

水稻 *BWMK1* 互作基因的分离

潘素君¹, 高佳², 刘玲², 刘赛军², 刘金灵¹, 刘雄伦¹, 王国梁^{1,3}, 戴良英^{1,2*}

(1.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 3.美国俄亥俄州立大学 植物病理系, 哥伦布 43210)

摘要: 为探明 *BWMK1* 介导的信号传导途径, 采用酵母双杂交系统, 构建水稻稻瘟病菌诱导后的 cDNA 文库, 以 *BWMK1* 为诱饵, 对文库进行筛选, 通过验证、测序和基因编码分析, 获得了 7 个 *BWMK1* 互作基因 *BWIP1*~*BWIP7*, 分别位于水稻基因组第 12、2、3、10、6、4、5 染色体上; 7 个互作基因中, 除 *BWIP2* 和 *BWIP7* 未找到同源编码蛋白外, 其余 5 个基因 *BWIP1* 编码硫甲基转运酶, *BWIP3* 编码磷酸肌醇合成酶, *BWIP4* 编码磷转运蛋白, *BWIP5* 编码 WD-40 重复包含蛋白, *BWIP6* 编码 N-乙酰谷氨酸激酶。

关键词: 水稻; 稻瘟病和伤诱导的促分裂素原活化蛋白激酶 1; 互作基因; 酵母双杂交; 稻瘟病菌

中图分类号: S511.01; Q781 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)05-0494-03

Identification of rice genes interacting with *BWMK1*

PAN Su-jun¹, GAO Jia², LIU Ling², LIU Sai-jun², LIU Jin-ling¹,
LIU Xiong-lun¹, WANG Guo-liang^{1,3}, DAI Liang-ying^{1,2*}

(1.Key Laboratory of Crop Genetic Engineering, Changsha 410128, China; 2.College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3.Department of Plant Pathology, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA)

Abstract: The rice MAPK gene *BWMK1* is transcriptionally activated by fungal pathogen infection and wounding and acts as a positive regulator in plant disease resistance signaling. To further understand the *BWMK1*-mediated molecular signaling regulating pathways, a yeast two-hybrid system using *BWMK1* as a bait was used to screen *BWMK1* interacting proteins, and 7 *BWMK1* interacting protein encoding genes *BWIP1*–*BWIP7* were isolated, *BWIP1*–*BWIP7* were located on 12, 2, 3, 10, 6, 4, 5 chromosomes, respectively. Homologous coding proteins were found for each isolated gene except *BWIP2* and *BWIP7*, which indicated that *BWIP1*, 3, 4, 5 and 6 respectively coded for 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase, myo-inositol phosphate synthase, putative phosphate transporter, WD-40 repeat containing protein and N-acetyl glutamate kinase 2.

Key words: rice; blast-and wound-induced MAP kinase 1(*BWMK1*); interacting gene; yeast two-hybrid; rice blast

MAPKs (Mitogen-activated protein kinases, 促分裂素原活化蛋白激酶)级联反应在生物体细胞感受和传导外界环境刺激信号并激活下游应答反应的过程中起重要作用^[1-4]。在动物和微生物中, MAPKs 参与生物体细胞生长、分化和对外界环境胁迫应激反应等多样性的生命活动程序^[5-9]。植物中, MAPKs 同样也参与植物对各种生物及非生物因

子的胁迫、激素应答反应等^[10-16]。He等^[17]分离了水稻第一个MAPK编码基因*BWMK1*(Blast-and Wound-induced MAP Kinase 1), 该基因在转录水平上同时受稻瘟病菌和机械损伤的诱导表达, 表明*BWMK1*很可能参与至少2条信号调控途径。*BWMK1*还受多种非生物胁迫和植物激素的调控, 低温、干旱、黑暗和茉莉酸处理均能诱导*BWMK1*表达^[12]。Cheong

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470990); 国家教育部博士点基金项目(20060537004); 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室自然科学基金开放项目(10KFXM13)

作者简介: 潘素君(1973—), 女, 湖南宁远人, 博士, 主要从事分子生物学研究, sujunpan@yahoo.cn; *通信作者, liangying_99@yahoo.com

等^[18]发现, *BWMK1*位于细胞核中, 其通过磷酸化1个 EREBP 类转录因子 *OsEREBP1* 后, 增强了 *OsEREBP1* 与一些防卫反应基因启动子中的顺式作用元件GCC盒结合, 从而激活防卫反应相关基因的表达。这一结果进一步在对转基因烟草的研究中得到了证明, 在烟草中超表达 *BWMK1* 增强了烟草的抗病性, 并激活了一系列防卫反应相关基因的表达。Koo等^[19]发现, *BWMK1* 通过磷酸化激活转录因子 *OsWRKY33* 的活性, 进而促进了SA和H₂O₂的聚集。这表明 *BWMK1* 很有可能是通过激活一系列相关的转录因子的活性来激活植物防卫反应信号途径。为进一步研究 *BWMK1* 介导的MAPK级联反应途径在植物抗病、抗逆反应信号传导中的生物学功能, 笔者采用酵母双杂交体系, 以 *BWMK1* 为诱饵, 筛选稻瘟病菌接种后构建的水稻cDNA文库, 获得了7个与 *BWMK1* 互作的基因, 旨在为深入研究 *BWMK1* 介导的信号途径提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统采用ProQuest™体系(Invitrogen公司), 主要材料为cDNA文库构建试剂盒(Stratagene公司)、酵母菌株MaV203(Invitrogen公司)、诱饵质粒载体 pDBLeu(Invitrogen公司)和猎物载体 pPC86(Invitrogen公司)。水稻材料为日本晴。

1.2 方法

1.2.1 pDBLeu-BWMK1 载体构建

用带有酶切位点的 *BWMK1* 基因引物(序列为 F: ATAAGTCGACCATGGCGCGGCAGGAGCAGC(*SalI*); R: TCTAGCGGCCGCCTACGCCGTCTGCGGCCG CACG(*NotI*))从合成的水稻 cDNA 中克隆 *BWMK1* 全长开放阅读框(ORF), 利用 *SalI* 和 *NotI* 酶切位点将 *BWMK1* 全长 ORF 克隆进诱饵载体 pDBLeu。

1.2.2 水稻 cDNA 文库构建

对生长约3周的日本晴接种稻瘟病菌, 24 h后取样, 采用Trizol法提取总RNA。mRNA纯化、cDNA文库构建参照 Stratagene 试剂盒操作手册进行(Stratagene, La Jolla, CA)。采用 *NheI*+*NcoI* 对猎物载体 pPC86酶切后, 将cDNA克隆至pPC86载体(程序参

照ProQuest™使用手册)。

1.2.3 cDNA 文库筛选

将诱饵载体 pDBLeu-BWMK1 和cDNA文库质粒DNA在酵母菌Mav203感受态中进行共转化, 获得假想阳性克隆后, 对其进行自激活反应测定, 获得阳性克隆。分离阳性克隆质粒并进行测序和序列分析, 确定阳性克隆中基因组成和编码蛋白。

1.2.4 序列分析

利用DNASar软件对阳性克隆序列进行编辑和归类, 以各基因片段序列为查询序列(Query), 利用Blast2程序将阳性克隆序列与NCBI水稻基因组序列数据进行比对, 确认各基因在水稻染色体上的位置和编码基因的全长序列。再以各基因编码蛋白序列为查询序列(Query), 利用Blast2程序与NCBI蛋白质数据库进行比对, 确定各个基因编码蛋白的功能。

2 结果与分析

2.1 诱饵蛋白表达载体的构建和自激活活性检测

构建的表达载体 pDBLeu-BWMK1 通过 *SalI* 和 *NotI* 酶切鉴定, 证实为融合的诱饵表达载体。自激活检测时, 将100 ng pDBLeu+100 ng pPC86-Y质粒组的酵母转化子涂在SC-His-Leu-Trp-Ura四缺平板上, 30 °C培养72 h后无菌落长出; 将pDBLeu+pPC86质粒组的酵母转化子涂在X-gal平板上, 30 °C培养48 h后仍为白色, 而已知具有相互作用的对照转化子均变蓝, 说明靶质粒pPC86-Y无自激活活性。

2.2 *BWMK1* 互作阳性克隆的筛选

利用“诱饵”质粒 pDBLeu-BWMK1 转化的酵母菌株对水稻cDNA文库进行筛选, 获得了30个假想酵母阳性克隆。进一步对这些克隆进行自激活和3-AT抑制鉴定, 筛选出9个真实的阳性克隆(封二图1)。分离阳性克隆质粒, 用于进一步的测序和基因编码功能分析。

2.3 候选蛋白编码基因的特征分析

将9个阳性克隆质粒序列在NCBI GeneBank数据库上进行BLAST比对, 结果表明, 阳性克隆共编码7个不同基因, 并命名为 *BWIP1* ~ *BWIP7*。其中 *BWIP5* 和 *BWIP7* 分别获得2个阳性克隆, 其他5个互作基因分别获得1个阳性克隆。 *BWMK1* 与 *BWIPs* 互作强弱显示, *BWMK1* 与 *BWIP3* 相互作用弱, 与

*BWIP4*相互作用较强,而与其他5个基因互作强。进一步与水稻品种日本晴参考基因组序列进行比对,发现7个基因分别位于水稻基因组第12、2、3、10、6、4、5染色体上。获得基因全长序列后,再将其蛋白序列在NCBI蛋白数据库中进行比对,分析其编码蛋白属性,结果表明,*BWIP1*编码硫甲基转运酶,*BWIP3*编码磷酸肌醇合成酶,*BWIP4*编码磷转运蛋白,*BWIP5*编码WD-40重复包含蛋白,*BWIP6*编码N-乙酰谷氨酸激酶,但尚未找到*BWIP2*和*BWIP7*的同源编码蛋白。

3 小结

*BWMK1*是水稻中被克隆的第一个MAPK基因,受稻瘟病菌的侵染诱导表达,很可能参与水稻抗病信号途径^[17],*BWMK1*还参与多种非生物胁迫和激素信号的反应^[12];因此,深入研究*BWMK1*介导的信号途径,将为全面解释*BWMK1*参与抗逆和激素反应的分子机制提供重要的证据。笔者利用酵母双杂交系统对水稻稻瘟病菌侵染24 h后的水稻cDNA文库进行筛选,获得了7个*BWMK1*互作基因,这些基因的分离为研究*BWMK1*介导的分子信号传导机制提供了重要线索。通过对分离的7个基因稻瘟病菌侵染后的表达型进行分析,发现*BWIP2*和*BWIP4*的表达受稻瘟病菌的诱导,表明其可能参与水稻抗病信号途径;因此,鉴定这些基因的功能及其与*BWMK1*的关系,将为深入认识水稻抗病分子机制提供依据。目前,笔者已获得*BWIP2*和*BWIP4*的RNAi和超表达转基因水稻,初步研究结果表明,2个基因RNA干涉转基因株系都显著增加了水稻的抗病性(另文发表),说明*BWIP2*和*BWIP4*可能是水稻抗病性调节的负调控因子。

参考文献:

- [1] Bogre L, Meskiene I, Heberle-Bors E, et al. Stressing the role of the MAP kinase in mitogenic stimulation [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(5/6): 705-718.
- [2] Ligterink W, Hirt H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: Versatile signaling tools [J]. *Int Rev Cytol*, 2001, 201: 209-275.
- [3] Jonak C, Ökresz L, Bögre L, et al. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 415-424.
- [4] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(11): 520-527.
- [5] Shiozaki K, Russell P. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast [J]. *Nature*, 1995, 378: 739-743.
- [6] 张小华, 刘向勇, 于典科, 等. 酿酒酵母促分裂原蛋白激酶Hog1p介导的渗透胁迫反应调控机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(11): 27-32.
- [7] 李学东, 陈斌, 郑创义, 等. 三七总皂甙通过P38MAPK信号通路促进大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞的增殖、分化 [J]. *中国伤残医学*, 2009, 17(4): 167-168.
- [8] Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation [J]. *Cell*, 1995, 80(2): 179-185.
- [9] Ruis H, Schüller C. Stress signaling in yeast [J]. *Bioessays*, 1995, 17(11): 959-965.
- [10] Agrawal G K, Agrawal S K, Shibato J, et al. Novel rice MAP kinases OsMSRMK3 and OsWJUMK1 involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(3): 775-783.
- [11] 谌江华, 宋凤鸣, 郑重. 水稻的促分裂原激活蛋白激酶及其功能 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(4): 795-800.
- [12] Hong W F, He C Z, Wang L J, et al. *BWMK1* responds to multiple environmental stress and plant hormones [J]. *Inte Plant Bio*, 2007, 49(6): 843-851.
- [13] Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, et al. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 11274-11279.
- [14] Coronado M J, Gonzalez-Melendi P, Segui J M, et al. MAPK entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes [J]. *Struct Biol*, 2002, 140(1-3): 200-213.
- [15] Yalamanchili R D, Stratmann J W. Ultraviolet-B activates components of the systemin signaling pathway in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 28424-28430.
- [16] Sangwan V, Dhindsa R S. In vivo and in vitro activation of comperature-responsive plant MAP kinases [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(3): 561-564.
- [17] He C, Fong S H T, Yang D, et al. *BWMK1*, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12(12): 1064-1073.
- [18] Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, et al. *BWMK1*, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(4): 1961-1972.
- [19] Koo S C, Choi M S, Chun H J, et al. Identification and characterization of alternative promoters of the rice MAP kinase gene *OsBWMK1* [J]. *Mol Cells*, 2009, 27(4): 467-473.

责任编辑: 杨盛强