

朱佳慧,徐秋芳,袁平平,等. 水稻幼苗酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):47-50.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.009

水稻幼苗酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定

朱佳慧^{1,2}, 徐秋芳², 袁平平^{1,3}, 倪海平², 周益军², 蒋选利³, 杜何为¹

(1. 长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014;

3. 贵州大学农学院,贵州贵阳 550025)

摘要:为解析水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)与寄主水稻的互作机制,筛选水稻中与病毒互作的蛋白,以易感 RBSDV 的水稻品种日本晴 3~4 叶期的组织样品为材料,通过提取总 RNA 后分离获得 mRNA,合成 cDNA 双链后连入 pDONR222 载体,获得初级文库。初级文库的滴度为 6.6×10^6 CFU/mL,库容为 1.9×10^7 CFU,重组率 >95%,插入片段平均长度 >1 kb。提取初级文库质粒,通过重组反应将水稻 cDNA 文库转移至 pGADT7-DEST 载体,构建获得水稻幼苗的酵母双杂交 cDNA 文库,文库的滴度为 4.5×10^6 CFU/mL,库容为 1.3×10^7 CFU,重组率 >95%,cDNA 插入片段平均长度 >1 kb。采用 RBSDV 候选基因进行文库筛选,结果表明所构建的酵母文库可用于筛选病毒互作蛋白。

关键词:水稻;幼苗 cDNA 文库;酵母双杂交;水稻黑条矮缩病毒;滴度;库容;重组率

中图分类号: S435.111.4⁺9; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0047-04

水稻黑条矮缩病是一种重要的水稻病毒病害,病原为水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV),主要通过介体灰飞虱以持久增殖型方式传播。水稻感染 RBSDV 后的典型症状为病株矮缩、叶色浓绿、叶片僵直,茎秆、叶背和叶鞘处出现瘤状突起。该病害自 20 世纪 60 年代和 90 年代在我国流行危害后,曾一度销声匿迹,2006 年以来

由于灰飞虱虫量上升和带毒率提高,水稻黑条矮缩病在江苏、浙江、安徽等地麦轮作区的水稻上普遍发生,2009 年仅江苏省的发病面积达 3.33×10^5 hm²,造成巨大的经济损失^[1-2]。当前生产上栽培的水稻品种对黑条矮缩病的抗性较差,大部分为感病品种,尚未鉴定到高抗品种^[3-4]。

水稻不同生育期对 RBSDV 的敏感性存在差异,3~4 叶期幼苗最易感病^[5]。苗期感病后,植株矮小、心叶短小而僵直,不能抽穗,严重的则出现枯死现象。分蘖期和抽穗期发病,出现包穗,部分分蘖能抽穗,但穗小或包穗,结实差^[6]。水稻感染黑条矮缩病毒后细胞壁结构发生改变^[7],病毒感染后引起的矮缩症状可能与纤维素合成酶及类纤维素合成酶基因及木质素相关基因表达有关^[8-9],病毒影响水稻育性可能是由于病毒的 P7-1 蛋白的表达抑制了花药中木质素合成,

收稿日期:2018-01-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471768);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1053]。

作者简介:朱佳慧(1992—),女,湖北孝昌人,硕士研究生,从事植物病毒学研究。E-mail:942336014@qq.com。

通信作者:杜何为,博士,教授,从事玉米耐渍性形成分子机制的研究。E-mail:duhewei666@163.com。

[3] Silva N C, Sarmiento B, Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(1): 5-10.

[4] Bagella L, Scocchi M, Zanetti M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins[J]. FEBS Letters, 1995, 376(3): 225-228.

[5] Lee D G, Kim P I, Park Y, et al. Antifungal mechanism of SMAP-29 (1-18) isolated from sheep myeloid mRNA against *Trichosporon beigelii*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 295(3): 591-596.

[6] Arzese A, Skerlavaj B, Tomasinsig L, et al. Antimicrobial activity of SMAP-29 against the *Bacteroides fragilis* group and clostridia[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(3): 375-381.

[7] Giacometti A, Cironi O, Ghiselli R, et al. Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2004, 169(2): 187-194.

[8] Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, et al. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes[J]. FEBS Letters, 1999, 463(1/2): 58-62.

[9] Anderson R C, Hancock R E, Yu P L. Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine-derived cathelicidins[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2): 673-676.

[10] 陈琛, 吴三桥, 李新生, 等. 抗菌肽 SMAP-29 结构功能及分子设计策略[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 846-859.

[11] 栾超. 利用 SUMO 融合技术在枯草芽孢杆菌中重组表达抗菌肽 cathelicidin-BF 及其生物活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[12] Vassilevski A A, Kozlov S A, Grishin E V. Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies[J]. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 2008, 2(1): 58-63.

[13] Malakhov M P, Mattern M R, Malakhova O A, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins[J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2004, 5(1/2): 75-86.

[14] Butt T R, Edavettal S C, Hall J P, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43(1): 1-9.

导致植株花药开裂异常,不能结实^[9]。然而,病毒如何影响寄主植物因子进而表现症状的机制还不是非常清楚。

酵母双杂交系统是由 Fields 等于 1989 年首次提出并建立的^[10],是筛选已知蛋白互作因子的有效系统。为解析 RBSDV 与寄主水稻的互作机制,筛选水稻中与病毒互作的寄主蛋白,本研究以易感 RBSDV 的水稻品种日本晴为材料,取水稻敏感生育期 3~4 叶时的组织样本构建酵母双杂交 cDNA 文库,为病毒致病相关寄主因子的筛选提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. *japonica*. cv. Nipponbare) 于实验室光照培养箱中培养至 3~4 叶期,取除根外的组织样品作为试验材料。试验取样时间为 2014 年 8 月,地点为江苏省农业科学院植物保护研究所。

Trizol、CloneMiner II cDNA Library Construction Kit、LR Clonase™ II Enzyme Mix、载体 pDONR™ 222、pDEST22、FastTrack® MAG mRNA isolation Kit 均购自 Invitrogen(USA); 载体 pGADT7-DEST 购自 Clontech(USA)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 用液氮研磨水稻幼苗样品,按照 0.1 g 样品加入 1 mL Trizol 的比例提取总 RNA,具体操作方法参照 Trizol 试剂说明书进行。采用 Nanodrop 2000 核酸分析仪检测总 RNA 的质量及浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.2.2 mRNA 分离纯化 利用 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit 分离并纯化总 RNA 中的 mRNA,具体步骤参照其说明书进行。分离纯化后的 mRNA 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.2.3 cDNA 初级文库构建 cDNA 初级文库的构建试验方法参照 CloneMiner II cDNA Library Construction Kit 文库构建说明书进行。取分离纯化后的 mRNA,加入 Biotin-attB2-Oligo(dT) Primer 和 SuperScript III RT 酶进行反转录,合成 cDNA 第 1 条链,再以 cDNA 第 1 条链为模板,在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DNA Ligase、大肠杆菌 DNA Polymerase I、大肠杆菌 RNase H 以及 T₄ DNA Polymerase 的作用下合成 cDNA 第二链。将双链 cDNA 与三框 attB1 重组接头连接后,进行 cDNA 分级分离并且收集。纯化后的 cDNA 通过重组反应连入 pDONR222 载体,反应产物电转化大肠杆菌 DH10B 后,加入 SOC 培养基,置于 37 ℃,225~250 r/min 摇床培养 1 h。培养结束后,取 10 μL 菌液用于库容量鉴定,剩余培养物加入甘油至终浓度为 20% 存于 -80 ℃,此即为初级文库菌液。

1.2.4 酵母双杂交 cDNA 文库构建 将初级文库菌液接种至 100 mL 含有卡那霉素 (Kan) 的 LB (LB/Kan) 培养基中,采用 PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) 提取初级文库质粒,稀释至 300 ng/μL,在 LR Clonase™ II Enzyme Mix 的作用下与 pGADT7-DEST (Invitrogen) 载体进行重组反应。重组反应体系为:1 μL 文库质粒 (300 ng/μL)、1 μL p GADT7-DEST (300 ng/μL)、4 μL LR Clonase II Mix、14 μL ddH₂O,混匀后置于 25 ℃ 恒温培养箱中反应 16~20 h。

反应结束后电转化 DH10B 感受态细胞,加入 3 mL SOC 培养基培养,获得酵母双杂交 cDNA 文库菌液。取 10 μL 菌液鉴定库容量,其余菌液加甘油至终浓度为 20%, -80 ℃ 保存。

1.2.5 文库重组率、文库滴度和插入片段大小分析

1.2.5.1 文库滴度分析方法 将 10 μL 文库菌液稀释 1 000 倍后,从中取出 50 μL 涂布含有相应抗性的 LB 平板,过夜培养后计算 1 mL 文库菌液中的库容量,即文库滴度 = 平板上的克隆数/平板上涂布菌液的体积 (μL) × 稀释倍数 × 1 000 μL。

1.2.5.2 重组率和插入片段长度分析 在鉴定库容量的平板上随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR,初级文库的 PCR 引物为 pDONR222 载体 2 端的通用引物 M13 正向引物 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') 及 M13 反向引物 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。酵母 cDNA 文库的 PCR 所用引物为 pGADT7 载体的通用引物 T7 (5'-TAATACGACTC ACTATAGGGCGAGCGCCGCCATG-3') 和 3'AD (5'-GTGA ACTTGCGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3')。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,分析扩增片段大小和扩增得到的基因片段数,计算重组率。

1.2.6 候选基因筛选水稻幼苗 cDNA 酵母文库 利用 RBSDV 编码的非结构蛋白 P7-1 作为候选基因筛选本研究构建的水稻幼苗 cDNA 酵母文库,以检测 cDNA 文库质量。pGADT7-RBSDV P7-1 诱饵载体由实验室构建保存,文库筛选方法和步骤参照 Clontech 文库筛选说明书进行。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离纯化

采用 Trizol 提取水稻幼苗总 RNA 后测定浓度并进行质量分析,结果显示,总 RNA 浓度为 1 921.7 ng/μL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}=2.08$ (图 1)。总 RNA 经 1% 凝胶电泳分离可以看到 3 条清晰的条带,分别为 28S、18S 和 5S。28S 亮度高于 18S,且 5S 条带清晰,没有弥散,表明提取的 RNA 质量完好,没有降解 (图 2-A)。

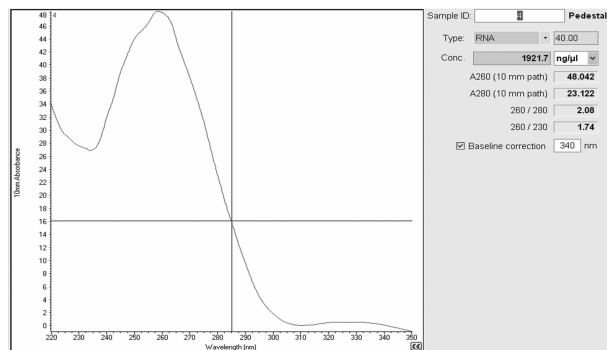
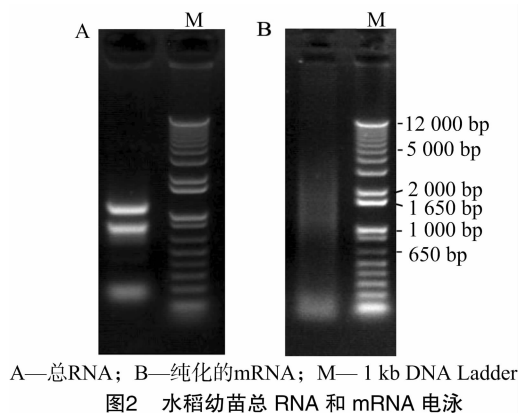


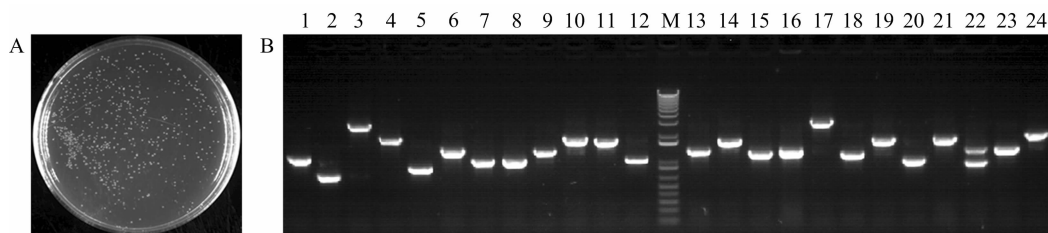
图1 核酸分析仪测定总 RNA 的质量和浓度测定结果

利用试剂盒 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit 分离纯化并获得 mRNA。电泳结果显示纯化所得的 mRNA 是一条弥散的条带,条带最亮部分的范围在较大的分子量范围内 (1~3 kb) (图 2-B),表明分离纯化的 mRNA 未发生降解,可用于 cDNA 文库构建。



2.2 cDNA 初级文库的构建及分析

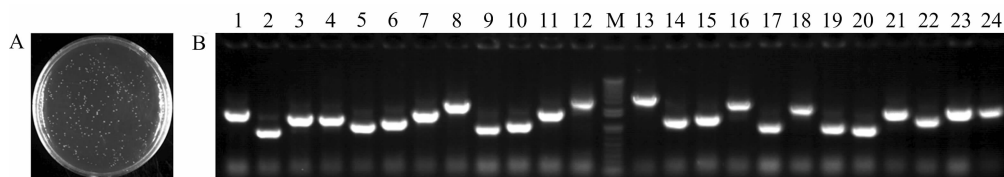
取 10 μL 初级文库菌液稀释 1 000 倍后,从中取出 50 μL 涂布 LB/Kan 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜并计数平板上克隆数(图 3 - A)。根据“初级文库滴度(CFU/mL) = 平板上的克隆数/平板上涂布菌液的体积(μL) \times 稀释倍数 \times 1 000 μL ,文库容量(库容) = CFU/mL \times 文库菌液总体积(mL)”的计算公示,得初级文库滴度为 6.6×10^6 CFU/mL,库容为 1.9×10^7 CFU。随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定,检测文库重组率和 cDNA 插入片段大小,根据重组率 = (有插入片段的反应个数/反应总数) \times 100%,计算得初级文库重组率 > 95%,插入片段大小除有 2 个克隆大小在 650 ~ 850 bp 外,其余克隆插入片段大小都在 1 kb 以上(图 3 - B),符合初级文库的高质量需求。



2.3 酵母双杂交 cDNA 文库的构建与分析

提取初级文库质粒后,将初级文库质粒与载体 pGADT7 - DEST 进行 LR 重组反应,重组后转化 DH10B,获得酵母双杂交 cDNA 文库。取 10 μL 文库菌液稀释 1 000 倍后,分别取出 50 μL 涂布 LB/Amp(氯苄西林)平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜并计数平板上克隆数(图 4 - A)。结果显示,文库滴度为 4.5×10^6 CFU/mL,库容为 1.3×10^7 CFU。从文库中随机挑选 24

个克隆,用 pGADT7 载体的通用引物 T7 和 3'AD 进行 PCR 扩增,分析插入不同大小片段。凝胶电泳结果显示,24 个单克隆均可扩增到 1 个单一的条带,重组率 > 95%,其中 23 个克隆插入片段大小 > 1 kb(图 4 - B)。以上结果表明,构建的 cDNA 酵母文库的库容、重组率和插入片段大小达到标准 cDNA 文库要求,可用于病毒互作基因的筛选。



2.4 筛选文库鉴定

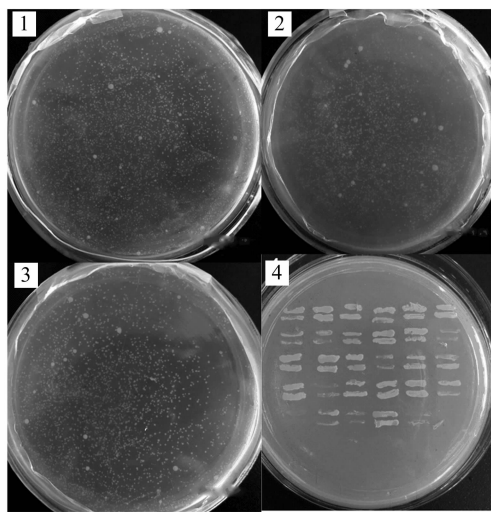
为进一步分析所构建的水稻幼苗 cDNA 文库是否可用于筛选互作蛋白,以 RBSDV 编码的非结构蛋白 P7 - 1 为诱饵,筛选本试验所构建的 cDNA 文库。将诱饵载体 pGADT - P7 - 1 转化酵母菌 AH109 后,制备感受态,提取 cDNA 文库质粒后进行转化,涂布 SD/ - His/ - Leu/ - Trp 平板,挑选生长良好的酵母菌落至 SD/ - His/ - Leu/ - Trp - Ade/X - α - Gal 培养基培养,可筛选获得变蓝的酵母菌落(图 5),表明本研究所构建的水稻日本晴幼苗 cDNA 文库能用来筛选 RBSDV 与水稻互作的蛋白。

3 讨论与结论

酵母双杂交技术能在真核细胞状态下检测蛋白质之间的互作,具有操作简便、灵敏度高特点,已成为研究蛋白质之间相互作用的有效手段。该技术可用于检测已知蛋白质之间的互作、建立基因组编码蛋白间的相互作用图谱、筛选药物作

用位点,还可以从 cDNA 文库中以某个已知蛋白为诱饵进行大规模筛选,寻找与已知蛋白相互作用的未知蛋白,在多个研究领域中共有广泛应用^[11]。

在植物与病毒互作机制研究方面,以病毒蛋白为诱饵筛选寄主植物 cDNA 文库,对于快速获取寄主植物体内的互作蛋白,进而研究互作蛋白在病毒致病过程中的功能具有重要意义。以水稻矮缩病毒与水稻的互作研究为例,Zhu 等以水稻矮缩病毒外壳蛋白 P2 为诱饵筛选 cDNA 文库时发现,P2 蛋白能够与水稻体内赤霉素合成途径关键酶贝壳杉烯氧化酶发生互作,导致赤霉素合成量下降,植物出现矮缩症状^[12]。P2 蛋白还能与水稻中生长素通路 Aux/IAA 家族蛋白 OsIAA10 相互作用,通过与 OsIAA10 的互作阻断 OsIAA10 与 OsTIR 的互作,抑制 26S 蛋白酶体介导的 OsIAA10 降解,使 OsIAA10 蛋白的稳定和积累量增多,导致生长素通路响应受阻,进而有利于 RDV 的复制侵染^[13]。此外,RDV 非结构蛋白 Pns11 筛选水稻 cDNA 文库发现,Pns11 能与 OsSAMS1 互作,



1~3—酵母菌落在 SD/-Leu/-Trp/-His 培养基上的生长状态; 4—酵母菌落在 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 培养基上的生长状态

图5 采用 RBSDV P7-1 筛选水稻幼苗 cDNA 文库的菌落生长状态

增强 OsSAMS1 的活性,导致乙烯含量增加,进而有利于病毒侵染^[14]。此外,酵母双杂交系统还用于研究植物蛋白与病毒的运动蛋白、病毒复制酶类蛋白等之间的互作研究。本研究以高感 RBSDV 的水稻品种日本晴为材料,取 RBSDV 最为敏感的 3~4 叶期组织构建了高质量酵母双杂交 cDNA 文库,并用 RBSDV P7-1 进行筛选可获得阳性克隆,为研究水稻黑条矮缩病毒与水稻的互作奠定了基础。

高质量 cDNA 文库是进行有效筛选互作蛋白的基础。评价 cDNA 文库质量有 2 个重要指标,即 cDNA 文库的代表性和重组序列的完整性^[15-16]。文库的代表性即文库中含有的 cDNA 种类的完整性,可反映来源组织中表达信息(即 mRNA)的完整性程度,是体现文库质量的重要指标,可用库容来衡量。库容是指 cDNA 文库中所包含的独立重组子克隆数量。当文库滴定浓度达到 1.7×10^5 CFU/mL 时,即可认定为有效文库,当文库滴定浓度达到 1×10^6 CFU/mL 时,可以满足低丰度 mRNA 筛选要求^[17]。本研究对提取的总 RNA 以及分离纯化的 mRNA 进行了质量评价,所提总 RNA 和 mRNA 完整性好,未发生降解,构建的酵母 cDNA 文库库容为 1.3×10^7 CFU,滴度为 4.5×10^6 CFU/mL,表明所构建的 cDNA 文库中所含基因信息丰富,可满足常规文库筛选要求,可用于进一步筛选与病毒互作相关重要基因。

重组 cDNA 片段序列的完整性可从重组率及插入片段长度 2 个方面来评价。重组率反映的是文库中所有克隆的阳性率,即文库中含有重组 cDNA 片段克隆的比率。平均插入片段长度即将随机的菌落 PCR 得到的产物片段长度取平均值,其体现了文库中重组的 cDNA 片段的序列完整性。只有重组 cDNA 片段足够长,才更有可能从文库中分离获得目的基因的完整序列。本研究构建的文库重组率 >95%,插入片段大小各异,平均插入片段在 1 000 bp 以上,表明所建文库符合高质量文库要求。用 RBSDV 的候选基因 P7-1 筛选所构建的酵母 cDNA 文库可以筛选到阳性克隆,也说明所构建文库可

以用作病毒互作蛋白筛选。

参考文献:

- [1] 陈声祥,张巧艳. 我国水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病研究进展[J]. 植物保护学报,2005,32(1):97-103.
- [2] 季英华,任春梅,程兆榜. 江苏省近年来新发生的一种水稻矮缩病害病原初步鉴定[J]. 江苏农业学报,2009,25(6):1263-1267.
- [3] 卢百关,秦德荣,方兆伟,等. 苏北地区水稻黑条矮缩病暴发流行原因及防控对策[J]. 江苏农业科学,2009(4):148-149.
- [4] 温以斌,王宝祥,刘艳,等. 水稻品种对黑条矮缩病和灰飞虱抗性的关联性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):222-225.
- [5] Wang H D, Chen J P, Wang A G, et al. Studies on the epidemiology and yield losses from rice black-streaked dwarf disease in a recent epidemic in Zhejiang Province, China[J]. Plant Pathology, 2009, 58(5):815-825.
- [6] 刘艳,秦德荣,徐大勇. 水稻黑条矮缩病研究进展[J]. 江苏农业科学,2010(3):152-154.
- [7] Zhou Y, Xu Z N, Duan C X, et al. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to rice black-streaked dwarf virus in maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(15):4593-4609.
- [8] Jia M, Li Y, Lei L, et al. Alteration of gene expression profile in maize infected with a double-stranded RNA Fijivirus associated with symptom development[J]. Phytopathology, 2011, 13(3):251-262.
- [9] Sun F, Yuan X, Xu Q F, et al. Overexpression of rice black-streaked dwarf virus P7-1 in Arabidopsis results in male sterility due to non-dehiscent anthers[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79514.
- [10] Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230):245-246.
- [11] 王婷,葛怀娜,郭宏. 酵母双杂交技术应用进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(5):392-396.
- [12] Zhu S F, Gao F, Cao X S, et al. The Rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases *in vivo*, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms[J]. Plant Physiology, 2005, 139(4):1935-1945.
- [13] Jin L, Qin Q Q, Wang Y, et al. Rice dwarf virus P2 protein hijacks auxin signaling by directly targeting the rice OsIAA10 protein, enhancing viral infection and disease development[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(9):e1005847.
- [14] Zhao S S, Hong W, Wu J G, et al. A viral protein promotes host SAMS1 activity and ethylene production for the benefit of virus infection[J]. eLife, 2017, 6:e27529.
- [15] Gao X H, Jia R Y, Wang M S, et al. Construction and identification of a cDNA library for use in the yeast two-hybrid system from duck embryonic fibroblast cells post-infected with duck enteritis virus[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(1):467-475.
- [16] 陈宏. 基因工程[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2011:142-148.
- [17] Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome[J]. Cell, 1976, 9(1):91-99.