

紫云英 AD-cDNA 文库构建及与豆血红蛋白 Lb 相互作用靶蛋白的筛选

刘燕, 谷慧琳, 熊小波, 李一星, 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】本文旨在构建紫云英酵母双杂交 AD-cDNA 文库和互作靶蛋白筛选平台, 为深入研究共生固氮作用的分子机理奠定工作基础。【方法】以接种华癸中慢生根瘤菌 7653R 的豆科植物紫云英不同时期根部组织为材料, 抽提和纯化 RNA, 构建了一个酵母 AD-cDNA 文库。库容量达到 $1.02 \times 10^6/3 \mu\text{g}$ pGADT7-RecDNA, 插入片段大小 1-1.5 kb 左右。以紫云英豆血红蛋白基因 AsB2510 构建诱饵载体 pGBKT7-AsB2510, 利用酵母双杂交技术, 筛选与诱饵蛋白相互作用的靶蛋白。【结果】在含有 X-gal 的 SD 四缺培养基上筛选得到 26 个克隆, 经过质粒抽提、PCR 鉴定、回转酵母验证获得 10 个阳性克隆。【结论】对阳性克隆的外源片段进行了测序和同源性分析, 发现一个值得深入研究的含有 tify domain 和 Divergent CCT motif 的转录调控因子。

关键词: 紫云英; 华癸中慢生根瘤菌 7653R; AD-cDNA 文库; 酵母双杂交; AsB2510; 互作蛋白

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1607-06

根瘤菌和豆科植物的共生固氮是宿主植物与微生物相互识别和信号分子间相互作用的结果, 包括早期结瘤阶段和晚期固氮阶段, 大量的根瘤菌和宿主植物基因参与其中。近年来, 在早期根瘤发生、发展和形成过程中宿主植物与根瘤菌相互识别、信号分子间相互作用的研究取得了突破进展, 如在宿主豆科植物中鉴定出结瘤因子受体和控制结瘤的关键基因, 其信号传导的主要途径和关键蛋白相互作用亦得到确定^[1]。晚期的研究则相对较少, 缺乏系统和深入的研究, 特别是在宿主植物参与或控制类菌体及根瘤发育、固氮等过程有关的功能基因、信号分子和蛋白质相互作用等方面有待加强。近年来随着豆科植物分子生物学和基因组学的发展, 这方面的研究取得了较大进展, 科学家们从豆科植物中分离出很多固氮相关的功能基因, 其中最具代表性的是豆血红蛋白基因 (leghemoglobin, Lb), 它控制和保

持类菌体周围的低氧环境, 保护固氮酶活性, 被认为是固氮的标志性基因^[8]。近年的研究^[9]表明 Lb 还在根瘤发育和固氮过程中具有多种其他重要功能, 但其作用及调控机制尚未阐明。

酵母双杂交技术是一种从基因水平分析蛋白质之间相互作用的灵敏方法^[2], 该方法在研究蛋白质间相互作用时可保持蛋白质在细胞内的天然构象, 能够反映蛋白质间的真实作用, 因而被广泛用于蛋白质相互作用的研究。构建 cDNA 文库也成为研究基因组学的基本手段之一, 已广泛用于研究不同发育阶段基因表达的变化、某特定发育期基因的表达情况、克隆新型细胞因子和分离新的组织特异基因等^[3-4]。通过酵母双杂交技术来筛选和研究与重要诱饵蛋白相互作用的靶蛋白, 将提供直接有力的实验证据揭示根瘤发育、固氮和衰老等过程等的蛋白互作网络和调控机制。

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划“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: 刘燕 (1984-), 女, 山西榆次人, 硕士研究生, 微生物学专业, 研究方向生物固氮。E-mail: hhcoco@sina.com

收稿日期: 2010-03-23; **修回日期:** 2010-05-15

紫云英-华癸中慢生根瘤菌共生固氮体系是我国具有长期研究历史、特色鲜明的一种共生固氮资源。紫云英个体小,生长迅速,易于室内栽培、它和华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)有着专一的共生关系,互作结果形成不定型根瘤^[5]。本研究利用酵母双杂交系统构建了高质量的华癸中慢生根瘤菌 7653R 侵染紫云英后的根部组织 cDNA 文库,同时以豆血红蛋白 Lb 作为诱饵构建载体。通过对 cDNA 文库的初步筛选,获得一个重要的转录调控因子,这为深入阐明 Lb 在共生固氮过程中的功能和调控机制提供了新的研究材料和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:根瘤菌菌株为华癸中慢生根瘤菌 7653R。酵母双杂交所用菌株为 AH109 和 Y187,质粒为 pGADT7-Rec、pGADT7-SV40、pGBKT7、pGBKT7-53 和 pGBKT7-Lam。

1.1.2 试剂与仪器:Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit (Cat. Nos. 630445)、Advantage® 2 PCR Kit (Cat. Nos. 639207) 购自 Clontech 公司。常规分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司及 Fermentas 公司,引物均由赛百盛公司合成,DNA 序列由南京金斯瑞生物科技有限公司测定。

1.2 总 RNA 抽提

紫云英种子经 95% 乙醇和 NaClO 表面灭菌后,在琼脂平板上萌发。萌发后移栽到灭菌沙钵中,待幼苗长出第一片真叶后,接种华癸中慢生根瘤菌 7653R。分别在接种后 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d 收获根部组织(即感染根和根瘤),液氮中研磨后加入 Trizol 混匀。将上述各材料按照相等比例混合移入离心管,用 Trizol 法提取总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 质量和浓度,符合要求则加入 RNase 抑制剂放入 -80℃ 保存。

1.3 AD-cDNA 文库构建

以总 RNA 为模板,以 CDSIII 和 SMART III 为引物,进行反转录,然后以得到的 cDNA 为模板,利用试剂盒提供的 PCR 引物,进一步扩增得到双链 cDNA。具体操作按照 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit (Clontech) 中的说明进行双链 cDNA 用 CHROMA SPINTM TE-400 树脂柱纯化后,经 3 mol/L NaAc 和 95% 乙醇沉淀过夜,离心去上清,干燥后加 20 μL 去离子水溶解备用。

双链 cDNA 和 Sma I 线性化的 pGADT7-Rec 质

粒共转化酵母菌株 AH 109。转化后将细胞悬浮液涂布到酵母选择性培养基 SD/-Leu 平板上,30℃ 培养 5 d。在每一个待收获的平板上加入 5 mL 冻藏液(含 25% 甘油的 YPD)。收集并均匀混合所有平板上得到的酵母细胞悬液。取 1 mL 用于血球计数板计数,其余分装小管于 -70℃ 保存。

利用酵母文库通用引物(5'-AD:5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3' 和 3'-AD:5'-GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3'),通过菌落 PCR 检测文库插入片段的大小。

1.4 诱饵载体构建及文库筛选

根据本研究室前期工作中克隆的紫云英豆血红蛋白 AsB2510 (GenBank: DQ199647) 基因序列,设计引物(上游:5'-CCGGAATTCATGGGTTTCACTGAGGCACA-3' 和下游:5'-CGCGGATCCTTAACATCAGCTTTCTTAATTCAGC-3'),PCR 扩增 AsB2510 编码区序列,将其克隆到 pGBKT7 获得 BD 诱饵质粒,测序无误后通过 LiAc 法转化酵母菌株 Y187。将含诱饵质粒的 Y187 菌悬液和文库菌 AH109 混合,约 20 h 后取培养物用 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板筛选,挑选直径大于 2 mm 的菌落点接于含 X-Gal (80 mg/mL) 的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上复筛。初步确定变蓝的菌落为阳性克隆。同时,从酵母阳性克隆中分离含有外源片段的文库质粒,回转到含有诱饵质粒 pGBKT7-AsB2510 的 AH109 菌株中进一步确证体内相互作用的发生。筛选过程中以 pGADT7-SV40/AH109 分别与 pGBKT7-53/Y187 和 pGBKT7-Lam/Y187 杂交,作为阳性和阴性对照。

1.5 阳性克隆分析

抽提阳性克隆的质粒,将酵母质粒转化到大肠杆菌感受态细胞中,用 LB + Amp 抗性平板进一步筛选出只含有 pGADT7-X 阳性克隆,进行测序和 BLAST 比对等生物信息学分析。

2 结果和分析

2.1 紫云英根部组织总 RNA 和 cDNA 的质量

RNA 质量直接影响 cDNA 文库的质量。RNA 样品的凝胶电泳分析是判断 RNA 质量的一种有效手段,在本研究中,从非变性琼脂糖凝胶电泳结果可看出:28S 和 18S rRNA 比例在 2.5 - 1 之间,且条带清晰,说明制备的 RNA 没有降解。同时通过紫外分光光度计检测, RNA 样品 A260 在 0.5 - 1.0 之间,此时吸光度与浓度的线性关系最好,所测得的数值

最可靠(表 1)。A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 - 2.0 之间,显示样品中蛋白质极少;A₂₆₀/A₂₃₀ > 2,显示样品中多糖类物质污染也极低,这两个比值说明所制备 RNA 中含有的杂质较少,纯度高,完全满足后续构建文库的要求。另一方面,双链 cDNA 的片段大小和浓度也是影响文库质量的关键因素。经过 CHROMA SPINS TE-400 树脂柱纯化、富集后的双链 cDNA,主要集中在 500 - 2000 bp,且分布均匀,达到了预期的 cDNA 片段大小范围和浓度要求。

表 1 紫外分光光度计测量 RNA 纯度

Table 1 RNA purity measured by ultraviolet spectrophotometer

Sample	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₃₀	Concentration/ (g/L)
1	0.287	0.610	0.327	0.020	1.922	2.210	3.776
2	0.283	0.608	0.325	0.019	1.925	2.231	3.770
3	0.288	0.606	0.325	0.021	1.924	2.191	3.774

2.2 AD-cDNA 文库容量的检测

酵母 AD-cDNA 的构建主要是利用外源 cDNA 片段和线性化的文库质粒 pGADT7-Rec 在酵母体内重组成 pGADT7-cDNA,进而得到保存和复制,所以酵母 AH109 的转化效率直接影响到文库的库容量。按照文库构建试剂盒中建议的标准操作和转化效率计算方法,我们检测了所构建文库的质量。结果显示效率为 1.02×10^6 转化子/3 μg pGADT7-Rec DNA,达到试剂盒要求的库效率期望值 1.0×10^6 转化子/3 μg pGADT7-Rec DNA。同时,随机挑取部分酵母单菌落为模板,以试剂盒中提供的 AD Insert Screening 引物进行菌落 PCR 扩增,检查其插入 cDNA 片段的分布及平均长度,结果表明目标 cDNA 片段主要分布在 1 - 1.5 kb 范围(图 1)。进一步通过血球计数板直接计数,检测结果表明所构建的文库细胞浓度达到了酵母双杂交所需浓度每 mL 2.0×10^7 个细胞。

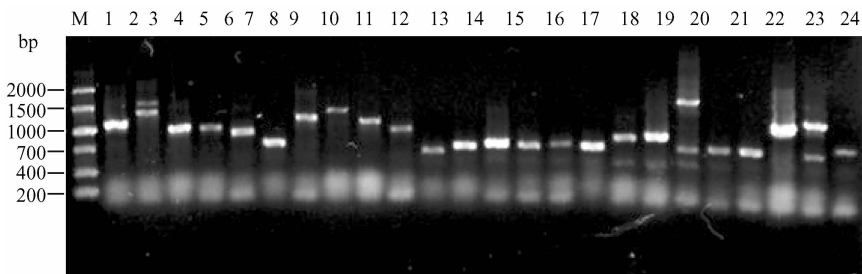


图 1 随机菌落 PCR 检查 cDNA 插入片段大小

Fig. 1 cDNA insert size checked by random colony PCR. M; Marker12, 1-24; Randomly selected yeast single colonies for PCR.

2.3 诱饵载体构建和自激活活性及毒性检测

设计适当引物,以紫云英根部组织 cDNA 为模板扩增紫云英豆血红蛋白基因 *AsB2510*,获得预期大小的 447 bp 片段,经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切,克隆于相同双酶切后的 BD 载体 pGBKT7 质粒上,从而构建出重组诱饵质粒 pGBKT7-*AsB2510*,其酶切

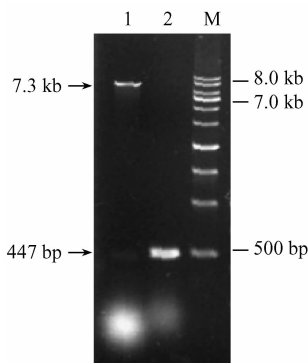


图 2 诱饵质粒 pGBKT7-*AsB2510* 的鉴定

Fig. 2 Identification of bait plasmid pGBKT7-*AsB2510*.

1. pGBKT7 vector; 2. *AsB2510*; M. Marker 1 kb ladder.

鉴定如图 2,选取的 Marker 为 1 kb Ladder。进一步测序无误后将上述诱饵质粒转入酵母 Y187 中,转化后涂布选择培养基 SD/-Trp。转化子接种到 SD/-Trp/X-gal 平板上,菌落不显蓝,说明融合蛋白无自激活活性(图 3)。同时将含有诱饵质粒的 Y187 接种到液体 SD/-Trp/Kan (20 g/L),30°C 震荡培养过夜,紫外分光光度计检测,OD₆₀₀ 大于 0.8,表明融合蛋白对酵母细胞生长无毒性。根据以上结果可判断该诱饵质粒可用于筛选文库。

2.4 与诱饵蛋白 Lb 相互作用的阳性克隆筛选

利用含诱饵质粒 pGBKT7-*AsB2510* 的 Y187 菌株与含文库质粒的 AH109 菌株在 YPDA 培养液中共培养进行有性杂交。在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上初步筛选获得 114 个阳性克隆。将这些克隆分别点种到含 X-gal (80 mg/L) 的 SD/-Leu-Trp/-His/-Ade 培养基上,通过检测报告基因 Lac Z 的表达进行复筛,结果显示共有 26 个菌落在 48 h 内不同程度显蓝。进一步,利用试剂盒中所提供的

文库质粒 pGADT7-Rec 上检测外源片段的 AD Insert Screening 特异性引物,对显蓝酵母菌落逐个进行菌落 PCR 检测,以鉴定文库质粒上外源 DNA 片段的大小,部分菌落 PCR 的电泳结果见图 4。同时,从酵母阳性克隆中分离含有外源片段的文库质粒,回转到含有诱饵质粒 pGBKT7-AsB2510 的 AH109 菌株中进一步小范围杂交确证,在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-gal 四缺平板都能长出菌落且显蓝,说明在酵母双杂交系统条件下,阳性克隆所编码产物确实能与 AsB2510 蛋白相互作用。

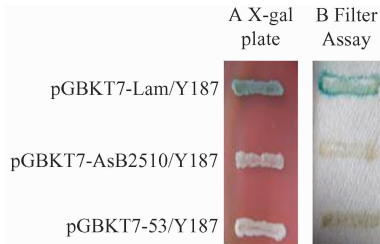


图 3 AsB2510-BD bait 自激活活性的检测

Fig. 3 Auto-transcriptional activation test of AsB2510-BD bait.

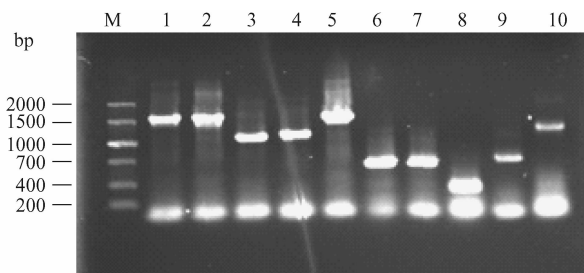


图 4 阳性克隆 cDNA 插入片段的菌落 PCR 鉴定

Fig. 4 cDNA insert sizes checked for positive clones by PCR. M: Marker12; Lane1-10: cDNA insert sizes checked by PCR.

2.5 阳性克隆的初步分析

挑选部分阳性克隆测序,测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 对比分析,获得与紫云英豆血红蛋白相互作用的四类序列。其中编号 LY-53 号克隆不仅与大豆中很多功能未知蛋白和假想蛋白在结构上保持高度同源,还含有 tify domain 和 Divergent CCT motif 功能结构域。针对 LY-53 号克隆,我们采用小范围点对点杂交方法,再次验证了该靶蛋白在酵母体内确实能与诱饵蛋白 Lb 相互作用(图 5)。考虑到 LY-53 基因为一个调控蛋白基因,本文进一步将转化含有 AD-LY-53 的酵母菌株 AH109 与转化含有 BD 空载体的酵母菌株 Y187 进行杂交,结果显示全部杂交子可在二缺平板上生长,但在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上不能生长。这表明靶蛋白 LY-53 本身不具有 AD 和 BD 活性,只有当诱

饵蛋白基因存在时,其才能够直接作用于酵母双杂交系统,因而可以判定筛选所获得的靶蛋白 LY-53 不是假阳性。

Bait (pGBKT-7)	Prey (pGADT-7)	
53	sv40	
AsB2510	LY-53	
lam40	sv40	

图 5 靶蛋白 LY-53 与诱饵蛋白 Lb 的相互作用验证

Fig. 5 The validation test for interactions between target protein LY-53 and bait protein Lb.

从生物信息学角度进一步分析 LY-53 蛋白的功能:在 LY-53 氨基酸序列图上,红色和绿色各代表两个功能域,绿色框代表 tify domain,红框代表 Divergent CCT motif(图 6)。前者包含有锌指结构,常见于植物转录因子中,在拟南芥中研究较多^[10-11],与多种调控功能相关^[12];后者与核定位有关^[13]。基于该基因片段的两个结构域功能特点,初步推断该候选靶蛋白序列代表一个具有重要功能的转录因子。

```

1      RSRKAPEKSN  FSYTCTLLSQ
21     FLKEKRISAD  SNTGMLGKLD
41     PKATTKDLIG  NLEQNSEGAL
61     RQKVSAMDFL  PQLVENPCIK
81     KSNLNRSFGS  ESPQLTIFYA
101    GKMLVFDTFE  AAKATEVMEL
121    ATKLASETPS  TEASPSVAPV
141    VSDKLQSKA  PQTNIALEPP
161    RPNQAVGSD  MRYPRRASLI
181    KFLEKRRDRV  IARGPYQLNN
201    PLKQGGSSSS  GGDPEGSCSK
221    QFDLNL*
  
```

图 6 阳性克隆 LY-53 插入序列推断的氨基酸序列及其结构域

Fig. 6 The putative amino acid sequence and conserved domain of positive clone LY-53.

3 讨论

生物信息学分析 LY-53 含有 tify 结构域,该结构域首先在模式植物拟南芥中研究并命名为 ZIM (BAA97679; Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem),随着对其保守区域的进一步研究,将 TIFY 蛋白是否含有 C2C2-GATA domain 又分为 I 和 II 型。而且这种蛋白只发现于陆地植物体内,目前关于该蛋白的具体功能研究还比较少,仅停留在影响组织分化和发育阶段^[12],但有研究发现

II 型 TIFY 蛋白与茉莉酸 (JA) 压力应答反应有关^[14]。JA 广泛分布于各种植物中, 并参与许多生理活动, 包括果实成熟、花粉的产生、根的生长、根毛卷曲、植物对非生物压力和外界伤害的反应和植物对昆虫以及病原菌的抵御反应^[15-18]。由此可见, TIFY 蛋白可能在植物正常生长阶段影响分化和发育, 在非正常状态类似于免疫系统调节植物发生应答反应抵御压力。

根瘤菌与宿主植物共生的早期实际上类似于病原菌入侵植物, 不同的是在长期的进化过程中, 双方为了更适应对方都发生了某些功能方面的协同演化与改变: 根瘤菌对植物免疫系统的影响与其它细菌不同, 根瘤菌缺少引起植物防御应答的微生物分子机制。同时, 豆科植物也和其他植物不同, 缺少对这种其他微生物分子机制防御性的感知和应答^[19]。由此推断, LY-53 蛋白与豆血红蛋白相互作用可能是豆科植物在被根瘤菌侵染后的一种免疫应答性质的反应。对于这种相互作用还有待深入研究, 可通过基因沉默 (RNAi)、超表达、活细胞体内互作定位及酵母单杂交等技术方法来分析其在共生固氮过程中的功能及调控机制。不难看出, 本文结果对研究 Lb 在豆科植物根瘤中除具有维持低氧浓度之外的其它功能提供了新的思路。

参考文献

- [1] Gherbi HK, Markmann. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2008, 105 (12) : 4928-32.
- [2] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-to-protein interactions. *Nature*, 1989, 340 : 2452-246.
- [3] Peterson LA, Brown MR, Carlisle AJ. An improved method for construction of directionally cloned cDNA libraries from microdissected cells. *Cancer research*, 1998, 58 (23) : 5326-5328.
- [4] Galaud JP, Carrieren, Pauly N. Construction of two ordered cDNA libraries enriched in genes encoding plasmalemma and tonoplast proteins from a high-efficiency expression library. *Plant*, 1999, 17(1) : 111-118.
- [5] Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Wang HL, Yuan HL, Li J L. *Rhizobium huakuii* sp. Nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41 : 275-280.
- [6] JP Nap, T Bisseling *Developmental Biology of a Plant-Prokaryote Symbiosis: The Legume Root Nodule. Science*, 1990, 250 (4983) : 948-954.
- [7] Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N. Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiology*, 2007, 145 (4) : 1600-18.
- [8] Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, Kondorosi E. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (13) : 5230-5.
- [9] Ott T, Sullivan J, James EK, Flegmetakis E, Gunther C, Gibon Y, Ronson C, Udvardi M. Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 : 800-808.
- [10] Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T. Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64 (7) : 1402-1409.
- [11] Shikata M, Matsuda Y, Ando K, Nishii A, Takemura M, Yokota A, Kohchi T. Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55 (397) : 631-639.
- [12] Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G. The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Science*, 2007; 12 (6) : 239-44.
- [13] Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 2000, 289 (5480) : 768-71.
- [14] Chung HS, Howe GA. A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009, 21 : 131-145.
- [15] Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda

- T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Tabata S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research*, 2001, 8: 53-61.
- [16] Sobajima H, Takeda M, Sugimori M, Kobashi N, Kiribuchi K, Cho EM, Akimoto C, Yamaguchi T, Minami E, Shibuya N, Schaller F, Weiler E W, Yoshihara T, Nishida H, Nojiri H, Omori T, Nishiyama M, Yamane H. Cloning and characterization of a jasmonic acid-responsive gene encoding 12-oxophytodi-enoic acid reductase in suspension-cultured rice cells. *Planta*, 2003, 216: 692-698.
- [17] Schilmiller AL, Howe GA. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8: 369-377.
- [18] Browse J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Plant hormones*, 2005, 72: 431-56.
- [19] Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 2007 Aug, 5(8):619-33.

Construction of *Astragalus sinicus* AD-cDNA library and identification of proteins interact with the leghemoglobin

Yan Liu, Huilin Gu, Xiaobo Xiong, Yixing Li, Youguo Li*

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

Abstract: [**Objective**] The objectives of this work were (i) to construct a yeast two-hybrid AD-cDNA library of *Astragalus sinicus* and provide a fundamental system to screen target proteins involved symbiotic nitrogen fixation, and (ii) to isolate the target proteins interacting with the leghemoglobin. [**Methods**] By using the Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit (Clontech), we constructed a yeast AD-cDNA library basing on the total RNA, which was isolated from the root and nodule tissues of *A. sinicus* at different developmental stages infected by *Mesorhizobium huakuii* 7653R. [**Results**] The quality examination of the AD-cDNA library showed that the transformation efficiency was 1.0×10^6 transformants/3 μ g pGADT7-Rec DNA, and the average length of cDNA inserts was around 1.0 kb. The library was then screened with the leghemoglobin AsB2510 as bait by yeast two-hybrid system, and 26 positive clones was obtained on SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade containing X-gal. 10 of them were individually further confirmed by resuing the plasmid, amplifying the cDNA insert and retesting the protein-interacting phenotype. [**Conclusions**] The cDNA inserts of positive clones were sequenced and undertaken a blast analysis in NCBI database, it was found that clone LY-53 contained a tify domain and divergent CCT motif, which was an important transcription factor needs in-depth investigation.

Keywords: *Astragalus sinicus*; *Mesorhizobium huakuii* 7653R; AD-cDNA library; AsB2510; yeast two-hybrid; interacting protein

(本文责编:张晓丽)