

应用酵母双杂交系统筛选橡胶延长因子 REF 的互作蛋白

曾日中, 李先昆, 聂智毅, 代龙军, 黎瑜, 段翠芳*

(中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学重点开放实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 海南 儋州 571737)

摘要: 利用酵母双杂交系统, 以橡胶树(*Hevea brasiliensis*)橡胶延长因子基因 REF 的开放阅读框(ORF)构建无自激活性的诱饵表达载体 pBD-GAL4-REF, 并筛选以 pAD-GAL4-2.1 载体构建的橡胶树胶乳 cDNA 文库, 对阳性克隆的 cDNA 插入片段进行测序及生物学功能分析。通过酵母双杂交筛选, 共获得 5 种可能与 REF 互作的候选蛋白质, 它们分别为与诱饵蛋白 REF 高度同源的 REF 家族成员、小橡胶粒子蛋白(SRPP)、翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)、激发子响应蛋白和泛素耦联酶 E2, 这表明橡胶延长因子 REF 除了与自身高度同源蛋白质可能存在相互作用之外, 还可能与 TCTP 和激发子响应蛋白等其它蛋白质发生相互作用。这些结果有助于揭示橡胶粒子的生物学功能。

关键词: 橡胶树; 橡胶延长因子 REF; 橡胶生物合成; 酵母双杂交系统

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)05-0400-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.05.002

Screening Interaction Proteins of Rubber Elongation Factor (REF) by Yeast Two-hybrid System

ZENG Ri-zhong, LI Xian-kun, NIE Zhi-yi, DAI Long-jun, LI Yu, DUAN Cui-fang*

(Institute of Rubber Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture Key Laboratory for Rubber Tree Biology; State Key Laboratory Incubation Base, Danzhou 571737, China)

Abstract: The interaction proteins of rubber elongation factor (REF) were screened using yeast two-hybrid system. A bait vector pBD-GAL4-REF without auto-activation was constructed by subcloning ORF cDNA of REF gene into the yeast two-hybrid vector pBD-GAL4, and the pAD-GAL4-2.1 cDNA prey library was prepared with mRNA extracted from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The bait and prey vectors were then co-transformed into YRG-2 yeast competent cells by two-step method. Five proteins interacted with REF were identified by yeast two-hybrid screening method, including two of REF family proteins, and small rubber particle protein (SRPP), translation control of tumor protein (TCTP), elicitor-responsive protein and ubiquitin-conjugating enzyme E2. The data suggested that REF could not only interact with high homologous proteins, but also with other proteins, such as TCTP, and E2, etc. These protein-protein interactions might help to revealing the biological function of *H. brasiliensis* rubber particles.

Key words: *Hevea brasiliensis*; REF; Rubber biosynthesis; Yeast two-hybrid system

巴西橡胶树 [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell.-Arg.] 是一种生长在热带地区的产胶

植物, 其乳管细胞分泌的胶乳是天然橡胶的主要来源。橡胶树胶乳本质上为乳管细胞的细胞质, 其中

收稿日期: 2011-01-19

接受日期: 2011-04-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2007CB116203); 国家自然科学基金项目(30860232); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(XJSYWFZX2009-13)资助

作者简介: 曾日中, 博士, 副研究员, 主要从事橡胶树产胶分子生物学研究工作, email: hnzrz@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: cuifangd@yahoo.com.cn

橡胶粒子是胶乳的最重要组分,它是乳管细胞内具有橡胶生物合成功能的一种特殊细胞器^[1-2]。橡胶生物合成是在多种橡胶粒子蛋白的共同作用下完成的,其前体物质是异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)^[3],包括一系列有序而连续的酶促催化过程,最终合成的橡胶分子储藏在橡胶粒子之中^[4]。迄今为止,已知参与橡胶生物合成的橡胶粒子蛋白主要有:橡胶延长因子(rubber elongation factor, REF)^[5]、橡胶转移酶(rubber transferase, EC 2.5.1.20)^[6]和小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP)^[7]等。除此之外,还有许多橡胶粒子蛋白尚未分离和鉴定^[8]。虽然已经证明 REF 和橡胶转移酶等橡胶粒子蛋白决定着橡胶生物合成的速率,并与橡胶树的胶乳产量和橡胶质量密切相关^[9-11],但目前对橡胶生物合成及其调控的分子机理仍不十分清楚。橡胶粒子中的蛋白质可能通过相互作用,形成与橡胶生物合成功能相关的蛋白质复合体^[12]。因此,研究 REF 等橡胶粒子蛋白的相互作用蛋白,对揭示橡胶生物合成相关蛋白质复合体的组成,以及橡胶生物合成及其调控的分子机制具有重要意义。

酵母双杂交系统以真核细胞转录机制为基础,可直接用于检测蛋白质间的相互作用,是研究和鉴定相互作用蛋白的有力工具^[13]。经过不断的完善和发展,酵母双杂交系统已广泛地应用于细胞生物学、肿瘤学和蛋白质组学等诸多研究领域^[14-15]。虽然以橡胶树死皮病相关蛋白 HbMyb I 为诱饵,利用该系统检测到了 HbMyb I 可能与橡胶延长因子 REF 发生相互作用^[16],但目前仍然对橡胶树 REF 的相互作用蛋白缺乏深入的研究。本研究利用酵母双杂交系统,以 REF 为诱饵蛋白,通过筛选橡胶树胶乳 cDNA 文库,鉴定 REF 的相互作用蛋白,为进一步研究 REF 的功能以及揭示橡胶生物合成的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

植物材料为种植于中国热带农业科学院试验场的巴西橡胶树[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell.-Arg.]无性系热研 7-33-97。按常规割胶方法收集橡胶树的胶乳,并于-80℃低温保存备用。

酵母双杂交系统 HybriZAP-2.1 和 cDNA 合成

试剂盒购自 Strategene 公司;mRNA 分离试剂盒(Oligotex™ Direct mRNA Mini Kit)购自 Qiagen 公司;酵母质粒和大肠杆菌(*Escherichia coli*)质粒(大量)提取试剂盒为 OMEGA 公司产品;氯霉素、四环素、氨苄青霉素和大肠杆菌质粒(小量)提取试剂盒为北京天根生化科技公司产品;异亮氨酸(isoleucine)等 15 种氨基酸购自 Dfco 公司;鲑鱼精 DNA、尿嘧啶(Uracil)和半硫酸腺苷(adenine hemisulfate salt)购自 Sigma 公司产品;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 等购自大连宝生物公司(TaKaRa)。PCR 产物测序由英骏(上海)生物公司完成。

1.2 橡胶树 REF 诱饵蛋白表达载体的构建

根据 GenBank 上橡胶树 REF(登录号:AY120685.1)序列,设计上游引物和下游引物序列,分别为 5'-CG-GAATTCGCTGAAGACGAAGACAAC-3'和 5'-GC-GTCGACTCAATTCTCTCCATAAAAC-3',下划线处分别为 *EcoR* I 和 *Sal* I 的酶切位点。按照曾日中等^[17]的方法从橡胶树胶乳中提取总 RNA,以用 RT-PCR 方法克隆 REF 的 ORF 片段(417 bp)为诱饵。将纯化的 PCR 产物亚克隆至 pMD18-T 载体中,获得重组质粒 pMD18-T-REF,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,提取质粒并用 *Sal* I 和 *EcoR* I 内切酶酶切并进行测序鉴定。

将重组质粒 pMD18-T-REF 和诱饵载体 pBD-GAL4-Cam 分别用 *Sal* I 和 *EcoR* I 进行双酶切,然后将 REF 的 ORF 片段亚克隆至 pBD-GAL4-Cam 载体中,构建 pBD-GAL4-REF 诱饵蛋白表达质粒,并通过双酶切和测序鉴定。

1.3 诱饵蛋白表达载体的毒性及自激活检测

挑选在 Ura⁻/SD 平板上生长的酵母菌 YRG-2,并制备成感受态细胞。将 pBD-GAL4-REF 诱饵质粒和 pGAL4 质粒(阳性对照)分别转化感受态细胞 YRG-2,观察酵母菌在 Trp⁻/SD 固体平板上的生长情况。

挑选 Trp⁻/SD 平板上生长良好的 pBD-GAL4-REF 转化子进行培养,提取质粒再转化 YRG-2 酵母菌进行 pBD-GAL4-REF 的自激活性检测。将转化液分别划线于 Trp⁻/SD、His⁻/SD、Leu⁻/SD 和 Trp⁻/Leu⁻/His⁻/SD 平板上,并以转化 pBD-WT 的酵母细胞 YRG-2 作阴性对照,转化 pGAL4 的酵母细胞 YRG-2 作阳性对照,在 30℃ 培养 3 d 后,通过 X-gal 的蓝白颜色反应鉴定 pBD-GAL4-REF 转化子有无

自激活性。

1.4 橡胶树胶乳 cDNA 文库的构建

1.4.1 胶乳 mRNA 的分离、纯化及双链 cDNA 的合成

用 Oligotex™ Direct mRNA Mini Kit (Qiagen) 从橡胶树胶乳的总 RNA 中分离和纯化 mRNA, 并用 HybriZAP-2.1 XR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) 将 mRNA 合成双链 cDNA, 所有操作均按试剂盒说明书进行。

1.4.2 双链 cDNA 与载体 HybriZAP-2.1 的连接及其噬菌体的包装

首先将 cDNA 的末端进行钝化, 并与 *EcoR* I 接头连接, 然后对连接产物磷酸化及 *Xho* I 酶切消化后, 用 CHROMA SPIN-400 柱去除已消化的接头碎片和小片段的 cDNA 分子, 收集双链 cDNA 片段, 并连接到 HybriZAP-2.1 载体上。

1.4.3 胶乳 cDNA 初级文库的构建及扩增

采用 Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) 对连接产物进行包装, 即为胶乳 cDNA 初级噬菌体文库; 通过感染宿主菌 XL1-Blue MRF' 对初级 cDNA 文库进行扩增, 获得扩增文库, 并分别测定初级和扩增文库的滴度。

1.4.4 胶乳 pAD-GAL4-2.1 质粒文库的转化

先利用 Assistant Helper phage 对 HybriZAP-2.1 重组噬菌体进行体内切割, 将切割后形成的噬菌粒转染 *E. coli* XL0LR, 形成 pAD-GAL4-2.1 重组质粒文库, 并提取文库重组质粒 pAD-GAL4-2.1, 用于酵母的转化。

1.5 酵母分步转化及胶乳 cDNA 文库的筛选

1.5.1 酵母细胞的分步转化

按酵母双杂交试验系统的要求, 采用分步转化的方法转化酵母细胞 YRG-2。先用诱饵质粒 pBD-GAL-REF 转化 YRG-2, 挑选在 SD/Trp⁻平板上生长的阳性克隆进行培养, 并制备成感受态酵母细胞; 然后, 用醋酸锂法将 pAD-GAL4-2.1 重组质粒再转化到已制备好的感受态酵母细胞中, 将细胞悬浮液涂布在 40 个 SD/Trp⁻/Leu⁻/His⁻营养缺陷型选择培养基上, 每平板涂布细胞悬浮液 250 μ L, 室温下待菌液充分吸收后, 倒置于 30℃ 恒温培养箱中孵育 10~15 d 长出克隆, 即 His⁺ 克隆。

1.5.2 阳性克隆的 β -半乳糖苷酶活性检测

对生长在 SD/Trp⁻/Leu⁻/His⁻营养缺陷型选择培

养基上的 His⁺ 克隆进行 β -半乳糖苷酶活性检测, 步骤与诱饵表达载体的自激活检测方法相同, 室温下在 3~8 h 内使 X-gal 变蓝的菌落则为阳性克隆, 即 lacZ⁺ 克隆。再次挑选使 X-gal 变蓝的克隆在 SD/Trp⁻/Leu⁻/His⁻平板上划线, 30℃ 恒温箱倒置培养 3~5 d, 重复上述筛选过程, 能使 X-gal 变蓝的菌落即为 His⁺/lacZ⁺ 阳性克隆。

1.6 酵母转化子中重组质粒的提取及其大肠杆菌的转化

1.6.1 酵母转化子中重组质粒的提取

将 His⁺/lacZ⁺ 阳性克隆在 YPAD 培养基中于 30℃ 恒温下培养 3 d, 直到 OD₆₀₀ $\geq$ 1.0, 用酵母质粒提取试剂盒提取重组质粒, 其中包括诱饵质粒 pBD-GAL-REF 和含有胶乳 cDNA 插入片断的靶质粒 pAD-GAL4-2.1。

1.6.2 酵母重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α

按常规方法将酵母重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于 LB-Amp⁺ 平板上, 倒置于 37℃ 恒温箱培养 18 h, 提取靶质粒 pAD-GAL4-2.1, 并进行酶切及电泳鉴定。

1.7 阳性克隆质粒插入 cDNA 片断的测序及生物信息学分析

挑取在 LB-Amp⁺ 平板上生长的 DH5 α 阳性克隆, 置于含 Amp 的 LB Broth 中, 在 37℃ 下 300 r min⁻¹ 培养细菌 8~12 h 扩增重组质粒, 提取质粒, 并用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对质粒进行双酶切鉴定, 电泳检测插入 cDNA 片断的大小。将含有 cDNA 插入片断的重组质粒 pAD-GAL4-2.1 进行测序, 引物为质粒上的 3'AD 和 5'AD 序列。将测序结果进行 BLASTX 比对分析, 确定目的基因所编码的靶蛋白及其生物学功能。

2 结果和分析

2.1 橡胶树 REF 诱饵蛋白表达载体的构建

以橡胶树胶乳的 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增获得长度约 400 bp 的橡胶粒子膜蛋白基因 *REF* 的 cDNA 片段(图 1A), 其中上下游引物分别位于 *REF* 开放阅读框的两侧。*REF* 的 ORF 的长度为 417 bp, 设计引物时去除了其中的起始密码子 ATG, 因此, 用作诱饵时, *REF* 的 ORF 实际长度为 414 bp。将扩增产物定向克隆至 pBD-GAL-Cam 表达载体上, 所得重组质粒命名为 pBD-GAL-REF。

质粒经 *Sal* I 和 *Eco*R I 双酶切的结果表明,插入片段 cDNA 长度与 RT-PCR 扩增产物大小相符(图 1B),最后通过测序确定重组质粒中插入 cDNA 片段的方向及其碱基序列正确。

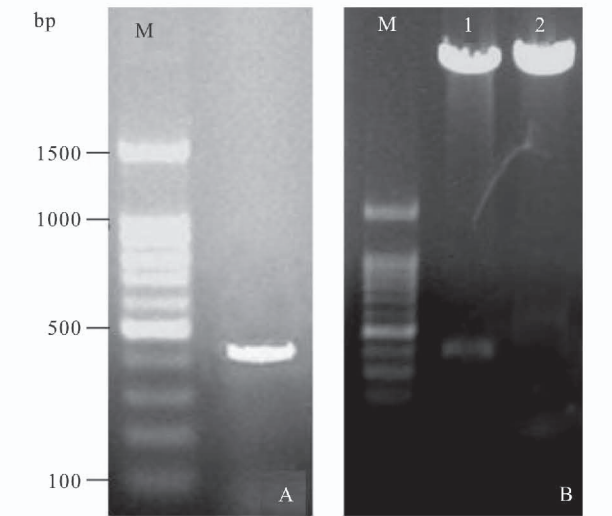


图 1 橡胶树 *REF* 基因 ORF 的克隆(A)及诱饵表达载体的酶切鉴定(B)。1. 双酶切鉴定; 2. 未经酶切; M. 100 bp DNA marker。
Fig. 1 Cloning of *REF* ORF of *Hevea* and identification of *REF* bait expression vector. 1. Digestion by two enzymes; 2. Without enzyme digestion; M. 100 bp DNA marker.

2.2 诱饵蛋白 pBD-GAL4-REF 毒性及自激活活性检测

所用酵母菌株为 YRG-2,该菌株能在 *Ura*⁻/SD 平板上生长,而在 *Trp*⁻/SD、*His*⁻/SD 和 *Leu*⁻/SD 3 种营养缺陷平板上不能生长。将 pBD-GAL4-REF 诱饵质粒和 pGAL4 质粒(阳性对照)分别转化感受态酵母细胞 YRG-2,并涂布在 *Trp*⁻/SD 固体平板上培养。pBD-GAL4-REF 转化子和阳性对照均能在 *Trp*⁻/SD 平板上正常生长,表明诱饵蛋白 REF 对酵母细胞 YRG-2 没有毒性。

随机挑取在 *Trp*⁻/SD 平板上生长的 pBD-GAL4-REF 转化子,分别划线于 *Trp*⁻/SD、*Leu*⁻/SD、*His*⁻/SD 和 *Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻/SD 平板上,在 30℃ 培养 3 d 后,在 *Leu*⁻/SD、*His*⁻/SD 和 *Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻/SD 平板上均无转化菌的生长,而在 *Trp*⁻/SD 平板上出现许多生长良好的酵母克隆(图 2A)。经 β-半乳糖苷酶活性检测表明,pBD-GAL4-REF 和阴性对照 pBD-WT 转化子印迹在含 X-gal 的 whatman 滤纸上的菌落没有颜色反应,而阳性对照 pGAL4 的转化子菌落则变为蓝色(图 2B),这表明 pBD-GAL4-REF 诱饵质粒不能激活 *His*-3 和 β-半乳糖苷酶基

因的表达,无自激活活性。

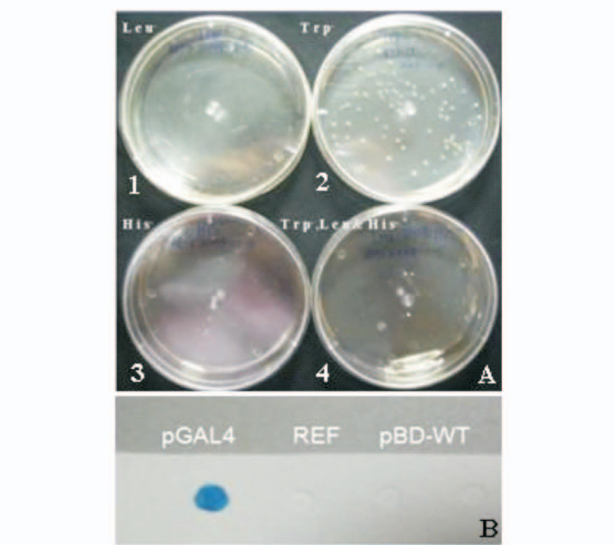


图 2 诱饵表达载体 pBD-GAL4-REF 的自激活活性分析。A. 在不同培养基上的生长; B. 转化子的 β-半乳糖苷酶活性检测; 1. *Leu*⁻/SD; 2. *Trp*⁻/SD; 3. *His*⁻/SD; 4. *Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻/SD。
Fig. 2 Auto-activation analysis of pBD-GAL4-REF. A. Grow on different mediums; B. β-galactosidase activity detection of the transformants; 1. *Leu*⁻/SD; 2. *Trp*⁻/SD; 3. *His*⁻/SD; 4. *Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻/SD.

2.3 橡胶树胶乳 cDNA 文库的构建与质量分析

橡胶树胶乳 cDNA 文库由本课题组构建,原始文库为噬菌体文库,经测定其滴度为 1.9×10^6 pfu mL⁻¹,重组率为 98.5%,cDNA 插入片段大小为 750 ~ 2000 bp。经扩增后,次级文库滴度为 5.4×10^9 pfu mL⁻¹,比原始文库扩增了 2.8×10^3 倍。

2.4 噬菌体文库的体内切割及其质粒文库的转化

在辅助噬菌体的作用下,HybriZAP-2.1 重组噬菌体在 XL1-Blue MRF' 细胞中可进行质粒的自动体内切割,形成含 pAD-GAL4-2.1 重组质粒的噬菌粒,滴度为约 3.9×10^8 pfu mL⁻¹。将切割后形成的噬菌粒转染 *E. coli* XL0LR,形成 pAD-GAL4-2.1 重组质粒文库(图 3A,B),用电泳检测重组质粒 pAD-GAL4-2.1 的大小(图 3C)。

2.5 酵母转化以及含 REF 互作蛋白的阳性克隆的筛选

将橡胶树胶乳 cDNA 文库质粒 pAD-GAL4-2.1 转化到带有诱饵表达质粒 pBD-GAL4-REF 的酵母感受态细胞中,涂布于 SD/*Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻ 营养缺陷型选择培养基上,当白色克隆的菌落直径达 2 mm 左右时,把它们接种于新的 SD/*Trp*⁻/*Leu*⁻/*His*⁻ 培养

基上,然后,对所有酵母转化子进行 β -半乳糖苷酶活性检测,根据颜色反应,共筛选到 12 个菌落呈蓝色反应的阳性克隆(图 4)。这 12 个阳性克隆质粒

(靶质粒)插入的 cDNA 片段所对应基因的编码蛋白与诱饵蛋白 REF 之间可能具有相互作用。

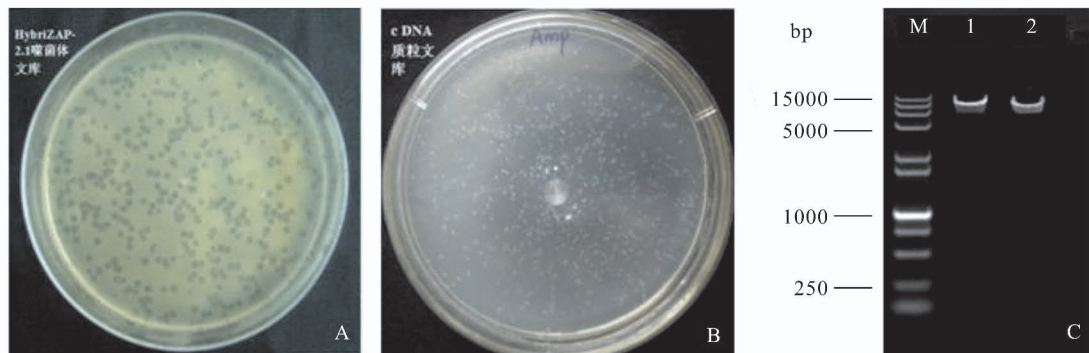


图 3 HybriZAP-2.1 噬菌体文库(A)切割转化为 pAD-GAL4-2.1 质粒文库(B)及其电泳检测(C)。1,2. 转化子质粒; M. 100 bp DNA marker。
Fig. 3 Electrophoresis detection (C) of pAD-GAL4-2.1 plasmid library (B) transformed from HybriZAP-2.1 phage library (A). 1,2. Plasmids from two transformants; M. 100 bp DNA marker.

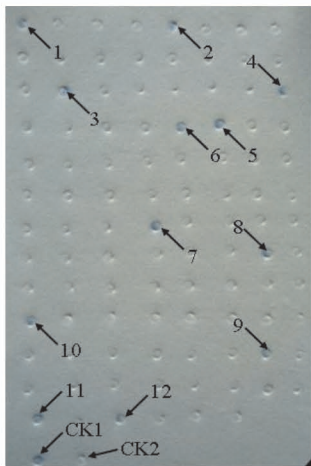


图 4 酵母转化子菌落的蓝白斑筛选实验。1~12. 蓝色反应的酵母转化子菌落; CK1. 转化 pGAL4 质粒的阳性对照; CK2. 转化 pBD-GAL4-REF 的阴性对照。
Fig. 4 Screening of the transformants through blue-white detection. 1-12. The transformants showing blue color; CK1. Positive control with pGAL4; CK2. Negative control with pBD-GAL4-REF.

2.6 重组质粒测序及同源性比对分析

所有靶质粒 pAD-GAL4-2.1 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定含有插入片段后,分别进行测序,并将序列在 GenBank 数据库中进行 BLASTX 同源性比对分析。共鉴定出 5 种可能与 REF 具有相互作用的胶乳蛋白质,它们相应基因的 cDNA 序列已登录 GenBank,登录号为 HQ640230~HQ640234,其中 3 种 REF 互作蛋白的基因序列与橡胶树的已知基因 REF、SRPP 和 TCTP (GenBank 登录号分别为

AY430052、AF051317 和 AF091455)高度同源,其余 2 种与蓖麻的激发子响应蛋白基因和泛素耦联酶基因(GenBank 登录号分别为 XM_002509707 和 GQ455410)高度同源(表 1)。

3 讨论

橡胶延长因子 REF 是橡胶粒子的主要蛋白组分,它与橡胶分子的比例为 1:1,是橡胶生物合成的关键蛋白因子之一^[5,18]。高产橡胶树 REF 的表达明显高于低产橡胶树,割胶产生的机械伤害和乙烯利诱导均可显著提高 REF 的表达^[10],这表明 REF 不仅参与催化橡胶生物合成,而且还与橡胶树的橡胶产量密切相关。目前,对 REF 在橡胶生物合成中发生作用的分子机制仍然不完全清楚。本研究利用酵母双杂交系统获得了 5 种可能与 REF 发生相互作用的蛋白,它们可分为 2 类,一类是与橡胶生物合成密切相关的蛋白质,包括 REF 和 SRPP;另一类为其它功能蛋白质,包括 TCTP、激发子响应蛋白和泛素耦联酶 E2,这些蛋白质与 REF 之间的相互作用,不仅有助于进一步揭示橡胶生物合成的分子机理,而且将为橡胶粒子生物学功能的研究奠定一定基础。

橡胶树的 REF 属于多基因家族,本研究表明,不同成员 REF 之间可能存在相互作用,并且可能形成同源二聚体或多聚体从而行使生物学功能。除了同一基因家族的 REF 之间可能发生蛋白互作外,另一个与 REF 可能发生相互作用并参与橡胶生物

表 1 橡胶延长因子 REF 互作蛋白的同源蛋白

Table 1 Homologous proteins interacted with REF of rubber tree

同源蛋白 Homologous protein	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 Homology (%)	比对物种 Alignment species
橡胶延长因子 Rubber elongation factor (REF)	AY430052	100	橡胶树 <i>H. brasiliensis</i>
小橡胶粒子蛋白 Small rubber particle protein (SRPP)	AF051317	100	橡胶树 <i>H. brasiliensis</i>
翻译控制肿瘤蛋白 Translationally controlled tumor protein (TCTP)	AF091455	98	橡胶树 <i>H. brasiliensis</i>
激发子响应蛋白 Elicitor-responsive protein	XM_002509707	85	蓖麻 <i>R. communis</i>
泛素耦联酶 Ubiquitin-conjugating enzyme E2	GQ455410	94	蓖麻 <i>R. communis</i>

合成的蛋白质是小橡胶粒子蛋白(SRPP)。SRPP、REF 和橡胶转移酶是橡胶生物合成中的 3 种主要橡胶粒子膜蛋白。SRPP 由单基因编码,与 REF 具有高度同源性^[7],小橡胶粒子 SRPP 的表达量明显大于大橡胶粒子^[19]。SRPP 在橡胶生物合成中的作用还不十分清楚,它可能与 REF 具有相似的催化橡胶分子聚合的作用,也可能具有橡胶转移酶的功能^[20],从而与 REF 一起共同催化橡胶生物合成。

TCTP、激发子响应蛋白和泛素耦联酶 E2 是通过酵母双杂交筛选到的可能与 REF 具有相互作用的另一类功能蛋白质。TCTP 广泛存在于动植物细胞^[21],在动物和人体细胞中具有抗凋亡和免疫调节等重要的生物学功能^[22-23],然而,对 TCTP 在植物细胞中的作用还知之甚少^[24]。橡胶树 TCTP 基因在叶片、胶乳和树皮组织中均有表达,而且乙烯刺激可提高它在胶乳中的表达水平^[25]。因此,TCTP 在乳管细胞中可能作为一种信号分子参与乙烯对胶乳代谢的调控作用。此外,过度割胶和乙烯刺激会导致橡胶树死皮的发生,出现橡胶树乳管细胞的坏死和胶乳的停排。有研究表明橡胶树死皮可能是由于乳管细胞的凋亡引起的^[26]。TCTP 与橡胶树乳管细胞的凋亡和死皮病之间的关系值得进一步研究。目前,在橡胶树中有关激发子响应蛋白和泛素耦联酶 E2 等研究还鲜见报道。激发子响应蛋白是一类含 CalB (protein kinase C conserved region 2)结构域的蛋白质,与植物体对病原体的防御反应以及茉莉酸信号分子的产生有关^[27-28],而茉莉酸已被证明是诱导橡胶树乳管细胞分化和促进橡胶生物合成的重要调控因子^[11,29],因此,橡胶树乳管细胞激发子信号转导可能对橡胶树产胶及其调控过程产生重要的影响。泛素耦联酶 E2 是蛋白质泛素化修饰复合体的组份之一^[30],它与 REF 之间的相互作用是否会引起 REF 结构的修饰从而影

响橡胶生物合成目前还不清楚。

橡胶延长因子 REF 之间以及与 SRPP、TCTP、激发子响应蛋白和泛素耦联酶 E2 等多种功能蛋白质可能具有相互作用,这为揭示橡胶生物合成的分子机理和胶乳凝固机制提供了一定的线索。然而,REF 与这些蛋白质互作发生的方式及其生理功能尚有待于进一步的验证和研究。

参考文献

[1] Southorn W A. Complex particles in *Hevea* latex [J]. Nature, 1960, 188(4745): 165-166.

[2] Dickenson P B. Electron microscopic studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis* [J]. J Rub Res Inst Malaya, 1969, 21(4): 543-559.

[3] Kush A. Isoprenoid biosynthesis: The *Hevea* factory [J]. Plant Physiol Biochem, 1994, 32(6): 761-767.

[4] Ohya N, Koyama T. Biosynthesis of natural rubber and other natural polyisoprenoids [M]// Koyama T, Steinbuechel A. Biopolymers Volume 2: Polyisoprenoids. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2001: 73-81.

[5] Dennis M S, Light D R. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization and role in rubber biosynthesis [J]. J Biol Chem, 1989, 264(31): 18608-18617.

[6] Comish K. The separate roles of plant *cis*- and *trans*-prenyl transferases in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis [J]. Eur J Biochem, 1993, 218(1): 267-271.

[7] Oh S K, Kang H, Shin D H, et al. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis* [J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 17132-17138.

[8] Duan C F(段翠芳), Nie Z Y(聂智毅), Zeng R Z(曾日中). Establishment of 2-DE system and primary analysis on the membrane proteins of rubber particles in *Hevea brasiliensis* by MALDI-TOF [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2006, 27(3): 22-29.(in Chinese)

[9] Chen S C(陈守才), Shao H S(邵寒霜), Hu D Q(胡东琼), et al. The relationship between the rubber transferase activity and the rubber-producing ability of rubber tree [J]. Chin J Trop Crops

- (热带作物学报), 1994, 15(3): 1–6.(in Chinese)
- [10] Priya P, Venkatachalam P, Thulaseedharan A. Differential expression pattern of rubber elongation factor (REF) mRNA transcripts from high and low yielding clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26(10): 1833–1838.
 - [11] Zeng R Z, Duan C F, Li X Y, et al. Vacuolar-type inorganic pyrophosphatase located on the rubber particle in the latex is an essential enzyme in regulation of the rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Sci, 2009, 176(5): 602–607.
 - [12] Kim I J, Ryu S B, Kwak Y S, et al. A novel cDNA from *Parthenium argentatum* Gray enhances the rubber biosynthetic *in vitro* [J]. J Exp Bot, 2004, 55(396): 377–385.
 - [13] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction [J]. Nature, 1989, 340(20): 245–246.
 - [14] Chien C T, Bartel P L, Sternglanz R, et al. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9578–9582.
 - [15] Miller J, Staglar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins [J]. Methods Mol Biol, 2004, 261: 247–262.
 - [16] Deng Z(邓治), Zhang Y X(张云霞), Chen C L(陈春柳), et al. Screening of the protein interaction with HbMyb1 using yeast two-hybrid system [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2007, 43(6): 1031–1034.(in Chinese)
 - [17] Zeng R Z(曾日中), Duan C F(段翠芳), Li Y(黎瑜), et al. Construction of the SSH library of latex cDNA and sequence analysis of JA-stimulated rubber tree [J]. Chin J Trop Crop(热带作物学报), 2003, 24(3): 1–6.(in Chinese)
 - [18] Dennis M S, Henzel W J, Bell J, et al. Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea latex* [J]. J Biol Chem, 1989, 264(31): 18618–18628.
 - [19] Wu K X(吴坤鑫), Wang Z(王震), Yao M P(姚茂平), et al. Comparative study of electrophoretic patterns of rubber particles from different clones of *Hevea brasiliensis* [J]. Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2008, 36(36): 15785–15787, 15803.(in Chinese)
 - [20] Ohya N, Tanaka Y, Wititsuwannakul R, et al. Activity of rubber transferase and rubber particle size in *Hevea latex* [J]. J Rubber Res, 2000, 3(4): 214–221.
 - [21] Sturzenbaum S R, Kille P, Morgan A J. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1398(3): 294–304.
 - [22] Yarn F R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(17): 6209–6221.
 - [23] Mak C H, Poon M W, Lun H M, et al. Heat-inducible translationally controlled tumor protein of *Trichinella pseudospiridis*: Cloning and regulation of gene expression [J]. Parasitol Res, 2007, 100(5): 1105–1111.
 - [24] Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, et al. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2008, 20(12): 3430–3447.
 - [25] Liang X L(梁小莲), Li H L(李辉亮), Peng S Q(彭世清). Cloning and expression of HbTCTP from *Hevea brasiliensis* [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2009, 7(1): 188–193.(in Chinese)
 - [26] Chen S, Peng S, Huang G, et al. Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Mol Biol, 2002, 51(1): 51–58.
 - [27] Benschop J J, Mohamme S, O'Flaherty M, et al. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. Mol Cell Proteome, 2007, 6(7): 1198–1214.
 - [28] Xu M J(徐茂军), Dong J F(董菊芳), Zhu M Y(朱睦元). Stimulatory effects of NO-mediated fungal elicitors through SA- or JA-signaling on the puerarin biosynthesis in the suspension cells of root of kudzu vine [J]. Sci China Ser C: Life Sci(中国科学 C 辑: 生命科学), 2006, 36(1): 66–75.(in Chinese)
 - [29] Hao B Z, Wu J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. Ann Bot, 2000, 85(1): 37–43.
 - [30] Bader M, Steller H. Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system [J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(6): 878–884.