

分子植物育种
Molecular Plant Breeding
ISSN 1672-416X, CN 46-1068/S

《分子植物育种》网络首发论文

题目：与酵母单杂交系统匹配的植物瞬时表达分析载体的构建
作者：张媛，黄芳，马燕林，马建忠
网络首发日期：2020-05-20
引用格式：张媛，黄芳，马燕林，马建忠. 与酵母单杂交系统匹配的植物瞬时表达分析载体的构建. 分子植物育种.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200520.1302.006.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

与酵母单杂交系统匹配的植物瞬时表达分析载体的构建

张媛 黄芳 马燕林 马建忠*

兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州, 730050

*通信作者, majz@lut.cn

摘要 为了在植物细胞/原生质体中验证酵母单杂交系统解析的植物转录因子及其关键结构域,本研究构建了一套与酵母单杂交系统相匹配的植物瞬时表达分析系统,并在拟南芥叶片原生质体中进行了瞬时表达分析。结果显示,以 *AtDPBF4* 的转录激活区(CRII)构建的效应载体可在拟南芥原生质体中激活报告基因 *GUS* 的转录。这一结果与 *AtDPBF4* 的 CRII 在酵母细胞中的结果一致。报告载体中,含有 6 个 UAS_{Gal1} 的杂合启动子可引发下游报告基因 *GUS* 转录的酶活性达 $0.96 \text{ nmol } 4\text{-MU mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 含有 3 个 UAS_{Gal1} 的杂合启动子可引发 *GUS* 基因的活性达 $0.73 \text{ nmol } 4\text{-MU mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 。含有 6 个 UAS_{Gal1} 的杂合启动子的强度明显强于含有 3 个 UAS_{Gal1} 的杂合启动子,但其活性并不是 3 个 UAS_{Gal1} 杂合启动子的 2 倍,仅比其活性高了 31.5%。由此表明,在报告基因中增加 *GAL4* 结合位点(UAS_{Gal1})的重复序列可以提高下游报告基因的表达,但是这种活性升高趋势并不与 UAS_{Gal1} 的重复数量呈线性关系。

关键词 酵母单杂交系统, 植物瞬时表达分析系统, 载体构建

Construction of Plant Transient Expression Analysis Vector Matching With Yeast Single Hybrid System

Zhang Yuan Huang Fang Ma Yanlin Ma Jianzhong*

College of life science and engineering, Lanzhou University of technology, Lanzhou Gansu 730050

*Corresponding author, majz@lut.cn

Abstract In order to verify the plant transcription factors and their key domains resolved by yeast single hybrid system in plant cells/protoplasts, a set of plant transient expression analysis system matched with yeast single

hybrid system was constructed, and transient expression analysis was carried out in Arabidopsis leaf protoplasts. The results showed that the reporter gene *GUS* could be activated in Arabidopsis protoplasts by the effector vector constructed from the transcriptional activation region (CRII) of AtDPBF4. This result is consistent with the result of CRII of AtDPBF4 in yeast cells. In the report vector, six heterozygous promoters containing UAS_{Gal1} could induce the *GUS* transcription of the downstream report gene with an enzyme activity of 0.96 nmol 4-MU mg⁻¹ min⁻¹; three heterozygous promoters containing UAS_{Gal1} could induce *GUS* gene with an activity of 0.73 nmol 4-MU mg⁻¹ min⁻¹. The heterozygous promoter with 6 UAS_{Gal1} was stronger than that with 3 UAS_{Gal1}, but its activity was not twice as high as that of 3 UAS_{Gal1}, only 31.5% higher than that of 3 UAS_{Gal1}. This indicates that increasing the repeat sequence of the GAL4 binding site (UAS_{Gal1}) in the reporter gene can increase the expression of the downstream reporter gene, but this increase in activity does not have a linear relationship with the number of repeats of UAS_{Gal1}.

Keywords Yeast single hybrid system, Plant transient expression analysis system; Vector construction

酵母单杂交系统(Yeast one-hybrid system, Y1H)不仅可用于发现新的转录因子,也可用于转录因子的结构解析(Fields and Song, 1989; Kim et al., 1997; Ma and Thomas, 1999)。以 Y1H 发现的许多转录因子并不都是来源于酵母菌的,其中很多是从植物或动物来源的。通常,来自非酵母菌的转录因子需要在其来源物种细胞中进一步验证。为了验证酵母单杂交系统发现的植物转录因子,本研究构建了一组与 Y1H 载体(pGBKT7)相匹配的、可在植物细胞或原生质体中进行瞬时表达分析的载体系统(图 1)。这套载体系统由 4 个载体组成:效应载体 pHQEff-6、报告载体 pHQRep(3x)和 pHQRep(6x)、以及作为负对照的载体 pHQEff-1。

效应载体 pHQEff-6 (NCBI No. KJ184338.1)含有 35S 启动子、酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合区(Ma et al, 1988)、拟南芥亮氨酸拉链类转录因子 AtDPBF4 的转录激活区 CRII (Ma and Thomas, 1999; 马建忠等, 2019, 中国专利, ZL 2015 1 0376978.2)、以及 *NOS* 终止子。对照载体 pHQEff-1 (NCBI No.KM985459)除不含有转录激活区 CRII 外,其余与效应载体相同。报告载体 pHQRep(3x) (NCBI No.KJ184340.1)和 pHQRep(6x) (NCBI No. KJ184341.1)含有 mini35S 启动子、GAL4 的 DNA 结合区识别元件 UAS (upstream activating

sequence), 报告基因 *GUS*、以及 *NOS* 终止子。

在本研究构建的系统中, 由于报告载体用到了 *GAL4* 识别的 *UAS* 序列, 不仅避免了报告基因被植物内源的转录因子启动转录, 而且效应载体中待验证的转录因子可直接从 *Y1H* 载体上亚克隆过来。除此之外, 本研究所构建的 2 个报告载体 *pHQRep(3x)* 和 *pHQRep(6x)*所含有的 *UAS* 拷贝数不同, 在 *pHQRep(3x)* 载体中含有 3 个 *UAS*、而在 *pHQRep(6x)*中含有 6 个 *UAS*。之所以这样构建, 目的之一在于对报告基因的表达强度可依研究工作的需要加以选择, 另一目的也是想要了解 *UAS* 数目加倍是否会使报告基因的表达强度加倍。从研究结果表明, *UAS* 数目的加倍可使报告基因的表达明显增强, 但并不存在活性增加二倍的数量关系。

1 结果与分析

1.1 植物瞬时表达分析载体的构建

以 *pUC19* 质粒为起始载体, 在其多克隆位点分别插入 4 个重组片段, 获得了用于植物瞬时表达分析的 4 个重组载体: 1 个对照载体 *pHQEff-1* (NCBI No.KM985459)、1 个效应载体 *pHQEff-6* (NCBI No.KJ184338.1)、以及两个报告载体 *pHQRep(3x)* (NCBI No.KJ184340.1) 和 *pHQRep(6x)* (NCBI No.KJ184341.1) (图 1; 图 2)。

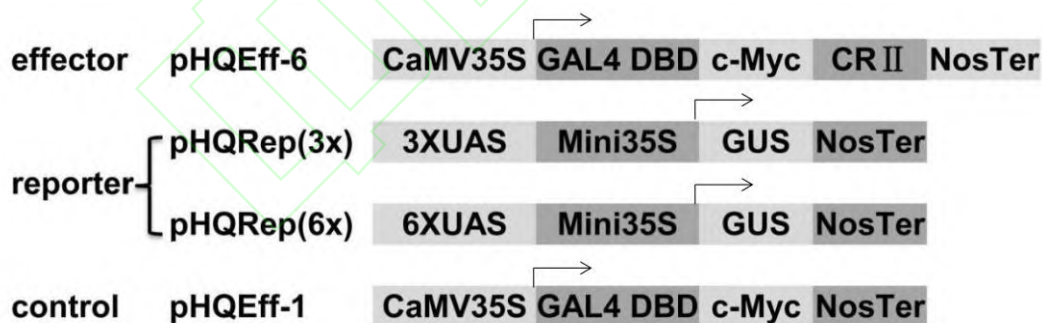


图 1 用于瞬时表达分析的报告载体, 效应载体和对照载体的结构

Figure 1 Schematic representation of the reporter, the effector and the control plasmids constructed for plant transient expression assay

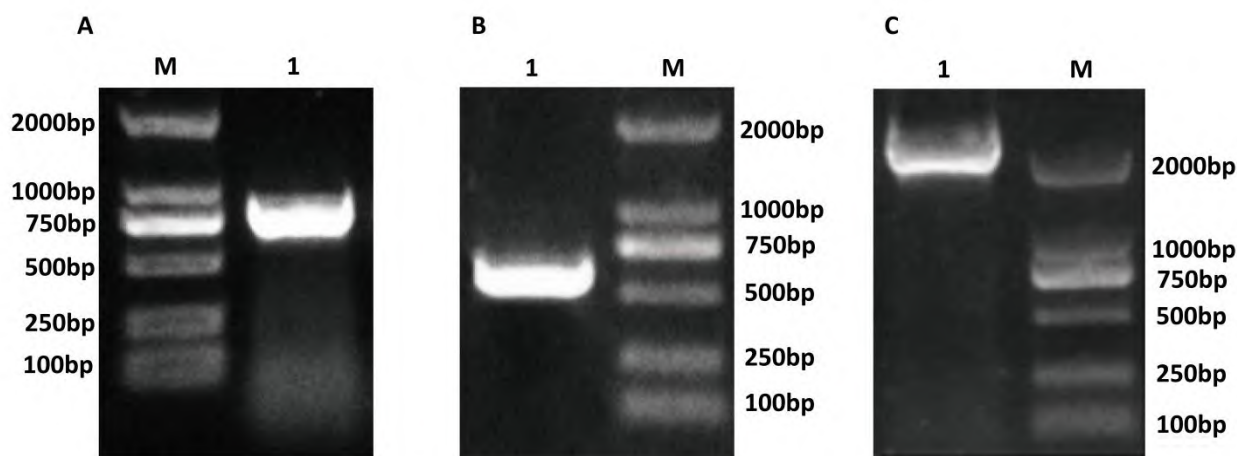


图 2 载体质粒 PCR 鉴定

注: A: 对照载体 pHQEff-1; B: 效应载体 pHQEff-6; C: 报告载体 pHQRep(3x)

Figure 2 Vector plasmid PCR identification

Note: A: Control vector pHQEff-1; B: Effector vector pHQEff-6; C: report vector pHQRep(3x)

1.2 拟南芥叶片原生质体中基因 *GUS* 瞬时表达分析

报告基因 *GUS* 由于其内源活性低、动态范围广, 在植物瞬时表达系统中应用最为广泛。然而, 随着培养时间的延长, *GUS* 酶的活性稳步增加, *GUS* 酶在拟南芥原生质体中存在内源活性(图 3)。

我们对转化处理后培养了 12 h 的拟南芥叶肉原生质体进行了 *GUS* 酶活力的荧光分析。所测样品酶反应时间与 4-MU 浓度关系曲线图和 *AtDPBF4* 的转录激活区 *CRII* 转录激活活性分析显示(图 3; 图 4), 4-MU 浓度关系曲线图和实验组和对照组的总蛋白含量对 *CRII* 转录激活活性中, 实验组 1: pHQEff-6+pHQRep(3x)的 *GUS* 酶活性为 $0.73 \text{ nmol } 4\text{-MU } \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 实验组 2: pHQEff-6+pHQRep(6x)的 *GUS* 酶活性为 $0.96 \text{ nmol } 4\text{-MU } \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 对照组 1: pHQEff-1+pHQRep(3x) 的 *GUS* 酶活性为 $0.47 \text{ nmol } 4\text{-MU } \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 对照组 2: pHQEff-1+pHQRep(6x) 的 *GUS* 酶活性为 $0.52 \text{ nmol } 4\text{-MU } \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 以及不加任何载体处理的拟南芥叶肉原生质体阴性对照, 其酶活性为 $0.45 \text{ nmol } 4\text{-MU } \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 。从以上结果可以看出, 实验组 *GUS* 酶活性显著高于对照, 表明 *AtDPBF4* 的 *CRII* 在植物细胞中也具有转录激活活性。同时, 本实验还得出含有 6 个重复的 *GAL4* 结合位点 UAS_{GalI} 的报告基因载体与含有 *AtDPBF4* *CRII* 的效应载体组合比含有 3 个重复 UAS_{GalI} 的报告基因载体与含有 *AtDPBF4* *CRII* 的效应载体组合具有较高的 *GUS*

酶活性，但是这种活性升高趋势并不与 UAS_{Gal1} 的重复数量呈线性关系。

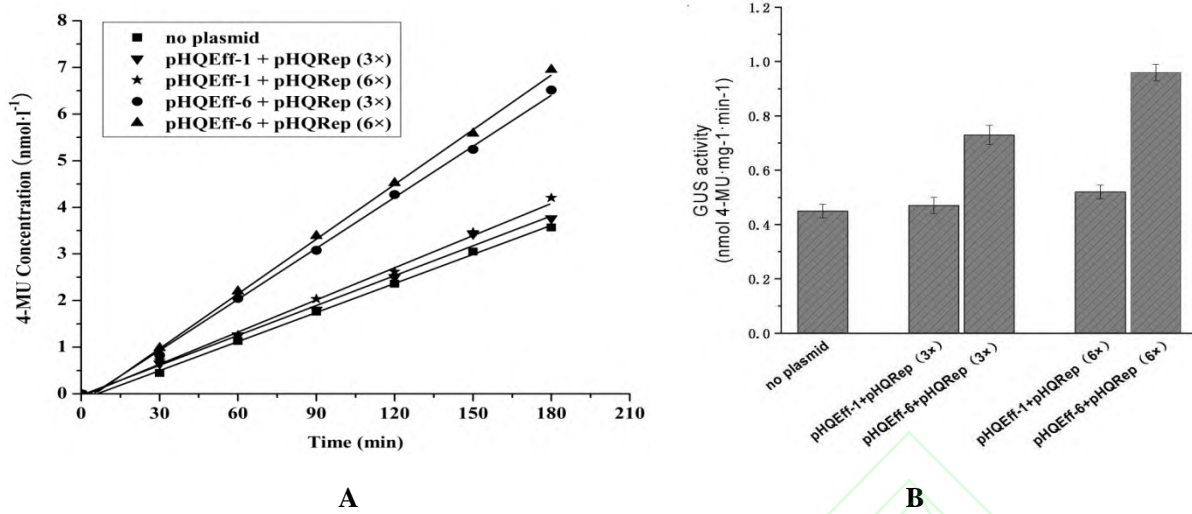


图 3 叶片原生质体中基因 GUS 瞬时表达分析

注: A: 各组样品酶催化 4-MUG 转化的时间曲线; 原生质体裂解液与 MUG 底物混合后分别在 37°C 下孵育 0, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, GUS 活性的时间历程测量呈线性表达动力学; B: 不同重复的 GAL4 结合位点 UAS_{Gal1} 的报告载体 GUS 酶活性; 拟南芥原生质体 GUS 酶活性的定量分析, 每个值都是三个独立实验结果的平均值, 误差棒显示标准偏差($n=3$)

Figure 3 Transient expression analysis of gene GUS in leaf protoplasts

Note: A: Time course of GUS catalyzed 4-MUG transformation in each group of samples; After the mixture of protoplast lysate and MUG substrate, they were incubated at 37°C for 0, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, respectively; The time course measurement of GUS activity showed linear expression kinetics; B: GUS enzyme activity of reporter vector UAS_{Gal1} with different repeated GAL4 binding sites; Quantitative analysis of GUS activity of protoplast in *Arabidopsis thaliana*; Each value is the average of three independent experimental results, and the error bar shows the standard deviation ($n=3$)

2 讨论

在转录激活活性分析中, 有几个来自于植物细胞的转录因子可以在酵母细胞中表现出激活转录的活性, 例如王怀琴等(2016)利用酵母双杂交系统筛选出了丹参 R2R3-MYB 类植物转录因子 $SmPAP1$ 相互作用的蛋白, 而韩聚东等(2016)通过构建出的含有梭梭 NAC 植物转录因子家族基因的 pGBKT7 融合表达载体,

并将其转入到 AH109 酵母菌当中进行了转录激活功能的分析，但是并不是每一个转录因子都可以在酵母和植物细胞中具有转录激活活性。例如，全长酵母转录因子 GAL4，在 GAL4 结合位点的介导下却不能在马铃薯细胞中激活报告基因的转录(Ma et al., 1988)。与之相反的是，来自于小麦 HALF-1 转录因子的转录激活域在马铃薯 BY2 细胞中具有转录激活活性，但却在酵母细胞中不能激活下游报告基因的表达(Okanami et al., 1996)。本实验以瞬时表达分析方法为手段，构建了一套与酵母单杂交系统相匹配的植物瞬时表达分析系统，来确定 AtDPBF4 的 CR2 是否能在植物细胞中激活报告基因的转录。实验数据显示，AtDPBF4 的 CR2 在植物细胞中具有转录激活活性这一结果与先前在酵母中利用酵母单杂交得到的结果是完全一致的(Ma and Thomas, 1999; 马建忠等, 2019, 中国专利, ZL 2015 1 0376978.2)。另外，该实验中含有 6 个重复的 GAL4 结合位点 UAS_{Gal1} 的报告基因载体与含有 AtDPBF4 的 CR2 的效应载体组合相对于含有 3 个重复 UAS_{Gal1} 的报告基因载体与含有 AtDPBF4 的 CR2 的效应载体组合 GUS 活性增加了 31.5%。正如我们所期待的，在报告基因中增加 Gal4 结合位点(UAS_{Gal1})的重复序列可以提高下游报告基因的表达，但是这种活性升高趋势并不与 UAS_{Gal1} 的重复数量呈线性关系。本实验 AtDPBF4 的 CR2 在拟南芥叶肉原生质体中转录激活活性的验证中，不仅为转录因子 AtDPBF4 的转录激活和调控机理的研究奠定了基础，而且为瞬时表达载体、报告基因载体的构建过程中 GAL4 结合位点 UAS_{Gal1} 的重复序列的选择提供了参考信息。

3 材料与方法

3.1 实验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α)、酿酒酵母 AH109、哥伦比亚生态型(*Columbia-0*)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、起始质粒 pUC19、遗传元件提供质粒 pCAMBIA1301、pGBKT7 和 pUC19-AtDPBF4 均为马建忠研究员实验室保存。

3.2 植物瞬时表达分析载体的构建

以 pCAMBIA1301 为模板, 3 个引物(表 1)进行连接 PCR 扩增出启动子和终止子片段 CaMV35S-NosTer, *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切后连接至同样限制性内切酶消化后的 pUC19 质粒(Sambrook et al., 2001), 获得重组质粒 pUC19-CaMV35S-NosTer。35S 启动子和 NosTer 终止子之间引入了新的限制性内切酶位点 *Xba* I 和 *Bam*H

I。同时，将载体 pGBKT7 和重组载体 pGBKT7-CR11 分别经 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切后获得 Gal4DBD 和 Gal4DBD-CR11 片段，然后在 *Xba* I 和 *Bam*H I 位点与 pUC19-35Spro-Noster 连接，得到对照载体 pHQEff-1。另外，在 *Xba* I 和 *Bam*H I 位点之间插入一个扩增片段 Gal4DBD-CR11，制备的重组质粒命名为 pHQEff-6，作为效应载体。保守区 II 是一个 22 个氨基酸片段，来自一种碱性亮氨酸拉链转录因子 AtDPBF4，它在酵母和植物中都起转录激活作用。

表 1 用于 CaMV35S-NosTer 片段扩增引物

Table 1 The primers were for amplification of the CaMV35S-NosTer fragment

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward primer 1	CTGAATTCAGTTTAGCTTCATG
Forward primer 2	GGGGACTCTTGACCATGGTATCTAGAGGATCCGATCGTTCAAACATTTGGC
Reverse primer 1	AGTAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAG

用一对来自 pCAMBIA1301 的引物(表 2)扩增 Mini35S-GUS-NosTer 片段，该引物引入了 *Xba* I 和 *Hind* III 两个限制性酶切位点。将扩增片段在 *Xba* I 和 *Hind* III 位点之间亚克隆到 pUC19 中，制备重组质粒 pHQMini35S-GUS-NosTer。

表 2 用于 Mini35S-GUS-NosTer 片段扩增引物

Table 2 The primers were for amplification of the Mini35S-GUS-NosTer fragment

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward primer 3	GCTCTAGAATTGATGTGATATCTCC
Reverse primer 2	AGTAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAG

3.3 构建报告基因

GAL1 与 GAL4 结合的 UAS 经化学合成后，在 Gal4BS-F 和 Gal4BS-R 两个寡聚 DNA 片段中重复三次(表 3)。两个片段粘性末端进行退火处理后，用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切消化，然后插入 mini-35S 启动子前

(表 3)。所得到的质粒被命名为报告载体 pHQRep(3×) (图 1)。将未经消化的退火片段克隆到 pHQRep(3x) 的 *Xba* I 位点，制成报告载体 pHQRep(6×) (图 1)。

表 3 化学合成 GAL1 的 3xUAS_G 序列

Table 3 The sequences of the chemically synthesized the 3xUAS_G of GAL1

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
Gal4BS-F	CTAGAGAATTCCGGAGGACTGTCCTCCGAGCGGAGGACTGTCCTCCGAGCGGAGGACTGTCCT CCGGGATCCT
Gal4BS-R	CTAGAGGATCCCGGAGGACAGTCCTCCGCTCGGAGGACAGTCCTCCGCTCGGAGGACAGTCCT CCGGAATTCT

3.4 拟南芥原生质体制备、转化及报告酶 GUS 活性的测定

本实验从 3~4 周龄拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗中采集莲座叶进行原生质体制备、纯化(Yoo et al., 2007),并使用荧光分光光度计(F97Pro13007, 上海棱光技术有限公司)进行 GUS 活性测定(Sahoo et al., 2014; Gong et al., 2007)。所有质粒使用 UNIQ-500 柱式质粒 DNA 大量抽提试剂盒(Sangon Biotech, China)进行提取。实验设计了 5 组共转化载体组合用以进行拟南芥原生质体中 *GUS* 基因瞬时表达分析, 实验组包括 pHQEff-6+pHQRep(3x)组合以及 pHQEff-6+pHQRep(6x)组合。对照组包括 pHQEff-1+pHQRep(3x)组合及 pHQEff-1+pHQRep(6x)组合, 以及不加任何载体的阴性对照组。每种质粒各取 15 μg 用于拟南芥原生质体的转化(Yoo et al., 2007)。在 37°C 恒温水浴培养后, 测定其蛋白质含量和 GUS 活性(Bradford et al., 1976; Jefferson et al., 1987)。所有实验组和对照组均设置三个平行, 并且每组实验重复三次, 所有数据用 SPSS20.0 软件工具进行统计分析。

作者贡献

我们建议采用如下格式编写作者贡献部分: 张媛、黄芳、马燕林是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 张媛、马燕林完成数据分析, 论文初稿的写作; 张媛、马燕林参与实验设计, 试验结果分析; 马建忠是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由受国家自然科学基金项目(编号 31560073 和 31860063)的资助。

参考文献

- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254
- Fields S., and Song O.K., 1989, A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature*, 340(6230): 245-246
- Gong Q.H., Yu W.G., Dai J.X., Liu H.Q., Xu R.F., Guan H.S., and Pan K.H., 2007, Efficient *gusA* transient expression in *Porphyra yezoensis* protoplasts mediated by endogenous beta-tubulin flanking sequences, *Journal of Ocean University of China*, 6(1): 21-25
- Han J.D., Zhang H., Ni Z.Y., Yao Z.P., Wang Z., Ren C., Chen Q.J., and Ma H., 2016, Cloning and transcriptional activation analysis of NAC gene family from *Haloxylon ammodendron*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Xueshengwu (Genomics and Applied Biology)*, 35(11):3163-3171 (韩聚东, 张桦, 倪志勇, 姚正培, 王泽, 任财, 陈全家, 麻浩, 2016, 梭梭NAC转录因子家族基因的克隆和转录激活分析, *基因组学与应用生物学*, 35(11): 3163-3171)
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., and Bevan M.W., 1987, GUS fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, 6(13): 3901-3907
- Kim S.Y., Chung H.J., and Thomas T.L., 1997, Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system, *Plant J.*, 11(6): 1237-1251
- Ma J., Przibilla E., Hu J., Bogorad L., and Ptashne M., 1988, Yeast activators stimulate plant gene expression, *Nature*, 344(6183): 631-633
- Okanami M., Meshi T., Tamai H., and Iwabuchi M., 1996, HALF-1, a bZIP-type protein, interacting with the

wheat transcription factor HBP-1a contains a novel transcriptional activation domain, *Genes Cells*, 1(1): 87-99

Sahoo D.K., Sarkar S., Raha S., Das N.C., Jee J.B., Dey N., and Maiti I.B., 2014, Analysis of *Dahlia Mosaic Virus* full-length transcript promoter-driven gene expression in transgenic plants, *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 1572-9818

Wang H.Q., Guo X.R., Yang X.B., Su J., and Cao X.Y., 2016, Screening of the proteins interacting with SmPAP1 of R2R3-MYB transcription factor from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by Yeast two-hybrid system, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Xueshengwu (Genomics and Applied Biology)*, 35(10): 2819-2826 (王怀琴, 郭晓荣, 杨新兵, 苏娇, 曹晓燕, 2016, 利用酵母双杂交筛选与丹参 R2R3-MYB 类转录因子 SmPAP1 互作的蛋白, *基因组学与应用生物学*, 35(10): 2819-2826)

Yoo S.D., Cho Y.H., AND Sheen J., 2007, *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis, *Nat. Protoc.*, 2(7): 1565-1572