



大豆 GmNF-YA13 互作蛋白的筛选及鉴定

刘 灿¹, 于月华², 倪志勇¹

(1. 新疆农业大学 生命科学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:大豆 GmNF-YA13 蛋白是一个核转录因子 Y(NF-Y), 在干旱和高盐响应过程中均发挥重要作用。为研究其抗旱和耐盐的作用机理, 寻找 GmNF-YA13 的互作蛋白, 构建 pGBKT7-GmNF-YA13 诱饵载体, 采用酵母双杂交筛选大豆酵母文库, 并进行 X- α -gal 染色验证。结果显示: 酵母双杂交获得 85 个阳性克隆, 测序分析后得到 36 个候选的互作蛋白。功能预测显示互作蛋白主要参与生长发育、胁迫响应、能量代谢、转录调控和信号转导等生物过程。选择 GmUVR8、GmCML41、GmFbox13 和 GmFBA 与诱饵 pGBKT7-GmNF-YA13 进行一对一验证, 只有 GmFBA 能与 GmNF-YA13 发生相互作用, 预示 GmNF-YA13 功能的发挥需要 GmFBA 的参与。该结果可为 NF-YA 抗逆分子网络的研究提供基础。

关键词:核转录因子; GmNF-YA13; 酵母双杂交; 互作蛋白

Screening and Identification of Interacting Proteins of GmNF-YA13 in Soybean

LIU Can¹, YU Yuehua², NI Zhiyong¹

(1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Soybean (*Glycine max*) GmNF-YA13 protein is a nuclear transcription factor Y(NF-Y) that plays a crucial role in drought and high salinity responses. To investigate its mechanisms of drought resistance and salt tolerance, and identify the interacting proteins of GmNF-YA13, a pGBKT7-GmNF-YA13 bait vector was constructed. The soybean yeast library was screened using yeast two-hybrid system, and verified by staining with X- α -gal. The result showed that: 85 positive clones were obtained after sequencing analysis, 36 candidate interacting proteins were identified. Functional prediction showed that these interacting proteins are mainly involved in growth and development, stress responses, energy metabolism, transcription regulation, and signal transduction processes. GmUVR8, GmCML41, GmFbox13, and GmFBA were selected for one-on-one validation with the bait vector pGBKT7-GmNF-YA13. The results revealed that only GmFBA could interact with GmNF-YA13, indicating that the function of GmNF-YA13 requires the involvement of GmFBA. These findings lay the foundation for further research on the NF-YA stress resistance molecular network.

Keywords: nuclear transcription factor; GmNF-YA13; yeast two-hybrid; interacting protein

核转录因子 Y (Nuclear transcription Factor-Y, NF-Y) 是广泛存在于不同生物中的一类转录复合物, 通常由 NF-YA、NF-YB 和 NF-YC 3 种亚基通过有序组装形成, 一般以异源二聚体、三聚体形式或与其他调控因子相互作用, 以结合于顺式作用元件 CCAAT-box 从而激活或抑制下游基因的表达^[1-3]。研究发现, 单个的 NF-YA、NF-YB 或 NF-YC 亚基广泛参与根系发育、胁迫响应、ABA 信号转导、开花、果实成熟等进程中^[4-9]。大豆中, GmNF-YA13 可以与 GmSALT3、GmMYB84、GmNCED3 和 GmRbohB 的启动子结合, 调节其在体内的表达丰度, 增强转基因大豆植株的耐盐性和耐旱性^[10]; 过表达 GmNF-YA5 可以通过 ABA 依赖和非 ABA 依赖的途径减少气孔开度和叶片水分流失提高大豆的抗旱性^[11]; 在

盐胁迫下, GmNF-YA 可以加速 GmHDA13 积累并竞争与 GmFVE 的相互作用, 导致组蛋白乙酰化的抑制和维持, 最终赋予大豆植株耐盐性^[12]。

在哺乳动物和酵母中, 每类 NF-Y 亚基由 1 个单基因编码, 然而在高等植物中, 同一类 NF-Y 亚基往往由 1 个基因家族编码, 不同的 NF-Y 蛋白还存在不同的互作蛋白, 导致植物体内可能形成多种形式的 NF-Y 复合物^[13-14]。最近对于 NF-Y 三聚体的研究也陆续报道。Zhou 等^[15]发现柑橘 (*Citrus*) 中 CiNF-YA1 受干旱和低温诱导表达, 通过形成 CiNF-YA1/CiNF-YB2/CiNF-YC2 转录复合体直接结合到 FT 启动子中的 CCAAT-box 元件进而激活其转录, 促进柑橘迅速进入“干旱逃逸”进而间接诱导开花。在大豆中, GmNF-YC14 与 GmNF-YA16 和 GmNF-

收稿日期: 2023-07-27

基金项目: 国家自然科学基金 (32160446); 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2022D01E14, 2021D01A93)。

第一作者: 刘灿 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: liuc1998@qq.com。

通讯作者: 倪志勇 (1981—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: nizhiyong@126.com;

于月华 (1981—), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事作物抗逆分子育种研究。E-mail: yuyuehua1213@sina.com。

YB2 形成异源三聚体,激活 *GmPYR1* 介导的脱落酸 (ABA) 信号通路,以调节大豆的胁迫耐受性,且过表达 *GmNF-YC14* 或 *GmPYR1* 可以提高单株产量、籽粒丰满度和茎基周长,从而提高了大豆植株对于旱条件的适应能力^[16]。

大豆是世界范围内重要的油料作物,其生产受到盐胁迫和干旱胁迫的限制。通过生物学手段筛选 NF-Y 的互作蛋白,探究 NF-Y 转录复合体的组成,对于植物抗逆分子网络的研究及大豆抗逆品种的培育具有重要意义。前期试验发现大豆中的 *NF-YA* 基因 *GmNF-YA13* 受到盐、干旱、ABA 和过氧化氢的强烈诱导^[17],为了探究大豆 *GmNF-YA13* 响应盐和干旱等胁迫的分子机制,克隆了 *GmNF-YA13* 基因并使用酵母双杂交筛选大豆 cDNA 文库,筛选与 *GmNF-YA13* 互作的蛋白质并进行酵母回转变证,旨在为 NF-YA 抗逆分子网络的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82。DH5 α 大肠杆菌菌株、AH109 酵母菌株、pGBKT7 和 pGADT7 酵母表达载体均为实验室保存。酵母培养基购自泛基诺公司,Frozen-EZ 酵母转化试剂盒为 ZYMO 公司产品。反转录试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒,质粒提取试剂盒为天根生物公司产品。其他试剂(高保真 Primer START 聚合酶,T₄ DNA 连接酶,限制性内切

酶 *EcoR* I、*Pst* I 等)购自 Thermofisher 生物公司。引物合成和 DNA 测序由生工生物(上海)完成。

1.2 总 RNA 提取与反转录

大豆水培 14 d 后使用 Trizol 法^[17]提取叶片总 RNA,使用 Thermofisher 超微量核酸蛋白浓度测定仪 NanoDrop ONCE 分析总 RNA 浓度和纯度,进一步采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,选择满足后续实验需求的 RNA,使用天根生物公司的反转录试剂盒进行反转录得到大豆 cDNA。

1.3 诱饵载体的构建

根据 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中 *GmNF-YA13* (登录号:NM_001255884.3)的 CDS 序列,使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 *GmNF-YA13-F* 和 *GmNF-YA13-R* (表 1)。以大豆叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 10 \times Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μ L、2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 2.0 μ L、上下游引物各 2.0 μ L、cDNA 模板 1.0 μ L、*Taq* 酶 0.5 μ L、最后加入超纯水至总体积为 25 μ L。PCR 反应条件为:98 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。使用天根公司的产物纯化回收试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物,得到 *GmNF-YA13* 目的片段。利用 T₄ 连接酶连接经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后的目的基因片段和 pGBKT7 载体片段并转化大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含有 50 μ g \cdot mL⁻¹卡那霉素的 LB 固体平板上,挑取单克隆并扩大培养,经菌液 PCR 鉴定和测序分析筛选获得诱饵载体 pGBKT7-*GmNF-YA13*。

表 1 供试引物
Table 1 Primers used in the test

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
GmNF-YA13-F	TAAGAATTTCATGCCGGGAAAGCTGACAC
GmNF-YA13-R	TAACTGCAGTCATTTGAAAGCCCCATTATTAG
GmUVR8-F	CCCATCGATACATGGCCATGA ATAATGGCG
GmUVR8-R	ACGGATCCTCAACTGTGGGACTCGGC
GmCML41-F	CTCATCGATACATGGCTAGCGAGAGAATTCTCAAG
GmCML41-R	ACGAGCTCTCATTGTGTAAGCTCATCGAAATC
GmWRKY52-F	CCGGAATTTCATGCATCACCGTAGATTTCAGC
GmWRKY52-R	CCGCTCGAGTTATCCTGTGATGCCGCC
GmFbox13-F	CCCATCGATTGATGGAACATAGTTTGAAAAGAAAGTCT
GmFbox13-R	CCGCTCGAGTCATACAGAAGCCTCTATCCTTTGG
GmFBA-F	GGGTTTCATATGATGGCCTCTGCATCAGCAT
GmFBA-R	CGCGGATCCTTAGTAGGAGTAGCCTTTGACG

1.4 共转化酵母感受态细胞及阳性克隆的鉴定与分析

使用 Frozen-EZ 酵母转化试剂盒制备 AH109 酵母感受态细胞,将 pGBKT7-*GmNF-YA13* 重组质粒和大豆文库(生长 20 d 大豆栽培品种 Williams 82 整株经 20% PEG 处理 12 h 的酵母文库)质粒共转化 AH109 酵母细胞,挑取 SD/-Trp/-Leu 缺陷型培养基上长出来的单菌落于 ddH₂O 中并测量 OD₆₀₀ 的吸光值,用 ddH₂O 稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.1 时,吸取 5 μL 接种在含有 40 μg·mL⁻¹ X-α-gal 的 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷型培养基上进行显色反应,倒置于 30 ℃ 恒温培养箱中,培养 2~4 d 后观察酵母细胞生长及显色情况,筛选蓝色阳性单克隆。

挑取适量阳性酵母菌落加入酵母裂解液中,于 PCR 仪中 98 ℃ 反应 20 min 后,取混合液作为模板进行 PCR 检测,选取插入片段大于 750 bp 的菌液 PCR 产物送至生工生物(上海)测序,测序结果经 DNAMAN 进行多序列比对后在 NCBI 数据库进行同源性分析,并在大豆数据库(<https://www.soybase.org/>)中进行功能预测。

从中挑选与胁迫相关的蛋白作为候选蛋白,根据其 CDS 序列设计特异性引物(表 1),以大豆叶片 cDNA 为模板扩增目的基因片段,并将其连接到 pGADT7 载体上。将构建好的重组载体质粒与 pGBKT7-*GmNF-YA13* 质粒共转化 AH109 酵母细胞,观察酵母细胞在不同营养缺陷型培养基上的生长及显色情况。

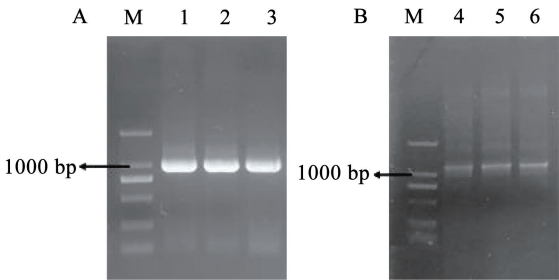
2 结果与分析

2.1 GmNF-YA13 诱饵载体的构建

将扩增得到的 *GmNF-YA13* 目的片段(图 1A)经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后,使用 T₄ 连接酶将其与线性化 pGBKT7 载体连接得到重组质粒,转化大肠杆菌感受态细胞,经菌液 PCR 检测(图 1B)及测序分析,获得含有 *GmNF-YA13* 基因的重组载体 pGBKT7-*GmNF-YA13*。实验室前期研究结果表明 pGBKT7-*GmNF-YA13* 无自激活现象,可以用于酵母双杂交文库筛选。

2.2 GmNF-YA13 互作蛋白的筛选与测序分析

将重组载体 pGBKT7-*GmNF-YA13* 诱饵质粒和大豆文库质粒混合后共转化酵母感受态细胞,涂布于营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu 与 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 缺陷型选择培养基上进行筛选,共得到出 85 个阳性克隆(图 2)。使用 pGADT7 载体的通用引物对显蓝的酵母单克隆进行 PCR 检测分析的结果显示,基因的片段大小各不相同,大部分集中在 1 000 bp 左右(图 3)。对扩增条带单一,大小在 750 bp 以上的 PCR 产物进行测序分析,利用 NCBI 数据库的 BLAST 工具比对分析测序结果,最后得到 36 个可能与 *GmNF-YA13* 互作的蛋白(表 2)。功能预测结果显示筛选出的互作蛋白参与生长发育、胁迫响应、能量代谢、离子运输、转录调控和信号转导等生物过程。



注:A. *GmNF-YA13* 基因克隆; B. 菌液 PCR 检测; M. 2K DNA Marker; 1~6. 目的条带。

Note: A. *GmNF-YA13* gene clone; B. PCR detection of bacterial solution; M. 2K DNA Marker; 1-6. Target band.

图 1 pGBKT7-*GmNF-YA13* 载体构建

Fig. 1 Construction of pGBKT7-*GmNF-YA13* vector

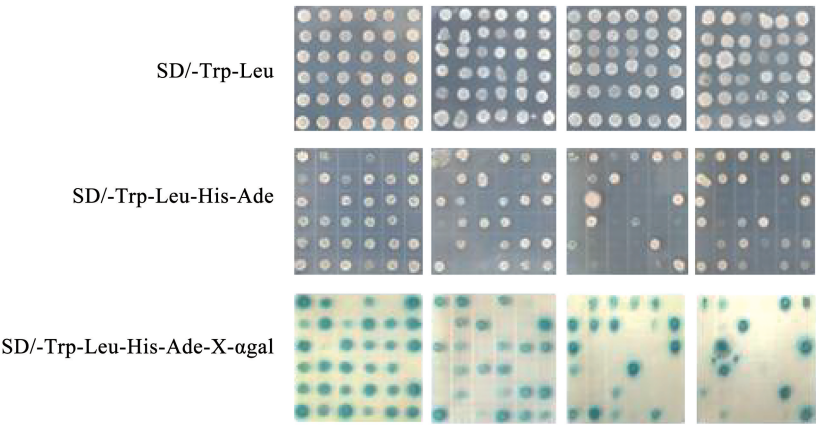
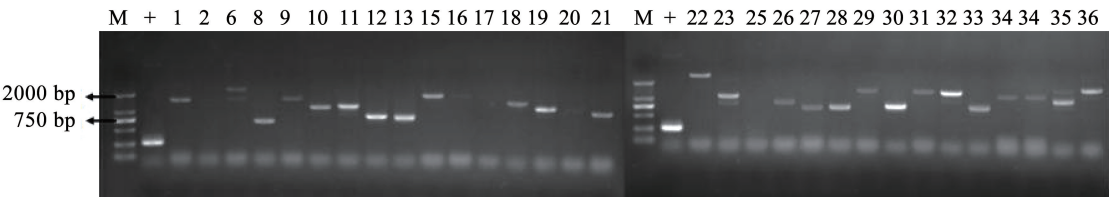


图 2 酵母双杂交结果

Fig. 2 Results of yeast two-hybrid



注：M. 2K DNA Marker；+. 阳性对照；1~36. 目的条带。

Note：M. 2K DNA Marker；+. Positive control；1-36. Target band.

图 3 阳性克隆 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of positive clones

表 2 酵母双杂交筛选的互作蛋白及其功能推测

Table 2 Interacting proteins screened by yeast two-hybrid and their functional speculations

编号 No.	基因座 Gene locus	基因描述 Gene description	功能预测 Speculative function
1	<i>Glyma. 19G220200</i>	S-腺苷甲硫氨酸合酶 1 Adenosylmethionine synthase 1	氨基酸的生物合成, 乙烯生物合成 Amino acid biosynthesis, ethylene biosynthesis
2	<i>Glyma. 02G142700</i>	OSB2 蛋白 Protein OSB2	细胞成分发生, 免疫系统过程, 防御反应的调节 Cellular components occur, immune system processes, and the regulation of defense responses
3	<i>Glyma. 06G172600</i>	甘油醛-3-脱氢酶 C 亚基 Glyceraldehyde-3-dehydrogenase C subunit	光合作用, 糖异生, 糖酵解 Photosynthesis, gluconeogenesis, glycolysis
4	<i>Glyma. 20G129300</i>	碳水化合物酯酶 At4g34215 Probable carbohydrate esterase At4g34215	水解酶活性 Hydrolase activity
5	<i>Glyma. 02G250700</i>	紫外线 b 受体 UVR8 Ultraviolet-B receptor UVR8	细胞对冷冻的反应, 木质素生物合成 Cell response to freezing, lignin biosynthesis
6	<i>Glyma. 06G056300</i>	铜转运 HMA8 P-ATP 酶 Copper-translocating HMA8 P-ATPase	铜离子运输 Copper ion transport
7	<i>Glyma. 11G111400</i>	果糖-二磷酸醛缩酶 1 Fructose-bisphosphate aldolase 1	对脱落酸的反应, 果糖 1, 6-二磷酸代谢过程, 糖异生 Response to abscisic acid, metabolic processes of fructose 1, 6-diphosphate, gluconeogenesis
8	<i>Glyma. 09G218500</i>	AP-4 复合物 ε 亚基 AP-4 complex subunit epsilon	生殖芽系统发育 Phylogeny of reproductive buds
9	<i>Glyma. 09G004400</i>	腺苷 5'-磷酸硫酸盐还原酶 Adenosine 5'-phosphosulfate reductase	硫酸盐同化、还原 Sulfate assimilation and reduction

表 2 (续)

编号 No.	基因座 Gene locus	基因描述 Gene description	功能预测 Speculative function
10	<i>Glyma. 13G289600</i>	DnaJ 和 4Fe-4S 双聚结构域含蛋白 DnaJ and 4Fe-4S dicluster domain- containing protein	细胞分解过程,细胞对光刺激的反应 Cell breakdown process, cell response to light stimulation
11	<i>Glyma. 06G176900</i>	伸长因子 Tu Elongation factor Tu	叶绿体组织、叶片发育 Chloroplast organization, leaf development
12	<i>Glyma. 16G142500</i>	EF-手钙结合家族蛋白 EF hand calcium-binding family protein	对茉莉酸的反应,对缺水的反应 Response to jasmonic acid, response to lack of water
13	<i>Glyma. 08G197500</i>	elf3 样蛋白 2 elf3-like protein 2	昼夜节律,调节花的发育,调节气孔运动,对脱落酸的反应,对冷的反应,DNA 结合转录因子活性,蛋白质结合 Circadian rhythms, regulating flower development, regulating stomatal movement, response to abscisic acid, response to cold, DNA-binding transcription factor activity, protein binding
14	<i>Glyma. 13G202200</i>	类胡萝卜素 9,10-裂解双加氧酶 Carotenoid 9,10-cleavage dioxygenase	胡萝卜素分解过程,缺水反应,叶黄素分解过程 Carotene decomposition process, dehydration reaction, lutein decomposition process
15	<i>Glyma. 05G007100</i>	叶绿体碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	气孔发育的负调节,气孔运动的调节,对寒冷的反应 Negative regulation of stomatal development, regulation of stomatal movement, response to cold
16	<i>Glyma. 18G036400</i>	核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶激活酶 Ribulose bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase	气孔发育的负调节,气孔运动的调节,对寒冷的反应 Negative regulation of stomatal development, regulation of stomatal movement, response to cold
17	<i>Glyma. 02G104600</i>	UDP-葡萄糖基转移酶 73B2 UDP-glucosyl transferase 73B2	细胞对缺氧的反应,对其他有机体的反应 Cells respond to hypoxia, respond to other organisms
18	<i>Glyma. 07G108100</i>	泛素羧基末端水解酶 Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase	第二类内含子剪接,光合作用 Type II intron splicing, photosynthesis
19	<i>Glyma. 13G289400</i>	转录因子 WRKY52 WRKY transcription factor 52	茉莉酸介导的信号通路,有机酸生物合成过程,植物表皮发育,缺水反应,伤害反应,根系发育 Jasmonate-mediated signaling pathway, organic acid biosynthesis process, plant epidermal development, dehydration response, injury response, root development
20	<i>Glyma. 20G149900</i>	表皮模式因子-like 蛋白 5 EPIDERMAL PATTERNING FACTOR- like protein 5	保卫细胞分化、气孔复合发育 Guard cell differentiation and stomatal compound development
21	<i>Glyma. 14G105800</i>	F-box 蛋白 13 Fbox protein 13	泛素依赖的蛋白质分解过程 Ubiquitin-dependent protein breakdown
22	<i>Glyma. 03G014600</i>	NAD 依赖性苹果酸酶 2 NAD-dependent malic enzyme 2	苹果酸代谢过程 Malate metabolism process
23	<i>Glyma. 16G092200</i>	磷酸肌醇激酶 Inositol phosphate kinase	肌醇磷酸化,肌醇六磷酸生物合成工艺 Inositol phosphorylation, biosynthesis process of inositol hexaphosphate
24	<i>Glyma. 12G169600</i>	铁氧还蛋白-A Ferredoxin-A	光合适应,光合电子传递链,对光刺激的响应 Photosynthetic adaptation, photosynthetic electron transport chain, response to light stimulation
25	<i>Glyma. 11G111100</i>	果糖-二磷酸醛缩酶 1 Fructose-bisphosphate aldolase 1	戊糖-磷酸盐分流,对脱落酸的反应 Pentose-phosphate shunt, response to abscisic acid
26	<i>Glyma. 09G273500</i>	甘露聚糖内嵌酶 1,4-甘露糖苷酶 Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	种子萌发 Seed germination

表 2 (续)

编号 No.	基因座 Gene locus	基因描述 Gene description	功能预测 Speculative function
27	<i>Glyma. 14G182100</i>	NADPH:P450 还原酶 NADPH:P450 reductase	苯丙烷类化合物的代谢过程,对氧化应激的反应 Metabolic processes of phenylpropanoids in response to oxidative stress
28	<i>Glyma. 06G242900</i>	3 型金属硫蛋白 MT3 Type 3 metallothionein MT3	细胞内铜离子稳态,激素介导的信号通路,对细胞分裂素的反应 Intracellular copper homeostasis, hormone-mediated signaling pathway, response to cytokinins
29	<i>Glyma. 19G091400</i>	核糖核苷-二磷酸还原酶小链 Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	DNA 修复,DNA 复制,多细胞生物发育,程序性细胞死亡,细胞周期调控 DNA repair, DNA replication, multicellular development, programmed cell death, cell cycle regulation
30	<i>Glyma. 08G116900</i>	可能的巯基蛋白酶-like Probable thiol protease-like	细胞分化,植物表皮的发育,蛋白质对细胞器的定位,根的形态发生,信号转导 Cell differentiation, plant epidermal development, localization of proteins to organelles, root morphogenesis, signal transduction
31	<i>Glyma. 02G069200</i>	蛋白开花位点 T-like Protein FLOWERING LOCUS T-like	程序性细胞死亡,参与细胞发育 Programmed cell death, involved in cell development
32	<i>Glyma. 14G021800</i>	GDP-L-半乳糖磷酸化酶 1-like GDP-L-galactose phosphorylase 1-like	L-抗坏血酸生物合成与代谢过程,热反应,茉莉酸反应 L-ascorbic acid biosynthesis and metabolic processes, thermal reaction, jasmonic acid reaction
33	<i>Glyma. 06G313200</i>	U11/U12 小核核糖核蛋白 U11/U12 small nuclear ribonucleo protein	发育过程,mRNA 剪接,调节细胞分裂 Developmental processes, mRNA splicing, regulation of cell division
34	<i>Glyma. 04G015900</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 B Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic-like	还原性戊糖-磷酸循环,对冷的反应,对光刺激的反应 The reduced pentose phosphate cycle, response to cold, response to light stimulation
35	<i>Glyma. 11G194600</i>	含重金属相关结构域的蛋白 Heavy-metal-associated domain- containing protein	花发育的负调控 Negative regulation of flower development
36	<i>Glyma. 07G168500</i>	1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶同源物 4 Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4	细胞对水杨酸刺激的反应,对信号转导的反应 Cell response to salicylic acid stimulation, response to signal transduction

2.3 GmNF-YA13 互作蛋白回转验证

将 GmUVR8、GmCML41、GmFbox13 和 GmFBA 的全长 CDS 分别与 pGADT7 连接,获得重组载体,且与 pGBKT7-*GmNF-YA13* 分别共转化酵母菌

AH109。结果显示,在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal 培养基上,除转化 GmFBA 质粒外,其余均不能正常生长(图 4),说明只有 GmFBA 与 GmNF-YA13 存在蛋白水平的相互作用。

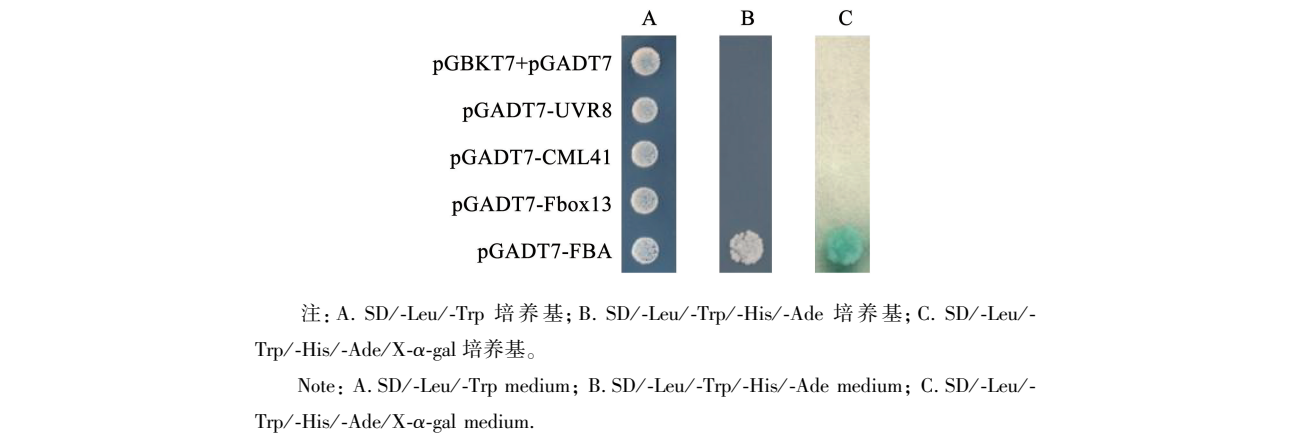


图 4 酵母双杂交验证结果
Fig.4 Results of yeast two-hybrid validation

3 讨论

栽培大豆属于甜土植物,生长过程中需水量较高,由于根系不发达且叶片蒸腾系数高,极易受到干旱、盐碱等非生物胁迫的影响^[18-19]。NF-Y 可以降低干旱、盐等胁迫对大豆的伤害,还能增加胁迫条件下大豆的产量和品质,但其作用机制还有待深入研究^[20-22]。本研究筛选到 36 个可能与 GmNF-YA13 相互作用的蛋白质,包含 WRKY52、Fbox13 等调节蛋白。已有研究发现 WRKY 蛋白和 Fbox 蛋白均参与植物逆境响应,如在盐和干旱胁迫条件下 *GmWRKY12* 表达量升高,增强了大豆植株的耐旱性和耐盐性^[23]; *GmFBX176* 可以通过 ABA 介导的信号途径负调控植物的耐旱性和耐盐性^[24]。此外,互作蛋白中还包含 21 种酶,包括 s-腺苷甲硫氨酸合酶、甘油醛脱氢酶、碳水化合物酯酶、铜转运 HMA8P-ATP 酶、果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶、叶绿体碳酸酐酶等,多与生长发育、胁迫响应和信号转导相关,表明 GmNF-YA13 应在大豆生长发育和胁迫响应过程中发挥重要功能。

果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶广泛存在于植物体内,参与糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径及光合作用中的卡尔文循环。该酶能够响应多种胁迫,促进果糖 1, 6-二磷酸的可逆性裂解,并参与细胞的内吞和膜泡运输,同时还参与非生物胁迫应答过程^[25]。Cai 等^[26]发现,低温胁迫会使番茄 (*Solanum lycopersicum*) 幼苗中 FBA 的表达量及酶活性发生显著变化,抑制 *SIFBA7* 的表达后,转基因番茄植株的净光合速率、核酮糖-1, 5-二磷酸和可溶性糖含量、茎粗、干重和种子大小都有所下降,体内超氧阴离子 (O_2^-) 和过氧化氢 (H_2O_2) 水平升高,这些结果说明了 *SIFBA7* 在调节番茄幼苗生长和耐冷性方面的重要作用。Fan 等^[27]发现马齿苋 (*Sesuvium portulacastrum*) 中 *SpFBA* 在根中高表达且受到海水、NaCl、ABA 和 PEG 等非生物胁迫的诱导,过表达重组 *SpFBA* 使转基因大肠杆菌耐盐能力增强。这些结果表明,*SpFBA* 在应对盐胁迫及相关的非生物刺激,提高马齿苋在高盐和干旱条件下的生存能力方面发挥着重要作用。GmNF-YA13 与 GmFBA 的互作也暗示了 GmNF-YA13 功能的多样性。

酵母双杂交作为经典的蛋白互作实验,自 1989 年被 Fields 等^[28]报道以来,广泛应用在大豆^[29]、水稻^[30]、草莓^[31]等作物研究中,取得了十分丰硕的成果,但因假阳性较高也存在一些局限性。李涵哲^[32]在使用酵母双杂交筛选到大豆 GmNF-YB1 的互作蛋白后,又使用了凝胶阻滞实验 (EMSA) 对蛋白间

的互作关系进行了验证;范延良等^[33]使用酵母双杂交筛选到茶树 CsHIPP26.1 的互作蛋白后,进一步通过体外 pull-down 实验和体内双分子荧光互补实验 (BiFC) 确定了 CsHIPP26.1 与 CsPIF4.2 的互作关系。本研究选取了 4 个蛋白进行酵母回转验证,结果显示只有 GmFBA 能与 GmNF-YA13 互作,后续仍需补充 pull-down 或双分子荧光互补等实验进一步对蛋白之间的互作关系进行验证。

4 结论

本研究克隆了 *GmNF-YA13* 基因并构建了其酵母诱饵载体 pGBKT7-*GmNF-YA13*,利用前期构建的大豆 cDNA 文库筛选到 36 个 GmNF-YA13 的候选互作蛋白,候选蛋白大多参与生长发育、胁迫响应、能量代谢、离子转运、转录调控和信号转导等过程。通过酵母回转试验进一步验证了 GmNF-YA13 与 GmFBA 的互作,暗示大豆 GmNF-YA13 功能的发挥可能需要 GmFBA 蛋白的参与。

参考文献

- [1] DOLFINI D, GATTA R, MANTOVANI R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 47(1): 29-49.
- [2] LALOUM T, DE MITA S, GAMAS P, et al. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? [J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(3): 157-166.
- [3] 李世贵, 马瑞, 王芳芳, 等. 植物 NF-Y 转录因子研究进展 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 248-256. (LI S G, MA R, WANG F F, et al. Research progresses on plant NF-Y transcription factors [J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(2): 248-256.)
- [4] ZHOU Y, ZHANG Y, WANG X, et al. Root-specific NF-Y family transcription factor, PdNF-YB21, positively regulates root growth and drought resistance by abscisic acid-mediated indoleacetic acid transport in Populus [J]. The New Phytologist, 2020, 227(2): 407-426.
- [5] JIAO Z, LIAN C, HAN S, et al. PtmR169o plays a positive role in regulating drought tolerance and growth by targeting the PtnF-YA6 gene in poplar [J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 189: 104549.
- [6] YU Y, BAI Y, WANG P, et al. Soybean nuclear factor YA10 positively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 180: 104249.
- [7] XIONG Y, REN Y, LI W, et al. NF-YC12 is a key multifunctional regulator of accumulation of seed storage substances in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(15): 3765-3780.
- [8] HUANG M, HU Y, LIU X, et al. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 mediates postembryonic development via interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR4 [J]. The Plant

- Cell, 2015, 27(11): 3099-3111.
- [9] HWANG K, SUSILA H, NASIM Z, et al. *Arabidopsis* ABF3 and ABF4 transcription factors act with the NF-YC complex to regulate SOC1 expression and mediate drought-accelerated flowering[J]. Molecular Plant, 2019, 12(4): 489-505.
- [10] MA X J, FU J D, TANG Y M, et al. *GmNFYA13* improves salt and drought tolerance in transgenic soybean plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 587244.
- [11] MA X J, YU T F, LI X H, et al. Overexpression of *GmNFYA5* confers drought tolerance to transgenic *Arabidopsis* and soybean plants[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 123.
- [12] LU L, WEI W, TAO J J, et al. Nuclear factor Y subunit *GmNFYA* competes with *GmHDA13* for interaction with *GmFVE* to positively regulate salt tolerance in soybean [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(11): 2362-2379.
- [13] OLDFIELD A J, YANG P, CONWAY A E, et al. Histone-fold domain protein NF-Y promotes chromatin accessibility for cell type-specific master transcription factors[J]. Molecular Cell, 2014, 55(5): 708-722.
- [14] 宋秋明, 李大勇, 张慧娟, 等. 植物 NF-Y 转录因子的生物学功能及其研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 623-632. (SONG Q M, LI D Y, ZHANG H J, et al. NF-Y transcription factors and their biological functions in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(5): 623-632.)
- [15] ZHOU H, ZENG R F, LIU T J, et al. Drought and low temperature-induced NF-YA1 activates FT expression to promote citrus flowering[J]. Plant, Cell & Environment, 2022, 45(12): 3505-3522.
- [16] YU T F, LIU Y, FU J D, et al. The NF-Y-PYR module integrates the abscisic acid signal pathway to regulate plant stress tolerance [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(12): 2589-2605.
- [17] 倪志勇. 大豆抗逆相关 *miR169c* 及其靶位点 *GmNFYA3* 和 *miR394a* 的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013. (NI Z Y. Functional study of stress-responsive *miR169c* and its target gene *GmNFYA3* and *miR394a* from soybean (*Glycine max* L. Merr) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.)
- [18] 李丹, 靳鲲鹏, 李小霞, 等. 大豆抗旱性鉴定、评价方法研究进展[J]. 北方农业学报, 2020, 48(4): 48-53. (LI D, JIN K P, LI X X, et al. Research progress on identification method and evaluation criterion of soybean drought resistance[J]. Journal of Northern Agriculture, 2020, 48(4): 48-53.)
- [19] 李琬. 干旱对大豆根系生育的影响及灌溉缓解效应研究进展[J]. 草业学报, 2019, 28(4): 192-202. (LI W. Research progress in understanding the effects of drought on growth of the soybean root system and the efficiency of irrigation [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(4): 192-202.)
- [20] NI Z, HU Z, JIANG Q, et al. *GmNFYA3*, a target gene of *miR169*, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(1): 113-129.
- [21] LI M, YU T F, XU Z S, et al. Soybean transcription factor gene *GmNF-YCa* enhances osmotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2017, 43(8): 1161.
- [22] 白玉翠, 王萍, 倪志勇, 等. 大豆 *GmNF-YA11* 基因克隆及特征分析[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 719-725. (BAI Y C, WANG P, NI Z Y, et al. Cloning and characterization of *GmNF-YA11* gene in soybean[J]. Soybean Science, 2019, 38(5): 719-725.)
- [23] SHI W Y, DU Y T, MA J, et al. The WRKY transcription factor *GmWRKY12* confers drought and salt tolerance in soybean [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4087.
- [24] YU Y, WANG P, BAI Y, et al. The soybean F-box protein *GmFBX176* regulates ABA-mediated responses to drought and salt stress [J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 176: 104056.
- [25] 肖舒文, 胡永红. 果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶的研究进展[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2022, 46(3): 297-303. (XIAO S W, HU Y H. Research progress of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase [J]. Journal of Hebei Normal University (Natural Science), 2022, 46(3): 297-303.)
- [26] CAI B, LI Q, LIU F, et al. Decreasing fructose-1, 6-bisphosphate aldolase activity reduces plant growth and tolerance to chilling stress in tomato seedlings [J]. Physiologia Plantarum, 2018, 163(2): 247-258.
- [27] FAN W, ZHANG Z, ZHANG Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum* [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 975-984.
- [28] FIELDS S, SONG O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340: 245-246.
- [29] 周汐, 张璟曜, 姚敏磊, 等. 大豆酵母杂交 cDNA 文库的构建及 *GmSPX3* 互作蛋白的筛选[J]. 大豆科学, 2016, 35(1): 18-24. (ZHOU X, ZHANG J Y, YAO M L, et al. Construction of yeast hybrid cDNA library and screening of interaction proteins of *GmSPX3* in soybean[J]. Soybean Science, 2016, 35(1): 18-24.)
- [30] 孙一丁, 杨奕, 刘畅媛, 等. 水稻酵母双杂交文库构建及 PID2 胞内结构域互作蛋白的筛选[J]. 分子植物育种, 2021, 20(12): 3931-3937. (SUN Y D, YANG Y, LIU C Y, et al. Construction of a rice yeast two hybrid library and screening of PID2 intracellular domain interaction proteins[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 20(12): 3931-3937.)
- [31] 谷思, 刘璐, 李安然, 等. 草莓果实酵母双杂交文库的构建及 *FvM4K1* 互作蛋白的筛选[J]. 园艺学报, 2021, 48(6): 1067-1078. (GU S, LIU L, LI A R, et al. Construction of a yeast two hybrid library for strawberry fruit and screening of *FvM4K1* interacting proteins[J]. Journal of Horticulture, 2021, 48(6): 1067-1078.)
- [32] 李涵哲. 大豆 *GmNFYB1* 互作蛋白分析及与干旱相关下游基因分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016. (LI H Z. Analysis of interacting protein and downstream gene related to *GmNFYB1* drought tolerant gene of soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.)
- [33] 范延良, 王域, 刘富浩, 等. 茶树 *Cs HIPP26.1* 互作蛋白的筛选与验证[J]. 中国农业科学, 2022, 55(8): 1630-1641. (FAN Y G, WANG Y, LIU F H, et al. Screening and verification of *CsHIPP26.1* interaction protein in tea plant [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(8): 1630-1641.)