

百脉根离子通道蛋白 Pollux 与 翻译延伸因子 EF1A 的相互作用

代广中 袁兆栋 苟洪兰 方庆 朱辉 张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用酵母双杂交技术,以百脉根离子通道蛋白 Pollux 胞内结构域为诱饵,从百脉根 AD-cDNA 文库中筛选到与 Pollux 相互作用的多个阳性克隆,经 DNA 序列测定及 NCBI 数据库 BLAST 分析,其中有 6 个阳性克隆编码翻译延伸因子 EF1A。进一步在大肠杆菌中表达与纯化 Pollux 和 EF1A 融合蛋白,通过 Pull-down 及 Western 杂交证实 Pollux 胞内结构域与 EF1A 的 C-末端相互作用。

关键词 百脉根; 离子通道蛋白; 酵母双杂交; 翻译延伸因子

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0034-05

百脉根(*Lotus japonicus*)是研究根瘤菌与豆科植物间相互作用的一种模式植物。自 2002 年以来,在模式豆科植物百脉根和苜蓿中发现了与根瘤菌结瘤因子的信号识别、传递及调控根瘤产生的基因,并建立了根瘤菌和菌根真菌(AM)的共生信号转导途径的模式^[1-3]。在共生信号转导途径中,百脉根 Pollux 与 Castor 编码一对同源性较高的离子通道蛋白,它们突变会导致有根瘤菌存在下却不能结瘤,其生理生化表型为缺乏由根瘤菌引起的钙离子振荡(calcium spiking)^[4]。进一步的研究结果表明, Pollux 与 Castor 定位在核膜上并形成异源蛋白复合物而调控核膜周围的离子浓度和电位^[5],同时,2 个基因突变也导致 AM 真菌不能感染,表明它们是内共生体形成的关键基因^[6]。酵母双杂交技术对研究蛋白质间相互作用具有突出优势,笔者所在研究室运用该技术鉴定出与 Castor 相互作用的蛋白,包括钙调素结合的翻译延伸因子(CaM binding translation elongation factor)^[7];共生信号途径关键基因 NSP1 和 NSP2 的转录激活和相互作用机制也通过该技术得以确证^[8-9]。本研究以 Pollux 胞内结构域为诱饵,分离与其相互作用的 EF1A 类型的翻译延伸因子,为深入研究这类离子通道蛋白在豆科植物共生信号转导过程中的功能和作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

百脉根 *Lotus japonicus* MG20 亚种,酵母菌株 AH109、Y187,大肠杆菌 DH5 α 、表达菌株 BL21-RIL,酵母质粒 pGBKT7、pGADT7 等为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存;根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAF303099^[10]由中国科学院华南植物园吴国江研究员馈赠。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *Nde* I、*Eco*R I 等、RT-Kit 等购自 TaKaRa 公司;Trizol (invitrogen)、X-gal (sigma)等购自武汉天源生物技术公司;His 标签蛋白抗体为笔者所在实验室制备;PCR 引物合成、克隆子测序服务由北京奥科生物技术公司提供。

1.3 百脉根总 mRNA 的提取

百脉根种子处理详见文献^[11]。种子经过表面消毒后,暗培养 4~5 d,移栽至经漂洗和高温处理的沙与蛭石混合的基质中,光照/黑暗(16 h/8 h),22 °C 培养,至真叶长出,接种根瘤菌。提取接种 5~8 d 的 RNA。RNA 提取采用 Trizol (invitrogen)方法提取。

1.4 RT-PCR 及诱饵质粒的构建

根据 NCBI 上 Pollux 序列,合成引物。上游引

收稿日期: 2011-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(30870186)、国家重点基础研究发展计划“973”课题(2010CB126502)和国家转基因重大专项课题(2009ZX08009-116B)

代广中,硕士研究生,研究方向:固氮微生物学. mail: tjololoo@sina.com

通讯作者: 张忠明,教授,研究方向:共生固氮体系的分子生物学. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

物含 *Nde* I 位点 (下划线): 5'-GGAATTC CATATG GGTGGTAGCCTTGCTGA-3'; 下游引物含 *Eco*R I 位点 (下划线): 5'-GG GAATTC TCAATCGCCTGAAGCAATTAC-3'。通过 RT-PCR, 扩增得到 *Pollux* 膜内编码区段 *Pollux*-C (312~917 aa)。回收扩增到的片段, 连接进入 pMD18-T (简称 T) 载体。*Nde* I/*Eco*R I 同时分别酶切 T-*Pollux*-C 和 pGBKT7。回收片段, 进行连接反应。转化 3.5 μ L 连接体系进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 限制性酶切和测序鉴定融合正确的转化子。

1.5 酵母双杂文库的筛选

参照酵母双杂交操作手册 (Clontech, PT3024-1) 进行: 鉴定正确的诱饵融合质粒 BD-*Pollux*-C, 转化进入酵母 Y187 感受态细胞, 检验没有自激活活性后, 与酵母文库菌进行杂交, 28 $^{\circ}$ C 低速振荡培养 24 h, 收集菌体, 涂布在选择性培养基 SD/-Trp/-Leu/(简称: SD/-TL) 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (简称: SD/-TLHA) 的平板上, 培养 5~8 d。挑取前 5 d 内生长旺盛的克隆子, 在 SD/-TLHA + 80 μ g/mL X gal 的平板上划线或点样; 提取在 SD/-TLHA + X gal 的平板上显蓝的酵母质粒, 回转验证。PCR 检测筛选到文库质粒插入 cDNA 片段大小及一致性。PCR 检测用到的上游引物为 5'-CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC-3'; 下游引物为, 5'-GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG ATT-3'。测序、回转验证与 PCR 片段大小较为一致的克隆子, NCBI 网站 Blast, 确定阳性克隆。

1.6 Western blotting 印迹转移

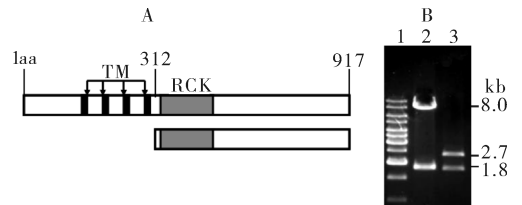
分别将 EF1A (2 个片段简称 ED219, ED267) 和 *Pollux*-C 融合到 pET28a 或 pGEX-6p1 载体 *Eco*R I/*Not* I 位点, 重组子转入表达菌株 BL21-RIL, IPTG 诱导表达目的蛋白。通过 Ni-琼脂糖凝胶与 GST-琼脂糖凝胶分离纯化目的蛋白^[12]。Western blotting 方法参照文献^[12-13]。相互作用体系经电泳转入 NC (硝酸纤维素膜) 膜上, 用含 5% 脱脂牛奶的 1 \times TBS-T 封闭过夜, 1 \times TBS-T 漂洗完毕, 加入 His 标签融合蛋白免疫试验大白兔产生的一抗 (稀释 400 倍), 孵育 2 h; 经 1 \times TBS-T 漂洗 3~5 次后, 室温将 NC 膜转入含有 1% 脱脂牛奶和适当稀释度二抗的 TBS-T 溶液中, 孵育 1 h; 1 \times TBS-T 漂洗 2 次, 1 \times TBS 漂洗 3 次, 加入化学发光

检测试剂, 化学发光成像仪检测目的的信号带。

2 结果与分析

2.1 *Pollux* 胞内结构域诱饵质粒的构建

离子通道蛋白 *Pollux* 由 917 个氨基酸所组成, 含有 4 个跨膜结构域 (TM; transmembrane) 和 1 个 RCK (regulate the conductance of K⁺) 结构域, 胞膜内 C-末端含有 606 个氨基酸, 其编码的 cDNA 为 1.821 kb (图 1A)。根据 NCBI 上 *Pollux* 序列, 设计引物并利用 RT-PCR 从百脉根中扩增到 1.8 kb cDNA 片段, 首先连接到 T-载体上, 经序列测定后, 将 1.8 kb 片段克隆到酵母双杂诱饵质粒 pGBKT7 的 *Nde* I/*Eco*R I 位点上。然后转化大肠杆菌并酶切来源于转化子中的质粒。鉴定结果表明, 重组质粒 pGBKT7-*Pollux*-C 和重组 T-*Pollux*-C 都含有 1.8 kb 的 DNA 片段 (图 1-B), 进一步测序验证 pGBKT7-*Pollux*-C 融合正确。



A: *Pollux* 蛋白结构域与 1.821 kb cDNA 编码 C-端 606 个氨基酸 (312-917) 示意图 Schematic representation of functional domains in *Pollux* and C-terminal 606 amino acid residues (312-917) was encoded by 1.821 kb cDNA; B: *Nde* I/*Eco*R I 酶切融合质粒 Fusion plasmid DNA digested with *Nde* I/*Eco*R I; 1: 1 kb DNA 指示标记 1 kb DNA ladder marker; 2: *Nde* I/*Eco*R I 酶切 pGBKT7-*Pollux*-C digested with *Nde* I/*Eco*R I; 3: *Nde* I/*Eco*R I 酶切 T-*Pollux*-C T-*Pollux*-C digested with *Nde* I/*Eco*R I.

图 1 诱饵质粒 pGBKT7-*Pollux*-C 的鉴定

Fig. 1 Construction and identification of bait plasmid pGBKT7-*Pollux*-C

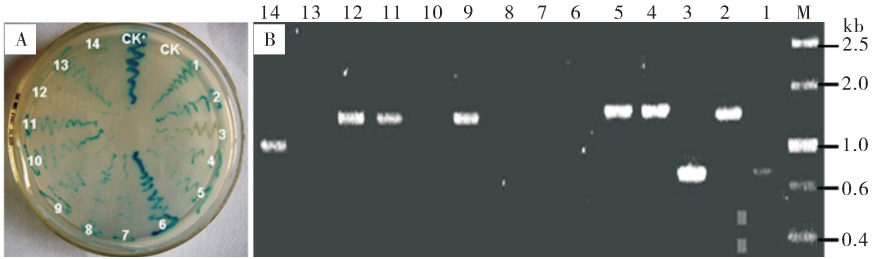
2.2 酵母阳性克隆子的分离和鉴定

将重组诱饵质粒 pGBKT7-*Pollux*-C 转化到酵母菌株 Y187 中, 并与含百脉根 cDNA 文库的酵母菌株 AH109 进行杂交。在 SD/-TLHA 培养基上筛选杂交子, 挑取 5~8 d 内生长良好的 14 个阳性菌落划线接种到含 X-gal 的 SD/-TLHA 平板上进行验证, 并提取靶质粒 (pGADT7-cDNA) 进行 PCR 检测。结果表明: 在 SD/-TLHA + X-gal 平板上划线的阳性克隆除 3 号、12 号外, 其他可以显蓝 (图 2-A); 从 14 个靶质粒中有 8 个扩增出 DNA 片

段,其中 2、4、5、9、11、12 号片段大小在 1.5 kb 左右 (图 2-B)。

DNA 序列测定和 NCBI 数据库 BLAST 分析

表明,其中 6 个阳性克隆的 DNA 片段都编码翻译延伸因子 1A (EF1A: translation elongation factor 1A)。



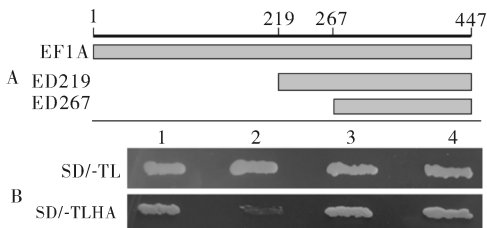
A: 在 SD/-TLHA + X-gal 培养基上阳性酵母克隆 (No. 1-14); CK⁺: 阳性对照 (pGBKT7-p53/pGADT7-SV40); CK⁻: 阴性对照 (pGBKT7-lam/pGADT7-SV40) Positive yeast clones (No. 1-14) grow on SD/-TLHA + X-gal plate; CK⁺: Positive control (pGBKT7-p53/pGADT7-SV40); CK⁻: Negative control (pGBKT7-lam/pGADT7-SV40); B: 阳性酵母克隆 (No. 1-14) 中抽提质粒进行 PCR 扩增; M: 1 kb DNA 标记 Plasmids isolated from positive yeast colonies (No. 1-14) were amplified with PCR; M: 1 kb DNA ladder marker.

图 2 酵母阳性克隆的分离和鉴定

Fig. 2 Isolation and identification of positive yeast clones

2.3 酵母双杂交验证 Pollux-C 与 EF1A 蛋白相互作用

百脉根基因组数据库 Blast 分析显示百脉根 EF1A 全长 cDNA 编码 447 个氨基酸,本研究分离的阳性克隆子 cDNA 片段长度不同,其中 2 号编码第 219~447 氨基酸(命名为 ED219),9 号编码第 267~447 氨基酸(命名为 ED267),见图 3-A。为了进一步验证 Pollux 与 EF1A 间的相互作用,分别将 ED219 和 ED267 重新转化到酵母 AH109 中,与含诱饵质粒的 Y187 进行杂交并在选择培养基上验证。结果表明:2 个克隆都能够在 SD/-TLHA 选择性培养基上生长(图 3-B),说明 Pollux-C 与 EF1A-C 具有蛋白间的相互作用。



A: EF1A 与截短片段 (ED219 and ED267) 结构示意图 Schematic representation of the EF1A and deletion mutants (ED219 and ED267); B: Pollux-C 分别与 ED219 和 ED267 进行酵母双杂交 Pollux-C interaction with ED219 and ED267 in yeast. 1: 阳性对照 (pGBKT7-p53/pGADT7-SV40) Positive control (pGBKT7-p53/pGADT7-SV40); 2: 阴性对照 (pGBKT7-Lam/pGADT7-SV40) Negative control (pGBKT7-Lam/pGADT7-SV40); 3: pGBKT7-Pollux-C/pGADT7-ED219; 4: pGBKT7-Pollux-C/pGADT7-ED267.

图 3 酵母双杂交验证 Pollux-C 与 EF1A 蛋白相互作用

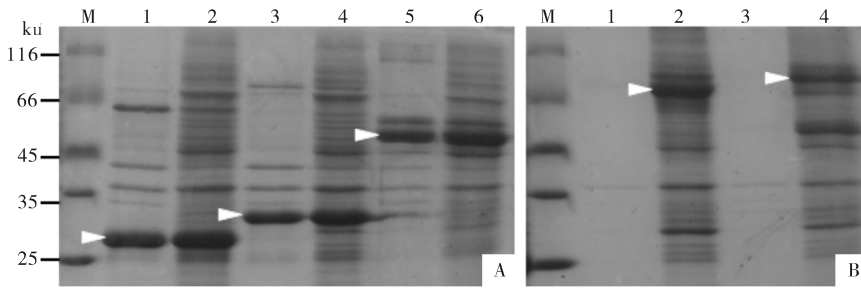
Fig. 3 Reconfirmation of Pollux-C interacted with EF1A by YTH

2.4 Pollux-C 融合蛋白及 EF1A 融合蛋白的表达和纯化

将 Pollux-C DNA 片段克隆到 pGEX-6p1 质粒上,构建 GST-Pollux-C 融合表达载体;分别将全长 EF1A cDNA、截短的 ED219 和 ED267 cDNA 片段克隆到 pET28a 质粒上,构建 His 融合表达载体,并分别转化大肠杆菌 BL21-RIL 菌株。经 IPTG 诱导后,融合蛋白 His-EF1A、His-ED219 和 His-ED267 都得到表达,其分子质量分别为 56、31 和 26 ku。所表达的蛋白大约一半存在于上清液中,另一部分则以包涵体形式存在于沉淀中(图 4-A),融合蛋白 GST-Pollux-C₁ (72 ku) 和 GST-Pollux-C₂ (95 ku) 则主要存在于上清液中,呈可溶性蛋白(图 4-B)。同时,通过 Ni-His 柱和 GST-柱分别纯化带标签的融合蛋白。

2.5 体外 Pollux-C 与 EF1A 蛋白相互作用的鉴定

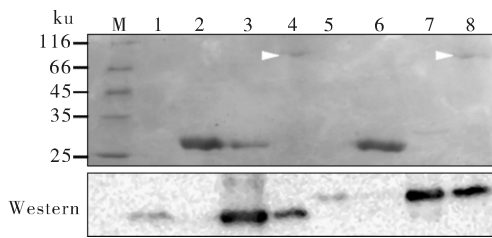
为了在体外证实 2 个蛋白间的相互作用,将分离纯化 GST-Pollux-C₁ 融合蛋白绑定在 GST-柱上,分别与纯化的融合蛋白 His-ED267 和 His-ED219 混合,经多次洗涤去掉杂蛋白后,进行 SDS-PAGE 电泳分离,并利用抗 His-tag 抗体进行 Western blotting 检测。结果表明:柱上的 GST-Pollux-C₁ 蛋白能特异结合游离的 His-ED267 (图 5-4) 和 His-ED219 融合蛋白 (图 5-8),而绑定在 GST-柱上的 GST 蛋白则不能与 His-ED267 (图 5-2) 和 His-ED219 融合蛋白 (图 5-6) 相互作用;仅 GST-柱与 His-ED267 (图 5-1) 和 His-ED219 融合蛋白 (图 5-5)



A: His-EF1A/ED219/ED267 蛋白表达 His-EF1A/ED219/ED267 protein; M: 蛋白标记 Protein marker; 1: 沉淀中 His-ED267 蛋白 His-ED267 protein in sediment; 2: 上清中 His-ED267 蛋白 His-ED267 protein in supernatant; 3: 沉淀中 His-ED219 蛋白 His-ED219 protein in sediment; 4: 上清中 His-ED219 蛋白 His-ED219 protein in supernatant; 5: 沉淀中 His-EF1A 蛋白 His-EF1A protein in sediment; 6: 上清中 His-EF1A 蛋白 His-EF1A protein in supernatant; B: GST-Pollux-C₁₋₂ 蛋白表达 GST-Pollux-C₁₋₂ protein; M: 蛋白标记 Protein marker; 1: 沉淀中 GST-Pollux-C₁ 蛋白 GST-Pollux-C₁ protein in sediment; 2: 上清中 GST-Pollux-C₁ 蛋白 GST-Pollux-C₁ protein in supernatant; 3: 沉淀中 GST-Pollux-C₂ 蛋白 GST-Pollux-C₂ in sediment; 4: 上清中 GST-Pollux-C₂ 蛋白 GST-Pollux-C₂ in supernatant.

图 4 融合蛋白的表达 (SDS-PAGE)

Fig. 4 Expression of fusion proteins (SDS-PAGE)



M: 蛋白质标记 Protein marker; 1: GST-beads 结合 His-ED267 蛋白 GST-beads plus His-ED267 protein; 2: GST-beads-GST 结合 His-ED267 蛋白 GST-beads-GST plus His-ED267 protein; 3: His-ED267 蛋白 His-ED267 protein; 4: GST-beads-GST-Pollux-C₁ 结合 His-ED267 蛋白 GST-beads-GST-Pollux-C₁ plus His-ED267 protein; 5: GST-beads 结合 His-ED219 蛋白 GST-beads plus His-ED219 protein; 6: GST-beads-GST 结合 His-ED219 蛋白 GST-beads-GST plus His-ED219 protein; 7: His-ED219 蛋白 His-ED219 protein; 8: GST-beads-GST-Pollux-C₁ 结合 His-ED219 蛋白 GST-beads-GST-Pollux-C₁ plus His-ED219 protein.

白色箭头指示的是 GST-Pollux-C₁ 蛋白; A 显示的是用考马斯亮蓝 R250 染色的 SDS-PAGE 蛋白胶图; B 显示的是同样的蛋白胶利用抗 His 标签的抗体进行免疫杂交的结果。White arrows indicated GST-Pollux-C₁ protein. A shows SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue R250; B shows a similar gel used for immunoblot by anti-His-tag antibody.

图 5 SDS-PAGE 电泳及 Western-blotting 检测

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis and Western-blotting

有非特异性结合,但信号明显弱于特异相互作用和阳性对照(图 5-3,7)。

3 讨论

翻译延伸因子 EF1A 在 GTP 酶作用下催化氨

酰-tRNA 转位到核糖体,参与蛋白质合成。已有研究表明,EF1A 是一种多功能的蛋白,参与应激信号转导、细胞骨架调节等^[14]。如:嗜肺性军团杆菌通过葡萄糖转移酶抑制宿主 EF1A 活性,引起军团菌肺炎 (legionnaires' disease)^[15];在胰腺肿瘤中,翻译延伸因子呈高量表达,抑制细胞凋亡^[16];EF1A 与富含亮氨酸的激酶 2(LRRK2; leucine-rich repeat kinase 2)相互作用,削弱激酶活性同时抑制其与微管结合等^[17]。在豆科植物百脉根中,Pollux 与 Castor 两个离子通道蛋白具有相同的结构特点,都是共生信号转导的关键调控蛋白,但二者的调控机制有待于进一步研究。本研究利用体内体外蛋白质相互作用的方法,证实了离子通道蛋白 Pollux 的胞膜内结构域与 EF1A 的 C-末端相互作用。尽管未涉及到其生物学功能,其研究结果可为深入研究 Pollux 调节 EF1A 的生化机制和揭示豆科植物共生信号的调控作用奠定基础。

参 考 文 献

[1] STRACKE S, KISTNER C, YOSHIDA S, et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis [J]. Nature, 2002, 417 (6892): 959-962.
 [2] RADUTOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. Plant recognition bacterial requires two lysM receptor like protein kinases [J]. Nature, 2003, 425: 585-591.
 [3] OLDROYD G E D, DOWNIE J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes [J]. Annual Re-

- view of Plant Biology, 2008, 59(1): 519-546.
- [4] IMAIZUMI-ANRAKU H, TAKEDA N, CHARPENTIER M, et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots[J]. Nature, 2005, 433(7025): 527-531.
- [5] CHARPENTIER M, BREDEMEIER R, WANNER G, et al. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis[J]. The Plant Cell, 2008, 20(12): 3467-3479.
- [6] CHEN C, FAN C, GAO M, et al. Antiquity and function of *Castor* and *Pollux*, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants[J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 306-317.
- [7] 杨绮, 朱辉, 陈春芬, 等. 应用酵母双杂交系统筛选与 CASTOR 相互作用的蛋白[J]. 农业生物技术, 2007, 15(6): 1012-1018.
- [8] 储晓洁, 康恒, 胡晓晶, 等. 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 与 NSP2 的转录激活作用[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 582-587.
- [9] 胡晓晶, 储晓洁, 康恒, 等. 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 与 NSP2 的相互作用[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(2): 132-137.
- [10] KANG H, ZHU H, CHU X, et al. A novel interaction between CCaMK and a protein containing the Scythe_N ubiquitin-like domain in *Lotus japonicus* [J]. Plant Physiology, 2011, 155(3): 1312-1324.
- [11] 陈春芬, 朱辉, 杨绮, 等. 百脉根结瘤因子受体 NFR5 及其相互作用蛋白的研究[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(4): 372-376.
- [12] ZHU H, CHEN T, ZHU M, et al. A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus* [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 337-347.
- [13] ZHANG Z, QUICK M K, KANELAKIS K C, et al. Characterization of a plant homolog of Hop, a cochaperone of Hsp90[J]. Plant Physiology, 2003, 131(2): 525-535.
- [14] GROSS S R, KINZY T G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(9): 772-778.
- [15] BELYI Y, STAHL M, SOVKOVA I, et al. Region of elongation factor 1A1 involved in substrate recognition by *Legionella pneumophila* glucosyltransferase Lgt1: identification of Lgt1 as a retaining glucosyltransferase[J]. J Biol Chem, 2009, 284(30): 20167-20174.
- [16] 张慷, 诸琪, 曹海霞, 等. 人类真核翻译延长因子 1A2 在胰腺癌的表达研究[J]. 胰腺病学, 2007, 7(1): 13-16.
- [17] GILLARDON F. Interaction of elongation factor 1-alpha with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling *in vitro* [J]. Neuroscience, 2009, 163(2): 533-539.

Interaction between ion channel protein Pollux and elongation factor 1A of translation in *Lotus japonicus*

DAI Guang-zhong YUAN Zhao-dong GOU Hong-lan
FANG Qing ZHU Hui ZHANG Zhong-ming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Using ion channel protein Pollux-C containing RCK domain as a bait, 14 yeast colonies were screened from *Lotus japonicus* AD-cDNA library with yeast two-hybrid technique. Six positive clones were found to encode elongation factor 1A (EF1A) of translation through DNA sequencing and BLAST against NCBI database. The fusion tag protein of Pollux-C and EF1A expressed in *E. coli* were purified. The intra-cellular domain of Pollux interacted with the C-terminus of EF1A was verified by pull-down and western blotting *in vitro*. The results might lay a foundation for further researches on the regulating mechanism and biological function of EF1A in symbiosis signaling in legume.

Key words *Lotus japonicus*; ion channel protein; yeast two-hybrid; EF1A