

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.002

铁皮石斛泛素结合酶 *DoUBC9* 的克隆鉴定与表达分析*

马凌晖 欧景丹 刘荣荣 胡睿 王万军[△] 郭建秀[△]

(西南交通大学 生命科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:本研究旨在探讨泛素结合酶 UBC9 在铁皮石斛原球茎发育过程中的分子机制, **方法:**利用生物信息学手段,从已获得的铁皮石斛基因组中鉴定出 UBC9 基因,命名为 *DoUBC9*,并利用 RACE 技术,克隆出 *DoUBC9* 3' 端,通过与基因组序列拼接,获得完整序列。 **结果:**本研究首次从铁皮石斛基因组中运用生物信息学的方法,鉴定出 *DoUBC9*,并通过 RACE 技术克隆后拼接,得到完整的 *DoUBC9*,基因全长为 7176bp, CDS 长为 447bp,共编码 148 个氨基酸。亚细胞定位预测结果表明, *DoUBC9* 大概率分布于分泌囊泡和质膜上。序列比对和进化树分析表明,铁皮石斛 *DoUBC9* 和其他物种中的 UBC9 拥有高度保守的 UBCc 结构域,进化关系高度保守。qRT-PCR 分析表明,在不同组织部位中, *DoUBC9* 在愈伤组织中的表达量最高、叶中表达量最小;在原球茎发育过程中,在 P1 时期具有最高表达量,其他各时期表达量较小,表明该基因可能促进了植物体的细胞快速分裂与生长。 **结论:**通过分子建模方式,首次构建出 *DoUBC9* 蛋白的基本模型,并通过不同的评价方式确定了以人泛素结合酶 E2 H 结构(2Z5D)为模板的为最优模型。

关键词:铁皮石斛;泛素结合酶 *DoUBC9*;基因克隆;进化表达分析

中图分类号: Q751; Q781; S567.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)13-2407-07

Clonal Identification and Expression Analysis of Ubiquitin-conjugating enzyme *DoUBC9* in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo*

MA Ling-hui, OU Jing-dan, LIU Rong-rong, HU Rui, WANG Wan-jun[△], GUO Jian-xiu[△]

(College of Life Science and Engineering Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To study the molecular mechanism of the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9 in the development of protocorms of *officinale*. **Methods:** UBC9 was identified from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo genome by bioinformatics, named *DoUBC9*. The cloning and splicing of RACE was used to obtain the complete *DoUBC9*, and the 3' end of *DoUBC9* gene was cloned and then spliced with the genomic sequence to obtain the complete sequence. **Results:** The full length of the gene was 7,176 bp and the CDS was 447 bp, encoding a total of 148 amino acids. Subcellular localization prediction results show that *DoUBC9* has a high probability of being distributed on secretory vesicles and plasma membrane. Sequence alignment and phylogenetic tree analysis indicated that UBC9 from *officinale* and other species had highly conserved UBCc domains, and the evolutionary relationship was highly conserved. qRT-PCR analysis showed that *DoUBC9* had the highest expression in callus and the lowest expression in leaves in different tissues. During protocorm development, it had the highest expression in P1 and less expression in other periods, indicating that the gene may promote rapid division and growth of cells in plants. **Conclusions:** The basic model of *DoUBC9* protein was constructed for the first time by molecular modeling. The optimal model of human ubiquitin-binding enzyme E2 H structure (2Z5D) was determined by different evaluation methods.

Key words: *Dendrobium Officinale* Kimura et Migo; *DoUBC9*; Gene Cloning; Evolutionary Expression Analysis

Chinese Library Classification(CLC): Q751; Q781; S567.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2407-07

前言

蛋白质是细胞的基础物质和一切生命活动的执行者,而蛋白质修饰是必不可缺的。在生物体中,依赖泛素或类泛素的翻译后的蛋白修饰被证实实现了对多种生物过程的调控,如细胞周期变化、细胞增殖与分化、细胞凋亡、DNA 修复、免疫识别以

及信号转导等^[1]。泛素化修饰是蛋白质翻译后修饰的一种常见的手段,通过泛素相关酶的级联反应,实现对内源蛋白的降解^[2]。UBC9 属于 E2 家族中的一员,具有 150 个左右的氨基酸残基,是主要的核蛋白之一,可同时定位于核孔复合物的两侧^[3]。同时,UBC9 是唯一一个既作用于泛素化过程又作用于类泛素化过程中的泛素结合酶,而且是类泛素化过程中唯一的结

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31371232,31271302);中央高校基本科研业务费专项资金资助(2682017CX093)

作者简介:马凌晖,硕士研究生,研究方向:发育生物学, E-mail: 895702002@qq.com

[△] 通讯作者:王万军,教授,主要研究方向:发育生物学, E-mail: wanjunwang@home.swjtu.edu.cn;

郭建秀,讲师,主要研究方向:生物信息学, E-mail: jx.guo@foxmail.com

(收稿日期:2018-11-31 接受日期:2018-12-26)

合酶,对类泛素化进程起着关键作用^[4],其 93 位半胱氨酸残基与 SUMO 的 C 端甘氨酸残基通过硫酯键形成 SUMO-UBC9 复合物中间体,并且促进底物蛋白上的赖氨酸基团形成一个牢固的异肽键,从而使 SUMO 分子结合到靶蛋白上,完成 SUMO 化修饰^[5]。

UBC9 是 SUMO 修饰途径中唯一的 E2 酶,近年来在肿瘤等靶点治疗领域有大量研究报道。在现阶段研究中,UBC9 基因在人体广泛表达但是表达水平在不同组织中有所不同,具有组织特异性,尤其在多种癌细胞中呈现高表达^[6]。同时,UBC9 被证明为是一种新型的哺乳动物内质网应激反应调节器,会促进卵巢上皮癌细胞的增殖^[7]。由于 UBC9 的生物学特性,现已成为多种癌症的治疗靶点^[8],但少见于在植物中的相关研究,尤其在生长、抗逆和抗病等方面。

铁皮石斛属于兰科植物,具有特殊的原球茎发育模式,目前对其发育模式的分子机制认识有限^[9]。本研究利用铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 基因组数据([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Dendrobium officinale](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Dendrobium_officinale)),以及原球茎的二代、三代转录组数据,从中筛选到一条 *DoUBC9*,利用 RACE 技术证实了 *DoUBC9* 在原球茎发育过程中的表达,并通过利用 Discovery Studio 3.0 对其进行分子建模,并通过不同的评价方式分析出最优分子模型,最后使用 qRT-PCR 技术分析了 *DoUBC9* 在铁皮石斛各个组织(根、茎、叶和愈伤组织)以及原球茎各个时期(P1-P7)的表达量情况,为进一步研究 *DoUBC9* 在铁皮石斛原球茎发育过程中的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 取株高 3~4 cm、叶片数量 4~5 片的铁皮石斛幼苗,获取根、茎、叶组织材料,每 100 mg 分管;取铁皮石斛愈伤组织,每 100 mg 分管;取各原球茎时期(P1~P7)的原球茎,每 100 mg 分管。材料放入液氮中,迅速冷冻,放入 -80℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 PCR 引物设计 根据铁皮石斛基因组数据库中的 *DoUBC9*(*Dendrobium_GLEAN_10131663*)CDS 数据,利用软件 Primer 5.0 设计巢式 PCR 引物、q-PCR 引物、内参引物,以及通用引物 3RP、3RNP,并由成都擎科新业生物技术公司合成(见表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将分管冷冻保存的材料依次取出放入预冷研磨仪中,快速研磨,使用 RNA Fast Kit (OMGEA)提取试剂盒提取总 RNA,并利用酶标仪测定 OD₂₆₀,计算 RNA 浓度。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,放至凝胶成像仪(GENE GENIUS)中观察 28s 和 18s 条带的完整性。以总 RNA 为模板,使用逆转录酶 Reverse Transcriptase M-MLV(TAKARA)和引物 Oligo(dT)₁₈ 进行逆转录,-80℃ 低温保存。

1.2.2 *DoUBC9* 基因鉴定 本研究采用巢式 PCR 技术,将产物电泳后,回收目标产物,3' 端加尾后,使用 pGEM-T Easy Vector (Promega) 载体连接目的基因后转入感受态大肠杆菌(DH5α)中,使用蓝白斑筛选技术,挑选出阳性克隆,送交擎科生物公司

表 1 *DoUBC9* 相关引物

Table 1 The primers of *DoUBC9*

引物名称 The name of the primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5' to 3')
UBC9-W	GTTTCACTGGCAAGCAA
UBC9-N	ACAATAATGGGTCTCTCTG
UBC9-RQ-F	CACTGGCAAGCAACAAT
UBC9-RQ-R	TGGGCTATCAGGAGGAC
3RP	GTCAACGATACGCTACGTAACG
3RNP	TACGTAACGGCATGACAGTG
Oligo(dT) ₁₈	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG GCATGACAGTG(T) ₁₈
ASS-RQ-F	GTGCTGACCGTTGATCAGA
ASS-RQ-R	AGAAGCGGGAGAGAGTTCTCT
GAPDH-RQ-F	GGCGACTCCCCTCACTACTA
GAPDH-RQ-R	CAGGCATCTCATTGCCCAGA
Actin1-RQ-F	TGAGCGTGAGATTGTGAGAGAC
Actin1-RQ-R	GATTCTGTCTGCTTCCATACCA
APH1L-RQ-F	TGCCTGCGTACTTTGCATTG
APH1L-RQ-R	GTACCAAAGGAGGGGCCAAA

测序。

1.2.3 *DoUBC9* 序列分析 用 BLAST 进行同源序列比对和相似性搜索;用 Expasy(<http://web.expasy.org/>)在线软件进行编码蛋白的理化性质推测;用 WOLF PSORT(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)在线软件进行亚细胞定位预测;用 TMH-MM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件进行跨膜预测;用 bioedit 软件进行基因序列拼接;用 SOPMA(<http://npsa-prabi.ibcp.fr/>)在线软件进行二级结构预测;用 ClustaX 软件对序列进行比对分析;用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线软件对其结构域进行分析;用 MEGA 7.0 软件,使用邻接法构建进化树。

1.2.4 分子建模及评价 分子建模使用 Discovery Studio 3.0 平台,以 PDB 数据库中相似度大于 30%的蛋白质作为模板,构建分子模型,并且利用 Profile-3D、Ramachandran plot 以及 ERRAT 评估模型,最终获取 *DoUBC9* 最佳分子模型。

1.2.5 荧光定量分析 以各不同组织和不同时期原球茎提取的总 RNA 逆转录而来的 cDNA 作为模板,使用成都擎科新业生物公司 Fast qPCR MIX(SYBR Green I)酶,通过 Roche@96 荧光定量仪进行扩增。每个样本采用三组生物学重复和三组技术重复,获取内参基因和目的基因的 Ct 值。目的基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 来计算。

2 结果

2.1 *DoUBC9* 的克隆鉴定

克隆产物经琼脂糖凝胶电泳检测获得大小约为 450 bp 核酸片段,与预测片段大小基本一致,结果如图 1 所示。该产物经成都擎科新业公司测序,与基因组中 CDS 比对后,除了单个碱

基突变外,完全一致,验证成功。通过序列比对,*DoUBC9*与NCBI中编号XM_020845489.1的mRNA相似度达到99%,其5'UTR长为100 bp,3'UTR为369 bp,处于铁皮石斛基因组 Scaffold312。

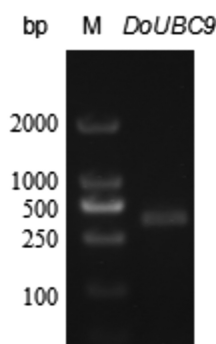


图1 *DoUBC9* 克隆结果图

Fig. 1 Cloning result of *DoUBC9*

将 *DoUBC9* 对应到基因组序列上,得到全长 7,176bp 的基因组序列,其中 CDS 长 447bp,拥有 3 个外显子和 2 个内含子,基因结构如图 2。

2.2 *DoUBC9* 生物信息学分析

2.2.1 *DoUBC9* 蛋白分析 *DoUBC9* 蛋白由 148 个氨基酸残基构成,分子量为 16,436.97ku,等电点 pI 为 7.74,原子个数为 2,295,为不稳定、疏水蛋白,体外半衰期为 30h。*DoUBC9* 蛋白拥有 UBCc 保守结构域,位于 4~143 位氨基酸残基。

DoUBC9 蛋白的亚细胞定位预测的结果如下:48.0%位于

分泌系统囊泡中,36.0%位于质膜上,16.0%位于细胞质中,如图 3。

DoUBC9 二级结构预测,如图 4(图中蓝色表示 α 螺旋,红色表示旋转,绿色表示延伸链,紫色表示环绕)。

2.2.2 同源性与系统发育分析 在 NCBI 上提交 *DoUBC9* 序列,查找到与之相似的序列有 100 条,相似度范围为 85~91%,其中植物物种序列有 13 条,分别为:芦笋(*Asparagus officinalis*) 91%、石竹(*Cynara cardunculus*) 90%、向日葵(*Helianthus annuus*) 89%、番木瓜(*Carica papaya*) 89%、小果野芭蕉(*Musa acuminata*) 88%、枣(*Ziziphus jujuba*) 88%、桑(*Morus notabilis*) 87%、西葫芦(*Cucurbita pepo*) 88%、南瓜(*Cucurbita moschata*) 88%、木豆(*Cajanus cajan*) 89%、木本棉(*Gossypium arboreum*) 88%、蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*) 85%、胡杨(*Populus euphratica*) 85%。

选取上述各物种的结构域序列,进行多序列比对。经比对发现,所有序列中保守结构域相似度极高,拥有高度保守的“MASKRILKELKDLQKDPPTSCSAGPVAEDMFHWQATIMGPPDSPYAGGVFLVTIHFPDPYPFKPPK”的蛋白基序,进一步研究发现,其激活位点为“FHPNINSNGSICLDIL”,其中 C 为半胱氨酸活性位点,在 ATP 的作用下催下 E2 连接酶与其他蛋白的共价结合。如图 5。

选取上述相似度高的物种序列,采用邻接法(Neighbor-Joining),使用 MEGA 7.0 构建进化树。进化分析表明,属于兰科单子叶植物的铁皮石斛,与同属于单子叶的芦笋、蝴蝶兰的亲缘关系较近,其次是石竹、向日葵,和属于双子叶的胡杨、

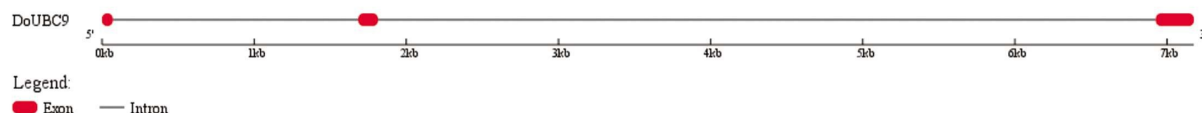


图2 *DoUBC9* 结构

Fig. 2 The structure of *DoUBC9*

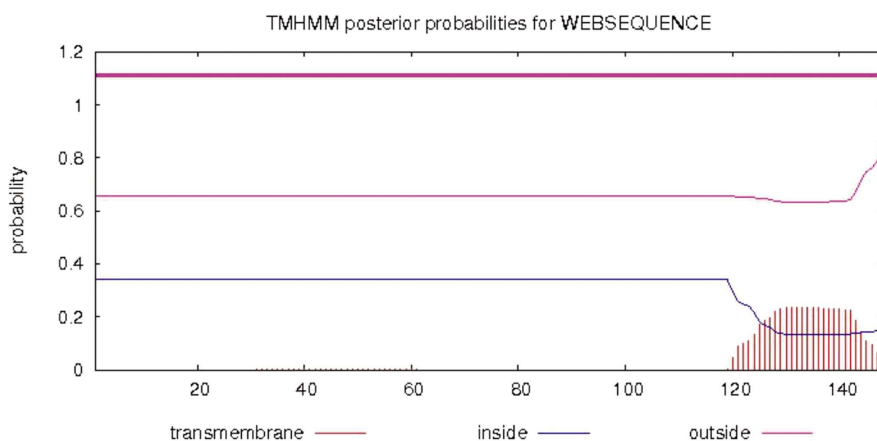


图3 *DoUBC9* 跨膜预测

Fig. 3 The transmembrane prediction of *DoUBC9*

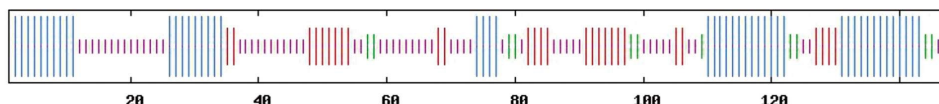


图4 *DoUBC9* 二级结构预测

Fig.4 The secondary structure prediction of *DoUBC9*



图 5 多序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment

桑、枣等灌木、乔木亲缘关系较远。进化树分析与植物学分类一致,证明了进化关系的准确性,如图 6。

2.3 DoUBC9 分子建模及分析

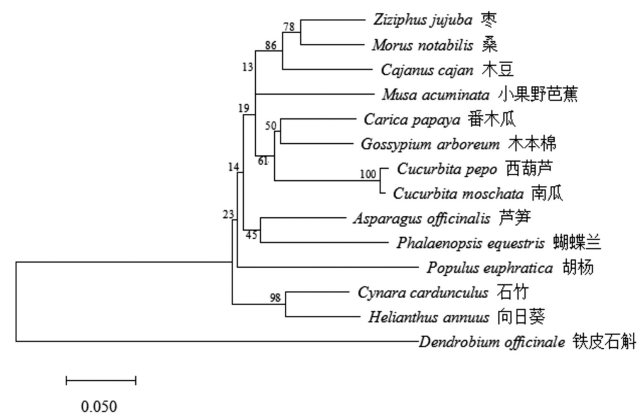


图 6 多物种 UBC9 基因进化树

Fig. 6 UBC9 phylogenetic tree of multi-species

目前,DoUBC9 蛋白尚无明确的晶体结构,将 DoUBC9 的 CDS 序列翻译后的蛋白序列提交到 PDB(Protein Data Bank)库中,搜索到 4 个物种已知蛋白晶体结构物种的相似模板,且相似度大于 25%,可用于构建分子模型,分别是:拟南芥 UBC9 (4X57)41.90%、恶性疟原虫泛素结合酶 PF 10_0330 结构 (2ONU)72.70%、人泛素结合酶 E2 H 结构 (2Z5D)67.70%和利

什曼原虫主要泛素结合酶 E2 的结构 (1YF9)29.80%。分子建模采用 Discovery Studio 3.0 软件,并采用三种不同的模型评价方式,来评价构建的 DoUBC9 蛋白结构模型,分别是 Profile-3D、Ramachandran plot 和 ERRAT。构建的蛋白结构模型如图 7。

2.3.1 Profile-3D 评价 Profile-3D 评价是一种基于“穿线法”的模型评估程序,该评价采用 3D-1D 的打分函数来检测所构建模型与自身氨基酸序列的匹配程度关系,分值越高,可信度越高^[10]。在此评价模式中,Expected High Score 与 Expected Low Score 分别代表模型评分可获得的最高和最低分,当得分高于 Expected High Score 则表示模型 100%可信,反之则 100%不可信,处于两者之间时表示可选择。根据表中得分的高低可以判断,模板 2ONU 构建的蛋白模型得分高于其他模型,则在此评价模式下,2ONU 优于其他模型。具体评分如表 2。

2.3.2 Ramachandran plot 评价 Ramachandran plot 评价用于阐述蛋白质或者肽立体结构中肽键内 α 碳原子和羧基原子间的键的旋转度 (psi) 对 α 碳原子和氮原子之间的旋转度 (phi),用来指明所构建模型中的氨基酸残基允许和不允许构象^[11]。图中蓝色线内区域代表“最适区”,紫色线内区域代表“允许区”,其他区域代表“错误区”,所构建模型中氨基酸残基处于最适区可信度最高,反之,处于错误区则可信度最低。图中,模型中有一个氨基酸残基处于错误区,而 2ONU、2Z5D、4X57 无氨基酸残基处于错误区,说明在该评价中,模型 2ONU、2Z5D、1YF9 优于模型 4X57。四种模板所构模型的“拉式”图,如图 8。

表 2 Profile-3D 评分表

Table 2 The evaluation table of profile-3D

模板 PDB ID	Verify Score	Expected High Score	Expected Low Score
4X57	40.22	58.31	26.24
2ONU	53.34	58.31	26.24
2Z5D	51.34	58.31	26.24
1YF9	40.19	58.31	26.24

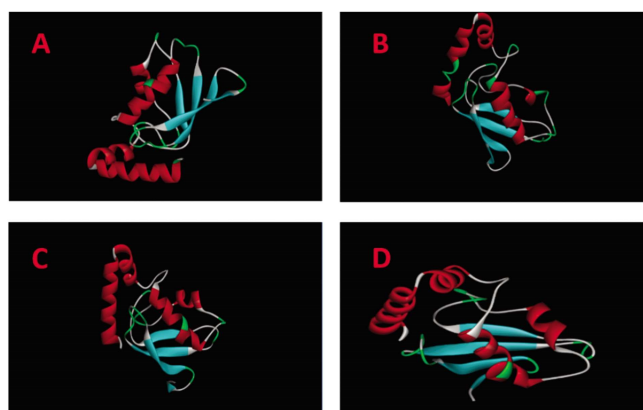


图 7 不同模板的 DoUBC9 构建

Fig. 7 The constructions of DoUBC9 for different templates

A: 模板 4X57 B: 模板 2ONU C: 模板 2Z5D D: 模板 1YF9

A: template 4X57 B: template 2ONU C: template 2Z5D D: template 1YF9

2.3.3 ERRAT 评价 ERRAT 评价是分析了不同原子类型间无键相互作用的统计量,绘制了误差函数关系图,评价所构建的模型原子之间非键相互作用的整体的性质^[12]。在 ERRAT 评价中,误差统计绿色柱为最佳区,黄色柱为可信而红色柱为高于错误率范围,不可信。使用在线软件 ERRAT(<http://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) 对所构建的铁皮石斛泛素 DoUBC9 蛋白质的三维模型进行评估,由图可知,模板 2Z5D 在此评价下,误差统计均为最佳或可用,无超出错率范围情况出现,所构建的模型明显优于其他三个模型,如图 9。

综合上述三种评价模式,以人泛素结合酶 E2 H 结构(2Z5D)为模板所构建的铁皮石斛 DoUBC9 蛋白结构在三种评价模式中为最优结构。

2.4 DoUBC9 表达分析

采用 qRT-PCR 技术,分析 DoUBC9 在不同组织和原球茎不同时期的相对表达量。根据安红强等^[13]对铁皮石斛内参基因的研究,在研究铁皮石斛不同组织表达量时,选用 *Atcin1*(β -Actin, β 肌动蛋白)、*GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate

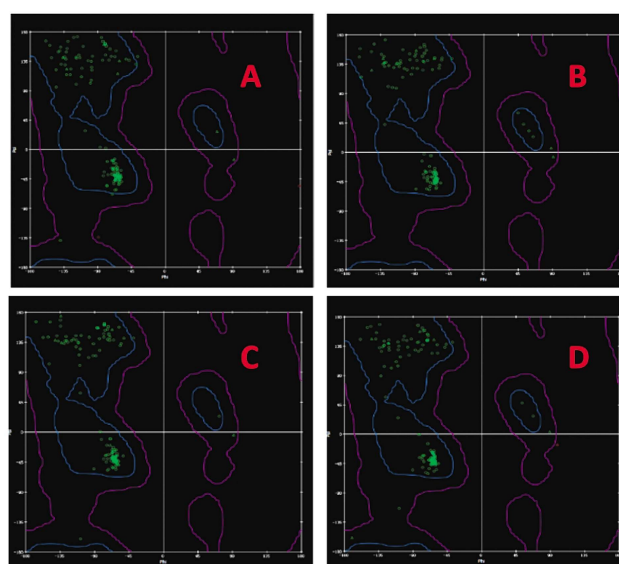


图 8 Ramachandran plot 评价

Fig. 8 The evaluation of ramachandran plot

A: 模板 4X57 B: 模板 2ONU C: 模板 2Z5D D: 模板 1YF9

A: template 4X57 B: template 2ONU C: template 2Z5D D: template 1YF9

dehydrogenase, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶)作为内参基因,而在研究铁皮石斛原球茎各时期表达量时,选用 *ASS*(Argininosuccinate synthase, 精氨酸琥珀酸合成酶)和 *APH1L* (Gamma-secretase sub unit APH1-like, γ -分泌酶亚基 APH1) 作为内参基因。qRT-PCR 的结果显示,该基因在各组织和各时期均广泛表达,如图 10。

经分析发现,DoUBC9 在愈伤组织中表达量最高,其次是茎、根,在叶中表达量最小,两者相差 139.9 倍。在不同时期原球茎的表达谱中,DoUBC9 在 P1 时期表达量远远大于其他时期原球茎中的表达量并且 p2 时大幅下降,在 P3 时期表达量最少,两者相差 56.86 倍,并自 P2 起开始上下小幅度波动,直至原球茎时期结束,相对表达量大小依次为 P1、P7、P2、P6、P4、P5、P2。

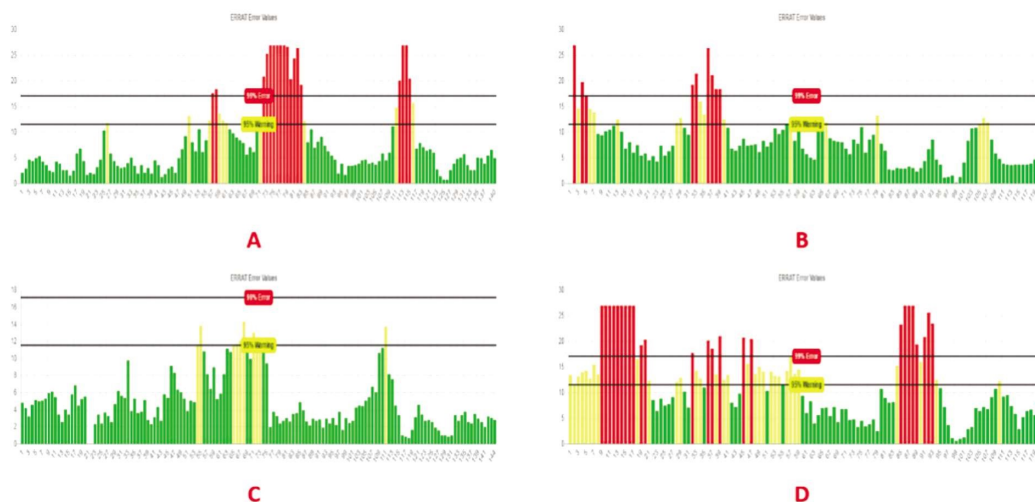


图 9 ERRAT 评价

Fig. 9 The evaluation of ERRAT

A: 模板 4X57 B: 模板 2ONU C: 模板 2Z5D D: 模板 1YF9

A: template 4X57 B: template 2ONU C: template 2Z5D D: template 1YF9

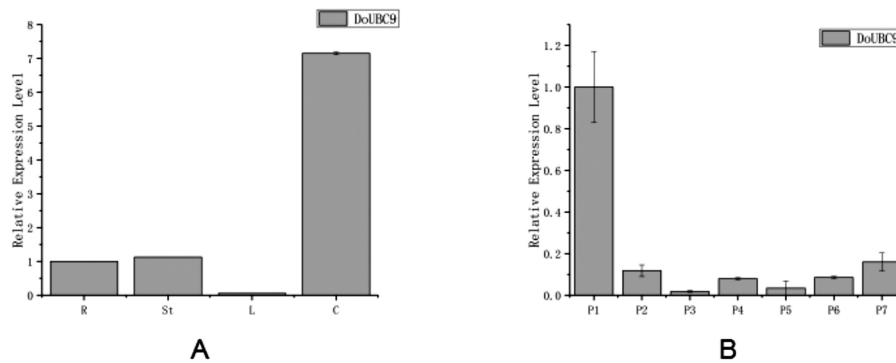


图 10 DoUBC9 不同组织和原球茎不同时期相对表达量

Fig. 10 The relative expression of DoUBC9 in different tissues and protocorms at different Stages

A: 不同组织: R- 根, St- 茎, L- 叶, C- 愈伤组织; B: 不同原球茎时期, P1: 0~5d, 种子活化, 突破种皮; P2: 10~15d, 原球茎形成; P3: 20~25d, 原分生组织形成; P4: 30~35d, 顶端分生组织形成; P5: 45~50d, 椭圆型原球茎形成; P6: 65~70d, 叶原基维管系统形成; P7: 90~100d, 根分生组织形成。

A: different tissues: R-root, St-stem, L-leaf, C-callus; B: different protocorm periods, P1: 0~5d, embryo activation period; P2: 10~15d, protocorm formation; P3: 20~25d, promeristem formation period; P4: 30~35d, apical meristem formation; P5: 45~50d, ellipsoid protocorm formation; P6: 65~70d, the formation of leaf primary vascular system; P7: 90~100d, root meristem formation.

3 讨论

1995 年, UBC9 基因首次被 Seufert 发现^[14], 后在酵母双杂交筛选中被克隆得到^[15]。最初, UBC9 被认为仅仅是泛素结合酶 E2 中的一种, 但随着研究的深入, 发现 UBC9 不仅仅是泛素蛋白, 同时又是类泛素蛋白中的一种^[16], 同时在泛素化和类泛素化中发挥作用, 而且, UBC9 为类泛素化中唯一的结合酶 E2^[17]。

SUMO 化修饰已经被发现至今十余年, 它被认为可以通过各种不同的机制来调节细胞内的蛋白功能, 而异常的修饰则会导致病变的产生。自从 UBC9 基因被发现是 SUMO 化过程中唯一的结合酶后^[18], 便成为了研究热门, 多见于在人或动物中对胚胎发育, 癌症靶点治疗^[19]等方面, 极少有相关植物 UBC9 基因的研究报道。UBC9 基因最初是在低等动物体内发现的, 参与着细胞的减数分裂与细胞周期进程的调控^[20]。近期研究发现, 在哺乳动物中, 抑制 UBC9 基因的表达, 不仅仅可以改变细胞周期, 抑制细胞运动^[21], 同时能够抑制 P53 的表达, 被认为是一种凋亡抑制因子^[22]。同时, 经研究发现, 在许多癌症患者中, 如肺癌^[23]、卵巢癌^[24]、胃癌^[25]、黑色素瘤^[26]等, 发现 UBC9 基因在癌变组织中高度上调, 若抑制 UBC9 基因的表达, 则可以增加肿瘤细胞对抗癌药物的敏感性^[27]。UBC9 基因在动物和植物细胞中均有促进细胞快速分裂的作用, 同时, UBC9 基因被证实具有在酵母中具有缺失致死性^[28], 总之, UBC9 在细胞减数分裂过程和维系细胞存活中发挥着重要作用。

本研究中, 从已有的铁皮石斛基因组中筛选出 UBC9 同源片段, 利用 RACE 技术获得该基因的 3' 端序列, 通过拼接后, 获得 7176bp 的铁皮石斛 *DoUBC9* 全长, 其中 CDS 区为 447bp, 共编码 148 个氨基酸的前体蛋白。该序列中, 包含一个 140 个氨基酸残基的保守结构域 UBCc, 与其他植物物种的比对后发现, 其拥有高度的保守性。在动物细胞中, UBC9 基因同样具有高度保守的结构域, 并与植物 UBC9 中的活性位点相似, 均为 Cys 残基活性位点^[29], 此位点直接关系到 SUMO 化能否顺利完成。同源比对发现, *DoUBC9* 与同属于单子叶的芦笋和蝴蝶兰亲缘关系最近, 与其他乔木、灌木属或双子叶植物亲缘关系较

远, 这符合生物学特征。

通过 qRT-PCR 分析发现, *DoUBC9* 在不同组织中均有表达, 但是存在着较大差异。铁皮石斛中的根可认为是一种延伸茎, 所以根和茎中的相对表达量基本一致, 但是 *DoUBC9* 愈伤组织中的相对表达量远远高于其他组织, 与表达量最低的叶相差了 139.9 倍。愈伤组织为植物体局部受伤后形成的薄壁细胞, 其过程中涉及着大量的细胞增殖, 细胞凋亡和大量的蛋白修饰^[30], 由于 *DoUBC9* 同时参与泛素化和类泛素化的过程^[31], 其在愈伤组织中的高表达正好体现了此基因可促进细胞快速分裂、增殖的特点^[32]。叶片中的表达量低可能是由于叶片中细胞分化基本完成, 最多的只是细胞的凋亡和新生, 相对于愈伤组织中细胞大量的分裂增殖和根、茎延伸过程中的细胞分裂, *DoUBC9* 表达量较低。铁皮石斛胚胎发育为紫苑型^[33], 需要经过原球茎这一时期才能发育成植株。*DoUBC9* 在原球茎不同时期均有表达, 且在 P1 时期具有特异高表达。P1 时期属于铁皮石斛种子活化, 突破表皮, 形成原球茎的开端, 是促使种子内细胞休眠到活动分裂的时期, 这一时期的 *DoUBC9* 的相对表达量与最低 P3 时期相差了 56.86 倍, 表明 *DoUBC9* 在促进种子活化、细胞快速增殖上具有一定的作用。*DoUBC9* 在原球茎各时期均有表达, 即其参与了原球茎发育的全过程, 但是 *DoUBC9* 在 P2 时期及以后, 在原球茎发育后续过程中, *DoUBC9* 表达量突然降低, 这也许与生长速度放缓, 以及受其他因素调控所致, 有待后续研究发现。

由于 UBC9 基因在植物中报道极少, 尚未准确地获得该基因在植物体中作用。通过本研究, 初步发现 UBC9 基因在铁皮石斛为代表的兰科植物中的愈伤组织和种子活化期高表达, 验证了此基因在人或动物研究中具有促进细胞分裂、增殖、分化等作用, 那么是否能够利用 UBC9 基因的这一特性, 选择性的高表达, 促进植物体的生长, 以及如研究癌症一样, 该基因在植物病、抗逆, 如抗旱、抗寒、抗热等^[34]中研究是否具有重要意义, 这可能成为日后研究的一个重要内容。

综上所述, 本研究首次从铁皮石斛基因组中运用生物信息学的方法, 鉴定出 *DoUBC9*, 并通过 RACE 技术克隆后拼接, 得

到完整的 *DoUBC9*, 基因全长为 7176bp, CDS 长为 447bp, 共编码 148 个氨基酸。通过分子建模方式, 首次构建出 *DoUBC9* 蛋白的基本模型, 并通过不同的评价方式确定了以人泛素结合酶 E2 H 结构(2Z5D)为模板的模型为最优模型。利用 qRT-PCR 技术, 分析了铁皮石斛 *DoUBC9* 在不同组织和原球茎不同时期的表达量情况, 为后续的铁皮石斛生长发育研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Varshavsky A. The ubiquitin system [J]. Nature Medicine, 1998, 67(67): 1-17
- [2] Schlesinger D H, Goldstein G, Niall H D. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells [J]. Biochemistry, 1975, 14(10): 2214-2218
- [3] Sekhri P, Tao T, Kaplan F, et al. Characterization of amino acid residues within the N-terminal region of Ubc9 that play a role in Ubc9 nuclear localization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(1): 128-133
- [4] Fei Y, Hao W, Wang L, et al. Orthoreovirus outer-fiber proteins are substrates for SUMO-conjugating enzyme Ubc9[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79814-79827
- [5] 王乌兰, 彭晓东, 俞男寿, 等. SUMO 化在细胞生长中的作用 [J]. 生命科学, 2018, (3): 276-284
- [6] Koh E H, Yong C, Bader D A, et al. Mitochondrial activity in human white adipocytes is regulated by the ubiquitin carrier protein 9/microRNA-30a axis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(47): 24747
- [7] Uemura A, Taniguchi M, Matsuo Y, et al. UBC9 regulates the stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response [J]. Cell Structure & Function, 2013, 38(1): 67
- [8] Moschos S J, Jukic D M, Athanassiou C, et al. Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues [J]. Human Pathology, 2010, 41(9): 1286-1298
- [9] 李清, 李标, 郭顺星. 兰科石斛属植物分子生物学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2753-2761
- [10] 宋涛, 冯斌, 李娟娟, 等. 川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶的同源建模与分子模拟对接[J]. 生物技术, 2015, 25(3): 247-250
- [11] 朱乾坤. AtNAC1 转录因子的分子建模和铁皮石斛 NAC 家族基因的克隆及表达分析[D]. 西南交通大学, 2014
- [12] 刘贝贝, 张霄, 谢雅晶, 等. Bt Cry1 类毒素共性结构域的分析、表达及鉴定[J]. 中国农业科学, 2016, 49(16): 3130-3139
- [13] An H, Zhu Q, Pei W, et al. Whole-transcriptome selection and evaluation of internal reference genes for expression analysis in protocorm development of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Plos One, 2016, 11(11): e0163478
- [14] Betting J, Seufert W. A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome-dependent path way [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(42): 25790-25796
- [15] Rodríguez-García M J, García-Reina A, Machado V, et al. Characterisation and expression analysis of UBC9 and UBS27 genes in developing gonads of cicindelids (Coleoptera: Cicindelidae) [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2016, 202: 75-82
- [16] Tang X, Li W, Xing J, et al. SUMO and SUMO-conjugating enzyme E2 UBC9 are involved in white spot syndrome virus infection in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Plos One, 2016, 11(2): e0150324
- [17] 陈圳川, 冷冷, 季守平. 泛素/类泛素化调控 DNA 损伤修复机制研究进展[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(2): 169-174
- [18] 邱君瑶, 郭武华. UBC9 与癌症的研究进展[J]. 生命的化学, 2015, 35(3): 301-306
- [19] Fang S, Qiu J, Wu Z, et al. Down-regulation of UBC9 increases the sensitivity of hepatocellular carcinoma to doxorubicin[J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 49783-49795
- [20] Jackson S P, Durocher D. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO[J]. Molecular Cell, 2013, 49(5): 795-807
- [21] Heaton P R, Deyrieux A F, Bian X L, et al. HPV E6 proteins target Ubc9, the SUMO conjugating enzyme [J]. Virus Research, 2011, 158(1): 199-208
- [22] Fukuda T, Kigoshitasho Y, Naganuma T, et al. CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 482(4)
- [23] 李慧, 吴宝刚, 牛慧彦, 等. Ubc9 在肺癌组织中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2014, (10): 2343-2346
- [24] 东梅, 徐扬, 张颐. 调节 Ubc9 基因对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响[J]. 解剖科学进展, 2016, (1): 16-19
- [25] 张冬梅. Ubc9 在胃癌中的表达及其与耐药蛋白的相关性研究[J]. 山西职工医学院学报, 2017, 27(06): 26-29
- [26] S J Moschos, A P Smith, M Mandic, et al. SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas [J]. Oncogene, 2007, 26(29): 4216-4225
- [27] Zhang D, Yu K, Yang Z, et al. Silencing Ubc9 expression suppresses osteosarcoma tumorigenesis and enhances chemosensitivity to HSV-TK/GCV by regulating connexin 43 SUMOylation [J]. International Journal of Oncology, 2018, 53(3): 1323-1331
- [28] Fei Y, Hao W, Wang L, et al. Orthoreovirus outer-fiber proteins are substrates for SUMO-conjugating enzyme Ubc9[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79814-79827
- [29] Agboola A O J, Musa A A, B.A. Ayoade, et al. Clinicopathological and molecular significance of Sumoylation marker (ubiquitin conjugating enzyme 9 (UBC9)) expression in breast cancer of black women[J]. Pathology Research & Practice, 2014, 210(1): 10-17
- [30] 黄娟, 吴鹏飞, 魏志超, 等. 杉木愈伤组织及再生芽分化的细胞学观察[J]. 福建林学院学报, 2017, 37(4): 392-397
- [31] 房慧勇, 朱虹, 丁海麦, 等. 影响愈伤组织中次生代谢产物含量的因素研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2846-2850
- [32] 孟志霞, 王春兰, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛原球茎/类原球茎的研究与应用[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1620-1624
- [33] 贾琪, 吴名耀, 梁康远, 等. 基因组学在作物抗逆性研究中的新进展[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(04): 375-385
- [34] 张美, 张会. 胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA 蛋白)与植物抗逆性研究进展[J]. 生物资源, 2017, 39(03): 155-161