DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94036

利用酵母双杂交系统筛选大豆结瘤因子受体 NFR1 α 的互作蛋白

柯丹霞* 彭昆鹏

信阳师范学院生命科学学院 / 大别山农业生物资源保护与利用研究院, 河南信阳 464000

摘 要: 大豆是重要的植物蛋白作物和粮豆间作作物, 挖掘大豆的生物固氮潜力, 对推动生态农业的可持续发展具有深远意义。大豆结瘤因子受体蛋白 GmNFR1 α (Nod Factor Receptor) 对结瘤至关重要, 但其具体调控机制尚不明确。本研究以大豆 mRNA 为模板, 利用 RT-PCR 方法扩增到 GmNFR1 α 蛋白的激酶结构域(GmNFR1 α -pk), 构建了 pGBKT7-GmNFR1 α -pk 诱饵表达载体, 通过酵母双杂交技术, 筛选大豆根瘤 AD-cDNA 文库, 从文库中分离到与 GmNFR1 α -pk 相互作用的 71 个阳性克隆, 经测序和同源性分析筛选到 12 种与 GmNFR1 α -pk 互作的蛋白, 包括钙离子结合手性蛋白、豆血红蛋白、结瘤素 Nod44 等蛋白。以大豆豆血红蛋白 GmLbc2 为例, 回转变酵母以及烟草体内 BiFC 验证其与诱饵蛋白的相互作用, 对其进行同源蛋白比对及系统进化树分析, 并利用百脉根根毛根转化技术鉴定 GmLbc2 在结瘤过程中的生物学功能。研究结果进一步补充和完善了 GmNFR1 α 介导的结瘤信号传递途径, 为大豆与根瘤菌共生互作机制提供了新的分子证据。

关键词: 大豆; 共生固氮; 结瘤因子受体蛋白; 酵母双杂交; 豆血红蛋白

Screening of NFR1 α -interactive proteins in soybean using yeast two hybrid system

KE Dan-Xia* and PENG Kun-Peng

College of Life Sciences, Xinyang Normal University / Institute for Conservation and Utilization of Agro-bioresources in Dabie Mountains, Xinyang 464000, Henan, China

Abstract: Soybean is the important plant protein crop and grain-bean intercropping crop. Exploring the biological nitrogen fixation potential of soybean is of far-reaching significance to promote the sustainable development of ecological agriculture. GmNFR1 α , a soybean nod factor receptor protein, is very important for nodulation, but its specific regulatory mechanism is still unclear. Soybean mRNA was used as template to amplify the kinase domain of GmNFR1 α protein (GmNFR1 α -pk) by RT-PCR method and the pGBKT7-GmNFR1 α -pk bait plasmid was constructed. Seventy-two positive clones interacted with GmNFR1 α -pk were isolated through yeast two hybrid screening of soybean nodule AD-cDNA library from the library. Among them, 12 proteins including calcium ion binding chiral protein, hemoglobin, nodulin Nod44 and other proteins interacted with GmNFR1 α -pk were screened by sequencing and homology analysis. The interaction between soybean hemoglobin and bait protein was verified by re-transforming in yeast and BiFC in tobacco. Comparison of homologous proteins and phylogenetic tree analysis were also done at the same time. The important function of GmLbc2 in nodulation process was clarified by hairy root transformation technology in *Lotus japonicus*. The results further complement and improve the signal transduction pathway mediated by GmNFR1 α , and provide new molecular evidence for the symbiotic interaction mechanism between soybean and rhizobia.

Keywords: soybean; symbiotic nitrogen fixation; nod factor receptor protein; yeast two-hybrid; soybean hemoglobin

豆科植物与根瘤菌互惠共生, 在形成的特殊器官根瘤中, 大气中分子态的氮被转变为可被植物直接利用的氨。类黄酮化合物作为豆科植物分泌的信号分子, 诱导根瘤菌产生结瘤因子(nod factor, NF)。

本研究由国家自然科学基金项目(31400213), 河南省科技攻关计划项目(182102110448)和信阳师范学院“南湖学者奖励计划”青年项目(2016)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31400213), the Science and Technology Research Projects of Henan Province (182102110448), and the Nanhu Scholars Program for Young Scholars of XYNU (2016).

* 通信作者(Corresponding author): 柯丹霞, E-mail: kdx_029@163.com

Received (收稿日期): 2019-03-07; Accepted (接受日期): 2019-08-09; Published online (网络出版日期): 2019-09-02.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20190902.1502.004.html>

NF 作为根瘤菌信号分子反过来作用于豆科植物, 启动一系列结瘤反应^[1-3]。在模式豆科植物百脉根和苜蓿中, 结瘤因子受体蛋白分别为 LjNFR1 和 LjNFR5^[4-5]、MtLYK3/MtLYK4 和 MtNFP^[6-8]。它们属于 LysM 类受体激酶(LysM-RLKs), 由膜内的丝/苏氨酸蛋白激酶结构域、中部跨膜结构域和膜外 2~3 个 LysM 结构域共同组成。百脉根 LjNFR1 和苜蓿 MtLYK3 均具有蛋白激酶活性, 而 LjNFR5 和 MtNFP 因为缺少激活环而不具备激酶活性。研究表明, 百脉根的 2 个结瘤因子受体蛋白可以形成异源二聚体^[9], 高亲和性地直接结合 NF^[10-11], 并且 LjNFR1 能够体外磷酸化 LjNFR5^[9], 这些证据表明结瘤因子受体蛋白可能以异源二聚体的形式与 NF 结合, 共同参与接收 NF 信号, 随后通过激酶间的磷酸化作用将 NF 信号传递下去。

近年的研究发现, 结瘤因子受体蛋白接收并传递 NF 信号的过程还需要其他蛋白共同参与。在苜蓿中筛选到 1 个 MtLYK3 的互作蛋白-E3 泛素连接酶 MtPUB1。MtLYK3 的激酶结构域能够磷酸化 MtPUB1, MtPUB1 在结瘤过程的早期侵染阶段发挥作用^[12]。在百脉根中也发现 1 个 E3 泛素连接酶 LjPUB13 能够专一地泛素化 LjNFR5 的激酶结构域, 从而正调控百脉根根瘤器官的发生^[13]。此外, 苜蓿中的 MtSYMREM1 能够分别与 MtLYK3 和 MtNFP 互作, MtSYMREM1 属于 Remorin 蛋白, 是一类植物特有的蛋白家族。MtSYMREM1 在质膜通过调控结瘤因子受体蛋白参与早期侵染过程, 影响侵染线的极性生长以及根瘤菌的释放^[14]。同源克隆百脉根 LjSYMREM1 发现, 它能够在体内与结瘤因子受体蛋白发生瞬时互作, 在体外能够被 LjNFR1 磷酸化, 参与调控根瘤菌侵染过程^[15]。柯丹霞等^[16-17]前期利用酵母双杂交技术, 在百脉根中筛选到 LjNFR5 的互作蛋白 LjROP6, 并证实 LjROP6 正调控根瘤菌对豆科植物的侵染。最近张忠明研究团队又报道了 1 个新的 LjNFR5 相互作用蛋白-百脉根二氢黄酮醇还原酶 LjDFL1, 并证实苜蓿中的同源蛋白 MtNFP 和 MtDFL1 之间也能够发生相互作用, 推测这 2 种蛋白之间的互作在不同豆科植物中保守存在^[18]。以上证据表明, NFRs 及其介导的结瘤信号转导途径在模式豆科植物百脉根和苜蓿中得到了较为广泛和深入的研究, 而大豆中关于这方面的研究报道较少。

大豆(*Glycine max*)是一种重要的蛋白质和油料

作物。充分发挥大豆的根瘤共生固氮作用, 对提高产量, 改良品质意义重大。大豆中已经鉴定到 4 个结瘤因子受体蛋白, 即 GmNFR1 α / β 和 GmNFR5 α / β ^[19]。GmNFR1 α 和 GmNFR1 β 分别位于大豆第 2 号、14 号染色体上, 二者之间有着相似的外显子-内含子结构, 碱基和氨基酸序列同源性分别为 92%和 89%。GmNFR1 α 和 GmNFR1 β 在 DNA 序列和外显子-内含子结构上与 LjNFR1 高度相似, 与 LjNFR1 和 MtLYK3 的氨基酸序列相似性分别为 79%和 75%。生物学功能研究表明, 超表达 GmNFR1 α 能够增加每株大豆的结瘤数, 而 GmNFR1 β 的突变体对结瘤没有影响, GmNFR1 β 在根瘤菌滴度较低情况下不能感知 NF, 但是可以诱导皮层细胞分裂。GmNFR5 α / β 的突变体不能引起结瘤过程的任何形态学变化。GmNFR1 β 单独与 GmNFR5 α / β 结合, 在表皮和根毛细胞中不能有效识别 NF, 根毛变形、卷曲以及侵染线的形成也被抑制。相反, GmNFR1 α 与 GmNFR5 α / β 结合能够实现完整的有效结瘤过程^[19]。以上结果说明, GmNFR1 β 的功能是冗余的, GmNFR1 α 与 LjNFR1 功能相似, 对结瘤至关重要。但是目前关于 GmNFR1 α 在共生互作中的具体功能和信号传递机制尚不清楚, 因此, 筛选 GmNFR1 α 相互作用蛋白, 阐明互作蛋白之间结瘤信号的传递方式, 对于揭示 GmNFR1 α 在结瘤信号转导途径中的调控机制具有重要意义。

本研究以大豆结瘤因子受体蛋白 GmNFR1 α 为诱饵, 利用酵母双杂交技术, 筛选大豆根瘤 AD-cDNA 文库, 钓取 GmNFR1 α 的互作蛋白, 通过互作蛋白的生物信息学分析及其在共生结瘤信号途径中的生物学功能鉴定, 补充和完善 GmNFR1 α 介导的结瘤信号传递途径的认知, 为大豆与根瘤菌共生互作机制提供新的分子证据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆根瘤 cDNA 文库、酵母菌株 Y2Hgold、Y187 由中国农业科学院油料作物研究所大豆研究室提供; 大豆品种 Willimas 82 由中国科学院东北地理与农业生态研究所孔凡江研究员提供; 酵母质粒抽提试剂盒、ABA、X- α -Gal 等购自 Clontech 公司; pMD18-T 载体、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶、RNA 提取及 RT-PCR 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; 常规的克隆载体、大肠杆菌菌株等均为本实验室保存。

1.2 植物材料处理

在通风厨中令大豆种子在生成的 Cl_2 中消毒过夜^[20]。将无菌种子种脐朝下均匀平铺于无菌水润湿的滤纸上, 以封口膜密封培养皿, 22°C 暗培养。大豆幼苗根长 2~3 cm 时收集根部组织, 液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱。

1.3 诱饵质粒的构建

根据 NCBI 网站公布的 *GmNFR1 α* 序列 (GenBank 登录号为 DQ219805) 设计 NFR1 α -pk (943~1755 位碱基) 引物。F-NFR1 α -pk 为 5'-GGAATTCAGCTTGGAGAATAAAATTGG-3' (下画线部分为 *EcoR* I 酶切位点), R-NFR1 α -pk 为 5'-GCGTCGACAAGTGTCTATGAGAGCAAC-3' (下画线部分为 *Sal* I 酶切位点)。提取大豆根部组织总 RNA, 按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录, 扩增出 *NFR1 α -pk* 片段, 其长度为 813 bp。将测序正确的目的片段经 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切后连接到 pGBKT7 上。酶切、测序检测无误后即获得诱饵质粒 pGBKT7-GmNFR1 α -pk。

1.4 诱饵质粒自激活及毒性检测

采用 LiAc 法制备酵母菌株 Y₂HGold 的感受态细胞, 将测序正确的诱饵质粒与 pGADT7 空载体共转化 Y₂HGold, 以含有 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 质粒的酵母菌为阳性对照, 以含有 pGBKT7-lam 和 pGADT7-T 质粒的酵母菌为阴性对照。将转化后的菌液涂布于 DDO/X (SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal) 平板, 置 30°C 培养箱暗培养 3~5 d, 观察菌落的显色情况, 确定诱饵蛋白是否具有自激活活性。分别挑取 SD/-Trp 平皿上直径为 2~3 mm 的诱饵质粒和对照空载体 pGBKT7 单菌落接种于 SD/-Trp/Kan (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 的液体培养基中, 30°C 摇床培养 24 h, 测定 OD₆₀₀ 值以判定诱饵蛋白是否对酵母菌株产生毒性。

1.5 筛选大豆根瘤 AD-cDNA 文库

参照 Clontech 公司 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual 所述方法, 接种新鲜的 2~3 mm 诱饵菌落到 SD/-Trp 液体培养基中, 30°C 摇床培养过夜至 OD₆₀₀ 达到 0.8。离心, 弃上清液, 用 4~5 mL SD/-Trp 液体重悬沉淀。室温融化 1 mL 文库菌株, 将文库菌株与诱饵菌株加入含有 45 mL 2 $\times$ YPDA/Kan (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 液体培养基的 2 L 锥形瓶中, 30°C 摇床低速振荡培养, 以防止细胞在锥形瓶中沉淀(剧烈摇动会降低交配效率, 但晃动过慢

会使细胞沉淀, 也降低交配效率)。将杂交 20~24 h 后的混合液涂布在 DDO/X/A (SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 选择培养基上, 30°C 培养 4~6 d, 挑取直径大于 2 mm 的蓝色菌落点种于 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 选择培养基上培养 3~5 d, 观察并统计酵母的生长及显蓝情况。

1.6 文库阳性克隆的鉴定

挑取 QDO/X/A 平板上生长良好且显蓝的菌落, 参考 Easy Yeast Plasmid Isolation Kit 说明书提取质粒。pGADT7 载体通用引物 (F-AD: 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'; R-AD: 5'-GTGAACTTGC GG GGT TTTTTCAGTATCTACGATT-3') 进行菌落 PCR, 根据扩增的 PCR 片段大小分析 pGADT7 载体中插入的 DNA 片段长度, 并排除大小一致的重复克隆, 初步确定阳性克隆子。

1.7 阳性克隆的测序及酵母回转变验

将上述阳性克隆子转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布于 LB/Amp (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 培养基上用于分离文库质粒。抽提文库质粒, 送交公司测序。根据测序结果将获得的文库质粒逐一与 pGBKT7-GmNFR1 α -pk 诱饵质粒共转化至 Y₂HGold 酵母菌株中, 并在 QDO/X/A 选择性培养基上培养筛选, 回转变酵母后再次显蓝的文库质粒可以保种用于今后的研究。

1.8 烟草体内 BiFC 实验

根据 NCBI 网站公布的 *GmNFR1 α* 和 *GmLbc2* 序列分别构建 BiFC 载体; 将测序正确的 pSCYNE-NFR1 α 和 pSCYCE(R)-GmLbc2 荧光互补载体分别转化农杆菌 GV3101, 倒置, 28°C 培养 2~3 d; 挑取单菌落于 5 mL LBK 液体培养基中, 28°C, 振荡培养 1~2 d, 待 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右, 离心收集菌体, 用农杆菌转化缓冲液分别将农杆菌的 OD₆₀₀ 调至 0.5, 等体积混合两个荧光互补载体的农杆菌悬浮液。室温放置 1 h 活化农杆菌; 去掉 1 mL 注射器的针头, 吸取农杆菌混合液, 注射至烟草叶片的下表皮; 将转化后的烟草黑暗培养 1~2 d; 然后制片, 用激光共聚焦显微镜观察荧光信号并照相。

1.9 阳性克隆的生物信息学分析

根据测序结果分析文库载体中插入的 DNA 序列, 利用 NCBI 网站的 Blast 功能预测目的基因开放读码框长度以及编码蛋白的二级、三级结构特征, 用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对分析, 利用 MEGA 4.0 构建系统进化树。

1.10 转 *GmLbc2* 基因超表达复合体植株的共生表型鉴定

将上述扩增的 *GmLbc2* 基因全长序列连入植物表达载体 pU1301 中, 构建超表达载体 pU 1301-*GmLbc2*, 并转入发根农杆菌 LBA1334 菌株中。利用百脉根 (*Lotus japonicus*) 毛根转化方法获得转 *GmLbc2* 基因的超表达复合体植株。百脉根 MG20 种子经表面灭菌、萌发后, 剪去下胚轴, 将幼苗子叶部分放入携带重组质粒的农杆菌菌悬液中侵染 30 min, 随后转移到 MS 平板上暗培养 5 d, 再移至含 250 mg L⁻¹ 羧苄的 MS 培养基上, 直至毛根长出。取毛根根尖处 1 cm 根段, 用 GUS 染液鉴定转基因阳性毛根, 然后提取阳性毛根总 RNA, 以 RT-PCR 检测 *GmLbc2* 基因的表达, 百脉根多聚泛素 (polyubiquitin) *UBI* 基因作为内参, 空载体 (pU1301) 阳性毛根作为阴性对照。将 RT-PCR 检测为阳性的复合体百脉根移入无菌沙盆中炼苗 5 d, 接种根瘤菌 MAFF303099, 每天浇灌无菌 Fahraeus 无氮营养液。接种 30 d 后, 对结瘤表型进行统计并拍照, 根据单株结瘤数和样本量 ($n = 20$), 计算单株 (CK 和 *GmLbc2*-OX) 平均结瘤数, 试验重复 3 次, 采用 Microsoft Excel 2007 中的 *t* 检验分析数据, 并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒的构建和自激活及毒性检测

经 PCR 扩增得到的 *GmNFR1α* 膜内激酶结构域 *GmNFR1α-pk*, 大小为 813 bp, 与预期长度一致。通过 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切, 将 *GmNFR1α-pk* 构建至诱饵载体 pGBKT7 上。重组质粒经双酶切可获得 7300 bp 的载体片段和 813 bp 的插入片段 (图 1-A)。测序结果表明, 插入片段与 NCBI 数据库中公布的 *GmNFR1α-pk* 基因序列完全一致。说明已成功克隆了 *GmNFR1α-pk* 基因并构建了酵母诱饵质粒 pGBKT7-*GmNFR1α-pk*。

共转化诱饵质粒 pGBKT7-*GmNFR1α-pk* 与 pGADT7 空载体, 以含有 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 质粒的酵母菌为阳性对照, 以含有 pGBKT7-lam 和 pGADT7-T 质粒的酵母菌为阴性对照。结果显示只有阳性对照在 DDO/X 平板上出现蓝色菌落, 诱饵质粒和 pGADT7 空载体组合与阴性对照一样, 只出现白色菌落 (图 1-B~D), 说明表达的 *GmNFR1α-pk* 诱饵蛋白不具有自激活活性。含有诱饵质粒和对照空载体的 2 种酵母菌在相同条件下培养 24 h 后生长情况相似, OD₆₀₀ 值均

图 1 诱饵质粒 pGBKT7-*GmNFR1α-pk* 的构建及自激活检测
Fig. 1 Construction and auto-activation test of the bait plasmid pGBKT7-*GmNFR1α-pk*

(A) M: trans 2K Plus II DNA marker; 1: *GmNFR1α-pk* 目的片段扩增; 2: pGBKT7-*GmNFR1α-pk* 诱饵质粒双酶切; 3: pGBKT7 空载体双酶切。(B) 阳性对照 (pGBKT7-53 和 pGADT7-T)。(C) 阴性对照 (pGBKT7-lam 和 pGADT7-T)。(D) pGBKT7-*GmNFR1α-pk* 与 pGADT7 空载体。

(A) M: trans 2K Plus II DNA marker; 1: isolation of *GmNFR1α-pk* cDNA; 2: pGBKT7-*GmNFR1α-pk* digested by *EcoR* I and *Sal* I; 3: pGBKT7 digested by *EcoR* I and *Sal* I. (B) positive control (pGBKT7-53 and pGADT7-T). (C) negative control (pGBKT7-lam and pGADT7-T). (D) pGBKT7-*GmNFR1α-pk* and pGADT7.

大于 0.8, 说明诱饵蛋白长势良好, 对酵母菌株无毒性, 可以直接用于后续酵母双杂交文库的筛选。

2.2 筛选与 *GmNFR1α-pk* 互作的蛋白

以 pGBKT7-*GmNFR1α-pk* 为诱饵筛选大豆根瘤 cDNA 文库, 将含有诱饵质粒的酵母菌株 Y2HGold 与含有文库的酵母菌株 Y187 进行有性杂交, 将杂交后的混合液涂布于 DDO/X/A 平板上, 30°C 培养 4~6 d, 挑取直径大于 2 mm 的蓝色菌落点种于 QDO/X/A 平板上培养 3~5 d, 统计菌落生长及显蓝情况。结果共有 71 个生长状况良好且显蓝的菌落, 部分结果见图 2-A。

挑取 QDO/X/A 平板上的阳性菌落, 扩繁并提取酵母质粒, 以 PCR 鉴定 cDNA 文库插入片段的大小, 舍弃 500 bp 以下的小片段 (图 2-B)。将剩余的阳性酵母质粒转化大肠杆菌 DH5α, 菌液送交公司进行核苷酸序列测定, 测序结果与 GenBank 数据库进行同源性比较, 将载体的阅读框与目的基因不同的克隆排除掉, 最终筛选到 12 种与 *GmNFR1α-pk* 互作的

图 2 酵母双杂交 cDNA 文库的筛选

Fig. 2 Screening of yeast two-hybrid cDNA library

(A) QDO/X/A 平板上的阳性克隆; (B) PCR 检测酵母双杂交 cDNA 文库插入片段大小。

(A) positive clones on QDO/X/A plate; (B) PCR detection of inserts from yeast two-hybrid cDNA library.

蛋白, 包括钙离子结合手性蛋白、豆血红蛋白、结瘤素 Nod44、肌醇-磷酸合酶、甲酰转移酶、氨基酸转移酶、NAD 激酶、分子伴侣样蛋白 HYPK、抗增殖蛋白 prohibitin-2 等。

2.3 蛋白相互作用的验证

为进一步验证 GmNFR1 α -pk 与靶蛋白的相互作用, 本研究以筛选到的其中一个互作蛋白-大豆血红蛋白 GmLbc2 (Leghemoglobin C2) 为例, 分别将 GmLbc2/GmNFR1 α -pk、阴性对照及阳性对照质粒转入酵母菌株 Y2HGold, 涂在 QDO/X/A 培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。观察发现, GmNFR1 α -pk 与靶蛋白 GmLbc2 共转化时, 在 QDO/X/A 培养基上菌落呈蓝色(图 3-A), 表明二者在酵母体内能够发生相互作用, 酵母回转实验进一步验证了阳性克隆的正确性, 排除了假阳性的干扰。将 GmNFR1 α 和 GmLbc2 基因分别构建到 BiFC 中配对的 2 个载体上, 然后通过瞬时表达系统共转化烟草, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光发生情况, 证实 2 个蛋白在烟草体内也存在相互作用, 且互作的位置在烟草表皮细胞的细胞膜(图 3-B)。

2.4 GmLbc2 蛋白的生物信息学分析

已有研究表明, 大豆血红蛋白 GmLb 受根瘤菌诱导表达, 是存在于共生根瘤类菌体内的一种组织特异性蛋白。GmLb 的含量和根瘤的固氮酶活性呈

正相关性, 根瘤中 GmLb 未表达前, 根瘤是没有固氮能力的; 随着 GmLb 含量的增加, 固氮能力增强; 衰老的根瘤伴随着 GmLb 的消失, 固氮作用也丧失。GmLb 由 4 个主要组分 Lbc1、Lbc2、Lbc3、Lba 构成。本研究筛选到的 GmNFR1 α -pk 互作蛋白即为其中的 Lbc2 蛋白。序列分析表明, 全长的大豆 GmLbc2 基因大小为 438 bp, 编码蛋白包含 145 个氨基酸残基。预测的分子量大小为 15.5 kD, 理论等电点为 5.38。经过 Blastp 以及 DNAMAN 软件分析, 对大豆 GmLbc2 基因编码的氨基酸序列进行同源比对发现, GmLbc2 与 GmLbc3、野生大豆 GsLbc1 和 GmLba 同源性较高(图 4)。同时, GmLbc2 蛋白与上述不同豆科植物的豆血红蛋白的进化树分析表明, GmLbc2 与 GmLbc3 处在同一进化分支上, 亲缘关系最近(图 5)。

2.5 过表达 GmLbc2 基因对百脉根阳性毛根共生结瘤的影响

为了鉴定 GmLbc2 基因在结瘤过程中的生物学功能, 根据基因序列信息, 构建超表达载体 pU1301-GmLbc2, 通过毛根转化法导入模式豆科植物百脉根毛根中, 进行盆栽实验。接种根瘤菌 30 d 后, GmLbc2 基因在百脉根毛根中的过量表达可以显著增加结瘤数目(图 6-A~C)。qRT-PCR 结果显示, 在超表达植株中 GmLbc2 基因的表达水平为对照的

图 3 GmNFR1 α 与 GmLbc2 相互作用的验证

Fig. 3 Interaction between GmNFR1 α and GmLbc2

(A) 酵母双杂交系统验证 GmNFR1 α -pk 与 GmLbc2 的相互作用。1: 阳性对照(pGBKT7-53 和 pGADT7-T); 2: 阴性对照(pGBKT7-lam 和 pGADT7-T); 3: pGBKT7-GmNFR1 α -pk 与 pGADT7-GmLbc2。(B) 双分子荧光互补技术验证 GmNFR1 α 全长与 GmLbc2 的相互作用。

(A) yeast two-hybrid analysis of interaction between GmNFR1 α -pk and GmLbc2. 1: positive control (pGBKT7-53 and pGADT7-T); 2: negative control (pGBKT7-lam and pGADT7-T); 3: pGBKT7-GmNFR1 α -pk and pGADT7-GmLbc2. (B) BiFC analysis of interaction between GmNFR1 α and GmLbc2.

12 倍, 说明百脉根复合体植株结瘤数目的增加是由于 GmLbc2 基因的过量表达引起的。以 qRT-PCR 进一步分析结瘤标志基因 NIN、ENOD40-1 和 ENOD40-2 在复合体植株毛根中的表达水平表明, GmLbc2 基因的过量表达显著增加这 3 种结瘤标志基因的表达水平(图 6-D)。

3 讨论

大豆在农业生产中发挥着举足轻重的作用, 大豆与谷物作物玉米、小麦等间作可促进氮的转移, 减少施肥量的同时增加谷物作物的产量, 并改善土壤氮营养状况, 对大豆共生信号调控网络的研究具有重要的现实意义。前人研究表明, 过量表达大豆结瘤因子受体激酶 GmNFR1 α 可以使结瘤增加, 并增强大豆植株在酸性土壤中形成根瘤的能力。GmNFR1 α 能够直接参与调控大豆 G 蛋白信号通路。G 蛋白亚基 G α 与 G 蛋白活性调节因子 RGS 都能够直接与 GmNFR1 α 发生相互作用, GmNFR1 α 通过磷酸化 RGS, 调控 G α 蛋白活性, 从而维持根瘤的正常发育^[21-22]。目前关于 GmNFR1 α 在共生结瘤固氮中的信号传递机制研究才刚刚起步, 其介导的下游信号传递途径仍有待进一步补充和完善。因此, 筛选

新的 GmNFR1 α 相互作用蛋白, 阐明互作蛋白之间结瘤信号的传递方式, 对于揭示 GmNFR1 α 在结瘤信号转导途径中的调控机制具有重要意义, 该工作具有原创性。酵母双杂交技术可以在活体内验证蛋白之间的相互作用, 是一种高效发掘新基因、探索基因调控网络的方法^[23]。本研究成功地利用该系统筛选到 GmNFR1 α 的相互作用蛋白, 并对这些靶蛋白进行了进化及功能分析, 为揭示 GmNFR1 α 在结瘤因子信号传递过程中的调控机制提供了新证据。

利用 BLAST 数据库对得到的靶蛋白进行结构功能域和同源性分析, 筛选到 12 种与 GmNFR1 α -pk 互作的蛋白, 包括钙离子结合手性蛋白、豆血红蛋白、结瘤素 Nod44、肌醇-磷酸合酶、甲酰转移酶、氨基酸转移酶、NAD 激酶、分子伴侣样蛋白 HYPK、抗增殖蛋白 prohibitin-2 等。其中, 重复克隆数最多的蛋白为大豆血红蛋白 GmLbc2。大豆血红蛋白与固氮作用密切相关, 通过调节根瘤中游离 O₂ 的浓度, 保护类菌体产生的易受 O₂ 破坏的固氮酶^[24]。根瘤中大豆血红蛋白的含量与固氮酶活性呈正相关性, 根瘤菌侵染大豆根系诱导大豆血红蛋白表达后, 根瘤才能够正常地进行固氮作用, 才能为宿主植物提供

GmLbc2	MGAFTEKQEAIVSSSFDAFKANIEHQYSVVFYTSILEKAPA	40
GmLbc3	MGAFIDKQEAIVSSSFDAFKINIEHQYSVVFYTSILEKAFV	40
GsLbc1	MGAFTEKQEAIVSSSFDAFKANIEHQYSVVFYTSILEKAPA	40
GmLba	MVAETEKQDAIVSSSFDAFKANIEHQYSVVFYTSILEKAPA	40
CcLb	MGGFTEKQEAIVNSSYDAFKANIEKHSVVFYTSILEKAFV	40
VaLb	MVAESDKQEAIVNGAWDAFKADIEKYSVVFYTSILEKAPA	40
VrLb	MVAESDKQEAIVNGAYDAFKADIEKYSVVFYTSILEKAPA	40
MtLb	.MGFTENQEAIVNSSWSEFKQNLIEGYSVFEYTTILEKAPA	39
LjLb	.MGFTAQDQEAIVGSSYDAFKQNLIESNSVIFYTLILEKAPA	39
AsLb	.MGFTEAQEAIVNSSWDAFKQNLIEHNSIIFYTFVLEKAPA	39
Clustal consensus	f q lv e fk p s fyt lekap	
GmLbc2	AKDIFSFLSNGVDPS..NPKLTGHAERLFGILVRDSAGQLK	78
GmLbc3	AKDIFSFLANGVDPT..NPKLTGHAERLFGILVRDSAGQLK	78
GsLbc1	AKDIFSFLANGVDPT..NPKLTGHAERLFGILVRDSAGQLK	78
GmLba	AKDIFSFLANGVDPT..NPKLTGHAERLFGILVRDSAGQLK	78
CcLb	AKTIFSFLANGVDPN..NPNLTGHAERLFGILTRDSAVQLR	78
VaLb	AKNIFSFLANGVDPS..NPKLTGHAERLFGILVRDSAAQLK	78
VrLb	AKNIFSFLANGVDPS..NPKLTGHAERLFGILVRDSAAQLK	78
MtLb	AKGMFSFLKDSSTGVQ.DSEQLQHAERLFGMVLRDPAVQLR	78
LjLb	AKDMFSFLKAS.GET.HSEQLQHAERLFGILTRDPAVQLL	77
AsLb	AKDIFSFLKNSDGVPKNNPALQHAERLFGILVRDPAVQLR	79
Clustal consensus	ak fsfl p l ghaek f rd a ql	
GmLbc2	ANGAVVA.DAFLGSIHQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEA	117
GmLbc3	ASGIVVI.DAFLGSIHQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEA	117
GsLbc1	TNGIVVA.DAFLVSIHQKAVTDPQFVVVKEALLKTIKEA	117
GmLba	ASGIVVA.DAFLGSIHQKAVTDPQFVVVKEALLKTIKAA	117
CcLb	AKGAVVA.DAFLGSIHQKGVDPQFVVVKEAVLTIKEA	117
VaLb	ASGAVVA.DAFLGAVHSQKAVTDAQFLVVKEAFVKTILKEA	117
VrLb	ASGAVVA.DAFLGAVHSQKAVTDAQFLVVKEAVLTIKEA	117
MtLb	ATGEVVLGDATLGSIHQKGVDPHFVVVKEALLKTIKEV	118
LjLb	AKGEVTLADATLGAHVQKAVADPHFVVVKEALLKTVQAA	117
AsLb	AKGEVTLGDATLGGVHVQKGVDPHFVVVKEALLKTIKEV	119
Clustal consensus	g v da l h qk d f vvkea t	
GmLbc2	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKAF	145
GmLbc3	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKAF	145
GsLbc1	VGGNWSDELSSAWEVAYDELAALIKKA.	144
GmLba	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKA.	144
CcLb	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKAY	145
VaLb	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKAY	145
VrLb	VGDKWSDELSSAWEVAYDELAALIKKAY	145
MtLb	VGDKWSEELSTSWEVAYDGLAALIKKAM	146
LjLb	VGDKWSEELSTAWGVAYDGLAALIKKAM	145
AsLb	AGGSWSAELSSAWEVAYDGLAALIKKAM	147
Clustal consensus	g ws els ayd la ikka	

图 4 大豆 GmLbc2 与其他植物同源蛋白的序列比对分析

Fig. 4 Amino acid sequence alignment analysis of GmLbc2 and its homologous proteins in some other plants

Gm: 栽培大豆, *Glycine max*; Gs: 野生大豆, *Glycine soja*; Cc: 木豆, *Cajanus cajan*; Va: 赤豆, *Vigna angularis*; Vr: 绿豆, *Vigna radiata*; Mt: 蒺藜苜蓿, *Medicago truncatula*; Lj: 百脉根, *Lotus japonicus*; As: 紫云英, *Astragalus sinicus*.

Gm: *Glycine max*; Gs: *Glycine soja*; Cc: *Cajanus cajan*; Va: *Vigna angularis*; Vr: *Vigna radiata*; Mt: *Medicago truncatula*; Lj: *Lotus japonicus*; As: *Astragalus sinicus*.

生长所需的氮源^[25]。在大豆结瘤信号途径中, 本研究首次将结瘤因子受体蛋白与豆血红蛋白联系起来, 证实二者在酵母体内的互作。推测 GmNFR1 α -pk 与 GmLbc2 互作可能将早期结瘤因子信号感知和后期有效根瘤的形成有机整合起来, 但具体作用方式及机制还需进一步研究。下一步我们将通

过细胞生化实验进一步研究这些靶蛋白与 GmNFR1 α 的互作机制和互作功能区域, 通过靶标基因的超表达和敲除实验研究这些靶蛋白的生物学功能, 期待破解大豆结瘤因子受体蛋白 GmNFR1 α 在共生信号转导途径中的具体功能及分子调控机制。

图 5 大豆 *GmLbc2* 蛋白与同系物的系统进化分析
Fig. 5 Phylogenetic tree of *GmLbc2* and its homologs
标尺代表遗传相似性, 表明不同物种间同系物进化关系的远近。
缩写同图 4。
The scale represents genetic similarity, indicating the proximity relationships among species. Abbreviations are the same as those given in Fig. 4.

综上所述, 本研究从大豆根瘤 AD-cDNA 文库中获得多个与 *GmNFR1α* 相互作用的靶蛋白, 并以大豆血红蛋白 *GmLbc2* 为例, 对其进行同源蛋白比对及系统进化树分析, 推测二者互作共同调控结瘤过程, 研究结果为进一步阐明 *GmNFR1α* 的信号传递机制提供了理论依据。可以相信, 对 *GmNFR1α* 互作蛋白功能及作用机制的深入研究必将大大推动大豆共生信号调控网络的研究, 也将为实现非豆科植物的共生固氮提供重要的科学线索。

4 结论

利用酵母双杂交筛选大豆根瘤中 *GmNFR1α*-pk 的相互作用蛋白, 获得 12 种靶蛋白。以大豆血红蛋白 *GmLbc2* 为例, 对其进行同源蛋白比对、系统进化树及生物学功能分析, 为进一步阐明 *GmNFR1α* 的信号传递机制提供了理论依据。

图 6 过表达 *GmLbc2* 对百脉根阳性毛根共生结瘤的影响
Fig. 6 Effect of *GmLbc2* overexpression on nodulation in *L. japonicus*
(A)空载体对照复合体植株的结瘤表型。(B)超表达 *GmLbc2* (*GmLbc2*-OX)复合体植株的结瘤表型; 接种根瘤菌 30 d 后照相, Bars = 5 mm。(C)平均每个植株的结瘤数目, **表示 $P<0.01$ 。(D) qRT-PCR 检测 *GmLbc2*、*NIN*、*Enod40-1* 和 *Enod40-2* 的表达水平。
(A) phenotype of hairy roots expressing p1301U (CK). (B) phenotype of hairy roots overexpressing *GmLbc2* (*GmLbc2*-OX); photographs were taken at 30 d after inoculation, Bars = 5 mm. (C) mean number of nodules per plant with standard deviation (SD) of *L. japonicus* expressing empty vector pU1301 (CK) of *GmLbc2*-OX at 30 days after inoculation with *M. loti*, ** $P<0.01$. (D) transcript levels of *GmLbc2*, *NIN*, *Enod40-1*, and *Enod40-2* in CK and *GmLbc2*-OX hairy roots detected by qRT-PCR.

References

- [1] Giles E D, Oldroyd G E, Downie J A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature*, 2004, 5: 566–576.
- [2] Oldroyd G E, Downie J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 519–546.
- [3] Oldroyd G E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 252–263.
- [4] Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, Felle H H, Umehara Y, Grönlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 2003, 425: 569–570.
- [5] Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 2003, 425: 637–640.
- [6] Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 2003, 302: 630–633.
- [7] Arrighi J F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano L C, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E P, Ghérardi M, Huguet T, Geurts R, Dénarié J, Rougé P, Gough C. The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol*, 2006, 142: 265–279.
- [8] Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol*, 2007, 145: 183–191.
- [9] Madsen E B, Antolin-Llovera M, Grossmann C, Ye J, Vieweg S, Broghammer A, Krusell L, Radutoiu S, Jensen O N, Stougaard J, Parniske M. Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J*, 2011, 65: 404–417.
- [10] Broghammer A, Krusell L, Blaise M, Sauer J, Sullivan J T, Maolanon N, Vinther M, Lorentzen A, Madsen E B, Jensen K J, Roepstorff P, Thirup S, Ronson C W, Thygesen M B, Stougaard J. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13859–13864.
- [11] Sørensen K K, Simonsen J B, Maolanon N N, Stougaard J, Jensen K J. Chemically synthesized 58-mer lysM domain binds lipochitin oligosaccharide. *Chembiochem*, 2014, 15: 2097–2105.
- [12] Mbengue M, Camut S, de Carvalho-Niebel F, Deslandes L, Froidure S, Klaus-Heisen D, Moreau S, Rivas S, Timmers T, Hervé C, Cullimore J, Lefebvre B. The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. *Plant Cell*, 2010, 22: 474–488.
- [13] Tsikou D, Ramirez E E, Psarrakou I S, Wong J E, Jensen D B, Isono E, Radutoiu S, Papadopoulou K K. A *Lotus japonicus* E3 ligase interacts with the Nod Factor Receptor 5 and positively regulates nodulation. *BMC Plant Biol*, 2018, 18: 217.
- [14] Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray J D, Udvardi M K, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 2343–2348.
- [15] Tóth K, Stratil T F, Madsen E B, Ye J, Popp C, Antolin-Llovera M, Grossmann C, Jensen O N, Schüssler A, Parniske M, Ott T. Functional domain analysis of the Remorin protein LjSYMREM1 in *Lotus japonicus*. *PLoS One*, 2012, 7: e30817.
- [16] Ke D X, Fang Q, Chen C F, Zhu H, Chen T, Chang X J, Yuan S L, Kang H, Ma L, Hong Z L, Zhang Z M. The small GTPase Rop6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, 2012, 159: 131–143.
- [17] 柯丹霞, 李祥永. 结瘤信号途径中相关调控蛋白的研究进展. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2015, 28: 621–626.
- Ke D X, Li X Y. Research progress of key regulatory proteins in nodulation pathway. *J Xinyang Nor Univ* (Nat Sci Edn), 2015, 28: 621–626 (in Chinese with English abstract).
- [18] Duan L J, Pei J Q, Ren Y P, Li H, Zhou X Z, Zhu H, Duanmu D Q, Wen J Q, Mysore K S, Cao Y R, Zhang Z M. A dihydroflavonol-4-reductase-like protein interacts with NFR5 and regulates rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Int*, 2018, 32: 401–412.
- [19] Indrasumunar A, Searle I, Lin M H, Kereszt A, Men A, Carroll B J, Gresshoff P M. Nodulation factor receptor kinase 1 α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant J*, 2011, 65: 39–50.
- [20] 柯丹霞, 熊文真, 彭昆鹏, 李祥永. 抗盐基因 *Gm01g04890* 大豆子叶节遗传转化研究. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2017, 30: 46–51.
- Ke D X, Xiong W Z, Peng K P, Li X Y. Study on genetic transformation of salt resistant gene *Gm01g04890* in soybean. *J Xinyang Nor Univ* (Nat Sci Edn), 2017, 30: 46–51 (in Chinese with English abstract).
- [21] Choudhury S R, Pandey S. Specific subunits of heterotrimeric G proteins play important roles during nodulation in soybean. *Plant Physiol*, 2013, 162: 522–533.
- [22] Choudhury S R, Pandey S. Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in soybean. *Plant Cell*, 2015, 27: 3260–3276.
- [23] Yin Y, Vafeados D, Tao Y. A new class of transcription factors mediates brassino steroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 120: 249–259.
- [24] Navascués J, Pérez-Rontomé C, Gay M, Marcos M, Yang F, Walker F A, Desbois A, Abián J, Becana M. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2660–2665.
- [25] Sainz M, Calvo-Begueria L, Pérez-Rontomé C, Wienkoop S, Abián J, Staudinger C, Bartesaghi S, Radi R, Becana M. Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant J*, 2015, 81: 723–735.