

研究报告



应用双分子荧光互补技术分析米曲霉 Fus3 与 Ste12 之间的蛋白互作

庄淼 张智敏 王宝腾 金锋杰*

南京林业大学江苏省南方现代林业协同创新中心 江苏 南京 210037

摘要:【背景】双分子荧光互补(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)在水稻恶苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)等微生物蛋白互作中的应用已有报道,但在工业菌株米曲霉(*Aspergillus oryzae*)中还未见应用。【目的】探究米曲霉中 Fus3 和 Ste12 蛋白在生长发育中可能存在的相互作用关系,建立在米曲霉活细胞中检测蛋白互作的方法,即 BiFC 体系。该系统可用于特异性、可视化米曲霉目标蛋白在活细胞中的定位,并且可以更加直观地探究蛋白之间是否存在相互作用。【方法】利用 Multisite Gateway 复杂载体构建技术,使用切开的绿色荧光蛋白,将荧光蛋白分子的两个片段 N 端和 C 端分别与米曲霉 Fus3 和 Ste12 蛋白融合,对获得的转化株进行荧光观察。通过 BiFC 系统检测蛋白之间的相互作用。【结果】成功转化的米曲霉菌丝中观察到荧光, Fus3 和 Ste12 在米曲霉中存在相互作用。【结论】通过 BiFC 技术证实蛋白质 Fus3 和 Ste12 在无性繁殖菌株米曲霉体内发生互作,暗示它们通过互作可能参与除了有性生殖之外的其他细胞功能,并为米曲霉蛋白互作功能研究提供一种新的检测技术和方法。

关键词: 米曲霉, 双分子荧光互补, 蛋白质相互作用

Interaction between Fus3 and Ste12 in *Aspergillus oryzae* analysed by Bimolecular fluorescence complementation

ZHUANG Miao ZHANG Zhi-Min WANG Bao-Teng JIN Feng-Jie*

Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China

Abstract: [Background] Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) is applied to explore the protein-protein interactions in some organisms such as *Fusarium fujikuroi*, but not yet applied in *Aspergillus oryzae*. [Objective] We used BiFC system to detect the interactions between proteins Fus3 and Ste12 in *Aspergillus oryzae* during growth and development. We used this system to specifically visualize the location of the target proteins in living cells. [Methods] Complex vectors were constructed by using the Multisite Gateway cloning system. Proteins Fus3 and Ste12 were fused to C- and N-terminal green fluorescence protein fragments, respectively, and then the hyphae of the obtained transformants were observed under a

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31570107)

*Corresponding author: E-mail: jinfj@njfu.edu.cn

Received: 25-11-2018; Accepted: 02-01-2019; Published online: 08-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31570107)

*通信作者: E-mail: jinfj@njfu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-25; 接受日期: 2019-01-02; 网络首发日期: 2019-01-08

fluorescence microscope. **[Results]** The green fluorescence protein was observed in successfully transformed cells, indicating that the interaction occurred between Fus3 and Ste12 happened in *A. oryzae*. **[Conclusion]** The method to detect protein-protein interaction in *A. oryzae* proves its broader application possibility.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Bimolecular fluorescence complementation (BiFC), Protein-protein interaction

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是一种丝状真菌,在发酵工业中具有重要的作用,是我国传统酿造食品酱、酱油和酒类的生产菌株^[1],也可用于工业生产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、植酸酶等^[2]。米曲霉在食品工业中有着上千年的安全应用历史,是美国食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)公布的安全微生物菌种(GRAS 级)^[3],也是世界保健组织公布的绝对安全性食品^[4]。在众多曲霉属家族中,米曲霉有着十分重要的地位。尽管米曲霉在发酵工业等应用领域有着重要的地位,但由于它属于多核细胞且没有有性生殖等因素,导致它的基因操作手段受到了一定的限制,与其他模式菌株相比其基础研究进展缓慢,需要进一步开发新的研究手段,为米曲霉基础研究和工业生产应用提供技术支持^[5]。

细胞内蛋白质之间的相互作用或形成蛋白复合物在细胞的生命活动过程中起着重要的作用。比如:转录因子常通过蛋白间相互作用形成二聚体或多聚体调节下游蛋白的表达^[6];蛋白质磷酸化或脱磷酸化等反应也都需要蛋白之间的相互作用^[7]。目前对蛋白质相互作用研究的实验方法也十分多样,主要可分为体外实验和体内实验。体外实验如免疫共沉淀、表面等离子共振、蛋白质芯片等;体内实验如酵母双杂交、荧光共振能量转移、蛋白质片段互补、双分子荧光互补技术(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)等^[8]。其中 BiFC 技术起源于蛋白质片段互补技术^[7],是近年来发展的在活细胞中研究蛋白相互作用的一种新技术。相比其他体外实验或酵母双杂交等手段,BiFC 技术可以更直观地观察活体细胞中两种蛋白质的相互作用以及胞内作用位点,可以更好地把蛋白之间互作关系和它们的功能联系起来。但是截至目前,在

米曲霉中蛋白质相互作用的研究主要还是依赖于酵母双杂交体系^[9-10],尚未应用 BiFC 实验体系。

生物信号传递是指细胞感知胞外刺激后,通过细胞内信号分子的逐级传递作用,最终诱导产生一系列的细胞质、细胞核内事件和各种生理生化反应的过程。而促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一组能被不同的细胞外刺激,如细胞因子、神经递质、激素、细胞应激及细胞黏附等激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。MAPK 信号通路是利用逐级磷酸化过程将信号放大传至细胞核内调节转录因子的活性,调控相应基因的表达,进而引起细胞反应的一类重要信号系统。MAPK 级联激活是多种信号通路的中心,参与到细胞的分裂、分化、凋亡等多种生命过程^[11-12]。这一途径广泛存在于各种真核生物(酵母、植物、哺乳动物)中,起到承上启下及整合、放大和传递信号的作用^[13]。Fus3 蛋白是这一级联途径的最后一个激酶,在酵母细胞中被上游的激酶磷酸化后,活化的 Fus3 进入细胞核,与细胞核中的转录因子 Ste12 相互作用,致使 Ste12 进一步磷酸化启动下游的有性繁殖^[14]。而在丝状真菌中,情况似乎更复杂,目前在丝状真菌模式菌株构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中发现, Fus3 (MpkB)与 Ste12 (SteA)通过相互作用来启动有性发育,同时 Fus3 还可以使 VeA 磷酸化, VeA 主要负责调节有性发育和次级代谢产物的生成^[15-16]。为了探究属于无性繁殖系的米曲霉中 Fus3 与 Ste12 蛋白是否也存在相互作用,从而探究它们进一步的功能,本研究通过双分子荧光互补(BiFC)实验,验证米曲霉中的 Fus3 与 Ste12 蛋白存在的相互作用关系,为深入研究米曲霉其他蛋白相互作用与功能研究提供新的实验方法并奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 引物、质粒和菌株

实验中使用的引物、质粒和米曲霉菌株见表 1、2 和 3。米曲霉野生株 *Aspergillus oryzae* RIB40 的营养缺陷型宿主菌 *niaD300* (*niaD*⁻), 由日本东京大学微生物实验室提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自 TaKaRa 公司。以上菌株分别用于米曲霉和大肠杆菌的转化实验。

1.1.2 主要试剂和仪器

MultiSite Gateway 克隆系统, Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、In-Fusion HD 克隆试剂盒、质粒提取试剂盒、荧光染料 SYBR[®] Premix Ex Taq II 和 ROX Reference Dye, TaKaRa 公司; 常规化学试剂均为国产分析纯, 国药集团化学

试剂有限公司。

定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 荧光显微镜, Olympus 公司。

1.1.3 主要培养基

CD(Glu)培养基(g/L): 硝酸钠 3.00, 氯化钾 2.00, 磷酸二氢钾 1.00, 七水硫酸镁 0.50, 七水硫酸亚铁 0.02, 葡萄糖 20.00, 琼脂粉 20.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 5.5。

CD(Dex)培养基(g/L): 硝酸钠 3.00, 氯化钾 2.00, 磷酸二氢钾 1.00, 七水硫酸镁 0.50, 七水硫酸亚铁 0.02, 糊精 20.00, 琼脂粉 20.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 5.5。

CD(Sta)培养基(g/L): 硝酸钠 3.00, 氯化钾 2.00, 磷酸二氢钾 1.00, 七水硫酸镁 0.50, 七水硫酸亚铁 0.02, 淀粉 20.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 5.5。

表 1 实验中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
Fus3(qPCR)-F	TCACGAAAGATCTCCTTCAACG
Fus3(qPCR)-R	CACGCAAAGTTGCAAGCAGAA
Ste12(qPCR)-F	CCTCCTCAGAAACCGGAAACAT
Ste12(qPCR)-R	GTTGATCTGGTTGCCAGTCTAC
histone H2A(qPCR)-F	GTTACCGTTTGCTTCGTAAGG
histone H2A(qPCR)-R	GGTCTTCTTGTATCACGAGCAG
aB4-PamyB-F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGATATC
Fusion-PamyB-R	CTTGCTCACCATGGACTCACGAATAGCAAGGAATTCGG
Fusion-nEGFP-F	CTATTCGTGAGTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
nEGFP-linker-R	CGTGCGATGGAGCGCATGATATAGACGTTGTGGCT
aB1-TamyB-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGATCTGTAGTAGCTCGTGAAGGGTG
Fusion-TamyB-R	CATAGCTGTTTCTGTTCCTATAATAGACTAGCGTGCTTGCGG
Fusion-PamyB-F	CTAGTCTATTATAGGAAACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGATATC
aB2-PamyB-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGACTCACGAATAGCAAGGAATTCGG
aB2-cEGFP-F	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGATGGCCGACAAGCAGAAGAACGG
cEGFP-linker-R	GTGGTTCATGACCTTCTGTTTCAGGTCGTTCCGGATCTTGCAAGCCGGGCGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
aB1-Sma I-nEGFP-R	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTCACccgggCGTGCGATGGAGCGCATGATA
aB3-Sma I-cEGFP-R	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTCACccgggGTGGTTCATGACCTTCTGTTTCAGGTC
Fus3-F	ATGGTGACGCAACTTCCTCCC
Fus3-R	TCACCGCATGATCTCCTCGTAG
Ste12-F(IF)3'	GGTCATGAACCACCCC-ATGTTTCCGCAACATGGTGCTCCCATGGCAC
Ste12-R(IF)3'	AATAAAGTTGTCACCC-CTACATCTGCTGTTGTAGAAGTTGCGGAGCA

表 2 实验中涉及的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒 Plasmids	描述 Description
pg5'PaNG	<i>amyB</i> promoter+ <i>negfp</i> (<i>Sma</i> I)
pgETPaB	<i>amyB</i> terminator+ <i>amyB</i> promoter
pg3'CG	<i>cegfp</i> (<i>Sma</i> I)
pg5'PaNGFus3	<i>amyB</i> promoter+ <i>negfp</i> + <i>Fus3</i>
pg3'CGSte12	<i>cegfp</i> + <i>Ste12</i>
pgDFuStG	<i>amyB</i> promoter+ <i>negfp</i> + <i>Fus3</i> + <i>amyB</i> terminator+ <i>amyB</i> promoter+ <i>cegfp</i> + <i>Ste12</i>
pgDNGCG	<i>amyB</i> promoter+ <i>negfp</i> + <i>amyB</i> terminator+ <i>amyB</i> promoter+ <i>cegfp</i>

表 3 实验涉及的米曲霉菌株

Table 3 *Aspergillus oryzae* strains used in this study

菌株 Strains	描述 Description	样本来源 Source
<i>Aspergillus oryzae</i> niaD300	<i>niaD</i> ⁻	From the University of Tokyo
FuSt	<i>niaD</i> ⁻ , <i>pgDFuStG::niaD</i>	This study
NGCG	<i>niaD</i> ⁻ , <i>pgDNGCG::niaD</i>	This study

YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 5.5。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 氯化钠 10.00, 琼脂粉 20.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 米曲霉 RNA 的提取与 cDNA 的合成

分别接种米曲霉到液体培养基(40 mL 液体培养基中接种 10⁶ 个分生孢子)和固体培养基, 30 °C 培养 2 d, 液体培养的摇床转速为 150 r/min, 培养结束后使用漏斗和滤纸过滤菌体, 并使用灭菌超纯水冲洗后称取 50 mg 菌体, 同时刮取约 50 mg 在固体培养基上培养 2 d 的菌丝体, 按 RNA 提取试剂盒说明分别提取米曲霉总 RNA。利用 NanoDrop2000C 检测 RNA 浓度, 并调成同一浓度 100 ng/μL, 同时利用 1.2%琼脂凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。

RNA 反转录按照试剂盒说明书操作, cDNA 反转录条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。反应结束后

将浓度调成统一浓度。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 实验

使用表 1 中的引物 Fus3(qPCR)-F/Fus3(qPCR)-R、Ste12(qPCR)-F/Ste12(qPCR)-R 分别对 AO090003000402、AO090009000638 进行实时荧光定量 PCR, 并使用 histone H2A 作为内参基因。实时荧光定量 PCR 的反应体系, 参照 SYBR[®] Premix Ex Taq 进行, PCR 反应体系: 2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL, 加灭菌超纯水补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。

1.2.3 质粒构建

使用 MultiSite Gateway 克隆系统通过 BP/LR 重组反应来构建质粒, 并使用 In-Fusion HD 克隆试剂盒通过 In-Fusion 重组反应构建质粒。

为了表达融合蛋白 nEGFP-Fus3 和 cEGFP-Ste12, 构建质粒 pg5'PaNG: 使用引物 aB4-PamyB-F 和 Fusion-PamyB-R 扩增 *amyB* 启动子, 获得 *amyB*(p)。使用引物 Fusion-nEGFP-F 和 nEGFP-linker-R 扩增 *egfp* 的 N 端; 并以此为模板, 使用引物 Fusion-nEGFP-F 和 aB1-*Sma* I-nEGFP-R 进行扩增, 获得 *negfp*(*Sma* I)。这两段扩增的片段存在同源区段, 可通过 Fusion PCR 技术进行融合, 获得 *amyB*(p)-*negfp*(*Sma* I)。通过 BP 重组反应, *amyB*(p)-*negfp*(*Sma* I) 可以克隆到质粒 pDONRTMP4-P1R 中, 产生质粒 pg5'PaNG。使用引物 Fus3-F 和 Fus3-R 扩增编码 Fus3 的 DNA 获得 *fus3*, 然后通过 DNA 连接酶插入 pg5'PaNG 的 *Sma* I 酶切位点, 得到 pg5'NGFus3。

使用引物 aB1-TamyB-F 和 Fusion-TamyB-R, 以及 Fusion-PamyB-F 和 aB2-PamyB-R 分别扩增 *amyB* 终止子和启动子, 获得 *amyB*(t)和 *amyB*(p)。这两段扩增的片段存在同源区段, 可以通过融合 PCR 连接获得 *amyB*(t)-*amyB*(p)。通过 BP 重组反应, *amyB*(t)-*amyB*(p)可以克隆到载体 pDONRTM221 中, 产生质粒 pgETPaB。

使用引物 aB2-cYFP-F 和 cYFP-linker-R 扩增

egfp 的 C 端, 并以此为模板使用引物 aB2-cEGFP-F 和 aB3-Sma I-cEGFP-R 进行扩增, 获得 *cegfp(Sma I)*。然后通过 BP 重组反应克隆到载体 pDONRTM P2R-P3 中, 产生质粒 pg3'CG。使用引物 Ste12-F (IF)3'和 Ste12-R(IF)3'扩增编码 Ste12 的 DNA, 获得 *ste12*, 然后使用 In-Fusion 克隆系统将其插入 pg3'CG 的 *Sma I* 位点, 产生质粒 pg3'CGSte12。

将产生的 3 个质粒(pg5'NGFus3, pgETPaB, pg3'CGSte12)与含有 *niaD* 选择标记和 *amyB* 终止子的目的载体 pgDN^[17]混合, 用于 LR 重组反应。产生的质粒 pgDFuStG 用于在米曲霉菌株中转化表达融合蛋白 nEGFP-Fus3 和 cEGFP-Ste12。将产生的 3 个质粒(pg5'PaNG, pgETPaB, pg3'CG)与含有 *niaD* 选择标记和 *amyB* 终止子的目的载体 pgDN 混合, 用于 LR 重组反应。产生的质粒 pgDNGCG 转化米曲霉获得的菌株用于实验的阴性对照。

1.2.4 重组米曲霉菌株的构建和培养

为了产生表达融合蛋白 nEGFP-Fus3 和 cEGFP-Ste12 的菌株 FuSt, 将质粒 pgDFuStG 导入米曲霉菌株 *niaD300*^[18]中, 使用选择培养基 CD(Glu)筛选出转化菌株 FuSt。与此同时, 将质粒 pgDNGCG 导入米曲霉菌株 *niaD300* 中, 使用选择培养基 CD(Glu)获得对照株 NGCG。将获得的菌株 FuSt 和

NGCG 分别接种到 CD(Dex)液体培养基, 30 °C 静置培养 17 h, 荧光显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 识别米曲霉中 Fus3 和 Ste12 的同源基因

前期研究表明构巢曲霉中的 Fus3(MpkB)与 Ste12(SteA)存在相互作用关系, 通过 BLAST 在米曲霉中检索到了这两个的同源基因 *fus3* (AO090003000402)和 *ste12* (AO090009000638)。BLASTp 分析结果表明, 米曲霉的 Fus3 与构巢曲霉的 MpkB 中氨基酸相似性高达 98.6%, 米曲霉的 Ste12 与构巢曲霉的 SteA 中氨基酸相似性也有 80%。以 Fus3-F 和 Fus3-R、Ste12-F (IF)3'和 Ste12-R(IF)3'为扩增引物, 米曲霉野生菌株 RIB40 基因组为模板, 通过 PCR 分别扩增出约 1.2 kb 的 *fus3* (AO090003000402)和 2.4 kb 的 *ste12* (AO090009000638)。

2.2 米曲霉中 *fus3* 和 *ste12* 基因的表达水平

采用 qRT-PCR 比较米曲霉菌株 *fus3* 和 *ste12* 基因在 CD(Glu)琼脂培养基、CD(Glu)液体培养基、CD(Dex)琼脂培养基、CD(Dex)液体培养基、CD(Sta)液体培养基、YPD 琼脂培养基、YPD 液体培养基这 7 种培养基中的表达情况, 结果如图 1 所示。*fus3* 和 *ste12* 基因在不同培养基有相似的表达趋势, 推

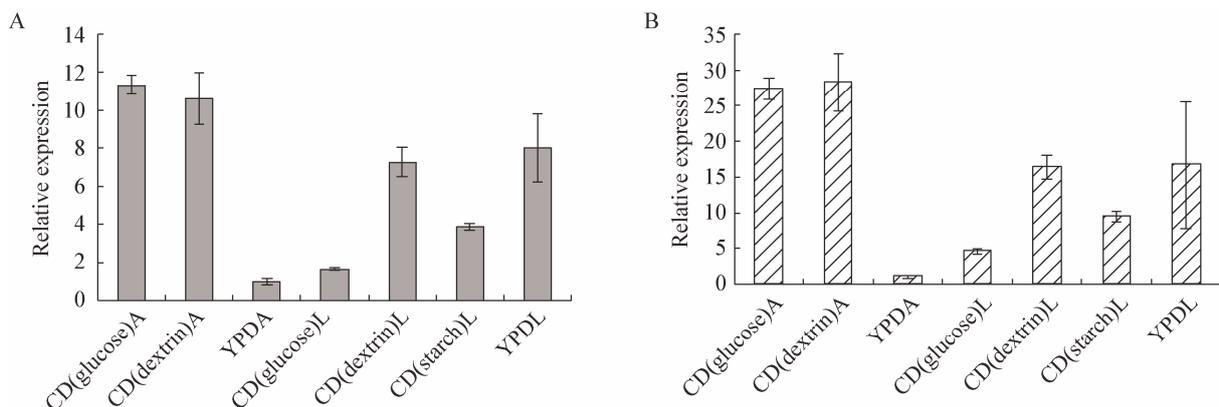


图 1 不同营养成分的培养基对米曲霉菌 *fus3* 和 *ste12* 基因表达的影响

Figure 1 Relative expression level of *fus3* and *ste12* genes in *Aspergillus oryzae* under different culture conditions

注: A: *fus3* 基因的表达; B: *ste12* 基因的表达。

Note: A: *fus3* gene expression; B: *ste12* gene expression.

测这两个基因有相近的表达背景,其编码蛋白有可能参与到相似的细胞功能;另外,两个基因在 CD 琼脂培养基均表现出较高的表达水平,表达水平没有因为培养基中碳源的变化而改变,即当 CD 培养基中的碳源由葡萄糖变成多糖糊精时,表达量没有明显变化。但是,当氮源由无机氮变为有机氮时,两个基因的表达量显著降低,说明在琼脂培养基中,相对饥饿的条件下有助于两个基因的表达,而有机氮源对两个基因的表达有抑制作用。然而这个趋势在液体培养条件下正好是相反的。两个基因在液体 CD(Glc)最小培养基培养条件下表现相对低的表达水平,而在多糖和有机氮作为碳、氮源的培养条件下表达水平均有所提高。

2.3 双分子荧光互补表达质粒的构建及验证

选用在米曲霉中表达能力较强的淀粉酶启动子 *amyB*(p)驱动 nEGFP 与 cEGFP 组合的融合蛋白。将 *amyB*(p)-*negfp*(*Sma* I)、*amyB*(t)-*amyB*(p) 和 *cegfp*(*Sma* I)通过 BP 重组反应分别克隆到质粒 pDONRTMP4-P1R、pDONRTM221 和 pDONRTMP2R-P3 中,转化 *E. coli* DH5 α 后挑取阳性克隆,采用试剂盒法提取质粒,经 DNA 测序验证获得质粒 pg5'PaNG、pgETPaB 和 pg3'CG。将 *fus3* 和 *ste12* 基因扩增的片段分别连接至经 *Sma* I 酶切的质粒

pg5'PaNG 和 pg3'CG 上,然后转化 *E. coli* DH5 α 并挑取阳性克隆,采用试剂盒法提取质粒,经 DNA 测序验证获得质粒 pg5'NGFus3 和 pg3'CGSte12。pg5'PaNG、pgETPaB、pg3'CG 和 pgDN 通过 LR 重组反应产生质粒 pgDNGCG (图 2A)。pg5'NGFus3、pgETPaB、pg3'CGSte12 和 pgDN 通过 LR 重组反应产生质粒 pgDFuStG (图 2B)。

2.4 Fus3 和 Ste12 蛋白相互作用的 BiFC 分析

将构建好的重组质粒 pgDFuStG 和 pgDNGCG 分别转化米曲霉 *niaD300*,使用选择培养基 CD(Glc)筛选出转化菌株 FuSt 和对照株 NGCG。将获得的菌株 FuSt 和 NGCG 分别接种到 CD(Dex)液体培养基,30 °C 静置培养 17 h 后进行荧光观察(图 3)。在绿色荧光视野可以看出,FuSt 菌株部分菌丝中明显观察到 EGFP 绿色荧光,而在阴性对照中全视野内没有观察到绿色荧光,进一步验证了米曲霉 Fus3 和 Ste12 蛋白互作的真实性以及米曲霉蛋白互作 BiFC 实验体系的成功建立。由于绿色荧光视野较暗无法观察菌丝内部结构,使用 DIG 微分干涉可以观察到菌丝内部的形态结构,以此可大致推断出两蛋白相互作用的位置。在 DIG 视野中可观察到的较大气泡为液泡,绿色荧光的位置基本与液泡位置不重合。实验使用的菌丝仅培养 17 h,菌丝处于早期生

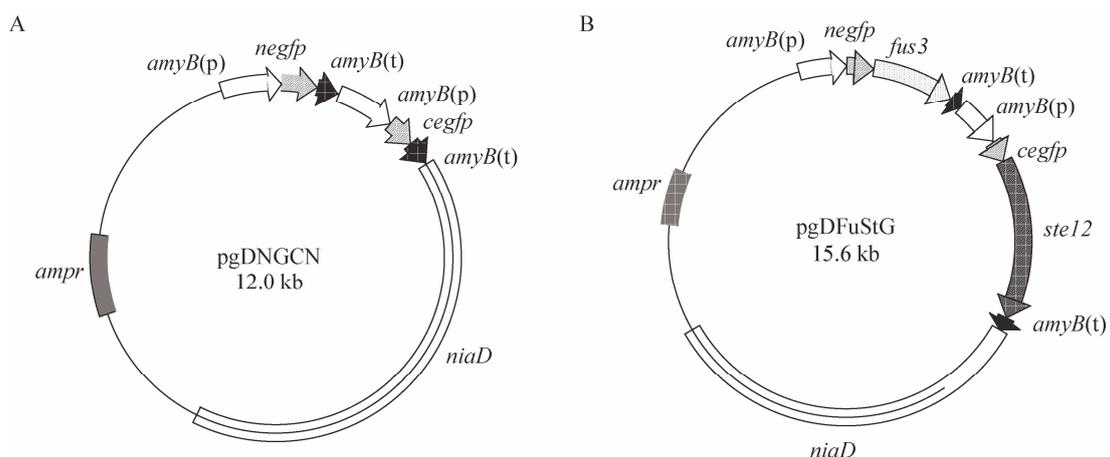


图 2 重组质粒 pgDNGCG 和 pgDFuStG 的构建

Figure 2 Construction of recombinant plasmid pgDNGCG and pgDFuStG

注: A: 对照株载体 pgDNGCG; B: 实验株载体 pgDFuStG.

Note: A: Plasmid pgDNGCG of control strain; B: Plasmid pgDFuStG of experimental strain.

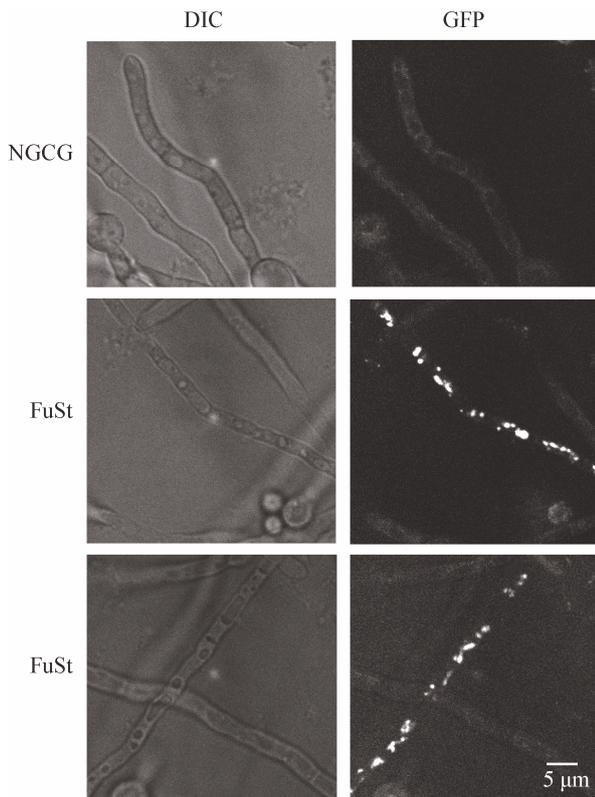


图 3 双分子荧光互补实验验证米曲霉中 Fus3 和 Ste12 蛋白之间的互作

Figure 3 Confirm the interactions between Fus3 and Ste12 in *Aspergillus oryzae* by BiFC

注: DIC: 微分干涉; GFP: 绿色荧光视野; NGCG: 对照菌株菌丝; FuSt: Fus3-Ste12 转化菌株菌丝.

Note: DIC: Differential interference; GFP: Field of green fluorescence; NGCG: Control strain hyphae; FuSt: Fus3-Ste12 transformed strain hyphae.

长状态, 绿色荧光部位的形态和位置与早期细胞核形态相似, 而且由于转录因子 Ste12 已被证实定位在细胞核, 因此推测相互作用发生的位点在细胞核, 但还需要进一步的实验验证。

在绿色荧光视野虽然可以观察到部分菌丝的绿色荧光, 但并不是所有菌丝都能观察到, 这说明 Fus3 和 Ste12 蛋白在特定的条件下才会发生相互作用。使用 DIG 微分干涉进行观察发现, Fus3 和 Ste12 蛋白会发生相互作用的菌丝大多是液泡存在较多且较大的菌丝, 即状态不是很好的菌丝。由此推测菌丝在状态不够良好或受到某些外界压力的条件

下, 这两个蛋白会产生相互作用。因此设计了一些压力实验, 例如在培养基中加入 1 mol/L NaCl 或将培养温度升高到 37 °C 等, 通过荧光观察发现发出绿色荧光的菌丝并没有明显增多(数据未显示)。综上所述, Fus3 和 Ste12 蛋白存在相互作用, 但相互作用的激发条件还需进一步研究。

3 讨论

BiFC 技术是能够快速且直观地判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术^[19]。目前虽然已经开发了一系列实验方法用于分析蛋白质之间的相互作用, 但大多数方法需要破坏细胞来检测分子间相互作用, 有些方法只能间接判断两蛋白的相互作用。BiFC 技术利用荧光蛋白本身的一个特点: 荧光蛋白活性被重建后能够自我催化形成荧光活性中心, 重新恢复荧光蛋白的特征光谱发出荧光, 自身作为报告蛋白, 直接反映蛋白质之间的相互作用^[20]。BiFC 技术为活细胞和生物体中分子相互作用的可视化提供了最直接的方法。2002 年, Hu 等^[21]利用被切开的黄色荧光蛋白(YFP)的 2 个非荧光片段来研究 bZIP 与 Rel 家族转录因子之间的相互作用, 并且首次提出了 BiFC 的概念。Michielse 等^[22]利用该技术研究水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 中 GATA 转录因子 AreA 和 AreB 相互关系的结果表明, 在氮饥饿的环境下 AreA 和 AreB 定位于细胞核且会发生相互作用。已有研究表明酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的 Fus3 与转录因子 Ste12 存在相互作用^[14]; Bayram 等^[16]利用 BiFC 技术验证了构巢曲霉 Fus3 与 Ste12 之间的相互作用, 进一步证实了激酶和转录因子之间的相互作用从酵母到丝状真菌是保守的。Okabe 等^[23]利用 BiFC 技术研究了米曲霉的自融合能力以及异核体的不亲和性。本研究成功建立了米曲霉 BiFC 系统, 并且验证了 Fus3 与转录因子 Ste12 存在相互作用, 由于转录因子 Ste12 已被证实定位在细胞核, 因此推测相互作用发生的位点在细胞核, 这需要进一步的验证。

由于米曲霉与构巢曲霉不同,米曲霉中并不存在有性生殖,因此无法直接进行杂交等实验。此外,米曲霉中可选用的选择标记基因有限,因此我们通过使用 MultiSite Gateway 克隆系统构建米曲霉的 BiFC 质粒,即在一个载体质粒中同时表达两种融合蛋白,从而为米曲霉蛋白互作功能研究提供一种新的检测技术和方法。尽管在构巢曲霉中 Fus3 与 Ste12 已被验证存在相互作用,但研究发现它们是通过相互作用来启动有性发育。然而米曲霉中至今未发现性生殖,因此在米曲霉中确认它们之间的相互作用仍然非常具有功能上的研究意义。

4 结论

本研究将 2 个蛋白分别连接到 EGFP 截断的 N 末端和 C 末端,当这 2 个蛋白相互作用靠近时,EGFP 截断的 N 末端和 C 末端便形成完整的 EGFP 发出绿色荧光。本试验成功构建了荧光表达载体,并且应用空 BiFC 载体为对照,得到转化株后在 CD(Dex)液体培养 17 h,然后通过激光共聚焦显微镜观察,检测到绿色荧光信号而 NGCG 未检测到荧光,暗示 Fus3 与转录因子 Ste12 在米曲霉中存在相互作用。

REFERENCES

- [1] Liu LP, Liu LH. Study and application of *Aspergillus oryzae* in different domains[J]. China Condiment, 2008, 33(4): 28-32 (in Chinese)
刘丽萍, 刘丽华. 米曲霉研究进展与应用[J]. 中国调味品, 2008, 33(4): 28-32
- [2] Chang SJ, Zu YP, Tao B, et al. Construction of a full-length cDNA library from the *Aspergillus oryzae* RIB40[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1485-1490 (in Chinese)
常淑君, 祖永平, 陶波, 等. 米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB40 全长 cDNA 文库的构建[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1485-1490
- [3] Yamada O, Ikeda R, Ohkita Y, et al. Gene silencing by RNA interference in the Koji mold *Aspergillus oryzae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(1): 138-144
- [4] Abe K, Gomi K, Hasegawa F, et al. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites[J]. Mycopathologia, 2006, 162(3): 143-153
- [5] Zhang ZM, Zhuang M, Jin FJ. Advances in gene engineering technologies for *Aspergillus oryzae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(9): 170-176 (in Chinese)
张智敏, 庄森, 金锋杰. 米曲霉基因工程技术的进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(9): 170-176
- [6] Wang L, Tang T, Ouyang WY, et al. A study on the interaction of transcription factor AP-2beta and p53 protein[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(2): 189-192 (in Chinese)
王琳, 汤婷, 欧阳文英, 等. 转录因子 AP-2beta 和 p53 蛋白相互作用的研究[J]. 激光生物学报, 2017, 26(2): 189-192
- [7] Gao X. The mechanism of myosin phosphorylation to actin-myosin interaction[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese)
高星. 肌球蛋白磷酸化调控肌动-肌球蛋白相互作用的机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016
- [8] Fan JY, Cui ZQ, Zhang XE. Bimolecular fluorescence complementation technique[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 24(8): 767-774 (in Chinese)
樊晋宇, 崔宗强, 张先恩. 双分子荧光互补技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(8): 767-774
- [9] Jin FJ, Nishida M, Hara S, et al. Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix transcription factor involved in the early stage of conidiophore development in *Aspergillus oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(12): 1108-1115
- [10] Zhuang M, Jin FJ. Research progress of *Aspergillus* bHLH transcription factors[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2243-2253 (in Chinese)
庄森, 金锋杰. 曲霉属 bHLH 转录因子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2243-2253
- [11] Mu JY, Chen XG. The progress of the study on the mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2002, 14(4): 208-211,203 (in Chinese)
牟金叶, 陈晓光. 促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号传导通路的研究进展[J]. 生命科学, 2002, 14(4): 208-211,203
- [12] Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K, et al. Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016, 80(9): 1667-1680
- [13] Yang XL, Jiang SJ, Ma J, et al. Identification of MAPK cascade signal pathway and prediction of the model in rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2017, 19(12): 24-33 (in Chinese)
杨系玲, 姜述君, 马婧, 等. 水稻纹枯病菌 MAPK 级联信号途径分析及信号通路模型预测[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(12): 24-33
- [14] Saito H. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(6): 667-683
- [15] Paoletti M, Seymour FA, Alcocer MJC, et al. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*[J]. Current Biology, 2007, 17(16): 1384-1389
- [16] Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL, et al. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(7): e1002816
- [17] Mabashi Y, Kikuma T, Maruyama JI, et al. Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus*

- oryzae* and its application to visualization of mitochondria[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(8): 1882-1889
- [18] Minetoki T, Nunokawa Y, Gomi K, et al. Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae* *agdA* gene encoding α -glucosidase[J]. Current Genetics, 1996, 30(5): 432-438
- [19] Cui XY, Zhang JX, Dou Y, et al. Interactions between SS I and PPK1 of maize using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(7): 49-53 (in Chinese)
崔喜艳, 张继晓, 窦瑶, 等. 双分子荧光互补技术(BiFC)分析玉米 SS I 与 PPK1 之间的蛋白互作[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(7): 49-53
- [20] Miller KE, Kim Y, Huh WK, et al. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies[J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(11): 2039-2055
- [21] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. Molecular Cell, 2002, 9(4): 789-798
- [22] Michiels CB, Pfannmüller A, Macios M, et al. The interplay between the GATA transcription factors AreA, the global nitrogen regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi*[J]. Molecular Microbiology, 2014, 91(3): 472-493
- [23] Okabe T, Katayama T, Mo TN. BiFC-based visualisation system reveals cell fusion morphology and heterokaryon incompatibility in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 2922

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.331)