

紫云英结瘤受体激酶靶蛋白的筛选与鉴定

王 宁 李一星 刘 燕 陈大松 李友国

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,以结瘤受体激酶(NORK)蛋白的跨膜结构域(TM)为诱饵,进行了与其相互作用靶蛋白的筛选鉴定。结果获得 41 个候选阳性克隆,通过测序和在 NCBI 中进行 Blast 比对分析,发现其中一个具有重要生物学功能的互作蛋白翻译延伸因子 AsEF1- α ,并将该蛋白相应的编码基因命名为 AsEF1- α 。进一步的验证表明靶蛋白 AsEF1- α 与诱饵互作的关键结构域是 EF1- α -III。

关键词 紫云英; 结瘤受体激酶; 翻译延伸因子蛋白(EF1- α); 蛋白互作; 酵母双杂交

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0006-06

共生固氮是根瘤菌与豆科植物之间复杂的分子对话过程,该过程受到根瘤菌和豆科宿主植物双方基因的调控^[1-4]。豆科植物中与共生固氮相关的基因包括早期结瘤基因和晚期固氮基因。早期结瘤基因中的共生受体激酶(SYMRK)基因、结瘤受体激酶(NORK)基因与信号转导和根瘤形成相关。

陈大松等^[5]分离获得紫云英结瘤受体激酶基因(AY946203),全长 2 820 bp。基因序列 Blast 分析表明它与多种豆科植物的共生受体激酶基因或结瘤受体激酶基因序列具有较高同源性,与非豆科植物同类基因的同源性较低^[3]。紫云英 NORK 序列也和其他豆科植物 SYMRK 基因一样,编码胞外、跨膜、胞内 3 个氨基酸结构域,含有富亮氨酸重复序列。NORK 编码的蛋白分子质量 103.7 ku,等电点 5.6,氨基端带有疏水性信号肽。

目前关于结瘤受体激酶的具体功能研究还不清楚,NORK 蛋白这种具有胞外序列相似的家庭在植物中是广泛存在的。豆科植物紫云英中存在一套与共生结瘤相关的功能基因,这些基因在接受来自根瘤菌的共生信号 Nod factor(结瘤因子)刺激后,通过一系列的表达调控在紫云英中引起钙离子激增,从而激活 CCaMK 蛋白的功能。接着将共生信号传递给下游的一些功能基因,进一步激活 NIN 基因,最后由 NIN 基因启动下游结瘤基因表达而形成根瘤。有研究表明 NORK 基因与 Nod factor

的接受传递系统相关^[4-7],为探究 NORK 在根瘤形成过程中的功能机制,本研究筛选出与紫云英中结瘤受体激酶 NORK 相互作用的靶蛋白,并通过酵母双杂交技术验证 2 个蛋白的相互作用,同时定位靶蛋白相互作用的关键结构域,并分析和讨论二者之间的作用机制,以期为深入研究这 2 个基因的功能机制提供理论基础,并且为构建早期结瘤信号传递网络提供新的材料和依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

用于酵母双杂交筛选的酵母菌株 Y187 和 AH109、酵母质粒 pGBKT7 和 pGADT7 购于 Clontech 公司。用于质粒克隆的大肠杆菌 DH10B 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室提供。

1.2 主要仪器和试剂

PCR 仪(Bio-Rad),Taq DNA 聚合酶,ExTaq 酶,T4 DNA 连接酶(Fermentas),各种限制性内切酶,DNA 及蛋白质分子量标准均为 Fermentas 公司产品。

1.3 诱饵基因扩增及诱饵质粒构建

根据笔者所在实验室克隆鉴定的 NORK 基因序列信息(AY946203),设计引物。

上游引物:5'-CGGAATTCATTCTGTTTTTTT-GCCGTTACA-3'(下划线为 EcoRI 酶切位点);下游引

收稿日期:2012-05-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30970074)和国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2010CB126500)

王 宁,硕士研究生,研究方向:根瘤菌共生固氮体系分子机制, E-mail: wangning142424@163.com

通讯作者:李友国,博士,教授,研究方向:生物固氮, E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

物：5'-CGGGATCC TGTGACCACCTCTAAATACTC-CAA -3' (下划线为 *Bam*HI 酶切位点)。提取紫云英根瘤总 RNA，以总 RNA 为模板进行反转录 PCR (RT-PCR)，以反转录产物单链 DNA 为模板，采用高保真性酶扩增 TM 区域 (171 bp)。PCR 扩增反应体系和程序为：10 × *ExTaq* Buffer 2 μL，模板 1 μL，引物 10 μmol/L 各 1 μL，2.5 mmol/L dNTP 1 μL，0.1 μL *ExTaq*，以 ddH₂O 补充体系至 20 μL。95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，50 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 30 s，30 个循环；72 °C 最后延伸 10 min。PCR 产物及 pGBKT7 质粒，采用限制酶 *Eco*R I 及 *Bam*H I 进行双酶切。利用 T4 DNA 连接酶进行连接、转化大肠杆菌，从而构建出重组诱饵质粒 pG-BKT7-NORK-TM，并通过双酶切及测序分析重组质粒的正确性。

1.4 诱饵质粒转化及紫云英 cDNA 文库筛选

利用 LiAc 转化法将验证无误的诱饵质粒 pG-BKT7-NORK-TM 转化酵母 Y187 感受态细胞，涂布于 SD/-Trp 平板上，28 °C 培养。通过酵母菌落 PCR 检测诱饵质粒是否转化成功。将转化成功的菌株分别划线于 SD/-Trp/-His 和 SD/-Trp+X-gal 的平板上，96 h 内观察平板上菌落是否变成蓝色，以检查其自激活性。挑取 SD/-Trp 平板上的单菌落 (直径大于 2 mm) 接种于 SD/-Trp 液体培养基中摇床振荡培养 (200 r/min)，24 h 后测定其 *D*_{600 nm}，观察是否超过 0.8，以确定其是否具有毒性。将检测无自激活性和无毒性的诱饵酵母菌株 Y187 (pG-BKT7-NORK-TM) 与前期已构建好的紫云英根瘤组织 cDNA 文库菌株 AH109 (pGADT7-cDNA) 杂

交，28 °C 摇床 (50~100 r/min) 培养 20~24 h 后，涂布 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 的大平板，筛选阳性克隆子，同时在 SD/-Leu，SD/-Trp 和 SD/-Trp/-Leu 平板上涂布计算杂交效率。

1.5 阳性克隆子的鉴定

将在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上可以生长的阳性克隆接种于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade+X-gal 平板，在 28 °C 暗培养 2~4 d，观察克隆子是否显蓝色而加以确证。将复筛获得的阳性克隆进行菌落 PCR，检查插入 cDNA 片段大小。从酵母菌株抽提阳性克隆质粒并转化大肠杆菌，利用载体抗性不同分离出克隆有文库插入 cDNA 片段的阳性克隆。最后，抽提大肠杆菌阳性克隆质粒进行酵母回转，小范围“一对一”杂交等再次验证阳性克隆的真实性。将最终确定的阳性克隆进行测序，将测序结果与 NCBI 数据库比对，用 DNAMAN 和 ExPASy 软件进行生物信息学分析。

1.6 靶蛋白与诱饵蛋白互作关键结构域的确

根据测序所得到的目的基因序列设计引物 (表 1)，利用 PCR 技术分别扩增靶蛋白的 3 个结构域，将其分别构建到载体 pGADT7 上，分别将任意 2 个结构域组合后构建到载体 pGADT7 上，转化酵母 AH109，与诱饵菌株进行小范围杂交，将杂交后的菌液混合物用 ddH₂O 洗涤后，以一定的稀释度涂布 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade+X-gal 平板，28 °C 暗培养 2~4 d，比较观察菌落生长情况和变蓝情况，同时测定二倍体杂合子的 β-半乳糖苷酶活性 (Miller 单位，U)，确定靶蛋白与诱饵蛋白相互作用的关键结构域。

表 1 靶蛋白中不同结构域截短 PCR 扩增所用的引物

Table 1 PCR primers used for target domain truncation in the identified interacting protein AseF1-α

目标结构域区段 Target domains	引物序列 Sequences of primers	片段大小/bp Sizes
Ras+EF1-II + EF1-III	Ras-up 5'-CCGGAATTCCTTATGGCTGGGGGGTGACAACA-3' EF1-III-down 5'-CGCGGATCC CTCTCCACACTCTTAATAACTCCC-3'	720
Ras+EF1-II	Ras-up 5'-CCGGAATTCCTTATGGCTGGGGGGTGACAACA-3' EF1-II-down 5'-CGCGGATCCCTTCTTAGCTGGGTCATCCTTAGAG-3'	396
EF1-II + EF1-III	EF1-II-up 5'-CCGGAATTCCTTATGGCTGGGGGGTGACAACA-3' EF1-III-down 5'-CGCGGATCCCTTCTCCACACTCTTAATAACTCCC-3'	621
Ras+EF1-III	Ras-up 5'-CCGGAATTCCTTATGGCTGGGGGGTGACAACA-3' EF1-III-down 5'-CGCGGATCCCTTCTCCACACTCTTAATAACTCCC-3' Ras+EF1-III-Ras-down 5'-CGGGGTACCCTGGGTGGCTGTCTGAAGGTCTC-3' Ras+EF1-III-EF1-III-up 5'-CGGGGTACCGCCTCAACTCTAAGGATGACCCAG-3'	423

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-NORK-TM 的构建

采用本文“1.3”设计的引物,以紫云英根(瘤)部组织 cDNA 为模板,扩增两端带有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点的紫云英 NORK-TM 结构域,获得预期大小为 171 bp 的片段,经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切,克隆于相同双酶切后的 BD 载体 pGBKT7 质粒上,构建重组质粒 pGBKT7-NORK-TM。经双酶切及测序分析正确后,将诱饵质粒转化酵母 Y187,涂布选择培养基 SD/-Trp。转化子在 SD/-Trp/-His 平板上不能生长,在 SD/-Trp+X-gal 的平板上显白色,说明诱饵没有自激活性。同时,菌体在液体中振荡培养时可以正常生长,说明所构建的诱饵质粒对酵母生长没有毒性,可以用于紫云英 cDNA 文库中靶蛋白的筛选。

2.2 蛋白相互作用阳性克隆的筛选与验证

将检测无自激活性和无毒性的诱饵菌株 Y187 (pGBKT7-NORK-TM) 与已构建好的紫云英根(瘤)部组织 cDNA 文库菌株 AH109 (pGADT7-cDNA)^[1] 杂交,在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上筛选得到 175 个杂交子,然后在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade+X-gal 平板上复筛,获得 41 个显蓝色的阳性克隆。抽提阳性克隆子质粒,利用 pGADT7 质粒上的通用引物 (5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACC -3', 5'-AGTGAAC-TTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGA -3') 进行 PCR 检测。结果显示插入 cDNA 片段位于 700~1 500 bp 之间,然后将扩增获得单一条带的目标质粒转化大肠杆菌 DH10B,利用 pGADT7 质粒上的抗性标记筛选目标质粒。如菌落 PCR 检测条带大小与筛库时检测大小一致,则将此转化正确且条带单一的克隆进行插入片段的全长测序。

2.3 目标克隆中 cDNA 插入片段的序列分析

将测序获得的 cDNA 序列在 NCBI 中进行 Blast 分析发现,阳性克隆主要包含两大类。一类为甲硫氨酸亚砷还原酶结构域(图 1)。甲硫氨酸亚砷还原酶可将甲硫氨酸亚砷还原为甲硫氨酸。生物通过这个过程可以缓解氧化压力。另一类为真核翻译延伸因子 1 α 亚科超家族。真核翻译延伸因子蛋白包含 Ras、EF1- α -II 和 EF1- α -III 3 个结构域(图 2),具有调控细胞增殖和分化、参与细胞信号传导等重要的生物学功能。本研究着重探讨 AsEF1- α 与诱饵蛋白 NORK-TM 的相互作用。

```

1 ETEKMSFNLM RISSSTPTTP IFSNLLQPLR SPSRTFFISI
41 SPSNRITSTL VNHQRKRGRF SGIVAMAASS SYNKSEEWNR
81 AVLSPEQFRI LRQKTEYYPG TGEYDKPFGE GVYSCAGCGT
121 PLYKSTIKFN SGGGNPAFFE GLPGAIKRTA DFDGRRIEIT
161 CAACGGHLGH VFKGEGFSTP TDERHCVNSI SLKFAEINSS
201 *

```

图中黑色方框区域代表 SeIR 结构域,该结构域与蓖麻的甲硫氨酸亚砷还原酶具有 86% 的同源性,而其与大豆中一种未知蛋白具有 87% 的同源性。In the figure the black box represents SeIR (structural) domain, this domain has a 86% homology with a methionine sulfoxide reductase in castor, while a 87% homology with an unknown protein in soybean.

图 1 甲硫氨酸亚砷还原酶蛋白序列

Fig. 1 The protein sequence of methionine-R-sulfoxide reductase

```

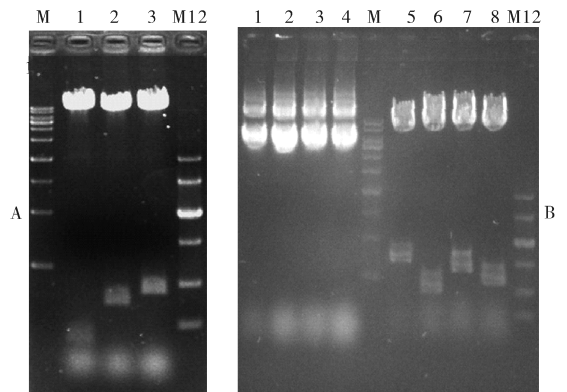
1 GDNMIRSTN LDVYKPTLL EALDQINEPK RFSDVPPSLI
41 LQDVYKIGGI GVPPGCRVET GVIKPGMLVT FAPTGLITEV
81 KSVEMHHEAL PEALPGDNVG FNKKNVAVKD LKRGFVASNS
121 KDDEAL EAAN FISVYLNH PKRIGNYAP VLOCHTSHIA
161 VKFAELVTKT DRRSCKEIEK EPKFLKNGDA GVYKMPIKPI
201 MYDETEAEYP PLGREAVRDM ROTAANGVIK SVEKKDPTGA
241 ITKAAAKKK *

```

图中的实线,点线和虚线方框区域分别代表 Ras、EF1- α -II 和 EF1- α -III 3 个结构域。The full, dotted and dashed box (region) respectively represent the Ras, EF1- α -II and EF1- α -III structural domains.

图 2 AsEF1- α 超家族蛋白序列

Fig. 2 The protein sequence of translation elongation factor-1 alpha



A: 分别含有 3 个独立结构域的 AD 质粒 The three plasmids of different mutated fragments cloned in pGADT7; 1: pGADT7-Ras; 2: pGADT7-EF1- α -II; 3: pGADT7-EF1- α -III; B: 分别含有 2 个组合结构域的 AD 质粒 The four plasmids of different two fragments cloned in pGADT7; 1, 5: AD-Ras + EF1- α -II + EF1- α -III; 2, 6: AD-Ras + EF1- α -II; 3, 7: AD-EF1- α -II + EF1- α -III; 4, 8: AD-Ras + EF1- α -III; M: 1 kb ladder; M12: Marker 12.

图 3 不同截短结构域所构建 AD 质粒的酶切验证

Fig. 3 The enzymatic digestion of different mutated fragments cloned in pGADT

2.4 靶蛋白 AsEF1- α 与诱饵蛋白 NORK-TM 互作的关键结构域确定

抽提测序正确的目标质粒 pGADT7-AsEF1- α ，回转酵母 AH109，根据测序所得到的 AsEF1- α 基因序列设计引物，利用 PCR 扩增靶蛋白 AsEF1- α 中的 Ras、EF1- α -II 和 EF1- α -III 3 个结构域，将其分别构建到载体 pGADT7 上，同时将任意 2 个结构域组合后也分别构建于载体 pGADT7，经酶切(图 3)和测序分析正确后转化酵母 AH109，与诱饵菌株进行小范围杂交，并测定杂合子的 β -半乳糖苷酶活性(图 4，图 5)。结果显示：AsEF1- α 蛋白与空载体 pGBKT7 没有相互作用，说明靶蛋白 AsEF1- α 无自激活性。当 3 个结构域单独存在时，EF1- α -III 与诱饵 NORK-TM 具有微弱相互作用。在结构域重新组合后，EF1- α -II 与 EF1- α -III 以及 Ras 与 EF1- α -III 构成的重组结构域均表现出与诱饵 NORK-TM 的

互作，且与全长 AsEF1- α 相比，互作强度略高(图 5)。因此推测，结构域 EF1- α -III 是靶蛋白 AsEF1- α 与诱饵 NORK-TM 互作的关键结构域，另外 2 个结构域，尤其是 Ras 结构域起到一定的辅助作用。

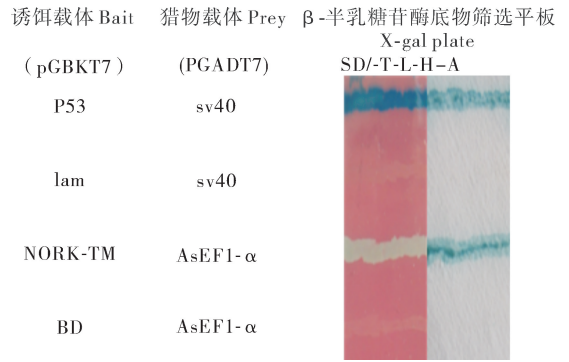


图 4 靶蛋白 AsEF1- α 与 NORK-TM 的互作假阳性排除
Fig. 4 Exclude false-positive test of interaction between the protein AsEF1- α and NORK-TM

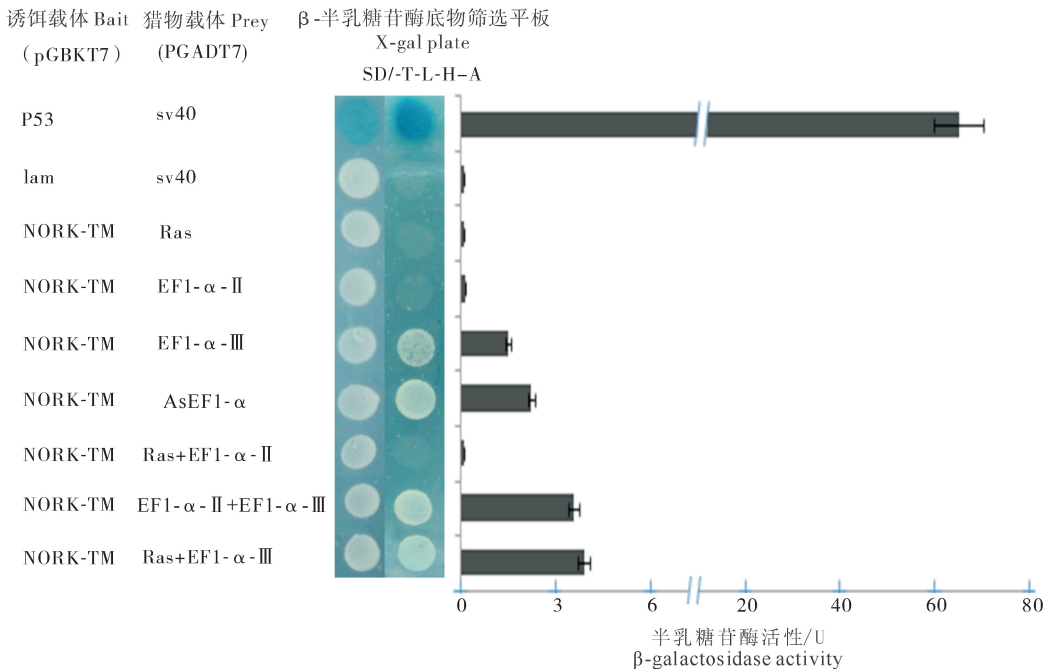


图 5 截短突变体在蛋白互作中的 β -半乳糖苷酶活性测定

Fig. 5 The measurement of β -galactosidase activity (Miller Units) for the mutants interacting with bait protein in the yeast two-hybrid system

3 讨 论

本研究利用紫云英结瘤受体激酶(NORK)的 TM 结构域为诱饵，从紫云英根(瘤)部组织 AD cDNA 文库中筛选获得与 NORK-TM 发生相互作用

的靶蛋白 AsEF1- α 。NORK 控制着两大共生菌系(固氮根瘤菌及放线菌和菌根真菌)对植物根部感染的早期阶段。有研究表明 NORK 基因参与了结瘤因子的接受传递，进而启动信号转导形成根瘤，虽然 NORK 蛋白这种具有胞外序列相似的家族在植物

中是广泛存在的,但目前关于结瘤受体激酶的具体功能还不太清楚^[4-7],因此,本研究试图通过分离鉴定其相互作用的靶蛋白,从新的角度说明和分析结瘤受体激酶在共生固氮过程中的功能机制。

真核生物中翻译延伸因子 EF1- α 包含 Ras、EF1- α -II 和 EF1- α -III 3 个结构域,可能参与多种细胞功能。EF1- α 帮助依赖于 GTP 的氨酰 tRNA 与核糖体的结合,与真核细胞骨架的肌动蛋白相互作用,在伸缩环微丝的组织形成中发挥关键调节作用^[8-9],也可能在细胞转化和细胞凋亡方面发挥功能作用^[10]。Ras 家族调控基因表达,在信号传导网络中起着极为重要的开关作用,同时在正常细胞增殖中亦具有极重要的作用^[11-14]。另外,*ras* 也是一类原癌基因,位于细胞膜上,介导各种酪氨酸激酶引起的细胞增殖分化^[15-16]。最近的研究显示,Ras 与乳腺癌等肿瘤的发生具有相关性^[17]。百合的 LIEF1- α 1 可以与 CCaMK 蛋白相互作用,被 CCaMK 通过 Ca^{2+} 和 CaM 依赖的方式直接磷酸化^[17],可能参与 Ca^{2+} 信号途径。根据以上研究结果,预测紫云英翻译延伸因子 (AsEF1- α) 参与了早期结瘤过程中的信号转导。

本研究表明紫云英翻译延伸因子 AsEF1- α 与诱饵蛋白 NORK-TM 存在相互作用,并将其互作关键结构域定位于 AsEF1- α 的 EF1- α -III 结构域,AsEF1- α 蛋白可能参与 NORK 蛋白影响根瘤形成过程中的信号转导,但其传递途径及具体机制还需要进一步的研究。例如,可以通过双分子荧光互补技术 (BiFC) 研究 2 个互作蛋白在细胞内的共定位,通过免疫荧光或免疫电镜研究 2 个蛋白的亚细胞或超显微定位,通过超表达和 RNAi 技术研究目标靶蛋白 AsEF1- α 在共生固氮过程中的生物学功能等。

参 考 文 献

- [1] 刘燕,谷慧琳,熊小波,等.紫云英 AD-cDNA 文库构建及与血红蛋白 Lb 相互作用靶蛋白的筛选[J].微生物学报,2010,50(12):1607-1612.
- [2] 代广中,袁兆栋,苟洪兰,等.百脉根离子通道蛋白 Pollux 与翻译延伸因子 EF1A 的相互作用[J].华中农业大学学报,2012,31(1):34-38.
- [3] GILES E D, OLDROYD, ALLAN D J. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in *Legumes*[J]. Annu Rev Plant Biol,2008,59:519-546.
- [4] 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.
- [5] PERHALD A, ENDRE G, KEVEI Z, et al. Strategies to obtain stable transgenic plants from non-embryogenic lines: complementation of the *nn1* mutation of the NORK gene in *Medicago sativa* MN1008[J]. Plant Cell Rep,2006,25:799-806.
- [6] GABRIELLA E, ATTILA K, ZOLTAN K, et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development[J]. Nature,2002,417:962-966.
- [7] 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 japonicas*[J]. Plant Physiology,2008,148:337-347.
- [8] NUMATA O, KURASAWA Y, GONDA K, et al. Tetrahymena elongation factor-1alpha is localized with calmodulin in the division furrow[J]. Journal of Biochemistry (Tokyo),2000,127(1):51-56.
- [9] CHEN E, PROESTOU G, BOURBEAU D, et al. Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis[J]. Experimental Cell Research,2000,259(1):140-148.
- [10] YUKSEL B, ABDUL R. Legume small GTPases and their role in the establishment of symbiotic associations with *Rhizobium* spp[J]. Plant Signaling & Behavior,2009,4(4):257-260.
- [11] AURIAC M C, TIMMERS A C J. Nodulation studies in the model legume *Medicago truncatula*: advantages of using the constitutive EF1 alpha promoter and limitations in detecting fluorescent reporter proteins in nodule tissues[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions,2007,20(9):1040-1047.
- [12] REHNER S A, BUCKLEY E. A *Beauveria phylogeny* inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*[J]. Mycologia,2005,97(1):84-98.
- [13] SHEPHERD J C, WALLDORF U, HUG P, et al. Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer[J]. PNAS,1989,86(19):7520-7521.
- [14] GONEN H, SMITH C E, SIEGEL N R, et al. Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu[J]. PNAS,1994,91(16):7648-7652.
- [15] CLORE A M, DANNENHOFFER J M, LARKINS B A. EF-1 alpha is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells[J]. The Plant Cell,1996,8(11):2003-2014.
- [16] GLYNN N C, HARE M C, PARRY D W, et al. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status[J]. Mycological Research,2005,109:872-880.

- [17] WANG W, POOVAIAH B W. Interaction of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase with a homolog of eukaryotic elongation factor-1 α [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(17): 12001-12008.

Screening and identification of target proteins interacting with NORK(nodulation receptor kinase) of *Astragalus sinicus*

WANG Ning LI Yi-xing LIU Yan CHEN Da-song LI You-guo

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

Abstract The nodulation receptor kinase (NORK) of *Astragalus sinicus* mainly contains three functional domains including repetitive sequences of the N-terminal leucine-rich domain (LRR), the central transmembrane domain (TM), and the C-terminal kinase domain (PK), respectively. Using yeast two-hybrid technique and TM domain as the bait protein, its interacting target proteins were screened and identified. 41 original positive clones were obtained. After the inserted cDNA sequencing and Blast analyses in the NCBI database, an interacting target protein with the same biological function as a translation elongation factor protein EF1 α was identified. The corresponding protein encoding gene was named *AsEF1- α* . The further confirmed experiment showed that the key interacted domain of *AsEF1- α* protein was located in the EF1- α -III. These results provide a fundamentally theoretical basis for future in-depth study of the genes' function and mechanism, and also provide novel information and material for establishing early root nodulation signaling network in legume plant.

Key words *Astragalus sinicus*; NORK; EF1- α ; protein interaction; yeast two-hybrid

(责任编辑:张志钰)