. fordii*



注: A. NfFBL3; B. NfFBL4

图 3 青天葵 F-box 蛋白 3 级结构预测

Figure 3 Predicted 3-D structures of two F-box proteins from *N. fordii*

2.2.5 青天葵 F-box 蛋白的系统进化树分析 见图 4。利用 NCBI 查找与 NfFBL3 和 NfFBL4 同源性较高的蛋白, 采用 MEGA 7.0 的邻接法(Neighbour-joining, NJ)对其进行进化树分析, 结果表明二者均与桃红蝴蝶兰和铁皮石斛等兰科植物的亲缘性较高, 其中 NfFBL3 与已发现的 F-box/LRR-repeat protein 3 聚为一支, 而 NfFBL4 则与已报道的 F-box/LRR-repeat protein 4 聚为一支。

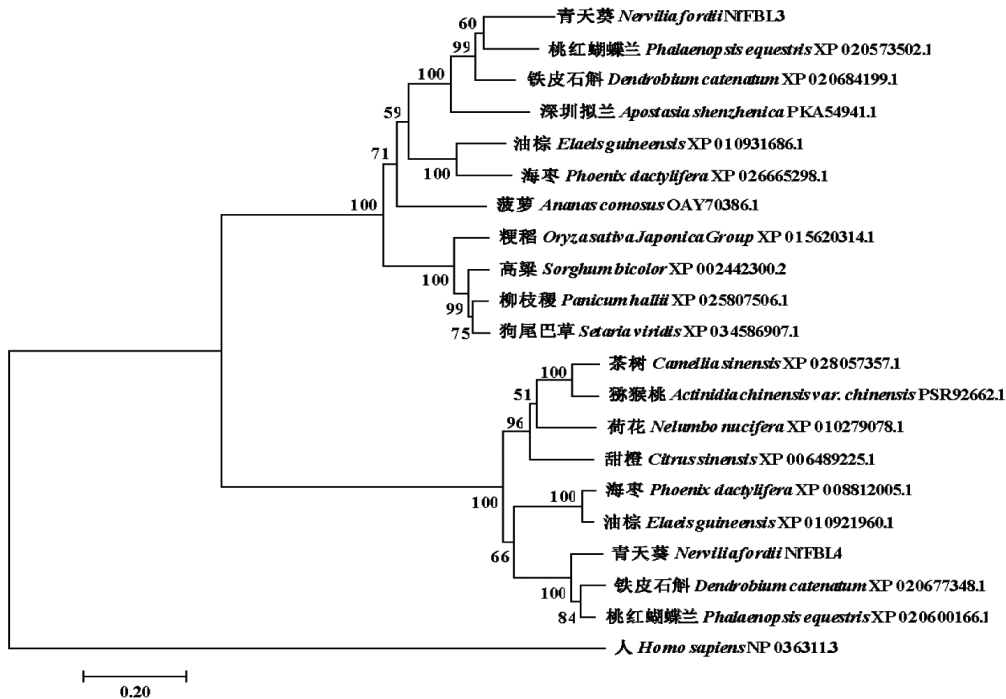
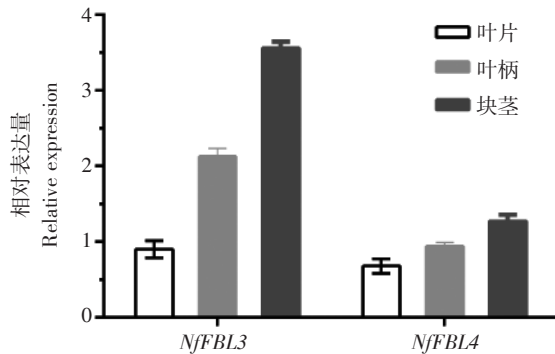


图 4 不同植物的 F-box 蛋白系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of F-box proteins from different plants

2.3 青天葵 *F-box* 基因表达模式分析 两个 *F-box* 基因在叶片、叶柄和块茎均有表达, 但叶和叶柄中的表达量均较低, 而在块茎中的表达量则显著高于叶和叶柄, 表明它们的表达具有组织部位特异性, 见图 5。

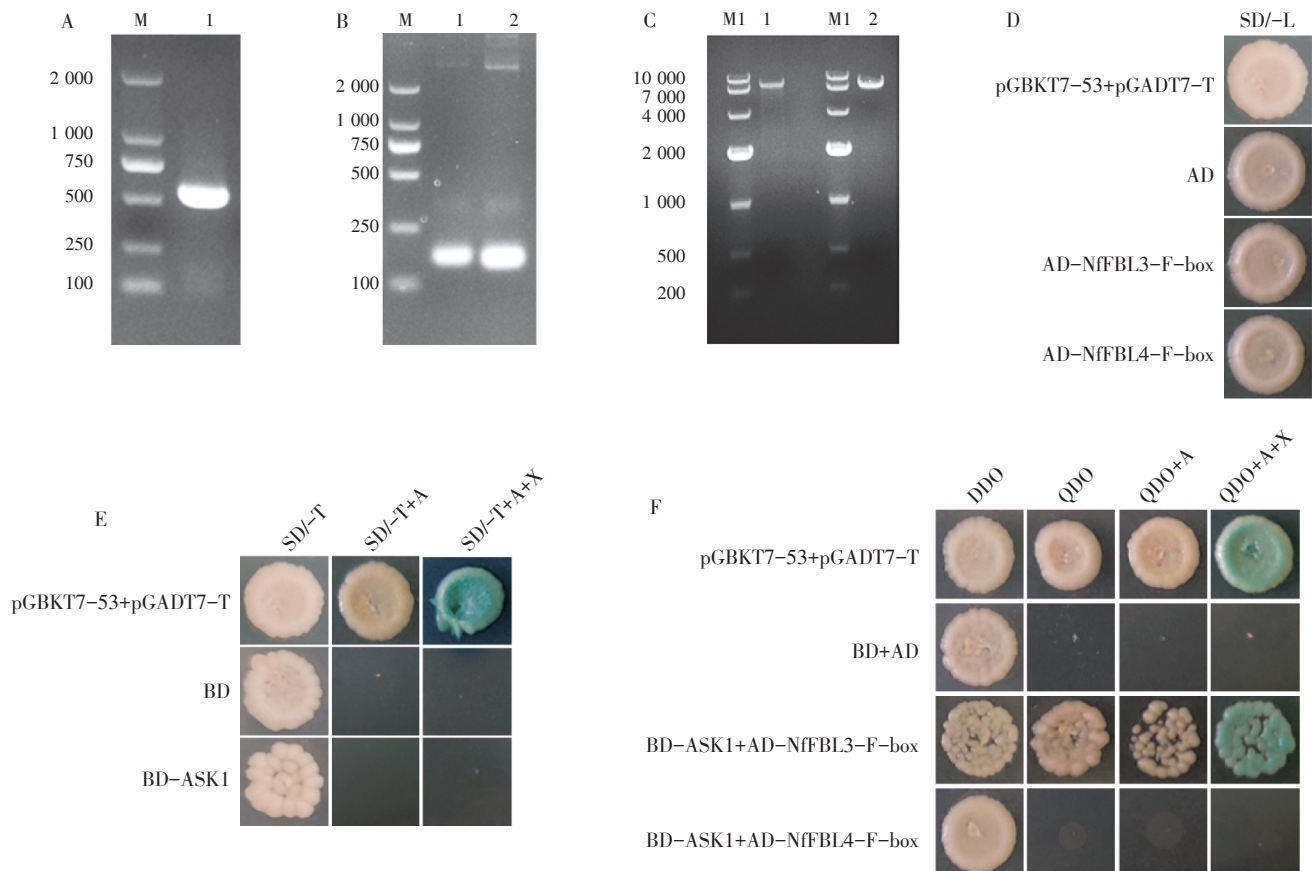


注: 不同部位两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 5 青天葵 *F-box* 基因表达模式分析 ($n=3$)

Figure 5 Tissue specific expression patterns of *F-box* genes from *N. fordii* ($n=3$)

2.4 酵母双杂交实验 见图 6。用 DNAMAN 比对发现 NfFBL3 的 F-box 结构域为 17~57 个氨基酸, NfFBL4 的 F-box 结构域为 12~52 个氨基酸。经验证, 重组质粒均对 Y2HGold 感受态细胞无毒性, 且 BD-ASK1 不具备自激活活性。捕获质粒分别与 BD-ASK1 共转至 Y2HGold 感受态细胞中, 进行一对一互作验证。结果表明, 阳性对照 (pGBKT7-53 + pGADT7-T)、阴性对照组 (BD+AD) 均能在 DDO 缺陷培养基上生长, 且阳性对照还能在 QDO 缺陷培养基上生长, 在 QDO+A+X 缺陷培养基上长出蓝色菌落。而实验组 BD-ASK1+AD-NfFBL3-F-box 和 BD-ASK1+AD-NfFBL4-F-box 均能在 DDO 缺陷培养基上生长, 但只有 BD-ASK1+AD-NfFBL3-F-box 能在 QDO+AbA 缺陷培养基上生长, 且在 QDO+A+X 缺陷培养基上长出蓝色菌落。酵母双杂交实验结果表明, NfBL3 蛋白的 F-box 结构域与拟南芥 ASK1 蛋白存在互作关系, 而 NfBL4 蛋白不与 ASK1 蛋白互作。



注: M. DL 2 000 marker, M1. DL 10 000 marker; A. BD-ASK1 扩增; B-1. AD-NfFBL4-F-box 扩增, B-2. AD-NfFBL3-F-box 扩增; C-1. pGADT7 双酶切 (*Nde* I 和 *Bam* H I), C-2. pGBKT7 双酶切 (*Nde* I 和 *Bam* H I); D. 捕获质粒的毒性检测; E. 诱饵质粒的自激活检测和毒性检测; F. 酵母双杂交结果

图 6 酵母双杂交验证 F-box 蛋白与拟南芥 ASK1 蛋白互作

Figure 6 Interaction of F-box and the *Arabidopsis* ASK1 in a yeast two-hybrid experiment

3 讨论

F-box 蛋白是 SCF 复合体中泛素连接酶 E3 的关键蛋白之一, 在植物中分布广泛, 基因序列差异大, 功能也有所区别^[25]。如 F-box 能通过调控不同的靶蛋白参与生长素(IAA)^[26]、脱落酸(ABA)^[4, 27]、茉莉酸(JA)^[28-29]、独脚金内酯(SLs)^[30-31]、赤霉素(GA)^[32]等多种植物激素信号转导通路, 从而影响植物的生长发育。F-box 蛋白家族的共同特点是 N 端含有一个约 50 个氨基酸组成的 F-box 基序, 该结构域是 F-box 蛋白与 SKP1/ASK1 蛋白结合的关键区域^[6]。而 F-box 蛋白的 C 端具有很多与蛋白相互作用密切相关的二级结构, 负责结合特异性底物。根据 C 端的二级结构的不同, 将 F-box 分为不同的亚家族, 如 FBL(富含 LRRs 结构域)、FBK(含 Kelch 结构域)、FBA(富含 F-box 相关结构域)、FBW(含 WD40 结构域)等^[2]。本研究通过 RACE 技术首次从青天葵中克隆得到 2 条 *F-box* 基因, 二者 N 端均具有 F-box 保守功能结构域, C 端具有多个 LRRs 结构域。*NfFBL3* 和 *NfFBL4* 均编码含 LRRs 的 F-box 蛋白, 属于 FBL 亚家族, 系统进化树进一步说明 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 同属于 F-box 蛋白。比对后发现二者的碱基序列相似性低, 提示二者可能具有不同的生理生化功能。二者在青天葵的叶片、叶柄和块茎中均有不同程度的表达, 但在块茎中的表达量显著高于叶片和叶柄。

F-box 蛋白通过其 F-box 结构域结合 SKP1/ASK1 蛋白参与 SCF 复合体的形成从而行使功能。ASK1 蛋白是从拟南芥中发现的 SKP1 类蛋白。如研究发现拟南芥 UFO^[33]、ORE^[34]、FOA2^[35]等 F-box 蛋白均能与 ASK1 蛋白互相作用形成 SCF 复合体, 参与不同的信号转导途径。棉花中的 GhMAX2 的 F-box 和全长均能与拟南芥 ASK1 蛋白互作^[36]; 小麦中的 TaFKOR23 和 TaSKP2A 均能与小麦 TaSkp1 和几丁质酶 2 (TaChitinase 2) 相互作用, 而 TaFKOR23 还能与 SEC1 家族运输蛋白 SLY1(TaSLY1)互作^[13-14]。这些实验结果均表明 F-box 蛋白能通过其 F-box 结构域与 SKP1 结合, 参与 SCF 复合体的形成。本研究用 *NfFBL3* 和 *NfFBL4* 的 F-box 结构域与拟南芥 ASK1 蛋白进行酵母双杂验证。结果表明, *NfFBL3* 与拟南芥 ASK1 蛋白互作参与 SCF 复合体的形成并行使功能, 而 *NfFBL4* 则不与 ASK1 蛋白互作。但已有研究表明部分 F-box 蛋白能不依赖 SKP1 蛋白发挥作用, 如已发现的 MoKA 是通过其 F-box 结构域结合 KLF7 激活转录因子, 协助其参与细胞分化过程^[37]。推测青天葵

的 *NfFBL3* 可能是通过与 SKP1 蛋白结合行使功能, 而 *NfFBL4* 可能不通过 SKP1 类蛋白行使功能。不同的 F-box 蛋白可能结合不同的 SKP1 蛋白形成 SCF 复合体从而参与不同的植物激素信号转导。本研究克隆得到青天葵的 2 个 *F-box* 基因, 其中 *NfFBL3* 蛋白能结合拟南芥 ASK1 蛋白参与 SCF 复合体的形成。青天葵一年每株只有 1 片叶子, 而 F-box 蛋白能与 SKP1 蛋白结合形成 SCF 复合体介导 SLs 的信号转导, 从而抑制植物的分蘖/分枝。本课题组已克隆得到青天葵中 SLs 的信号转导关键基因 *NfD14s*^[38], 后续可进一步研究这 2 个 *F-box* 基因是否参与到青天葵中 SLs 的信号转导过程中的 SCF 复合体形成, 为寻找解决青天葵资源紧缺的措施提供科学基础。

参考文献:

- [1] JIN J P, CARDOZO T, LOVERING R C, et al. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(21): 2573-2580.
- [2] 魏春茹, 李虎滢, 田苗苗, 等. 拟南芥 F-box 蛋白家族的功能研究进展[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(11): 2300-2308.
- [3] LECHNER E, ACHARD P, AMERIN V, et al. F-box proteins everywhere[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(6): 631-638.
- [4] QU L, SUN M, LI X, et al. The *Arabidopsis* F-box protein FOF2 regulates ABA-mediated seed germination and drought tolerance[J]. *Plant Science*, 2020, 301: 110643.
- [5] SCHWECHHEIMER C, BJORN C W, ZOURELIDOU M, et al. Examining protein stability and its relevance for plant growth and development[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 479: 147-171.
- [6] EDWARD T K, MICHELE P. The F-box protein family[J]. *Genome Biology*, 2000, 1(5): 3343-3347.
- [7] OU C Y, PI H W, CHIEN C T. Control of protein degradation by E3 ubiquitin ligases in *Drosophila* eye development[J]. *Trends in Genetics*, 2003, 19(7): 382-389.
- [8] THOMAS J H. Adaptive evolution in two large families of ubiquitin-ligase adapters in nematodes and plants[J]. *Genome Research*, 2006, 16(8): 1017-1030.
- [9] 李彦泽. 拟南芥 *F-box* 基因 *AtPP2-B11* 的功能分析及苹果 RING finger 型泛素连接酶 E3 的家族分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [10] JAIN M, NIJHAWAN A, ARORA R, et al. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1467-1483.
- [11] 霍冬英, 郑炜君, 李盼松, 等. 谷子 *F-box* 家族基因的鉴定、分类及干旱响应[J]. *作物学报*, 2014, 40(9): 1585-1594.

- [12] 魏春茹, 孟钰玉, 范润侨, 等. 小麦*F-box/LRR*类基因*TaFBL14*的抗逆相关表达模式及互作蛋白鉴定[J]. 植物生理学报, 2020, 56(4): 886–894.
- [13] 魏春茹, 孟钰玉, 范润侨, 等. 小麦*F-box/Kelch*类基因*TaFKOR23*的抗逆相关表达模式及分子互作蛋白鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 695–705.
- [14] 孟钰玉, 李虎滢, 许媛, 等. 小麦*TaSKP2A*基因抗逆相关表达分析及与其互作蛋白的筛选[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(4): 571–581.
- [15] 李欢, 黑小斌, 李依民, 等. 铁皮石斛*F-box*蛋白基因*DoSKP2A*的克隆与表达分析[J]. 中草药, 2019, 50(8): 1960–1965.
- [16] 陈秀秀, 张彤, 余倩文, 等. 紫花苜蓿*F-box*蛋白基因*MsFTL*的克隆及功能分析[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(3): 750–759.
- [17] 于兰芳, 周硕, 张双喜, 等. 葡萄*F-box*基因*VvF-box5*的基因结构与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 361–369.
- [18] 王西成, 吴伟民, 王壮伟, 等. 葡萄*F-box*基因*VvSLY1*的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(5): 959–966.
- [19] 陈英, 邵志龙, 王浩然, 等. 杨树*PeAFB*基因克隆及表达模式初步分析[J]. 林业科学, 2015, 51(8): 26–32.
- [20] 郭丹妮, 刘玉洁, 张渝, 等. 沙田柚*F-box*蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(14): 3723–3726.
- [21] 梅全喜. 青天葵的化学成分、药理作用与临床应用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(10): 2239–2241.
- [22] 文和群, 许兆然, J. Villa-Lobos, 等. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J]. 广西植物, 1993, 13(2): 110–127.
- [23] 谢月英, 谭小明, 吴庆华, 等. 广西青天葵野生资源现状[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 783–787.
- [24] 黄琼林, 何瑞, 詹若挺. 基于转录组测序的青天葵差异表达基因分析[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 687–691.
- [25] HUA Z, ZOU C, SHIU S, et al. Phylogenetic comparison of *F-box (FBX)* gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift[J]. PloS one, 2011, 6(1): e16219.
- [26] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* *F-box* protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435(7041): 446–451.
- [27] BU Q, LV T, SHEN H, et al. Regulation of drought tolerance by the *F-box* protein MAX2 in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2014, 164(1): 424–439.
- [28] DEVOTO A, NIETO-ROSTRO M, XIE D, et al. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2002, 32(4): 457–466.
- [29] XU L, LIU F, LECHNER E, et al. The SCF COI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2002, 14(8): 1919–1935.
- [30] STIRNBERG P, FURNER I J, OTTOLINE LEYSER H M. MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching[J]. The Plant Journal, 2007, 50(1): 80–94.
- [31] SHEN H, LUONG P, HUQ E. The *F-box* protein MAX2 functions as a positive regulator of photomorphogenesis in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2007, 145(4): 1471–1483.
- [32] YU H, ITO T, ZHAO Y X, et al. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(20): 7827–7832.
- [33] ZHAO D, YANG M, SOLAVA J, et al. The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*[J]. Developmental Genetics, 1999, 25(3): 209–223.
- [34] WOOH R, CHUNG K M, PARK J H, et al. ORE9, an *F-box* protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2001, 13(8): 1779–1790.
- [35] 段桂芳. 拟南芥*F-box*家族基因*FOA2*的功能初步研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2014.
- [36] ZHAO L, FANG J, XING J, et al. Identification and functional analysis of two cotton orthologs of MAX2 which control shoot lateral branching[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2017, 35(5): 480–490.
- [37] SMALDONE S, LAUB F, ELSE C, et al. Identification of MoKA, a novel *F-box* protein that modulates Krüppel-like transcription factor 7 activity[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(3): 1058–1069.
- [38] 李炎坤, 卓一南, 曾湘达, 等. 青天葵独脚金内酯信号转导关键基因*D14*的克隆与亚细胞定位分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(3): 504–513.

(编辑: 梁进权)