

# 小麦富含半胱氨酸的类受体激酶 TaCRK2 与翻译控制 肿瘤蛋白 TaTCTP 的相互作用

顾 佳, 李 浩, 安瑞朋, 刘 刚, 王冬梅

(华北作物改良与调控国家重点实验室 / 河北省植物生理与分子病理学重点实验室 / 河北农业大学 生命科学院,  
河北 保定 071001)

**摘要:** *TaCRK2* 在叶锈菌侵染小麦诱发的过敏性反应中起正调控作用, 为深入了解 *TaCRK2* 在小麦抵抗叶锈菌侵染中的作用机制, 本试验采用串联亲和纯化与质谱联用 (TAP-MS) 技术, 鉴定出翻译控制肿瘤蛋白 (Translationally controlled tumor protein, TCTP) 为 *TaCRK2* 的潜在互作蛋白。但 *TaCRK2* 与 *TaTCTP* 的相互作用还缺乏试验证据, 本研究利用 DUALmembrane 系统酵母双杂交 (DUALmembrane system yeast-two-hybrid) 和双分子荧光互补 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 技术验证 *TaCRK2* 和 *TaTCTP* 之间的相互作用。DUALmembrane 系统酵母双杂交结果显示, 同时携带 *TaCRK2* 和 *TaTCTP* 的酵母 NMY51 可以在缺陷型培养基上生长; BiFC 试验结果显示, *TaCRK2* 和 *TaTCTP* 发生相互作用, 并且定位在烟草表皮细胞的内质网膜上。本研究为深入了解 *TaCRK2* 在叶锈菌侵染小麦诱发的过敏性反应中的作用机制奠定了基础。

**关键词:** CRK; TCTP; DUALmembrane 系统酵母双杂交; 双分子荧光互补; 小麦

**中图分类号:** S512.1; Q943.2

**开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):**

**文献标志码:** A



## Interaction between wheat cysteine-rich receptor-like kinases TaCRK2 and translationally controlled tumor protein TaTCTP

GU Jia, LI Hao, AN Ruipeng, LIU Gang, WANG Dongmei

(State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation, Key Laboratory of  
Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology / College of Life Sciences, Hebei  
Agricultural University, Baoding 071001, China)

**Abstract:** *TaCRK2* plays a positive regulation role in the hypersensitive reaction induced by *Puccinia triticina* infection of wheat. To further understand the role of *TaCRK2* resistance to *Puccinia triticina* infection, the translationally controlled tumor protein (TCTP) was identified as a potential interaction protein of *TaCRK2* by using tandem affinity purification and mass spectrometry (TAP-MS) technology. However, there is still no experimental evidence for the interaction between *TaCRK2* and *TaTCTP*. In this study, DUALmembrane system yeast two-

**收稿日期:** 2020-05-22

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31171472; 31871548); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (优先发展领域) (20111302130001);  
河北省应用基础研究计划重点基础研究项目 (12967149D).

**第一作者:** 顾 佳 (1994-), 女, 河北赞皇人, 博士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究. E-mail: 1286363225@qq.com

**通信作者:** 刘 刚 (1978-), 男, 河北定兴人, 博士, 副教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究. E-mail: gangliu2004@126.com

王冬梅 (1963-), 女, 河北景县人, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究. E-mail: dongmeiwang63@126.com

**本刊网址:** <http://hauxb.hebau.edu.cn:8080/CN/volumn/home.shtml>

hybrid and BiFC experiments were used to verify the interaction between TaCRK2 and TaTCTP. Through the DUALmembrane system yeast two-hybrid, it was found that yeast NMY51 with both TaCRK2 and TaTCTP could grow on a defective medium. By BiFC experiments, it was found that the fluorescence signal of the interaction between TaCRK2 and TaTCTP occurred on the endoplasmic reticulum membrane of tobacco epidermal cells. This study lays the foundation for a deep understanding of the mechanism of TaCRK2 in the hypersensitive reaction induced by *Puccinia triticina* infection of wheat.

**Keywords:** CRK; TCTP; DUALmembrane system yeast two-hybrid; BiFC; wheat

类受体蛋白激酶 (Receptor-like protein kinases, RLKs) 是植物蛋白激酶家族中最大的家族, 在跨膜信号传导中起着至关重要的作用。富含半胱氨酸的类受体激酶 (Cysteine-rich receptor-like kinases, CRKs) 是 RLKs 中最大的亚家族。典型的 CRKs 胞外含有 2 个具有抗菌活性的 DUF26 结构域 (Domain of unknown function 26, DUF26)<sup>[1]</sup>, DUF26 结构域包含 3 个半胱氨酸 (C-Xn-C-X2-C) 的保守序列, 可能作为氧化还原调节的潜在靶标, 表明 CRKs 可能会受到活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的调节, 而 ROS 是植物响应多种逆境胁迫共同的信号分子, 这意味着 CRKs 可能在多种胁迫应答中起重要作用。

目前对模式植物拟南芥中 CRKs 的研究较多, 通过 T-DNA 插入序列集合的大规模细胞组学分析, 确定了与氧化应激相关的 *AtCRK* 的主要作用<sup>[2]</sup>。*AtCRK6* 和 *AtCRK7* 均参与胞外氧化胁迫的信号转导过程<sup>[3]</sup>。*AtCRK13* 的上调导致与细胞死亡相关的超敏反应, 并诱导对病原体的防御<sup>[4]</sup>。*AtCRK28* 过表达增加拟南芥抵抗丁香假单胞菌的能力<sup>[5]</sup>。*AtCRKs* 的研究成果引起了对该基因家族的极大关注, 近几年, 人们逐渐增加了对不同农作物抵抗病原菌侵染过程中 CRKs 功能的研究。大麦 *HvCRK1* 在感染白粉菌后高表达, 瞬时沉默 *HvCRK1* 增强了大麦抵御白粉菌的能力, 表明 *HvCRK1* 在大麦抵抗白粉菌侵染过程中发挥负调控作用<sup>[6]</sup>。沉默 *OsCRK1* 后获得的转基因植株表现出明显的感病性状, 表明 *OsCRK1* 正调控水稻对白叶枯病菌的抗性<sup>[7]</sup>。同时, 六倍体小麦中 CRKs 的功能研究也已经展开, 试验证明 *TaCRK1* 在抗病品种 CI12633 受到纹枯病菌侵染时有较高水平的表达<sup>[8]</sup>。以上研究表明 CRKs 在植物应答生物或非生物胁迫过程中起到了至关重要的作用。

在研究小麦抵抗叶锈菌侵染的抗病机制过程中,

本实验室通过 RNA-Seq 分析分离克隆了小麦中富含半胱氨酸的类受体激酶 2 (Cysteine-rich receptor-like kinases2, *TaCRK2*), 利用 VIGS 和 RNAi 技术沉默 *TaCRK2* 后导致小麦抵御叶锈菌的能力降低<sup>[9]</sup>, 借助串联亲和纯化-质谱鉴定 (TAP-MS) 技术, 发现了 1 个 *TaCRK2* 潜在的互作蛋白即翻译控制肿瘤蛋白 (Translationally controlled tumor proteins, TCTP)。但对于 *TaCRK2* 与 *TaTCTP* 的相互作用缺乏试验验证。

TCTP 是一种广泛存在于植物、动物和酵母等真核生物中且高度保守的亲水蛋白, 在细胞内、外均能发挥作用, 对细胞的增殖、分化和凋亡起调控作用, 参与细胞免疫应答等<sup>[10-12]</sup>。*AtTCTP* 的过表达抑制了 BAX 蛋白诱发的细胞程序性死亡, 表明其参与了对细胞程序性死亡的调控<sup>[13]</sup>。另外, Meng 的研究发现, 黄瓜 *TCTP* 基因超表达会导致黄瓜对白粉病的抗性降低, 表明其对白粉病起负调控作用<sup>[14]</sup>。在小麦中对 TCTP 也有了初步的认识, *TaTCTP* 正调控小麦抵抗叶锈菌侵染的过程<sup>[15]</sup>。虽然利用 TAP-MS 技术发现了 *TaTCTP* 是 *TaCRK2* 的互作蛋白, 但对 TCTP 互作蛋白的研究还鲜有报道。本试验利用 DUALmembrane 系统酵母双杂交 (DUALmembrane system yeast-two-hybrid) 和双分子荧光互补 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 试验验证两者间的相互作用。

本研究使用的 DUALmembrane 系统不同于可溶性蛋白质间相互作用验证的酵母双杂交系统<sup>[16-17]</sup>。DUALmembrane 系统是利用分裂泛素机制来检测细胞内自然环境中膜整合蛋白或膜相关蛋白间或与其他蛋白质间的相互作用, 能够在膜上原位检测到发生相互作用的蛋白。Zhang 等人利用 DUAL 膜系统从感染甘蔗花叶病毒的植株中筛选并检测到与 SCMV-6K2 相互作用的蛋白<sup>[18]</sup>。本实验室前期工作已经证明 *TaCRK2* 定位在内质网膜上<sup>[9]</sup>, 因此利用 DUALmembrane 系统可以更准确的验证

TaCRK2 与 TaTCTP 的相互作用。

借助 DUALmembrane 系统酵母双杂交、BiFC 试验验证 TaCRK2 与 TaTCTP 二者间的相互作用, 有助于进一步了解 TaCRK2 在小麦与叶锈菌互作过程中的作用机制, 对揭示小麦抗叶锈病的机理及信号转导机制具有重要意义。

## 1 材料方法

### 1.1 植物和叶锈菌材料

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 近等基因系 TcLr26 与本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 均为本实验室长期保存的材料。小麦叶锈菌 (*Puccinia tritricina*) 生理小种 260 与 TcLr26 组成不亲和组合, 利用感病品种 ‘郑州 5389’ 进行小麦叶锈菌的繁殖。

TcLr26 小麦幼苗在 23 ~ 25 °C 的温室中培养, 7 日龄 TcLr26 接种小麦叶锈菌生理小种 260。根据 Qiao<sup>[19]</sup> 的方法种植小麦及接种叶锈菌。本生烟草在 23 ~ 25 °C 的温室中培养大约 30 d, 可以注射农杆菌, 进行双分子荧光互补试验, 根据 Sparkes<sup>[20]</sup> 的方法种植烟草。

### 1.2 试验引物合成

利用 primer premier 5.0 软件, 根据 TaCRK2 (GenBank 登录号: MK424819) 核苷酸序列, 设计出具有 Sfi I 限制性位点的基因特异性引物 Y2H-TaCRK2 F/R 和具有 Sal I 和 Kpn I 限制性位点的基因特异性引物 BiFC-TaCRK2 F/R。根据 TaTCTP (GenBank 登录号: 542949) 核苷酸序列, 设计出具有 Sfi I 限制性位点的基因特异性引物 Y2H-TaTCTP F/R 和具有 Sal I 和 Kpn I 限制性位点的基因特异性引物 BiFC-TaTCTP F/R。除 M13 F/R 外, 其余引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

### 1.3 目的序列的扩增

在 7 日龄小麦叶片表面接种 *Puccinia tritricina* 生理小种 260, 在接种 48 h 时取样, 利用 Trizol (生工, 上海) 的方法提取总 RNA, 依据 TaKaRa 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA。以该 cDNA 为模板, 利用引物 TaTCTP F/R, 使用高保真酶 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (TaKaRa, 大连) 扩增得到 TaTCTP 的编码区, 长度为 507 bp, 连接至克隆载

体 pEASY-T1 (全式金, 北京) 上, 利用引物 M13F/R 筛选阳性克隆, 测序由北京华大基因股份有限公司完成。通过 5' RACE 技术克隆得到 TaCRK2 编码区全长 1 482 bp<sup>[9]</sup>。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物 Primer	序列 (5' -3') Sequence (5' -3')	酶切位点 Restriction site
Y2H-TaCRK2 F	<u>GGCCATTACGGCC</u> ATGCCTTCTTCCACCTTG	Sfi I
Y2H-TaCRK2 R	<u>GGCCGAGGCGGCCT</u> CAAGCCAGCGT	Sfi I
BiFC-TaCRK2 F	<u>CGTCGAC</u> ATGCCTTCTTCCACCTTG	Sal I
BiFC-TaCRK2 R	<u>GGGTACC</u> AGCCAGCGTCCAGCAAGA	Kpn I
Y2H-TaTCTP F	<u>GGCCATTACGGCC</u> ATGCTCGTGTACCAGGA	Sfi I
Y2H-TaTCTP R	<u>GGCCGAGGCGGCCT</u> TAGCACTTGA	Sfi I
BiFC-TaTCTP F	<u>CGTCGAC</u> ATGCTCGTGTACCAGGA	Sal I
BiFC-TaTCTP R	<u>GGGTACC</u> TTAGCACTTGACCTCTTTCA	Kpn I
TaTCTP F	ATGCTCGTGTACCAGGACAA	
TaTCTP R	TTAGCACTTGACCTCTTTCA	
M13 F	GTAAACGACGGCCAGT	
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	

注: \* 下划线部分为酶切位点。

### 1.4 重组表达载体的构建

为构建 TaCRK2 和 TaTCTP DUALmembrane 系统酵母双杂交载体, 使用具有 Sfi I 限制性位点的基因特异性引物 Y2H-TaCRK2 F/R 和 Y2H-TaTCTP F/R (表 1), 扩增 TaCRK2 和 TaTCTP 的编码序列, 将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (生工, 上海) 回收目的片段, 目的片段与载体 pPR3-N 和 pBT3-N 经 Sfi I 进行酶切后, 用 Solution I DNA 连接酶进行连接, 然后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞。对得到的阳性克隆进行酶切验证和测序。测序结果用 DNAMAN 软件进行比对分析。

为构建 TaCRK2 和 TaTCTP 双分子荧光互补载体, 使用具有 Sal I 和 Kpn I 限制性位点的基因特异性引物 BiFC-TaCRK2 F/R 和 BiFC-TaTCTP F/R (表 1), 扩增 TaCRK2 和 TaTCTP 的编码序列。过程与构建 DUALmembrane 系统酵母双杂交载体相同, 将构建成功的重组质粒通过热激法转化到根癌农杆菌 (GV3101) 中。



### 1.5 DUALmembrane 系统酵母双杂交

使用 PEG/LiAc 法转化酵母 NMY51。pPR3-N 和 pBT3-N 为空载体对照、pPR3-N 和 pBT3-N-*TaCRK2*、pPR3-N 和 pBT3-N-*TaTCTP* 为阴性对照,检测 2 个基因的自激活。pPR3-N-*TaTCTP* 和 pBT3-N-*TaCRK2* 共转化、pPR3-N-*TaCRK2* 和 pBT3-N-*TaTCTP* 共转化作为试验组。将重组质粒转化到 NMY51 酵母感受态细胞中,菌液涂布于缺陷型二缺 (SD/-Leu/-Trp) 培养基上,28℃ 倒置培养 3 d,挑取较大的单个菌斑到二缺液体培养基中,28℃ 振荡培养,直至 OD<sub>546</sub> 大约为 0.6,用双蒸水稀释至 OD<sub>546</sub> 为 0.2,稀释后的菌液点在二缺、三缺 (SD/-Leu/-Trp/-His) 和四缺 (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) 的培养基上,28℃ 倒置培养 3~4 d 后观察并拍照。

### 1.6 双分子荧光互补

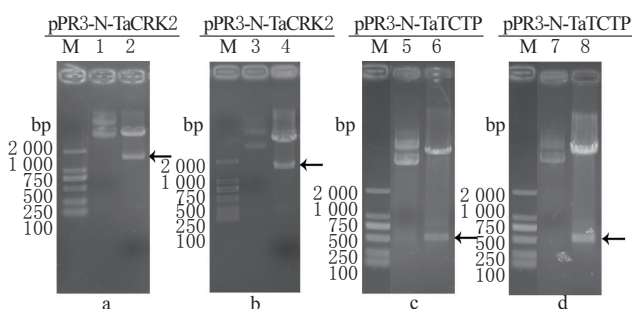
在烟草叶片中,将含有目的基因的重组质粒瞬时表达。对分别携带有 pSPYNE、pSPYCE、pSPYNE-*TaCRK2*、pSPYCE-*TaCRK2*、pSPYNE-*TaTCTP* 和 pSPYCE-*TaTCTP* 重组质粒的 GV3101 农杆菌进行过夜培养,4 000 r/min,15 min 离心,所得菌体用侵染缓冲液 (10.06 g/L MES、0.76 g/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、5 g/L 葡萄糖、0.1 mmol/L AS) 洗涤,再用侵染缓冲液重悬菌体,调 OD<sub>600</sub> 值约为 0.6。将携带有 pSPYNE 和 pSPYCE-*TaCRK2*、pSPYNE-*TaCRK2* 和 pSPYCE、pSPYNE 和 pSPYCE-*TaTCTP*、pSPYNE-*TaTCTP* 和 pSPYCE、pSPYNE-*TaCRK2* 和 pSPYCE-*TaTCTP*、pSPYNE-*TaTCTP* 和 pSPYCE-*TaCRK2* 的农杆菌均按 1:1 的比例混合,然后注射烟草,在 48 h 后使用激光扫描共聚焦显微镜 (OLYMPUS FV1000, 日本) 进行观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 DUALmembrane 系统酵母双杂交载体的构建

以 pPR3-N 和 pBT3-N 为载体,使用单酶切连接法构建 DUALmembrane 系统酵母双杂交载体。使用引物 Y2H-*TaCRK2* F/R 扩增 *TaCRK2* 编码区,使用引物 Y2H-*TaTCTP* F/R 扩增 *TaTCTP* 编码区。用 *Sfi* I 将目的基因和表达载体 pPR3-N 和 pBT3-N 酶切,用连接酶进行连接、转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。在大约 1 482 bp (图 1-a, b) 和 507 bp (图 1-c, d) 处检测到目的条带,结果表明 *TaCRK2* 和 *TaTCTP*

基因的 DUALmembrane 系统酵母双杂交载体构建成功。

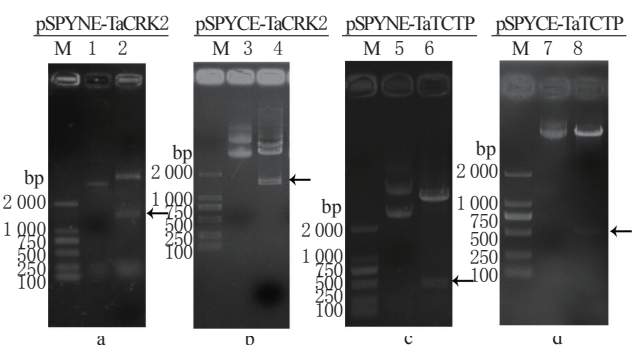


注: M: DL 2 000 DNA 分子标记; 1: pPR3-N-*TaCRK2* 质粒; 2: pPR3-N-*TaCRK2* 质粒酶切片段; 3: pBT3-N-*TaCRK2* 质粒; 4: pBT3-N-*TaCRK2* 质粒酶切片段; 5: pPR3-N-*TaTCTP* 质粒; 6: pPR3-N-*TaTCTP* 质粒酶切片段; 7: pBT3-N-*TaTCTP* 质粒; 8: pBT3-N-*TaTCTP* 质粒酶切片段。

图 1 DUALmembrane 系统酵母双杂交载体的酶切鉴定  
Fig. 1 Restriction enzyme digestion of the DUALmembrane system yeast two-hybrid vectors

### 2.2 双分子荧光互补载体的构建

使用引物 BiFC-*TaCRK2* F/R 扩增带 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切位点的 *TaCRK2* 编码区,使用引物 BiFC-*TaTCTP* F/R 扩增带 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切位点的 *TaTCTP* 编码区。将目的基因 *TaCRK2* 和 *TaTCTP* 与表达载体 pSPYNE 和 pSPYCE 用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切,用连接酶进行连接、转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。结果显示,在大约 1 482 bp (图 2-a, b) 和 507 bp (图 2-c, d) 处检测到目的条带,表明 *TaCRK2* 和 *TaTCTP* 基因的双分子荧光互补载体构建成功。



注: M: DL 2 000 DNA 分子标记; 1: pSPYNE-*TaCRK2* 质粒; 2: pPR3-N-*TaCRK2* 质粒酶切片段; 3: pSPYCE-*TaCRK2* 质粒; 4: pSPYCE-*TaCRK2* 质粒酶切片段; 5: pSPYNE-*TaTCTP* 质粒; 6: pSPYNE-*TaTCTP* 质粒酶切片段; 7: pSPYCE-*TaTCTP* 质粒; 8: pSPYCE-*TaTCTP* 质粒酶切片段。

图 2 双分子荧光互补载体的酶切鉴定  
Fig. 2 Restriction enzyme digestion of the bimolecular fluorescence complementary vectors

### 2.3 TaCRK2 与 TaTCTP 相互作用的 DUALmembrane 系统酵母双杂交检测

在 SD/-Leu/-Trp (-LW) 平板培养基上, pPR3-N 和 pBT3-N 空载体、pPR3-N 和 pBT3-N-TaCRK2 共转化、pPR3-N 和 pBT3-N-TaTCTP 共转化、pPR3-N-TaTCTP 和 pBT3-N-TaCRK2 共转化、pPR3-N-TaCRK2 和 pBT3-N-TaTCTP 共转化的酵母均正常生长, 并且其生长状态基本一致。在 SD/-Leu/-Trp/-His (-LWH) 培养基上, 只有 pPR3-N-TaTCTP 和 pBT3-N-TaCRK2 共转化、pPR3-N-TaCRK2 和 pBT3-N-TaTCTP 共转化的酵母正常生长 (见图 3)。在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade (-LWHA) 培养基上的生长状况与 SD/-LWH 平板培养基上的生长状况基本一致。结果表明 TaCRK2 与 TaTCTP 在酵母中发生了相互作用。

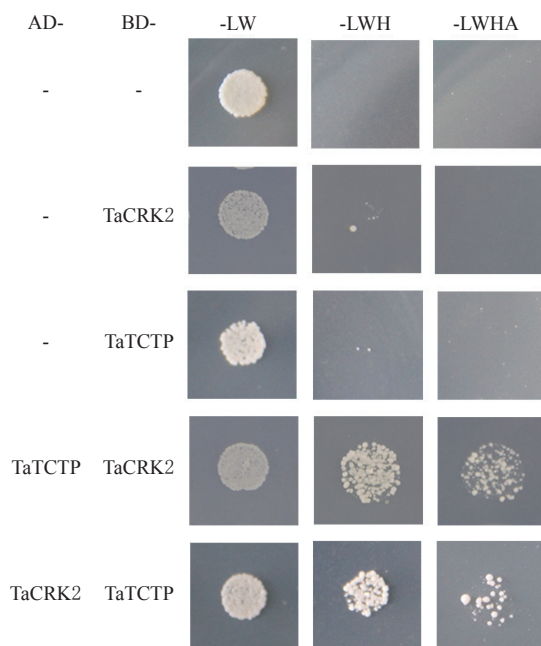


图 3 DUALmembrane 系统酵母双杂交检测 TaCRK2 与 TaTCTP 的相互作用

Fig. 3 DUALmembrane system yeast two-hybrid detection of TaCRK2 and TaTCTP interaction

### 2.4 TaCRK2 与 TaTCTP 相互作用的双分子荧光互补试验检测

在酵母细胞中 TaCRK2 与 TaTCTP 能发生相互作用, 为了进一步检测 TaCRK2 与 TaTCTP 是否会在植物体内相互作用, 使用双分子荧光互补试验验证 TaCRK2 与 TaTCTP 在烟草细胞中的相互作用。将携带 TaCRK2 与 TaTCTP 的 pSPYNE 和 pSPYCE 载体单独或共同注射烟草叶片, 用激光扫描共聚焦

显微镜观察。结果显示, TaCRK2 和 TaTCTP 共同转化的烟草下表皮细胞的荧光信号很强, 而单独注射的对照组烟草没有荧光 (图 4), 其荧光信号的分布特征与前期对 TaCRK2 进行的亚细胞定位结果极其相似<sup>[9]</sup>。结果表明, TaCRK2 与 TaTCTP 可以在植物细胞内相互作用, 由于 TaCRK2 定位于内质网膜, 所以二者的相互作用很可能发生在内质网膜上。

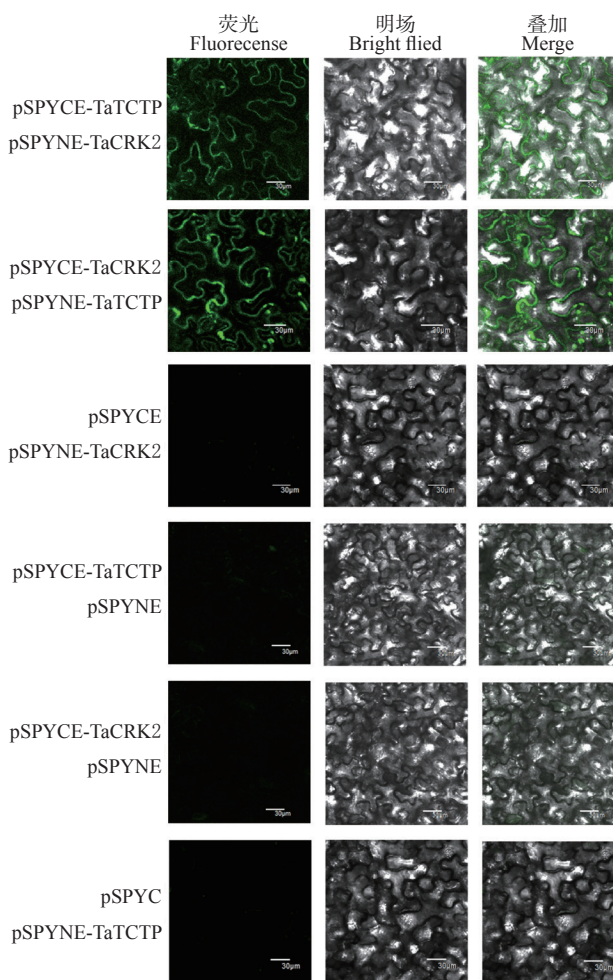


图 4 双分子荧光互补检测 TaCRK2 与 TaTCTP 的相互作用  
Fig. 4 Bimolecular fluorescence complementary detection of TaCRK2 and TaTCTP interaction

## 3 讨论与结论

植物通过识别病原菌效应物蛋白, 激发抗病防卫反应, 导致寄主细胞发生超敏反应 (Hypersensitive reaction, HR), 从而使病原菌的生长受到抑制<sup>[21]</sup>。已经证明  $\text{Ca}^{2+}$  作为信号分子参与调控小麦 - 叶锈菌互作中 HR 的发生<sup>[19, 22]</sup>。然而,  $\text{Ca}^{2+}$  如何调控 HR 尚不清楚。本课题组前期借助转录组分析发现



一个受  $\text{Ca}^{2+}$  调控的基因 *TaCRK2*, 以  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的方式调控小麦对叶锈菌的抗性<sup>[9]</sup>。CRK 是 RLKs 的亚家族成员, 在植物抗病性和细胞死亡中起重要作用。在拟南芥中 *AtCRK4*、*AtCRK6* 和 *AtCRK36* 的过表达导致对丁香假单胞菌的抗性增强, 并且增强了早期和晚期 PTI 反应的激活<sup>[23]</sup>。*AtCRK13* 过表达也会诱导细胞死亡<sup>[5]</sup>。但目前人们对 CRKs 参与生物胁迫和非生物胁迫的作用机制却知之甚少。*AtCRK36* 的过表达植株表现出高敏感性细胞死亡, 与 BIK1 相互作用, 介导 ROS 产生, 增强气孔防御<sup>[24]</sup>。*AtCRK28* 在拟南芥中过表达增强了对丁香假单胞菌的抗性, 在烟草中瞬时表达 *AtCRK28* 可以诱导细胞死亡, *AtCRK28* 能够和 BAK1-FLS2 复合体启动寄主的防卫反应, 诱导细胞死亡<sup>[5]</sup>。在本试验中通过 DUALmembrane 系统酵母双杂交和 BiFC 试验证明了 TaCRK2 与 TaTCTP 之间存在相互作用。

TaCRK2 定位在内质网膜上, TaTCTP 定位于细胞质和细胞核。通过 DUALmembrane 系统酵母双杂交验证 TaCRK2 与 TaTCTP 存在相互作用后, 进一步使用 BiFC 试验在活细胞的生理环境中原位显示蛋白质的相互作用, 结果显示 TaCRK2 与 TaTCTP 的相互作用可能发生在内质网膜上, 说明 TaTCTP 可能在 TaCRK2 调控小麦抵抗叶锈菌侵染诱导 HR 的信号转导网络中起作用, 参与胞质内信号的传递, 但二者的上下游关系仍有待进一步探讨。下一步的工作将通过免疫共沉淀技术进一步证明二者在体内存在互作。前期研究表明 *TaCRK2* 的激酶结构域缺少了催化核心域 (VIb 和 VII)<sup>[9]</sup>, 那么 TaCRK2 与 TaTCTP 相互作用的本质, 互作位点的特征将是研究的重点。已知 TaTCTP 和 TaSnRK1 存在相互作用<sup>[25]</sup>, 因此推测 TaTCTP 可能作为磷酸化靶标, 在 TaTCTP 和 TaCRK2 之间进行信号传递, 但 TaCRK2 是否与 TaSnRK1 发生相互作用仍需要试验验证, 这些问题的澄清将有助于完善 TaCRK2 参与小麦抵抗叶锈菌侵染诱导 HR 的信号转导机制。在以后研究中将利用 VIGS 和 RNAi 技术沉默 *TaCRK2*、*TaTCTP* 或将二者同时沉默, 观察基因沉默对叶锈菌发育及 HR 的影响, 对其上下游关系进行探究; 通过位点突变进一步研究 TaCRK2 与 TaTCTP 相互作用的实质。这为阐明 TaCRK2 调控叶锈菌侵染小麦后诱发 HR 的分子机制奠定了重要基础, 亦对全面

地阐释 TaCRK2 在植物免疫过程中的作用机制具有重要的理论意义和实践意义。

#### 参考文献:

- [1] Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H, et al. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds [J]. *Biological Chemistry*, 2007, 388(3): 273–280.
- [2] Bourdais G, Burdiak P, Gauthier A, et al. Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress [J]. *Plos Genetics*, 2015, 11(7): e1005373.
- [3] Idänheimo N, Gauthier A, Salojärvi J, et al. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases *CRK6* and *CRK7* protect against apoplastic oxidative stress [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 445(2): 457–462.
- [4] Acharya B R, Raina S, Maqbool S B, et al. Overexpression of *CRK13*, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae* [J]. *The Plant Journal*, 2007, 50(3): 488–499.
- [5] Yadeta K A, Elmore J M, Creer A Y, et al. Cysteine-rich protein kinase associates with a membrane immune complex and the cysteine residues are required for cell death [J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 771–787.
- [6] Rayapuram C, Jensen M K, Maiser F, et al. Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(2): 135–147.
- [7] 张明伟. 水稻抗白叶枯病相关基因 *OsCRK1* 的鉴定和克隆 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [8] Yang K, Rong W, Qi L, et al. Isolation and characterization of a novel wheat cysteine-rich receptor-like kinase gene induced by *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3021–3030.
- [9] Gu J, Sun J W, Liu N, et al. A novel cysteine-rich receptor-like kinase gene, *TaCRK2*, contributes to leaf rust resistance in wheat [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21:732–746.
- [10] Schroeder J T, Lichtenstein L M, MacDonald S M. Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils [J]. *Journal of Immunology*, 1997, 159(1): 447–452.
- [11] Susini L, Besse S, Duflaut D, et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(8): 1211–1220.
- [12] Vonakis B M, Sora R, Langdon J M, et al. Inhibition of cytokine gene transcription by the Human recombinant

- histamine-releasing factor in human T lymphocytes [ J ]. Journal of Immunology, 2003, 171(7): 3742–3750.
- [ 13 ] Hoepflinger M C, Reitsamer J, Geretschlaeger A M, et al. The effect of translationally controlled tumour protein (TCTP) on programmed cell death in plants [ J ]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 135.
- [ 14 ] Meng X N, Yu Y, Zhao J Y, et al. The two translationally controlled tumor protein genes, *CsTaTCTP1* and *CsTaTCTP2*, are negative modulators in the *Cucumis sativus* defense response to *Sphaerotheca fuliginea* [ J ]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 544–558.
- [ 15 ] 张立峰. *TcLr19* 与叶锈菌互作早期的酵母双杂交 cDNA 文库构建及 *TaTCTP* 表达分析 [ D ]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- [ 16 ] Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, et al. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo* [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(9): 5187–5192.
- [ 17 ] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [ J ]. Nature, 1989, 340(6230): 245–246.
- [ 18 ] Zhang H, Cheng G, Yang Z, et al. Identification of Sugarcane Host Factors Interacting with the 6K2 Protein of the Sugarcane Mosaic Virus [ J ]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 3867–3886.
- [ 19 ] Qiao M, Sun J W, Liu N, et al. Changes of nitric oxide and its relationship with  $H_2O_2$  and  $Ca^{2+}$  in defense interactions between wheat and *Puccinia triticina* [ J ]. PloS One, 2015, 50: e0132265.
- [ 20 ] Sparkes I A, Runions J, Kearns A, et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants [ J ]. Nature Protocols, 2006, 1(4): 2019–2025.
- [ 21 ] Caplan J, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar S P. Plant NB-LRR immune receptors: From recognition to transcriptional reprogramming [ J ]. Cell Host & Microbe, 2008, 3(3): 126–135.
- [ 22 ] Liu G, Hou C Y, Wang D M. Calcium influx is required for the initiation of the hypersensitive response of *Triticum aestivum* to *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* [ J ]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2010, 74(2010): 267–273.
- [ 23 ] Yeh Y-H, Chang Y-H, Huang P-Y, et al. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases [ J ]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 322–334.
- [ 24 ] Lee D S, Kim Y C, Kwon S J, et al. The *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase CRK36 regulates immunity through interaction with the cytoplasmic kinase BIK1 [ J ]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1856–1873.
- [ 25 ] 麻楠, 乔金柱, 汤文倩, 等. 小麦翻译控制肿瘤蛋白 TCTP 与蔗糖非酵解型蛋白激酶 SnRK1 的相互作用 [ J ]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1686–1697.

(编辑: 李 川)