

水稻 LRR 型类受体蛋白激酶胞外区的 原核表达及多克隆抗体制备*

程彦伟** 李亮** 沈嵘 齐耀程 刘晓宇 王宁 张炜***

(南京农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学系,
南京农业大学 GE Healthcare Biosciences 蛋白质组学合作示范实验室, 南京 210095)

摘要 前期研究表明, 水稻根尖细胞质膜类受体蛋白激酶 OsRLK 的表达受盐胁迫诱导. 为了进一步研究该激酶的生理功能, 通过反转录 PCR 得到 OsRLK 胞外区 cDNA 片段, 将其亚克隆至 pET29a 原核表达载体并在大肠杆菌中实现了高表达, 表达量约为细胞总蛋白的 30%. 重组蛋白经 SDS-PAGE 分离, 染色切胶收集后, 作为抗原免疫新西兰家兔, 分离抗血清, 经纯化得到 1:20 000 效价的多克隆抗体. Western blot 结果显示, 该抗体能特异识别在原核表达系统内表达的抗原, 以及水稻根尖细胞质膜组分中的 LRR 型类受体蛋白激酶, 并且在蛋白质水平证实该激酶为盐胁迫响应蛋白.

关键词 LRR 型类受体蛋白激酶, 水稻, 原核表达, 多克隆抗体

学科分类号 Q503, Q789

高等植物中的类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLK)是一类定位在质膜上, 包含胞外结构域(extracellular domain)、跨膜结构域(transmembran domain)和胞内激酶域(cytoplasmic protein kinase domain)的膜蛋白. 因为这类蛋白激酶的分子结构和功能类似动物细胞中的受体蛋白激酶(receptor protein kinase, RPK)^[1~3], 并且绝大多数尚未鉴定出其配基, 故称之为类受体蛋白激酶^[4]. 近年来发现的植物类受体蛋白激酶包括以下诸多成员: 拟南芥中的 RPK1^[5]、TMK1^[6]、TMKL1^[7]、CLV1~3^[8]、FLOR1^[9]和 ETECTA^[10], 水稻中的 Xa21^[11]、OsRLK1^[12]、BRI1^[13], 辣椒中的 CALRR1^[14]等. 目前, 在高等植物中已鉴定的类受体蛋白激酶绝大多数属于富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)型^[15]. LRR 基序参与蛋白质与蛋白质的相互作用, 尤其在分子识别过程中, 如信号转导、细胞粘连、细胞发育、DNA 修复和 RNA 加工过程中起重要作用^[16]. LRR 家族成员的胞内苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶区域保守性高, 但胞外区域则在 LRR 重复序列的数目、长度及排列上存在很大差异, 如 TMK1 有 11 个 LRRs 结构, TMKL1 有 7 个 LRRs, RLK5 则有 21 个 LRRs^[17], 油菜 BRI1 含有 25 个 LRR 重复单元^[18], RPK1 则含有 5 个 LRR 单元, 进而推测可能是每一种 LRR 家族成员负责接受某一种特定的信号.

目前 LRR 型类受体蛋白激酶作为胁迫响应基因参与植物细胞对生物和非生物逆境的应答及相关防御反应逐渐受到人们的关注. 例如, 水稻受体激酶 Xa21 的胞外 LRR 结构与配基(水稻白叶枯病原菌的无毒基因产物)结合后能够诱导 Xa21 胞内激酶自磷酸化, 产生一系列细胞反应, 保护水稻免受该病原菌的侵害^[11, 19]. 这些结果提示 LRR 结构在其与配基(病原体)结合时发挥重要的作用. 对 LRR 型 RLKs 响应非生物逆境的研究证明, 水稻的 LRR 型受体激酶 OsRLK1 基因可被低温和盐胁迫诱导表达^[12], Junga 等^[14](2004 年)也发现辣椒的 CALRR1 不仅可以被炭疽病原菌诱导表达也可以在高盐、脱落酸(ABA)和伤害等非生物胁迫条件下表达. 由于多种非生物逆境如干旱、高盐和低温均可造成渗透压的改变, 因此有人认为非生物逆境下 RLKs 的诱导表达可能是通过渗透压途径而不是直接的胁迫反应. 从目前的研究现状看, 对与植物抗病相关 LRR 型 RLKs 的研究较为深入, 而这类受体激酶对非生物逆境响应的生物学意义尚不明.

除了参与逆境防御, LRR 型 RLKs 也在激素调

* 国家自然科学基金(30400030)和教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0494)资助项目.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 025-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-01-21, 接受日期: 2008-03-06

节植物生长发育的信号传导中发挥重要作用。生化和遗传分析证明,拟南芥所有组织的质膜上均存在油菜素类固醇(BR)的受体 BRI1,而且是一种 LRR 型 RPK,可能在感知 BR 信号中发挥与配基结合的作用^[13,20]。此外,研究证明,其他植物激素如脱落酸、赤霉素、乙烯等也可诱导 LRR 型 RPKs 的表达,这其中是否还存在激素受体有待更加深入的研究。

研究蛋白质功能的重要手段之一是制备针对该蛋白质的抗体。例如,马云等^[21](2006 年)制备了水稻 TNFR 型类受体蛋白激酶 OsCR4 的多克隆抗体,但到目前为止,针对植物 LRR 型类受体蛋白激酶的抗体依然很少。我们在前期工作中开展了盐胁迫下水稻质膜蛋白质组分析,鉴定了一批盐胁迫响应质膜蛋白,其中包括一个分子质量 98 ku,等电点 8.4 的蛋白质点,在胁迫处理后表达水平显著上调(结果另文发表)。经水稻蛋白质数据库检索,该蛋白质为一个推测的类受体蛋白激酶 OsRLK,为了深入研究该激酶的功能,我们扩增出了 *OsRLK* 基因胞外区 N 端 154~350 个氨基酸片段,并在大肠杆菌中进行了高效表达,表达蛋白作为抗原免疫新西兰家兔,分离抗血清,经纯化制备出了相应的多克隆抗体。特异性抗体的获得为进一步深入研究水稻 LRR 型类受体蛋白激酶对逆境的响应模式、磷酸化状态及可能的配基提供了必要手段。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)和质粒 pET29a 由本实验室保存。Trizol 试剂盒购自 Tiangen 公司,限制性核酸内切酶购自 Takara 公司,反转录酶购自 Promega 公司,T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自晶美生物工程有限公司,DNA marker 购自金思特科技(南京)有限公司(DNA kb ladder M101);Protein marker 购自上海碧云天生物技术有限公司(货号 P0061)。实验动物雄性新西兰家兔购自江苏省农业科学院。

粳稻推广品种徐稻三购自徐州农业科学院。种子用 0.1%(w/v)升汞消毒,充分清洗后用去离子水浸泡 48 h,在 28℃ 黑暗环境中催芽 24 h 后,种植于培养箱。幼苗一直生长在光照培养箱中,白天黑夜各 12 h,温度分别控制在 28℃ 和 25℃。水培 2 周后收集根尖(3~5 cm)用于 RNA 提取及质膜制备。

1.2 引物的设计与合成

GenBank 收录的 *OsRLK* 基因(GenBank 登录号: NP_001055877)氨基酸序列见图 1。根据其编码胞外区 154~350 个氨基酸的氨基酸序列设计如下引物: S(上游引物), 5' GATCCATATGCCGTCTTCGATTGGCGTAC 3'(划线处为 *Nde* I 位点); A(下游引物), 5' GATCGAATTCGTCCCGTTGAATTGGTTG 3'(划线处为 *EcoR* I 位点)。在 S、A 引物序列中分别引入 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切位点,引物由 Invitrogen 有限公司合成。

1.3 *OsRLK* 基因的 RT-PCR 扩增

用 Trizol 试剂盒提取水稻根尖组织 RNA(方法参照产品说明书)。反转录总反应体系为 25 μl,取 10.3 μl DEPC 处理的双蒸水、2.7 μl RNA(2 g/L),加入 2 μl Oligo(dT),置于 72℃ 加热 5 min,立即冰浴 5 min,加入 5 μl 5×缓冲液、dNTP (2.5 mmol/L) 1.25 μl、Rnasin (40U/μl) 0.625 μl、M-MLV(200U/μl) 1 μl,补水至 25 μl,混匀,置 42℃ 下 60 min,95℃ 作用 5 min 灭活反转录酶。以上述反转录产物为模板进行 PCR。PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 35 s, 72℃ 40 s,循环扩增 34 次;最后 72℃ 延伸 10 min 结束扩增。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 重组质粒的构建和鉴定

PCR 反应产物从琼脂糖凝胶上切胶回收,克隆至 pMD-18T 载体(Takara 公司),并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。提取重组质粒,经 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切,目的片段用琼脂糖凝胶电泳切胶回收,与经同样双酶切的 pET29a 载体连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,挑取抗卡那霉素阳性克隆,提取质粒并测序鉴定,验证正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。

1.5 *OsRLK* 蛋白胞外区的原核表达

转化菌株 37℃ 过夜培养。次日,以 1:100 的体积比接种至 100 ml 含卡那霉素(终浓度 50 mg/L)的新鲜 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养至 A_{600} 约为 0.6,分别加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L,继续在 37℃ 下诱导表达 3、6、9 h,各取 1 ml 菌液,12 000 g 离心 5 min,弃上清,向沉淀中加入 100 μl 上样缓冲液,混匀,沸水浴加热 3~5 min,12% 分离胶电泳检测。

1.6 动物免疫及多克隆抗体的制备

裂解的菌液上清进行 SDS-PAGE(分离胶浓度为 12%),考马斯亮蓝染色、脱色后,割取目的蛋

白条带，碾碎，与 1 ml 弗氏完全佐剂混匀，在新西兰兔背部脊柱两侧 4 点以及腹股沟和腋窝两侧注射，共 8 点。首次免疫为皮内注射，并注射有卡介苗，以后皮下注射，每次间隔 14 天，每次剂量为上次的 1.2 倍，与弗氏不完全佐剂混合乳化，共加强免疫 4 次。酶联免疫吸附实验(ELISA)测定抗体效价，抗体效价达到 1：20 000 左右时(第 4 次免疫后第 10 天)，颈动脉插管收集全血，分离血清，过抗原亲和柱纯化抗体，所得抗体于-20℃中保存备用。

1.7 水稻根尖细胞质和质膜蛋白的提取

参考 Feng 等^[22]的方法进行。

1.8 Western blot

自工程菌或水稻根尖质膜提取的蛋白质样品加等体积 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 5 min 后离心，取上清液进行电泳(分离胶浓度为 12%)。电泳结束后将胶上蛋白质电转移至 PVDF 膜上(5 mA/cm² 膜，恒流 30 min)，将 PVDF 膜置于封闭液(含 3%脱脂奶粉的 TBST)中 30℃ 封闭 1 h，以不同稀释比例加入制备的多克隆抗体，30℃ 孵育 1 h，

用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 4 次，每次 5 min。以 1：5000 的比例加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG，30℃ 孵育 1 h，用含 0.05% Tween-20 的 TBST 洗膜 4 次，每次 5 min，加 TMB 显色。

2 实验结果

2.1 水稻质膜 LRR 型类受体蛋白激酶 OsRLK 序列分析

本实验室在前期工作中，利用蛋白质组学方法分析了盐胁迫下水稻根尖质膜蛋白质组的变化，发现一个表观分子质量为 98 ku 的 LRR 型类受体蛋白激酶的表达水平在盐胁迫条件下显著上调(结果另文发表)。经 NCBI 蛋白质数据库检索，OsRLK 全长 969 个氨基酸(图 1)。OsRLK 蛋白利用 SMART 软件(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl)分析其保守结构域，该蛋白质含有一个跨膜域，其 N 端 1~23 氨基酸处存在一信号肽，其后有 Pfam：LRRNT-2 区和 6 个亮氨酸拉链富集区，C 端含有蛋白激酶保守结构域(图 2a)，以上信息与 NCBI 提供的该蛋白质氨基酸序列信息相符。

1 MEPRVLMALA LVVVAAGVPA VLCQTNAQDA AAELGLKSQW TNYPLSWNSG DPCGGGWDGI MCTNGRVTTL RLSSVSLQGT LSSSIGQLGQ LTYLDLSFNI
101 NLGGPLPAEI GNLGELTTLI LAGCSFTGNI PTIAIGNLRKL GFLALNSNKF SGGIPSSIGV LTNLLWDLA DNQLTGSVPI STSTSPGLDQ LVKTQHFHFN
201 KNQLTGTLTG LFNSNMTLIH ILFDSNKFSG SIPAEVGTVS TLEVLRLDRN GFTGAIPATI GSVLKLNELN LANNKLTGSV PDLNMTNLN VVDLSNNTFD
301 PSVAPSWFTS LTLASVSVS SGSLSGQVVK GLFTLPTLQQ VLSNNQFNG TLEITGNISS SLQTVNLMDN RIVSTDTASY KKTLLLAGNP FCAEQDPNNR
401 AFCSRQLQNA SPYSTSMEKC GSAQCSGQGN VNPASCGCAF SYNGKMVFRA PFFVDLSST PFQLESTMA AKLNLPLPGSV ALSDIHFNSD NYLQVQVKLF
501 PTSGVTFNLS ELTRIGSSLS NQIYKPPANF GPYFFIADPY APLAVALGK KSKMSTGAIA GIAVAGGVLV IALIFMSLFA LRQKRRAKEL KERADPFASW
601 AAGQKDSGGA PQLKGARFFS FDELKICTNN FSDNHEIGSG GYGKVVYRIL GDGTRVAIKR ADRNSMQGAV EFKNEIELLS RVHHRNLVSL IGFCYEQGEQ
701 MLVVEYISNG TLRENLTGSG MYLDWKKRLR IALGSARGLA YLHELADPPI IHRDIKSTNI LLDNNLKAKV ADFGLSKLVA DTEKGHVSTQ VKGTLGYLDP
801 EYYMTQQLSE KSDVYSFGVV MLELVSGRQP IEKGRYVVRE VRLAIDPADH DHHYGLRGIV DPAIRDAART PVFRRFVQLA MRCVDESAAA RPAMGAVVKE
901 IEAMLQNEPD DAGAGEGDSS ADPSANEFDR HRGGGGPPAH PYSDEISRG SYAGDGASDY MPYFEVKPK

Fig. 1 The sequence of OsRLK
Amino acid residues are shown in the single-letter codes.

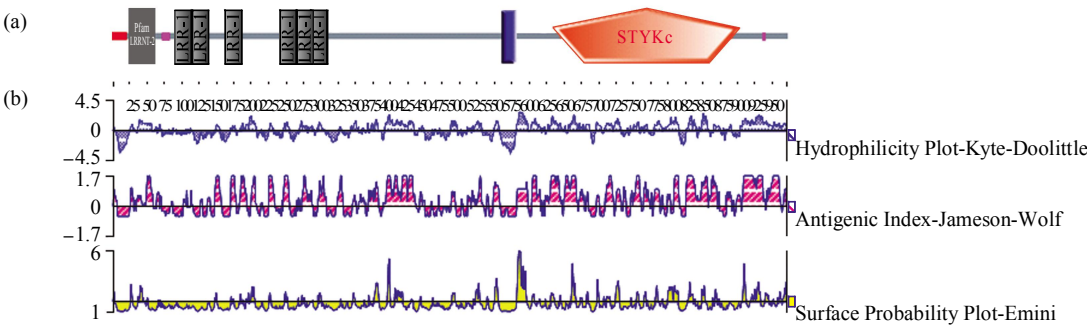


Fig. 2 The domain structure of OsRLK analyzed by SMART and the antigen analysis of OsRLK by DNA Star 5.0
(a) The domain structure of OsRLK analyzed by SMART. Transmembrane segments predicted by the TMHMM2 program (■), segments of low compositional complexity determined by the SEG program (■). Signal peptides determined by the SignalP program (■). (b)Antigen analysis of OsRLK by DNA Star 5.0. The Hydropathy -Kyte-Doolittle method predicts regional hydropathy of proteins from their amino acid sequences, using the approach of Kyte and Doolittle (1982). The Antigenicity -Jameson-Wolf method predicts potential antigenic determinants by combining existing methods for protein structural predictions, using the approach of Jameson and Wolf (1988). The Surface Probability -Emini method predicts the probability that a given region lies on the surface of a protein, using the approach of Emini *et al* (1985).

为了选择比较可靠的目标抗原, 我们通过利用 DNASTar Protean 软件对抗原指数分布^[23]进行了分析, 数据显示: 氨基酸 149~332, 395~433, 582~669, 771~870, 905~961 区段具有较高的抗原指数, 同时结合该蛋白质的氨基酸亲水性^[24]和蛋白质表面可能性^[25]的分析结果, 肽段氨基酸 149~332 和肽段 771~870 都比较适合作为候选抗原片段(图 2b). 但肽段氨基酸 771~870 处于 C 端激酶区, 通过 NCBI 对 *OsRLK* 蛋白进行了 BlastP 分析, 发现该蛋白质 N 端胞外区片段特异性较强, C 端激酶区在各种类型的蛋白激酶间同源性很高(结果未列出). 为了保证制备抗体的特异性, 我们选择具备一定抗原性的胞外区氨基酸 154~350 片段进行原核表达, 并以表达片段为抗原, 制备针对 *OsRLK* 的多克隆抗体.

2.2 原核表达载体的构建

上述 氨基酸 154~350 胞外区片段经反转录 PCR 得到长度为 589 bp 的 cDNA 片段(图 3), 连接入 pMD-18T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重

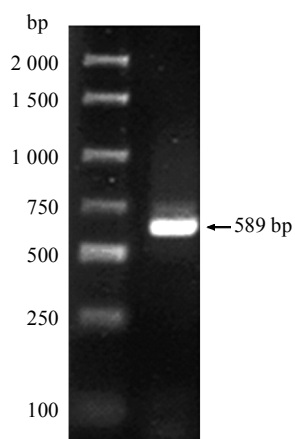


Fig. 3 Target fragment of the *OsRLK* acquired through RT-PCR

组质粒, 双酶切后收集胞外区片段连入 pET29a 载体并转化大肠杆菌 DH5 α , 经单、双酶切分析证实, 589 bp 的胞外区片段已经亚克隆至 pET29a 载体中(图 4). DNA 测序结果与 *OsRLK* 核苷酸序列比对, 结果显示目的片段序列完整且读框正确(结果未列出).

2.3 蛋白质的诱导表达与纯化

将上述克隆正确的 pET29a-RLK 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达后收获菌体, 2 $\times$ 上样缓冲液煮沸裂解菌体, 离心上清进行

SDS-PAGE, 结果如图 5 所示: 与转化有空载体 pET29a 的大肠杆菌 BL21 相比, 含有重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后产生大量 26 ku 的表达产物, 分子质量大小与预期的胞外区片段分子质量相符. 分别用 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 诱导时表达量相近, 而随诱导时间延长表达量增加, 至诱导 9 h, 胞外区片段的表达量约占细胞总蛋白的 30%, 这一结果表明我们已实现了 *OsRLK* 胞外区片段在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的高表达.

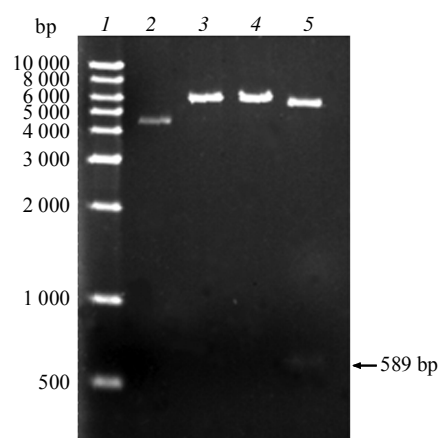


Fig. 4 Restrictive enzyme digestion analysis of pET29a-RLK

1: Marker: DNA kb ladder M101 of Genscript Corporation; 2: pET29a-RLK; 3: pET29a-RLK digested by *EcoR* I for 12 h; 4: PET29a-RLK digested by *Nde* I for 12 h; 5: PET29a-RLK digested by *Nde* I -*EcoR* I for 12 h.

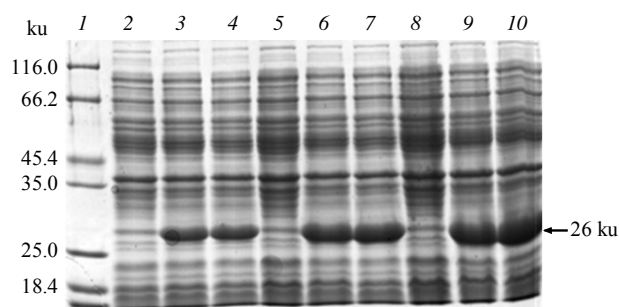


Fig. 5 Purification and expression of the fusion protein of *OsRLK*

1: Marker: Protein molecular mass marker P0061 of Beyotime; 2, 5, 8: pET29a transformed bacterial cells induced respectively for 3, 6, 9 h by 1 mmol/L IPTG. 3, 6, 9: pET29a-RLK transformed bacterial cells induced respectively for 3, 6, 9 h by 0.1 mmol/L IPTG. 4, 7, 10: pET29a-RLK transformed bacterial cells induced respectively for 3, 6, 9 h by 1 mmol/L IPTG.

2.4 抗体的特异性分析

从 SDS-PAGE 凝胶上切割 26 ku 诱导表达蛋白条带, 作为抗原免疫新西兰兔, 得到抗血清, 进一步经过抗原亲和纯化得多克隆抗体. 为验证制备抗体的特异性, 我们采用 Western blot 在上述大肠杆菌表达体系中进行检测, 结果显示: 以未转化质粒的出发菌株 BL21(DE3)和转化空载体 pET29a 的菌株作为对照, 未见信号(图 6a, 泳道 1 和 2), 而含有重组质粒诱导表达产物的菌体裂解物可见预期信号(图 6a, 泳道 3), 表明我们制备的抗体可特异识别 26 ku 的目标抗原. 利用大肠杆菌诱导蛋白为抗原, Western blot 检测抗原的最低量为 1ng (图 6b).

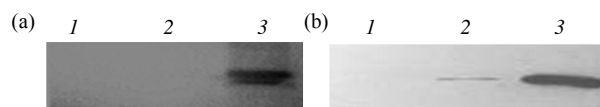


Fig. 6 The specificity and the lowest detected limit of polyclonal antibodies of the OsRLK were analyzed by Western blot

(a) 1: BL21 bacterial cells induced by 1 mmol/L IPTG; 2: pET29a transformed bacterial cells induced by 1 mmol/L IPTG; 3: pET29a-RLK transformed bacterial cells induced by 1 mmol/L IPTG. (b) The lowest detected limit of fusion protein of OsRLK was analyzed by Western blot. The content of the purified OsRLK fusion protein: 1, 100 pg; 2, 1ng; 3, 10 ng.

2.5 水稻根尖 OsRLK 受盐胁迫诱导表达

随后我们利用该制备抗体具体分析了盐胁迫条件下水稻 LRR 型类受体蛋白激酶 OsRLK 的表达情况. 水培 2 周的水稻幼苗根用 150 mmol/L NaCl 分别处理 0、3、12、48 h, 两相法提取水稻根尖细胞质膜组分并进行 SDS-PAGE 分离(图 7a), 采用上述抗体进行 Western blot, 结果如图 7b, 在未经胁迫的水稻根尖中, 可以检测到表观分子质量约为 98 ku 的目标条带. 我们同时在细胞质组分中进行了 Western blot, 没有任何特异性条带信号出现(图 7c). 以上结果通过实验证实了 OsRLK 的亚细胞定位是细胞质膜, 该激酶在水稻根尖组织中具有基础表达. 我们的结果进一步证明, 盐胁迫 12 h OsRLK 的表达显著上调, 至胁迫 48 h 表达仍维持在较高的水平, 这是首次在蛋白质水平证明 OsRLK 为盐胁迫响应蛋白.

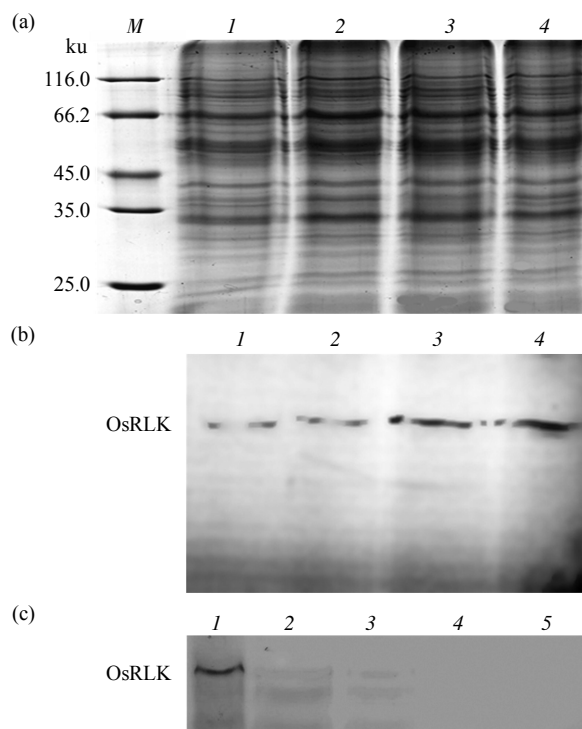


Fig. 7 Western blot analysis of the expression of cytoplasm and plasma membrane OsRLK in the root tips of rice seedlings under salt stress

(a) SDS-PAGE analysis of plasma membrane proteins in the root tips of rice seedlings under salt stress. M: Protein molecular mass marker. 1, 2, 3, 4: 0, 3, 12, 48 h salt stress, respectively. (b) The expression analysis of plasma membrane OsRLK, 1, 2, 3, 4: 0, 3, 12, 48 h salt stress, respectively. (c) The expression analysis of cytoplasmic OsRLK, 1: positive control; 2, 3, 4, 5: 0, 3, 12, 48 h salt stress, respectively. The root tips of rice seedlings were treated by 150 mmol/L salt for 0, 3, 12, and 48 h, respectively. The plasma membrane in the root tips of rice seedlings was separated by the method of two phase partitioning. Same amount of plasma membrane fraction (15μg protein) were loaded on 12% SDS-PAGE, followed by transferring to PVDF membrane. Filter was then probed with the anti-OsRLK antibody and signals were detected by ECL.

3 讨 论

近年来, 越来越多的研究表明, 植物类受体蛋白激酶可能参与了植物细胞抗逆反应^[12, 14]、植物形态发生^[18]、自交不亲和^[26]等众多的生理生化过程. 对植物细胞类受体蛋白激酶的研究将极大地丰富植物信号传导的内容, 有助于揭示形态发生、器官发育以及逆境生理的分子机制. 对植物类受体蛋白激酶进行研究将进一步丰富 G-蛋白耦联及钙离子等信号转导途径的理论, 使之更为充实.

尽管已有研究证明, 水稻及拟南芥中 LRR 型类受体蛋白激酶对许多环境胁迫因子如低温, 高盐

等有显著响应,但均为转录水平的结果^[5,12]。由于类受体蛋白激酶发挥生物学功能有赖于蛋白质水平的修饰如磷酸化等过程,因此这些结果并不能完全证明该类激酶是否参与胁迫信号传导。为了在蛋白质水平研究水稻 OsRLK 的表达状况,制备相应抗体是开展研究工作的前提。在过去二十多年中,采用各种载体在原核表达系统中已经表达了数百种重组蛋白,尤其是用原核表达的重组蛋白免疫动物来制备抗体已成为一种行之有效的方法。本文选取水稻 OsRLK 氨基酸序列中变化较大的胞外区片段作为抗原以保证制备抗体的特异性,利用 pET 表达系统,在大肠杆菌中高效表达了 OsRLK 胞外区片段,直接切割凝胶作为抗原,一次电泳得到大量的蛋白质即可满足免疫实验动物的需要。据此,我们成功地实现了该胞外区片段在大肠杆菌中的高表达,并制备了特异性较高的抗 OsRLK 多克隆抗体。利用该抗体我们初步研究了 OsRLK 对盐胁迫的响应,表明盐胁迫 12 h 诱导 OsRLK 显著上调,这一结果与 Lee 等^[12](2004 年)针对水稻另一个蛋白激酶 OsRLK1 在转录水平得到的结果相一致,但该激酶含有 1 001 个氨基酸,包含 3 个跨膜区,20 个胞外 LRR 区和 1 个胞内激酶区,和我们研究的 OsRLK 明显不同。这也是首次在蛋白质水平证明 OsRLK 受盐胁迫诱导。我们通过提取水稻根尖细胞的总蛋白、微粒体粗膜蛋白、细胞质蛋白和质膜蛋白用制备的抗体做 Western blot 检测,总蛋白、微粒体粗膜蛋白和细胞质蛋白均未检测到 OsRLK 蛋白的免疫反应信号(总蛋白、微粒体粗膜蛋白结果未显示,细胞质结果见图 7c),只在提取的质膜中检测到 OsRLK 的特异信号(图 7b),可以认为,OsRLK 做为位于质膜上的膜蛋白,属于低丰度蛋白,表达量较低,必须通过质膜纯化进行富集才可检测到该基因的表达。

由于盐胁迫会引起胞内渗透压改变,为了明确该受体激酶对盐胁迫的响应是一个主动的原初反应,还是一个间接的效应,我们将检测多种处理条件如 ABA 直接处理、PEG 渗透胁迫等对该激酶基因的诱导情况。此外,LRR 型受体激酶的胞外配基和下游信号分子所知甚少,我们将利用该抗体通过免疫共沉淀的方法,结合电泳分离,捕捉在激活条件下与该激酶结合的其他蛋白质或多肽。综上所述,抗水稻 LRR 型类受体蛋白激酶多克隆抗体的成功制备,为进一步研究该激酶在信号传递中的作用机制及其在植物抗逆中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- Hanks H K, Quinn A M, Hunter T. The protein kinase family: conserved feature and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 1988, **241**(4861): 42~52
- Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 1988, **57**: 443~478
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61**(2): 203~212
- Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 1995, **108**(2): 451~457
- Hong S W, Jon J H, Kwak J M, *et al.* Identification of a receptor like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, **113**(4): 1203~1212
- Braun D M, Stone J M, Walker J C. Interaction of the maize and *Arabidopsis* kinase interaction domains with a subset of receptor-like protein kinases: for transmembrane signaling in plants. *Plant J*, 1997, **12**(1): 83~95
- Valon C, Smalle J, Goodman H M, *et al.* Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. *Plant Mol Biol*, 1993, **23**(2): 415~421
- Stone J M, Trotochaud A E, Walker J C, *et al.* Control of meristem development by CLVATA 1 receptor kinase and KAPP protein phosphatase interactions. *Plant Physiol*, 1998, **117** (4): 1217~1225
- Acevedo F G, Gamboa A, Paéz-Valencia J, *et al.* FLOR1, a putative interaction partner of the floral homeotic protein AGAMOUS, is a plant-specific intracellular LRR. *Plant Sci*, 2004, **167**(2): 225~231
- Shpak E D, Berthiaume C T, Hill E J, *et al.* Synergistic interaction of three ERECTA family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development*, 2004, **131**(7): 1491~1501
- Song W Y, Wang G L, Chen L L, *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 1995, **270**(5243): 1804~1806
- Lee S C, Kima J Y, Kima S H, *et al.* Trapping and characterization of cold-responsive genes from T-DNA tagging lines in rice. *Plant Sci*, 2004, **166**(1): 69~79
- Wang Z Y, Seto H, Fujioka S, *et al.* BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 2001, **410**(6826): 380~383
- Junga E H, Jung H W, Lee S C, *et al.* Identification of a novel pathogen-induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of *Capsicum annuum*. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1676**(3): 211~222
- 马媛媛, 甘 睿, 王宁宁. 植物富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的生物学功能. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, **31**(4): 331~339
Ma Y Y, Gan R, Wang N N. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, **31**(4): 331~339
- Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions

- between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 1995, **374**(6518): 183~186
- 17 Horn M A, Walker J C. Biochemical properties of the autophosphorylation of RLK5, a receptor-like protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1208**(1): 65~74
 - 18 Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in Brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 1997, **90**(5): 929~938
 - 19 Wang G L, Wu C, Zeng L, *et al.* Isolation and characterization of rice mutants compromised in Xa21-mediated resistance to *X. oryzae pv. oryzae*. *Theor Appl Genet*, 2004, **108**(5475): 379~384
 - 20 He Z, Wang Z Y, Li J, *et al.* Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science*, 2000, **288**(3): 2360~2363
 - 21 马 云, 孙大业, 孙 颖. 水稻类受体激酶 OsCR4 的抗体制备及特异性检测. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22**(11): 924~930
Ma Y, Sun D Y, Sun Y. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, **22**(11): 924~930
 - 22 Feng Y, Zhu Y Y, Muller C, *et al.* Adaptation of H-pumping and plasma membrane H-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 2002, **129**(1): 50~63
 - 23 Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS*, 1998, **4**(1): 181~186
 - 24 Jack Kyte, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mole Biol*, 1982, **157**(1): 105~132
 - 25 Emimi E A, Hughes J, Perlow D, *et al.* Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virology*, 1985, **55**(3): 836~839
 - 26 Stein J C, Howlett B, Boyes D C, *et al.* Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(19): 8816~8820

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of The Extracellular Domain About Rice LRR Receptor-like Protein Kinase*

CHENG Yan-Wei**, LI Liang**, SHEN Rong, QI Yao-Cheng, LIU Xiao-Yu, WANG Ning, ZHANG Wei***

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing Agricultural University GE Healthcare Biosciences Proteomics Research Cooperative Demonstration Laboratory, Nanjing 210095, China)

Abstract Previous study indicated that the expression of a LRR receptor-like protein kinase OsRLK in root tips of rice could be induced by salt stress. In order to study the functions of OsRLK, the extracellular fragment of *OsRLK* gene was obtained through RT-PCR. The target fragment was subcloned into pET29a, and the recombinant plasmid pET29a-RLK was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The target fragment over-expressed in host strain, and the expression level was about 30% of the total cellular protein. After separated by SDS-PAGE, the target band was excised from the gel, and was used as an antigen to raise the antibody in New Zealand rabbits. After separation and purification of antiserum, the anti-OsRLK polyclonal antibody with the titers of 1 : 20 000 was successfully prepared. Western blot analysis showed that the antibody could specifically recognize the expressed fragment in *E. coli* and the OsRLK protein in root tips from rice. In addition, for the first time, the OsRLK was confirmed as a salt stress responsive protein.

Key words LRR receptor-like protein kinase, *Oryza sativa*, prokaryotic expression, polyclonal antibody

*This work was support by grants from The National Natural Science Foundation of China (30400030) and The Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-05-0494).

**CHENG Yan-Wei and LI Liang contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-25-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn.

Received: January 21, 2008 Accepted: March 6, 2008