

芒果果肉cDNA文库构建及MiCTR1互作蛋白的筛选

袁芳¹, 王春艳¹, 李丽^{2*}

(1. 广西民族师范学院生物与食品工程学院, 广西崇左 532200)

(2. 广西壮族自治区农业科学院农产品加工研究所, 广西果蔬贮藏与加工新技术重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要: 该文旨在鉴定芒果 MiCTR1 的互作蛋白, 深入探究 MiCTR1 调控芒果果实后熟过程的分子机理。以‘台农1号’芒果为材料, 建立芒果果肉的 cDNA 文库, 构建诱饵载体, 对其自激活检测后, 从文库中筛选与 MiCTR1 互作的蛋白, 并进行回转验证, 通过 NCBI 网站进行序列比对, 明确互作蛋白的功能。结果表明: 所构建的 cDNA 初级和次级文库的库容量分别达到了 5.7×10^6 和 1.2×10^7 CFU/mL, 重组率 100%, 插入片段长度为 1 000~2 000 bp, 诱饵载体 pGBKT7-MiCTR1 不存在自激活。从酵母双杂交文库中筛选到 21 个初始阳性克隆, 经回转验证后最终获得 20 个与 MiCTR1 互作的蛋白, 主要功能涉及遗传代谢, 类叶绿素、维生素 E 的合成, 物质的转运, 物质代谢, 细胞生长, 光合作用。综上, 该研究构建的芒果果实 cDNA 文库质量较高, 完整性好, 酵母双杂交筛库技术鉴定出多个与芒果 MiCTR1 互作的蛋白, 并且解析其生物功能, 为探究 MiCTR1 调控芒果果实后熟的分子机制奠定理论基础。

关键词: 芒果; 果实成熟; 酵母双杂交; *MiCTR1*; 蛋白互作

文章编号: 1673-9078(2025)05-61-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0257

Construction of cDNA Libraries of Mango Pulp and Screening of *MiCTR1*-Interacting Proteins

YUAN Fang¹, WANG Chunyan¹, LI Li^{2*}

(1. College of Chemistry and Biological Engineering, Guangxi Minzu Normal University, Chongzuo 532200, China)

(2. Agro-Food Science and Technology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Key Laboratory of Fruits and Vegetables Storage-processing Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: MiCTR1-interacting proteins in mango were identified, and the molecular mechanism of MiCTR1 regulating the ripening process of mango fruit was preliminarily clarified. Using *Tainong* No. 1 mango as the material, cDNA libraries of mango pulp were established. A bait vector was constructed. After the self-activation detection of the bait vector, MiCTR1-interacting proteins were screened from the cDNA library and analyzed by reverse verification. Their functions were identified by aligning with sequences on the NCBI website. The primary and secondary cDNA libraries were 5.7×10^6 and 1.2×10^7 CFU/mL, respectively, with a recombination rate of 100% and insert lengths of 1 000 to 2 000 bp, and the bait vector PGBKT7-MiCTR1 had no self-activation. A total of 21 initial positive clones were screened in the yeast two-hybrid

引文格式:

袁芳,王春艳,李丽.芒果果肉cDNA文库构建及MiCTR1互作蛋白的筛选[J].现代食品科技,2025,41(5):61-67.

YUAN Fang, WANG Chunyan, LI Li. Construction of cDNA libraries of mango pulp and screening of *MiCTR1*-interacting proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 61-67.

收稿日期: 2024-03-04

基金项目: 国家重点研发计划专项 (2021YFD1600100); 国家自然科学基金项目 (3230181455); 广西自然科学基金项目 (2020GXNSFBA297099)

作者简介: 袁芳 (1986-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: yf2018yuyu@126.com

通讯作者: 李丽 (1983-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 农产品贮藏技术研究工作, E-mail: lili@gxaas.net

library, and after rotation verification, 20 MiCTR1-interacting proteins were finally obtained. Their main functions involved genetic metabolism, biosynthesis of chlorophylls and vitamin E, material transport, material metabolism, cell growth, and photosynthesis. In summary, the cDNA libraries of mango pulp constructed in this study were of high quality and complete. MiCTR1-interacting proteins were identified by yeast two-hybrid library screening, and their functions were analyzed. This study lays a theoretical foundation for further clarifying the molecular mechanism of MiCTR1 regulating the ripening of mango fruit.

Key words: emango; fruit ripening; yeast two-hybrid; *MiCTR1*; protein interaction

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是一种属于漆树科的长寿常绿植物, 在世界热带和温暖的亚热带地区广泛种植, 中国是排名前三的生产国之一^[1]。芒果果实被誉为水果之王, 是最受欢迎的水果之一, 味香诱人, 营养价值很高, 果肉含有丰富的还原糖、氨基酸、芳香族化合物和其他功能性化合物, 如果胶、维生素、花青素和多酚等^[1,2]。由于芒果是呼吸跃变型水果, 采后极易软化成熟腐烂, 从而降低质量和保质期^[3]。芒果果实采后成熟过程中品质性状由遗传和环境等多种因素决定, 众多代谢相关基因和调控因子参与芒果的后熟, 其中果实软化是一种依赖于乙烯的成熟过程。

组成性三重反应 1 (CTR1) 是乙烯受体的下游蛋白, 充当乙烯信号传导的负调节因子^[4], 在没有乙烯的情况下主动抑制乙烯反应途径, 而存在乙烯的情况下, 乙烯分子在一个金属铜离子的辅助下与其受体蛋白结合, 导致受体蛋白失活, 使其不能正常激活 CTR1 蛋白, 从而导致 CTR1 蛋白的信号抑制功能失效, 进而将乙烯信号传递到下游的 EIN2、EIN3/EILs 和 ERF 元件^[5]。研究发现, CTR 家族与乙烯受体的相互作用具有选择性, 番茄 LeCTR2 与 LeETR1 和 LeETR2 具有相互作用, 不与其他受体相互作用, 表明 LeCTR2 可能在乙烯信号转导的特定分支中发挥作用^[6]。Klee 等^[7]的研究显示番茄特定组织中 *CTR1* 的水平与该组织的乙烯敏感性呈现负相关, 说明 *CTR1* 响应乙烯的机制比较复杂。*CpCTR1* 和 *CpCTR4* 与木瓜果实的硬度呈现负相关, 推测其可能在乙烯作用下的果实软化中发挥重要作用^[4], Monthathip 等^[8]研究发现榴莲中 *DzCTR1* 基因的表达量与色泽呈现正相关, 与果肉硬度和可溶性固形物含量呈现负相关, 说明在果实的成熟过程中, CTRs 可能还介导了其他物质代谢。CTR1 的结构域可以直接与磷脂酶 D 介导产生的磷酸结合, 磷酸可阻断 CTR1 与乙烯受体之一 ETR1 的相互作用^[9]。说明 *CTR1* 在植物体内通过参与调控果实成熟的路径较

复杂, 在不同物种中的调控路径又存在一定差异。

而关于 CTR1 互作蛋白的研究较少, 因此挖掘芒果 MiCTR1 的互作蛋白, 解析其功能特点, 对进一步阐明 MiCTR1 蛋白如何参与调控果实成熟过程等问题待探索。本研究利用酵母双杂交技术构建了芒果双杂交文库, 并筛选可能与 MiCTR1 互作的蛋白, 为深入研究 MiCTR1 调控芒果物质代谢与成熟提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器设备

实验材料为‘台农 1 号’芒果, 采摘于广西百色市, 取成熟度 8~9 成的新鲜芒果果肉组织液氮速冻, 于 -80 °C 保存备用。

X3R 型台式高速冷冻离心机, 赛默飞世尔; HE-120 电泳仪, 上海天能科技有限公司; 2500 凝胶成像仪, 上海天能科技有限公司; 21R 型台式高速冷冻离心机, 赛默飞世尔; 2720 PCR 仪, 赛默飞世尔; ECM630 电转化仪, 上海木森生物科技有限公司。

1.2 芒果果肉组织总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

取芒果果肉组织, 采用 Trizol 法提取 Total RNA, 提取获得的总 RNA 用 Fasttrack MAG beads 分离 mRNA。

1.3 初级文库的构建

参考陈思梦等^[10]的方法, 用 1.2 分离得到的 mRNA 进行反转录, 合成双链 cDNA, 将 cDNA 与三框 attB1 重组接头连接。将 cDNA 样本分入主子进行分级, 再进行 BP 重组, 将重组产物加到点转化细胞中后转移到电转化杯中, 按照说明书进行转化, 点转化后进行菌液培养, 获得初级文库菌液。对初级文库进行总库容量鉴定, 库容量以 CFU/mL 表示, 总库容量 (CFU)= 库容量 (CFU/mL) × 菌液体积 (mL)。

1.4 次级文库的构建

参考陈思梦等^[10]的方法,使用 PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit 从鉴定合格后的初级文库中抽提质粒,与 pGADT7-T7 进行连接反应,转入大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中置于 37℃,225~250 r/min 摇床培养 1 h,获得次级文库菌液,取菌液 10 μL 按照 1:1 000 稀释取 50 μL 涂布平板,对次级文库进行库容量(以 CFU/mL 表示)及菌落 PCR 鉴定。

1.5 诱饵载体构建与自激活检测

诱饵载体构建与自激活检测都参考郭金菊等^[11]的方法,将 *CTRI* 基因 cDNA 克隆构建到酵母双杂交的诱饵载体上,对含有目的基因的载体进行扩增、Sfi I 酶切,获得该克隆片段,并与 sfi I 酶切的酵母双杂交诱饵载体质粒 pGBKT7 载体链接,连接产物转化成大肠杆菌感受态,再进行菌落 PCR 扩增,并在扩增结果中,选取一个阳性条带的克隆进行后续测序分析并对其结果进行比对。

将 AD 质粒与 BD 质粒等各种受体转入菌 AH109 感受态细胞中,从编号 3 的质粒组合共转化得到的酵母转化子菌落中随机挑选 6 个进行自激活活性的检测。

1.6 酵母双杂交文库筛选CTRI互作蛋白

参考郭金菊等^[11]的方法,将文库质粒转入受体菌制备感受态后进行涂布,恒温培养后转液体培养基继续培养 18 h,然后转接到 YPDA 液体(初始 $OD_{600}=0.6$),反复离心收菌和重悬菌体后继续涂布平板,观察转化结果,并且记录转化效率。阳性克隆转化子,用无菌水进行稀释后再点种至缺陷平板,恒温培养后进行基因检测。

将这些阳性克隆质粒从酵母细胞中回收出来进行 DNA 测序,并与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对。最后参考郭金菊等^[11]的方法进行回转变验证。

2 结果与分析

2.1 芒果果肉组织总RNA的提取及mRNA的分离

本课题采取 Trizol 法提取了芒果果肉组织的总

RNA(图 1a),经检测,总 RNA 含量为 1 695 ng/μL,获得 RNA 总量为 678 μg, A_{260}/A_{280} 比值为 1.98。电泳结果显示 mRNA 条带分别清晰,质量完好,无明显 28S 和 18S rRNA 条带,该 mRNA 纯化后可合成双链 cDNA,用于后续建库。

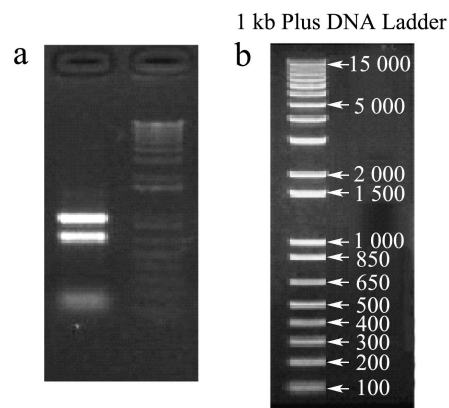


图 1 芒果果肉总 RNA 的提取 (a) 及 marker (b)
Fig.1 Extraction of total RNA from mango pulp (a) and marker (b)

注:图 a 上条带为 28S rRNA,下条带为 18S rRNA。

2.2 初级文库的构建及鉴定

上述 cDNA 与载体 pDONR222 连接后,转入感受态大肠杆菌 DH10B 细胞中,从细菌培养液中取出 1 μL 原液,稀释到 1 000 倍 1 μL 后取 1 μL 液体涂布 LB 平板。在平板上长出约 286 个单克隆(图 2a),再乘以稀释倍数后得到转化平板得库容量为 5.7×10^6 CFU/mL,文库的总克隆数为 1.1×10^7 CFU。经 PCR 扩增后,挑取的单克隆都得到条带,重组率为 100%,插入片段的平均长度大于 1 000 bp(图 2b)。说明文库插入片段多态性较好,成果构建初级文库。

2.3 次级文库的构建及鉴定

对初级文库菌液在肉汤培养基(含卡那霉素)中培养后进行质粒抽提,与载体连接后电转化感受态细胞,获得次级文库菌液,对次级文库进行鉴定发现,克隆总数为 311 个(图 3a),次级文库容量 1.2×10^7 CFU。随机挑选 24 个菌落进行 PCR 扩增,都获得条带(图 3b),且重组率为 100%,同时插入片段大小在 1 000~2 000 bp 之间,说明次级文库构建成功。

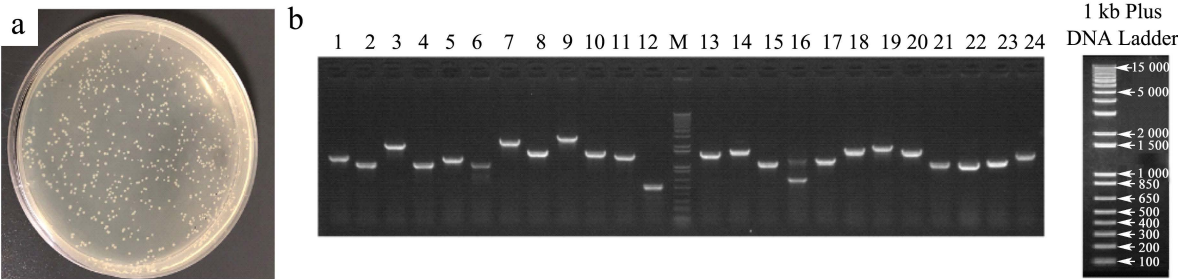


图 2 初级文库图片 (a) 和插入片段长度鉴定图片 (b)

Fig.2 Primary library image (a) and insert length identification image (b)

注: Marker 是 1 kb Plus DNA Ladder ; 1~24 为 PCR 样品。图 3 同。

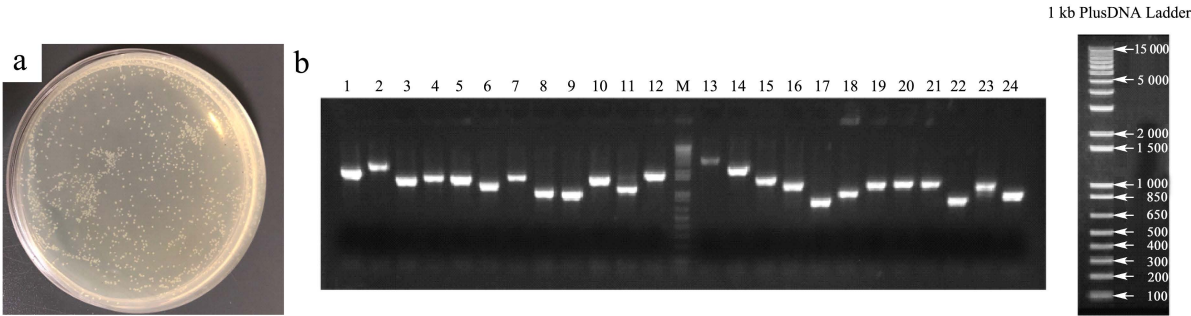


图 3 次级文库图片 (a) 和插入片段长度鉴定图片 (b)

Fig.3 Secondary library image (a) and insert length identification image (b)

2.4 诱饵载体构建与自激活检测

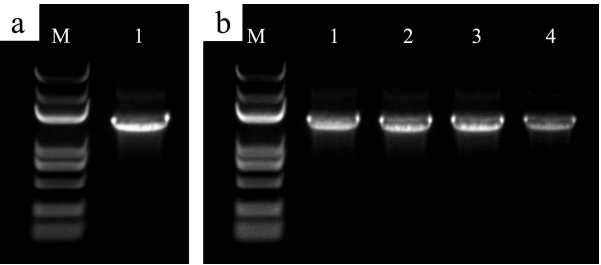


图 4 CTR1 扩增结果 (a) 和诱饵质粒 pGBKT7-CTR1 菌落 PCR 结果 (b)

Fig.4 CTR1 amplification results (a) and bait plasmid pGBKT7-CTR1 colony PCR results (b)

注: M 为 DNA Marker, 由上至下依次为: 5、3、2、1.5、1 k, 750、500、250 bp, 泳道 1~4 为 pGBKT7-CTR1 转化子的 PCR 产物。

通过 PCR 反应成功扩增 *CTR1* 基因, 结果如

图 4a 所示, 目的条带大小与预期相符, 约为 1 800 bp。将目的基因与载体进行酶切、连接、转化大肠杆菌 Top10 感受态, 并随机挑选 4 个大肠杆菌转化子进行培养, 用质粒引物进行 PCR 扩增和测序鉴定, 结果如图 4b 所示, PCR 扩增条带的大小与与目的带一致, 表明 pGBKT7-CTR1 诱饵载体构建成功。

将已经构建的 pGADT7/pGBKT7-CTR1, 与阳性对照、阴性对照一同转入受体菌 AH109 中, 经过 YPDA 液体培养基转接培养后, 从 AH109 酵母转化子中随机挑选了 6 个菌落, 用以自激活活性检测。在 SD-TL 缺陷平板上, 所有对照菌株均能正常生长 (图 5), 而阳性对照只能在更为严格的缺陷平板生长。随机选取的 6 个转化子与阴性对照一样, 在缺陷平板上均未能生长。此外, MEL1 检测中, 这些转化子的结果也与阴性对照相同, 这表明该诱饵蛋白不存在自激活, 因此可做筛库实验。

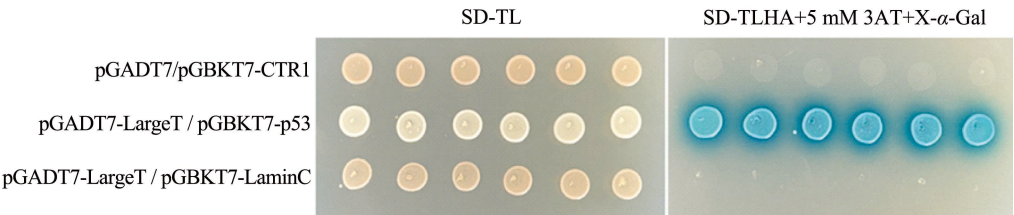


图 5 诱饵载体 pGBKT7-CTR1 的自激活检测结果

Fig.5 Self-activation detection results of bait vector pGBKT7-CTR1

表 1 CTRI互作蛋白筛选
Table 1 Screening of CTRI interacting proteins

阳性克隆编号	NCBI 登记号	基因号	蛋白名称
2	无结果		
9、12、22	XM_044633713.1	LOC123214029	RNA 聚合酶 II 降解因子 1-Like
14	XM_044648457.1	LOC123224755	分选连接蛋白 2A-like
16、47	XM_044641985.1	LOC123220000	芒果 60S 核糖体蛋白 L5
20	XM_044618016.1	LOC123202189	本构活性 ROPs1 相互作用子
32	XM_044637497.1	LOC123216869	ABC1 复合激酶 7, 叶绿体
33	XM_044612849.1	LOC123198196	SPIRAL1-like 3 蛋白
38	XM_044631280.1	LOC123212206	香叶基香叶基二磷酸还原酶, 叶绿体
39	XM_044630349.1	LOC123211548	ATPase10, 类质膜
40	XM_044609092.1	LOC123195411	60S 核糖体蛋白 L5-like
42	XM_044619938.1	LOC123203541	磷酸甘油酸变位酶 like 1
48	XM_044630217.1	LOC123211465	磷脂转运酶, P ₄ 型 ATP 酶
1、19、41	XM_044630161.1	LOC123211434	未知蛋白
25	XM_044615194.1	LOC123200081	未知蛋白
34	XM_044643288.1	LOC123220727	未知蛋白
37	XM_044614667.1	LOC123199637	未知蛋白

2.5 文库筛选的结果分析

将文库质粒导入感受态细胞中后，对文库 DNA 进行转化，再分别稀释 10、100、1 000 倍后涂布平板，分别获得 1 268、416、31 个克隆，文库转化效率为 4.54×10⁴ μg⁻¹ (图 6)。

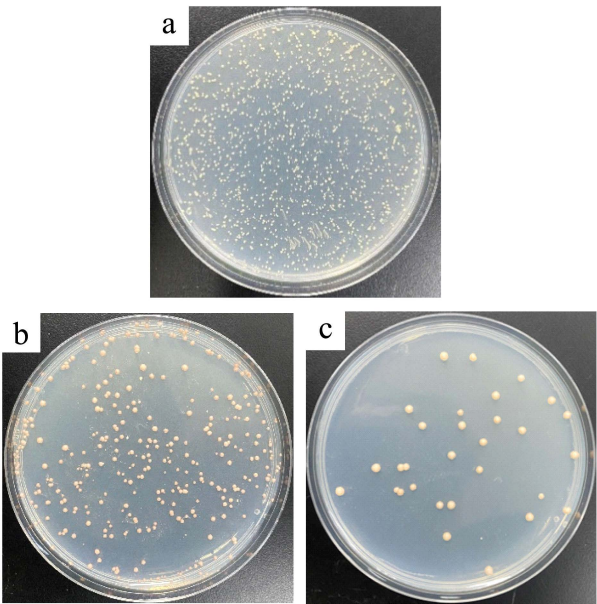


图 6 CTRI 基因筛选文库的转化效率
Fig.6 Transformation efficiency of CTRI gene screening library
注: a 为 1/10, b 为 1/100, c 为 1/1 000。

2.6 阳性克隆鉴定

从筛库平板中挑选出阳性克隆单菌落，进一步进行阳性克隆鉴定。阳性对照能够在 SD-TL 与 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT+X-α-Gal 两种平板上正常生长，并且菌落呈现蓝色 (图 7)。相比之下，阴性对照虽然能在 SD-TL 平板上正常生长但菌落不显蓝色，而在缺乏 Histidine 和 Adenine 的 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT+X-α-Gal 平板上则无法生长。这表明，本实验的初始阳性克隆不仅能在 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT+X-α-Gal 平板上生长，而且其菌落呈现蓝色，意味着这些克隆同时激活了 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因。

2.7 酵母阳性克隆DNA提取和测序比对

本研究从酵母细胞中成功提取了以上阳性克隆质粒，经过测序和比对。结果如表 1 所示，在 21 个阳性克隆中，有 1 个克隆的比对结果不明确，其余的 20 个克隆均可以确定为 15 种不同蛋白质的编码基因。

2.8 回转验证

为验证阳性克隆与 CTRI 基因的相互作用，再将 16 种阳性克隆分别转化到受体菌中，培养之后

获得的转化子被点种至缺陷平板上,并在 30 ℃ 恒温下培养了 3~4 d。如图 8 所示,这 16 种阳性克隆均能够成功激活 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的回转验证,从而证实了它们与 *CTR1* 基因的有效互作。

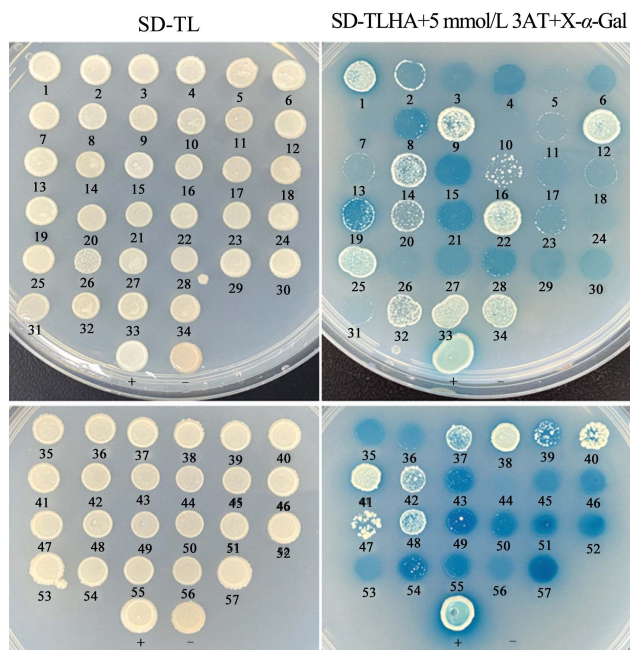


图 7 筛库阳性克隆激活 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因检测

Fig.7 Detection of activation of HIS3, ADE2 and MEL1 reporter genes by positive clones in the screening library

注: 右边列显示蓝颜色为 HIS3、ADE2 和 MEL1 平板, 编号“+”为阳性对照, 编号“-”为阴性对照。

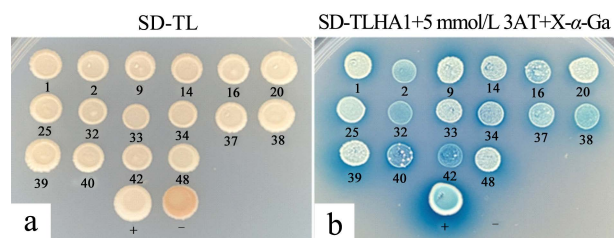


图 8 阳性克隆回转验证

Fig.8 Positive clone rotation validation

注: a 图为 SD-TL 平板, b 图为 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT+ X-α-Gal 平板。编号“+”为阳性对照, 编号“-”为阴性对照。

3 讨论与结论

芒果的后熟软化依赖乙烯,通过前期转录组数据和采后生理的研究发现, MiCTR1 与芒果果实的乙烯释放速率和软化有密切关系,也有报道表明 MiCTR1 对果实采后的营养品质有关联^[8]。因此,本研究构建诱饵重组质粒,从芒果果肉中的 cDNA 筛选出与芒果 MiCTR1 互作的蛋白,尝试揭示芒果

MiCTR1 调控果实后熟的可能机制。

本研究构建的芒果果肉 cDNA 酵母初级和次级文库的库容量分别达到了 5.7×10^6 和 1.2×10^7 CFU/mL, 高于 1×10^6 CFU/mL, 插入片段大小在 1000~2000 bp, 重组率为 100%, 说明该文库的质量较高, 涵盖的信息较完整, 能筛选到丰度较低的基因^[12], 为筛选 MiCTR1 的互作蛋白提供了有利条件。最终筛选到 15 个与 MiCTR1 相互作用的候选蛋白, 包括 RNA 聚合酶 II, 它定位在细胞核基质中, 可以催化核糖核酸的转录, 来合成 mRNA, 在调节植物生长发育与响应环境变化中发挥重要作用^[13,14]。分选连接蛋白 2A-like 是一种膜蛋白, 通过磷脂酰肌醇、细胞器运输蛋白质, 在蛋白质转运与结合过程中发挥重要作用, 并参与细胞内吞作用^[14]。核糖体蛋白是核糖体的主要成分之一, 在遗传物质 DNA 的修复、细胞凋亡、抗病抗逆、转录和翻译调控中起作用^[15,16]。本构活性 ROPs1 相互作用子与细胞生长和植物根尖分生组织的维护维护有关^[17], SPIRAL1-like 3 蛋白可能与微管结合相互作用并参与纤维细胞的发育过程^[18]。ABC1 复合激酶 7 活性蛋白参与调节叶绿素、生育酚和叶绿醌异戊二烯化的合成与代谢, 具有调节叶绿素降解的功能, 具有光氧化胁迫响应与维生素 E 的代谢有关^[19-22]。ATPase10 对许多生理过程如能量代谢、物质的吸收和运输、植物抗逆性等具有重要作用^[23,24]。糖核糖体蛋白在 DNA 修复、转录调控和翻译调控中起着重要的作用^[15,16]。磷酸甘油酸变位酶 (PGAM) 在调节糖异生和糖酵解途径的平衡中发挥重要作用, 在糖酵解过程 PGAM 中催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸, 后者代谢终产物为丙酮酸, 丙酮酸进行三羧酸循环最终合成 ATP, 为生命活动提供能量。所以 PGAM 与碳水化合物转运、新陈代谢、催化活性有关^[25]。P₄ 型 ATP 酶又称脂质翻转酶、氨基磷脂转运蛋白, 可以利用 ATP 水解的能量选择性地将另一侧的磷脂酰丝氨酸 (PS) 和磷脂酰乙醇胺 (PE) 转入至细胞膜内测^[26,27]。

综上, 与芒果 MiCTR1 互作的蛋白可以分为几类, 第一类与遗传代谢有关, 参与遗传物质的合成、转录和修复, 比如 RNA 聚合酶 II 降解因子 1-Like、芒果 60S 核糖体蛋白 L5、60S 核糖体蛋白 L5-like; 第二类叶绿素、维生素 E 的合成有关, 香叶基香叶基二磷酸还原酶 (叶绿体); 第三类与物质的转运有关, 比如分选连接蛋白 2A-like、ATPase 10, 类质膜、磷酸甘油酸变位酶 like 1、磷脂转运酶, P₄

型 ATP 酶；第四类与物质代谢有关，比如与磷酸甘油酸变位酶 like 1；第五类与细胞生长有关，比如本构活性 ROPs1 相互作用子和 SPIRAL1-like 3 蛋白，第六类参与光合作用，比如 ABC1 复合激酶 7（叶绿体）；表明 *CTR1* 与这些生物过程紧密相关。需要注意的是在互作蛋白中，磷酸甘油酸变位酶 like1、磷脂转运酶，磷酸甘油酸变位酶 like1 等影响脂质转运与淀粉、膜脂物质代谢有关的酶蛋白，而后者影响了细胞膜的完整性，这为研究芒果采后后熟过程提供新思路。

参考文献

- [1] MIRZA B, CROLEY C R, AHMAD M, et al. Mango (*Mangifera indica* L.): a magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(13): 2125-2151.
- [2] LEBAKA V R, WEE Y J, YE W, et al. Nutritional composition and bioactive compounds in three different parts of mango fruit [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(2): 741.
- [3] BAMBALELE N L, MDITSHWA A, MAGWAZA L S, et al. Recent advances on postharvest technologies of mango fruit: A review [J]. International Journal of Fruit Science, 2021, 21(1): 565-586.
- [4] ZHU X Y, ZOU Y, FU D W, et al. Molecular cloning, characterizing, and expression analysis of *CTR1* genes in harvested papaya fruit [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238: 503-513.
- [5] WANG W Y, HALL A E, O'MALLEY R, et al. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(1): 352-357.
- [6] LIN Z F, ALEXANDER L, HACKETT R, et al. LeCTR2, a CTR1-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence [J]. The Plant Journal, 2008, 54(6): 1083-1093.
- [7] KLEE H J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(377): 2057-2063.
- [8] THONGKUM M, IMSABAI W, BURNS P, et al. The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on expression of ethylene receptor genes in durian pulp during ripening [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 125: 232-238.
- [9] TESTERINK C, LARSEN P B, VAN D D D, et al. Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of Arabidopsis CTR1 [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(14): 3905-3914.
- [10] 陈思梦,王锦鑫,党明静,等.‘白花建’莲酵母双杂文库构建及 NnWRKY40 互作蛋白筛选[J].植物科学学报,2023, 41(4):447-457.
- [11] 郭金菊,史亮亮,王茹芳,等.苦瓜果实酵母双杂交文库构建及 McRPF 互作蛋白筛选[J].核农学报,2022,36(7): 1293-1299.
- [12] 赵彩良,张洁,唐锐敏,等.甘薯块根 cDNA 酵母文库的构建及 IbNCED3 启动子互作蛋白的筛选鉴定[J].山西农业大学学报(自然科学版),2022,42(4):19-27.
- [13] 钱虹萍,陈博,林金星,等. RNA 聚合酶 II 动态调控及其成像技术的研究进展[J].生物技术通报,2021,37(4):293-302.
- [14] 武晶.拟南芥分选连接蛋白 SNXs 通过 ABA 介导的气孔运动调控植物的干旱胁迫响应[D].济南:山东大学,2018.
- [15] 张安勉,杨玉菊,王凤,等.樟叶越桔 60S 核糖体蛋白 L9 基因的克隆及生物信息学分析[J].中南林业科技大学学报,2023,43(7):159-169.
- [16] 卜娇迪,陈莹莹,刘孟军,等.枣 60S 核糖体蛋白 L8-3 基因的克隆及生物信息学分析[J].河北农业大学学报,2015, 38(2):72-75,98.
- [17] LI S D, GU Y, YAN A, et al. RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth [J]. Molecular Plant, 2008, 1(6): 1021-1035.
- [18] 李榕,寇伟,谭兰,等.一个棉花微管结合蛋白基因 *GhSPIL5* 的克隆及表达分析[J].生物技术通报,2014,10: 82-87.
- [19] GALLI F, AZZI A, BIRRINGER M, et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 102: 16-36.
- [20] FRITSCH S, WANG X X, JUNG C. Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops [J]. Antioxidants, 2017, 6(4): 99.
- [21] KELLER K, BOUVIER F, D'HARLINGUE A, et al. Metabolic compartmentation of plastid prennylipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase [J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 251(1-2): 413-417.
- [22] VOM D, HÖLZL G, PLOHMANN C, et al. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2015, 27(10): 2846-2859.
- [23] 邓林,陈少良.ATPase 与植物抗盐性[J].植物学报,2005, 22(增刊):11.
- [24] 刘健健,刘俊丽,季敏杰,等.番茄质膜 H^{+} -ATPase 家族基因的鉴定和表达分析[J].浙江农林大学学报,2016, 33(5):734-741.
- [25] 龙翔宇,董绪浓,方永军,等.橡胶树 *PGAM* 基因的克隆及表达特性分析[J].热带作物学报,2013,34(10):1895-1901.
- [26] 陈柯志,刘锦燕,王鲁灵,等.真菌中的脂质不对称调节和 P_4 型 ATP 酶[J].中国真菌学杂志,2023,18(4):364.
- [27] 刘白云.拟南芥 P_4 型 ATP 酶 ALA6 参与高温胁迫的应答机理[D].兰州:兰州大学,2017.