

Research Method of Transcription Factors in Plant

Jiangyi Zhou, Qian Zhou

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang
Email: jiangyizhou36@163.com

Received: Nov. 20th, 2019; accepted: Dec. 23rd, 2019; published: Dec. 30th, 2019

Abstract

Plant transcription factors regulate the expression of vast downstream genes and play an important role in the regulation of plant growth and development, as well as its response to environment. With the development of transcription factors in model plants and crops, the research methods of transcription factors are also being innovated. We describe the research methods of plant transcription factors from two aspects: protein-protein interaction and target gene-protein interaction, so as to provide a reference method for the related research of plant transcription factors. Protein-protein interaction methods include: yeast two-hybrid system, fluorescence resonance energy transfer, bimolecular fluorescence complementation, pull down and co-immunoprecipitation; methods for target gene-protein interaction include: yeast one-hybrid system, chromatin immunoprecipitation, electrophoretic mobility shift assay and luciferase reporter assay.

Keywords

Plant Transcription Factor, Transcription Control, Protein-Protein Interaction, Target Gene-Protein Interaction

植物转录因子研究方法

周蒋毅, 周倩

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华
Email: jiangyizhou36@163.com

收稿日期: 2019年11月20日; 录用日期: 2019年12月23日; 发布日期: 2019年12月30日

摘要

植物转录因子可以调控众多下游基因的表达, 在植物的生长发育、响应外界环境刺激等方面起着重要的

调控作用。随着转录因子在模式植物和作物中基因转录调控的研究不断深入, 转录因子研究方法也在持续创新。我们主要从蛋白质与蛋白质互作和靶基因与蛋白质互作这两个方面阐述植物转录因子研究方法, 为植物转录因子的相关研究提供参考方法。蛋白质与蛋白质互作的方法主要有: 酵母双杂交系统、荧光共振能量转移技术、双分子荧光互补技术、下拉实验和免疫共沉淀技术; 靶基因与蛋白质互作的方法主要有: 酵母单杂交系统、染色质免疫沉淀技术、凝胶电泳迁移技术和荧光素酶报告系统。

关键词

植物转录因子, 转录调控, 蛋白质与蛋白质互作, 靶基因与蛋白质互作

Copyright © 2020 by author(s) 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

1. 引言

转录因子(Transcription Factor, TF)也称反式作用因子, 其可直接或间接与基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合、对基因转录进行调控的蛋白质[1]。其主要功能是激活或抑制基因的转录效应。典型的转录因子一般具有 4 个功能结构域, 即 DNA 结合结构域(DNA-Binding Domain)、转录调控结构域(Transcription Regulation Domain)、核定位信号区(Nuclear Location Signal)和寡聚化位点区(Oligomerization Site)。DNA 结合结构域特异性结合顺式作用元件; 转录调控结构域激活或抑制靶基因表达; 核定位信号区是转录因子中富含精氨酸和赖氨酸残基的核定位区域, 转录因子进入细胞核的过程受该区段控制; 寡聚化位点区是不同转录因子借以发生相互作用的功能域。这些结构域共同调节靶基因的转录起始[1] [2]。

转录因子在植物的生长发育及对外界环境刺激等方面发挥着重要的调控作用。从 1987 年 Paz-AerS 首次报道玉米转录因子基因的克隆以来, 相继从高等植物中分离出的调控干旱、高盐、低温、激素、病原反应及生长发育等相关基因表达的转录因子已达数百种[3]。植物中约有 58 个转录因子家族[4], 其中有 6 个转录因子家族据研究报道参与了生物和非生物胁迫反应, 如 AP2/ERF (APETALA2/乙烯响应因子), bHLH (基础螺旋 - 环 - 螺旋), MYB (与成髓细胞相关), NAC (无顶端分生组织(NAM)), 拟南芥转录激活因子(ATAF1/2), 杯状子叶(CUC2), WRKY 和 bZIP (碱性亮氨酸拉链) [5] [6]。

随着转录因子在模式植物和作物中基因转录调控的研究不断深入, 转录因子研究方法也在持续创新。我们主要从蛋白质与蛋白质互作和靶基因与蛋白质互作这两个方面阐述植物转录因子研究方法。

2. 蛋白质与蛋白质互作

2.1. 酵母双杂交系统

酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system, Y2H)于 1989 年首次开发, 彻底改变了寻找和鉴定互作蛋白的过程[7]。该系统根据酵母 GAL4 转录因子的特性, 由 DNA 结合结构域(Binding Domain, BD)和转录激活结构域(Activation Domain, AD)组成。DNA 结合结构域由 GAL4 N 端 1-147 位氨基酸残基组成, 转录激活结构域由 C 端 768-881 位氨基酸残基组成[8]。这两个结构域之间由大的结构区域隔开, 独立且功能稳定。一般情况下, 单独的 BD 结合 DNA 上游激活序列(Upstream Activating Sequence, UAS)但不引起转录, 单独的 AD 不能与 UAS 结合, 只有当两个相互作用的蛋白质分别与 BD 和 AD 融合时, 它们的相互作用产生嵌合型转录因子从而引起启动子下游基因的转录。

依据此特性, 将编码已知蛋白(诱饵蛋白, Bait)的基因构建到含有 BD 序列的载体上, 在酵母中表达产生融合蛋白 BD-Bait, 将编码未知蛋白(猎物蛋白, Prey)的基因构建到含有 AD 序列的载体上, 在酵母中表达产生融合蛋白 AD-Prey, 当 BD-Bait 与 AD-Prey 在酵母核中相互作用时, DNA-BD 和 AD 接近以恢复功能性 GAL4 转录激活因子, 前者与报告基因(如 lacZ、ADE2、HIS3 和 MEL1)的 UAS 结合, 从而启动报告基因的表达[8]。因此可以通过判断酵母克隆能否在与报告基因对应的营养缺陷型培养基上生长来证明两个蛋白是否存在相互作用。

与其它的研究蛋白质相互作用的方法相比, 假阴性、假阳性以及互作蛋白的强制性核定位是 Y2H 的局限, 当然 Y2H 有其独特的优点。首先, Y2H 不仅可以检测稳定的相互作用蛋白, 还可以检测弱而短暂的蛋白相互作用[9]。第二, 由于 Y2H 是在酵母细胞核内进行的, 因此检测的蛋白质可能以天然构象存在[8]。第三, Y2H 是对生化方法(如免疫共沉淀和质谱分析)的补充[9] [10]。近年来 Y2H 得到了很大的改进, 不仅可以应用于蛋白质-DNA 相互作用[11]和酵母三杂交[12], 还可以用于膜蛋白, DNA 结合蛋白和 RNA 结合蛋白的相互作用研究[13]。

2.2. 荧光共振能量转移技术

高端共聚焦显微镜和荧光蛋白的发展促进了亚细胞尺度的蛋白质分析。荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)是指处于激发态的供体荧光蛋白将能量以非辐射的方式转移到附近的受体分子[14]。发生 FRET 必须有三个先决条件: 1) 供体发射和受体吸收的光谱重叠区域必须有有效的能量转移; 2) 荧光基团之间的距离必须小于 10 nm; 3) 荧光基团的双极取向必须以理想的平行方式对齐。虽然 FRET 常用于蛋白质相互作用, 但实际上是通过理论计算来检测[15]。

有很多方法可以检测到 FRET, 每种方法都各有好处和缺陷。目前有三种最常用的技术: 1) 敏化发射测量(FRET-SE); 2) 受体光漂白(FRET-AB); 3) 荧光寿命成像(FRET-FLIM)。

敏化发射测量(FRET-SE)主要用于动态检测活细胞中的 FRET 效率[16]。FRET-SE 的限制在于每次实验需要利用至少 3 个对照样本对光学检测系统以及荧光基团的光学性质进行事先校正, 一旦校正完成, 后续实验不能再改变任何系统参数, 且每次实验都要重新校正, 这极大地增加了实验的工作量和难度。

受体光漂白(FRET-AB)通过检测光漂白受体漂白前后供体的荧光强度来获得 FRET 效率[17]。这是一种直接的方法, 不需要高端显微镜, 也不受光谱影响, 可以自己控制样品。

荧光寿命成像显微术(FRET-FLIM)主要通过测量受体存在和不存在时的供体分子的荧光寿命来确定 FRET 效率[18]。这是一种不受光谱, 供体或受体浓度差异, 激发强度变化和光漂白影响的技术[19]。其限制因素主要是系统价格昂贵, 而且需要熟练的操作人员进行操作。

2.3. 双分子荧光互补技术

双分子荧光互补技术(Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)最初从大肠杆菌发展而来, 后来广泛适用于哺乳动物和植物系统[20]。其原理是将荧光蛋白在合适的位点切开形成不发荧光的 N 端和 C 端片段, 这 2 个片段借助融合于其上的目标蛋白的相互作用, 彼此靠近重新形成具有活性的荧光蛋白, 并在该荧光蛋白的激发光激发下发射荧光。尽管 BiFC 被广泛应用, 但它受到两个主要限制: 1) 估计半衰期为 10 年的分裂荧光蛋白片段的不可逆互补排除了相互作用动力学的分析; 2) 大多数分裂片段可以不受阻碍地自发重新组装。这些缺陷增加了假阳性的可能。

2.4. Pull down 和免疫共沉淀技术

Pull down 技术主要在体外验证两种蛋白之间是否存在直接的相互作用。主要有两种常用的 pull down 方法: 一种是用谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione s-Transferase, GST)标签(GST-tag)的亲纯化柱进行的,

称为 GST-pull down; 一种是用带组氨酸(Histidine, His)标签(His-tag)的亲和纯化柱进行的, 称为 His-pull down [21]。以 GST-pull down 为例, 首先是获得带有 GST 标签的融合蛋白, 然后将带有 GST 标签的融合蛋白亲和到谷胱甘肽层析柱上, 接着将与融合蛋白发生相互作用的蛋白被亲和到谷胱甘肽层析柱上, 最后切掉标签, 洗脱得到相互作用的蛋白。

免疫共沉淀技术(Co-Immunoprecipitation, Co-IP)以抗体和抗原之间的专一性结合作用为基础, 用于检测和确定生理条件下蛋白质之间的相互作用。其基本原理是将细胞在非变性条件下裂解, 在细胞裂解液中加入特异性的抗体, 这样抗体可以和已知的抗原形成抗原-抗体复合物, 如果在系统中存在与已知抗原相互作用的蛋白质, 该蛋白质也会以复合物的形式沉淀下来, 经过洗脱就可以得到与已知抗原相互作用的蛋白质, 然后进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析[22]。该技术研究的相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的处于天然状态的, 因此可避免人为的影响, 同时可分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物。但 Co-IP 难以检测到弱或瞬时相互作用。此外, 多个相互作用蛋白质复合物的存在也可引起 Co-IP 中的相互作用。

3. 靶基因与蛋白质互作

3.1. 酵母单杂交系统

酵母单杂交系统(Yeast one-hybrid system, Y1H)由酵母双杂交系统发展而来, 是一种在酵母细胞内分析与鉴定转录因子和 DNA 顺式作用元件相互作用的有效方法[12]。依据此原理构建目的基因与转录激活结构域融合的载体, 将顺式作用元件和报告基因分别连在启动子的上游和下游, 转录激活域融合蛋白与特异的 DNA 序列结合激活启动子下游报告基因表达。因此可以通过判断酵母克隆能否在与报告基因对应的营养缺陷型培养基上生长来证明目的蛋白能否与 DNA 序列结合。由于酵母单杂交系统常常受所用报告基因的影响, 较高的假阳性一直是该技术的“瓶颈”问题。此外, 在酵母单杂交系统中, 假阴性一直被忽略。如某些外源基因的蛋白表达产物可能对酵母本身有毒性作用, 影响酵母细胞的生长和表型, 而这其中可能就包含着与靶 DNA 序列相互作用的蛋白。

3.2. 染色质免疫沉淀技术

染色质免疫沉淀技术(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)是一种利用抗原抗体反应的特异性, 在染色质水平上真实反映体内基因组 DNA 与蛋白质结合情况的转录调控技术。其原理是在生理条件下把细胞内的 DNA 与蛋白质交联在一起, 通过超声波将染色质随机切成小片段, 利用抗原抗体的特异性识别反应, 将与目的蛋白结合的 DNA 沉淀下来, 检测目的片段得到蛋白质与 DNA 相互作用信息[23]。Chip 实验涉及众多的实验步骤, 包括细胞固定、染色质断裂、染色质免疫沉淀、解交联、DNA 的纯化以及 DNA 的鉴定, 而且结果的重复性较低, 因此对 Chip 实验过程的每一步都应设计相应的对照。

近年来发展起来的 Chip-seq 技术将染色质免疫沉淀技术(Chip)与芯片技术和第二代测序技术(seq)相结合, 用来进行靶基因的高通量筛选, 为研究目的蛋白与整个基因组相互作用提供了可能。

3.3. 凝胶电泳迁移技术

凝胶电泳迁移技术(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)又称为电泳迁移率改变分析技术和凝胶阻滞实验。这是一种利用探针体外分析 DNA 与蛋白质相互作用的凝胶电泳技术[24]。其原理是蛋白质和 DNA 结合后增加了相对分子质量, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中, DNA-蛋白质复合物与单一的 DNA 片段相比, 前者迁移速度明显较慢。具体方法是将含有假定蛋白质结合位点的已标记 DNA 片段与纯化蛋白进行孵育, 然后将反应产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。传统的 32P 标记探针的凝胶

阻滞实验, 具有很高的灵敏度, 但会接触到危险性的放射性同位素且不容易定量分析。即使现在有很多研究报道利用非放射性标记的凝胶阻滞实验, 但非放射性标记探针的凝胶阻滞试剂盒的费用很高。

3.4. 荧光素酶报告系统

荧光素酶报告系统(Luciferase reporter assay)指的是以荧光素为底物来检测荧光素酶活性的检测系统[25]。荧光素酶是一种广泛使用的报告基因, 其可以催化荧光素氧化成氧化荧光素, 在荧光素氧化的过程中, 会发出生物荧光(bioluminescence)。荧光素和荧光素酶这一发光系统具有极高的灵敏性。荧光素酶不仅可以作为一种报告基因进行检测分析, 还可以用于化学污染物的监测与分析, 此外还可以用于 RNA 干扰的研究、蛋白质之间作用的研究及微生物检测等, 应用前景十分广阔[26]。

4. 结论

转录调控在拟南芥、水稻等模式植物和作物中的研究越来越多。转录调控技术的应用有助于更好地阐明植物内部的转录调控机制。在这篇综述中, 我们从蛋白质与蛋白质互作和靶基因与蛋白质互作这两个方面总结了植物转录因子主要分析方法, 以期能为植物转录因子的相关研究提供参考方法。

参考文献

- [1] 刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报, 2000, 45(14): 1465-1474.
- [2] Liu, L., White, M.J. and MacRae, T.H. (1999) Transcription Factors and Their Genes in Higher Plants. *European Journal of Biochemistry*, **262**, 247-257. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00349.x>
- [3] Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., et al. (1987) The Regulatory c1 Locus of *Zea mays* Encodes a Protein with Homology to Myb Proto-Oncogene Products and with Structural Similarities to Transcriptional Activators. *The EMBO Journal*, **6**, 3553-3558. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02684.x>
- [4] Jin, J., Tian, F., Yang, D.C., et al. (2017) Plant TFDB 4.0: Toward a Central Hub for Transcription Factors and Regulatory Interactions in Plants. *Nucleic Acids Research*, **45**, 1040-1045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw982>
- [5] Singh, K., Foley, R.C. and Onate-Sanchez, L. (2002) Transcription Factors in Plant Defense and Stress Responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 430-436. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00289-3)
- [6] Seo, E., Choi, D. and Choi (2015) Functional Studies of Transcription Factors Involved in Plant Defenses in the Genomics Era. *Briefings in Functional Genomics*, **14**, 260-267. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv011>
- [7] Fields, S. and Song, O. (1989) A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions. *Nature*, **340**, 245-246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- [8] Cowell, I.G. (1997) Yeast Two-Hybrid Library Screening. *Methods in Molecular Biology*, **69**, 185-202. <https://doi.org/10.1385/0-89603-383-X:185>
- [9] Stasi, M., De Luca, M. and Bucci, C. (2015) Two-Hybrid-Based Systems: Powerful Tools for Investigation of Membrane Traffic Machineries. *Journal of Biotechnology*, **202**, 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.007>
- [10] Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) The Two-Hybrid System: A Method to Identify and Clone Genes for Proteins That Interact with a Protein of Interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9578-9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9578>
- [11] Reece-Hoyes, J.S., Barutcu, A.R., McCord, R.P., et al. (2011) Yeast One-Hybrid Assays for Gene-Centered Human Gene Regulatory Network Mapping. *Nature Methods*, **8**, 1050-1052. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1764>
- [12] Reece-Hoyes, J.S. and Marian Walhout, A.J. (2012) Yeast One-Hybrid Assays: A Historical and Technical Perspective. *Methods*, **57**, 441-447. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.027>
- [13] Petschnigg, J., Groisman, B., Kotlyar, M., et al. (2014) The Mammalian-Membrane Two-Hybrid Assay (MaMTH) for Probing Membrane-Protein Interactions in Human Cells. *Nature Methods*, **11**, 585-592. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2895>
- [14] Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., et al. (2016) A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel, Switzerland)*, **16**, pii: E1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- [15] Breusegem, S.Y., Levi, M. and Barry, N.P. (2006) Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Nephron. Experimental Nephrology*, **103**, 41-49. <https://doi.org/10.1159/000090615>

- [16] Kenworthy, A.K. and Eddidin, M. (1998) Distribution of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein at the Apical Surface of MDCK Cells Examined at a Resolution of < 100 Å Using Imaging Fluorescence Resonance Energy Transfer. *The Journal of Cell Biology*, **142**, 69-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.69>
- [17] Zal, T. and Gascoigne, N.R. (2004) Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells. *Biophysical Journal*, **86**, 3923-3939. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.022087>
- [18] Zadran, S., Standley, S., Wong, K., et al. (2012) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Biosensors: Visualizing Cellular Dynamics and Bioenergetics. *Applied microbiology and Biotechnology*, **96**, 895-902. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4449-6>
- [19] Bucherl, C.A., Bader, A., Westphal, A.H., et al. (2014) FRET-FLIM Applications in Plant Systems. *Protoplasma*, **251**, 383-394. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0595-7>
- [20] Miller, K.E., Kim, Y., Huh, W.K. and Park, H.O. (2015) Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *Journal of Molecular Biology*, **427**, 2039-2055. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.005>
- [21] Schafer, F., Seip, N., Maertens, B., et al. (2015) Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, **559**, 127-139. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.005>
- [22] Lin, J.S. and Lai, E.M. (2017) Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology*, **1615**, 211-219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_17
- [23] Mundade, R., Ozer, H.G., Wei, H., et al. (2014) Role of ChIP-seq in the Discovery of Transcription Factor Binding Sites, Differential Gene Regulation Mechanism, Epigenetic Marks and Beyond. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **13**, 2847-2852. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949201>
- [24] Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1992) Basic Peptides Enhance Protein/DNA Interaction *in Vitro*. *Nucleic Acids Research*, **20**, 3523. <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3523>
- [25] Gould, S.J. and Subramani, S. (1988) Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology. *Analytical Biochemistry*, **175**, 5-13. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90353-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90353-3)
- [26] 耿德玉, 原媛, 郭华荣. 双荧光素酶报告基因系统的应用研究进展[J]. 科技资讯, 2012(21): 1.