



甘薯IbKFB互作蛋白的筛选及分析

常璐¹, 董海涛¹, 赵彩良², 张红梅³, 武小平³, 吕运韬¹, 贾小云^{1,*}, 唐锐敏^{1,*}, 贺立恒^{2,*}

¹山西农业大学生命科学学院, 山西晋中030801

²山西农业大学农学院, 山西晋中030801

³山西农业大学玉米研究所, 山西忻州034000

*共同通信作者: 贾小云(ji Xiaoyun@sxau.edu.cn)、唐锐敏(ruimin_tang829@hotmail.com)、贺立恒(gsshlh@hotmail.com)

摘要: 甘薯(*Ipomoea batatas*)是一种极为重要的粮食、饲料和工业原料类块根作物。与普通甘薯相比, 紫心甘薯块根中富含花青素, 已成为当前功能性食品开发的热点作物。本课题组前期通过不同薯肉颜色的甘薯块根的小RNA、降解组和转录组测序以及靶向代谢组联合分析发现, Ib-miRNA2111及其候选靶基因(*IbKFB*)可能参与花青素生物合成调控。为了深入探究IbKFB在甘薯花青素生物合成过程中的功能和调控机理, 本研究克隆了*IbKFB*基因, 构建IbKFB的酵母双杂诱饵载体pGBKT7-IbKFB, 采用酵母双杂交(Y2H)技术从甘薯cDNA文库中筛选出21个与IbKFB相互作用的候选蛋白。通过对这些蛋白进行功能注释和分析, 鉴定出5个注释与花青素生物合成相关的候选蛋白, 分别为IbPAL、IbSAUR50、IbERF、IbWDR11和IbGAPCp1。进一步利用Y2H回转实验和双分子荧光互补实验(BiFC)验证了IbKFB与候选蛋白相互作用的真实性。本研究可丰富甘薯花青素生物合成的分子调控网络和植物地下器官花青素代谢调控机制的认识, 为花青素生物强化专用型甘薯新种质的创制提供分子理论基础和基因资源。

关键词: 甘薯; 花青素; IbKFB; 互作蛋白

Screening and analysis of IbKFB interacting protein in sweetpotato

CHANG Lu¹, DONG Haitao¹, ZHAO Cailiang², ZHANG Hongmei³, WU Xiaoping³, LÜ Yuntao¹, JIA Xiaoyun^{1,*}, TANG Ruimin^{1,*}, HE Liheng^{2,*}

¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

²College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

³Maize Research Institute, Shanxi Agricultural University, Xinzhou, Shanxi 034000, China

*Co-corresponding authors: Jia XY (ji Xiaoyun@sxau.edu.cn), Tang RM (ruimin_tang829@hotmail.com), He LH (gsshlh@hotmail.com)

Abstract: Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) is a highly valued root crop used for food, feed and industrial raw material. Compared with ordinary sweetpotato, purple-fleshed sweetpotato storage roots are abundant in anthocyanins, which has become a hot crop in functional food development. In our previous study, through the combined analysis of small RNA, degradation group, transcriptomic sequencing and targeted metabolome of sweetpotato root storage roots with different flesh colors, we discovered that Ib-miRNA2111 and

收稿 2023-02-11 修定 2023-07-04

资助 国家青年科学基金(31900450)、山西省农业科学院应用基础研究计划(YGC2019FZ4)、中央引导地方科技发展资金项目(YDZX-20201400001019)、吕梁市引进高层次人才重点研发项目(2021RC-2-21)、国家外国专家局高端专家引智项目(G2022004007L和G2023004003L)、山西省出国留学人员科研资助项目(2022-094)和忻州市重点研发计划-农业领域(202102025)。

its candidate target gene (*IbKFB*) may be involved in regulating anthocyanin biosynthesis. In order to further explore the function and regulatory mechanism of *IbKFB* in anthocyanin biosynthesis of sweetpotato, we cloned the *IbKFB* gene and constructed the yeast decoy vector pGBKT7-*IbKFB*. Using yeast two-hybridization (Y2H), we screened 21 candidate proteins from sweetpotato cDNA library that interacted with *IbKFB*. By functional annotation and analysis of these proteins, we identified five candidate proteins: *IbPAL*, *IbSAUR50*, *IbERF*, *IbWDR11* and *IbGAPCp1*. Further validation of the interaction between *IbKFB* and candidate proteins was confirmed through Y2H reversion assay and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. This study improves our understanding of the molecular regulatory network of anthocyanin biosynthesis in sweetpotato, as well as the regulation mechanism of anthocyanin metabolism in underground plant organs. Furthermore, it provides a molecular theoretical basis and gene resources for the development of new sweetpotato varieties with enhanced anthocyanin content.

Key words: sweetpotato (*Ipomoea batatas*); anthocyanin; *IbKFB*; interacting proteins

KFB (kelch containing F-box protein)是一类广泛存在各种生物体中的F-box蛋白, 是E3泛素连接酶的家族成员SCF (Skp1-Cullin-F-box)复合物组分之一, 在精细调控细胞许多代谢过程中起到重要作用(朱燕2019)。近年来有研究发现, KFB蛋白可以通过泛素化次生代谢相关酶来调控它们的稳定性, 进一步影响植物中代谢产物的合成与积累, 从而调控次生代谢途径。例如, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现SAGL1 (small and glossy leaves1, a kelch repeat F-box containing protein)的突变导致苯丙类生物合成途径中的花青素和木质素大量积累, 这是由于AtSAGL1与AtPAL1相互作用, 通过降解AtPAL1蛋白影响拟南芥苯丙类化合物的生物合成(Yu等2019)。此外, 在甜瓜(*Cucumis melo*)中也发现CmKFB作为转录后调控因子通过转移类黄酮的代谢通量负向调节柚皮苷查尔酮的产生和积累(Feder等2015)。以上结果表明, KFB蛋白在类黄酮生物合成中发挥重要作用。

甘薯为旋花科甘薯属双子叶藤本植物, 因其产量高、适应性广、营养丰富而成为世界重要的农作物(刘世芳等2020)。相比于普通甘薯, 紫心甘薯块根含有丰富的类胡萝卜素和花青素等抗氧化物质, 因此成为了功能性食品的热门选择, 并在中国和其他亚洲国家广泛种植(Johnson和Pace 2010; Wang等2022)。花青素是一种水溶性的植物类黄酮化合物, 它们可以使植物呈现丰富的色彩并具有一定自我防护机制(庄维兵等2018)。此外花青素在医药领域还具有多种生物活性, 例如对心血

管疾病和高脂血症的促进作用, 以及抗氧化、抗炎症、抗突变和抗肿瘤等作用(Bakuradze等2019)。

本研究前期以不同薯肉颜色(白色和紫色)的2个甘薯品种的块根为试验材料, 利用花青素靶向代谢组和转录组技术联合分析筛选到Ib-miRNA-2111与花青素代谢相关, 并通过降解组测序发现Ib-miRNA2111的靶基因为*IbKFB* (He等2019)。为研究IbKFB在花青素生物合成过程中的调控方式, 本研究构建IbKFB的酵母双杂诱饵载体pGBKT7-Ib-KFB, 通过筛选甘薯酵母cDNA文库获得了与IbKFB相互作用的蛋白, 并进行酵母双杂回转实验与双分子荧光互补实验验证了IbKFB与花青素生物合成相关候选蛋白的互作。本研究可进一步揭示甘薯花青素生物合成的分子调控网络, 为花青素生物强化专用型甘薯新种质的创制提供分子理论基础和基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酵母双杂交菌株Y2HGold (2DP320)购自北京华越洋生物公司; 诱饵载体pGBKT7及猎物载体pG-ADT7由山东青岛欧易生物科技有限公司提供; BiFC载体pXY-106-YFP-N-和pXY-104-YFP-C-由河南大学张学斌教授实验室惠赠; 大肠杆菌(DH5 α)、农杆菌(GV3101和EHA105)及植物表达载体pCam-bial300-GFP均由本实验室保存。

药品试剂: YNB (Yeast Nitrogen Base)及缺陷型培养基均购自北京Coolaber公司; 蛋白胨、琼脂

购自美国BD Difco公司; 酵母粉购自英国OXOID公司; 二甲基亚砜、腺嘌呤硫酸盐购自上海生工生物技术公司; X- α -gal购自Takara公司; 限制性内切酶*Bam*HI、*Nde*I、*Kpn*I、*Xba*I和*Sal*I购自NEB公司。其他试剂均为国产分析纯。

测序及引物合成均送由上海生物工程股份有限公司来完成。

1.2 实验方法

1.2.1 *IbKFB*基因的克隆和诱饵载体的构建

以甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] 品种‘徐薯18’块根的反转录cDNA为模板, 用基因特异性引物扩增*IbKFB*的ORF序列, 引物序列见表1, 利用Axy-gen DNA片段纯化试剂盒纯化回收。双酶切PCR回收产物和诱饵空载体pGBKT7, 16°C过夜连接。连接产物进行大肠杆菌DH5 α 感受态细胞的转化, 使用特异性基因引物对挑取的阳性菌落进行PCR鉴定。提取阳性克隆质粒, 用基因特异性引物和T7/3’ BD这两对引物验证(表1), 并双酶切验证重组质粒pGBKT7-*IbKFB*是否构建正确。

1.2.2 诱饵载体转化Y2HGold酵母菌株

将重组诱饵载体pGBKT7-*IbKFB*转入酵母Y2-H Gold感受态细胞中。挑取5~10个单克隆, 分别接种到5 mL (15 mL离心管) SD/-Trp液体培养基中, 30°C、230 r·min⁻¹过夜培养。吸取菌液做PCR鉴定, 无菌水为阴性对照, 诱饵载体为阳性对照, 以T7与*IbKFB*_BamHI_R为扩增引物(表1), 预期PCR结果为: 阴性对照没有条带, 阳性pGBKT7-*IbKFB*诱饵菌株扩增后得到大小1 274 bp (T7到*Bam*HI间的序

列87 bp+*IbKFB*片段1 187 bp)。

1.2.3 诱饵载体毒性及自激活检测

将pGBKT7空载体与重组诱饵载体pGBKT7-*IbKFB*, 分别转入酵母Y2HGold感受态细胞中, 涂布于SD/-Trp平板上倒置培养2~3 d, 温度为30°C, 观察诱饵菌株和空载体菌株在培养基上的生长和显色情况。

将阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T)、阴性对照(pGBKT7-Lam+pGADT7-T)以及2个诱饵载体(pGBKT7-*IbKFB*+pGADT7)转入Y2HGold酵母菌株中, 涂布并划线于DDO/X (SD-Leu-Trp+X- α -gal)和TDO/X (SD/-His-Leu-Trp+X- α -gal)酵母固体培养基上, 30°C倒置培养2~3 d, 通过菌落生长情况去判断诱饵蛋白是否具有自激活活性。

1.2.4 *IbKFB*互作蛋白的筛选

将诱饵菌株Y2HGold (pGBKT7-*IbKFB*)与本实验室构建的甘薯酵母文库菌株共培养, 于30°C、40 r·min⁻¹情况下培养20 h观察酵母合子, 20 h后将酵母细胞涂布于DDO/X和TDO (SD/-His-Leu-Trp)固体培养基, 于30°C下生长3~7 d。将DDO/X培养基上生长的蓝色酵母菌落以及TDO培养基上正常生长的酵母菌落, 转移至TDO/X和QDO/X (SD/-His-Leu-Trp-Ade+X- α -gal)培养基划线复筛。为了更精准的验证阳性克隆, 将初步复筛的克隆进行摇菌, 然后在TDO/X和QDO/X上进行再次复筛, 最后获得的蓝色菌落即为候选互作蛋白。

1.2.5 酵母阳性克隆鉴定、测序分析及功能分类

提取酵母双杂阳性克隆质粒并转化至DH5 α

表1 所用引物序列和用途
Table 1 Primer sequences and purposes

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
IbKFB_ <i>Nde</i> I_F	<u>GGAGGACCTGC</u> ATATGATGGATGAGAGATCTTATTTTAGG	诱饵载体构建所需 <i>IbKFB</i> 片段扩增
IbKFB_ <i>Bam</i> HI_R	<u>GCAGGTCGAC</u> GGATCCTCATGCAACCATAACAGAACAATT	
T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGAGC	重组诱饵载体鉴定
3' BD	TTTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC	
IbKFB_F_ <i>Bam</i> HI	CGGGATCCATGGATGAGAGATCTTATTT	BiFC载体构建所需基因片段扩增
IbKFB_R_ <i>Sal</i> I	GCGTCGACTGCAACCATAACAGAACAATTT	
IbERF_F_ <i>Xba</i> I	GCTCTAGAATGGCGTCCACCCGTGA	
IbERF_R_ <i>Sal</i> I	GCGTCGACCATCCACAACGGCGCG	

下划波浪线为载体同源序列, 下划直线为酶切位点。

大肠杆菌感受态细胞中,挑取单菌落过夜摇菌(氨苄青霉素抗性, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)后提取质粒,质粒用文库通用引物T7和3' AD检测条带大小。阳性克隆的质粒送公司测序,测序引物为文库通用引物T7和3' AD。将测序所得到的序列通过NCBI网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx-&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)比对后获得候选基因,参考甘薯六倍体功能注释文件,分析候选基因功能,并使用Uniprot网站(<https://www.uniprot.org/>)进行功能注释与分类。

1.2.6 互作蛋白的酵母双杂交回转变验证

将*IbKFB*全长cDNA插入pGBKT7载体作为诱饵,将候选基因*IbERF*全长cDNA插入pGADT7载体,然后把pGADT7-IbERF重组载体与pGBKT7-IbKFB诱饵重组载体共同转化到Y2HGold酵母感受态中,以Y2HGold (pGBKT7-53+pGADT7-T)为阳性对照,Y2HGold (pGBKT7-Lam+pGADT7-T)为阴性对照,点板于DDO (SD/-Trp/-Leu)和QDO/X平板上,30°C倒置培养3~5 d后观察菌斑生长情况。

1.2.7 互作蛋白的双分子荧光互补实验

将*IbKFB*的序列构建到pXY-106-YFP-N-载体上,命名为IbKFB-nYFP;将*IbERF*基因的序列构建到pXY-104-YFP-C-载体上,命名为IbERF-cYFP试验中所需引物序列见表1。

对照组为IbKFB-nYFP+cYFP和cYFP+nYFP蛋白组合,实验组为IbKFB-nYFP+IbERF-cYFP蛋白组合,转化至农杆菌GV3101,挑选阳性克隆培养达到 $\text{OD}_{600}=0.5\sim 0.6$,用浸染液(含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MES}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮, $\text{pH}=5.6$)悬浮农杆菌菌体,使其达到 $\text{OD}_{600}=1.0$,室温静置2~3 h。等体积混合2种含有不同质粒的菌体,选取长势一致的4周龄本氏烟草注射叶片。注射过的烟草在黑暗条件下放置12 h,然后在约21°C条件下培养72 h后,用荧光正置显微镜观察荧光成像。

2 实验结果

2.1 pGBKT7-IbKFB诱饵载体构建及Y2HGold酵母菌转化

扩增得到*IbKFB*基因的ORF序列大小为1 187 bp,与预期目的片段大小相符(图1-A)。重组诱饵

载体pGBKT7-IbKFB用基因特异性引物扩增,以空载体为模板扩不到片段,以重组载体为模板可以扩到1 187 bp的目的片段(图1-B);用载体上的引物T7和3' BD扩增,以空载体为模板扩增到298 bp的片段,以重组载体为模板可以扩到1 463 bp的片段(图1-C)。重组载体pGBKT7-IbKFB经*Nde*I和*Bam*-HI双酶切后应产生1 187 bp的小片段(图1-D),说明诱饵载体构建成功。

pGBKT7-IbKFB转化Y2HGold酵母细胞,经破壁处理后用PCR检测诱饵载体。结果(图1-E)显示,阴性对照未发现扩增出条带,阳性对照扩增出大小为1 274 bp的条带,转化了诱饵载体pGBKT7-IbKFB的酵母菌株中也均扩增出和阳性对照一样大小的条带,说明诱饵载体转化成功及所选克隆均为阳性克隆。

2.2 诱饵载体的毒性和自激活检测

将pGBKT7-IbKFB诱饵菌株和空载体pGBKT7菌株分别涂在SD/-Trp酵母固体培养基上,于30°C条件下倒置培养2~3 d。结果显示,2个酵母菌株均能在SD/-Trp培养基上正常生长,并且菌落数目和大小无太大差别(图2-A),说明诱饵载体表达的融合蛋白对酵母细胞没有毒性。

将阳性对照质粒(pGBKT7-53+pGADT7-T)、阴性对照质粒(pGBKT7-Lam+pGADT7-T)以及诱饵载体(pGBKT7-IbKFB+pGADT7)分别转入酵母菌株Y2HGold中,分别划线于DDO/X和TDO/X酵母固体培养基上。结果显示,转入诱饵载体的酵母菌株在DDO/X固体培养基上可以生长且不变蓝,而在TDO/X固体培养基上不生长(图2-B),说明(pGBKT7-IbKFB+pGADT7)质粒成功转入酵母Y2HGold中,且诱饵载体无自激活效应。

2.3 IbKFB互作蛋白的筛选

将诱饵菌株Y2HGold (pGBKT7-IbKFB)与本实验室构建的甘薯酵母文库菌株共培养,于30°C、 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养20 h后,发现视野内酵母合子细胞大部分为“米奇头或三叶草形状”(图3-A),表明培养液中酵母杂交过程正常。将酵母细胞涂布于DDO/X和TDO固体培养基,在30°C条件下生长3~7 d。随后,把DDO/X培养基的酵母菌落与TDO培养基上正常生长的酵母菌落进行复筛,共获得50个候

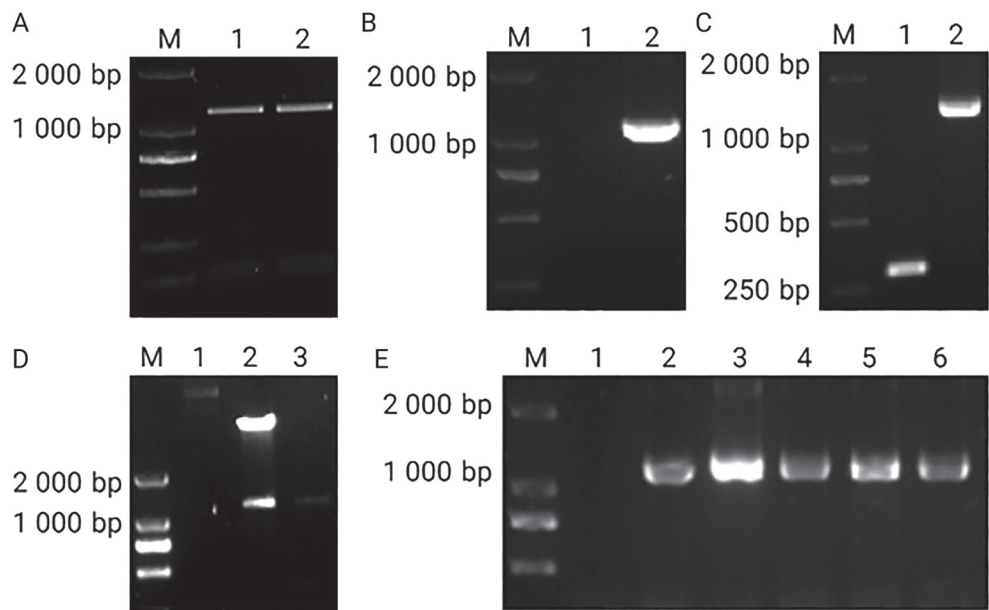


图1 pGBKT7-IbKFB载体的构建及阳性诱饵菌株的PCR鉴定

Fig. 1 Construction of pGBKT7-IbKFB vector and PCR identification of positive bait strains

A: *IbKFB*目的片段; B: *IbKFB_NdeI_F*和*IbKFB_BamHI_R*为引物的扩增产物, 1: pGBKT7模板的PCR片段, 2: pGBKT7-IbKFB模板的PCR片段; C: T7和3' BD为引物的扩增产物, 1: pGBKT7模板的PCR片段, 2: pGBKT7-IbKFB模板的PCR片段; D: pGBKT7-IbKFB重组载体的酶切验证, 1: pGBKT7空载体, 2: pGBKT7-IbKFB重组载体双酶切, 3: *IbKFB*的PCR片段, M: DL2000; E: 阳性诱饵菌株的PCR鉴定, 1: PCR无菌水为模板, 2: pGBKT7-IbKFB质粒为模板的PCR片段, 3~6: 转化后的诱饵菌株Y2H (pGBKT7-IbKFB)为模板的PCR片段, M: DL2000。

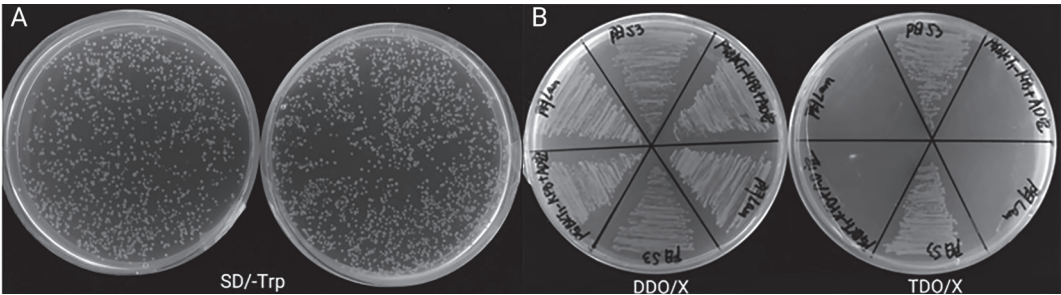


图2 诱饵载体毒性和自激活检测

Fig. 2 Toxicity test and self activation detection of pGBKT7-bait vectors

A: pGBKT7-IbKFB诱饵菌株和pGBKT7空载体菌株Y2HGold在SD/-Trp酵母培养基上涂布的生长情况; B: 阴性对照质粒、阳性对照质粒和(pGBKT7-IbKFB+pGADT7)质粒分别共转化酵母菌株Y2HGold后在DDO/X和TDO/X酵母培养基上的生长情况。

选阳性克隆(图3-B)。为了进一步验证阳性克隆, 将所获得的克隆再进行加压复筛, 最后共获得21个互作蛋白的阳性克隆(图3-C)。

2.4 互作蛋白的克隆和分析

提取酵母双杂阳性克隆质粒后转入DH5α大

肠杆菌感受态细胞进行扩繁, 然后用文库通用引物T7和3' AD鉴定条带分布大小, 电泳结果显示, 21株阳性克隆大小750~2 000 bp (图4)。将阳性克隆质粒送公司测序, 通过对测序获得的*IbKFB*互作蛋白基因序列进行NCBI比对和功能注释, 发现这些

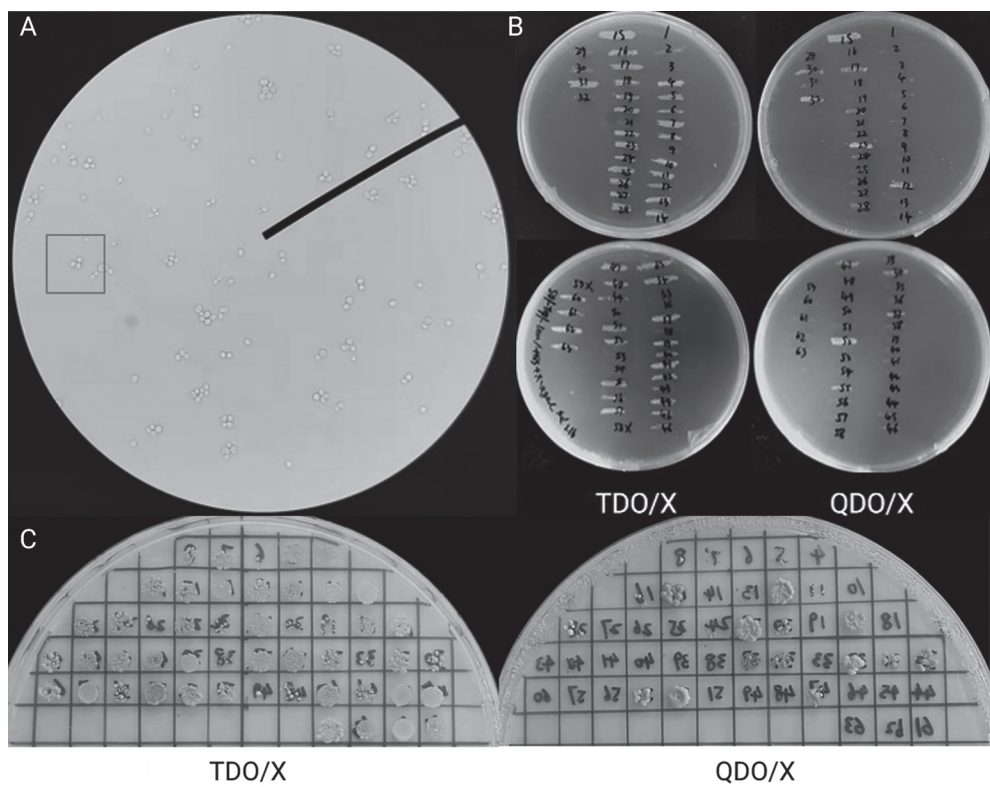


图3 酵母合子细胞(A)、初步复筛结果(B)和再次复筛结果(C)

Fig. 3 Yeast zygote cells (A), the preliminary re-screening result (B) and the re-screening result (C)

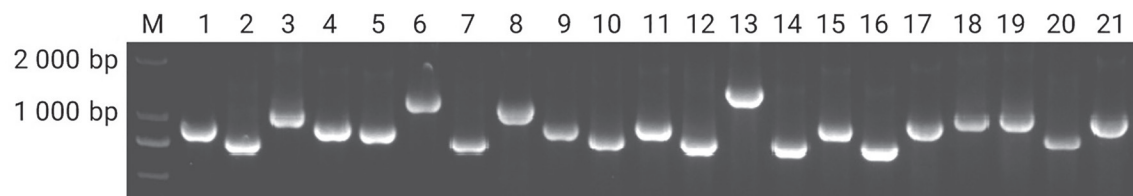


图4 酵母阳性质粒PCR鉴定

Fig. 4 PCR identification of positive plasmids

M: DL2000, 1~21: 酵母阳性质粒模板的PCR片段。

互作蛋白可能参与多个生物学过程, 包括甘薯生长发育、糖代谢、蛋白质泛素化、细胞运输、花青素生物合成等。通过分析基因功能注释与检索相关文献, 进一步确定了5个可能调控花青素生物合成的互作蛋白, 分别为IbPAL、IbSAUR50、IbERF、IbWDR11和IbGAPCp1 (表2)。

2.5 互作蛋白的酵母双杂交回转验证

选取与花青素合成代谢相关的其中1个候选蛋白IbERF进行酵母双杂交回转验证。结果如图5

所示: 转化后的Y2HGold酵母细胞在DDO都能正常生长, 说明诱饵和猎物质粒均已成功转入酵母细胞; 在QDO/X培养基上, 阴性对照不能生长, 含候选基因质粒的酵母细胞都能生长且变蓝, 菌液稀释1 000倍后仍能生长, 表明IbERF这个候选蛋白在酵母系统里与IbKFB互作。

2.6 互作蛋白的BiFC验证

采用体外试验BiFC技术进一步确定IbKFB和IbERF的互作关系。将IbERF序列与BiFC载体融合

表2 与花青素合成调控有关的5个互作蛋白功能注释
Table 2 Functional annotation of 5 candidate proteins related to the regulation of anthocyanin

蛋白名称	登录号	功能注释
IbSAUR50	XP_019193343.1	SAUR蛋白参与Ca ²⁺ 信号与生长素介导的信号转导途径, 而生长素能够促进植物生长和花青素合成
IbERF	XP_031128475.1	直接与乙烯反应元件中的GCC盒相互作用, 是调节乙烯转录所必需的。在调控花青素积累过程中发挥重要作用
IbPAL	XP_031119107.1	植物代谢的关键酶, 催化 L-苯丙氨酸生物合成基于苯丙烷骨架的多种天然产物的第一反应; 花青素合成的前体
IbGAPCp1	XP_031115088.1	参与糖酵解和磷酸盐新陈代谢; 抑制果实成熟并负调控花青素、有机酸及其衍生物、黄酮类物质的含量
IbWDR11	XP_019189607.1	含有2个WD40和1个TPR结构域, WD40蛋白能与MYB和bHLH蛋白互作, 以WMB的形式共同调控花青素的合成

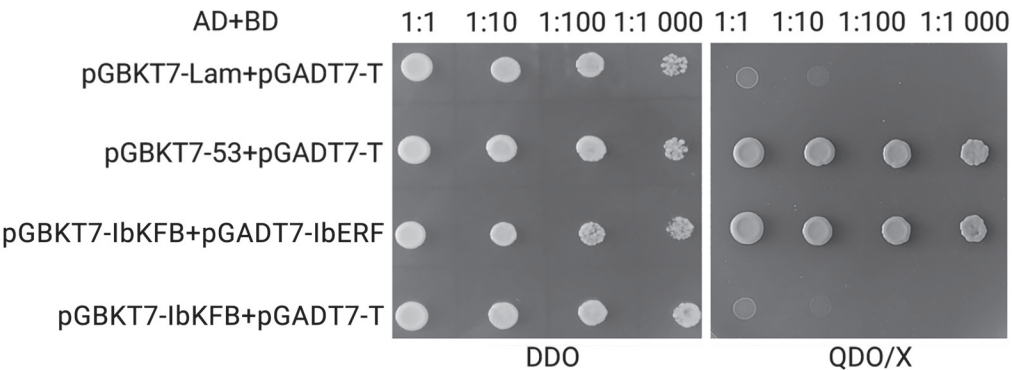


图5 酵母双杂交验证

Fig. 5 Validation of yeast two-hybrid system

Y2HGold (pGBKT7-53+pGADT7-T): 阳性对照, Y2HGold (pGBKT7-Lam+pGADT7-T): 阴性对照, Y2HGold (pGADT7-IbERF+pGBKT7-IbKFB): pGADT7-IbERF与pGBKT7-IbKFB质粒共同转化到Y2HGold酵母感受态中的生长情况; Y2HGold (pGBKT7-IbKFB+pGADT7-T): pGBKT7-IbKFB与pGADT7-T质粒共同转化到Y2HGold酵母感受态中的生长情况, 也是阴性对照。

获得重组载体, 重组载体酶切验证表明载体构建成功(图6-A)。将BiFC空载体与构建成功的重组载体分别转入农杆菌GV3101中, 然后将2种菌液等体积混匀, 注射烟草背面检测荧光信号。结果如图, 对照组(nYFP/cYFP、IbKFB-nYFP/cYFP)均没有检测到荧光信号, 实验组(IbKFB-nYFP/IbERF-cYFP)存在荧光信号, 说明IbKFB和IbERF存在相互作用(图6-B)。

3 讨论

KFB蛋白作为一种负调控因子能够通过泛

素-26S蛋白酶体途径特异性识别靶蛋白并使其泛素化降解来调节细胞活动(Hassan等2015)。在水稻中研究发现, OsFBK1 (*Orza sativa* F-box Kelch 1) 与肉桂酰基辅酶A还原酶(OsCCR14)相互作用, 并控制花药的木质化和根系发育(Borah和Khurana 2018)。有研究发现拟南芥AtKFB通过与苯丙氨酸解氨酶(AtPAL)相互作用并特异性介导其泛素化和降解, 负调控苯丙素的生物合成(Zhang等2013)。此外, 在植物地下器官相关研究发现, 丹参SmK-FB5在根中表达量较高, 并且该蛋白通过泛素化来降解苯丙氨酸解氨酶(SmPAL)进而调控苯丙素生

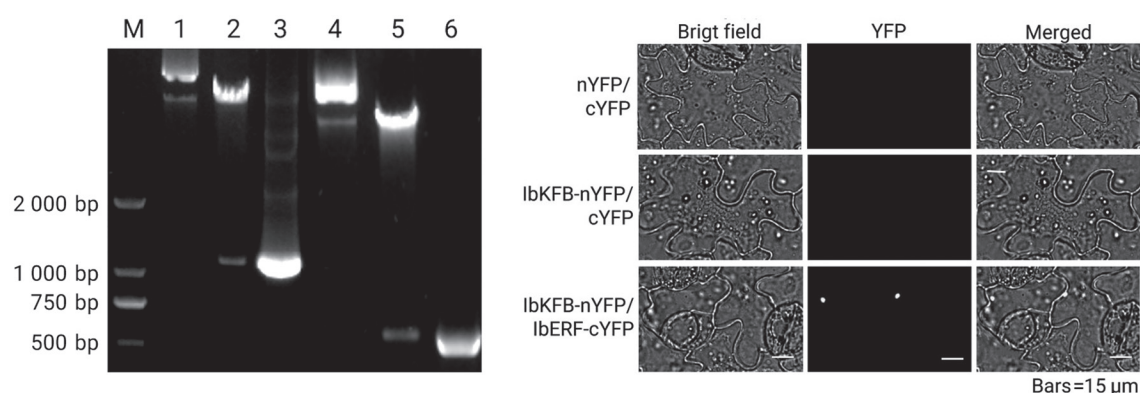


图6 IbKFB与IbERF蛋白的BiFC检测

Fig. 6 BiFC detection of IbKFB and IbERF proteins

A: BiFC重组载体酶切验证, 1: IbKFB-nYFP质粒, 2: *Bam*HI和*Sal*I双酶切IbKFB-nYFP质粒, 3: *IbKFB*基因片段, 4: IbERF-cYFP质粒, 5: *Sal*II和*Xba*I双酶切IbERF-cYFP质粒, 6: *IbERF*基因片段, M: DL2000; B: BiFC检测IbKFB与IbERF蛋白的互作, 标尺代表15 μ m长度。

物合成(Yu等2020)。

为了探究甘薯IbKFB介导块根花青素合成的调控机制, 本研究利用酵母双杂交技术筛选到了甘薯IbKFB的互作蛋白。首先构建了pGBKT7-IbKFB酵母诱饵载体, 检测发现其不具有毒性和自激活活性; 然后通过酵母mating试验筛选出21个与IbKFB相互作用的候选蛋白, 分析发现这些互作蛋白参与了生长素响应、乙烯转录、调控植物次生代谢物合成、泛素依赖性蛋白质分解代谢以及植物防御病原体等过程, 其中有5个候选蛋白与花青素合成代谢相关(IbSAUR50、IbERF、IbGAPCp1、IbPAL和IbWDR11)。为了验证实验的可靠性, 进一步利用酵母双杂交回转实验验证了其中IbERF与IbKFB的相互关系, 并利用双分子荧光互补实验再一次验证了其互作关系。研究发现乙烯反应因子(ERF)在植物生长发育、逆境胁迫和激素信号应答等领域扮演着重要的角色, 尤其是近年来, ERF转录因子在调控植物次生代谢产物合成方面引起了大家广泛的关注(Feng等2020; 肖亮等2020)。袁凌教授实验室发现ERF通过与CrMYC2互作参与了长春花中单萜吲哚生物碱类和黄酮类代谢合成的调控(Paul等2017)。在苹果中发现ERF类转录因子能够调控类胡萝卜素生物合成通路中关键酶基因的表达(Charles等2015), 并且最近在梨和苹果中

均发现ERF也可以调控花青素的积累(毕思琦等2019; Yao等2017)。

本研究筛选了与IbKFB相互作用的蛋白, 发现IbSAUR50、IbERF、IbGAPCp1和IbPAL为IbKFB的互作蛋白, 并且可能调控甘薯块根中花青素的生物合成。在未来的研究中, 还需要通过泛素化实验验证IbKFB是否通过泛素化降解这些候选互作蛋白来负调控花青素的生物合成。本研究初步探究了IbKFB在甘薯花青素合成方面的功能, 有助于揭示IbKFB调控紫色甘薯合成花青素的分子调控网络和作用机制, 为高花青素含量甘薯新品种的选育提供新的研究思路。

参考文献(References)

- Bakuradze T, Tausend A, Galan J, et al (2019). Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radic Res*, 53 (1): 276–281
- Bi SQ, An JP, Wang XF, et al (2019). Ethylene response factor MdERF3 promotes anthocyanin and proanthocyanidin accumulation in apple. *Acta Horti Sin*, 46 (12): 2277–2285 (in Chinese with English abstract) [毕思琦, 安建平, 王小非等(2019). 苹果乙烯响应因子MdERF3促进花青苷和原花青苷积累. *园艺学报*, 46 (12): 2277–2285]
- Borah P, Khurana J (2018). The OsFBK1 E3 ligase subunit affects anther and root secondary cell wall thickenings by mediating turnover of a cinnamoyl-CoA reductase. *Plant Physiol*, 176: 2148–2165

- Charles A, Nicky D, David L, et al (2015). The phytoene synthase gene family of apple (*Malus × domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content. *BMC Plant Biol*, 15 (1): 185
- Feder A, Burger J, Gao S, et al (2015). A kelch domain-containing F-Box coding gene negatively regulates flavonoid accumulation in muskmelon. *Plant Physiol*, 169: 1714–1726
- Feng K, Hou XL, Xing GM, et al (2020). Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Crit Rev Biotechnol*, 40 (6): 750–776
- Hassan MN ul, Zainal Z, Ismail I (2015). Plant kelch containing F-box proteins: structure, evolution and functions. *RSC Adv*, 5 (53): 42808–42814
- He LH, Tang RM, Shi XW, et al (2019). Uncovering anthocyanin biosynthesis related microRNAs and their target genes by small RNA and degradome sequencing in tuberous roots of sweetpotato. *BMC Plant Biol*, 19 (1): 232
- Johnson M, Pace RD (2010). Sweetpotato leaves: properties and synergistic interactions that promote health and prevent disease. *Nutr Rev*, 68 (10): 604–615
- Liu SF, Liu XY, Zhang J, et al (2020). Cloning, subcellular localization and expression analysis of *IbWRKY75* in *Ipomoea batatas*. *Plant Physiol J*, 56 (5): 969–980 (in Chinese with English abstract) [刘世芳, 刘霞宇, 张洁等 (2020). 甘薯 *IbWRKY75* 的克隆、亚细胞定位及表达特性分析. *植物生理学报*, 56 (5): 969–980]
- Paul P, Singh SK, Patra B, et al (2017). A differentially regulated AP2/ERF transcription factor gene cluster acts downstream of a MAP kinase cascade to modulate terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *New Phytol*, 213 (3): 1107–1123
- Wang X, Dai WW, Liu C, et al (2022). Evaluation of physiological coping strategies and quality substances in purple sweetpotato under different salinity levels. *Genes (Basel)*, 13 (8): 1350–1362
- Xiao L, Chen RB, Wu Y, et al (2020). Research progress on effect of AP2/ERF transcription factors in regulating secondary metabolite biosynthesis. *Chin J Chin Mater Med*, 45 (22): 5412–5420 (in Chinese with English abstract) [肖亮, 陈瑞兵, 吴宇等 (2020). AP2/ERF 转录因子调控次生代谢产物生物合成的研究进展. *中国中药杂志*, 45 (22): 5412–5420]
- Yao G, Ming M, Allan AC, et al (2017). Map-based cloning of the pear gene *MYB114* identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis. *Plant J*, 92 (3): 437–451
- Yu H, Jiang M, Xing B, et al (2020). Systematic analysis of Kelch repeat F-box (KFB) protein gene family and identification of phenolic acid regulation members in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Genes (basel)*, 11 (5): 557
- Yu SI, Kim HJ, Yun DJ, et al (2019). Post-translational and transcriptional regulation of phenylpropanoid biosynthesis pathway by Kelch repeat F-box protein SAGL1. *Plant Mol Biol*, 99 (1–2): 135–148
- Zhang XB, Gou MY, Liu C (2013). *Arabidopsis* Kelch repeat F-Box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell*, 25 (12): 4994–5010
- Zhu Y (2019). Functional study of Kelch motif-containing F-box proteins in tartary buckwheat secondary metabolic regulation (dissertation). Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [朱燕 (2019). 苦荞具Kelch基序的F-box蛋白在次生代谢调控中的功能探究(学位论文). 陕西杨凌: 西北农林科技大学]
- Zhuang WB, Liu TY, Shu XC, et al (2018). The molecular regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis and coloration in plants. *Plant Physiol J*, 54 (11): 1630–1644 (in Chinese with English abstract) [庄维兵, 刘天宇, 束晓春等 (2018). 植物体内花青素苷生物合成及呈色的分子调控机制. *植物生理学报*, 54 (11): 1630–1644]