

文章编号: 1005-0906(2015)01-0026-07

玉米类受体激酶基因 *Psy2* 的生物信息学分析及 RNAi 转基因表达鉴定

吴晓军, 徐 丽, 王守才

(中国农业大学/国家玉米改良中心, 北京 100193)

摘 要: 根据玉米细菌性褐斑病抗病基因的定位结果预测得到 1 个编码受体激酶(Receptor-like kinases, RLKs) 基因 *Psy2*, 采用生物信息学方法对显性基因 *Psy2* 和隐性基因 *psy2* 编码蛋白的结构、功能和理化性质进行预测和分析。结果表明, *psy2* 的编码氨基酸与 *Psy2* 相比共有 57 个氨基酸差异, 包括起始密码子 Met 提前 1 位、1 个精氨酸的缺失和 55 个氨基酸替换; 两者理化性质差异较小, 都被归类为不稳定蛋白; 都具有信号肽, 属分泌性蛋白; *psy2* 无法形成有效跨膜结构域(Transmembrane domain, TM), 但都定位于质膜; *Psy2* 基因的进化与相应的物种进化相一致。推测 *psy2* 蛋白的氨基酸残基替换、缺失以及跨膜结构域的改变影响了信号的正常传导。通过基因枪转化法将 RNA 干扰表达载体导入受体 Hi II A×Hi II B 的幼胚, 获得阳性转基因植株, 经过 qRT-PCR 检测显示, *Psy2a*-RNAi 在成株期(开花期)的干扰效果比苗期显著增强。

关键词: 玉米; RNA 干扰; 转基因; 细菌性褐斑病

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Bioinformatic Analysis and Transgenic RNAi Expression Identification of Maize Receptor-Like Kinase Gene *Psy2*

WU Xiao-jun, XU Li, WANG Shou-cai

(China Agricultural University / National Maize Improvement Center, Beijing 100193, China)

Abstract: A candidate gene *Psy2* encoding receptor-like kinase was predicted based on the mapping results of maize bacterial brown spot disease. Bioinformatic analysis showed that 57 amino acid differences exist between *Psy2* and *psy2* proteins, including the changed position of initiation codon met, an amino acid deletion and 55 amino acid substitutions in *psy2* protein. *Psy2* and *psy2* proteins were classified as unstable proteins, had a signal peptide, were secretory protein; *psy2* protein unable to form an effective transmembrane domain(TM), but both were located in the plasma membrane. The genetic evolution of *psy2* proteins coincided with the evolution of corresponding species. Therefore, these amino acid changes in *psy2* protein resulted in the abnormal function. The RNA interference expression vector was transformed into the immature embryos of Hi II A×Hi II B via particle bombardment, and the expression detection of transgenic plants by qRT-PCR showed that interference effects in the flowering period than seedling in *Psy2a*-RNAi plants significantly enhanced.

Key words: Maize; RNAi; Transgene; Bacterial brown spot disease

植物细胞能够通过类受体激酶感受生物和非生物因子的刺激, 将外界信号传递到胞内, 然后通过转

录因子调控一系列相关基因的表达, 从而对外界信号做出适应性反应。植物类受体激酶基因是利用分子生物学手段鉴定的动物受体蛋白激酶基因的一类植物同源基因^[1], 除少数成员外, 大多数编码蛋白质的天然结合配基和上下游结合蛋白还未找到, 信号传导途径也还待进一步研究阐明^[2]。目前, RLKs 是植物中发现的数量最大的一类蛋白激酶家族, 预测显示在拟南芥中超过 600 个基因, 在水稻中超过 1 000 个基因, 占各基因组的 2% 左右^[3,4]。

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家高新技术研究与发展计划“863”(2012AA101104, 2011AA10A103)、国家重点基础研究发展计划“973”(2009CB118400)

作者简介: 吴晓军(1981-), 男, 河南信阳人, 博士, 主要从事玉米细胞工程和分子育种研究。E-mail: jdfs30@163.com

植物 RLKs 由胞外域、胞内域和连接 2 个区域的跨膜区 3 个部分构成,能够通过胞内激酶域的自磷酸化或磷酸化传递以开启或关闭下游靶蛋白,完成信号跨膜、跨蛋白传递的功能^[5]。RLKs 在植物抗病性反应的信号传递中具有极其重要的作用,其胞外域变异度较大,负责特异性识别病原物效应因子 (Effector)^[6]。根据胞外域的不同 RLKs 可大致分为以下几种类型:第一类仅具有胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶域 (Serine/threonine kinase, STK),如番茄的细菌性斑点病抗性基因 *Pto*^[7],PTO 编码蛋白能够通过编码激酶的 N 末端十四烷基化位点将自身定位于原生质膜上,识别并结合病原物无毒蛋白 *avrPto* 和 *avrPtoB*^[8];第二类具有胞外 LRR 结构域和胞内激酶结构域,该类是目前植物 RLKs 中基因数量最大的家族^[9],如拟南芥的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 识别受体 *FLS2*^[10,11],水稻白叶枯病抗性基因 *Xa21*、*Xa26* 等^[12];第三类是与细胞壁连接的类受体激酶,不仅具有跨膜结构,而且胞外域与细胞壁紧密相连被称为 WAKs (wall-associated receptor kinases),如拟南芥的枯萎病抗性基因 *RFO1*^[13];第四类具有胞外外源类凝集素 B-lectin 结构域,该类 RLKs 一般具有 2 个胞外区域,一个是具有球形结构的 lectin,与甘露糖或胞外配体结合的区域,另一个是 PAN 结构域,能够与蛋白或碳水化合物结合,这类 RLKs 可能参与结合寡糖,如水稻稻瘟病抗性基因 *Pi-d2*^[14];其他还有具有胞外 START 油脂结合域和激酶结构域的基因,如小麦条锈病抗性基因 *Yr36* 等^[15]。

玉米细菌性褐斑病是一种玉米种传病害,研究表明,其病原为丁香假单胞杆菌丁香致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, *Pss*)^[16]。根据本实验室以前的定位研究,预测得到两个编码类受体蛋白激酶的基因 *Psy1* 和 *Psy2*,通过比对这两个基因在多个抗病自交系中的序列信息发现,多个抗病自交系是 *psy1* 基因型,所有抗病自交系都是 *Psy2* 基因型。*psy1* 基因因碱基突变导致蛋白编码提前终止,无法形成完整的激酶结构域,因此,排除了 *Psy1* 基因,将 *Psy2* 基因作为玉米细菌性褐斑病的首要抗病候选基因。*Psy2* 基因属于具有外源类凝集素 B-lectin 结构域的 RLKs 基因。本研究利用生物信息学分析手段对显性基因 *Psy2* 及隐性基因 *psy2-2* (简称 *psy2*) 编码蛋白的结构、功能和理化性质进行分析,进一步明确该候选基因的抗性功能。另外,构建了 *Psy2* 基因的 RNAi 表达载体并对转基因效果进行分析,为深入研究其抗性功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

玉米 Hi II 的杂交 F₁ 代种子 (Hi II A×Hi II B),在授粉后 9~14 d 取幼穗,剥幼胚 (大小约 1.2~2 mm) 作为转基因受体材料。大肠杆菌菌株 DH5α 和 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;中间载体 P1022 和表达载体 pCambia 3301 (p3301) 由中国农业大学国家玉米改良中心金危危教授课题组惠赠;限制性内切酶和 T4 连接酶购自 Fermentas 公司;高保真酶 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 购至大连宝生物公司;植物总 RNA 提取试剂盒 (DP432) 购自天根生化科技有限公司;反转录酶 SuperScript™ III reverse transcription kits 购自 Invitrogen 公司;实时定量 RT-PCR 试剂盒 2×SG Green qPCR Mix kit 购自北京信诺金达生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

通过 PCR 扩增手段得到 *Psy2* 基因的 DNA 序列,经美国国立生物信息中心的 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询得到编码蛋白的结构域、不同剪切长度的转录本和基因组中的同源基因。采用 DNAMAN 分析软件对蛋白、转录本、基因 DNA 序列进行同源性比对,确定该基因在染色体中的位置和拷贝数。利用多种序列分析软件和生物信息学数据库对该基因的编码蛋白进行结构、理化特性分析及功能预测。

采用生物信息数据库 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白功能域预测;利用 ProParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白理化性质分析;利用蛋白质功能位点数据库 Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 进行蛋白功能位点预测;利用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白信号肽预测;利用 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行蛋白跨膜结构域预测;利用 ProtComp v.9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 和 PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) 进行蛋白亚细胞定位预测。从 NCBI 数据库中查询得到 *Psy2* 基因的不同物种直系同源蛋白序列,使用软件 clustalx1.83 进行“do complete Alignment”比对,接着将比对结果输入分子进化遗传分析软件 MEGA5.1,将其转换为 .meg 格式并保存,最后采用 Neighbor-Joining 算法构建蛋白质进化树。

1.2.2 构建 *Psy2* 基因的 RNAi 表达载体

来自自交系 F349 的新鲜叶片中提取 RNA,反转录

后以 cDNA 为模板进行 *Psy2* 基因的干扰片段克隆, 使用高保真酶以确保所克隆干扰片段的高保真性。设计的干扰片段 *Psy2a*-RNAi 部分位于编码 *Psy2* 激酶催化区的基因序列, *Psy2a* 干扰片段克隆使用正向引物 *Psy2a*-*Bam*H I : 5' GCG **GGATCC** GAACATGTGGAAAGAAGGGAAAATAG 3' (含 *Bam*H I 酶切位点), 反向引物 *Psy2a*-*Spe* I : 5' GCG**ACTAGT**-GGGCTGAACGATCAGTTTTAGTTATG 3' (含 *Spe* I 酶切位点)。

将连接干扰片段的克隆载体经 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切后, 回收带有酶切粘性末端的干扰片段。将中间载体 P1022 使用 *Bam*H I 和 *Spe* I、*Xba* I 和 *Bgl* II 前后分别进行 2 次双酶切, 第 1 次酶切后连

接带有粘性末端的干扰片段, 得到含有正义干扰片段的 P1022 中间载体阳性克隆; 在此基础上进行第 2 次酶切, 回收中间载体线性片段与带有粘性末端的干扰片段再次连接, 得到含有正义和反义干扰片段的 P1022 中间载体阳性克隆 (图 1)。其原理是 *Xba* I 和 *Bgl* II 分别是 *Spe* I 和 *Bam*H I 的同尾酶, 相互连接后能够形成反义干扰片段, 并且酶切位点消失, 无法再次酶切。两次连接成功后得到含有正、反义干扰片段的 RNAi 中间载体, 将它和表达载体 P3301 进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 酶切后分别回收 RNAi 表达盒和表达载体的线性片段, 使用 T4 连接酶连接, 最终构建好 *Psy2* 基因的 RNAi 干扰表达载体 (图 1)。本实验中还进行了酶切和测序验证。

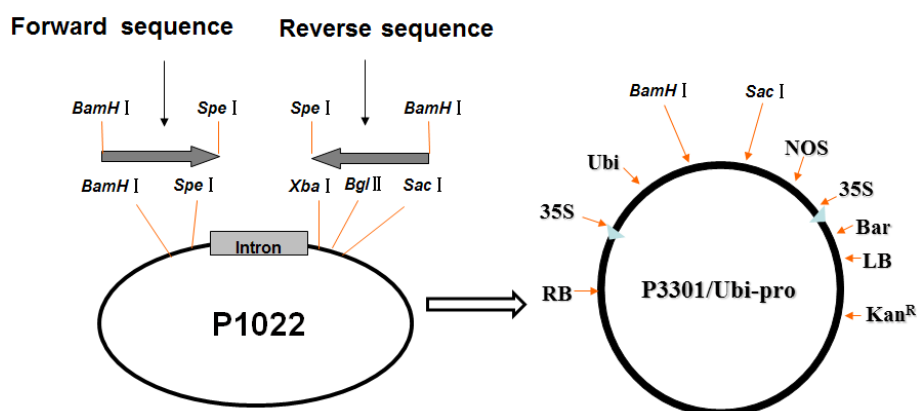


图 1 RNAi 载体构建示意图

Fig.1 The construction of RNAi vector

1.2.3 阳性转基因植株检测

以 CTAB 法提取的转基因植株叶片 DNA 为模板, 使用两对特异性引物组合进行 PCR 扩增以检测转基因阳性株。第一对引物组合的正向引物 Ubi (Ubiquitin, Ubi): 5' GGATCTGTATGTGTGTGCCA 3', 反向引物 *PSY2a*-*Gsp*: 5' TGTCGTCGTTTTGTTCTC-CAGC 3'; 第二对是 *bar* 基因特异性引物, 正向引物 *Bar*-F: 5' ACAAGCACGGTCAACTTCC 3', 反向引物 *Bar*-R: 5' ACTCGGCCGTCCAGTCGTA 3'。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测阳性条带。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 对 *Psy2a*-RNAi 转基因阳性株进行干扰效果分析。从获得的阳性株里选取 6 株 (4 株处于苗期, 2 株处于开花期) 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (DP432) 提取叶片总 RNA, 使用反转录试剂盒 (SuperScript™ III reverse transcription kits) 将总 RNA 中的 mRNA 反转录为 cDNA。设计基因特异性引物 (正向引物 PRT-E2F:

5' CCAACAAGGTTCAAGATAATCCACG 3', 反向引物 PRT-ER: 5' GTAACCATATGTCCCTACAACCTGG 3'), 以 *actin* 基因作为内参基因利用 qRT-PCR 试剂盒 (2×SG Green qPCR Mix kit) 检测 *Psy2* 基因干扰后的表达量。

2 结果与分析

2.1 *Psy2* 生物信息学分析

2.1.1 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白的氨基酸序列比对分析

Psy2 基因和 *psy2* 基因的开放阅读框 (ORF) 都为 2 454 bp, 有 7 个外显子, 编码 817 个氨基酸。但是两者氨基酸序列差异明显, 除了 55 个氨基酸残基替换外, *psy2* 因为碱基突变形成新的起始密码子 ATG, 使得起始氨基酸 Met 较 *Psy2* 提前 1 位, 但在其编码氨基酸序列的 428 号位置因 3 个碱基的缺失而丢失了一个精氨酸 (ARG)。由此可以推测, 抗、感基因编码氨基酸的差异造成了玉米细菌性褐斑病的抗、感表型 (图 2)。

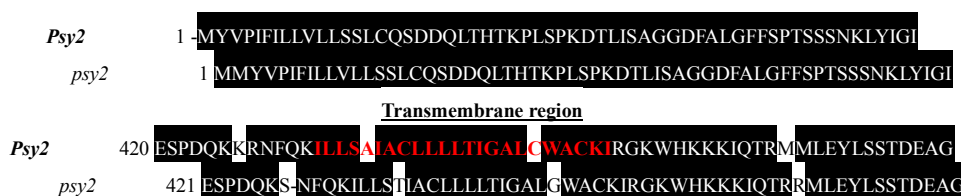


图2 显性基因 *Psy2* 与隐性基因 *psy2* 的部分氨基酸序列比对

Fig.2 The sequence alignment between partial amino acid of dominant gene *Psy2* and recessive gene *psy2*

2.1.2 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白的理化性质分析

基因 *Psy2* 和 *psy2* 编码的蛋白质都由 817 个氨基酸组成,分子量分别为 91.4 KDa 和 91.0 KDa,理论等电点分别为 6.17 和 6.13,分子式分别为 $C_{4091}H_{6336}N_{1068}O_{1220}S_{52}$ 和 $C_{4064}H_{6297}N_{1065}O_{1212}S_{47}$ 。 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白的丝氨酸含量最高,分别占 10.0% 和 10.2%;色氨酸含量最低,分别占 1.8% 和 1.7%。 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白的不稳定系数分别为 49.07 和 47.46,都被归类为不稳定蛋白;他们在哺乳动物网织红细胞中的半衰期都为 30 h,大肠杆菌中半衰期为 10 h,酵母菌中半衰期为 20 h。二者的蛋白质分子量、氨基酸残基、等电点、稳定性等理化性质差异较小。

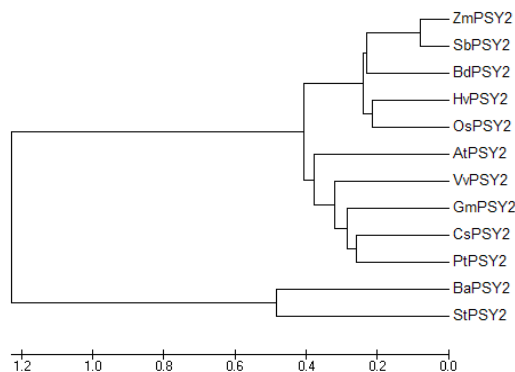
2.1.3 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白的信号肽、功能位点、结构域和亚细胞定位预测

使用 SignalP4.1 对 *Psy2* 和 *psy2* 编码蛋白进行预测,结果显示,两者均具有信号肽,都属于分泌性蛋白。使用 PROSITE 数据库对蛋白质功能位点进行预测,结果显示, *Psy2* 和 *psy2* 均具有 3 个功能活性位点,分别是核糖体蛋白 S6e (Ribosomal protein S6e signature)、蛋白激酶 ATP 结合区域 (Protein kinases ATP-binding region signature) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性位点 (Serine/Threonine protein kinases active-site signature)。使用 SMART 数据库预测显示,两者都具有 4 个结构域: B_lectin domain (Bulb-type mannose-specific lectin)、S_locus_glycop domain (S-locus glycoprotein family)、PAN_AP domain (divergent subfamily of APPLE domains) 和 S_TKc domain (Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain)。使用 TMHMM2.0 软件预测显示, *Psy2* 基因在 432-454 位置具有跨膜结构域,而 *psy2* 基因在该位置含有两个氨基酸替换 (A-T, C-G),不能形成有效的 TM。然而使用 ProtComp v. 9.0 和 PSORT 对两者进行蛋白质亚细胞定位预测,结果显示, *Psy2* 和 *psy2* 均定位于细胞质膜。研究表明,类受体蛋白激酶定位于质膜上行使信号传导功能,本研究中 *psy2* 蛋白在 TM 结构发生改变的情况下,可能无法正常行使胞外结合配

基后向胞内激酶催化域传导信号的功能,表现玉米细菌性褐斑病感病表型。

2.1.4 *Psy2* 蛋白的系统进化分析

从构建的进化树可以看出, *Psy2* 在植物与原核生物中的进化距离较远,被聚类到具有最大差异的两个独立分支上;在真核生物分支中禾本科植物玉米、高粱、二穗短柄草、大麦和水稻被聚类为一类,其中,玉米、高粱和二穗短柄草被聚类为独立分支,大麦和水稻被聚类为另一分支 (图 3)。真核生物的另一大分支中黄瓜和毛果杨被聚为独立小分支,他们与大豆、葡萄、拟南芥的进化关系依次由近及远。由此也看出,不同物种中该基因的进化关系与物种进化关系一致。



注: Zm 为玉米; Sb 为高粱; Bd 为二穗短柄草; Hv 为大麦; Os 为水稻; At 为拟南芥; Vv 为葡萄; Gm 为大豆; Cs 为黄瓜; Pt 为毛果杨; Ba 为芽孢杆菌; St 为葡萄球菌。

Note: Zm, *Zea mays*; Sb, *Sorghum bicolor*; Bd, *Brachypodium distachyon*; Hv, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; Os, *Oryza sativa*; At, *Arabidopsis thaliana*; Vv, *Vitis vinifera*; Gm, *Glycine max*; Cs, *Cucumis sativus*; Pt, *Populus trichocarpa*; Ba, *Bacillus*; St, *Staphylococcus*.

图3 *Psy2* 蛋白的分子进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Psy2* proteins

2.2 *Psy2* 基因 RNAi 表达载体的构建及干扰效果鉴定

2.2.1 *psy2a*-RNAi 干扰序列的获取

根据 *Psy2* 基因转录本信息设计分别带有 5' 端

*Bam*H I 和 3'端 *Spe* I 酶切位点的基因特异性引物, PCR 扩增得到长度为 386 bp 的 *psy2a*-RNAi 干扰片段(图4)。

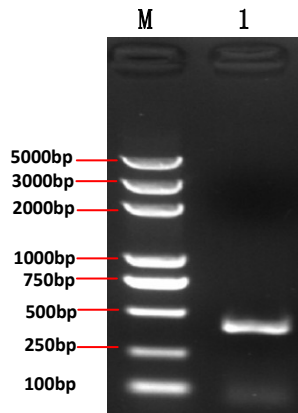
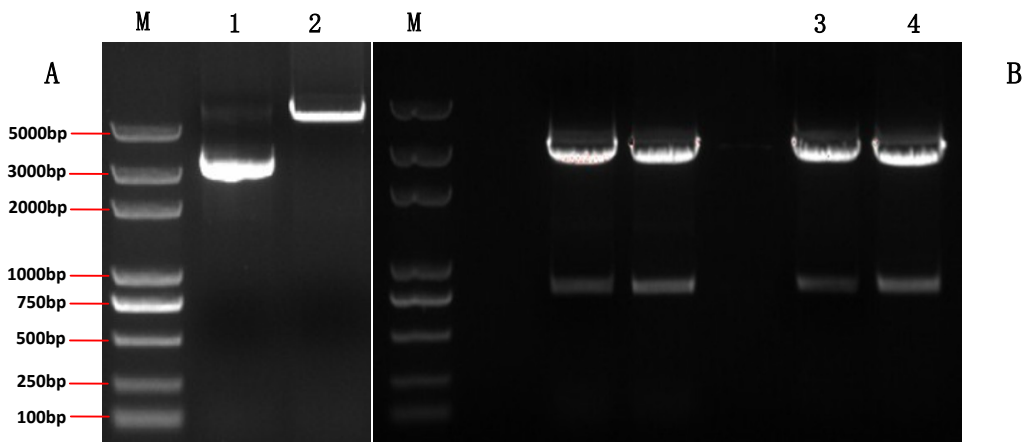


图4 *psy2a*-RNAi 干扰片段的检测

Fig.4 The detection of interference fragment *psy2a*-RNAi

2.2.2 RNAi表达载体构建及鉴定

中间载体 P1022 的内含子大小约为 120 bp, *Psy2a* 基因的 *Psy2a*-RNAi 干扰片段大小为 386 bp, 利用两次双酶切装配正、反义片段, 得到 RNAi 表达盒的大小约为 892 bp。表达载体 P3301 的空载体的 *Bam*H I 和 *Sac* I 两酶切位点序列较为靠近, 因此, 双酶切后只能看到一条表达载体线性条带(图5)。装配好的中间载体经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后显示得到一条 RNAi 表达盒长度的条带。将装配好的 *Psy2a*-RNAi 表达盒与 P3301 表达载体线性片段通过 *Bam*H I 和 *Sac* I 粘性末端分别连接, 最终得到构建好的 *Psy2a*-RNAi-P3301 表达载体。将 *Psy2a*-RNAi-P3301 表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定, 结果显示, RNAi 表达盒长度位于 marker 梯度的 750 ~ 1 000 bp 之间(图6), 表明 *Psy2a*-RNAi-P3301 表达载体构建成功。



注: A 为 P3301 空载体酶切验证; M 为 Marker; 1 为 P3301 空载体; 2 为经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切;

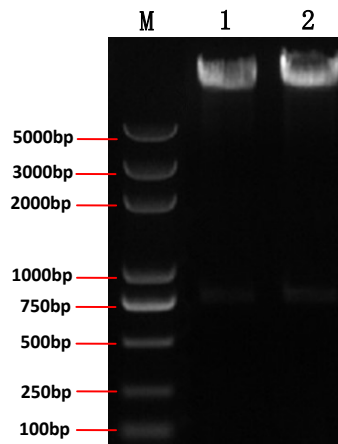
B 为装配好的 P1022 中间载体酶切验证; 3、4 为经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切。

Note: A, enzyme analysis of empty vector P3301; M, Marker; 1, empty vector P3301; 2, *Bam*H I amHySac I digestion;

B, enzyme analysis of assembled intermediate vector P1022; 3 and 4, *Bam*H I amHdSac I digestion.

图5 载体的酶切验证

Fig.5 Identification of vectors by enzyme digestion



注: M 为 Marker; 1、2 为 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切。

Note: M, Marker; 1 and 2, *Bam*H I amHdSac I digestion.

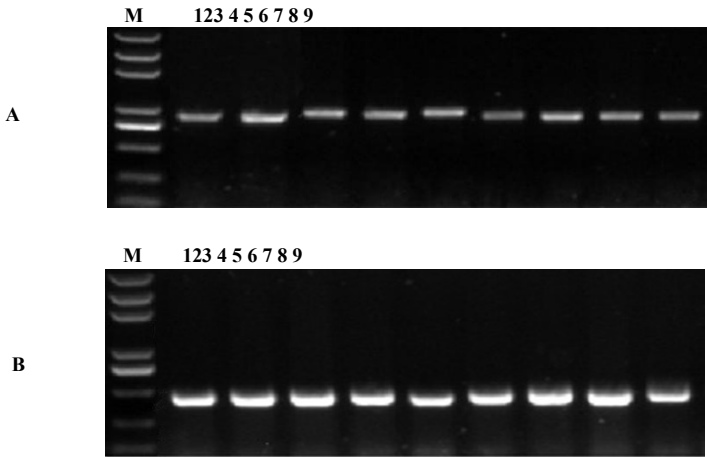
图6 *Psy2a*-RNAi-P3301 表达载体酶切验证

Fig.6 Identification of *Psy2a*-RNAi-P3301 vectors by enzyme digestion

2.2.3 *Psy2a*-RNAi 转基因植株的分子鉴定

本实验以玉米HI II的幼胚为受体材料,采用基因枪轰击法进行转基因操作。设计两对特异性引物进行T₀代转基因植株的阳性株检测,一对特异性引

物组合的正向引物来自表达载体P3301的泛素启动子Ubi,反向引物来自 *Psy2a*-RNAi 片段(图7);另一对是 *bar* 基因引物组合。两对特异性引物检测结果显示,共得到9个阳性转基因植株。



注:A为引物组合Ubi和 *Psy2a*-Gsp;B为 *bar* 基因引物组合。
Note: A, PCR analysis by the primer combination Ubi and *Psy2a*-Gsp; B, PCR analysis by the primer combination derive from *bar* gene.

图7 两对引物组合检测转基因阳性株

Fig.7 Identification of transgenic plants by two primer combinations

2.2.4 RNA 干扰转基因干扰效果鉴定

本实验使用qRT-PCR分析转基因阳性株中 *Psy2* 基因干扰后的表达量,设置2个时间点:苗期和成株期(开花期)。从结果可以看出,转基因 *Psy2a*-RNAi 在苗期 *Psy2a*-2、*Psy2a*-3、*Psy2a*-4 与对照(CK1)相比,表达量分别降低47.6%、61.2%和41.8%,

Psy2a-5 的表达量没有明显变化;成株期转基因植株 *Psy2a*-1 和 *Psy2a*-6 与对照(CK2)相比干扰效果尤为显著,表达量分别降低86.3%和86.9%(图8)。可以看出,在Ubi启动子作用下,RNAi转基因植株中 *Psy2* 基因在成株期的干扰效果比苗期大大增强。

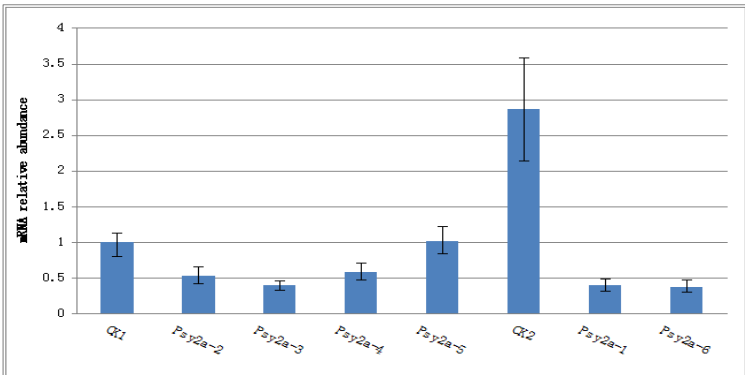


图8 转基因植株 *Psy2* 基因的qRT-PCR检测

Fig.8 The expression detection of *Psy2* gene in transgenic plants by qRT-PCR

3 结论与讨论

植物生活在一个充满多样化微生物的复杂环境里,为了应对病原物威胁,他们进化出一套能够及时感知潜在侵染的防御系统,其中受体蛋白激酶的参

与起到重要的作用。受体蛋白激酶通过自磷酸化和磷酸化传递行使信号传递功能,这个过程是由胞内激酶域完成的,它将三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)的 $\gamma\gamma$ 位磷酸基团转移到蛋白质分子的羟基氨基酸侧链。目前,已经克隆得到了一些具有蛋

白激酶保守结构域的抗病基因,他们的胞外结构域形式多样,其中,水稻稻瘟病抗病基因 *Pi-d2* 是第一个被揭示抗性功能的含有胞外 B-lectin 结构域的蛋白激酶^[14]。本研究中对玉米细菌性褐斑病抗病基因的精细定位结果进行分析,找到了2个具有胞外 B-lectin 结构域的抗病候选基因 *Psy1* 和 *Psy2*,其中 *Psy1* 经序列比对分析后被排除。

通过生物信息学手段对 *Psy2* 和 *psy2* 蛋白进行分析,发现两者的理化性质差异不大,都具有3个活性位点和4个结构域。两者在编码氨基酸序列上的差异较多,共有57个氨基酸残基发生变化,其中 *psy2* 蛋白由于碱基突变形成相连的两个起始密码子 ATG,并且与 *Psy2* 蛋白相比在氨基酸序列的428位缺失一个精氨酸。跨膜结构域预测显示,*psy2* 蛋白无法形成有效的 TM 结构域,而亚细胞定位结果显示其可能定位于质膜上;这与水稻稻瘟病抗病基因 *Pi-d2* 的情况类似,其抗、感等位基因由于在跨膜结构域编码区的一个氨基酸替换而导致抗、感功能差异。推测 *psy2* 蛋白由于多个氨基酸的替换和一个氨基酸的缺失形成了无功能蛋白,尤其是 TM 结构的变化,使得胞外结构域结合配基后无法将信号通过 TM 正常传递给胞内的激酶结构域,无法启动下游基因表达,从而丧失了抗性功能。

为了验证 *Psy2* 基因的抗性功能,使用抗玉米细菌性褐斑病的受体材料 Hi II 进行 RNAi 转基因操作,结果显示,转基因 T₀ 代阳性株在成株期的干扰效果比苗期显著增强。病感材料在人工气候箱和田间种植时均为苗期阶段发病,本研究中转基因干扰效果在苗期并不明显,成株期时干扰效果虽然明显却可能因错过发病最佳时期而无法再发病。在基因多个位置设计更长的干扰片段,使用具有花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子的表达载体进行 RNAi 转基因操作,以克服在苗期干扰效果欠佳的情况。另外,受体蛋白激酶往往处于各种通道的节点位置,与病原菌释放的效应因子及上下游相关蛋白组成了一个复杂网络,它通过激酶域内丝/苏氨酸残基的磷酸化和脱磷酸化来传导信号,调节植物的抗病性反应,因此,对蛋白互作进行研究也是揭示其抗性功能的重要途径。

参考文献:

- [1] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(19): 10763-10768.
- [2] Gish L A, Clark S E. The RLK/Pelle family of kinases[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(1): 117-127.
- [3] Shiu S, Karolowski W M, Pan R, et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice[J]. *The Plant Cell Online*, 2004, 16(5): 1220-1234.
- [4] Morillo S A, Tax F E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(5): 460-469.
- [5] Smith R D, Walker J C. Plant protein phosphatases[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1996, 47(1): 101-125.
- [6] Walker J C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26(5): 1599-1609.
- [7] Salmeron J M, Barker S J, Carland F M, et al. Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition[J]. *The Plant Cell Online*, 1994, 6(4): 511-520.
- [8] 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(5295): 2060-2063.
- [9] Gomez-Gomez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flt. FLS2 in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5: 1003-1011.
- [10] Dunning F M, Sun W, Jansen K L, et al. Identification and mutational analysis of *Arabidopsis* FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception[J]. *The Plant Cell Online*, 2007, 19(10): 3297-3313.
- [11] Song W, Wang G, Chen L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*[J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1804-1806.
- [12] Sun X, Cao Y, Yang Z, et al. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(4): 517-527.
- [13] Diener A C, Ausubel F M. RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific[J]. *Genetics*, 2005, 171(1): 305-321.
- [14] Chen X, Shang J, Chen D, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(5): 794-804.
- [15] Fu D, Uauy C, Distelfeld A, et al. A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust[J]. *Science*, 2009, 323(5919): 1357-1360.
- [16] Xu L, He Y, Zhang D, et al. Identification and fine-mapping of a bacterial brown spot disease resistance gene in maize[J]. *Molecular Breeding*, 2009, 23(4): 709-718.

(责任编辑:朴红梅)