



小桐子植物特异性酪蛋白激酶PS-CK1-5基因的克隆及原核表达分析

王海波, 吴贞莹, 郭俊云

引用本文:

王海波, 吴贞莹, 郭俊云. 小桐子植物特异性酪蛋白激酶PS-CK1-5基因的克隆及原核表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2024, 32(1): 93-100.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4719>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[铁皮石斛DoSMT2基因的克隆与表达分析](#)

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591-598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

[毛竹油菜素内酯受体激酶基因的分子特征及表达模式分析](#)

Molecular Characteristics and Expression Analysis of Brassinolide Receptor Kinase Genes in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(3): 215-223 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3818>

[青花菜BoSCL3基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析](#)

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress

热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 195-200 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4263>

[毛竹APX家族基因鉴定和表达分析](#)

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255-264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

[三角梅cDOPA 5GT基因的克隆和光照对其表达的影响](#)

Cloning of Cyclo-DOPA-5-glucosyltransferase Gene from *Bougainvillea glabra* and Effect of Illumination on Its Expression

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 75-81 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4233>

向下翻页, 浏览PDF全文

小桐子植物特异性酪蛋白激酶 *PS-CK1-5* 基因的克隆及原核表达分析

王海波, 吴贞莹, 郭俊云

(曲靖师范学院生物资源与食品工程学院, 云南 曲靖 655011)

摘要: 酪蛋白激酶(casein kinase, CK)作为一类普遍存在的 Ser/Thr 蛋白激酶, 通过调节靶标蛋白的活性与稳定性, 在植物整个生理过程及信号转导途径中发挥重要作用。基于同源序列比对, 该研究对小桐子(*Jatropha curcas*)酪蛋白激酶基因家族进行鉴定与表达分析。结果表明, 小桐子基因组中共鉴定到 7 个酪蛋白激酶 1 基因(*CK1*)、5 个植物特异性酪蛋白激酶 1 基因(*PS-CK1*)、3 个酪蛋白激酶 2 α 亚基基因(*CK2- α*)、2 个酪蛋白激酶 2 β 亚基基因(*CK2- β*)、4 个亚家族成员在氨基酸长度、等电点及外显子数目等都有其家族特异性。蛋白的氨基酸序列比对表明, 小桐子酪蛋白激酶 1 都包含 N 端保守激酶结构域, 同时其内部都鉴定到典型的激酶活性环基序、ATP 结合核心基序、核定位信号肽。qRT-PCR 表达分析表明, 小桐子 *JcPS-CK1-5* 基因在叶片与根中都属于低温诱导基因, 可能参与小桐子抗冷性过程。构建其原核表达载体 pET-32a-*JcPS-CK1-5*, 并在 BL21(DE3)中诱导表达, 得到 81.6 kD 的条带, 与理论融合蛋白的分子量一致。这可为小桐子 CK 基因的功能鉴定及逆境信号转导机制研究提供参考。

关键词: 小桐子; 基因家族; 酪蛋白激酶; 基因克隆; 原核表达

doi: 10.11926/jtsb.4719

Cloning and Prokaryotic Expression of Plant-specific Casein Kinase Gene *PS-CK1-5* from *Jatropha curcas*

WANG Haibo, WU Zhenying, GUO Junyun

(College of Biological Resource and Food Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, Yunnan, China)

Abstract: Casein kinase (CK), a ubiquitous Ser/Thr protein kinase, plays an important role in the whole physiological process and signal transduction pathway of plants through regulating activity and stability of target protein. The CK gene family in *Jatropha curcas* was identified from *J. curcas* genome based on the BLAST method. The results showed that a total of seven *CK1*s, five *PS-CK1*s, three *CK2- α* s, and two *CK2- β* s were identified from *J. curcas* genome, and the four subfamily members owned family-specificity in amino acid length, isoelectrical point, and exon number. Domain and motif analysis revealed that all of *CK1* contain N-terminal conserved kinase domain, and the kinase activation loop (A-loop), ATP-binding core motif, and nuclear localization signal peptide (NLS) were identified in its interior. A plant-specific casein kinase 1-5 gene, named *JcPS-CK1-5*, was cloned. qRT-PCR analysis showed that *JcPS-CK1-5* gene was a low temperature-induced gene in both leaves and roots, and might be involved in cold resistance of *J. curcas*. A prokaryotic expression vector pET-32a-*JcPS-CK1-5* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). A band of 81.6 kD was obtained, which was consistent with the expected weight. Therefore, these would provide a reference for studying

收稿日期: 2022-08-25

接受日期: 2022-10-12

基金项目: 云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项项目(202001BA070001-003); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202110684009)资助

This work was supported by the Project for Local Colleges Applied Basic Research in Yunnan (Grant No. 202001BA070001-003), and the Program for Yunnan Undergraduate on Innovation and Entrepreneurship Training (Grant No. 202110684009).

作者简介: 王海波(1980年生), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物逆境分子生物学。E-mail: bocai0406@163.com

the functional identification of CK gene and the stress signal transduction mechanism in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; Gene family; Casein kinase; Gene cloning; Prokaryotic expression

可逆的蛋白质磷酸化/去磷酸化共价修饰调节作为蛋白质的翻译后修饰方式,在参与植物生长发育、细胞周期、新陈代谢及逆境响应等方面发挥核心作用^[1]。该过程由蛋白激酶与蛋白磷酸酶负责完成^[1-2]。蛋白激酶催化目标蛋白的羟基基团共价修饰结合磷酸基团,根据磷酸化的氨基酸残基的不同,蛋白激酶分为 Ser/Thr 蛋白激酶、Tyr 蛋白激酶及双特异性蛋白激酶^[3]。酪蛋白激酶(casein kinase, CK)是一类在真核生物中高度保守的 Ser/Thr 类蛋白激酶。根据其理化性质、蛋白结构及在 DEAE-纤维素柱的分离洗脱顺序分为 1 型和 2 型,即 CK1 和 CK2^[4]。CK1 以单体形式存在,仅以 ATP 作为磷酸供体,属多基因家族。最初关于 CK1 的研究主要来自酵母和动物,目前,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)鉴定并克隆到 *YCK1*、*YCK2*、*YCK3*、*HRR25* 等 4 个 CK1 基因,裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)则包含 *Cki1*、*Cki2*、*Hhp1*、*Hhp2* 等 4 个 CK1 基因,参与酵母形态建成、出芽等主要代谢过程^[5],而哺乳动物至少鉴定到 7 个 CK1 同工酶(α 、 β 、 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 、 δ 、 ϵ),其氨基酸长度为 300~500 aa,都包含 1 个高度保守的激酶结构域,参与哺乳动物生物节律、细胞凋亡等重要生理过程^[6]。目前对于植物 CK1 基因家族的鉴定与功能机制研究还较少,但已经明确植物 CK1 基因家族较动物多,且存在功能的冗余^[7],如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)包含 13 个成员^[8]、水稻(*Oryza sativa*)包含 15 个成员^[9]。另外,在植物中还鉴定到一类植物特有的 CK1 (PS-CK1),氨基酸长度约为 700 aa。第 1 个被报道的 PS-CK1 来自绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的 MUT9p^[10],而拟南芥中鉴定到 4 个同源 PS-CK1 蛋白 MLK1~MLK4 (MUT9 like kinase, MLK)^[11]。有研究表明,这些 PS-CK1 参与植物开花节律、脂肪酸代谢、下胚轴伸长、蛋白质泛素化降解等重要生理生化过程。CK2 全酶是由 2 个催化亚基 α 和 2 个调节亚基 β 构成的异源四聚体($\alpha_2\beta_2$),以 ATP 和 GTP 作为磷酸供体^[12]。在酵母和哺乳动物中,催化亚基有 2 种异形体 α 、 α' ,分别由不同的基因编码,而植物 CK2 与动物存在较大差异,且 α 、 β 亚基序列相似性较小,分别属于不同的多基因家族^[13]。拟南芥中鉴定到 4 个 α 亚基基因(*CK2- α* , 包含 1 个叶绿体定位 α 亚基)、4 个 β 亚

基基因(*CK2- β*)^[14],玉米中也鉴定到 4 个 α 亚基基因(包含 2 个叶绿体定位 α 亚基)、4 个 β 亚基基因^[15]。CK2 的磷酸化底物多达 300 余种,参与植物细胞周期调控、光信号转导、生物钟、逆境适应等大部分生理过程。

能源植物小桐子(*Jatropha curcas*)为大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属多年生落叶灌木或小乔木。作为木本油料植物,小桐子种子含油量高达 35%~60%,是加工生物柴油的优质原料^[16]。小桐子是原产于热带及亚热带地区的喜温植物,低温冷害是影响小桐子地域分布、限制小桐子产业发展的主要环境因素。研究表明,脱落酸(abscisic acid, ABA)信号转导途径与蛋白激酶组成代谢网络广泛参与植物多种抗逆性如抗冷性等过程,而 CK 基因家族在小桐子中的鉴定及其与 ABA 共同参与小桐子抗冷性功能研究还未见报道。本研究基于同源序列比对的方法,在小桐子全基因组中共鉴定到 CK1 基因 7 个、PS-CK1 基因 5 个、CK2- α 基因 3 个、CK2- β 基因 2 个,在此基础上,克隆了 PS-CK1-5 基因的全长 cDNA 序列,并对其进行了 ABA 处理下的 qRT-PCR 低温差异表达分析及原核细胞蛋白表达分析,为研究小桐子酪蛋白激酶的功能及参与的代谢途径奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小桐子(*Jatropha curcas*)种子采自云南省楚雄州元谋县。选取饱满的种子,用 1.5% CuSO₄ 消毒 20 min,无菌水漂洗 5 次,于 26 °C 的恒温培养箱中吸涨 24 h。将吸涨的种子在无菌水中漂洗 3 次,置于垫有 5 层无菌水湿润滤纸的白磁盘中,于 26 °C/20 °C (昼/夜)、相对湿度 75%、16 h/8 h 光周期的恒温培养箱中萌发 5 d。将发芽的种子播种于 1/2Hogland 营养液的砂培白磁盘中,在同上条件的恒温培养箱中生长 14 d,每天添加 1/2Hogland 营养液,得到第 2 片真叶展开且长势一致的小桐子幼苗^[17]。取幼苗(对照)叶片、根材料 0.1 g 置于 1.5 mL 离心管中,液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱中保存。将长势一致的小桐子幼苗,移栽至添加 100 μ mol/L ABA 的

1/2Hogland 营养液中,对照材料继续添加 1/2Hogland 营养液,同时置于温度 12 °C、相对湿度 75%、16 h/8 h 光周期的低温培养箱中进行低温胁迫处理,分别于 0.5、3、12、24、48 h 后取叶片、根 0.1 g 置于 1.5 mL 离心管中,液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱中用于 RNA 的提取。

1.2 CK 基因家族的鉴定及序列分析

从 GenBank 下载小桐子注释蛋白质数据库(v101)。基于拟南芥已经鉴定的 13 个 *CK1* 基因、4 个 *PS-CK1* 基因、4 个 CK2 催化亚基 α 基因(*CK2- α*)和 4 个 CK2 调节亚基 β 基因(*CK2- β*),从拟南芥 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)下载对应蛋白质的氨基酸序列。通过 ClustalX 进行多重序列比对,利用 Hmmer 3.0 软件的 Hmmbuild 程序将比对结果生成酪蛋白激酶结构域的隐马尔可夫 HMM 模型,基于模型,利用 Hmmer 3.0 软件的 Hmsearch 程序对小桐子蛋白质数据库进行检索(阈值 $E < 1e-10$),经过去除重复序列,得到非冗余的小桐子酪蛋白激酶 *CK1*、*PS-CK1*、*CK2- α* 、*CK2- β* 的氨基酸序列,同时,下载其对应的基因序列、mRNA 序列。利用 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白的氨基酸长度、等电点(isoelectric point, pI)等参数。将鉴定到的小桐子酪蛋白激酶氨基酸序列利用 ClustalX 进行序列相似性比对,然后用 MEGA6.0 软件通过邻接法(NJ)构建系统进化树,同时,利用 GenDOC 软件对 ClustalX 比对结果进行蛋白保守结构域分析。利用在线软件 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行编码框 CDS 与基因序列比对以确定基因内含子与外显子的结构并绘制基因结构图。染色体定位以吴平治等^[18]构建的小桐子遗传连锁图谱进行锚定。

1.3 *PS-CK1-5* 基因的荧光定量表达分析

利用 TriZol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取小桐子叶片、根的总 RNA,并利用 DNase I (TaKaRa 公司)消化 RNA 中的残余基因组 DNA,得到纯化的总 RNA。分别取 3 μ g 总 RNA,以 Random primer 为逆转录引物,利用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司)合成第一链 cDNA。以 *GAPDH* 为内参基因^[19],利用 Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI 公司)进行小桐子 *PS-CK1-5* 基因的实时荧光定量 PCR (qPCR)表达分析,引物分别为 *PS-CK1-5_F1*: 5'-CGATAGTGGTGGTTTGAGCG-3', *PS-CK1-5_R1*: 5'-CCACCCCTTACCCAACCTTCCT-3'; *GAPDH_F*: 5'-TGAAGGACTGGAGAGGTGGA-3', *GAPDH_R*: 5'-

ATCAACAGTTGGAACACGGAA-3'。反应体系总体积 20 μ L,每样品重复 3 次。扩增程序为:95 °C 预变性 3 min;然后 95 °C 变性 10 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环;之后增加溶解曲线程序:0.5 °C 增量 5 s,65 °C~95 °C 连续检测信号。以对照(CK)的表达量为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因相对表达量。

1.4 *PS-CK1-5* 蛋白的诱导表达分析

根据 *PS-CK1-5* 基因的 mRNA 序列,设计带酶切位点的全长编码框(CDS)扩增引物,引物分别为 *PS-CK1-5_F2*: 5'-catggctgatatcggatccgaattcATGCCTGAGCTTCGCAGAGGT-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点), *PS-CK1-5_R2*: 5'-agtgggtggtggtggtggtcgcagGGAGACTGTCCGTCCATAGCA-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。以叶片 cDNA 为模板,使用高保真 DNA 聚合酶 KOD FX Neo DNA Polymerase (TOYOBO 公司)进行 PCR 扩增,扩增程序为:98 °C 预变性 5 min;然后 98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 2 min,共 30 个循环;最后 68 °C 延伸 5 min。电泳检测 PCR 产物质量,扩增产物与原核表达载体 pET-32a 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,切胶回收后利用 T₄ DNA 连接酶 16 °C 过夜连接,获得重组质粒,将其转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布 LB 抗性(含 50 mg/L 的 Amp)平板,37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,送华大基因公司进行测序,经酶切和测序验证正确的重组质粒命名为 pET-32a-*JcPS-CK1-5*。

将构建的小桐子 *PS-CK1-5* 基因原核表达载体通过热激法转化大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株,同时转化 pET-32a 空质粒作为对照,挑选阳性单克隆接种至 5 mL LB 液体培养基中(含 50 mg/L 的 Amp),37 °C 200 r/min 过夜振荡培养。之后按体积比 1:100 接种至 100 mL LB 液体培养基中(含 50 mg/L 的 Amp),37 °C 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,取 1 mL 菌液至 1.5 mL EP 管中,4 °C 保存。之后,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,16 °C 诱导表达,分别取诱导 1、3、6、12 h 的菌液 1 mL 于 4 °C 保存备用。将未诱导与诱导不同时间的菌液 14 463 \times g 离心 5 min,弃上清,将菌体沉淀利用 200 μ L PBS 缓冲液(pH 值 7.4)重悬浮,加入 50 μ L 5 \times SDS 上样缓冲液,100 °C 煮沸 10 min,冷却至室温,14 463 \times g 离心 5 min,取 20 μ L 上清蛋白样品上样,进行 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶,12%分离胶),

考马斯亮蓝 G250 染色，检测蛋白质的表达情况。

2 结果和分析

2.1 酪蛋白激酶 CK 基因家族的鉴定

根据同源序列比对，在小桐子基因组中共鉴定到 CK1 基因 7 个、PS-CK1 基因 5 个、CK2- α 基因 3 个、CK2- β 基因 2 个(表 1)。除 CK2- β 蛋白的等电点显酸性外，其他家族成员的蛋白等电点都显碱性。基因结构显示，各基因家族的外显子与内含子

分布都有家族特异性且较为保守(图 1)。小桐子酪蛋白激酶家族基因不均匀分布于 9 条染色体上，其中，11 号染色体最多，有 5 个基因。

序列比对表明，小桐子酪蛋白激酶 1 都由 1 个高度保守的激酶结构域和不保守的 N 端、C 端非催化区域组成。核心激酶结构域(Ser/Thr kinase domain)包含约 280 个氨基酸残基，序列相似性为 63%~92%，多肽二级结构都包含 9 个 α -螺旋和 10 个 β -折叠。同时，在激酶结构域中都鉴定到典型的激酶活性环基序(A-loop)、ATP 结合基序和核定位信号肽(NLS)，

表 1 小桐子酪蛋白激酶家族基因信息

Table 1 Information of casein kinase gene family from *Jatropha curcas*

亚家族 Subfamily	基因 Gene	基因编号 Gene No.	基因长度 (bp) Gene length	氨基酸长度(aa) Amino acid length	等电点 pI	外显子数量 Exon number	染色体定位 Chromosome
CK1	<i>JcCK1-1</i>	105637899	6 005	477	9.64	14	11
	<i>JcCK1-2</i>	105631434	3 893	472	9.66	14	2
	<i>JcCK1-3</i>	105638242	6 175	427	9.52	15	11
	<i>JcCK1-4</i>	105637761	4 528	426	9.43	14	11
	<i>JcCK1-5</i>	105644516	6 554	456	9.71	14	7
	<i>JcCK1-6</i>	105632151	8 217	464	9.73	14	1
	<i>JcCK1-7</i>	105647747	6 229	463	9.66	14	6
PS-CK1	<i>JcPS-CK1-1</i>	105632633	7 915	705	9.07	17	6
	<i>JcPS-CK1-2</i>	105637701	9 717	666	9.51	19	11
	<i>JcPS-CK1-3</i>	105631550	6 500	721	8.97	17	2
	<i>JcPS-CK1-4</i>	105638219	5 270	681	9.28	16	11
	<i>JcPS-CK1-5</i>	105650959	8 244	710	9.41	16	1
CK2- α	<i>JcCK2-α1</i>	105630870	5 101	333	8.44	10	4
	<i>JcCK2-α2</i>	105639820	5 287	416	8.33	10	7
	<i>JcCK2-α3</i>	105639833	11 036	432	9.34	10	7
CK2- β	<i>JcCK2-β1</i>	105636692	5 143	283	5.05	5	3
	<i>JcCK2-β2</i>	105643247	3 110	286	5.25	5	8

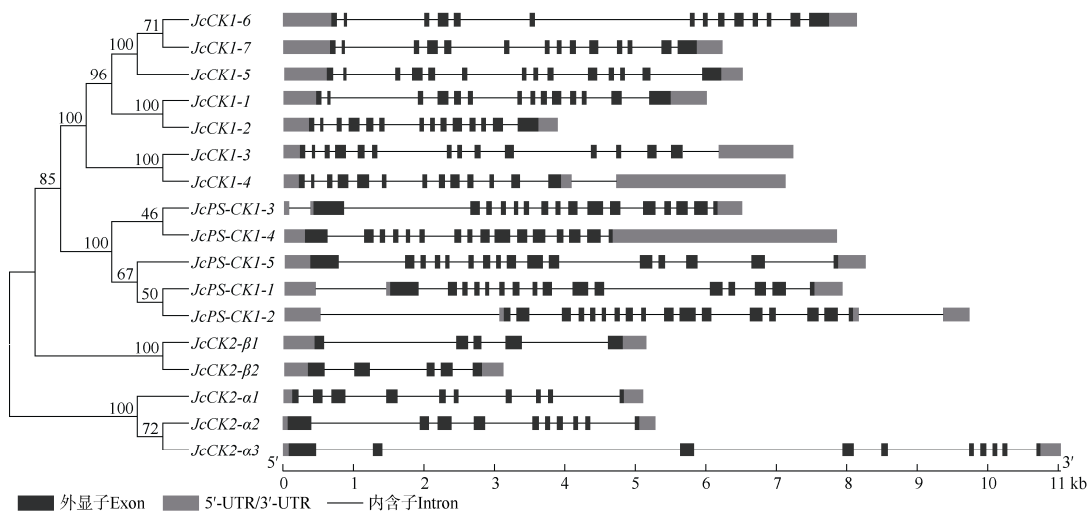


图 1 小桐子酪蛋白激酶 CK 家族的基因结构

Fig. 1 Gene structure of casein kinase family from *Jatropha curcas*

但小桐子 CK1 与 PS-CK1 都有自己的亚家族序列特异性。其中, ATP 结合核心基序 CK1 亚家族都为 -IGSGSFG-, 而 PS-CK1 亚家族都为 -LGKGGFG-; 核定位信号肽序列 CK1 亚家族都为 -TKKQKY-, 而

PS-CK1 亚家族都为 -QGD/ENKS/G-。另外, 小桐子植物特异性 PS-CK1 较 CK1 蛋白具有更长的 N 端和 C 端序列, 同时, 激酶结构域的 11 个保守基序之间间隔的氨基酸残基数目也更多(图 2)。

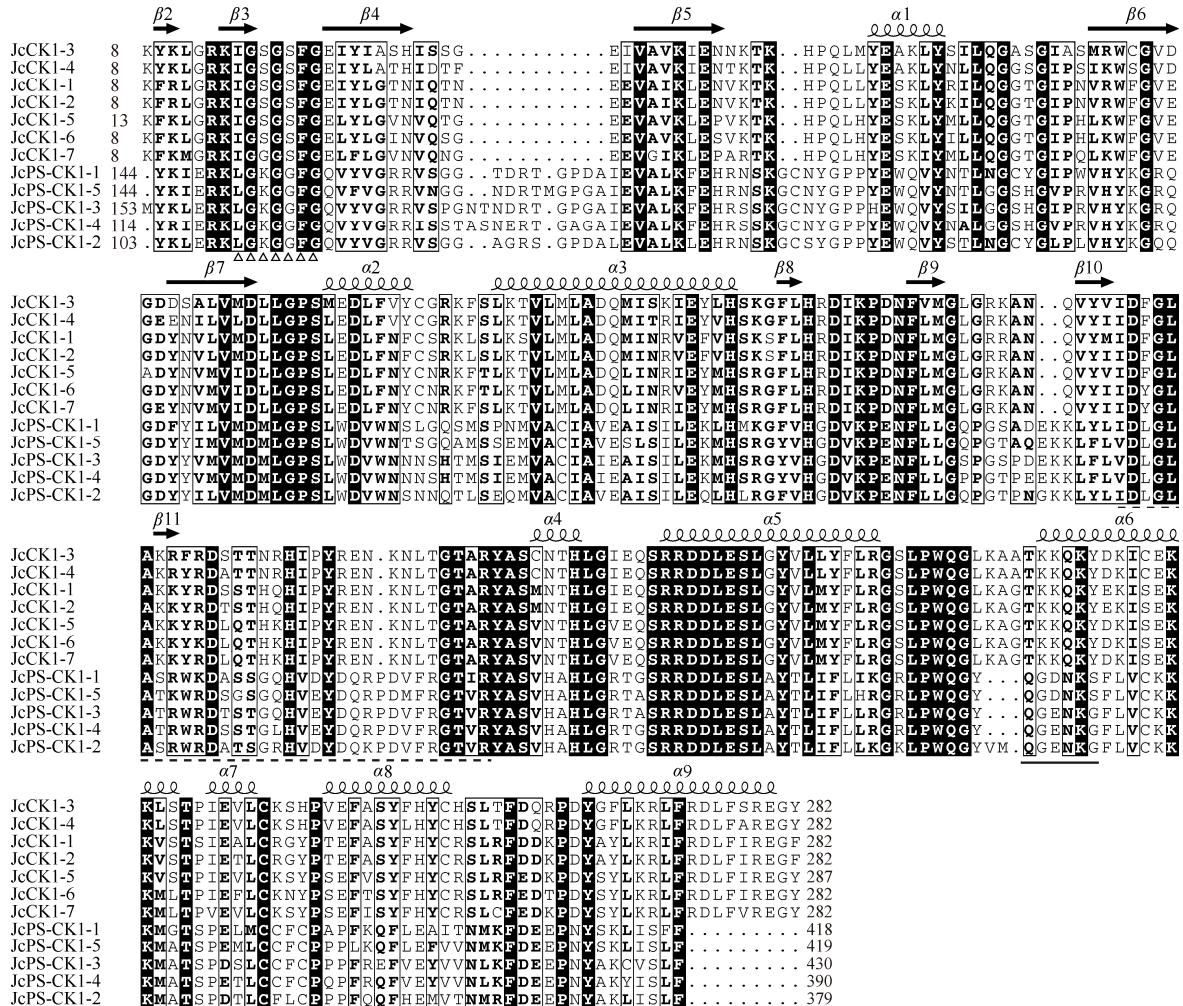


图 2 小桐子酪蛋白激酶 1 激酶结构域的多序列比对。α1~α9: α-螺旋; β2~β11: β-折叠; 下划虚线: 活性环基序(A-loop); △: ATP 结合核心基序; 下划直线: 核定位信号肽。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of casein kinase 1 domain from *Jatropha curcas*. α1~α9: α-helix; β2~β11: β-sheet; dash line: Kinase activation loop (A-loop); △: ATP-binding core motif; underline: Nuclear localization signal peptide.

2.2 PS-CK1-5 基因的表达分析

通过实时荧光定量表达分析 PS-CK1-5 的低温表达特性。结果表明(图 3), PS-CK1-5 基因在叶片与根中都属于低温诱导基因且表现出相似的诱导表达特性, 可能参与小桐子抗冷性过程。随着低温胁迫时间的持续, PS-CK1-5 基因在叶片和根中的表达量都逐渐增加, 分别在低温胁迫 3、0.5 h 时达到最大, 较对照(CK)分别提高 3.29 和 2.89 倍(P<0.01), 说明 PS-CK1-5 基因在根中较叶片响应低温更加快

速, 之后表达量逐渐下降。另外, 100 μmol/L ABA 处理对低温胁迫下小桐子幼苗叶片和根中 PS-CK1-5 基因的表达存在一定的抑制作用, 仅在根中低温胁迫 0.5、24 h 时, 其表达量较未经 100 μmol/L ABA 处理的稍有上调。

2.3 PS-CK1-5 原核表达载体的构建与蛋白表达

通过 EcoRI 与 Xho I 双酶切, 将小桐子 PS-CK1-5 基因的编码框序列连接至 pET-32a 表达载体, 构建了原核表达载体 pET-32a-JcPS-CK1-5 (图 4), 经过

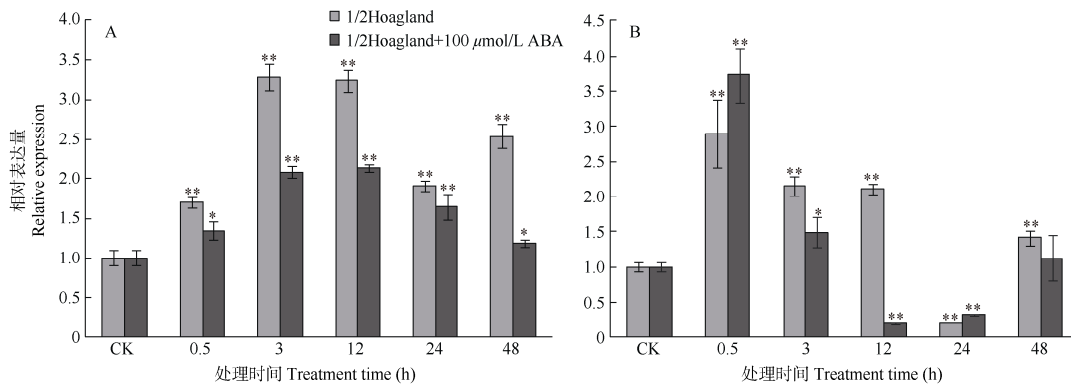


图 3 小桐子 *PS-CKI-5* 基因的低温差异表达。A: 叶片; B: 根; CK: 对照; **: $P<0.01$; *: $P<0.05$ 。

Fig. 3 Differential expression of *Jatropha curcas PS-CKI-5* gene under cold stress. A: Leaf; B: Root; CK: Control; **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

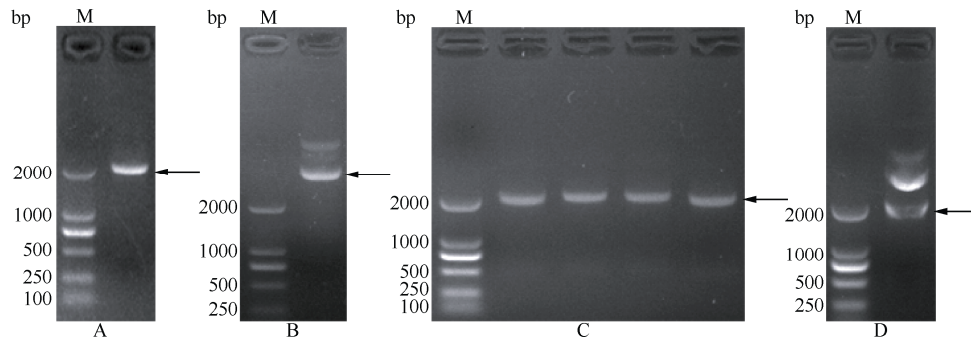


图 4 小桐子 *PS-CKI-5* 基因的克隆及原核表达载体构建。A: 基因扩增; B: 重组质粒 pET-32a-*JcPS-CKI-5*; C: 菌落 PCR 验证; D: 酶切验证; M: DNA Marker。

Fig. 4 Cloning and prokaryotic expression vector construction of *PS-CKI-5* from *Jatropha curcas*. A: Gene amplification; B: Recombinant vector of pET-32a-*JcPS-CKI-5*; C: Colony PCR verification; D: Restriction enzyme digestion verification by *EcoR I* and *Xho I*; M: DNA Marker.

酶切与测序验证正确, 未出现突变。将大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株、转 pET-32a 空质粒与 pET-32a-*JcPS-CKI-5* 重组载体的菌液裂解后进行 SDS-PAGE 表达蛋白的电泳分析(图 5)。经 IPTG 诱导后都出现 1 条约 81.6 kD 的蛋白条带, 与理论融合蛋白的分子量一致, 表明小桐子 *PS-CKI-5* 基因已经在大肠杆菌中成功表达。另外, 目的蛋白在诱导 1 h 后即开始表达, 且其表达量在诱导 6 h 时达到最大。而大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株(CK-1)、转 pET-32a 空质粒(CK-2) 及转 pET-32a-*JcPS-CKI-5* 重组载体未诱导(0 h)的菌株都未出现相应条带。

3 结论和讨论

由于植物 *CKI* 基因家族成员较多, 且相互之间存在功能冗余, 导致植物 *CK1* 的功能及磷酸化作用机制研究起步较晚。早期研究主要集中在 *CK1* 蛋白的分离纯化^[20-21], Klimczak 等^[22]与 Liu 等^[23]将拟南

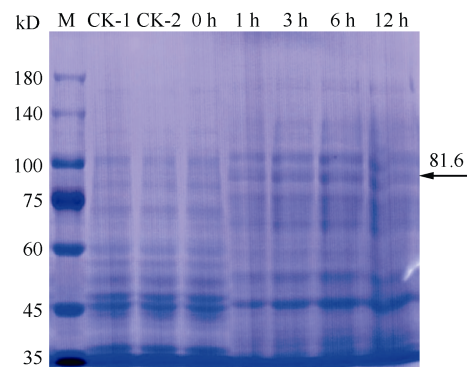


图 5 小桐子 *PS-CKI-5* 基因大肠杆菌表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳。CK-1: 大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株; CK-2: 转空 pET-32a 表达载体; 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 表示转重组表达载体经 IPTG 分别诱导 0、1、3、6、12 h; M: Marker。

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis of *Escherichia coli* expression protein of *Jatropha curcas PS-CKI-5* gene. CK-1: *E. coli* BL21(DE3) strain; CK-2: *E. coli* BL21(DE3) strain containing pET-32a; 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, and 12 h indicate that *E. coli* BL21(DE3) strain with recombinant vector was induced by IPTG for 0, 1, 3, 6, and 12 h, respectively; M: Marker.

芥与水稻CK1蛋白功能的研究推进到分子与机理水平,体外表达研究表明,拟南芥 *AtCK1I* 与水稻 *OsCK1I* 都能够磷酸化酪蛋白,同时 *OsCK1I* 基因受 ABA 诱导上调表达^[23]。研究表明,植物低温信号转导途径也主要依赖 ABA 诱导基因的表达,此类低温诱导基因含有 ABA 应答元件(ABRE),ABA 通过亮氨酸拉链蛋白(bZIP)与该元件结合而调控基因的表达,另外,也可通过特异的转录因子如 MYB、MYC、bZIP 等,这些转录因子存在典型的 DNA 结合蛋白基序如 bHLH、AP2 等,可以与低温诱导基因的上游调控区域结合而调控其表达^[24],Kim 等^[25]报道芝麻(*Sesamum indicum*)的 *SePS-CK1* 表达能够被 ABA 诱导,并通过磷酸化 bHLH 转录因子,调控油酸去饱和酶(SeFAD2)的表达,从而影响种子中脂肪酸的代谢。本研究在小桐子 *PS-CK1-5* 基因启动子中鉴定到低温响应元件,但未见 ABA 响应元件,同时,还鉴定到大量 MYB、MYC 等转录因子结合区域,推测为小桐子 *PS-CK1-5* 基因表达的主要调控位点。小桐子属于低温敏感植物,CK1 基因家族参与小桐子抗冷性及其与 ABA 的响应关系研究还未见报道,根据我们课题组前期的小桐子低温转录组与数字基因表达谱数据表明,*PS-CK1-5* 属低温诱导表达基因^[26],本研究通过 qRT-PCR 进行验证,也表明 *PS-CK1-5* 基因受到低温胁迫的诱导表达,与小桐子的抗冷性直接相关,但 ABA 对其低温胁迫下的表达却存在负调控作用,暗示 *PS-CK1-5* 基因的低温诱导表达还受到其他转录因子或信号途径如不依赖 ABA 信号转导途径的调节。

鉴定 CK 下游靶标蛋白的种类及磷酸化位点对于该激酶家族功能的分子机制研究至关重要。目前,植物 CK 磷酸化位点的识别主要依赖生物信息学预测,且都是基于微生物和动物 CK 的研究,而对于植物特异性酪蛋白激酶 *PS-CK1* 的靶标蛋白研究还鲜有报道。最早报道的绿藻 *PS-CK1* 蛋白 MUT9 能够磷酸化组蛋白 H2A 和 H3,从而调控多个基因的表达^[10],对应拟南芥 MLKs 主要通过磷酸化组蛋白 H2A 的 Ser⁹⁵ 促进开花生理过程^[27],利用生物信息学预测小桐子 *PS-CK1-5* 的磷酸化靶标蛋白也包括组蛋白家族,与上述绿藻、拟南芥的报道一致。另外,水稻 *PS-CK1* 蛋白 EL1 通过磷酸化赤霉素信号途径中的负调控因子 SLR1 的 Ser¹⁹⁶ 和 Ser⁵¹⁰ 来调节水稻的开花时间^[28],而拟南芥的 AEL 蛋白通过磷酸化 ABA 受体 PYL1 的 Ser¹³⁶ 和 Ser¹⁸²,加速其

泛素化降解,从而调节种子的休眠与萌发过程^[29]。这些说明 *PS-CK1* 可以磷酸化多种下游靶标转录因子,广泛参与植物整个生命周期中的代谢过程。通过 STRING 蛋白互作网络和 NetPhos 磷酸化位点分析工具鉴定小桐子 *PS-CK1* 家族的靶向目标蛋白显示,除包含模式植物拟南芥已经报道的途径外,还涉及植物形态建成、光合作用、ABA 信号转导、抗逆性如抗冷性 ICE-CBF 途径等生理生化过程。

在小桐子全基因组中鉴定到酪蛋白激酶基因家族 7 个 *CK1* 基因、5 个 *PS-CK1* 基因、3 个 *CK2- α* 基因、2 个 *CK2- β* 基因。克隆到小桐子植物特异性酪蛋白激酶 *PS-CK1-5* 基因,其在小桐子叶片与根中都受低温诱导表达,在小桐子抗冷性中发挥重要作用。构建了该基因的原核表达载体 pET-32a-*JcPS-CK1-5*,并成功在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达。

参考文献

- [1] LUAN S. Protein phosphatases in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 63–92. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743.
- [2] HANKS S K, QUINN A M, HUNTER T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains [J]. *Science*, 1988, 241(4861): 42–52. doi: 10.1126/science.3291115.
- [3] CHUANG H C, WANG X H, TAN T H. MAP4K family kinases in immunity and inflammation [J]. *Adv Immunol*, 2016, 129: 277–314. doi: 10.1016/bs.ai.2015.09.006.
- [4] TUAZON P T, TRAUGH J A. Casein kinase I and II-multipotential serine protein kinases: Structure, function, and regulation [J]. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1991, 23: 123–164.
- [5] ROBINSON L C, HUBBARD E J, GRAVES P R, et al. Yeast casein kinase I homologues: An essential gene pair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(1): 28–32. doi: 10.1073/pnas.89.1.28.
- [6] GROSS S D, ANDERSON R A. Casein kinase I: Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family [J]. *Cell Sign*, 1998, 10(10): 699–711. doi: 10.1016/s0898-6568(98)00042-4.
- [7] CHEN H H, XUE H W. Casein kinase 1 in plants [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2018, 30(11): 1184–1192. [陈虎辉, 薛红卫. 植物 I 型酪蛋白激酶的研究进展及展望 [J]. *生命科学*, 2018, 30(11): 1184–1192. doi: 10.13376/j.cbls/2018143.]
- [8] UEHARA T N, MIZUTANI Y, KUWATA K, et al. Casein kinase I family regulates PRR5 and TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(23): 11528–11536. doi: 10.1073/pnas.1903357116.
- [9] KANG J M, WANG Z. *Mut9p-LIKE KINASE* family members: New

- roles of the plant-specific casein kinase I in plant growth and development [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1562. doi: 10.3390/ijms21051562.
- [10] CASAS-MOLLANO J A, JEONG B R, XU J P, et al. The MUT9p kinase phosphorylates histone H3 threonine 3 and is necessary for heritable epigenetic silencing in *Chlamydomonas* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6486–6491. doi: 10.1073/pnas.0711310105.
- [11] WANG Z, CASAS-MOLLANO J A, XU J P, et al. Osmotic stress induces phosphorylation of histone H3 at threonine 3 in pericentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(27): 8487–8492. doi: 10.1073/pnas.1423325112.
- [12] RIERA M, VÉLEZ-BERMÚDEZ I C, LEGNAIOLI T, et al. Specific features of plant CK2 [M]// PINNA L A. *Protein Kinase CK2*. Ames: John Wiley & Sons, Inc., 2013. doi: 10.1002/9781118482490.ch9.
- [13] VELEZ-BERMUDEZ I C, IRAR S, CARRETERO-PAULET L, et al. Specific characteristics of CK2 β regulatory subunits in plants [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 356(1/2): 255–260. doi: 10.1007/s11010-011-0971-6.
- [14] SALINAS P, FUENTES D, VIDAL E, et al. An extensive survey of CK2 α and β subunits in *Arabidopsis*: Multiple isoforms exhibit differential subcellular localization [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(9): 1295–1308. doi: 10.1093/pcp/pcj100.
- [15] PERACCHIA G, JENSEN A B, CULIÁÑEZ-MACIÀ F A, et al. Characterization, subcellular localization and nuclear targeting of casein kinase 2 from *Zea mays* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(2): 199–211. doi: 10.1023/A:1006196530079.
- [16] MAKKAR H P S, BECKER K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2009, 111(8): 773–787. doi: 10.1002/ejlt.200800244.
- [17] AO P X, LI Z G, FAN D M, et al. Involvement of antioxidant defense system in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(1): 153–160. doi: 10.1007/s11738-012-1058-z.
- [18] WU P Z, ZHOU C P, CHENG S F, et al. Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant [J]. *Plant J*, 2015, 81(5): 810–821. doi: 10.1111/tj.12761.
- [19] ZHANG L, HE L L, FU Q T, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in the biofuel plant *Jatropha curcas* using real-time quantitative PCR [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 24338–24354. doi: 10.3390/ijms141224338.
- [20] MURRAY M G, GUILFOYLE T J, KEY J L. Isolation and preliminary characterization of a casein kinase from cauliflower nuclei [J]. *Plant Physiol*, 1978, 62(3): 434–437. doi: 10.1104/pp.62.3.434.
- [21] KLIMCZAK L J, CASHMORE A R. Purification and characterization of casein kinase I from broccoli [J]. *Biochem J*, 1993, 293(1): 283–288. doi: 10.1042/bj2930283.
- [22] KLIMCZAK L J, FARINI D, LIN C, et al. Multiple isoforms of *Arabidopsis* casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109(2): 687–696. doi: 10.1104/pp.109.2.687.
- [23] LIU W, XU Z H, LUO D, et al. Roles of *OsCKII*, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity [J]. *Plant J*, 2003, 36(2): 189–202. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01866.x.
- [24] KAPLAN F, KOPKA J, SUNG D Y, et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content [J]. *Plant J*, 2007, 50(6): 967–981. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03100.x.
- [25] KIM M J, GO Y S, LEE S B, et al. Seed-expressed casein kinase I acts as a positive regulator of the SeFAD2 promoter via phosphorylation of the SebHLH transcription factor [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(4/5): 425–437. doi: 10.1007/s11103-010-9630-7.
- [26] WANG H B, ZOU Z R, WANG S S, et al. Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82817. doi: 10.1371/journal.pone.0082817.
- [27] SU Y H, WANG S L, ZHANG F, et al. Phosphorylation of histone H2A at serine 95: A plant-specific mark involved in flowering time regulation and H2A.Z deposition [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(9): 2197–2213. doi: 10.1105/tpc.17.00266.
- [28] DAI C, XUE H W. Rice early *flowering1*, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling [J]. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1916–1927. doi: 10.1038/emboj.2010.75.
- [29] CHEN H H, QU L, XU Z H, et al. EL1-like casein kinases suppress ABA signaling and responses by phosphorylating and destabilizing the ABA receptors PYR/PYLs in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(5): 706–719. doi: 10.1016/j.molp.2018.02.012.