热带亚热带植物学报 2015, 23(1): 43 ~ 50
Journal of Tropical and Subtropical Botany

利用酵母双杂交系统筛选水稻组蛋白去乙酰化酶HDA705的互作蛋白

李明智[1,2], 赵金会[1], 刘勋成[1], 张建霞[1], 段俊[1*]
(1. 中国科学院华南植物园,广州 510650; 2. 中国科学院大学,北京 100049)

摘要: 为了解水稻(*Oryza sativa*)组蛋白去乙酰化酶 HDA705 的生物学功能,构建了 HDA705 酵母双杂交诱饵表达载体与双杂交文库,并筛选了与 HDA705 相互作用的蛋白。结果表明, HDA705 的诱饵载体无自激活活性且对酵母无毒性作用,文库的滴度也适合常规的酵母双杂交文库筛选。通过对酵母双杂交文库的筛选,共获得了 164 个阳性克隆,经 DNA 测序分析,这些克隆编码 47 个可能与 HDA705 相互作用的蛋白,其中包括 3 个在逆境响应或激素信号转导过程中起到重要作用的(辅)转录因子、6 个参与光合作用的叶绿体蛋白、1 个含有 R3H 结构域的蛋白以及 22 种酶类等。这为进一步研究 HDA705 的生物学功能提供了重要的线索。

关键词: 水稻; 组蛋白去乙酰化酶; 酵母双杂交; 互作蛋白
doi: 10.11926/j.issn.1005–3395.2015.01.007

Screening of Proteins Interacting with Histone Deacetylase HDA705 in Rice (*Oryza sativa*) by Yeast Two Hybrid System

LI Ming-zhi[1,2], ZHAO Jin-hui[1], LIU Xun-cheng[1], ZHANG Jian-xia[1], DUAN Jun[1*]
(1. *South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 501650, China; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand the biological function of histone deacetylase HDA705 in rice, the yeast two-hybrid bait vector of HDA705 and the cDNA library were constructed and the interaction partners of HDA705 were screened. The results showed that HDA705 bait vector showed no self-activating and no toxicity to yeast cells. Furthermore, the titer of cDNA library was suitable for normal yeast two-hybrid screening assay. There were 164 positive clones by yeast two-hybrid screening. DNA sequencing analysis indicated that these positive clones encoded 47 proteins which may interact with HDA705. These proteins included 3 transcription factors (or transcription co-factors) which play key roles in stress responses and hormone signaling pathways, 6 chloroplast located proteins which were involved in photosynthesis, 1 protein containing the R3H domain structure, and 22 enzymes in plant, etc. These may provide important cues to further study the biological function of HDA705 in rice.
Key words: Rice; Histone deacetylase; Yeast two-hybrid; Interaction protein

核心组蛋白的乙酰化与去乙酰化作用在真核生物的基因转录调控中起到重要的作用[1]。组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)是通过移除染色质组蛋白上的乙酰基,使染色质的结构变得紧密从而抑制基因的转录[2–8]。高等植物中, HDACs 家族成员被划分为 RPD3/HDA1 超家族、SIR2 家

收稿日期: 2014–03–25 **接受日期:** 2014–06–12
基金项目: 广东省科技计划项目(2011A020102008)资助
作者简介: 李明智(1987~),男,硕士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: limzhi87@163.com
* 通信作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

族和 HD2 家族 3 大类[9–12]。HDACs 成员广泛参与植物的生长发育过程及对逆境胁迫的响应途径[13]。

水稻(*Oryza sativa*)中已鉴定出 18 个 HDACs 成员,其中, HDA705 属于 RPD3/HDA1 超家族成员,具有典型的 HDAC 功能结构域[14]。目前,对 HDA705 的功能研究仅局限于生物信息学分析、不同发育阶段和不同逆境条件下的表达谱分析、以及启动子特异性表达分析等方面,罕见有关其参与水稻的生长发育及对逆境胁迫的响应等生物学功能方面的研究报道[14–16]。有研究表明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的组蛋白去乙酰化酶 HDA15、HDA6 和 HDA19 分别与 PIF3 (Phytochrome-interacting factor 3)、AS1 (Asymmetric leaf 1)及 HSL1 (HSI2-like 1)等蛋白互作,调控叶绿素的生物合成、叶片发育及种子成熟等相关基因的表达[17–19], 表明 HDACs 通常通过与其它蛋白质的相互作用共同调控植物基因表达和生长发育过程。因此,筛选和鉴定 HDA705 的互作蛋白对于解析其在水稻中的生物学功能具有重要的意义。

酵母双杂交(Yeast two hybrid)是一种高效的互作蛋白筛选方法,通过转录激活报告基因表达,能迅速、灵敏地在酵母体内检测蛋白的互作。酵母双杂交技术已在细胞周期与分化、信号传导和基因表达调控等蛋白质互作研究方面得到了广泛的应用[20–21]。

本研究中,我们构建了水稻 HDA705 的酵母双杂交诱饵表达载体和双杂交文库,并通过接合型酵母双杂交文库筛选,获得了与 HDA705 互作的蛋白, 为 HDA705 生物学功能及作用机制的研究提供了重要的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH10B、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 AH109 和 Y187、pGADT7 DNA-AD Cloning Vector、pGBKT7 DNA-BD Cloning Vector、酵母双杂交试剂盒及酵母培养基各组分购自 Clontech 公司;水稻(*Oryza sativa*)品种‘中花 11’(‘Zhonghua11’, ZH11)为中国科学院华南植物园生物技术育种课题组保存;质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;mRNA 纯化试剂 Oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit (From Total RNA)、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 所用 Ex *Taq* 酶, RNA 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;其他为国产分析纯试剂。

1.2 诱饵载体构建

以水稻 ZH11 的两周幼苗为材料,采用 Trizol 法提取总 RNA 后逆转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板,采用 TaKaRa 公司的高保真酶(Ex *Taq*)扩增 *HDA705* 基因的全长序列,引物分别为 OsHDA705F: 5′-GAAGATCTATGGCGGCGTCCGGCGAGGG-3′ 和 OsHDA705R: 5′-GAAGATCTCTAGGAATCATC-ATTCGATT-3′。回收扩增片段后连接到 T 载体,并转化到大肠杆菌 DH10B,提取质粒进行测序验证。以测序正确的质粒为模板,采用 In-fusion 技术进行 PCR 扩增,引物分别为 OsHDA705L: 5′-CATG-GAGGCCGAATTCATGGCGGCGTCCGGCGAGG-GGGCG-3′ 和 OsHDA705R: 5′-GCAGGTCGACG-GATCCCTAGGAATCATCATTCGATTCATC-3′。回收 PCR 产物,并用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 进行双酶切,获得的片段与 pGBKT7-DNA-BD 载体连接,构建为 pGBKT7-HDA705 诱饵载体,转化大肠杆菌后提取质粒进行测序。pGBKT7-HDA705 诱饵载体转化酵母菌后,即可表达由 ADH I 启动子驱动表达的 GAL4 BD-HDA705 诱饵蛋白。

1.3 诱饵蛋白毒性及自激活检测

为检测诱饵蛋白 GAL4 BD-HDA705 对酵母菌的毒性和自身激活能力,分别将 pGBKT7-*HDA705* 诱饵载体和 pGBKT7-DNA-BD 空载体质粒转化到酵母菌株 AH109 中,并将菌液涂抹在 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上培养。4 d 后分别挑选 10 个 2 mm 大小的单克隆进行摇菌培养,至菌液浓度 OD_{600} 为 0.5 左右时,分别取 0.5 μL 菌液在 SD/-Trp/X-α-Gal 固体培养基上点样培养,于 30℃恒温箱中培养 4 d 后,观察酵母菌的生长情况。

1.4 cDNA文库的构建及丰度检测

采用 Trizol 法提取水稻 ZH11 两周幼苗的总 RNA,用 mRNA 纯化试剂盒分离纯化水稻 mRNA。以分离的 mRNA 为模板,用 Oligo (dT) 18-Anchor Primer [5′-(GA)10ACTAGTCTCGAG$(T)_{18}$V-3′ (V:

A/C/G)] 进行逆转录反应，合成单链 cDNA，双链化后进行平末端处理，并连接上 *Eco*RI Adaptor [5′-OH-AATTCGGCACGAGG-3′ (3′-GCCGTGCT-CCp-5′)]，进行 *Eco*R I/*Xho* I 双酶切后连接到 pGADT7 载体，得到酵母双杂交 cDNA 文库。将 cDNA 文库质粒转化大肠杆菌进行培养，利用血球计数板计算滴度达到 1.0×10^6 cfu mL^{-1} 后涂平板扩增放大 cDNA 文库。大量提取 cDNA 文库质粒后，取 15 μg 质粒转化到酵母感受态 Y187 中，将 25 mL 转化液均匀涂抹到 160 个直径为 9 cm 的 SD/-Leu 平板上，于 30℃培养 4 d。采用 500 mL Freezing medium 洗脱菌体，并取 100 μL 菌液，稀释 5 倍后采用血球计数板计算滴度。将洗脱的菌液离心浓缩成文库所需滴度，分装后放入 –80℃冰箱保存。构建成功的 cDNA 文库可以在 ADH I 启动子驱动下表达 GAL4 AD-cDNA 融合蛋白。

1.5 cDNA文库的鉴定

从 SD/-Leu 平板中随机挑取 30 个单菌落，采用 pGADT7 通用引物进行菌落 PCR 反应，PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，根据扩增片段的大小和个数，统计 cDNA 文库的重组率和插入片段大小的分布情况。

1.6 酵母双杂交文库筛选与HDA705相互作用的蛋白

挑取表达诱饵载体的 AH109 单菌落(大小约 2~3 mm)至 50 mL SD/-Trp 液体培养基中培养，至菌液浓度 OD_{600} 约为 0.8 时在 1000×*g* 下离心 5 min，用 4~5 mL SD/-Trp 液体培养基进行重悬浮 (>1×10^8 cfu mL^{-1})。取 1 mL cDNA 文库菌液与 4~5 mL 诱饵载体菌液混合，并添加 45 mL 2×YPDA 液体培养基进行低速摇菌培养(30~50 r min^{-1})。20 h 后，取菌液在显微镜下观察，出现三叶草或者米老鼠状酵母接合体，说明酵母接合杂交成功。将菌液在 1000×*g* 下离心 10 min，弃上清液后用 50 mL 0.5×YPDA 液体培养基重悬浮菌体，再次离心(1000×*g*，10 min)，弃上清液后重悬浮于 10 mL 0.5×YPDA 液体培养基中。取 10 μL 菌液稀释 1/10000 涂至 SD/-Trp、SD/-Leu 和 SD/-Leu/-Trp 平板上(100 μL 板 $^{-1}$)，用各板生长菌落数计算接合效率和杂交克隆数。将剩余未稀释的菌液涂于 55 个 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 平板上。挑取生长良好、显蓝色的克隆进行菌落 PCR 检测，并提取质粒，用 pGADT7 通用引物进行测序，在 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列比对分析，以序列相似度最高的水稻基因为目的基因。

2 结果和分析

2.1 HDA705诱饵蛋白表达载体的构建及序列测定

将 pGBKT7-*HDA705* 连接产物转化大肠杆菌后，采用载体两端的引物进行菌落 PCR 分析，结果得到大小为 1300~1500 bp 的 PCR 产物(图 1: A)，由于 *HDA705* cDNA 全长 1377 bp，表明得到的克隆均为阳性克隆。将阳性克隆进行摇菌培养，提取质粒后进行酶切检测。*HDA705* cDNA 的 1099 bp

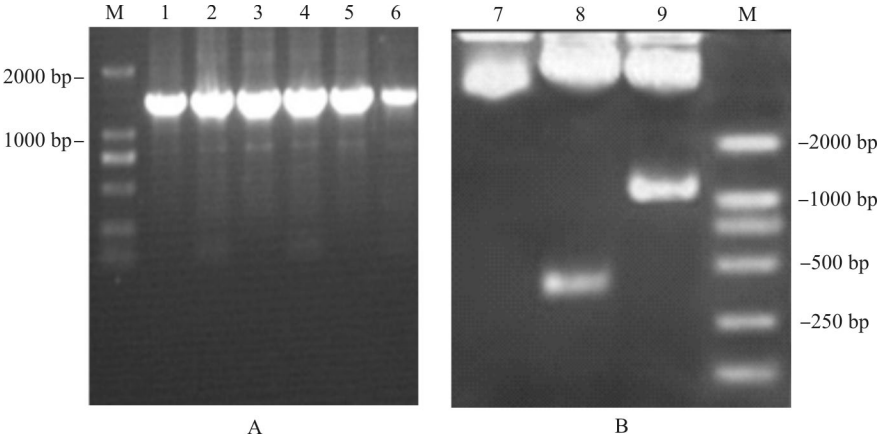

图 1 pGBKT7-*HDA705* 诱饵表达载体的菌落 PCR 检测(A)和酶切验证(B)。M: 2000 bp DNA marker; 1~6: 阳性克隆；7: 对照；8: *Pst* I 酶切；9: *Eco*R I 酶切。

Fig. 1 Colony PCR (A) and enzymatic digestion detection (B) of pGBKT7-*HDA705* bait vector. M: 2000 bp DNA marker; 1–6: Positive colonies; 7: Control; 8: *Pst*Ⅰ digestion; 9: *Eco*RⅠ digestion.

处有 1 个 *Eco*R I 酶切位点，991 bp 处有 1 个 *Pst* I 酶切位点，而在 pGBKT7-DNA-BD 载体的 1300 bp 处也有 1 个 *Eco*R I，1326 bp 处有 1 一个 *Pst* I，因此可以采用 *Eco*R I 或 *Pst* I 对构建的载体质粒进行单酶切检测。酶切后电泳结果表明，*Eco*R I 酶切得到的片段约为 1100 bp，而 *Pst* I 酶切得到约为 400 bp 的片段，均符合预期的片段大小(图 1: B)。将酶切检测正确的质粒送交测序，序列比对结果显示序列正确(图 2)，表明诱饵蛋白表达载体构建成功。

2.2 诱饵蛋白载体的毒性和自激活检测

将 pGBKT7-*HDA705* 重组质粒和 pGBKT7-DNA-BD 空载体质粒分别转化到 AH109 菌株中，摇菌培养后，取菌液点在 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上培养 3 d。结果表明，同转化空载体的阴性对照一致，转化 pGBKT7-*HDA705* 诱饵载体的菌落在 SD/-Trp/X-α-Gal 培养基上能正常生长，且不显蓝色(图 3)，表明 pGBKT7-HDA705 诱饵蛋白在 AH109 酵母细胞内无毒性，且无自激活活性，可以用于酵母双杂交的文库筛选实验。

2.3 文库载体的丰度检测

取 1 mL 酵母 cDNA 文库菌液稀释 5 倍，血球计数板上每格约 200 个菌体。因此，酵母 cDNA 文库滴度为 2.5×10^{8} cfu mL^{-1}，达到酵母双杂交所需的文库滴度要求(2.0×10^{7} cfu mL^{-1})。

2.4 酵母cDNA文库片段大小和重组率的测定

将构建的 cDNA 文库质粒转化酵母后，随机挑选了 30 个菌落进行 PCR 检测。结果表明，挑选的 30 个菌落中除 10、19 和 24 号菌落没有扩增出任何条带外(图 4: 白色箭头)，其余 27 个菌落均扩增出外源片段(图 4)，表明文库的重组率约为 90%。同时，重组外源片段大小为 250~2000 bp (图 4)。

```
HDA705          1 ..................ATGGCGGCGTCCGGCGAGGGGGCGTCGCTGGCGTCGGCGGCGGGAGGGGAGGACGGG
pGBKT7-HDA705   1 CCATGGAGGCCGAATTCATGGCGGCGTCCGGCGAGGGGGCGTCGCTGGCGTCGGCGGCGGGAGGGGAGGACGGG
HDA705         58 CGGCGGCGGCGGGTGAGCTACTTCTACGAGCCGTCGATCGGGGACTACTACTACGGGCAGGGGCACCCGATGAA
pGBKT7-HDA705  75 CGGCGGCGGCGGGTGAGCTACTTCTACGAGCCGTCGATCGGGGACTACTACTACGGGCAGGGGCACCCGATGAA
HDA705        132 GCCCCATCGCATCCGCATGGCGCACTCGCTGGTGGTCCACTACGGCCTCCACCGCCTCCTCGAGCTCTCCCGCC
pGBKT7-HDA705 149 GCCCCATCGCATCCGCATGGCGCACTCGCTGGTGGTCCACTACGGCCTCCACCGCCTCCTCGAGCTCTCCCGCC
HDA705        206 CCTACCCGGCCTCCGACGCCGACATCCGCCGCTTCCACTCCGACGACTACGTCGCCTTCCTCGCCTCCGCCACC
pGBKT7-HDA705 223 CCTACCCGGCCTCCGACGCCGACATCCGCCGCTTCCACTCCGACGACTACGTCGCCTTCCTCGCCTCCGCCACC
HDA705        280 GGGAACCCCGCCCTGCTCGACGCCCGCGCCGTCAAGCGCTTCAACGTCGGCGAGGACTGCCCGGTCTTCGACGG
pGBKT7-HDA705 297 GGGAACCCCGCCCTGCTCGACGCCCGCGCCGTCAAGCGCTTCAACGTCGGCGAGGACTGCCCGGTCTTCGACGG
HDA705        354 CCTCTTCCCCTTCTGCCAGGCCTCCGCGGGGGGCAGCATCGGCGCCGCCGTCAAGCTCAACCGCGGCGACGCCG
pGBKT7-HDA705 371 CCTCTTCCCCTTCTGCCAGGCCTCCGCGGGGGGCAGCATCGGCGCCGCCGTCAAGCTCAACCGCGGCGACGCCG
HDA705        428 ACATCACCGTCAACTGGGCGGGGGGCCTCCACCACGCCAAGAAGGGCGAGGCCTCCGGCTTCTGCTACGTCAAC
pGBKT7-HDA705 445 ACATCACCGTCAACTGGGCGGGGGGCCTCCACCACGCCAAGAAGGGCGAGGCCTCCGGCTTCTGCTACGTCAAC
HDA705        502 GACATCGTCCTCGCCATCCTCGAGCTCCTCAAGTTCCACAGGCGTGTGCTATATGTAGACATTGATGTCCACCA
pGBKT7-HDA705 519 GACATCGTCCTCGCCATCCTCGAGCTCCTCAAGTTCCACAGGCGTGTGCTATATGTAGACATTGATGTCCACCA
HDA705        576 TGGAGATGGCGTGGAGGAAGCTTTCTTCACTACGAATCGAGTCATGACTTGTTCCTTTCACAAGTATGGGGACT
pGBKT7-HDA705 593 TGGAGATGGCGTGGAGGAAGCTTTCTTCACTACGAATCGAGTCATGACTTGTTCCTTTCACAAGTATGGGGACT
HDA705        650 TTTTCCCTGGTACTGGGCATATCACTGATGTTGGAGCAGGCGAAGGAAAACATTATGCTTTAAATGTGCCCCTG
pGBKT7-HDA705 667 TTTTCCCTGGTACTGGGCATATCACTGATGTTGGAGCAGGCGAAGGAAAACATTATGCTTTAAATGTGCCCCTG
HDA705        724 AGTGATGGCATTGATGATGATACCTTTCGTGATCTGTTCCAGTGCATCATCAAAAAGGTAATGGAGGTTTATCA
pGBKT7-HDA705 741 AGTGATGGCATTGATGATGATACCTTTCGTGATCTGTTCCAGTGCATCATCAAAAAGGTAATGGAGGTTTATCA
HDA705        798 GCCAGATGTAGTTGTTCTCCAGTGTGGAGCCGACTCTTTGGCTGGAGACAGGTTAGGTTGCTTCAACCTGTCTG
pGBKT7-HDA705 815 GCCAGATGTAGTTGTTCTCCAGTGTGGAGCCGACTCTTTGGCTGGAGACAGGTTAGGTTGCTTCAACCTGTCTG
HDA705        872 TGAAAGGTCATGCAGACTGCCTCCGTTACCTTAGGTCATTCAATATTCCTATGATGGTTTTGGGAGGTGGGGGT
pGBKT7-HDA705 889 TGAAAGGTCATGCAGACTGCCTCCGTTACCTTAGGTCATTCAATATTCCTATGATGGTTTTGGGAGGTGGGGGT
HDA705        946 TACACCATCAGAAATGTTGCTCGCTGCTGGTGCTATGAGACTGCAGTTGCTGTTGGAGTTGAACCTGATAACAA
pGBKT7-HDA705 963 TACACCATCAGAAATGTTGCTCGCTGCTGGTGCTATGAGACTGCAGTTGCTGTTGGAGTTGAACCTGATAACAA
HDA705       1020 GTTACCTTATAATGACTACTATGAGTACTTTGGTCCTGATTATAATCTCCATATTCAACCCAGAAGTGTGGAGA
pGBKT7-HDA705 1037 GTTACCTTATAATGACTACTATGAGTACTTTGGTCCTGATTATAATCTCCATATTCAACCCAGAAGTGTGGAGA
HDA705       1094 ACCTGAATTCGACTAAAGACCTGGAGAACATAAAGAGCATGATATTGGATCATCTCTCAAAAATTGAGCATGTT
pGBKT7-HDA705 1111 ACCTGAATTCGACTAAAGACCTGGAGAACATAAAGAGCATGATATTGGATCATCTCTCAAAAATTGAGCATGTT
HDA705       1168 CCGAGCACTCAGTTCCATGACAGACCATCAGATCCTGAAGCTCCAGAGCAGGAAGAGGAGGACATGGACAAGAG
pGBKT7-HDA705 1185 CCGAGCACTCAGTTCCATGACAGACCATCAGATCCTGAAGCTCCAGAGCAGGAAGAGGAGGACATGGACAAGAG
HDA705       1242 ACCACCTCAGCGCAGTAGGTTATGGAGTGGAGGAGCTTATGAATCTGATACAGAGGATCCTGACAACATGAAAA
pGBKT7-HDA705 1259 ACCACCTCAGCGCAGTAGGTTATGGAGTGGAGGAGCTTATGAATCTGATACAGAGGATCCTGACAACATGAAAA
HDA705       1316 CTGAGACCAATGACTTATCTGCCAGCTCTGTCATGAAGGATGAATCGAATGATGATTCCTAG......
pGBKT7-HDA705 1333 CTGAGACCAATGACTTATCTGCCAGCTCTGTCATGAAGGATGAATCGAATGATGATTCCTAGGGATCC
```

图 2 pGBKT7-*HDA705* 测序结果与原序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of pGBKT7-*HDA705* and *HDA705*

2.5 酵母双杂交筛选与HDA705相互作用的蛋白

将接合杂交后的酵母菌液 10 μL 稀释至 1/10000 后涂板(每板 100 μL)。在 SD/-Leu/-Trp 培养基长出 31 个单克隆菌落，在 SD/-Leu 培养基上长出约 170 个菌落，在 SD/-Trp 培养基上长出约 560 个单克隆菌落(图 5)，因此，筛选得到文库克隆总数约为 3.56×10^7 个，杂交率约为 18%，满足酵母双杂交文库筛选的杂交效率(2%)。将其余未稀释的杂交转化菌经过两轮 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 培养基筛选(图 6)，共获得 164 个阳性克隆，对这些克隆进行 DNA 测序分析，最终得到了 47 个非重复的候选基因(克隆)序列，表明筛选得到了 47 个可能与 HDA705 互作的蛋白。在这些蛋白中，包括 3 个转录因子或者辅转录因子，RSS3、RHSF10 和含有 WD40 结构域的 GAMYB-binding 蛋白，6 个叶绿体蛋白，1 个含有 R3H 结构域的蛋白，22 个具有催化作用的蛋白，10 个含有一些特殊结构域的蛋白以及 5 个未知蛋白(表 1)。

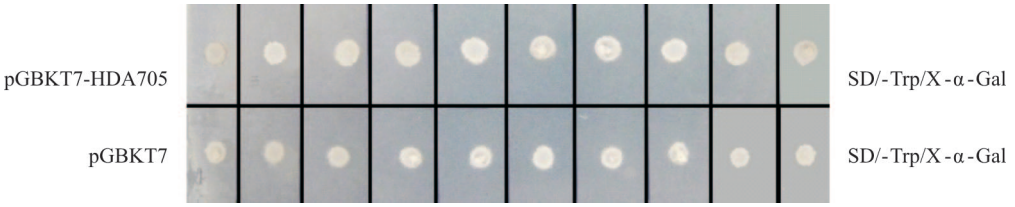

图 3 pGBKT7-HDA705 诱饵蛋白在 AH109 菌株内的自激活活性和毒性检测

Fig. 3 Autoactivation and toxicity detection of pGBKT7-HDA705 bait protein in AH109

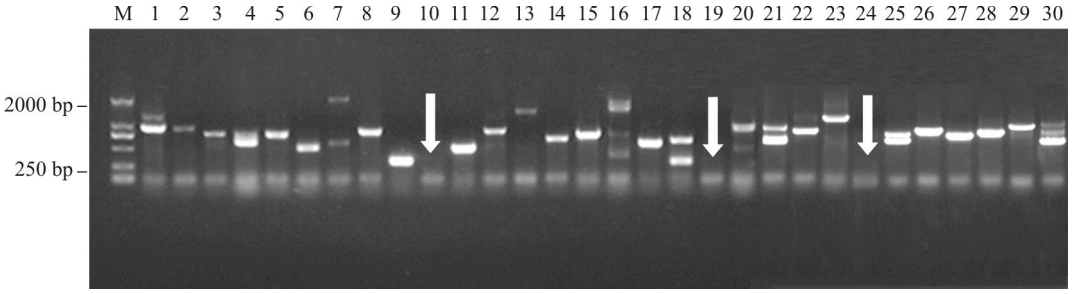

图 4 cDNA 文库的 PCR 检测。1~30: 克隆编号；M: 2000 bp DNA marker。

Fig. 4 PCR detection of cDNA library. 1–30: Clone No.; M: 2000 bp DNA marker.

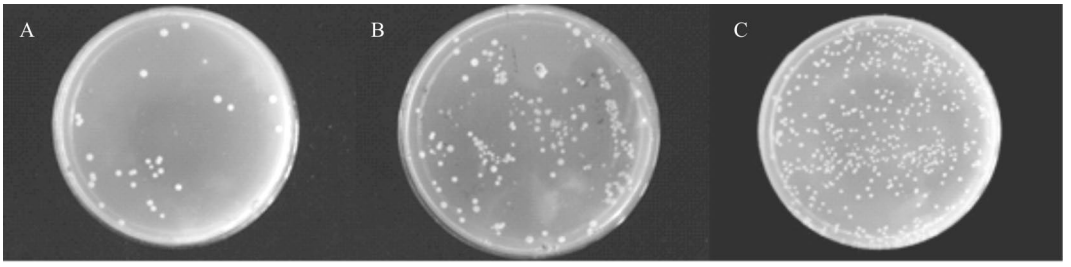

图 5 酵母接合杂交后的培养。A: SD/-Leu/-Trp; B: SD/-Trp; C: SD/-Leu。

Fig. 5 Culture of yeast after mating. A: SD/-Leu/-Trp; B: SD/-Trp; C:SD/-Leu.

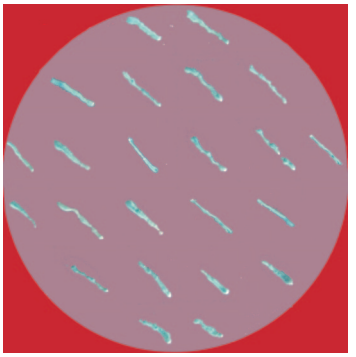

图 6 酵母接合杂交后经两轮 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 培养基筛选

Fig. 6 Twice screen of mating yeast on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal plate

表 1 酵母双杂交筛选到的水稻中编码与 HDA705 互作蛋白的基因

Table 1 Genes encoding HDA705 interactors screened by yeast two hybrid

基因 Gene	基因序列登录号 Gene accession No.	功能描述 Function description	蛋白质序列登录号 Protein accession No.	克隆数 Number of clone
AB753860	AB753860	Rice salt sensitive 3, regulates root cell elongation	BAM62866.1	2
Os08g0408200	NM_001068312	Similar to GAMYB-binding protein	NP_001061777.1	1
Os05g0411600	NM_001062073	Single-stranded nucleic acid binding R3H domain containing protein	NP_001055538.2	25
Os09g0456800	NM_001069899	Similar to heat stress transcription factor Spl7, heat shock factor RHSF10	NP_001063364.1	1
Os03g0704000	NM_001057555	Similar to 30S ribosomal protein S13, chloroplast precursor (CS13) – (CS13),	NP_001051020.2	4
Os03g0856500	NM_001058485	Similar to plastid- specific 30S ribosomal protein 1	NP_001051950.1	9
Os05g0560000	NM_001062839	Photosystem I reaction center subunit VI	NP_001056304.1	1
Os06g0101600	NM_001063065	Plastocyanin, chloroplast precursor	NP_001056530.1	10
Os07g0556200	NM_001066497	Rieske iron sulfur protein family protein	NP_001059962.1	20
Os08g0560900	NM_001069046	Similar to Photosystem I reaction center subunit II	NP_001062511.1	35
Os01g0294700	NM_001049335	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial family protein	NP_001042800.1	1
Os02g0817700	NM_001055058	Similar to 3-ketoacyl-CoA thiolase (fragment)	NP_001048523.1	1
Os06g0111500	NM_001063121	Cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase	NP_001056586.1	1
Os04g0578600	NM_001060176	Ferric reductase-like transmembrane component family protein	NP_001053641.2	1
Os10g0576900	NM_001072019	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	NP_001065487.1	1
Os11g0707000	NM_001075087	Similar to Ribulose bisphosphate carboxylase activase (EC 6.3.4.-) (fragment)	NP_001068555.2	1
OSJNBb0060I05.4	AC092697	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	AAL58118.1	1
Os02g0101500	NM_001052124	Similar to NADH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29) (fragment)	NP_001045589.1	1
Os01g0690800	NM_001050464	Protein kinase-like domain containing protein	NP_001043929.2	1
Os02g0232500	NM_001185939	Leucine-rich repeat, plant specific containing protein	NP_001172868.1	2
Os01g0713200	NM_001050587	Similar to β-glucanase	NP_001044052.1	1
Os02g0250400	NM_001052979	Lipase, GDSL domain containing protein	NP_001046444.1	4
Os02g0730700	NM_001054550	Peptidase A1, pepsin family protein	NP_001048015.1	1
Os06g0531900	NM_001064321	Lipolytic enzyme, G-D-S-L family protein	NP_001057786.1	1
Os03g0365800	NM_001056710	Lipolytic enzyme, G-D-S-L family protein	NP_001050175.1	1
Os05g0567100	NM_001062883	Aspartic proteinase oryzasin 1 precursor	NP_001056348.1	1
Os09g0533900	NM_001070306	Similar to CEL5=CELLULASE 5	NP_001063771.1	1
Os05g0179300	NM_001061339	Transferase family protein	NP_001054804.1	1
Os10g0437600	NM_001071213	Similar to Starch synthase II	NP_001064678.1	1
Os03g0186100	NM_001055736	Similar to Uroporphyrinogen III synthase	NP_001049201.1	1
Os06g0643500	NM_001064713	Similar to ADR11 protein (fragment)	NP_001058178.1	1
Os10g0552800	NM_001071866	Similar to Tfm5 protein	NP_001065334.1	1
Os01g0306900	NM_001049382.1	Protein of unknown function DUF789 family protein	NP_001042847.1	1
Os02g0566500	NM_001053707	Protein of unknown function DUF1644 family protein	NP_001047172.1	1
Os04g0445200	NM_001059435	Protein of unknown function DUF861, cupin_3 domain containing protein	NP_001052900.1	2
Os10g0574700	NM_001072008	Protein of unknown function DUF597 family protein	NP_001065476.1	2
Os03g0431100	NM_001056960	XYPPX repeat containing protein	NP_001050425.1	7
Os05g0111300	NM_001060982	Similar to B22EL8 protein	NP_001054447.1	1
Os05g0346100	NM_001061794	Phox-like domain containing protein	NP_001055259.1	2
Os07g0173200	NM_001065538	Frigida-like family protein	NP_001059003.1	1

续表(Continued)

基因 Gene	基因序列登录号 Gene accession No.	功能描述 Function description	蛋白质序列登录号 Protein accession No.	克隆数 Number of clone
Os09g0115500	NM_001069119	CBS domain containing protein	NP_001062584.1	1
Os03g0200800	NM_001055827	ADP-ribosylation factor family protein	NP_001049292.1	1
Os06g0602200	NM_001187958	Hypothetical protein	NP_001174887.1	1
Os03g0213500	NM_001055898	Hypothetical protein	NP_001049363.1	1
Os04g0679900	NM_001060818	Conserved hypothetical protein	NP_001054283.1	1
Os07g0189700	NM_001065619	Conserved hypothetical protein	NP_001059084.1	2
Os06g0280900	NM_001187784	Conserved hypothetical protein	NP_001174713.1	1

3 讨论

本研究中，采用酵母接合型双杂交系统筛选与组蛋白去乙酰化酶 HDA705 互作的蛋白，结果酵母接合效率约为 18%，远远高于实验所要求的最低值 2%，也显著高于国内报道的酵母双杂交最高接合效率(约 12%)[22]，说明通过一定的条件优化，酵母双杂交的接合效率还有一定的提升空间。较高的接合率将扩大候选互作蛋白的覆盖度，使低表达的互作蛋白也能被有效的筛选出来。

本研究中，利用酵母接合型双杂交系统成功筛选出 47 个可能与 HDA705 在胞内存在互作的蛋白质。这 47 个候选蛋白中，有 3 个在逆境响应或激素信号转导过程中起到重要作用的转录因子或者辅转录因子 RSS3、RHSF10 和 1 个含有 WD40 结构域的 GAMYB-binding 蛋白。已有研究表明，水稻 RSS3 蛋白作为负调控者抑制逆境条件下 JA 响应基因的表达[23]，HDA705 可能通过与 RSS3 蛋白互作，改变 JA 响应基因的组蛋白乙酰化水平从而抑制其表达。RHSF10 属于 HsfB1 家族蛋白，该家族蛋白具有辅助转录激活或者转录抑制的功能。在番茄(*Lycopersicon peruvianum*)中，RHSF10 的同源蛋白 LpHsfB1 可以通过 C 末端的 Histone-Like Motif 和一些 CREB 接合蛋白互作调节下游基因的表达[24]。在大豆(*Glycine max*)中，RHSF10 的同源蛋白 GmHsfB1 通过 C 端调节区域的抑制结构域(RD)和 TFIIB 结合域与一些 GTFs 互作从而发挥转录抑制作用[25]。在拟南芥中，RHSF10 的同源蛋白 AtHsfB1/B2b 与 HsfA 家族的热激因子互作从而调节热休克反应的关闭[26]，并参与抑制一些热诱导的热激因子和热激蛋白基因的表达[27]。我们的研究表明，HDA705 能与 RHSF10 进行互作，揭示 HDA705 可能参与水稻热诱导基因的表达调控过程。本实验筛选到的水稻 GAMYB-binding 蛋白又称 SRWD4 蛋白，属于 SRWD (Salt responsive WD40 protein)亚家族成员。水稻中共有 5 个此类蛋白(SRWD1~SRWD5)，它们的表达都受到盐胁迫的诱导，其中 SRWD4 蛋白在花药和胚乳中有较高的表达[28]。本研究中鉴定 HDA705 能与 SRWD4 蛋白互作，揭示 HDA705 可能通过与 SRWD4 互作调控下游基因的表达，进而影响水稻对盐胁迫的响应过程。

近期的研究结果表明，拟南芥中与光合作用相关的蛋白包括叶绿素结合蛋白 LHCB、光系统 II 亚基和 Rubisco 大小亚基等能够发生乙酰化修饰的变化[29–30]。本研究中，筛选出与 HDA705 互作的 6 个参与光合作用的叶绿体蛋白，表明在水稻中 HDA705 可能参与这些叶绿体蛋白的乙酰化修饰及光合作用的调控途径。此外，在筛选到的与 HDA705 互作的蛋白中，有 22 个具有催化作用的蛋白。这些结果暗示 HDA705 除了拥有组蛋白的去乙酰化效应外，还可能参与细胞内的非组蛋白的去乙酰化作用。

综上所述，本研究利用酵母双杂交系统筛选出 47 个可能与 HDA705 在胞内相互作用的蛋白质，其中有 3 个在逆境响应或激素信号转导过程中起到重要作用的(辅)转录因子、6 个参与光合作用的叶绿体蛋白、1 个含有 R3H 结构域的蛋白、22 个细胞内的各种酶类、10 个含有一些特殊结构域的蛋白以及 5 个未知功能蛋白。这些互作蛋白的鉴定为进一步研究和了解 HDA705 参与调控水稻生长发育和逆境响应的分子机制提供了重要的信息。

参考文献

[1] Pfluger J, Wagner D. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants [J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10(6): 645–652.

[2] Lusser A, Brosch G, Loidl A, et al. Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein [J]. Science, 1997, 277(5322): 88–91.

[3] Kuo M H, Allis C D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation [J]. Bioessays, 1998, 20(8): 615–626.

[4] Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms [J]. Genes Dev, 1998, 12(5): 599–606.

[5] Sterner D E, Berger S L. Acetylation of histones and transcription-related factors [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(2): 435–459.

[6] Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, et al. Functional significance of histone deacetylase diversity [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(2):162–166.

[7] Eberharter A, Becker P B. Histone acetylation: A switch between repressive and permissive chromatin (Second in review series on chromatin dynamics) [J]. EMBO Rep, 2002, 3(3): 224–229.

[8] Yang X J, Seto E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression [J]. Curr Opin Genet Dev, 2003, 13(2): 143–153.

[9] Frye R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273 (2): 793–798.

[10] Graessle S, Loidl P, Brosch G. Histone acetylation: Plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(5/6): 704–720.

[11] Lusser A, Kolle D, Loidl P. Histone acetylation: Lessons from the plant kingdom [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(2): 59–65.

[12] Pandey R, Muller A, Napoli C A, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes [J]. Nucl Acid Res, 2002, 30(23): 5036–5055.

[13] Yuan L Y, Liu X C, Luo M, et al. Involvement of histone modifications in plant abiotic stress responses [J]. J Integr Plant Biol, 2013, 55(10): 892–901.

[14] Fu W Q, Wu K Q, Duan J. Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(4): 843–850.

[15] Hu Y F, Qin F J, Huang L M, et al. Rice histone deacetylase genes display specific expression patterns and developmental functions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(2): 266–271.

[16] Zhang W, Liu X C, Zhao J H, et al. Cloning and expression characterization of histone deacetylase gene *HDA705* promoter in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Trop Subtrop Bot, 2014, 22(1): 77–82.
张伟, 刘勋成, 赵金会, 等. 水稻组蛋白脱乙酰化酶基因*HDA705*启动子的克隆与表达特性分析 [J] . 热带亚热带植物学报, 2014, 22(1): 77–82.

[17] Liu X, Chen C Y, Wang K C, et al. Phytochrome interacting factor3 associates with the histone deacetylase HDA15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in etiolated *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Cell, 2013, 25(4): 1258–1273.

[18] Luo M, Yu C W, Chen F F, et al. Histone deacetylase HDA6 is functionally associated with AS1 in repression of *KNOX* genes in *Arabidopsis* [J]. Plos Genet, 2012, 8(12): e1003114.

[19] Zhou Y, Tan B, Luo M, et al. Histone deacetylase$_{19}$ interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Cell, 2013, 25(1): 134–148.

[20] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245–246.

[21] Soellick T R, Uhrig J F. Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses [J]. Genome Biol, 2001, 2(12): research00-7.

[22] Xue P. The construction of a yeast two-hybrid cDNA library of *Eimeria tenella* and preliminary screening of interaction proteins with EtAMA 1 [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2013: 1–70.
薛璞. 柔嫩艾美耳球虫子孢子酵母双杂交cDNA文库的构建及EtAMA1相互作用蛋白的初步筛选 [D]. 上海: 上海师范大学, 2013: 1–70.

[23] Toda Y, Tanaka M, Ogawa D, et al. Rice salt sensitive3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors and regulates jasmonate-induced gene expression and root cell elongation [J]. Plant Cell, 2013, 25(5): 1709–1725.

[24] Bharti K, von Koskull-Doring P, Bharti S, et al. Tomato heat stress transcription factor *HsfB1* represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1 [J]. Plant Cell, 2004, 16(6): 1521–1535.

[25] Czarnecka-Verner E, Pan S, Salem T, et al. Plant class B *HSFs* inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP [J]. Plant Mol Biol, 2004, 56(1): 57–75.

[26] Kumar M, Busch W, Birke H, et al. Heat shock factors *HsfB1* and *HsfB2b* are involved in the regulation of Pdf1.2 expression and pathogen resistance in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2009, 2(1): 152–165.

[27] Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M. *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance [J]. Plant Physiol, 2011, 157(3):1243–1254.

[28] Huang J, Wang M M, Bao Y M, et al. SRWD: A novel WD40 protein subfamily regulated by salt stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Gene, 2008, 424(1/2): 71–79.

[29] Wu X, Oh M, Schwarz E M, et al. Lysine acetylation is a widespread protein modification for diverse proteins in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2011, 155(4): 1769–1778.

[30] Finkemeier I, Laxa M, Miguet L, et al. Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2011, 155(4): 1779–1790.