

剑麻*AsKNOX I*基因克隆及蛋白表达分析

陆军迎, 张燕梅, 李俊峰, 周文钊*

中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 海南省热带作物营养重点实验室, 广东湛江524091

摘要: 植物的同源异型盒基因(knotted1-like homeobox, *KNOX*)与叶片形态建成具有密切的相关性。本研究以剑麻(*Agave sisalana*)茎顶端分生组织为材料分离得到编码357个氨基酸的*AsKNOX I*全长基因, 预测该蛋白的分子量约为40 kDa, 等电点为pI 6.4, 且包含*KNOX I*同源蛋白家族典型的HD、MEINOX、ELK和GSE保守结构域。后通过构建原核和真核表达载体, 分别在大肠杆菌和烟草叶片中瞬时表达, 用His标签进行蛋白纯化, Western blot用于表达产物检测。结果表明, *AsKNOX I*基因已在原核和真核中成功表达, 为进一步分析该蛋白的结构及功能特征提供了技术支持。

关键词: 剑麻; *AsKNOX I*; 真核表达; 原核表达

Cloning and Expression of *AsKNOX I* of *Agave sisalana*

LU Jun-Ying, ZHANG Yan-Mei, LI Jun-Feng, ZHOU Wen-Zhao*

Hainan Provincial Key Laboratory for Tropical Crops Nutrition, South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: Plant knotted1-like homeobox genes (*KNOX*) are closely related with leaf formation. A full-length gene of *AsKNOX I*, encoding 357 amino acids, was amplified from the shoot apical meristem (SAM) of sisal (*Agave sisalana*). The predicted molecular weight of *AsKNOX I* is about 40 kDa. Isoelectric point (pI) is 6.4. The protein includes some conservative domain structures of *KNOX I* family such as HD, MEINOX, ELK, and GSE. Therefore, the prokaryotic and eukaryotic expression vectors were constructed, and expressed in *Escherichia coli* and tobacco leaf, respectively. The *AsKNOX I* protein was purified with His tags. Western blot was used to detect the expression product. The results indicated that *AsKNOX I* had been successfully expressed in prokaryotic and eukaryotic expression system, which will provide a technical support for further analyzing the protein structure and function.

Key words: *Agave sisalana*; *AsKNOX I*; prokaryotic expression; eukaryotic expression

剑麻作为重要的热带经济作物, 其纤维具有较强的抗撕裂、耐磨和防腐等特性, 已被广泛运用于航海、交通运输、石油和冶金等领域(张燕梅等2009)。而其次生代谢物和后加工产品可作为食品添加剂和糖与脂肪的替代品(Gomez等2009; Leach和Sobolik 2010)。近几年, 尽管在剑麻抗病育种、再生体系建立和遗传多样性等方面取得了一定进展(张燕梅等2009; Nikam等2003; Rodriguez-Garay等2009), 然而, 对于剑麻的基因组和后基因组学研究较少, 尤其是对高纤维叶片的发育和形成机制知之甚少。

大量研究表明, 植物的同源异型盒基因(knotted1-like homeobox, *KNOX*)与叶片形态的建成具有密切的相关性(Liu等2008; Mello等2010)。*KNOX*家族是一类在动植物和酵母中高度保守的转录因子家族, 含有一个或多个氨基酸高度保守

的同源异型盒(Gehring等1994)。*KNOX*是首次从DS2转座子诱导的玉米(*Zea mays*)突变体(KNOTTED1, *kn1*)中被鉴定, *kn1*的突变导致玉米叶边序结构特征发生较大改变(Vollbrecht等1991)。后期, 水稻(*Oryza sativa*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、西红柿(*Solanum lycopersicum*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)等植物的*KNOX*同源基因也被相继报道(刘青2013)。

植物的*KNOX*同源基因根据其表达模式特征分为两个亚家族(Sentoku等1999), 亚细胞定位显示

收稿 2015-02-06 修定 2015-03-10

资助 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-19)。

* 通讯作者(E-mail: wenzhaozhou@163.com; Tel: 0759-2859216)。

KNOX蛋白可位于细胞的不同位置(Jackson 2002), 这表明KNOX蛋白在植株发育的不同时期可能在细胞间处于动态变化过程, 发挥着不同的功能特征。例如, 缺失或突变KNOX的植株会失去顶端优势, 形成较多的侧枝(Hu等2005)。将大豆的*Gm-KNT1*转入拟南芥后, 会导致叶片皱缩、叶裂、茎的节间缩短等现象(Liu等2008)。而龙舌兰的KNOX基因会使得拟南芥叶面皱缩、叶缘缺刻和果荚形态特征发生显著的变化(Abraham-Juárez等2010)。而在复叶植物番茄*curl*和*mouse-ear*显性突变体中, *TKn2* (tomato *Kn2*)的过量或异位表达, 均会导致多重复叶(Parnis等1997)。类似地, *LeT6/TKn2*和玉米*ZmKN1*在各自的转基因番茄中过表达时, 也会促进叶片产生更多分支(Janssen等1998)。由此说明, KNOX在茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)的形成和维持中发挥着重要作用。然而, KNOX家族转录因子的功能结构域如何与互作蛋白协同作用调节基因转录仍需进一步研究。

本研究以从剑麻SAM中分离的*AsKNOX I*全长基因为研究对象, 通过表达载体构建和体外原核、真核蛋白表达分析, 为探讨AsKNOX I蛋白结构功能特征及DNA功能互作区域分析提供理论基础。

材料与方法

1 试验材料与试剂

剑麻(*Agave sisalana* Perr.)材料种植于中国热带农业科学院南亚热带作物研究所剑麻种质资源圃。SAM采集后立刻放于液氮中处理, 并置于-80℃保存备用。烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105及改造后的表达载体pCAMBIA1305和pET-28a (已引入35S启动子)均由本实验室保存。

pGEM-T Easy Vector购自Promega公司; 一链

合成试剂盒、各种限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶购自TaKaRa公司; RNA提取试剂盒购自天泽生物公司; 胶回收和质粒提取试剂盒购自美国OMEGA生物技术有限公司。

2 剑麻总RNA分离与cDNA合成

用RNAiso Plus (TaKaRa)提取剑麻SAM中总RNA, 1.5%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计用于检测RNA的质量。一链cDNA合成参照PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa)使用说明书进行。

3 *AsKNOX I*引物设计及PCR扩增

依据本课题前期从剑麻不同发育时期全长cDNA文库中分离的*AsKNOX I* (GenBank登录号为GU980050)序列设计特异引物(表1), 以高保真PrimeSTAR HS DNA聚合酶(TaKaRa)进行目的基因PCR扩增。反应体系为: cDNA模板2 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 4 μL, 2×GC buffer 25 μL, 10 mmol·L⁻¹上、下游引物各2 μL, 2.5 U·μL⁻¹ PrimeSTAR HS DNA聚合酶0.5 μL, ddH₂O补足至50 μL。扩增程序为: 85℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 35个循环; 最后72℃总延伸10 min。将上述PCR产物回收并连入pMD18-T (TaKaRa)载体中, 通过蓝白斑和酶切鉴定筛选阳性克隆, 后进行测序鉴定目的片段的正确性。

4 表达载体构建

以pMD18-*AsKNOX I*为模板, 用分别含有HindIII和XhoI的上、下游引物特异性扩增*AsKNOX I* (表1), 后用相同的内切酶对PCR产物进行双酶切并连入pET-28a表达载体。类似地, 用XbaI和HindIII两个引物分别加入*AsKNOX I*基因的上下游, 扩增产物经酶切后连入pCAMBIA1305中。上述阳性克隆经双酶切加以验证。

5 重组质粒表达及蛋白纯化

将pET28a-*AsKNOX I*和空载体分别转入大肠

表1 PCR扩增引物

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>AsKNOX Ia</i>	ATGGAGGAATTCCTCACTTGAG	AGGTGACGGGCCAAAAGCGAT
<i>AsKNOX Ib</i>	<u>CAAGCTT</u> GATGGAGGAATTCCTCACTTGAG	<u>CCTCGAGG</u> AGGTGACGGGCCAAAAGCGAT
<i>AsKNOX Ic</i>	<u>CTCTAGAG</u> ATGGAGGAATTCCTCACTTGAG	<u>CAAGCTT</u> GAGGTGACGGGCCAAAAGCGAT

a: *AsKNOX I*基因克隆; b: 原核表达载体构建; c: 真核表达载体构建。下划线代表酶切位点及保护碱基。

杆菌(BL21)中。选择单克隆在5 mL的LB液体培养基(卡那霉素50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养过夜; 后取2 mL菌液在400 mL LB液体培养液(卡那霉素50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中放大培养至OD值约为0.5, 加入IPTG至终浓度为0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 18 $^{\circ}\text{C}$ 诱导24 h。

将植物表达载体pCAMBIA1305-*AsKNOX I*通过电激法导入根瘤农杆菌EHA105中, 后在含有卡那霉素(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和利福平(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的固体LB培养基上培养16 h, PCR验证阳性克隆。挑取阳性克隆并进行放大培养, 用OD值为0.6的农杆菌菌液(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮)注射烟草叶片后, 在28 $^{\circ}\text{C}$ 共培养36 h, 后提取侵染叶片的总蛋白。上述蛋白通过镍柱亲和层析的方法纯化重组蛋白, 具体步骤依据Qiagen公司的蛋白纯化手册进行。

6 Western blot检测重组蛋白

Western blot依据Welinder和Ekblad (2011)所描述的方法操作。100 mg瞬时表达的烟草叶片在液氮中研磨成细粉, 转入300 μL 上样缓冲液[2 \times SDS loading buffer, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6.8, 2% (W/V) SDS, 10% (V/V)甘油, 2% (V/V) β -巯基乙醇, 0.02% (W/V)溴酚蓝]。离心取上清液并过His柱子进行纯化。每个泳道上样20 μL 纯化蛋白, 通过SDS-PAGE分离后, 进行转膜、杂交。

实验结果

1 *AsKNOX I*基因克隆及序列分析

以剑麻SAM组织中提取的总RNA为模板, 并进行cDNA一链的合成和PCR扩增。电泳结果如图1-A所示, 在1.0 kb处特异地扩增出一目的条带, 与已知序列大小相符。为进一步验证所得序列的正确性, 将上述PCR产物回收并连入pMD18-T载体中进行测序。完整的开放阅读长度为1 074 bp, 编码357个氨基酸, 预测的蛋白分子量约为40 kDa, 等电点pI为6.4。保守结构域预测结果表明, *AsKNOX I*含有MEINOX、GSE、ELK和HD四个高度保守的KNOX结构域(图1-B)。MEINOX可分为KNOX1和KNOX2两个亚单位, 对与DNA的绑定活性和下游基因的表达起到重要作用, 而ELK是KNOX基因入核运输的信号序列, GSE结构域对于蛋白信号的降解起到重要作用。通过对比MEINOX-HD结构域特征, 发现*AsKNOX I*属于一类KNOX家族的b亚类, 推测其表达活性与SAM和叶片形态建成具有重要的作用。聚类分析结果表明, *AsKNOX I*与拟南芥(NP850951)、豌豆(O82805)、碧桃(ABO28750)等植物KNOX具有70%以上的同源性, 尤其是与龙舌兰(NP179840)氨基酸的同源性高达92% (图1-C)。

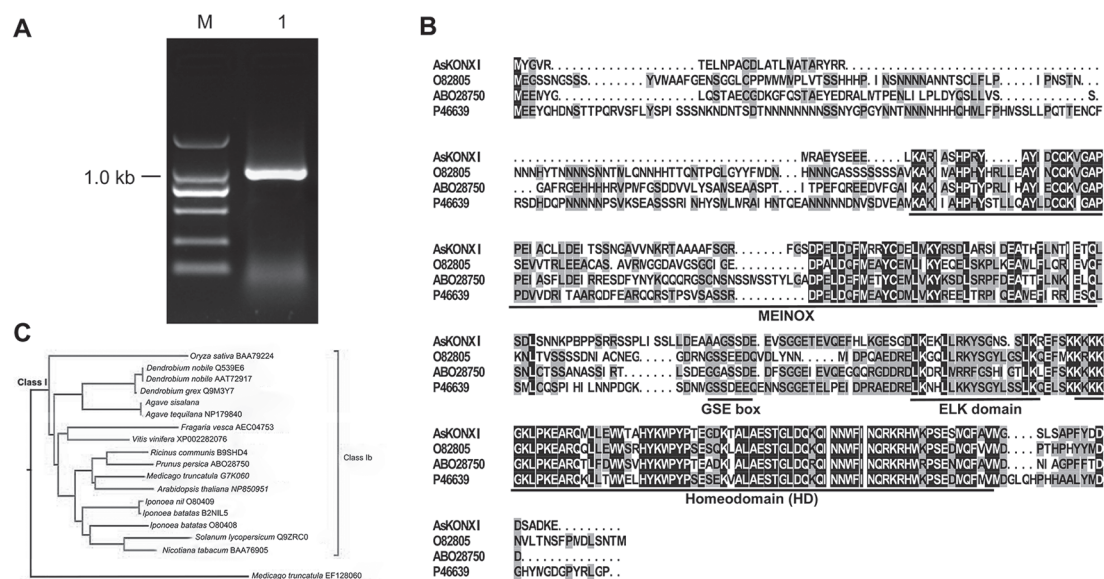


图1 *AsKNOX I*基因PCR扩增及序列比对

Fig.1 PCR amplification of *AsKNOX I* gene and sequence alignment

A: *AsKNOX I*基因PCR扩增。M: DL2000 marker; 1: RNA水平PCR扩增结果。B: *AsKNOX I*与拟南芥(P46639)、豌豆(O82805)、碧桃(ABO28750)等植物KNOX氨基酸比对及保守结构域分析。C: *AsKNOX I*与其他植物KNOX蛋白的聚类分析。苜蓿的KNOX (EF128060)用于Class II外组。

2 *AsKNOX I*基因表达载体构建

用含有*Hind*III和*Xho*I及*Xba*I和*Hind*III酶切位点的两对引物对*AsKNOX I*基因进行扩增, PCR产物分别连入pET-28a和pCAMBIA1305表达载体。后用上述内切酶对重组质粒分别进行双酶切, 结果如图2所示, 重组质粒能够得到一条与回收片段大小相似的片段。这表明目的片段已经分别导入不同的表达载体。

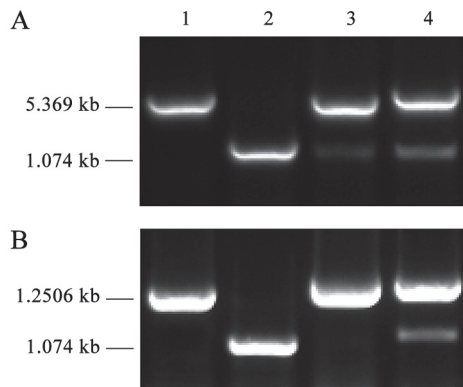


图2 *AsKNOX I*基因表达载体构建

Fig.2 Expression vector construction of *AsKNOX I* gene

A: *AsKNOX I*原核表达载体酶切结果。1: 空质粒酶切结果; 2: PCR回收产物; 3、4: 重组质粒酶切结果。B: *AsKNOX I*真核表达载体酶切结果。1、3: 空质粒酶切结果; 2: PCR回收产物; 4: 重组质粒酶切结果。

3 *AsKNOX I*基因原核表达及蛋白纯化

为探寻*AsKNOX I*蛋白功能, 本研究将pET28a-*AsKNOX I*和空载体分别在大肠杆菌中进行表达, 后用镍柱亲和层析对目的蛋白进行纯化。考马斯亮蓝对体外表达的蛋白进行染色, 结果如图3所示, 在约44 kDa (含有6个组氨酸)处有一条纯化的蛋白条带。His抗体对*AsKNOX I*基因表达结果进行Western blot验证, 泳道1的空质粒表达的蛋白44 kDa处无任何杂交信号; 而pET28a-*AsKNOX I*表达(泳道2)和纯化(泳道3)的蛋白均具有较强的杂交信号。由此表明, *AsKNOX I*蛋白已在在大肠杆菌中被成功表达。

4 *AsKNOX I*基因真核表达及蛋白纯化

分别将含有pCAMBIA1305-*AsKNOX I*和pCAMBIA1305空载体用叶片注射的方法使其在烟草中瞬时表达, 后提取叶片的总蛋白并通过His标签加以纯化, Western blot用于检测*AsKNOX I*表

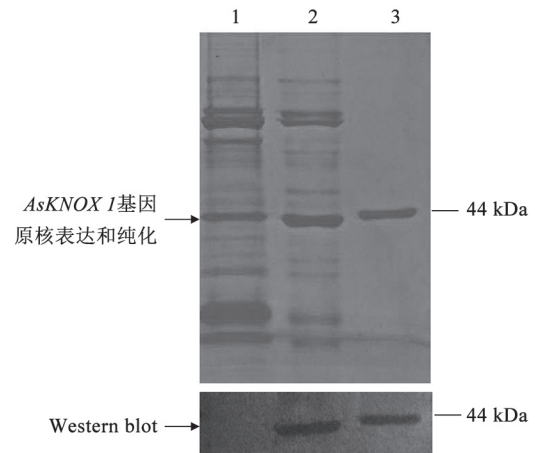


图3 *AsKNOX I*原核表达及Western blot检测

Fig.3 *AsKNOX I* prokaryotic expression and Western blot detection

1: pET28a空质粒表达结果; 2: pET28a-*AsKNOX I*表达结果; 3: 蛋白纯化结果。

达结果, Ribulose用于作为对照蛋白, 保证了不同泳道蛋白上样量的一致性, 结果如图4所示, 泳道1和泳道2 Ribulose均具有较强的杂交信号, 而*AsKNOX I*蛋白仅在泳道2具有杂交信号, 由此说明*AsKNOX I*在烟草叶片中已被瞬时表达。

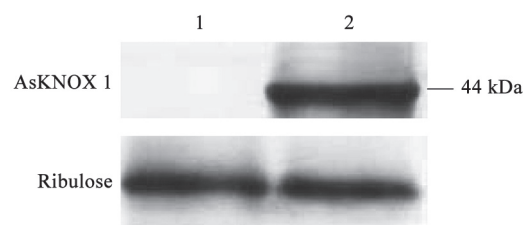


图4 Western blot检测*AsKNOX I*在烟草中表达结果

Fig.4 Expression detection of *AsKNOX I* in tobacco by Western blot

1: pCAMBIA1305空载体表达结果; 2: pCAMBIA1305-*AsKNOX I*表达结果。

讨 论

植物的生长发育依赖于茎顶端分生组织自我更新的能力, 而*KNOX I*对分生组织的形成和功能维持起到重要作用(Liu等2008; Mello等2010; Gehring等1994)。本课题组前期从剑麻SAM中分离得到*KNOX I*的同源基因*AsKNOX I*, 时空表达分析表明该基因主要在SAM组织和花絮小花中具有较高

的表达水平,而在成龄剑麻的叶片中表达量较低(Zhou等2012)。拟南芥*KNOX I*缺失突变体的胚芽形成受阻或结构紊乱,部分植株出现子叶柄融合,无法进一步发育(Scofield和Murray 2006)。而另外一些*KNOX I*同源蛋白KNAT1/BP、KNAT2或KNAT6在SAM中功能丧失并不会影响茎顶端分生组织的发育,表明某些*KNOX I*存在冗余的功能(Hay等2004)。尽管*AsKNOX I*蛋白在剑麻叶片的发育过程中具有重要的作用(Zhou等2012),然而,该蛋白不同结构域如何调节下游基因表达,诱导叶片的形成过程仍需要进一步研究。

当前,以GUS为报告标签,用农杆菌介导外源基因在烟草叶片中瞬时表达研究植株启动子功能及顺式元件和转录因子之间调节机制,不仅可以缩短实验周期,而且可以节约大量的人力和物力(韦淑亚等2014; 龚举成等2004)。然而,由于瞬时表达产物的稳定性及表达后的检测时间和手段制约了结果的准确性(欧阳乐军等2013)。其次,在进行功能基因研究时,启动子的选择也极其重要,诱导型启动子增加了诱导过程的复杂性和存在异源基因表达水平较低等现象。本研究利用组成型启动子和Western blot检测手段有效地解决上述两个难题,成功地利用农杆菌介导烟草瞬时表达pCAMBIA1305:35S-*AsKNOX I*。

结构预测结果表明,*AsKNOX I*包含*KNOX I*同源蛋白家族典型的HD、MEINOX、ELK、GSE保守结构域(图1)。而MEINOX结构域包括*KNOX1*和*KNOX2*亚结构域,可能对*AsKNOX I*异常表达起到调节作用,而*KNOX2*亚结构域可能参与二聚体的形成(李春苑等2009)。GSE结构域中富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸以及苏氨酸残基,可能调节蛋白质的稳定性,通过泛素降解途径使其编码的蛋白质降解(Ori等1999)。然而,这些不同的结构域是如何调节植物下游信号通路需要对其进行蛋白功能分析,本研究通过体外和体内的蛋白表达体系的建立,为进一步研究*AsKNOX I*蛋白功能提供了理论基础。

参考文献

龚举成, 苟小平, 徐莺, 唐琳, 王乔, 王治涛, 陈放(2004). 水稻*RSSG8*基因启动子与*GUS*融合基因的构建及在烟草中的瞬间表达. 四川大学学报(自然科学版), 41 (5): 1070~1075
李春苑, 阮美煜, 贾海燕, 王崇英(2009). 同源异型盒基因I类*KNOX*

的表达调控及在植物形态建成中的作用. 细胞生物学杂志, 31 (5): 635~640
刘青(2013). 麻竹2个同源异型盒基因(*KNOX*)的分子特征及功能研究[硕士论文]. 北京: 中国林业科学研究院
欧阳乐军, 黄真池, 沙月娥, 曾富华(2013). 植物病原菌诱导表达载体构建及在烟草中的瞬时表达研究. 华北农学报, 28 (4): 41~45
韦淑亚, 刘小东, 张莹莹, 赵旭东, 罗青晨, 刘虎, 杨广笑, 何光源(2014). 水稻钙依赖型蛋白激酶*OsCPK9*基因启动子的克隆及在烟草中的瞬时表达分析. 浙江农业学报, 26 (2): 261~267
张燕梅, 李俊峰, 陆军迎, 周文钊, 梁辉, 张浩, 戴梅莲(2009). 剑麻ISSR反应体系的建立与分析. 中国麻业科学, 31 (5): 291~295
Abraham-Juárez MJ, Martínez-Hernández A, Leyva-González MA, Herrera-Estrella L, Simpson J (2010). Class I *KNOX* genes are associated with organogenesis during bulbil formation in *Agave tequilana*. J Exp Bot, 61 (14): 4055~4067
Gehring WJ, Affolter M, Burglin T (1994). Homeodomain proteins. Ann Rev Biochem, 63: 487~526
Gomez E, Tuohy KM, Gibson GR, Klinder A, Costabile A (2009). *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of *Agave* fructans. J Appl Microbiol, 108: 2114~2121
Hay A, Craft J, Tsiantis M (2004). Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? BioEssays, 26 (4): 395~40
Hu X, Wu QF, Xie YH, Ru H, Xie F, Wang XY, Wang CY (2005). Ectopic expression of the *Pttn1* gene induces alterations in the morphology of the leaves and flowers in *Petunia hybrida* Vilm. J Integr Plant Biol, 47 (10): 1153~1158
Jackson D (2002). Double labeling of *KNOTTED1* mRNA and protein reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. Plant Physiol, 129 (4): 1423~1429
Janssen BJ, Lund L, Sinha N (1998). Overexpression of a homeobox gene, *LeT6*, reveals indeterminate features in the tomato compound leaf. Plant Physiol, 117 (3): 771~786.
Leach JD, Sobolik KD (2010). High dietary intake of prebiotic inulin-type fructans in the prehistoric Chihuahuan Desert. Brit J Nutr, 103: 1558~1561
Liu J, Ha D, Xie ZM, Wang H, Zhang W, Zhang J, Chen S (2008). Ectopic expression of soybean *GmKNT1* in *Arabidopsis* results in altered leaf morphology and flower identity. J Genet Genomics, 35: 441~449
Mallo M, Wellik DM, Deschamps J (2010). *Hox* genes and regional patterning of the vertebrate body plan. Dev Biol, 344: 7~15
Nikam TD, Bansude GM, Aneesh Kum KC (2003). Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). Plant Cell Rep, 22: 188~194
Ori N, Juarez M T, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM, Hake S (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. Plant Cell, 11 (6): 1073~1080
Parnis A, Cohen O, Gutfinger T, Hareven D, Zamir D, Lifschitz E (1997). The dominant developmental mutants of tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a *Knotted* gene. Plant Cell, 9 (12): 2143~2158

- Rodríguez-Garay B, Lomeli-Sencion JA, Tapia-Campas E, Gutiérrez-Moraa A, García-Galindoc J, Rodríguez-Domíngueza JM, Urbina-López D, Vicente-Ramírez I (2009). Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Lino. Ind Crop Prod, 29 (1): 220~228
- Scofield S, Murray JAH (2006). *KNOX* gene function in plant stem cell niches. Plant Mol Biol, 60 (6): 929~946
- Sentoku N, Sato Y, Kurata N, Ito Y, Kitano H, Matsuoka M (1999). Regional expression of the rice *KNI*-type homeobox gene family during embryo, shoot and flower development. Plant Cell, 11: 1651~1663
- Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S (1991). The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. Nature, 350: 241~243
- Welinder C, Ekblad L (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. J Proteome Res, 10 (3): 1416~1419
- Zhou WZ, Zhang YM, Lu JY, Li JF (2012). Construction and evaluation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences for rapid discovery of new genes from sisal (*Agave sisalana* Perr.) different developmental stages. Int J Mol Sci, 13 (10): 13150~13168