

# 利用酵母双杂交研究铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiB 的自身相互作用

郑锦乾, 徐虹, 章军, 王靖, 朱斌琳

(厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 从铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC7820 中克隆了生物钟基因 *kaiB*, 并将其克隆入酵母双杂交系统的两个质粒 pGADT<sub>7</sub> 和 pGBKT<sub>7</sub> 中。经测序验证后, 将重组质粒 pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* 和 pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 转化酵母菌 AH109 进行自激活性和自身相互作用的检测和验证。结果表明, 铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiB 无自激活性, KaiB 蛋白自身能发生相互作用。因此, 可用 KaiB 蛋白为诱饵利用酵母双杂交系统筛选文库钓取与 KaiB 发生相互作用的蛋白。

**关键词:** 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*); 生物钟蛋白 KaiB; 酵母双杂交; 自身相互作用  
中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)08-0041-05

蓝藻是目前已知具有昼夜节律现象的最简单生物, 它的昼夜节律现象受到生物钟的控制<sup>[1,2]</sup>。自从第一个蓝藻生物钟基因从聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC7942 中被克隆后, 研究者们就利用 PCR 和 Southern 杂交证实了在近 40 种蓝藻中都存在生物钟基因<sup>[3,4]</sup>。蓝藻生物钟基因是一个基因簇 *kaiABC*, 由 3 个基因 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 组成, 其中 *kaiA* 单独转录, *kaiB*, *kaiC* 共同转录, 它们的表达产物 KaiA, KaiB, KaiC 蛋白共同组成生物钟的中央振荡器, 产生昼夜节律的计时机制<sup>[1-3]</sup>。KaiC 蛋白能发生周期性的自身磷酸化, 其自身磷酸化的昼夜节律性是生物钟计时的关键, 而 KaiA 和 KaiB 则能调节 KaiC 的自磷酸化活性。KaiA 能增强 KaiC 的自磷酸化活性, 提高 KaiC 的磷酸化水平, KaiB 是 KaiC 磷酸化的负调控因子, 它能降低由 KaiA 增强的 KaiC 磷酸化水平, 使 KaiC 自身脱磷酸化<sup>[5-8]</sup>。

由于铜绿微囊藻是湖泊、水库及其他水域生态系统发生和形成富营养化危害(水华、赤潮)的主要藻种之一<sup>[9]</sup>, 因此研究其生理代谢和生长繁殖的规律对研究和预防水华赤潮的发生具有非常重要的意义。虽然早在 1996 年 Sato 等<sup>[10]</sup>就报道了铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 光合基因的表达存在昼夜节律现象, 但此后却一直未见有关于铜绿微囊藻生物钟相关研究的进一步报道。作者所在的实验室已发现铜绿微囊藻的光合作用和细胞分裂具有明显的昼夜节律性, 并且已克隆了它的生物钟基因

*kaiABC* (GenBank accession number: DQ156152)。目前在蓝藻钟蛋白中, 对 KaiA 和 KaiC 的研究较多而对 KaiB 则知之甚少, 为了研究 KaiB 的作用机制, 作者拟用酵母双杂交系统钓取与之相互作用的蛋白。在大规模筛选文库之前首先要检测 KaiB 是否具有毒性或自激活活性, 能否用于酵母双杂交系统, KaiB 蛋白自身是否具有相互作用。

## 1 材料与 方法

### 1.1 质粒

载体 pMD18 T-Vector 购自 Takara 公司, pUC19 为本实验室保存; 酵母双杂交系统所用的质粒 pGADT7, pGBKT7, pGADT7T, pGBKT7-53, pGBKT7-Lam 购自 Clontech 公司; pMD18 T-*kaiB*, pGADT7-*kaiB*, pGBKT7-*kaiB* 均由本实验室构建。

### 1.2 菌株

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  由作者所在的实验室保存; AH109 酵母菌购自 CLONTECH 公司, 进行酵母双杂交实验; 铜绿微囊藻 PCC7820 购自中国科学院水生生物研究所。

收稿日期: 2005-10-26; 修回日期: 2006-03-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40306024)

作者简介: 郑锦乾(1976), 男, 海南三亚人, 硕士研究生, 研究方向: 生化与分子生物学; 徐虹, 通讯作者, E-mail: xuhongxm@sohu.com

### 1.3 试剂

分子生物实验试剂: 限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶为 TakaRa 公司产品。PCR 纯化试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自上海博亚生物公司。酵母氮源为 Difco 产品, PEG4000 以及鱼精 DNA, X-gal 购自 Sigma 公司。

### 1.4 铜绿微囊藻染色体的提取

提取方法参照文献[11]。

### 1.5 铜绿微囊藻生物钟基因 *kaiB* 的扩增

为了便于克隆和表达, 分别在其上游引物和下游引物中设计了 NdeI 和 EcoRI 酶切位点。设计的引物序列如下:

P1: 5'-CTTAACATATGAGCGTCT-3'  
NdeI

P2: 5'-ATGATTCAAAAGACCTAGG-3'  
EcoRI

50 μL PCR 反应体系中含模板(铜绿微囊藻染色体) 0.1 μg, 上下游引物各 60 μmol/L, 10× PCR 缓冲液 5 μL, 250 μmol/L dNTP, 5U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 45 s, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 经 35 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定效果。

### 1.6 铜绿微囊藻生物钟基因 *kaiB* 的克隆及鉴定

将 PCR 扩增的 *kaiB* 基因纯化后与 pMD18-T Vector 连接, 挑取阳性克隆进行酶切鉴定和测序。

### 1.7 重组质粒 pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*, pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 的构建

鉴定正确的重组子 pMD18-T-*kaiB* 用 NdeI 和 EcoRI 进行酶切, 然后回收 *kaiB* 基因片段, 再克隆于经同样酶切的 pGADT<sub>7</sub>, pGBKT<sub>7</sub> 中。

### 1.8 酵母双杂交实验

参照 Clontech 公司的 Matchmaker GAL4 Two Hybrid System3 Manual 进行。

#### 1.8.1 营养缺陷筛选

以酵母菌 AH109 为宿主菌, 分别转入以下 4 组质粒: 阳性对照 (pGADT<sub>7</sub>-T + pGBKT<sub>7</sub>-53)、阴性对照 (pGADT<sub>7</sub>-T + pGBKT<sub>7</sub>-Lam)、自激活检测组 (pGADT<sub>7</sub> + pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*)、自身相互作用组 (pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* + pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*)。将转化后的酵母菌分别涂布于营养缺陷选择平板 SD/-Leu Trp、SD/-Leu Trp His Ade 上培养, 分别进行低、高严谨

度营养缺陷选择的检测, 以验证其自激活性和自身相互作用。

#### 1.8.2 β-半乳糖苷酶活性分析

采用 β-半乳糖苷酶印迹法检测 LacZ 报告基因的表达。分别从阳性对照、阴性对照、pGADT<sub>7</sub> + pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*、pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* + pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 的 SD/-Leu Trp 选择平板上挑取长出的阳性菌落, 分别划线于 SD/-Leu Trp、SD/-Leu Trp His Ade 营养缺陷平板上, 30 °C 培养 3~4 d 后做 X-gal 显色实验。

## 2 结果

### 2.1 铜绿微囊藻生物钟基因 *kaiB* 的克隆

以铜绿微囊藻的染色体为模板, 用带有 NdeI 酶切位点的 P1 引物和 EcoRI 位点的 P2 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经电泳检测可知约为 300bp 左右大小(图 1), 这与铜绿微囊藻生物钟基因 *kaiB* (315bp) 的大小相一致。随后将该 PCR 产物与 T 载体 pMD18-T Vector 连接后转化 *Escherichia coli* DH5α, 经 Amp 筛选, 挑取阳性克隆, 经 EcoRI 单酶切、NdeI 和 EcoRI 双酶切进行验证(图 2), 酶切的结果表明该阳性克隆中已插入 *kaiB* 基因。将该阳性克隆进行测序, 测序结果表明插入的 *kaiB* 基因序列扩增正确无误。

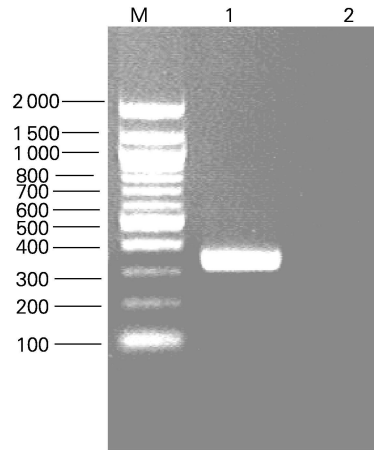


图1 PCR 扩增 *kaiB* 基因

Fig. 1 the PCR production of *kaiB*  
M: 100bp 的分子量标记; 1. PCR 产物; 2. 空白对照  
M: 100bp DNA Marker; 1. PCR product; 2. negative control

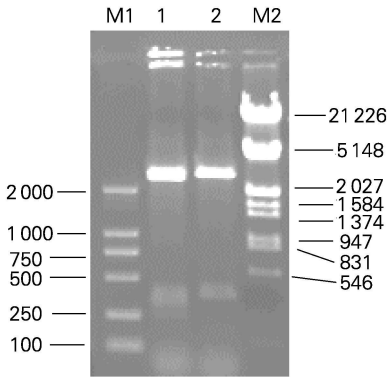


图2 重组质粒 pMD18-T-*kaiB* 的酶切验证

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pMD18-T-*kaiB*  
 M1: DL2 000 DNA 分子量标记; 1. pUC18 / EcoRI (阴性对照); 2. pMD18-T-*kaiB*/ EcoRI  
 M1: DL2 000 DNA Marker; 1. pUC18 / EcoRI (negative control); 2. pMD18-T-*kaiB*/ EcoRI

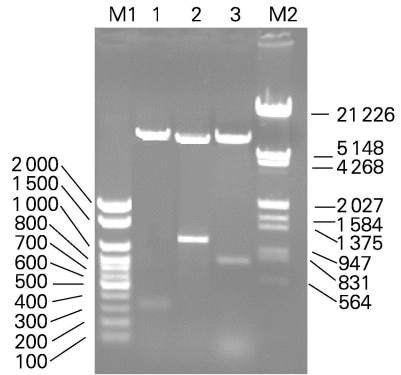


图4 pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* 的酶切验证

Fig. 4 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*  
 1. pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*/ NcoI + EcoRI;  
 2. pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*/HindIII; 3. pGADT<sub>7</sub>/ HindIII(阴性对照); M1: 2 000 bp DNA 分子量标记; M2: λ DNA/Hind III+ EcoRI 分子量标记  
 1. pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*/ NcoI + EcoRI; 2. pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*/ HindIII; 3. pGADT<sub>7</sub>/ HindIII(negative control); M1: 2 000 bp DNA marker; M2: λ DNA/ Hind III+ EcoRI marker

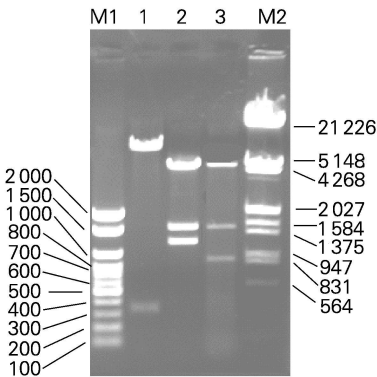


图3 pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 的酶切验证

Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*  
 1. pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*/ NcoI + EcoRI; 2. pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*/HindIII; 3. pGBKT<sub>7</sub>/ HindIII (阴性对照); M1: 2 000 bp DNA 分子量标记; M2: λ DNA/Hind III+ EcoRI 分子量标记  
 1. pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*/ NcoI + EcoRI; 2. pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*/HindIII; 3. pGBKT<sub>7</sub>/ HindIII (negative control); M1: 2 000 bp DNA marker; M2: λ DNA/ Hind III+ EcoRI marker

## 2.2 pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*、pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 的构建

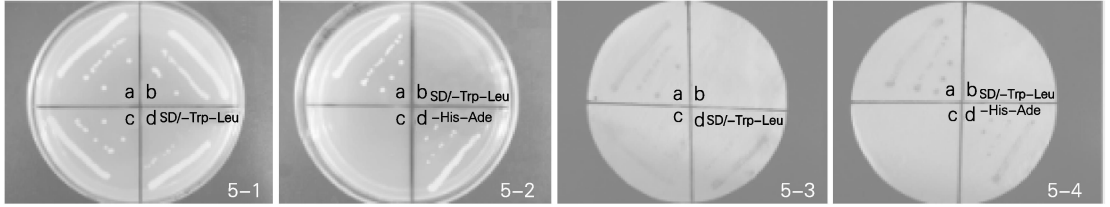
将 pMD18-T-*kaiB* 经 NdeI 和 EcoRI 双酶切后, 电泳回收 *kaiB* 基因, 然后分别与同样经 NdeI 和 EcoRI 双酶切的 pGADT<sub>7</sub>、pGBKT<sub>7</sub> 载体片段进行连接, 分别挑阳性克隆提取质粒进行 NdeI 和 EcoRI 双酶切、HindIII 单酶切验证(图 3、图 4), 酶切结果表明重组质粒 pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* 和 pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB* 构建正确, 将重组质粒进行测序, 测序结果表明 *kaiB* 基因已分别插入 pGADT<sub>7</sub> 和 pGBKT<sub>7</sub> 载体中, 且阅读框正确。

## 2.3 KaiB 的自激活活性和自身相互作用研究

在酵母 AH 109 中分别共转化入下列 4 组质粒: 阳性对照 (pGADT<sub>7</sub>-T + pGBKT<sub>7</sub>-53)、阴性对照 (pGADT<sub>7</sub>-T + pGBKT<sub>7</sub>-Lam)、自激活检测组 (pGADT<sub>7</sub> + pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*)、自身作用检测组 (pGADT<sub>7</sub>-*kaiB*+ pGBKT<sub>7</sub>-*kaiB*), 转化产物分别涂布于 SD<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>Trp 二缺培养基平板和 SD<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Ade 四缺平板。30 °C 培养 4~6 d 后, 4

组转化酵母菌均能在 SD/- Leu/- Trp 二缺培养基平板生长(图 5 1), 这说明 4 组共转化都获成功, 每组酵母菌中均含有所转化的两种质粒, 且融合表达的 KaiB 蛋白对酵母菌不产生毒性, 不影响酵母细胞的生长。但在 SD/- Leu/- Trp/- His/- Ade 四缺平板上只有阳性对照组和自身作用检测组有酵母菌生长, 而 pGBKT7 *kaiB*+ pGADT7 空载体转化组不能在四缺平板上生长(图 5 2), 这说明 KaiB 不能激活酵母菌 AH 109 的 *his3* 和 *ade2* 基因的转录, 不具有自激活活性, 而 KaiB 自身由于能发生相互作用从而激活了报

告基因 *his3* 和 *ade2* 的转录因而能在四缺平板上生长。分别将二缺和四缺平板上生长的菌落影印到滤纸上进行 X-gal 显色, 结果 2 种平板上都只有阳性对照组和自身作用检测组显蓝色, 而阴性对照组和自激活检测组的转化菌则不显色, 这也说明 KaiB 不具有自激活活性, 不能激活 LacZ 基因表达; 而 KaiB 自身能发生相互作用, 从而激活了报告基因 LacZ 的表达(图 5 3, 5 4)。



a: pGADT7 T+ pGBKT7 53      b: pGADT7 T+ pGBKT7 Lam  
c: pGADT7 + pGBKT7 *kaiB*      d: pGADT7 *kaiB*+ pGBKT7 *kaiB*  
图 5 转化酵母在营养缺陷平板上的生长情况和 X-gal 显色结果

Fig. 5 The growth on SD dropout medium and  $\beta$ -galactosidase analysis of the transformed yeast

5 1. 转化酵母菌在二缺平板 SD/-Trp/Leu 上的生长; 5 2. 转化酵母菌在四缺平板 SD/-Trp/Leu/His/Ade 上的生长; 5 3. SD/-Trp/Leu 平板上转化菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析; 5 4. SD/-Trp/Leu/His/Ade 平板上转化菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析  
5 1. Growth of transformed yeast cell on SD/-Trp/Leu plate; 5 2. Growth of transformed yeast cell on SD/-Trp/Leu/His/Ade plate; 5 3. Assay for  $\beta$  galactosidase activity of transformed yeast cell growth on SD/-Trp/Leu plate; 5 4. Assay for  $\beta$  galactosidase activity of transformed yeast cell growth on SD/-Trp/Leu/His/Ade plate

### 3 讨论

为了研究铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiB 究竟与哪些相关蛋白发生相互作用而发挥生物钟的调控作用, 拟采用酵母双杂交系统对铜绿微囊藻基因组文库进行筛选, 而在运用酵母双杂交大规模筛选之前必须验证 KaiB 蛋白是否具有毒性和自激活活性。为此, 作者构建了酵母双杂交的重组质粒 pGADT7 *kaiB*、pGBKT7 *kaiB*, 并将它们转入了酵母菌 AH 109 中。经过营养缺陷型筛选和  $\beta$ -半乳糖苷酶检测表明: 生物钟蛋白 KaiB 不具有自激活活性, 可以进行下一步的文库筛选。另外, 实验的结果还证实了 KaiB 蛋白会发生自身相互作用, 暗示其在发挥生物钟调控作用时可能是以二聚体或多聚体的形式参与。

#### 参考文献:

[1] Ditty J L, Williams S B, Golden S S. Cyanobacterial circadian time mechanism [J]. *Annu Rev Genet*, 2003, 37: 513-543.

[2] 徐虹, 章军. 蓝藻生物钟分子机制研究进展 [J]. *海洋科学*, 2004, 28(7): 61-66.  
[3] Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, *et al.* Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feed back process in cyanobacteria [J]. *Science*, 1998, 281(4): 1 519-1 523.  
[4] Lorne J, Scheffer J, Lee A. Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria[J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2000, 189: 129-133.  
[5] Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, *et al.* Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria [J]. *PNAS*, 2000, 97(1): 495-499.  
[6] Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, *et al.* KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria [J]. *PNAS*, 2002, 99(24): 15 788-15 793.  
[7] Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, *et al.* KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system [J]. *EMBO J*, 2003, 22(9): 2 127-2 134.  
[8] Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, *et al.* Role of

- KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC7942 [ J ]. *PNAS*, 2004, **101**( 38 ): 13 927-13 923.
- [ 9 ] 李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究 [ J ]. 水生生物学报, 1999, **23**( 5 ): 517-523.
- [ 10 ] Sato M, Shibato J, Asayama M, *et al.* Light responsive and rhythmic gene expression of *psbA2* in cyanobacterium *microcystis aeruginosa* K-81 [ J ]. *J Gen Appl Microbiol*, 1996, 42: 381-391.
- [ 11 ] Smoker J A, Barnum S R. Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria [ J ]. *FEMS Microbiol Letters*, 1988, 56: 119-122.

## Study on self interaction of clock protein KaiB of *Microcystis aeruginosa* by yeast two-hybrid

ZHENG Jir-qian, XU Hong, ZHANG Jun, WANG Jing, ZHU Bir-lin

( The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Oct. 26, 2005

**Key words:** *Microcystis aeruginosa*; circadian clock protein KaiB; yeast two-hybrid; self interaction

**Abstract:** Clock gene *kaiB* of *Microcystis aeruginosa* was amplified and cloned into pGBKT<sub>7</sub> and pGADT<sub>7</sub> respectively. After being verified by sequencing, the two recombinant plasmids pGADT<sub>7</sub>-*kaiB* and pGBT<sub>7</sub>-*kaiB* were transformed into yeast strain AH109 by polyethylene glycol/lithium acetate method and its expression products were assayed whether it can affect the growth of yeast cells and activate the reporter ( $\beta$ -galactosidase) genes. The result shows that KaiB protein was not toxic to AH109 and could not activate the reporter gene. KaiB protein could play self interaction. Yeast two-hybrid GAL4 system could be applied to fish KaiB interacting protein.

( 本文编辑: 张培新 )