

水稻 OsZFP 互作蛋白的筛选与鉴定

郑秀文¹, 崔鹏¹, 石嘉伟¹, 杨静静¹, 陈敏敏², 郑瑶², 许玲², 刘宏波¹

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江理工大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: CCHC 型锌指结构蛋白 OsZFP 参与调控水稻 *Oryza sativa* 侧根的生长发育, 但其相关互作蛋白及调控机制未知。以水稻 ‘日本晴’ ‘Nipponbare’ 为试验材料, 克隆了 *OsZFP* 基因, 利用 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点构建酵母双杂交诱饵表达载体 pGBKT7+*OsZFP*, 验证该表达载体对酵母菌株 Y2H 无毒性及报告基因自激活现象; 采用酵母双杂交技术, 从已构建的水稻 cDNA 文库中筛选到 1 个阳性互作蛋白, 经美国国家生物技术信息中心数据库 (NCBI) 同源性比对, 鉴定为含有 T-complex polypeptide 1 (TCP-1) 结构域 of 的分子伴侣蛋白第 7 个亚基 (Os06g0687700), 命名为 chaperonin containing TCP-1 eta subunit (CCT-eta), 进而通过酵母一对一回复验证该互作蛋白。基于 CCT-eta 亚基与 OsZFP 蛋白互作, 推测分子伴侣蛋白亚基 CCT-eta 可能参与调控水稻侧根的生长发育。图 4 参 19

关键词: 植物学; 水稻; 调控蛋白; 载体构建; 酵母双杂交; 蛋白互作

中图分类号: S511; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2017)06-1024-05

Screening and identification of a protein for controlling lateral root development in *Oryza sativa*

ZHENG Xiuwen¹, CUI Peng¹, SHI Jiawei¹, YANG Jingjing¹, CHEN Minmin²,
ZHENG Yao², XU Ling², LIU Hongbo¹

(1. School of Agricultural and Food Sciences, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;
2. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract: OsZFP, a CCHC-type zinc finger protein, has reportedly participated in lateral root development in rice. To determine the molecular mechanism and its interacting proteins in a regulated network, the *OsZFP* gene from *Oryza sativa*. ‘Nipponbare’ was cloned, and then a yeast bait vector, pGBKT7 + *OsZFP*, was constructed by *EcoRI* and *SalI* for cDNA library screening of rice. Results showed no toxicity or autoactivation with transformation of the Y2H strain containing the pGBKT7 + *OsZFP* bait vector. In a yeast two-hybrid assay, a positive interacted protein was obtained and confirmed from the cDNA library. Sequencing and homologous alignment from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) showed that the interacting protein (named chaperonin containing a T-complex polypeptide 1 (TCP-1) eta subunit, CCT-eta) was the eta subunit of the chaperone which contained a TCP-1 domain. Based on the interaction between OsZFP and the CCT-eta subunit, it was speculated that the CCT-eta subunit of the chaperone protein may be involved in controlling lateral root development in rice. [Ch, 4 fig. 19 ref.]

Key words: botany; *Oryza sativa*; regulated protein; vector construction; yeast two-hybrid; protein interaction

收稿日期: 2016-10-30; 修回日期: 2016-12-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31301272); 浙江农林大学人才启动基金资助项目(2013FR022); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510341001); 浙江省高校生物学重中之重(一级)学科开放基金资助项目(2015D19)

作者简介: 郑秀文, 从事水稻根系发育基因功能研究。E-mail: 1327158979@qq.com。通信作者: 刘宏波, 副教授, 博士, 从事作物水稻根系发育与逆境相关基因功能研究。E-mail: hbliu@zafu.edu.cn

水稻 *Oryza sativa* 是世界上重要的禾本科 Gramineae 粮食作物之一。据估计，到 2030 年，禾本科作物的产量至少需要提高 40% 才能满足人口增长所带来的粮食需求^[1]。生长发育良好的水稻根系不仅使植株适应不利的生长环境，而且还能提高植株对水分和营养的利用率^[2]，从而保证结实率和产量。水稻的种子根只在植株发育初期起作用，随后的整个生育期主要通过发育更为完善和发达的侧根和冠根维持生长发育。因此，发掘和鉴定调控水稻侧根和根冠生长发育的蛋白对水稻根系遗传发育及分子调控机制研究显得尤为重要。目前，在水稻根系发育研究中已获得了一些突变体表型及其调控侧根和冠根发育的关键基因，这些基因的功能缺失突变能特异地影响根系的生长发育和形态建成^[3-5]。水稻侧根通过中柱鞘和内皮层细胞不断分裂而形成^[6]。已有研究表明：真核生物中含锌指结构域蛋白能特异结合 DNA，RNA 和蛋白质，从而参与调控真核生物细胞的发育和凋亡过程及相关信号传导途径^[7-8]。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* C1-1i 亚族中 GIS，GIS2，ZFP8 和 ZFP5 蛋白受赤霉素和细胞分裂素诱导，参与调控表皮毛的生长发育及相关信号传导途径^[9-12]；而 C1-2i 亚族中的 *Zat6* 被证实参与调控种子根的生长发育和磷酸盐的吸收^[13]。最近，水稻中已鉴定出 189 个含 C₂H₂ 型锌指结构蛋白，其中至少 26 个蛋白响应不同的生物胁迫和非生物胁迫^[14]。这些研究结果预示着含锌指结构域的蛋白在水稻生长发育过程中起着重要的调节作用。在前期研究中，我们已鉴定到 1 个水稻调控侧根生长发育的 C₂HC 型锌指结构蛋白。本研究拟利用酵母双杂交技术筛选鉴定与该蛋白互作的调控蛋白，以期水稻根系生长发育分子机制的解析奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 钓饵表达载体构建

根据酵母表达载体 pGBKT7 多克隆位点及水稻锌指结构蛋白基因 (*OsZFP*) 表达序列设计引物，正向：5'-CGGAATTCATGGCAAGGGAACCAAGTCC-3' (下划线为 *EcoRI* 酶切位点)，反向：5'-ACGCGTCGACCTAAAATGCCTGGCTCCTAA-3' (下划线为 *SalI* 酶切位点)。以本实验室保存的水稻品种 ‘日本晴’ ‘Nipponbare’ 幼苗为试验材料，对幼苗 cDNA 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增，反应体系和扩增程序参照文献^[15]稍作修改。目的基因经双酶切回收后连接至酵母表达载体 pGBKT7 并转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α ，重组酵母表达载体 pGBKT7+*OsZFP* 双酶切验证后进行单克隆测序。

1.2 钓饵载体毒性和自激活分析

按 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 小量法转化酵母表达载体 pGBKT7 和酵母钓饵表达载体 pGBKT7+*OsZFP* 至 50 μ L 酵母菌株 Y2H 感受态细胞，分别稀释转化菌液至 1/10 和 1/100，取 100 μ L 酵母表达载体 pGBKT7 转化液涂布于 SD/-Trp；同时，取 100 μ L 酵母钓饵表达载体 pGBKT7+*OsZFP* 转化液涂布于 SD/-Trp (SDO)，SD/-Trp/X- α -Gal (SDO/X) 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA (SDO/X/A) 固体培养基，30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d，对比 pGBKT7 和 pGBKT7+*OsCYP2* 两者转化后酵母单克隆大小，观察统计结果，检测钓饵载体是否对酵母菌株有毒性及是否对报告基因存在自激活现象。

1.3 cDNA 文库筛选

按 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 共转化水稻幼苗 cDNA 文库和酵母钓饵表达载体 pGBKT7+*OsZFP* 至 600 μ L 酵母菌株 Y2H 感受态细胞，所有转化菌液全部涂布于 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A) 固体培养基，30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d，挑选蓝色单克隆接种至 SD/-Leu/-Trp/-His/Ade/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A) 固体培养基，30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d，将蓝色克隆菌株划线至 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal (DDO/X) 固体培养基，重复 2~3 次，分离阳性互作蛋白。

1.4 互作蛋白的分离和回复验证

挑取上述 DDO/X 固体培养基中分离出来的蓝色单克隆，用酵母质粒提取试剂盒 (easy yeast plasmid isolation kit) 提取钓饵与互作蛋白表达质粒，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，挑选单克隆提取质粒，送生物公司测序。将分离的互作蛋白表达质粒，与 pGBKT7 或 pGBKT7+*OsZFP* 分别共转化酵母菌株 Y2H，取 100 μ L 转化菌液涂布于 DDO/X 和 QDO/X/A 固体培养基中，30 $^{\circ}$ C 培养 3 d，回复验证阳性互作蛋白。

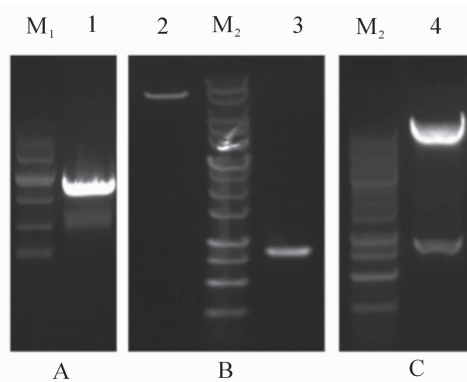
2 结果与分析

2.1 含 *OsZFP* 基因的钓饵载体获得

PCR 扩增 *OsZFP* 基因获得大小为 828 bp 的目的片段(图 1A), 与预期条带相符; 利用 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点酶切酵母表达载体 pGBKT7 及目的基因 *OsZFP*(图 1B), T4 连接酶连接后转化大肠埃希菌 DH5 α , 提取重组表达载体后进行双酶切验证(图 1C), 阳性克隆送生物公司测序验证。

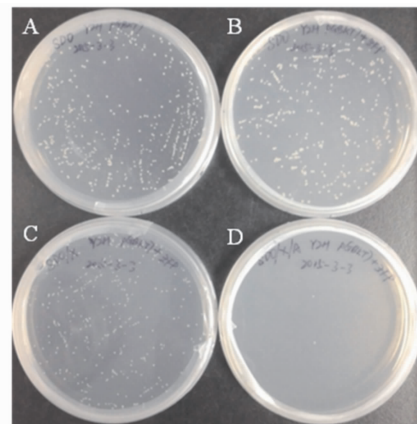
2.2 钓饵表达载体毒性及自激活分析

酵母表达载体 pGBKT7 和钓饵载体 pGBKT7+*OsZFP* 转化酵母菌株 Y2H 感受态细胞, 分别涂布于 SDO, SDO/X 和 SDO/X/A 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。结果显示: SDO 培养基中, 含有 pGBKT7 与 pGBKT7+*OsZFP* 载体的酵母菌株单克隆大小相近(图 2A 和 2B), 表明含有 *OsZFP* 基因的钓饵表达载体对酵母菌株的生长没有毒性作用; 同时, 含有 pGBKT7+*OsZFP* 载体的酵母菌株在 SDO/X 固体培养基中呈白色(图 2C), 且在 SDO/X/A 固体培养基中不能生长(图 2D), 表明 pGBKT7+*OsZFP* 载体在酵母菌株 Y2H 中无自激活现象, 适合互作蛋白的文库筛选。



1. *OsZFP* 基因 PCR 扩增; 2. 酵母表达载体 pGBKT7 双酶切; 3. 目的基因 *OsZFP* 双酶切; 4. 重组酵母表达载体双酶切验证; M₁. DNA 分子量标准 100~2 000 bp; M₂. DNA 分子量标准 500~15 000 bp

图 1 含 *OsZFP* 基因的酵母表达载体构建
Figure 1 Construction of bait vector which containing *OsZFP*



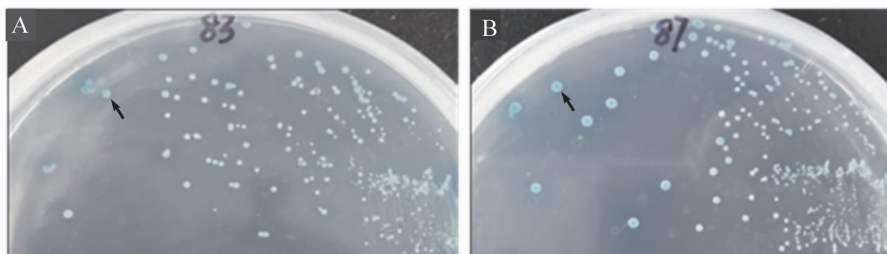
A. pGBKT7 转化酵母菌株 Y2H 后在 SDO 培养基中生长情况; B, C, D. pGBKT7+*OsZFP* 转化酵母菌株 Y2H 后分别在 SDO, SDO/X 和 SDO/X/A 培养基中生长情况

图 2 *OsZFP* 基因对酵母菌株 Y2H 的毒性及自激活验证

Figure 2 Testing bait vector which contained *OsZFP* for toxicity and autoactivation

2.3 互作蛋白的筛选与分离

将 pGBKT7+*OsZFP* 载体与水稻 cDNA 文库共转化酵母菌株 Y2H 感受态细胞, 涂布于 DDO/X/A 固体培养基进行筛选; 挑选候选阳性单克隆进一步接种至 QDO/X/A 固体培养基进行筛选。将候选阳性单克隆(83 号和 87 号)转接至 DDO/X 固体培养基 2~3 次, 筛选分离出蓝色(箭头所示)阳性单克隆(图 3)。



箭头所示为筛选出的阳性单克隆

图 3 候选互作蛋白(83 号和 87 号)在 DDO/X 固体培养基中的筛选
Figure 3 Segregation of candidate positive interactors (blue) from non-interactors (white)

2.4 互作蛋白的分离和回复验证

利用酵母质粒提取试剂盒提取 DDO/X 固体培养基中蓝色单克隆表达质粒。将分离互作蛋白表达载体 pGADT7+83(AD-83)和 pGADT7+87(AD-87)分别与 pGBKT7(BD)或 pGBKT7+OsZFP(BD-ZFP)共转化酵母菌株 Y2H, 涂布于 DDO/X 和 QDO/X/A 固体培养基进行筛选。结果显示, BD-ZFP/AD-83 和 87 以及 BD/AD-83 和 87 共转化后, 酵母 Y2H 均能在 DDO/X 固体培养基中生长; 但是只有 BD-ZFP/AD-87 共转化后酵母 Y2H 能在 QDO/X/A 固体培养基中生长且呈蓝色(图 4), 表明 87 号筛选蛋白可能为阳性互作蛋白。进一步对 87 号互作蛋白的文库表达载体进行测序和同源性比对, 鉴定为含有 T-complex polypeptide 1(TCP-1)结构域分子伴侣蛋白第 7 个亚基(LOC4341893), 命名为 chaperonin containing TCP-1 eta subunit(CCT-eta); 该基因 mRNA 全长为 2 123 bp, 编码 560 个氨基酸。

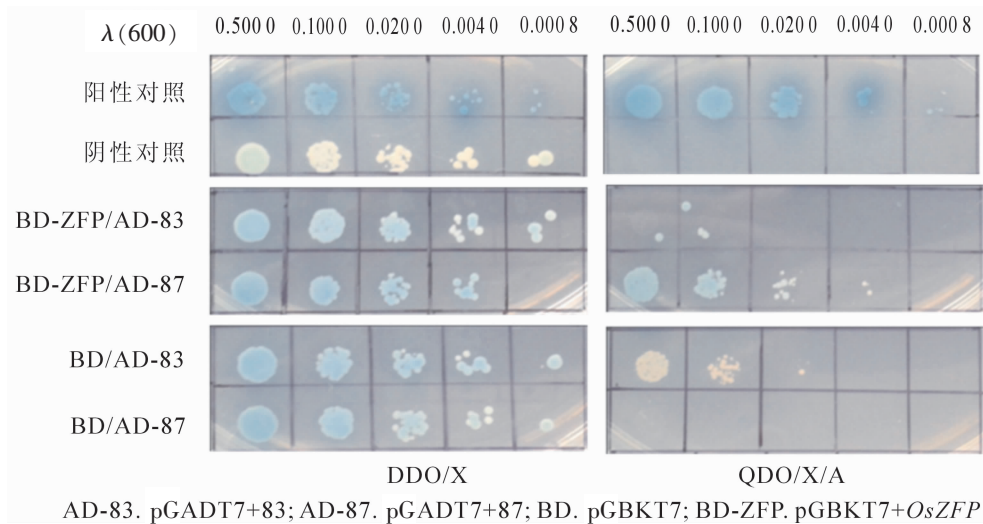


图 4 酵母双杂交回复验证

Figure 4 Confirmation of positive interaction by yeast two-hybrid

3 讨论

锌指结构蛋白是一类含有指状结构域的基因表达调控蛋白, 依据蛋白结构中半胱氨酸和组氨酸残基的数目和顺序可以将锌指结构分为 C_2H_2 , C_2HC 和 C_2C_2 等类型。在真核生物中, C_2H_2 型锌指结构蛋白的类型最多, 研究也较为深入。水稻基因组中存在 189 个编码含有 QALGGH 保守结构域的 C_2H_2 型锌指结构转录因子, 其中有 18 个基因是调控水稻穗发育, 12 个是种子特异表达基因^[16]; 另外, 含有 C_2H_2 型锌指结构的水稻蛋白 ZFP36 被证实参与脱落酸诱导的抗氧化防御机制^[17]。这些结果都表明: 锌指结构蛋白广泛参与调控水稻的生长发育及生理生化途径。

本研究以调控水稻侧根生长发育的 CCHC 型锌指结构蛋白为诱饵, 通过酵母双杂交技术从水稻 cDNA 文库中筛选获得 2 个互作蛋白; 酵母双杂交一对一回复验证显示 BD/AD-87 共转化酵母在 QDO 培养基中不能生长, 但 BD-ZFP/AD-87 能在 QDO 培养基中生长且呈蓝色(图 4), 表明 87 号蛋白为阳性互作蛋白。另外, BD/AD-83 在 QDO 培养基中呈白色, 但 BD-ZFP/AD-83 共转化酵母在 QDO 培养基上不能生长, 因此, 83 号筛选蛋白为假阳性。

含有 TCP-1 结构域分子伴侣蛋白已被证实在真核生物细胞中参与蛋白的折叠与复性^[18]。该蛋白至少由 8 个不同功能亚基组成, 各个亚基同源性仅为 30%; 同时, 各个蛋白亚基也含有相对保守的结构域, 可能与 ATP 酶活性相关^[19]。本研究筛选到的编码 CCT 蛋白的第 7 个亚基与 C_2HC 型锌指结构蛋白存在互作, 推测它可能参与锌指结构蛋白的折叠与形成, 从而调控水稻根系的生长发育, 其相关生物学功能需要通过反向遗传学进一步研究。

4 参考文献

- [1] KHUSH G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030 [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **59**(1): 1 – 6.
- [2] KING J, GAY A, SYLVESTER-BRADLEY R, *et al.* Modelling cereal root systems for water and nitrogen capture: towards an economic optimum [J]. *Annu Bot*, 2003, **91**(3): 383 – 390.
- [3] ZHAO Yu, HU Yongfeng, DAI Mingqiu, *et al.* The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice [J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(3): 736 – 748.
- [4] ZHU Zhenxing, LIU Yu, LIU Shaojun, *et al.* A gain-of-function mutation in *OsIAA11* affects lateral root development in rice [J]. *Mol Plant*, 2012, **5**(1): 154 – 161.
- [5] KANG Bo, ZHANG Zhongchen, WANG Lingling, *et al.* *OsCYP2*, a chaperone involved in degradation of auxin-responsive proteins, plays crucial roles in rice lateral root initiation [J]. *Plant J*, 2013, **74**(1): 86 – 97.
- [6] COUDERT Y, PÉRIN C, COURTOIS B, *et al.* Genetic control of root development in rice, the model cereal [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(4): 219 – 226.
- [7] LUCHI S. Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(4): 625 – 635.
- [8] CIFTCIYILMAZ S, MILLTER R. The zinc finger network of plants [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, **65**(7/8): 1150 – 1160.
- [9] GAN Yinbo, KUMIMOYO R, LIU Chang, *et al.* GLABROUS INFLORESCENCE STEMS modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(6): 1383 – 1395.
- [10] GAN Yinbo, LIU Chang, YU Hao, *et al.* Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate [J]. *Development*, 2007, **134**(11): 2073 – 2081.
- [11] ZHOU Zhongjing, AN Lijun, SUN Lili, *et al.* Zinc finger protein 5 is required for the control of trichome initiation by acting upstream of zinc finger protein 8 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2011, **157**(2): 673 – 682.
- [12] AN Lijun, ZHOU Zhongjing, SUN Lili, *et al.* A zinc finger protein gene ZFP5 integrates phytohormone signaling to control root hair development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, **72**(3): 474 – 490.
- [13] DEVAIAH B N, NAGARAJAN V K, RAGHOTHAMA K G. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6 [J]. *Plant Physiol*, 2007, **145**(1): 147 – 159.
- [14] AGARWAL P, ARORA R, RAY S, *et al.* Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(4): 467 – 485.
- [15] LIU Hongbo, GUO Xiang, NAEEM M S, *et al.* Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2011, **106**(1): 143 – 151.
- [16] AGARWAL P, ARORA R, RAY S, *et al.* Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(4): 467 – 485.
- [17] ZHANG Hong, LIU Yanpei, WEN Feng, *et al.* A novel rice C₂H₂-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice [J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(20): 5795 – 5809.
- [18] ZEBOL J R, HEWITT N M, MORETTI P A, *et al.* The CCT/TriC chaperonin is required for maturation of sphingosine kinase 1 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, **41**(4): 822 – 827.
- [19] KUBOTA B H, HYNES G, WILLISON K. The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1) multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol [J]. *Eur J Biochem*, 1995, **230**(1): 3 – 16.