

大豆酵母杂交 cDNA 文库的构建及 GmSPX3 互作蛋白的筛选

周 汐,张璟曜,姚敏磊,谢凤斌,盖钧镒,杨守萍

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘 要:为研究 *GmSPX3* 在大豆低磷胁迫响应中的作用机制,寻找与 *GmSPX3* 发生相互作用的蛋白质,利用 Gateway 技术构建了低磷大豆根系酵母杂交 cDNA 文库,并使用 pGBKT7-*GmSPX3* 融合蛋白为诱饵,采用酵母双杂交方法筛选酵母杂交 cDNA 文库,经过显色反应验证后获得 21 个阳性克隆,通过生物信息学分析,选择 2 个转录因子编码基因 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 作为候选基因进行克隆,并分别构建 AD 载体 pGADT7-*GmUNE12* 和 pGADT7-*GmPosF21*,与诱饵 pGBKT7-*GmSPX3* 进行一对一互作验证,结果证明 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 蛋白均与 *GmSPX3* 诱饵蛋白发生了相互作用。

关键词:大豆;*GmSPX3* 基因;Gateway 技术;酵母杂交 cDNA 文库;酵母双杂交

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 01. 0018

Construction of Yeast Hybrid cDNA Library and Screening of Interaction Proteins of GmSPX3 in Soybean

ZHOU Xi, ZHANG Jing-yao, YAO Min-lei, XIE Feng-bin, GAI Jun-yi, YANG Shou-ping

(Soybean Research Institute/National Center for Soybean Improvement/MOA Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean(General)/National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To study the mechanism of *GmSPX3* in response to low phosphorus stress and search for the interaction proteins of *GmSPX3* in soybean, the present research constructed yeast hybrid cDNA library from the soybean root treated with low phosphorus by gateway technology. Furthermore, yeast hybrid cDNA library was screened through the method of yeast two-hybrid using pGBKT7-*GmSPX3* fusion protein as bait. After color reaction of validation, 21 positive clones were obtained. Two transcription factors *GmUNE12* and *GmPosF21* were chosen as the candidate genes for cloning by bioinformatics analysis. Two AD vectors of pGADT7-*GmUNE12* and pGADT7-*GmPosF21* were constructed. The results of one to one interaction demonstrated that *GmUNE12* and *GmPosF21* proteins interacted with *GmSPX3* bait protein, respectively.

Keywords: Soybean[*Glycine max* (L.) Merr.]; *GmSPX3* gene; Gateway technology; Yeast hybrid cDNA library; Yeast two-hybrid

磷作为生物体核酸和生物膜的组成成分,以及生物合成的重要底物,是植物必不可少的营养元素,也是限制作物产量的重要因素之一^[1]。然而,由于土壤中能够被直接利用的有效磷含量很少^[2],且植株对磷肥的利用率不高,使得磷肥的施用无法有效增加作物的生物产量,并导致环境污染^[3]。因此,寻找大豆耐低磷基因,培育能够高效利用土壤中有限磷元素的新品种,是提高大豆磷利用能力的一条高效、节能的有效途径^[4]。

在低磷响应相关基因的研究中,SPX 结构域在酵母和植物无机磷传输蛋白与信号传递蛋白中被发现^[5-6]。在含有 SPX 结构域的众多基因中,SPX 亚家族的基因被证实在磷的内环境稳定中扮演了重要角色,其中水稻的 *OsSPX1* 基因被证实经由一

种负反馈调控途径抑制无机磷的摄取^[7-9]。而对大豆 *SPX* 基因家族的研究证实,*GmSPX3* 位于大豆第四号染色体上,ORF 长度为 870 bp,编码 286 个氨基酸,含有 4 个外显子和 3 个内含子,具有 1 个 SPX 结构域,在磷代谢通路中起正向调节的作用^[10]。

酵母双杂交技术是一种直接在活体内验证蛋白与蛋白之间相互作用的方法^[11],利用该技术从 cDNA 文库中直接筛选与已知蛋白质相互作用的其它蛋白质,是一种高效发掘新基因、探索基因调控网络的方法。植物主要依靠根系吸收其所接触到的有效磷^[12-13],由此可以推测,根是研究植物低磷胁迫应答机制的首要器官。构建一个低磷处理的大豆根系 cDNA 文库,可以为挖掘大豆耐低磷相关基因及分析相关基因之间的互作网络和调控机制

收稿日期:2015-02-06

基金项目:国家转基因重大专项(2011ZX08004-005,2013ZX08004-005,2014ZX08004-005);国家高技术研究发展计划“863 计划”(2011AA10A105);国家重点基础研究发展计划“973 计划”(2011CB109301);教育部长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT13073);江苏省现代作物生产协同创新中心(JCIC-MCP)。

第一作者简介:周汐(1989-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:ciel891259@gmail.com。

通讯作者:杨守萍(1967-),女,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:spyung@126.com。

提供有利的条件。

本研究以低磷处理的大豆幼苗根系为材料,利用 Gateway 技术构建酵母杂交 cDNA 文库,并利用与水稻 *OsSPX1* 基因高度同源的大豆 *GmSPX3* 基因作为诱饵进行文库筛选,以期研究 *GmSPX3* 基因在低磷胁迫下的调控网络,并在与其互作的基因中寻找与大豆耐低磷相关的有价值的基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种 Williams 82 为本实验室保存。

1.1.2 菌株及质粒 携带 *GmSPX3* 插入片段的质粒 T-*GmSPX3* 由本实验室保存。大肠杆菌 DH10B 菌株,酵母菌 Y2HGold 菌株,BD 诱饵空载质粒 pG-BKT7,AD 文库质粒 pGADT7-Rec,AD 空载质粒 pGADT7,对照质粒 pGBKT7-lam、pGBKT7-53、pGADT7-T,均由上海欧易生物医学科技有限公司惠赠。

1.1.3 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒购自天根公司,TRIzol Reagent、CloneMiner II cDNA Library Construction Kit、FastTrack™ MAG mRNA isolation Kit、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒、iTaq Universal SYBR Green Supermix 试剂盒、Clontech Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 试剂盒、酵母 SD/-Leu/-Trp Broth 二缺培养基、酵母 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp Broth 四缺培养基和 X-α-Gal 购自宝生物工程(大连)有限公司。引物合成和测序反应服务由上海英潍捷基贸易有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大豆的培养 用 1/2 Hoagland 营养液培养大豆品种 Williams 82 幼苗 120 株,在幼苗真叶完全展开后随机将幼苗分成 2 组,第一组 90 株,使用磷浓度为 $2.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的营养液培养,作为用于测定基因表达量的低磷处理组,以及用于构建低磷大豆根系 cDNA 文库的材料;第二组 30 株,以磷浓度 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正常营养液培养,作为用于测定基因表达量的对照组。

1.2.2 取样 将用于测定基因相对表达量的处理组和对照组材料,在处理第 0、1、5 和 10 天时,分别随机取 3 株大豆植株的叶片和根系作为样品。在第 10 天取样结束后,从进行低磷处理的大豆植株中随机选 5 株,使用磷浓度为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正常营养液,进行恢复处理,在恢复处理后 1 d(即开始低磷处理总天数的第 11 天),随机取 3 株的叶片和根作为样品。将剩余的低磷处理的大豆植株根系全部

取样,作为构建低磷大豆根系 cDNA 文库的材料。取得的所有样品均用液氮速冻后,保存于 -80°C 冰箱中。

1.2.3 双链 cDNA 的合成 按照天根公司植物总 RNA 提取试剂盒说明书,分别提取处理组和对照组在特定时间点取得的所有样品的总 RNA,之后按照反转录试剂盒说明书合成双链 cDNA。

1.2.4 诱饵基因的相对表达量分析 以上述合成的所有样品的双链 cDNA 为模板,设计特异性荧光定量 PCR 引物(*GmSPX3*-L 5'-CCAATGGCGTGA-CAAGTTCC, *GmSPX3*-R 5'-GATGATGTCTCCCTCGT-GCC),根据 iTaq Universal SYBR Green Supermix 试剂盒说明书的一步法,对诱饵基因 *GmSPX3* 进行相对表达量的测定,以对照组的表达量为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理数据,计算在不同时间点时大豆叶片和根中 *GmSPX3* 的相对表达量。

1.2.5 文库构建用 mRNA 的获得 使用 Trizol 法提取用于建库的根系样品的总 RNA 并检测质量,参照 FastTrack™ MAG mRNA isolation Kit 说明书将提取的总 RNA 进行 mRNA 的分离和纯化,并检测质量。

1.2.6 三框 cDNA 片段的合成、分离和收集 为了构建含有 3 种读码框的 cDNA 文库,在参照 CloneMiner 说明书进行 cDNA 第一链和第二链的合成后,利用 T4 连接酶将合成的双链 cDNA 与 3 种不同的 attB1 重组接头分别连接,用分级柱将加了接头的 cDNA 片段进行分级分离后,合并收集 cDNA 片段。

1.2.7 初级文库的构建 根据 Gateway 说明书,在 BP 反应阶段,将 cDNA 片段重组到载体质粒 pDONR222 上,用电转化的方法将重组产物转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞,活化培养后,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 菌液稀释 1 000 倍,再取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 涂布 LB/Amp 平板。将剩余的菌液加入甘油至终浓度 20%,保存于 -80°C 冰箱中,此即为初级文库菌液。第二天对涂布的 LB/Amp 平板进行文库滴度的测定,同时从平板上随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR,鉴定重组率和插入片段长度。

文库滴度($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) = 平板上的克隆数/涂板菌液量 \times 稀释倍数

文库总克隆数(CFU) = 文库滴度 \times 文库菌液总体积

重组率(%) = PCR 扩增出的片段数/进行 PCR 的菌落数 $\times 100$

1.2.8 酵母杂交文库的构建 将初级文库菌液扩大培养并抽提质粒后,进行 LR 重组反应,将 cDNA 片段重组到文库质粒 pGADT7-Rec 上,获得的重组质粒按照 1.2.7 的方法,电转大肠杆菌 DH10B 感受

态细胞,活化培养后测定文库的滴度、重组率和插入片段长度。从剩余菌液中取 1 mL,加入甘油至终浓度 20%,保存于 -80°C 冰箱中,此即为酵母杂交文库菌液。将其余的菌液进行扩大培养并抽提质粒,即为酵母杂交文库质粒,可直接用于酵母杂交试验。

1.2.9 诱饵载体的构建 利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I,对 T-*GmSPX3* 质粒和 BD 诱饵空载质粒 pGBKT7 进行酶切,利用 T4 连接酶连接经过胶回收纯化的酶切产物,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布 LB/Kan 平板,待菌落长出后随机挑选单克隆进行测序。

1.2.10 诱饵融合蛋白的自激活活性鉴定 根据 Clontech YeastmakerTM Yeast Transformation System 2 说明书中小规模转化的方法,将表型正确的 Y2HGOLD 酵母菌株在 YPDA 培养基上划线活化,扩大培养后制备高质量的酵母感受态细胞,用 0.2 μg 构建好的诱饵载体质粒 pGBKT7-*GmSPX3* 和 0.1 μg 空载质粒 pGADT7 共同转化制备好的酵母感受态细胞,同时将空载对照 pGBKT7 + pGADT7、阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T 和阴性对照 pGBKT7-lam + pGADT7-T 均按照 pGBKT7 质粒与 pGADT7 质粒的质量比为 2:1 的比例进行共同转化,转化结束后用生理盐水分别重悬四组转化后的菌体,分别吸取 150 μL 涂布二缺平板和四缺平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d 观察结果。若菌落可以在二缺培养基上生长,但在四缺培养基上不生长,即说明该诱饵融合蛋白没有转录自激活活性,可以继续进行的毒性测试。

1.2.11 毒性测试 分别从实验组 pGBKT7-*GmSPX3* + pGADT7、空载对照组 pGBKT7 + pGADT7、阳性对照组 pGBKT7-53 + pGADT7-T 和阴性对照组 pGBKT7-lam + pGADT7-T 的二缺平板上,随机挑取一个直径 2~3 mm 的酵母菌落接种到 50 mL 的 SD/-Trp/Kan 培养基中培养 16~24 h,培养后分别测定各组菌液的 OD₆₀₀ 值,并比较各组菌液的生长状况,若 OD₆₀₀ 值达到 0.8 以上且生长状况与其它组没有区别,即说明该融合蛋白对酵母无毒性,可以用于文库筛选。

1.2.12 筛库实验 根据 Clontech YeastmakerTM Yeast Transformation System 2 说明书中大规模转化的方法进行转化。用 2 μg pGBKT7-*GmSPX3* 和 1 μg 文库质粒共同转化制备好的高质量酵母感受态细胞,活化培养后用 6 mL 生理盐水重悬,吸取 200 μL 重悬菌液按 10,100,1 000 倍进行稀释后,分别涂布二缺平板以测定转化效率,剩余菌液每 150 μL 涂布一个四缺平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d 观察结果。

1.2.13 显色实验 配置 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 X- α -Gal 溶液并取 50 μL 涂布四缺平板,将筛库后四缺平板上生长的单克隆挑至 X- α -Gal 四缺平板上继续培养,观察显色情况。待菌落生长 3 d 后,挑选变蓝并长大的单克隆于 X- α -Gal 四缺平板上继代培养,并观察显色情况。若单菌落两次均在 8 h 内变蓝且长大,即说明该酵母单菌落包含的诱饵基因融合蛋白与文库 cDNA 融合蛋白发生了相互作用。

1.2.14 互作蛋白测序分析与互作鉴定 用通用引物 AD 和 T7 对显色反应中的阳性单克隆进行 PCR,经测序后参照 NCBI 数据库进行序列比对分析。挑选可能与耐低磷相关的阳性基因作为候选基因,克隆该基因并构建其相应的 AD 载体,再次与诱饵载体共同转化酵母进行一对一互作鉴定。

1.2.15 候选基因的相对表达量分析 以 1.2.3 中合成的第 0,5,10 天和恢复全磷后第 1 天(即开始低磷处理总天数的第 11 天)的大豆根系双链 cDNA 为模板,分别设计 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的特异性荧光定量 PCR 引物,并根据 iTaq Universal SYBR Green Supermix 试剂盒说明书的一步法,对 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 在大豆根中的相对表达量进行测定,以对照组的表达量为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理数据,计算 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的相对表达量。

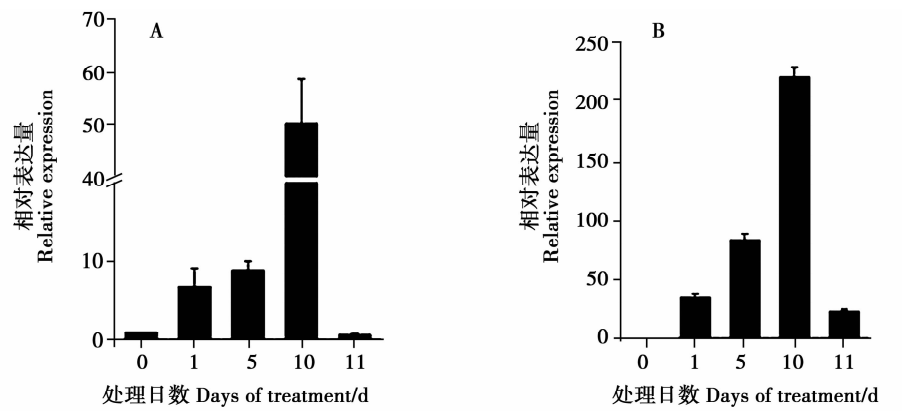
2 结果与分析

2.1 *GmSPX3* 的相对表达量分析

对特定时间点 *GmSPX3* 在大豆叶片和根系中的相对表达量进行测定,结果显示,*GmSPX3* 在大豆叶片和根中的相对表达量具有相同的趋势,即第 0 天时表达量很小,随着低磷处理时间的延长表达量增加,而在恢复全磷培养后,表达量大幅降低(图 1)。实验表明 *GmSPX3* 的表达受到低磷条件的诱导,且表达量随磷含量变化而变化。此外,*GmSPX3* 在大豆根中的表达量比在叶片中的表达量要高,说明根系是大豆对低磷胁迫产生响应的重要器官,本研究中期望利用根系材料构建低磷大豆 cDNA 文库,以发现更多的大豆耐低磷相关基因的设想是可行的。

2.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离纯化

经检测,从低磷处理的大豆根系样品中提取的总 RNA 的 D₂₆₀/D₂₈₀ 值为 2.00,质量浓度为 1.015 7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,说明获得的总 RNA 样品没有 DNA、蛋白质或其他小分子的污染。1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,总 RNA 有 18S 和 28S 两条带且条带清晰,说明提取的总 RNA 未发生降解,质量合格,可以进行 mRNA 的分离纯化(图 2)。



A:叶片中 *GmSPX3* 相对表达量;B:根中 *GmSPX3* 相对表达量。
A:Relative expression of *GmSPX3* in leaf; B:Relative expression of *GmSPX3* in root.

图 1 *GmSPX3* 在大豆叶片和根中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of *GmSPX3* in soybean leaf and root

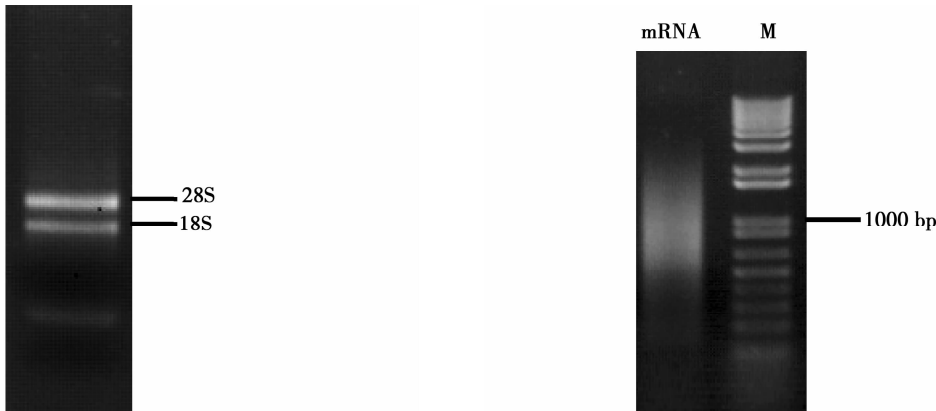


图 2 总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 2 Total RNA analysis on 1% agarose gel

mRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,经过分离纯化的 mRNA 呈均匀弥散状,且主要分布于 1 000 kb 上下,说明分离的 mRNA 纯度高,无 rRNA 污染,质量良好,可以用于 cDNA 的合成(图 3)。

2.3 文库质量鉴定

初级文库菌液总体积为 3 mL,获得菌落 477 个,计算得初级文库滴度为 9.54×10^6 CFU \cdot mL⁻¹,总克隆数为 2.86×10^7 个(图 4)。1% 琼脂糖凝胶电泳显示,初级文库的平均插入片段长度在 1 kb 上下,同时计算得初级文库重组率为 100%(图 5)。实验结果表明,获得的初级 cDNA 文库质量较高,可用于酵母杂交文库的构建。

M: 1 kb Plus DNA 分子量标准。
M: 1 kb Plus DNA Ladder.

图 3 mRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 3 mRNA analysis on 1% agarose gel

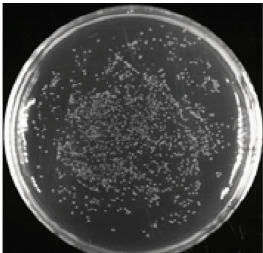


图 4 初级文库滴度鉴定

Fig. 4 Titer detection of the primary library

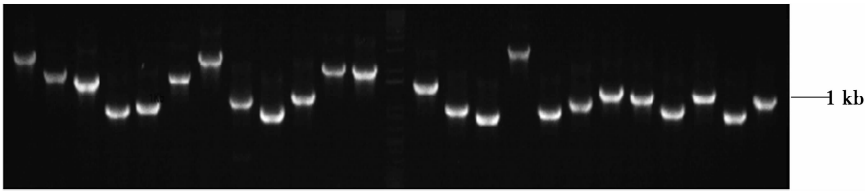


图 5 初级文库中插入片段的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR detection of insert fragments in the primary library

酵母杂交文库菌液总体积为 3 mL, 获得菌落 501 个, 计算得文库滴度为 $1 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 总克隆数为 3×10^7 个(图 6)。1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 次级文库的平均插入片段长度在 1 kb 上下, 同时计算得酵母杂交文库重组率为 92% (图 7)。试验结果表明, 获得的低磷处理大豆根系酵母杂交次级 cDNA 文库质量较高, 可用于酵母杂交分析。

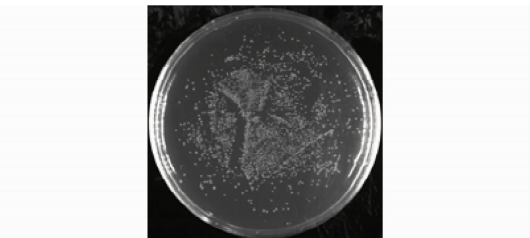


图 6 酵母杂交文库滴度鉴定

Fig. 6 Titer detection of the yeast hybrid library

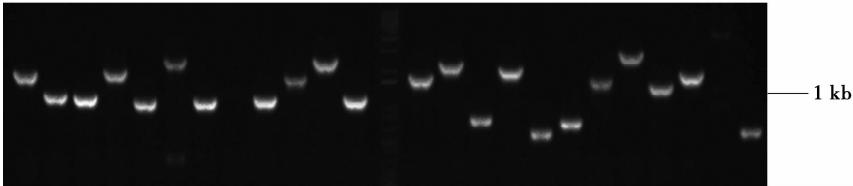


图 7 酵母杂交文库中插入片段的 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR detection of insert fragments in the yeast hybrid library

2. 4 诱饵融合蛋白的自激活活性鉴定及毒性测试

将实验组 pGBKT7-*GmSPX3* + pGADT7 转化酵母 Y2HGold 感受态细胞, 同时设置空载对照组 pG-BKT7 + pGADT7、阳性对照组 pGBKT7-53 + pGADT7-T 和阴性对照组 pGBKT7-lam + pGADT7-T。

结果显示实验组在二缺平板上有菌落生长但在四缺平板上没有, 与空载对照及阴性对照的情形一致, 说明该诱饵基因的融合蛋白没有自激活活性, 可以进行毒性测试(图 8)。

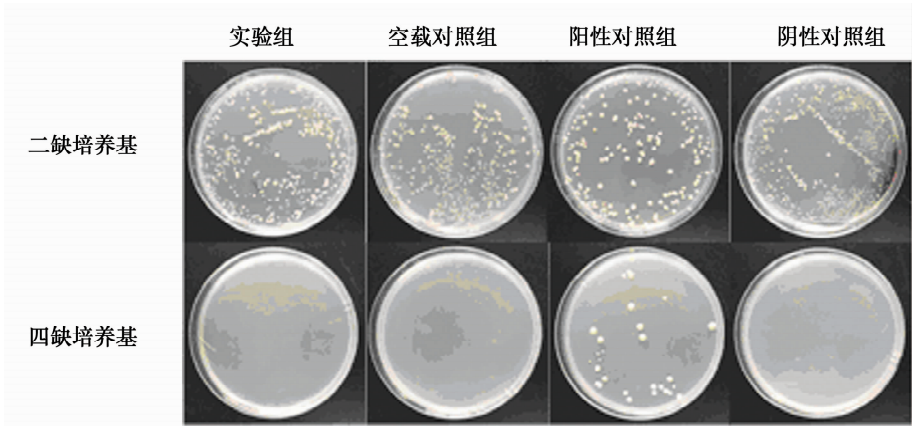


图 8 诱饵融合蛋白的自激活活性鉴定

Fig. 8 Self - activation detection of the bait recombinant protein

随机挑取实验组和 3 个对照组在二缺平板上的单菌落进行毒性测试, 经过检测, 各组菌液的 OD₆₀₀ 值均达到 0.8 以上, 且实验组与对照组相比, 生长速度没有差异, 颜色也没有发生变化。研究结果表明, 该诱饵基因的融合蛋白对酵母菌株没有毒性, 可以用于文库筛选。

2. 5 酵母双杂交筛选及显色反应

筛库 5 d 后, 在四缺平板上共获得 128 个单菌落。经过 2 次继代后, 在四缺/X-α-Gal 平板上, 获得 21 个 2 次均能在 8 h 内变蓝且长大的单菌落(图 9)。

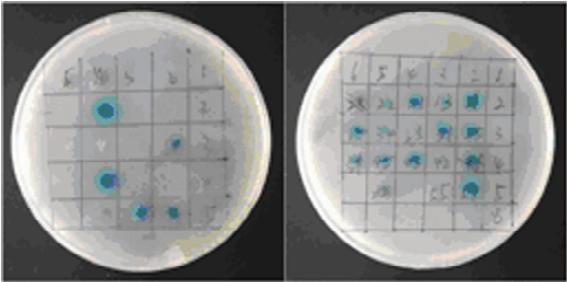


图 9 四缺/X-α-Gal 平板上的阳性菌落表型鉴定

Fig. 9 Phenotype detection of positive clones on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal plate

2.6 阳性菌落的 PCR、测序分析和候选基因的筛选

将获得的 21 个阳性菌落进行 PCR 后测序,通过 NCBI 数据库的 BLAST 比对,排除未注释的基因和一些与基础代谢相关的基因,最后筛选出 2 个编码转录因子 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的基因作为候选基因进行下一步验证。*GmUNE12* 基因位于大豆第 19 号染色体上,CDS 长度为 879 bp,含有 6 个内含子,具有 1 个 HLH 结构域。*GmPosF21* 基因位于大豆第 12 号染色体上,CDS 长度为 1 194 bp,含有 4 个内含子,具有 1 个 B_zip1 结构域和 1 个 B_zip2 结构域。根据生物信息学分析结果,对 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 进行扩增引物的设计并成功克隆。

2.7 诱饵基因与候选基因的一对一互作鉴定

分别构建 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的 AD 载体,命名为 pGADT7-*GmUNE12* 和 pGADT7-*GmPosF21*。将 pGADT7-*GmUNE12* 质粒和 pGADT7-*GmPosF21* 质粒分别与诱饵 pGBKT7-*GmSPX3* 质粒共同转化酵母,培养 3~5 d,随机挑选长出的单克隆,点接于 X-α-Gal 平板上。实验结果显示,在四缺/X-α-Gal 平板上,随机挑选的 *GmSPX3* + *GmUNE12* 单克隆和 *GmSPX3* + *GmPosF21* 单克隆均发生了不同程度的变色,再次证明 *GmUNE12* 蛋白和 *GmPosF21* 蛋白均与诱饵蛋白 *GmSPX3* 发生了相互作用(图 10,图 11)。

2.8 GmUNE12 和 GmPosF21 基因的相对表达量分析

根据数据库序列,设计 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的特异性荧光定量 PCR 引物,对特定时间点 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 在大豆根中的表达量进行

测定。结果显示,*GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的表达量均随低磷处理时间的延长而增加,在恢复全磷培养后表达量均有所降低,变化趋势与诱饵基因 *GmSPX3* 基本一致,表明 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的表达可能受到 *GmSPX3* 表达变化的影响(图 12)。

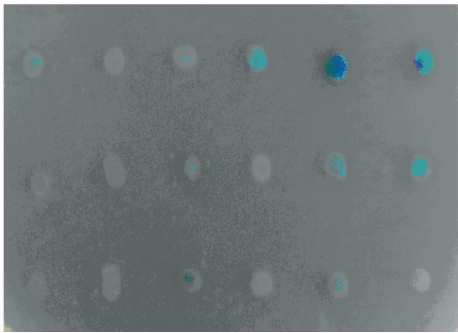


图 10 GmUNE12 蛋白与 GmSPX3 蛋白之间的互作鉴定
Fig. 10 Interaction detection between GmUNE12 and GmSPX3

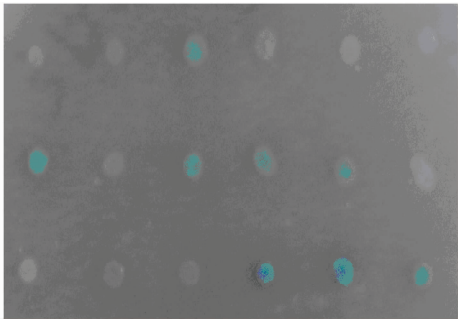


图 11 GmPosF21 蛋白与 GmSPX3 蛋白之间的互作鉴定
Fig. 11 Interaction detection between GmPosF21 and GmSPX3

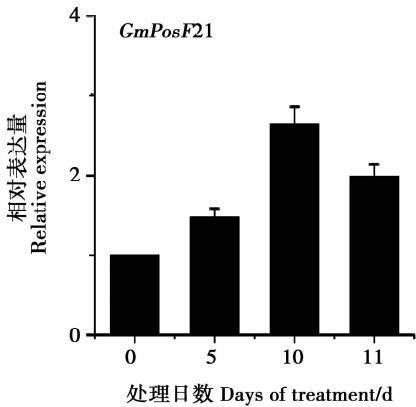
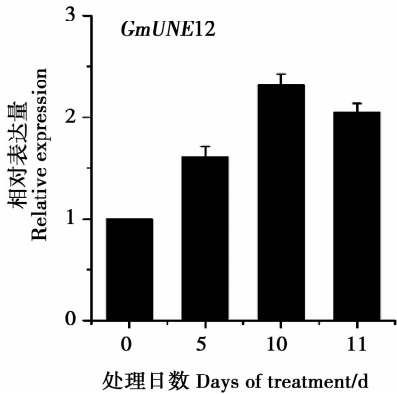


图 12 GmUNE12 和 GmPosF21 在大豆根中的相对表达量
Fig. 12 Relative expression of GmUNE12 and GmPosF21 in soybean root

3 讨论

植物由于长期进化,积累了一系列极其复杂、相互调控的耐逆基因库^[14-15],构建大豆根系低磷胁迫下的 cDNA 文库并利用酵母杂交技术研究蛋白互

作网络,对于挖掘大豆低磷胁迫相关基因,研究其对于大豆低磷胁迫响应的调控机理及基因之间的相互作用关系是一个高效的方法。

本研究将大豆全基因组测序品种 Williams 82 作为材料,提取经过长时间低磷处理的根系的总

RNA 并分离纯化出 mRNA,利用 Gateway 技术将 cDNA 片段同源重组到文库载体 pGADT7-Rec 上,构建了低磷大豆根系酵母杂交 cDNA 文库。该文库为大豆耐低磷基因的挖掘、调控机理的研究及互作蛋白的筛选创造了丰富的响应基因库,提供了相对完整的信息搜索依据,奠定了研究大豆耐低磷响应生理生化反应通路的基础。同时,由于选择了 pGADT7-Rec 作为最终载体,该文库也可用于进行酵母单杂交实验。此外,由于植物在逆境条件下会发生一系列生理生化反应,且在逆境胁迫下许多基因会产生协同作用从而影响植物对于其他养分元素的吸收,因此该文库也可用于其它逆境相关基因互作网络的研究。

酵母杂交技术自从 1989 年第一次被报道以来,已被广泛应用在拟南芥、水稻等作物研究中,以确定生物体中蛋白与蛋白之间的互作关系,并且已成为快速有效鉴定蛋白质相互关系的方法之一^[16]。一个高质量的 cDNA 文库是酵母杂交系统的关键要素之一,利用 Gateway 技术构建文库无需酶切和连接,重组效率高,并且可以根据不同的目的选择不同的表达载体,与其它方法构建的 cDNA 文库相比具有明显优势。需要注意的是,在实验中必须保证总 RNA 和 mRNA 的质量,并且在初级文库构建结束后,必须经过质量鉴定合格的初级文库才能继续用于酵母杂交文库的构建。最终,本研究构建的大豆根系酵母杂交 cDNA 文库参照文库质量标准,经过文库质量鉴定结果表明具有较高的质量,可以用于酵母双杂交实验或酵母单杂交实验。

本研究使用大豆 *GmSPX3* 基因作为诱饵基因,在构建的酵母杂交文库中找到了 2 个可能参与大豆低磷胁迫响应,并参与调节大豆内环境磷平衡的转录因子 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 基因。同时,根据 3 个基因相对表达量的结果,推测诱饵基因 *GmSPX3* 的表达受到低磷条件的诱导,且影响了 2 个候选互作基因 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 的表达。本研究从不同的角度为大豆 *SPX* 基因家族对于低磷环境的响应、信号转导及调控等机制研究开拓了新的路径,为 *GmSPX3* 基因的互作网络的完善奠定了基础,也为继续研究这 2 个候选基因的功能提供了前提条件。

然而,由于酵母双杂交系统本身存在一定的假阳性,所以尽管已经在酵母体内反复验证了 *GmUNE12* 和 *GmPosF21* 蛋白与 *GmSPX3* 蛋白的相互作用,但仍然需要通过双分子荧光互补或免疫共沉淀等实验进行进一步证实。此外,*GmUNE12* 和

GmPosF21 基因的功能也有待进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[J]. New Phytologist, 2003, 157: 423-447.
- [2] Raghothama K G, Karthikeyan A S. Phosphate acquisition[J]. Plant and Soil, 2005, 274: 37-49.
- [3] Gahoonia T S, Nielsen N E. Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties[J]. Plant and Soil, 2004, 260: 47-57.
- [4] Chiou T J, Lin S I. Signaling network in sensing phosphate availability in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 185-206.
- [5] Secco D, Wang C, Arpat B A, et al. The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis[J]. New Phytologist, 2012, 193: 842-851.
- [6] Secco D, Wang C, Shou H X, et al. Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins[J]. FEBS Letters, 2012, 586: 289-295.
- [7] Duan K, Yi K, Dang L, et al. Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation[J]. The Plant Journal, 2008, 54(6): 965-975.
- [8] Wang C, Ying S, Huang H, et al. Involvement of *OsSPX1* in phosphate homeostasis in rice[J]. The Plant Journal, 2009, 57(5): 895-904.
- [9] Liu F, Wang Z, Ren H, et al. *OsSPX1* suppresses the function of *OsPHR2* in the regulation of expression of *OsPT2* and phosphate homeostasis in shoots of rice[J]. The Plant Journal, 2010, 62: 508-517.
- [10] Yao Z, Tian J, Liao H. Comparative characterization of *GmSPX* members reveals that *GmSPX3* is involved in phosphate homeostasis in soybean[J]. Annals of Botany, 2014, 114(3): 477-488.
- [11] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246.
- [12] 曹爱琴, 严小龙. 不同供磷条件下大豆根构型的适应性变化[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(1): 92. (Cao A Q, Yan X L. Adaptation of soybean root architecture under different P conditions[J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(1): 92.)
- [13] 敖雪, 谢甫锦, 张惠君, 等. 磷素处理对不同磷效率基因型大豆根系性状的影响[J]. 大豆科学, 2008, 27(5): 787-791. (Ao X, Xie F T, Zhang H J, et al. Effect of phosphorus on root traits of soybean cultivars with different phosphorus efficiencies[J]. Soybean Science, 2008, 27(5): 787-791.)
- [14] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses[J]. The Plant Cell, 1995, 7: 1099-1111.
- [15] Rai A K, Takabe T. Abiotic stress tolerance in plants[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2010.
- [16] Fukao Y. Protein-protein interactions in plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(4): 617-625.