

# 水稻 OsVDAC4 诱饵蛋白载体的构建及鉴定

白雪琪, 谭艳平, 覃永华, 王亚楠, 杨武, 龚秋涵, 刘学群, 王春台\*

(中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室/武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430074)

**摘要** [目的]获得可用于筛选膜蛋白酵母双杂交文库的诱饵蛋白载体。[方法]在对 OsVDAC4 进行生物信息学分析的基础上,将 OsVDAC4 全长 ORF 分别与 pBT3-N 和 pBT3-SUC 连接,构建 2 个诱饵蛋白载体 pBT3-OsVDAC4-N-Cub 和 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub,利用膜蛋白酵母双杂交技术鉴定出可用于筛选的诱饵蛋白载体。[结果]pBT3-OsVDAC4-N-Cub 和 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 都可以与目标蛋白互作,但由于 OsVDAC4 的 N 端有约 50 个可自由伸展的氨基酸残基导致 pBT3-OsVDAC4-N-Cub 本底反应非常强,OsVDAC4 的 C 端存在于膜中而没有可自由伸展的氨基酸残基,pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 的本底反应很弱。[结论]pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 可用于文库筛选,这为获取 OsVDAC4 的互作蛋白提供了基础。

**关键词** OsVDAC4;诱饵蛋白载体;膜蛋白酵母双杂交

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)36-0090-05

## Construction and Identification of OsVDAC4 Bait Protein Vector in Rice

BAI Xue-qi, TAN Yan-ping, QIN Yong-hua et al (Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

**Abstract** [Objective] To achieve the bait protein vector that suited for screening of the membrane protein yeast two-hybrid library. [Method] On the basis of bioinformatics analysis of OsVDAC4, 2 bait protein vectors, pBT3-OsVDAC4-N-Cub and pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub, were constructed through connecting the full length ORF with pBT3-N and pBT3-SUC respectively. The bait protein vector best suited to screen the library was identified with membrane protein yeast two-hybrid technique. [Result] There were interactions between both pBT3-OsVDAC4-N-Cub and pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub with the target protein. However, because of about 50 free-stretching amino acid residues in the N-terminal of OsVDAC4, there was a very strong background reaction between pBT3-OsVDAC4-N-Cub and other proteins. And the C-terminal of OsVDAC4 existed in the membrane without free-stretching amino acid residues, pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub's background reaction was very weak. [Conclusion] pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub can be used for library screening, which provides a basis for acquiring proteins interacted with OsVDAC4.

**Key words** OsVDAC4; Bait protein vector; Membrane-based yeast two-hybrid

电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channels, VDACs)最早是从草履虫线粒体外膜上分离得到的<sup>[1]</sup>,它广泛存在于线粒体外膜上,是线粒体外膜上最丰富的蛋白之一<sup>[2]</sup>。VDACs 通过与胞质、线粒体和细胞骨架蛋白以及其他膜通道相互作用,通过线粒体外膜的代谢物或离子转运以及线粒体介导的细胞凋亡和能量代谢等参与许多细胞进程<sup>[3-4]</sup>。VDACs 可以折叠成 19- $\beta$ -链的桶状结构,且它的 N 末端在桶外部并且包含  $\alpha$ -螺旋结构<sup>[5]</sup>。几乎所有细胞功能都依赖复杂的蛋白间相互作用来完成<sup>[6]</sup>。为了探究水稻中 VDAC 的结构、功能及作用机理,生物技术国家民委重点实验室植物遗传与发育课题组之前在日本晴中鉴定出 8 种 VDAC 蛋白,并对其结构及表达模式等进行了预测,OsVDAC4 编码 317 个氨基酸<sup>[7]</sup>,OsVDAC4 蛋白定位于线粒体<sup>[8]</sup>。为了研究 OsVDAC4 的作用机理,必须获取与其相互作用的蛋白质因子。用于膜系统相互作用蛋白筛选的膜酵母双杂交系统要求相互作用的蛋白均位于细胞质中,所以该研究针对预测得到的 OsVDAC4 跨膜方式,构建 2 种不同的 OsVDAC4 全长的诱饵蛋白载体(pBT3-OsVDAC4-N-Cub 和 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub),鉴定出适合筛选 OsVDAC4 互作蛋白的诱饵载体,为筛选 OsVDAC4 的互作蛋白奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 酵母菌株 NMY51、载体 pBT3-N、pBT3-SUC、pPR3-N 均购自 Dualsystems Biotech 公司;限制性内切酶 *Sfi* I、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶购自 BioLabs 公司;各种氨基酸、YNB、X-Gal、Z 缓冲液均购自 Coolaber 公司;3-氨基-1,2,4-三唑(3-AT)、RNase A、鲑鱼精购自 SIGMA 公司;琼脂、DMSO 购自赛国生物科技有限责任公司;酵母提取物、PEG4000 购自 OX-OID 公司;氯化钠、醋酸锂、葡萄糖、鱼粉蛋白胨购自国药集团化学试剂有限公司;片段回收试剂盒购自 Axygen 公司;酵母质粒提取试剂盒购自康为公司;Ex *Taq* 酶、反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;水稻粳泰 B 幼穗 cDNA 文库、日本晴种子由中南民族大学生物技术国家民委重点实验室提供。

**1.2 仪器** C1000 touch thermal cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad);Universal Hood II 凝胶成像系统(美国);Heraeus Multifuge X1R 高性能通用台式冷冻离心机(德国);Heraeus Pico 21 Centrifuge 微量台式冷冻离心机(德国);SBD50-1 水浴锅(丹麦 Heto-Holten);Nanodrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪(美国);DH4000A 电热恒温培养箱(中国);SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(中国);72N 紫外可见分光光度计(中国);ZQZY-70BS 两层小容量振荡培养箱。

## 1.3 方法

**1.3.1 RNA 的提取与反转**。取日本晴 1~2 cm 的幼穗放入预处理后预冷的研钵中,加入液氮快速研磨,将 100 mg 粉末转移到 RNase free 的 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL TRIzol,迅速

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31170226)。

**作者简介** 白雪琪(1993—),女,湖北仙桃人,硕士研究生,研究方向:分子遗传学。\*通讯作者,教授,硕士生导师,博士,从事分子遗传学研究。

**收稿日期** 2018-11-12

混匀。室温静置 5 min 后加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min,吸取 400  $\mu\text{L}$  上清。加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇,混匀,室温静置 10 min。4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min,得到白色沉淀。沉淀用 1 mL 75% 乙醇(DEPC 水配制)洗涤 2 次,晾干后加 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解。65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,测定 RNA 浓度,取 2  $\mu\text{L}$  RNA 样品进行电泳检测,剩下样品用 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录,具体步骤参考试剂盒说明书。

**1.3.2 OsVDAC4 的扩增。**从日本晴幼穗 cDNA 中分别扩增

出用于连接 pBT3-N 和 pBT3-SUC 的目的片段 OsVDAC4-N 和 OsVDAC4-SUC。20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系组成为 10 $\times$ Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTPs mixture 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  OsVDAC4 ORF 扩增引物(表 1)各 0.3  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  Ex Taq 0.1  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、无菌水 15.3  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,32 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后,取 2  $\mu\text{L}$  产物进行电泳检测,剩下产物用于切胶回收。用 Axygen 公司的切胶回收试剂盒回收目的片段,具体步骤参照试剂盒说明书。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of the primers

用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
OsVDAC4 ORF 的扩增 Amplification of OsVDAC4 ORF	V4 F	5'-ATTAACAAGGCCATTACGCGCCATGGAGCGGAGACGGAGTG-3'
	V4 N R	5'-AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTCAGGCGTTGAGAACCAGCG-3'
	V4 SUC R	5'-AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTCAGGCGTTGAGAACCAGCGACA-3'
诱饵蛋白载体阳性鉴定 Positive identification of bait protein vector	pBT3-N F	5'-CAGAAGGAGTCCACCTTAC-3'
	pBT3-N R	5'-AAGCGTGACATAACTAATTAC-3'
	PBT3-SUC F	5'-TGGCATGCATGTGCTCTG-3'
	pBT3-SUC R	5'-GTAAGGTGGACTCCTTCT-3'

**1.3.3 诱饵蛋白载体构建。**用限制性内切酶 *Sfi* I 分别酶切 PCR 扩增后回收的 OsVDAC4-N、OsVDAC4-SUC 以及载体 pBT3-N 和 pBT3-SUC 质粒。50  $\mu\text{L}$  酶切反应体系组成为 DNA 15  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ NEB buffer 5  $\mu\text{L}$ 、20 U/ $\mu\text{L}$  *Sfi* I 1  $\mu\text{L}$ 、无菌水 29  $\mu\text{L}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$  酶切 6 h。用 Axygen 公司的清洁回收试剂盒回收酶切后的 DNA,具体步骤参考试剂盒说明书。

**1.3.3.1 目的片段与载体的连接。**将回收的目的片段 OsVDAC4-N 连接载体 pBT3-N,OsVDAC4-SUC 连接载体 pBT3-SUC。20  $\mu\text{L}$  连接体系组成为质粒 1  $\mu\text{L}$ 、目的片段 5  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$  T4-Ligase buffer 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 U/ $\mu\text{L}$  T4-Ligase 1  $\mu\text{L}$ 、无菌水 11  $\mu\text{L}$ 、16  $^{\circ}\text{C}$  过夜。

**1.3.3.2 连接产物转化大肠杆菌。**从-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出制备好的感受态细胞,置于冰浴上解冻,加入连接产物,混匀,在冰浴上静置 30 min,42  $^{\circ}\text{C}$  热激 90 s,冰上放置 5 min,再加入 800  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基(不含抗生素),37  $^{\circ}\text{C}$  180 r/min 1 h。取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂抗性平板,37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜。

**1.3.3.3 重组质粒的阳性鉴定。**从平板上挑取单菌落于液体培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜(180 r/min),取菌液 1.4 mL 收集菌体,加 100  $\mu\text{L}$  Solution I 使沉淀重悬,加 200  $\mu\text{L}$  Solution II,混匀后放置冰浴 3 min,加 150  $\mu\text{L}$  Solution III,混匀后冰浴放置 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$  14 000 r/min 离心 5 min,取上清至另一离心管中,加入 2/3 体积的异丙醇,摇匀,4  $^{\circ}\text{C}$  14 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 500  $\mu\text{L}$  75% 乙醇洗涤 2 次。晾干后加入 30  $\mu\text{L}$  1 $\times$ TE(1:1 000 加入 RNase A),溶解后 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

分别用 pBT3-N F/pBT3-N R,pBT3-SUC F/pBT3-SUC R 引物(表 1)进行重组质粒的阳性鉴定,PCR 体系和程序同“1.3.2”。

**1.3.4 诱饵蛋白载体的筛选。**

**1.3.4.1 酵母菌株 NMY51 的活化与收集。**取保存的酵母菌

株 NMY51 在 1 $\times$ YPAD 平板上划线后 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d。挑取单菌落于 50 mL 1 $\times$ YPAD 液体培养基中 30  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养(200 r/min)。当酵母 OD<sub>546</sub> 达 0.6~0.8 时,将菌液置于冰上至完全冷却。将菌液转移至 50 mL 离心管中,2 500 r/min 离心 5 min 收集菌体,再用 2.5 mL 无菌水重悬菌体,置于冰上,备用。

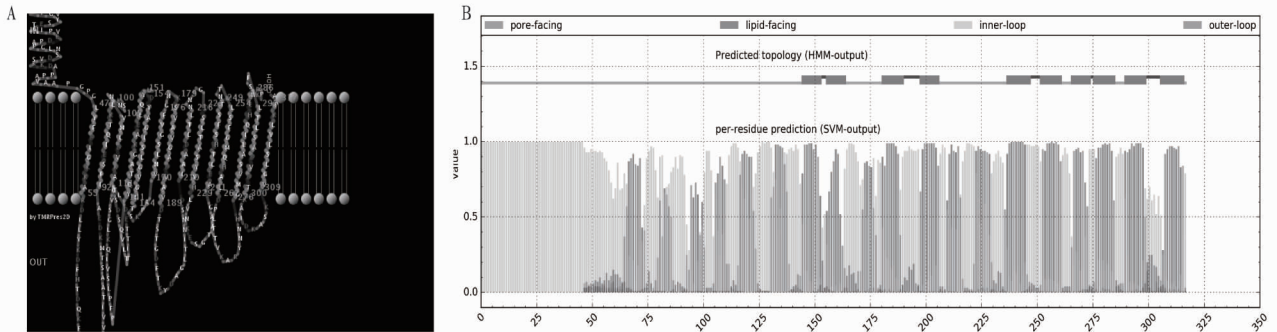
**1.3.4.2 PEG/LiOAc Master Mix 的制备。**将鲑鱼精 DNA (10 mg/mL) 稀释至 2 mg/mL,沸水煮 10 min,立即置于冰上备用。配制 PEG/LiOAc Master Mix 5 份,每份组成为 50% PEG4000 240  $\mu\text{L}$ 、1 mol/L LiOAc 36  $\mu\text{L}$ 、2 mg/mL 鲑鱼精 DNA 25  $\mu\text{L}$ ,总体积 301  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.4.3 诱饵蛋白载体的鉴定。**向上述 5 个装有 PEG/LiOAc Master Mix 的 EP 管中,分别加入 5 组质粒,每组质粒 1.5  $\mu\text{g}$ 。第 1 组 pAI-AIg5-N-Nub I+pCCW-AIg5-C-Cub I,第 2 组 pBT3-OsVDAC4-N-Cub+pAI-AIg5-N-Nub I,第 3 组 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub+pAI-AIg5-N-Nub I,第 4 组 pBT3-OsVDAC4-N-Cub+pDL2-AIg5-N-Nub G,第 5 组 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub+pDL2-AIg5-N-Nub G。然后向每管中分别加入 100  $\mu\text{L}$  NMY51 菌液,涡旋振荡 1 min 使其混合均匀。42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 45 min(每 15 min 颠倒混合 1 次)后 700 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 100  $\mu\text{L}$  0.9% NaCl 溶液重悬。分别取 50  $\mu\text{L}$  菌液涂 SD-Trp-Leu 和 SD-Trp-Leu-His-Ade 固体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 3~4 d。

**1.3.5 抑制假阳性 3-AT 浓度的筛选。**将质粒 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 和 pBT3-OsVDAC4-N-Cub 分别转化入酵母菌 NMY51,获得含诱饵蛋白载体的酵母菌株。再将文库空载质粒 pPR3-N 分别转化入含不同诱饵蛋白载体的酵母菌株,用 2 $\times$ YPAD 液体培养基 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 90 min(150 r/min)。收集菌体并用 0.9% NaCl 溶液重悬菌体,取 300  $\mu\text{L}$  菌液涂布

含有不同浓度 3-AT 的 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板, 30 °C 倒置培养 3~4 d。

**1.3.6 酵母阳性克隆 Lac Z 活性检测。**参考湛鑫<sup>[9]</sup>的方法, 按 20 μL X-gal (20 mg/mL) : 12 μL β-巯基乙醇 : 2 mL Z buffer 配制染色液, 加到放置有 2 张滤纸的 9 cm 培养皿中, 使滤纸浸湿。取一张浸湿的滤纸, 覆盖在已 30 °C 培养 3~4 d 的菌体表面, 轻按滤纸后用镊子小心揭下, 并置于液氮中迅速冷冻 10~30 s, 然后在室温中解冻。将解冻的滤纸置于另一张浸湿的滤纸上, 注意让粘有菌体的一面朝上, 赶走滤纸间的气泡。30 °C 孵育 5 min, 观察菌斑是否显出蓝色。



注: A 为 PRED-TMBB; B 为 BOCTOPUS

Note: A. PRED-TMBB; B. BOCTOPUS

图 1 OsVDAC4 跨膜结构预测

Fig.1 Prediction of transmembrane structure of OsVDAC4



图 2 OsVDAC4 的空间结构预测

Fig.2 Prediction of spatial structure of OsVDAC4

能位于膜中间的桶状结构中。

**2.2 诱饵蛋白载体构建** 试验表明, *OVDAC4* 在花药中有高表达, 而在其他部位几乎都不表达<sup>[7]</sup>, 所以用日本晴幼穗提取 RNA, 反转成 cDNA, 用于扩增 *OsVDAC4*。 *OsVDAC4* 全长 954 bp, 从图 3 可以看出 PCR 扩增出来的条带大小正确, 可以用于下一步试验。

将片段用试剂盒回收后, 连接载体 pBT3-N 和 pBT3-SUC。将连接产物转化入大肠杆菌 DH5α, 涂带有 Kan 的抗性平板, 挑取单菌落扩大培养, 提取质粒。图 4 是对质粒进行 PCR 后的结果, 条带大小正确, 测序结果表明序列正确, 可用于诱饵蛋白载体的筛选。

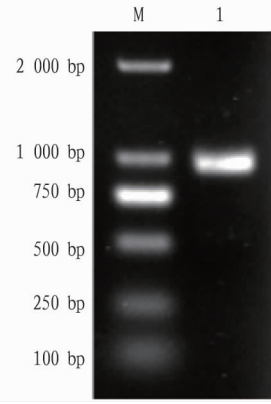
**2.3 OsVDAC4 诱饵蛋白载体的筛选** 泛素蛋白可以分为 Cub (包含泛素蛋白的第 34~76 氨基酸) 和 NubI (包含泛素蛋白的第 1~38 氨基酸), Cub 与 NubI 在自然条件下可以形成

## 2 结果与分析

**2.1 OsVDAC4 的跨膜结构及空间结构预测** 用 PRED-TMBB<sup>[10]</sup> 和 BOCTOPUS<sup>[11]</sup> 在线软件对 *OsVDAC4* 的跨膜结构进行预测, 结果发现 *OsVDAC4* 有 14 次跨膜, 其 C 端跨膜结构较为集中, 且 C 端可能位于膜内靠内侧、N 端位于膜内侧 (图 1)。进一步用 I-TASSER 预测 *OsVDAC4* 的空间结构<sup>[12]</sup>, 根据 <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 预测 (图 2), *OsVDAC4* 的 C 端可能位于膜内靠内侧, 与 PRED-TMBB 和 BOCTOPUS 的预测一致; 而 N 端预测结果稍有差异, 有可能位于膜内侧, 也有可能位于膜外侧, 还有可

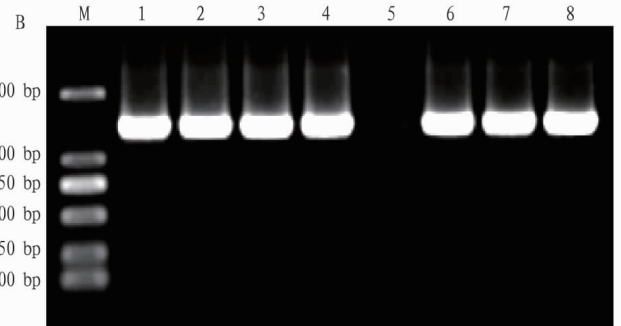
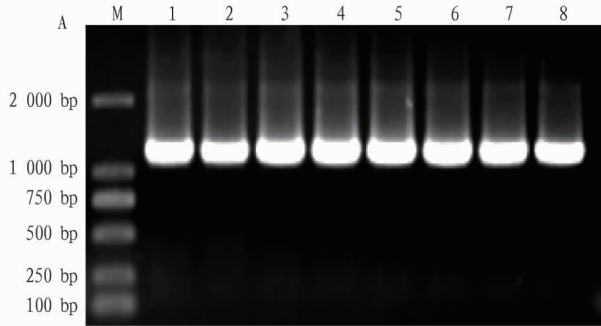
完整的泛素蛋白, 而将 NubI 突变成 NubG 之后, Cub 与 NubG 在自然条件下不能形成完整的泛素蛋白。Alg5 蛋白是一种广泛存在于酵母中的跨膜蛋白, 其 N 端和 C 端均位于细胞质中。该试验采用 3 种不同载体的 Alg5 蛋白 (pAI-Alg5-N-NubI, pDL2-Alg5-N-NubG 和 pCCW-Alg5-C-Cub), pAI-Alg5-N-NubI 与 pCCW-Alg5-C-Cub 作为阳性对照<sup>[9]</sup>。为了确定诱饵蛋白 *OsVDAC4* 的哪一端存在于细胞质中可以与互作蛋白作用, 分别将其 N 端与带有 Cub 的载体 pBT3-N 相连 (pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub), C 端与带有 Cub 的 pBT3-SUC 相连 (pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub), 当诱饵蛋白载体连有泛素 Cub 的 N 端或 C 端也位于细胞质时, 便能同 Alg5 的 N 端或 C 端连接上的 NubI 相互结合, 形成完整泛素分子, 最终导致报告基因的表达, 酵母可以在四缺培养基 SD-Trp-Leu-His-Ade (SD-4) 上生长, GUS 染色为蓝色。该试验将 5 组质

粒 DNA 分别共转入酵母细胞,阳性对照组 (pAI-*Alg5*-N-NubI+ pCCW-*Alg5*-C-Cub) 在 SD-Trp-Leu (SD-2) 平板上长出白色菌落,在四缺培养基 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板上稀释了  $10^{-4}$  后也长出菌落 (图 5A), 说明阳性对照组间的相互作用明显高于试验组和阴性对照组。试验组 pAI-*Alg5*-N-NubI+ pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub (第 2 组) 和 pAI-*Alg5*-N-NubI+ pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub (第 3 组) 在 SD-Trp-Leu 培养基上都有生长,在 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板上也有生长,但第 3 组在 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板上的长势优于第 2 组。在 SD-Trp-Leu 平板上第 2 组长出的菌落是白色的,而第 3 组长出的菌落是粉红色的,根据 DUAL membrane starter kits User Manual 上的说明,当 2 个蛋白之间相互作用弱时,酵母体内的腺嘌呤合成途径受阻,会有红色代谢物积累,因此酵母会呈现出粉红色,而第 3 组在 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板上呈现出白色菌落,且生长状态良好,SD-Trp-Leu 培养



注: M. DL2000; 1. *OsVDAC4*  
Note: M. DL2000; 1. *OsVDAC4*

图 3 *OsVDAC4* PCR 扩增  
Fig.3 Amplification of *OsVDAC4* by PCR



注: A 为 pBT3-N-*OsVDAC4*; B 为 pBT3-SUC-*OsVDAC4*; M 为 DL2000; 1~8 为不同质粒  
Note: A. pBT3-N-*OsVDAC4*; B. pBT3-SUC-*OsVDAC4*; M. DL2000; 1-8. Different plasmids

图 4 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant plasmid by PCR

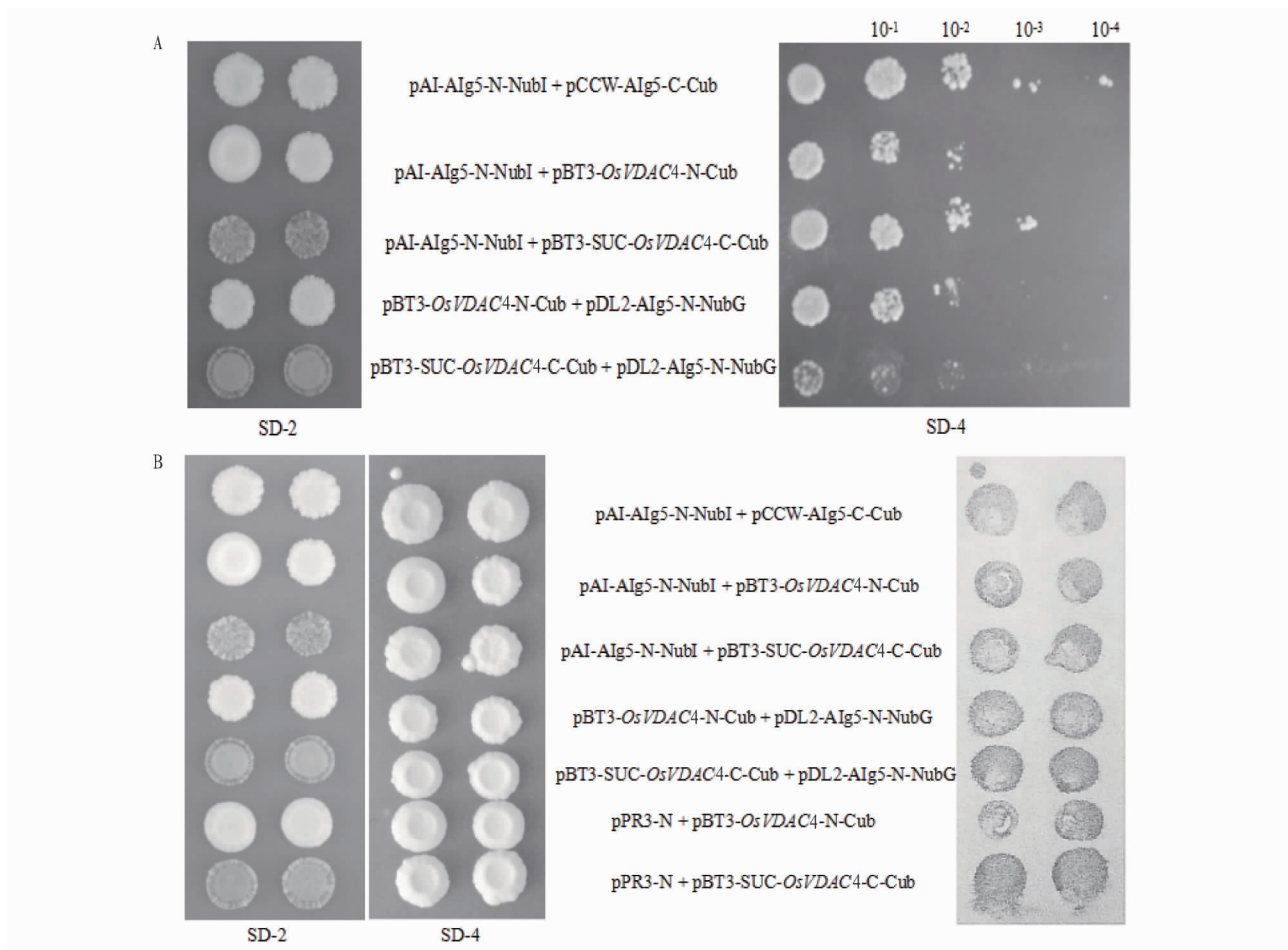
基中要比 SD-Trp-Leu-His-Ade 培养基中多加了 Ade 和 His 这两种氨基酸,由此推测在 SD-Trp-Leu 培养基上酵母呈现出粉红色可能是由于培养基中的 Ade 足够酵母生长所需,不需要自身合成,于是酵母呈现粉红色。但阴性对照组 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub+pDL2-*Alg5*-N-NubG (第 4 组) 和 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub+pDL2-*Alg5*-N-NubG (第 5 组) 在 SD-Trp-Leu 和 SD-Trp-Leu-His-Ade 平板上均有生长,第 5 组的风势较弱 (图 5A)。进一步检测 *Lac Z* 的活性,发现阴性对照组也能染为蓝色 (图 5B)。这些结果说明 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 和 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 都可以用于筛选膜酵母双杂交文库,但可能具有较高的本底反应。

为了降低本底反应,进行 3-AT 的严谨性优化。将文库空载 pPR3-N 分别转化至含有诱饵蛋白载体 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 和 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 的酵母菌株中。pPR3-N 上带有突变的 NubG,诱饵蛋白载体 pBT3-SUC-*OsVDAC4* 上带有 Cub,为了减少假阳性,消除本底反应,在用 3-AT 来减少假阳性的同时也使蛋白互作相对较弱的菌能够生长,设置了 4 个浓度梯度,分别是 0、1.0、2.5、5.0 mmol/L,重复 3 次试验,结果表明在不加 3-AT 的条件下文库空载 pPR3-N 与诱饵蛋白载体 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 没有发

生本底反应 (图 6), 而文库空载 pPR3-N 与诱饵蛋白载体 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 在试验所用的 3-AT 浓度范围内本底反应很强,随后加大 3-AT 浓度,到 80 mmol/L 还是有很强的本底反应。这些结果说明诱饵蛋白载体 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 可以用于膜酵母双杂交文库的筛选。

### 3 讨论

生物技术国家民委重点实验室植物遗传与发育课题组之前在日本晴中鉴定出了 8 个 *VDAC* 基因,即 *OsVDAC1*~8。利用生物信息学方法对 *OsVDAC1*~8 进行了结构分析,并通过 RT-PCR 技术分析了 *OsVDAC1*~8 的表达模式,尝试构建部分 *OsVDACs* 的 RNAi 植株,并取得初步成功。然后对 *OsVDACs* 的原核、真核表达进行研究,并对 *OsVDACs* 进行亚细胞定位。通过膜蛋白酵母双杂交技术从 YTB 幼穗 cDNA 文库中筛选到了 *OsVDAC3* 的 3 个互作蛋白,成功得到了 *OsVDAC3* 超表达植株,并进一步验证了 *OsVDAC3* 与其互作蛋白间的互作。成功得到了 *OsVDAC5* 的 RNAi 转基因植株,并筛选得到了 7 个与 *OsVDAC5* (1~75 aa) 互作的蛋白<sup>[9]</sup>,将其命名为 *OsV5IP1*~7,为了探索 *OsVDAC5* (1~75 aa) 与 *OsV5IP1*~7 是否真正互作,还进行了酵母双杂、pull down、BiFC、亚细胞定位,试验结果显示它们之间发生了互作。



注:A 为互作强度检测;B 为 *Lac Z* 活性检测

Note: A. Interaction strength test; B. *Lac Z* assay

图 5 诱饵蛋白载体的筛选

Fig.5 Screening of bait protein vector

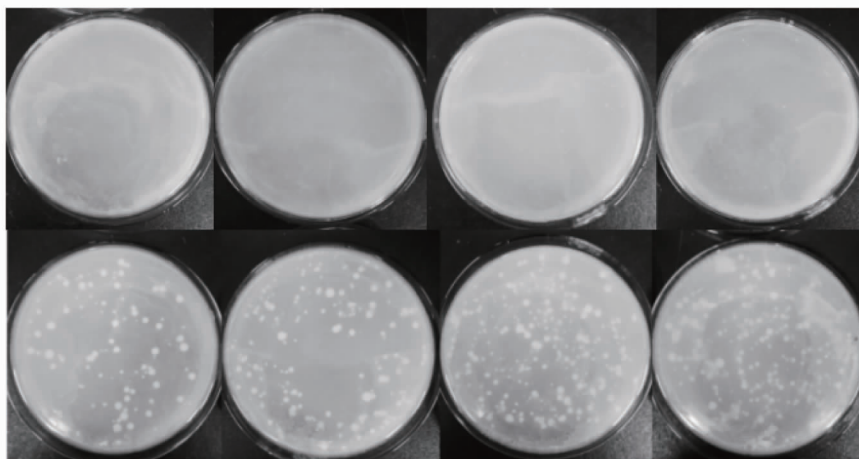


图 6 酵母在不同 3-AT 条件下生长情况

Fig.6 Growth of yeast under different 3-AT conditions

该试验从日本晴幼穗 cDNA 中扩增出 *OsVDAC4* 全长片段,连接载体 pBT3-N 和 pBT3-SUC,得到重组载体 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 和 pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub。在正式筛选文库之前对 2 个诱饵蛋白载体进行筛选,结果表明 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 的试验组和阴性对照都长势良好,相比较

而言,pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 的试验组长势良好的同时,阴性对照长势较弱。并且在之后的 3-AT 浓度筛选试验中发现,pBT3-SUC-*OsVDAC4*-C-Cub 与文库空载几乎没有发生本底反应,而 pBT3-*OsVDAC4*-N-Cub 与文库空载发生 (下转第 124 页)

表4 结球甘蓝不同肥料和肥料配比效益分析

Table 4 Benefit analysis of different fertilizer and fertilizer ratio of head cabbage

处理 Treatment	氮磷钾施入量合计 Application amount of nitrogen, phosphorus and potassium//kg/hm <sup>2</sup>	氮磷钾比对照减少 Decreased amount of nitrogen, phosphorus and potassium compared with the control group//%	产量 Production kg/hm <sup>2</sup>	增产 Increased production kg/hm <sup>2</sup>	净增收益 Increased net income 元/hm <sup>2</sup>	净增利润率 Net profit margin//%
①(空白)	0	100	16 183	-6 505	-12 312.00	-24.63
②(CK)	540.0	—	22 688	—	—	—
③	346.5	35.8	23 142	454	1 089.60	2.00
④	243.0	55.0	24 196	1 508	3 619.20	6.65
⑤	306.0	43.3	24 675	1 987	4 768.80	8.76
⑥	247.5	54.2	25 688	3 000	7 200.00	13.22

### 3 结论

(1) 该试验结果表明,不同肥料和肥料配比对结球甘蓝植株性状的影响主要表现在不同程度地促进植株的生长和叶球的形成,如株高、叶球横径、球围、净菜率等方面。

(2) 该研究以施生命源黄腐酸螯合肥(10-10-10) 300 kg/hm<sup>2</sup>+夏氏蓝得土壤调理剂 150 kg/hm<sup>2</sup>+施可丰稳定性肥料(16-8-18) 375 kg/hm<sup>2</sup> 减肥增效的效果最好,表明在结球甘蓝生产上施用营养全面、适当配比的化肥与有机肥,可以达到减少氮磷钾的施用量,提高肥料利用率,实现增产、增效的目的。

### 参考文献

[1] 中华人民共和国农业部. 到 2020 年化肥使用量零增长行动方案[A].

(上接第 94 页)

的本底反应难以抑制,所以 pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 载体更合适筛库。

根据生物信息学分析,上述试验结果产生的原因可能是由于 OsVDAC4 的 C 端位于膜结构中,与之相连的 Cub 自由度较小,难以与没有互作的空间上较远的 NubG 反应,因此本底反应弱。OsVDAC4 的 N 端 Cub 与没有互作的空载上的 NubG 具有很强的互作,说明其 N 端没有在膜内侧或膜中间的桶状结构中,而是位于膜外侧的细胞质中;由于其 N 端有约 50 个氨基酸残基在膜结构外面处于伸展状态,因此与它相连的 Cub 可以与在空间上相距很远的 NubG 互作,表现为很强的本底反应。综上所述,pBT3-SUC-OsVDAC4-C-Cub 更适合于下一步进行互作蛋白的筛选。

### 参考文献

- [1] SCHEIN S J, COLOMBINI M, FINKELSTEIN A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria[J]. Journal of membrane biology, 1976, 30(2): 99-120.
- [2] MESSINA A. VDAC as a pharmaceutical target[J]. Current medicinal chemistry, 2017, 24(40): 4417-4418.
- [3] MAURYA S R, MAHALAKSHMI R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeo-

2015.

- [2] 朱国梁, 毕军, 夏光利, 等. 不同缓释肥料对黄瓜产量、品质及养分利用率的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2013(1): 68-73.
- [3] 杜建军, 毋永龙, 田吉林, 等. 控/缓释肥料减少氮挥发和氮淋溶的效果研究[J]. 水土保持学报, 2007, 21(2): 49-52.
- [4] 黄益宗, 冯宗炜, 王效科, 等. 硝化抑制剂在农业上应用的研究进展[J]. 土壤通报, 2002, 33(4): 310-315.
- [5] 燕飞. 不同施肥处理对设施黄瓜养分吸收影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [6] 曾祥明, 肖焱波, 段惠明. 稳定性长效复合肥恩泰克在西兰花上的应用效果[J]. 长江蔬菜, 2015(13): 63-64.
- [7] 刘翠玲, 梁志杰, 滕芳超. 含氨基酸水溶肥料在蔬菜上应用及其经济效益[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(30): 93-94.
- [8] 李帆, 万水霞, 蒋光月, 等. 有机肥施用量对甘蓝产量及土壤中养分含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(13): 5776-5778.

stasis: Highlighting hidden structural features and unique functionalities [J]. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2017, 92(4): 1843-1858.

- [4] DELISLE L, FUHRMANN M, QUÉRÉ C, et al. The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* is upaccumulated during infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): An indicator of the Warburg effect [J]. Marine biotechnology, 2018, 20(1): 87-97.
- [5] SHUVO S R, KOVALTCHOUK U, ZUBAER A, et al. Functional characterization of an N-terminally-truncated mitochondrial porin expressed in *Neurospora crassa* [J]. Canadian journal of microbiology, 2017, 63(8): 730-738.
- [6] XING S P, WALLMEROH N, BERENDZEN K W, et al. Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo [J]. Plant physiology, 2016, 171(2): 727-758.
- [7] XU X, TAN Y P, CHENG G, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the VDAC gene family in rice [J]. Genetics and molecular research, 2015, 14(4): 15683-15696.
- [8] 李林鹏. 水稻 4 个 OsVDAC 蛋白的亚细胞定位和超表达 osvdac3 对水稻生长的影响[D]. 武汉: 中南民族大学, 2013.
- [9] 谌鑫. 水稻 OsVDAC5 互作蛋白筛选及其基因 RNA 干涉[D]. 武汉: 中南民族大学, 2015.
- [10] TSIRIGOS K D, ELOFSSON A, BAGOS P G. PRED-TMBB2: Improved topology prediction and detection of beta-barrel outer membrane proteins [J]. Bioinformatics, 2016, 32(17): 665-671.
- [11] HAYAT S, ELOFSSON A. BOCTOPUS: Improved topology prediction of transmembrane  $\beta$  barrel proteins [J]. Bioinformatics, 2012, 28(4): 516-522.
- [12] ZHANG Y. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8 [J]. Proteins, 2009, 77(S9): 100-113.

## 科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过 20 字。英文与中文应相吻合。英文题名词首字母大写,连词及冠词除外。