

采用酵母双杂交技术研究OsRUS1与OsRUS2.1之间的相互作用

潘家强¹, 侯学文^{1,2,*}

华南农业大学生命科学院¹植物逆境生物学研究中心, ²植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州510642

摘要: 为了研究OsRUS1 (ROOT UV-B SENSITIVE 1)与OsRUS2.1 (ROOT UV-B SENSITIVE 2.1)之间是否具有相互作用以及通过何种结构域相互作用, 采用酵母双杂交技术开展了如下工作。根据对OsRUS1与OsRUS2.1的DUF647结构域分布的分析, 分别采用分子克隆技术将OsRUS1的4个不同片段[OsRUS1 (1~1 782)、OsRUS1 (1~504)、OsRUS1 (510~1 282)和OsRUS1 (1 188~1 782)]克隆到诱饵载体pGBKT7上, 并将OsRUS2.1的4个不同片段[OsRUS2.1 (1~1 317)、OsRUS2.1 (1~138)、OsRUS2.1 (139~879)和OsRUS2.1 (880~1 317)]克隆到猎物载体pGADT7上, 酶切和测序结果表明诱饵和猎物载体构建成功, 读码框正确。将所构建的4个OsRUS1诱饵载体和4个OsRUS2.1猎物载体质粒依次转化酵母AH109, 研究转化AH109菌落在营养缺陷型培养液SD-Trp-DO或SD-Leu-DO上的生长情况, 以及对报告基因*ADE*、*HIS*、*MEL1*和*LacZ*的激活情况, 表明它们均没有对酵母菌株AH109产生毒性和自激活活性。再将4个OsRUS1诱饵载体和4个OsRUS2.1猎物载体的16种组合分别共转化酵母AH109, 共转化菌株能在二缺营养缺陷板SD-Trp-Leu-DO上生长良好, 但不能在四缺营养缺陷板SD-Trp-Leu-Ade-His-DO上生长, 也不能激活*MEL1*和*LacZ*报告基因。这些结果表明OsRUS1与OsRUS2.1之间没有直接的相互作用。

关键词: OsRUS; 酵母双杂交; 相互作用; 自激活

Study of Interaction between OsRUS1 and OsRUS2.1 by Yeast Two-Hybrid Technology

PAN Jia-Qiang¹, HOU Xue-Wen^{1,2,*}

¹Research Center of Plant Stress Biology, ²Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Yeast two-hybrid technology was applied to study whether OsRUS1 interacts with OsRUS2.1, and they interact through which domain. The four different length of *OsRUS1* fragments [*OsRUS1* (1~1 782), *OsRUS1* (1~504), *OsRUS1* (510~1 282), *OsRUS1* (1 188~1 782)] were cloned into bait vector pGBKT7, and four different length of *OsRUS2.1* fragments [*OsRUS2.1* (1~1 317), *OsRUS2.1* (1~138), *OsRUS2.1* (139~879), *OsRUS2.1* (880~1 317)] were cloned into prey vector pGADT7, according to the distribution of DUF647 domain in *OsRUS1* and *OsRUS2.1*. These constructed vectors were confirmed by enzyme digestion and sequencing. The four *OsRUS1* bait vectors and four *OsRUS2.1* prey vectors were transformed into yeast strain AH109, respectively. The self-activation and toxicity of the plasmids to host yeast AH109 were analyzed by the expression of *ADE*, *HIS*, *MEL1* and *LacZ* reporter genes and by culturing in auxotroph medium SD-Trp-DO or SD-Leu-DO. Results showed that the eight constructed vectors had no self-transcriptional activity and not toxicity to yeast strain AH109. Then 16 combinations of four *OsRUS1* bait vectors and four *OsRUS2.1* prey vectors were cotransformed into yeast strain AH109, respectively. The transformed AH109 could grow well in auxotroph medium SD-Trp-Leu-DO, but could not grow in auxotroph medium SD-Trp-Leu-Ade-His-DO, and both the reporter gene *MEL1* and *LacZ* could not be activated. All these results showed that there was no direct interaction between OsRUS1 and OsRUS2.1.

Key words: OsRUS; yeast two-hybrid; interaction; self-activation

UV-B是太阳光线的成分之一, 在强度较高时对植物是一个逆境因子, 但在低强度时却是一个重要的形态建成、生长发育的调控因子(Frohn-meyer和Staiger 2003)。目前研究已经确认植物中至少存在两条UV-B信号传导途径, 即UVR8依赖途

径和UVR8非依赖途径(Brown和Jenkins 2008)。经

收稿 2012-09-17 修定 2012-10-16

资助 国家自然科学基金(30971709)。

* 通讯作者(E-mail: hxw1969@scau.edu.cn; Tel: 020-85287961)。

过近年来的工作, UVR8依赖途径的研究取得了重要进展, 陆续鉴定出了UVR8、COP1、HY5、HYH、RUP、CHS等成员(钱珊珊和侯学文2011; Heijde和Ulm 2012), 并于近期确认UVR8即是UV-B受体(Rizzini等2011)以及描述了UVR8感受UV-B的机制(Christie等2012; Wu等2012)。但对UVR8非依赖途径的研究进展却不大。Tong等(2008)、Leasure等(2009)相继报道了*ROOT UV-B SENSITIVE1*和2, 即*AtRUS1*与*AtRUS2*, 发现它们对极低强度的UV-B感受有关, 参与拟南芥根的早期发育, 它们与UVR8依赖途径和UVR8非依赖途径的关系如何, 目前尚不清楚。通过生物信息学分析, 发现拟南芥基因组中有6个*RUS*基因, 它们的共同特点是均具有一个功能未知的结构域DUF647。研究发现*rus1*、*rus2*与双突变体*rus1rus2*的表型相同, 推测它们可能是以一个复合体起作用。酵母双杂交的工作表明, *AtRUS1*与*AtRUS2*之间存在互作, 并且它们之间的互作是依赖于DUF647中的保守氨基酸(Leasure等2009)。通过对水稻基因组的分析, 在水稻基因组中也发现6个*OsRUS*基因, 且均具有DUF647的未知功能结构域。水稻中*OsRUS*是否也如拟南芥*AtRUS*一样感受极低强度的UV-B并与根的早期发育有关? 我们正在利用转基因技术进行研究。*OsRUS1*与*OsRUS2.1*之间是否具有如*AtRUS1*与*AtRUS2*之间的相互作用? 在本研究中, 我们根据*OsRUS1*和*OsRUS2.1*中DUF647的分布情况, 以4个*OsRUS1*不同片段构建诱饵载体, 4个*OsRUS2.1*不同片段构建猎物载体, 采用酵母双杂交技术研究二者之间是否具有相互作用, 为*OsRUS*功能的解析提供线索。

材料与方法

1 实验材料

酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) AH109菌株、pGBKT7质粒、pGADT7质粒、阳性对照质粒pGBKT7-53和pGADT7-T、阴性对照质粒pGBKT7-Lam和pGADT7-T(美国Clontech公司)、大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers] TOP10菌株以及已克隆的*OsRUS1*基因pMD18-T-S-BamHI-1-*OsRUS1* cDNA-1782-MluI、*OsRUS2.1*基因pMD18-T-S-BamHI-*OsRUS2.1* cD-

NA-1317-MluI由本校实验室保存; 其他试剂有YNB和蛋白胨(Difco公司), SD-Trp-DO、SD-Leu-DO、SD-Trp-Leu-DO和SD-Trp-Leu-Ade-His-DO(美国Clontech公司), 酵母提取物(OXOID公司), DNA限制性内切酶和T₄ DNA连接酶(TaKaRa公司), Kod-Plus-Neo DNA聚合酶和dNTPs(TOYOBO公司), DS2000 Marker(东盛生物公司), DNA胶回收试剂盒(普博欣生物公司), 2×power Taq PCR Mix(百泰克生物公司), X-β-gal(美国BBL公司), X-α-gal(美国GOLDBIO公司), PEG3350(广州华奇盛生物公司), 乙酸锂(天津科密欧有限公司), N,N-二甲基甲酰胺(北京奇华盛生物公司), 二甲基亚砜(上海凌峰化学试剂公司)以及Z buffer/X-β-gal液(现配现用: 100 mL Z buffer, 0.27 mL β-巯基乙醇, 1.67 mL X-β-gal原液)。

本实验所用引物名称及序列有*OsRUS1* cDNA-*EcoRI*-1-F: 5' AGAATTCATGTCCTCCTCG-CAATCTCTCC 3'; *OsRUS1* cDNA-BamHI-504-R: 5' AGGATCCACCGGCCTTCTCCGCATC 3'; *OsRUS1* cDNA-*EcoRI*-510-F: 5' AGAATTCGTGC-CGAGCTGGCTGC 3'; *OsRUS1* cDNA-BamHI-1282-R: 5' GGGATCCTCTTTGACTGAAGGAACTTGTC 3'; *OsRUS1* cDNA-*EcoRI*-1188-F: 5' AGAATTCGAATCGATTCAGCTGAGGACACT 3'; *OsRUS1* cDNA-BamHI-1782-R: 5' TGGATCCT-TATGAAGGAGCATCTCCTATGC 3'; *OsRUS2.1* cDNA-*EcoRI*-1-F: 5' CGAATTCATGAACATACTC-GAGAGGATAC 3'; *OsRUS2.1* cDNA-BamHI-138-R: 5' AGGATCCTTACAGAGACTCTGCCG-GCGT 3'; *OsRUS2.1* cDNA-*EcoRI*-139-F: 5' GGAATTCAAAAGTTATCCAAGATTCGAGAC 3'; *OsRUS2.1* cDNA-BamHI-879-R: 5' TGGATCCG-GAAACCTTTCCACTCTTGAT 3'; *OsRUS2.1* cDNA-*EcoRI*-880-F: 5' GGAATTCAGCCCAGCT-GAGCTAAGATATCG 3'; *OsRUS2.1* cDNA-BamHI-1317-R: 5' CGGATCCTCATAAAGCACTACCGCTGA 3'; Matchmaker 5' AD LD-insert screening amplicon: 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCCA-CCAAACCC 3'; Matchmaker 3' AD LD-insert screening amplicon: 5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAG-TATCTACGATT 3'; T7 sequencing primer: 5'

TAATACGACTCACTATAGGGC 3'。

2 实验方法

2.1 *OsRUS1*与*OsRUS2.1*基因DUF647结构域分析及载体构建

采用<http://smart.embl-heidelberg.de/>网站上结构域在线分析工具分析*OsRUS1*与*OsRUS2.1*结构域分布情况,以Primer Premier 5.0设计引物,利用分子克隆技术分别成功构建4个*OsRUS1*不同片段诱饵载体和4个*OsRUS2.1*不同片段猎物载体。

2.2 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体转化酵母AH109感受态及对宿主菌毒性检测

按Clontech公司酵母双杂交手册进行酵母菌株AH109感受态制备。采用PEG/LiAc法依次进行4个*OsRUS1*诱饵载体和4个*OsRUS2.1*猎物载体的转化,最后将8种转化菌菌液涂布在相应营养缺陷板上筛选,同时将AH109感受态菌液分别涂布SD-Trp-DO和SD-Leu-DO板,放入30℃恒温箱静置培养2~3 d观察缺陷板上菌落生长情况。3 d后分别挑取直径2~3 mm的4种*OsRUS1*诱饵载体的AH109菌落接种于3 mL的SD-Trp-DO培养液(含20 μg·mL⁻¹的卡那霉素),挑取直径2~3 mm的4种*OsRUS2.1*猎物载体的AH109菌落接种于3 mL的SD-Leu-DO培养液(含25 μg·mL⁻¹的氨苄青霉素)中,30℃、250 r·min⁻¹振荡培养过夜,检测OD₆₀₀是否大于0.8,以此判断载体表达蛋白对宿主菌AH109是否具有毒性。

2.3 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体对酵母AH109转录自激活活性的检测

按Clontech公司酵母双杂交手册进行,将4种*OsRUS1*诱饵载体转化菌划线于SD-Trp-Ade-His-DO板,将4种*OsRUS2.1*猎物载体转化菌划线于SD-Leu-Ade-His-DO板,30℃恒温箱中静置培养3~5 d,观察生长情况以检测营养缺陷报告基因ADE和HIS是否被激活。

取过夜摇菌培养的阳性对照菌液以及上述8种转化酵母菌单菌落菌液2 mL于离心管中,12 000 r·min⁻¹离心15 s后弃上清,将离心管在液氮中速冻10 min,取出使其自然融解约10 min,再重复操作一次,加入50 μL现配的Z buffer/X-β-gal液,30℃静置存放24 h染色,以检测报告基因LacZ的表达情况。

将含上述4种诱饵载体和4种猎物载体的AH109转化菌以及含阳性和阴性对照质粒的AH109单菌落,分别划线于涂有100 μL X-α-gal液(4 mg·mL⁻¹)的直径10 cm的SD-Trp-DO板和SD-Leu-DO板,30℃静置培养3 d,以检测报告基因MEL1的表达情况。

2.4 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化酵母AH109感受态及对宿主菌毒性检测

按Clontech公司酵母双杂交手册进行,具体为将阳性对照质粒、阴性对照质粒以及4种诱饵载体与4种猎物载体按照两两搭配的16种组合采用PEG/LiAc法分别共转化AH109感受态,然后将这些转化菌液和AH109感受态菌液一半涂二缺板,一半涂四缺板,倒置放30℃恒温箱培养5 d后,观察转化和生长情况。毒性检测方法同2.2节,只是将培养液换成SD-Trp-Leu-DO(含20 μg·mL⁻¹的卡那霉素和25 μg·mL⁻¹的氨苄青霉素)。

2.5 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化酵母AH109菌落的PCR检测

按潘家强和侯学文(2012)的方法粗提共转化酵母菌株的质粒,分别采用*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体上的特异引物进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测。

2.6 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化酵母AH109菌落的转录激活活性的检测

方法同2.3节,只是分别使用了四缺培养基SD-Trp-Leu-Ade-His-DO及二缺培养基SD-Trp-Leu-DO。

实验结果

1 *OsRUS1*与*OsRUS2.1*结构域分布及相关载体构建

经SMART在线软件分析,*OsRUS1*开放阅读框(ORF)全长1 782 bp,结构域DUF647位于523~1 269 bp,*OsRUS2.1*开放阅读框(ORF)全长1 317 bp,结构域DUF647位于150~879 bp(图1)。根据这一分析结果,成功构建了4个*OsRUS1*不同片段的诱饵载体pGBKT7-EcoRI-1-*OsRUS1* cDNA-1782-BamHI、pGBKT7-EcoRI-1-*OsRUS1* cDNA-504-BamHI、pGBKT7-EcoRI-510-*OsRUS1* cDNA-1280-BamHI和pGBKT7-EcoRI-1188-*OsRUS1* cDNA-1782-BamHI,以及4个*OsRUS2.1*不同片段的猎物载体pGADT7-EcoRI-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-BamHI、pGADT7-EcoRI-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-BamHI、pGADT7-

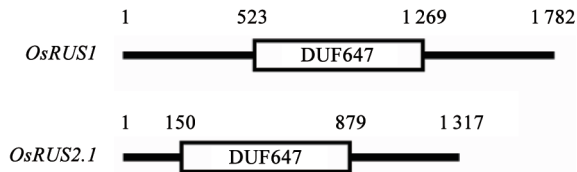


图1 结构域DUF647在*OsRUS1*和*OsRUS2.1*中的分布图
Fig.1 The schematic map of DUF647 domain in *OsRUS1* and *OsRUS2.1*

EcoRI-139-*OsRUS2.1 cDNA*-879-*BamHI*和

pGADT7-EcoRI-880-*OsRUS2.1 cDNA*-1317-*BamHI*。这些载体已被转化入宿主菌Y187中,已表明它们没有自激活活性及对Y187毒性。

2 *OsRUS1*诱饵载体、*OsRUS2.1*猎物载体转化酵母感受态AH109及检测

涂布在SD-Trp-DO板的4种*OsRUS1*诱饵载体转化菌液和涂布SD-Leu-DO板的4种*OsRUS2.1*猎物载体转化菌液在培养3 d后都长出数百个菌落,而涂布在SD-Trp-DO板和SD-Leu-DO板的AH109感受态菌液均无菌落生长,说明转化成功。挑取菌落在对应的培养液上培养过夜后 OD_{600} 均在1.6以上,说明转化载体对菌株AH109没有毒性;划线在SD-Trp-Ade-His-DO板的4种*OsRUS1*诱饵载体转化菌和划线在SD-Leu-Ade-His-DO板的4种*OsRUS2.1*猎物载体转化菌均无菌落生长,表明上述8种载体都不能激活AH109的*ADE*及*HIS*报告基因;LacZ显色法结果表明,上述8种载体都不能激活AH109的*LacZ*报告基因(图2);

MEL1显色法结果表明,上述8种载体也不能激活报告基因*MEL1*(图3、4),说明构建的*OsRUS1*诱饵质粒和*OsRUS2.1*猎物质粒不仅对宿主菌AH109没有毒性,而且也没有自激活活性,可用于后续蛋白互作研究。

3 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化酵母AH109感受态

为了检测*OsRUS1*与*OsRUS2.1*之间是否有互作以及通过哪个区域互作,将上述构建的4个*OsRUS1*诱饵载体与4个*OsRUS2.1*猎物载体分别两两配对共16个组合,转化宿主菌AH109;转化时设置阳性对照与阴性对照。转化时将转化菌液和AH109感受态菌液一半涂二缺板,一半涂四缺板,倒置放30℃恒温箱培养5 d后,结果AH109感受态菌液在二缺和四缺板上都不能生长,说明营养缺陷培养基的筛选压力很高,未转化成功的AH109酵母不能生长。阳性对照菌在二缺和四缺板上都长有100个左右菌落,生长情况差别不大;阴性对照菌在二缺板上长有近100个菌落,在四缺板上无菌落生长。4种诱饵载体与4种猎物载体按照两两搭配的16种组合共转化AH109培养5 d后,在所有二缺板上都长有100多个菌落,说明共转化AH109酵母成功,而在所有四缺板上都无菌落生长,说明不同组合的*OsRUS1*诱饵蛋白与*OsRUS2.1*猎物蛋白之间没有互作,因而不能激活AH109酵母体内的营养缺陷筛选的报告基因*ADE*和*HIS*的表达,所以不能在四缺板上生长。

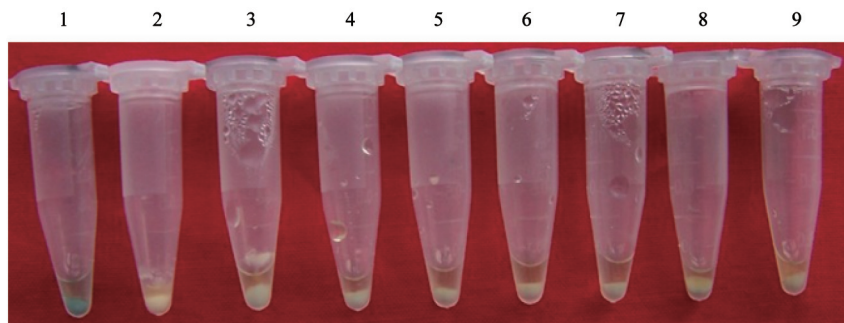


图2 4种*OsRUS1*重组诱饵载体和4种*OsRUS2.1*重组猎物载体对AH109的自激活活性检测

Fig.2 The self-activation detection of four *OsRUS1* bait vectors and four *OsRUS2.1* prey vectors to AH109

用LacZ法检测。1: 阳性对照; 2: 含

pGBKT7-EcoRI-1-*OsRUS1 cDNA*-504-*BamHI*的AH109; 3: 含

pGBKT7-EcoRI-510-*OsRUS1 cDNA*-1280-*BamHI*的AH109; 4: 含

pGBKT7-EcoRI-1188-*OsRUS1 cDNA*-1782-*BamHI*的AH109; 5: 含

pGBKT7-EcoRI-1-*OsRUS1 cDNA*-1782-*BamHI*的AH109; 6: 含

pGADT7-EcoRI-1-*OsRUS2.1 cDNA*-138-*BamHI*的AH109; 7: 含

pGADT7-EcoRI-139-*OsRUS2.1 cDNA*-879-*BamHI*的AH109; 8: 含

pGADT7-EcoRI-880-*OsRUS2.1 cDNA*-1317-*BamHI*的AH109; 9: 含

pGADT7-EcoRI-1-*OsRUS2.1 cDNA*-1317-*BamHI*的AH109。

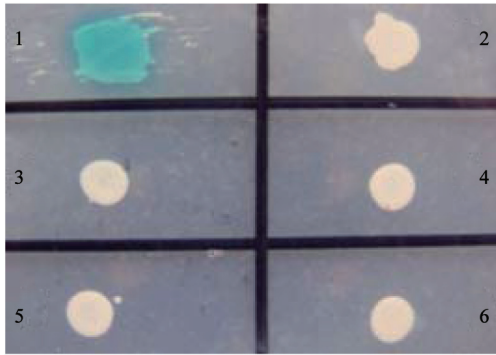


图3 SD-Trp-DO-X- α -gal板上4种*OsRUS1*诱饵载体对AH109酵母的自激活活性检测

Fig.3 The self-activation detection of four *OsRUS1* bait vectors to AH109 on SD-Trp-DO-X- α -gal plate

用MEL1法检测。1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 含pGBKT7-*EcoRI*-1-*OsRUS1* *cDNA*-504-*Bam*HI的AH109; 4: 含pGBKT7-*EcoRI*-510-*OsRUS1* *cDNA*-1280-*Bam*HI的AH109; 5: 含pGBKT7-*EcoRI*-1188-*OsRUS1* *cDNA*-1782-*Bam*HI的AH109; 6: 含pGBKT7-*EcoRI*-1-*OsRUS1* *cDNA*-1782-*Bam*HI的AH109。

4 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化酵母AH109的PCR验证

根据野生型AH109及共转化*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体的酵母AH109在二缺板上的生长表现情况来看, 对应的*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体已共转入AH109。为了进一步确认这一结果, 我们挑选在二缺板上生长的克隆, 粗提质粒后, 分别采用构建*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体上的特异引物进行

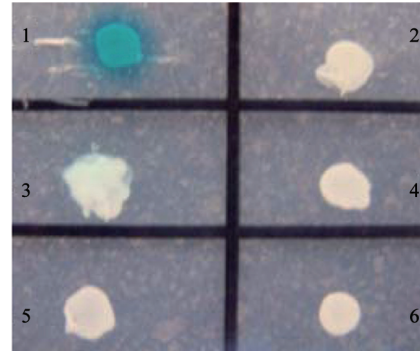


图4 SD-Leu-DO-X- α -gal板上4种*OsRUS2.1*猎物载体对AH109酵母的自激活活性检测

Fig.4 The self-activation detection of four *OsRUS2.1* prey vectors to AH109 on SD-Leu-DO-X- α -gal plate

用MEL1法检测。1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 含pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* *cDNA*-138-*Bam*HI的AH109; 4: 含pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* *cDNA*-879-*Bam*HI的AH109; 5: 含pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* *cDNA*-1317-*Bam*HI的AH109; 6: 含pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* *cDNA*-1317-*Bam*HI的AH109。

PCR扩增, 实验结果表明, 挑选的克隆均同时含有对应的*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体扩增条带(图5), 再次证明共转化成功。

5 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化对酵母AH109的毒性检测

分别挑取上述经验证的含*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体的AH109菌落, 在3 mL的SD-Trp-Leu-DO (添加卡那霉素与氨苄青霉素)的液体培养基中过夜培养, OD₆₀₀均达到了1.6,

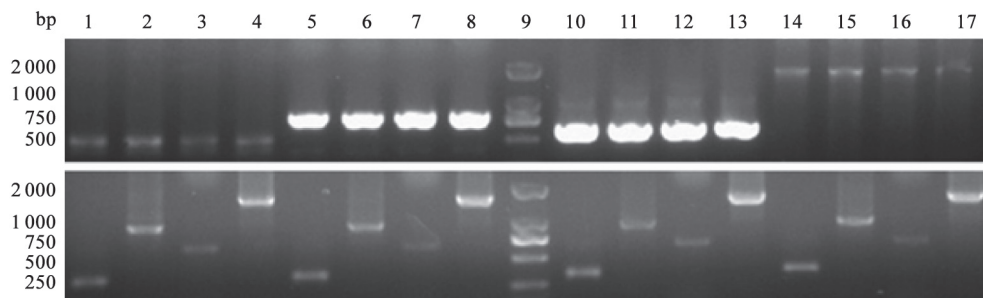


图5 16种共转化*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体的酵母AH109菌落的PCR验证

Fig.5 The PCR verification of 16 yeast AH109 strains cotransformed by *OsRUS1* bait vectors and *OsRUS2.1* prey vectors

上部分是对*OsRUS1*诱饵载体片段扩增, 下部分是对*OsRUS2.1*猎物载体片段扩增。9: Marker DS2000; 1、2、3、4: 转化的诱饵载体为pGBKT7-*EcoRI*-1-*OsRUS1* *cDNA*-504-*Bam*HI; 5、6、7、8: 转化的诱饵载体为pGBKT7-*EcoRI*-510-*OsRUS1* *cDNA*-1280-*Bam*HI; 10、11、12、13: 转化的诱饵载体为pGBKT7-*EcoRI*-1188-*OsRUS1* *cDNA*-1782-*Bam*HI; 14、15、16、17: 转化的诱饵载体为pGBKT7-*EcoRI*-1-*OsRUS1* *cDNA*-1782-*Bam*HI; 1、5、10、14: 转化的猎物载体为pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* *cDNA*-138-*Bam*HI; 2、6、11、15: 转化的猎物载体为pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* *cDNA*-879-*Bam*HI; 3、7、12、16: 转化的猎物载体为pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* *cDNA*-1317-*Bam*HI; 4、8、13、17: 转化的猎物载体为pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* *cDNA*-1317-*Bam*HI。

说明在AH109中共表达Gal DNA-BD-OsRUS1蛋白不同片段融合蛋白及Gal DNA-AD-OsRUS2.1蛋白不同片段融合蛋白对宿主菌的生长没有毒性, 可以进行下一步的实验。

6 *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体共转化对报告基因*LacZ*及*MEL1*的激活活性检测

综合共转化*OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体的AH109菌落在二缺板及四缺板上的生

长情况, 说明它们之间可能没有互作, 不能激活营养缺陷筛选的报告基因*ADE*及*HIS*的表达。随后检测了对报告基因*LacZ*及*MEL1*的激活情况, 实验结果表明, 除了阳性对照能激活报告基因*LacZ*及*MEL1*的表达外, *OsRUS1*诱饵载体与*OsRUS2.1*猎物载体的16种组合均不能激活报告基因*LacZ* (图6)及*MEL1* (图7)的表达, 说明*OsRUS1*与*OsRUS2.1*之间可能不存在直接的相互作用。

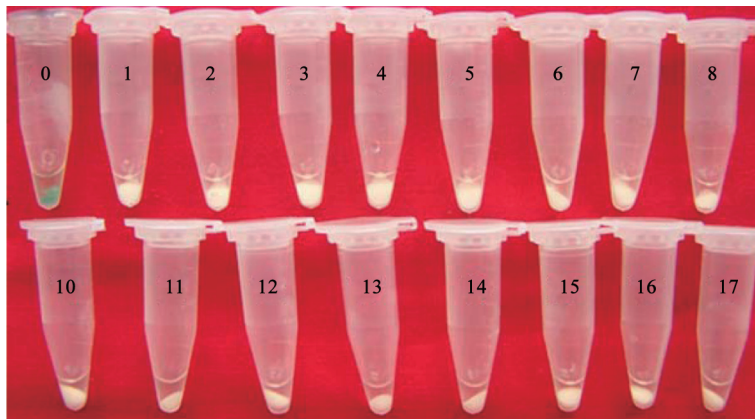


图6 16种*OsRUS1*诱饵载体和*OsRUS2.1*猎物载体组合共转化对AH109的*LacZ*报告基因激活活性检测

Fig.6 The activation detection of 16 combinations of *OsRUS1* bait vectors and *OsRUS2.1* prey vectors to AH109 *LacZ* reporter gene using *LacZ* method. 0 for positive interaction control, the remaining numbers are the same as in Fig.5 for co-transformed bait vectors and prey vectors in AH109 yeast cells.

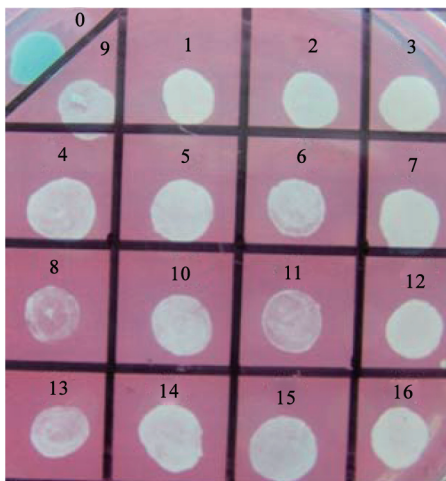


图7 16种*OsRUS1*诱饵载体和*OsRUS2.1*猎物载体组合共转化对AH109的*MEL1*报告基因激活活性检测

Fig.7 The activation detection of 16 combinations of *OsRUS1* bait vectors and *OsRUS2.1* prey vectors to AH109 *MEL1* reporter gene

using *MEL1* method. 0: positive interaction control; 9: negative interaction control; the remaining numbers are the same as in Fig.5 for co-transformed bait vectors and prey vectors in AH109 yeast cells.

讨 论

细胞代谢、信号传导等生命过程涉及到蛋白间的相互作用, 因此解析蛋白间的相互作用对了解生命活动的机制意义重大(Immink和Angenent 2002)。在众多的研究蛋白间相互作用的技术中, 酵母双杂交系统具有高通量、技术难度不大、无需制备特异抗体、以及准确率相对较高等优势。自Fields和Song (1989)提出此项技术以来, 在筛选与已知蛋白的候选互作蛋白或验证蛋白间的相互作用等方面获得了大量应用(李志等2009; 孙丽静等2012; Lee等2012; Wang等2012), 为蛋白功能的解析提供了有用的信息。在前言中已经述及利用酵母双杂交技术表明AtRUS1与AtRUS2之间存在互作, 并且它们之间的互作是依赖于DUF647中的保守氨基酸(Leasure等2009)。但在本研究中却未发现*OsRUS1*与*OsRUS2.1*之间存在互作(图6、7)。这一结果是否预示*OsRUS*与*AtRUS*在功能上

具有不同? 序列分析表明, AtRUS1与OsRUS1之间的相似性约为56.7%, AtRUS2与OsRUS2.1之间的相似性约为67.2%, 这表明OsRUS与AtRUS之间的相似性不算太高, 这或许暗示它们之间功能不同也是可能的。或者是由于酵母双杂交的技术缺陷而未能真实揭示二者之间的互作? 虽然酵母双杂交功能强大、应用广泛, 但它也存在固有的技术缺陷, 如它不能检测所有的蛋白与蛋白之间的相互作用, 另外酵母毕竟是低等真核生物, 在其体内表达的外源蛋白的翻译后修饰折叠加工成熟过程与水稻细胞内的真实加工过程还是存在差异, 这些都可能掩盖蛋白间真实的相互作用而获得假阴性结果(Fields 2005; 马晶等2011)。为了克服这一技术缺陷, 采用不同原理的研究蛋白互作的技术(双分子荧光互补技术BiFC或免疫共沉淀等)开展工作, 将会揭示蛋白间真实的互作情况, 这些也是我们下一步的研究计划, 以确认OsRUS1与OsRUS2.1之间是否存在互作。

参考文献

- 李志, 刘志斌, 向俊蓓, 岳渝飞, 王艳, 王健美, 杨毅, 李旭峰(2009). 利用酵母双杂交系统研究甘蓝型油菜APX和ATP之间的相互作用. 中国农业科技导报, 11: 95~99
- 马晶, 赵国强, 朱含, 袁建党, 章茜, 安玉会(2011). 酵母双杂交系统检测SK2与RyR2蛋白的相互作用. 郑州大学学报(医学版), 46: 45~48
- 潘家强, 侯学文(2012). *OsRUS1*酵母双杂交诱饵载体的构建及其自激活作用检测. 热带作物学报, 33: 107~110
- 钱珊珊, 侯学文(2011). 植物UV-B生理效应的分子机制研究进展. 植物生理学报, 47 (11): 1039~1046
- 孙丽静, 张芊, 路铁刚, 孙颖(2012). 利用酵母双杂交系统筛选水稻类受体激酶OsWAK50胞内域相互作用蛋白. 生物化学与生物物理进展, 39: 438~447
- Brown BA, Jenkins GI (2008). UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol*, 146: 576~588
- Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, Kelly SM, Hothorn M, Smith BO, Hitomi K et al (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science*, 335: 1492~1496
- Fields S (2005). High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. *FEBS J*, 272: 5391~5399
- Fields S, Song O (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245~247
- Frohmeyer H, Staiger D (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol*, 133: 1420~1428
- Heijde M, Ulm R (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci*, 17: 230~237
- Immink RG, Angenent GC (2002). Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions. *Trends Plant Sci*, 7: 531~534
- Leasure CD, Tong HY, Yuen GG, Hou XW, Sun XF, He ZH (2009). ROOT UV-B SENSITIVE2 acts with ROOT UV-B SENSITIVE1 in a root ultraviolet B-sensing pathway. *Plant Physiol*, 150: 1902~1915
- Lee JH, Lee GT, Kwon SJ, Jeong J, Ha YS, Kim WJ, Kim IY (2012). CREBZF, a novel Smad8-binding protein. *Mol Cell Biochem*, 368: 147~153
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI et al (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science*, 332: 103~106
- Tong HY, Leasure CD, Hou XW, Yuen GG, Briggs W, He ZH (2008). Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 21039~21044
- Wang JN, Kuang JF, Shan W, Chen J, Xie H, Lu WJ, Chen JW, Chen JY (2012). Expression profiles of a banana fruit linker histone H1 gene *MaHIS1* and its interaction with a WRKY transcription factor. *Plant Cell Rep*, 31: 1485~1494
- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan CY, Huang X, Zhang J, Yang PY, Deng HT, Wang JW et al (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484: 214~219