

拟南芥动蛋白 AtOvKLP 的序列分析及原核表达

刘瑞娟, 王海庆, 沈裕虎

(中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810001)

摘要: 选择拟南芥 AtOvKLP 蛋白作为研究对象, 对其氨基酸序列和结构域进行了分析. 结果表明, AtOvKLP 蛋白 ATP 结合位点序列 (FAYGQTGSGKT) 与大多数动蛋白中的 ATP 结合位点序列不完全一致 (YGQTGSGKT); 通过与动蛋白其它亚家族的系统分析比较, 发现 AtOvKLP 与 KHC 亚家族类的各动蛋白距离较近; 同时构建了 pET-khc 原核表达载体, 并得到了体外表达蛋白.

关键词: 拟南芥; 动蛋白; 序列分析; 原核表达

中图分类号: Q 943.2

文献标识码: A

文章编号: 1003 4315(2010) 03- 0151- 05

Sequence analysis and prokaryo expression of kinesin AtOvKLP in *Arabidopsis thaliana*

LIU Ruijuan, WANG Haiqing, SHEN Yuhu

(Northwest Plateau Institute of Biology, Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota,
Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: AtOvKLP is one of kinesin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. The sequencing and motoregion analysis displayed ATP-binding sequence of AtOvKLP (FAYGQTGSGKT) was different from other kinesins (YGQTGSGKT). A close relationship between AtOvKLP and kinesins of KHC subfamily was supported by the phylogenetic analysis among AtOvKLP and other subfamilies. And expressed the AtOvKLP cDNA sequence in *E. coli* and obtained desired products in vitro for further study in validating the biochemistry activity of AtOvKLP.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; kinesin; sequence analysis; prokaryo expression

真核细胞中的蛋白纤维网架体系形成了细胞骨架 (cytoskeleton). 近年来研究发现, 细胞骨架不仅在细胞形态的维持, 保持细胞内部结构的有序性中具有重要作用, 而且与细胞运动、物质运输、能量转化、信息传递、细胞分裂、基因表达、细胞分化等生命活动密切相关. 狭义的细胞骨架指细胞质骨架, 包括微丝 (microfilament, MF), 微管 (microtubule, MT) 和中间纤维 (intermediate filament, IF). 微管系统作为细胞骨架的主要组成部分, 在细胞形态的维持,

胞内各种膜性细胞器的运输, 细胞有丝分裂和减数分裂时的染色体分离, 胞质中 mRNA 的定位以及胚胎发生早期形态发生因子的不对称定位等方面发挥了重要作用^[1]. 在上述过程中, 微管马达蛋白在微管的协调作用下水解 ATP, 将化学能转化为机械能, 从而产生沿着微管的定向运动. 与此同时, 微管马达蛋白与其它大分子或细胞器、囊泡等结合, 将这些“货物”运送到细胞内的特定部位^[2].

动蛋白是 1 类依赖于微管的马达蛋白, 参与生

作者简介: 刘瑞娟 (1981), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为植物分子生物学. E-mail: rjliu@nwiqb.ac.cn

通信作者: 王海庆, 副研究员, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学. E-mail: wanghq@nwiqb.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870228).

收稿日期: 2009-07-03; 修回日期: 2009-11-19

物体诸多的生物学过程^[3]. 动蛋白具有依赖于核苷酸的微管结合特性和被微管激活的 ATPase 活性, 并能产生沿着微管的定向运动^[4]. 目前, 植物中动蛋白的研究主要集中在细胞极性生长与胞质分裂方面^[5-6]. 拟南芥基因组测序工作的完成为以拟南芥为模式植物研究植物动蛋白的结构和功能提供了有利条件. 拟南芥基因组中编码动蛋白的基因有 61 个, 在完成基因组测序的真核生物中, 拟南芥基因组中动蛋白基因所占比例最高^[7]. 如何解释以拟南芥为代表的高等植物中庞大的动蛋白亚家族中各个成员的功能, 将成为今后植物动蛋白研究的焦点. AtOvKLP 是拟南芥中发现的 61 个动蛋白之一, 通过氨基酸序列分析将其归类于 KHC (The kinesin heavy chains) 亚家族下. 与拟南芥其它亚家族下为数较多的动蛋白相比, 拟南芥 KHC 亚家族仅含有 AtOvKLP 一个动蛋白, 这样就避免了在功能研究过程中出现基因功能冗余等现象, 为揭示该基因的功能提供有利条件.

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、BL21 大肠杆菌菌株和 pET-30b(+) 载体为本实验室保存; 酶切所用酶均为 Takara 公司产品, T₄DNA 连接酶为上海生物工程技术公司产品.

1.2 AtOvKLP 序列分析

AtOvKLP 与水稻、果蝇、线虫等 KHC 亚家族动蛋白的系统树分析, 及与水稻 Os08g0117000 氨基酸序列的比较均在 DNAMAN Ver 4.0 软件下进行.

1.5 AtOvKLP 基因原核表达载体的构建

质粒 DNA 提取、基因克隆、转化、酶切鉴定等按照 Sambrook 等^[8]的方法. 用 pET-30b(+) 为原核表达载体, 首先对其进行 Kpn I 酶切, 随后进行去磷酸化处理. 扩增 AtOvKLP 基因时, 分别在 5' 端与 3' 端引入了 Kpn I 位点. 用 Kpn I 酶切获得目的基因片段, 连接到经磷酸化处理的 pET-30b(+) 载体上构建原核表达载体 pET-khc (图 1).

1.4 AtOvKLP 基因在原核细胞中的诱导表达

与表达载体 pET-30b(+) 构建成重组质粒后转

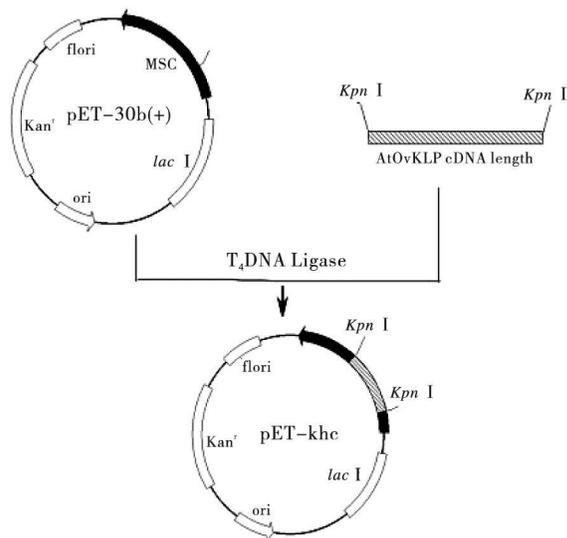


图 1 AtOvKLP 基因原核表达载体的构建流程

Fig. 1 Construction process of pET-khc expression vector. The pET-khc expression vector was transformed into *E. coli* BL21, and protein expression was induced by IPTG. Different induction times were collected, and the cells were lysed for SDS-PAGE analysis^[9,10].

2 结果和分析

2.1 AtOvKLP 氨基酸序列及其结构域分析

AtOvKLP 是拟南芥动蛋白 KHC 亚家族的唯一成员, 为 465 个氨基酸残基组成的多肽, 其中 1-334 氨基酸区段为其马达区, 含有 ATP 结合位点和微管结合位点. 值得注意的是, 与大多数动蛋白中的 ATP 结合位点序列 (FAYGQTGSGKT) 相比, AtOvKLP 蛋白 ATP 结合位点序列与其不完全一致 (YGQTGSGKT). 微管结合位点 (SSRSH, VDLAGEE, HIPYR) 则完全保守 (图 2). 根据 Reddy 等^[7]对拟南芥中各亚家族的归类, 我们分别找到了拟南芥中 BimC、G-Terminal、KIP3、KIF4 各亚家族中具有代表性的动蛋白, 以及在裂殖酵母、酿酒酵母、线虫、果蝇、人、小家鼠、鱿鱼、水稻中的 KHC 亚家族类动蛋白, 共同与 AtOvKLP 进行了系统分析比较 (图 3). 通过系统树可以看到 AtOvKLP 与 KHC 亚家族类的各动蛋白距离较近, 其中与高等植物水稻中 2 个 KHC 亚家族动蛋白距离最近. 对 AtOvKLP 与水稻中的 Os08g0117000 动蛋白进行了氨基酸序列同源性比较, 两者一致性达 35.99% (图 4). 而与拟南芥中其它亚家族类的动蛋白相距

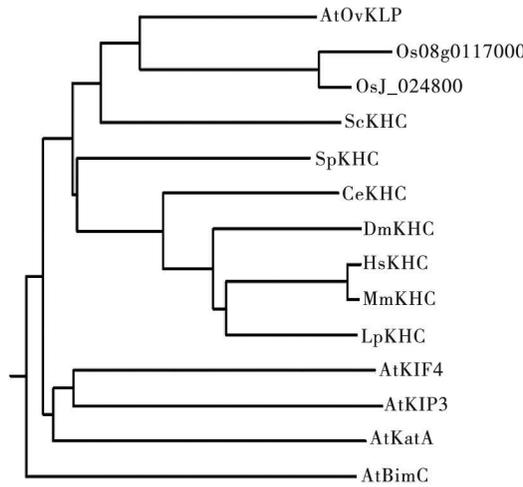
```

1   MSNVTVCARF RPRSSKEMRD PSRDGVCARP IDAETFVFDQ DKEDEFTFSL
51  DRVfyEDSTQ AAVyEFLALP IMRDAVNGIN GTIITyGQTG AGKTYSMEGP
101 GIQDCDEHnk GLLPRVvHGM FEQISSsNDI ARyTVKLSMV EIYMEKVRDL
151 LDLSKANIqI KENKtQGILL SGVTEVPVSD SVEALQHLCT GLANRAVGET
201 QNMMSsSRSH CAYLFTIQD SVKDKRVKtG KLILvDLAGS EKADKTGAEG
251 RVLEEAKtIN KSLsALGNVI NALtSGPSSK GNIHPyRDSK LTRILQDALG
301 GNSRMALlCC CSPStLNASE TLStLRFgMR AKHIKASPRa SEVKSaKAQE
351 EPSSVtKDEK CGRIlEKmKE RMSNEDIKML EDVFIQEGII FSLDSMAEVE
401 TVYEDIvSKT IQSLQQAvDE LQQVKKLEa ENIGIQEQAL RNHEPGSVGK
451 MSRFISSWYA SFFtS
    
```

注:阴影部分为 AtOvKLP 的马达区;黑影部分为 ATP 结合区和微管结合区

图 2 AtOvKLP 氨基酸序列的分析

Fig. 2 The amino acid sequences of AtOvKLP



注: SpKHC (klp3, *Schizosaccharomyces pombe*), Os08g0117000 (NP_001060858, *Oryza sativa*), OsJ_024800 (EAZ41317, *Oryza sativa*), ScKHC (ADR145Cp, *Saccharomyces cerevisiae*), CeKHC (unc-116, *Caenorhabditis elegans*), DmKHC (CG10845 PA, *Drosophila melanogaster*), HsKHC (P33176, *Homo sapiens*), MmKHC (AAA20133, *Drosophila melanogaster*), LpKHC (P21613, *Loligo pealei*), AtKatA (CAB79127, *Arabidopsis thaliana*, G-Terminal), AtKIF4 (NP851151, *Arabidopsis thaliana*, KIF4), AtKIP3 (CAB62469, *Arabidopsis thaliana*, KIP3), AtBimC (NP850281, *Arabidopsis thaliana*, Bicm), AtOvKLP (*Arabidopsis thaliana*).

图 3 AtOvKLP 与其它动蛋白氨基酸序列的系统树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of the AtOvKLP and other kinesins

较远,进一步说明了 KHC 同一亚家族中蛋白结构的相似性.

2.2 原核表达载体的构建和鉴定

将在 5' 端与 3' 端引入 *Kpn*I 位点的 AtOvKLP cDNA 目的片段克隆到 pBluescript II 载体 *Sma*I 位点,进行测序确认后,用 *Kpn*I 酶切获得目的基因片段,连接到经磷酸化处理的 pET-30b (+) 载体上构建原核表达载体 pET-khc. 挑取 LB 固体培养板上的阳性菌落于 37 °C 过夜摇菌后提取

质粒,所得质粒分别用 *Kpn*I 与 *Bam*H I 酶切鉴定,如图 5 所示,酶切后分别得到约 1 450 bp 与 400 bp 片段,证明构建的原核表达载体正确.

2.3 AtOvKLP 基因的原核表达

构建好的 pET-khc 原核表达载体鉴定好后转入 BL21(DE3) 菌株中,在 37 °C, 0.9 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导下表达 4 h,目的蛋白得到大量表达. 分别取其诱导前、诱导 4 h 后、诱导后的上清与沉淀做 SDS-PAGE 检测,如图 6 所示. 诱导 4 h 后有约 55

Ku 的目的条带出现. 通过诱导后上清与沉淀的对比, 可以看到目的蛋白主要在沉淀中表达. 但是由于

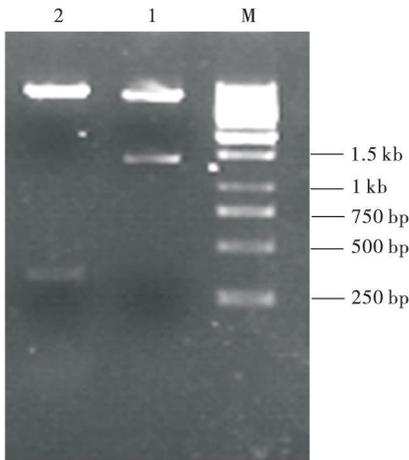
上清液中目的蛋白含量很低, 最终未能够纯化出目的蛋白.

AtOvKLPMSHVTVCAR	9
Os08g0117000	MVSESGSGQRRRAAGRRSGVGLRRLRRRGHFPISRFADETLTGAHSPPPAAAHRSRGTQSSSEINVPFSLNPLRIMLAGRMSHVTVCTR	90
AtOvKLP	FRFRSSKEMRDRSDGVCARPIDAETFFVFDQDKEDFTFSDLDVFPYEDSTQAAVIEFLAIPIMRDAWNGINGTIIITYGQTGAGKTYSMEG	99
Os08g0117000	FRPLSHKERKTNGDKIR.....QDEREDVIFSEDRVFPYEDAEQSDVYINFLAIPIVADAISGINGTIIITYGQTGAGKTYSMEG	168
AtOvKLP	PEIQDCDEHNKGLPRVVGHGMEQISSNDIARYTYKLSMVEIYMEKVRDLLDLSKANIQIKENKTOGILLGGTVEVPVPSDSVEALQHEC	189
Os08g0117000	PSILHCHUKQKTELVQRVVDELFQSLQSSSEMAWMSVKLSMVEIYMEKVRDLLDLSKANIQIKESKTOGILLGGATEVSIQSSDALECLSS	258
AtOvKLP	TGLANRAVGETMNMSSSRSHCAYLFTIQDSVKDRVKTGKILVLDLAGSEKADKTGAEGRVLEEAKTINKSLGALGNVWALTSQPS	279
Os08g0117000	EGLANRAVGET.....QQEETSDEVRVGGKILVLDLAGSEKVEKTGAEGRVLEEAKTINKSLGALGNVWALTSQIDF	332
AtOvKLP	KGNHPIPRDSKPT.....RILQDALGGNSRMALLCCSPSTLNASETLSTLRFGRMRAKHKASPRASEVKSAAKQEEP	352
Os08g0117000	SGENKHQQKVTITTYALLLYLLVLSFHLQVNRIMCLIVTLSLRAFPKMHWLVKRFQSEFLNRRHLRSRTKLIKTTPKSISEPVDSTKKPIP	422
AtOvKLP	SSVTKDEKCGRILKMKERMSENEDIKMLEDFVFIQEGIIIFSLDSMAEVETVYEDIVSKTIQSLQQAQVDELQQQKKEAEENIGIQEQALR	441
Os08g0117000	BHGQNDLRD.RILDKLRLSLKEEDVDLLEELFVQEGIIIPDPNYSVADIDSACQDAASQEVSLTQAQVEELKETVEELTDEERLGELEL	511
AtOvKLP	NHEPGSVGKMSRF.....ISSNYASEFTS	465
Os08g0117000	AQEAATAAATAADGALLGFYPAVAISSLLRPPGFVP	548

注: 黑影部分显示 AtOvKLP 与 Os08g0117000 氨基酸一致性区域

图 4 AtOvKLP 与 Os08g0117000 同源性比较

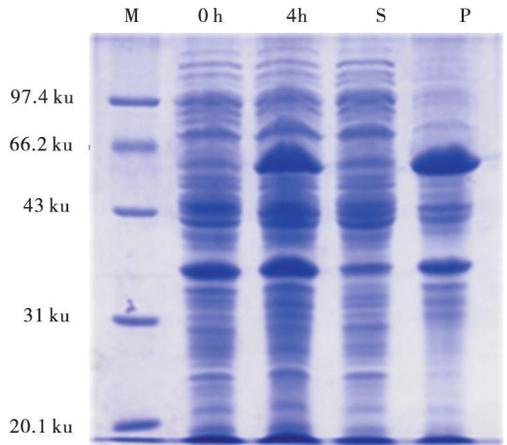
Fig. 4 Alignment of AtOvKLP with Os08g0117000



注: M. DNA Marker; 1. 重组质粒 *Kpn* I 酶切鉴定; 2. 重组质粒 *Bam*H I 酶切鉴定.

图 5 pET-khc 表达载体的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pET-khc by *Kpn* I and *Bam*H I



注: 0 h. 诱导前总蛋白; 4 h. 诱导 4h 后总蛋白; S. 诱导后上清中蛋白; P. 诱导后沉淀中蛋白

图 6 AtOvKLP cDNA 序列在原核细胞中的诱导表达

Fig. 6 The expression of AtOvKLP cDNA sequence in *E. coli*.

3 讨论

序列分析表明 AtOvKLP 具有 KHC 动蛋白亚家族的特性, 其 ATP 结合位点序列与其它大多数动蛋白 ATP 结合位点序列不完全一致, 这是否与 AtOvKLP 具有的特有功能有关还需进一步的研究. 此外, 各物种 KHC 亚家族类动蛋白同源性较

高, 是否与高等植物某些特有的功能相关, 也需进一步的探讨.

本研究中采用大肠杆菌作为体外表达系统在 AtOvKLP 蛋白体外生化活性方面做了初步探索. 通过大肠杆菌使 *AtOvKLP* 基因得到大量表达, 但是如结果所示, 目的蛋白主要集中分布于沉淀中, 仅有微量目的蛋白分布在上清中. 产生这种现象的根

本原因可能是由于目的产物的过量表达,而使产生的大量蛋白来不及正确折叠,以致形成不溶解的包涵体^[1]。因此,若要在上清中获得目的蛋白,就要对诱导表达的条件及蛋白纯化的方法进行改进,获得具有体外活性的蛋白。

参考文献

- [1] 翟中和,王喜忠,丁明孝,等.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,2004:318-342
- [2] Vale R D, Fletterick R J. The design plan of kinesin motors [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 745-777
- [3] Brady S. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor motor [J]. *Nature*, 1985, 317: 73-75
- [4] 王海庆. 拟南芥动蛋白基因 AtKPI 的克隆和表达[D]. 北京: 中国农业大学, 2002
- [5] Folkers U, Kirik V, Schobinger U, et al. The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton [J]. *EMBO*, 2002, 21 (6): 1280-1288
- [6] Liu B, Ju L, Lee Y R. Kinesin related protein in plant cytokinesis [J]. *Plant Growth Regul*, 2001, 20(2): 141-150
- [7] Reddy A S N, Day I. Kinesin in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes [J]. *BMC Genomics*, 2001, 2(1): 2-14
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 733-806
- [9] 侯路珍,刘发央,谢小冬. 萝卜抗菌肽基因 AFP 的克隆及其在大肠杆菌中的诱导表达 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(3): 245-248
- [10] Bollag D M, Rozycki M D, Edelstein S J. *Protein Methods* [M]. 2nd eds. USA: Wiley-Liss Publishers, 1996: 107-128
- [11] 邝爱丽,陈圆圆,彭志峰,等. 包涵体的形成原因及其处理方法 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2009, (1): 62-63
- (责任编辑 李 辛)
-
- (上接第144页)
- [6] 李仁年,王浩,苏吉鑫,等. 旋风分离器内部流场及分离效率的数值仿真 [J]. *兰州理工大学学报*, 2007, 33(2): 50-53
- [7] 王福军. 计算流体动力学分析 CFD 软件原理与应用 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2004
- [8] 韩占忠,王敬,兰小平. *FLUENT 流体工程仿真计算实例与应用* [M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2004
- [9] 王瑞金,张凯,王刚. *FLUENT 技术基础与应用实例* [M]. 北京: 清华大学出版社, 2007
- [10] 杨静,魏宏安,张得俭,等. 5PZX-2600 型啤酒花清洗机的结构与性能试验 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2006, 41(3): 122-126
- [11] Yoshida H, Fukui K, Yoshida K. Particle separation by Inoya's type gas cyclone [J]. *Power Technology*, 2001, 118: 16-23
- [12] Hoffmann A C, De Groot M, Hospers A. The effect of the dust collection system on the flow pattern and separation efficiency of a gas cyclone [J]. *Can J Chem Eng*, 1996, 74: 464-470
- [13] Reitz P. Investigations on a particular yield mapping system for combine harvesters [J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 1996, 14(2,3): 137-150
- (责任编辑 李 辛)