

网络出版时间:2013-06-20 16:22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130620.1622.036.html>

双分子荧光互补技术(BiFC)分析玉米 SS I 与 PPDK1 之间的蛋白互作

崔喜艳^{1,2}, 张继晓¹, 窦瑶³, 孙小杰¹, 尹悦佳², 刘相国²

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130124;

3 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130012)

【摘要】【目的】分析玉米胚乳可溶性淀粉合成酶(SS I)与质体型糖酵解途径关键催化酶丙酮酸磷酸双激酶(PPDK1)的蛋白互作关系,揭示可能发生互作的亚细胞位置。【方法】采用酶切连接的方法构建 326-CYCHA-ss1 和 326-CYNEE-ppdk1 双分子荧光互补表达载体,转化农杆菌 EHA105,瞬时浸染烟草叶片组织,激光共聚焦显微镜下观察 SS I 和 PPDK1 相互作用产生的荧光信号。【结果】双酶切试验鉴定表明,326-CYCHA-ss1 和 326-CYNEE-ppdk1 重组载体构建正确;PCR 结果证实,植物表达载体成功转化到农杆菌 EHA105 中;双分子荧光互补试验中,可观测到 SS I 和 PPDK1 相互结合而产生的黄色荧光信号。【结论】证实 SS I 和 PPDK1 能够在植物活体细胞内发生真实的蛋白互作。

【关键词】 SS I; PPDK1; 双分子荧光互补技术(BiFC); 瞬时转化; 蛋白质互作

【中图分类号】 Q753

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)07-0049-05

Interactions between SS I and PPDK1 of maize using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay

CUI Xi-yan^{1,2}, ZHANG Ji-xiao¹, DOU Yao³, SUN Xiao-jie¹,
YIN Yue-jia², LUI Xiang-guo²

(1 School of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Institute of Agricultural Biotechnology in Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124, China;

3 School of Life Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China)

Abstract: 【Objective】Protein interactions between soluble starch synthase (SS I) and acetone phosphate double kinase (PPDK1) of the glycolytic pathway in maize endosperm were analyzed to reveal the location of interactional subcellular. 【Method】Enzyme digestion and ligation method was used to construct the expression vector of 326-CYCHA-ss1 and 326-CYNEE-ppdk1 and the constructed expression vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, which was used to dip tobacco leaf tissue momentarily. At last the interactions of SS I and PPDK1 were observed using confocal laser scanning microscope. 【Result】Results showed that 326-CYCHA-ss1 and 326-CYNEE-ppdk1 vectors were constructed and expressed successfully. Yellow fluorescent BiFC signals expressed strongly *in vivo*. 【Conclusion】Real interactions between SS I and PPDK1 were observed in living cells.

Key words: SS I; PPDK1; bimolecular fluorescence complementation; transient transformation; protein

* [收稿日期] 2013-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31170731, 31200611); 上海市科学技术委员会资助项目(10DZ2271800); 吉林省博士后科研项目[吉人社办字(2009)第 100 号]

[作者简介] 崔喜艳(1971—), 女(达斡尔族), 吉林长春人, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

E-mail: cuixiyan2005@163.com

[通信作者] 刘相国(1983—), 男, 吉林长春人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物功能基因组学研究。E-mail: lxgyjy@foxmail.com

and protein interaction

淀粉是玉米籽粒贮藏的主要物质,玉米淀粉的生物合成是一个复杂的代谢过程,主要发生在胚乳造粉质体内,其合成的数量多少直接影响玉米的产量^[1]。淀粉合成过程是蔗糖合成酶首先分解蔗糖为果糖和 UDP-葡萄糖,进而形成 1-磷酸葡萄糖(G-1-P)^[2]。G-1-P 进入造粉质体后,在 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的作用下形成淀粉合成重要前体物质 ADP-葡萄糖,进一步在淀粉合成酶(starch synthase, SS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)和淀粉去分支酶(debranching enzyme, DBE)协同作用下合成直链和支链淀粉;直链和支链淀粉在合成的同时也不断地降解,通过糖酵解途径,参与其他的碳代谢循环^[3]。

最近的研究表明,玉米淀粉并非单一酶催化的反应,而是通过蛋白质相互作用以复合物的形式参与到淀粉代谢中。2008 年 Hennen-Bierwagen 等^[4]利用酵母双杂交技术,对 2 种可溶性淀粉合成酶 SSs(SS I 和 SS III)和 3 种淀粉分支酶 SBEs(SBE I、SBE II a 和 SBE II b)进行了一对一的蛋白互作检测,结果发现 SS I 能够与其他淀粉代谢关键酶发生蛋白质相互作用。体外活性试验表明 SS I 为 74 ku^[5],而凝胶渗透色谱(GPC)结合免疫抗体印迹试验却发现 SS I 在 150~670 ku 内均能被检测到,并且免疫信号非常稳定,该研究预示玉米胚乳中 SS I 很可能与其他未知蛋白相结合形成多种多样的蛋白质复合物,发挥一定的功能。2009 年 Hennen-Bierwagen 等^[6]利用免疫共沉淀结合质谱鉴定技术研究玉米多酶复合物关系时发现,丙酮酸磷酸双激酶(Pyruvate, phosphate dikinase, PPDK)与 SS III、ADPG 的大小亚基等共同形成 670 ku 的多酶复合物,推测 PPDK 可能通过蛋白质互作的方式调控玉米淀粉和氨基酸代谢。

玉米可溶性淀粉合成酶(zea mays starch synthase, zSS)作为淀粉合成代谢的关键酶之一,主要存在于质体基质内,主要作用是支链淀粉的合成和延伸支链淀粉的分支链。可溶性淀粉合成酶主要包括 SS I、SS II a、SS II b、SS III 几种亚型^[7]。其中玉米中超过 85% 的 SS I 与淀粉粒密切联系,ss1 基因全长为 2 907 bp,包含一个开放阅读框(596~2 472 bp),编码 622 个氨基酸残基的多肽链,蛋白分子量约为 64 ku。SS I 最适 pH 值为 7.5~9.0,最适温度为 37 ℃,在没有底物的情况下仍存在活性^[8],研

究表明 SS I 的转录在玉米授粉后 15 d 的胚乳中能够被检测到,且在叶、根中都没有发现,其主要参与糖基在 15 以内短链的合成,负责合成支链淀粉^[9-10]。ss2a 基因全长为 3 124 bp,含有一个 2 199 bp 的开放阅读框(670~2 868 bp),编码 732 个氨基酸的多肽,蛋白分子量约为 80 ku,主要在胚乳中表达,但是活性较低;ss2b 基因全长 2 480 bp,包含 2 097 bp 的开放阅读框(58~2 154 bp),编码 698 个氨基酸的多肽,主要存在于玉米叶片中^[11]。SS II a 和 SS II b 在没有柠檬酸存在时,对温度不敏感,分别在 45 ℃ 和 40 ℃ 表现出较低的最适温度,较高温度时柠檬酸在一定程度上能稳定 SS II a 和 SS II b 的活性^[12]。SS III 含有 1 674 个氨基酸残基,主要存在于胚乳中,酶活性较低^[13]。柠檬酸能够提高 SS III 对 ADPG 的亲和力,但直链淀粉既可以作为 SS III 的底物,同时亦会抑制 SS III 的活性^[14]。

丙酮酸磷酸双激酶 PPDK 催化 ATP、丙酮酸(pyruvate)和 Pi 经三步反应生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP),PEP 是 CO₂ 的受体,因此 PPDK 对光合功能具有重要调节作用。PPDK 的表达主要在转录水平上,酶的活性受光照调节,在光照下被蛋白磷酸盐调控。ppdk 基因在叶片中参与玉米等 C4 植物光合作用,直接影响光合速率;在种子中参与糖酵解反应,调控氨基酸和淀粉的生物合成^[15]。玉米 ppdk 基因家族含有 2 个成员(ppdk1 和 ppdk2),2 个成员在根、叶片和种子中存在独立的表达系统。ppdk1 基因全长为 3 171 bp,阅读框长度为 2 844 bp,起始密码子开始于第 114 位的 ATG,终止于第 2 957 位的 TGA,编码 948 个氨基酸残基^[16];ppdk2 基因 cDNA 编码 884 个氨基酸残基,存在于细胞质中^[17]。

基于 SS I 为淀粉合成酶中参与支链淀粉合成的主要酶,PPDK1 在糖酵解途径中发挥重要作用,在种子中也参与淀粉的合成,根据吉林省农业科学院农业生物技术研究实验室,前期采用酵母双杂交验证 SS I 和 PPDK1 发生相互作用的试验结果(数据未发表),本研究利用双分子荧光互补技术(BiFC)^[18],从单个完整细胞可视化的角度,探讨 SS I 和 PPDK1 在植物体内是否存在互作关系,为深入了解玉米中支链淀粉的合成,解析复杂的淀粉调控网络提供新的理论依据和基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

大叶烟草种子,由吉林省农业科学院农业生物技术研究所保存。

pGADT7-ss1 质粒、pGBKT7-ppdk1 质粒,均由吉林省农业科学院农业生物技术研究所保存;荧光互补表达载体:阳性质粒 326-CYNEE-CYCH、326-CYCHA-CDKD,阴性质粒即空载体 326-CYNEE、326-CYCHA,均由中国科学院植保所馈赠;大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、农杆菌菌株 EHA105,均由吉林省农业科学院农业生物技术研究所保存。

PCR 所用扩增酶、Prime STAR,均购于 TAK-ALA 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,均购自 Fermentas 公司。质粒提取试剂盒及凝胶回收试剂盒,均购于上海生工公司。酵母提取物、蛋白胨购自 OXIXD 公司;琼脂粉购自 BD 公司;氯化镁、酚:氯仿:异戊醇试剂、乙酰丁香酮、2-吗啉乙磺酸等,均购自上海生工公司。

1.2 方法

1.2.1 玉米 ss1 和 ppdk1 基因的 PCR 扩增 以 pGADT7-ss1 和 pGBKT7-ppdk1 质粒为模板,采用带酶切位点的引物进行 PCR 扩增。ss1 基因上游引物 F1:5' GCTCTAGAATGGCGACGCCCTCGG-3',在 5'端引入 *Xba* I 酶切位点;下游引物 R1:5' CGGGATCCTCATGACATAGGGTTCGATCGATGAA 3',在 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点。ppdk1 基因上游引物 F2:5' CCGCTCGAGATGGCGGCATCGGTTTCC 3',在 5'端引入 *Xho* I 酶切位点;下游引物 R2:5' CGGGATCCTGACAAGCACCTGAGCTGCAGCTA 3',在 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点。

PCR 扩增条件:预变性 98 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果。

1.2.2 双分子荧光互补表达载体的构建及鉴定 ss1 基因 PCR 产物经凝胶回收后与 326-CYCHA 载体分别进行(*Xba* I/*Bam*H I)双酶切。ppdk1 基因 PCR 产物经凝胶回收后与 326-CYNEE 载体分别进行(*Xho* I/*Bam*H I)双酶切。将酶切后的目的基因与载体经 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 过夜连接,并转化 *E. coli* DH5 α 。挑取阳性克隆摇菌后提取质粒,分别进行 PCR 和酶切双重鉴定,鉴定成功的克隆送上海生工测序。

1.2.3 SS I 和 PPK1 分子相互结合的 BiFC 分析

将测序成功的重组质粒转化农杆菌 EHA105,同时以转化阳性和阴性质粒为对照,28 $^{\circ}$ C 过夜摇菌,提取质粒后 PCR 验证阳性克隆。将转化农杆菌后的阳性克隆 28 $^{\circ}$ C 摇菌,3 000 g 离心 5 min,用稀释液稀释 OD₆₀₀至 1.0 左右,使含有待检测重组质粒的 2 种菌液浓度达到一致。同时,以稀释的阳性和阴性菌液为对照。用 1 个 1 mL 无针头的注射器注射烟草叶片,48 h 后取注射烟草叶片组织,铺于载玻片上,于 515 nm 黄光激发光、100 $\times$ 物镜下,使用激光共聚焦显微镜观察烟草细胞中荧光(黄色)信号。

2 结果与分析

2.1 玉米 ss1 和 ppdk1 基因的 PCR 扩增结果

以 pGADT7-ss1 和 pGBKT7-ppdk1 质粒为模板,以 F1/R1、F2/R2 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果与预期大小一致:ss1 为 1 920 bp,ppdk1 为 2 841 bp(图 1)

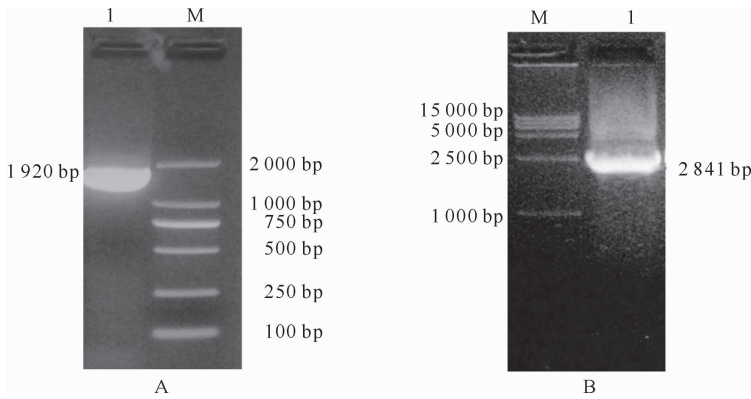


图 1 玉米 ss1 基因和 ppdk1 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果
A:1. ss1(1 920 bp);M. DNA 2 000 bp Marker;B:1. ppdk1(2 841 bp);M. DNA 15 000 bp Marker
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis for PCR products of ss1 and ppdk1 genes

2.2 双分子荧光互补表达载体的鉴定

ss1 和 *ppdk1* 基因 PCR 扩增的片段经 *Xba* I / *Bam*H I、*Xho* I / *Bam*H I 双酶切后,分别连接到同样经 *Xba* I / *Bam*H I、*Xho* I / *Bam*H I 双酶切的荧光载体 326-CYCHA 和 326-CYNEE 上,转化大肠

杆菌后挑选阳性克隆,采用试剂盒法提取质粒,经双酶切鉴定后,*ss1* 条带约为 1 920 bp,*ppdk1* 条带约为 2 841 bp,同预期结果一致(图 2)。测序结果与 GenBank 报道的序列一致,表明 326-CYCHA-*ss1* 和 326-CYNEE-*ppdk1* 表达载体构建成功。

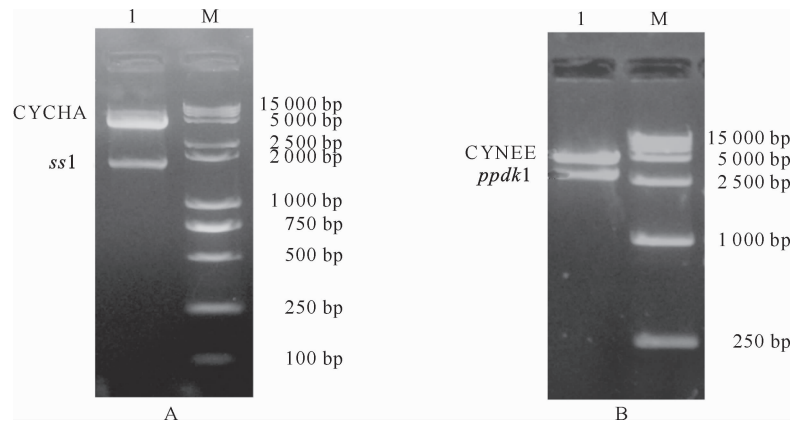


图 2 重组质粒 326-CYCHA-*ss1*(A)和 326-CYNEE-*ppdk1*(B)的双酶切结果
A:1. 重组质粒 326-CYCHA-*ss1* 限制性酶切结果(*Xba* I / *Bam*H I);M. DNA 15 000 bp and DNA 2 000 bp Marker;
B:1. 重组质粒 326-CYNEE-*ppdk1* 限制性酶切结果(*Xho* I / *Bam*H I);M. DNA 15 000 bp Marker
Fig. 2 Identification of recombinant 326-CYCHA-*ss1* (A) and 326-CYNEE-*ppdk1* (B) by enzyme digestion
A:1. Restriction endonuclease analysis of 326-CYCHA-*ss1* vector (*Xba* I / *Bam*H I);M. DNA 15 000 bp and 2 000 bp Marker;
B:1. Restriction endonuclease analysis of 326-CYNEE-*ppdk1* vector (*Xho* I / *Bam*H I);M. DNA 15 000 bp Marker

2.3 SS I 和 PPDK1 分子相互结合的 BiFC 分析

将构建好的 326-CYCHA-*ss1* 重组载体和 326-CYNEE-*ppdk1* 重组载体,共同瞬时转化烟草叶肉细胞 48 h 后,515 nm 黄光激发光,100×物镜下激光共聚焦显微镜下观察荧光(黄色)信号,同时设置 326-CYNEE-CYCH、326-CYCHA-CDKD 为阳性对照,空载体 326-CYNEE、326-CYCHA 为阴性对照。结果表明,在激光共聚焦显微镜下,SS I 和 PPDK1 蛋白互作结果与阳性对照组一致,检测到较为明显的黄色荧光信号(图 3)。

3 讨 论

BiFC 技术是一种直观、快速地判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术^[18]。该技术是将荧光蛋白分子在特定的位点切开分为 N 端和 C 端,然后分别与目标蛋白融合表达,如果荧光蛋白活性恢复,则表明目标蛋白之间发生相互作用。2004 年 Walter 等^[19]将 BiFC 技术运用到植物细胞中,用农杆菌悬液处理烟草叶表皮细胞,共表达 bZ-IP63YN 与 bZIP63YC,发现荧光基团恢复。Grinberg 等^[20]利用该技术进一步研究转录因子 Myc、Max、Mad 3 个蛋白质家族蛋白质间在活细胞中的相互作用,结果表明,Max 家族蛋白能与 Myc 和

Mad 家族的所有成员结合。Boruc 等^[21]利用 BiFC 技术研究了拟南芥细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶复合物,分析了 58 个核心细胞周期蛋白,得到了 357 种蛋白互作关系。

本试验成功构建了荧光表达载体,并且应用空 BiFC 载体和阳性质粒为对照,转染 48 h 后通过激光共聚焦显微镜观察,326-CYCHA-*ss1* 和 326-CYNEE-*ppdk1* 共转染组和阳性对照组检测到黄色荧光信号,充分说明两者在细胞内相互结合。本研究建立了烟草瞬时浸染试验体系,应用 BiFC 技术成功解析,在玉米中 SS I 和 PPDK1 之间存在蛋白互作。PPDK1 主要催化 ATP、丙酮酸和 Pi 经 3 步反应生成 PEP,并参与碳代谢流由淀粉生成到氨基酸合成的转换^[15-16],而 SS I 参与支链淀粉合成中分支链的延伸^[11]。这 2 对蛋白的互作,会形成封闭的代谢元,使得代谢底物在空间上接近,有效地加速碳代谢流。PPDK1-SS I 多酶复合物的形成,可能在玉米调控支链淀粉积累和氨基酸合成代谢转换中发挥重要作用。以上猜测仍需进一步的试验数据支持。玉米 SS I-PPDK1 蛋白复合物的形成,可为深入解析复杂的淀粉调控网络提供新的理论依据和基础数据。多酶复合物功能的进一步解析,对于利用生物技术改良作物淀粉代谢途径具有重要意义。

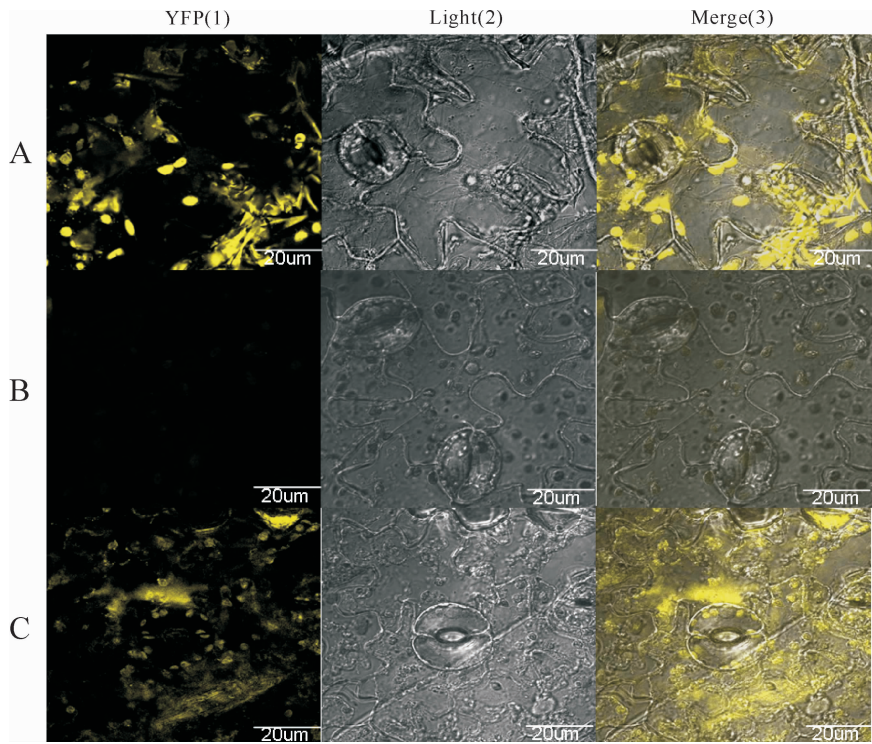


图 3 烟草叶肉细胞中的荧光共聚焦检测结果

A. 瞬时转化 326-CYNEE-CYCH 和 326-CYCHA-CDKD(阳性对照)的烟草叶肉细胞:(1). YFP 激发光下所发荧光;(2). 明视场;(3). (1)和(2)的叠加;bar=20 μm。B. 瞬时转化 326-CYCHA 和 326-CYNEE(阴性对照)的烟草叶肉细胞:(1). 无荧光现象;(2). 明视场;(3). (1)和(2)的叠加;bar=20 μm。C. 瞬时转化 326-CYCHA-ss1 和 326-CYNEE-ppdk1 的烟草叶肉细胞:(1). SSI 和 PPK1 互作蛋白所发荧光;(2). 明视场;(3). (1)和(2)的叠加;bar=20 μm

Fig. 3 Identification of the mesophyll cells in tobacco by bimolecular fluorescence complementation technology

A. Momentary dip 326-CYNEE-CYCH and 326-CYCHA-CDKD (positive control) in nicotiana mesophyll cells:(1). YFP excitation light fluorescing;(2). Light;(3)Merge;bar=20 μm。B. Momentary dip 326-CYCHA and 326-CYNEE (negative control) in nicotiana mesophyll cells:(1). YFP excitation light fluorescing;(2). Light;(3)Merge;bar=20 μm。C. Momentary dip 326-CYCHA-ss1 and 326-CYNEE-ppdk1 in nicotiana mesophyll cells:(1). YFP excitation light fluorescing;(2). Light;(3)Merge;bar=20 μm

[参考文献]

[1] 谷岩,胡文河,王思远,等. 不同株型玉米籽粒胚乳细胞与淀粉合成关键酶活性分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(8):96-101.
Gu Y, Hu W H, Wang S Y, et al. Relationship between endosperm cell and activities of key enzymes for starch in maize with different pant types [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2011, 39(8): 96-101. (in Chinese)

[2] Fernie A R, Willmitzer L, Trethewey R N. Sucrose to starch: A transition in molecular plant physiology [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(1): 35-41.

[3] Nelson O, Pan D. Starch synthesis in maize endosperms [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1995, 46: 475-496.

[4] Hennen-Bierwagen T A, Liu F, Marsh R S, et al. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes [J]. Plant Physiology, 2008, 146: 1892-1908.

[5] Cao H, Imparl-Radosevich J, Guan H, et al. Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm [J]. Plant Physiology, 1999, 120: 205-215.

[6] Hennen-Bierwagen T A, Lin Q, Liu F, et al. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes; A model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts [J]. Plant Physiology, 2009, 149: 1541-1559.

[7] Kossmann J, Abel W, Wringer F. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato that is predominantly expressed in leaf tissue [J]. Planta, 1999, 208: 503-511.

[8] Knight E, Ham C, Hylton C M, et al. Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in Escherichia coli [J]. The Plant Journal, 1998, 14: 613-622.

(下转第 59 页)