

文章编号: 1674-7054(2010)04-0314-07

橡胶树蔗糖转运蛋白基因 *SOS* 酵母双杂交体系的诱饵载体构建及自激活检测

秦云霞, 戚继艳, 唐朝荣

(中国热带农业科学院 橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 为了筛选巴西橡胶树蔗糖转运蛋白(*HbSUT*)的互作蛋白质, 构建了以 *SOS* 恢复系统为原理的胞质酵母双杂交系统的 6 个 *HbSUT* 基因的诱饵载体, 并进行了自激活检测。通过 PCR 技术从携带 *HbSUT* 基因的质粒中获得预期的基因编码序列, 将目标片段定向插入诱饵载体 *pSOS* 的 *Sal* I 及 *Not* I 酶切位点之间, 酶切和测序结果表明, 获得了序列和读框正确的 6 个 *HbSUT* 基因的诱饵载体 *pSOS-SUTs*, 进一步导入酵母温度敏感酵母 *cdc25H* 菌株中, 检测其表达产物对酵母 *SOS* 恢复系统 *Ras* 信号通路的激活作用, 除 *pSOS-SUT5* 外, 其他 5 个诱饵载体对酵母菌株均无激活作用, 因而适合于进行后续互作蛋白质筛选研究。

关键词: 巴西橡胶树; 蔗糖转运蛋白; 诱饵载体; *SOS* 恢复系统; 酵母双杂交系统

中图分类号: Q 816

文献标志码: A

在巴西橡胶树中, 橡胶的生物合成是以蔗糖为原料、乳管细胞为加工场所进行的。蔗糖的转运与库组织的分配, 特别是对乳管的供给效率是决定橡胶产量的一个关键因素^[1]。橡胶树成熟的乳管细胞与其周围的薄壁细胞之间没有胞间连丝连接^[2], 因此蔗糖要通过跨膜运输进入乳管。而在其他高等植物中, 蔗糖的跨膜运输是由一个中等规模的蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, *SUT*), 又称蔗糖-H⁺共转运蛋白(sucrose-H⁺ cotransporter, *SUC*)基因家族负责完成的^[3]。Reinders 等人^[4]利用酵母双杂交证实, 西红柿的 3 个蔗糖转运蛋白家族成员 *LeSUT1*, *LeSUT2*, *LeSUT4* 之间可以形成同源或异源寡聚体; 此外, 免疫定位显示这些蛋白同时存在于西红柿的叶片、叶柄和茎的筛管分子中, 表明它们在植物体内也可能发生互作。在细菌和哺乳动物中, 许多膜转运蛋白的功能发挥也依赖于形成低聚物^[4-5]。最近, Krügel 等人^[6]发现在酵母体系中, 细胞的氧化还原状态直接影响到异源表达的 *StSUT1* 蛋白的蔗糖吸收能力, 同时这种吸收能力与该转运蛋白的单体和二聚体比例的改变具有明显相关性。例如, 氧化剂(H₂O₂ 和 GSSG)处理可显著增加酵母细胞的蔗糖转运能力, 同时氧化剂处理也促使 *StSUT1* 蛋白由单体向二聚体转变, 从而二聚体的比例显著增加; 但用还原剂(GSH 和 DTT)处理酵母细胞, *StSUT1* 蛋白的蔗糖转运能力和二聚体比例均明显降低。最近, 张大鹏的研究表明^[7], 苹果果实中的蔗糖转运蛋白 *MdSUT1* 在体内和体外均与细胞色素 b5 相互作用, 并通过这种互作上调该蔗糖转运蛋白对蔗糖的亲合性, 从而使细胞能更好地适应糖饥饿。总之, 以上研究显示, 蛋白互作是植物蔗糖转运蛋白调控蔗糖转运活性的一种有效方式。

在前期研究中, 笔者克隆到 6 个橡胶树蔗糖转运蛋白基因(*HbSUT*)的全长 cDNA, 分别被聚为双子叶植物 *SUT* 基因的 3 种类型, 即 *SUT1*-type, *SUT2*-type, *SUT4*-type^[8], 并进一步证明其中的一个成员 *HbSUT3*

收稿日期: 2010-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(30760114); 农业部基本科研业务费(XJSYWFZX2008-16, XJSYWFZX2010-13); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-033-6)

作者简介: 秦云霞(1971-), 女, 河南禹州人, 中国热带农业科学院橡胶研究所助理研究员。

通信作者: 唐朝荣, 研究员. E-mail: chaorongtang@126.com

是决定乳管蔗糖供给和影响橡胶产量的一个关键基因^[9]。筛选橡胶树蔗糖转运蛋白家族成员的互作蛋白,有助于研究其活性调控的分子机制。笔者利用以 Sos 恢复系统为原理(Sos recruitment system, SRS)的细胞质酵母双杂交系统^[10],构建了 6 个 *HbSUT* 基因的诱饵表达载体,并检测其自激活性,为后续的互作蛋白筛选奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、试剂和委托业务 大肠杆菌 JM109 系本实验室保存;实验所用的限制性内切酶购自 MBI Ferments 公司;Taq plus DNA polymerase 购自天根生化科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axy-gen 公司;pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;酵母培养所用的培养基购自 BD 公司;其他生化试剂为进口或国产分析纯试剂。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;测序由深圳华大基因科技有限公司完成;胞质酵母双杂交系统 CytoTrap XR Library Construction Kit 中的菌株购自 Strata-gene 公司,载体和对照质粒载体由中国热带农业科学院生物技术研究所以沈文涛博士惠赠。

1.1.2 基因与引物 橡胶树蔗糖转运蛋白(*HbSUT*)6 个基因的全长 cDNA 克隆由本室分离保存,序列已提交 GeneBank(登录号:DQ985466, DQ985467, DQ985465, EF067334, EF067335 和 EF067333)。根据对 6 个 *HbSUT* 基因的酶切图谱分析,结合酵母诱饵表达载体 pSos 的阅读框和多克隆位点,在不同 *HbSUT* 基因 cDNA 编码区的 5'和 3'端分别引入 *Sal* I 及 *Not* I 酶切位点(表 1),以便将它们的编码区定向克隆到 pSos 上。

表 1 不同蔗糖转运蛋白基因编码区扩增所用的引物对

基因名称	正向引物序列(5'~3')	反向引物序列(5'~3')
<i>HbSUT1</i>	ACGTCGACGATGGAAGCTGATCCTAGGAA	ATGCGGCCGCTCAATGGAAGGCGGC
<i>HbSUT2A</i>	ACGTCGACGATGGACTCAGTGTGATTCTG	ATGCGGCCGCTTAGCCAAAATGAAAACCAGAC
<i>HbSUT2B</i>	ACGTCGACGATGGATTCGTTGTGATTCTG	ATGCGGCCGCTTAGCCAAAATGAAAACCAG
<i>HbSUT3</i>	ACGTCGACGATGGAGACTGATCCTACGAA	ATGCGGCCGCTCAATGGAAGGCAGCTGT
<i>HbSUT4</i>	ACGTCGACGATGGCGATCCCACAGGC	ATGCGGCCGCTCATGGGGGGGGCCCT
<i>HbSUT5</i>	ACGTCGACGATGCCAATCCCACAGG	ATGCGGCCGCTCATGGGAGGGCCATG

注:正向引物下划线示引入的 *Sal* I 酶切位点序列;反各引物下划线示引入的 *Not* I 酶切位点序列。

1.2 方法

1.2.1 蔗糖转运蛋白基因的克隆 利用本实验室保存的携带蔗糖转运蛋白全长 cDNA 基因的质粒为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,循环数为 25。扩增结束后,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的扩增结果。

1.2.2 pSos 诱饵载体的构建与鉴定 PCR 产物经回收纯化后与 pMD18-T 连接,连接产物转化大肠杆菌 JM109,挑取菌落用测序引物进行 PCR 初步鉴定,阳性克隆作进一步的测序验证。挑取序列准确无误的克隆,摇菌提取质粒并用 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切,回收相应的插入片段,用 T₄ DNA 连接酶与经同样双酶切的酵母表达载体 pSos 连接过夜,然后转化 JM109 感受态细胞,挑取菌落进行 PCR 鉴定,阳性克隆作进一步的测序鉴定,序列准确和读框正确的重组质粒即为 *HbSUT* 基因的 pSOS 诱饵载体,分别命名为 pSOS-SUT1, pSOS-SUT2A, pSOS-SUT2B, pSOS-SUT3, pSOS-SUT4 和 pSOS-SUT5。上述载体构建后检测和测序中所用的测序引物为 5'-CCAAGACCAGGTACCATG-3'(正向测序)和 5'-GCCAGGGTTTTCCCACT-3'(反向测序)。

1.2.3 共转化与诱饵蛋白对酵母 Sos 恢复系统 Ras 信号通路激活作用的检测 参照 CytoTrap XR Library Construction Kit(Stratagene)提供的方法进行酵母感受态细胞的制备、共转化与激活作用检测。按表 2 进

行不同质粒的组配。

表 2 诱饵蛋白和对照检测质粒共转化组配

编号	质粒组配	各质粒 用量/ng	酵母感受态 用量/ μ L	说明	培养基
1	<i>pSOS</i> + <i>pMyr</i>	2 000	500	验证温敏回复和转化效率	
2	<i>pSOS SUT1</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT1</i> 的 <i>Sos-SUT1</i> 融合蛋白是否正常表达	
3	<i>pSOS SUT1</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT1</i> 是否有自激活作用	
4	<i>pSOS SUT2A</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT2A</i> 的 <i>Sos-SUT2A</i> 融合蛋白是否正常表达	SD/Glucose (- UL)
5	<i>pSOS SUT2A</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT2A</i> 是否有自激活作用	
6	<i>pSOS SUT2B</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT2B</i> 的 <i>Sos-SUT2B</i> 融合蛋白是否正常表达	
7	<i>pSOS SUT2B</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT2B</i> 是否有自激活作用	SD/Galactose (- UL)
8	<i>pSOS SUT3</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT3</i> 的 <i>Sos-SUT3</i> 融合蛋白是否正常表达	
9	<i>pSOS SUT3</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT3</i> 是否有自激活作用	
10	<i>pSOS SUT4</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT4</i> 的 <i>Sos-SUT4</i> 融合蛋白是否正常表达	
11	<i>pSOS SUT1</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT4</i> 是否有自激活作用	
12	<i>pSOS SUT5</i> + <i>pMyr SB</i>	300	100	验证质粒 <i>pSos-SUT5</i> 的 <i>Sos-SUT5</i> 融合蛋白是否正常表达	
13	<i>pSOS SUT5</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	验证 <i>SUT5</i> 是否有自激活作用	
14	<i>pSOS MAFB</i> + <i>pMyr Lamin C</i>	300	100	阴性对照	
15	<i>pSOS MAFB</i> + <i>pMyr MAFB</i>	300	100	阳性对照	

1.2.4 诱饵载体单独转化温敏突变型酵母检测 参照 CytoTrap XR Library Construction Kit (Stratagene) 提供的方法进行酵母感受态细胞的制备和转化。*pSOS* 和 *pSOS-SUT5* 两个诱饵蛋白载体分别转化 *cdc25* 酵母细胞,使用 SD/Glucose (- Leu)或 SD/Galactose (- Leu)培养基,质粒用量均为 300 ng。

2 结果与分析

2.1 诱饵蛋白基因编码区的扩增 利用 PCR 扩增获得巴西橡胶树 6 个蔗糖转运蛋白基因 *HbSUT1*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT3*, *HbSUT4* 和 *HbSUT5* 的 cDNA 编码区,同时在编码区的 5'和 3'端分别引入了 *Sal* I 和 *Not* I 位点。预期扩增产物大小分别为 1 596,1 836,1 836,1 605,1 497 和 1 497 bp,PCR 扩增片段与预期大小相符(见图 1)。

2.2 诱饵载体的构建与鉴定 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化,然后与 *pMD18 - T* 连接,重组子经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切鉴定,结果显示插入片段的大小与预期结果相符(图 2);回收相应的目的片段,与经同样双酶切的酵母表达载体 *pSOS* 连接,获得诱饵载体,分别命名为:*pSOS-SUT1*, *pSOS-SUT2A*, *pSOS-*

SUT2B, *pSOS-SUT3*, *pSOS-SUT4* 和 *pSOS-SUT5*, 提取质粒后进行双酶切鉴定, 得到与预期大小一致的片段 (图 3), 测序结果与预期一致, 且开放阅读框架正确, 表明已成功构建了 6 个 *HbSUT* 基因的酵母诱饵载体。

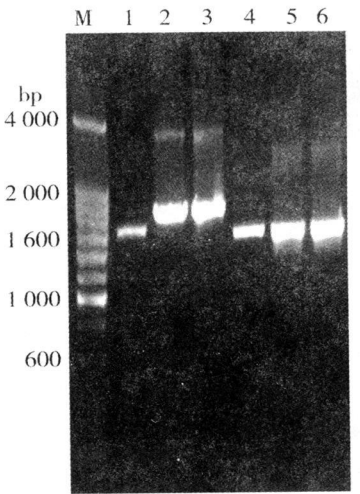


图 1 诱饵蛋白基因编码区的 PCR 扩增
M: 200 bp DNA ladder; 1: *HbSUT1*; 2: *HbSUT2A*; 3: *HbSUT2B*; 4: *HbSUT3*; 5: *HbSUT4*; 6: *HbSUT5*

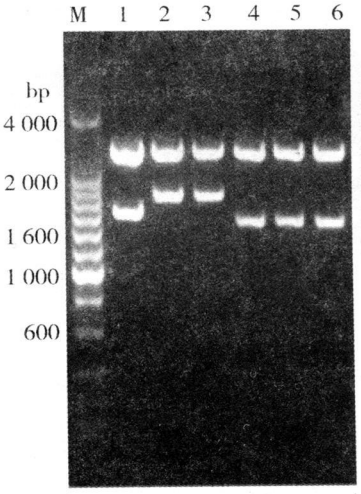


图 2 克隆载体 SalI + NotI 双酶鉴定
M: 200 bp DNA ladder; 1: *HbSUT1*; 2: *HbSUT2A*; 3: *HbSUT2B*; 4: *HbSUT3*; 5: *HbSUT4*; 6: *HbSUT5*

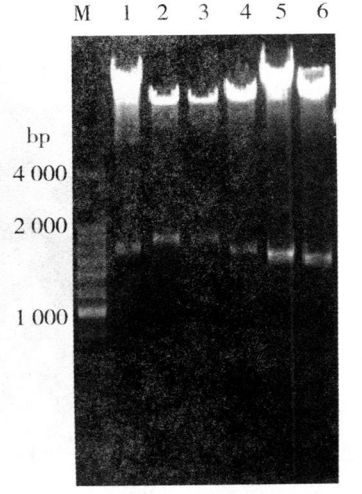


图 3 诱饵载体的双酶切 (Sal I + Not I) 鉴定
M: 200 bp DNA ladder; 1: *pSos-SUT1*; 2: *pSos-SUT2A*; 3: *pSos-SUT2B*; 4: *pSos-SUT3*; 5: *pSos-SUT4*; 6: *pSos-SUT5*

2.3 酵母感受态细胞的温敏恢复突变和转化效率测定 取 75 μL 感受态细胞涂于 YPDA 平板上, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 6 d 后仅出现了 8 个酵母菌落, 说明酵母菌株温敏回复突变的发生率极低, 可用于后续实验。根据质粒组配 1, 计算出酵母感受态细胞的转化效率为 $2.3 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 酵母质粒; 剩余转化液于 SD / Glucose (–UL) 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 d, 未观察到温敏回复, 说明所制备的酵母感受态细胞可用于后续的酵母双杂交筛选。

2.4 诱饵蛋白自激活作用的检测 按表 2 将质粒组配 2 ~ 15 的转化物涂布于 SD/Glucose (–Leu, –Ura, –UL) 平板上, 按“材料与方法”中所述操作进行 *SOS-SUT* 融合蛋白的表达和自激活检测。图 4 显示, 阳性和阴性对照的结果同预期一致, 同时 6 种 *SOS-SUT* 融合蛋白均正常表达。不过, 自激活检测显示, 除 *HbSUT5* 外, 其他 5 个 *SUT* 蛋白对酵母 *SOS* 恢复系统 Ras 信号通路无自激活作用, 可作为诱饵蛋白用于后续互作检测。在葡萄糖培养基上, *pSOS-SUT5* 和 pMyr-Lamin C 组合可使温敏酵母突变体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长, 但却不能使其在半乳糖培养基上生长。然而, 根据 Petitjean 的研究结果, 在葡萄糖存在时, 由于 Gal1 启动子受抑制而关闭了由该启动子控制的 Myr – 靶蛋白融合蛋白的表达, 只有在半乳糖的平板上, 诱饵蛋白和靶蛋白才能实现共表达, 如二者存在相互作用, 将使与诱饵蛋白融合的 Sos 也定位到膜上, 从而可激活 Ras 蛋白使酵母在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下生长^[10], 这与本实验结果不相符。

2.5 诱饵载体单独转化温敏突变型酵母的实验检测 为进一步分析 *pSOS-SUT5* 和 pMyr-Lamin C 组合可使温敏突变型酵母在葡萄糖培养基上恢复突变的原因, 笔者单独转化诱饵载体 *pSOS-SUT5*。结果显示, *pSOS-SUT5* 转化对温敏突变型酵母的影响与同时共转化 *pSOS-SUT5* 和 pMyr-Lamin C 的效果一致 (图 5)。以此推测, 在葡萄糖培养基上, 表达的 *SOS-SUT5* 融合蛋白可能直接定位到质膜上并激活 Ras 信号通路, 使突变型酵母回复突变。但是, 尚无法解释为什么携带 *pSOS-SUT5* 的酵母转化子在半乳糖培养基却不能使突变型酵母回复突变。

SD/-Leu, -Ura

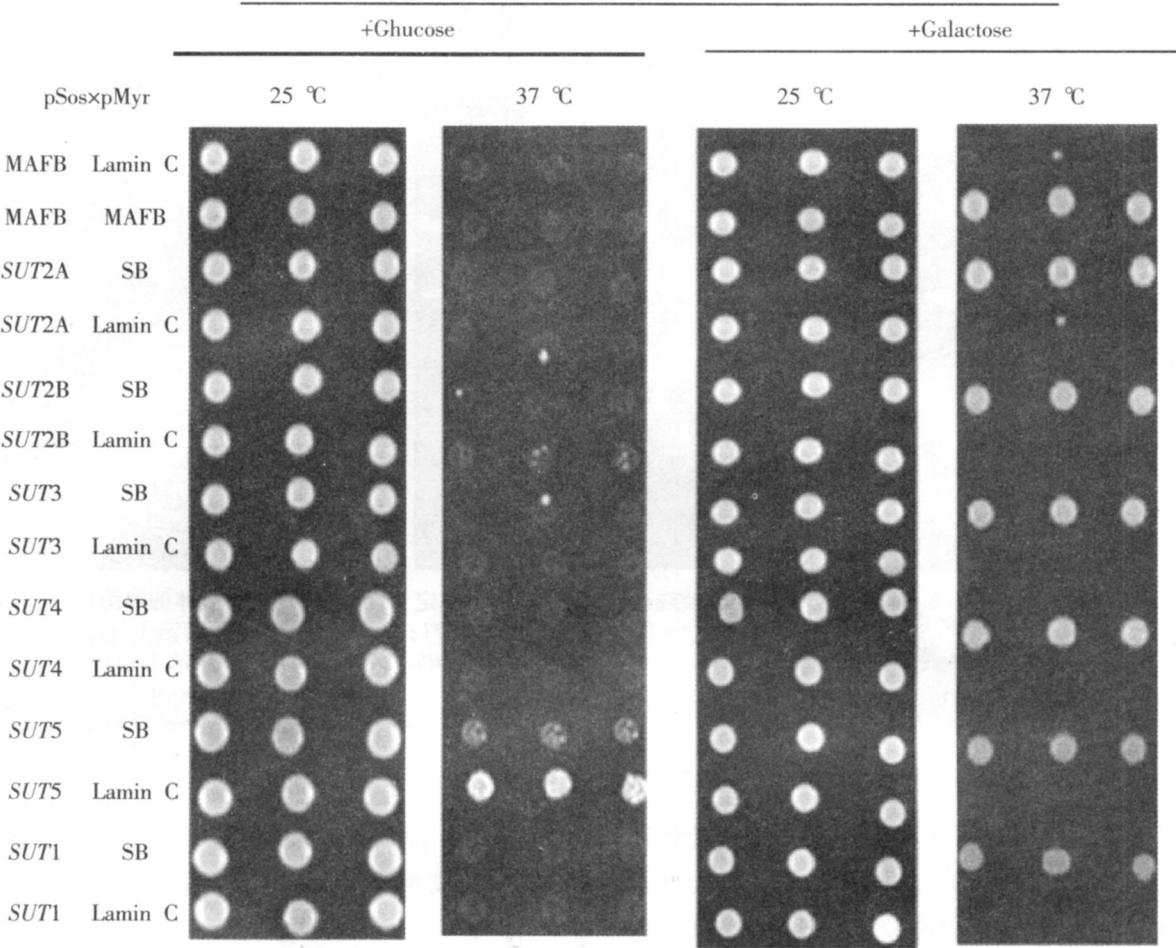


图4 诱饵蛋白共转化的自激活作用检测

SD/-Leu

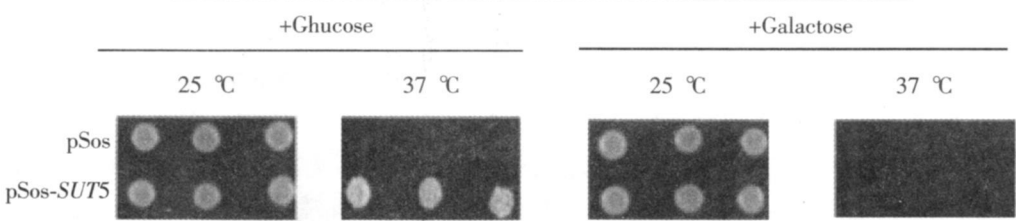


图5 诱饵载体单独转化的自激活作用检测

3 讨 论

在巴西橡胶树中,乳管是重要的库器官,是天然橡胶合成和贮存的场所。天然橡胶的生物合成所需的原料——蔗糖是来自进行光合作用的成熟叶肉细胞,是长距离运输后经乳管原生质体膜进入乳管的^[11-12]。蔗糖转运蛋白是一类典型的膜结合蛋白,广泛存在于高等植物的各种组织和器官中,负责蔗糖的跨膜运输,在蔗糖进出韧皮部、蔗糖的贮藏和库组织的蔗糖供给等环节中发挥重要作用^[5]。为了维持糖在细胞中的动态平衡,糖转运蛋白可能会通过检测糖质量浓度的改变而调控其表达水平和转运活性^[9]。研究显示,在大多数情况下,高质量浓度蔗糖下调这些基因的表达^[13-16],而蔗糖饥饿上调这些基因的表达^[17]。在巴西橡胶树中,尽管研究者早已开展胶乳中蔗糖含量与产胶的相关性研究^[3],但目前尚

不清楚乳管的蔗糖供给与蔗糖代谢的调控机制。本实验成功构建 6 个橡胶树蔗糖转运蛋白基因 *Sos* 恢复系统的诱饵载体,自激活实验表明,除 *HbSUT5* 外,其他 5 个 *SUT* 诱饵蛋白对酵母 *Sos* 恢复系统 Ras 信号通路均无自激活作用,这为分析橡胶树蔗糖转运蛋白家族成员间的相互作用或筛选这些蔗糖转运蛋白的互作蛋白奠定了基础,有助于进一步了解橡胶树蔗糖转运蛋白调控蔗糖供给和代谢的机理。

酵母双杂交系统是一种建立在酵母菌基础上的遗传学分析方法,主要用于检测蛋白间的相互作用及克隆与已知蛋白相关的未知新基因。与传统的酵母双杂交系统相比,*Sos* 恢复系统主要有以下优点:(1)被研究的蛋白质的相互作用发生在胞质而不是核中,诱饵蛋白和靶蛋白可经过翻译后加工;(2)诱饵蛋白与转录因子互作无须担心诱饵蛋白自身的转录能力,适合研究转录因子以及在胞质中行使生理功能的蛋白质;(3)一些原本对酵母生长有害的蛋白质与 *Sos* 融合在细胞质中表达以后对酵母生长的毒性可能会降低。因此,*Sos* 恢复系统克服了传统的酵母双杂交系统的一些限制,大大拓展了酵母双杂交技术的应用范围^[18-21]。但是酵母双杂交系统中假阳性是一个较突出的问题,靶基因的自身激活作用就是造成假阳性结果的重要原因。从笔者进行的实验中可以看出,一些膜蛋白会把与其融合的 *Sos* 蛋白定位到酵母细胞膜上,从而恢复 Ras 信号通路产生自激活效应,因此,对一些膜蛋白 *Sos* 恢复系统可能无法进行分析。所以,在应用双杂交系统研究蛋白与蛋白相互作用,尤其是筛选 cDNA 文库之前,首先要排除诱饵融合蛋白的自激活功能,否则假阳性结果会大大增加。

参考文献:

- [1] AUZAC J, JACOB J L, PRÉVOT J C, et al. The regulation of cis-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea brasiliensis*; Proceedings of Recent research developments in plant physiology Trivandrum, 1996 [C]. Trivandrum: Research Singpost, 1997; 273 - 332.
- [2] DEFAY E, SANIER C, HEBANT C. The distribution of plasmodesmata in the phloem of *Hevea brasiliensis* in relation to laticifer loading [J]. Protoplasma, 1989, 149: 155 - 162.
- [3] 戚继艳, 阳江华, 唐朝荣. 植物蔗糖转运蛋白的基因与功能 [J]. 植物学通报, 2007, 24(4): 532 - 543.
- [4] REINDERS A, SCHULZE W, KÜHN C, et al. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element [J]. The Plant Cell, 2002, 14: 1567 - 1577.
- [5] VEENHOFF L M, HEUBERGER E H, POOLMAN B. Quaternary structure and function of transport proteins [J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(5): 242 - 249.
- [6] KRÜGEL U, VEENHOFF L M, LANGBEIN J, et al. Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter *SUT1* is affected by posttranslational modification [J]. The Plant Cell, 2008, 20: 2497 - 2513.
- [7] FAN R C, PENG C C, XU Y H, et al. Apple sucrose transporter *SUT1* and sorbitol transporter *SOT6* interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars [J]. Plant Physiology, 2009, 150: 1880 - 1901.
- [8] 阳江华, 黄德宝, 刘术金, 等. 巴西橡胶树六个蔗糖转运蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 32 - 38.
- [9] TANG C, HUANG D, YANG J, et al. The sucrose transporter *HbSUT3* plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. Plant, Cell Environment, 2010, 33: 1708 - 1720.
- [10] PETITJEAN A, HILGER F, TATCHELL K. Comparison of thermosensitive alleles of the *Cdc25* gene involved in the camp metabolism of *saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 1990, 124(4): 797 - 806.
- [11] HÉBANT C. Ontogénie des laticifères du système primaire d'*Hevea brasiliensis*; une étude ultrastructurale et cytochimique [J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 974 - 985.
- [12] BOUTEAU F, DELLIS O, BOUSQUET U, et al. Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea* [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1999, 48(1): 135 - 139.

- [13] WEBER H, BORISJUK L, HEIM U, et al. A role for sugar transporters during seed development; molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in faba bean seeds[J]. The Plant Cell, 1997, 9: 895 – 908.
- [14] RANSOM-HODGKINS W D, VAUGHN M W, BUSH D R. Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter[J]. Planta, 2003, 217: 483 – 489.
- [15] CHIOU T J, BUSH D R. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4784 – 4788.
- [16] LI C Y, SHI J X, WEISS D, et al. Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306: 402 – 407.
- [17] LI C Y, WEISS D, GOLDSCHMIDT E E. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root[J]. Planta, 2003, 217(1): 11 – 20.
- [18] MAROUN M, ARONHEIM A. A novel in vivo assay for the analysis of protein-protein interaction[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(13): 4.
- [19] HUANG Z, ANDRIANOV V M, HAN Y, et al. Identification of arabidopsis proteins that interact with the cauliflower mosaic virus (CaMV) movement protein[J]. Plant Mol Biol, 2001, 47(5): 663 – 675.
- [20] LALONDE S, EHRHARDT D W, LOQUÉ D, et al. Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions; latest techniques and current limitations[J]. Plant Journal, 2008, 53(4): 610 – 635.
- [21] 沈文涛, 周鹏. PRSV 运动相关病毒蛋白的 SOS 恢复系统诱饵载体构建及自激活效应检测[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 363 – 367.

Construction of Bait Vectors Containing Sucrose Transporter Genes of *Hevea Brasiliensis* in SOS Recruitment System and Identification of their Autonomous Activation Effects

QIN Yun-xia, QI Ji-yan, TANG Chao-rong

(1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China;

2. Agronomy College, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: In order to screen the interacting proteins of sucrose transporters (*SUTs*) from *Hevea brasiliensis*, the bait vectors of the six sucrose transporters of cytoplasmic yeast two-hybrid system, which was based on Sos recruitment system (SRS), were constructed and detected for their self activity. The coding sequences of *SUTs* were obtained by PCR from the plasmids containing respective *Hevea SUTs*, and the amplified products were cloned into the bait vector pSos at site *Sal* I and *Not* I. Restriction analysis and sequencing confirmed the sequence identity and the correct in frame fusion with the Sos gene of pSos. The resultant bait vectors of the 6 *Hb-SUT* genes were termed as pSos-*SUTs*. The pSos-*SUTs* were transformed into the temperature-sensitive strain *cdc25H*, and detected for their self activating effects. The results showed that except for pSos-*SUT5*, the other five bait vectors had no autonomous activation upon the yeast strain, which were suitable for the follow-up studies.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Sucrose transporter; bait vector; Sos recruitment system; yeast two-hybrid system