

苹果转录因子MdHB1自激活作用及其互作蛋白分析

刘艳利¹, 姜永华¹, 王豪杰¹, 戚英伟², 刘翠华¹, 任小林^{1*}

¹西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌712100; ²宁夏大学农学院, 银川750021

摘要: 筛选苹果转录因子MdHB1的互作蛋白, 可以为研究苹果生长发育过程中各种信号分子网络提供线索和依据。本文以苹果品种‘皇家嘎啦’为试材, 应用SMART技术构建酵母双杂交cDNA文库。分析MdHB1的转录活性区域并验证其对Y2HGold的细胞毒性作用, 利用诱饵载体pGBKT7-MdHB1-N进行文库筛选, 获得了24个阳性克隆, 测序分析后得到9个无重复的MdHB1互作蛋白, 其涉及光合作用、病虫害防御、逆境胁迫等过程。

关键词: 互作蛋白; 酵母双杂交文库; SMART技术; MdHB1

Self Activation and Interaction Protein Analysis of MdHB1 Transcription Factor in Apple

LIU Yan-Li¹, JIANG Yong-Hua¹, WANG Hao-Jie¹, QI Ying-Wei², LIU Cui-Hua¹, REN Xiao-Lin^{1*}

¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: The screening of protein interactions with our target protein MdHB1 in apples provides clues and evidences to the study of molecular network in growth and development. This experiment used ‘Royal Gala’ as the testing material and SMART technology was used to construct the yeast two-hybrid cDNA library. We analyzed that MdHB1 protein had obvious self-activation activity, while the N-terminus of MdHB1 (excluding with transcription activity of CS2 structure domain) had no self-activation activity and toxicity. The quality of the library was tested and used for subsequent screening. Finally, we screened 9 positive dots using pGBKT7-MdHB1-N. Function annotation showed that these candidate interacting proteins were related to photosynthesis, defense reaction and resistance.

Key words: protein interactions; yeast two-hybrid library; SMART technology; MdHB1

苹果(*Malus pumila* Mill)是世界上主栽水果之一, 生长发育过程中的胁迫和防御反应以及光合作用决定着苹果的产量和品质。逆境胁迫, 如干旱、极端温度、损伤等非生物胁迫和病虫害等生物胁迫, 严重影响植物的生长发育及产量(张晶红和那杰2014)。植物能够通过内源激素水平影响环境应答反应途径, 从而形成复杂的信号转导网络(杨剑飞等2014)。与胁迫反应相关的转录因子有MYB类、WRKY类等, 但是HD-Zip (homeodomain-leucine-zipper)家族是植物界所特有的一类转录因子, HD结构下游有一个与其紧密相连的亮氨酸拉链结构(结构名称为HALZ, 一般用Zip表示), Zip部分作为二聚化功能基元。HD结构包括一个蛋白结构域和一个由60个氨基酸构成的保守域, 是所有真核生物共有的转录因子结构。在拟南芥中发现17个HD-Zip I亚家族成员, 其蛋白主要参与植物对非生物和生物环境因子的逆境应答、

激素应答、光信号的应答以及器官发育等过程的调控(亢键等2014)。

HD-Zip I中的基因表达规律复杂, 功能具有多样性, 甚至有一些基因在功能上有重叠(Henriksson等2009)。MdHB1基因属于HD-Zip I家族, 在苹果富士的幼果和花中含量都较高。HD-Zip I家族成员还参与苹果果实成熟过程, 在苹果品种‘富士’中MdHB5基因的表达与乙烯释放量同步(亢键等2014)。李兴亮(2014)从细胞信号转导的角度, 对果实发育过程中乙烯信号起源的机制进行了探究, 推测MdSnRK2.4可以通过对MdHB1转录因子功能域磷酸化修饰以调控MdHB1蛋白活性。前人研究表明MdHB1可能参与苹果果实发育以及成熟衰老

收稿 2015-06-29 修定 2015-10-27

资助 农业部现代农业技术体系苹果专项资金(MATS)。

* 通讯作者(Tel: 029-87099217; E-mail: renxl@nwsuaf.edu.cn)。

进程, 并响应多种激素信号。蛋白质组学研究方法为研究果实发育以及调控分子网络提供了一个新的视野(王清等2009)。本实验的前期研究发现在果实不同发育阶段中*MdHB1*在幼果中的表达量最高, 暗示*MdHB1*可能参与了苹果幼嫩果实和花器官中其他相关基因表达的调控, 但具体机制尚不清楚(朱敏等2014)。基于实验室前期已经克隆到的苹果转录因子*MdHB1*的基因全长(于巧平等2012), 本研究以苹果幼果果肉为材料, 用Clontech公司的SMART技术构建cDNA文库。筛选与*MdHB1*转录因子的互作蛋白, 通过对互作蛋白进行生物信息学分析, 推测其在苹果生长发育过程中可能具有的生物学功能, 为阐述苹果生长发育过程中各种信号分子网络提供线索和依据。

材料与方 法

1 试验材料

试验材料为花后70 d的‘皇家嘎拉’(*Malus domestica* Borkh. cv ‘Royal Gala’), 采自西北农林科技大学园艺场, 苹果采收后立即运回西北农林科技大学园艺学院采后实验室, 并且分别取果肉和果皮冻于液氮中, 标记后在-70 °C下保存, 备RNA提取用。

文库构建试剂盒为Make Your Own ‘Mate & Plate’ Library System (Cat. No. 630490), PCR扩增试剂盒采用Advantage 2 Polymer-ase Mix (Cat. No. 639201)和Matchmaker Insert Check PCR Mix2 (Cat.

No. 630497), Easy Yeast Plasmid Isolation Kit (Cat. No. 630467)、Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Cat. No. 630439)、Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Cat. No. 630489)酵母培养基均购自Clontech公司。

2 方法

2.1 文库构建

采用张今今等(2003)的SDS-酚法提取苹果总RNA。根据Make Your Own ‘Mate & Plate’ Library System (Cat. No. 630490)说明书将纯化后的RNA反转录合成cDNA第一链, 再经LD-PCR扩增生成cDNA第二链, 利用CHROMA SPIN TE-400 column纯化cDNA, 去除小于400 bp的小片段后转入酵母感受态细胞Y187, 制备酵母双杂cDNA文库。

2.2 *MdHB1*的转录激活区域分析及毒性检测

根据苹果*MdHB1*的cDNA全长序列, 利用Primer5.0软件设计*MdHB1*的N端和全长的基因特异性引物(表1)并引入酶切位点后分别扩增*MdHB1*的N端(不含CS2结构域)和全长(含CS2结构域)。扩增产物经克隆、测序后, 分别与载体pGBKT7相连, 获得pGBKT7-*MdHB1*-N和pGBKT7-*MdHB1*载体。并根据酵母转化手册(Clontech, Cat. No. 630439)分别转化酵母Y2HGold 菌株, 涂布于SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal和SD/-Trp/X- α -Gal/AbA固体平板上30 °C倒置培养3 d, 检测*MdHB1*的N端和全长是否具有自激活和毒性作用。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'→3')	限制性内切酶
MdHB S	CGGAATTCATGATGGAGCCGGGCCG	<i>Eco</i> RI
MdHB A	CGGGATCCTTATGACCATCCCCACCAAGTTCA	<i>Bam</i> HI
MdHB-N A	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGATGATGAGTGT	<i>Bam</i> HI

3 文库筛选及其互作蛋白生物信息学分析

将无自激活作用的诱饵质粒pGBKT7-*MdHB1*-N转化入感受态酵母Y2HGold中, 参照Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Cat. No. 630489)说明书, 与1 mL文库菌液杂交(40 r·min⁻¹, 30 °C), 20 h之后取一滴杂交菌液, 显微镜下观察杂交成功后, 将杂交酵母菌液涂布于60块

直径15 cm的SD/-Leu-Trp/X- α -Gal/Aba琼脂平板上, 于30 °C孵箱中倒置培养3~5 d后, 挑取蓝斑菌落划线培养QDO/X/(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal), 重复划线培养直至筛选获得蓝色单克隆。

根据酵母质粒提取试剂盒(Cat. No. 630467)说明书提取阳性克隆质粒后转化大肠杆菌 DH5 α , 提交北京奥科生物公司测序。将测序结果在NCBI

数据库进行 BLAST 比对以便检索其生物功能。

实验结果

1 全长cDNA文库构建及评价

用 SDS-酚法提取的总 RNA 分离纯化后(图 1-A), 18S rRNA 和 28S rRNA 两条带清晰, 说明总 RNA 质量好, 完整性好。RNA 反转录后的 cDNA 呈弥散状分布(图 1-B), CHROMA SPIN TE-400 柱子过滤之前介于 0.1~4.0 kb, CHROMA SPIN TE-400 柱子过滤之后短片段明显减少, 弥散介于 0.3~4.0 kb 之间, 集中分布在 0.5~2.0 kb, Nanodrop 分光光度计检测浓缩后的 cDNA 浓度为 $0.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 满足构建 cDNA 文库的要求。

根据文库稀释液在固体培养基 SD/-Leu 所长克隆数(图 2-A 和 B), 按照 Clontech 说明书计算得文库滴度为 $2.9 \times 10^7 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。随机挑取 20 个单克隆进行 PCR 扩增插入片段, 结果表明, 有插入片段的单克隆是 18 个, 文库转化率为 90%, 其中插入片段 1.0 kb 左右的片段 3 个, 最小的片段是 250 bp, 片段长度集中分布在 500 bp 左右(图 2-C)。

2 MdHB1 的转录激活区域分析以及毒性检测

分别构建 pGBKT7-MdHB1-N (不含 CS2 结构域) 和 pGBKT7-MdHB1 诱饵表达载体。转化酵母菌 Y2HGold 获得了含有 pGBKT7-MdHB1-N、pGBKT7-MdHB1 的酵母。涂布于 SD/-Trp、

SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体平板上。结果发现, pGBKT7-MdHB1-N 在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X- α -gal 平板上都能长出菌落, 且菌落颜色为白色(图 3-C)。pGBKT7-MdHB1 在固体培养基 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 长出蓝斑, 表明 MDHB1 全长约 1 000 bp (含 CS2 结构域) 有明显的自激活活性, 而约 800 bp 的 MdHB1-N (不含 CS2 结构域) 无自激活活性(图 3-C)。此外转化酵母(pGBKT7-MdHB1) 菌斑大小与转化酵母(pGBKT7) 菌斑大小相当, 表明融合蛋白对酵母 Y2HGold 生长没有毒害(图 3-A 和 B)。

3 筛选文库验证

用诱饵 MdHB1 转录因子筛选本试验所构建的 cDNA 文库, 经过共转化, 初步筛选得到 24 个阳性单克隆, 这些阳性克隆在缺陷性培养基 QDO/X/(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal) 筛选情况如图 4 所示。证明本文所构建的苹果 cDNA 文库是合格的, 能够用来筛选苹果成熟期基因的互作蛋白。

4 互作蛋白生物信息学分析

将这 24 个阳性克隆扩繁提取质粒后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 进行测序并将序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析。序列比对分析结果(表 2)筛选出了 9 个无重复的互作蛋白, 它们参与胁迫响应、能量代谢、抗逆和防御、光合作用等过程, 还有一个未知蛋白。

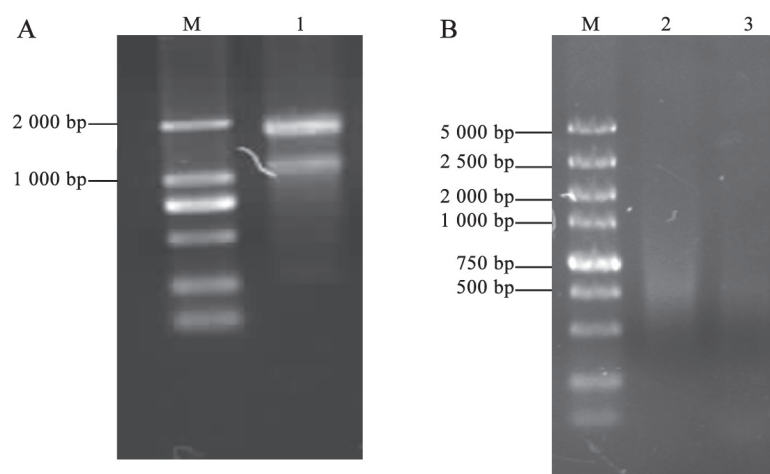


图1 RNA (A)与LD-PCR cDNA (B)电泳检测

Fig.1 Electrophoresis detection of total RNA (A) and LD-PCR cDNA (B)

A中M: DL2000 DNA marker; B中M: DL15000 DNA marker; 1: 纯化后RNA; 2: 纯化前的dscDNA; 3: TE-400 column 纯化的dscDNA。

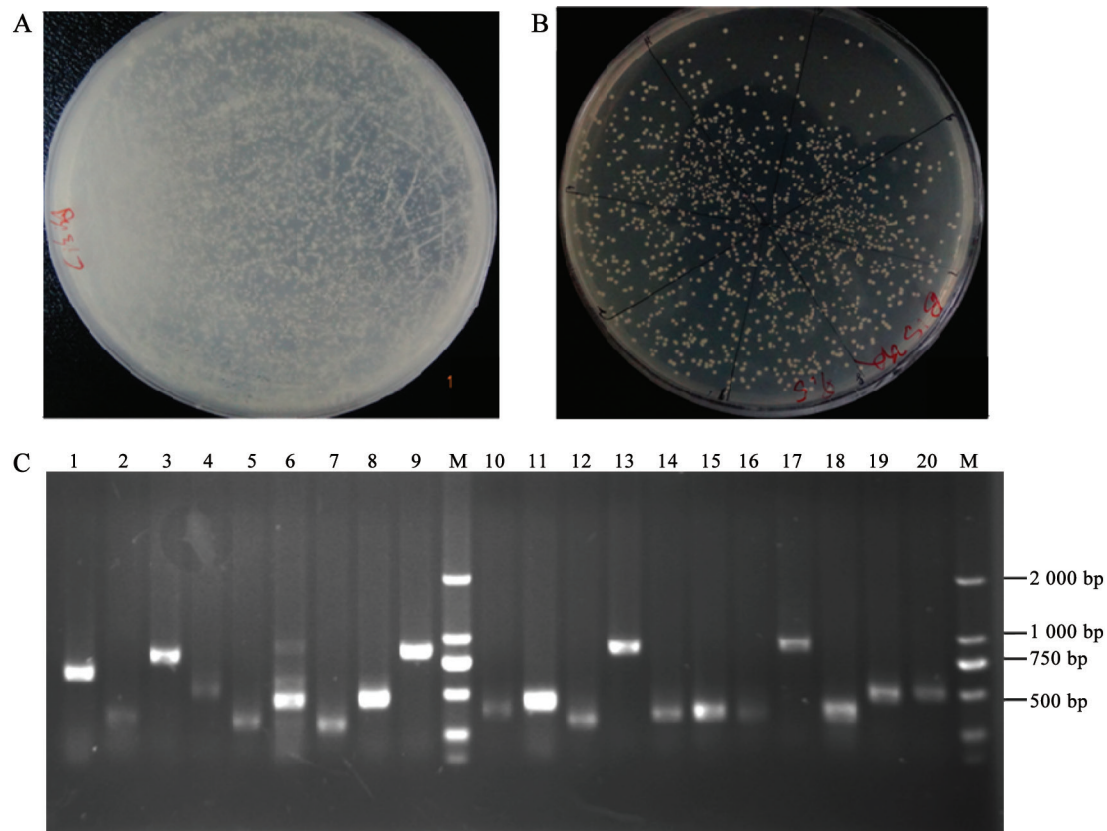


图2 文库质量及插入片段鉴定

Fig.2 cDNA library quality and insert segments identification

A: 溶液A所长克隆数(稀释因子=10⁻²); B: 溶液B所长克隆数(稀释因子=10⁻⁴); C: 文库菌插入片段检测; M: DL2000 DNA marker; 1~20: 菌落编号。

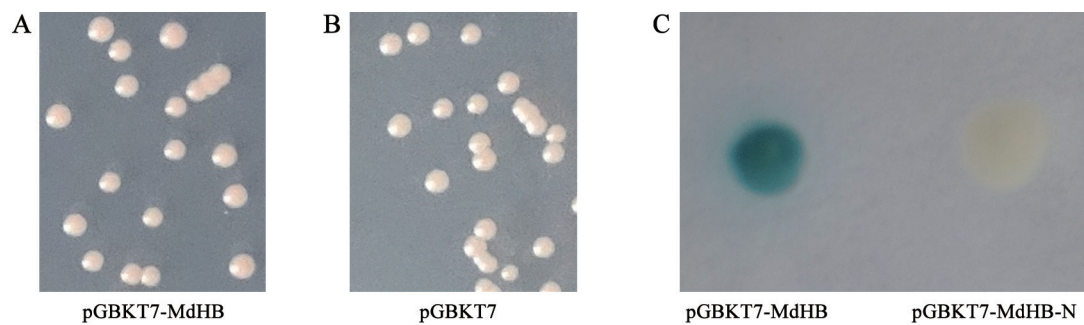


图3 MdHB和MdHB-N的转录活性以及毒性检测

Fig.3 The transcription activity and toxicity detection of MdHB and MdHB-N

A、B: pGBKT7-MdHB1的毒性检测; C: pGBKT7-MdHB1的自激活检测。

讨 论

本研究以全长MdHB1为诱饵筛选文库。作为诱饵蛋白, 转录因子C末端的酸性氨基酸可能使其存在自激活特性。Miyake等(2002)发现ABF1转录因子C末端含有具有转录激活功能的CS1和CS2结

构, 其中含有30个氨基酸的CS2结构可独立激活下游基因的转录和染色体复制。本实验中MdHB1全长发生了自激活, 将CS2结构与MdHB1蛋白进行氨基酸序列比对, 并没有查询到相似度很高的序列。因此实验过程中, 将MdHB1转录因子C端可能

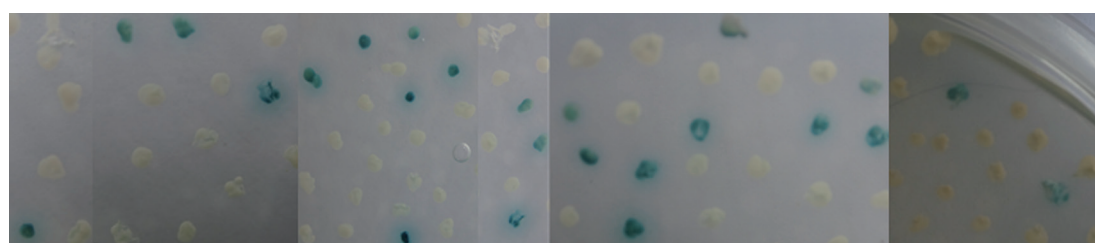


图4 筛选到的MdHB1互作蛋白阳性克隆
Fig.4 The screened positive clones of MdHB1 interaction proteins
QDO/X/(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal)培养基。

表2 MdHB1 互作蛋白的筛选结果

Table 2 Screening results of MdHB1 interaction proteins

基因 ID	基因注释	预测功能
LOC103414026	三角状五肽重复蛋白	在植物的生长发育、细胞器形成、细胞质雄性不育的育性恢复、RNA的编辑加工、细胞核与细胞器之间信号传递、逆境防御等方面具有重要作用
LOC103440038	RNA聚合酶因子	基本蛋白调节光系统的化学计量, 从而维持稳定的电子流和光合效率
LOC103440484	抗病相关蛋白	可控制特异病原体识别位点, 激活后续防御反应
LOC103419882	脱水相关蛋白	响应干旱、冷害、盐胁迫、脱落酸刺激
LOC103440403	甘氨酸丰富-RNA结合蛋白	可能与植物的细胞死亡以及免疫反应抵御病原菌侵染有关, 可能参与防御反应
LOC103409404	甘油醛-3-磷酸脱氢酶B	催化剂作用、参与卡尔文循环磷酸化途径
LOC103437829	叶绿素a-b结合蛋白P4	参与光合作用
LOC103423192	未知蛋白	功能未知
LOC103401859	氧甾醇结合相关蛋白	参与囊泡运输、细胞脂质代谢和细胞信号转导

存在的激活域CS2结构去除, 得到MdHB1-N (不含CS2)序列。试验验证MdHB1转录因子自激活结构域为C端的CS2结构。而MdHB1-N没有自激活作用, 完全可以用于进一步的文库筛选。通过文库筛选, 利用生物信息方法, 对筛选获得的候选互作蛋白进行分析表明这些蛋白主要参与光合作用、胁迫响应、能量代谢以及其他途径, 还有一个是未知蛋白。实验室前期研究发现MdHB1启动子区含有光响应元件(GATAGGA), 试验筛选获得的LOC103440038为RNA聚合酶因子, 可以调节光合体系的化学计量, 保持电子流和光合效率和谐稳定(Hakimi等2000; Privat等2003)。Green和Durnford (1996)发现LOC103437829参与光合作用。因此推测MdHB1可能与这些蛋白共同参与光合作用。

此外MdHB1启动子的TC-rich repeats区域有防御与胁迫反应位点。本实验筛选到的与生物胁迫相关的蛋白有LOC103440403和LOC103440484。Gendra等(2004)发现蛋白LOC103440403可能与植物的细胞死亡以及免疫反应抵御病原菌侵染等有关, 参与防御反应。有相关报道CaGRP1与CaPIK1

互作通过抑制活性氧积累调节CaPIK1诱导的细胞死亡和防御反应(Kim等2015)。抗病蛋白LOC103440484在植物抗病中可控制特异病原体识别位点, 激活后续防御反应(Xiao等2001)。本研究获得的与非生物胁迫相关的蛋白有LOC103414026和LOC103419882。在植物的生长发育、细胞器形成、细胞质雄性不育的育性恢复、RNA的编辑加工、细胞核与细胞器之间信号传递、逆境防御等方面都离不开三角状五肽重复蛋白LOC103414026。Yu等(2009)发现在水稻上缺了三角状五肽重复蛋白的突变体会黄化。蛋白LOC103419882能响应干旱、冷害、盐胁迫、脱落酸的刺激(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 1993)。前人研究发现在向日葵、拟南芥的发育过程中HaHB-4 (HD-Zip I)可能参与调控一些抗旱相关基因的表达, 在特定的发育阶段, HaHB-4的表达受到干旱和ABA的诱导(Dezar等2005a, b)。油菜的*BnHB-6*基因明显地与参与到对不同的生物与非生物胁迫的相应的防御反应通路中的基因有一定的联系(Yu等2005)。因此进一步推测MdHB1在苹果

的防御和胁迫反应过程中有重要作用, 还待验证。

本实验还筛选到了与能量代谢有关的蛋白, LOC103409404参与卡尔文循环与糖酵解(Brinkmann等1989), LOC103401859被认为属于一种新型蛋白质家族, 参与囊泡运输、细胞脂质代谢和细胞信号转导(Lehto和Olkkonen 2003)。LOC-103423192为一种未知蛋白, 对它的结构进行分析预测有谷胱甘肽结合位点(Soranzo等2004)。前期研究表明HD-Zip I基因可能参与到对胁迫应答或植物发育中的不同的植物激素信号转导的响应中(亢键等2014)。综合以上结果推测MdHB1或许参与物质代谢或转运, 或许参与抗逆胁迫, 光合作用等多条信号传导通路, 形成网络调控苹果生长发育及逆境过程, 具体功能有待进一步的挖掘。由于酵母双杂假阳性较高, 而且以MdHB1为诱饵, 通过酵母双杂交进行互作筛选的研究还未见报道, 再确认互作之前, 还需要BiFC或Pull-down等技术进行验证, 为进一步研究MdHB1的功能提供线索。

参考文献

- 亢键, 姜永华, 王豪杰, 杨艳青, 任小林(2014). 苹果果实HD-Zip I 转录因子亚家族基因鉴定及表达分析. 西北农业学报, 23 (9): 160~165
- 李兴亮(2014). 苹果果实发育及成熟进程中乙烯发生的信号转导机制[学位论文]. 北京: 中国农业大学
- 王清, 产祝龙, 秦国政, 田世平(2009). 果实蛋白质组学研究的实验方法. 植物学报, 44 (1): 107~116
- 杨剑飞, 王宇, 杨琳, 李玉花(2014). 光敏色素互作因子PIFs是整合多种信号调控植物生长发育的核心元件. 植物生理学报, 50 (8): 1109~1118
- 于巧平, 尹明安, 任小林, 姜永华(2012). 苹果ACO1转录因子MdHB1基因的克隆及其真核表达载体的构建. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 40 (10): 154~160
- 张今今, 王跃进, 王西平, 杨克强, 杨进孝(2003). 葡萄总RNA提取方法的研究. 果树学报, 20 (3): 178~181
- 张晶红, 那杰(2014). 植物逆境胁迫耐受性启动子的研究进展. 植物生理学报, 50 (6): 707~710
- 朱敏, 尹明安, 叶红红, 任小林(2014). 苹果ACO1基因及转录因子MdHB-I基因的表达模式. 食品科学, 35 (23): 166~170
- Brinkmann H, Cerff R, Salomon M, Soll J (1989). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. Plant Mol Biol, 13 (1): 81~94
- Dezar CA, Fedrigo GV, Chan RL (2005a). The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb-4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. Plant Sci, 169 (2): 447~456
- Dezar CA, Gago G.M, Gonzalez DH, Chan RL (2005b). *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. Transgenic Res, 14: 429~440
- Gendra E, Moreno A, Albà MM, Pages M (2004). Interaction of the plant glycine-rich RNA-binding protein MA16 with a novel nucleolar DEAD box RNA helicase protein from *Zea mays*. Plant J, 38 (6): 875~886
- Green BR, Durnford DG (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 47: 685~714
- Hakimi MA, Privat I, Valay JG, Lerbs-Mache S (2000). Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma⁷⁰-type transcription factors between plants and bacteria. J Biol Chem, 275 (13): 9215~9221
- Henriksson E, Olsson A, Johannesson H, Johansson H, Hanson J, Engstrom P, Soderman E (1995). Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. Plant Physiol, 139: 509~518
- Kim DS, Kim NH, Hwang BK (2015). Glycine-rich RNA-binding protein1 interacts with receptor-like cytoplasmic protein kinase1 and suppresses cell death and defense response in pepper. New Phytol, 205 (2): 786~800
- Lehto M, Olkkonen VM (2003). The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signaling. BBA-Mol Cell Biol, 1631 (1): 1~11
- Miyake T, Loch CM, Li R (2002). Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating Sequence-Binding Factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. Mol Cell Biol, 22 (2): 505~516
- Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ, Mache-Lerbs S (2003). Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. Plant Mol Biol, 51 (3): 385~399
- Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, De Toma G, Frova C (2004). Organisation and structural evolution of rice glutathione S-transferase gene family. Mol Genet Genomics, 271 (5): 511~521
- Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. Science, 291 (5501): 118~120
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet, 238 (1-2): 17~25
- Yu QB, Jiang Y, Chong K, Yang ZN (2009). AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript *accD* RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 59 (6): 1011~1023
- Yu SW, Zhang LD, Zuo KJ, Tang DQ, Sun XF, Tang KX (2005). *Brassica napus* L. homeodomain leucine-zipper gene *BnHB6* responds to abiotic and biotic stresses. J Integr Plant Biol, 47 (10): 1236~1248