

文章编号: 1674 - 7054(2012) 02 - 0121 - 05

拟南芥 *AtGRP7* 基因诱饵载体的构建 及酵母双杂的初筛

刘长仁, 刘伟, 翟金玲, 黄亮, 黄惜

(热带生物资源教育部重点实验室/生物科学技术研究所; 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘要: *AtGRP7* 基因是拟南芥的一个从动振荡器基因, 目前其生理功能知之甚少。为了更好地研究与 *AtGRP7* 基因的互作蛋白, 笔者利用 PCR 技术从携带 *AtGRP7* 基因序列的质粒中扩增该基因的编码序列, 然后将目标序列插入 pGBKT7 载体的 *Nco* I 和 *Pst* I 2 个酶切位点之间, 构成酵母双杂体系的诱饵载体。酶切和测序结果表明, 构建的载体目标基因序列和阅读框是正确的。之后, 将该载体转入感受态酵母 Y2H Gold 菌株中, 并检测其表达物对报告基因的激活情况。*AtGRP7* 酵母转化菌在 SD/ - Trp 平板上长势良好; 在 SD/ - Trp/ - Ade 平板上长势较弱; 在 SD/ - Trp/ - His 和 SD/ - Trp/ - Ade/ - His 平板上则没有生长。这说明 His 合成相关基因没有被转录和翻译, *AtGRP7* 基因在该酵母双杂体系中没有自转录激活。笔者在酵母双杂的初步筛选中, 还获得几个可能与 *AtGRP7* 互作的基因。

关键词: *AtGRP7*; 诱饵载体; 自转录激活

中图分类号: Q 782

文献标志码: A

生物节律(也称生物钟)使生物体的生理生化过程更好地适应环境的变化, 从而提高其生存概率^[1]。在植物基因组中, 大约有 10% 的功能基因受到生物节律的调控。参与生物节律调控的基因又分为中央振荡器(central oscillator)和从动振荡器(slave oscillator)^[2]。从动振荡器基因的表达受到中央振荡器基因的控制, 但从动振荡器又能调控下游基因的表达和节律变化^[3]。*AtGRP7* 蛋白是拟南芥的一个富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白, 其表达受到自我反馈调控, 并参与局部的生物节律的控制, 是一个从动振荡器基因^[4-5]。Fu Z O 等的研究表明, 植物假单胞菌病原菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 分泌的 III 型效应因子 HopU1 能使植物体 GRP 蛋白的 RNA 识别基序发生 ADP 核糖基化, 使 GRP 蛋白丧失结合 RNA 的能力, 致使 GRP 蛋白无法激活下游相关基因引起植物免疫应答反应, 这表明 *AtGRP* 蛋白与植物免疫应答的激活有关^[6]。此外, 还有研究表明, *AtGRP* 与拟南芥的冷胁迫应答及花期的过渡有关^[7-8]。*AtGRP7* 基因是首个在拟南芥上发现的从动振荡器基因, 其转录水平在傍晚时段达到最高, 之后逐渐下降, 形成以 24 h 为周期的振荡^[4-5]。*AtGRP7* 的表达节律一方面受到 *CCA1* 和 *Toc1* 等中央振荡器基因的调控, 另一方面又受到自我反馈调控^[9]。目前的研究表明, *AtGRP7* 基因参与植物的免疫应答反应^[6] 和 ABA 信号途径相关的非生物胁迫^[10-11] 以及花期的调控等生理过程^[7-8]。但 *AtGRP7* 的分子作用机理至今依然是个谜, 与之发生相互作用的蛋白还未被鉴定, 所以鉴定与之互作的蛋白是解答这个学术问题的关键。但到目前为止, 与 *AtGRP7* 发生相互作用的蛋白还未被鉴定, 与之相关的发生机理尚不清楚。笔者利用酵母双杂交技术已筛选出几个可能与 *AtGRP7* 发生相互作用的蛋白基因, 结果报道如下:

收稿日期: 2012 - 02 - 14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060107); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金博导类项目(20104601110003) 资助

作者简介: 刘长仁(1985 -) 男, 湖南衡阳人, 海南大学农学院生物化学与分子生物学 2009 级硕士研究生。

通信作者: 黄惜, xihuang01@gmail.com

1 材料与方法

1.1 材料 酵母菌株 Y187、Y2H Gold 及酵母双杂诱饵载体 pGBKT7 均购自 Clontech 公司; *Taq* DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司; 快速限制性内切酶购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒与凝胶回收试剂盒购自 AxyGen 公司; 其他常规试剂及生化试剂均为国产超纯和分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *AtGRP7* 基因诱饵载体的构建 根据拟南芥 *AtGRP7* 基因的序列, 设计出分别带有 *Nco* I 和 *Pst* I 酶切位点的引物 P1 (TTCCATGGCGTCCGGTGATGTTGAGT) 和 P2 (CCCTGCAGTTACCATCCTCCACCAC-CACC) 并利用实验室保存的携带 *AtGRP7* 基因序列的质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 循环数为 35; 72 °C 5 min。PCR 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收, 再次电泳检测后连接 pMD-20T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 。用 *Nco* I 和 *Pst* I 分别对 pMD-20T-*AtGRP7* 和 pGBKT7 载体进行酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的片段, 然后用 T4-DNA 连接酶将酶切后的 *AtGRP7* 和 pGBKT7 回收片段连接起来, 转化大肠杆菌 DH5 α 。转化后进行质粒提取, 然后将构建好的 *AtGRP7*-pGBKT7 载体再次进行 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切检测, 然后送华大公司测序。

1.2.2 Y2H Gold 酵母感受态转化及自转录激活检验 Y2H Gold 酵母感受态转化步骤: 1) 取经 -80 °C $w = 25\%$ 的甘油保存的 Y2 HGold 菌种, 并将其划线于 YPDA 平板上, 30 °C 培养 2~3 d。从划线的 YPDA 平板上挑取直径为 2~3 mm 的酵母菌落接种于 5 mL 的 YPDA 液体培养基中, 30 °C 220 r·min⁻¹ 振荡培养 8~12 h。2) 取 5 μ L 上述振荡培养后的菌液接种于预装在 250 mL 三角瓶中 50 mL 的 YPDA 液体培养基中, 30 °C 220 r·min⁻¹ 振荡培养 16~20 h, 直至 $OD_{600} = 0.15 \sim 0.3$ 。3) 将步骤 2) 中的菌液进行离心 (1 000 r·min⁻¹) 5 min, 弃上清, 将沉淀重悬于 100 mL 的 YPDA 液体培养基中, 继续进行 30 °C 220 r·min⁻¹ 振荡培养 3~5 h, 直至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 。4) 将步骤 3) 的 100 mL 的 YPDA 液体培养基倒入 2 个 50 mL 无菌的离心管中, 室温 (26 °C) 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 用 30 mL 的 ddH₂O 重新悬浮并洗涤菌体。5) 将经 ddH₂O 重新悬浮并洗涤的菌体在室温 (26 °C) 下, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 留下酵母细胞。6) 用 1 mL 的 0.1 mol·L⁻¹ LiAc 重新悬浮酵母细胞, 并将菌体转移至 1.5 mL 离心管中, 高速离心 (14 000 r·min⁻¹) 15 s, 弃上清, 留下酵母细胞。7) 用 600 μ L 的 0.1 mol·L⁻¹ LiAc 重新悬浮酵母细胞, 振荡细胞悬浮液, 取 50 μ L 细胞悬浮液加到标记的 1.5 mL 离心管中, 同上离心沉淀细胞, 用微量取样器除去 LiAc。8) 将 1 mL 单链载体 DNA 样品煮沸 5 min, 迅速在冰水中冷却, 备用。9) 往标记的离心管中加入 240 μ L (ρ (PEG) = 500 g·L⁻¹, 36 μ L 1.0 mol·L⁻¹ LiAc, 25 μ L 步骤 8) 的单链载体 DNA (2.0 g·L⁻¹), 50 μ L 水和 *AtGRP7*-pGBKT7 载体质粒 (0.1~10 μ g)。剧烈振荡反应管直到细胞混合液完全混匀, 置 30 °C 下温育 30 min, 42 °C 水浴中热激 20~25 min, 以 6 000~8 000 r·min⁻¹ 离心 15 s, 用微量移液枪除去上清, 吸 0.2~1.0 mL 无菌水加到反应管中, 用移液枪上下轻轻抽提的方式悬浮沉淀。10) 最后用 200 μ L 转化混合液涂布于 SD/-Trp 选择平板, 待 2~3 d 后, 做菌落 PCR 检测, 挑取经菌落 PCR 验证过的菌落置于 SD/-Trp 液体培养基中培养 2~3 d 后, 用 $w = 25\%$ 的甘油保菌, -80 °C 保存。

取 1 mL 经 PCR 验证后的转化酵母菌液接种于 SD/-Trp 的液体培养基中, 培养 2~3 d 后再分别接种到 SD/-Trp, SD/-Trp/-Ade, SD/-Trp/-His, SD/-Trp/-Leu/-His 营养缺陷培养基上, 在 30 °C 下培养 3~7 d, 观察在不同缺陷型培养基上的生长情况。酵母双杂参照 Clontech 操作手册 (PT4084-1) 进行。

2 结果

2.1 *AtGRP7* 基因的克隆和诱饵载体的构建 利用引物 P1 和 P2, 以携带 *AtGRP7* 基因序列的质粒为模板进行 PCR 扩增, 得到的 PCR 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增的条带略微大于 500 bp, 与预测的 510 bp 大小一致 (见图 1A)。PCR 产物经切胶回收和再次电泳检测, 连接 pMD-20T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经 PCR 检测证实其扩增片段大小一致 (见图 1B)。提取质粒, 用 *Nco* I 和 *Pst* I 进行双酶

切,再利用琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收 *AtGRP7* 目的片段,然后用 T4-DNA 连接酶将酶切后的 *AtGRP7* 和 pGBKT7 连接起来,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒后再用 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切检测,得到的酶切结果符合预期的片段大小(见图 1C)。构建的载体经测序分析,确定其序列及阅读框是正确的(测序结果未列出)。

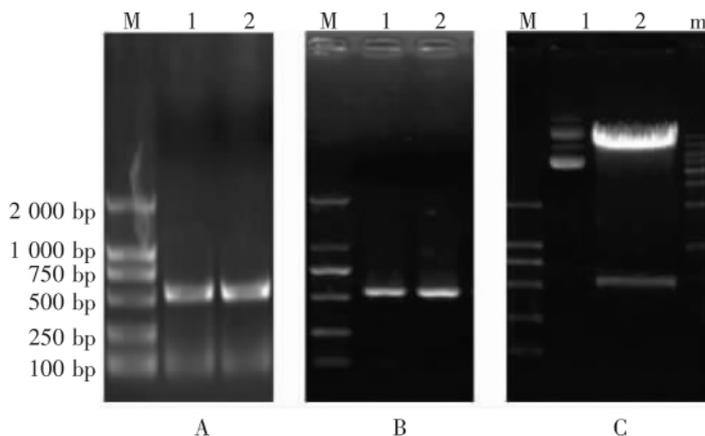


图 1 *AtGRP7* 酵母转化诱饵载体的构建

A. *AtGRP7* 基因的 PCR 产物; B. pGBKT7-*AtGRP7* 载体菌液 PCR 检测; C. pGBKT7-*AtGRP7* 载体的双酶切检测; M: DL2000; m: 申能博彩生物 perfect 1Kb Ladder; 在图 1A 中, 1~2 是 *AtGRP7* 基因的 PCR 产物; 在图 1B 中, 1~2 是 pGBKT7-*AtGRP7* 载体菌液 PCR 产物; 在图 1C 中, 1 是未酶切的 pGBKT7-*AtGRP7* 质粒载体, 2 是 pGBKT7-*AtGRP7* 质粒用 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切后的产物。

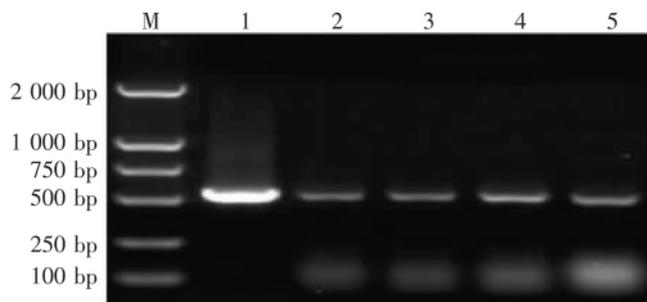


图 2 *AtGRP7* 酵母转化菌落 PCR 检测

M: AL2000; 1: 阳性对照; 2~5: *AtGRP7* 酵母转化后菌落 PCR 产物。

2.2 诱饵载体自激活检验及酵母双杂 将 pGBKT7-*AtGRP7* 诱饵载体转化 Y2H Gold 酵母后,进行菌落 PCR 检测。如图 2 所示,以转化后酵母菌落为模板的 PCR 产物与以 pGBKT7-*AtGRP7* 载体质粒为模板的 PCR 阳性对照大小一致,约为 510 bp,这表明目标载体成功转化 Y2H Gold 酵母感受态。

pGBKT7-*AtGRP7* 诱饵载体酵母双杂结果(见图 3)表明,酵母转化菌利用诱饵载体携带合成 Trp 基因,在 SD/-Trp 平板上长势良好,这说明 *AtGRP7* 基因的表达对宿主菌没有明显毒性。酵母转化菌在缺少腺嘌呤和 Trp 的 SD/-Trp/-Ade 缺失平板上,长势较差;在缺少组氨酸和 Trp 的 SD/-Trp/-His 平板上和 SD/-Trp/-Ade/-His 三缺平板培养基上,几乎停止生长,这说明与组氨酸合成的基因的转录没有被 *AtGRP7* 基因激活,因此,该诱饵载体转化菌可用于酵母双杂筛选。由于酵母双杂系统的 pGADT7-Rec 载体携带 Leu 合成相关基因,因此,可以选择 SD/-Trp/-His/-Leu(三缺)和 SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu(四缺)作为筛选培养基,用于 *AtGRP7* 基因互作蛋白的筛选(见图 3A)。经过酵母双杂实验,笔者已经筛选出几个与 *AtGRP7* 发生相互作用的蛋白基因(见图 3B)。它们的测序结果显示,一个是编码核糖体蛋白的基因(A1),一个是编码类似碳水化合物结合蛋白的基因(A4),还有一个是编码假定的木酮糖激酶的基因(A5),其他几个为功能未知的基因(A2, A3 和 B15, C30),这些功能未知的基因的序列分析及其 *AtGRP7* 的互作和功能还有待进一步研究。

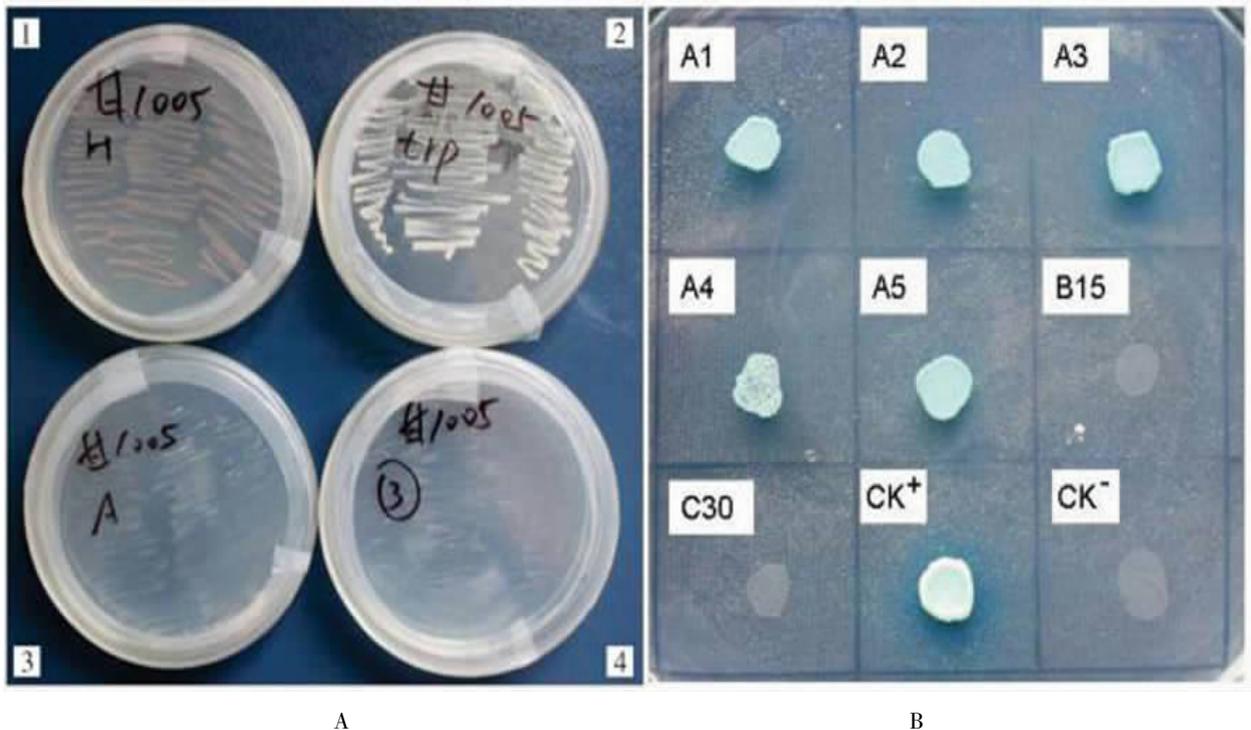


图3 pGBKT7 - *AtGRP7* 诱饵载体酵母双杂结果

A: 诱饵载体自激活检验, 1. SD/ - Trp/ - Ade 平板, 2. SD/ - Trp 平板, 3. SD/ - Trp/ - His 平板, 4. SD/ - Trp/ - Ade/ - His 平板; B: 酵母双杂筛选结果, 平板为 SD/ - Trp/ - Ade/ - His/ - Leu, 加 AbA 和 α -gal, CK⁺ 为 pGADT7 - T + pGBKT7 - 53, CK⁻ 为 pGADT7 - T + pGBKT7 - λ 。

3 讨论

酵母双杂交技术是一种研究真核生物细胞内蛋白互作的重要手段。酵母双杂交技术虽然经过不断的改进和完善,但假阴性和假阳性是其局限性之一。假阴性是指酵母中诱饵蛋白和猎物蛋白本来能发生互作,但由于融合蛋白间的空间位阻阻碍了蛋白间的物理互作,或者表达的融合蛋白不稳定,或者融合蛋白互作不是定位与细胞核、诱饵蛋白和猎物蛋白不正确的翻译后修饰,或者诱饵蛋白与目标蛋白的正确折叠需要其他非酵母因子等原因,造成诱饵蛋白和猎物蛋白不能互作的情况。假阳性有 2 类,一类是指诱饵蛋白或猎物蛋白没有互作,或筛选的酵母菌落发生突变,就能单独激活报告基因,这类假阳性可以通过自激活实验,使用多个报告基因,或重复实验等来加以避免;还有一类假阳性是指诱饵蛋白和目标蛋白确实在酵母细胞中发生了真实的互作,但它们在生物体中,由于处于不同的亚细胞结构或细胞的不同生长时期而永远不会发生互作的现象,同源蛋白假阳性互作就属于这一类。本实验使用的 Clontech 的 Matchmaker™ Gold 双杂系统携带 6 个筛选基因 (*MEL1*, *HIS3*, *AUR1-C*, *LEU2*, *ADE2* 和 *TRP*),用于不同阶段的筛选。另外还有 *lacZ*,用不同的启动子表达位于酵母 2 个染色体的报告基因,可明显减少假阳性。此外,酵母感受态的制备不同于大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备,在制备 DH5 α 感受态时,液体摇菌 OD 值最后在 0.3 ~ 0.4 之间,浓度大于 0.4 时, DH5 α 感受态的转化效率会大大下降,而酵母感受态的制备则不然,菌浓度可以比参考的 OD 值更大些,且转化效率更高。值得注意的是,在制备酵母感受态时,酵母菌在 YPGA 固体平板上培养不宜超过 2 d。笔者在本实验中发现,酵母菌在 YPGA 固体平板上培养 36 h 最佳,超过 2 d 的酵母菌落会变微红,制得的感受态效率大大下降。其原因可能是酵母在 YPGA 固体平板上培养超过 2 d 后,其酵母细胞老化,酵母细胞壁变厚,使得外源 DNA 不容易进入酵母细胞。

通过酵母双杂实验,笔者筛选得到几个可能与 *AtGRP7* 发生相互作用的蛋白基因,并发现其中 1 个编码核糖体蛋白的基因可能参与 mRNA 的编辑剪切;另外 2 个分别编码类似碳水化合物结合蛋白的基因和木酮糖激酶的基因,可能参与糖类及细胞壁代谢;还有几个功能未知的基因,这些基因的序列分析及其与 *AtGRP7* 的互作和功能还有待进一步鉴定。

参考文献:

- [1] MIZUNO T. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 499 – 505.
- [2] KIKIS E A, KHANNA R, QUAIL P H. ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY [J]. *Plant J*, 2005, 44: 300 – 313.
- [3] MCCLUNG C R, GUTIERREZ R A. Network news: prime time for systems biology of the plant circadian clock [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2010, 20: 588 – 598.
- [4] HEINTZEN C, NATER M, APEL K, et al. *AtGRP7*, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 8515.
- [5] SCHONING J C, STREITNER C, PAGE D R, et al. Auto-regulation of the circadian slave oscillator component *AtGRP7* and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation [J]. *Plant J* 2007, 52: 1119 – 1130.
- [6] FU Z Q, GUO M, JEONG B R, et al. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity [J]. *Nature* 2007, 447: 284 – 288.
- [7] STREITNER C, DANISMAN S, WEHRLE F, et al. The small glycine rich RNA binding protein *AtGRP7* promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J* 2008, 56: 239 – 250.
- [8] KIM J Y, PARK S J, JANG B, et al. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions [J]. *Plant J*, 2007, 50: 439 – 451.
- [9] STAIGER D, HEINTZEN C. The circadian system of *Arabidopsis thaliana*: forward and reverse genetic approaches [J]. *Chronobiology International*, 1999, 16: 1 – 16.
- [10] KIM Y O, KIM J S, KANG H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J* 2005, 42: 890 – 900.
- [11] CAO S, JIANG L, SONG S, et al. *AtGRP7* is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2006, 11: 526 – 535.

Construction and Autoactivation Test of a Bait Vector of *AtGRP7* for Two-hybrid System

LIU Chang-ren, LIU Wei, ZHAI Jin-ling, ZI Liang, HUANG Xi

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education/Institute of Bio-Science and Biotechnology,
College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *AtGRP7* is one of slave oscillator of *Arabidopsis thaliana*, but its physiological role is so far less known. In order to screen the *AtGRP7* interacted proteins, the CDS sequence of *AtGRP7* was first amplified using PCR and inserted into pGBKT7 vector between the clone site *Nco* I and *Pst* I to construct the bait vector for yeast two-hybrid (Y2H) system. Restricted digestion and sequencing result showed that the *AtGRP7* sequence was inserted into pGBKT7 vector in correct reading frame. Furthermore, the bait vector was transformed into Y2H Gold yeast strain to test the autoactivation and toxicity. The transformed yeast grew very well on SD/-Trp plate, but weakly on SD/-Trp/-Ade plate. No yeasts grew on SD/-Trp/-His and SD/-Trp/-Ade/-His plates, suggesting that histidine synthase gene was not transcribed and translated. This indicated that *AtGRP7* was not autoactivated in the Y2H system.

Key words: *AtGRP7*; bait vector; autoactivation