

## 拟南芥PKS5激酶磷酸化ABI5参与植物ABA响应

赵菲佚\*, 焦成瑾, 陈荃, 王太术, 田春芳, 高雅梅

天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃天水741001

**摘要:** 植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物生长、发育及环境胁迫中起着重要的作用。本研究发现拟南芥PKSes (SOS2-like protein kinases)蛋白激酶家族成员PKS5 (SOS2-like protein kinase 5)参与植物ABA响应。PKS5功能获得性点突变体*pks5-3*与*pks5-4*表现出对ABA的敏感表型。在外源ABA处理下,*pks5-3*与*pks5-4*种子萌发率降低,幼苗生长矮小、黄化。体外磷酸化测试显示,PKS5特异磷酸化ABA响应元件ABI5 (ABA-insensitive 5) N末端多肽(1~211 aa)。qRT-PCR分析表明*pks5-3*与*pks5-4*突变体中ABI5下游ABA响应基因*RAB18* (*RESPONSIVE TO ABA18*)与*EM6* (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 6*)表达均发生改变。这些研究结果表明,拟南芥PKS5通过磷酸化ABI5的N末端参与植物ABA响应过程。

**关键词:** PKS5; ABI5; ABA响应; 磷酸化

## PKS5 Kinase is Involved in ABA Response through Phosphorylating ABI5 in *Arabidopsis*

ZHAO Fei-Yi\*, JIAO Cheng-Jin, CHEN Quan, WANG Tai-Shu, TIAN Chun-Fang, GAO Ya-Mei

School of Bioengineering & Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China

**Abstract:** The phytohormone abscisic acid (ABA) plays an essential role in plant growth and development as well as abiotic stress responses. In this study, we found that PKS5 (SOS2-like protein kinase 5), a family member of PKSes (SOS2-like protein kinases), involved in ABA response in *Arabidopsis*. PKS5 gain-of-function point mutants *pks5-3* and *pks5-4* exhibited hypersensitive to ABA in the phenotypic test. Additionally, seed germinations of *pks5-3* and *pks5-4* decreased and seedlings of them showed stunted growth and leaf chlorotic symptoms under exogenous ABA treatment. *In vitro* phosphorylation assay indicated that PKS5 specifically phosphorylates the ABA-responsive component ABI5 (ABA-insensitive 5) N terminus fragment range from 1 to 211 amino acids. Moreover, the relative expression levels of *RAB18* and *EM6*, which are the downstream ABA-responsive genes of ABI5, significantly altered in *pks5-3* and *pks5-4* mutants compared with the wild-type plants by quantitative real-time PCR using gene-specific primers. Taken together, the results of this study revealed that PKS5 involves in ABA response via phosphorylating the N-terminus of ABI5 in *Arabidopsis*.

**Key words:** PKS5; ABI5; ABA response; phosphorylation

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物的整个生活周期中起着关键性的作用。已有研究表明,ABA参与植物种子贮藏蛋白和脂类合成、种子脱水耐受和促进休眠、抑制胚胎萌发和从营养生长到生殖生长的转变(Rock 2000)。此外,ABA还介导了盐、低氧、冷、干旱等胁迫生理响应,以及病理性的诱导抗性(Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki 2000)。植物感应、转导ABA的分子作用机理一直是植物分子生物学重要的研究内容。

ABI5为碱性亮氨酸拉链(bZIP)类型的转录因子。早期发现其在种子萌发后以ABA依赖方式抑制植物生长(Finkelstein 1994; Lopez-Molina和Chua 2000)。ABI5转录激活与ABI5的稳定性影响ABI5

蛋白的累积程度,由此决定ABI5对种子萌发后生长抑制的效率(Lopez-Molina和Chua 2000; Brocard等2002)。近期发现蛋白磷酸酶PP6 (protein phosphatase 6)通过调节ABI5的磷酸化程度参与拟南芥ABA信号过程(Dai等2013)。在种子早期发育中,ABI5介导了ABA对SHB1 (short hypocotyls under blue 1)的负向调控表达(Cheng等2014)。属于PP2A相关蛋白TAP46 (PP2A-associated protein 46)在ABI5调节相关基因的表达中起着正向调节子的角色(Hu等2014)。

收稿 2015-05-15 修定 2015-08-25

资助 国家自然科学基金(31260568和31160060)。

\* 通讯作者(E-mail: tspaulzhao@163.com; Tel: 0938-8362830)。

一个抗盐同源因子BBX21 (B-box 21)、HY5 (elongated hypocotyls 5)和ABI5共同作用于ABI5启动子上,对光与ABA信号进行整合调控(Xu等2014)。最近又鉴定了在ABA调节负向反馈环中起作用的多个对ABI5表达、稳定性及活性起作用的调控因子,如E3连接酶KEG (KEEP ON GOING)通过泛素化或苏素化ABI5参与ABA响应(Stone等2006; Liu和Stone 2010)。

PKSes (SOS2-like protein kinases)蛋白激酶属于拟南芥CDPK-SnRK超家族中SnRK3 (SNF1-related kinase3)家族(Hrabak等2003; Weinl和Kudla 2009)。该家族中,PKS12在ABA调节的冷胁迫中起作用(Sheen等1999)。PKS18参与植物在种子萌发和幼苗期对ABA的响应,PKS18组成型表达形式PKS18T/D转基因植物在种子萌发和幼苗期显示出对ABA的超敏感性,而该激酶的RNAi沉默形式则表现出对ABA的不敏感(Gong等2002)。近来发现,PKS3与SCaBP5 (SOS3-like calcium binding protein 5)相互作用在种子萌发、幼苗生长和气孔关闭上表现出对ABA的超敏感性(Cheong等2003)。而PKS24不仅在远红光对拟南芥黄化苗转绿的抑制效应中起作用(Qin等2010),也参与植物对盐及ABA的胁迫应答(Qin等2008)。

PKS5 (SOS2-like protein kinase 5)为PKS家族26个成员之一。其通过磷酸化AHA2 (质膜ATPase的等位形式之一)第931位丝氨酸而阻止其与14-3-3蛋白相互作用,进而负向调控AHA2的活性,使植物表现出对外源高pH的抗性(Fuglsang等2007)。近期研究又鉴定了参与此信号途径的分子伴侣共作用因子J3 (Arabidopsis DnaJ homologous protein3)。体内J3通过对PKS5的活性抑制方式参与植物对外源盐碱胁迫的响应(Yang等2010)。最近发现,PKS5在体内与SCaBP8 (SOS3-like calcium binding protein 8)存在相互作用,并通过对AHA2的磷酸化过程参与对外界的盐碱调节过程(Xie等2009)。此外,PKS5也可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)的磷酸化过程介导了WRKY38 (WRKY DNA-binding protein 38)与WRKY62 (WRKY DNA-binding protein 62)的表达,从而参与植物的抗病过程(Xie等2010)。然而,PKS5是否也参与了植物ABA响应

目前未见报道。本研究使用PKS5功能缺失与获得性突变体对其ABA表型进行了考察,确定了PKS5在ABA信号途径中的作用,并对其参与ABA响应的作用机理进行了探讨。研究结果将为ABA信号途径鉴定新的参与元件,并提供PKS5调控ABA信号转导作用机理依据。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(Col-0)、T-DNA突变体*pks5-1* (SALK\_108074)订购自SALK。*pks5-3*与*pks5-4*为TILLING突变体(<http://tilling.fhcr.org:9366>),订购自ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3)、农杆菌GV3101与植物转化载体为本实验室保存。克隆用T载体购自上海生物工程公司。

### 2 引物设计

引物设计使用Primer Premier 5.0软件进行,本研究中所有引物均由上海生物工程公司进行合成。引物序列见表1。

### 3 植物突变纯合体鉴定

*pks5-1*突变纯合体鉴定基因正向引物为P51T-F,反向引物为P51T-R。T-DNA上鉴定引物使用左边界Lba1与Lb1。引物P51T-F与Lba1扩增产物大小大约550 bp;引物P51T-F与Lb1扩增产物大小大约350 bp。*pks5-3*与*pks5-4*点突变纯合体鉴定使用衍生型酶切扩增多态性序列(derived Cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS)分子标记技术。*pks5-3*使用P53D-F与P53D-R引物对,PCR扩增263 bp片段, *Ava*I内切酶切野生型扩增产物;*pks5-4*使用P54D-F与P54D-R引物,PCR扩增236 bp片段, *Mlu*I内切酶切野生型扩增片段。

### 4 植物培养条件及ABA表型观察

试验种子用消毒液(20%次氯酸钠+0.1% Triton X-100)在EP管中灭菌10 min,灭菌ddH<sub>2</sub>O洗5次后点种于MS或含0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA处理MS固体平板上。处理MS平板在4  $^{\circ}\text{C}$ 下春化2 d后置于16 h (L) (22  $^{\circ}\text{C}$ )/8 h (D) (20  $^{\circ}\text{C}$ )光周期条件下进行培养。培养一定时间后,对平板上种子萌发率进行统计,并观察幼苗ABA表型。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	限制性酶
P51T-F	ATGCCAGAGATCGAGATTGCC	
P51T-R	AATAGCCGCGTTTGTGACGAC	
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
LBb1	GCGTGGACCGTTGCTGCAACT	
P53D-F	GCGTTTGATTGATTCTTACTCCT	
P53D-R	CACCACAAGCAAATCATTCAA	
P54D-F	GTTTCGGATTTCGGTCTAAACG	
P54D-R	CTCTCCTTTATAAATCTTC	
P5-F	<u>CGGGATCC</u> ATGCCAGAGATCGAGATTGCC	<i>Bam</i> HI
P5-R	GGAATTCCTAAATAGCCGCGTTTGTG	<i>Eco</i> RI
A3N-F	<u>CGGGATCC</u> ATGAAAAGCTTGCATGTGGCC	<i>Bam</i> HI
A3N-R	ACGCGTCGACTCATTGTGTGGTGGAGGAAC	<i>Sal</i> I
A3C-F	<u>CGGGATCC</u> CAAGCTTTTGTCTCGGACCCG	<i>Bam</i> HI
A3C-R	ACGCGTCGACTCATTAAACAGTTGAGAAGT	<i>Sal</i> I
A4N-F	CCCAAGCTTATGGACCTTTAGCTTCCCAA	<i>Hind</i> III
A4N-R	CCGCTCGAGTTAGATACCCTACGGACCAAAGTT	<i>Xho</i> I
A4C-F	CCCAAGCTTCCTTTAACAACAACATCTTC	<i>Hind</i> III
A4C-R	CCGCTCGAGTTAATAGAATCCCCAAGAT	<i>Xho</i> I
A5N-F	<u>CGGGATCC</u> ATGGTAACTAGAGAAACGAAG	<i>Bam</i> HI
A5N-R	ACGCGTCGACTTACACCAAGAAATCCTCAAGTGA	<i>Sal</i> I
A5C-F	<u>CGGGATCC</u> AAGGCTGGTGTGGTTAGAGAA	<i>Bam</i> HI
A5C-R	ACGCGTCGACTTAGAGTGGACAACCTCGGGTT	<i>Sal</i> I
A5NI-R	ACGCGTCGACTTACTTGCCGTTCTACATAAAGC	<i>Sal</i> I
A5NII-F	<u>CGGGATCC</u> AACTTTGGGTCCATGAACATG	<i>Bam</i> HI
A5NII-R	ACGCGTCGACTTAAAGACTAGACTCGTTCGCTAT	<i>Sal</i> I
A5NIII-F	<u>CGGGATCC</u> CCTCGACAAGGCTCTTTGACA	<i>Bam</i> HI
P5P-F	CATGCTAGATCTTTATAATATATACTCAC	<i>Xba</i> I
P5P-R	CATGCCATGGGATTGATGAATCCAGAGATTGA	<i>Nco</i> I
P5G-F	CCGCTCGAGATGCCAGAGATCGAGATTGCC	<i>Xho</i> I
P5G-R	CCGCTCGAGAATAGCCGCGTTTGTGAC	<i>Xho</i> I
P5Q-F	TCGTCGGGATTGGATTGTC	
P5Q-R	TCCATCTCAAACCCATACTC	
R8Q-F	GAGCACCACGAGAAGAAGG	
R8Q-R	GCACAATACAACGACCGAATG	
E6Q-F	TGTCTCGTTTGTTCAG	
E6Q-R	CACTATGTTGAGAATCCAC	
A2Q-F	GTCGTACAACCGGTATTGTG	
A2Q-R	GAGCTGGTCTTTGAGGTTTC	

序列中下划线为限制性酶作用位点碱基。

## 5 RNA分离、反转录及RT-PCR

生长10 d拟南芥野生型(Col-0)、*pks5-1*、*pks5-3*与*pks5-4*总RNA提取使用TRI试剂(Ambion)进行。提取总RNA使用Promega公司M-MLV反转录酶(Promega, M1705)在42 °C下进行反转录, 获得cDNA第一链。总RNA提取与cDNA第一链合成均按试剂盒操作方法进行。以Col-0及*pks5-1*反转录

cDNA第一链为模板, 使用引物P5-F与P5-R对*PKS5*全长进行RT-PCR扩增。同时, 以A2Q-F与A2Q-R为引物对*ACTIN2*扩增作为RT-PCR对照。PCR反应为30个循环。

## 6 *PKS5*点突变与*ABI5*序列克隆与蛋白原核表达

*PKS5*序列克隆以野生型(Col-0)及*pks5-3*、*pks5-4*各点突变体基因组DNA为模板, 使用引物

P5-F与P5-R, PCR扩增得到野生型及各点突变PKS5基因编码序列。以野生型(Col-0) cDNA为模板, 使用引物A3N-F与A3N-R; A3C-F与A3C-R分别扩增ABI3的N端(ABI3N, 1~360 aa)与C端(ABI3C, 361~720 aa)。使用引物A4N-F与A4N-R; A4C-F与A4C-R扩增ABI4的N端(ABI4N, 1~164 aa)与C端(ABI4C, 165~328 aa)。用引物A5N-F与A5N-R; A5C-F与A5C-R引物扩增ABI5的N端(ABI5N, 1~211 aa)与C端(ABI5C, 212~442 aa)。使用引物A5NI-F与A5NI-R; A5NII-F与A5NII-R; A5NIII-F与A5N-R分别扩增ABI5的N端第一段(ABI5NI, 1~60 aa)、第二段(ABI5NII, 61~140 aa)和第三段(ABI5NIII, 141~211 aa)。PCR扩增各片段纯化后使用标准克隆程序克隆至pET28a载体。阳性候选克隆送上海生物工程公司测序验证。从DH5 $\alpha$ 提取的拟表达载体经电转化方法转入BL21(DE3)表达菌株, 再次经PCR筛选得到阳性克隆后保存备用。

含目标表达载体的BL21(DE3)菌株按1:1 000的比例接入含30  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯霉素和50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素的60 mL LB液体培养基中, 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50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan的LB培养基中继续培养, 当菌液OD达0.7时收菌, 2 664 $\times g$ 离心后沉淀加入30 mL裂解液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ 、10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑, pH 8.0)重悬, 在超声破碎仪(VCX130, SON-ICS)上破碎(250 W, 超声3 s, 间隔3 s, 1 min循环, 共5 min)后23 000 $\times g$ 离心, 上清液中加入100  $\mu\text{L}$  Ni-NTA树脂进行蛋白结合, 最后使用洗脱缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ 、250  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑, pH 8.0)进行洗脱得到目标蛋白。后续融合蛋白纯化方法按Qiagen公司的树脂提取方法进行。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。

### 7 PKS5点突变重组蛋白体外激酶活性测试

激酶体外磷酸化试验按照以下方法进行。在冰浴EP管中混合激酶与底物蛋白MBP (myelin basic protein), 反应在20  $\mu\text{L}$ 体系中进行, 计算激酶反应缓冲液(20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.2, 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 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  $\mu\text{Ci}$  ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) 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。

### 8 PKS5 promoter-GUS在转基因植物中表达及PKS5荧光融合蛋白亚细胞定位

使用引物P5P-F与P5P-R, 以拟南芥野生型(Col-0)基因组DNA为模板, PCR扩增PKS5转译起点上游2 kb片段, 并克隆至植物表达载体pCAMBIA1301上, 构建PKS5 promoter-GUS融合载体并转化拟南芥野生型(Col-0)。植物转化与GUS检测按Haritatos等(2000)方法进行。

以野生型(Col-0)基因组DNA为模板, P5G-F与P5G-R为引物对进行PCR扩增。扩增产物克隆至pTA7002植物表达载体上, 构建植物PKS5-GFP绿色荧光融合蛋白表达载体。测序验证的植物荧光表达载体经质粒纯化试剂盒Maxprep Kit (Vigorous Biotechnolgy)纯化后, 转化拟南芥野生型(Col-0)。生长5 d的T<sub>2</sub>代转基因植物用于PKS5亚细胞定位。pTA7002-PKS5-GFP转化生长5 d的T<sub>2</sub>代转基因植物使用10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DEX (dexamethasone)处理24 h后在confocal显微镜(Zeiss 510 META)下进行荧光观察。

### 9 qRT-PCR检测

以野生型(Col-0)、pks5-1、pks5-3、pks5-4的cDNA为模板, 使用SYBR Premix Ex Taq试剂盒(Takara), 在ABI 7500 Fast Real-time PCR仪上, 对不同组织中PKS5及RAB18和EM6在不同突变体中的表达进行测定。对PKS5表达, 使用引物P5Q-F与P5Q-R。对RAB18和EM6表达, 分别使用引物R8Q-F和R8Q-R、E6Q-F和E6Q-R。反应以ACTIN2扩增为内参, 对各基因表达水平进行标准化。ACTIN2扩增使用引物A2Q-F和A2Q-R。qRT-PCR按照Takara公司试剂盒方法进行。

## 实验结果

### 1 PKS5蛋白结构及突变位置

PKS5定位于拟南芥第2条染色体上(At2g-30360), 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。整个蛋白可分为两个大的结构域, 位于N端

的激酶结构域和C端的激酶调控域(Guo等2001)。激酶结构域内含有一个推测的激活环(KDAL)(Gong等2002)。调控结构域内含有两个子结构域, FISL基序和PPI结构域。FISL基序是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(Gong等2004)。在激酶结构域和FISL基序之间由连接结构域(JK)

进行连接(Gong等2002)。从SALK与ABRC获得PKS5不同类型突变体。*pks5-1*为T-DNA插入突变体。*pks5-3*发生了c→t的转换, 蛋白的第168位氨基酸由丙氨酸变为缬氨酸(A168V); *pks5-3*突变位于已知的激酶激活环内; *pks5-4*发生了c→t的突变, 在317位氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸(S317L), *pks5-4*的突变位于FISL基序内(图1)。

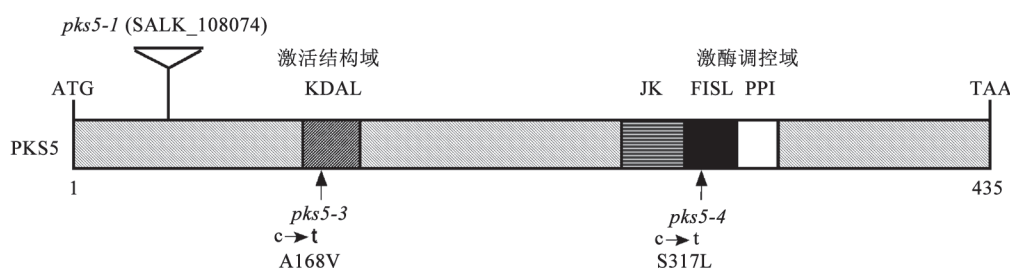


图1 PKS5蛋白结构与突变位点示意图

Fig.1 Schematic diagram of PKS5 structure and sites of point mutations

KDAL: 激酶催化结构域激活环; JK: 连接区; FISL: FISL基序; PPI: 与PP2C蛋白磷酸酶作用结构域。深灰色部分为激活环结构域, 黑色横线部分为连接区, 黑色部分为FISL结构域, 白色部分为PPI结构域。箭头指示点突变位置, 三角形指示PKS5 T-DNA插入位置。

## 2 PKS5不同结构域点突变体外激酶活性测试

为检测PKS5不同结构域发生点突变后其激酶活性的变化, 对PKS5不同的点突变CDS序列进行克隆, 并在原核中表达突变蛋白。不同PKS5点突变重组蛋白的激酶活性比较如图2所示。激酶活性测试结果显示, 不同的PKS5点突变激酶活性发生改变, 与PKS5对照相比较, PKS5-3与PKS5-4活性增高, 而PKS5-3较PKS5-4又具有更高的活

性。PKS5点突变激酶底物磷酸化(MBP)活性与自磷酸化活性变化一致(图2-B)。此结果说明PKS5不同结构域发生突变对PKS5激酶活性的影响不同。PKS5-3突变发生于激酶激活环(KDAL)内, PKS5-4则发生于FISL基序内。KDAL突变对激酶活性影响要大于FISL内突变。从PKS5点突变激酶活性也可得知, 与野生型(Col-0)相比较, *pks5-3*与*pks5-4*突变体为功能获得性突变体。

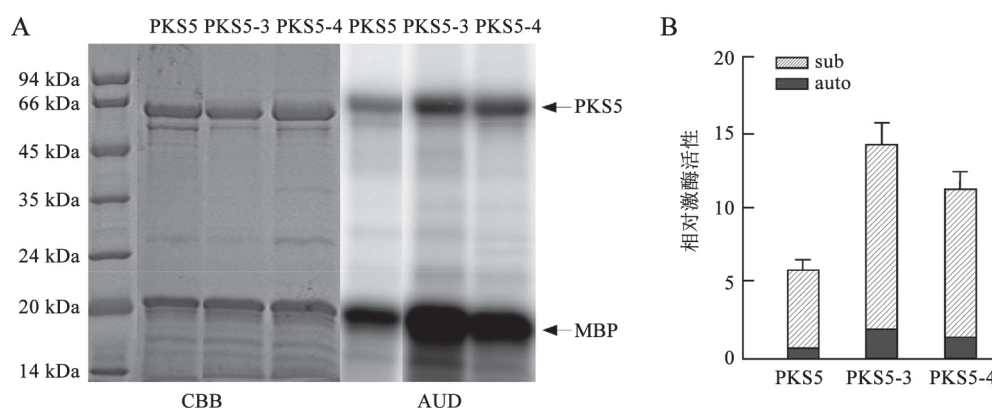


图2 PKS5点突变PKS5-3与PKS5-4磷酸化活性比较

Fig.2 Comparison of phosphorylation of the PKS5 point mutated PKS5-3 and PKS5-4

A: PKS5-3与PKS5-4体外磷酸化活性测试, CBB: 考马斯亮蓝染色; AUC: 放射自显影; B: PKS5-3与PKS5-4相对磷酸化活性, auto: 自磷酸化活性; sub: MBP底物磷酸化活性。

### 3 *PKS5*表达模式与亚细胞定位

为考察*PKS5*的表达模式,将*PKS5*转译起始点上游2 kb序列克隆至pCAMBIA1301载体上与*GUS* ( $\beta$ -glucuronidase)进行转录融合,并将此载体转化拟南芥野生型(Col-0)。GUS染色结果显示*PKS5*表达于幼苗根及叶片中(图3-A~D)。此与已有报道的*PKS5*表达模式一致(Fuglsang等2007)。将*PKS5*克隆于pTA7002-GFP载体上与*GFP*进行N端转译融合,

转入拟南芥野生型(Col-0)中。使用Confocal对T<sub>2</sub>代转基因植物进行荧光观察,以确定*PKS5*的亚细胞定位。结果显示*PKS5*定位于细胞膜、细胞质及细胞核中(图3-E~G)。为考察*PKS5*组织特异性表达状况,提取生长40 d野生型植物根、茎、莲座叶、叶片、茎生叶、花、角果及种子总RNA,使用qRT-PCR对其表达进行分析。图3-H显示*PKS5*在所有的组织中都有组成性的表达,在生殖器官与根中有着较高的表

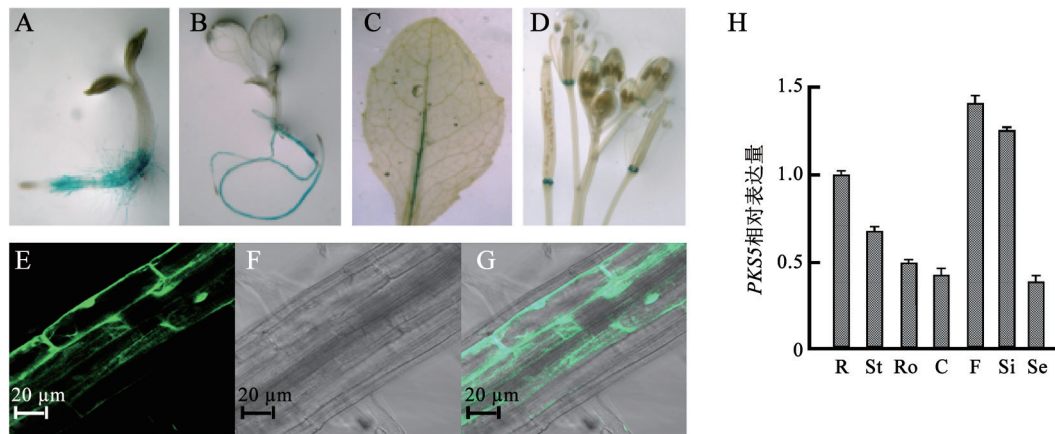


图3 *PKS5*表达模式与亚细胞定位

Fig.3 Expression pattern and subcellular localization of *PKS5*

A~D: *PKS5* promoter-*GUS*在转化野生型(Col-0)生长3 d的幼苗(A), 生长10 d的幼苗(B), 莲座叶(C)和花(D)中的表达; E~G: *PKS5*-GFP在根上部亚细胞定位, E为Confocal图像, F为明视野图像, G为Confocal与明视野重叠图像; H: *PKS5*在不同组织中的相对转录水平, R: 根, St: 茎, Ro: 莲座叶, C: 茎生叶, F: 花, Si: 果夹, Se: 种子。

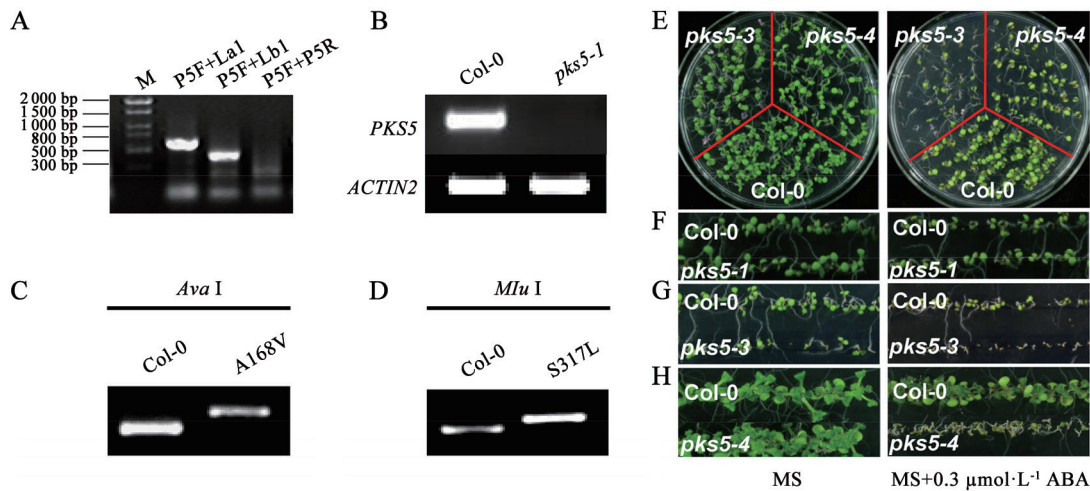


图4 *PKS5*突变纯合体鉴定及ABA表型

Fig.4 Identification and ABA phenotype of homozygous *PKS5* mutants

A: *pks5-1*突变纯合体PCR鉴定, M: Transgen 1 kb plus DNA分子量标准; P5F: P51T-F引物; P5R: P51T-R引物; La1: Lba1引物; Lb1: LBb1引物; B: *pks5-1*中*PKS5*表达RT-PCR分析, *ACTIN2*为对照; C: *pks5-3*突变纯合体dCAPS鉴定, *Ava*I切野生型; D: *pks5-4*突变纯合体dCAPS鉴定, *Mlu*I切野生型; E: *pks5-3*与*pks5-4*种子萌发后9 d的ABA表型; F: *pks5-1*幼苗生长9 d的ABA表型; G: *pks5-3*幼苗生长6 d的ABA表型; H: *pks5-4*幼苗生长17 d的ABA表型。图中*PKS5*突变体ABA表型测试均在含0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA的MS平板进行。

达, 其中花中表达量最高, 而在种子中表达最低。*PKS5*表达模式、*PKS5*定位与组织特异表达与*ABI5*的相一致(Finkelstein和Lynch 2000; Lopez-Molina和Chua 2000), 预示体内*PKS5*与*ABI5*存在相互作用。

#### 4 *PKS5*突变纯合体鉴定及ABA表型分析

为考察*PKS5*突变体是否具有ABA表型, 对*PKS5*点突变体*pks5-3*、*pks5-4*和T-DNA插入突变体*pks5-1*的突变纯合性进行鉴定并对其ABA表型进行考察。图4-A表明, *pks5-1*为T-DNA插入突变纯合体。*PKS5*在*pks5-1*突变体中无转录本存在(图4-B)。dCAPS分析表明*pks5-3*和*pks5-4*均为纯合点突变体(图4-C和D)。在含 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA的MS平板上, *pks5-3*和*pks5-4*表现出对ABA的敏感表型, 萌发率与野生型相比较降低(图4-E), 幼苗生长矮小, 黄化(图4-F~H)。*pks5-3*与*pks5-4*相比较, *pks5-3*对ABA更敏感。体外磷酸化活性测试表明, 点突变*PKS5-3*比*PKS5-4*具有更高的激酶活性(图2), 表明*PKS5*突变体对ABA的响应与体内*PKS5*的磷酸化活性相关。图4-F显示*pks5* T-DNA突变体在此条件下与野生型相比较未表现出ABA敏感表型, 此表明*PKS5*不同的突变形式对ABA的响应存在差异。

#### 5 *PKS5*对ABI转录因子磷酸化测试

已发现2个 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的蛋白激酶CPK4 (calcium-dependent protein kinase 4)与CPK11可通过磷酸化ABA信号途径中ABF1 (ABA-responsive transcrip-

tion factor 1)及ABF4参与ABA响应(Zhu等2007)。与*PKS5*属于同一家族的CIPK26 (calcineurin B-like interacting protein kinase 26)可与*ABI5*相互作用, 并在体外磷酸化*ABI5* (Lyzenga等2013)。推测*PKS5*体外也可磷酸化参与ABA响应的转录因子。为验证此推测, 以原核表达的*ABI3*、*ABI4*及*ABI5*的N端或C端作为激酶作用底物, 使用*PKS5*对其磷酸化作用进行测试。结果显示, *PKS5*蛋白激酶不能磷酸化*ABI3*与*ABI4*, 只可磷酸化*ABI5*的N端多肽(图5-A), 说明*PKS5*对*ABI5*的磷酸化作用具有特异性。*PKS5*及其突变蛋白对*ABI5*的N端多肽磷酸化能力与其对MBP的磷酸化情形相似, *PKS5-3*与*PKS5-4*较*PKS5*的激酶活性升高, 两者对*ABI5*的N端多肽也具有较高的磷酸化能力。*PKS5-3*与*PKS5-4*相比较, *PKS5-3*有更高的磷酸化*ABI5*的能力(图5-B)。为进一步缩小*PKS5*对*ABI5*的磷酸化位点范围, 将*ABI5*的N端多肽分为*ABI5NI* (1~60 aa)、*ABI5NII* (61~140 aa)和*ABI5NIII* (141~211 aa)三个部分, 体外表达各段多肽后进行同样的磷酸化测试。图5-C显示, *PKS5*对*ABI5*的磷酸化位点存在于其N端的第1~140个氨基酸区域内, 且第1~60个氨基酸区域为*PKS5*磷酸化*ABI5*的主要位点位置, 第61~140氨基酸部分次之。*PKS5*对*ABI5*的磷酸化测试表明: 体外*PKS5*的确存在对*ABI5*的特异性磷酸化作用, *ABI5*受*PKS5*磷酸化的位点主要存在于*ABI5NI*与*ABI5NII*区域内。

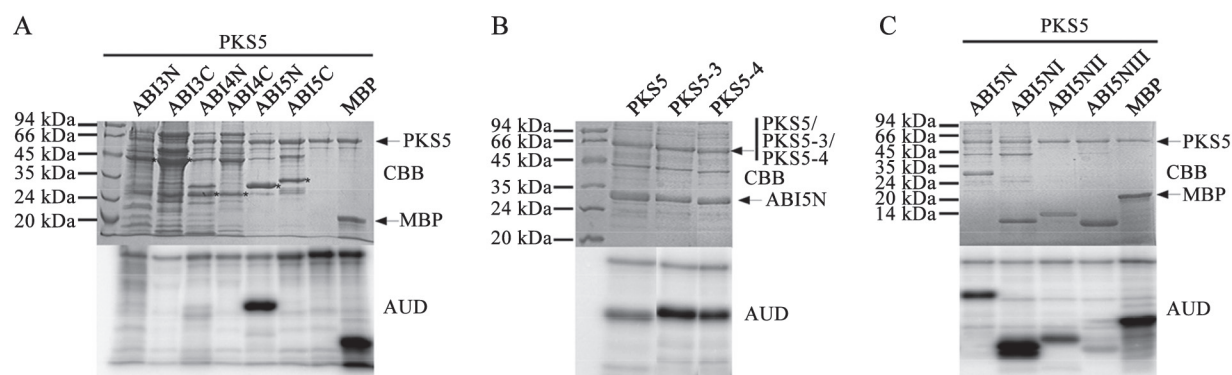


图5 *PKS5*体外磷酸化*ABI5*的N末端

Fig.5 *PKS5* phosphorylated the N-terminus of *ABI5* *in vitro*

A: *PKS5*特异磷酸化*ABI5*的N末端, *ABI3N*: *ABI3*的N末端, *ABI3C*: *ABI3*的C末端, *ABI4N*: *ABI4*的N末端, *ABI4C*: *ABI4*的C末端, *ABI5N*: *ABI5*的N末端, *ABI5C*: *ABI5*的C末端; B: *PKS5*点突变体外磷酸化*ABI5*的N末端; C: *PKS5*体外磷酸化*ABI5*的N末端*ABI5NI*与*ABI5NII*部分。*ABI5NI*: *ABI5*的N末端第一部分(1~60 aa); *ABI5NII*: *ABI5*的N末端第二部分(61~140 aa); *ABI5NIII*: *ABI5*的N末端第三部分(141~211 aa); CBB: 考马斯亮蓝染色; AUD: 放射自显影。

## 6 *PKS5*突变对*ABI5*响应基因表达的影响

ABA响应基因*RAB18*与*EM6*受*ABI5*的调控,*PKS5*可磷酸化*ABI5*参与ABA响应过程。为考察当*PKS5*突变后,植物体内受*ABI5*调节的基因表达水平是否会发生改变,使用qRT-PCR,以*RAB18*与*EM6*为标记基因,在无ABA及ABA处理下,对*PKS5*不同突变体内*RAB18*与*EM6*的表达水平进行分析。qRT-PCR测定及数据多重比较结果显示,无ABA处理时,所选ABA响应标记基因表达无差别(图6);当使用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA处理时,*RAB18*表达受ABA的诱导,在*PKS5*不同突变体内,*RAB18*的ABA诱导表达存在差异。与野生型(Col-0)相比较,*pks5-1*中*RAB18*表达与对照无差异,*pks5-3*与*pks5-4*中*RAB18*表达量升高,且*pks5-3*中*RAB18*表达水平最高( $P<0.05$ ) (图6-A)。*EM6*表达也同样受ABA诱导,但*EM6*在*PKS5*不同突变体中的表达与*RAB18*呈现相反的模式。与野生型(Col-0)相比较,*pks5-1*中*EM6*表达与对照无差异,*pks5-3*与*pks5-4*中*EM6*表达降低,且*pks5-3*中*EM6*表达量最低( $P<0.05$ ) (图6-B)。此结果说明*PKS5*通过*ABI5*影响其下游基因的表达水平,进而参与ABA响应过程。不同的*PKS5*突变形式对*ABI5*下游基因表达的影响有着不同的模式与效应。

## 讨 论

ABA在植物发育及各种外界胁迫反应中起着重要的作用。对ABA的合成与响应过程已有大量研究成果(Finkelstein 2013)。ABA响应途径中元件的鉴定与作用机理是解析ABA信号转导的基础。本研究中,*PKS5*功能获得性点突变体*pks5-3*与*pks5-4*在拟南芥种子萌发与幼苗早期生长表现出外源ABA处理敏感表型,突变体种子萌发率降低,幼苗生长矮小,黄化(图4-E~H)。表明*PKS5*蛋白激酶参与植物ABA响应过程,*PKS5*为ABA信号途径中的作用元件。体外以*ABI5*为*PKS5*激酶作用底物的磷酸化测试发现,*PKS5*可磷酸化*ABI5*的N末端(图5)。此外,*pks5-3*与*pks5-4*中*ABI5*下游调控标记基因的表达发生了变化,表明体内*PKS5*通过*ABI5*而影响下游基因的表达(图6)。上述结果表明:体内*PKS5*为ABA信号途径中的成员,*PKS5*对ABA的响应是通过磷酸化*ABI5*的N端作用方式而实现。

*pks5-1*为*PKS5*功能缺失型突变体,在外源ABA处理下,*pks5-3*与*pks5-4*均对ABA敏感,而*pks5-1*与野生型(Col-0)对ABA的反应相似,未观察到ABA处理的敏感表型(图4-F)。*pks5-1*中*ABI5*下游调控基因的表达水平也与野生型(Col-0)中无差

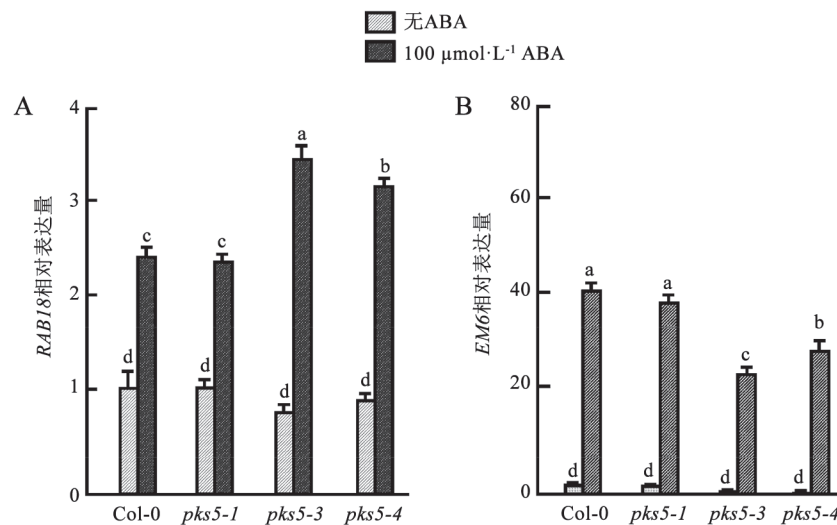


图6 *PKS5*突变体中*ABI5*响应基因表达

Fig.6 Expression of *ABI5*-responsive genes in *PKS5* mutants

A: *PKS5*突变体中*RAB18*相对表达水平; B: *PKS5*突变体中*EM6*相对表达水平。图中数值为3次重复测定结果,不同小写字母表示差异达到显著水平( $P<0.05$ )。



异(图6-A和B)。*pks5-1*为T-DNA插入突变体(图4-A), 无PKS5转录本存在(图4-B)。推测在植物体内除了PKS5对ABI5通过磷酸化调控之外, 还存在PKS家族中的其他成员或其他非PKS家族元件与PKS5具有功能上的冗余性。当PKS5缺失时, 其他PKS成员或元件对ABI5的调控作用互补了PKS5的功能, 因而在表型测试与ABI5下游基因表达中无法观察到该类突变体的ABA表型与基因表达变化。而*pks5-3*与*pks5-4*为PKS5的功能获得性突变体, 由于PKS5的存在且PKS5活性的变化, 使其可表现出对外源ABA处理的反应。

PKS5属于PKS家族成员, 人们发现PKS家族与SCaBP家族构成了复杂的相互作用网络, 参与植物对盐、干旱及ABA响应过程。如PKS3与SCaBP5(SOS3-like calcium binding protein 5)间存在相互作用, 在种子萌发、幼苗生长和气孔关闭过程中表现出对ABA的超敏感性(Cheong等2003)。PKS5蛋白激酶一方面可通过磷酸化下游元件起作用, 本身也可能受到其他作用元件的调控, 推测在PKS-SCaBP网络中也存在与PKS5相互作用的SCaBP家族成员参与ABA响应过程。如J3可与PKS5相互作用, 通过对PKS5抑制作用方式调节质膜质子泵活性(Yang等2010), 表明PKS5可能与其他不同类型的元件存在相互作用, 共同参与植物生理过程。

### 参考文献

- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2002). Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol*, 129 (4): 1533~1543
- Cheng ZJ, Zhao XY, Shao XX, Wang F, Zhou C, Liu YG, Zhang Y, Zhang XS (2014). Abscisic acid regulates early seed development in *Arabidopsis* by ABI5-mediated transcription of *SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1*. *Plant Cell*, 26 (3): 1053~1068
- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (8): 1833~1845
- Dai MQ, Xue Q, McCray T, Margavage K, Chen F, Lee JH, Nezames CD, Guo LQ, Terzaghi W, Wan JM et al (2013). The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (2): 517~534
- Finkelstein RR (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J*, 5 (6): 765~771
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12 (4): 599~609
- Finkelstein R (2013). Abscisic acid synthesis and response. *Tab*, 11: e0166
- Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu QS, Song CP, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS et al (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*, 19 (5): 1617~1634
- Gong DM, Gong ZZ, Guo Y, Chen XY, Zhu JK (2002). Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel *Arabidopsis* protein kinase. *J Biol Chem*, 277 (31): 28340~28350
- Gong DM, Guo Y, Schumaker KS, Zhu JK (2004). The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134 (3): 919~926
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13 (6): 1383~1399
- Haritatos E, Ayre BG, Turgeon R (2000). Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiol*, 123 (3): 929~937
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR et al (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132 (2): 666~680
- Hu RB, Zhu YF, Shen GX, Zhang H (2014). TAP46 plays a positive role in the ABSCISIC ACID INSENSITIVE5-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 164 (2): 721~734
- Liu HX, Stone SL (2010). Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *Plant Cell*, 22(8): 2630~2641
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 41 (5): 541~547
- Lyzenga WJ, Liu HX, Schofield A, Muise-Hennessey A, Stone SL (2013). *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *J Exp Bot*, 64 (10): 2779~2791
- Qin YZ, Guo M, Li X, Xiong XY, He CZ, Nie XZ, Liu XM (2010). Stress responsive gene *CIPK14* is involved in phytochrome A-mediated far-red light inhibition of greening in *Arabidopsis*. *Sci China Ser C*, 40 (10): 970~977
- Qin YZ, Li X, Guo M, Deng KQ, Lin JZ, Tang DY, Guo XH, Liu XM (2008). Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in *Arabidopsis*. *Sci China Ser C*, 38 (5): 446~457
- Rock CD (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol*, 148 (3): 357~396
- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 2 (5): 410~418
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 3 (3): 217~223
- Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J (2006). KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling.

- Plant Cell, 18 (12): 3415~3428
- Weinl S, Kudla J (2009). The CBL-CIPK Ca<sup>2+</sup>-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol*, 184 (3): 517~528
- Xie CG, Lin HX, Deng XW, Guo Y (2009). Roles of SCaBP8 in salt stress response. *Plant Signal Behav*, 4 (10): 956~958
- Xie CG, Zhou XN, Deng XW, Guo Y (2010). PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of *WRKY38* and *WRKY62*. *J Genet Genomics*, 37 (6): 359~369
- Xu DQ, Li JG, Gangappa SN, Hettiarachchi C, Lin F, Andersson MX, Jiang Y, Deng XW, Holm M (2014). Convergence of light and ABA signaling on the *ABIS* promoter. *PLoS Genet*, 10 (2): e1004197
- Yang YQ, Qin YX, Xie CG, Zhao FY, Zhao JF, Liu DF, Chen SY, Fuglsang AT, Palmgren MG, Schumaker KS et al (2010). The *Arabidopsis* chaperone J3 regulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase through interaction with the PKS5 kinase. *Plant Cell*, 22 (4): 1313~1332
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ et al (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (10): 3019~3036