

# XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质在酿酒酵母中的表达 及其自我磷酸化研究

王书利<sup>1</sup> 李莉云<sup>1</sup> 尚俊军<sup>2</sup> 王 静<sup>2</sup> 刘国振<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学生命科学学院 保定 071001)

(<sup>2</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

**摘 要** 白叶枯病和稻瘟病是最主要的水稻病害。*Xa21* 是水稻白叶枯病抗性基因, *Pi-d2* 是稻瘟病抗性基因, 二者都编码类受体激酶蛋白质。在前期研究中, 曾系统地研究了细菌中表达 XA21 激酶蛋白质的生化活性。在此实验中利用真核表达系统酿酒酵母对 *Xa21* 和 *Pi-d2* 编码的蛋白激酶进行了表达、纯化及自我磷酸化活性分析, 为进一步的生化分析、蛋白质-蛋白质相互作用研究、底物筛选等奠定了基础。

**关键词** 水稻; 白叶枯病; 稻瘟病; 抗病基因; 酿酒酵母

中图分类号: Q786 Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)06-1009-04

水稻是最重要的粮食作物之一, 是全世界一半以上人口的主要粮食来源。水稻病害的侵染会导致减产甚至绝收。白叶枯病和稻瘟病是水稻两大主要病害, 对抗病基因介导的抗病分子机理研究对水稻生产具有重要的意义。*Xa21* 是第一个克隆的水稻抗病基因, 对水稻白叶枯病具有广谱抗性。其编码的蛋白质是一个类受体蛋白激酶<sup>[1]</sup>。刘国振等对 *Xa21* 编码蛋白的激酶区进行了系统的生化特性的研究, 证明了 *Xa21* 编码一个有活性的蛋白激酶, 是丝/苏氨酸特异的<sup>[2]</sup>。稻瘟病是真菌性病害, 由异宗配合子囊菌 *Magnaporthe grisea* 的无性世代 *Pyricularia grisea* 产生的分生孢子侵染而使水稻致病。*Pi-d2* 抗稻瘟病基因最早在水稻品种地谷中发现, 并定位在第 6 号染色体上<sup>[3]</sup>。经图位克隆法克隆后, 发现 *Pi-d2* 也编码一个类受体激酶<sup>[4]</sup>。本实验中, 我们将 XA21 和 PI-D2 蛋白激酶在真核表达系统酵母中进行了表达。纯化后获得了考染可见并具有自我磷酸化活性的蛋白质, 为两个蛋白激酶的大量表达, 进而开展相关生化分析奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株: 酿酒酵母 (*Saccharomyces*

*cerevisiae*) Y258 菌株与 pEGH 穿梭载体由中国科学院北京基因组研究所朱衡研究员惠赠, 该载体是 URA3 高拷贝表达载体, 含有受半乳糖诱导的 GAL1 启动子, 表达 GST-6×His 融合蛋白<sup>[5]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器** *Eco*R I 和 *Hind* III 购自大连宝生物公司; 1kb DNA ladder、Tween-20、DTT 购自 Amersham Biosciences; 琼脂糖、卡那霉素、氨苄青霉素、Yeast nitrogen base (YNB)、SDS 购自上海生工; 过硫酸铵、EDTA、β-巯基乙醇购自 Sigma; 抗 HIS 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自上海午立生物技术有限公司。PCR 仪购自德国 Biometra 公司; 凝胶成像、蛋白质电泳和 Western blot 湿转系统购自 Bio-rad 公司; 台式高速冷冻离心机 (型号 6K15) 购自 Sigma 公司。

**1.1.3 寡核苷酸引物的设计合成** 根据酿酒酵母同源重组特点、pEGH 载体及 XA21 激酶和 PI-D2 激酶区序列, 采用 Sequencer 软件设计了相应的特异扩增引物, 用于扩增 XA21K 的正反向引物分别为: PrimXA21K-F (5'-GCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCACAAGAGAACTAAAAAGGGAGC-3'), PrimXA21K-R (5'-AGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATCAGAATTC AAGGCTCCACCT-3'); 用于扩增 PI-D2K 的正

基金项目 国家自然科学基金 (30328019, 30370872, 30670175)

\* 通讯作者。Tel: 86-312-7528250 E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

作者简介 王书利 (1979-) 女, 河北省石家庄人, 硕士研究生, 主要进行植物分子生物学方面研究。E-mail: wangshuli\_mbb@126.com

收稿日期 2007-03-23 接受日期 2007-04-13 修回日期 2007-07-16

反向引物分别为: PrimPi-d2K-F(5'-GCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTGGTTCATCGGAAGATGATG-3'), PrimPi-d2K-R(5'-AGGCAGATCGTCACTCACTCACGATGAATCATCTGGGACCAGAGAGCCTCACA-3')。

## 1.2 PCR 扩增

PCR 反应体系为 25  $\mu$ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。XA21K 扩增的模板来自美国佛罗里达大学植病系宋文源博士实验室, PI-D2K 扩增的模板来自中国科学院遗传与发育生物学研究所朱立煌教授实验室。

## 1.3 酿酒酵母转化及重组子的验证

将 PCR 产物与线性化的 pEGH 载体 DNA 混合后, 用 LiAC/PEG 方法<sup>[6]</sup>进行酵母转化(受体菌株 Y258)。转化后的菌液涂在不含尿嘧啶的 SC 培养基上进行筛选。每个转化挑取 6 个单克隆分别接种到 3mL SC-Ura<sup>-</sup>/Glucose 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 230r/min 振荡培养过夜。用玻璃珠破碎法提取酵母质粒, 获得的质粒 DNA 用热激法转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue 感受态细胞, 挑取单克隆, 提取质粒 DNA, 对得到的质粒进行 *Eco*R I 酶切验证。酶切验证正确的重组质粒再进行测序验证, 测序工作由北京华大基因研究中心完成。

## 1.4 蛋白质表达、纯化及考染检测

将上述经过酶切鉴定的阳性克隆, 重新转化酵母。挑取单菌落, 在 SC-Ura<sup>-</sup>/Raffinose 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养使  $OD_{600}$  达到 0.6 ~ 0.8。加入半乳糖至终浓度 2%, 诱导 12h。离心收集菌体, 加入预冷的裂解缓冲液和适量铅珠(直径 2mm), 4 $^{\circ}$ C 剧烈振荡。3000r/min 5min 离心后取上清, 与 GST Resin (Amersham Bioscience) 混匀, 4 $^{\circ}$ C 旋转混合过夜。离心后取沉淀, 用我 Washing buffer I 和 Washing buffer II 分别洗 3 次, 每次 3000r/min 1.5min。得到的沉淀即为 GST 融合蛋白质<sup>[7]</sup>。利用 7.5% SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色 30min, 脱色过夜后观察和扫描。

## 1.5 Western blot 检测

将纯化后的 XA21K 和 PI-D2K 激酶蛋白质进行 SDS-PAGE 分离, 之后将蛋白质转到 PVDF (Polyvinylidene-Fluoride) 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1h 后, 用抗 6 $\times$  His 的鼠源单克隆抗体在 4 $^{\circ}$ C 进行

过夜孵育, 孵育后的 PVDF 膜用 TTBS 溶液( Tween 0.1%, Tris 0.1mol/L, NaCl 0.15 mol/L pH7.9)洗 3 次, 再用 HRP 标记的 IgG 二抗在室温孵育 1h。孵育后的 PVDF 膜用 TTBS 溶液洗 3 次, 然后用 ECL 发光检测液( GE Healthcare)对 PVDF 膜进行发光反应, 暗室中曝光  $\chi$  光片, 显影、定影后观察扫描。

## 1.6 激酶自我磷酸化

将结合在 GST Resin 上的融合蛋白质用激酶缓冲液漂洗 3 次后, 加入 2 $\mu$  Ci [  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ]ATP(3000Ci/mmol, 中国同位素公司), 反应体系为 20 $\mu$ L, 室温放置 30min 后加入 SDS-PAGE 上样缓冲液终止反应。7.5% SDS-PAGE 干胶, 于 -70 $^{\circ}$ C 进行  $\chi$  光片曝光<sup>[7]</sup>。

# 2 结果

## 2.1 Xa21 和 pi-d2 激酶区的 PCR 扩增

利用设计的引物和相应的模板, 对 XA21K 和 PI-D2K 进行 PCR 扩增, 扩增产物用琼脂糖电泳分离(图略)。这两个片段的理论大小分别是 1050bp 和 1061bp, 电泳结果可以看出扩增产物大小与理论值相符。

## 2.2 阳性转化子的验证

将 PCR 产物与线性化的酵母表达载体 pEGH 混合, 转化 Y258 酵母菌株, 每份转化挑取 10 个阳性克隆, 提取 DNA, 用载体通用引物进行 PCR 扩增验证插入片段。与细菌不同, 酵母中可以容纳两个或多个的不同的质粒, 因此再提取 PCR 验证阳性的酵母质粒 DNA, 转化细菌, 获得阳性细菌克隆, 再提取细菌的质粒 DNA, 进行酶切和测序验证, 结果表明, 我们获得了序列完全正确的整合到 pEGH 表达载体的 XA21K 和 PI-D2K 克隆(数据未附)。

## 2.3 蛋白质诱导表达和 Western blot 检测

将测序正确的质粒重新转化酵母, 并进行蛋白质的诱导表达, 纯化后 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质的 SDS-PAGE 图谱见图 1-A。本实验所用的 pEGH 载体表达的是 GST-6 $\times$  His-目标蛋白质构成的融合蛋白质, 根据 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质的序列, 预测的融合蛋白质的分子量分别为 65kDa 和 66kDa, 电泳结果(图 1)与此相符。根据考染结果, XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质在酵母中的表达量约在 0.5 ~ 1mg/L 培养基。为了进一步验证获得的蛋白质的正确性, 我们用抗 His 抗体进行 Western blot 检测(图 1-B)。

阳性条带与考染结果相符， $\chi$  光片上主带清晰，表明纯化的效果较好。

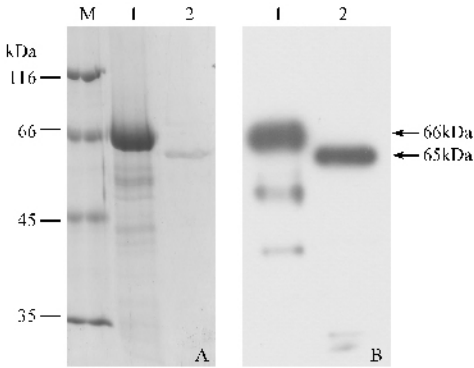


图 1 酿酒酵母中表达 XA21K 和 PI-D2K 蛋白质的 SDS-PAGE 分离 (A) 及 Western blot 检测 (B)

Fig.1 SDS-PAGE separation (A) and western blot detection (B) of XA21K and PI-D2K proteins expressed in *S. cerevisiae*. M. Protein Marker ;1. GST-PI-D2K ;2. GST-XA21K.

### 2.4 激酶自我磷酸化活性检测

将纯化后的 XA21K、PI-D2K 激酶蛋白质在体外进行自我磷酸化反应后对  $\chi$  光片进行曝光。结果表明，在酿酒酵母中表达的 XA21K、PI-D2K 激酶蛋白质是有活性的，能够发生自我磷酸化(图 2-B)。

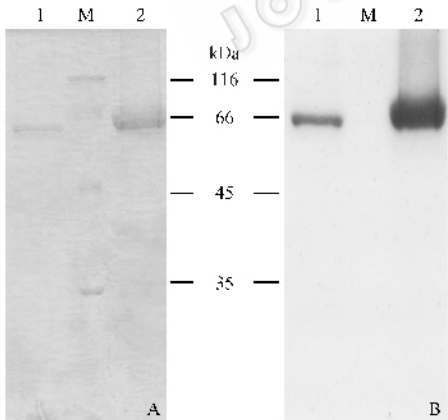


图 2 XA21K 和 PI-D2K 在酿酒酵母中的表达 (A) 及自我磷酸化活性分析 (B)

Fig.2 Expression of XA21K and PI-D2K protein kinases in *S. cerevisiae* (A) and autophosphorylation assay (B). M. Protein marker ; 1. GST-XA21K ; 2. GST-PI-D2K.

## 3 讨论

利用酿酒酵母系统，本实验表达了水稻抗白叶枯病 *Xa21* 和抗稻瘟病基因 *Pi-d2* 的激酶区。纯化后的蛋白质经 SDS-PAGE 分离，考染可见清晰的条带。自我磷酸化分析表明，目的蛋白质具有磷酸化活性。一般认为，真核系统表达的蛋白质可能修饰，而这种蛋白质修饰是细菌表达系统不可能发生的。虽然本文没有对细菌和酵母两个系统表达的蛋白质的激酶活性进行定量比较，缺乏是否发生修饰的直接证据，但从表达量上看，酵母系统比细菌的表达量约高十几倍，达到 0.5 ~ 1mg/L 的水平。该实验为进一步的生化特性、蛋白质-蛋白质相互作用研究以及底物筛选研究等提供了条件。利用酵母表达的 PI-D2K 蛋白质，我们已筛选出一些可能的底物(未发表数据)。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Song WY ,Wang GL ,Chen LL ,et al . A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene ,*Xa21*. *Science* ,1995 , **270**( 5243 ) :1804 – 1806.

[ 2 ] Liu GZ ,Pi LY ,Walker JC ,et al . Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase *XA21*. *JBC* 2002 **277**( 23 ) :20264 – 20269.

[ 3 ] Chen XW ,Li SG ,Xu JC ,et al . Identification of Two Blast Resistance Genes in a Rice Variety ,*Digu*. *J. Phytopathology* , 2003 **151**( 1511 ) :1 – 9.

[ 4 ] Chen XW ,Shang JJ ,Chen DX ,et al . A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *The Plant Journal* ,2006 **46** ( 5 ) :794 – 804.

[ 5 ] Zhu H ,Klemic JF ,Chang S ,et al . Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 2000 **26**( 3 ) :283 – 289.

[ 6 ] Gietz RD ,Schiestl RH ,Willems AR ,et al . Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* ,1995 **11**( 4 ) :355 – 360.

[ 7 ] 李莉云 ,孙 健 ,王海娇 ,等 . 水稻蛋白激酶的规模化克隆、表达及活性研究. *分子细胞生物学报* ,2007 **40**( 3 ) :253 – 258.

## Expression and autophosphorylation analysis of XA21 and PI-D2 protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Shu-li<sup>1</sup>, LI Li-yun<sup>1</sup>, SHANG Jun-jun<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, LIU Guo-zhen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(<sup>2</sup> Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** :Rice bacterial blight and blast are the most crucial rice disease. *Xa21* confers resistance to bacterial blight, while *Pi-d2* confers resistance to rice blast. Both *Xa21* and *Pi-d2* encode receptor kinase-like proteins. Biochemical properties of XA21 kinase expressed in bacterial were characterized in our previous report. In this study, both XA21 and PI-D2 kinase domain were PCR amplified and cloned into yeast expression vector pEGH via recombinational cloning strategy. Kinase proteins expressed in eukaryotic yeast system was purified and autophosphorylation assay was carried out. The results indicated that XA21 and PI-D2 protein can be detected by SDS-PAGE and showed expected molecular weight. Autophosphorylation assay indicated that yeast expressed XA21 and PI-D2 were active when incubated with P<sup>32</sup> labelled ATP. The experiment provided basic materials for biochemical prosperity analysis, protein-protein interaction and substrate screening research.

**Keywords** : rice ; bacterial blight ; rice blast ; disease resistance gene ; *Saccharomyces cerevisiae*

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30328019, 30370872, 30670175 )

\* Corresponding author. Tel : 86-312-7528250, E-mail : gzhliu@genomics.org.cn

Received : 23 March 2007 / Accepted : 13 April 2007 / Revised : 16 July 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>