

铁皮石斛 2 个 F 家族 ABC 转运蛋白基因的克隆和表达研究

李依民¹, 雷根平³, 颜永刚¹, 彭亮¹, 张娜¹, 刘亮亮¹, 黑小斌¹, 李欢¹, 张岗^{1,2*}, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医药大学药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 陕西中医药大学附属医院第一临床医学院, 陕西 咸阳 712000

摘要: 目的 克隆铁皮石斛 *Dendrobium officinale* ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白 F 家族基因并进行生物信息学分析。方法 利用 RACE 从铁皮石斛叶片 cDNA 中分离 ABC 基因, 并进行编码蛋白相对分子质量、等电点、结构域、信号肽、跨膜域及亚细胞定位等生物信息学分析; 采用 DNASTAR 和 MEGA6 进行氨基酸多序列比对和分子进化分析; 借助实时荧光定量 PCR 技术检测基因组织表达模式。结果 从铁皮石斛中分离到 2 个 F 家族 ABC 转运蛋白基因 DoABCF1 和 DoABCF2 (GenBank 注册号 KU160474 和 KU160475), 全长为 2 104 bp 和 2 193 bp, 各编码 1 条由 600 和 659 个氨基酸组成的肽链, 相对分子质量 67 030 和 74 140, 等电点 6.20 和 5.71; DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白均包含 2 个保守的 ABC 结构域 (分别为 74~314、385~600 和 65~323、392~607) 和多个基元; 2 个蛋白不含信号肽或跨膜域, 预测均定位在叶绿体。2 个基因与植物 F 家族 ABC 转运蛋白基因相似性高达 80% 以上, 与玉米和水稻等单子叶植物 F 家族 ABC 转运蛋白基因亲缘关系较近。DoABCF1 和 DoABCF2 基因转录本在石斛 3 个器官中差异表达且均在叶中高度表达, 茎和根中相对表达量差异不显著; 以茎为校正样本, 前者在根中相对表达量为茎中的 1.74 倍, 后者在叶中表达量为茎中的 3.44 倍。结论 成功获得 DoABCF1 和 DoABCF2 基因全长 cDNA, 二者在铁皮石斛叶中的高表达特征暗示其可能在铁皮石斛生长发育过程中起一定作用。

关键词: 铁皮石斛; ATP-binding cassette; 转运蛋白; 克隆; 表达模式

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3153-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.022

Molecular cloning and expression analysis of two genes encoding F family ATP-binding cassette transporters in *Dendrobium officinale*

LI Yi-min¹, LEI Gen-ping³, YAN Yong-gang¹, PENG Liang¹, ZHANG Na¹, LIU Liang-liang¹, HEI Xiao-bin¹, LI Huan¹, ZHANG Gang^{1,2}, GUO Shun-xing²

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. 1st Clinical Medical College and Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To clone and characterize the F family ATP-binding cassette (ABC) transporter genes in *Dendrobium officinale*. **Methods** RACE was used to isolate ABC transporter genes from the leaf cDNA of *D. officinale*. Characteristics including molecular weight, theoretical pI (isoelectric point), conserved domain, transmembrane structure, signal peptide, and subcellular localization of the deduced protein were analyzed by serials of bioinformatics algorithms. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were respectively performed by DNASTAR and MEGA6. Tissue specific expression patterns were determined by real-time quantitative PCR (qPCR) analyses. **Results** Two full length genes DoABCF1 and DoABCF2 (GenBank accessions KU160474 and KU160475), 2 104 and 2 193 bp in length, respectively, were obtained. DoABCF1 was deduced to a 600 aa (amino acid) protein with a molecular weight of 67 030 and pI of 6.20, while DoABCF2 encoded a 659 aa protein with a molecular weight of 74 140 and pI of 5.71. The two deduced DoABCF1 and DoABCF2 proteins both had two conserved ABC domains (74—314 and 385—600 for the former, 65—323 and 392—607 for the latter) and several functional motifs. The proteins did not contain any signal peptide or transmembrane

收稿日期: 2017-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101608); 陕西省自然科学基金项目 (2017JM8030); 陕西省青年科技新星项目 (2012KJXX-44)

作者简介: 李依民, 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: 396697703@qq.com

*通信作者 张岗, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

郭顺星, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药用植物菌根生物学。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

domain, and were predicted to locate in the chloroplast. The two genes were highly identical to the plant F family ABC transporter genes with more than 80% similarity, and were mostly close to monocots ABC F family members from maize and rice. DoABCF1 and DoABCF2 showed different expression among the three organs and both had relatively highest expression levels in the leaves, whereas no significant difference could be observed in the roots and stems. Taken the stem as the calibrator sample, DoABCF1 transcripts were 1.74 fold over that in the stems and DoABCF2 transcripts were 3.44 fold, respectively. **Conclusion** Two F family DoABCF1 and DoABCF2 genes with full length cDNAs are successfully cloned in this study. The highest expression levels of the two ABC genes in the leaves of *D. officinale* suggest that they should play an important role during the growth and development of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; ATP-binding cassette protein; clone; expression pattern

ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 是生物体内普遍存在的一类数目最大的蛋白家族^[1], 绝大多数借助水解 ATP 释放能量, 实现胞质中肽、糖、脂、重金属螯合物、无机离子、生物碱、类固醇等代谢物的分子转运, 参与生物体摄取营养、胁迫反应、细菌和肿瘤细胞耐药性等生命活动^[2]。ABC 转运蛋白通常含 2 个 ABC 结构域 (即核苷酸结合结构域) 和 2 个跨膜结构域, 前者能够结合和水解 ATP 释放能量, 后者利用该能量介导对底物的跨膜转运。基于蛋白溶解性、跨膜域、序列特性和功能, ABC 转运蛋白分为 8 个亚家族 (ABCA~ABCH)^[3], 植物中尚未见 H 家族报道。ABCE 和 ABCF 家族蛋白仅有 2 个 ABC 结构域, 无跨膜域, 不具备物质转运的特性。

自植物中第一个 ABC 转运蛋白 AtPGP1 报道以来^[4], 大量研究证实, 植物 ABC 转运蛋白参与气孔调节、抗逆境反应、植物-微生物互作、激素和次生代谢物运输等多种生理过程^[5]。黄连 ABC B 家族 CjMDR1 负责黄连素从根到根状茎的转运^[6]。AtABCB14 起到清除苹果酸酯和调节气孔运动的作用^[7]。水稻 ABC C 家族 OsMRP5 在种子中植酸代谢过程中起重要调控作用^[8]。拟南芥 ABC G 家族 AtPDR9 专一性地从细胞内向外转运 2,4-D^[9]。目前, 植物 ABCF 基因研究鲜有报道, 酵母^[10]、人^[11]和线虫^[12] ABCF 蛋白主要作为翻译调控因子参与基因表达调控。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科多年生草本植物, 以新鲜或干燥茎药用, 有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳及明目强身等功效, 是重要的名贵中药材之一。铁皮石斛含倍半萜类、萜酮类、生物碱及多糖等有效成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗衰老和提高免疫力等作用^[13]。为研究铁皮石斛种子萌发的分子机制, 前期, 本课题组利用 SSH 技术富集铁皮石斛种子受真菌浸染共生萌发的差异表达基因^[14]。其中, 2 条表达序列标签 (EST) C1020、C1904 与植物 ABCF 家族成员序列相似性较高。本

研究首次克隆 DoABCF1 和 DoABCF2 基因全长并进行生物信息和表达分析, 为研究其生物学功能奠定基础。

1 材料

野生植物材料于 2014 年 10 月采自浙江金华, 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星研究员鉴定为兰科石斛属铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo。幼嫩石斛小苗处于营养生长阶段, 无花蕾, 株高 (10±2) cm, 取根、茎、叶样品, 液氮速冻后置-80 °C 保存备用。

2 方法

2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京爱德莱) 操作说明提取各样品总 RNA, RQ1 Rnase-free DNaseI (Promega, 美国) 消解去除基因组 DNA; 采用 NanoDrop™ 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定 RNA 质量和纯度, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。使用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, 美国) 反转录合成第一链 cDNA, -20 °C 保存备用。

2.2 3'-RACE 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

序列分析表明 C1020 和 C1904 各自编码的肽段分别包含 N 末端 243 和 310 个氨基酸, 因此只需进行 3'-RACE 克隆。分别设计 2 条基因特异引物: C1020-F1 为 5'-GGCGATATGGTTTACTTGGCTTG-AATG-3' 和 C1020-F2 为 5'-CCACCACCTTACTCG-GGAGATTGAAGC-3'; C1904-F1 5'-CGGTGGGTG-GCAGATGAGGATGTCC-3' 和 C1904-F2 为 5'-TAT-GCACAAAGATTGTGGAAACGGATATGG-3'。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan) 说明书, 分别与试剂盒中提供的 UPM 引物组合进行 2 次 3'-RACE。

分别用 C1020-F1 和 C1904-F1 引物与 UPM 引物组合, 试剂盒中 Program 1 程序进行第 1 轮 3'-RACE。反应体系为 2.0 μL 10×Advantage® 2

PCR buffer, 0.4 μL 10 mmol/L dNTPs, 0.4 μL 10 μmol/L C1020-F1/UPM 或 C1904-F1/UPM, 0.5 μL 3'-RACE ready cDNA, 0.4 μL 5 U/μL 50×Advantage[®] 2 Polymerase Mix, 补 ddH₂O 至 20 μL。PCR 程序为 94 °C、3 min, 94 °C、30 s, 68 °C、30 s, 72 °C、90 s, 30 个循环; 72 °C、7 min, 4 °C 保温。反应结束后, 分别取 1.0 μL 产物作为模板, 各自分别以 C1020-F2 和 C1904-F2 与 UPM 引物组合, 进行第 2 轮巢式 3'-RACE。PCR 程序为 94 °C、3 min, 94 °C、30 s, 68 °C、30 s, 72 °C、1 min, 32 个循环; 72 °C、7 min, 4 °C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆送上海生工测序, 与原 EST 拼接分析, 设计 2 对跨 ORF 引物 DoABCF1-orfF: 5'-GTGGTGCGAAGGAGGTGAT-3' 和 DoABCF1-orfR: 5'-CTGAAAATATATTCAGTTT-GTTTACTC-3'; DoABCF2-orfF: 5'-GAAAATGGC-GGGCTTTAGTGGCATAGA-3' 和 DoABCF2-orfR: 5'-GTATCACTTCAACGTTTAGCATTCTTC-3', 进行全长基因的 RT-PCR 克隆、测序验证分析。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 DoABCF1 和 DoABCF2 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>)、PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html) 分析 2 个基因编码蛋白质的结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行 DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白质三维建模分析; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测信号肽和跨膜区域; Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 6.0 进行氨基

酸序列比对分析; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

2.4 qRT-PCR 分析

分别取石斛根、茎、叶样品总 RNA 2 μg 反转录合成第一链 cDNA, 稀释 20 倍备用。以 EF1α 作为内参基因^[15], 采用 qRT-PCR 技术检测 DoABCF1 和 DoABCF2 基因的组织表达模式。定量引物 DoABCF1-rtF: 5'-TCAGTGGTGCGAAGGAGGTGAT-3' 和 DoABCF1-rtR: 5'-TGGATGAGGACGACGAGGACTT-3', DoABCF2-rtF: 5'-CGGAGACGGAGACTGATGCTGT-3' 和 DoABCF2-rtR: 5'-AACGC-CAACCAACCCAACCTT-3' 的扩增产物分别为 176 bp 和 227 bp。应用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 PCR 扩增。反应体系为 12.5 μL 2×SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix, 0.5 μL 正反向引物 (10 μmol/L), 0.5 μL Dye, 2 μL cDNA 模板, 9 μL ddH₂O。PCR 程序为 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、1 min, 40 个循环, 同时绘制溶解曲线。每个反应做 3 次技术重复, 包括不加模板的对照 (NTC), 实验重复 3 次。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, 美国) 生成的 C_t (cycle threshold) 值, 采用 2^{-ΔΔC_t} 计算基因相对表达量^[16]。

3 结果与分析

3.1 基因克隆分析

2 次 3'-RACE 反应分别获得预期长度的单一条带, 经克隆、测序产生 1 567、1 220 bp 的 2 条序列, 分别与原始 EST 拼接, 获得长度为 2 104 和 2 193 bp 2 条 cDNA 序列。BLASTx 分析表明二者与 GenBank 中已注册的多种植物 ABC 转运蛋白 F 家族成员基因有很高的一致性 (>80%), 因此分别定名为 DoABCF1 和 DoABCF2, 提交 GenBank 获得注册号分别为 KU160474 和 KU160475。序列分析显示, DoABCF1 含有 1 个 1 803 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 5'-UTR 长 142 bp, 3'-UTR 长 159 bp; DoABCF2 ORF 长 1 980 bp, 5'-UTR 长 107 bp, 3'-UTR 长 105 bp; 二者均含有真核生物特有的 polyA 尾巴结构, 起始密码子附近 AAGATGG 和 AAAATGG 碱基序列遵循 KOZAK 规则, 即 A/GNNATGG^[17]。使用引物组合 DoABCF1-orfF/R 和 DoABCF2-orfF/R 进行 RT-PCR 验证, 均产生大小为 2 000 bp 的单一条带 (图 1), 克隆测序分析与拼接序列一致且都含有完整 ORF, 说明已成功获得 2 个基因 cDNA 全长。

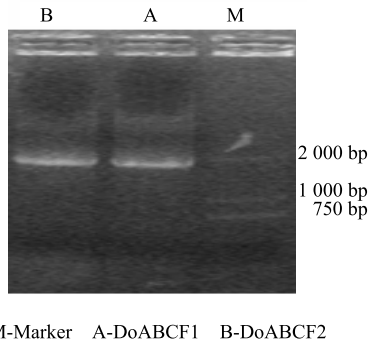


图 1 RT-PCR 扩增 DoABCF1 和 DoABCF2 基因全长
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of full length cDNAs of DoABCF1 and DoABCF2

3.2 蛋白理化特性分析

Compute pI/MW 预测 DoABCF1 和 DoABCF2 基因编码蛋白质的分子式分别为 C₂₉₄₇H₄₇₂₇N₈₄₁O₈₈₅S₂₉ 和 C₃₂₇₈H₅₃₁₄N₈₉₀O₁₀₁₁S₂₄, 相对分子质量 67 030 和 74 140, 等电点 6.20 和 5.71。

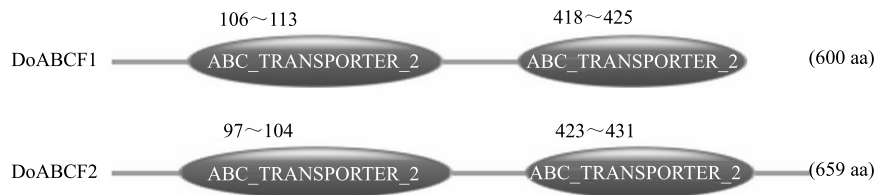


图 2 DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白的 PROSITE 分析
Fig. 2 PROSITE analyses of DoABCF1 and DoABCF2 proteins

表 1 DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白序列的保守基元
Table 1 Conserved motifs of DoABCF1 and DoABCF2 proteins

结构域和基序	氨基酸位点	
	DoABCF1	DoABCF2
ABC 转运蛋白家族基序	218~232	227~241, 511~525
ATP/GTP 结合基元 A (P-loop)	18~25, 106~113, 418~425	97~104, 424~431
蛋白激酶 C 磷酸化位点	6~8, 29~31, 57~59, 259~261, 338~340, 361~363, 493~495	43~45, 47~49, 73~75, 144~146, 160~162, 220~222, 349~351, 387~389
酪氨酸激酶 II 磷酸化位点	38~41, 92~95, 145~148, 152~155, 191~194, 305~308, 476~479, 541~544	5~8, 25~28, 144~147, 173~176, 317~320, 353~356, 380~383, 395~398, 473~476, 477~480, 512~515, 584~587, 627~630
cAMP/cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点		52~55, 506~509
N-糖基化位点	373~376, 503~506	69~72, 142~145, 307~310, 471~474, 582~585
N-豆蔻酰化位点	22~27, 42~47, 63~68, 106~111, 109~114, 173~178, 203~208, 279~284, 421~426	6~11, 97~102, 100~105, 299~304, 344~349, 346~351, 427~432, 513~518, 558~563, 651~656
酰胺化位点	98~101	
亮氨酸拉链		163~184

SOPMA 分析表明, DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白质的二级结构主要由 α 螺旋 (alpha helix, 50.33%和 50.68%)、延伸链 (extended strand, 16.17%和 18.66%)、随机卷曲 (random coil, 25.17%和 24.13%) 及少量的 β 转角 (beta turn, 8.33%和 6.53%) 组成。

3.3 蛋白结构域分析

InterProScan 分析结果显示, DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白质均含有 2 个保守的 ABC 转运蛋白结构域 (ABC_TRANSPORTER_2), 分别为 74~314、385~600 与 65~323、392~607, 与 PROSITE 的预测结果一致, 在 2 个 ABC_TRANSPORTER_2 内部分别包含有 2 个 ATP 结合位点 (图 2)。由表 1 分析表明, 2 个蛋白均含有数目不等的 ABC 转运蛋白家族基元、ATP/GTP 结合位点 A (P-loop)、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪氨酸激酶 II 磷酸化位点、N-糖基化位点和 N-豆蔻酰化位点等; 同时, DoABCF1 还包含 1 个酰胺化位点, DoABCF2 有 2 个 cAMP-

cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点和 1 个亮氨酸拉链基序。SignalP 4.0 分析显示 2 个蛋白都没有信号肽序列，不属于分泌蛋白，TMHMM 分析 2 个蛋白不存在跨膜氨基酸残基，Trans-mPLoc 预测 2 个蛋白都定位在叶绿体。

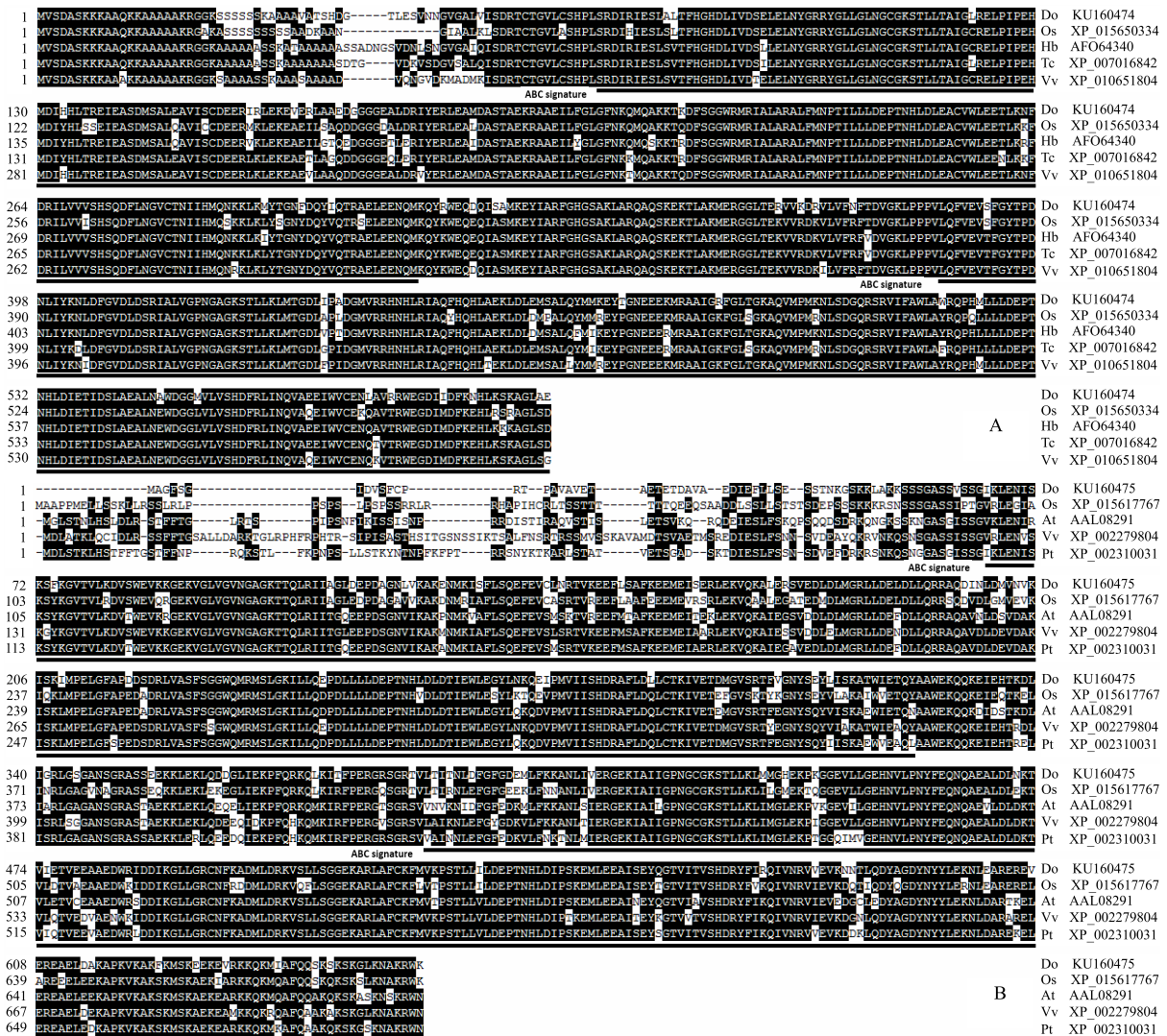
3.4 蛋白多序列比对

运用 DNASTar 6.0 中的 MegAlign 程序对 DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白和多种植物 ABCF 蛋白进行多序列比对分析 (图 3-A、B)。结果表明，铁皮石斛 DoABCF1 蛋白与葡萄 VvABCF (XP_010651804)、可可 TcABCF (XP_007016842)、

橡胶树 HvABCF (AFO64340) 和水稻 OsABCF4 (XP_015650334) 的相似性分别为 88.5%、88.3%、87.8%、87.3%。DoABCF2 蛋白与葡萄 VvABCF (XP_002279804)、毛果杨 PtABCF (XP_002310031)、水稻 OsABCF6 (XP_015617767) 和拟南芥 AtABCF5 (AAL08291) 等蛋白的相似性分别为 78.6%、77.7%、76.8%、76.6%。此外，2 个蛋白各有 2 个保守的 ABC 结构域，符合 ABC 转运蛋白 F 家族的结构特点。

3.5 蛋白分子进化分析

采用 MEGA 6.0 软件，邻接法 (neighbour-joining)



At-拟南芥 Hb-橡胶树 Do-铁皮石斛 Os-水稻 Pt-毛果杨 Tt-可可 Vv-葡萄，实线为 2 个 ABC 结构域，下同 At-Arabidopsis thaliana Hb-Hevea brasiliensis Do-Dendrobium officinale Os-Oryza sativa Pt-Populus trichocarpa Tt-Theobroma cacao Vv-Vitis vinifera Thick lines indicate the two conserved ABC_TRANSPORTER_2 domains, same as below

图 3 DoABCF1 (A) 和 DoABCF2 (B) 蛋白与不同植物 ABCFs 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignments of deduced DoABCF1 (A) and DoABCF2 (B) proteins with ABCFs proteins from other plants

构建 DoABCF1 和 DoABCF2 基因编码蛋白与拟南芥、水稻和玉米 3 种植物 ABCFs 蛋白家族成员的分子进化树。结果表明 (图 4), DoABCF1 和 DoABCF2 蛋白分别被聚在 2 个不同的分支上, 并且都与水稻和玉米 ABCFs 蛋白聚在一起, 表明他们与单子叶植物亲缘关系较近。

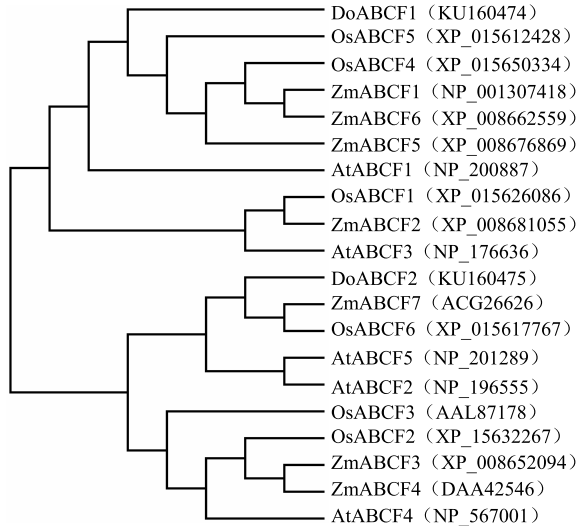


图 4 DoABCF1 和 DoABCF2 与拟南芥、水稻和玉米 ABCFs 家族蛋白的进化树
Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of DoABCF1 and DoABCF2 with ABCFs family proteins from *A. thaliana*, rice, and maize

3.6 组织表达特异性分析

分别提取铁皮石斛根、茎、叶样品的总 RNA, 利用 qRT-PCR 技术检测 2 个基因的组织表达模式。结果表明 (图 5), DoABCF1 和 DoABCF2 基因转录本在 3 种组织中的相对表达量存在差异, 但基因表达模式类似, 均在叶中高量表达。以茎为校正样本, DoABCF1 在叶中的相对表达量为茎中的 1.74 倍, 根中较低, 为茎中的 0.79 倍; DoABCF2 在叶中的相对表达量为茎中的 3.44 倍, 根中次之, 为茎中的 1.55 倍。

4 讨论

鉴于 ABC 转运蛋白在植物生长发育中重要调控作用, 基于全基因组、转录组分析策略, 已在拟南芥^[1,7,9,18]、水稻^[8,19]、玉米^[20]、百脉根^[21]、葡萄^[22]和橡胶树^[23]等重要植物中, 进行了 ABC 家族基因的系统鉴定、进化、染色体定位等研究。药用植物中也有 ABC 转运基因的初步报道, 如日本黄连^[6]和长春花、银杏与红豆杉 ABC 转运基因^[24]。已知功能的 ABC 转运蛋白主要隶属于 A、B、C、D、G

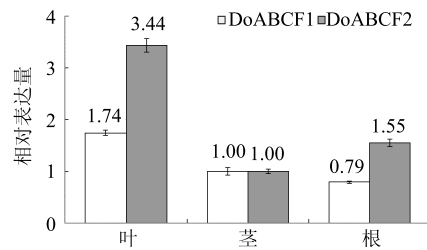


图 5 qRT-PCR 分析 DoABCF1 和 DoABCF2 基因的组织表达
Fig. 5 Tissue-specific expression of DoABCF1 and DoABCF2 genes using qRT-PCR analyses

和 I 6 个家族, 植物中 E 家族基因 AtABCE1 是细胞内源 RNA 沉默的抑制子^[25]。不同植物的 F 家族基因数目有差异, 拟南芥和水稻各有 5 个^[18-19]、玉米 7 个^[20]、百脉根 6 个^[21]、葡萄和橡胶树各 4 个^[22-23]。鉴定铁皮石斛 ABC 基因家族并研究其生物学功能, 为道地石斛药材形成的分子机制提供理论支撑。因此, 本研究利用 RACE 首次分离到 DoABCF1、DoABCF2 基因, 并进行了蛋白理化特性、结构域、亚细胞定位、分子进化及基因组织表达特性分析。

DoABCF1、DoABCF2 与多种植物 F 家族 ABC 转运蛋白基因一致性较高, 其编码蛋白均含有 ABC 转运蛋白家族的 2 个保守 ABC 结构域、ATP 结合位点, 符合植物 F 家族 ABC 蛋白的序列和结构特征^[3]。2 个蛋白无信号肽和跨膜域, 系可溶性蛋白, 预测定位在叶绿体, 可能在叶绿体生理代谢中起作用。石斛 ABCF 转运基因与玉米和水稻关系较近, 符合进化。随着模式植物中 F 家族基因功能的阐明, 有助于这两个石斛基因功能的同源性比对分析。

基因表达模式检测是探索基因功能的首要前提。对拟南芥 131 个 ABC 转运基因在 47 个组织、器官或发育阶段的表达分析, 结果发现 ABC 转运基因在花药发育过程中具有较高的协调性, 在时空和组织上表达受到严格调控, 5 个 ABCF 基因差异表达调控器官发育^[18]。本研究定量 PCR 结果显示 2 个 ABCF 基因在石斛叶中表达丰度较高, 推测其可能在叶片中发挥一定的生物学功能。当然, 其究竟如何起作用仍有待于深入研究。最近, 铁皮石斛全基因组遗传信息已获全面解析^[26], 为这一名贵药材的功能基因组学、遗传学、系统进化等方面的研究提供了重要基础数据, 必将加速铁皮石斛生理生化代谢途径相关基因家族成员的系统发掘和研究, 如 ABC 转运蛋白、WRKY 转录因子等, 这将为铁皮石斛的分子辅助育种奠定坚实基础。

参考文献

- [1] Davies T G E, Coleman J O D. The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: An emerging superfamily [J]. *Plant Cell Env*, 2000, 23(5): 431-443.
- [2] Davidson A L, Dassa E, Orelle C, et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(2): 317-364.
- [3] Verrier P J, Bird D, Burla B, et al. Plant ABC proteins- a unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(4): 151-159.
- [4] Dudler R, Hertig C. Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. evolutionary implications [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(9): 5882-5888.
- [5] Lane T S, Caroline S, Rempe C S, et al. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology [J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16(1): 47.
- [6] Shitan N, Bazin I, Dan K, et al. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 751-756.
- [7] Lee M, Choi Y, Burla B, et al. The ABC transporter AtABC14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂ [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(10): 1217-1223.
- [8] Xu X H, Zhao H J, Liu Q L, et al. Mutations of the multi-drug resistance-associated protein ABC transporter gene 5 result in reduction of phytic acid in rice seeds [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119(1): 75-83.
- [9] Ito H, Gray W M. A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 63-74.
- [10] Marton M J, Vazquez de Aldana C R, Qiu H, et al. Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2 [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(8): 4474-4489.
- [11] Tyzack J K, Wang X, Belsham G J, et al. ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44): 34131-34139.
- [12] Hirose T, Horvitz H R. The translational regulators GCN-1 and ABCF-3 act together to promote apoptosis in *C. elegans* [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(8): e1004512.
- [13] 陈晓梅, 王春兰, 杨俊山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(19): 1634-1640.
- [14] Zhao M M, Zhang G, Zhang D W, et al. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72705.
- [15] Zhang G, Song C, Zhao M M, et al. Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67(2): 360-368.
- [16] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nuc Acids Res*, 2001, 29(19): e45.
- [17] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [18] 朱璐, 许杰, 张大兵. 拟南芥 ABC 转运类蛋白家族的分子进化、表达模式和蛋白功能网络预测分析 [J]. *植物生理学报*, 2012, 48(12): 1151-1166.
- [19] Saha J, Sengupta A, Gupta K, et al. Molecular phylogenetic study and expression analysis of ATP-binding cassette transporter gene family in *Oryza sativa* in response to salt stress [J]. *Comput Biol Chem*, 2015, 54: 18-32.
- [20] Pang K, Li Y, Liu M, et al. Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Gene*, 2013, 526(2): 411-28.
- [21] Sugiyama A, Shitan N, Sato S, et al. Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) proteins in a model legume plant, *Lotus japonicus*: comparison with *Arabidopsis* ABC protein family [J]. *DNA Res*, 2006, 13(5): 205-228.
- [22] Çakir B, Kiliçkaya O. Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78860.
- [23] Niu Z Y, Kang G J, Li Y, et al. Whole-transcriptome survey of the putative ATP-binding cassette (ABC) transporter family genes in the latex-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116857.
- [24] 金宏滨. 药用植物 ABC 转运蛋白基因的克隆与特征研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [25] Kärblane K, Gerassimenko J, Nigul L, et al. ABCE1 is a highly conserved RNA silencing suppressor [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116702.
- [26] Yan L, Wang X, Liu H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(6): 922-934.