

## AtSARK互作蛋白的筛选与鉴定

肖冬, 徐欣欣, 管婧雯, 王宁宁\*

南开大学生命科学学院, 天津300071

**摘要:** 植物LRR型类受体蛋白激酶在植物生命活动中发挥着重要作用。前期研究发现了一个通过生长素和乙烯的协同作用参与拟南芥叶片衰老过程正调控的类受体蛋白激酶, AtSARK。为深入研究 AtSARK 蛋白的作用机制, 文章采用酵母双杂交系统, 以AtSARK胞内域(AtSARK-CD)为诱饵蛋白, 对拟南芥均一化cDNA文库进行筛选, 得到83个AtSARK的候选互作组分, 经过复筛, 初步发现AtSARK的互作组分包括14-3-3蛋白、FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶、醛缩酶超家族成员、RING/U-box 超家族成员以及WRKY转录因子家族成员。我们对其中一个功能未知的醛缩酶家族基因 *AtFBA5* (*AT4G26530*) 的表达模式进行了分析, 并用GST pulldown实验证实了AtSARK-CD与 AtFBA5间存在直接的相互作用。AtSARK互作组分的文库筛选及AtFBA5的分离有利于进一步研究 *AtSARK* 基因在衰老信号通路中的作用机制。

**关键词:** AtSARK; 拟南芥; 酵母双杂交; pulldown

## Identification of the Interactive Proteins of AtSARK

XIAO Dong, XU Xin-Xin, GUAN Jing-Wen, WANG Ning-Ning\*

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract:** Lucine-rich-repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs) are known to function in various signaling pathways in plants. Our previous study suggested a role for an *Arabidopsis* LRR-RLK, AtSARK, which regulates leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. This study was designed to identify the interaction partners of AtSARK. A normalized *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) cDNA library was screened by the yeast two hybrid screening method with the cytoplasmic domain of AtSARK (AtSARK-CD) as bait, and 83 candidate preys were identified. We confirmed five proteins (14-3-3 protein, FKBP peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase family protein, Aldolase superfamily protein, RING/U-box superfamily protein and a member of the plant WRKY transcription factor family) as the AtSARK interaction partners in yeast. Furthermore, we analyzed the expression pattern of *AtFBA5* (*AT4G26530*), a function unknown gene of Aldolase superfamily, and confirmed the physical interaction between AtSARK-CD and AtFBA5 by an *in vitro* pulldown assay. The separation of AtSARK-interacting proteins is beneficial to disclose the mechanism of *AtSARK* in leaf senescence process.

**Key words:** AtSARK; *Arabidopsis thaliana*; yeast two hybrid system; pulldown

植物叶片衰老是一个重要的发育阶段, 对调节营养分配, 提高植物对环境的适应能力十分重要(Lohman等1994)。植物叶片的衰老的发生受到内部发育信号和外部各种环境因子的协调控制(Guo和Gan 2005; Zhang和Zhou 2013)。尽管人们这些年做了许多关于叶片衰老的分子机制的研究(van Doorn 2008; Zhang等2012), 但不同因素引发的衰老信号是如何通过不同的信号通路传递进而控制衰老的发生和发展的的问题还远未弄清。

植物类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinases, RLKs)是一类包含胞外域、单次跨膜域和胞内激酶域的蛋白分子, 在植物多种发育过程中发挥重要作用(Lindner等2012)。在前期研究中, 我们

分离鉴定了拟南芥的衰老上调表达的LRR型类受体蛋白激酶基因 *AtSARK*, 该基因编码一个丝、苏氨酸和酪氨酸双底物特异性的蛋白激酶, 诱导过表达该基因会引起拟南芥叶片早衰, 并且发现AtSARK通过生长素和乙烯的协同作用参与拟南芥叶片衰老过程(Xu等2011)。但是, 关于AtSARK介导的信号传递及其调控的细节尚不清楚。因此, 筛选与AtSARK相互作用的蛋白质, 探明该基因在

收稿 2014-01-22 修定 2014-03-27

资助 国家自然科学基金项目(31170261)、教育部科学技术研究重大项目(313032)和教育部博士点基金优先发展领域项目(20130031130003)。

\* 通讯作者(E-mail: wangnn@nankai.edu.cn; Tel: 022-23504096)。

叶片衰老进程中的作用机制具有重要的科学理论意义。

AtSARK是一个定位于细胞膜的一类受体蛋白激酶(数据未发表),我们以AtSARK的胞内域为诱饵蛋白,利用酵母双杂交的方法,在拟南芥均一化cDNA文库中筛选互作组分。经过层层筛选并结合测序分析,得到83个AtSARK的候选互作组分,经过复筛,初步发现AtSARK的互作组分包括14-3-3蛋白、FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶、醛缩酶超家族成员、RING/U-box超家族成员以及WRKY转录因子家族成员。接着我们对其中一个功能未知的醛缩酶家族基因*AtFBA5* (*AT4G26530*)的表达模式进行了分析,并用GST Pulldown实验证实了AtSARK-CD与*AtFBA5*间存在直接的相互作用。

## 材料与方 法

### 1 试验材料

酵母菌株 AH109,大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 、Rosetta (DE3),以及质粒pGBKT7、pGADT7、pGBKT7-53、pGBKT7-lam、pGADT7-T、pGEX6p-1和pET22b为本实验室保存;拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)均一化cDNA文库购自Clontech公司。

### 2 酵母双杂交

#### 2.1 pGBKT7-AtSARK-CD诱饵载体构建及转化酵母

以含有*AtSARK*基因的pMD18-T-AtSARK载体为模板,以带有EcoRI酶切位点的序列SARKCD-F (5'-GAATTCATCCTTAACTTAAACGAT-3')和带有SalI酶切位点的序列SARKCD-R (5'-GTCGACTC-TTGGACCGATAGTTC-3')为引物,用DNA聚合酶Ex-Taq (TaKaRa)进行PCR扩增。产物回收加T载体连接,转化大肠杆菌,酶切鉴定并测序,将测序正确的克隆载体用EcoRI和SalI酶切,分离目的片段和用EcoRI和SalI酶切的pGBKT7载体片段连接。连接产物转化大肠杆菌,筛选阳性克隆进行酶切鉴定,并测序。鉴定正确后用PEG/LiAc方法转化酵母菌株AH109。

#### 2.2 诱饵蛋白的自激活鉴定

将质粒pGBKT7-AtSARK-CD转化酵母AH109,将转化物涂布在SD/-Trp平板上,生长2~3 d,将阳性克隆划线于SD/-Trp-Ade平板上,30℃培

养2 d后观察。以共转化质粒组合pGBKT7-53和pGADT7-T的AH109转化子为正对照,以共转化质粒组合pGBKT7-lam和pGADT7-T的AH109转化子为负对照。

### 2.3 酵母双杂交及初步鉴定

将转化有pGBKT7-AtSARK-CD质粒的酵母AH109单克隆接种于50 mL SD/-Trp液体培养基,培养16~20 h,至OD<sub>600</sub>达到0.8。离心收集菌体沉淀,用4~5 mL SD/-Trp液体培养基重悬,使得菌浓度大于1 $\times 10^8$ ;将1 mL拟南芥cDNA文库(Clontech,已转入Y187菌株)与诱饵菌混合于2 L锥形瓶中,加入45 mL 2 $\times$ YPDA培养基,30℃培养20~24 h,缓慢摇晃(30~50 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>)。20 h后,镜检观察接合情况。镜检通过后,收集菌液,离心后用10 mL 0.5 $\times$ YPDA培养基重悬,并涂布于SD/-Trp-Leu-Ade三缺培养基上。取部分接合产物,稀释后涂布于SD/-Trp-Leu双缺培养基上,检测筛选的文库克隆数。将三缺培养基上生长的阳性克隆转移到用四缺培养基(SD/-Trp-Leu-Ade-His+1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 3-AT)鉴定杂交结果。从四缺培养基上生长的阳性菌落中分离互作基因。

### 3 Pulldown验证实验

#### 3.1 *AtFBA5*基因克隆和原核表达载体构建

以拟南芥cDNA为模板,用带有BamHI酶切位点的序列ATFBA5-F (5'-GGATCCGATGTCTGCT-TTTGTCGGC-3')和带有XhoI酶切位点的序列ATFBA5-R (5'-CTCGAGATACTTGTATCCTC-CTC-3')为引物,用DNA聚合酶Ex-Taq (TaKaRa)进行PCR扩增。产物回收加T载体连接,转化大肠杆菌,酶切鉴定并测序。将*AtSARK-CD*与钓到的*AtFBA5*基因的中间载体分别用EcoRI和SalI及BamHI和XhoI进行双酶切。将*AtSARK-CD*片段插入到pGEX6p-1载体,将*AtFBA5*片段插入pET22b载体。

#### 3.2 *AtFBA5*的表达分析

利用AtGenExpress Visualization Tool (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>)提供的芯片数据研究*AtFBA5*在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)莲座叶中的表达情况,收集17 d苗龄拟南芥第2、4、6、8片莲座叶的*AtFBA5*的表达数据。

检测过表达*AtSARK*转基因拟南芥的转录本芯片数据和过表达*SSPP* (*Senescence Suppressed Pro-*

tein Phosphatase)转基因拟南芥的转录本芯片数据中*AtFBA5*的转录变化情况。*AtSARK*芯片数据的实验材料为DEX (dexamethasone)诱导的5 d苗龄的*GVG:AtSARK*转基因拟南芥和mock (乙醇, DEX的溶剂)处理的*GVG:AtSARK*转基因拟南芥。*SSPP*转基因拟南芥芯片数据的实验材料为37 d苗龄的35S:*SSPP*转基因拟南芥和野生型拟南芥的第3和4片莲座叶。

总RNA提取、cDNA合成和基因表达分析参照已发表文献描述(Liu等2010)。用于分析的内标基因是*TIP41-like*, 用引物rtTIP-F (5'-GTATGAA-GATGAACTGGCTGACAAT-3')和rtTIP-R (5'-GAAATTCAGGAGCAAGCCGTCTCAG-3')进行扩增; *AtFBA5*的检测引物为rtFBA5-F (5'-CCTC-TACCAGAAAACCCACGG-3')和rtFBA5-R (5'-CTGCTAGATCAACCACACCC-3')。实验进行3次生物学重复, 给出的为典型结果。

### 3.3 蛋白纯化和pull-down验证

将原核表达载体转化Rosetta (DE3)菌株, 参考GE公司的说明手册用Glutathione Sepharose 4B column (GE Healthcare) 进行蛋白纯化。

参考Zhang和Zhou (2013)方法进行pull-down实验, 略有改动。将结合了GST-*AtSARK-CD*或GST的珠子用PBS (0.14 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、2.7 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、10.1 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和1.8 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)充分洗净, 做GST pull-down的准备。每个反应中加入大约30 μg *ATFBA5-His*蛋白, 当加入带有GST融合蛋白的珠子后, 混合物在4 °C条件下轻摇1 h。之后用PBS洗5次, 将蛋白洗脱。加入2×loading buffer (100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6.8; 200 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 4% SDS, 20%甘油和0.2%溴酚蓝) 并沸水浴10 min。进行12% SDS-PAGE电泳, 用His抗体进行免疫印记实验, 检测His融合蛋白。

## 实验结果

### 1 酵母双杂交筛选拟南芥cDNA文库中*AtSARK*的互作组分

为了筛选*AtSARK*的互作组分, 我们首先构建了*AtSARK*基因胞内域片段(*AtSARK-CD*)的诱饵载体, pGBKT7-*AtSARK-CD* (图1-A)。将诱饵载体转入酵母菌株AH109中, 挑转化子于SD/-Trp-Ade平

板上进行自激活检测。结果可见(图1-B), 正对照能在自激活检测平板上正常生长, 而转化诱饵载体的菌株和负对照一样, 不能在自激活检测平板上生长, 说明*AtSARK-CD*没有自激活活性, 可以作为诱饵蛋白用于文库筛选。

将携带诱饵表达载体pGBKT7-*AtSARK-CD*的AH109诱饵菌株和携带cDNA文库的Y187猎物菌株接合转化, 镜检确认接合子形成后(图2-A), 取

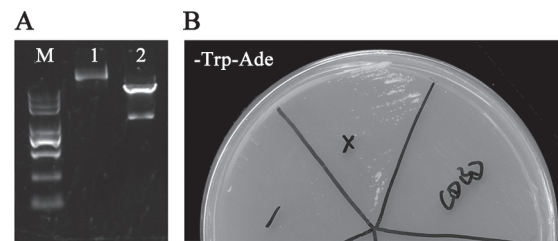


图1 诱饵载体构建和诱饵蛋白自激活特性检测

Fig.1 Construction of the bait vector pGBKT7-*AtSARK-CD* and identification of auto-activation for bait protein *AtSARK-CD*

A: pGBKT7-*AtSARK-CD*质粒酶切检测。M: DNA分子标记DL2000; 1: 未经酶切的对照质粒pGBKT7-*AtSARK-CD*; 2: *EcoRI*和*SalI*双酶切质粒pGBKT7-*AtSARK-CD*。B: 在SD/-Trp-Ade培养基上划线培养。+和-: 阳性和阴性质粒对照组合pGBKT7-53/pGADT7-T和pGBKT7-lam/pGADT7-T的转化子; CDBD: 质粒pGBKT7-*AtSARK-CD*的转化子。

少量转化液稀释10 000倍涂布于SD/-Trp-Leu培养基(图2-B), 长出了5个阳性菌落, 由于涂布的体积为50 μL, 收集的转化液体积为10 mL, 说明本次实验筛选了1.0×10<sup>7</sup>个文库克隆, 高于文库说明书中要求的1.0×10<sup>6</sup>的标准。其余转化液则涂布于SD/-Trp-Leu-Ade培养基进行初筛。挑出初筛得到的阳性克隆转移至SD/-Trp-Leu-Ade-His+1 mmol·L<sup>-1</sup> 3-AT培养基继续筛选(图2-C)。经过筛选, 共获得233个阳性克隆。

将获得的233个克隆分别提取质粒回转大肠杆菌, 筛选具有氨苄青霉素抗性的转化子, 即含有文库质粒的转化子。从该转化子中提取质粒后直接送测序, 排除含有相同基因的阳性克隆, 一共获得了83个*AtSARK-CD*的候选互作组分。结合文献, 挑选5个目标基因(表1)进行复筛。将对应克隆的猎物质粒与pGBKT7-*AtSARK-CD*共转化进入AH109中, 用三缺平板(SD/-Trp-Leu-Ade)和含有X-α-Gal的四缺平板(SD/-Trp-Leu-Ade-His+1

表1 AtSARK-CD 相互作用蛋白信息

Table 1 The information of the interaction partner of AtSARK-CD

基因编号	基因描述
#1	14-3-3家族, 多功能分子伴侣。具有结合磷酸化蛋白的能力——选择性的与磷酸化蛋白非共价结合
#2	FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶
#3	醛缩酶超家族。推测它在糖酵解作用中催化1,6-二磷酸果糖与磷酸二羟丙酮及甘油醛-3-磷酸的相互转变
#4	RING/U-box 超家族。蛋白质降解相关路径发挥作用
#5	WRKY转录因子家族成员, 参与植物抗病响应过程

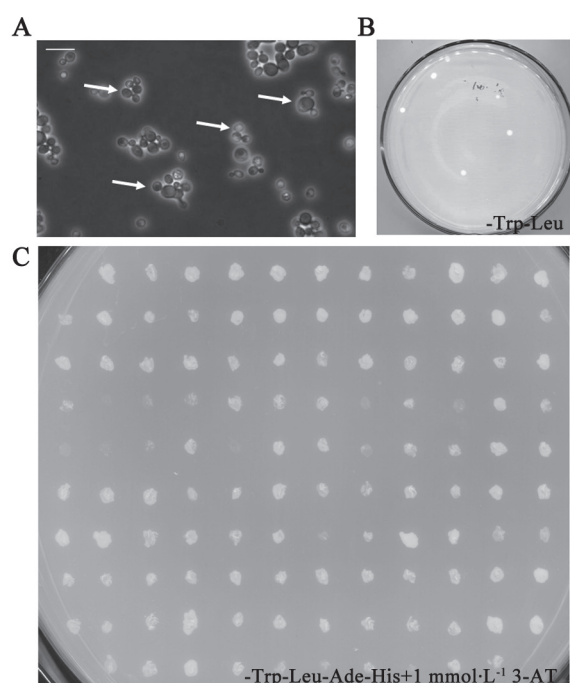


图2 酵母双杂交转化及阳性克隆的生长。

Fig.2 Yeast mating and growth of positive clones from yeast two-hybrid

A: 对转化诱饵载体的AH109菌株和携带文库的Y189菌株的接合产物进行镜检, 箭头指示典型酵母合子, 标尺长度20  $\mu\text{m}$ ; B: 接合产物稀释10 000倍取50  $\mu\text{L}$ 涂布于SD/-Trp-Leu培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长4 d; C: 阳性克隆在SD/-Trp-Leu-Ade-His+1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  3-AT培养基上生长。

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  3-AT)进行复筛。结果表明这5个目标克隆的转化子都能在选择培养基上正常生长(图3)。

## 2 拟南芥醛缩酶基因*AtFBA5*的表达分析

表1中的3号克隆测序后进行BLAST比对(图4-A), 发现它与大豆(*Glycine max*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)高度同源, 相似度分别达到87%和86%; 与拟南芥*AtFBA6*的相似度达到78%, 属于拟南芥醛缩酶超家族中的*AtFBA5* (*AT4G26530*)。由

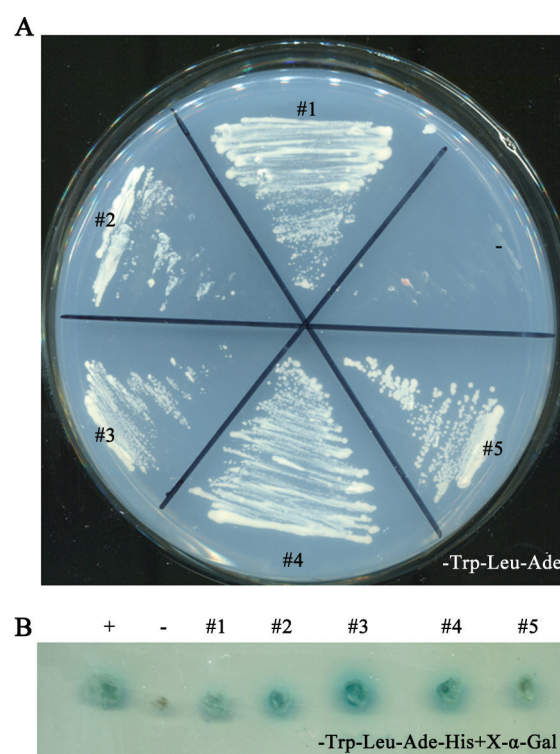


图3 单个文库质粒与诱饵载体酵母双杂交结果

Fig.3 Yeast two-hybrid assay for candidate preys and bait

A: 阳性克隆在SD/-Trp-Leu-Ade培养基上生长, -: 阴性质粒对照组合pGBKT7-lam/pGADT7-T的转化子; B: 阳性克隆在SD/-Trp-Leu-Ade-His+1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  3-AT+X- $\alpha$ -Gal培养基上生长, +和-: 阳性和阴性质粒对照组合pGBKT7-53/pGADT7-T和pGBKT7-lam/pGADT7-T的转化子。

于该基因的功能未知, 我们首先利用AtGenExpress Visualization Tool (Schmid等2005)对该基因在植物发育中的表达情况进行了预测。图4-B表明, 在17 d苗龄的拟南芥中, *AtFBA5*的表达量在幼叶中相对较高, 随着叶龄的增大而逐渐下降。接着我们分别分析了过表达*AtSARK*转基因拟南芥的转录本芯片数据和过表达*SSPP* (*Senescence Suppressed Protein Phosphatase*)转基因拟南芥的转录本芯片数据

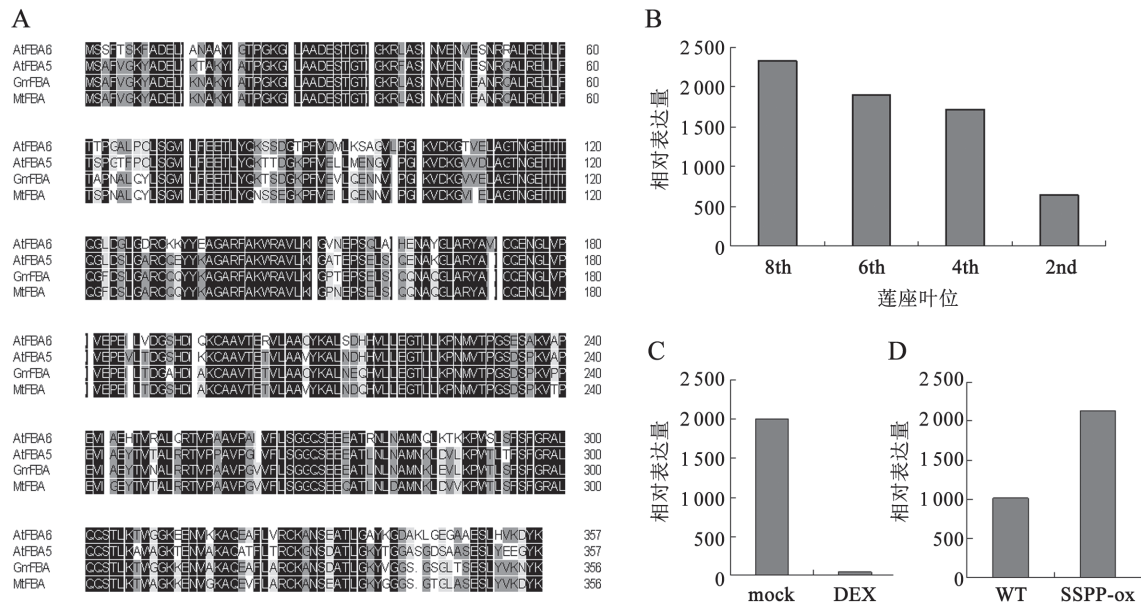


图4 *AtFBA5*的氨基酸序列分析和*AtFBA5*基因在叶片发育中的表达模式

Fig. 4 Amino acid sequence analyses of *AtFBA5* and the expression pattern of *AtFBA5* in leaf development

A: *AtFBA5*的氨基酸序列分析。将*AtFBA5* (AT4G26530)、*AtFBA6* (AT2G36460)、大豆(*Glycine max*) *GmFBA* (NP\_001237315.1)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) *MtFBA* (XP\_003617895.1)的氨基酸序列用clustal X2软件分析,用DNAMAN软件出图; B: *AtFBA5*在17 d苗龄拟南芥的莲座叶中的表达情况。基因芯片数据来源于AtGenExpress Visualization Tool (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>); C: *AtFBA5*在DEX诱导过表达*AtSARK*的转基因拟南芥中的表达情况; D: *AtFBA5*在35S:*SSPP*过表达拟南芥中和野生型拟南芥表达情况的比较。

中*AtFBA5*的转录变化情况(图4-C和D)。诱导*AtSARK*的过表达会引起植物早衰,相反的,过表达*SSPP*会延缓植物的衰老(徐凡2012)。我们发现*AtFBA5*的转录本在*AtSARK*的过表达植株中大幅度下降,而在*SSPP*过表达转基因拟南芥中的积累量则明显增多(图4-C和D)。

进一步,我们用real-time PCR的方法检测了*AtFBA5*在叶片发育过程中的表达变化,与芯片分析的结果一致,*AtFBA5*的转录水平在幼叶中最高,随着叶片衰老,*AtFBA5*的表达量逐渐下降(图5)。这些结果说明*AtFBA5*的转录水平受到衰老进程的抑制,这种趋势与*AtSARK*的转录水平在叶片发育中随着衰老发生而逐渐升高的趋势是相反的(Xu等2011),暗示着*AtFBA5*在叶片发育过程中起着与*AtSARK*相反的功能。

### 3 *AtFBA5*与*AtSARK*-CD体外互作的pulldown验证

为了进一步验证*AtFBA5*与*AtSARK*-CD的相互作用。我们以拟南芥cDNA为模板,克隆了*AtFBA5*全长基因,并分别构建了*AtFBA5*和*AtSARK*-CD的原核表达载体(见材料与方法3.1)。将GST、GST-*AtSARK*-CD和*AtFBA5*-His融合蛋白在大肠

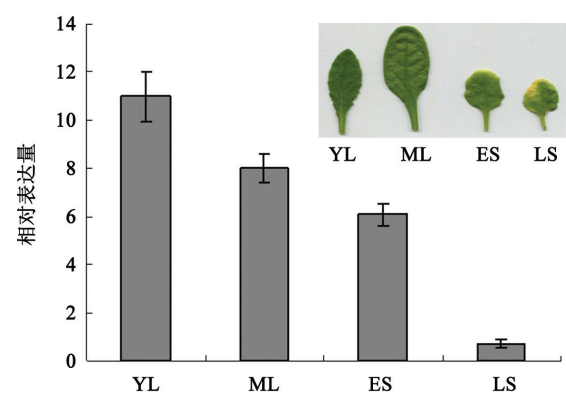


图5 *AtFBA5*在拟南芥叶片衰老过程中的表达分析

Fig. 5 Expression of *AtFBA5* during leaf senescence in *Arabidopsis*

定量RT-PCR分析*AtFBA5*在衰老过程中的表达情况。用*TIP41-like*基因作为RT-PCR的内标基因。图中YL: 幼叶; ML: 成熟叶; ES: 衰老早期阶段叶片; LS: 衰老晚期阶段叶片。

杆菌内诱导表达,采用亲和层析柱(珠子)纯化融合蛋白(见材料与方法3.3)。以GST-*AtSARK*-CD或GST(负对照)为挂柱蛋白,利用GST pulldown方法下拉过柱体系中的蛋白*AtFBA5*-His,结果(图6)发现*AtFBA5*-His蛋白能被GST-*AtSARK*-CD下拉出

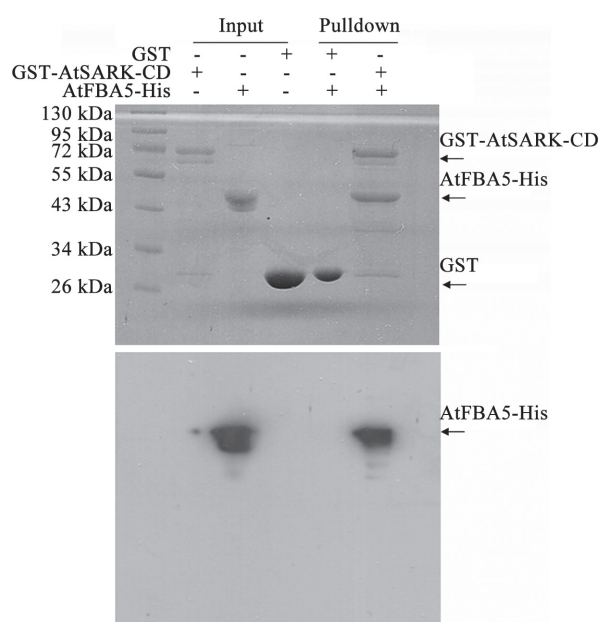


图6 AtSARK-CD和AtFBA5间存在互作  
Fig.6 A pull-down assay showing the interaction between AtSARK-CD and AtFBA5

将纯化的AtFBA5-His蛋白分别与结合有GST-AtSARK-CD或GST的琼脂糖珠子孵育。反应后洗脱的蛋白经12% SDS-PAGE电泳分离,进行考马斯亮蓝染色(上图),或用His抗体进行免疫印迹检测(下图)。

来,而不能被对照GST蛋白下拉,这说明AtFBA5与AtSARK-CD间存在直接的相互作用。

## 讨 论

叶片衰老是叶片发育的最后阶段,它是一个受到多种发育和环境信号调控的程序性细胞死亡过程(Lim等2007)。衰老程序的启动、传递、衰老进程的控制以及内外部调控因子之间的相互作用机制等已经成为研究热点。然而,衰老起始信号的本质却依然是一个未回答的问题,并且引起衰老起始的不同的信号途径也有待于进一步的阐明。真核生物中,蛋白激酶和蛋白磷酸酶介导的蛋白磷酸化-去磷酸化作用在调控信号传导方面十分重要。近年来的研究表明,在引起植物叶片衰老的不同刺激因素所诱发的各种信号途径中,蛋白激酶同样发挥着重要的作用(Lee等2011; Cho等2012; Gao等2012)。

拟南芥类受体蛋白激酶基因*AtSARK*是我们前期工作中发现的直接参与调控叶片衰老过程的

*RLK*基因,诱导表达该基因会引起叶片早衰,而该基因的缺失突变体则表现出晚衰表型(Xu等2011)。对其作用机制的研究发现,*AtSARK*是通过生长素和乙烯的协同作用来发挥对叶片衰老过程正调控的作用(Xu等2011)。为进一步研究*AtSARK*的功能,本研究以*AtSARK*的胞内域为诱饵蛋白,通过酵母双杂交的方法筛选*AtSARK*的互作组分。初步的结果表明,*AtSARK*的互作组分包括14-3-3蛋白、FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶、与病原菌诱导相关的转录因子WRKY蛋白、以及与蛋白质降解相关的E3连接酶等。

14-3-3蛋白由Moore和Perez最早发现,几乎在所有真核生物中都存在的一类蛋白(van Hemert等2001)。通过与靶蛋白结合,14-3-3蛋白可以增强或抑制靶蛋白的催化活性,如拟南芥钙依赖蛋白激酶家族的CPK1能被14-3-3所激活(Camoni等1998)。此外,14-3-3还起着保护靶蛋白不受降解的作用,以及调节靶蛋白的核质转运与亚细胞定位的作用(Cotelle等2000; Ryu等2007)。我们预测在拟南芥中,14-3-3蛋白可以通过与*AtSARK*的互作来调控*AtSARK*的活性,从而参与到*AtSARK*调控的衰老信号通路中。FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶是一类催化折叠反应的酶。在含脯氨酸残基的蛋白质分子中,由于空间结构的立体化学制约,在蛋白折叠时,某些脯氨酸亚氨基的肽键必须异构化为顺式才能形成蛋白质的天然空间结构。最新的报道发现脯氨酸异构酶CYP20-2通过调控BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT1)的构象影响其对拟南芥开花调控的功能(Zhang等2013)。因此我们预测FKBP-型肽脯氨酰顺反异构酶的作用与14-3-3蛋白类似,可能起着调控*AtSARK*活性的功能。WRKY转录因子在植物界中广泛存在,并且是植物当中一类比较大的转录因子家族;其中与病原菌诱导相关的WRKY转录因子是WRKY转录因子大家族中的一类,*AtSARK*与之互作暗示着*AtSARK*除了参与叶片发育的调控过程,也参与了植物对病原物的响应过程。文库筛选还发现*AtSARK*能与E3连接酶相互作用,暗示着*AtSARK*的降解路径之一是通过泛素连接酶介导的蛋白酶体途径降解。

此外,我们筛选到一个编码醛缩酶家族未知

功能蛋白质的基因 *AtFBA5* (*AT4G26530*)。通过发掘芯片数据,我们发现该基因的表达在幼叶中较高,而在老叶中较低,呈现出随叶龄增大而表达下降的特点(图4-B~D和图5)。由于*AtSARK*的表达模式是随衰老而上调的,因此我们推测*AtFBA5*在植物发育过程中具有与*AtSARK*相反的作用。而它们的互作可能反映了相反功能的内在的作用机制。进一步,我们通过pulldown实验证明*AtFBA5*与*AtSARK*间能够发生直接的相互作用(图6)。后期我们将研究*AtFBA5*的生物学功能,尤其是它在*AtSARK*介导的叶片衰老路径中发挥的作用。

### 参考文献

- 徐凡(2012). *GmSARK*和*AtSARK*基因调控叶片衰老分子机制的研究[毕业论文]. 天津:南开大学
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG (1998). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett*, 430: 381~384
- Cho YH, Hong JW, Kim EC, Yoo SD (2012). Regulatory functions of *SnRK1* in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol*, 158: 1955~1964
- Cotelle V, Meek SE, Provan F, Milne FC, Morrice N, MacKintosh C (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J*, 19: 2869~2876
- Gao Q, Yang Z, Zhou Y, Yin Z, Qiu J, Liang G, Xu C (2012). Characterization of an *Abc1* kinase family gene *OsABC1-2* conferring enhanced tolerance to dark-induced stress in rice. *Gene*, 498: 155~163
- Guo Y, Gan S (2005). Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Curr Top Dev Biol*, 71: 83~112
- Lee IC, Hong SW, Whang SS, Lim PO, Nam HG, Koo JC (2011). Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol*, 52: 651~662
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H (2007). Leaf Senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 115~136
- Lindner H, Muller LM, Boisson-Dernier A, Grossniklaus U (2012). CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall. *Curr Opin Plant Biol*, 15: 659~669
- Liu D, Gong Q, Ma Y, Li P, Li J, Yang S, Yuan L, Yu Y, Pan D, Xu F, Wang NN (2010). cpSecA, a thylakoid protein translocase subunit, is essential for photosynthetic development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 61: 1655~1669
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 92: 322~328
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of *BZR1* mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell*, 19: 2749~2762
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, 37: 501~506
- van Doorn WG (2008). Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *J Exp Bot*, 59: 1963~1972
- van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays*, 23: 936~946
- Xu F, Meng T, Li P, Yu Y, Cui Y, Wang Y, Gong Q, Wang NN (2011). A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its *Arabidopsis* homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol*, 157: 2131~2153
- Zhang H, Zhou C (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol Biol*, 82: 539~545
- Zhang K, Xia X, Zhang Y, Gan SS (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 69: 667~678
- Zhang Y, Li B, Xu Y, Li H, Li S, Zhang D, Mao Z, Guo S, Yang C, Weng Y, Chong K (2013). The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of *FLOWERING LOCUS D* to regulate flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 2504~2521