

拟南芥钙调素结合蛋白 AtIQD26 的分离鉴定*

韦慧彦^{1,2)} 郭振清^{1)**} 王振杰¹⁾ 李朝炜^{1)**} 王志娟¹⁾ 崔素娟^{1)***}

(¹⁾河北师范大学生命科学学院分子细胞生物学实验室, 石家庄 050016; ²⁾焦作师范高等专科学校理化生系, 焦作 454000)

摘要 钙调素结合蛋白的研究有助于探明钙调素介导的信号转导途径. 以拟南芥钙调素亚型 2(ACaM2)为诱饵, 重组共转化法构建并筛选了酵母双杂交文库. 复筛后得到一个阳性克隆. 序列测定及分析表明, 分离的阳性克隆中包含一个编码钙调素结合蛋白 AtIQD26 的 cDNA 片段. 凝胶覆盖实验进一步表明, AtIQD26 在 1 mmol/L Ca^{2+} 或 1 mmol/L EGTA 条件下都能与钙调素结合, 说明其存在不依赖于 Ca^{2+} 的 CaM 结合特性. GUS 染色分析表明, AtIQD26 具有普遍的组织表达特性, 尤其是在新生的组织中表达量较大; 融合荧光蛋白定位显示, AtIQD26 在细胞核与质膜附近有分布. AtIQD26 与钙调素空间分布的相似性, 预示着它们在植物生长发育过程中可能共同发挥作用.

关键词 钙调素结合蛋白, 酵母双杂交, 拟南芥, 凝胶覆盖分析, 组织表达, 亚细胞定位

学科分类号 Q291

钙调素(calmodulin, CaM)是一类小分子质量、高度保守的钙结合蛋白, 作为胞内钙信使的多功能受体蛋白, 广泛参与细胞信号转导的诸多途径^[1]. 由于 CaM 自身没有酶活性, CaM 介导的信号途径依赖于钙调素结合蛋白(calmodulin-binding proteins, CaMBPs)的表达模式和活性^[1]. 因此, 对 CaMBPs 的研究是揭示 CaM 发挥生理功能作用机制的重要途径, 是探明钙离子(Ca^{2+})-CaM 信号转导系统的关键.

CaMBPs 与 CaM 的结合可分为依赖于 Ca^{2+} 的和不依赖于 Ca^{2+} 的两种类型, 分别称之为钙依赖性 CaMBPs 和钙不依赖性 CaMBPs^[2]. 钙依赖性 CaMBPs 在真核细胞中发挥着重要功能^[1]. 然而, CaMBPs 与 Ca^{2+} 的结合并不总是必需的, 钙不依赖性 CaMBPs 在细胞内具有另外一些重要作用^[2]. 钙不依赖性 CaMBPs 的研究与钙依赖性 CaMBPs 的研究同等重要却远远滞后, 因此, 加强钙不依赖性 CaMBPs 的研究, 有助于探明 CaMBPs 在生物生长发育中的作用. 对钙不依赖性 CaMBPs 的鉴定与分析将有助于阐明 CaM 信号转导途径的特异性、复杂性和多样性.

酵母双杂交体系(yeast two-hybrid system)又称相互作用陷阱(interaction trap), 是在酿酒酵母中研究蛋白质间相互作用的一种非常有效的分子生物学

方法, 可用来分离能与一种已知靶蛋白相互作用的蛋白质的编码基因^[3]. 酵母双杂交系统反映的是不同蛋白质之间在活细胞内的相互作用, 并可结合对整个 cDNA 文库进行筛选, 直接克隆与某已知蛋白质相互作用的蛋白质基因, 简便、灵敏、高效的优点使其应用广泛^[4].

酵母双杂交体系在植物中的应用, 主要集中在筛选 cDNA 文库中编码与诱饵蛋白特异作用的未知蛋白并检测蛋白质间的相互作用. Quail 实验室^[5]以光敏色素 C 端序列为诱饵, 从拟南芥的 cDNA 文库中筛选到一个与光敏色素发生相互作用的蛋白 PIF3 是一个转录因子. Doonan 等^[6]用双杂交技术分离了 CDK 的相互作用蛋白, 如 cdk 抑制子和 suc1 的同源物. Mizoguchi 等^[7]用双杂交技术证明 ATMAPK4、MEK1 和 ATMEKK1 可以相互作用, 在拟南芥中形成一特殊的 MAPK 级联. 本文报道

* 国家自然科学基金(2006CB0D1105, 30470889, 90208004), 河北省自然科学基金(C2004000152), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-06-0256)和河北师大博士基金资助项目(L2004B11).

** 郭振清. 现工作单位: 河北科技师范学院生命科学系, 秦皇岛 066000

** 李朝炜. 现工作单位: 河北科技大学生命科学院, 石家庄 050016

*** 通讯联系人.

Tel: 0311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

收稿日期: 2007-11-17, 接受日期: 2007-12-27

了利用酵母双杂交技术对拟南芥钙调素结合蛋白 AtIQD26(At3g16490)的分离鉴定, 研究结果表明, AtIQD26 存在不依赖于 Ca^{2+} 的 CaM 结合特性.

1 材料和方法

1.1 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型为 Columbia, *E. coli* DH5 α , 二元载体 pCambia1300 和农杆菌 GV3101 菌株为河北师范大学分子细胞生物学实验室保存; 质粒 pGBKT7-AtCaM2, 含有拟南芥 2 号亚型钙调素基因, 为河北师范大学分子细胞生物学实验室博士生宋林霞构建.

Matchmarker™ Two-Hybrid Library Construction Screening Kit, 酵母双杂交 GAL4 系统及酵母缺失培养基等购自 Clontech 公司; mRNA 分离试剂盒为 Qiagen-Ambion 公司产品.

载体构建用各种内切酶和逆转录酶、Taq 酶、T4 连接酶分别为 TaKaRa、华美、Promega 等产品; 常用生化试剂: 氨卞青霉素、卡那霉素、dNTP、鲑精 DNA、DMSO、玻璃珠购自 Sigma 公司; LB 培养基成分购自 Oxoid 公司; 酵母培养基成分购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒购于上海华舜公司; 其他生化试剂为进口分装或国产分析纯试剂; 寡核苷酸引物合成(PAGE 纯化, 纯度 99%)及 DNA 序列测定由上海生工公司完成.

1.2 拟南芥的种植

拟南芥种子经表面(75%乙醇, 30~60 s; 无菌水洗 3 次)和深层(2.5%次氯酸钠, 8~10 min, 无菌水洗 3~5 次)消毒后, 4℃暗处处理 3 天, 播种在固体 MS 培养基(3%或 1%蔗糖, 0.7%琼脂粉, 1×Murashige 和 Skoog 盐和和维生素, 用 KOH 调 pH 至 5.8)上, 转到光照培养箱中培养, 22℃, 16 h/8 h 光周期(L/D 光强 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8~10 天即幼苗长出 2 片真叶后, 将幼苗移栽到浸透水的花盆中(盆中含有营养土与蛭石按 1:2 比例混合的培养介质), 相同温度和光照周期继续培养, 每周浇 1~2 次水.

1.3 酵母双杂交文库的构建及筛选

取拟南芥花的雄蕊和雌蕊约 3 g, 液氮研磨, 按 RNAwiz™ 试剂盒说明进行 RNA 的提取, 参照 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Spin-Column Protocol 进行 mRNA 的分离. 然后按 Clontech 公司 Matchmarker™ Two-Hybrid Library Construction & Screening Kit 的用户手册进行文库的共转化法构建

和筛选鉴定. 首先以分离的 mRNA 为模板合成第一链 cDNA, LD-PCR 扩增 ds cDNA, 利用 CHROMA SPIN+ TE-400 Column 纯化 dscDNA. 再将 dscDNA 样品与 pGADT7-Rec 和 pGBKT7-CaM 共转化 AH109 感受态酵母, 把共转化混合物涂在二缺(SD / Leu⁻ Trp⁻, DDO)培养基上, 将二缺培养基上长出的克隆转印到三缺(SD / His⁻ Leu⁻ Trp⁻, TDO)或四缺(SD / Ade⁻ His⁻ Leu⁻ Trp⁻, QDO)培养基上, 30℃恒温培养直至阳性克隆出现. 将在四缺平板上生长的阳性克隆, 进行 β -半乳糖苷酶活性的滤膜染色分析(X-Gal assay). 提取染色为蓝色的阳性克隆酵母中的 pGADT7 质粒, 分别与 pGBKT7-CaM 质粒, 一对一共转化酵母 AH109, 筛选出四缺平板生长及 X-Gal 显蓝的 pGADT7 质粒, 测序确定外源 cDNA 序列.

1.4 AtIQD26 cDNA 的 RT-PCR 扩增与克隆

取 5 μg 花粉 RNA 为模板, 以 5' ggaattcatggg-aagagctgcgagatggttca 3' 为上游引物, 以 5' cgggatccctaattatgaatctaaatcagtct 3' 为下游引物(5'、3' 分别引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点), 按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 Manual 进行 RT-PCR 扩增. PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收 1 170 bp 片段, 将其连入 pGEM-T Easy 载体. 测序正确的 AtIQD26 cDNA 和载体 pGADT7 进行连接, 构建质粒 pGADT7-AtIQD26cDNA. 重组质粒转化至 *E. coli* DH5 α , 平板培养过夜, 挑取阳性克隆, 扩大培养, 以碱裂解法提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 通过测序验证正确性.

1.5 AtIQD26 在原核系统中重组表达

将 pGADT7-AtIQD26 和 pET-28b(+) 质粒经 *Bam*H I 和 *Nco* I 酶切, 电泳回收、连接、转化. 将 AtIQD26 蛋白编码区克隆到 pET-28b(+) 表达载体上, 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态菌株. 抗性(kan^r)平板上挑选阳性克隆, 酶切鉴定, 最后测序验证正确性, 获得正确构建的阳性重组子 pET-28b-AtIQD26cDNA.

1.6 SDS-PAGE 及 CaM 凝胶覆盖分析

接种含 pET-28b-AtIQD26cDNA 单克隆的 BL21 菌株于 2~3 ml LB 液体培养基中, 37℃摇培过夜, 然后按 1:50 比例扩培于新鲜培养基中, 37℃生长至 $A_{600\text{nm}}=0.6\sim0.8$ 时(约 3 h), 取菌液于 EP 管中, 每管 1 ml, 作诱导前对照. 加 IPTG 到终浓度为 1 mmol/L, 于诱导后 1、2、3 h 分别取样, 样品和对照分别 10 000 g 离心 1 min, 弃上清,

收集菌体或于-20℃保存。

按 Laemmli^[8]方法, 将离心收集的菌体进行 12% SDS-PAGE. 电转移至 NC 膜, 氨基黑染色确定转膜效果. 生物素化钙调素凝胶覆盖(Bio-CaM overlay)按李家旭等^[9]方法; ³⁵S 标记钙调素凝胶覆盖(³⁵S-CaM overlay)按崔素娟等^[10]方法.

1.7 拟南芥的遗传转化

质粒 pCAMBIA1300-GUS 和 pCAMBIA1300 35S::YFP 为河北师范大学分子细胞生物学实验室保存. 将来自 pGEM-T Easy 载体上的 *Hind* III-*Bam* H I *AtIQD26* 启动子片段插入 pCAMBIA1300-GUS 质粒, 获得 pCAMBIA1300 *AtIQD26*::GUS 二元载体; 将来自 pGEM-T Easy 载体上的 *Bam* H I-*Bgl* II *AtIQD26*cDNA 插入 pCAMBIA1300 *AtIQD26*::GUS 质粒, 获得 pCAMBIA1300 *AtIQD26*::cDNA-GUS 二元载体; 将 *AtIQD26*cDNA 插入 pCAMBIA1300 35S::YFP 质粒, 获得 pCAMBIA1300 35S::*AtIQD26*-YFP 二元载体. 将构建好的 pCAMBIA1300 35S::*IQD26*-YFP 及对照 35S::YFP 和 pCAMBIA1300 *AtIQD26*::cDNA-GUS 及 *AtIQD26*::GUS 的表达载体分别转化农杆菌 GV3101, 再利用浸花法转化拟南芥植株^[11]. T2 代出现潮霉素抗性分离比为 3:1 的株系进入后续实验.

1.8 转基因拟南芥植株的 GUS 组织染色

取不同时期转基因苗按 Jefferson 等^[12]方法进行 GUS 组织化学染色, 体视显微镜(日本尼康公司, 型号 C-DSS230, 规格 SMZ800)拍照.

1.9 倒置荧光显微镜观察

取 10 天左右转基因苗于载玻片上, 滴上适量水, 加盖玻片, 置于倒置荧光显微镜(日本尼康公司, 型号 TE2000-U)上进行观察. 观察条件为: 以 450~490 nm 观察 YFP 荧光, 以 330~380 nm 观察 DAPI. 随机 Nikon ACT-1 软件记录结果, 处理图像.

2 结 果

2.1 以钙调素为诱饵筛选酵母双杂交文库

首先进行拟南芥花总 RNA 的提取、mRNA 的分离、cDNA 的合成、扩增及纯化, 然后将 ds cDNA 样品与 pGADT₇-Rec 和 pGBKT₇-CaM 共转化酵母菌 AH109 感受态酵母细胞, 二缺 DDO 上筛出共转有 pGADT 和 pGBKT₇(AD 和 BD)质粒的酵母, 再经过三缺 TDO 或四缺 QDO 的进一步

筛选, 得到了 5 个 QDO 生长且 X-Gal 染色显蓝色的阳性克隆.

进一步分别提取 5 个染色较深的阳性克隆酵母中的 AD 质粒, 分别与 pGBKT₇-CaM 质粒一对一共转化酵母, 筛选出四缺平板生长及 X-gal assay 阳性的 AD 质粒, 测序得到外源 cDNA 序列, 其中的 3 个克隆中得到了一致的序列. 将序列提交到 GenBank(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)网站进行了比对, 结果表明, 其中一个阳性克隆含有的 cDNA 序列代表的是分析推测的拟南芥基因 at3g16490 的开放阅读框(ORF) 286~859 位核苷酸, 其编码的蛋白质为推测的 AT3G16490 全蛋白的一部分. AT3G16490 被 Abel 等^[13]命名为 *AtIQD26*.

2.2 *AtIQD26* 编码区全长 cDNA 扩增及预测编码蛋白的分析

由于文库筛选到的阳性克隆中包含 *AtIQD26* ORF 的部分片段, 为进一步验证 *AtIQD26* 全长与 CaM 的相互作用, 我们根据拟南芥专业网站 TAIR (www.arabidopsis.org)提供的信息, 设计引物, 扩增了 *AtIQD26* cDNA 编码区全长片段, 将其连入 pGEM-T Easy 载体, 经测序分析, 与网上生物信息学分析的序列一致. *AtIQD26* 的 cDNA 编码区全长 1 170 bp, 编码 389 个氨基酸组成的 *AtIQD26* 蛋白, 富含 Ala(A, 11%)、Ser(S, 10%)、Arg(R, 9%)和 Lys(K, 7%)(图 1). 蛋白质一级结构分析表明, *AtIQD26* 蛋白分子质量为 43 661.0 u, 等电点为 10.6.

二级结构预测表明: *AtIQD26* 蛋白 106~172 位含有一个由 67 个氨基酸残基组成的、植物特有的、与 CaM 结合有关的结构域——IQ67 结构域(即 IQD), 该 IQD 包含 3 个 Ca²⁺非依赖的 IQ 基序(氨基酸序列通式为 [ILV]QxxxRGxxx[RK]), 其间距分别是 11 和 15 个氨基酸残基; 每个 IQ 基序又同时与 Ca²⁺依赖的 1-5-10 和 1-8-14 基序部分重叠; 每个 IQ 基序旁侧序列中还包含保守的疏水和碱性氨基酸残基(图 2a).

借助 [Http://calcium.uhnres.utoronto.ca](http://calcium.uhnres.utoronto.ca) 网站对 *AtIQD26* 蛋白 135~151 共 17 个氨基酸残基(LQALVRGYLVKRKAAET)进行了轮状分析, 结果表明, 17 个氨基酸形成了一个典型的双亲性的 α 螺旋, 并包括间隔的带正电荷的氨基酸残基, 符合 CaM 结合域(CaMBD)的典型特征^[14, 15](图 2b).

```

1   ATG GGA AGA GCT GCG AGA TGG TTC AAG GGT ATT TTT GGT ATG AAG AAG AGC AAA GAG AAA
   M  G  R  A  A  R  W  F  K  G  I  F  G  M  K  K  S  K  E  K
61  GAG AAC TGT GTT TCC GGC GAC GTT GGA GGT GAA GCC GGT GGT TCT AAC ATT CAC CGG AAA
   E  N  C  V  S  G  D  V  G  G  E  A  G  G  S  N  I  H  R  K
121 GTT CTC CAA GCT GAC TCC GTC TGG CTC AGA ACT TAC CTT GCG GAA ACA GAC AAA GAA CAG
   V  L  Q  A  D  S  V  W  L  R  T  Y  L  A  E  T  D  K  E  Q
182 AAC AAA CAC GCG ATT GCG GTT GCT GCT GCT ACA GCC GCG GCT GCT GAC GCA GCG GTT GCA
   N  K  H  A  I  A  V  A  A  A  A  T  A  A  A  A  D  A  A  V  A
241 GCG GCT CAA GCT GCT GTG GCG GTG GTC AGG TTA ACA AGT AAC GGA AGA AGC GGA GGA TAT
   A  A  Q  A  A  V  A  V  V  R  L  T  S  N  G  R  S  G  G  Y
301 TCC GGG AAC GCA ATG GAG CGG TGG GCC GCA GTG AAA ATT CAA TCA GTC TTC AAG GGC TAT
   S  G  N  A  M  E  R  W  A  A  A  V  K  I  Q  S  V  F  K  Y
361 TTG GCG AGA AAA GCG TTA CGA GCT TTG AAA GGT TTA GTG AAG CTA CAA GCT TTG GTA AGA
   L  A  R  K  A  L  R  A  L  K  G  L  V  K  L  Q  A  L  V  R
421 GGA TAC TTA GTC CGC AAA CGC GCC GCC GAA ACG CTG CAT AGC ATG CAA GCT CTC ATT AGA
   G  Y  L  V  R  K  R  A  A  E  T  L  H  S  M  Q  A  L  I  R
481 GCT CAA ACC AGC GTC CGA TCG CAA CGC ATC AAC CGC AAC AAC ATG TTT CAT CCT CGA CAC
   A  Q  T  S  V  R  S  Q  R  I  N  R  N  N  M  F  H  P  R  H
541 TCA CTT GAG AGG TTG GAT GAT TCA AGA AGT GAA ATC CAT AGC AAG AGA ATA TCA ATC TCT
   S  L  E  R  L  D  D  S  R  S  E  I  H  S  K  R  I  S  I  S
601 GTA GAG AAA CAG AGT AAT CAC AAC AAC AAT GCG TAC GAT GAG ACC AGT CCC AAG ATT GTG
   V  E  K  Q  S  N  H  N  N  N  A  Y  D  E  T  S  P  K  I  V
661 GAG ATT GAT ACT TAC AAG ACG AAA TCA AGA TCA AAG AGA ATG AAT GTG GCT GTA TCC GAA
   E  I  D  T  Y  K  T  K  S  R  S  K  R  M  N  V  A  V  S  E
721 TGT GGA GAT GAT TTC ATC TAT CAA GCC AAA GAT TTC GAA TGG AGT TTT CCG GGA GAG AAA
   C  G  D  D  F  I  Y  Q  A  K  D  F  E  W  S  F  P  G  E  K
781 TGC AAG TTT CCT ACG GCT CAA AAC ACG CCG AGA TTC TCT TCA TCA ATG GCT AAT AAT AAC
   C  K  F  P  T  A  Q  N  T  P  R  F  S  S  S  M  A  N  N  N
841 TAT TAC TAC ACG CCC CCA TCG CCG GCG AAA AGT GTT TGC AGA GAC GCT TGT TTT AGG CCA
   Y  Y  Y  T  P  P  S  P  A  K  S  V  C  R  D  A  C  F  R  P
901 AGT TAT CCT GGT TTG ATG ACA CCT AGC TAT ATG GCT AAT ACG CAG TCG TTT AAA GCC AAG
   S  Y  P  G  L  M  T  P  S  Y  M  A  N  T  Q  S  F  K  A  K
961 GTA CGT TCG CAT AGT GCA CCG AGA CAA CGT CCT GAT AGA AAA AGA TTG TCA CTT GAT GAG
   V  R  S  H  S  A  P  R  Q  R  P  D  R  K  R  L  S  L  D  E
1021 ATT ATG GCG GCT AGA AGT AGC GTT AGT GGT GTG AGG ATG GTG CAA CCA CAA CCA CAA CCG
   I  M  A  A  R  S  S  V  S  G  V  R  M  V  Q  P  Q  P  Q  P
1081 CAA ACG CAA ACG CAG CAA CAG AAA CGC TCT CCT TGT TCG TAT GAT CAT CAG TTT CGT CAG
   Q  T  Q  T  Q  Q  Q  K  R  S  P  C  S  Y  D  H  Q  F  R  Q
1141 AAC GAG ACT GAT TTT AGA TTC TAT AAT TAG
      N  E  T  D  F  R  F  Y  N

```

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the coding region in AtIQD26

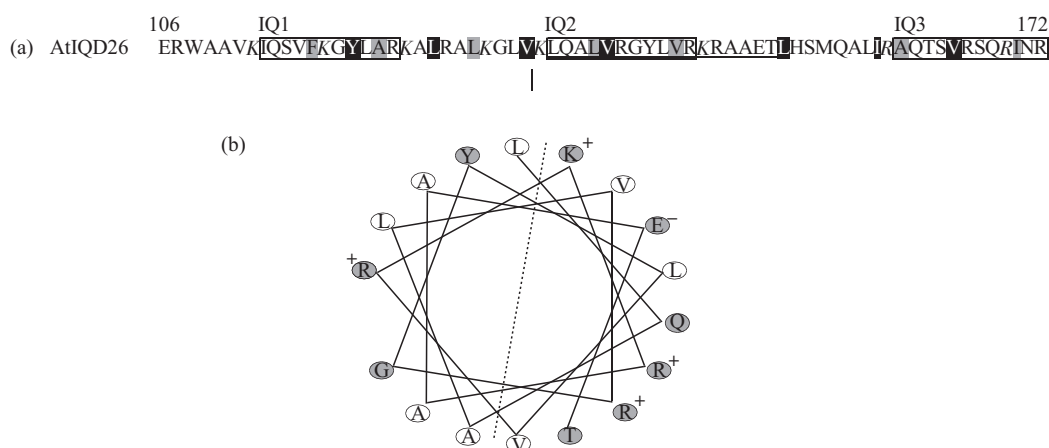


Fig. 2 IQD domain and CaMBD analysis in AtIQD26

(a) IQD domain 106~172 amino acid sequence in AtIQD26. The 3 boxed amino acid sequences are the IQ1-3 motifs. The 1-5-10 motifs and the 1-8-14 motifs are shaded in grey and black respectively. Underlines indicate the putative CaM-binding domain (CaMBD) analyzed by helical wheel projection. Hydrophobic amino acid residues are highlighted in bold. Basic amino acid residues are written in italics. (b) The helical wheel projection of the putative CaMBD IQ2 in AtIQD26. Hydrophilic residues are shaded and basic residues are depicted with a positive charge symbol.

2.3 AtIQD26 全蛋白与 CaM 的结合特性

文库筛选克隆到的阳性克隆只编码出 AtIQD26 蛋白的部分片段，为进一步验证 AtIQD26 (At3G16490) 全蛋白与 CaM 的相互作用，我们采用了酵母双杂交和标记 CaM 凝胶覆盖两种方法。

首先利用酵母双杂交方法，鉴定 AtIQD26 全蛋白和 ACaM2 是否具有相互作用。将重组质粒 pGADT₇-AtIQD26 cDNA 转化到含有质粒 pGBKT₇-ACaM2 的酵母菌 AH109 中，涂布在缺少 Trp 和 Leu 的二缺 DDO 固体培养基上，30℃ 培养 2~3 天，待菌落长出，将其划线转接到四缺培养基 QDO 上，观察它的生长情况，结果显示，共转 AD-At3g16490 和 BD-CaM 质粒的酵母克隆生长良好，将在四缺平板上生长出的菌落，进行 β- 半乳糖苷酶活性检测，结果为阳性(图 3a)。而 AtIQD26 和 BD-CaM 的单独转化子，β- 半乳糖苷酶活性检测均为阴性，而且在四缺培养基上不能生长，这说明二者无自激活作用(图 3b)。上述结果表明，全长 AtIQD26 蛋白能够和 ACaM2 在酵母体内发生相互作用。

为了进一步验证 AtIQD26 蛋白与 CaM 的结合特性，又采用了标记 CaM 凝胶覆盖实验。将含阳性重组子 pET-28b-AtIQD26 cDNA 的 BL21 菌株，

37℃ 进行 1 mmol/L IPTG 诱导，经 SDS-PAGE 分析表明，IPTG 诱导了一条分子质量约 43 ku 的蛋白表达，这与理论预测的 AtIQD26 分子质量一致，而在对照菌株中并没有此蛋白质的表达。用生物素化 CaM(Bio-CaM)及 ³⁵S-CaM 分别对诱导蛋白进行了覆盖检测，结果表明，诱导表达蛋白在有 Ca²⁺ 条件下与 CaM 结合，表现为一条明显的显色条带，在 1 mmol/L EGTA 存在条件下也有较强的结合(图 4)。

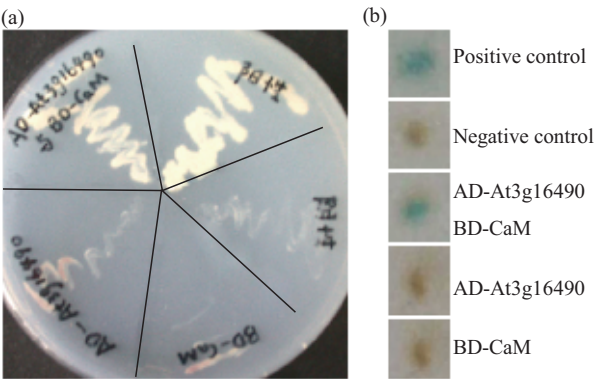


Fig. 3 AtIQD26 interacted with ACaM2 in vivo by yeast two-hybrid system
(a) Growth on QDO medium. (b) X-Gal assay.

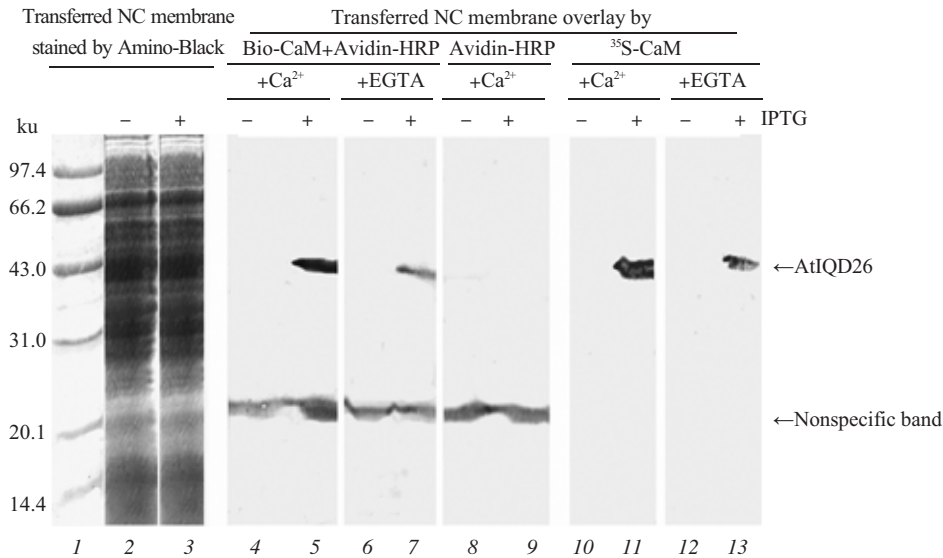


Fig. 4 Recombinant AtIQD26 interacted with CaM in vitro by CaM overlay

2.4 AtIQD26 的亚细胞定位

为了研究 AtIQD26 的亚细胞定位，我们用黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)做为报告基因，构建了 pCAMBIA1300:35S::AtIQD26-YFP 及对对照 35S::YFP 的双元表达载体，经过测序证明

构建结果正确。借助倒置荧光显微镜观察上述转基因纯合体，同时采用细胞核特异荧光染料 DAPI 染色，结果表明，报告基因 YFP 在质膜和细胞核处的表达较明显，但在胞质内也有明显的表达(图 5)。这样的结果与对 AtIQD26 蛋白定位预测的生物信

息学分析结果基本一致, 表明 AtIQD26 可能是分泌蛋白, 主要分布在细胞核及细胞膜附近。

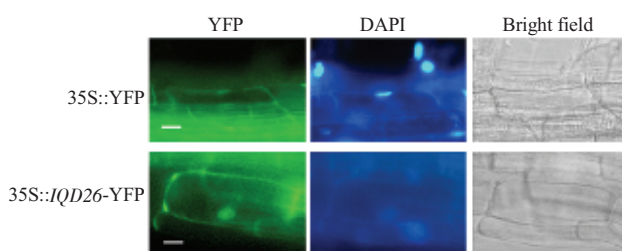


Fig. 5 The subcellular location of AtIQD26 in root of 35S::IQD26-YFP transgenic *Arabidopsis* line
Bar = 10 μ m

2.5 AtIQD26 的组织表达特性

用 β -葡萄糖苷酶(β -glucuronidase, GUS)做为报告基因, 将 AtIQD26 的启动子或 cDNA 与 GUS

构建成融合基因并经过测序证明构建结果正确. 利用 GUS 的化学染色分析 AtIQD26 的组织表达. 结果表明: 利用 AtIQD26::GUS 的纯合体植株作为材料时, 在子叶的叶脉和叶尖、真叶叶尖、根的中柱, 花萼、花丝、花柱、柱头等处检测到了明显的 GUS 表达, 说明 AtIQD26 在这些部位中有表达(图 6a). 利用 AtIQD26::cDNA-GUS 的纯合体植株作为材料时, AtIQD26 在新生真叶中表达量较高且明显, 但随着下一对真叶的长出, 前一对真叶中该基因的表达量明显下降, 当叶子完全长大后 AtIQD26 就基本仅在叶柄、叶脉处表达了, 在根中的表达主要局限于根的中柱(根中的输导组织)且相对较弱, 花中仅在花柱部位(胚珠)检测到了 GUS 的表达(图 6b).

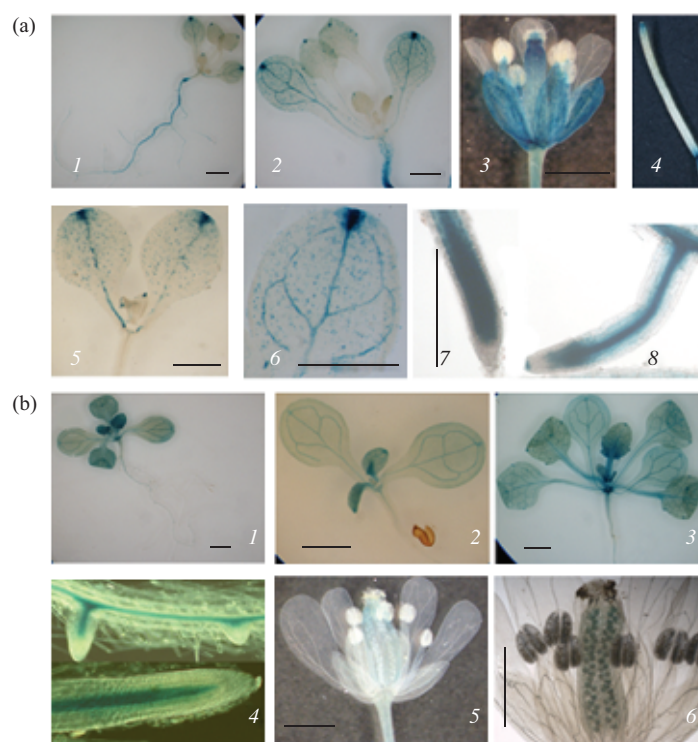


Fig. 6 Spatiotemporal expression of AtIQD26 gene by GUS histochemical staining

(a) AtIQD26::GUS transgenic lines. 1: Seedling; 2, 5, 6: Leaf; 3: Flower; 4: Silique; 7: Primary root; 8: Lateral root. (b) AtIQD26::cDNA-GUS transgenic lines. 1: Seedling; 2, 3: Leaf; 4: Root; 5, 6: Flower. Bar = 1 cm

3 讨 论

酵母双杂交系统是一种研究蛋白质-蛋白质在生物体内相互作用的有效方法. 植物细胞信号转导研究中, 借助这一系统验证、筛选了许多重要的信号组分^[16]. 本实验以拟南芥的花器官为实验材料,

以拟南芥钙调素亚型 2(ACaM2)为钓饵, 重组共转化法构建并筛选了酵母双杂交文库. 经初筛、复筛确定了一个推测的 CaMBP——AtIQD26.

为了证实 AtIQD26 确为 CaMBP, 利用生物信息学方法对其 CaM 结合域进行了分析预测, 结果表明: AtIQD26 蛋白中存在多个 Ca^{2+} 依赖的和 Ca^{2+}

非依赖的 CaM 结合基序, 说明它有与 CaM 相互作用的潜力, 通过酵母双杂交验证了二者在酵母体内确实能发生相互作用. Bio-CaM 及 ^{35}S -CaM 凝胶覆盖体外结合实验研究表明, 重组 AtIQD26 蛋白在有 1 mmol/L Ca^{2+} 条件下与 CaM 结合, 而在 1 mmol/L EGTA 存在条件下也有结合, 但有 Ca^{2+} 条件下有利于它们的结合(图 4), 说明 AtIQD26 存在不依赖于 Ca^{2+} 的 CaM 结合特性. 同时, 纯化的重组 GST-AtIQD26 的融合蛋白点杂交结果也显示: 有 Ca^{2+} 的条件下比无 Ca^{2+} 条件下的结合信号要强(结果未展示).

生物信息学的分析表明: AtIQD26 蛋白在分类上属于具有未知生化功能的、推测的 CaM 靶蛋白家族——IQD(IQ67 domain)家族. IQD 家族是 Abel 等^[13]借助生物信息学方法, 利用 IQ 基序搜索模式植物拟南芥和水稻基因组, 得到一类具有 IQ67 结构域(即由 67 个氨基酸残基组成的含有 IQ 基序的结构域)的推测的 CaMBPs 的总称. 由于 IQ 基序是典型的 Ca^{2+} 非依赖性 CaMBP, 因此该类 CaMBP 在理论上都存在不依赖于 Ca^{2+} 的 CaM 结合特性, 属于钙不依赖性 CaMBPs. 拟南芥的 IQD 家族由 33 个基因成员组成, 其编码的蛋白质被称为 IQD1~33. 迄今为止, 拟南芥 IQD 家族是拟南芥基因组中最庞大的 CaMBP 家族, 仅随其后的是与 CBL Ca^{2+} 传感器相互作用的 CIPK 家族(25~30 个基因成员).

研究显示 IQD(IQ67 domain)中包含 3 个 Ca^{2+} 非依赖的 CaMBD (IQ 基序) 和多个 Ca^{2+} 依赖的 CaMBD(1-5-10 或 1-8-14 基序). 虽然 IQ 基序在生物界分布广泛, 但 IQD 中 3 个 IQ 基序的排列组合方式却是植物特有, 目前尚未在植物蛋白以外发现 IQD^[13]. 例如除 IQD 家族以外, 结合 CaM 的转录激活子(calmodulin-binding transcription activator, CAMTA)家族、肌球蛋白(myosin)家族和循环核苷酸门控通道(cyclic nucleotide gated channels, CNGC)家族都是具有 IQ 基序的 CaMBP 家族, 但 CAMTA、myosin 和 CNGC 家族中各 IQ 基序的间距以及外显子-内含子的组合方式与 IQD 家族明显不同^[16]. 此外, 分析表明^[16], 大多 IQD 蛋白都具有碱性等电点, 富含 Ser 且多数定位于细胞核内. 根据上述研究推测, IQD 蛋白参与并协调了与 CaM 及其同源蛋白的相互作用, 可能在细胞核发挥功能, 在转录及转录后水平调节基因表达^[13].

然而, 目前人们对 IQD 家族各成员所知甚

少. 仅有体外实验证明: IQD20 在 Ca^{2+} 或 EGTA 存在时都能与 CaM 结合, 而 IQD1 只在 Ca^{2+} 存在时与 CaM 结合, IQD1 参与促进植物体内芥子油苷积累, 与防御反应相关^[17].

在对 AtIQD26 的研究中, 为了进一步揭示 AtIQD26 的结构和功能, 我们研究了其组织表达与亚细胞定位. AtIQD26 自身启动子与 GUS 融合基因的恒定转化可以反映 AtIQD26 在转录水平的表达情况, 而 AtIQD26 自身启动子与 cDNA-GUS 融合基因的恒定转化可以反映 AtIQD26 在转录及翻译水平的表达情况. *AtIQD26::GUS* 及 *AtIQD26::cDNA-GUS* 恒定转化的结果显示: 虽然两者表达模式存在一些差异, 但 AtIQD26 广泛存在于植物体的各个部分(图 6), 说明它可能与植物基本的生理功能有关. 此外, 转 *AtIQD26::cDNA-GUS* 的植株中, GUS 组织染色结果显示: AtIQD26 在生长分裂旺盛的部位和维管组织中表达量较高, 推测其功能可能与细胞分裂、营养和信号分子的运输有关. 当然, 这一推测还需要进一步实验的支持.

越来越多的证据表明: 植物细胞中能产生核特异的 Ca^{2+} 信号, CaM 及其相关 Ca^{2+} 受体蛋白在转录或基因剪接等核过程中具有潜在的调控作用^[18~24]. 在 35 S 强启动子驱动下, AtIQD26 与 YFP 融合基因恒定转化的结果显示: AtIQD26 蛋白主要定位在细胞核及质膜附近(图 5). 虽然 AtIQD26 蛋白结构中不含有已知的 DNA 或 RNA 结合结构域, 但考虑到 AtIQD26 蛋白的碱性等电点和富含丝氨酸的特性, 说明其可能在细胞核发挥功能, 在转录及转录后水平调节基因表达. 而且 AtIQD26 蛋白中多个 Ca^{2+} 依赖的和 Ca^{2+} 非依赖的 CaMBD 可能参与、协调了与 CaM 或 CaM 样蛋白的相互作用, 其生理功能有待进一步的探讨.

参 考 文 献

- 1 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 等. 细胞信号转导. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001. 92~118
Sun D Y, Guo Y L, Ma L G, et al. Cell Signal Transduction. 3th. Beijing: Science Press, 2001. 92~118
- 2 Jurado L A, Chockalingam P S, Jarrett H W. Apocalmodulin. Physiological Reviews, 1999, 79 (3): 661~682
- 3 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002. 242~246
Wang G L, Fang H J. Plant Genetic Engineering. Beijing: Science Press, 2002. 242~246
- 4 张迪, 霍克克, 顾科隆, 等. 酵母双杂交技术研究进展. 高技术通讯, 2000, 10(3): 98~101

- Zhang D, Huo K K, Gu K L, *et al.* Progress on yeast two-hybrid technology. *Advanced Technology Bulletin*, 2000, **10**(3): 98 ~ 101
- 5 Ni M, Tepperman J M, Quail P H. Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 1999, **400**(6716): 781~784
 - 6 Doonan J, Fobert P. Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9**: 824~830
 - 7 Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K, *et al.* Identification of a possible MAPKinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett*, 1998, **437**(1): 56~60
 - 8 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5160): 680 ~ 685
 - 9 李家旭, 白娟, 王学臣, 等. 生物素标记钙调素用于植物钙调素结合蛋白的检测. *植物生理学报*, 1994, **20**(2): 157~162
Li J X, Bai J, Wang X C, *et al.* *Acta Phytophysiol Sin*, 1994, **20**(2): 157~162
 - 10 崔素娟, 郭晓强, 等. ³⁵S 标记重组植物钙调素的制备方法. *生物化学与生物物理学研究进展*, 2002, **29**(5): 801~805
Cui S J, Guo X Q, *et al.* *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2002, **29**(5): 801~805
 - 11 Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, **16**(6): 735~743
 - 12 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**(13): 3901~3907
 - 13 Abel S, Savchenko T, Levy M. Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *BMC Evol Biol*, 2005, **5**(1): 72~96
 - 14 O'Neil K T, Degrado F. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends Biochem Sci*, 1990, **15**(1): 59~64
 - 15 James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faced. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**(1): 38~42
 - 16 朱金鑫, 李小方. 酵母双杂交技术及其在植物研究中的应用. *植物生理学通讯*, 2004, **40**(2): 235~239
Zhu J X, Li X F. *Plant Physiology Bulletin*, 2004, **40**(2): 235~239
 - 17 Levy M, Wang Q, Kaspi R, *et al.* Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J*, 2005, **43**(1): 79~96
 - 18 Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, *et al.* Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 2002, **14**(Suppl): S389~400
 - 19 Yang T, Poovaiah B W. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*, 2002, **277**(47): 45049~45058
 - 20 Bouché N, Scharlat A, Snedden W, *et al.* A novel family of calmodulin-binding transcription in multicellular organisms. *J Biol Chem*, 2002, **277**(24): 21851~21861
 - 21 Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 2000, **290**(5489): 142~144
 - 22 Du L, Poovaiah B W. A novel family of Ca²⁺/calmodulin-binding proteins involved in transcriptional regulation: interaction with fsh/Ring3 class transcription activators. *Plant Mol Biol*, 2004, **54**(4): 549~569
 - 23 Perruc E, Charpentau M, Ramirez B C, *et al.* A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J*, 2004, **38**(3): 410~420
 - 24 Yoo J H, Park C Y, Kim J C, *et al.* Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor MYB2 enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(5): 3697~3706

Isolation and Characterization of Calmodulin-binding Protein AtIQD26 in *Arabidopsis thaliana**

WEI Hui-Yan^{1,2)}, GUO Zhen-Qing^{1)**}, WANG Zhen-Jie¹⁾, LI Zhao-Wei^{1)**}, WANG Zhi-Juan¹⁾, CUI Su-Juan^{1)***}

¹⁾ Institute of Molecular Cell Biology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

²⁾ Department of Physics, Chemistry and Biology, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454000, China)

Abstract Calmodulin (CaM) is a ubiquitous, multifunctional calcium (Ca^{2+}) sensor that exists in all eukaryotes. Calmodulin-binding proteins (CaMBPs) play important roles in various signal pathway of calmodulin. The finding of new CaMBPs will be useful for illustrating mechanism of CaM implicating in plant growth and development. Yeast two-hybrid system is an effective method for studying protein-protein interactions *in vivo*. In the study of plant signal transduction, many important signal transduction molecules were obtained by this system. Here, *Arabidopsis* flower were used as the material. The Yeast two-hybrid library of *Arabidopsis* flower was constructed by co-transforming yeast strain AH109 with ds cDNA, pGADT₇-rec and pGBKT₇-ACaM2. A positive clone was identified. DNA sequencing and analysis indicated that this cDNA clone encodes calmodulin-binding protein AtIQD26. The AtIQD26 protein contains a plant-specific domain of 67 conserved amino acid residues, referred to as the IQ67 domain(IQD), which is characterized by a unique and repetitive arrangement of three different CaM recruitment motifs, known as the IQ, 1-5-10, and 1-8-14 motifs. Yeast two-hybrid analysis and gel overlay experiments demonstrated that AtIQD26 interacted with CaM both in the presence or absence of Ca^{2+} . A striking feature of AtIQD26 is the high isoelectric point (~ 10.6) and frequency of serine residues ($\sim 10\%$). To uncover potential roles for AtIQD26, a series of expression vectors were constructed about it, and the relative transgenic works were finished. Using these transgenic lines, the tissue expression and the subcellular localization of AtIQD26 were studied. Fusion GFP reporter showed that AtIQD26 was located at the nucleus and near cytoplasm membrane. GUS histochemical assay showed that AtIQD26 had characteristic of universal tissue expression, especially in the nascent tissue. Interaction of AtIQD26 with CaM and the presence of predicted CaM binding sites in it suggest that AtIQD26 is a new member of CaM targets. The basic isoelectric point and its potential nuclear localization suggest that AtIQD26 links Ca^{2+} signaling pathways to the regulation of gene expression. Expression similarity indicates that AtIQD26 combined with CaM to regulate plant development and growth.

Key words calmodulin-binding proteins, yeast two-hybrid system, *Arabidopsis*, gel overlay, tissue-specific expression, subcellular localization

*This work was partly supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (2006CB0D1105, 90208004, 30470889), National Education Department New Century Excellent Teacher Project (NCET-06-0256), The National Natural Science Foundation of Hebei Province (C2004000152) and Specialized Research Fund for The Doctoral Program of Hebei Normal University (L2004B11).

**GUO Zhen-Qing. Current address: College of Life Science, Hebei Science and Technology Normal University, Qinhuangdao 066000

LI Zhao-Wei. Current address: College of Life Science, Hebei Science and Technology Normal University, Shijiazhuang 050016

***Corresponding author.

Tel: 86-311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

Received: November 17, 2007 Accepted: December 27, 2007