

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

利用酵母双杂交系统从番茄中筛选稻瘟菌激活
蛋白的互作蛋白

**Screening for the Proteins from Tomato Interact with Activator
Protein from *Magnaporthe grisea* by Yeast Two-hybrid System**

硕 士 研 究 生：尚 威

指 导 教 师：邱德文 研究员

申请学位类别：理学硕士

专 业：生物化学与分子生物学

研 究 方 向：微生物分子生物学与基因工程

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院

植物保护研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation**

**Screening for the Proteins from Tomato Interact with Activator
Protein from *Magnaporthe oryzae* by Yeast Two-hybrid System**

Ms. Candidate: Shang Wei

Advisor: Qiu Dewen

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Specialty: Microbial Molecular Biology and
Genetic Engineering

Institute of Plant Protection
Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目		利用酵母双杂交系统从番茄中筛选稻瘟菌激活蛋白的互作蛋白				
论文作者		尚威	专 业	生物化学与	研究方向	微生物分子生物学与基因工程
指导教师		邱德文研究员		培养单位（研究所）		植物保护研究所
姓名		职称	硕(博)	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	冯洁	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院植保所	植物病理学	/
	向华	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中科院微生物所	分子微生物学	
答 辩 主 席	李怀方	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农业大学	植物病理学	
答 辩 委 员	李赞东	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农业大学	生物化学与分子生物学	
	简恒	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农业大学	植物病理学	
	张春义	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院生物所	分子生物学	
	曾凡荣	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院植保所	生物化学与分子生物学	
			硕导 ☐ 博导 ☐			
			硕导 ☐ 博导 ☐			
会议记录（秘书）			杨秀芬			
论文答辩时间地点			中国农科院中日中心 116 房间			

摘 要

激活蛋白是从多种真菌中分离、纯化出的一类原发、外源性的蛋白激发子。不同来源的激活蛋白在理化性质上略有差异，但生物学功能相近，具有较强的诱导抗病防虫、促进植物生长等生物活性。然而目前对它们的信号传导途径等方面的作用机理研究还比较薄弱。稻瘟菌激活蛋白作为从稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 中分离的一种激活蛋白，揭示其分子作用机理和植物体内的受体蛋白具有十分重要的意义。

本论文借助酵母双杂交技术，首先将稻瘟菌激活蛋白 (PemG1) 基因 *pemG1* 克隆到DNA-BD载体上用以表达诱饵蛋白，然后筛选克隆在AD载体上的番茄cDNA文库，以期获得稻瘟菌激活蛋白的互作蛋白，最终实验得到了十二组阳性克隆。

序列分析表明稻瘟菌激活蛋白可能影响了番茄的蛋白质合成和修饰过程，并可能与一种植物肽类生长调节物质相互作用，促进植物细胞的生长和分化。在抗病机理方面发现：与稻瘟菌激活蛋白作用的4-香豆酸-CoA连接酶 (4CL) 在苯丙烷类生物合成途径中是关键酶，这就暗示激活蛋白可能影响了苯丙烷类生物合成途径，同时影响黄酮类植保素、木质素、水杨酸等与抗病有关的植物次生代谢物的生物合成，起到激发抗病防虫功能的作用。

关键词： 稻瘟菌激活蛋白，酵母双杂交，蛋白互作

Abstract

Activator protein, a kind of primary, exogenous protein elicitor, is isolated and purified from a variety of fungi. Although activator proteins from various sources have slightly different physicochemical property, they have similar biological functions. They can strongly induce the resistance to disease and pest and promote the plant growth. However, the research of their mechanism, such as action mode in signal transduction pathway, is still relatively weak. It is a great significance to reveal the molecular mechanism of activator protein from *Magnaporthe griesea* and analyse its receptor proteins in plant.

In this paper, activator protein gene *pemG1* from *Magnaporthe griesea* was cloned into DNA-BD vector for expression of bait protein, then screen for interacting protein of PemG1 from tomato cDNA library cloned in AD vector. Ultimately, twelve groups of positive clones were obtained by yeast two-hybrid assay.

Sequencing analysis indicated that PemG1 may be involved in the process of tomato protein synthesis and modification and interacts with Phytosulfokine (PSK), a unique plant peptide growth factor, to promote plant growth and cell differentiation. In resistance mechanism study we found that 4-coumarate-CoA links enzyme (4CL), which is a key enzyme in phenylpropanes biosynthesis pathway, interacted with PemG1. This result implies that activator protein may have an impact on the phenylpropanes biosynthesis pathway. It may also affect the biosynthesis of the plant secondary metabolites which related to resistance, such as flavonoid phytoalexin, lignin, salicylic acid; and stimulate the resistance to disease and pest.

Key word: Activator protein from *Magnaporthe griesea*, yeast two-hybrid, protein interaction

目 录

第一章 引言	1
1.1 文献综述——酵母双杂交系统	1
1.1.1 酵母双杂交系统的原理	1
1.1.2 酵母双杂交系统的类型	3
1.1.3 酵母双杂交系统的优势和局限性	3
1.1.4 酵母双杂交系统的应用	3
1.1.5 双杂交的其他形式	5
1.1.6 酵母双杂交系统的未来展望	7
1.2 研究背景	8
1.2.1 蛋白激发子	8
1.2.2 过敏蛋白 (Harpin)	9
1.2.3 隐地蛋白 (Cryptogein)	10
1.2.4 激活蛋白 (Activator)	10
1.3 研究目的和意义	11
第二章 酵母双杂交系统载体构建和自激活作用检测	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 菌株和质粒	13
2.1.2 主要试剂	14
2.1.3 常规仪器	14
2.2 实验方法	14
2.2.1 PCR扩增 <i>pemG1</i> 基因	14
2.2.2 纯化PCR产物	15
2.2.3 酶切PCR产物	16
2.2.4 回收酶切产物	16
2.2.5 制备诱饵质粒载体pLexA	17
2.2.6 诱饵载体的酶切和回收	18
2.2.7 构建重组诱饵载体pLexA-PEMG1	18
2.2.8 酵母感受态细胞的制备	19
2.2.9 重组诱饵载体的酵母转化及自激活作用检测	19
2.3 结果与分析	20
2.3.1 <i>pemG1</i> 基因的扩增	20
2.3.2 重组诱饵载体酶切鉴定	20
2.3.3 测序结果比对	21
2.3.4 自激活检测	22
2.4 小结与讨论	23
2.4.1 成功构建重组诱饵融合质粒pLexA-PEMG1	23
2.4.2 无自激活作用	23
第三章 利用酵母双杂交筛选稻瘟菌激活蛋白的互作蛋白	24

3.1 实验材料	24
3.1.1 菌株和文库	24
3.1.2 主要试剂	24
3.1.3 常规仪器	24
3.2 实验方法	24
3.2.1 试剂配制	24
3.2.2 酵母感受态细胞制备	27
3.2.3 文库质粒的酵母转化	27
3.2.4 涂平板	27
3.2.5 筛选文库假定阳性共转化子	28
3.2.6 酵母质粒的提取	28
3.2.7 PCR扩增AD/文库质粒插入片段	29
3.2.8 <i>Alu</i> I酶切PCR产物进行分组	30
3.2.9 大肠杆菌KC8 的电转化	30
3.2.10 大肠杆菌KC8 阳性质粒提取	32
3.2.11 假定阳性质粒DH5 α 的转化与提取	32
3.2.12 AD/文库质粒自激活的检测	32
3.2.13 阳性质粒的酵母双杂交再次转化验证	32
3.2.14 阳性克隆的测序比对分析	32
3.3 结果与分析	33
3.3.1 转化效率	33
3.3.2 文库共转化子的筛选	33
3.3.3 假定阳性克隆的分组	34
3.3.4 阳性克隆的测序比对分析	34
3.4 小结与讨论	36
3.4.1 转化效率	36
3.4.2 假阳性的排除	37
3.4.3 比对结果讨论	37
3.4.4 作用机理探讨	38
第四章 结论	40
参考文献	41
致谢	47
作者简历	48

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
AA	Amino acid	氨基酸
AD	Activation domain	激活结构域
DMF	Dimethylformamide	二甲基甲酰胺
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA-BD	DNA binding domain	DNA 结合结构域
dNTP	Deoxy-ribonucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核苷酸
DO	Dropout supplement	缺省成分添加剂
Gal	Galactose	半乳糖
His	Histidine	组氨酸
Leu	Leucine	亮氨酸
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Raf	Raffinose	棉子糖
SD induction medium [SD/Gal/Raf]	SD medium containing galactose and raffinose	SD 诱导培养基，半乳糖和棉子糖作碳源
SD medium	Minimal synthetic dropout medium (with glucose)	SD 培养基：合成缺陷培养基，葡萄糖作碳源
Trp	Tryptophan	色氨酸
UAS	Upstream activation sequence	上游激活序列
Ura	Uracil	尿嘧啶
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚-半乳糖苷

第一章 引言

1.1 文献综述——酵母双杂交系统

蛋白质相互作用几乎是所有生物学过程都必需的重要的生理过程，从遗传物质的复制、基因的表达调控到细胞的代谢过程、细胞的信号转导，以及细胞与细胞之间的短程、远程通讯，生物体的形态形成、病原微生物的致病、宿主对病原微生物的免疫等，蛋白质相互作用都在其中扮演着重要的角色。蛋白质相互作用已经成为国内外生命科学研究的热点之一。

近十年来，多个诺贝尔生理医学奖项目都与蛋白质相互作用研究有关。一般认为诺贝尔奖对社会产生社会效益约需要40年左右时间，但蛋白质及其相互作用研究在实际应用方面已经显示出了良好的前景。了解蛋白质相互作用的方式、作用强度、作用结果，进行蛋白质功能分析、生命发育探索，不仅具有重要的理论意义，还可以为探明致病微生物的致病机理，开发新药，提高人民的生活质量提供指导（唐泽耀等，2005）。

随着实验技术的发展，目前研究蛋白质相互作用的技术方法主要有酵母双杂交系统（Fields & Song, 1989）、噬菌体展示技术（Smith, 1985）、pull-down（Liu, *et al.*, 2000; Magnard, *et al.*, 2002）、免疫共沉淀（Phizicky & Fields, *et al.*, 1995）、串联亲和纯化技术（Rigaut, *et al.*, 1999; 2001）、表面等离子共振技术（Fagerstam, *et al.*, 1992）、荧光共振能量转移技术（Förster T, 1948）、蛋白质芯片（Zhu, *et al.*, 2001）、射线晶体衍射、核磁共振等多种，这些技术为蛋白质相互作用研究做出了重大贡献，也积累了宝贵的资料。

酵母双杂交系统自建立以来就成为分析蛋白质相互作用的强有力的方法之一，经过不断完善，如今不仅可以用来检验体内蛋白质间的相互作用，还可以用来发现新的作用蛋白质，在对蛋白质组中特定的代谢途径中蛋白质相互作用关系网络的认识上发挥了重要的作用。据2001年估计，当时已经发表的研究蛋白质相互作用的文献中超过一半的发现来源于酵母双杂交实验（Xenarios, *et al.*, 2001）。

1.1.1 酵母双杂交系统的原理

酵母双杂交系统的建立得力于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。80年代中后期的工作表明，转录激活因子在结构上是组件式的(modular)，即这些因子往往由两个或两个以上相互独立的结构域构成，其中有DNA结合结构域(DNA binding domain, 简称为DNA-BD)和转录激活结构域(activation domain, 简称为AD)，它们是转录激活因子发挥功能所必需的（Brent & Ptashne, 1984; Hope & Struhl, *et al.*, 1985; Keegan, *et al.*, 1986），单独的DNA-BD虽然能和启动子结合，但是不能激活转录，而单独的AD也不能激活转录，只有它们在空间上彼此联系时才能发挥转录激活作用。同样，不同来源的转录激活因子的DNA-BD和AD只要在空间上彼此联系，就能具有正常的激活转录的功能（Brent & Ptashne,

1985)。酵母双杂交正是基于以上原理，将空间上可以分离，功能上相对独立的两个结构域分别融入外源蛋白，与DNA-BD融合的蛋白“X”一般称为“诱饵蛋白”(bait protein)，与AD融合的蛋白“Y”一般称为“猎物蛋白”或“靶蛋白”(prey or target protein)。如果分别融合于DNA-BD和AD上的“诱饵蛋白”和“猎物蛋白”之间存在相互作用，那么DNA-BD和AD就能重新形成有活性的转录激活因子，从而激活相应报告基因(reporter gene)的转录与表达。相反，通过对报道基因表达产物的检测，就可以判别“诱饵”和“猎物”两个蛋白质之间是否存在相互作用(图1-1，高宁&胡宝成，2006)。

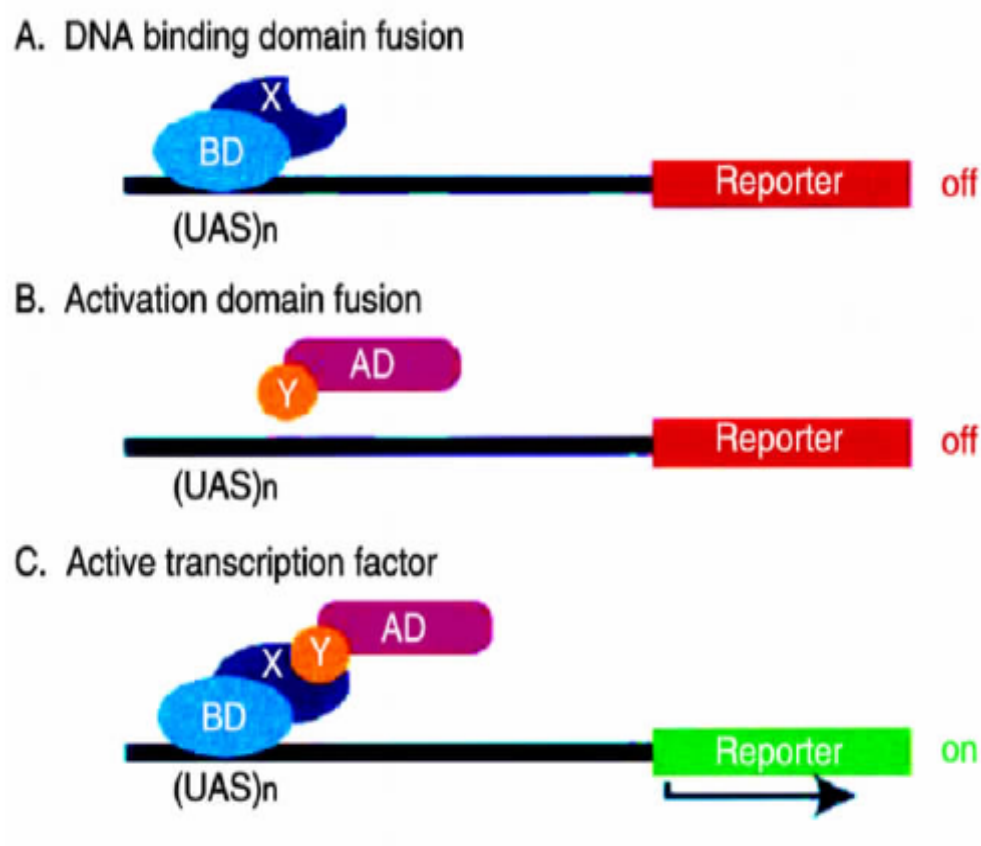


图1-1 酵母双杂交原理

Figure 1-1: Principle of the yeast two-hybrid

- A: DNA结合结构域与X蛋白形成融合蛋白，DNA结合结构域能与上游激活序列(UAS)结合，但在缺少激活结构域时，不能激活报告基因的转录；
- B: 同样，激活结构域与Y蛋白形成融合蛋白，但在缺少DNA结合结构域时也不能激活报告基因的转录；
- C: X蛋白和Y蛋白之间的相互作用导致DNA结合结构域与激活结构域的重组而形成有功能的转录因子，激活报告基因的转录。

1.1.2 酵母双杂交系统的类型

目前,酵母双杂交主要有两套系统,主要区别在于转录因子组成和使用的报告基因不同。GAL4系统最初是由Fields和Song创立的(Fields & Song, 1989),是利用酵母的GAL4转录因子的DNA结合结构域(DNA-BD)和激活结构域(AD),以及使用*lacZ*和*HIS3*作为报告基因。*HIS3*基因的表达产物可以通过在缺少组氨酸的培养基上生长来选择相互作用的细胞。而LexA系统“作用陷阱”是由Brent及其同事们(Gyuris, *et al.*, 1993)建立的,是利用细菌的BD LexA和疱疹病毒VP16或大肠杆菌B42 AD来作为转录因子的组分,这种非酵母转录因子组分的应用降低了其他方式产生的假阳性数量。同时用*lacZ*和*LEU2*作为报告基因,并且用诱导型启动子使猎物cDNAs只有在相互作用时表达,因此降低了有毒猎物蛋白对细胞生长的抑制。

1.1.3 酵母双杂交系统的优势和局限性

酵母双杂交系统的优势:酵母是真核细胞,表达的蛋白可保持天然状态下在细胞中产生相互作用,一定程度上代表了细胞内的真实情况;易于转化、便于回收扩增质粒,而酵母菌能同时容纳两种质粒;具有可直接进行选择的标记基因和特征性报道基因;酵母的内源性蛋白不易同来源于哺乳动物的蛋白结合,避免了对文库编码蛋白的干扰;具有高度敏感性,可检测存在于蛋白质之间的微弱的或瞬时性的相互作用;可采用不同组织、器官、细胞类型和分化时期材料来构建cDNA文库,能分析细胞质、细胞核及膜蛋白等多种不同亚细胞部位及功能的蛋白;酵母菌有很多营养缺陷型标记,筛选方便。

酵母双杂交系统的局限性:有些诱饵蛋白质本身具有激活转录功能或在酵母中表达时发挥转录激活的作用,使在无特异激活结构域情况下激活转录;有些杂交蛋白质不能稳定地在酵母中表达或定位于酵母细胞核内,比如有些蛋白质相互作用通常要在细胞表面发生;有些DNA-BD融合蛋白或AD融合蛋白一部分可能封闭正常的作用位点,或者破坏了蛋白质的正确折叠,从而影响了蛋白间作用的能力;有些蛋白质的正确折叠、修饰和功能有赖于其它非酵母蛋白的辅助,这限制了某些胞外蛋白(如哺乳动物)和细胞膜受体蛋白等的研究;反之,在酵母中相互作用的哺乳动物蛋白并不一定反映其天然环境下的相互作用;有些蛋白质本身对酵母细胞具有毒性作用。

1.1.4 酵母双杂交系统的应用

酵母双杂交技术创立至今的十几年中,在基因和蛋白质研究中已得到广泛应用,并取得了许多有价值的结果。除了在酵母中应用外,此项技术已扩展到哺乳动物和植物细胞的研究中(Fearon, *et al.*, 1992)。用酵母双杂交技术鉴定的多种受体、转录因子、蛋白激酶、磷酸化酶、肿瘤发生蛋白、细胞骨架蛋白以及参与细胞周期调控的因子不胜枚举(张树民&陈英碕, 1999)。

1.1.4.1 检验已知蛋白质之间的相互作用

检验已知蛋白间的相互作用，就是将已知的两个蛋白基因分别克隆到DNA-BD和AD载体上，要求开放阅读框正确，然后分别进行自激活检测，最后共转入酵母菌株中进行相互作用的检验。例如，在筛选大豆cDNA文库时，得到了与P34受体相结合的两个具有97 %同一性的蛋白P42-1和P42-2，它们具有参与植物光呼吸作用的一个重要的酶HPR(依赖NADH - 羟基丙酮酸还原酶)特性，但是为了检验是否两个或其中之一结合于受体P34，于是将P34基因克隆到pLexA载体 (DNA-BD) 上，与克隆在pB42AD载体(AD)上的 P42-1或 P42-2基因共表达，最终证明受体P34只与P42-2蛋白结合 (Okinaka, *et al.*, 2002)。

1.1.4.2 研究蛋白质之间发生相互作用所必需的结构域

可应用于确定两已知有生理作用的蛋白间的作用位点或结构域。利用此系统已分析和测定了多种重要的结构域 (Ehrhardt, *et al.*, 1997; Kusk, *et al.*, 1999)，当证实了两个蛋白有相互作用后，可以对其进行缺失实验而找到相互作用发生所必须的氨基酸残基。通过该方法还能研究蛋白质的结构与功能。通常需要对待测蛋白做点突变或缺失突变的处理。

1.1.4.3 发现新的作用蛋白质，以研究蛋白质之间相互作用的信号传递途径

用已知功能的蛋白基因筛选双杂交cDNA文库，以研究蛋白质之间相互作用的传递途径，寻找与靶蛋白相互作用的新蛋白，是双杂交系统目前应用最广泛和最有价值的应用之一。戴良英等用酵母双杂交系统研究了从拟南芥的茉莉素信号转导链中分离得到的第一个基因——*Col1*基因的互作基因 (戴良英等, 2002)。Yamazaki等研究藻类植物*Perilla frutescens*的花青素生物合成途径调节机制，并证实特异 bHLH 因子 MYC-F3G1 可与另一个 bHLH 因子MYC-RP以及含WD40重复序列的蛋白PFWD相互作用，而与光诱导MYB因子MYB-P 1则不发生作用。他们认为MYC-F3G1、MYC- RP和PFWD的蛋白复合体对*P. frutescens*中花青素生物合成基因有调节作用 (Yamazaki, *et al.*, 2003)。严景华等应用酵母双杂交技术，以BRCT2为诱饵蛋白，从卵巢文库中筛选到了与BRCT2结构域相互作用蛋白FHL2 (four and half LIM domains)。并通过其他生物化学方法证明FHL2与BRCA1 BRCT2特异结合，而不与BRCA1 BRCT1、Rap1 BRCT结构域结合。BRCA1与FHL2相互作用的发现为研究BRCA1以及FHL2在肿瘤发生、发展中的作用打下了坚实的基础 (严景华等, 2003)。齐兵等从人肺细胞系(WI-38)cDNA文库中筛选出一个asy相互作用蛋白基因asyip (asy interacting protein)。结果发现与asy 基因一样，asyip基因的大量表达能抑制肿瘤细胞Saos-2的生长，诱发细胞凋亡，但效率比asy低 (齐兵等, 2000)。

1.1.4.4 分析新基因的生物學功能

即以功能未知的新基因克隆在DNA-BD载体上，酵母双杂交筛选克隆在AD载体上的cDNA文库，根据筛选到的已知基因的功能推测该新基因的功能。已从基因组数据库中发现了一族参与笼形蛋白包被小泡运输的植物AtSH3Ps (*Arabidopsis thaliana* SH3 - containing proteins, 拟南芥含SH3的蛋白)。通过亚细胞结构分级和免疫定位研究证实，AtSH3P1 出现在内膜系统，集中在笼形蛋白上。体外进行脂类结合鉴定法证明，AtSH3P1 专一结合在内陷的小窝或内吞小泡中累积的脂类家族。另外，免疫组织化学研究和肌动蛋白结合鉴定法分析表明：AtSH3Ps 也调控沿肌动蛋白细

胞骨架的膜泡运输。酵母互补研究表明AtSH3Ps 参与了胞吞作用和肌动蛋白排列。通过酵母双杂交筛选、免疫定位和体外结合鉴定法试验证明,在AtSH3P1 和辅助蛋白类蛋白间有一种新的相互作用。这种相互作用是通过AtSH3P1 的SH3 区域和辅助蛋白的富集脯氨酸区域介导的。辅助蛋白类蛋白通过Hsc70 刺激笼形蛋白包被的囊泡脱壳,这一反应明显受AtSH3P1 产生所抑制。因此,AtSH3P1 在笼形蛋白包被囊泡分裂和脱壳过渡过程中起调节或支架作用 (Lam, *et al.*, 2001)。

1.1.4.5 寻找具有药物治疗作用的小分子多肽

通过双杂交系统筛选和目标蛋白相互作用的多肽,如靶蛋白是药物设计的目标,则有可能得到一些具有药物治疗作用的小分子多肽药物。胡承香等通过将随机DNA片段与GAL4的AD融合构建酵母表达载体,从而成功构建了一个可筛选、扩增的酵母双杂交随机肽库,可用于筛选和设计靶蛋白相互作用多肽,主要用于药物筛选设计(胡承香等, 2003)。酵母双杂交系统的筛选发生于酵母细胞内,对胞内蛋白而言,应用此系统更能保持靶蛋白的天然构象和功能,如此筛选获得的多肽具有生物活性的可能性更大。此技术已逐渐被应用于筛选新型的具有生物活性的肽类药物、诊断试剂和其他功能性多肽。现在,能抑制Src SH2结构域并能和配体相互作用的小分子已经开发并用来治疗骨质疏松症,特别是抑制破骨细胞再吸收。但在设计这些小分子抑制剂和调节剂的过程中遇到了一个历史性挑战:这些组件式的结构域在各自家族内高度同源,难以开发一种针对一个特定相互作用的高度特异性抑制剂。

1.1.4.6 蛋白质相互作用图谱的构建

随着基因组研究计划的开展,及mRNA在不同组织器官的不同发育阶段表达图谱的构建,蛋白在不同时空状态下相互作用图谱的构建也逐渐展开。Ichimura等对拟南芥的MAPK信号级联系统也作了研究。他们以ATMEKK1为诱饵,筛选得到MAPKK同源物ATMKK2和MAPK的同源物ATMPK4以及一未知蛋白。ATMKK2和拟南芥中的MEK1(一种MAPKK)同源性很高。根据酵母双杂交分析,检测了ATMEKK1和ATMKK2/PMEK1 (MAP2KKs), ATMKK2/ PMEK1和ATMPK4 (MAPK), ATMPK4和ATMEKK1间蛋白与蛋白间相互作用。这些结果表明ATMEKK、ATMKK2/MEK1和ATMPK4有可能组成拟南芥中的MAPK级联 (Ichimura, *et al.*, 1998)。酵母蛋白质相互作用的横向研究是近年来双杂交系统最引人注目的应用,用以揭示多种细胞活动过程中各控制因子间的联系。以线虫的生殖发育过程为研究对象,从已知的27个线虫发育相关蛋白出发,构建了一个大规模的酵母双杂交系统,并得到了100 多个相互作用结果 (Walhout, *et al.*, 2000)。

1.1.5 双杂交的其他形式

科学家们很快意识到酵母双杂交的作用,并使其不断的得到改进和提高,以期解决上面提到的不同限制问题和应用。除了引入双诱饵系统方便检测两个蛋白相互作用外 (Serebriiskii, *et al.*, 1999; Grossel, *et al.*, 1999),其他几种改进形式也提供了蛋白质和DNA相互作用的研究,桥联蛋白或化合物的分析,修饰酶的介入以及干扰蛋白作用实体的选择。几篇经典的文献已经谈到了这些不同的形式 (Toby & Golemis, 2001; Auerbach, *et al.*, 2002; Vidal & Legrain, 1999)。

1.1.5.1 单杂交系统

在单杂交系统中, 候选的DNA结合蛋白或者文库蛋白和AD融合, 在带有报告基因的酵母中和目的DNA序列结合, 如转录因子应答元件等。如果猎物蛋白结合目的DNA, AD就会激活报告基因的表达。已经发现几种特定的转录因子的应答元件就是以这种方式作用的。通过分析DNA结合蛋白或同源DNA序列的突变使得更容易绘制关键结合的认识序列。转换已知的DNA-BD与猎物文库融合, 单杂交系统也已经发现了转录激活能力的蛋白结构域。在制药领域, 单杂交对于转录因子目标蛋白的调控因子研究特别有用, 也包括核内受体 (Teyssier, *et al.*, 2003), 以普通细胞为基础的混合物对细胞核受体配体的筛选构建了单杂交系统在哺乳动物细胞中的应用 (De Urquiza, *et al.*, 2003)。

1.1.5.2 三杂交系统

多个研究小组已经利用第三种成分, 如: 联结蛋白 (Zhang & Lauter, 1996)、修饰酶 (Osbourne, *et al.*, 1995)、RNA (Sengupta, *et al.*, 1996) 或小分子量的化合物 (Licitra & Liu, 1996) 构建了三杂交系统。虽然这些方法都证明是有效的, 但是后者已经特别应用于药物开发, 它曾经鉴定了孤药的目的蛋白。在酵母三杂交技术中, 未知的目的蛋白与结合已知DNA-BD蛋白的小分子化合物相结合。换言之, 化合物成为第三个杂交体, 它和DNA-BD蛋白有效的相互作用转变为在体外对于结合化合物诱饵的猎物蛋白的亲和力。在酵母三杂交系统的最初实验中, 糖皮质激素受体与地塞米松FK506联结用于捕捉FK506结合蛋白 (Licitra & Liu, 1996)。然而, 尽管它相对于常规亲和力捕捉技术具有明显的优势, 但酵母三杂交系统很少用于药物开发。其原因主要包括少量的孤药化合物, 对酵母膜渗透力的需要和结合时维持化合物活性的难度很大。

1.1.5.3 反向双杂交系统

反向双杂交是酵母双杂交的另一个应用变型, 是用来开发鉴定突变、小分子或干扰蛋白—蛋白相互作用的小肽的 (Leanna & Selig, 1996; Vidal, *et al.*, 1996)。反向双杂交系统采用反向选择的报告基因来使酵母细胞产生抑制细胞生长或产生细胞毒素的应答。总之, 两个反向选择基因之一已经用于反向酵母双杂交系统: 5 FOA (5-氟乳清酸) 的URA3基因或者CYH2 (放线菌酮) 敏感基因。含有5-氟乳清酸或者放线菌酮的培养基能够杀死具有双杂交作用的细胞, 因此缺少相互作用蛋白的细胞或作用受干扰的细胞能够继续生长形成菌落。反向双杂交已经在制药工业上筛选鉴定干扰蛋白作用的小分子。类似于三杂交系统, 反向双杂交系统的应用并没有超过最初用已知蛋白相互作用干扰的证据的报道 (Huang & Schreiber, *et al.*, 1997)。虽然后来有重大进展, 但其报道少的主要原因是目的蛋白—蛋白和小分子相互作用是十分困难的 (Cochran, 2000)。举例来说, 杨等 (Young, *et al.*, 1998) 使用CYH2反向双杂交作为高通量的筛选来鉴定与N-型钙离子通道的人的 $\alpha 1B$ 和 $\beta 3$ 亚基相干扰的化合物。这种通道涉及神经传递素在中枢和周边神经系统中的释放, 一些具有阻断亚基作用的小分子将有效的抑制通道的活性。筛选超过156,000种化合物的反向化学文库, 最终发现多种化合物抑制着主要神经细胞的通道活性。

1.1.5.4 无核双杂交系统

经典的酵母双杂交系统其中的一个主要的局限性是不适合转膜蛋白的相互作用，而只能定义在细胞内功能域的筛选。现在已知药物的目的蛋白约50%由转膜蛋白构成，因此这对于制药的前景来说是一个重大的缺陷。的确，在基因组范围内的酵母双杂交对转膜蛋白的研究甚少 (Uetz, *et al.*, 2000; Ito, *et al.*, 2001)。近几年来，其他几种酵母双杂交系统已经鉴定了膜蛋白和细胞质蛋白相联系的蛋白质的相互作用。其中包括反向Ras补充系统，G蛋白融合方法和分离泛素膜蛋白酵母双杂交技术 (Stagljar & Fields, 2002)。虽然前两项技术已经具有检测膜上蛋白质相互作用的能力，但并不适用于候选作用蛋白文库的筛选。然而，分离泛素膜蛋白酵母双杂交系统已经成功的用于猎物文库的筛选，并且也发现了ErbB3 蛋白激酶的新的作用因子 (Thaminy, *et al.*, 2003)。如果这项技术被证明象经典酵母双杂交一样有效的话，那么，它将代表科学向研究膜蛋白生物学迈出了重要的一步。

1.1.5.5 哺乳动物细胞系统

虽然以酵母为基础的杂交分析具有细胞快速生长和转化效率高的明显优势，但研究其他细胞类型的蛋白作用的能力也是十分重要的，特别是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统可以用于验证酵母双杂交的结果，提供在酵母细胞中不能利用辅助因子或者翻译后修饰的相互作用。现在已有几种途径可以做到，标准的哺乳动物双杂交系统的原理与酵母双杂交系统相似，但却适用于哺乳动物细胞的蛋白表达，转录激活和报告基因检测 (Fearon, *et al.*, 1992)。然而较低的转化效率抑制了在哺乳动物细胞中文库的筛选，限制了哺乳动物双杂交分析对假设实验的应用。其他的系统则是依靠两个蛋白的融合蛋白，即他们自己重组的报告蛋白，由此无需第二个报告基因，其中包括 β -半乳糖苷酶互补分析 (Rossi, *et al.*, 2000; Michnick, 2001) 和共振能转移技术 (FRET和BRET) (Eidne, *et al.*, 2002)。因为不需要单独的报告系统，这些技术可以在许多不同的细胞类型中进行，不再受细胞内的特定的分隔空间限制。

1.1.6 酵母双杂交系统的未来展望

酵母双杂交技术有着很高的普遍性，适用于很大范围内的不同蛋白质，并且很容易被生物学团体掌握。然而，早期的实验就证明了假阳性很容易观察到，这些不受欢迎的假阳性应尽量消除掉，但是这需要密集型劳动的实验方法。酵母双杂交方法的改造将继续以期解决目前方法不能解决的问题。随着这种方法更加广泛应用，它应服从于高通量方法，首先对于简单生物体，然后是果蝇和线虫类。这些大规模的方法最终产生了相互作用的巨大数据集，并且也包含了相当程度的假阳性。但密集型劳动实验方法不足以用于去除假阳性，所以开发了通过它们相互作用可信性分类的新的计算方法。

高通量酵母双杂交系统已经成为近来酵母双杂交的改进中最令人兴奋的应用了。这些改进将作为关键的工具鉴定基因组测序工程识别的多血症相关的蛋白质。象其他技术一样，高通量酵母双杂交系统是快速分析的通行证，能够更全面地认识细胞的功能和障碍 (Legrain & Selig, 2000;

Walhout & Vidal, 2001)。现在, 构建整个生物体的蛋白质相互作用图谱是可能的 (Giot, *et al.*, 2003; Siming, *et al.*, 2004)。而且, 不同生物体的蛋白质相互作用图谱的比较将推进我们从一个物种到另一个物种的推断知识能力。如, 从模式生物到人类。整合从其他遗传技术得到的结果数据可以相互促进信息的获得。这些信息将明显的推进我们对潜在的疾病途径的认识, 提示对新的药物目的蛋白的探索, 酵母双杂交将帮我们把基因进化的硕果转化成重要的新药, 应用于疾病治疗。

下一个研究前沿很可能是人类细胞蛋白质相互作用图谱, 为了完成这个目标, 所有的努力已经在进行中。因为酵母双杂交技术和互补的生物化学方法将会产生巨大数量的相互作用对, 所以计算方法的不断研究将不仅需要对数据可靠性的评估, 而且需要揭示这些相互作用的联系来观察生物过程。

1.2 研究背景

1.2.1 蛋白激发子

在植物与病原菌相互作用过程中, 能够以非亲和性互作方式, 诱导引发防御反应的某种特定的微生物或植物分子即称为激发子 (Anderson, 1989; Templeton & Lamb, 1988), 是一类可以诱导寄主产生防卫反应的特殊物质 (王金生, 2001)。激发子的类型有多种, 从来源上可分为: 生物源和非生物源。非生物源激发子是一些如重金属离子、表面活性剂等理化因子。生物源激发子是由微生物、寄主植物或两者相互作用后产生的激发子, 可划分为由病原微生物和其它微生物产生的外源激发子和由寄主植物自身产生的内源激发子; 根据产生先后又可分为: 病原微生物或寄主植物直接产生的原发激发子和寄主植物与病原微生物互作后产生的次生激发子。

生物源激发子从化学组成上主要有寡糖激发子、糖蛋白激发子和蛋白激发子等类型。在激发子信号转导中, 寡糖类激发子是研究得最为充分的信号分子, 曾被认为是植物细胞有别于动物细胞的特有信号分子。目前已鉴定并纯化出的寡糖类激发子包括葡聚糖、几丁质及衍生物和脂多糖 (王源超等, 2003)。从植物病原微生物中已发现许多糖蛋白激发子, 主要包括疫霉糖蛋白、酵母糖肽、禾谷锈菌糖蛋白等 (郭泽建&蒋冬花, 2003)。在病原真菌 *Colletotrichum lindemuthianum* 中存在无毒基因, 可产生一种富含甘露糖和半乳糖的胞外糖蛋白, 这种糖蛋白作为激发子, 可造成抗性大豆的植物抗毒素积累 (Tepper, *et al.*, 1986; 1989)。在植物病原菌互作系统也发现了许多蛋白和多肽类激发子, 其中包括疫霉属 (*Phytophthora*) 和腐霉属 (*Pythium*) 真菌产生的激发素 (elicitins)、细菌中的过敏蛋白 (harpins) 和鞭毛蛋白 (flagellin)、植物病毒的蛋白激发子以及无毒基因产物无毒蛋白等。疫霉属 (*Phytophthora*) 的很多病原菌能向培养基分泌诱导非寄主产生过敏反应的蛋白质, 此类蛋白可诱导茄科的烟草、十字花科的油菜和萝卜产生过敏性坏死和诱导抗性等防御反应, 称为 Elicitin (Ricci, *et al.*, 1989)。

蛋白激发子是病原菌和植物相互识别的重要信号分子。激发子与受体识别被认为是植物抗病防卫反应产生的第一步。目前已分离了一些激发子特异性的结合蛋白, 大量的试验已表明这些激发子结合蛋白作为受体大多位于细胞表面的原生质膜上。寡糖类激发子 β -1, 3葡聚糖的受体首先

在大豆原生质膜上发现 (Yoshikawa, *et al.*, 1993)。植物对病菌侵染的识别一般可用激发子-受体模型 (Elicitor-Receptor Model) 来解释。即植物病原菌产生的激发子作为配体 (ligand) 与植物细胞表面的受体相互识别或通过第三种因子识别配体, 形成抗病信号, 活化信号传导链, 激活各种防卫相关基因的表达, 最终导致各种防卫反应的活化和抗病性的表现 (郭泽建&蒋冬花, 2003)。在过去的十多年中, 许多的研究工作都致力于它的作用机制上。最近提出的“保卫假说” (guard hypothesis) 可以较好地解释植物病原激发子-受体互作产生防卫反应还需有其他因子的参与 (Dixon, *et al.*, 2000), 但还需要更多的实验数据来验证。

蛋白激发子在体外不表现杀菌作用, 仅通过启动植物体内的防御机制而在抗病性中发挥作用, 因此在当前化学防治造成严重生态恶化、抗病育种无法解决抗性不稳定等难题的情况下, 蛋白激发子将成为农业生态系统中病害控制的新思路。微生物新型蛋白质农药也应运而生, 主要是蛋白激发子类物质, 它与传统的微生物蛋白农药最大的区别不是直接杀灭害虫和病原物, 而是激发植物自身的抗病防虫基因表达, 促进植物生长。其中具代表性的有过敏蛋白 (Harpin)、隐地蛋白 (Cryptogein) 和激活蛋白 (Activator) 等。

1.2.2 过敏蛋白 (Harpin)

1992年韦忠民等首先从梨火疫病细菌 (*Erwinia amylovora*) 中分离出过敏蛋白, 定名为Harpin Ea, 由 *hrpN* 基因 (Hypersensitive reaction and pathogenicity gene) 编码 (Wei, *et al.*, 1992)。Harpin Ea是由403个氨基酸组成的亲水蛋白, 分子量44 kD, 富含甘氨酸而缺少半胱氨酸, 无四级结构, 对热稳定——100℃处理10 min不会使其失活, 对蛋白酶K和紫外线敏感可以引起烟叶的过敏反应 (hypersensitive response, HR)。由于过敏反应是植物与病原菌互作过程时, 植物抵抗病原侵染的普遍表现形式和有效途径, 所以受到广泛重视。随后的大量研究表明编码过敏蛋白的 *hrpN* 基因在多种植物革兰氏阴性病原菌中普遍存在。并且过敏蛋白在引起植物过敏反应的同时, 能诱导植物获得系统抗性并刺激植物生长发育。

目前, 关于过敏蛋白诱导植物抗性的机理与田间试验资料主要来自Ea321 *hrpN* 基因编码的 harpinEa 蛋白, 少量的作用机理研究来自于*P.s. pv. Syringae*菌株! *hrpZ* 基因编码的harpinPss, 而对其他菌株来源的过敏蛋白研究资料很少。从现有研究资料来看, 所有分离到的过敏蛋白均能够引起烟草过敏反应, 在烟草上的过敏反应已经成为检验过敏蛋白活性的经典方法。对现有的过敏蛋白的氨基酸同源性比较发现, 来自于同属的菌株的过敏蛋白同源性较高, 而不同属菌株的同源性较低, 同属不同种的过敏蛋白同源性也有一定的差异, 这些差异所引起的抗病性及其他生物学效应的差异还未见报道。

在过敏蛋白作用机理的研究中, Eden公司的植物受体和信号传导小组宣布利用酵母双杂交系统从拟南芥cDNA文库中筛选到harpinEa 蛋白的受体HrBP1, 同时发现这一受体在植物中广泛存在, 并被定位在细胞壁上, 但目前还未见正式的报道。但是, 目前关于过敏蛋白与植物互作后的信号传导主要集中在水杨酸途径、MAPK 级联反应。已经证实 harpinEa 可以激活水杨酸途径、乙烯/茉莉酸途径, 诱导植物获得系统抗性, 其中MAPK 级联反应参与了信号的传导。

1.2.3 隐地蛋白 (Cryptogein)

隐地蛋白是一种由隐地疫霉 (*Phytophthora cryptogea*) 所分泌的蛋白类激发子, 等电点为9.8, 由98个氨基酸组成, 在培养液中很丰富。因隐地蛋白在极低浓度 (100pmol/ml) 下就能诱导烟草产生过敏反应, 并使植株获得广谱抗病性, 同时产生与防卫反应相关的物质如乙稀、植物保卫素等, 所以倍受植物病理学家和育种工作者的重视。隐地蛋白在国外得到了较为系统的研究, 在氨基酸序列、空间结构、寄主与非寄主抗病性、作用机理、作用靶标、结构与生物活性的相关性和抗病基因工程等方面取得了较大的进展。国内也进行了相关研究, 蒋冬花等从隐地疫霉中克隆隐地蛋白激发子基因, 通过根癌农杆菌介导的叶盘转化法转入烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中, 抗病性测定结果表明转化植株对烟草黑胫病菌 (*P.parasitica* var. *nicotianae*)、赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 和野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) 的抗性均有提高。(蒋冬花等, 2003)。

1.2.4 激活蛋白 (Activator)

激活蛋白是从葡萄孢菌 (*Botrytis* sp.)、交链孢菌 (*Alternaria* sp.)、黄曲霉菌 (*Asporgillus* sp.)、稻瘟菌 (*Pyricularia*)、青霉菌 (*Penicillium* sp.)、纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、木霉菌 (*Trichoderma* sp.)、镰刀菌 (*Fusarium* sp.) 等多种真菌中筛选、分离、纯化出的一类原发、外源性的蛋白激发子 (邱德文, 2002)。不同来源的激活蛋白在理化性质上略有差异, 但生物学功能相近, 具有较强的诱导抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长等生物活性 (李丽等, 2005; 邱德文等, 2005; 徐锋等, 2006)。已经分离出的几种激活蛋白基因和蛋白质序列不同于过敏蛋白和隐地蛋白, 它们因不激发烟草植株的过敏反应而不同于过敏蛋白活性; 它们具有很好的热稳定性, 在100℃沸水中处理半小时仍然具有生物活性, 虽然耐热机制尚不清楚, 但隐地蛋白还没有热稳定性的相关报道。三种蛋白激发子的特征对比见表 1-1。

表 1-1 蛋白激发子类新型微生物农药
Table 1-1 A new type microbe pesticide - Protein Elicitors

蛋白激发子 类型	生物来源	分子量	长度	等电点	表达形式	过敏反应 (烟草寄主)	热稳定性	专利情况
隐地蛋白 (Cryptogein)	卵菌 (<i>P. cryptogea</i>)	10~15kD	98AA	pH9.8	胞外分泌	或有或无	无报道	法国专利 1985 年
过敏蛋白 (Harpin)	细菌 (<i>E. amylovora</i>)	30~40kD	403AA	pH4.5*	胞外分泌	有	高 100℃,10min	美国专利 1992 年
激活蛋白 (Activator)	稻瘟菌 (<i>Pyricularia</i>)	30~70kD	316AA	pH4.7	胞内可溶	无	很高 100℃,30min	中国专利 2000 年

* (陆徐忠&王金生, 2006)

目前, 激活蛋白已经成功实验于多种蔬菜、水果和作物植株中, 如番茄、黄瓜、白菜、辣椒、蚕豆、西瓜、柑桔、草莓、烟草、水稻、玉米、棉花等。生物活性试验表明它们具有诱导抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长的作用。激活蛋白诱导处理黄瓜种子能加快种子萌发, 促进幼根的生长; 提高多种瓜果蔬菜的座果率, 如处理西瓜和番茄可使瓜果数和果重显著提高, 分别达到77.4% 和45.7%, 对白菜有显著的抗病增产作用, 同时能大幅度提高白菜的品质(邱德文等, 2005)。研究还发现激活蛋白制剂能够成倍地提高 Bt 对鳞翅目害虫的防治效果, 增效达 18.5倍(邱德文等, 2005)。研究获得的激活蛋白初试产品性能稳定, 便于规模化生产, 产品无毒, 无残留, 可用于植物的拌种、浸种、浇根和叶面喷施。经多种植物的室内盆栽和田间试验表明, 对病虫害的防治效果为40%~80%, 提高作物产量10%~20%。激活蛋白可湿性粉剂已经商业化生产, 大田推广中取得了良好的效果, 具有广泛的应用前景。

前期试验显示, 较低浓度的激活蛋白能促进植物生长, 并对其相关物质生长素、纤维素酶、根系脱氢酶进行了测定, 发现处理植株根系脱氢酶、纤维素酶活性、生长素含量明显高于对照; 较低浓度的真菌激活蛋白也具有抗病防虫作用, 处理植株后, 抗性明显增强, 对其相关物质过氧化物酶、脯氨酸、醇脱氢酶等进行了测定, 结果显示过氧化物酶活性, 脯氨酸、醇脱氢酶含量也明显高于对照(徐锋等, 2006)。水稻抗病相关基因转录水平的影响和抗病防御相关酶活性和稻瘟菌抗性的变化的研究表明, 2mg/ml剂量激活蛋白处理 5d后诱导了水稻幼苗对稻瘟菌的抗性, H_2O_2 和 O_2 含量均明显升高, 之后呈下降趋势; 并且水稻幼苗抗病防御相关酶苯丙氨酸解氨酶(PAL)、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性提高, 分别于处理后第7、5、9d 活性达到高峰; 处理1d后水稻幼苗抗病相关基因*NPR1*和*EIN2*转录活性增强, 3 d后*CTR1*的转录受到抑制, 表明*EIN2* 和*CTR1*以不同的调控方式促进乙烯信号的转导, 引起水稻幼苗对稻瘟菌的抗性, 而*PR4* 的转录水平稳定, 可能说明*PR4* 的诱导需要完整的乙烯和茉莉酸信号(赵丽辉, 2005)。

研究表明, 激活蛋白主要通过激活植物体内分子“免疫系统”, 引起植物体内一系列代谢反应, 诱导和激活植物自身免疫系统和生长系统, 从而对病虫害产生抗性, 促进植物生长, 提高作物产量(邱德文, 2004)。

1.3 研究目的和意义

植物在长期的进化过程中常受到一些病原微生物的侵袭, 它们在生态系统中长期并存、相互影响, 乃至协同进化, 在这一过程中植物逐渐获得了一系列防御机制来保护自己。植物在抵御病原菌侵害的过程中, 关键环节是病原菌与寄主的相互识别及其随后诱发的一系列防卫反应。植物通过细胞表面或亚细胞表面的受体分子与病原菌的激发子结合启动级联信号系统, 活化防卫基因的表达, 最终表现对病原菌的抗性。因此, 研究植物病原菌的激发子及其对病菌信号的识别机制, 对认识植物的抗病性, 特别是非寄主植物对病原菌的广谱抗病性具有重要的意义。

当病原物和寄主植物接触时, 激发子的作用可以引起寄主植物发生变化, 如抗病基因的诱导表达, 抗病物质的产生, 细胞调亡, 过敏反应(HR)等。这些反应阻止或限制了病害的发展, 减

小了危害。由于激发子作用在“植物-微生物”互作事件中的上游，是其他反应（如与受体结合，信号传导，抗病基因诱导表达等）的源头，因此对其研究就显得尤为重要。

本实验室从多种病原真菌中分离纯化得到激活蛋白，虽然它们都具有抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长等生物活性。但目前对它们的作用机理、信号传导途径等理论研究方面还比较薄弱。对现有的几种激活蛋白的氨基酸同源性比较发现，来自于同属菌株的激活蛋白同源性较高，而不同属菌株的同源性较低，同属不同种的激活蛋白同源性也有一定的差异。这些差异是否造成激活蛋白在蛋白质结构上也存在着一定差异，它们所引起的抗病性及其他生物学效应有多大程度的相同，激活蛋白在植物上的受体是什么，如何识别？它们所诱导的抗性信号传导途径中有多少细节，是否交叉对话？这些问题都有待于进一步用分子生物学方法来研究。这些问题的研究将有助于从分子水平上进一步了解病原和植物的相互作用及协同进化，为研发新型高效、安全的生物农药奠定理论基础。

稻瘟菌全基因组序列已经测出，遗传背景相对清楚，在此基础上，本实验室已经克隆出稻瘟菌激活蛋白基因 *pemG1*；利用抑制性消减杂交技术成功获得了水稻的28个上调表达差异基因（徐锋等，2006），但激活蛋白的分子作用机理仍不清楚：激活蛋白与植物体上什么受体识别？参与什么信号传导机制促使植物诱导激活植物自身免疫系统和生长系统作用的发挥？稻瘟菌激活蛋白作为从稻瘟菌（*Magnaporthe grisea*）中分离的一种激活蛋白，解析其作用途径与分子机制，对揭示激活蛋白在植物体内的相互作用机理具有十分重要的意义。

因此，本论文实验希望借助酵母双杂交技术，首先将稻瘟菌激活蛋白基因 *pemG1* 克隆在 DNA-BD 载体上表达诱饵蛋白，然后筛选克隆在 AD 载体上的番茄 cDNA 文库表达的猎物蛋白，以期获得与稻瘟菌激活蛋白 PemG1 互作的蛋白，通过筛选得到的互作蛋白提供的信息来探讨稻瘟菌激活蛋白信号传导途径。

第二章 酵母双杂交系统载体构建和自激活作用检测

酵母双杂交实验首先需要构建融合诱饵质粒，就是将已知外源基因克隆到 DNA 结合结构域（DNA-BD）载体上，然后检测诱饵蛋白是否具有自动激活下游报告基因的作用，本章主要是将稻瘟菌激活蛋白 *pemG1* 基因克隆到 DNA-BD 载体 pLexA 上，然后检测其自激活作用和对酵母细胞的毒性作用。

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和质粒

本实验使用的双杂交系统为 Clontech 公司 MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System 酵母双杂交系统，酵母菌株 EGY48[p8op-lacZ]、诱饵质粒载体 pLexA，阴性对照质粒 pLexA-Lam，阳性对照质粒 plexA-pos 均由清华大学谢道昕教授惠赠。稻瘟菌激活蛋白 *pemG1* 基因为本实验室克隆。实验所用菌株和质粒，详见表 2-1。

表 2-1 菌株和质粒
Table 2-1 Strain and Plasmids

菌株/质粒	相关特征	本研究用途	来源
<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hdsR17</i> 含有 p8op-lacZ 质粒，报告基 因： <i>LEU2</i> 和 <i>lacZ</i>	细菌宿主菌	博大泰克公司
EGY48[p8op-lacZ]	转化标记 <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	酵母宿主菌	清华大学谢道昕实验组
pLexA	见图 2-1	诱饵载体	清华大学谢道昕实验组
pB42AD	见图 2-1	文库载体	清华大学谢道昕实验组
pTJCP	含有 <i>pemG1</i> 基因的 pMD18-T 载体	PCR 模板	本实验室

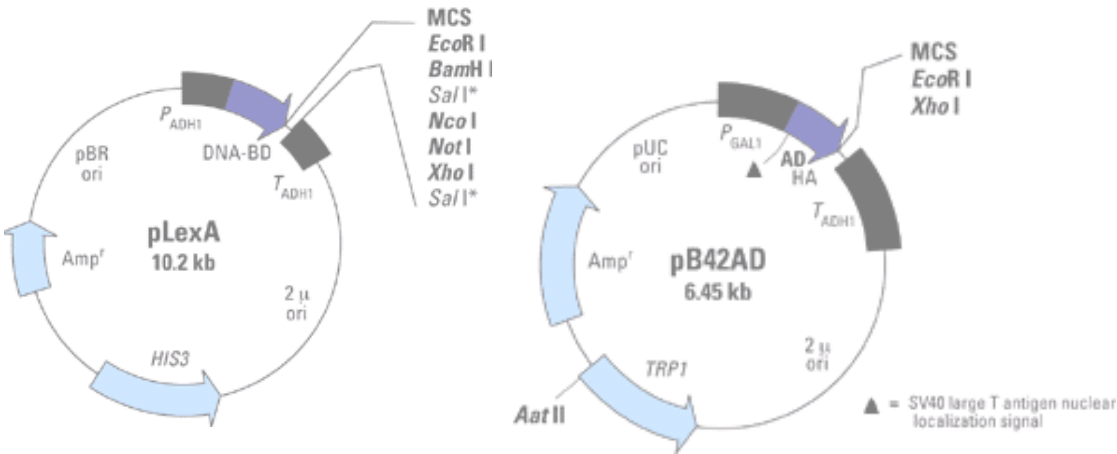


图2-1: pLexA和pB42AD质粒图谱
Figure 2-1: pLexA and pB42AD plasmid map

2.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I (TaKaRa 公司)

T4 DNA 连接酶 (NEB 公司)

DNA Marker、pfu DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒 (TIANGEN 公司)

树脂型™ PCR 产物 (DNA 片段) 纯化试剂盒 (赛百盛公司)

抗生素、X-gal 和 DH5 α 感受态细胞 (博大泰克公司)

氨基酸、棉子糖、半乳糖/酵母培养基及转化用试剂 (经科宏达公司)

DNA Marker (全式金公司)

鲑鱼精子 ss DNA (Invitrogen)

DMSO (SIGMA)

2.1.3 常规仪器

电子分析天平(Sartorius)

紫外可见分光光度计(SHIMADZU UV-2550)

高速冷冻离心机(Heraeus Biofuge)

小型离心机(Eppendorf 5415D)

PCR 仪(MJ Research, INC. PTC-200)

凝胶成像系统(Multigenins Syngene)

超纯水仪(Millipore ZMQ55VOTI)

电转仪(Bio-Red Trans-Blot SD cell)

制冰机(SCOTSMAN)

2.2 实验方法

2.2.1 PCR扩增 基因

为与诱饵质粒 pLexA 连接, 根据 *pemG1* 基因序列, 在上下游分别引入酶切位点 *EcoR*I 和 *Xho*I, 并加保护碱基, 送上海生工合成:

上游引物 (Primer 1): 5'-GGAATTC ATGAGCGCAGTTGTGTCG-3';
EcoR I

下游引物 (Primer 2): 5'-GACTCGAG GCTGCTGCCAAGGGAGGG-3';
Xho I

以质粒 pTJCP (含有 *pemG1* 基因的 pMD18-T 载体) 为模板, 按如下参数进行 30 个循环的 PCR 反应:

反应体系如下：

dd H ₂ O	36 μ l
10 $\times$ PCR Buffer	5 μ l
dNTP(10mmol/L)	2 μ l
Primer 1 (10 μ mol/L)	2.5 μ l
Primer 2 (10 μ mol/L)	2.5 μ l
模板 pTJCP(100ng/ μ l)	1 μ l
Pfu DNA 聚合酶	1 μ l
总体积	50 μ l

反应程序如下：

94℃预变性 5 min
 94℃变性 30 s
 58℃退火 30 s
 72℃延伸 1.5 min
 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

} 30 个循环

PCR 反应结束，取 5 μ l 反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.2 纯化PCR产物

纯化 PCR 产物（赛百盛树脂型™ PCR 产物（DNA 片段）纯化试剂盒）：

（1）将 0.4 ml 纯化树脂（使用前充分混匀）与 45 μ l 无石蜡油的 PCR 反应液颠倒混匀 3 min。然后装入离心纯化柱，13,000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液。

（2）加入 500 μ l 80%异丙醇（或乙醇），13,000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液。重复第 2 步一次，此步骤 13,000 r/min 离心 2 min，务必将异丙醇（或乙醇）除尽。如果离心纯化柱上还残留有异丙醇（或乙醇），13,000 r/min 再离心 1 min。

（3）将离心纯化柱套入干净的 1.5 ml 或 2 ml 离心管中，开盖放置 2~3 min，使残留的乙醇充分挥发干净。加入 30 μ l TE 缓冲液（若用于测序，则加 50 μ l 超纯水）于纯化树脂上，不能粘在管壁上。放置 2 min 后，13,000 r/min 离心 30 s。TE 缓冲液或超纯水的用量视用户对浓度的要求而定。离心纯化柱放入离心管中，若盖不上盖子，亦没有关系，可开盖离心。

（4）离心管中的液体即是纯化的 PCR 产物，取 4 μ l 电泳（0.8%琼脂糖，120 V，10 min）检测并目测定量。 -20℃保存备用。

2.2.3 酶切PCR产物

反应体系如下：

dd H ₂ O	15 μ l
10 $\times$ H Buffer	3 μ l
PCR 产物	10 μ l
<i>Eco</i> RI	1 μ l
<i>Xho</i> I	1 μ l
总体积	30 μ l

混匀后，37℃酶切过夜。

2.2.4 回收酶切产物

将酶切产物进行 1%琼脂糖电泳，然后胶回收纯化。

(1) 将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下（尽量切除多余部分）放入干净的离心管中，称取质量；

(2) 向胶块中加入 3 倍体积溶胶 PN；50℃水浴放置 10 min，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解（溶解后降至室温）；

(3) 将上一步所得溶液加入到一个吸附柱中，13 000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

(4) 向吸附柱中加入 700 μ l 漂洗液 PW（已加入无水乙醇），13 000 r/min 离心 30 s，倒掉废液，将吸附柱重新放入收集管中。

(5) 向吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 PW（已加入无水乙醇），13 000 r/min 离心 30 s，倒掉废液，将吸附柱重新放回收集管中，13 000 r/min 离心 2 min，尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温或 50℃温箱数分钟，彻底干燥，以防止残留漂洗液影响下一步实验。

(6) 将吸附柱放到一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 30 μ l 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min。13 000 r/min 离心 1 min 收集 DNA 溶液。

(7) 为了提高 DNA 的回收量，可将离心得到的 DNA 溶液再重新加回离心吸附柱中，重复步骤 6。

2.2.5 制备诱饵质粒载体pLexA

2.2.5.1 载体质粒的转化

博大泰克公司 DH5 α 感受态细菌细胞产品操作步骤（无菌操作）：

- （1）取待转化的质粒 1 μ l（连接产物 5 μ l），试剂 A 20 μ l，无菌水稀释到 100 μ l，冰上备用。
- （2）将以上混合液加入到一管感受态细菌细胞（约 80 μ l~100 μ l）中去混匀，冰浴 20 min。随后室温放置 10 min。
- （3）加入 400 μ l LB 培养基，37 $^{\circ}$ C，200 r/min 振荡 10~40 min。然后取 100 μ l~600 μ l 铺平皿，于 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 12~16 h。

2.2.5.2 载体质粒的提取

TIANGEN 质粒小提试剂盒操作步骤：

- （1）柱平衡步骤：向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 的平衡液 BL，12 000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
- （2）取 1~5 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，12 000 r/min 离心 1 min，尽量吸除上清（菌液较多时可以多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
- （3）向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ l 溶液 P1（已经加入 RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。（此步要混合彻底，以免降低产量和纯度）
- （4）向离心管中加入 250 μ l 溶液 P2，温和地上下翻转 4~6 次使菌体充分裂解。注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不宜超过 5 min，以免质粒受到破坏。
- （5）向离心管中加入 350 μ l 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6~8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12 000 r/min 离心 10 min，此时在离心管底部形成沉淀。注意：P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
- （6）小心地将上清倒入或用移液器转移到吸附柱 CB3 中，注意尽量不要吸出沉淀。室温放置 1~2 min，12 000 r/min 离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- （7）向吸附柱 CB3 中加入 700 μ l 漂洗液 PW，12 000 r/min 离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- （8）向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 漂洗液 PW，12 000 r/min 离心 30~60 s，弃掉收集管中的废液。

(9) 将吸附柱 CB3 重新放回收集管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 目的是去除吸附柱中残余的漂洗液。注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续酶反应(酶切、PCR 等)实验。所以建议将吸附柱 CB3 开盖, 置于室温或 50℃温箱放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(10) 将吸附柱放到一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 50~100 μ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 1 min。12 000 r/min 离心 2 min 将质粒溶液收集到离心管中。

(11) 为了提高质粒的回收效率, 将得到的溶液重新加回离心吸附柱中, 重复步骤 10。

取 3 μ l 质粒进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪检测提取质量并估算浓度。

2.2.6 诱饵载体的酶切和回收

酶切反应体系:

dd H ₂ O	15 μ l
10 $\times$ H Buffer	2 μ l
pLexA plasmid	2 μ l
<i>Eco</i> RI	0.5 μ l
<i>Xho</i> I	0.5 μ l
总体积	20 μ l

混匀后, 37℃酶切 2 h。然后参照 2.2.4 将酶切产物进行胶回收。

2.2.7 构建重组诱饵载体pLexA-PEMG1

2.2.7.1 载体与目的基因的连接

连接反应体系:

10 $\times$ Ligase Buffer	1 μ l
T4 DNA Ligase	0.5 μ l
pLexA plasmid / <i>Eco</i> R I+ <i>Xho</i> I	2 μ l
<i>pemG1</i> / <i>Eco</i> R I+ <i>Xho</i> I	6.5 μ l
总体积	10 μ l

混匀后, 16℃连接过夜。

2.2.7.2 连接产物转化

取 2.2.7.1 连接产物 5 μ l 进行大肠杆菌转化, 步骤同 2.2.5.1 载体质粒的转化。

2.2.7.3 提取阳性克隆质粒

提取上步骤获得阳性克隆质粒, 步骤同 2.2.5.2 载体质粒的提取。

2.2.7.4 阳性重组质粒载体酶切鉴定

将 2.2.7.3 中提取的质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定，体系同 2.2.6，取 5 μ l 酶切产物电泳检测。

2.2.7.5 测序鉴定

将含有酶切鉴定为阳性重组载体质粒的菌液，送上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)测序。

2.2.8 酵母感受态细胞的制备

- (1) 从 SD/-Ura 平板上挑取几个酵母菌株 EGY48 [p8op-lacZ] 单克隆至 1 ml 液体培养基 SD/-Ura 中，高速涡旋振荡打散细胞；
- (2) 将培养液转移至 50 ml 液体培养基 SD/-Ura 中，30 $^{\circ}$ C 摇床 (250 r/min) 培养 18 h，至稳定期 OD₆₀₀>1.5；
- (3) 再将上步培养液转移至 300 ml YPD 培养基中 (初始 OD₆₀₀ = 0.2~0.3)，于 30 $^{\circ}$ C 摇床 (230 r/min) 培养 3 h，至 OD₆₀₀ = 0.5 $\pm$ 0.1；
- (4) 将培养液 1000 $\times$ g 室温离心 5 min，弃上清，用 25~50 ml 无菌水重悬细胞，1000 $\times$ g 离心 5 min，弃上清，用新配制的 1.5 ml 无菌 1 $\times$ TE/LiAc 溶液重悬细胞。

2.2.9 重组诱饵载体的酵母转化及自激活作用检测

- (1) 在每个 1.5 ml 的离心管中加入 100 μ l 酵母感受态细胞，0.1 mg 鲑鱼精子 DNA；
- (2) 分别加入 0.1 μ g 重组诱饵质粒，阴性对照质粒 pLexA-Lam 或 pLexA，及阳性对照质粒 plexA-pos，涡旋振荡混匀；
- (3) 再在每离心管中加入 0.6 ml 无菌的 PEG/LiAc 溶液，混匀后于 30 $^{\circ}$ C 振荡 (200 r/min) 培养 30 min；
- (4) 向每管加入 DMSO 70 μ l，42 $^{\circ}$ C 热休克 15 min，冰上置 90 s；
- (5) 14 000 r/min 离心 5 s，弃上清，用 500 μ l 1 $\times$ TE 重悬菌体；
- (6) 取 100 μ l 重悬菌体直接涂布于含有 X-gal 和 BU Salts 的相应缺陷培养基上 (SD/-His/-Ura 和 SD/Gal/Raf/-His/-Ura)。
- (7) 将平皿倒置于 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 天，进行营养缺陷型和 LacZ⁺ 筛选及 β -半乳糖苷酶整板分析自激活作用。

2.3 结果与分析

2.3.1 *pemG1* 基因的扩增

根据已得 *pemG1* 基因编码区序列, 设计特异引物, 在引物两端引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, 以含有 *pemG1* 基因的质粒载体为模板进行 PCR 扩增, 产物电泳结果见图 2-2。如图所示, 扩增片段大小约为 1kb, 与 *pemG1* 基因长度 (951bp) 相符。

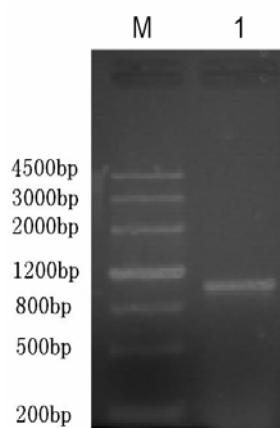


图 2-2: PCR 扩增 *pemG1* 基因

Figure 2-2: Amplification of *pemG1* gene by PCR

M: DNA Marker 1: PCR 扩增产物

2.3.2 重组诱饵载体酶切鉴定

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切重组诱饵质粒 (命名为 pLexA-PEMG1), 进行琼脂糖凝胶电泳检测可知, 双酶切产物与 *pemG1* 基因大小相符, 如图 2-3。说明获得了含有目的基因的重组诱饵质粒 pLexA-PEMG1。

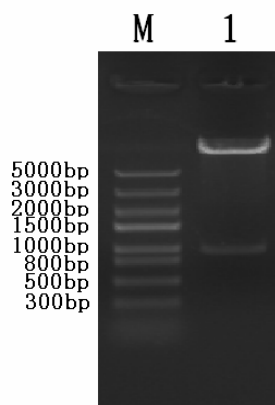


图 2-3: 重组质粒的酶切鉴定

Figure 2-3: Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

M: DNA Marker 1: 重组质粒 pLexA-PEMG1

2.3.3 测序结果比对

将酶切鉴定正确的重组质粒进行测序。测序结果与 *pemG1* 基因比较，序列完全一致，阅读框分析正确，说明诱饵质粒载体构建成功。比对结果如下示：

gb|EF062504.1| Magnaporthe grisea elicitor protein (PEMG1) mRNA, complete cds, Length=951
Score = 1757 bits (951), Expect = 0.0
Identities = 951/951 (100%), Gaps = 0/951 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   1   ATGAGCGCAGTTGTGTGCGAAGAACCTCTTTGCCCTCCTCGGCAATGACGAGGAGGACGAC   60
      |||
Sbjct   1   ATGAGCGCAGTTGTGTGCGAAGAACCTCTTTGCCCTCCTCGGCAATGACGAGGAGGACGAC   60

Query   61   ACCCCTAAGGCGCCCGTGAAGACGGTCGACAAGAAGGTCACCCACACGACCAAGCGCACT   120
      |||
Sbjct   61   ACCCCTAAGGCGCCCGTGAAGACGGTCGACAAGAAGGTCACCCACACGACCAAGCGCACT   120

Query   121  GGTGCTGACGAGGCCCGCCGAGCAACGCTGCTGCTGCTGGTTCTCGCCGTGGAGCCGGC   180
      |||
Sbjct   121  GGTGCTGACGAGGCCCGCCGAGCAACGCTGCTGCTGCTGGTTCTCGCCGTGGAGCCGGC   180

Query   181  AACGACGGAGGCGATCGTCGCCAGGAACACCGACGAGGCCCGCGGCCCGGGGAGGC   240
      |||
Sbjct   181  AACGACGGAGGCGATCGTCGCCAGGAACACCGACGAGGCCCGCGGCCCGGGGAGGC   240

Query   241  ATTGGTGCTCGTGCCCGTGGTGGACGTGGTGGCAGCTTCCGGAGGGATCGCGATGACCGT   300
      |||
Sbjct   241  ATTGGTGCTCGTGCCCGTGGTGGACGTGGTGGCAGCTTCCGGAGGGATCGCGATGACCGT   300

Query   301  CATGCTAAGAACTTGCCGTGAGCGGATCCGAGAAGACTGCCGCTCAGTCATGGGGCGCC   360
      |||
Sbjct   301  CATGCTAAGAACTTGCCGTGAGCGGATCCGAGAAGACTGCCGCTCAGTCATGGGGCGCC   360

Query   361  ACCGAGGGTGAGGCCGAGCTGAAGGACGAGCAGGCTGGCGAAGAGCTCGCTAAGAAGGAG   420
      |||
Sbjct   361  ACCGAGGGTGAGGCCGAGCTGAAGGACGAGCAGGCTGGCGAAGAGCTCGCTAAGAAGGAG   420

Query   421  CAGAAAGAGGCCAATGCCGAGGATGCTGCTGCCGAGGAGCCTGTCGAGGAGGAGACAAG   480
      |||
Sbjct   421  CAGAAAGAGGCCAATGCCGAGGATGCTGCTGCCGAGGAGCCTGTCGAGGAGGAGACAAG   480

Query   481  AGCATTTCTGATGCCGACTACCTCGCCAGCAGGCCGAGAAGAAGCTTGCCCTTGACAAC   540
      |||
Sbjct   481  AGCATTTCTGATGCCGACTACCTCGCCAGCAGGCCGAGAAGAAGCTTGCCCTTGACAAC   540

Query   541  GACCTCAAGGTCGCCAGGCCAACGAGGGCACCAAGCTCAAGAAGGAGTGGGCCGCTGCT   600
      |||
Sbjct   541  GACCTCAAGGTCGCCAGGCCAACGAGGGCACCAAGCTCAAGAAGGAGTGGGCCGCTGCT   600

Query   601  AAGCCCCTTGTCAGGATGAGGACGATGACTTCATCGCCGGCTCAGGTGGCAAGGCCAAG   660
      |||
Sbjct   601  AAGCCCCTTGTCAGGATGAGGACGATGACTTCATCGCCGGCTCAGGTGGCAAGGCCAAG   660

```

Query	661	CGCGAGCGTGAGCGCAAGGTCAAGCAGGTCGTTGATATTGACCAGCGCTTCGTTGAGCAG	720
Sbjct	661	CGCGAGCGTGAGCGCAAGGTCAAGCAGGTCGTTGATATTGACCAGCGCTTCGTTGAGCAG	720
Query	721	CAGGACCGCCCTCGTGGCGGTGGCCGGGTGGTCCCGCGGCGGTGCCCGCGGTGAGTTC	780
Sbjct	721	CAGGACCGCCCTCGTGGCGGTGGCCGGGTGGTCCCGCGGCGGTGCCCGCGGTGAGTTC	780
Query	781	CGCGGAGGCCGTGGTTCGTGGTGAGGGACGTGGTCGCGGTGACTTTGAGAGCCGTGGCCGT	840
Sbjct	781	CGCGGAGGCCGTGGTTCGTGGTGAGGGACGTGGTCGCGGTGACTTTGAGAGCCGTGGCCGT	840
Query	841	GGTGGCCCTCGCGATGGTCCTCGTGAGGGTGGCCGTGGAGGTCCTCGTGGTGGCGCTCAA	900
Sbjct	841	GGTGGCCCTCGCGATGGTCCTCGTGAGGGTGGCCGTGGAGGTCCTCGTGGTGGCGCTCAA	900
Query	901	ACCATCAACACTAAGGACACGTCTGCGTTCCCTCCCTTGGCAGCAGCTAG	951
Sbjct	901	ACCATCAACACTAAGGACACGTCTGCGTTCCCTCCCTTGGCAGCAGCTAG	951

其中，Query = pLexA-PEMG1重组质粒测序结果，Sbjct = *pemG1*序列

2.3.4 自激活检测

β-半乳糖苷酶整板分析发现，转入阳性对照质粒的酵母菌株 EGY48[p8op-lacZ, pLexA-pos] 呈蓝色，这是因为 pLexA-pos 质粒激活下游报告基因 *LacZ*，使得 β-半乳糖苷酶大量增加，分解底物 X-gal，从而使菌落呈蓝色；而转入重组诱饵质粒的酵母菌株 EGY48[p8op-lacZ, pLexA-PEMG1]与带有阴性对照质粒的酵母菌株 EGY48 [p8op-lacZ, pLexA-Lam]一样，菌落不显蓝色（图 2-4）。这说明重组诱饵质粒 pLexA-PEMG1 不能激活报告基因 *LacZ*，没有自激活作用。另外，从菌落生长状况观察，酵母菌株 EGY48 [p8op-lacZ, pLexA-PEMG1] 和 EGY48[p8op-lacZ, pLexA]无显著差异，说明构建的重组诱饵蛋白对宿主菌也无毒性作用。

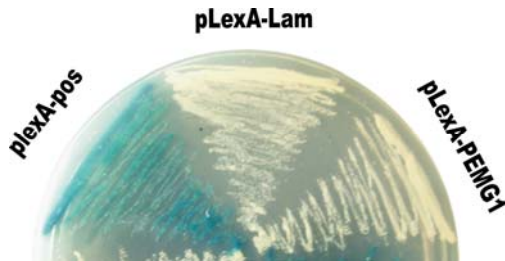


图 2-4：自激活检测
Figure 2-4: Identification of self-activation

质粒 pLexA-pos, pLexA-Lam, pLexA-PEMG1 分别转入酵母菌株 EGY48[p8op-lacZ]中，将转化子划线到含有 X-gal 的培养基 SD/-His/-Ura 上，其中 pLexA-pos 为阳性对照，pLexA-Lam 为阴性对照，pLexA-PEMG1 为重组诱饵质粒。

2.4 小结与讨论

2.4.1 成功构建重组诱饵融合质粒pLexA-PEMG1

运用 PCR 方法扩增稻瘟菌激活蛋白基因 *pemG1*，并在其上下游分别引入酶切位点 *EcoRI* 和 *Xho I*，经双酶切并回收后与同样处理的质粒载体 pLexA 连接构建重组诱饵质粒，转入大肠杆菌扩增提取，最后经酶切鉴定，测序比对，得到了与目的基因一致且阅读框正确的重组诱饵融合质粒 pLexA-PEMG1。

2.4.2 无自激活作用

虽然酵母双杂交系统是研究蛋白质间相互作用的一种非常有效的遗传学方法。但是由于实验中常会出现假阳性来干扰实验的准确性(Bartel, *et al.*, 1993)。为解决这一问题，一方面需要在系统中设立尽可能全面的对照，反复筛选检测，另一方面首先保证与 DNA-BD 融合表达的诱饵蛋白本身没有转录激活作用，即不能单独激活报告基因的转录表达。本实验采用 Clontech 公司的 LexA 系统构建诱饵载体，并将重组诱饵融合质粒 pLexA-PEMG1 转入酵母菌株 EGY48[p8op-lacZ] 中进行 β -半乳糖苷酶整板分析检测，结果表明无自动激活报告基因作用，并且对酵母菌株也无毒性作用，这就排除了诱饵蛋白自激活可能产生的假阳性。同时也说明该重组诱饵质粒 plexA-PEMG1 可用于酵母双杂交系统，为下一步筛选番茄 cDNA 文库获得诱饵蛋白 PemG1 的相互作用蛋白奠定了基础。

第三章 利用酵母双杂交筛选稻瘟菌激活蛋白的互作蛋白

3.1 实验材料

3.1.1 菌株和文库

本筛选实验所用菌株、质粒和文库请参见表 3-1 和表 2-1。

表 3-1 菌株和质粒
Table 3-1 Strain and Plasmid

菌株/质粒	相关特征	本研究用途	来源
<i>E.coli</i> KC8	基因型: <i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF::Tn5</i> , <i>hisB463</i> , <i>lacΔX74</i> , <i>strA</i> , <i>galU</i> , <i>K</i>	细菌宿主菌, 分离文库质粒	Clontech 公司
EGY48[p8op-lacZ, pLexA-PEMG1]	含有p8op-lacZ质粒和重组诱饵质粒pLexA-PEMG1	酵母宿主菌	本实验室构建
AD/番茄文库	构建于pB42AD载体上的文库, 质粒图谱见图2-1	cDNA 文库	清华大学谢道昕实验组

3.1.2 主要试剂

参见 2.1.2 主要试剂。

3.1.3 常规仪器

参见 2.1.3 常规仪器。

3.2 实验方法

3.2.1 试剂配制

3.2.1.1 LB培养基

蛋白胨	10 g/L
酵母提取物	5 g/L
NaCl	5 g/L

用 5 N NaOH 调节 pH 到 7.0, 高压灭菌, 常温保存。

3.2.1.2 LB/amp固体培养基

在上面 LB 液体培养基中加入琼脂 (15 g/L)，高压灭菌，待冷却至 50℃加氨苄青霉素至浓度 100 g/ml，铺平皿保存于 4℃。

3.2.1.3 YPD培养基

蛋白胨	20 g/L
酵母提取物	10 g/L
琼脂 (固体培养基)	15 g/L

加水至 950 ml，调节 pH 到 6.5，高压灭菌。待冷却至 55℃时加葡萄糖至终浓度 2% (50 ml 灭菌的 40%贮存液)。

3.2.1.4 SD培养基

分为液体和固体、诱导 (半乳糖+棉子糖) 和非诱导 (葡萄糖) 培养基。

A. 10 × DO 氨基酸混合液 (-His, -Trp, -Leu, -Ura)

氨基酸	10×浓度	贮存浓度
腺嘌呤 (L-Adenine hemisulfate salt)	200 mg/L	
精氨酸 (L-Arginine HCl)	200 mg/L	
组氨酸 (L-Histidine HCl monohydrate)		100 × (160 mg/80 ml)
异亮氨酸 (L-Isoleucine)	300 mg/L	
亮氨酸 (L-Leucine)		50 × (1 g / 200 ml)
赖氨酸 (L-Lysine HCl)	300 mg/L	
甲硫氨酸 (L-Methionine)	200 mg/L	
苯丙氨酸 (L-Phenylalanine)	500 mg/L	
苏氨酸 (L-Threonine)	2000 mg/L	
色氨酸 (L-Tryptophan)		100 × (160 mg/80 ml)
酪氨酸 (L-Tyrosine)	300 mg/L	
尿嘧啶 (L-Uracil)		100 × (160 mg/80 ml)
缬氨酸 (L-Valine)	1500 mg/L	

调至适当体积，高压灭菌，4℃保存。

B. 碳源贮存液

40% Dextrose (Glucose)葡萄糖	40 g/100 ml
40% Galactose[D(+)] 半乳糖	40 g/100 ml
40% Raffinose 棉子糖	40 g/100 ml

加水至适当体积，高压灭菌，121℃灭菌 15 min，以免过热使糖碳化。4℃保存。

C. $10 \times$ BU salts (BU盐)

溶解下列成份于1L水中，调节至pH 7，高压灭菌，室温保存。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70 g
NaH_2PO_4	30 g

D. YNB + Agar (高压灭菌，121℃灭菌15 min，4℃保存)

Medium Volume 体积	1000 ml
YNB	6.7 g
Agar (固体培养基用)	20 g
加 H_2O 至	700 ml

E. SD培养基

SD Medium	SD/-Ura	SD/-Ura/-His	SD/-Ura/-Trp	III:SD/-Ura/-His/-Trp
Medium Volume	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
YNB + Agar	70 ml	70 ml	70 ml	70 ml
$10 \times$ DO	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
40% Dextrose	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
$100 \times$ Histidine	1 ml	—	1 ml	—
$100 \times$ Tryptophan	1 ml	1 ml	—	—
$50 \times$ Leucine	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
$100 \times$ Uracil	—	—	—	—
dd H_2O	11 ml	12 ml	12 ml	13 ml

SD Induction Medium	SD/Gal/Raf/-Ura/-His	SD/Gal/Raf/-Ura/-Trp	SD/Gal/Raf/-Ura/-Trp/-His/-Leu
Medium Volume	100 ml	100 ml	100 ml
YNB + Agar	70 ml	70 ml	70 ml
$10 \times$ DO	10 ml	10 ml	10 ml
40% Galactose	5 ml	5 ml	5 ml
40% Raffinose	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
$100 \times$ Histidine	—	1 ml	—
$100 \times$ Tryptophan	1 ml	—	—
$50 \times$ Leucine	2 ml	2 ml	—
$100 \times$ Uracil	—	—	—
X-gal (20 mg/ml)	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
$10 \times$ BU salts	10 ml	10 ml	10 ml
dd H_2O	-0.9 ml	-0.9 ml	2.1 ml

以上培养基在无菌条件下配制，4℃保存，诱导培养基需避光。

3.2.2 酵母感受态细胞制备

- (1) 从 SD/-His/-Ura 平板上挑取几个酵母菌株 EGY48 [p8op-lacZ, pLexA-PEMG1] 单克隆至 1 ml 液体培养基 SD/-His/-Ura 中, 高速涡旋振荡打散细胞;
- (2) 将培养液转移至 50 ml 液体培养基 SD/-His/-Ura 中, 30℃ 摇床 (250 r/min) 培养 18 h, 至稳定期 $OD_{600} > 1.5$;
- (3) 再将上步培养液转移至 300 ml YPD 培养基中 (初始 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.3$), 于 30℃ 摇床 (230 r/min) 培养 3 h, 至 $OD_{600} = 0.5 \pm 0.1$;
- (4) 将培养液 $1000 \times g$ 室温离心 5 min, 弃上清, 用 25~50 ml 无菌水重悬细胞, $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用新配制的 1.5 ml 无菌 $1 \times TE/LiAc$ 溶液重悬细胞。

3.2.3 文库质粒的酵母转化

- (1) 准备 PEG/LiAc 溶液 10 ml (现用现制)。在 15 ml 的无菌离心管中加入 1 ml 酵母感受态细胞, 2 mg 鲑鱼精子 DNA;
- (2) 再加入 10~50 μg 文库质粒, 涡旋振荡混匀;
- (3) 再向离心管中加入 6 ml 无菌的 PEG/LiAc 溶液, 最高转速涡旋混匀后于 30℃ 振荡 (200 r/min) 培养 30 min;
- (4) 加入 DMSO 700 μl , 轻轻混匀, 42℃ 热休克 15 min, 不时地轻轻翻转, 然后冰浴 1~2 min;
- (5) $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用 10 ml $1 \times TE$ 重悬菌体;
- (6) 同时用小量规模共转化阳性对照质粒和阴性对照质粒。

3.2.4 涂平板

- (1) 取 100 μl 重悬菌体分别按 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 稀释, 涂于培养基 SD/-His/-Trp/-Ura 上, 进行转化效率的计算 (100-mm 平皿);
- (2) 再各取 1 μl 重悬菌体 (溶于 100 μl 水中), 分别涂于培养基 SD/-His/-Ura 和培养基 SD/-Trp/-Ura 上, 检测每种质粒的转化效率 (100-mm 平皿)。
- (3) 将余下悬浮液倒入各装有 300 ml YPD 液体培养基的 1L 三角瓶中, 于 30℃ 振荡 (230 r/min) 培养 5 h;
- (4) $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用 10 ml $1 \times TE$ 重悬菌体; 取 5 ml 转化悬液加同体积 65% 甘油/MgSO₄ 溶液, 分装成 $10 \times 1 ml$, 保存于 -80℃。

(5) 将余下 5 ml 转化溶液, 用 1×TE 稀释一倍后, 每 200 μ l 涂于培养基 SD/-His/-Trp/-Ura 上 (150-mm 平皿)。

(6) 将平皿倒置于 30℃ 培养 2~3 天, 直到菌落出现。

3.2.5 筛选文库假定阳性共转化子

(1) 将培养基 SD/-His/-Trp/-Ura 上生长 2~3 天, 直径约 1 mm 大时的菌落克隆利用滤膜转印到培养基 SD/Raf/Gal/-His/-Trp/-Leu/-Ura + X-Gal + BU salts 上; 每隔 12hr 观察一次, 以查看是否有菌落变成蓝色, 以及变蓝的程度。

(2) 标记 Leu⁺, LacZ⁺ 阳性克隆, 并收集到平皿 SD/-His/-Trp/-Ura 上, 不含有 X-Gal, 倒置 30℃ 培养 4~6 天, 待菌落长出后用封口膜封住, 保存于 4℃。

(3) 划线上步保存的阳性克隆于 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基上, 在三种质粒表型的压力下, 有利于一些 AD/文库质粒的分离, 30℃ 培养 4~6 天。

(4) 将上步划线分离的单克隆转印或接种到 SD/Raf/Gal/-His/-Trp/-Leu/-Ura + X-Gal + BU salts 上, 进行 Leu⁺, LacZ⁺ 阳性的整板分析。

(5) 收集重新划线再检测的 Leu⁺, LacZ⁺ 阳性克隆到 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基上, 倒置 30℃ 培养 4~6 天, 待菌落长出后用封口膜封住, 保存于 4℃。

(6) 再重复步骤 3、4、5 步 1~2 次, 将获得的阳性克隆收集至 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基上, 保存于 4℃。

3.2.6 酵母质粒的提取

挑取阳性克隆菌落, 用液体培养基 SD/-Trp 进行过夜培养, 酵母质粒提取按 TIANGEN 酵母质粒小提试剂盒操作步骤:

(1) 柱平衡步骤: 向吸附柱 CB2 中加入 500 μ l 的平衡液 BL, 13 000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子)

(2) 取 5 ml 过夜培养的菌液, 加入离心管中, 13 000 r/min 离心 1 min, 尽量吸除上清(菌液较多时可以多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

(3) 向菌体沉淀中加入 100 μ l 裂解液 LB, 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮酵母细胞沉淀。

(4) 向细胞悬液中加入 5 μ l Lyticase 溶液 (10 U/ μ l), 37℃ 放置 30~60 min。

(5) 6500 r/min (4000 × g) 离心 5 min, 吸除上清, 保留沉淀。

(6) 用 250 μl 溶液 YP1 (已经加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。(此步要混合彻底, 以免降低产量和纯度)

(7) 向离心管中加入 250 μl 溶液 YP2, 温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。注意: 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA, 造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不宜超过 5 min, 以免质粒受到破坏。

(8) 向离心管中加入 350 μl 溶液 YP3, 立即温和地上下翻转 6~8 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。13 000 r/min 离心 10 min, 此时在离心管底部形成沉淀。注意: YP3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

(9) 小心地将上清倒入或用移液器转移到吸附柱 CB2 中, 注意尽量不要吸出沉淀。室温放置 1~2 min, 13 000 r/min 离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

(10) 向吸附柱 CB2 中加入 500 μl 去蛋白液 PD, 13 000 r/min 离心 30 s, 倒掉废液。

(11) 向吸附柱 CB2 中加入 700 μl 漂洗液 PW, 13 000 r/min 离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液。

(12) 向吸附柱 CB2 中加入 500 μl 漂洗液 PW, 13 000 r/min 离心 30~60 s, 弃掉收集管中的废液。

(13) 将吸附柱 CB2 重新放回收集管中, 13 000 r/min 离心 2 min, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续酶反应(酶切、PCR 等)实验。所以建议将吸附柱 CB2 开盖, 置于室温或 50 $^{\circ}\text{C}$ 温箱放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(14) 将吸附柱 CB2 放到一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 50~100 μl , 经 65~70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min。13 000 r/min 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

(15) 为了提高质粒的回收效率, 将得到的溶液重新加回离心吸附柱中, 重复步骤 14。

3.2.7 PCR 扩增 AD/文库质粒插入片段

根据 pB42AD 质粒图谱, 在多克隆位点上游和下游设计引物, 以扩增 AD/文库质粒插入片段, 引物设计为 (上海生工合成):

上游引物 (pB42AD5'): 5'-GATGTTAACGATACCAGCCTCTTG-3';

下游引物 (pB42AD3'): 5'-CAAACCTATGGCGAAGAAGTCC-3';

以提取的酵母质粒为模板, 按如下参数进行 32 个循环的 PCR 反应:

反应体系如下：

2 × HiFi PCR mix（不含染料）	25 μ l
引物 pB42AD5' (10 μ mol/L)	2.5 μ l
引物 pB42AD3' (10 μ mol/L)	2.5 μ l
酵母质粒	7.0 μ l
dd H ₂ O	13 μ l
总体积	50 μ l

反应程序如下：

94℃预变性 5 min	
94℃变性 1 min	} 32 个循环
56℃退火 30 s	
72℃延伸 1.5 min	
72℃延伸 10 min, 4℃保存。	

PCR 反应结束，取 10 μ l 反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

3.2.8 *Alu* I酶切PCR产物进行分组

由于文库的扩增，将导致筛选得到的多个阳性克隆中可能含有相同的插入片段，为了减少因此带来的麻烦，可用具有频繁酶切位点的限制内切酶（如 *Alu* I 或 *Hae* III）进行酶切分类。酶切反应体系如下：

dd H ₂ O	7.5 μ l
NEBuffer 2	2 μ l
PCR 产物	10 μ l
<i>Alu</i> I	0.5 μ l
总体积	20 μ l

混匀后，37℃酶切 2h，取 10 μ l 反应产物进行 1.8%琼脂糖凝胶电泳检测。从检测得到的酶切图谱的克隆中选出具有代表性（不同的）克隆，重新收集到一个新的平板培养基 SD/-His/-Trp/-Ura 上，保存于 4℃。

3.2.9 大肠杆菌KC8 的电转化

3.2.9.1 M9/-Trp固体培养基配制：

- A. 葡萄糖 1.2 g
- B. 琼脂 6.0 g
- C. 5× M9 缓冲液 60 ml

D. $10 \times \text{DO}$ (-His, -Leu, -Trp, -Ura) 30 ml

E. $100 \times \text{His}$ 3 ml

F. $50 \times \text{Leu}$ 6 ml

G. $100 \times \text{Ura}$ 3 ml

H. ddH₂O 198 ml

121℃, 高压灭菌 15 min, 冷却至 50℃左右, 加入下列成份, 混匀铺板

I. 1.0M Thiamine-HCl(维生素 B1) 0.3 ml

J. 100 mg/ml Amp 0.3 ml

3.2.9.2 KC8感受态细胞的制备:

(1) 用枪头挑取单克隆菌落, 投入盛有 10 ml LB 液体培养基的 50 ml 离心管中。(同时做培养基和枪头的空白对照)

(2) 37℃, 220 r/min, 振荡培养 14~16 h。

(3) 第二天, 以 1:100 的比例将这 10 ml 菌液倒入 1000 ml LB 液体培养基中, 37℃, 220 r/min, 振荡 2~3 h, 每半小时测一次 OD 值, 当 OD₆₀₀ 达到 0.3~0.4 时, 停止培养。

(4) 将菌液在冰上预冷 30 min, 随后将菌液分装到 500 ml 预冷的离心杯中, 4℃, 2500 r/min 离心 10 min。

(5) 弃上清, 离心杯中加入少量 ddH₂O, 使沉淀悬浮后, 再将水注满离心杯, 4℃, 4000 r/min 离心 10 min。

(6) 弃上清, 加少量灭菌水, 重悬菌体, 再将水注满离心杯, 4000 r/min, 4℃, 离心 10 min。

(7) 弃上清, 往离心杯中加入少量 10% 甘油(灭菌, 预冷), 重悬菌体, 再加满 10% 甘油, 4℃, 4000 r/min, 离心 10 min。

(8) 弃上清, 每个离心杯中加入 5 ml 10% 的甘油, 使沉淀悬浮后, 将菌液以 300 μl /管分装于 1.5 ml 的离心管中, -80℃ 冰箱中保存。同时取 100 μl 感受态加 0.01 ng pUC18 直接电穿孔转化, 检测转化效率。

(9) 次日观察转化子生长情况, 并记录。

3.2.9.3 电转化:

(1) 从 -80℃ 冰箱中取出感受态细胞, 置于冰上解冻。

(2) 加 10 μl 酵母质粒到 100 μl 电转感受态细胞中, 混匀预冷。

(3) 将样品转入预冷的电击杯 (0.1 cm) 中, 轻轻敲击电极杯, 使混合物均匀进入电极杯的底部。

(4) 将电转杯放入电转仪, 进行电击操作 (1.8 kV 电压, 10- μ F 电容, 300 Ω 电阻)。

(5) 电转完毕, 迅速加入 1ml LB 无抗生素培养基, 轻轻吸打混匀, 将悬浮细胞转入 15 ml 尖底 Falcon 离心管中。

(6) 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min, 剧烈振荡培养 1 h。

(7) 2500 r/min 室温离心 5 min, 丢弃上清, 沉淀用余下约 100 μ l 液体重悬。

(8) 将重悬菌液涂布于 M9/-Trp/amp 固体培养基上。

(9) 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 36–48 h, 观察转化子生长情况。

3.2.10 大肠杆菌KC8 阳性质粒提取

提取Trp⁺, Amp^r 阳性KC8 转化子, 方法步骤参见 2.2.5.2 载体质粒的提取。

3.2.11 假定阳性质粒DH5 α 的转化与提取

转化步骤参见 2.2.5.1 载体质粒的转化, 提取步骤参见 2.2.5.2 载体质粒的提取, 提取前将菌液按 1: 1 比例和 50%甘油混匀保存于-80 $^{\circ}$ C和 4 $^{\circ}$ C。

3.2.12 AD/文库质粒自激活的检测

由于仅有AD/文库质粒也可能激活报告基因的表达, 从而造成假阳性的出现, 所以有必要进行AD/文库质粒自激活检测来排除此部分的假阳性。检测步骤参见 2.2.8~2.2.9, 仅转化AD/文库质粒, 最后涂布于培养基SD/Raf/Gal/-Trp/-Ura + X-Gal + BU salts (因为AD质粒只有诱导才能表达融合蛋白, 所以要用诱导型培养基) 上进行LacZ⁺报告基因的筛选。如果LacZ⁺报告基因表达, 菌落显蓝色, 则筛选得到的克隆为假阳性, 非我们所需要。

3.2.13 阳性质粒的酵母双杂交再次转化验证

转化步骤参见 2.2.8~2.2.9, 将分离的AD/文库质粒和重组诱饵质粒pLexA-PEMG1 共转化入酵母细胞EGY48[p8op-lacZ], 最终涂布于培养基SD/-His/-Trp/-Ura上, 然后再转印至培养基SD/Raf/Gal/-His/-Trp/-Leu/-Ura + X-Gal + BU salts上进行Leu⁺, LacZ⁺报告基因的筛选。如果Leu⁺, LacZ⁺报告基因再次表达, 则可以将阳性克隆质粒测序。

3.2.14 阳性克隆的测序比对分析

将上步确认得到的阳性克隆对应的 3.2.11 中保存于 4 $^{\circ}$ C的菌液提交测序公司测序, 再将测序结果进行 NCBI BLAST 比对进行分析。

3.3 结果与分析

3.3.1 转化效率

$$\frac{\text{cfu (101)} \times \text{总悬浮体积 (10}^4 \mu\text{l)}}{\text{涂布体积(100 } \mu\text{l)} \times \text{稀释倍数(0.1)} \times \text{所用DNA总量(20 } \mu\text{g)}} = 5.05 \times 10^3 \text{ cfu } / \mu\text{g DNA}$$

此次转化中，有 1×10^5 克隆被扩增。

3.3.2 文库共转化子的筛选

初步筛选得到克隆 103 个，依次命名为 ST1, ST2, ST3,, ST103。

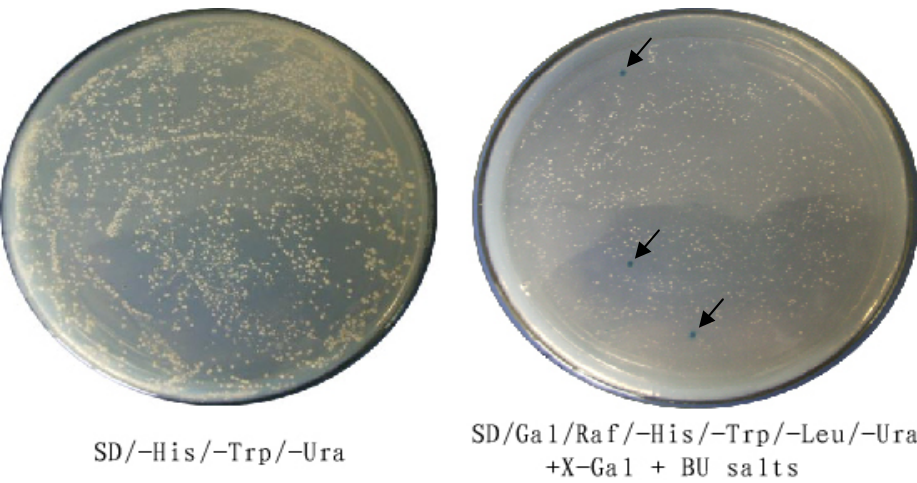


图 3-1 筛选文库共转化子
Figure 3-1: Screening library cotransformants

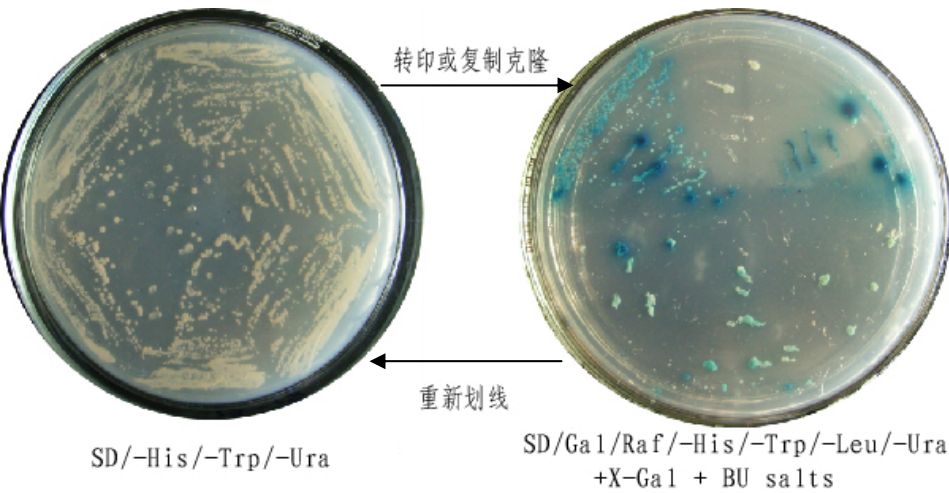


图 3-2 划线并再次检测阳性克隆子
Figure 3-2: Restreak and retest positive colonies

3.3.3 假定阳性克隆的分组

以分离的假定阳性克隆酵母质粒为模板，进行 PCR 扩增。如图 3-3 所示为扩增出的 AD/文库质粒插入片段。再将 PCR 产物 *Alu* I 酶切，酶切图谱如图 3-4 所示。最终获得 33 个组别，选出各组具有代表性的质粒进行 AD/文库质粒分离。

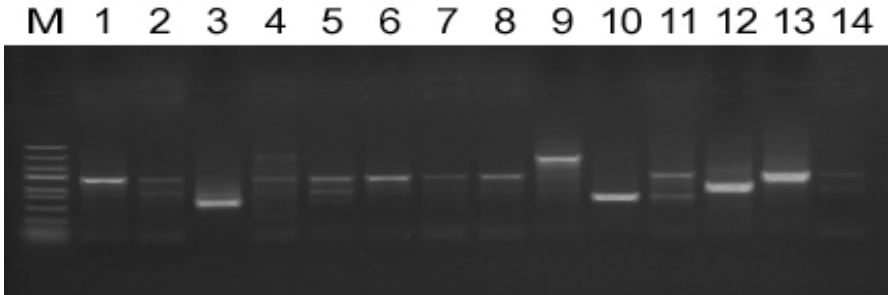


图 3-3 PCR 扩增 AD/文库插入片段
Figure 3-3: Amplification of the AD/library inserts by PCR
M: DNA Marker III 1-14: 部分 AD/文库质粒

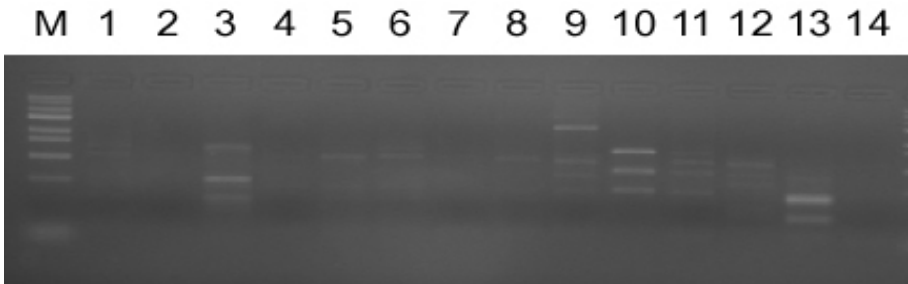


图 3-4 *Alu* I 酶切 AD/文库插入片段
Figure 3-4: digestion of the AD/library inserts by *Alu* I
M: DNA Marker III 1-14: 部分 AD/文库质粒

3.3.4 阳性克隆的测序比对分析

经过 AD/文库质粒的分离，进行自激活检测，并再次和重组诱饵质粒共转入酵母验证相互作用，最终获得了十二组阳性克隆，组别为 A、B、C……。其中，编号为初步筛选得到的克隆编号，由于有的酵母菌落含有两个或以上的文库质粒，故将同一菌落中分离的不同的 AD 文库质粒后面加“-1，-2”加以区分。其中有八组获得了较高的同源基因，并且功能已知，一组找到较高同源基因，但功能未知，另外三组没有找到其同源序列，为未知基因。具体测序比对结果如表 3-2 所示。

A 组：ST3，ST12-1，ST15。三个序列长度 585bp，与烟草克隆 PR55 的 mRNA 序列同源性较高（87%），克隆 PR55 的 mRNA 是类真核生物 60S 亚基上的核糖体蛋白 L15mRNA，具有参与翻译，组成核糖体结构，生物起源等功能。

表 3-2 阳性克隆测序比对分析
Table 3-2 Positive clone sequence blast and analysis

组别	阳性克隆编号	序列长度	NCBI Blast(n) 比对结果	同源基因长度和相似度	功能
A	ST3, ST12-1, ST15	585bp	gb AF154663.1 Nicotiana tabacum clone PR55 mRNA sequence, ribosomal protein L15-like mRNA, complete cds	Length = 888 Identities = 476/541 (87%),	类似于 60S 亚基上核糖体蛋白 L15, 参与翻译, 核糖体结构, 生物起源等。
B	ST24-1	534bp	tpg BK000121.1 TPA_exp: Lycopersicon esculentum putative phytosulfokine peptide precursor (PSK2) mRNA, complete cds	Length = 490 Identities = 490/490 (100%)	植物磺肽素, 与生长素和细胞分裂素调节的信号传递途径密切相关, 是一种植物新型肽类生长调节物质。
C	ST25-2, ST66	700bp	gb DQ191661.1 Solanum tuberosum ribosomal protein L27a-like protein mRNA, complete cds	Length = 665 Identities = 400/475 (84%),	类似于 60S 亚基上核糖体蛋白 L27a, 参与翻译, 核糖体结构, 生物起源等。
D	ST30	960bp	emb X14449.1 LELEEF1 Tomato LeEF-1 mRNA for elongation factor 1 alpha	Length=1692 Identities = 626/694 (90%)	延长因子 1 的 α 亚基(EF-1 α), 在真核生物蛋白质肽链延伸中起关键作用。
E	ST40-1	1248 bp	gb M62755.1 POTST4C11 Potato 4-coumarate-CoA ligase (St4C1-1) gene, complete cds	Length=4030 Identities = 1009/1076(93%)	4-香豆酸-CoA 连接酶, 具有 CaiC 结构域, 与脂类代谢、二级代谢产物合成, 运输和分解有关。
F	ST53 ST97	792bp	emb AJ580839.1 NBE580839 Nicotiana benthamiana mRNA for SUMO E2 conjugating enzyme SCE1 (sce1 gene)	Length = 591 Identities = 435/477 (91%),	SUMO 小泛肽介导的修饰途径, 在蛋白质翻译后修饰中起到重要作用, 调控核蛋白转录的活性。
G	ST54 ST55	517bp	gb U71108.1 NTU71108 Nicotiana tabacum S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase mRNA, complete cds	Length=1267 Identities = 250/287 (87%),	S-腺苷甲硫氨酸-固醇甲基转移酶 C 末端, 存在于真菌和植物中的甲基转移酶羧基端, 该酶具有自动平衡体内植物甾醇的功能。
H	ST82	556bp	gb BT013352.1 Lycopersicon esculentum clone 135308F, mRNA sequence	Length=599 Identities = 541/542 (99%),	功能未知
I	ST103	1227 bp	emb AJ414051.1 NTA414051 Nicotiana tabacum partial sat1 gene for serine acetyl- transferase 1, genomic RNA	Length=1181 Identities = 846/994 (85%),	丝氨酸乙酰基转移酶, 与植物体内 O-丝氨酸乙酰化相关
J	ST35, ST38, ST45	1224 bp	No result		无比对结果
K	ST6	832bp	No result		无比对结果
L	ST18	1171 bp	No result		无比对结果

B 组: ST24-1, 序列长 534bp, 与番茄中的植物磺肽素前体 (PSK2) mRNA 同源性达到 100%, 其功能与生长素和细胞分裂素调节的信号传递途径密切相关, 是一种植物新型肽类生长调节物质。

C 组: ST25-2, ST66。两个序列长度 700bp, 与马铃薯核糖体蛋白 L27a 蛋白 mRNA 序列同源性较高 (84%), 具有参与翻译, 组成核糖体结构, 生物起源等功能。

D 组: ST30, 序列长 960bp, 与番茄延长因子 1 的 α 亚基 LeEF-1 mRNA 序列同源性较高 (90%), 在真核生物蛋白质肽链延伸中起关键作用 (Pokalsky, 1989)。

E 组: ST40-1, 序列长 1248bp, 与马铃薯中的 4-香豆酸-CoA 连接酶基因同源性较高 (93%), 参与脂类代谢、二级代谢产物合成, 运输和分解等过程。

F 组: ST53, ST97, 序列长 792bp, 与烟草 SUMO E2 连接酶 mRNA 同源性较高 (91%), 参与小泛肽介导的修饰途径, 在蛋白质翻译后修饰中起到重要作用, 调控核蛋白转录的活性。

G 组: ST54, ST55, 序列长 517bp, 与烟草 S-腺苷甲硫氨酸-固醇甲基转移酶 C 末端 mRNA 同源性较高 (87%), 存在于真菌和植物中的甲基转移酶羧基端, 具有自动平衡体内植物甾醇的功能 (Nes, 2000; 2003)。

H 组: ST82, 序列长 556bp, 与番茄克隆 135308F 的 mRNA 序列同源性较高 (99%), 但功能未知。

I 组: ST103, 序列长 1227bp, 与烟草丝氨酸乙酰基转移酶 1 (SAT1) 基因序列同源性较高 (85%), 参与植物体内 O-丝氨酸乙酰化过程 (Wirtz, *et al.*, 2003)。

另外, J 组的 ST35, ST38, ST45 和 K 组的 ST6 及 L 组的 ST18 比对均无结果。

3.4 小结与讨论

3.4.1 转化效率

酵母双杂交筛选实验中, 转化效率是决定最终文库筛选的完整性的关键因素 (方玉楷等, 2005), 在此实验中, 虽然采用了按顺序转化方式, 但第一次转化效率 (5.05×10^3 cfu/ μ g) 仍低于按顺序转化的 1×10^4 cfu/ μ g 的要求, 根据单独 AD/文库质粒的转化效率计算结果 $< 5 \times 10^4$ cfu/ μ g, 分析转化效率低的原因是使用的文库质粒量较少。根据转化效率计算, 为筛选得到较为完整的文库容量 1×10^6 克隆, 则需要 AD/文库质粒 200 μ g, 然而由于 AD/文库质粒只有 100 μ g, 所以可能筛选得到的克隆只有 0.5×10^6 , 是通常完整文库的一半, 但是为了提高转化效率, 在转化过程热激步骤后增加了一个让转化细胞复苏的过程, 这将有助于提高筛选文库容量的完整性。

3.4.2 假阳性的排除

酵母双杂交筛选文库中,只有DNA-BD/诱饵蛋白质粒和AD/文库质粒同时存在,且他们融合的蛋白彼此相互作用的时候,表达报告基因的才是真的阳性克隆。在LexA系统中,假阳性转化子可能表现出 Leu^+ 或 LacZ^+ ,或两者兼有,但是他们所含有的质粒编码的杂合蛋白并不存在直接的相互作用。这此假阳性克隆的出现存在许多原因(Bartel, *et al.*, 1993)。有些实验中AD/文库质粒单独存在可以激活下游报告基因的表达,但是另一些实验中却需要DNA-BD质粒才能激活。因此,除了上一章排除的DNA-BD/诱饵蛋白的自激活作用外,还需要排除筛选得到的AD/文库质粒产生的自激活作用。

因此在本实验筛选中,为了减少假阳性的干扰,不仅使用了相应的对照质粒,而且还进行了AD/文库质粒的排除,并进行了再次共转化验证。

另外,在分离AD/文库质粒的时候,发现由于酵母中质粒拷贝数比较低,特别是文库质粒要比诱饵质粒还要少,所以比较难于分离。但是可以先将阳性克隆挑到3ml液体培养基SD/-Trp/-Ura中培养2天,在划线到固体培养基SD/-Trp/-Ura上保存。在这种情况下可以保留AD/文库质粒(含 TRP1 基因)和报告质粒(含 URA3 基因),而诱饵质粒由于没有选择压力就会随机丢失,丢失率约在10~20%。这样提取的酵母质粒中AD/文库质粒比例就会比以前大一些,有利于以后的分离。

3.4.3 比对结果讨论

筛选得到的十二组阳性克隆中,有八组获得了同源性较高的比对序列。分析稻瘟菌激活蛋白PEMG1可能影响的植物体内代谢的功能有:

1. A组的类核糖体蛋白L15, C组的类核糖体蛋白L27a都参与蛋白质翻译,组成核糖体结构。D组的番茄延长因子1的 α 亚基(EF-1 α),在真核生物蛋白质肽链延伸中起关键作用。说明稻瘟菌激活蛋白PEMG1可能影响蛋白质合成的过程。

2. B组与植物磺胺素前体(PSK2)mRNA同源性达到100%。日本学者Matsubayashi和Sakagami于1996年在用石刁柏的叶肉细胞悬浮培养时,发现植物细胞密度对培养细胞的分裂和增殖有很大的影响。后经Matsubayashi研究小组多年研究表明PSK具有植物肽类激素的属性,其功能与生长素和细胞分裂素调节的信号传递途径密切相关,是一种植物新型肽类生长调节物质(Yang, *et al.*, 2000; Igasaki, *et al.*, 2003)。值得注意的是,蛋白质的磺化在动物中是普遍存在的,磺化后的蛋白质与分子识别有关,而植物磺化反应是否具有同样的机制目前还没有相关报道(陈新建等, 2005)。

3. E组和G组分别与4-香豆酸-CoA连接酶基因和S-腺苷甲硫氨酸-固醇甲基转移酶C末端相似性较高,参与植物体内的脂类代谢、二级代谢产物合成等过程。

许多植物在受到病原微生物侵染后,产生并积累次生代谢物质,用以增强自身抵抗力。参与植物防御的次生代谢物质包括各种类型的植保素、木质素和其他一些次生代谢物质。其中植保素是植物受侵染后产生的一类分子量较低的抗病原物的次生物质,一般在侵染点附近出现,其产生

速度和积累的量与植物抗病性有关。植保素的大量积累能导致病原微生物的死亡或生理功能的紊乱。

激发子不仅诱导植物次生代谢物质含量的增加,而且可改变次生代谢物质合成中相关酶的活性。一般来说,在特征酶诱导和植物次生代谢物质积累间具有直接相关性,相应酶活性可能提高。异黄酮植保素和木质素的生物合成都通过苯丙烷类代谢途径。苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(CA4H)和4-香豆酸-CoA 连结酶(4CL)是苯丙烷代谢途径的关键酶,它们的活性在植物体内的变化与植物的抗病性存在一定的联系。

4. F 组和 I 组分别参与小泛肽介导的修饰和丝氨酸氧原子的糖基化,这些都是蛋白质翻译后修饰过程。

正如第一章所提到的,酵母双杂交虽然有诸多优势,但也有局限性,其中一个就是很容易得到假阳性结果,不仅增加后期实验的工作量,而且对实验结果的分析也会产生干扰。因此去除假阳性结果,进行重复验证显得尤为重要。

另外,一般在阳性克隆测序后,许多研究者还选择其它的独立的生物化学方法来确认这种蛋白质和蛋白质的相互作用,如亲和层析法或者共免疫沉淀法(Fields, *et al.*, 1994)。酵母双杂交方法相对于检测微弱的或者瞬时的蛋白质相互作用是十分敏感的,但是这些作用在使用一般的生物化学方法时是检测不到的,而这些相互作用却可能对复合生物系统的功能来说是关键的(Guarente, 1993; Estojak, *et al.*, 1995)。

所以下一步需要运用其它独立的方法对所得结果进行验证(杨齐衡&李林, 1999),并利用它们的位点缺失或突变体来判断哪部分序列是对这种相互作用所必需的,从而为进一步探讨稻瘟菌激活蛋白 pemG1 的相互作用机理提供更可靠的实验依据。

3.4.4 作用机理探讨

植物发病是“植物-微生物”体系相互作用的结果,发病的表型取决于寄主、病原物和环境条件三者的相互关系。对该体系的研究提出了很多重要的理论和假设。Flor 经历十余年对亚麻—亚麻锈病(*Melampsora lini*)体系的研究,在 1956 年提出基因对基因假说(gene-for-gene hypothesis)(Lamb, 1996)。其它重要理论还有:植物对微生物的侵染产生的抗病性可以分为垂直抗性和水平抗性;植物的防卫机制有组成型和诱导型;植物和病原菌的相互作用也分为非亲和互作以及亲和互作等。虽然有众多的理论和假说的提出,但面对纷繁复杂的植物-微生物体系,人们意识到要更好地理解和研究该问题需要在更多的系统层面上进行分析,仅对其中一两个物质做简单的测定和研究很难合理解释目前的现象。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷生物合成中的第一个酶,一方面参与防御物质木质素和异黄酮类物质的合成;另一方面产生水杨酸(SA),启动过敏反应(HR)和系统获得性抗性反应(SAR)的表达,因此 PAL 的快速转录激活在植物抗病性中起着中心作用。PAL 等酶活性的提高可以抵御病原真菌的侵染,其活性的变化可作为植物抗性的重要指标。从交链孢菌激活蛋白诱

导不同时间的 PAL 活性变化趋势似乎可以看出, 交链孢菌激活蛋白在 7d 时已明显增强了水稻幼苗对稻瘟菌的抗性 (赵丽辉, 2005)。

苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (CA4H) 和本实验筛选得到的 4-香豆酸-CoA 连接酶 (4CL) 是苯丙烷类生物合成途径的关键酶, 且黄酮类植保素、木质素、水杨酸等的生物合成都是通过此途径。这似乎给稻瘟菌激活蛋白和交链孢菌激活蛋白具有相同的诱导抗性途径提供了线索。

另外, 本人在利用噬菌体展示技术筛选随机十五肽库中得到了一个 NBS-LRR 抗病蛋白同系物。具有或部分具有亮氨酸重复区 (leucine-rich repeats, LRR)、核苷酸结合位点 (nucleotide binding site, NBS) 或丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine-threonine kinase, STR) 保守序列恰是抗病基因的特点。抗病基因 (*R* 基因) 是寄主与病原无毒基因互作的基因, 抗病基因和无毒基因互作会活化植物的信号转导途径, 进而激活植物的防御反应。

目前已经鉴定的参与植物-病原菌互作中的编码受体激酶类激酶 (RLK) 的蛋白激酶 Xa21 也属于 NBS-LRR 类型。通过 cDNA 芯片技术鉴定出 229 个交链孢菌激活蛋白激发的水稻差异表达基因, 研究分析了这些基因参与植物体内广谱的生物学过程, 从 28 个抗病防御和信号转导相关基因中选取 10 个进行的半定量 RT-PCR 和 Northern blotting 验证, 结果显示出良好的一致性, 表明交链孢菌激活蛋白激活了包括蛋白激酶、调节蛋白 NPR1 等在内的抗性相关基因的表达。

综上所述, 越来越多的研究表明细胞内的防御活动通常不只受一条信号途径的调节, 而是受两条或多条信号途径的协同调节。多条信号途径交叉是植物信号转导网络中的一个重要机制 (图 3-5)。研究认为多条信号途径间的交叉可使植物在不同的逆境条件下从时空上激活不同的基因。

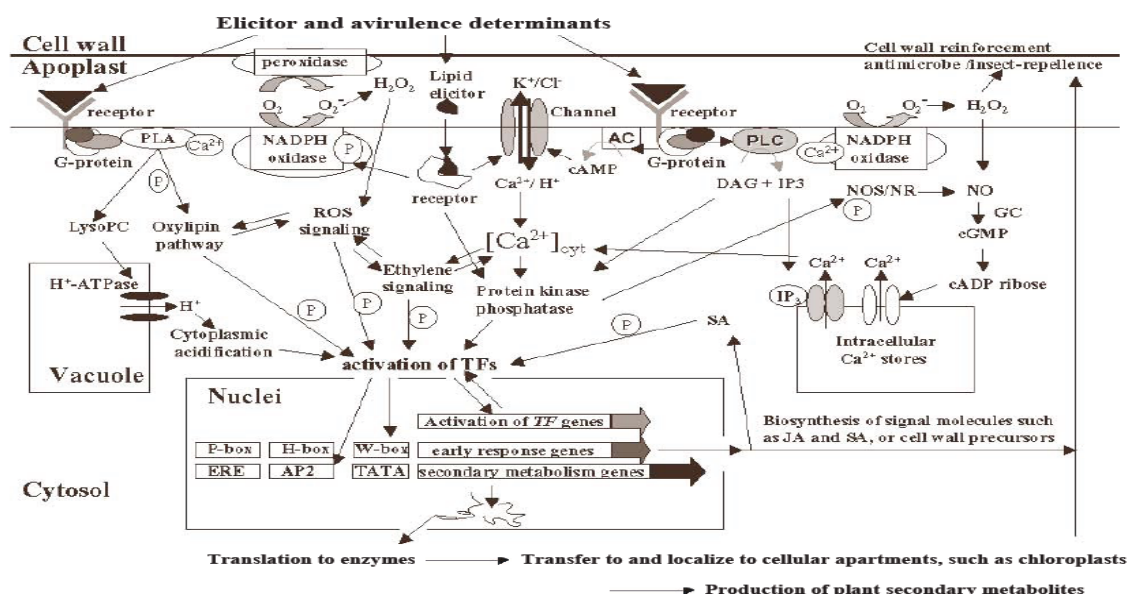


图 3-5 激发子信号转导网络图

Figure1-5 A comprehensive schematic illustration of elicitor signal transduction

第四章 结论

1. 运用 PCR 方法扩增稻瘟菌激活蛋白基因 *pemG1*, 构建重组诱饵融合质粒 pLexA-PEMG1, 并检测无自激活作用, 进行番茄 cDNA 文库筛选, 在本实验室成功构建了 LexA 酵母双杂交系统, 为下一步继续研究其它来源激活蛋白的信号传导作用机理使用该方法提供了实验技术基础。

2. 运用该系统成功筛选得到了十二组阳性克隆, 经过测序比对分析:

稻瘟菌激活蛋白可能影响番茄的蛋白质合成和修饰过程, 并可能与一种植物肽类生长调节物质 (PSK) 相互作用, 影响番茄细胞的生长和分化。植物磺胺素 (PSK) 具有促进悬浮细胞生长和增殖, 促进导管分化和胚性细胞形成, 调节花粉的群体效应, 提高植物的耐热性等功能。研究发现, PSK-a 的产生和生物活性的表达与生长素和细胞分裂素调节的信号传递途径密切相关。

在抗病机理方面: 与稻瘟菌激活蛋白作用的 4-香豆酸-CoA 连结酶 (4CL) 和交链孢菌激活蛋白激发提高活性的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 在苯丙烷类生物合成途径中都是关键酶, 而像黄酮类植保素、木质素、水杨酸等与抗病有关的植物次生代谢物的生物合成均需通过苯丙烷类生物合成途径。这就暗示激活蛋白可能影响苯丙烷类生物合成途径, 同时影响黄酮类植保素、木质素、水杨酸等与抗病有关的植物次生代谢物的生物合成, 而起到激发抗病防虫的作用。

3. 本实验没有获得已知的膜上受体蛋白, 这与酵母双杂交系统的局限性有一定关系, 而且由于本实验所用 AD/文库质粒有限, 也限制了筛选的完整性。令人欣喜的是, 本实验还是得到了一些可参考的信息, 为实验室建立了酵母双杂交系统, 并将用这项技术继续研究激活蛋白与互作蛋白机理, 相信这些研究会对寻找受体蛋白提供更多的线索。

参考文献

1. 陈新建, 杨艳会, 陈军营, 崔党群. 植物新型肽类生长调节物质——植物磺肽素. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 669~673.
2. 戴良英, 李枸, 罗宽. 拟南芥 COI1 互作基因的分离. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 5: 359~363.
3. 方玉楷, 许丽艳, 麦瑞琴. 酵母双杂交技术的影响因素及其实验策略. 中国实验诊断学, 2005, 9(1): 70~74.
4. 高宁, 胡宝成. 酵母双杂交系统的发展及其衍生系统的比较. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 421~424.
5. 郭泽建, 蒋冬花. 植物病原菌激发子与信号识别机理. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2003, 26(1): 1~7.
6. 胡承香, 徐祥, 梁华平, 王付龙, 罗艳, 王正国. 酵母双杂交随机肽库的设计及构建. 动物医学进展, 2003, 24(2): 61~63.
7. 蒋冬花, 郭泽建, 陈旭君, 程志强, 郑重. 激发子隐地蛋白基因介导的烟草抗病性研究. 农业生物技术学报, 2003, 11: 299~304.
8. 李丽, 邱德文, 刘峥. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用. 中国生物防治, 2005, 21(4): 265~268.
9. 陆徐忠, 王金生. 新型水稻黄单胞菌 Harpin 蛋白的纯化及其特性研究. 高等学校化学学报, 2006, 27(5): 875~879.
10. 齐兵, 齐义鹏, M.Yutsudo, 刘青珍. 用酵母双杂交系统分离一个新的人类细胞凋亡诱发基因. 中国科学(C 辑), 2000, 30(2): 113~122.
11. 邱德文, 肖友伦, 姚庆. 植物激活蛋白对黄瓜的促生诱抗相关酶的影响. 中国生物防治, 2005, 21(1): 41~44.
12. 邱德文, 曾凡荣, 刘峥, 杨秀芬, 袁京京. 植物激活蛋白对甜菜夜蛾幼虫生长和发育的影响. 植物保护学报, 2005, 32(3): 329~330.
13. 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展. 中国生物防治, 2004, 20(2): 91~94.
14. 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质, (中国) 专利申请号: 0112866.0 2001 年 10 月, 专利公开号: CN1344727A 专利公开日期: 2002 年 4 月 17 日《中国专利公报》18(16)期.
15. 唐泽耀, 戴淑芳, 陈华, 林原. 蛋白质相互作用研究的哲学思考. 医学与哲学, 2005, 26(1): 53~54.
16. 王金生. 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
17. 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2002.
18. 王源超, 张正光, 李俊, 安成才, 陈章良, 郑小波. H₂O₂ 参与棉疫病菌 90kD 蛋白激发子诱导的烟草过敏反应和系统获得抗性. 植物生理和分子生物学学报, 2003, 29(3): 185~191.
19. 吴乃虎. 基因工程原理. 北京: 科学出版社, 1998.

20. 肖海华, 印莉萍, 许雪峰, 韩振海. 酵母双杂交在植物功能基因组研究中的应用. 生物信息学, 2006, 4: 34~37.
21. 徐锋, 杨勇, 谢馥交, 刘铮, 邱德文, 杨秀芬. 稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响. 华北农学报, 2006, 21 (5): 1~5.
22. 徐锋, 杨勇, 谢馥交. 激活蛋白处理水稻引发基因差异表达的研究. 生物技术通报, 2006, 4: 82~85.
23. 严景华, 叶棋浓, 朱建华, 钟红君, 郑回勇, 黄翠芬. BRCA1 相互作用蛋白的分离及鉴定. 遗传学报, 2003, 30(12): 1161~1166.
24. 杨齐衡, 李林. 酵母双杂交技术及其在蛋白质组研究中的应用. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(3): 221~225.
25. 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998.
26. 张树民, 陈英碕. 酵母双杂交体系的新发展. 国外医学遗传学, 1999, 22(5): 225~227.
27. 赵利辉, 邱德文, 刘峥, 杨秀芬. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1358~1363.
28. Anderson A J. The biology of glycoproteins elicitors.in: T Kosuge E W Nexter, eds. Plant-Microbe Interactions III. New York: McGraw Hill, 1989, 87~130.
29. Auerbach D, Thaminy S, Hottiger M O, *et al.* The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. Proteomics, 2002, 2: 611~623.
30. Bartel P, Chien C T, Sternglanz R, *et al.* Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Biotechniques, 1993, 14: 920~924.
31. Brent R, Ptashne M. A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. Nature, 1984, 312(5995): 612~615.
32. Brent R, Ptashne M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. Cell, 1985, 43: 729~736.
33. Cochran, A.G. Antagonists of protein-protein interactions. Chem. Biol, 2000, 7: 85~94.
34. De Urquiza, A.M. and Perlmann, T. In vivo and in vitro reporter systems for studying nuclear receptor and ligand activities. Methods Enzymol, 2003, 364: 463~474.
35. Dixon M S, Catherine G, Thomas C M, *et al.* Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by cf22. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 8807~8814.
36. Ehrhardt T, Zimmermann S, Muller-Rober B. Association of plant K^{+}_{in} channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. FEBS Lett, 1997, 409: 166~170.
37. Eidne, K. A., Kroeger, K. M. and Hanyaloglu, A. C. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. Trends Endocrinol.Metab, 2002, 13: 415~421.
38. Estojak, J., Brent, R. & Golemis, E. A. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. Molecular and Cellular Biology, 1995, 15: 5820~5829.

39. Fagerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, *et al.* Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Chromatogr*, 1992, 597(1-2): 397~410.
40. Fearon ER, Finkel T, Maura L, *et al.* Karyoplasmic interaction selection strategy: A general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89(17): 7958~7962.
41. Fearon, E.R., Finkel T, Gillison M L, *et al.* Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1992, 89: 7958~7962.
42. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340: 245~246.
43. Fields, S., Sternglanz, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, 1994, 10: 286~292.
44. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik*, 1948, 2: 57~75.
45. Giot L, Bader J S, Brouwer C, *et al.* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2003, 302: 1727~1736.
46. Grossel, M.J., Wang H, Gadea B, *et al.* A yeast two-hybrid system for discerning differential interactions using multiple baits. *Nat. Biotechnol*, 1999, 17: 1232~1233.
47. Guarente, L. Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1993, 90: 1639~1641.
48. Gyuris, J., Golemis E, Chertkov H, *et al.* Cdi, a human G1 and S phase protein phosphatase that associated with Cdk2. *Cell*, 1993, 75: 791~803.
49. Hope IA, Struhl K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 1986, 46(6): 885~894.
50. Huang, J. and Schreiber, S.L. A yeast-genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997, 94: 13396~13401.
51. Ichimura K, Mizoguchi T, Ire K. Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(2): 532~543.
52. Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, *et al.* Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(12): 1412~1416.
53. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2001, 98: 4569~4574.
54. J. 萨姆布鲁克, E.F., 弗里奇, T., 曼尼阿蒂斯. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南, 第2版. 北京: 科技出版社, 2002.
55. Keegan L, Gill G, Ptashne M. Separation of DNA binding from the transcription-activating

- function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 1986, 231(4739): 699~704.
56. Kusk M, Ahmed R, Thomsen B, *et al.* Interactions of protein kinase CK2 beta subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol Cell Biochem*, 1999, 191(1-2): 51~58.
57. Lam BC, Sage TL, Bianchi F, *et al.* Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2001, 13(11): 2499~2512.
58. Lamb C. A Ligand-Receptor Mechanism in Plant-Pathogen Recognition. *Science*, 1996, 274(5295): 2038~2039.
59. Leanna, C.A. and Hannick, M. The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 3341~3347.
60. Legrain, P. and Selig, L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett*, 2000, 480: 32~36.
61. Licitra, E. and Liu, J.O. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1996, 93: 12817~12821.
62. Liu G, Schwartz JA, Brooks SC. Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute-2. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1810~1814.
63. Magnard C, Bachelier R, Vincent A, *et al.* BRCA1 intercates with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. *Oncogene*, 2002, 21(44): 6729~6739.
64. Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, *et al.* An LRR Receptor Kinase Involved in Perception of a Peptide Plant Hormone, Phytosulfokine. *Science*, 2002, 296: 1470~1472.
65. Matsubayashi Y, Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis*. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 7623~7627.
66. Michnick, S.W. Exploring protein interactions by interaction-induced folding of proteins from complementary peptide fragments. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 2001, 11: 472~477.
67. Nes WD. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. *Phytochemistry*, 2003, 64(1): 75~95.
68. Nes WD. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1529 (1-3): 63~88.
69. Okinaka Y, Yang CH, Herman E, *et al.* The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(12): 1213~1218.
70. Osborne MA, Dalton S, Kochan JP. The yeast tribrid system-genetic detection of transphosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology*, 1995, 13: 1474~1478.
71. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.*, 1995, 69 (6) : 94~123.
72. Pokalsky, A.R., Hiatt, W.R., Ridge N, *et al.* Structure and expression of elongation factor lco in tomato. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(12): 4661~4673.
73. Puig O, Casparly F., Rigaut G, *et al.* The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods*, 2001, 24(3): 218~229.

74. Ricci P, Bonnet P, Huet JC, *et al.* Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 1989, 183: 555~563.
75. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 1030~1032.
76. Rossi, F.M., Blakely BT, Blau HM.. Interaction blues: protein interactions monitored in live mammalian cells by β -galactosidase complementation. *Trends Cell Biol*, 2000, 10: 119~122.
77. Sengupta, D.J., Zhang B., Kramer B., *et al.* A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1996, 93: 8496~8501.
78. Serebriiskii I, Khazak V, Golemis EA. A two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions. *J. Biol. Chem*, 1999, 274: 17080~17087.
79. Siming Li, Christopher M. Armstrong, *et al.* A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, 2004, 303: 540~543.
80. Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors for the display of cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315~1317.
81. Stagljar, I. and Fields, S. Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem. Sci*, 2002, 27: 559~563.
82. Templeton M D, Lamb C J. Elicitors and defense gene activation. *Plant Cell Environ*, 1988, 11: 395~401.
83. Tepper CS, Albert F G, Anderson AJ. Differential mRNA accumulation in three cultivars of bean in response to elicitors from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Mol. Plant Pathol*, 1989, 34: 85~98.
84. Tepper CS, Anderson AJ. Two cultivars of bean display a differential response to extracellular components from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Mol Plant pathol*, 1986, 29: 411~420.
85. Teyssier C, Belguise K, Galtier F, *et al.* Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect. *Mol. Endocrinol*, 2003, 17: 287~299.
86. Thaminy S, Auerbach D, Arnoldo A, *et al.* Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Genome Res*, 2003, 13: 1744~1753.
87. Toby, G.G. and Golemis, E.A. Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods*, 2001, 24: 201~217.
88. Uetz P, Giot L, Cagney G, *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000, 403: 623~627.
89. Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, *et al.* Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1996, 93: 10315~10320.

90. Vidal, M. and Legrain, P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 919~929.
91. Walhout AJ, Sordella R, Lu X, *et al.* Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, 2000, 287(5450): 116~122.
92. Walhout, A.J. and Vidal, M. Protein interaction maps for model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2001, 2: 55~62.
93. Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, *et al.* Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257: 85~88.
94. Wirtz M, Hell R. Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids*, 2003, 24(1-2): 195~203.
95. Xenarios I, Fernandez E, Salwinski L, *et al.* DIP: the database of interacting proteins: update. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 239~241.
96. Yamazaki M, Makita Y, Springob K, *et al.* Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. crisp. *Biochem Eng J*, 2003, 14: 191~197.
97. Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, *et al.* Phytosulfokine-alpha, a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(7): 825~30.
98. Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y. A receptor on membranes for a fungal elicitor of phytoalexin umulation. *Plant Physiol*, 1993, 73: 497~506.
99. Young K, Lin S, Sun L, *et al.* Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen. *Nat. Biotechnol*, 1998, 16: 946~950.
100. Zhang, J. and Lauter, S. A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal. Biochem*, 1996, 242: 68~72.
101. Zhu H, Bilgin M, Bangham R., *et al.* Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 2001, 293(5537): 2101~2105.

致 谢

本毕业论文是在邱德文研究员的悉心指导下完成的。邱老师归国投身农业科学研究事业的爱国精神值得我敬佩。他渊博的学识,认真细致的治学态度和严谨的工作作风是我一生学习的榜样。三年的学习生涯中,恩师无论在学习还是生活上都给予了无尽的关怀和帮助!论文的选题、实验设计、撰写、修改和定稿中无不倾注了恩师大量的心血。在此,谨向恩师和师母表示最衷心的感谢和祝福!

同时感谢蛋白质药物工程实验室的刘峥老师、杨秀芬老师、曾洪梅老师、袁京京老师、杨怀文老师,蒋伶活老师和曾凡荣老师,谢谢你们在我学习、实验和生活上给予的无私的指导、关心和帮助!

特别感谢清华大学谢道昕教授在酵母双杂交实验方面给予的巨大帮助和指导;特别感谢武汉大学闫俊鹏博士在噬菌体展示实验方面提供的指导和帮助!

感谢张宁硕士、刘文平硕士、刘延峰硕士在实验中给予的大量的指导、帮助和支持!同时感谢徐锋博士、赵利辉博士、龚永兴博士、顾成波博士、董健伸硕士、龙承祖硕士、杨勇硕士、曹丽波硕士、谢馥娇硕士、孙柏欣硕士、郭广君硕士、吕素芳硕士、黄丽俊硕士,冯飞博士、张志刚博士、金鑫硕士、李承雷硕士、武晓丽硕士、赵明治硕士、姚庆硕士和张云华师姐、毛建军博士、李明勇硕士、李杰硕士、刘华硕士、袁泉、周红运同学和陈小玲师傅,很荣幸与你们一起学习工作。实验室共同奋战的日日夜夜,经历的酸甜苦辣都将是我永久的记忆!更忘不了的是你们对我的关心与帮助!

感谢四川农业大学崔云凤硕士在学习和生活中给予的帮助和支持!

感谢同寝室的谷嵩硕士、周庭辉硕士、陈宝瑞硕士和硕士楼 314 室的在编室员们,谢谢你们给我生活带来的无尽欢乐和帮助!

感谢所有关心和帮助过我的老师、领导、朋友和同学们!

最后还要深深感谢我的父母和家人,他们为我求学提供了良好的保障,使我能顺得完成学业,他们多年来默默的支持和殷切的希望,正是我不断前进的动力!

论文的顺利完成与大家的鼓励和帮助是密不可分的!谨以此文献给所有我爱和爱我的人,向你们致以诚挚的谢意!祝你们永远健康快乐! :)

本论文实验得到国家“863”计划(2006AA10A210) 和“973”计划(2003CB114204)资助,特此感谢!

尚 威

2007 年 6 月

作者简历

基本信息			
姓 名	尚威	性 别	男
出生年月	1979 年 9 月	籍 贯	辽宁抚顺
政治面貌	中共党员	民 族	汉族
毕业院校	中国农业科学院研究生院	专 业	生物化学与分子生物学
电子信箱	shangwei_1979@163.com		
教育经历			
	时间	2004.09—2007.07	
	毕业院校	中国农业科学院研究生院	
	所学专业	生物化学与分子生物学	
	研究方向	微生物分子生物学与基因工程	
	学历	硕士	
	实验室	植物保护研究所蛋白质药物工程实验室	
	毕业论文：“利用酵母双杂交系统筛选稻瘟菌激活蛋白的互作蛋白”。 主要从事植物激活蛋白的分子作用机理方面的研究。 运用酵母双杂交技术和噬菌体展示技术对激活蛋白在植物体内的相互作用蛋白进行筛选和初步鉴定。 发表文章《稻瘟菌蛋白激发子在酵母双杂交系统中的自激活检测》		
	时间	1998.09—2002.07	
	毕业院校	沈阳农业大学生物科学技术学院	
	所学专业	生物技术	
	研究方向	分子生物学	
	学历	本科	
	课题组	蔬菜花卉研究所加工番茄课题组	
	毕业论文：“番茄雄性不育基因 <i>ps-2</i> 的 RFLP 分子标记”。 主要从事基因在染色体上定位方面的研究。 运用“限制性片段长度多态性”分子标记方法进行基因定位。		