

拟南芥TAK蛋白激酶的结构预测与功能分析*

蒋佳宏¹ 王东¹ 胡源¹ 杜林方^{1,2**}

(¹四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

(²四川大学纳米生物医学技术与膜生物学研究所 成都 610041)

摘要 TAK1、TAK2和TAK3属于TAK蛋白激酶家族,由拟南芥核基因编码,其中TAK1参与了主要捕光色素复合物LHCII蛋白磷酸化调控与光系统的状态转移.本文使用生物信息学手段对TAK1、TAK2和TAK3蛋白进行了较为系统的分析,发现TAK1、TAK2和TAK3为单次跨膜蛋白,具有保守的激酶活性域、疏水性强的N端跨越类囊体膜、亲水性高的C端处于基质中等特点.在PDB中找到了不少与TAK1、TAK2和TAK3同源性大于30%的蛋白序列,其中大部分也带有酪氨酸激酶保守域,使用同源建模的方法,建立了拟南芥蛋白激酶TAKs核心结构域的三维结构,围绕蛋白激酶的结构和作用机制关系进行了探讨,设计出多肽抗体,并进行蛋白印迹检测抗体的专一性,为TAKs蛋白激酶进一步的功能研究奠定了基础.图5表1参15

关键词 TAK; 磷酸化; LHCII; 核心结构域; 同源建模; 抗体

CLC Q946.5

Structure Prediction and Function Analysis of TAK Kinase in *Arabidopsis**

JIANG Jiahong¹, WANG Dong¹, HU Yuan¹ & DU Linfang^{1,2**}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Bio-resources and Eco-environment, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(²Institute for Nanobiomedical Technology and Membrane Biology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract TAK1, TAK2 and TAK3 belong to TAK kinase family and are nuclear-encoded kinases. TAK1 is involved in the phosphorylation of LHCII and the state transitions. Few studies on the structure or function of TAKs have been done because they are membrane combined proteins. In this research, TAKs were studied using a systematical bioinformatical method and all the members of TAK kinase family were found with a hydrophobic N-terminal connected with a transmembrane region located in thylakoid membrane and a hydrophilic C-terminal (kinase catalytic domains) on the stromal side of thylakoid. Lots of sequences which contained the same TyrKc kinase catalytic domains with a similarity more than 30% were found in PDB, and three dimensional structures of core domains of TAK1, TAK2 and TAK3 were then predicted by using homologous modeling method. The analysis of the relationship between the structure and function of TAKs provided the foundation for further studying the functions of TAK1, TAK2 and TAK3. We designed an antibody on the base of prediction of the three dimensional structures, and its western blotting showed that there was an immunoaffinity reaction. Fig 5, Tab 1, Ref 15

Keywords TAK; phosphorylation; LHCII; structure of core domain; homologous modeling; antibody

CLC Q946.5

植物的生长发育受外界环境的影响,光合相关蛋白的可逆磷酸化是一种重要的调控方式.状态转换(State transitions)是植物调节激发能在两个光系统之间分配的一种快速机制,以响应短期光照条件的变化^[1].状态转换与主要捕光天线色素蛋白复合体LHCII的磷酸化紧密相关.TAK(Thylakoid associated Kinase)是从拟南芥类囊体膜上分离得到的激酶^[2],参与LHCII磷酸化的调控,TAK家族包含TAK1、TAK2和TAK3^[3],经反义RNA技术得到TAK1减少的拟南芥植株仅有少量的LHCII发生磷酸化^[3].最近人们发现拟南芥类囊体膜结合激酶STN7也参与了LHCII磷酸化与状态转换^[4],但是STN7与TAK间的关系不清楚.关于TAK激酶家族的研究目前相对匮乏,具体的催化机制和空间结

构都不清楚.为研究TAK1、TAK2和TAK3蛋白激酶的结构与功能,本文采用生物信息学方法对TAK进行了较为系统的研究,分析了氨基酸序列与二级结构的关系,进一步构建了激酶种系发生树并进行了核心区域的三维建模.分析显示,TAK1、TAK2和TAK3存在跨膜结构域^[2],为单次跨膜蛋白,构建的三维结构可用于阐明TAK结构特性与定位的关系,可用于进一步探讨其结构与功能,也为突变体的设计打下基础,并在结构预测的基础上,设计出多肽抗体,免疫家兔,制备得到特异性抗血清.

1 材料与方法

1.1 序列来源

TAK1、TAK2和TAK3激酶的氨基酸序列来自NCBI美国国家生物信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),收录号分别为TAK1: NP_192172, TAK2: NP_171661和TAK3: NP_192042.其他蛋白激酶序列来自于欧洲生物信息学中心数据库(<http://www.ebi.ac.uk>).以下序列分析中均采用缺省

收稿日期: 2008-11-13 接受日期: 2009-03-04

*教育部新世纪人才支持计划(No. NCET-04-0861)和四川大学“985”项目资助 Supported by the Program for New Century Excellent Talents in Universities of China (No. NCET-04-0861) and the Grant “985” of Sichuan University, China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: dulinfang@yahoo.com)

值, 仅特殊参数进行额外说明。

1.2 疏水性、跨膜区与模体分析

使用ExPasy网站的蛋白分析工具包ProtScale程序(氨基酸分值选用参数Hphob. / Kyte & Doolittle)在线分析TAKs蛋白的疏水区域, 用以二级结构和功能域的预测; 用丹麦技术大学的TMHMM2.0程序分析跨膜区, 用于跨膜区域定位; 用Prosites程序进行模体分析, 用于功能结构域划分^[5]。

1.3 二级结构预测、多重序列比对与系统发生树的构建

Predictprotein (结合PSI-blast的神经网络算法)软件被用于对TAK1、TAK2和TAK3激酶进行二级结构预测, 在美国国家生物信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站上搜索选取同源序列, 对TAK激酶进行多重比对。利用ClustalW算法^[6]使用MEGA程序构建系统发生树^[7]。目前较为常用的几种蛋白质二级结构预测方法有PHD、Jpred、PREDATORh和PSA, 本研究采用预测准确率最高的Predictprotein程序^[8]。

1.4 三级结构建模

对未知蛋白质三级结构预测一般使用同源建模(Homologous modeling)或折叠识别(Folding recognition)^[9]。TAK1、TAK2和TAK3具有相似的保守区域, 在PDB数据库中找到与TAK1、TAK2和TAK3同源性大于30%的蛋白质, 使用准确率更高的同源建模方法构建TAK核心区域的三级结构。利用Swiss- Model在线系统分析TAK1、TAK2和TAK3激酶核心区域的立体结构, 用软件Rasmol 2.7进行蛋白质三维结构图的查看^[10]。

1.5 抗体制备和检测

在结构预测的基础上, 参照李晓鹏、杜林方等的方法^[11]进行, 选择位于类囊体膜外侧、连接两个 α -螺旋之间的一段

亲水肽段(另文发表), 固相合成后与BSA偶连, 免疫家兔, 得到的特异性抗血清用于蛋白印迹检测。

参照陈、张等的方法^[12]提取拟南芥类囊体膜。采用13.75%含6 mol/L尿素的分离胶(pH 8.8)和5%浓缩胶(pH 6.8)电泳分离类囊体膜样品, 每泳道样品含5 μ g叶绿素。蛋白分开后用考马斯亮兰R-250染色, 或电转移至PVDF膜, 用制备的TAK1抗体进行Western Blot, 采用ECL发光系统(Amersham)进行检测。

2 结果

2.1 疏水性和跨膜区分析

TAK1蛋白共包含492个氨基酸残基, 亲水氨基酸占50.8%, 为亲水蛋白质, 而疏水氨基酸占38.6%, 在序列的15~44位以及66~71位疏水性很强(图1), 在C端区域也具有一定的疏水性, 分布较为均匀, 中间的100~350区域疏水性弱, 体现亲水性; TAK2包含472个氨基酸残基, 疏水氨基酸占40.7%, 亲水氨基酸占50.4%, 为亲水蛋白质, N端的20~70位与C端的405~470位疏水性较强, 其中N端的20~70位预测形成跨膜螺旋(图1); 中间部分表现亲水性。TAK3蛋白含329个氨基酸残基, 疏水氨基酸占41.8%, 22~49位疏水性很强。

跨膜分析结果(图2)显示, TAK1、TAK2和TAK3都为单次跨膜蛋白。TAK1的跨膜区域为氨基酸序列的22~44位, 其中N端位于类囊体腔中, 中间段和C端位于叶绿体基质; TAK2激酶跨膜区域为25~47, 其中C端位于类囊体腔中, 中间段和N端位于叶绿体基质; TAK3激酶的跨膜区域为27~49, 其中C端位于类囊体腔中, 中间段和N端位于叶绿体基质。

2.2 模体(Motif)和二级结构预测分析

搜索PROSITE数据库的结果(表1)显示: TAK1激酶序列中存在8种motif, 共计33个; TAK2激酶序列中存在8种

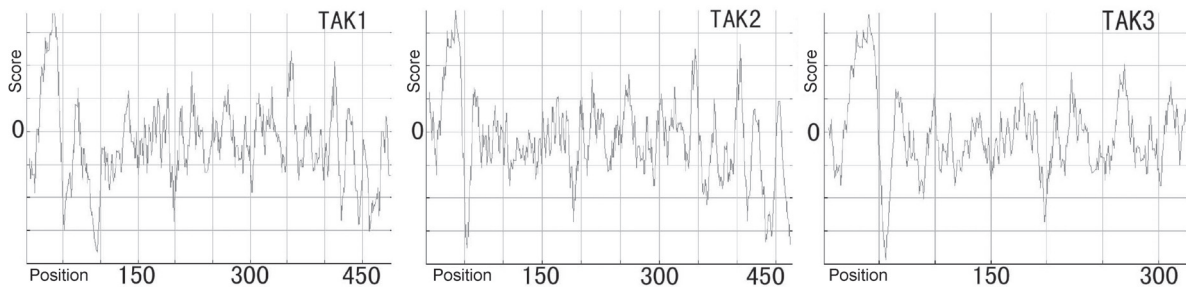


图1 TAK1、TAK2与TAK3蛋白亲疏水值分析(参数选用Hphob Kyte & Doolittle)

Fig. 1 Hydrophobicity analysis of TAK1, TAK2 and TAK3 proteins by programme ProtScale (Hphob Kyte & Doolittle)

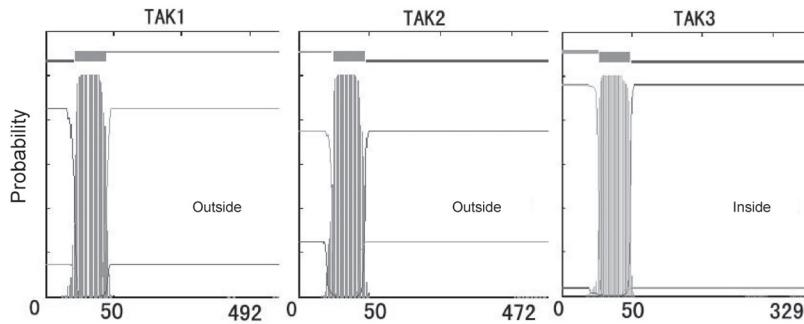


图2 TAK1、TAK2与TAK3蛋白跨膜域分析

Fig. 2 Transmembrane region analysis of TAK1, TAK2 and TAK3

表1 TAK1, TAK2和TAK3激酶模体分析
Table 1 Motifs in TAK1, TAK2 and TAK3 analysis by using Prosite programme

Motif	TAK1	TAK2	TAK3
ASN_GLYCOSYLATION	53~56, 63~66, 468~471	82~85	0
GLYCOSAMINOGLYCAN	122~125, 126~129, 448~451	124~127	132~135
cAMP_PHOSPHO_SITE	445~448, 462~465	436~439	0
PKC_PHOSPHO_SITE	50~52, 59~61, 151~153, 270~272, 322~324, 360~362, 385~387, 402~404, 405~407, 460~462	48~50, 103~105, 143~145, 313~315, 351~353, 393~395, 438~440	50~52, 113~115, 151~153, 321~323
CK2_PHOSPHO_SITE	137~140, 151~154, 363~366, 385~388, 441~444, 470~473	2~5, 107~110, 116~119, 143~146, 438~441	117~120, 124~127, 151~154
MYRISTYL	27~32, 117~122, 123~128, 249~254, 269~274, 315~320, 449~454	29~34, 113~118, 125~130, 176~181, 260~265, 306~311, 376~381, 456~461	31~36, 174~179, 184~189
PROTEIN_KINASE_ATP	168~190	160~182	168~190
PROTEIN_KINASE_ST	285~297	276~288	284~296

motif, 共计25个; TAK3激酶序列中存在6种motif, 共计13个。

TAK1蛋白含有9个 α -螺旋和18个 β -折叠, 约57%的无规卷曲。在第168~190位存在一个ATP结合域, 第162~440位为激酶功能域。TAK1激酶活性区域是VVHRDIKSSNILL (285~297), 具有典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的特点, 第289位的D(Asp)是激活丝氨酸-苏氨酸羟基的催化残基, 即活性位点。

TAK2蛋白中有9个 α -螺旋和15个 β -折叠, 无规卷曲约60%。一级结构中的第154~431位组成核心结构域, 第160~182位存在ATP结合环, 序列VVHRDIKSSNILL (276~288)是TAK2的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶活性部位区域, 而第280位的D(Asp)是活性位点。TAK3蛋白含5个 α -螺旋和11个 β -折叠, 无规卷曲60%。一级结构中的第168~331位组成核心结构域, 第168~190位含有一个ATP结合部位。PKVVHRDIKSSNI (282~294)为TAK3激酶活性部位, 第288位D(Asp)是激酶活性位点。

分析结果显示, TAK1和TAK2都具有丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶位点、N-乙酰化位点、蛋白激酶C磷酸化位点、N-肉豆蔻酰化位点、酪蛋白激酶II磷酸化位点以及cAMP-和cGMP-依赖蛋白激酶位点; 但TAK3缺少N-乙酰化位点、cAMP-和cGMP-依赖蛋白激酶位点(表1)。

2.3 种系发生树构建

TAK1具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性, 而拟南芥丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶共分成12种较大的亚家族^[13], 我们选择了这12种亚家族中的代表序列种系发生树。从种系发生树(图3)可以看出, TAK1和TAK2在进化距离上与属于Receptor-like kinases家族的WAK1激酶较近, 与RLKs家族属于同一亚家族, 表明其可能与RLKs家族的结构与功能相似。RLKs家族是受体类激酶家族, 具有单次跨膜、位于胞外的N端疏水性信号肽、位于胞内的C端含催化结构域、受胞外因子调节而激活等特点。我们对TAK1和TAK2的跨膜、模体预测和二级结构预测的结果也表明了这一点, 但TAK1保守活性域更象酪氨酸激酶家族, 而TAK2与TAK3则更接近丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 且进化上的亲缘性更高, 这在一定程度上决定了它们结构功能上的差异与联系。

2.4 核心结构域建模

构建未知蛋白的三维结构一般使用同源建模或折叠识别法。同源建模的准确率较高, 对于序列相似性大于30%的蛋白质序列已经能够建立相当精确的结构模型, 但需要有序列相关蛋白的三级结构作为建模的模板。我们在NCBI对TAKs进行同源比对(数据库选择PDB), 发现相似性超过30%的序列很多, 大部分都含Tyrosine kinase domain, 因此我们采用同源建模的方法(图4)。从图中可以看出, TAK1、TAK2和TAK3激酶核心结构域折叠方式符合二级结构的分析结果。

TAKs的核心结构域都由两个结构域组成。在TAK1蛋白核心区域中, 靠近N端的叶状区域包含4个 β -折叠和1个 α -螺旋, C端为5个 α -螺旋组成的网状结构域, 中间是一个铰链结构连接两个结构域。N端叶状区的 α 螺旋(C螺旋)在活性状态下能与保守的Lys (184)残基形成一个盐桥, 为ATP磷酸盐定位提供场所。二级结构分析中ATP结合区域为第168~190位, 而TAK1三级结构中的167~190位残基形成了一个明显的P环结合ATP; C端5个 α -螺旋组成网状结构, 以及一个短的

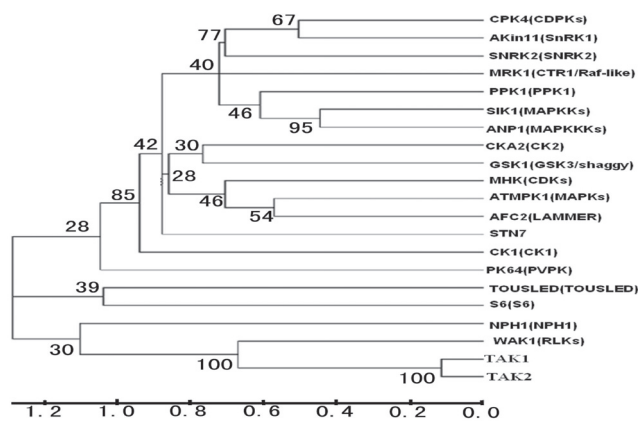


图3 拟南芥丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族系统发生树分析

Fig. 3 Neighbor-joining tree of *Arabidopsis thaliana* protein kinases. Sequences of the protein kinases were retrieved from EMBI database. The sequences were aligned by using the ClustalW program, and the resulting alignment parameters were used to construct the phylogenetic tree using MEGA program. Bootstrap values were calculated for 500 replicates and were shown on branches. Branch lengths reflect the evolutionary distances indicated by the scales

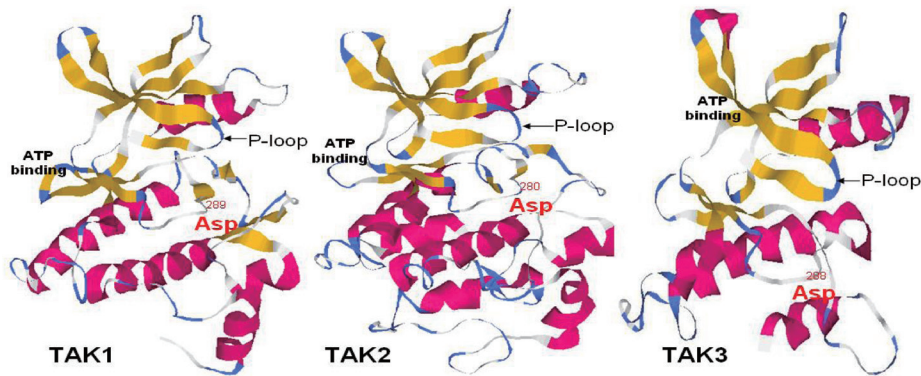


图4 TAK1、TAK2与TAK3蛋白核心区域三维结构

Fig. 4 Three-dimensional structures of core domains of TAK1, TAK2 and TAK3

α -螺旋和两个短的 β -折叠, 两个结构域之间是一个起连接作用的铰链结构, 同时也是ATP的结合位点和活性位点. 跨膜结构预测结果显示TAK1蛋白N端的22~44肽段的疏水性强, 可以形成跨膜结构, 二级结构预测中, 我们也发现该区域被预测成为 α -螺旋, 且可信度高. 分析结果表明TAK1是单次跨膜蛋白, N端位于类囊体腔中, 而激酶核心结构域位于基质.

与TAK1相似, TAK2核心结构域中靠近N端的叶状区域也包含4个 β -折叠和1个 α -螺旋, C端为5个 α -螺旋组成的网状结构域, 叶状结构之间是1个起连接作用的铰链结构, 也是ATP结合位点和活性位点, 序列160~182是1个ATP结合的P环, 该区域的甘氨酸是ATP的磷酸根锚定所必需的. 跨膜结构预测中, TAK3蛋白N端的25~47肽段为疏水性区域, 在二级结构预测时为跨膜的 α -螺旋. 进一步的分析表明, TAK2蛋白的N端位于基质中, 而激酶的核心结构域在内的主体位于类囊体腔中, 这与TAK1正好相反. TAK3的核心结构与TAK1与TAK2的相似, 包括1个铰链区和2个叶状结构区, 氨基酸残基数少, 只含有5个 β -折叠和11个 α -螺旋. 定位情况与TAK2相似, 预测结果显示核心区域在内的主体部分都在类囊体腔, 跨膜区域为25~47肽段, 仅N端起始序列处于基质中.

在3种TAK的三级结构中, 都存在由连续的 β 片层形成的P环, 为ATP的结合区域. 比对发现在拟南芥的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域中, ATP结合域通常是高度保守且富含甘氨酸残基, 是ATP磷酸根锚定的必需结构. 在TAK1、TAK2和TAK3激酶中该区域所含氨基酸高度相似, 尤其是TAK2与TAK3, ATP结合域的氨基酸序列相似度达到了96%, 第168~185位的序列相同, 其中178 Gly-Glu-Gly-Gly-Tyr-Gly 183区域富含甘氨酸, 容易形成loop, 而且Gly可以与ATP磷酸基团形成氢键, 参与ATP的结合与定位. 叶状C端都较大, 主要是由 α -螺旋组成, 在催化中心附近没有出现限制底物的Q环, 因而可以容纳底物蛋白较大肽段的进入. TAK1和TAK2的结构更为紧密, 推测对底物分子的大小更有选择性, 而TAK3结构更为松散. 结合进化树分析, TAK3与TAK2的同源性更高, 且定位相似, 很有可能具有相似或相近的生理功能.

2.5 抗体制备和检测

TAK1、TAK2和TAK3激酶都是膜蛋白, 难以纯化制备抗体, 本研究在结构预测的基础上, 选择了位于类囊体膜外侧、连接两个螺旋之间的亲水肽段, 合成后免疫家兔, 得到

的抗体用于Western Blotting检测. 所得TAK1抗体结果如图5所示, 在相对分子质量 55×10^3 有明显的免疫亲和反应, 表明制备的抗体能专一地识别拟南芥TAK1激酶.

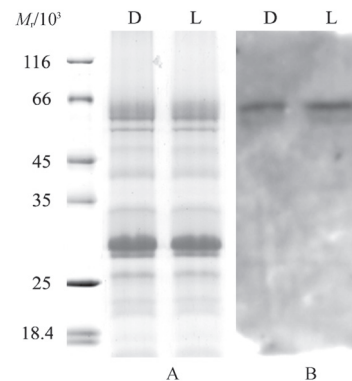


图5 Western 杂交对制备的TAK1抗体进行鉴定

Fig. 5 Identification of anti-peptide antibody for TAK1

A, SDS-PAGE of thylakoid membrane proteins; B, Immunoblots of TAK1

3 讨论

植物蛋白激酶在叶片中的含量高, 参与光信号传导、胁迫抗性、激素调节等重要生理过程. 植物蛋白激酶超过一千余种, 目前在拟南芥中就发现有638条丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶序列. 按照底物磷酸化氨基酸种类分为3类: (1) 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, (2) 酪氨酸蛋白激酶, (3) 组氨酸蛋白激酶. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在进化上更加古老, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶与酪氨酸蛋白激酶的保守区域非常相似, 且有相似的活性中心, 仅能通过某些特定的氨基酸残基进行区分. 新近发现拟南芥中的两种蛋白激酶STN7和STN8均属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 对底物蛋白的磷酸化主要发生在苏氨酸残基上^[10]. 氨基酸序列分析表明, TAK1属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 因此选择拟南芥丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶12种较大的亚家族中有代表性的激酶构建种系发生树. 但是核心域三级结构建模时发现, PDB中搜索到了众多同源性高于30%的蛋白序列, 其中大部分都为酪氨酸蛋白激酶, 因此按酶活保守区域划分TAK1更偏向于酪氨酸激酶家族, 发生树的结果也显示如此. TAK2与TAK3在进化上更加接近, 保守域同源性达到90%, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族.

植物具有PSI和PSII两个光系统, 因为结构及色素组

成上的差异导致对激发能的吸收处于不均一状态,而状态转换(State transitions)就是一种在短期内调节光能分配的快速机制。LHCII蛋白可逆磷酸化是状态转换发生的重要前提,与质体醌还原状态、介导LHCII磷酸化的激酶与Cyt b₆f复合体结合,以及叶绿体中含硫化物氧化还原状态相关^[14]。研究表明TAK1参与了LHCII蛋白磷酸化和状态转换^[3],与其同源的、序列更短的TAK2与TAK3,可能也具有相似的功能。尽管它们都含有半胱氨酸残基,TAK1有3个而TAK2和TAK3含有6个,但分析结果显示它们不能形成二硫键,因此TAKs中可能不存在硫氧还蛋白作用的位点。

与已知的拟南芥丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶相比,TAKs激酶核心区序列的保守性高且立体结构相似, β 片层为主的N端与 α 螺旋为主的C端通过铰链区连接。但是它们又有各自的特点:TAK1与TAK2核心域的N端都含4个 β -折叠和1个 α -螺旋,TAK1和TAK2的ATP结合域均位于第160~190位,而它们C端所含5个 α -螺旋具有相似紧密度的结构,这可能与它们一级结构相似有关。TAK1比TAK2多20个氨基酸,在C端多一个motif。分析结果显示TAK1是单次跨膜蛋白,活性部位以及C端都处于叶绿体基质中,这与LHCII磷酸化作用发生在基质侧相吻合^[10];TAK3与TAK2催化核心部分的同源性达到96%,在进化上更为靠近,两者活性域的N端叶状结构相似度高,而C端差别较大。TAK2含有472个氨基酸残基,活性域为154~431,而TAK3仅含329个氨基酸残基,活性域为第163~329位,因此TAK3活性域较TAK2更加松散,有利于大的底物进入。TAK2和TAK3在预测中具有相同的类囊体定位,N端暴露于叶绿体基质中,C端以及中间的酶活区域都位于类囊体腔,对底物容纳能力的差别说明它们可能在功能上存在差异。

TAK1、TAK2和TAK3中的激酶活性域起始位置相似,所含催化中心的核心残基都是Asp,并具有多种作用:(1)结合ATP;(2)底物蛋白的结合和定向;(3)催化ATP的 γ -磷酸基团转移到受体苏氨酸的羟基上。TAK1和TAK2相似的底物结合位点,位于C端的叶状结构中,与肽链底物之间存在着形状和电荷互补作用,能容纳较大的肽段进入活性中心,因此可以使底物蛋白的1个或多个位点Ser/Thr残基发生磷酸化,这与LHCII存在多个磷酸化位点情况相吻合^[15]。此外,TAK1、TAK2和TAK3催化中心(PKVVHRDIKSSNI)氨基酸组成相同,周围都分布着5个碱性氨基酸残基,间接说明了三者的底物具有相同电荷分布情况。

在结构预测的基础上,我们设计出多肽抗体,并通过蛋白印迹得到鉴定。一方面说明结构预测的准确性,另一方面得到的抗体可用于研究外界环境变化对拟南芥TAK1、TAK2和TAK3激酶在表达水平上的影响,探讨TAK1、TAK2和TAK3激酶在膜蛋白磷酸化中的调控机制。

以上借助生物信息学的方法对TAK家族蛋白激酶进行了分析,并利用同源建模的方法建立了核心结构域的三维结构,说明了TAK1、TAK2和TAK3激酶的同异以及定位差别,从结构上揭示了蛋白底物的相似性,以利于突变体的设

计等后续研究工作的进行。

References

- Allen JF. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098**: 275~335
- Snyders S, Kohorn BD. TAKs, thylakoid membrane protein kinase associated with energy transduction. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 9137~9140
- Snyders S, Kohorn BD. Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 32169~32176
- Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD. State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 2005, **433**: 892~895
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinform*, 2002, **1**: 107~108
- Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Meth Enzymol*, 1996, **266**: 383~402
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**: 150~163
- Li J (李佳), Zheng QC (郑清川), Du LF (杜林方). Homology modeling and fluorescence spectra study of tobacco Pr-1a. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **4**: 466~468
- Hu Y (胡源), Du LF (杜林方), Jiang JH (蒋佳宏). Structure prediction and function analysis of STN7 and STN8 protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biophys Sin* (生物物理学报), 2008, **2**: 99~106
- Sayle R, Milner-White EJ. Rasmol: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**: 374~376
- Li XP (李晓鹏), Du LF (杜林方), Liang HG (梁厚果), Wu WS (吴宛菘). Preparation and identification of antidodecapeptide of polypeptide D1 of photosystem II reaction center. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1997, **24**: 283~285
- Chen H, Zhang, DY, Guo JK, Wu H, Jin MF, Lu CM, Zhang LX. A Psb27 homologue in *Arabidopsis thaliana* is required for efficient repair of photodamaged photosystem II. *Plant Mol Biol*, 2006, **61**: 567~575
- Hardie DG. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 97~131
- Rintamaki E, Martinsuo P, Pursiheimo S, Aro E-M. Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 11644~11649
- Hartwig HD, Allen JF, Paulsen H, Race HL. Truncated recombinant light harvesting-complex II protein are substrates for a protein associated with photosystem II core complexes. *FEBS Lett*, 1998, **435**: 101~104