

橡胶树酵母双杂交文库构建及 HbTRXy2 互作蛋白筛选

吴 双^{1,2}, 逯锐琳¹, 何其光¹, 袁 坤¹, 胡义钰¹, 王真辉¹, 刘进平², 刘 辉^{1*}

1. 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/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南海口 571101; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘 要: 硫氧还蛋白通过催化硫醇-二硫键交换反应调节靶蛋白的结构和功能, 在维持细胞氧化还原稳态中发挥关键作用。前期研究证实橡胶树 γ 型硫氧还蛋白 HbTRXy2 具有很强的抗氧化功能。为探究 HbTRXy2 调控抗氧化性的分子机制, 本研究构建橡胶树酵母双杂交文库及 HbTRXy2 诱饵载体 pGBKT7-HbTRXy2, 并通过酵母双杂交筛选与 HbTRXy2 互作的蛋白。结果显示: 本研究构建的次级文库重组率为 100%, 插入片段平均长度大于 1000 bp, 库容量为 3.80×10^6 CFU/mL; 经检测, 诱饵载体 pGBKT7-HbTRXy2 在酵母中无毒性 and 自激活活性, 可用于酵母双杂交筛选; 采用共转化法从构建的文库中筛选到与 HbTRXy2 互作的蛋白 24 个。生物信息学分析表明, 这些候选互作蛋白的功能涉及氧化还原、逆境胁迫响应、ATP 结合与代谢、卡尔文循环、单碳代谢、碳固定、蛋氨酸生物合成、脂质 A 生物合成、金属离子结合或转运、跨膜转运、细胞体积调控、磷酸根离子稳态、蛋白质磷酸化和蛋白质折叠等。本研究结果为深入解析 HbTRXy2 在橡胶树中的功能及其作用机理奠定基础。

关键词: 橡胶树; 硫氧还蛋白; 酵母双杂交; 酵母文库构建; 互作蛋白

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Construction of Yeast Two-Hybrid Library of *Hevea brasiliensis* and Screening of HbTRXy2 Interacting Proteins

WU Shuang^{1,2}, LU Ruilin¹, HE Qiguang¹, YUAN Kun¹, HU Yiyu¹, WANG Zhenhui¹, LIU Jinping², LIU Hui^{1*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Thioredoxins play critical roles in the maintenance of cellular redox homeostasis by regulating the structure and function of the target proteins through catalyzing thiol-disulfide exchange reactions. Previous research has confirmed that the γ -type thioredoxin HbTRXy2 of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) has a strong antioxidant function. To investigate the molecular mechanism of HbTRXy2 in enhancing antioxidant defense, a yeast two-hybrid library of rubber tree and the bait vector pGBKT7-HbTRXy2 for HbTRXy2 were constructed, and the interacting proteins of HbTRXy2 were identified via yeast two-hybrid in this study. The results indicated that the secondary library constructed in this study had a recombination rate of 100%, an average length of inserted fragments greater than 1000 bp, and a capacity of approximately 3.80×10^6 CFU/mL. It was identified that the bait vector has no toxicity and self-activating activity in yeast and could be used for yeast two-hybrid screening. After testing, it was found that the bait vector had no toxicity and self-activating activity in yeast and could be used for yeast two-hybrid screening. Using the co-transformation method, 24 proteins interacting with HbTRXy2 were screened from the constructed library. Bioinformatics analysis revealed that the functions of the candidate interacting proteins encompassed redox processes, stress

收稿日期 2025-02-10; 接受日期 2025-02-12

基金项目 海南省重点研发项目 (No. ZDYF2024XDNY232); 国家自然科学基金面上项目 (No. 32371922); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022023008)。

作者简介 吴 双 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 刘 辉 (LIU Hui), E-mail: liuhui@catas.cn。

responses, ATP binding and metabolism, Calvin cycle, single-carbon metabolism, carbon fixation, methionine biosynthesis, lipid A biosynthesis, metal ion binding or transport, transmembrane transport, cell volume regulation, phosphate ion homeostasis, protein phosphorylation, protein folding, etc. The results would lay the foundation for further revealing the function and mechanism of HbTRXy2 in rubber tree.

Keywords: rubber tree; thioredoxin; yeast two hybrid; yeast library construction; interacting protein

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.001

硫氧还蛋白 (thioredoxins, TRXs) 是一类多基因家族编码的低分子量的氧化还原酶, 含有高度保守的 WC(G/P)PC 基序, 可通过催化硫醇-二硫键交换反应调节靶蛋白的结构和功能, 在维持植物细胞氧化还原稳态中发挥关键作用^[1-4]。根据蛋白氨基酸序列同源性和亚细胞定位的不同, 植物 TRXs 被划分为 8 种类型: h、f、m、o、s、x、y 和 z^[2, 4]。其中, h 型 TRXs 定位于细胞质、细胞核、内质网、线粒体等多种亚细胞结构中^[3-4], o 型 TRXs 定位于线粒体或细胞核中, s 型 TRXs 定位于内质网中, 而 f、m、x、y 和 z 型 TRXs 定位于质体中。研究表明, 质体 TRXs 在叶绿体光合作用和胁迫应答中发挥重要作用, 且不同类型的质体 TRXs 行使不同的功能^[5-7]。x 和 y 型 TRXs 具有抗氧化功能, f 和 m 型 TRXs 主要参与光合碳代谢的调节, 而 z 型 TRXs 的作用似乎仅限于质体基因表达的调控^[3, 8]。

拟南芥含有 2 个 y 型 TRXs: AtTRXy1 和 AtTRXy2^[9]。体外生化试验表明, AtTRXy1 和 AtTRXy2 是过氧化物酶 Prx Q、甲硫氨酸亚砷还原酶 MSR B2 等抗氧化酶的还原底物^[9-10]。AtTRXy1 还是质体葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G6PDH1 的有效激活剂^[11], AtTRXy2 是单脱氢抗坏血酸还原酶 MDHAR6 的激活剂^[1]。在正常条件下, *atrxy1* 和 *atrxy2* 突变体及其双突变体植株生长发育与野生型相似, 但对干旱的敏感性增加^[1]; 强光条件下, *atrxy2* 突变体及 *atrxy1 atrxy2* 双突变体较野生型生长减缓, 叶绿素含量降低^[10]。OKEGAWA 等^[12]研究证实, y 型 TRXs 通过调节光系统 I (PSI) 受体侧的氧化还原平衡在光合作用中发挥重要作用。此外, y 型 TRXs 在调控种子在干旱或氧化胁迫下的发芽势中起着重要作用, 但这种功能的行使并不归因于其抗氧化作用, 而是通过调节植物激素实现^[13]。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是重要的热带经济林木, 其产生的胶乳是重要战略物资和工业原料天然橡胶的主要来源。刘辉等^[14]从橡胶树中克

隆了 1 个 y 型 TRX 基因 *HbTRXy2*, 发现干旱、低温、盐以及氧化胁迫处理均能上调该基因的表达, 并利用酵母表达系统证实 *HbTRXy2* 具有很强的抗氧化功能。为解析 *HbTRXy2* 调控抗氧化性的分子机制, 本研究构建橡胶树非生物胁迫诱导的酵母双杂交文库, 并通过酵母双杂交技术鉴定与 *HbTRXy2* 互作的蛋白。研究结果将为进一步揭示 *HbTRXy2* 调控抗氧化性的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取健康、一致的橡胶树热研 7-33-97 组培苗 (移栽培养约 8 个月) 进行氧化和低温胁迫处理。氧化胁迫处理采用 20 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液, 处理时将溶液喷施于植株所有的叶片。低温处理在 4 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的人工气候箱中进行。在处理 24 h 时, 采集胁迫处理以及未处理植株的叶片。选择种植于中国热带农业科学院试验农场六队的热研 7-33-97 健康和割面干涸 (割面干涸率在 70% 左右) 植株 (树龄 16 a), 采集胶乳样品。同时, 选择健康植株, 涂施 1.5% 乙烯利, 并于处理 24 h 时采集胶乳样品。上述叶片和胶乳采集后液氮冻存, 用于总 RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交文库的构建 (1) 总 RNA 提取和 mRNA 的分离纯化。采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取叶片和胶乳总 RNA, 具体提取方法参照试剂盒说明书。使用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Scientific) 检测 RNA 的完整性、纯度和浓度。采用 Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) 分离纯化 mRNA, 并通过凝胶电泳检测分离纯化 mRNA 的质量。

(2) 初级文库构建。cDNA 第一链和第二链的合成参照 CloneMiner II cDNA 文库构建试剂盒 (Invitrogen)。将重组接头连接到 cDNA 末端, 并通过固定分级柱进行分级分离。参照 Invitrogen

公司 Gateway BP Clonase II Enzyme Mix 试剂盒说明书,通过 BP 重组反应将分级分离获得的 cDNA 重组至 pDONR222 载体上。采用电击转化的方法,将反应产物转入大肠杆菌 DH10B 菌株,获得初级文库菌。将 50 μL 100 倍稀释的初级文库菌涂布于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,统计生长出的单克隆数,并计算初级文库的库容量 ($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和总克隆数 (CFU)。随机挑取单克隆 24 个,采用 M13-F (5'-GTAA-AACGACGGCCAG-3') 和 M13-R (5'-CAGGAA-ACAGCTATGAC-3') 引物进行菌落 PCR 鉴定。PCR 采用 EasyTaq DNA Polymerase (北京全式金生物技术有限公司),具体反应体系和程序参照其说明书。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

(3) 次级文库构建。抽提初级文库和 pG-ADT7-DEST 载体的质粒,参照 Gateway LR Clonase II Enzyme mix 试剂盒 (Invitrogen) 说明书将二者进行 LR 重组,并通过电击转化法将重组产物转入大肠杆菌 DH10B 菌株,获得次级文库菌。将 50 μL 100 倍稀释的次级文库菌涂布于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,统计生长出的单克隆数,并计算次级文库的库容量 (CFU/mL) 和总克隆数 (CFU)。随机挑取单克隆 24 个,采用 T7-F (5'-TAATA-CGACTCACTATAGGGC-3') AD-R (5'-AGAT-GGTGCACGATGCACAG-3') 引物进行菌落 PCR 鉴定。PCR 采用 EasyTaq DNA Polymerase (北京全式金生物技术有限公司),具体反应体系和程序参照其说明书。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。抽提次级文库菌质粒,并检测其质量和浓度。

1.2.2 HbTRXy2 诱饵载体的构建、毒性及自激活活性分析 (1) 构建 HbTRXy2 诱饵载体。根据 HbTRXy2 全长序列 (XM_021825437.1) 设计基因克隆的引物,并添加 Nco I 和 Sal I 酶切位点及保护碱基。正向引物 HbTRXy2-F: 5'-TACCAT-GGCTATGGCGATTCTTCTCTCTCG-3', 反向引物 HbTRXy2-R: 5'-ACGTCGACACCTCAACTA-TTGCTTCACTTGC-3'。以橡胶树热研 7-33-97 叶片 cDNA 为模板,采用 TransStart FastPfu DNA Polymerase (北京全式金生物),进行 PCR 扩增。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。切胶回收目标片段,与 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 连接,并转化大肠杆菌。经菌落 PCR 筛选,

送 3 个阳性单克隆到公司进行测序。将测序正确的阳性菌液扩大培养,采用 Plasmid Mini Kit I (OMEGA) 提取质粒并进行 Nco I 和 Sal I 双酶切,回收目标片段。抽提酵母表达载体 pGBKT7 质粒, Nco I 和 Sal I 双酶切,回收大片段。采用 T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) 将 HbTRXy2 基因与 pGBKT7 载体连接,获得诱饵载体 pGBKT7-HbTRXy2。将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α , 菌落 PCR 筛选阳性克隆,并抽提其质粒。

(2) 诱饵载体毒性和自激活检测。通过 PEG/LiAc 法将 pGBKT7-HbTRXy2 质粒转入酵母菌株 Y2HGold, 挑选单克隆 3 个,参照酵母质粒提取试剂盒 (OMEGA) 说明书提取质粒。使用 EasyTaq DNA Polymerase (北京全式金生物技术有限公司) 进行 PCR 鉴定,引物采用 T7-F 和 HbTRXy2-R。以 pGBKT7-HbTRXy2 质粒作为阳性对照。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

将实验室保存的 Y2HGold[pGBKT7] (空载体对照, CK)、Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T] (阳性对照, CK⁺)、Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T] (阴性对照, CK⁻) 以及 Y2HGold [pGBKT7-HbTRXy2] 酵母菌划线活化。挑单克隆, 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养 24 h, 分别划线于 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp 平板上。30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 观察比较各酵母菌的生长差异。

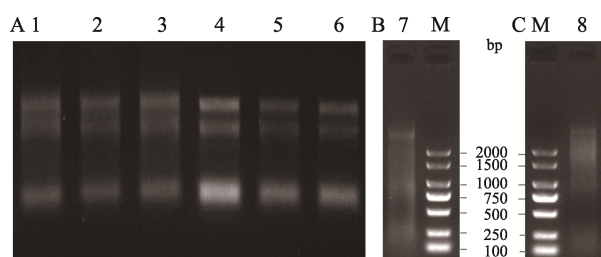
1.2.3 HbTRXy2 互作蛋白的筛选及功能注释 Y2H Gold 酵母感受态细胞的制备参照 Yeastmaker Yeast Transformation System 2 User Manual (Clontech)。将 10 μg 酵母文库质粒、5 μg pGBKT7-HbTRXy2 质粒与 20 μL 预变性的 Carrier DNA 共转化感受态细胞。将转化菌液涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d, 进行初筛。将初筛平板上长出的约 2 mm 的单克隆转接至含有 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 的平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d, 进一步进行高严谨度筛选。采用 Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 (Clontech) 对生长出的蓝色单克隆进行酵母菌落 PCR, PCR 体系和扩增程序参照其说明书。取 PCR 产物 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 挑选扩增出单一条带的, 将其 PCR 产物送至海南楠山生物技术有限公司进行测序。将测序结果在橡胶树基因组数据库 HeveaDB (<http://hevea.catas.cn/home/index>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih>).

gov) 数据库中进行 Blast 分析, 获取互作蛋白基因的 ID 及功能注释等信息。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

提取经低温、 H_2O_2 处理和无处理的橡胶树组培苗叶片以及健康、割面干涸和乙烯利处理橡胶树胶乳的总 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳以及微量分光光度计检测其质量和浓度, 结果显示, 各 RNA 样本 $A_{260/280}$ 值介于 1.8~2.1 之间, 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰, 无明显降解 (图 1A), 质量符合建库要求。将各 RNA 等量混合, 并进一步分离纯化 mRNA 及合成双链 cDNA。电泳检测结果显示, 纯化得到的 mRNA 以及合成的双链 cDNA 条带清晰, 呈弥散状均匀分布 (图 1B, 图 1C), 质量较好, 可用于后续文库构建。



1~6: 6 个组织样品总 RNA; 7: 纯化的 mRNA; 8: 双链 cDNA;
M: DL2000 Plus DNA marker。

1~6: Total RNA of six tissue samples; 7: Purified mRNA;
8: Double stranded cDNA; M: DL2000 Plus DNA marker.

图 1 电泳检测总 RNA (A)、纯化的 mRNA (B) 及合成的双链 cDNA (C) 的质量

Fig. 1 Detection of the quality of total RNA (A), purified mRNA (B) and synthesized double stranded cDNA (C) by electrophoretic

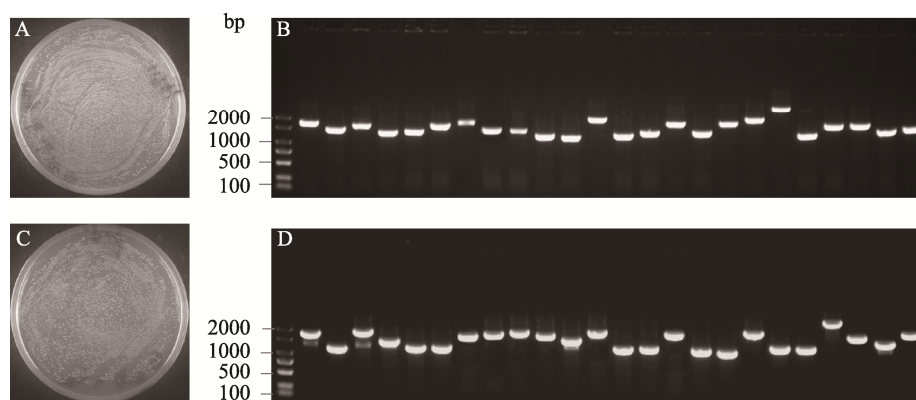
2.2 酵母双杂交文库的构建及鉴定

将纯化获得的 mRNA 反转录合成双链 cDNA, 添加重组接头后, 并通过 BP 反应连入 pDONR222 载体, 转化大肠杆菌, 得到 cDNA 初级文库菌液。取 50 μ L 稀释 100 倍的文库菌液涂板, 生长出的克隆总数约为 2100 个 (图 2A), 初级文库库容量约为 4.20×10^6 CFU/mL, 总克隆数为 1.68×10^7 CFU。菌落 PCR 结果显示, 24 个随机选取的单克隆均扩出单一条带, 且片段平均长度超过 1000 bp, 重组率达 100% (图 2B), 符合初级文库的质量要求。

通过电极转化法将初级文库质粒与 pGADT7-DEST 载体质粒 LR 反应产物转入大肠杆菌 DH10B, 获得次级文库菌液。取 50 μ L 100 倍稀释后文库菌液涂板, 生长出约 1900 个单菌落 (图 2C)。经计算, 次级文库库容量约为 3.80×10^6 CFU/mL, 总克隆数为 1.52×10^7 CFU。对 24 个随机选取的单菌落进行 PCR 鉴定, 电泳结果显示, 均扩增出条带, 重组率达 100%, 平均插入片段长度超过 1000 bp (图 2D)。以上结果表明, 所构建的文库质量很好, 可进行酵母双杂交筛选。

2.3 *HbTRXy2* 诱饵载体构建及其毒性和自激活活性检测

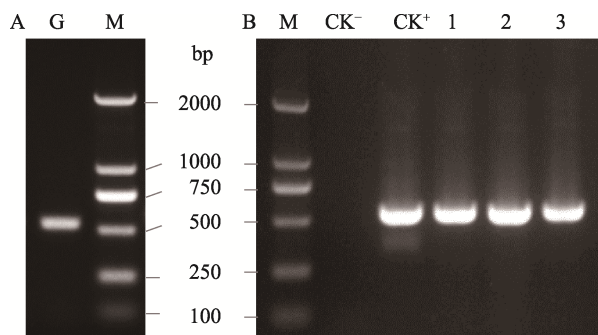
根据 *HbTRXy2* 基因全长序列设计扩增完整编码区的引物, 从橡胶树叶片 cDNA 中扩出了符合预期大小 527 bp 的条带 (图 3A)。经公司测序确定正确后, 通过酶切连接的方法将 *HbTRXy2* 基因连接到载体 pGBKT7, 获得诱饵载体 pGBKT7-*HbTRXy2*。将 pGBKT7-*HbTRXy2* 质粒转入 Y2HGold 酵母感受态细胞, 挑取 3 个单克隆抽提质粒并进



A: 初级文库库容的检测; B: PCR 检测初级文库插入片段的大小; C: 次级文库库容的检测; D: PCR 检测次级文库插入片段的大小。
A: Detection of the capacity of the primary library; B: PCR detection of the size of the inserted fragments in the primary library;
C: Detection of the capacity of the secondary library; D: PCR detection of the size of the inserted fragments in the secondary library.

图 2 初级文库和次级文库的质量鉴定

Fig. 2 Quality identification of primary and secondary libraries



G: *HbTRXy2* 基因; M: DL2000 DNA marker; CK⁻: 无模版阴性对照; CK⁺: 阳性对照(pGBKT7-*HbTRXy2* 质粒); 1~3: pGBKT7-*HbTRXy2* 转化酵母的质粒。

G: *HbTRXy2* gene; M: DL2000 DNA marker; CK⁻: Template-free negative control; CK⁺: Positive control (pGBKT7-*HbTRXy2* plasmid); 1-3: plasmid of yeast transformed with pGBKT7-*HbTRXy2*.

图 3 *HbTRXy2* 基因的 PCR 扩增 (A) 和 pGBKT7-*HbTRXy2* 转化酵母的鉴定 (B)

Fig. 3 PCR amplification of *HbTRXy2* gene (A) and identification of yeast transformed with pGBKT7-*HbTRXy2* bait vector (B)

行 PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳结果证实诱饵载体成功转化酵母细胞 (图 3B)。

将含有 pGBKT7-*HbTRXy2*、pGBKT7 (空载体对照)、pGBKT7-Lam+pGADT7-T (阴性对照) 或 pGBKT7-53+pGADT7-T (阳性对照) 的 Y2H-Gold 酵母菌分别在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -gal 和 SD/-Trp/X- α -gal/AbA 平板上划线培养。结果 (图 4) 显示, 4 种酵母菌在 SD/-Trp 平板上均有生长,

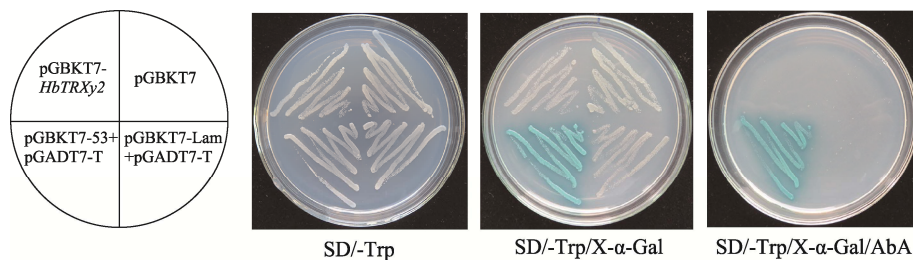
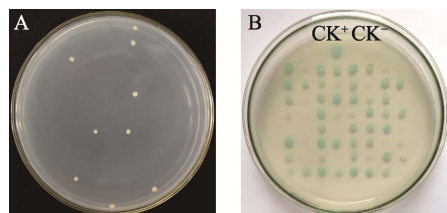


图 4 pGBKT7-*HbTRXy2* 诱饵载体的毒性和自激活活性分析

Fig. 4 Analysis of toxicity and self-activation activity of pGBKT7-*HbTRXy2* bait vector



A: SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 培养基上初筛到的部分克隆;
B: SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 进一步筛选阳性克隆。
A: Partial clones initially screened on SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His medium; B: SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA further screening for positive clones.

图 5 *HbTRXy2* 互作蛋白的筛选

Fig. 5 Screening of *HbTRXy2* interacting proteins

差异不明显, 表明诱饵载体 pGBKT7-*HbTRXy2* 对酵母菌无毒性。在 SD/-Trp/X- α -gal 平板上, 4 种酵母菌均能正常生长, 但仅有阳性对照酵母菌显蓝色。在 SD/-Trp/X- α -gal/AbA 平板上, 仅有阳性对照酵母菌生长且显蓝色, 表明诱饵载体 pGBKT7-*HbTRXy2* 在 Y2HGold 酵母菌株中无自激活活性, 可用于酵母双杂交筛选。

2.4 *HbTRXy2* 互作蛋白的筛选与分析

通过共转化将诱饵载体 pGBKT7-*HbTRXy2* 质粒和次级文库质粒一起转入 Y2HGold 酵母感受态细胞, 涂布于 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 平板上进行初筛 (图 5A)。将初筛平板上生长出的克隆转接到 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 平板上, 进行高严谨度筛选。52 个克隆在 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -gal/AbA 平板上生长, 且呈蓝色 (图 5B)。采用 Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 对阳性克隆进行菌落 PCR 扩增, 回收纯化目标条带送公司测序。经序列比对分析, 除去重复序列后, 最终鉴定到 24 个与 *HbTRXy2* 互作的蛋白 (表 1)。对筛选到的互作蛋白进行功能注释发现, 这些蛋白的生物学功能涉及氧化还原、逆境胁迫响应、ATP 结合与代谢、卡尔文循环、单碳代谢、碳固定、蛋氨酸生物合成、脂质 A 生物合成、金属离子结合或转运、跨膜转运、细胞体积调控、磷酸根离子稳态、蛋白质磷酸化和蛋白质折叠等。

3 讨论

蛋白质是基因功能的直接执行者, 虽然一些蛋白质可以独立地行使功能, 但大多数蛋白质需要与其他蛋白质互作才能充分发挥其功能。因此, 研究蛋白质之间的相互作用已成为深入解析蛋白质的生物学功能及其作用机制的关键环节之一。酵母双杂交技术具有操作简单、成本低、高通量等优点, 是鉴定蛋白与蛋白互作的最常用方法^[15]。在橡胶树研究中, 利用该技术已筛选鉴定了与 HbHDA6^[16]、HbMC1^[17]、HbPSKR2^[18]、HbSRPP7^[19]等互作的蛋

表 1 筛选到的与 HbTRXy2 互作的蛋白及其功能注释
Tab. 1 Screened proteins interacting with HbTRXy2 and functional annotation

编号 No.	基因 ID Gene ID	蛋白名称 Protein name	功能注释 Function annotation
1	scaffold0198_606133	dehydrin 脱水素	response to stress 逆境胁迫响应
2	scaffold0137_967149	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1 UDP-葡萄糖 6-脱氢酶 1	oxidation-reduction process 氧化还原过程
3	scaffold1603_54869	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A	oxidation-reduction process; Calvin cycle 氧化还原过程; 卡尔文循环
4	scaffold0624_438647	sorbitol dehydrogenase 山梨醇脱氢酶	oxidation-reduction process; zinc ion binding 氧化还原过程; 锌离子结合
5	scaffold0773_328521	serine/threonine-protein kinase AFC2 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AFC2	oxidation-reduction process; protein phosphorylation 氧化还原过程; 蛋白质磷酸化
6	scaffold0442_10352	casein kinase 1-like protein HD16 酪蛋白激酶 1 类似蛋白 HD16	protein phosphorylation 蛋白质磷酸化
7	scaffold1340_33382	FK506-binding protein 2 FK506 结合蛋白 2	protein folding 蛋白质折叠
8	scaffold0705_61387	importin-5 核输出蛋白 5	intracellular protein transport 细胞内蛋白转运
9	scaffold0073_2290349	monosaccharide-sensing protein 2 单糖感应蛋白 2	transmembrane transport 跨膜转运
10	scaffold0008_4136903	copper-transporting ATPase PAA1 铜转运 ATP 酶 PAA1	metal ion transport 金属离子转运
11	scaffold0840_283341	fructose-bisphosphate aldolase 6 果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶 6	glycolytic process; Calvin cycle 糖酵解过程; 卡尔文循环
12	scaffold0297_1099976	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基	carbon fixation 碳固定
13	scaffold0484_894238	adenosylhomocysteinase 腺苷同型半胱氨酸水解酶	one-carbon metabolic process 单碳代谢过程
14	scaffold0400_649822	ATP synthase F1 subunit 1 ATP 合成酶 F1 亚基	ATP metabolic process ATP 代谢过程
15	scaffold0345_829597	ruvB-like 2	ATP binding ATP 结合
16	scaffold0023_2452670	metE 5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸同型半胱氨酸甲基转移酶	methionine biosynthetic process 蛋氨酸生物合成过程
17	scaffold0129_624152	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase 2 UDP-3-O-酰基葡萄糖胺 N-酰基转移酶 2	lipid A biosynthetic process 脂质 A 生物合成过程
18	scaffold2021_36234	purple acid phosphatase 17 紫色酸性磷酸酶 17	phosphate ion homeostasis 磷酸根离子稳态
19	scaffold0152_1754460	purple acid phosphatase 18 紫色酸性磷酸酶 18	phosphate ion homeostasis 磷酸根离子稳态
20	scaffold1504_16442	EG45-like domain containing protein 类 EG45 结构域包含蛋白	cell volume regulation 细胞体积调控
21	scaffold0025_2379668	RNA polymerase beta subunit RNA 聚合酶 β 亚基	transcription; DNA binding 转录; DNA 结合
22	XR_002493814.1	uncharacterized protein	unknown 未知
23	scaffold0803_390106	uncharacterized protein	unknown 未知
24	scaffold0432_789540	hypothetical protein 假定蛋白	unknown 未知

白。利用酵母双杂交筛选与目标蛋白互作的蛋白,首先需要构建高质量的酵母 cDNA 文库,而文库的质量主要由 RNA 的完整性、文库库容等决定^[20]。为使文库包含的蛋白更多,本研究将 ABA、H₂O₂、低温处理的叶片以及健康、割面干涸、乙烯利处理橡胶树的胶乳样品的总 RNA 等量混合,用于分离纯化 mRNA 及双链 cDNA 合成,并基于同源重组的方法构建了酵母 cDNA 文库。经鉴定,所构建的次级文库质量较好,文库重组率达 100%,插入片段平均长度超过 1000 bp,库容量约为 3.80×10^6 CFU/mL,总克隆数约为 1.52×10^7 CFU,达到了酵母双杂交筛选文库的质量要求。该文库的建立为通过酵母双杂交筛选与目标橡胶树蛋白互作的蛋白奠定了基础。

硫氧还蛋白通过还原靶蛋白的二硫键在植物氧化还原反应、光合作用、叶片衰老、逆境响应等过程中发挥重要作用^[1-4, 21]。鉴定硫氧还蛋白的靶蛋白将有助于揭示其作用机理。目前,已鉴定了一些能与硫氧还蛋白互作的蛋白。ARSOVA 等^[22]采用酵母双杂交筛选到与 239 个克隆与拟南芥 TRXz 互作,并进一步通过 BIFC (双分子荧光互补)等证实 TRXz 与类果糖激酶 FLN1 和 FLN2 互作。酵母双杂交、BIFC、pull-down 与 Co-IP (免疫共沉淀)证实,番茄 SlTrxh 与过氧化物氧化蛋白 SlPrx 存在互作^[23]。体外和植物体内试验也表明,拟南芥 TRXy2 能与 2-半胱氨酸过氧化物氧化蛋白 (2-Cys Prx) 互作^[24]。前期研究中,本团队从橡胶树中克隆鉴定了一个受非生物胁迫诱导的 y 型 TRX 基因 HbTRXy2,并证实了在酵母中超量表达该基因能提高重组酵母的抗氧化性^[14]。为鉴定 HbTRXy2 的靶蛋白,进一步解析 HbTRXy2 调控抗氧化性的作用机制,本研究构建了 HbTRXy2 的诱饵载体,并通过酵母双杂交筛选获得 24 个可能与 HbTRXy2 互作的蛋白,其中,UDP-葡萄糖 6-脱氢酶 1 (scaffold0137_967149)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A (scaffold1603_54869)、山梨醇脱氢酶 (scaffold0624_438647)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AFC2 (scaffold0773_328521) 和脱水素 (scaffold0198_606133) 与氧化还原和胁迫应答相关。推测 HbTRXy2 可能通过与这些蛋白互作在抗氧化性中发挥作用。已有研究证实,芍药甘油醛-3-磷酸脱氢酶 PIGAPC2 能通过提高 NAD⁺ 的含量抑制高温条件下活性氧的 (ROS) 产生^[25]。过表达拟南芥山梨醇脱氢酶 SDH 能提高转基因

株系对盐胁迫和渗透胁迫的抗性^[26]。在烟草中过表达高粱脱水素基因 *SbDhn1* 和 *SbDhn2* 均能增强转基因株系的抗氧化性^[27]。

功能注释表明,筛选到的与 HbTRXy2 互作的 24 个蛋白涉及氧化还原、逆境胁迫响应、ATP 结合与代谢、糖酵解、单碳代谢、碳固定、卡尔文循环、蛋氨酸生物合成、脂质 A 生物合成、金属离子结合或转运、跨膜转运、细胞体积调控、磷酸根离子稳态、蛋白质磷酸化和蛋白质折叠等。其中,单碳代谢、碳固定、卡尔文循环、ATP 结合与代谢等均与光合作用密切相关。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶是植物催化 CO₂ 固定的关键酶,决定着光合作用中碳同化速率,由多个大亚基和多个小亚基组成^[28]。叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶和果糖 1,6-二磷酸醛缩酶光合作用中参与卡尔文循环的重要酶^[29-30]。本研究的酵母双杂交筛选结果显示, HbTRXy2 与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基 (scaffold0297_1099976)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A (scaffold1603_54869) 和果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 6 (scaffold0840_283341) 存在相互作用,表明 HbTRXy2 可能通过调节卡尔文循环参与光合作用。已有研究证实,叶绿体硫氧还蛋白系统在植物光合作用中发挥重要作用^[7-8, 12]。本课题组前期的研究发现, HbTRXy2 基因在叶片中高表达,且主要定位在叶绿体^[14]。叶绿体是进行光合作用的场所。根据 HbTRXy2 基因的表达特性以及与其互作蛋白的功能注释,推测 HbTRXy2 在橡胶树光合作用中发挥重要作用。

4 结论

本研究构建了库容量为 3.80×10^6 CFU/mL、平均插入片段长度大于 1000 bp 的高质量橡胶树酵母双杂交文库,为筛选橡胶树功能基因的互作蛋白奠定基础;构建了具有抗氧化功能的硫氧还蛋白 HbTRXy2 的诱饵载体 pGBKT7-HbTRXy2,并通过酵母双杂交筛选获得 24 个与 HbTRXy2 互作的蛋白,功能涉及氧化还原、逆境胁迫响应、ATP 结合与代谢、糖酵解、单碳代谢、碳固定、卡尔文循环、蛋氨酸生物合成、脂质 A 生物合成、金属离子结合或转运、跨膜转运、细胞体积调控、磷酸根离子稳态、蛋白质磷酸化和蛋白质折叠等多种生物学进程,为进一步解析 HbTRXy2 的生物学功能及其作用的分子机制奠定基础。

参考文献

- [1] VANACKER H, GUICHARD M, BOHRER A S, ISSAKIDIS-BOURGUET E. Redox regulation of monodehydroascorbate reductase by thioredoxin y in plastids revealed in the context of water stress[J]. *Antioxidants*, 2018, 7(12): 183.
- [2] SEVILLA F, MARTI M C, DE BRASI-VELASCO S, JIMENEZ A. Redox regulation, thioredoxins, and glutaredoxins in retrograde signalling and gene transcription[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(19): 5955-5969.
- [3] GEIGENBERGER P, THORMAHLEN I, DALOSO D M, FERNIE A R. The unprecedented versatility of the plant thioredoxin system[J]. *Trends Plant Science*, 2017, 22(3): 249-262.
- [4] JIMENEZ A, LOPEZ-MARTINEZ R, MARTI M C, CANO-YELO D, SEVILLA F. The integration of TRX/GRX systems and phytohormonal signalling pathways in plant stress and development[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 207: 108298.
- [5] KANG Z, QIN T, ZHAO Z. Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: a review[J]. *Gene*, 2019, 706: 32-42.
- [6] NEE G, WANG F, CHATEL-INNOCENTI G, MHAMDI A, JURANVILLE E, VANACKER H, NOCTOR G, ISSAKIDIS-BOURGUET E. Thioredoxins m regulate plastid glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Arabidopsis* roots under salt stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1179112.
- [7] 秦童, 黄震, 康振辉. 叶绿体硫氧还蛋白系统的调节机制[J]. *植物学报*, 2019, 54(1): 119-132.
QIN T, HUANG Z, KANG Z H. Regulatory mechanism of thioredoxin (Trx) in chloroplasts[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2019, 54(1): 119-132. (in Chinese)
- [8] SERRATO A J, FERNANDEZ-TRIJEQUE J, BARAJAS-LOPEZ J D, CHUECA A, SAHRAWY M. Plastid thioredoxins: a “one-for-all” redox-signaling system in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 463.
- [9] COLLIN V, LAMKEMEYER P, MIGINIAC-MASLOW M, HIRASAWA M, KNAFF D B, DIETZ K J, ISSAKIDIS-BOURGUET E. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4088-4095.
- [10] LAUGIER E, TARRAGO L, COURTEILLE A, INNOCENTI G, EYMERY F, RUMEAU D, ISSAKIDIS-BOURGUET E, REY P. Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(3): 670-682.
- [11] NEE G, ZAFFAGNINI M, TROST P, ISSAKIDIS-BOURGUET E. Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin[J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(17): 2827-2832.
- [12] OKEGAWA Y, SATO N, NAKAKURA R, MURAI R, SAKAMOTO W, MOTOHASHI K. X- and y-type thioredoxins maintain redox homeostasis on photosystem I acceptor side under fluctuating light[J]. *Plant Physiology*, 2023, 193(4): 2498-2512.
- [13] NEE G, CHATEL-INNOCENTI G, MEIMOUN P, LEYMARIE J, MONTRICHARD F, SATOUR P, BAILLY C, ISSAKIDIS-BOURGUET E. A new role for plastid thioredoxins in seed physiology in relation to hormone regulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10395.
- [14] 刘辉, 王真辉, 王帅, 何其光, 胡义钰, 袁坤, 冯成天. 来源于橡胶树的硫氧还蛋白 HbTRXy2 及其相关生物材料与应用: ZL202310632739.3[P]. 2024-08-13.
LIU H, WANG Z H, WANG S, HE Q G, HU Y Y, YUAN K, FENG C T. Thioredoxin HbTRXy2 derived from rubber tree and its related biomaterials and applications: ZL202310632739.3[P]. 2024-08-13. (in Chinese)
- [15] 沈竹, 曹勤红. 酵母双杂交及其衍生技术应用研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(12): 2425-2433.
SHEN Z, CAO Q H. Research progress on application of yeast two hybrid system and Y₂H-derived techniques[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(12): 2425-2433. (in Chinese)
- [16] 张世鑫, 吴绍华, 杨署光, 晁金泉, 史敏晶, 葛立鑫, 蒋毅, 田维敏. 橡胶树形成层组织的酵母双杂交 cDNA 文库构建及 HbHDA6 互作蛋白筛选[J]. *广西植物*, 2024, 44(2): 245-256.
ZHANG S X, WU S H, YANG S G, CHAO J Q, SHI M J, GE L X, JIANG Y, TIAN W M. Construction of yeast two-hybrid cDNA library incambium tissue of *Hevea brasiliensis* and screening of HbHDA6 interacting proteins[J]. *Guihaia*, 2024, 44(2): 245-256. (in Chinese)
- [17] LIU H, WEI Y, DENG Z, YANG H, DAI L, LI D. Involvement of HbMC1-mediated cell death in tapping panel dryness of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. *Tree Physiology*, 2019, 39(3): 391-403.
- [18] 杜晓愚, 赵一杰, 张世鑫, 田维敏, 晁金泉. 巴西橡胶树 HbPSKR2 基因克隆及互作蛋白鉴定[J]. *热带作物学报*, 2024, 45(4): 653-662.
DU X Y, ZHAO Y J, ZHANG S X, TIAN W M, CHAO J Q. Cloning and interacted protein identification of HbPSKR2 gene from rubber tree[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2024, 45(4): 653-662. (in Chinese)

- [19] 聂智毅, 康桂娟, 覃怀德, 曾日中. 橡胶树膜系统酵母双杂交 cDNA 文库构建及 HbSRPP7 互作蛋白筛选[J]. 热带作物学报, 2023, 44(9): 1735-1744.
- NIE Z Y, KANG G J, QIN H D, ZENG R Z. Construction of a normalized *Hevea brasiliensis* latex MYTH cDNA library and screening of HbSRPP7 interacting proteins[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(9): 1735-1744. (in Chinese)
- [20] 陈玉婷, 刘露, 楚盼盼, 魏嘉贤, 钱慧娜, 陈华, 蔡铁城, 庄伟建, 张冲. 受青枯菌诱导的花生根酵母双杂交文库构建和 AhRRS5 互作蛋白的筛选[J]. 作物学报, 2021, 47(11): 2134-2146.
- CHEN Y T, LIU L, CHU P P, WEI J X, QIAN H N, CHEN H, CAI T C, ZHUANG W J, ZHANG C. Construction of yeast two-hybrid cDNA library induced by *Ralstonia solanacearum* and interaction protein screening for AhRRS5 in peanut[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(11): 2134-2146. (in Chinese)
- [21] LI X, SU G, PAN C, ZHAN J, WANG A, HAN Z, XIAO D, HE L. TRX h2-PP2AC2 module serves as a convergence node for aluminum stress and leaf senescence signals, regulating cell death via ABA-mediated ROS pathway[J]. The Plant Journal, 2024, 120(6): 2602-2622.
- [22] ARSOVA B, HOJA U, WIMMELBACHER M, GREINER E, USTUN S, MELZER M, PETERSEN K, LEIN W, BORNKE F. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(5): 1498-1515.
- [23] ZHAI J, QI Q, WANG M, YAN J, LI K, XU H. Overexpression of tomato thioredoxin h (*SlTrxh*) enhances excess nitrate stress tolerance in transgenic tobacco interacting with SlPrx protein[J]. Plant Science, 2022, 315: 111137.
- [24] JURADO-FLORES A, DELGADO-REQUEREY V, GALVEZ-RAMIREZ A, PUERTO-GALAN L, PEREZ-RUIZ J M, CEJUDO F J. Exploring the functional relationship between y-type thioredoxins and 2-Cys peroxiredoxins in *Arabidopsis* chloroplasts[J]. Antioxidants, 2020, 9(11): 1072.
- [25] ZHAO D, CHENG Z, QIAN Y, HU Z, TANG Y, HUANG X, TAO J. PIWRKY47 coordinates with cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 gene to improve thermotolerance through inhibiting reactive oxygen species generation in herbaceous peony[J]. Plant, Cell & Environment, 2025, 48(1): 226-243.
- [26] SHI X P, REN J J, YU Q, ZHOU S M, REN Q P, KONG L J, WANG X L. Overexpression of *SDH* confers tolerance to salt and osmotic stress, but decreases ABA sensitivity in *Arabidopsis*[J]. Plant Biology, 2018, 20(2): 327-337.
- [27] HALDER T, UPADHYAYA G, BASAK C, DAS A, CHAKRABORTY C, RAY S. Dehydrins impart protection against oxidative stress in transgenic tobacco plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 136.
- [28] TAYLOR-KEARNEY L J, WANG R Z, SHIH P M. Evolution and origins of rubisco[J]. Current Biology, 2024, 34(16): R764-R767.
- [29] ZHANG Z, LI X, ZHANG Y, ZHOU J, CHEN Y, LI Y, REN D. Identification of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) family genes in maize and analysis of the phosphorylation regulation of ZmFBA8[J]. Plant Science, 2024, 350: 112311.
- [30] SIMKIN A J, ALQURASHI M, LOPEZ-CALCAGNO P E, HEADLAND L R, RAINES C A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B are essential to maintain photosynthetic efficiency[J]. Plant Physiology, 2023, 192(4): 2989-3000.