

条斑紫菜酵母双杂交文库的构建及 *PyMAPK5* 互作蛋白的筛选*

董道英 孔凡娜 崔正彩 孙 斌

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 为进一步研究条斑紫菜促分裂原活化激酶家族 *PyMAPK5* 的下游互作蛋白, 理解其生物学功能, 本研究通过酵母双杂交的方法进行其相互作用蛋白的筛选。提取不同温度和失水逆境胁迫下的 RNA, 利用 Invitrogen 体系构建条斑紫菜酵母双杂交 cDNA 文库, 其库容为 1.44×10^7 CFU, 重组率为 91.8%。以 pGBKT7-*PyMAPK5* 为诱饵蛋白载体, 利用共转化方法, 从文库中筛选得到 26 个与 *PyMAPK5* 互作的候选蛋白。候选蛋白集中在光系统 II 相关蛋白、捕光蛋白、微管蛋白、ATP 酶、GTP 结合蛋白及假设蛋白等。微管蛋白、捕光蛋白、光系统 II 蛋白一对一验证结果为阳性, 表明在酵母体内存在互作。本研究为阐明条斑紫菜 *PyMAPK5* 与其互作蛋白的关系及解析 *PyMAPK5* 下游作用机制奠定了基础。

关键词 *PyMAPK5*; 条斑紫菜; 酵母双杂交; 互作蛋白; 逆境胁迫

中图分类号 Q943 doi: 10.11693/hyhz20190400070

促分裂原活化激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是真核生物信号转导中重要的组成部分, 能将细胞膜表面受体感知的信号经过一系列级联反应转变为细胞内信号, 在植物生长发育、增殖分化以及应对逆境胁迫中发挥重要作用 (Colcombet *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2013)。MAPK 级联通路由 MAPKKK-MAPKK-MAPK 三种激酶组成 (Bergmann *et al.*, 2004), MAPKKK 构成 MAPK 最大的家族组分 (Chaiwongsar *et al.*, 2006), 其接收膜上的信号后, 通过磷酸化 MAPKK 活化环的 S/T-X3-5-S/T 基序中的两个氨基酸将信号传递到 MAPKK。MAPKK 是双特异性激酶, 在被 MAPKKK 激活后, 进一步通过激活环中 T-X-Y 基序的双磷酸化来激活 MAPK (Lukowitz *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2006)。磷酸化的 MAPK 能激活下游的靶蛋白, 如特定的转录因子、细胞骨架蛋白、蛋白激酶等, 启动各种效应分子共同参与细胞的生理活动 (Zhang *et al.*, 2001; Zwerger *et al.*, 2001)。

MAPK 广泛参与干旱、渗透压、温度等非生物胁迫,

干旱胁迫下水稻 OSMAPK5 激酶活性增加, 对失水胁迫的耐受性增强 (Xiong *et al.*, 2003)。棉花的 *GhMPK2* 基因过表达, 干旱条件下植株水分流失降低 (Agrawal *et al.*, 2002); 黄瓜中 *CsNMAPK* 在高盐和渗透压胁迫下其转录水平上调, 在烟草中过表达后, 盐度和渗透压胁迫下的种子发芽率明显高于野生型 (Xu *et al.*, 2010); 玉米根在 5—25°C 温度升高期间, *ZmMPK5* 转录水平和激酶水平均增加 (Berberich *et al.*, 1999), 响应高温胁迫; 而 4°C 处理玉米幼苗根部, *ZmMPK5*、*ZmMPK6*、*ZmMPK7* 在 2h 内的表达量均升高, 响应低温胁迫 (Wu *et al.*, 2011)。

目前对 MAPK 互作蛋白的研究在拟南芥和水稻等高等植物中较为深入。水稻 OSMAPK1 与 41 种蛋白质存在相互作用 (Singh *et al.*, 2012)。拟南芥 *AtMPK3* 可能的下游靶蛋白有 48 个, *AtMPK6* 可能的下游靶蛋白有 39 个 (Lee *et al.*, 2008), 其中 *AtMPK6* 通过磷酸化转录因子 MYB41 的 Ser 251 位点, 增强植株的耐盐性 (Hoang *et al.*, 2012)。干旱条件下, 拟南芥 *MPK6* 转录

* 国家自然科学基金项目, 31672641 号。董道英, 硕士研究生, E-mail: ddy712707302@163.com

通信作者: 孔凡娜, 副教授, E-mail: fnkong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-04-05, 收修改稿日期: 2019-05-27

和蛋白水平表达上调,并激活细胞核中的转录因子 DCP1,对失水胁迫做出快速反应(Xu *et al.*, 2012)。柑橘 *PtrMAPK* 转录水平在干旱和低温条件下显著上调,并活化抗氧化系统,在烟草中过表达 *PtrMAPK* 基因,编码活性氧清除酶的基因(NtSOD、NtAPX、NtCAT 等)转录水平显著上调,水分胁迫下细胞内活性氧的积累明显降低。早期研究也表明,MAPK 级联可调节玉米和烟草中 ROS 相关基因的表达,应对非生物胁迫(Huang *et al.*, 2011)。

条斑紫菜生活在潮间带地区,随潮汐变化承受着失水、高温、强光、渗透压等环境因子的胁迫,实验室前期进行了 *MAPK* 基因家族分析,鉴定出 15 个 *MAPK* 基因,均含有高等植物 *MAPK* 的 11 个保守结构域,其磷酸化位点除 TEY 和 TDY 两种基序外,还存在 TAY、TQY、TTY、TSH、TAH 和 TQA 这六种新类型的基序。失水胁迫下的研究表明条斑紫菜 *MAPK* 家族中 *PyMAPK5* 在失水胁迫下显著上调表达,但是其作用的下游蛋白仍然不清晰,本研究通过酵母双杂交技术进行 *PyMAPK5* 互作蛋白的筛选,为阐述 *PyMAPK5* 参与的下游途径及其机制奠定基础,同时为研究潮间带海藻逆境胁迫机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) RZ 纯系,由本实验室保存。

1.1.2 菌株和质粒 酵母 Y2H Gold 菌株, BD 空载质粒 pGBKT7, AD 空载质粒 pGADT7, 对照质粒 pGBKT7-53, pGBKT7-Lam, pGADT7-T(以上质粒和菌株均购于宝日生物技术有限公司)。

1.1.3 实验试剂 植物总 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 美国): RNase-free 柱上 DNA 消化酶(OMEGA, 美国): 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司): 质粒小提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司): Clone Miner II cDNA 文库构建试剂盒(Thermo, 美国), FastTrack MAG mRNA 分离试剂盒(Thermo, 美国), 快速凝胶提取和 PCR 纯化组合试剂盒(Thermo, 美国): SD/-Trp 培养基, SD/-Trp/-Leu 培养基, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade x- α -gal, AbA 培养基(Clontech, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 用条斑紫菜 RZ 纯系叶状体作为实验材料,在光照为 35—45 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光

周期为 12L:12D, 10°C 通气培养。挑选叶片长度为 5cm, 生长状态良好的藻体置于 2L 的通气瓶中驯养 3—5 天, 分别进行温度胁迫和失水胁迫处理。温度胁迫设置如下: -8、0、10、16、24°C 培养 4h, 其中 10°C 培养为对照组; 失水胁迫实验条件设置如下: 对照、失水 30%、失水 70%、失水 80%后复水 30min。所有处理均设置 3 组平行, 处理见表 1。

表 1 条斑紫菜的不同处理条件
Tab.1 Different treatment conditions of *P. yezoensis*

样品名称	处理条件
对照组(正常培养)	盐度 33 的消毒海水, 10°C, 4h
失水率 30%	置于密闭培养皿中达到失水 30%的重量, 10°C
失水率 70%	置于密闭培养皿中达到失水 70%的重量, 10°C
失水率 80%后复水 30min	置于密闭培养皿中达到失水 80%的重量, 10°C, 然后放在盐度 33 的消毒海水中 30min
-8°C	盐度 33 消毒海水, -8°C, 4h
0°C	盐度 33 消毒海水, 0°C, 4h
16°C	盐度 33 消毒海水, 16°C, 4h
24°C	盐度 33 消毒海水, 24°C, 4h

1.2.2 RNA 的提取以及 mRNA 分离纯化 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取用于建库所有处理下样品的总 RNA 后进行等量混合, 并进行质检。按照 Oligotex mRNA Midi Kit 说明书进行 mRNA 分离纯化, 并检测质量。

1.2.3 cDNA 文库(Uncut 型)的构建 参照 CloneMiner 说明书进行 cDNA 第一条链及第二条链的合成, 用 T4 连接酶将 cDNA 与三框 attB1 重组接头连接, 以构建含有三种读码框的 cDNA 文库。用分级柱进行 cDNA 的分级分离和收集。

1.2.4 初级文库的构建 参照 Gateway 说明书, 进行 BP 重组反应, 将带有重组接头的 cDNA 片段重组到载体 pDONR222 上, 采用电转化的方法转化到大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 将转化产物 37°C、250rpm 震荡培养 1h, 得到初级文库菌液。取转化后细菌原液 10 μL 稀释 1000 倍后, 取 50 μL 涂布 LB/Amp 固体培养基, 第二天计数进行初级文库滴度鉴定, 随机挑取 96 个克隆进行 PCR 鉴定, 计算重组率, 计算如公式(1)所示。

文库滴度(CFU/mL) = 平板上的克隆数/涂板菌液体积 × 稀释倍数

文库总克隆数 = 文库滴度 × 文库菌液总体积(mL), (1)
重组率(%) = PCR 扩增出片段的克隆数/PCR 的菌落总数 × 100%

1.2.5 次级文库的构建 将初级文库菌液扩大培养并抽提质粒, 稀释后将其与 pGADT7-DEST 进行 LR 重组, 得到重组质粒按照 1.2.4 步骤进行转化, 并进行相同的滴度鉴定以及重组率鉴定。剩余菌液加入 20%甘油保存, 为次级文库菌液。菌液进行质粒抽提得到次级文库质粒, 可直接用于酵母双杂交共转化。

1.2.6 诱饵载体构建 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 BD 质粒载体 pGBKT7 后进行胶回收, 设计引物扩增 *PyMAPK5* 完整 ORF, 并运用同源重组的方法将回收的载体与目的片段进行连接。引物序列如下, 其中斜体部分表示同源臂区段:

pGBKT7-
PyMAPK5 CATGGAGGCCGAATCCATGCAGCCTGCTGCGGCT
F:
R:
GCAGGTCGACGGATCCCCGACGACGCTTCAGTGC

用 In-Fusion 酶将 *PyMAPK5* 片段和上述酶切载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态, 涂布于 LB/Kan 固体培养基上, 过夜培养, 挑取单克隆测序, 将测序结果比对完全一致的菌液提取质粒, -20°C 保存备用。

1.2.7 诱饵蛋白自激活检测和毒性检测 参照 Clontech Yeastmaker TM Yeast Transformation System 2 说明书中小规模转化的方法, 在 YPDA 培养基活化 Y2H Gold 酵母菌株, 严格按照要求制备酵母感受态细胞。按表 2 所示将实验组, 空载对照, 阳性对照和阴性对照进行共转化。转化液溶于 0.9% NaCl, 分别取 100 μ L 涂布于 SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 选择性培养基, 实验组在 SD/-Trp/-Leu 有菌落生长, 而在 SD/-Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 培养基上无菌落生长即无自激活现象。另从培养基上随机挑取实验组和空载质粒组菌落于 SD/-Trp/-Leu 液体培养基 30°C 震荡培养, 分别在不同时间测定其一天内的光密度 (optical density, OD) 值, 若二者生长状况无明显差异, 则说明 pGBKT7-*PyMAPK5* 对酵母细胞无毒。

表 2 酵母双杂交共转化实验预期结果
Tab.2 Expected results of yeast two-hybrid co-transformation

实验组别	预期结果
pGBKT7- <i>PyMAPK5</i> + pGADT7	不变蓝
pGBKT7 + pGADT7(空载)	不变蓝
pGBKT753+pGADT7-T(阳性对照)	变蓝
pGBKT7lam+ pGADT7-T(阴性对照)	不变蓝

1.2.8 文库筛选与阳性克隆鉴定 制备新鲜的感受态细胞, 参照 1.2.7 转化步骤, 按照 pGBKT7-*PyMAPK5*: 文库质粒=2:1 的量进行大规模共转化, 转化液溶于 10mL 0.9% NaCl, 取 10 μ L 稀释 100 倍涂布于 SD/-Trp/-Leu 固体培养基进行滴度鉴定, 剩余菌液每个板 200 μ L 涂于 SD/-Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 选择性培养基, 其中 SD/-Trp/-Leu 培养基为 Trp 和 Leu 氨基酸缺陷, 而两个载体上分别有合成 Trp 和 Leu 的基因, 可用于筛选共转化成功的质粒: 酵母菌株上具有报告基因 AURI-C 和 MEL1, 前者的表达使酵母菌株具有 AbA(抗生素金担子素)抗性, 后者可表达 α 半乳糖苷酶, 水解底物 x- α -gal 呈现蓝色, 只有蛋白互作才能激活报告基因的表达, 在 SD/-Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 选择培养基上生长出蓝色菌落。30°C 培养 5—7 天观察菌落生长至大小约 2—3mm。为进一步降低假阳性, 挑取变蓝的菌落再次转移到 SD/-Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 选择培养基上筛选, 选 8h 内再次变蓝的菌落进行菌落 PCR, 送上海生工测序并将返回序列比对分析。

1.2.9 候选互作蛋白基因 GO (Gene Ontology) 富集分析 将筛选到的互作蛋白的 cDNA 序列从条斑紫菜基因组信息调出, 依据在线网站(www.omicshare.com/tools)进行 GO 富集, 并分析其参与的生物学过程和功能。

1.2.10 候选互作蛋白基因表达谱分析 根据实验室已有的条斑紫菜 RZ 纯系在不同水分胁迫下的表达谱数据 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA235353>), 对候选互作蛋白的表达谱数据(正常培养, 失水 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%, 失水 50% 后复水 30min, 失水 80% 后复水 30min 和失水 80% 后复水 60min)进行分析, 均一化处理后进行热图制作。

1.2.11 候选互作蛋白验证

选取候选蛋白微管蛋白 tubulin、捕光蛋白 light-harvesting protein、光系统 II 蛋白 photosystem II protein 进行质粒提取, 并与 *PyMAPK5* 诱饵质粒共转化酵母细胞进行一对一验证。

2 结果与分析

2.1 条斑紫菜酵母双杂交 cDNA 文库的构建

不同处理条件下条斑紫菜 RNA 提取, 电泳结果如图 1, 条带清晰无弥散, 显示 RNA 提取较完整, 且浓度在 100—300ng/ μ L 之间, A260/280 为 1.9—2.0, A260/A230 为 2.0—2.2 之间: 将 8 个处理条件下的 RNA 进行等量混合, 并进行 mRNA 分离纯化: mRNA 长度主要分布在 0.5—2.0kb 之间, 呈弥散状, 浓度检测为 15ng/ μ L, 总量为 3 μ g, 达到建库要求。

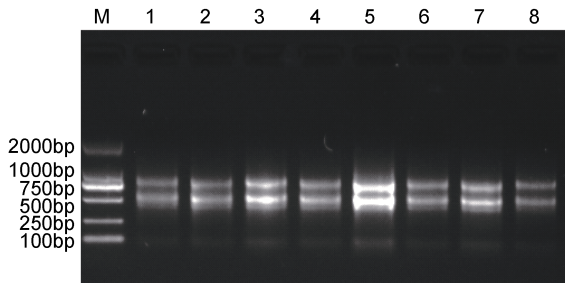


图 1 不同处理条件下条斑紫菜 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 1% agarose gel analysis of RNA under different treatment conditions

注: 1: -8°C: 2: 0°C: 3: 16°C: 4: 24°C: 5: 对照: 6: 失水 30%: 7: 失水 70%: 8: 失水 80%后复水 30min

将 cDNA 与 pDONR222 载体进行 BP 重组后电转化大肠杆菌 DH10B, 37°C 过夜培养即得到初级文库菌液。取细菌原液 10 μ L 稀释 1000 倍, 取 50 μ L 涂于

LB 固体培养基, 第二天计数即得到初级文库库容, 库容鉴定为 2.0×10^7 CFU: 随机选取 96 个克隆进行 PCR 检测, 空载 8 个, 重组率 91.6%, 即为初级文库重组率, 部分电泳结果如下(图 2)。结果表明文库覆盖率较高, 均达到初级文库要求。

将初级文库菌液过夜培养后进行质粒抽提, 与 pGADT7-DEST 载体进行 LR 重组, 电转化大肠杆菌 DH10B, 37°C 过夜培养后取细菌原液 10 μ L 稀释 1000 倍, 取 50 μ L 涂于 LB 固体培养基, 第二天计数即得到次级文库库容, 库容鉴定为 1.44×10^7 CFU。随机选取 96 个克隆进行 PCR 检测, 空载 8 个, 重组率为 91.6%, 部分电泳结果如下(图 3), 库容在 10^7 以上显示较高的库容, 对转录本覆盖率 10^3 以上。满足次级文库要求, 可用于后续文库筛选实验。

2.2 诱饵蛋白 PyMAPK5 自激活检测和毒性检测

将扩增出的 *PyMAPK5* 基因与酶切后的 pGBKT7 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, 并测序比对结果与基因组序列完全一致。

将实验组、空载对照组、阳性对照和阴性对照分别转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 涂于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu /x- α -gal/AbA 选择性培养基 30°C 培养 3—5 天, 结果显示四组均在 SD/-Trp/-Leu 上生长, 只有阳性对照在 SD/-Trp/-Leu /x- α -gal/AbA 上生长(图 4), 说明该诱饵蛋白无自激活活性, 可进行下一步实验。将在 SD/-Trp/-Leu 培养基上培养 3—5 天的实验组和空载对照组随机挑取直径相当的酵母菌落,

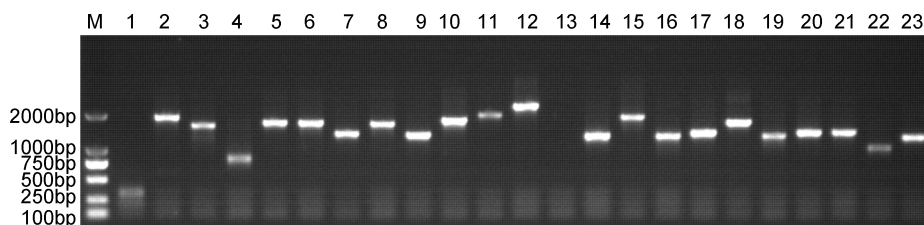


图 2 初级文库中插入片段 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of inserts in the primary library

注: M: DL2000 marker: 1—23: 随机挑取的初级文库菌落

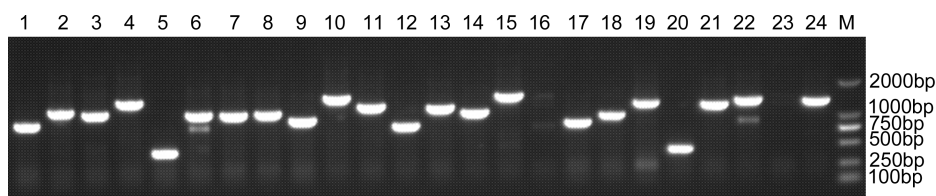
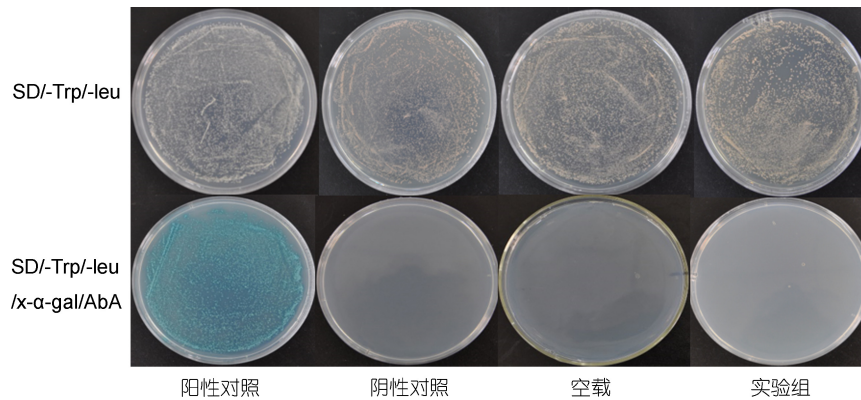


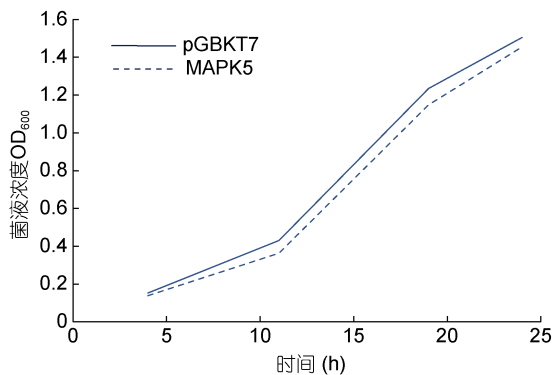
图 3 次级文库中插入片段 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of inserts in the secondary library

注: M: DL2000 marker: 1—24: 随机挑取的次级文库菌落

图4 pGBKT7-*PyMAPK5* 诱饵蛋白自激活检测Fig.4 Self-activation assay of pGBKT7-*PyMAPK5* bait protein

在 SD/-Trp 液体培养基震荡培养 24h, 并记录 OD_{600} , 结果表明二者 OD_{600} 均达到 0.8 以上, 且生长速度并无明显差异(图 5), 表明诱饵蛋白对酵母细胞无毒性。

图5 pGBKT7-*PyMAPK5* 诱饵蛋白毒性检测Fig.5 Toxicity test of pGBKT7-*PyMAPK5* bait protein

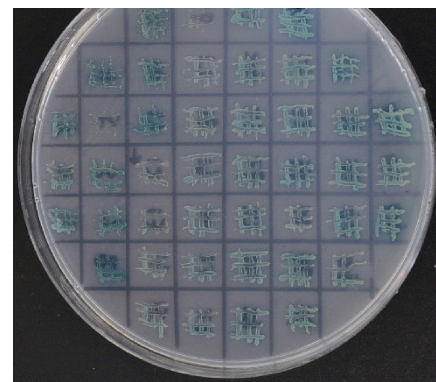
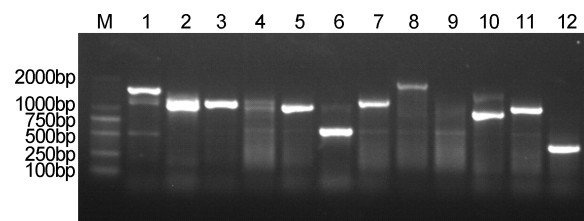
2.3 *PyMAPK5* 互作蛋白的筛选

将 pGBKT7-*PyMAPK5* 质粒和文库质粒共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 稀释 100 倍涂布于 SD/-Trp/-Leu 培养基上, 生长 3—5 天, 统计平板上的菌落数为 209 个, 计算得到转化效率为 1.25×10^4 CFU/ μ g。将筛选得到的阳性克隆再次转移到 SD/- Trp/-Leu/x- α -gal/AbA 选择性培养基上, 得到 37 个阳性克隆, 如图 6: 选取阳性克隆进行 PCR 鉴定, 部分 PCR 结果如图 7, 阳性克隆片段大小主要集中在 500—2000bp, 最终得到测序成功的阳性克隆共 26 个。

2.4 候选蛋白功能注释

将测序比对正确的序列进行比对分析, 26 个候选

蛋白的注释结果如表 3 所示, 其中丙氨酸乙醛酸转氨酶和假设蛋白 Py06157.t1 两个基因重复出现两次。注释到的蛋白质集中在与光合作用的蛋白质, 能量代谢相关的蛋白以及细胞骨架蛋白。值得注意的是 8 条序列为未知蛋白或假设蛋白, 其具体的作用有待进一步挖掘。

图6 *PyMAPK5* 筛选得到的阳性克隆Fig.6 Positive colonies screened by *PyMAPK5*图7 *PyMAPK5* 部分候选互作蛋白酵母菌落 PCR 检测
Fig.7 PCR detection of yeast colonies screened by *PyMAPK5* partial candidate interaction

注: M: DL2000 marker; 1—12: 候选蛋白部分阳性克隆

表 3 *PyMAPK5* 阳性克隆测序结果及分析
Tab.3 The sequence of positive clones of *PyMAPK5* and the analysis

基因号	出现次数	非冗余蛋白序列数据库功能注释
<i>Py06157.t1</i>	2	hypothetical protein
<i>Py05333.t1</i>	2	alanine-glyoxylate aminotransferase
<i>Py04248.t1</i>	1	tubulin beta-4B chain isoform X1
<i>Py06259.t1</i>	1	hypothetical protein SDRG
<i>Py03902.t1</i>	1	photosystem II 12 kDa extrinsic protein
<i>Py02495.t1</i>	1	Ham1 family
<i>Py02924.t1</i>	1	predicted protein
<i>Py11159.t1</i>	1	light-harvesting complex protein
<i>Py06810.t1</i>	1	light-harvesting protein
<i>Py11123.t1</i>	1	GDP-D-mannose
<i>Py04643.t2</i>	1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<i>Py03379.t1</i>	1	integrin alpha-D
<i>Py06158.t1</i>	1	hypothetical protein
<i>Py04108.t1</i>	1	AMP-activated protein kinase
<i>Py10293.t1</i>	1	acid-thiol ligase
<i>Py03784.t1</i>	1	GTP-binding protein
<i>Py10177.t1</i>	1	hypothetical protein SOVF
<i>Py02555.t1</i>	1	hypothetical protein AURANDRAFT
<i>Py03593.t1</i>	1	hypothetical protein BRAFLDRAFT
<i>Py03097.t1</i>	1	hypothetical protein Gasu
<i>Py08028.t1</i>	1	hypothetical protein PLEOSDRAFT
<i>Py05176.t1</i>	1	PhosphomethylPyrimidine synthase
<i>Py09446.t1</i>	1	hypothetical protein EMIHU DRAFT
<i>Py03353.t1</i>	1	vacuolar ATPase subunit DVA41
<i>Py03374.t1</i>	1	Similar to Ubiquitin-60S ribosomal protein
<i>Py00802.t1</i>	1	hypothetical protein M408DRAFT

2.5 候选互作蛋白 GO 富集分析

将 *PyMAPK5* 筛选到的 26 个候选互作蛋白基因进行 GO 富集(图 8), 结果显示其富集在生物学过程、细胞组分和分子功能三方面。生物学过程主要包括核苷三磷酸代谢过程(显著富集的蛋白质有甘油醛 3-磷酸脱氢酶, Ham1 家族), 细胞前体代谢物和 ATP 代谢过程(ATP 酶亚基、AMP 激活的蛋白激酶、光系统 II 蛋白显著富集), 以及核糖体生物发生(如泛素-60S 核糖体蛋白及某些注释的未知蛋白): 细胞组分主要包括细胞内组分(GTP 结合蛋白、GDP-甘露糖、微管蛋白 β 异构体、叶绿体异构体 X3 等)和细胞内膜以及细胞器组分(光捕获蛋白、核糖体蛋白等): 分子功能主

要参与包括有机化合物的结合(显著富集 AMP 激活的蛋白激酶 α 亚基、GTP 结合蛋白、磷酸甲基嘧啶合成酶), 催化活性(假设蛋白 SDRG、丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶)和 GTP 酶活性等功能。表明 *PyMAPK5* 可能广泛作用于不同的生物学过程, 从而调控条斑紫菜应答逆境胁迫。

2.6 候选互作蛋白在不同失水胁迫条件下的表达分析

PyMAPK5 候选互作蛋白不同失水胁迫下的表达量(图 9)分析显示, 可分为 3 种表达模式, 其中 13 个基因对复水响应敏感, 失水条件下表达下降, 复水后表达量显著上升, 包括微管蛋白、光系统 II 蛋白、AMP 蛋白激酶、甘油醛 3-磷酸脱氢酶、GTP 结合蛋白、核糖体蛋白、捕光蛋白复合体以及部分未知蛋白: 8 个基因在条斑紫菜失水早期(10%—30%)表达量显著升高, 随失水程度增加表达量降低, 但在复水后表达量又增加, 包括假设蛋白 Gasu、丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶、ATP 酶、甲基嘧啶合成酶及假设蛋白等: 5 个基因在失水过程中表达量升高, 尤其是在失水 60%—80%之间表达量显著增加, 复水过程表达量降低, 如捕光蛋白、酸-硫醇连接酶、Ham1 家族和未知蛋白等。

2.7 候选互作蛋白共转化验证

将候选蛋白中的微管蛋白 tubulin、捕光蛋白 light-harvesting protein、光系统 II 蛋白的重组质粒与 *PyMAPK5* 诱饵质粒共转化酵母感受态细胞, 转化液依次稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/x- α -gal/AbA 选择性培养基上, 如图 10。结果表明三个候选蛋白与 *PyMAPK5* 的互作均呈现阳性, 表明本研究筛选结果具有较高的阳性率。

3 讨论

MAPK 级联反应在植物中发挥重要的作用, 而对 MAPK 底物的研究已经成为如今研究的热点之一(Zhang *et al*, 2018)。本研究通过对 *PyMAPK5* 互作蛋白的研究, 有助于认识 MAPK 磷酸化蛋白的特点, 并找到其信号传导的最终作用对象, 进一步解析 MAPK 参与条斑紫菜失水胁迫的生物学过程。为此, 本研究采用 Invitrogen 体系首次构建了高质量的条斑紫菜酵母双杂交 cDNA 文库(库容 1.44×10^7 CFU), 与水稻酵母双杂交 cDNA 文库库容(2.9×10^6)、大豆(1.7×10^6)、玉米(2.56×10^7)相比(Singh *et al*, 2012; 崔晓艳等, 2013; 雷海英等, 2018), 本研究酵母双杂交文库覆盖度较高, 为条斑紫菜相关基因互作蛋白的筛选奠定了基础。

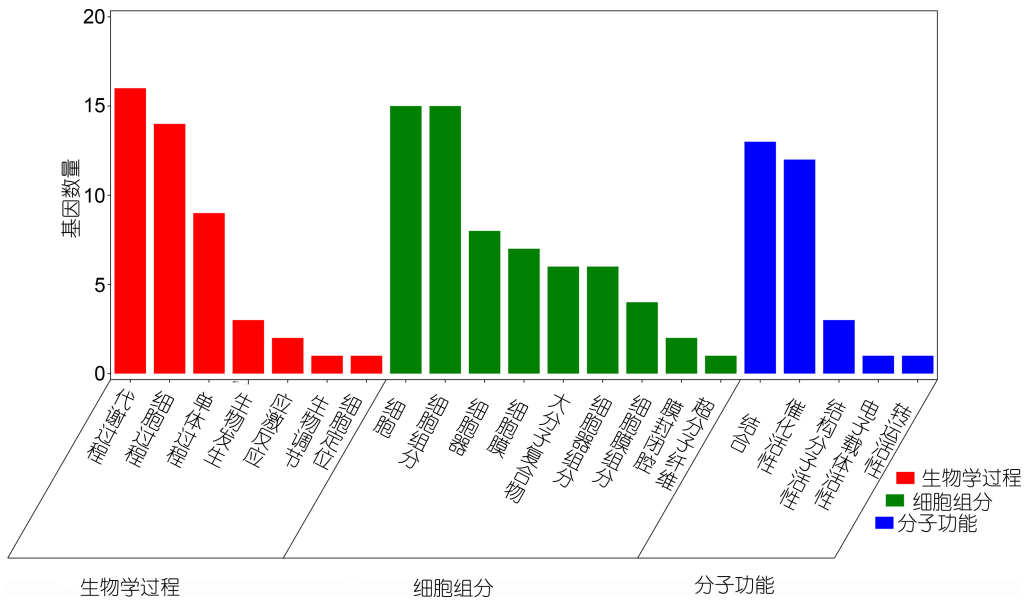


图 8 *PyMAPK5* 候选互作蛋白 GO 注释

Fig.8 Gene ontology annotation of *PyMAPK5* candidate interaction protein

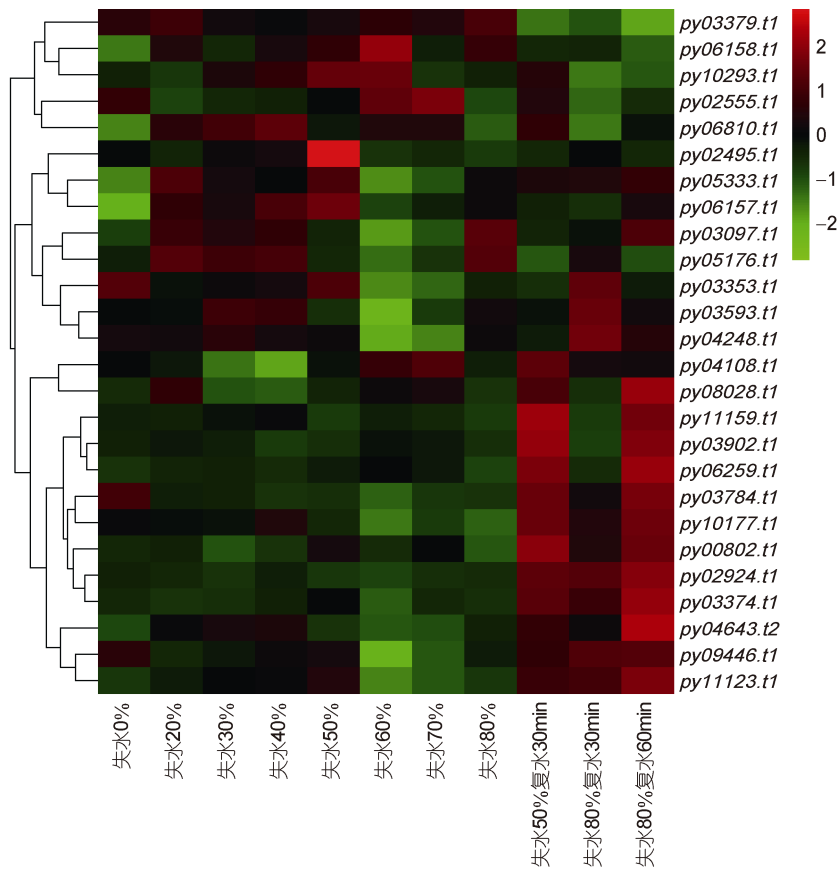


图 9 *PyMAPK5* 互作蛋白基因失水胁迫下表达谱分析

Fig.9 The expression profile of *PyMAPK5* interaction protein gene under water stress

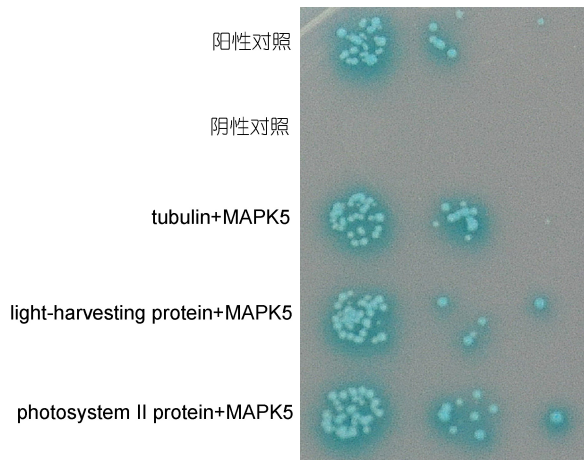


图 10 *PyMAPK5* 候选互作蛋白 SD/-Trp/-Leu /-His/-Ade/x- α -gal/AbA 培养基一对一验证

Fig.10 One-to-one verification of *PyMAPK2* candidate interaction protein on the SD/-Trp/-Leu /-His/-Ade/x- α -gal/AbA

本研究筛选到 26 个与 *PyMAPK5* 相互作用的候选蛋白, 包括参与光合作用的相关蛋白、微管蛋白、GTP 结合蛋白、AMP 蛋白激酶、核糖体蛋白、假设蛋白等, 并一对一验证了微管蛋白、捕光蛋白、光系统 II 蛋白与 *PyMAPK5* 的互作。其中候选互作蛋白 β -tubulin 属于微管蛋白, 微管和微丝共同组成植物细胞的骨架系统, 微管骨架重组可调控细胞形状改变、细胞分裂和响应不同刺激的信号传导等过程 (Volkman *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2007)。植物微管蛋白可以通过在 MAPK 蛋白激酶的磷酸化作用下, 对细胞周期进行调节 (Blume *et al.*, 2008)。烟草研究中, MAPK/NTF6 被激活后, 可以磷酸化微管结合蛋白 NTMAP65-1 中 579 位的苏氨酸残基, 调节有丝分裂 M 期及后期纺锤体的行为 (Sasabe *et al.*, 2006); 拟南芥的 AtMAPK4 参与微管蛋白磷酸化调节, 在细胞减数分裂中起作用 (Zeng *et al.*, 2011; Hoehenwarter *et al.*, 2013)。苜蓿丝裂原活化蛋白激酶 SIMK, 其活性变化调节微管蛋白细胞骨架变化, 对细胞极性生长起直接作用 (Sangwan *et al.*, 2002)。本研究发现 tubulin 可能与 *PyMAPK5* 互作, 推测逆境胁迫可能激发 *PyMAPK5* 对微管蛋白的磷酸化, 进一步改变了细胞骨架的结构从而适应非生物胁迫, 但是二者具体的作用过程仍需进一步验证。

逆境胁迫往往导致植物光合作用活性氧大量积累, 叶绿体中活性氧积累可导致类囊体膜降解 (Lee *et al.*, 2009)。烟草的 MAPK 激活后, 植物在黑暗中不会

积累 H_2O_2 , 细胞死亡延迟 (Liu *et al.*, 2007); 拟南芥 *MPK4* 敲除后, 叶绿体中活性氧代谢失衡, 类囊体系统重排, PSII 被损伤 (Gawroński *et al.*, 2014)。此外, 拟南芥 MEKK1 和 MPK4 级联通路参与活性氧稳态的调节, MPK4 的激活导致编码质体或叶绿体蛋白的相关基因下调表达, 抑制光合作用 (Pitzschke *et al.*, 2009)。以上研究均表明 MAPK 的活化有助于降低植物细胞内活性氧水平, 减少逆境胁迫下活性氧带来的光损伤, 从而增强植物的适应性。本研究发现捕光蛋白和光系统 II 蛋白可能作为 *PyMAPK5* 的互作蛋白, 推测其可能被条斑紫菜 *PyMAPK5* 激活, 引发相应表达量的改变, 共同参与逆境胁迫下光合作用的调节, 维持 ROS 稳定, 以响应失水等逆境胁迫, 具体的调节过程也需进一步研究。

近年来酵母双杂交技术广泛应用于互作蛋白筛选, 但是对于条斑紫菜互作蛋白的筛选是首次应用, 本研究筛选到了 *PyMAPK5* 的候选蛋白, 后续实验会进一步进行体外 BIFC 或 Co-IP 等方法的验证, 并进一步研究条斑紫菜 *PyMAPK5* 的生物学通路和调控机制。藻类中未见关于 MAPK 与本研究筛选到的互作蛋白的相关报道, 故本研究也为藻类中 MAPK 互作蛋白的研究提供一定的参考。

4 结论

本研究首次构建了条斑紫菜酵母双杂交 cDNA 文库, 以 *PyMAPK5* 为诱饵蛋白进行了互作蛋白的筛选, 得到 26 个候选互作蛋白, 并通过 GO 富集初步解析了候选蛋白的功能, 热图分析了失水胁迫下候选蛋白的表达量差异, 一对一验证证明微管蛋白、捕光蛋白、光系统 II 蛋白与 *PyMAPK5* 互作均为阳性结果, 本研究为进一步解析条斑紫菜 *PyMAPK5* 的分子调控机制奠定了基础。

参 考 文 献

- 崔晓艳, 陈 新, 栾鹤翔等, 2013. 大豆花叶病毒诱导的应用于膜蛋白酵母双杂交的大豆 cDNA 文库构建. 植物病理学报, 43(5): 556—560
- 雷海英, 白凤麟, 段永红等, 2018. 玉米酵母双杂交 cDNA 文库的构建及 ZmCEN 互作蛋白的筛选. 西北植物学报, 38(4): 598—606
- Agrawal G K, Rakwal R, Iwahashi H, 2002. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294(5): 1009—1016

- Berberich T, Sano H, Kusano T, 1999. Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(3): 534—542
- Bergmann D C, Lukowitz W, Somerville C R, 2004. Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304(5676): 1494—1497
- Blume Y B, Lloyd C W, Yemets A I, 2008. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In: Blume Y B, Baird W V, Yemets A I *et al* eds. *The Plant Cytoskeleton: A Key Tool for Agro-Biotechnology*. Dordrecht: Springer, 145—159
- Chaiwongsar S, Otegui M S, Jester P J *et al*, 2006. The protein kinase genes *MAP3K ε 1* and *MAP3K ε 2* are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 48(2): 193—205
- Colcombet J, Hirt H, 2008. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413(2): 217—226
- Gawroński P, Witoń D, Vashutina K *et al*, 2014. Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 7(7): 1151—1166
- Hoang M H T, Nguyen X C, Lee K *et al*, 2012. Phosphorylation by AtMPK6 is required for the biological function of AtMYB41 in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(1): 181—186
- Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E *et al*, 2013. Identification of novel *in vivo* MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(2): 369—380
- Huang X S, Luo T, Fu X Z *et al*, 2011. Cloning and molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from *Poncirus trifoliata* whose ectopic expression confers dehydration/drought tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 5191—5206
- Ichimura K, Casais C, Peck S C *et al*, 2006. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48): 36969—36976
- Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M *et al*, 2007. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*, 26(7): 945—957
- Lee J S, Huh K W, Bhargava A *et al*, 2008. Comprehensive analysis of protein-protein interactions between *Arabidopsis* MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling & Behavior*, 3(12): 1037—1041
- Lee R H, Hsu J H, Huang H J *et al*, 2009. Alkaline α -galactosidase degrades thylakoid membranes in the chloroplast during leaf senescence in rice. *New Phytologist*, 184(3): 596—606
- Liu Y D, Ren D T, Pike S *et al*, 2007. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 51(6): 941—954
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D *et al*, 2004. A MAPKK Kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*, 116(1): 109—119
- Meng X Z, Zhang S Q, 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 245—266
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F *et al*, 2009. A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular Plant*, 2(1): 120—137
- Sangwan V, Örvar B L, Beyerly J *et al*, 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*, 31(5): 629—638
- Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y *et al*, 2006. Phosphorylation of NtMAP65—1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes & Development*, 20(8): 1004—1014
- Singh R, Lee M O, Lee J E *et al*, 2012. Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system. *Plant Physiology*, 160(1): 477—487
- Volkman D, Baluška F, 1999. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. *Microscopy Research & Technique*, 47(2): 135—154
- Wu T, Kong X P, Zong X J *et al*, 2011. Expression analysis of five maize MAP kinase genes in response to various abiotic stresses and signal molecules. *Molecular Biology Reports*, 38(6): 3967—3975
- Xiong L Z, Yang Y N, 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell*, 15(3): 745—759
- Xu H N, Li K Z, Yang F J *et al*, 2010. Overexpression of *CsNMAPK* in tobacco enhanced seed germination under salt and osmotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 37(7): 3157—3163
- Xu J, Chua N H, 2012. Dehydration stress activates *Arabidopsis* MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 31(8): 1975—1984
- Zeng Q N, Chen J G, Ellis B E, 2011. AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 67(5): 895—906
- Zhang M M, Su J B, Zhang Y *et al*, 2018. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 45: 1—10
- Zhang S Q, Klessig D F, 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6(11): 520—527
- Zwerger K, Hirt H, 2001. Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biological Chemistry*, 382(8): 1123—1131

CONSTRUCTION OF A TWO-HYBRID LIBRARY OF *PYROPIA YEZOENSIS* AND SCREENING OF *PYMAPK5* INTERACTION PROTEIN

DONG Dao-Ying, KONG Fan-Na, CUI Zheng-Cai, SUN Bin

(The Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract To understand the downstream interacting proteins of mitogen-activated kinase family PyMAPK5 and its biological functions in *Pyropia yezoensis*, we screened the interacting proteins of PyMAPK5 by yeast two-hybrid. Total RNA of *P. yezoensis* under a different temperature and water stress was used to construct the yeast cDNA library with the Invitrogen system. The resulted storage capacity was 1.44×10^7 CFU, and the recombination rate was 91.8%. In addition, we screened the total 26 candidate proteins interacting with *PyMAPK5* by co-transformation method. The candidate proteins were focused on photosystem II related proteins, light-harvesting proteins, tubulin, ATPase, GTP-binding proteins, and hypothetical proteins. At last, we one-to-one verified the reliabilities of three candidate proteins (including tubulin, light-harvesting protein, and photosystem II protein). This study may help clarify the relationship between PyMAPK5 and its interaction proteins and lay a foundation for the analysis of downstream mechanism of PyMAPK5.

Key words *PyMAPK5*; *Pyropia yezoensis*; yeast two-hybrid; interacting proteins; adversity stress