

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.01.029

# 拟南芥 CARK3 与 RCAR12 相互作用的研究

黄琪, 李小意, 陈静波, 李晶祥, 李旭锋, 杨毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘要:** 植物激素 ABA 是植物应对非生物胁迫的响应因子, 广泛参与了植物生长发育的调控。ABA 结合其受体后抑制 PP2Cs 的磷酸酶活性, 释放 SnRK2s, 从而启动 ABA 信号转导途径。本文采用酵母双杂交系统, GST-pull down 技术研究蛋白质激酶 CARK3 与 ABA 受体 RCAR12 在体外的相互作用, 结果显示 CARK3 和 RCAR12 共转入酵母后, 在三缺平板上能够正常生长; 经 His-Tag 抗体检测, CARK3 与 RCAR12 出现明显且单一的条带。同时, 采用双分子荧光互补实验研究 CARK3 与 RCAR12 在体内的相互作用, 结果显示 CARK3 与 RCAR12 共转化烟草后能观察到较强的荧光。体内外实验表明, CARK3 与 RCAR12 存在明显的相互作用, CARK3 可能通过直接磷酸化 ABA 受体 RCAR12 来调控 ABA 信号途径的生理应答。

**关键词:** CARK3; RCAR12; 酵母双杂交系统; GST-pull down; BIFC

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)01-0179-05

## An interaction of ABA receptor RCAR12 with CARK3 in *Arabidopsis thaliana*

HUANG Qi, LI Xiao-Yi, CHEN Jing-Bo, LI Jing-Xiang, LI Xu-Feng, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The phytohormone abscisic acid (ABA) is crucial for plant development and response to abiotic stress, including drought. ABA perceived by the ABA receptors, PYR/PYL/RCAR, which bound to ABA, and then recruit Protein phosphatase 2C (PP2C) to inhibit the PP2C activity, thereby activating SNF1-RELATED PROTEIN KINASE2 (SnRK2s). Here, CARK3 and RCAR12 interact in yeast two-hybrid system and GST-pull down in vitro. The results indicated that CARK3 and RCAR12 were co-transfected into yeast and grew normally on the three-deficient plates; CARK3 and RCAR12 showed a significant and single band, which detected by His-Tag antibody. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was used to illuminate the interaction between CARK3 and RCAR12 in *Nicotiana benthamiana* in vivo. The result showed that CARK3 and RCAR12 were co-transfected into tobacco, and a strong fluorescence was observed. We could infer that CARK3 indeed interacts with RCAR12 in present study and the phosphorylation modulates the physiological response of the core ABA signaling pathway.

**Keywords:** CARK3; RCAR12; Yeast two-hybrid system; GST-pull down; BIFC

收稿日期: 2017-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(31671455), 973 计划(2015CB755702)

作者简介: 黄琪(1991-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为分子进化. E-mail: 18302870530@163.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

## 1 引言

植物激素脱落酸(ABA)参与植物抗逆性调控,在植物个体生长和发育的不同阶段都扮演着重要角色<sup>[1-3]</sup>.近年来,随着 ABA 受体 PYR/PYL/RCAR 的发现<sup>[4,5]</sup>,人们对 ABA 信号转导途径及其作用机制有了进一步的认识.当 ABA 存在时,ABA 与 PYR/PYL/RCAR 结合,抑制了 PP2Cs 的活性,从而释放 SnRK2s(SnRK2.2/2.3/2.6),SnRK2s 磷酸化下游靶基因并启动效应基因的表达.当缺少 ABA 时,PP2Cs 抑制下游蛋白激酶 SnRK2s 的激酶活性,使其不能激活 ABA 的响应元件,例如 ABFs<sup>[6,7]</sup>.

研究者发现,蛋白质磷酸化和去磷酸化参与了各种物种的细胞信号转导,因此,ABA 受体也可能会受到蛋白质激酶的修饰调控<sup>[8-10]</sup>.本实验室前期通过酵母双杂交筛选到与拟南芥 ABA 受体 RCAR3 相互作用的蛋白 CARK1,属于拟南芥 RLCK VIII 亚家族.经研究发现,该蛋白与 ABA 受体 RCAR3、RCAR11 在体内和体外均能发生相互作用.前期研究结果已证实了 CARK1 在 ABA 信号通路中的功能和作用,即正调控 ABA 介导的生理应答,并且从结构学层面解析了 CARK1 的激酶结构.因此,为了进一步研究拟南芥 RLCK VIII 亚家族在 ABA 信号通路中的功能,本文选取了 CARK 家族 11 个成员中的一个,将其命名为 cytosolic ABA receptor kinase 3(CARK3),对 CARK3 和 ABA 受体 RCAR12 之间的相互作用机制进行了初步的研究.本文构建了载体 pGBKT7-RCAR12、pGADT7-CARK3 $\Delta$ N(pGADT7-CARK3 $\Delta$ N 为截短的 CARK3,本实验室前期研究发现截短 CARK1 后更易研究分析)、pET28A-CARK3-KD、pGEX-6p-1-RCAR12,采用酵母双杂交技术,GST-pull down 试验验证 CARK3 和 RCAR12 在体外的相互作用.接着进一步构建了 pSPYNE-CARK3、pSPYCE-RCAR12 载体,通过双分子荧光互补实验验证了 CARK3 和 RCAR12 在植物体内的相互作用.这对深入研究 CARK 家族在 ABA 信号途径中的作用机制奠定了基础.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株, Rosetta 菌株, pET28a、pGEX-6P-1、pSPYCE、pSPYNE 载体由实验室保存,酵母菌株 AH109、pGBKT7、pGADT7-Rec 载体均购于 Clontech 公司. GST-resin、His-resin 蛋白纯化柱购自 invitrogen 公司, His 抗体购自 Sigma 公司,拟

南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚型由本实验室保存,引物合成及测序由华大基因和擎科公司完成.

### 2.2 实验方法

2.2.1 目的基因的分离和载体的构建 以实验室保存的 cDNA 为模版,加入相应的引物和 Primer-STAR Max 高保真聚合酶,PCR 扩增目的基因片段,得到截短的 CARK3 及全长 CARK3、RCAR12. 构建 pGBKT7-RCAR12、pGADT7-CARK3 $\Delta$ N、pET28A-CARK3-KD、pGEX-6p-1-RCAR12、pSPYNE-CARK3、pSPYCE-RCAR12 载体,分别用于酵母双杂交实验,GST-pull down 实验和双分子荧光互补实验.

2.2.2 酵母共转化 根据 Clontech 操作手册,制备 AH109 酵母感受态细胞,共转化载体 pGBKT7-RCAR12、pGADT7-CARK3 $\Delta$ N,将转化后的酵母细胞均匀涂布于 SD/Leu-/Trp-平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~4d,然后分别挑取单克隆菌用牙签挑取划线到 SD/Leu-/Trp-与 SD/Leu-/Trp-/His-平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4d,观察菌落生长状况,再从 SD/Leu-/Trp-中挑取阳性菌接入缺陷型液体培养基 SD/Leu-/Trp-中,30 $^{\circ}$ C,220rpm 培养 48h,用 0.9% NaCl 将样品调至 OD 值相同,再将样品稀释 10 倍,100 倍,1000 倍,分别取 5 $\mu$ L 菌液滴点在培养基 SD/Leu-/Trp-与 SD/Leu-/Trp-/His-平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 3-4d,观察菌落生长状况.

2.2.3 蛋白质纯化及 Pull down 将构建好的 pET28A-CARK3-KD、pGEX-6p-1-RCAR12 转入到 Rosetta 菌株中,活化菌体并扩大培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8.加入 0.5mM IPTG,18 $^{\circ}$ C,180r/min 诱导过夜,严格按照纯化蛋白的步骤纯化出较好的 CARK3,RCAR12,GST 蛋白,BCA 法测量蛋白浓度.取 40 $\mu$ L 谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆于 1.5mL EP 管中,分别加入 5 $\mu$ g RCAR12、GST 蛋白质,再向其中加入 5 $\mu$ g CARK3-KD,加 Incubation buffer 到 500 $\mu$ L 体系,4 $^{\circ}$ C 轻轻混合 2h.用 Washing buffer 洗五次,加入 30 $\mu$ L 1 $\times$ loading buffer,取 1.3 $\mu$ L His-CARK3 制作 10% input,99 $^{\circ}$ C 煮 5min,再用 10% SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 检测.

2.2.4 双分子荧光互补 将构建好的 pSPYNE-CARK3、pSPYCE-RCAR12 转化农杆菌,200r/min,28 $^{\circ}$ C 过夜培养,室温 1000g 离心 10min 收集菌体,弃上清,用浸染液(50mL 浸染液:0.25g Glu,5mL MES 原液,5mL Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,50 $\mu$ L 100mM 乙酰丁香酮,40mL dd H<sub>2</sub>O)重悬后 4000rpm 离心 10min,并用浸染液多洗几次,将沉淀用浸染液重悬至 OD<sub>600</sub> =

0.4~0.8, 静置一小时后, 等量混合, 用 1mL 注射器以压力注射法共同瞬时转化烟草叶片 48h 后, 用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。

### 3 结果与分析

#### 3.1 酵母共转化验证 CARK3 和 RCAR12 体外的相互作用

分析菌落在 SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>与 SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>平板上的生长情况, 如图所示, 结果发现 pG-

BKT7-RCAR12+pGADT7-CARK3 $\Delta$ N, pGBKT7-MYB44 + pGADT7-CARK3 $\Delta$ N 转入酵母后, 在 SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>平板上均长出邱状隆起状、白色光滑的菌落, 说明酵母转化成功. 共转化 pGBKT7-RCAR12 和 pGADT7-CARK3 $\Delta$ N, 在 SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>平板上能够正常生长, pGBKT7-MYB44 和 pGADT7-CARK3 $\Delta$ N 不能长出菌落. 初步表明在酵母系统中 CARK3 可以与 RCAR12 发生相互作用。

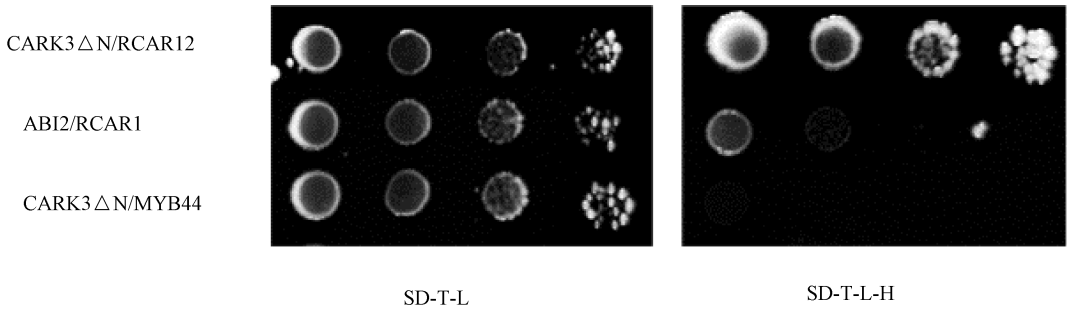


图 1 酵母共转化检测 CARK3 和 RCAR12 体外的相互作用

Fig. 1 Interaction between CARK3 and RCAR12 by Yeast two-hybrid system *in vitro*

Yeast two-hybrid assay for the interaction between CARK3 and RCAR12. Fusion constructs of the CARK3 fused with the AD and RCAR12 fused with the BD, CARK3 $\Delta$ N/MYB44 as a negative control.

#### 3.2 Pull down 验证 CARK3 和 RCAR12 体外的相互作用

通过亲和层析纯化方法, 得到纯度较高的 CARK3, RCAR12, GST 蛋白. 然后采用 His-Tag 特异性抗体检测了 Pull down 实验得到的相互作用蛋白复合物, 如图所示从左至右分别是 His-CARK3 + GST-RCAR12、His-CARK3 + GST、10% Input, 10% Input 作为阳性对照. 图中可以看到 GST-RCAR12 泳道和 10% Input 泳道均有一条明显、单一且大小相同的条带, 而 His-CARK3 + GST 泳道则只能见到一条亮度很弱的条带. 实验结果说明 His-CARK3 和 GST-RCAR12 在体外存在明显的相互作用。

#### 3.3 双分子荧光互补技术分析 CARK3 和 RCAR12 体内的相互作用

将构建好的 pSPYNE-CARK3, pSPYCE-RCAR12 共同转化烟草叶片 48h 后, 用激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 同时设置 pSPYNE-ABI1, pSPYCE-RCAR1 为阳性对照, pSPYNE-CARK3 和 pSPYCE 为阴性对照. BIFC 实验的结果如图, 共转 pSPYNE-CARK3 和 pSPYCE 时, 没有观测到荧光, 而共转 pSPYNE-CARK3, pSPYCE-RCAR12 及 pSPYNE-ABI1, pSPYCE-

RCAR1 时, 出现相对较强的荧光. 说明在植物体内 CARK3 和 RCAR12 存在相互作用。

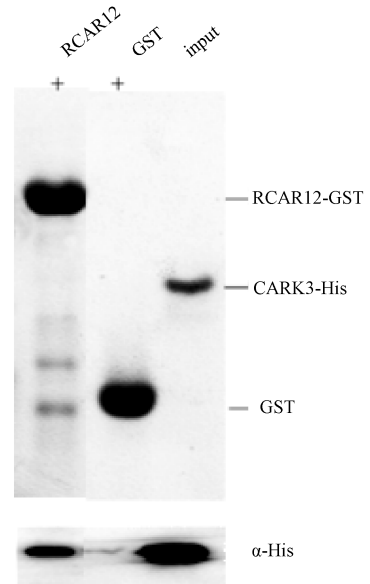


图 2 Pull down 实验检测 CARK3 和 RCAR12 体外的相互作用

Fig. 2 Interaction between CARK3 and RCAR12 by Yeast two-hybrid system, GST-pull down assay *in vitro*

Detecting of the interaction between CARK3 and RCAR12 by His antibody. His-CARK3 + GST as a negative control.

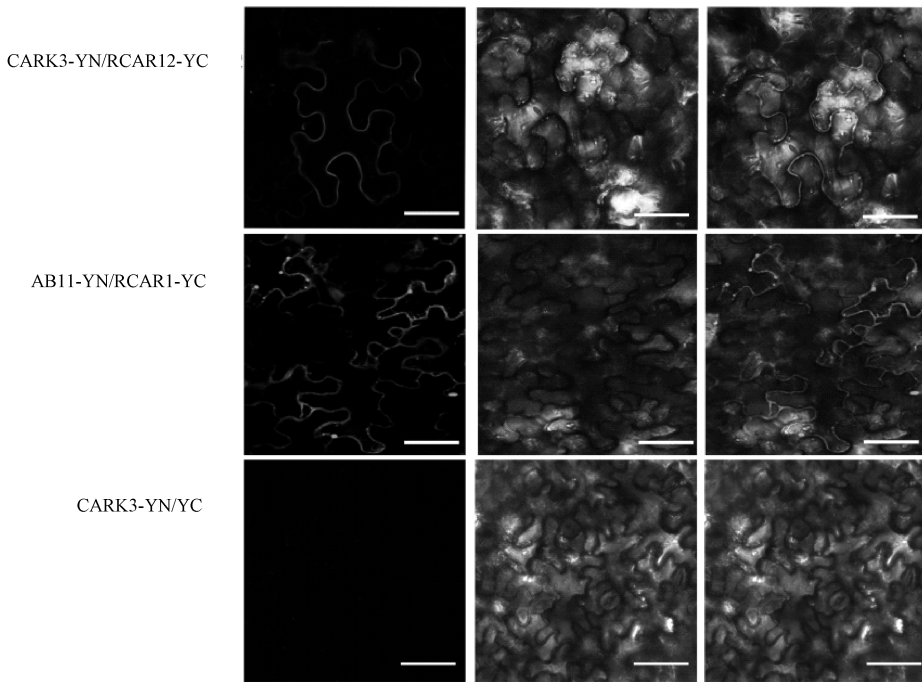


图 3 BIFC 验证 CARK3 和 RCAR12 体内的相互作用

Fig. 3 Interaction between CARK3 and RCAR12 by BIFC *in vivo*

Photographs show epifluorescence confocal images of transiently transformed tobacco epidermal cells co-expressing pSPYNE-CARK3 and pSPYCE-RCAR12

## 4 讨 论

植物在面对不断变化的恶劣环境(如高盐、干旱、低温等)时,依赖细胞信号转导途径建立适当的应对机制以确保生存.大量研究表明,蛋白质的修饰是其功能的基础,尤其是蛋白质磷酸化在所有生物体的细胞信号转导中起着中心作用,而蛋白质激酶参与了蛋白质磷酸化过程,因此研究蛋白激酶的功能显得尤为重要.拟南芥中,类受体蛋白质激酶家族(RLCKs)约有 134 个成员,11 个保守结构域,是类受体激酶(RLK)的第二大亚家族,占拟南芥中 RLK 的 25%.RLCKs 定位于细胞质,仅含有胞内激酶结构域.它们通过磷酸化下游靶蛋白在植物的生长、发育及其生物胁迫、非生物胁迫应答过程中发挥着重要作用<sup>[11-14]</sup>.近年来,对 RLCK 的研究多集中在 BR、PA、ROS 信号通路和植物非特异性免疫应答上<sup>[15-19]</sup>.已有的研究表明,蛋白激酶 BAK1 与类受体胞质激酶 BIK1,调节 BR 信号通路,参与了拟南芥特异性免疫信号识别和调控.另一个 RLCK 家族成员 PBS1 在病原菌应答反应中也发挥关键作用<sup>[20]</sup>.然而,以上研究均未对 RLCKs 家族在激素信号转导中具体作用和植物发育过程中的功能做出详细探讨.

基因组计划揭示了许多新的基因,但通过基因

组测序的大多数基因,我们都尚未了解其具体的功能,正因如此,这些新的基因功能在分子生物学上得到了广泛的研究.通过对蛋白质相互作用的研究,我们能揭示所研究的蛋白质与其他蛋白质的关系,从而进一步揭示编码该蛋白的基因在细胞信号转导及其他方面的作用机制.经过 NCBI 数据库序列比对发现,拟南芥中 CARK 家族成员与番茄中的 Pti1 (Pto-interacting 1) 具有很高的同源性,而 CARK1 与 Pti1 的氨基酸同源性更是高达 80%.经过本实验室前期研究发现,CARK1 属于 RLCK VIII 亚家族成员,其与 ABA 受体 RCAR3, RCAR11 在体内外存在相互作用,并且相互作用依赖于 CARK1 的激酶活性位点 N204.基于以上的研究结果,本研究主要利用酵母双杂交技术, GST-pull down 实验, BIFC 等实验对 CARK 家族成员中的 CARK3 和 ABA 受体 RCAR12 的相互作用进行了研究.结果显示 CARK3 与 RCAR12 在体内和体外均存在相互作用,至此我们推测 CARK3 或许与家族成员 CARK1 功能类似,可能同样通过磷酸化 ABA 受体 RCAR3 来调控 ABA 信号传导途径的生理应答.但其相互作用在 ABA 信号通路中的功能还需进一步的研究.为了验证 CARK3 是否与多个 ABA 受体相互作用,后期需要对 CARK3 与 RCAR 家族其他 13 个成员的相

互作用进行研究. 结合磷酸化实验检测 CARK3 和 RCARs 的修饰关系, 了解 CARK3 磷酸化受体的位点, 并揭示如何通过磷酸化 ABA 受体影响 ABA 信号的传递. 同时为了进一步揭示 CARK 家族与 RCARs 之间的关系, 清楚 ABA 受体的磷酸化调控过程, 最终达到了了解植物抗逆分子机制的目的, 我们还需要构建 CARK 家族的两重和三重突变体, 并且在突变体中过表达 CARKs 分析突变体和转基因植物的表型, 从而探究 CARK 家族在 ABA 信号通路中的具体作用.

#### 参考文献:

- [1] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, *et al.* In vitro reconstitution of an abscisic acid signaling pathway [J]. *Nature*, 2009, 462: 660.
- [2] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Plant Biology*, 2002, 53: 247.
- [3] Finkelstein R R, Gampala S S, Rock C D, *et al.* Abscisic acid signaling in seeds and seedlings [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S15.
- [4] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, *et al.* Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. *Science*, 2009, 324: 1064.
- [5] Park S Y, Fung P, Nishimura N, *et al.* Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins [J]. *Science*, 2009, 324: 1068.
- [6] 赵哲, 李德款, 袁德志, 等. AtMYB44 与 ABI1 竞争性结合 ABA 受体 RCAR1 的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 52: 664.
- [7] Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, *et al.* Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity [J]. *Plant J*, 2009, 61: 25.
- [8] Herrmann M M, Pinto S, Kluth J, *et al.* The PTII-like kinase ZmPti1a from maize co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte [J]. *BMC plant biology*, 2006, 6: 22.
- [9] Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 451.
- [10] Swiderski M R, Innes R W. The Arabidopsis PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily [J]. *Plant J*, 2001, 26: 101.
- [11] Dardick C, Chen J, Richter T, *et al.* The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 579.
- [12] Vij S, Giri J, Dansana P K, *et al.* The receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress. [J]. *Mol Plant*, 2008, 1: 732.
- [13] Shiu S H, Bleeker A B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 530.
- [14] Zhou J, Loh Y T, Bressan R A, *et al.* The tomato gene PtiI encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response [J]. *Cell*, 1995, 83: 925.
- [15] Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, *et al.* The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in Arabidopsis resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 257.
- [16] Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, *et al.* A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence [J]. *Nature*, 2007, 448: 497.
- [17] Kinoshita T, Canodalgado A, Seto H, *et al.* Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1 [J]. *Nature*, 2005, 433: 167.
- [18] Shan L, He P, Li J, *et al.* Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity [J]. *Cell Host Microb*, 2008, 4: 17.
- [19] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124: 783.
- [20] Shao F, Golstein C, Ade J, *et al.* Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector [J]. *Science*, 2003, 301: 1230.