

张利国. CsBLH7 与 CsKNAT4 蛋白互作调节下胚轴细胞的伸长[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(6): 41–44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.06.006

CsBLH7 与 CsKNAT4 蛋白互作调节下胚轴细胞的伸长

张利国

(黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: CsBLH7 与 CsKNAT4 分别属于 BELL 类蛋白与 KNOX 类蛋白, 可能与植物器官形态建成密切相关, 但目前几乎没有关于 CsBLH7 与 CsKNAT4 蛋白互作的深入报道。采用酵母双杂交初步确定 CsBLH7 与 CsKNAT4 能够在细胞体内互作, 形成 BLH7–KNAT4 蛋白复合物。双分子荧光互补 (BiFC) 进一步确定了这种互作关系。原生质体瞬时转染试验结果表明, CsBLH7 与 CsKNAT4 分别为转录抑制因子与转录激活因子。同时, 针对 35S::CsBLH7、35S::CsKNAT4 材料的形态分析结果表明, 下胚轴细胞长度分别缩短与伸长, 这与它们的转录活性相适应。再者, 35S::CsBLH7、35S::CsKNAT4 遗传材料的赤霉素合成酶基因分别下调与上调。研究结果表明, BLH7–KNAT4 可能是通过调节赤霉素合成来调控下胚轴细胞长度, 对揭示 CsBLH7 和 CsKNAT4 调控植物形态建成分子机理具有重要意义。

关键词: CsBLH7; CsKNAT4; 蛋白互作; BiFC; 下胚轴细胞; 转录活性; 植物形态建成

中图分类号: S563.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2022)06–0041–04

BELL 类蛋白几乎存在于所有植物当中^[1], 大麻中目前发现有 13 个 BELL 蛋白^[2]。现有研究揭示, BLH1 能够调节植株花基形态, 在生殖生长与营

养生长的转换节点可能发挥重要负调控功能; 在拟南芥中 BLH3 和 BLH6 的转录活性相反, 同时还可能参与调节植株叶片的形态与花期^[3]。

KNOX 家族作为 TALE 蛋白的一个亚类, 也能够从多方面参与对植物形态建成的调控。不同物种的同源 BELL 和 KNOX 蛋白可能存在不同的蛋白互作关系^[4–5]。研究的前期工作基础初步表明, CsBLH7 可能与 CsKNOXs 家族部分成员之间存在蛋白互作关系。对比大麻的全基因组测序数据, 在大

收稿日期: 2021–06–11

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (编号: LH2020C097); 黑龙江省农业科学院国自然培育项目 (编号: 2019JJPY003); 黑龙江省麻类科技创新基金 (编号: MLCX–20); 特色经济作物绿色种植技术推广项目 (编号: KYBG–05WDL–2020001)。

作者简介: 张利国 (1978—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 助理研究员, 主要从事麻类分子育种研究。E-mail: zlg86@aliyun.com。

2491–2497.

[19] Chen M H, Citovsky V. Systemic movement of a *Tobamovirus* requires host cell pectin methylesterase [J]. *The Plant Journal*, 2003, 35(3): 386–392.

[20] Chen J, Ahlquist P. Brome mosaic virus polymerase–like protein 2a is directed to the endoplasmic Reticulum by helicase–like viral protein 1a [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(9): 4310–4318.

[21] Dorokhov Y L, Mäkinen K, Frolova O Y, et al. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host–cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein [J]. *FEBS Letters*, 1999, 461(3): 223–228.

[22] Lartey R T, Ghoshroy S, Citovsky V. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses [J]. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 1998, 11(7): 706–709.

[23] Ishibashi K, Nishikiori M, Ishikawa M. Interactions between *Tobamovirus* replication proteins and cellular factors: their impacts on virus multiplication [J]. *Molecular Plant–Microbe Interactions*,

2010, 23(11): 1413–1419.

[24] Fujisaki K, Ravelo G B, Naito S, et al. Involvement of THH1, an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *TOM1* gene, in *Tobamovirus* multiplication [J]. *The Journal of General Virology*, 2006, 87 (Pt 8): 2397–2401.

[25] Asano M, Satoh R, Mochizuki A, et al. *Tobamovirus*–resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(20): 4479–4484.

[26] Hagiwara Y, Komoda K, Yamanaka T, et al. Subcellular localization of host and viral proteins associated with *Tobamovirus* RNA replication [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(2): 344–353.

[27] Kumar S, Dubey A K, Karmakar R, et al. Inhibition of TMV multiplication by siRNA constructs against *TOM1* and *TOM3* genes of *Capsicum annuum* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 186(1/2): 78–85.

[28] Fereres A, Moreno A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects [J]. *Virus Research*, 2009, 141(2): 158–168.

麻中发现 6 个 KNOX 蛋白和 13 个 BELL 蛋白,因此确定它们之间的互作关系、调节方式,对解析大麻器官形态发生的机制是十分必要的,将是揭示 CsBLH7 调控基因表达分子机理的基础与关键。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究中植物材料为工业大麻新品种龙大麻 4 号,由黑龙江省农业科学院经济作物研究所选育。龙大麻 4 号的 THC (四氢大麻酚) 含量低于千分之一,为高产高纤型工业大麻品种。

1.2 酵母双杂交相关质粒构建与测试蛋白-蛋白互作

采用 PCR 方法通过对大麻 cDNA 进行克隆获取 BLH7 和 KNAT4 的开放读码框片段。在酵母细胞中,转入 BLH7 的同源异型结构域蛋白片段与 Bell-like 片段,在 pvgDT3 中插入 BLH7 与 BLH10 的 cDNA。在缺乏 Trp 及缺乏 Leu 的培养基中筛选酵母细胞,以测试其蛋白互作关系,在缺少 Ade 与 Leu,以及无 Trp、无 His 的培养基中培养筛选后的株系。使用阴性对照 P_gatd7SV (40) 和 P_gbkt (7) Lam, 阳性对照是 P_gatd7SV (40) 与 P_gbkt (7) p53。

1.3 采用双分子荧光互补技术 (BiFC) 测试蛋白-蛋白互作

通过 35S 启动子的调控,黄色荧光蛋白的两端^[4]分别连接 BLH 蛋白与 KNOX 蛋白形成融合蛋白,即 C-KNAT4 与 N-BLH7。扩增完成后,在 pSAT6-nEYFP-N1 中亚克隆 KNAT4-YFPC、KNAT3-YFPC,在 pSAT6-cEYFPN1 中亚克隆 BLH7-YFPN、BLH10-YFPN,参考 Yoo 等聚乙二醇转染拟南芥原生质体的试验方法^[4]展开试验,于 Leica 2PS SSC 激光共聚焦显微镜下观察荧光成像情况。

1.4 原生质体瞬时转染试验

在 pUC19 质粒中构建 35S:GD-OIPs,用于质粒提取和扩增。反式强激活作用因子 Ld-Vp16,以及报告基因 2 LexA-2 Gal4:Gus 和 2Gal4:Gus 也在本试验中应用。本试验采用无内毒素转染级质粒试剂盒 (Abcam) 进行报告质粒和效应因子的分析,至少重复进行 3 次生物学试验和设置 2 次技术性重复,数据分析处理采用 *t* 检验。研究采用 Gal4 DNA-binding domain 和 LexA DNA-binding domain,对应 GD-OIPs 与 VP16,其可靠性已被反复证实,例如

AUX/IAA 蛋白^[6]、OFP4 蛋白^[7]。

2 结果与分析

2.1 酵母双杂交测试 CsBLH7 与 CsKNAT4 之间的蛋白互作

通过酵母双杂交试验测试 CsBLH7 与 KNAT4 在体内的相互作用,CsBLH7 与转录蛋白因子的结合域连接组成融合蛋白,KNAT4 与转录激活域形成融合蛋白。为排除目标蛋白可能的自激活活性,测试结合域蛋白-Oips 与激活域蛋白-Empty 蛋白互作。试验结果表明,CsBLH7、KNAT4 均无自激活活性,CsBLH7 与 CsKNAT4 在体内存在蛋白互作关系,形成 BLH7-KNAT4 蛋白复合物。CsBLH7 与 CsKNAT4 酵母双杂交 (图 1)。在缺乏 Leu 与缺乏 Trp 的培养基质中,Yeast-cell 首先被选择,在缺乏 Leu、缺 Trp、无 His 与无 Ade 的培养基质中培养 5~6 d,完成 BLH-KNOX 蛋白-蛋白互作测试。

2.2 双分子荧光互补 (BiFC) 研究 BLH7 与 KNAT4 蛋白互作

由于酵母双杂交技术上的局限性,为进一步证实 BLH7 与 KNAT4 在细胞体内的蛋白互作,采用双分子荧光互补方法进行测试。试验采用拟南芥叶肉原生质体,共转染 YFPC-CsKNAT4 与 YFPN-CsBLH7,试验体系采用 RACK1-C-EYFP 作为阴性对照。BiFC 试验结果显示,BLH7 与 KNAT4 蛋白互作发生在细胞核中 (图 2)。

2.3 BLH7 与 KNAT4 转录活性测试

从原生质体瞬时转染效应因子相对表达量可知,图中 GD-BLH7 的 GUS 相对表达量明显降低 (图 3),GD-KNAT4 的 GUS 相对表达量明显上调 (图 3、图 4),由此可知 CsBLH7 为转录抑制因子,CsKNAT4 为激活因子,且 CsBLH7 能够与 CsKNAT4 互作,并能够抑制 CsKNAT4 的转录激活活性 (图 5)。

2.4 CsBLH7-CsKNAT4 调节下胚轴细胞的伸长

在过去针对 BELL 与 KNOX 类蛋白研究的结果表明,二者能够调节植株的形态发育,包括叶片的形状、茎的长度、花基发育等。对比野生型 (Col),35S:CsBLH7 下胚轴长度与下胚轴细胞长度明显缩短,35S:CsKNAT4 下胚轴长度明显伸长 (图 6、图 7)。

在水稻、拟南芥等植物中过去关于 BELL 与 KNOX 蛋白的研究曾报道,BELL-KNOX 通过调控赤霉素合成酶基因来调节茎与细胞的伸长。为进一步探究 CsBLH7-CsKNAT4 调节胚轴与茎细胞长



图1 酵母双杂交分析 BLH7 与 KNAT4 蛋白-蛋白互作

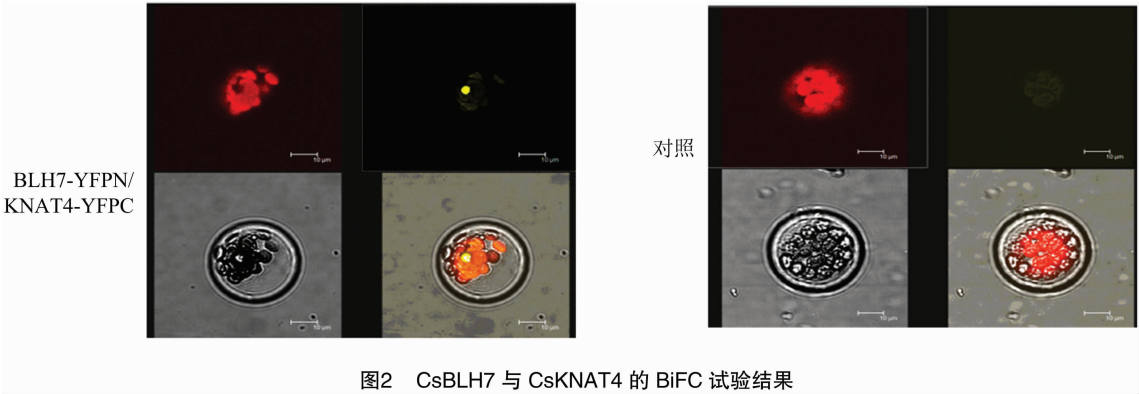


图2 CsBLH7 与 CsKNAT4 的 BiFC 试验结果

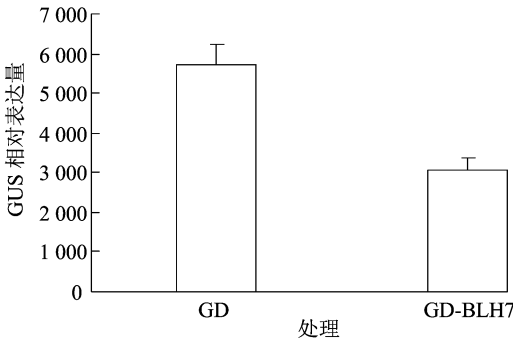


图3 CsBLH7 转录活性测试

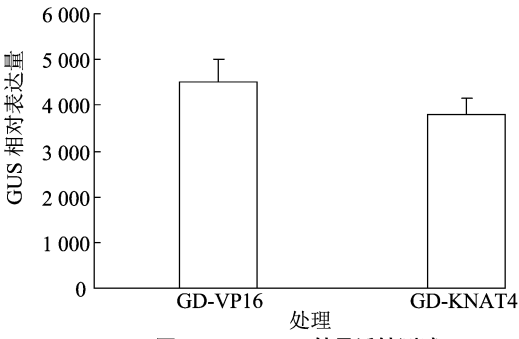


图4 CsKNAT4 转录活性测试

度的机制,对不同遗传背景材料的赤霉素合成酶基因做荧光定量分析。结果表明,35S: *CsBLH7* 中 *CsGA20ox1* 表达量均降低,35S: *CsKNAT4* 中 *CsGA20ox1* 表达量上升(图8)。

3 讨论

研究采用酵母双杂交初步确定, *CsBLH7* 与

CsKNAT4 能够在细胞体内互作,形成 BLH7 - KNAT4 蛋白复合物,双分子荧光互补 (BiFC) 进一步证实了这种蛋白互作。以拟南芥原生质体为材料,为确定转录蛋白的作用开展瞬时转染,通过酶标仪以 GUS 基因相对表达量,确定 *CsBLH7* 为转录抑制因子,35S: *CsKNAT4* 为转录激活因子。材料 35S: *CsBLH7* 下胚轴与细胞长度降低,材料 35S: *CsKNAT4*

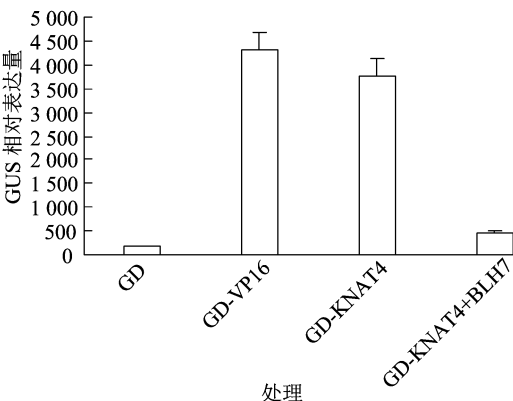
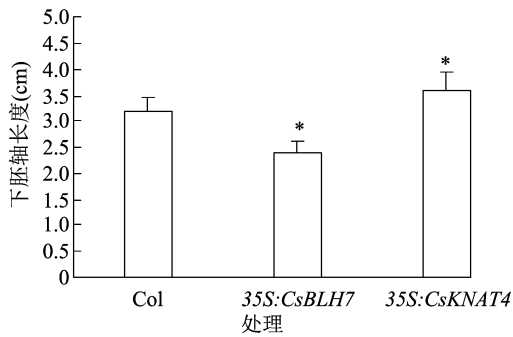


图5 CsBLH7 与 CsKNAT4 原生质体共转染



*表示差异显著($P<0.05$)。下图同

图6 下胚轴长度对比

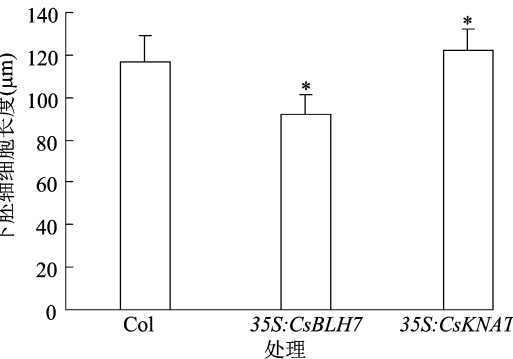


图7 下胚轴细胞长度对比

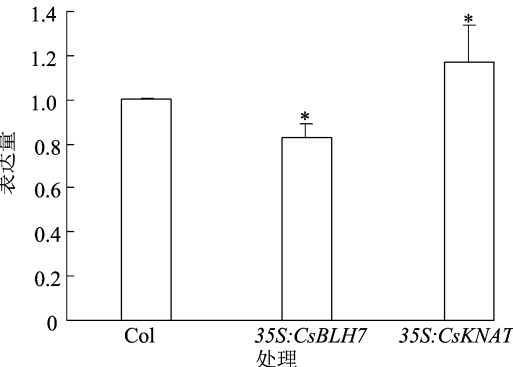


图8 CsGA200x1 的 Realtime-PCR 表达分析

下胚轴与细胞长度增加。BLH7 与 KNAT4 互作形

成 BLH7 - KNAT4 蛋白复合物, BLH7 能够抑制茎与胚轴细胞的伸长, KNAT4 能够促进茎与胚轴细胞的发育, 这与 BLH7 作为一个转录抑制因子, KNAT4 作为一个转录激活因子的遗传特性相适应。结合不同材料 CsGA20ox1 的表达量, 在 BLH7 与 KNAT4 蛋白互作基础上, 暗示 BLH7 - KNAT4 可能是通过调节赤霉素合成来调控下胚轴与茎细胞长度, 从而影响下胚轴的发育。

同时, 在过去的报道中, OFP 等其他转录蛋白可能与 BELL - KNOX 蛋白复合物发生互作来发挥调控作用, 形成 OFP - BELL - KNOX 复合蛋白^[8-9], 本研究中 KNAT4 与 BLH7 的蛋白 - 蛋白互作, 也可能并不是直接形成的, 并不能排除是通过其他蛋白间接形成的互作, 这需要通过体外蛋白互作试验进一步来确定。

参考文献:

[1] Arnaud N, Pautot V. Ring the BELL and tie the KNOX; roles for TALEs in gynoecium development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 93.

[2] Kumar R, Kushalappa K, Godt D, et al. The *Arabidopsis* BELL - LIKE HOMEODOMAIN proteins SAW1 and SAW2 act redundantly to regulate KNOX expression spatially in leaf margins[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2719 - 2735.

[3] Gómez - Mena C, Sablowski R. *ARABIDOPSIS THALIANA* *HOMEODOMAIN GENE1* establishes the basal boundaries of shoot organs and controls stem growth[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2059 - 2072.

[4] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1565 - 1572.

[5] Furumizu C, Alvarez J P, Sakakibara K, et al. Antagonistic roles for *KNOX1* and *KNOX2* genes in patterning the land plant body plan following an ancient gene duplication[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(2): e1004980.

[6] Oh E, Zhu J Y, Bai M Y, et al. Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl[J]. *eLife*, 2014, 3: e03031.

[7] Giacomo E D, Sestili F, Iannelli M A, et al. Characterization of *KNOX* genes in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1/2): 135 - 150.

[8] Zhou H B, Liu B, Weeks D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): 10903 - 10914.

[9] Tzfira T, Tian G W, Lacroix B, et al. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(4): 503 - 516.