

doi:103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 031

麻疯树基因 *JcKNOX1* 的克隆和表达调控分析

时小东¹, 田银帅¹, 闫晓雪¹, 方志荣^{1,2}, 陈放¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064;

2. 西昌学院动物科学学院, 西昌 615013)

摘要: *KNOX* 同源异型盒基因在植物生长发育中扮演着极其重要的角色, 首次从大戟科植物麻疯树 cDNA 中克隆到一个同源异型盒基因, 命名为 *JcKNOX1*. 其开放阅读框全长 693 bp, 编码 230 个氨基酸残基, 预测蛋白质等电点 $pI=6.13$, 分子量 $PA=25.92$ kD. 聚类分析表明, *JcKNOX1* 与毛白杨在进化上具有最近的亲缘关系, 其次是甜橙. 荧光定量 PCR 检测发现, *JcKNOX1* 基因在麻疯树植株各个器官中均有表达, 幼嫩部位表达量明显高于成熟器官, 表达量依次为: 茎尖>嫩叶>茎>叶>花>叶柄>根; 对麻疯树幼苗进行 ABA 和低温胁迫发现, *JcKNOX* 基因表达量明显增加. 上游调控元件预测分析表明, 该基因可能在麻疯树光调节、激素调控、花粉基因特异性表达、逆境调控等重要生物学过程中具有重要作用.

关键词: 麻疯树; *JcKNOX1*; 序列分析; 表达分析

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0187-06

Cloning and expression regulation analysis of a *JcKNOX1* gene from *Jatropha curcas* L.

SHI Xiao-Dong¹, TIAN Yin-Shuai¹, YAN Xiao-Xue¹, FANG Zhi-Rong^{1,2}, CHEN Fang¹

(1. Key Laboratory of Bio-source and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences,

Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. School of Animal Science of Xichang College, Xichang, 615013, China)

Abstract: *KNOX* family genes, coding homeobox proteins, play an important role in plant development. A novel homeobox gene, *JcKNOX1*, was cloned from the cDNA of *Jatropha curcas* L.. The full-length ORF of *JcKNOX1* was 693bp, encoding a protein of 230 amino acids residues. The predicted structure of *JcKNOX1* showed that its theoretical isoelectric point and molecular weight were 6.13 and 25.92 kDa respectively. Phylogenetic analysis indicated that *JcKNOX1* was relation to *Populus tomentosa* and *Citrus sinensis* closely. By fluorescence quantitative PCR the expression levels were different as follows: stem apex>tender leaf>stem>leaf>flower>petiole>root, which showed that the *JcKNOX1* expressed with high levels in developing organs. Meanwhile, *JcKNOX* was strongly induced by ABA and low temperature in *Jatropha curcas* L. seedlings. Through biology software prediction analysis indicated that *JcKNOX1* might play an important role in light regulation, hormone regulation, expression of pollen-specific gene and abiotic stress of *Jatropha curcas* L..

Key words: *Jatropha curcas* L.; *JcKNOX1*; Sequence analysis; Expression analysis

收稿日期: 2014-09-26

基金项目: 国家“十二五”重大科技支撑计划课题(2011BAD22B08); 四川省教育厅项目(08ZB015)

作者简介: 时小东(1988-), 男, 山东邹平人, 硕士研究生, 主要研究领域为资源植物学.

通讯作者: 陈放. E-mail: chenfang_scu@hotmail.com

1 引言

同源异型盒基因家族(homeobox genes)广泛存在于真核生物中,编码的蛋白作为调控因子,在植物生长发育中具有重要的作用^[1].根据基因的序列特征和表达模式,植物 KNOX 家族可分为 3 类:Ⅰ类、Ⅱ类和Ⅲ类 KNOX 亚家族^[2].典型的同源异型盒结构域具有高度保守的核酸序列,具有环-螺旋-转角-螺旋的 3 个螺旋区结构域 DNA 结合基序^[3].迄今为止,已经从玉米、水稻、拟南芥、大豆、烟草、油菜、麻竹等多种植物中分离出 KNOX 家族基因,广泛参与植物的生长发育和器官分化形成过程^[4-9].其中,玉米 *ZmKN1* 基因的异位表达使叶脉附近形成叶节状的分生组织结构,在茎尖分生组织的形成和保持方面发挥作用^[10];拟南芥 *stm-1* 缺失突变体能阻止胚性顶端分生组织形成,从而导致叶柄融合^[11];甘蓝型油菜 *BnKNAT2* 基因超表达推迟开花期,并且叶片形态改变^[8];大豆 *GmKNOX1* 生物信息学分析发现,其表达部位主要集中在茎顶端分生组织^[12].

麻疯树为多年生耐干旱耐贫瘠小型木本植物,是目前公认的一种具有应用前景的产业化能源植物^[13,14].截止目前,KNOX 家族基因在麻疯树中尚无功能研究的相关报道.研究 KNOX 基因在麻疯树中调控分生组织形成和器官功能维持的机制,对麻疯树及木本油料作物品种培育及丰产具有重要的理论指导意义.本研究从麻疯树 cDNA 中克隆到一个同源异形盒基因 *JcKNOX1* 的 cDNA 序列,并通过生物信息学和荧光定量 PCR 的方法对该基因进行了表达分析,以期为进一步认识和利用 *JcKNOX1* 的功能提供理论指导.

2 材料和方法

2.1 材料

麻疯树材料取自四川省凉山彝族自治州金河乡的麻疯树基地,选取 6 年生麻疯树根、茎、叶、嫩叶、花、茎尖和叶柄,取材后迅速放入液氮罐中保存.

pEAFY-T1 试剂盒及感受态细胞购于北京全式金技术公司,植物总 DNA 提取试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,荧光定量 PCR 试剂盒 SsoFast EvaGreen Supermix 购自 Bio-Rad 公司,引物订购自华大基因

科技服务有限公司.

2.2 方法

2.2.1 *JcKNOX1* 基因的克隆 按照植物总 RNA 提取试剂盒操作说明提取麻疯树 RNA,并采用反转录试剂盒进行反转录,以 cDNA 第一条链作为模板进行以下操作.根据 *JcKNOX1* 序列设计特异性引物(F1: 5'-ATGAGTGAAAACCTGGTTTTGT-3', R1: 5'-TCATTGAAGTGGT-TGTTGTTGT-3').PCR 产物经试剂盒回收后,按照 pEASY-T1 试剂盒操作说明,连接 T 载体,获得阳性单菌落,送华大基因科技服务有限公司进行测序.同时,以麻疯树总 DNA 为模板,进行上述操作,测序获得序列.

2.2.2 生物信息学分析 根据麻疯树基因组数据库(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)搜索 *JcKNOX1* 基因序列;用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性对比;用 ExPASy(<http://au.expasy.org>)的 Compute pI/Mw 计算蛋白质的等电点、分子量;DNAMAN 软件进行氨基酸序列对比;用 MEGA5 构建系统进化树;用 SOPMA 预测二级结构;用 SWISS-MODEL 预测三级结构;通过 PLACE 在线程序(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)进行顺式作用元件分析.

2.2.3 *JcKNOX1* 基因的组织表达特点 以麻疯树 18S rRNA(Genbank 登录号:AY823528.1)为内参基因设计荧光定量 PCR 引物(F2: 5'-CAAC-CATAAACGATGCCGACC-3', R2: 5'-CAGC-CTTGCGACCATACTCCC-3');目的基因序列设计特异性荧光定量 PCR 引物(F3: 5'-GGAGGCT-TATTGTGACATGTTG-3', R3: 5'-ATTTAGCT-GCGTCTCGATTCT-3').对引物进行验证后,进行不同组织 *JcKNOX1* 基因表达水平的检测.

2.2.4 *JcKNOX1* 基因在胁迫下的表达情况 将七叶一心期麻疯树分别置于 1mM ABA 溶液和 4℃光照培养箱中处理 6h,取第三片叶提取 RNA,利用荧光定量 PCR 对处理前后的 *JcKNOX1* 表达情况进行分析.

3 结果与分析

3.1 *JcKNOX1* 序列分析

以麻疯树 cDNA 和 DNA 为模板,通过 PCR 的方法获得相应的基因序列,测序结果显示其序列大小不同,分别为 693bp 和 935bp,其含有 2 个

有内含子, 分别为 101bp 和 141bp(图 1A), 其编码 230 个氨基酸残基, 预测蛋白理论分子量为 5.92KD, 等电点为 6.13. 含有两个典型的 KNOX 结构域, 108~151 位是一个 KNOX1-like 结构域, 159~210 位是一个 KNOX2-like 结构域, 除此之外, 分析还发现一个 Protein-kinase-like 结构域, 位于 63~89 位(图 1B).

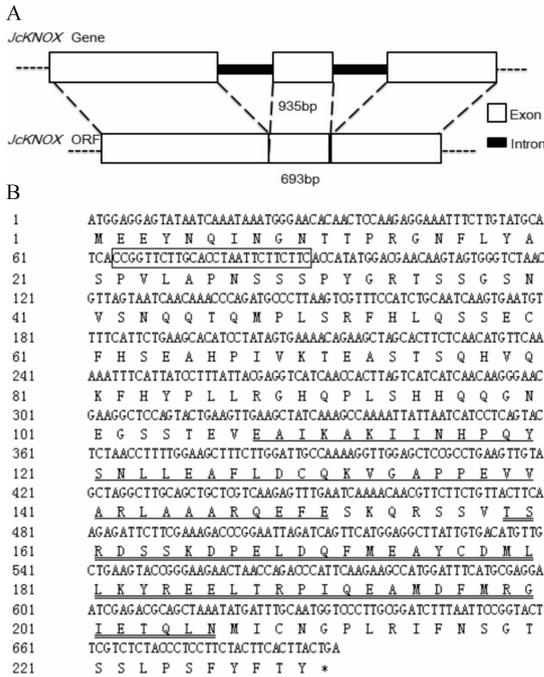


图 1 麻疯树 *JcKNOX1* 基因结构及对应氨基酸序列特征

A 图为麻疯树 *JcKNOX1* 基因结构, 其中方框代表外显子, 黑色横线代表内含子; B 图为麻疯树 *JcKNOX1* cDNA 所编码氨基酸序列特征, 其中 * 为终止密码, 方框内第 63~89 位为 Protein-kinase-like 结构域, 单下划线的第 108~151 位是一个 KNOX1-like 结构域, 双下划线的第 159~210 位是一个 KNOX2-like 结构域

Fig. 1 The gene structure and deduced amino acid sequence of *JcKNOX1* from *Jatropha curcas* L.

JcKNOX1 基因氨基酸序列的二级结构预测显示, 含有大量的 α -螺旋和无规则卷曲结构元件, 其余少量是 β 链, 分别为 52%、53% 和 3%。进一步采用 Swiss-Model 数据库对 *JcKNOX1* 蛋白的三级结构进行分析(图 2), 与报道的 KNOX 蛋白的 DNA 结合基序的三螺旋结构相符合。

3.2 *JcKNOX1* 同源性分析

利用 NCBI 在线软件 BLAST 进行分析比较, 结果显示 *JcKNOX1* 编码的蛋白与其他植物的 KNOX 蛋白具有较高的一致性, 如可可树(*Theobroma cacao*)、毛白杨(*Populus tomentosa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、光皮桦(*Betula lumini fera*)等,

一致性都在 50% 以上。利用 DNAMAN 软件将 *JcKNOX1* 基因编码蛋白与同源性蛋白的氨基酸序列进行对比(图 3), 结果显示他们的 KNOX 区域几乎完全一致, 保持了进化上的保守性, 推测可能与其功能有关。



图 2 *JcKNOX* 编码的蛋白质三级结构预测
Fig. 2 Predicted 3-Dimension structure of *JcKNOX* protein

利用 MEGA 对 *JcKNOX1* 与来自其他物种的 KNOX 蛋白氨基酸序列构建系统进化树(图 4), 结果显示, *JcKNOX1* 与双子叶植物 KNOX 亲缘关系更近, 与杨柳科毛白杨、柑橘属甜橙共同构成一个分支, 这与植物分类学的进化特征相吻合, 具有明显的种属特性。

3.3 *JcKNOX1* 上游调控元件预测分析

利用调控元件预测程序 Place 对 *JcKNOX1* 开放阅读框上游的 1500bp 序列进行顺式作用元件预测(表 1), 结果显示, 该序列除了一些基本的保守转录元件之外, 与植物光合作用和光调节有关的调节元件多达 24 个, 与植物激素有关的调控元件约 9 个, 此外存在一些可能参与植物花粉特异性表达和启动子功能构建, 逆性调控, 腋芽分枝诱导和次生木质部发育等有关的作用元件。这些说明麻疯树 *JcKNOX1* 基因与麻疯树激素调节、光调节和分生组织等活性相关。

3.4 *JcKNOX1* 基因在组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术对 *JcKNOX1* 基因在麻疯树根、茎、嫩叶、叶、茎尖、花和叶柄中表达的表达情况进行分析, 发现 *JcKNOX1* 在麻疯树各个组织器官中均有表达(图 5), 其中在茎尖中表达量最高, 其次是嫩叶。对于成熟器官和幼嫩器官相比, *JcKNOX1* 基因在幼嫩部位的表达均高于成熟器官, 其中茎尖 *JcKNOX1* 基因表达量是茎表达量 8.6 倍, 嫩叶中表达量是叶表达量的

2.5 倍, 意味着基因 *JcKNOX1* 在麻疯树分化阶段转录活跃, 这充分说明其可能参与组织分化调控。

3.5 *JcKNOX1* 基因在胁迫下的表达分析

麻疯树七叶一心幼苗在 1mM ABA 和 4℃ 冷处理 6h 后, *JcKNOX1* 基因表达量均变化明显

(图 6), ABA 和冷处理后表达量分别是处理前的 3.0 倍和 4.5 倍. 推测是因为麻疯树 *JcKNOX1* 基因对逆境胁迫作出相应调控, 从而调节其抗逆. 这表明 ABA 处理和冷胁迫等胁迫均能诱导 *JcKNOX1* 表达。

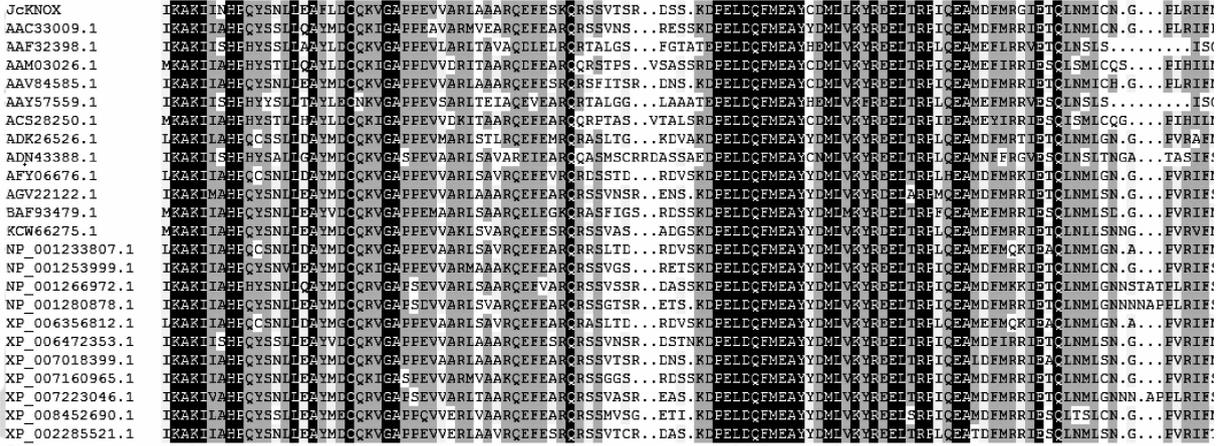


图 3 麻疯树 *JcKNOX1* 蛋白与其他植物 KNOX 蛋白氨基酸序列对比

其中 XP_007018399.1 来自可可树 (*Theobroma cacao*), AAV84585.1 来自毛白杨 (*Populus tomentosa*), XP_002285521.1 来自葡萄 (*Vitis vinifera*), AGV22122.1 来自光皮桦 (*Betula lumini fera*), XP_006472353.1 来自甜橙 (*Citrus sinensis*), NP_001253999.1 来自大豆 (*Glycine max*), KCW66275.1 来自巨桉 (*Eucalyptus grandis*), XP_007223046.1 来自黄桃 (*Prunus persica*), NP_001280878.1 来自苹果 (*Malus domestica*), AFY06676.1 来自烟草 (*Nicotiana tabacum*), XP_008452690.1 来自香瓜 (*Cucumis melo*), XP_007160965.1 来自菜豆 (*Phaseolus vulgaris*), NP_001266972.1 来自草莓 (*Fragaria vesca*), ADK26526.1 来自矮牵牛花 (*Petunia x hybrida*), BAF93479.1 来自甘薯 (*Ipomoea batatas*), XP_006356812.1 来自马铃薯 (*Solanum tuberosum*), AAC33009.1 来自豌豆 (*Pisum sativum*), NP_001233807.1 来自番茄 (*Solanum lycopersicum*), AAM03026.1 来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), ACS28250.1 来自甘蓝 (*Brassica oleracea*), AAF32398.1 来自小麦 (*Triticum aestivum*), ADN43388.1 来自龙舌兰 (*Agave tequilana*), AAY57559.1 来自玉米 (*Zea mays*)。下同。

Fig. 3 Aligenment of the amino acid sequences from *JcKNOX1* with other plant KNOX sequences

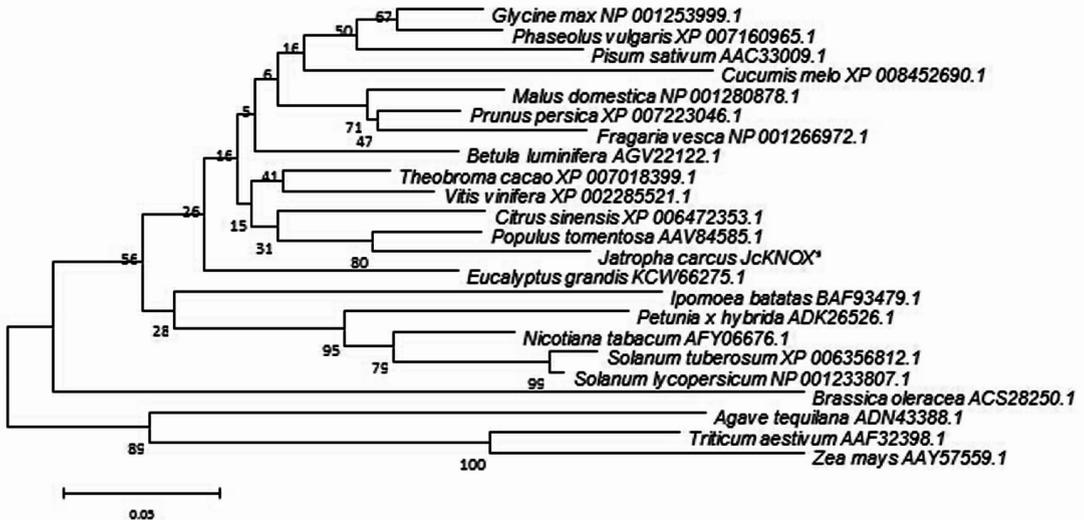


图 4 麻疯树 KNOX 蛋白与其他物种 KNOX 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *JcKNOX1* protein from *Jatropha curcas* L. and other species

表 1 *JcKNOX1* 顺式作用元件预测分析

Tab. 1 The cis-acting elements of the gene *JcKNOX1*

	可能元件	位置	功能
与光合作用有关	ACGTATERD1	656 (+), 832 (+)	黄化现象有关
	EBOXBNNAPA	389 (+), 720 (+), 389 (-), 720 (-)	光响应和生物合成基因的组织特异性活性有关
	INRNTPSADB	492 (+), 1268 (+), 1306 (+), 等	光合体系 I 基因调节有关
	REALPHALGLHCB21	432 (-), 1435 (-), 1449 (-)	光敏色素调节有关
	S1FBOXSORPS1L21	1243 (-), 1359 (-)	叶绿体核糖体有关
激素调节有关	ASF1MOTIFCAMV	657 (-), 833 (-)	生长素、水杨酸和光调节有关
	CPBCSPOR	409 (-), 775 (-)	细胞分裂素和叶绿素调节有关
	ERELEE4	305 (-), 368 (-), 1465 (-)	乙烯和衰老有关
	MYCONSENSUSAT	389 (+), 720 (+), 389 (-), 720 (-)	MYC、脱落酸信号和抗寒性有关
	WRKY71OS	170 (+), 18 (-), 233 (-), 658 (-), 等	赤霉素和脱落酸途径有关
其它功能	CBFHV	684 (-)	脱水响应和冷驯化有关
	GT1GMSCAM4	148 (+), 472 (+), 977 (+), 1043 (-), 等	病原体和盐诱导有关
	MYBCORE	348 (-), 132 (-), 380 (-), 486 (-)	MYB、水胁迫和脱水应激有关
	POLLENILELAT52	609 (+), 642 (+), 897 (+), 等	花粉启动子和其他基因特异有关
	XYLAT	414 (+)	次生木质部发育有关
	UP2ATMSD	1410 (-), 1441 (-)	腋芽分枝诱导有关

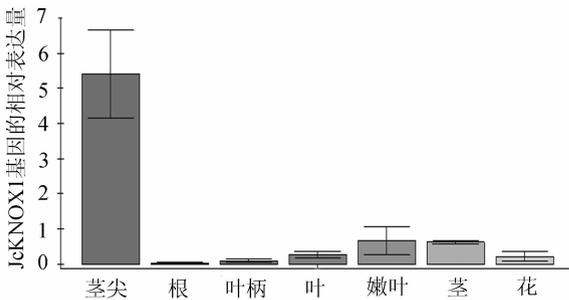


图 5 麻疯树 *JcKNOX1* 在麻疯树不同组织的表达
Fig. 5 Expression analysis of *JcKNOX1* gene in different tissues of *Jatropha curcas* L

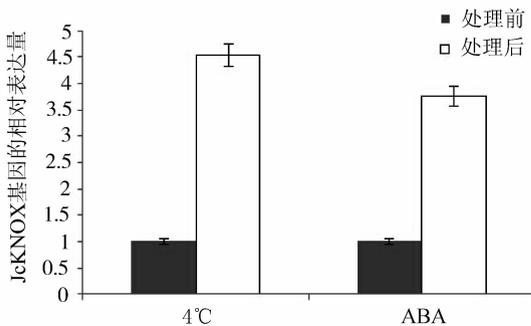


图 6 麻疯树 *JcKNOX1* 在低温和 ABA 胁迫下的表达
Fig. 6 Expression analysis of *JcKNOX1* gene under low temperature and ABA stress conditions

建^[15,16]. 同时研究表明, *KNOX* 基因可以促进细胞分裂素的合成^[17], 促进植物的横向生长, 参与叶形态的构建等作用. 除此之外, 还有研究表明, *KNOX* 基因参与植物花的发育, 与花序发育关系密切^[18]. 由此可见, *KNOX* 基因对植物的生长发育具有重要的作用.

植物 *KNOX* 基因已经在多种植物中成功克隆并对功能进行系列研究, 但尚无关于麻疯树 *KNOX* 基因相关研究报道. 本研究首次对麻疯树 *JcKNOX1* 基因进行了克隆和分析, 阐明了麻疯树 *JcKNOX1* 基因的结构特点, 发现其具有典型的 *KNOX* 家族特征; 同时顺式作用元件预测发现其可能参与植物激素调控、光调节和冷胁迫等有关. 此外分析了 *JcKNOX1* 在麻疯树不同组织器官和胁迫的表达情况, 该基因在麻疯树植株各个组织器官均有表达, 其中发育中的组织表达量明显高于成熟组织中, 胁迫后其表达量明显增加, 由此可见 *JcKNOX1* 参与麻疯树的生长发育和胁迫应答. 上述研究, 都为 *JcKNOX1* 的进一步研究提供了基础, 尤其是 *JcKNOX1* 在转基因植物中的表达和其如何参与调节植物发育过程的激素变化及其他胁迫.

参考文献:

[1] Mallo M, Wellik D M, Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan[J]. Dev Biol, 2010, 344(1): 7.
[2] Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, et al. The develop-

4 讨论

KNOX 基因在植物中具有广泛性, 参与调控与器官分化的多个过程, 作为关键基因调控分生组织的形成和维持, 最终影响植物器官的形态构

- mental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family [J]. *Nature*, 1991, 350(6315): 241.
- [3] Matsuoka M, Ichikawa H, Saito A, *et al.* Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(9): 1039.
- [4] Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, *et al.* A KNOTTED1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants[J]. *Plant Cell*, 1994, 6(12): 1859.
- [5] Ma H, McMullen M D, Finer J J. Identification of a homeobox containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24(3): 465.
- [6] Müller K, Romano N, Gerstner O, *et al.* The barley Hooded mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron [J] *Nature*, 1995, 374(72): 7.
- [7] Tamaoki M, Kusaba S, Kano-Murakami Y, *et al.* Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(8): 917.
- [8] 陶章生, 柳琼, 王新发, 等. 甘蓝型油菜 *BnKNAT2* 基因克隆和功能分析[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(3): 300.
- [9] 刘青, 汪玉凤, 赵韩生, 等. 麻竹同源异型盒基因 *DlKNOX1* 的克隆及功能初步分析[J]. *林业科学*, 2014, 50(2): 56.
- [10] Gehring W J, Affolter M, Burglin T. Homeodomain proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 487.
- [11] Scofield S, Murray J A. *KNOX* gene function in plant stem cell niches[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(6): 929.
- [12] 李方正, 杨素欣, 吴春霞, 等. 大豆 *KNOX* 基因家族的结果和表达分析[J]. *植物学报*, 2012, 47(3): 236.
- [13] 李诗娟, 张伟, 魏磊, 等. 一个麻疯树 C2H2 型锌指蛋白 *JcZFP1* 的克隆与表达分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51(1): 206.
- [14] 朱雅雅, 范林洪, 王胜华, 等. 影响麻疯树叶片离体再生条件的优化[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51(1): 213.
- [15] Hay A, Tsiantis M. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity[J]. *Development*, 2010, 137(19): 3153.
- [16] Chatterjee M, Bermudez-Lozano C L, Clancy M A, *et al.* A *Strawberry* *KNOX* Gene Regulates Leaf, Flower and Meristem Architecture[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): 1.
- [17] Frugis G, Giannino D, Mele G, *et al.* Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1370.
- [18] Hake S, Smith H M, Holtan H, *et al.* The role of *knox* genes in plant development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 125.