

紫云英类受体蛋白激酶 Nip43 靶蛋白的 筛选与初步鉴定

叶竞阳 王建云 熊小波 陈大松 谢福莉 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以紫云英类受体蛋白激酶 Nip43 的 S-TKs 结构域构建诱饵载体, 通过酵母双杂交技术, 筛选获得 17 个候选的阳性克隆。经过测序分析和 Blast 比对, 最终确定了 1 个互作蛋白 EPN。EPN 蛋白是网格蛋白聚合反应中的配体蛋白, 可调控网格蛋白的聚合反应。通过实验验证显示, 靶蛋白 EPN 与 Nip43 蛋白互作最强的区域为 ENTH/ANTH 结构域。Real-time qPCR 检测表明, *epn* 基因参与了根瘤菌早期结瘤过程。

关键词 紫云英; 共生固氮; 酵母双杂交; Nip43; EPN; 蛋白互作

中图分类号 S 154.38⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0049-05

华癸中慢生根瘤菌 7653R 是我国特有的根瘤菌共生固氮资源, 它通过一系列复杂的分子对话与紫云英形成专一性强的共生固氮体系^[1-2]。华癸中慢生根瘤菌 7653R 在侵入线阶段是如何逃逸植物防御反应、最终形成根瘤原基, 一直不为人们所了解。通过对 7653R 基因组的测序分析显示, 7653R 可通过 III 型分泌系统 (TTSS) 分泌一种效应蛋白 NopP。III 型分泌系统是微生物为适应在宿主细胞内存活和繁殖而形成的一种特殊机制^[3]。III 型分泌系统分泌的效应蛋白进入真核生物细胞可产生 2 种效果: 一部分效应蛋白可以干扰宿主信号转导途径, 使宿主细胞免疫紊乱或细胞骨架重排, 便于细菌侵入; 另一部分效应蛋白则是非致病蛋白, 可帮助细菌适应宿主细胞的胞内环境。

笔者所在实验室前期工作中以 NopP 蛋白为诱饵, 钓取并分离获得了与 NopP 互作的紫云英受体蛋白激酶基因 *nip43*, 编码一个类受体蛋白激酶 Nip43, 分子质量为 96 ku。将其氨基酸序列上传 Pfam 数据库中分析, Nip43 属于 B-lectin 结构域型受体蛋白激酶; 同源性分析结果表明, 其与苜蓿中的同源蛋白相似度最高。

笔者根据文献^[4]推断紫云英 Nip43 蛋白在侵入线形成阶段识别根瘤菌效应蛋白 NopP, 传递下

调植物防御反应的信号, 使根瘤菌逃逸植物防御反应, 进而导致共生体的形成。本研究利用酵母双杂交技术, 筛选鉴定与 Nip43 互作的靶蛋白 EPN, 构建 EPN 蛋白的结构域截短突变体, 确定 2 个蛋白互作关键结构域, 通过 Real-time qPCR 检测 *epn* 基因是否参与根瘤菌早期结瘤和信号转导过程, 旨在为探明受体蛋白激酶 Nip43 的下游蛋白信号传递通路提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

酵母双杂交所用酵母菌株 Y187、AH109 及诱饵质粒 pGBKT7 均来源于 Clontech 公司。用于大肠杆菌质粒转化的菌株 DH5 α 和华癸中慢生根瘤菌 7653R 均为笔者所在实验室保存的菌株。

1.2 主要仪器和试剂

PCR 仪 (Bio-Rad)、实验相关的酶及 DNA 分子质量标准均为 TaKaRa 公司产品, RACE 试剂盒购于 Clontech 公司, SYBER Green 试剂为 Roche 公司产品。

1.3 诱饵质粒的构建

根据 *nip43* 基因的信息, 设计引物: 上游 5'-GGAAT-TCCATATGAATTTCAAGACTCTAATTGG; 下游 5'-

收稿日期: 2015-06-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) (2010CB126500); 国家自然科学基金项目 (31371549 和 31460056); 高等学校博士点基金专项 (20110146110012)

叶竞阳, 硕士研究生。研究方向: 根瘤菌共生固氮体系分子机制。E-mail: snowsheep2011@163.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授。研究方向: 生物固氮、农业环境微生物。E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

C GGGATCCC TACAAAGATTCAATGCTAGG (下划线为酶切位点 *Nde* I 和 *Bam* H I)。以紫云英 cDNA 为模板进行 PCR 扩增: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。将回收的 PCR 产物和 pGBKT7 载体经过双酶切和酶连, 最终转化入大肠杆菌 DH5 α 。对大肠杆菌转化子进行测序分析及双酶切验证, 最终确定重组质粒的正确性。

1.4 紫云英 cDNA 文库的筛选

将诱饵质粒 pGBKT7-nip43-C 转化到酵母菌株 Y187 中, 在筛选文库前还应确认诱饵质粒的自激活活性和毒性。将转化子划线于 SD/-Trp/X-gal、SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上培养, 30 °C 培养 2~4 d 后, 观察菌落的生长状况及显蓝情况。若诱饵 BD-融合蛋白没有激活作用, 则酵母菌落为白色且在 SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上也不会生长。挑取 SD/-Trp 平板上直径大于 2 mm 的白色单菌落接种于 SD/-Trp 培养基中, 震荡培养 24 h, 观测培养液的 D_{600} 是否大于 0.8, 以确定诱饵质粒是否具有毒性。将检测无自激活活性与自毒性的诱饵质粒与 1.5 mL 的文库菌株 AH109 混合于 50 mL 的 2 \times YPDA 培养基中, 在 30 °C、50 r/min 的摇床中培养 24 h, 涂布于直径 200 mm 的 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上筛选阳性克隆。

1.5 阳性克隆的鉴定

挑取可以在筛选培养基 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上生长的阳性克隆, 接种到 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-gal 平板上, 30 °C 避光培养 2~3 d, 挑选显蓝色的阳性克隆进一步验证。通过菌落 PCR 排除有空载体及多个插入片段的阳性克隆。将筛选得到的阳性克隆经过回转验证, 点对点杂交等实验再次排除阳性克隆假阳性的可能。将复筛确定的阳性克隆进行测序, 测序结果通过 Blast 进行分析比对。

1.6 蛋白互作关键结构域的确定

根据 RACE 试剂盒的操作手册设计一段特异性引物扩增得到了 *epn* 基因的全长。根据 *epn* 基因的全长信息设计截短突变体的引物, 构建 2 个缺失突变体 *epn*-1 和 *epn*-2。将带有 *epn*-1 和 *epn*-2 片段的质粒 pGADT7 分别与诱饵质粒 pGBKT7-nip43-C 进行点对点杂交, 按一定浓度点种于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-gal 平板上, 30 °C 避光培养 2~3 d, 观察菌落生长与变蓝的情

况。通过 ONPG 法测定 β -半乳糖苷酶活性来确定蛋白互作的关键结构域。

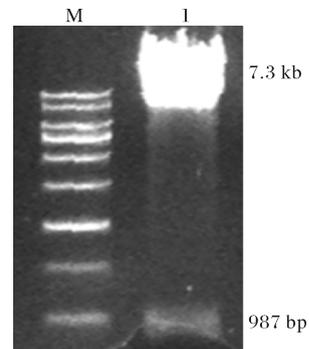
1.7 *epn* 基因表达量的测定

分别抽提接种 *M. huakuii* 7653R(Nod⁺ Fix⁺) 和未接菌的紫云英根、茎、叶部组织的 RNA; 分别抽提接种 *M. huakuii* 7653R(Nod⁺ Fix⁺) 的紫云英 6、12、18 h, 1、3、6、9、12 d 时间点根部组织的 RNA 纯化并测定浓度。在反转录时, 通过改变各样品的体积使各样品的 RNA 总浓度一致。将反转录产物按上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L、模板 2.0 μ L、ddH₂O 7.0 μ L, SYBR Green Marster(Rox) 10.0 μ L 的比例配成 20 μ L 的反应体系, 进行 Real-time qPCR: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 60 °C 20 s; 72 °C 20 s; 72 °C 10 min, 40 个循环。采用相对定量 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法, 得到 Ct 值。

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-nip43-C 的构建

根据 *nip43* 的序列信息设计 *nip43* 激酶结构域的引物, 通过 PCR 技术扩增获得了 *nip43* 激酶结构域的 987 bp 片段, 由于该基因片段位于 *nip43* 基因的 C 端, 故在本文中将该基因片段称为 *nip43*-C。将 *nip43*-C 片段通过 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切后, 用 T4 连接酶连接到同样经过双酶切的 pGBKT7 载体上, 转入大肠杆菌 DH10B 中, 菌落 PCR 验证, 抽提质粒, 双酶切验证质粒的正确性(图 1), 测序。



1: pGBKT7-*nip43*-C 双酶切片段; pGBKT7 载体 7.3 kb, *nip43*-C 片段 987 bp Double enzyme fragments of vector pGBKT7-*nip43*-C: 7.3 kb of vector pGBKT7, 987 bp of vector *nip43*-C; M: Marker 12.

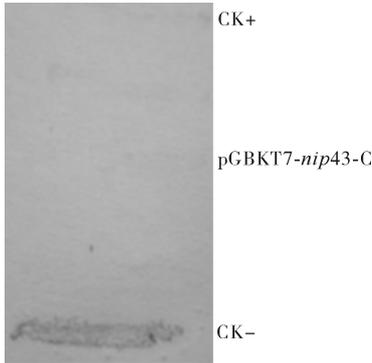
图 1 诱饵质粒 pGBKT7-*nip43*-C 的构建

Fig.1 Construction of bait plasmid pGBKT7-*nip43*-C

2.2 诱饵质粒 pGBKT7-nip43-C 自激活活性和毒性的检测

将带有 pGBKT7-*nip43*-C 诱饵质粒的酵母菌

Y187 划线于 SD/-Trp + X-gal、SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上培养。酵母菌无法在 SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上生长,且在 SD/-Trp + X-gal 平板及滤纸影印都不变蓝,说明诱饵载体没有自激活活性(图2)。在毒性



CK+ : 正对照; CK- : 负对照; pGBKT7-nip43-C 为重组质粒 CK+ ; Positive control; CK- ; Negative control ; pGBKT7-nip43-C is recombinant plasmid.

图 2 pGBKT7-nip43-C/Y187 平板影印法自激活活性检测

Fig.2 Testing the BD-nip43-C bait for auto-transcriptional activation

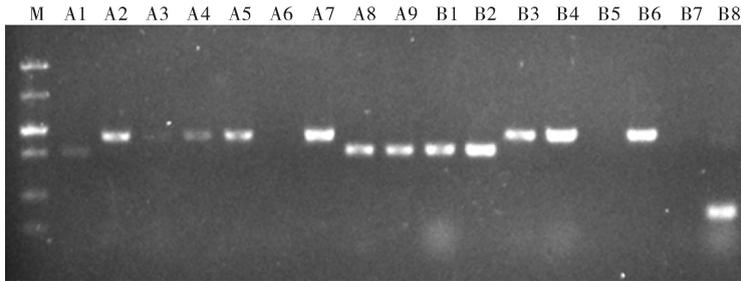
检测中,菌液 24 h 后培养液的 D_{600} 值为 3.466,明显大于 0.8,说明诱饵载体没有自激活活性和自毒性。

2.3 阳性克隆的筛选与验证

经过与紫云英 cDNA 文库的杂交,从筛选平板 SD/-Trp-Leu-His-Ade 上获得了 136 个初始克隆。挑取平板上大于 2 mm 的单菌落划线到 SD/-Leu-Trp-His-Ade + X-gal 平板上,通过检测报告基因 *lacZ* 的表达进行复筛。在 48 h 内变蓝的菌落初步确定为阳性克隆,总共有 17 个。挑取 17 个阳性克隆为模板、AD 通用引物为引物进行菌落 PCR,PCR 产物进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,检测筛选克隆是否有空载体及插入片段的大小(图 3)。

2.4 阳性克隆插入片段的序列分析

对这 17 个阳性克隆的测序结果进行 Blast 分析(表 1),可将阳性克隆分为 2 类:一类是带有 EN-TH/ANTH 结构域的网格蛋白聚合反应配体蛋白 EPN;另一类是植物抗逆结构域 LEA14。由于 EPN 蛋白定位于细胞膜,除了参与了网格蛋白的聚合反应,还参与细胞信号转导和肌动蛋白的调节过程。因此,本文着重于 EPN 蛋白的研究。



A1-B8: 阳性克隆菌落 PCR 产物的片段 Fragments of PCR products of positive clones; M: Marker 12.

图 3 阳性克隆的菌落 PCR 鉴定

Fig.3 Check the positive colonies by PCR

表 1 Nip43 诱饵筛选紫云英 AD-cDNA 文库阳性克隆测序及对比结果

Table 1 The results of positive clones after sequencing and Blast

编号 Code	名称 Name	数量 Number	同源基因/蛋白 Homologous gene(protein)
A1, A8, A9, B1, B2	脱水保护蛋白 Desiccation protectant protein	5	大豆(<i>Glycine max</i>)脱水保护蛋白 Le14 Desiccation protectant protein Le14 homolog
A2, A3, A4, A5, A7, B3, B4, B6	衔接蛋白 Epsin	8	苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)衔接蛋白 Epsin N-terminal homology (ENTH) domain containing protein

2.5 EPN 蛋白与 Nip43 蛋白关键互作结构域的确定

根据 *epn* 基因的全长信息设计截短突变体的引物,构建 2 个缺失突变体 *epn-1* (1~720 bp) 和 *epn-2* (721~1479 bp)。将经过自激活和毒性检测的带有 *epn-1*、*epn-2* 全长的质粒 pGADT7,分别与诱饵质粒 pGBKT7-nip43-C 进行“点对点”杂交,点

种于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade + X-gal 平板上,30 °C 避光培养 2~3 d,观察菌落,发现质粒在二缺平板上都能生长,但只有带全长和 *epn-1* 片段的质粒能在四缺平板上生长。通过 ONPG 法测定 β -半乳糖苷酶活性,确定了蛋白互作的关键结构域为 EPN 蛋白的 N 端,即 ENTH/ANTH 结构域(图 4)。

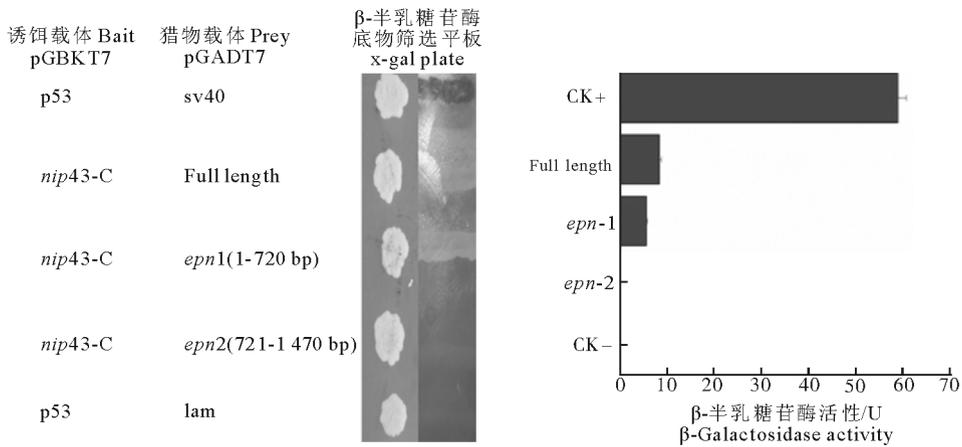
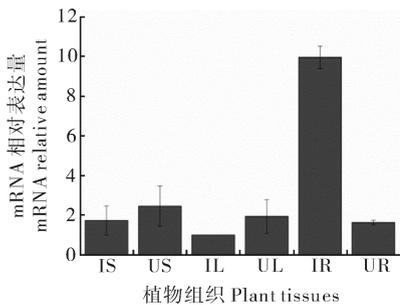


图 4 Nip43 与 EPN 在酵母细胞中相互作用

Fig.4 Interaction of Nip43 with EPN in the yeast

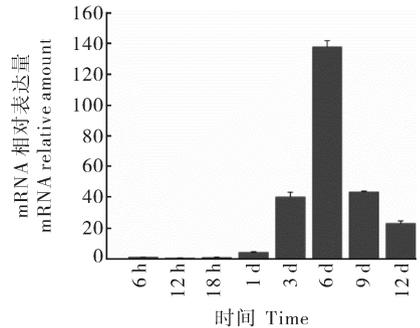
2.6 *epn* 基因的时空表达分析

在紫云英接种根瘤菌第 6 天时,分别收取接种根瘤菌的植株的根、茎、叶组织和未接种根瘤菌的植株的根、茎、叶组织,抽提 RNA 并反转录得到 cDNA,分别扩增紫云英 *actin* 确定 cDNA 质量。之后,利用 Real-time PCR 定量分析 *epn* 的组织表达特异性(图 5)。结果显示,*epn* 基因在紫云英中呈组织型表达,但在接种根中的表达量是其他组织的表达量的 5 倍,这说明 *epn* 基因参与了根瘤菌早期结瘤过程,为 Nip43 与 EPN 蛋白互作在空间上提供了证据。

图 5 *epn* 基因在植物组织中的表达Fig.5 Expression of *epn* in plant tissue

选择 6、12、18 h、1、3、6、9、12 d 共 8 个时间点的紫云英感染根部组织的 RNA 样品,经过 Real-time PCR 检测分析(图 6)可以看出,在 12 d 中,*epn* 在感染根部的表达呈倒 U 形变化,在第 6 天的表达量达到最高峰。通过与前期发现的 *nip43* 基因时序表达结果(*nip43* 表达最高峰在第 7 天)比较发

现,*epn* 和 *nip43* 的表达高峰时期及动态特征高度吻合。综上,*epn* 确实参与了早期根瘤形成阶段的信号转导过程,且 2 个基因的表达在时间上也呈现相关性,为 Nip43 与 EPN 的互作在时间上提供了证据。

图 6 *epn* 基因在感染根部不同时期的表达水平Fig.6 Expression level of *epn* gene in inoculated root at different stage

3 讨论

Nip43 蛋白属于类受体蛋白激酶,其 B-lectin 结构域参与调节细胞与细胞、宿主和病原之间的互作及免疫反应^[5],在植物中呈组成型表达。通过对拟南芥中 Nip43 同源蛋白的研究发现 B-lectin 结构域参与糖信号的识别和传递。在豆科植物与根瘤菌早期共生信息交流中涉及到多糖物质的识别和反应,如结瘤因子和表面多糖^[6]。表面多糖主要包括胞外多糖、脂多糖、荚膜多糖及其小分子衍生物等,这类多糖物质都在信号传递方面起作用,并且有助于细菌侵入^[7]。

EPN 蛋白含有一个 ENTH/ANTH 结构域,含有该结构域的蛋白大都可与磷脂酰肌醇(PtdIns(4,5)P₂)特异性结合,使细胞膜产生极大程度的弯曲

和液泡化,在胞吞作用的过程中作为网格蛋白组蛋白的配体蛋白发挥作用^[8]。EPN 蛋白可能作为一种荷载特异性配体蛋白(cargo-specific adaptor)参与网格蛋白介导的病原微生物的入侵。Chen 等^[9]通过随机光学显微重建法(STORM)发现 EPN 的人体同源蛋白 epsin1 会在流感病毒的细胞膜结合位点附近聚集,通过 *epsin1* 基因敲除实验证明,流感病毒无法通过网格蛋白介导的内吞作用侵入缺乏 *epsin1* 的细胞。

紫云英 EPN 蛋白的表达量在接种根瘤菌后明显上升,说明 EPN 蛋白的表达是受根瘤菌诱导的。而 EPN 与 Nip43 蛋白在感染的根中的表达量同时在接种根瘤菌后的第 6 天达到最高峰,说明 EPN 蛋白参与了 NopP 蛋白对于植物防御反应调节的信号通路。同时接种根瘤菌的第 6 天也是侵染线形成的时间点。侵染线是根毛细胞的细胞膜内陷,细胞壁物质沉积在内陷的质膜处,形成一种管状结构^[10]。在侵入线末端,根瘤菌以胞吞作用的形式进入宿主植物的皮层细胞^[11]。本研究只是初步鉴定了 Nip43 蛋白与 EPN 蛋白在体外的相互作用,其具体的分子机制还有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 李一星,李芳,周鑫兰,等.利用细菌双杂交文库筛选华葵中慢生根瘤菌 7653R 中与外膜蛋白 Opa22 互作的蛋白[J].华中农业大学学报,2014,33(2):28-33.

- [2] 李一星,王建云,石晓峰,等.紫云英非特异性转脂蛋白 AsIB259 的体外酶活性及在共生固氮中的功能[J].华中农业大学学报,2014,33(3):19-25.
- [3] DEAKIN W J, MARIE C, SAAD M M, et al. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234 [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2005, 18: 499-507.
- [4] NIEHAUS K, BECKER A. The role of microbial surface polysaccharides in the rhizobium-legume interaction [J]. Subcell Biochem, 1998, 29: 73-116.
- [5] BARRE A, HERVE' C, LESCURE B, et al. Lectin receptor kinases in plants [J]. Crit Rev Plant Sci, 2002, 21: 379-399.
- [6] HERVE' C, SERRES J, DABOS P, et al. Characterization of the *Arabidopsis* lecRK-a genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39: 671-682.
- [7] HIRSCH A M. Role of lectins and rhizobial exopolysaccharides in legume nodulation [J]. Curr Opin Plant Biol, 1999, 2: 320-326.
- [8] MARIJIN G F, IAN G M, BRIAN J P, et al. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin [J]. Nature, 2002, 419 (6905): 361-366.
- [9] CHEN C, XIAO W Z. Epsin 1 is a cargo specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus [J]. PNAS, 2008, 105(33): 11790-11795.
- [10] GAGE D J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(2): 280-300.
- [11] JONES K M, KOBAYASHI H, DAVIES B W, et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium Medicago* model [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(8): 619-633.

Screening and identification of the interacting protein with a RLKs protein Nip43 in *Astragalus sinicus*

YE Jingyang WANG Jianyun XIONG Xiaobo CHEN Dasong XIE Fuli LI Youguo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The S-TKs domain of *Astragalus sinicus* gene *nip43* was cloned into pGBKT7 and used as a bait plasmid. 17 original positive candidate clones were obtained with yeast two-hybrid screening method. One positive clone encoding an EPN protein out of importance was identified through sequencing the cDNA inserts. EPN is an adaptor in the polymerization of clathrins. The critical interaction domain of EPN with Nip43 was determined as ENTH/ANTH domain. Results of real-time qPCR showed that *epn* gene was involved in the early process of root nodulation.

Keywords *Astragalus sinicus*; symbiotic nitrogen fixation; yeast two-hybrid; Nip43; EPN; protein-protein interactions

(责任编辑:张志钰)