

烟草 *NtSKOR1* 基因的克隆及功能分析

高玉龙¹, 隋学艺¹, 王丙武¹, 宋中邦¹, 赵璐¹, 杨东升², 焦芳婵¹

(1 云南省烟草农业科学研究院, 昆明 650021; 2 云南省烟草公司昆明市石林分公司, 昆明 652200)

摘要: 该研究利用拟南芥 *AtSKOR* 蛋白序列, 通过 NCBI 的 Blast 搜索获得烟草 *NtSKOR1* 基因 CDS 序列。设计全长 CDS 扩增引物, 通过 RT-PCR 方法从栽培烟草中克隆得到 *NtSKOR1* 基因, 对其进行生物信息学、表达特性等分析, 并利用 CRISPR/Cas9 技术获得 *NtSKOR1* 的敲除材料。结果表明: (1) *NtSKOR1* 基因 CDS 由 2 466 bp 核苷酸组成, 编码 821 个氨基酸, 推测 *NtSKOR1* 蛋白等电点为 6.36, 分子量为 94.21 kD。(2) *NtSKOR1* 定位于细胞膜, 有 6 个跨膜区, 无信号肽序列; *NtSKOR1* 蛋白含有孔形成区(P)及锚定蛋白区(ANK)等典型 SKOR 类蛋白功能域。(3) 进化树分析表明, 烟草 *NtSKOR1* 蛋白与番茄和马铃薯的 SKOR 蛋白遗传距离最近, 与禾本科植物的 SKOR 蛋白遗传距离较远。(4) 组织特异性表达分析表明, *NtSKOR1* 基因主要在烟草根中表达, 其表达模式与拟南芥一致; 钾胁迫处理后, *NtSKOR1* 基因呈先降低后升高再降低的表达模式。(5) CRISPR/Cas9 敲除 *NtSKOR1* 基因, 烟草叶片钾含量显著降低, 表明 *NtSKOR1* 基因是控制烟叶钾离子的关键基因之一。该研究结果为解析烟草钾离子吸收转运的分子机制提供重要依据。

关键词: 烟草; *NtSKOR1*; 基因克隆; 功能分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Function Analysis of *NtSKOR1* in Tobacco

GAO Yulong¹, SUI Xueyi¹, WANG Bingwu¹, SONG Zhongbang¹,
ZHAO Lu¹, YANG Dongsheng², JIAO Fangchan¹

(1 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming 650021, China; 2 Shilin Branch of Kunming Branch of Yunnan Tobacco Company, Kunming 652200, China)

Abstract: In this study, the tobacco *NtSKOR1* gene that is homologous to *AtSKOR* gene in Arabidopsis was identified from tobacco via NCBI Blast and RT-PCR. The bioinformatics and expression characteristics of *NtSKOR1* were analyzed, and the knock out materials of *NtSKOR1* was obtained by CRISPR/Cas9 technology. The results showed that: (1) full length CDS of *NtSKOR1* was found to be 2 466 bp, encoding a sequence of 821 amino acid residues, and successfully cloned with gene specific primer pair by RT-PCR. The isoelectric point of this protein is 6.36 and the molecular weight is 94.21 kD. (2) The subcellular localization result of *NtSKOR1* showed that this gene was localized in cell membrane. Amino acid sequence analysis showed that this protein contains 6 trans-membrane structures, but with no signal peptide sequence. As a typical SKOR family protein, *NtSKOR1* is featured by pore-forming domain and ankyrin structural domains. (3) Phylogenetic analysis showed that *NtSKOR1* protein is close to SKOR proteins identified from tomato and potato, while is distant from the SKOR proteins of Gramineae species. (4) Tissue specific expression analysis showed that *NtSKOR1* was preferentially expressed in roots, which

收稿日期: 2020-09-15; 修改稿收到日期: 2020-12-03

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技计划重点项目(2019530000241006)

作者简介: 高玉龙(1976—), 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为烟草生物技术育种。E-mail: gyl3000@163.com

was in line with *AtSKOR1* expression pattern in Arabidopsis. After potassium stress treatment, the expression pattern of *NtSKOR1* showed a fluctuant trend. (5) CRISPR/Cas9-based genome editing of *NtSKOR1* significantly decreased the potassium content in the leave of transgenic lines, suggesting *NtSKOR1* gene is one of the key genes in controlling potassium content in tobacco leaves. Our results provided significant evidence of the molecular mechanism of potassium intake and transport in tobacco.

Key words: tobacco;*NtSKOR1*;gene cloning;functional analysis

钾是植物生长所必需的一种矿质营养元素之一,是植物体内含量最丰富的一价阳离子,参与植物细胞光合作用、气孔调节、蛋白质合成、氧化代谢和抗逆性等生理过程。在植物体内钾不足的情况下,钾被优先分配到生长旺盛的幼嫩组织及器官中。植物主要通过根部吸收钾。在植物体内钾以 K^+ 的形态存在。根吸收的 K^+ 很容易被转运到地上部,在植物体内也很容易从一个部位转移到其他部位,可以在植物体内被重复利用。

钾主要是通过钾离子通道或转运体蛋白进入植物体内并进行转运,植物具有庞大的钾离子转运系统。拟南芥钾离子转运系统至少有 35 个基因,其中 15 个属于钾离子通道基因,可以分为 3 类:Shaker 钾离子通道(Shaker K^+ channel)、TPK 通道(Tandem-Pore K^+ channels)和 Kir-like 通道(K^+ inward rectifier like channel)^[1-3]。SKOR(Stelar K^+ outward rectifying channel)属于 Shaker 钾离子通道家族,SKOR 主要在根中表达,当 K^+ 被吸收进入根中后,SKOR 通过中柱将 K^+ 转移到木质部, K^+ 随木质部汁液运往地上部,这可能是唯一对木质部汁液中 K^+ 分泌起作用的 Shaker K^+ 通道^[4-6]。此外,SKOR 还在木质部和花粉中表达。拟南芥 *AtSKOR* 基因受到外界钾离子浓度的调控,在维持细胞离子动态平衡和非生物胁迫方面起重要功能^[7-9]。有研究表明,SKOR 与 GORK(Guard cell outward rectifying K^+ channel)互作形成有功能的异聚外向整流通道^[10]。

钾被认为是烟草的品质元素,钾含量是评价烟叶品质优劣的重要指标之一。烟叶钾含量提高可以改善烟叶的组织结构,使烟叶结构细腻,而且还能提高烟叶外观色泽,使烟叶呈深橘黄色,香气足,吃味好,富有弹性和韧性,填充性增强。另外钾还可以增强烟叶糖类、色素类、芳香类物质的合成积累。中国烟叶钾含量显著低于津巴布韦、巴西等国外优质烟叶^[11],中国烟草钾含量还有较大提升空间。烟草 SKOR 基因调控钾含量的研究还未见报道,克隆烟草 SKOR 基因并研究其钾离子转运功能,对调控烟

草钾离子含量、培育高质量烟叶具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理方法

克隆基因及表达分析所用材料为烟草主栽品种‘云烟 87’。温室种植‘云烟 87’,白昼 16 h/8 h,温度 25 ℃/20 ℃,按每株 5 g 纯氮施入烟草专用复合肥(氮:磷:钾=10:10:15),分 5 次施入。生长至开花期,取根、茎、叶、花液氮冷冻后置于-80 ℃冰箱保存备用。另外,取生长整齐一致具 5~6 片叶的烟苗,用含 0.01 mmol/L K^+ 的霍格兰溶液水培处理,处理后 0、0.5、1、4、12、24 和 48 h 取根,液氮冷冻后置于-80 ℃冰箱保存备用。CRISPR/Cas9 编辑载体为 pHSE401^[12],农杆菌 C58C1,编辑材料为‘Coker176’。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 利用试剂盒 RNAiso Plus(TaKaRa)提取材料 RNA,按照操作说明进行。由微量紫外检测仪 Nano-Drop 检测 RNA 浓度。利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time, TaKaRa)将提取的 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 基因克隆 拟南芥 *AtSKOR*(NP_186934)蛋白提交 NCBI 烟草数据库,利用 Tblastn 程序进行搜索,获得烟草 SKOR1 基因同源序列。根据获得的烟草同源序列,设计扩增全长 CDS 序列引物 SKOR1F(ATGACGAGAGTAGCAGAGGA)和 SKOR1R(TCAAGTTGATTGATCATTGATC)。以‘云烟 87’的根 RNA 反转录的 cDNA 为模板克隆目的基因,反应在 Mastercycler® pro 扩增仪上进行,反应总体积 50 μL,包括 200 ng cDNA,5×Phusion HF 反应缓冲液 10 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,2 U 的 Phusion® High-Fidelity DNA 聚合酶,10 μmol/L 正反向引物各 1 μL,补水至 50 μL。扩增程序为:98 ℃预变性 30 s;98 ℃变性 7 s;58 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 60 s;35 个循环;72 ℃延伸 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶分离后回收纯化。纯化产物与 TOPO(Invitrogen)载体连接,连接程序为:

4 μ L 纯化产物、1 μ L 盐溶液、1 μ L PCR[®]-Blunt II-TOPO 混匀,25 $^{\circ}$ C 水浴 30 min;将连接好的载体通过热激转化大肠杆菌 DH5a,PCR 筛选阳性克隆并测序。

1.2.3 生物信息学分析 将克隆基因的 CDS 用 DNASTar 软件翻译蛋白质序列。利用在线工具 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)分析推测的蛋白理论等电点、分子量等。wolf pSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)预测蛋白质亚细胞定位。TMPred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)进行蛋白质跨膜结构域分析。SignalP-5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽。SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)软件预测蛋白的二级结构。ClustalX 软件对蛋白质序列进行多序列比对,然后用软件 MEGA-X 构建进化树。

1.2.4 基因表达分析 根据克隆的基因序列设计 qRT-PCR 引物 SKOR-QF (CGAGAGTAGCAG-AGGAAGTACTGG)和 SKOR-QR (AATTCTC-CGCGGAAACAAGT)。以烟草 *Actin* 基因作为内参,引物为 *Actin*-F(CTGAGGTCCTTTTCCAAC-CA)和 *Actin*-R (TACCCGGGAACATGGTAG-AG)。以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR,反应在 Roche LightCycler 480 上利用 LightCycler 480 SYBR Green I master 进行,20 μ L 体系含有 10 μ L LightCycler 480 SYBR Green I master(2 $\times$),正反引物各 1 μ L(10 μ mol/L),cDNA 1 μ L(反转录产物稀释 4 倍),7 μ L 灭菌蒸馏水。反应程序如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,45 个循环。荧光定量 PCR 结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算 *NtSKOR1* 基因的相对表达量。各处理设 3 个生物学重复,用 Excel 软件绘图。

1.2.5 CRISPR/Cas9 材料创制及分析 根据 *NtSKOR1* 基因组序列设计 CRISPR/Cas9 靶位点,即 GAGAGTAGCAGAGGAAGTACTGG,该靶位点位于第一外显子。根据靶位点设计靶位点引物 P1 (ATTGGAGAGTAGCAGAGGAAGTAC)和 P2 (AAACGTACTTCCTCTGCTACTCTC)。在靶位点两侧设计编辑材料的检测引物 SdF(TCCATCA-CACGAACTCTCCA)和 SdR(GAGAGCAAGAG-AGAGAGGAGT),扩增长度 475 bp。引物 P1/P2 通过退火形成互补 DNA oligo。利用 BsaI 酶切

pHSE401 载体,对酶切产物进行电泳检测分析,可见 1 200 bp 和 11 520 bp 两个条带,回收 11 520 bp 的酶切产物,利用 T₄ DNA 连接酶将所回收的大片段酶切产物与 DNA oligo 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,利用引物对 U6-26p F (TGTC-CCAGGATTAGAATGATTAGGC)和 P2 筛选阳性克隆,并进行测序验证。构建正确的克隆(pHSE401-SKOR1)转化农杆菌 C58C1,利用叶盘法转化‘Coker176’。

转化阳性植株移入小花盆,6 片叶左右提取 DNA,用引物对 SdF/SdR 进行扩增,扩增产物回收后用 SdF 测序,筛选突变单株留种(T₁)。种植 T₁ 代材料,苗期通过测序筛选纯合突变单株进行试验。突变体材料(15 株左右)及野生型材料种植于温室,试验条件同 1.1。现蕾期取上部叶(16~19 位叶),中部叶(9~11 位叶),下部叶(3~5 位叶),杀青后检测钾含量^[13]。

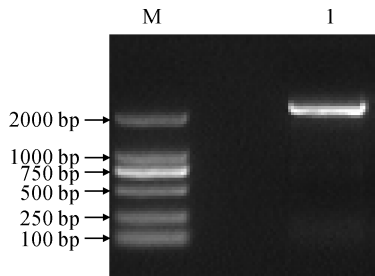
2 结果与分析

2.1 *NtSKOR1* 基因克隆及组织表达分析

拟南芥 *AtSKOR*(NP_186934)蛋白提交 NCBI 烟草数据库进行 Blast 搜索,获得烟草 *SKOR* 基因同源序列,设计引物 SKOR1F/ SKOR1R,以‘云烟 87’根部 cDNA 为模板进行 RT-PCR,扩增产物经电泳检测(图 1)。回收测序后获得 *NtSKOR1* 基因编码序列,由 2 466 bp 核苷酸组成。根据 *NtSKOR1* CDS 序列设计 q-PCR 引物,对 *NtSKOR1* 在根、茎、叶、花中的表达分析结果(图 2)表明,*NtSKOR1* 在根中表达量最高,其他组织中表达相对较低,其表达模式与拟南芥中 *SKOR* 基因类似^[4]。

2.2 *NtSKOR1* 蛋白分析

NtSKOR1 基因编码蛋白由 821 个氨基酸残基组成。ExPASy 预测 *NtSKOR1* 蛋白的理论等电点为 6.36,分子量为 94.21 kD。wolf pSORT 预测



M. DL2000;1. *NtSKOR1*

图 1 *NtSKOR1* 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR production of *NtSKOR1*

远,表明 SKOR 蛋白与物种间的亲缘关系密切相关。

2.3 低钾胁迫下 *NtSKOR1* 基因表达特征

突变 SKOR 基因后植株地上部钾离子浓度急剧减少,而根中钾离子浓度不受影响,所以推测 SKOR 蛋白负责将钾离子装载到木质部向上运输。为了研究烟草 *NtSKOR1* 基因受低钾胁迫的反应,利用 0.01 mmol/L 钾胁迫处理烟草,对 *NtSKOR1* 基因在烟草根部的表达进行分析(图 5),烟草 *NtSKOR1* 基因在胁迫处理初期显著降低,随后逐渐升高,随后又降低的表达模式。低钾胁迫可引起植物素 IAA 和 JA 等的变化^[14],*NtSKOR1* 在低钾胁迫下的表达模式可能是由于该基因的表达受植物激素调控的原因。

2.4 敲除 *NtSKOR1* 基因烟叶钾含量分析

在 *NtSKOR1* 基因第一外显子区设计敲除位点,构建了 *NtSKOR1* 基因敲除株系 *NtSKOR1*-CP,通过测序,发现其在敲除位点插入一个 A(图 6),导致该基因提前形成终止密码子。温室种植编辑

材料,现蕾期分别取上、中、下部叶片杀青后烘干,检测钾含量。与对照‘Coker176’相比,敲除株系上、中、下部叶片钾含量比对照分别下降 20.14%、28.72%和 24.18%(图 7),表明 *NtSKOR1* 基因可能参与了钾离子向木质部的装载。

3 讨 论

SKOR 属于外向整流的 Shaker 类钾离子通道家族^[3,4],在植物吸收钾离子的过程中发挥重要作用。植物吸收钾离子后主要通过 SKOR 蛋白转载进入木质部汁液,进而向地上部转运。1998 年拟南芥中 *AtSKOR* 基因被克隆鉴定^[4],敲除突变 *AtSKOR* 基因后拟南芥木质部汁液和拟南芥苗钾离子含量显著降低。

本研究克隆了烟草 *NtSKOR1* 同源基因,*NtSKOR1* 蛋白含有 6 个跨膜区,孔形成区及锚定蛋白区等 SKOR 类蛋白的保守域^[4,15]。进化分析表明,烟草 *NtSKOR1* 与茄科 SKOR 蛋白遗传距离较近,尤其与番茄和马铃薯 SKOR 蛋白最近,而禾本科植

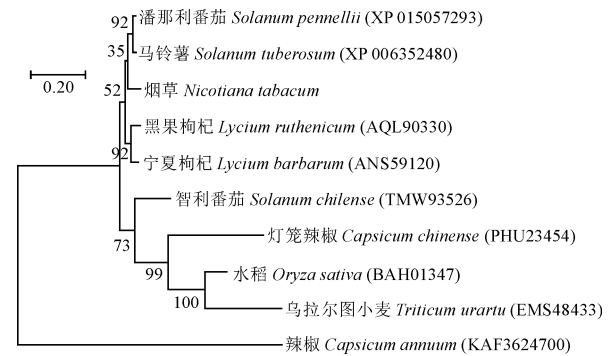
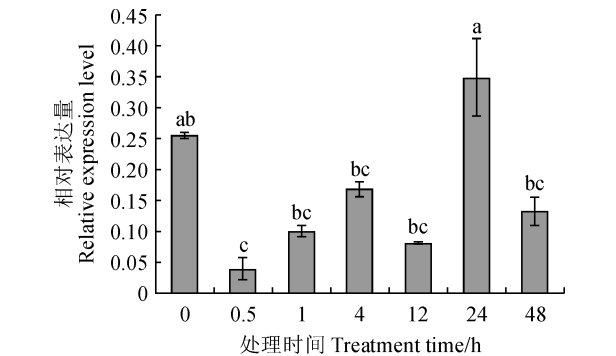
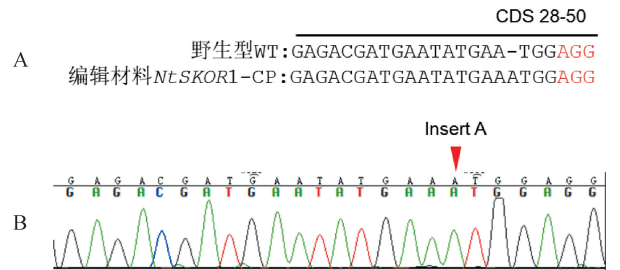


图 4 *NtSKOR1* 与其他作物同源蛋白进化树分析
Fig. 4 Phylogenetic tree of *NtSKOR1* and homologous proteins of other species



不同字母表示低钾处理不同时间显著差异, $P < 0.05$
图 5 *NtSKOR1* 基因低钾胁迫后表达分析
Different letters indicate significant differences among different time points of low potassium treatment, $P < 0.05$

Fig. 5 *NtSKOR1* gene expression under low potassium treatment



A. CRISPR/Cas9 编辑位点; B. 编辑材料测序结果
图 6 *NtSKOR1* 基因编辑位点和编辑材料测序结果
A. Editing sequence of CRISPR/Cas9; B. Sequencing results of editing plant

Fig. 6 Editing sequence of *NtSKOR1* and sequencing results of editing plant

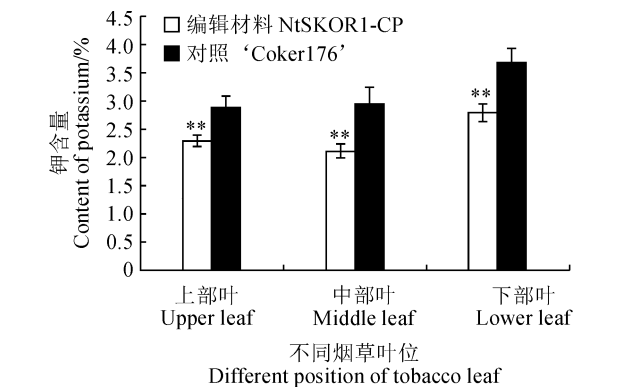


图 7 *NtSKOR1* 编辑材料烟叶钾含量
Fig. 7 Potassium content in leaf of *NtSKOR1* genome editing plants

物水稻和小麦 SKOR 蛋白聚为一个亚类,表明 SKOR 类蛋白在亲缘关系较近的物种间功能是保守的。组织特异性表达分析表明,*NtSKOR1* 主要在根部表达,与其他作物 SKOR 基因表达特性一致^[4,16-19],结合亚细胞预测其定位于细胞膜,推测该蛋白与拟南芥 SKOR 蛋白功能相似,负责钾离子在根部细胞向木质部汁液的转运。低钾处理后 *NtSKOR1* 基因呈现出先降低后升高再降低的表达模式,其他作物 SKOR 基因低钾处理后表达下调^[16,20]

参考文献:

[1] MÄSER P, THOMINE S, SCHROEDER J I, *et al.* Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(4): 1 646-1 667.

[2] VÉRY A A, SENTENAC H. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, **54**: 575-603.

[3] LEBAUDY A, VÉRY A A, SENTENAC H. K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions[J]. *FEBS Letters*, 2007, **581**(12): 2 357-2 366.

[4] GAYMARD F, PILOT G, LACOMBE B, *et al.* Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap[J]. *Cell*, 1998, **94**(5): 647-655.

[5] LIU K, LI L G, LUAN S. Intracellular K⁺ sensing of SKOR, a Shaker-type K⁺ channel from *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2006, **46**(2): 260-268.

[6] WEGNER L H, DE BOER A H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K⁺ homeostasis and long-distance signaling[J]. *Plant Physiology*, 1997, **115**(4): 1 707-1 719.

[7] SHARMA T, DREYER I, RIEDELSBERGER J. The role of K⁺ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, **4**: 224. DOI:10.3389/fpls.2013.00224.

[8] JOHANSSON I, WULFETANGE K, PORÉE F, *et al.* External K⁺ modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel SKOR via an unusual mechanism [J]. *The Plant Journal*, 2006, **46**(2): 269-281.

[9] ADAMS E, SHIN R. Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, **56**(3): 231-249.

[10] DREYER I, PORÉE F, SCHNEIDER A, *et al.* Assembly of plant shaker-like k_{out} channels requires two distinct sites of the channel α -subunit[J]. *Biophysical Journal*, 2004, **87**(2): 858-872.

[11] 尹启生, 陈江华, 王信民, 等. 2002 年度全国烟叶质量评价分析[J]. 中国烟草学报, 2003, **9**(z1): 59-70.

YIN Q S, CHEN J H, WANG X M, *et al.* The quality evaluation of leaf tobacco in China in 2002[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2003, **9**(z1): 59-70.

的表达模式有差异,可能烟草 *NtSKOR1* 基因在调节钾离子平衡方面存在其独特的机制,也可能该基因的表达受植物激素的调控所致。为了研究 *NtSKOR1* 在烟草钾离子平衡中的功能,构建了其 CRISPR/Cas9 植株。敲除植株叶片钾含量比对照显著降低,证明 *NtSKOR1* 基因可能在钾离子从根部向木质部转运中发挥重要功能。本研究结果可为探索烟草钾离子从根部向地上部转运提供借鉴,具体的机制还需要进一步研究。

[12] XING H L, DONG L, WANG Z P, *et al.* A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, **14**: 327.

[13] 樊文强, 孙鑫, 杨爱国, 等. 基于关联分析发掘烟草高钾优异等位变异[J]. 中国烟草学报, 2016, **22**(2): 100-107.

FAN W Q, SUN X, YANG A G, *et al.* Exploring high-potassium favorable allele mutation of tobacco based on genome-wide association analysis[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2016, **22**(2): 100-107.

[14] ARMENGAUD P, BREITLING R, AMTMANN A. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling[J]. *Plant Physiology*, 2004, **136**(1): 2 556-2 576.

[15] JEGLA T, BUSEY G, ASSMANN S M. Evolution and structural characteristics of plant voltage-gated K⁺ channels [J]. *The Plant Cell*, 2018, **30**(12): 2 898-2 909.

[16] HUANG L T, ZHAO L N, GAO L W, *et al.* Constitutive expression of CmSKOR, an outward K⁺ channel gene from melon, in *Arabidopsis thaliana* involved in saline tolerance [J]. *Plant Science*, 2018, **274**: 492-502.

[17] ACHE P, BECKER D, IVASHIKINA N, *et al.* GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel [J]. *FEBS Letters*, 2000, **486**(2): 93-98.

[18] HOSY E, VAVASSEUR A, MOULINE K, *et al.* The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**(9): 5 549-5 554.

[19] KIM H Y, CHOI E H, MIN M K, *et al.* Differential gene expression of two outward-rectifying shaker-like potassium channels OsSKOR and OsGORK in rice [J]. *Journal of Plant Biology*, 2015, **58**(4): 230-235.

[20] HU J, MA Q, KUMAR T, *et al.* ZxSKOR is important for salinity and drought tolerance of *Zygophyllum xanthoxylum* by maintaining K⁺ homeostasis[J]. *Plant Growth Regulation*, 2016, **80**(2): 195-205.