

月季 RhNAC31 互作蛋白的筛选及分析

丁爱琴^{1,2}, 韩坤桀¹, 杨立晨¹, 张竹君¹, 耿子雯¹, 付鲁峰¹, 刘庆华^{1,*},
姜新强^{1,*}

(¹青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛 266109; ²北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要: 为了进一步研究 RhNAC31 在胁迫响应中的作用机制, 以 RhNAC31 蛋白为诱饵, 利用酵母双杂交系统在切花月季‘萨曼莎’失水胁迫 cDNA 文库中进行了互作蛋白的筛选和分析。根据 RhNAC31 的转录激活区域 (C 端, 157~286 aa) 的序列特征, 将其划分为 C1 (157~250 aa, RhNAC31-C1) 和 C2 (251~286 aa, RhNAC31-C2) 两段, 分别构建到 pGBKT7 上检测其自激活活性及对酵母 Y2H Gold 细胞的毒性。结果显示, pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 对酵母 Y2H Gold 细胞均没有毒性, 能激发金担子素 A (Aureobasidin A, AbA) 报告基因的表达, 具有自激活活性, 在含有 400 ng·mL⁻¹ AbA 的 SD 缺陷型培养基上其活性受到抑制, 以含该浓度 AbA 的培养基作为筛选文库培养基。在此筛选条件下, 在酵母双杂交文库中筛选到 21 个阳性克隆, 对其测序并用 Blast 比对获得了 16 个与 RhNAC31 互作的候选蛋白。利用 Uniprot 网站对互作蛋白进行基因本体学分析, 结果显示 RhNAC31 能够与 RZFP34、MIEL1、RUB 泛素连接酶 E3、SGT1 蛋白、DnaJ 蛋白等多种蛋白相互作用, 可能参与糖脂生物合成、蛋白质泛素化、植物防御、叶绿素生物合成、模式识别受体信号通路、蛋白质折叠、乙烯生物合成、胁迫响应等生物学过程。

关键词: 月季; RhNAC31; 酵母双杂交; 互作蛋白

中图分类号: S 685.12

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 07-1335-10

Screening and Analysis of Rose (*Rosa hybrida*) RhNAC31 Interacting Proteins by Yeast Two-Hybrid System

DING Aiqin^{1,2}, HAN Kunjie¹, YANG Lichen¹, ZHANG Zhujun¹, GENG Ziwen¹, FU Lufeng¹, LIU Qinghua^{1,*}, and JIANG Xinqiang^{1,*}

(¹College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To further understand the molecular mechanism of RhNAC31 in stress response, we used the RhNAC31 protein as bait through cut rose ‘Samantha’ water deficit stress yeast two-hybrid (Y2H) cDNA libraries and screened its interacting proteins. RhNAC31 transactivation domain was located in its C-terminal (157 - 286 aa). Two different deletion regions, including RhNAC31-C1 (157 - 250 aa) and RhNAC31-C2 (251 - 286 aa), were constructed to pGBKT7 vector, respectively. Self-activation activity and toxicity were also examined in Y2H Gold yeast cells. The results showed that both

收稿日期: 2019 - 11 - 14; **修回日期:** 2020 - 03 - 24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000400); 国家自然科学基金项目 (31501798)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jiangxinqiang8@163.com, lqh6205@163.com)

pGBKT7-RhNAC31-C1 and pGBKT7-RhNAC31-C2 had no toxicity in Y2H Gold cells and could stimulate Aureobasidin A (AbA) reporter gene with auto-activation activity. The activities were obviously inhibited when supplemented with $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ AbA under SD deficient medium. The SD deficient medium plus $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ AbA was used as Y2H screening library medium. Twenty-one positive colonies were screened by Y2H, and 16 of them may be candidate interacting proteins of RhNAC31 which were further sequenced. In addition, these interacting proteins were also functional associations based on gene ontology through Uniprot website. RhNAC31 may interact with RZFP34, MIEL1, RUB E3 ubiquitin ligase, SGT1, DnaJ and other proteins. These different proteins may participate in glycolipid biosynthesis, protein ubiquitination, plant defense, chlorophyll biosynthesis, pattern recognition receptor signaling pathway, protein folding, ethylene biosynthesis, stress response and other biological processes.

Keywords: rose; RhNAC31; yeast two-hybrid; interacting protein

在月季 (*Rosa hybrida*) 的栽培及流通过程中, 干旱或失水造成的水分胁迫是影响其商品价值的重要环境因素。转录调控是植物应对不良环境的重要调控过程, 众多转录因子广泛参与植物对干旱、高盐等非生物胁迫的适应。

NAC 转录因子是植物体内具有多种生物学功能的特异转录因子。NAC 转录因子在不同植物中成员众多, 广泛参与植物的生长发育、器官建成、激素调节以及对生物胁迫和非生物胁迫的应答 (Livak & Schmittgen, 2001), 通过结合下游调控基因的特异性顺式作用元件 CATGTG (Singh et al., 2002) 对其进行调控表达。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* (Tran et al., 2004), 水稻 *SNAC3*、*SNAC1*、*SNAC4* 和 *SNAC6* (Nakashima et al., 2007; Takasaki et al., 2010; Fang et al., 2015), 杨树 *PnsNAC7*、*PnsNAC57* (李晰妍, 2017; 张雪梅 等, 2017) 均能提高植物对非生物胁迫的抵抗能力。目前, 月季中已分离获得 4 个 NAC 转录因子基因, 分别为 *RhNAC2* (Dai et al., 2012)、*RhNAC3* (Jiang et al., 2014)、*RhNAC31* (Ding et al., 2019) 和 *RhNAC100* (Pei et al., 2013), 其中 *RhNAC2*、*RhNAC3* 和 *RhNAC31* 被证明与非生物胁迫密切相关, 但其作用机制尚不清晰。

酵母双杂系统是由 Fields 和 Sternglanz (1994) 根据真核生物转录调控的特点首次提出并建立, 它可直接用于细胞内检测蛋白质的相互作用, 在草本植物大豆 (于月华, 2008)、丹参 (时王珂, 2017)、番茄 (王翔和尹钧, 2011)、春兰 (胡月苗 等, 2016) 等, 木本植物茶树 (魏俊燕, 2016)、小黑杨 (赵慧 等, 2016) 等互作蛋白的筛选中都有应用。月季 *RhNAC31* 是胁迫诱导转录因子, 异源过表达 *RhNAC31* 能够提高拟南芥对干旱、高盐和冷胁迫等非生物胁迫的抵抗能力 (Ding et al., 2019), 但其调控网络尚不清晰。本研究中以 RhNAC31 为诱饵蛋白, 利用酵母双杂交系统在切花月季 ‘萨曼莎’ 失水胁迫 cDNA 文库中筛选与其互作候选蛋白, 并对候选蛋白进行生物信息分析, 为进一步揭示 RhNAC31 在胁迫应答信号的作用机制、明确其调控网络奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态 *E. coli* DH5 α Electro-Cells 购自擎科生物技术有限公司。载体 pMD-18T 购自 TaKaRa 宝生物 (大连) 工程有限公司。酵母菌株 Y2H Gold、酵母双杂载体

pGBKT7-53 载体质粒、pGBKT7-Lam 载体质粒、pGBKT7 载体质粒、pGADT7 载体质粒和切花月季‘萨曼莎’花瓣失水胁迫 cDNA 文库由本实验室保存。

DNA Marker、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indoly- α -D-galactoside, X- α -Gal)、YPDA 培养基、SD 培养基、金担子素 A (Aureobasidin A, AbA)、Carrier DNA、YeastmarkerTM Yeast Transformation System 2 和 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 均购于 TaKaRa 宝生物 (大连) 工程有限公司; Mix、高纯度质粒 DNA 小量试剂盒 (PM0201-50)、DNA 凝胶回收试剂盒 (GE0101-200) 购自擎科生物技术有限公司。LB 肉汤、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 和卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 购自北京 Solarbio 科技有限公司; 其他试剂均采用国产分析纯。

1.2 RhNAC31 诱饵载体的构建

参考 Dai 等 (2012) 和 Jeong 等 (2009) 的方法, 将 RhNAC31 的转录激活区域 C 端 (157~286 aa) 划分为 2 个片段: RhNAC31-C1 (157~250 aa) 和 RhNAC31-C2 (251~286 aa)。分段设计带有酶切位点的引物扩增 RhNAC31 C 端的 2 个片段 (表 1), 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 TaKaRa Mini BESTAgarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 回收目的条带。将回收产物与克隆载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 中。挑取单菌落鉴定, 根据菌落 PCR 结果, 将鉴定出的阳性克隆交由青岛派森诺生物科技股份有限公司测序。将测序正确序列利用上海生工生物有限公司 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (NO. B518191) 提取质粒。采用限制性内切酶 EcoRV 和 BamH I 构建酵母 pGBKT7 表达载体。通过测序验证重组诱饵载体 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 构建成功。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers names and sequences

用途 Usage	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Primer sequence
表达载体构建 Overexpression vector construction	<i>RhNAC31-C1-EcoR V-F</i>	TATGATATCAAAGGAGAGATGAACGACAACATGA
	<i>RhNAC31-C1-BamH I-R</i>	TGCGGATCCGTCATTTTTTGGCCTTATTTTCGGTG
	<i>RhNAC31-C2-EcoR V-F</i>	TATGATATCGATGATTATGGATTTTTATGGGACA
候选基因检测 Candidate gene detection	<i>RhNAC31-C2-BamH I-R</i>	TGCGGATCC TAGCAAACCATGCTGTTCTCCATC
	pGADT7-F	TAATACGACTCACTATAGGGC
	pGADT7-R	AGATGGTGCACGATGCACAG

1.3 诱饵载体的毒性检测及自激活分析

通过 LiAc 法 (Liu et al., 2016) 制备 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 将阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T、阴性对照 pGBKT7-Lam + pGADT7-T、重组诱饵载体 pGBKT7-RhNAC31-C1、pGBKT7-RhNAC31-C2 和空载体 PGBKT7 转入到酵母感受态中, 涂布于 SD/-Trp 缺陷型固体培养基上, 倒置于 30 °C 恒温箱中培养 3~5 d, 观察其生长情况。挑取直径为 2~3 mm 的单菌落接种到 YPDA 液体培养基中, 30 °C, 250 r·min⁻¹ 摇床培养 12 h, 均匀点样于相应的含有 0、100、150、200、400 和 500 ng·mL⁻¹ AbA 的 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal 和 SD/-Trp/X- α -gal 缺陷型固体培养基上, 观察菌斑生长情况, 判断能否激活报告基因。

1.4 酵母双杂交筛选互作蛋白

将阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T、阴性对照 pGBKT7-Lam + pGADT7-T、重组诱饵载体

pGBKT7-RhNAC31-C1 + pGADT7-cDNA 分别共转化到 Y2H Gold 酵母感受态细胞中, 涂布于 SD/-Trp/-Leu 缺陷型固体培养基上, 30 °C 培养 3 ~ 5 d 进行初筛。挑取初筛平板上直径为 2 ~ 3 mm 的单菌落在 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X-α-gal/AbA 缺陷型固体培养基上划线进行 2 次筛选。挑取在 2 次筛选中变蓝的菌落接种到 YPDA 液体培养基中, 30 °C、250 r · min⁻¹ 摇床培养 12 h, 均匀点样于上述缺陷型固体培养基上进行 3 次筛选。同时以 pGADT7-F/pGADT7-R 为引物对阳性菌落进行 PCR 检测 (表 1)。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 15 s; 72 °C 延伸 1 min; 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。根据 1% 琼脂糖凝胶电泳结果, 将 PCR 产物送至青岛派森诺生物科技股份有限公司测序。

1.5 候选基因生物信息分析

将筛选的候选互作蛋白进行测序, 在 NCBI 数据库中进行 BLASTx 比对分析, 获得同源序列, 预测基因功能, 并利用网站 Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 进行 Gene Ontology (GO) 注释 (<https://www.uniprot.org>)。

2 结果与分析

2.1 RhNAC31 诱饵载体

以带有酶切位点的引物 (*RhNAC31-C1-EcoRV-F*, *RhNAC31-C1-BamHI-R*; *RhNAC31-C2-EcoRV-F*, *RhNAC31-C2-BamHI-R*) 扩增 RhNAC31 的 C 端的 2 个片段 pGBKT7-RhNAC31-C1 (C 端 157 ~ 250 aa) 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 (C 端 250 ~ 286 aa), 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带。将回收产物连接转化大肠杆菌 DH5α 中, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定无误后进行测序, 将测序正确的序列提取质粒。利用 *EcoRV* 和 *BamHI* 对 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 重组质粒分别进行双酶切 (图 1, B), 1% 琼脂糖凝胶电泳并回收产物, 连接转化进行测序, 载体与目的基因的测序结果进行比对, 成功构建 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 诱饵载体。

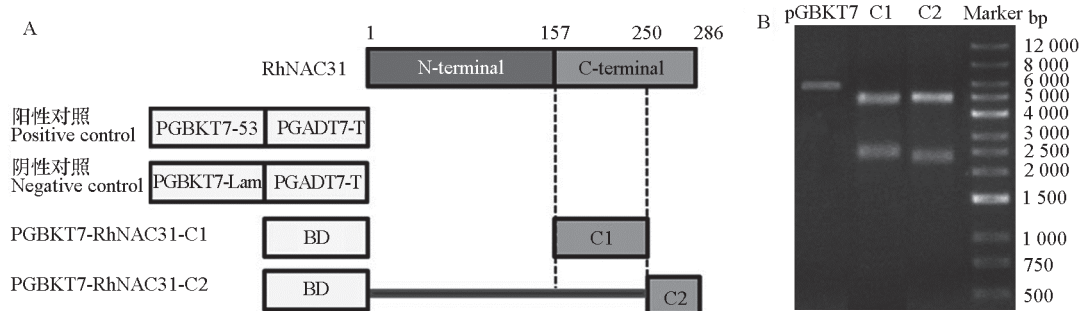


图 1 RhNAC31 诱饵载体构建示意图 (A) 和重组质粒 *EcoRV* 和 *BamHI* 双酶切鉴定 (B)

Fig. 1 The construction of RhNAC31 bait vector (A) and identification of recombinant plasmid digested by *EcoRV* and *BamHI* (B)

2.2 诱饵载体毒性及自激活活性

为检测 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 诱饵载体的毒性及自激活活性, 将

pGBKT7-53 + pGADT7-T (阳性对照)、pGBKT7-Lam + pGADT7-T (阴性对照) 和诱饵载体分别转化至 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 并将转化后的酵母涂布于 SD/-Trp/-Leu 缺陷型固体培养基上。结果显示, 含有诱饵载体的酵母与携带空载体 pGBKT7 的酵母单克隆大小一致, 均能够正常生长, 说明诱饵载体对酵母细胞无毒性 (图 2, A)。

用含有不同浓度 AbA 的 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal 和 SD/-Trp/X- α -gal 缺陷型固体培养基, 检测诱饵载体的自激活活性 (图 2, B), 转阴性对照质粒 (pGBKT7-Lam + pGADT7-T) 的酵母在 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal/AbA 缺陷型固体培养基上不能正常生长, 不能够激发 X- α -gal 报告基因的表达, 酵母不变蓝; 而转阳性对照质粒 (pGBKT7-53 + pGADT7-T) 的酵母由于 pGBKT7-53 中的 p53 蛋白与 pGADT7-T 表达的 T 蛋白发生相互作用能够激活 AbA 报告基因, 可在 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal/AbA 缺陷型固体培养基上生长, 且能激发 X- α -gal 报告基因并使酵母变蓝。转诱饵载体 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 酵母可激活 AbA 报告基因的表达, 且能在 SD/-Trp/X- α -gal/AbA 缺陷型平板上正常生长, 激活 X- α -gal 报告基因, 酵母变蓝, 表明其具有自激活活性; 但是随着 AbA 浓度的增加, 酵母活性显著降低, 当 AbA 的浓度达到 400 和 500 ng · mL⁻¹ 时, 转诱饵载体酵母不能生长且没有变蓝, 这表明 AbA 抑制了 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 的自激活活性。因此, 以含有 400 ng · mL⁻¹ AbA 浓度的 SD 缺陷型培养基为筛选文库培养基。

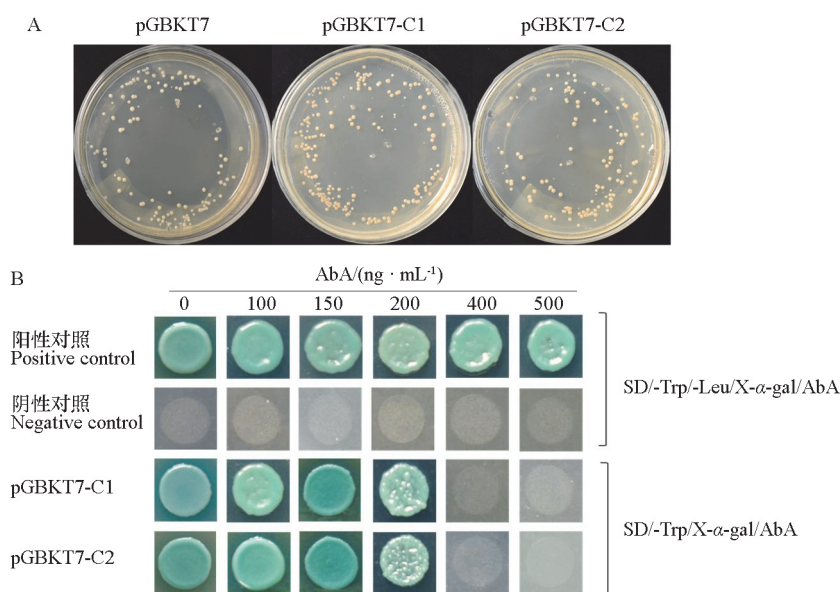


图 2 诱饵载体的毒性检测 (A) 和自激活检测 (B)

Fig. 2 Toxicity tests (A) and auto-activation examination of the bait vector (B)

2.3 酵母双杂筛选 RhNAC31 候选互作蛋白

将阳性对照质粒、阴性对照质粒和 pGBKT7- RhNAC31-C1 + pGADT7-cDNA 分别转入 Y2H Gold 酵母感受细胞, 涂布于 SD/-Trp/-Leu 缺陷型固体培养基 (图 3) 均能生长, 表明质粒转化成功。挑取 SD/-Trp/-Leu 缺陷型固体培养基上的单菌落在 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 缺陷型固体培养基上划线培养, 大部分菌落都能生长且变蓝。将 2 次筛选获得的 21 个阳性克隆接种到

SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 缺陷型固体培养基上进行 3 次筛选, 获得 19 个蓝色阳性克隆(图 3)。以 pGADT7-F/pGADT7-R 为引物对上述阳性克隆进行 PCR 检测, 21 个克隆均可以扩增出 800 ~ 2 500 bp 的条带(图 4)。

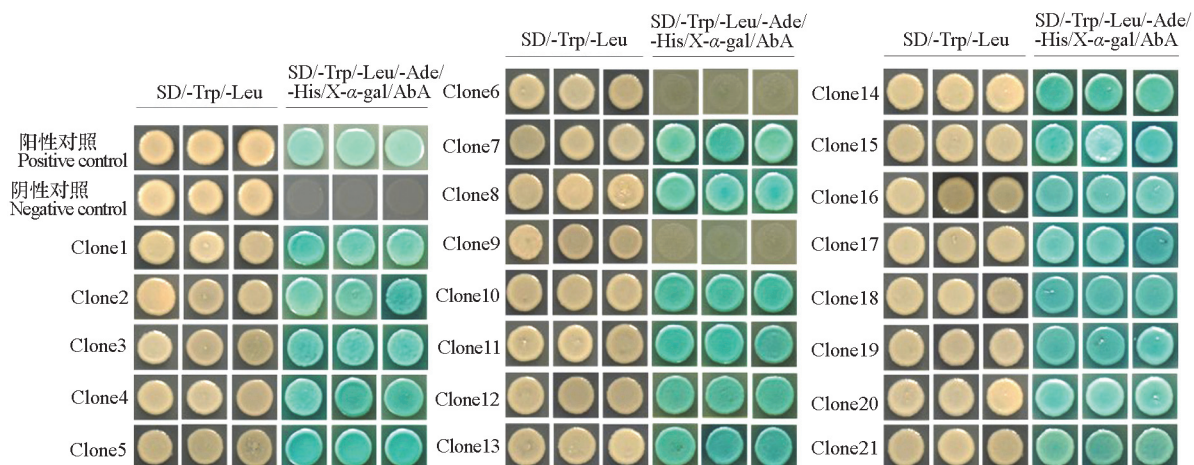


图 3 酵母双杂交筛选 RhNAC31 互作蛋白

Fig. 3 Screening of RhNAC31 interacting proteins by yeast two-hybrid

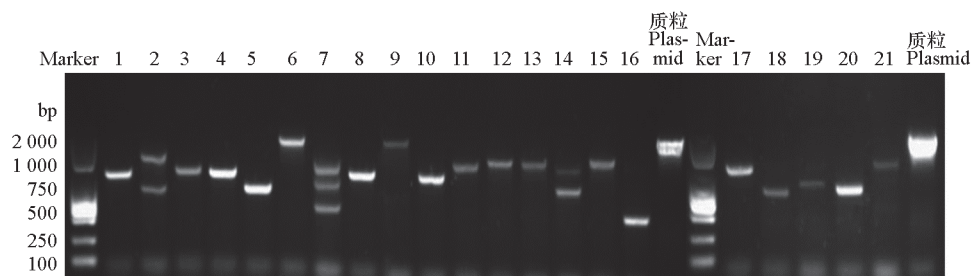


图 4 阳性克隆 (1~21) 的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of positive clones (1 - 21)

2.4 候选基因的生物信息分析

将 21 个阳性克隆的 PCR 产物送至公司测序, 将测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLASTx 比对分析, 共获得 16 个与 RhNAC31-C1 互作的候选蛋白(表 2), 包括突触结合蛋白-2 亚型 X2 (synaptotagmin-2 isoform X2)、线粒体糖原脱氢酶样氧化还原酶 (mitochondrial saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase)、假定磷脂酰甘油/磷脂酰肌醇转移蛋白 DDB (putative phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein DDB)、可能的 E3 泛素蛋白连接酶 RZFP34 (probable E3 ubiquitin-protein ligase RZFP34)、蛋白 SGT1 同系物 (protein SGT1 homolog)、谷氨酸 tRNA 还原酶 1 (glutamyl-tRNA reductase 1)、E3 泛素蛋白连接酶 MIEL1 (E3 ubiquitin-protein ligase MIEL1)、蛋白质 AE7 (protein AE7)、质体脂质相关蛋白 (plastid-lipid-associated protein)、DnaJ 蛋白 ERDJ3B(DnaJ protein ERDJ3B)、泛素 NEDD8 样蛋白 RUB2(ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2)、伴侣蛋白 DnaJ C76 (chaperone protein DnaJ C76) 和 1 个未知蛋白质。

利用网站 Uniprot 对 16 个候选蛋白进行 Gene Ontology (GO) 注释, 结果如表 2 所示, RhNAC31

表 2 RhNAC31 互作候选蛋白的 GO 注释

Table 2 Gene Ontology annotation of RhNAC31 interacting candidate proteins

克隆号 Clone number	登录号 Genebank accession	基因名称 Gene name	生物过程 Biological process	分子功能 Molecular function	细胞组成 Cellular composition
1	XP_024163369.1	突触结合蛋白 - 2 亚型 X2 Synaptotagmin-2 isoform X2	内质网质膜拴系; 脂质转运 Endoplasmic reticulum-plasma membrane tethering; lipid transport	脂质结合 Lipid binding	膜 Membrane
2-2	XP_024180909.1	可能的线粒体糖原脱氢酶样氧化还原酶 AT5G39410 Probable mitochondrial saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase At5g39410	糖脂生物合成过程 Glycolipid biosynthetic process	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	叶绿体; 线粒体 Chloroplast; Mitochondrion
5	XP_024188631.1	假定磷脂酰甘油/磷脂酰肌醇转移蛋白 DDB_G0282179 Putative phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein DDB_G0282179	细胞内固醇转运 Intracellular sterol transport	甾醇转运 Sterol transport	液泡 Vacuole
7	XP_024165118.1	可能的 E3 泛素蛋白连接酶 RZFP34 Probable E3 ubiquitin-protein ligase RZFP34	蛋白质泛素化 Protein ubiquitination	转移酶活性; 锌离子结合 Transferase activity; Zinc ion binding	细胞核 Nucleus
10	XP_024176256.1	蛋白 SGT1 同系物 Protein SGT1 homolog	免疫; 植物防御; UBL 结合途径 Mmunity; Plant defense; UBL conjugation pathway	蛋白质结合 Protein binding	细胞质; 细胞核 Cytoplasm; nucleus
11	XP_024171068.1	谷氨酸 tRNA 还原酶 1 (叶绿体) Glutamyl-tRNA reductase 1 (chloroplastic)	叶绿素生物合成过程 Chlorophyll biosynthetic process	NADP 绑定; 谷氨酰 tRNA 还原酶活性 NADP binding; glutamyl-tRNA reductase activity	叶绿体 Chloroplast
12、13、 15、2-1	XP_024194373.1	E3 泛素蛋白连接酶 MIEL1 E3 ubiquitin-protein ligase MIEL1	防御反应; 转录因子分解代谢过程的正调控; 蛋白质泛素化 Defense response; positive regulation of transcription factor catabolic process; ubiquitination	转录因子结合; 泛素蛋白转移酶活性; 锌离子结合 Transcription factor binding; Ubiquitin- protein transferase activity; Zinc ion binding	细胞核; 细胞质 Nucleus; Cytoplasm
14	XP_024198949.1	未知蛋白 Uncharacterized protein	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown
17	XP_024173479.1	蛋白质 AE7 Protein AE7	染色体分离 Chromosome segregation	空泡分选信号绑定 Vacuolar sorting signal binding	细胞核; 细胞质 Nucleus; Cytoplasm
18	XP_024160174.1	质体脂质相关蛋白 (类叶绿体) Plastid-lipid-associated protein (chloroplastic-like)	未知 Unknown	未知 Unknown	叶绿体 Chloroplast
19	XP_024173887.1	DnaJ 蛋白 ERDJ3B DnaJ protein ERDJ3B	模式识别受体信号通路; 蛋白质折叠 Pattern recognition receptor signaling pathway; Protein folding	未折叠蛋白结合 Unfolded protein binding	内质网; 质膜 Endoplasmic reticulum; Plasma membrane
20	XP_024158728.1	泛素 NEDD8 样蛋白 RUB2 Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	乙烯生物合成过程; 蛋白质泛素化; 修饰依赖性蛋白分解代谢过程 Ethylene biosynthetic process; Protein ubiquitination; Modification-dependent Protein catabolic process	蛋白质标签; 泛素蛋白连接酶结合 Protein tag; ubiquitin protein ligase binding	胞液; 细胞核; 细胞质 Cytosol; nucleus; cytoplasm
21	XP_024182121.1	伴侣蛋白 DnaJ C76 (叶绿体样亚型 X1) Chaperone protein DnaJ C76 (chloroplastic-like isoform X1)	胁迫响应 Stress response	电子转移活性; 铁离子结合 Electron transfer activity; iron ion binding	叶绿体; 质体 Chloroplast; plastid

的 16 个候选互作蛋白分别具有氧化还原酶活性、蛋白质结合、锌离子结合、转录因子结合、泛素蛋白转移酶活性、电子转移活性、泛素蛋白连接酶结合等生物功能，参与了糖脂生物合成、蛋白质泛素化、植物防御、叶绿素生物合成、模式识别受体信号通路、蛋白质折叠、乙烯生物合成、胁迫响应等生物过程，细胞成分主要是细胞核、细胞质和叶绿体。

3 讨论

月季 *RhNAC31* 的表达受失水、盐害、冷害、乙烯和 ABA 胁迫诱导，是胁迫响应类 NAC 转录因子基因，其启动子区域包含众多应激反应相关顺式元件，如 MBS (MYB 结合位点参与干旱诱导)、HSE (热激反应元件)、Spl (光响应元件) 以及 LTR (低温反应元件) 等。同时，*RhNAC31* 参与了月季花朵开放过程和器官发育过程。在拟南芥中异源过表达 *RhNAC31* 提高了转基因株系抗旱、抗盐和抗冷能力 (Ding et al., 2019)。*RhNAC31* 可能在逆境胁迫反应中发挥重要作用。

试验前期研究表明，RhNAC31 转录因子是 1 个转录激活子 (Ding et al., 2019)。N - 端为 DNA 结合结构域，C - 端为转录调控区域，其转录活性主要集中在 C - 端，对下游基因的调控也依赖于 C - 端的不同氨基酸序列。为了进一步研究 *RhNAC31* 参与月季失水胁迫的分子机制，参考 Dai 等 (2012) 和 Jeong 等 (2009) 的方法，将 RhNAC31 的 C 端划分为 2 个片段 (C1 和 C2) 并分别构建诱饵表达载体 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2。pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 能激活 AbA 报告基因的表达，具有自激活活性。这与月季 RhNAC2 (Dai et al., 2012) 和水稻 OsNAC5 (Jeong et al., 2009) C - 端缺失分段后部分序列不具有自激活活性不同，推测可能与不同 NAC 转录因子成员 C - 端氨基酸序列的高度分化有关。不同浓度 AbA 能够抑制 pGBKT7-RhNAC31-C1 和 pGBKT7-RhNAC31-C2 的转录活性。当 AbA 浓度达到 400 ng · mL⁻¹ 时，其转录活性受到抑制。

利用酵母双杂交技术，以 pGBKT7-RhNAC31-C1 为诱饵蛋白，从月季 cDNA 文库中共筛选出 16 个与 RhNAC31 相互作用的候选蛋白。这些候选蛋白广泛参与了糖脂生物合成、蛋白质泛素化、植物防御、叶绿素生物合成等过程。16 个候选蛋白有 3 个属于泛素化途径相关基因 (RZFP34、MIEL1 和 RUB)，表明 RhNAC31 可能存在泛素化修饰过程。蛋白质泛素化是一种翻译后的蛋白修饰，其在应对生物胁迫、非生物胁迫、生长和发育等过程中起重要作用 (Ciechanover, 1998; Itoh et al., 2003)。在不同植物中 RZFP34/CHYR1、MIEL1 和 RUB1 均可通过泛素化参与不同胁迫反应 (Marino et al., 2013; 曹博洋, 2014; Ding et al., 2015)。对模式植物的研究结果表明，泛素连接酶能够参与 NAC 转录因子的泛素化修饰或调控。Miao 等 (2016) 在番茄中发现泛素连接酶 SINA3 能够泛素化 NAC1，促进其降解，并在防御信号传导中起到负向作用。上述 3 个泛素连接酶均为 RhNAC31 筛选的候选互作蛋白，暗示着 RhNAC31 存在泛素化介导的翻译后修饰，在月季生长发育和应对非生物胁迫过程中，可能通过 RZFP34、MIEL1 或 RUB 完成对 RhNAC31 的泛素化降解。但何种泛素连接酶调控 RhNAC31 以及具体的泛素化位点尚需进一步研究。

基因 SGT1 是植物防御反应信号转导的关键调控因子，尤其在抗病方面发挥着重要作用。植物 SGT1 的发现暗示着泛素途径可能与植物防御反应紧密相关 (李为民, 2003)。当受到水分胁迫时，RhNAC31 可能与 SGT1 相互作用，一方面可能通过泛素化途径来增强月季的防御反应，另一方面 RhNAC31 也可能通过调控 SGT1 这类基因来参与生物胁迫防御途径。DnaJ 蛋白作为热激蛋白家族中的一类，是广泛存在于植物细胞中的胁迫响应因子，在许多生物及非生物胁迫响应中都扮演着重

要的角色 (樊芳菲 等, 2018)。拟南芥 DnaJ 蛋白 AtDjB1 通过保护细胞免受高温诱导产生活性氧的损伤来提高其耐热性 (Zhou et al., 2012)。酵母双杂交结果表明 DnaJ 蛋白 ERDJ3b 和伴侣 DnaJ 可能与 RhNAC31 发生互作, 共同调控植物对外界非生物胁迫的响应, 也可能参与了逆境胁迫后受伤蛋白质的修复或降解、叶绿体类囊体膜蛋白复合体的聚合和解聚等, 但具体的互作机制还需要进一步研究。

本研究中利用酵母双杂技术对 RhNAC31 进行酵母文库筛选得到 21 个候选阳性克隆, 对阳性克隆测序并利用 Blast 比对共获得 16 个与 RhNAC31 互作的候选蛋白, 包括 RZFP34、MIEL1、RUB E3 泛素连接酶、SGT1 蛋白、DnaJ 蛋白等多种蛋白。互作蛋白的 GO 注释分析显示 RhNAC31 可能参与糖脂生物合成、蛋白质泛素化、植物防御、叶绿素生物合成、模式识别受体信号通路、蛋白质折叠、乙烯生物合成、胁迫响应等生物过程。上述结果为深入了解月季 RhNAC31 参与防御反应的分子调控网络及其作用机制奠定了基础。

References

- Cao Bo-yang. 2014. Identification and expression analysis of *RUB1* in dongxiang wild rice [M D. Dissertation]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. (in Chinese)
- 曹博洋. 2014. 东乡野生稻 RUB1 基因的鉴定与表达分析[硕士论文]. 南昌: 江西农业大学.
- Ciechanover A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO Journal*, 17 (24): 7151 - 7160.
- Dai F W, Zhang C Q, Jiang X Q, Kang M, Yin X, Lü P T, Zhang X, Zheng Y, Gao J P. 2012. RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals. *Plant Physiology*, 160 (4): 2064 - 2082.
- Ding A Q, Li S C, Li W, Hao Q, Wan X L, Wang K L, Liu Q C, Liu Q H, Jiang X Q. 2019. RhNAC31, a novel rose NAC transcription factor, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41 (6): 1 - 16.
- Ding S C, Zhang B, Qin F. 2015. *Arabidopsis* RZFP34/CHYR1, a ubiquitin E3 Ligase, regulates stomatal movement and drought tolerance via SnRK2.6-mediated phosphorylation. *Plant Cell*, 27: 3228 - 3244.
- Fan Fang-fei, Yang Xian, Kang Yun-yan, Chai Xi-rong, Meng Lin-ping. 2018. Research progress on DnaJ proteins in plants. *Molecular Plant Breeding*, 16 (6): 2028 - 2034. (in Chinese)
- 樊芳菲, 杨 暹, 康云艳, 柴喜荣, 蒙林平. 2018. 植物 DnaJ 蛋白的研究进展. *分子植物育种*, 16 (6): 2028 - 2034.
- Fang Y J, Liao K F, Du H, Xu Y, Song H Z, Li X H, Xiong L Z. 2015. A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice. *Journal of Experimental Botany*, 66 (21): 6803 - 6817.
- Fields S, Sternglanz R. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*, 10 (8): 286 - 292.
- Hu Yue-miao, Chen Yue, Qin De-hui, Hu Feng-rong, Sun Chong-bo. 2016. Selecting interactor protein of flowering regulatory protein DEF3 in *Cymbidium goeringii* by yeast two-hybrid system. *Molecular Plant Breeding*, 14 (7): 1666 - 1671. (in Chinese)
- 胡月苗, 陈 跃, 秦德辉, 胡凤荣, 孙崇波. 2016. 利用酵母双杂交系统筛选春兰开花调控蛋白 DEF3 的互作蛋白. *分子植物育种*, 14 (7): 1666 - 1671.
- Itoh H, Matsuoka M, Steber C.M. 2003. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends in Plant Science*, 8 (10): 492 - 497.
- Jeong J S, Park Y T, Jung H, Park S H, Kim J K. 2009. Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. *Plant Biotechnology Reports*, 3 (2): 127 - 134.
- Jiang X Q, Zhang C Q, Lü P T, Jiang G M, Liu X W, Dai F W, Gao J P. 2014. RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals. *Plant Biotechnology Journal*, 12 (1): 38 - 48.
- Li Wei-min. 2003. Cloning and function analysis of *Gossypium barbadense* *Rar1*, *Sgt1*, *Rac1*, *KTN1* gene and *Gossypium arboreum* *cab* promoter [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 李为民. 2003. 海岛棉 *Rar1*、*Sgt1*、*Rac1*、*KTN1* 基因及中棉 *cab* 基因启动子的克隆和功能分析 [博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Li Xi-yan. 2017. Functional analysis of *Populus alba* × *Populus glandulosa* transcription factor NAC57 gene in salt stress tolerance [M. D.

- Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 李晰妍. 2017. 84K 杨转录因子 NAC57 基因耐盐胁迫功能分析[硕士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Liu J Q, Chen X J, Liang X X, Zhou X G, Yang F, Liu J, He S Y, Guo Z J. 2016. Alternative splicing of rice WRKY62 and WRKY76 transcription factor genes in pathogen defense. *Plant Physiology*, 171 (2): 1427 - 1442.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Marino D, Froidure S, Canonne J, Khaled S B, Khaffif M, Pouzet C, Jauneau A, Roby D, Rivas S. 2013. *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nature Communications*, 4: 1476.
- Miao M, Niu X L, Kud J, Du X R, Avila J, Devarenne T P, Kuhl J C, Liu Y S, Xiao F M. 2016. The ubiquitin ligase SEVEN IN ABSENTIA (SINA) ubiquitinates a defense-related NAC transcription factor and is involved in defense signaling. *New Phytologist*, 211: 138 - 148.
- Nakashima K, Tran L P, Nguyen D V, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal*, 51 (4): 617 - 630.
- Pei H X, Ma N, Tian J T, Luo J, Chen J W, Li J, Zheng Y, Chen X, Fei Z J, Gao J P. 2013. An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163 (2): 775 - 791.
- Shi Wang-ke. 2017. Identification of proteins interacting with *Salvia miltiorrhiza* bunge PPO using yeast two-hybrid system[M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 时王珂. 2017. 利用酵母双杂交筛选与丹参 PPO 互作的蛋白[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Singh K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. England: Elsevier Ltd, 5: 430 - 436.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 284 (3): 173 - 183.
- Tran L S P, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson S D, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress I Promoter. *Plant Cell*, 16 (9): 2481 - 2498.
- Wang Xiang, Yin Jun. 2011. Functional studies of *JOINTLESS* and its interacting MADS-domain proteins in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (4): 701 - 708. (in Chinese)
- 王翔, 尹钧. 2011. 番茄花柄离区发育基因 *JOINTLESS* 及互作蛋白基因的功能研究. *园艺学报*, 38 (4): 701 - 708.
- Wei Jun-yan. 2016. Tea yeast two hybrid cDNA library and the interactive protein screening of *CsCOR1*[Ph. D. Dissertation]. Xinyang: Xinyang Normal University. (in Chinese)
- 魏俊燕. 2016. 茶树酵母双杂交 cDNA 文库的构建和 *CsCOR1* 互作蛋白的筛选[博士论文]. 信阳: 信阳师范学院.
- Yu Yue-hua. 2008. Functional analyses of *DREB* transcription factor genes from soybean (*Glycine max*), and isolation and identification of its interacting proteins[M. D. Dissertation]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University. (in Chinese)
- 于月华. 2008. 大豆 *DREB* 基因的功能分析及互作蛋白的筛选和鉴定[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.
- Zhang Xue-mei, Yao Wen-jing, Zhao Kai, Jiang Ting-bo, Zhou Bo-ru. 2017. Expression analysis of NAC7 transcription factor gene from *Populus simonii* × *P. nigra* in response to salt stress. *Journal of Northeast Forestry University*, 45 (8): 6 - 9, 13. (in Chinese)
- 张雪梅, 姚文静, 赵凯, 姜廷波, 周博如. 2017. 杨树 NAC7 转录因子基因应答盐胁迫表达. *东北林业大学学报*, 45 (8): 6 - 9, 13.
- Zhao Hui, Wang Sui, Jiang Jing, Liu Gui-feng. 2016. Screening of *Populus simonii* × *Populus nigra* WRKY70-interactive proteins by the yeast two-hybrid system. *Journal of Beijing Forestry University*, 38 (2): 44 - 51. (in Chinese)
- 赵慧, 王遂, 姜静, 刘桂丰. 2016. 酵母双杂交筛选与小黑杨 *PsnWRKY70* 相互作用的蛋白质. *北京林业大学学报*, 38 (2): 44 - 51.
- Zhou W, Zhou T, Li M X, Zhao C L, Jia N, Wang X X, Sun Y Z, Li G L, Xu M, Zhou R G, Li B. 2012. The *Arabidopsis* J-protein AtDjB1 facilitates thermotolerance by protecting cells against heat-induced oxidative damage. *New Phytologist*, 194 (2): 364 - 378.