

~~~~~  
研究简报  
~~~~~

铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiA 的自身相互作用研究

徐 虹 郑 锦 乾 章 军 李 珣 胡 晗 华

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

SELF-INTERACTION OF CIRCADIAN CLOCK PROTEIN KAIA OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* IN YEAST TWO HYBRIDIZATION SYSTEM

XU Hong, ZHEN Jing-Qian, ZHANG Jun, LI Xun and HU Han-Hua

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

关键词: 铜绿微囊藻; 钟蛋白; 酵母双杂交

Key words: *Microcystis aeruginosa*; Clock protein; Yeast two hybridization

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)05-0591-04

蓝藻虽为原核生物, 但它也和真核生物一样具有生物钟, 它的固氮作用、光合作用、氨基酸吸收、细胞分裂以及基因表达等生理代谢过程都受到生物钟的调控, 具有昼夜节律性。虽然蓝藻生物钟和真核生物钟一样, 都以近 24 h 的周期运行, 都具有温度补偿效应, 光、温等环境因素都能重置生物钟的时相, 但组成蓝藻生物钟的钟蛋白与真核生物钟蛋白间不具有任何同源性, 蓝藻生物钟的计时机制也与真核生物钟存在差异^[1-2]。蓝藻钟基因为一个基因簇 *kai*, 由三个基因 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* 以单一拷贝成簇排列, Kai 蛋白组成蓝藻生物钟的核心即中央振荡器, 其中 KaiC 蛋白的磷酸化状态是中央振荡器产生周期性震荡的关键, 它决定中央振荡器的时相, 而 KaiC 的磷酸化状态则受到 KaiA 和 KaiB 的调节。KaiA 是接受和整合环境信息的钟蛋白, 具有 N-端和 C-端两个结构域, N-端缺乏保守天冬氨酸残基的伪接受域能通过与输入途径的某种蛋白(目前未知)发生相互作用而感受环境信号并引起自身 C-端构象的改变, 而 C-端构象变化将影响 KaiA 和 KaiC 的相互作用, 改变 KaiC 的磷酸化状态, KaiC 磷酸化状态的改变就产生了中央振荡器的计时机制^[3-9]。

为了研究生物钟的输入途径和输入信息被 Kai 蛋白接受和整合的机制, 作者从铜绿微囊藻基因组中克隆到了 KaiA 基因(GenBank accession number: AY821548), 并希望通过酵母双杂交系统来钓取与 KaiA 相互作用的蛋白, 研究其功能, 以

得到环境信号被钟蛋白接受和整合的相关信息, 为了解蓝藻生物钟的输入途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种 铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 购自中国科学院水生生物研究所。

1.2 质粒和菌株 pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保种; 酵母双杂交系统为 Clontech 公司产品, 包括酵母菌株 AH109, 诱饵质粒 pGBKT7、AD 质粒 pGADT7、对照质粒 pGBKT7-53、pGBKT7-lam、pGADT7-T。

1.3 培养基 铜绿微囊藻培养使用 BG-11 培养基; 酵母菌的继代培养和感受态细胞的制备使用 YPD 培养基; 自激活活性和相互作用研究使用二缺陷型酵母合成培养基(SD/-Leu/-Trp)和四缺陷型酵母合成培养基(SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade)。

1.4 铜绿微囊藻染色体 DNA 的提取 参照 Smoker 等的方法进行^[10]

1.5 *kaiA* 基因的扩增 以铜绿微囊藻染色体 DNA 为模板, 用引物 P1: 5'-ATGCCATGGCGGGGGTTGTC-3' 和 P2: 5'-CCGAATTCTTAGTCTATTCC-3'(上海博亚生物技术有限公司合成)进行扩增。反应液为 50 μ L, 含有 1 \times PCR buffer, 200 μ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.6 μ mol/L 引物, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U

收稿日期: 2004-12-01; 修订日期: 2005-02-16

基金项目: 国家自然科学基金(40306024)资助

作者简介: 徐虹(1973—), 女, 湖南常德人; 在职博士; 研究藻类生理与分子生物学, xuhongxm@sohu.com

Taq 酶。扩增条件为 94℃ 预变性 7min, 然后 94℃ 1min, 55℃ 60s, 72℃ 90s, 35 个循环, 最后于 72℃ 保温 10min。扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 质粒的构建 将 PCR 扩增的 *kaiA* 基因插入 pMD18-T 载体中, 经测序证明序列正确后, 用 *Nco* I / *Eco* R I 双酶切含扩增片断的 pMD18-T 载体, 经琼脂糖凝胶电泳后挖胶回收 1.0kb 大小的 *kaiA* 片断, 分别连接到经同样双酶切的 pGBKT7 (含 DNA 结合结构域) 和 pGADT7 (含转录激活结构域) 质粒中, 通过测序确保插入的 *kaiA* 基因与质粒的阅读框架一致。

1.7 酵母感受态细胞的制备 接种 AH109 单菌落至 1mL YPD 培养液中, 振荡混匀后转入 10mL YPD 培养液中 30℃ 培养过夜 ($OD_{600} > 1.5$); 将过夜培养物转入 100mL YPD 培养液中 ($OD_{600} = 0.2 - 0.3$), 30℃ 摆培 3h ($OD_{600} = 0.5$), 以 4000r/min 离心收集菌体; 用 30mL 无菌水重悬洗涤菌体一次, 4000r/min 离心收集菌体; 将菌体重悬在 1mL 1×TE/LiAc 溶液中, 可立即转化或于 4℃ 保存。

1.8 转化感受态酵母细胞 取 100μL 感受态酵母菌, 分别加入待转化质粒各 0.1μg 和鲑鱼精 DNA 100μg, 混匀, 加入 0.6mL PEG/LiAc 溶液, 混匀后于 30℃ 摆培 30min; 加入 70μL DMSO, 混匀, 于 42℃ 热击 15min, 冰浴 1—2min; 15,000r/min 离心 5s, 弃上清, 菌体用 0.5mL YPD 重悬, 取 100μL 转化混合物涂布合适的缺陷培养基平板, 30℃ 培养 4—6d 至出现转化菌落。

1.9 HIS3 和 ADE2 报告基因的表达检测 挑取酵母菌单克隆划线于 SD/-Leu/-Trp 二缺平板和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上, 30℃ 培养 10d, 观察酵母菌的生长情况。

1.10 LacZ 报告基因的表达检测 采用 β-半乳糖苷酶印迹法检测 LacZ 报告基因的表达。将平板上的菌落影印到 Whatman 滤纸上, 将滤纸(菌落面朝上)在液氮中冷冻 30s, 室温解冻以裂解菌体。将滤纸印有菌落面朝上放在另一张同样大小浸有 Z 缓冲液/X-gal ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 16.1g/L; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5.5g/L; KCl, 0.75g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.246g/L, pH7.0; X-gal, 0.3g/L; β-巯基乙醇, 0.3%) 的滤纸上, 避免气泡, 30℃ 温育 30min 至 8h, 观察颜色变化。

2 结果

2.1 重组质粒 pGBKT7-kaiA 和 pGADT7-kaiA 的构建

以铜绿微囊藻染色体 DNA 为模板, 用根据 *kaiA* 序列设计合成的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 可见扩增出一条与预期大小一致的 0.9kb 的 DNA 片段(图 1A)。将 PCR 扩增产物与 pMD18-T 载体连接, 经测序证实插入序列正确后, 用 *Nco* I / *Eco* R I 双酶切该载体, 回收 0.9kb 大小的 *kaiA* 扩增片断, 并将该片断亚克隆到经同样双酶切的 pGBKT7 和 pGADT7 质粒中, 重组质粒 pGBKT7-kaiA 和 pGADT7-kaiA 分别用 *Hind* III 单酶切和 *Nco* I / *Eco* R I 双酶切鉴定, 鉴定结果表明重组质粒构建正确, 含有 0.9kb 大小的 *kaiA* 片段(图 1B, C)。为了确保 *kaiA* 的正确表达, 对重组

质粒 pGBKT7-kaiA 和 pGADT7-kaiA 进行测序, 结果表明 *kaiA* 阅读框分别与质粒 pGBKT7 的 DNA 结合结构域及 pGADT7 的转录激活结构域的阅读框架完全一致。

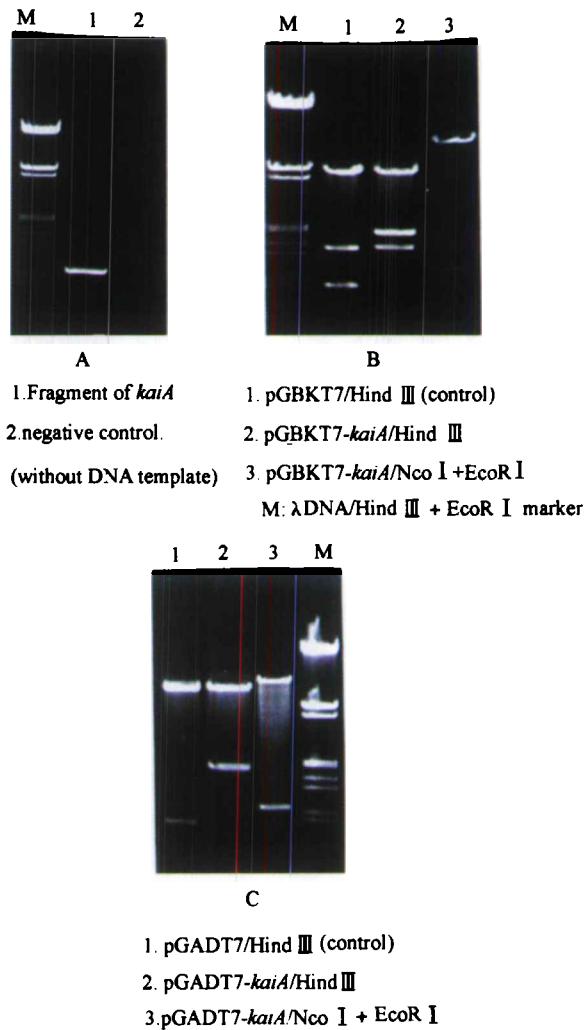


图 1 重组质粒 pGBKT7-kaiA 和 pGADT7-kaiA 的构建

Fig.1 Constructions of recombinant plasmid pGBKT7-kaiA and pGADT7-kaiA

A. Agarose gel electrophoresis of PCR product

B. Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGBKT7-kaiA

C. Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGADT7-kaiA

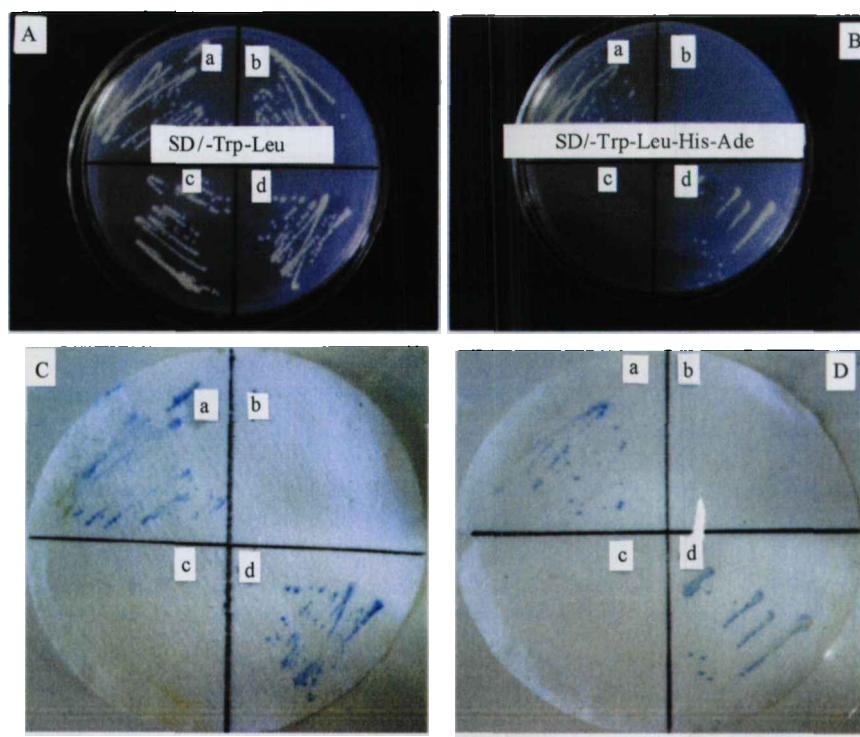
2.2 *KaiA* 自激活性和自身相互作用

将质粒 pGBKT7-kaiA + pGADT7 空载体、重组质粒 pGBKT7-kaiA + pGADT7-kaiA 分别共转化酵母菌株 AH109, 以 pGBKT7-53 + pGADT7-T 的共转化组为阳性对照, pGBKT7-Lam + pGADT7-T 的共转化组为阴性对照, 转化产物分别涂布于 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板。30℃ 培养 4—6d 后四组转化酵母菌均能在 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板生长(图 2A), 这说明四组共转化都获成功, 每组酵母菌中均含有所转化的两种质粒, 且融合表达的 *KaiA* 蛋白对酵母菌不产生毒性, 不影响酵母细胞的生长。但在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上只有阳性对

照组和重组质粒 pCBKT7-kaiA + pGADT7-kaiA 转化组有酵母菌生长,而 pCBKT7-kaiA + pGADT7 空载体转化组不能在四缺平板上生长(图 2B),这说明 KaiA 不能激活酵母菌 AH109 的 his3 和 ade2 基因的转录,不具有自激活活性,而 KaiA 自身由于能发生相互作用从而激活了报告基因 his3 和 ade2 的转录。

为了进一步验证 KaiA 的自激活性和自身相互作用,将 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺培养基平板上的转化菌影印到滤纸上,经液氮冻融裂解后进行 β -半乳糖苷酶活性检测。结果表明,在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade

四缺平板上生长的两组菌即阳性对照菌和重组质粒 pCBKT7-kaiA + pGADT7-kaiA 转化菌在 30℃温育 1h 后都显蓝色,而在 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板生长的四组转化菌,也只有阳性对照组和 pCBKT7-KaiA + pGADT7-KaiA 共转化菌显蓝色,而阴性对照组和 pCBKT7-KaiA + pGADT7 转化菌在 30℃温育 8h 后仍未显蓝色,这说明它们不具有 β -半乳糖苷酶活性, *LacZ* 基因没得到表达(图 2C, D)。因此,根据 β -半乳糖苷酶活性分析结果可知, KaiA 确实不具有自激活性,不能激活 *LacZ* 基因表达;而 KaiA 自身则能发生相互作用,从而激活报告基因 *LacZ* 的表达。



a. pGBKT7-53 + pGADT7-T (positive control)
c. pGBKT7-KaiA + pGADT7

b. pGBKT7-Lam + pGADT7-T (negative control)
d. pGBKT7-KaiA + pGADT7-KaiA

图 2 KaiA 蛋白的自身相互作用分析

Fig. 2 Assay for self-interaction of KaiA protein in yeast cells

- A. Culture of transformed yeast cell on SD/-Trp-Leu plate
- B. Culture of transformed yeast cell on SD/-Trp-Leu-His-Ade plate
- C. Colony-lift filter assay for β -galactosidase activity of A plate
- D. Colony-lift filter assay for β -galactosidase activity of B plate

3 讨论

酵母双杂交系统主要是用来钓取与已知蛋白直接相互作用分子的一种系统。对于功能未知的蛋白如能钓取到已知蛋白则有助于阐明该蛋白的功能,而对于功能已知的蛋白如能钓取与之相作用的分子则有助于阐明该蛋白的作用机制。

一般用来作为钓饵的蛋白除了对受体菌没有毒性,不影响受体菌的生长外,还要不具有自激活性,不会激活报告基

因的表达。本实验成功构建了融合有铜绿微囊藻 KaiA 蛋白与 Gal4 蛋白 BD 结构域的重组质粒 pGBKT7-kaiA,并将重组质粒 pGBKT7-kaiA 和仅含 Gal4 蛋白 AD 结构域的 pGADT7 质粒共转化酵母菌株 AH109,通过 Leu 和 Trp 的双缺陷营养筛选表明,AD 质粒和含 KaiA 的 BD 质粒均已成功转入受体菌中,KaiA 蛋白对受体菌不具有毒性,不会影响受体菌的生长。通过 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺陷营养筛选和 β -半乳糖苷酶活性检测表明,KaiA 蛋白不具有自激活性,不会激活报告基因的表达,因此能够作为诱饵从文库中钓取与之相互作用

的蛋白。这与 Iwasaki 等报道聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的 KaiA 蛋白具有自激活性不能用作酵母双杂交系统的诱饵蛋白的结果相反^[11]。

KaiA 蛋白在细菌内通常以二聚体的形式存在^[2,6-7]。因此为了检验 KaiA 蛋白自身是否能发生相互作用以及作者所构建的诱饵质粒的有效性,还构建了 KaiA 和 Gal4 蛋白 AD 结构域融合表达的载体 pGADT7-kaiA, 并将其与诱饵质粒 pGBKT7-kaiA 共转化酵母菌 AH109, 通过 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺陷营养筛选和 β -半乳糖苷酶活性检测表明, KaiA 自身能发生较强的相互作用, 作者所构建的诱饵质粒能用于酵母双杂交从基因组文库中钓取与 KaiA 相互作用的蛋白。

参考文献:

- [1] Johnson C H, Golden S S. Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism [J]. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**: 389—409
- [2] Ditty J L, Williams S B, Golden S S. Cyanobacterial circadian time mechanism [J]. *Annu. Rev. Genet.*, 2003, **37**: 513—543
- [3] Shiura M, Kutsuna S, Aoki S, et al. Expression of a clock gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria [J]. *Science*, 1998, **281**: 1519—1523
- [4] Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, et al. Nucleotide binding and autophosphorylation of clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *PNAS*. 2000, **97**: 495—499
- [5] Taniguchi Y, Yamaguchi A, Iwasaki H, et al. Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *FEBS letters*, 2001, **496**: 86—90
- [6] Williams S B, Vakonakis I, Golden S S. Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: A potential clock input mechanism. *PNAS*. 2002, **99**(24): 15357—15363
- [7] Vakonakis I, Sun J, Wu T, Honzenburg A, Golden SS and Liwang AC. NMR structure of the KaiC-interacting C-terminal domain of KaiA, a circadian clock protein: Implications for KaiA—KaiC interaction. *PNAS*, 2004, **101**(6): 1479—1484
- [8] Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, et al. KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *PNAS*, 2002, **99**(24): 15788—15793
- [9] Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, et al. KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J.*, 2003, **22**(9): 2127—2134
- [10] Smoker J A, Barnum S R. Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Letters*, 1998, **56**: 119—122
- [11] Iwasaki H, Taniguchi Y, Ishiura M, et al. Physical interactions among circadian clock protein KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *EMBO J.*, 1999, **18**(5): 1137—1145