第 29 卷 第 5 期 华 中 农 业 大 学 学 报 Vol. 29 No. 5
2010 年 10 月 Journal of Huazhong Agricultural University Oct. 2010,582～587

百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 的转录激活作用*

储晓洁 康 恒 胡晓晶 张忠明**

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070

摘要 共生结瘤过程是根瘤菌与宿主植物交换信号分子的相互作用过程,结瘤信号通道蛋白基因 *NSP*1 和 *NSP*2 是结瘤因子诱导的共生信号转导途径的必要元件。LjNSP1 和 LjNSP2 蛋白都包含植物所特有的 GRAS 结构域,推测为转录调节子,但缺乏明确的生化证据。为验证这一推测,本研究采用酵母双杂交系统,将两者分别融合到酵母 GAL4 转录因子的 DNA 结合结构域上,根据是否能激活报告基因的表达来验证它们的转录激活能力。结果表明 LjNSP1 和 LjNSP2 在酵母体内均具有转录激活的能力。为进一步确定转录激活的区域,对 LjNSP1 和 LjNSP2 构建了一系列的缺失突变,鉴别出转录激活区段均位于两者的 N-末端的可变区域。为验证作为转录因子的 LjNSP1 和 LjNSP2 是否具有结合某种特定基因的启动子的能力,进行了酵母单杂交实验。其结果表明,LjNSP1 和 LjNSP2 蛋白均能够结合根瘤起始基因 *NIN* 的启动子,但不能结合钙离子结合蛋白基因 *CBP*1 的启动子。

关键词 百脉根;共生信号转导;转录激活;GRAS 蛋白;酵母单杂交

中图分类号 S 154.38^{+}1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0582-06

豆科植物能特异地与根瘤菌形成固氮根瘤,根瘤的形成和发育依赖于共生双方基因及信号分子的参与[1]。结瘤因子作为根瘤菌共生信号分子作用于宿主植物,引起植物一系列形态、生理生化等表型变化及共生信号转导[2]。目前,已经从豆科植物百脉根和苜蓿中鉴定出结瘤因子受体和一套共生信号传递基因[3-5]。其中结瘤信号通道基因 *NSP*1 和 *NSP*2 (nodulation signaling pathway) 是结瘤因子信号转导所必需的[6-7]。突变体表型研究结果表明,*NSP*1、*NSP*2 基因分别突变后在接种根瘤菌或结瘤因子处理条件下,都不能引起根毛的卷曲、侵染线的形成以及皮层细胞的分裂,但不影响根毛尖端的隆起和分枝[8]。*NSP*1、*NSP*2 基因所编号的蛋白都属于 GRAS 家族类转录因子,在共生信号传递途径中位于 CCaMK 下游,NSP1 直接受 CCaMK 的调控[9-10]。

NSP1 和 CCaMK 都定位在细胞核中,但还没有证据直接证实它们之间的相互作用。NSP2 的亚细胞定位不同于 NSP1,它开始定位在核膜和内脂网上,当用结瘤因子处理后则定位于细胞核中[6,11]。

GRAS 家族蛋白广泛存在于非豆科植物中[12],其中 *Lj-NSP*1、*Lj-NSP*2 基因与水稻的 *Os-NSP*1、*Os-NSP*2 都分别归类于一个亚家族。将烟草 *Nb-NSP*1 导入百脉根 *Lj-NSP*1 突变体能恢复结瘤的功能,其根瘤也具有固氮酶活性[13]。最近的研究结果[14]表明,在苜蓿中,NSP1 和 NSP2 能形成同源和异源多聚体并结合在早期结瘤素基因 *ENOD*11 启动子上,调控早期结瘤素基因的表达。然而,在百脉根中尽管 *LjNSP*2 与 *MtNSP*2 在核苷酸水平有 73%的同源性,但 *LjNSP*2 与 *MtNSP*2 表达模式不同,*MtNSP*2 在根和茎中均有表达,并随着根瘤菌的接种表达量增加;而 *LjNSP*2 只在根和早期的根瘤中表达,在成熟的根瘤中被强烈抑制[6,11]。笔者利用酵母单、双杂交系统,研究了百脉根 LjNSP1 和 LjNSP2 蛋白在酵母体内的转录激活和结合 DNA 的能力,旨在为阐明其结构及其在结瘤因子信号传导中的调控机制提供线索。

收稿日期:2009-04-28;修回日期:2010-03-19

* 国家自然科学基金项目(30870186)资助

** 通讯作者. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

储晓洁,女,1985 年生,硕士研究生. 研究方向:共生固氮体系的分子生物学. E-mail: cxj822@163.com

1　材料与方法

1.1　菌株与质粒

酵母（*Saccharomyces cereviaiae*）Y187 菌株，质粒 pGBKT7 和 pGADT7-Rec 购自 Clontech 公司（美国，加利福尼亚）。百脉根中生根瘤菌（*Mesorhizobium loti*）菌株 NZP2037、*E. coli* DH10B 菌株由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

1.2　主要试剂

Trizol RNA 抽提试剂为 Invitrogen 公司（美国，加利福尼亚）产品，反转录试剂盒（TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0）、限制性内切酶和连接酶等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司，PCR 所用引物和测序由北京奥科生物公司提供。

1.3　百脉根的培养方法

将百脉根（MG-20）的种子进行表面消毒处理：70%无水乙醇处理 30 s，2%次氯酸钠浸泡 8 min，无菌水漂洗 7～8 次，利用残留的水分进行催种发芽，22 ℃避光培养，每天需换新鲜的无菌水，待芽长到约 2 cm 时移栽至灭菌后的细沙培养，每天浇灌无菌水，待子叶脱落并长出新叶时接种根瘤菌，此后每天以无氮营养液进行浇灌，22 ℃光照培养。

1.4　GAL4 BD-NSP 酵母表达质粒的构建

根据 NCBI 数据库提供的 *NSP*1 基因（GenBank：EF012819）和 *NSP*2（GenBank：DQ665943）序列分别设计 *NSP*1 的引物为（上游引物 5′-CCGGAATTCATGACCATGGAACCAAAC-3′　含 *Eco*RⅠ酶切位点，下游引物 5′-ATCGGATCCTCAGCTTGTGCCACCCT-3′含 *Bam*HⅠ酶切位点）和 *NSP*2 的引物（上游引物 5′-GGACTGCCATATGGAAATGGATATAGATTG-3′含 *Nde*Ⅰ酶切位点，下游引物 5′-ATCGGATCCCTATGCACAATCTGATTC-3′含 *Bam*HⅠ酶切位点），以百脉根总 RNA 的反转录产物为模板，PCR 程序为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，循环 30 次；72 ℃延伸 10 min。扩增出 *NSP*1 和 *NSP*2 的全长编码框，经 *Nde*Ⅰ和 *Bam*HⅠ酶切后，连接到 pGBKT7 上得到酵母表达质粒。所有构建的载体均经过测序验证。

1.5　融合蛋白对酵母的毒性检测和转录激活分析

采用 LiAc 法制备酵母菌株 Y187 的感受态细胞，将诱饵质粒转化 Y187 菌株中。将 pGBKT7-Lj-NSP1/Y187 和 pGBKT7-Lj-NSP2/Y187 划线接种于含 X-gal（80 mg/L）的 SD/-Trp 选择培养基上，检测报告基因 *LacZ* 的表达。以 pGBKT7/Y187 为阴性对照。同时，分别挑取新鲜的酵母转化子 pGBKT7-*nsp*2-1/Y187 和空载体 pGBKT7/Y187 于 SD/-Trp 液体培养基中，30 ℃摇床培养 16～24 h，测定 $D_{600\ nm}$值，鉴定融合蛋白的毒性。

1.6　ONPG 法定量检测 β-半乳糖苷酶活性

将 2 mL 过夜的待测培养物加入 8 mL YPD 培养基中，30 ℃，培养 3～5 h，记录收集细胞的 $D_{600\ nm}$值；收集 1.5 mL/管，去上清，加入 1.5 mL Z buffer，再次离心收集，用 300 μL Z buffer 重悬细胞；取 100 μL 到新的离心管中，浸入液氮速冻 0.5～1 min，取出置 37 ℃水浴 0.5～1 min，重复 2～5 次（在 1 个新的离心管中加入 100 μL Z buffer 作为空白对照）；加入 0.7 mL Z buffer 和 β-巯基乙醇混合液，并迅速加入 160 μL ONPG（4 mg/mL），开始记时；30 ℃水浴孵育，当反应液变黄时，加入 0.4 mL 1 mol/L的 Na_2CO_3终止反应，记录所用时间；离心后取出上清，检测上清 $D_{420\ nm}$的值；利用 Miller 公式计算 β-半乳糖苷酶活/U＝ $1\ 000\times D_{420\ nm}/(t\times V\times D_{600\ nm})$（$t$ 为所用时间，V ＝ 0.1×浓度因子，$D_{600\ nm}$为 1 mL 培养物在 600 nm 时所测光密度值）。

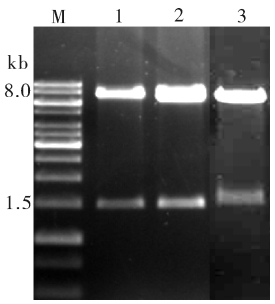
1.7　酵母单杂交分析

pGADT7-NSP1、pGADT7-NSP2 分别与 pNIN-HIS2 和 pCBP1-HIS2 共转化酵母菌 Y187，同时以 pGADT7-NSP1、pGADT7-NSP2 分别与 p53-HIS2 共转化酵母菌 Y187 作为阴性对照，以 pGADT7-53 与 pHIS-53 共转化酵母菌 Y187 作为阳性对照。在 SD/-His/-Leu/-Trp＋45 mmol/L 3-AT的选择性培养基上，检测蛋白是否能结合目标启动子，从而启动下游基因的表达。

2　结果与分析

2.1　百脉根 *NSP*1 和 *NSP*2 基因克隆及酵母表达载体的构建

百脉根结瘤信号通道基因 *NSP*1 和 *NSP*2 所编号的蛋白都属于 GRAS 家族转录因子，它们在根瘤菌共生信号转导中起重要作用。为了研究 NSP1、NSP2 蛋白的结构和功能，通过 NCBI 数据库提供的序列（GenBank：EF012819、DQ665943），设计引物并利用 RT-PCR 分别从百脉根中扩增得出全长的 *NSP*1（1 629 bp）、*NSP*2（1 500 bp）CDS 片段，分别克隆到酵母双杂交载体 pGBKT7 和



M. 1 kb DNA ladder 分子质量标准 1 kb DNA ladder marker; 1. pGADT7-NSP2 的 *Nde* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切结果 pGADT7-NSP2 digested with *Nde* Ⅰ and *Bam*H Ⅰ; 2. pGBKT7-NSP2 的 *Nde* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切 pGBKT7-NSP2 digested with *Nde* Ⅰ and *Bam*H Ⅰ; 3. pGBKT7-NSP1 的 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切结果 pGBKT7-NSP1 digested with *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ.

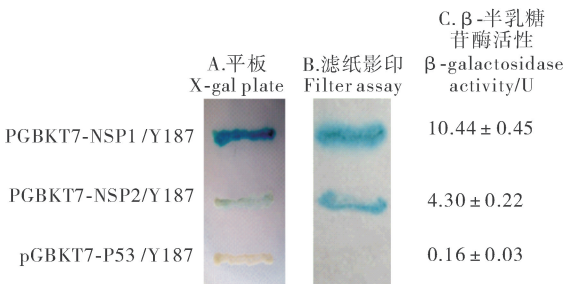
图 1 重组载体的酶切验证

Fig. 1 Construction of yeast expression plasmid

pGADT7 质粒上，并经测序验证为正确的克隆(图 1)。

2.2 百脉根 NSP1 和 NSP2 蛋白在酵母中的转录激活作用

将构建的 pGBKT7-NSP1 和 pGBKT7-NSP2 酵母表达载体分别转化到酵母菌株 Y187 中，鉴定 NSP1 和 NSP2 是否具有转录因子的激活作用，结果表明：分别含有 pGBKT7-NSP1 和 pGBKT7-NSP2 的 Y187 菌株在 SD/-Trp/X-gal 的平板上，都能检测到报告基因 *lacZ* 的表达，说明 NSP1 和 NSP2 在酵母细胞中都具有激活 *lacZ* 报告基因的作用。β-半乳糖苷酶测定结果表明 NSP1 的激活活性高于 NSP2(图 2)。



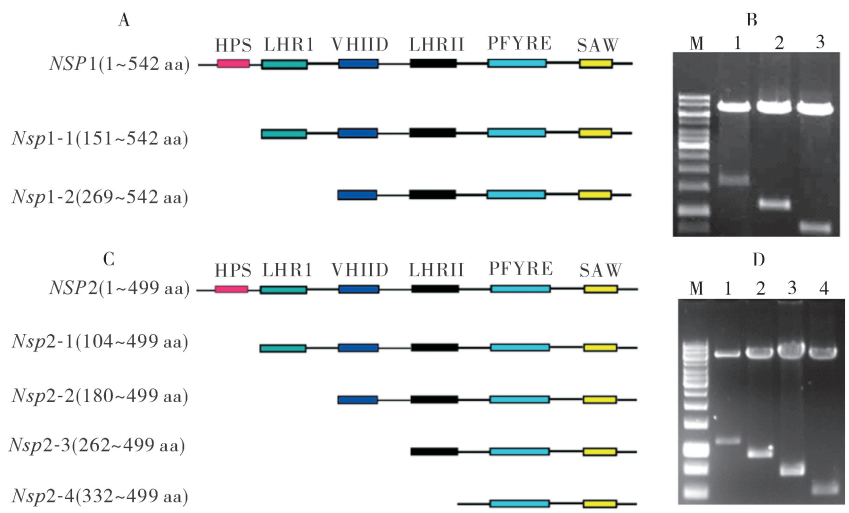
A. SD/-Trp/X-gal 平板上检测转录激活作用 *In vivo* plate assay of β-galactosidase using X-gal in the medium SD/-Trp/; B. 酵母菌落滤纸影印检测转录激活作用 β-galactosidase assay using colony-lift filter; C. ONPG 法定量检测β-半乳糖苷酶活性 Liquid culture assay using ONPG as substrate.

图 2 NSP1 和 NSP2 在酵母中转录激活作用的检测

Fig. 2 Test the transcriptional activation of NSP1 and NSP2 in yeast

2.3 百脉根 NSP1 和 NSP2 蛋白结构域缺失突变体的构建

尽管百脉根 NSP1 和 NSP2 在蛋白质水平上同源性很低(氨基酸等同性和相似性分别为20%、



A. 构建 *NSP1* 全长和 2 个缺失突变体的结构 Constuct of full length *NSP1* and two deletion mutants; B. *NSP1* 全长和 2 个缺失突变体克隆到 pGBKT7 质粒上的酶切结果：M. 1 kb DNA ladder; 1. pGBKT7-NSP1 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切; 2. pGBKT7-*nsp*1-1 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切; 3. pGBKT7-*nsp*1-2 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切 *NSP1* and two deletion mutants cloned in pGBKT7, each was digested with *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ; C. 构建 *NSP2* 全长和 4 个缺失突变体的结构 Constuct of full length *NSP2* and four deletion mutants; D. *NSP2* 4 个缺失突变体克隆到 pGBKT7 质粒上的酶切结果：M. 1 kb DNA ladder; 1. pGBKT7-*nsp*2-1 *Nde* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切; 2. pGBKT7-*nsp*2-2 *Nde* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切; 3. pGBKT7-*nsp*2-3 *Nde* Ⅰ 和*Bam*H Ⅰ 双酶切；pGBKT7-*nsp*2-4 *Nde* Ⅰ 和*Bam*H Ⅰ 双酶切 Four deletion mutants cloned in pGBKT7, each was digested with *Nde* Ⅰ and *Bam*H Ⅰ.

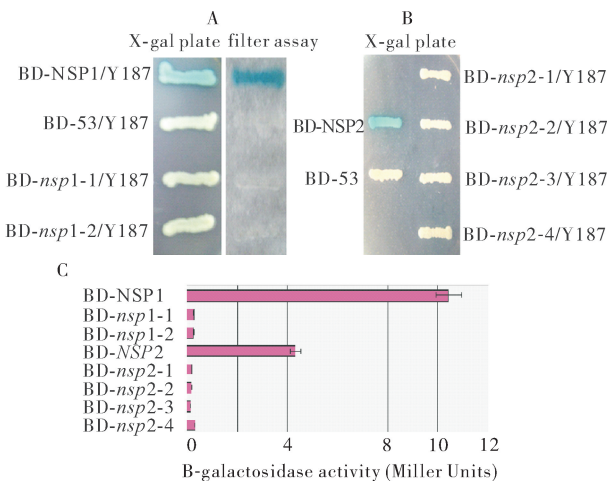
图 3 NSP1 和 NSP2 缺失突变体的构建

Fig. 3 Construct deletion mutants of NSP1 and NSP2

33%)，但它们含有相同的几个蛋白结构域，分别为：LHRI、VHIID、LHRII、PFYRE、SAW 结构域[15]。为了鉴定出哪个结构域与激活作用相关，按照 NSP1 和 NSP2 蛋白结构域位置(图 3-A，C)，分别构建了 *NSP1* 基因的 2 个缺失突变体、*NSP2* 基因的 4 个缺失突变体。然后将这些突变体基因分别克隆到 pGBKT7 质粒上，所构建的酵母重组表达载体经酶切和测序验证，其结果见图 3-B、D。

2.4　NSP1 和 NSP2 蛋白转录激活结构域的鉴定

将构建的缺失突变基因表达载体转化到酵母菌株 Y187 中，SD/-Trp/X-gal 检测转录激活活性。结果表明：NSP1 在缺失掉 N-末端 150 个氨基酸后不具备转录激活功能，其激活结构域位于 N-末端 150 个氨基酸中(图 4-A、C)；NSP2 在缺失掉 N-末端 104 个氨基酸后也不具备转录激活功能，其激活结构域位于 N-末端 104 个氨基酸中(图 4-B、C)，在这一区段中含有典型的多聚谷氨酸(polyE)和多聚苏氨酸(polyT)的 HSP 结构域，该结构域与转录激活作用密切相关。而在 NSP1 中未发现该结构域，但激活活性高于 NSP2 的 2 倍以上(图 4-C)。



A. SD/-Trp/X-gal 和平板影印分别检测 NSP1 及其 2 个缺失突变体的转录激活活性，可见 pGBKT7- *nsp*1-1 和 pGBKT7- *nsp*1-2 均不显蓝，NSP1 激活结构域位于 N-末端 150 个氨基酸中 *In vivo* SD/-Trp/X-gal plate and colony-lift filter assay of transcriptional activation of NSP1 and the two deletion mutants, BD-53 as negative control; B. SD/-Trp/X-gal 分别检测 NSP2 及其 4 个缺失突变体的转录激活活性，可见 pGBKT7- *nsp*2-1、pGBKT7- *nsp*2-2、pGBKT7- *nsp*2-3 和 pGBKT7- *nsp*2-4 均不显蓝，NSP2 激活结构域位于 N-末端 104 个氨基酸中 *In vivo* SD/-Trp/X-gal plate assay of transcriptional activation of NSP2 and the four deletion mutants, BD-53 as negative control; C. ONPG 法定量检测 NSP1、NSP2 及其缺失突变体的β-半乳糖苷酶活性 The β-galactosidase activity of NSP1, NSP2 and the six deletion mutants using ONPG as substrate.

图 4　鉴定 NSP1 和 NSP2 的转录激活结构域

Fig. 4　The domain of transcriptional activation of NSP1 and NSP2

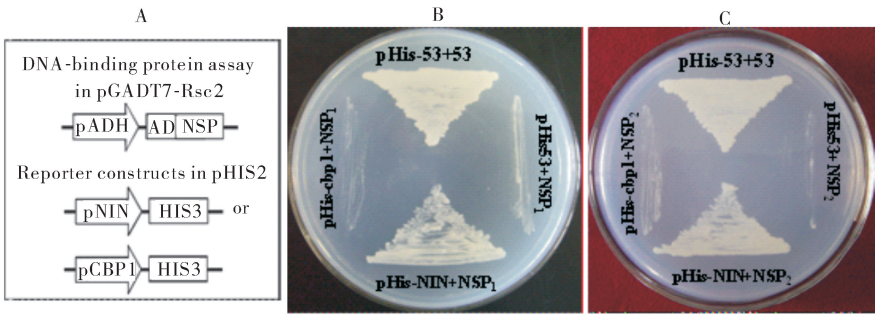
2.5　百脉根 NSP1 和 NSP2 具有结合 *NIN* 基因启动子的能力

在模式豆科植物百脉根中，已有的研究表明结瘤启始基因 *NIN*(nodule inception)和钙离子结合蛋白基因(*CBP*1)的表达完全依赖于根瘤菌结瘤因子信号，*NIN* 所编码的蛋白也是一个转录因子，在根瘤形成过程中起关键的调控作用[15-16]。在另一个模式豆科植物蒺藜苜蓿中，MtNSP1、NSP2 作用于早期结瘤素基因 *ENOD*11 启动子[14]。在百脉根共生信号转导途径中，*NSP*1、*NSP*2 有可能位于 *NIN* 基因上游。因此，本研究利用前期克隆的 *NIN* 和 *CBP*1 基因启动子[17]，将 *NIN* 和 *CBP*1 的启动子区域分别融合到到载体 pHIS2 的报告基因上，同时将 NSP1 和 NSP2 蛋白分别融合到 pGADT7-Rec2 的 GAL4-AD 结构域上(图 5-A)，通过酵母单杂交技术分别鉴定 NSP1、NSP2 是否具有结合 *NIN* 和 *CBP*1 基因启动子的能力。结果表明：NSP1 和 NSP2 都具有结合起始结瘤基因(*NIN*)基因启动子的能力，但都不能结合百脉根钙离子结合蛋白(*CBP*1)基因的启动子(图 5-B、C)。

3　讨　论

在百脉根结瘤因子信号转导途径中，GRAS(GAI，RGA，SCR)家族蛋白有 2 个：NSP1 和 NSP2，都含有一个可变的 N-末端和一个高度保守的 C-末端，包含 5 个熟悉的结构域，分别为：LHRI、VHIID、LHRII、PFYRE、SAW 结构域[18]。模式豆科植物苜蓿中，NSP1 和 NSP2 形成异源二聚体，MtNSP1 可以直接结合到 ENOD11 启动子顺式元件 AATTT 上，调控早期结瘤素基因的表达，结合启动子 DNA 区域是它的 2 个 LHR 结构域[14]。

在百脉根 *NSP*2 突变体中，*NIN* 的表达几乎完全阻断，诱导 *NIN* 的表达需要 *NSP*2 基因的参与[11,19]。百脉根 *NIN* 突变体能形成正常的共生菌根和根瘤菌诱导的早期反应，包括根毛的变形、Ca^{2+} 的流入和震荡[15]。对于信号从共生的一般途径传到结瘤特有的途径的过程中，信号元件如何相互作用尚未确定。有研究表明 MtNSP1 可以结合 *NIN* 启动子的－862～－13片段，但MtNSP2是否能



A. 将 *NIN* 和 *CBP*1 的启动子区域，分别融合到到载体 pHIS2 的报告基因上游，同时将 NSP1 和 NSP2 蛋白分别融合到 pGADT7-Rec2 的 GAL4-AD 结构域上，共转化入 Y187 中 NSP2 was expressed as a fusion protein with the GAL4 AD (pGADT7-NSP2) in yeast Y187 cells harboring the reporter construct NINpro::HIS3, CBP1pro:HIS3, which expresses the HIS3 reporter gene under the promoter of the NIN or CBP1 gene; B、C. 在 SD/-Trp-Leu-His 加有 45 mM 3-AT 的平板上共转化酵母的生长状况，p53-HIS2 和 pGADT7-53 共转化 Y187 作为阳性对照，p53-HIS2 和 pGADT7-NSP 共转化 Y187 作为阴性对照 Yeast cells were examined for growth on the SD/-Trp-Leu-His plates in the presence of 45 mM 3-AT. Yeast cells harboring p53-HIS2 and pGADT7-53 were used as a positive control, whereas those containing p53-HIS2 and pGADT7-NSP2 served as negative control.

图 5 酵母单杂交分析 NSP1 和 NSP2 结合 NIN 启动子的能力

Fig. 5 Assay of NSP1 and NSP2 binding to the NIN promoter by yeast one hybrid

够结合 *NIN* 启动子没有明确的证据[14]。本研究利用酵母单杂交技术，证明 LjNSP1 和 LjNSP2 在酵母体内均能够结合 *NIN* 启动子的－500～－1 片段，在体外还有待证明。LjNSP1 和 LjNSP2 蛋白推测为 GRAS 家族转录调节子，这个基因家族遍及植物王国(拟南芥中含有 33 个成员)，涉及赤霉素等植物激素信号转导、根的发育、叶腋的发育以及芽顶端分生组织的维持[6]。本研究证明 LjNSP1 和 LjNSP2 都具有转录激活作用，其激活区段均位于近 N-末端区域；并通过酵母单杂交，证明了 LjNSP1 和 LjNSP2 在酵母体内均能够结合 *NIN* 启动子，初步断定它们具有结合 DNA 的能力，为体外生化水平和植物体内进一步确证 LjNSP1 和 LjNSP2 结合 DNA 能力提供基础。

参 考 文 献

[1] 胡国元，周俊初. 华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)研究进展[J]. 华中农业大学学报，2006，25(2)：213-218.

[2] OLDROYD G E D, DOWNIE J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 519-546.

[3] 朱浩，朱辉，杨绮，等. 百脉根 AD-cDNA 文库的构建及与结瘤因子受体 NFR1 相互作用蛋白的鉴定[J]. 华中农业大学学报，2007，26(6)：793-799.

[4] MADSEN E B, MADSEN L H, RADUTOIU S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals[J]. Nature, 2003, 425(6958): 637-640.

[5] KISTNER C, WINZER T, PITZSCHKE A, et al. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis[J]. Plant Cell, 2005, 17(8): 2217-2229.

[6] KALO P, GLEASON C, EDWARDS A, et al. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators[J]. Science, 2005, 308(5729): 1786-1789.

[7] SMIT P, RAEDTS J, PORTYANKO V, et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription[J]. Science, 2005, 308(5729): 1789-1791.

[8] OLDROYD G E D, LONG S R. Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 1027-1032.

[9] TIRICHINE L, IMAIZUMI-ANRAKU H, YOSHIDA S, et al. Deregulation of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1153-1156.

[10] GLEASON C, CHAUDHURI S, YANG T, et al. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1149-1152.

[11] MURAKAMI Y, MIWA H, IMAIZUMI-ANRAKU H, et al. Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD*40 gene expression in nodule initiation[J]. DNA Research, 2006, 13(6): 255-265.

[12] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development[J]. Planta, 2004, 218(5): 683-692.

[13] HECKMANN A B, LOMBARDO F, MIWA H, et al. *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume[J]. Plant

Physiology，2006，142(4)：1739-1750.

[14] HIRSCH S，KIM J，MUNOZ A，et al. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*[J]. The Plant Cell，2009，21(2)：545-557.

[15] SCHAUSER L，ROUSSIS A，STILLER J，et al. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules[J]. Nature，1999，402(6758)：191-195.

[16] WEBB K J，SKØT L，NICHOLSON M N，et al. *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*[J]. Mol Plant Microbe Interact，2000，13(6)：606-616.

[17] 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 Physiol，2008，148(1)：337-347.

[18] PYSH L D，WYSOCKA-DILLER J W，CAMMILLERI C，et al. The GRAS gene family in *Arabidopsis*：sequence characterization and basic expression analysis of the scarecrow-like genes[J]. The Plant Journal，1999，18(1)：111-119.

[19] MARSH J，RAKOCEVIC A，MITRA R，et al. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase[J]. Plant Physiol，2007，144(1)：324-335.

Transcriptional Activation of *Lotus japonicus* NSP1 and NSP2

CHU Xiao-jie　KANG Heng　HU Xiao-jing　ZHANG Zhong-ming

State Key Laborotory of Agricultural Microbiology，Huazhong Agricultural University，Wuhan 430070，*China*

Abstract　The symbiotic nodulation between legumes and rhizobacteria is an interactive process of exchange of signal molecules. Genes for nodulation signal pathway *NSP*1 and *NSP*2 are the essential components for nod-factor induced symbiotic signal pathway. Protein encoded by LjNSP1 and LjNSP2 includes the plant-specific *GRAS* domain，which are predicted to code transcription factor，but the unique biochemical evidence remains to be identified. To examine this inference，the above two genes were fused into DNA binding domain for yeast GAL4 transcription factor with yeast two hybrid. Whether or not activating expression of downstream reporter genes were utilized to test their function of transcriptional activation. Our result substantiated encoding products of these two genes possess such activation in yeast. To further determine the transcriptional activation region，a series of deletion mutants were constructed，which successfully identified the activation region belonging to the variable domain of N terminal of each protein. Yeast one -hybrid was performed to test whether LjNSP1 and LjNSP2 proteins，possess function of binding promoter for certain specified genes as transcription factor. The result showed that proteins encoded by LjNSP1 and LjNSP2 were capable of binding promoter of *NIN*（nodulation initiation）gene，but failed to bind that of *CBP*1（calcium binding protein ）gene. This study demonstrates that LjNSP1 and LjNSP2 possess function of binding particular DNA and transcriptional activation，providing important significance for the elucidation of mechanism for nod-factor induced signaling.

Key words　*Lotus japonicus*；symbiotic pathway；transcriptional activation；GRAS protein；yeast one-hybrid

（责任编辑：张志钰）