

青天葵中 SKP1 同源基因的克隆及原核表达

黎斯敏, 左紫梅, 詹若挺, 何 瑞*

广州中医药大学中药学院(中医药数理工程研究院) 广州中医药大学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 从青天葵 *Nervilia fordii* 克隆 SKP1 的同源基因 NSKs, 并对编码的蛋白进行生物信息学分析及原核表达, 为了深入研究青天葵中 SCF 复合体的功能奠定基础。方法 从青天葵转录组中筛选得到 5 条 SKP1 同源基因序列(NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11), 构建 pGEX-4T-NSKs 原核表达载体于大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中诱导表达 GST-NSKs 融合蛋白并进行纯化。结果 NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11 的开放阅读框(ORF)分别为 495、483、489、498 和 486 bp, 编码 164、160、162、165 和 161 个氨基酸, 蛋白相似性达到 73.65%, 均属于 SKP1 蛋白家族, 具 F-box 和 Cullin 蛋白结合位点。亚细胞定位预测 NSK2、NSK3 和 NSK5 定位于细胞核, 而 NSK7 和 NSK11 定位于细胞质和细胞核。系统进化树结果表明, NSK2、NSK3 和 NSK5 聚为一簇, 与小麦和玉米等的同源性较高; NSK7 和 NSK11 聚为一簇, 与多头绒泡菌的同源性较高。通过构建原核表达载体, 确定了在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中的有利诱导条件, 成功诱导表达并纯化得到 5 个 GST-NSKs 重组蛋白。结论 成功克隆 5 个 SKP1 同源基因 NSKs, 获得 NSKs 蛋白, 为深入研究青天葵中 SCF 复合体的功能提供了一定的基础。

关键词: 青天葵; NSK; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3383-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.026

Cloning and prokaryotic expression of SKP1 homologous genes from *Nervilia fordii*

LI Si-min, ZUO Zi-mei, ZHAN Ruo-ting, HE Rui

Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Research of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, College of Traditional Chinese Medicine (Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine), Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective In order to study the function of SCF complex in *Nervilia fordii*, five SKP1 homologous genes, the NSKs were cloned, and the encoded proteins were analyzed by bioinformatics, and the recombinant proteins were obtained by prokaryotic expression. **Methods** Sequences of five SKP1 homologous gene were screened from the *N. fordii* transcriptome, designated NSK2, NSK3, NSK5, NSK7, and NSK11. The open reading frames (ORFs) of these five genes were amplified by RT-PCR using specific primers. The genes were introduced into the prokaryotic expression vectors pGEX-4T-NSKs for expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells under IPTG induction. **Results** The ORFs of the NSK genes were 495, 483, 489, 498, and 486 bp, encoding 164, 160, 162, 165, and 161 amino acids, respectively. The protein similarity reached 73.65%, all belong to the SKP1 protein family, containing F-box and Cullin protein binding sites. The prediction of subcellular locations showed that NSK2, NSK3, and NSK5 were located in the nucleus, while NSK7 and NSK11 were located in the cytoplasm and nucleus. The phylogenetic tree showed that NSK2, NSK3, and NSK5 clustered together with *Triticum aestivum* and *Zea mays*, and NSK7 and NSK11 clustered together sharing high homology with *Phytophthora polycephalum*. By constructing a prokaryotic expression vector, the favorable induction conditions in *E. coli* Rosetta (DE3) were determined, and GST-NSKs recombinant proteins were successfully induced and purified. **Conclusion** Five SKP1 homologous genes, NSKs were cloned and the correspondent NSK proteins were obtained, which provided a reference for further study on function of SCF complexes in *N. fordii*.

Key words: *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.; NSK; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

收稿日期: 2020-09-06

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)

作者简介: 黎斯敏(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源的可持续利用与开发。E-mail: 1456794816@qq.com

*通信作者: 何 瑞(1972—), 女, 博士, 研究员, 主要从事中药资源的可持续利用与开发。E-mail: ruihe@gzucm.edu.cn

SKP1 (S-phase kinase associated protein 1) 蛋白在真核生物中普遍存在,其主要功能是结合 F-box 蛋白和 Cullin 蛋白形成 SKP1-Cullin-F-box (SCF) 复合体,参与生物体内蛋白质的泛素化降解过程^[1]。经研究发现,多种 SCF 复合体参与酵母和哺乳动物的众多重要生物过程^[2],除此之外,SCF 复合体还能影响植物的生长发育,如赤霉素^[3]、生长素 (Auxin)^[4]、独脚金内酯 (SLs)^[5-6]和茉莉酸^[7]等激素的信号转导过程和花的发育^[8]、生物钟^[9]、光信号^[10]、细胞分裂过程^[11]等。泛素化过程需要泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3) 的参与,其中 E3 能特异性识别不同的底物。SCF 复合体是最常见的一类 E3 泛素化连接酶^[12],一般由 SKP1 蛋白、Cullin 蛋白、Rbx1 4 蛋白和 F-box 蛋白组合而成^[12],其中 SKP1 蛋白起到桥梁作用,能分别结合不同的 F-box 和 Cullin 蛋白^[13]。SKP1 蛋白由约 170 个氨基酸残基组成,C 端具有 8 个 α 螺旋结构 (H1-H8),N 端具有的 $\alpha\beta$ 超二级结构类似于 BTB/POZ 结构域的折叠方式^[14]。SKP1 是一类较为保守的蛋白家族,该蛋白在人^[15]和酵母^[16]中都只有一个,但线虫中至少有 21 个 SKP1 相关蛋白 (SKR)^[17],且其表达模式、Cullin 和 F-box 蛋白结合方式上均有不同。SKP1 在众多植物中都不止 1 个成员,如拟南芥中预测得到 21 个 SKP1 同源基因^[18]。目前已从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh^[19]、水稻 *Oryza sativa* L.^[20]、兰花 *Cymbidium* L.^[21]、烟草 *Nicotiana tabacum* L.^[22]、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.^[23]、黄瓜 *Cucumis sativus* L.^[24]、草莓 *Fragaria × ananassa* Duch.^[25]等植物中克隆得到 SKP1 同源基因并对其功能进行了不同程度的研究,其中对拟南芥 ASK1 基因的研究较为深入。

青天葵又名独叶莲、珍珠草,来源于多年生兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 的叶或全草,具有清热润肺、解毒消肿等功效,主治肺癆咯血等疾病,临床上常用于治疗小儿呼吸道感染等肺部疾病^[26]。由于青天葵生长环境要求较苛刻,且种子无胚乳,以无性繁殖为主,繁殖系数低。一般每年只生长 1 片叶子,1~2 个块茎。过度采挖和生态环境恶化导致青天葵的野生资源日渐匮乏^[27-29]。目前尚未有关于青天葵中 SKP1 基因的报道,而本课题组前期已获得青天葵转录组数据^[30],从中挖掘并克隆 SKP1 同源基因,有助于了解其参与青天葵的生长发育等方面的调控机制。

本研究从青天葵叶片中克隆得到 5 个 SKP1 同源

基因 NSKs,对其进行生物信息学分析,并将其连接至 pGEX-4T-2 原核表达载体上,在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行诱导表达,经纯化得到融合蛋白,为后期进一步探讨 NSKs 蛋白的功能提供基础。

1 材料、试剂及仪器

1.1 药材

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 *N. 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 菌种及载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司 (TaKaRa); pLB Vector 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Rosetta (DE3) Chemically Competent Cell 购自上海唯地生物技术有限公司。

1.3 试剂

质粒小提试剂盒 (TIANprep Mini Plasmid Kit)、pLB 零背景快速克隆试剂盒 (Lethal Based Fast Cloning Kit)、通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (Universal DNA Purification Kit)、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、DNA Markers、PrimeScript RT reagent Kit 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司 (TaKaRa); OminiPlant RNA Kit (DNase I) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; PurKine[™] 谷胱甘肽 S 转移酶标签蛋白纯化试剂盒 (谷胱甘肽) 购自 Abbkine; PageRuler Prestained Protein Ladder 购自 Thermo; ProteinFind[®] Anti-GST Mouse Monoclonal Antibody、ProteinFind[®] Goat Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate 和 EasySee[®] Super Western Blot Kit 均购自北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司; 液氮。

2 方法

2.1 青天葵叶片总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

参照 OminiPlant RNA Kit (DNase I) 说明书提取青天葵叶片总 RNA,用微量分光光度计测定其浓度和纯度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测叶片总 RNA 的完整性。参照 PrimeScript RT reagent Kit 说明书反转录得到 cDNA。设计 18 S rRNA 引物 18 S-F、18 S-R 进行 PCR 扩增,PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2 青天葵 *NSKs* 基因编码区序列的克隆

将课题组前期建立的青天葵转录组注释的 Unigenes 数据库进行比对, 筛选到 5 条与拟南芥 *ASK1* 基因序列高度同源的 Unigenes 序列。将这 5 条 Unigenes 分别命名为 *NSK2*、*NSK3*、*NSK5*、*NSK7*、*NSK11*。将 *NSK7* 和 *NSK11* 基因的碱基序列交由广州天一辉远基因科技有限公司进行全基因合成。同时设计基因特异性引物(表 1), 以“2.1”项下所得

cDNA 为模板进行 *NSK2*、*NSK3*、*NSK5* 的开放阅读框(ORF)扩增, 反应总体积为 10 μ L: cDNA 0.2 μ L; 引物 F/R 各 0.2 μ L; PrimeSTAR 5 μ L; ddH₂O 4.4 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C、2 min; 98 $^{\circ}$ C、10 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C、7 min。目的片段经回收纯化后连接至 pLB Vector, 转化至 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后, 挑取阳性菌株送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

表 1 所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')	用途
18S-F	CGCTCTGGATACATTAGCATGG	18 S 扩增
18S-R	GACAAATCGCTCCACCAACTAAG	
NSK2-F	ATGGCTTCGGATGATGGTAAGAAGGT	ORF 扩增
NSK2-R	TTACTCAAACGCCCACTGGTTCTC	
NSK3-F	ATGTCGATGAAGGTGACACTCAAGAG	
NSK3-R	TCACTCGAAAGCCCACTGATTCTC	
NSK5-F	ATGGCTTCCGACGAAGGCAAAAA	载体构建
NSK5-R	TCATTCAAAGGCCCATTTGATTCTCCCT	
4T-NSK2-F	TGGATCCCCGGAATTCATGGCTTCGGATGATGGTAAGAAG	
4T-NSK2-R	GGCCGCTCGAGTCGACTTACTCAAACGCCCACTGGTTCT	
4T-NSK3-F	TGGATCCCCGGAATTCATGTCGATGAAGGTGACACTCAAGAG	
4T-NSK3-R	GGCCGCTCGAGTCGACTCACTCGAAAGCCCACTGATTCT	
4T-NSK5-F	TGGATCCCCGGAATTCATGGCTTCCGACGAAGGC	
4T-NSK5-R	GGCCGCTCGAGTCGACTCATTCAAAGGCCCATTTGATTC	
4T-NS7-F	TGGATCCCCGGAATTCATGGCCGCAGAACAACCC	
4T-NSK7-R	GGCCGCTCGAGTCGACTTATTTCTCCTCGCACCCTCATTCT	
4T-NSK11-F	TGGATCCCCGGAATTCATGGTCGTTCTTGTACTAGTGACAATGAG	
4T-NSK11-R	GGCCGCTCGAGTCGACTTATCGATCCTCAGCCCATTCGTTTT	

2.3 青天葵 *NSKs* 蛋白的生物信息学分析

采用 ExPASy-ProtParam 在线网站预测目的蛋白的相对分子质量、等电点等基本理化性质; 分别用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测蛋白质的二级结构和三级结构; 采用 Cell-PLoc 2.0 package 对蛋白进行亚细胞定位预测; 利用 NCBI 的 BLASTP 和 DNAMAN 对氨基酸序列进行同源检索和比对, 应用软件 MEGA7.0 构建系统进化树; 用 SignalP 4.1 Server 和 TMHMM Server v 2.0 在线软件分别预测信号肽和跨膜结构域。

2.4 青天葵 *NSKs* 原核表达载体构建、蛋白表达纯化及检测

2.4.1 原核表达载体构建

以“2.2”项下得到的含有 *NSK2*、*NSK3*、*NSK5*、*NSK7*、*NSK11* 完整编码区序列质粒为模板, 设计引物扩增目的基因片段(表 1),

反应总体积为 100 μ L: cDNA 2 μ L; 引物 F/R 各 2.5 μ L; PrimeSTAR 50 μ L; ddH₂O 43 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C、2 min; 98 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C、7 min。目的片段经回收纯化后得到 *NSKs* 片段; 为便于检测重组蛋白, 用 Infusion 酶将各 *NSK* 片段分别与经 *SalI* 和 *EcoRI* 双酶切后的 pGEX-4T-2 载体连接。将连接产物转化至 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后, 挑取阳性菌株送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序, 测序正确后提取质粒。

2.4.2 蛋白表达纯化

将重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株, 挑取单菌落于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 用 LB 液体培养基以 1:100 的比例扩大培养, 振荡培养至 A₆₀₀ 达 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 转入 16 $^{\circ}$ C 继续培养 18 h。培养结束后离心收集菌体, 每 100 mL 菌液加入 10 mL 磷酸盐

缓冲液 (PBS, pH 7.4), 按 PurKine™ 谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 标签蛋白纯化试剂盒说明书进行纯化, 得到纯化蛋白。分别取 20 μ L 纯化蛋白, 加入 4 $\times$ Loading buffer, 100 $^{\circ}$ C 灭活 10 min, 用 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2.4.3 Western Blot 检测 为了得到清晰的条带, 将纯化得到的重组蛋白稀释一定比例, 经 SDS-PAGE 电泳后, 利用湿转法将蛋白转移至已活化的 Immobilon-E PVDF 转印膜, 将膜置于封闭液 (用 TBST 缓冲液配制 5% 脱脂奶粉), 于摇床上振荡孵育 90 min; 随后加入 Anti-GST Mouse mAb (1:5000) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 用洗膜液 (1 $\times$ TBS 加入 0.1% 聚山梨酯-20) 洗涤 5 次。在室温

条件下与 Goat Anti-Mouse IgG/HRP (1:10000) 孵育 1 h, 再用洗膜液洗涤 5 次, 参照 EasySee Western Blot Kit 说明书加入发光液, 用全自动化图像分析系统进行拍照。

3 结果与分析

3.1 青天葵 NSKs 基因的克隆

通过本地 Blast 从青天葵转录组中筛选得到 5 条具有完整 ORF 的 NSKs 序列, 将其分别命名为 NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11。通过 ORF Finder 在线网站预测已知序列的 ORF 片段, 设计基因特异性引物进行扩增, 克隆得到 3 条 NSKs 基因, 即 NSK2、NSK3、NSK5, 见图 1。NSK7 和 NSK11 基因由广州天一辉远基因科技有限公司合成。

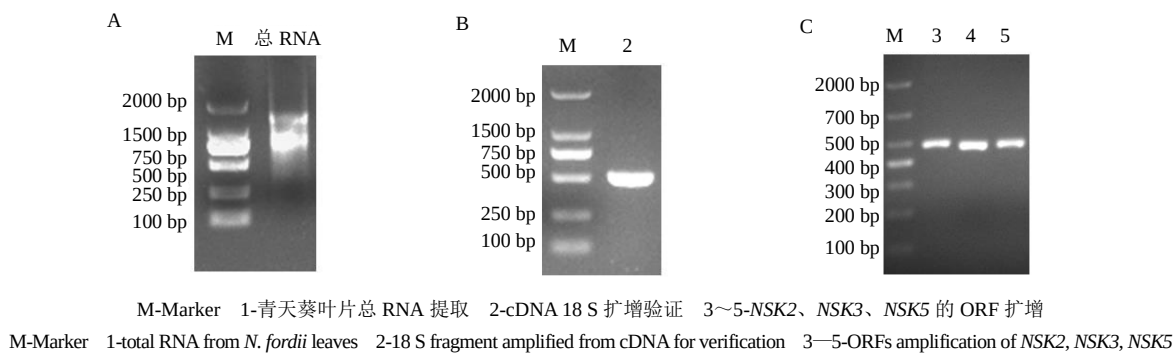


图 1 青天葵叶片总 RNA (A) 和 cDNA 的 18S (B) 及 NSKs (C) 扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *N. fordii* leaves (A), 18S (B), and NSKs amplified from cDNA (C)

3.2 青天葵 NSKs 蛋白的生物信息学分析

3.2.1 青天葵 NSKs 蛋白的基本理化性质、功能域预测和亚细胞定位预测 采用 ExPASy-ProtParam 在线工具对 NSKs 蛋白的基本理化性质进行分析, 结果表明, NSK2、NSK3、NSK5 均为不稳定的亲水蛋白, 而 NSK7 和 NSK11 是稳定的疏水蛋白, 见表 2。

Cell-PLoc 2.0 package 在线软件对 NSKs 的亚细胞定位预测表明 NSK2、NSK3、NSK5 均定位于细胞核, 而 NSK7 和 11 定位于细胞质和细胞核。利用 NCBI 预测 NSKs 蛋白的保守功能结构域, 发现 NSK2、NSK3、NSK5、NSK7 和 NSK11 均具有 F-box、Cullin 蛋白的结合位点, 且 N 端均具有类似

BTB/POZ 折叠的约 120 个氨基酸残基的 α/β 结构。

3.2.2 青天葵 NSKs 蛋白的高级结构、信号肽和结构域分析 用 SOPMA 在线软件对 NSKs 蛋白进行二级结构预测, 发现 5 个蛋白的二级结构主要由四种形式组成, 其中 NSK3、NSK5、NSK7 和 NSK 11 中均是 α -螺旋 (α helix) > 无规卷曲 (random coil) > 延伸链 (extended strand) > β 转角 (β turn), 而 NSK2 的 β 转角 > 延伸链, 见表 3。

用 SWISS-MODEL 进行 NSKs 蛋白建模, 结果表明, NSK2、NSK3 和 NSK5 的蛋白三级结构高度相似, 而 NSK7 和 NSK11 的蛋白三级结构较为不同。前三者的模板为茉莉酸信号中的 Coronatine-insensitive

表 2 青天葵 NSKs 基本理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of NSKs proteins from *N. fordii*

蛋白名称	相对分子质量	等电点	稳定性系数	脂肪系数	总平均亲水性
NSK2	18 400	4.55	48.04	83.84	-0.479
NSK3	18 000	4.57	50.02	87.75	-0.399
NSK5	18 300	4.52	53.32	80.68	-0.533
NSK7	18 700	4.59	39.90	82.12	-0.593
NSK11	18 400	4.50	33.69	88.32	-0.537

表 3 青天葵 NSKs 蛋白的二级结构信息

Table 3 Secondary structure information of NSK proteins from *N. fordii*

蛋白名称	α -螺旋/%	无规卷曲/%	延伸链/%	β 转角/%
NSK2	61.59	25.61	5.49	7.32
NSK3	63.12	28.12	5.00	3.75
SK5	64.20	22.84	6.79	6.17
NSK7	63.03	24.24	7.27	5.45
NSK11	64.60	25.47	4.97	4.97

protein 1 和 SKP1-like protein 1A、JAZ1 incomplete degron peptide 的复合体结构,一致性均在 75%左右,相似性均为 0.54; NSK7 参考模板是 S-phase kinase-associated protein 1 蛋白与 F-box/LRRs -repeat protein 17 和 Kelch-like ECH-associated protein 1 的复合体结构,一致性为 67.3%,相似性为 0.5; NSK11 参考模板为人的 S-phase kinase-associated protein 1 蛋白模型,一致性均为 61.78%,相似性均为 0.49; 具体信息见图 2。

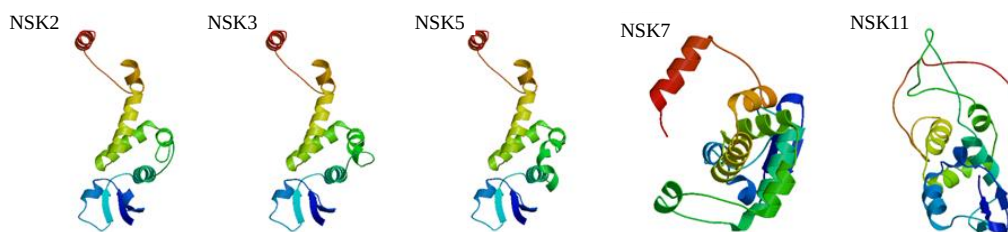


图 2 青天葵 NSKs 蛋白的三级结构预测

Fig. 2 Prediction of three-dimensional structures of NSK proteins from *N. fordii*

根据 SignalP 4.1 Server 在线软件预测结果可知, NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11 的信号肽平均值分别为 0.000 6、0.000 8、0.000 6、0.000 6 和 0.001 3, 均不具有信号肽及切割点, 为非分泌蛋白。利用 TMHMM Server v2.0 在线软件对 NSKs 蛋白的跨膜结构域进行分析, 结果表明三者均为膜外蛋白, 无跨膜区。

3.2.3 青天葵 NSKs 蛋白的同源比对及亲缘进化树分析 用 DNAMAN 比对 NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11 的蛋白序列, 发现 5 者的同源性达到 73.65 %。用 NCBI 对 NSKs 蛋白进行蛋白序列同源性检索, 选出同源性较高 SKP1 同源蛋白用 MEGA 7.0 对其进行分析 (图 3)。结果发现青天葵 NSK2、NSK3 和 NSK5 聚为一簇, 与小麦和玉米等的同源性较高, 而 NSK7 和 NSK11 聚为一簇, 与多头绒泡菌的同源性较高。研究表明, 尽管 SKP1 蛋白广泛存在于真核生物中, 但该蛋白在进化上具有一定的保守性^[19]。

3.3 GST-NSKs 融合蛋白的表达纯化

根据目的片段设计特异性引物扩增得到单一条带, 菌落 PCR 及测序结果表明基因 NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11 成功插入到 pGEX-4T-2 载体中 (图 4)。将重组质粒转化至

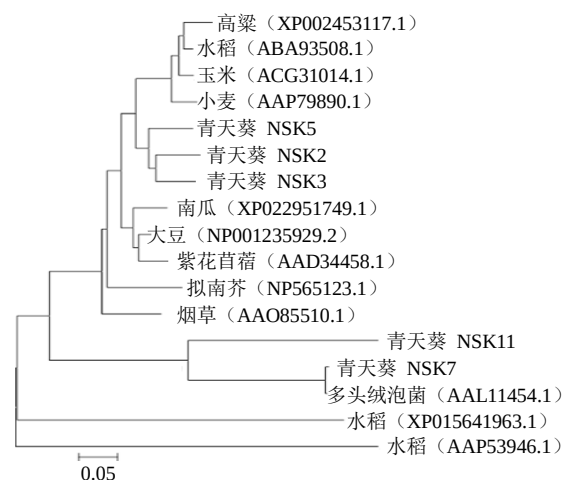
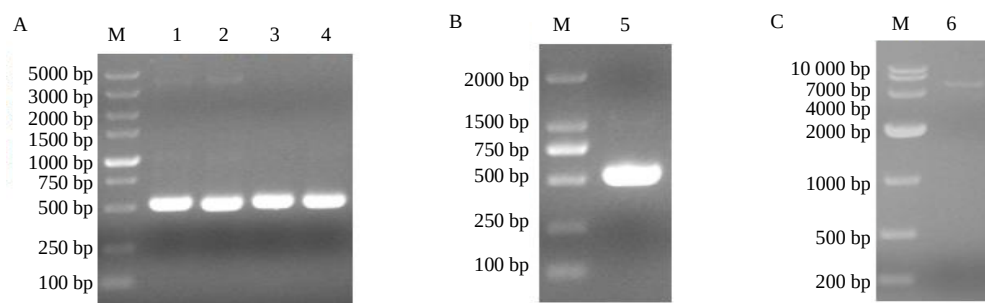


图 3 不同植物中 SKP1 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of SKP1 proteins from different plants

Rosetta (DE3) 感受态中, 经 IPTG 诱导表达 GST 融合蛋白, 用 PurKineTM 谷胱甘肽 S 转移酶标签蛋白纯化试剂盒纯化得到较纯的 NSKs 重组蛋白。

SDS-PAGE 凝胶电泳结果如图 5 所示, 5 者均在约 50 000 处出现目的蛋白。Western Blot 结果表明, 纯化的 GST-NSKs 蛋白的条带大小与预期的蛋白大小相符。

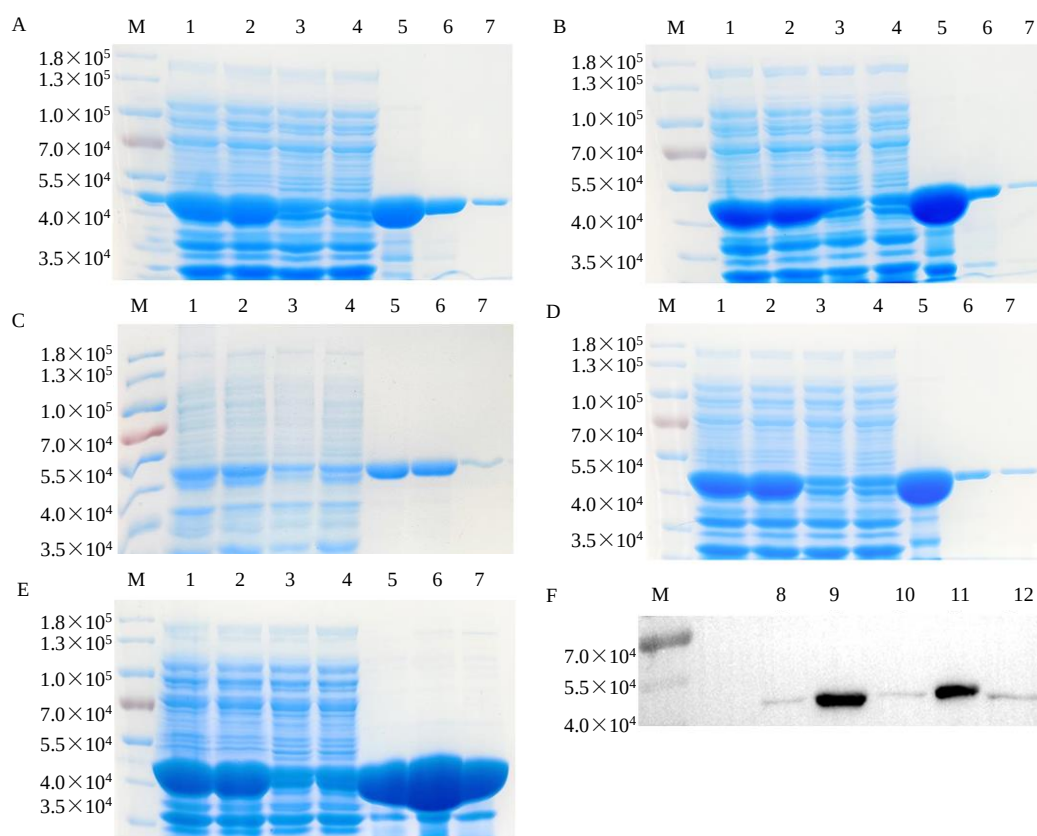


M-Marker 1~4-GST-NSK2、NSK3、NSK7、NSK11 的扩增条带 5-GST-NSK5 的扩增 6-pGEX-4T-2 的双酶切

M-Marker 1~4-amplification of GST-NSK2, NSK3, NSK7, NSK11 5-amplification of GST-NSK5 6-fragments of pGEX-4T-2 empty vector 2 double digested with *Sal* I and *Eco* R I

图 4 NSKs 原核表达载体构建

Fig. 4 Construction of prokaryotic expression vectors of NSKs fused with GST-tag



M-Marker 1-总蛋白 2-上清蛋白 3~4-流穿蛋白 5~7-纯化蛋白 8~12-NSK2、NSK3、NSK5、NSK7、NSK11 A-GST-NSK2 B-GST-NSK3 C-GST-NSK5 D-GST-NSK7 E-GST-NSK11 F-Western Blot 检测 NSKs 蛋白

M-Marker 1-Total proteins 2-Superalbumin 3~4-Flow-through protein 5~7-The purified recombinant NSK proteins 8~12-NSK2, NSK3, NSK5, NSK7, NSK11 A-GST-NSK2 B-GST-NSK3 C-GST-NSK5 D-GST-NSK7 E-GST-NSK11 F-Western blotting analysis of NSKs

图 5 重组 GST-NSKs 蛋白的纯化及 Western blot 检测

Fig. 5 Purification of recombinant GST-NSK proteins and Western blot analysis

4 讨论

SKP1 基因广泛存在于植物中，且植物中一般会存在多个 *SKP1* 基因。如拟南芥中有 21 个表达模式和功能差异较大的 *SKP1* 同源基因 (*ASK1* ~

ASK21)，序列高度相似的 *ASK* 基因的表达水平和方式较为相似，部分 *ASK* 基因定位于核内^[18]。而单子叶植物水稻中也发现了 18 个 *SKP1* 同源基因，从中克隆得到 *OSK1*、*OSK2*、*OSK3* 基因，*OSK1* 是水

稻内具有管家功能的 *SKP1* 基因, 而 *OSK2* 和 *OSK3* 则可能具有与 *OSK1* 不同的功能^[20]。本研究从青天葵中克隆得到 5 个 *SKP1* 同源基因, 5 者相似性高达 73.65%。亚细胞定位预测结果与已发现的 *SKP1* 基因一致, 均能在细胞核内表达。而三级结构预测及亲缘进化树结果均表明, *NSK2*、*NSK3* 和 *NSK5* 和玉米、小麦等单子叶植物的同源性较高, 而 *NSK7* 和 *NSK11* 与多头绒泡菌聚为一簇, 但二者的三级结构较为不同。以上结果均表明, *NSKs* 编码 *SKP1* 类蛋白, 可能具有参与 SCF 复合体的形成从而调控植物的生长发育的功能。在 SCF 复合体的形成中 *NSK2*、*NSK3* 和 *NSK5* 蛋白的功能可能是相似的, 而 *NSK7* 和 *NSK11* 的功能可能有些不同, 还需进一步研究。

SKP1 蛋白能与 F-box 蛋白结合, 即结合不同激素信号受体蛋白结合形成多种 SCF 复合体从而参与生长素、茉莉酸、独脚金内酯等植物激素的信号传导过程^[19]。如拟南芥中的 *ASK1* 和 *ASK2* 能分别与拟南芥的生长素受体 *TIR1* 蛋白和拟南芥的茉莉酸受体 *COI1* 蛋白互作形成 SCF 复合体, 而 *ASK11* 和 *ASK12* 以及小粒水稻 *OmSKP1* 也能与 *COI1* 互作形成 SCF 复合体与泛素-蛋白酶体途径蛋白降解^[31-35]。此外, *ASK1* 与 *ORE9/MAX2* 蛋白互作及水稻 *OSK1*、*OSK5*、*OSK20* 与 *OsD3* 互作从而参与独脚金内酯信号的传导^[5,36]。如上所述, *SKP1* 类蛋白能与不同的 F-box 蛋白结合, 有些 *SKP1* 蛋白能与多种 F-box 蛋白结合, 但结合作用强弱有所不同, 而有些 *SKP1* 蛋白至今未能找到与其互作的 F-box 蛋白^[33,37]。本研究建立了适用于携带 GST 标签的 *NSKs* 蛋白的原核诱导表达条件, 经 Western Blot 检测表明成功诱导并纯化得到可溶性良好的、携带 GST 标签的 *NSKs* 蛋白, 后期可用于 Pulldown 实验验证与之互作的 F-box 蛋白。试验中发现 GST-*NSK5* 融合蛋白的表达量较另外 4 者的低, 可能是诱导时间不够, 后期蛋白功能验证试验可适当延长诱导时间, 以提高目的蛋白的表达水平, 获得足量的蛋白。有学者从黄瓜中克隆得到 *Skp1* 基因并纯化得到 *Skp1* 蛋白, 利用该蛋白制备的抗血清能从黄瓜中提取到的蛋白中检测出 *Skp1* 蛋白^[24]。这为研究青天葵中 *NSKs* 蛋白功能提供了一定的研究思路, 可进一步通过纯化得到的 *NSKs* 蛋白制备目的蛋白的特异抗体, 检测青天葵原植物中 *NSKs* 的蛋白表达情况等。本研究表明从青天葵中克隆得到的 5 个 *NSKs* 基因具有

一定的保守性, 五者在 SCF 复合体中发挥的功能有待后续的深入研究验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zimmerman E S, Schulman B A, Zheng N. Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20(6): 714-721.
- [2] Schulman B A, Carrano A C, Jeffrey P D, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 381-386.
- [3] McGinnis K M, Thomas S G, Soule J D, et al. The *Arabidopsis* SLEEPY₁ gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1120-1130.
- [4] Li C J, Liang Y, Chen C B, et al. Cloning and expression analysis of TSK1, a wheat SKP₁ homologue, and functional comparison with *Arabidopsis* ASK₁ in male meiosis and auxin signalling [J]. *Funct Plant Biol*, 2006, 33(4): 381-390.
- [5] 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]. *Plant J*, 2007, 50(1): 80-94.
- [6] Shen H, Luong P, Huq E. The F-box protein MAX2 functions as a positive regulator of photomorphogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1471-1483.
- [7] Xie D X, Feys B F, James S, et al. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility [J]. *Science*, 1998, 280(5366): 1091-1094.
- [8] Samach A, Klenz J E, Kohalmi S E, et al. The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem [J]. *Plant J*, 1999, 20(4): 433-445.
- [9] Mizoguchi T, Coupland G. ZEITLUPE and FKF1: Novel connections between flowering time and circadian clock control [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(10): 409-411.
- [10] Dieterle M, Zhou Y C, Schäfer E, et al. EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(8): 939-944.
- [11] 李驰峻. 小麦 SKP1 同源基因 TSK1 的克隆和功能分析 [D]. 北京: 中国科学院研究生院(植物研究所), 2006.
- [12] Seo K I, Song E, Chung S, et al. Roles of various cullin-RING E3 ligases involved in hormonal and stress

- responses in plants [J]. *J Plant Biol*, 2012, 55(6): 421-428.
- [13] Hong M J, Kim D Y, Seo Y W. SKP₁-like-related genes interact with various F-box proteins and may form SCF complexes with Cullin-F-box proteins in wheat [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 969-981.
- [14] Aravind L, Koonin E V. Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain [J]. *J Mol Biol*, 1999, 285(4): 1353-1361.
- [15] Yu Z K, Gervais J L, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP₁/SKP₂ complex and regulates p21(CIP₁/WAF₁) and cyclin D proteins [J]. *PNAS*, 1998, 95(19): 11324-11329.
- [16] Connelly C, Hieter P. Budding yeast SKP₁ encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression [J]. *Cell*, 1996, 86(2): 275-285.
- [17] Yamanaka A, Yada M, Imaki H, et al. Multiple Skp1-related proteins in *Caenorhabditis elegans*: Diverse patterns of interaction with Cullins and F-box proteins [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(4): 267-275.
- [18] Kong H Z, Landherr L L, Frohlich M W, et al. Patterns of gene duplication in the plant SKP₁ gene family in angiosperms: Evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth [J]. *Plant J*, 2007, 50(5): 873-885.
- [19] 叶佑丕. 拟南芥 ASK 基因研究进展 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(6): 683-690.
- [20] 赵晋平. 水稻 (*Oryza sativa*.) Osk 基因分离及功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [21] Nadeau J A, Zhang X S, Li J, et al. Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 213-239.
- [22] 张付云, 白雪芳, 杜昱光, 等. 烟草 SKP1 基因 cDNA 的克隆分析及原核表达 [J]. 作物学报, 2007, 33(4): 693-696.
- [23] Chen Y, Chi Y, Meng Q, et al. GmSK1, an SKP₁ homologue in soybean, is involved in the tolerance to salt and drought [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 127: 25-31.
- [24] 孙新艳, 魏莹, 韩晓玉, 等. 黄瓜 S 期激酶相关蛋白 Skp1 的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. 华北农学报, 2017, 32(6): 73-77.
- [25] 殷姗姗, 李茂福, 王华, 等. 草莓 FaSKP1-1 基因的克隆与表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(12): 28-34.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录 (第 1 卷): 红色名录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 131.
- [30] 黄琼林. 青天葵转录组特征研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [31] Dezfulian M H, Soulliere D M, Dhaliwal R K, et al. The SKP₁-like gene family of *Arabidopsis* exhibits a high degree of differential gene expression and gene product interaction during development [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50984.
- [32] Gray W M, Kepinski S, Rouse D A, et al. Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins [J]. *Nature*, 2001, 414(6861): 271-276.
- [33] Ren C, Pan J, Peng W, et al. Point mutations in *Arabidopsis* Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response [J]. *Plant J*, 2005, 42(4): 514-524.
- [34] Dai L Y, Xu L H, Huang D F, et al. ASK₁ physically interacts with COI₁ and is required for male fertility in *In* [J]. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2002, 45(6): 631-636.
- [35] 吴渊源, 韦鹏飞, 郭崇炎, 等. 小粒野生稻 OmSKP1 基因的克隆与功能初探 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(23): 7641-7648.
- [36] 王涛. 水稻独脚金内酯相关基因的图位克隆与功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [37] Takahashi N, Kuroda H, Kuromori T, et al. Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(1): 83-91.

[责任编辑 时圣明]