

文章编号: 1674-7054(2013)01-0031-05

拟南芥 *NiNJA* 基因酵母双杂诱饵载体 构建及互作蛋白的筛选

訾亮, 洪灏, 翟金玲, 马穗, 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: JAZ 蛋白是植物茉莉酸信号途径的重要负调控因子, JAZ 与 *NiNJA* 形成蛋白复合体抑制茉莉酸下游转录因子的转录活性, *NiNJA* 蛋白是联系 JAZ 蛋白与下游转录因子的重要因子。为了研究 *NiNJA* 调控的下游基因, 首先构建了 *NiNJA* 基因的诱饵载体 pGBKT7-*NiNJA*, 然后转化酵母 Y2H Gold 感受态, 通过自转录激活实验, 发现诱饵载体 pGBKT7-*NiNJA* 没有自转录激活活性。在此基础上, 从拟南芥“Mate & PlateTM” Library 进行酵母双杂筛选, 获得若干个与 *NiNJA* 互作的蛋白, 为下一步鉴定 *NiNJA* 的互作蛋白及茉莉酸的信号调控途径打下基础。

关键词: *NiNJA* 基因; pGBKT7 诱饵载体; 自转录激活验证; 酵母双杂

中图分类号: Q 782

文献标志码: A

茉莉酸(JA)及其衍生物是广泛存在于植物中的一种生长调节物质, 在植物细胞中起着非常重要的作用^[1]。研究表明, 茉莉酸作为信号分子参与调节植物的生长发育^[2], 还参与植物胁迫响应过程^[3]。当植物体受到病害、虫害及环境胁迫等影响时, 植物体受侵害的部位迅速将茉莉酸合成茉莉酸-异亮氨酸复合物(JA-Ile)。JA-Ile 参与植物的生长及防御过程, 在 JA 信号途径中发挥重要的活性作用^[4-7]。Coi1 是一类 F-box 蛋白, 被鉴定为植物茉莉酸受体蛋白, 当植物受到创伤胁迫时会产生茉莉酸, 茉莉酸化合物 JA-Ile 能够促使 SCFcoi1 蛋白与 JAZ 蛋白结合, 进而将 JAZ 蛋白泛素化, JAZ 蛋白通过 26S 蛋白酶体降解, 解除对茉莉酸相关转录因子的抑制作用, 启动植物创伤反应^[8]。胁迫解除后, JAZ 蛋白通过 NOVEL INTER-ACTOR OF JAZ (*NiNJA*) 蛋白的 EAR 基序招募共阻遏蛋白 TOPLESS, 从而抑制转录活性^[9-10], 可见, 在茉莉酸信号途径中, *NiNJA* 蛋白作为负调控因子, 起着非常重要的作用。最近, 虽然在鉴定 *NiNJA* 的互作蛋白上取得了一定的结果^[9-10], 但是, 更多的 *NiNJA* 蛋白的互作蛋白还有待筛选和鉴定。笔者通过构建 *NiNJA* 基因的诱饵载体 pGBKT7-*NiNJA*, 利用酵母双杂交技术筛选与 *NiNJA* 发生相互作用的基因, 获得了几个可能与 *NiNJA* 发生互作的蛋白基因, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 酵母双杂交的菌株 Y₂H Gold、Y187 及 pGBKT7 诱饵载体均购自 Clontech 公司; 快速限制性内切酶购自 Fermentas 公司; *Taq* DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; PCR 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒及质粒 DNA 小剂量提取试剂盒均购自 AxyGen 公司; perfect 1 Kb Ladder 购自申能博彩生物; 其他生化试剂及常规试剂均为国产保质期内的超纯或者分析纯。拟南芥“Mate & PlateTM” Library 购自 Clontech(PT4085-1)。

收稿日期: 2013-03-10

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(20114601110003)

作者简介: 訾亮(1987-), 男, 山东泰安人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 黄惜, 教授, xihuang@hainu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 *NiNJA* 基因酵母双杂体系诱饵载体构建 根据拟南芥 *NiNJA* 基因序列,分别设计出含有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点的 5'端引物 P1 (aaGAATTCatggacgatgataatgggctcga) 及 3'端引物 P2 (aaGTCGACtcagggtgtagctgacgtgca),以拟南芥 cDNA 为模板扩增 *NiNJA* 基因,PCR 反应程序为:95 °C 3 min;95 °C 30 s 52 °C 30 s 72 °C 1.5 min(35 个循环);72 °C 10 min。待反应结束后,取 5 μL 的 PCR 产物进行 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测,若有条带则进行 PCR 产物纯化,纯化后再经电泳验证有条带后,将目的片段连接 pMD-20T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 。提取质粒后,分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 对 pMD-20T-*NiNJA* 和 pGBKT7 质粒进行酶切,并用琼脂糖凝胶电泳检测,最后切胶回收目的片段和质粒。用 T4 DNA Ligase 将酶切后的 *NiNJA* 和 pGBKT7 质粒连接,连接条件是:16 °C 24 h。然后转化大肠杆菌 DH5 α 。菌液 PCR 后挑阳性克隆提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 对 pGBKT7-*NiNJA* 载体进行双酶切鉴定,检测验证后将提取的质粒样品送往华大公司测序,以备进行后续试验。

1.2.2 转录自激活检测和酵母双杂实验 酵母感受态制备及转化:1) 将 Y2H Gold 菌种(-80 °C $\mu = 50\%$ 的甘油保存)接种于 YPDA 液体培养基中,30 °C 200 r·min⁻¹ 摇菌 48 h 后将菌在 YPDA 平板上划线,30 °C 培养 48 h;2) 待菌落长出后,挑取直径约 2 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 振荡培养过夜;3) 取上述菌液 10 μL 接种到装有 50 mL 的 YPDA 液体培养基,容积为 500 mL 的锥形瓶中,于 30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养 18~20 h,每隔一段时间检测菌液的浓度,直至菌液的 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.3$ 时,停止培养;4) 将上述菌液 2 850 r·min⁻¹ 离心 8 min,弃上清,将菌体重悬于 100 mL 的 YPDA 液体培养基中,30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养 4~6 h,直至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.5$;5) 将上述 100 mL 菌液分别倒入 2 个 50 mL 无菌离心管中,25 °C 2 850 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,接着在每个试管中加入 30 mL 无菌水重悬并洗涤菌体,25 °C 2 850 r·min⁻¹ 离心 5 min,重复 2 次,收集菌体;6) 用 1 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 LiAc 重悬酵母细胞,接着将菌体转移到 2 mL 离心管中,高速离心 30 s,弃上清,收集菌体;7) 用 500 μL 0.1 mol·L⁻¹ 的 LiAc 重悬酵母细胞,再将 50 μL 的酵母细胞重悬液转移到 1.5 mL 离心管中,高速离心,收集菌体,用微量移液器吸除 LiAc;8) 在上述含有菌体的离心管中分别加入 240 μL $w = 50\%$ 的 PEG 36 μL 1.0 mol·L⁻¹ 的 LiAc 25 μL $\rho = 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单链载体 DNA(单链载体 DNA 样品用前煮沸 5 min,迅速在冰水中冷却),50 μL 无菌水和 pGBKT7-*NiNJA* 质粒(0.1~10 μg),剧烈震荡离心管直到菌体沉淀完全混匀;9) 反应管置于 30 °C 下温育 30 min,接着 42 °C 水浴热激 25 min,然后以 8 000 r·min⁻¹ 离心 30 s,小心除去上清液;10) 取 200 μL 无菌水加到反应管中,轻轻吸打悬浮沉淀,悬浮液涂布于 SD/-Trp 的选择培养基上,30 °C 培养 3 d,待菌落长出后做菌落 PCR 检测,检测后含有目的条带的菌落挑取后摇菌,并用 $w = 50\%$ 的甘油保存菌种,置于 -80 °C 长期保存备用。

转录自激活检测及酵母双杂试验:取 100 μL 载体转化成功的酵母菌液,接种于 10 mL 的 SD/-Trp 液体培养基中,30 °C 培养 36~48 h,测 $OD_{600} = 0.4$,取 5 μL 菌液分别滴加到 SD/-Trp,SD/-Trp/-His,SD/-Trp/-Ade,SD/-Trp/-Ade/-His 的营养缺陷型固体培养基平板上,置于 30 °C 培养 3~6 d 后,观察酵母菌在不同营养缺陷型平板上的生长情况。待自激活实验检测完毕后,进行酵母双杂交实验,此实验的具体操作过程参考酵母双杂 Clontech 操作手册(PT4084-1)进行,杂交后的菌液在 SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu 固体培养基加 α -gal 和 AbA 的平板上筛选,得到阳性克隆后,提取质粒转化 DH5 α 大肠杆菌,胺苄抗性筛选得到互作蛋白 AD 载体,通过测序得到互作基因序列。将互作蛋白 AD 载体与 pGBKT7-*NiNJA* 质粒共转化 Y2H Gold,验证其互作。

2 结 果

2.1 *NiNJA* 基因克隆和双杂体系诱饵载体构建 以拟南芥 cDNA 为模板,用引物 P1 和 P2,扩增目的基因 *NiNJA*,经 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到条带大于 1 000 bp 的片段,与目的片段 1 100 bp 大小相一致(图 1a);将所得 PCR 产物纯化及电泳检测后,连接到 pMD-20T 载体中,然后转入大肠杆菌 DH5 α 中,经菌液 PCR 鉴定,得到与目的片段大小一致的基因片段(图 1b);提取 pMD-20T-*NiNJA* 质粒,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切实验,经琼脂糖凝胶电泳检测后发现,条带与目的片段大小一致。之后,用 T4 DNA 连接

酶将酶切后的 pGBKT7 质粒和 *NiNJA* 基因片段连接起来, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取构建的质粒, 命名为 pGBKT7-*NiNJA* 诱饵载体。再次, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切检测, 酶切完毕后的基因片段与预期目的片段大小一致(图 1c)。将构建的酵母双杂交载体进行测序, 结果显示载体序列及阅读框正确。

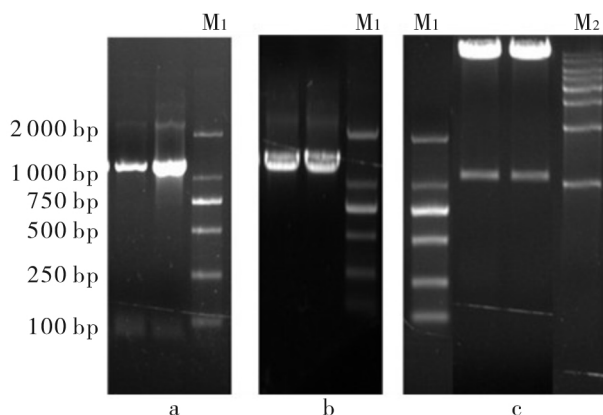


图1 *NiNJA* 基因 PCR 扩增及双杂诱饵载体构建图谱

a: *NiNJA* 基因的 PCR 检测; b: 载体 pGBKT7-*NiNJA* 的菌液 PCR 检测; c: 载体 pGBKT7-*NiNJA* 的双酶切检测; M₁: BM 2000 DNA marker; M₂: Perfect 1 Kb Ladder

Fig. 1 PCR amplification and construction of Y2H trait vector for *NiNJA*

a: PCR amplification of *NiNJA*; b: Verification of the vector of pGBKT7-*NiNJA* by PCR; c: Verification of the vector of pGBKT7-*NiNJA* by restriction endonuclease; M₁: BM 2000 DNA marker; M₂: Perfect 1 Kb Ladder

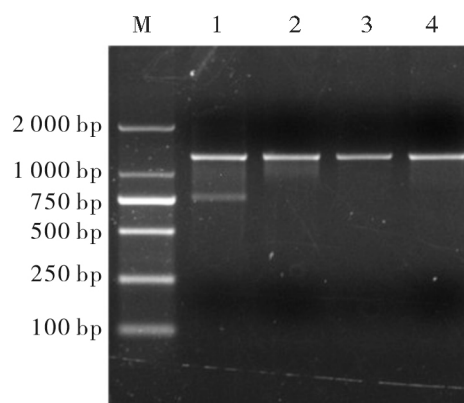


图2 *NiNJA* 基因转酵母感受态后菌落 PCR 检测
M: BM 2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2~4: *NiNJA* 基因转化酵母感受态后菌液 PCR 产物

Fig. 2 Verification of yeast competent cell transformed with pGBKT7-*NiNJA* vector by PCR
M: BM 2000 DNA marker; 1: Positive control; 2~4: PCR products using transformed yeast cell as template

2.2 pGBKT7-*NiNJA* 诱饵载体自激活检测及酵母双杂交筛选 把 pGBKT7-*NiNJA* 诱饵载体转入 Y2H Gold 酵母感受态后进行菌落 PCR 检测, 检测结果见图 2。泳道 1 是以 pGBKT7-*NiNJA* 质粒为模板的 PCR (阳性对照), 泳道 2~4 是以转化后菌落为模板的 PCR, 两者大小一致, 均为 1 100 bp, 上述实验结果表明: 酵母双杂诱饵载体 pGBKT7-*NiNJA* 质粒成功转化到 Y2H Gold 酵母感受态细胞中。用 pGBKT7-*NiNJA* 诱饵载体筛选酵母文库进行酵母双杂交实验, 实验结果见图 3, 其中图 3a 为 pGBKT7-*NiNJA* 转酵母感受态自激活实验, 本实验构建的诱饵载体携带能合成 Trp 的基因, 酵母菌在 SD/-Trp 缺陷型培养基上长势良好, 表明 *NiNJA* 基因的表达产物对酵母菌 Y2H Gold 没有明显毒性; 然后将 SD/-Trp 缺陷型培养基上长出的单菌落接种到 SD/-Trp/-Ade 缺陷型培养基上, 发现其长势较差; 再将其分别接种到 SD/-Trp/-His 和 SD/-Trp/-Ade/-His 的缺陷型培养基上, 发现酵母菌的生长完全被抑制。上述自激活实验结果表明: 与组氨酸合成相关的基因转录没有被 *NiNJA* 基因激活, 即不存在组氨酸的自激活对酵母双杂交体系的影响, 所以, 构建的 pGBKT7-*NiNJA* 诱饵载体可以用于酵母双杂交的筛选实验。由于 pGADT7 质粒上携带 Leu 合成相关基因, 因此, 本实验选取 SD/-Trp/-His/-Leu 和 SD/-Trp/-His/-Ade/-Leu 缺陷型培养基, 用于筛选 *NiNJA* 基因的互作蛋白, 实验结果如图 3b 所示。

将构建的全长捕获载体与诱饵载体 pGBKT7-*NiNJA* 一起转化到酵母菌株 Y2H Gold 中, 反复验证 3 次, 剔除假阳性, 最后得到 5 个真正互作的基因(图 3b), 分别为: G1, G2, G3, G4, G6。G1 为叶绿体内 TATC 蛋白转位酶基因; G2 为一种 HSP40 热激蛋白基因; G3 为 PIN 包含结构域蛋白基因; G4 为 GTP 结合蛋白基因; G6 为一种磷脂酶基因。以上筛选结果只是在体外用酵母双杂交方式粗筛得到的, 为了确定上述结果的正确性, 必须对 *NiNJA* 基因的功能和互作基因做更深入的研究。

3 讨论

酵母双杂交技术具有方便快捷的优点, 目前广泛应用于蛋白互作研究。但利用酵母双杂交技术得到

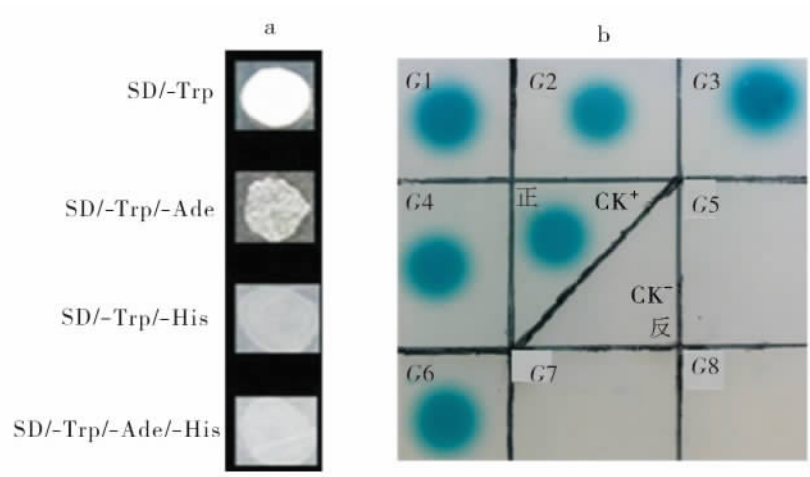


图3 pGBKT7-NiNJA 诱饵载体自激活检测(a)和酵母双杂交筛选(b)

平板为 SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu 四缺培养基,加 AbA 和 X- α -gal,CK⁺ 为 pGADT7-T + pGBKT7-53,CK⁻ 为 pGADT7-T + pGBKT7- λ

Fig.3 Autoactivation of pGBKT7-NiNJA vector (a) and Y2H screening (b)

SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu as screening medium containing AbA and X- α -gal was used as screening medium, CK⁺ is pGADT7-T + pGBKT7-53, and CK⁻ is pGADT7-T + pGBKT7- λ

的互作蛋白也可能存在假阳性或假阴性。假阴性可能是由于蛋白在细胞内定位不同,使捕获蛋白和诱饵蛋白在酵母细胞中被分割开来,阻碍了蛋白之间的互作;另一类假阴性可能是由于它们在细胞的不同生长时期出现,导致其不可能发生互作。假阳性是指捕获蛋白即使没有与诱饵蛋白发生互作,但也能与 GAL 启动子结合并激活相应报告基因,此类假阳性需要进行自转录激活实验验证。为了降低假阳性的发生概率,在本实验中,用 MatchmakerTM Gold 双杂系统所携带的 6 个筛选基因(*HIS3*, *MEL1*, *LEU2*, *AUR1-C*, *TRP* 和 *ADE2*) 进行多重筛选。在此基础上,还应用了 *lacZ* 基因进行筛选,以利用不同启动子表达位于酵母 2 个染色体上的报告基因,更有效地降低假阳性的存在。

Clontech 的实验方案要求酵母感受态的液体摇菌 $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$,而本实验发现 OD_{600} 大于 0.4 时,转化效果更好。但要注意以下 2 点: 1) 在制备酵母细胞感受态时,酵母菌在 YPDA 固体培养基上的培养时间切勿超过 48 h; 2) 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下,酵母菌落在 YPDA 固体培养基上培养的最佳时间为 36 h,超过 48 h 的酵母菌落就会明显变红,且随着时间的延长,红色逐渐加深,从而严重降低感受态的转化效率。其原因可能是在此培养条件下,当培养时间超过 48 h 时,酵母细胞开始老化,细胞壁变厚,使外源基因转入酵母细胞的阻力变大,从而导致其活性降低。

NiNJA 是以 JAZ 为诱饵,通过串联免疫共沉淀鉴定到的 JAZ 互作蛋白^[9],但以 NiNJA 为诱饵,通过酵母双杂交进行互作筛选的研究还未见报道。笔者通过酵母双杂交实验的初步筛选,得到几个可能与 NiNJA 发生互作的蛋白基因,如 TATC 蛋白转位酶基因、HSP40 热激蛋白基因、PIN 包含结构域蛋白基因、GTP 结合蛋白基因和磷脂酶基因,此前都未见报道,因此推测,它们可能是与 NiNJA 蛋白互作的新基因。但由于酵母双杂交存在较多假阳性,在确认互作之前,还需要通过 Pull-down 或免疫共沉淀等技术进行深入验证。另外,互作蛋白所包含的生理作用和涉及的信号途径,还需要进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] SEMBDNER G, PARTH IER B. The biochemistry and the physiological and molecular action of jasmonates [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993, 44: 569 - 589.
- [2] CREELMAN R A, MULLET J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology, 1997, 48: 355 - 381.

- [3] DEVOTO A , TURNER J G. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis* [J]. *Annals of Botany* , 2003 , 92: 329 – 337.
- [4] BROWSE J. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone [J]. *Annual Review of Plant Biology* , 2009 , 60: 183 – 205.
- [5] KAZAN K , MANNERS J M. Jasmonate signaling: toward an integrated view [J]. *Plant Physiology* , 2008 , 146: 1459 – 1468.
- [6] WASTERNAK C. Jasmonates: an update on biosynthesis , signal transduction and action in plant stress response , growth and development [J]. *Annals of Botany* , 2007 , 100: 681 – 697.
- [7] PAUWELS L , INZE D , GOOSSENS A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? [J] *Trends Plant Science* , 2009 , 14: 87 – 91.
- [8] GLICKMAN M H , CIECHANOVER A. The ubiquitin proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction [J]. *Physiological Reviews* , 2002 , 82: 373 – 428.
- [9] PAUWELS L , BARBERO G F , GEERINCK J , et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling [J]. *Nature* , 2010 , 464: 788 – 791.
- [10] PAUWELS L , GOOSSENS A. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade [J]. *Plant Cell* , 2011 , 23: 3089 – 3100.

Construction of Bait Vector for *NiNJA* Gene in *Arabidopsis* and Screening the Interacted Proteins Using Yeast Two-hybrid

ZI Liang , HONG Hao , ZHAI Jinling , MA Sui , HUANG Xi

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

Abstract: JAZ proteins are important negative factors for jasmonic acid (JA) signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *NiNJA* interacted with JAZ proteins to inhibit the transcription activity of JA-related transcription factors. *NiNJA* is a key factor that connected the JAZs and JA-related transcription factors. In order to screen *NiNJA*-interacted proteins , *NiNJA* full-length cDNA sequence was PCR amplified inserted into pGBKT7 vector to construct a bait vector for yeast two-hybrid system. Furthermore , the vector was transformed into Y2H Gold strain. The result of autoactivation showed that pGBKT7-*NiNJA* vector had no autoactivation. Finally , the bait vector was used to screen the interacted proteins in “Mate & PlateTM” Library and several potential interacted proteins were obtained. This work laid a foundation for further identification of *NiNJA* interacted proteins and related signaling pathway.

Key words: *NiNJA*; pGBKT7 bait vector; autoactivation; yeast two-hybrid