

甘蓝花粉管钙感应蛋白 CaM 与 SRK 相互作用研究

许俊强, 孙梓健, 宋 明*, 汤青林, 王志敏, 王小佳*

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为研究甘蓝花粉管钙感应蛋白 CaM 与 SRK 相互作用的分子机理及其可能相互作用的区域, 从自交不亲和甘蓝材料 ‘E1’ 中分别克隆得到 *CaM12* 基因 450 bp 及 *S* 位点受体激酶 (*SRK7*) 基因全长序列 2 118 bp, 并亚克隆得到 *SRK* 胞外域 (*eSRK*) 和胞内激酶域 (*iSRK*), 构建原核表达载体 pGEX-CaM12、pCold-eSRK 和 pCold-iSRK, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 进行原核表达, 表达产物纯化后进行体外相互作用, 结果表明 CaM12 能够与 SRK7 进行相互作用, 但作用区域是 iSRK7 而不是 eSRK7。为进一步验证其相互作用, 本研究利用酵母双杂交系统, 构建 pGBKT7-CaM12、pGADT7-eSRK7、pGADT7-iSRK7 和 pGADT7-SRK7 酵母表达载体, 转化相应酵母 Y2HGold 和 Y187 感受态细胞后未出现自激活和毒性现象, 相互作用结果与原核表达检测一致。同时将 CaM12 的 3 个 EF-hands 结构域突变体 CaM12-2-、CaM12-23-和 CaM12-234-与 iSRK7 分别构建酵母表达载体 pGADT7-CaM12-2-、pGADT7-CaM12-23-、pGADT7-CaM12-234-, 检测其相互作用。结果表明 CaM12 EF-hands 突变体 CaM12-2-、CaM12-23-和 CaM12-234-在酵母双杂交系统中均不能与 iSRK7 片段发生相互作用, 说明 CaM12 的 EF-hands 结构域突变后失去结合 Ca^{2+} 能力而不能与 iSRK7 相互作用。该研究可为自交不亲和机理提供新的参考依据。

关键词: 结球甘蓝; *CaM12*; *S* 位点受体激酶 (*SRK7*) 基因; 原核表达; 酵母双杂交

中图分类号: S 635.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 12-2429-12

Studies on the Interactions Between the Pollen Tube Calmodulin (CaM) and SRK from *Brassica oleracea* var. *capitata*

XU Jun-qiang, SUN Zi-jian, SONG Ming*, TANG Qing-lin, WANG Zhi-min, and WANG Xiao-jia*

(Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education; Chongqing Key Laboratory of Olericulture, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In order to study the molecular mechanism and possible interaction domains between pollen tube calmodulin (CaM) protein and *S* locus receptor kinase (SRK) from *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. We got the full length sequence of *CaM12* with 450 bp and *SRK7* gene with 2 118 bp from self-incompatibility of *Brassica oleracea* var. *capitata* E1, respectively, and got extracellular domain of SRK (*eSRK7*) and intracellular kinase domain (*iSRK7*), then constructed prokaryotic expression vectors

收稿日期: 2013 - 09 - 25; **修回日期:** 2013 - 11 - 07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071802, 31000908); 重庆市自然科学基金重点项目 (2011BA1002); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2012B020); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2012CB113900)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wxj@swu.edu.cn; swausongm@163.com; Tel: 023-68251093)

of pGEX-CaM12, pCold-eSRK7 and pCold-iSRK7, transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and checked the interactions with purified expression products *in vitro*. The results showed that CaM12 protein and SRK7 could do interaction, and interactive domain is iSRK7 rather than eSRK7. In order to verify their interaction furtherly, yeast two-hybrid system was used in this study, we constructed yeast expression vectors pGBKT7-CaM12, pGADT7-eSRK7, pGADT7-iSRK7 and pGADT7-SRK7, transformed into corresponding Y2HGold and Y187 yeast cells, and made sure that they did not appear the self-activation and toxicity. The results was consistent with prokaryotic expression. Simultaneously, we constructed yeast expression vectors pGADT7-CaM12-2-, pGADT7-CaM12-23-, pGADT7-CaM12-234- and pGBKT7-iSRK7 with CaM12-2-, CaM12-23-, CaM12-234- mutants from three EF-hands of CaM12 and iSRK7, and tested their interactions. The results showed that all CaM EF-hands mutants CaM12-2-, CaM12-23- and CaM12-234- cannot interact with iSRK7 in yeast two-hybrid system. CaM12 protein lost the ability to combine Ca^{2+} and cannot interact with iSRK7 after EF-hands structure domains were mutated. This study could provide a new reference for the mechanism of self-incompatibility in *Brassica oleracea*.

Key words: *Brassica oleracea*; CaM12; SRK7; prokaryotic expression; yeast two-hybrid

自交不亲和性 (Self-incompatibility, SI) 在显花植物中普遍存在, 是阻止自交, 预防近亲繁殖和促进远系杂交, 保持遗传多样性的重要机制。植物基因组编码的受体蛋白很多都具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 植物受体激酶 (Plant receptor kinase, PRK) 与动物中的络氨酸受体激酶和丝氨酸/苏氨酸受体激酶有一定联系, 这三者可能是从同一受体激酶进化而来 (Shiu & Bleecker, 2001)。在这 3 种受体激酶中, 植物中的 S 位点受体激酶 (S locus receptor kinase, SRK) 最为人所熟知。SRK 位于柱头乳突细胞的质膜上, 且是芸薹属植物自交不亲和反应中雌蕊成分 (Stein et al., 1991; Delorme et al., 1995; Takasaki et al., 2000)。SI 反应中柱头表面能够识别不接受自花花粉而促进杂交 (Cock, 2000)。SRK 作为跨膜蛋白镶嵌于柱头乳突细胞的质膜上, 作为自交不亲和性的雌性决定因子被广泛研究。现在有研究表明 SRK 通过与花粉外壳的一种半胱氨酸分泌肽 SCR 互作而介导自花粉识别, 最终造成了自交不亲和 (Schopfer et al., 1999; Takayama et al., 2000, 2001; Kachroo et al., 2001; Shiba et al., 2001)。SRK 在接受不亲和花粉后发生磷酸化 (Cabrillac et al., 2001), 且体外试验表明 SRK 激活可能在膜上涉及自身磷酸化分子之间的关联 (Giranton et al., 2000)。Sanders 等 (1999) 利用酵母双杂交试验已经鉴定了一些与 SRK 相互作用的蛋白, 其中钙调素由于参与到动植物的很多信号转导途径而备受关注 (Chin & Means, 2000)。

Dearnaley 等 (1997) 测定了自交亲和与自交不亲和花粉授粉后在柱头突触细胞的细胞质和细胞壁中的钙离子流。这些钙离子流与接触花粉粒细胞区域相关, 油菜中胞质内的钙峰与后续花粉粒的水合相对应 (Elleman & Dickinson, 1999; Goring, 2000)。因此体外钙调素的作用可能是介导授粉和 SI 钙信号转导。在对动物受体激酶调控的研究中发现, 受体激酶介导的细胞间相互识别会涉及到一系列调控过程, 如与钙调蛋白结合, 诱导下游基因转录等过程, 而同一受体激酶可能参与多种调控。植物中 SRK 与钙调蛋白是否能发生相互作用调控下游反应, 以及 CaM 与 SRK 相互作用区域, 还不得而知。因此本试验中通过酵母双杂交等方法对 SRK7 亚型与 CaM12 亚型的相互作用进行了初步研究, 从而了解本试验分离得到的 CaM 亚型是否参与了 SRK 的调控过程。

本研究中构建了结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 钙调蛋白 CaM12 与 SRK7 不同截短片段的 iSRK7、eSRK7 及 SRK7 的原核与酵母双杂交表达载体, 建立适用于 CaM12 与 SRK7 蛋白相互作用研究的酵母双杂交体系, 旨在分析 CaM12 与 SRK7 可能的相互作用区域及进行 CaM

重要 EF-hand 结构域突变后与 iSRK 的相互作用验证，为深入研究 CaM 与 SRK 相互作用机理提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝 ‘E1’ 是西南大学蔬菜学实验室保存的高度自交不亲和材料。2012 年 3 月底采摘开花前 1 ~ 2 d 的花蕾，分别提取柱头和花药总 RNA。酵母双杂交系统（Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System）、X- α -Gal、Aureobasidin A（简称 AbA）及酵母培养基购自 Clontech 公司。

1.2 *CaM12* 和 *SRK7* 基因的克隆

钙感应蛋白基因 *CaM12* 克隆及 *CaM12* 突变体构建参考孙梓健等（2012）的方法。

通过现有已知甘蓝 SRK 氨基酸序列设计兼并引物，克隆得到 E1 材料柱头 *SRK7* 基因 cDNA 的开放阅读框片段。使用 SRK7-F/SRK7-R 引物（表 1）将克隆得到的片段连接至克隆载体，转化 *E. coli* JM109，挑取阳性重组子测序，正确的重组子命名为 pEasyBlunt-SRK7。

表 1 本研究中所采用的引物序列表
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	酶切位点 Digested sites	连接载体 Vectors	宿主细胞 Cells
SRK7-F	GCGCGGATCCCTTRCTCGTCTTYGTTGTCATG	<i>Bam</i> H I	pEasy Blunt	<i>E. coli</i> JM109
SRK7-R	GCGCAAGCTTGACYCCAAAAGTGAAMACATCT	<i>Hind</i> III	simple	
P5026-F	GCGCGGATCCATGGCGGATCAGCTCACCGAC	<i>Bam</i> H I	pGEX-4T-1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
P5026-R	CGCGGTCGACTCATCACTAGCCATCATGACT	<i>Sal</i> I		
P5027-F	GCGCGGATCCCTTGCTCGTCTTTGTTGTCATG	<i>Bam</i> H I	pColdI	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
P5027-R	GCGCGTCGACCTCTGACATAAAGATCTTGACC	<i>Sal</i> I		
P5028-F	GCGCGGATCCAGGAAACAAAATCGAGC	<i>Bam</i> H I	pColdI	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
P5028-R	GCGCGTCGACCGACCCCAAAAGTGAACATC	<i>Sal</i> I		
P8027-F	GCGCCATATGATGGCGGATCAGCTCACCGAC	<i>Nde</i> I	pGBKT7	Y2HGold
P8027-R	CGCGGAATTCCTTAGCCATCATGACTTTAACG	<i>Eco</i> R I		
P8028-F	GCGCGAATTCATCTATTTCAACACTTTGTCGTC	<i>Eco</i> R I	pGADT7	Y187
P8028-R	CGCGGGATCCCTCTGACATAAAGATCTTGACC	<i>Bam</i> H I		
P8029-F	GCGCCATATGAGGAAACAAAATCGAGC	<i>Nde</i> I	pGADT7	Y187
P8029-R	CGCGGGATCCCGACCCCAAAAGTGAACATC	<i>Bam</i> H I		
P8030-F	GCGCGAATTCATCTATTTCAACACTTTGTCGTC	<i>Eco</i> R I	pGADT7	Y187
P8030-R	GCGGGATCCCGACCCCAAAAGTGAACATCT	<i>Bam</i> H I		

1.3 *CaM12* 与 *SRK7* 原核表达载体的构建及相互作用

1.3.1 钙调蛋白 *CaM12* 的原核表达载体构建

使用引物 P5026-F/P5026-R（表 1）从 pEasyBlunt-12#（孙梓健 等，2012）上对 *CaM12* 序列进行扩增，扩增产物与表达载体 pGEX-4T-1 共同双酶切。回收片段连接转化 *E. coli* JM109，检测正确的重组载体命名为 pGEX-CaM12，最后转化 *E. coli* BL21 (DE3) 进行原核表达。表达产物经 Glutathione Sepharose 4B（GE，17-0756-01）纯化。

1.3.2 eSRK7 与 iSRK7 原核表达载体的构建

使用引物 P5027-F/P5027-R（表 1）从 pEasyBlunt-5276 上亚克隆得到 *eSRK*（不含信号肽）片段；

用引物对 P5028-F/P5028-R 扩增 *iSRK*。扩增产物与 pColdI DNA 共同双酶切,回收片段连接转化 *E. coli* JM109,检测正确的重组载体分别命名为 pCold-eSRK7 和 pCold-iSRK7,最后转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行原核表达,表达产物经 Ni-NTA 纯化。

1.3.3 CaM12 与 eSRK7、iSRK7 原核表达产物的体外相互作用

将纯化得到的 GST 标签的融合蛋白 CaM12 分别加入吸附有 eSRK7 与 iSRK7 的 Ni-NTA 柱中,将 Ni-NTA 柱置于 4 °C 避光孵育 2 h,10 倍柱体积的 MCAC 缓冲液清洗,用 2 倍柱体积的洗脱液 (MCAC 缓冲液含 250 mmol · L⁻¹ 咪唑) 洗脱,最后经 SDS-PAGE 电泳进行分析。

1.4 酵母载体的构建及蛋白相互作用检测

1.4.1 基因克隆

使用引物 P8027-F/P8027-R 扩增 *CaM12* 的完整开放阅读框序列,eSRK7 (不含 N 端信号肽和跨膜域) 扩增引物为 P8028-F/P8028-R,iSRK7 (不含跨膜域) 扩增引物为 P8029-F/P8029。SRK7 (不含 N 端信号肽) 扩增引物为 P8030-F/P8030-R。

1.4.2 CaM12 与 SRK7 相互作用的酵母载体构建

根据表 1 的酶切位点,酶切连接,分别构建 pGBKT7-CaM12、pGADT7-eSRK7、pGADT7-iSRK7 及 pGADT7-SRK7。将 pGBKT7 质粒和 iSRK 共同使用 *Nde* I /*Bam*H I 消化后连接,构建 pGBKT7-iSRK7 重组载体。以孙梓健等 (2012) 构建的钙调蛋白 CaM12 突变体 pCaM12-2-、pCaM12-23-、pCaM12-234-为模板,用 P8027 引物对亚克隆得到 CaM12 点突变基因片段进行 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切,构建酵母表达载体,分别命名为 pGADT7-CaM12-2-、pGADT7-CaM12-23-、pGADT7-CaM12-234-。

1.4.3 CaM12 与 SRK7 蛋白相互作用检测

酵母表达质粒毒性检测和酵母表达质粒自激活检测根据 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual。分别挑取 SD/-Trp、SD/-Leu 平板上的菌落,将含有不同基因片段的 Y2HGold 转化菌落与含有不同基因片段的 Y187 转化菌落两两组合,同时接种于 500 μL 的 2× YPDA 液体培养基中,30 °C 振荡培养 18 ~ 20 h,在显微镜下检测 Y2HGold 与 Y187 交配形成二倍体接合型的情况;并设立 Y2HGold[pGBKT7-Lam] × Y187[pGADT7-T] (阴性对照) 组和 Y2HGold[pGBKT7-T53] × Y187[pGADT7-T] (阳性对照) 组。然后将融合菌液涂布到 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu/X-α-Gal/AbA 平板上,30 °C 培养 3 ~ 5 d;最后将 DDO/X-α-Gal/AbA 平板上的蓝色克隆划线至 SD/-Trp-Leu-Ade-His/X-α-Gal/AbA 板,观察其生长情况。

2 结果与分析

2.1 SRK7 基因片段的克隆与分析

以 ‘E1’ 材料柱头总 RNA 逆转录合成的第一链 cDNA 为模板,利用特异性引物 SRK-F/SRK-R 扩增得到 SRK 基因片段 (含胞外域、跨膜域及激酶域)。经测序分析,该片段长 2 118 bp,编码 706 个氨基酸残基,预测分子量为 80.54 kD,等电点 pI 为 8.39。以 TMMHMM 和 TMPRED 预测该蛋白是跨膜蛋白,跨膜区位于 433 ~ 455 位氨基酸残基,其氨基酸序列与现有芸薹属 SRK 蛋白氨基酸序列比对结果表明,从 E1 扩增得到的 SRK 片段为 SRK7,甘蓝材料 E1 为 S7 单倍型。胞外从 N 端至 C 端依次为 B-Lectin 结构域 (26 ~ 307 位氨基酸)、S 位点糖蛋白域 (207 ~ 307 位氨基酸) 和 PAN-APPLE 结构域 (323 ~ 397 位氨基酸),并含有 12 个保守半胱氨酸分别位于第 286、292、298、

306、308、329、337、367、371、375、377 和 392 位氨基酸处; 胞内激酶域含有 I、II、VI、VII 保守结构域, 分别位于 515~538、562~571、610~652 及 654~674 位氨基酸处 (图 1)。

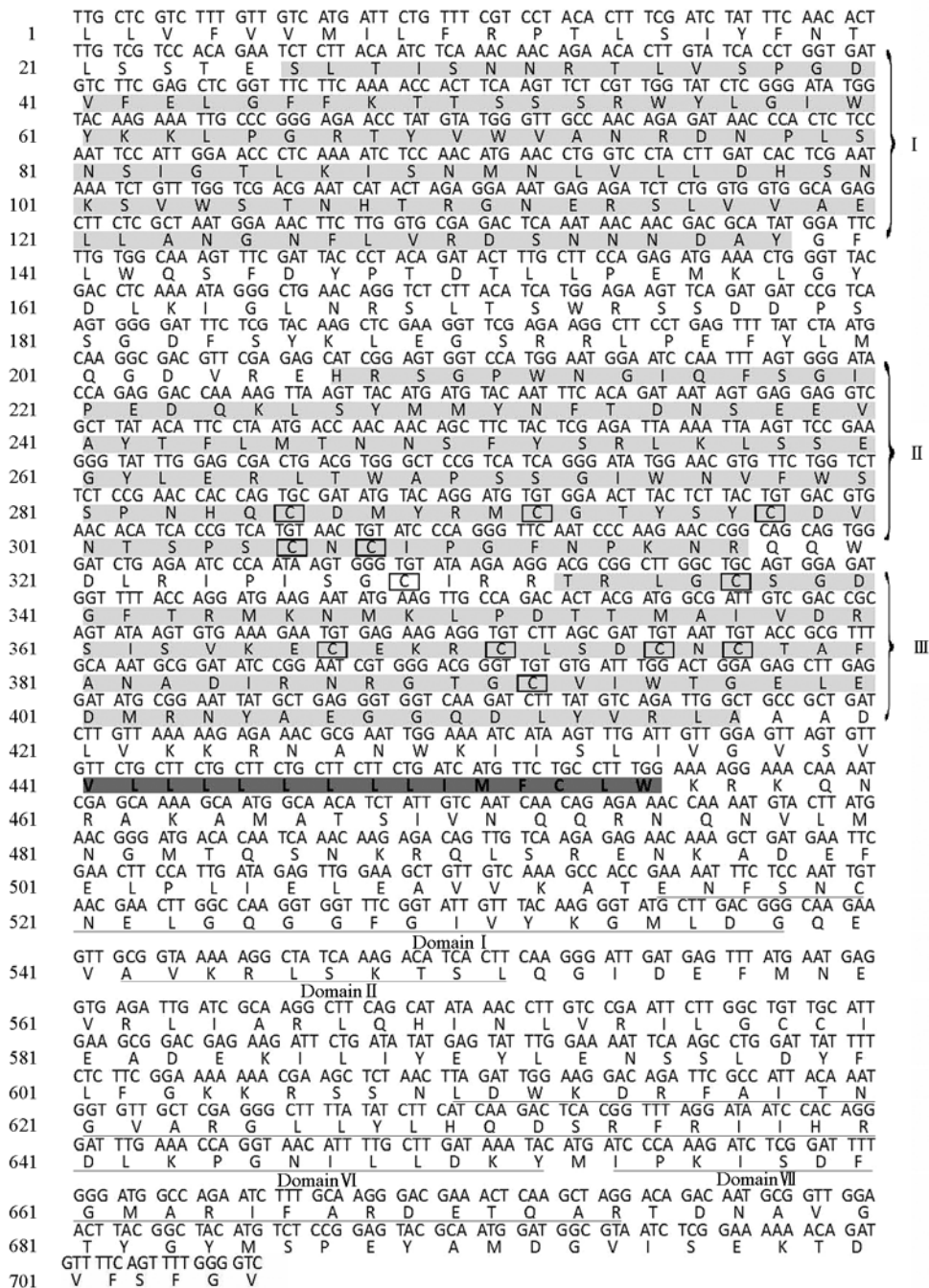


图 1 结球甘蓝 SRK7 基因序列及其推导氨基酸序列

深色底纹: 跨膜域; 底纹 I: B-Lectin 结构域; 底纹 II: S 位点糖蛋白域; 底纹 III: PAN-APPLE 结构域; 方框: 12 个保守的半胱氨酸残基; 下划线: 激酶区保守结构域 (N 端向 C 端依次为 I、II、VI、VII 保守结构域)。

Fig. 1 SRK cDNA sequence and deduced amino acid sequence of cabbage

Dark background: Transmembrane domain; Background I: B-Lectin domain; Background II: S locus glycoprotein domain; Background III: PAN-APPLE domain; Small Box: Twelve conserved cysteine residues; Dark background: Transmembrane domain;

Underlined residues are the conserved domain I, II, VI, VII of kinase domain.

2.2 CaM12 与 eSRK7 及 iSRK7 体外相互作用检测

如图 2 所示, 第 4 泳道为纯化的含 GST 标签的 CaM12 融合蛋白, 与预测分子量 40 kD 左右一致, 第 5 泳道为纯化的 6His 标签 eSRK7 融合蛋白, 第 6 泳道为含 6His 标签的 iSRK7 融合蛋白。在经过柱上孵育以后检测到了 iSRK7 融合蛋白与 CaM12 有相互作用 (图 2, 第 8 泳道), 而与 eSRK7 没有相互作用 (图 2, 第 7 泳道)。

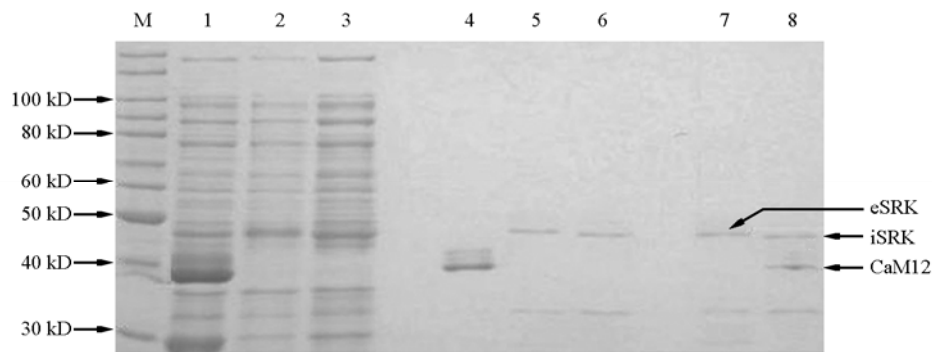


图 2 钙调蛋白 CaM12 与 eSRK7、iSRK7 原核表达产物的体外相互作用

M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导未纯化的 CaM12 融合蛋白; 2: 空表达载体对照; 3: 未诱导对照; 4: 纯化的 CaM12 融合蛋白; 5: 纯化的 eSRK7 融合蛋白; 6: 纯化的 iSRK7 融合蛋白; 7: CaM12 融合蛋白与 eSRK7 融合蛋白孵育结果; 8: CaM12 融合蛋白与 iSRK7 融合蛋白孵育结果。

Fig. 2 Interaction between CaM12 and eSRK7, iSRK7

M: Protein standard; 1: pGEX-CaM12 induced with IPTG; 2, 3: Control; 4: Purified GST-tagged CaM12; 5: Purified 6His-tagged eSRK7; 6: Purified 6His-tagged iSRK; 7: Interaction between CaM12 and eSRK7; 8: Interaction between CaM12 and iSRK7.

2.3 CaM12 与 SRK7 片段的酵母双杂交相互作用检测

2.3.1 酵母载体的构建

如图 3 所示, 分别用 P8028、P8029 和 P8030 引物从 pEasyBlunt-5276 上克隆得到 iSRK7、eSRK7 和 SRK7 片段, 随后将各片段分别插入酵母载体相应酶切位点。

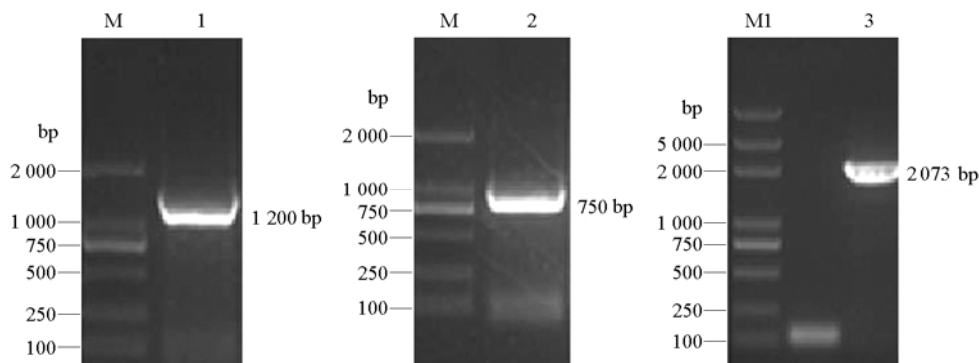


图 3 酵母载体的 eSRK7、iSRK7 和 SRK7 片段

Fig. 3 Agarose electrophoresis of iSRK7, eSRK7 and SRK7

M: D2k DNA marker; M1: D2k plus DNA marker; 1: eSRK7, 2: iSRK7; 3: SRK7.

2.3.2 融合蛋白的毒性检测与自激活检测

酵母 Y187 (pGADT7-SRK7)、Y187 (pGADT7-eSRK7) 和 Y187 (pGADT7-iSRK7) 在单缺培养基 SD/-Leu 上与对照酵母 Y187 (pGADT7) 在划单线培养 3 d 后菌落大小相似, 由此可知重组质粒对酵母 Y187 没有毒性; 而酵母 Y2HGold (pGBKT7-CaM12) 与对照 Y2HGold (pGBKT7) 在单缺培养基 SD/-Trp 上单克隆菌落大小相似, 重组质粒 Y2HGold (pGBKT7-CaM12) 对酵母 Y2HGold 无毒性。

重组质粒 pGBKT7-CaM12、pGADT7-iSRK7 和 pGADT7-eSRK7 的双酶切检测如图 4 所示, 酶切检测结果与预期一致, 随后将测序正确的质粒通过化学转化法转入相应酵母菌株。

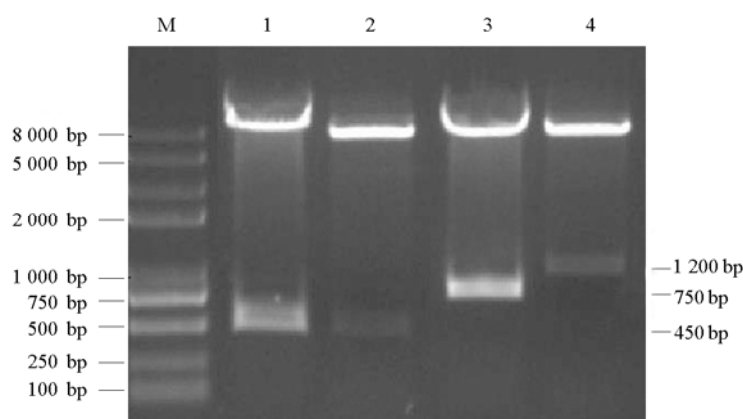


图 4 酵母重组载体的双酶切检测

Fig. 4 Double digest of recombinant plasmids

M: D2k plus II DNA marker; 1, 2: pGBKT7-CaM12; 3: pGADT7-iSRK7; 4: pGADT7-eSRK7.

在 SD/-Leu 和 SD/-Leu/X- α -Gal 固体培养基上, Y187(pGADT7-SRK7)、Y187(pGADT7-eSRK7) 和 Y187 (pGADT7-iSRK7) 都能长出白色菌落, 但在 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 和 SD/-Leu/-Trp 培养基上不能生长。

在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X- α -Gal 培养基上, Y2HGold (pGBKT7-CaM) 能长出白色菌落, 但在 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 培养基上都不能生长。而阳性对照在 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 培养基上菌落均呈蓝色。

在 SD/-Leu/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal 培养基上阴性对照都有白色菌落, 而在 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 培养基上都不能生长。

说明所亚克隆至酵母载体的基因片段在酵母表达载体和对应的酵母菌株中均不能自主激活 MEL1 和 AUR1-C 报告基因, 没有自身转录激活活性。

2.3.3 CaM12 与 iSRK7、eSRK7 的相互作用检测

将带有目的基因载体和空载体的酵母菌株按照表 2 的组合融合为二倍体酵母。1~7 号二倍体酵母在 SD/-Leu/-Trp 上能够长出白色菌落, 但除阳性对照(8 号)外仅有 6 号与 7 号组合在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 上能够生长, 且在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 上呈蓝色(图 5), 阴性对照(9 号)不能生长。

由此可推测, 二倍体酵母 6 号与 7 号的报告基因 HIS3、AUR1-C、和 ADE2 均被激活, 说明在酵母二倍体中, CaM12 能与 SRK7 片段发生相互作用, 且这一作用区域在胞内激酶区。

表 2 酵母中 CaM12 与 SRK7、iSRK7 和 eSRK7 片段相互作用分析
Table 2 Analysis of the interaction of CaM12 with SRK7, iSRK7 and eSRK7

编号 No.	菌株 (质粒) Strain (Plasmid)	缺陷培养基 Synthetic dropout	菌斑 Bacterial plaque	颜色 Color
1	Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-SRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	
2	Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-eSRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	
3	Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-iSRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	
4	Y187 (pGADT7) × Y2HGold (pGBKT7-CaM12)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	
5	Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-eSRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	
6	Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-SRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	有 Yes	蓝 Blue
7	Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-iSRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	有 Yes	蓝 Blue
8	Y2HGold (pGBKT7-T53) × Y187 (pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	有 Yes	蓝 Blue
9	Y2HGold (pGBKT7-Lam) × Y187 (pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	无 No	

2.3.4 CaM12 EF-hand 突变体与 iSRK7 酵母双杂交检测

上述试验结果说明在酵母二倍体中, CaM12 能与 SRK7 片段发生相互作用, 且这一作用区域在胞内激酶区。为验证 SRK7 胞内激酶区片段 iSRK7 与 CaM12 的具体作用区段, 将 CaM12 EF-Hand 突变体 CaM12-2-、CaM12-23-和 CaM12-234-采用 P8027 引物对通过 PCR 获得相应片段后克隆至酵母载体 pGADT7, 分别命名为 pGADT7-CaM12-2-、pGADT7-CaM12-23-和 pGADT7-CaM12-234-, 并转化酵母菌株 Y187; 将 iSRK7 片段亚克隆至 pGBKT7, 命名为 Y2HGold (pGBKT7-iSRK7), 转化酵母菌株 Y2HGold。相应测序正确的酵母单克隆均无毒性和自激活现象。

将带有目的基因载体和空载体的酵母菌株按照表 3 的组合融合为二倍体酵母。如表 3 所示：1 ~ 7 号二倍体酵母在 SD/-Leu/-Trp 能够长出白色菌落，而在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 上均不能生长，仅有阳性对照（8 号）能够长出蓝色菌斑（图 6）。由此可知，CaM12 EF-Hand 突变体均不能与 iSRK7 片段发生相互作用。

表 3 酵母中 CaM12 突变体与 iSRK7 相互作用分析
Table 3 Analysis of the interaction of CaM12 mutants with iSRK

编号 No.	菌株（质粒） Strain (Plasmid)	缺陷培养基 Synthetic dropout	菌斑 Bacterial plaque	颜色 Color
1	Y2HGold (pGBKT7) \times Y187 (pGADT7-CaM12-2-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
2	Y2HGold (pGBKT7) \times Y187 (pGADT7-BoCaM12-23-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
3	Y2HGold (pGBKT7) \times Y187 (pGADT7-BoCaM12-234-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
4	Y187 (pGADT7) \times Y2HGold (pGBKT7-iSRK7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
5	Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) \times Y187 (pGADT7-CaM12-2-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
6	Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) \times Y187 (pGADT7-CaM12-23-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
7	Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) \times Y187 (pGADT7-CaM12-234-)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
8	Y2HGold (pGBKT7-T53) \times Y187 (pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	有 Yes	蓝 Blue
9	Y2HGold (pGBKT7-Lam) \times Y187 (pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	



图 5 酵母 CaM12 与 SRK7、iSRK7 和 eSRK7 片段相互作用分析

Fig. 5 The interaction of CaM12 with SRK7, iSRK7 and eSRK7
1: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-SRK7); 2: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-eSRK7); 3: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-iSRK7); 4: Y187 (pGADT7) × Y2HGold (pGBKT7-CaM12); 5: Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-eSRK7); 6: Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-SRK7); 7: Y2HGold (pGBKT7-CaM12) × Y187 (pGADT7-iSRK7); 8: Y2HGold (pGBKT7-T53) × Y187 (pGADT-T); 9: Y2HGold (pGBKT7-Lam) × Y187 (pGADT-T).



图 6 酵母 CaM12 突变体与 iSRK7 相互作用分析

Fig. 6 Analysis of the interaction of CaM12 mutants with iSRK7
1: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-CaM12-2-); 2: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-BoCaM12-23-); 3: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7-BoCaM12-234-); 4: Y187 (pGADT7) × Y2HGold (pGBKT7-iSRK7); 5: Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) × Y187 (pGADT7-CaM12-2-); 6: Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) × Y187 (pGADT7-CaM12-23-); 7: Y2HGold (pGBKT7-iSRK7) × Y187 (pGADT7-CaM12-234-); 8: Y2HGold (pGBKT7-T53) × Y187 (pGADT-T); 9: Y2HGold (pGBKT7-Lam) × Y187 (pGADT-T).

2.3.5 CaM12 与 iSRK7 相互作用区域模型预测

对 SRK7 蛋白氨基酸的分析发现, SRK7 激酶区第Ⅵ和第Ⅶ保守结构域具有两个疏水性 α 螺旋。通过 ZDOCK 软件建模得到的 CaM12 与 iSRK7 相互作用模型 (图 7), 黄色区域表示两者相互作用发生的区域。

3 讨论

3.1 CaM12 与 SRK7 相互作用在胞内激酶区

本试验中克隆得到了甘蓝单倍型 SRK7 基因, 其包含多种功能结构。Erickson-Viitanen 和 Degrado (1987) 研究发现, 钙调蛋白可以与靶蛋白的疏水性 α 螺旋结合发生相互作用。随后对 28 个芸薹属 SRK 蛋白氨基酸残基序列比对中发现, 在第Ⅵ保守结构域中均含有预测的疏水性 α 螺旋结构 (第 607 ~ 624 位氨基酸残基, SSNLDWKDRFAITNGVAR)。拟南芥 S 位点受体类激酶 (S-locus RLK) 能与 CaM 相互作用, 钙调蛋白也可能与其他 PRKs 发生相互作用。本试验中首先构建甘蓝 CaM12 与 SRK7 全长、胞外域及胞内激酶域的原核表达载体, 通过 pulldown 验证了 CaM12 与激酶域的相互作用。由于 N 端的信号肽会影响酵母双杂交系统的检测, 本研究中将 N 端的信号肽区域删除, 而后再进一步的酵母双杂交试验也证明了 CaM12 与 SRK7 能够相互作用, 且相互作用区域在胞内激酶域。由此可见, CaM12 可能不仅与 SRK7 的胞内激酶域发生相互作用, 还能与其他单倍型的 SRK 蛋白胞内激酶域发生相互作用 (Kim et al., 2009)。因此可以推知, 钙调蛋白在柱头与花粉识别并启



图 7 BoCaM12 与 iSRK7 相互作用模型

绿色: iSRK7; 紫红色: CaM12; 黄色: 相互作用区域。

Fig. 7 The interaction model of BoCaM12 and iSRK7

Green: iSRK7; Burgundy: CaM12; Yellow: Interaction region.

动下游钙信号的过程中具有重要作用。

3.2 CaM12 EF-hand 突变体不能与 SRK7 相互作用

甘蓝 CaM12 具有 4 个保守 EF-hand 结构域, CaM 对钙离子的结合依赖 EF-hand 结构域氨基酸残基的保守性, 如果 EF-hand 结构域的保守氨基酸残基位点改变, 那么对于钙离子的结合能力变弱 (Yang & Poovaiah, 2003)。CaM12 中 4 个 EF-hand 结构域通过氢键成对的形成分子内反向平行的 β 折叠, 以形成钙离子结合位点, EF-hand 结构模型表明 CaM 的 N 端和 C 端成对的 EF-hand 结构域形成哑铃状构象对钙离子的结合具有重要的作用, 且 C 端结构 (EF3 和 EF4) 对钙离子具有更高的亲和能力 (Babu et al., 1985; Osnat & Michael, 1985; Rajagopal et al., 1992)。在钙调蛋白 EF-hand 突变体与 iSRK7 相互作用的研究中, 构建 CaM12 的突变体, 通过酵母双杂交试验显示突变第 2 个 EF-hand、第 2、3 个 EF-hand 和第 2、3、4 个 EF-hand 模体的钙调蛋白突变体均不能与 iSRK7 发生相互作用。所以钙调蛋白参与动植物信号传导过程, 需要与 Ca^{2+} 结合保持一定的构象才能与靶蛋白相结合。该试验结果证实了 CaM12 的 4 个 EF-hand 模体对于分子的构象具有重要的作用, 而这一过程必须要有 Ca^{2+} 的参与。

3.3 CaM 作用的定位

有试验表明 CaM 在胞内多定位于细胞质中, 作为某些酶的亚基参与信号传导 (Rudd & Franklin-Tong, 1999, 2001; Reddy, 2001), 但也有部分 CaM 进入并定位于细胞核内, 参与基因的表达调控 (McCormack & Braam, 2003)。CaM 结构的改变是行使 Ca^{2+} 受体功能和有效传递 Ca^{2+} 信号的基础, 而 Ca^{2+} -CaM 复合体对不同靶蛋白亲和力的差异是传递不同 Ca^{2+} 信号所必需 (Snedden & Fromm, 2001; Lecourieux et al., 2006)。由本试验中 CaM12 与 SRK7 的相互作用的结果也可以推测, 试验中得到的 CaM12 不仅分布于质外体空间, 诱导胞外钙梯度形成, 也可作用于胞内参与胞内信号传导。

本试验从甘蓝花粉和柱头中分别克隆得到 CaM12 基因和 SRK7 基因, 随后构建了 CaM12 和 SRK7 胞外域和激酶域原核表达体系, Pull-down 试验及酵母双杂交试验得到 CaM12 能与 iSRK7 发生相互作用, 及 CaM12 EF-Hand 突变体与 iSRK7 均不能发生相互作用。本研究为 CaM 功能提供了重要的理论依据, 同时也为自交不亲和过程中 CaM 调控作用的研究奠定基础。

References

- Babu Y S, Sack J S, Greenhough T J, Bugg C E, Means A R, Cook W J. 1985. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature*, 315: 37 - 40.
- Cabrillac D, Cock J M, Dumas C, Gaude T. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 410: 220 - 223.
- Chin D, Means A R. 2000. Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Bio*, 10: 322 - 328.
- Cock J M. 2000. A receptor kinase and the self-incompatibility response in *Brassica*. In: Kreis M, Walker J C. *Plant protein kinases. Advances in botanical research*, London: Academic Press: 32: 270 - 298.
- Dearnaley J D W, Levina N N, Lew R R, Heath I B, Goring D R. 1997. Interrelationships between cytoplasmic Ca^{2+} peaks, pollen hydration and plasma membrane conductances during compatible and incompatible pollinations of *Brassica napus* papillae. *Plant Cell Physiol*, 38: 985 - 999.
- Delorme V, Giranton J L, Hatzfeld Y, Friry A, Heizmann P, Ariza M J, Dumas C, Gaude T, Cock J M. 1995. Characterization of the S locus genes, SLG and SRK, of the *Brassica* S3 haplotype: Identification of a membrane-localized protein encoded by the S locus receptor kinase gene. *The Plant Journal*, 7: 429 - 440.
- Elleman C, Dickinson H G. 1999. Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: Calcium accumulation during stigmatic penetration by *Brassica oleracea* pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 12: 94 - 202.
- Erickson-Viitanen S, Degrado W F. 1987. Recognition and characterization of calmodulin-binding sequences in peptides and proteins. *Methods in*

- Enzymology, 139: 455 – 478.
- Giranton J L, Dumas C, Cock J M, Gaude T. 2000. The integral membrane S-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 3759 – 3764.
- Goring D R. 2000. The search for components of the self-incompatibility signaling pathway (s) in *Brassica napus*. *Annals of Botany*, 85: 147 – 153.
- Kachroo A, Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 2001. Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, 293: 1824 – 1826.
- Kim H S, Jung M S, Lee K, Kim K E, Yoo J H, Kim M C, Kim D H, Cho M J, Chung W S. 2009. An S-locus receptor-like kinase in plasma membrane interacts with calmodulin in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 583: 36 – 42.
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, 171: 249 – 269.
- McCormack E, Braam J. 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 159 (3): 585 – 598.
- Osnat H, Michael N G. 1985. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature*, 313: 653 – 659.
- Rajagopal C, William E M, Anthony R M, Florante A Q. 1992. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228 (4): 1177 – 1192.
- Reddy A S N. 2001. Calcium: Silver bullet in signalling. *Plant Science*, 160: 381 – 404.
- Rudd J J, Franklin-Tong V E. 1999. Calcium signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 214 – 232.
- Rudd J J, Franklin-Tong V E. 2001. Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytologist*, 151: 733 – 749.
- Sanders D, Brownlee C, Harper J F. 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11: 691 – 706.
- Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286: 1697 – 1700.
- Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa T, Che F S, Suzuki G, Watanabe M, Hinata K, Isogai A. 2001. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiology*, 125: 2095 – 2103.
- Shiu S H, Bleecker A B. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98: 10763 – 10768.
- Snedden W A, Fromm H. 2001. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist*, 151: 35 – 66.
- Stein J C, Howlett B, Boyes D C, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88: 8816 – 8820.
- Sun Zi-jian, Wei Jing-yi, Wang Xiao-jia, Song Ming, Tang Qing-lin, Wang Zhi-min, Ren Xue-song. 2012. Cloning and expression analysis of calmodulin gene in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (4): 677 – 686. (in Chinese)
- 孙梓健, 韦静宜, 王小佳, 宋 明, 汤青林, 王志敏, 任雪松. 2012. 结球甘蓝花粉钙调素基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 39 (4): 677 – 686.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. 2000. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403: 913 – 916.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 1920 – 1925.
- Takayama S, Shimosato H, Shiba H, Funato M, Che F S, Watanabe M, Iwano M, Isogai A. 2001. Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 413: 534 – 538.
- Yang T B, Poovaiah B W. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci*, 8 (10): 505 – 512.