

## 利用酵母双杂交筛选豌豆叶绿体镁离子 螯合酶 D 亚基相互作用蛋白

余 静, 罗 韬, 罗美中\*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要** 植物叶绿体镁离子螯合酶是四吡咯化合物生物合成途径中合成叶绿素分支(镁分支)的第一个酶,它催化镁离子螯合到原卟啉 IX 中,形成镁原卟啉 IX。镁离子螯合酶是 1 个由 3 个亚基 H、D 和 I 组成的多亚基酶,3 个亚基均由细胞核编码,进入叶绿体发挥功能。该酶不仅控制着叶绿素的合成,其各个亚基还具有很多其它的功能: H 亚基既是 ABA 受体,又参与叶绿体到细胞核的反向信号传导; D 亚基也与叶绿体到细胞核的反向信号传导有关。本文利用酵母双杂交技术,将编码豌豆镁离子螯合酶 D 亚基的 cDNA 片段构建到诱饵载体 pGBKT7 中,分别用共转化的方法筛选豌豆叶片细胞核编码的均一化 cDNA 文库和用 Mating 的方法筛选豌豆叶片叶绿体编码的均一化 cDNA 文库,共得到 121 个候选克隆,其中有 60 个克隆共编码 21 个叶绿体蛋白质,19 个来自于核基因编码,2 个来自于叶绿体基因编码。这些候选蛋白参与叶绿素合成、卡尔文循环、叶绿体蛋白质翻译和叶绿体基因转录等多个代谢过程。酵母点对点 and GST-pull down 对其中的 4 个蛋白做了进一步的验证。这些结果将为 D 亚基的功能研究提供进一步的线索。

**关键词** 镁离子螯合酶 D 亚基; 酵母双杂交系统; GST-pull down; 叶绿体  
中图分类号 Q71

## Screening for Proteins Interacting with Mg-chelatase D Subunit in Pea Chloroplast Using Yeast Two-hybrid System

YU Jing, LUO Tao, LUO Mei-Zhong\*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** Plant chloroplast Mg-chelatase, the first enzyme at the branch of chlorophyll biosynthesis pathway, catalyzes the incorporation of  $Mg^{2+}$  into protoporphyrin IX. Its three subunits, H, D and I, are products of nuclear coding genes, then imported into and function at the chloroplast. These subunits are not only involved in chlorophyll biosynthesis along with the enzyme, also exert other functions. Subunit H was found as an ABA receptor, and both H and D subunits were involved in the retrograde signaling from chloroplast to nucleus. Using a yeast two-hybrid system, we constructed a pGBKT7 bait vector containing pea Mg-chelatase D subunit cDNA and screened both a normalized nuclear-encoded and chloroplast-encoded cDNA library of pea leaves by co-transformation and mating method, respectively. In the total of 121 putative positive clones obtained, 60 clones encode 21 chloroplast proteins, of which 19 were nuclear genes and 2 were chloroplast genes. The identified proteins were involved in different biological functions, such as chlorophyll biosynthesis, Calvin cycle, and regulation of protein translation and transcription in chloroplast, etc. By two hybrid re-cotransformation and GST pull-down assay, 4 proteins were validated.

收稿日期: 2011-05-09; 接收日期: 2011-06-13

国家自然科学基金项目(No. 30971748)资助

\* 联系人 Tel: 027-87284213; E-mail: mzluo@mail.hzau.edu.cn

Received: May 9, 2011; Accepted: June 13, 2011

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30971748)

\* Corresponding author Tel: 027-87284213; E-mail: mzluo@mail.hzau.edu.cn

Our results provided valuable clues for the functional studies of chloroplast Mg-chelatase D subunit.

**Key words** Mg-chelatase D subunit; yeast two-hybrid system; GST pull-down; chloroplast

四吡咯化合物是生物体内非常重要的一类化合物,它们参与生物体发育过程中的大部分代谢途径.在光合自养生物中,其作用尤为重要,因为四吡咯化合物的终产物之一——叶绿素分子对于光合作用是必不可少的,叶绿素在光合作用中负责吸收和转换太阳能以及将水光解产生的电子在光系统复合物中传递.叶绿体中叶绿素合成途径是四吡咯化合物代谢的一条重要分支(镁分支),这一分支途径中的第1个酶就是镁离子螯合酶,该酶是由3个亚基(H、D和I亚基)组成的复合酶<sup>[1-4]</sup>.镁离子螯合酶通过水解ATP提供能量,将 $Mg^{2+}$ 插入到原卟啉IX中形成镁原卟啉IX.镁离子螯合酶参与的催化反应包括两步:第一步是在ATP和 $Mg^{2+}$ 的存在下,I和D亚基与ATP和镁离子形成一个复合体,作为催化平台,这一步叫做激活步骤;第二步是结合了底物原卟啉IX的H亚基再结合到催化平台上,这时I亚基催化ATP水解,为 $Mg^{2+}$ 插入到底物原卟啉IX中提供能量,这一步叫做插入步骤<sup>[5-8]</sup>.最近研究发现,GUN4(genomes uncoupled 4)和TRX-f(硫氧还蛋白-f)参与调控镁离子螯合酶的活性.其中,GUN4是与镁离子螯合酶H亚基相结合的一个蛋白,它可以与镁离子螯合酶的底物和产物结合,从而促进镁离子螯合酶与底物的结合以及产物的解离,另外,GUN4还影响铁离子螯合酶的活性<sup>[9-11]</sup>.硫氧还蛋白-f是叶绿体氧化还原系统中的一个重要蛋白,它通过调节I亚基中二硫键的氧化还原状态来调控I亚基的ATP酶活性,从而影响镁离子螯合酶的活性<sup>[12,13]</sup>.长期以来,人们对镁离子螯合酶3个亚基的结构和功能进行了大量的研究,得到了许多结果:在真核生物中,从地钱属植物开始,镁离子螯合酶的3个亚基都是由细胞核编码的,而在一些藻类生物中,I亚基是由叶绿体编码的<sup>[14]</sup>;这3个亚基的表达都受到光的诱导,而且H亚基的表达还具昼夜节律性<sup>[15]</sup>;从氨基酸序列来看,高等植物中的镁离子螯合酶3个亚基的N端序列都具有叶绿体信号肽,且I亚基和D亚基的N端序列具有一定的同源性,这可能与基因的起源有关<sup>[16]</sup>;I和D亚基都属于AAA<sup>+</sup>(ATPase associated with diverse cellular activities)蛋白家族,其中I亚基具有ATPase活性,而D和H亚基则不具有.同时,I亚基还是D亚基的伴侣蛋白<sup>[17-19]</sup>;H亚基不仅参与植物中叶绿体到

细胞核的反向信号传导<sup>[20]</sup>,而且还是ABA(脱落酸)的受体<sup>[21]</sup>.随着研究的深入,研究者们发现拟南芥中D亚基的T-DNA插入突变体也具有GUN表型,这说明D亚基也可能参与叶绿体到细胞核的反向信号传导<sup>[22-23]</sup>.此外,在对烟草D亚基氨基酸序列的功能研究表明,维持镁离子螯合酶活性以及与其它亚基相互作用的只是中间的一段110个氨基酸(第375到第485位氨基酸)序列,而两端氨基酸序列的功能都还未知<sup>[3]</sup>.为了探索镁离子螯合酶D亚基的未知功能,本研究以豌豆为材料,利用酵母双杂交技术寻找D亚基相互作用蛋白,从而进一步了解镁离子螯合酶D亚基的生物学功能.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Trizol试剂(Invitrogen公司);逆转录试剂盒,KOD Plus polymerase( TOYOBO公司);+A试剂盒(上海生工公司);DNAaseI(RNAase free, Promega公司);T4连接酶,各种限制性内切酶(Fermentas公司);各种氨基酸、葡萄糖(Sigma公司);Glutathione-Sepharose 4B( GE Healthcare公司);酵母YNB培养基(无氨基酸),琼脂,酶水解蛋白胨(BD公司);Matchmaker Library Construction & Screening Kit( Clontech公司);双链特异性核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN)( Evrogen公司);QIAquick PCR Purification Kit( QIAGEN公司);其它试剂均为国产分析纯.

pMR101和pGEX6P-1细菌表达载体,BL21(DE3)和DH10B大肠杆菌菌种由本实验室保存;pGADT7,pGADT7-Rec和pGBKT7质粒,Y187和AH109酵母菌株随试剂盒购自Clontech公司,pGEM-T Easy克隆载体购自Promega公司.

豌豆种子(中豌6号)购自河北省农科院畜牧研究所.处理方法是:先将种子用自来水冲洗干净,再用温水浸泡过夜,选取发胀的种子于25℃避光催芽1~2d,最后选取萌发的种子播种到营养土中,在温室中生长.生长温度为25℃,14h光照/10h黑暗.

### 1.2 载体构建

根据NCBI网站上豌豆镁离子螯合酶D亚基的序列(GI: 2318116),设计引物:5'-(Nde I)

AAGCTTATGGGTTTCAGTTTGACACACAC-3' 和 5'-(*Bam*H I) GGATCCTGAAGTCTTCAGAGCTGCTAAA GCT-3', 以豌豆叶片 cDNA 作为模板, PCR 扩增得到除去 55 个预测的叶绿体信号肽全长 cDNA 序列, 产物通过 TA 克隆的方法连接到 pGEM-T Easy 载体, 测序验证, 再通过酶切连接分别构建在诱饵载体 pGBKT7 和细菌表达载体 pMR101 上, 得到 pGBKT7-D 和 pMR101-D 融合载体分别用于酵母双杂交和 pull-down 实验. 对于筛选到的阳性克隆, 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切外源片段并连接到 pGEX6P-1 表达载体上(含 GST-Tag), 用于进一步的 GST-pull down 实验.

### 1.3 豌豆叶片细胞核编码的均一化酵母双杂交 cDNA 文库的构建

取生长 5~8 d 不同时间点(每 4 h 取一次样)的豌豆幼嫩叶片, 用 Trizol 试剂提取总 RNA. 经电泳结果和  $A_{260}/A_{280}$  的比值确定 RNA 质量. 选取合格的 RNA, 依照酵母双杂交试剂盒中说明书(PT4084-1), 用 SMART 技术以 CDSIII 引物经反转录合成第一链 cDNA. 得到的产物用 Advantage 2 Polymerize mix (Clontech) 进行 18 个循环的 Long Distance PCR (LD-PCR), 之后 PCR 产物用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) 回收并进行均一化处理, 具体处理方法为: 20  $\mu$ L 纯化产物与 8  $\mu$ L 4 $\times$  杂交缓冲液 (200 mmol/L HEPES pH 7.5, 2 mol/L NaCl, 0.8 mmol/L EDTA) 和 4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 混合, 分成 4 份 8  $\mu$ L 的反应体系, 分别标为 0、1/4、1/2 和 3/4, 体系于 98  $^{\circ}$ C 变性 2 min, 再 68  $^{\circ}$ C 杂交 5 h. 之后趁热在每个体系中加入 1  $\mu$ L 预热到 68  $^{\circ}$ C 的 10 $\times$  DSN master 缓冲液 (500 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L DTT) 和相应单位的 DSN 酶, 标 0 的体系中加 1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 标 1/4 的加 1/4 单位 DSN 酶, 混匀后于 68  $^{\circ}$ C 反应 20 min, 再加入 5  $\mu$ L 2 $\times$  DSN 终止液 (10 mmol/L EDTA pH 8.0), 68  $^{\circ}$ C 反应 5 min 终止反应. 为确定产物的均一化效果, 取 1  $\mu$ L 各产物作为模板进行 18 个循环的 LD-PCR 反应并电泳检测, 均一化效果最好应是没有特异性条带且平均片段大小最大. 取其中最合格的产物作为模板, 进行 LD-PCR 反应, 产物用 CHROMA SPINTM TE-400 column 纯化以去除小于 500 bp 的 cDNA 片段, -20  $^{\circ}$ C 保存备用.

### 1.4 豌豆叶片叶绿体编码的均一化酵母双杂交 cDNA 文库的构建

取生长 7 d 的豌豆幼嫩叶片提取完整叶绿体

(方法参照文献 [2]). 得到的叶绿体用 Trizol 试剂提 RNA. 用 SMART 技术以随机引物 CDSIII/6 进行反转录合成一链 cDNA. 进行 cDNA 均一化, 但有几处作了修改: 首先, 开始的 LD-PCR 循环数为 15 个循环; 其次, 不同单位的 DSN 酶处理改为 0、1/8、1/4、1/2; 最后, 得到的 LD-PCR 产物用 QIAquick PCR Purification Kit 进行纯化. 将产物与 pGADT7-rec 线性化载体共转到酵母 AH109 菌株中, 转化子在 SD/-Leu 选择培养基上生长, 用 YPD 冰冻培养基回收培养板上的转化子并 -80  $^{\circ}$ C 保存备用.

### 1.5 筛选豌豆叶片细胞核编码的均一化 cDNA 文库

按照酵母双杂交试剂盒说明书中酵母共转化的方法筛选豌豆叶片细胞核编码的均一化 cDNA 文库, 即将制备好的均一化 cDNA 片段、线性化 pGADT7-Rec 载体和 pGBKT7-D 诱饵载体共转化到 AH109 酵母感受态细胞中, 转化产物涂布在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 选择性培养基上, 30  $^{\circ}$ C 培养箱培养 8~11 d.

### 1.6 筛选豌豆叶片叶绿体编码的均一化 cDNA 文库

按照酵母双杂交试剂盒说明书中酵母 Mating 的方法筛选豌豆叶片叶绿体编码的均一化 cDNA 文库, 即将含有豌豆叶片叶绿体编码的均一化 cDNA 文库的 AH109 菌株与含有 pGBKT7-D 诱饵载体的 Y187 菌株进行 Mating, 产物涂布在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 选择性培养基上, 30  $^{\circ}$ C 培养箱培养 8~11 d.

### 1.7 假阳性克隆的鉴定与排除

待培养基上的酵母斑长到直径为 3 mm 左右后, 用枪头挑取单克隆作为模板, 利用 pGADT7-Rec 载体上的 5' AD: 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCC CACCAAACCC-3' 和 3' AD: 5'-GTGAACTTGC GGTTTTTCAGTATCTACGAT-3' 作为引物, 扩增外源插入片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小. 对于从豌豆叶片细胞核编码的均一化文库中筛选到的克隆, 选取其中能扩增出 1 条带并且大于 750 bp 的克隆, 取 PCR 产物送测序; 对于从豌豆叶片叶绿体编码的均一化文库中筛选到的克隆, 则取全部扩增为 1 条带的克隆送测序. 测序结果利用 NCBI 网站进行序列同源性比较, 得到候选克隆编码蛋白的信息. 鉴于 D 亚基是叶绿体蛋白, 于是选择定位在叶绿体中的克隆作进一步验证, 即在酵母菌中提取含有这些外源基因的 pGADT7 融合载体, 与 pGBKT7-D 共转化 AH109 酵母菌株, 转化子先涂布在 SD/-Trp/-Leu 选择性培养基上, 待长出菌落后再转涂到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 选择性培养基上, 30  $^{\circ}$ C 培

养箱培养 5~8 d.

### 1.8 GST pull down 实验进一步验证 D 亚基与筛选到的蛋白的相互作用

为了在大肠杆菌中同时表达两个外源蛋白,选择具有相容性复制子和不同抗生素筛选的 2 个表达载体 pGEX-6p1 (pMB1ori/Amp<sup>r</sup>) 和 pMR101 (p15Aori/Kan<sup>r</sup>) 进行共转化实验. 转化 BL21( DE3) 感受态细胞后,挑单菌落于 28 °C 下加 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达过夜. 菌液离心沉淀,用 PBS 缓冲液重悬,再用超声波裂解上清,留一部分作为实验对照,另取一部分与 Glutathione-Sephrose 4B 琼脂糖珠混合 4 °C 孵育 2 h. 孵育后将琼脂糖珠用 PBS 缓冲液洗 3 次,再用 1 × SDS PAGE 上样缓冲液重悬,进行 SDS-PAGE,之后以 D 亚基的兔抗血清(本实验室制备)作为一抗,Western 杂交检测.

## 2 结果

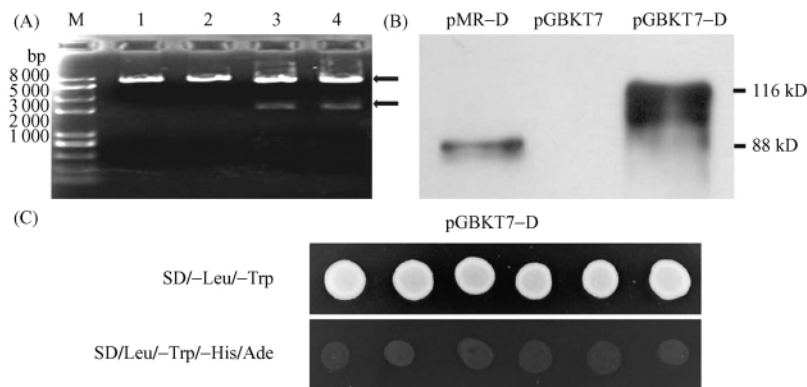
### 2.1 镁离子螯合酶 D 亚基诱饵载体和细菌表达载体的构建及诱饵载体自激活验证

通过 PCR 扩增豌豆 cDNA,构建了豌豆镁离子螯合酶 D 亚基的酵母双杂交诱饵融合载体 pGBKT7-D (与载体上 28 kD 的 BD 结构域融合, Fig. 1A) 和细菌表达载体 pMR101-D (照片未显示). 对 2 个载体分别在酵母菌株 AH109 和大肠杆

菌 BL21( DE3) 中的表达进行了 Western 检测. 结果表明,二者均能表达出正确的蛋白( Fig. 1B). 然后检测融合蛋白在酵母中的自激活效应,即将 pGBKT7-D 和 pGADT7-*recT* 共转化酵母 AH109 菌株,在选择性平板上筛选. 结果表明,SD/-Leu/-Trp 平板上能长出转化子,说明两个质粒转入成功,再挑取平板上的转化子涂布到 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上,发现转化子不能生长,从而说明 D 亚基在 AH109 中不具有自激活作用( Fig. 1C). 构建的 pGBKT7-D 融合载体可以用于酵母双杂交的筛选, pMR101-D 载体可用于 pull-down 实验.

### 2.2 豌豆叶片细胞核编码的均一化 cDNA 文库的构建

提取的叶片总 RNA 经 3% 琼脂糖凝胶电泳观察表明( Fig. 2A), 28s rRNA 和 18s rRNA 两条带很明显,说明 RNA 完整. 经可见/紫外分光光度计检测其  $A_{260}/A_{280}$  为 1.998,说明 RNA 纯度比较高,适合后续实验. 均一化产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察表明( Fig. 2B),以 0.25 个单位 DSN 酶处理的 cDNA 作为模板进行 LD-PCR 反应的产物均一性最好,未见明显的特异性条带. 经第二轮 LD-PCR 反应和产物纯化后得到丰度均一且片段大小在 0.5~2 kb 左右的 cDNA 文库( Fig. 2C). 为进一步验证均一化和纯化效果,选取几个表达丰度不同的基因,检测它们

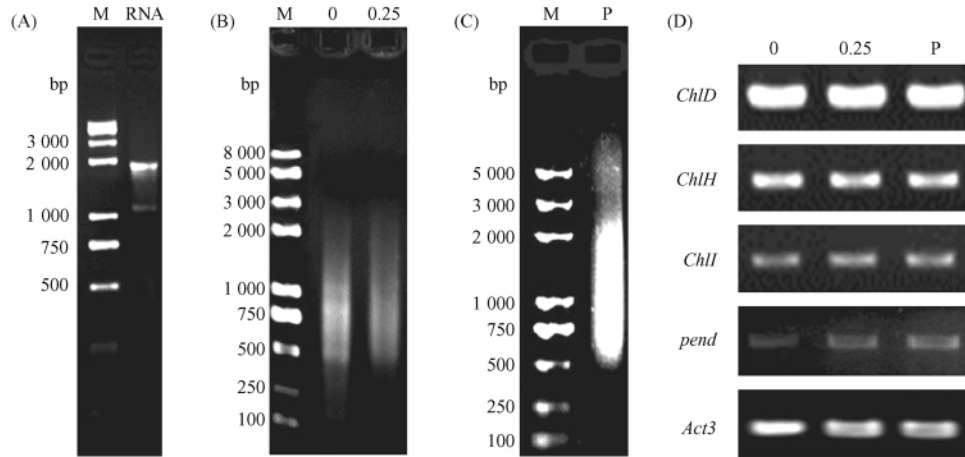


**Fig.1 Construction and test for expression and autoactivation of the pGBKT7-D bait vector** (A)

Construction of the pGBKT7-D vector. The *chLD* cDNA without the chloroplast transit peptide was amplified by PCR from pea and constructed into the pGBKT7 vector to form the pGBKT7-D vector. Plasmid DNA samples were digested by *Nde* I and *Bam* H I, and separated on 1% agarose gel electrophoresis. M: marker; 1 & 2: pGBKT7; 3 & 4: pGBKT7-D. The upper 7.3 kb band is the pGBKT7 vector; the lower 2.3 kb band is the *chLD* cDNA insert. (B) Test for expression of the pGBKT7-D vector in yeast and pMR101-D vector in *E. coli*. Total proteins were separated on 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-D antibody. pMR-D: pMR101-D. The expressed fusion protein from pGBKT7-D vector include a 28 kD BD domain. (C) Test for autoactivation of the pGBKT7-D vector. The pGBKT7-D vector and pGADT7-*rec-T* vector were co-transferred into the yeast AH109 cells, and selected on the SD/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade selective medium, respectively

在均一化前后扩增产物的变化. 从 Fig. 2D 中可以看出, 表达丰度较高的基因 *actin3* 在均一化后丰度有所下降; 表达中等的镁离子螯合酶 3 个亚基基因在均一化后丰度基本不变; 而对于低丰度基因 *pend*

(*pend* 基因编码叶绿体中与 DNA 结合的一个内膜蛋白) 均一化后丰度明显上升. 这些结果说明, 均一化后降低了表达丰度高的 cDNA 丰度, 同时增加了表达丰度低的 cDNA 丰度, 达到了理想的均一化效果.



**Fig. 2 Construction of the normalized pea leaf nuclear-encoded cDNA library** (A) Quality check of the pea leaf total RNA. An aliquot of pea leaf total RNA were separated on a 3% agarose gel electrophoresis. (B) The result of the DSN normalization. The first strand cDNA was synthesized by reverse transcription using CDSIII as primer and amplified by LD-PCR for 18 cycles. PCR products were treated with different concentration of DSN and checked on gel. (C) Quality check of an aliquot of the purified size-selected normalized pea leaf nuclear cDNA library on gel. (D) Redundancy changes after normalization. *chlD*, *chlH*, *chlI*, *pend* and *actin 3* are genes that express with different redundancies in pea leaves. M: marker; 0: No DSN was used; 0.25: Treated with 0.25 U of DSN; P: Purified

### 2.3 豌豆叶片叶绿体编码的均一化 cDNA 文库的构建

叶绿体中绝大部分蛋白质由细胞核编码、从细胞质中运输而来, 但还有一小部分(约 5%) 由叶绿体基因组编码. 为能筛选到这类蛋白质, 我们构建了 1 个叶绿体编码的均一化 cDNA 文库. 提取的叶绿体 RNA 符合后续实验要求( Fig. 3A). 琼脂糖凝胶电泳观察表明( Fig. 3B), 以 0.125 个单位 DSN 酶处理的 cDNA 作为模板进行 LD-PCR 反应的产物均一性最好, 经第二轮 LD-PCR 反应和产物纯化后得到丰度均一且片段大小在 0.1 ~ 1 kb 左右的 cDNA 片段( Fig. 3C). 在与 pGADT7-*rec* 线性化载体共转化酵母菌株 AH109 后, YPD 冰冻培养基收集阳性转化子, 测定得出该酵母菌液的滴度为  $1.2 \times 10^7$  pfu/mL 菌液, 随机挑取酵母单克隆, PCR 检测该文库的平均插入片段为 500 bp 左右.

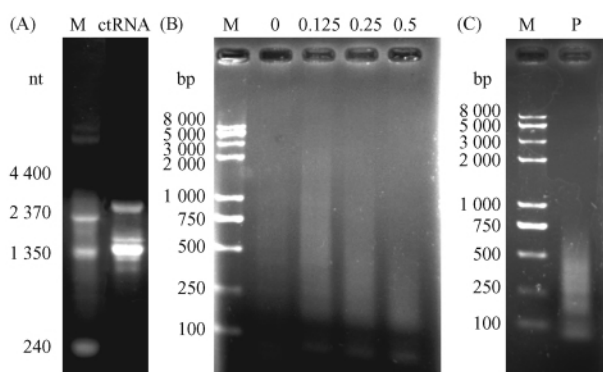
### 2.4 酵母文库的筛选和外源插入片段序列的鉴定

为了更全面筛选诱饵蛋白, 采用不同方法同时筛选细胞核编码和叶绿体编码的酵母双杂交 cDNA 文库, 即利用共转的方法筛选了  $2 \times 10^6$  个细胞核编码的酵母双杂交 cDNA 克隆, 利用 Mating 方法筛选

了  $1 \times 10^6$  个叶绿体编码的 cDNA 克隆. 两次筛选后, 共挑取 500 个酵母单菌落, PCR 方法检测表明: 筛选到的叶绿体编码的克隆平均插入片段在 500 bp 左右( 除去了大约 300 bp 的载体序列); 筛选到的细胞核编码的克隆平均插入片段在 700 bp 左右; 少量克隆中具有 2 条或 2 条以上的带, 可能是 PCR 非特异性扩增或酵母中具有 2 个以上的质粒( Fig. 4). 取特异性单条带 PCR 产物测序, 最后成功测得 160 个克隆序列.

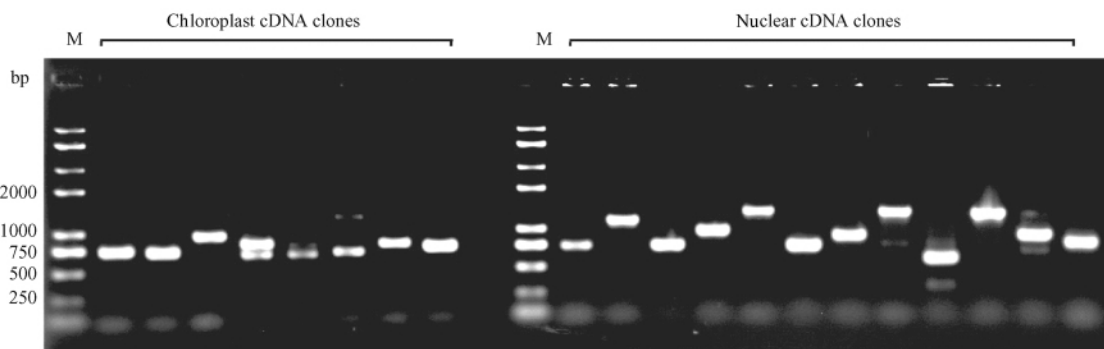
### 2.5 阳性克隆的筛选和分析

将这 160 个克隆的碱基序列用 ExPasy 网站的 translate 软件翻译成氨基酸, 根据 pGADT7-*rec* 载体上的阅读框除去提前终止序列, 最后得到 121 个克隆. 再利用 NCBI 网站的 BLAST 工具对这 121 个克隆进行同源性比较. 结果表明, 121 个克隆总共编码 77 个蛋白, 其中有 60 个克隆共编码 21 个叶绿体蛋白, 剩下的包括分布在其它细胞器和细胞质以及无具体定位的未知蛋白( Fig. 5). 进一步对这 21 个叶绿体蛋白分析表明, 它们分别参与 ATP 能量代谢、光呼吸、叶绿素合成、光系统 II 活性调控、叶绿体基因的转录、翻译及蛋白转运等多个代谢过程( Table 1).



**Fig. 3 Construction of the normalized pea leaf chloroplast-encoded cDNA library**

(A) Quality check of the pea leaf chloroplast RNA. An aliquot of pea leaf chloroplast RNA were separated on a 3% agarose gel. (B) The result of the DSN normalization. The first strand cDNA was synthesized by reverse transcription using CDSIII/6 as primer and amplified by LD-PCR for 15 cycles. PCR products were treated with different concentration of DSN and checked on gel. (C) Quality check of an aliquot of the purified size-selected normalized pea leaf chloroplast cDNA library on gel. M: marker; 0: no DSN was used; 0.125, 0.25 and 0.5: treated with 0.125 U, 0.25 U and 0.5 U of DSN, respectively; P: purified



**Fig. 4 Insert checks of the putative positive cDNA clones selected by yeast two-hybrid screening using yeast plaque PCR** Left panel, PCR products from different chloroplast cDNA clones separated on 1% agarose gel; right panel, PCR products from different nuclear-cDNA clones separated on 1% agarose gel

**Table 1 Details of the clones encoding chloroplast proteins**

Clone No.	Gene name	Metabolic pathway
1, 69	F1 ATPase ( BAA20135. 1)	ATP metabolism
ct17	ATP synthase subunit beta( X03852. 1)	ATP metabolism
78	Homolog of hypothetical chloroplast RF21 ( ACF20554. 1)	ATP metabolism
218	Homolog of arabidopsis FtsH8 ( 837154)	PSII associated Lhcb catabolic process
446	Homolog of arabidopsis FtsH1( NP_564563. 1)	PSII associated Lhcb catabolic process
355	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha ( P08926. 2)	Calvin cycle
198, 203	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta ( P08927. 2)	Calvin cycle
414 etc. *	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit ( P07689. 1)	Calvin cycle
131, 135, 232	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenises A ( P12858. 2)	Calvin cycle
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenises B ( P12859. 2)	Calvin cycle
291	Carbonic anhydrase ( P17067. 1)	Calvin cycle
302	Mg-chelatase I subunit ( JN198382)	Chlorophyll synthesis
83	Elongation factor Tu ( AAM01198. 1)	Chloroplast translation
223	Homologof arabidopsis translation release factor ( NP_191850. 2)	Chloroplast translation
24, 47	Homolog of arabidopsis 30S ribosomal protein S10 ( NP_187919. 1)	Chloroplast translation
37	Homolog of arabidopsis 30S ribosomal protein S5 ( NP_180936. 1)	Chloroplast translation
ct27	PEP beta subunit( YP_003587568. 1)	Chloroplast transcription
467	Glutamine synthetase ( P08281. 2)	Photorespiration and nitrogen metabolism
468	Homolog of Arabidopsis Uridylyltransferase ( NP_564010. 1)	Nitrogen metabolism
261	Outer plastidial membrane protein porin ( P42054. 2)	Chloroplast protein transport
395	Unknown	Unknown

\* A total of 35 overlapping clones were found for this protein

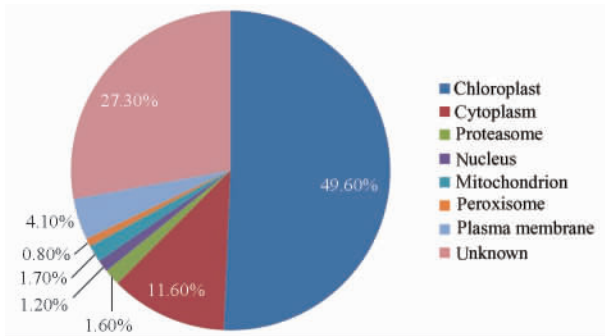


Fig. 5 Subcellular locations of the deduced proteins of the 121 clones obtained by yeast two-hybrid screening

为进一步验证这些克隆与 D 亚基的相互作用,将 pGADT7-prey 质粒分别与 pGBKT7-D 和 pGBKT7-53 共转化酵母 AH109 菌株进行点对点验证(其中 pGBKT7-53 与 pGADT7 prey 共转作为阴性对照),结果表明,除了 24 号、37 号和 223 号这 3 个克隆在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/x-gal 筛选培养基中生长并且并蓝,从而无法确定与 D 亚基的相互作用之外,其余克隆与 D 亚基在酵母中都有相互作用(Fig. 6).

## 2.6 GST pull down 进一步验证蛋白互作

在这些阳性克隆中,选取了以下几个感兴趣的克隆(302、ct27、414 和 83),用 GST pull-down 实验

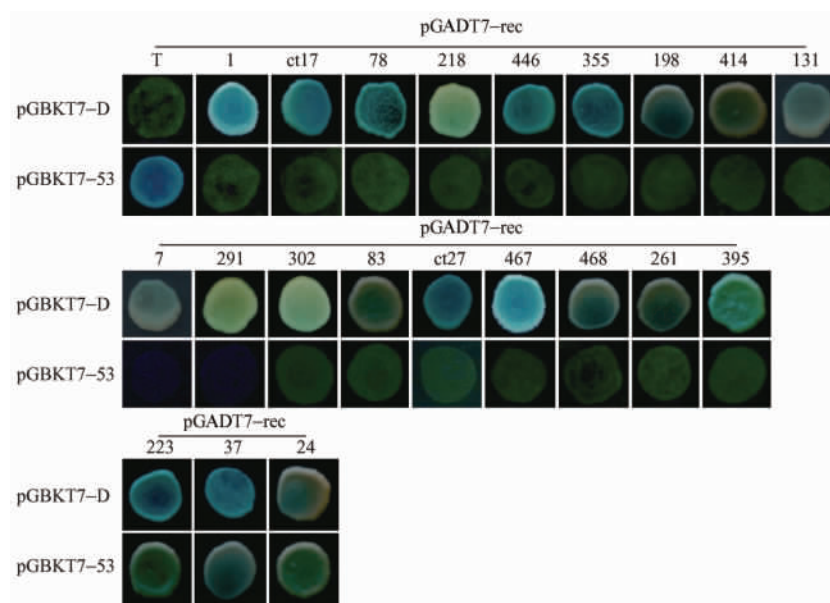
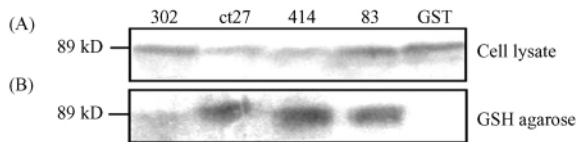


Fig. 6 X- $\alpha$ -Gal assays Numbers of the putative positive clones (in pGADT7-rec vector) were listed on the top of each panel. T stands for pGADT7-Rec-T. The pGADT7-Rec-T and pGBKT7-53 vectors are the control AD and BD vectors, respectively, included in yeast two-hybrid kit. The pGADT7-Rec-T and pGBKT7-53 combination was used as positive control, and combinations between pGBKT7-53 and the putative positive clones were used as negative controls. Combinations between the pGBKT7-D and the putative positive clones were checked for interactions between D and the deduced protein of each putative positive clone. Each combination was co-transferred into yeast AH109 and selected on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal selective medium

进一步验证它们与 D 亚基的互作。302 号克隆编码的是镁离子螯合酶 I 亚基序列; ct27 号克隆编码的是叶绿体 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基部分序列(由叶绿体基因编码); 414 号克隆编码的是 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Rubisco)小亚基家族中的 3A 成员; 83 号克隆编码的是叶绿体翻译释放因子部分序列。

将含有这些基因片段的 pGADT7 融合载体双酶切分离出外源片段并连接在 pGEX-6p1 载体上,与 pMR101-D 在细菌 BL21(DE3) 中进行共表达,其中

将 pGEX-6p1-CPD302 与 pMR101-D 共转的样作为阳性对照,因为很早就证实镁离子螯合酶 D 亚基和 I 亚基是有相互作用,同时共转 pMR101-D 和 pGEX-6p1 空载体作为阴性对照。Fig. 7A 表明, D 亚基在所有共转的 BL21 菌株中都得到了表达,并且在与 Glutathione Sepharose 4B 琼脂糖珠孵育的裂解上清中有 D 亚基的存在。Fig. 7B 表明: 302、ct27、414 和 83 样中的 GST 融合蛋白可以 pull-down 裂解上清中的 D 亚基,这进一步验证了它们与 D 亚基的相互作用。



**Fig. 7 GST Pull-down assays** Western analysis was performed using anti-D antibody. (A) Western analysis of the cell lysate. Cell lysate was prepared from the BL21 (DE3) cells co-transformed with two-plasmid combinations between pMR101-D (no Tags) and pGEX6P-1 containing inserts from clone numbers 302, ct27, 414 and 83, fused to the GST Tag of the vector or no insert (labeled GST on the top) as negative control. (B) Western analysis the proteins which has been pull-downed

### 3 讨论

生物体中参与各项生命活动的蛋白质都不是孤立存在的,它们之间存在着一个严谨的调控网络,这些相互作用对于生命代谢活动非常重要。目前研究蛋白相互作用的方法很多,其中酵母双杂交技术一直被认为是最为可信的方法。本文以豌豆镁离子螯合酶D亚基为诱饵,分别筛选豌豆叶片细胞核编码的均一化cDNA文库和叶绿体编码的均一化cDNA文库,经选择性平板筛选,得到500个酵母单克隆。再通过PCR产物测序和序列同源性比较,确定了121个阳性克隆,其中有21个是叶绿体蛋白。

除去3个无法确定是否与D亚基相互作用的克隆,在剩下的18个候选蛋白中,重复最多的是1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Rubisco)小亚基家族蛋白,共重复了34次(Table 1)。在很多文献中提到,由于该蛋白的表达丰度很高,很可能是一个假阳性蛋白。但本次实验中我们对cDNA文库进行了有效的均一化,因此怀疑该蛋白是否与镁离子螯合酶有真正的相互作用。为验证这一假设,我们用GST-Pull Down实验进一步验证了它与D亚基的相互作用。同时83号克隆(编码叶绿体翻译延伸因子)、ct27号克隆(叶绿体RNA聚合酶beta亚基,由叶绿体基因编码)也都经验证表明与D亚基有相互作用。

利用软件进行序列分析,表明1、ct24和302号克隆编码的3个叶绿体蛋白都具有ATPase活性,属于P-loop NTPase蛋白超家族,而镁离子螯合酶D亚基也属于这个蛋白超家族,该家族中的成员一般会与其他成员或者自己本身形成聚合物来行使功能。因此这3个蛋白与D亚基至少在结构上有相互作用。

综上所述,镁离子螯合酶D亚基除了参与镁离子的螯合反应外,还具有许多其它功能。通过酵母双杂交和GST-pull down实验我们发现了与D亚基相互作用的一系列蛋白,包括:1) 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶小亚基,该酶是一个双功能酶,在CO<sub>2</sub>浓度高的环境中,RuBP进行羧化反应,起羧化酶的作用,形成磷酸甘油酸进行碳的固定,参与光合作用。在O<sub>2</sub>浓度高的环境中,RuBP进行氧化反应,起加氧酶的作用,形成磷酸乙醇酸和磷酸甘油酸,参与光呼吸作用。因此推测镁离子螯合酶D亚基可能通过与1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶小亚基相互作用来调节植物中的C代谢;2) 叶绿体基因编码的RNA聚合酶β亚基,该RNA聚合酶由4个亚基α、β、β'和β''装配成核心酶,当细胞核编码的sigma因子参与形成全酶后识别相关的启动子来启动转录,该酶主要是负责转录与光合作用有关的基因,因此推测镁离子螯合酶D亚基可能通过与该酶的β亚基相互作用来调节光合作用有关的基因转录,从而调节这些基因的表达量;3) 细胞核编码的叶绿体翻译延伸因子,该蛋白在叶绿体基因的翻译过程中对翻译的延伸过程起调控作用,因此推测D亚基可能通过与叶绿体基因编码的RNA聚合酶和细胞核编码的叶绿体翻译延伸因子共同作用,从而调控叶绿体基因的表达。这些都将成为镁离子螯合酶D亚基的新功能研究提供很好的线索。

### 参考文献(References)

- [1] Papenbrock J, Gräfe S, Kruse E, et al. Mg-chelatase of tobacco: identification of a ChLD cDNA sequence encoding a third subunit, analysis of the interaction of the three subunits with the yeast two-hybrid system, and reconstitution of the enzyme activity by co-expression of recombinant CHL D, CHL H and CHL I[J]. *Plant J*, 1997, 12(5): 981-990
- [2] Guo R, Luo M, Weinstein J D. Magnesium-chelatase from developing pea leaves[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 605-615
- [3] Gräfe S, Saluz H P, Grimm B, et al. Mg-chelatase of tobacco: The role of the subunit CHL D in the chelation step of protoporphyrin IX [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(5): 1941-1946
- [4] Luo M, Weinstein J D, Walker C J. Magnesium chelatase subunit D from pea: characterization of the cDNA, heterologous expression of an enzymatically active protein and immunoassay of the native protein[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(6): 721-731
- [5] Wallsgrove R M, Turner J C, Hall N P, et al. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetases. Biochemical and genetic analysis [J]. *Plant Physiol*, 1987, 83(1): 155-158



- [ 6 ] Gillham N W , Boynton J E , Hauser C R. Translational regulation of gene expression in chloroplasts and mitochondria [J]. *Annu Rev Genet* , 1994 , **28**: 71-93
- [ 7 ] Willows R D , Gibson L C D , Kanangara C G , *et al.* Three separate proteins constitute the magnesium chelatase of *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Eur J Biochem* , 1996 , **235** ( 1-2 ) : 438-443
- [ 8 ] Jensen P E , Gibson L C D , Henningsen K W , *et al.* Expression of the chlI , chlD , and chlH genes from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 in *Escherichia coli* and demonstration that the three cognate proteins are required for magnesium-protoporphyrin chelatase activity [J]. *J Biol Chem* , 1996 , **271** ( 28 ) : 16662-16667
- [ 9 ] Lam H M , Coschigano K , Schultz C , *et al.* Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis [J]. *Plant Cell* , 1995 , **7** ( 7 ) : 887-898
- [ 10 ] Wilde A , Mikolajczyk S , Alawady A , *et al.* The gun4 gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism [J]. *FEBS Lett* , 2004 , **571** ( 1-3 ) : 119-123
- [ 11 ] Tanaka R , Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Biol* , 2007 , **58**: 321-346
- [ 12 ] Ikegami A , Yoshimura N , Motohashi K , *et al.* The CHLI1 subunit of Arabidopsis thaliana magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin [J]. *J Biol Chem* , 2007 , **282** ( 27 ) : 19282-19291
- [ 13 ] Kozaki A , Takeba G. Photorespiration protects C3 plant from photooxidation [J]. *Nature* , 1996 , **384** ( 6609 ) : 557-560
- [ 14 ] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen's and dissipation of excess photons [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* , 1999 , **50**: 601-639
- [ 15 ] Hoshida H , Tanaka Y , Hibino T , *et al.* Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase [J]. *Plant Mol Biol* , 2000 , **43** ( 1 ) : 103-111
- [ 16 ] Fodje M N , Hansson A , Hansson M , *et al.* Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase [J]. *J Mol Biol* , 2001 , **311** ( 1 ) : 111-122
- [ 17 ] Hausler R E , Blackwell R D , Lea P J , *et al.* Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase [J]. *Planta* , 1994 , **194** ( 3 ) : 406-417
- [ 18 ] Jensen P E , Willows R D , Petersen B L , *et al.* Structural genes for Mg-chelatase subunits in barley: Xanth a-f , g and h [J]. *Mol Gen Genet* , 2001 , **250** ( 4 ) : 383-394
- [ 19 ] Lam H M , Peng S S Y , Coruzzi G M. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in Arabidopsis thaliana [J]. *Plant Physiol* , 1994 , **106** ( 4 ) : 1347-1357
- [ 20 ] Mochizuki N , Brusslan J A , Larkin R , *et al.* Arabidopsis genomes uncoupled 5 ( GUN5 ) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2001 , **98** ( 4 ) : 2053-2058
- [ 21 ] Shen Y Y , Wang X F , Wu F Q , *et al.* The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor [J]. *Nature* , 2006 , **443** ( 7113 ) : 823-826
- [ 22 ] Zhang H , Li J , Yoo J H , *et al.* Rice Chlorina-4 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase , a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development [J]. *Plant Mol Biol* , 2007 , **62** ( 3 ) : 325-337
- [ 23 ] Beyer A. Sequence analysis of the AAA protein family [J]. *Protein Sci* , 1997 , **6** ( 10 ) : 2043-2058