

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.02.026

拟南芥 ABA 受体与 UGT71B6 的相互作用研究

樊晶, 马燕林, 曹婧, 陈乔乔, 杨毅

(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 610064)

摘要:为进一步分析 ABA 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 UGT71B6 参与植物抗逆反应的具体机制, 本研究通过体外酵母双杂交实验与 GST-Pull down 实验、体内双分子荧光互补实验 (BIFC) 分析了 ABA 受体 RCARs 与 UGT71B6 之间的相互作用关系。实验结果显示 ABA 受体 RCAR12、RCAR13 与 UGT71B6, 在体内、体外均存在直接的相互作用。研究表明 UGT71B6 的生理功能与 ABA 受体之间存在重要联系, UGT71B6 可能通过 ABA 受体的介导参与了植物逆境应答反应。实验结果也为初步探究 ABA 受体是否参与 ABA 稳态调节过程提供一定参考。

关键词: 脱落酸稳态调节; 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 71B6; 脱落酸受体; 蛋白质相互作用
中图分类号: Q555+.4, Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)02-0333-05

The research on the interaction between the UGT71B6 and ABA receptors in *Arabidopsis*

FAN Jing, MA Yan-Lin, CAO Jing, CHEN Qiao-Qiao, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to investigate whether ABA receptors participate in ABA homeostatic regulation mediated by UGT71B6 and analyze the specific mechanisms of UGT71B6's involvement in plant stress responses, we analyzed the interaction between RCARs and UGT71B6 by yeast two-hybrid assay, BIFC, and GST-pull down assay. The results indicated that UGT71B6 interacted with RCAR12/13 in vivo and in vitro. Thus, it is likely that the mechanism of UGT71B6 participating in plant abiotic responses is related to its interaction with ABA RCARs. The experimental results also provide some references for the role studying of ABA receptors in the ABA homeostasis regulation process.

Keywords: ABA homeostasis; UGT71B6; ABA receptor; Protein Interaction

1 引言

脱落酸(Abscisic acid, ABA)在调节植物生长发育和抗逆反应中发挥重要功能^[1,2], 目前已经清楚 ABA 主要通过由 ABA 受体 PYR1/PYL/RCARs 家族成员、PP2C 和 SnRK2s 蛋白构成的

ABA 核心信号通路参与植物生理过程^[3-5]。ABA 受体家族十四个成员的生理功能具有多样性和差异性, 如 PYL8 和 PYL9 均能促进侧根生长和干旱诱导下的叶片衰老^[6], PYL7/8/10/11 与植物抗病虫害的反应有关^[7], PYL6 是 ABA 信号通路与 JA 通路的连接点^[8], 但目前尚不清楚 ABA 受

收稿日期: 2018-03-11

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

作者简介: 樊晶(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学与基因工程方向研究。E-mail: 18740454305@163.com

通讯作者: 杨毅。E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

体是否参与 ABA 稳态调节. 而本实验室前期的酵母双杂交实验中, 证明了 RCAR1/PYL9 与调节 ABA 稳态的糖基转移酶 UGT71C5 存在相互作用, 表明 ABA 受体可能参与了 ABA 稳态调节过程^[9-10].

细胞内 ABA 稳态调节与 ABA 合成、代谢和转运三个生理过程密切相关^[11-14]. ABA 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶可通过糖基化 ABA 生成 ABA 葡萄糖酯(ABA-GE)调节植物体内 ABA 及 ABA-GE 水平, 因此是 ABA 代谢途径之一^[15]. 目前已经报道的 ABA 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶包括 UGT71B6B7/B8/C5 等^[16-18]. 研究表明 UGT71B6 在植物抗逆生理中发挥功能, 但作用的具体机制还有待研究^[18]. 由于 ABA 受体 RCARs 是 ABA 信号通路核心成员, 是 ABA 抗逆应答反应的起点和关键, 因此 UGT71B6 的植物抗逆功能可能与 RCARs 相关.

本研究分析了 UGT71B6 与 ABA 信号通路重要组分 RCARs 家族成员的相互作用关系, 对 UGT71B6 生理功能与 ABA 受体的关系进行初步探究, 对揭示 UGT71B6 参与植物抗逆反应的具体机制及分析 ABA 受体是否参与 ABA 稳态调节过程具有重要意义.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 生物材料 菌种: 大肠杆菌(*E. coli*)克隆菌株 DH5 α 和表达菌株 Rosetta(DE3)、酵母菌株 AH109、农杆菌菌株 GV3101; 载体: 原核表达载体 pET28a、pET-RCARs、pGEX6P-1 及双分子荧光互补载体 pSPYCE、pSPYNE、pSPYCE-RCARs、pSPYNE-ABI1, 酵母载体 pGADT7、pGBKT7、pGADT7-ABI2、pGBKT7-RCARs; 植物材料: 野生型本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)和哥伦比亚野生型(Col)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*). 所有生物材料均保存于本实验室.

2.1.2 缓冲液 孵育缓冲液: 50 m mol/L Tris-HCl(pH7.5), 100 m mol/L NaCl, 1 m mol/L EDTA, 0.05% 2-Mercaptoethanol, 0.2% TritonX-100; 洗涤缓冲液: 50 m mol/L Tris-HCl(pH7.5), 500 m mol/L NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% 2-Mercaptoethanol, 1% TritonX-100; 浸染缓冲液: 2%葡萄糖、500 m mol/L MES、20 m mol/L Na₃PO₄ · 12H₂O、1 mol/L 乙酰丁香酮.

2.1.3 培养基与试剂 LB 培养基(1000 mL): NaCl 10 g、酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g; YEB 培养基(1000 mL): 酵母提取物 1 g、蛋白胨 5 g、牛肉膏提取物 5 g、蔗糖 5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、ddH₂O, pH=7.0; YPDA 培养基(1000 mL): 蛋白胨 20 g、酵母提取物 10 g、2%的葡萄糖、2 mg/mL 的 Ade、ddH₂O, pH=5.8; SD/氨基酸营养缺陷培养基(100 mL): YNB 0.17 g、NH₄SO₄ 0.5 g、Dropout/-Trp-Leu-His-Ade 0.06 g、2%葡萄糖、ddH₂O, 并根据对培养基类型的需要添加 100×D-Adenine(Ade)溶液和 1.5 mL 100×L-Histidine(His)溶液.

2.2 方法

2.2.1 克隆目的基因、构建相关载体 从 TAIR 数据库下载 UGT71B6 基因序列, 选用合适的酶切位点设计引物(引物序列如表 1 所示); 以哥伦比亚型拟南芥 cDNA 为模板扩增目的基因, 构建大肠杆菌原核表达载体 pGEX6P-1-UGT71B6、酵母双杂交载体 pGADT7-UGT71B6、双分子荧光互补实验载体 pSPYNE-UGT71B6. 测序检测重组载体的序列正确性.

2.2.2 酵母双杂交实验 本实验参考 Clontech 公司的酵母双杂交使用手册. 将 14 个 pGBKT7-RCARs 分别与 pGADT7-UGT71B6 共转化; 同时以 pGADT7-ABI2 与 pGBKT7-RCAR1 共转为阳性对照, 以 pGADT7-Rec 与 pGBKT7、pGADT7-UGT71B6 与 pGBKT7 共转作为两组阴性对照. 30 °C 培养转化酵母并鉴定出阳性转化菌后接种于 SD/-Trp-Leu 液体培养基, 220 r/min、30 °C 震荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值约为 0.6. 收集适量菌体并分别稀释至 1/10、1/100、1/1000. 取稀释前、稀释后的菌液各 5 μ L 滴于 SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-Ade 平板, 30 °C 恒温培养. 最后拍照记录生长状况.

2.2.3 蛋白质纯化及 GST-pull down 实验 蛋白质纯化: 蛋白质 GST、GST-RCARs 和 His-UGT71B6 的诱导表达及纯化分别参考 PET 原核表达系统操作手册、GST 树脂(GenScript 公司)及 Ni-NAT 树脂(Thermo scientific 公司)使用说明. 纯化蛋白使用 Mini Pore 超滤管进行浓缩, 并通过 SDS-PAGE 检测蛋白质量. 纯化蛋白置于 -80 °C 冰箱冻存.

GST-pull down 实验方法: 在 1.5 mL EP 管中加入 20 μ L 50% 的 GST 树脂、5 μ g GST-RCARs

蛋白(或 GST 蛋白)、5 μg His-UGT71B6 蛋白, 补加孵育 buffer 至终体积为 500 μL . 混合体系置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻柔翻转混合 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g 离心 3 min, 弃上清. 加入 1 mL 洗涤 buffer 继续于 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻柔翻转 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g 离心 3 min, 弃上清. 重复此步骤 5~6 次后加入适量的 2 \times loading buffer, 煮沸 10 min. 最后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测.

表 1 UGT71B6 基因克隆引物

Tab. 1 Primers for cloning UGT71B6 gene

载体名称	引物序列(5'→3')
PET- 28a-UGT71B6	5'-CGGGATCC ATGAAAATAGAGCTAG TATTCATTCC-3'
	5'-CCCTCGAG CTAGCTTTCAGTTTCCG ACC-3'
pGADT7- UGT71B6	5'-CGGGATCC ATGAAAATAGAGCTAG TATTCATTCC-3'
	5'-CCCTCGAG CTAGCTTTCAGTTTCCG ACC-3'
pSPYCE- UGT71B6	5'-CGGGATCC ATGAAAATAGAGCTAG TATTCATTCC-3'
	5'-CCCTCGAG CTAGCTTTCAGTTTCCG ACC-3'

2.2.4 双分子荧光互补实验 将上述构建好的载体转化农杆菌 GV3101, 挑取阳性克隆接种于 5 mL YEB 液体培养基(含 50 mg/L Kan, 25 mg/L Rif), 置于恒温摇床 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养. 用 1.5 mL EP 管收集适量菌体, 用浸染缓冲液调节 OD₆₀₀ 值至 0.6~0.8 并置于室温避光静置 3 h. 分别将含有 14 个 pSPYCE-RCARs 质粒的 GV3101 与含 pSPYNE-UGT71B6 质粒的 GV3101 按 1:1 的比例均匀混合. 取适量混合体系注射烟草叶片, 培养 2~3 d 后利用激光共聚焦显微镜检测荧光信号.

3 结果与分析

3.1 体外验证蛋白质的相互作用

3.1.1 酵母双杂交实验 本实验中, 所有实验组和对照组均在 SD/-Trp-Leu 型氨基酸缺陷平板上长出丘状隆起的白色光滑菌落, 说明生长正常, 酵母中共转化了两种目的质粒. 在 SD/-Trp-Leu-Ade 型氨基酸缺陷的平板上, 实验组中的 PG-BKT7-RCAR12/13 生长正常; 而对照组中, 阳性对照组生长正常, 阴性对照未见酵母生长, 说明实

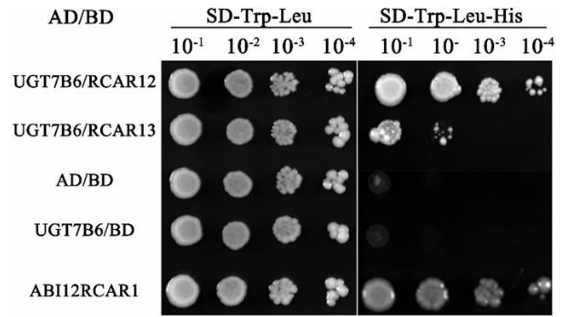


图 1 UGT71B6 和 RCAR12, RCAR13 在酵母双杂交中的相互作用结果

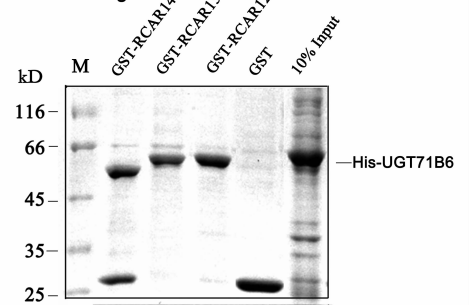
Fig. 1 Interaction of UGT71B6 with RCAR12 and RCAR13 in yeast two-hybrid assay

验体系设置正确、目的蛋白与酵母空载质粒无自激活作用. 因此本实验证明了 UGT71B6 和 RCAR12/13 在酵母中具有相互作用(图 1)

3.1.2 GST-Pull down 实验. 融合蛋白质纯化: 利用亲和层析方法纯化蛋白 His-UGT71B6 和 GST-RCAR12/13/14. 纯化结果如图 2(a) 所示. 图中各蛋白大小均与预期一致, 条带比较单一, 表明纯化蛋白质量合格, 可用于后续实验.

GST-pulldown 实验: 利用图 2(a) 纯化的蛋白进行体外 pull down 实验, 结果如图 2(b) 所示. 图中 western blot 结果显示 His-UGT71B6 蛋白拉下了 GST-RCAR12/13, 说明 His-UGT71B6 与 RCAR12/13 存在相互作用.

A Coomassie Blue staining



B western blot:

WB:His-UGT71B6

图 2 GST-Pull down 实验

A. His-UGT71B6、GST、GST-RCAR12、GST-RCAR13、GST-RCAR14 蛋白纯化结果; B. UGT71B6 与 RCAR12、RCAR13、RCAR14 的 GST-pull down 结果

Fig. 2 GST-pull down assay

A. Protein purification of His-UGT71B6, GST, GST-RCAR12, GST-RCAR13 and GST-RCAR14; B. Interaction of UGT71B6 with RCAR12, RCAR13 and RCAR14 in GST-pull down assay

3.2 体内 BIFC 验证蛋白质的相互作用

注射烟草叶片 2~3 d 后, 剪取相应的注射区域制作装片, 利用激光共聚焦显微镜观察荧光.

由图 3 所示的实验结果可看出,阳性对照组具有明显沿细胞轮廓分布的黄色荧光而各阴性对照组均未观察到任何荧光信号,说明实验体系设置正确实验组中 UGT71B6 与 RCAR12/13 组观察到与对照组类似的荧光,而其余实验组观察结果与阴性对照组相似.因此实验结果说明,UGT71B6 和 RCAR12/13 在烟草的叶片表皮细胞中存在相互作用.

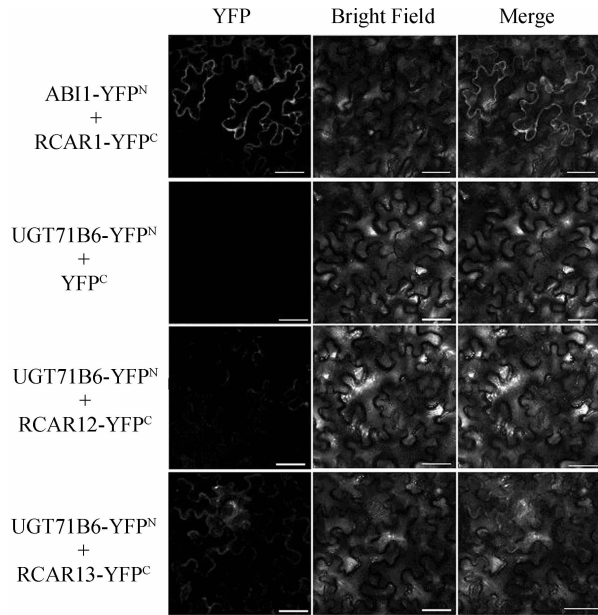


图 3 UGT71B6 与 RCAR12、RCAR13 在 BIFC 实验中的相互作用结果

Fig. 3 Interaction of UGT71B6 with RCAR12、RCAR13 in BIFC assay

4 讨 论

本研究通过酵母双杂交实验、GST-pull down 实验和双分子荧光互补实验,分别从体外和体内对分析了 RCARs 与 UGT71B6 的相互作用关系.实验结果表明,ABA 受体 RCAR12/13 与 UGT71B6 在体外酵母双杂交实验及 GST-pull down 实验、体内双分子荧光互补实验均存在相互作用.因此研究证明 ABA 受体与 UGT71B6 之间存在直接相互作用,表明 UGT71B6 的生理功能与 ABA 受体有关.UGT71B6 作为 ABA 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶,具有体内外特异性识别生理活性 ABA 分子、催化 ABA 糖基化生成 ABA-GE 的功能.UGT71B6 参与 ABA 稳态调节并在植物抗逆应答反应中发挥功能.本研究结果证明 ABA 受体与 UGT71B6 存在直接的相互作用关系,因此 UGT71B6 的植物抗逆功能很可能与

RCARs 相关,但是否与 ABA 受体有直接关联需作进一步探究.

由于 ABA 稳态调节对 ABA 参与植物抗逆应答反应具有重要意义,因此可能 ABA 信号通路 with ABA 稳态调节之间具有某种联系.UGT71B6 既参与 ABA 稳态调节又在植物抗逆反应中发挥功能,可能是 ABA 稳态调节与植物抗逆信号通路的一个交叉点.而本研究证明了 UGT71B6 与 ABA 受体存在直接的相互作用关系,表明 ABA 受体可能与 UGT71B6 的 ABA 稳态功能相关,这为进一步分析 ABA 受体与 ABA 稳态调节关系、进而探究 ABA 信号通路 with ABA 稳态调节之间的关系提供了一定的实验依据.

参考文献:

- [1] Finkelstein R R, Gampala S S, Rock C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S15.
- [2] Wilkinson S, Davies W J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 195.
- [3] Albinsky D, Masson J E, Bogucki A, *et al.* Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signaling pathway [J]. *Plant J*, 1999, 17: 73.
- [4] Wang P, Zhao Y, Li Z, *et al.* Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response [J]. *Mol Cell*, 2018, 69: 100.
- [5] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 781.
- [6] Xing L, Zhao Y, Gao J, *et al.* The ABA receptor PYL9 together with PYL8 plays an important role in regulating lateral root growth [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27177.
- [7] Lim C W, Lee S C. Arabidopsis abscisic acid receptors play an important role in disease resistance [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 88: 313.
- [8] Aleman F, Yazaki J, Lee M, *et al.* An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: A putative link of ABA and JA signaling [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28941.
- [9] 李德款, 张亮, 彭梅芳, 等. ABA 受体 RCAR1/PYL9 相互作用蛋白质的筛选及初步研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2011, 48: 486.

- [10] 刘震. 拟南芥尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT71C5)对脱落酸(ABA)内稳态调节的分析[D]. 成都: 四川大学, 2013.
- [11] Qin X, Zeevaart J A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 15354.
- [12] Lee K H, Piao H L, Kim H Y, *et al.* Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid [J]. Cell, 2006, 126: 1109.
- [13] Xu Z Y, Lee K H, Dong T, *et al.* A vacuolar beta-glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2012, 24: 2184.
- [14] Okamoto M, Tanaka Y, Abrams S R, *et al.* High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2009, 149: 825.
- [15] Xu Z J, Nakajima M, Suzuki Y, *et al.* Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from Adzuki bean seedlings. [J]. Plant Physiol, 2002, 129: 1285.
- [16] 岑咏一, 刘震, 李旭锋, 等. UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 酶活性及酶反应动力学分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53: 171.
- [17] Priest D M, Ambrose S J, Vaistij F E, *et al.* Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2006, 46: 492.
- [18] Dong T, Xu Z Y, Park Y, *et al.* Abscisic acid uridine diphosphate glucosyltransferases play a crucial role in abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2014, 165: 277.

引用本文格式:

中文: 樊晶, 马燕林, 曹婧, 等. 拟南芥 ABA 受体与 UGT71B6 的相互作用研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 333.

英文: Fan J, Ma Y L, Cao J, *et al.* The research on the interaction between the UGT71B6 and ABA receptors in *Arabidopsis* [J]. J Sichuan Univ; Nat Sci Ed, 2019, 56 333.