



利用酵母双杂交系统筛选玉米 ZmPRR73 的互作蛋白

王盼盼,王雷立,张严玲,刘青青,董柯清,李安然,王翠玲

(河南科技大学 农学院,河南洛阳 471023)

摘 要 为了阐明ZmPRR73 基因的生物学功能,构建诱饵表达载体 pGBKT7-ZmPRR73,利用酵母双杂交技术,从长日照光照环境诱导的热带玉米自交系的 cDNA 文库中筛选与 ZmPRR73 互作的蛋白。结果显示:构建的诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73 对酵母菌株无毒性,且对报告基因无自激活活性,共鉴定出 12 个与 Zm-PRR73 互作的候选蛋白。生物信息学分析表明,这些候选互作蛋白的功能涉及植物的转录调控、离子跨膜转运的调节、信号转导、电子传递链等多个方面,推测 ZmPRR73 蛋白与以上蛋白互作参与多个信号转导和代谢途径,研究结果补充和完善了 ZmPRR73 蛋白参与的调控途径,为进一步研究生物钟核心元件 ZmPRR73 的分子功能提供了新的分子证据。

关键词 玉米;酵母双杂交;ZmPRR73;生物钟;互作蛋白

生物钟(Circadian clock)是生命体对地球一年四季的季节变化和一天内 24 h 昼夜节律的长期适应而演化产生的一种复杂的内在计时器。生物钟可以帮助生命体感知并响应周围环境的周期性变化,从而调控生物体的新陈代谢、生长发育和增加对逆境胁迫环境的适应性^[1-4]。PRRs(pseudo-response regulators)家族蛋白基因是生物钟中央振荡器的重要组成部分,与两个编码 MYB 蛋白的基因 LHY(late elongated hypocotyl)和 CCA1(circadian clock associated 1)一起组成转录翻译反馈环,三者转录和翻译水平的昼夜周期性变化维持了生物节律钟的昼夜节律^[5-7]。

目前关于 PRRs 蛋白的研究主要集中在 LHY、CCA1 和 PRRs 的转录反馈抑制调控环上,着重于上游基因结合在下游基因的启动子上抑制其表达,通过 ChIP-Seq 技术和转录组分析,科学家对拟南芥 PRR9、PRR7、PRR5 和 TOC1 转录因子的结合区域进行研究,结果表明 PRRs 家族转录因子直接调控植物的生长、光信号传导、非生物胁迫和光周期调控开花途径^[8-11]。研究显示 LHY、CCA1 和 PRRs 的相互抑制调控不是上游基因直接结合在下游基因的启动子上,而是与其他基因

互作,形成复合体后结合在后者的启动子上抑制其表达,例如,TOC1 与 TCP21 (TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEA-PCF21) 互作来抑制 CCA1 的表达^[12]。PRR9、PRR7 和 PRR5 蛋白能通过其 EAR (ERF-associated amphiphilic repression)结构域与 TOPLESS 和 HDA6 (histone deacetylase 6) 形成一个复合体,结合到 CCA1 和 LHY 的启动子上从而抑制 CCA1 和 LHY 的转录,调节生物钟周期^[13]。因此筛选生物钟基因 PRRs 的互作蛋白,对研究这些基因的反馈调控机制具有非常重要的意义。

与拟南芥和水稻中各存在 5 个 PRR 基因家族成员不同的是,玉米中共鉴定到 9 个 ZmPRR 基因 (ZmPRR1-1、ZmPRR1-2、ZmPRR37-1、ZmPRR37-2、ZmPRR73、ZmPRR59-1、ZmPRR59-2、ZmPRR95-1 和 ZmPRR95-2),除 ZmPRR73 外,这些基因中分别有两个与拟南芥 At-PRR 或水稻 OsPRR 基因家族成员高度同源^[14-15]。河南科技大学玉米分子育种课题组前期对调控玉米开花时间和光周期敏感性的主效 QTL *qDPS9* 进行了精细定位,并克隆了候选基因 ZmPRR73,生物信息学分析表明 ZmPRR73 基

收稿日期:2022-07-18 修回日期:2022-09-15

基金项目:国家自然科学基金河南省联合基金(U2004153);河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(202102110010);国家自然科学基金青年基金(31901548,31901561)。

第一作者:王盼盼,女,硕士研究生,从事作物分子育种相关研究。E-mail:1520943326@qq.com

通信作者:王翠玲,女,博士,教授,主要从事作物分子育种相关研究。E-mail:lywgg@126.com

因编码的蛋白属于伪应答调节蛋白 PRRs 家族成员,与拟南芥 *AtPRR7* 基因同源性最高^[16]。研究表明 *PRR7* 及其同源基因在拟南芥、水稻、高粱、小麦、大麦等植物的开花时间的光周期调控中发挥重要作用^[17-19]。近期研究表明 PRRs 家族不但在生物钟节律中起关键作用,在植物应对寒冷、干旱、氧化应激、病原体攻击等生物钟基因在胁迫响应调节中也起着非常重要的作用^[20-23]。*ZmPRR73* 基因作为玉米生物钟中央振荡器的重要组成部分,在玉米开花时间调控中的分子功能和参与玉米逆境胁迫响应的分子机制尚未见报道。

酵母双杂交技术是一种检测细胞内蛋白间互作的技术,不仅可以检测到蛋白之间稳定的相互作用,也能够敏感地检测到蛋白质之间微弱或短暂的相互作用,成为目前高通量筛选互作蛋白的最常用的方法。许多研究者构建酵母双杂交 cDNA 文库,利用酵母双杂交技术筛选到很多非常重要的与诱饵蛋白相互作用的蛋白^[24-26]。本研究旨在从长日照处理的热带玉米自交系的 cDNA 文库中初步筛选与 *ZmPRR73* 互作的蛋白,进一步揭示 *ZmPRR73* 基因在玉米光周期反应和环境胁迫应答中的调控机制及生物学通路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

长日照诱导热带玉米自交系 CML288 的酵母双杂交 cDNA 文库和携带目的基因 *ZmPRR73* 的 PMD19T-*ZmPRR73* 质粒由河南科技大学玉米分子育种课题组构建并保存。质粒提取试剂盒和酵母质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。酵母菌株 Y2H Gold、酵母双杂交载体 pGBKT7-53、pGBKT7-Lam、pGADT7-T、pGBKT7 等购自上海欧易公司。Infusion 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。酵母缺陷型培养基和 X- α -Gal 等购自北京酷来搏科技有限公司。

1.2 诱饵载体 pGBKT7-*ZmPRR73* 的构建

根据 *ZmPRR73* 基因和 pGBKT7 载体序列设计带酶切位点的特异性引物 (*ZmPRR73*-in-F: CATGGAGGCCGAATTCATGGGCAGTGCT-TGCCAAGCTGGC; *ZmPRR73*-in-R: GCAG-GTCGACGGATCCTCATCTTTCTGAACCTT-GCGCTGT)。以 PMD19T-*ZmPRR73* 质粒为模板使用高保真酶进行 PCR 扩增,回收、纯化并鉴

定目的片段;同时使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam* H I 对 pGBKT7 载体进行双酶切,胶回收并纯化线性化后的载体;然后按照 Infusion 试剂盒的方法,利用同源重组技术将 *ZmPRR73* 基因 CDS 序列插入到 pGBKT7 载体的酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam* H I 之间,构建诱饵载体 pGBKT7-*ZmPRR73*。

1.3 诱饵载体 pGBKT7-*ZmPRR73* 毒性及自激活检测

把 pGBKT7-53 + pGADT7-T 作为阳性对照,pGBKT7-Lam + pGADT7-T 作为阴性对照,pGBKT7-*ZmPRR73* + pGADT7 作为自激活检测组,将对照组与自激活检测组载体分别转化酵母 Y2HGold 感受态细胞。分别挑取阳性单克隆接种到 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- α -Gal /AbA 营养缺陷型培养基上,30 °C 恒温培养 3~5 d,观察酵母菌落生长情况。

1.4 酵母双杂交文库筛选及阳性克隆的鉴定

制备新鲜的酵母感受态细胞,将诱饵质粒 pGBKT7-*ZmPRR73* 与 pGADT7-cDNA 文库质粒共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞。将转化产物均匀涂布于 SD/-Leu/-Trp/-His/ X- α -Gal 固体培养基上进行初筛,挑选蓝色阳性单克隆菌,接种到 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 培养基上进行高严谨度筛选。30 °C 恒温培养 3~5 d,菌落生长至约 2~3 mm,挑选蓝色阳性克隆单菌落接种于 SD/-Leu/-Trp 液体培养基中,30 °C 培养 16~18 h。菌液 PCR 验证,对阳性菌液提取酵母质粒,用热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,送阳性菌液至上海生工测序。

1.5 互作蛋白的点对点验证

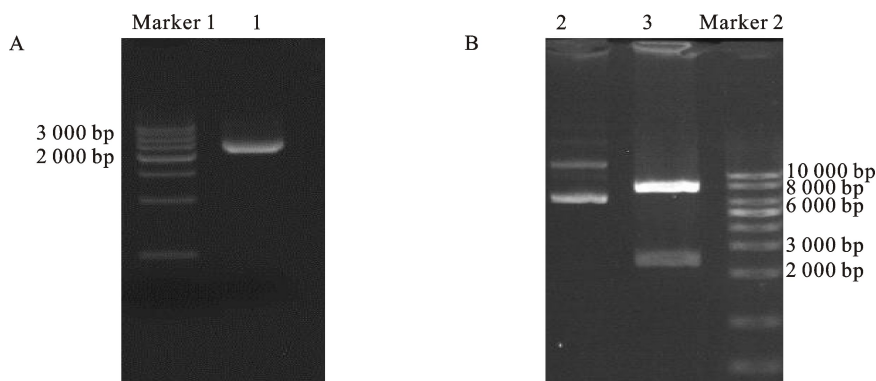
将构建好的 pGBKT7-*ZmPRR73* 质粒与 pGADT7-候选互作蛋白质粒,共转于 Y2H Gold 酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Leu/-Trp/-His 平板中,培养 3~5 d。挑取单菌落在 YPDA 液体培养基中 30 °C 恒温培养至菌液 OD₆₀₀ 约为 0.8 时,将菌液分别稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍,各取 5 μ L 点样在 SD/-Leu/-Trp 培养基和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 培养基上,30 °C 倒置培养 3~5 d,观察共转酵母质粒的生长情况。以 pGBKT7-53 + pGADT7-T 为阳性对照,pGBKT7-lam + pGADT7 和 pGBKT7-*ZmPRR73* + pGADT7 为阴性对照,平行重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73 的构建

前期从热带玉米自交系 CML288 中克隆到 *ZmPRR73* 基因的 CDS 序列, 片段大小为 2 298 bp (图 1-A), 以 PMD19T-ZmPRR73 质粒为模板, 用引物 ZmPRR73-in-F / ZmPRR73-in-R 使用高保真酶进行 PCR 扩增目的片段并验证, 片段

大小和测序结果与目的基因完全一致 (图 1-A)。在此基础上, 利用同源重组的方法将目的片段 *ZmPRR73* 与线性化的 pGBKT7 载体进行连接。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 挑取单克隆菌落做菌液 PCR, 测序结果显示 *ZmPRR73* 已插入到序列的正确位置, 重组载体读码框正确, 无移码突变, 说明目的基因与载体融合, pGBKT7-ZmPRR73 诱饵载体构建成功 (图 1-B)。



Marker 1, 500 bp DNA 分子量标准; Marker 2, KB 分子量标准; 1. *ZmPRR73* 基因的 PCR 扩增; 2. 诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73; 3. 诱饵载体的双酶切 (*EcoRI* and *NotI*)

Marker 1, 500 bp DNA ladder; Marker 2, KB Ladder; 1. PCR amplification of *ZmPRR73*; 2. Bait vector pGBKT7-ZmPRR73; 3. Bait vector pGBKT7-ZmPRR73 digested by *EcoRI* and *NotI*

图 1 *ZmPRR73* 基因的 PCR 扩增 (A) 和 pGBKT7-ZmPRR73 诱饵表达载体的双酶切验证 (B)

Fig. 1 PCR amplification of *ZmPRR73* (A) and bait vector pGBKT7-ZmPRR73 digested by *EcoRI* and *NotI* (B)

2.2 诱饵载体毒性及自激活分析

将阳性对照 pGBKT7-53/pGADT7-T、阴性对照 pGBKT7-Lam/pGADT7-T 和 pGBKT7-ZmPRR73/pGADT7 分别转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 分别涂布在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 培养基上培养, 在 30 $^{\circ}$ C 条件下培养 3~5 d。结果显示阳性对照 pGBKT7-53/pGADT7-T 在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 培养基上有克隆生长且变蓝, 阴性对照 pGBKT7-Lam/pGADT7-T 和诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73/pGADT7 在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 培养基上有白色克隆生长, 但不变蓝, 说明 pGBKT7-ZmPRR73 质粒成功转入酵母菌株中, 且诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73 对宿主酵母菌无毒性 (图 2)。

阳性对照 pGBKT7-53/pGADT7-T 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 培养基上蓝色克隆生长, 阴性对照 pGBKT7-Lam/pGADT7-T 和诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73/pGADT7 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 培养基上无克隆生长, 说明 pGBKT7-ZmPRR73 不存在

自激活现象 (图 2)。综上所述, 诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73 在和空 AD 质粒 pGADT7 共转时, 在 Y2H Gold 酵母菌株中没有自激活活性, 可用于后续筛库实验。

2.3 互作蛋白的筛选与分离

以 pGBKT7-ZmPRR73 为诱饵蛋白, 与热带玉米自交系 CML288 的叶片和根组织等量混合构建的 cDNA 文库共同转化酵母感受态细胞 Y2H Gold, 涂布到三缺培养基 SD/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 上进行初筛, 挑取直径大于 2 mm 且生长健康的蓝色克隆, 接种到四缺培养基 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 上进行高严谨度筛选。结果显示, 在 SD/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 缺陷培养基筛选平板上共有 44 个克隆生长变蓝, 再次转到四缺培养基 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 筛选平板上复筛后, 共获得 18 个候选阳性克隆 (图 3)。对阳性克隆菌落提取酵母质粒, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 再次培养后送大肠杆菌阳性菌液至上海生工测序, 测序结果显示除去重复序列后最终确定有 12 个互作阳性克隆。

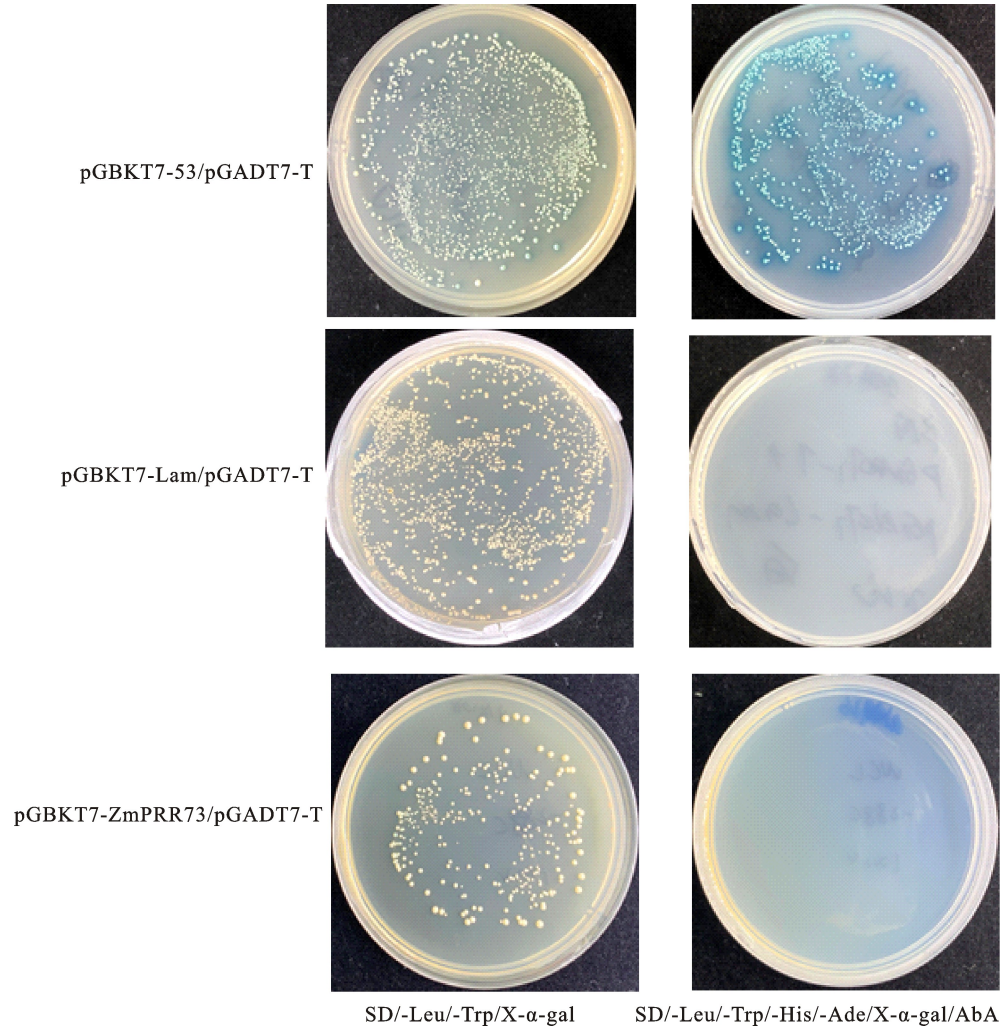


图 2 诱饵载体 pGBKT7-ZmPRR73 的毒性检测和自激活检测

Fig. 2 Detection of toxicity and self-activation of bait vector pGBKT7-ZmPRR73

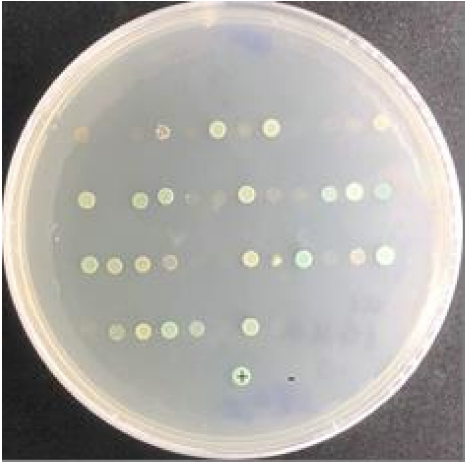


图 3 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal/AbA 培养基上筛选到的阳性克隆

Fig. 3 Positive clones screened on SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal/AbA medium

2.4 互作蛋白的测序及比对分析

测序结果显示除去重复序列后最终确定有 12 个互作阳性克隆。生物信息学分析表明这些基因功能涉及植物的转录调控、离子跨膜转运的调节、信号转导、电子传递链等多个方面(表 1)。值得注意的是,第 2 号蛋白编码 S-腺苷甲硫氨酸合成酶,具有甲硫氨酸腺苷转移酶活性,可能参与 S-腺苷甲硫氨酸生物合成过程^[27-28]。第 3 号蛋白编码拟南芥铁氧还蛋白 Ferredoxin5(Fd5)的同源基因,具有电子转移活性和金属离子结合功能,可能参与电子传递链,对植物的生长发育至关重要^[29]。第 11 号蛋白编码拟南芥 AP2/EREBP 类转录因子 EREB17 的同源基因,可能参与下游基因的转录调控,在植物的生长发育的信号转导中发挥重要的作用^[30]。互作蛋白中还有 4 个未知蛋白,其可能的功能仍需进一步探究。

表 1 酵母双杂交文库筛选获得的 ZmPRR73 互作蛋白及其功能推测

Table 1 Interacting proteins of ZmPRR73 screened by yeast two-hybrid system and their putative function

编号 No.	基因 ID Gene ID	长度/bp Length	分子功能 Molecular function	细胞定位 Cellular localization	生物过程 Biological process
1	Zm00001eb210500	1 255	电压门阳离子通道活性 Voltage-gated cation channel activity 孔蛋白活性 Porin activity	叶绿体外膜 Chloroplast outer mem- brane 黄化叶绿体膜 Etioplast membrane 孔复合体 Part of pore complex	离子跨膜转运的调节 Regulation of ion transmem- brane transport
2	Zm00001eb354640	2 015	Atp 结合 Atp binding 甲硫氨酸腺苷转移酶活性 Methionine adenosyltransferase activity 转移酶活性 Transferase activity 核苷酸结合 Nucleotide binding 金属离子结合 Metal ion binding	细胞质 Cytoplasm	S-腺苷甲硫氨酸生物合成过程 S-adenosylmethionine biosyn- thetic process 单碳代谢过程 One-carbon metabolic process
3	Zm00001eb260150	794	[2fe-2s]铁硫簇结合 2 iron,2 sulfur cluster binding 电子转移活性 Electron transfer activity 金属离子结合 Metal ion binding	叶绿体 Chloroplast	电子传递链 Electron transport chain
4	Zm00001eb168930	1 001	金属离子结合 Metal ion binding	未知 Unknown	未知 Unknown
5	Zm00001eb251540	2 024	跨膜转运活性 Transmembrane transporter activity	膜 Membrane	跨膜运输 Transmembrane transport
6	Zm00001eb060550	828	Rna 结合 Rna binding 核糖体的结构成分 Structural constituent of ribosome	核糖体 Ribosome	转译 Translation
7	Zm00001eb292990	1 281	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown
8	Zm00001eb434490	1 504	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown
9	Zm00001eb296320	708	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown
10	Zm00001eb335790	1 126	甲基转移酶活性 Methyltransferase activity	膜 Membrane 线粒体基质 Mitochondrial matrix	果胶代谢过程 Pectin metabolic process
11	Zm00001eb194220	1 814	Dna 结合 Dna binding Dna 结合转录因子活性 Dna-binding transcription factor activi- ty	细胞核 Nucleus	转录调控,dna 模板化 Regulation of transcription,dna- templated
12	Zm00001eb035450	1 228	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown

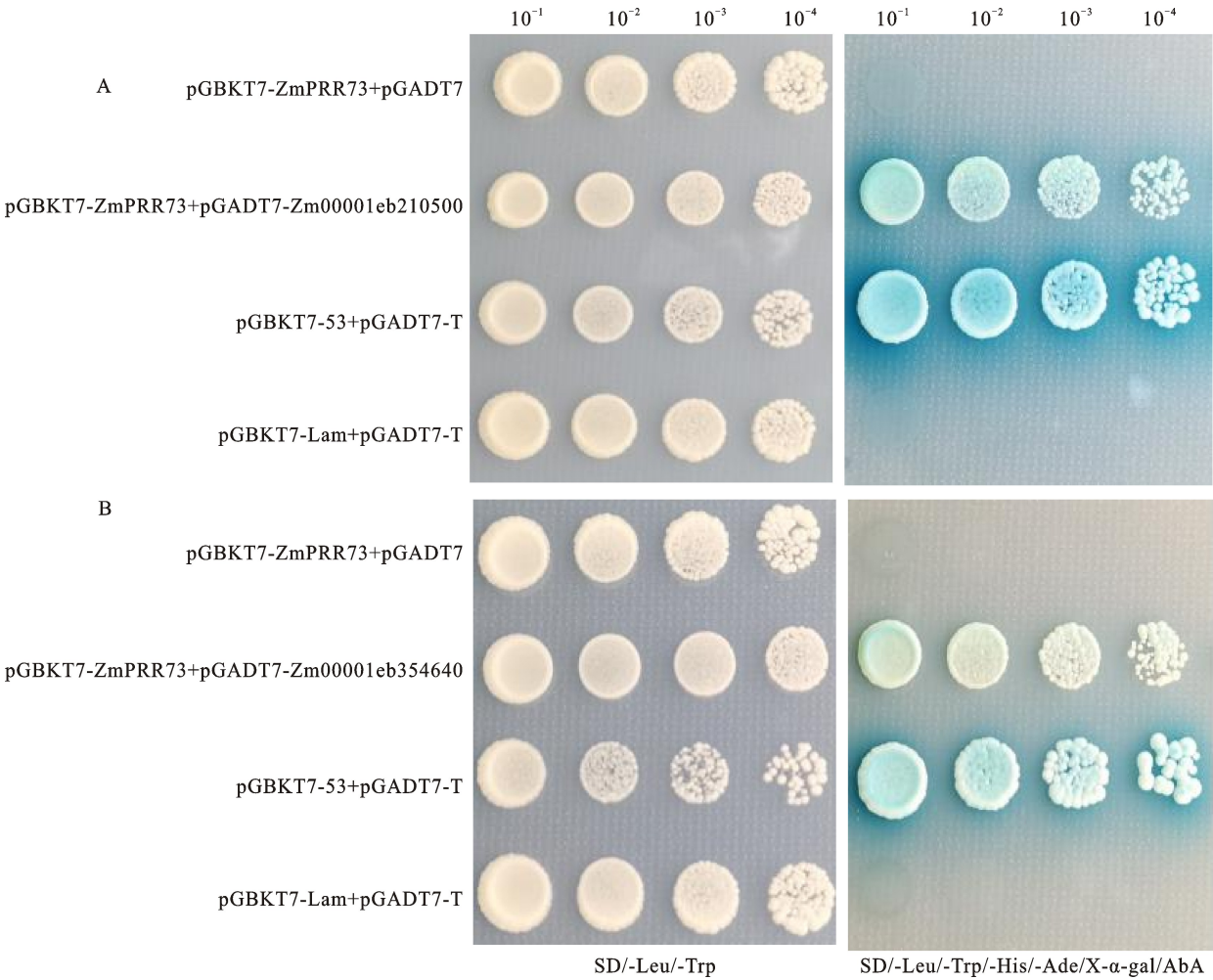
2.5 互作蛋白的点对点验证

为进一步验证 ZmPRR73 与筛选得到的蛋白之间存在的互作关系,从中选取 1 号蛋白 Zm00001eb210500 和 2 号蛋白 Zm00001eb354640 的

cDNA 插入序列转化含有 pGBKT7 或 pGBKT7-ZmPRR73 转化子的酵母感受态中,进行点对点验证(图 4)。阴性对照 pGBKT7-Lam + pGADT7-T、阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-

T、空载对照 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7 以及 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7-Zm00001eb210500 和 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7-Zm00001eb354640 均能在 SD/-Leu/-Trp 培养基上正常生长。在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA 培养基上, 只有阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T 和 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7-Zm00001eb210500

以及 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7-Zm00001eb354640 能正常生长且显现蓝色, 而阴性对照 pGBKT7-Lam + pGADT7-T 和空载对照 pGBKT7-ZmPRR73 + pGADT7 均未见菌斑, 表明 Zm00001eb210500 蛋白和 Zm00001eb354640 蛋白与 ZmPRR73 在酵母体内均能够发生相互作用, 排除了假阳性的干扰。



A. 与 1 号蛋白 Zm00001eb210500 的点对点验证;B. 与 2 号蛋白 Zm00001eb354640 的点对点验证
A. Interaction validation of ZmPRR73 and No. 1 (Zm00001eb210500); B. Interaction validation of ZmPRR73 and No. 2 (Zm00001eb354640)

图 4 ZmPRR73 与部分候选互作蛋白点对点验证

Fig. 4 Interaction validation of ZmPRR73 and partial candidate proteins

3 讨论

挖掘ZmPRR73 基因的互作蛋白是解析其功能及分子通路的关键。目前有关植物蛋白质互作的研究方法有很多,包括酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system, Y2H)、免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP)、双分子荧光互补技术

(Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)、pull-down 技术、荧光共振能量转移技术 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)、蛋白质芯片技术(Protein chip)、亲和纯化-质谱技术(AP-MS)和邻近标记技术(Proximity labeling)等^[31]。其中酵母双杂交技术是一种简单易行、高通量、高灵敏度的检测细胞内蛋白质

相互作用的技术,不论是对蛋白质之间稳定的相互作用还是微弱而短暂的相互作用均能够敏感地检测到。通过构建不同处理条件下的酵母双杂交文库,将目的基因作为诱饵,利用酵母双杂交技术筛选与诱饵相互作用的蛋白,找到基因之间的联系,构建蛋白质互作网络,建立蛋白连锁图,已经成为解析重要基因的分子功能及信号传导、代谢途径、分子通路的最常用的方法。本研究利用酵母双杂交技术挖掘出了*ZmPRR73* 基因的一些重要的互作蛋白,为进一步解析*ZmPRR73* 基因的功能及作用机制和调控网络奠定了基础。鉴于酵母双杂交系统可能存在假阳性问题,需要继续用双分子荧光互补试验对互作蛋白进行逐一验证,并通过互作蛋白之间的相互作用研究*ZmPRR73* 基因的调控机制和生物学通路。

本研究中筛选到 12 个与 *ZmPRR73* 相互作用的候选蛋白,包括外包膜孔蛋白 24A、S-腺苷甲硫氨酸合成酶 1、铁氧还蛋白 5、富半胱氨酸/组氨酸 C1 结构域家族蛋白、PTR 家族蛋白、核糖体蛋白、LBD 转录因子、BTB/POZ 结构域蛋白、DUF3143 家族蛋白、AP2/EREBP 类转录因子 17、DUF1997 家族蛋白等。其中筛选到的 2 号基因(*Zm00001eb354640*)编码 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(*ZmSAMS1*),是植物代谢过程中的一个关键酶,它催化 ATP 和 L-甲硫氨酸反应生成 S-腺苷甲硫氨酸,在干旱、高温、低温、盐和 ABA 等逆境胁迫环境下调节相关基因的表达以适应环境的变化,对植物的适应性具有重要意义^[27-28]。本研究筛选鉴定到 *ZmSAMS1* 蛋白与生物钟中央振荡器核心元件 *ZmPRR73* 蛋白存在直接互作,表明 S-腺苷甲硫氨酸合成酶不但参与了干旱、高温、低温、盐和 ABA 等逆境胁迫响应,而且还与玉米的光周期反应有关。生物信息学分析显示玉米 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *ZmSAMS1* 的启动子区域包含包括 G-Box、AAGAA-motif、ATCC-motif、Box 4、Box-W1、GATA-motif、I-box、chs-CMA2bGA-motif、GAG-motif、circadian 等重要的光应答元件,表明 *ZmSAMS* 基因的表达可能受光周期反应的调控^[28]。具体生物钟基因*ZmPRR73* 如何影响 S-腺苷甲硫氨酸的合成,或者 S-腺苷甲硫氨酸合成酶*ZmSAMS1* 如何参与玉米的生物钟反应,深入研究二者相互作用的分子机制和生物学功能具有非常重要的意义。

筛选到的 3 号蛋白与拟南芥铁氧还蛋白

Ferredoxin5(Fd5)同源,有研究报道在植物光合过程中,光合型铁氧还蛋白作为唯一的可溶性电子受体,可将来自光系统 I 的电子传输到下游各种代谢过程,将光能转化为化学能,是光合电子向叶绿素代谢、碳氮同化、光敏色素合成、脂肪酸合成等生物学途径分配的中枢元件,对植物的生长发育至关重要。水稻铁氧还蛋白 I 突变后会造成水稻光合电子传递受阻,光合碳同化过程被破坏,从而引起突变体内源光合产物合成不足,导致突变体快速褪绿并致死的表型^[29]。筛选到的 5 号蛋白(*Zm00001eb251540*)编码植物硝酸盐转运蛋白 NRT1/PTR FAMILY 8.3,植物硝酸盐转运蛋白(Nitrate transporter, NRT)是植物氮素营养系统的关键生物大分子之一,在吸收和感知外界硝酸盐及信号调控方面有着重要的作用。NRT1/PTR FAMILY 8.3 是二肽转运体,在氮循环中很活跃的,可以影响信号传导过程和次生代谢产品的生产过程,干旱促进 NRT1/PTR FAMILY 8.3 基因的表达,随着干旱程度的增加,其表达量显著上调^[32]。有文献表明硝酸盐转运蛋白的表达活性受昼夜节律调节^[33-34],但是其相关分子机制迄今未见报道,本研究鉴定到生物钟元件 *ZmPRR73* 蛋白与玉米硝酸盐转运蛋白 *Zm00001eb251540* 存在互作,进一步深入研究二者的互作机制,将为探索硝酸转运蛋白的昼夜节律表达的分子机理奠定基础。11 号蛋白编码 AP2/EREBP 转录因子家族蛋白 EREB17,研究表明 AP2-EREBP 家族蛋白家族是植物特有的一类转录因子,广泛参与了植物的细胞分化、激素调控、病原反应以及生物和非生物胁迫应答反应等各个生命过程,在植物的生长发育以及逆境胁迫应答等信号转导中发挥重要的作用^[30,35]。以上这些互作蛋白的发现,表明 *ZmPRR73* 基因除了维持生物钟节律外,还广泛参与玉米生长发育、逆境胁迫响应、氮素营养调控、光合电子传递等重要的生理生化过程。

因此在本研究的基础上,进一步开展玉米 *ZmPRR73* 与候选互作蛋白 EREB17、SAMS1、Protein NRT1/ PTR FAMILY 8.3 和 FDX5 的互作关系研究,对深入了解玉米*ZmPRR73* 基因的功能及其参与逆境胁迫响应机制有重要意义。

参考文献 Reference:

- [1] 谢启光,徐小冬.植物生物钟与关键农艺性状调控[J].生命

- 科学, 2015, 27(11): 1336-1344.
- XIE Q G, XU X D. Circadian clock and the control of key agronomic traits in higher plants[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(11): 1336-1344.
- [2] 王 晗. 生物钟生物学及其研究进展[J]. 生命科学, 2015, 27(11): 1313-1319.
- WANG H. Circadian biology and its recent progresses[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(11): 1313-1319.
- [3] YAN J, KIM Y J, SOMERS D E. Post-Translational Mechanisms of Plant Circadian Regulation [J]. *Genes*, 2021, 12(3): 325.
- [4] 谢启光, 徐小冬. 作物生物钟的研究进展与前瞻[J]. 植物生理学报, 2022, 58(1): 39-51.
- XIE Q G, XU X D. Progress and prospects of circadian clock in agriculture[J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(1): 39-51
- [5] SHIM J S, KUBOTA A, IMAIZUMI T. Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: Constans is a hub for signal integration[J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 5-15.
- [6] NOHALES M A, KAY S A. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(12): 1061-1069.
- [7] 魏 华, 王 岩, 刘宝辉, 等. 植物生物钟及其调控生长发育的研究进展[J]. 植物学报, 2018, 53(4): 456-467.
- WEI H, WANG Y, LIU B H, *et al.* Deciphering the underlying mechanism of the plant circadian system and its regulation on plant growth and development[J]. *Chinese Bulletin Botany*, 2018, 53(4): 456-467
- [8] HUANG W, PÉREZ-GARCÍA P, POKHILKO A, *et al.* Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator[J]. *Science*, 2012, 336(6077): 75-79.
- [9] NAKAMICHI N, KIBA T, KAMIOKA M, *et al.* Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(42): 17123-17128.
- [10] LIU T, CARLSSON J, TAKEUCHI T, *et al.* Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7 [J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(1): 101-114.
- [11] CERVELA-CARDONA L, YOSHIDA T, ZHANG Y, *et al.* Circadian control of metabolism by the clock component TOC1 [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 683516.
- [12] NAKAMICHI N. The transcriptional network in the *Arabidopsis* circadian clock system[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(11): 1284.
- [13] WANG L, KIM J, SOMERS D E. Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(2): 761-766.
- [14] WANG C L, WANG L L, LIU Q Q, *et al.* Genome-wide identification and characterization of PRR gene family and their diurnal rhythmic expression profile in maize[J]. *International Journal of Genomics*, 2022, 2022: 6941607.
- [15] LAI X, BENDIX C, YAN L, *et al.* Interspecific analysis of diurnal gene regulation in panicoid grasses identifies known and novel regulatory motifs[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21: 428.
- [16] 赵淑靓. 玉米伪应答调节基因ZmPRR73的克隆与表达分析[D]. 河南洛阳: 河南科技大学, 2018.
- ZHAO SH J. Gene cloning and expression analysis of Zm-PRR73 in *Zea mays*[D]. Luoyang Henan: Henan University of Science and Technology, 2018.
- [17] WANG L, SUN S, WU T, *et al.* Natural variation and CRISPR/Cas9-mediated mutation in *GmPRR37* affect photoperiodic flowering and contribute to regional adaptation of soybean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(9): 1869-1881.
- [18] 梁力文. 水稻 CCT 家族基因 OsPRR73 和 OsCO3 调控抽穗期的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- LIANG L W. Study on the molecular mechanisms of rice CCT family genes OsPRR73 and OsCO3 in regulating heading date[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [19] ZHANG W, ZHAO G, GAO L, *et al.* Functional studies of heading date-related gene *TaPRR73*, a paralog of *Ppd1* in common wheat [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 772.
- [20] YANG M, HAN X, YANG J, *et al.* The *Arabidopsis* circadian clock protein PRR5 interacts with and stimulates ABI5 to modulate abscisic acid signaling during seed germination[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(9): 3022-3041.
- [21] ZHANG Y, PFEIFFER A, TEPPERMAN J M, *et al.* Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(6): 3261-3269.
- [22] LI N, ZHANG Y, HE Y, *et al.* Pseudo response regulators regulate photoperiodic hypocotyl growth by repressing PIF4/5 transcription [J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 686-699.
- [23] 李剑峰, 李 婷, 贾小平. PRRs 家族功能基因的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1399-1407.
- LI J F, LI T, JIA X P. Advances on unlocking the functional basis of PRRs family genes[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(6): 1399-1407.
- [24] 郑 凯, 曲延英, 倪志勇, 等. 海岛棉纤维均一化酵母双杂

- 交文库的构建与 GbTCP5 互作蛋白的筛选[J]. 核农学报, 2019, 33(10):1928-1939.
- ZHENG K, QU Y Y, NI Z Y, *et al.* Construction of yeast two-hybrid normalized cDNA library and screening of interaction proteins of GbTCP5 in *Gossypium barbadense* fiber[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(10):1928-1939.
- [25] 刘永惠, 沈一, 沈悦, 等. 利用酵母双杂交系统筛选花生 AhMYB44 互作蛋白[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1):201-207.
- LIU Y H, SHEN Y, SHEN Y, *et al.* Yeast two-hybrid screening of the proteins interacting with AhMYB44 from peanut[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(1):201-207.
- [26] 范延良, 王域, 刘富浩, 等. 茶树 Cs HIPP26.1 互作蛋白的筛选与验证[J]. 中国农业科学, 2022, 55(8):1630-1641.
- FAN Y G, WANG Y, LIU F H, *et al.* Screening and verification of CsHIPP26.1 interaction protein in tea plant[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(8):1630-1641.
- [27] SUN F, MA J, WANG P, *et al.* Genome-wide identification of the SAMS gene family in upland cotton(*Gossypium hirsutum* L.) and expression analysis in drought stress treatments[J]. *Genes*, 2022, 13(5):860.
- [28] 余爱丽, 赵晋锋, 王高鸿, 等. 玉米 SAMS 家族基因鉴定及其在逆境胁迫下的表达分析[J]. 中国农学通报, 2016, 32(8):30-36.
- YU A L, ZHAO J F, WANG G H, *et al.* Identification of SAMS genes from maize and its expression under adversity stresses[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(8):30-36.
- [29] HE L, LI M, QIU Z, *et al.* Primary leaf-type ferredoxin 1 participates in photosynthetic electron transport and carbon assimilation in rice [J]. *The Plant Journal*, 2020, 104(1):44-58.
- [30] YU F, LIANG K, FANG T, *et al.* A group VII ethylene response factor gene, *ZmEREB180*, coordinates waterlogging tolerance in maize seedlings[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(12):2286-2298.
- [31] QIN W, CHO K F, CAVANAGH P E, *et al.* Deciphering molecular interactions by proximity labeling [J]. *Nature Methods*, 2021, 18(2):133-143.
- [32] CORRATGE-FAILLIE C, LACOMBE B. Substrate (un) specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(12):3107-3113.
- [33] 贾宏昉, 张洪映, 刘维智, 等. 高等植物硝酸盐转运蛋白的功能及其调控机制[J]. 生物技术通报, 2014(6):14-21.
- JIA H F, ZHANG H Y, LIU W ZH, *et al.* Function and regulation mechanisms of nitrate transporters in higher plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(6):14-21.
- [34] 徐海荣, 谷俊涛, 路文静, 等. 水稻硝酸盐转运蛋白基因 *OsTNrt2.1* 的编码蛋白特征和表达[J]. 作物学报, 2007, 33(5):723-730.
- XU H R, GU J T, LU W J, *et al.* Characterization and expression of nitrate transporter gene *OsTNrt2.1* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(5):723-730.
- [35] JISHA V, DAMPANABOINA L, VADASSERY J, *et al.* Overexpression of an AP2/ERF type transcription factor *OsEREBP1* confers biotic and abiotic stress tolerance in rice [J]. *PloS One*, 2015, 10(6):e0127831.

Screening of Proteins Interacting with ZmPRR73 in Maize Using Yeast Two-hybrid System

WANG Panpan, WANG Leili, ZHANG Yanling, LIU Qingqing,
DONG Keqing, LI Anran and WANG Cuiling

(Department of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 47102, China)

Abstract To elucidate its biological function, the bait vector PGBKT7-ZMPRR73 was constructed, and the proteins interacting with *ZmPRR73* was screened from the yeast cDNA library of a tropical maize inbred line induced by long-day photoperiod treatment, using yeast two-hybrid technique. The results showed that the bait vector pGBKT7-ZmPRR73 exhibited no toxicity to yeast strains and did not activate the reporter gene on its own. A total of 12 candidate proteins that interacted with ZmPRR73 were identified. Bioinformatics analysis showed that these candidate interacting proteins were involved in various pathways, such as plant transcription regulation, ion transmembrane transport regulation, signal transduction and electron transport chain. This suggests that ZmPRR73 may participate in multiple signal transduction and metabolic pathways by interacting with the identified interaction proteins. The results enhance our understanding of the signal transduction and the regulatory pathways associated with *ZmPRR73* and provide molecular evidence for further investigations into its molecular function and regulatory mechanism as a core component of circadian clock in maize.

Key words Maize; Yeast two-hybrid system; *ZmPRR73*; Circadian; Interacting protein

Received 2022-07-18

Returned 2022-09-15

Foundation item Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China (No. U2004153); Science and Technology Research Project of Henan Province (No. 202102110010); Youth Foundation of National Natural Science Foundation of China (No. 31901548, No. 31901561).

First author WANG Panpan, female, master student. Research area: molecular breeding of crops. E-mail: 1520943326@qq.com

Corresponding author WANG Cuiling, female, Ph. D, professor. Research area: molecular breeding in crops. E-mail: lywgg@126.com

(责任编辑:成 敏 Responsible editor: CHENG Min)