

# 橡胶树膜系统酵母双杂交 cDNA 文库构建及 HbSRPP7 互作蛋白筛选

聂智毅, 康桂娟, 覃怀德, 曾日中\*

中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101

**摘要:** 橡胶树橡胶粒子上的蛋白质在橡胶生物合成一系列反应过程中起着关键作用, 它们直接决定着橡胶烃分子的数量和大小, 影响天然橡胶的产量和质量。小橡胶粒子蛋白 (small rubber particle protein, SRPP) 是丰度仅次于橡胶延伸因子 (rubber elongation factor, REF) 的橡胶粒子蛋白组分, 与橡胶粒子发育和橡胶生物合成密切相关。目前已知橡胶粒子上存在多种 SRPP 家族蛋白, 但大部分成员的功能尚不清楚。SRPP 可能通过与其他橡胶粒子蛋白相互作用发挥功能。为了筛选 SRPP 蛋白家族成员之一 HbSRPP7 的互作蛋白, 本研究利用位点特异性重组技术构建了原始库容为  $1.5 \times 10^7$  CFU 的均一化橡胶树胶乳膜蛋白酵母双杂交系统 (membrane yeast two-hybrid system, MYTH) cDNA 文库, 该文库插入片段平均长度大于 1500 bp, 重组率约为 100%。构建了用于 MYTH 系统筛选 HbSRPP7 互作蛋白的 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 诱饵载体并确认其能在 NMY32 酵母菌株中正确表达, 无自激活活性。使用 pBT3STE-SRPP7 诱饵质粒对胶乳 MYTH cDNA 文库进行筛选, 获得 21 个 HbSRPP7 候选互作的蛋白, 包括 3 个 REF 家族蛋白 (HbREF1、HbREF3 和 HbREF8)、2 个 SRPP 家族蛋白 (HbSRPP1、HbSRPP2)、2 个活性氧清除相关蛋白 (thioredoxin H-type-like、L-ascorbate peroxidase 2) 以及 5 个胁迫相关蛋白 (high mobility group B protein 2-like、RPM1-interacting protein 4-like、stress-related protein-like、salt stress-induced hydrophobic peptide ES13-like 和 F-box/kelch-repeat protein)。结果显示 HbSRPP7 除了可能通过与橡胶生物合成相关的橡胶粒子蛋白互作参与橡胶生物合成, 也可能通过与生物和非生物逆境胁迫相关蛋白互作, 响应橡胶树乳管生物和非生物逆境胁迫系统信号, 参与橡胶粒子上的橡胶生物合成调控。该研究结果有助于了解 SRPP 家族蛋白的功能, 为揭示橡胶粒子上参与橡胶生物合成的蛋白复合体组成, 阐明橡胶生物合成及其调控的分子机制奠定基础。

**关键词:** 橡胶树; HbSRPP7; 膜蛋白酵母双杂交系统; cDNA 文库; 互作蛋白

中图分类号: S435.661 文献标识码: A

## Construction of a Normalized *Hevea brasiliensis* Latex MYTH cDNA Library and Screening of HbSRPP7 Interacting Proteins

NIE Zhiyi, KANG Guijuan, QIN Huaide, ZENG Rizhong\*

Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** The proteins on rubber particles of *Hevea brasiliensis* play key roles in a series of reactions of rubber biosynthesis. They directly determine the number and size of rubber molecules, thus affecting the yield and quality of natural rubber. Small rubber particle protein (SRPP) is the second highest abundance protein in rubber particles following after the rubber elongation factor (REF), which is closely related to rubber particle development and rubber biosynthesis. At present, it is known that there are many SRPP family proteins on rubber particles, but the functions of most

收稿日期 2022-09-08; 修回日期 2022-09-30

基金项目 海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (No. 2019RC328); 国家自然科学基金项目 (No. 31770642)。

作者简介 聂智毅 (1978—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 橡胶生物合成及质量调控。\*通信作者 (Corresponding author): 曾日中 (ZENG Rizhong), E-mail: hnzrz@aliyun.com。

SRPP family proteins have not been identified. SRPP may function by interacting with other rubber particle proteins. To screen the interaction protein of HbSRPP7, a normalized *H. brasiliensis* latex cDNA library was constructed based on the membrane yeast two-hybrid (MYTH) system. The capacity of the cDNA library was  $1.5 \times 10^7$  CFU, the average library recombination rate was about 100%, and the average amplification sizes of insert fragments in the cDNA library were above 1500 bp. The pBT3STE-SRPP7 and pBT3SUC-SRPP7 bait vectors were constructed and confirmed that they could be correctly expressed in the NMY32 yeast strain without self-activating activity. The latex MYTH cDNA library was screened using the bait plasmid pBT3STE-SRPP7, and 21 candidate proteins of HbSRPP7 were obtained, including three REF family proteins (HbREF1, HbREF3, and HbREF8), two SRPP family proteins (HbSRPP1 and HbSRPP2), two reactive oxygen species scavenging-related proteins (thioredoxin H-type-like and L-ascorbate peroxidase 2), and five stress-related proteins (high mobility group B protein 2-like, RPM1-interacting protein 4-like, stress-related protein-like, salt stress-induced hydrophobic peptide ESI3-like and F-box/kelch-repeat protein). It is shown that HbSRPP7 may participate in rubber biosynthesis through interaction with the rubber particle proteins related to rubber biosynthesis. In addition, HbSRPP7 may also participate in the regulation of rubber biosynthesis on rubber particles by interacting with biotic and abiotic stress-related proteins and responding to biotic and abiotic stress signals in laticiferous cells of *H. brasiliensis*. The research results are helpful to understand the function of SRPP family proteins and lay a foundation for revealing the composition of protein complexes involved in rubber biosynthesis on rubber particles and elucidating the molecular mechanism of rubber biosynthesis and its regulation.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; HbSRPP7; membrane yeast two-hybrid system; cDNA library; interacting protein

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.001

天然橡胶（顺式-聚异戊二烯，橡胶烃）作为重要的工业原料和战略物资广泛应用于人们的日常生活、交通运输、军事装备及航空航天等领域，在我国经济和国防建设中具有重要的战略地位。天然橡胶产业是一种典型的资源约束型产业，在生产地域和产品性能上具有不可替代性。天然橡胶主要来源于巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis* Muell. Arg., 简称橡胶树）乳管细胞细胞质中的橡胶粒子<sup>[1]</sup>。橡胶粒子是橡胶树乳管细胞中的一种特殊细胞器，作为橡胶树乳管细胞细胞质的主要成分，其体积约占胶乳总体积的 30%~45%，是橡胶生物合成及其产物最终贮藏的场所<sup>[2]</sup>。橡胶生物合成的整个过程涉及乳管细胞产胶代谢的一系列生化反应，其中发生在橡胶粒子上橡胶分子的起始、延长和终止是橡胶生物合成的关键步骤。橡胶粒子上的蛋白质（酶）在这一系列反应过程中起着关键作用，它们直接决定着橡胶烃分子的数量和大小，从而影响着天然橡胶的产量和质量。深入研究橡胶粒子蛋白的功能，分析其与橡胶生物合成之间的关系，对揭示橡胶生物合成及其分子调控机制具有重要意义。DAI 等<sup>[3]</sup>提取洗涤过的橡胶粒子蛋白并采用“Shotgun（鸟枪法）”质谱分析，鉴别了 186 个橡胶粒子蛋白，其中已知参与橡胶生物合成的橡胶粒子蛋白主要有 3 种，分别是橡胶延伸因子（rubber elongation factor, REF）、小橡胶粒子蛋白（small rubber particle

protein, SRPP）和顺式-异戊烯基转移酶（cis-prenyltransferase, CPT）。除此之外，橡胶粒子上存在调控橡胶生物合成的焦磷酸酶<sup>[4]</sup>以及其他功能未知的蛋白<sup>[3]</sup>。REF、SRPP 及 CPT 等蛋白可能通过相互作用，形成蛋白复合体<sup>[5-8]</sup>，在橡胶粒子上催化 800~20 000 个 IPP 分子中的异戊二烯基顺式聚合，形成多聚顺式异戊二烯（即天然橡胶分子），但这些橡胶粒子蛋白的具体功能及作用机制仍有待更深入研究<sup>[9]</sup>。SRPP 是丰度仅次于 REF 的橡胶粒子蛋白组分，与橡胶粒子发育和橡胶生物合成密切相关<sup>[10-11]</sup>。DAI 等<sup>[3]</sup>研究表明，橡胶粒子上存在多个 SRPP 蛋白，但大部分成员的功能尚未鉴定。进一步鉴定橡胶粒子上 SRPP 家族其他成员的相互作用蛋白，有助于揭示橡胶粒子上参与橡胶生物合成的蛋白复合体组成，阐明橡胶生物合成及其调控的分子机制。HbSRPP7（GenBank 登录号：XM\_021791298.1）是一个在橡胶生物合成活跃度相对较低的大橡胶粒子上表达量较小橡胶粒子高的橡胶粒子蛋白，可能与大、小橡胶粒子的橡胶生物合成活性差异相关<sup>[12]</sup>，但其功能及其参与橡胶生物合成的机制需要进一步深入研究。本研究利用位点特异性重组技术构建高质量膜蛋白酵母双杂交系统（membrane yeast two-hybrid system, MYTH）cDNA 文库，使用 DUALmembrane system 构建 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 诱饵载体并进行自激活及表达

功能检测。以 pBT3STE-SRPP7 诱饵质粒对胶乳 MYTH cDNA 文库进行筛选, 获得 21 个可能与 HbSRPP7 互作的蛋白, 为了解 HbSRPP7 的功能及其功能发挥的机制, 阐明橡胶生物合成的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以 2000 年定植于海南省儋州市宝岛新村的热研 7-33-97 品系橡胶树胶乳为材料。多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司, Oligotex mRNA Kits 购自 Qiagen 公司, SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit 购自 Invitrogen 公司, Trimmer-2 cDNA normalization kit 购自 Evrogen 公司, 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA Ligase 和 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, DNA 凝胶回收和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司, ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 及 Phanta EVO HS Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, DUALmembrane starter kit 购自 Dualsystems Biotech 公司, 酵母缺陷培养基、酵母转化试剂盒购自 Clontech 公司, DH5 $\alpha$  大肠杆菌为本实验室保存, 其余生化试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。引物合成及测序委托英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 橡胶树胶乳 RNA 提取和 cDNA 合成 根据多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取橡胶树胶乳总 RNA, 以分光光度计测定 RNA 纯度及浓度并参照 Oligotex mRNA Kits 说明书分离纯化 mRNA。参照 SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链以及第二链, -20 °C 保存备用。

1.2.2 橡胶树胶乳 MYTH 系统 cDNA 文库制备及质量检测 (1) cDNA 的均一化处理。将合成的 34  $\mu$ L cDNA 第二链加入以下反应体系: 10 $\times$ T<sub>4</sub> Ligase buffer 5  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 5'Adapter (序列为 5'-GCAGAGTGGCCATTACGGCCACAACCTTG TACAAAAAAGTTGG-3') 10  $\mu$ L, 40 U/ $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA Ligase 1  $\mu$ L, 混匀后于 16 °C 放置 16 h。加入 10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, T<sub>4</sub> DNA Polymerase 2  $\mu$ L, 16 °C 放置 20 min, 反应结束后经 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 并用 14  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀物,

取其中 12  $\mu$ L 参照 Trimmer-2 cDNA normalization kit 说明书进行均一化处理, 切胶回收 1000 bp 以上片段, 溶解于 14  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中。

(2) cDNA 文库制备。按照 DUALmembrane starter kit 以及 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 说明书, 使用位点特异性重组的方式, 将 14  $\mu$ L 均一化 cDNA 与 6  $\mu$ L 线性化的 MYTH 系统载体 pPR3-N 加入 50  $\mu$ L 2 $\times$ ClonExpress Mix, 30  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 置于 50 °C 反应 30 min。反应结束后加入 10  $\mu$ L 10  $\mu$ g/ $\mu$ L 的 Proteinase K 灭活重组酶。并依次加入 90  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、20  $\mu$ g/ $\mu$ L Glycogen 2  $\mu$ L、7.5 mol/L NH<sub>4</sub>OAc 100  $\mu$ L、无水乙醇 750  $\mu$ L, 混合均匀并置于 -80 °C 2 h。于 4 °C, 16 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 加入 150  $\mu$ L 70%乙醇; 4 °C, 16 000 r/min 离心 3 min; 重复此步骤 1 次, 小心去除上清, 室温晾干 10 min。用 10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 置冰上重悬沉淀。重组产物每 2.5  $\mu$ L 电转化 50  $\mu$ L 大肠杆菌感受态细胞, 电击后迅速向电转杯中加入 LB 培养基 1 mL, 合并 4 次转化后的菌液, 用培养基补足至 5 mL, 置于 37 °C, 以 250 r/min 震荡培养 2 h 后, 取 2  $\mu$ L 培养物梯度稀释 10、100、1000、10 000 倍, 其余培养物加入甘油至终浓度 20%保存于 -80 °C 备用。

(3) cDNA 文库质量检测。取转化后的大肠杆菌梯度稀释液 10  $\mu$ L 涂布于氨苄抗性 (100  $\mu$ g/mL) LB 平板, 培养 16 h 后计数。CFU/mL=平板上的克隆数/10 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 1000, 文库总 CFU=CFU/mL $\times$ 文库菌液总体积 (mL)。以无菌枪尖从原始文库滴度测定平板上随机挑取菌斑克隆, 利用 3'AD (5'-CTCGAGAGGCCGAGGCGGCC-3') 和 5'AD (5'-GCAGAGTGGCCATTACGGCC-3') 引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序为: 95 °C 预扩增 5 min; 然后 94 °C 30 s, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增结束后以 1%琼脂糖凝胶电泳检测文库插入片段大小。

(4) cDNA 文库的扩增与文库质粒提取。将上步检验合格的原始 cDNA 文库, 根据其库容量, 以每个涂布约 3 万个克隆的密度铺板培养于 35 cm 氨苄抗性 (100  $\mu$ g/mL) LB 培养基平板, 37 °C 培养 16 h, 培养完成后以 LB 液体培养基洗脱菌斑克隆, 以质粒大抽试剂盒抽提质粒, -80 °C 保存备用。

1.2.3 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 诱饵载体构建、自激活检测及功能检测 根据 *HbSRPP7*

的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列以及 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 说明书设计包含 *Sfi* I 酶切位点引物 (SRPP7-F: 5'-GG-ATCTTCCAGAGATGGCCATTACGGCCATGGA GATGGAGAAGAAGAACCC-3', SRPP7-R: 5'-C-TGCCGTTTCGACGATGGCGCCTCGGCCCCATC CGAATCTGATGAATCATGTGC-3'), 用于扩增 *HbSRPP7* 的 ORF 片段。PCR 反应体系: Phanta EVO HS Super-Fidelity DNA Polymerase 1  $\mu$ L、稀释 50 倍的橡胶树胶乳第一链 cDNA 2  $\mu$ L、5 $\times$ EVO Buffe 10  $\mu$ L、10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 的 SRPP7-F 及 SRPP7-R 引物各 1  $\mu$ L, 以 ddH<sub>2</sub>O 补至体积 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序为 95  $^{\circ}$ C 预扩增 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增结束后以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 切胶回收扩增条带, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

利用 *Sfi* I 限制性内切酶酶切诱饵载体质粒 pBT3STE 和 pBT3SUC, 切胶回收线性化载体片段, 根据 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒说明书将 *HbSRPP7* 的 ORF 片段克隆至 pBT3STE 和 pBT3SUC 载体的 *Sfi* I 位点中, 然后将重组后的质粒转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。涂布于含卡那霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h。挑取单菌落至 LB 液体培养基培养 16 h 并提取质粒, 以 *Sfi* I 酶切鉴定为阳性的克隆送测序。根据测序结果将无移码无碱基突变的重组质粒分别命名为 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7。参照 DUALmembrane starter kit 试剂盒说明书, 将各种质粒组合 (表 1) 转入受体菌 NMY32 中, 培养 4 d, 记录每块筛选平板上的克隆数量, 并计算其相对生长率, 对构建的诱饵载体进行自激活检测及表达功能检测。

表 1 自激活及表达功能检测所用质粒

反应 Reaction	猎物质粒 Prey plasmid	诱饵质粒 Bait plasmid	用途 Purpose
1	pNubG-Fe65	pTSU2-APP	阳性对照
2	pPR3N	pTSU2-APP	阴性对照
3	pPR3N	pBT3STE-SRPP7	自激活检测
4	pPR3N	pBT3SUC-SRPP7	自激活检测
5	pOST1-NubI	pBT3STE-SRPP7	功能检测
6	pOST1-NubI	pBT3SUC-SRPP7	功能检测

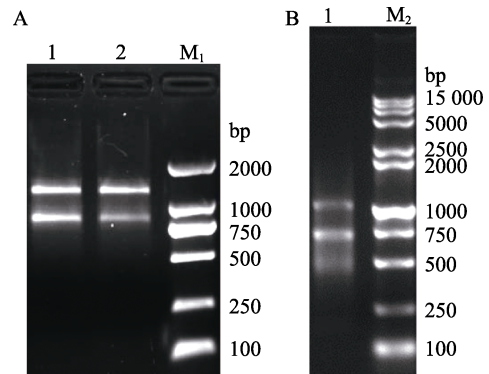
1.2.4 *HbSRPP7* 互作蛋白筛选及回转验证 使用 pBT3STE-SRPP7 诱饵载体参照 DUALmembrane

starter kit 试剂盒说明书进行互作蛋白筛选及回转验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

本研究提取的橡胶树胶乳总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 2.10, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 为 1.88, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1A 所示, 呈现 2 条相对集中的亮带, 带型完整, 边缘清晰, 说明 RNA 样品的完整性好。分离的 mRNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶 (图 1B) 电泳显示呈弥散状分布, 条带分布均匀, 紫外分光光度测定总量为 6.5  $\mu$ g, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.91, 表明分离的 mRNA 总量及纯度满足建库要求。取 5  $\mu$ g mRNA 合成 cDNA 第二链, 进行均一化处理后直接用于 cDNA 文库的制备。



M<sub>1</sub>: RL2000 RNA marker; M<sub>2</sub>: DL15 000 DNA marker.

图 1 橡胶树胶乳总 RNA (A) 和 mRNA (B) 电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and mRNA (B) isolation from latex of *H. brasiliensis*

### 2.2 cDNA 文库制备、质量检测及质粒提取

构建的重组产物经电击转化大肠杆菌, 稀释 100 倍细菌培养物的 LB 平板共长了约 266 个克隆子, 稀释 1000 倍的 LB 平板共长了约 32 个克隆子, 稀释 1000 倍的 LB 平板共长了 3 个克隆子 (图 2), 经计算其原始 cDNA 文库的滴度约为  $3.0 \times 10^6$  CFU/mL, 总库容为  $1.5 \times 10^7$  CFU, 符合筛库要求。通过 PCR 鉴定制备的 cDNA 文库插入片段多数介于 1000~4000 bp 之间 (图 3), 平均插入片段长度约为 1500 bp, 重组率为 100%。将上述经检测的 cDNA 文库涂布于 500 个 35 cm LB 平板, 经培养、洗脱及质粒提取后获得库容大于  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/mL 的文库质粒, 用于下一步的筛库实验。

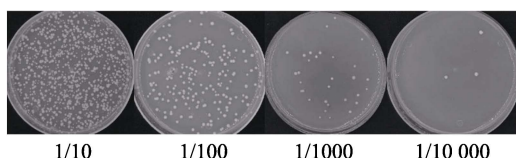
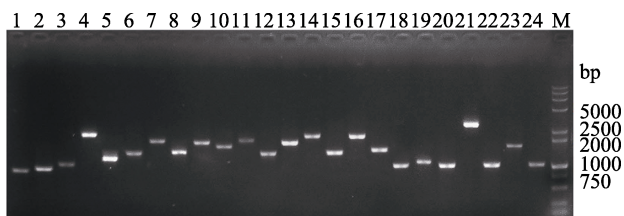


图 2 cDNA 文库库容鉴定

Fig. 2 Identification of capacity of cDNA library



M: DL15 000 DNA marker; 1~24: 随机挑选原始文库菌落 PCR 扩增结果。

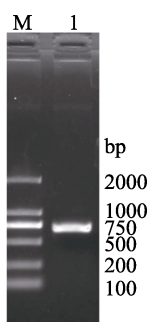
M: DL15 000 DNA maker; 1~24: PCR amplification results of randomly selected original library colonies.

图 3 PCR 鉴定 cDNA 文库插入片段大小与重组率检测电泳图

Fig. 3 Recombination rate and PCR identification of inserted fragment of cDNA library

### 2.3 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 诱饵载体的构建

琼脂糖电泳检测显示, PCR 扩增 HbSRPP7 的 ORF 片段大小正确(图 4), 构建的诱饵载体经内切酶检测与预计相符(图 5)。测序结果显示, 目的片段正确插入 pBT3STE 及 pBT3SUC 载体的 *Sfi* I 位点中, 且序列无移码及碱基突变现象, 说明诱饵载体 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 构建成功。



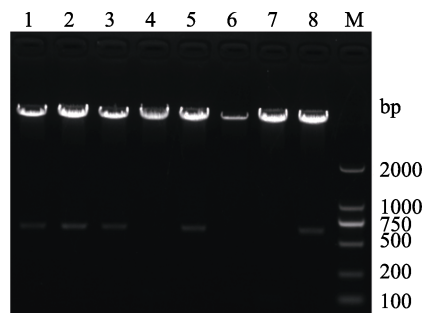
M: DL2000 DNA marker.

图 4 HbSRPP7 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of PCR amplification products of HbSRPP7

### 2.4 诱饵载体的自激活检测及功能检测

自激活及功能检测结果显示(表 2), 阳性对照(反应 1)在 SD/-Trp/-Leu (SD-TL)、SD/-Trp/-Leu/-His (SD-TLH) 及 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (SD-TLHA) 筛选平板上生长旺盛, 阴性对照(反应 2)在 SD-TL 筛选平板上生长正常, 在 SD-TLH



1~4: 诱饵载体 pBT3STE-SRPP7 的酶切分析; 5~8: 诱饵载体 pBT3SUC-SRPP7 的酶切分析; M: DL2000 DNA marker。

1-4: Restriction analysis of bait vector pBT3STE-SRPP7; 5-8: Restriction analysis of bait vector pBT3SUC-SRPP7; M: DL2000 DNA marker.

图 5 诱饵载体的 *Sfi* I 内切酶酶切分析电泳图

Fig. 5 Identification of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion

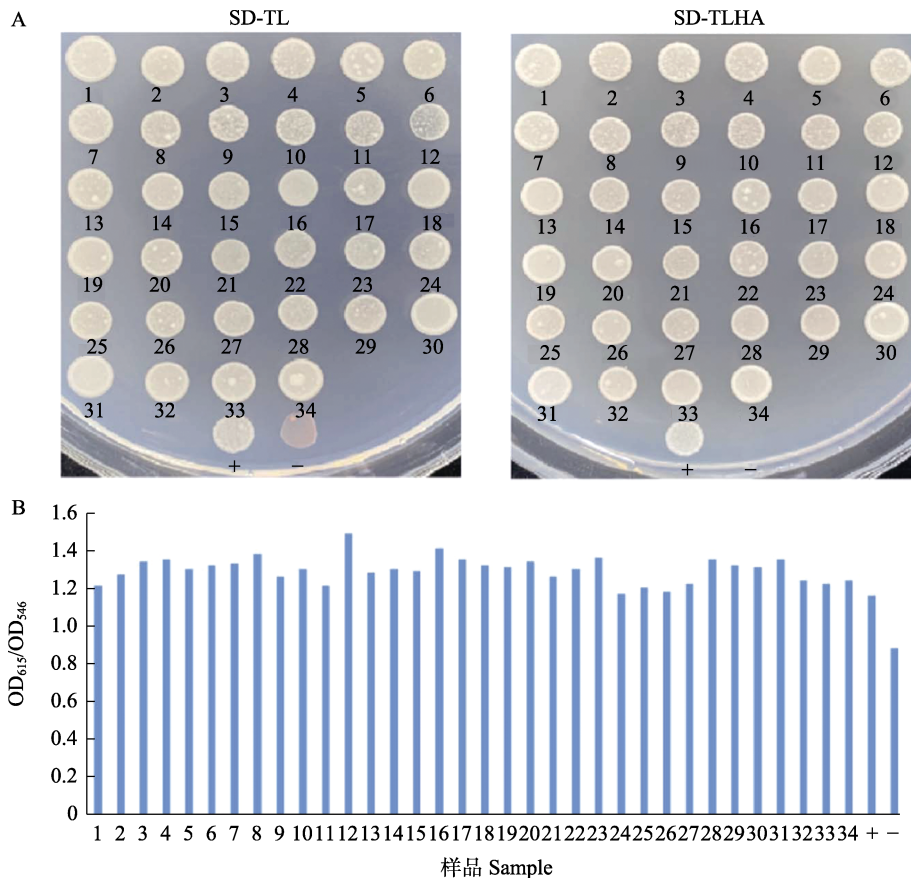
和 SD-TLHA 筛选平板上无生长, 与预计相符合, 说明实验体系对照成立。而自激活检测的反应 3 和反应 4 在 SD-TL 筛选平板上生长正常, 在 SD-TLH 和 SD-TLHA 筛选平板上无生长, 说明 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 诱饵载体对 NMY32 酵母无自激活活性。功能检测的反应 5 和反应 6 在 SD-TLH 和 SD-TLHA 筛选平板上有生长, 相对于 SD-TL 筛选平板生长率在 35%~61% 之间, 显示 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 均可在酵母中正常表达, 皆可应用于下一步的筛库实验, pBT3STE-SRPP7 的相对生长率(60.7% 和 44.3%) 较 pBT3SUC-SRPP7 (58.5% 和 35.8%) 高, 说明 pBT3STE-SRPP7 诱饵载体表达功能相对更强, 因此后续筛库实验选用 pBT3 STE-SRPP7 诱饵载体进行。

### 2.5 HbSRPP7 的互作蛋白筛选及回转验证

文库筛选共获得 34 个可激活 ADE2 和 HIS3 报告基因的初始阳性克隆(图 6A)。*LacZ* 报告基因激活检测显示这 34 个初始阳性克隆的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性 ( $OD_{615}/OD_{546}$ ) 值皆大于阴性对照值(图 6B), 表明这些初始阳性克隆均是与 HbSR-PP7 存在相互作用的阳性克隆。初始阳性克隆的质粒 DNA 经测序及 Blastn 比对, 结果显示这 34 个阳性克隆包含 21 种不同编码的基因(表 3)。进一步的回转验证结果显示, 全部阳性克隆均能通过对 ADE2 和 HIS3 报告基因激活的回转验证, 但其中 2、3、8、12、23、26、29 和 30 号阳性克隆生长较弱(图 7A)且  $\beta$ -半乳糖苷酶活性值较低(图 7B), 表明这些克隆所包含的相关蛋白与 HbSRPP7 间存在的蛋白相互作用可能比较弱。

表 2 诱饵载体的自激活检测及表达功能检测结果  
Tab. 2 Results of self-activation and functional assay of bait vectors

反应 Reaction	1	2	3	4	5	6
SD-TL 平板菌落数量	1032	520	2832	2528	3976	4240
SD-TLH 平板菌落数量	816	0	0	0	2416	2480
SD-TLH/SD-TL 增长率/%	79.1	0	0	0	60.7	58.5
SD-TLHA 平板菌落数量	952	0	0	0	1 760	1520
SD-TLHA/SD-TL 增长率/%	92.2	0	0	0	44.3	35.8
备注	阳性对照正常	阴性对照正常	pBT3STE-SRPP7 无自激活	pBT3SUC-SRPP7 无自激活	pBT3STE-SRPP7 在 NMY32 中有功能	pBT3SUC-SRPP7 在 NMY32 中有功能



A: ADE2 和 HIS3 报告基因的激活检测; B:  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测。  
A: Activation detection of HIS3 and ADE2 reporter genes; B: Detection of  $\beta$ -Galactosidase activity.

图 6 初始阳性克隆的验证检测

Fig. 6 Validation detection of initial positive clones

### 3 讨论

酵母双杂交技术是目前最经典的蛋白间相互作用研究方法,具有简单高效的特点<sup>[13]</sup>。但传统的酵母双杂交系统仅限于相互作用发生于细胞核中的 2 个或者几个可溶性蛋白的互作分析,并不能对相互作用发生在细胞质中的膜蛋白或可溶蛋白进行研究。MYTH 系统是传统酵母双杂交系统

的一种替代方法,无需核定位信号,主要依赖泛素降解途径作为蛋白质相互作用“感应器”,对膜蛋白与膜蛋白、膜蛋白与可溶性蛋白之间相互作用进行研究<sup>[14-16]</sup>,并且可以检测 3 个蛋白之间“桥接”的相互作用<sup>[7]</sup>。此外,因为检测的诱饵和猎物蛋白之间相互作用发生在细胞质或细胞膜,所以可以与传统酵母双杂交系统相互补充,分析更

表 3 HbSRPP7 的候选互作蛋白信息

Tab. 3 Information on candidate interacting proteins of HbSRPP7

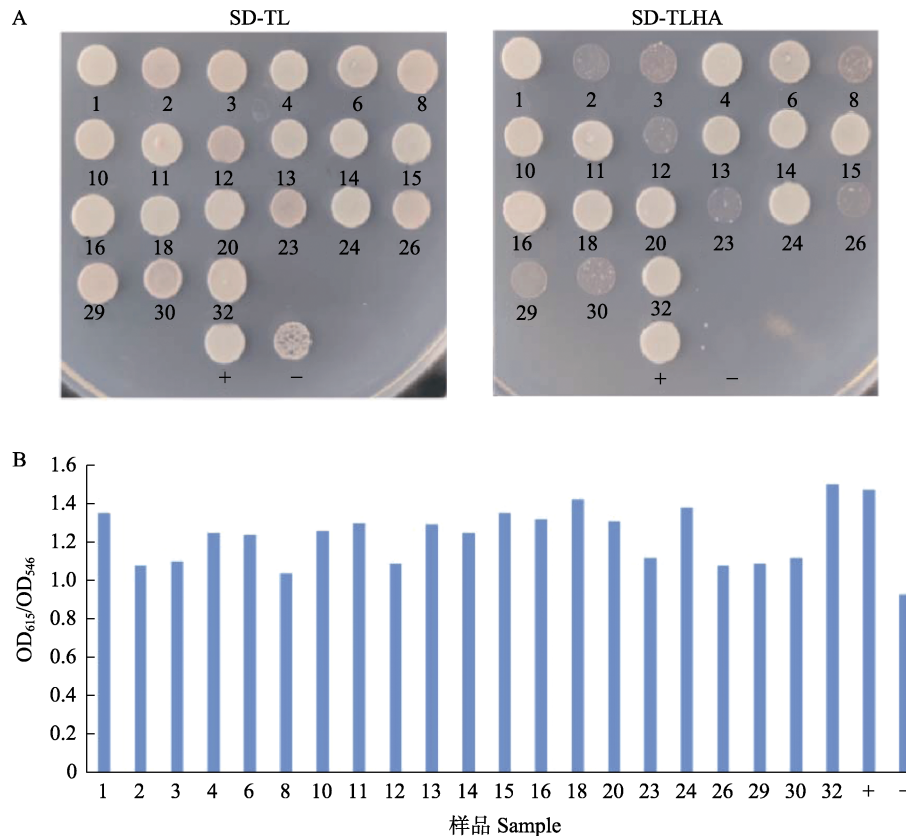
编号 Code	登录号 Accession No.	注释 Annotation
1	AY430052.2	<i>Hevea brasiliensis</i> clone A531 rubber elongation factor (REF) mRNA, complete cds
2	XM_021799387.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> 60S ribosomal protein L7a-1-like (LOC110646071), mRNA
3	XM_021782629.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic (LOC110633839), mRNA
4, 5, 7, 9, 17, 22, 31	XM_021796622.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> hydrophobic protein RC12B (LOC110644023), mRNA
6, 21, 25	XM_021797893.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> stress-related protein-like (LOC110644921), mRNA
8	XM_021819334.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> annexin-like protein RJ4 (LOC110660891), mRNA
10, 34	XM_021797910.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> rubber elongation factor protein (LOC110644928), mRNA
11, 27	XM_021788383.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> salt stress-induced hydrophobic peptide ES13-like (LOC110637996), mRNA
12	XM_021791460.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> F-box/kelch-repeat protein At1g57790-like (LOC110640229), transcript variant X2, mRNA
13	XM_021822088.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> high mobility group B protein 2-like (LOC110662920), mRNA
14	XM_021818014.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> acyl carrier protein 2, mitochondrial-like (LOC110659925), mRNA
15, 19	XM_021811228.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> selenoprotein K-like (LOC110655047), mRNA
16	XM_021781239.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> auxin-repressed 12.5 kDa protein-like (LOC110632873), mRNA
18	XM_021797905.1	<i>Hevea brasiliensis</i> small rubber particle protein (LOC110644925), transcript variant X1, mRNA
20, 28	XM_021780980.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> thioredoxin H-type-like (LOC110632666), mRNA
23	XM_021799813.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> ras-related protein Rab7-like (LOC110646394), mRNA
24	XM_021797904.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> rubber elongation factor protein-like (LOC110644923), transcript variant X5, mRNA
26	XM_021827556.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> uncharacterized LOC110666903 (LOC110666903), mRNA
29	XM_021801122.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> RPM1-interacting protein 4-like (LOC110647343), mRNA
30	XM_021781656.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> wound-induced basic protein (LOC110633149), mRNA
32	XM_021806494.1	PREDICTED: <i>Hevea brasiliensis</i> REF/SRPP-like protein At3g05500 (LOC110651232), mRNA
33	无对比结果	

多的互作目标蛋白<sup>[17-19]</sup>。橡胶生物合成发生于乳管细胞中的橡胶粒子表面<sup>[20-21]</sup>。SRPP 家族蛋白是主要存在于橡胶粒子上的高丰度蛋白质之一<sup>[22]</sup>, 其蛋白相互作用并非发生于细胞核中, 使用 MYTH 系统, 可更有效筛选 HbSRPP7 的互作蛋白。

MYTH 系统与传统酵母双杂交系统类似, 均存在假阳性率较高的缺点。诱饵蛋白在宿主酵母菌中的自激活活性是造成筛选结果假阳性的重要原因之一<sup>[23]</sup>。本研究所用 MYTH 系统诱饵蛋白自激活常见的表现是 NMY32 中表达的诱饵 (bait) 融合蛋白和任意猎物 (prey) 载体 (NubG) 结合启动下游的转录<sup>[24]</sup>。需要比对阳性对照或进一步通过竞争抑制剂 3-AT (3-Aminotriazole, 3-氨基三唑) 抑制较为轻微的自激活活性, 降低干扰背景。此外, 诱饵蛋白的正确翻译与定位是本研究所使用 MYTH 系统正常运转的前提。因此为保证后续

利用 MYTH 系统筛选 HbSRPP7 的互作蛋白获得较为可靠结果, 在文库筛选前, 本课题组对诱饵载体的自激活活性以及在酵母中表达的诱饵蛋白功能进行了鉴定。结果显示所构建诱饵载体 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 在 NMY32 酵母中均不存在自激活现象, 排除诱饵蛋白自激活活性对筛选结果的干扰。同时功能检测显示 pBT3STE-SRPP7 和 pBT3SUC-SRPP7 均在 NMY32 酵母中有功能, 确认诱饵蛋白能在 NMY32 酵母中正确表达。

本研究利用表达功能相对更强的 pBT3STE-SRPP7 诱饵载体对构建的 MYTH cDNA 文库进行筛选, 并通过回转验证最终获得 21 个候选的 HbSRPP7 互作蛋白。在这 21 个候选互作蛋白中, 有 3 个 REF 家族蛋白及 2 个 SRPP 家族蛋白。其中 HbREF1 (XM\_021797910.1) 及 HbSRPP1



A: ADE2 和 HIS3 报告基因的激活检测; B:  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测。  
A: Activation detection of HIS3 and ADE2 reporter genes; B: Detection of  $\beta$ -Galactosidase activity.

图 7 阳性克隆的回转验证

Fig. 7 Return test of positive clones

(XM\_021797905.1)已被证实与橡胶粒子发育相关<sup>[11, 21, 25-27]</sup>, 并通过与 CPT 蛋白直接或间接互作参与橡胶生物合成<sup>[7-8]</sup>。显示 HbSRPP7 可能通过与 HbREF1 及 HbSRPP1 等橡胶粒子互作, 在橡胶粒子发育过程中发挥作用, 或者作为橡胶生物合成相关蛋白复合体的组分之一参与橡胶生物合成。此外, HbSRPP7 候选互作蛋白中有 2 个活性氧清除相关蛋白(thioredoxin H-type-like、L-ascorbate peroxidase 2)<sup>[28-29]</sup>和 5 个胁迫相关蛋白(high mobility group B protein 2-like、RPM1-interacting protein 4-like、stress-related protein-like、salt stress-induced hydrophobic peptide ESI3-like、F-box/kelch-repeat protein)<sup>[30-34]</sup>, 表明 HbSRPP7 可能通过蛋白互作参与橡胶树乳管生物和非生物逆境胁迫的响应。橡胶树的胶乳是一种与生物和非生物逆境胁迫的响应关联的保护物质, 割胶可以显著促进胶乳中的橡胶生物合成<sup>[35]</sup>。因此, HbSRPP7 除了可能通过与橡胶生物合成相关的橡胶粒子蛋白互作参与橡胶生物合成, 也可能通过与生物和非生物逆境胁迫相关蛋白互作, 响应

橡胶树乳管细胞生物和非生物逆境胁迫系统信号, 参与橡胶粒子上的橡胶生物合成调控。HbSRPP7 与这些蛋白的相互作用在橡胶粒子上的具体功能尚有待确认, 下一步以免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP)及双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)鉴定互作蛋白, 并通过橡胶体外合成实验及反向遗传学研究手段对 HbSRPP7 及其互作蛋白进行功能研究, 将有助于了解 HbSRPP7 的功能及其功能发挥的机制, 揭示橡胶粒子上参与橡胶生物合成的蛋白复合体组成, 阐明橡胶生物合成及其调控的分子机制。

## 参考文献

- [1] MOOIBROEK H, CORNISH K. Alternative sources of natural rubber[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(4): 355-365.
- [2] SUNTHERN R A. Complex particles in *Hevea latex*[J]. Nature, 1960, 1988(4745): 165-170.
- [3] DAI L J, KANG G J, LI Y, NIE Z Y, DUAN C F, ZENG R

- Z. In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree)[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(1): 155-168.
- [4] ZENG R Z, DUAN C F, LI X Y, TIAN W M, NIE Z Y. Vacuolar-type inorganic pyrophosphatase located on the rubber particle in the latex is an essential enzyme in regulation of the rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Science*, 2009, 176(5): 602-607.
- [5] CORNISH K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthesis rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(2): 182-189.
- [6] KIM I J, RYU S B, KWAK Y S, KANG H. A novel cDNA from *Parthenium argentatum* gray enhances the rubber biosynthetic activity *in vitro*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(396): 377-385.
- [7] YAMASHITA S, YAMAGUCHI H, WAKI T, AOKI Y, MIZUNO M, YANBE F, ISHII T, FUNAKI A, TOZAWA Y, MIYAGI-INOUE Y, FUSHIHARA K, NAKAYAMA T, TAKAHASHI S. Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*[J]. *eLife*, 2016, 5: e19022.
- [8] BROWN D, FEENEY M, AHMADI M, LONOCE C, SAJARI R, DI COLA A, FRIGERIO L. Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(18): 5045-5055.
- [9] MEN X, WANG F, CHEN G Q, ZHANG H B, XIAN M. Biosynthesis of natural rubber: current state and perspectives[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 20(1): 50.
- [10] OH S K, KANG H, SHIN D H, YANG J, CHOW K S, YEANG H Y, WAGNER B, BREITENEDER H, HAN K H. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(24): 17132-17138.
- [11] COLLINS-SILVA J, NURAL A T, SKAGGS A, SCOTT D, HATHWAIK U, WOOLSEY R, SCHEGG K, MCMAHAN C, WHALEN M, CORNISH K, SHINTANI D. Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TksRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism[J]. *Phytochemistry*, 2012, 79: 46-56.
- [12] XIANG Q L, XIA K C, DAI L J, KANG G J, LI Y, NIE Z Y, DUAN C F, ZENG R Z. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasiliensis* using 2D-DIGE[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 60: 207-213.
- [13] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [14] BASHLINE L, GU Y. Using the split-ubiquitin yeast two-hybrid system to test protein-protein interactions of transmembrane proteins[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1242: 143-158.
- [15] MEMISEVIC V, ZAVALJEVSKI N, RAJAGOPALA S V, KWOM K, PIEPER R, DESHAZER D, REIFMAN J, WALLQVIST A. Mining host-pathogen protein interactions to characterize *Burkholderia mallei* infectivity mechanisms[J]. *PLoS Computational Biology*, 2015, 11(3): e1004088.
- [16] MARIK A, NAIYA H, DAS M, MUKHERJEE G, BASU S, SAHA C, CHOWDHURY R, BHATTACHARYA K, SEAL A. Split-ubiquitin yeast two-hybrid interaction reveals a novel interaction between a natural resistance associated macrophage protein and a membrane bound thioredoxin in *Brassica juncea*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 92(4/5): 519-537.
- [17] COX C, MCKENNA J P, WATT A P, COYLE P V. Urea plasma parvum and *Mycoplasma genitalium* are found to be significantly associated with microscopy-confirmed urethritis in a routine genitourinary medicine setting[J]. *International Journal of STD and AIDS*, 2016, 27(10): 861-867.
- [18] INDRIOLO E, GORING D R. Yeast two-hybrid interactions between *Arabidopsis lyrata* S. receptor kinase and the ARC1 E3 ligase[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2016, 11(6): e1188233.
- [19] LI J J, GAO J, HAN L, ZHANG Y J, GUAN W, ZHOU L, YU Y, HAN W. Development of a membrane-anchored ligand and receptor yeast two-hybrid system for ligand-receptor interaction identification[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 35631.
- [20] ARCHER B L, AUDREY B G, COCKBAIN E G, MCSWEENEY G P. Biosynthesis of rubber, incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis* latex fractions[J]. *Biochemical Journal*, 1963, 89(3): 565-574.
- [21] BERTHELOT K, LECOMTE S, ESTEVEZ Y, PERUCH F. *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): an overview on rubber particle proteins[J]. *Biochimie*, 2014, 106(11): 1-9.
- [22] 代龙军, 项秋兰, 黎瑜, 聂智毅, 康桂娟, 段翠芳, 曾日中. 巴西橡胶树橡胶粒子蛋白质的 16-BAC/SDS-PAGE 双向电泳及质谱分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(11): 2328-2338.
- DAI L J, XIANG Q L, LI Y, NIE Z Y, KANG G J, DUAN C

- F, ZENG R Z. Rubber particle protein analysis of *Hevea brasiliensis* by two dimensional 16-BAC/SDS-PAGE and mass spectrometry[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(11): 2328-2338. (in Chinese)
- [23] RUDEN D M, MA J, LI Y, WOOD K, PTASHNE M. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences[J]. *Nature*, 1991, 350(6315): 250-252.
- [24] 赵小兰, 彭昌操. DUALmembrane 系统——一种膜蛋白质互作研究方法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29: 2. ZHAO X L, PENG C C. DUALmembrane System: a technique to study membrane protein interactions[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29: 2. (in Chinese)
- [25] BERTHELOT K, LECOMTE S, ESTEVEZ Y, COULARY-SALIN B, BENTALEB A, CULLIN C, DEFFIEUX A, PERUCH F. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48065.
- [26] YEANG H Y, CHEONG K F, SUNDERASAN E, HAMZAH S, CHEWA N P, HAMID B S, HAMILTON R G, CARDOSA M J. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1996, 98(3): 628-639.
- [27] DENNIS M S, LIGHT D R. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. identification, characterization, and role in rubber biosynthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(31): 18608-18617.
- [28] HUANG D J, CHEN H J, HOU W C, LIN C D, LIN Y H. Active recombinant thioredoxin h protein with antioxidant activities from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam Tainong 57) storage roots[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(15): 4720-4724.
- [29] CAVERZAN A, PASSAIA G, ROSA S B, RIBEIRO C W, LAZZAROTTO F, MARGIS-PINHEIRO M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35: 1011-1019.
- [30] KWAK K J, KIM J Y, KIM Y O, KANG H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing high mobility group B proteins under high salinity, drought or cold stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48(2): 221-231.
- [31] SUN X, GREENWOOD D R, TEMPLETON M D, LIBICH D S, MCGHIE T K, XUE B, YOON M, CUI W, KIRK C A, JONES W T, UVERSKY V N, RIKKERINK E H A. The intrinsically disordered structural platform of the plant defence hub protein RPM 1-interacting protein 4 provides insights into its mode of action in the host-pathogen interface and evolution of the nitrate-induced domain protein family[J]. *The FEBS Journal*, 2014, 281(17): 3955-3979.
- [32] DENG Z, CHEN J S, LECLERCQ J, ZHOU Z Z, LIU C R, LIU H, YANG H, MONTORO P, XIA Z H, LI D J. Expression profiles, characterization and function of HbTCTP in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 789.
- [33] VENLATAACHALAM P, THULASEEDHARAN A, RAGHOTAMA K. Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Planta*, 2007, 226(2): 499-515.
- [34] WANG J, YAO W K, WANG L, MA F L, TONG W H, WANG C, BAO R, JIANG C Y, YANG Y Z, ZHANG J X, XU Y, WANG X P, ZHANG C H, WANG Y J. Overexpression of VpEIFP1, a novel F-box/Kelch-repeat protein from wild Chinese *Vitis pseudoreticulata*, confers higher tolerance to powdery mildew by inducing thioredoxin z proteolysis[J]. *Plant Science*, 2017, 263: 142-155.
- [35] 杨署光, 陈月异, 李言, 张世鑫, 张晓飞, 曾霞, 晁金泉, 田维敏. 天然橡胶生物合成相关基因表达与橡胶产量的相关性[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(3): 475-482. YANG S G, CHEN Y Y, LI Y, ZHANG S X, ZHANG X F, ZENG X, CHAO J Q, TIAN W M. Correlation between the expression level of natural rubber biosynthesis genes and rubber yield[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(3): 475-482. (in Chinese)