

# 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 的相互作用

胡晓晶 储晓洁 康 恒 朱 辉 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** 豆科植物百脉根是研究共生固氮体系的模式植物之一, 对其根瘤菌共生信号转导途径和作用机制的研究, 有助于揭示根瘤菌与豆科植物共生关系建立和共生体形成的奥秘。本研究利用酵母双杂交系统和体外蛋白质相互作用技术, 证明百脉根 GARS 类家族转录因子结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 在体外体内均可以相互作用, 并将相互作用的位点定位在 NSP1 的 GRAS 结构域的 LHR II 区域和 NSP2 的 LHR I 区内。

**关键词** 百脉根; 结瘤信号通道蛋白 NSP1; 结瘤信号通道蛋白 NSP2; 共生信号转导; 酵母双杂交

**中图分类号** S 154.38<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0132-06

根瘤菌与豆科植物能特异地形成共生体——根瘤, 这种共生关系的建立涉及到低等微生物与其宿主植物之间复杂的信号识别、基因表达调控等过程<sup>[1-2]</sup>。在模式豆科植物共生信号转导途径中, 结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 位于 CCaMK(Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase)下游并受其调控, 其基因突变均导致不结瘤表型<sup>[3]</sup>。NSP1 和 NSP2 基因所编码的蛋白都属于 GRAS 家族转录因子<sup>[4]</sup>, 都含有保守的 LHR I、VHIID、LHR II、PFYRE、SAW 等 5 个结构域<sup>[5-6]</sup>, 但二者之间的同源性非常低(约 20%)。NSP1 定位于细胞核中, 而 NSP2 开始定位在核膜和类质网上, 当受根瘤菌感染或结瘤因子处理后则定位到细胞核内<sup>[6-7]</sup>。最近, Kalop 等<sup>[6]</sup>的研究结果表明: 在豆科植物苜蓿中 NSP1 可以直接结合到早期结瘤素基因 *ENOD11* 的启动子上, 而 NSP2 则不能直接结合到 *ENOD11* 的启动子上, NSP1 和 NSP2 在细胞核内可能形成同源和异源多聚体共同调控早期结瘤素基因的表达。然而, 在百脉根中尽管 *LjNSP2* 与 *MtNSP2* 在核苷酸水平有 73% 的同源性, 但 *LjNSP2* 与 *MtNSP2* 表达模式不同, *MtNSP2* 在根和茎中均有表达, 随着根瘤菌的接种表达量增加; 而 *LjNSP2* 只在根和早期的根瘤中表达, 在成熟的根瘤中被强烈抑制<sup>[4,8-9]</sup>。

前期的研究<sup>[10]</sup>结果表明: 百脉根 NSP2 和

NSP1 在酵母体内均具有转录激活的能力, 其转录激活区段均位于 GRAS 类蛋白 N-末端的可变区域, 缺失这一区段后, 在酵母中均失去转录激活作用, *LjNSP1* 和 *LjNSP2* 均能够结合启动结瘤基因 *NIN* (nodule inception) 的启动子。本研究利用酵母双杂交和体外蛋白质相互作用技术验证百脉根 NSP1 和 NSP2 蛋白是否具有形成异源二聚体的功能, 以证实其在体外、体内是否存在相互作用并进行定位。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

*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。

Y187 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株, 质粒 pGBKT7 和 pGADT7-Rec 购自 Clontech 公司 (美国, 加利福尼亚)。

### 1.2 主要试剂

引物合成和测序由北京奥科公司完成; 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; GST 柱子购自韦氏博慧公司; 凝胶回收试剂盒为 V-Gene 公司产品; SDS-PAGE 所需试剂和 X-Gal、IPTG、Amp、DTT 等购自 Sigma; 其他生化试剂均为国产分析纯产品。

收稿日期: 2010-05-04

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”)项目(2010CB1265027)和国家自然科学基金项目(30870186)

胡晓晶, 硕士研究生, 研究方向: 共生固氮体系的分子生物学. E-mail: huxj15@126.com

通讯作者: 张忠明, 博士, 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

1.3 pGEX-6P1-NSP、pET28a-NSP2/NSP2-1 及 NSP 全长的酵母表达质粒的构建

以百脉根总 RNA 的反转录产物为模板,PCR 程序为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,循环 30 次;72 ℃ 延伸 10 min。扩增出全长 NSP1 和 NSP2 以及 NSP1 的 4 种缺失突变体 DNA 片段,按常规方法分别克隆到 pET28a、pG-BKT7、pGADT7 载体上。

表 1 NSP1、NSP2 全长及缺失获得突变体基因的引物  
Table 1 Primers of NSP1, NSP2 full length and deletion mutants

| 基因<br>Gene        | 引物<br>Primer                                 | 内切酶<br>Endonuclease |
|-------------------|----------------------------------------------|---------------------|
| NSP1              | Upper: 5'-C GAATTCATGACC ATGGAAC-CA AAC T-3' | EcoR I              |
|                   | Lower: 5'-AAGTCTCGAGTCA GCTTGTG-CCAC-3'      | Xho I               |
|                   | Lower: 5'-ATCGGATCCTCAGCTTG TGC-CACCT-3'     | BamH I              |
| NSP1-1            | Upper: 5'-CGGAATTCGGTAGATGGGCAG-AGC-3'       | EcoR I              |
|                   | Lower: 5'- ATCTCGAGTCAGCTTGTGCC-ACCCT-3'     | Xho I               |
| NSP1-2            | Upper: 5'-CGGAATTCCTCCACATCCTTG-ACATTG-3'    | EcoR I              |
|                   | Lower: 5'- ATCTCGAGTCAGCTTGTGCC-ACCCT-3'     | Xho I               |
| NSP1-3            | Upper: 5'-CGGAATTCGGTTATAACT-ACTAT-3'        | EcoR I              |
|                   | Lower: 5'-AAGTCTCGAGTCAGCTTGTGC-CAC-3'       | Xho I               |
| NSP1-4            | Upper: 5'-CGGAATTCTTAATTGTCTGTG-C-3'         | EcoR I              |
|                   | Lower: 5'- AAGTCTCGAGTCAGCTTGTG-CCAC-3'      | Xho I               |
| NSP2              | Upper: 5'-GGACTGCCATATGGAATGG-ATATAGATTG-3'  | Nde I               |
|                   | Lower: 5'-ATCGGATC CTA TGCACA AT-CTGATTC -3' | BamH I              |
| NSP2-1            | Upper: 5'-GAGTAACCATATGGCGGCAGA-CGACGACT-3'  | Nde I               |
|                   | Lower: 5'-CCGAATTCCTATGCACAATC-TGAT-3'       | EcoR I              |
| NSP2<br>(105-186) | Upper: 5'-GGACTGCCATATGGAATGGA-TATAGATTG-3'  | Nde I               |
|                   | Lower: 5'-GGAATTCCTAGATGACGTGGT-GCTTGCT-3'   | EcoR I              |

1.4 靶蛋白诱导表达纯化

将 NSP1、NSP1-1、NSP1-2、NSP1-3、NSP1-4、NSP2 分别连接在质粒 pGEX-6P1、pET28a 上重组载体,转化表达菌株 *E. coli* DE3 和 RP 中。按储晓洁等<sup>[10]</sup>提供的方法表达并纯化蛋白。

1.5 酵母体内检测蛋白间的相互作用

分别将含有诱饵质粒的 pGBKT7-NSP1、pG-

BKT7-NSP1-1、pGBKT7-NSP1-2 的 Y187 菌株和靶质粒 pGADT7-NSP2 的 AH109 菌株于 3 个含有 0.5 mL 2×YPDA 的 PA 瓶中,同时将含有诱饵质粒 pGBKT7-NSP2、pGBKT7-NSP2-1 的 Y187 菌株和靶质粒 pGADT7-NSP1AH109 菌株于另 2 个含有 0.5 mL 2×YPDA 的 PA 瓶中,100 r/min、30 ℃ 培养 20~24 h,将培养物涂布 SD/-Trp-Leu、SD/-Ade-His-Trp-Leu 平板,30 ℃ 培养 3~5 d,统计平板上的菌落,挑选白色的直径大于 2 mm 的菌落点于含 X-Gal(80 μg/mL)的 SD/-Trp-Leu、SD/-Ade-His-Trp-Leu 平板上,30 ℃ 培养。

1.6 β-半乳糖苷酶活性测定

挑取 SD/-Trp-Leu、SD/-Ade-His-Trp-Leu 2 种营养缺陷型平板上的单菌落,30 ℃ 培养 20~24 h,之后每毫升过夜培养物加入 4 mL YPDA 培养基中,在  $D_{600\text{ nm}}=0.5\sim0.8$  时,收集菌体,然后按 Miller 法测定 β-半乳糖苷酶活性<sup>[11]</sup>。

1.7 Western blotting 技术检测蛋白间的相互作用

以 His 标签的 NSP2 蛋白作为阳性对照,GST 标签的 NSP1 蛋白及其缺失突变体蛋白为检测蛋白以及以 NSP2-1 蛋白作为阳性对照,NSP1 全长蛋白为检测蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳。按储晓洁等<sup>[10]</sup>提供的方法进行 Western 杂交检测。

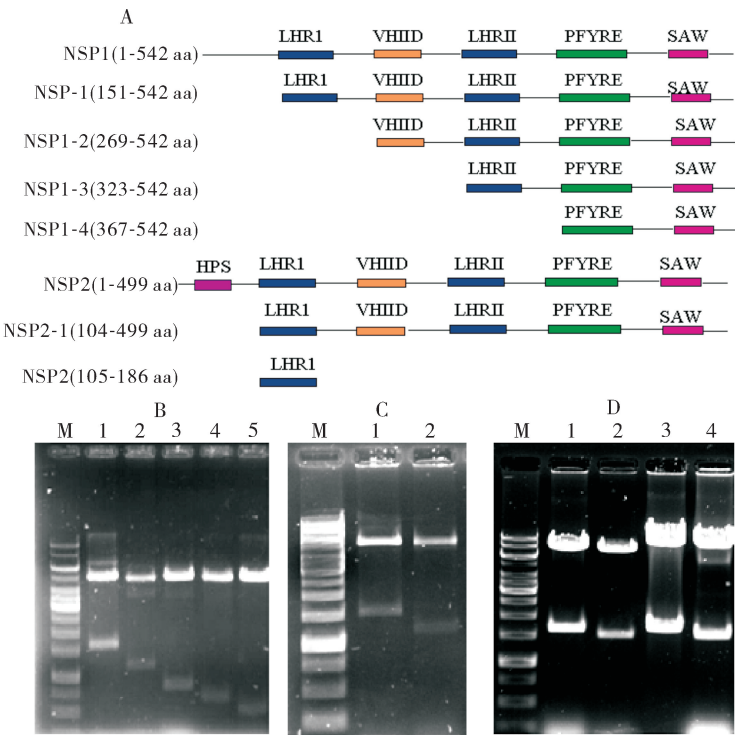
2 结果与分析

2.1 NSP 大肠杆菌表达质粒及酵母表达质粒的构建

为了鉴定哪些结构域参与 2 个蛋白间的相互作用,按照图 1-A 所示,分别构建了一系列大肠杆菌表达的缺失突变体,酶切结果证实表达载体含有外源 DNA,片段大小与预期相符(图 1-B 和 C)。同时,酶切和琼脂糖凝胶电泳结果也表明全长的 *LjNSP1*、*LjNSP2* 已分别构建到酵母双杂交载体 pGBKT7 和 pGADT7 上(图 1-D)。

2.2 百脉根 NSP1、NSP2 及其缺失突变体融合蛋白的表达和纯化

分别将构建在 pGEX-6P1 上的 NSP1 及其突变体和构建在 pET28a 上的 NSP2 及 NSP2-1 表达载体转化到 *E. coli* DE3 和 RP 菌株中,在 22 ℃ 诱导表达融合蛋白。结果表明所有蛋白都存在于细胞裂解物的上清液中,呈可溶性融合蛋白(结果未展示)。利用 GST 琼脂糖凝胶柱绑定及纯化 GST-NSP1 及



A. *LjNSP1*, *LjNSP2* 全长及其缺失突变体结构示意图 The structure of NSP1 and the deletion mutants; B. 大肠杆菌表达载体 pGEX-6P-NSP1 及其缺失突变体的 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切-电泳图 NSP1 and four deletion mutants cloned in pGEX-6P-1, each was digested with *EcoR* I and *Xho* I ; M. DNA marker; 1. 全长 NSP1 The full length of NSP1; 2. NSP1-1; 3. NSP1-2; 4. NSP1-3; 5. NSP1-4; C. 大肠杆菌表达载体 pET28a-NSP2 及 NSP2-1 的 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切-电泳图 NSP2、NSP2-1 cloned in pET28a each was digested with *Nde* I and *Bam*H I ; M. DNA marker 1. 全长 NSP2 The full lenght of NSP2; 2. NSP2-1; D. NSP1、NSP2 全长构建到 pGBKT7、pGADT7 载体上的酶切图, NSP1 被 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 NSP2 被 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切 The full length of NSP1、NSP2 cloned in pGBKT7、PGADT7 NSP1 was digested with *EcoR* I and *Bam*H I , NSP2 was digested with *Nde* I and *Bam*H I ; M. DNA marker; 1. pGBKT7- NSP1; 2. pGBKT7-NSP2; 3. pGADT7-NSP1; 4. pGADT7-NSP2.

图 1 NSP1、NSP2 及其缺失突变体的构建

Fig.1 Construction of *E. coli* expression plasmid and yeast expression plasmid

其缺失突变体融合蛋白以 10~20 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱;使用 Ni-Resin HP 柱子纯化 His-NSP2 及 NSP2-1 融合蛋白。SDS-PAGE 电泳结果表明,纯化后得到相对纯化的 GST-NSP1 融合蛋白(图 2:1~5 泳道)、纯化的 His-NSP2 及 NSP2-1 融合蛋白(图 2:6~7 泳道)。

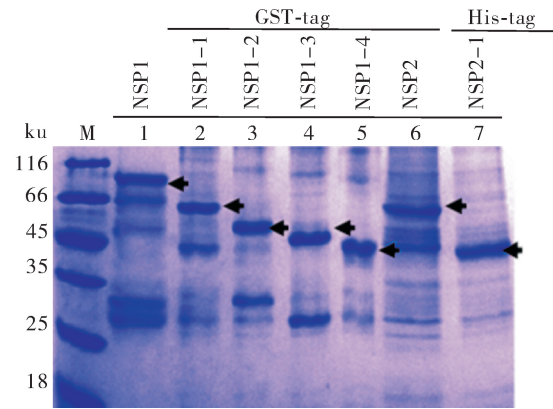
2.3 百脉根 NSP1 与 NSP2 蛋白在酵母体内的相互作用

利用酵母双杂交技术,研究百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 是否具有形成异源二聚体的功能,以百脉根 NSP1、NSP2 转录自激活活性为对照(图 3-A),分别将 NSP1 构建在诱饵(pGBKT7-NSP1)和靶质粒(pGADT7-NSP1)上;同时,也分别将 NSP2 构建在诱饵(pGBKT7-NSP2)和靶质粒(pGADT7-NSP2)上。将含有诱饵质粒的 Y187 菌

株与含有靶质粒的 AH109 菌株进行有性交配,在含有 X-Gal 的 SD/-Trp -Leu 的培养基上都能生长,蛋白质间有相互作用的菌落呈蓝色,没有相互作用的菌落为白色。在有 X-Gal 的 SD/-Ade-His-Trp-Leu 的培养基上只有相互作用发生才能生长且菌落呈蓝色(图 3-B)。比较图 3-A 和图 3-B 的结果,NSP1、NSP2 蛋白间相互作用的菌落呈现的蓝色明显深于自激活作用呈现的蓝色, $\beta$ -半乳糖苷酶酶活测定的结果也证实了这一结论(图 3-C),说明了全长 NSP1 和 NSP2 蛋白之间具有相互作用,可能形成异源二聚体。

2.4 NSP2 与 NSP1 相互作用结构域的鉴定

为了确定 NSP1 蛋白与 NSP2 相互作用的结构域,首先利用酵母双杂技术考察了 NSP1-1、NSP1-2 两个截短蛋白与 NSP2 间的相互作用,结果表明 NSP1

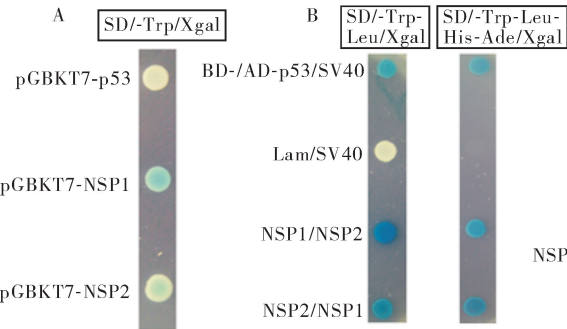


M. 蛋白质标记 Protein marker; 1. GST-NSP1 融合蛋白 Purified pGEX-6P-1-NSP1; 2. GST-NSP1-1 融合蛋白 Purified pGEX-6P-1-NSP1-1; 3. GST-NSP1-2 融合蛋白 Purified pGEX-6P-1-NSP1-2; 4. GST-NSP1-3 融合蛋白 Purified pGEX-6P-1-NSP1-3; 5. GST-NSP1-4 融合蛋白 Purified pGEX-6P-1-NSP1-4; 6. His-NSP2 融合蛋白 Purified His-NSP2; 7. His-NSP2-1 融合蛋白 Purified His-NSP2-1; 箭头所指为目标蛋白 What the arrow indicates are the target proteins.

图 2 SDS-PAGE 蛋白质电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE protein electrophoresis

缺失 LHR1 结构域后不能与 NSP2 相互作用而 NSP2 的 LHR1 结构域(105-186 aa)则能与 NSP1 相互作用(图 4-B)。这一结果说明 NSP1 与 NSP2 的相互作用的区段主要集中在 2 个蛋白的 LHR1 结构域,而附近的区段对相互作用有一定的影响。

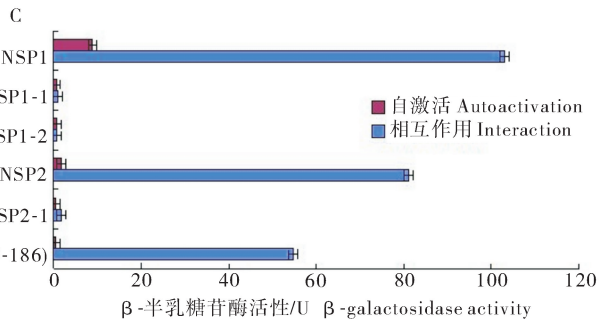


A. 百脉根 NSP1、NSP2 转录自激活活性的检测,含有诱饵质粒的酵母菌 Y187 在含有 X-gal 的 SD/-Trp 培养基生长的菌落,蓝色具有自激活活性,白色没有自激活活性 The test of transcriptional activation of NSP1 and NSP2 in yeast on media with selection,the blue colonies have the autoactivation,the white colonies have no autoactivation; B. NSP1 和 NSP2 分别在诱饵和靶质粒上的相互作用,诱饵质粒在 Y187 菌株中,靶质粒在 AH109 菌株中,通过有性交配得到的二倍体酵母在含 X-gal 的 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 选择性培养基上生长的菌落,蓝色显示具有相互作用,白色没有相互作用 The interaction of NSP1 and NSP2 in the bait and target plasmids,and the bait plasmid in Y187 strain,the target plasmid in the AH109 strain,the diploid yeast obtained by sexually mating grew on media with SD/-Trp-Leu/X-gal SD/-Trp-Leu-His-Ade/ X-gal,the blue colonies indicates interaction,the white colonies indicates no interaction;

为了进一步证实酵母双杂交的研究结果,利用 pull-down 和 Western 印迹转移技术进行了体外蛋白质相互作用试验。研究表明:在体外全长 NSP1 蛋白与 NSP2 全长蛋白具有相互作用(图 5-A),缺失了 N-末端(NSP1-1)、LHR1(NSP1-2)和 VHIIID(NSP1-3)结构域的 NSP1 蛋白都能与 NSP2 蛋白相互作用,而唯独缺失 LHRII(NSP1-4)结构域的 NSP1 不能与 NSP2 蛋白相互作用(图 5-B)。说明 NSP1 的 LHRII 结构域参与了 2 个蛋白间的相互作用。同时,缺失 HPS(NSP2-1)结构域的 NSP2 蛋白也能参与 NSP1 蛋白的相互作用(图 5-C)。然而在酵母双杂交试验中,这两者间是没有相互作用的,其原因可能是由于 NSP2-1 融合蛋白在细胞内不能正确折叠,在空间结构上掩盖了 LHR1 结构域导致不能与 NSP1 蛋白相互作用。当单独将 LHR1 结构域(105-186 aa)融合到 BD 载体上,则可以与 NSP1 蛋白相互作用。

3 讨 论

NSP1、NSP2 基因编码的蛋白属于 GRAS 蛋白家族,GRAS 蛋白家族在整个植物界中都很常见,并且在植物生长过程中起着不同的作用<sup>[5-6]</sup>。GRAS 蛋白含有一个可变的 N-末端和一个保守的 C-末端。LjNSP1 编码 542 个氨基酸,而 LjNSP2 编



C.  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定,红色表示自激活活性,蓝色表示 NSP1、NSP2 蛋白间相互作用的活性 The assay of the  $\beta$ -galactosidase activity,the red indicates autoactivation,the blue indicates interaction.

图 3 体内 NSP1 与 NSP2 相互作用

Fig. 3 The interaction of NSP1 and NSP2 in vivo

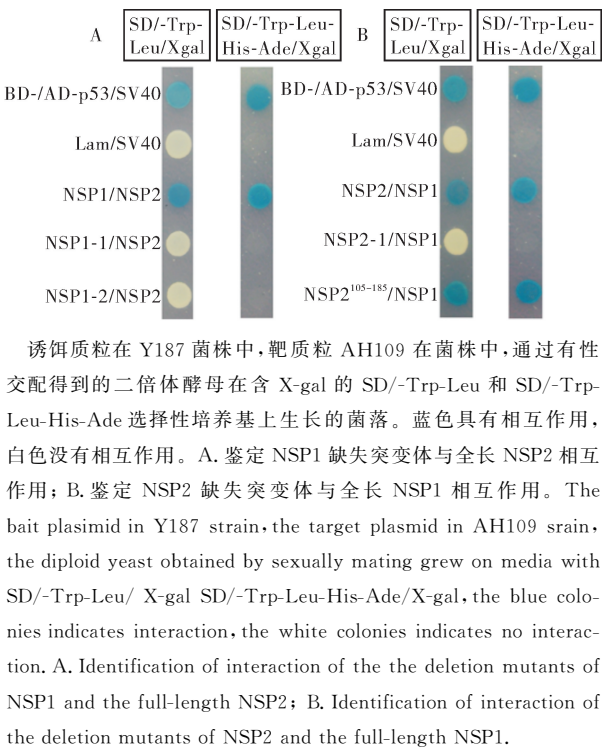
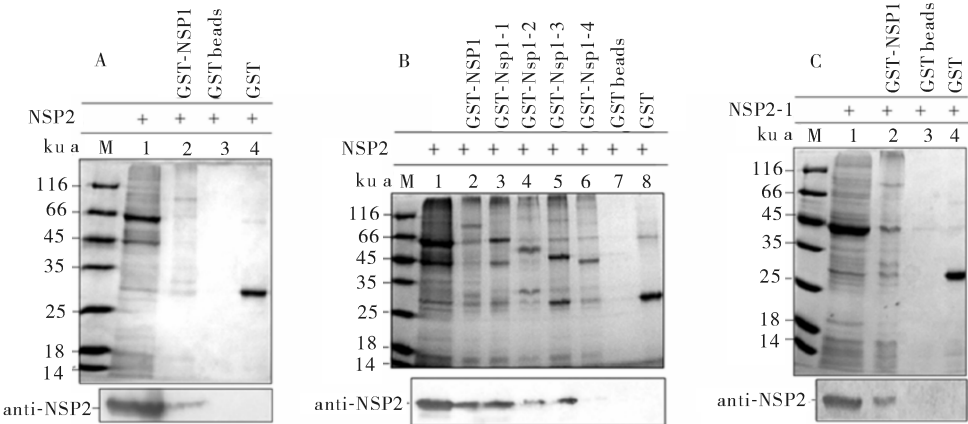


图 4 酵母双杂交鉴定 NSP1 与 NSP2 相互作用的结构域

Fig. 4 Identification of interaction domain of NSP1 and NSP2 by Y2H



- A. 全长 NSP1 蛋白与 NSP2 蛋白间的相互作用 The interaction of the full-length NSP1 and NSP2; M. Protein marker; 1. His-NSP2 蛋白 Purified His-NSP2; 2. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1 蛋白 GST-NSP1 protein binding to GST-beads; 3. GST 柱子 GST beads; 4. GST 蛋白 GST;
- B. NSP1 缺失突变体与 NSP2 蛋白间的相互作用 The interaction of the the deletion mutants of NSP1 and NSP2; M. Protein marker; 1. His-NSP2 蛋白 purified His-NSP2; 2. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1 蛋白 GST-NSP1 binding to GST-beads; 3. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1-1 蛋白 GST-NSP1-1 binding to GST-beads; 4. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1-2 蛋白 GST-NSP1-2 binding to GST-beads; 5. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1-3 蛋白 GST-NSP1-3 binding to GST-beads; 6. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1-4 蛋白 GST-NSP1-4 binding to GST-beads; 7. GST 柱子 GST beads; 8. GST 蛋白 GST;
- C. NSP1 与 NSP2-1 蛋白间的相互作用 The interaction of NSP1 and NSP2-1; M. protein marker; 1. His-NSP2 蛋白 His-NSP2; 2. 绑定在 GST 柱上的 GST-NSP1 蛋白 GST-NSP1 binding to GST-beads; 3. GST 柱子 GST beads; 4. GST 蛋白 GST.

在 A、B、C 中,上框为 SDS-PAGE 电泳图,下框为 Western blotting 显影图,anti-NSP2 为抗 NSP2 的抗体 In the figure of A,B,C,the box above is SDS-PAGE electrophoresis,the box below is western blotting imaging.

图 5 体外检测 NSP1 及其缺失突变体与 NSP2 蛋白间的相互作用

Fig. 5 The interaction of NSP1 and deletion mutants with NSP2 in vitro

码 499 个氨基酸,它们都含有 5 个 GRAS 家族典型的结构域:即 LHRI、VHIID、LHRII、PFYRE 和 SAW<sup>[9]</sup>。

2009 年,Hirsch 等<sup>[8,13]</sup>在豆科模式植物苜蓿中的研究表明:NSP1 是一个结合 DNA 的蛋白,可以结合到早期结瘤素基因 *ENOD11*、*ERN1* 和起始结瘤基因 *NIN* 的启动子上,在体内 NSP1 和 *ENOD11* 启动子的相互作用随着结瘤因子的诱导而增强。已有的研究表明,非豆科植物广泛存在结瘤信号通道基因 NSP1 和 NSP2,其中烟草的 NSP1 也可以互补豆科植物 *nsp1* 突变体,所结根瘤与正常根瘤结构完全一样<sup>[6,8]</sup>。由于不同的物种结瘤信号通道基因 NSP1 和 NSP2 的表达模式以及在植物中所起的作用并不相同,本研究以豆科模式植物百脉根为研究对象,证明了结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 在体外、体内均可以相互作用,并且明确 NSP1 的 LHRII 和 NSP2 的 LHR1 结构域是 2 个蛋白相互作用所必需的,说明 NSP1 和 NSP2 百脉根结瘤因子信号转导中是以异源二聚体或四聚体形式行使其功能<sup>[13]</sup>,前期研究<sup>[10]</sup>利用酵母单杂交技术证明了百脉根 NSP1 和 NSP2 均能结合到起始结

瘤基因 *NIN* 的启动子上,体外蛋白质与 DNA 相互作用的研究正在进行之中。

参 考 文 献

[1] 程国军,陈大松,李友国,等. 华癸中生根瘤菌共生基因 *exo56* 的克隆和功能初步分析[J]. 华中农业大学学报,2008,27(4): 483-486.

[2] 吴梅,丑敏霞,李一星,等. 参与紫云英共生固氮的 1 个上调表达结瘤素基因 *AsB6* 的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010,29(2):169-174.

[3] OLDROYD G E D, LONG S R. Identification and characterization of NSP2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling[J]. Plant Physiol,2003,131:1027-1032.

[4] 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 *ENOD40* gene expression in nodule initiation[J]. DNA Res, 2006,13:255-265.

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

[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: 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,2005,308:1789-1791.

[8] 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]. Plant Cell,2009, 21:545-557.

[9] 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 Physiol,2006,142:1739-1750.

[10] 储晓洁,胡晓晶,康恒,等. 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1/NSP2 转录激活作用的研究[J]. 华中农业大学学报,2010,29 (5):582-587.

[11] MILLER J H. Experiments in molecular genetics [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1972.

[12] MIDDLETON P H, JAKAB J, PENMETSA R V, et al. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction[J]. Plant Cell,2007, 19:1221-1234.

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

Interaction of *Lotus japonicus* NSP1 and NSP2

HU Xiao-jing   CHU Xiao-jie   KANG Heng   ZHU Hui   ZHANG Zhong-ming  
*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** *Lotus japonicus* in legumes is one of the model plants in the study of the system on the symbiotic nitrogen fixation. The research of the symbiotic signaling pathway and the mechanism of interaction of rhizobial bacteria helps to discover the secret about the establishment of symbiotic relationship and the formation of the symbiont between rhizobial bacteria with legumes. In this study, the interaction of the two GRAS family proteins, nodulation signaling pathway1 (NSP1) and nodulation signaling pathway2 (NSP2), was confirmed *in vivo* and *in vitro* using a yeast two-hybrid system and protein-protein interaction in *in vitro*. The interacting loci were assessed to be the LHRI domain of NSP2 and LHRII domain of NSP1.

**Key words** *Lotus japonicus*; nodulation signaling pathway1 (NSP1); nodulation signaling pathway2 (NSP2); symbiotic signaling; yeast two-hybrid

(责任编辑:张志钰)