

• 药材与资源 •

铁皮石斛类受体激酶 DoRLK 的基因克隆和分子特征

高 静¹, 王 楠^{2#}, 刘阿萍¹, 张明英¹, 陈 莹¹, 关思静¹, 彭 亮¹, 张 岗^{1*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

2. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712000

摘要:目的 克隆铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 类受体激酶 (receptor-like kinase, RLK) 基因, 命名为 DoRLK (GenBank 注册号 ANC68272.1)。方法 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 RACE 技术获取基因全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等分子特性; 用软件 DNASTAR 6.0 和 MEGA 7.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助定量 PCR 检测基因表达模式。结果 DoRLK 基因 cDNA 全长 1 715 bp, 编码 1 条由 423 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量 47 800.88, 等电点为 9.47。DoRLK 蛋白包含 RLK 蛋白家族的 1 个蛋白激酶结构域 (85~370) 和一个跨膜基序 (250~270)。DoRLK 基因与多种植物 RLK 基因相似性很高 (43.62%~63.35%), 与小兰屿蝴蝶兰、海枣、芦笋等植物亲缘关系较近。DoRLK 基因具有组织表达特异性, 其转录本在石斛根中表达量较高, 分别为叶和茎中的 2.22、2.75 倍。结论 DoRLK 基因的分子鉴定为进一步揭示 RLK 在铁皮石斛与环境互作中的功能奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 类受体激酶; 基因表达; 定量 PCR; 抗逆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5307-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.025

Molecular cloning and characterization of a novel DoRLK gene from *Dendrobium officinale*GAO Jing¹, WANG Nan², LIU A-ping¹, ZHANG Ming-ying¹, CHEN Ying¹, GUAN Si-jing¹, PENG Liang¹, ZHANG Gang¹

1. Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To identify a receptor-like kinase (RLK) encoding gene named as DoRLK (GenBank accession No. ANC68272.1) from *Dendrobium officinale*. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to isolate the full length cDNA of DoRLK. Characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of the deduced DoRLK protein were determined by a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 7.0 softwares, respectively. Quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** The results showed that the full length cDNA of DoRLK was 1 715 bp in length and encoded a 423 aa protein with a molecular weight of 47 800.88 and an isoelectric point (pI) of 9.47. The deduced DoRLK protein, like other RLK proteins, constituted one conserved domains (85—370) and one transmembrane motifs (250—270). Multiple sequence alignment and phylogenetic analyses demonstrated that DoRLK had high identity (43.62%—63.35%) to a number of RLK genes from various plants and was closely related to *Phalaenopsis equestris*, *Phoenix dactylifera* and *Asparagus officinalis*. Real time quantitative PCR (qPCR) analysis revealed that DoRLK was expressed in the three included organs. The transcripts were the most abundant in the roots with 2.22 fold over that in the leaves,

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31600320); 陕西省高校科协青年人才托举计划项目 (20170208); 陕西省社会发展科技攻关项目 (2018SF-338); 陕西省普通高校毕业生就业人才计划项目; 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目; 陕西中医药大学“思邈青年学者”项目

作者简介: 高 静 (1986—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物生理生态学。E-mail: gaojing@sntcm.edu.cn

***通信作者** 张 岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为药用植物生物技术与分子生物学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

#并列第一作者 王 楠, 男, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物生理生态学。E-mail: wangnan@sntcm.edu.cn

followed by that in the stems with 2.75 fold. **Conclusion** Molecular characterization of DoRLK will be useful for further functional elucidation of the gene involving in *D. officinale* responses to environmental factors.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; RLK; gene expression; quantitative PCR; stress resistance

植物类受体激酶 (receptor like kinase, RLK) 在植物免疫信号传导、调控组织和器官发育等过程中发挥重要作用^[1]。典型的 RLK 由 3 个功能域组成, 包括一个可变的胞外结构域、跨膜结构域和胞内蛋白激酶结构域^[1-2]。目前已从玉米、拟南芥、水稻等 20 多种植物中鉴定到许多 RLK^[3]。根据胞外结构域的区别, 可以将 RLKs 分为 6 类, 即富含亮氨酸重复序列 (eucine-rich repeats, LRRs) 型、PR5K (pathogenesis-related protein 5-like receptor kinase) 型、WAK (wall-associated kinase) 型、CR4 (CRINKLY4) 型、外源类凝集素结合域 (lectin-binding domain, LB) 型和 S 结构域 (S-domain, S) 型^[1-3]。

大多数植物 RLK 有一段结构多样性的胞外受体结构域, 具有识别细胞外各种生物和非生物因子的功能。胞外结构域能识别配体, 然后经过胞内激酶区的磷酸化或去磷酸化等反应, 完成跨膜信号传递过程, 从而调节植物应答外界信号^[1-3]。研究表明 RLK 通过 STOMAGEN (气孔蛋白)-类 LRR 受体蛋白激酶参与调控气孔发育^[4], 拟南芥中的类受体胞质激酶 ARCK1 (ABA and osmotic stress inducible receptor-like cytosolic kinase1) 通过感应 ABA 应答盐胁迫和水分胁迫^[5], $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖的 RLK 则通过油菜素内酯信号传导参与植物免疫反应^[6], 类受体激酶 BAK1 具有调节植物生长发育、细胞死亡和免疫信号传导等多种功能^[7], 拟南芥的受体激酶 EMS1 能介导自交不亲和反应^[8], RLK 还调控茎端分生组织中干细胞的数目, 进而影响维管束的发育^[9]。可见, 植物 RLK 广泛地参与到调控植物的生长发育以及感知信号传导过程中。

作为我国传统的珍稀名贵品种之一, 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 具有较高的药用价值, 它是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年附生草本植物, 其药用部位为新鲜或干燥茎, 主治胃阴不足、阴虚火旺、骨蒸劳热等症^[10]。现代研究表明铁皮石斛含有生物碱、多糖、酚类、萜类等活性成分, 具有极大的药用价值, 但是, 其生长易受环境因子影响, 野外繁殖率低。前期本课题组利用抑制性差减杂交技术 (SSH)

富集菌根真菌侵染铁皮石斛的差异表达基因^[11], 分离 1 条长度 395 bp 的差异基因, BLASTx 分析显示其与多种植物 RLKs 蛋白高度一致。RLK 不仅调控植物正常的生长发育, 而且参与植物的抗逆反应, 推测该 EST 可能在铁皮石斛生长发育、抗病防御机制中起重要作用。目前对 RLK 的研究集中于一些模式植物和作物中, 对石斛 RLK 类基因分子生物学的研究极为迫切。本研究从铁皮石斛中分离得到 1 个 RLK cDNA 全长 DoRLK 基因, 并利用生物信息学手段对其编码蛋白序列的结构和功能进行预测, 同时分析了 DoRLK 基因在不同组织器官中的表达模式, 为揭示其分子作用机制奠定基础。

1 材料

野生植物材料采自云南西双版纳, 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星研究员鉴定为兰科石斛属植物铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo。取石斛根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 -80°C 保存备用。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDropTM 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega 公司, 美国) 操作说明, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, -20°C 保存备用。

2.2 RACE 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

序列分析表明, 原始 EST 仅编码一段由 307 个氨基酸残基组成, 羧基端不完整, 因此需要进行 5'/3'-RACE 反应。设计 2 对基因特异引物, 5'-RACE 引物为 DoRLK-R 5'-CTGATGCTTGAGAA-GGTGGT-3'; 3'-RACE 引物为 DoRLK-F 5'-ATC-TGTTGAGAGACCTCCTTTTCC-3', 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书, 分别与 UPM 引物组合进行 2 次 3'-RACE。

2 次 RACE-PCR 反应体系均为 25 μL , 包括 10 $\times$

Advantage[®] 2 PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L, DoRLK-R 或 DoRLK-F (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 10 $\times$ UPM 0.5 μ L, 5'-RACE ready cDNA 或 3'-RACE ready cDNA 模板各 1.0 μ L, 50 $\times$ Advatange[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μ L, ddH₂O 19.5 μ L。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C、3 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、2 min 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C、7 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen 公司, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara 公司, 中国), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆并送上海生工生物工程有限公司测序。所获 cDNA 序列与原 EST 拼接, 设计跨开放阅读框 (ORF) 引物 DoRLK-S: 5'-ATGAAG-TGTTTCCAATTCTCAAATGGAG-3'; DoRLK-AS: 5'-AAGCTTGTTAGAGCTCATTGA-3', 进行全长基因 RT-PCR 验证。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 DoRLK 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 和 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=SM00157) 分析 DoRLK 蛋白结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; ProtComp (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对分析; 借助 MEGA 7.0 构建系统进化树。

2.4 qRT-PCR 分析

分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, EF1 α 作为内参基因, qRT-PCR 分析 DoRLK 基因的组织表达模式。qRT-PCR 引物 DoRLK-qRT-S: 5'-GGAAGTGCTGCTCCACGGTTAA-3' 和 DoRLK-

qRT-AS: 5'-GGCTCCTGGTACTGGCTACTCA-3' 的扩增产物长 320 bp。用 ABI PRISM 7500 qRT-PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 qRT-PCR。反应体系 25 μ L 包括 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix (Takara 公司, 中国) 12.5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ROX 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, 美国) 生成的循环阈值 (cycle threshold, C_t), 用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法^[10] 计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 DoRLK 基因全长 cDNA 克隆

通过 BlastX 分析比对可知原始序列具有 5'-UTR, 利用 RACE 引物进行 2 次 3'-RACE 扩增。与原始 EST 拼接成一条 1 715 bp 的 cDNA; BLASTx 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 RLK 转录因子基因有较高的相似性 (49%~57%), 将其命名为 DoRLK, 提交 GenBank 获得注册号 ANC68272.1。该 cDNA 序列包含完整开放阅读框 (ORF) 长 1 272 bp, 5'-UTR 长 251 bp, 3'-UTR 长 192 bp, 具有 1 个真核生物 mRNA 加尾信号 AATAA 以及 polyA 尾巴, 起始密码子附近碱基序列 CAAATGG 并不符合 Kozak 规则 (即 A/GNNATGG)^[12]。使用 DoRLK-S/DoRLK-AS 引物进行 qRT-PCR 验证扩增产生单一条带 (图 1),

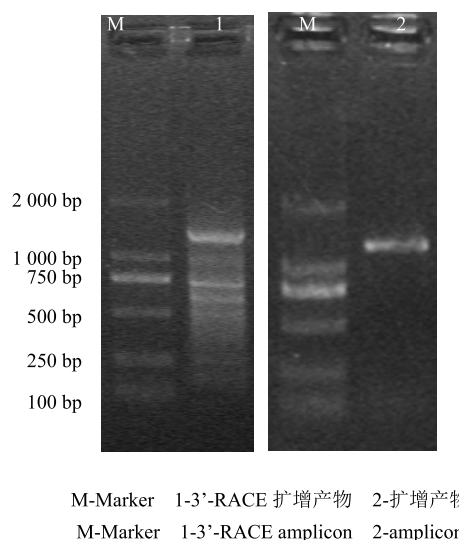


图 1 DoRLK 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning of a full length DoRLK gene in *D. officinale*

克隆、测序分析其为完整 ORF, 进而证明已成功获得 DoRLK 基因全长 cDNA。

3.2 DoRLK 基因的编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DoRLK 基因编码的蛋白质的分子式为 $C_{2118}H_{3378}N_{604}O_{620}S_{18}$, 包含 423 个氨基酸残基, 相对分子质量 47 800.88, 等电点 9.47; DoRLK 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 61, 负电残基 (Asp+Glu) 为 47。该蛋白的不稳定系数为 36.74, 脂肪系数为 79.74, 亲水性系数为 -0.487。SOPMA 分析表明, DoRLK 蛋白二级结构主要由 α 螺旋 (35.46%)、随机卷曲 (39.01%)、延伸链 (16.55%) 和少量的 β 转角 (8.98%) 组成。

3.3 DoRLK 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

ScanProsite 与 SMART 结果均显示其有 ATP 结合位点 (91~119), 此外, ScanProsite 结果表明 DoRLK 蛋白具备高等植物的蛋白激酶结构域 (85~370), SMART 结果显示在 81~366 氨基酸位点有磷酸转移酶活性区, 可能是一种丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶, 两者结果相似。TMpred 分析结果 250~270 氨基酸之间存在一个跨膜结构 (从里向外, 得分 601), SgnalP 4.0 分析蛋白不含信号肽。ProtComp 结果显示该蛋白质位于细胞膜 (得分 8.8), 在 410 氨基酸位置处有一个糖基磷酸酰肌醇锚区, 可能是一个富含脯氨酸的受体蛋白。

3.4 DoRLK 蛋白的三维建模

将 DoRLK 蛋白序列提交 SWISS-MODEL 数据库, 以蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中已提交的拟南芥 BAK1 (PDB No.: 3tl8.1.A) A、D、G、H 链晶体分子为模板, 进行同源建模结构预测。图 2 结果显示, DoRLK 与 BAK1 蛋白结构域序列有 43.45% 相似性, 空间结构类似。

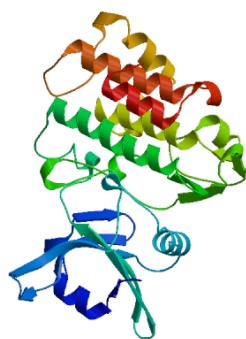


图 2 基于 SWISS-MODEL 的 DoRLK 蛋白三维建模

Fig. 2 Three-dimensional structure of DoRLK protein based on SWISS-MODEL

3.5 蛋白序列比对和进化分析

运用 DNASTAR 6.0 中的 MegAlign 程序, 对 DoRLK 与代表性植物的 6 个 RLK 蛋白进行多序列比对 (图 3)。结果显示, 铁皮石斛 DoRLK 蛋白与小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. PBL19 (XP_020589184.1) 一致性最高, 为 63.35%; 与芦笋 *Asparagus officinalis* L. PBL19 (XP_020276044.1) 的一致性次之, 为 48.42%; 与莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. At5g47070 (XP_010253 943.1) 和棉花 *Gossypium hirsutum* L. At5g47070 (XP_016725497.1) 的一致性近似, 分别为 46.93% 和 47.26%; 与铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* L. PBL19 (XP_020698502.1) 和蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn (XP_013449997.1) 的一致性近似, 分别为 43.62% 和 43.78%。

3.6 DoRLK 基因编码蛋白的系统进化树分析

利用 MEGA 7.0 软件, 采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建 DoRLK 和拟南芥、水稻等植物 RLK 家族部分蛋白的系统进化树 (图 4)。结果表明, 37 个蛋白聚成植物 RLK 蛋白家族分子进化树的组 I、II、III、IV 4 大分支; DoRLK 被聚在组 2 分支, 与兰科的小兰屿蝴蝶兰的进化关系最近。

3.7 基因表达模式分析

分别提取石斛根、茎、叶等样品总 RNA, 利用 qPCR 技术检测 DoRLK 基因的组织表达模式。图 5 结果表明, DoRLK 在 3 种器官中均有表达, 但相对表达量存在差异。以叶为校正样本, 该基因转录本在石斛根中的表达量较高, 茎中最少, 分别为叶中的 2.22 倍和 0.8 倍。

4 讨论

RLK 在植物响应各种生物和非生物胁迫因子中发挥重要作用, 参与激素信号传导、繁殖器官的形成、自交不亲和、植物抗盐、抗旱、抗病的胁迫响应等生理过程^[2-6]。目前在拟南芥中和水稻中已经鉴别出来可能编码为 RLK 的基因分别为 610 多个和 1 110 个家族成员^[13]。关于铁皮石斛的其他类 RLK 基因克隆的研究未见报道。本实验利用 RACE 克隆获 DoRLK 基因全长, 编码蛋白具有 RLK 高度保守的丝氨酸/苏氨酸催化结构域和跨膜结构域, 与多种植物 RLK 蛋白基因一致性较高, 进化上属于 RLK 分子进化树的组 II。这些结果说明 DoRLK 是编码铁皮石斛 RLK 蛋白的新基因。

铁皮石斛 (ANC68272.1)	MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	54
小兰屿蝴蝶兰 (XP_020589184.1)	MRTSLSMIFLITVEELSRGSLNHLHLLINLKNFEIRFQTS.....MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	97
芦笋 (XP_020276044.1)	MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	54
莲 (XP_010253943.1)	MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	52
棉花 (XP_016725497.1)	MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	56
铁皮石斛 (XP_020698502.1)	MKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	54
莼菜 (XP_013449997.1)	MSSVSGVSCFPYENAVNSGIMKCFPFSGGSGGQFMKSGSGSS.....STIDPFRSGSGSNNVSVSLSPSS	75
consensus	mkcf.....a a s.....d.....gse ns.....a a s	
铁皮石斛 (ANC68272.1)	VSEPFPSLHOKNNLRFETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	154
小兰屿蝴蝶兰 (XP_020589184.1)	VSEPFPSLHOKNNLRFETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	197
芦笋 (XP_020276044.1)	IGSCMPFSQSRSENLAVETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	154
莲 (XP_010253943.1)	MGEFPEFSLQSRSENLAVETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	152
棉花 (XP_016725497.1)	STANSEALSLQSRSENLAVETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	156
铁皮石斛 (XP_020698502.1)	VSEPFPSLHOKNNLRFETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	154
莼菜 (XP_013449997.1)	LRGNAHFLSLQSRSENLAVETSELNATNRSRSLVGEFGGCVYRGVGHEDFYATIEIAVKQLSRRLQGHKEWTEVNVGLGVVEHNLVAVLGVGC	175
consensus	q nl f el at f s m gegggf vy g.....avkql g qgh w tev lq v h n l v l gyc	
铁皮石斛 (ANC68272.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	254
小兰屿蝴蝶兰 (XP_020589184.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	297
芦笋 (XP_020276044.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	254
莲 (XP_010253943.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	252
棉花 (XP_016725497.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	256
铁皮石斛 (XP_020698502.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	254
莼菜 (XP_013449997.1)	AEDDERGIQRLLYVEYMPNRSVDEHLSRSTAPLQSMRLKIALDAARGLYLHEGMDQIIFRDFKTSNILLDDNNARLSDFGLARQGEGLSHVST	275
consensus	a derg qrlly yeympn sv hl l w r a daargl yhe m qzifrd k snilld w aksldfglar gp g h t	
铁皮石斛 (ANC68272.1)	VVVGTVGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	354
小兰屿蝴蝶兰 (XP_020589184.1)	VVVGTVGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	397
芦笋 (XP_020276044.1)	AVVGTIGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	354
莲 (XP_010253943.1)	AVVGTIGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	352
棉花 (XP_016725497.1)	AVVGTIGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	356
铁皮石斛 (XP_020698502.1)	AVVGTIGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	354
莼菜 (XP_013449997.1)	AVVGTIGYAAPEYIQTGRLLTAKSDIWSYGVLYELITGRREDRNPFKECEQLLEWVKEVMDPKRKEHLIDPRMGANESIKSARKLAAVANKCLIRQEK	375
consensus	vvgt gyaapey tg l k d w s qv lyelitgr p d nrp eq l ew p d kkf i dpr sa l an cl	
铁皮石斛 (ANC68272.1)	IRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	423
小兰屿蝴蝶兰 (XP_020589184.1)	IRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	465
芦笋 (XP_020276044.1)	SRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	431
莲 (XP_010253943.1)	SRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	426
棉花 (XP_016725497.1)	SRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	451
铁皮石斛 (XP_020698502.1)	SRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	430
莼菜 (XP_013449997.1)	SRPRMSEVLQVQSVIIDDIAEAEHCHISTFY.....KSGSRPSRSGAESRIGIDKML.....NREAPKLVRH.....	446
consensus	trp msev v k r.....w pk	

图 3 DoRLK 与其他植物 RLK 蛋白多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of DoRLK and RLK proteins from other plants

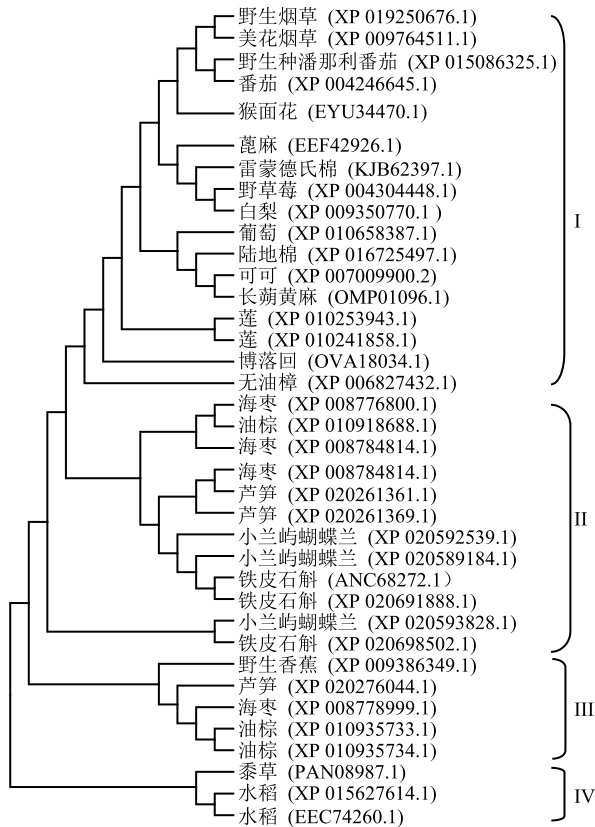


图 4 DoRLK 与植物 RLK 家族部分蛋白的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of DoRLK with some RLK proteins from plants

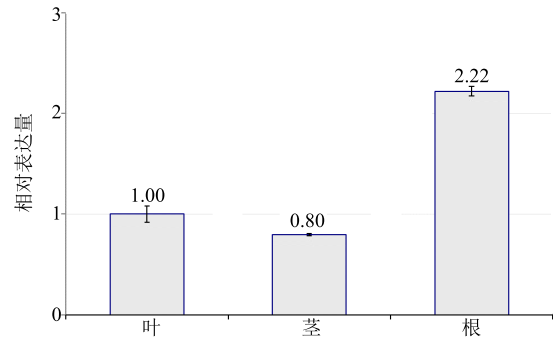


图 5 利用 qRT-PCR 分析 DoRLK 基因的组织表达模式

Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of DoRLK gene using qPCR analysis

蛋白质的结构与功能息息相关, 蛋白序列比对结果表明 DoRLK 与小兰屿蝴蝶兰 PBL19 一致性最高。PBL 蛋白属于 RLK 中的类受体胞质激酶 (receptor-like cytoplasmic kinase, RLCK), 含有 ATP 结合域和胞内激酶域, 缺少跨膜结构域和胞外结构域, 在调控植物生长发育, 尤其是植物免疫方面有重要作用^[14]。DoRLK 空间结构与拟南芥 BAK1 蛋白结构域序列类似, BAK1 在植物识别激发子类物质, 抵御病原菌入侵中发挥重要作用^[14]。因此, DoRLK 有可能参与生物胁迫应答调控。

植物中 RLK 的表达具有组织特异性。在水稻

的叶片及叶鞘中存在高表达的 OsLPR1 类受体激酶, 这说明该基因可能与水稻叶片的生长发育有关^[15]。而水稻中的 OsRPK1 类受体激酶则在根和叶中表达量最高, 茎中的表达量明显较低, 它可能参与了水稻对外源生长素的信号识别^[16]。在非洲菊的舌状花、管状花、萼片、叶片和根中 Gj RLK1 基因均有表达, 且在舌状花和花萼中的相对表达量较高, Gj RLK1 参与了细胞分裂素调控的菊花衰老过程^[17]。番茄中富含半胱氨酸的类受体激酶 SICRK1 在花粉中的表达量要高于根、叶、果实和种子其他组织^[13]。棉花中的 RLK 基因 GRLK5 种子中的表达量最高, 而在花蕾、花瓣、子房、木质部和叶片中表达量偏低^[18]。植物的组织特异性表达与其发育、营养物质运输及植物与微生物互作方面密切相关。本研究中 qRT-PCR 分析表明 DoRLK 基因在石斛根中的表达量较高, 茎中最少, 这说明了该基因通过特异的分子表达机制参与植物组织的生长发育, DoRLK 基因在根中的高表达特征暗示其很可能在石斛根中执行重要的功能, 可能影响其根的形成, 参与根与根际微生物互作过程。

铁皮石斛具有较高的药用价值, 野生资源稀少, 是我国濒危药物植物之一。大多数 RLK 基因参与植物对逆境胁迫的响应, 对铁皮石斛 RLK 家族基因成员的研究, 将为增强石斛抗逆性、保护野生资源、提高石斛抗病免疫力、品质形成的分子机制提供基础资料。本研究中 DoRLK 蛋白序列与小兰屿蝴蝶兰 PBL19 高度相似, 空间结构上与拟南芥 BAK1 蛋白结构域序列类似, 以及 DoRLK 在根中的高表达都表明 DoRLK 有可能参与根对土壤环境的响应, 然而, DoRLK 在 RLK 家族中的具体分类和作用机制尚不明确, 后续将进一步研究 DoRLK 基因家族的表达模式和生物学功能, 为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质提供理论支撑。

参考文献

- [1] 李莉云, 靳苗静, 刘 茜, 等. 植物类受体激酶的功能与底物鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(2): 113-119.
- [2] Fischer I, Dievart A, Droc G, *et al.* Evolutionary dynamics of the leucine-rich repeats receptor-like kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(3): 1595-1610.
- [3] Kimura S, Waszczak C, Hunter K, *et al.* Bound by Fate: The role of reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(4): 638-654.
- [4] 商业绯, 李 明, 丁 博, 等. 生长素调控植物气孔发育的研究进展 [J]. 植物学报, 2017, 52(2): 235-240.
- [5] 曹玉婷, 丁艳菲, 朱 诚. 类受体蛋白激酶与植物非生物胁迫应答 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(3): 241-247.
- [6] 卫卓赞, 黎 家. SERKs, 拟南芥中一组参与多条细胞信号传导途径的共受体 [J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 789-797.
- [7] 陈现朝, 周永力. BAK1 调控植物免疫信号识别和转导的分子机制 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1102-1107.
- [8] 陆佳楠, 叶娟英, 许俊旭, 等. 定量蛋白质组学方法揭示受体蛋白激酶 EMS1 调控拟南芥花药发育的下游信号网络 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1287-1296.
- [9] 王 旭, 杨少辉, 王洁华. CLE 多肽激素信号转导在植物维管系统发育分化中的作用 [J]. 林业科学, 2011, 47(11): 160-165.
- [10] 张 岗, 刘思思, 彭 亮, 等. 铁皮石斛转录因子基因 DoWRKY3 的克隆与分子特性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2930-2936.
- [11] 赵明明, 张 岗, 宋 超, 等. 铁皮石斛种子接菌共生萌发抑制差减杂交文库的构建及序列分析 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(5): 341-345.
- [12] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [13] 郑 超, 李登高, 白 薇. 植物富含半胱氨酸的类受体激酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 10-17.
- [14] Lin Z J D, Liebrand T W H, Yadeta K A, *et al.* PBL13 is a serine/threonine protein kinase that negatively regulates *Arabidopsis* immune responses [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169: 2950-2962.
- [15] 宋 婷, 熊 炜, 李莹莹, 等. 一个水稻富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的 RNAi 及表达分析 [J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2016, 36(1): 48-51.
- [16] Zou Y, Liu X, Wang Q, *et al.* OsRPK1, a novel leucine-rich repeat receptor-like kinase, negatively regulates polar auxin transport and root development in rice [J]. *BBA-Gen Subjects*, 2014, 1840(6): 1676-1685.
- [17] 王 迪. 非洲菊切花类受体蛋白激酶基因的克隆与表达分析 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2015.
- [18] 杨郁文, 何 冰, 张保龙, 等. 一个棉花类受体蛋白激酶基因的克隆与表达分析 [J]. 棉花学报, 2011, 23(1): 15-21.