

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.04.033

拟南芥 AtHHR2 与 DREB2C 的相互作用研究

蔡潇潇, 刘志斌, 王健美, 李旭锋

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 已有研究表明拟南芥 Highly Homologous RING domain 2 (At5g43200, 命名为 AtHHR2) 基因在盐胁迫中起正调控作用, 并且其同源基因 *AtHHR3* 基因在酵母双杂交实验筛选中与 DREB2C 基因有相互作用. 本研究利用体外、体内蛋白质相互作用实验以及生物化学方法进一步探究了 *AtHHR2* 的功能性. 体外 Pull-down 实验证实了 AtHHR2 与 DREB2C 有体外的相互作用. 体外泛素化实验进一步验证了它们之间的相互作用, 且 AtHHR2 起到 E3 连接酶的作用. 为了进一步确定它们的关系, 我们用双分子荧光互补实验, 在体内分别验证了 AtHHR2 与 DREB2C 之间确实有相互作用. 综上所述在拟南芥中 AtHHR2 与 DREB2C 有相互作用关系, 且 AtHHR2 起到 E3 连接酶的作用.

关键词: *AtHHR2*; RING finger E3 连接酶; 拟南芥; DREB2C

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)04-0860-05

Analysis of the interaction between AtHHR2 and DREB2C in *Arabidopsis thaliana*

CAI Xiao-Xiao, LIU Zhi-Bin, WANG Jian-Mei, LI Xu-Feng

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: A previous report has revealed that AtHHR2 (At5g43200) played a positive regulatory role in *Arabidopsis thaliana* in salt stress, and its homologous gene AtHHR3 has interaction with DREB2C gene in yeast two-hybrid test. In this study, *in vitro* and *in vivo* protein interaction assays and biochemical methods were used to further explore the functionality of AtHHR2. And Pull-down result validated the interaction between AtHHR2 and DREB2C *in vitro*. And the ubiquitination analysis demonstrated that AtHHR2 acted as an E3 ligase of DREB2C, further confirming the interaction between AtHHR2 and DREB2C. Furthermore, bimolecular fluorescence complementation assay results showed that AtHHR2 did have interaction with DREB2C *in vivo*. In summary, the AtHHR2 interacts with DREB2C and acts as an E3 ligase.

Keywords: AtHHR2; RING finger E3 ligase; *Arabidopsis thaliana*; DREB2C

1 引言

植物在自然生存下会受到很多胁迫,分为生物

胁迫和非生物胁迫. 其中非生物胁迫对植物的威胁最大. 非生物胁迫有很多,像干旱,盐害,化学污染,极致的温度等等. 其中对植物造成最主要威胁的是

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 国家转基因专项(2016ZX08009003-002-001); 国家自然科学基金(31671455)

作者简介: 蔡潇潇(1991-), 女, 浙江湖州人, 硕士, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: caixiaox@163.com

通讯作者: 李旭锋. E-mail: xfli@scu.edu.cn

干旱和盐害. 据统计全球有超过 40% 的耕地受到来自盐害的影响^[1]. 受到盐渍化威胁的土壤面积全球有近 8.31 亿 hm^2 ^[2], 就我国盐渍化面积就有 3600 万 hm^2 , 占总土壤面积的 4.88%^[3]. 而全球得的淡水只占 1.6%. 在人口日益增多, 全球不断变暖, 耕地减少和淡水资源不足的情况下, 如何利用盐渍化的土地是一个迫切需要解决的问题. 因此对植物盐耐受性分子机制的研究, 不管是对提高农作物产量还是对土地的运用都有着重要的意义. 不过值得庆幸的是植物体内有很多机制可以在面对这些胁迫时降低胁迫的压力从而得到生机. 当植物受到胁迫时会产生相应的调节机制来应答胁迫. 植物的调节机制有很多, 像泛素化就是其中主要的一种机制.

泛素(Ubiquitin)是一个小蛋白, 会与细胞质中, 核中和内在膜中的许多蛋白共价结合或者是单独游离. 泛素保守的 76 残基多肽在真核生物中共价结合其它细胞内蛋白有着重要的作用^[4,5]. 泛素化(Ubiquitination)在很多调节机制中起作用; DNA 修复, 细胞周期控制, 以及胁迫应答等所有这些看上去都需要特殊的泛素化机制. 泛素化需要三个酶的参与: E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) 和 E3 (ubiquitin ligase). 泛素 C 端的甘氨酸残基被 E1 激活与 E1 结合形成复合体; 而后被激活的泛素被传递到一个泛素载体蛋白, E2 上的一个活性位点半胱氨酸残基; 最后通过 E3 的催化作用, 泛素与底物蛋白的赖氨酸残基上的一个 ϵ -氨基酸组相连接^[6-8].

本实验室之前用 *Arabidopsis* eFP Browser 预测得到三个同源性很高的基因 At2g24480, At5g43200 和 At3g28620^[9]. 其中 AtHHR2 能编码一个具有 RING 结构域的 E3 连接酶, 且具有 E3 连接酶活性. 已有的研究表明拟南芥 AtHHR2 在盐胁迫中起到正调控的作用^[10]. 本实验为了进一步探究 AtHHR2 的功能性展开了一系列的相关性研究, 主要探究 AtHHR2 的作用蛋白, 为下一步研究 AtHHR2 的抗逆性机制做准备.

2 材料与方 法

2.1 实验材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia 植株种子(Col.) 和本氏烟草由实验室保存, AtHHR2 基因突变体的种子(SALK_150860) 购于拟南芥生物资源中心(ABRC), 以 Columbia 生

态型为背景.

大肠杆菌(*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、BL21、根瘤农杆菌(*Agrobacterium*) 菌株 GV3101、pGEX-6p-1-HHR2 载体、PET-28 载体由本实验室保存.

Taq DNA 聚合酶、Primer STAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 连接酶等购于 Takara 公司. E1, E2 购于 Boston Biochem 公司, 泛素 Ub 购于 Sigma 公司. 质粒提取试剂盒购于 Omega 公司, DNA 纯化试剂盒购于天根公司, 实验所用的引物则由华大基因合成.

表 1 引物列表

Tab. 1 Primers List

基因(Gene)	引物序列(Primer Sequence)5'→3'
PET28a-DREB2C F	GCGAATTCATGCCGTCGGAGAT-TGTTG
PET28a-DREB2C R	GCGTCGACTGTAGATCCATGAACATCTTTG
pSPYNE-AtHHR2 F	CGTCTAGAATGGAAACTGAATCTTCAAACCTCG
pSPYNE-AtHHR2 R	CGCTCGAGCTGTGGTTGTTTGTCAACAG
pSPYCE-DREB2C F	CGTCTAGAATGCCGTCGGAGAT-TGTTG
pSPYCE-DREB2C R	CGCTCGAGTGTAGATCCATGAACATCTTTG

2.2 实验方法

2.2.1 引物设计 从 Tair(<https://www.arabidopsis.org/>) 上搜索得 AtHHR2, DREB2C 的基因序列, 后用 Primer premier 5.0 设计引物.

2.2.2 原核表达载体的构建 从 Tair 上下载 DREB2C 的基因序列. 设计引物 PCR 扩增并纯化. 双酶切 PCR 产物和 PET-28 载体, 回收纯化后用 T4DNA 连接酶分别连接 PET-28 载体与 DREB2C 基因, 连接体系转化大肠杆菌感受态 DH5 α . 鉴定纯和后提取 PET-28-DREB2C 载体, 转化大肠杆菌 BL21 感受态, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存菌种.

2.2.3 融合蛋白的诱导表达及纯化 将含有 pGEX-6p-1-HHR2 和 PET-28-DREB2C 的 BL21 菌株 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 达到 0.6~0.8, 加入 IPTG 至浓度为 0.5mmol/L, 换 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 10h 左右诱导目的蛋白表达, 超声破碎菌体细胞取上清, 亲和层析法用 GST 和 Ni 纯化柱对蛋白进行纯化.

2.2.4 Pull-down Ni-NTA 与 His-DREB2C 蛋白在缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM

NaCl, 1mM EDTA, 0.05% 2-Mercaptoethanol, 0.2% TritonX-100)下 4 °C 孵育 2 h, 其间孵育管不断旋转混匀使其完全结合. 缓冲液轻柔地清洗三次后加入 AtHHR2 蛋白继续 4 °C 孵育 2 h, 缓冲液清洗三次, 离心, Western 检测结果.

2.2.5 体外泛素化 GST-AtHHR2 融合蛋白作为 E3 连接酶, 在 E1, E2, 带 His 标签的泛素(ubiquitin)分子, ATP 以及缓冲液都存在的条件下与 His-DREB2C 底物蛋白在 30 °C 反应 5 h, 加入 5× loading buffer 终止反应. 分别在体系中缺 E1, E2, E3 作为负对照. Western 检测结果.

2.2.6 双分子荧光互补 构建双分子荧光载体 pSPYNE-AtHHR2、pSPYCE-DREB2C, 转化农杆菌感受态 GV3101, 筛选得到纯和菌种. 28 °C 培养农杆菌至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8, 收集菌体用特定缓冲液重悬, 静置 1 h 使农杆菌活化后混合菌液注射烟草. 实验组设为: pSPYNE-AtHHR2 与 pSPYCE-DREB2C. pSPYNE-ABI 与 pSPYCE-RCAR 已报道有相互作用作为正对照. pSPYCE 与 pSPYNE-AtHHR2 作为负对照. 2~3 d 后, 激光共聚焦荧光显微镜观察并照相.

3 结果与分析

3.1 AtHHR2 与 DREB2C 在体外有相互作用

本实验室之前获得三个同源性高达 79% 的基因 AtHHR1, AtHHR2 和 AtHHR3. 用 AtHHR3 为饵, 酵母双杂交筛选到与之有相互作用的基因 DREB2C. 后我们猜测与 AtHHR3 同源性很高的两个基因与之也可能有相互作用. 所以本实验以 AtHHR2 为材料, 用 Pull-down 实验检测 AtHHR2 与 DREB2C 是否在体外有相互作用关系.

Ni-NTA 可结合 His 标签的蛋白, 并可用洗脱缓冲液洗脱下结合的蛋白. 我们的 Pull-down 实验用 Ni-NTA 与带 His 标签的 DREB2C 蛋白结合再拉 AtHHR2 蛋白. Western 检测的结果显示在体外 AtHHR2 蛋白与 DREB2C 蛋白之间有相互作用(图 1).

3.2 AtHHR2 在体外可泛素化 DREB2C

AtHHR2 是编码一个 RING 结构域的 E3 连接酶, 且 RING 结构域在 E3 连接酶活性中起重要作用. 既然 AtHHR2 在体外 DREB2C 有相互作用, 那么其中 AtHHR2 是否有起到 E3 连接酶的作用. 我们进一步用体外泛素化实验进行了验证.

AtHHR2 蛋白在泛素、E1、E2 存在的条件下, 与 DREB2C 蛋白在反应缓冲液中反应 5 h 之后,

Western 检测蛋白 DREB2C 以及泛素. 从结果可以看到在 AtHHR2, E1, E2, 泛素(ubiquitin)都存在的条件下 DREB2C 蛋白被泛素化(图 2). 但当缺少 E1, E2 或者 AtHHR2 时泛素化条带没有出现, 说明在体外 AtHHR2 与 DREB2C 蛋白有相互作用, 且是通过泛素化的途径. 即 DREB2C 是 AtHHR2 的一个作用底物.

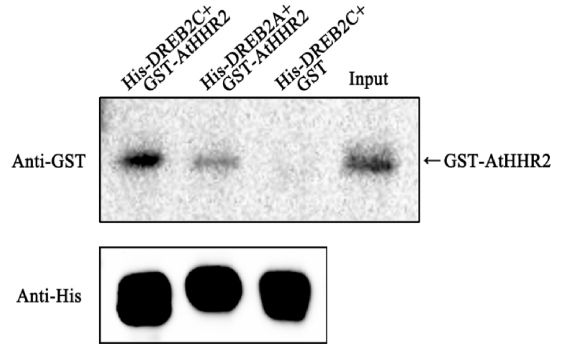


图 1 体外 Pull down 实验
Fig. 1 Pull down assay in vitro

3.3 AtHHR2 与 DREB2C 在体内有相互作用

在体外我们已经验证了 AtHHR2 与 DREB2C 之间确实存在相互作用的关系, 且是通过泛素化的途径. 为了进一步证明这几个基因之间确实存在着相互作用的关系, 我们采用双分子荧光互补实验在体内对 AtHHR2 与 DREB2C 之间的作用关系进行验证.

我们构建了双分子荧光互补载体 pSPYNE-AtHHR2 以及 pSPYCE-DREB2C. 分别转入农杆菌之后, 将实验菌体混合注射入烟草. 实验组为 pSPYNE-AtHHR2 与 pSPYCE-DREB2C. pSPYNE-ABI 与 pSPYCE-RCAR 作为以验证的正对照. pSPYNE-AtHHR2 与 pSPYCE 作为负对照. 2~3d 后使用共聚焦显微镜观察荧光结果.

从实验结果我们可以得到在体内 AtHHR2 与 DREB2C 确实是有相互作用, 且相互作用的位置是在细胞质(图 3).

4 讨论

本研究是继对 AtHHR2 一个初步的研究之后做的一个进一步的研究. 最早本实验室通过对 AtHHR2 突变体, AtHHR2 互补株系以及野生型的抗逆性表型研究得到 AtHHR2 的突变体对盐胁迫非常敏感, 说明 AtHHR2 在盐胁迫应答中应该有着重要的作用. 于是我们想知道 AtHHR2 在植物胁迫中到底起到一个怎样的作用.

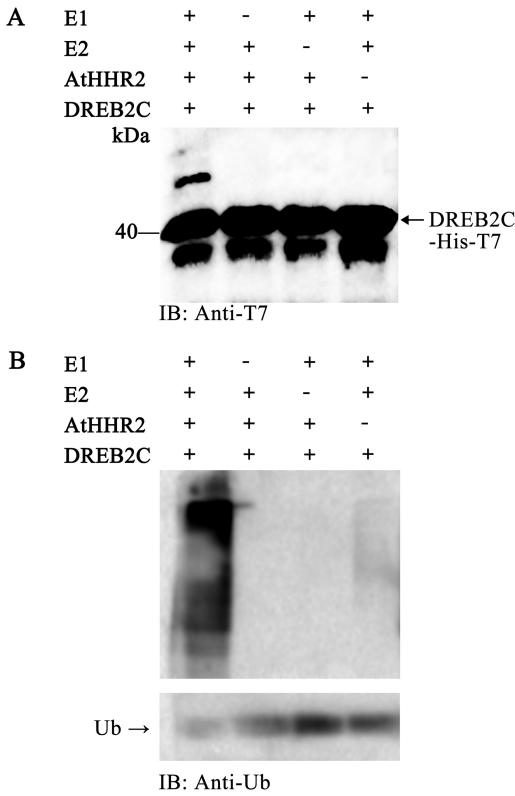


图 2 体外泛素化分析

Fig. 2 Ubiquitination assay in vitro

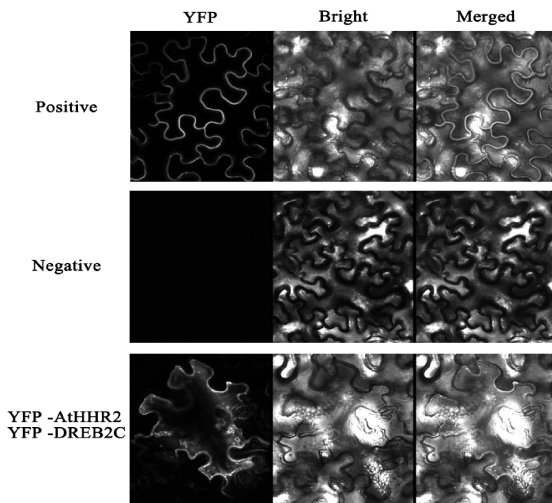


图 3 双分子荧光互补分析

双分子荧光互补实验检测体内相互作用, 照相所用为激光共聚焦显微镜。正对照组为实验室所保存 pSPYNE-ABI 与 pSPYCE-RCAR。负对照为 pSPYNE-AtHHR2 与 pSPYCE。实验组为 pSPYNE-AtHHR2 与 pSPYCE-DREB2C。

Fig. 3 Bimolecular fluorescence complementation assay

The bimolecular fluorescence complementation assay was performed to detect the interaction in vivo; photos were taken by laser scanning confocal microscopy. Positive control: pSPYNE-ABI and pSPYCE-RCAR; negative control: pSPYNE-AtHHR2 and pSPYCE; experimental group: pSPYNE-AtHHR2 and pSPYCE-DREB2C.

RING 结构域最开始由 Freemont 和他的同事们提出的^[11]. Ring/U-box E3s 是一群具有一个 Ring-finger 的 E3 连接酶^[12], Ring-finger 结构域决定着 E3 泛素连接酶的功能性^[13]. AtHHR2 是 C3HC4 型 RING E3 连接酶. 在此之前还未曾被报道过。

在拟南芥中, 两类脱水应答元件结合蛋白 (DREBs) 已经被发现, 分别由 DREB1 和 DREB2 编码^[14]. 在面对低温, 干旱, 严寒和高盐时会转录 DREB1s^[15]; 而 DREB2s 最初被认定为干旱和高盐应答基因^[16], 后又与高温应答有关^[17,18]. DREB2C 也参与调节盐胁迫^[19]. DREB2C 参与激活 heat shock factor A3 (HSfA3) 的转录在热激应答的开始和结束时^[20,21].

我们得到的 AtHHR2 与盐胁迫有密切关系, 且与 DREB2C 有相互作用. DREB2C 在盐胁迫应答中的机制被发现的还很少, 所以我们想深入探究这两个基因之间在盐胁迫中的作用关系。

参与盐胁迫的三个重要因子 SOS1, SOS2 和 SOS3 我们也有检测过是否与我们的 AtHHR2 有相互作用, 结果显示没有直接相互作用, 推测可能这三个基因位于 AtHHR2 的上游。

土壤中可溶性盐的增多会对植物生长造成危害. 人口增多, 气候变暖, 环境污染等问题在加重着土壤的减少, 土壤盐渍化问题也越来越严重. 因此对植物耐盐性机制的研究不管是对提高农作物的产量还是对提高土地的运用率都有着重要的意义。

参考文献:

- [1] Pasternak D. Biosaline research in Israel: alternative solutions to a limited fresh water supply [M]. New York: Plenum Press, 1982: 39.
- [2] Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA. Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies [M]. Australia: Cab international, 1995: 213.
- [3] Wang J, Huang X, Zhong T, *et al.* Review on sustainable utilization of salt-affected land [J]. Acta Geophys Sinica, 2011, 66: 673.
- [4] Hershko A. The ubiquitin system [J]. Ann Rev Biochem, 1998, 67: 1.
- [5] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation [J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 405.
- [6] Kraft E, Stone S L, Su N. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-Type

- E3 ligase ubiquitination enzymes of arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1597.
- [7] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. *Science*, 2007, 315: 201.
- [8] Stone SL, Hauksdóttir H, Troy A, *et al.* Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137: 13.
- [9] 杨虹伟, 翟先芝, 刘志斌, 等. 两个高度同源的 RING 结构域蛋白功能初步研究[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15: 100.
- [10] 杨皓, 刘志斌, 李旭锋, 等. 拟南芥 AtHHR2 基因的功能初步研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 945.
- [11] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif [J]. *Cell*, 1991, 64: 483.
- [12] Jackson P K, Eldridge A G, Freed E, *et al.* The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10: 429.
- [13] Vierstra RD. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10: 385.
- [14] Liu Q, Kasuga M, Shinozaki Y, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature -responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391.
- [15] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854.
- [16] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, *et al.* Functional analysis of an arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 1292.
- [17] Chan J L, Yang K A, Hong J K, *et al.* Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells [J]. *J Plant Res*, 2006, 119: 373.
- [18] Sakuma Y, Maruyama K, Feng Q, *et al.* Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18822.
- [19] Song C, Je J, Hong J K, *et al.* Ectopic expression of an *Arabidopsis* dehydration-responsive element-binding factor DREB2C improves salt stress tolerance in crucifers [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 1239.
- [20] Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, *et al.* Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 368: 515.
- [21] Chen H, Hwang J E, Lim C J, *et al.* *Arabidopsis* DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2010, 401: 238.

引用本文格式:

中文: 蔡潇潇, 刘志斌, 王健美, 等. 拟南芥 AtHHR2 与 DREB2C 的相互作用研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 860.

英文: Cai X X, Liu Z B, Wang J M, *et al.* Analysis of the interaction between AtHHR2 and DREB2C in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 860.