

芥菜开花调控蛋白 SVP 与 FLC 酵母表达载体的构建及其相互作用研究

汤青林, 李念祖*, 丁 宁, 陈竹睿, 宋 明**, 王志敏

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为深入研究芥菜开花信号整合子的两个核心调节因子 SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) 与 FLOWERING LOCUS C (FLC) 相互作用的分子机理, 通过 PCR 扩增, 从芥菜材料 ‘QJ’ 中分别克隆含 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切位点的 SVP 和 FLC 编码区全长, 并利用酵母双杂交体系, 将 FLC 与 GAL4 报告基因 DNA 激活域融合 (pGADT7FLC), SVP 与 GAL4 报告基因 DNA 结合域融合 (pGBKT7SVP)。两种重组质粒分别转化酵母 Y187 和 Y2HGold 后未出现自激活和毒性现象。融合的二倍体酵母 (pGADT7FLC × pGBKT7SVP) 能在选择性固体培养基 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 上生长, 并且菌落呈蓝色。将诱饵质粒 (pGBKT7SVP) 与猎物质粒 (pGADT7FLC) 载体互换 (pGADT7SVP、pGBKT7FLC), 再次转化酵母后仍能融合成二倍体酵母 (pGADT7SVP × pGBKT7FLC), 并同时激活报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 由此表明 SVP 与 FLC 蛋白能够相互结合。

关键词: 芥菜; SVP; FLC; 酵母双杂交

中图分类号: S 637.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 06-1175-08

Determination of Interactions Between SVP and FLC in *Brassica juncea* Coss. by Yeast Two-Hybrid System

TANG Qing-lin, LI Nian-zu*, DING Ning, CHEN Zhu-rui, SONG Ming**, and WANG Zhi-min

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China)

Abstract: The fate of the flowering signal integrators is determined by SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) and FLOWERING LOCUS C (FLC). For further study on the mechanism of the mutual recognition between SVP and FLC in *Brassica juncea* Coss. (Mustard) variety ‘QJ’, the coding sequences of SVP and FLC with digestion sites of *EcoR* I/*Bam*H I were respectively amplified via PCR, and the interactions between SVP and FLC were detected by the yeast two-hybrid system. The full-length FLC was fused to the GAL4 DNA activation domain, which was designated as pGADT7FLC and then transformed into Y187 yeast strain. While SVP was fused to the GAL4 DNA binding domain, which was designated as pGBKT7SVP and then transformed into Y2HGold yeast strain. The two transformed yeast

收稿日期: 2012-02-22; **修回日期:** 2012-04-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ‘973’ 项目 (2012CB113900); 国家自然科学基金项目 (31000908); 重庆市自然科学基金项目 (2011BA1002); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2012B020)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: swutql@163.com, swausongm@yahoo.com.cn)

stains did not exhibit autoactivation and toxicity. The yeast stains of pGADT7FLC and pGBKT7SVP could mate into yeast diploids. The zygote diploids grew on selective agar plates QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) with blue stains. The results strongly indicated that SVP and FLC could combine with each other. Furthermore, the expression vectors of bait plasmid (pGBKT7SVP) and prey plasmid (pGADT7FLC) were exchanged with each other. Then the recombinated yeast plasmids of pGADT7SVP and pGBKT7FLC were reconstructed and respectively transformed into Y187 and Y2HGold yeast stains. The yeast zygote diploids (pGADT7SVP \times pGBKT7FLC) exhibit on selective agar plates QDO/X/A, and the DNA-BD and AD were brought into proximity to activate transcription of four independent reporter genes (*AURI-C*, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*). The results showed that SVP and FLC could act with each other to combine and form a complex.

Key words: *Brassica juncea*; SVP; FLC; yeast two-hybrid system

芥菜 (*Brassica juncea* Coss.) 等十字花科植物从营养生长向生殖发育的转变受到开花信号整合子 FLOWERING LOCUS T (FT)、SUPPRESSOR OF OWEEXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1) 和 LEAFY (LFY) 等调控 (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Blazquez & Weigel, 2000; Lee et al., 2000; Samach et al., 2000)。SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) 和 FLOWERING LOCUS C (FLC) 是开花信号整合子的两个核心调节蛋白, 它们相互作用能够调节开花信号整合子 (Li et al., 2008; Jung & Müller, 2009)。SVP 是开花负调控蛋白 (Hartmann et al., 2000), 属 MADS-box 转录因子。它在植物的整个营养体生长阶段中表达, 维持营养生长阶段, 但在花序分生组织中几乎检测不到 (Hartmann et al., 2000; Liu et al., 2007)。SVP 蛋白既能在茎尖分生组织中抑制 *SOC1* 基因转录, 又能在幼叶中调节 *FT* 基因表达 (Lee et al., 2007)。FLC 在分生组织和叶片中广泛表达 (Sheldon et al., 2002; Noh & Amason, 2003)。大量表达 FLC 至少可抑制两个开花整合子基因 *FT* 和 *SOC1*, 从而阻止分生组织向开花转变。春化和自发途径就是通过抑制 *FLC* 表达来促进开花 (Michaels & Amsino, 1999; Sheldon et al., 1999, 2000; Lee et al., 2000; Hepworth et al., 2002; Michaels et al., 2005)。FLC 蛋白能抑制 *FT* 基因在叶片中表达, 阻止 FT 蛋白等开花信号从叶片向分生组织运转 (Antonis & George, 2008); FLC 蛋白也会通过抑制 *SOC1*、*FT* 及其协调因子 *FD* 表达, 削弱分生组织对开花信号的反应 (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Searle et al., 2006; Corbesier et al., 2007)。

在模式植物拟南芥中, 利用 GST 融合技术、酵母双杂和免疫共沉淀法证实了 SVP 与 FLC 在体内和体外均存在相互作用 (Li et al., 2008; Sumire et al., 2008; Jung & Müller, 2009)。最近汤青林等 (2011) 利用 pET 原核表达系统, 证实了芥菜 SVP 与 FLC 在体外相互作用并能形成复合体。但是, 原核表达系统有可能会因为体外表达的截短体蛋白 (或者突变体蛋白) 的折叠和修饰发生异常, 不能很好地鉴定互作蛋白之间的结构域和作用位点。因此, 本研究中构建芥菜 SVP 和 FLC 酵母重组表达质粒, 从真核表达水平建立芥菜 SVP 与 FLC 酵母双杂交体系, 为深入分析芥菜 SVP 与 FLC 间的作用域和互作位点以及探讨其与下游开花信号整合子的相互作用等提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2011 年 8 月至 12 月于重庆市蔬菜学重点实验室完成。

芥菜材料‘QJ’为本实验室提供。酵母双杂交系统(Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System)、环酯肽抗生素(Aureobasidin A, 以下简称 AbA)、X- α -Gal、YPD、YPDA 及各种酵母缺陷型培养基均购自 Clontech 公司。*EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。平末端克隆载体、DNA 回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 TransGen 公司。高保真 DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。高效连接酶购自 ToYoBo 公司。

1.2 SVP 和 FLC 的克隆

分别设计芥菜 *SVP* 基因特异引物对 PF (5'-CCGGAATTCCTTCGTTGTGATGGCGAGAGAAAAG A-3') 和 PR (5'-CGCGGATCCATCTCTAACCACCATACGGTAAGCC-3') 以及 *FLC* 基因特异引物对 CF (5'-CCGGAATTCACAGAAGCCATGGGAAGAAAAAAC-3') 和 CR (5'-CGCGGATCCGTG GCTAATTAAGCAGTGGGAGAGT-3')。

上游引物 PF、CF 的 5' 为带保护碱基 *Eco*RI 酶切位点; 下游引物 PR、CR 的 5' 为带保护碱基 *Bam*H I 酶切位点。

按 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒提取芥菜茎尖 RNA, 反转录 cDNA 后以此为模板, 采用高保真聚合酶进行 PCR 扩增, 分别克隆 *SVP* 与 *FLC*。

1.3 酵母重组表达载体构建

将 *SVP*、*FLC* 质粒经 *Eco*R I /*Bam*H I 双酶切后, 连接到载体 pGADT7、pGBKT7, 分别构建酵母重组质粒 pGADT7FLC、pGBKT7SVP 以及 pGBKT7FLC、pGADT7SVP。将通用引物 T7 和 3'BD 鉴定为阳性的质粒(pGBKT7FLC、pGBKT7SVP)以及用 T7 和 3'AD 鉴定为阳性的质粒(pGADT7SVP、pGADT7FLC)送样测序。

1.4 酵母感受态制备和转化

参考 Clontech 公司 Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册, 从 YPDA 固体培养基上挑选直径为 2~3 mm 的酵母单菌落 Y187 和 Y2HGold, 分别制备酵母感受态细胞。采用醋酸锂转化法, 将重组质粒 pGADT7SVP 和 pGADT7FLC 分别转入 Y187 感受态细胞; pGBKT7SVP 和 pGBKT7FLC 分别转入 Y2HGold 感受态细胞。

1.5 自激活和毒性检测

将转化到酵母 Y187 的 pGADT7SVP、pGADT7FLC 菌液分别涂在 SD/-Leu、SD/-Leu/X- α -Gal、SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 固体平板上; 转化到酵母 Y2HGold 的 pGBKT7FLC、pGBKT7SVP 菌液分别涂在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体平板上。

同时以空载体转化子 Y187 (pGADT7) 和 Y2HGold (pGBKT7) 等为对照, 30 °C 培养 3~5 d, 观察 FLC、SVP 在酵母体内有无自激活和毒性现象。

1.6 酵母双杂及其蛋白互作检测

从酵母菌 Y187、Y2HGold 转化子中分别挑取单个阳性克隆于 500 μ L 2 \times YPDA 中混匀, 30 °C 培养 20~24 h, 取适量涂于 SD/-Trp、SD/-Leu 和 DDO (SD/-Leu/-Trp) 固体培养基, 30 °C 倒置培养 3~5 d 至阳性克隆出现。再从 DDO 固体培养基上挑取阳性克隆分别涂于 SD/-Leu/-Trp/AbA、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基, 30 °C 培养 3~5 d 观察是否有蓝色菌落。

2 结果与分析

2.1 SVP 与 FLC 序列分析

从芥菜材料‘QJ’中克隆的基因 *SVP*、*FLC* 分别编码 241 和 197 个氨基酸, 蛋白序列分析 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) (图 1) 表明: 芥菜 *SVP* 蛋白与白菜、拟南芥和甘蓝 (NCBI 登录号分别为 ABI96182.1、NP-179840.2 和 CAD48304.1) 的 *SVP* 蛋白相似性分别为 99%、92% 和 98%。芥菜 *FLC* 蛋白与白菜、油菜、萝卜、甘蓝和拟南芥 (NCBI 登录号分别为 AAS55409.1、AAK70216.1、BAK55645.1、AAQ76273.1 和 NP-196576.1) 的 *FLC* 蛋白相似性分别为 84%、92%、87%、87% 和 84%。*SVP* 蛋白的保守性高于 *FLC* 蛋白。

结构域分析 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 表明 (图 1): 芥菜 *SVP* 与 *FLC* 均属 MIKC 型蛋白。二者的 M 域 (MADS domain) 分别由 50 (第 13 ~ 62 位) 和 51 (第 12 ~ 62 位) 个氨基酸组成, K 结构域 (Keratin-like domain) 则分别由 78 (第 96 ~ 173 位) 和 54 (第 114 ~ 167 位) 个氨基酸组成。两个蛋白 M 域的保守性均高于 I 域 (Intervening domain, 位于 M 域和 K 域之间)、K 域和 C 域 (C-terminal domain, 位于 K 域之后)。

信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 表明: *SVP* 与 *FLC* 蛋白的 N 端均不含信号肽, 不属于胞外分泌蛋白或膜蛋白。因此, 分别构建含 *SVP*、*FLC* 完整编码框的酵母表达质粒, 应该不会因为信号肽的干扰而影响酵母双杂交系统 (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System) 中的蛋白相互作用检测。

2.2 酵母重组表达质粒鉴定、自激活与毒性检测

经过 PCR 检测、*EcoR* I / *Bam* H I 双酶切鉴定以及测序表明: pGBKT7*SVP*、pGADT7*FLC* 以及载体互换后 pGBKT7*FLC*、pGADT7*SVP* 酵母重组质粒中目的基因的核苷酸序列、插入载体位置与方向均完全正确。将以上重组质粒分别转化对应的酵母菌 Y187 和 Y2HGold 后, 均无自身转录激活活性, 且对酵母没有毒性, 可用于相互作用研究。

2.3 相互作用鉴定

酵母转化子 Y187(pGADT7*FLC*)、Y187(pGADT7*SVP*) 分别记为 M1、M2, 酵母转化子 Y2HGold (pGBKT7*FLC*)、Y2HGold (pGBKT7*SVP*) 分别记为 N1、N2。M1 和 M2 在 SD/-Leu、SD/-Leu/X- α -gal 平板上都能长出白色菌落, 而在 SD/-Leu/-Trp 平板不能生长 (表 1)。N1 和 N2 在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -gal 平板上长出的菌落均呈白色; 而在 SD/-Leu/-Trp 平板不能生长 (表 1)。

将 M1 和 N2 结合的二倍体酵母 (pGADT7*FLC* \times pGBKT7*SVP*) 记为 H1。载体互换后, M2 和 N1 结合的二倍体酵母 (pGADT7*SVP* \times pGBKT7*FLC*) 记为 H2。其余二倍体酵母 (pGADT7*FLC* \times pGBKT7)、(pGADT7 \times pGBKT7*SVP*)、(pGADT7 \times pGBKT7*FLC*)、(pGADT7*SVP* \times pGBKT7)、(pGADT7-T \times pGBKT7-Lam)、(pGADT7-T \times pGBKT7-53) 分别记为 H3、H4、H5、H6、H7 和 H8, 共 6 个对照。其中 H7、H8 分别为酵母双杂交系统试剂盒中的阴性对照和阳性对照。

试验组中所有二倍体酵母在 SD/-Leu/-Trp 平板上均可以长出菌落, 但只有 H1、H2 和 H8 能够在 SD/-Leu/-Trp/AbA 平板上生长; H1 和 H2 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上也能生长出菌落, 说明在试验组中酵母二倍体 H1 和 H2 中的报告基因 *HIS3*、*AUR1-C* 和 *ADE2* 都能够被激活 (表 1)。

此外, H1 (pGADT7*FLC* \times pGBKT7*SVP*) 还能够在 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal/ AbA) 平板上生长, 并且菌落呈蓝色, 而阴性对照 (H3、H4、H7) 均不能生长 (图 2)。由此表明:

FLC 能够与 SVP 结合, 启动了 4 个报告基因 *HIS3*、*AURI-C*、*ADE2*、*MEL1* 的表达。载体互换后, H2 (pGADT7SVP × pGBKT7FLC) 也能够 QDO/X/A 平板上长出蓝色菌落, 而阴性对照 (H5、

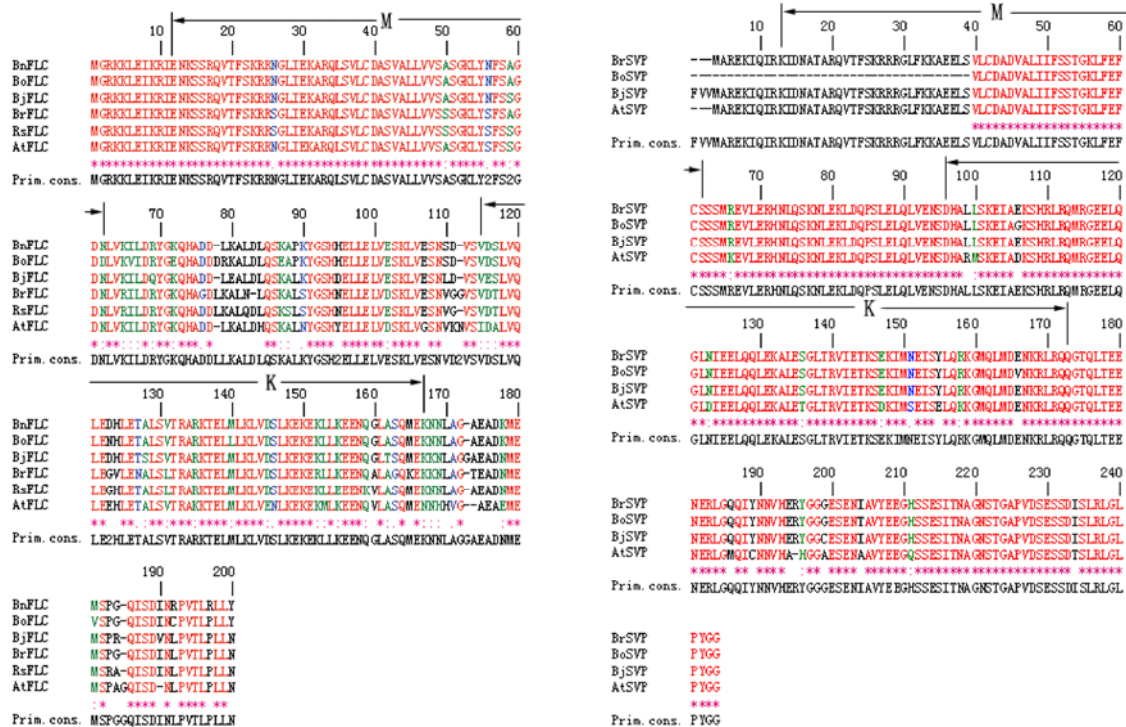


图 1 芥菜 SVP (左) 和 FLC (右) 蛋白序列分析

Br: 白菜; Bo: 甘蓝; At: 拟南芥; Bn: 油菜; Rs: 萝卜; Bj: 芥菜。

Fig. 1 Sequence analysis of protein SVP (left) and FLC (right)

Br: *Brassica campestris*; Bo: *Brassica oleracea*; At: *Arabidopsis thaliana*; Bn: *Brassica napus*; Rs: *Raphanus sativus*; Bj: *Brassica juncea*.

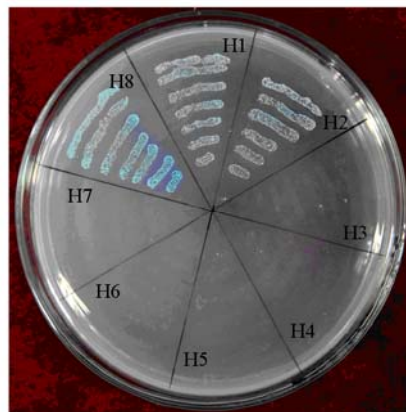


图 2 酵母中 FLC 和 SVP 之间相互作用分析

Fig. 2 Analysis of the interactions between FLC and SVP in yeast on the SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-Gal/AbA plate
H1: Y2HGold (pGBKT7SVP) × Y187 (pGADT7FLC); H2: Y2HGold (pGBKT7FLC) × Y187 (pGADT7SVP);
H3: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7FLC); H4: Y2HGold (pGBKT7SVP) × Y187 (pGADT7);
H5: Y2HGold (pGBKT7FLC) × Y187 (pGADT7); H6: Y2HGold (pGBKT7) × Y187 (pGADT7SVP);
H7: Y2HGold (pGBKT7-Lam) × Y187 (pGADT-T);
H8: Y2HGold (pGBKT7-T53) × Y187 (pGADT-T).

H6、H7) 均不能生长, 说明 SVP 能够与 FLC 结合, 激活酵母系统中的 4 个报告基因 (图 2)。虽然 H1 (正向杂交)、H2 (载体互换后杂交) 中菌落的颜色均略弱于阳性对照 H8, 但在 QDO/X/A 平板上均呈现明显蓝色, 说明芥菜 SVP 与 FLC 确实存在相互作用, 这为深入研究二者相互作用的结构域及锚定位点成功构建了一个技术平台。

表 1 酵母中 SVP 和 FLC 之间相互作用分析
Table 1 Analysis of the interactions between SVP and FLC in yeast

编号 Number	酵母质粒 Yeast plasmids	选择培养基 Selective agar plate	菌斑 Colony	颜色 Color
M1	Y187(pGADT7FLC)	SD/-Leu	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/X- α -Gal	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp	无 No	
M2	Y187(pGADT7SVP)	SD/-Leu	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/X- α -Gal	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp	无 No	
N1	Y2HGold(pGBKT7FLC)	SD/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Trp/X- α -Gal	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp	无 No	
N2	Y2HGold(pGBKT7SVP)	SD/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Trp/X- α -Gal	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp	无 No	
H1	Y2HGold(pGBKT7SVP) \times Y187(pGADT7FLC)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	有 Yes	蓝色 Blue
H2	Y2HGold(pGBKT7FLC) \times Y187(pGADT7SVP)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	有 Yes	蓝色 Blue
H3	Y2HGold(pGBKT7) \times Y187(pGADT7FLC)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
H4	Y2HGold(pGBKT7SVP) \times Y187(pGADT7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
H5	Y2HGold(pGBKT7FLC) \times Y187(pGADT7)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
H6	Y2HGold(pGBKT7) \times Y187(pGADT7SVP)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
H7	Y2HGold(pGBKT7-Lam) \times Y187(pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	无 No	
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	无 No	
H8	Y2HGold(pGBKT7-T53) \times Y187(pGADT-T)	SD/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Leu/-Trp/AbA	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	有 Yes	白色 White
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	有 Yes	蓝色 Blue

3 讨论

本研究中从芥菜中克隆的 *SVP* 和 *FLC* 基因均编码 MIKC 型蛋白, 这 2 个蛋白的 MADS 域都高度保守。I 域在序列和结构上变化较大, 其保守性差异明显。*SVP* 的 I 域保守性明显高于 *FLC* 的 I 域。与白菜、拟南芥和甘蓝 (NCBI 登录号分别为 ABI96182.1、NP-179840.2 和 CAD48304.1) 相比, *SVP* 的 I 域仅有 1 个氨基酸不保守, 例如芸薹属的白菜、甘蓝和芥菜 I 域不保守性位点均为精氨酸; 而拟南芥属的拟南芥则为赖氨酸。K 域的保守性较差, 含有 3 个连续的亲水 α 螺旋。K 域的前 2 个 α 螺旋被认为是在二聚体结构形成中起决定性作用 (Yang et al., 2003), 但其精细作用以及目标位点序列的特异性识别仍然未知。C 端域为最不保守的区域, 但是 C 端域可能会增强或稳定受 K 域调节的这种相互作用 (Pelaz et al., 2001)。

Sumire 等 (2008) 将模式植物拟南芥 *SVP*、*FLC* 基因分别插入 pGBKT7、pGADT7 载体, 并转入酵母菌 AH109 中进行蛋白相互作用验证, 融合的二倍体酵母在添加 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-AT 缺陷型培养基 (缺 Leu、Trp 和 His) 均可长菌, 从而证明了 *SVP* 与 *FLC* 存在相互作用。最近, 汤青林等 (2011) 将芥菜 *SVP* 和 *FLC* 构建到 pET 原核表达系统, 通过蛋白体外表达以及 SDS-PAGE, 检测到芥菜 *SVP* 与 *FLC* 能相互作用, 并形成稳定的蛋白复合物。本研究利用酵母双杂交系统, 分别将诱饵质粒 (pGBKT7*SVP*、pGBKT7*FLC*) 与猎物质粒 (pGADT7*FLC*、pGADT7*SVP*) 转入酵母菌 Y2HGold、Y187, 均不存在自激活和毒性现象。通过正向杂交 (pGBKT7*SVP* \times pGADT7*FLC*) 以及载体互换后杂交 (pGBKT7*FLC* \times pGADT7*SVP*) 验证, 发现二倍体融合酵母转化子均能在 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 固体培养基上生长, 且为蓝色。由此表明: 芥菜 *SVP* 与 *FLC* 确实存在相互作用, 从而激活了酵母的 4 个报告基因 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 这与拟南芥 *SVP* 与 *FLC* 能相互作用的结果相吻合。芥菜 *SVP* 与 *FLC* 酵母双杂交体系的建立, 为这二者间的作用结构域和互作位点的筛选提供了一个可靠的技术平台。

关于十字花科植物 *SVP* 与 *FLC* 相互作用的研究并不多见, 且主要集中于模式植物拟南芥中 (Li et al., 2008)。已有的对拟南芥 *SVP* 和 *FLC* 相互作用研究结果, 对芥菜 *SVP* 与 *FLC* 相互作用研究提供了一个新的启示: 芥菜 *SVP* 与 *FLC* 也很可能在植物体内存在直接的相互作用。本研究中, 在酵母真核表达系统中证实了芥菜 *SVP* 与 *FLC* 能相互结合, 关于体内相互作用还有待进一步试验鉴定。

References

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309: 1052 – 1056.
- Antonios Giakountis, George Coupland. 2008. Phloem transport of flowering signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 687 – 694.
- Blazquez M A, Weigel D. 2000. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, 404: 889 – 892.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030 – 1033.
- Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of *SVP*: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 21: 351 – 360.
- Hepworth S R, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G. 2002. Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J*, 21: 4327 – 4337.
- Jung C, Müller A E. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science*, 14 (10): 563 – 73.
- Kardailsky I, Shukla V K, Ahn J H, Dagenais N, Christensen S K, Nguyen J T, Chory J, Harrison M J, Weigel D. 1999. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 286: 1962 – 1965.

- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286: 1960 – 1962.
- Lee H, Suh S S, Park E, Cho E, Ahn J H, Kim S G, Lee J S, Kwon Y M, Lee I. 2000. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 14: 2366 – 2376.
- Lee J H, Yoo S J, Park S H, Hwang I, Lee J S, Ahn J H. 2007. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 21: 397 – 402.
- Li Dan, Liu Chang, Shen Lisha, Wu Yang, Chen Hongyan, Masumi Robertson, Chris A Helliwell, Toshiro Ito, Elliot Meyerowitz, Yu Hao. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 15 (1): 110 – 120.
- Liu C, Zhou J, Bracha-Drori K, Yalovsky S, Ito T, Yu H. 2007. Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, 134: 1901 – 1910.
- Michaels S D, Amasino R M. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11: 949 – 956.
- Michaels S D, Himelblau E, Kim S Y, Schomburg F M, Amasino, R M. 2005. Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 137: 149 – 156.
- Noh Y S, Amasino R M. 2003. *PIE1*, an ISWI family gene, is required for FLC activation and floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1671 – 1682.
- Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohalmi S E, Crosby W L, Yanofsky M F. 2001. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J*, 26: 385 – 394.
- Samach A, Onouchi H, Gold S E, Ditta G S, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky M F, Coupland G. 2000. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 288: 1613 – 1616.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino R A, Coupland G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 20: 898 – 912.
- Sheldon C C, Burn J E, Perez P P, Metzger J, Edwards J A, Peacock W J, Dennis E S. 1999. The *FLF* MADS box gene: A repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 11: 445 – 458.
- Sheldon C C, Conn A B, Dennis E S, Peacock W J. 2002. Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of FLOWERING LOCUS C and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell*, 14: 2527 – 2537.
- Sheldon C C, Rouse D T, Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. 2000. The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3753 – 3758.
- Sumire Fujiwara, Atsushi Oda, Riichiro Yoshida, Kanae Niinuma, Kana Miyata, Yusuke Tomozoe, Takeomi Tajima, Mayu Nakagawa, Kounosuke Hayashi, George Coupland, Tsuyoshi Mizoguchi. 2008. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 2960 – 2971.
- Tang Qing-lin, Xu Jun-qiang, Song Ming, Wang Zhi-min. 2011. Determination of interactions between the two determinant transcription factors of flowering signal integrators *in vitro* in *Brassica juncea* Coss. (Mustard). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2317 – 2324. (in Chinese).
- 汤青林, 许俊强, 宋 明, 王志敏. 2011. 芥菜开花信号整合子的两个核心转录因子 FLC 和 SVP 相互作用的体外检测. *园艺学报*, 38 (12): 2317 – 2324.
- Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U, Weigel D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309: 1056 – 1059.
- Yang Y Z, Fanning L, Jack T. 2003. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA*. *Plant Journal*, 33 (1): 47 – 59.