

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201306008

赵菲佚, 焦成瑾, 陈荃, 等. 拟南芥 PKS5 激酶点突变体外表达与磷酸化测试[J]. 广西植物, 2015, 35(3):408—413

Zhao FY, Jiao CJ, Chen Q, et al. *In vitro* expression and determination of phosphorylation activity of point mutants of the PKS5 kinase in *Arabidopsis*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3):408—413

拟南芥 PKS5 激酶点突变体外表达与磷酸化测试

赵菲佚^{1,2}, 焦成瑾¹, 陈 荃¹, 马伟超¹, 安建平¹, 呼丽萍^{1,2}

(1. 天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741000; 2. 甘肃大樱桃工程技术中心, 甘肃 天水 741000)

摘 要: PKS5 (protein kinase SOS2-like 5) 虽为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中介导植物响应外界高 pH 的蛋白激酶, 但其关键功能结构域尚未被确定。该研究用 PCR 对 PKS5 不同位置点突变形式进行克隆, 并在原核系统中进行表达, 得到 PKS5 不同的点突变蛋白; 使用激酶通用底物 MBP (myelin basic protein) 及 PKS5 体内特异底物 AHA2 (*A. thaliana* isoform of the PM H⁺-ATPase, 拟南芥质膜质子泵等位形式之一) 对 PKS5 点突变蛋白磷酸化活性进行了测试。结果表明: 点突变 PKS5-2 失去了激酶活性, PKS5-4、PKS5-5、PKS5-9 自磷酸化与 MBP 磷酸化活性与 PKS5 相比无差异; 而与 PKS5 相比, 点突变 PKS5-6 和 PKS5-7 自磷酸化及对 AHA2 的磷酸化活性升高, 且 PKS5-7 活性高于 PKS5-6。说明 PKS5 特定位置点突变改变 PKS5 的自磷酸化及底物磷酸化活性水平, 不同位置的点突变对其磷酸化活性的影响存在差异。研究结果可为确定 PKS5 功能结构域及体内作用机理提供依据。

关键词: PKS5; 点突变; 蛋白表达; 磷酸化活性**中图分类号:** Q948.112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0408-06

In vitro expression and determination of phosphorylation activity of point mutants of the PKS5 kinase in *Arabidopsis*

ZHAO Fei-Yi^{1,2}, JIAO Cheng-Jin¹, CHEN Quan¹,MA Wei-Chao¹, AN Jian-Ping¹, HU Li-Ping^{1, 2}

(1. School of Life Sciences and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741000, China;

2. Gansu Engineering and Research Center for Sweet Cherry, Tianshui 741000, China)

Abstract: In *Arabidopsis*, PKS5 (protein kinase SOS2-like 5), a serine-threonine kinase, involves in the response to the external high pH stress based on the study of its loss-of-function mutant. Whereas, the fine functions of the domains resided in PKS5 are not currently well determined. We report here the dissection of domains of PKS5 in the activity of phosphorylation against MBP (myelin basic protein) and AHA2 (one of the *Arabidopsis thaliana* isoform of PM H⁺-ATPases), which is the specific substrate of PKS5 *in vivo*, using the assay of phosphorlation *in vitro* via expressing the distinct PKS5 mutant versions in bacteria using the PKS5 cloning from plants employing PCR approach. The results showed that the point mutated PKS5-2 lost its activity, PKS5-4, PKS5-5 and PKS5-9 displayed no difference in autophosphorylation and the MBP phosphorylation. Moreover, autophosphorylation and the AHA2 phosphorylation of the point mutated PKS5-6 and PKS5-7 increased compared with PKS5 and the PKS5-7 activity was higher than PKS5-6. Taken together, the specific point mutations in PKS5 altered its activity of autophosphorylation and the substrate phosphoylation of BMP and AHA2. The effects due to the alteration of mutations resided in

收稿日期: 2014-08-30 **修回日期:** 2014-12-22**基金项目:** 国家自然科学基金(31160060, 31260568); 天水师范学院中青年教师科研项目(TSB1016)。**作者简介:** 赵菲佚(1972-), 男, 甘肃天水人, 博士, 副教授, 研究方向为植物抗逆分子生物学, (E-mail) tspaulzhao@163.com。

PKS5 on the activity of phosphorylation were comparable within the various PKS5 mutated protein versions. The results of this study would provide the basis for pinpointing the functional domains of PKS5 and the mechanism of functions of PKS5 in planta.

Key words: PKS5; point mutant; protein expression; phosphorylation activity

PKS5 (protein kinase SOS2-like 5) 为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 蛋白激酶之一, 属 PKS (protein kinase) 家族成员。拟南芥基因组中共含有 24 个 PKS 家族成员, 被命名为 PKS2-PKS25 (protein kinase SOS2-like) (Yan *et al.*, 2001)。SOS2 (salt overly sensitive 2) 蛋白激酶是首先被克隆的该家族成员。SOS2 与 Ca^{2+} 结合蛋白 SOS3 (salt overly sensitive 3) 及质膜上的反转运体 SOS1 (salt overly sensitive 1) 构成了拟南芥专一性响应外源盐胁迫的信号转导途径 (Albrecht *et al.*, 2001; Hardie *et al.*, 1998)。在结构上, PKS 与来源于酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 SNF1 (sucrose-non-fermenting protein kinase) 和动物中 AMPK (AMP-activated protein kinase) 激酶具有相似性 (Hardie *et al.*, 1998; Hrabak *et al.*, 2003)。在功能上, PKS18 参与了植物在萌发和幼苗期对 ABA 的响应 (Deming *et al.*, 2002)。PKS24 不仅参与了拟南芥对盐及 ABA 的胁迫应答 (秦玉芝等, 2008), 也介导了拟南芥幼苗中植物色素 A 对其绿化的抑制作用 (秦玉芝等, 2010)。前期研究发现, SCaBP5 (SOS3-like calcium binding protein 5) 和 PKS3 相互作用在种子萌发、幼苗生长和气孔关闭上发挥作用。此外, SCaBP5 的过表达可增强干旱诱导而降低胁迫基因的冷诱导 (Cheong *et al.*, 2003)。PKS12 在介导 ABA 信号中起作用 (Jen *et al.*, 1999)。PKS11 在植物对糖的响应中可能介导了 Ca^{2+} 信号, 且此功能不依赖于己糖激酶途径 (Deming *et al.*, 2002)。

对 PKS5 前期研究发现, PKS5 的功能缺失突变体在外源 pH 为 8.4 胁迫下表现出抗性表型, 进一步的研究发现 PKS5 对质膜上 ATPase 等位形式之一 AHA2 (*Arabidopsis thaliana* isoform of the PM H^{+} -ATPase) 存在负调控作用。其作用机理为 PKS5 通过对 AHA2 的 C 末端第 931 位丝氨酸的磷酸化作用解除 AHA2 与 14-3-3 蛋白的结合, 进而调控 AHA2 的活性而保持胞内的质子内平衡。在酵母中的互补试验表明: PKS5 与 SCaBP1 (SOS3-like calcium binding protein 1) 共同作用下调

AHA2 的活性 (Anja *et al.*, 2007)。近期又鉴定出了参与此途径又一新的作用元件 J3 (*Arabidopsis* DnaJ homologous protein 3), J3 为一分子伴侣的共作用因子。体内 J3 通过对 PKS5 的活性抑制而参与植物对外源盐碱胁迫响应 (Yong *et al.*, 2010)。使用 PKS5 功能缺失突变体, 对 PKS5 在此信号途径中的作用已有研究。然而, 对该蛋白关键功能结构域的确定以及各结构域在此信号途径中的精细作用尚未见报道。本研究通过体外表达 PKS5 点突变蛋白, 并对其磷酸化活性进行测试以确定其功能结构域, 研究结果将为 PKS5 功能结构域解析及其体内作用机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料、培养条件及 DNA 提取

拟南芥野生型 (Columbia), *pks5* 点突变体 (TILLING 突变体, <http://tilling.fhrc.org>:9366), 订购自 ABRC (*Arabidopsis* Biological Resources Center), 分别命名为 *pks5-2*、*pks5-4*、*pks5-5*、*pks5-6*、*pks5-7*、*pks5-8* 和 *pks5-9*。植物种子用含 0.1% TritonX-100 的 20% 次氯酸钠消毒液在 EP 管中消毒 10~12 min, 灭菌 ddH₂O 洗 5 次后, 点种或平铺于 MS (Murashige and Skoog) 固体培养基上。种子在 4 °C 下春化 2~3 d 后移至 22 °C 连续或长日照 (16 h/8 h) 及短日照 (8 h/16 h) 条件下培养。植物基因组 DNA 提取使用 DNA 快速提取方法 (Detlef *et al.*, 2002)。

1.2 PKS5 点突变及 AHA2 序列克隆

PKS5 序列克隆以野生型及 PKS5 各点突变体基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到野生型及点突变 PKS5 基因编码序列。所用正向引物为 PKS5GEXFBamHI5'-CGGGATCCATGCCAGAG-ATCGAGATTGCC-3' 反向引物为 PKS5GEXR-EcoRI-5' GGAATTCTTAAATAGCCGCGTTTG-TTG-3' (上海生工合成)。下划线部分为 BamHI 和 EcoRI 位点。经 PCR 扩增并进行纯化后使用标准克隆程序克隆至 pGEX-6p-1 载体。阳性候选克

隆送上海生物工程公司测序验证。为得到 AHA2C 末端 100 个氨基酸表达片段,设计以下引物: AHA2C100AABamHI-5' CGGGATCCGCGTGG-CTCAACTTGTGTTGAG-3' 和 AHA2REcoRI-5' GGAATTCCTACACAGTGTAGTGAAGT-3', 以 pMP1663(丹麦 Anja Thoe Fuglsang 博士提供)质粒为模板,PCR 扩增产物克隆至 pET28a 载体上测序验证。所有在原核中表达的载体经测序验证后从 DH5 α 提取质粒再经电转化方法转入 BL21(DE3) 表达菌株,再次经 PCR 筛选得到阳性克隆后保存备用。

1.3 PKS5 点突变蛋白及 AHA2C 末端蛋白原核表达

将转入正确表达载体的 BL21(DE3) 菌株按照 1:1 000 的比例接入含 30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯霉素和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨苄青霉素或 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素的 60 mL 的 LB 液体培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜小量培养,次日将 10 mL 过夜培养物转入 1 L 含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp 的 LB 培养基中继续培养,当菌液 O.D. 达 0.7 时收菌,离心后沉淀加入 30 mL 裂解液(GST 融合蛋白 140 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 2.7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄, 1.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH₂PO₄, pH 7.3, HIS 融合蛋白 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH₂PO₄, 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, pH 8.0) 重悬,在超声破碎仪(VCX130, SONICS)上破碎(250 W, 超声 3 s, 间隔 3 s, 1 min 循环,共 5 min)后离心,上清液中加入 100 μL GST 树脂进行蛋白结合,最后使用洗脱缓冲液(GST 融合蛋白使用其裂解液, HIS 融合蛋白 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH₂PO₄, 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, pH 8.0) 进行洗脱得到目标蛋白。后续融合蛋白纯化方法按 Amersham 公司的 Gluathione Sepharose 4B 树脂及 Qiagen 公司的 Ni-NTA 树脂提取方法进行。结合于树脂上的重组目标蛋白保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.4 PKS5 点突变蛋白体外磷酸化测试

激酶体外磷酸化试验按照以下方法进行。在冰浴 EP 管中混合激酶及测试底物蛋白 MBP 或 AHA2C100AA, 磷酸化反应使用 20 μL 体系进行, 计算激酶反应缓冲液(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.2, 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP, 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 的用量, 每个反应使用 2 μCi (γ -³²P)ATP。将反应所需体积的重组蛋白加入激酶反应缓冲液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应

30 min 后加入 6 $\times$ SDS 蛋白载样缓冲液,并在干浴器(SBH130D/3, Stuart)上 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。离心后于 12% 的 SDS 蛋白胶上进行变性电泳,考马斯亮蓝染色后在脱色液中脱色,凝胶成像仪上(GelDoc-It2 310, UVP)照相后使用保鲜膜包好蛋白凝胶,压于磷屏上,次日于磷屏成像仪(STORM 860, Amersham Biosciences)上进行成像。

2 结果与分析

2.1 PKS5 蛋白结构与点突变位置

PKS5 定位于拟南芥第 2 条染色体上(At2g30360),其 CDS 共有 1 308 个碱基,不含内含子。编码蛋白共有 435 个氨基酸,为一丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。蛋白结构如图 1 所示,整个蛋白可分为两个大的结构,位于 N 端的激酶结构域和 C 端的激酶调控域。激酶结构域内含有一个推测的激活环(KDAL),调控结构域内含有两个子结构域, FISL 基序和 PPI 结构域。FISL 结构域是 PKS 家族中保守的结构域,是与 SCABP(SOS3-like calcium binding protein)相互作用所必须的结构域,删除 FISL 结构域导致 PKS5 组成型的激活。PPI 结构域是与 2C 型的磷酸酶相互作用所必需的,与 SCABP 一起介导了拟南芥对 ABA 信号的响应。在激酶结构域和 FISL 基序之间由连接结构域(JK)进行连接。

为考察 PKS5 结构域功能,将 PKS5 基因序列输入 TILLING(<http://tilling.fhcrc.org:9366>)网站进行比对,发现在 TILLING 中心已有该基因上的 7 个点突变体。其中 *pks5-2* 发生了 g-a 突变,造成了氨基酸在 219 位上甘氨酸变为丝氨酸(G219S); *pks5-4* 发生了 g-a 突变,导致在 341 位的氨基酸由谷氨酸变为赖氨酸(E341K); *pks5-5* 也发生了 g-a 突变,在蛋白的 155 位氨基酸由谷氨酸变为赖氨酸(E155K); *pks5-6* 发生了 c-t 的突变,在 317 位氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸(S317L); *pks5-7* 发生了 c-t 的转换,在蛋白的第 168 位氨基酸由丙氨酸变为缬氨酸(A168V); *pks5-8* 发生了 g-a 的突变,在 276 位上引入了一个终止密码子(W276*); *pks5-9* 发生了 c-t 的转变,在蛋白的第 148 位氨基酸由脯氨酸变为酪氨酸(P148Y)。在各点突变中, *pks5-7* 突变位于已知的激酶激活环内, *pks5-6* 的突变位于 FISL 基序内,而 *pks5-4* 突变位于 PPI 结构域内,

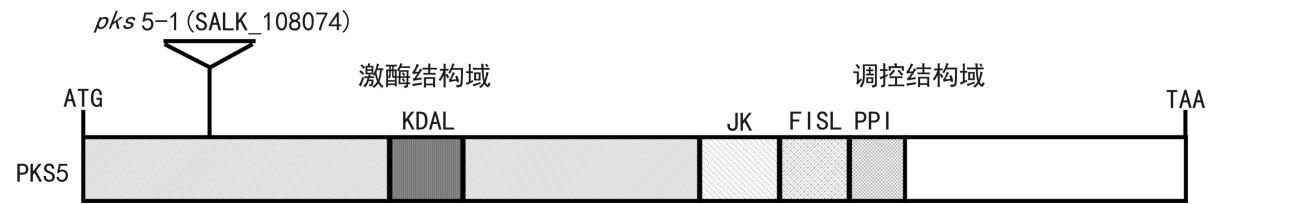


图 1 PKS5 蛋白结构示意图 **KDAL**. 激酶催化结构域激活环；**JK**. 连接区；**FISL**. FISL 基序；**PPI**. PP2C 蛋白磷酸酶作用结构域。
Fig. 1 Structure of PKS5 protein **KDAL**. Activation loop resides in the kinase catalytic domain；**JK**. Conjunction domain；**FISL**. FISL motif；**PPI**. Domain interacted with the PP2C phosphorase.

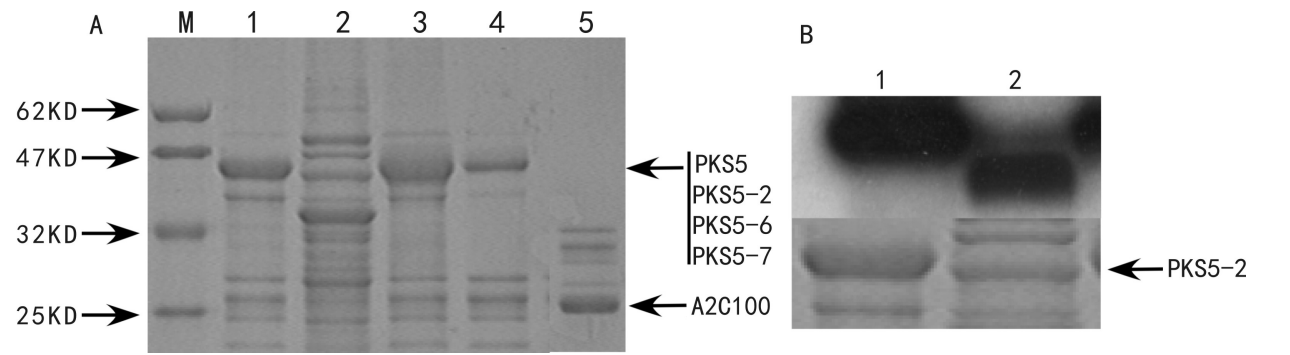


图 2 PKS5 点突变蛋白纯化及 PKS5-2 蛋白表达 Western 验证 **A**. PKS5 纯化点突变蛋白 SDS-PAGE 电泳 **M**. NEB 蛋白标准；**1**. PKS5 纯化蛋白；**2**. PKS5-2 点突变纯化蛋白；**3**. PKS5-6 点突变纯化蛋白；**4**. PKS5-7 点突变纯化蛋白；**5**. AHA2 C 末端 100 个氨基酸纯化蛋白(A2C100)。**B**. PKS5-2 蛋白表达杂交结果 **1**. PKS5 纯化蛋白；**2**. PKS5-2 点突变纯化蛋白。图中上部为使用 GST 抗体蛋白杂交结果,下部为考马斯亮蓝染色。
Fig. 2 Purification of the diverse PKS5 point mutant proteins and Western verification of the PKS5-2 expression **A**. SDS-PAGE gel electrophoresis of the purified PKS5 point mutant proteins **M**. NEB protein standard；**1**. Purified PKS5 protein；**2**. Purified point mutant PKS5-2 protein；**3**. Purified point mutant PKS5-6 protein；**4**. Purified point mutant PKS5-7 protein；**5**. Purified C-terminal 100 amino acids of AHA2 (A2C100). **B**. Analysis of Western blot for PKS5-2 **1**. Purified PKS5 protein；**2**. Purified point mutant PKS5-2 protein. The upper panel illustrates the hybrid for PKS5-2 using the antibody against GST and the lower panel is the Coomassie stain.

pks5-2 的位置靠近激活环。

2.2 PKS5 点突变与 AHA2C 末端蛋白的原核表达

将纯化的 PKS5 点突变融合蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳(图 2:A)。PKS5 和所有点突变蛋白及 AHA2C 末端 100 氨基酸均可进行表达,纯化的蛋白除 PKS5-2 外,其余分子量大小均与预测相符。而 PKS5-2 蛋白主条带不明显,为确认 PKS5-2 是否已表达及其位置,使用 GST 抗体以 Western 进行验证,确认 PKS5-2 得到表达,但其位置发生了变化(图 2:B),此可能是由于 PKS5-2 点突变导致其在胶上的迁移率发生变化所致。

2.3 PKS5 及其突变蛋白的体外磷酸化活性

通过体外磷酸化测试,PKS5 点突变蛋白的自磷酸化活性水平与通用底物 BMP 磷酸化水平比较(图 3)。体外自磷酸化分析表明 PKS5-2 失去了激酶活性。此外 PKS5-2 以原核方式表达后其蛋白的大小也发生了变化(图 3:A),与 PKS5 相比较其大

小相差约 10 kD,推测 PKS5-2 突变可能改变了蛋白的空间结构,进而使得其迁移发生了相应的改变,从而造成其激酶活性也丧失。由于 PKS5-2 已不具有激酶活性,因而在此后的研究中对激酶活性的分析不再对 PKS5-2 进行测试。

PKS5、PKS5-6 和 PKS5-7 的自磷酸化活性比较(图 3:B)。从图 3:B 可以看出,与 PKS5 相比较,PKS5-6 和 PKS5-7 的自磷酸化活性增强,PKS5-7 增强最多,而 PKS5-6 次之。PKS5-6 和 PKS5-7 对蛋白激酶通用底物 MBP 底物磷酸化活性能力测试结果如图 3:C 所示,与 PKS5 相比较,PKS5-6 和 PKS5-7 的底物水平磷酸化能力也增强,PKS5-7 增强最多,而 PKS5-6 则次之,与 PKS5、PKS5-6 和 PKS5-7 的自磷酸化活性的变化相一致。对 PKS5 其它点突变蛋白的自磷酸化与 MBP 底物磷酸化活性测试表明:与 PKS5 相比,PKS5-4、PKS5-5 和 PKS5-9 的两种磷酸化活性没有发生变化(图 3:D),

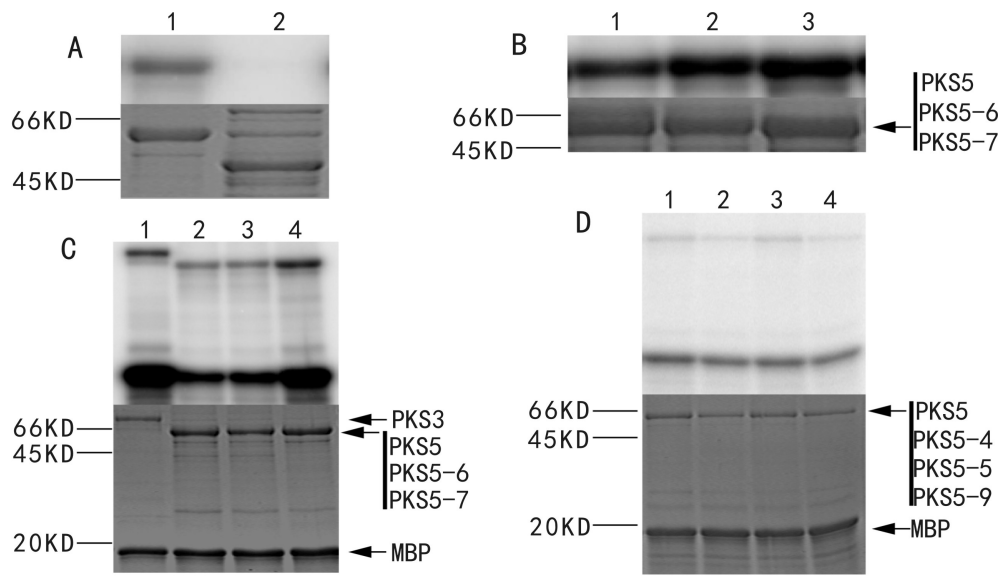


图 3 PKS5 点突变蛋白体外磷酸化活性分析 A. PKS5-2 突变导致激酶活性丧失 1. PKS5 纯化蛋白; 2. PKS5-2 点突变纯化蛋白。B. PKS5-6、PKS5-7 与 PKS5 的自磷酸化活性比较 1. PKS5 纯化蛋白; 2. PKS5-6 点突变纯化蛋白; 3. PKS5-7 点突变纯化蛋白。C. PKS5-6、PKS5-7 和 PKS5 对 MBP 底物磷酸化活性的比较 1. PKS3 与 MBP 纯化蛋白样品; 2. PKS5 与 MBP 纯化蛋白样品; 3. PKS5-6 点突变纯化蛋白与 MBP 纯化蛋白样品; 4. PKS5-7 点突变纯化蛋白与 MBP 纯化蛋白样品。D. PKS5、PKS5-4、PKS5-5 和 PKS5-9 自磷酸化与 BMP 底物磷酸化活性比较 1. PKS5 与 MBP 纯化蛋白样品; 2. PKS5-4 与 MBP 纯化蛋白样品; 3. PKS5-5 点突变纯化蛋白与 MBP 纯化蛋白样品; 4. PKS5-9 点突变纯化蛋白与 MBP 纯化蛋白样品。A、B、C、D 中上部为放射自显影结果,下部为考马斯亮蓝染色。

Fig. 3 Analysis of *in vitro* phosphorylation activity of the PKS5 point mutant proteins A. Mutation in PKS5-2 abolishes the activity of phosphorylation of PKS5 1. Purified PKS5 protein; 2. Purified point mutant PKS5-2 protein. B. Comparison of the autophosphorylation activity of PKS5 with PKS5-6 and PKS5-7 1. Purified PKS5 protein; 2. Purified point mutant PKS5-6 protein; 3. Purified point mutant PKS5-7 protein. C. Comparison of the substrate phosphorylation activity of PKS5 with PKS5-6 and PKS5-7 to MBP 1. Sample containing the purified PKS3 and MBP proteins; 2. Sample containing the purified PKS5 and MBP proteins; 3. Sample containing the purified point mutant PKS5-6 and MBP proteins; 4. Sample containing the purified point mutant PKS5-7 and MBP proteins; D. Comparison of the autophosphorylation activity and substrate phosphorylation activity of PKS5 with PKS5-4, PKS5-5 and PKS5-9 to MBP 1. Sample containing the purified PKS5 and MBP proteins; 2. Sample containing the purified point mutant PKS5-4 and MBP proteins; 3. Sample containing the purified point mutant PKS5-5 and MBP proteins; 4. Sample containing the purified point mutant PKS5-9 and MBP proteins. The upper panels present the result of autoradiograph and the lower panels show the Coomassie stain of pictures in A, B, C and D.

说明 PKS5 在此位置的突变对其磷酸化活性未产生影响。

2.4 PKS5 及其突变蛋白对 AHA2 的磷酸化作用

植物细胞内 pH 内平衡主要由质膜上 H⁺-ATPase 来保持。拟南芥 ATPase 主要等位形式 AHA2 主要分布于根中,与 PKS5 的组织定位相一致,在根中起着调节植物 pH 内平衡的功能。本研究前期工作中已发现 PKS5 可直接磷酸化 AHA2。为了进一步解析 PKS5 各结构域功能,我们在体外测试了当 PKS5 在不同的结构域突变后其对 AHA2 磷酸化能力的变化(图 4)。从图 4 可以看出,当 PKS5 在不同结构域发生突变后,PKS5-6 和 PKS5-7 为功能获得性突变,与 PKS5 相比较 PKS5-6 和 PKS5-7 对 AHA2 的磷酸化能力增强,这与 PKS5-6 与 PKS5-7 自磷酸化能力的增强结果相一致。其中 PKS5-7 对

AHA2 的磷酸化能力最强,而 PKS5-6 次之。

PKS5 及其点突变形式 PKS5-6 和 PKS5-7 对 AHA2 磷酸化的特异性在本试验中也得到了证实。PKS3 与 PKS5 同属于 PKS 家族,为测试 PKS5 是否特异的磷酸化 AHA2,本测试中加入 PKS3 作为对照。结果显示:PKS3 不能磷酸化 AHA2,因而可证实 PKS5 可特异的磷酸化 AHA2。此外,测试中加入 BSA (bovine serum albumin)作为阴性对照,结果显示 PKS5 及其突变蛋白不能磷酸化 BSA。

3 讨论与结论

PKS5 蛋白激酶作为拟南芥中参与外界高 pH 与盐胁迫响应信号途径中的元件,其在体内的功能已被进行了研究(Anja *et al.*, 2007)。由于蛋白激

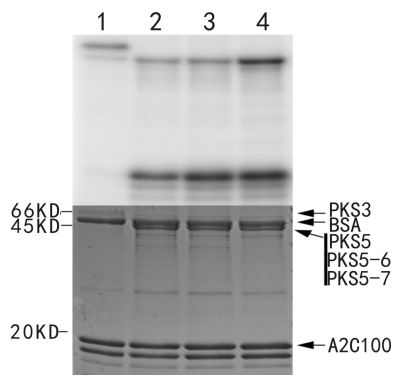


图 4 PKS5 点突变蛋白 PKS5-6、PKS5-7、PKS5 和 PKS3 对 AHA2 磷酸化活性比较 1. PKS3 与 A2C100 纯化蛋白样品; 2. PKS5 与 A2C100 纯化蛋白样品; 3. PKS5-6 点突变纯化蛋白与 A2C100 纯化蛋白样品; 4. PKS5-7 点突变纯化蛋白与 A2C100 纯化蛋白样品。图中上部为放射自显影结果,下部为考马斯亮蓝染色,PKS3 和 BSA 为对照。

Fig. 4 Comparison of phosphorylation activity of PKS5 and PKS3 with point mutant proteins PKS5-6 and PKS5-7 to AHA2 1. Sample containing the purified PKS3 and A2C100 proteins; 2. Sample containing the purified PKS5 and A2C100 proteins; 3. Sample containing the purified point mutant PKS5-6 and A2C100 proteins; 4. Sample containing the purified point mutant PKS5-7 and A2C100 proteins. The upper panel presents the result of autoradiograph and the lower panel shows the Coomassie stain. PKS3 and BSA serve as controls in this assay.

酶的结构特点,当激酶不同结构域上发生突变可能会使激酶活性发生改变。本研究结果证实:当 PKS5 在不同结构域发生突变后的确会改变其激酶活性。一种激酶在体内功能的体现主要在于其自身磷酸化或对其底物的磷酸化作用上。一般而言,一种激酶磷酸化其特异底物的前提是其自身的磷酸化能力。对 PKS5-2 而言,在此位置发生突变后使激酶的自磷酸化与底物水平的磷酸化活性丧失,而 PKS5-6 和 PKS5-7 激酶的两种磷酸化活性与野生型相比较则增强(图 3:A-C)。PKS5-4,PKS5-5 与 PKS5-9 突变蛋白两种磷酸化活性与 PKS5 相比无变化,说明此位点的突变对蛋白的结构或其功能未产生影响(图 3:D)。

在本研究中,与 PKS5 的激酶活性相比较,PKS5-2 的自磷酸化与对 AHA2 的磷酸化活性丧失,而 PKS5-6 和 PKS5-7 的两种磷酸化活性增强,两者呈现相反的结果,说明 PKS5 不同的结构域突变对激酶的磷酸化活性会产生不同的影响,进而可能使其在体内的功能也发生变化。试验中使用激酶阴性通用底物 BSA 作为对照,PKS3 和 PKS5 及 PKS5-6、PKS5-7 均不能磷酸化 BSA,表明 PKS5 对

AHA2 的磷酸化作用具有特异性,推测 PKS5 体内功能也同样具有特异性。

植物体内的激酶通过对其底物磷酸化作用从而对各种生理功能进行调节。其调节可能也存在体内磷酸酶对相同底物的去磷酸化作用。体内激酶一方面可磷酸化下游底物,另一方面也可能受到其上游调控元件的调控,此过程如果是受另一种上游蛋白激酶调控,由此便构成了磷酸化级联过程(Uner *et al.*,2004)。PKS5 在体内对 AHA2 的调节是通过磷酸化其第 931 位的丝氨酸而实现,而此变化阻碍了 AHA2 与 14-3-3 蛋白的相互作用。已知 AHA2C 末端第 947 位苏氨酸的磷酸化是其与 14-3-3 蛋白相互作用的前提,推测此位点磷酸化由体内未知激酶作用而产生。近期发现 PKS5 在体内与 SCaBP8 存在相互作用,并通过磷酸化过程参与对外界的盐碱调节过程(Changgen *et al.*,2009),也发现 PKS5 通过对植物抗病途径中一个主要共激活子 NPR1(Nonexpressor of Pathogenesis-Related gene 1)的磷酸化过程而介导了 WRKY38(WRKY DNA-binding protein 38)与 WRKY62(WRKY DNA-binding protein 62)的表达而参与了植物的抗病过程(Xie *et al.*,2010)。PKS5 参与植物体内的多种调控过程说明其功能的重要性与多样性。蛋白激酶功能是通过磷酸化其所参与的信号转导过程中的下激信号元件实现,其激酶活性的改变是其调控作用的主要方式。本研究结果显示其不同的结构域在激酶活性中起着不同的作用,可推测 PKS5 的激酶活性在体内也同样受到严格的调控,此精细调控可能是通过对其不同的结构域的调节而实现。本研究仅通过体外测试方式对 PKS5 不同点突变蛋白的激酶活性进行研究,对 PKS5 点突变在体内的活性测试以及筛选与 PKS5 有相互作用的元件是本研究的进一步工作。

参考文献:

Albrecht V,Ritz O,Linder S,*et al.* 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺ regulated kinases[J]. *Embo J*,**20**(5):1 051—1 063

Anja TF, Yan G, Tracey AC, *et al.* 2007. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein[J]. *Plant Cell*,**19**(5): 1 617—1 634

Changgen X, Huixin L,Xingwang D,*et al.* 2009. Roles of SCaBP8 in salt stress response[J]. *Plant Sign Behav*,**4**(10):956—958

- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, *et al.* 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation[J]. *Plant Physiol*, **120**(3): 867—878
- He DL, Han C. 2011. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach[J]. *Proteomics*, **11**: 2 693—2 713
- Hirose T, Scofield GN, Terao T. 2008. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice[J]. *Plant Sci*, **174**(5): 534—543
- Horst I, Welham T, Kelly S, *et al.* 2007. TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase[J]. *Plant Physiol*, **144**(2): 806—820
- Kaneko M, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, *et al.* 2002. The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium[J]. *Plant Physiol*, **128**(4): 1 264—1 270
- Karrer EE, Litts JC, Rodriguez RL. 1991. Differential expression of α -amylase genes in germinating rice and barley seeds[J]. *Plant Mol Biol*, **16**(5): 797—805
- Lawrence DM, Halmer P, Bowles DJ. 1990. Mobilisation of storage reserves during germination and early seedling growth of sugar beet[J]. *Physiol Plant*, **78**(3): 421—429
- Lovegrove A, Hooley R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone[J]. *Trends Plant Sci*, **5**: 102—110
- McCouch SR. 2008. CGSNL (Committee on Gene Symbolization, Nomenclature, Linkage, Rice Genetics Cooperative). Gene nomenclature system for rice[J]. *Rice*, **1**: 72—84
- Mohammadi H, Soltani A. 2011. Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean[J]. *Int J Plant Prod*, **5**(1): 65—70
- Nandi S, Das G, Sen-mandi S. 1995. α -amylase activity as an index for germination potential in rice[J]. *Ann Bot*, **75**: 463—467
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, *et al.* 2004. Reserve mobilization in the arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase 1[J]. *Plant Cell*, **16**: 2 705—2 718
- Potokina E, Sreenivasulu N, Altschmied L, *et al.* 2002. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Funct Integr Gen*, **2**(1-2): 28—39
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, *et al.* 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, **31**: 639—647
- Soltani A, Gholipour M. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity[J]. *Environ Exp Bot*, **55**: 195—200
- Svetlana L, Asa G. 2010. Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil[J]. *J Exp Bot*, **61**(11): 3 089—3 099
- Zhang ZH, Yu SB, Yu T, *et al.* 2005. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for seedling-vigor using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Field Crops Res*, **91**: 161—170
- Zhang ZL, Zhai WJ. 2007. Plant physiology Experimental Guidance [M]. Beijing: Higher Education Press: 127—128
- Ziegler P. 1999. Cereal β -amylases[J]. *J Cereal Sci*, **29**: 195—204

(上接第 413 页 Continue from page 413)

- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, *et al.* 2003. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, **15**(8): 1 833—1 845
- Deming G, Zizhong G, Jiankang Z. 2002. Expression, activation and biochemical properties of a novel *Arabidopsis* protein kinase[J]. *Plant Physiol*, **129**(1): 225—234
- Deming G, Changqing Z, Xiuyin C, *et al.* 2002. Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an *Arabidopsis* PKS protein kinase[J]. *J Biol Chem*, **227**(44): 42 088—42 096
- Detlef W, Jane G. 2002. *Arabidopsis*: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 168—169
- Hardie DG, Carling D, Carlson M. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell[J]. *Ann Rev Biochem*, **67**(1): 821—855
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, *et al.* 2003. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. *Plant Physiol*, **132**(2): 666—680
- Jen S, Li Z, Jang JC. 1999. Sugars as signaling molecules[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **2**: 410—418
- Qin YZ(秦玉芝), Li X(李旭), Guo M(郭明), *et al.* 2008. Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in *Arabidopsis* (钙传感蛋白互作激酶 CIPK14 参与拟南芥盐和 ABA 胁迫应答调节)[J]. *Sci Chin Ser C: Life Sci* (中国科学 C 辑: 生命科学), **38**(5): 446—457
- Qin YZ(秦玉芝), Guo M(郭明), Li X(李旭), *et al.* 2010. Stress responsive gene CIPK14 is involved in phytochrome A-mediated far-red light inhibition of greening in *Arabidopsis* (胁迫相关基因 CIPK14 在 PHYA 介导抑制拟南芥远红光黄化苗转绿过程中的作用)[J]. *Sci Chin: Life Sci* (中国科学: 生命科学), **40**(10): 970—977
- Uner K, Stefan W, Dragica B, *et al.* 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks[J]. *Plant Physiol*, **134**(1): 43—58
- Xie C, Zhou X, Deng X, *et al.* 2010. PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of WRKY38 and WRKY62[J]. *J Genet Genom*, **37**(6): 359—369
- Yan G, Ursula H, Manabu I, *et al.* 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance[J]. *Plant Cell*, **13**(6): 1 383—1 399
- Yong QY, Yun XQ, Chang XX, *et al.* 2010. The *Arabidopsis* chaperone J3 regulates the plasma membrane H^+ -ATPase through interaction with the PKS5 kinase[J]. *Plant Cell*, **22**(4): 1 313—1 332

作者: [赵菲佚](#), [焦成瑾](#), [陈荃](#), [马伟超](#), [安建平](#), [呼丽萍](#), [ZHAO Fei-Yi](#), [JIAO Cheng-Jin](#), [CHEN Quan](#), [MA Wei-Chao](#), [AN Jian-Ping](#), [HU Li-Ping](#)

作者单位: [赵菲佚,呼丽萍,ZHAO Fei-Yi,HU Li-Ping\(天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741000; 甘肃大樱桃工程技术中心, 甘肃 天水 741000\)](#), [焦成瑾,陈荃,马伟超,安建平,JIAO Cheng-Jin,CHEN Quan,MA Wei-Chao,AN Jian-Ping\(天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水,741000\)](#)

刊名: [广西植物](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [Guihaia](#)

年, 卷(期): 2015(3)

参考文献(16条)

1. [Albrecht V;Ritz O;Linder S](#) The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺ + reg-ulated kinases 2001(5)
2. [Anja TF;Yan G;Tracey AC](#) Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by pre-venting interaction with 14-3-3 protein 2007(5)
3. [Changgen X;Huixin L;Xingwang D](#) Roles of SCaBP8 in salt stress response 2009(10)
4. [Cheong YH;Kim KN;Pandey GK](#) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis 2003(8)
5. [Deming G;Zizhong G;Jiankang Z](#) Expression, activation and biochemical properties of a novel Arabidopsis protein kinase 2002(1)
6. [Deming G;Changqing Z;Xiuyin C](#) Constitutive activa-tion and transgenic evaluation of the function of an Arabidopsis PKS protein kinase 2002(44)
7. [Detlef W;Jane G](#) Arabidopsis: A Laboratory Manual 2002
8. [Hardie DG;Carling D;Carlson M](#) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell 1998(1)
9. [Hrabak EM;Chan CW;Gribskov M](#) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases 2003(2)
10. [Jen S;Li Z;Jang JC](#) Sugars as signaling molecules 1999
11. [秦玉芝, 李旭, 郭明, 邓克勤, 林建中, 唐冬英, 郭新红, 刘选明](#) 钙传感蛋白互作激酶CIPK14参与拟南芥盐和ABA胁迫应答调节[期刊论文]-中国科学C辑 2008(5)
12. [秦玉芝, 郭明, 李旭, 熊兴耀, 何长征, 聂先舟, 刘选明](#) 胁迫相关基因CIPK14在PHYA介导抑制拟南芥远红光黄化苗转绿过程中的作用[期刊论文]-中国科学C辑 2010(10)
13. [Uner K;Stefan W;Dragica B](#) Calcium sensors and their interacting protein kinases:genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks 2004(1)
14. [Xie C;Zhou X;Deng X](#) PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of WRKY38 and WRKY62 2010(6)
15. [Yan G;Ursula H;Manabu I](#) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance 2001(6)
16. [Yong QY;Yun XQ;Chang XX](#) The Arabidopsis chaperone J3 regulates the plasma membrane H⁺-ATPase through interaction with the PKS5 kinase 2010(4)

引用本文格式: [赵菲佚](#), [焦成瑾](#), [陈荃](#), [马伟超](#), [安建平](#), [呼丽萍](#), [ZHAO Fei-Yi](#), [JIAO Cheng-Jin](#), [CHEN Quan](#), [MA Wei-Chao](#), [AN Jian-Ping](#), [HU Li-Ping](#) [拟南芥 PKS5激酶点突变体外表达与磷酸化测试](#)[期刊论文]-[广西植物](#) 2015(3)