

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.014

潘家强,侯学文. *OsRUS2.1* 酵母双杂交猎物载体的构建及其细胞毒性和自激活作用检测[J]. 广西植物,2013,33(1):76–81

Pan JQ,Hou XW. Construction of *OsRUS2.1* yeast two-hybrid prey vectors and detection of their toxicity and self-activated activity[J]. *Guihaia*,2013,33(1):76–81

OsRUS2.1 酵母双杂交猎物载体的构建及其细胞毒性和自激活作用检测

潘家强¹, 侯学文^{1,2*}

(1. 华南农业大学 生命科学学院 分子植物生理研究室, 广州 510642; 2. 华南农业大学 生命科学学院 植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州 510642)

摘要: 采用 PCR 技术扩增水稻根 UV-B 敏感基因 2.1(*ROOT UV-B SENSITIVE 2.1*, *RUS2.1*) 四个不同片段 [*OsRUS2.1*(1-1317), *OsRUS2.1*(1-138), *OsRUS2.1*(139-879), *OsRUS2.1*(880-1317)], 连接到 T 载体 pMD18-T-Simple 上, 测序无误后分别亚克隆到猎物表达载体 pGADT7 上。结果表明: 四个 *OsRUS2.1* 基因片段的表达载体构建成功, 读码框正确; 分别转化这四个猎物表达载体于酵母感受态细胞 Y187 中, 用 LacZ、MEL1 活性检测法和营养缺陷型培养基 SD-Leu-DO 培养法进行自激活检测和毒性检测, 结果表明构建的四个 *OsRUS2.1* 不同片段的猎物表达载体对酵母菌株 Y187 均没有转录激活活性和毒害作用, 可用于后续研究。

关键词: 水稻根对 UVB 敏感基因 2.1; 猎物载体; 酵母双杂交; 自激活; 毒性检测

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0076-06

Construction of *OsRUS 2.1* yeast two-hybrid prey vectors and detection of their toxicity and self-activated activity

PAN Jia-Qiang¹, HOU Xue-Wen^{1,2*}

(1. *Lab of Molecular Plant Physiology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*; 2. *Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract: Four fragments of rice (*Oryza sativa*) *ROOT UV-B SENSITIVE 2.1* (*OsRUS2.1*), *OsRUS2.1*(1-1317), *OsRUS2.1*(1-138), *OsRUS2.1*(139-879), *OsRUS2.1*(880-1317), were amplified by PCR from cloned *OsRUS2.1* plasmid, and were ligated with pMD18-T-simple vector, then transformed to *E. coli* TOP10 competent cell. The positive clones were selected and sequenced. The confirmed fragments were subcloned to prey vector pGADT7. The four constructed pGADT7 prey vectors were further confirmed by enzyme digestion and sequencing. The confirmed 4 types of pGADT7 prey vectors were transformed to Y187 yeast competent cells. The self-activation and toxicity of the plasmids to host yeast Y187 were detected by LacZ and MEL1 activity assays and culturing in auxotroph medium SD-Leu-DO. Results showed that the four constructed plasmids had no self-transcriptional activity and not toxicity to yeast strain Y187, and they could be used in the following yeast two-hybrid experiments.

* 收稿日期: 2012-08-23 修回日期: 2012-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(30971709)

作者简介: 潘家强(1985-), 男, 湖北十堰市人, 硕士研究生, 研究方向为植物功能基因组与分子生物学, (E-mail) pjq19851203@163.com。

* 通讯作者: 侯学文, 博士, 研究员, 研究方向为植物抗逆生理与分子生物学, (E-mail) hxw1969@scau.edu.cn。

Key words: rice ROOT UV-B SENSITIVE 2.1 (*OsRUS2.1*); prey vector; yeast two hybrid; self-activated transcriptional activity; toxicity detection

UV-B 是太阳辐射的组成部分,它能够穿过大气层到达地表,但到达地表的 UV-B 辐照强度与季节、云层厚度以及大气层臭氧含量有关。近几十年来,随着大气中臭氧含量逐渐下降导致到达地表的 UV-B 强度有增强的趋势(任健等,2005)。UV-B 对植物的生理效应根据 UV-B 辐射强度的不同具有明显的双重效应,即在强度较高时($>1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)就作为逆境因子对植物造成伤害;在较低强度下($<1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)却是一个信号调控因子参与植物的多种光形态建成(Frohnmeier & Staiger,2003)。Brown & Jenkins(2008)的研究表明,在拟南芥中存在 UVR8 依赖和 UVR8 非依赖的 UV-B 信号传导途径,近年来对 UVR8 依赖的 UV-B 信号传导途径研究取得了很大进展,相继发现这一途径中的几个成员(Brown *et al.*,2005; Gruber *et al.*,2010),特别是确认 UVR8 就是 UV-B 受体(Rizzini *et al.*,2011)及其感受 UV-B 的机理(Wu *et al.*,2012)。UVR8 非依赖的 UV-B 信号传导途径的研究进展较慢,对于这一途径涉及哪些基因,目前尚不清楚。

ROOT UV-B SENSITIVEs (*RUSs*) 是近年来在拟南芥中发现的与极低强度 UV-B 信号传导有关的基因(Tong *et al.*,2008),但它与目前已知的 UV-B 信号传导途径的关系目前在进一步研究中。*RUS* 的共同特点是具有一个功能未知的结构域 DUF647,采用酵母双杂交技术表明 *AtRUS1* 与 *AtRUS2* 能通过该结构域互作(Leasure *et al.*,2009)。在拟南芥研究的基础上,经生物信息学分析发现水稻基因组中也具有 6 个 *OsRUS* 基因。我们已用 *OsRUS1* 构建了酵母双杂交诱饵载体(潘家强等,2012),并从水稻 cDNA 文库中筛选到了一些互作基因,研究结果在进一步分析中。*OsRUS2.1* 开放阅读框(ORF)全长 1 317 bp,结构域 DUF647 位于 138~879 bp,为研究 *OsRUS2.1* 是否能与 *OsRUS1* 互作以及它们之间通过哪一个结构域互作,我们在已构建好的四个 *OsRUS1* 不同片段酵母双杂交诱饵载体的基础上,本文根据 *OsRUS2.1* 结构域 DUF647 的分布情况,构建了四个 *OsRUS2.1* 不同片段酵母双杂交猎物载体,并进行毒性及自激活检测,以便用于后续的酵母双杂交技术实验。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y187 菌株, pGADT7 质粒,阳性对照质粒 pGBKT7-53 和 pGADT7-T,阴性对照质粒 pGBKT7-Lam(美国 Clontech 公司),大肠杆菌 TOP10 菌株及已克隆的 *OsRUS2.1* 基因 pMD18-T-S-BamHI-*OsRUS2.1*cDNA-1317-HindIII 由本实验室保存;YNB 和蛋白胨(Difco 公司),SD-Leu-DO(美国 Clontech 公司),酵母提取物(OXOID 公司),DNA 限制性内切酶和 T4DNA 连接酶(TaKaRa 公司),KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶和 dNTPs(TOYOBO 公司),DS2000 Marker(东盛生物公司),DNA 胶回收试剂盒(普博欣生物公司),2X power Taq PCR Mix(Microanalysis 公司),X-β-gal(BBL 公司),X-α-gal(GOLDBIO 公司)。

本实验所用的引物名称及引物序列:

OsRUS2.1 cDNA-*EcoRI*-F: 5'-CGAATTCATGAACATACTCGAGAGGATAC -3';

OsRUS2.1 cDNA-*BamHI*-138-R: 5'-AGGATCCTTACAGAGACTCTGCCGGCGT-3';

OsRUS2.1 cDNA-*EcoRI*-139-F: 5'-GGAATTCAAAGTTATCCAAGATTCGAGAC -3';

OsRUS2.1 cDNA-*BamHI*-879-R: 5'-TGGATCCGAAACCTTTCCACTCTTGAT -3';

OsRUS2.1 cDNA-*EcoRI*-880-F: 5'-GGAATTCAGCCCAGCTGAGCTAAGATATCG -3';

OsRUS2.1 cDNA-*BamHI*-1317-R: 5'-CGGATCCTCATAAAGCACTACCGCTGA -3';

Matchmaker 5' AD LD-insert screening amplicon: 5'-CTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC -3';

Matchmaker 3' AD LD-insert screening amplicon: 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT -3'。

1.2 *OsRUS2.1* 全长及片段克隆

以本实验室已克隆并测序的 pMD18-T-S-BamHI-*OsRUS2.1*cDNA-1317-HindIII 为模板,

分别以 *OsRUS2.1cDNA-EcoRI-1-F/OsRUS2.1cDNA-BamHI-1317-R*, *OsRUS2.1cDNA-EcoRI-1-F/OsRUS2.1cDNA-BamHI-138-R*, *OsRUS2.1cDNA-EcoRI-139-F/OsRUS2.1cDNA-BamHI-879-R*, *OsRUS2.1cDNA-EcoRI-880-F/OsRUS2.1cDNA-BamHI-1317-R* 为引物,采用高保真酶 KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶反应体系,扩增获得 *OsRUS2.1cDNA* 的四个不同片段。将这四个片段加 A 后与 pMD18-T-Simple 连接,转化 *E. coli* TOP10 感受态,筛选获得阳性克隆,并经测序确认无突变。

1.3 重组表达载体的构建与鉴定

将上述克隆并验证的 pMD18-T-S-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI*、pMD18-T-S-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-138-BamHI*、pMD18-T-S-*EcoRI-139-OsRUS2.1cDNA-879-BamHI* 和 pMD18-T-S-*EcoRI-880-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI* 及空载体 pGADT7 用 *EcoRI/BamHI* 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳检测酶切正确后,按照常规分子生物学连接、转化、筛选,获得 pGADT7-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI*、pGADT7-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-138-BamHI*、pGADT7-*EcoRI-139-OsRUS2.1cDNA-879-BamHI* 和 pGADT7-*EcoRI-880-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI* 四个重组表达载体,分别采用双酶切鉴定及测序确认读码框正确。

1.4 重组载体转化酵母感受态及快速筛选

按 Clontech 公司酵母双杂交手册(2007)进行酵母菌株 Y187 感受态制备,以及阳性对照质粒、阴性对照质粒、四个 *OsRUS2.1* 猎物载体(pGADT7-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI*、pGADT7-*EcoRI-1-OsRUS2.1cDNA-138-BamHI*、pGADT7-*EcoRI-139-OsRUS2.1cDNA-879-BamHI* 和 pGADT7-*EcoRI-880-OsRUS2.1cDNA-1317-BamHI*)的转化,并在相应营养缺陷板上筛选。分别对在 SD-Leu-DO 营养缺陷板上生长的含 *OsRUS2.1* 猎物载体的 Y187 菌落进行快速 PCR 筛选,方法如下:挑取 1 个直径 2~3 mm 转化酵母菌落于 PCR 管中,加入 30 μL 0.2% SDS,漩涡振荡器上振荡 15 s,然后在 PCR 仪上 90 $^{\circ}\text{C}$ 处理 4 min 后,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,以上清液作为 PCR 反应模板。按 10 μL PCR 反应体系加入 0.2 μL 提取液作为模板,引物选用通用筛选引物 Matchmaker 5' AD LD-insert screening amplimer/Matchmaker 3' AD LD-insert

screening amplimer,以 2X PCR premix 进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 重组蛋白毒性检测

按照 Clontech 公司的酵母双杂交手册(2007)进行,具体为将上述验证保存的四个分别含 *OsRUS2.1* 猎物载体载体的 Y187 划线于 SD-Leu-DO 营养缺陷板,倒置放 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 3~4 d 至菌落长出后,挑一个较大的菌落(直径 2~3 mm)接种于 50 mL SD-Leu-DO 液体培养基中(氨苄青霉素为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$),30 $^{\circ}\text{C}$,250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 过夜摇菌培养,第二天检测培养物的 OD₆₀₀。

1.6 重组载体转录自激活活性的检测

按 Clontech 公司酵母双杂交手册(2007)进行。取过夜摇菌培养的阳性菌株(含阳性互作质粒)、阴性菌株,空载体 pGADT7 转化菌以及上述四种转化酵母菌液 2 mL 于离心管中,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 s 后弃上清,将离心管在液氮中速冻 10 min,取出使其自然融解约 10 min,再重复操作一次,加入 50 μL 现配的 Z/X-gal 液,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置存放 8 h 染色,以检测报告基因 *LacZ* 的表达情况。

分别将含上述 4 种 *OsRUS2.1* 猎物载体、pGADT7 空载体以及含阳性对照质粒和阴性对照质粒的 Y187 菌株,划线于涂有 100 μL X- α -gal 液(4 mg/mL)的直径 10 cm 的 SD-Leu-DO 板,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置存放 3 d,以检测报告基因 *MEL1* 的表达情况。

2 结果与分析

2.1 四个 *OsRUS2.1* 表达载体的构建与验证

采用高保真酶 KOD Plus Neo 反应体系分别扩增获得了 *OsRUS2.1* 的四个基因片段(图 1)。将这些片段与 pMD18-T-Simple 连接、转化,筛选获得阳性克隆,测序确认序列完全正确。通过 *EcoRI* 和 *BamHI* 依次将四个 *OsRUS2.1* 装载到表达载体 pGADT7 上,再分别采用 *EcoRI/BamHI* 双酶切和 *HindIII* 酶切鉴定,用 *EcoRI/BamHI* 双酶切可以获得 pGADT7 载体骨架及相应的插入片段;在 pGADT7 多克隆位点两端均有一个 *HindIII* 酶切位点,因此用 *HindIII* 酶切就可以获得 pGADT7 载体骨架及 800bp 加上相应的插入片段的两个片段,结果完全符合预期(图 2)。用 Matchmaker 5' AD LD-insert screening amplimer 为引物测序表明,四个载体读码框正确,能表达出预期的蛋白,可以用于

下一步实验。

2.2 酵母的转化及酵母菌落的 PCR 鉴定结果

pGADT7 空载体和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1*cDNA-879-*Bam*HI 和 pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 四个重组载体转化的 Y187 酵母在 SD-Leu-DO 营养缺陷板上, 以及 pGADT7-T 与 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 与 pGBKT7-Lam 分别共转化的 Y187 酵母在 SD-Trp-Leu-DO 营养缺陷板上培养 3 d 后即有数量不等的菌落长出, 而未转化的 Y187 却不

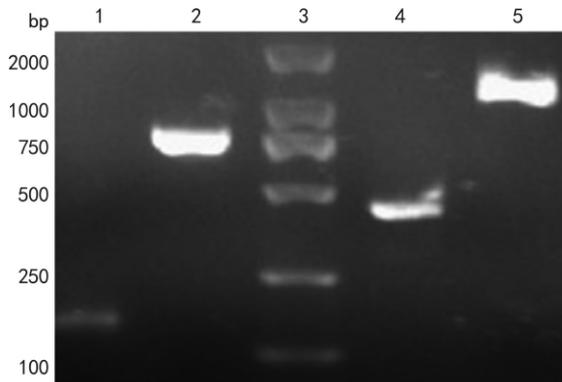


图 1 四个 *OsRUS2.1* 片段的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 Amplified map of four *OsRUS2.1* PCR fragments
泳道 3 为 DS2000 Marker; 泳道 1 为 *OsRUS2.1*(1~138) 片段; 泳道 2 为 *OsRUS2.1*(139~879) 片段; 泳道 4 为 *OsRUS2.1*(880~1317) 片段; 泳道 5 为 *OsRUS2.1*(1~1317) 片段。

能在 SD-Trp-DO, SD-Leu-DO, SD-Leu-Trp-DO 营养缺陷板上生长。挑取含 *OsRUS2.1* 不同片段的重组载体的四种转化酵母菌落进行快速 PCR 筛选鉴定, 由于采用载体上的 Matchmaker 5' AD LD-insert screening amplimer/Matchmaker 3' AD LD-insert screening amplimer 通用引物, 扩增获得的片段比插入片段大约大 200 bp(图 3)。综合营养缺陷板筛选及克隆 PCR 结果说明构建的四种猎物载体成功地转入酵母 Y187 中。

2.3 重组 *OsRUS2.1* 表达载体对酵母菌株 Y187 的毒性检测

培养检测结果表明, 含 pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1*cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187 在培养 16 h, OD_{600} 分别达到 0.807、0.878, 含 pGADT7、pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-138-*Bam*HI 的 Y187 在培

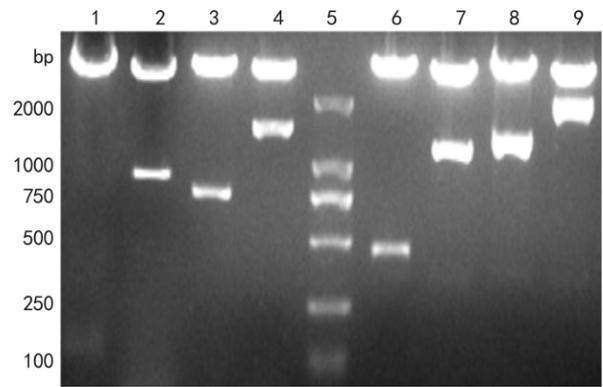


图 2 四种 *OsRUS2.1* 猎物重组载体的酶切鉴定图谱
Fig. 2 Verification map of 4 *OsRUS2.1* prey vectors digested by restriction enzymes

泳道 5 为 DS2000 Marker; 泳道 1, 3, 6 和 8 为 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1*cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 被 *EcoRI*/*Bam*HI 酶切图谱; 泳道 2, 4, 7 和 9 为 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1*cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 被 *Hind*III 酶切图谱。

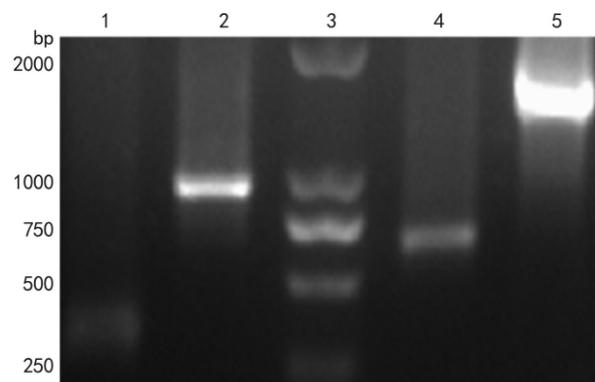


图 3 转化 *OsRUS2.1* 猎物重组载体的酵母 Y187 菌株的克隆 PCR 筛选图谱

Fig. 3 PCR screening map of Y187 strains transformed by *OsRUS2.1* prey vectors

泳道 3 为 DS2000 Marker; 泳道 1, 2, 4 和 5 分别为 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1*cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI Y187 克隆 PCR 筛选。

养 18 h, OD_{600} 分别达到 1.131、0.827, 含 pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1*cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187 在培养 19 h, OD_{600} 达到 0.866, 均超过 0.8 的判断标准, 说明重组蛋白对酵母 Y187 生长无毒性, 可用于下一步的蛋白相互作用研究。

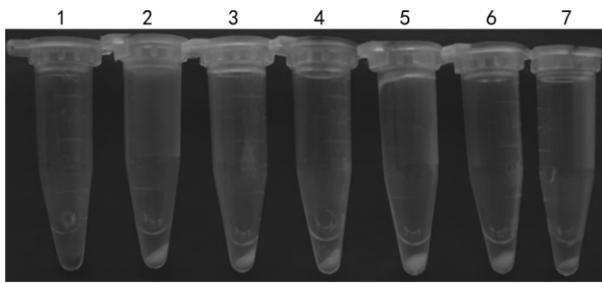


图 4 四种 *OsRUS2.1* 重组猎物载体对 Y187 的自激活活性检测 (LacZ 法)

Fig. 4 Self-activated activity of 4 *OsRUS2.1* prey vectors on Y187 (LacZ method)

1 为阳性对照; 2 为阴性对照; 3 为转化有 pGADT7 空载体的 Y187; 4 为含 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-*Bam*HI 的 Y187; 5 为含 pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* cDNA-879-*Bam*HI 的 Y187; 6 为含 pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187; 7 为含 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187; 1 为蓝色, 其余均为白色。

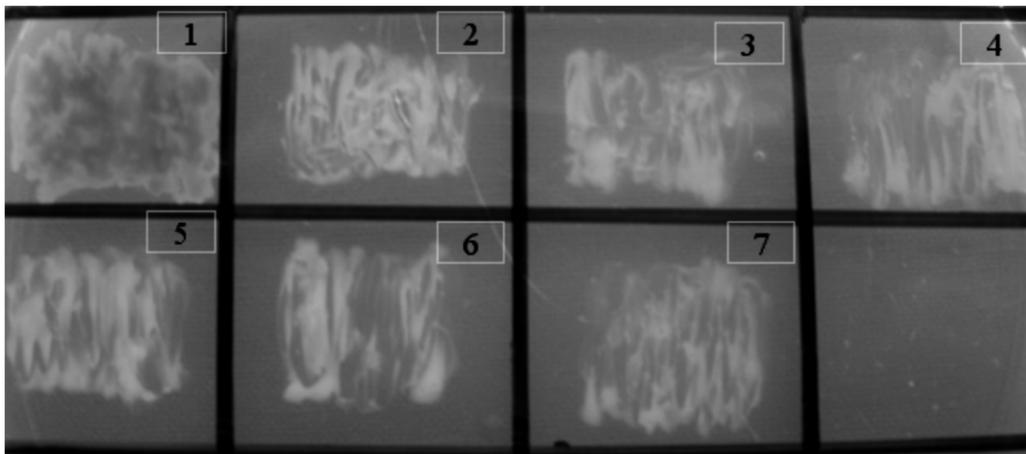


图 5 四种 *OsRUS2.1* 猎物载体对 Y187 的自激活活性检测 (MEL1 法)

Fig. 5 Self-activated activity of 4 *OsRUS2.1* prey vectors on Y187 (MEL1 method)

1 为阳性对照; 2 为阴性对照; 3 为含空载体 pGADT7 的 Y187; 4 为含 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-*Bam*HI 的 Y187; 5 为含 pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* cDNA-879-*Bam*HI 的 Y187; 6 为含 pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187; 7 为含 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187; 1 为蓝色, 其余均为白色。

未变蓝, 为正常白色菌落, 而阳性对照菌落则变蓝 (图 5), 进一步说明这四个基因片段均不会对酵母 Y187 产生自激活作用, 可用于以后的酵母双杂交蛋白互作验证。

3 结论与讨论

酵母双杂交技术既是筛选与目标蛋白具有相互作用能力未知蛋白的高通量技术, 也可用于检验两个已知蛋白间是否具有相互作用, 自 Fields & Song (1989) 提出此方法以来, 这一技术在研究蛋白互作

2.4 重组 *OsRUS2.1* 表达载体对酵母菌株 Y187 的自激活活性检测

β -半乳糖苷酶显色法的结果表明, 含 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 的 Y187 经 8 h 染色均未变蓝, 而阳性对照在 5 h 就变蓝 (图 4), 说明这四个基因片段均不会对酵母 Y187 产生自激活作用, 可用于以后的蛋白互作研究。

X- α -gal 平板显色法检测结果表明, 含 pGADT7-空载体、pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* cDNA-879-*Bam*HI、pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 和阴性对照的 Y187 划线菌落培养 3 d 后都

领域发挥了重要作用。*RUS* 是近年来发现的与植物极低强度 UV-B 下光形态建成有关的基因, 但目前对其信号传导途径尚缺乏认识 (Tong *et al.*, 2008; Leasure *et al.*, 2009)。笔者采用酵母双杂交技术研究 *OsRUS1* 和 *OsRUS2* 的互作情况, 以进一步了解这一信号传导途径的分子机制。笔者在前期工作中, 已根据 *OsRUS1* 的 DUF647 的分布情况构建了 *OsRUS1* 四个不同片段的诱饵载体, 并进行表达蛋白毒性及自激活活性检测 (潘家强等, 2012)。

本研究根据 *OsRUS2.1* 的 DUF647 分布情况, 构建 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-138-*Bam*HI、

pGADT7-*EcoRI*-139-*OsRUS2.1* cDNA-879-*Bam*HI, pGADT7-*EcoRI*-880-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam* 和 pGADT7-*EcoRI*-1-*OsRUS2.1* cDNA-1317-*Bam*HI 四种猎物蛋白表达载体,这些工作将为下一步研究 *OsRUS1* 和 *OsRUS2* 是否具有相互作用以及通过什么区域互作奠定基础。由于某些蛋白的表达可能对酵母细胞产生毒害作用,使其不能在选择培养基上生长;以及一些蛋白含有酸性氨基酸区域或者能够与酵母宿主转录激活因子结合,从而直接激活报告基因的表达。因此在筛选前需验证诱饵载体的毒性与自身激活作用,用以排除假阳性和假阴性的相互作用。本研究采用含上述重组猎物表达载体的 Y187 摇菌培养, OD_{600} 全部能在 19 h 以内达到 0.8,说明表达的 *OsRUS2.1* 及其片段对酵母的生长无毒性;对 *LacZ* 和 *MEL1* 报告基因活性染色表明, *OsRUS2.1* 及其片段也不能激活酵母的转录系统。综上所述,构建的四个 *OsRUS2.1* 猎物蛋白表达载体表达的融合蛋白对宿主菌 Y187 无毒性,且无自激活作用,可应用于后续的酵母双杂交实验。

参考文献:

- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, *et al.* 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**:18 225-18 230
- Brown BA, Jenkins GI. 2008. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature

- Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH[J]. *Plant Physiol*, **146**:576-588
- Duarte DT, Hul S, Sacher M. 2011. A yeast two hybrid screen identifies SPATA 4 as a TRAPP interactor[J]. *FEBS Letters*, **585**:2 676-2 681
- Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, **340**:245-247
- Frohnmeyer H, Staiger D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection[J]. *Plant Physiol*, **133**:1 420-1 428
- Gruber H, Heijde M, Heller W, *et al.* 2010. Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**:20 132-20 137
- Leasure CD, Tong HY, Yuen GG, *et al.* 2009. ROOT UV-B SENSITIVE2 acts with ROOT UV-B SENSITIVE1 in a root ultraviolet B-sensing pathway[J]. *Plant Physiol*, **150**:1 902-1 915
- Pan JQ(潘家强), Hou XW(侯学文). 2012. Construction of *OsRUS1* yeast two-hybrid bait vectors and detection of their self-activated activity(*OsRUS1* 酵母双杂交诱饵载体的构建及其自激活作用检测)[J]. *Chin J Trop Crop*(热带作物学报), **33**(1): 107-110
- Ren J(任健), Li CY(李春阳). 2005. Research advances in response of seed plants to enhanced ultraviolet-B radiation(种子植物对中波紫外辐射胁迫的响应研究进展)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志), **24**(3): 315-320
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, *et al.* 2011. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein [J]. *Science*, **332**:103-106
- Tong HY, Leasure CD, Hou XW, *et al.* 2008. Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**:21 039-21 044
- Wu D, Hu Q, Yan Z, *et al.* 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8[J]. *Nature*, **484**:214-219

(上接第 45 页 Continue from page 45)

本种与荔波报春苣苔 *Primulina liboensis* (W. T. Wang & D. Y. Chen) Mich. Möller & A. Weber 和桂林报春苣苔 *P. guelinensis* (W. T. Wang) Y. Z. Wang 在亲缘关系上相接近,但叶两面均具直立柔毛,叶上面呈显著泡状,具较多花序,(1)2~9 条,花序梗较长,(4.0)8.5~15 cm,苞片线形或线状披针形,大小为 7 mm×1 mm,花大,长 4.2~5.3 cm,粉紫色,退化雄蕊较长,13~15 mm,花期 11 月,可以区别(表 1)。

致谢 承蒙林文宏先生为本文绘图,在此表示衷心的感谢!

参考文献:

- 王文采. 1990. 唇柱苣苔属[M]//王文采. 中国植物志(第 69 卷). 北京:科学出版社:333-408
- 韦毅刚,温放, Möller M, *et al.* 2010. 华南苦苣苔科植物[M]. 南宁:广西科学技术出版社:258-474

- 李振宇,王印政. 2004. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社:171-261
- Tang H, Wen F. 2011. *Chirita tiandengensis* (Gesneriaceae) sp. nov. from Guangxi, China[J]. *Nord Jour Bot*, **29**:233-237
- Wang WT, Pan KY, Li ZY. 1998. *Chirita* Buch.-Ham. ex D. Don [M]//Wu ZY, Raven PH. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **18**:311-345
- Weber A, Middleton DJ, Forrest A, *et al.* 2011. Molecular systematics and remodelling of *Chirita* and associated genera (Gesneriaceae)[J]. *Taxon*, **60** (3):767-790
- Wu WH, Xu WB, Nong DX, *et al.* 2011. *Chirita ningmingensis* (Gesneriaceae), a new species from Guangxi, China[J]. *Ann Bot Fenn*, **48**:422-424
- Xu WB, Liu Y, Gao HS. 2010. *Chiritopsis jingxiensis*, a New Species of Gesneriaceae from a karst Cave in Guangxi, China[J]. *Novon*, **19**:559-561
- Xu WB, Huang YS, Wu L, *et al.* 2011. *Chirita luochengensis* (Gesneriaceae), a new species from limestone areas in northern Guangxi, China[J]. *Brittonia*, **63**(2):314-317