

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1320–1326; 4 October 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

与紫云英转脂蛋白 AsE246 相互作用靶蛋白的筛选及其基因表达特征

朱庆燕, 李一星, 王宁, 陈大松, 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:【目的】*AsE246* 是我们首次报道的紫云英根瘤特异表达的非特异性转脂蛋白 (nsLTP1: non specific lipid transfer protein 1) 编码基因。本实验旨在筛选和鉴定与 *AsE246* 相互作用的宿主植物靶蛋白, 并分析靶基因在共生和胁迫条件下的表达特征。【方法】利用酵母双杂交技术、小范围杂交技术及实时荧光定量 PCR, 筛选与 *AsE246* 的相互作用蛋白, 并定量分析靶基因在结瘤与固氮过程中的时空表达特性。【结果】获取一个阳性克隆, 其 cDNA 序列经 Blast 分析表明: 候选靶蛋白是一个 DnaJ-like 蛋白, 该蛋白相应基因命名为 *AsDJLI*。*AsE246* 与 *AsDJLI* 在酵母体内确实相互作用。*AsDJLI* 在固氮根瘤中特异性增强表达, 在 NaCl 胁迫下表达水平显著提高, 在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 胁迫下表达水平显著下降。【结论】本实验是筛选与 LTP 相互作用蛋白的首次报道。获得了直接的实验证据表明互作基因 *AsDJLI* 与 *AsE246* 具有高度相似的表达特征和功能, 为深入研究二者的相互作用及其在共生固氮和应答环境胁迫中的调控机制, 提供了一定的工作基础和理论依据。

关键词: 紫云英; DnaJ-like 蛋白; 表达特性; nsLTP1; 酵母双杂交

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1320-07

根瘤菌和豆科植物的共生固氮作用涉及到双方基因的相互协调表达, 基因信号的传递, 营养物质的交流和能量的供应。在结瘤过程中被诱导表达或表达增强的植物基因命名为结瘤素基因, 其编码产物称为结瘤素 (nodulin)。本室前期工作中, 通过抑制差减杂交技术, 分离获得了紫云英根瘤特异或增强表达的 13 个新结瘤素基因及其全长 cDNA。序列分析表明, 其中一个基因 *AsE246* 编码非特异性脂质转运蛋白 nsLTP1^[1], 与多种植物的 LTP1 氨基酸序列具有较高同源性, 含有 nsLTP1 蛋白特有的 AAI (Alpha Amylase Inhibitor subgroup) 和 AAI_LTSS 结构域 (Alpha Amylase Inhibitor, Lipid Transfer and Seed Storage proteins), 具有信号肽结构, N 端存在跨膜结构域。*AsE246* 编码的蛋白分子量 12.1 kDa、等

电点 pH 8.66、氨基端带有疏水性的信号肽, 这些特点也都与已报道的 nsLTP1 类似^[2]。采用 Real-time RT-PCR 对该基因的器官组织和时空表达特征进行检测。结果表明: *AsE246* 仅在紫云英根瘤中特异表达, 在感染植株的根茎叶等器官中、不接种对照根中及与菌根真菌互作形成的菌根共生体中不表达。在 NaCl 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 胁迫下的表达检测表明: 在 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理后, *AsE246* 基因转录量显著降低; NaCl 处理后, *AsE246* 基因转录量显著提高, 表明 *AsE246* 可能参与植物对盐胁迫的反应^[3]。总之, *AsE246* 是我们首次报道的根瘤特异表达 nsLTP1 基因, 明显区别于其它多数植物中存在的 LTP, 分析表明 *AsE246* 与紫云英根瘤固氮和应答环境胁迫具有密切关系。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划)——生物固氮作用的分子机理研究 (2010CB126500)

* 通信作者。Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 朱庆燕 (1985–), 女, 山东省泰安市, 硕士生, 研究方向为固氮分子生物学。E-mail: qingyan0812@163.com

收稿日期: 2010-04-27; **修回日期:** 2010-06-19

目前国内外关于 LTP 与根瘤共生固氮的关系报道极少,特别是对于 LTP 调节和作用机制的认识还远远不够,尤其是在共生固氮过程中,是否还有其它因子与其相互作用,它是如何调控固氮过程等问题目前仍没有明确解释。为查明 AsE246 在共生固氮过程中的调控和作用机制,本研究通过酵母双杂交技术首次筛选与 AsE246 相互作用的宿主靶蛋白,并研究靶基因的组织 and 时空表达特征,及其胁迫环境条件下的表达变化。结合前期发表的有关研究结果,预测靶蛋白和 AsE246 的相互作用机理,及其在共生固氮和胁迫应答中的功能,为后续深入研究 AsE246 的功能调控机制提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH109 和 Y187 菌株,pGBKT7 和 pGADT7-Rec 质粒均购自 Clontech 公司(美国,加利福尼亚),华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 DH10B 由农业微生物学国家重点实验室(华中农业大学)保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:Dnase I (Rnase-free), Reverse Transcriptase M-MLV, Ribonucleasa Inhibitor (TaKaRa), Taq DNA 聚合酶、ExTaq 酶、T4 连接酶 (TaKaRa); SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (Applied Biosystem); 各种限制性内切酶、DNA 及蛋白质分子量标准为 Fementas 公司产品。Step One Real-time PCR System(美国,ABI);微量核酸蛋白测定仪 GeneQuant 100(美国通用公司);PCR 仪 (Bio-Rad)。

1.2 紫云英组织材料采集

将饱满的紫云英种子进行消毒处理:先用 95% 无水乙醇处理 5 min,再用 3% 次氯酸钠浸泡 5 min,然后用无菌水漂洗 7-8 次,最后把种子平摊于 2% 的琼脂培养基表面,22 $^{\circ}$ C 避光培养,待芽长出后移栽至装有灭菌细沙的钵体中培养,待第一片真叶长出后接华癸中慢生根瘤菌 7653R。培养期间,及时补充无氮营养液。在不同时期按照计划采集根瘤等器官组织材料,-80 $^{\circ}$ C 保存。

紫云英根瘤总 RNA 抽提:按照 Trizol 法提取接种华癸中慢生根瘤菌及胁迫条件下,紫云英根瘤组织总 RNA,经 DNase I 处理后,测定 RNA 纯度和浓度。经 1.2% 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。以纯化 RNA 为模板进行 RT-PCR,用紫云英组成型

表达的 Ubiquitin 基因做内参基因,检测分析目标基因的表达特性和变化。

1.3 诱饵基因扩增和诱饵质粒构建

根据本室在 NCBI 登记的 AsE246 基因序列(DQ199648)设计引物,上游引物:5'-CGGAATTCATGAAATTTGCATATGTGGTT-3' (含 EcoR I 克隆位点),下游引物:5'-CGGGATCCCTAGACCAACAAAGTTTGAAGTAT-3' (含 BamH I 克隆位点)。提取紫云英固氮正常根瘤的总 RNA,根据 RT 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链,以单链 cDNA 为模板扩增目的片段 AsE246。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。PCR 产物 AsE246 及 pGBKT7 质粒,以 EcoR I 及 BamH I 进行双酶切。利用 T4 连接酶构建重组质粒 pGBKT7-AsE246,双酶切及测序分析鉴定重组质粒的正确性。

1.4 诱饵质粒筛选紫云英文库

将测序正确的 pGBKT7-AsE246 转化 Y187 酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Trp 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养。通过菌落 PCR 检测诱饵质粒是否转化成功,然后将转化成功的菌株分别划线于 SD/-Trp + X-gal 和 SD/-Trp/-Leu 的平板上,观察 SD/-Trp + X-gal 平板上 96 h 内菌落是否变成蓝色以检查其自激活活性。挑取 SD/-Trp 平板上的单菌落(直径大于 2 mm)接种于 SD/-Trp 的液体培养基中摇床培养(200 r/min),观察 24 h 内 OD₆₀₀ 能否超过 0.8,以检测诱饵蛋白的毒性。将无自激活、无毒性的 pGBKT7-AsE246/Y187 菌株与已构建的含有紫云英 cDNA 文库 pGADT7-cDNA/AH109 菌株进行杂交,28 $^{\circ}$ C 摇床(30-50 r/min)培养 20-24 h 后,在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 的平板上筛选阳性克隆子,同时在 SD/-Trp、SD/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu 平板上涂布计算杂交效率。

1.5 阳性克隆子鉴定

将初筛获得的阳性克隆接种于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade + x-gal 平板,观察克隆子是否显蓝以复筛确证。将复筛获得的阳性克隆进行菌落 PCR,检查插入片段大小。抽提酵母菌株阳性克隆质粒并转化大肠杆菌,利用载体抗性不同分离出克隆有文库插入片段的阳性文库克隆,将含文库质粒的阳性克隆进行 PCR,再次检测扩增的插入片段大小。最后,抽提大肠杆菌阳性克隆质粒进行酵母回转、小范围杂交等再次验证阳性克隆。将最终确定的阳性克隆进行测序,结果与 NCBI 数据库比对,用 DNAMAN

等软件进行生物信息分析。

1.6 目标基因的表达检测分析

采用 Real-time RT-PCR 检测目的基因在根瘤等

组织器官中、以及胁迫条件下根瘤中的表达水平。有关引物序列见表 1。

表 1 目标基因 RT-PCR 和 Real-time PCR 引物

Table 1 The primers used for RT-PCR and Real-time RT-PCR of target genes		
Target genes and use of primers	Sequences of primers (5'→3')	Sizes/bp
DnaJ domain of <i>AsDJLI</i> PCR	left: ATGATTCAACAAATGCAGCATCC right: TCAGTGAGGGACAATGTGTGCTC	300
<i>AsDJLI</i> Real-time PCR	left: TGA CTCACTTGGATGGCAGAC right: GGCCTTGTTGGCAGAATAG	214
18S rRNA gene Real-time PCR	left: GTATGGTCGCAAGGCTGAAAC right: TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT	232

2 结果和分析

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-AsE246 构建

用高保真性 ExTaq 酶扩增出 *AsE246* 的整个编码区 (399 bp)。用 *EcoR* I 及 *Bam*H I 双酶切 pGBKT7 质粒及 PCR 扩增出的 *AsE246*, 利用 T4 连接酶构建重组质粒 pGBKT7-*AsE246*, 双酶切鉴定重组质粒正确, 测序结果与已知序列一致, 诱饵质粒构建成功。将诱饵质粒 pGBKT7-*AsE246* 转化酵母菌株 Y187, 在 SD/-Trp + X-gal 平板上显白色, 在 SD/-Trp/-Leu 上不生长, 鉴定其无自激活性, 并且在培养过程中发现其能正常生长, 确定诱饵质粒对于宿主酵母菌株没有毒性, 可用于酵母双杂交进行互作靶蛋白的初步筛选。

2.2 紫云英 AD-cDNA 文库质量检测

按照有关操作标准和计算方法, 我们检测了所构建文库的质量。结果显示转化效率为: 每 3 μg pGADT7 有 1.02 × 10⁶ 转化子。从紫云英 AD-cDNA 文库中随机挑取部分文库酵母克隆, 抽取其质粒进行 PCR 检测插入片段大小 (图 1), 电泳结果可见: 插入片段集中在 500 bp - 1.5 kb 范围内, 表明构建文库覆盖较好, 空载率为 7.8%, 所构建的文库达到了预期的质量要求, 可以作为酵母双杂交的靶基因文库。

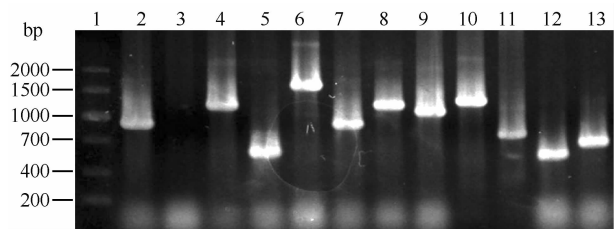


图 1 AD-cDNA 文库克隆随机 PCR 检测插入片段
Fig. 1 Insert size detection by PCR for random clones chosen from AD-cDNA library. M. Marker V; 1 - 12: Inserts of random cDNA clones.

2.3 阳性克隆筛选和验证

利用诱饵菌株从 AD-cDNA 文库中初筛获得 3

个阳性克隆, 并在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/ X-α-Gal 平板上进行 (设置正负对照) 复筛, 阳性克隆在筛选平板显蓝色。最后仅获得一个阳性克隆 (图 2-A 箭头所指克隆)。抽提阳性克隆质粒, 利用 AD 质粒上的同源引物 (5'-CTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACC-3' 和 5'-AGTGAAGTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3') 进行 PCR, 电泳结果显示目标插入片段, 即编码靶蛋白基因片段约为 1.1 kb。将该目标质粒转化大肠杆菌, 利用质粒上的抗性分离纯化目标质粒。并采用双酶切验证 (图 2-B) 目标质粒后进行酵母回转, 与诱饵菌株进行小范围杂交, 结果显示所有酵母克隆全部显蓝。最后将通过验证的阳性 cDNA 克隆片段提交公司测序。

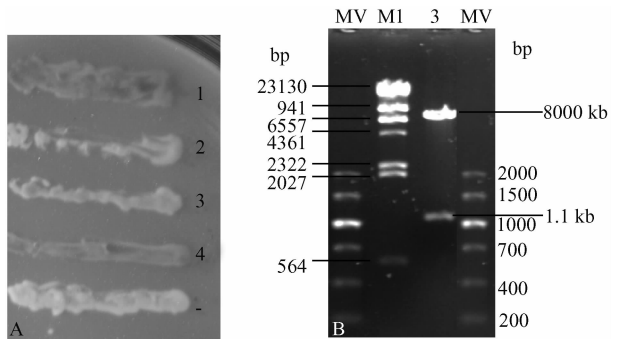


图 2 阳性克隆复筛结果及质粒双酶切验证
Fig. 2 Results of re-screening for positive clones and confirmation of positive clone plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I. A: 1. positive AD cDNA clone; +. positive control, BD-53/Y187 strain mated with AD-SV40/AH109; -. negative control. B: MV. Marker V; M1. λDNA/*Hind* III; 3. plasmid of positive clone digested by *EcoR* I and *Xho* I.

2.4 阳性克隆 cDNA 序列分析和功能域验证

将阳性文库质粒的 cDNA 测序结果通过 DNAMAN 整理, 输入 NCBI 中进行 Blast 分析。发现该 cDNA 片段编码一个含有 DnaJ-C super-family 结

构域的蛋白。为了更加有依据地推测靶蛋白功能及与诱饵蛋白的互作关系,我们将靶蛋白与其同源蛋白的相同长度同源区域进行了比对分析(表2)。结果显示:阳性克隆编码蛋白特别是其 DnaJ 结构域与大豆 PM37 (AAD51625.1)、拟南芥 ATJ2 (NP_568412.1)等 DnaJ-like 蛋白具有很高的同源性,因而我们将从文库中钓取的该互作蛋白相应编码基因命名为 *AsDJL1* (HM064455)。同源分析结果表明:AsDJL1 的氨基酸比同源蛋白少,但是与包含相同结构域、同等大小的同源蛋白比对,同源性很高。由此推测:AsDJL1 可能是完整蛋白中一部分包含了 J 结构域的蛋白片段,也有可能属于 DnaJ I 蛋白,而 DnaJ I 型蛋白所具有的 Zn 指模型有可能像拟南芥中的 Zn 指模型一样,调节与多种细胞活动有关的蛋白和蛋白的相互作用并且作为 ABA 信号传导的

重要调节子^[4-6],与 LTP 的参与信号传递的功能相似^[7]。DnaJ-like 蛋白除了能转运折叠蛋白外,也能和 LTP 一样参与植物对生物或非生物因素的抗性反应^[8-9]。AsDJL1 与 AsE246 的功能相似性,使我们的继续研究有了一定的理论依据。

实验证明:AsDJL1 没有自激活性,自身间也不发生相互作用,也不能与空 AD、BD 载体发生作用。为研究 DnaJ-C 结构域是否与 LTP 相互作用以再次证实 AsDJL1 与 AsE246 的相互作用关系,我们以紫云英 cDNA 为模板,扩增出整个 DnaJ-C 结构域的编码框序列。将单独构建的 AD-DnaJ 质粒转入 AH109 酵母菌株,再次与诱饵菌株 BD-AsE246/Y187 小范围杂交,发现阳性融合子显示的蓝色更深,因而确证了 AsDJL1 中所含有的 DnaJ-C 结构域与诱饵蛋白 AsE246 存在的体内相互作用。

表 2 *AsDJL1* 编码蛋白的同源比对结果

Table 2 Comparison of protein encoded by *AsDJL1* and homologous proteins

GenBank No.	Homologous protein	Homology/%
AAD51625.1	seed maturation protein pm37 [glycine max]	89.83
XP_002316479.1	predicted protein [populus trichocarpa]	88.14
NP_001149958.1	DnaJ protein [Zea mays]	86.02
ABB16989.1	DnaJ-like protein [solanum tuberosum]	85.17
NP_568412.1	ATJ2; protein binding [Arabidopsis thaliana]	77.97

2.5 目标基因 *AsDJL1* 在紫云英器官组织中的表达特征

抽提紫云英共生条件下不同时间和不同器官组织的总 RNA,调整至一致浓度反转录成 cDNA,进行 Real-time-PCR 检测靶基因 *AsDJL1* 在器官组织中的表达特征(图3、图4)。由图3可见:AsDJL1 在正常固氮根瘤中表达量最高,在感染根、茎和叶中表达量较低,在不接种根瘤菌的对照根和不固氮无效根瘤

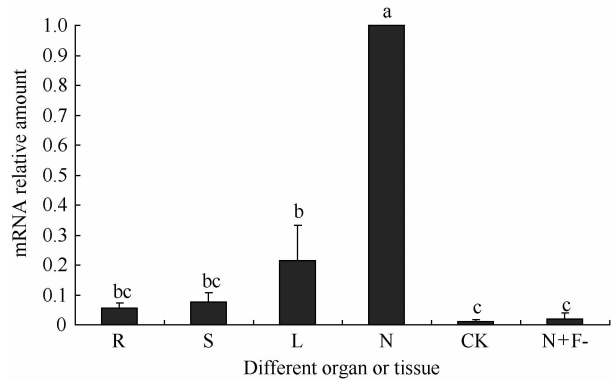


图3 *AsDJL1* 在紫云英不同器官组织的表达特征
Fig.3 Expression pattern of *AsDJL1* in different organ/tissue of *A. sinicus*. R: root; S: stem; L: leaf; N: nodule; CK: no inoculation; N⁺F⁻: invalid nodule (*P* < 0.05).

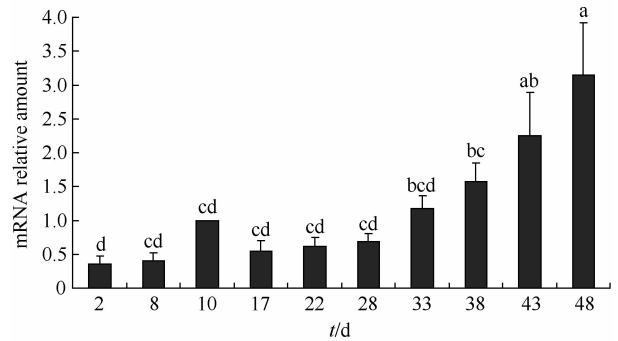


图4 *AsDJL1* 在紫云英根瘤发育和固氮过程中的表达特征 (*P* < 0.05)
Fig.4 Dynamic expression pattern of *AsDJL1* in the program of root nodule development and nitrogen fixation of *A. sinicus* (*P* < 0.05).

中表达量几乎为零,经过统计学分析证明 *AsDJL1* 在固氮有效根瘤中呈特异性增强表达,这与 *AsE246* 在根瘤中特异性表达特征具有高度的一致性^[1],从一个侧面说明了该靶蛋白和 AsE246 可能相互作用而参与结瘤固氮过程。由图4还可见:在根瘤发育固氮的过程中,随着时间的推移,靶基因 *AsDJL1* 在根瘤中的表达量在后期呈明显上升趋势,我们推测该基因可能还与共生固氮后期的根瘤衰老有关。

2.6 目标基因 *AsDJL1* 在根瘤应对胁迫条件下的表达变化

以接种华癸中慢生根瘤菌的紫云英植株为正对照,不接菌处理为负对照,胁迫处理为实验组。采用2种胁迫处理方式:80 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄。在接菌第15天后开始实施胁迫处理,在胁迫处理15 d后收获根瘤材料,抽取其总RNA并调至一致浓度。采用实时荧光定量PCR技术进行*AsDJL1*基因的相对定量分析(图5),使用相同的试剂、引物及相同浓度的模板,测定分析实验重复3次,每个样品设置3个重复。结果表明:NaCl胁迫处理的紫云英根瘤中的该基因表达量高于正对照,(NH₄)₂SO₄处理根瘤中其表达量明显低于正对照,经过表达差异性分析得到两种胁迫处理下的*AsDJL1*表达量都具有显著性差异。NaCl处理后*AsDJL1*表达增高,推测*AsDJL1*与NaCl胁迫应对机制有关,(NH₄)₂SO₄处理后*AsDJL1*表达降低,这与根瘤固氮活性明显降低相一致。总体看来在相同的胁迫条件和处理方式下,*AsDJL1*的表达变化与*AsE246*的表达变化^[3]具有高度的一致性,进一步说明了这两种蛋白的相互作用关系。

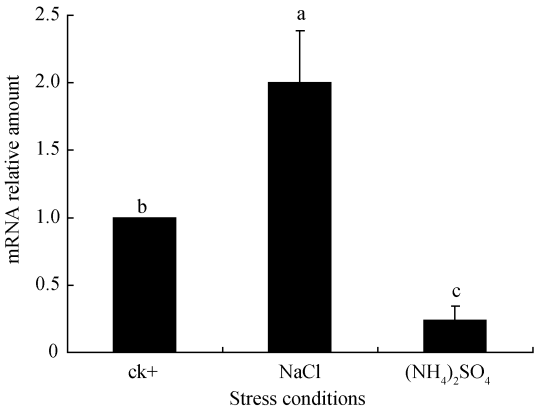


图5 胁迫条件下紫云英根瘤中*AsDJL1*的表达变化($P < 0.05$)

Fig.5 Expression changes of *AsDJL1* in root nodules of *A. sinicus* under stress conditions($P < 0.05$).

3 讨论

本文利用构建的pGBKT7-*AsE246*/Y187诱饵菌株,从紫云英AD cDNA文库中钓取了与*AsE246*相互作用的靶蛋白,靶蛋白含有DnaJ-C结构域,属于DNA蛋白家族。研究发现DnaJ蛋白有3种,I型为真正DnaJ蛋白,II和III型蛋白是DnaJ-like蛋白。DnaJ蛋白是Hsp70伴侣分子系统的辅助蛋白,除了参与蛋白的折叠、积累、转运和修复外^[10-11],也参与

细胞对压力的抗性反应等^[12-14]。诱饵蛋白*AsE246*是一种特殊的转脂蛋白(Lipid Transfer Protein, LTP),在植物地下部分且只在根瘤中表达。实验证明,LTP除了可以转运脂类物质,还具有诸多作用:参与植物对真菌抗性的反应过程^[15],增强植物抵抗和适应性如水胁迫、盐胁迫、金属胁迫、热激和冷处理等恶劣环境,也会由于稳定的四个二硫键成为食物过敏原^[16]。虽然体外实验对于LTP研究比较透彻,但其在体内具体作用和调节机制还不清楚。

本文通过酵母双杂交系统,获得与*AsE246*相互作用的DnaJ-like蛋白*AsDJL1*。*AsE246*和*AsDJL1*所属的蛋白家族,在功能上具有很大的相似性,从侧面说明它们之间可能有相互调节的作用。二者均与生物或者非生物因素的抗性有关,可对热、盐和氧化等多种胁迫产生应答使植物增强抗逆境胁迫能力^[17]。首先,LTP与DnaJ蛋白都在植物病理防御机制中有着重要作用。LTP作为抗菌肽,除了参与防御信号转导及角质形成来抵御病菌侵染,自身也具有一定的真菌致死性,透过改变细胞膜通透性杀死真菌,但毒性不影响宿主^[18]。DnaJ蛋白可能会参与某些蛋白的合成或是错误蛋白的修复来阻止病菌的侵入,两者也可能会共同协作产生防御应答。其次,LTP与DnaJ蛋白可增强宿主对盐、热、冷等非生物胁迫的抗性,使植物在逆境中能够生存。LTP被多次试验证明可增强宿主对盐、热、冷和水等多种胁迫的抗性^[3,8];DnaJ蛋白作为Hsp70蛋白的辅助蛋白,参与细胞对压力的抗性反应,调节胆固醇合成以接收细胞对外界的热、缺氧等不适环境做出的适应性反应,HSP70能通过DnaJ蛋白识别、结合及提供多肽底物来保护酶结构,增强生物抗性,使细胞膜免受重金属伤害。Geetha等(2009)通过对花生进行缺水 and 干旱实验,证明了nsLTP和DnaJ蛋白的表达量在缺水胁迫中都呈现上升趋势,两者对胁迫都表现出抗性^[19]。

本文还通过实时荧光定量PCR分析,结果显示*AsDJL1*和*AsE246*的组织 and 时空表达、以及胁迫条件下的表达变化等特征,确实存在着高度的一致性。基于由本实验结果和文献报道,我们可以分析诱饵蛋白*AsE246*与靶蛋白*AsDJL1*相互作用的可能途径。首先,实验证明LTP中存在着与CaM相似的位点,可能会参与脱落酸、茉莉酸的调节过程参与信号的传导^[19];而DnaJ蛋白也推测参与信号的转导,可为HSP70分子伴侣系统提供蛋白信号;2种蛋白都具有ABA信号传导的功能^[21-22],推测它们之间可

能存在着信号的间接联系,共同参与根瘤发育、共生固氮和衰老过程。其次,DnaJ 蛋白能调节脂类合成^[23],LTP 蛋白能转运脂类物质,那么我们预测这两种蛋白可以来完成脂类加工转运的一系列过程。DnaJ 蛋白作为一种分子伴侣的辅助蛋白,能够参与 LTP 蛋白折叠、转运及修复,LTP 作为一种分泌性蛋白,极有可能与 DnaJ 蛋白存在相互作用。

总之,本文首次报道了与 LTP 相互作用的靶蛋白 AsDJL1,我们分析认为 AsE246 与 AsDJL1 蛋白可能形成复合物共同协作,参与根瘤共生固氮作用和胁迫应答机制。但它们在共生固氮体系的具体功能及机制,还需要进一步的深入研究,如可通过 RNAi 技术研究目标基因沉默后的共生表型,通过双分子荧光互补 (BiFC) 技术研究目标蛋白在活细胞内的互作和亚细胞定位等等。

参考文献

- [1] Chou MX, Wei XY, Chen DS, Zhou JC. Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(11): 2673-2685.
- [2] Arondel VV, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 2000, 157: 1-12.
- [3] Chen DS, Li YG, Zhou JC. The symbiosis phenotype and expression patterns of five nodule-specific genes of *Astragalus sinicus* under ammonium and salt stress conditions. *Plant Cell Report*, 2007, 26: 1421-1430.
- [4] Ham BK, Park JM, Lee SB, Kim MJ, Lee IJ, Kim KJ, Kwon CS, Paek KH. Tobacco Tsipl, a DnaJ-Type Zn Finger protein, is recruited to and potentiates Tsi1-mediated transcriptional activation. *Plant Cell*, 2006, 18: 2005-2020.
- [5] Bu Q, Li H, Zhao Q, Jiang H, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Wang D, Li C. The *Arabidopsis* RING finger E3 ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling in seedling development. *Plant Physiology*, 2009, 150: 463-481.
- [6] Sung DL, Won CY, Jun CM, Dong SK, Byung ML, Cheol SJ. A gene family encoding RING finger proteins in rice: their expansion, expression diversity and co-expressed genes. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72: 369-380.
- [7] Sujon S, Young JK, Ki DK, Byung KH, Sung HO, Jeong SS. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Report*, 2009, 28: 419-427.
- [8] Fatma L, Stephanie BM, Yanoura N, Nelly L, Christine P, Annick J. DjlA, a Membrane-Anchored DnaJ-Like Protein, Is Required for Cytotoxicity of Clam Pathogen *Vibrio tapetis* to Hemocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(18): 5750-5758.
- [9] George S, Parida A. Characterization of an Oxidative Stress Inducible Nonspecific Lipid Transfer Protein Coding cDNA and its Promoter from Drought Tolerant Plant. *Prosopis juliflora*. *Plant Molecular Biology Report*, 2010, 28: 32-40.
- [10] Thomas S, Jurgen S. Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33: 181-185.
- [11] Shen Y, Hendershot LM. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Molecular Biology Cell*, 2005, 16: 40-50.
- [12] Reyes F, Marchant L, Norambuena L, Ricardo N, Herman S, Ariel O. AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, is located in the endoplasmic reticulum and up-regulated by the unfolded protein response. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 9145-9151.
- [13] Baniwal SK, Chan KY, Scharf KD, Nover L. Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 3605-3613.
- [14] Tamura K, Takahashi H, Kunieda T, Fuji K, Shimada T, Hara NI. *Arabidopsis* KAM2/GRV2 is required for proper endosome formation and functions in vacuolar sorting and determination of the embryo growth axis. *Plant Cell*, 2007, 19: 320-332.
- [15] Jayaraj J, Punja ZK. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Report*, 2007, 26: 1539-1546.
- [16] Fernandez RM. The place of lipid transfer proteins (LTP) in the cross-reactivity of plant foods. *Revue francaise d'allergologie*, 2009, 49: 433-436.
- [17] Oliveira CA, Valdirene MG. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology A concise review. *Peptides*, 2007, 28: 1144-1153.
- [18] Regente MC, Giudici AM, Villalain J, Canal LD. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein

- involve membrane permeabilization of target cell. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 40: 183-189.
- [19] Geetha G, Harshavardhan VTG, Kalaarasi PJ, Dhanalakshmi RI, Muthappa SK, Nese S, Makarla UK. Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Molecular Genet Genomics*, 2009, 281: 591-605.
- [20] Wang CM, Xie WQ, Chi F, Hu WQ, Mao GH, Sun DY, Li CF, Sun Y. BcLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM. *Plant Cell Report*, 2008, 27: 159-169.
- [21] Maria LF, Heidi F, Ronald WS. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley Ltp gene is determined by a shortened promoter sequence. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57: 35-51.
- [22] Sung DL, Won CY, Moon JC, Dong SK, Byung ML, Cheol SJ. A gene family encoding RING finger proteins in rice: their expansion, expression diversity, and co-expressed genes. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72: 369-380.
- [23] Robichon C, Varret M, Liepvre XL, Lasnier F, Hajdich E, Ferre P, Dugail I. DnaJA4 is a SREBP-regulated chaperone involved in the cholesterol biosynthesis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1761: 1107-1113.
- [21] Maria LF, Heidi F, Ronald WS. The complex

Screening of target protein interacting with lipid transfer protein AsE246 of *Astragalus sinicus* and expression characteristics of corresponding encoding gene

Qingyan Zhu, Yixing Li, Ning Wang, Dasong Chen, Youguo Li *

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

Abstract: [**Objective**] *AsE246* was a novel nodule-specific expressed nodulin gene encoding non-specific lipid transfer protein 1 (nsLTP1) of *A. sinicus*. We screened and identified host plant target protein interacting with *AsE246*, and characterized the expression patterns of target gene under symbiotic and stress conditions. [**Methods**] Yeast two-hybrid system, small-scale yeast hybridization test and real-time PCR technique were used to capture the host target protein that interacts with the bait protein *AsE246*, and to quantitatively analyze the temporal and spatial expression characteristics of target gene during root nodule development and nitrogen fixation process. [**Results**] One positive clone was obtained, its cDNA insert sequence and Blast analysis showed that: the target protein was a DnaJ-like protein, thus the corresponding encoding gene was named as *AsDJLI*. *AsDJLI* was specifically-enhancing expressed in nitrogen-fixing root nodules, and significantly increased under NaCl stress while significantly decreased under $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stress. [**Conclusion**] This work was the first report on the isolation of proteins interacting with LTP. The work obtained some direct and convincing evidences to show the interacting gene demonstrated high similarity as *AsE246* in expression patterns and functions involved. The present progress provided a basic foundation and theoretical basis to undertake any further investigation into their interaction, and regulation mechanism associated with symbiotic nitrogen fixation or response to environmental stress.

Keywords: *A. sinicus*; DnaJ-like protein; expression characteristics; nsLTP1; yeast two-hybrid

(本文责编: 张晓丽)