



# 小飞蓬捕光叶绿素结合蛋白基因 *CcLhca-J9* 克隆及表达分析

李祖任<sup>1</sup>, 罗丁峰<sup>1</sup>, 柏浩东<sup>1</sup>, 徐晶晶<sup>1</sup>, 韩进财<sup>1</sup>, 徐强<sup>2</sup>, 王若仲<sup>2</sup>, 柏连阳<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>湖南省农业科学院杂草生物学及安全防控生物学湖南省重点实验室, 长沙 410125; <sup>2</sup>湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 长沙 410128

**摘要:**【背景】恶性杂草小飞蓬(*Conyza canadensis*)危害严重,有效治理手段匮乏。植物源羊脂酸可高效抑制小飞蓬光合作用,是一种具有开发潜力的天牛型植物源除草化合物。捕光叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC)是光合系统 I(PSI)中重要复合体蛋白,在植物进行光合作用中发挥关键作用。【目的】挖掘羊脂酸抑制小飞蓬的潜在靶标基因,为植物源羊脂酸除草剂的开发提供理论依据。【方法】采用同源克隆和 RACE 技术从小飞蓬叶片中克隆 *CcLhca-J9* 的全长序列,并利用 DNAMAN 分析其核酸序列特征。在 NCBI 中搜索 LHC 的高相似度氨基酸序列,采用邻接法构建系统进化树。利用 SWISS-MODEL 和 ExPaSy 在线预测分子量、等电点和蛋白结构。以同源建模结果作为模型,采用 AutoDock 4.2 软件分析羊脂酸与 *CcLhca-J9* 蛋白之间的亲和力。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析羊脂酸和对照药剂阿魏酸及清水处理小飞蓬叶片后 *CcLhca-J9* 表达差异。【结果】成功获得小飞蓬 *CcLhca-J9*, 基因编码区全长为 744 bp, 编码 247 个氨基酸, 分子量为 26.766 kD, 理论等电点为 6.43, 属于 Chloroa-b-bind 家族蛋白。系统进化分析表明, *CcLhca-J9* 与除虫菊(GEW73959.1, *Tanacetum cinerariifolium*)和黄花蒿(PWA35049.1, *Artemisia annua*) Lhca 蛋白进化程度最为接近, 同处于菊科这一分支, 一致性超过 85%, 表明该基因家族保守性较强。*CcLhca-J9* 蛋白二级结构具有螺旋、 $\beta$ 转角、延伸链、无规则卷曲; 以 4y28.1.0 (2.80Å) 为模板进行同源建模, 三级结构是单分子物体, 具有 6 个叶绿体 a 配体, 是一个典型的捕光复合体 I 叶绿素 a/b 结合蛋白。分子对接显示, 羊脂酸与 *CcLhca-J9* 蛋白的氨基酸残基 Gly68、Phe67、Phe69 和 Arg197 在结合过程中产生了氢键和  $\pi$ - $\pi$  的作用力。RT-qPCR 结果显示, 羊脂酸胁迫处理小飞蓬叶片条件下, *CcLhca-J9* 的表达量存在明显差异, 药后 0—8 h 内随时间延长表达量表现出下降的趋势。与对照阿魏酸和清水处理相比, 羊脂酸处理抑制了 *CcLhca-J9* 的表达。【结论】*CcLhca-J9* 具有典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能, 可能参与了羊脂酸抑制小飞蓬叶片生长过程, 是具有开发除草剂潜力的抑草靶标。

**关键词:** 小飞蓬; 光捕获蛋白; 基因克隆; 分子对接; 羊脂酸

## Cloning and Expression Analysis of Light Harvesting Chlorophyll a/b Protein Gene *CcLhca-J9* in *Conyza canadensis*

LI ZuRen<sup>1</sup>, LUO DingFeng<sup>1</sup>, BAI HaoDong<sup>1</sup>, XU JingJing<sup>1</sup>, HAN JinCai<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>2</sup>, WANG RuoZhong<sup>2</sup>, BAI LianYang<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Weeds, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125;

<sup>2</sup>Hunan Provincial Key Laboratory for Phytohormones, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

**Abstract:** 【Background】 *Conyza canadensis*, a pernicious weed, is harmful and lack of the effective management strategy. The

收稿日期: 2020-04-12; 接受日期: 2020-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(31801754)、湖南省农业科技创新资金(2019LS05, 2019LS06, 2019TD03)

联系方式: 李祖任, E-mail: lizuren88214@sina.com。通信作者柏连阳, E-mail: bailianyang2005@aliyun.com

caprylic acid can efficiently inhibit the photosynthesis of *C. canadensis*, which is a potential bio-herbicidal compound. Light harvesting chlorophyll a/b-binding protein (LHC) is the key complex protein in PSI, and plays an important role in photosynthesis.

【Objective】The objective of this study is to explore the LHC gene in response to caprylic acid, and to provide a theoretical basis for the development of bio-herbicide. 【Method】The open reading frame (ORF) of *CcLhca-J9* was cloned from *C. canadensis* leaf by homologous PCR and RACE. The nucleotide sequence was analyzed by DNAMAN. The phylogenetic tree was constructed with the high similarity nucleotide from NCBI by neighbor-joining method and MEGA software. The molecular weight, isoelectric point and protein structure were analyzed using SWISS-MODEL and ExPaSy websites. Using homologous modeling results as a model, the affinity of caprylic acid and CcLhca-J9 protein was analyzed using AutoDock 4.2 software. RT-qPCR was used to analyze the difference of *CcLhca-J9* expression level of caprylic acid, water and ferulic acid treatments. 【Result】The *CcLhca-J9* ORF is 744 bp, encoding 247 amino acid residues with a molecular weight of 26.766 kD and theoretical pI of 6.43, which belongs to Chloroa b-bind family protein. The phylogenetic analysis showed that the CcLhca-J9 had the most closed relationship with the Lhca protein of *Tanacetum cinerariifolium* (GEW73959.1) and *Artemisia annua* (PWA35049.1), and was in the same branch of Asteraceae group, with consistency of more than 85%, indicating that the gene family was conserved. The second structure of CcLhca-J9 protein had alpha helix, random coil, extended strand, beta turn. The homologous three-dimensional model of CcLhca-J9 protein was compared by 4y28.1.O (2.80Å), the tertiary structure was a monomolecular object with six chlorophyll a ligands, which was a typical light harvesting chlorophyll a/b-binding protein. Molecular docking result showed that hydrogen and p- $\pi$  bond interaction were produced between caprylic acid and CcLhca-J9 amino acid residues Gly68, Phe67, Phe69 and Arg197. The result of RT-qPCR showed that the expression level of *CcLhca-J9* was significantly decreased after 0-8 h caprylic acid treatment. Compared with ferulic acid control and water treatment, caprylic acid treatment inhibited the expression of *CcLhca-J9*. 【Conclusion】CcLhca-J9 has the typical function of light harvesting chlorophyll a/b-binding protein, which may be involved in the process of inhibiting the growth of *C. canadensis* leaves and is a herbicidal target with the potential to develop herbicides.

**Key words:** *Conyza canadensis*; light harvesting protein; gene clone; molecular docking; caprylic acid

## 0 引言

【研究意义】小飞蓬 (*Conyza canadensis*) 为菊科 (Asteraceae) 飞蓬属 (*Conyza*) 的一种具较强繁殖和环境适应能力的入侵杂草, 主要分布于果、桑、茶园、草坪和荒地<sup>[1]</sup>。小飞蓬已对草甘膦、草铵膦、莠去津等多种化学除草剂产生不同程度的抗药性, 例如浙江宁波的两个抗草甘膦种群抗性指数分别达 8.28 和 7.92<sup>[2-3]</sup>。据报道, 当小飞蓬 1 m<sup>2</sup> 发生数为 72 株时, 油菜角果数、角果籽粒数显著下降, 产量下降达 35.93%, 可见恶性杂草小飞蓬给农业生产带来较大的经济损失<sup>[4]</sup>。植物化感物质的挖掘和利用是开发植物源除草剂的有效途径, 是治理小飞蓬等抗药性杂草的热点方向之一<sup>[5]</sup>。发掘新颖生物源化合物结构、除草作用机制和靶标, 阐明活性化合物与杂草相互作用机制, 利用生物除草关键基因资源, 可最终克服生物除草剂产品发展的成本与环境制约因素<sup>[6]</sup>。【前人研究进展】目前, 以天然产物为基础研究的生物除草剂的作用机制主要有五大类, 但是许多天然产物的抑草作用靶点和分子机制仍然是未知的<sup>[7]</sup>。光合系统是除草剂作用的重要靶标之一, 其中光系统 I 和光系统 II 是吡啶类和三嗪酮类除草剂的靶标<sup>[8]</sup>。链霉

菌 (*Streptomyces* spp.) 产生的多肽 L-phosphinothricin 抑制谷氨酰胺合成酶, 链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 产生的细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid, TeA) 阻断光合系统 II<sup>[9-10]</sup>。上述抑草靶标的发现, 为生物除草剂的开发提供了科学依据。羊脂酸分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, 油状液体不溶于水, 属于有机酸类化合物, 主要用于染料、防腐剂、杀菌剂<sup>[11]</sup>。笔者所在课题组前期从椰子中分离提取出羊脂酸, 并验证其作为一种具有广谱、高效抑草活性的植物源化合物, 具有开发成为植物源除草剂的潜力<sup>[12]</sup>。采用透射电镜技术观察到羊脂酸处理小飞蓬叶片后, 叶绿体和线粒体结构随着作用时间的延长出现了空腔、裂解的现象<sup>[13]</sup>。采用 Label-free 蛋白质组学技术分析羊脂酸处理小飞蓬叶片, 发现 LHC 蛋白 (UniProt ID: A0A103Y9J9) 响应了羊脂酸处理, 并与光合指标测定结果相一致, 但该蛋白是否为羊脂酸抑制小飞蓬的靶标蛋白仍需进一步研究<sup>[14]</sup>。捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 (light harvesting chlorophyll a/b-binding protein, LHC) 是光系统 I 和光系统 II 中获取光能并将其传送到光反应中心的色素蛋白复合体<sup>[15]</sup>。在高等植物体内, 编码 LHC (LHCI、LHCII) 蛋白是一个多基因家族, 定位于细胞核内; LHCI 蛋白由 *Lhca1*、*Lhca2*、*Lhca3* 和 *Lhca4* 基因编码, LHCII

蛋白由 *Lhcb1*、*Lhcb2*、*Lhcb3*、*Lhcb4*、*Lhcb5* 和 *Lhcb6* 基因编码<sup>[16]</sup>。随着分子克隆和基因测序技术的发展,部分植物的 LHC 蛋白基因已被克隆出来,例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、籼稻 9311 (*Oryza sativa*)<sup>[17-19]</sup>。【本研究切入点】目前的研究大部分集中在各植物 LHC 蛋白及其基因的表达差异、功能解析等,对于 LHC 蛋白与抑草活性胁迫相关的功能解析研究较少<sup>[20]</sup>。【拟解决的关键问题】通过分子克隆和生物信息学等技术全面阐释小飞蓬捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 (*CcLhca-J9*) 的分子特征,解析羊脂酸处理下该基因表达的特殊性,预测羊脂酸作用 LHC 蛋白的关键位点,为后续基因功能验证打下基础,同时为植物源羊脂酸产品研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

小飞蓬种子 2018 年 9 月采集于湖南省长沙市芙蓉区湖南省农业科学院院内荒地并保存于种子超干低湿存储柜 (购于北京明日百傲生物科技有限公司),选出饱满种子用 0.4% 赤霉素溶液催芽后,挑选吐白的种子移入塑料盆钵 (内径 20 cm),置于光照培养箱 (8 h 黑暗、温度 18℃/16 h 光照、光强 100—120 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、温度 20℃) 培养至三叶期待用。羊脂酸 (纯度 99%) 采用蒸馏萃取法自制,具体制备方法参考文献<sup>[12]</sup>。

1.2 *CcLhca-J9* 的克隆

从 NCBI 中选择保守性高的 *Lhca* 基因同源序列设计简并引物 CcJ9-1 (表 1),进行 PCR 扩增获取目的

基因片段。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 循环 30 次; 70℃ 延伸 7 min。凝胶电泳检测 PCR 产物,切胶回收纯化目的片段,连接到 pCambia2301 载体,连接转化大肠杆菌 DH5α (购于南京诺唯赞生物科技有限公司),挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序<sup>[17]</sup>。根据已知目的片段设计 5' 和 3' RACE 特异引物 (表 1),采用 TaKaRa 公司 Clonotech SMARTer RACE 5'/3' Kit 扩增试剂盒说明扩增。获得 *Lhca* 的 5' RACE 序列、核心序列及 3' RACE 序列,根据三者拼接后序列设计引物 (表 1) 确定 *CcLhca-J9* 全长。

1.3 生物信息学分析

采用 DNAMAN 分析核酸序列并检测编码氨基酸序列,ExPaSy 在线预测分子量和等电点 (molecular weight/isoelectric point, MW/pI),在 NCBI 中搜索 LHC 的高相似度氨基酸序列,选取 19 个典型的植物蛋白,先用 ClustalX 软件多序列比对,再用 MEGA 4.1 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建进化树<sup>[21]</sup>。利用 SWISS-MODEL 在线搜索与选择模板,再通过 Swiss-PdbViewer 软件优化模型结构<sup>[22]</sup>。

1.4 分子对接

采用上一步 LHC 同源建模结果作为模型来寻找羊脂酸与 LHCI-J9 蛋白的对接方式。在 AutoDock 4.2 软件上运行,电荷计算采用 RESP (Restrained electrostatic potential) 法;活性位点采用 AutoGrid 格式点搜索,网格大小为 60Å×40Å×60Å,格点间隔为 1.0Å。中心设定为配体在 LHC 中的质心;采用 LGA (Lamarckian genetic algorithm) 法计算配体与受体间

表 1 *CcLhca-J9* 克隆及实时荧光定量 PCR 表达引物

Table 1 The primers used for *CcLhca-J9* cloning and RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物用途 Use of primers
CcJ9-1	Forward: GAGYTGCGGYATC <u>BCCGCCGT</u> Reverse: GTTGTGCCATGGRTCAGCCAA	核心片段扩增 Fragment cloning
CcJ9-F2	Forward: CGGATTTGACCCACTTCGTCT	5' RACE 扩增 5' cDNA end amplification
CcJ9-R2	Reverse: TATTGCCAGTATGGTGGGTAGGGT	5' RACE 扩增 5' cDNA end amplification
CcJ9-R3	Reverse: GGCAGCCATTCTTGTGCTTTTAC	5' RACE 扩增 5' cDNA end amplification
CcJ9-F3	Forward: GGCAACTGGGTAAAAGCACAAGAAT	3' RACE 扩增 3' cDNA end amplification
CcJ9-F4	Forward: AAGACCCAAAAACATTGCAGAGTA	3' RACE 扩增 3' cDNA end amplification
qR-J9	Forward: CATTCTTGCTGCTTTACCCAG Reverse: GAGGTTTAAAGAGTCCGAGCT	实时荧光定量 PCR RT-qPCR
ACTIN	Forward: CCGATCCAGACGCTGTATTT Reverse: TGCTGATCGTATGAGCAAGG	实时荧光定量 PCR RT-qPCR

下划线表示简并碱基设计, 简并引物 Y=C/T; R=A/G; B=A/T/C Degenerate bases were underlined, degenerate primers Y=C/T; R=A/G; B=A/T/C

的自由能,其余参数均为缺省值<sup>[23]</sup>。在最终得到的 10 个最优构象中,选取能量值最低的构象作为进一步研究对象。

### 1.5 *CcLhca-J9* 响应羊脂酸的表达分析

用羊脂酸 ( $625 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、阿魏酸 ( $625 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和清水对照各  $10 \mu\text{L}$ , 兑水  $10 \text{ mL}$ , 喷雾处理小飞蓬叶片 0、0.5、1、2、4、8 h 后, 收集新鲜叶片立即置于液氮。参照 Trizol 改良法提取小飞蓬叶片总 RNA, 反转录合成第一链 cDNA。RT-qPCR 反应体系  $20 \mu\text{L}$ : SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup>  $10 \mu\text{L}$ 、引物 (R 和 F)  $0.5 \mu\text{L}$ 、cDNA  $5 \mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O  $4 \mu\text{L}$ 。反应程序:  $95^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $58^\circ\text{C}$   $20 \text{ s}$ , 循环 40 次。所用引物为目的基因特异性引物 qR-J9 和内参基因 *Actin* 引物 (表 1)。数据处理运用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法, 比较目的基因的表达水平<sup>[24]</sup>。利用 SPSS 软件中 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析。

## 2 结果

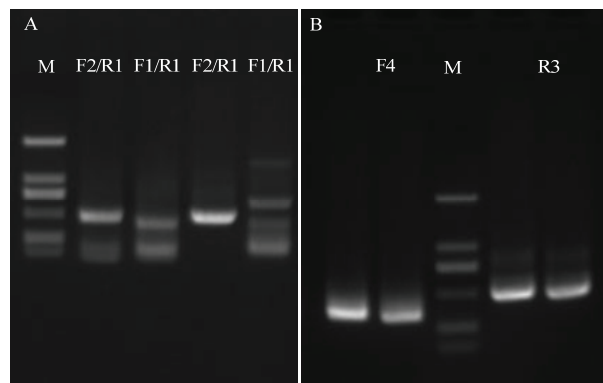
### 2.1 *CcLhca-J9* 序列的获得

以反转录未施药的小飞蓬叶片 cDNA 为模板, 用简并引物 CcJ9-1 进行 PCR 扩增、回收和测序, 获得 *CcLhca-J9* 核心序列 483 bp (图 1-A)。用引物 Cc-F2、Cc-R2、Cc-R3、Cc-F3 和 Cc-F4 进行三轮 PCR 扩增, 产物经回收和测序, 获得 cDNA 5'端序列 428 bp 和 3'端序列 253 bp (图 1-B)。将 5' RACE 序列、核心序

列及 3' RACE 序列用 DNAMAN 软件拼接, 获得 *CcLhca-J9* cDNA 序列全长 (图 2)。

### 2.2 *CcLhca-J9* 生物信息学分析

经同源克隆和 RACE 克隆, 获得了 *CcLhca-J9* 的全长 cDNA 序列, 该基因阅读框长 744 bp, 编码 247 个氨基酸 (图 2)。编码蛋白分子质量为 26.766 kD, 理论等电点为 6.43; 该蛋白中 25 个丙氨酸, 占总数的 10.1%; 其次是脯氨酸和甘氨酸, 分别为 24 和 23 个, 各占 9.7% 和 9.3%。*CcLhca-J9* 蛋白保守区



A: *CcLhca-J9* 核心序列 PCR 扩增 Amplification of *CcLhca-J9* core sequence; B: *CcLhca-J9* RACE PCR 扩增 Amplification of *CcLhca-J9* RACE

图 1 *CcLhca-J9* 扩增

Fig. 1 Amplification of *CcLhca-J9*

```

1  GATACTACAAACCAATCTCTCAAAACTTTCATTTCAGATTTCATATTTTTTTTCTCTCTGGAATGGCTTC
1  M A S
73  TAATGCATTAAATGAGCTGGGTATGGCGGCTGTATAACCGOCTTCGGTTTCTCTCTCTAAGTCGAGATT
4  N A L M S C G I A A V Y R P S V F S S K S R F
145 CGCCACGGCTGTCCACTTTCGGTGTGCTACTAATGCTTCCAGGATTTCATGACCGCTGACTGGATGOC
28  A T A V P L S G V A T N A S R I S M T A D W M P
217 TGGTCAACCGTCCACCTTAOCTGATGGATCTGCACCGGGGATTTCCGGTTTGACCGCTTGTCTTGG
52  G Q P R P P Y L D G S A P G D F G F D P L R L G
289 TGAGGTTCAGAGAATCTTGAGAGGTTCAAAGAGTCGAGCTCATTCACTGCAGATGGGCTATGCTTGCAGT
76  E V P E N L E R F K E S E L I H C R W A M L A V
361 TCCCGGAATCTTGTACCGAAGCGTTAGGATTGGGCAACTGGGTAAAGCACAAGATGGGCTGCCCTTCC
100 P G I L L P E A L G L G N W V K A Q E W A A L P
433 CGGAGGTCAAGCAACATACTTAGGGAACCTGTCCATGGGGTACCCTAACCACTACTGGCAATAGAGTT
124 G G Q A T Y L G N P V P W G T L P T I L A I E F
505 CATCTCCATTGCCCTTTGTAGAGCAOCAAAGGAGCATGGAAGAAAGACCCGAAAGAGAGTACCTGGTGG
148 I S I A F V E H Q R S M E K D P E K K K Y P G G
577 AGCTTTTGACCGTGGGATACTCAAAAGAOCCAAAAACATTCGCAGAGTACAAAGTAAAGAGATCAAAAA
172 A F D P L G Y S K D P K T F A E Y K V K E I K N
649 TGGACGTCTAGCAGTTGTGGGTTTCGTATGGATTCTTGGTGCACCAATCGGCTTACCTGGTACTGGAC
196 G R L A V V G V R M D S C V Q Q S A Y P G T G P
721 CTGGGAGAACTTGGCAOCCACTTGGCTGAOCCATGGCACAACAACATTTGAGATGTTATTATCOCTAAAGG
220 L E N L A T H L A D P W H N N I G D V I I P K G
793 AATTTTCCAAACTAAAATACTTTCTTCTCGAATTCATATGTAAAAATCCATGTAAOCCATCATCTTGTGA
244 I F P N

```

图 2 *CcLhca-J9* 基因核苷酸及编码的氨基酸序列

Fig. 2 *CcLhca-J9* gene nucleotide and the encoded amino acid sequences

预测显示,该蛋白属于 Chloroa<sub>b</sub>-bind 家族,具有典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能(图 3)。系统进化结果表明,不同物种来源的 Lhca 蛋白在分属不同分支,CcLhca-J9 蛋白与除虫菊(GEW73959.1, *Tanacetum cinerariifolium*)和黄花蒿(PWA35049.1, *Artemisia annua*) Lhca 蛋白进化程度最为接近,同处于菊科这一分支(图 4)。预测二级结构发现,蛋白具有螺旋(Hh) 97 个,占 39.27%; $\beta$ 转角(Tt)

7 个,占 2.83%;延伸链(Ee) 9 个,占 3.64%;无规则卷曲(Cc) 134 个,占 54.25%(图 5)。LHC-J9 蛋白以 4y28.1.O (2.80Å) 为模板进行同源建模,序列相似度为 89.9%,高度同源结构,GEQE=0.75, QMEAN=-2.20,可见所获得的模型质量是较为可靠的。CcLhca-J9 蛋白是单分子物体,具有 6 个叶绿体 a 配体,是一个典型的捕光复合物 I 叶绿素 a/b 结合蛋白(图 6)。

TcLhca	MASNTLMSCGIAAVARPSMSSSKSRFATAVPLSGVATNASRVSMTADWMPGQPRPPYLDGSAPGDFGFD	70
AaLhca	MASNTLMSCGIAAVARPSMSSSKSRFATAVPLSGVATNASRVSMTADWMPGQPRPPYLDGSAPGDFGFD	70
HaLhca	MASNTLMSCGISAVCRPSLSSSKSRFATAVPLSGVATNASRVSMTADWMPGQPRPPYLDGSAPGDFGFD	70
LsLhca	MASNTLMSCGIPAVGRPSLSSSKSRFATAVPLSGVATNASRVSMTADWMPGQPRPPYLDGSAPGDFGFD	70
CcLhca	MASNALMSCGIAAVYRPSVSSSKSRFATAVPLSGVATNASRVSMTADWMPGQPRPPYLDGSAPGDFGFD	70
Consensus	masn lmscgi av rps sssksrfatavplsgv tnasr sm a wmpgqprppyl dgsapgdgfd	
TcLhca	PLRLGEVPSNLERFKESLIHCRWAMLAVPGILLPEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGPNVPVWGTLF	140
AaLhca	PLRLGEVPSNLERFKESLIHCRWAMLAVPGILLPEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGPNVPVWGTLF	140
HaLhca	PLRLGEVPSNLERFKESLIHCRWAMLAVPGILLPEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGPNVPVWGTLF	140
LsLhca	PLRLGEVPSNLERFKESLIHCRWAMLAVPGILLPEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGPNVPVWGTLF	140
CcLhca	PLRLGEVPSNLERFKESLIHCRWAMLAVPGILLPEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGPNVPVWGTLF	140
Consensus	pl lgevp nlerfkese lihcrwamlavpgillpeal glgnwvkaqewaa pggqatylgnpvpwgtlf	
TcLhca	TILAIEFVSIAFVEHQRSMEKDEKKKYPGGAFDPLGYSKDPKTFEYKVKEIKNGRLALLAF.VGFFVQ	209
AaLhca	TILAIEFVSIAFVEHQRSMEKDEKKKYPGGAFDPLGYSKDPKTFEYKVKEIKNGRLALLAF.VGFFVQ	209
HaLhca	TILAIEFVSIAFVEHQRSMEKDEKKKYPGGAFDPLGYSKDPKTFEYKVKEIKNGRLALLAF.VGFFVQ	209
LsLhca	TILAIEFVSIAFVEHQRSMEKDEKKKYPGGAFDPLGYSKDPKTFEYKVKEIKNGRLALLAF.VGFFVQ	209
CcLhca	TILAIEFVSIAFVEHQRSMEKDEKKKYPGGAFDPLGYSKDPKTFEYKVKEIKNGRLAVGVMDSCVQ	210
Consensus	tilaiefv siafvehqrsme kdek kypggaf dplgyskdpk tfe ykvke ikng rla llaf .vgffvq	
TcLhca	QSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVII PKGIFP	245
AaLhca	QSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVII PKGIFP	245
HaLhca	QSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVII PKGVFP	245
LsLhca	QSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVII PKGIFP	245
CcLhca	QSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVII PKGIFP	246
Consensus	qsaypgtgplenlathladpwhnnig d ipkg fp	

同源氨基酸及其登录号 The source and accession number of the amino acids are as follows: TcLhca (*Tanacetum cinerariifolium*, GEW73959.1), AaLhca (*Artemisia annua*, PWA35049.1), HaLhca (*Helianthus annuus*, XP021976973.1), LsLhca (*Lactuca sativa*, XP023729531.1), CcLhca (*Conyza canadensis*)

图 3 CcLhca-J9 与同源基因编码区氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of CcLhca-J9 and homologous gene coding region

## 2.3 分子对接

分子对接的计算结果显示(图 7),羊脂酸与 CcLhca-J9 蛋白形成氢键和 p- $\pi$  的作用力共同影响了两者之间的结合,其结合能量为-20.9 kJ·mol<sup>-1</sup>。羊脂酸的羰基氧原子与 Gly68 氨基酸残基形成氢键,键长为 2.9Å; Phe67 和 Phe69 中氮原子与羊脂酸的碳氧双键形成 p- $\pi$ ,距离均为 3.1Å;羊脂酸的羟基氢原子与 Arg197 氨基酸残基形成氢键,键长为 2.4Å;羊脂酸的羟基氧原子与 Arg197 氨基酸残基形成 p- $\pi$ ,键长为 3.3Å。

## 2.4 羊脂酸处理对 CcLhca-J9 表达的影响

RT-qPCR 结果表明,在羊脂酸处理小飞蓬叶片后 0—8 h, CcLhca-J9 表达量明显下降。羊脂酸处理后

0.5—1 h, CcLhca-J9 的表达量与清水对照相比下降了 66.01%;羊脂酸处理后 2 h, CcLhca-J9 的表达量缓慢下降,与对照相比下降了 82.72%;4—8 h 后, CcLhca-J9 的表达量趋于稳定,与对照相比下降 92%—93%(图 8)。羊脂酸处理后, CcLhca-J9 表达量与对照相比呈下调趋势,此结果与前期蛋白质组学结果一致。清水对照和另一有机酸类化合物阿魏酸处理小飞蓬叶片, CcLhca-J9 表达量总体未出现显著变化。

## 3 讨论

植物 LHC 蛋白家族基因是细胞核内的光合系统基因,其编码的蛋白与色素形成的复合物能捕获光

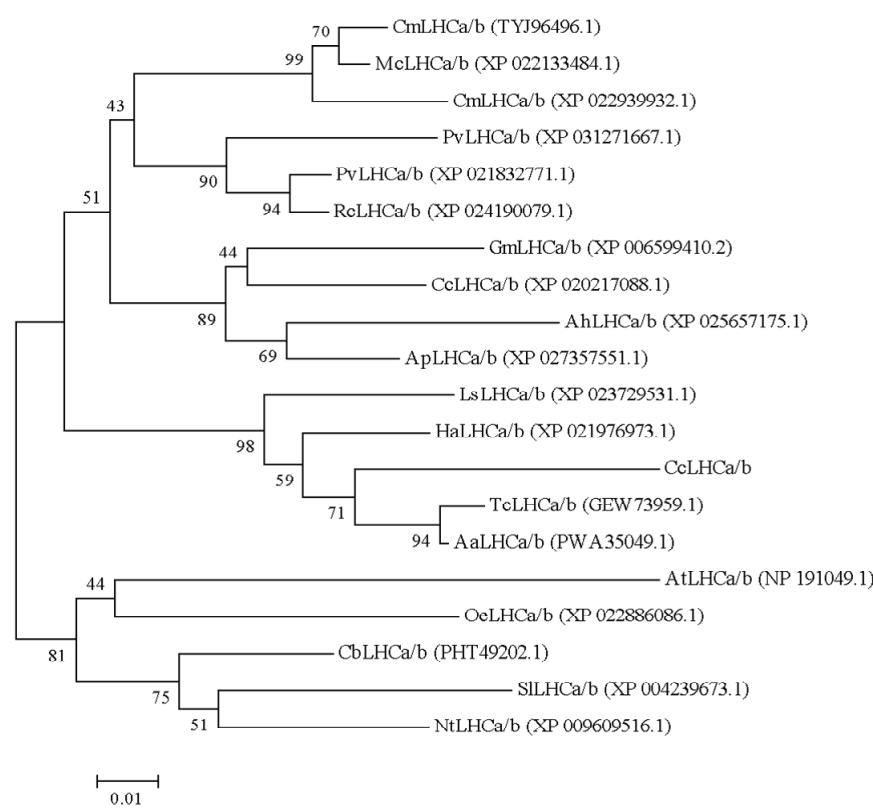
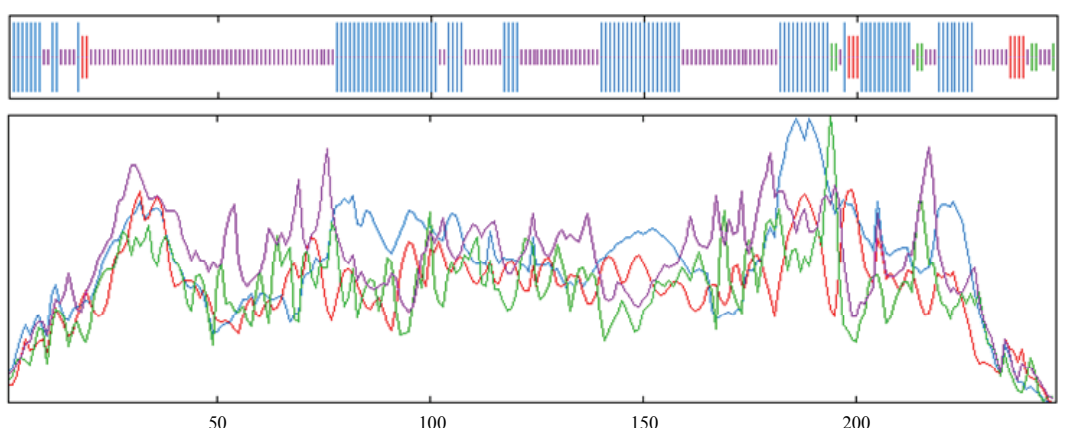


图 4 *CcLhca-J9* 蛋白与近缘种群的系统进化树（邻接法，1 000 次重复）

Fig. 4 Phylogenetic tree of *CcLhca-J9* protein with homologous proteins from other species (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

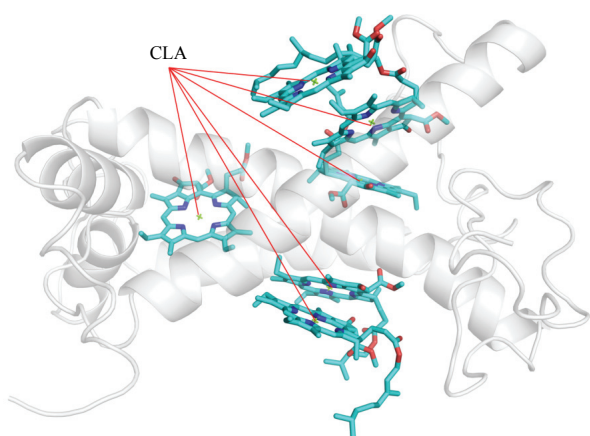


蓝色 Blue:  $\alpha$ -螺旋 Alpha helix; 紫色 Purple: 无规则卷曲 Random coil; 红色 Red: 延伸链 Extended strand; 绿色 Green:  $\beta$ -转角 Beta turn

图 5 *CcLhca-J9* 蛋白二级结构

Fig. 5 Secondary structure of *CcLhca-J9*

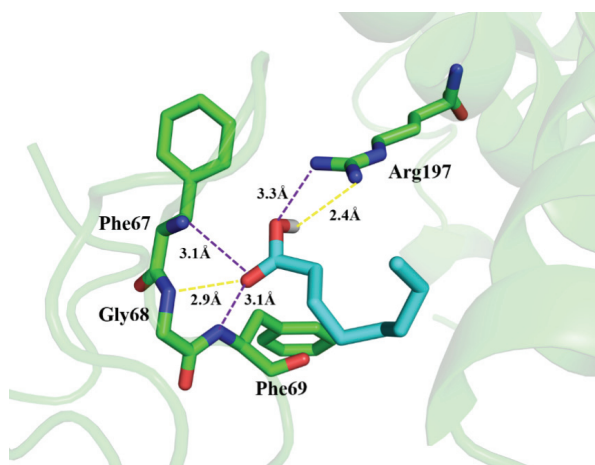
能并传递能量至光化学反应中心<sup>[16]</sup>。本研究采用 RACE 技术克隆获得小飞蓬叶片 LHC 蛋白家族基因成员 *CcLhca-J9* cDNA 序列，其 OFR 全长为 744 bp，编码 247 个氨基酸，分子量为 26.766 kD，理论等电点为



CLA: 叶绿素 a 配体 (6 个, 带不同颜色) 6x CLA (chlorophyll a) ligands were shown with different colors

图 6 CcLhca-J9 蛋白同源三级结构预测模型

Fig. 6 Homology model structure of CcLhca-J9



黄色虚线 Yellow imaginary line: 氢键 Hydrogen bond; 紫色虚线 Purple imaginary line:  $\pi$ - $\pi$

图 7 羊脂酸与 CcLhca-J9 的分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking schema chart between caprylic acid and CcLhca-J9

6.43; 二级结构具有螺旋、 $\beta$  转角、延伸链、无规则卷曲; 以 4y28.1.O (2.80Å) 为模板进行同源建模, 三级结构是单分子物体, 具有 6 个叶绿体 a 配体, 是一个典型的捕光复合物 I 叶绿素 a/b 结合蛋白。系统进化分析表明, 与除虫菊和黄花蒿 Lhca 蛋白进化程度最为接近, 同处于菊科这一分支, 一致性超过 85%, 表明该基因家族保守性较强。比对已报道的植物 LHC 蛋

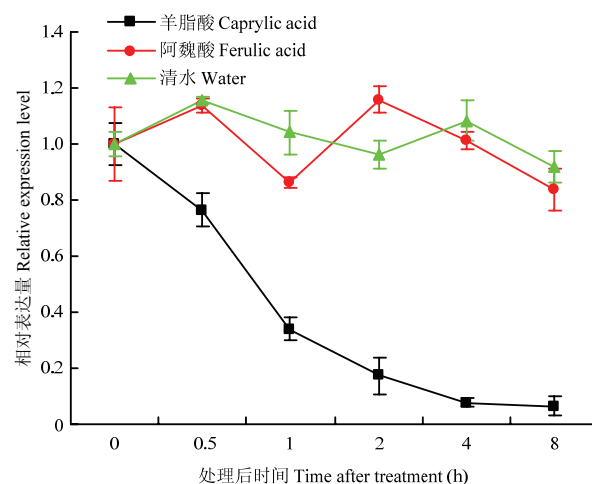


图 8 羊脂酸处理后不同时间 CcLhca-J9 的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of CcLhca-J9 after caprylic acid treatment

白, 发现它们均无信号肽, 存在跨膜区, 含有结构功能域, 为亲水性非分泌蛋白<sup>[25-26]</sup>。

植物 LHC 表达与抗逆性密切相关。YANG 等<sup>[27]</sup>研究表明, 与野生型相比, 稀脉浮萍 (*Lemna perpusilla*) 的细胞色素 b6f 突变体在低光强下可维持 LHC II 在一个恒定的低水平上; 李真等<sup>[28]</sup>研究发现, 东南景天 (*Sedum alfredii*) 的 *SaLhcb2* 在镉、铜、铅处理后, 根、茎、叶中表达量相比对照均发生显著上调或者降低; YANG 等<sup>[29]</sup>研究发现, 菠菜 (*Spinacia oleracea*) N-端 LHCII 可识别蛋白降解酶, 通过降解 LHCII 的含量可达到响应不同光强。本研究 qPCR 结果显示, 羊脂酸胁迫处理小飞蓬叶片后, *CcLhca-J9* 的表达量在处理 0—8 h 随时间延长表现出下降的趋势。与对照清水和阿魏酸处理相比, 羊脂酸抑制 *CcLhca-J9* 的表达存在着一定的特异性, 预示着 LHC 可作为抑草靶标用来开发除草剂。

植物 LHC 是一类潜在的植物源除草剂作用靶标。光合作用抑制剂的开发一直是农学家创制新型除草剂的热门方向, 但是建立在充分研究受体蛋白结构与抑制剂相互作用的前提下<sup>[30]</sup>。去草净 (terburyn) 是一种典型三嗪类 PSII 抑制剂, 与 D1 蛋白氨基酸残基 Ile224 和 Ser233 形成氢键, 与 Glu212、Val220 和 Ile229 也有反应<sup>[31]</sup>。敌草隆 (diuron, DCUM) 的芳香取代基与 Phe255 形成氢键, 提高了其抑制活性<sup>[32]</sup>。TeA 是一种从链格孢菌里分离提取出来的抑制 PSII 的除草化合物, 其作用机制也是与靶蛋白 D1 的相互作用有

关<sup>[33]</sup>。本研究采用分子对接的手段,发现羊脂酸与植物 LHC 中氨基酸残基 Gly68、Phe67、Phe69 和 Arg197 形成氢键和  $\pi$ - $\pi$  键,其结合能量为  $-20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,两者存在较强的作用力,羊脂酸具有开发成光合作用抑制剂类除草剂的潜力。

## 4 结论

*CcLhca-J9* 是一个典型的捕光复合物 I 叶绿素 a/b 结合蛋白,与羊脂酸结合形成氢键和  $\pi$ - $\pi$  键,同时 *CcLhca-J9* 表达量在羊脂酸处理小飞蓬叶片后存在明显的特异性。因而,推测 *CcLhca-J9* 在羊脂酸抑制小飞蓬叶片生长过程中起了较为关键的作用,但是该基因是否为植物源羊脂酸的靶标基因有待更进一步的功能验证。

## 参考文献 References

- [1] 李杨汉. 中国杂草志. 北京: 中国农业出版社, 1998.  
LI Y H. Weed of China. Beijing: China Agriculture Press, 1998. (in Chinese)
- [2] METZGER B A, SOLTANI N, RAEDER A J, HOOKER D C, ROBINSON D E, SIKKEMA P T. Multiple herbicide-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) dose response to tolypylate and tolypylate plus atrazine and comparison to industry standard herbicides in corn. *Weed Technology*, 2019, 33(2): 366-373.
- [3] SONG X L, WU J J, ZHANG H J, QIANG S. Occurrence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) population in China. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(7): 1049-1055.
- [4] 朱文达, 曹塍程, 喻大昭, 魏守辉. 小飞蓬对油菜产量性状的影响及其经济价值. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 217-222.  
ZHU W D, CAO A C, YU D Z, WEI S H. Influence of *Conyza canadensis* on the yield character of oil seed rape and its economic threshold. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(2): 217-222. (in Chinese)
- [5] LI Z R, AMIST N, BAI L Y. Allelopathy in sustainable weeds management. *Allelopathy Journal*, 2019, 48(2): 109-138.
- [6] DUKE S O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?. *Pesticide Management Science*, 2012, 68(4): 505-512.
- [7] DUKE S O, DAYAN F E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins//Discovery and Synthesis of Crop Protection Products. ACS Symposium Series, 2015, 1204: 79-92.
- [8] WANG P, GRIMM B. Comparative analysis of light-harvesting antennae and state transition in *chlorine* and cpSRP mutants. *Plant Physiology*, 2016, 172(3): 1519-1531.
- [9] BAI W J, LU C, WANG X. Recent advances in the total synthesis of tetramic acid-containing natural products. *Journal of Chemistry*, 2016, 2016: 8510278.
- [10] DOMINGOS L, DESRUS A, MÊME S, MÊME W. L-Phosphinothricin modulation of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channels increased excitability in striatal medium-sized spiny neurons. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(7): 1719-1727.
- [11] SALIMON J, SALIH N, YOUSIF E. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012, 5(2): 135-145.
- [12] 李祖任, 黄勤勤, 彭琼, 周勇, 周小毛, 柏连阳. 植物源羊脂酸的除草活性及其响应机制. *植物保护学报*, 2018, 45(5): 1161-1167.  
LI Z R, HUANG Q Q, PENG Q, ZHOU Y, ZHOU X M, BAI L Y. Herbicidal activity and response mechanism of botanical caprylic acid. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(5): 1161-1167. (in Chinese)
- [13] LI Z R, SHEN W H, ZHOU X M, ZHAN Q C, PENG Q, WANG L F, WU L M, YANG H N, BAI L Y. Changes in *Conyza canadensis* (L.) cronquist leaf anatomy under caprylic acid stress. *Pakistan Journal of Botany*, 2019, 51(4): 1223-1229.
- [14] LI Z R, KUANG W, LIU Y B, PENG D, BAI L Y. Proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) subjected to caprylic acid stress. *Proteomics*, 2019, 19(9): e1800294.
- [15] KROL M, SPANGFORT M D, HUNER N P, OQUIST G, GUSTAFSSON P, JANSSEN S. Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutant. *Plant Physiology*, 1995, 107: 873-883.
- [16] 石兰馨, 张晓平, 梁厚果. 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白和 cab 基因. *植物生理学通讯*, 1995, 31(6): 470-476.  
SHI L X, ZHANG X P, LIANG H G. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein and CAB gene. *Plant Physiology Communications*, 1995, 31(6): 470-476. (in Chinese)
- [17] HEY D, ROTHBART M, HERBST J, WANG P, MULLER J, WITTMANN D, GRUHL K, GRIMM B. LIL3, a light-harvesting complex protein, links terpenoid and tetrapyrrole biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1037-1050.
- [18] 阳江华, 张希财, 邹智. 橡胶树捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *CAB2* 的克隆与分析. *西南林业大学学报 (自然科学版)*, 2019, 39(1): 88-94.  
YANG J H, ZHANG X C, ZOU Z. Molecular cloning and analysis of *HbCAB2*, a chlorophyll a/b-binding protein-encoding gene from *Hevea brasiliensis*. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Science Edition)*, 2019, 39(1): 88-94. (in Chinese)
- [19] 袁定阳, 余东, 谭炎宁, 孙志忠, 韶也, 孙学武, 段美娟. RT-PCR

- 克隆水稻叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长 cDNA 及序列的 *in silico* 分析. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(2): 173-177.
- YUAN D Y, YU D, TAN Y N, SUN Z Z, SHAO Y, SUN X W, DUAN M J. RT-PCR Cloning and *in silico* analysis of a full-length cDNA gene encoding the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*). Genomics and Applied Biology, 2012, 31(2): 173-177. (in Chinese)
- [20] SAGA Y, MIYAGI K. Characterization of 3-acetyl chlorophyll *a* and 3-acetyl protochlorophyll *a* accommodated in the b800 binding sites of photosynthetic light-harvesting complex 2 in the purple photosynthetic bacterium *Rhodoblastus acidophilus*. Photochemistry and Photobiology, 2018, 94(4): 698-704.
- [21] 蒋梦婷, 朱宁, 龚洪泳, 侯应军, 余心怡, 渠慎春. ‘南通小方柿’赤霉素不敏感基因 *DkGAI2* 的克隆与功能分析. 中国农业科学, 2019, 52(19): 3417-3429.
- JIANG M T, ZHU N, GONG H Y, HOU Y J, YU X Y, QU S C. Cloning and function analysis of gibberellin insensitive *DkGAI2* gene in Nantongxiaofangshi (*Diospyros kaki* Linn. cv. nantongxiaofangshi). Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(19): 3417-3429. (in Chinese)
- [22] BIENERT S, WATERHOUSE A, DE BEER T A P, TAURIELLO G, STUDER G, BORDOLI L, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL repository—new features and functionality. Nucleic Acids Research, 2017, 45(Database issue): D313-D319.
- [23] SUBRAMANIVAN V, SEKAR R, PRAVEENKUMAR A, SELVAM R. Molecular modeling studies of repandusinic acid as potent small molecule for hepatitis B virus through molecular docking and ADME analysis. Quantitative Biology, 2019, 7(4): 302-312.
- [24] 宋维源, 侯钰, 赵剑宇, 刘小凤, 张小兰. 黄瓜 CsRPL1/2 的克隆及其功能分析. 中国农业科学, 2020, 53(1): 148-159.
- SONG W Y, HOU Y, ZHAO J Y, LIU X F, ZHANG X L. Cloning and functional analysis of *CsRPL1/2* in cucumber. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(1): 148-159. (in Chinese)
- [25] 翟玉山, 邓宇晴, 董萌, 徐倩, 程光远, 彭磊, 林彦铨, 徐景升. 甘蔗捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *ScLhca3* 的克隆及表达. 作物学报, 2016, 42(9): 1332-1341.
- ZHAI Y S, DENG Y Q, DONG M, XU Q, CHENG G Y, PENG L, LIN Y Q, XU J S. Cloning and characterization of light harvesting chlorophyll a/b-binding protein coding gene (*ScLhca3*) in sugarcane. Acta Agronomica Sinica, 2016, 42(9): 1332-1341. (in Chinese)
- [26] WEI L, CAO Y, BAI L H, LIANG X, DENG T T, LI J, QIAO D R. Cloning and expression of a gene coding for the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in the green alga *Dunaliella salina*. Journal of Applied Phycology, 2007, 19: 89-94.
- [27] YANG D H, ANDERSSON B, ARO E M, OHAD I. The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex II (LHC II) during photoacclimation. Photosynthesis Research, 2001, 68(2): 163-174.
- [28] 李真, 刘明英, 韩小娇, 乔桂荣, 蒋晶, 邢世岩. 东南景天捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *salhcb2* 的分离及功能. 浙江农林大学学报, 2014, 31(6): 838-846.
- LI Z, LIU M Y, HAN X J, QIAO G R, JIANG J, XING S Y. Characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCB) gene, *salhcb2*, in *Sedum alfredii*. Journal of Zhejiang A & F University, 2014, 31(6): 838-846. (in Chinese)
- [29] YANG D H, PAULSEN H, ANDERSSON B. The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. FEBS Letters, 2000, 466(2/3): 385-388.
- [30] 刘小兰, 杨霞, 孙命, 刘晓红, 赵茹, 缪方明. 新型光系统 II 抑制剂的設計、合成和生物活性测定. 化学学报, 2002, 60(3): 487-492.
- LIU X L, YANG X, SUN M, LIU X H, ZHAO R, MIAO F M. Design, synthesis and biological activity determination of new type photosystem II inhibitors. Acta Chimica Sinica, 2002, 60(3): 487-492. (in Chinese)
- [31] MICHEL H, EPP O, DEISENHOFER J. Pigment—protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. The EMBO Journal, 1986, 5(10): 2445-2451.
- [32] NASIR M N, LEGRAND V, GATARD S, BOUQUILLON S, LAURENT P, NOTT K. Molecular analysis of the interfacial and membrane-interacting properties of D-xylose-based bolaforms. Planta, 2012, 216(4): 630-638.
- [33] CHEN S G, KANG Y, ZHANG M, WANG X X, STRASSER R J, ZHOU B, QIANG S. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. Environmental and Experimental Botany, 2015, 112: 1-15.

(责任编辑 岳梅)