

分裂泛素化酵母双杂交系统 研究光合膜蛋白相互作用*

朱树勇^{1,2)} 迟伟¹⁾ 张立新^{1)**}

¹⁾中国科学院植物研究所, 光合作用与环境分子生理重点实验室, 北京 100093;

²⁾兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要 光合类囊体膜主要由光系统Ⅱ、细胞色素 b_6f 复合物、光系统Ⅰ以及 ATP 合酶 4 个超分子复合物组成. 利用分裂泛素化酵母双杂交系统研究光合类囊体膜蛋白间的相互作用. 将叶绿体 *psbA* 基因编码的 D1 蛋白作为诱饵蛋白, 以叶绿体基因 *psbD* 编码的 D2 蛋白、*petB* 编码的 $Cytb_6$ 蛋白作为靶蛋白, 分别共转化酵母菌株后进行相互作用分析. 实验结果表明, 诱饵蛋白 D1 能与来源于同一复合物光系统Ⅱ的 D2 蛋白发生相互作用, 而与来源于细胞色素 b_6f 复合物的 $Cytb_6$ 蛋白没有互作. 这一结果表明, 分裂泛素化酵母双杂交系统可以用于检测光合膜蛋白间的相互作用, 从而为研究光合膜蛋白生物发生的调控机理提供一个有效的工具.

关键词 光合膜蛋白, 蛋白质相互作用, 分裂泛素化酵母双杂交系统, 光系统Ⅱ

学科分类号 Q71

高等植物叶绿体类囊体膜是植物进行光合作用的场所. 进行光合作用的 4 类复合物均分布于类囊体膜中, 它们分别是光系统Ⅱ、细胞色素 b_6f 复合物、光系统Ⅰ以及 ATP 合酶. 其中, 光系统Ⅱ至少由 27 种亚基构成^[1], 它在光合作用过程中的功能是进行光能转化、水的裂解以及释放氧气. 在该复合物中, 进行原初光化学反应的叶绿素结合蛋白复合体称作反应中心, 其基本的结构单位为 D1-D2- $Cytb_{559}$ ^[2]. 其中的 D1 蛋白由叶绿体基因 *psbA* 编码, 按照同步翻译-组装的模型插入类囊体膜^[3,4], 并在类囊体膜上跨膜 5 次, 最终形成 N 端在基质、C 端在囊腔的跨膜蛋白^[5]. 叶绿体基因 *psbD* 编码的 D2 蛋白以相同方式跨类囊体膜, 并与 D1, $Cytb_{559}$ 结合而构成光反应中心的基本单位^[6]. 在光系统Ⅱ功能复合物组装过程中, 需要由核基因编码的蛋白质因子来协同参与, 这些参与叶绿体基因表达的反式调控因子, 通过与靶蛋白发生特异性结合的方式来发挥其功能^[1]. 根据 Emanuelsson 等^[7]预测, 有 3 000 个以上核基因编码的蛋白质定位于叶绿体, 作为调控因子, 它们与特定的类囊体膜蛋白发生瞬时而复杂的特异性结合来参与叶绿体的生物发生, 同时调节在不同发育时期和不同环境背景

下叶绿体的基因表达.

蛋白质相互作用在基因的生物学功能研究中起着重要的作用. 由于膜蛋白的正确折叠需要特定的疏水性环境, 所以常用于在体外检测蛋白质相互作用的生化方法, 如免疫沉淀、化学交联等, 难于检测到瞬时或者较弱的相互作用. Fields 等^[8]发展的酵母双杂交系统已被广泛用于体内检测蛋白质-蛋白质相互作用, 且在蛋白质-核酸, 蛋白质-肽分子间的相互作用研究中也取得了巨大成功. 但传统的酵母双杂交系统要求所检测的生物分子必须同时定位在亲水性的核基质中并具有功能结构, 对于膜蛋白而言, 一旦离开特定的疏水环境后, 其结构和功能将改变或丧失, 蛋白质间的相互结合也不可能发生. 因而在膜蛋白的相互作用研究中, 该系统存在一定的局限性. 为此, Stagliar 等^[9]发展了基于分裂

*国家自然科学基金资助项目(30500037), 中国科学院植物研究所特别支持经费.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62836256, Fax: 010-82599384

E-mail: zhanglixin@ibcas.ac.cn

收稿日期: 2005-10-14, 接受日期: 2005-11-25

泛素的酵母双杂交系统. 该系统所采用的泛素分子为 76 个氨基酸的肽链, 并具有位于 N 端(Nub)和 C 端(Cub)的两个相对独立的结构域, 且分裂的野生型 Nub(NubI)和 Cub 能通过扩散-碰撞模式重新自发折叠成具有生物活性的结构. Johnson 等^[9]证实, 当 Nub 的第 13 个氨基酸发生 I→G 或者 I→A 的点突变后, 分裂的 NubG(A)和 Cub 不能再以扩散-碰撞的模式重新折叠. 但是, 如果分裂的 NubG(A)和 Cub 分别连在两条多肽的末端, 且当这两条多肽在同一细胞内相互作用时, 与之相连的 NubG(A)和 Cub 在细胞内的局部浓度就会获得明显增加, 这种分子浓度的局部增大能够促使 NubG(A)和 Cub 形成泛素分子的天然构象^[10]. 根据这个原理, Stagljar 等^[9]将待检测的两个膜蛋白分别与发生 I→G 点突变后的 NubG 和 Cub 相连, 并在 Cub 的 N 端或 C 端连接一个人工转录因子 PLV (proteinA-LexA-VP16). 当两个蛋白质发生相互作用时, 相互接近的空间效应使得被融合的 NubG 和 Cub 重新折叠成功能性的泛素分子^[10], 引发细胞内泛素特异性蛋白酶的识别, 并从 Cub 的 C 端剪切与之融合的蛋白质. 在分裂泛素化酵母双杂交系统中, 这种蛋白酶的特异性剪切, 将导致人工转录因子 LexA-VP16 或者 LexA-VP16-Cub 的释放, 从而激活报告基因 *His3* 和 *LacZ* 的表达.

分裂泛素化酵母双杂交系统克服了传统双杂交的局限性, 近两年已广泛地应用于酵母内质网膜蛋白^[11]、人神经细胞膜蛋白^[12]间的相互作用研究. 在植物细胞内, 已被用于检测细胞膜上蔗糖转运子^[13]以及钾离子通道蛋白亚基^[14]之间的相互作用. 为研究叶绿体光合膜蛋白的相互作用, 将不同的类囊体膜蛋白构建于带有 NubG 或 Cub 片段的酵母表达载体内, 共转化酵母菌株后, 分析光合膜蛋白在该系统中的互作情况.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及 DNA 提取. 采用的实验材料为拟南芥 *Columbia* 生态型, 在 $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 光照条件下培养, 生长至 2 周后, 提取叶绿体基因组 DNA.

1.1.2 质粒及菌株. 酵母菌株 NMY32 (MATahis3delta200trp1-901leu2-3, 112LYS2 :: (lexAop)4-HIS3URA3 :: (lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2GAL4), 对照靶载体 pAI-Alg5 和

pDI-Alg5, 诱饵蛋白表达载体 pNCW, 靶蛋白表达载体 pDSLNX, pDL2xN-SUC 均购自 DUALSYSTEMS BIOTECH 公司. 表达酵母质膜融合蛋白 Fur4-NubI、Fur4-NubG, 内质网膜融合蛋白 OST1-NubI、OST1-NubG 的对照载体由瑞士 Zurich-Irchel 大学 Daniel 博士惠赠. pMD18-T 克隆载体由 TakaRa 公司提供.

1.1.3 酵母培养基及主要试剂. 所有缺陷型培养基购自 CLONTECH 公司. D1, D2 抗体来自 Eva-Mari Aro 实验室, Cytb₆ 抗血清本室自制. 限制性内切酶 *Sfi* I 购自 NEB 公司. 425 ~ 600 μm 玻璃珠、LiOAc, PEG4000, SS-DNA 均购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建. 以叶绿体基因组为模板, 利用带有 *Sfi* I 识别位点的特异性引物, PCR 扩增 *psbA*, *psbD*, *petB* 全长. 将回收的 PCR 产物连至 pMD18-T 克隆载体, 测序验证后亚克隆至相应的表达载体. 诱饵表达载体 pNCW 编码的 Cub 半分子位于诱饵蛋白的 N 端, 亚克隆 *psbA* 至 pNCW 后产生的表达载体记作 pNCW-D1, 表达诱饵融合蛋白为 LexA-VP16-Cub-D1. 靶蛋白表达载体 pDL2xN-SUC, pDSLNX 编码的 NubG 半分子分别位于靶蛋白的 C 端、N 端, 将 *psbA*, *psbD* 分别亚克隆至 pDL2xN-Suc, *psbD*, *petB* 亚克隆至 pDSLNX, 表达的靶融合蛋白分别为 D1-NubG, D2-NubG, NubG-D2, NubG-b₆.

1.2.2 酵母菌株 NMY32 的小量转化. 取 20 ml 生长于完全培养基 YPAD 的酵母菌株 NMY32 培养物 ($A_{546}=0.6 \sim 1.0$), 700 g 离心 5 min 收集菌体, 悬浮于 1 ml 灭菌水中备用. 取 1 μl pNCW-D1 质粒于 300 μl 转化预混液 (270 μl 50% PEG4000, 5 μl 5 mol/L LiOAc, 25 μl 2 g/L 鲑鱼精基因组 DNA) 中, 快速涡旋混匀, 加入 100 μl 上述酵母细胞, 轻轻混匀 1 min. 42℃ 水浴 45 min, 中间偶尔轻摇. 700 g 离心 5 min 收集转化细胞, 悬浮于 100 μl 灭菌生理盐水 (0.9% NaCl). 取 50 μl 转化细胞均匀涂布于新鲜制备的 SD-Leu 平板, 30℃ 倒置培养 2~3 天, 所得转化细胞记作 NMY32/NCW-D1.

1.2.3 诱饵蛋白在酵母中表达的检测. 从 SD-Leu 平板上挑单克隆于 10 ml SD-Leu 液体培养基中, 30℃, 200 r/min 生长至 $A_{546}=1.0$, 收集菌体, 用 1 mmol/L EDTA 洗涤沉淀. 加入 200 μl 2 mol/L NaOH 后冰浴 10 min 以裂解细胞, 再加入等体积的 50%三氯乙酸(TCA), 冰浴 60 min 沉淀总蛋白.

4℃, 18 000 *g* 离心 20 min, 弃上清, 沉淀在样品缓冲液(9 mol/L 尿素, 25 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 10%甘油)增溶后, 37℃温育 15 min, 所得样品 11% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 用 D1 特异性抗体免疫检测其表达情况。

1.2.4 诱饵蛋白在酵母膜上跨膜方向的检测. 按上述方法, 用对照载体 pAI-Alg5 和 pDI-Alg5 小量转化 NMY32/NCW-D1. 将所得转化细胞, 以 50 μ l 依次涂于 SD-Leu-Trp, SD-His-Leu-Trp, SD-Ade-His-Leu-Trp 缺陷型平板, 倒置培养 3~6 天后, 观察菌落表型及其生长情况。

1.2.5 酵母双杂交验证相互作用. 按上述方法收集对数期的 NMY32/NCW-D1, 以 1 μ g pDSLx-D2、pDSLx-b₆、pDL2xN-SUC-D2、pDL2xN-SUC-D1 质粒分别转化酵母细胞. 取 50 μ l 转化细胞均匀涂于 SD-Leu-Trp 平板, 30℃培养 2 天. 从每组转化中挑单克隆于 10 ml 亮氨酸、色氨酸缺陷型液体培养基中, 生长至对数期后, 依次稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍, 取 5 μ l 于 SD-His-Leu-Trp 平板上生长, 2 天后观察菌落表型. 为分析 β -半乳糖苷酶活性, 将每组转化细胞重新用平头牙签在 SD-Leu-Trp 平板上划线培养, 生长 2 天后, 用灭菌的 Whatman 滤纸覆盖平板 10 min, 将带有细胞的滤纸转入液氮速冻 5 min, 再室温裂解, 反复冻融 3 次后, 在滤纸上直接倾倒 10 ml 0.5% 琼脂糖的 Z 缓冲液 (60 mmol/L Na₂PO₄, 40 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, 0.1 g/L X-gal), 凝固后, 倒置于 30℃培养箱, 1~23 h 内观察菌落颜色。

1.2.6 酵母膜组分提取及表达蛋白的共定位检测. 从生长有不同共转化细胞的 SD-Leu-Trp 平板上挑单克隆于 500 ml 液体培养基中, 生长至 $A_{546}=1.0$, 收集菌体. 按照 David 等^[15]方法, 将沉淀悬浮于 6 ml 预冷的裂解液 I 中 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L PMSF). 混匀, 转至 2 ml Eppendorf 管中, 加入 300 μ l 直径为 425~600 μ m 的玻璃珠, 剧烈震荡 30 s, 冰上静置 1 min, 反复 7 次. 4℃, 700 *g* 离心 10 min, 沉淀未破裂细胞. 所得上清轻轻转移至新的超速离心管内, 4℃, 150 000 *g* 离心 2 h, 上清即为细胞基质蛋白. 上清加入等体积 50% 的三氯乙酸沉淀蛋白质, 丙酮洗涤, 沉淀在样品缓冲液中增溶, 45℃温育 30 min 后, 14 000 *g* 离心 5 min, 上清直接用于

蛋白质印迹检测. 在包括膜组分的沉淀中加入预冷的裂解液 II (裂解液 I +1% Triton X-100), 4℃, 186 000 *g* 离心 2 h, 取上清, 三氯乙酸 (TCA) 沉淀后, 用样品缓冲液增溶, SDS-PAGE 后利用特异性抗体免疫印迹检测其表达。

2 结 果

2.1 融合诱饵蛋白在酵母细胞内的表达

诱饵蛋白在酵母细胞内表达是进一步研究蛋白质相互作用的前提. 以带有 LexA-Vp16-Cub 表达序列和全长 *psbA* 的 pNCW-D1 表达载体作为诱饵蛋白载体, 小量转化酵母细胞 NMY32, 表达的融合蛋白为 LexA-Vp16-Cub-D1. 三氯乙酸法提取酵母细胞总蛋白质, 电泳分析其表达情况. 已知拟南芥的 D1 蛋白的分子质量大约为 40 ku (351 个氨基酸), 诱饵融合蛋白则大约为 92 ku (821 个氨基酸). 由于 pNCW 中采用截短的 *CYC1* 作为启动子, 相应的诱饵蛋白只能在酵母细胞中低丰度表达. 在分裂泛素化系统中, 要求诱饵蛋白在酵母细胞不能高丰度表达, 但又要在蛋白质免疫印迹时能够检测到其表达信号. 因为表达丰度过高可能引起诱饵蛋白在细胞内停留从而扩散至细胞核, 导致假阳性产生, 相反, 过低则检测不到相应的互作蛋白. 因而

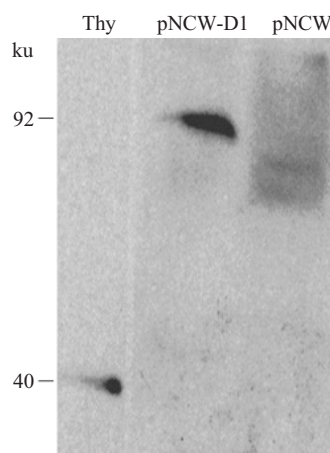


Fig. 1 Western blot analysis of yeast total protein extracts

Yeast cells were transformed with the indicated pNCW-D1 construct and empty pNCW vector and grown on the minimal medium lacking leucine. The total protein extracts were subjected to SDS-PAGE, then the separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected with the D1 antibody. The thylakoid membrane proteins and total protein extract from pNCW transformed yeast cell were used as positive and negative control, respectively. Thy: thylakoid membrane proteins; pNCW-D1: total protein extract from yeast cells transformed by bait expressing vector pNCW/D1; pNCW: total protein extracts from yeast cells transformed by empty bait vector pNCW.

在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 难以从电泳图谱中直接检测到与空白对照(带有空载体 pNCW 的转化细胞)差异明显的相应条带. 但利用 D1 特异性抗体免疫检测结果表明, 在转化诱饵蛋白的细胞中检测到条带的迁移率明显落后于类囊体 D1 蛋白的迁移率(图 1). 这种在分子质量上的差异与预期结果相符, 说明诱饵蛋白在酵母细胞 NMY32 中已经得到表达.

2.2 表达蛋白可作为功能性诱饵

在分裂泛素化酵母双杂交系统中, 要求诱饵蛋白表达后在细胞的膜环境中定位, 而与诱饵蛋白相连的转录因子和 Cub 半分子则又必须暴露于细胞基质中, 这是由于泛素特异性蛋白酶仅细胞基质和核基质中分布的缘故. 为检验 LexA-Vp16-Cub-D1 表达后是否具有自激活功能, 以及是否以 N 端位于基质侧的方式定位于内质网膜, 分别以 pAI-Alg5 (表达蛋白 Alg5-NubI) 或 pDI-Alg5 (表达蛋白 Alg5-NubG) 作为靶载体, 少量转化 NMY32/NCW-D1, 对所得转化细胞分别进行 β -半乳糖苷酶活性及组氨酸缺陷型平板上的生长分析, 结果如图 2 所示. 与 pAI-Alg5 (Alg5-NubI) 共转化后, 转化细胞在筛选严谨度较低的 SD-His-Leu-Trp 平板上能够生长, 且菌落颜色为白色, 表明与组氨酸合成相关的报告基因 *His3* 和与腺嘌呤合成相关的 *Ade2* 报告基因均被激活. 同时, 该结果还表明诱饵蛋白 LexA-Vp16-Cub-D1 已经在内质网上定

位, 否则其中的 Cub 将不能与内质网蛋白 Alg5-NubI 中的 NubI 半分子相结合从而激活报告基因表达. 转化细胞在筛选严谨度较高的 SD-Ade-His-Leu-Trp 平板上没有生长(结果未给出), 这是因为外源的 D1 蛋白在酵母 NMY32 中的表达时, 该蛋白质的表达量自身存在一个相对较低的阈值, 虽然 Alg5-NubI 中的 NubI 与 LexA-Vp16-Cub-D1 中的 Cub 能够自发折叠, 并也激活了与之相关的报告基因 *Ade2* 的表达(若没有激活, 腺嘌呤合成受阻, 导致粉红色的代谢中间物积累, 菌落将呈粉红色), 但来自诱饵融合蛋白 Cub 分子的相对低表达水平, 限制了它与 NubI 以扩散-碰撞的模式折叠成具有生物功能的泛素分子的数量, 从而抑制了酵母细胞在高选择压下 SD-Ade-His-Leu-Trp 平板上的生长(来自与 Daniel 博士的交流). 在与 pDI-Alg5 共转化中, 转化细胞在 SD-His-Leu-Trp 或 SD-Ade-His-Leu-Trp 平板上没有生长, 且在 SD-Trp-Leu 平板上的菌落呈粉红色(结果未给出). 这是由于 D1 与 Alg5 没有相互作用, NubG 和 Cub 不能在细胞内得到富集, 从而不能折叠成泛素分子功能结构的缘故. 结合 pNCW-D1 与 pAI-Alg5 及 pDI-Alg5 共转化细胞的 β -半乳糖苷酶活性分析结果(图 2b), 可以表明融合蛋白 LexA-Vp16-Cub-D1 不具有自激活功能, 在酵母细胞 NMY32 中表达后, 能以 N 端位于基质侧的方式定位于内质网膜, 而且在细胞质中没有分布(若在细胞基质中分布,

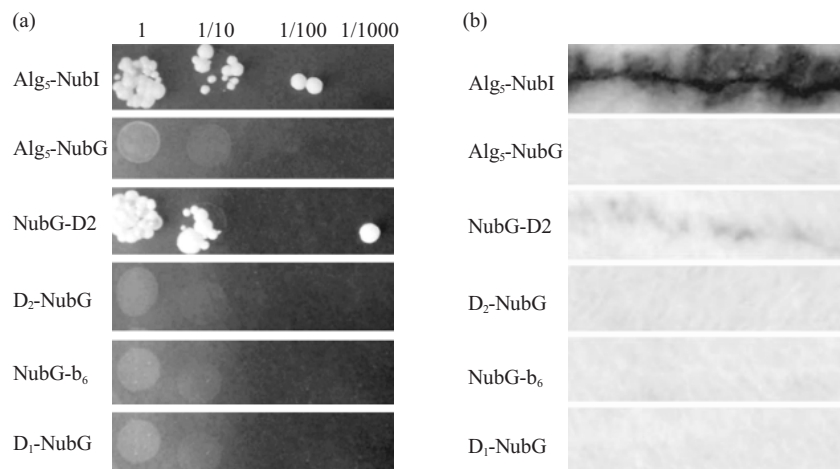


Fig. 2 Growth (a) and β -galactosidase activity (b) of the yeast cells expressing LexA-Vp16-Cub- D1 with Alg5 controls and preys

Yeast cells containing bait protein were co-transformed with each prey or control. (a) Growth of the co-transformants on SD plates lacking histidine. The resulting cells on agar plates lacking tryptophan and leucine were grown to logarithmic phase, 5 μ l of 1 : 10 serial dilutions was spotted on the SD plates lacking tryptophan, leucine and histidine, and incubated at 30°C for 3 days. The construct Alg5-NubI was also used as a positive control, and construct Alg5-NubG as a negative control. (b) β -galactosidase activity assay of the co-transformants. Cells were grown on plates lacking tryptophan and leucine, transferred to Whatman filters, permeabilized, and incubated in the presence of X-gal (0.1 g/L). The blue color development is positive.

诱饵蛋白将在人工转录因子的牵引下扩散至细胞核, 或者受到细胞内蛋白酶的非特异降解, 释放出人工转录因子 LexA-VP16, 则不带有靶载体或者带有 pDI-Alg5 的酵母细胞 NMY32/NCW-D1 都将存在报告基因的表达。所以, 光合膜蛋白 D1 构建至 pNCW 载体后, 可以用作分裂泛素化酵母双杂交系统中的功能性诱饵蛋白。

2.3 酵母双杂交验证光合膜蛋白的特异性相互作用

为验证定位于内质网膜上的 D1 诱饵蛋白能否与光系统 II 的已知互作蛋白 D2 发生特异性结合, 将 *psbD* 基因构建于 pDSLNX 及 pDL2xN-SUC 靶蛋白表达载体当中, 分别产生 NubG-D2, D2-NubG 两种融合蛋白。已知 D1, D2 在类囊体膜中均以 N 端在基质、C 端在囊腔的方式跨膜^[9]。在靶载体 pDL2xN-SUC 中, 编码酵母 SUC2 蛋白信号肽的基因序列被连接至启动子的下游, 表达的膜蛋白在该信号肽的牵引下, 其 N 端将位于内质网膜囊腔侧。同样, 将 *psbA* 构建于 pDL2xN-SUC 中, 产生的靶蛋白 D1-NubG 具有与诱饵蛋白相异的跨膜方式。把同一蛋白质按不同的跨膜方式应用于分离泛素化系统中的策略, 已被用于同一膜复合物中不同亚基间的拓扑结构研究^[11]。为进一步证明相互作用的特异性, 将编码叶绿体 Cytb₆ 蛋白的 *petB* 基因构建至 pDSLNX 中, 产生融合的 NubG-b₆ 蛋白。Cytb₆ 蛋白

是类囊体上另外一个复合物 Cytb₆f 的一个亚基, 不能与 D1 发生相互作用。而选择 pDSLNX 作为靶载体, 是因为 Cytb₆ 蛋白在类囊体中跨膜 4 次, 所以位于 Cytb₆ 的 N 端或 C 端的 NubG 都将在基质侧分布, 对于相同的融合蛋白来说, 位于其 N 端的 NubG 比位于 C 端 NubG 更易和 Cub 结合^[16], 因而即使诱饵蛋白 D1 与 NubG-b₆ 有较弱的非特异性互作, 也将在验证过程中检测到。将 pNCW-D1 分别与 pDSLNX-D2, pDSLNX-b₆, pDL2xN-SUC-D2, pDL2xN-SUC-D1 共转化酵母菌株 NMY32, 对所得转化细胞进行 β-半乳糖苷酶 (β-gal) 活性和组氨酸缺陷型生长分析。如图 2 所示, 只有 pNCW-D1 与 pDSLNX-D2 的共转化细胞具有 β-gal 活性并且在 SD-His-Trp-Leu 平板上生长, 而其余的转化组则不能。这一结果说明, 诱饵蛋白 LexA-VP16-Cub-D1 只能与 NubG-D2 发生相互作用, 而不能与 D2-NubG, NubG-b₆, D1-NubG 相互作用。

2.4 互作蛋白在酵母膜上的定位分析

只有待分析的膜蛋白都定位于细胞的相同膜组分内, 才能说明相互作用的特异性。为检测蛋白质是否在膜上共定位, 按上述方法分离酵母的膜组分, 利用特异性抗体检测相应的蛋白质是否定位于膜系统里。免疫印迹结果表明(图 3a), 所有的靶蛋

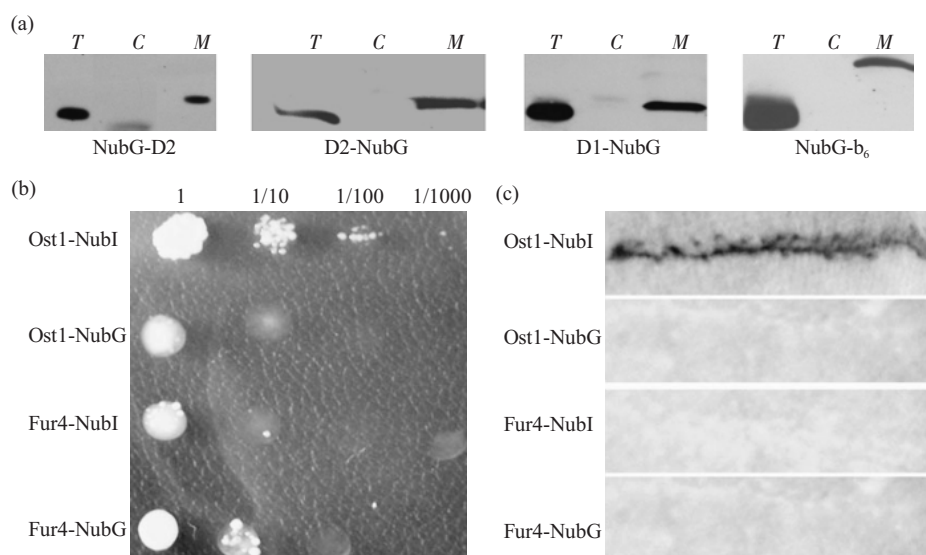


Fig. 3 Analysis of the location of thylakoid membrane protein expressed in yeast cell

(a) Western blotting analyses of the yeast cell cytosolic and membrane fractions. Each co-transformant cells were used for preparation of a cytosolic and a membrane fraction as described in **Methods and materials**. Western blotting analyses were performed using the antibodies against D2, D1, and Cytb₆, respectively. The thylakoid membrane proteins were used as positive control in each blot. T: thylakoid membrane; C: cytosolic fraction of yeast cells; M: membrane fraction of yeast cells. (b) and (c) Analyzing the location of bait protein expressed in yeast cells by virtue of different prey controls. The yeast cells containing bait protein were transformed respectively with construct Ost1-NubI, Ost1-NubG, Fur4-NubI, Fur4-NubG. The co-transformants were used to assay the growth on SD agar plates lacking tryptophan, leucine, and histidine (b) and β-galactosidase activity by filter assays (c) as described above.

白都在酵母膜组分中检测到,而在细胞基质中则没有.从图2可以看出,诱饵蛋白 LexA-Vp16-Cub-D1 定位于酵母内质网膜内.但是,进入内质网的蛋白质,可由不同运输小泡根据特异性信号序列分泌到其余膜组分上,而没有明显定位信号的蛋白质,将驻留于内质网膜或者分泌小泡的膜上,或者由分泌小泡融合至质膜^[17,18].由于已表达的蛋白质在酵母细胞内没有同源性,也没有特异性定位信号,因而以内质网膜上易位子的蛋白质亚基 Ost1 以及质膜蛋白 Fur4 作为对照,分别与诱饵蛋白共转化酵母菌株 NMY32.结果如图 3b, c 所示,在 LexA-Vp16-Cub-D1 与 Ost1-NubI 转化组中,转化细胞能够在组氨酸缺陷平板上生长并具有 β -gal 活性,而与 Ost1-NubG, Fur4-NubI, Fur4-NubG 则不能.该结果表明,光合膜蛋白 D1 在酵母细胞内表达后,在内质网膜上分布,与之发生的蛋白质相互作用也相应发生在内质网膜内.

3 讨 论

分裂泛素化酵母双杂交系统是一种在体内分析膜蛋白间相互作用的遗传学方法.以光系统 II 以及细胞色素 b_6f 复合物的不同蛋白亚基作为研究对象,利用该系统进行光合膜蛋白之间的相互作用分析.实验结果证实:叶绿体基因编码的 D1 蛋白,只能与来自同一复合物并以 NubG-D2 方式跨膜的 D2 蛋白相互结合,而与来自另一复合物的 Cytb₆ 蛋白以及 D2-NubG 则不能相互结合.

所有研究的光合膜蛋白在酵母细胞内表达后,在细胞质内均未检测到(图 3a).这是因为在酵母细胞内膜蛋白的分选,除了位于 N 端或 C 端保守性较强的氨基酸序列外,膜蛋白自身所带的跨膜信号,即跨膜片段的长度和组成,也参与决定膜蛋白的定位^[19].由于叶绿体基因编码的光合膜蛋白在酵母细胞内缺乏明显定位信号,如信号肽、前导肽等序列,因此采用内质网膜上易位子的亚基 Ost1 以及质膜蛋白 Fur4 作为靶蛋白,分别与诱饵蛋白 D1 共转化后进行报告基因的活性分析,证实了诱饵蛋白 D1 仅在内质网上分布(图 3b, c).这表明光合膜蛋白在酵母细胞内表达后,可能存在某种依赖于跨膜片段的分选机制. Schatz 等^[18]也认为,在叶绿体基因表达过程中,光合类囊体膜可能模仿了真核生物内质网的功能.当然,也有可能正是因为特异性定位信号的缺乏,才使之选择性地驻留于内质网膜中^[17].考虑到类囊体膜与内质网膜具有不同的结构

组成,而且如果这种差异能够导致光合膜蛋白在内质网上非功能性折叠,或者会产生不同的跨膜方式,那么,实验过程中检测到的相互作用将会是一种非特异的物理性结合.为证明这种可能性是否存在,将 D1, D2 蛋白在外加信号肽作用下改变其跨膜形式后(由 N 端在基质变为 N 端在囊腔)作为靶蛋白,与诱饵蛋白的双杂交分析结果表明:以 D2-NubG 表达的 D2 不能再与诱饵蛋白相互作用.这从反面证实了诱饵蛋白与 NubG-D2 相互作用的特异性(如果诱饵蛋白与 NubG-D2 的相互作用是非特异性的,那么 D2-NubG 和诱饵蛋白间也应该存在相同的非特异性互作从而激活报告基因),结合与 D1-NubG, NubG-cytb₆ 也没有相互作用发生这一结果(图 2),证实了 D1, D2 在内质网膜中的相互作用是符合于其生理性结合模式的,相应的蛋白质拓扑结构,也是具有生理性功能的.对于与 Nub 和 Cub 融合表达的光合膜蛋白而言,泛素半分子 Cub 和 Nub 的小分子质量以及呈电中性的性质,不会影响与之融合膜蛋白的正确折叠.而且也有证据表明,多次跨膜蛋白的拓扑结构,也是由所有跨膜片段所带的信号来决定的.在整个跨膜过程中,一些跨膜片段甚至还会前后移动以形成正确的拓扑结构^[20].因而光合膜蛋白在内质网上自发跨膜后,可以在跨膜区所带信号的指导下形成正确的拓扑结构.

总之,本实验的结果初步说明,分裂泛素化的酵母双杂交系统可为光合膜蛋白相互作用研究提供一种有效的检测方法.最近的研究表明,该系统在叶绿体膜通道蛋白间的相互作用研究中也是可行的^[21].因此,我们将利用 LexA-Vp16-Cub-D1 作为诱饵蛋白,筛选克隆至分裂泛素化系统靶载体中的 cDNA 文库,以期发现一些与 D1 相互作用的新型靶蛋白,为阐明叶绿体生物发生的分子机理研究,以及光信号调控网络的机制奠定一定的基础.

致谢 感谢瑞士 Zurich-Irchel 大学的 Daniel 博士赠送酵母表达载体 pOST1-NubI, pOST1-NubG, pFur4-NubI, pFur4-NubG, 以及实验过程中给予宝贵的建议.感谢芬兰 Turku 大学 Eva-Mari Aro 教授惠赠 D1, D2 抗体.

参 考 文 献

- 1 Rochaix J -D. Genetics of the biogenesis and dynamics of the photosynthetic machinery in eukaryotes. *Plant Cell*, 2004, **16**(7): 1650~1660

- 2 Deisenhofer J, Epp O, Miki P, *et al.* Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, **318** (9): 618~624
- 3 Zhang L X, Paakkari V, Suorsa M, *et al.* A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276** (41): 37809~37814
- 4 Zhang L X, Paakkari V, van Wijk K J, *et al.* Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell*, 2000, **12**(9): 1769~1782
- 5 Zouni A, Witt H T, Kern J, *et al.* Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 2001, **409** (7): 739~747
- 6 Trebst A. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z Naturforsch*, 1986, **41c**: 240~245
- 7 Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, **300** (4): 1005~1016
- 8 Fields S, Song O-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **40** (18): 245~246
- 9 Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, *et al.* A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (9): 5187~5192
- 10 Johnson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, **91** (22): 10340~10344
- 11 Yan A, Wu E, Lennarz W J. Studies of yeast oligosaccharyl transferase subunits using the split-ubiquitin system: topological features and *in vivo* interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (20): 7121~7126
- 12 Matsuda S, Giliberto L, Matsuda Y, *et al.* The familial dementia BRI2 gene binds the Alzheimer's gene APP and inhibits Abeta production. *J Biol Chem*, 2005, **280** (32): 28912~28916
- 13 Reinders A, Schulze W, Thamin S, *et al.* Intra- and intermolecular interactions in sucrose transporters at the plasma membrane detected by the split-ubiquitin system and functional assays. *Structure*, 2002, **10** (3): 763~772
- 14 Obrdlík P, Hamacher T, Cappellaro C, *et al.* K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (33): 12242~12247
- 15 David N E, Gee M, Andersen B, *et al.* Expression and purification of the *Saccharomyces cerevisiae* α-factor receptor (Ste2p), a 7-transmembrane-segment G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 1997, **272** (24): 15553~15561
- 16 Raquet X, Eckert J H, Müller S, *et al.* Detection of altered protein conformations in living cells. *J Mol Biol*, 2001, **305** (4): 927~938
- 17 Schmid S L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Ann Rev Biochem*, 1997, **66** : 511~548
- 18 Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 1996, **271** (6): 1519~1526
- 19 Rayner J C, Pelham H R B. Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J*, 1997, **16** (8): 1832~1841
- 20 Goder V, Spiess M. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett*, 2001, **504** (3): 87~93
- 21 Pasch J C, Nickelsen J, Schunemann D. The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **69** (4): 440~447

Studying of The Thylakoid Membrane Protein Interactions Through The Split-ubiquitin Yeast Two Hybrid System*

ZHU Shu-Yong^{1,2)}, CHI Wei¹⁾, ZHANG Li-Xin^{1)**}

⁽¹⁾Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

⁽²⁾School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract The major photosynthetic complexes PS I, PS II, the cytochrome *b₆f* complex and the ATP synthase complex are located in the thylakoid membrane. Here, the newly developed split-ubiquitin two hybrid system was used to investigate protein-protein interactions of thylakoid membrane proteins. The reaction center D1 protein of PS II, which is encoded by plastid gene *psbA*, was used as the bait protein, while the D2 encoded by plastid gene *psbD*, another PS II reaction center protein, and Cytb₆ encoded by plastid gene *petB*, a component of Cytb₆f complex, were used as prey proteins. The yeast two hybrid analysis showed that the D1 protein interacts with D2, but not with the Cytb₆. This result confirms the protein interaction model of thylakoid membrane protein complex, and also means the availability of this system in detecting thylakoid membrane protein interactions. Thus, the split-ubiquitin two hybrid systems could provide an efficient tool to reveal the regulation mechanism of chloroplast proteins biogenesis.

Key words thylakoid membrane proteins, protein interaction, split-ubiquitin yeast two hybrid system, PS II

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30500037) and from Institute of Botany.

**Corresponding author. Tel: 86-10-62836256, Fax: 86-10-82599384, E-mail: zhanglixin@ibcas.ac.cn

Received: October 14, 2005 Accepted: November 25, 2005