

# 青稞 *HVUL1H08544.2* 基因特性分析及 互作蛋白筛选

旺姆, 羊海珍\*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/ 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏 拉萨 850032)

**摘要:** 为了进一步探究青稞 *HVUL1H08544.2* 基因的生物学功能, 对该基因进行了基本生物学特性分析和互作蛋白鉴定。结果显示, *HVUL1H08544.2* 基因编码 236 个氨基酸, 相对分子量为 58.26 kD, 包含一个 HLH 保守结构域, 属于 bHLH 转录因子。利用同源重组的方法成功构建了诱饵载体 pGBKT7-*HVUL1H08544.2*, 通过酵母双杂交系统筛选青稞白粉菌诱导的 cDNA 文库, 共鉴定到 5 个与 *HVUL1H08544.2* 互作的蛋白, 分别为核酮糖二磷酸羧化酶、叶绿素 a-b 结合蛋白、叶绿体茎环结合蛋白、抗增殖蛋白、茉莉酸诱导蛋白。该结果对后续青稞应答白粉菌侵染的机制研究具有重要参考价值。

**关键词:** 青稞; 白粉菌; *HVUL1H08544.2*; 互作蛋白

中图分类号: S512.3 文献标志码: A

## Characterization and Interacting Proteins Screening of *HVUL1H08544.2* in Tibetan Hulless Barley

Wangmu, YANG Haizhen\*

(State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement/ Institute of Agricultural, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

**Abstract:** To further investigate the biological function of *HVUL1H08544.2*, the biological characteristics was analyzed and the proteins interacted with *HVUL1H08544.2* were screened. The results showed that *HVUL1H08544.2* encoded 236 amino acids with a relative molecular weight of 58.26 KD. It contains a conservative HLH domain, which means that *HVUL1H08544.2* belongs to bHLH transcription factor. The bait vector pGBKT7-*HVUL1H08544.2* was constructed by homologous recombination and the cDNA library of Tibetan hulless barley under powdery mildew stress was screened by the yeast two-hybrid system. Five proteins included ribulose biphosphate carboxylase, chlorophyll a-b binding protein, chloroplast stem-loop binding protein, prohibitin, jasmonate-induced protein showed interaction with *HVUL1H08544.2*. This study have important reference value for the follow-up study on the molecular mechanisms in response to powdery mildew infection in Tibetan hulless barley.

**Key Words:** tibetan hulless barley; powdery mildew; *HVUL1H08544.2*; Interacting protein

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f)营养价值丰富,是青藏高原藏族人民的主要粮食,同时也是重要的畜牧饲料以及啤酒、保健食品的原材料<sup>[1]</sup>。青稞作为西藏种植面积最大、产量占全区粮食作物总产比重最高的农作物,在西藏的农业发展中一直占据举足轻重的地位<sup>[2]</sup>。然而,青稞在生长过程中易遭受各种病原菌的侵染,导致产量和品质下降。其中由布氏白粉菌属大麦专化型活体寄生菌(*Blumeria graminis f.sp.hordei*)引起的真菌病害,在西藏各个青稞种植区普遍发生,危害日趋严重<sup>[3-4]</sup>。

目前,西藏青稞白粉病的基础研究薄弱,主要

收稿日期: 2021-03-24

基金项目: 西藏财政预算内项目(2015ZX001); 西藏科技计划项目(XZ2019NA01-2020)。

作者简介: 旺姆(1989-),女,研究实习员,主要从事青稞遗传育种研究, E-mail: wm1252354663@163.com; \*为通讯作者: 羊海珍(1992-),女,研究实习员,主要从事青稞遗传育种研究, E-mail: 17782673107@163.com。

集中在抗病鉴定、防治技术研究等方面<sup>[5-7]</sup>,有关青稞白粉病抗病机制的研究报道较少。发掘抗白粉病基因,解析青稞白粉病抗性机制,可以为青稞抗病育种提供指导,对防治青稞白粉病、保障青稞粮食安全具有重要意义。试验前期进行了青稞应答白粉菌侵染的转录组学研究<sup>[8]</sup>,从分析结果中筛选到一个受白粉菌诱导后表达量显著上调的基因 *HVUL1H08544.2*,推测该基因在青稞抵御白受粉病侵染的过程中可能扮演着重要作用。本研究以 *HVUL1H08544.2* 为诱饵蛋白,利用酵母双杂交技术在青稞白粉菌诱导的 cDNA 文库中筛选互作蛋白,为进一步揭示 *HVUL1H08544.2* 应答白粉菌侵染的作用机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

青稞品种“藏青 13”、青稞白粉菌诱导酵母双杂交 cDNA 文库、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株均由本实验室保存;pGBKT7 载体、pGADT7 载体、SD 营养缺陷型培养基、YPDA 培养基、限制性内切酶、高保真扩增酶均购自大连宝生物工程有限公司;Y2HGold 酵母感受态细胞购自于上海唯地生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于无锡百泰克生物技术有限公司;一步法克隆试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司;其余常规生化试剂购于北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 *HVUL1H08544.2* 基因的克隆及序列分析

采集生长 10 d 的青稞叶片样品,参照试剂盒说明书,提取青稞总 RNA,反转录为 cDNA。根据 *HVUL1H08544.2* 基因的序列和 pGBKT7 载体图谱,设计并合成带有载体同源系列的基因特异性引物 *HVUL1H08544.2*-F (5' -GCCATGGAGGCC-GAATTCATGGAGTCCGACATGGACATG-3') 和 *HVUL1H08544.2*-R (5' -CTGCAGGTCGACG-GATCCTCAGTGGGCTTCTTCTCGCAT-3');以青稞叶片的 cDNA 为模板,使用高保真酶进行 PCR 扩增,将有目的条带的 PCR 产物回收纯化后送上海生工生物工程公司测序。所获基因序列利用 Expasy

(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 分析蛋白质序列的分子量和等电点;用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白的结构域;利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 工具进行同源基因序列比对。

### 1.3 诱饵载体构建

参照一步法克隆试剂盒说明书,将测序验证正确的目标片段连接到经 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pGBKT7 载体上,采用热激法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37 ℃ 过夜培养。挑取单菌落,使用 pGBKT7 载体的通用引物 BD-F (5' -CGACATCATCATCG-GAAGAGAGTAGT-3') 和 BD-R (5' -CCG-GAATTAGCTTGGCTGCAA-3') 进行 PCR 检测,将检测获得的阳性克隆进行扩大培养后提取质粒,送公司测序确认。

### 1.4 诱饵载体自激活活性检测

参照 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册,采用聚乙二醇/醋酸锂的方法,将重组诱饵载体 pGBKT7-*HVUL1H08544.2* 和 pGADT7 空载体共转入 Y2HGold 酵母感受态中,转化液稀释 10 倍后涂布于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 营养缺陷型固体培养基上,30 ℃ 倒置培养 3~5 d,观察其生长情况。

### 1.5 诱饵蛋白与青稞 cDNA 文库杂交

将重组诱饵载体 pGBKT7-*HVUL1H08544.2* 转入 Y2HGold 酵母感受态中,在 SD-Trp 平板上培养 3 d。挑取单菌落接种于 50 mL SD-Trp 液体培养基中,30 ℃,220 rpm 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 后离心,用 5 mL SD/-Trp 重悬沉淀并转移至 2 L 锥形瓶中,加入 2 mL 青稞白粉菌诱导的 cDNA 文库菌液(Y187)和 45 mL 2×YPDA 液体培养基,30 ℃,40 rpm 培养 20~24 h,取 1 滴菌液于显微镜下观察是否出现酵母合子细胞;离心收集菌体,用 50 mL 0.5×YPDA 液体培养基重悬后离心,弃上清液,用 10 mL 0.9% NaCl 溶液重悬菌液,分别涂布 300  $\mu$ L 至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基平板上,30 ℃ 培养 3~5 d,挑取酵母单克隆转到另一个 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上复筛,重复 3 次,得到候选克隆子。

### 1.6 阳性克隆鉴定及分析

使用pGADT7载体通用引物AD-F(5'-GGAG-TACCCATACGACGTACC-3')和AD-R(5'-TATC-TACGATTCATCTGCAGC-3')对3次转板后仍能正常生长的酵母单克隆进行PCR检测,回收PCR扩增条带后送公司测序。将测序所得序列比对到青稞基因组数据库,得到与HVUL1H08544.2相互作用的蛋白,利用Uniprot(<https://www.uniprot.org>)对互作蛋白进行gene ontology(GO)注释。

## 2 结果与分析

### 2.1 HVUL1H08544.2基因的克隆及特性分析

以青稞叶片的cDNA为模板,PCR扩增到上下游分别带有17 bp和18 bp载体同源序列的目的片段(711 bp),条带大小约750 bp(图1),符合预期大小。通过Expasy分析可知,HVUL1H08544.2编码的蛋白包含236个氨基酸,相对分子量为58.26 kD,理论等电点为5.08。结构域分析显示,HVUL1H08544.2包含一个保守的HLH结构域,位于67和116氨基酸之间,属于bHLH转录因子家族成员。BLAST结果表明,在其他物种中,山羊草(*Aegilops tauschii*)中的**bHLH35-like**基因与HVUL1H08544.2系列一致性最高,为88.24%。

已有研究表明,bHLH转录因子不仅能调控植物的生长发育、信号转导及合成代谢等,而且参与了植物低温、干旱、高盐、缺铁等逆境胁迫响应过程<sup>[9]</sup>。近年来陆续有研究表明,bHLH转录因子在植物应答病原菌侵染的过程中也发挥了重要作用<sup>[10-11]</sup>。本研究,受白粉菌诱导后上调表达的HVUL1H08544.2属于bHLH转录因子,与上述研究结果相符。

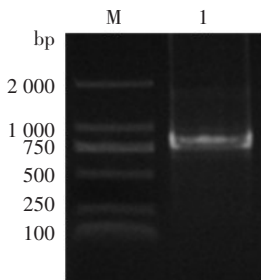


图1 HVUL1H08544.2基因的电泳检测

### 2.2 诱饵载体的构建和自激活活性检测

将HVUL1H08544.2基因片段与pGBKT7载体进行同源重组后转化大肠杆菌,随机挑取6个单菌落进行PCR鉴定,发现所有菌落均有目的条带(图2)。经过比对,质粒测序结果与HVUL1H08544.2序列完全一致,表明重组诱饵载体pGBKT7-HVUL1H08544.2构建成功。将诱饵载体pGBKT7-HVUL1H08544.2与pGADT7空载体共转化酵母Y2HGlod,在SD/-Trp-Leu培养基平板上有正常的菌落生长(图3A),说明pGBKT7-HVUL1H08544.2能够在酵母中成功表达;在SD/-Trp-Leu-His-Ade培养基平板上没有菌落生长(图3B),说明诱饵载体不能启动下游报告基因His,Ade的表达,没有转录自激活活性。

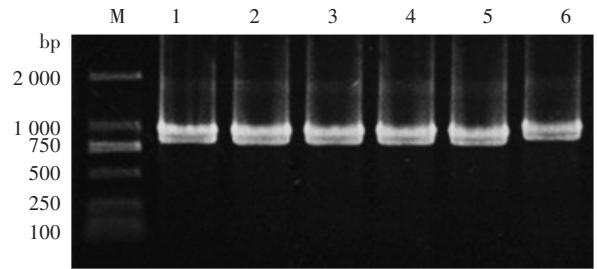


图2 重组诱饵载体pGBKT7-HVUL1H08544.2的PCR鉴定

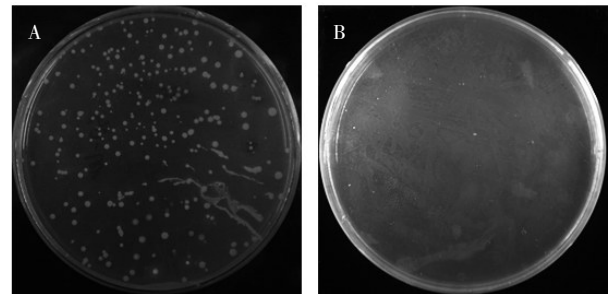


图3 共转化pGBKT7-HVUL1H08544.2与pGADT7的菌株在缺陷培养基上的生长情况

### 2.2 HVUL1H08544.2互作蛋白的筛选

将含有pGBKT7-HVUL1H08544.2诱饵载体的Y2HGold菌株与含有青稞cDNA文库的Y187菌株共培养,22 h后镜检可观察到三叶草型的酵母合子细胞(图4),表明诱饵菌株与文库菌株形成了结合子,杂交成功。经过SD/-Trp-Leu-His-Ade缺陷培养基的3次筛选,共获得32个候选单克隆。PCR鉴

定结果显示能扩增出条带的单克隆有26个,片段大小在500 bp和2 000 bp 之间(图5)。将PCR 条带测序结果在青稞基因组数据库中进行比对,去除重复克隆,排除没有完整开放阅读框的蛋白后,进行GO 注释,最终得到5个与 pGBKT7-*HVUL1H08544.2*相互作用的蛋白(表1),分析发现它们参与了光合作用、防御反应、激素应答等多个生物过程。

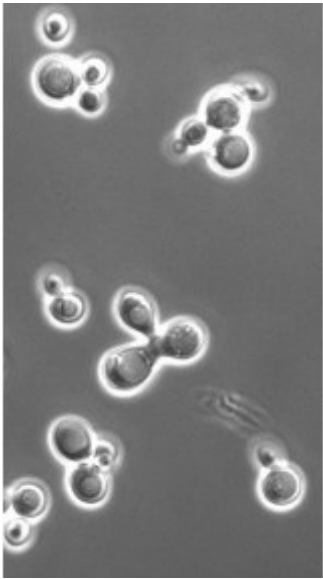


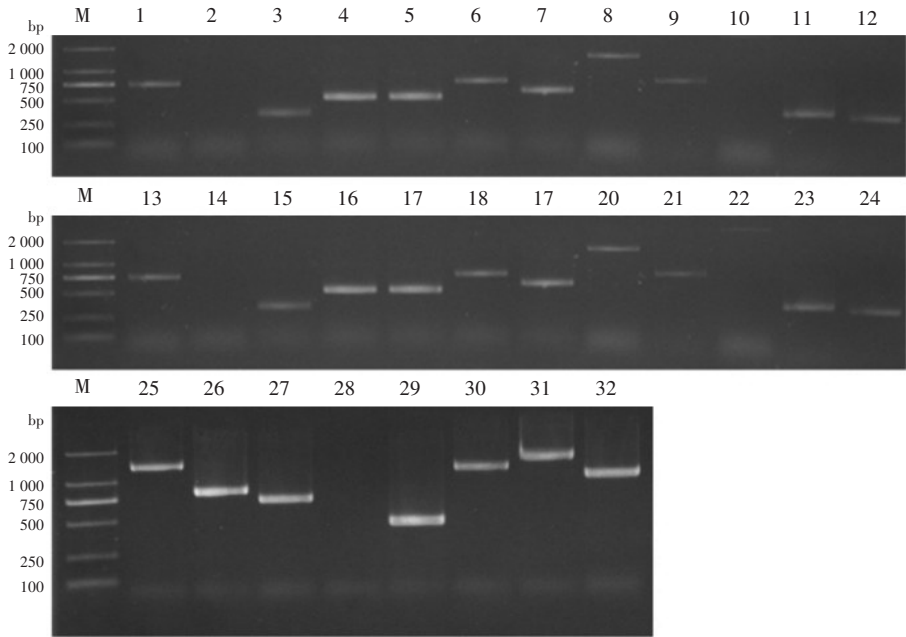
图4 酵母合子细胞观察

表1 *HVUL1H08544.2* 互作蛋白信息

基因 ID	基因描述	片段大小 /bp	阳性克隆数
<i>HVUL5H36602.2</i>	核酮糖二磷酸羧化酶	570	2
<i>HVUL7H07040.2</i>	叶绿素 a-b 结合蛋白	693	4
<i>HVUL6H22485.2</i>	叶绿体茎环结合蛋白	527	3
<i>HVUL6H58743.2</i>	抗增殖蛋白	1 079	3
<i>HVUL2H00175.2</i>	茉莉酸诱导蛋白	447	4

3 结论与讨论

已有研究表明,bHLH 转录因子可通过特定的结构域与靶基因相互识别并作用,激活或抑制相关基因的表达,进而调控植物的生长发育、信号转导、逆境胁迫响应等过程<sup>[12]</sup>。目前,该转录因子家族在植物抗病中的研究相对滞后,其蛋白互作网络也鲜见报道。本研究中以课题组前期从青稞中鉴定的一个受白粉菌诱导上调表达的 bHLH 转录因子——*HVUL1H08544.2* 为诱饵,筛选出了5个与其相互作用的蛋白,它们参与了植物光合作用、防御反应、激素应答等生物过程。由此,推测



M: DL2000 DNA 分子量标准品; 1~32:32个酵母菌落 PCR 产物。

图5 酵母阳性克隆的PCR 鉴定

*HVUL1H08544.2*通过参与以上生物过程来调节青稞对白粉病的抗性,但要明确具体机制,后续还需进行大量的研究。

值得一提的是,酵母双杂交系统虽然灵敏性高、操作方便,但由于一些蛋白质不需要“诱饵”与“猎物”的特异性结合便能激活酵母内报告基因的表达,会导致结果产生假阳性<sup>[13]</sup>。因此,需要通过双分子荧光互补、免疫共沉淀等其他方法进一步对互作进行验证。

#### 参考文献:

- [1] 强小林, 顿珠次仁, 次 珍, 等. 西藏青稞产业发展现状分析 [J]. 西藏农业科技, 2011, 33(1): 1-3.
- [2] ZENG X Q, LONG H, WANG Z, et al. The Draft Genome of Tibetan Hulless Barley Reveals Adaptive Patterns to the High Stressful Tibetan Plateau [J]. PNAS, 2015, 112(4): 1095-1100.
- [3] 王玉林. 西藏青稞白粉病研究进展与展望 [J]. 西藏农业科技, 2018, 40(S1): 72-75.
- [4] ZENG X Q, LUO X M, WANG Y L, et al. Transcriptome Sequencing in a Tibetan Barley Landrace with High Resistance to Powdery Mildew [J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 1-9.
- [5] 原红军. 西藏青稞种质资源材料白粉病抗性鉴定 [J]. 大麦与谷类科学, 2014(4): 8-14.
- [6] 李 杨. 76份青稞材料对白粉病的抗性评价与分析 [J]. 西藏农业科技, 2018, 40(4): 15-18.
- [7] 刘仁建. 播期、密度、施氮量对元谋冬繁青稞白粉病发病的影响 [J]. 西藏农业科技, 2019, 41(1): 30-32.
- [8] YUAN H J, ZENG X Q, YANG Q F, et al. Gene Coexpression Network Analysis Combined with Metabonomics Reveals the Resistance Responses to Powdery Mildew in Tibetan Hulless Barley [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 14928.
- [9] 于 冰, 田 烨, 李海英, 等. 植物bHLH转录因子的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(9): 75-80.
- [10] YAMAMURA C, MIZUTANI E, OKADA K, et al. Diterpenoid Phytoalexin Factor, a BHLH Transcription Factor, Plays a Central Role in the Biosynthesis of Diterpenoid Phytoalexins in Rice [J]. The Plant Journal, 2015, 84(6): 1100-1113.
- [11] CHENG Q, DONG L D, GAO T J, et al. The BHLH Transcription Factor GmPIB1 Facilitates Resistance to Phytophthora Sojae in Glycine Max [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(10): 2527-2541.
- [12] 王艳敏, 白 卉, 曹 焱. bHLH转录因子研究进展及其在植物抗逆中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(21): 34-35, 50.
- [13] BRÜCKNER A, POLGE C, LENTZE N, et al. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(6): 2763-2788.