

乙烯受体 ETR1-GAF 的功能化制备及其对抑制肽 NOP-1 的结合鉴定

徐一帆, 何振东, 施金莹, 陈文*

华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510641

徐一帆, 何振东, 施金莹, 陈文. 乙烯受体 ETR1-GAF 的功能化制备及其对抑制肽 NOP-1 的结合鉴定[J]. 生物工程学报, 2026, 42(1): 458-466.

XU Yifan, HE Zhendong, SHI Jinying, CHEN Wen. Functional reconstitution of the ethylene receptor ETR1-GAF and characterization of its binding with the inhibitory peptide NOP-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(1): 458-466.

摘要: 乙烯是调控植物生长发育与环境应答的关键气态激素, 乙烯信号传导的识别过程始于细胞膜上的乙烯受体蛋白。ETR1 (ethylene response 1) 是植物中重要的乙烯受体, 其 GAF 结构域在介导与下游信号蛋白 EIN2 (ethylene insensitive 2) 的相互作用中发挥核心作用。目前, 乙烯受体蛋白与下游元件的相互作用研究仍缺乏高通量、快速的检测体系, 限制了对其识别机制的深入解析。本研究利用毕赤酵母表达系统, 表达并纯化了 ETR1 的跨膜结构域和 GAF 结构域, 通过去垢剂 Fos-14 增溶提取, 并采用 Anti-Flag 抗体与 Ni-NTA 亲和层析两步纯化策略, 成功获得高纯度、具有结构完整性的 ETR1-GAF 蛋白。圆二色谱分析表明 ETR1-GAF 在溶液中主要以 α -螺旋构象存在, 进一步基于生物膜干涉技术 (bio-layer interferometry, BLI), 对不同浓度抑制肽 NOP-1 与 ETR1-GAF 蛋白进行动力学结合测定, 结果表明 ETR1-GAF 与 NOP-1 肽段之间存在高亲和力、浓度依赖性的特异性结合, 其平衡解离常数 (equilibrium dissociation constant, KD) 为 $(6.885 \times 10^{-5} \pm 7.944 \times 10^{-6})$ mol/L, $R^2=0.9914$ 。本研究成功建立了一种稳定、可定量的乙烯受体蛋白体外互作分析系统, 为在分子水平深入研究乙烯信号传导中受体与下游元件的动态识别机制提供了关键工具, 也为后续探索乙烯信号网络的蛋白质互作谱及开发新型调控策略奠定了方法学基础。

关键词: 乙烯受体; 膜蛋白; ETR1-GAF; 抑制肽 NOP-1; 生物膜干涉技术

资助项目: 国家自然科学基金(B5231140); 广东省自然科学基金(B6232950)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (B5231140) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (B6232950).

*Corresponding author. E-mail: wenchen@scut.edu.cn

Received: 2025-09-22; Accepted: 2025-11-17; Published online: 2025-12-08

Functional reconstitution of the ethylene receptor ETR1-GAF and characterization of its binding with the inhibitory peptide NOP-1

XU Yifan, HE Zhendong, SHI Jinying, CHEN Wen*

School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China

Abstract: Ethylene, a pivotal gaseous plant hormone regulating plant growth and environmental responses, initiates its signaling through receptor proteins on the membrane. Ethylene response 1 (ETR1) is a key ethylene receptor in plants, and its GAF domain plays a central role in mediating the interaction with the downstream signaling protein ethylene insensitive 2 (EIN2). The research on the interactions between ethylene receptors and downstream components still lacks high-throughput and rapid detection systems, which limits in-depth understanding of the recognition mechanisms. In this study, we utilized the *Pichia pastoris* expression system to express and purify the transmembrane and GAF domains of ETR1. Membrane proteins were solubilized in the detergent Fos-14 and successfully purified through a two-step strategy involving the Anti-Flag antibody and Ni-NTA affinity chromatography, which yielded high-purity ETR1-GAF protein with structural integrity. Circular dichroism spectroscopy revealed that ETR1-GAF adopted a predominantly α -helical conformation in solution. Using bio-layer interferometry, we conducted kinetic binding assays between ETR1-GAF and the inhibitory peptide NOP-1 at various concentrations. The results revealed a high-affinity, concentration-dependent specific interaction, with a dissociation constant $KD=(6.885\times 10^{-5}\pm 7.944\times 10^{-6})$ mol/L, $R^2=0.991$ 4. This study establishes a stable and quantifiable *in vitro* interaction analysis system for ethylene receptors, providing a crucial tool for molecular-level investigation into the dynamic recognition mechanisms between receptors and downstream elements in ethylene signaling. Moreover, it lays a methodological foundation for further exploration of the ethylene signaling network and the development of novel regulatory strategies.

Keywords: ethylene receptor; membrane proteins; ETR1-GAF; inhibitory peptide NOP-1; bio-layer interferometry

乙烯是首先被证明具有激素作用的气态分子^[1],也是植物生长发育和胁迫适应的关键调控因子^[2]。乙烯的作用包括刺激种子发芽、调节幼苗在不同环境中的生长、叶片的伸展速率和程度、果实的成熟衰老与脱落、调节植物个体对外界环境压力的应答以及收获后的储存等^[3]。在不同的植物中,乙烯的调控作用机理类似^[4-8],因此研究乙烯在植物中的作用机制及相关的信

号传导通路具有重要意义。

乙烯在生物合成以后,能够在脂质环境中快速扩散,进入植物细胞与受体结合而被植物感知和利用^[9]。乙烯受体蛋白位于内质网和高尔基体,具有负向调节乙烯反应的功能^[10-12]。拟南芥等许多植物中存在5种不同类型的乙烯受体: ethylene response 1 (ETR1)、ETR2、ethylene response sensor 1 (ERS1)、ERS2、

ethylene insensitive 4 (EIN4)^[13]。植物中不同的乙烯受体亚型具有相似的结构域组成,包括在 N 末端的 3 个 α -螺旋组成的跨膜结构域以及 GAF 区域和激酶结构域,其中 ETR1、EIN4 和 ETR2 还包含 1 个接收结构域^[14]。EIN2 蛋白是乙烯信号转导的核心组分,是一个具有多个跨膜区域的膜蛋白,由 12 个跨膜螺旋的疏水氨基端结构域(氨基酸 1-461)和 1 个广泛的亲水羧基端部分(氨基酸 462-1 294)组成^[15],遗传学研究表明,*ein2* 的功能缺失突变会使植物对乙烯完全丧失敏感性,并且它是目前已知的唯一具有此表型的基因。因此,*ein2* 被认为是乙烯信号转导过程中最为关键的调控节点^[16]。研究表明,乙烯信号激活后,EIN2-C 端被 S1P 蛋白酶裂解,裂解后的片段通过核定位基序(nuclear localization signal, NLS)介导的核输入机制进入细胞核,当 EIN2 的 NLS 被破坏,EIN2-C 端无法顺利进入细胞核,从而中断乙烯信号传导^[17-18]。后续研究证明 EIN2 中的 NLS 基序是与乙烯受体 ETR1 相互作用所必需的,根据 NLS 基序设计的合成肽 NOP-1 (LKRYKRRL)可以通过竞争性取代阻断 EIN2 和 ETR1 之间的相互作用^[16],并且确定了 GAF 结构域是与 NOP-1 相互作用的 ETR1 结构单元^[19-20]。基于 NLS 基序设计的合成肽 NOP-1 以及其衍生肽均被证明在番茄、切花等植物中使用时能够抑制乙烯反应,具有延缓果实成熟时间、延缓植物衰老等功能^[21-22]。

乙烯受体具有 3 个 α -螺旋组成的跨膜结构域,跨膜结构域易导致蛋白错误折叠、形成包涵体或发生聚集从而失去功能。由于毕赤酵母适合高密度发酵,并具有必要的细胞机制来执行某些翻译后修饰,例如糖基化、二硫键形成、蛋白的折叠加工能力和蛋白水解加工,适用于表达真核生物蛋白和功能复杂的蛋白^[23],可以通过圆二色谱的光谱特征分析乙烯受体蛋白的二级结构。表面等离子体共振、等温滴定量热法和免疫共沉淀法等是研究蛋白相互作用的常用方法,但由于膜蛋白的低表达量、低溶解性

等特性,上述方法不适用于研究膜蛋白与小分子的相互作用^[24]。生物膜干涉测量法(BLI)是一种基于白光干涉原理的光学生物传感技术,通过实时监测生物分子结合至传感器表面所引起的干涉光谱位移,能够实现对分子间相互作用动力学的无标记、实时分析,可用于高通量的动力学分析、分析物检测和定量^[25]。目前基于生物膜干涉测量平台设计的 Octet (赛多利斯公司)能够用于动力学分析和定量,能够测量低至 150 Da 的低分子量分子,由于其具有可实时监测分子间的结合与解离过程、提供直接的动力学参数以及检测灵敏度高等优点,可用于定量研究蛋白质与蛋白质以及小分子间的相互作用。

本研究使用毕赤酵母异源表达系统和 pPICZA 载体对乙烯受体蛋白 ETR1-GAF(氨基酸 1-307)进行融合表达;随后通过超速离心与去垢剂增溶提取膜蛋白,并采用 Anti-Flag 抗体填料与 Ni-NTA 填料对 ETR1-GAF 进行纯化;圆二色谱分析证实该蛋白在溶液中以 α -螺旋为主,具备良好的结构完整性,并首次利用 BLI 技术实现了 ETR1-GAF 与抑制肽 NOP-1 之间相互作用的实时、定量动力学分析,明确其高亲和力结合特性。本研究通过表达具有生物活性的乙烯受体蛋白,构建一套稳定、可定量检测乙烯受体蛋白-小分子互作的体外分析体系,以期为深入解析乙烯信号转导中受体与下游元件间的识别机制提供关键方法支撑。

1 材料与方法

1.1 ETR1-GAF 异源表达系统构建

1.1.1 毕赤酵母表达载体构建

采用毕赤酵母表达系统,对乙烯受体蛋白 ETR1-GAF (UniProt 登录号: P49333)编码序列进行密码子优化。在 C 末端引入 6 \times His 标签编码序列,在 N 末端引入 Flag 标签编码序列,并于 5' 端及 3' 端分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶识别位点。优化后的基因序列合成后,

通过双酶切连接法克隆至 pPICZA 载体, 构建重组质粒 pPICZA-ETR1-GAF (图 1)。基因合成和载体构建由金斯瑞生物科技股份有限公司完成, 并通过 Sanger 基因测序验证载体序列。

1.1.2 重组质粒制备

将验证正确的 4 μg 重组质粒干粉用 40 μL TE buffer 溶解, 得到浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的重组质粒。取 1 μL 重组质粒转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞(北京博迈德基因技术有限公司), 通过含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 泽欧霉素 (zeocin) 的低盐 LB 固体抗性培养基筛选阳性克隆。挑取单菌落接种于低盐 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 16 h, 按照质粒小量快速提取试剂盒(北京博迈德基因技术有限公司)说明书进行质粒提取, 提取后的质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 DNA 测序。酶切体系包含 5 μL *Pme* I 酶、10 μL 10 \times Buffer (赛默飞世尔科技公司)、10 μg 重组质粒, 再用无酶水补充至 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h, 65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min 后使用琼脂糖凝胶电泳验证酶切效率。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(广州美基生

物科技有限公司)回收线性化质粒并冻干。

1.1.3 酵母细胞电转化

取 5–10 μg 冻干后线性化质粒溶解于 5 μL 无菌水, 取用 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的 X-33 毕赤酵母感受态细胞, 置于无菌冰面解冻至细胞悬液恢复流动性。将质粒与感受态细胞混匀后将全部转至 0.2 cm 电转化杯, 冰上放置 5 min, 再放入电转化仪中恒定电压 2 000 V、脉冲时间 5 ms 电击处理。电击完成后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 吹吸混匀后转移至 1.5 mL 无菌离心管, 维持低温环境放置 5 min, 再转移至 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置 1.5 h。取 100 μL 菌液均匀涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin 的 YPDS 平板, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置培养 2–3 d 至形成单克隆菌落, 再将单菌落转接到含 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin 的 YPDS 平板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养至形成单克隆菌落。

1.1.4 PCR 验证

用无菌牙签从单菌落中挑取少量菌体, 加入 25 μL 20 mmol/L NaOH, 100 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 15 min, 低速离心 2–3 min, 取 5 μL 上清作为检测模板。PCR 反应体系(总体积 50 μL)为: 2 \times PCR 预混液 25 μL , 5' *AOX1* 引物 1 μL , 3' *AOX1* 引物 1 μL , 无酶水 18 μL , 模板 5 μL 。在第 29、35 个循环分别取样, 使用琼脂糖凝胶电泳验证。

1.1.5 蛋白表达条件筛选

挑选 PCR 鉴定后的阳性克隆接种到 BMGY 培养基, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 条件下培养过夜, 待菌液 OD_{600} 值达到 2–6 后, 离心收集菌体重悬至 BMMY 培养基中, 使起始 $OD_{600}=1$, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 条件下进行甲醇诱导, 在不同时间点取样。使用裂解缓冲液(25 mmol/L PBS, 50 mmol/L NaCl, pH 7.4)裂解细胞。通过 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹分析表达情况, 使用鼠源抗 Flag 单克隆抗体(1:10 000, 金斯瑞生物科技股份有限公司)及 HRP 标记羊抗鼠二抗(1:1 000, 上海碧云天生物技术股份有限公司)进行检测, ECL 化学发光系统(上海天能科技有限公司)

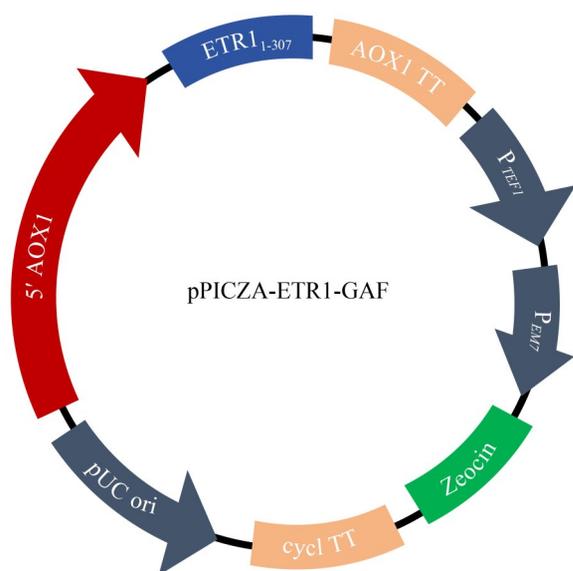


图1 重组表达载体 pPICZA-ETR1-GAF 的构建
Figure 1 Construction of the recombinant expression vector pPICZA-ETR1-GAF.

显影。

1.2 膜蛋白纯化

1.2.1 膜蛋白提取

酵母细胞使用甲醇诱导 60 h 后, 收集细胞沉淀。使用含有蛋白酶抑制剂的 TBS 溶液 (150 mmol/L Tris-base, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 进行重悬后, 使用高压均质机进行细胞破碎, 1 200 bar 压力破碎 180 s。裂解液经 200 000×g 超速离心(Beckman Coulter 公司) 2 h 分离膜组分, 在组织研磨器中使用含有蛋白酶抑制剂的 TBS 溶液 (150 mmol/L Tris-base, 150 mmol/L NaCl, 1% Fos-14, pH 7.4) 对膜沉淀进行匀浆, 收集匀浆液体在 4 °C 旋转孵育 3 h 溶解膜蛋白。

1.2.2 膜蛋白亲和层析纯化

可溶组分经 14 000×g 离心 60 min 去除不溶物后, 与 Anti-Flag Affinity Resin (金斯瑞生物科技股份有限公司) 4 °C 结合 60 min。使用 TBS 溶液 (150 mmol/L Tris-base, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Fos-14, pH 7.4) 清洗填料, 再用甘氨酸酸性洗脱液 (100 mmol/L 甘氨酸, 0.05% Fos-14, pH 3.5) 洗脱, 之后立刻用磷酸盐溶液 (500 mmol/L PBS, 0.05% Fos-14, pH 7.5) 中和洗脱液 pH。通过 SDS-PAGE 分析纯化情况, 收集目标蛋白洗脱液与 Ni-NTA Resin (金斯瑞生物科技股份有限公司) 4 °C 结合 60 min。使用磷酸盐溶液 (25 mmol/L PBS, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Fos-14, pH 7.4) 清洗填料, 再用磷酸盐溶液 (25 mmol/L PBS, 100 mmol/L NaCl, 1 mol/L 咪唑, 0.05% Fos-14, pH 7.4) 进行梯度洗脱, 收集不同的洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测目标蛋白。

1.3 圆二色谱分析

采用圆二色谱仪对 ETR1-GAF 进行分析。在 190–260 nm 波长范围内扫描, 测定其远紫外圆二色光谱, 检测蛋白质二级结构特征。设定狭缝宽度为 1 nm, 响应时间为 1 s, 所有实验均在 25 °C 下进行。通过光谱信号分析获得 α -螺旋、 β -折叠等结构, 评估 ETR1-GAF 的结构完

整性与折叠状态。

1.4 Octet 分子相互作用分析

1.4.1 试剂准备

将 ETR1-GAF 目标蛋白透析至 Octet 分析缓冲液 (50 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Fos-14, pH 7.5), 将 NOP-1 (金斯瑞生物科技股份有限公司) 溶解于 Octet 分析缓冲液中配制成不同浓度, 分别为 1、5、25、125、625 μ mol/L。

1.4.2 蛋白-小分子相互作用分析

实验使用抗 Penta-HIS (HIS1K) 生物传感器, 在传感器放置的孔中加入 200 μ L 分析缓冲液, 确保传感器预湿时间大于 10 min。根据样品的实际位置设置样品板, 输入样品名称浓度等信息, 添加需要进行的分析步骤, 同时设置分析步骤的时间和转速。动力学分析转速设置成 1 000 r/min, 添加 baseline1 (60 s)、loading (1 080 s)、baseline2 (60 s)、association (600 s)、dissociation (300 s), 根据实际位置进行传感器位置设定并更改传感器类型, 设置实验温度为 25 °C, 数据采集频率选择 2 Hz。方法设置完毕后将样品板和传感器正确放置到仪器内部, 且确保仪器门已关好, 点击开始实验, 实验结束后使用 Octet 高通量分析软件 Octet Analysis Studio 处理数据。

2 结果与分析

2.1 ETR1-GAF 的表达和纯化

为了确定最优的表达时间, 使用蛋白免疫印迹分析验证不同菌株以及不同表达时间的表达情况。结果显示, 在 38 kDa 附近出现了特异性表达条带 (附图已上传至国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0002184), 与报道过的乙烯受体蛋白 ETR1-GAF 分子量相符^[19], 证明 ETR1-GAF 融合蛋白在毕赤酵母中成功表达。2 号菌株在 60 h 时显示出清晰、单一的特异性条带, 因此后续功能实验以此作为标准表达菌株。

细胞破碎后, 使用去垢剂 Fos-14 增溶的方式提取膜蛋白。首先使用抗体填料 Anti-Flag 对去垢剂中的 ETR1-GAF 进行亲和纯化, 用 SDS-PAGE 验证纯化结果, 结果显示, 在酸性洗脱馏分 E2、E3 和 E4 中可以得到纯度 >80% 的 ETR1-GAF 蛋白, 纯化后的蛋白主要以单体和二聚体这 2 种聚集状态存在(图 2A)。再使用镍填料对含有目标蛋白的洗脱馏分进行第 2 步亲和纯化, 用 SDS-PAGE 验证纯化结果, 结果显示, 在洗脱馏分 E1、E2、E3 和 E4 中非特异性杂条带减少, 可以得到纯度 >85% 的 ETR1-GAF 蛋白, 纯化后的蛋白仍然主要以单体和二聚体这 2 种聚集状态存在(图 2B), 证实了 ETR1-GAF 蛋白 C 端所融合的组氨酸标签具有良好镍离子螯合活性, 可用于后续功能实验。

2.2 ETR1-GAF 的圆二色谱分析

圆二色谱分析结果表明, 纯化后的 ETR1-GAF 蛋白在 208 nm 和 222 nm 处呈现双负峰, 并在 192 nm 附近存在 1 个正峰(图 3)。该光谱特征表明, ETR1-GAF 在溶液中主要以 α -螺旋构象存在, 该纯化方法可以得到结构完整、具备生物活性的蛋白, 为其与 NOP-1 的相互作用提供了结构基础。

2.3 BLI 动力学分析

首次采用 BLI 对 ETR1-GAF 蛋白与 NOP-1 分子之间的相互作用进行了实时、定量动力学分析。结果显示, ETR1-GAF 与 NOP-1 之间存在浓度依赖性的结合行为, 结合相响应值随 NOP-1 浓度升高而增加, 解离相则表现出可逆的动力学特征。使用高通量分析软件处理得到 $KD=(6.885 \times 10^{-5} \pm 7.944 \times 10^{-6}) \text{ mol/L}$, $R^2=0.9914$ (图 4), 表明两者间具有较强的亲和力, 并且拟合结果的可靠性强。表明毕赤酵母表达体系得到的乙烯受体蛋白 ETR1-GAF 具有良好的结构完整性和生物活性, 并且成功构建了基于 BLI 的乙烯受体蛋白体外互作定量分析系统, 为在天然膜模拟环境中研究受体-配体互作提供了新方法, 也为深入解析乙烯信号通路的分子识别机制奠定了关键技术基础。

3 讨论与结论

本研究利用毕赤酵母表达系统实现了拟南芥乙烯受体 ETR1 跨膜域及 GAF 结构域(ETR1-GAF)的功能性表达与制备, 并建立了结合 Fos-14 去垢剂增溶和 Anti-Flag/Ni-NTA 串联亲和层析的膜蛋白纯化流程, 获得了高纯度、结构完整的目标蛋白。圆二色谱结果显示 ETR1-

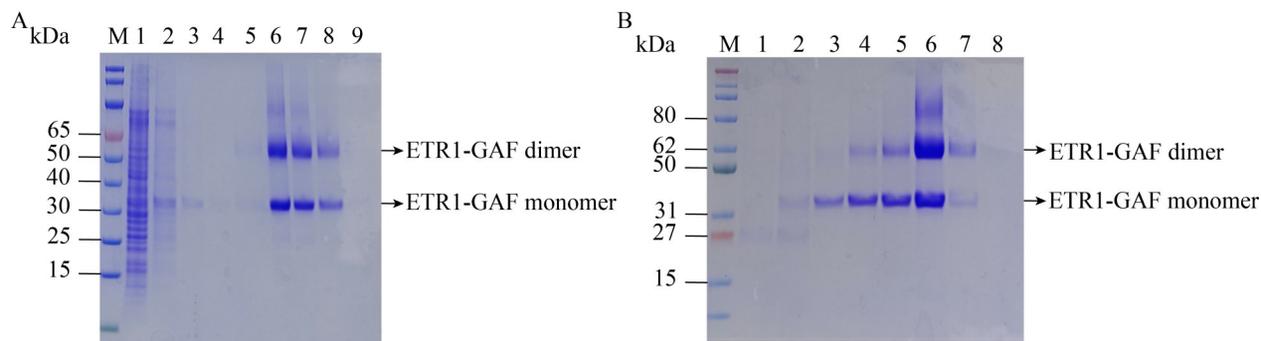


图2 SDS-PAGE检测ETR1-GAF蛋白纯化结果

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purified ETR1-GAF protein. A: Purification results by anti-Flag antibody affinity chromatography. M: Protein marker; 1: Flow-through fraction; 2–4: Wash fractions; 5–9: Elution fractions. B: Purification results by Ni-affinity chromatography. M: Protein marker; 1: Flow-through fraction; 2–3: Wash fractions; 4–8: Elution fractions.

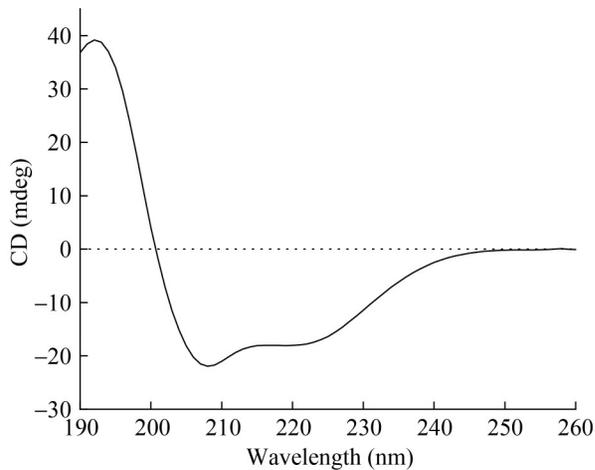


图3 ETR1-GAF的圆二色谱分析结果

Figure 3 Circular dichroism spectroscopy of ETR1-GAF.

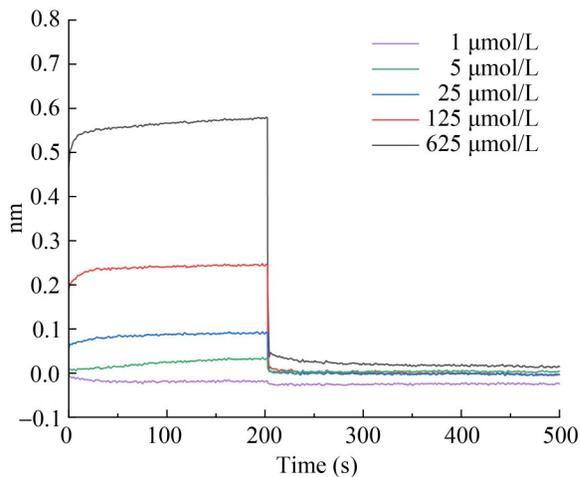


图4 BLI检测ETRI-GAF与NOP-1相互作用

Figure 4 BLI test of ETR1-GAF interacted with NOP-1. Time-dependent response of the ETR1-GAF modified probe interacted with different concentrations of NOP-1 (1, 5, 25, 125, 625 $\mu\text{mol/L}$), recorded on a Sartorius Octet system.

GAF 在 208 nm 和 222 nm 处呈现典型的双负峰, 提示该蛋白在溶液中以 α -螺旋为主的二级结构构象存在; SDS-PAGE 结果则表明蛋白以单体和二聚体这 2 种聚集状态共存, 这与乙烯受体在细胞内以寡聚体形式发挥功能的认识相吻合。

与传统的以大肠杆菌为宿主、需要包涵体复性或依赖可溶截短片段的策略相比, 真核毕赤酵母表达体系更有利于维持膜蛋白的正确折叠和部分翻译后修饰, 本研究为后续其他乙烯受体亚型乃至更多膜蛋白的功能化制备提供了可推广的技术路线。

在受体-配体互作分析方面, 本研究首次将生物膜干涉技术(BLI)应用于 ETR1-GAF 与抑制肽 NOP-1 之间的实时动力学研究。结果显示, 两者之间存在典型的浓度依赖性结合行为, association 阶段响应值随 NOP-1 浓度增加而升高, dissociation 阶段则表现为可逆的非共价解离过程, 拟合得到的平衡解离常数 KD 约为 $6.9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, R^2 接近 1, 说明 ETR1-GAF 与 NOP-1 之间具有较高亲和力且数据拟合可靠。在前期研究中, 乙烯受体相关肽段-蛋白的相互作用多借助荧光或热力学方法间接表征, 而 BLI 能够在含去垢剂的缓冲体系中以较低样品消耗量实时记录结合与解离全过程, 对膜蛋白尤其友好。与表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)和等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)相比, 本研究建立的 BLI 体系在操作便捷性、对样品量和缓冲体系的兼容性方面更适合扩展为乙烯受体家族的高通量筛选平台。

从生理和应用角度来看, NOP-1 源自乙烯信号通路核心组分 EIN2-C 端的核定位基序, 可通过竞争性占据 ETR1-GAF 结构域的结合界面, 阻断 EIN2 与受体之间的信号转导。本研究在体外定量验证了 ETR1-GAF 与 NOP-1 之间的高亲和力结合, 为解释 NOP-1 及其衍生肽在番茄、切花等植物中延缓熟化、抑制衰老的表型效应提供了分子基础。BLI 平台不仅可以比较不同 NOP-1 衍生肽(如序列延长、关键位点突变、D-氨基酸替换或端基修饰等)对亲和力和结合动力学的影响, 还可以引入不同乙烯受体亚型以及来自重要经济作物(如番茄、芒果等)的同源 GAF 结构域, 系统评估不同受体-肽段组合的

识别特异性和调控潜力,从而为开发更高效、更稳定的抗衰老防软化调控肽提供理论支持和实验依据。

需要指出的是,本研究仍然存在一定局限性。首先,当前使用的是包含跨膜域与 GAF 结构域的 ETR1 片段,并未覆盖激酶和接收结构域,因而尚不能全面反映全长受体在膜上的构象变化和信号输出过程;其次, Fos-14 去垢剂模拟的微环境与内质网/高尔基体等天然膜系统仍存在差异,可能对受体的寡聚状态、局部柔性和配体结合热力学参数产生影响。此外,本研究以代表性抑制肽 NOP-1 为模型配体,尚未在同一体系中直接比较 EIN2-C 端大分子配体与 NOP-1 之间的竞争关系,也尚未从高分辨率结构层面解析具体结合界面和关键残基。

针对上述不足,后续工作可以从 2 个层面进一步深化。其一,在膜环境层面,可尝试将 ETR1-GAF 重构于纳米盘、脂质体或高分子嵌段共聚物(如 DIBMA)形成的膜样环境中,系统比较不同膜模拟体系下蛋白折叠状态、寡聚行为及 NOP-1 结合动力学参数的差异,以评估当前 Fos-14 条件对受体构象和亲和力的潜在影响;同时,可尝试不同脂质组成或胆固醇含量,探索脂质组分对乙烯受体-抑制肽互作的调节作用。其二,在分子识别机制层面,可利用同位素标记和多维核磁共振等高分辨率技术,对 EIN2-C 端与 ETR1-GAF 的相互作用进行残基水平解析:例如,制备 ^{15}N 或 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的 EIN2-C 端结构域,通过 HSQC 及三共振实验完成主链化学位移归属,以化学位移扰动(chemical shift perturbation, CSP)、峰面积和线宽变化描绘结合界面和构象变化;进一步结合关键残基突变和功能表型测定,将 BLI 得到的亲和力变化与结构扰动一一对应,可在原子分辨率层面揭示乙烯受体-EIN2 以及抑制肽之间的精细识别机理。

综上所述,本研究建立了一个以毕赤酵母高效表达的 ETR1-GAF 为核心,结合 BLI 实时动力学检测的乙烯受体体外互作分析平台,成

功获得了 ETR1-GAF 与抑制肽 NOP-1 之间相互作用的定量参数,并从方法学和应用潜力这 2 个层面验证了该平台的可行性和优势。未来,通过在该平台上系统引入不同乙烯受体亚型、EIN2 结构域、多种衍生肽及小分子配体,有望绘制乙烯信号网络关键组分的蛋白质互作谱,并在此基础上筛选出具有更高活性和更好稳定性的调控分子,为园艺作物的采后保鲜、观赏植物寿命延长及乙烯相关胁迫管理提供新的分子工具和技术路径。

作者贡献声明

徐一帆:方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作;何振东:方案设计、实验操作、稿件润色修改;施金莹:实验操作、数据管理;陈文:实验设计、监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BAKSHI A, SHEMANSKY JM, CHANG CR, BINDER BM. History of research on the plant hormone ethylene[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(4): 809-827.
- [2] JOHNSON PR, ECKER JR. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective[J]. *Annual Review of Genetics*, 1998, 32: 227-254.
- [3] IQBAL N, KHAN NA, FERRANTE A, TRIVELLINI A, FRANCINI A, KHAN MR. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 475.
- [4] JU CL, POEL B, COOPER ED, THIERER JH, GIBBONS TR, DELWICHE CF, CHANG CR. Conservation of ethylene as a plant hormone over 450 million years of evolution[J]. *Nature Plants*, 2015, 1: 14004.
- [5] BANKS JA, NISHIYAMA T, HASEBE M. The selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants[J]. *Science*, 2011, 332(6032): 960-963.
- [6] RENSING SA, LANG D, ZIMMER AD. The physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants[J]. *Science*, 2008, 319(5859): 64-69.
- [7] HELLIWELL EE, WANG Q, YANG Y. Ethylene

- biosynthesis and signaling is required for rice immune response and basal resistance against magnaporthe oryzae infection[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(11): 831-843.
- [8] SHULAEV V, SARGENT DJ, CROWHURST RN. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(2): 109-116.
- [9] LACEY RF, BINDER BM. How plants sense ethylene gas: the ethylene receptors[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, 133: 58-62.
- [10] SHAKEEL SN, WANG XM, BINDER BM, SCHALLER GE. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family[J]. *AoB Plants*, 2013, 5: plt010.
- [11] CHEN YF, RANDLETT MD, FINDELL JL, SCHALLER GE. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(22): 19861-19866.
- [12] ZHOU X, LIU Q, XIE F, WEN CK. RTE1 is a Golgi-associated and ETR1-dependent negative regulator of ethylene responses[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 75-86.
- [13] HUA J, SAKAI H, NOURIZADEH S, CHEN QG, BLEECKER AB, ECKER JR, MEYEROWITZ EM. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(8): 1321-1332.
- [14] MÜLLER-DIECKMANN HJ, GRANTZ AA, KIM SH. The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1[J]. *Structure*, 1999, 7(12): 1547-1556.
- [15] ALONSO JM, HIRAYAMA T, ROMAN G, NOURIZADEH S, ECKER JR. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2148-2152.
- [16] BISSON MMA, GROTH G. Targeting plant ethylene responses by controlling essential protein-protein interactions in the ethylene pathway[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1165-1174.
- [17] QIAO H, SHEN ZX, HUANG SC, SCHMITZ RJ, URICH MA, BRIGGS SP, ECKER JR. Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas[J]. *Science*, 2012, 338(6105): 390-393.
- [18] BISSON MMA, GROTH G. New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors[J]. *Plant signaling & behavior*, 2011, 6(1): 164-166.
- [19] MILIĆ D, DICK M, MULNAES D, PFLEGER C, KINNEN A, GOHLKE H, GROTH G. Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 3890.
- [20] BISSON MMA, BLECKMANN A, ALLEKOTTE S. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 424(1): 1-6.
- [21] HOPPEN C, MÜLLER L, ALBRECHT AC, GROTH G. The NOP-1 peptide derived from the central regulator of ethylene signaling EIN2 delays floral senescence in cut flowers[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 1287.
- [22] BISSON MMA, KESSENBROCK M, MÜLLER L, HOFMANN A, SCHMITZ F, CRISTESCU SM, GROTH G. Peptides interfering with protein-protein interactions in the ethylene signaling pathway delay tomato fruit ripening[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30634.
- [23] PATRA P, DAS M, KUNDU P, GHOSH A. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107695.
- [24] KRELL T. Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology[J]. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1(2): 126-136.
- [25] JUG A, BRATKOVIČ T, ILAŠ J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2024, 176: 117741.