

百脉根组氨酸蛋白激酶 LHK1 的表达及活性鉴定

张恒尹 琚 张 晴 张 忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究 LHK1 蛋白的功能, 构建了 pPub-LHK1 : AG-GFP 和 pFastBac-LHK1 表达载体, 分别在烟草叶肉细胞和昆虫细胞表达百脉根组氨酸蛋白激酶 LHK1 跨膜蛋白。结果表明: 在烟草和昆虫细胞中 LHK1 蛋白都能表达, 且表达的蛋白在体外都能磷酸化底物(组氨酸转移酶 HP1 蛋白), 具有组氨酸蛋白激酶活性。

关键词 百脉根; 组氨酸蛋白激酶; 烟草表达系统; 昆虫表达系统

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0059-05

细胞分裂素是控制植物不同发育过程和响应环境刺激的主要植物激素。在植物中细胞分裂素信号转导途径由组氨酸激酶 HK(histidine kinase)、组氨酸磷酸转移蛋白 HP(histidine phosphotransferase) 和应答调节蛋白 RR(response regulators) 所组成, 每一步都由多基因家族编码的蛋白参与^[1]。在豆科植物百脉根(*Lotus japonicus*) 中, 发现组氨酸蛋白激酶 LHK1(lotus histidine kinase 1) 在结瘤因子信号转导及根瘤器官发生中起重要作用^[2]。LHK1 的 1 个点突变体 *snf2*(L266F) 导致在没有根瘤菌存在条件下自发结瘤(spontaneous nodule formation)^[3], 而其功能缺失型突变体 *hit1* 导致根瘤形成和发育受阻^[4]。进一步研究发现, *hit1* 突变体影响根瘤原基形成, 不影响根瘤菌对植物的侵染, 但其侵入线好像失去了方向性, 不能向着内皮层细胞延伸, 而是形成向四周伸展的复杂的侵染结构^[5]。LHK1 与拟南芥细胞分裂素受体 AHK4 在蛋白水平上具有同样的结构域, 其氨基酸同一性达到 68%^[6], 这说明 LHK1 可能是百脉根的一个细胞分裂素受体。已有的研究表明, 根瘤菌产生的结瘤因子是根瘤菌侵染和根瘤形成所必需的, 但这个过程也严格受到宿主植物的调控^[7-9]。然而, 结瘤因子信号是如何启动或调控细胞分裂素信号转导途径的分子机制还知之甚少。为了研究 LHK1 蛋白在共生信号途径中的生物化学功能, 本研究在烟草叶肉细胞和昆虫细

胞中分别对 LHK1 进行表达, 并在体外测定其组氨酸激酶的磷酸化活性, 旨在为后续揭示 LHK1 蛋白在共生过程中的生化功能和作用机制提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

百脉根(*L. japonicus*) MG-20 生态型种子和烟草(*Nicotiana tabacum*) 种子由笔者所在实验室保存。农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 烟草表达系统质粒 pVYNE 来源于德国 Kudla 教授实验室, pPub-GFP-3×FLAG 载体来源于华中农业大学农业微生物学国家重点实验室。昆虫 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统、*Escherichia coli* DH10Bac 菌株、pFastBac 质粒和昆虫细胞由华中农业大学动物科学技术学院/动物医学院肖少波教授惠赠。

高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker、胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司。蛋白质标准分子质量 marker 及蛋白预染 marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。Western blot 分析所用抗体为启动子生物技术有限公司的产品, 一抗 Myc-tag 和 Flag-tag 抗体, 二抗是 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H + L)。昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清(FBS)、Cellfectin 转染试剂均购自 Invitrogen 公司。

1.2 载体的构建

根据 LHK1 序列, 设计并合成引物。在烟草表达

收稿日期: 2016-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370278); 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2010C126502)

张 恒, 硕士研究生, 研究方向: 共生固氮. E-mail: 625977995@qq.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

系统中连接含有 35S 启动子的 pVYNE 载体,上游含 *Spe* I 引物: 5' CTAGACTAGTATGGGTCTTGGGT-TCAAG 3';下游含 *Sal* I 引物 5' ACGCGTCGACT-GAGTCTGAAGCAGGC3'。p*Pub*-GFP-3 × FLAG 载体连接 *LHK1* 片段的上游含 *Xba* I 引物: 5' GCTCTAGAATGGGTCTTGGGTTCAG 3';下游含 *Stu* I 引物 5' GAAGGCCTTGAGTCTGAAGCAGGC3'。在昆虫表达载体 *LHK1* 上上游引物为 5' ATGGGTCT-TGGGTTCAG 3';下游引物为 5' TGAGTCTGAAG-CAGGC3'。回收扩增到的片段,分别用相应的限制性内切酶酶切回收。将酶切好的片段与相应的载体进行酶连反应。转化 7 μ L 酶连体系到感受态细胞中,菌落 PCR 和序列鉴定融合的转化子是否正确。

1.3 烟草表达系统

将含目的基因的质粒电转化导入农杆菌 EHA105,鉴定后于 -80°C 保存菌株备用。

烟草蛋白表达前 3 d,挑取保存的菌株划线接种到含抗生素培养基的平板上, 28°C 培养 2~3 d。挑取单菌落接种到 5 mL 含抗生素的 LB 培养液中,在 28°C 振荡培养 12 h 后加入 10 μ L 100 mmol/L AS (AS 可以促进外源基因的整合),继续培养至 D_{600} 达到 0.7 左右时,离心收集菌体。用 Agro-infiltration 缓冲液洗涤,然后将菌体重悬于该缓冲液中并调整菌液 D_{600} 。当注射 1 个样品(1 个农杆菌菌株含 1 种蛋白)时,将 D_{600} 调整为 0.5;当混合注射 2 个样品(2 个农杆菌菌株分别含有不同蛋白)时,将 2 种菌液混合,离心后重悬菌体并将 D_{600} 调整为 1.0。室温静置 2~4 h 后,将菌液注射到烟草叶片背面,使菌体充满整个叶片,黑暗培养 2~3 d,剪下烟草叶片。用液氮快速研碎成干粉,每 0.1 g 组织加入 0.2 mL Extraction buffer,静置融化后移至新的离心管,于 4°C 12 000 r/min 离心 30 min,取上清到另一支离心管,样品一直置于冰上,用 Bradford 试剂盒检测总蛋白的浓度, -80°C 冻存储用。具体方法参考文献[10]。

1.4 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统

将目的基因克隆到 pFastBac™ 供体质粒上,转化到感受态细胞中得到阳性克隆。将阳性质粒转化 DH10Bac™ 产生重组质粒。发生转座作用的 Bacmid 由于 *LacZ* 基因被插入失活,使得带有重组 Bacmid 的菌落生长为白色,挑取正确的白色菌落培

养。重组质粒 DNA 转染昆虫细胞产生重组杆状病毒。扩增滴定(amplify and titer)杆状病毒株,使用病毒株感染昆虫细胞表达目的重组蛋白。

1.5 Western blot 印迹转移

煮沸变性后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后切除蛋白胶的积层胶,进行转膜。转膜结束后用含有 5% 脱脂牛奶的 TBS-T 在室温条件下孵育 1~2 h 或在 4°C 条件下孵育过夜,孵育之后,在一抗的 TBS-T 溶液中孵育 1~2 h,在二抗的 TBS-T 溶液中,孵育 1 h;将 NC 膜和化学发光底物试剂反应,该试剂与二抗的辣根过氧化物酶作用发光,通过化学发光凝胶成像系统检测杂交信号。具体方法见参考文献[11]。

1.6 蛋白激酶的自磷酸化和底物磷酸化检测

在 40 μ L 反应体系中加入适量待测蛋白(底物磷酸化加入底物蛋白约 2 μ g)和 Kinase buffer(50 mmol/L HEPES-Na, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L DTT, 10 μ mol/L 冷 ATP, 10 μ Ci [γ - ^{32}P] ATP)。 25°C 反应 30 min。加入 SDS-PAGE 上样缓冲液终止反应,沸水中水浴 10 min;12% SDS-PAGE 电泳约 2 h,取出凝胶,磷屏压片 2~3 h,使用 FUJIFILM FLA5100 检测。检测后的凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,脱色,拍照、分析。

2 结果与分析

2.1 百脉根 LHK1 烟草叶肉细胞表达载体的构建

百脉根组氨酸激酶 LHK1 蛋白由 993 个氨基酸残基组成,含有 2 个跨膜结构域,在胞外有细胞分裂素结合和识别的受体 CHASE 结构域,胞内有组氨酸激酶 HK 结构域和 Receiver 结构域(图 1A)。根据 *LHK1* 的序列,设计含有 *Xba* I / *Stu* I 酶切位点的引物,利用 RT-PCR 从百脉根中扩增出 2.9 kb 的 DNA 片段,经酶切后连接到 p*Pub*-FLAG-GFP 载体 *Xba* I / *Stu* I 位点上(图 1B),构建 p*Pub*-LHK1 : FLAG-GFP 融合表达载体。通过酶切验证,结果表明:融合表达载体 p*Pub*-LHK1 : FLAG-GFP 都含有 2.9 kb 片段(图 1),通过测序证明序列融合正确。重组载体 p*Pub*-LHK1 : FLAG-GFP 结构示意图见图 1。

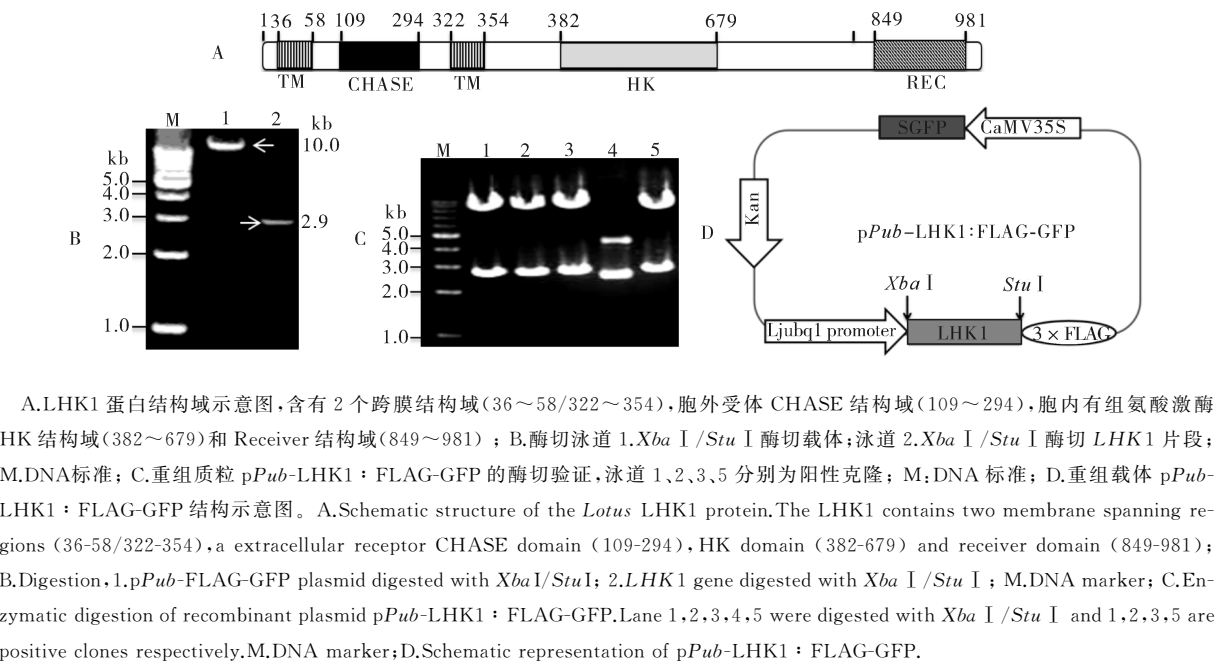


图 1 烟草叶肉细胞表达载体的构建

Fig.1 Construction and identification of plasmid in tobacco expression system

2.2 昆虫细胞表达载体构建及重组杆粒的鉴定

利用 *Bam* H I / *Eco* R I 分别酶切杆粒载体 pFastBac (4.7 kb) 和 *LHK1* DNA (2.9 kb) 片段 (图 2A)。回收后酶连并转化大肠杆菌, 经菌落 PCR 鉴定, 得到阳性克隆 (图 2B)。将测序后的 pFastBac-*LHK1* 的质粒转化到 DH10Bac 细菌中, 产生重组杆粒 (Bacmid)。在选择性培养平板挑取 3 个白色和 1 个蓝色菌落, 在含卡那霉素、庆大霉素、四环素、Biuo-gal 和 IPTG 的 LB 平板重新划线培养。结果显示, 1、2、3 号菌落含有重组杆粒, 4 号菌落没有

重组杆粒, 只含空载体 (图 2C)。

2.3 烟草叶肉细胞 LHK1 蛋白的表达及体外磷酸化活性检测

在前期的试验中, 我们将 *LHK1* 基因置于 CaMV35S 启动子控制下, 导入烟草叶肉细胞表达, 结果均未检测到 *LHK1* 蛋白 (结果未显示)。因此, 我们构建了 p*Pub*-LHK1 : FLAG-GFP 融合表达载体, 将 *LHK1* 基因置于百脉根泛素启动子 (*LjUbq1*) 控制下注入烟草叶肉细胞, 4 周后抽提蛋白并检测蛋白的表达水平。蛋白电泳和 Western blot 结果显

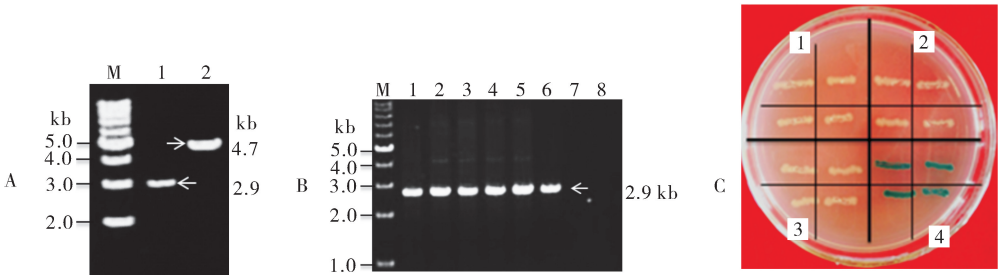
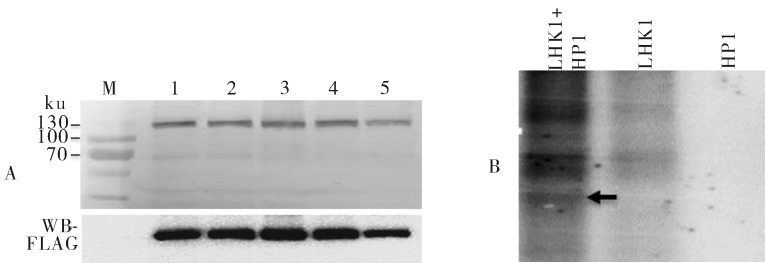


图 2 pFastBac-LHK1 质粒的构建及重组杆粒的鉴定

Fig.2 Construction of pFastBac-LHK1 and identification of baculovirus Bacmid

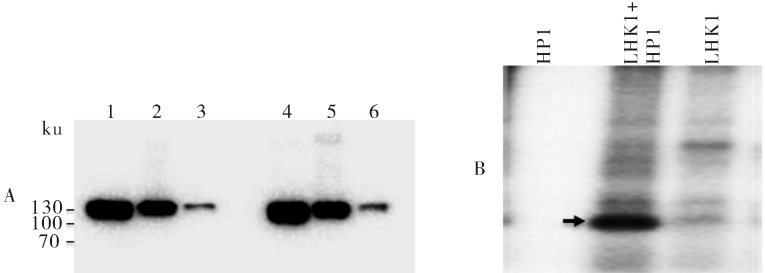
示:LHK 融合蛋白在烟草叶肉细胞中得到表达,其蛋白表达水平不受注射农杆菌量的影响(图 3A)。为了检测烟草中表达的 LHK1 蛋白是否具有组氨酸激酶活性,以大肠杆菌表达并纯化的组氨酸磷酸转移蛋白 HP1 为底物,在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在条件下体外检测了 LHK1 蛋白的激酶活性。结果显示,LHK1 蛋白具有磷酸化 HP1 的功能(图 3B)。



A.LHK1 : FLAG-GFP 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳(上)及 Western blot(下);泳道 1,2.注射菌液的 $D_{600}=0.5$,泳道 3~5 $D_{600}=1.0$,M.蛋白标准; B.LHK1 蛋白磷酸化 HP1 放射性自显影,箭头标明被磷酸化的 HP1 蛋白。A.SDS-PAGE electrophoresis(upper panel) and Western blot(lower panel) of LHK1 : FLAG-GFP; Lane 1,2.Samples extracted from tobacco leaf by injected bacterial suspension for $D_{600}=0.5$ and lane 3-5 samples for $D_{600}=1.0$;M.Marker ;B.Autoradiograph shows the corresponding phosphorylated HP1 (arrow).

图 3 烟草细胞表达的 LHK1 蛋白 Western blot 检测及体外磷酸化活性检测

Fig.3 Western blot and protein kinase assay of LHK1 expressed in tobacco leaf cell



A.LHK1 蛋白的 Western blot 检测,泳道 1,4 蛋白上样量 $40\mu\text{L}$,2,5 上样量 $20\mu\text{L}$,3,6 上样量 $10\mu\text{L}$; B.LHK1 蛋白磷酸化 HP1 放射性自显影,箭头标明被磷酸化的 HP1 蛋白。A.LHK1 protein detected by Western blot.Lane 1 & 4.Loading sample $40\mu\text{L}$,Lane 2 & 5.Loading sample $20\mu\text{L}$,Lane 3 & 6.loading sample $10\mu\text{L}$; B.Autoradiograph shows the corresponding phosphorylated HP1 (arrow).

图 4 昆虫细胞表达的 LHK1 蛋白 Western blot 检测及体外磷酸化活性检测

Fig.4 Western blot and protein kinase assay of LHK1 expressed in insect cell

酸磷酸转移蛋白 HP1 为底物,在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在条件下体外检测了 LHK1 蛋白的激酶活性。放射性自显影结果显示,在昆虫细胞中表达的 LHK1 蛋白在体外具有底物水平的磷酸化活性(图 4B)。

3 讨论

随着近几年对拟南芥细胞分裂素受体研究的深入,关于细胞分裂素信号通路的理论正在不断完善^[12]。已有的研究表明,在细胞分裂素诱导的条件下,组氨酸激酶蛋白可将磷酸基转移到组氨酸磷酸转移酶 HP 的组氨酸位点上,再由 HP 将磷酸基团转移到反应调控子 RR 上并调控下游基因的转

2.4 昆虫细胞 LHK1 蛋白的表达及体外磷酸化活性检测

将转染重组杆粒 Bacmid 转染到 sf9 昆虫细胞中,扩增并检测杆状病毒株的滴度,使用病毒株感染 sf9 昆虫细胞表达目的重组蛋白。Western blot 结果表明:LHK1 膜蛋白在昆虫表达系统中能成功表达(图4A)。同样以大肠杆菌中表达并纯化的组氨

录^[13]。在豆科植物百脉根中,组氨酸激酶 LHK1 作为一个细胞分裂素受体参与根瘤菌结瘤因子信号途径,并在根瘤形成中行使重要功能。为了进一步研究 LHK1 在共生过程中的生物化学功能和作用机制,本研究利用烟草叶肉细胞瞬时表达系统,成功地对 LHK1 蛋白进行了表达,在体外能检测到 LHK1 磷酸化 HP1 蛋白的活性,但信号较弱。其原因是由于从烟草叶片中提取的蛋白含有许多杂蛋白,其中包含有许多内源的反应调节子 RR 蛋白;在反应体系中,当 HP1 被磷酸化后迅速将磷酸基团转移到 RR 蛋白上,所以在放射自显影图上呈现多条杂带,

导致 HP1 蛋白磷酸基团减少。为了解决这一问题，一方面可以利用 FLAG 标签纯化 LHK1 蛋白，尽量去除烟草内源的 RR 蛋白；另一方面在反应系统中加入纯化的 RR 蛋白，检测 RR 蛋白被磷酸化的水平。同时，本研究利用昆虫杆状病毒表达系统，也成功地对 LHK1 蛋白进行了表达，在体外具有较强的底物磷酸化活性，为后续深入研究 LHK1 在共生信号转导中的作用机制及其与细胞分裂素信号间的分子对话奠定了前期工作基础。

致 谢 本研究得到华中农业大学动物科学技术学院/动物医学院彭贵青教授的大力支持和协助，特此致谢！

参 考 文 献

[1] MÜLLER B, SHEEN J. Advances in cytokinin signaling[J]. Science, 2007, 318(5847): 68-69.

[2] HELD M, HOU H, MIRI M, et al. Lotus japonicus cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation[J]. Plant cell, 2014, 26(2): 678-694.

[3] TIRICHINE L, SANDAL N, MADSEN L H, et al. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis[J]. Science, 2007, 315(5808): 104-107.

[4] MURRAY J D, KARAS B J, SATO S, et al. A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis[J]. Science, 2007, 315(5808): 101-104.

[5] HIRSCH A M. Studying early nodulin gene ENOD40 expres-

sion and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa[J]. Plant physiology, 1998, 116(1): 53-68.

[6] VESCOVI M, RIEFLER M, GESSUTI M, et al. Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in Arabidopsis cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4[J]. Journal of experimental botany, 2012, 63(7): 2825-2832.

[7] BÁÑEZ F, FABRA A. Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the Aeschynomeneae legume Arachis [J]. Plant biology, 2011, 13(5): 794-800.

[8] 张晓媛, 王建云, 魏丰, 等. 紫云英根瘤中特异表达 CCPs 基因的同源分析及表达定位[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 48-55.

[9] 路达, 彭杰丽, 谢福莉, 等. 华癭中慢生根瘤菌 7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4): 56-61.

[10] KANG H, CHU X, WANG C, et al. A MYB coiled-coil transcription factor interacts with NSP2 and is involved in nodulation in Lotus japonicus [J]. New phytologist, 2014, 201(3): 837-849.

[11] ZHU H, CHEN T, ZHU M, et al. A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in Lotus japonicus [J]. Plant physiology, 2008, 148(1): 337-347.

[12] AUER C A. Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism[J]. Journal of plant growth regulation, 2002, 21(21): 24-31.

[13] HWANG I, SHEEN J, MÜLLER B. Cytokinin signaling networks[J]. Annual review of plant biology, 2012, 63(3): 353-380.

Expression and activity of lotus histidine kinase 1 in Lotus japonicus

ZHANG Heng YIN Jun ZHANG Qing ZHANG Zhongming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Lotus histidine kinase 1 is a cytokinin receptor protein which serves an important function in symbiotic signaling pathway and nodules formation. Two sets of eukaryotic expression vectors were built and expressed in tobacco expression system and baculovirus insect expression system to study the function of LHK1 protein. The results showed that it can be expressed in tobacco and insect cells. The LHK1 protein expressed has histidine protein kinase activity *in vitro*. It will be useful for further studying the biochemical mechanism of LHK1 in symbiotic signaling pathway.

Keywords Lotus japonicus; lotus histidine kinase 1; tobacco expression system; baculovirus insect expression system

(责任编辑: 张志钰)