

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.02.029

拟南芥 CARK4 与 RCAR12 相互作用的研究

陈静波, 李小意, 李晶祥, 黄 琪, 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: 本研究采用酵母双杂交(Y2H)、GST-融合蛋白沉降技术(GST-pull-down)及双分子荧光互补实验(BiFC)实验方法研究蛋白质激酶 CARK4 与脱落酸受体 RCAR12 之间的相互作用. 酵母双杂交(Y2H)试验显示, 缺失氮端的 CARK4(CARK4 Δ N)与 RCAR12 具有明显的相互作用. 体外 GST-融合蛋白沉降技术试验进一步得出 CARK4 能拉下 RCAR12, 而不能结合负对照 GST, 这证明 CARK4 可以直接与 RCAR12 相互作用. 为了确定 CARK4 与 RCAR12 在植物体内是否也存在相互作用, 利用农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达来进行 BiFC 实验, 结果表明在烟草中共注射 CARK4 与 RCAR12 能激发荧光, 而负对照却没有, 这说明 CARK4 与 RCAR12 在植物体内存在相互作用. 研究表明, CARK4 与 RCAR12 在植物体内、体外均具有相互作用.

关键词: 酵母双杂交; GST-融合蛋白沉降技术; 双分子荧光互补; 脱落酸受体; 蛋白激酶

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2018)02-0375-06

Interaction study between CARK4 and RCAR12 in *Arabidopsis thaliana*

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

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment, Ministry of Education,

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Here, we studied the interaction of CARK4 and RCAR12, one of ABA receptors by the way of Yeast two-hybrid system (Y2H), Pull down and Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays. In the Y2H assay, the results showed that the interaction of CARK4 Δ N (the deletion of N-terminal of the protein CARK4) and RCAR12. On the other hand, the results from GST-pull down also indicated that their interaction *in vitro*, while the negative control of GST failed to interact with CARK4. In order to confirm the conclusion, BiFC, the method of the transient expression with the infiltration of *Agrobacterium tumefaciens* in tobacco leaves was used to test the interaction of CARK4 and RCAR12, showing that the co-transformation of CARK4 and RCAR12 had green fluorescence, while the negative controls not. Taken together, CARK4 interacts with RCAR12 *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Y2H; Pull down; BiFC; RCAR12; CARK4

1 引言

植物激素脱落酸(ABA)在植物的胁迫应答和生长发育的不同阶段都发挥着重要作用^[1]. 如调节种

子成熟和萌发、气孔关闭以及渗透胁迫应答基因表达^[2-4]. 多年来, 研究人员鉴定出许多参与 ABA 信号通路中的信号分子, 特别是近年来 ABA 信号通路中的核心元件的发现, 初步建立起 ABA 信号转导途径

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: 陈静波(1990-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: 15281097874@163.com

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

的网络^[5]. 目前以拟南芥为背景建立的 ABA 信号通路模型中包括三类核心元件: ABA 受体 PYR/PYL/RCARs、蛋白质磷酸酶 PP2C、SNF1 相关的蛋白激酶 2(SnRK2). 植物在正常生长条件下, 细胞内 ABA 表达水平很低, PP2Cs 可以去磷酸化 SnRK2 使其失活. 当植物在干旱、高盐等渗透胁迫下, 植物细胞内 ABA 会积累, 积累的 ABA 与 PYR/PYL/RCARs 受体结合, 使受体结构改变, 改变结构的受体再与蛋白磷酸酶(PP2Cs)结合形成一个三元复合体, 从而抑制了 PP2Cs 的活性, 使 PP2Cs 下游的靶蛋白 SnRK2 的活性得到恢复, 最终正调控 ABA 应答基因的表达^[6]. 目前, 关于上述三个核心元件的上游和下游组份的描述非常有限, 因此建立完整的 ABA 信号转导网络还需进一步的研究.

在 ABA 信号通路中, ABA 与受体 PYR/PYL/RCARs 的结合起到至关重要的作用^[7]. RCARs 受体家族包含 14 个成员, 通过与 ABA 结合引发植物应答机制^[5]. 但是对于 ABA 受体 PYR/PYL/RCARs 的直接调控过程还不是很清楚. 本实验室前期发现了一个与 ABA 受体作用的类受体细胞质蛋白质激酶(RLCK), 将其命名为细胞溶质 ABA 受体激酶 1(CARK1). 初步研究证实 CARK1 通过磷酸化 ABA 受体, 进而正调控 ABA 介导的生理应答. 基本的生物信息学分析发现, 拟南芥中共有 11 个 CARK 同源基因, 可以将其分为三个分支, 其中 CARK4 单独为一个分支, 那么研究 CARK4 和 CARK1 与 ABA 受体之间的关系是否存在一定共性就显得尤为重要.

鉴于以上原因, 本实验以 CARKs 家族中的 CARK4 和 RCARs 家族中的 RCAR12 为研究对象, 验证二者之间的相互作用. 首先, 截取 CARK4 的第 295 位氨基酸到第 365 位氨基酸得到 CAEK4 Δ N. 采用酵母双杂交技术, 验证 CARK4 Δ N 与 RCAR12 之间的关系. 实验结果显示 CARK4 Δ N 与 RCAR12 存在相互作用. 接下来又进行体外 Pull down 和体内 BiFC 试验研究 CARK4 与 RCAR12 之间的作用关系. 实验结果表明, 在体外、体内二者之间存在相互作用.

2 材料与方法

2.1 材料

大肠杆菌(*E. coli*)DH5a 菌株、Rosseta 菌株、农杆菌(GV3101)菌株、pET28a、pGEX-6P-1、pSPYCE、pSPYNE 载体为本实验室保存. 酵母双

杂交系统及酵母相关产品购自 Clontech 公司. YNB、DMSO、His 抗体购自 Sigma 公司. GST-resin、His-resin 蛋白质纯化柱购自 invitrogen 公司. PVDP 膜购自罗氏. Primerstar Max 高保真酶为 Takara 产品, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶均为 Fermentas 产品, Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 为北京天根产品, 卡那霉素、利福平为 Amresco 产品, 其他试剂均为国产分析纯. 引物合成及测序由华大基因公司完成.

2.2 方法

2.2.1 目的基因的分离与载体的构建 以本实验室保存的拟南芥 cDNA 为模板, 用 PrimerSTAR 高保真 DNA 聚合酶和相应的引物扩增基因片段, 得到 CARK4 和 RCAR12 基因全长以及 CARK4 Δ N. 构建用于酵母双杂交实验的重组表达载体 pGBKT7-RCAR12、pGADT7-CARK4 Δ N; 构建原核表达载体 pET28a-CARK4、pGEX-6P-1-RCAR12, 用于 Pull down 实验; 构建用于 BiFC 实验的重组表达载体 pSPYCE-RCAR12、pSPYNE-CARK4.

2.2.2 氨基酸序列对比分析及构建进化树 拟南芥 CARK4 氨基酸序列下载自 Arabidopsis Information Resource database (<http://www.arabidopsis.org/>), 其他物种中 CARK4 同源基因的氨基酸序列下载自 UniProt (<http://www.uniprot.org/>). 采用 DNAMAN 进行不同物种中 CARK4 同源基因的氨基酸序列对比分析. 使用 MEGA5.1 的 NJ 算法构建进化树.

2.2.3 酵母双杂交 酵母双杂交步骤参照 Clontech 手册和相关文献进行^[8]. 以 pGBKT7-RCAR1 + PGADT7-ABI2 为阳性对照、pGBKT7-MYB44 + pGADT7- CARK4 Δ N 和 pGBKT7 + pGADT7 为阴性对照、pGBKT7-RCAR12 + pGADT7-CARK4 Δ N 为实验组. 将转入质粒后的酵母细胞均匀的涂布在氨基酸缺陷型 SD/-Trp-Leu 培养基上 30℃ 培养 2d. 然后挑取单克隆, 接种于 SD/-Trp-Leu 液体培养基中振荡培养, 测定 OD₆₀₀ 值, 然后将各样品用 0.9% NaCl 稀释到相同 OD₆₀₀ 值, 再将各样品分别稀释 10、100、1000 倍, 各取 5 μ L 点于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上, 分别培养 2d、3d、4d, 能在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上长出白色光滑, 丘状隆起状的菌落为阳性菌落.

2.2.4 蛋白质纯化及 Pull down 蛋白质纯化过程参考文献^[9]得到 His-CARK4、GST-RCAR12、

GST(用作空白对照组)三个蛋白,分别取 5 μ g 的 GST-RCAR12、GST 蛋白,向其中各加入 40 μ L 的谷胱甘肽-Sepharose4B 介质及 5 μ g 的 His-CARK4 蛋白质,然后各用 Incubation buffer 补足至终体积为 500 μ L,4 $^{\circ}$ C 孵育 2h. 然后用 washing buffer 4 $^{\circ}$ C 洗涤 10min,重复 6 次,500g 离心 3min,得到蛋白质相互作用复合体取 0.5 μ g 的 His-CARK4 作为 10%Input. 上述样品经 SDS-PAGE 分析,然后用 His-Tag 特异性抗体作为检测抗体. 用软件 Bio-Rad 分析 Western-blot 实验结果.

2.2.5 BiFC 利用农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达来进行 BiFC 实验,主要参考文献^[10],并作适当修改. 以 pSPYNE-ABI1 + pSPYCE-RCAR1 为阳性对照组,以 pSPYNE-CARK4 + 空载的 pSPYCE 为阴性对照组, pSPYCE-RCAR12 + pSPYNE-CARK4 为实验组. 培养含有融合表达载体的农杆菌菌株,并获得一定量的菌体. 用 500 μ L 侵染液重悬菌体,室温静置 2 h. 取含 pSPYCE-RCAR12 和 pSPYNE-CARK4 的农杆菌重悬液各 500 μ L,按照 1 μ l 的比例混合均匀. 混合后的农杆菌液转化烟草叶片,并做标记,然后利用激光共聚焦显微镜对其互作荧光进行观察分析.

3 结果与分析

3.1 不同物种中 CARK4 激酶活性结构域同源基因的对比分析

拟南芥 CARK4 共含有 366 氨基酸,运用 NCBI 数据库在线分析,预测出该激酶活性结构域的氨基酸序列(图 1-A). 同时,在其他物种中也发现了 CARK4 的同源基因. 选取小麦(*Triticum aestivum*)、木薯(*Manihot esculenta*)、西红柿(*Solanum lycopersicum*)、水稻(*Oryza sativa*)、欧洲油菜(*Brassica napus*)、牛(*Bos taurus*)、人(*Homo sapiens*)、狗(*Canis lupus familiaris*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)CARK4 的激酶活性结构域与拟南芥 CARK4 激酶活性结构域进行氨基酸序列对比分析,结果发现植物和动物中该序列是保守的. 欧洲油菜与拟南芥中的 CARK4 激酶活性结构域同源性最高,相似性更是达到 98%,小麦、木薯、西红柿、水稻、牛、人、狗、大鼠与拟南芥中的 CARK4 激酶活性结构域的氨基酸序列相似性分别是 91%、94%、94%、86%、52%、52%、53%、53%. 对拟南芥、小麦、木薯、西红柿、水稻、欧洲油菜、牛、人、狗、大鼠中的 CARK4 进行进化树分析,

分析显示拟南芥与欧洲油菜等植物物种的 CARK4 具有非常高的同源性,与人等动物物种也具有一定的同源性(图 1-B).

3.2 酵母双杂交实验验证 CARK4 Δ N 与 RCAR12 的相互作用

首先用酵母双杂交的方法,研究 CARK4 Δ N 与 RCAR12 之间的相互作用. 所有的转化子在 SD/-Trp-Leu 培养基上均能长出白色光滑,丘状隆起状的菌落,这表明酵母共转化质粒均已成功转入酵母菌中. 阳性对照组 RCAR1 + ABI2 能够在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上长出白色光滑,丘状隆起状的菌落,阴性对照组 MYB44 + CARK4 Δ N 和空载的 AD + BD 在 SD/-Trp-Leu-His 的培养基上长势很弱,在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 的培养基上完全没有生长(图 2),由此证明实验结果是可信的,并且可以重复. 而转化子 CARK4 Δ N + RCAR12 在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上长出阳性菌落(图 2),说明 CARK4 Δ N 和 RCAR12 具有较强的相互作用.

3.3 Pull down 实验验证 CARK4 与 RCAR12 的相互作用

在体外,实验进一步进行了 pull down 分析 CARK4 与 RCAR12 的相互作用,分析和作图方法参考文献^[11]. 首先采用亲和层析纯化的方法得到一定纯度的目标蛋白(图 3-A),接下来用 pull down 实验,获得了 GST-RCAR12 与 His-CARK4、GST 与 His-CARK4 的蛋白交联产物,再用特异性的 His-Tag 抗体检测,发现 GST-RCAR12 与 His-CARK4 孵育的样品,用 His 抗体检测时,可以检测到 CARK4 的条带(这里用 10%加入的 His-CARK4 作为对照),而用 His 抗体检测 GST 和 His-CARK4 孵育的样品时,并没有检测到 CARK4 的条带(图 3-B). 结果表明,RCAR12 蛋白质可以将 CARK4 蛋白质拉下来,由此说明,CARK4 可以直接与 ABA 受体 RCAR12 相互作用.

3.4 BiFC 实验验证 CARK4 与 RCAR12 的相互作用

随后,采用 BiFC 实验来检测在植物体内 CARK4 与 RCAR12 的相互作用情况. 首先将 RCAR12 融合 YFP 的 C 段,CARK4 融合 YFP 的 N 段,通过烟草叶片瞬时表达来进行 BiFC 实验. 实验结果表明,共转 RCAR12-YFP^C 与 CARK4-YFP^N 和阳性对照 RCAR1-YFP^C 与 ABI1-YFP^N 一样在烟草叶片中有绿色荧光,而阴性对照组共转空

载 YFP^C 与 CARK4-YFP^N、RCAR12-YFP^C 与空载 YFP^N, 没有观测到荧光(图 4). 因此, 我们的研究进一步证实 CARK4 与 RCAR12 在植物体内也具有直接的相互作用.

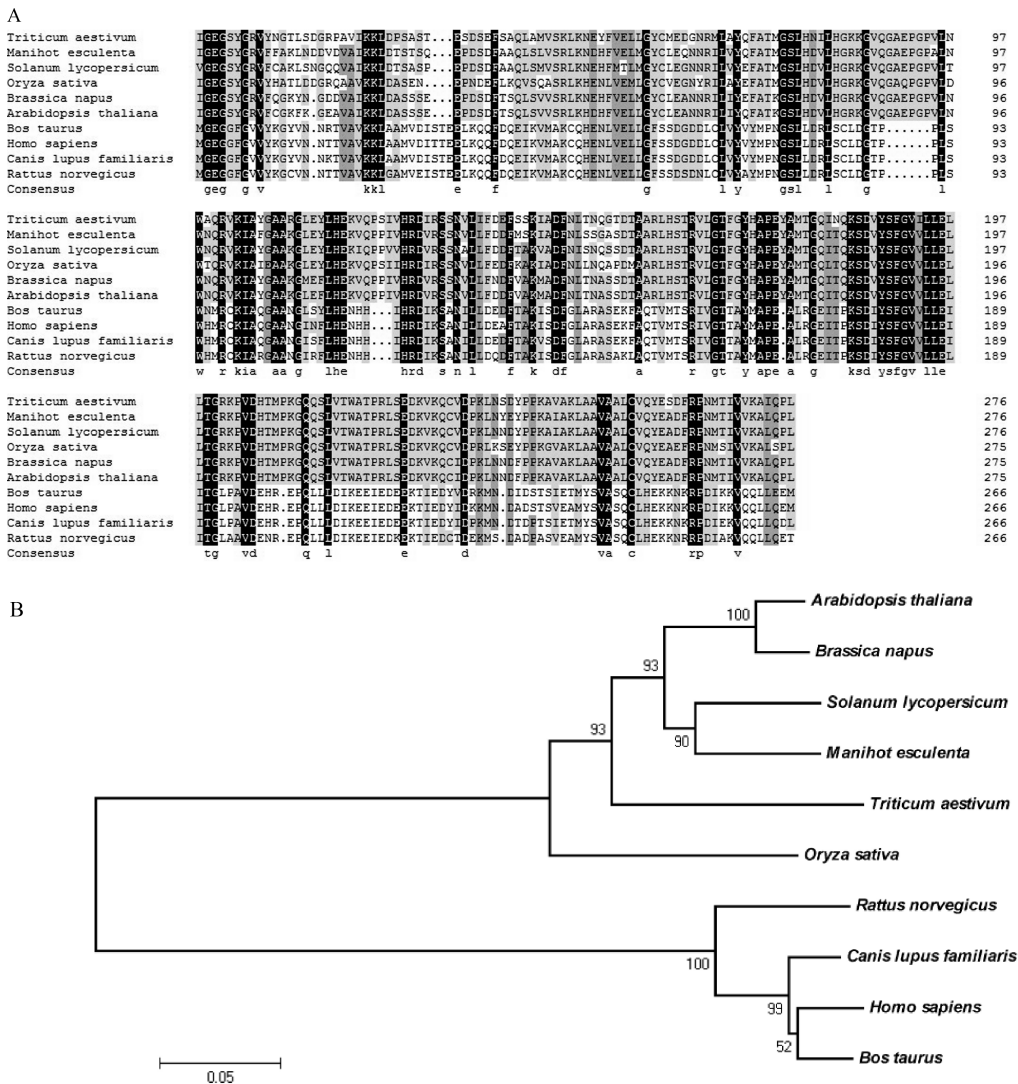


图 1 不同物种 CARK4 激酶活性结构域同源基因氨基酸序列对比和不同物种 CARK4 进化树分析

A: 氨基酸序列对比; B: 进化树分析

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of CARK4 catalytic domain and phylogenetic tree analysis of CARK4 in different species

A: Amino acid sequence alignment; B: phylogenetic tree analysis

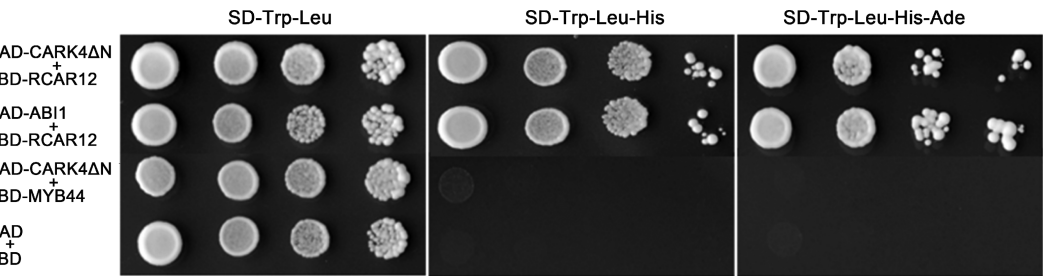


图 2 酵母双杂交实验检测 CARK4ΔN 与 RCAR12 的相互作用

Fig. 2 The yeast co- transformation result of CARK4ΔN and RCAR12

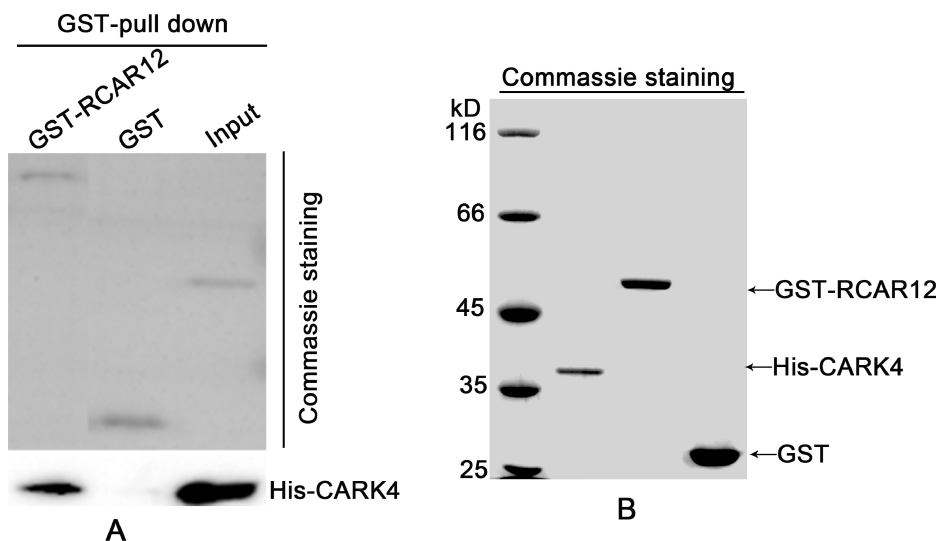


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 GST Pull down 体外实验检测 CARK4 与 RCAR12 的相互作用
A: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; B: His 抗体检测 GST-RCAR12 与 His-CARK4 之间的相互作用
Fig. 3 Interaction between CARK4 and RCAR12 by GST Pull down assay in vitro
A: SDS- PAGE result map; B: Detecting the interaction between GST- RCAR12 and His-CARK4 with anti- His

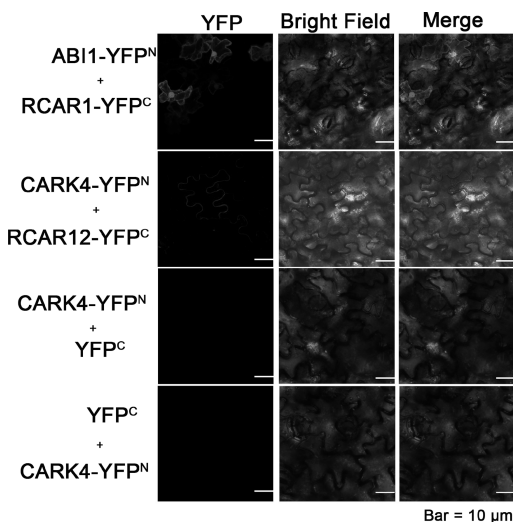


图 4 BiFC 体内实验检测 CARK4 与 RCAR12 的相互作用
Fig. 4 Interaction of CARK7 with RCAR12 in BiFC assay in vivo

4 讨论

非生物胁迫严重影响植物生长和发育,导致农作物减产,甚至死亡.植物为了生存下去,利用不同的响应机制应对各种胁迫环境. ABA 在植物的各种非生物胁迫应答中发挥重要作用,比如干旱,高盐.类受体激酶家族(RLKs)是植物中最大的激酶家族,在植物的生长发育过程、以及抗病性等方面至关重要.已有研究表明 RLKs 参与了 ABA 信号应答,如参与干旱、盐胁迫应答,从而诱导或者是抑

制基因表达,最终激活多种生理反应,包括根的生长、气孔关闭、营养生长调节和衰老^[12].蛋白质的修饰往往是其发挥其功能的基础,大量研究表明蛋白质磷酸化在所有物种的细胞信号转导途径中发挥着重要作用^[14,15].RLKs 定位在细胞质膜上,通过磷酸化作用将细胞外部信号传入胞内,调节植物的生长、发育、和胁迫应答^[16,17].拟南芥中 RLKs 是一个庞大的家族,有超过 600 个成员,其中大多数 RLK 有三个结构域:一个胞外受体结合的结构域、一个跨膜结构域、一个胞内激酶结构域^[18].而类受体蛋白激酶(RLCKs)具有与 RLK 类似的催化结构域,而没有胞外受体结合的结构域和跨膜结构域.研究初步表明,RLCKs 很可能在识别和转导经由 RLKs 识别的外界信号中起作用^[19].

本实验室前期研究中,已经发现了一个与 ABA 受体 RCAR1/3 相互作用的蛋白质激酶 RLCK,我们将其命名为 CARK1.初步研究证实 CARK1 是通过磷酸化 ABA 受体,进而正调控 ABA 介导的生理应答.拟南芥中 CARKs 共有 11 个成员,可以将其分为三个亚家族,其中 CARK4 单独为一个亚家族,那么对 CARK4 与 ABA 受体 RCARs 之间的关系进行研究,对揭示 CARK 家族与 ABA 受体 RCARs 之间的关系具有重要作用.

本实验以 CARKs 家族中的 CARK4 和 RCARs 家族中的 RCAR12 为研究对象,通过酵母双杂交、Pull down、以及 BiFC 实验验证二者之间

的相互作用. 由于全长的 CARK4 与 RCAR12 的相互作用弱, 在酵母双杂交实验的强筛选压力 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 下, 检测不到 CARK4 和 CARK11 与 RCAR 家族的相互作用. 参考本实验前期工作, 以 RCAR3 为诱饵筛选得到的相互作用区段是 CARK1 的 C 端(激酶结构域). 参照这个结果, 我们截取 CARK4 的 C 端 (295~365 aa) 简称 CARK4 Δ N, 进行酵母验证, 发现 CARK4 Δ N 与 RCAR12 是存在明显相互作用的. 接下来进行体外 Pull down 实验, 结果发现 CARK4 与 RCAR12 在体外确实存在相互作用. 为了进一步验证他们在植物体内的关系, 利用农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达来对二者进行 BiFC 实验, 实验结果表明 CARK4 与 RCAR12 在烟草体内也存在相互作用. 参考实验室前期实验结果, CARK4 与 CARK1 具有非常高的同源性, 特别是激酶结构域, 具有相似的保守特征基序 (motif), 包括: ATP 结合位点、多肽结合位点 (P-loop)、以及激活 loop (A-loop). 据此我们推测 CARK4 也许通过磷酸化 RCAR12 或者是 RCARs 家族中其他一个或多个成员, 来直接参与 ABA 信号通路的转导. 那么在 ABA 信号通路中, 受体 RCARs 是否受到蛋白激酶 CARK4 的修饰以此调控 ABA 介导的生理应答, 还需要进一步的研究.

参考文献:

- [1] Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, *et al.* An updaters on abscisic acid signaling in plants and more [J]. *Mol Plant*, 2008, 1: 198.
- [2] Finkelstein R R, Gampala S S, Rock C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S15.
- [3] Gonzalez-Guzman M, Pizzio G A, Antoni R, *et al.* Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid [J]. *Plant Cell*, 2012, 26: 2483.
- [4] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 2002: 247.
- [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 Signaling*, 2009, 324: 1068.
- [6] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, *et al.* Abscisic acid: emergence of a core signaling network [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 651.
- [7] Fujii H, Verslues P E, Zhu J K, *et al.* Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 108: 1717.
- [8] 李德款, 张亮, 彭梅芳, 等. ABA 受体 RCAR1/PYL9 相互作用蛋白的筛选及初步研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2011, 48: 486.
- [9] Takai R, Tanaka E, Miyazaki T, *et al.* Function of RNH-1/14-3-3 beta gene in cellular differentiation and proliferation [J]. *J Biol Chem*, 1995, 118: 1045.
- [10] Imogen A S, Runions J, Kearns A, *et al.* Rapid transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2019.
- [11] Flajole M, Rakhilin S, Wang H, *et al.* Protein phosphatase 2C binds selectively to and dephosphorylates metabotropic glutamate receptor 3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 16006.
- [12] Kim H, Hwang H, Hong J W, *et al.* A rice orthologue of the ABA receptor, OsPYL/RCAR5, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth [J]. *J Am Inst Conserv*, 2012, 63: 1013.
- [13] Hidenori T, Yuriko O, Katsura S. Abiotic Stress-Inducible Receptor-Like Kinases Negatively Control ABA Signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, 70: 599.
- [14] Herrmann M, Pinto S, Kluth J, *et al.* The PTII-like kinase ZMPTIIa from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 22.
- [15] Stone J, Walker J. Plant protein kinase families and signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 451.
- [16] Morris E R, Walker J C. Receptor-like protein kinases: the keys to response [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 339.
- [17] Becraft P. Receptor kinase signaling in plant development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18: 163.
- [18] Shiu S H, Karlowski W M, Pan R, *et al.* Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1220.
- [19] Tang X, Frederick R D, Zhou J, *et al.* Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase [J]. *Science*, 1996, 274: 2060.