

青花菜 E3 泛素连接酶基因的克隆及表达分析*

裴徐梨¹, 焦鹏¹, 胡文婷¹, 郭品然¹, 荆赞革^{1,2},
唐征^{2**}, 莫丽玲¹, 徐谦², 刘院梅¹

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214; 2. 温州科技职业学院 农业与生物技术学院
浙南作物育种重点实验室, 浙江 温州 325006)

[摘要] 为探讨泛素蛋白酶体在高温胁迫下参与蛋白质降解途径相关的生理过程和功能, 以青花菜‘KUQ19-27’为试验材料进行高温胁迫(38℃)处理, 设计特异性引物从青花菜中克隆得到青花菜 E3 泛素连接酶基因并进行生物学信息分析, 并运用实时荧光定量 PCR 技术分析其表达特征。结果显示: E3 泛素连接酶基因的 ORF 长度为 1 332 bp, 编码 443 个氨基酸, 相对分子量为 48.3 kD。亲疏水性分析结果表明: 在多肽链中第 207 位氨基酸时, 亲水性最高, 为 3.38; 在肽链中第 280 位氨基酸时, 疏水性最高, 为 -4.23, 是疏水性蛋白。在青花菜 E3 泛素连接酶基因氨基酸序列中, 其 C、Y、S 值均小于 0.5, 由此预测其不具有信号肽, 不属于分泌蛋白。系统进化分析表明青花菜 E3 泛素连接酶基因与其他物种, 比如拟南芥、草莓、月季、葡萄等核苷酸序列相似性都在 60% 以上, 同甘蓝、油菜、白菜和拟南芥的进化关系较近, 同草莓、月季、菜豆、葡萄、刺菜蓟、芝麻和水桔梗的进化关系较远, 与其他物种, 如拟南芥、草莓、月季、葡萄等核苷酸序列相似性都在 60% 以上。荧光定量 PCR 技术结果表明高温处理 3 h 时, 青花菜 E3 泛素连接酶基因表达量下调 30%, 胁迫 12 h 时表达量持续下降仅为对照的 20%。研究结果可为进一步深入探讨青花菜 E3 泛素连接酶的高温胁迫响应机制提供一定的理论依据。

[关键词] 青花菜; E3 泛素连接酶; 高温胁迫; 表达特征

[中图分类号] S635.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639(2023)03-0093-05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2023.03.015

泛素蛋白酶体途径是真核生物体内具有高度选择性的蛋白质降解途径。泛素化过程由泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和 E3 泛素连接酶共同作用完成^[1]。E3 泛素连接酶根据不同的共价键结合方式, 可分为 3 类: HECT 结构域、RING 结构域和 U-box 结构域^[2]。目前, 已在番茄、辣椒、豇豆^[3]、向日葵^[4]等多种园艺作物中鉴定到泛素连接酶基因。

E3 泛素连接酶的表达受非生物和生物胁迫的诱导, 并能增强植物的抵抗能力。高温胁迫会抑制植物的生长和种子的萌芽, 而过表达 E3 泛素连接酶的转基因烟草在高温胁迫下, 植株生长和种子萌芽均比野生烟草高, 表明其在高温胁迫下具有重要的调节作用^[5,6]。高温胁迫也会使植物细胞膜的稳定性出现损害, 而过表达 E3 泛素连接酶同样能有效保护细胞膜的稳定性。拟南芥中 PUB22 和 PUB23 参与干旱胁迫响应过程, 二者可协同负调控干旱胁迫响应过程^[7]。水稻 SPL11 蛋白上存在 U-box/ARM 重复结构, 具有 E3 活性, 该基因突变使水稻呈现病斑的表型, 可提高水稻对一些细菌病原物的抗性^[8]。

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 为十字花科芸薹属一年或两年生蔬菜, 其主根粗大根系发达, 青花菜是我国大宗蔬菜种类之一并且种植面积已超过 8.7 万 hm², 每年出口量超 12 万 t^[9]。因其营养丰富具有预防心脑血管疾病、癌症、近视等疾病方面具有一定的功效而备受人们喜爱^[10], 然而青花菜在高温

* [收稿日期] 2022-9-12

[作者简介] 裴徐梨, 女, 云南个旧人, 昆明学院助理研究员, 博士, 研究方向为蔬菜分子生物学。

** [通信作者] 唐征, 男, 江西宜春人, 温州科技职业学院副教授, 硕士, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: 2037457902@qq.com。

[基金项目] 云南省科技厅基础研究专项青年项目(2019-1-C-2531800002236); 浙江省自然科学基金项目(LY18C150006); 云南省应用基础研究计划项目(2018FH001-044); 浙江省农业(蔬菜)新品种选育重大科技专项(2021C02065-4-2); 温州市科技项目(2019ZX007-2); 浙江省教育厅项目(Y202045786)。

胁迫下生长发育不良,导致产量减少^[11,12],而E3泛素连接酶可提高植物高温胁迫抗性^[13],缓解产量减少的问题。因此,本研究对青花菜E3泛素连接酶基因进行克隆和生物信息学分析,检测其在高温胁迫下的表达特性,探讨该基因在高温胁迫中的功能,以期为提高青花菜高温抗性提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以青花菜‘KUQ19-27’为试验材料。常规育苗,待幼苗五叶期时,进行高温胁迫(38℃)处理,处理时间为3h和12h,重复3次。分别取样保存于-80℃冰箱备用。

1.2 青花菜E3泛素连接酶基因的克隆

提取叶片总RNA检验合格后,采用TaKaRa公司的SYBR® Premix Ex Tap™ II试剂盒反转录cDNA第一链。根据实验室转录组unigene数据库中青花菜E3泛素连接酶的保守结构域基因序列设计特异性引物,引物的构建由软件Primer Premier 5.0完成(F:5'-ggatcttcagagatATGCCAATGTTTCAGCCGTT-3';R:5'-ct-gccgttcagacatTTATTGAATCGTTGCTGCAAGC-3')。反应体系和程序参照裴徐梨的方法^[14]。PCR产物经连接转化后,挑选阳性克隆测序。

1.3 青花菜E3泛素连接酶基因序列特征分析

利用ProtParam tool工具预测氨基酸多肽链的氨基酸组成、ORF长度、等电点、相对分子量、分子式等^[15]。利用DNAMAN工具分析多肽链的亲疏水性。使用软件SignalP 4.1 Server对E3泛素连接酶的基因进行信号肽的预测和分析。用GOR4工具,对编码蛋白的二级结构进行预测。用SWISS-MODEL预测蛋白三级结构。用NCBI-BLAST和MEGA5软件进行蛋白序列同源比对和系统进化分析。

1.4 青花菜E3泛素连接酶基因的表达特征分析

以青花菜actin(引物序列为:F:GACAACCTACAACCTCCATCAT和R:CTCATACGGTCAGCGATA)为内参基因,青花菜E3泛素连接酶的荧光定量PCR引物序列为:F:5'-GACAACCTACAACCTCCATCAT-3'和R:5'-CTCATACGGTCAGCGATA-3',反应体系和程序参照裴徐梨的方法^[16],PCR反应体系:(总量40μL),上、下游引物各2μL,2μL cDNA,14μL dd H₂O,20μL Taq mixture。扩增程序:94℃预变性5min,94℃变性30s,60℃复性50s,72℃延伸1min,36个循环,72℃延伸10min。最后利用2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 青花菜E3泛素连接酶基因的克隆

经PCR扩增得到1条特异条带(图1),经blast比对实证为青花菜E3泛素连接酶基因,该基因的开放阅读框为1332bp,推导编码443个氨基酸。

2.2 青花菜E3泛素连接酶基因的序列特征分析

根据ProtParam软件分析结果表明(图2),青花菜E3泛素连接酶基因相对分子量为48.3kD,分子式为C₂₁₃₄H₃₅₀₉N₅₈₃O₆₃₀S₂₈,理论等电量pI=7.13。

亲疏水性分析结果表明:该蛋白多肽链共有443个点位,其中多肽链中第207位氨基酸时,亲水性最高,为3.38;而多肽链中第280位氨基酸时,疏水性最高,为-4.23,是疏水性蛋白。青花菜E3泛素连接酶基因氨基酸序列中,其C、Y、S值均小于0.5,由此预测其不具有信号肽,不属于分泌蛋白。二级结构进行预测结果显示该蛋白的结构由α螺旋、伸展链和无规则卷曲组成。其中α螺旋所占比例最大,为41.99%,无规则卷曲第2,为40.18%,伸展链所占比例最小,为17.83%。三维结构预测结果显示该蛋白是由α螺旋、β折叠片和β转角等成分所组成的三维

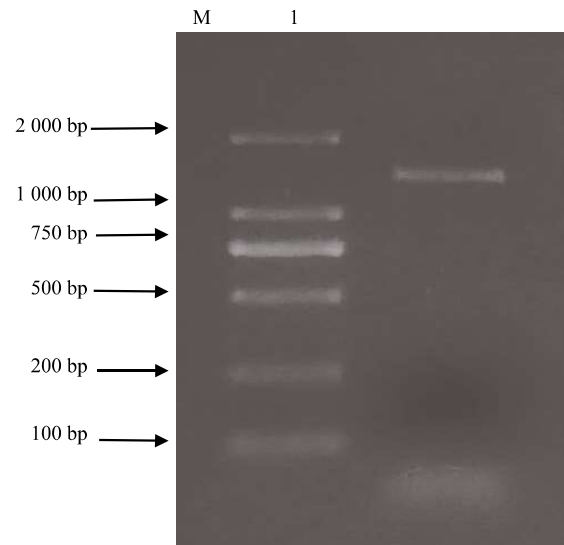


图1 RT-PCR克隆青花菜E3泛素连接酶基因

结构, 表面形成连环螺旋结构.

```

1      ATG CCAATGTTTCAGCCGTTCAAAGCGGTGGCTTCGACGGCCACGTCATAGATCTACAC
M P M F Q P F K G G G F D G H V I D L H
61     ACGGCGGTCAAAGACGGCGTCTCGGCGCGGAGATGGCGGAGAAGTCAAACCGCGGGC
T A V K D G V L G G G D G G E V K T A A
121    GTGGAGAACGAACTAGATCTCAAACGATGATCACAAACCTTGAATTACCAGAAACACCC
V E N E L D L K T M I T N L E L P E T P
181    TCGGTCTTCATCTGCCCATCTCTCTAGAGCCGATGCAAGATCCAGTCACGCTCTGCACC
S V F I C P I S L E P M Q D P V T L C T
241    GGTGACACCTACGAGAGGTCCAACATCCTCAAATGGCTTAGCTTAGGACACCGCACTTGC
G Q T Y E R S N I L K W L S L G H R T C
301    CCCACCAGATGCAAGAGCTCTGGGACGACCGCTCACCCGAACAAGACGCTTACCAG
P T T M Q E L W D D A V T P N K T L H Q
361    CTGATCCACGCTTGGTCTCGAAAAGTATGTAATGATGAAGAAACGGTCGGAGGATGTT
L I H A W F S Q K Y V M M K K R S E D V
421    CAGGGCGAGTATCGAGATCGTGGGGCGTTGAGGAAGCGAAAGGAAAGAGAAAGTT
Q G R V I E I V G A L R K A K G K E K V
481    CACGCTTTGACCGAGCTTAAGGAGTTGTGATGGCCACGATCGCTAAGAAGAGTGT
H A L S E L K G V V M A H E I A K K S V
541    GTTGACGAAGTGGAGCTTTGTCTCTCTCTTTGACTCCTTTACTTCCACGCC
V D E G G V F V I S S L L T P F T S H A
601    GTTGGATCAGAAGCTGTGGGATTTGGTTAATTTAGAGCTTGATGCTGTTTCAAACCG
V G S E A V A I L V N L E L D A V S K A
661    GGGCTGATGCAGCCCGCTAGGGTCTCGTTGATGGTCGACATGTGAACGATGGCTCGATC
G L M Q P A R V S L M V D M L N D G S I
721    GAAACGAAAATAACTGCGCGAGTTAATCGGGAGTTGGTCGAGGAGAGAGTTTCA
E T K I N C A R L I G R L V E E R G F R
781    GCAGAGCTTGTCTAGTCACAGTTTGTCTGCGGGTTAATGAGATTGGTTAAGATAGA
A E L V S S H S L L V G L M R L V K D R
841    CGGCGAAGAAGTGGTGTCTGCCAGCTTTGCCCTGTCAAATCGATTTCGGTTCATAAA
R R R S G V S P A L A L L K S I S V H K
901    CAAGTTAGAAGCTTGATGGTTAGTGTGAAGCGGTTCTCAGTTAGTTGACGCTTTCCT
Q V R S L M V S V E A V P Q L V D V L P
961    TGTTTAGGACCAGAGTGTTTGGAATCAGCTCTTTATGTTTGGACTATTGTTTGGGAT
C L G P E C L E S A L Y V L D S L C W D
1021   AACGAAGGAGTAAGTCCGTTGAAAGATTCTGTAAACACGATCCCAATACGGTTAGGTTG
N E G V T A L K D S V N T I P N T V R L
1081   CTGATGAGATATCTGAGACGTGACCGGCTACTCGGTTTCGATTCTTTGGTCGGTTTC
L M R V S E T C T A Y S V S I L W S V C
1141   AGATTAGCTTCTGAGAGTGTCTCTCTTTCGGTTGAACTTGGTTTGGCTGCTAAACTA
R L A S R E C S S L A V E L G L A A K L
1201   CTGCTTGATACAAAGTGGATGTGATCCAGCTTTGAAGCAACGTTACGCTGAGTTGTG
L L V I Q S G C D P A L K Q R S A E L L
1261   AAGCTTTGTAGTTGCATTATTCGGATACGATGTTATTCTAAATGTAAGCTTGCACCA
K L C S L H Y S D T M F I S K C K L A P
1321   ACGATTCAA TAA
T I Q *
    
```

图2 青花菜 E3 泛素连接酶基因的序列

2.3 青花菜 E3 泛素连接酶基因的同源性及进化树分析

BLAST 比对分析结果发现, 青花菜 E3 泛素连接酶氨基酸序列与甘蓝 (*Brassica oleracea*) 序列号: XP_013612569.1)、油菜 (*Brassica napus*) 序列号: CAF1716945.1)、白菜 (*Brassica rapa*) 序列号: XP_009112205.1) 的氨基酸同源性分别是 99%、99% 和 97%, 核苷酸序列相似性也都在 90% 以上; 与其他拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 序列号: NP_001330653.1)、草莓 (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*) 序列号: XP_004288267.1)、月季 (*Rosa chinensis*) 序列号: XP_024179473.1)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 序列号: XP_007155812.1)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 序列号: XP_045812150.1)、刺菜蓟 (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) 序列号: XP_024977973.1)、芝麻 (*Sesamum indicum*): 序列号: XP_020554039.1)、水桔梗 (*Doroceras hygrometricum*) 序列号: KZV29383.1) 的氨基酸同源性分别是 69%、65%、66%、65%、65%、65%、64% 和 66%, 核苷酸序列相似性都在 60% 以上。

将青花菜泛素连接酶氨基酸序列与甘蓝、油菜、白菜、拟南芥、草莓、月季、菜豆、葡萄、刺菜蓟、芝麻、水桔梗等物种的序列用 MEGA5.0 软件构建进化树进行分析, 结果如图 3 所示. 同属于十字花科的青花菜、甘蓝、油菜、白菜和拟南芥进化关系较近, 位于同一大的分支上, 表明同科的植物 E3 泛素连接酶具有较近的亲缘关系. 而草莓、月季、菜豆、葡萄、刺菜蓟、芝麻和水桔梗等进化关系较远的物种, 则聚为另一大的分支.

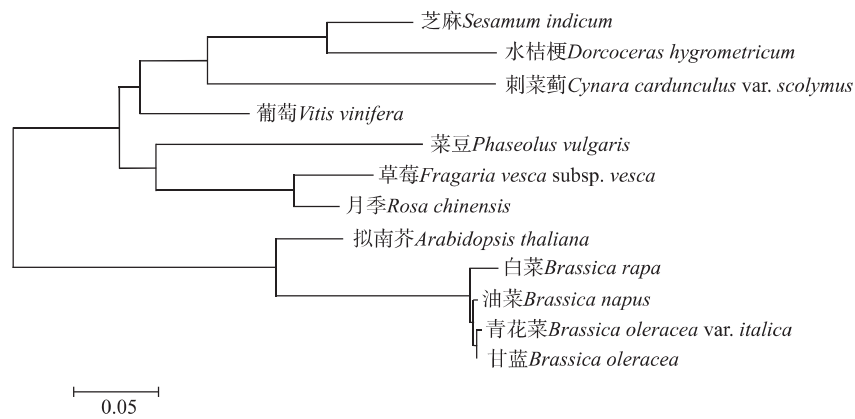


图3 青花菜 E3 泛素连接酶分子系统进化分析

2.4 青花菜 E3 泛素连接酶基因在高温胁迫下的表达特征分析

实时荧光定量 PCR 技术检测结果表明在高温处理 3 h 后, 该基因的相对表达量由 1 下降到 0.7, 减少了 30%; 在胁迫 12 h 后, 该基因的表达量持续下降, 显著低于胁迫 3 h 后的表达量, 仅为对照的 20% (图 4).

3 讨论

E3 泛素连接酶基因对于植物的生长发育和提高抗性起着重要作用. 本研究克隆到青花菜 E3 泛素连接酶基因, 其氨基酸 C 端存在 U-box 结构域, N 端则含有 ARM 重复结构, 而在某些植物 U-box 蛋白中, 如拟南芥中其 C 端含有 1 个 6~7 个 ARM 重复结构功能域, 中间含有 1 个 U-box 功能域, 是 SRK 激酶下游信号的传递因子, 能在柱头乳突细胞中特异性表达, 能促进花粉水合、萌发和花粉管生长的雌性亲和因子^[17]. ARM 功能域是由多个约含有 40 个氨基酸残基的 ARM 基序串联组成的 1 个超螺旋结构. ARM 在细胞内的信号传递过程中起作用并参与 E3 泛素化, 这与拟南芥^[18]发现的 E3 泛素连接酶基因的功能相似. 通过构建系统进化树结果表明, 它们与同科属植物同源性很高, 和其他科属的植物同源性较低, 这与其他学者在其他物种间同源性分析结论基本一致, 说明同源关系较近的植物中基因保守性更强^[19]. 依据属内同源性较高的理论, 说明 U-box 蛋白家族基因进化上比较保守, 其氨基酸序列相似度可在一定程度上说明了不同物种亲缘关系远近. 本研究中的青花菜 E3 泛素连接酶基因与拟南芥 *AtPUB* 基因在同一类型进化枝上, 表明二者可能行使类似的功能^[20].

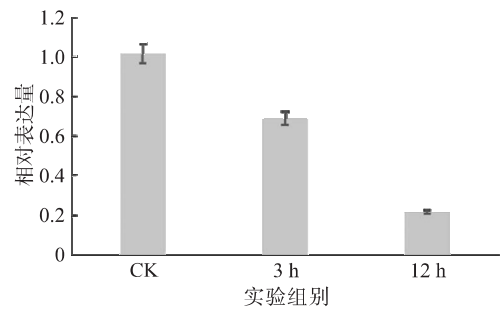


图4 青花菜 E3 泛素连接酶基因在高温胁迫下的表达特征分析

此次研究通过克隆青花菜 E3 泛素连接酶基因, 对其基因的序列特征、亲疏水性、信号肽、蛋白序列同源比对及进化树等进行预测和分析, 检测了青花菜 E3 泛素连接酶基因在不同高温胁迫处理时间下的表达特征, 初步明确其可能参与调控生长素的作用以及逆境响应的过程, 本研究为青花菜 E3 泛素连接酶基因在高温胁迫下的调控机制和提高青花菜高温抗性研究提供一定的理论依据.

[参考文献]

- [1] 唐文武, 莫灿坤, 吴秀兰. 无籽沙糖桔 E3 泛素连接酶 U-box 基因的克隆及表达分析 [J]. 江西农业大学学报, 2018, 40 (2): 383-388.
- [2] 缴莉. 山葡萄 U-box 蛋白基因 VaPUB 的克隆和功能研究 [D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017.
- [3] 唐勋, 司怀军, 张宁. 马铃薯 StRFP2 基因克隆及其生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16 (9): 2761-2767.
- [4] 张艳芳, 孙瑞芬, 郭树春, 等. 向日葵 E3 泛素连接酶基因的分析定位和表达鉴定 [J]. 西北植物学报, 2018, 38 (2): 211-218.
- [5] 李晓辉. 黄瓜泛素 E3 连接酶基因的克隆及表达分析 [D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2014.
- [6] 钟代星, 王秦豪, 茹懿, 等. 重组泛素连接酶 tTRIP-U-box 的构建与表达 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13 (27):

5205-5208.

- [7] 宁约瑟. 水稻 SINA 泛素连接酶 OsDIS1 的功能分析和作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2011.
- [8] 陈浩, 李莉云, 白辉, 等. 水稻 U-box 蛋白质在不同发育时期的表达分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36 (9): 1208-1214.
- [9] 李占省, 刘玉梅, 韩风庆等. “十三五”我国青花菜遗传育种研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2021, 383 (1): 33-40.
- [10] MORRONI F, TAROZZI A, SITA G, et al. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease [J]. Neuro Toxicology, 2013, 36: 63-71
- [11] BJÖRKMAN T, PEARSON J K. High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49 (318): 101-106.
- [12] MURIES B, CARVAJAL M, MARTÍNEZ-BALLESTA M D C. Response of three broccoli cultivars to salt stress, in relation to water status and expression of two leaf aquaporins [J]. Planta, 2013, 237: 1297-1310.
- [13] 祁静霞. 拟南芥 U-box E3 泛素连接酶 PUB19 生物学功能及互作蛋白结构和功能分析 [D]. 杭州: 浙江农业大学硕士学位论文, 2015.
- [14] 裴徐梨, 荆赞革, 唐征, 等. 青花菜花粉外壁蛋白基因的克隆与表达特征分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33 (5): 1046-1052.
- [15] 胡德龙. 茄子花青素糖基转移酶基因 SmGT 的克隆与生物信息学分析 [J]. 浙江农业科学, 2017, 58 (11): 2029-2033.
- [16] 裴徐梨, 付双, 荆赞革, 等. 青花菜 BoSCL3 基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 9 (2): 195-200.
- [17] 张雅文, 沈祥娟, 张静, 等. 大豆 E3 泛素连接酶基因 GmAIRP1 的同源克隆及在烟草中的功能鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20 (4): 1011-1019.
- [18] 雷苏炜. 拟南芥磷脂结合蛋白 PUIP4 调控抗病性与发育的功能研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2017.
- [19] 李巧茹. 小麦泛素连接酶基因 TaPUB15 的克隆与功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2017.
- [20] 孟宪文. 植物中 HECT 和 U-box 基因的结构与进化研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2016.

Cloning and Expression Analysis of E3 Ubiquitin Ligase Gene in Broccoli

PEI Xuli¹, JIAO Peng¹, HU Wenting¹, GUO Pinran¹, JING Zange^{1,2},
TANG Zheng², MO Liling¹, XU Qian², LIU Yuanmei¹

(1. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Southern Zhejiang Key Laboratory of Crop Breeding, School of Agriculture and Biotechnology,
Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou, Zhejiang, China 325006)

Abstract: To explore the physiological processes and functions of ubiquitin proteasome involved in protein degradation pathway under high temperature stress. The broccoli 'KUQ19-27' was treated with high temperature stress (38 C). And the specific primers were designed to clone the E3 ubiquitin ligase gene from broccoli and biological information was analyzed. The expression characteristics were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the ORF length of E3 ubiquitin ligase gene was 1 332 bp, encoding 443 amino acids, and the relative molecular weight was 48.3 kD. The results of hydrophilicity and hydrophobicity analysis showed that the hydrophilicity was the highest at the 207th amino acid in the polypeptide chain, which was 3.38. When the 280th amino acid in the peptide chain, the hydrophobicity is the highest, -4.23, which is a hydrophobic protein. In the amino acid sequence of broccoli E3 ubiquitin ligase gene, the C, Y and S values were all less than 0.5, which predicted that it did not have a signal peptide and did not belong to a secretory protein. Phylogenetic analysis showed that the E3 ubiquitin ligase gene of broccoli had more than 60% nucleotide sequence similarity with other species such as *Arabidopsis thaliana*, strawberry, rose, grape and so on. It had a close evolutionary relationship with cabbage, rapeseed, cabbage and *Arabidopsis thaliana*, and had a distant evolutionary relationship with strawberry, rose, kidney bean, grape, artichoke, sesame and water orange. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the expression of E3 ubiquitin ligase gene in broccoli was down-regulated by 30% at 3h of high temperature treatment, and the expression level was only 20% of the control at 12 h of stress. In this study, E3 ubiquitin ligase gene was cloned from broccoli, and its expression level gradually decreased under high temperature stress. The results provide a theoretical basis for further exploring the high temperature stress response mechanism of E3 ubiquitin ligase in broccoli.

Key words: broccoli; E3 ubiquitin ligase; high temperature stress; expression characteristics

(责任编辑: 陈伟超)