

芥菜开花调控因子 SVP 与 FLC 蛋白互作的结构域筛选与鉴定

汤青林, 李念祖*, 宋明**, 丁宁, 陈竹睿, 刘智宇, 王志敏

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为阐明芥菜开花路径核心调节子 SVP 与 FLC 相互作用的结构域, 从酵母重组质粒 pGADT7SVP、pGBKT7FLC 分别亚克隆了 5 个 SVP 截短体 (SVP1~5) 和 5 个 FLC 截短体 (FLC1~5)。SVP1~5 与 FLC1~5 编码蛋白的结构域均分别为 MI、MIK、K、IKC 和 KC。利用酵母双杂体系, 分别构建酵母猎物质粒 pGADT7SVP1~5 与诱饵质粒 pGBKT7FLC1~5, 并转化对应的酵母 Y187、Y2HGold 菌。酵母转化子 Y187 [pGADT7SVP2~5] 能与 Y2HGold [pGBKT7FLC] 融合, 并可在选择性固体培养基 QDO/X/A 上长出蓝色菌落, 表明 FLC 能与截短体蛋白 SVP2~5 异源结合, SVP 的 K 域 (SVP3) 可独立作用于 FLC 蛋白。此外, Y187 [pGADT7SVP] × Y2HGold [pGBKT7FLC2~5] 也能同时激活报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 表明 FLC 的 K 域 (FLC3) 也可独立作用于 SVP。进一步研究发现: Y187 [pGADT7SVP3] × Y2HGold [pGBKT7FLC3] 正向杂交以及 Y187 [pGADT7FLC3] × Y2HGold [pGBKT7SVP3] 载体互换后杂交均可相互作用, 表明 SVP 的 K 域 (SVP 第 96~173 位氨基酸区域) 与 FLC 的 K 域 (FLC 第 114~167 位氨基酸区域) 能够异源结合, 是介导 SVP 与 FLC 蛋白互作的关键结构域。

关键词: 芥菜; 截短体; SVP; FLC; 酵母双杂交

中图分类号: S 637.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 12-2395-09

Identification of Acting Domains Mediating the Protein Interactions Between SVP and FLC in *Brassica juncea* Coss.

TANG Qing-lin, LI Nian-zu*, SONG Ming**, DING Ning, CHEN Zhu-rui, LIU Zhi-yu, and WANG Zhi-min

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University; Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education; Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China)

Abstract: SVP and FLC were the key regulators in plant flowering pathways. For further study on the molecular mechanism of flowering control in *Brassica juncea* Coss. (mustard), the protein interaction domains between SVP and FLC were screened via yeast two-hybrid system. The truncated genes of SVP1-5 and FLC1-5 were respectively subcloned from yeast recombination plasmids pGADT7SVP and pGBKT7FLC. The proteins encoded by SVP1-5 or FLC1-5 had MI-domain, MIK-domain, K-domain,

收稿日期: 2012-08-21; 修回日期: 2012-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000908); 重庆市自然科学基金项目 (2011BA1002); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2012B020)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: swutql@163.com; swausongm@yahoo.com.cn)

IKC-domain and KC-domain, respectively. SVP1-5 truncated forms were fused into bait plasmid pGADT7, which were designated as pGADT7SVP1-5 and then transformed into Y187 yeast stains. FLC1-5 truncated forms were fused into prey plasmid pGBKT7, which were designated as pGBKT7FLC1-5 and then transformed into Y2HGOLD stains. All the transformed yeast stains were not autoactivation and toxicity. The yeast stains of pGADT7SVP2-5 and pGBKT7FLC could mate into zygotes and grew on selective agar plates QDO/X/A with blue stains. The results showed that SVP2-5 truncated forms and FLC protein could act with each other to form heterodimers. K domain of SVP (SVP3) was the key amino acid region to independently mediate the interactions between SVP and FLC. Then pGBKT7FLC2-5 and pGADT7SVP were brought into proximity to form protein compounds and activate transcription of four independent reporter genes (*AURI-C*, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*). The results also indicated that K domain of FLC (FLC3) played an important role in mediating the SVP-FLC heterodimers. To further confirm the acting domains between SVP and FLC, the interactions between SVP3 and FLC3 were tested. The yeast zygotes (pGADT7SVP3 × pGBKT7FLC3, pGADT7FLC3 × pGBKT7SVP3) exhibit blue stains on selective agar plates QDO/X/A. The results strongly showed that the K domain of SVP (amino acid region from position 96 to 173) and the K domain of FLC (amino acid region from position 114 to 167) were the key structure domains and mediated the protein interactions between SVP and FLC.

Key words: *Brassica juncea* Coss.; truncated form; SVP; FLC; yeast two-hybrid system

SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) 和 FLOWERING LOCUS C (FLC) 是重要的开花抑制因子 (Hartmann et al., 2000, Li et al., 2008), 它们均属于 MIKC 型蛋白, 能够相互结合形成蛋白复合物, 在自发途径、春化途径、光周期途径和赤霉素途径等多条开花路径中具有核心调节作用, 调控开花时间。SVP 蛋白能在茎尖分生组织和叶片中直接抑制开花信号整合子基因 *SOC1* 的转录, 从而抑制开花 (Li et al., 2008)。此外, 表达于叶片并长距离运输到茎顶端分生组织的成花信号 *FT* 基因也会受到 SVP 的调节 (Lee et al., 2007)。SVP 蛋白能结合到 *SOC1* 和 *FT* 的启动子上, 抑制基因的转录表达, 该结合区域同时也是 FLC 蛋白的绑定位点。FLC 是另一个开花路径核心调节子 (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Searle et al., 2006; Corbesier et al., 2007), 在营养生长阶段, 它能与 SVP 相互作用形成蛋白复合物, 抑制抽薹, 延缓开花 (Li et al., 2008; Sumire et al., 2008; Jung & Müller, 2009)。

目前已有利用 pET 原核表达系统, 以 Poly-His 为亲和标签, Ni²⁺ 为配位体对芥菜 (*Brassica juncea* Coss.) 的 SVP、FLC 体外蛋白表达进行的研究, 证实了芥菜 SVP 与 FLC 能够相互作用, 形成稳定的异源蛋白复合物 (汤青林 等, 2011)。最近, 利用酵母真核表达系统分别构建了 SVP、FLC 对应的诱饵质粒与猎物质粒, 二者融合后能在选择性固体培养基 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-a-Gal/AbA) 上生长并呈蓝色, 同时激活报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 再次证明芥菜 SVP 与 FLC 蛋白能够相互结合, 这也为深入研究二者相互作用的结构域及锚定位点构建了一个技术平台 (汤青林 等, 2012)。

但是, 芥菜 SVP 和 FLC 这两个 MIKC 型蛋白如何相互作用, 在蛋白的 MADS 域 (M-)、Intervening 域 (I-)、Keratin-like 域 (K-) 和 C-terminal 域 (C-) 中, 究竟是哪个结构域介导了该蛋白互作, 目前仍不清楚。本研究中分别构建了芥菜 SVP 和 FLC 的多个截短体, 并利用酵母双杂交技术平台筛选和鉴定 SVP 与 FLC 蛋白互作的结构域, 为进一步揭示 SVP 与 FLC 之间氨基酸位点的精细作用以及目标序列的特异性识别机制奠定基础, 对抽薹开花的分子调控具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验于 2012 年 2 月至 6 月在重庆市蔬菜学重点实验室完成。芥菜酵母重组质粒 pGADT7SVP、pGBKT7FLC 由本实验室提供。酵母双杂交系统 (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System) 及各种酵母缺陷型培养基均购自 Clontech 公司。*EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。DNA 回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 TransGen 公司。高保真 DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。

1.2 SVP 与 FLC 截短体克隆及酵母表达载体构建

以本实验室芥菜 pGADT7SVP 质粒为模板, 采用 Platinum pfx DNA polymerase 高保真聚合酶, 分别以 SF1/SR2、SF1/SR3、SF2/SR3、SF3/SR1、SF2/SR1 为引物对 (表 1), 亚克隆 SVP 基因的 5 个截短体 *SVP1*、*SVP2*、*SVP3*、*SVP4*、*SVP5* (以下简称为 *SVP1* ~ 5)。分别以 FF1/FR2、FF1/FR3、FF2/FR3、FF3/FR1、FF2/FR1 为引物对 (表 1), 从 pGBKT7FLC 质粒亚克隆 *FLC1*、*FLC2*、*FLC3*、*FLC4*、*FLC5* (以下简称为 *FLC1* ~ 5)。回收目标条带, 经目的基因特异引物和载体通用引物 (M13F、M13R) PCR 鉴定以及双酶切分析后, 取阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

以 TransGen 公司质粒提取试剂盒分别提取 *SVP1* ~ 5、*FLC1* ~ 5 目的基因质粒以及酵母表达载体质粒 pGADT7、pGBKT7, 并经 *EcoR* I /*Bam*H I 双酶切后, 高效连接酶 16 °C 连接 30 min, 分别构建酵母重组表达质粒 pGADT7SVP1 ~ 5、pGBKT7FLC1 ~ 5。将通用引物对 T7/3'AD 和 T7/3'BD 分别鉴定为阳性的质粒 pGADT7 SVP1 ~ 5、pGBKT7FLC1 ~ 5 送上海英骏生物技术有限公司测序。

表 1 *FLC* 与 *SVP* 截短体的 PCR 引物

Table 1 Primers used for amplification of the *FLC* and *SVP* truncated forms

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	大小/bp Primer size
SF1	CCGGAATTC <u>TTCGTTGTGATGGCGAGAGAAAAGA</u>	34
SF2	CCGGAATTC <u>GATCACGCCCTGTTGAGCAAAGAGA</u>	34
SF3	CCGGAATTC <u>TCCAGCATGAGGGAAGTGTAGAGA</u>	34
SR1	CGCGGATCCATCTCTAACCACCATACGGTAAGCC	34
SR2	CGCGGATCC <u>TGTTCTCGACTAGCTGTA</u> ACTCAAG	34
SR3	CGCGGATCC <u>TGCTGCCTTAGCCGTTGTTCTCA</u>	34
FF1	CCGGAATTCACAGAAGCCATGGGAAGAAAAAAC	34
FF2	CCGGAATTCGAATCAAATTTAGATGTAAGCGTCG	34
FF3	CCGGAATTC <u>TCCGGCAAGCTTTACA</u> ACTTCTCCT	34
FR1	CGCGGATCCGTTGGCTAATTAAGCAGTGGGAGAGT	34
FR2	CGCGGATCC <u>TTGATTCCACAAGCTTACTTCCA</u>	34
FR3	CGCGGATCCCTTCTCCATCTGGCTAGTCAAACC	34

注: 下划线为 *EcoR* I 或 *Bam*H I 酶切位点。

Note: The sites of *EcoR* I or *Bam*H I are underlined.

1.3 酵母转化子的获得以及毒性与自激活检测

参考 Clontech 公司 Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册和汤青林等(2012)的方法, 从 YPDA 固体培养基上挑选直径为 2~3 mm 的酵母单菌落 Y2HGold 和 Y187, 分别制备酵母感受态细胞。取 100 ng 待转化的重组质粒 pGADT7SVP1 ~ 5、pGBKT7FLC1 ~ 5, 采用 PEG/LiAc 法分别转化到 50 μL 的 Y187、Y2HGold 感受态细胞, 获得酵母转化子 Y187[pGADT7SVP1 ~ 5]、Y2HGold [pGBKT7FLC1 ~ 5], 并分别涂于 SD/-Leu、SD/-Trp 固体培养基上, 同时分别以空载体转化子 Y187[pGADT7]、Y2HGold[pGBKT7]为对照, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 通过观察菌落生长情况判断是否存在毒性。

将酵母转化子 Y187[pGADT7SVP1~5] 分别涂于 SD/-Leu、SD/-Leu/X- α -Gal、DDO 和 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 平板上; 将酵母转化子 Y2HGold[pGBKT7FLC1~5] 分别铺于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Leu/-Trp(DDO) 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上; 30 °C 培养 3~5 d, 观察 Y187[pGADT7SVP1~5] 和 Y2HGold[pGBKT7FLC1~5] 在选择平板上的生长情况。同时设立 Y2HGold [pGBKT7-Lam] \times Y187[pGADT7-T] (阴性对照) 和 Y2HGold[pGBKT7-53] \times Y187[pGADT7-T] (阳性对照), 判断是否存在自激活现象。

1.4 结构域筛选与鉴定

分别挑取 SD/-Trp、SD/-Leu 平板上的菌落, 将含有 FLC 全长的 Y2HGold[pGBKT7FLC] 转化菌落与含有不同结构域的 Y187[pGADT7SVP1~5] 转化菌落两两融合后, 分别涂布于 DDO、SD/-Trp/-Leu/AbA (DDO/A) 平板, 30 °C 培养 3~5 d 后将 DDO/A 平板上的克隆菌株划线至 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His (QDO) 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA (QDO/x/A) 平板, 同时设阳性和阴性对照, 观察菌落生长情况, 筛选介导 SVP 蛋白作用于 FLC 的结构域。

同样将含有 SVP 全长的 Y187[pGADT7SVP] 转化子与含有不同结构域的 Y2HGold[pGBKT7FLC1~5] 两两融合后, 分别先后涂布于 DDO、DDO/A、QDO 和 QDO/x/A 平板上, 筛选介导 FLC 蛋白作用于 SVP 的结构域。

以介导 FLC 蛋白作用于 SVP 的结构域为诱饵质粒, 以介导 SVP 蛋白作用于 FLC 的结构域为猎物质粒, 两两融合后, 先后涂布于 DDO、DDO/A、QDO 和 QDO/x/A 平板上, 酵母双杂交鉴定。同时将诱饵质粒和猎物质粒载体互换, 重新构建酵母重组质粒, 再次酵母双杂交验证。

2 结果与分析

2.1 SVP 截短体的克隆及其猎物质粒构建

分别以 SF1/SR2、SF1/SR3、SF2/SR3、SF3/SR1、SF2/SR1 为引物对, 从芥菜酵母重组质粒 pGADT7SVP 中亚克隆了 SVP1、SVP2、SVP3、SVP4、SVP5 共 5 个 SVP 截短体, 大小分别为 301、537、252、571 和 472 bp, 分别编码 95、173、78、179 和 146 个氨基酸, 且分别含有 MI 域、MIK 域、K 域、IKC 域和 KC 域。将克隆的截短体 SVP1~5 分别构建到酵母质粒 pGADT7, 获得的猎物质粒 pGADT7SVP1~5 分别经过 PCR 检测、EcoR I / BamH I 双酶切鉴定 (图 1) 及上海英骏公司测序表明: 重组质粒中目的基因的核苷酸序列、插入载体位置与方向均完全正确, 而且没有发生移码突变。

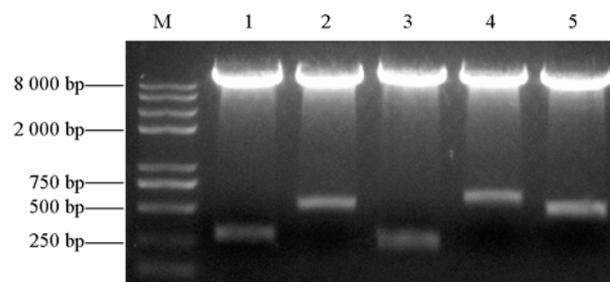


图 1 重组质粒 pGADT7SVP1~5 酶切电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profiles of pGADT7SVP1~5 digested by restriction enzymes

M: Trans2K plus II DNA marker; 1-5: recombinant of pGADT7SVP1-5 digested by EcoR I / BamH I.

酵母猎物质粒 pGADT7SVP1 ~ 5 分别转化酵母菌 Y187 后, 能在 SD/-Leu 平板上长出白色菌落, PCR 能检测到目的条带, 未转化的酵母无菌落生长, 说明重组质粒转化成功。酵母转化子 Y187[pGADT7SVP1 ~ 5] 在 SD/-Leu/X- α -Gal 平板上长出白色菌落, 但在 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 和 SD/-Leu/-Trp 平板上均不能生长。而阳性对照 Y2HGold[pGBKT7-53] \times Y187[pGADT7-T] 在 SD/-Leu/-Trp 固体平板上有白色菌落, 在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上有蓝色菌落; 阴性对照 Y187[pGADT7-T] \times Y2HGold[pGBKT7-Lam] 在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上不能生长。说明 SVP1 ~ 5 均不能自激活 *MEL1* 和 *AURI-C* 等报告基因, 无自身转录激活活性。酵母转化子 Y187[pGADT7SVP1 ~ 5] 的单菌落转培养于 SD/-Leu 培养基上, 与对照 Y187[pGADT7] 在 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 的菌落大小相当, 说明融合蛋白 pGADT7SVP1 ~ 5 对酵母没有毒性。

2.2 *FLC* 截短体的克隆及其诱饵质粒构建

分别以 FF1/FR2、FF1/FR3、FF2/FR3、FF3/FR1、FF2/FR1 为引物对, 从芥菜酵母质粒 pGBKT7FLC 中亚克隆了 *FLC1*、*FLC2*、*FLC3*、*FLC4*、*FLC5* 共 5 个 *FLC* 截短体, 大小分别为 341、513、198、466 和 301 bp, 分别编码 110、168、54、148 和 92 个氨基酸, 也分别含有 MI 域、MIK 域、K 域、IKC 域和 KC 域。截短体 *FLC1* ~ 5 分别与酵母质粒 pGBKT7 重组, 获得诱饵质粒 pGBKT7FLC1 ~ 5。PCR 检测、*EcoR* I / *BamH* I 双酶切鉴定 (图 2) 以及测序表明酵母诱饵质粒完全正确。酵母诱饵质粒分别转化 Y2HGold 酵母菌后, 自身均不能激活报告基因, 且对酵母无毒性, 可用于后续的酵母双杂交研究。

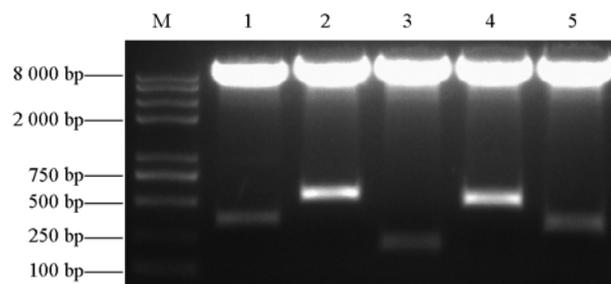


图 2 重组质粒 pGBKT7FLC1 ~ 5 酶切电泳图

Fig. 2 Electrophoresis profiles of pGBKT7FLC1 - 5 digested by restriction enzymes

M: *Trans2K* plus II DNA marker; 1 - 5: Recombinant of pGBKT7FLC1 - 5 digested by *EcoR* I / *BamH* I .

诱饵质粒 pGBKT7FLC1 ~ 5 分别转化酵母菌 Y2HGold 后, 能在 SD/-Trp 平板上长出白色菌落, 菌落 PCR 为阳性, 表明重组质粒转化酵母成功。酵母转化子 Y2HGold[pGBKT7FLC1 ~ 5] 在 SD/-Trp/X- α -Gal 平板上长出白色菌落, 而在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上不能生长, 也不能在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长。说明 FLC1 ~ 5 也无自身转录激活活性。酵母转化子 Y2HGold [pGBKT7FLC1 ~ 5] 的单菌落转培养于 SD/-Trp 缺陷型选择性固体培养基上, 与对照 Y2HGold [pGBKT7] 在 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 的菌落大小相当, 说明融合蛋白 pGBKT7FLC1 ~ 5 对酵母的生长影响很小, 对酵母也均无毒性。

2.3 介导 SVP 蛋白作用于 FLC 的结构域筛选

酵母诱饵转化子 Y2HGold[pGBKT7FLC] 与猎物转化子 Y187[pGADT7SVP1 ~ 5] 相互融合, 分别记为 R1、R2、R3、R4、R5; 酵母双杂交系统试剂盒中的阳性对照 Y2HGold[pGBKT7-53] \times Y187[pGADT-T] 和阴性对照 Y2HGold[pGBKT7-Lam] \times Y187[pGADT-T] 分别记为 P 和 N; Y187

[pGADT7SVP1~5]分别与空载 Y2HGold[pGBKT7]融合作为阴性对照, 记为 M1、M2、M3、M4、M5; Y2HGold[pGBKT7FLC]与 Y187[pGADT7]融合也作为阴性对照, 记为 M6 (表 2)。以上 13 个试验组在 DDO 平板上均能长出白色菌落 (表 2)。其中在 R1、R2、R3、R4、R5 的 DDO 平板上, 分别采用 FLC 全长和 SVP 相应截短体的引物组合, 进行酵母菌落 PCR 发现, 既有 FLC 条带又有相应 SVP 截短体条带。由此表明: 酵母诱饵质粒与猎物质粒成功转入二倍体接合型酵母菌中。

在 R1、R2、R3、R4、R5 这 5 个处理组中, 只有 R2、R3、R4、R5 这 4 个能够在缺陷型培养基 DDO/AbA、QDO 和 QDO/X- α -Gal/AbA 上生长 (表 2), 且在 QDO/X- α -Gal/AbA 培养基中呈现蓝色菌落 (图 3, A)。但是, 处理组 R1 在缺陷型培养基 DDO/AbA、QDO 和 QDO/X- α -Gal/AbA 上都不能生长 (图 3, A)。而酵母双杂交系统试剂盒中的阳性对照 (P) 在这 3 种缺陷型培养基中均能生长, 且在含有 X- α -Gal 的培养基中生长呈蓝色; 所有阴性对照 (N、M1、M2、M3、M4、M5、M6) 在这 3 种培养基中都不生长。

表 2 酵母中 FLC1~5 与 SVP1~5 之间相互作用分析
Table 2 Analysis of the interactions between FLC1-5 and SVP1-5 in yeast

编号 No.	类型 Type	DDO	DDO/AbA	QDO	QDO/X- α -Gal/AbA	MEL1	AURI-C
R1	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7SVP1]	+	-	-	-	无 No	无 No
R2	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7SVP2]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
R3	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7SVP3]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
R4	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7SVP4]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
R5	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7SVP5]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
M1	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP1]	+	-	-	-	无 No	无 No
M2	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP2]	+	-	-	-	无 No	无 No
M3	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP3]	+	-	-	-	无 No	无 No
M4	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP4]	+	-	-	-	无 No	无 No
M5	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP5]	+	-	-	-	无 No	无 No
M6	Y2HGold[pGBKT7FLC] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
H1	Y2HGold[pGBKT7FLC1] × Y187[pGADT7SVP]	+	-	-	-	无 No	无 No
H2	Y2HGold[pGBKT7FLC2] × Y187[pGADT7SVP]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
H3	Y2HGold[pGBKT7FLC3] × Y187[pGADT7SVP]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
H4	Y2HGold[pGBKT7FLC4] × Y187[pGADT7SVP]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
H5	Y2HGold[pGBKT7FLC5] × Y187[pGADT7SVP]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
N1	Y2HGold[pGBKT7FLC1] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
N2	Y2HGold[pGBKT7FLC2] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
N3	Y2HGold[pGBKT7FLC3] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
N4	Y2HGold[pGBKT7FLC4] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
N5	Y2HGold[pGBKT7FLC5] × Y187[pGADT7]	+	-	-	-	无 No	无 No
N6	Y2HGold[pGBKT7] × Y187[pGADT7SVP]	+	-	-	-	无 No	无 No
A	Y2HGold[pGBKT7FLC3] × Y187[pGADT7SVP3]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
B	Y2HGold[pGBKT7SVP3] × Y187[pGADT7FLC3]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
P	Y2HGold[pGBKT7-53] × Y187[pGADT-T]	+	+	+	++	蓝色 Blue	有 Yes
N	Y2HGold[pGBKT7-Lam] × Y187[pGADT-T]	+	-	-	-	无 No	无 No

注: ++、+和 - 分别表示蓝色菌落、白色菌落和无菌落。

Note: ++, + and - respectively represented blue yeast stains, white yeast stains and no stains on the plates.

以上表明: 截短体蛋白 SVP2、SVP3、SVP4、SVP5 均分别能够与 FLC 蛋白结合, 发生异源二聚化, 使得这 4 个酵母二倍体 (R2、R3、R4、R5) 都可全部激活酵母双杂交系统的 ADE2、AURI-C、HIS3 和 MEL1 报告基因; 而截短体蛋白 SVP1 (只有 MI 域, 不含 K 域) 不能够与 FLC 发生异源二

聚化。能与 FLC 异源二聚化的截短体蛋白 SVP2 (含 MIK 域)、SVP3 (含 K 域)、SVP4 (含 IKC 域)、SVP5 (含 KC 域) 都含有 K 结构域, 特别是 SVP3 只含有 K 结构域。由此可见: K 域 (SVP3) 可以介导 SVP 蛋白与 FLC 发生异源二聚化。

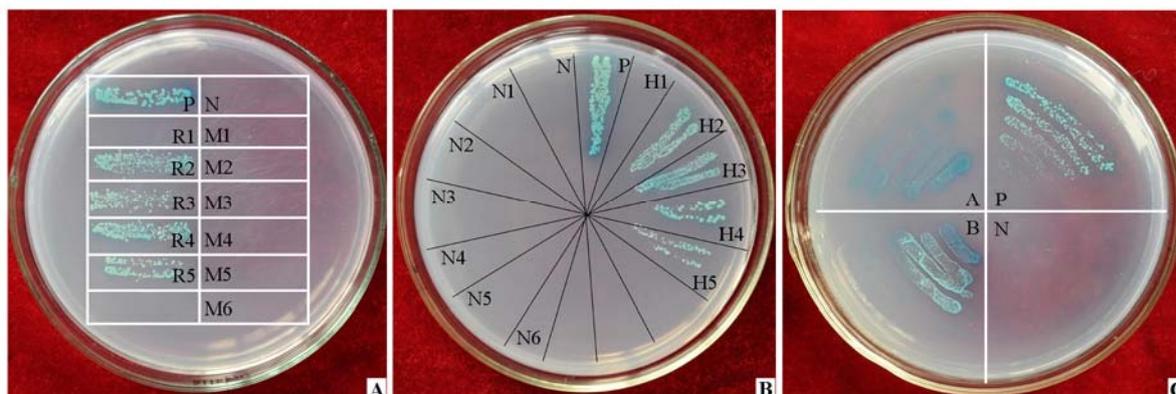


图 3 芥菜 SVP1~5 与 FLC1~5 酵母双杂交分析

A: FLC 与截短体 SVP1~5 相互作用分析; B: SVP 与截短体 FLC1~5 相互作用分析;
C: SVP3 与截短体 FLC3 相互作用分析。

Fig. 3 Analysis of interactions between FLC1 - 5 and SVP1 - 5 via yeast two-hybrid system in mustard

A: Analysis of interactions between FLC and SVP1 - 5 truncated forms in yeast on QDO/X/A plate;
B: Analysis of interactions between SVP and FLC1 - 5 truncated forms in yeast on tQDO/X/A plate;
C: Analysis of the interactions between SVP3 and FLC3 in yeast on QDO/X/A plate.

2.4 介导 FLC 蛋白作用于 SVP 的结构域筛选

酵母诱饵转化子 Y2HGold[pGBKT7FLC1~5]与猎物转化子 Y187[pGADT7SVP]相互融合, 分别记为 H1、H2、H3、H4、H5。酵母试剂盒中自带的阳性和阴性对照分别记为 P、N (表 2)。空载 Y187[pGADT7]分别与 Y2HGold[pGBKT7FLC1~5]融合记为 N1、N2、N3、N4、N5; Y2HGold[pGBKT7]与 Y187[pGADT7SVP]融合记为 N6 (表 2)。

利用酵母双杂交发现: FLC2、FLC3、FLC4、FLC5 分别与 SVP 蛋白融合 (表 2 中编号 H2、H3、H4、H5), 均能在 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-a-Gal/AbA) 固体培养基上生长, 且为蓝色 (图 3, B), 激活了酵母的 4 个报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*。FLC2 (缺少 C 域) 能与 SVP 相互作用暗示这一异源复合物并不由 C 域决定; FLC4 (缺少 M 域) 能与 SVP 蛋白互作暗示该蛋白相互作用也不由 M 域决定; FLC5 (缺少 M 域和 I 域) 能与 SVP 互作暗示 I 域同样不会决定这一相互作用; FLC1 (只含有 M 域和 I 域) 不能与 SVP 互作, 也证实 M 域和 I 域确实不能介导 FLC 蛋白与 SVP 结合。

以上表明: 无论 M 域、I 域还是 C 域, 都不能介导 FLC 蛋白与 SVP 互作, 很可能是 K 域介导了该蛋白复合体。而 FLC3 (只含有 K 域) 与 SVP 相互作用的结果确实表明: K 域 (FLC3) 介导了 FLC 蛋白与 SVP 结合形成蛋白复合物。

2.5 SVP3 与 FLC3 相互作用鉴定

酵母诱饵转化子 Y2HGold[pGBKT7FLC3]与猎物转化子 Y187[pGADT7SVP3]相互融合记为 A; 载体互换后的酵母转化子 Y2HGold[pGBKT7SVP3]与 Y187[pGADT7FLC3]相互融合记为 B; 酵母试剂盒中自带的阳性和阴性对照分别记为 P、N (表 2)。

利用酵母双杂交发现：正向杂交 Y2HGold[pGBKT7FLC3] × Y187[pGADT7SVP3]（表 2 中编号 A）和载体互换后杂交 Y2HGold[pGBKT7SVP3] × Y187[pGADT7FLC3]（表 2 中编号 B）均可以在 QDO/X/A 固体培养基上长出蓝色菌落，激活酵母的 4 个报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*（图 3，C）。

由此表明：芥菜 SVP 与 FLC 蛋白相互作用的确是靠 SVP3 与 FLC3 相互结合在一起的。即 SVP 蛋白的 K 域（第 96 ~ 173 位氨基酸区域）与 FLC 蛋白的 K 域（第 114 ~ 167 位氨基酸区域）能够异源二聚化，K 域是 SVP 与 FLC 蛋白互作的关键结构域。

3 讨论

芥菜 SVP 与 FLC 基因编码的蛋白均具有 MADS 域、I 域、K 域和 C 域（汤青林 等，2012），属典型的 MIKC 型蛋白，在植物开花发育和信号转导中起着核心调节作用（Theissen et al., 1996; Messenguy & Dubois, 2003）。为了检测 SVP 蛋白与 FLC 蛋白相互作用的结构域，本试验构建了 SVP 蛋白的 5 个截短体 SVP1 ~ 5（图 1）以及 FLC 蛋白的 5 个截短体 FLC1 ~ 5（图 2）。SVP1 或 FLC1 均删除了 K 域和 C 域，SVP2 或 FLC2 均删除了 C 域，SVP3 或 FLC3 都只保留了 K 域，SVP4 或 FLC4 都删除了 M 域，SVP5 或 FLC5 均删除了 M 域和 I 域。同时 SVP4（或 FLC4）比 SVP5（或 FLC5）多保留了一个 I 域。因此完全可以根据这些截短体作出判断：在 M、I、K 和 C 4 个结构域中，哪个域决定了 SVP 与 FLC 的蛋白互作。

本研究中构建的截短体 SVP1 ~ 5 和 FLC1 ~ 5 均未发生移码突变，分别与酵母载体融合成诱饵质粒与猎物质粒后，也不存在自激活和毒性现象（表 2），完全可利用酵母双杂交体系筛选蛋白互作的结构域。蛋白互作的检测与筛选虽然可以采用多种系统，例如 pET 原核表达系统、酵母真核表达系统等，但是原核表达系统有可能会因为体外表达的截短体蛋白（或者突变体蛋白）的折叠和修饰发生异常，不能很好的鉴定互作蛋白之间的结构域和作用位点。而酵母真核表达系统能够尽可能地弥补原核表达系统的不足之处，同时也不用提取和纯化表达蛋白。本试验所用的酵母真核表达系统具有 4 个报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*，利用 QDO/X/A（SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-a-Gal/AbA）培养基进行筛选时，能够保证该系统具有很好的严谨性。

尽管如此，酵母双杂交的蛋白双方如果均直接采用截短体（非完整编码区）进行互作筛选，也有可能干扰或掩盖蛋白互作行为的真实性。因此，本试验中在利用酵母真核表达系统时，并不是直接将 SVP1 ~ 5 截短体与 FLC1 ~ 5 截短体进行互作筛选，而是先固定 FLC 蛋白为全长，再将 SVP 蛋白的多个截短体（SVP1 ~ 5）与之相互作用，筛选出 SVP 蛋白的作用域为 K 域（SVP3）；再采用 FLC1 ~ 5 截短体与 SVP 全长进行互作筛选，得到 FLC 的 K 域（FLC3）是这一作用的关键域；最后才将 SVP3 截短体与 FLC3 截短体进行相互作用鉴定。

本试验中 SVP2（MIK 域）、SVP3（K 域）、SVP4（IKC 域）、SVP5（KC 域）均含有 K 域，且能与 FLC 蛋白相互作用，激活酵母的 4 个报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*，在 QDO/X/A 平板上均呈蓝色菌落，但是它们的颜色深浅并不相同（图 3，A），表明其它结构域（M、I 或 C 域）可能会影响（增强或削弱）K 域对 FLC 蛋白的作用强度。同样，FLC 的 K 域也可能会受到其它结构域（M、I 或 C 域）的影响，增强或削弱对 SVP 蛋白的作用强度（图 3，B）。SVP3（SVP 的 K 域）与 FLC3（FLC 的 K 域）正向杂交（pGBKT7FLC3 × pGADT7SVP3）以及载体互换后杂交（pGBKT7SVP3 × pGADT7FLC3）验证，确实存在相互作用（图 3，C），但在 QDO/X/A 平板上着色较浅，表明其作用强度较弱。因此可以推测：其它结构域（M、I 或 C 域）很可能会增强 K 域的这一相互作用，但还需进一步研究验证。

本试验中得到 K 域是 SVP 与 FLC 异源二聚化的关键结构域, 两个蛋白的 K 域均含有 α 螺旋, 都存在 K1、K2 和 K3 共 3 个亚域 (Fan et al., 1997; Yang et al., 2003; 汤青林 等, 2012)。但在 K 域的亚域 (K1、K2、K3) 上有较小的不同, SVP (或 FLC) K 域同源比对发现, K2 和 K3 亚域的保守性均高于 K1, 而且有亮氨酸拉链存在 (汤青林 等, 2012)。这可能暗示, K1、K2 和 K3 亚域对 SVP 与 FLC 蛋白互作的贡献并非相等。在模式植物拟南芥中, 通过凝胶阻滞和酵母双杂交试验也证实了 MIKC 型蛋白 K 域的亚域对蛋白互作的贡献存在差异 (Yang et al., 2003)。那么, 介导 SVP 与 FLC 蛋白异源互作究竟是由 K 域中的哪个亚域起主导作用, 有待进一步研究。

References

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309: 1052 - 1056.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030 - 1033.
- Fan H Y, Hu, Y, Tudor M, Ma H. 1997. Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J*, 2: 999 - 1010.
- Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 21: 351 - 360.
- Jung C, Müller A E. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science*, 14 (10): 563 - 573.
- Lee J H, Yoo S J, Park S H, Hwang I, Lee J S, Ahn J H. 2007. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 21: 397 - 402.
- Li Dan, Liu Chang, Shen Lisha, Wu Yang, Chen Hongyan, Masumi Robertson, Chris A Helliwell, Toshiro Ito, Elliot Meyerowitz, Yu Hao. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 15 (1): 110 - 120.
- Messenguy F, Dubois E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, 316: 1 - 21.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino R A, Coupland G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 20: 898 - 912.
- Sumire Fujiwara, Atsushi Oda, Riichiro Yoshida, Kanae Niinuma, Kana Miyata, Yusuke Tomozoe, Takeomi Tajima, Mayu Nakagawa, Kounosuke Hayashi, George Coupland, Tsuyoshi Mizoguchi. 2008. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 2960 - 2971.
- Tang Qing-lin, Li Nian-zu, Ding Ning, Chen Zhu-rui, Song Ming, Wang Zhi-min. 2012. Determination of interactions between SVP and FLC in *Brassica juncea* Coss. by yeast two-hybrid system. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1175 - 1182. (in Chinese)
- 汤青林, 李念祖, 丁宁, 陈竹睿, 宋明, 王志敏. 2012. 芥菜开花调控蛋白SVP与FLC酵母表达载体的构建及其相互作用研究. *园艺学报*, 39 (6): 1175 - 1182.
- Tang Qing-lin, Xu Jun-qiang, Song Ming, Wang Zhi-min. 2011. Determination of interactions between the two determinant transcription factors of flowering signal integrators *in vitro* in *Brassica Juncea* Coss. (mustard). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2317 - 2324. (in Chinese)
- 汤青林, 许俊强, 宋明, 王志敏. 2011. 芥菜开花信号整合子的两个核心转录因子 FLC 和 SVP 相互作用的体外检测. *园艺学报*, 38 (12): 2317 - 2324.
- Theissen G, Kim J T, Saedler H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, 43: 484 - 516.
- Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U, Weigel D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309: 1056 - 1059.
- Yang Y Z, Fanning L, Jack T. 2003. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *Plant Journal*, 33 (1): 47 - 59.