

采用酵母双杂交法筛选 HbMyb1 相互作用蛋白

邓治¹, 张云霞², 陈春柳¹, 陈守才^{1,*}

¹中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部热带作物栽培生理学重点实验室, 海南儋州 571737; ²海南医学院生物化学教研室, 海口 571101

摘要: *HbMyb1* 是橡胶树死皮病相关基因, 为了进一步研究 *HbMyb1* 的功能, 采用酵母双杂交方法, 从胶乳 cDNA 文库中筛选出 10 个与 *HbMyb1* 发生相互作用的蛋白, 包括已知的橡胶延伸因子和橡胶小粒子蛋白等, 其中 4 个分别与 3-羟酰基-ACP-脱氢酶、NAD-依赖的山梨糖醇脱氢酶、氧化还原酶、假定的富含亮氨酸重复蛋白具有同源性的蛋白, 其余 4 个为未知蛋白。

关键词: 巴西橡胶树; 死皮病; *HbMyb1*; 酵母双杂交

Screening of the Protein Interaction with HbMyb1 Using Yeast Two-hybrid System

DENG Zhi¹, ZHANG Yun-Xia², CHEN Chun-Liu¹, CHEN Shou-Cai^{1,*}

¹Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cultivation Physiology for Tropical Crops, Ministry of Agricultural, Danzhou, Hainan 571737, China; ²Staff Room of Biochemistry, Hainan Medical College, Haikou 571101, China

Abstract: *HbMyb1* was related to TPD (tapping panel dryness) of *Hevea brasiliensis*. To study the function of *HbMyb1* protein, we used yeast two-hybrid assay to screen a latex cDNA library with full-length of *HbMyb1*. Ten proteins interacted with *HbMyb1* protein were obtained. Among them, 6 proteins with known functions were obtained, including the rubber elongation factor, small rubber particle protein, 3-hydroxyacyl-acyl-carrier protein dehydratase, NAD-dependent sorbitol dehydrogenase enzyme, oxidoreductase and putative leucine-rich repeat protein. 4 proteins with unknown function were found. These work could help for the further study on the function of *HbMyb1* and the clarification of mechanism of the TPD.

Key words: *Hevea brasiliensis*; tapping panel dryness (TPD); *HbMyb1*; yeast two-hybrid system

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是种重要的产胶植物,也是天然橡胶的唯一商业来源。橡胶树死皮病(tapping panel dryness, TPD)作为天然橡胶单产提高的限制因子,在世界各橡胶种植园普遍发生,对橡胶种植业危害很大。橡胶树死皮病发生时,割线的局部或全部乳管堵塞,排胶量大大减少甚至停排,严重时树皮产生褐色斑点、斑纹或者出现树皮爆裂症状。据估计,全世界每年因橡胶树死皮病损失的干胶产量为 5×10^5 t,价值相当于 4 亿美元(蒋菊生和周钟毓 1999)。因此,橡胶树死皮病受到各植胶国的高度重视。人们为了寻找死皮病的发病原因和探索死皮机制,从其病理学(陈慕容等 1991)、解剖学(Gomez 和 Ghandimathi 1990)、生理生化(Chrestin 1989; 曾日中等 1997)、遗传学(范思伟和杨少琼 1995)和气候环境(Pushpades 等 1975)等诸方面进行了研究,

并提出了各种假说。但对于死皮病发生的真正原因,至今还没有得到令人满意的解释。为研究橡胶树死皮病发生和发展的分子机制,Chen 等(2002)采用 DDRT-PCR 技术从橡胶树无性系 RRIM600 胶乳中克隆了 1 个类 *Myb* 激活转录因子 *HbMyb1*, 对该基因进行 Northern Blot 分析表明, *HbMyb1* 在健康树中表达强,在死皮树中表达弱;在抗死皮品种或种质中表达强,在对死皮敏感品种或种质中表达弱;在树皮中表达强,在叶中表达弱;在远离死皮树割线的树皮中表达强,在割线附近表达弱,因此认为该基因是死皮抗性相关基因。但迄今为止人们对 *HbMyb1* 的认识仍

收稿 2007-07-18 修定 2007-11-13

资助 中国热带农业科学院科技基金(Rky050103)。

* 通讯作者(E-mail: scc07@163.com; Tel: 0898-23301174)。

然有限。本文利用酵母双杂交技术,寻找与HbMyb1相互作用的橡胶树胶乳相关蛋白分子,为进一步查明HbMyb1的生物学功能和阐明其在橡胶树体内的作用机制提供参考。

材料和方法

酵母双杂交系统试剂盒(pGBKT7、pGADT7-Rec、pGBK7-53、pGBKT7-Lam、pGADT7-RecT等穿梭质粒及所有的酵母培养基)和酵母工程菌株(*Saccharomyces cerevisiae*) AH109、Y187购自Clontech公司。其中pGBKT7质粒含有TRP基因、Kan基因和GAL4 DNA结合区(GAL4-BD);pGADT7-Rec质粒含有LEU基因、Amp基因和GAL4 DNA激活区(GAL4-AD);pGBK7-53和pGADT7-RecT为系统阳性对照;pGBKT7-Lam为系统阴性对照。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109为本室保存。3-AT、X- α -Gal购自Sigma公司。限制性内切酶和连接酶购自TaKaRa公司。巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)无性系RRIM600胶乳采自本院试验农场。

诱饵载体的构建根据文献报道的HbMyb1基因(GenBank登录号为AF239956)序列,在编码区两侧设计上游引物:5' CAGCCATGGATCGGG-GAATTGAAATC 3' (含有NcoI酶切位点),下游引物:5' ATTCTGCAGTTACTGGCGTTG-CATCGG 3' (含PstI酶切位点),以胶乳cDNA为模板,用高保真Pyrobest DNA聚合酶扩增诱饵蛋白HbMyb1的片段。PCR扩增产物经NcoI和PstI酶切和纯化处理后与经过同样酶切和纯化处理的pGBKT7载体进行体外连接。将连接产物转化大肠杆菌JM109,并在LB/Kan⁺板上筛选。选取菌落提取质粒DNA,进行PCR及酶切鉴定,并将阳性重组质粒递交北京三博生物技术有限公司进行测序。确定HbMyb1读码框序列正确后,参考Matchmaker Library Construction and Screening说明书采用PEG-LiAc方法将该诱饵载体pGBKT7-HbMyb1转化酵母菌株AH109和Y187,并检测其自激活活性和毒性。在培养基中加入不同浓度的3-AT,根据平板上菌落生长抑制情况,确定最佳抑制浓度。

构建胶乳cDNA文库时,提取的胶乳总

RNA,用Oligo(dT)引物合成第1链,再以第1链为模板,用LD-PCR方法合成双链cDNA,对得到的cDNA进行纯化后和载体pGADT7-Rec对酵母菌株AH109进行共转化。在SD/-Trp平板上筛选出转化成功的克隆。将收获得到的转化成功的克隆悬浮在液体培养基中,用血球计数板计数,测定文库滴度。此即胶乳酵母双杂交文库宿主菌液。

pGBKT7-HbMyb1诱饵载体筛选胶乳cDNA文库时,用酵母融合方法筛选,将诱饵载体pGBKT7-HbMyb1和文库宿主菌液放在同一长颈瓶中融合20h,用显微镜观察有无融合子出现。酵母融合后将菌液涂布在三缺平板SD/-His/-Leu/-Trp/3-AT和四缺SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/3-AT平板上,于30℃下培养3~5d。同时将菌液涂布在SD/-Leu、SD/-Trp和SD/-Leu/-Trp平板上以检测酵母融合效率及筛选文库克隆数。挑取直径大于2mm的白色克隆重复在四缺平板上划线生长。

鉴定与分析酵母阳性克隆时,将反复在四缺SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/3-AT平板上划线仍能生长的酵母克隆以格子点样形式转接到四缺SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/3-AT/X- α -Gal平板上,进一步验证ADE和HIS的表达,30℃下培养后出现蓝色克隆为酵母阳性克隆。提取阳性克隆的酵母质粒,用试剂盒中的5' LD Amplimer和3' LD Amplimer进行酵母质粒PCR扩增,检测插入片段大小。将插入片段大于400bp的文库质粒转化大肠杆菌JM109,再以PCR验证插入的片段大小是否与其在酵母克隆的PCR扩增产物的大小相同。同时做回转实验验证阳性克隆。最后对鉴定为阳性克隆的插入片段进行测序,测序结果在GenBank上进行同源性搜索和序列比对分析。

实验结果

1 诱饵载体的构建及其自激活活性和毒性检测

用特异引物以胶乳cDNA为模板扩增出全长HbMyb1阅读框。用NcoI和PstI酶切消化后克隆到pGBKT7载体上,转化大肠杆菌JM109,经双酶切、PCR鉴定为阳性的重组质粒进行DNA测序的结果表明,融合区域的阅读框序列完全正确。该阳性重组质粒命名为诱饵载体pGBKT7-

HbMyb1。

采用 PEG/LiAc 法将诱饵载体 pGBKT7-*HbMyb1* 分别转化酵母菌株 AH109 及 Y187, 检测诱饵蛋白在酵母中的 α -半乳糖苷酶活性的结果为阴性, 这表明 *HbMyb1* 本身没有明显的自激活活性, 毒性检测结果表明 *HbMyb1* 对酵母宿主菌无毒性, 因此认为, 可以用作诱饵蛋白进行酵母双杂交筛选(图 1)。以浓度梯度法确定 3-AT 抑制 *HIS3* 基因渗漏表达的最适浓度为 12.5 mmol·L⁻¹。

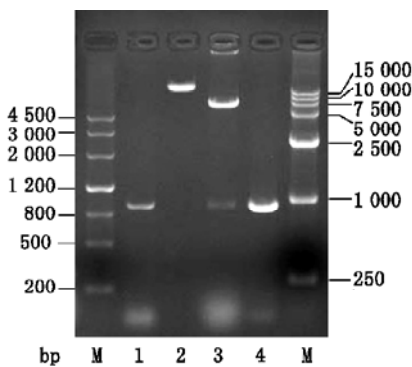


图 1 诱饵载体的鉴定

Fig.1 Identification of bait vector

M : DNA marker ; 1 : PCR 扩增的 *HbMyb1* 片段 ; 2 : pGBKT7-*HbMyb1* 质粒 DNA ; 3 : pGBKT7-*HbMyb1* DNA 经 *NcoI* and *PstI* 双酶切 ; 4 : pGBKT7-*HbMyb1* PCR 鉴定。

2 胶乳 cDNA 文库的鉴定

按上述方法构建成胶乳 cDNA 文库, 文库构建后以有限稀释法测定胶乳 cDNA 文库滴度为 3.6×10^8 cfu·mL⁻¹, 随机挑取胶乳 cDNA 文库中 18 个克隆菌落, 以 5' LD Amplimer 和 3' LD Amplimer 为引物进行 PCR 扩增, 测得胶乳 cDNA 文库的插入片段基本在 400 bp 以上(图 2), 符合酵母双杂交 cDNA 文库的构建要求。

3 酵母双杂交筛选及鉴定

pGBKT7-*HbMyb1*-Y187 酵母与文库宿主菌液共培养 24 h 后, 杂交结合率为 3.9%, 达到文库筛选结合率必须 >2% 的要求。三缺和四缺板上共有 3.2×10^5 个转化子, 经过反复在四缺板上划线鉴定后共生长出 235 个杂交酵母菌落, 挑取四缺板上生长的菌落在新鲜的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ 3-AT/X- α -Gal 上划线, 能继续生长, 呈蓝色的菌落有 130 个(图 3-a 中 1、2、4)。将划线后继续

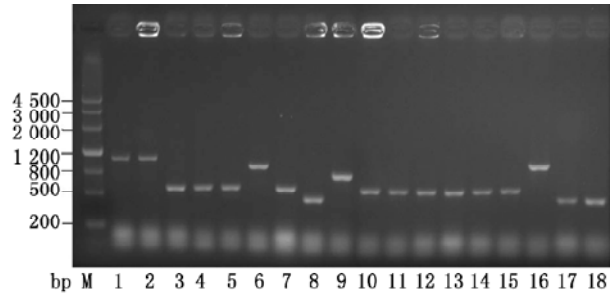


图 2 cDNA 文库插入片段 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of the inserts of 18 randomly picked clones in the latex cDNA library

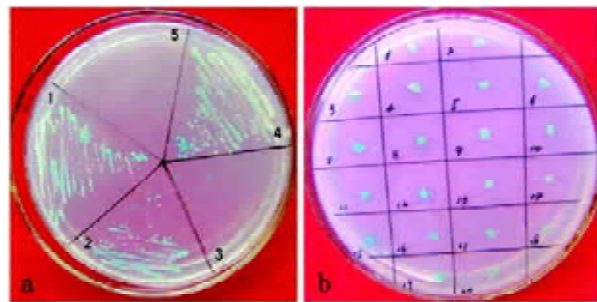


图 3 阳性克隆的筛选和验证

Fig.3 Screening and re-confirmation of candidates

a : 1、2、4 是阳性克隆, 3、5 是假阳性克隆 ; b : X- α -Gal 分析 Ade⁺、His⁺、Leu⁺、Trp⁺ 克隆。

生长的菌落以格子的形式重新验证阳性克隆(图 3-b), 结果其中显色反应呈强蓝色的杂交菌落有 85 个。提取的酵母质粒, 以 pGADT7 载体引物进行 PCR 鉴定, 得到的插入片段中大于 400 bp 的克隆 23 个, 用之转化大肠杆菌, 再次经 PCR 及回转变实验反复鉴定后测序。在胶乳 cDNA 文库中筛选得到 10 个与 *HbMyb1* 有相互作用的蛋白, 其中 1 号插入片段是橡胶延伸因子(rubber elongation factor, REF)的一段 cDNA, 编码其 C 端 127 个氨基酸 ; 2 号插入片段是橡胶小粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP)的一段 cDNA, 编码其 C 端 160 个氨基酸 ; 3 号插入片段编码 143 个氨基酸, 与水稻 3-羟酰基-ACP-脱氢酶(3-hydroxylacyl-acyl-carrier protein dehydratase)同源性为 82% ; 4 号插入片段编码 87 个氨基酸, 与桃 NAD- 依赖的山梨糖醇脱氢酶(NAD-dependent sorbitol dehydrogenase enzyme, SDH)同源性为 89% ; 5 号插入片段编码 152 个氨基酸, 与拟南

芥氧化还原酶(oxidoreductase)同源率为73%；6号插入片段编码138个氨基酸，与拟南芥假定的富含亮氨酸重复蛋白(putative leucine-rich repeat protein)同源率为80%；7、8、9、10号插入片段分别编码4个未知蛋白。虽然3、4、5、6号插入片段编码蛋白经过比对后与已知蛋白具有同源性，但是否就是这些已知蛋白，还有待进一步证明。

讨 论

蛋白质间相互作用是当前研究的一个热点。在所有生命活动中，蛋白质之间的相互作用是必不可少的，它是细胞进行一切代谢活动的基础。蛋白质的相互作用能产生许多效应，了解蛋白质相互作用的方式、作用程度、作用结果，将有助于蛋白质功能的分析、生命发育的探索和疑难病理的研究等众多问题的解决。因此揭示蛋白质间相互作用的关系，建立相互作用关系的网络图已成为蛋白质组学研究中引人注目的问题。自酵母双杂交系统创立以来(Fields和Song 1989)，此项技术已在诸多领域得到广泛应用。实践证明，酵母双杂交技术是筛选和鉴定相互作用蛋白的一个非常有效的手段。

本文以HbMyb1为诱饵，从巴西橡胶树胶乳cDNA文库中筛选到10个与HbMyb1可能有相互作用的克隆。其中筛选到的REF和SRPP是死皮病发生的标志性蛋白，在本实验测序结果中多次出现。Sookmark等(2002)研究健康树和死皮树中胶乳的差异蛋白质的结果表明，这两种蛋白在健康树和死皮树中均存在，但在死皮树中大量积累。尽管两种蛋白含量在死皮和健康树中有差异，但其在转录水平上则没有差异。REF不仅在橡胶聚合过程中起作用，同时也是一个胶乳过敏原(*Hev b1*)。SRPP与菜豆胁迫相关蛋白(PvSRP)高度同源。一般认为PvSRP在植物防御机制中起作用，且受重金属、伤害及病原体等的诱导，但乙烯刺激和伤害均不改变橡胶树SRPP基因的转录水平。另外3个蛋白分别编码3-羟酰基-ACP-脱氢酶、NAD-依赖的山梨糖醇脱氢酶、氧化还原酶。D'Auzac等(1985)的研究表明，乳管细胞内活性氧代谢失调时，黄色体膜破裂，最终导致胶

乳原位凝固和产胶功能衰竭而死皮。这3个蛋白可能都参与胶乳中的氧化还原过程，与活性氧代谢失调导致死皮病有关。假定的富含亮氨酸重复蛋白存在于多种功能不同的蛋白中。在植物中，富含亮氨酸重复的蛋白在细胞生长发育、抗病反应过程中均起作用，与蛋白质之间的相互作用以及信号转导有密切关系。这些研究结果将有助于进一步深入探讨HbMyb1的功能及阐明死皮病的发生机制。虽然本文筛选了以上10个与HbMyb1相互作用的蛋白，但这些蛋白如何与HbMyb1发生作用？它们在橡胶树死皮病的发生过程中究竟发挥什么功能？尚待进一步研究。

参考文献

- 陈慕容, 杨绍华, 郑冠标, 陈作义, 沈菊英(1991). 橡胶树丛枝病及其与褐皮病关系的研究. 热带作物学报, 12 (1): 65~73
- 范思伟, 杨少琼(1995). 强割和排胶过度引起的死皮是一种特殊的局部衰老病害. 热带作物学报, 16 (2): 15~22
- 蒋菊生, 周钟毓(1999). 21世纪初中国天然橡胶生产、消费、贸易预测. 热带农业科学, 6: 63~71
- 曾日中, 黎瑜, 杨少琼(1997). 巴西橡胶树胶乳核酸含量与产量及死皮关系的研究. 热带作物学报, 18 (1): 10~15
- Chen SC, Peng SQ, Huang GX, Wu KX, Fu XH, Chen ZQ (2002). Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*. Plant Mol Biol, 51 (1): 51~58
- Chrestin H (1989). Biochemical aspects of bark dryness induced by overstimulation of rubber trees with ethrel. In: D'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (eds). Physiology of Rubber Tree Latex. Florida: CRC Press, 431~439
- D'Auzac J, Sanier C, Chrestin H (1985). Study of a NADH-quinone-reductase producing toxic oxygen from *Hevea* latex. International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 102~112
- Fields S, Song OK (1989). A novel genetic system to detect protein-to-protein interactions. Nature, 340: 245~246
- Gomez JB, Ghandimathi H (1990). The brown bast syndrome of *Hevea* part I. Morphological observation. J Nat Rubb Res, 5: 81~89
- Pushpades MV, Kochappan Nair K, Krishnakumari M, Karthikakutty Amma M (1975). Brown bast and nutrition: a case study. Rubb Board Bull, 12 (3): 83~88
- Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Lacote R, Naiyanetr C, Seguin M, Romruensukharom P, Narangajavana J (2002). Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. Plant Cell Physiol, 43 (11): 1323~1333