

# 马铃薯 StRab 互作蛋白的筛选与分析

高文<sup>1</sup>,谢从华<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学 林学院,河南 洛阳 471003; 2. 华中农业大学 园艺林学学院,湖北 武汉 430070)

**摘要:**为了进一步探讨 StRab 蛋白在马铃薯晚疫病抗性中的作用机制,采用酵母双杂交技术,以 StRab 蛋白为诱饵,对马铃薯晚疫病菌诱导表达的 cDNA 文库进行筛选。通过验证、测序和比对等分析,获得了 26 个候选克隆,其中支架蛋白、多聚泛素、蛋白酶抑制子、ERF 转录因子、多酚氧化酶、几丁质酶等均与植物逆境胁迫有关。说明 StRab 蛋白在马铃薯晚疫病抗性的信号途径中有重要作用。

**关键词:**马铃薯; StRab; 酵母双杂交; 互作蛋白

**中图分类号:**S572   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2015)12-0006-05

## Screening and Analysis of Potato StRab Interacting Proteins

GAO Wen<sup>1</sup>, XIE Conghua<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** To further explore the functional mechanism of StRab protein in potato late blight resistance, StRab was constructed into the pGBKT7 vector as bait protein, and then used to screen the interacting proteins by yeast two-hybrid technology in potato (*Solanum tuberosum* L.) cDNA library. Twenty-six candidate clones were acquired by evaluation, sequencing and Blast analysis. Of the potential target proteins, scaffold protein, polyubiquitin, ERF transcription factor, proteinase inhibitor, polyphenol oxidase and chitinase were reported to relate with adversity stresses in plant. The results suggested that the StRab protein might play an important role in signal pathway of potato late blight resistance.

**Key words:** potato; StRab; yeast two-hybrid; interacting proteins

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是全球重要的粮食作物<sup>[1]</sup>。预计到 2020 年我国将有 50% 的马铃薯用于主粮,马铃薯作为粮食产业的重要性将得到很大提升。晚疫病是全球马铃薯生产的严重危害因子<sup>[2]</sup>。因此,提高马铃薯晚疫病抗性依然是世界性的难题,许多研究者为此付出了毕生的努力。Wang 等<sup>[3]</sup>采用基因芯片技术分析了马铃薯晚疫病抗性相关的表达序列标签 (ESTs),共获得 348 条代表不同基因的片段。在晚疫病菌诱导条件下,根据基因启动表达的早晚、表达量的高低及其在抗病和感病品种中的差异,进一步选择关键基因进行克隆和功能分析。其中 StRab 基因在晚疫病菌接种后 2 h 开始表达,至 36 h 表达最高,72 h 稍下降, StRab 可被

水杨酸 (SA) 和脱落酸 (ABA) 诱导表达,在抗性品种 (垂直抗性材料 E3、水平抗性材料 QR) 中均有表达,而在感病材料 (JX) 中则不表达。用实时荧光定量 PCR 进行分析<sup>[4]</sup>发现,StRab 超量表达的马铃薯转基因株系较野生型的表达量平均高 23 倍,进一步的表型鉴定分析表明,StRab 超量表达后增强了对晚疫病菌的抗性。因此,该基因对马铃薯晚疫病抗性的工程技术改良具有重要意义。

关于 Rab 蛋白功能的研究,有许多相关的报道。其具有可调节细胞分裂、胚胎发育、花粉管萌发、根毛和根瘤的形成、果实成熟等生长发育相关的功能,而且还与病原、干旱、盐、伤害等生物和非生物胁迫有关。因此,其功能具有多样性。如:豌豆中的

收稿日期:2015-06-29

基金项目:国家马铃薯产业技术体系项目 (CARS-10-P06)

作者简介:高文(1973-),男,内蒙古赤峰人,讲师,博士,主要从事生物技术与繁育工作。E-mail:tommoto@163.com

*RabA3*<sup>[5]</sup>通过光诱导参与了 DWF 蛋白的活性调节,从而间接地参与了油菜素内酯的生物合成。水稻中的 *rgp1*<sup>[6]</sup> 经超量和抑制表达后,表明该基因与植物激素代谢调节相关。海岸松中的 *Rab1*<sup>[7]</sup> 在不同部位、同一部位不同发育时间的表达分析表明,该基因可能与胚胎发育相关。将烟草中的 *Rab11*<sup>[8]</sup> 与 *gfp* 融合后定位分析,结合该基因的超量和抑制表达,结果表明其与花粉管顶端生长和花粉管的膜运输有关。番茄中的 *Rab11a*<sup>[9]</sup> 在叶、花、根中的表达量不同,结合抑制表达分析,证明该基因可能参与果实成熟的调控。根瘤菌可诱导菜豆根的 *Rab42*<sup>[10]</sup> 表达,进一步的试验表明,该基因参与了根瘤形成和根毛发育。在盐胁迫下矮牧豆树中的 *Rab7*<sup>[11]</sup> 上调表达,而且在高盐胁迫下转该基因的烟草生长正常,说明其与盐胁迫相关。小麦中的 *Rab2*<sup>[12]</sup> 可被叶锈病菌诱导并快速表达,预示其可能与小麦叶锈病的抗性有关。在植物中,Rab 蛋白的广泛存在及其功能多样性表明其在植物生长发育中具有重要的作用。

Gao 等<sup>[4]</sup>首次报道了 *StRab* 基因在马铃薯晚疫病抗性中的重要作用。为了进一步研究其功能机制,本研究采用酵母双杂交技术获取与 *StRab* 互作的蛋白,并分析其在抗病网络中的重要性,以期为马铃薯晚疫病抗性改良工作提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料及马铃薯 cDNA 文库构建

植物材料为马铃薯晚疫病水平抗性品系 386209.10,由国际马铃薯中心(CIP)引进。接种晚疫病菌混合小种 W1 和 H1 后 36 h 时取样,采用异硫盐酸胍法提取总 RNA。先用 PolyATtract System III and IV 试剂盒分离并纯化 mRNA,再用 Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kits 试剂盒合成 cDNA,并与载体 pGADT7 - Rec 共转化酵母 AH109。

### 1.2 pGBK7 - StRab 载体构建与自激活性检测

用 *BamH I* 和 *EcoR I* 将 *StRab* 从 pMD18 - T 载体切下,与 pGBK7 连接形成诱饵表达载体 pGBK7 - *StRab*,然后将其和空白载体 pGBK7 分别转入酵母 Y187,并将其分别接种于 SD/ - Trp 液体培养基中,于 30 ℃,250 r/min 振荡培养 20 h。同时,将转化了 pGBK7 - *StRab* 的 Y187 涂在 SD/ - Trp 和 SD/ - Trp/ - His 平板上,在 30 ℃ 培养 3 d,观察 Y187 的生长状况。

### 1.3 马铃薯 cDNA 文库的筛选

依据 Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kits 试剂盒说明,分别取 1 mL 和 5 mL 文库菌株 AH109 与诱饵菌株 Y187 于 2 L 的三角瓶中,在 30 ℃ 恒温摇床(30~50 r/min)中杂交培养 20~

24 h。然后取 200 μL 杂交混合液涂在 150 mm 的 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 平板上,30 ℃ 培养 3~8 d。再挑选大于 2 mm、白色或亮粉色斑,摇菌并取 1 μL 点在 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp/X - α - gal(SD/Z - buffer/X - α - gal) 平板上,30 ℃ 培养 2~4 d,统计蓝色阳性克隆数量并编号。

### 1.4 候选克隆的 PCR 检测和测序分析

将 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp/X - α - gal 平板上的蓝色阳性克隆摇菌并提取质粒,作为 PCR 模板,并用 T7 sequencing 和 3' - AD sequencing 引物进行 PCR 扩增,然后将插入片段大于 400 bp 的质粒转化大肠杆菌 DH5α 中并测序。测序结果在 GenBank 做比对分析,初步预测蛋白质的功能。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯文库构建分析

取 0.2 μL 总 RNA 在 1% 的普通琼脂糖凝胶中电泳(图 1)。28S 与 18S 条带的亮度相似,5S 则相对较弱,说明总 RNA 符合下一步试验要求。用紫外分光光度计(UV - 2401PC,日本岛津)测定波长为 230 nm、260 nm、280 nm 的吸光度值,均值分别为 0.33、0.73、0.35,其中 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 2.08,表明总 RNA 的纯度较高,符合后续试验要求。通过试剂盒分离纯化 mRNA 并反转录成 ds cDNA,采用 CHROMA SPIN<sup>TM</sup> TE - 400 Column 过滤 ds cDNA 以去除 400 bp 以下的小片段,电泳结果表明 ds cDNA 主要集中在 400~2 000 bp,小片段被完全去除(图 2),说明 ds cDNA 质量较高,符合 cDNA 文库构建要求。

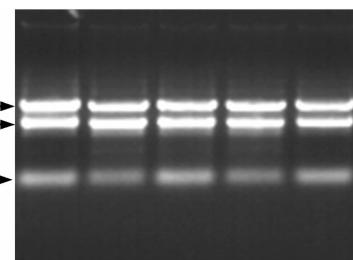
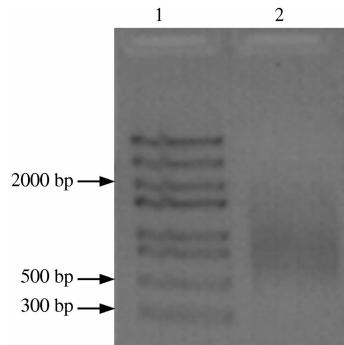


图 1 马铃薯总 RNA



1:分子量标准 MarkerⅢ; 2:过柱后大于 400 bp 的 ds cDNA

图 2 过柱纯化后的 ds cDNA

## 2.2 诱饵表达载体构建及自激活性分析

诱饵表达载体 pGBKT7 - *StRab* 经 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切后获得 750 bp 的片段,且大小与目标片段相同(图 3),表明目标片段已装入载体。进一步测序分析,表明插入载体 pGBKT7 中的 *StRab* 基因是正确的。

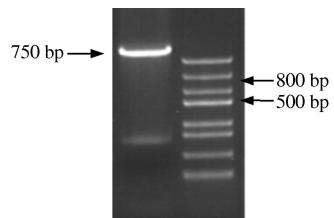


图 3 pGBKT7 - *StRab* 酶切结果

转化了空白载体 pGBKT7 和重组载体 pGBKT7 - *StRab* 的 Y187 菌液的 OD<sub>600</sub> 均为 1.56,说明重组载体 pGBKT7 - *StRab* 产生的融合蛋白对 Y187 菌既无毒害也无抑制作用。重组载体 pGBKT7 - *StRab* 在 SD/ - Trp 平板上生长正常,但不能在 SD/ - Trp/ - His 平板上生长(图 4),进一步说明目的融合蛋白不能激活报告基因(His),即重组载体 pGBKT7 - *StRab* 没有自激活现象。

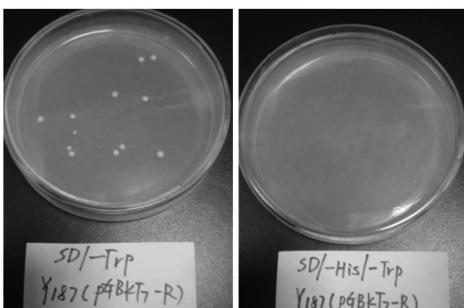
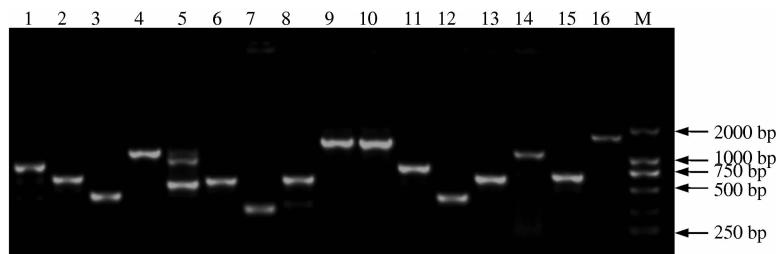


图 4 pGBKT7 - *StRab* 自激活性检测



M 是 DL2000; 洋道 1、2、3…16 是部分阳性克隆

图 6 插入片段的 PCR 鉴定

表 1 候选克隆测序和 Blast 分析结果

序号	StRab 互作蛋白						
1	支架蛋白	8	多酚氧化酶	14	伯灵顿抑制剂	21	伸展蛋白
2	氰酸酯裂解酶	9	种子吸涨蛋白	15	预测蛋白	22	Poly(A)结合蛋白
3	多聚泛素	10	C2 蛋白	16	II型几丁质酶	23	果胶甲基酯酶
4	核糖体蛋白	11	线粒体外膜孔蛋白	17	P69C 蛋白	24	丝氨酸棕榈转移酶
5	ERF 转录因子	12	根结线虫诱导的	18	LeArcA1 蛋白	25	长春碱前体
6	分泌性糖蛋白	13	巨细胞蛋白类似物	19	蛋白激酶 MK5	26	非特异转脂蛋白
7	蛋白酶抑制子 II	14	半胱氨酸合成酶	20	组蛋白 H2A		

### 3 结论与讨论

有研究表明,Rab 蛋白曾参与许多真核生物的胁迫反应,在过氧化氢胁迫条件下,*Rab* 基因在酵母、拟南芥和人类 HeLa 细胞的转录表达谱中均有出现<sup>[13]</sup>,但是 Rab 蛋白在活性氧胁迫中的具体作用仍不清楚。在超氧化物、水杨酸(SA)、腐生病原菌诱导下,拟南芥的 *AtRabG3e* 基因启动表达<sup>[14]</sup>。在冷害、干旱、NaCl 等不同环境因子的诱导下珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)的 *PgRab7* 基因上调表达,而且转该基因的烟草对 NaCl、甘露醇的抗胁迫能力提高<sup>[15]</sup>。在小麦叶锈病菌(*Puccinia triticina*)的诱导下,小麦的 *Rab2* 基因上调表达<sup>[12]</sup>。上述研究结果表明,无论是在动物中还是在植物中,Rab 蛋白均与很多胁迫现象有关。

那么,在植物对胁迫的防御网络中 Rab 蛋白是如何发挥功能的,目前有 2 种观点,由于 Rab GTPases 的传统功能是调节运输小泡,如运输小泡的产生、移动、停靠、与目标融合等,即在胁迫过程中,运输小泡可将一些新合成的物质运输到相应的目标位置,从而间接地参与了植物防御反应。但是运输小泡与防御反应之间的具体关系目前仍不清楚<sup>[16]</sup>。同时也有人认为,Rab 蛋白直接参与了植物防御反应信号网络调节系统,在细胞分裂、细胞凋亡、激素调节、病原菌以及来自病原真菌、细菌和病毒的激发子等引发的生物胁迫,同时在伤害、冷害、干旱和活性氧等环境条件引发的非生物胁迫等现象中均涉及 MAPK、SA、ET、JA 等多种信号途径<sup>[17]</sup>。这些信号途径是相互联系的而不是独立地发挥作用,在适宜的时空条件下协调支架蛋白、衔接蛋白、蛋白修饰(如:甲基化、泛素化、糖基化、磷酸化、脂修饰等)等所有信号分子<sup>[18]</sup>,并调节胁迫相关基因(转录因子、酚类物质、几丁质等)的表达,以适应各种胁迫反应。

MAPK 途径在酵母的交配、芽孢的形成、假菌丝的生长和对胞外高渗透压的调节等许多方面发挥作用。Ste5 是一种支架蛋白<sup>[19]</sup>,使 MAPK 途径中各种 MAP kinases 之间的识别特异性增强,同时提高了各种 MAP kinases 之间的信息传递效率。Cullin3 也是存在于泛素系统中的一种支架蛋白<sup>[20]</sup>,其与 NPR1 介导的植物系统获得抗性(SAR)有关。而且泛素-蛋白酶体途径在植物生长发育各个方面均有报道<sup>[21-23]</sup>。上述结果表明,支架蛋白、泛素均与植物防御反应有关。在本研究中,用酵母双杂交技术捕获了与 StRab 互作的蛋白,其中有支架蛋白和泛素。因此推测,StRab 蛋白是通过其互作蛋白直接参与了

对植物胁迫防御信号网络的调节适应。另外,除支架蛋白和泛素外,还有 ERF 转录因子、蛋白酶抑制子、几丁质酶、多酚氧化酶等均与植物胁迫防御有关。如 ERF 转录因子曾参与并调节乙烯、茉莉酸这 2 条信号途径中的下游防卫基因的表达<sup>[24]</sup>。超量表达 ERF 转录因子的拟南芥对灰霉菌(*B. cinerea*)和食线虫真菌(*P. cucumerina*)的抗性增强<sup>[25]</sup>。蛋白酶抑制子是植物内源防御反应中的关键因子,其在蛋白酶活性的调节中发挥重要作用。而且,转该基因的植株对不同病原菌均有抗性<sup>[26]</sup>。在生物和非生物胁迫中植物产生了多酚氧化酶等次生代谢物质,多酚氧化酶在植物胁迫防御中的主要作用是产生活性氧(ROS)。高浓度的 ROS 可直接危害细胞,低浓度时又可作为第二信使传递信息。敲除该基因的番茄对假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)的敏感性提高,相反则抗性增强<sup>[27]</sup>。上述结果表明,StRab 蛋白可能是通过其互作蛋白直接参与了植物防御反应。

### 参考文献:

- [1] Harwkes J G. The potato evolution, biodiversity, and genetic resource [M]. Lond on: Belhaven, 1990.
- [2] Salaman R N. The potato famine: Its cause and consequences [M]// Harwkes J G. In the history and social influence of the potato. Cambridge Univ Press, 1985: 289-361.
- [3] Wang B L, Liu J, Tian Z D, et al. Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays [J]. Plant Science, 2005, 169(6): 1155-1167.
- [4] Gao Wen, Tian Zhendong, Liu Jun, et al. Isolation, characterization and functional analysis of *StRab*, a cDNA clone from potato encoding a small GTP-binding protein [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135(24): 80-86.
- [5] Kang J G, Yun J, Kim D H, et al. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth [J]. Cell, 2001, 105 (5): 625-636.
- [6] Sano H, Youssefian S. A novel has-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice [J]. Molecular General Genetics, 1991, 228(1/2): 227-232.
- [7] Goncalves S, Cairney J, Rodriguez M P, et al. *PpRab1*, a Rab GTPase from maritime pine is differentially expressed during embryogenesis [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 278(3): 273-282.
- [8] De Graaf B H, Cheung A Y, Andereyey T, et al. *Rab11*

- GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco [J]. Plant Cell, 2005, 17(9):2564-2579.
- [9] Lu C, Zainal Z, Tucker G A, et al. Developmental abnormalities and reduce fruit softening in tomato plants expressing an antisense *Rab11* GTPase gene[J]. Plant Cell, 2001, 13(8):1819-1833.
- [10] Blanco F A, Meschini E P, Zanetti M E, et al. A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association [J]. Plant Cell, 2009, 21 (9) : 2797-2810.
- [11] George S, Parida A. Over-expression of a Rab family GTPase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confers tolerance to salt stress on transgenic tobacco[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(3):1669-1674.
- [12] 杨静静,李星,李亚宁,等. 小G蛋白*Rab2*基因参与小麦抗叶锈病反应的研究[J]. 华北农学报,2010,25 (4):1-5.
- [13] Vandebroucke K, Robbins S, Vandepoele K, et al. Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: A comparative analysis[J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(3):507-516.
- [14] Mazel A, Leshem Y, Tiwari B S, et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e) [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1):118-128.
- [15] Agarwal P K, Agarwal P, Jain P, et al. Constitutive overexpression of a stress inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(1):105-115.
- [16] Moshkov I E, Novikova G V. Superfamily of plant monomeric GTP-binding proteins:2. Rab proteins are the regulators of vesicle trafficking and plant responses to stresses [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2008, 55 (1) : 119-129.
- [17] Tena G, Asai T, Chiu W L, et al. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. Current Opinion Plant Biology, 2001, 4(5):392-400.
- [18] Xiong L, Zhu J K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(2):152-166.
- [19] Levin D E, Errede B. The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast [J]. Current Opinion Plant Biology, 1995, 7(2):197-202.
- [20] Spoel S H, Mou Z, Tada Y, et al. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity [J]. Cell, 2009, 137 (5):860-872.
- [21] Sullivan J A, Shirasu K, Deng X W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants [J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(12):948-958.
- [22] Moon J, Parry G, Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development [J]. The Plant Cell, 2004, 16(12):3181-3195.
- [23] Craig A, Ewan R, Mesmar J, et al. E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(4):1123-1132.
- [24] Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano J J, et al. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense[J]. The Plant Cell, 2003, 15(1):165-178.
- [25] Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi [J]. Plant Journal, 2002, 29(1):23-32.
- [26] Habib H, Fazili K M. Plant protease inhibitors: A defense strategy in plants[J]. Biotechnology and Molecular Biology Review, 2007, 2(3):68-85.
- [27] Thipyapong P, Stout M J, Attajarusit J. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology [J]. Molecules, 2007, 12(8):1569-1595.