

Screening Telomere Binding Proteins from *Ginkgo biloba* L. Using Yeast One-Hybrid Library

Luyao Jiang, Lihong Li, Xiaoyun Yao, Qiang Zhang, Jingyi Han, Ying Wang, Hui Li, Hai Lu, Di Liu

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing
Email: jiangluyao@bjfu.edu.cn

Received: Mar. 5th, 2016; accepted: Mar. 22nd, 2016; published: Mar. 29th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To provide a powerful experimental basis for the research of telomere binding proteins and telomeres in woody plants especially in Ginkgo, we investigated the telomere-binding proteins that bind with telomere sequence in ginkgo. **Methods:** Using Ginkgo leaves as experimental material, we obtained some gene sequences encoding telomere-binding proteins through yeast one-hybrid library screening technology, then verified their binding specificity by GFP yeast one-hybrid experiments. **Results:** We did not get any desired DNA sequences using bait vector contain telomere specificity sequence (TTTAGGG)₃. However, we obtained 52 DNA sequences using bait carrier contain telomere specificity sequence (TTTAGGG)₅ successfully. Our results suggested that the telomere specificity sequence (TTTAGGG)₃ might be too short to binding any proteins. After removing repeat sequences, we found that 10 genes were encoded by these 52 DNA sequences through sequences analysis. One gene among them was confirmed that could bind with Ginkgo telomere specificity sequence. Through GFP yeast one-hybrid technology. **Conclusion:** Our study established a screening method to investigate telomere binding proteins in Ginkgo through yeast one-hybrid library screening and GFP yeast one-hybrid technology, and obtained a telomere binding protein which binding with Ginkgo telomere specificity sequence specifically.

Keywords

Ginkgo biloba L., Telomere Binding Protein, Yeast One-Hybrid Library, Yeast One-Hybrid

利用酵母单杂交文库技术筛选银杏端粒结合蛋白

蒋璐瑶, 李丽红, 要笑云, 张强, 撒静宜, 王莹, 李慧, 陆海, 刘頔

文章引用: 蒋璐瑶, 李丽红, 要笑云, 张强, 撒静宜, 王莹, 李慧, 陆海, 刘頔. 利用酵母单杂交文库技术筛选银杏端粒结合蛋白[J]. 植物学研究, 2016, 5(2): 55-65. <http://dx.doi.org/10.12677/br.2016.52009>

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京
Email: jiangluyao@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2016年3月5日; 录用日期: 2016年3月22日; 发布日期: 2016年3月29日

摘要

目的: 为了获得与银杏端粒结合序列相结合的端粒结合蛋白, 为木本植物端粒结合蛋白的研究提供实验依据, 从而丰富对银杏端粒的研究。方法: 以银杏叶片为实验材料, 利用酵母单杂交文库筛选获得可能为银杏端粒结合蛋白的基因片段, 并通过GFP酵母单杂交实验验证获得基因片段与端粒序列的结合特异性。结果: 使用端粒特异性结合序列(TTTAGGG)₃的诱饵载体没有获得合适大小的扩增片段, 而使用端粒特异性结合序列(TTTAGGG)₅的诱饵载体成功获得52个扩增片段, 这说明端粒DNA序列(TTTAGGG)₃过短, 不利用蛋白质的结合。比较这些扩增片段序列并去除相同序列, 结果显示这52个扩增片段分别属于10个基因片段。对这10个基因片段进行进一步序列分析, 并使用酵母单杂交技术验证, 结果显示其中一个基因能够与银杏端粒序列特异性结合。结论: 本研究通过酵母单杂交文库筛选, GFP酵母单杂交验证等实验方法建立了银杏端粒结合蛋白的筛选方法, 并成功获得了一个和银杏端粒重复序列特异性结合的端粒结合蛋白。

关键词

银杏, 端粒结合蛋白, 酵母单杂交文库, 酵母单杂交

1. 引言

【研究意义】银杏(*Ginkgo biloba* L.)是现存最古老的种子植物, 被称为植物中的活化石, 在遗传学上有重要的地位[1]。端粒是位于真核生物染色体末端的特殊 DNA-蛋白复合结构, 具有保护染色体的作用。其中端粒结合蛋白作为端粒的重要组成部分, 在维持端粒结构、调控端粒长度和端粒保护功能方面起十分重要的作用。在木本植物端粒相关蛋白的研究还很空缺[2], 只在少部分木本植物中如毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)中克隆得到一些可能的端粒结合蛋白, 关于这些可能的端粒结合蛋白的作用机制少见报道。银杏作为我国特有的珍稀名贵树种, 其分子生物学、发育生物学及遗传学等领域的研究价值日益重要[3]。【前人研究进展】从模式生物拟南芥中首次克隆得到植物端粒序列 TTTAGGG。目前已发现的植物端粒双链结合蛋白有水稻中的 OsRTBP1 [4], 拟南芥中的 AtTRP1、AtTRB1、AtTRB2 [5], 玉米中的 Smh1 等[6], 单链结合蛋白有烟草中的 NtGTBP1 等[7]。【本研究切入点】近几年, 酵母单杂交系统被广泛用于模式植物转录因子的克隆研究[8] [9]。杏作为一种长寿树种, 在我国各地普遍存在几百年至数千年的银杏树。这暗示了银杏 能存在特殊的端粒保护结构。因此深入比较研究银杏端粒结合蛋白对端粒的保护机制, 在植物端粒生物学研究领域意义重大。【拟解决的关键问题】本研究以银杏为材料, 尝试使用酵母单杂交文库筛选端粒结合蛋白, 并进一步利用酵母单杂交技术, 验证其结合特异性。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料与试剂

试验材料为银杏叶片, 取自北京林业大学校园内。筛库用酵母单杂交体系 Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System、Aureo-basidin A(AbA)、Matchmaker Insert Check PCR Mix 1、

Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 均购自 Clontech 公司; GFP 酵母单杂交体系 The Grow'n'Glow GFP One-Hybrid Kit 购自 Mo Bi Tec 公司; Easyspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; mRNA 分离试剂盒 PolyATtract mRNA Isolation Systems 购自 Promega 公司; 反转录试剂盒 FastQuant RT Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司; 高保真 DNA 聚合酶 *TransStart® FastPfu* DNA Polymerase、*E. coil* DH5 α 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶均购自 NEB 公司; DNA 序列合成由生工生物工程股份有限公司完成; DNA 测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

2.2. 银杏酵母单杂交体系建立

2.2.1. 诱饵酵母载体 pBait-AbAi 构建

为了提高端粒序列与端粒结合蛋白的识别率和结合率, 合成端粒序列(TTTAGGG)的 3 次和 5 次串联重复序列与诱饵载体 pAbAi 进行连接。由于合成片段过短和载体连接效率较低, 本研究以载体 pBI121 为模板, 利用 PCR 扩增其部分 *GUS* 基因片段, 延长与诱饵载体的连接序列, 从而提高连接成功率。根据 *GUS* 基因序列设计上、下游引物(表 1)。反应体系 25 μ L, 包括上、下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L、pBI121 载体(20 ng/ μ L)稀释 100 倍取 1 μ L、 $2 \times$ Taq Mix 12.5 μ L、ddH $_2$ O 9.5 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收纯化与载体 pMD-18T 连接, 16 $^{\circ}$ C 连接 3 h, 转化大肠杆菌 DH5 α , 用含氨苄西林的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 并测序鉴定。载体 pAbAi 和测序正确的 T 载体同时用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切, 酶切产物胶回收纯化进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。阳性克隆单菌落提取质粒, 并以限制性内切酶 *Kpn* I 进行酶切, 去除 *GUS* 基因片段, 剩余片段 16 $^{\circ}$ C 自连接过夜转化大肠杆菌 DH5 α 。阳性克隆单菌落测序鉴定。

2.2.2. 诱饵载体转化酵母获得诱饵酵母

pAbAi 载体(图 1(a))含有尿嘧啶报告基因 *URA3* 和 *AURI-C*, 其中 *AURI-C* 基因使载体对金担子素 A(AbA) 具有抗性, 在 *AURI-C* 上游的多克隆位点插入诱饵序列, 如有顺式作用元件与诱饵序列结合, 激活 *AURI-C* 基因表达, 诱饵酵母便可在含有 AbA 培养基上生长, 故可利用 AbA 筛选获得阳性酵母单菌落。

游离的 pAbAi 载体不能在酵母细胞中表达, 只有经限制性酶切位点 *Bst*B I 或 *Bbs* I 线性化的 pAbAi 载体与 Y1HGold 酵母基因 *ura3-52* 位点进行同源重组, 整合到酵母基因组中, 才能在酵母中稳定表达。同时使酵母细胞具有编码 Ura 的能力, 可用 SD-Ura 筛选培养基筛选阳性诱饵酵母单菌落。

参照 Yeastmaker Yeast Transformation System 2 说明制备酵母菌 Y1HGold 感受态细胞。用经 *Bst*B I 酶切线性化的 pBait-AbAi 1 μ g 转化 Y1HGold 感受态细胞, 涂布于 SD/-Ura 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培育 3 d, 挑取直径在 2~3 mm 单菌落, 利用 Matchmaker Insert Check PCR Mix 1 进行菌落 PCR 鉴定, 如获得长度为 1.35 kb 加上三次或五次端粒重复序列产物, 则说明诱饵载体正确整合到酵母基因中。

2.2.3. 测定报告基因本底表达水平

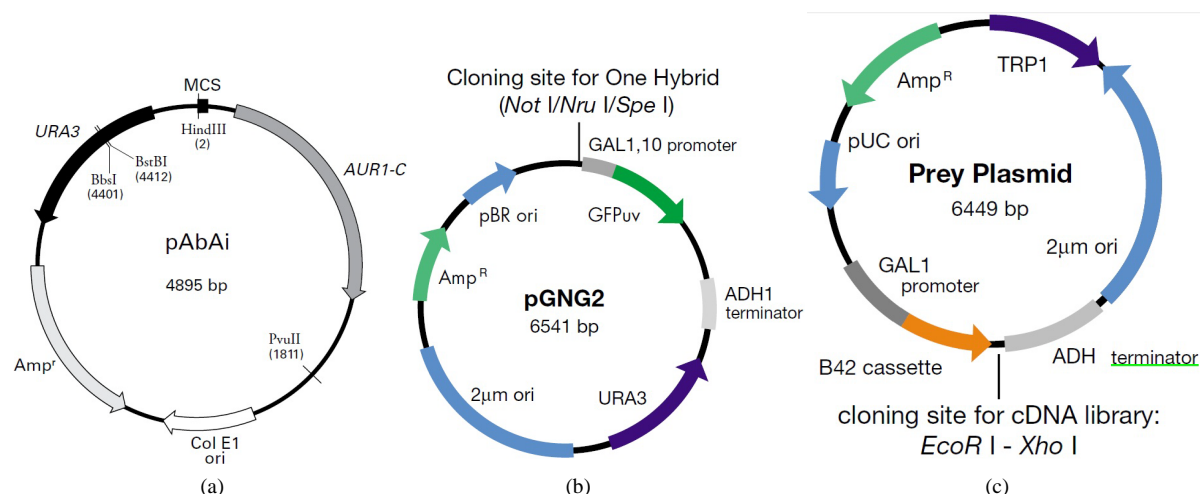
为了排除酵母内源转录因子与目的顺式元件相互作用的干扰, 需要在筛库之前确定 AbA 最低使用浓度。挑取在 SD/-Ura 固体培养基上正常生长的诱饵酵母, 悬浮在 0.9% NaCl 中, 将 OD $_{600}$ 调整至 0.002 并分别涂布在含 0、100、300、500、800、1000 和 1500 ng/mL AbA 的 SD/-Ura 固体培养基上, 根据酵母生长情况, 确定筛库所需 AbA 的最低浓度。

2.2.4. cDNA 文库合成

采用 TRIzol 法提取银杏叶片总 RNA。使用 PolyATtract mRNA Isolation Systems 试剂盒分离出 mRNA。以 0.5 μ g mRNA 为模板, 采用 SMART 技术合成单链 cDNA, 并利用 LD-PCR 扩增技术获得双链 cDNA。

Table 1. PCR primer sequences used for amplifying *GUS* fragments**表 1.** 扩增 *GUS* 基因片段的引物序列

引物名称	引物序列
上游引物 1	5'CCCAAGCTT(TTTAGGG);GGTACCACGAACTGAACTGGCAGAC-3'
上游引物 2	5'CCCAAGCTT(TTTAGGG);GGTACCACGAACTGAACTGGCAGAC-3'
下游引物	5'CCGCTCGAGGGTACCATCTCTCAGCGTAAGGGT-3'

**Figure 1.** The structure chart of pAbAi, pGNG2 and pJG4-5 vector**图 1.** pAbAi、pGNG2 和 pJG4-5 载体示意图

取 7 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其余使用 CHROMA SPINTE-400 树脂层析柱(Clontech 公司)纯化。

2.2.5. 酵母单杂交文库构建及初步筛选

将 20 μL 经过纯化的双链 cDNA(2~5 μg)和 3 μg 经 *Sma* I 线性化的 pGADT7-Rec 载体混合, 参照 Yeastmaker Yeast Transformation System 2 方法共转化诱饵酵母感受态细胞。将酵母细胞悬浮液分别稀释至 1/10、1/100、1/1000 和 1/10000, 各取 100 μL 分别涂布在 SD/-leu 和 SD/-leu/AbA 固体培养基上, 以便计算建库的总克隆数, 总克隆数小于 1.0×10^6 会降低结果的可信度。将剩余的菌液涂布在 SD/-leu/AbA 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培育 3 d, 挑取直径在 2~3 mm 单菌落, 利用 Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 进行菌落 PCR 鉴定, 对 cDNA 插入片段进行测序和初步的鉴定和分析。

2.3. GFP 酵母单杂交鉴定

2.3.1. 诱饵载体 pGNG2-bait 构建

为了保持研究一致性, 仍设计端粒序列(TTTAGGG) 5 次串联重复序列与诱饵载体 pGNG2 (图 1(b))进行连接, 方法同 pBait-AbAi 载体的构建, 限制性酶切位点为 *Not* I、*Spe* I 和 *Nru* I。构建好的载体测序鉴定。

2.3.2. 诱饵酵母构建

诱饵载体 pGNG2 含有选择标记 *URA3* 和报告基因 *GFPuv*, 其中 *URA3* 能使酵母细胞在 SD/-Ura 培养基上生长。GAL1,10 启动子启动 *GFPuv* 基因, 在 GAL1,10 启动子上游的多克隆位点插入诱饵序列, 如待鉴定序列所表达蛋白能正确结合诱饵序列, 则能使 *GFPuv* 基因表达, 酵母细胞在紫外(360~400 nm)下发绿色荧光。故可以通过酵母细胞是否发绿色荧光鉴定待测序列和端粒重复序列的结合特异性。

采用 LiAc 法制备酵母菌 EGY48 感受态细胞, 将构建好的 pGNG2-bait 诱饵载体转化到 EGY48 酵母细胞中, 涂布在 SD/-Ura(Glu)固体培养基上, 30℃培养 3 d, 挑取单克隆提取质粒, 通过 PCR 鉴定并测序。

2.3.3. 表达载体 pJG4-5 构建

载体 pJG4-5 (图 1(c))含有 GAL1 诱导型启动子, 控制融合蛋白的表达, 在含有半乳糖的培养基中正常表达, 抑制其在含葡萄糖的培养基上的表达。载体上的 *TRP1* 标记基因使酵母细胞能在缺少色氨酸培养基上生长。

在待鉴定序列首尾两端分别添加限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, 并与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆单菌落测序鉴定。构建好的 T 载体与载体 pJG4-5 同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化, 回收产物连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 双酶切鉴定。

2.3.4. 构建 GFP 酵母单杂交体系

采用 LiAc 法制备诱饵酵母感受态细胞。将构建好的含有待鉴定序列的表达载体 pJG4-5 转化到诱饵酵母细胞中, 涂布在 SD/-TRP-URA(GAL/RAF)固体培养基上, 30℃培养 3 d。挑取单菌落置于荧光显微镜下观察, 发绿色荧光即可认为待测序列能与端粒序列(TTTAGGG)特异性结合。

3. 结果与分析

3.1. 构建酵母单杂交文库

3.1.1. 诱饵载体 pBait-pAbAi 构建

在本实验室课题组的前期研究中已鉴定银杏端粒序列为拟南芥型 TTTAGGG 序列。为了增加可能的端粒结合蛋白与端粒的结合能力, 在构建诱饵载体 pBait-pAbAi 时, 分别使用了两个特异性结合序列 (TTTAGGG)₃ 和 (TTTAGGG)₅ 构建两个诱饵载体 pBait-pAbAi。此外, 由于特异性结合序列片段较小, 为了增加构建成功率, 使用了 *GUS* 基因片段作为引导序列(图 2)。

以载体 pBI121 为模板, 表一的序列为引物扩增 *GUS* 基因片段, 获得 *GUS* 片段加端粒序列(TTTAGGG)三次及五次重复序列的长度约 640 bp 的条带(图 3(a)), 与载体 pMD-18T 连接后测序鉴定正确。

以 *Hind* III 和 *Xho* I 分别酶切质粒 pMD-18T-(TTTAGGG)_{3/5}-*GUS* 和载体 pAbAi, 分别得到长度约为 640 bp 和 5000 bp 的片段, 进行连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α , *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 3(b))。

使用限制性内切酶 *Kpn* I 对质粒 pAbAi-(TTTAGGG)_{3/5}-*GUS* 进行酶切, 获得约 5000 bp 和 600 bp 两个片段, 对长度约 5000 bp 的片段利用 T4 连接酶进行自连。经测序鉴定, (TTTAGGG)_{3/5} 序列成功连接到载体 pAbAi 上。

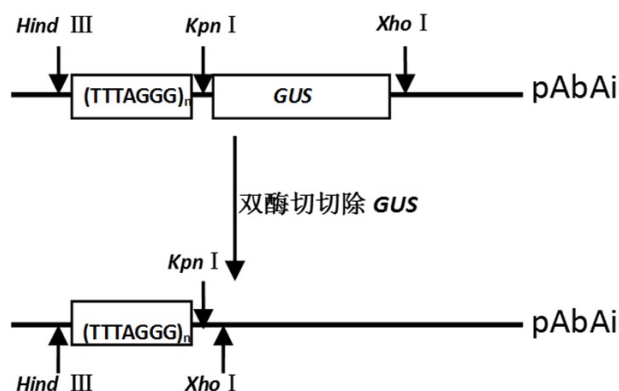


Figure 2. Construction of target-reporter pBait-pAbAi

图 2. 诱饵载体 pBait-pAbAi 构建示意图

3.1.2. 诱饵载体转化酵母 Y1HGold

经 *Bst* *b* I 线性化的两个 pBait-pAbAi 转化酵母感受态细胞，涂布于 SD/-Ura 固体培养基上，30℃ 培养 3 d，挑取 2~3 mm 单菌落进行 PCR 检测。获得长度约 1.4 kb 的片段(图 3(c))，说明诱饵载体成功转入酵母 Y1HGold 中。

同时将经过 0.9% NaCl 稀释的酵母菌液涂布于含 AbA 梯度浓度的 SD/-Ura 培养基上，当 AbA 浓度达到 1000 ng/mL 时完全抑制了酵母单菌落生长，如图 4 所示，确定本研究所需 AbA 浓度为 1000 ng/mL。

3.1.3. 银杏酵母单杂交文库构建

提取银杏 RNA 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，由图 5(a)可知，其中 28S 和 18S 条带比例约为 2:1，总 RNA 浓度为 1200 ng/μL，OD_{260/280} 为 1.92，说明 RNA 纯度质量好，可以用于构建文库。

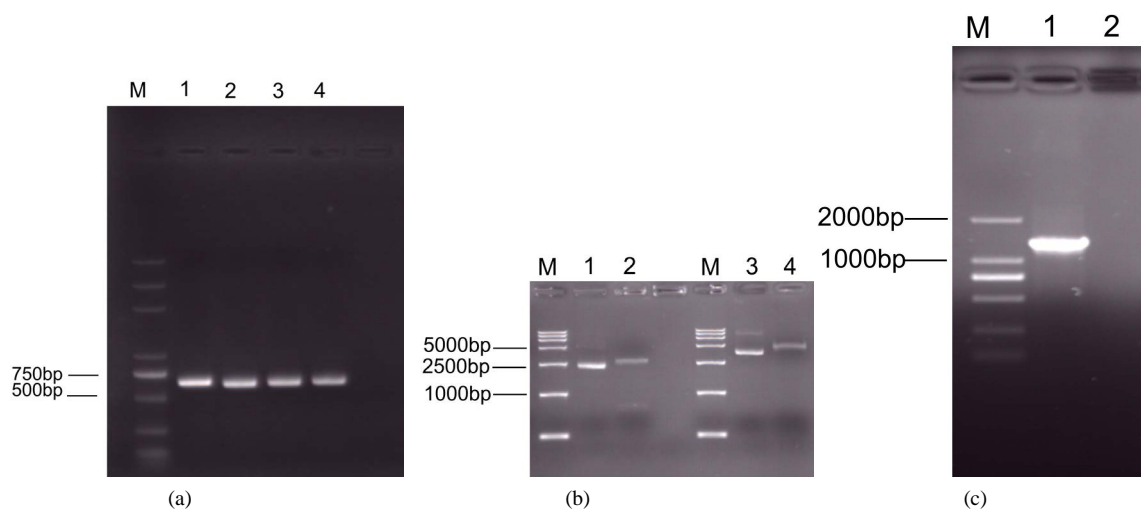


Figure 3. PCR detection results of vector construction in yeast one-hybrid library
 图 3. 酵母单杂交文库载体构建电泳检测图
 A: (TTTAGGG)₃/5-GUS 片段 PCR 扩增电泳检测图, M:DM 2000 Plus DNA Marker;1-2: (TTTAGGG)₃-GUS 片段电泳结果;3-4:(TTTAGGG)₅-GUS 片段电泳结果;B:质粒 pMD-18T-(TTTAGGG)₅-GUS 和载体 pAbAi 双酶切电泳图, M:DL 15000 DNA Marker;1: 质粒 pMD-18T-(TTTAGGG)₅-GUS;2: pMD-18T-(TTTAGGG)₅-GUS 双酶切;3:载体 pAbAi;4: pAbAi 双酶切线性化;C: 诱饵酵母菌落 PCR 电泳检测图, M:DL2000 DNA Marker;1:诱饵酵母菌落 PCR 扩增结果

Figure 3. PCR detection results of vector construction in yeast one-hybrid library
 图 3. 酵母单杂交文库载体构建电泳检测图

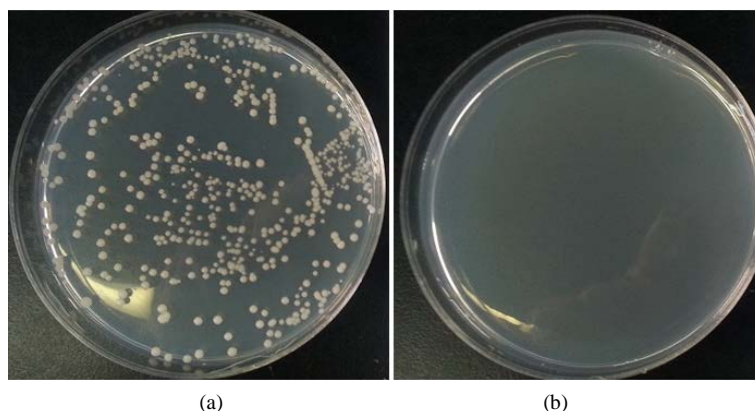


Figure 4. The minimal inhibitory concentration of Aureobasidin A
 图 4. AbA 最低使用浓度筛选结果

Figure 4. The minimal inhibitory concentration of Aureobasidin A
 图 4. AbA 最低使用浓度筛选结果

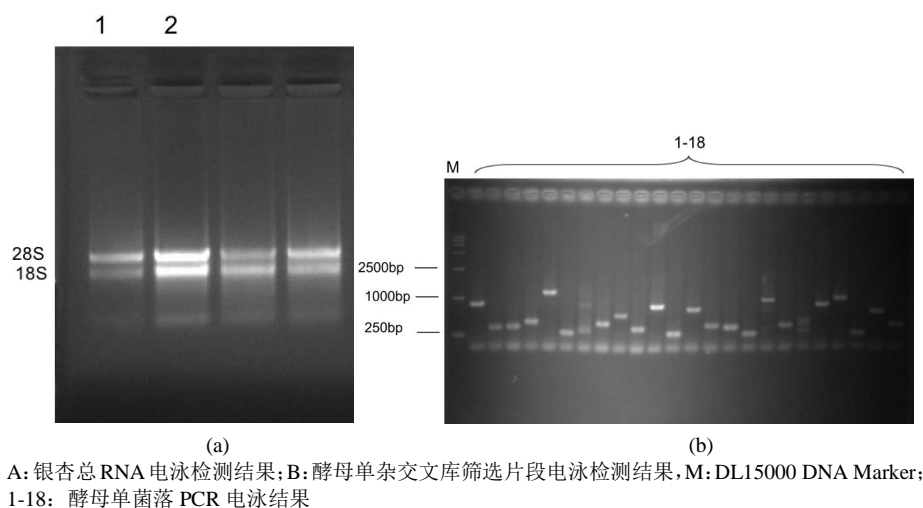


Figure 5. Total RNA detection result of *Ginkgo biloba* L. and PCR detection results of yeast one-hybrid library
图 5. 银杏总 RNA 及酵母单杂交文库筛选片段电泳检测图

总 RNA 利用磁珠分离出 mRNA，浓度为 20 ng/μL，OD_{260/280} 为 1.90。以 3 μL mRNA 为模板，通过反转录及 LD-PCR 获得双链 cDNA，最后通过 CHROMASPINTE-400 树脂层析柱进行纯化。

cDNA 文库与经 *Sma* I 线性化的 pGADT7-Rec 载体共转化诱饵酵母感受态细胞。将经过转化的酵母细胞稀释 1000 倍后涂布在 SD/-Leu 培养基上，共长出 20 个单菌落，经过计算可知总克隆数即转化效率为 3.0×10^6 ，大于构建文库最低限度 1.0×10^6 。转化效率 = (菌落个数/涂布菌液体积) × 稀释倍数 × 总体积。

剩余酵母转化产物在 SD/-Leu/AbA (1000 ng/mL) 培养基上 30℃ 培养 3 d，挑取单克隆进行菌液 PCR 检测(图 5(b))，并对其中大于 250 bp 的扩增片段进行测序。

3.1.4. 可能的银杏端粒结合蛋白的鉴定

结果显示，使用端粒特异性结合序列(TTTAGGG)₃ 的诱饵载体没有能够获得合适大小的扩增片段，显示该端粒特异性结合序列难以有效结合端粒结合蛋白。而使用端粒特异性结合序列(TTTAGGG)₅ 的诱饵载体成功获得 52 个扩增片段，显示该端粒特异性结合序列能够有效结合端粒结合蛋白。

对 52 个扩增片段的进行测序，并进行序列比对，去除序列相同的结果，得到 10 个 cDNA 序列可能为银杏端粒结合蛋白基因序列片段。进一步利用 NCBI 的 BLAST 分析，其中有 3 个序列显示为功能未知蛋白，7 个为无对应序列，这可能是由于缺乏有效的银杏基因组序列的结果。进一步通过 DNAMAN 等软件分析，这 10 个序列中有 7 个序列中存在较多的终止子，不能翻译成相对应的蛋白。说明这 7 个序列可能是银杏 cDNA 文库构建过程中的干扰序列。该结果在已报道的酵母单杂交文库筛选技术研究中也有报道，显示该技术存在一定的假阳性现象。其余 3 个序列为端粒结合蛋白的相应序列的可能性较大。为了方便区分，暂以 A-C 来标明该 3 个基因片段(图 6)。由于酵母单杂交文库不能有效鉴定蛋白质与 DNA 的结合的一一对应关系，为了进一步这 3 个序列是否独立与端粒序列特异性结合，研究组进一步使用酵母单杂交技术进行分析。

3.2. GFP 酵母单杂交鉴定

3.2.1. 诱饵载体 pGNG2-bait 构建

诱饵载体 pGNG2-bait 构建方法同诱饵载体 pBait-pAbAi 的构建，此处不再详述。仅将限制性酶切位点改为 *Not* I、*Spe* I 和 *Nru* I。以序列 5'-GCCCAATACGCAAACCGCCT-3'为引物，测序鉴定。

3.2.2. 诱饵载体转化酵母 EGY48

将构建好的诱饵载体 pNG2-bait 转化到酵母 EGY48 感受态细胞中, 涂布在 SD/-URA(Glu)培养基上, 30℃培养 3 d。挑取单克隆置于 SD/-URA(Glu)液体培养基中震荡培养, 提取质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 在含氨苄西林的 LB 培养基上生长, 根据挑取阳性单菌落提取质粒电泳检测验证诱饵载体已成功转化入酵母 EGY48 中。

3.2.3. 表达载体 A/B/C-pJG4-5 构建

A、B、C 三个序列使用 DNAMAN 软件分析确定碱基翻译序列, 分别在上下游添加限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I 设计引物, 以载体 A/B/C-pGADT7-Rec 为模板, 通过 PCR 扩增获得长度约 1000bp 的条带, 与载体 pMD-18T 连接。测序鉴定。

以 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切 A/B/C-pMD-18T 与表达载体 pJG4-5, 获得长度约 1000 bp 和 6500 bp 的条带, 利用 T4 连接酶连接。转化大肠杆菌 DH5 α , *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 7)。

3.2.4. GFP 酵母单杂交体系建立

将构建好的 A/B/C-pJG4-5 载体转化到诱饵酵母细胞中, 并涂布于 SD-TRP-URA(GAL/RAF)固体培养基, 30℃培养 3 d。挑取单菌落用 0.9% NaCl 稀释, 通过在荧光显微镜下观察, 其中 A-pJG4-5 转化的酵母细胞发绿色荧光(图 8), 其余未见绿色荧光。说明 A 序列可以与银杏端粒序列(TTTAGGG)特异性结合。

```

a序列:
1 GGGGACGATG AAGAAGAAGA GGACAAGGAG AAGAAGAGG AAGAAGGTA GATTGAAGAG
61 ATTGATGAGG AGAAGGAGAA GGAAGAAAAG AAGAAGAAGA AGATCAAGGA AGTGTCTCAT
121 GAATGGACTC TTGTAACAAA GCAAAAAGCCC ATCTGGATGA GAAAGCCAGA AGAAATTACC
181 AAGGAAGAGT ATGCTGCATT TTACAAGAGT TTAACAAATG ACTGGGAAGA GCATTGGCTC
241 GTGAAACATT TCTCCGTAGA GGGACAGCTG GAGTTCAAGG CTGTGCTCTT TGTCCAAAAG
301 AGGGCACCTT TCGATCTATT TGATACCAAG AAAAAGCTCA ACAACATCAA ACTCTATGTT
361 AGACGGGTAT TTATCATGGA TAACTGTGAG GAGTTGATTC CCGAATATCT TAGTTTTGTG
421 AAGGGAGTGG TAGACTCTGA AGATCTTCCT CTGAATATTT CTCGTGAAAT GCTCCAACAG
481 AACAAAATTT TAAAGGTTAT TAGGAAGAAT CTTGTCAAGA AATGCGTTGA AATGTTTTTT
541 GAGATTGCAG AGAATAAAGA AGACTACAAC AAATTTTATG AGGCGTTCTC CAAGAATATT
601 AAGTGGGTA TTCATGAGGA TAGCCAGAAT AGTCCAAGC TTGCTGATCT ACTCCGGTAT
661 CACTCTACAA AGAGTGGAGA TGAGATGACC AGTTTGAAGG ATTATGTGAC CCGAATGAAG
721 GAGGGCCAGA AAGATATATA TTATATCACT GGTGAAAGCA AAAAGCCGCT GGAGAACTCT
781 CCATCTTGG AACCTTGA GAAGAAGGGC TATGAAGTTC TCTTCATGTT TGATGCTATT
841 GATGAATATG CTATTGGACA ATTTAAGGAG TATGATGGGA AGAAATTGTT GTCCGACAAA
901 AAGGAGGTTT TGAAGTTGGA AGAAAGTGAA AA

b序列:
1 GGGACGGTGA AACGTACC GTATGTGTGT GTGAAACGAG GAGCATCAGC ACCCAGAGCA
61 AGGATTTGTC GTCTGGGTTT GGTCAATTTT ATTTTCTCT GAACCCACTG CACAAAATTT
121 AACATCGCAG AGGCGCGAGG AGTTGATACA GAGGTGACAT GGGAGGATCA GCAAAAATTT
181 AATAAATTTG GACGACTCAA TAACAGGTTT CACGAGCTGG AGGATGAGAT CAAGGCCAAG
241 AAGGAATAGA CTGAGAATCT TGAGGATGCA AGCAATGAAC TTATCTTCTG TGATGAGGAA
301 ATAGTGAGAT TTCAGCTTGG TGAGGTTTTT AGTCACATGC CAAAAGRAGA AGTTGAAATG
361 AGGTTAGATT CTTTGAAGA AGAGACAATG AAGAAGCTTG AAAAAGCTGA GGAAGAAAAG
421 GAATCGGTAC TGGCACAAT GCGGAGCTA AAAAAGATT CTTATGGAAA ATTCAGGATC
481 TCTATTAATT TGGAAGAGGA CTAATGACTA CTCCCGGATT GGCCTCTCAT CTGCAAGCAA
541 TATCACAAAG ATGATGGATT TTGCTATAG GTCCGTTTAA AAACCATATG GTATTGTTA
601 TTAGCTACA AACTGTGATA TGCCTTAGTT GAAGGCTAAG AACGAATATG CTTCTGGCCG
661 TGCTCAATT TGTGTAATTG GTATGCGTTA TGTAATCTTT TGCTTGATCT TTCTAGTGCT
721 TGTAGCTCCA CTGGTAGGTA GGTAAAGTGA TATTAGAAGA AATCATCAAG ATATCTCATC
781 ATTATCTCTA TTCACAACTA TGATAGTAGT ACCTTCAACT ATTTGCTTGG CAAGTAGAAA
841 GAATCTTAG GATGAAATAA ATTTAAAGGT ATTTGATTTT ATGCTTGGAT CATGAAGGGC
901 CATGCTAATT TTCTTCTATT TTCTAAAAA AAA

c序列:
1 GGGATCGGAG AAGTGGCTGT CAAATTTATT CTAAGCATG GAGCTAAGT TGTATCGCT
61 GACATCCAGG ACGACATGGA AACAAAGTCT GCTGAATCTC TCGGCCCGCA AGCGTCTTAT
121 TTCCATTGCG ATGCTGCAAA AGAAAATGAG GTATCTGCTC TCGTAGATTA TACGCTGATG
181 AAGCATGGCC TGCTGGATAT CATGTACAGC AACGCAGGGA TTTGGCCCTC GGGACCATGT
241 CCCGTGCCAG CCATGCCGAT AGAGGATATA CAGTCTCTGA TCGCAGTGAA CGTATTGGGA
301 GCATATTTAT GCACAAAGCA TGCGGCGCGG GTGATGATTC CGAGGAAAAA GGGCTGCATC
361 TTTTACACTG CGAGCCTGGC ATCTTTAATA GCGGTGGCAA CTGTCTCGGC CGTTTACACT
421 GCCTCTAAGC ACGCAGTGGC GGGAGTTATG AAGTCTGCGG CGGCAAAATTT GGTCTCATAT
481 GGCATTGCGA TGAAGTGGCT GTCTCCACGC GCATTACCCA CTCCAATGTT TGTCAAGAGC
541 ATGCAAGAGC TGCTTCTGCT TTTTGACACA GAATCTGTGG CTGAGATGTT GGAAGAGGTT
601 GCGGAGCTGA AGGTTGTGAG ATTTGAGGCT GAAGATGTGG CCAAGCCGCG ACTGTTTTTA
661 TGCAGCGATG AGGCTCGATA CATCAGCGGG CACAACCTTG TGATCGATGG AGCCTTTTCT
721 GTTCCAAAT CTTTCTCCAC GTCAACATC ATGGAATTCG TTCTGCCAAA ATCTGTTTTT
781 GAGGAAGTGG TAGCCCGTTC TGCTGCCTAG AGAGTTCTAC CCATCCAAAT CAACACAGGG
841 CACTTCCCTG CTGTCTGCTC TATTAATATT TTATCTTCT AGTAGTCGTA AACATCTACC
901 TATATACTAC TTCGCATATC CAGCACTCTC AGAGCTCTGAG TTTGTTACTG AATAATTAAT
961 TTAAGTGGC TATTTTGATG TCTTAAAAA AAAAAAAAAA

```

Figure 6. The nucleotide sequences of (a) (b) (c) gene

图 6. (a) (b) (c) 基因序列片段

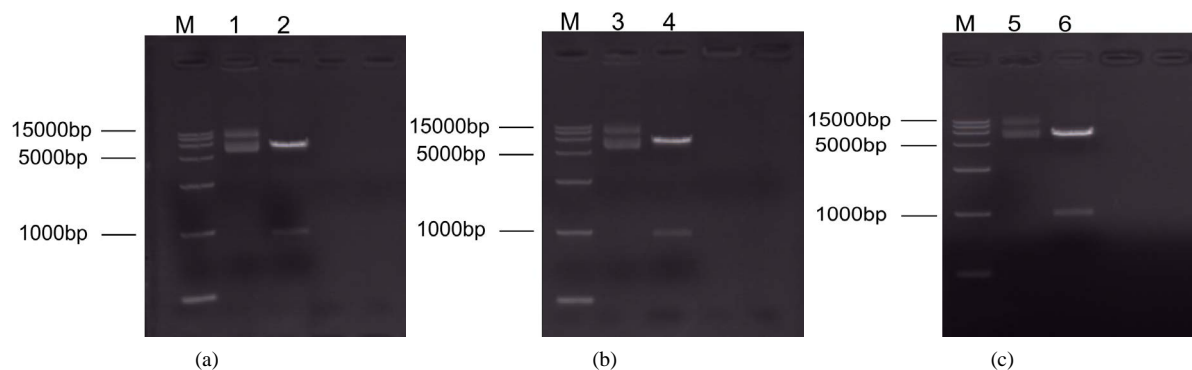
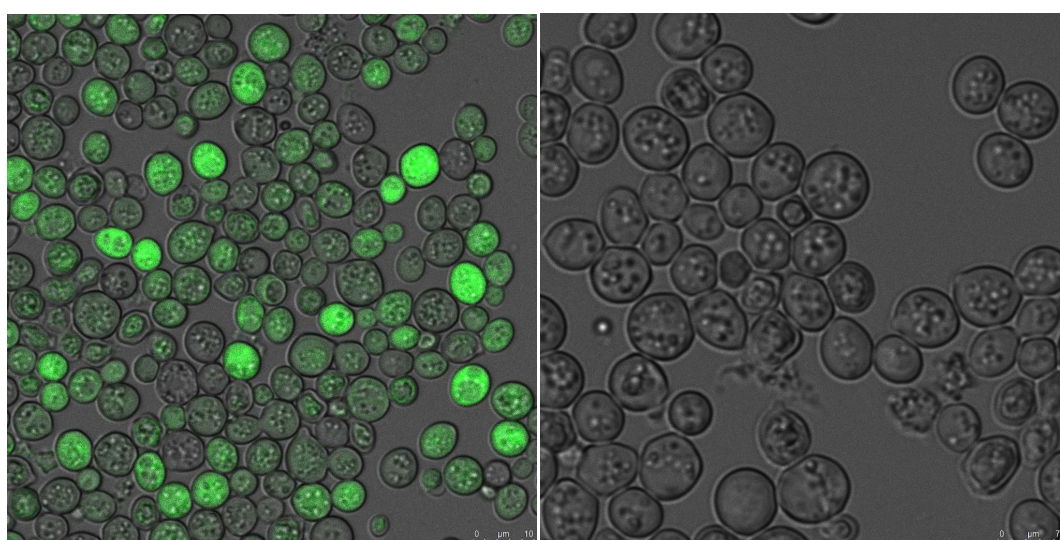


Figure 7. Double enzyme digestion results of A/B/C-pJG4-5 expression vector

图 7. 表达载体 A/B/C-pJG4-5 双酶切电泳检测图



左图为蛋白与端粒序列特异性结合，细胞发绿色荧光；右图为阴性对照。

Figure 8. Fluorescent detection of GFP yeast one-hybrid

图 8. GFP 酵母单杂交荧光显示图

而 B, C 两个基因与银杏端粒序列(TTTAGGG)特异性结合能力较弱或不能独立与银杏端粒序列(TTTAGGG)特异性结合。

4. 讨论

端粒位于真核生物染色体末端，是一种具有保护染色体作用的特殊 DNA-蛋白复合结构。端粒的功能在于防止染色体 DNA 降解、非正常重组和染色体缺失等，从而起到保护染色体基因完整性的功能，因此端粒功能的发挥为生命活动的正常运作提供了重要保障[10]。绝大多数真核生物的端粒 DNA 序列是由富含 TG 的重复序列组成，在脊椎动物中为 TTAGGG，大多数植物中为 TTTAGGG [11]。

端粒结合蛋白不仅在维持端粒结构上非常重要，且在调控端粒长度和端粒保护功能方面起十分重要作用[12]。端粒结合蛋白主要分两类：一类是在哺乳动物中被称为端粒重复结合因子(TRF)，其结合于端粒双链区域[13]。其中 TRF1 和 TRF2 均结合在端粒 Myb 区域，以二聚体形式存在[14]。TRF1 控制端粒长度，TRF2 参与维持染色体的稳定[15]。另一类蛋白以端粒保护蛋白(POT1)为代表，通过寡糖/寡核苷酸结合在端粒单链序列上[16]。

端粒在植物学领域的研究还比较缺少。通过凝胶迁移实验,首次在拟南芥中发现了端粒结合蛋白[17][18]。在目前的研究中可以看出,对植物端粒及端粒结合蛋白的相关研究主要集中于草本模式植物,例如拟南芥、水稻、玉米等。对于木本植物端粒的相关研究还少有报道。

一般来说,在酵母单杂交文库筛选过程中,可能存在载体构建时因合成片段过短导致和载体连接效率较低的问题,本研究以载体 pBI121 为模板,利用 PCR 扩增其部分 *GUS* 基因片段,延长与诱饵载体的连接序列,从而提高连接成功率,后期再通过切除 *GUS* 基因片段,载体自我连接即可完成载体构建。目前酵母单杂交文库筛选一般使用植物总 RNA 来构建 cDNA 文库,但是存在大量的 tRNA 和 rRNA 会对筛选产生干扰,造成过多的假阳性产生。本研究采用磁珠法从总 RNA 中分离出 mRNA 来构建 cDNA 文库,可以有效降低假阳性率。在构建重组酵母时,应确保 OD₆₀₀ 在 0.4~0.6 之间,否则易造成转化效率低或者不能成功转化。为了排除酵母内源转录因子与目的顺式元件相互作用的干扰,在筛库之前须确定 AbA 的最低使用浓度。

总之,本研究通过酵母单杂交文库筛选, GFP 酵母单杂交验证等实验方法建立了银杏端粒结合蛋白的筛选技术,并获得了一个和银杏端粒重复序列特异性结合的端粒结合蛋白。本研究丰富了对银杏端粒的研究,为木本植物端粒结合蛋白的研究提供了有力的实验依据。

5. 结论

本研究通过酵母单杂交文库筛选和 GFP 酵母单杂交等实验方法获得一个与银杏端粒重复序列 (TTTAGGG) 特异性结合的基因片段。

基金项目

国家自然科学基金项目(31370590, J1103516)。

参考文献 (References)

- [1] Jacobs, B.P. and Browner, W.S. (2000) *Ginkgo biloba*: A Living Fossil. *American Journal of Medicine*, **108**, 341-342. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00290-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00290-4)
- [2] Shakirov, E.V., Song, X., Joseph, J.A., et al. (2009) POT1 Proteins in Green Algae and Land Plants: DNA-Binding Properties and Evidence of Co-Evolution with Telomeric DNA. *Nucleic Acids Research*, **37**, 7455-7467. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp785>
- [3] 慕莹, 赵晓燕, 景丹龙. 银杏不同组织器官及愈伤组织培养中端粒酶活性测定[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(3): 95-99.
- [4] Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., et al. (2000) Sequence-Specific DNA Recognition by the Myb-Like Domain of Plant Telomeric Protein RTBP1. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 24208-24214. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003250200>
- [5] Hwang, M.G., Chung, I.K., Kang, B.G., et al. (2001) Sequence Specific Binding Protein 1 (AtTBP1). *FEBS Letters*, **503**, 35-40. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02685-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02685-0)
- [6] Schrupfova, P., Kuchar, M., Mikova, G., et al. (2004) Characterization of Two *Arabidopsis thaliana* Myb-Like Proteins Showing Affinity to Telomeric DNA Sequence. *Genome*, **47**, 316-324. <http://dx.doi.org/10.1139/g03-136>
- [7] Hirata, Y., Suzuki, C. and Sakai, S. (2004) Characterization and Gene Cloning of Telomere-Binding Protein from Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol Biochem*, **42**, 4-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.10.002>
- [8] 刘蕾, 胡旭东, 张强, 等. 毛白杨酵母单杂交体系的建立[J]. 南方农业学报, 2015, 46(3): 370-375.
- [9] 王琪, 朱延明, 王冬冬. 酵母单杂交系统在植物基因工程研究中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(1): 141-147.
- [10] 朱雅新, 麻浩. 端粒和端粒酶的结构与功能及其应用[J]. 湖南农业大学学报, 2005, 31(1): 98-105.
- [11] Shakirov, E.V., Salzberg, S.L., Alam, M. and Shippen, D.E. (2008) Analysis of *Carica papaya* Telomeres and Telomere-Associated Proteins: Insights into the Evolution of Telomere Maintenance in Brassicales. *Tropical Plant Biology*, **1**, 202-215. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-008-9018-x>

-
- [12] Kuchar, M. (2006) Plant Telomere-Binding Proteins. *Biologia Plantarum*, **50**, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-005-0067-9>
- [13] Sue, S.C., Hsiao, H.H., Chung, B.C., *et al.* (2006) Solution Structure of the *Arabidopsis thaliana* Telomeric Repeat-Binding Protein DNA Binding Domain: A New Fold with an Additional C-Terminal Helix. *Journal of Molecular Biology*, **356**, 72-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.009>
- [14] Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., *et al.* (1997) TRF1 Is a Dimer and Bends Telomeric DNA. *The EMBO Journal*, **16**, 1785-1794. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.7.1785>
- [15] Wei, C. and Price, M. (2003) Protecting the Terminus: t-Loops and Telomere End-Binding Proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **60**, 2283-2294. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3244-z>
- [16] Baumann, P. and Cech, T.R. (2001) Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans. *Science*, **292**, 1171-1175. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1060036>
- [17] Regad, F., Lebas, M. and Lescure, B. (1994) Interstitial Telomeric Repeats within the *Arabidopsis thaliana* Genome. *Journal of Molecular Biology*, **239**, 163-169. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1360>
- [18] Zentgraf, U. (1995) Telomere-Binding Proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **27**, 467-475. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00019314>