

大豆胚发育期酵母双杂文库的构建及与 bHLH 转录因子互作蛋白的筛选

刘德泉,郭文云,何则铭,苏连泰,李景文,王 英,张海军,王庆钰

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘 要:构建了大豆幼胚生长期 20 ~ 50 d DSN (duplex-specific nulease) 均一化 cDNA 酵母双杂文库,总克隆数为 2.8×10^7 cfu。为了筛选能与已知大豆 bHLH 转录因子 GmbHLH3a 相互结合的蛋白质,以转录因子 GmbHLH3a 为诱饵蛋白构建诱饵载体,GmbHLH3a 诱饵载体无自激活活性,通过酵母双杂筛选到了两个能与诱饵蛋白相互作用的蛋白及其序列。

关键词:大豆;发育;酵母双杂;转录因子;cDNA 文库

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 05. 0789

Yeast Two-hybrid cDNA Library Construction of Soybean Embryo Developmental Phase and Screening of Proteins Interacting with Soybean bHLH Transcription Factor

LIU De-quan, GUO Wen-yun, HE Ze-ming, SU Lian-tai, LI Jing-wen, WANG Ying, ZHANG Hai-jun, WANG Qing-yu
(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In present study, DSN (duplex-specific nulease)-normalization yeast two-hybrid cDNA libraries of soybean seed development from 20 to 50 days after flowering were constructed. The total clone number was 2.8×10^7 cfu. In order to obtain the proteins that could bind with the known soybean bHLH transcription factor GmbHLH3a, the bait plasmid of GmbHLH3a, whose carrier has no auto-activation, was constructed. Through yeast two-hybrid screening, two proteins which could interact with the bait plasmid and their corresponding sequences were acquired.

Keywords: Soybean; Development; Yeast two-hybrid; Transcription factors; cDNA library

大豆作为世界主要的油料作物之一,其种子中积累着大量的蛋白质、油脂和碳水化合物,约占种子干重的 90% 以上^[1],大豆幼胚发育过程中,伴随着蛋白质、油脂及多种次级代谢产物的积累^[2-3]。大豆的种子发育受品种和环境的影响,精确的时间并不相同^[4]。通常称受精的第一天为 R1 (初花期),在 R3 (初荚期,开花后第 12 天)到 R4 (盛荚期,开花后第 24 天)豆荚开始伸长,R4 到 R7 (初熟期)的种子开始大量积累蛋白质、油脂和次级代谢产物,在 R6 (鼓粒满期),植株营养部分开始变黄并伴随着叶片衰老,并且有大量储藏蛋白质积累^[5-6],此过程中有一系列的基因进行时空表达,且存在多个蛋白质的相互作用。这些不同时空表达的基因和多蛋白的互作控制着幼胚代谢及增殖分化。通过研究大豆幼胚发育过程的基因调控及协同作用,能够更好地掌握大豆种子在发育过程中营养物质的积累过程,从而更有效的开展大豆品种的栽培及选育工作。当前研究蛋白质相互作用的工作正处于上升阶段,而在作物中有关蛋白间互作的研究起

步相对较晚,所以建立种子幼胚发育期的酵母双杂 cDNA 文库能够更好开展种子发育期蛋白质互作的工作。

bHLH 转录因子作为转录因子家族中较大的一个家族^[7],参与调控多个植物代谢途径及生长发育过程^[8-9],在调控类黄酮生物合成方面已有多篇报道^[10-14]。在单独转入 bHLH 转录因子的植株中不一定能够恢复突变体的表型^[15],这说明 bHLH 转录因子需要与其他的转录因子形成转录复合体共同参与调控过程。本研究利用 GmbHLH3a 转录因子构建诱饵蛋白载体,筛选大豆籽粒发育期酵母双杂文库,研究与 GmbHLH3a 存在互作的转录因子类蛋白质,以期为进一步阐明 bHLH 转录因子参与的调控通路提供研究信息。

1 材料与方法

1.1 材料

以吉林 32 大豆品种作为建库材料,通过 Invitro-

收稿日期:2014-12-17
基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划子任务(2011BAD35B06-2);国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08004-003);国家自然科学基金面上项目(31371641)。
第一作者简介:刘德泉(1988-),男,硕士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:dequanliu1988@qq.com。
通讯作者:王庆钰(1963-),女,博士,教授,主要从事基因工程在育种上的应用研究。E-mail:qywang@jlu.edu.cn。

gen 公司合成大豆籽粒生长期均一化酵母单双杂通用 cDNA 文库;酵母单双杂通用载体 pGADT7-DEST (Invitrogen 公司);克隆载体 pMD-18T(Takara 公司);Clontech 公司的酵母双杂系统;质粒试剂盒中提 (Biomiga 公司)。pGBKT7 酵母双杂载体,pMD-18T-*GmbHLH3a* 质粒,酵母菌 Y2H Gold Yeast Strain 及大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (用于感受态细胞制备),均由吉林大学植物种质资源研究与利用研究室保存。

1.2 方法

1.2.1 大豆籽粒生长期均一化酵母双杂交 cDNA 文库构建 选取生长状态正常、植株开花后 20,25,

30,35,40,45 及 50 d 的第四节豆荚(图 1),并剥取籽粒,-80 $^{\circ}$ C 保存。分别提取不同时间点多粒混合总 RNA,等质量混合各组样品用于 cDNA 文库构建。然后,取 Invitrogen 公司合成的酵母双杂文库原液 10 μ L 稀释 1 000 倍后,从中取出 50 μ L 涂布于 LB 固体培养基(100 μ g \cdot mL $^{-1}$ Kan),37 $^{\circ}$ C 培养过夜后第 2 天计数。随机挑选单一菌落进行菌液 PCR,并计算重组率和插入片段长度。最后,从 cDNA 文库菌种中取出 600 μ L 菌液接种于 100 mL 肉汤培养基中,30 $^{\circ}$ C,200 r \cdot min $^{-1}$ 培养,当 OD(吸光度)到达 0.6 时收集菌液,按照中抽质粒的试剂盒操作方法抽提质粒,库质粒于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

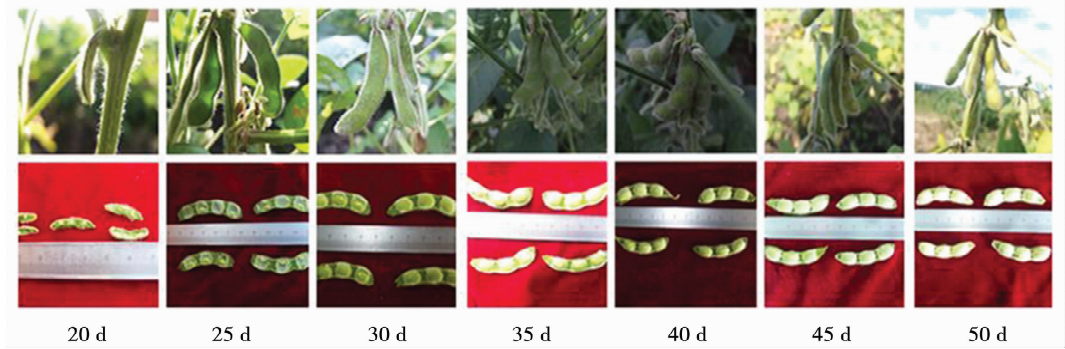


图 1 不同时期的大豆籽粒生长情况

Fig. 1 The growth of soybean grain in different developing periods

1.2.2 诱饵载体的构建和自激活检测 将 pGBKT7 分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 限制性内切酶酶切 1.5 h 后回收酶切产物;将回收产物与带有 *Eco*RI 和 *Bam*HI 粘性末端的 *GmbHLH3a* 连接(图 2)。连接体系:pGBKT7 回收物 15 ng、粘性末端 *GmbHLH3a* 60 ng、10 \times T4 DNA ligase buffer 1 μ L、T4 DNA ligase 0.5 μ L、H $_2$ O 5.4 μ L,16 $^{\circ}$ C 温育 15 h;连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后取 50 μ L 稀释 10 倍涂布

于固体 LB (附加 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ Kan) 上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;挑取单菌落接种于 LB 液体培养基 (附加 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ Kan),37 $^{\circ}$ C,200 r \cdot min $^{-1}$ 培养 14 h,当菌液 OD 约为 0.5~0.6 时收集菌体,提取质粒并进行酶切和电泳验证。使用 Clontech 公司的酵母感受态细胞转化 pGBKT7-*GmbHLH3a* 诱饵蛋白质,在 DDO/A/X (-Leu/-Trp/AbA/X- α -gal) 固体选择培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 72 h,观察是否蓝斑菌株生长。

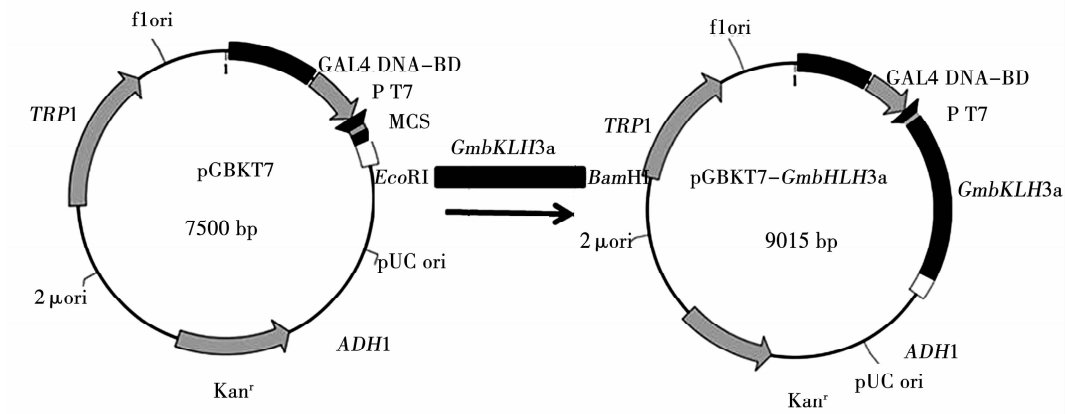


图 2 pGBKT7-*GmbHLH3a* 诱饵蛋白载体的构建

Fig. 2 Construction of the bait plasmid of pGBKT7-*GmbHLH3a*

1.2.3 酵母双杂交体系筛选与 *GmbHLH3a* 互作蛋白 使用 Clontech 公司的酵母双杂系统制备的酵母感受态细胞对库质粒和 pGBKT7-*GmbHLH3a* 诱饵质

粒进行共转化,在 DDO/A/X (-Leu/-Trp/AbA/X- α -gal) 固体选择培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 72 h,挑取蓝色阳性菌落,使用 10 μ L 0.9% (w/v) NaCl 稀释菌落,各

取 3 μL 分别滴于 DDO/A/X 和 QDO/A/X (-Ade/-His/-Leu/-Trp/AbA/X- α -gal) 固体选择培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h,待酵母菌落生长良好挑取酵母单菌落进行 PCR 鉴定分析。挑取单菌落接种于 YPDA 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 230 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 16 h,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,收集菌体,液氮冷冻,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻,重复 3 次,使用碱法提取酵母质粒。提取的酵母质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,取 200 μL 涂布于固体 LB(附加 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp)上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp),37 $^{\circ}\text{C}$,200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 14 h,当菌液 OD 约为 0.5~0.6 时收集菌体,提取质粒。PCR 检测提取质

粒并对质粒测序验证,测序正确质粒保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。提取得到不同的 pGADT7-DEST-cDNA 质粒与 pGBKT7-*GmbHLH3a* 进行酵母双杂试验,方法同上。

2 结果与分析

2.1 酵母文库重组率和插入片段长度鉴定

随机挑取文库细菌原液长出的 24 个克隆酵母菌落,用 T7、ADR 通用引物进行 PCR 扩增检测。结果表明:插入片段长度在 0.8~3 kb,插入率 96% (图 3)。

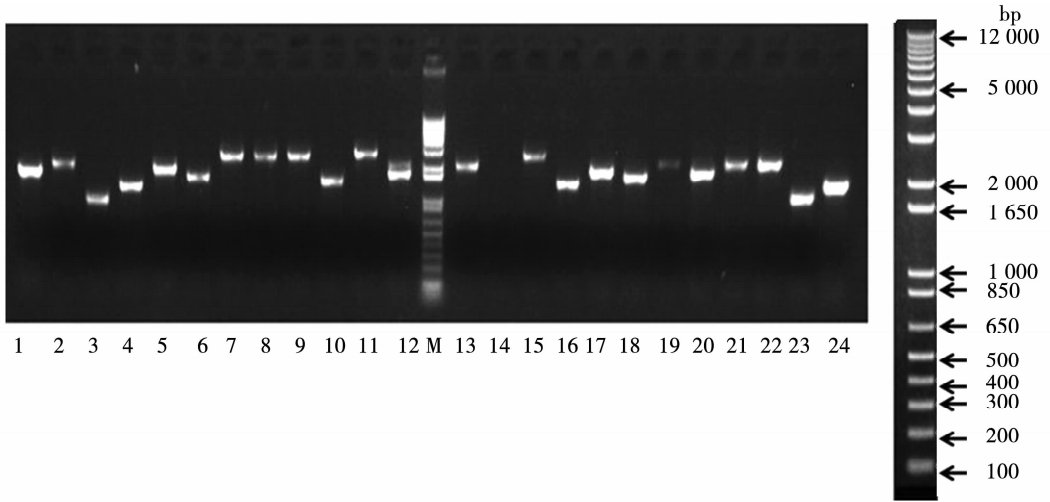


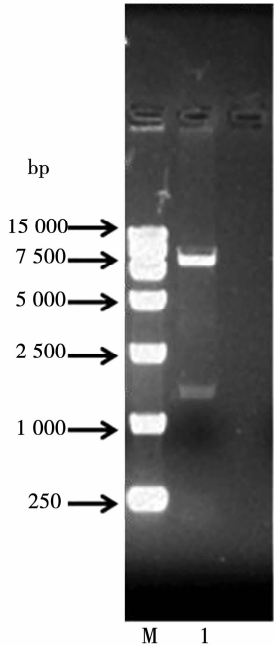
图 3 均一化 cDNA 酵母双杂文库载体 pGADT7-cDNA-DEST 的 PCR 产物
Fig. 3 The PCR product of DSN normalization yeast two-hybrid cDNA library pGADT7-cDNA-DEST

2.2 诱饵载体的构建和自激活检测

将构建完整的 pGBKT7-*GmbHLH3a* 载体质粒用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶酶切 1.5 h,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳验证(图 4)。对比载体插入片段测序结果,证明载体构建正确。诱饵载体自激活检测结果为阴性(图 5),证明 pGBKT7-*GmbHLH3a* 载体可用于酵母双杂实验。

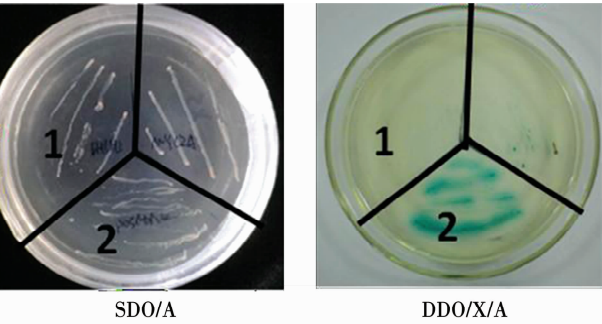
2.3 与 GmbHLH3a 互作蛋白的筛选

对酵母双杂文库进行筛选,通过 6 次筛选后得到 15 个阳性克隆,对这 15 个阳性克隆菌株进行保存并提取质粒验证(图 6-7),质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后进行测序验证并保存,得到两个具有研究价值的 pGADT7-DEST-cDNA 质粒,与 pGBKT7-*GmbHLH3a* 质粒再次进行酵母双杂交互作验证,同样阳性克隆菌株在 QDO/A/X 生长良好(图 8)。通过对捕获载体测序得到两个阳性克隆质粒 AD1-1 和 AD5-1,分别为大豆番茄红素环化酶蛋白和大豆半胱氨酸蛋白酶转录本片段。用在线软件 BaCello (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>) 预测结果表明两者均定位于细胞核中。



M:15000bp DNA ladder;1:重组载体酶切鉴定。
M:15 000 bp DNA ladder;1:Restriction enzyme identification of recombinant vector.

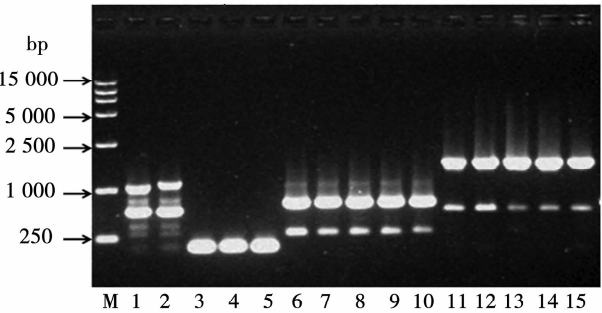
图 4 诱饵载体双酶切
Fig. 4 Restriction enzyme identification of bait carrier



1:转化 pGBKT7-*GmbHLH3a* 的酵母菌生长情况;2:阳性对照菌株。
1:The growth of pGBKT7-*GmbHLH3a* in yeast strains; 2: Positive control.

图 5 诱饵载体自激活检测

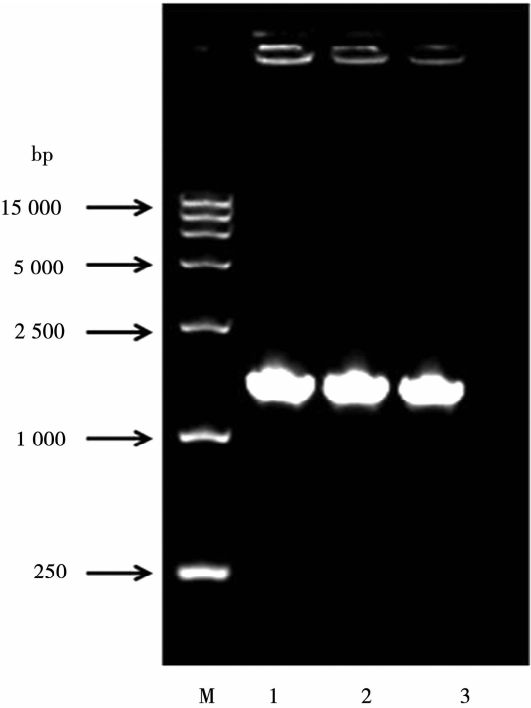
Fig. 5 Testing of bait carrier for auto-activation



M:15 000 bp DNA ladder; 1: AD3-1; 2: AD3-2; 3: AD2-1; 4: AD2-2; 5: AD2-3; 6: AD1-1; 7: AD1-2; 8: AD1-3; 9: AD1-4; 10: AD1-5; 11: AD5-1; 12: AD5-2; 13: AD5-3; 14: AD5-4; 15: AD5-5

图 6 酵母双杂阳性克隆菌株 PCR 产物

Fig. 6 The PCR product of Yeast two-hybrid positive clone strains



M:15 000 bp DNA ladder; 1: *GmbHLH3a* 基因 PCR 阳性对照; 2: AD1-1 PCR 产物; 3: AD5-1 PCR 产物。
M:15 000 bp DNA Ladder; 1: The positive control of *GmbHLH3a*; 2: The PCR product of AD1-1; 3: The PCR product of AD5-1.

图 7 酵母阳性克隆菌株 PCR 产物

Fig. 7 The PCR product of yeast two-hybrid positive clone strains

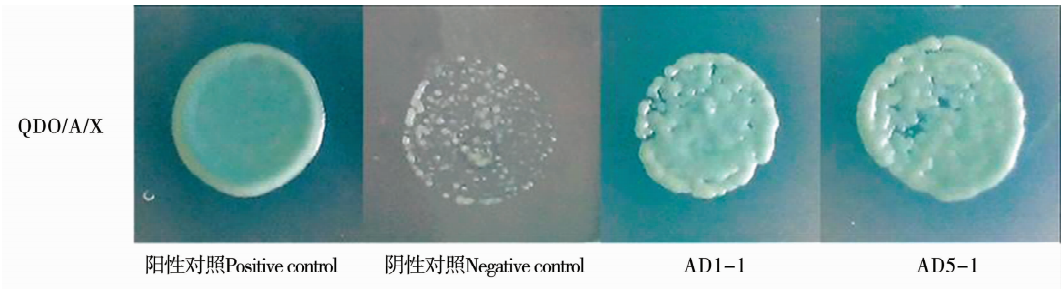


图 8 酵母双杂菌落图

Fig. 8 Colony image of yeast two-hybrid

3 结论与讨论

酵母双杂 cDNA 文库是当前最为常用、最为可靠的研究蛋白质相互作用的实验方法^[16],本研究选取 20 ~ 50 d 同一结荚位置多株豆荚,随后提取高质量的总 RNA,等质量混合各组样品用于 cDNA 文库的构建。在基因型一致的前提下,最大限度的减少了环境影响造成的基因表达量的变化,并能够包含

相对完整的大豆籽粒不同发育期的 EST 序列。通过 DNS 均一化方法,增大了低丰度基因的拷贝数,克服了由于高丰度基因的多拷贝对于后期酵母双杂交实验大量重复阳性结果的干扰,并且增加了低拷贝数基因被筛选到的几率。最终本研究得到总克隆数 2.8×10^7 cfu,插入片段长度在 0.8 ~ 3.0 kb,插入率 96% 的 DSN 均一化酵母双杂交 cDNA 文库,相关参数均符合高质量文库的标准。为进一步研

究大豆籽粒发育期间蛋白质相互作用及协同调控的研究奠定了基础。

bHLH3 作为 bHLH 转录因子第 III d 亚族的成员之一,这一转录因子家族已在多种植物中证明其参与调控类黄酮代谢^[14],并抑制花青素合成。迄今为止,已在拟南芥、牵牛花及玉米等植物中证实 bHLH 转录因子能够与 JAZ、MYB-R2R3、WD40 蛋白之间发生相互作用^[16-20]。但是作为一个大的转录因子家族,bHLH 转录因子是否与其他蛋白质之间存在相互作用还有待证明,因为研究表明转录因子之间常常相互结合形成不同的转录因子复合体参与复杂的转录调控^[21-22]。本研究构建了 Gm-bHLH3a 诱饵蛋白筛选酵母双杂文库,得到两个阳性克隆质粒 AD1-1 (Gene Bank No. KP297803) 和 AD5-1 (Gene Bank No. KP297802),为进一步阐明大豆胚发育期基因的协同调控,及探究 bHLH 转录因子与不同蛋白之间形成蛋白质复合体提供了可靠信息。其中 AD5-1 在细胞核内的研究只在 Micheal Water^[23]中有所阐述。但只通过序列比对和预测还不能确定其是否参与调控类黄酮代谢,后续还需要进一步研究进行验证。

参考文献

[1] 邱丽娟,王昌陵,周国安,等. 大豆分子育种研究进展[J]. 中国农业科学,2007,40(11):2418-2436. (Qiu L J, Wang C L, Zhou G A, et al. Soybean molecular breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2418-2436.)

[2] 孙君明,丁安林. 大豆种子发育过程中异黄酮的积累[J]. 植物生理学通讯,1998,34(1):10-13. (Sun J M, Ding A L. Accumulation of isoflavone of soybean seeds during development[J]. Plant Physiology Communication,1998,34(1):10-13.)

[3] Boerma H R, Specht J E. Soybeans: Improvement, production and uses[M]. Madison: American Society of Agronomy, 2004.

[4] Ritchie S W, Hanway J J, Thompson H E. How a soybean plant develops. Special Report,1996(53).

[5] Jones S I, Vodkin L O. Using RNA-Seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity[J]. PloS ONE, 2013, 8(3): e59270.

[6] Asakura T, Tamura T, Terauchi K, et al. Global gene expression profiles in developing soybean seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 52: 147-153.

[7] Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Cell Online, 2003, 15(11): 2497-2502.

[8] Komatsu K, Maekawa M, Ujiie S, et al. LAX and SPA: Major regulators of shoot branching in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(20): 11765-11770.

[9] Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, et al. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 1924-1935.

[10] Sweeney M T, Thomson M J, Pfeil B E, et al. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice[J]. The Plant Cell, 2006, 18(2): 283-294.

[11] Pauwels L, Barbero G F, Geerinck J, et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonatesignalling[J]. Nature, 2010, 464(7289): 788-791.

[12] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. The Plant Journal, 2008, 53(5): 814-827.

[13] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway[J]. Journal of Experimental Botany, 2011: 442.

[14] Artigot M P, Daydé J, Berger M. Expression of key genes of the isoflavonoid pathway in hypocotyls and cotyledons during soybean seed maturation[J]. Crop Science, 2013, 53(3): 1096-1108.

[15] Song S, Qi T, Fan M, et al. The bHLH subgroup III d factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(7): e1003653.

[16] Uetz P, Giot L, Cagney G, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature, 2000, 403(6770): 623-627.

[17] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity[J]. Molecular biology and evolution, 2003, 20(5): 735-747.

[18] Heisler M G, Atkinson A, Bylstra Y H, et al. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein[J]. Development, 2001, 128(7): 1089-1098.

[19] Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Galstyan A, et al. PAR1 and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks[J]. Plant Signaling & Behavior, 2008, 3(7): 453-454.

[20] Li S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex[J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(1): e27522.

[21] Feller A, Machemer K, Braun E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. The Plant Journal, 2011, 66(1): 94-116.

[22] Grotewold E, Sainz M B, Tagliani L, et al. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(25): 13579-13584.

[23] Micheal W, Christina C, Katia S, et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. The Plant Journal, 2004, 40: 428-438.