

利用酵母单杂交方法筛选大豆根融合基因表达 cDNA 文库

刘清醒¹, 郭长虹¹, 毕影东², 郭东林¹

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院/黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 酵母单杂交体系通过筛选 cDNA 文库可直接得到与靶序列相互作用的蛋白质基因序列, 是研究 DNA-蛋白质相互作用和转录因子功能的最常用、最有效的方法之一。通过构建与 Gal4p 的激活结构域融合的表达 cDNA 文库, 利用抗病相关基因启动子区的 W-box 顺式元件采用酵母单杂交方法对该文库进行了筛选, 共得到 4 个阳性克隆。结果为进一步研究与顺式元件 W-box 相互作用的 WRKY 蛋白奠定了基础。

关键词: 大豆; cDNA 文库; 酵母单杂交

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)02-0165-03

Construction of Fusion Gene Expression cDNA Library of Soybean Root with Yeast One-hybrid Method

LIU Qing-xing¹, GUO Chang-hong¹, BI Ying-dong², GUO Dong-lin¹

(1. Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province/College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 2. Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Gene sequence of protein which interacted with specific cis-element can be found by screening cDNA library in yeast one-hybrid system. Yeast one-hybrid system has become an important efficient method to investigate DNA-protein interaction and function of transcription factor. In this report, gene expression cDNA library fused to activation domain of Gal4p was constructed. Library was investigated using W-box cis-element in yeast one-hybrid system. As a result, 4 positive clones were found. The study paved a foundation for screening WRKY protein which interacted with W-box cis-element.

Key words: Soybean; cDNA library; Yeast one-hybrid

酵母单杂交体系 (yeast one-hybrid system) 是借鉴酵母双杂交体系的基本原理, 通过观察酵母细胞内报告基因的表达状况, 研究 DNA-蛋白质之间的相互作用。该方法已被广泛应用于寻找与目的 DNA 片段相互作用的蛋白质分子, 特别是在检测特定转录因子与顺式作用元件互作的敏感性和可靠性方面具有独特优势, 成为克隆与靶元件特异结合的转录因子基因 (cDNA) 的有效方法^[1]。在酵母单杂交体系中, 省略了在酵母双杂交体系中采用的 BD-X 蛋白质杂交体, 将 GAL4 的 DNA 结合结构域置换为文库蛋白编码基因, 只要其表达的蛋白能与目的基因相互作用就会启动下游报告基因的转录。从而捕获具有与该元件特异结合的结构域的蛋白质^[2-3]。该体系也适用于研究参与转录抑制和 DNA 复制过程的蛋白质^[4]。在研究 DNA 与蛋白质相互作用中, 酵母单杂交体系主要用于确定已知 DNA 与蛋白质之间是否存在相互作用, 分离编码结合于目的顺式调控元件或其他短 DNA 结合位点蛋白的新基因和定位已经证实的具有相互作用的 DNA 结合蛋白的 DNA 结合结构域。迄今为止, 应用酵母单杂交体系已经识别并验证了许多与目的 DNA 序

列结合的蛋白质^[5-7]。本研究利用大豆根 cDNA 文库构建了融合表达 cDNA 文库, 为进一步利用酵母单杂交方法筛选与 DNA 序列特异结合的蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆根 cDNA 文库由 Invitrogen 公司合成, 库容量 5×10^9 cfu (colony forming units), 平均插入片段长度 1 500 bp, 载体为 pSPORT-P, 具有 Gateway 系统的 attB1、attB2 重组位点和氨苄青霉素 (AMP) 抗性选择标记; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (用于感受态细胞制备); 质粒载体 pPC86: 酵母细胞表达载体, 具有色氨酸合成酶 (Trp1)、AMP 抗性选择标记, 用于构建融合表达 cDNA 文库, 为本实验室所存。

1.2 方法

1.2.1 融合表达 cDNA 文库的建立及扩增 将 pPC86 载体质粒分别用限制内切酶 *Not* I 和 *Sal* I 进行处理, 电泳后回收, 用无菌水溶解至终浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 将处理好的载体同回收的文库插入片段进行连接 (图 1)。连接体系 ($20 \mu\text{L}$): 处理好的 pPC86 载体质粒

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08004-002); 哈尔滨科技创新人才研究专项资金 (RC2011LX002004)。

第一作者简介: 刘清醒 (1987-), 女, 在读硕士, 主要从事植物遗传学研究。E-mail: qxhappyforever@126.com。

2 μL , 文库回收片段 6 μL , ligase 1 μL (0.5 U), 10 \times buffer 2 μL , ddH₂O 9 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 温育 6 h, 将连接产物全部电激转化大肠杆菌 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 加入 SOC 培养基, 于小三角瓶中 37 $^{\circ}\text{C}$, 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 1 h。取 3 mL 接种在 100 mL 2 \times LB 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$, 230 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养。当 OD₆₀₀ 值为 1.3 时, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后收集菌体; 弃上清, 加入 100 mL 2 \times LB (含甘油 12.5%) 悬浮, 分 10 mL 一份于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取上述建立的融合表达 cDNA 文库菌液 4 mL 接种于 250 mL LB 液体培养基 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Chl) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 230 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 6 h。当 OD₆₀₀ 值约为 0.8 时, 收集菌体, 提取质粒。

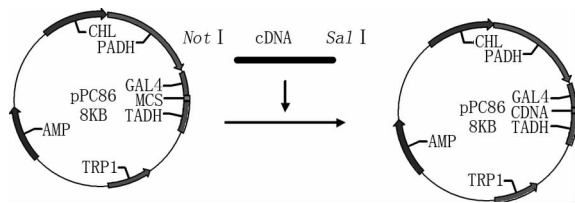


图1 融合表达 CDNA 文库的构建

Fig.1 Schematic illustration of the CDNA library

1.2.2 诱饵载体的构建 将穿梭载体 pRS315 分别用 *Xba* I 和 *Bam* H I 进行酶切处理, 酶切完全后回收。酶切后的 pRS315 载体与磷酸化、退火后的 W-box 连接 (图 2)。连接体系 (10 μL): pRS315 质粒 20 ng, W-box 30 ng, ligase 0.5 μL (0.5 U), 10 \times buffer 1 μL , ddH₂O 5.5 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 温育 6 h, 取上述连接产物 1.5 μL 电激转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后涂布于固体 LB 培养基 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp) 上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。

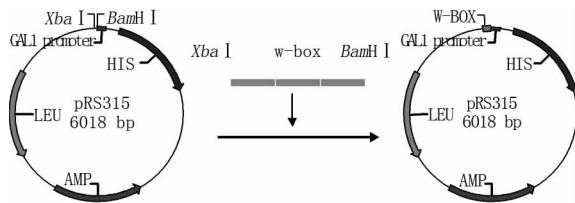


图2 诱饵载体的构建

Fig.2 Schematic illustration of the bait vector construction

1.2.3 利用酵母单杂交方法筛选 cDNA 文库 将构建好的诱饵载体转化酵母感受态细胞。挑取酵母单菌落接种到 3 mL Leu⁻ 液体选择培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 36 h; 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 15 s 收集 1.5 mL 酵母菌液; 用 200 μL 酵母质粒提取缓冲液重悬细胞, 加约等体积的玻璃珠 (直径 0.45 mm) 涡旋震荡 1 min; 再加 200 μL 的酚涡旋 1 min, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min; 取上清, 加 1/10 体积的 NaAC 和等体积的异丙醇, 混匀后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清, 用 80% 的乙醇洗一次, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 3 min, 干燥后加 10 μL 灭菌水溶解沉淀, 取 1 μL 诱饵载体质粒电激转化 *E. coli* DH5 α ; 提取质粒进

行酶切和测序鉴定。把融合表达 cDNA 文库质粒转化酵母菌株 yWAM2 中。分别取 5, 10, 50, 200 μL 转化液涂到 Trp⁻, Leu⁻ 固体选择培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 计数。将其余转化细胞涂到 His⁻, Trp⁻, Leu⁻ 固体选择培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。待酵母长出后, 挑取酵母单菌落进行鉴定分析。将在 His⁻, Trp⁻, Leu⁻ 固体选择培养基上生长的克隆提取质粒后电激转化 *E. coli* DH5 α , 提取质粒, 用 *Not* I, *Sal* I 酶切分析, 将选取的克隆质粒转化含诱饵载体的 pRSW8 酵母菌株。并分别在 Trp⁻, Leu⁻ 固体选择培养基和 His⁻, Trp⁻, Leu⁻ 固体选择培养基划线培养, 酵母质粒的提取和酵母转化方法同上。

2 结果与分析

2.1 融合表达 cDNA 文库插入片段、文库容量的鉴定

为检测文库质量, 将建立的融合表达 cDNA 文库提取质粒 (随机挑取 20 个单菌落培养后提取质粒酶切 (*Not* I 和 *Sal* I) 鉴定转化效率和片段插入情况, 结果表明插入片段大小为 1.0 ~ 2.5 kb, 插入率为 90% (图 3)。

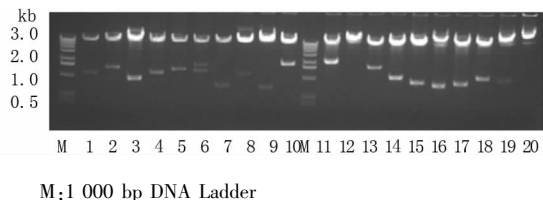


图3 构建的融合 cDNA 文库的 *Not* I, *Sal* I 酶切检测

Fig.3 cDNA clones digested by *Not* I and *Sal* I

从扩增的融合表达 cDNA 文库中取 1, 2 μL 涂板计数, 经测定, 表达 cDNA 文库的滴度为 2.7×10^8 cfu。

2.2 诱饵载体的构建

随机挑取 10 个菌落, 摇菌用 *Pvu* II 和 *Bam* H I 进行酶切鉴定, 发现 5 号、8 号有 200 bp 条带, 初步证明片段已插入并将其测序, 对测序结果分析后证明 8 号克隆酶连正确 (图 4)。

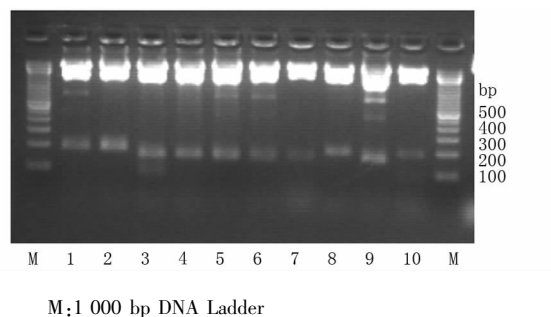


图4 构建诱饵载体的 *Pvu* II, *Bam* H I 酶切检测

Fig.4 Bait vector digested by *Pvu* II, *Bam* H I

2.3 融合表达 cDNA 文库的筛选

用酵母单杂交方法先后 3 次对 cDNA 文库进行了筛选, 得到了 4 个阳性克隆, HY1-3, HY5-2,

HY22-2 和 HY23-2。将这 4 个克隆分别转化含诱饵载体的 pRSW8 酵母菌株,结果 pRSW8 酵母在 Trp⁻ 和 Leu⁻ 选择培养基和 His⁻、Trp⁻ 和 Leu⁻ 选择培养基上均生长;对照在 Trp⁻ 和 Leu⁻ 选择培养基上生长菌落,而在 His⁻、Trp⁻ 和 Leu⁻ 选择培养基上不生长菌落,进一步证明筛选的克隆为阳性克隆。

3 讨 论

酵母单杂交技术是一种体内鉴定 DNA 与蛋白质互作的有效方法^[8,9]。本研究构建了与酵母单杂交系统中 Gal4p 的激活结构域融合的表达 cDNA 文库,一般文库滴度达到 1×10^5 cfu 以上为有效文库,本研究文库滴度为 2.7×10^8 cfu,随机 PCR 检测表明文库重组率为 90%;片段插入长度为 1~2.5 kb,符合优良文库标准。通过酵母单杂交的方法,从大豆根的 cDNA 文库筛选到了 4 个与 W-box 相互作用的阳性克隆,为进一步研究大豆中与靶基因启动子的顺式作用元件特异性结合并相互作用的 WRKY 蛋白奠定了基础。

转录因子是调控真核生物基因表达的重要因子,激活或抑制靶基因的表达,在植物生长发育过程中起到了重要的调控作用^[10],WRKY 转录因子是近年来在植物中发现的 N-端含有 WRKYGQK 高度保守氨基酸序列的新型转录调控因子,调节启动子中含 W-box 元件基因的表达,从而参与植物的各种防卫反应^[11-12]。迄今为止,研究者们已经分别在拟南芥、水稻、大豆和欧芹中利用酵母单杂交系统发现了新的 WRKY 类转录因子基因^[13-16]。Liu 等利用酵母单杂交系统证明拟南芥的 WRKY18、WRKY40 和 WRKY60 转录因子与脱落酸相应基因 *ABI4* 和 *ABI5* 启动子区域中的 W-box 相互作用,初步阐明了 WRKY 蛋白介导的 ABA 信号转导机制^[17]。Suttipanta 等研究表明长春花的 WRKY1 转录因子参与了萜类物质合成代谢的调控^[18]。植物的植物调控逆境胁迫和生长发育的调控是涉及受体蛋白、激酶、转录因子的协同作用的复杂过程^[19],本研究拟以 WRKY 转录因子特异结合的特定顺式元件 W-box 为诱饵^[20],利用酵母单杂交系统克隆与之结合的 WRKY 转录因子,为进一步研究大豆逆境胁迫和生长发育的调控奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Lopato S, Bazanova N, Morran S, et al. Isolation of plant transcription factors using a modified yeast one-hybrid system [J]. *Plant Methods*, 2006, 2(1): doi:10.1186/746-4811-2-3.
- [2] Ito T, Chiba T, Ozawa R, et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome [J]. *PNAS*, 2001, 98(8): 4569-4574.
- [3] Deplancke B, Dupuy D, Vidal M, et al. A gateway-compatible yeast one-hybrid system [J]. *Genome Research*, 2004, 14(10): 2093-2101.
- [4] Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2000, 130: 59-78.
- [5] Reece-Hoyes J S, Diallo A, Lajoie B, et al. Enhanced yeast one-hybrid assays for high-throughput gene-centered regulatory network mapping [J]. *Nature Methods*, 2011, 8: 1059-1064.
- [6] Reece-Hoyes J S, Marian Walhout A J. Yeast one-hybrid assays: A historical and technical perspective [J]. *Methods*, 2012, 57(4): 441-447.
- [7] Ouwerkerk P B, Meijer A H. Yeast one-hybrid screens for detection of transcription factor DNA interactions [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 678: 211-227.
- [8] Arda H E, Walhout A J M. Gene-centered regulatory networks [J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2010, 9(1): 4-12.
- [9] Lisowsky T, Loguercio Polosa P, Sagliano A, et al. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Krüppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence [J]. *FEBS Letters*, 1999, 453(3): 369-374.
- [10] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [11] Shree P P, Imre E S. The role of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [12] Nobuaki I, Hirofumi Y. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012, 15(4): 431-437.
- [13] Ying M, Thomas M L, Anja S, et al. Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(1-2): 63-67.
- [14] Rui Y, Quan H Y, Zhi H X, et al. Development of an efficient method for the isolation of factors involved in gene transcription during rice embryo development [J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(2): 348-357.
- [15] Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl R P, et al. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(1-2): 81-92.
- [16] Robert S C, Thomas E, Paul J R, et al. Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2002, 1576(1-2): 92-100.
- [17] Liu Z Q, Yan L, Wu Z, et al. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 63(18): 6371-6392.
- [18] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, et al. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [19] Kahir B, Agasse A, Gaillard C, et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(9): 2165-80.
- [20] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.