

小麦 h 型硫氧还蛋白 Trx-h 酵母双杂交诱饵载体的构建和自激活检测

曹玲珑, 李冬兵, 熊大斌, 邓 利, 牛洪斌, 姜玉梅, 尹 钧*

(河南农业大学, 河南粮食作物协同创新中心, 小麦玉米作物学国家重点实验室,
国家小麦工程技术研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 为构建小麦 h 型硫氧还蛋白 Trx-h 酵母双杂交诱饵载体, 并检测其对酵母细胞的自激活作用。利用 RT-PCR 扩增 *TaTrx-h* 基因的 ORF 区域, 并与 pGBKT7 载体连接构建诱饵载体 pGBKT7-Trx-h, 利用 PEG/LiAC 法转化酵母 AH109 后, 通过表型筛选检测诱饵蛋白对酵母有无自激活作用。结果表明, 含 pGBKT7-Trx-h 质粒的酵母在 SD/-Trp-Leu 培养基上能正常生长, 说明诱饵载体表达产物对酵母细胞无毒性作用; 在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上不能生长, 说明诱饵质粒无自主激活报告基因的作用。因此, 可以利用该诱饵载体通过酵母双杂交方法筛选与 Trx-h 蛋白相互作用的蛋白。

关键词: 小麦; 硫氧还蛋白; 酵母双杂; 诱饵载体; 自激活

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0019-04

Construction and Self-activation Detection of Yeast Two-hybrid Bait Vector for Trx-h of Wheat

CAO Ling-long, LI Dong-bing, XIONG Da-bin, DENG Li, NIU Hong-bin, JIANG Yu-mei, YIN Jun*

(National Engineering Research Center for Wheat, State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science,
Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crop Henan Agricultural University,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To construct the bait vector for Trx-h of wheat and to evaluate its self-activation in yeast two-hybrid system, the open reading frame(ORF) of *Trx-h* gene was amplified by RT-PCR and cloned into the vector pGBKT7 to construct the bait vector pGBKT7-Trx-h. The constructed bait vector pGBKT7-Trx-h was transformed into yeast strains AH109 by PEG/LiAC and its self-activation was tested through the phenotype screening. The result showed that the yeast strain AH109 transformed with the bait plasmids grew well on SD/-Trp-Leu plate without the toxicity effect, whereas they could not grow on SD/-Trp-Leu-His-Ade plate, indicating that pGBKT7-Trx-h could not activate the transcription of reporter gene alone in yeast two-hybrid system. So the pGBKT7-Trx-h could act as a bait to screen the interaction proteins with Trx-h by yeast two-hybrid system.

Key words: wheat; Trx-h; yeast two-hybrid; bait vector; self-activation

收稿日期: 2014-02-09

基金项目: 国家转基因新品种培育重大专项(2011ZX08002-003); “十二五”农村领域国家科技计划项目(2012AA101105)

作者简介: 曹玲珑(1988-), 男, 河南清丰人, 在读硕士研究生, 研究方向: 作物分子改良。E-mail: caollldss@sina.com

* 通讯作者: 尹 钧(1957-), 男, 山西运城人, 教授, 博士, 主要从事小麦生育生态、小麦高产栽培生物技术研究。

E-mail: xmzxyj@126.com

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是普遍存在于生物体内的一种小分子量且含有还原二硫键活性的蛋白质。许多研究显示,它是参与生物体内重要生命活动的具有酶活力调节功能的蛋白^[1]。研究发现,Trx 具有多样性,是一个非常庞大的蛋白家族,目前共将其分为 f 型硫氧还蛋白(Trx-f)、m 型硫氧还蛋白(Trx-m)和 h 型硫氧还蛋白(Trx-h)^[2-7]。研究发现,几乎所有的 Trx 中都含有保守的半胱氨酸残基(-Cys-Gly-Pro-Cys-)活性中心,氧化态 Trx 活性中心有一个由胱氨酸残基构成的二硫键(S-S),可被 NADPH 和 NADP 还原酶、二硫苏糖醇(DTT)和还原态淀粉酶抑制蛋白(Asi-red)所还原^[8-9]。Trx 至少在十几种生物反应体系中发挥作用。例如, Pasternak 等^[10]通过改造光合细菌中的一种 Trx,使其丧失原来的功能,结果显示,Trx 参与光合作用细胞器的形成;而且 Ballicora 等^[11]发现,Trx 能还原 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶,提高了它和活化剂 3-磷酸甘油酸的亲和活力,从而促进淀粉的合成,说明 Trx 能参与淀粉的合成与分解过程;Karoly 等^[12]从小麦籽粒中提取 Trx-h,用其研究 NADP/Trx 系统对 α -淀粉酶抑制作用,让还原状态的 Trx-h 和 CM-1、DSG-1、DSG-2、嘌呤硫素 4 种 α -淀粉酶抑制物反应,结果显示,这些蛋白抑制物的二硫键均被还原,从而影响了 α -淀粉酶的活性。刘雷等^[13]通过研究转反义 *trxs* 基因小麦,发现转反义 *trxs* 基因的转基因株系 α -淀粉酶活性和储藏蛋白的还原性明显降低,具有明显的抗穗发芽能力。

大量研究表明, *Trx-h* 基因与小麦抗穗发芽有关,但在国内外文献还未发现关于 *Trx-h* 基因介导的抗穗发芽机制的研究。酵母双杂交系统是研究蛋白互作的有效手段,而构建有效的诱饵载体是运用酵母双杂交系统开展蛋白互作研究的重要基础^[13-17]。本研究拟通过构建小麦 Trx-h 酵母双杂交诱饵载体,并进行其对酵母细胞的自激活作用的检测,以期利用酵母双杂交系统研究与 Trx-h 相互作用的未知蛋白,为 *Trx-h* 基因介导的抗穗发芽机制研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料:小麦品种郑麦 9023 叶片;菌株:大肠杆菌菌株 DH5 α 、酵母菌株 AH109;质粒载体:pGBKT7、pMD19-T;主要仪器:高压灭菌锅、琼脂糖凝胶电泳仪、摇床、恒温培养箱、水浴锅、移液枪、超净

工作台等。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

RNA 的提取采用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂,总 RNA 用于 cDNA 第一条链的合成。

1.3 小麦 *TaTrx-h* 基因的扩增

以反转录得到的 cDNA 为模板,利用引物(TaTrx-hf1: 5'-GAATTCATGGGAGGCTGTGTGG-3', TaTrx-hr1: 5'-CTGCAGTCAACTGC-CATCGCCAAGA-3')进行 PCR 扩增:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环;72 °C 10 min。目的片段用胶回收试剂盒回收,将回收的目的片段与 pMD19-T 进行连接,得到 pMD19-Trx-h,转化大肠杆菌 DH5 α 。从转化平板中随机挑取白斑,摇菌提质粒 DNA,进行 PCR 鉴定。

1.4 诱饵蛋白载体的构建

将得到的 pMD19-Trx-h 和 pGBKT7 载体分别用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切,分别回收目的片段和酶切后的 pGBKT7 载体,接着用 T4 连接酶连接获得 pGBKT7-Trx-h,转化大肠杆菌。从转化平板中随机挑取几个白斑,摇菌提质粒 DNA,将所提取质粒进行 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定,其余用 50% 甘油保存于 -80 °C 冰箱待用。

1.5 酵母菌株的表型鉴定

挑取酵母菌株 AH109 划线于 YPDA 平板上,在 30 °C 的培养箱中倒置培养 3~5 d,待菌落直径约 2~3 mm 时将菌落分别划线于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-His、SD/-Ade 的培养基上,将平板置于 30 °C 的培养箱中倒置培养 3~5 d 后,观察酵母生长情况。

1.6 诱饵载体的自激活检测

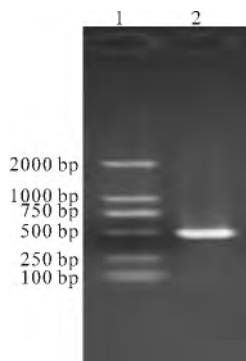
将诱饵载体 pGBKT7-Trx-h 和 pGADT7 载体一起转入酵母细胞 AH109 中,分别划线于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 上,同时划线转有 pGBKT7-53/pGADT7-T、pGBKT7-lam/pGADT7-T 的酵母菌,分别作为阳性对照和阴性对照。将平板倒置,于 30 °C 培养 3~4 d 后观察记录酵母生长情况。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的扩增及 pGBKT7-Trx-h 重组载体的构建

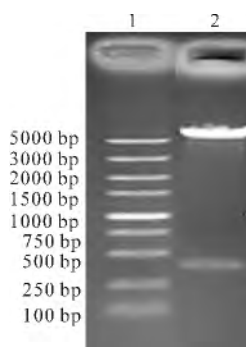
以郑麦 9023 种子胚 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 扩增获得一个与预期片段相符的特异性 PCR 产物(图 1),测序结果表明,目的片段大小为 396 bp,证实是小麦 *TaTrx-h* 基因序列。诱饵载体 pGBKT7-Trx-h 酶

切鉴定结果见图 2, 测序结果表明, *Trx-h* 片段已按正确的读码框插入到 pGBKT7 的多克隆位点, 且序列正确, 没有发生有义突变。



1. Marker 2000; 2. 目的基因片段

图 1 小麦 *TaTrx-h* 基因 PCR 扩增结果

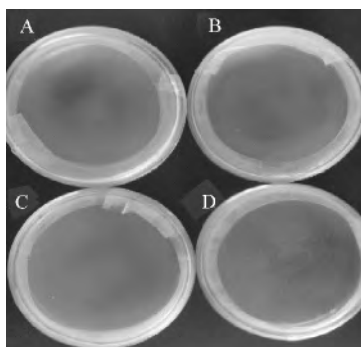


1. Marker 5000; 2. pGBKT7-Trx-h 载体的酶切

图 2 重组载体 pGBKT7-Trx-h 的酶切鉴定

2.2 酵母菌株 AH109 表型鉴定结果

菌株 AH109 分别划线于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-His、SD/-Ade 培养基上, 置于 30 °C 的培养箱中倒置培养 3~5 d 后, 发现酵母菌株 AH109 均没有生长(图 3)。说明该酵母菌株 AH109 未发生表型突变。



A. SD/-Leu 培养基; B. SD/-His 培养基;
C. SD/-Ade 培养基; D. SD/-Trp 培养基

图 3 菌株 AH109 在各单个缺陷性培养基上的生长情况

2.3 pGBKT7-Trx-h 的自激活验证

据观察(图 4), 试验组、阳性对照和阴性对照在 SD/-Trp-Leu 上都能生长; 阳性对照在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 上生长, 而试验组和阴性对照在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 上不能生长, 说明诱饵载体 pGBKT7-Trx-h 无自激活报告基因的作用。

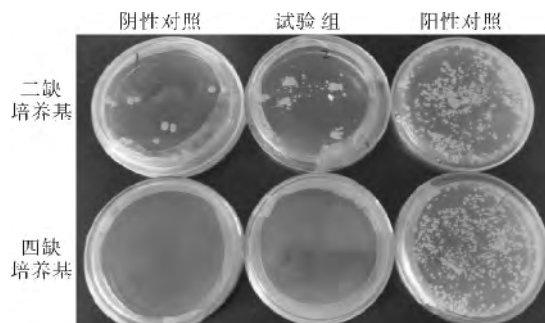


图 4 成功转化 pGBKT7-Trx-h 的 AH109 在二缺和四缺培养基上的生长情况

3 结论与讨论

Trx-h 广泛参与酶活性调节、胁迫应答、信号传导等许多重要的生命活动^[1-5]。Suske 等^[18]研究发现, 小麦籽粒中有 Trx-h。此后研究还发现, 种子发芽时 Trx-h 能促进淀粉酶和蛋白质酶活性的提高, 增加贮藏蛋白的水溶性, 使种子中贮藏的营养物质更易于水解以及促进胚乳中的碳氮代谢, 这些功能与 Trx-h/NADP 系统还原种子中蛋白质和酶的抑制物有关^[8-9]。学者 Joshuan 曾研究 Trx-h 活性对种子萌发的影响, 发现随着 Trx-h 活性的上升, 种子中淀粉酶活性、贮藏蛋白的相对还原状态以及发芽势都有所上升。在酵母双杂交系统中, 由于其在真核生物内模拟蛋白互作, 更接近目的蛋白与互作蛋白在植物体内的真实情况, 因此, 广泛应用于植物功能基因的研究中。然而, 由于靶基因的自身激活作用, 酵母双杂交系统的假阳性率很高^[14-19]。因此, 在构建诱饵载体之后, 必须确定诱饵质粒转入酵母菌表达的诱饵蛋白没有自激活作用。本研究构建了用于酵母双杂交系统的诱饵载体 pGBKT7-TaTrx-h, 并证明其没有自激活作用。因此, pGBKT7-Trx-h 诱饵载体的成功构建, 为通过酵母双杂交系统研究与硫氧还蛋白相互作用的蛋白奠定了基础。

参考文献:

- [1] Laurent T C, Moore E C, Reichard P. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*[J]. Biol Chem, 1964, 239: 3436-3444.

- [2] Ricardo A W, Nancy A C, Boihon E, *et al.* Isolation of three thioredoxin from spinach leaves[J]. Biol Chem, 1979, 254:1627-1632.
- [3] Laughner B J, Sehnke P C, Ferl R J. A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily[J]. Plant Physiol, 1998, 118:987-996.
- [4] Miranda V A, Damdimopoulos A E, Pedrajas J R, *et al.* Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization[J]. Eur J Biochem, 1999, 261:405-412.
- [5] Christophe L, Naganand R, Yvette C, *et al.* Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:14144-14149.
- [6] Klaus V, Hartunt F. Characterization of three different thioedoxins in wheat[J]. Bioc Biop Acta, 1986, 873:415-418.
- [7] Rivera M R, Mestres D M P, *et al.* Evidence for five divergent thioredoxin-h sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:237-271.
- [8] Arne H. Thioredoxin and glutaredoxin systems[J]. Biol Chem, 1989, 264:13963-13966.
- [9] Holmgren A. Tioeredoxin[J]. Ann Rev Biochem, 1985, 54:237-271.
- [10] Pasternak C, Haberzettl K, Klug G. Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Bacteriol, 1999, 181:100-106.
- [11] Ballicora M A, Frueauf J B, Schurmann P, *et al.* Activation of the potato tuber ADP-glucose phosphatase by thioredoxins[J]. Biol Chem, 1999, 275:1315-1320.
- [12] Karoly K, Boihon C Y, Bob B B. Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of α -amylase and trypsin inhibitor protein[J]. Biol Chem, 1991, 266:16135-16140.
- [13] 刘雷, 尹钧, 任江萍, 等. 反义 *trxs* 基因的导入对小麦种子发芽的影响[J]. 作物学报, 2004, 30(8):801-805.
- [14] Yang M, Wu Z, Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(7):1152-1156.
- [15] Young K H. Yeast two-hybrid; so many interactions, (in) so little time[J]. Biology of Reproduction, 1998, 58:302-311.
- [16] Zhang Z, Hong Z, Verma D P S. Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains [J]. Biol Chem, 2000, 275(12):8779-8784.
- [17] Frederickson R M. Macromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1998, 9:90-96.
- [18] Suske G, Wangner W. NADP-dependent thioeredoxin reductase and a new thioredoxin from wheat [J]. Z Naturforsch, 1979, 34:212-214.
- [19] Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions[J]. TIG, 1994, 10(8):286-292.

(上接第 18 页)

- [5] Urano J, Nakagawa T, Maki Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase[J]. FEBS Letters, 2000, 466(1):107-111.
- [6] 张维静, 陆海, 杜希华. 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用[J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2008, 23(4):113-115.
- [7] 王芳, 王斐, 孙辉, 等. 棉花 *GhDHAR3* 基因克隆、功能序列分析及烟草的遗传转化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(5):88-93.
- [8] 牛歆雨, 雷玉山, 梁东, 等. 猕猴桃果实 L-半乳糖内酯脱氢酶和脱氢抗坏血酸还原酶 cDNA 片段的克隆与序列分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(12):57-62.
- [9] 李晓晓, 李蕊, 李雅轩, 等. 大豆脱氢抗坏血酸还原酶基因的电子克隆及进化分析[J]. 大豆科学, 2007, 26(1):45-50.
- [10] 张国裕, 康俊根, 张延国, 等. 青花菜雄性不育相关基因 *BoDHAR* 的克隆与表达分析[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5):751-756.
- [11] 余春梅, 杨艳萍, 刘鑫燕, 等. 普通小麦中双脱氢抗坏血酸还原酶(*TaDHAR*)基因的克隆与生化特性分析[J]. 生物工程学报, 2009, 25(10):1483-1489.
- [12] Chen Z, Gallie D R. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development and function[J]. Plant Physiol, 2006, 142(2):775-787.