

文章编号: 1674-7054(2015)03-0256-05

HbCoi1 基因启动子酵母单杂 pHIS 载体的构建及互作蛋白筛选

洪 灏, 刘小婷, 肖 华, 黄 惜, 袁红梅

(海南大学 农学院/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 海口 570228)

摘 要: 茉莉酸是调节天然橡胶树产胶的主要激素, *HbCoi1* 是茉莉酸信号的受体, 研究 *HbCoi1* 基因的表达调控对了解橡胶树的产胶机理具有重要的意义。首先 PCR 扩增 *HbCoi1* 基因的启动子, 然后将目标序列插入 pHIS2.1 载体, 构建酵母单杂诱饵载体。将该载体转入酵母 Y187 菌株感受态中, 在缺失培养基上检测自转录激活, 发现 *HbCoi1* 基因的启动子在 3-AT 浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时自转录激活得到有效抑制。在此基础上, 通过与橡胶 cDNA 文库进行酵母单杂筛选, 得到了几个可能与 *Hbcoi1* 启动子发生互作的基因, 其中包括 DNA 结合蛋白、核糖体蛋白和功能未知基因, 旨在为深入研究 *Hbcoi1* 基因表达调控打下基础。

关键词: *HbCoi1*; pHIS 载体; 自转录激活; 酵母单杂

中图分类号: Q 946.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2015.03.006

天然橡胶是在橡胶树乳管细胞中合成和积累的, 通常认为限制天然橡胶产胶的因素主要与次生乳管的分化有关。研究表明, 割胶树在开割期间新产生的乳管列数目比停割胶树的明显增多, 采胶能够促进乳管分化。此外, 在机械损伤但并不排胶的条件下, 也能诱导乳管分化^[1-2]。进一步的研究发现, 茉莉酸可能在橡胶树体内乳管分化中起了重要的作用。外施茉莉酸或茉莉酸生物合成的前体亚麻酸可以诱导形成层分化出正常的次生乳管列, 而外施其他激素, 如生长素、脱落酸、细胞分裂素、水杨酸和乙烯等均不能诱导乳管分化^[3]; 另外, 机械伤害也可以诱导乳管分化, 但这一作用可以被施用茉莉酸生物合成的抑制剂所阻断, 表明机械伤害的作用是它在橡胶树体内诱导形成茉莉酸的结果。这一发现为天然橡胶生产和橡胶树化学调控技术研究提供了理论根据^[4-5]。在模式植物拟南芥中, 茉莉酸信号途径及其关键基因的鉴定已经取得了较大进展。1998 年, 茉莉酸信号受体蛋白 COI1 被克隆^[6], COI1 是 1 个 F-box 蛋白, 可直接与 SKP1 和 cullin 等蛋白互作形成 SCF^{COI1} 泛素连接酶蛋白复合体, 通过 26S 蛋白酶体降解途径降解目标蛋白, 调节茉莉酸下游信号途径^[7]。2007 年, 第 1 个 SCFCOI1 目标蛋白被鉴定出来, 它们是一类携带 ZIM 结构域的 JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) 家族蛋白。JAZ 蛋白是 JA 信号途径中关键的负调控因子, 能与茉莉酸信号途径相关的转录因子结合并抑制其转录活性。茉莉酸与受体 SCF^{COI1} 蛋白复合体结合后, 与 JAZ 蛋白发生互作, JAZ 蛋白被泛素化而进入 26S 蛋白酶体降解途径, 从而释放所抑制的转录因子的转录活性, 从而激活 JA 应答反应^[8-9]。除了 ZIM (或称 TIFY) 结构域, 所有 JAZ 蛋白都包含 1 个 JAS 结构域, JAS 结构域能够与茉莉酸应答相关的 MYC 或 MYB 转录因子结合并调控其转录^[10-11], 而 ZIM 结构域与转录 NINJA 蛋白互作, 然后招募 TOPLESS (TPL) 转录抑制蛋白, 完成转录抑制功能^[12]。橡胶茉莉酸信号途径的研究还处在初级阶段, 一些关键基因尚未被克隆鉴定, 茉莉酸调控橡胶树产胶和乳管分化的分子机理尚未被揭示。橡胶 *HbCoi1* 基因的全长 cDNA 已经被克隆, 其开放阅读框包含 2 187 bp, 编码 597 个氨基酸, Southern-blot 结果表明 *HbCoi1* 基因在橡胶基因组只有 1 个拷贝^[13]。作为茉莉酸的信号受体蛋白, *HbCoi1* 基因的表达调控对茉莉酸信号发挥着重要作用, 为了研究哪些转录因子可能参与 *HbCoi1* 基

收稿日期: 2014-07-15

基金项目: 国家自然科学基金(31370608; 31260170); 海南省科技项目(ZDZX2013023)

作者简介: 洪灏(1986-), 海南大学农学院 2011 级硕士研究生, E-mail: hhyatbst@hotmail.com

通信作者: 袁红梅, 女, 讲师, E-mail: yuanhongmei618@163.com

因的表达。笔者通过 PCR 扩增该基因的启动子,通过酵母单杂系统筛选与之互作的基因,旨在为橡胶 *Hb-coil* 基因功能鉴定及橡胶茉莉酸信号途径研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 酵母菌株 Y187 及酵母单杂 pHIS2.1 载体均购于 Clontech 公司; PCR 2 × mixture 购自海南合辉实业有限公司; 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上海生物工程有限公司; 其他常规试剂及生化试剂均为国产超纯和分析纯; 酵母文库由本实验室提供。

1.2 *Hbcoil* 基因启动子 pHIS 载体的构建 根据 *HbCoil* 启动子序列设计带 EcoR I 和 Sac I 酶切位点的引物 P1(aaGAATTCtattaaaagtga) ,P2(aaGAGCTCaataaaaaaccctc) 。以橡胶乳胶总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到启动子的目的片段。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 1 min, 循环数为 35; 72 °C 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,然后切胶、回收,同时用 EcoRI 和 SacI 分别对 pHIS2.1 载体进行酶切,经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶分别同时回收目的片段及载体部分,再用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 *HbCoil* 和 pHIS2.1 的回收片段进行连接。转化大肠杆菌 DH5 α 。将得到的阳性克隆进行质粒提取,同时将构建好的 pHIS2.1-*HbCoil* 载体再次用 EcoRI 和 SacI 双酶切进行检测,最后送生工公司进行测序。

1.3 pHIS2.1-*HbCoil* 载体酵母自转录激活检验及酵母单杂筛选 酵母转化及自转录激活检验参照 Clontech 操作手册(Protocol No. PT3529-4) 进行。将 pHIS2.1-*HbCoil* 载体转化酵母 Y187 菌株,分别接种到 SD/ - Trp, SD/ - Trp/ - His, SD/ - Trp/ - His 3 - AT 10 mmol · L⁻¹, SD/ - Trp/ - His 3 - AT 20 mmol · L⁻¹, SD/ - Trp/ - His 3 - AT 30 mmol · L⁻¹, SD/ - Trp/ - His 3 - AT 40 mmol · L⁻¹, SD/ - Trp/ - His 3 - AT 50 mmol · L⁻¹ 选择培养基上,在 30 °C 下培养 3 ~ 5 d,观察在各选择培养基上的生长情况。根据酵母的生长情况鉴定其细胞毒性及自转录激活水平。酵母单杂文库为橡胶胶乳 cDNA 文库,构建文库采用 Clontech Matchmaker™ One-Hybrid Library Construction & Screening Kit 试剂盒(Cat. No. 630304) ,酵母单杂筛选按照操作手册(PT3529-4) [14] 进行。

2 结果与分析

2.1 *HbCoil* 基因启动子的克隆和 pHIS 载体的构建 利用引物 P1 和 P2,以橡胶乳胶总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现扩增的条带大小约为 1 000 bp,与预测大小一致(图 1A)。PCR 产物切胶回收,同时用 EcoR I 和 Sac I 分别对 pHIS2.1 载体进行酶切,电泳检测后切胶回收目的片段及载体部分,然后用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 *HbCoil* 和 pHIS2.1 回收片段连接起来,转化大肠杆菌 DH5 α ,经菌落 PCR 检测证实其扩增片段大小一致(图 1B),之后进行转化和质粒提取,再进行 EcoR I 和 Sac I 双酶切检测,得到的酶切结果符合预期的片段大小(图 1C)。最后通过载体测序分析,确认其序列及阅读框是正确的。

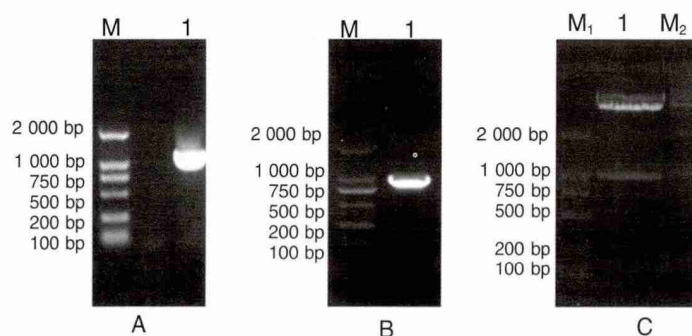


图 1 pHIS2.1-*HbCoil* 酵母单杂载体的构建

A. 从 cDNA 扩增得到的 *HbCoil* 启动子片段; B. *HbCoil* 启动子连接转化大肠杆菌后的 PCR 结果; C. pHIS2.1-*HbCoil* 载体的限制性内切酶酶切鉴定。M 及 M1: DL2 000; M2: 申能博彩生物 perfect 1 Kb Ladder

Fig. 1 Construction of pHIS2.1-*HbCoil* bait vector for yeast-one-hybrid

A: PCR amplification of *HbCoil* promoter; B: PCR detection of pHIS2.1-*HbCoil* in *E. coli*; C: digestion with restricted enzymes for pHIS2.1-*HbCoil*. M, M1: DL2 000; M2: perfect 1 Kb Ladder

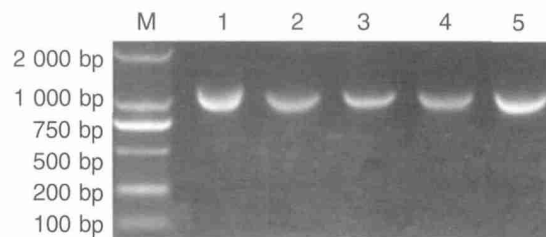


图2 pHIS2.1-HbCoi1 酵母转化菌落 PCR 检测

M: AL2 000; 1: 阳性对照; 2~5: pHIS2.1-HbCoi1 酵母转化后菌落 PCR 产物

Fig. 2 Colony PCR assay of yeast transformed pHIS2.1-HbCoi1 plasmid

M: DL2 000; 1: positive control; 2~5: colony PCR result of yeast transformed pHIS2.1-HbCoi1 plasmid

2.2 pHIS2.1-HbCoi1 载体自激活检验 将 pHIS2.1-HbCoi1 载体转化 Y187 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 pHIS2.1-HbCoi1 载体质粒为模板的 PCR 阳性对照大小一致,约 1 000 bp,这表明目标载体成功转化 Y187 酵母感受态。转化菌株在 SD/-Trp 缺失培养基上生长良好,说明 pHIS2.1-HbCoi1 载体在酵母 Y187 菌株能够表达 *HbCoi1* 基因启动子调控的 His 报告基因的表达对宿主菌无明显毒性。酵母转化菌在 SD/-Trp/-His 双缺平板上也有生长,说明 *HbCoi1* 基因启动子在酵母中能够激发 His 报告基因的表达。但转化菌在含有 10 mmol·L⁻¹或以上浓度 3-AT 的 SD/-Trp/-His 双缺培养基上,几乎都停止生长,说明 *HbCoi1* 基因启动子调控的 His 报告基因的表达较微弱,10 mmol·L⁻¹ 3-AT 抑制剂即可抑制其本底表达,该载体在含有 10 mmol·L⁻¹或以上浓度 3-AT 培养基上可用于酵母单杂筛选(图 3A)。

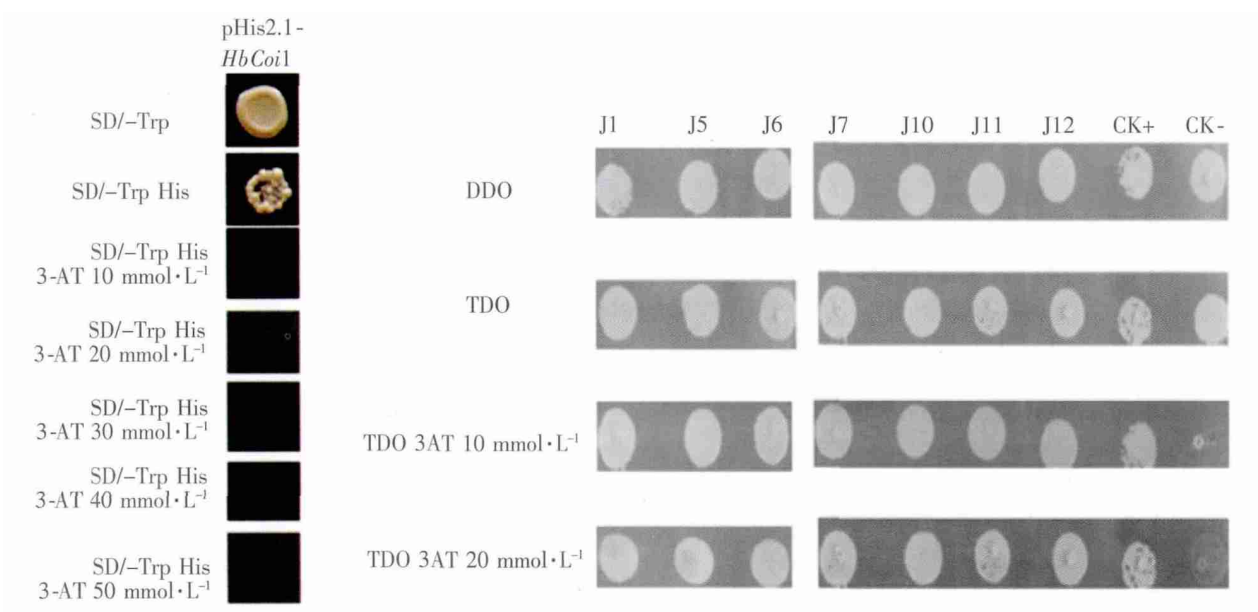


图3 pHIS2.1-HbCoi1 载体自激活检测及酵母单杂交筛选验证

a: pHIS2.1-HbCoi1 单杂载体自激活验证; b: 酵母单杂交筛选结果(DDO 为 SD/-Trp/-Leu 双缺培养基, TDO 为 SD/-Trp/-Leu/-His, “+”为正对照(p53His2 + pGADT7 - Rec2 - 53), “-”为负对照(pHIS2.1 + pGADT7 - Rec2 - 53))

Fig. 3 Autoactivity test and yeast one hybrid screening of pHIS2.1-HbCoi1

a: autoactivity test for pHIS2.1-HbCoi1; b: Y-1-H screening. DDO: SD/-Trp/-Leu; TDO: SD/-Trp/-Leu/-His “+”: p53His2 + pGADT7 - Rec2 - 53 “-”: pHIS2.1 + pGADT7 - Rec2 - 53

2.3 HbCoi1 启动子与橡胶乳胶 cDNA 文库的酵母单杂筛选 将 pHIS2.1-HbCoi1 载体和橡胶乳胶 pGADT7-Rec2 cDNA 文库转化酵母 Y187 感受态,然后在含 3-AT 浓度的 SD/-Trp/-His/-Leu 三缺平板上进行酵母单杂筛选,部分菌落 10 mmol·L⁻¹和 20 mmol·L⁻¹ 3-AT 浓度的平板上仍然生长较好,而

pHis2.1-*HbCoi1* 载体单转菌落不能生长,将筛选得到的菌落继续在三缺平板上继代培养 3 代,以减少假阳性克隆。之后将得到的阳性菌落挑出培养并进行 PCR 扩增,得到 PCR 片段大小大于 750 bp 的菌落 50 个,将 PCR 片段连接 T-载体转化大肠杆菌进行测序,排除重复序列得到 23 个单一序列,经过 BLAST 比对结果显示,阳性菌落编码的蛋白大多为 DNA 结合蛋白和核糖体蛋白,有些为功能未知的基因(图 3B 表 1)。筛选的阳性克隆中,有 2 个基因(J5 和 J12)编码 DNA 结合蛋白,这些蛋白很可能就是参与 *HbCoi1* 启动子互作并调控其表达的基因,其功能还需要进一步研究。

表 1 *HbCoi1* 启动子发生互作的基因
Tab. 1 Genes interacted with *HbCoi1* promoter

筛选基因编号 No.	Blast 结果 Blast result
J1	<i>Sterculia apetala</i> 26S ribosomal RNA gene
J5	<i>Ricinus communis</i> DNA binding protein
J6	<i>Ricinus communis</i> conserved hypothetical protein
J7	<i>Ricinus communis</i> 40S ribosomal protein S8
J10	<i>Hevea brasiliensis</i> 60S ribosomal protein L27B (RPL27B) mRNA
J11	<i>Bischofia javanica</i> 26S ribosomal RNA gene
J12	<i>Ricinus communis</i> nucleotide binding protein

3 讨 论

在机械创伤、病原微生物、昆虫侵害或者其他外部信号的诱导下,植物内源茉莉酸大量合成,茉莉酸和异亮氨酸结合形成具有生物活性的 JA-Ile 分子,在该活化分子的作用下,SCF^{COI1} 蛋白复合物和 JAZ 家族成员相结合,使得 JAZ 家族被泛素化而被降解,启动一系列茉莉酸相关应激反应。*Coi1* 基因在整个茉莉酸信号途径中发挥关键作用,但哪些基因参与了 *Coi1* 基因的表达调控目前尚不清楚。笔者利用酵母单杂系统筛选出了与 *HbCoi1* 基因启动子互作的蛋白,以及参与橡胶 *HbCoi1* 的表达调控的基因。

酵母单杂系统是从酵母双杂交技术发展而来的一种研究蛋白质和 DNA 相互作用的实验体系,由 Wang 和 Reed 等在 1993 年创立^[15]。酵母单杂体系具有许多优点:1) 操作简便,不需要去分离纯化蛋白。2) 酵母菌属于真核生物,利用酵母单杂体系验证真核生物蛋白-DNA 的互作,避免了诸如包涵体的形成或者蛋白折叠活化等在原核表达系统容易出现的问题,所以单杂技术的准确性和灵敏度相对较高。笔者利用酵母单杂系统筛选到的与 *HbCoi1* 启动子互作的蛋白大多为 DNA 结合蛋白和核糖体蛋白,有些为功能未知的基因(表 1)。其中的 DNA 结合蛋白很可能是调控 *HbCoi1* 转录相关的基因,核糖体蛋白通常参与 mRNA 结合并参与蛋白的翻译,与 *HbCoi1* 启动子的结合很可能是一种非特异性结合。对于功能未知的基因则需要进一步的功能鉴定。此外,酵母单杂体系也有它自身的局限性,出现假阳性的结果较多,因此,本研究虽为深入研究 *Hbcoi1* 基因表达调控打下了基础,但其机理仍有待深入细致的鉴定分析。

参考文献:

[1] 郝秉中,吴继林,云翠英. 排胶对橡胶树乳管分化的促进作用[J]. 热带作物学报,1984,5(2): 19-23.
[2] 郝秉中,吴继林. 创伤(割胶)对乳管分化的影响[J]. 植物学报,1982(24): 388-391.
[3] HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. *Annals of Botany*, 2000, 85: 37-43.
[4] 曾日中,白先权,黎瑜. 外源茉莉酸诱导巴西橡胶树乳管分化的酶学研究(Ⅰ)[J]. 热带作物学报,2001(22): 18-23.
[5] ZHU J, ZHANG Z. Ethylene stimulation of latex production in *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant signaling behavior* [J]. 2009, 4 (11): 1072-1074.
[6] XIE D X, FEYS B F, JAMES S. *COI1*: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility [J]. *Science*, 1998, 280(5366): 1091-1094.
[7] KAZAN K, MANNERS J M. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk [J]. *Trends in Plant Science*,

- 2011 ,17(1) : 22 – 31.
- [8] SHEARD L B , TAN X , MAO H. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor[J]. *Nature* , 2010 ,468(7322) : 400 – 405.
- [9] THINES B , KATSIR L , MELOTTO M. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signaling[J]. *Nature* ,2007 ,448(7154) : 661 – 665.
- [10] QI T , SONG S , REN Q. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell* ,2011 ,23 (5) : 1795 – 1814.
- [11] NIU Y , FIGUEROA P , BROWSE J. Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis* [J]. *Journal of experimental botany* ,2011 ,62(6) : 2113 – 2151.
- [12] PAUWELS L , BARBERO G F , GEERINCK J A. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling[J]. *Nature* ,2010 ,464(7289) : 788 – 791.
- [13] PENG S Q , XU J , LI H L. Cloning and molecular characterization of HbCOI1 from *Hevea brasiliensis* [J]. *Bioscience , Biotechnology Biochemistry* ,2009 ,73(3) : 665 – 670.
- [14] LABORATORIES C. Matchmaker TM gold yeast one-hybrid system user manual [R]. California: Clontech Laboratories , Inc. ,2007.
- [15] WANG M M , REED R R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast [J]. *Nature* ,1993 ,364(6433) : 121 – 126.

Construction of Yeast-one-hybrid Bait Vector and Screening of Interacted Proteins of *HbCoil*

HONG Hao , LIU Xiaoting , XIAO Hua , HUANG Xi , YUAN Hongmei

(College of Agronomy , Hainan University/Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Haikou 570228 , China)

Abstract: Jasmonic acid (JA) is one of the most important phytohormones for regulation of latex biosynthesis in *Hevea brasiliensis*. *HbCoil* is the receptor of JA signaling pathway. Analysis of the gene expression of *HbCoil* is of great significance to reveal molecular mechanism of latex biosynthesis in *H. brasiliensis*. In this context , the promoter of *HbCoil* was PCR amplified and inserted into pHis2. 1 vector to construct bait vector pHIS-*HbCoil* for yeast-one-hybrid. The vector was then transformed into Y187 yeast strain and cultured on the SD medium to test the auto-activity of the transcription. The growth of the strain containing bait vector was inhibited on the SD medium added with $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT. Furthermore , pHIS-*HbCoil* vector and pGADT7-rec2 cDNA library of *H. brasiliensis* were co-transformed into Y187 strain , and several proteins interacted with *HbCoil* promoter were identified , including DNA binding protein , ribosomal proteins and uncharacterized proteins , which lays a foundation for further study of gene expression of *HbCoil*.

Key words: *HbCoil*; pHIS vector; auto-activation; yeast-one-hybrid