

TcLr19PR1、*TcLr19PR2* 和 *TaLr19TLP1* 的酵母双杂交诱饵载体的构建及鉴定

王 菲, 张艳俊, 梁 芳, 张家瑞, 王海燕, 刘大群

(河北农业大学 植物保护学院/河北省农作物植物病虫害生物防治工程技术研究中心/
国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071000)

摘要: 在前期研究的基础上, 将成功克隆得到 3 个病程相关蛋白 *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的序列, 分别命名为 *TcLr19PR1*、*TcLr19PR2* 和 *TaLr19TLP1*。将这 3 个基因分别连接到酵母双杂交诱饵载体 pGBKT-7 上, 并转化到感受态菌株 Y2HGold 中, 检测其毒性和自激活活性。结果显示, 成功构建了包含目的基因的诱饵重组载体 pGBKT-7-*TcLr19PR1*、pGBKT-7-*TcLr19PR2* 和 pGBKT-7-*TaLr19TLP1*; 将转化产物涂布于 SD/-Trp/X 平板上, 生长良好, 并出现阳性克隆; 毒性检测中, 将 3 个诱饵重组载体与空载体在 SD/-Trp 液体培养基中的生长情况进行对比, 发现诱饵无毒性; 自激活检测试验中, 重组载体无法在二缺、三缺和四缺培养基中正常生长, 证明诱饵无自激活活性。因此, 本研究成功构建的 3 个诱饵重组载体可用于 3 个 PR 蛋白互作蛋白的筛选, 为进一步研究其在小麦与叶锈菌互作中的分子机理奠定基础。

关键词: 病程相关蛋白; 酵母双杂交; 诱饵载体; 自激活检测; 毒性检测

中图分类号: Q819

文献标志码: A

Construction and identification of yeast two-hybrid bait vectors of *TcLr19PR1*, *TcLr19PR2* and *TaLr19TLP1*

WANG Fei, ZHANG Yan-jun, LIANG Fang, ZHANG Jia-rui, WANG Hai-yan, Liu Da-qun

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei/Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province/National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071000, China)

Abstract: Based on the previous studies, three pathogenesis-related proteins of *PR1*, *PR2*, and *PR5* named *TcLr19PR1*, *TcLr19PR2* and *TaLr19TLP1* have been successfully cloned. In this study, three target genes were attached to yeast two-hybrid bait vector pGBKT-7, and then they were transformed into yeast Y2HGold competent cells to test its self-activated activity and toxicity. The results showed that these recombinant bait vectors grew well on SD/-Trp/X agar medium. In SD/-Trp culture, bait vectors grew faster than pGBKT-7, which indicated that three bait plasmids were not toxic to yeast cells. In the self-activated activity experiments, the

收稿日期: 2016-10-07

基金项目: 国家省自然科学基金项目(31501623); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015171)。

作者简介: 王 菲(1992-), 女, 辽宁省大连市人, 在读硕士生, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 王海燕(1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事分子植物病理学研究. E-mail: ndwanghaiyan@163.com

刘大群(1958-), 男, 博士, 教授, 主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

yeast strains containing bait plasmids could not grow on SD/-Trp/-leu DO supplement, SD/-His/-leu/-Trp DO supplement, and SD/-Ade/-His/-leu/-Trp DO supplement, which proved that they didn't have self-activated activity. Three baits were successfully constructed and could be used to screen targeted protein interacting with 3 PR proteins. The experiment lay the foundation for understanding the molecular mechanism of the interaction between wheat and leaf rust pathogen in the future.

Keywords: pathogenesis-related proteins; yeast two-hybrid system; auto activation; toxicity test

酵母双杂交技术是 Fields 等在 1989 年研究真核基因转录调控时提出并初步建立的^[1]。这是利用遗传学方法在酵母真核细胞内研究蛋白之间互作的非常有效的一种分子生物学技术^[2], 是研究蛋白互作的较为简单、灵敏、高效的方法之一。目前, 利用酵母双杂交技术来寻找互作蛋白的方法愈见成熟。牛吉山等人^[3]用该方法从 cDNA 文库中筛选出一个小麦类甜蛋白的全长 cDNA, 并证明有一定的抗白粉的特性。Okinaka Y 等人^[4]通过双杂交系统筛选大豆 cDNA 文库, 得到 2 个同源性具有 97% 的蛋白, P42-1 和 P42-2, 证明 P42-2 是 P34Syringolide 受体第 2 信使的主要成员之一。邹华文等人^[5]通过研究玉米 Pto 蛋白与 Ptl 蛋白间的相互作用, 从而得知只有当 Zmptp 和 Zmptil 互作时才可激活报告基因。

以往的研究中发现, 病程相关蛋白 (Pathogenesis-Related Proteins, PRs) PR1 家族有防御真菌的能力, 也是病原物诱导的系统获得性抗性防御信号获得的标志。但其他作用机理还未清楚^[6-7]。PR2 蛋白家族可以编码 β -1, 3-葡聚糖酶、水解酶等, 且只有定位于液泡中的碱性蛋白才可作为分解真菌细胞壁的工具^[6, 8]。PR5 蛋白可降解真菌细胞壁, 具有抗真菌侵染的能力及激活植物防卫反应信号途径的作用^[9]。本研究前期, 王琬^[10]、高琳^[11]等人利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术分别从抗叶锈病近等基因系材料 *TcLr19* 中获得了病程相关蛋白 *PR1*、*PR2*、*PR5* 的基因序列, 依次命名 *TcLr19PR1*、*TcLr19PR2* 和 *TaLr19TLP1*。本研究拟构建 3 个 PR 蛋白酵母双杂交诱饵载体, 进行毒性检测和自激活测试, 为筛选互作蛋白、进一步诠释 PR 蛋白参与小麦与叶锈菌互作的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验植物材料为回交 6 代小麦抗叶锈病近等基因系 *TcLr19*, 小麦叶锈菌菌株为 07-10-421-3 (FHJT), 与 *TcLr19* 为非亲和互作, 侵染型为“;”, Y2HGold 酵母菌株。

1.2 主要试剂

X- α -gal、AbA、SD/-Trp DO Supplement、SD/-Trp/-leu DO Supplement、SD/-His/-leu/-Trp DO Supplement、SD/-Ade/-His/-leu/-Trp DO Supplement、酵母转化试剂盒均购自 Clontech 公司; TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒、凝胶回收试剂盒、反转录酶、RNA 酶抑制剂、OligdT、*Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶、pMD19-T 载体均购自 TaKaRa 公司; 小型质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小麦 RNA 的提取及 cDNA 的获得 将叶锈菌接种于一心一叶期的小麦 *TcLr19* 上, 接菌后分别取 0、12、24、36、48、72、96 h 的叶片 0.1 g, 迅速置于液氮中 -80℃ 保存备用。参考 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书提取总 RNA, 检测 $OD_{260/280}$ 和 $OD_{260/230}$ 值; 并使用 TaKaRa 公司的反转录酶等试剂合成 cDNA 第一链。

1.3.2 Bait 重组载体的构建 以不同时间点 cDNA 等量混合为模板扩增 *TcLr19PR1*、*TcLr19PR2* 和 *TaLr19TLP1* 的目的片段, 引物序列如表 1。在序列中添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的酶切位点, 将扩增到的 3 个基因的片段与载体 pGBKT-7 双酶切, 利用凝胶回收试剂盒回收酶切产物, 连接过夜处理后转化至 *E. coli* DH5 α 中, 然后测序。

表 1 PCR 引物的序列
Table 1 Sequences of primers for PCR

引物名 Primer	序列 (5'-3') Sequences(5'-3')
<i>TcLr19PR1</i> (F)	CATGGAGGCC <u>GAATTC</u> CAGAACTCGC- CTCAGGACTACCTCTCAC
<i>TcLr19PR1</i> (R)	GCAGGTCGAC <u>GGATCC</u> GTATGGTTTC- TGTCCAATGATATTCCCG
<i>TcLr19PR2</i> (F)	CATGGAGGCC <u>GAATTC</u> ATCGGGGTGT- GCTACGGCATGAGCGC
<i>TcLr19PR2</i> (R)	CAGGTCGAC <u>GGATCC</u> GAAGCTGAT- GGG- GTAGACGTGCTG CATGGAGGCC <u>GAATTC</u> GCCACCTTC-
<i>TaLr19TLP1</i> (F)	TAC- ATCAAGAACAACACTGC
<i>TaLr19TLP1</i> (R)	GCAGGTCGAC <u>GGATCC</u> TCATGGACAG- AAGGTGATCTGGTAG

注:划线部分为酶切位点.

1. 3. 3 酵母菌株 Y2HGold 的转化 按 Clontech 公司酵母转化说明书进行转化操作,醋酸锂法制备酵母菌株 Y2HGold 的感受态细胞^[12],将构建好的 pGBKT-7-*TcLr19PR1*、pGBKT-7-*TcLr19PR2*、pGBKT-7-*TaLr19TLP1* 以及空载 pGBKT-7 分别转化于其中,将转化产物涂布于 SD/-Trp 平板上,30 ℃ 倒置培养 3~5 d,直到单菌落出现。

1. 3. 4 Bait 毒性检测 3~5 d 后观察在 SD/-Trp 平板上菌落形态和大小,挑培养基中 pGBKT-7-*TcLr19PR1*、pGBKT-7-*TcLr19PR2*、pGBKT-7-*TaLr19TLP1* 以及空载 pGBKT-7 的较大的单克隆于 50 mL 的液体 SD/-Trp 中,30 ℃,250 r/min 振荡培养,记录 0~30 h 的 OD₆₀₀ 值(每 5 h 检测 1 次)。对比 Bait 与空载的生长速率。

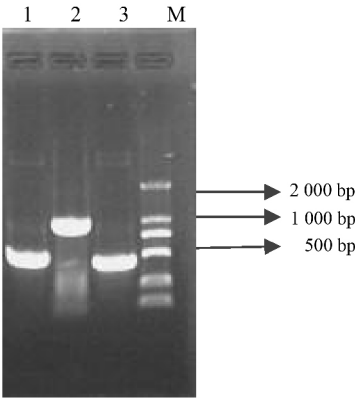
1. 3. 5 Bait 的自激活检测 毒性检测验证重组载体对酵母菌株 Y2HGold 无毒性后,进行自激活检测,挑 SD/-Trp 平板上生长良好的较大的单克隆于 SD/-Trp/X、SD/-Trp/-leu、SD/-His/-Trp/-leu、SD/-Ade/-His/-Trp/-leu 平板上,30℃ 培养3~5 d,观察菌落的生长情况。

2 结果与分析

2. 1 Bait 的构建

将不同时间点反转录的 *TcLr19* cDNA 等量混合,以其为模板,利用表 1 中设计的引物分别进行 3 个基因的扩增,结果显示, *TcLr19PR1*、*TcLr19PR2*、*TaLr19TLP1* 的目的基因扩增片段分

别在 466,1000 和 516 bp,与本实验室前期克隆基因的目的片段大小一致(图 1)。

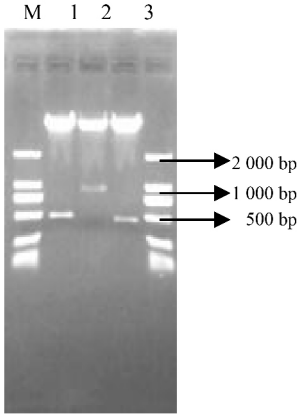


M:DL2000; 1:*TaLr19TLP1*; 2:*TcLr19PR2*; 3: *TcLr19PR1*.

图 1 3 个基因的扩增图

Fig 1 Electrophoresis of three genes

将 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后的载体 pGBKT-7 和目的片段连接过夜,转化到 *E. coli* DH5 α 中。使用天根公司质粒提取试剂盒提取质粒后,进行双酶切验证。结果显示,在 516,1000 和 466 bp 的位置均出现了对应的目的条带,测序结果也表明插入片段序列正确,证明重组载体构建成功(图 2)。



M:DL2000; 1:*TaLr19TLP1*-pGBKT-7;
2:*TcLr19PR2*-pGBKT-7; 3:*TcLr19PR1*-pGBKT-7.

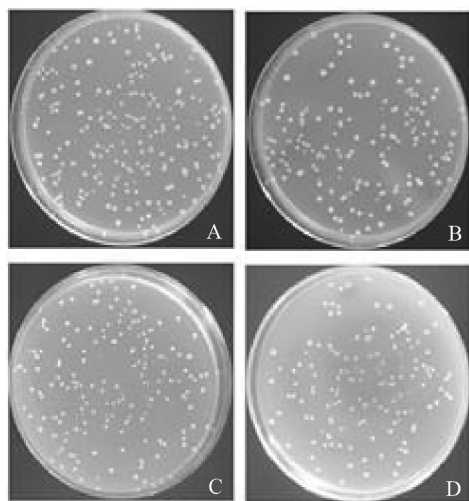
图 2 重组载体 *Bam*HI and *Eco*RI 酶切鉴定

Fig 2 Recombinant vector digested by restriction enzymes *Bam*HI and *Eco*RI

2. 2 毒性检测

将涂布了重组诱饵载体以及空载的转化菌株的平皿置于 30 ℃ 培养箱中培养 3 d,观察其长势,发现在 SD/-Trp 平板上均生长良好,菌落长满平皿(图 3)。挑取平皿上直径为 2~3 mm 的单克隆于 SD/-Trp 液体培养基中,同时设空载体的菌株做为对照,每隔 5 h 检测 1 次 OD₆₀₀ 值,绘制折线图

(*TcLr19PR1*、*TcLr19PR2*、*TaLr19TLP1* 简称为 *PR1*、*PR2*、*PR5*)。结果显示,三组重组载体的菌株与对照在液体培养基中生长情况相似,证明 Bait 对酵母菌株 Y2HGold 无毒性(图 4),可进一步进行自激活检测。



A:ABCD 分别为 *TcLr19PR1*;B:*TcLr19PR2*;
C:*TaLr19TLP1*;D:空载对照

图 3 毒性检测 4 组转化产物在 SD/-Trp 上的长势

Fig 3 The yeast growth on SD/-Trp medium for test of toxicity

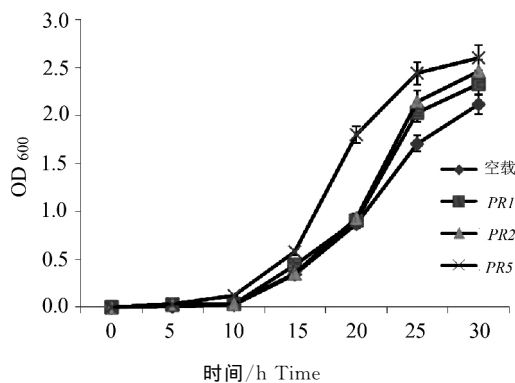


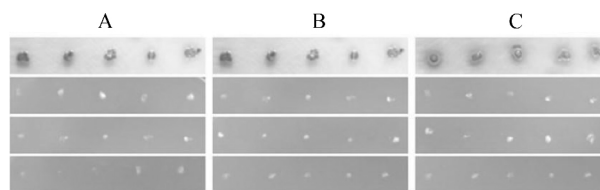
图 4 酵母菌在 SD/-Trp 液体培养基中的生长情况

Fig 4 The growth of yeast cells cultured in SD/-Trp liquid medium

2.3 自激活检测

将重组诱饵载体菌株分别涂布于 SD/-Trp/X、SD/-Trp/-leu、SD/-His/-Trp/-leu、SD/-Ade/-His/-Trp/-leu 上,结果显示,三组转化菌株 pG-BKT-7-*TcLr19PR1*、pGBKT-7-*TcLr19PR2*、pG-BKT-7-*TaLr19TLP1* 在 SD/-Trp 平板上均能正常生长;在 SD/-Trp/X 平板上出现有蓝色菌斑的阳性克隆;在二、三、四缺培养基中无转化菌斑生长。表明 Bait 自身无法激活报告基因 His 和 Ade 的表达,三组重组质粒在菌株 Y2HGold 中无自

激活活性(图 5)。



A B C 分别为:*TcLr19PR1*、*TcLr19PR2*、*TaLr19TLP1* 在不同培养基中的生长情况,培养基从上到下分别是:SD/-Trp/X、SD/-Trp/-leu、SD/-His/-Trp/-leu、SD/-Ade/-His/-Trp/-leu。

图 5 重组诱饵载体的自激活检测图

Fig 5 Self-activation detection of the three bait vectors

3 讨论与结论

酵母双杂交(Y2H)系统是最成功的可检测和分析到蛋白互作的方法之一。Y2H 可应用于大规模全基因组或蛋白质组的检测^[13]。在酵母双杂交技术研究病程相关蛋白的研究中,Zhou J 等人^[14]发现水杨酸(SA)信号转导途径中 NPR1 是重要的组成部分,可诱发防卫基因的表达,如病程相关蛋白 *PR1* 基因的表达,研究证明 *PR1* 基因的表达使得 TGA 家族中的转录因子与 SA 途径中的 NPR1 互作。S Z 等人^[15]利用该方法发现 *PR1* 参与系统获得性抗性反应,水杨酸途径可控制 *PR1* 基因的诱导。NPR1 与两蛋白家族的成员 TGA 转录因子和 NIMIN 互作,研究数据显示,在烟草中 SAR 的早期 NIMIN2 蛋白控制 *PR1* 基因的表达。

在小麦与叶锈菌互作研究中,张立峰^[16]利用酵母双杂交的方法构建了小麦 *TcLr19* 与叶锈菌互作早期的酵母双杂交 cDNA 文库。王悦琳^[17]以 TaCaM4-1 为诱饵进行酵母双杂交试验,在受叶锈菌侵染的小麦叶片 cDNA 文库中筛选出 7 个 CaM 结合蛋白阳性克隆基因。闫超^[18]将 TaCPK2 激酶区构建诱饵载体,与酵母双杂交文库 Mating 互作,筛选与 TaCPK2 相互作用的蛋白,得到 3 个阳性克隆。在前期研究的基础上,成功获得了病程相关蛋白基因 *TcLr19PR1*、*TcLr19PR2* 和 *TaLr19TLP1*。本研究中,进一步将 3 个目的基因的片段连接到载体 pG-BKT-7 上,按照 Clontech 公司的转化手册,完成酵母菌 Y2HGold 的制备,并将目的基因转至感受态 Y2HGold 菌株中,对其进行毒性及自激活检测。在毒性检测中,通过对比菌斑的大小,发现 Bait 的菌斑生长大小与空载对比不明显,通过在 SD/-Trp 液体培养基中菌株生长速率对比,发现三组重组载体 pG-BKT-7-*TcLr19PR1*、pGBKT-7-*TcLr19PR2*、pGBKT-7-

TaLr19TLP1 与对照在液体培养基中生长情况相似,判断 Bait 无毒^[19]。自激活性检测发现,Bait 只能在 SD/-Trp(一缺)培养基中生长,在 SD/-Trp/X 上出现阳性克隆,在二缺、三缺、四缺平板上不生长,证明 Bait 无自激活性^[19-20]。今后的试验中,将利用这 3 个 Bait 载体筛选小麦的 Y2H 文库,钓取互作蛋白,并明确其在小麦和叶锈菌互作中的功能。

参考文献:

- [1] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340 (6230):245-246.
- [2] 李先昆,聂智毅,曾日中. 酵母双杂交技术研究与应用进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(7):2867-2869.
- [3] 牛吉山,于玲,陈佩度,等. 小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系叶片 cDNA 文库构建及鉴定[J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(1):5-8.
- [4] Okinaka Y, Yang C H, Herman E, et al. The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(12):1 213-1 218.
- [5] 邹华文,宋仲骞,朱泳. 利用酵母双杂交系统鉴定玉米 Pto 蛋白与 Ptl 蛋白间的相互作用[J]. *玉米科学*, 2012, 20(4):42-44.
- [6] 栗小英. *PR1*, *PR2* 和 *PR5* 基因参与小麦 *TcLr35* 成株抗叶锈病反应的表达分析[D]. 保定:河北农业大学, 2015.
- [7] 李连华. 植物病程相关蛋白的研究进展[J]. *福建农业*, 2015(2):100.
- [8] Su Y C, Xu L P, Xue B T, et al. Molecular cloning and characterization of two pathogenesis-related β -1, 3-glucanase genes *ScGluA1* and *ScGluD1* from sugarcane infected by *Sporisorium scitamineum* [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(10):1503-1519.
- [9] Elkereamy A, Elsharkawy I, Ramamoorthy R, et al. *Prunus domestica*, Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection [J]. *Plos One*, 2011, 6(3):e17973-e17973.
- [10] 王坤,王海燕,刘大群. 叶锈菌与 *TcLr19* 小麦互作体系中 *PR1* 基因的克隆及分析[J]. *河北农业大学学报*, 2012, 35(2):1-6.
- [11] 高琳,栗小英,张艳俊,等. 叶锈菌与小麦互作过程中 β -1, 3-葡聚糖酶基因的表达式分析[J]. *河北农业大学学报*, 2014(5):55-60.
- [12] Serebriiskii I. Yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions-stage 2: Transforming and characterizing the library [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010 (5):149-154.
- [13] Caufield J H, Sakhawalkar N, Uetz P. A comparison and optimization of yeast two-hybrid systems [J]. *Methods*, 2012, 58(4):317-324.
- [14] Zhou J M Y, Silva H, Pontier D, et al. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13 (2): 191-202.
- [15] S Z, Mast S, Stos V, et al. Tobacco NIMIN2 proteins control *PR* gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(4):385-400.
- [16] 张立峰. *TcLr19* 与叶锈菌互作早期的酵母双杂交 cDNA 文库构建及 *TaTcTP* 表达分析[D]. 保定:河北农业大学, 2011.
- [17] 王悦琳. 小麦与叶锈菌互作过程中 CaM 靶蛋白 *TaCAMTA4* 基因的克隆及表达分析[D]. 保定:河北农业大学, 2013.
- [18] 闫超. 小麦与叶锈菌互作过程中 *TaCDPKs* 的表达分析及 *TaCPK2* 互作蛋白的筛选[D]. 保定:河北农业大学, 2014.
- [19] 段豪. 苹果褪绿叶斑病毒互作寄主因子的筛选[D]. 保定:河北农业大学, 2014.
- [20] 许媛,于秀梅,刘大群,等. *Ta-SKP2A* 克隆及其酵母双杂交诱饵载体的构建[J]. *华北农学报*, 2016, 31 (2):17-22.

(编辑:李 川)