

软克里藻生长素合成关键酶TAA1初步功能研究

艾玉, 张振华, 郑玉玉, 钟伯坚, 朱自强*

南京师范大学生命科学学院, 南京210023

摘要: 生长素是一类重要的内源植物激素, 在植物的生长发育过程中起重要作用。植物生长素的合成及信号转导机制目前已研究得比较清楚, 但其起源仍存在争议。吲哚-3-丙酮酸途径是植物生长素合成的主要途径之一, TAA1和YUCCA是该途径中的两类关键酶, 也常被作为生长素合成起源的研究线索。轮藻门是植物从水生到陆生登陆过程中的关键类群, 轮藻门的软克里藻(*Klebsormidium flaccidum*)已经完成了全基因组测序, 其基因组数据为研究生长素合成是否起源于轮藻提供了重要资源。本研究首先比对了软克里藻与其他植物物种间TAA1蛋白质氨基酸序列, 推测软克里藻TAA1蛋白(KfTAA1)可能具有催化色氨酸合成吲哚-3-丙酮酸的能力; 随后将*KfTAA1*过量表达在拟南芥*taa1*突变体(*wei8-2*)中, 观察KfTAA1是否可以回补*taa1*突变体的表型; 最后利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)蛋白表达纯化系统, 体外纯化了GST-KfTAA1融合蛋白。我们的初步研究结果显示KfTAA1不能回补拟南芥*taa1*突变体表型, 推测KfTAA1可能不具有催化吲哚-3-丙酮酸合成的活性。

关键词: 生长素; 起源; 软克里藻; *KfTAA1*

生长素是最先被报道的植物激素, 参与植物生长和发育的诸多过程, 如细胞分裂、伸长和分化, 顶端优势以及器官发育等。植物中有依赖色氨酸(tryptophan, Trp)和不依赖于色氨酸合成吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的两条信号途径(Tivendale等2014)。在依赖色氨酸途径下存在4条不同的生长素合成路径, 分别是吲哚-3-乙酰胺(indole-3-acetamide, IAM)途径、吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvic acid, IPyA)途径、色胺(tryptamine, TAM)途径以及吲哚-3-乙醛肟(indole-3-acetaldoxime, IAox)途径。其中吲哚-3-丙酮酸途径是最主要的途径, 色氨酸转氨酶(TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1, TAA1)催化L-Trp形成吲哚-3-丙酮酸, 进而被核黄素单加氧酶(flavin monooxygenase) YUCCA催化形成IAA (Cohen等2003; Strader和Bartel 2008; Sugawara等2009; Zhao 2010; Mashiguchi等2011; Won等2011)。

生长素合成信号通路在高等植物中已研究得很透彻, 但植物生长素合成的起源至今仍有争议。目前已有研究证明, 植物生长素的合成最早起源于陆生苔藓植物, 藓类、角苔以及溪苔等部分苔类中可测得生长素的存在(Sztein等1995; Thomas等1983; Cooke等2002); 也有学者认为植物生长素的合成可能起源于进化位置更低的轮藻类植物。

500万年前的陆地环境十分恶劣, 只有细菌和真菌可以在陆地上生存。而丝状淡水轮藻类逐渐适应了干旱、强光、多变的温度和强紫外辐射等

非生物胁迫, 成功登陆并在陆生环境中繁衍生息。为了在陆地上生存, 植物需要更加复杂的信号通路和激素调控来应对多变的环境。现有的系统进化分析表明轮藻类中的双星藻纲是陆地植物的姐妹群, 并且轮藻类不是单系类群。目前轮藻类的软克里藻(*Klebsormidium flaccidum*)已经完成了全基因组测序, 其基因组数据为进一步研究植物从水生到陆生的转变提供了分子基础(Rensing 2018)。尽管轮藻与陆生植物相比形态差异巨大, 但对轮藻叶绿体和线粒体基因组序列进行系统发生分析, 发现轮藻是最接近陆生植物的水生植物(Turmel等2002; Civián等2014); 此外, 基于轮藻的转录组分析发现陆生植物细胞壁的合成机制起源于轮藻(Mikkelsen等2014)。Hori等(2014)对比轮藻与陆生植物的基因组序列, 发现软克里藻存在生长素、茉莉酸、脱落酸、水杨酸以及细胞分裂素的激素信号通路的同源蛋白, 并具有高等植物的一些激素响应系统, 因此推测软克里藻具有合成生长素的能力。

TAA1和YUCCA蛋白常被作为研究生长素合成起源的线索。Yue等(2014)对TAA1和YUCCA蛋白进行系统发生分析, 认为陆生植物编码YUCCA蛋白的基因可能来源于细菌, 植物获得合成生长

收稿 2018-07-03 修定 2018-08-18

资助 江苏高校优势学科建设工程。

致谢 南京师范大学韩管助教授对本课题的建议。

* 通讯作者(zqzhu@njnu.edu.cn)。

素的能力可能是与微生物互作的结果;另一方面,他们没有在轮藻中找到TAA1和YUCCA蛋白的同源物,因此他们认为生长素合成起源于陆生植物,而不是轮藻。

Wang等(2014)对软克里藻的全基因组进行分析,发现软克里藻蛋白序列kfl00051_0080和kfl-00109_0340分别与拟南芥TAA1和YUCCA蛋白十分相似。并且,他们通过构建TAA1蛋白系统发生树,证明了软克里藻kfl00051_0080蛋白与陆生植物的TAA1同源蛋白属于一个家族,因此推测生长素合成可能起源于轮藻。但这个推测也遭受部分学者的质疑,如Huang等(2014)认为目前没有充分的实验能够证明轮藻中含有有功能的TAA和YUCCA蛋白。

Turnaev等(2015)对软克里藻kfl00051_0080序列进行结构和系统发育分析,认为软克里藻kfl00051_0080序列编码的蛋白其功能不同于陆生植物,即认为植物生长素合成不起源于轮藻。而Wang等(2016)认为Turnaev等(2015)研究人员构建的系统发育树是无根树,没有同源物种作为外群,所以结果不具有真实性。

Ju等(2015)对5种具有代表性的轮藻进行转录组分析,除软克里藻外,其他4种轮藻均不含有TAA1同源基因。而Ke等(2015)认为Ju等(2015)没有在轮藻的其他4个种内发现TAA1同源序列,并不意味着它们不存在TAA1基因;此外,他们通过对比软克里藻TAA1蛋白(KfTAA1)和拟南芥TAA1蛋白的模拟三维结构,发现KfTAA1蛋白三维结构的活性位点与拟南芥TAA1蛋白相似,推测KfTAA1蛋白还是可能具有拟南芥TAA1蛋白的功能的。

本研究以KfTAA1为研究对象,通过转基因回补的方法初步研究了轮藻TAA1是否具有合成生长素的能力,为今后进一步深入研究KfTAA1蛋白功能及生长素起源提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中使用的拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]突变体材料为wei8-2,购自Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (N16408)。实验中所用的大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers]菌株DH5 α 、BL21热激感受态细胞购自

南京伟沃生物科技有限公司;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend)菌株GV3101和克隆载体pGEX-5X-1、pEGAD由本实验室保存。

1.2 拟南芥总RNA提取和第一链cDNA合成

拟南芥RNA提取所用TRIzol试剂购自Invitrogen公司,使用DeNovix DS-11超微量分光光度计检测提取的RNA质量和浓度。拟南芥cDNA的合成参照PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa)使用说明书进行。

1.3 氨基酸序列多重比对

软克里藻[*Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell]已经完成全基因组测序。用KfTAA1蛋白序列在拟南芥、小立碗藓[*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.]和地钱(*Marchantia polymorpha* L.)的基因组中分别用BLASTP程序(Altschul等1997)进行序列同源性的比较,同源性的可靠性评价E-value阈值设置为较严格的 1×10^{-5} 。通过BLASTP搜索,本研究分别在拟南芥中找到了5条蛋白序列[AtTAA1 (At1g-70560)、AtTAR1 (At1g23320)、AtTAR2 (At4g-24670)、AtTAR3 (At1g34040)和AtTAR4 (At1g-34060)],小立碗藓中6条蛋白序列(Pp3c5_24670V3.1、Pp3c17_6500V3.1、Pp3c18_15140V3.1、Pp3c21_15370V3.1、Pp3c25_6670V3.1和Pp3c26_12520V3.1),以及地钱中2条蛋白序列(Mapoly0032s0124.1和Mapoly0023s0144.1)。将找到的蛋白序列用MEGA 6.0软件(Tamura等2013)进行序列同源性分析,并且使用Gblocks v0.9 (Castresana 2000)和DNAMAN软件(7.212版)进行保守位点的选取和高亮突出。

1.4 TAA1基因表达载体构建

KfTAA1编码序列(coding sequence)由苏州金唯智生物科技有限公司合成并克隆于pET-15b载体。以pET-15b-KfTAA1为模板,用含有BamHI酶切位点的上、下游引物(表1)特异性扩增KfTAA1编码序列,后用相同的内切酶对PCR产物进行酶切通过In-Fusion方法连入pEGAD表达载体。同样,用含有BamHI的上、下游引物(表1)从拟南芥cDNA中特异性扩增AtTAA1编码序列,也使用In-Fusion方法连入pEGAD表达载体。

以pET-15b-KfTAA1为模板,用分别含有EcoRI

表1 PCR扩增引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

引物名称	引物序列(5'→3')
pEGAD-AtTAA1-F	CGAGAAGCTTGGATCCGTGAAACTGGAGAAGCTCGAG
pEGAD-AtTAA1-R	TAGATCCGGTGGATCCAAGGTCAATGCTTTTAATGAG
pEGAD-KfTAA1-F	CGAGAAGCTTGGATCCATAGCTTTGCTCGGAAGCTG
pEGAD-KfTAA1-R	TAGATCCGGTGGATCCTGATTCCGGCAATGGTCTTC
pGEX-5X-1-AtTAA1-F	CCGGAATTCGTGAAACTGGAGAAGCTC
pGEX-5X-1-AtTAA1-R	ACGCGTCGACCTAAAGGTCAATGCTTTTA
pGEX-5X-1-KfTAA1-F	CCGGAATTCATAGCTTTGCTCGGAAGCTG
pGEX-5X-1-KfTAA1-R	ATAAGAATGCGGCCGCTGATTCCGGCAATGGTC

和*NotI*酶切位点的上、下游引物(表1)特异性扩增*KfTAA1*编码序列, 双酶切后连入pGEX-5X-1表达载体。用分别含有*EcoRI*和*SalI*酶切位点的上、下游引物(表1)特异性扩增*AtTAA1*编码序列, 双酶切后连入pGEX-5X-1表达载体。

1.5 农杆菌介导的拟南芥遗传转化

将表达载体pEGAD-*KfTAA1*、pEGAD-*AtTAA1*通过电激法导入农杆菌感受态细胞GV3101中, 随后在含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素和50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平的固体LB培养基上28°C倒置培养1~2 d, 长出单菌落。接种单菌落于3 mL含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素和50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平的液体LB培养基上30°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养24 h, 随后将3 mL菌液全部倒入150 mL含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素和50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平的液体LB培养基上30°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养30 h, 2 000 \times g离心10 min收集菌体。用重悬液(5%蔗糖和0.03% Silwet L-77)重悬菌体, 用OD₆₀₀值约为0.8的农杆菌菌液侵染4~5周龄的拟南芥未开花花蕾30 s, 黑暗放置24 h后, 将拟南芥植株置于温室光照条件下正常生长。

待拟南芥成熟后, 收取T1代种子, 播种于含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 草铵膦(glufosinate ammonium)的MS固体培养基上, 4°C放置3 d后, 转移至光照培养箱中生长7 d, 将具有抗性的拟南芥幼苗移入土中温室光照条件下生长。拟南芥幼苗在温室生长4周后, 剪取少量叶片, 进行蛋白质免疫印迹实验筛选能正常表达TAA1蛋白的植株。单株收取T1代能正常表达TAA1蛋白的植株的T2代种子, 并进行编号。实验中所用的转基因幼苗均为T2代植株。

1.6 根长测定

暗中生长3 d的拟南芥幼苗用解剖镜(Nikon)

拍照并用测量软件ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)对根长进行测量。用STATISTIC软件对实验数据进行单因子方差检验, 不同上标字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

1.7 蛋白质提取与免疫印迹

将收取的拟南芥材料迅速装入1.5 mL离心管中, 液氮预冷研磨, 加入75 μL 蛋白质提取液[50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)、150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟化钠、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正钒酸钠、10%甘油、0.1% Tween 20、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和1 \times Complete Protease Inhibitor], 涡旋振荡, 4°C、13 500 \times g离心5 min, 取60 μL 上清液, 放入新的离心管中, 加入15 μL 5 \times 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液(loading buffer), 于微量恒温器100°C煮2 min, 取10 μL 上样, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。

电泳结束后采用湿转装置将凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上。将NC膜取出置于含有5%脱脂奶粉的1 \times 含Tween 20的磷酸盐缓冲液(phosphatic buffered solution Tween, PBST)中, 在室温下封闭2 h后, 去除封闭液, 用1 \times PBST缓冲液漂洗10 min。加入兔抗绿色荧光蛋白(anti-green fluorescent protein, anti-GFP)多克隆抗体(1:1 000), 室温孵育2 h后, 用1 \times PBST溶液洗涤3次, 每次10 min。洗涤结束后, 加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG (1:2 500), 室温孵育1 h后, 用1 \times PBST溶液洗涤3次,

每次10 min。HRP发光试剂盒(TaKaRa)显色后,快速地将NC膜转移至全自动数码凝胶图像分析系统Tanon 4100中进行拍摄。

1.8 TAA1重组蛋白的诱导表达与纯化

将表达GST-AtTAA1和GST-KfTAA1质粒分别转化大肠杆菌BL21感受态细胞。挑取单菌落接种于3 mL LB培养基(含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素), 37°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养12 h。转移至新鲜100 mL LB培养基(含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素), 37°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养3 h。吸取1 mL菌液留做SDS-PAGE分析。随后加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 诱导培养3 h, 吸取1 mL菌液留做SDS-PAGE分析。

收集100 mL IPTG诱导培养3 h的细菌培养液, 4°C、1 300 $\times g$ 离心10 min, 用20 mL细胞裂解液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA和100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, pH 8.0)重悬菌体, 涡旋振荡, 于冰上进行超声波破碎(UP-250, 功率200 W, 冰浴下超声10 s, 每次间隔60 s, 10个循环)。在裂解液中加入终浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PMSF溶液、1% Triton X-100和125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶菌酶溶液于4°C冷室旋转混和2 h, 4°C、13 640 $\times g$ 离心15 min, 上清液用于蛋白纯化柱上样。上样前, 取洁净的蛋白纯化柱, 分别加入20 μL 谷胱甘肽琼脂糖凝胶(glutathione sepharose) 4B填料, 再用10 mL磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤一次。上样后, 4°C冷室旋转混和2 h, 蛋白与填料结合完毕后, 用10 mL PBS溶液洗涤5次, 最后用200 μL 洗脱缓冲液[50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)和10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽]分3次洗脱蛋白, 分管收集洗脱液, 完成蛋白纯化操作。SDS-PAGE鉴定蛋白纯度。

2 实验结果

2.1 KfTAA1与AtTAA1序列比对

过去研究表明, 拟南芥 $taa1$ 突变体($wei8-2$)中的AtTAA1蛋白没有酶活性, 是因为AtTAA1蛋白的第166位脯氨酸(P)突变成为了丝氨酸(S) (Stepanova等2008); 此外, AtTAA1蛋白的第171位甘氨酸(G)突变成为谷氨酸(E)以及第217位赖氨酸(K)突变成为丙氨酸(A)都会造成拟南芥AtTAA1蛋白失活(Stepanova等2008; Tao等2008; Yamada等2009); 当

AtTAA1蛋白的第217位K突变成G或者第250位G突变成S均会降低拟南芥在避荫条件下的生长率(Stepanova等2008; Tao等2008)。

把拟南芥、地钱和小立碗藓的基因组里的KfTAA1序列用BLASTP程序进行序列同源性的比较, 再用MEGA 6.0软件进行氨基酸序列同源性分析, 结果如图1所示, KfTAA1蛋白有着TAA1蛋白家族共同的结构特点: C端序列较保守, 都具有磷酸吡哆醛结合位点, 如第58位酪氨酸(Y)、第168位天冬酰胺(N)、第191位天冬氨酸(D)和第225位精氨酸(R); 以及色氨酸转氨酶活性位点, 如第166位P、第171位G和第217位K, 仅第250位G除外。结果说明, KfTAA1蛋白可能具有色氨酸转氨酶活性。

2.2 免疫印迹筛选转基因植株

前人报道乙烯抑制根伸长依赖于TAA1催化的生长素合成途径, $wei8-2$ 突变体表现出对乙烯特异性的根伸长不敏感反应(Stepanova等2008)。利用这一系统, 本研究首先将KfTAA1和AtTAA1编码序列分别构建到35S启动子驱动GFP融合蛋白表达载体pEGAD中(Culter等2000), 得到pEGAD-KfTAA1和pEGAD-AtTAA1表达载体, 并转入拟南芥 $wei8-2$ 中以观察KfTAA1是否可以回补拟南芥TAA1缺失的表型。提取叶片总蛋白进行蛋白质免疫印迹实验检测T2代植物中转基因的蛋白表达情况, 结果如图2所示, KfTAA1和AtTAA1均已在拟南芥中成功表达, 并分别得到4个不同的转基因株系用于后续研究。

2.3 转基因拟南芥的表型

随后对鉴定出成功表达外源蛋白的T2代KfTAA1/ $wei8-2$ 和AtTAA1/ $wei8-2$ 转基因拟南芥幼苗施加乙烯合成前体物质1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-amino-1-cyclopropanecarboxylic acid, ACC), 观察转基因幼苗的根对ACC是否敏感。

将不同处理的拟南芥幼苗于暗中生长3 d后, 测量其根长, 结果如图3所示, T2代KfTAA1/ $wei8-2$ 和AtTAA1/ $wei8-2$ 转基因拟南芥幼苗对0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC都有响应, 顶端弯钩加剧; AtTAA1/ $wei8-2$ 转基因拟南芥幼苗的根长在0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC处理下受到显著抑制, 说明AtTAA1蛋白的过表达恢复了 $wei8-2$ 对乙烯不敏感的表型; 而KfTAA1/ $wei8-2$ 转基因拟南芥幼苗的根在0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC处理下仍不敏感, 暗示KfTAA1可能在体内不具有功能。

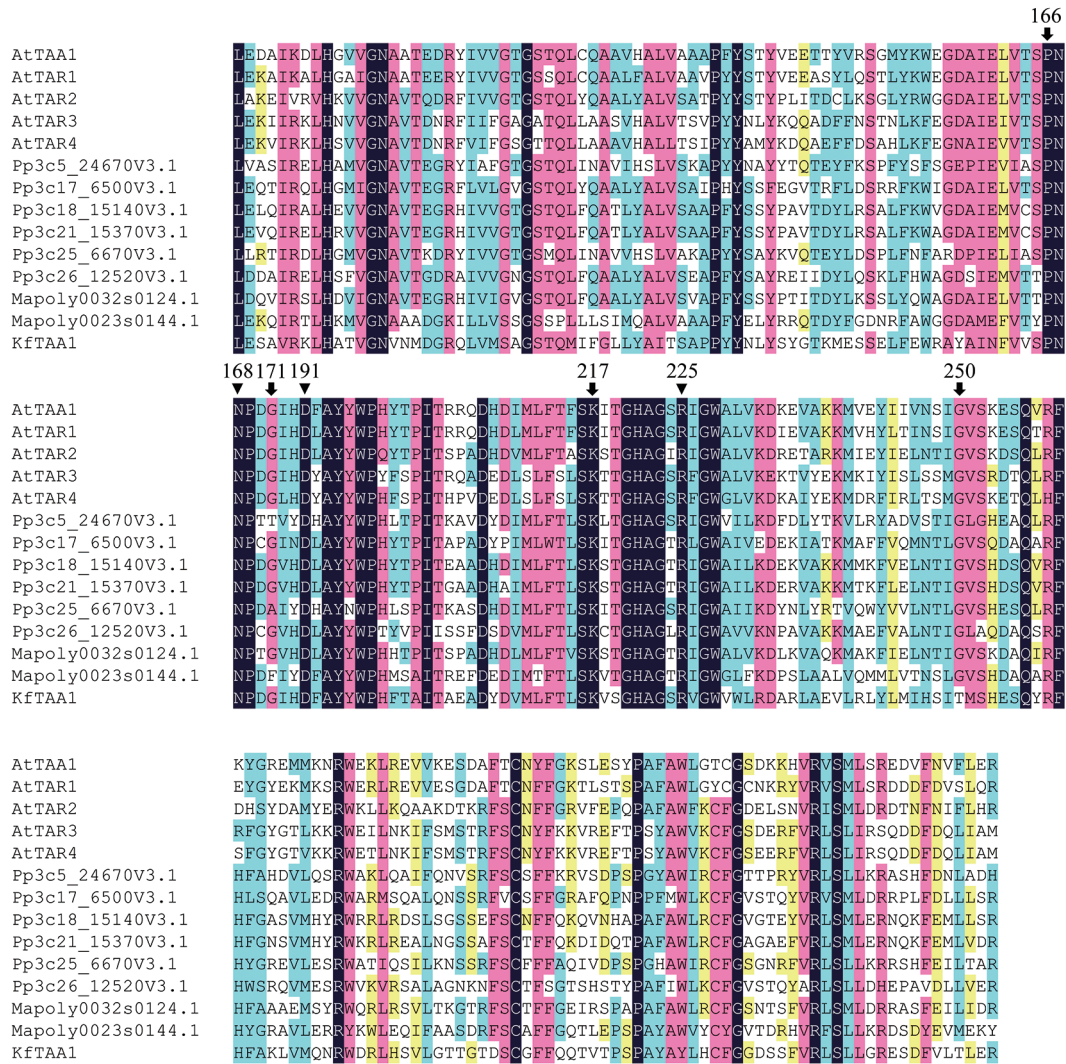


图1 不同物种中TAA1氨基酸序列比较

Fig.1 Amino acid sequence alignments of TAA1s in various species

三角形表示磷酸吡哆醛结合位点, 箭头表示色氨酸转氨酶活性位点。根据同源级别加亮显示, 其中黑色表示100%, 粉色表示 $\geq 75\%$, 蓝色表示 $\geq 50\%$, 黄色表示 $\geq 33\%$ 。蛋白名称前缀At表示来源于拟南芥, Pp表示来源于小立碗藓, Mapoly表示来源于地钱, Kf表示来源于软克里藻。

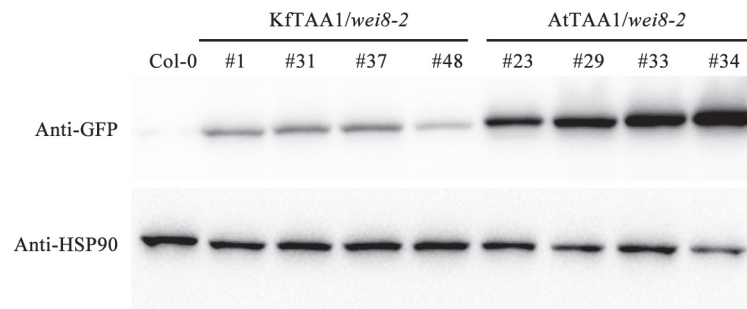
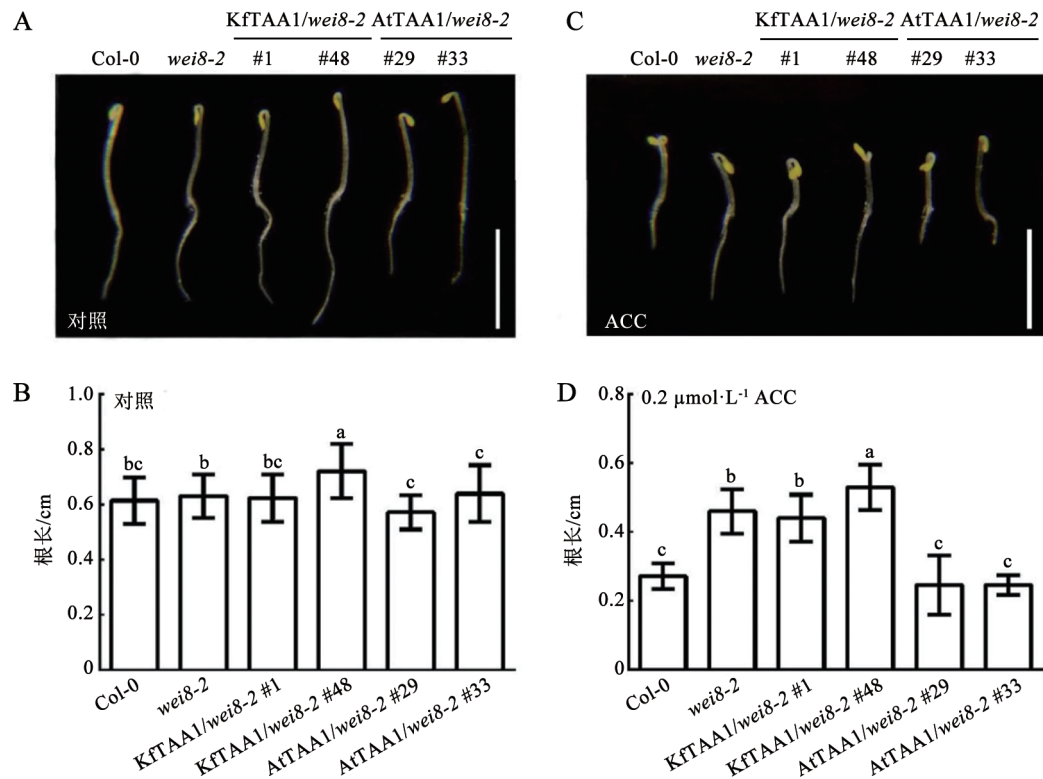


图2 蛋白质免疫印迹检测KfTAA1和AtTAA1蛋白在拟南芥中的表达结果

Fig.2 Detection of KfTAA1 and AtTAA1 in *A. thaliana* seedlings through western blot

图示与GFP融合的KfTAA1和AtTAA1蛋白在不同转基因株系中的蛋白表达情况, HSP90蛋白为内参。Anti-GFP为检测GFP融合蛋白所用的抗体, Anti-HSP90为检测HSP90蛋白的抗体。

图3 0.2 μmol·L⁻¹ ACC对拟南芥根长的影响Fig.3 Effect of 0.2 μmol·L⁻¹ ACC on root lengths of *A. thaliana* seedlings

不同遗传材料在正常MS培养基(对照, A和B)或添加有0.2 μmol·L⁻¹ ACC的MS培养基(C和D)上生长3 d的黄花苗根长表型。标尺代表0.5 cm长度。

2.4 KfTAA1基因原核表达及蛋白纯化

为今后深入研究KfTAA1的活性,本研究利用谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)标签纯化系统(GST自身可以作为阴性对照蛋白)将KfTAA1和AtTAA1分别在大肠杆菌中进行表达纯化。考马斯亮蓝染色结果见图4,在约74和69 kDa处各有一条纯化的蛋白条带,分别为GST-KfTAA1和GST-AtTAA1融合蛋白,说明KfTAA1和AtTAA1蛋白均已被成功表达纯化。

吲哚-3-丙酮酸是赖氨酸的吲哚-3-丙酮酸途径中生长素合成的前体物质。接下来的体外酶活实验将研究GST-KfTAA1蛋白是否具有催化色氨酸合成吲哚-3丙酮酸的能力,以进一步研究轮藻是否具有催化生长素合成的能力。

3 讨论

藻类独特的演化地位对于理解生命的起源与演化至关重要。植物由水生到陆生的演化需要获

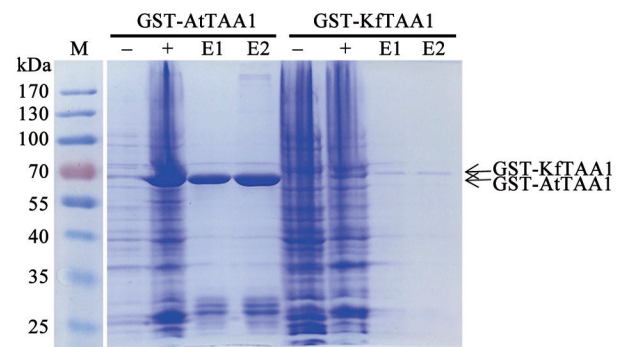


图4 GST-TAA1融合蛋白的纯化和鉴定

Fig.4 Purification and identification of TAA1-fusion protein

考马斯亮蓝染色显示蛋白纯化结果。泳道从左至右依次为: M (蛋白质分子量标准)、GST-AtTAA1蛋白在IPTG诱导前(-)和诱导后(+)的细菌总蛋白、两次洗脱产物(E1和E2)、GST-KfTAA1蛋白在IPTG诱导前(-)和诱导后(+)的细菌总蛋白以及两次洗脱产物(E1和E2)。

得更加复杂的信号调控网络以适应新环境。生长素在植物的生长发育过程中起着至关重要的作用,其在高等植物中的合成途径十分保守。轮藻在演

化地位上是最接近陆生植物的水生植物。轮藻是否具有合成生长素的能力是当今激素演化研究的热点之一。目前的研究热点集中于探讨轮藻中是否存在具有功能的TAA1基因以及轮藻是否具有合成生长素的能力,从而确定生长素的合成是否起源于轮藻。而轮藻中是否存在具有功能的TAA1基因,不应仅仅通过基因组分析、结构预测或系统发生关系分析,更应结合一系列实验手段加以研究。

本研究对比了软克里藻与拟南芥、地钱、小立碗藓的TAA1蛋白氨基酸序列,推测软克里藻的TAA1蛋白可能具有色氨酸转氨酶活性。我们通过转基因手段分别构建了KfTAA1和AtTAA1回补*wei8-2*突变体的转基因株系,并通过蛋白质免疫印迹实验筛选得到阳性表达的T2代转基因植株。但是本研究发现KfTAA1蛋白过表达不能恢复*wei8-2*植株对乙烯的不敏感性(图3),分析其原因可能是多方面的,一种可能是KfTAA1蛋白本身就没有色氨酸转氨酶活性,另一种可能是轮藻和拟南芥的亲缘关系较远,轮藻的TAA1可能不足以回补拟南芥*taa1*突变体表型。为进一步直接研究KfTAA1蛋白的活性,本研究已经纯化得到GST-KfTAA1融合蛋白,今后将开展KfTAA1的活性实验以深入研究软克里藻中TAA1的功能。

参考文献(References)

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25 (17): 3389–3402
- Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*, 17 (4): 540–552
- Civáň P, Foster PG, Embley MT, et al (2014). Analyses of charophyte chloroplast genomes help characterize the ancestral chloroplast genome of land plants. *Genome Biol Evol*, 6 (4): 897–911
- Cohen JD, Slovin JP, Hendrickson AM (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 8 (5): 197–199
- Cooke TJ, Poli DB, Sztein AE, et al (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol*, 49 (3–4): 319–338
- Cutler S, Ehrhardt D, Griffiths J, et al (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (7): 3718–3723
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, et al (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun*, 5: 3978
- Huang J, Yue J, Hu X (2014). Origin of plant auxin biosynthesis in charophyte algae: a reply to Wang *et al*. *Trends Plant Sci*, 19 (12): 743
- Ju C, Van de Poel B, Cooper ED, et al (2015). Conservation of ethylene as a plant hormone over 450 million years of evolution. *Nat Plants*, 1: 14004
- Ke M, Zheng Y, Zhu Z (2015). Rethinking the origin of auxin biosynthesis in plants. *Frontiers Plant Sci*, 6 (441): 1093
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, et al (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (45): 18512–18517
- Mikkelsen MD, Harholt J, Ulvskov P, et al (2014). Evidence for land plant cell wall biosynthetic mechanisms in charophyte green algae. *Ann Bot*, 114 (6): 1217–1236
- Rensing SA (2018). Great moments in evolution: the conquest of land by plants. *Curr Opin Plant Biol*, 42: 49–54
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, et al (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133: 177–191
- Strader LC, Bartel B (2008). A new path to auxin. *Nat Chem Biol*, 4 (6): 337–339
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, et al (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (13): 5430–5435
- Sztein AE, Cohen JD, Slovin JP, et al (1995). Auxin metabolism in representative land plants. *Am J Bot*, 82 (12): 1514–1521
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12): 2725–2729
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, et al (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133: 164–176
- Thomas RJ, Harrison MA, Taylor J, et al (1983). Endogenous auxin and ethylene in *Pellia* (Bryophyta). *Plant Physiol*, 73 (2): 395–397
- Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 19: 44–51
- Turmel M, Otis C, Lemieux C (2002). The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (17): 11275–11280
- Turnaev II, Gunbin KV, Afonnikov DA (2015). Plant auxin biosynthesis did not originate in charophytes. *Trends Plant Sci*, 20 (8): 463–465
- Wang C, Li SS, Han GZ (2016). Commentary: plant auxin

- biosynthesis did not originate in charophytes. *Frontiers Plant Sci*, 7: 158
- Wang C, Liu Y, Li SS, et al (2014). Origin of plant auxin biosynthesis in charophyte algae. *Trends Plant Sci*, 19 (12): 741–743
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, et al (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF *ARABIDOPSIS* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (45): 18518–18523
- Yamada M, Greenham K, Prigge MJ, et al (2009). The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol*, 151: 168–179
- Yue J, Hu X, Huang J (2014). Origin of plant auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 19 (12): 764–770
- Zhao Y (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 49–64

Preliminary study on the function of TAA1, a key enzyme in auxin biosynthesis, in *Klebsormidium flaccidum*

AI Yu, ZHANG Zhen-Hua, ZHENG Yu-Yu, ZHONG Bo-Jian, ZHU Zi-Qiang*

College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract: Auxin is an important plant hormone, which is indispensable for plant growth and development. Although the mechanisms for auxin biosynthesis and signaling have been extensively studied, the origin of auxin is still under debate. Indole-3-pyruvic acid (IPyA) pathway is the major route for auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. TAA1 and YUCCAs are two types of crucial enzymes participating in this pathway. Land plants evolve from a lineage of freshwater charophyte green algae, and that is why charophyte plants are critical species for understanding the evolutionary adaptation during plant landing. The genome of a charophyte *Klebsormidium flaccidum* has been completely sequenced, providing a useful resource for answering whether auxin biosynthesis origins from charophyte. Here we firstly made a sequence alignment of TAA1 amino acid sequences retrieved from different species, and found that KfTAA1 has conserved enzymatic reaction sites. Then we over-expressed *KfTAA1* in *A. thaliana* mutants (*wei8-2*) and found that over-expression of *KfTAA1* was not sufficient for complementation. Finally, we purified GST-KfTAA1 recombinant protein from *Escherichia coli* cells, which would be used for future enzymatic assays.

Key words: auxin; origin; *Klebsormidium flaccidum*; *KfTAA1*

Received 2018-07-03 Accepted 2018-08-18

This work was supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

*Corresponding author (zqzhu@nynu.edu.cn).