

烟草内源铁蛋白 NtFer1 和 NtFer2 的相互作用

周博如, 吴丽丽, 丁宝健, 姜廷波*

东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 以2个烟草铁蛋白基因全长序列(*NtFer1* 和 *NtFer2*, GenBank 登录号: AY083924 和 AY141105)为基础, 利用细菌双杂交系统分析不同烟草铁蛋白亚基之间及相同铁蛋白亚基之间的互作关系, 并利用Northern杂交分析2个铁蛋白基因的特异表达。结果表明, 铁蛋白基因 *NtFer1* 和 *NtFer2* 在叶片中均有表达, 同时2种亚基之间存在很强的互作关系, 说明在叶片中组成铁蛋白的24个亚基可能有3种类型, 或来自单一的 *NtFer1* 亚基, 或来自单一的 *NtFer2* 亚基, 也可能来源于不同的铁蛋白亚基。在烟草根部组织中只有铁蛋白 *NtFer1* 基因大量表达, 而 *NtFer2* 基因的表达非常微弱, 所以根部的铁蛋白大分子可能由单一的铁蛋白 *NtFer1* 亚基聚合而成的。

关键词: 烟草; 铁蛋白; 蛋白质互作; 基因表达

Protein Interaction Analysis among Tobacco Ferritin NtFer1 and NtFer2

ZHOU Bo-Ru, WU Li-Li, DING Bao-Jian, JIANG Ting-Bo*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Based on the full length sequence of two tobacco ferritin genes (*NtFer1* and *NtFer2*), the differential expression of ferritin genes was detected by Northern blotting, and the protein interaction among the ferritin subunits were analyzed by BacterioMatch two-hybrid assay system. Results indicated that the *NtFer1* and *NtFer2* gene could be higher expressed in leaf, and a strong interaction between *NtFer1* and *NtFer2* subunits were detected, and suggested that composed of 24 subunits of ferritin may contain three assemble types: sole kind *NtFer1* subunit, or sole kind *NtFer2* subunit, or multi kind subunits. In the root, only *NtFer1* gene was expressed, which suggested that composed of 24 subunits of ferritin in root was sole kind of *NtFer1* subunit.

Key words: tobacco; ferritin; protein interaction; gene expression

铁蛋白(ferritin)是一种可以储存铁离子的蛋白质, 每个铁蛋白分子能以可溶、无毒和生物体可利用的形式储存高达4 500个铁原子(Harrison 和 Arosio 1996)。植物可以通过铁蛋白氧化还原过程有规律的吸收和释放铁离子, 铁蛋白对协调铁离子的新陈代谢, 避免铁离子不溶性和毒性具有重要作用(Theil 1987)。植物铁蛋白与动物铁蛋白不同, 植物铁蛋白亚基的氨基酸序列较长, 在N端编码有信号肽, 而动物铁蛋白不含信号肽序列。植物铁蛋白亚基前体N端信号肽大约由70个氨基酸残基组成, 包括一个质体定位(targetting plastid, TP)序列(大约40个残基)和延伸肽(extention peptide, EP)。TP用于铁蛋白在质体中的定位, 在蛋白质进入质体后被剪切掉。EP存在于成熟铁蛋白的N端, 可能是体外蛋白质稳定性调控的一个重要决定因素。自1990年从大豆胚轴中克隆出第一个植物铁蛋白基因以来(Ragland等1990), 已经对许多植物的铁蛋白

基因进行了克隆和测序, 如菜豆(Spence 等 1991)、大豆(Lescure 等 1991)、豌豆(Lobréaux 等 1992)、蚕豆(Wicks 和 Entsch 1993)、豇豆(Wardrop 等 1999)、玉米(Petit 等 2001)和烟草(Jiang 2005)等植物铁蛋白基因均已见报道。研究认为植物铁蛋白基因是由少数基因编码的基因家族(玉米, Fobis-Loisy 等 1995; 拟南芥, Petit 等 2001), 说明在植物细胞中可能同时存在不同的铁蛋白亚基。

前期研究表明至少有2个不同的的铁蛋白基因 *NtFer1* 和 *NtFer2* 存在于烟草基因组内(Jiang 2005), 并获得了2个铁蛋白基因cDNA的全长序列, 为研究烟草铁蛋白亚基在形成多聚体过程中的作用

收稿 2010-05-14 修订 2010-06-05

资助 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB125906)和黑龙江省重大科技攻关项目(GA09B201-4)。

* 通讯作者(E-mail: tbjiang@yahoo.com; Tel: 0451-82190607)。

机制奠定了基础。本研究为探索内源烟草铁蛋白的互作关系, 利用细菌双杂交方法对两种烟草铁蛋白亚基的相互作用及单一亚基间的作用进行分析, 为明确铁蛋白亚基的聚合机制提供理论依据。

材料与方法

1 细菌双杂交分析

1.1 pBT 和 pTRG 载体构建 本研究采用 Bacterio-Match® II 双杂交系统载体试剂盒(Two-Hybrid System Vector Kit, Stratagene)进行载体构建。为了将 *NtFer1* 和 *NtFer2* 克隆到 pBT 和 pTRG 中, 根据 Jiang (2005) 报道的 2 个烟草铁蛋白基因序列(GenBank 登录号: AY083924 和 AY141105), 在编码成熟肽链区域设计引物(表 1), 并在引物的 5' 端导入内切酶的酶切位点, 用于以后的定向克隆。设计引物时充分注意插入的铁蛋白基因片段与载体上的 λ cI 蛋白和

RNAP α 蛋白的读码框相匹配, 以保证表达出正确的蛋白质。用 PCR 法从克隆载体上扩增铁蛋白基因 cDNA 目的片段。PCR 产物经胶回收纯化后, 取出 2 μ g 分别用相应的限制性内切酶双消化, 同时载体 pBT 和 pTRG 也取出 2 μ g 用相应的内切酶进行酶切。酶切产物经胶回收纯化后进行连接反应, 采用插入片段和载体的摩尔比为 2:1 设置连接体系, 用 Ligation High® (TOYOBO) 连接酶在 16 °C 连接过夜。用电穿孔法将连接产物转化到大肠杆菌菌株 XL1-Blue MRF' Kan 中, 经抗生素筛选、PCR 检测重组体, 最后通过测序确认序列的正确性, PCR 引物和测序引物根据载体上的序列设计, 跨越 λ cI 蛋白(pBT 重组质粒)和 RNAP α 蛋白(pTRG 重组质粒)与插入片段的两侧。将测序确认正确的克隆摇菌, 用质粒纯化试剂盒(Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, Promega)提取重组的 pBT 和

表 1 实验中使用的引物名称和序列

Table 1 The name and sequence of primers used in this study

引物名称	DNA 序列(5' → 3')	酶切位点及用途	退火温度 / °C
NF2-F1	GCGAATTC <u>AAAGGGTTCGAACACC</u>	含 <i>EcoRI</i> , 构建 pBT 重组质粒	61.97
NF2-F2	GCGAATTCCTTCAAAGGGTTCGAACACC	含 <i>EcoRI</i> , 构建 pTRG 重组质粒	64.94
NF2-R	GCGCTCGAGTCATGCAACAACCTTCCTC	含 <i>XhoI</i> , 构建两种重组质粒	66.56
NF1-F	GCGGATCCTCAAAGGCGAGCAACCAC	含 <i>BamHI</i> , 构建 pTRG 重组质粒	68.30
NF1-R	GCGCTCGAGTCAAGCAGCAGCTCCCTC	含 <i>XhoI</i> , 构建 pTRG 重组质粒	71.11
PBT-F	TCCGTTGTGGGAAAGTTATC	pBT 正向测序引物	58.01
PBT-R	GGGTAGCCAGCAGCATCC	pBT 反向测序引物	61.86
PTRG-F	TGGCTGAACAAGCTGGAAGCT	pTRG 正向测序引物	57.8
PTRG-R	ATTCGTCGCCGCCATAA	pTRG 反向测序引物	57.3

DNA 序列中下划线表示酶切位点。

pTRG 质粒。

1.2 质粒共转化和蛋白互作分析 为了测定 *NtFer1* 和 *NtFer2* 之间的相互作用, 将构建好的重组质粒 pBT-*NtFer2*、pTRG-*NtFer2*、pTRG-*NtFer1* 以及 pBT 和 pTRG 空载体进行组合, 再加上试剂盒提供的阴性对照一共 6 个组合, 用电转化仪(Electroporator 2510, Eppendorf)将两种质粒导入 BacterioMatch II validation reporter cells 中。细胞复苏之后, 等量菌液分别涂布于不含有 3-AT 的非选择培养基、含有 3-AT 的选择培养基以及含有链霉素的双重选择培养基上, 培养基按照 BacterioMatch II 双杂交系统载体试剂盒(Stratagene)说明书配制。

2 *NtFer1* 和 *NtFer2* 差异表达分析

2.1 植物材料 将烟草种子(*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR-1), 播种于含 MS 培养基的培养皿中生长 1 个月后, 移栽到含不同铁离子浓度 MS 培养基的培养瓶中(培养基含 0、25 或 100 μ mol·L⁻¹ Fe-EDTA)。生长条件为 27~29 °C, 每天 16 h 光照, 8 h 黑暗。2 个月后, 采集叶片和根系保存在液氮中备用。

2.2 Northern 杂交分析 用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Auckland, New Zealand)提取烟草叶片和根系的总 RNA。每个样本取 5 μ g 烟草总 RNA 在 1% 的甲醛变性胶上进行电泳, 然后将 RNA 转移到尼龙膜上

(HybondTM-N⁺, Amersham)。参照 Engler-Blum 等 (1993) 描述的方法进行 Northern 杂交分析。为研究 *NtFer1* 和 *NtFer2* 两个基因的不同表达情况, 在两基因编码区设计特异探针, 并用地高辛探针合成试剂盒 (Boehringer Mannheim, Germany) 进行探针标记, 探针设计参照 Jiang (2005) 描述的方法进行, 一个探针来自 *NtFer1* 的编码区 (110~822 bp), 另一个探针来自 *NtFer2* 编码区 (147~788 bp)。对 2 个探针的特异性进行检测表明, 不同探针可特异性地识别各自的 cDNA。

实验结果

1 细菌双杂交系统的检测

在利用细菌双杂交系统研究目的蛋白互作关系之前, 先用重组诱饵质粒 pBT 和空白靶质粒 pTRG, 或用空白诱饵质粒 pBT 和重组靶质粒 pTRG 对大肠杆菌报告菌株 (BacterioMatch II validation reporter cells) 进行共转化, 检测利用该系统研究 2 种铁蛋白互作的可行性。按照上述组合将一个空质粒和一个含有铁蛋白 *NtFer1* 或 *NtFer2* 基因 cDNA 序列的重组质粒导入报告菌株, 然后将等量菌液分别涂布到不含 3-AT 的非选择平板培养基 (含 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素和 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四环素) 和含有 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-AT 的选择平板培养基 (含 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素和 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四环素), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后进行检测。结果表明在非选择培养基上产生了大量菌落 (图 1-A、C、E、G), 说明共转化成功; 但在含有 3-AT 的选择培养基上没有菌落产生 (图 1-B、D、F、H), 说明在报告菌株中含有一个空白质粒和一个重组质粒不会激活报告基因的转录, 即不会产生假阳性反应, 细菌双杂交系统适用于研究烟草铁蛋白的互作关系。

2 铁蛋白亚基互作关系分析

将含有编码 2 个蛋白基因序列的重组质粒 pBT-*NtFer2* 和 pTRG-*NtFer1* 共导入报告菌株, 分析烟草铁蛋白 *NtFer1* 和 *NtFer2* 之间是否存在互作关系; 将含有铁蛋白基因 *NtFer2* 的重组质粒 pBT-*NtFer2* 和 pTRG-*NtFer2* 导入报告菌株, 检测 *NtFer2* 铁蛋白亚基之间的相互作用。结果表明, 2 个组合的共转化报告菌株在选择培养基与非选择培养基都长出了大量的阳性克隆, 而且在 2 种选择培养基上

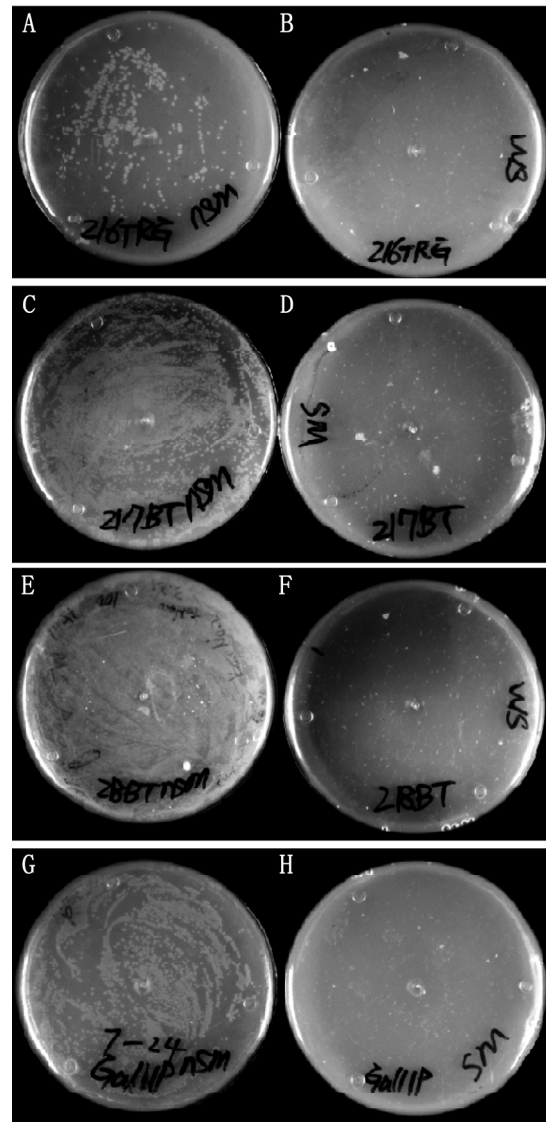


图 1 含铁蛋白基因 *NtFer1* 和 *NtFer2* 的重组质粒自我激活检测

Fig.1 Testing self-activation by recombinant pBT and pTRG containing *NtFer1* and *NtFer2* gene

用于转化报告大肠杆菌的质粒组合分别是: 重组 pBT-*NtFer2*+ 空质粒 pTRG (A、B), 空质粒 pBT+ 重组 pTRG-*NtFer2* (C、D), 空质粒 pBT+ 重组 pTRG-*NtFer1* (E、F), 空质粒 pBT+ 重组 pTRG-Gal11P (G、H)。将共转化的报告大肠杆菌分别涂布在非选择平板培养基上 (A、C、E、G) 和选择平板培养基上 (B、D、F、H)。如果共转化的报告大肠杆菌不能在选择平板培养基 (B、D、F、H) 上生长, 说明该系统适合用于检测目的蛋白之间的互作分析。

出现的克隆数都很多 (图 2), 说明 2 个铁蛋白 *NtFer1* 和 *NtFer2* 亚基之间存在很强的相互作用, 并且相同的铁蛋白 *NtFer2* 亚基之间的相互作用也很强。

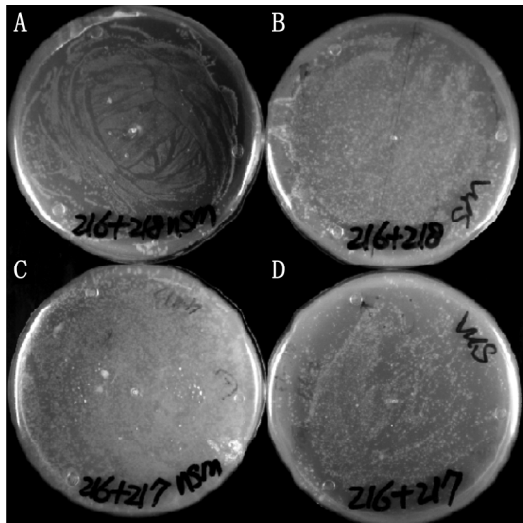


图2 铁蛋白亚基 NtFer1 和 NtFer2 互作关系分析

Fig.2 Interaction analysis of NtFer1 and NtFer2 subunit

用于转化报告大肠杆菌的质粒组合分别是: 重组 pBT-NtFer2+ 重组 pTRG-NtFer1 (A、B), 重组 pBT-NtFer2+ 重组 pTRG-NtFer2 (C、D)。将共转化的报告大肠杆菌分别涂布在非选择平板培养基上(A、C)和选择平板培养基上(B、D)。如果共转化的报告大肠杆菌能在选择平板培养基上(B、D)生长, 说明重组质粒上翻译出的蛋白之间存在互作关系。

3 阳性克隆的链霉素抗性筛选

为了进一步验证在选择培养基上出现阳性克隆的蛋白组合之间相互作用的正确性, 从选择培养基上挑取阳性克隆, 用无菌水稀释后, 均匀涂布在含有 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-AT 和 2 种抗生素的双重选择培养基上(含 $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素和 $12.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四环素及 $12.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h。结果表明 2 个组合均出现了阳性克隆, 证明铁蛋白 NtFer1 和 NtFer2 亚基之间及相同的铁蛋白 NtFer2 亚基之间的相互作用是真实的(图 3)。

4 两种烟草铁蛋白基因的差异表达

利用 Northern 杂交分析铁离子对烟草铁蛋白 mRNA 丰度的影响表明, NtFer1 和 NtFer2 在不同组织中的表达水平差异明显。通过加铁处理发现, 叶片和根系中 NtFer1 基因均可被铁离子诱导表达, 而 NtFer2 基因只在叶片中被铁离子诱导表达(图 4)。在铁离子 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上生长的烟草根系中, 几乎检测不到 NtFer2 基因的表达, 并且叶片中 NtFer1 基因的表达水平明显高于 NtFer2 基因的表达水平。

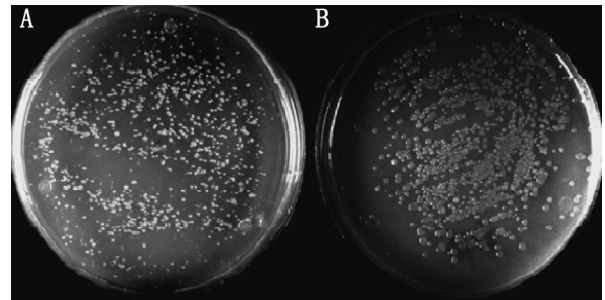


图3 蛋白质间互作关系的链霉素抗性验证

Fig.3 Verification of positives using the streptomycin resistance reporter

将表现为阳性的克隆涂布于双重选择平板培养基, 进一步验证蛋白质互作的真实性。A: 来自重组 pBT-NtFer2 和重组 pTRG-NtFer1 共转化菌株; B: 来自重组 pBT-NtFer2 和重组 pTRG-NtFer2 共转化菌株。

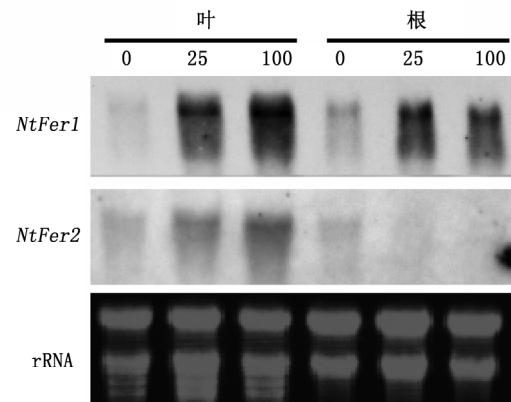


图4 烟草叶片和根系的铁蛋白 mRNA 丰度分析

Fig.4 Ferritin mRNA abundance in roots and leaves of tobacco plants

将烟草幼苗移植到含有 0、25 和 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-EDTA 的液体培养基中生长 3 个月分别采集根和叶用于提取 RNA。分别用对 NtFer1 和 NtFer2 基因具有特异性的探针进行 Northern 杂交。图中数字表示铁离子含量, 单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨 论

植物铁蛋白主要存在于植物细胞质体中, 如叶绿体、线粒体、白色质体, 以及种子、幼苗、根的顶部(Lescure 等 1991; Zancani 等 2007)。另外, 在植物导管细胞、维管形成层、生殖细胞和衰老的细胞中也发现有铁蛋白的存在(Briat 等 1995)。铁蛋白在植物体中的功能主要是在种子形成、叶片衰老或铁过量时积累铁, 在种子萌发或质体绿化过程中释放铁, 调节植物对铁的吸收和释放(Laulhere

和 Briat 1993; Lauthere 等 1996)。铁蛋白是迄今为止发现的唯一能控制铁离子从固相转移到液相的蛋白质。铁蛋白是一种由 24 个亚基组成的储存铁离子的蛋白质外壳, 这 24 个亚基是由去除了信号肽的成熟肽链组成的, 但有关铁蛋白分子亚基之间的相互作用研究鲜有报道。研究蛋白质体内互作关系的方法目前可用酵母双杂交系统和细菌双杂交系统, 两种方法各有优势。由于细菌双杂交系统具有细菌生长快、转化率高、假阳性率低, 及来自真核生物的外源蛋白对报告菌株的毒性作用低等特点, 因而可明显提高实验的效率和降低真核生物蛋白质互作的假阳性。本研究采用的 BacterioMatch II 系统中的报告基因 *His3* 和 *aadA(Str^r)*, 当待检测蛋白之间发生相互作用, 就会使与被检测蛋白结合的 DNA 结合域(λ cl)氨基端, 结合到与另一被检测蛋白结合的 RNA 聚合酶 α 亚基的 N 端, 从而使 RNA 聚合酶结合到启动子上, 激活下游报告基因 *His3* 和 *aadA(Str^r)* 的表达, 报告菌株对 3-AT (组氨酸酶抑制剂) 和链霉素产生的耐性, 使其不但能在含有 3-AT 的培养基上生长, 而且能生长在含有链霉素的双重选择培养基上。这样, 被检测蛋白是否存在互作就得到了进一步验证。本研究表明铁蛋白 NtFer1 和 NtFer2 亚基之间以及 2 个 NtFer2 亚基之间均存在很强的互作关系, 同时 2 个基因在叶片中均有大量表达, 说明在叶片中组成铁蛋白的 24 个亚基可能存在 3 种类型, 或来自单一的 NtFer1 亚基, 或来自单一的 Ntfer2 亚基, 也可能源于不同的铁蛋白亚基。而在烟草根部组织中, 由于只有铁蛋白 *NtFer1* 基因大量表达, 而 *NtFer2* 基因的表达非常微弱, 所以根部的铁蛋白大分子可能由单一的铁蛋白 NtFer1 亚基聚合而成的。

参考文献

- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, von Wirén N, Van Wuytswinkel O (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell*, 84: 69~81
- Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA (1993). Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ^{32}P -based hybridizations. *Anal Biochem*, 210: 235~244
- Fobis-Loisy I, Loridon K, Lobréaux S, Lebrun M, Briat JF (1995). Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur J Biochem*, 231: 609~619
- Harrison PM, Arosio P (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1275: 161~203
- Jiang TB (2005). Isolation and expression pattern analysis of two ferritin genes in tobacco. *J Integr Plant Biol*, 47 (4): 477~486
- Lauthere JP, Briat JF (1993). Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochem J*, 290: 693~699
- Lauthere JP, Barcelo F, Fontecave M (1996). Dynamic equilibria in iron uptake and release by ferritin. *Biomaterials*, 9: 303~309
- Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF (1991). Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8222~8226
- Lobréaux S, Yewdall S, Briat JF, Harrison PM (1992). Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J*, 288: 931~939
- Petit JM, Van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobréaux S (2001). Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem*, 276: 5584~5590
- Ragland M, Briat JF, Gagnon J, Lauthère JP, Massenet O, Theil EC (1990). Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J Biol Chem*, 265: 18339~18344
- Spence MJ, Henzl MT, Lammers PJ (1991). The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol Biol*, 17: 499~504
- Theil EC (1987). Ferritin: structure, gene, regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu Rev Biochem*, 56: 289~315
- Wardrop AJ, Wicks RE, Entsch B (1999). Occurrence and expression of members of the ferritin gene family in cowpeas. *Biochem J*, 337: 523~530
- Wicks RE, Entsch B (1993). Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume, *Vigna unguiculata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 192 (2): 813~819
- Zancani M, Peresson C, Patui S, Tubaro F, Vianello A, Macri F (2007). Mitochondrial ferritin distribution among plant organs and its involvement in ascorbate-mediated iron uptake and release. *Plant Sci*, 173: 182~189