

Cdh1 和 Num1 过表达菌株的构建

李巧巧, 庞文颖, 海力, 唐仙英*

(中南民族大学生命科学学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 生物技术国家民委重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]研究 Cdh1 和 Num1 之间是否存在相互作用, 构建用于 Cdh1 和 Num1 免疫共沉淀试验的过表达菌株。[方法]首先在酵母菌株 YWL630 中用 GAL1 和 3HA 对 CDH1 进行标记, 构建 GAL1-3HA-CDH1 NUM1-GFP 菌株, 再利用酵母四分体解离的方法使菌株 YWL63 和 YWL490 分别与该菌株杂交并进行四分体解离, 从而得到所需菌株。[结果]成功构建不同基因型和配型的重组酵母菌株, 其中 YT52 成功过表达了约 340 kD 的 Num1, YT53 成功过表达了 340 kD 的 Cdh1, YT57 成功过表达了 75 kD 的 Cdh1。[结论]经过同源重组的方法成功标记 CDH1 并诱导蛋白过表达, 通过酵母四分体解离的方法构建用于 Cdh1 和 Num1 互作试验的过表达菌株, 为揭示 APC/C 是否介导 Num1 的降解及机制奠定基础。

关键词 过表达; 酵母四分体解离; Cdh1; Num1

中图分类号 Q26 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)10-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.10.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Construction of Cdh1 and Num1 Overexpressing Strains

LI Qiao-qiao, PANG Wen-ying, HAI Li et al (Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] To study whether there is an interaction between Cdh1 and Num1, and construct an over-expression strain for Cdh1 and Num1 co-immunoprecipitation experiments. [Method] Firstly, CDH1 was labeled with GAL1 and 3HA in yeast strain YWL630 to construct GAL1-3HA-CDH1 NUM1-GFP strain, and then yeast YWL63 and YWL490 were hybridized with the strain by yeast tetrad dissection method. The tetrad dissection was carried out to obtain the desired strain. [Result] The recombinant yeast strains with different genotypes and mating types were successfully constructed. YT52 successfully over-expressed Num1 with a size of about 340 kD. YT53 successfully over-expressed 340 kD Num1 and 75 kD Cdh1, and YT57 successfully over-expressed 75 kD of Cdh1. [Conclusion] The method of homologous recombination successfully labeled CDH1 and induced protein over-expression, and constructed an over-expression strain for Cdh1 and Num1 interaction experiments by yeast tetrad dissection thereby laying the foundation for revealing whether APC/C mediates the degradation of Num1 and its mechanism.

Key words Over-expression; Yeast tetrad dissection; Cdh1; Num1

在不对称细胞分裂期间, 有丝分裂纺锤体必须正确地定向, 以确保细胞命运决定因子准确地分配到每个子细胞^[1]。在芽殖酵母的有丝分裂中, 细胞膜锚定的 dynein 对细胞质微管施加拉力, 将有丝分裂纺锤体移动到芽体颈部, 而 dynein 的锚定则需要 Num1^[2]。Num1 (nuclear migration 1, 核迁移)^[3-5] 是一个 313 kD 的大分子蛋白质, 含有 N-末端卷曲螺旋(CC)结构域, 中间一个 EF hand motif, 12 个由 64 个氨基酸组成的重复区域以及 C-末端 pleckstrin 同源性(PH)结构域^[6]。Num1 定位于细胞膜, 并与 dynein 相互作用。其中, CC 结构域直接与线粒体膜相互作用, 也是 Num1 和动力蛋白相互作用所必需的, 而与 PI₄,₅P₂ 高度特异性结合的 PH 结构域将 Num1 锚定到细胞质膜上^[6-10]。

APC/C (anaphase-promoting complex) 是一种多亚基 E3 泛素连接酶, 负责细胞周期调节蛋白在中期到后期和有丝分裂期到 G1 期过渡中的泛素化^[11-13]。APC/C 在细胞周期的不同阶段分别由 2 种特异性激活因子 Cdh1 和 Cdc20 调控^[14-15], 只有与共激活因子相结合时, APC/C 在细胞周期中才能起到泛素化 Cyclins 的作用。研究表明, 具有活性的

APC/C 作用底物具有 2 种共同的降解基序: D box 和 KEN motif。这些底物通过这种降解基序特异性结合 APC/C 及其共激活因子复合物^[16-18]。

前期通过对 Num1 进行序列分析, 发现 Num1 序列中包含数个分别与 APC 的激活蛋白 Cdh1 和 Cdc20 结合的保守基序 KEN motif 和 D box, 意味着 Num1 的降解可能与 APC/C 有关。因此, 通过检测 APC 共激活因子与 Num1 之间有无相互作用, 进而了解 APC/C 是否可能介导 Num1 的降解。该研究利用同源重组原理先在 YWL630 菌株中成功构建 Gal-3HA-Cdh1 重组蛋白, 接着采取酵母四分体解离的方法构建 COIP 所需过表达菌株。在利用四分体分析技术的研究中, 常采用酿酒酵母作为试验对象。2 个配型不同的亲代酵母菌株杂交而产生 4 个黏在一起的子代酵母, 称为四分体。为了使这个四分体分开称为 4 个单独的孢子, 利用四分体解离显微镜在物理上进行孢子解离, 继而经过筛选获得不同基因型。笔者通过构建过表达 Cdh1 和 Num1 菌株, 通过免疫共沉淀试验检测 Cdh1 和 Num1 的相互作用, 旨在为揭示 APC/C 是否介导 Num1 的降解及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。DH5 α 大肠杆菌细胞(北京鼎国昌盛); 酿酒酵母 YWL630 基因型: MAT α Num1- γ EGFP :: spHIS5 ura3-52 lys2-801 leu2- Δ 1 his3- Δ 200 trp1- Δ 63; YWL490 基因型: MAT α

基金项目 国家自然科学基金项目(31371366, 31401155); 中南民族大学基本科研业务费专项资金项目(3212018CZY18021)。

作者简介 李巧巧(1994—), 女, 云南曲靖人, 硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。* 通信作者, 教授, 硕士生导师, 从事细胞周期研究。

收稿日期 2019-03-18

TRP1-GAL1-Num1-YFP-HIS ura3-52 lys2-801 leu2-Δ1 his3-Δ200 trp1-Δ63; YWL63 基因型; *MATα DYN1-3GFP :: TRP1 ura3-52 lys2-801 leu2-Δ1 his3-Δ200 trp1-Δ63*; 质粒 PFA6a-TRP1-GAL1-3HA。

1.1.2 培养基及试剂。YPD 培养基和缺乏相应氨基酸的 SD (synthetic define) 培养基; Lithium-Sorb 溶液; 10 mmol/L LioAC, 100 mmol/L Sorbitol, 10 mmol/L Tris-base, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; PEG 溶液: 10 mmol/L LioAC, 40% PEG, 10 mmol/L Tris-base, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 转膜液: 190 mmol/L Glycine, 0.05% SDS, 25 mmol/L Tris-base, 10% 甲醇; TBST 溶液: 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-base, 0.05% Tween 20, pH 8.0。

1.2 方法

1.2.1 GAL1-3HA-CDH1 NUM1-GFP 菌株的构建。利用聚合酶链式反应(PCR)对 *Cdh1* 进行过表达启动子和蛋白标签的标记。

1.2.1.1 PCR 扩增转化片段。为了后续对 *Cdh1* 蛋白表达进行分析,去掉了 *CDH1* 的起始密码子,并在 ORF 前接上蛋白标签 *3HA* 的编码序列,为了能检测到高水平的蛋白量,在其 N 末端接上了一个卡那霉素抗性筛选标记 *KAN^r*,便于在含 G418(0.02 mg/mL)抗性的 YPD 培养基上选择转化子。用于标记 *CDH1* 的转化片段 *KAN^r-PGAL-3HA* 的正向引物序列: 5'-GAACCTCATGGATTACAATACCTTACTGACTTGGCCA-TCTCAAACCTTGGTTCATCCTCTAAGAATTCGAGCTCGTTTAA-AC-3'; 反向引物序列: 5'-AGAACCCTTGAGTGGGGAGGAGGAAG-GCGTATTATTCATGAATGGGTTTCAGGTTTGTGGAGCA-CTGAG-CAGCGTAATCTG-3'。以质粒 PFA6a-TRP1-GAL1-3HA (Addgene) 为模板进行目的片段的扩增,50 μL PCR 扩增体系: ddH₂O 33 μL; 5×SF PCR Buffer 10 μL; dNTPs mixture 1 μL; 正向引物(10 μmol/L) 2 μL; 反向引物(10 μmol/L) 2 μL; 模板 DNA 1 μL; Phanta super fidelity DNA polymerase 1 μL。

PCR 扩增程序: 98 °C, 3 min; 98 °C, 10 s, 45 °C, 20 s, 72 °C, 1 min, 2 个循环; 98 °C, 10 s, 45 °C, 20 s, 72 °C, 1 min, 33 个循环; 72 °C, 5 min; 12 °C 保存。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后用凝胶回收试剂盒回收。

1.2.1.2 酵母感受态的制备。从-80 °C 冰箱将菌株拿出在 YPD 固体培养基上划线置于 30 °C 恒温培养箱培养 1~2 d 后,挑菌至 3 mL YPD 液体培养基中放置于 30 °C 摇床, 200 r/min 培养 24 h 左右;次日吸取 3 μL 菌液至新的 30 mL YPD 液体培养基中,30 °C, 200 r/min 摇床中培养至对数期 (OD₆₀₀ 为 0.6 左右)即可收集;将 30 mL 对数期生长的 YWL630 细胞 3 000 r/min 离心 3 min 后弃上清,用 10 mL 灭菌水清洗细胞,3 000 r/min 离心 1 min 弃上清。再用 3 mL Lithium-Sorb 溶液悬浮细胞,3 000 r/min 离心 2 min,吸弃上清;向沉淀中加入 360 μL Lithium-Sorb 和 40 μL 鲑鱼精子 DNA (作为载体 DNA,制备感受态之前将其在沸水中煮 10 min 后放回冰上冷却至 0 °C) 悬浮细胞,再分装到新的 1.5 mL EP 管中,每管 100 μL 左右,放置在-80 °C 保存。

1.2.1.3 转化。从-80 °C 冰箱将近期制备的 YWL630 感受态取出置于冰上,接着吸取 10 μL 用于转化的 PCR 产物加入到 100 μL 感受态细胞中轻轻混匀,再加入 600 μL PEG 溶液混匀,在室温下静置 30 min;加入 38 μL 二甲基亚砜(DMSO)混匀后在 42 °C 水浴中热激 5 min;3 000 r/min 离心 2 min,吸弃上清;向白色沉淀中加入 50 μL 灭菌水重悬细胞,将细胞均匀涂布在含有 G418(0.02 mg/mL)抗性的 YPD 固体培养基上,用封口膜封口并倒置在 30 °C 恒温箱培养 2~3 d 等待克隆长出。

1.2.1.4 克隆的筛选。待单克隆长出后,挑取其中数个划线在筛选固体培养基上置于 30 °C 培养,此为第一次划线;等待 2~3 d 克隆长出后,重复一次划线,此为第二次划线。从第二次划线的培养基上挑取 4 个克隆扩大培养,待提取总蛋白进行鉴定。

1.2.2 重组转化子的过表达鉴定。

1.2.2.1 酵母过表达菌株的细胞培养。从-80 °C 冰箱将菌株取出,在 YPD 固体培养基上划线并置于 30 °C 恒温培养箱培养 1~2 d;待克隆长出后,第 1 天挑取适量菌落至 3 mL YPD 液体培养基中并放置于 30 °C 摇床,200 r/min 培养 24 h 左右;细胞长至饱和后,吸取 4 μL 菌液至含 2% (W/V) 棉子糖 (Raffinose) 的液体 YPA 培养基中,置于摇床中 200 r/min、30 °C 培养 16 h;接着将细胞 3 000 r/min 离心 1 min 后弃上清,向沉淀中加入含 2% (W/V) 半乳糖 (Galactose) 的液体 YPA 培养基,继续置于 30 °C 摇床中培养 4 h 左右即可收集细胞。

1.2.2.2 TCA 法提取总蛋白。从培养好的对数期细胞中吸取 1.5 mL 菌液至 1.5 mL 收集管中,3 000 r/min 离心 2 min 后弃上清继续 3 000 r/min 离心 1 min,吸弃上清并收集沉淀;向沉淀中加入 100 μL 20% 的三氯乙酸(TCA)重悬混匀后,再加入直径 1 mm 的玻璃珠至与液面相平,放在冰上静置短暂时间;室温下用细胞振荡破碎仪破碎 2 min,其中每破碎 1 min 后即刻将收集管在冰上静置冷却 1 min;接着用针头在收集管底部戳一个小孔,并将其插入另一个新的 1.5 mL EP 管中,置于 4 °C 冷冻离心机中 3 000 r/min 离心 3 min 后丢弃装有玻璃珠的收集管;继续将装有细胞裂解液的 1.5 mL EP 管 3 000 r/min 离心 5 min 后,收集沉淀;向白色沉淀中加入 40 μL 2x Protein Loading Buffer 和 40 μL Tris-HCl (pH 8.0),用移液器吹打混匀后,封口膜封口并继续静置于冰上;将离心管放置于煮沸的 100 °C 水中煮 5 min 后,12 000 r/min 离心 1 min,上清用于蛋白质免疫印迹分析或保存在-20 °C 备用。

1.2.2.3 Western Blot 分析。在常规的蛋白免疫印迹分析中,蛋白经 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳 (SDS-PAGE, 配方见表 1) 分离后,使用半干转膜仪在含 10% 甲醇的转膜液中转移到 PVDF 膜上。蛋白膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液浸泡轻摇 1 h 后用 HA 抗体 (THETMc-HA Tag Antibody, mAb, Mouse, GenScript) 或 GFP 抗体 (Mouse Anti GFP Monoclonal-Antibody, 兴华基因) 室温下孵育 2 h, TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10 min,再用二抗室温下孵育 1 h。结合了抗体的

蛋白膜用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10 min,随后用 ECL 超敏化学发光试剂盒染色,再用凝胶成像仪曝光检测。

表 1 聚丙烯酰胺凝胶配方

组分 Component	含量 Content	
	3% 浓缩胶 3% concentrated glue (10 mL)	10% 分离胶 10% separating gel (15 mL)
ddH ₂ O	6.40	6.10
30% acrylamide	1.00	5.00
4 x upper Buffer pH 6.8	2.50	—
4 x lower Buffer pH 8.8	—	3.75
10% APS	0.10	0.10
TEMED	0.01	0.01

1.2.3 重组菌株基因组 DNA 的提取及 PCR 鉴定。挑取蛋白表达量较高的一个克隆培养过夜提取基因组 DNA,酵母基因组的提取使用酵母基因组快速提取试剂盒(康为世纪),详细步骤见试剂盒说明书。

以提取的基因组 DNA 为模板,对标记位点片段进行 PCR 检测,其中正向引物序列:5'-GAGGCGATAAG-GAAGAAAGCGCC-3',反向引物序列:5'-AGAACCCTT-GACTGGGGAGGAGGAAGGCGTATTATTCATGAATGGGTTTC-AGGTTTGTGGAGCACTGAGCAGCGTAATCTG-3'。

将 PCR 产物送测,测序结果显示构建成功,对该菌株进行保菌并命名为 YT23。

1.2.4 酵母四分体解离法构建重组过表达菌株及表达鉴定。

(1) 亲代酵母菌株的杂交:将-80℃冰箱取出的酵母菌株 YT23(α)、YWL63(a)、YWL490(a)在 YPD 固体培养基上划线,倒置 30℃恒温箱培养 1~2 d;待菌落长出后,用 1 mL 枪头分别挑取配型不同的 YT23 和 YWL63 以及 YT23 和 YWL490 一小块菌落混匀在新的 YPD 培养基上,30℃恒温箱培养 24 h 后用枪头挑取适量菌落转移至 3 mL SPM 液体培养基中,30℃、200 r/min 培养 3~4 d。

(2) 酵母细胞壁的处理:吸取 70 μL 细胞液 3 000 r/min 离心 1 min 收集沉淀,加入 100 μL Lisorb 和 7.5 μL Zymolase 轻轻混匀。37℃恒温箱处理 8 min 30 s,吸取 20 μL 滴至 YPD 固体培养基一侧使之从上往下顺流,待菌液稍干即可用于四分体的解离。

(3) 四分体的解离和筛选:使用酵母解离显微镜 MSM400 操作系统对四分体进行分离,详细步骤见 Singer MSM System 400 说明书,完成后置于 30℃恒温箱培养 1~2 d。为了筛选所需要的基因型:*GAL1-NUM1-YFP*、*GAL1-NUM1-YFP GAL1-3HA-CDH1*、*GAL1-3HA-CDH1*,将 YPD 培养基上生长的孢子复制到 SD-HIS、SD-TRP、含 G418 (20 mg/mL)抗性的 YPD 以及 SC 固体培养基上,30℃恒温箱培养 2~3 d,具体筛选情况见表 2。

(4) 将筛选得到的菌落转移至 3 mL YPD 液体培养基中培养,收集对数期细胞提取总蛋白并进行 Western Blot 鉴定。

2 结果与分析

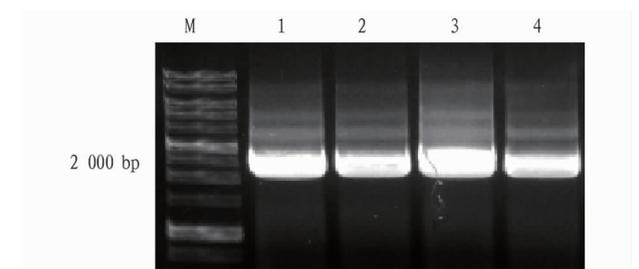
2.1 GAL-3HA-Cdh1 Num1-GFP 重组菌株的构建和表达鉴定 将实验室保存的质粒 PFA6a-TRP1-GAL1-3HA 吸取

少量进行转化并提取大量质粒 DNA 作为模板,并利用酵母同源重组原理对目的片段 *GAL-3HA-CDH1* 进行 PCR 扩增,

表 2 孢子复制缺陷培养基筛选情况

亲代酵母 Parental yeast	四分体 Tetrad	孢子 Spore	含 G418 抗性的 YPD YPD containing G418 resistance			交配型 Mating type		
			SD-HIS	SD-TRP				
YT23 x YWL490	A	A ₁	+	+	-	α		
		A ₂	+	+	-	α		
		A ₃	+	-	+	a		
		A ₄	+	-	+	a		
		B ₁	+	+	-	a		
		B ₂	+	+	+	α		
		B ₃	+	-	+	α		
		B ₄	+	-	-	a		
	C	C ₁	+	-	-	a		
		C ₂	+	+	-	a		
		C ₃	+	+	+	α		
		C ₄	+	-	+	a		
		YT23 x YWL63	C	C ₁	+	+	-	α
				C ₂	-	+	+	a
				C ₃	-	-	-	α
				C ₄	+	-	+	a
D	D ₁	+	+	-	a			
	D ₂	-	-	+	α			
	D ₃	+	-	-	α			
	D ₄	-	+	+	a			

扩增正确片段见图 1。将 PCR 扩增产物回收后转化及划线筛选后,选取部分克隆经 YPD 培养并用 2% 半乳糖诱导过表达启动子,提取总蛋白利用 Western Blot 对重组蛋白 Gal-3HA-Cdh1 表达水平进行分析鉴定,结果见图 2。由图 2 可知,1 和 2 号泳道相比 3 和 4 号显示更高的蛋白表达量,说明克隆 1 和克隆 2 在酵母菌株 YWL630 细胞内成功过表达。将鉴定得到过表达的 1 号克隆提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,结果见图 3。用其回收产物进行测序,测序结果显示 Cdh1 过表达菌株构建成功,保菌并将其命名为 YT23。



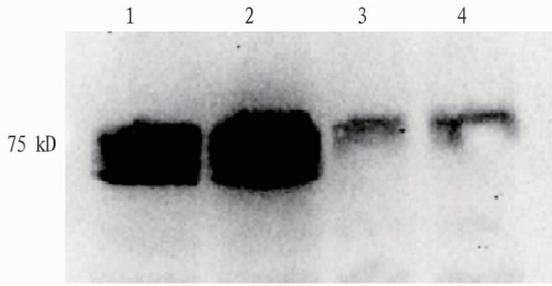
注:M.DLI0000;1~4.KAN-PGAL1-3HA

图 1 KAN-PGAL1-3HA 的 PCR 检测

Fig.1 PCR detection of KAN-PGAL1-3HA target fragment

2.2 酵母四分体解离法构建重组菌株的筛选鉴定

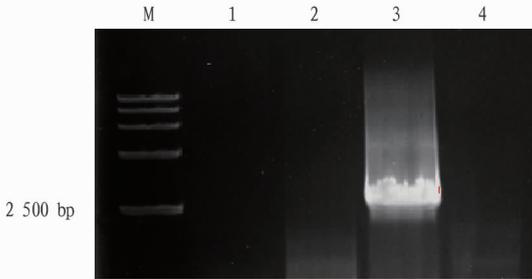
2.2.1 重组菌株的筛选结果。经 2 个配型不同的亲代酵母杂交得到四分体并进行解离,全部筛选结果见表 3,其中筛选得到了 Num1 和 Cdh1 免疫共沉淀试验所需过表达菌株:YT52、YT53、YT57。此外其余菌株保存在-80℃以供备用。



注:1~4.KAN-GAL1-3HA-Cdh1

图2 GAL1-3HA-Cdh1 蛋白的 Western Blot 分析

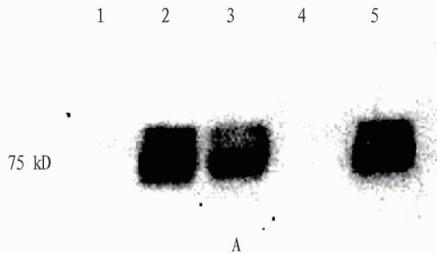
Fig.2 Western Blot analysis of GAL1-3HA-Cdh1 protein



注:M.DL15000;1~4.KAN-PGAL1-3HA-CDH1

图3 基因组 PCR 检测标记位点片段

Fig.3 Genomic PCR detection of marker locus



注:A图中1.YT52,2.YT53,3.YT57,4.YWL490(负对照),5.YT23(正对照,HA 抗体孵育);B图中1.YT52,2.YT53,3.YT57,4.YWL490(正对照),5.YT23(负对照,GFP 抗体孵育)

Note:In figure A, 1. YT52,2.YT53,3.YT57, 4. YWL490 (negative control), 5.YT23 (positive control, HA antibody incubation); in figure B, 1. YT52, 2. YT53, 3. YT57, 4. YWL490 (positive control), 5. YT23 (negative contrast, GFP antibody incubation)

图4 重组蛋白的 Western Blot 分析

Fig.4 Western Blot analysis of recombinant proteins

3 结论与讨论

该研究旨在构建过表达 Cdh1 和 Num1 的重组菌株用于后期试验。首先在 CDH1 位点前插入过表达启动子、蛋白标签和筛选标记,通过半乳糖诱导使该蛋白过表达,成功构建了 GAL-3HA-CDH1 NUM1-GFP 重组菌株。使用酵母四分体解离技术的方法构建了不同基因型的重组菌株,并从中筛选研究中所需要的菌株,经过 Western Blot 分析,已验证 Cdh1 和 Num1 蛋白成功过表达且每个菌株中基因型也是正确的。

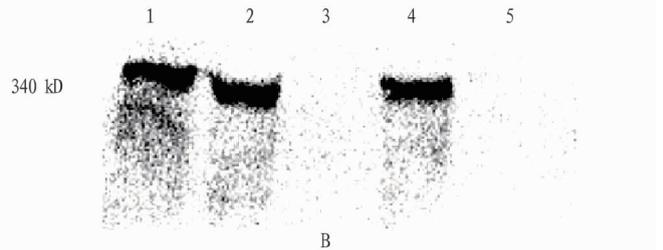
该试验中,根据酵母菌株的构建总结了以下经验:首先需要熟练掌握同源重组原理设计扩增引物用于转化插入基因组正确位点。其次,每一个步骤均要严格控制,如缺陷型固体培养基的配制、引物扩增的条件、感受态的制备和转化等过程中细节的控制十分重要。另一方面,四分体解离的方法与同源重组转化的方法相比,该方法步骤简单,试验周期

表3 孢子复制缺陷培养基筛选结果

Table 3 Screening of spore replication defective medium

亲代酵母 Parental yeast	孢子 Spore	筛选得到的菌株 Screened strains	交配型 Mating type	命名 Name
YT23 x	B ₁	TRP-GAL-NUM1-YFP-HIS	a	YT52
YWL490	B ₂	KAN ^r -GAL1-3HA-CDH1	α	YT53
	B ₃	TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS		
	B ₃	KAN ^r -GAL1-3HA-CDH1 NUM1-GFP-HIS	α	YT55
	C ₂	TRP-GAL-NUM1-YFP-HIS	a	YT56
	C ₃	KAN ^r -GAL1-3HA-CDH1 TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS	α	YT54
YT23 x YWL63	D ₂	KAN ^r -GAL1-3HA-CDH1	α	YT57

2.2.2 YT52、YT53、YT57 重组蛋白的 Western Blot 鉴定。将 YWL490、YT23、YT52、YT53、YT57 经 2% 半乳糖诱导(其中 YWL490 和 YT23 互为正对照和负对照)培养收集对数期细胞提取总蛋白进行免疫印迹分析,结果见图 4。使用 HA 一抗对 PVDF 膜进行孵育,结果见图 4A。由图 4A 可知,在 75 kD 处有单一条带出现且蛋白表达量较高,说明在重组酵母菌株 YT53 和 YT57 中,Cdh1 蛋白成功过表达;使用 GFP 一抗重新孵育,结果见图 4B。由图 4B 可知,在 340 kD 处具有高表达量的单一蛋白条带,说明在重组酵母菌株 YT52 和 YT53 中,Num1 蛋白成功过表达。



较短,成功率较高。此方法的熟练使用为以后重组菌株的构建提供了便利,重组蛋白的成功构建为 Num1 在细胞周期中的作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] BOWMAN S K, NEUMÜLLER R A, NOVATSKOVA M, et al. The *Drosophila* NuMA homolog mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division[J]. *Developmental cell*, 2006, 10(6): 731-742.
- [2] FARKASOVSKY M, KÜNTZEL H. Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions[J]. *The journal of cell biology*, 1995, 131(4): 1003-1014.
- [3] BLOOM K. Nuclear migration; Cortical anchors for cytoplasmic dynein[J]. *Current biology*, 2001, 11(8): 326-329.
- [4] FARKASOVSKY M, KÜNTZEL H. Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac1p and cytoplasmic microtubules in budding yeast[J]. *The journal of cell biology*, 2001, 152(2): 251-262.
- [5] KORMANEC J, SCHAFFNER-GERSTENSCHLÄGER I, ZIMMERMANN F K, et al. Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein[J]. *Molecular and general genetics*, 1991, 230(1/2): 277-287.

3 结论与讨论

从土壤中共分离得到 4 株溶磷解钾菌,液体培养试验结果显示,4 株菌株中,菌株 LW-3 的解磷和解钾能力最强,溶解无机磷量为 19.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相对增加 38.64%,溶解有机磷量为 17.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相对增加 28.57%,溶解钾量为 33.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相对增加 15.96%,是理想的菌肥生产用菌株,经鉴定确定该菌株为纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 LW-3 (*Lysinibacillus fusiformis* LW-3)。

除具有溶磷解钾作用外,研究表明,纺锤形赖氨酸芽孢杆菌可产大量胞外多糖、氨基甲酸酯水解酶、植酸酶等有益物质,具有溶藻、降解原油、除铅、防治水稻纹枯病等特性^[11-18],对研究开发生物菌肥、生物农药、动物饲料添加剂、水体净化剂、土壤修复剂等具有重要意义,开发应用前景极其广阔。

参考文献

[1] 尹逊霄,华璐,张振贤,等.土壤中磷素的有效性及其循环转化机制研究[J].首都师范大学学报(自然科学版),2005,26(3):95-101.

[2] ADESEMOYE A O, KLOEPPER J W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2009, 85(1):1-12.

[3] 鲁如坤,时正元,顾益初.土壤积累态磷研究II.磷肥的表现积累利用率[J].土壤,1995,27(6):286-289.

[4] 周鑫斌,洪坚平,谢英荷.溶磷细菌肥对石灰性土壤磷素转化的影响[J].水土保持学报,2005,19(6):70-73.

[5] 罗娜,周德明,徐睿,等.降香黄檀、檀香根际解钾菌的筛选与活性研究[J].热带作物学报,2016,37(5):964-970.

[6] 郝晶,洪坚平,刘冰,等.不同解磷菌群对豌豆生长和产量影响的研究[J].作物杂志,2006(1):73-76.

[7] 郝春花,张强,卢朝东,等.选用解磷菌剂改善缺磷土壤磷素的有效性[J].农业工程学报,2005,21(5):56-59.

[8] 中国土壤学会.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业出版社,1999.

[9] 万璐,康丽华,廖宝文,等.红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J].林业科学研究,2004,17(1):89-94.

[10] 张洁,徐桂花,尤丽琴.16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J].农产品加工(创新版),2009(4):47-49,69.

[11] 刘阳,陈敏,庞昕,等.一株产胞外多糖的山药内生细菌 *Lysinibacillus fusiformis* S-1 的分离和鉴定[J].应用与环境生物学报,2014,20(3):382-388.

[12] MAHENDRAN S, VIJAYABASKAR P, SARAVANAN S, et al. Structural characterization and biological activity of exopolysaccharide from *Lysinibacillus fusiformis*[J]. African journal of microbiology research, 2013, 7(37):4629-4639.

[13] 刘晓慧,方芳,夏小乐,等.定点突变改造提高纺锤形赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸酯水解酶稳定性[J].生物工程学报,2016,32(9):1233-1242.

[14] 孔志园,丁轲,余祖华,等.一株土壤源高产植酸酶芽孢杆菌的分离与鉴定[J].河南科技大学学报(自然科学版),2012,33(4):65-68,73.

[15] 张菊,韦坤逢,李灿灿,等.小麦内生溶藻细菌 ZB1 的分离鉴定及其溶藻特性[J].西南农业学报,2017,30(5):1068-1073.

[16] 李国丽,曾小英,翟立翔,等.一株石油降解菌 *Lysinibacillus fusiformis* 23-1 的筛选鉴定及原油降解特性[J].浙江农业学报,2018,30(7):1229-1236.

[17] ADEBO O A, NJOBEH P B, MAVUMENGWANA V. Degradation and detoxification of AFB1 by *Staphylococcus warneri*, *Sporosarcina* sp. and *Lysinibacillus fusiformis*[J]. Food control, 2016, 68:92-96.

[18] 罗文芳,魏松红,王海宁,等.水稻纹枯病生防菌的筛选与鉴定[J].沈阳农业大学学报,2017,48(6):660-665.

(上接第 4 页)

[6] TANG X Y, GERMAIN B S, LEE W L. A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning[J]. The journal of cell biology, 2012, 196(6):743-756.

[7] LACKNER L L, PING H, GRAEF M, et al. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2013, 110(6):458-467.

[8] PING H A, KRAFT L M, CHEN W T, et al. Num1 anchors mitochondria to the plasma membrane via two domains with different lipid binding specificities[J]. The journal of cell biology, 2016, 213(5):513-524.

[9] TANG X Y, PUNCH J J, LEE W L. A CAAX motif can compensate for the PH domain of Num1 for cortical dynein attachment[J]. Cell cycle, 2009, 8(19):3182-3190.

[10] STEGMEIER F, RAPE M, DRAVIAM V M, et al. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities[J]. Nature, 2007, 446(7138):876-881.

[11] STEVERMANN L, LIAKOPOULOS D. Molecular mechanisms in spindle positioning: Structures and new concepts[J]. Current opinion in cell biology, 2012, 24(6):816-824.

[12] BOCHIS O V, FETICA B, VLAD C, et al. The importance of ubiquitin E3

ligases, SCF and APC/C, in human cancers[J]. Clujul medical, 2015, 88(1):9-14.

[13] PESIN J A, ORR-WEAVER T L. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24:475-499.

[14] ZACHARIAE W, NASMYTH K. Whose end is destruction: Cell division and the anaphase-promoting complex[J]. Genes Dev, 1999, 13(16):2039-2058.

[15] PFLEGER C M, KIRSCHNER M W. The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1[J]. Genes & development, 2000, 14(6):655-665.

[16] HUANG J N, PARK I, ELLINGSON E, et al. Activity of the APC^{Cdh1} form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p[J]. The journal of cell biology, 2001, 154(1):85-94.

[17] SETHI N, MONTEAGUDO M C, KOSHLAND D, et al. The CDC20 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, a beta-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes[J]. Molecular & cellular biology, 1991, 11(11):5592-5602.

[18] QIN L, GUIMARÃES D S, MELESSE M, et al. Substrate recognition by the Cdh1 destruction box receptor is a general requirement for APC/CCdh1-mediated proteolysis[J]. Journal of biological chemistry, 2016, 291(30):15564-15574.