

# 水稻冷应答类受体蛋白激酶 Os-RLK1初探

汇报人：杨圣  
组 员：李鑫  
钟超  
徐雷锋



研究背景

基本信息

构建进化树

RLK1蛋白结构预测

实验计划

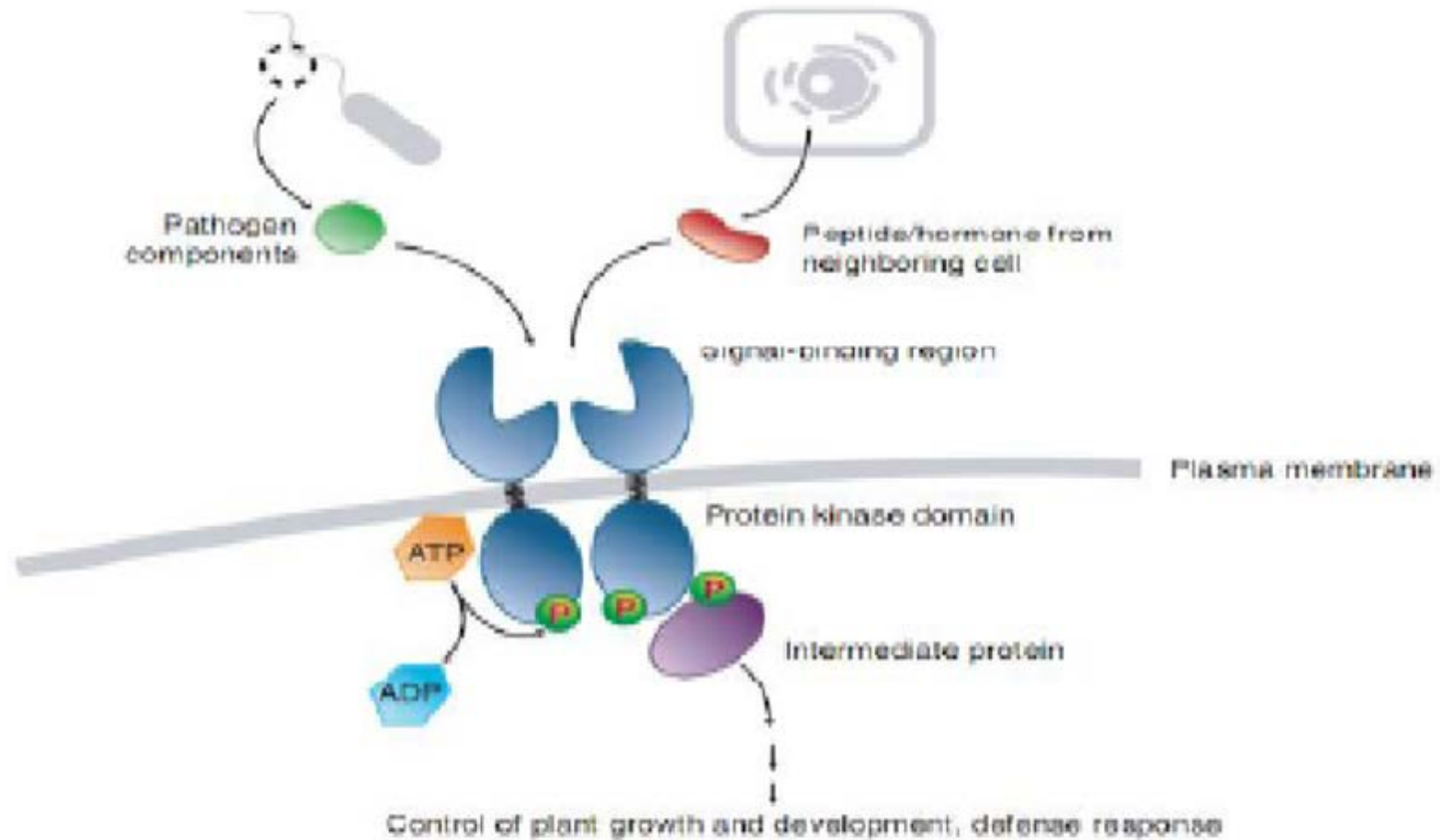
# 一 研究背景

- \* 植物类受体蛋白激酶(receptorlikeproteinkinase,RLKs)在植物的信号转导途径中发挥着重要作用。因其在植物抗逆相关方面的作用，希望通过对某些RLKs的透彻研究，最终利用基因改造提高农作物产量和对生物和非生物胁迫的抗逆性。

# 植物RLKs四个主要结构域

- \* 1.胞外结构域(extracellularligandbindingdomain,ECLB)
- \* 2.跨膜结构域(transmembranedomain,TM)
- \* 3.保守的胞内激酶结构域(proteinkinasecatalyticdomain,PKC)
- \* 4.N端信号肽 (N-terminalsignalpeptide,SP)

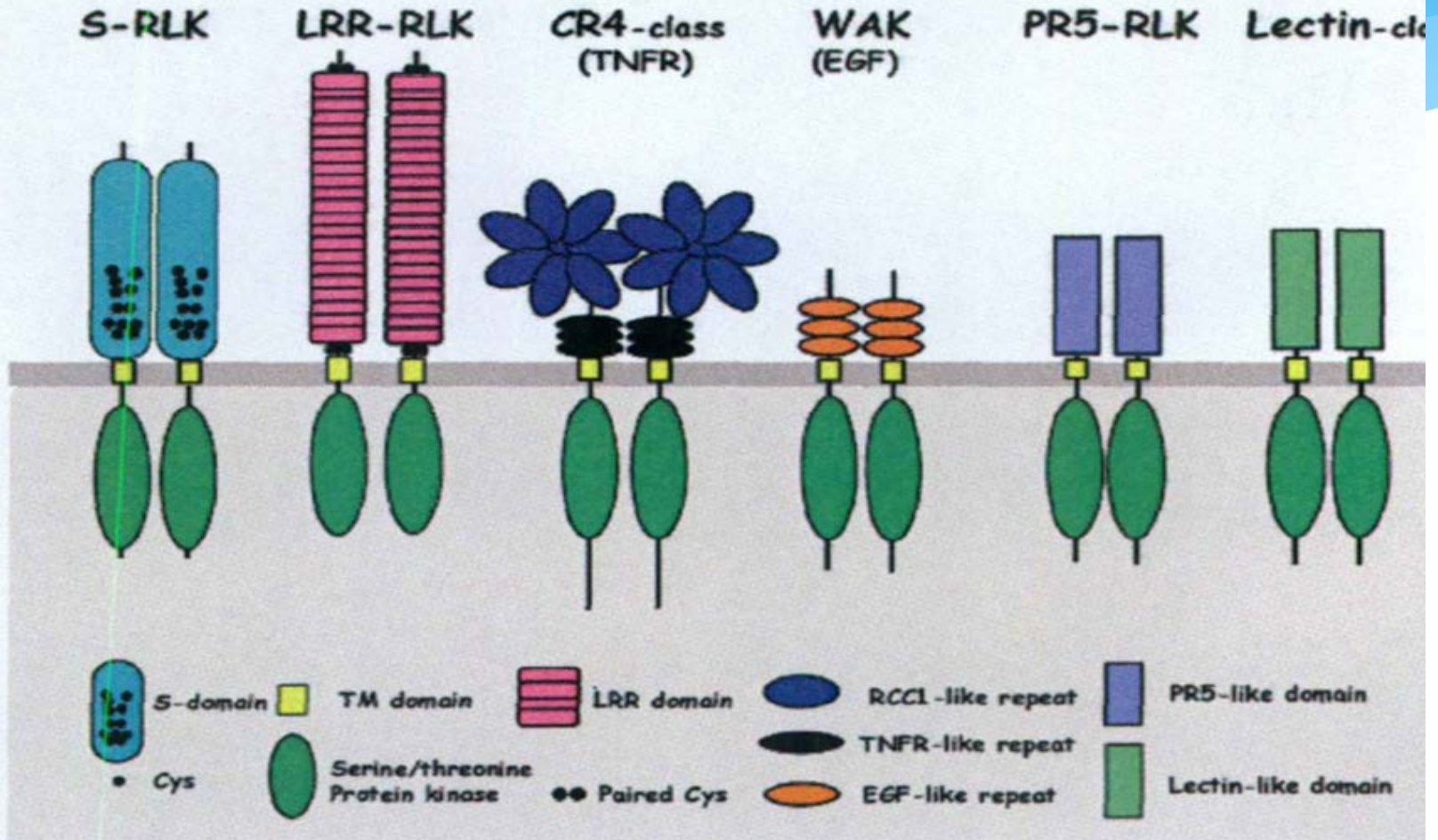
# 植物类受体激酶的结构模型与工作原理



# RLKs主要分为以下6类：

- \* 1 具有S-结构域（S-domain）型RLK
- \* 2 富含亮氨酸重复序列（leucine-rich repeats, LRRs）型RLK
- \* 3 WAK(Wall-associated kinase)类RLK
- \* 4 PRS(pathogenesis related proteins)类RLK
- \* 5 PERK和CRINKLY类似的RLK
- \* 6 凝集素型（lectin-like）RLK

# 植物类受体激酶按胞外结构域的分类

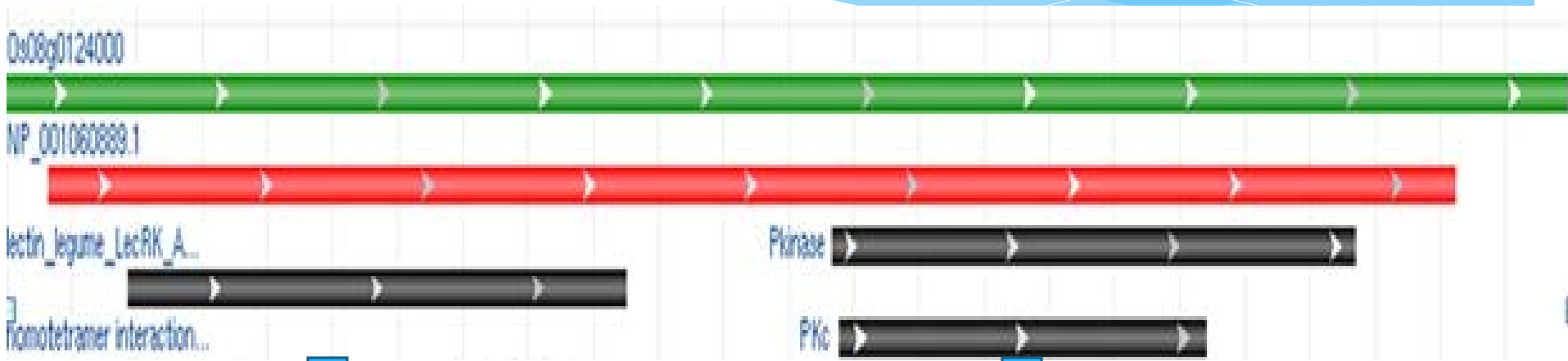




\* 我们实验室利用粳稻C418为背景，籼稻Bg300为供体，构建了一批耐冷导入系群体K354，并在这批导入系中定位了耐冷相关QTL。利用基因芯片对C418和K354在冷胁迫条件下的全基因组表达谱进行了比较分析，在第8染色体的耐冷QTL区域内筛选到一个K354特异的受冷胁迫诱导的类受体蛋白激酶（receptor-like kinases, RLK）基因Os-RLK1（Cold induced RLK1）。

## 二 基本信息

# NCBI



凝集素

激酶

# Uniprot

- \* 全长：719AA
- \* 分子功能：丝/苏氨酸蛋白激酶
- \* 受体
- \* 转移酶

猜测：凝集素类受体蛋白

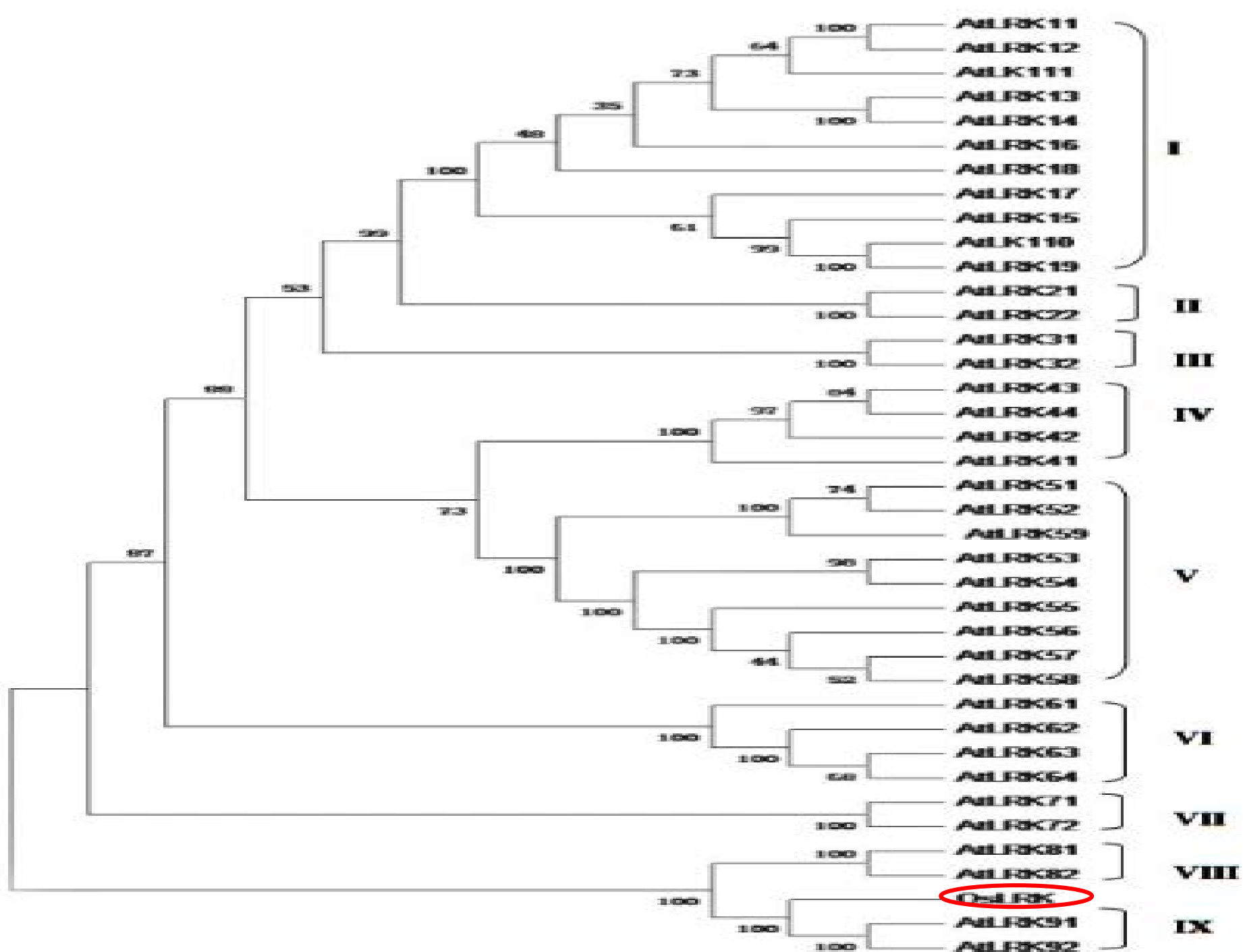


# 三 构建进化树

➤ 在Uniprot中搜索出了拟南芥的凝集素

➤ 下载39个标注过的蛋白序列

➤ 使用MEGA 5.0构建系统进化树





# 三 RLK1蛋白结构预测

+ GTCGTGTCCA	ACAAGACCTT	GACCTTGCCC	AGCTTCACCC	TCGTCGGGAA	CATGACCGCC	GTCGTGAGT
- CAGCACAGGT	TGTTCTGGAA	CTGGAACGGG	TCGAAGTGGG	AGCAGCCCTT	GTACTGGCGG	CAGCAGCTCA
+ ACGACAACGT	CTCCAGCATC	CTGGCCATGA	GGCTGCACCT	CGGCTATGGG	CTTAGTGGCC	CCCGTCACCG
- TGCTGTTGCA	GAGGTCGTAG	GACCGGTACT	CCGACGTGGA	GCCGATACCC	GAATCACCGG	GGGCAGTGGC
+ GCCGGATTAC	AACCTTAGCT	ACAAGGTTGA	CCTCAAGAGC	GTGCTGCCGG	AGCTGGTCTC	CGTTGGCTTC
- CGGCCTAATG	TTGGAATCGA	TGTTCCAAC	GGAGTTCTCG	CACGACGGCC	TCGACCAGAG	GCAACCGAAG
+ TCCGCCTCCA	CGACCACATC	CTTTGAGCTG	CATCAGCTGC	ATTCATGGTA	TTTCAGCTCA	TCGTTGGAAC
- AGGCGGAGGT	GCTGGTGTAG	GAAACTCGAC	GTAGTCGACG	TAAGTACCAT	AAAGTCGAGT	AGCAACCTTG
+ CAAAGGCCGC	GGTGCCTGGC	AGAGTTGTAG	CGGGAGCCAC	CGTTGGCAGC	GTAATGTTTCG	TCATACTCCT
- GTTCCGGCG	CCACGCACCG	TCTCAACATC	GCCCTCGGTG	GCAACCCTGC	CATTACAAGC	AGTATGAGGA
+ CTTCGCCATG	GTAGCAGTCC	TTGTACGACA	ACGTCAGAGC	AAGAAGAGGG	AGACAGAGGA	GGCAAAGAAC
- GAAGCGGTAC	CATCGTCAGG	AACATGCTGT	TGCAGTCTCG	TTCTTCTCCC	TCTGTCTCCT	CCGTTTCTTG
+ GGAGGCATGG	ATGGCAGCGA	CGACGACGAT	GACGACGACG	GCGAGACCAT	CGTAGAGATC	GAGATGGGGA
- CCTCCGTACC	TACCGTCGCT	GCTGCTGCTA	CTGCTGCTGC	CGCTCTGGTA	GCATCTCTAG	CTCTACCCCT
+ CGGGGCCAAG	GCGATTTCCA	TACTACGAAC	TTGTTCGAGGC	GACCAAGAGT	TTGCGGGCGG	AGGAGAAGCT
- GCCCCGGTTC	CGCTAAAGGT	ATGATGCTTG	AACAGCTCCG	CTGGTTCTCA	AAGCGCCGCC	TCCTCTTCGA
+ TGGGCAAGGC	GGTTTCGGCA	CAGTGTATCG	GGGCTACCTC	AGAGAGCAGG	GCCTCGCCGT	CGCCATAAAG
- ACCCGTTCCG	CCAAAGCCGT	GTCACATAGC	CCCATGGAG	TCTCTCGTCC	CGGAGCGGCA	GCGGTATTTT
+ AGATTCACCA	AAGATTCCTC	CAAGCAAGGC	AGGAAGGAGT	ACAAGTCAGA	GATCAAGGTC	ATAAGCCGTC
- TCTAAGTGGT	TTCTAAGGAG	GTPCGTTCCG	TCCTTCTCA	TGTTTCAGTCT	CTAGTTCCAG	TATTCGGCAG
+ TGCGCCACCG	CAATCTCGTG	CAGCTCATCG	GCTGGTGCCA	TGGCCACGAC	GAGCTCCTTC	TTGTTTACGA
- ACGCGGTGGC	GTTAGAGCAC	GTCGAGTAGC	CGACCACGGT	ACCGGTGCTG	CTCGAGGAAG	AACAAATGCT
+ GCTCGTCCCC	AACCGTAGCC	TCGACATCCA	TCTCCACGGC	AATGGCACCT	TCCTCACATG	GCCAATGAGG
- CGAGCAGGGG	TTGGCATCGG	AGCTGTAGGT	AGAGGTGCCG	TTACCGTGGA	AGGAGTGTAC	CGGTTACTCC
+ TTATTAUCTC	TTGCTAATTT	TGTCTTAATC	TTTGTAGTGT	CAACTTAATT	GGCGAACATA	TTGTCAAATT
- AATAATGAG	AACGATTA	ACAGAATTAG	AAACATCACA	GTTGAATTAA	CCGCTTGTAT	AACAGTTTAA
+ TTAATCAGGT	TTACGAACTT	GCTAAGTGCA	CATCGAGATC	TCTAAACTTG	GTTTAGAGTA	TCATCTCGGT
- AATGAGTCCA	AATGCTTGAA	CGATTCACGT	GTAGCTCTAG	AGATTTGAAC	CAAATCTCAT	AGTAGAGCCA
+ CCAAAGCCGC	GTTTGACCGT	GCTCTTGCC				
- GGTTCGGCG	CAAACCTGGCA	CGAGAACGG				



plantCARE 启动子区分析

## CGTCA-motif

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence
<a href="#">CGTCA-motif</a>	Hordeum vulgare	623	+	5	CGTCA
<a href="#">CGTCA-motif</a>	Hordeum vulgare	872	+	5	CGTCA
<a href="#">CGTCA-motif</a>	Hordeum vulgare	829	+	5	CGTCA
<a href="#">CGTCA-motif</a>	Hordeum vulgare	940	-	5	CGTCA

## LTR

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence
<a href="#">LTR</a>	Hordeum vulgare	1063	-	6	CCGAAA

## MBS

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence
<a href="#">MBS</a>	Zea mays	543	-	6	CGGTCA
<a href="#">MBS</a>	Zea mays	1484	-	6	CGGTCA

## TGACG-motif

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence
<a href="#">TGACG-motif</a>	Hordeum vulgare	623	-	5	TGACG
<a href="#">TGACG-motif</a>	Hordeum vulgare	872	-	5	TGACG
<a href="#">TGACG-motif</a>	Hordeum vulgare	829	-	5	TGACG
<a href="#">TGACG-motif</a>	Hordeum vulgare	940	+	5	TGACG

# 结果

RLK1基因的调控区域存在MeJA激素顺式作用元件TGACG-motif、CGTCA-motif，响应低温胁迫的顺式作用元件LTR，转录因子MYB家族结合位点MBS，所以该基因的转录可能受激素、冷胁迫、MYB的诱导，该基因的最终表达蛋白可能参与了激素信号的转导，植物对冷胁迫的响应的转导。

# 信号肽预测

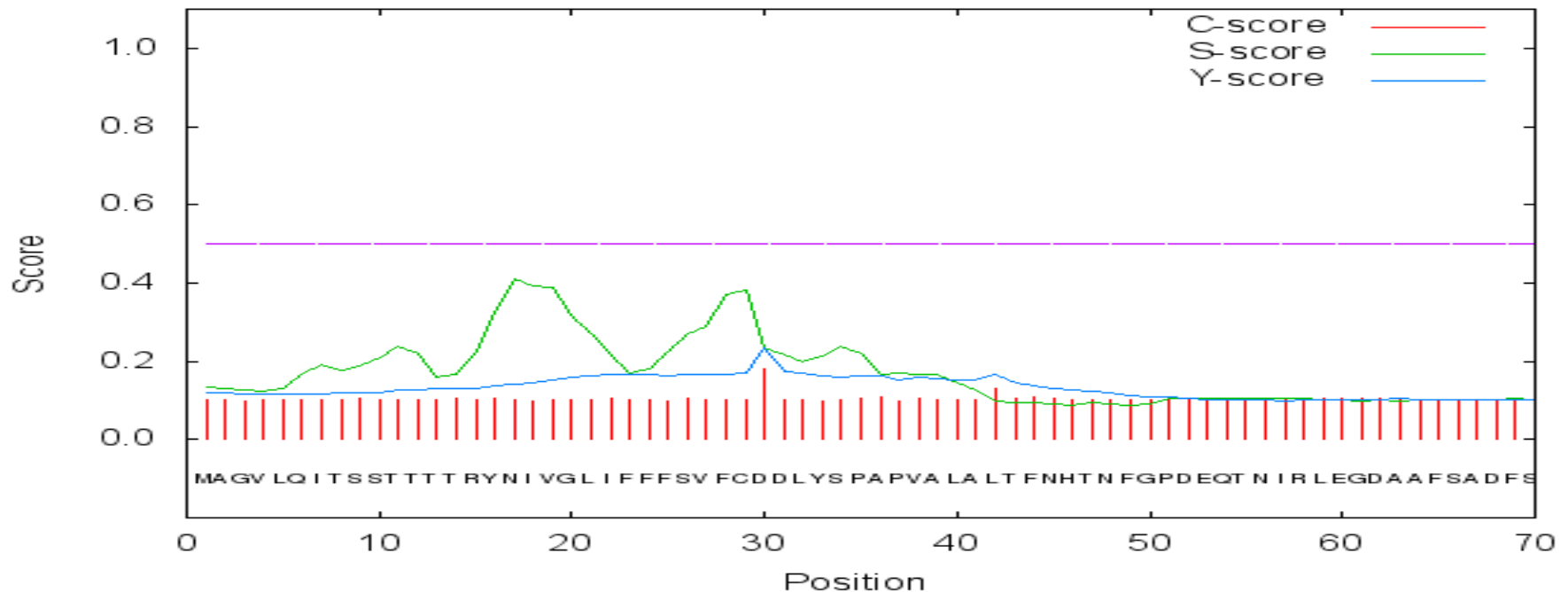
\* 通常的信号肽序列具有以下特征

一般含有15—30个氨基酸残基，在N端或接近N端的位置有1—7个亲水的极性氨基酸残基，带正电荷，此外，还存在一个由7—8个疏水的氨基酸残基组成的疏水核心。

# SignalP 4.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

SignalP-4.1 prediction (euk networks): Os08g0124000



# 预测结果

- \* 没有信号肽
- \* PERK家族成员没有N端信号肽结构，尽管缺乏N端信号肽，试验证实PERKI蛋白也定位在细胞膜上。

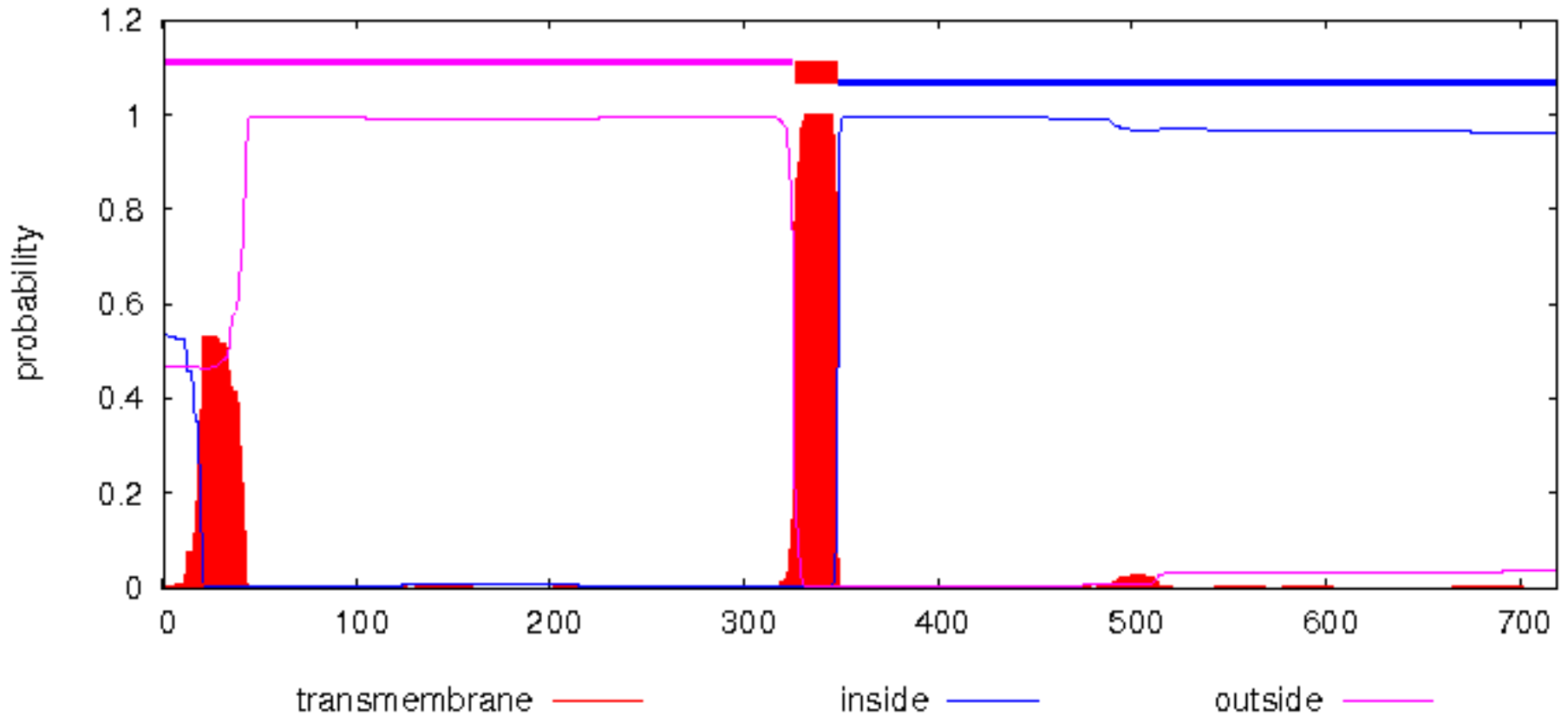
# 跨膜区预测

- \* 跨膜结构域一般由20个左右的疏水氨基酸残基组成，形成 $\alpha$ -螺旋(长度约3nm左右)，其外部疏水侧链通过范德华力与脂双层分子脂肪酸链(厚度约3.2nm)相互作用，是膜中蛋白与膜脂相结合的主要部位。



# TMHMM软件

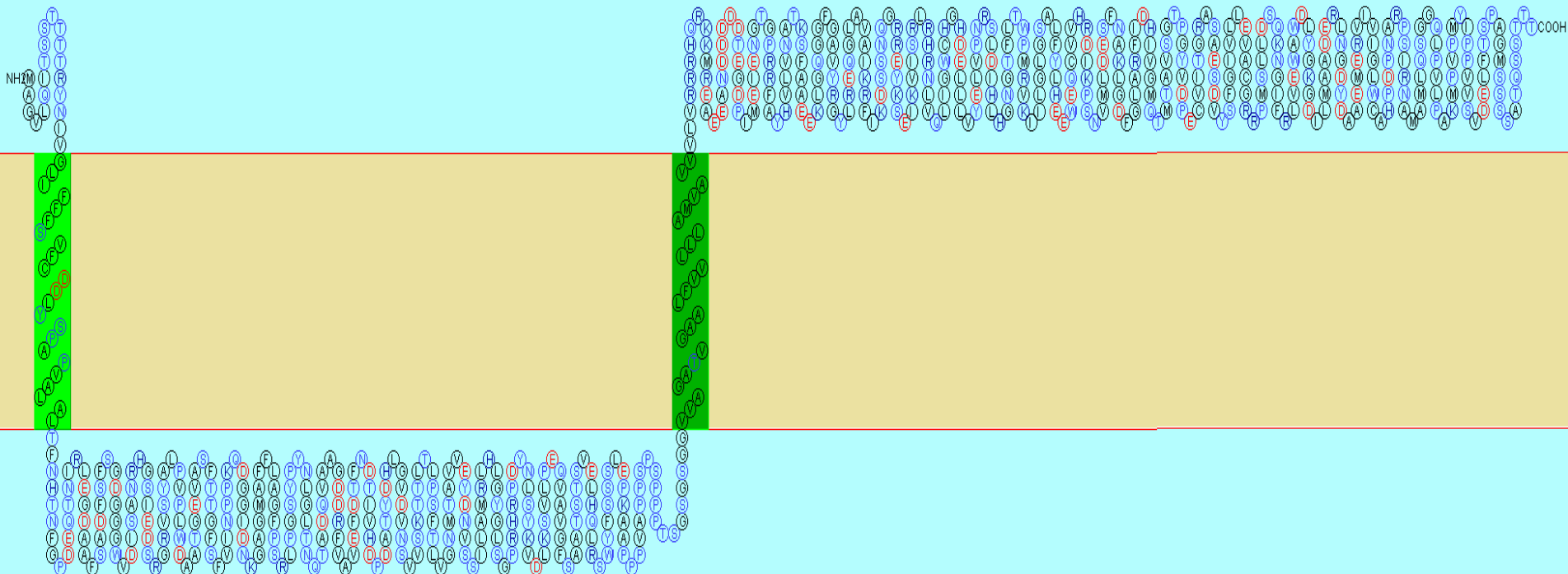
TMHMM posterior probabilities for Os08g0124000



跨膜区：326——348

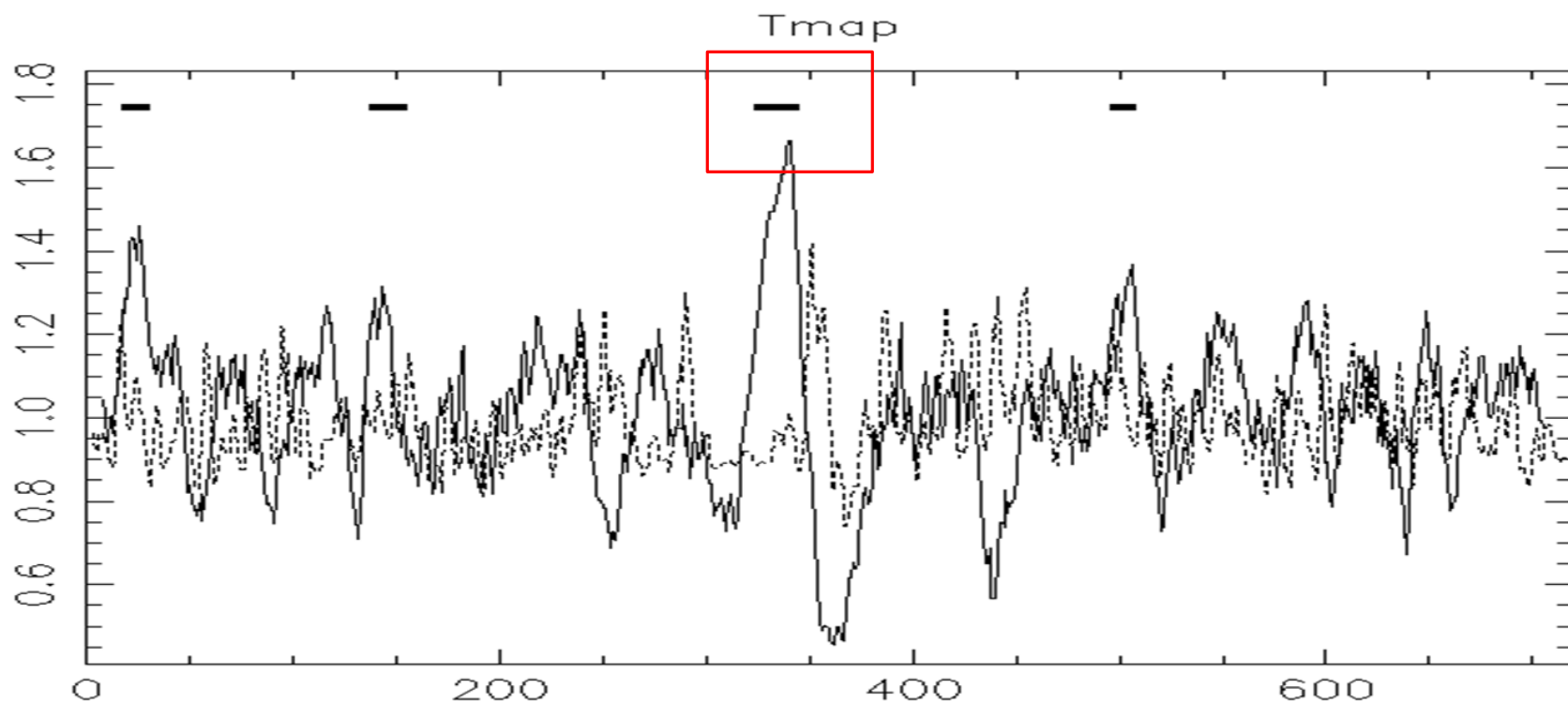
# Nagoya 软件

PRIMARY HELIX  
SECONDARY HELIX



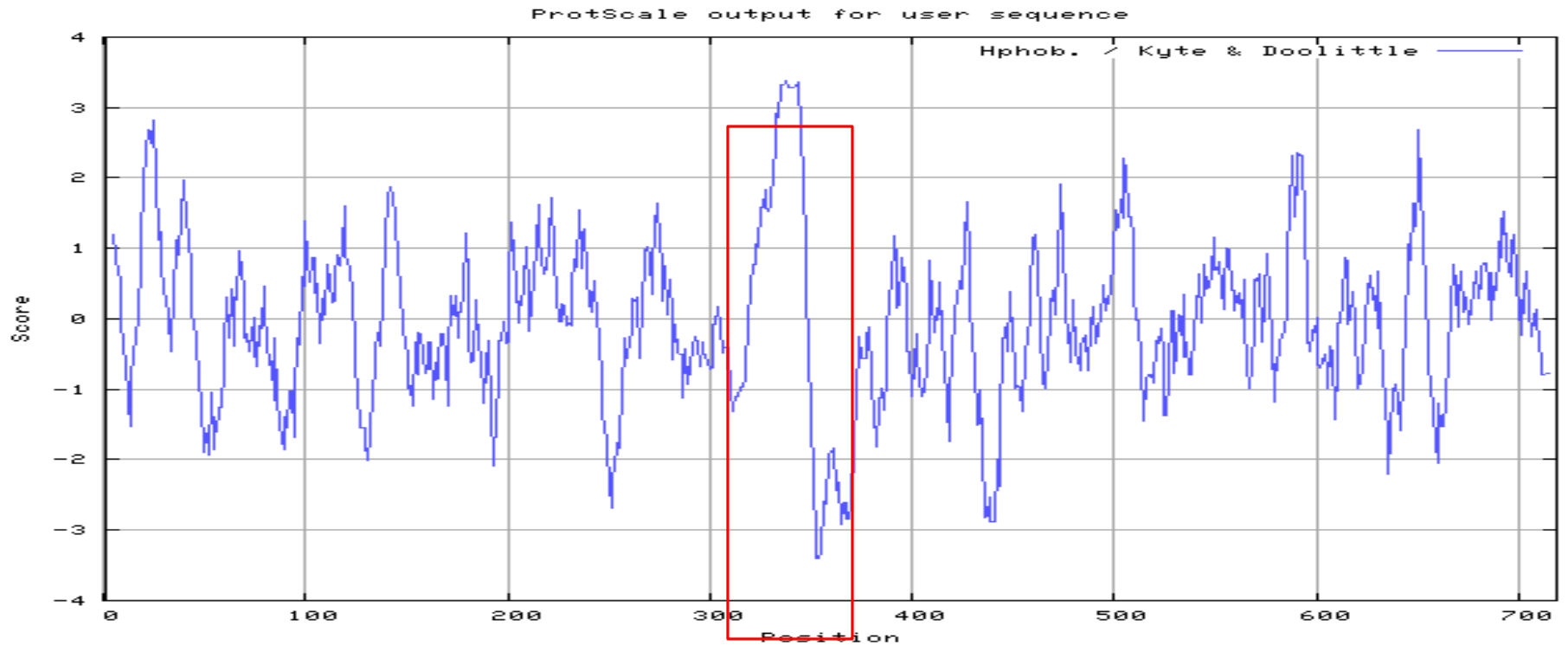
跨膜区：28——50  
331——353

# tmap



跨膜区：320——348

# 疏水性预测



亲水性蛋白

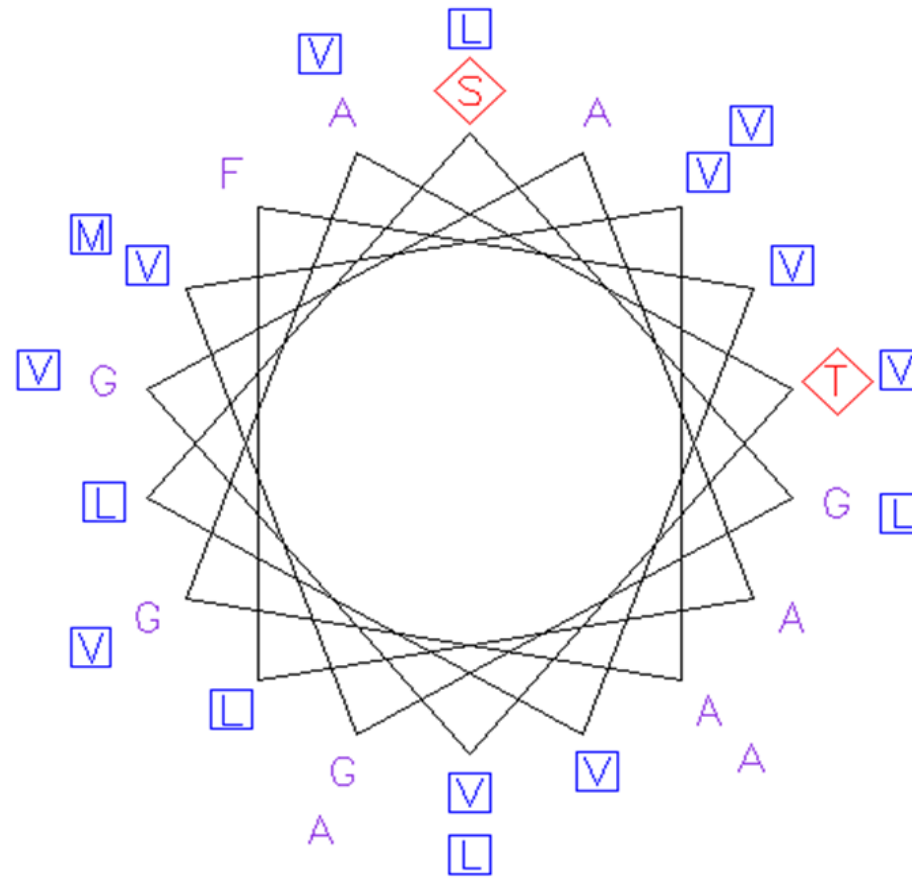
# 跨膜预测结果

- \* RLK1为跨膜蛋白，可能是单跨膜。
- \* 胞外区：1——319
- \* 跨膜区：320——348
- \* 胞内区：349——719

# 选取320-348位氨基酸残基序列用 pepwheel画螺旋图

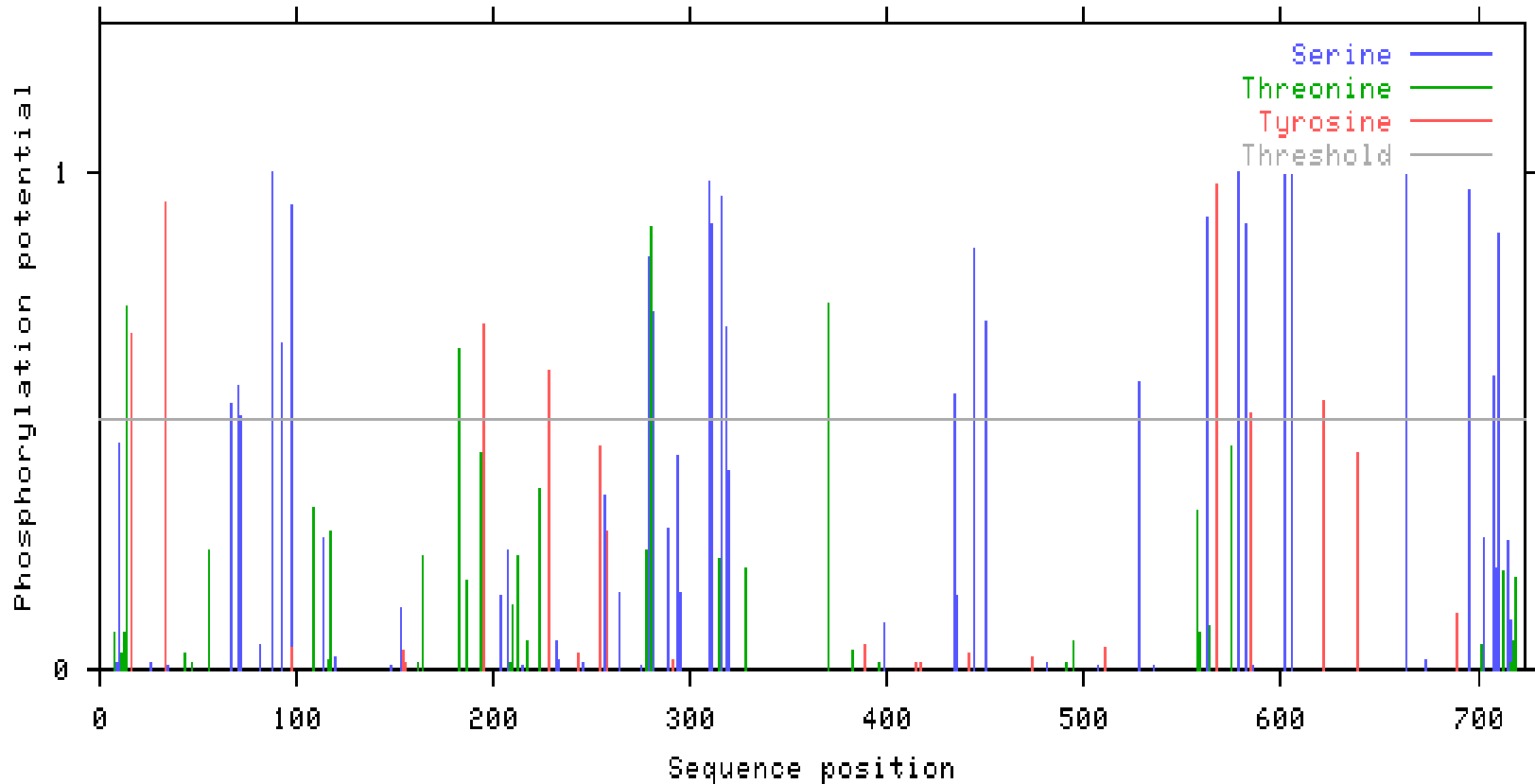
Helical wheel of raw::604686

Sat 30 Mar 2013 21:26:39



# NetPhos 2.0 预测磷酸化位点

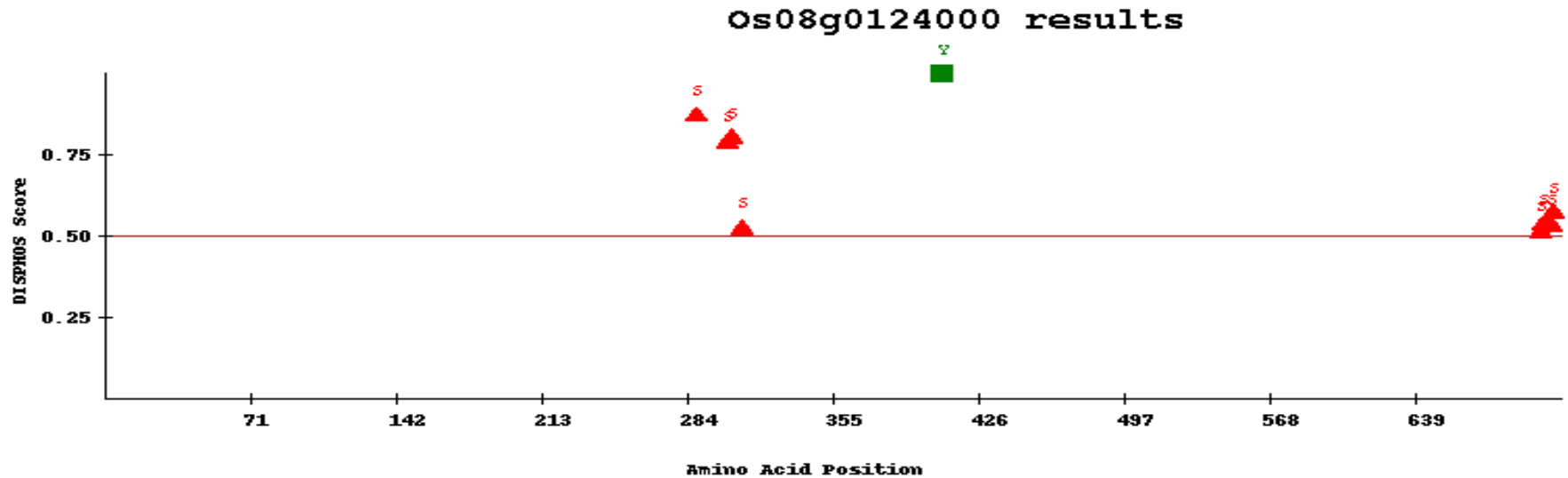
NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in Os08g012400



- \* 丝氨酸位点: 66、70、72、88、92、97、279、281、309、311、316、318、434、444、450、528、562、579、582、602、606、664、696、708、 、 711
- \* 苏氨酸位点: 13、182、280、370
- \* 酪氨酸位点: 16、33、195、228、567、585、622



# DISPHOS Results



S: 293、309、311、316、710、711、715、716  
Y: 414

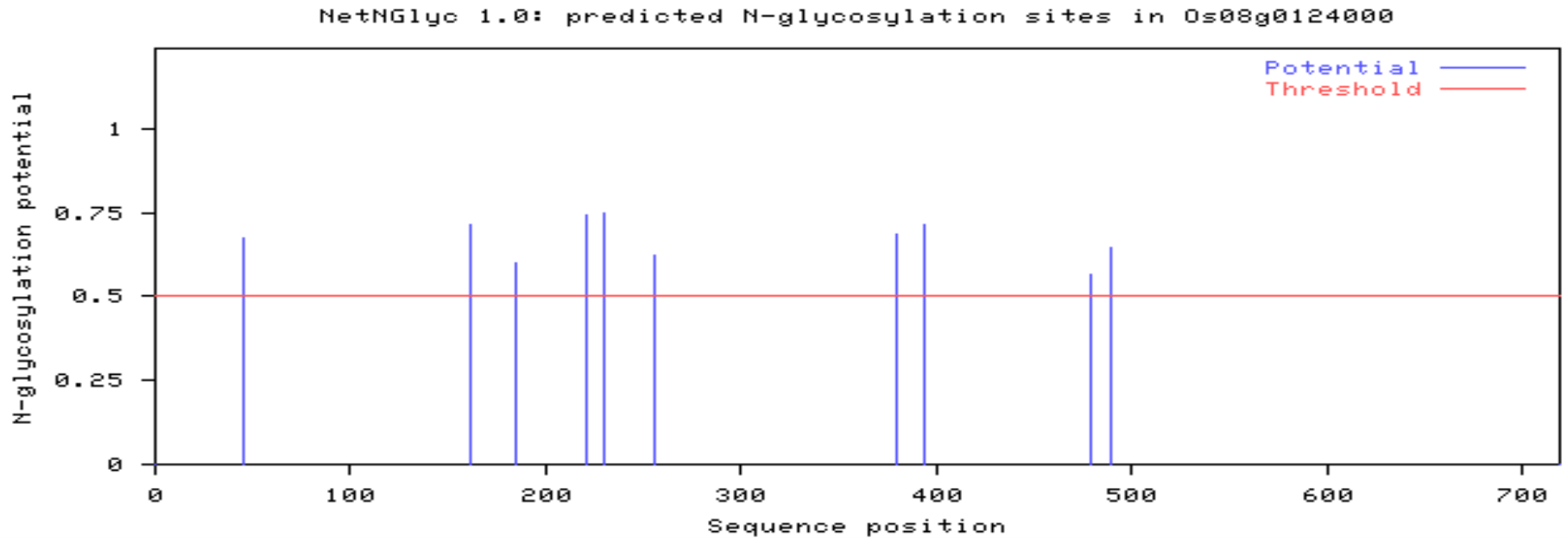
\* 预测出的共同位点:

S: 309 311 316 711



丝氨酸蛋白激酶

# 糖基化预测



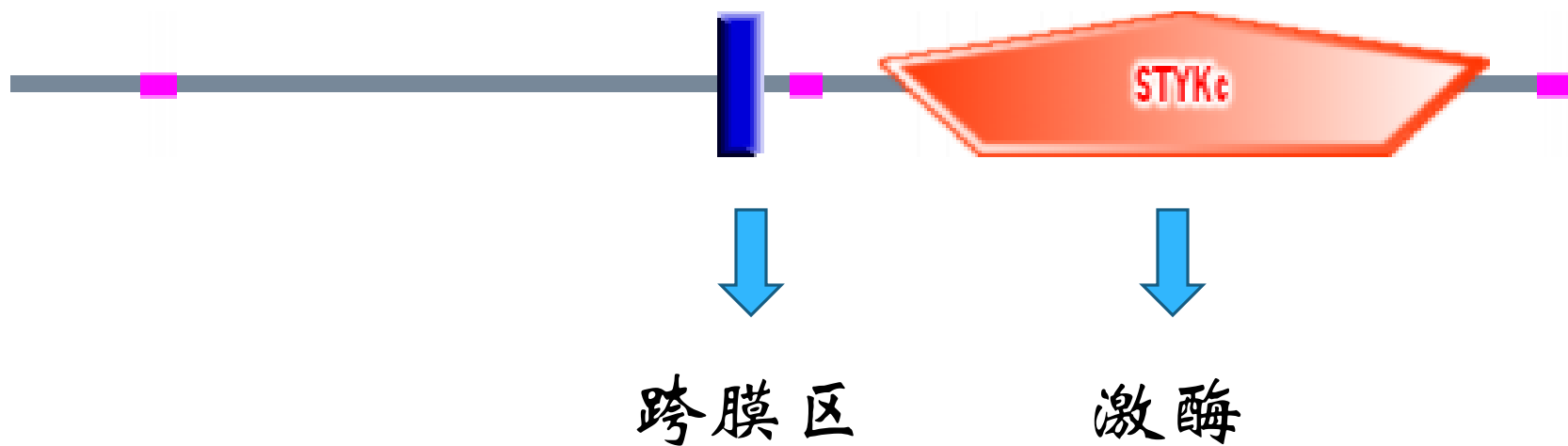
162、221、230、380、394



配体识别

# SMART

## SMART 结构域预测



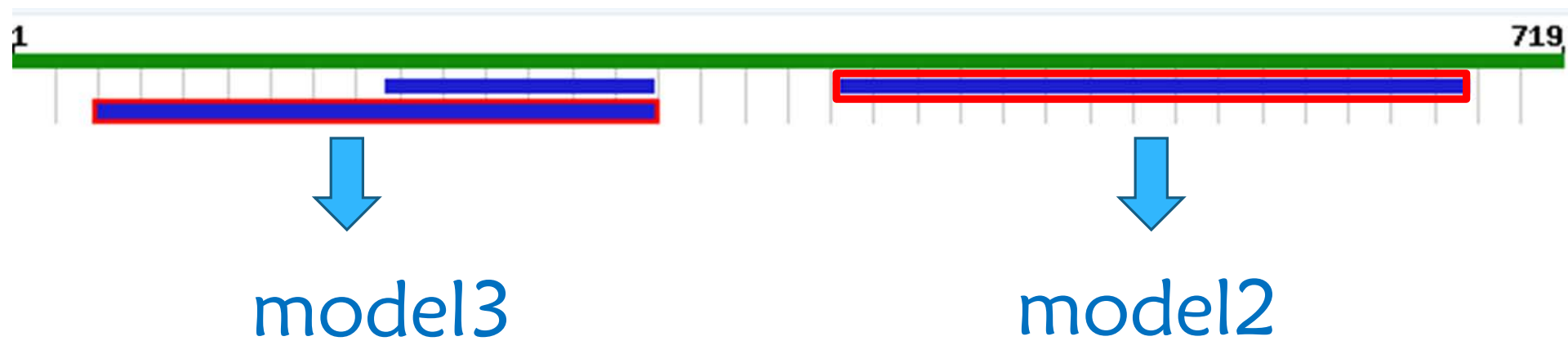
与跨膜预测相符

# 初步判断

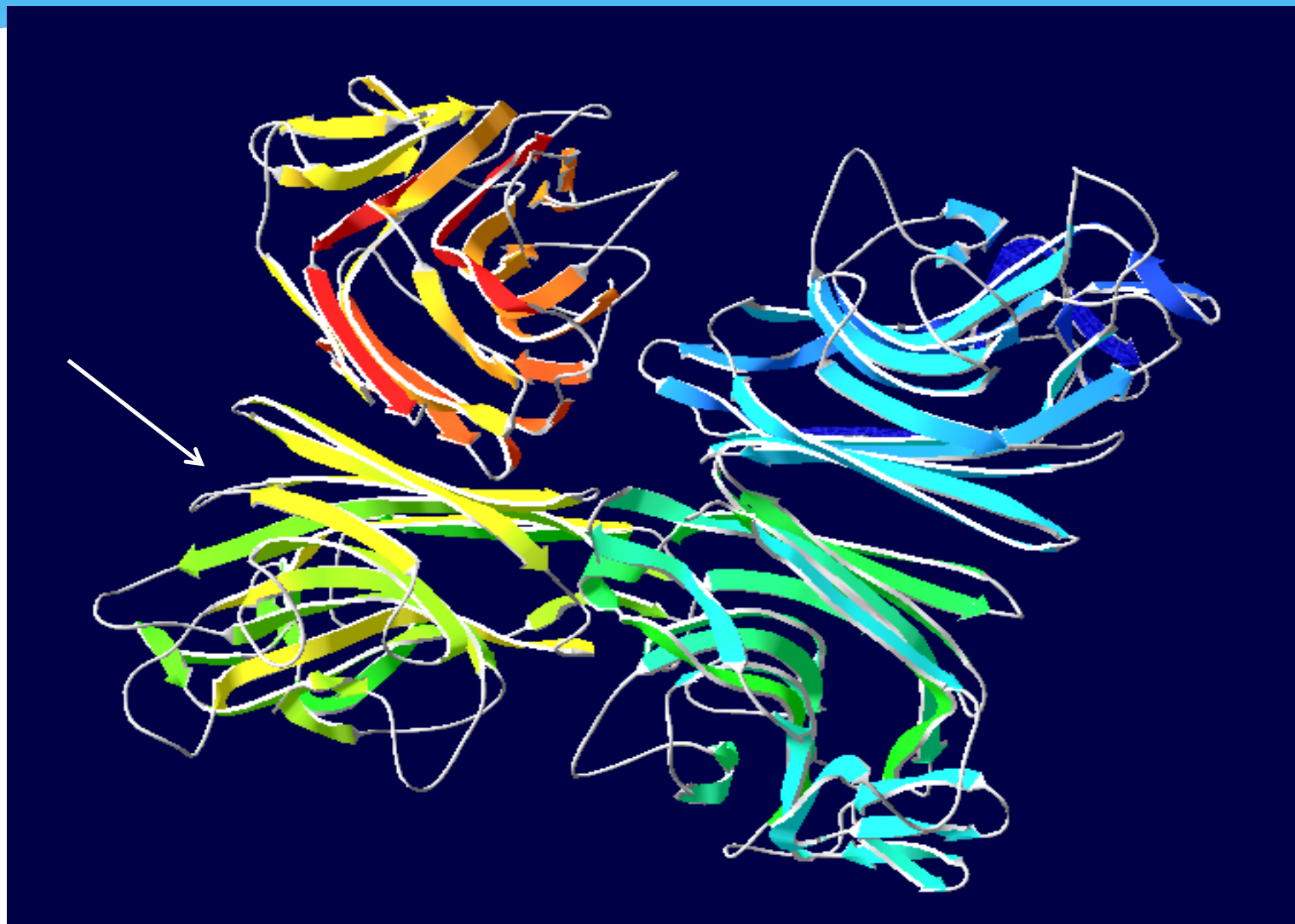
- \* RLK1蛋白属于丝氨酸蛋白激酶
- \* 具有磷酸化和自我磷酸化活性

# 同源建模分析

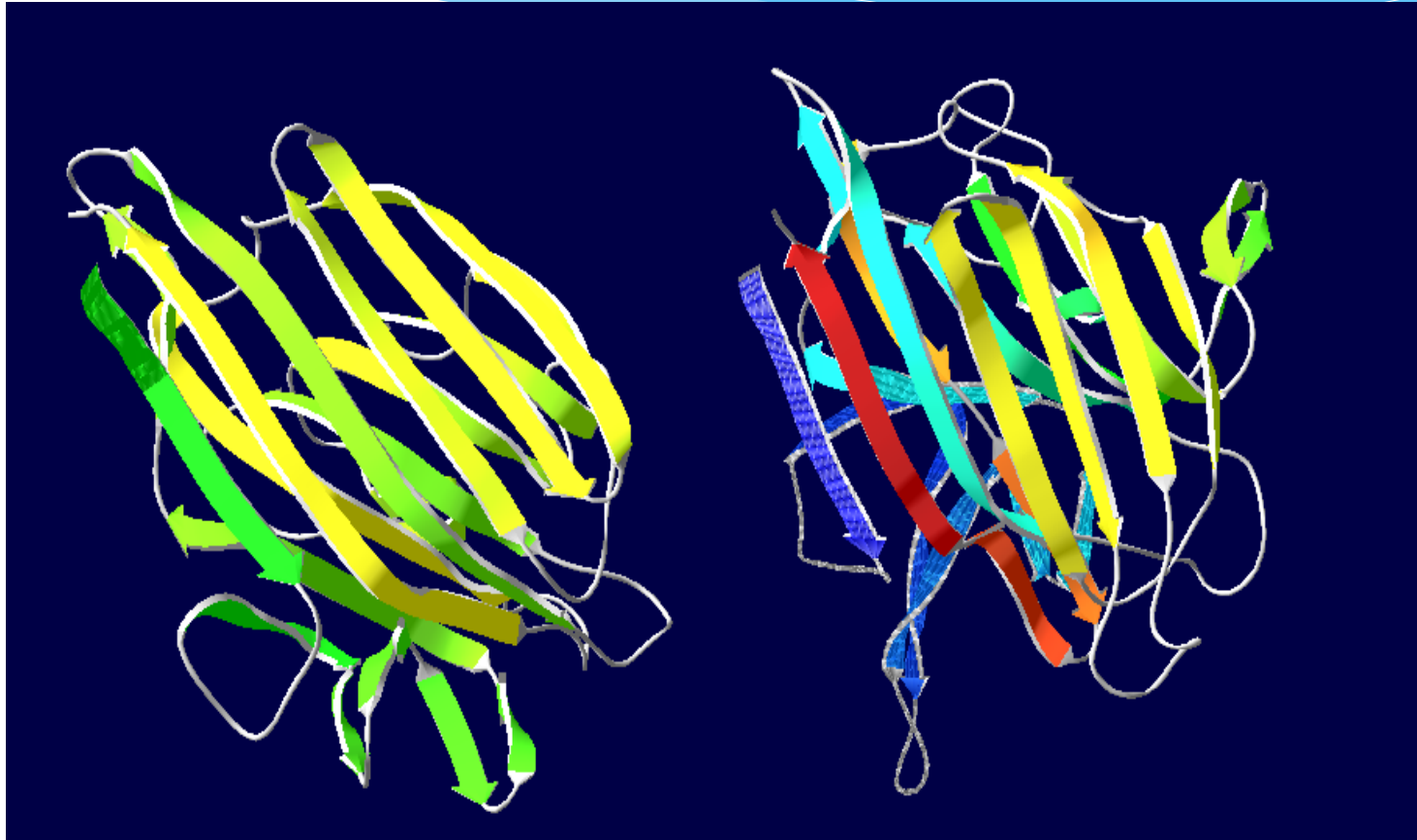
Swiss model



# Model3 模板: WINGED BEAN LECTIN



# Model<sub>3</sub>—<sub>3</sub>TL8

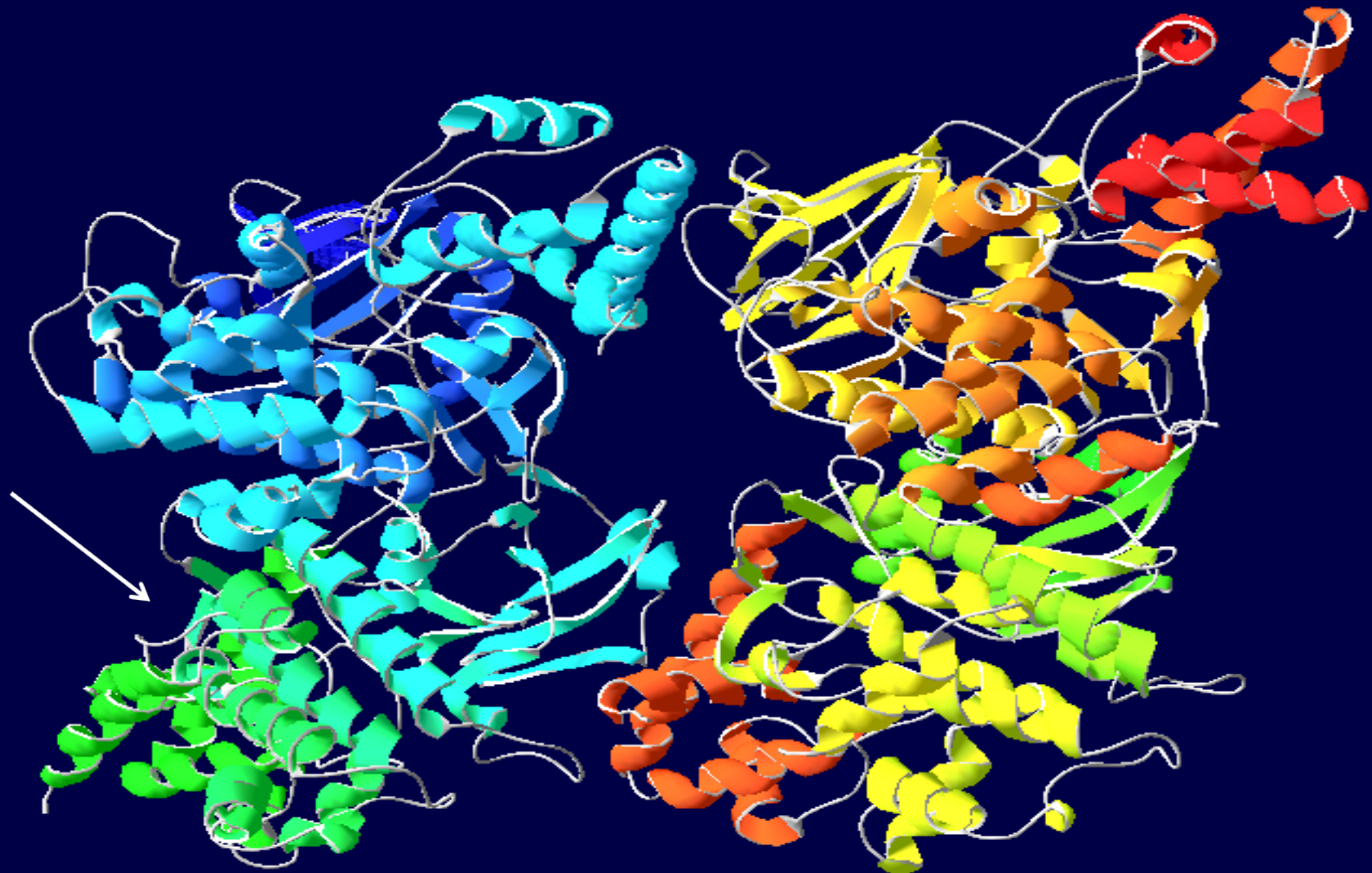




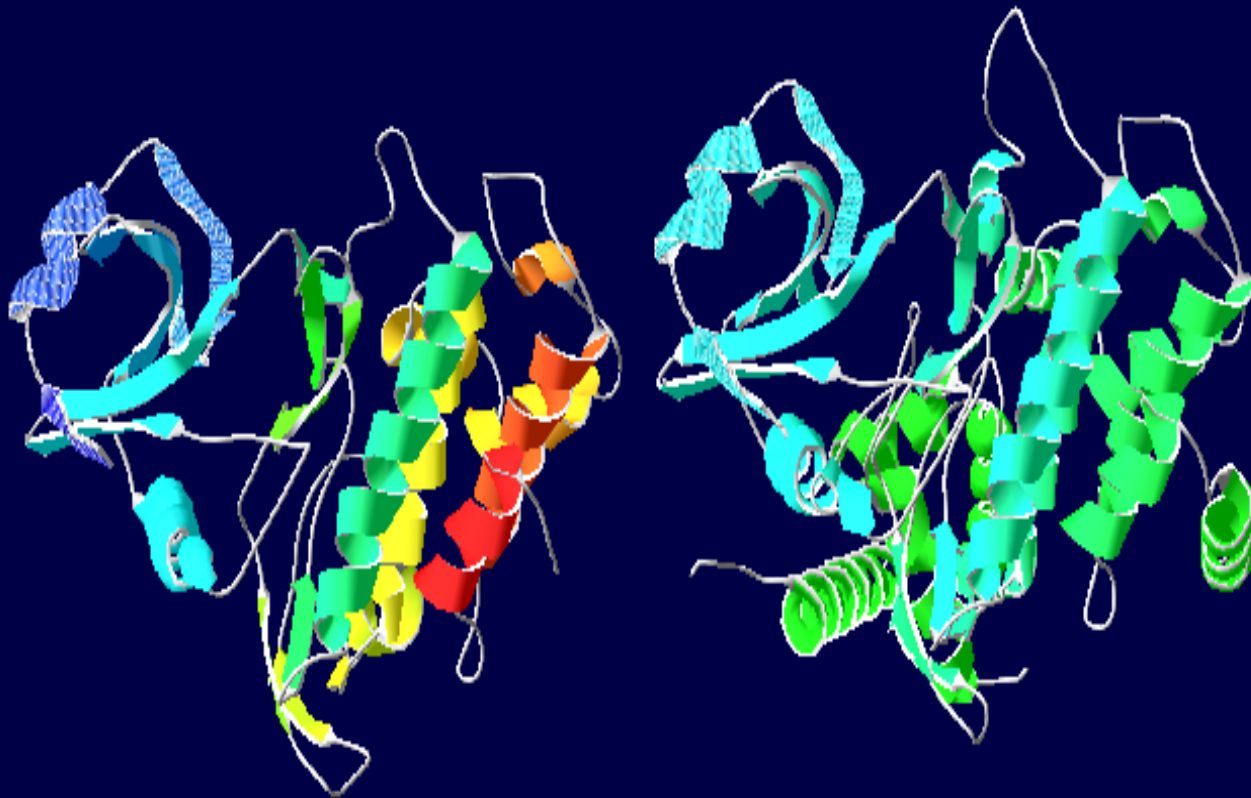
# 文献

- \* 通过生物信息学的手段对LecRK的序列和蛋白的三维结构模型的分析表明,在凝集素类似的结构域的 $\beta$ 折叠之间形成了一个疏水的空腔,这个疏水部位很可能会结合疏水的植物激素分子。
- \* 与构建的模型相符

# Model2 模板: AVRPTOB-BAK1 COMPLEX



# Model<sub>3</sub>—1WBL



# 五 实验计划

## \* 1、水稻OsCI-RLK1基因的耐冷相关功能验证

- \* 利用RNAi技术将水稻耐冷导入系K354中的OsCI-RLK1基因进行表达抑制，同时将C418中OsCI-RLK1基因进行过量表达，鉴定转基因水稻植株在冷胁迫条件下的耐冷表型。

## 2、水稻OsCI-RLK1基因的生化功能分析

利用水稻原生质体瞬时转化技术，分析OsCI-RLK1亚细胞定位，激酶活性，同时利用酵母双杂交、双分子荧光互补、免疫共沉淀等技术鉴定OsCI-RLK1的互作蛋白，进一步分析其生化机理。

请老师和同学批评与指正  
谢谢