

甘蓝两种SRK短截蛋白的体外表达及其与THL1作用检测

高启国¹, 孙梓健¹, 韦静宜¹, 朱利泉^{2,*}, 王小佳^{1,*}

(¹南方山地园艺学教育部重点实验室, 西南大学重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715; ²西南大学植物生理生物化学实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为探明 S-位点受体激酶 (SRK) 上与类硫氧还蛋白 1 (THL1) 作用的氨基酸区域以及两者间作用方式, 依据 SRK_{E1} 上功能域分布构建了两种 SRK_{E1} 短截体原核表达质粒 pGEX-SRK_{E1A} 和 pGEX-SRK_{E1B}, 分别在大肠杆菌 BL21 中获得了可溶性表达。通过体外孵育检测蛋白质相互作用的方法对 SRK_{E1A}、SRK_{E1B} 与 THL1 相互作用进行了检测, 结果表明 SRK_{E1A} 和 SRK_{E1B} 均可与 THL1 结合, 明确了 THL1 与 SRK 相互作用并不依赖于 SRK 激酶活性。两类 SRK 等位序列间比对结果表明 Cys 在两类 SRK 间的保守性存在明显差异, 推测两类 SRK 材料亲和性的差异可能与 Cys 保守性不同有关。

关键词: 甘蓝; S-位点受体激酶; 类硫氧还蛋白 1; 相互作用

中图分类号: S 635.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 04-0725-08

In Vitro Expression of Two Truncated Form of SRK and Analysis on Its Interaction with THL1

GAO Qi-guo¹, SUN Zi-jian¹, WEI Jing-yi¹, ZHU Li-quan^{2,*}, and WANG Xiao-jia^{1,*}

(¹Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Key Laboratory in Olericulture of Chongqing, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Plant Physiology and Biochemistry Laboratory of Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To determine the amino acid region on SRK responsible for binding THL1 and their interaction manner, according to distribution of functional domains on SRK_{E1}, two truncated form of SRK_{E1} prokaryotic expression plasmids pGEX-SRK_{E1A} and pGEX-SRK_{E1B} were constructed, and the recombinant protein were expressed in *E. coli* (BL21). SRK_{E1A} and SRK_{E1B} were incubated with THL1 respectively, their interaction were analyzed *in vitro*. The result showed that SRK_{E1A} and SRK_{E1B} could interact with THL1, and their interaction did not depend on SRK kinase activity. Through alignment of SRKs from Class I and Class II, the result showed that the conserved cysteine sites were different between the two Class SRKs, which suggests that self-incompatibility difference between two Class SRK probably has relation to the conserved Cys.

Key words: *Brassica oleracea*; S-locus receptor kinase; thioredoxin-h-like protein 1; interaction

收稿日期: 2011-02-21; 修回日期: 2011-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900986); 重庆市自然科学基金项目 (2009BB1298); 西南大学博士基金项目 (SWUB2008042); 教育部博士点基金项目 (200806350006)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn; wxj@swu.edu.cn)

自交不亲和信号传导是研究植物胞间信号传导的模式系统,其机理的研究是国际研究的热点之一(Nasrallah, 2000)。芸薹属植物自交不亲和属于典型孢子体型自交不亲和,在遗传上受具有复等位基因的单一 *S*-locus 控制(Boys et al., 1997)。在 *S* 多基因家族中 *S*-位点受体激酶(SRK)是柱头识别自花花粉,启动自交不亲和信号传导并最终导致花粉萌发受阻的核心关键酶,是自交不亲和反应中唯一雌蕊决定因子(Silva et al., 2001; Takayama & Isogai, 2003)。SRK 由胞外结构域、跨膜结构域和激酶结构域 3 部分组成,其中胞外结构域与花粉配体 *S*-位点半胱氨酸富集蛋白(SCR)结合引起 SRK 构象变化,激发 SRK 活性,进而在细胞内传递来自细胞外的信号(Ivanov et al., 2010)。

现已从甘蓝材料中分离出 50 多个 SRK 等位基因,依据其序列的相似性,将 SRK 分成两类:表现强自交不亲和性 Class I 和表现为弱自交不亲和性 Class II (Kakizaki et al., 2006),至今两类材料亲和性差异产生的分子机制尚不清楚,据 Mazzurco 等(2001)推测可能与两类 SRK 引发的下游信号传导过程有关。Bower 等(1996)利用酵母双杂交技术从甘蓝柱头 cDNA 文库筛选出 SRK 下游因子类硫氧还蛋白 1/2 (THL1/2),Cabrillac 等(2001)体外研究表明 THL1 是 SRK 激酶负调控因子,配体缺乏时能抑制 SRK 激酶活性,而加入 *S*-位点富含半胱氨酸蛋白(SCR)可消除 THL1 的抑制作用。虽然 Mazzurco 等(2001)利用酵母双杂交技术证明两类 SRK 均与 THL1 作用,但是 SRK 上哪些区域氨基酸组成的三维结构域决定了 SRK 与 THL1 相互作用以及两者间作用是否依赖 SRK 激酶活性等问题有待于进一步研究。作者在已证明 SRK_{E1} 与 THL1 相互作用的基础上(高启国等, 2008),依据 SRK_{E1} 上功能域分布体外表达了两种 SRK_{E1} 短截蛋白 SRK_{E1A} 和 SRK_{E1B},以 SRK_{E1} 作为对照对 SRK_{E1A} SRK_{E1B} 与 THL1 之间的作用进行体外检测,分析两者间的作用方式,并对两类 SRK 序列间的保守性进行了分析,以期探讨两类材料亲和性差异的分子机制提供依据,为深入阐述自交不亲和性信号传导的分子机理提供新的内容。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为本实验室保存的从高度自交不亲和甘蓝 E1 材料克隆的 SRK_{E1} 和 THL1 编码序列(高启国等, 2007, 2008)。THL1 原核表达质粒 pET43.1-THL1、原核表达载体 pGEX-6P-1、大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由本实验室保存; TransStartTM FastPfu DNA Polymerase、pEASYTM-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性酶 *Bam*H I、*Sal* I 购自 TaKaRa 公司; Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit 购自 Omega Bio-tek 公司; MagneHisTM Protein Purification System 购自 Promega 公司; 其余试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

依据 SRK_{E1} 激酶结构域上功能域的分布(高启国等, 2008),设计特异性引物构建两种 SRK_{E1} 激酶结构域短截蛋白表达体,分别命名为 SRK_{E1A} 和 SRK_{E1B},其引物序列:上游引物 P1 为 5'-GGATCC ACTGTTGGTGTAGTGTTTC-3',单下划线为 *Bam*H I 酶切位点;下游引物 P2 为 5'-GTCGACCTCACC TAAACCGTGAGTCTTG-3'; P3 为 5'-GTCGACCTCATAGGACTTCTTGTTG-3'; P4 为 5'-GTCGA CCTCAATCATATTACCGGGCATC-3' (用于 SRK_{E1} 与 THL1 作用对照),3 条引物单下划线为 *Sal* I 酶切位点、双下划线为终止密码子。

1.2.2 表达质粒的构建与鉴定

以 SRK_{E1} 的 cDNA 为模板, 用 P1 和 P2 扩增短截蛋白 SRK_{E1A} 编码序列、用 P1 和 P3 扩增短截蛋白 SRK_{E1B} 编码序列、用 P1 和 P4 扩增 SRK_{E1} 编码序列, PCR 循环参数均为: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。3 种 PCR 产物经胶回收后与 pEASYTM-Blunt Simple 克隆载体连接, 产物转化感受态 DH5 α , 经菌落 PCR 鉴定后, 送 Invitrogen 公司以 M13 通用引物测序, 用 Vector NTI advance 11 软件进行序列分析。

经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后将 SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 编码序列定向插入到表达载体 pGEX-6P-1, 重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 筛选后, 提取质粒进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 构建正确的质粒命名为 pGEX- SRK_{E1A} 、pGEX- SRK_{E1B} 和 pGEX- SRK_{E1} 。

1.2.3 重组蛋白的体外表达

将 pET43.1-THL1、空载体 pGEX、pGEX- SRK_{E1A} 、pGEX- SRK_{E1B} 和 pGEX- SRK_{E1} 分别转化大肠杆菌 BL21。THL1 蛋白表达方法见高启国等 (2007) 报道。 SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 的表达方法如下: 挑取单菌落, 接种于 1 mL 含有 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄培养基的 LB 液体培养基, 37 °C 摇床上过夜培养。次日, 过夜培养物按照 1:100 扩大培养, 当 OD₆₀₀ 在 0.8 ~ 1.0 时加入 IPTG 至终浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 32 °C、250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 4 h, 表达完成后收集细胞用于表达情况分析和相互作用检测。

SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 蛋白可溶性检测: 分别取空载体、 SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 蛋白融合表达菌液 50 mL, 4 °C 下 3 300 \times g 离心 10 min, 去上清液, 细胞重悬于 2 mL 蛋白提取液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0, 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% 曲拉通 X-100, 10% 甘油, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟, 10 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 亮抑酶肽, 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲胺, 30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抑肽酶), 悬浮液于 -20 °C 冰箱中过夜, 次日冰上解冻, 超声破碎 15 min, 4 °C 下 13 400 \times g 离心 10 min, 收集上清液置冰上备用, 各取 20 μL 电泳检测。

1.2.4 SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 以及 SRK_{E1} 与 THL1 相互作用的体外检测

对 THL1 融合蛋白进行了纯化和生物活性检测 (高启国 等, 2007), 相互作用的体外检测步骤如下。

(1) 依据 Ni-Particles 与 THL1 结合情况分析结果 (高启国 等, 2008), 取 pET43.1-THL1 表达菌液 50 mL, 4 °C 下 3 300 \times g 离心 10 min, 去上清液, 用 3 mL 1 \times 细胞裂解液悬浮细胞, 取 160 μL MagneHis Ni-Particles 加到细胞悬浮液中, 轻轻混匀, 室温孵育 2 min, 磁力架回收 Ni-Particles, 用 160 μL 蛋白质提取液重新悬浮 Ni-Particles, 依次取 40 μL 重悬液于 4 个 1.5 mL 离心管。

(2) 向上述 4 管中分别加入 1.2.3 步中制备的 pGEX、pGEX- SRK_{E1A} 、pGEX- SRK_{E1B} 和 pGEX- SRK_{E1} 上清液 300 μL , 轻轻翻转混匀, 4 °C 下孵育 2 h, 每隔 15 min 混匀 1 次, 孵育结束后用 150 μL 清洗缓冲液 (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 0.1% 曲拉通 X-100, 150 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl 和 1 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 原钒酸钠) 清洗 3 次, 然后用 50 μL 洗脱缓冲液洗脱蛋白。

(3) 将蛋白洗脱液加入 1/4 体积的 4 \times 样品缓冲液 100 °C 煮沸 5 min, 取 50 μL 电泳检测。

1.2.5 SRK 氨基酸序列比对分析

依据登录号从 NCBI 网站 (网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 收集 SRK 等位基因氨基酸序列。 SRK_5 登录号为 Y18259, SRK_6 为 M76647, SRK_{15} 为 Y18260, SRK_{29} 为 AB008191, SRK_{2-b} 为 AB024416, SRK_{910} 为 M97667, SRK_{A14} 为 U00443。

用 Vector NTI advance 11 软件进行序列比对分析, 用在线服务器 (网址为 <http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/>) 预测 SRK 分子内二硫键。

2 结果与分析

2.1 表达质粒的构建与鉴定

SRK_{E1} 和 THL1 结合形成稳定的复合体, 序列分析表明 SRK_{E1} 包含其跨膜结构域后 16 个氨基酸和整个激酶结构域 (高启国 等, 2008)。利用在线服务器 (网址为 <http://ca.expasy.org/prosite/>) 分析 SRK_{E1} 上功能域, 结果表明 84~106 位氨基酸是激酶 ATP 结合域、199~211 氨基酸是丝氨酸/苏氨酸激酶活性域。利用在线服务器 (网址为 <http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/>) 预测 SRK_{E1} 分子内二硫键, 发现共形成 3 个分子内二硫键, 分别位于第 14 和第 81 位、第 338 和 372 位以及第 388 和第 401 位 Cys 之间。

依据 SRK_{E1} 功能域和二硫键的分布, 构建 SRK_{E1} 两种短截体并重新扩增 SRK_{E1} 用于构建基于 pGEX-6P-1 的表达质粒。测序结果表明 SRK_{E1A} 为 594 bp, 编码 198 个氨基酸; SRK_{E1B} 为 987 bp, 编码 329 个氨基酸; 三者推导的氨基酸序列见图 1, SRK_{E1A} 包含第 1 个分子内二硫键和激酶 ATP 结合域; SRK_{E1B} 包含第 1 个分子内二硫键、激酶 ATP 结合域和丝氨酸/苏氨酸激酶活性域; SRK_{E1} 包含全部 3 个分子内二硫键、激酶 ATP 结合域和丝氨酸/苏氨酸激酶活性域。据 Mazzurco 等 (2001) 分析跨膜结构域 Cys 可能参与了 SRK 与 THL1 作用, Stein 和 Nasrallah (1993) 证实激酶结构域 Lys 是 SRK 激酶活性关键位点, 本试验扩增的两种 SRK_{E1} 短截体和 SRK_{E1} 跨膜域的 Cys, 以及 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 上激酶活性域的 Lys 均没有发生突变, 表明扩增结果符合试验要求。



图 1 SRK_{E1} 短截体序列分析

单下划线部分为激酶 ATP 结合域; 双下划线部分为丝氨酸/苏氨酸激酶活性域; 虚线表示分子内二硫键; 星号表示丝氨酸/苏氨酸激酶活性域保守的 Lys。

Fig. 1 Amino acid sequence analysis of SRK_{E1} truncated forms

Protein kinase ATP-binding region was single-underlined; Serine/Threonine protein kinase active-site was double-underlined; The dotted line indicated intramolecular disulphide bonds; Star indicated the conserved Lys in Serine/Threonine protein kinase active-site.

构建的表达质粒 pGEX-SRK_{E1A}、pGEX-SRK_{E1B} 和 pGEX-SRK_{E1} 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 电泳结果表明分别得到了两条明亮的条带 (图 2), 目的基因的大小分别与 SRK_{E1A}、SRK_{E1B} 和 SRK_{E1}

完全一致, 表达质粒送 Invitrogen 公司测序, 结果 SRK_{E1A} 、 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 基因片段的插入位点和方向完全正确。

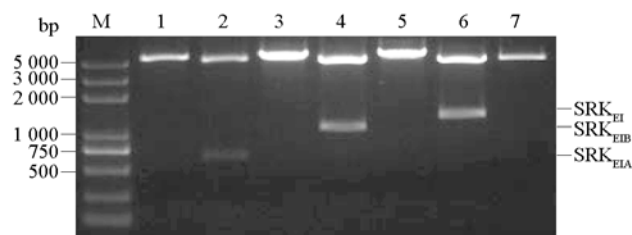


图 2 重组质粒酶切电泳图

M: DNA marker; 1: pGEX-SRK_{E1A} 质粒 *Bam*H I 单切; 2: pGEX-SRK_{E1A} 质粒 *Bam*H I /*Sal* I 双切; 3: pGEX-SRK_{E1B} 质粒 *Bam*H I 单切; 4: pGEX-SRK_{E1B} 质粒 *Bam*H I /*Sal* I 双切; 5: pGEX-SRK_{E1} 质粒 *Bam*H I 单切; 6: pGEX-SRK_{E1} 质粒 *Bam*H I /*Sal* I 双切; 7: pGEX-6P-1 质粒 *Bam*H I 单切。

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmids digested by restriction enzymes

M: DNA marker; 1: pGEX-SRK_{E1A} digested by *Bam*H I; 2: pGEX-SRK_{E1A} digested by *Bam*H I /*Sal* I; 3: pGEX-SRK_{E1B} digested by *Bam*H I; 4: pGEX-SRK_{E1B} digested by *Bam*H I /*Sal* I; 5: pGEX-SRK_{E1} digested by *Bam*H I; 6: pGEX-SRK_{E1} digested by *Bam*H I /*Sal* I; 7: pGEX-6P-1 digested by *Bam*H I.

2.2 重组蛋白的诱导表达与电泳检测

诱导表达结束后收菌, 用蛋白提取液重悬细胞, 超声破碎后离心取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。如图 3 所示, 泳道 2 为诱导空载体上清对照, 泳道 3 为未诱导 SRK_{E1A} 上清对照, 泳道 4 为诱导的 SRK_{E1A} 上清液, 泳道 4 比泳道 3 和泳道 2 明显多 1 条带, 且蛋白质相对分子质量与 SRK_{E1A} 预计值相符, 表明 SRK_{E1A} 成功表达且溶解在蛋白提取液中, 可用于后续研究。同样 SRK_{E1B} 诱导上清液 (泳道 6) 比 SRK_{E1B} 未诱导上清 (泳道 5) 和空载体对照 (泳道 2) 多 1 条带, SRK_{E1} 诱导上清液 (泳道 8) 比 SRK_{E1} 未诱导上清 (泳道 7) 和空载体对照 (泳道 2) 多 1 条带, 其蛋白质相对分子质量与 SRK_{E1B} 和 SRK_{E1} 预计值相符, 表明两种蛋白也成功表达且溶解在蛋白提取液中, 可用于后续研究。Stein 和 Nasrallah (1993) 用载体 pGEX-3X 和宿主菌 JM109 表达 SRK₆ 激酶结构域, 其表达产物主要以包涵体形式存在, 而试验中将两种短截体以及 SRK_{E1} 亚克隆至 pGEX-6P-1 载体, 在 BL21 (DE3) 中诱导表达, 结果表明表达产物全部是可溶的, 可直接进行后续研究。

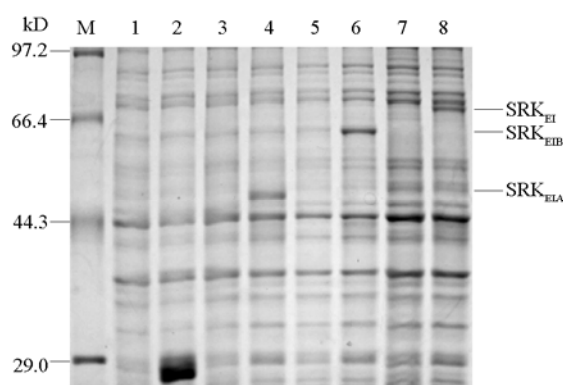


图 3 重组蛋白表达产物检测

M: Protein marker; 1: 未诱导的 pGEX-6P-1 对照; 2: 诱导的 pGEX-6P-1; 3: 未诱导的 pGEX-SRK_{E1A} 对照; 4: 诱导的 pGEX-SRK_{E1A}; 5: 未诱导的 pGEX-SRK_{E1B} 对照; 6: 诱导的 pGEX-SRK_{E1B}; 7: 未诱导的 pGEX-SRK_{E1} 对照; 8: 诱导的 pGEX-SRK_{E1}。

Fig. 3 SDS-PAGE of recombinant proteins expressed in *E. coli* strain BL21

M: Protein marker; 1: Control of uninduced recombinant strain BL21/pGEX; 2: Induced recombinant strain BL21/pGEX; 3: Control of uninduced recombinant strain BL21/SRK_{E1A}; 4: Induced recombinant strain BL21/SRK_{E1A}; 5: Control of uninduced recombinant strain BL21/SRK_{E1B}; 6: Induced recombinant strain BL21/SRK_{E1B}; 7: Control of uninduced recombinant strain BL21/SRK_{E1}; 8: Induced recombinant strain BL21/SRK_{E1}.

2.3 SRK_{E1} 与 THL1 相互作用的体外检测

依据 Ni 离子与 THL1 结合情况分析结果, 每 5 mL 的表达菌液中 THL1 蛋白可以使低于等于 25 μ L Ni-Particles 与该蛋白完全结合 (高启国 等, 2008), 本试验中每 5 mL 的表达菌液中 THL1 蛋白使用了 16 μ L Ni-Particles 与之结合, 以排除因镍离子剩余而可能到来的假阳性结果。

分别将纯化的 THL1 蛋白与两种 SRK_{E1} 短截蛋白以及 SRK_{E1} 上清液在 4 $^{\circ}$ C 下孵育, 依据 THL1 融合蛋白上组氨酸标签利用镍离子磁珠纯化 THL1 与 SRK_{E1A}、SRK_{E1B} 以及 SRK_{E1} 结合形成的复合体。

纯化产物与对照一起电泳, 结果见图 4。其中泳道 1~3 依次是 THL1 与 SRK_{E1A}、SRK_{E1B}、SRK_{E1} 孵育产物, 泳道 4 为 THL1 与空载体孵育对照, 泳道 5~8 依次是 THL1、SRK_{E1A}、SRK_{E1B}、SRK_{E1} 融合蛋白诱导表达产物。泳道 1 与泳道 5 和 6 对比, 该泳道中既有 THL1 条带也有 SRK_{E1A} 条带, 因镍离子不能与 GST 标签结合 (泳道 4), 因此该泳道中 SRK_{E1A} 应是与 THL1 结合并随镍离子一起沉淀下来的。同理, 泳道 2 中 SRK_{E1B} 和泳道 3 中 SRK_{E1} 也分别是其与 THL1 结合并随镍离子一起沉淀下来的, 进而说明两种 SRK_{E1} 短截蛋白均可以直接与 THL1 蛋白相互作用。

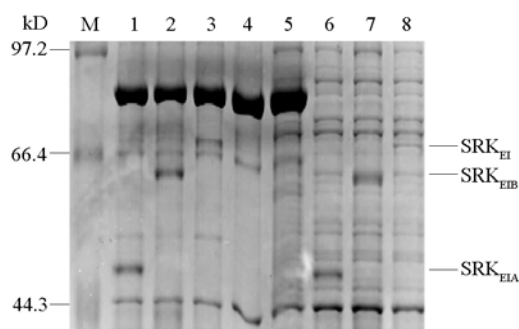


图 4 3 种 SRK_{E1} 短截蛋白与 THL1 相互作用检测

M: Protein marker; 1: SRK_{E1A} 与 THL1 孵育产物; 2: SRK_{E1B} 与 THL1 孵育产物; 3: SRK_{E1} 与 THL1 孵育产物;
4: GST 标签与 THL1 孵育产物; 5: THL1 表达产物; 6: SRK_{E1A} 表达产物;
7: SRK_{E1B} 表达产物; 8: SRK_{E1} 表达产物。

Fig. 4 SDS-PAGE of interaction between THL1 and three truncated form of SRK_{E1}

M: Protein marker; 1: SRK_{E1A} incubated with THL1; 2: SRK_{E1B} incubated with THL1; 3: SRK_{E1} incubated with THL1;
4: GST tag incubated with THL1; 5: Product expressed by THL1; 6: Product expressed by SRK_{E1A};
7: Product expressed by SRK_{E1B}; 8: Product expressed by SRK_{E1}.

2.4 SRK 氨基酸序列比对分析

利用 Vector NTI advance 11 软件对 SRK_{E1A} 氨基酸序列在不同单倍型 SRK 间比对分析 (图 5), 结果表明 SRK_{E1A} 对应区域的 Cys 在两类 SRK 间的保守性存在差异, 其中 SRK_{E1A} 上 Cys14、Cys140、Cys141 对应位点在两类 SRK 间完全保守, 而 Cys81 对应的位点仅在 Class I 类 SRK 间保守, Ser170 对应的 Cys 仅在 Class II 类 SRK 间保守。

通过分子内二硫键预测, 发现 Class I 类 SRK 在 SRK_{E1A} 对应区域均形成 1 个分子内二硫键, 且参与的 Cys 位点与 SRK_{E1A} 上二硫键位点完全对应, 而 Class II 类 SRK 中, 仅在 SRK₁₅ 和 SRK₂₉ 内存在 1 个二硫键, 对应的 Cys 位点与 Class I 类完全不同。



图5 SRK 氨基酸序列对比

下划线指示在两类 SRK 间保守的 Cys, 星号表示在 Class I 或者 Class II 类内保守的 Cys, 序列的 NCBI 登录号 SRK₅ 为 Y18259; SRK₆ 为 M76647; SRK₁₅ 为 Y18260; SRK₂₉ 为 AB008191; SRK_{2-b} 为 AB024416; SRK₉₁₀ 为 M97667; SRK_{A14} 为 U00443。

Fig. 5 Alignment of SRKs amino acid sequence

The conserved Cys in two Class SRKs were underlined; Star indicated Cys conserved in Class I or Class II; The access number in NCBI of SRK₅ is Y18259; SRK₆ is M76647; SRK₁₅ is Y18260; SRK₂₉ is AB008191; SRK_{2-b} is AB024416; SRK₉₁₀ is M97667; SRK_{A14} is U00443.

3 讨论

SRK 是自交不亲和信号传导核心因子, 负责将来自细胞外信号传递到细胞内 (Ivanov et al., 2010)。在甘蓝花期 THL1/2 与 SRK 激酶结构域结合, 抑制其激酶活性, 当花粉落到柱头上后, 相同单倍型 SCR 与 SRK 胞外结构域结合, 引起 SRK 构象变化, 使其释放原本结合在激酶结构域的 THL1/2, 激活 SRK 激酶活性, 进而在细胞内引发次级级联反应继续传递来自细胞外的信号, 并最终导致自交不亲和反应发生 (Kachroo et al., 2002; Ivanov et al., 2010)。THL1/2 是至今发现的唯一自交不亲和信号传导负调控因子 (Cabrillac et al., 2001), 两类 SRK 材料亲和性差异可能与 THL1/THL2 的负调控作用有关 (Mazzurco et al., 2001)。虽然 Mazzurco 等 (2001) 利用酵母双杂交技术证实了两类 SRK 均可以与 THL1 作用, 但 SRK 上参与 THL1 作用氨基酸区域以及两者间作用方式尚不清楚。本文首次报道体外表达 SRK_{EI} 激酶结构域两种短截蛋白 SRK_{EIA} 和 SRK_{EIB}, 以 SRK_{EI} 为对照证明两者均可与 THL1 相互作用, 其中最小的 SRK_{EIA} 仅有 198 个氨基酸, 不含 SRK 丝氨酸/苏氨酸激酶活性域, 因此 SRK_{EIA} 和 THL1 相互作用结果表明 THL1 与 SRK 作用并不依赖于 SRK 的激酶活性, 且两者间的作用并不是以磷酸化方式进行。依据 Heldin (1995) 研究, 动物酪氨酸激酶表达激酶活性过程涉及其构象的变化, 因此 Mazzurco 等 (2001) 利用酵母双杂交技术检测不到 SRK 激酶失活突变体与 THL1 之间作用, 可能与突变失活导致 SRK 空间构象发生改变有关。本结果证实 SRK 与 THL1 相互作用不依赖于 SRK 激酶活性, 这与 Mazzurco 等 (2001) 认为 THL1 只与有激酶活性的 SRK 作用的观点不符, 作者推测其未能检测到激酶失活突变体与 THL1 之间作用可能是由酵母双杂交有较高的假阳性造成的, 其研究结果尚需进一步体外验证。

类硫氧还蛋白典型的生理功能是通过还原分子内二硫键广泛的参与酶活性调节、信号传导等重要的生理过程 (Holmgren, 1989)。Mazzurco 等 (2001) 利用酵母双杂交技术研究表明 SRK₉₁₀ 跨膜结构域保守的 Cys 被 Ala 替代后就不能与 THL1 作用, 结合本结果推测 SRK 与 THL1 可能是通过分子间二硫键相互作用, 且由于两类 SRK 间 Cys 保守性不同, 可能导致 THL1 对 SRK 激酶的负调控强弱差异, 进而使 Class I 类材料表现出强自交不亲和, 而 Class II 类材料表现弱自交不亲和。本试验中 THL1 与 SRK 相互作用检测体系可以作为两者作用方式的研究平台, 二硫苏醇糖能够还原蛋白质及蛋白质亚基间的二硫键 (He et al., 2009), 因此用二硫苏醇糖类化学试剂处理 SRK_{E1A} 与 THL1 孵育形成的复合体就可明确两者间是否通过二硫键结合。此外利用点突变结合表面等离子共振技术可以明确是否因两类 SRK 间 Cys 保守性不同导致两类材料亲和性差异。由于 THL1/2 是自交不亲和信号传导负调控因子, 对其作用机理的深入分析将有助于探寻自交不亲和性人为调控的方法, 进而克服自交障碍, 为自交不亲和系材料的简便保存提供全新的思路和方法。

References

- Bower M S, Matias D D, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein A J, Goring D R. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S-locus receptor kinase. *Plant Cell*, 8: 1641 - 1650.
- Boyes D C, Nasrallah M E, Vrebalov J, Nasrallah J B. 1997. The self-incompatibility (S) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell*, 9: 237 - 247.
- Cabrillac D, Cock J M, Dumas C. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 410: 220 - 223.
- Gao Qi-guo, Song Ming, Niu Yi, Yang Kun, Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2007. Molecular characterization and expression of thioredoxin-like protein *THL1* gene from *Brassica oleracea* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 909 - 914. (in Chinese)
- 高启国, 宋 明, 牛 义, 杨 坤, 朱利泉, 王小佳. 2007. 甘蓝中硫氧还蛋白编码基因 *THL1* 的分子特性及表达研究. *园艺学报*, 34 (4): 909 - 914.
- Gao Qi-guo, Song Ming, Niu Yi, Yang Kun, Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2008. Test of interaction between THL1 and SRK from *Brassica oleracea* L. in self-incompatibility signaling process. *Acta Agronomica Sinica*, 34 (6): 934 - 943. (in Chinese)
- 高启国, 宋 明, 牛 义, 杨 坤, 朱利泉, 王小佳. 2008. 甘蓝自交不亲和信号传导中 THL1 和 SRK 相互作用的体外检测. *作物学报*, 34 (6): 934 - 943.
- Heldin C H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80: 213 - 223.
- He Chang-zou, Zhi Rong-lu, Ye Jing-wang, Ying Mei-zou, Fei Zou, Yong Doo-park. 2009. Effect of cysteine modification on creatine kinase aggregation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 15 - 28.
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 13963 - 13966.
- Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T. 2010. When no means no: Guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends in Plant Science*, 15: 387 - 394.
- Kachroo A, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 2002. Self-incompatibility in the Brassicaceae: Receptor-ligand signaling and cell-to-cell communication. *Plant Cell*, 14: S227 - S238.
- Kakizaki T, Takada Y, Fujioka T, Suzuki G, Satta Y, Shiba H, Isogai A, Takayama S, Watanabe M. 2006. Comparative analysis of the S-intergenic region in class-II S haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa*. *Genes Genetic Systems*, 81: 63 - 67.
- Mazzurco M, Sulaman W, Elina H, Cock J M, Goring D R. 2001. Further analysis of the interactions between the *Brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol*, 45: 365 - 376.
- Nasrallah J B. 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Plant Biology*, 3: 368 - 373.
- Stein J C, Nasrallah J B. 1993. A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L. encodes a functional Serine/Threonine kinase. *Plant Physiol*, 101: 1103 - 1106.
- Silva N F, Stone S L, Christie L N, Sulaman W, Nazarian K A P, Burnett L A, Arnoldo M A, Rothstein S J, Goring D R. 2001. Expression of the S receptor kinase in self-incompatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 552 - 559.
- Takayama S J, Isogai A. 2003. Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany*, 54: 149 - 156.