

利用酵母表达质粒检测甜菜黄化病毒 蛋白质间相互作用的遗传学研究

金 红

(天津市农业生物工程研究中心, 天津 300192)

V. V. Doljia V. V. Peremyshlov

(美国俄勒冈州立大学植物系)

摘 要 利用酵母双杂合系统, 检测与植物线状病毒组中热休克蛋白 HSP70相结合的其它相关的 BYV 蛋白。在体外构建两种编码融合蛋白的酵母表达质粒: 一组为将编码转录激活区域的基因与 HSP70r基因融合并克隆到 pACT 质粒中 (pACT⁺ HSP70r), 它编码转录激活区域与 HSP70 蛋白的融合蛋白; 另一组为将编码 DNA 结合区域的基因分别与甜菜黄化病毒基因组其它 7个基因融合并克隆到 pAS 质粒中 (pAS⁺ -), 分别编码 7个融合蛋白。经两质粒共转化酵母细胞后, 通过双报告基因 (LacZ基因和组氨酸 H is3基因) 筛选获得阳性菌落, 以阳性菌落总 DNA 为模板, 经体外特异性引物的 PCR 扩增, 检测出 HSP70蛋白与 p20蛋白之间的相互作用, 并证实这一相互作用是特异的。

关键词 酵母双杂合系统 热休克蛋白 HSP70 甜菜黄化病毒 蛋白质间相互作用

植物线状病毒组最突出的特点之一是它们都含有一个编码热休克蛋白 HSP70的基因, 已发现它存在于甜菜黄化病毒中^[1]。动物、植物、细菌和病毒都含有类似的这种蛋白质, 在细胞中, 它的重要功能是执行细胞的分子保护机制, 包括蛋白质折叠、多重亚基的组装和蛋白质分泌等功能^[2]; 参与病毒的繁殖、病毒 RNA 运输等过程^[3]。另外已知各种不同细胞的热休克蛋白都是通过与其它蛋白质相结合而发挥作用的。因此, 识别与热休克蛋白 HSP70相结合的其它相关蛋白质对解释甜菜黄化病毒在寄主中的繁殖和寄生规律具有重要意义。

由于生物体内蛋白质间的相互作用很弱, 很难用物理化学方法检测到, 酵母双杂合系统 (Yeast two-hybrid system) 的出现为研究蛋白质之间的这种较弱的相互作用提供了良好的实验手段^[4]。这种方法已被广泛地应用到癌基因的检测和调控中^[5]。Yiling 和 Erin 分别用酵母双杂合系统检测了马铃薯病毒组和苜蓿花叶病毒组的蛋白质间的相互作用^[10, 11]。

1 材料和方法

1.1 将 BYV 基因构建到酵母表达质粒中

在体外分别合成 BYV 的 8个基因 PCR 扩增所需的 8对引物, 以 BYV DNA 为模板, 常规

PCR 法扩增这 8 个基因 (PCR 反应条件为: $1\mu\text{L}$ DNA, $10\mu\text{L}$ 10XTaq 酶缓冲液, $1\mu\text{L}$ B' 引物, $1\mu\text{L}$ 5' 引物, $1\mu\text{L}$ Taq DNA 多聚酶, $1\mu\text{L}$ Taq 酶 extender, $5\mu\text{L}$ dNTP, $80\mu\text{L}$ ddH₂O, PCR 程序为: 每个循环 93°C 运行 1 min, 56°C 运行 1 min, 72°C 运行 2 min, 共运行 26 个循环后, 72°C 延伸 5 min 其中基因 p6 的 PCR 程序与上述程序有所不同, 每个循环中的 72°C 只运行 30s 其他条件相同。

用 BamHI 和 NcoI 酶切 HSP70r 基因和 pACT 质粒 DNA, 经体外连接, 形成含有两者融合基因的质粒, 即 pACT° HSP70r

用 BamHI 和 NcoI 酶切其余 7 个基因和 pAS 质粒 DNA, 经体外连接, 分别获得下列含 7 个融合基因的质粒: pAS° HC-P α , pAS° p6, pAS° p64, pAS° Cp β , pAS° Cp β , pAS° p2Q, pAS° p2L, 将这 7 个质粒 DNA 取等量混合, 获得的混合物存于 -20°C 条件下备用。

酵母表达质粒 pACT 和 pAS 的图谱及体外构建的酶切位点见图 1 (引自参考文献 5)。

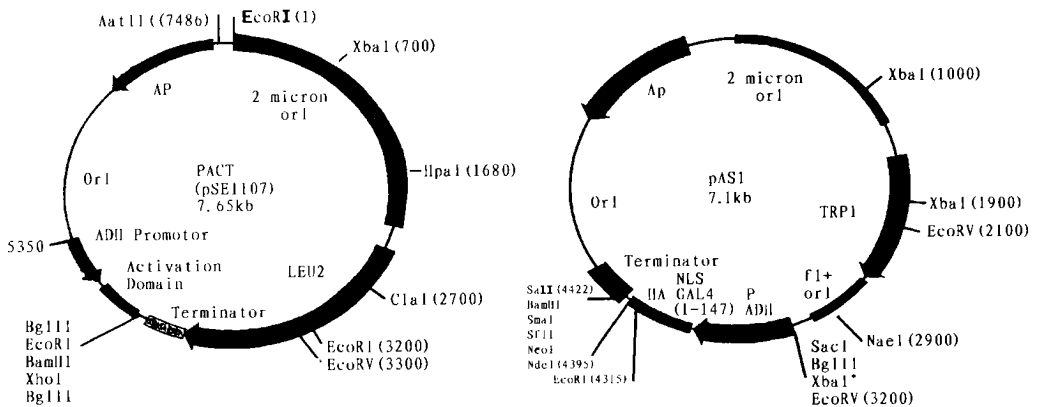


图 1 酵母表达质粒 pACT 和 pAS 的图谱及体外构建所需的多克隆酶切位点

1.2 含 BYV 基因的酵母表达质粒的转化及转化子的检测

将构建的 pACT° HSP70r 质粒和 7 种 pAS° - 质粒混合物共转化 Y190 细胞, 具体方法见参考文献 [5]。将转化后的细胞涂于 $-his^+$ SC 培养基上 (不含组氨酸的不完全培养基), 于 30°C 培养 5~7 d。待菌落出现后, 划线培养在新的 $-his^+$ SC 培养基上, 30°C 培养, 直到菌落生长较好为止。用 $-his^+$ SC 培养基筛选可以进行几次, 最少要重复两次以上, 以去除假阳性, 当菌落长好后, 用硝酸纤维素滤膜将菌落印在其上, 于液氮中浸 10s, 取出后放在用含 X-Gal 的缓冲液浸湿的 Whatman 滤纸上, 于 30°C 培养过夜, 观察颜色变化。

将转变为蓝色的菌落挑出, 培养在 $-his^+$ SC 液体培养基中, 抽提其总 DNA, 具体方法见参考文献 [6], 以该 DNA 为模板, 用合成的 8 对引物做体外 PCR 扩增, 电泳。

2 结果与分析

2.1 阳性菌落的第一次筛选 (利用组氨酸基因筛选)

阳性菌落的第一次筛选即为用不含有组氨酸的培养基筛选, 经两次划线培养, 有些菌落能够一直存在, 而有些则消失, 那些一直生长的菌落可能是阳性菌落, 结果见表 1。

从表 1 可见, 菌落 1 2 3 6 8 在 - his 培养基上两次划线培养均能正常生长, 可能为阳性菌落, 但还要经过第二次筛选才能确定。菌落 4 7 在第二次划线培养时就不再生长了, 说明它一定不是阳性菌落。第二次筛选时可以排除第一次筛选产生的假阳性菌落。用 - his 培养基筛选的次数越多, 假阳性去除得越好。

2.2 阳性菌落的第二次筛选 (利用 β -半乳糖苷酶基因筛选)

本文所采用的酵母菌是经过改造的, 它的特点是其染色体上具有双重报告基因 (β -半乳糖苷酶基因 LacZ 和组氨酸基因 His3), 它们的转录激活子已被取代。因此, 在通常情况下不转录, 只有当所构建的 pACT 和 pAS 融合质粒共转化该酵母细胞, 并且这两个融合质粒中的蛋白能够相互作用, 进而形成有功能的转录激活因子时才能激活报告基因的转录。组氨酸基因表达的结果使酵母细胞能生长在缺乏组氨酸的培养基上。

β -半乳糖苷酶基因的转录结果是细胞产生 β -半乳糖苷酶, 用该酶的底物 X-Gal 检测菌落时, 菌落由白色转变为蓝色。因此, 蓝色菌落为阳性菌落, 白色菌落为阴性菌落。说明只有那些经过双重报告基因筛选表现为阳性的菌落才为真正的阳性菌落 (图 2)。

从图 2 可见, 在 - his 培养基上正常生长的菌落 1 2 3 8 经 X-Gal 检测表现为蓝色, 从而确定这些菌落是经过两个报告基因筛选的阳性菌落, 可以用于 PCR 检测; 6 号菌落虽能在 - his 培养基上生长, 但 X-Gal 检测却为白色, 说明即使在不含组氨酸培养基上表现阳性的菌落也可能不是真正的阳性菌落; 第 1 次筛选即表现非阳性的 4 和 7 两个菌落, 不会在 X-Gal 上产生蓝色则是确定无疑的。

2.3 阳性菌落的 PCR 检测结果

以阳性菌落抽提的总 DNA 为模板, 取针对以上 8 个基因的 8 对引物做体外 PCR 扩增, 电泳出现的片段应该是编码相互结合的一对蛋白的基因, 而没有电泳出的基因片断, 它们所编码的蛋白则不能与 HSP70 相互作用, 结果见图 3。

由图 3 可见, 2 号孔出现的片段为分子量 1793nt 的 HSP70_r 基因, 7 号孔出现的片段为分子量 548nt 的 p20 基因, 其它孔没有片段出现。由于与这 8 个基因相对应的 8 对引物是完全特异的, 因此, 产生的 PCR 产物也是绝对特异的。在同一个阳性菌落中只有 HSP70_r 和 p20 的 PCR 产物出现, 说明两者特异的相互作用导致了两个报告基因的转录, 而且这种相互作用是特异的, 其它基因所编码的蛋白之间则不存在这种相互作用。

2.4 HSP70 与 P20 相互作用特异性的进一步验证

为了排除这一相互作用的偶然性, 设计如下两个实验:

2.4.1 取 7 个阳性菌落, 分别抽提它们的总 DNA, 以其为模板, 用以上相同的方法做 PCR 体

表 1 第一次筛选菌落生长情况

菌落编号	初培养	第二次划线培养	阳性菌落发生的可能性
1	+	+	可能
2	+	+	可能
3	+	+	可能
4	+	-	非阳性
5	++	++	阳性对照
6	+	+	可能
7	+	-	非阳性
8	+	+	可能
9	-	-	阴性对照

注: 1 2 3 4 6 7 8 为划线的转化菌落; 5 为已知一对相互作用的蛋白 pSE111/pSE112; 9 为已知毫不相关的蛋白 pACTα /pASα; + : 生长; - : 不能生长; ++ : 生长好

外扩增。从图 4可以看出,这 7个阳性菌落均出现相同的 PCR 扩增结果,即在每一个阳性菌落中同时出现 HSP 70_r和 p20 的 PCR 产物,说明 7个阳性菌落的产生都是由于 HSP 70和 p20相互作用的结果,从而证明这种相互作用不是仅在某一个阳性菌落中偶然出现的。

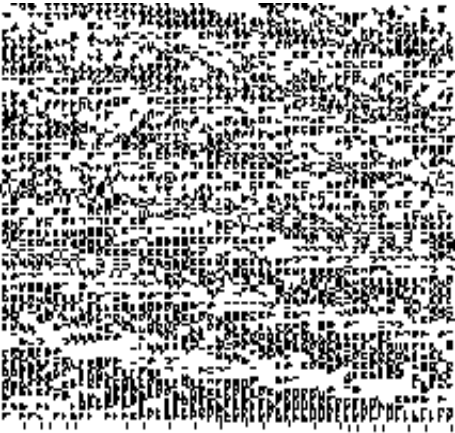


图 2 经 X-Gal反应后的菌落颜色情况

注:菌落编号同表 1

图 3 阳性菌落 PCR 扩增后的电泳结果

1为 1kb DNA 分子量标准; 2~ 9为 8对引物的 PCR 扩增产物:

2 HSP 70_r; 3 HC-Prq 4 p6 5 p64 6 p2k 7 p2Q 8 Cpr 9 Cp



图 4 7个阳性菌落 HSP70_r和 p20基因引物 PCR 扩增结果

1为 1kb DNA 分子量标准; 2~ 8为阳性菌落的编号。

2.4.2 将 BYV 的 HSP70_r基因分别与 BYV 的其它基因进行组合,克隆到 pACT 和 pAS 表达质粒中,共转化酵母细胞,经 *-his*培养基培养和 X-Gal反应检测后的结果汇总于表 2

从表 2可见,只有 pACT⁺ HSP70_r与 pAS⁺ p20共转化的酵母细胞经 X-Gal反应检测,菌落才表现为蓝色,且反应强度稍次于阳性对照。其他组合的菌落反应均表现为白色。这一结果说明热休克蛋白 HSP70与 p20蛋白的相互作用是专一的。

3 讨论

植物线状病毒基因组中突出的特点是都含有一个 HSP70_r 基因, 它编码分子量为 65KDa 的蛋白质 HSP70(p65), 它是该组病毒的标志, 尽管其他基因的数目和出现的位置不同, 但 HSP70_r 基因在这组病毒中都处于极端相似的位置, 具有严格的保守性。该组病毒中包括: 柑桔速衰病毒 (CTV)、甜菜黄矮化病毒 (BYSV)、黄瓜退绿斑纹病毒 (CCSV)、莴苣感染性黄化病毒 (LIYV) 等^[1]。p65 蛋白同动植物细胞内的热休克蛋白 HSP70 极端相似, 执行着细胞内的分子保护机制。病毒的侵染向寄主细胞内的分子保护系统提出两个挑战: ① 细胞需增加 HSP70_r 基因的表达, 以缓解外部的压力 (犹如动物和人类发生感染时免疫系统就要受到警告一样); ② 各种病毒要利用细胞内 HSP70 协助进行复制和组装^[7, 8]。

推测 HSP70 在病毒繁殖中的功能可能有以下几方面: ① 它通过与细胞的翻译机器结合来参与病毒 RNA 穿过胞浆的过程; ② 参与基因组复制或亚基因组 RNA 合成所需要的多重亚基复合体的组装; ③ 参与病毒颗粒的组装^[1]。BYV 中的 HSP70_r 基因有可能与一个编码小的疏水蛋白的基因同时翻译出来, 暗示出 HSP70 蛋白与这一小疏水蛋白可能相互结合, 通过共价连接起到在细胞内定位的作用, 以助于 HSP70 功能的完成^[9]。关于 2KDa 蛋白, 它与目前已知的 BYV 蛋白均无任何相似之处, 只与 CTV 的 2KDa 蛋白结构相似, 由此暗示它存在的特异性, 但其具体功能尚不清楚^[1]。

本文利用酵母表达质粒 pACT 和 pAS 在酵母细胞内检测到 HSP70 与 p20 之间的相互作用, 对进一步解释这两种蛋白的功能有重要意义。热休克蛋白 HSP70 的重要作用不言而喻, 利用它能与 p20 相互结合的特点, 通过 p20 抗体监测 HSP70 在寄主中的活动, 为解释 HSP70 在寄主细胞内如何行使分子保护功能提供一个新的手段。这一研究结果也为我们提供了另外一种可能性, 即病毒基因组内不含有或去除 HSP70_r 基因, 病毒是否会利用细胞的 HSP70 蛋白进行繁殖, 如果答案是否定的, 则可为我们从分子水平上提出病毒防治机制提供理论依据。

酵母双杂合体系统是利用某些点特异性转录激活子的转录活性来检测蛋白质间相互作用的。转录激活子由 DNA 结合区域和转录激活区域组成, 只有当这两个区域靠近在一起时才能形成一个有功能的转录激活子复合体, 从而激活报告基因的转录, 将这一过程放在真核细胞中进行。因此, 通过该系统检测出的蛋白质间的相互作用反映了细胞内自然状态下发生的情

表 2 BYV 的热休克蛋白 HSP70 与其它蛋白的相互作用

与 DNA 结合区域融合 的基因 (pACT ⁺ X)	与激活区域融合 的基因 (pAS ⁺ Y)	菌落颜色 (X-Gal 反应)	相互作用 的强弱
HSP70 _r	H C-P _{ro}	白色	-
HSP70 _r	p6	白色	-
HSP70 _r	p64	白色	-
HSP70 _r	Cp _r	白色	-
HSP70 _r	Cp	白色	-
HSP70 _r	p20	蓝色	+++
HSP70 _r	p21	白色	-
HSP70 _r	HSP70 _r	白色	-
无	p20	白色	-
HSP70 _r	无	白色	-
无	无	白色	-
PSE1111	pSE1112	深蓝色	+++

注: - : 无相互作用; +++: 最强的相互作用; ++: 较强的相互作用;
pSE1111 / pSE1112 阳性对照; 无 / 无: 阴性对照; 无: 没有 BYV 基因插入

况^[4];另外,以组氨酸基因筛选,由于细胞对组氨酸需求量很低,因此,即使较弱的相互作用也可以检测出来^[5]。本文的研究证明,酵母双杂合系统检测自然状态下蛋白质之间较弱的相互作用是有效,灵敏的

参 考 文 献

- 1 Doljia VV, et al Molecular biology and evolution of closteroviruses Annu Rev Phytopathol 1994, 32: 261 ~ 285
- 2 Gething M -J et al Protein folding in the cell Nature, 1992, 355: 33~ 45
- 3 Meyers G, et al Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences Virology, 1991, 180: 602~ 616
- 4 Fields S, et al The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions Trends Genet, 1994, 10: 286~ 292
- 5 Tim D, et al The retinoblastoma protein associate with the protein phosphatase type I catalytic subunit Gene Development 1993, 7: 555~ 569
- 6 Hoffman CS, et al A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of E.coli Gene (Amst), 1987, 57: 267~ 272
- 7 Young RA, et al Stress proteins infection and immune surveillance. Cell 1989, 59: 5~ 8
- 8 Georgopoulis G et al Role of the major heat shock proteins as a molecular chaperones Annu Rev Cell Biol 1993, 9: 601~ 634
- 9 Karasev AV, et al Screening if the closterovirus genome by degenerate primer-mediated PCR. J gen virol 1994
- 10 Yiling H, et al A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and Vpg in yeast cells Virology, 1995, 214: 159~ 166
- 11 Erin K O'Reilly, et al Biochemical and genetic analyses of the interaction between the helicase-like and polymerase-like proteins of the bromemosaic virus Virology, 1995, 214: 59~ 71

Genetic Studies on the Interactions of BYV Proteins Using Yeast Expression Plasmid Vectors

Jin Hong

V. V. Doljia V. V. Peremyslov

(Tianjin Center for Agri Biotech, Tianjin 300192) (Dept of Botany of Oregon State University, USA)

Abstract This thesis analyzed the beet yellow virus proteins which are possible to interact with Heat shock protein 70 of plant closteroviruses in the host cells using the highly specific yeast two-hybrid system. *In vitro* two yeast expression plasmids containing hybrids were constructed one was the plasmid pACT⁺-HSP70r containing the fused genes between the gene encoded for activation domain and HSP70r gene which codes their fused protein; the other one was the plasmid pAS⁺-BYV gene(s) containing the fused gene(s) between the gene encoded for DNA binding domain and BYV gene(s), which respectively codes seven fused protein(s). Yeast cells were co-transformed by both of the two plasmids and the transformed cells were detected by two report genes (LacZ gene and His3 gene). Positive colonies were obtained Total DNA extracting from the positive colonies was used as the template and PCR was done *in vitro*. The interaction between HSP70 and p20 was found and it was proved that this interaction was specific This result will give us the new way to study the function of HSP70

Key words Yeast two-hybrid system; Heat shock protein 70; Beet yellow virus (BYV); Protein-protein interaction