

邹禹,刘园园,张培江,等. 水稻富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 OsRPK1 响应外源生长素的作用研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):46-51. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.010

水稻富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 OsRPK1 响应外源生长素的作用研究

邹禹¹, 刘园园², 张培江¹, 钱宝云¹, 张炜²

(1. 安徽省农业科学院水稻研究所,安徽合肥 210031; 2. 南京农业大学生命科学院,江苏南京 210095)

摘要:为明确水稻富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 OsRPK1 响应外源生长素的作用机制,首先分析外源生长素 2,4-D 对 OsRPK1 转基因水稻根部表型的影响;其次,异源表达 OsRPK1 胞外富亮氨酸重复 LRRs,检测 H³-IAA 竞争结合融合蛋白 GST-LRRs 后的放射性活度以及利用等温滴定量热(ITC)法分析 IAA 与融合蛋白 GST-LRRs 相互作用的微热量变化。结果表明,在正常生长条件下,OsRPK1 过表达能够抑制水稻侧根的生长;0.01 μmol/L 2,4-D 处理 4 d 后发现,OsRPK1 抑制表达植株侧根的数量比野生型多 112% (P < 0.01),而 OsRPK1 过表达植株侧根生长受到极显著抑制(P < 0.001);0.1 μmol/L 2,4-D 处理 10 d 后,抑制表达植株不定根的数量相对于野生型多 18.2% (P < 0.05),而过表达植株不定根的生长受到显著抑制(P < 0.01);大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达获得了包涵体形式的 GST-LRRs 融合蛋白,通过复性、纯化获得可溶性融合蛋白;H³-IAA 竞争结合融合蛋白 GST-LRRs 以及 IAA 溶液滴定融合蛋白的微热量分析都表明 OsRPK1 与外源生长素未发生直接作用。

关键词:水稻富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 OsRPK1;原核表达;外源生长素;融合蛋白 GST-LRRs

中图分类号:S511.01;Q55 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)08-0046-06

植物类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLKs)是一类包含胞外结构域(extracellular domain)、单次跨膜域(single-pass transmembran domain)和胞内激酶域(cytoplasmic protein kinase domain)的蛋白分子^[1]。在植物中类受体蛋白激酶家族非常庞大,拟南芥中至少有 610 个成员,水稻中几乎是拟南芥的 2 倍,其中胞外富亮氨酸重复类受体蛋白激酶(leucine-rich repeat receptor like protein kinase, LRR-RLKs)是植物类受体蛋白激酶家族中数量最大的亚族,该亚族在拟南芥中发现了 239 个成员,水稻中有 309 个成员,并在植物生长发育、激素信号转导以及抗逆胁迫中发挥重

要作用^[2]。在植物长期进化过程中 LRR-RLKs 的胞内激酶域保守性较高,而胞外 LRRs 具有特异性,如 LRRs 基序的数量、长度及位置存在差异性,这可能是赋予 LRR-RLKs 识别不同胞外信号或配体,通过跨膜域将信号传递至胞内,引起细胞的生理生化反应。

鉴定 LRR-RLKs 胞外 LRRs 识别的配体对于充分理解该类激酶的生物学功能具有重要的意义,但目前为止,只有少数植物 LRR-RLKs 的配体是明确的。现已发现的这些配体包括内源或外源的肽类和小分子激素,LRR-RLKs 通过胞外 LRRs 识别配体,继而调节植物的生长发育、免疫等,更好地适应体内外环境的变化^[3-4]。如水稻受体蛋白激酶基因 Xa21 是白叶枯病广谱抗性基因,胞外 23 个 LRRs 识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的病程识别蛋白,诱导 Xa21 胞内激酶自磷酸化,产生一系列细胞反应,提高水稻对白叶枯病的抗性^[5-6]。油菜素内酯(brassinosteroid, BR)受体 BRII(brassinosteroid-insensitive 1)胞外的 LRRs 能形成岛状结构,该结构对识别 BR 具有重要的作用。BAK1(BRI-associated kinase 1)也是一个 LRR 型受体蛋白激酶,膜外含有亮氨酸拉链,5 个 LRRs 和 1 个富含脯氨酸的结构域,大量试验已证明 BAK1 与 BRII 形成异源二聚

收稿日期:2018-12-05

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0101801);国家自然科学基金(编号:31701409);安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL63);安徽省农业科学院学科建设项目(编号:17A0101)。

作者简介:邹禹(1986—),男,安徽安庆人,博士,助理研究员,主要从事水稻基因功能解析及分子育种。Tel: (0551) 62160151; E-mail: zouyu0308@126.com。

通信作者:张炜,博士,教授,主要从事植物蛋白质组学研究。Tel: (025)84399572; E-mail: wzhang@njau.edu.cn。

[5] Mekeown - Longo P J, Higgins P J. Integration of canonical and noncanonical pathways in TLR4 signaling: complex regulation of the wound repair program[J]. Advances in Wound Care, 2017, 6(10): 320-329.

[6] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002.

[7] 丁咚,刘铮铸,李蕴玉,等. 罗斯 308 鸡 IL-2 基因的克隆及生

物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015,12(23):90-94,314.

[8] 周蕾,顾建新. N-糖基化位点鉴定方法和非经典 N-糖基化序列[J]. 生命科学,2011,23(6):605-611.

[9] 阮班军,代鹏,王伟,等. 蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(7):1027-1037.

[10] 韦薇,项金忠,罗建辉. 真核细胞表达重组蛋白糖基化研究与评价[J]. 中国新药杂志,2014,23(15):1743-1748.

体,作为 BR1 受体伴侣参与 BR 信号转导^[7-9],所以 BR 是 BR1 的配体。FLS2 是植物抗菌免疫至关重要的 LRR - RLKs,胞外含有 28 个 LRRs 能够识别配体细菌鞭毛蛋白(flagellin) N 端保守的 22 个氨基酸(Flg22),使植物产生防卫反应^[10-11]。CLV3 是一个调控拟南芥茎顶端分生区发育的多肽配体,能够与受体 CLV1(胞外富含 LRRs 的受体蛋白激酶)、CLV2(胞外含有 LRRs,但胞内不含激酶域)、RPK2(receptor-like protein kinase 2)^[12-13]结合完成信号传递。最近我国科学家揭示了一类含有磺酸化修饰的 13 个氨基酸的小肽激素 RGF 是根分生组织生长因子,其受体是 5 个位于膜上的 LRR - RLKs RGFRs, RGFRs 识别 RGF 肽激素信号调控根干细胞,维持根的正常生长发育、形态建成以及向重力生长^[14]。为了更广泛地了解这类受体蛋白激酶,寻找这类蛋白激酶胞外 LRR 结合的配体还有大量工作需要完成。

生长素是调控植物生长发育重要的植物激素^[15],现研究最多的生长素受体是运输抑制剂响应蛋白(transport inhibitor resisrant 1, TIR1)和生长素结合蛋白(auxin binding protein, ABP1)。1997 年 Ruegger 等发现了 TIR1^[16],随后被证明确定为生长素受体蛋白^[17-18],但 TIR1 主要介导胞内的生长素信号转导。ABP1 可能参与胞外的细胞信号转导,在过去几十年中一直作为候选的生长素受体受到关注,最近研究在拟南芥中发现 2 个新的 *abp1* 突变体不显示任何明显的发育缺陷、生长素相关的生理反应以及影响生长素相关的基因表达,认为 ABP1 并不是拟南芥生长发育和生长素信号途径所必需的^[19],所以识别外源生长素的受体至今仍未发现。LRR - RLKs 的胞外 LRR 基序能够识别外源植物激素油菜素内酯 BR、胞内分泌性蛋白或肽类激素等,从而参与植物的生长发育和抗逆性。本研究前期利用蛋白质组学方法从水稻根部鉴定出一个新的具有激酶活性的富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 OsRPK1,主要受外源生长素 2,4 - D(2,4 - 二氯苯氧乙酸)和 IAA(吲哚乙酸)诱导表达,并且 OsRPK1 能影响部分生长素极性运输相关基因^[20]和部分生长素信号转导途径基因表达(数据未发布),而不影响生长素合成重要基因 *OsyUCCA1* 表达。为了进一步阐明 OsRPK1 参与外源生长素的作用机制,首先利用 OsRPK1 过表达与抑制表达转基因水稻观察对外源生长素敏感性以及侧根、不定根生长的影响;其次异源表达 OsRPK1 胞外 LRRs,在体外分析 OsRPK1 的 LRRs 是否识别及结合生长素,为进一步研究 OsRPK1 的可能配体以及参与的信号转导机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌感受态 DH5 α 、BL21(DE3)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,原核表达载体 pGEX - 4T - 1 为笔者所在实验室保存。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、高保真 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶、限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司,T₄ DNA 聚合酶购自新英格兰(NEB)公司,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自赛默飞世尔科技公司,蛋白 Marker 购自北京百泰克生物技术有限公司,GST 结合树脂购自金斯瑞生物科技有限公司,2,4 - D、IAA 购自 Sigma 公司,H³ - IAA 购自 American Radiolabeled Chemicals 公司。

日本晴(*Oryza. Sativa* L. spp. japonica cv. Nipponbare)水稻种子及 T₃ 代 *OsRPK1* 过表达株系 O1、O7 与抑制表达株系 A5、A7 种子由南京农业大学生命科学学院实验室保存。观察 *OsRPK1* 转基因植株与日本晴在外源生长素 2,4 - D 处理下的侧根和不定根的表型参照文献^[21 - 23],并稍有改动。选取籽粒饱满的日本晴和转基因水稻种子,除去稻壳、表面消毒杀菌后移入 1/2 MS 固体培养基中,待萌发后再分别移入含有 0、0.01、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 2,4 - D 的 1/2 MS 固体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱分别培养 4、10 d,其中光照度为 600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照条件为白天 14 h 和黑夜 10 h,相对湿度为 75%,对水稻侧根、不定根进行观察、拍照以及统计,采用 GraphPad Prism6.0 软件进行数据处理,以 *** ($P < 0.001$)、** ($P < 0.01$)、* ($P < 0.05$) 表示不同程度的差异显著性。

1.2 融合表达载体的构建

根据在线网站 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析水稻类受体蛋白激酶 OsRPK1(NCBI 登录号:XP_015640180)的蛋白质结构域,确定胞外富亮氨酸重复序列 LRRs 的位置并设计 2 条引物用于扩增该区域:上游引物 P1 - LRR - F: TAAGGATCCCAGACCAACGCCAGGACG(划线为 *Bam*H I 酶切位点),下游引物 P1 - LRR - R: TAAGCGGCCCGCCACCAAGAGCAACTGCCAAG(划线为 *Not* I 酶切位点),引物由上海英骏生物有限公司合成。水稻根部总 RNA 提取以及反转录合成 cDNA 参照 TaKaRa 产品说明书,利用高保真 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,循环扩增 35 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析后将目的片段回收、纯化,目的片段与 pGEX - 4T - 1 空载体分别用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,酶切产物回收后用 T₄ DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 4 h,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑取单菌落进行 PCR 扩增、酶切和测序验证。

1.3 富亮氨酸重复序列 LRRs 体外原核表达

将构建成功的 pGEX - LRRs 质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞,PCR 鉴定阳性克隆并接种于 5 mL LB(含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)新鲜液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{nm}} = 0.8$,加入终浓度为 0.8 mmol/L IPTG,摇床振荡诱导培养 4 h;吸取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 80 mL 磷酸缓冲液重悬后,再加入 20 μL 5 倍上样缓冲液混匀,沸水中处理 5 min 使蛋白变性。12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液于 12% 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)鉴定。

1.4 包涵体的复性和纯化

将活化的含有 pGEX - LRRs 质粒的 BL21(DE3)表达菌株按 1 : 100 接种于 1 L LB 新鲜液体培养基中(含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{nm}} = 0.8$,加入 0.8 mmol/L IPTG 后继续诱导培养 4 h,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体;弃上清液,加入 50 mL 缓冲液(含有 20 mmol/L Tris - HCl,500 mmol/L NaCl,pH 值为 8.5)重悬菌体,用超声裂解法破碎大肠杆菌,12 000 r/min 离心 15 min 收

集沉淀;用含有1% TritonX-100和2 mol/L尿素的缓冲液洗涤沉淀3次后,12 000 r/min离心15 min收集包涵体沉淀,用含有8 mol/L尿素和1 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)的缓冲液充分溶解包涵体沉淀,室温放置1 h,12 000 r/min离心15 min收集上清液;将上清液缓缓加入含有0.4 mol/L L-精氨酸和2 mmol/L DTT的缓冲液中,不断搅拌溶液直至沉淀溶解,4 ℃静置过夜,使得变性蛋白能够完全复性;12 000 r/min离心15 min,收集上清液。上清液装入透析袋中,利用磷酸缓冲液透析过夜去除复性液中的变性剂;复性后的蛋白液利用Sephacryl-S200柱纯化,冻干浓缩存于-80 ℃冰箱中待用。

1.5 融合蛋白 GST-LRRs 与外源生长素体外结合试验

吸取200 μL GST结合树脂于1.5 mL离心管中,磷酸缓冲液清洗6次后吸取10 μg GST-LRRs融合蛋白至GST结合树脂中,轻轻混匀,温室孵育3 h;磷酸缓冲液再清洗6次,除去未结合的融合蛋白;加入100 nmol/L H^3 -IAA于4组含有融合蛋白的GST树脂中,每组再依次加入0、0.1、1.0、10.0 μmol/L IAA,每组3次重复;用磷酸缓冲液补至体积为1 mL,置于室温孵育30 min;300 r/min离心1 min后,轻轻倒除磷酸缓冲液,用磷酸缓冲液清洗3次;加入100 μL ddH₂O重悬GST结合树脂后倒入5 mL离心管中,并用3 mL闪烁液冲洗GST结合树脂,收集GST结合树脂于5 mL离心管;避光置于温室1 h后用Beckman液闪仪读数。

1.6 等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)测定 GST-LRRs 和外源生长素相互作用

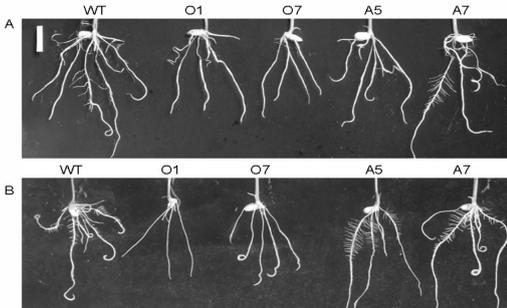
等温滴定量热试验采用MicroCal公司的VP-ITC进行测定,数据处理利用Origin 7.0软件,参照文献[24]。将1 mL 5 μmol/L GST-LRRs融合蛋白注入至样品池中,微量

滴定注射器吸取100 μL IAA溶液,以上溶液皆用pH值5.5磷酸缓冲液稀释配制;以1 mL pH值5.5磷酸缓冲液做参比,并注入参照池中。设置反应温度为20 ℃,将IAA溶液滴定到GST-LRRs融合蛋白溶液中,每次滴加10 μL,滴加次数共20次,平衡时间200 s,间隔300 s,搅拌速度为500 r/min。

2 结果与分析

2.1 外源生长素 2,4-D 处理后的 *OsRPK1* 转基因水稻根部表型分析

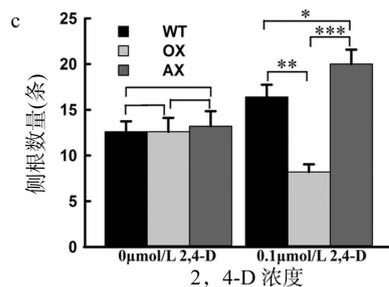
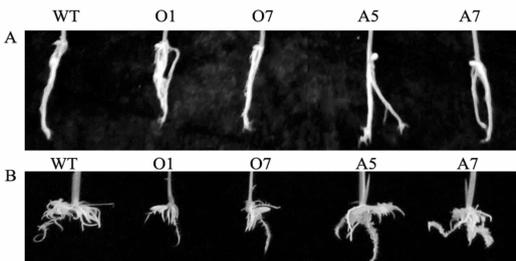
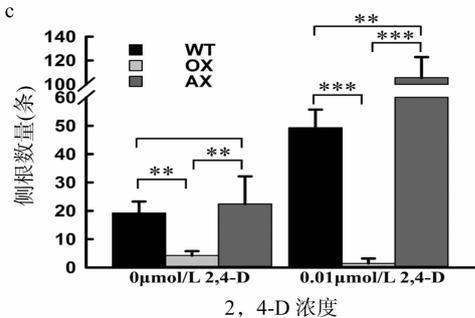
水稻萌发后移至1/2 MS固体培养基中生长4 d后,*OsRPK1*抑制表达植株AX(表示A5、A7)与野生型侧根数量无显著差异($P>0.05$),而*OsRPK1*过表达植株OX(表示O1、O7)的侧根数量相对于野生型显著减少($P<0.01$)(图1-A);生长10 d后,*OsRPK1*过表达植株OX、*OsRPK1*抑制表达植株AX和野生型的不定根数量基本一致(图2-A)。进一步观察0.01 μmol/L 2,4-D处理4 d以后的侧根变化,*OsRPK1*抑制表达植株AX侧根的数量比野生型多112%($P<0.01$)(图1-B),而*OsRPK1*过表达植株OX侧根的发生受到显著抑制($P<0.001$)(图1-C)。0.1 μmol/L 2,4-D处理10 d以后,抑制表达植株AX的不定根数量相对于野生型WT多18.2%,差异显著($P<0.05$)(图2-C),而过表达植株OX的不定根发生受到显著抑制,与野生型相比差异极显著($P<0.01$)(图2-C)。以上结果表明,在水稻中*OsRPK1*表达量的改变能影响水稻侧根的发生,外源生长素2,4-D处理情况下,*OsRPK1*负调控水稻侧根和不定根的发生,这暗示了*OsRPK1*可能参与生长素生理反应来调节水稻根部的生长发育。



数据以3次独立的重复试验结果统计(平均值±标准差),***表示差异水平为 $P<0.001$,**表示差异水平为 $P<0.01$,*表示差异水平为 $P<0.05$ 。图2同

A. 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株正常生长 4 d 后的根部表型; B. 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株经 0.01 μmol/L 2,4-D 处理 4 d 后的根部表型; C. 转基因植株和野生型侧根数量统计

图1 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株正常生长 4 d 后的侧根表型

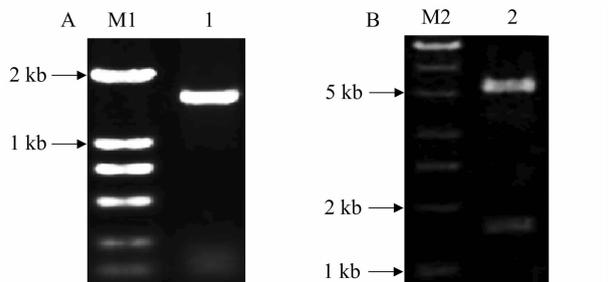


A. 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株正常生长 10 d 后的根部表型; B. 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株 0.1 μmol/L 2,4-D 处理 10 d 后的根部表型; C. 转基因植株和野生型不定根数量统计

图2 野生型和 *OsRPK1* 转基因植株正常生长 10 d 后的不定根表型

2.2 原核表达载体 pGEX-LRRs 的构建

设计特异性引物扩增 *OsRPK1* 胞外富亮氨酸重复序列 *LRRs*, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后显示大小为 1 600 bp 左右,与预期值 1598 bp 相符(图 3-A)。回收目的片段和原核表达载体 pGEX-4T-1,分别用 *Not* I 和 *Bam* H I 进行双酶切, T_4 连接酶连接后构建重组质粒 pGEX-LRRs, 重组质粒转化 DH5 α 菌株,筛选阳性单克隆后提取质粒进行 *Not* I 和 *Bam* H I 双酶切验证,酶切产物是 1 600 bp 左右的 *LRRs* 片段和 pGEX-4T-1 线性化载体,结果显示酶切产物大小与理论值相符(图 3-B)。阳性克隆进行 DNA 测序鉴定,测序结果与 NCBI 数据库中的序列一致,无碱基突变或缺失,说明 pGEX-LRRs 原核表达载体构建成功。

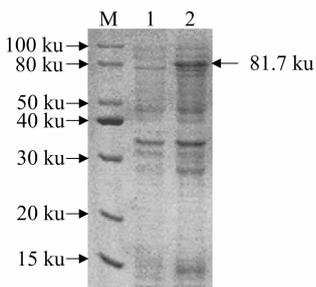


A. PCR 扩增 *OsRPK1-LRRs* B. pGEX-LRRs 重组质粒双酶切鉴定
M1、M2—DNA marker; 1—PCR 扩增 *OsRPK1-LRRs*;
2—双酶切质粒 pGEX-LRRs

图3 原核表达载体 pGEX-LRRs 的构建

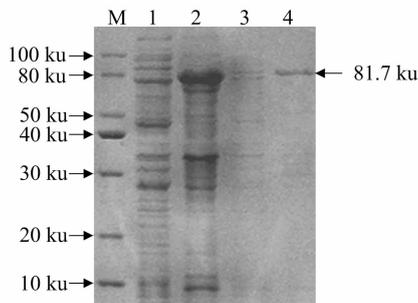
2.3 富亮氨酸重复序列 LRRs 体外原核表达

将重组质粒 pGEX-LRRs 转化 BL21(DE3) 菌株感受态,尝试在不同温度、不同浓度 IPTG 条件下诱导融合蛋白表达,选定 37 $^{\circ}$ C、0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 作为蛋白表达条件,表达得到的蛋白通过 SDS-PAGE 进行检测(图 4),第 1 泳道为未加 IPTG 诱导的阴性对照,2 泳道为加 0.1 mmol/L IPTG 诱导后的表达蛋白,且蛋白大小与目的蛋白大小(81.7 ku)相吻合,说明融合蛋白 GST-LRRs 在 BL21(DE3) 表达菌株中成功表达。进一步分析,如图 5 所示,1 泳道为 IPTG 诱导蛋白表达后菌液经离心收集的上清液,上清液里未检测到融合蛋白,说明 GST-LRRs 融合蛋白在大肠杆菌中以不溶性的、无活性的包涵体形式存在。为了得到有活性的可溶性融合蛋白,首先对其进行变性溶解,然后再将其复性,4 泳道是复性后获得的高纯度的 GST-LRRs 融合蛋白,此蛋白可以满足后续试验的要求。



M—蛋白 marker; 1—未用 IPTG 诱导的 GST-LRRs 融合蛋白表达; 2—0.1 mmol/L IPTG 诱导的 GST-LRR 融合蛋白表达

图4 0.1 mmol/L IPTG 诱导 GST-LRRs 融合蛋白在 BL21(DE3) 中原核表达

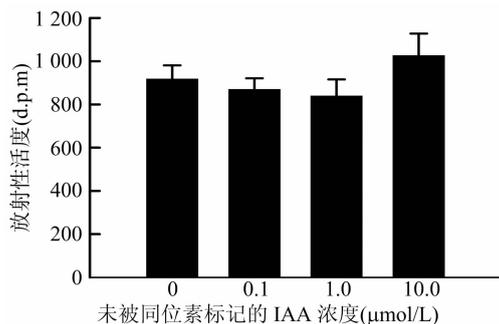


M—蛋白 marker; 1—IPTG 诱导的 GST-LRRs 融合蛋白表达的上清液; 2—IPTG 诱导的 GST-LRRs 融合蛋白表达的沉淀; 3—洗涤包涵体的上清液; 4—复性的 GST-LRRs 融合蛋白

图5 GST-LRRs 融合蛋白在 BL21(DE3) 中原核表达和复性

2.4 融合蛋白 GST-LRRs 与外源生长素相互作用分析

利用 100 nmol/L H^3 -IAA 和 0.1、1.0、10.0 μ mol/L 不同浓度的 IAA 竞争结合 10 μ g 融合蛋白 GST-LRRs,用磷酸缓冲液洗脱未被结合的 H^3 -IAA 和 IAA,Beckman 液闪仪读取与融合蛋白结合的 H^3 -IAA 放射性活度。结果如图 6 所示,只有 100 nmol/L H^3 -IAA 时,和 GST-LRRs 结合后,放射性活度测得为 918.6 d.p.m.,随着未被同位素标记的 IAA 浓度(0.1、1.0、10.0 μ mol/L)的递增与 100 nmol/L H^3 -IAA 竞争结合 GST-LRRs,放射性活度分别测得为 870.5、840.3、1 027.6 d.p.m.,IAA 竞争 H^3 -IAA 结合融合 GST-LRRs 后放射性活度无显著性差异($P > 0.05$),说明 IAA 竞争结合 GST-LRRs 也未改变 GST-LRRs 与 H^3 -IAA 的结合量,这些结果表明融合蛋白 GST-LRRs 未与生长素发生直接结合。



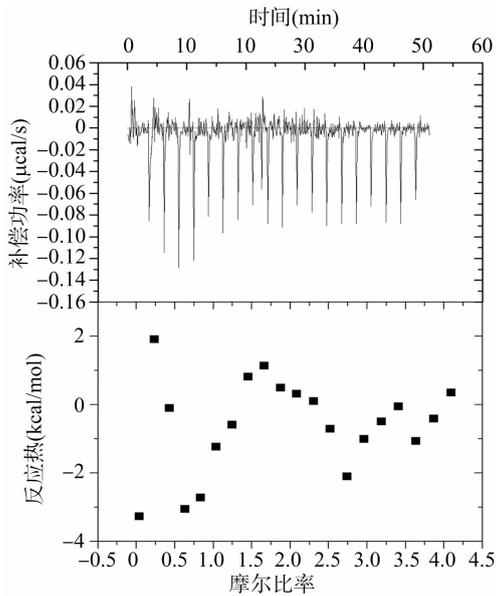
未被同位素标记的 IAA 浓度(μ mol/L)
d.p.m. 为液闪计数单位,数据以 3 次独立的重复试验结果统计(平均值 \pm 标准差)

图6 H^3 -IAA 与 IAA 体外竞争结合 GST-LRRs

等温滴定热 ITC 法通过类似化学滴定的方法,分析 2 个物质之间相互作用的微热量变化以研究分子相互作用,广泛用于检测蛋白质与小分子相互作用^[25-27]。图 7-A 显示的是连续等温线 5 μ mol/L IAA 溶液滴定至 100 μ mol/L GST-LRRs 融合蛋白溶液后的补偿功率变化。使用数据分析软件 Origin 7.0 对原始数据进行积分和标准化处理,如图 7-B 所示,得到反应热随摩尔比的变化函数图呈散点状,说明 IAA 不能结合 GST-LRRs 融合蛋白。ITC 法得到理想的试验数据,需要反应的亲和常数 K 值在 $10^3 \sim 10^8$,而 IAA 和 GST-LRRs 可能是由于两者的亲和常数太低,热量未被仪器检测到,从而得不到两者相互作用的信息。

3 结论与讨论

植物在不同生长发育阶段会受到外界环境胁迫和体内细



A. IAA 滴定到 GST-LRRs 融合蛋白溶液中补偿功率随时间变化的曲线; B. IAA 滴定到 GST-LRRs 融合蛋白溶液中反应热随摩尔比变化的曲线, $1 \text{ cal}=4.18 \text{ J}$

图7 等温滴定量热曲线

胞间信号的影响, LRR-RLKs 的胞外 LRR 结构域能够首先识别和接受来自胞外的信号, 通过跨膜结构域将胞外信号传递至胞内, 引起细胞的生理生化反应。OsRPK1 在前期被鉴定为一个新的具有激酶活性、定位于细胞膜的典型的 LRR-RLK, 并且分析 *OsRPK1* 在植物激素处理下的表达模式表明, *OsRPK1* 主要受生长素 2,4-D 和 IAA 诱导表达, 并且 2,4-D 诱导效果要比 IAA 稍显著^[20]。生长素是调节植物生长发育的一类重要的植物激素, 在植物根部发育过程中发挥重要作用^[28-29]。为了进一步研究 *OsRPK1* 与生长素的相关性, 鉴于 2,4-D 诱导 *OsRPK1* 表达的效果比 IAA 稍显著, 并且 2,4-D 化学性质也比 IAA 稳定, 所以本研究选用 2,4-D 作为外源生长素, 观察外源生长素对 *OsRPK1* 表达量改变后水稻根部表型的影响。

水稻根系主要由大量的不定根及侧根组成。外源生长素可促进侧根的发生, 但浓度过高则抑制侧根原基的露出, Zhang 等研究 2,4-D 对水稻侧根长度的影响, 利用不同浓度的 2,4-D 处理野生型和 *OsWRKY31* 过表达水稻, 发现 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 处理萌发后水稻侧根的发生在 6 d 时表型显著^[21]; Inukai 等研究 *crl1* 突变体时发现, 0.01 ~ 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 对突变体侧根的发生影响显著^[22]。因此, 本研究结合前人研究成果选择 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 作为观察侧根发生的作用浓度, 结果表明 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 处理 4 d 后, 转基因植株的侧根数量相对于野生型差异显著。正常生长情况下, *OsRPK1* 过表达转基因植株相对于野生型的侧根生长受到显著抑制 ($P < 0.01$), 在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 处理 4 d 后的 *OsRPK1* 抑制表达植株侧根的数量与野生型相比多 112% ($P < 0.01$), 而 *OsRPK1* 过表达植株侧根生长受到极显著抑制 ($P < 0.001$)。Wang 等研究 *OsCAND1* 对水稻不定根发生的影响, 认为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 处理 7 d 的水稻 *Oscand1* 突变体与野生型不定根的数量差异最为显著^[23]。本研究利用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 处理水稻, 发现 10 d

时水稻不定根差异明显, 抑制表达植株不定根的数量相对于野生型多 18.2% ($P < 0.05$), 而过表达植株不定根的生长受到极显著抑制 ($P < 0.01$)。这些表型和已报道的一些生长素相关的突变体表型极为相似, 如生长素上调小 RNA 基因 *SAUR39* 负调控生长素合成和转运, 过表达 *SAUR39* 转基因水稻表现出侧根的发生受到抑制^[30]; *OsAGAP* (ARF-GTP 酶激活蛋白) 能够调节生长素内流和根部发育, *OsAGAP* 会破坏水稻中生长素的极性运输, 影响主根和侧根的发生, *OsAGAP* 过表达水稻幼苗侧根发生比野生型水稻慢约 2 d, *OsAGAP* 转基因水稻幼苗在萌发后 12 d 的侧根数约为野生型的 50%, 不定根的数量也明显增多^[31]; 在生长素信号转导途径中, Aux/IAA 发挥着非常重要的作用, Kitomi 等研究也表明, *Osiat13* 突变体的侧根数量受到明显的抑制^[32]。*OsRPK1* 能影响部分生长素极性运输相关基因^[20] 和部分生长素信号转导途径基因表达。这些结果表明, *OsRPK1* 可能参与了生长素信号途径或极性运输途径调节水稻根部的生长发育。

大量研究已表明生长素运输抑制剂响应蛋白 (TIR1) 是生长素胞内受体蛋白^[17-18], 介导胞内的生长素信号转导, 但识别外源生长素的受体至今仍未发现。*OsRPK1* 作为一个典型的 LRR-RLK, 其胞外富亮氨酸重复 LRRs 可能与外源生长素相互作用, 胞内的激酶结构域通过磷酸化作用将信号传递给下游生长素响应蛋白, 从而调节水稻侧根和不定根的生长。因此本研究将 *OsRPK1* 蛋白的 LRRs 通过原核系统异源表达, 在体外观察 *OsRPK1* 的 LRRs 结构域是否与生长素结合。同位素 H^3 标记的 IAA 与未被同位素标记的 IAA 竞争结合试验可以判断一个蛋白是否与生长素结合^[17-18], 同时利用等温滴定微量热 (ITC) 法测定两者在体外作用的微热量变化, 试验结果都表明 GST-LRRs 并未与外源生长素结合。

现有的研究表明 LRR-RLKs 受体激活的机制主要有 2 类: 一类以油菜素内酯受体 BR11 和鞭毛蛋白受体 FLS2 为代表, 通过配体的“胶联”作用结合共受体形成异源二聚体来激活受体^[7-11]; 另一类是以植物磺化肽激素受体 PSKR 为代表, 主要通过配体别构诱导受体构象变化来介导受体与其共受体 SERK 相互作用激活受体^[14,33]。在这 2 种不同的受体激活模式中, 涉及的受体和共受体均是 LRR 型类受体蛋白激酶。更有趣的是现已发现的共受体几乎都是 SERK 蛋白, 一个共受体如何促进不同配体的特异性结合和激活不同的 LRR 型受体蛋白激酶尚不清楚^[34]。最近科学家在拟南芥中使用高敏感、高通量相互作用分析法, 研究了 4 万个潜在的细胞表面受体胞外结构域的相互作用, 构建了由 567 个相互作用组成的 LRR 的细胞表面相互作用网络^[35]。由此可见, LRR-RLKs 在植物生长发育过程中功能行使的机制是多样化的, 且不同的 LRR-RLKs 在配体识别过程中扮演的角色也有区别, 有的 LRR-RLKs 直接与配体结合, 有的只是作为共受体与受体结合来帮助受体识别配体。虽然在体外试验中未证明融合蛋白 GST-LRRs 与外源生长素直接结合, 一方面可能是因为原核表达系统异源表达, 缺乏蛋白翻译后加工修饰, 可能导致表达的蛋白没有生物学活性, 体外试验不能够完全模拟体内环境。另一方面可能是 *OsRPK1* 作为复杂的细胞表面互作网络的一员, 发挥作用需要结合其他蛋白或复合物才能和外源生长素直接或间接作用, 这也将是以后研究 *OsRPK1* 参与生

长素信号途径和极性运输途径需要重点解决的问题。

参考文献:

- [1] 查笑君, 马伯军, 潘建伟, 等. 植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的研究进展[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2010, 33(1): 7-12.
- [2] Liu P L, Du L, Huang Y, et al. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRR-RLK*) genes in plants[J]. BMC Evolutionary Biology, 2017, 17(1): 47.
- [3] Hohmann U, Lau K, Hothorn M. The structural basis of ligand perception and signal activation by receptor kinases[J]. Annual Review of Plant Biology, 2017, 68(1): 109-137.
- [4] Song W, Han Z F, Wang J Z, et al. Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2017, 43: 18-27.
- [5] Lee S W, Han S W, Sririyanum M, et al. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity[J]. Science, 2013, 342(6155): 850-853.
- [6] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. Science, 1995, 270(5243): 1804-1806.
- [7] Nam K H, Li J M. BRII/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. Cell, 2002, 110(2): 203-212.
- [8] Oh M H, Clouse S D, Huber S C. Tyrosine phosphorylation of the BRII receptor kinase occurs via a post-translational modification and is activated by the juxtamembrane domain[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 175.
- [9] Oh M H, Wang X F, Kota U, et al. Tyrosine phosphorylation of the BRII receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(2): 658-663.
- [10] Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2001, 13(5): 1155-1163.
- [11] Sun Y D, Li L, Macho A P, et al. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex[J]. Science, 2013, 342(6158): 624-628.
- [12] Gish L A, Clark S E. The RLK/pelle family of kinases[J]. Plant Journal, 2011, 66(1): 117-127.
- [13] Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, et al. RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis* [J]. Development, 2010, 137(22): 3911-3920.
- [14] Song W, Liu L, Wang J Z, et al. Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth[J]. Cell Research, 2016, 26(6): 674-685.
- [15] Lavy M, Estelle M. Mechanisms of auxin signaling [J]. Development, 2016, 143(18): 3226-3229.
- [16] Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, et al. Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects [J]. Plant Cell, 1997, 9(5): 745-757.
- [17] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435(7041): 441-445.
- [18] Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor [J]. Nature, 2005, 435(7041): 446-451.
- [19] Gao Y B, Zhang Y, Zhang D, et al. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(7): 2275-2280.
- [20] Zou Y, Liu X Y, Wang Q, et al. OsRPK1, a novel leucine-rich repeat receptor-like kinase, negatively regulates polar auxin transport and root development in rice [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014, 1840(6): 1676-1685.
- [21] Zhang J, Peng Y C, Guo Z. Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants [J]. Cell Research, 2008, 18(4): 508-521.
- [22] Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, et al. *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an auxin response factor in auxin signaling [J]. Plant Cell, 2005, 17(5): 1387-1396.
- [23] Wang X F, He F F, Ma X X, et al. OsCAND1 is required for crown root emergence in rice [J]. Molecular Plant, 2010, 4(2): 289-299.
- [24] Lewis E A, Murphy K P. Isothermal titration calorimetry [J]. Methods in Molecular Biology, 2005, 305(3): 1-16.
- [25] Frazier R A, Papadopoulou A, Green R J. Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(5): 1602-1605.
- [26] Singh S K, Kishore N. Thermodynamic insights into the binding of Triton X-100 to globular proteins: a calorimetric and spectroscopic investigation [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(19): 9728-9737.
- [27] 齐心洁, 王玥, 王彦珍, 等. 等温滴定量热法在蛋白质-配体相互作用中的应用 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(5): 40-49.
- [28] Peret B, De Rybel B, Casimiro I, et al. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story [J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(7): 399-408.
- [29] Peret B, Li G W, Zhao J, et al. Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence [J]. Nature Cell Biology, 2012, 14(10): 991-998.
- [30] Kant S, Bi Y M, Zhu T, et al. *SAUR39*, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice [J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 151(2): 691-701.
- [31] Zhuang X L, Jiang J F, Li J H, et al. Over-expression of OsAGAP, an ARF-GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development [J]. Plant Journal, 2006, 48(4): 581-591.
- [32] Kitomi Y, Inahashi H, Takehisa H, et al. OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice [J]. Plant Science, 2012, 190(3): 116-122.
- [33] 王继刚, 李红菊, 韩志富, 等. 植物肽激素受体激活的新机制 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016(2): 123-126.
- [34] Hohmann U, Santiago J, Nicolet J, et al. Mechanistic basis for the activation of plant membrane receptor kinases by SERK-family coreceptors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(13): 3488-3493.
- [35] Smakowska-Luzan E, Mott G A, Parys K A, et al. An extracellular network of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases [J]. Nature, 2018, 553(7688): 342-346.