

马芳芳,蒋明义. 外源 ABA 处理的玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):58-61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.015

外源 ABA 处理的玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价

马芳芳^{1,2}, 蒋明义²

(1. 山西农业大学农学院,山西太谷 030801;2. 南京农业大学生命科学学院,江苏南京 210095)

摘要:为深入研究 ABA 信号转导机制以及筛选该信号途径中相关重要蛋白的相互作用,利用 Gateway 技术,以外源 ABA 处理的玉米叶片为材料首先构建了 cDNA 初级文库,初级文库再通过 LR 重组的方式最终构建成为以 pDEST22 为目的载体的酵母双杂交 cDNA 文库。经质量鉴定,该文库的滴度为 3.9×10^6 CFU/mL,文库总容量达到 1.17×10^7 CFU,平均插入 cDNA 片段长度大于 800 bp,重组率大于 95%。结果表明所获酵母双杂交文库质量较高,符合文库构建的标准,保证了文库的覆盖度,为进一步开展互作蛋白筛选的后续工作奠定了基础。

关键词:ABA;玉米;酵母双杂交;cDNA 文库;滴度;重组率;互作蛋白

中图分类号:S513.01;Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0058-04

脱落酸(ABA)是一种重要的植物激素,它在植物生长发育的各个方面,包括种子发育、萌发和休眠、营养生长及对各种生物、非生物胁迫的响应等方面起作用^[1-2]。水分胁迫下(包括干旱、盐渍),植物体通过迅速积累 ABA 以促进气孔关闭以及调节众多基因的表达,从而使植株对逆境环境做出适应反应^[3-6]。大量研究表明,ABA 信号转导是一个非常复杂的网络,许多重要的中间组分如胞内钙离子、钙调素、磷酸肌醇、cADPR、H⁺、活性氧、一氧化氮以及蛋白可逆磷酸化等都在 ABA 信号转导途径中发挥着重要的作用^[7]。然而 ABA 参与的许多信号途径的详细过程特别是具体的分子作用机理仍有待阐明,鉴定参与 ABA 信号途径的细胞组分,并对其功能进行阐明分析,将有助于我们提高对 ABA 信号转导途径的认识。

酵母双杂交系统是一种用来研究蛋白质间相互作用的简便、快速而有效的方法^[8],该方法由 Fields 和 Song 于 1989 年首先建立,至今被广泛应用于生物研究的各个领域^[9-10]。它的一个很重要的功能就是发现新的蛋白质以及发现蛋白质的新功能,即从 cDNA 文库中筛选出与已知蛋白相互作用的未知蛋白,进而为探索该蛋白的相关特性及功能奠定基础^[11-15]。所以,高质量酵母双杂交 cDNA 文库的构建是利用酵母双杂交技术进行大规模互作蛋白筛选的前提和保障^[16]。近年来,针对许多重要农作物如水稻^[17]、小麦^[18]、大麦^[19]、玉米^[20]等,众多学者构建了以不同组织、器官、细胞类型或分化时期为材料的酵母双杂交 cDNA 文库,为相关作物的蛋白质组学研究提供了基础。然而国内外关于外源 ABA 处理的玉

米 cDNA 文库的相关研究还未见报道,本研究以施用外源 ABA 的玉米为材料,利用 Gateway 技术构建了 ABA 处理的玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库,旨在有效地分离与已知蛋白相互作用的靶蛋白,以期为进一步研究 ABA 信号网络提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 以玉米(*Zea mays* L.)杂交种农大 108 为材料,将玉米种子浸泡 12 h 后,25 ℃催芽,挑取发芽一致的种子播于含有营养液的沙土中培养[昼/夜温度 28 ℃/22 ℃,光照度 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,相对湿度 75%,昼/夜光周期 14 h/10 h]。当幼苗的第 2 片真叶完全展开时,用锋利的刀片将玉米幼苗从茎基部快速切割下来,放在纯水中 2 h 以消除伤害胁迫^[21],然后用 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 外源 ABA 进行处理[温度 25 ℃、光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$],在不同的处理时间点(0.25、0.5、1、2、4、8、12、24 h),分别剪取第 2 片叶,迅速置于液氮中冷冻,将最终所得材料混合均匀,-80 ℃保存备用。

1.1.2 菌株和载体 大肠杆菌 DH10B、文库载体 pDONR222(用于构建初级文库)、pDEST22(用于构建酵母双杂交文库)均购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要试剂 Trizol Reagent、CloneMiner cDNA Library Construction Kit、FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit、1 kb Plus DNA Ladder、UltraPure™ Phenol - Chloroform - Isoamyl Alcohol(体积比 25:24:1)购自 Invitrogen 公司;氨苄青霉素、卡那霉素为 Sigma 公司产品;Taq DNA Polymerase、DNA Marker III、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.1.4 引物 M13 Forward,5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13 Reverse,5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; pDEST22 Forward,5'-TATAACGCGTTTGAATCACT-3'; pDEST22 Reverse,5'-AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC-3'。

收稿日期:2015-11-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:30970238);山西农业大学博士启动基金(编号:2013YJ04);山西农业大学科技创新基金(编号:2014022,2014YZ2-5)。

作者简介:马芳芳(1984—),女,山西长治人,博士,讲师,主要从事植物逆境生理学方向的研究。E-mail:mff1984abc@163.com。

所用引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的构建

1.2.1 玉米叶片总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化

取玉米叶片,在预冷的研钵中将其用液氮研磨成细粉,用 Trizol 提取其总 RNA,具体过程参照说明书进行。得到的总 RNA 经过质量及纯度检测之后,用于下一步的 mRNA 纯化操作,具体的纯化过程参照 FastTrack® 2.0 Kit 说明书进行。得到的 mRNA 经质量及纯度检测之后,用于下一步的文库构建操作。

1.2.2 cDNA 初级文库的构建

参照 CloneMiner cDNA Library Construction Kit 说明书,按以下步骤进行:首先将上步纯化得到的 mRNA 进行 cDNA 第 1 链的合成;然后进行 cDNA 第 2 链的合成及纯化;cDNA 与三框重组接头 attB1 Adapter 连接后进行 cDNA 的分级分离及收集;利用 Gateway 技术将收集得到的 cDNA 与入门文库载体质粒 pDONR222 混合进行 BP 重组反应;重组反应产物经 Proteinase K 处理以及纯化之后,利用电转化法转入大肠杆菌 DH10B;加入 1 mL SOC 培养基,37 ℃ 培养 1 h,即为 cDNA 初级文库菌液;加甘油至终浓度 20%, -80 ℃ 保存备用。

1.2.3 酵母双杂交 cDNA 文库的构建

参照 CloneMiner cDNA Library Construction Kit 说明书,将上述得到的 cDNA 初级文库菌液接种于含有卡那霉素抗性的肉汤培养基中,30 ℃ 过夜培养;第 2 天中抽质粒并检测吸光度;将中抽得到的质粒稀释到终浓度 300 ng/μL,取出其中 1 μL,利用 Gateway 技术将其与酵母双杂交文库载体质粒 pDEST22 (含 GAL4 Transcriptional - Activation Domain) 混合进行 LR 重组反应;重组反应产物经 Proteinase K 处理以及纯化之后,利用电转化法转入大肠杆菌 DH10B;加入 3 mL SOC 培养基,37 ℃ 培养 1 h,即为酵母双杂交 cDNA 文库菌液;加甘油至终浓度 20%, -80 ℃ 保存备用。

1.2.4 文库质量的鉴定

1.2.4.1 库容量的鉴定

分别从“1.2.2”节和“1.2.3”节得到的转化后文库细菌原液中取出 10 μL,稀释 1 000 倍后,从中吸出 50 μL 涂布于含有相应抗性的 LB 平板上(初级文库鉴定平板使用卡那霉素抗性、酵母双杂交文库鉴定平板使用氨苄青霉素抗性),37 ℃ 培养 12 ~ 16 h 后进行计数,根据公式:文库滴度(CFU/mL) = 平板克隆数 × 稀释倍数/涂板体积;文库总容量(CFU) = 文库滴度 × 文库总体积,计算出文库的滴度以及总容量。

1.2.4.2 重组率和插入片段长度鉴定

从平板上随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR,初级文库菌落 PCR 使用的引物 Primer 1 和引物 Primer 2 分别是 M13 Forward 和 M13 Reverse,酵母双杂交文库菌落 PCR 使用的引物 Primer 1 和引物 Primer 2 分别是 pDEST22 Forward 和 pDEST22 Reverse,PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 3 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保温。PCR 产物用 1% Agarose 凝胶电泳检测,鉴定插入片段大小和阳性克隆重组率。

2 结果与分析

2.1 玉米叶片总 RNA 和纯化的 mRNA 质量分析

利用 Trizol Reagent 提取了外源 ABA 处理的玉米叶片总

RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见 28S 和 18S 条带明亮清晰,亮度比约 2 : 1,表明该总 RNA 完整性好且基本上未发生降解(图 1)。经总 RNA 紫外分析测定,结果显示 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.95,表明总 RNA 纯度好,符合实验要求,可用于后续实验操作。总 RNA 样品经过分离纯化后得到了 mRNA,电泳图结果可见其在较大范围内呈涂布状分布(图 2),与预期结果相符,说明纯度较高,完整性较好。

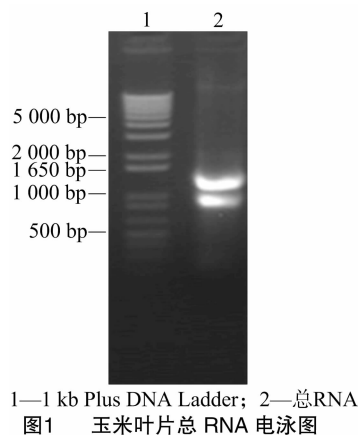


图1 玉米叶片总 RNA 电泳图

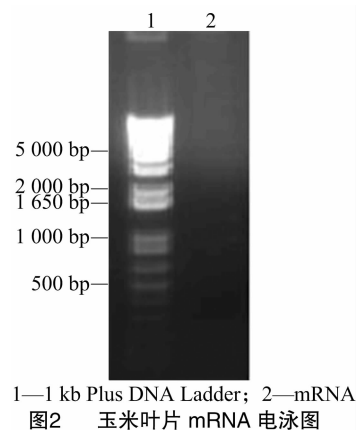


图2 玉米叶片 mRNA 电泳图

2.2 cDNA 初级文库的质量鉴定

2.2.1 库容量测定

从 cDNA 初级文库原始菌液中取出 10 μL,稀释 1 000 倍后,吸出 50 μL 涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板上,37 ℃ 培养 12 ~ 16 h 后计菌落数,结果为 643 个(图 3),菌液量为 1 mL。根据公式:文库滴度(CFU/mL) = 平板克隆数 × 稀释倍数/涂板体积;文库总容量(CFU) = 文库滴度 × 菌液总体积,计算得出:cDNA 初级文库的滴度 = $643 \times 1\,000/0.05 = 1.28 \times 10^7$ CFU/mL;cDNA 初级文库的总容量 =

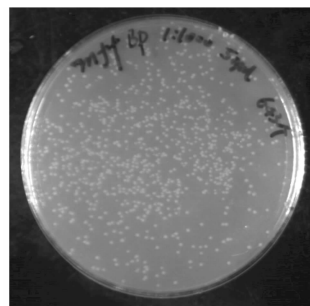
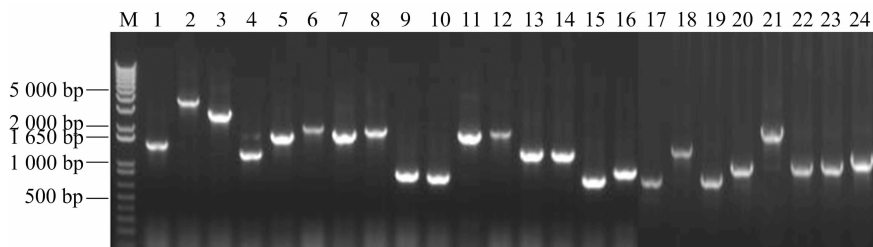


图3 初级文库库容量平板鉴定图

1.28×10^7 CFU/mL $\times 1$ mL = 1.28×10^7 CFU。

2.2.2 重组率和插入片段大小测定 从平板上随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR, PCR 产物用 1% Agarose 凝胶电泳检测, 根据电泳图, 可以看出所有克隆的 PCR 结果都呈阳性, 重

组率达 100%, 插入 cDNA 片段长度大小不等, 主要分布在 500 ~ 3 000 bp 范围内, 多态性较好, 且平均插入片段长度大于 1 000 bp (图 4)。



M—1 kb Plus DNA Ladder; 1~24—菌落PCR结果

图4 初级文库插入片段鉴定

2.3 酵母双杂交文库 cDNA 文库的质量鉴定

2.3.1 库容量测定 从酵母双杂交 cDNA 文库原始菌液中取出 10 μ L, 稀释 1 000 倍后, 吸出 50 μ L 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h 后计菌落数, 结果为 195 个 (图 5), 菌液量为 3 mL。根据公式: 文库滴度 (CFU/mL) = 平板克隆数 \times 稀释倍数 / 涂板体积; 文库总容量 (CFU) = 文库滴度 \times 菌液总体积, 计算得出: 酵母双杂交文库的滴度 = $195 \times 1\,000 / 0.05 = 3.9 \times 10^6$ CFU/mL; 酵母双杂交文库的总容量 = 3.9×10^6 CFU/mL $\times 3$ mL = 1.17×10^7 CFU。

2.3.2 重组率和插入片段大小测定 从平板上随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR, PCR 产物用 1% Agarose 凝胶电泳检测, 从电泳图中可以看出 24 个克隆中有 23 个为阳性结果, 重组率大于 95%, cDNA 插入片段长度大小不等, 主要分布在

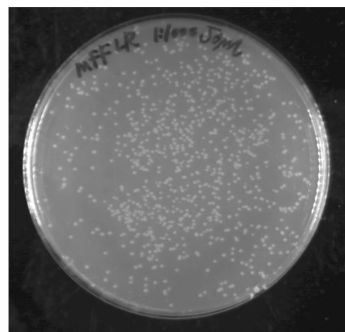
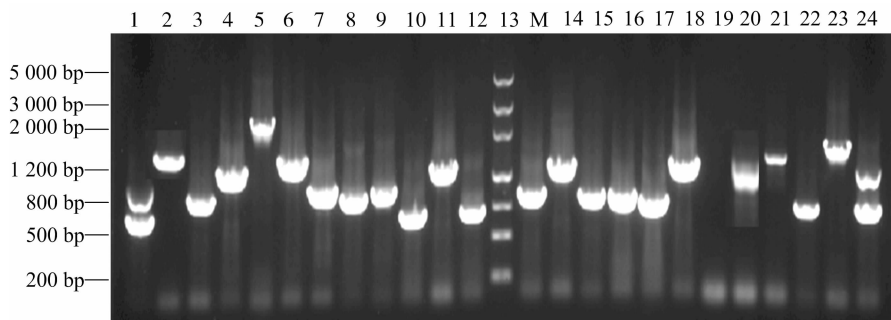


图5 酵母双杂交文库库容量平板鉴定

500 ~ 3 000 bp 范围内, 多态性较好, 且平均插入片段长度大于 800 bp (图 6)。



M—DNA marker III; 1~24—菌落PCR结果

图6 酵母双杂交文库插入片段鉴定

3 讨论

一个高质量酵母双杂交 cDNA 文库的获得, 能够为我们进行大规模互作蛋白的筛选提供前提和保障, 对于我们研究相关生物的功能蛋白质组学具有重要意义。目前很多生物种类的 cDNA 文库已经获得, 并且在此基础上获得了大量的信息^[17~20], 然而关于外源 ABA 处理的玉米 cDNA 文库的相关研究还未见报道。已有的研究发现, 一些蛋白激酶如 MAPK^[22]、CaMK^[23~25]、CDPK^[26] 等在 ABA 诱导的抗氧化防护过程中发挥着重要的作用, 我们拟利用酵母双杂交技术筛选与这些蛋白相互作用的靶蛋白, 进而探究该蛋白在 ABA 信号途径中的具体作用机制, 因此, 外源 ABA 处理的玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的建立就成为了不可或缺的重要基础工具。

RNA 质量的好坏直接影响文库质量的高低, 本研究中提取的玉米叶片总 RNA 纯度高、完整性好且基本上未发生降解, 经分离纯化后得到的 mRNA 在较大范围内呈涂布状分布, 具有较高的纯度和完整性, 可用于后续的文库构建。本研究在构建酵母双杂交 cDNA 文库的过程中使用了 Gateway 技术, 一种基于已研究的非常清楚的 λ 噬菌体位点特异性重组系统, 该系统能够高效而快速地将 DNA 定向重组进入不同的载体系统中, 进而应用于蛋白的表达与功能分析^[27~29]。由于在载体构建时无需经历限制性内切酶的酶切和酶连等过程, 并且通过引入 3 种不同的接头使得插入片段能够包含 3 种不同的读码方式, 这样既降低了嵌合克隆出现的概率、保证了插入片段的序列完整性, 同时又克服了由于插入片段中非编码区带有终止密码子而造成的蛋白提前终止翻译, 有效地提高了文库的完整性和覆盖性^[30]。

通常一个高质量的 cDNA 文库,其库容量应至少大于 1×10^6 CFU,这样才能保证 cDNA 种类的完整性以及文库的代表性。本试验对构建的玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的分析结果表明,库容量为 1.17×10^7 CFU,保证了文库的覆盖度。而平均插入 cDNA 片段长度则体现了文库遗传信息的完整性,如果大部分克隆插入了全长 cDNA 序列,则说明文库的完整性好。本试验构建的文库重组率大于 95%,平均插入 cDNA 片段长度大于 800 bp,说明该文库达到了高质量文库的标准,可以用来进行后续的大规模互作蛋白的筛选试验。

参考文献:

- [1] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247 – 273.
- [2] Xu Z Y, Kim D H, Hwang I. ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 807 – 813.
- [3] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, et al. Absciscic acid: emergence of a core signaling network [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 651 – 679.
- [4] Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, et al. ABA – mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants [J]. *J Plant Res*, 2011, 124: 509 – 525.
- [5] Hubbard K E, Nishimura N, Hitomi K, et al. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions [J]. *Genes Dev*, 2010, 24: 1695 – 1708.
- [6] Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 1821 – 1839.
- [7] Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more [J]. *Mol Plant*, 2008, 1: 198 – 217.
- [8] 张雨良, 张树珍, 王健华, 等. 感染高粱花叶病毒甘蔗叶片 cDNA 文库构建及评价 [J]. *热带作物学报*, 2012, 33(6): 1096 – 1100.
- [9] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein – protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340: 245 – 246.
- [10] Song O, Dolan J W, Yuan Y L, et al. Pheromone – dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation [J]. *Genes Dev*, 1991, 5: 741 – 750.
- [11] Walhout A J, Boulton S J, Vidal M. Yeast two – hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm [J]. *Yeast*, 2000, 17: 88 – 94.
- [12] Ito T, Ota K, Kubota H, et al. Roles for the two – hybrid system in exploration of the yeast protein interactome [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 561 – 566.
- [13] Auerbach D, Thaminy S, Hottiger M O, et al. The post – genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives [J]. *Proteomics*, 2002, 2: 611 – 623.
- [14] Chen Y, Xu D. Computational analyses of high – throughput protein – protein interaction data [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, 4: 159 – 181.
- [15] Cho S, Park S G, Lee D H, et al. Protein – protein interaction networks: from interactions to networks [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37: 45 – 52.
- [16] Chien C T, Bart P I, Sternglanz R. The two – hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(21): 9578 – 9582.
- [17] Singh R, Lee M O, Lee J E, et al. Rice mitogen – activated protein kinase interactome analysis using the yeast two – hybrid system [J]. *Plant Physiology*, 2012, 160: 477 – 487.
- [18] 卫晓静, 王华忠, 岳洁瑜. 白粉菌诱导小麦叶片全长 cDNA 文库的构建及质量评价 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(2): 38 – 40.
- [19] 曹玲珑, 李冬兵, 熊大斌, 等. 外源 ABA 处理大麦胚的均一化 cDNA 文库的构建 [J]. *麦类作物学报*, 2014, 34(7): 912 – 916.
- [20] 崔红军, 张军杰, 黄玉碧. 玉米根部酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 161 – 164.
- [21] 薛贝贝, 蒋明义. 外源精胺对玉米叶片细胞溶质抗氧化防护酶的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2008(6): 32 – 34.
- [22] Liu Y. Roles of mitogen – activated protein kinase cascades in ABA signaling [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1 – 12.
- [23] Ma F, Lu R, Liu H, et al. Nitric oxide – activated calcium/calmodulin – dependent protein kinase regulates the abscisic acid – induced antioxidant defense in maize [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 4835 – 4847.
- [24] Shi B, Ni L, Zhang A, et al. OsDMI3 is a novel component of abscisic acid signaling in the induction of antioxidant defense in leaves of rice [J]. *Mol Plant*, 2012, 5: 1359 – 1374.
- [25] Shi B, Ni L, Liu Y, et al. OsDMI3 – mediated activation of OsMPK1 regulates the activities of antioxidant enzymes in abscisic acid signaling in rice [J]. *Plant, Cell Environ*, 2014, 37: 341 – 352.
- [26] Ding Y, Cao J, Ni L, et al. ZmCPK11 is involved in abscisic acid – induced antioxidant defense and functions upstream of ZmMPK5 in the abscisic acid signaling in maize [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64: 871 – 884.
- [27] Bushman W, Thompson J F, Vargas L, et al. Control of directionality in lambda site specific recombination [J]. *Science*, 1985, 230: 906 – 911.
- [28] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site – specific recombination [J]. *Ann Rev Biochem*, 1989, 58: 913 – 949.
- [29] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using *in vitro* site – specific recombination [J]. *Genome Research*, 2000, 10: 1788 – 1795.
- [30] 肖冬来, 邓慧颖, 谢荔岩, 等. 灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建及分析 [J]. *植物保护*, 2011, 37(1): 19 – 23.