

烟草双特异性激酶基因 (*NtDSK2*) 的克隆与表达分析

熊腾飞¹, 张改云¹, 郭家明², 徐兆师³, 马有志³, 陈学平²

1 中国科学技术大学研究生院, 合肥市金寨路 96 号 230026;

2 中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 合肥 230052;

3 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

摘要: 利用对表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据库进行比对和搜索分析, 并通过 RT-PCR 的方法从烟草中克隆到一个包含 1218bp 开放阅读框的新基因 *NtDSK2*。*NtDSK2* 编码了具有典型的双特异性激酶特征的蛋白。此蛋白与花生的 STY 激酶属于双特异性激酶的同个亚家族。基于 EST 的数字化组织表达特征分析推测 *NtDSK2* 在烟草组织中广泛表达。运用半定量 RT-PCR 方法检测了烟草受烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染后的表达特征。结果表明 *NtDSK2* 的表达量在 TMV 处理后随时间稳步上升, 并在 48 h 达到最大。推测 *NtDSK2* 是参与烟草抗胁迫调控的重要激酶基因。

关键词: HZNH; 烟草花叶病毒; 双特异性激酶

中图分类号: S432.41 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2007)02-0038-05

Isolation and characterization of a new gene (*NtDSK2*) encoding a dual-specificity protein kinase

XIONG Teng-fei¹, ZHANG Gai-yun¹, GUO Jia-ming², XU Zhao-shi³, MA You-zhi³, CHEN Xue-ping²

1 Graduate School of USTC, Hefei 230026, China;

2 Tobacco and Health Research Center of USTC, Hefei 230052, China;

3 Crop Science Institute of CAAS, Beijing 100081, China

Abstract: A new gene named *NtDSK2* was cloned in the research. *NtDSK2* encoded a putative protein with 404 aa residues, which were characterized with STY domain. Expression characteristics were observed by semi-qualitative PCR after TMV infections. Results showed that expressions of *NtDSK2* accumulated steadily and reached to its peak at 48h, after infection, which suggested that *NtDSK2* may be an important kinase in the process of resistance to TMV.

Key words: HZNH; Tobacco Mosaic Virus; Dual-specificity Protein Kinase

植物在生长过程中受到多种的生物胁迫(如病虫害)和非生物胁迫(如干旱、高盐、冷冻等)的影响。在不断进化过程中, 植物形成了复杂和完整的防御体系。已经发现有大量的蛋白参与了不同的胁迫调节途径。多种多样的信号受体蛋白感受不同的或相同的胁迫信号, 然后激活一系列的信号传递途径, 最后诱导防御相关蛋白的表达。

蛋白激酶位于信号传导途径的上游。蛋白激酶磷酸化目的蛋白的氨基酸残基, 在调节酶活性和其他的细胞过程中起重要的作用^[1]。按照激酶的特异底物将它们分为 5 类: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、酪氨酸蛋白激酶、组氨酸蛋白激酶、色氨酸蛋白激酶和天冬氨酰基/谷氨酰基蛋白激酶。蛋白磷酸化对植物防御过程起了重要的作用^[2]。例如, Xa21 是在水稻中发现的含丝氨酸/苏氨酸结构域的抗病蛋白, 含有 3 个重要的结构域。其中亮氨酸重复结构域位于胞外起到了识别抗原的作用。位于中间的为跨膜域, 是将 Xa21 定位在膜上的重要区域。信号从膜外传递到膜内, 最后由胞内激酶区进行信号放大^[3]。另一种属于丝氨酸/苏氨酸类的激酶: MAPK, 是真核中重要的也是广泛研究的一种

作者简介: 熊腾飞, 男, 中国科学技术大学硕士研究生, 从事植物抗逆基因工程的研究, Email: xjfs@yaho.com.cn

陈学平(通讯作者), Email: ustcchxp@sina.com

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目(110200101006)。

收稿日期: 2006-07-10

发挥信号传导和放大的蛋白,参与了大量生物胁迫和非生物胁迫的调节^[4]。

在植物中还没有发现单独发挥酪氨酸磷酸化作用的激酶。目前从植物中发现的发挥酪氨酸磷酸化作用的激酶都是双特异性激酶,如烟草的 *NtDSK1*^[3],大豆的 *GmSTY1*^[9]。这些激酶的功能大都尚未鉴定。*STY* 是从花生中发现的双特异性激酶,它是一个非 MAPK 级联的双特异性激酶。*STY* 可能在种子储存营养中发挥信号作用,并且受非生物胁迫调节^[7]。另外,大豆 *GmSTY1* 可能与非生物胁迫相关^[9]。

烟草花叶病毒是影响烟草生长的重要病毒之一。黄花烟 HZNH 是我国特有的地方品种,陈学平等发现它是一种新的对 TMV 表现出较高的系统获得抗病性的特异种质资源^[8]。为研究其抗性机理,本研究在分析 EST 数据库的基础上从 HZNH 中克隆出一个新的基因 *NtDSK2*,并利用生物信息学方法对其编码的蛋白进行了结构和系统发生树分析,并预测了 *NtDSK2* 的组织特异性表达特征。通过半定量 RT-PCR 的方法推测 *NtDSK2* 在 TMV 抗胁迫过程中发挥了重要的作用,可能为抗 TMV 基因工程提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料与取样方法

高抗 TMV 品种烟草 (*Nicotiana rustica* L. HZNH) 由本实验室保存。烟草种子用 70% 乙醇消毒 10 min,然后用蒸馏水冲洗 3 次,放在润湿的滤纸上,20 °C 放置 10 d。然后将种子播种到营养土中,28 °C/16 h 光照/8 h 黑暗培养。两周后,将每株烟草幼苗移栽到单独的花盆中培养。

1.2 RNA 提取与反转录

抽提总 RNA 用的 Trizol 购买自天根生化科技(北京)有限公司,并按照说明书的方法提取。提取所用仪器和试剂按照《分子克隆》第三版的要求处理。为除去总 RNA 中残留的基因组 DNA,在总 RNA 中加入 DNase (Promega),37 °C 保温 30 min 后利用苯/氯仿/异戊醇纯化。反转录过程采用 Takara 的 AMV 反转录酶,并按照 Takara 的操作手册进行。

提取的核酸溶液用分光光度计和电泳进行浓度测定和质量检测。琼脂糖凝胶用 EB 染色,并用 BIO-RAD 凝胶成像系统进行照相。

1.3 *NtDSK2* 的克隆

为从 cDNA 中克隆 *NtDSK2* 基因,根据拼接的序列

设计了 2 条包含预测的完整开放阅读框的特异性引物。正向引物为: *NDSK1*, 5'-TTGATCGCGGCAGGAGAGGT-3'; 反向引物为: *NDSK2*, 5'-CATGGTGAACCTCAAATCAGTTTTGCCAT-3'。以烟草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 的条件为: 94 °C 解链 5 min, 然后进行 35 个以下循环: 94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 最后 72 °C 保温 10 min, 4 °C 保存。目标条带经琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Takara) 回收纯化后, 连接到 pMD18-T 载体 (Takara) 上, 转化大肠杆菌 DH5 α (此菌株由本实验室保存), 并由中国农业科学院重大工程实验室测序部进行测序。新克隆的 *NtDSK2* 基因的 Genebank 注册号为 DQ672264。

1.4 序列分析

利用 ClustalX 进行同源性比对 (<ftp://ftp-igbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX/>); 利用 NCBI 的 treeview 功能生成系统进化树。利用 SMART 和 Motif scan 进行结构域预测 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif-scan>)。

1.5 数字化组织表达分析

以克隆得到的烟草 *NtDSK2* 基因的全长 cDNA 为探针, 利用 BlastN 工具对烟草 EST 数据库进行比对搜索, 所获得的高同源性 (本实验采用的域值为 89%), 并且具有较低 E 值 (本实验采用的域值为 e^{-70}) 的 EST 被认为代表烟草 *NtDSK2* 基因的 EST。根据每个 EST 的注释而确定来源的组织。对于来源于一个组织的 EST 用黑色条带作图, 来源于混合组织的 EST 用灰色条带作图。

1.6 TMV 接种处理

实验所用 TMV 菌种保存在感病株 K326 中。新鲜的带有 TMV 的叶片放在研钵中, 加入磷酸缓冲溶液进行研磨。用小毛刷沾取少量的石英砂和含 TMV 的磷酸缓冲溶液, 轻轻摩擦叶片几次。最后用温水冲洗叶片一次。按照不同时间段收集接种叶片, 提取 RNA, 供半定量 RT-PCR 使用。

1.7 半定量 RT-PCR

为进行 *NtDSK2* 的表达分析, 设计了一对能扩增 500bp 片断的引物。正向引物为: *FNDSK1*, 5'-CATTTGGGCTTGAGAATTATGATGAGTG-3'; 反向引物为: *FNDSK2*, 5'-CAATACGAGCAACACCAAAGTCCG-3'。用烟草看家基因 ACTIN 做为内标。内标正向引物为: *ACT1*, 5'-AGTCTGGTGTGTTAGC-3'; 反向引物为:

ACT2, 5'-CCTATCAGCAATTCAGGAAAC-3'。两对引物的PCR扩增条件相同,即94℃解链5min,然后进行28个以下循环:94℃30s,58℃1min,72℃45s,最后72℃保温10min,4℃保存。

2 结果与分析

2.1 *NtDSK2* 的 cDNA 克隆与序列分析

以花生双特异性激酶基因 STY (Genebank 注册号: AF106324) 的核苷酸序列为探针,对烟草的 EST 数据库进行 BlastN 比对。发现该序列与烟草中多条 EST 序列存在高度的同源性。用 DNAMAN 对它们进行拼接并进行手工的修改,最终得到一条 cDNA 序列。根据该序列设计特异性引物 NDSK1 和 NDSK2,从烟草中克隆到一个 1385bp 的 cDNA 片段(图 1)。该 cDNA 包含一个 1218bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF),编码 406 个氨基酸组成的多肽。在 ORF 上游含有 103bp 的 5' 非编码区,下游含有 64bp 的 3' 非编码区。在 5' 非编码区含有大量的终止密码子。对预测蛋白在 Genebank 进行 BlastP 比对。结果发现,预测蛋白与拟南芥、花生和水稻等双特异性激酶有高度的同源性,并拥有相似的完整结构,所以预测克隆到的基因含全长的开放阅读框,编码了完整的蛋白。

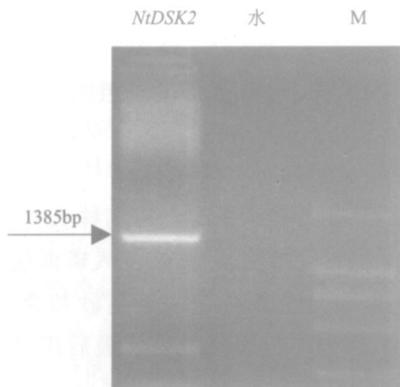


图 1 *NtDSK2* 的克隆。M: marker DL2000

2.2 *NtDSK2* 蛋白的结构分析

NtDSK2 为一个偏碱性的蛋白($PI=7.61$),预测蛋白分子量为 45.5 KD。*NtDSK2* 含有大量的憎水区和亲水区(图 2),推测 *NtDSK2* 可能是一个膜上的蛋白。对 *NtDSK2* 蛋白进行了 SMART 和 Motif scan 搜索,发现了

大量的结构域/基序。其中,从 125 位到 380 位的氨基酸编码了一个典型的 STY 激酶结构域。双特异性激酶含有 11 个亚结构域^[9]。经比较发现,它们都出现在 *NtDSK2* 中(图 3)。同时还预测到有 7 个 N-糖基化位点和 6 个十四酰基化位点。糖基化位点的出现说明该蛋白存在转录后修饰,这对蛋白活性有重要的意义。而酰基化位点的出现,说明这个激酶可能在细胞膜位置发挥功能。

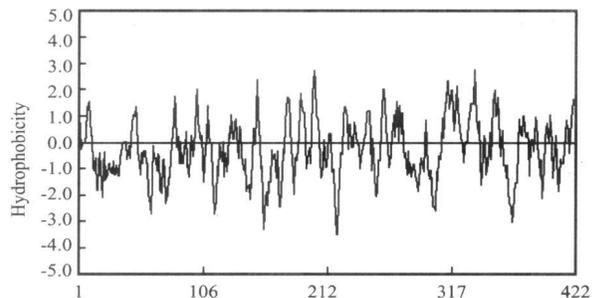


图 2 *NtDSK2* 疏水性分析

2.3 *NtDSK2* 的同源性比较及系统发生树

对 NCBI 蛋白质数据库进行 Blast 结果表明, *NtDSK2* 与大量的双特异性激酶具有很高的同源性。其中 *NtDSK2* 与花生的 STY 的同源性最高(图 3)。显然,不管在激酶域还是其他非激酶域都表现出高同源性,而且亚结构域同源性更高,甚至大部分完全相同。推测烟草中的 *NtDSK2* 激酶和拟南芥及花生中的 STY 可能有类似的功能。由于 *NtDSK2* 和其他的激酶也有很高的同源性。我们对这些激酶进行了系统进化树分析(图 4)。发现 *NtDSK2* 和部分双子叶植物激酶同源性最高,但与草本单子叶植物激酶的同源性又要高于与木本激酶的同源性。但一些拟南芥中的激酶也表现出例外,可能 *NtDSK2* 与这些激酶在进化过程中更早期就开始分化。

2.4 *NtDSK2* 的数字化组织表达分析

以烟草 *NtDSK2* 基因的 cDNA 全长为探针,对烟草 EST 数据库进行 BlastN 搜索,共获得 9 个高度同源的 EST。这些 EST 来自于不同的组织的 cDNA 文库。根据电子 RNA 印记推测, *NtDSK2* 在烟草的叶、发芽的种子组织中有表达,在根、茎和愈伤中也可能有表达(图 5)。

NtDSK2	.MLEAFKFEVLELIDLNQNLS.....SQNFYHKLGGESNMS	32
peanut	MLEGGAKFPGCLIDLNKHTTDNYDFSSQGFYHKLGECTNM.	39
Consensus	kf lidln sq fyhklgeg nm	
NtDSK2	TESYGLQMSGGGSVAMSDNSSVGSNDSHTRILNHQSL	72
peanut	..SIDSMTSNGGGSVAMSIDNSSVGSNDSHTRILNHQSL	77
Consensus	s s q s gggsvams dnssvgsndshtrilnhq l	
NtDSK2	NRVHNNYSVAA.SVNRV.RVSNGLSNDALAQALIDPREPT	110
peanut	RRRANDNYSVQNSVNRGRVTHALSDDALAQALMSSSPT	117
Consensus	r n svnr rv ls dalaqal d pt	
NtDSK2	IGLENYDEWTIDLRKLNMGFAFAQGAFGKLYKGTYNGEDV	150
peanut	EGLENEDEWTIDLRKLNMGFAFAQGAFGKLYRGTYNGEDV	157
Consensus	glen dewtidlrklnmg afaqqafgkly gtyngedv	
NtDSK2	AIKLLERPEHDLERAHLMEQQFQQEVMMLANLKHPNIVRF	190
peanut	AIKILERPENELSKACLMEQQFQQEVMMLATLKHPNIVRF	197
Consensus	saik lerpe l a lmeqqfqqevmmla lkhpnivrf	
NtDSK2	IGACRKPMVWCIVTEYAKGGSVRQFLTRRHNRSVPLKLAIV	230
peanut	IGACRKPMVWCIVTEYAKGGSVRQSLMKFQNRSVPLKLAIV	237
Consensus	sigacrkpmvwcivteyakggsvrq l r nrsvplklav	
NtDSK2	KCALDVARGMEYVHALNLIHRDLKSDNLLIADKSIKIAD	270
peanut	KCALDVARGMAYVFWLGLIHRDLKSDNLLIFGAKSIKIAD	277
Consensus	skqaldvargm yv l lihrdlksdnlli ksikiad	
NtDSK2	FGVARIIEVQTEGMPETGTYRWMAPEMIOHRPYTQKVDVY	310
peanut	FGVAGIEVQTEGMPETGTYRWMAPEMIOHRPYTQKVDVY	317
Consensus	fgva ievqtegmtpetgtyrwmapemiohrpytqkvdy	
NtDSK2	SFGIVLWELITGMLPFQNMFAVCAAFAVVNRGVRPITIPND	350
peanut	SFGIVLWELIPGMLPFQNMFAVCAAFAVVTKNVRPIIPND	357
Consensus	ussfgivlveli gmlpfqnm avqaafavv k vrp ipnd	
NtDSK2	CLPVLSEIMTRCWDADPDNRPFFSQVVMLEAAETEIMTT	390
peanut	CLPVLRDIMTRCWDPNPDVRPFIC...RNCRNAETEIMTT	394
Consensus	scplvl im rcwd pd rpp r aeteimtt	
NtDSK2	VRKARFRCCI.QPMTTDEAKRKLAACWMAKL	421
peanut	VRKARFRCOMTQPMTAD.....	411
Consensus	svrkarfrcc qpmt d	

图3 *NtDSK2* 与 *STY* 的比对。I~XI 为亚结构域的编号，其中 VI 含有 a 和 b 两个子结构域

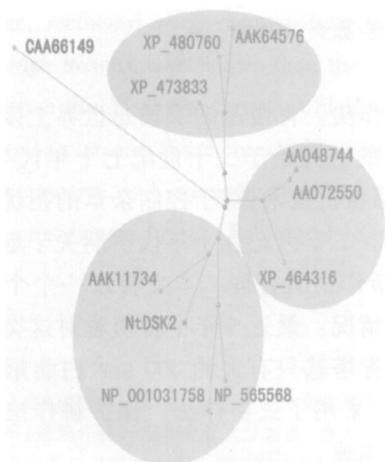


图4 烟草 *NtDSK2* 的系统发生树
(蛋白名称为 **Genebank** 登陆号)

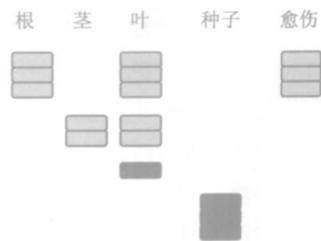


图5 *NtDSK2* 的数字化组织表达分析

2.5 TMV 对 *NtDSK2* 的诱导

由于一些双特异激酶与植物抗胁迫调控相关，并且 *NtDSK2* 基因来源于具有对 TMV 高抗性的地方品种 HZNH，所以用半定量 RT-PCR 分析了 *NtDSK2* 在 HZNH 进行 TMV 处理后的表达特征。结果发现，烟草受 TMV

处理之后 *NiDSK2* 的表达明显增强,并且在 48 h *NiDSK2* 表达量达到最大(图6)。

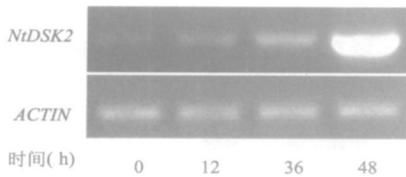


图6 TMV 侵染诱导 *NiDSK2* 的表达

3 结论

目前在植物内仅克隆出为数不多的双特异性激酶基因,其中大部分基因的功能尚未报道。本实验从烟草中克隆到一个新的基因 *NiDSK2*。此基因编码了一个含有双特异性激酶的蛋白。同源性比较发现它编码的蛋白与花生中的 STY 激酶具有很高的同源性。STY 已证实表现出磷酸化丝氨酸/亮氨酸/酪氨酸活性。而大量的激酶参与了植物胁迫调节过程。这使我们设想 *NiDSK2* 可能也参与了胁迫防御过程。实验证明, TMV 能诱导 *NiDSK2* 的表达。所以,此基因可能是烟草防御 TMV 过程中的重要调控基因。

基因工程技术已经大大改善了植物抗逆能力。本实验中的双特异性激酶可能参与大量的抗生物胁迫的调控。对此基因进行转基因工作可能得到在实际生产中抗 TMV 和其他胁迫的新品种。

参考文献

- [1] Hunter T. A thousand and one protein kinases[J]. Cell, 1987(50): 823-829.
- [2] Romeis T. Protein kinases in the plant defence response[J]. Curr Opin Plant Biol, 2001(4): 407-414.
- [3] Liu G Z, Pi L Y, Walker J C, et al. Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA2[J]. J Biol Chem, 2002(277): 20264-20269.
- [4] Pedley K F, Martin G B. Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005(5): 541-547.
- [5] Cho H S, Yoon G M, Lee S S, et al. A novel dual-specificity protein kinase targeted to the chloroplast in tobacco[J]. FEBS Lett, 2001(497): 124-130.
- [6] Xu Z S, Ma Y Z, Cheng X G, et al. Isolation and characterization of GmSTY1, a novel gene encoding a dual-specificity protein kinase in Glycine max[J]. J Int Plant Biol, 2006(6), in press.
- [7] Rudrabhatla P, Rajasekharan R. Developmentally regulated dual-specificity kinase from peanut that is induced by abiotic stresses[J]. Plant Physiology, 2002(130): 380-390.
- [8] 陈学平, 夏凯, 孔繁明, 等. 烟草品种对 TMV 抗性差异的比较研究[J]. 中国烟草科学, 2001(1): 1-3.
- [9] Hanks S K, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. FASEB J, 1995(9): 576-596.

美国肯塔基白肋烟生产过程中的保护耕作法应用进展

PEARCE R C, RITCHEY E

肯塔基大学植物与土壤学系, Lexington, 肯塔基州 40546, 美国

肯塔基大学长期以来一直在研究并推动中耕作物生产的保护耕作法。肯塔基的农民是世界上接受保护耕作大规模种植玉米和大豆的首批农户之一。保护耕作用于白肋烟生产的研究始于二十世纪七十年代早期,但此前烟农的兴趣始终不高。烟农不愿放弃传统的耕作方式,缺乏合适的移植机技术,对于控制杂草的担忧以及更多的是近来对于未来生产水平的不确定性使得采用保护耕作的进展减缓。二十世纪九十年代中期关于烟草的保护耕作研究再度恢复,引发了关于移植机,杂草控制的新概念的产生,包括作物的管理。本文将以一个独立的研究结果演示考虑采用保护耕作的烟农们使用的建议和指导方针的进展情况。最近 5 年中种植者对这类耕种实践的兴趣正在逐步提高。据 2003 年一项种植者耕作方式调研的估计,在肯塔基只有大约 400 hm² 白肋烟生产采用保护耕作。而 2004 年同样的调研报告却报道超过 3000 hm² 白肋烟生产采用了此耕作法。保护耕作法的接受率预计将随美国烟草纲要实施的结束和较小烟草生产种植农场的合并而加速。

(吴晓芸译自 2005 年 CORESTA 学组联合会 农学/植物论文摘要集,康婧、赵百东校)