

引文格式: 吴钊漳, 孙旭东, 徐慧妮. 拟南芥 NBS1 互作蛋白的筛选和鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(4): 558–565. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202202008](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202202008)

拟南芥 NBS1 互作蛋白的筛选和鉴定*

吴钊漳¹, 孙旭东², 徐慧妮^{1**}

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】筛选拟南芥中 NBS1 的互作蛋白, 探究 NBS1 蛋白的新功能, 为后续研究奠定基础。【方法】利用酵母双杂交技术筛选拟南芥 cDNA 文库, 对得到的序列进行 BLAST 比对、亚细胞定位分析和基因本体注释。【结果】共有 221 个阳性克隆, 测序后通过 BLAST 比对得到 97 个与 NBS1 互作的蛋白, 包括膜蛋白、转运蛋白和折叠蛋白等, 它们主要定位于细胞质、细胞核和叶绿体等, 主要富集于 4 个分子功能、5 个细胞组分和 13 个生物过程。【结论】拟南芥中与 NBS1 互作的蛋白在刺激响应、信号转导和细胞代谢等方面发挥着重要作用, 也证明 NBS1 是一种多功能蛋白, 但其功能及分子机制还需进一步研究。

关键词: 拟南芥; NBS1; 蛋白互作; 酵母双杂交; 基因本体注释

中图分类号: Q949.748.306

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2023) 04-0558-08

Screening and Identifying Interaction Proteins of NBS1 in *Arabidopsis thaliana*

WU Fanzhang¹, SUN Xudong², XU Huini¹

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To screen the interaction protein and explore the new function of NBS1 protein in *Arabidopsis thaliana*, laying the foundation for further research. [Methods] The yeast two-hybrid technology was used to screen the interaction proteins of NBS1 from *A. thaliana* cDNA library. BLAST alignment, subcellular localization analysis and gene ontology annotations were performed on the obtained sequences. [Results] There were 97 proteins interacted with NBS1 in 221 positive clones by BLAST after sequencing, including membrane proteins, transporters and folding proteins. These proteins were mainly localized in cytoplasm, nucleus and chloroplast, which were mainly enriched in four molecular functions, five cellular components and 13 biological processes. [Conclusion] The proteins interacting with NBS1 play an important role in stimulus response, signal transduction and cell metabolism. It is also confirmed that NBS1 is a multifunctional protein, but its function and molecular mechanism need further studies.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; NBS1; protein interaction; yeast two-hybrid; gene ontology

收稿日期: 2022-02-16

修回日期: 2022-03-02

网络首发日期: 2023-09-06

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760582)。

作者简介: 吴钊漳 (1995—), 男, 陕西府谷人, 在读硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。

E-mail: 1902354059@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 徐慧妮 (1980—), 女, 山东莱阳人, 博士, 教授, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: hnxusun@126.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20230906.1109.003>



植物在生长发育过程中,因各种因素会产生 DNA 损伤,其中 DNA 双链断裂(double-strand breakage, DSBs)是一种非常严重的损伤,若不及时修复会影响基因组的稳定,甚至导致细胞死亡^[1]。同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)是植物 DSBs 修复的 2 种途径^[2],使基因组受到损伤后仍然能够被精确地修复。HR 主要发生在细胞周期的 S 期,以姐妹染色单体或同源染色体为模板进行修复,准确率极高;而 NHEJ 发生在整个细胞周期,通过连接 DNA 末端来修复 DSBs,这种方法虽然明显快于 HR 修复,但准确率低于 HR 途径,而且会导致遗传信息丢失^[3]。MRN 复合物是由 3 种蛋白质(MRE11、RAD50 和 NBS1)组成的基因修复复合体,在 DSBs 修复的 2 种途径中发挥着重要作用,参与起始修复、引发信号转导和协助修复等各个环节^[4-5]。

NBS1 是 MRN 复合物的重要组分,是细胞应答 DNA 损伤的关键蛋白,在 DNA 复制、DSBs 识别、细胞周期调控和维持基因组稳定等方面具有重要作用^[6]。NBS1 蛋白主要分为 3 个结构域:N 端、中心区和 C 端。其中,N 端包含 FHA 结构域和 BRCT 结构域,这 2 种结构域与 DNA 损伤修复和细胞周期调控相关^[7-9]。FHA/BRCT 结构域能够直接结合磷酸化后的组蛋白 H2AX,招募 MRN 复合物到 DNA 双链断裂的位点附近^[10-11]。研究发现:BCAS2 可以与 NBS1 的 N 端互作,增强 DNA 双链断裂的修复能力^[12]。中心区含有若干个丝氨酸残基,当 DNA 双链发生断裂时,这些丝氨酸残基会被 ATM 磷酸化,与 NBS1 一起参与细胞周期 S 期的调控^[13-14]。NBS1 蛋白的 C 端含有 MRE11 的结合位点,NBS1 通过该位点与 MRE11 结合并与 RAD50 共同组成 MRN 复合体,同时参与 MRN 复合物的核转位^[15]。本研究通过拟南芥酵母文库筛选得到 97 个与 NBS1 互作的蛋白,为后续研究拟南芥 NBS1 蛋白的功能及其分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用拟南芥品种为哥伦比亚(Columbia Col-0),酵母培养基购自北京酷莱博科技有限公司,拟南芥的 cDNA 文库、酵母菌株 Y2HGold、

Y187、大肠杆菌 DH5 α 、酵母双杂交载体 pGADT7(AD)和 pGBKT7(BD)均为中国科学院昆明植物研究所实验室保存。

1.2 重组载体的构建

利用 Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒提取拟南芥总 RNA,再用 5 $\times$ All-In-One RT MasterMix 试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 NBS1 基因特异性引物 NBS1-F: GAGGACCTGCATATG-ATGGTTTGGGGTCTCTTTCCC 和 NBS1-R: CAGGTCGACGGATCCTCAACTTCCAGAGAGAA-CCC 扩增得到 NBS1 的基因序列。胶回收后用同源重组法将 NBS1 基因重组到 BD 载体上,再转化到大肠杆菌 DH5 α 中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落进行 PCR 扩增,将阳性克隆送至擎科生物有限公司测序。

1.3 重组载体的自激活检测

将测序正确的 BD-NBS1 重组载体转化到酵母菌株 Y2HGold 中,用 SD/-Trp 平板筛选,同时转化 AD 和 BD 空载体作为阴性对照。将转 AD 空载体的 Y187 菌株分别与转 BD 空载体和 BD-NBS1 重组载体的 Y2HGold 菌株共同培养 12 h,培养液稀释后涂布于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,检测其自激活活性。

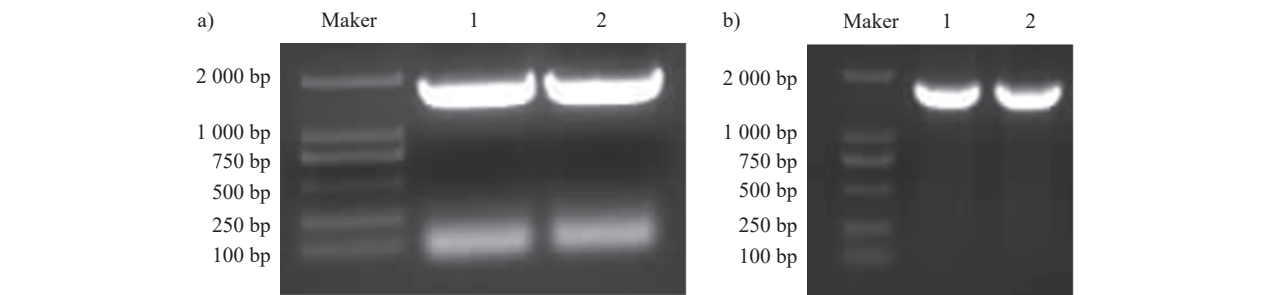
1.4 酵母 cDNA 文库筛选互作蛋白

将转 BD-NBS1 重组载体的酵母 Y2HGold 菌株培养到 OD₂₆₀~0.8,再与含 cDNA 文库的 Y187 菌株混合培养 24 h,离心集菌后用 0.5 $\times$ YPDA 液体培养基 10 mL 悬浮菌体,涂到 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d。挑取单菌落,吸取菌液 1 μ L 进行 PCR 检测,将阳性克隆送至擎科生物科技有限公司测序,分析测序结果。为了验证筛选结果的可靠性,随机挑选 4 个候选蛋白,利用同源重组法将基因重组到 AD 载体上,与 BD-NBS1 质粒共同转化酵母菌株 Y2HGold,涂 SD/-Trp/-Leu 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。挑取单菌落,然后稀释培养液,吸取菌液 1 μ L 点至 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d。

2 结果与分析

2.1 重组载体 BD-NBS1

以拟南芥 cDNA 为模板克隆 NBS1 基因,大小为 1 629 bp(图 1a);单菌落 PCR 进行扩增(图 1b)



注: a) RT-PCR 扩增 *NBS1*, 1 和 2 为 RT-PCR 产物; b) BD-*NBS1* 菌落 PCR 扩增, 1 和 2 为 BD-*NBS1* 重组菌落 PCR 扩增产物。
Note: a) RT-PCR amplification of *NBS1*, 1 and 2 are RT-PCR products; b) colony PCR amplification of BD-*NBS1*, 1 and 2 are BD-*NBS1* recombinant colony PCR amplification products.

图 1 BD-*NBS1* 重组载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant vector BD-*NBS1*

后成功获得 BD-*NBS1* 的重组载体。

培养后, SD/-Trp/-Leu/-Ade 平板上无菌落生长, 说明 BD-*NBS1* 重组载体在酵母菌株 Y2HGold 中无自激活现象, 可用于后续酵母文库的筛选。

2.2 重组载体 BD-*NBS1* 的自激活活性

由图 2 可知: 重组载体 BD-*NBS1* 经转化、

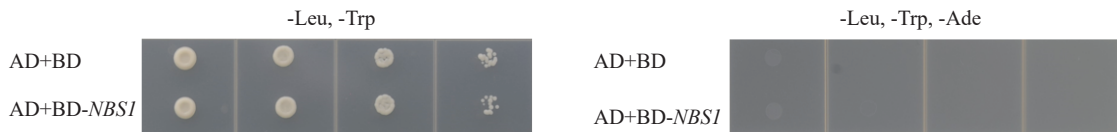


图 2 BD-*NBS1* 自激活检测

Fig. 2 Identification of BD-*NBS1* for auto-activation

2.3 互作蛋白的筛选结果

研究共获得 221 个阳性克隆, 测序后通过 TAIR

BLAST 进行比对分析, 得到 97 个与 *NBS1* 互作的蛋白, 其亚细胞定位结果见表 1。

表 1 *NBS1* 结合蛋白及其功能分析

Tab. 1 Functional analysis of *NBS1* binding proteins

编号 number	基因座位 gene locus	亚细胞定位 subcellular localization	蛋白描述 protein description	功能预测 functional prediction
1	AT2G17720	线粒体 mitochondrion	2-酮戊二酸和铁依赖性加氧酶蛋白 2-oxoglutarate and Fe (II)-dependent oxygenase protein	铁离子结合 iron ions binding
2	AT1G35190	细胞质 cytoplasm	2-酮戊二酸和铁依赖性加氧酶蛋白 2-oxoglutarate and Fe (II)-dependent oxygenase protein	铁离子结合 iron ions binding
3	AT1G12440	细胞核 nucleus	锌指家族蛋白 zinc finger family protein	DNA 结合 DNA binding
4	AT4G37000	叶绿体 chloroplast	红叶绿素分解代谢还原酶 red chlorophyll catabolite reductase	蛋白质结合 protein binding
5	AT2G21620	细胞质 cytoplasm	腺嘌呤核苷酸 α 水解酶 adenine nucleotide α hydrolases	水解酶活性 hydrolase activity
6	AT5G67560	液泡 vacuole	ADP-糖基化因子 ADP-ribosylation factor	GTP 结合 GTP binding
7	AT3G48690	细胞核 nucleus	α/β -水解酶超家族蛋白 α/β -hydrolases superfamily protein	水解酶活性 hydrolase activity
8	AT3G11680	叶绿体 chloroplast	苹果酸转运蛋白 malate transporter	转运蛋白活性 transporter activity
9	AT2G38710	叶绿体 chloroplast	AMMECR1 家族蛋白 AMMECR1 family protein	催化活性 catalytic activity
10	AT5G40160	叶绿体 chloroplast	锚蛋白重复家族蛋白 ankyrin repeat family protein	蛋白质结合 protein binding
11	AT3G22110	线粒体 mitochondria	20S 蛋白酶体 α 亚基 20S proteasome α subunit	水解酶活性 hydrolase activity

表1 (续)

编号 number	基因座位 gene locus	亚细胞定位 subcellular localization	蛋白描述 protein description	功能预测 functional prediction
12	AT4G14440	细胞核 nucleus	3-羟乙基辅酶A脱水酶 1 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1	水合酶活性 hydratase activity
13	AT2G19590	细胞质 cytoplasm	ACC氧化酶 ACC oxidase	氧化酶活性 oxidase activity
14	AT1G59910	细胞核 nucleus	肌动蛋白结合FH2家族蛋白 actin-binding FH2 family protein	肌动蛋白结合 actin binding
15	AT3G05420	细胞质 cytoplasm	酰基辅酶A结合蛋白 acyl-CoA binding protein	酰基辅酶A结合 acyl-CoA binding
16	AT2G41445	线粒体 mitochondria	MADS-box蛋白 MADS-box protein	蛋白质结合 protein binding
17	AT3G28940	细胞核 nucleus	AIG2家族蛋白 AIG2 family protein	催化活性 catalytic activity
18	AT4G36250	细胞质 cytoplasm	醛脱氢酶 aldehyde dehydrogenase	醛脱氢酶活性 aldehyde dehydrogenase activity
19	AT5G13420	叶绿体 chloroplast	TIM家族蛋白 TIM family protein	转醛酶活性 transaldolase activity
20	AT3G42790	细胞核 nucleus	ALFIN家族蛋白 ALFIN family protein	甲基化组蛋白结合 methylated histone binding
21	AT4G22260	线粒体 mitochondria	氧化酶家族蛋白 oxidase family protein	氧化酶活性 oxidase activity
22	AT1G19130	细胞核 nucleus	RMLC折叠蛋白 RMLC fold protein	催化活性 catalytic activity
23	AT4G33780	叶绿体 chloroplast	ATP磷酸核糖转移酶 ATP phosphoribosyl transferase	蛋白质结合 protein binding
24	AT4G32530	液泡 vacuole	V-ATP酶家族蛋白 V-ATPase family protein	ATP水解活性 ATP hydrolysis activity
25	AT1G31770	质膜 plasma membrane	ATP结合盒式转运蛋白 ATP-binding cassette transporter	转运蛋白活性 transporter activity
26	AT1G67730	线粒体 mitochondria	β -酮酰基还原酶 beta-ketoacyl reductase	氧化还原酶活性 oxidoreductase activity
27	AT5G20230	质膜 plasma membrane	蓝铜结合蛋白 blue-copper-binding protein	电子转移活性 electron transfer activity
28	AT4G33430	质膜 plasma membrane	BRI1相关受体激酶 BRI1-associated receptor kinase	信号受体结合 signaling receptor binding
29	AT2G41010	细胞核 nucleus	钙调素结合蛋白 calmodulin-binding protein	钙调素结合 calmodulin binding
30	AT4G25780	细胞外 extracellular	CAP超家族蛋白 CAP superfamily protein	有机环状化合物结合 organic cyclic compound binding
31	AT3G04700	细胞核 nucleus	TPR蛋白 TPR protein	蛋白质结合 protein binding
32	AT3G52600	细胞壁 cell wall	细胞壁转化酶 cell wall invertase	水解酶活性 hydrolase activity
33	AT3G06778	细胞核 nucleus	伴侣DNA J结构域蛋白 chaperone DNA J-domain protein	蛋白质结合 protein binding
34	AT3G13310	叶绿体 chloroplast	伴侣DNA J结构域蛋白 chaperone DNA J-domain protein	蛋白质结合 protein binding
35	AT5G18140	叶绿体 chloroplast	伴侣DNA J结构域蛋白 chaperone DNA J-domain protein	蛋白质结合 protein binding
36	AT1G48850	细胞核 nucleus	分支酸合酶 chorismate synthase	FMN结合 FMN binding
37	AT2G18600	细胞核 nucleus	RUB1结合酶 RUB1-conjugating enzyme	转移酶活性 transferase activity
38	AT1G05060	叶绿体 chloroplast	卷曲螺旋蛋白 coiled-coil protein	蛋白质结合 protein binding
39	AT4G02570	细胞核 nucleus	泛素连接酶 ubiquitin ligase	蛋白质结合 protein binding
40	AT4G34180	叶绿体 chloroplast	环化酶家族蛋白 cyclase family protein	芳基甲酰胺酶活性 arylformamidase activity
41	AT5G10860	细胞质 cytoplasm	胱硫醚 β 合酶 cystathionine beta-synthase	钴离子结合 cobalt ion binding

表1 (续)

编号 number	基因座位 gene locus	亚细胞定位 subcellular localization	蛋白描述 protein description	功能预测 functional prediction
42	AT3G27090	细胞核 nucleus	DCD结构域蛋白 DCD domain protein	蛋白质结合 protein binding
43	AT1G17600	细胞核 nucleus	抗病蛋白 disease resistance protein	蛋白质结合 protein binding
44	AT3G12210	细胞核 nucleus	DNA结合蛋白 DNA binding protein	蛋白质结合 protein binding
45	AT2G34860	叶绿体 chloroplast	DNA J/Hsp40超家族蛋白 DNA J/Hsp40 superfamily protein	还原酶活性 reductase activity
46	AT4G13830	细胞核 nucleus	DNA J蛋白 DNA J protein	蛋白质结合 protein binding
47	AT4G15910	线粒体 mitochondria	干旱诱导蛋白 drought-induced protein	蛋白质结合 protein binding
48	AT3G11600	细胞核 nucleus	E3泛素蛋白连接酶 E3 ubiquitin-protein ligase	蛋白质结合 protein binding
49	AT1G08500	细胞外 extracellular	早期类结瘤素蛋白 early nodulin-like protein	电子转移活性 electron transfer activity
50	AT3G60360	细胞核 nucleus	核仁小RNA small nucleolar RNA	蛋白质结合 protein binding
51	AT3G22845	细胞质 cytoplasm	GOLD家族蛋白 GOLD family protein	蛋白质结合 protein binding
52	AT3G15750	细胞核 nucleus	YAE1蛋白 YAE1 protein	蛋白质结合 protein binding
53	AT2G31990	高尔基体 golgi apparatus	外泌素家族蛋白 exostosin family protein	糖基转移酶活性 glycosyltransferase activity
54	AT3G45970	细胞壁 cell wall	扩展蛋白 expansin protein	结构分子活性 structural molecule activity
55	AT3G20300	线粒体 mitochondria	离子通道蛋白 ion channel protein	蛋白质结合 protein binding
56	AT4G04930	细胞膜 cell membrane	脂肪酸去饱和酶家族蛋白 fatty acid desaturase family protein	蛋白质结合 protein binding
57	AT3G10060	叶绿体 chloroplast	肽脯氨酰顺反异构酶 peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase	蛋白质结合 protein binding
58	AT5G58870	叶绿体 chloroplast	FTSH蛋白酶 FTSH protease	ATP水解活性 ATP hydrolysis activity
59	AT3G48680	细胞质 cytoplasm	γ 碳酸酐酶 2 gamma carbonic anhydrase 2	蛋白质结合 protein binding
60	AT4G12870	细胞外 extracellular	溶酶体巯基还原酶 lysosomal thiol reductase	氧化还原酶活性 oxidoreductase activity
61	AT3G16370	叶绿体 chloroplast	酰基水解酶超家族蛋白 acylhydrolase superfamily protein	水解酶活性 hydrolase activity
62	AT5G20630	细胞核 nucleus	类萌发素蛋白 germin-like protein	锰离子结合 manganese ion binding
63	AT3G43860	细胞外 extracellular	糖基水解酶 glycosyl hydrolase	水解酶活性 hydrolase activity
64	AT3G10970	叶绿体 chloroplast	卤酸脱卤酶水解酶 haloacid dehalogenase hydrolase	催化活性 catalytic activity
65	AT3G51880	细胞核 nucleus	HMGB蛋白 HMGB protein	蛋白质结合 protein binding
66	AT3G29075	细胞膜 cell membrane	富含甘氨酸蛋白 glycine-rich protein	磷脂酸结合 phosphatidic acid binding
67	AT2G25625	叶绿体 chloroplast	去乙酰化酶 deacetylase	蛋白质结合 protein binding
68	AT3G61890	细胞核 nucleus	亮氨酸拉链蛋白 leucine zipper protein	蛋白质结合 protein binding
69	AT3G24860	细胞核 nucleus	Trihelix转录因子 Trihelix transcription factor	转录因子活性 transcription factor activity
70	AT3G17609	细胞核 nucleus	HYS蛋白 HYS protein	蛋白质结合 protein binding
71	AT3G24030	叶绿体 chloroplast	羟乙基噻唑激酶家族蛋白 hydroxyethylthiazole kinase family protein	蛋白质结合 protein binding

表1 (续)

编号 number	基因座位 gene locus	亚细胞定位 subcellular localization	蛋白描述 protein description	功能预测 functional prediction
72	AT5G50600	叶绿体 chloroplast	羟基类固醇脱氢酶 hydroxysteroid dehydrogenase	脱氢酶活性 dehydrogenase activity
73	AT1G65430	细胞核 nucleus	含IBR结构域蛋白 IBR domain-containing protein	连接酶活性 ligase activity
74	AT5G02820	细胞核 nucleus	DNA拓扑异构酶 DNA topoisomerase	蛋白质结合 protein binding
75	AT5G13220	细胞核 nucleus	茉莉酸锌结构域蛋白 jasmonate-zim-domain protein	蛋白质结合 protein binding
76	AT1G73325	细胞外 extracellular	蛋白酶抑制剂 protease inhibitor	抑制剂活性 inhibitor activity
77	AT1G17620	细胞核 nucleus	富含羟脯氨酸的糖蛋白 hydroxyproline-rich glycoprotein	蛋白质结合 protein binding
78	AT4G21750	细胞核 nucleus	分生组织蛋白 meristem protein	蛋白质结合 protein binding
79	AT4G11060	叶绿体 chloroplast	单链DNA结合蛋白 single-stranded DNA binding protein	蛋白质结合 protein binding
80	AT5G40440	叶绿体 chloroplast	丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase	蛋白质结合 protein binding
81	AT4G09460	细胞核 nucleus	MYB结构域蛋白 MYB domain protein	蛋白质结合 protein binding
82	AT2G29290	细胞膜 cell membrane	NADP结合蛋白 NADP-binding protein	催化活性 catalytic activity
83	AT1G18800	细胞核 nucleus	NAP1相关蛋白 NAP1-related protein	组蛋白结合 histone binding
84	AT4G01900	叶绿体 chloroplast	氮调节蛋白 nitrogen regulatory protein	蛋白质结合 protein binding
85	AT5G53190	质膜 plasma membrane	SWEET家族蛋白 SWEET family protein	蛋白质结合 protein binding
86	AT2G34720	细胞核 nucleus	核因子Y nuclear factor Y	蛋白质结合 protein binding
87	AT1G45248	线粒体 mitochondria	核仁组蛋白甲基转移酶 nucleolar histone methyltransferase	甲基转移酶活性 methyltransferase activity
88	AT3G52220	细胞核 nucleus	细胞免疫球蛋白类受体蛋白 immunoglobulin-like receptor protein	蛋白质结合 protein binding
89	AT1G67100	细胞核 nucleus	含LOB结构域蛋白 LOB domain-containing protein	蛋白质结合 protein binding
90	AT3G32980	细胞外 extracellular	过氧化物酶超家族蛋白 peroxidase superfamily protein	血红素结合 heme binding
91	AT5G19620	叶绿体 chloroplast	外膜蛋白 outer envelope protein	蛋白质结合 protein binding
92	AT1G25260	细胞核 nucleus	核糖体蛋白 ribosomal protein	蛋白质结合 protein binding
93	AT2G47340	细胞质 cytoplasm	植物转化酶 plant invertase	果胶酯酶活性 pectinesterase activity
94	AT2G45790	细胞质 cytoplasm	磷酸甘露聚糖酶 phosphomannomutase	蛋白质结合 protein binding
95	AT1G75770	细胞核 nucleus	假设蛋白 hypothetical protein	蛋白质结合 protein binding
96	AT3G27906	细胞核 nucleus	假设蛋白 hypothetical protein	蛋白质结合 protein binding
97	AT2G43340	细胞核 nucleus	假设蛋白 hypothetical protein	蛋白质结合 protein binding

97 个基因的基因本体注释结果 (图 3) 显示: NBS1 候选互作蛋白主要富集于 4 个分子功能、5 个细胞组分和 13 个生物过程。分子功能包括蛋白质结合、氧化还原酶活性、催化活性和水解酶活性; 细胞组分包括细胞质、叶绿体、内质网、

染色体和液泡; 生物过程包括细胞死亡、响应茉莉酸、响应脱落酸、胚胎后发育、囊泡介导的转运、响应光刺激、响应辐射、信号转导、叶片发育、响应氧化胁迫、脂质生物合成过程、代谢过程和响应温度刺激。

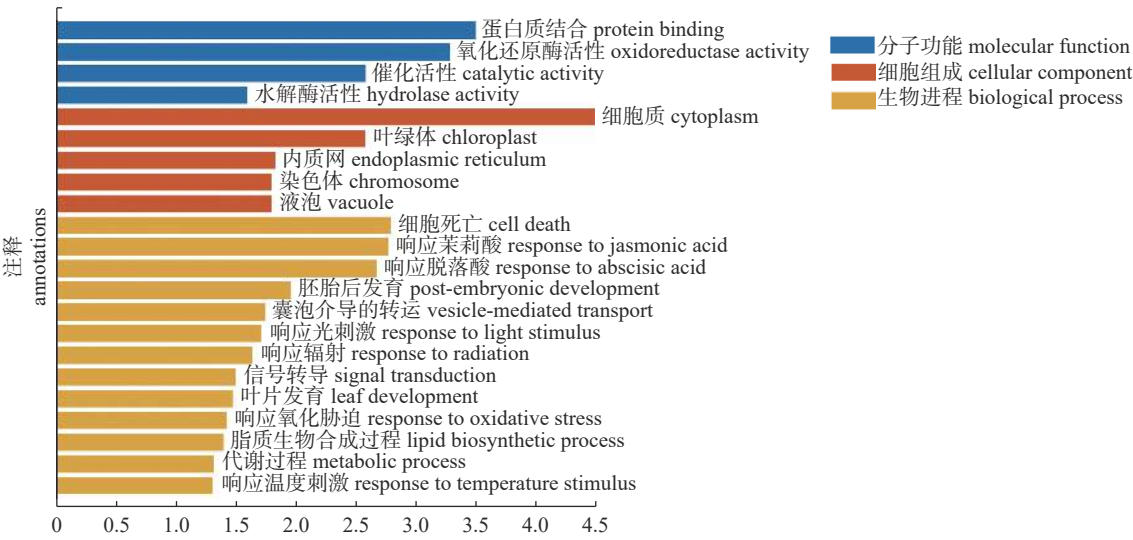


图 3 *AtNBS1* 候选互作蛋白基因本体注释

Fig. 3 Gene ontology annotation of *AtNBS1* candidate interaction proteins

2.4 互作蛋白的回复验证

由图 4 可知：随机挑选的 4 个候选蛋白经基因重组、转化酵母菌株 Y2HGold、涂布和培养后菌落能够正常生长，说明候选蛋白与 NBS1 蛋白存在相互作用，筛选结果可靠。

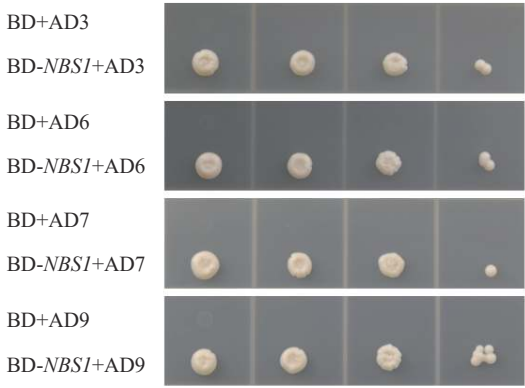


图 4 酵母双杂交回复验证

Fig. 4 Confirmation of positive interaction by yeast two-hybrid

3 讨论

在植物细胞生长过程中，其 DNA 随时都可能受到外界因素 (如紫外线和电离辐射) 和内源因素 (如 DNA 复制错误和活性氧) 的损伤^[16]，进而可能导致某些功能丧失，严重的甚至导致细胞死亡。前期研究发现：DNA 修复途径在不同物种之间是高度进化保守的^[17]。DSBs 是一种非常严重的 DNA 损伤，主要通过 HR 途径和 NHEJ 途

径修复^[2]。在 DSBs 修复过程中，MRN 复合物有着重要作用。NBS1 蛋白是 MRN 复合物的关键组成部分，它是一种多功能蛋白，参与各种 DNA 损伤反应，如 DSBs 识别、细胞周期调控和维持基因组稳定等^[6]。

为进一步研究 NBS1 蛋白的功能及其分子机制，通过筛选拟南芥酵母文库，获得了 97 个 NBS1 的互作蛋白。这些蛋白参与了刺激响应、细胞死亡和信号转导等过程，证明 NBS1 是一种多功能蛋白。在这些互作蛋白中，发现 1 个 MYB 家族蛋白。MYB 家族是植物中最大的转录家族之一，广泛参与植物代谢和生物调控^[18]。MYB 蛋白可分为 4R-MYB、3R-MYB、1R-MYB 和 R2R3-MYB 4 类，其中，R2R3-MYB 类蛋白数量最多，参与植物代谢及抗病等过程^[19]。有研究发现：Aspf2-like (VDAL) 蛋白与 E3 连接酶 PUB25 和 PUB26 相互作用，可防止 MYB6 降解，从而提高植物对黄萎病的抵抗力^[20]。

蛋白质翻译后修饰 (磷酸化、糖基化、泛素化和甲基化等) 是近年研究的热点，几乎参与细胞所有的生命活动过程，在植物体内发挥着重要的调控作用^[21]。前期也有研究发现：E3 连接酶 RNF20 可以与 NBS1 相互作用，共同参与 DNA 双链修复^[22]。本研究筛选出 1 个与泛素化有关的 E3 连接酶 GIR2，其能否与 NBS1 形成转录调控网络还需要进一步研究。

4 结论

NBS1 蛋白在植物的生长发育过程中发挥着重要作用,除了参与 DNA 损伤修复之外,其他功能尚不清楚。本研究利用酵母双杂交技术筛选 cDNA 文库,得到 97 个 NBS1 的互作蛋白,这些蛋白参与胚胎发育、信号转导和细胞代谢等生物过程,但 NBS1 是否参与这些生物过程还需要通过分子生物学及遗传学方法进一步研究。

[参考文献]

- [1] 宋囡,石磊. DNA损伤修复的分子机理研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(1): 95. DOI: [10.3969/j.issn.2096-3351.2018.01.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.2096-3351.2018.01.022).
- [2] TERASAWA M, SHINOHARA A, SHINOHARA M. Double-strand break repair-adox: restoration of suppressed double-strand break repair during mitosis induces genomic instability[J]. Cancer Science, 2014, 105(12): 1519. DOI: [10.1111/cas.12551](https://doi.org/10.1111/cas.12551).
- [3] HAPLIN A K, BLUNDELL T L. Structural biology of multicomponent assemblies in DNA double-strand-break repair through non-homologous end joining[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2020, 61: 9. DOI: [10.1016/j.sbi.2019.09.008](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.008).
- [4] 何湘,钟辉. MRN复合物的结构及功能研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 979. DOI: [10.3969/j.issn.1009-0002.2007.06.027](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-0002.2007.06.027).
- [5] WILLIAMS G J, LEES-MILLER S P, TAINER J A. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks[J]. DNA Repair, 2010, 9(12): 1299. DOI: [10.1016/j.dnarep.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.10.001).
- [6] D'AMOURS D, JACKSON S P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, 3(5): 317. DOI: [10.1038/nrm805](https://doi.org/10.1038/nrm805).
- [7] 张鹏,沈筱筠,周春仙,等. NBS1功能研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(6): 477. DOI: [10.3867/j.issn.1000-3002.2008.06.014](https://doi.org/10.3867/j.issn.1000-3002.2008.06.014).
- [8] BECKER E, MEYER V, MADAoui H, et al. Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response[J]. Bioinformatics, 2006, 22(11): 1289. DOI: [10.1093/bioinformatics/bt1075](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bt1075).
- [9] XU C, WU L M, CUI G F, et al. Structure of a second BRCT domain identified in the Nijmegen breakage syndrome protein Nbs1 and its function in an MDC1-dependent localization of Nbs1 to DNA damage sites[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 381(2): 361. DOI: [10.1016/j.jmb.2008.05.087](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.087).
- [10] KOBAYASHI J, TAUCHI H, SAKAMOTO S, et al. NBS1 localizes to γ -H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain[J]. Current Biology, 2002, 12(21): 1846. DOI: [10.1016/s0960-9822\(02\)01259-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01259-9).
- [11] WILLIAMS R S, DODSON G E, LIMBO O, et al. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair[J]. Cell, 2009, 139(1): 88. DOI: [10.1016/j.cell.2009.07.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.033).
- [12] WANG L P, CHEN T Y, KANG C K, et al. BCAS2, a protein enriched in advanced prostate cancer, interacts with NBS1 to enhance DNA double-strand break repair[J]. British Journal of Cancer, 2020, 123(12): 1796. DOI: [10.1038/s41416-020-01086-y](https://doi.org/10.1038/s41416-020-01086-y).
- [13] LIM D S, KIM S T, XU B, et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway[J]. Nature, 2000, 404(6778): 613. DOI: [10.1038/35007091](https://doi.org/10.1038/35007091).
- [14] GATEI M, YOUNG D, CEROSALETTI KM, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 115. DOI: [10.1038/75508](https://doi.org/10.1038/75508).
- [15] TAUCHI H, KOBAYASHI J, MORISHIMA K, et al. The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50-hMRE11-NBS1 complex DNA repair activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(1): 12. DOI: [10.1074/jbc.C000578200](https://doi.org/10.1074/jbc.C000578200).
- [16] 钟鸣,陈琢,刘宛,等. 逆境胁迫下植物DNA损伤和DNA错配修复研究进展[J]. 生态学杂志, 2012, 31(9): 2404. DOI: [10.13292/j.1000-4890.2012.0342](https://doi.org/10.13292/j.1000-4890.2012.0342).
- [17] TAYLOR E M, LEHMANN A R. Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms[J]. International Journal of Radiation Biology, 1998, 74(3): 277. DOI: [10.1080/095530098141429](https://doi.org/10.1080/095530098141429).
- [18] 牛义岭,姜秀明,许向阳,等. 植物转录因子MYB基因家族的研究进展[J]. 分子植物育种, 2016, 14(8): 2050. DOI: [10.13271/j.mpb.014.002050](https://doi.org/10.13271/j.mpb.014.002050).
- [19] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573. DOI: [10.1016/j.tplants.2010.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005).
- [20] MA A F, ZHANG D P, WANG G X, et al. *Verticillium dahliae* effector VDAL protects MYB6 from degradation by interacting with PUB25 and PUB26 E3 ligases to enhance *Verticillium* wilt resistance[J]. Plant Cell, 2021, 33(12): 3675. DOI: [10.1093/plcell/koab221](https://doi.org/10.1093/plcell/koab221).
- [21] 相小超,焦丰龙,张养军,等. 功能材料在蛋白质组研究中的应用进展[J]. 色谱, 2019, 37(11): 1137. DOI: [10.3724/SP.J.1123.2019.04041](https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2019.04041).
- [22] NAKAMURA K, KATO A, KOBAYASHI J, et al. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination[J]. Molecular Cell, 2011, 41(5): 515. DOI: [10.1016/j.molcel.2011.02.002](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.002).

责任编辑: 何承刚