

路遥,周东,郑银英. 加工番茄 PVY^{N:0} HC-Pro/STV RdRp 酵母双杂交诱饵载体的构建及自激活验证[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):49-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.012

加工番茄 PVY^{N:0} HC-Pro/STV RdRp 酵母双杂交诱饵载体的构建及自激活验证

路遥,周东,郑银英

(石河子大学生命科学学院/石河子大学农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003)

摘要:马铃薯 Y 病毒(potato virus Y,简称 PVY)和南方番茄病毒(southern tomato virus,简称 STV)是加工番茄上非常普遍的病毒,以从加工番茄 cDNA 文库中筛选与病毒功能蛋白互作的基因为目标,构建 PVY HC-Pro/STV RdRp Cyto Trap 酵母双杂交诱饵载体,为抗病基因的筛选工作奠定基础。通过 PCR 技术,扩增 PVY HC-Pro/STV RdRp 片段分别克隆到诱饵载体 pSos,用酶切、测序结果正确的 2 个诱饵载体重组质粒转化酵母感受态 cdc25H,进行自激活检测及毒性验证。将不同组合的酵母转化液涂布于 SD/Glu(-UL)培养基(SD/Glu 指含有葡萄糖的 SD 培养基,-UL 指缺失尿嘧啶、亮氨酸 2 种氨基酸)平板上,于 25℃ 培养 4 d 后,挑取 3 个单菌落分别划线于 2 个 SD/Glu(-UL)和 2 个 SD/Gal(-UL)培养基上,并分别置于 25、37℃ 继续培养 5 d。结果表明,在 25℃ 培养条件下,SD/Glu(-UL)和 SD/Gal(-UL)培养基上酵母菌生长正常;在 37℃ 培养条件下,SD/Glu(-UL)培养基上无酵母菌的生长,SD/Gal(-UL)培养基上阳性组合酵母生长正常,阴性组合酵母均不生长。构建的 pSos-HC-Pro、pSos-RdRp 诱饵载体没有转录自激活活性和毒害作用,可用于 Cyto Trap 酵母双杂交系统。

关键词:加工番茄;PVY;STV;酵母双杂交;自激活;诱饵载体

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0049-03

新疆加工番茄病毒病日益严重,通过田间病毒检测发现马铃薯 Y 病毒(potato virus Y,简称 PVY)和南方番茄病毒(southern tomato virus,简称 STV)是造成新疆加工番茄病害的主要病毒,极大地减少了加工番茄的产量。马铃薯 Y 病毒是马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)的典型成员,根据寄主、生物学症状、基因组序列以及血清学特征可将 PVY 分为普通株系(common or ordinary strain)PVY⁰、烟草叶脉坏死株系(tobacco vein necrosis strain)PVY^N、马铃薯薯刻条斑株系(potato stipple streak strain)PVY^C、PVY^Z以及 PVY⁰和 PVY^N的重组株系 PVY^{NTN}、PVY^{N:0}和 PVY^{N-Wi}[1]。梁学超等通过血清学检测发现,新疆加工番茄上 PVY⁰、PVY^{0/N/C}、PVY^N检出率分别为 20%、18.05%、0,且 PVY 不同株系总检出率达到 24.9%,表明新疆加工番茄上 PVY 主要为 PVY^{N:0}株系和 PVY⁰株系[2]。PVY 为单链正义 RNA 病毒,只包含 1 个开放阅读框(ORF),翻译成 1 个大的多聚蛋白,再利用蛋白酶将其加工成 11 个多功能蛋白(P1、HC-Pro、P3、P3N-PIPO、6K1、CI、6K2、VPg、NIa-Pro、NIb、CP)[3-4]。HC-Pro 是马铃薯 Y 病毒重要的多功能蛋白,可以影响病毒生活史的多个方面,它具有 HC-Pro/P3 特异切割位点识别功能,在病毒基因组翻译、蛋白加工中发挥重要作用,同时参与病毒的复制和症状表达,促进病毒在植物体内细胞间移动

和系统移动,抑制转录后基因沉默和病毒诱导的基因沉默[5-6]。南方番茄病毒是一种双链 RNA(dsRNA)病毒,其基因组核苷酸序列全长为 3 437 nt,含有 2 个部分重叠的开放阅读框,推测 ORF1 编码 377 个氨基酸的外壳蛋白(CP),而 ORF2 编码 762 个氨基酸的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)[7-9]。STV 为种传病毒,尚未发现其他传播机制,目前,对于 STV 的研究还处于初期阶段,对于其侵染番茄植株的分子机制及侵染症状尚不了解。酵母双杂交系统是植物病毒学研究中的重要手段,主要应用于病毒蛋白与寄主编码蛋白相互作用的研究,可以通过酵母双杂交系统筛选与 PVY HC-Pro 和 STV RdRp 基因相关的加工番茄内源基因。由于酵母双杂交系统可能出现假阳性现象,所以需要进行诱饵载体自激活试验,本研究利用以 Sos 恢复系统(一种不依赖转录激活机制的酵母双杂交系统)为原理的胞质酵母双杂交系统,构建 PVY HC-Pro 和 STV RdRp 基因的诱饵载体,并在酵母中进行自激活检测及毒性分析,为从加工番茄 cDNA 文库中筛选与 PVY HC-Pro 和 STV RdRp 互作的寄主因子以及研究 PVY 和 STV 的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及试剂 温度敏感酵母突变株 cdc25H、大肠杆菌(Escherichia coli)DH5α 为笔者所在实验室保存。质粒 pSos、pSos MAFB、pMyr MAFB、pMyr LaminC、pSos Col I、pMyr SB,均购自 Stratagene 公司;T₄ DNA 连接酶及 PCR 产物回收试剂盒均购于 Promega 公司;试验所需内切酶购自 Fermentas 公司;氨基酸、酵母提取物、蛋白胨、葡萄糖等购自生工生物工

收稿日期:2017-04-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460466)。

作者简介:路遥(1991—),男,新疆五家渠人,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究。E-mail:1601404971@qq.com。

通信作者:郑银英,博士,副教授,主要从事植物病毒学与植物分子遗传学研究。E-mail:69825983@qq.com。

程(上海)股份有限公司。

1.1.2 基因与引物 根据笔者所在实验室已获得的 PVY^[2] 和 STV 基因组全长序列设计引物,结合酵母表达载体 pSos 的阅读框和多克隆位点,在 PVY *HC-Pro* 上下游引物的 5'端分别引入 *Bam*H I/*Sal* I 酶切位点,在 STV *RdRp* 上下游引物的 5'端分别引入 *Sal* I/*Sac* I 酶切位点(表 1)。引物合成和序列测定均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 以笔者所在实验室已经克隆、测序的 pGEM-T-PVY *HC-Pro* 及 pGEM-T-STV 质粒 DNA 为模板,利用引物 *HC-Pro* F/*HC-Pro* R、*RdRp* F/*RdRp* R 分别扩

增 *HC-Pro* 和 *RdRp*,扩增结束后,将 5 μL PCR 产物进行电泳,对剩下的扩增产物进行回收。

1.2.2 克隆载体和诱饵载体的构建与鉴定 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收、纯化后与 pGEM-T 载体于 4 ℃ 过夜连接。将连接产物转化 *Escherichia coli* DH5α,37 ℃ 过夜培养,挑取单菌落,37 ℃ 摇菌 16 h,提取质粒 DNA,双酶切鉴定正确的克隆载体进行测序。将测序正确的重组质粒 pGEM-*HC-Pro*、pGEM-*RdRp* 分别用 *Bam*H I/*Sal* I、*Sal* I/*Sac* I 双酶切,同时用相同的酶消化酵母诱饵载体 pSos,回收目的片段,用 T₄ DNA 连接酶于 4 ℃ 连接过夜,构建 pSos *HC-Pro*、pSos-*RdRp* 载体。

表 1 试验所用的引物及序列

引物	序列	限制性内切酶
HC-Pro F	5'-CGGATCCATGGGGTTATGGATTCAATGGT-3'	<i>Bam</i> H I
HC-Pro R	5'-CGTCGACTTAACCAACTCTATAATGTTTTATATC-3'	<i>Sal</i> I
RdRp F	5'-GCTCGACATGAAGTGAATCAGAGGACG-3'	<i>Sal</i> I
RdRp R	5'-GGAGCTCTCTAGTTGGCTTCTCCGTCTCAG-3'	<i>Sac</i> I

注:下划线表示在相应引物 5'端引入酶切位点的序列位置。

1.2.3 酵母菌株 cdc25H 表型的验证 将 Stratagene 公司 CytoTrap XR Library Construction Kit 中的酵母菌株 cdc25H 划线于 YPAD 平板,分别于 25、37 ℃ 孵育 6 d,同时将酵母菌株 cdc25H 在 4 种单营养缺陷型[尿嘧啶缺陷型(Ura⁻)、亮氨酸缺陷型(Leu⁻)、色氨酸缺陷型(Trp⁻)、组氨酸缺陷型(His⁻)]SD/Glu 培养基(指含有葡萄糖的 SD 培养基)平板上划线,在 25 ℃ 下培养 6 d,观察结果。

1.2.4 共转化及诱饵蛋白转录自激活活性的检测 将表 2 的不同质粒组合分别加入酵母感受态细胞中并混匀,再按照 Stratagene 公司 CytoTrap XR Library Construction Kit 所提供的

方法进行共转化与激活作用检测试验。分别将 10、100 μL 转化酵母菌液涂布于 SD/Glu(-UL)平板上,于 25 ℃ 培养 5 d,计算酵母感受态细胞转化效率,并将剩余转化酵母菌液 1(对应表 2 中的第 1 组)涂布于 SD/Glu(-UL)平板上,于 37 ℃ 培养 6 d,观察是否发生温敏回复。分别将转化酵母菌液 2~9(对应表 2 中的第 2~9 组)涂布于 SD/Glu(Leu⁻、Ura⁻、-UL)平板上,25 ℃ 培养 5 d 后,随机挑取 3 个单菌落,分别用 25 μL 无菌水混匀,再分别取 2.5 μL 菌液划线于 2 个 SD/Glu(-UL)和 2 个 SD/Gal(-UL)平板上,每种平板分别放置于 25、37 ℃ 下培养 5 d,观察温度对菌落生长的影响。

表 2 诱饵蛋白和对照检测质粒共转化组配

编号	质粒组配	质粒用量(μg)	酵母感受态用量(μL)	作用	培养基
1	pSos + pMyr	2.0	500	验证温敏回复和转化效率	SD/Glu(-UL)
2	pSosMAFB + pMyr MAFB	0.3	100	阳性对照	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
3	pSos MAFB + pMyr SB	0.3	100	阳性对照	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
4	pSos Col I + pMyr MAFB	0.3	100	阴性对照	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
5	pSosMAFB + pMyrLaminC	0.3	100	阴性对照	SD/Glu(-UL)SD/半乳糖(-UL)
6	pSos <i>HC-Pro</i> + pMyrLamin C	0.3	100	<i>HC-Pro</i> 对 SRS 激活作用检测	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
7	pSos <i>HC-Pro</i> + pMyr SB	0.3	100	验证 pSos <i>HC-Pro</i> 的完整性	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
8	pSos-RdRp + pMyrLamin C	0.3	100	<i>RdRp</i> 对 SRS 激活作用检测	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)
9	pSos-RdRp + pMyr SB	0.3	100	验证 pSos-RdRp 的完整性	SD/Glu(-UL)SD/Gal(-UL)

注:“-UL”指缺失尿嘧啶、亮氨酸 2 种氨基酸。下同。

2 结果与分析

2.1 克隆载体与诱饵载体的构建及鉴定

通过 PCR 扩增、克隆获得 1 398 bp PVY *HC-Pro* 和 286 bp STV *RdRp* 基因,并将相应的目的片段连接 pSos,成功构建 pSos *HC-Pro* 和 pSos-*RdRp* 载体(图 1)。

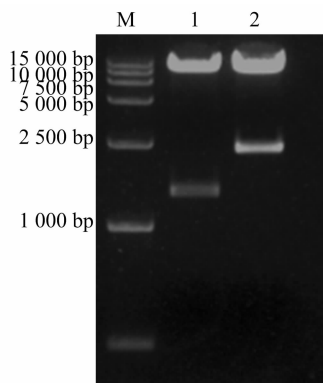
2.2 酵母菌株 cdc25H 表型的验证

将酵母菌株 cdc25H 在 YPAD 平板上划线,分别在 25、37 ℃ 培养 6 d。在 25 ℃ 时菌落生长正常,在 37 ℃ 时无菌落生成。同时,将酵母菌株 cdc25H 在 4 种单营养缺陷型(-Ura、-Leu、-Trp、-His)SD/Glu 平板上划线,于 25 ℃ 培

养 6 d,结果在 4 种单氨基酸营养缺陷型的平板上均不生长。结果表明,酵母菌株 cdc25H 表型正常,没有发生温度敏感回复突变,可用于后续试验。

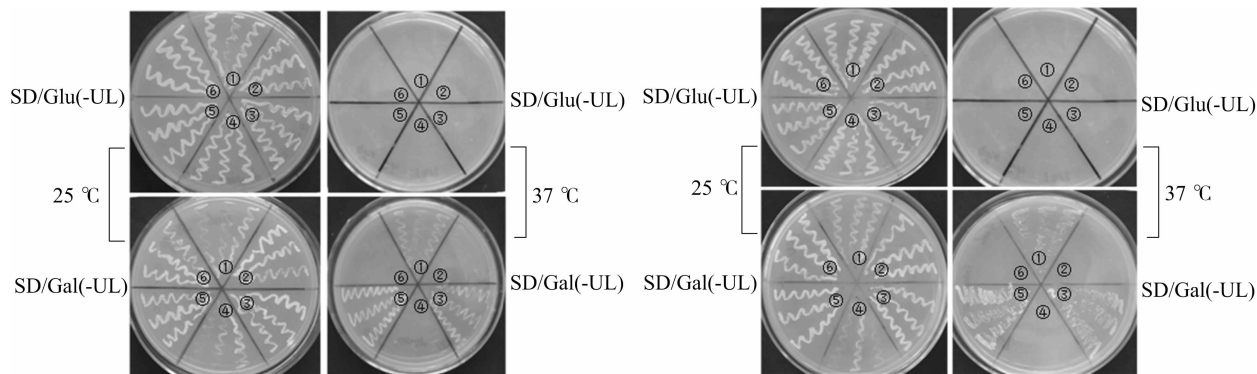
2.3 酵母感受态细胞的制备和转化效率的计算

取 75 μL 酵母感受态细胞涂布于 YPAD 平板上,于 37 ℃ 孵育 6 d 后发现没有出现酵母菌落,表明未发生温度敏感回复突变,可用于后续试验,根据表 2 中转化酵母菌液 1 可计算出酵母感受态细胞的转化效率为 6.14 × 10³/μg,将剩余转化酵母菌液 1 涂布于 SD/Glu(-UL)平板上,于 37 ℃ 孵育 6 d,未发现酵母菌落生长,表明没有温敏回复发生,说明所制备的酵母感受态可用于酵母双杂交试验。



M—Marker DL15000; 1—*pSos HC-Pro* / *Sal* I + *Bam* H I; 2—*pSos-RdRp* / *Sal* I + *Sac* I

图1 *pSos HC-Pro* 及 *pSos-RdRp* 质粒酶切鉴定



A. 诱饵蛋白 STV RdRp 的自激活验证

B. 诱饵蛋白 STV RdRp 的自激活验证

①~⑥为每个小区转化的质粒载体; ①—*pSos* MAFB+*pMyr* MAFB; ②—*pSos* MAFB+*pMyr* LaminC; ③—*pSos* MAFB+*pMyr* SB; ④—*pSos* Col I + *pMyr*-MAFB; ⑤—*pSos* HC-Pro/*pSos* STV-*RdRp*+*pMyr* SB; ⑥—*pSos* HC-Pro/*pSos* STV-*RdRp*+*pMyr* LaminC

图2 诱饵蛋白的自激活活性分析

3 讨论

新疆由于水土光热资源丰富,使得加工番茄成为该地的主要经济作物。近年来,由于受栽培模式及气候等客观因素的影响,使得病毒病得以蔓延。通过对新疆加工番茄田间病毒检测发现,新疆加工番茄病毒病主要有 CMV、ToMV、PVY、STV,这表明 STV 也成为加工番茄种植不容忽视的主要病毒^[10-11]。本研究将 PVY、STV 作为新疆加工番茄主要原有病毒以及新兴的主要病毒,研究 PVY、STV 与加工番茄的相互作用以及揭示其致病机制尤为重要。

酵母双杂交技术是在真核细胞调控转录中进行的一种高效敏感的研究蛋白与蛋白之间相互关系的技术^[12]。近年来,酵母双杂交技术已成为植物病毒学研究中的主要手段,广泛应用于研究植物病毒蛋白与寄主编码蛋白之间的相互作用,大量应用于筛选与已知蛋白的候选互补蛋白或验证蛋白间相互作用方面^[13-14]。研究认为,HC-Pro 在病毒侵染过程中起至关重要的作用,利用酵母双杂交系统筛选加工番茄中与 PVY HC-Pro 互作的寄主因子,将有可能从加工番茄中分离鉴定出参与病毒沉默的寄主因子基因,有助于加工番茄防治病毒病的研究。STV 作为新兴的加工番茄主要病毒,其侵染加工番茄的分子机制尚不清楚,利用酵母双杂交系统筛选与 STV-RdRp 互作的寄主基因,将有可能弄清 STV 侵染植物的

2.4 诱饵蛋白自激活作用的检测

将测序后证明构建正确的诱饵载体 *pSos HC-Pro* 及 *pSos-RdRp* 按照表 2 中的配比转入制备好的 *cdc25H* 酵母感受态细胞后,发现 25 °C 时均能够在 SD/Glucose (-UL) 平板上正常生长,分别随机挑取 3 个单菌落分别划线于 2 个 SD/Glu(-UL) 和 2 个 SD/Gal(-UL) 平板上,每种平板分别放置在 25、37 °C 下培养 5 d,对于诱饵蛋白 *pSos HC-Pro* 及 *pSos-RdRp*,在 25 °C 时每种组合在 SD/Glu(-UL) 和 SD/Gal(-UL) 平板上均能生长,现象正常;在 37 °C 时 SD/Glu(-UL) 平板上均不生长,在 SD/Gal(-UL) 平板上①、③、⑤生长现象正常,结果表明诱饵蛋白 *pSos-HcPro* 及 *pSos-RdRp* 没有自激活作用(图 2),因此可见 2 种诱饵载体适用于该酵母双杂交系统,可以进行后续的 cDNA 文库筛选。

机制,为研究 STV 提供基础。

在利用酵母双杂交系统筛选文库验证及蛋白质间相互作用的过程中,诱饵蛋白的正确表达至关重要,一方面由于某些蛋白的表达可能会对酵母菌株有毒害作用,使其不能够在选择培养基上进行生长,影响后续筛选工作,另一方面某些诱饵蛋白本身就具有转录自激活活性,这些蛋白能够激活报告基因,使其能够表达,造成假阳性现象,因此,要进行诱饵载体的自激活和毒性验证,以此排除假阳性和假阴性现象。本研究构建了 PVY HC-Pro 和 STV-RdRp 基因的诱饵载体,通过研究显示这 2 个诱饵载体均无毒性或自激活作用,因此,构建完成的诱饵载体符合本试验的需要,为下一步从加工番茄 cDNA 文库中筛选与 HC-Pro 和 RdRp 相互作用的蛋白奠定了基础。

参考文献:

- [1] 梁五生,温雪玮,刘洪义,等. 马铃薯 Y 病毒株系分类及中国大田马铃薯感染的马铃薯 Y 病毒株系谱研究进展[J]. 中国农学通报,2015,31(21):136-143.
- [2] 梁学超,路遥,刘丽娜,等. 新疆加工番茄马铃薯 Y 病毒株系鉴定[J]. 植物病理学报,2016,46(6):739-747.
- [3] Lindner K, Trautwein F, Kellermann A, et al. Potato virus Y (PVY) in seed potato certification [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2015, 122(3): 109-119.

肖登攀, 齐永青, 柏会子, 等. 河北平原区早播玉米产量潜力及气候条件分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 52–56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.013

河北平原区早播玉米产量潜力及气候条件分析

肖登攀^{1,2}, 齐永青², 柏会子¹, 沈彦俊²

(1. 河北省科学院地理科学研究所, 河北石家庄 050011; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 河北石家庄 050022)

摘要:河北平原区长时期的高耗水作物种植制度(冬小麦—夏玉米一年两熟)对区域水资源尤其是地下水资源带来严重的负面影响。缩减冬小麦种植面积, 提高玉米产量并保证粮食安全是该区域当前面临的重要课题。本研究基于作物模型评估了早播玉米的产量潜力和气候条件。研究结果表明, 玉米早播使得各个生长阶段历时均显著延长, 尤其是生殖生长阶段延长达 20 d。早播玉米灌浆期延长有助于产量的提高, 使其产量比夏玉米增加 24.7%~25.8%。早播玉米虽然在一定程度上能够改善其生长过程中的辐射条件, 但比夏玉米更容易在生殖生长阶段和开花期受到高温气候的影响。因此, 在筛选优质早播玉米品种时, 要优先考虑耐高温胁迫和生育期长的玉米品种。

关键词:早播玉米; 夏玉米; 气候条件; 产量; 适宜性

中图分类号: S162.5+3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0052-05

近几十年来, 河北平原区种植结构趋向单一化, 以冬小麦—夏玉米一年两熟轮作的种植制度为主体^[1]。受降水资源季节性差异的影响, 冬小麦的水分生态适应性较差, 存在需水关键期和降水盛期不符的问题^[2]。平均条件下, 冬小麦生育期内降水量 120 mm 左右, 夏玉米生育期内降水量 300 mm 左右, 导致冬小麦生育期水分亏缺约 300 mm, 需要进行灌溉来保证产量, 而夏玉米只要适时播种, 自然降水一定程度上可满足其对水分的需求^[3]。因此, 灌溉是该地区一年两熟种植制度获得稳产和高产的保证^[3-4]。一般情况下, 作物灌溉导致的农业用水占总用水的 70% 以上, 其中有 85% 以上的灌溉用水来自地下水。持续的高耗水种植模式已导致河北平原区水资源大量消耗, 使得地表水几近枯竭, 同时地下水位也以年均

0.8 m 的速度迅速下降^[5-7]。相关研究表明, 河北省 1984—2008 年间用于粮食生产的净地下水消耗达 1 390 亿 m³, 获得的粮食增产效益为 1.9 亿 t, 主要集中消耗在河北省中南部平原, 引起中南部平原的地下水位平均下降达 7.4 m, 引发地下水位下降的贡献达到 80% 以上^[8]。因此, 该地区农业水资源可持续利用存在常规作物生长与降水耦合性差、种植结构不合理等问题^[9]。

鉴于高耗水作物种植制度对区域水资源的影响, 政府决策者和相关科研人员均提出缩减冬小麦种植面积, 进而减少灌溉耗水来解决研究区的水资源危机, 最终实现区域水资源的可持续利用^[10-11]。一定程度上, 缩减冬小麦种植面积, 势必会对粮食产量带来影响, 但部分影响可以通过改善玉米种植条件、增加玉米产量来弥补^[12]。通常情况下, 没有冬小麦种植的农田, 单季玉米可以提前播种, 从而可以保证玉米生育期充足的有效积温和籽粒充足的灌浆时间, 达到玉米增产的目的^[13-14]。李向岭等通过设置不同播期的玉米种植试验指出, 播期间产量差异表现为早播玉米(5月3日) > 中播玉米

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(编号: 41401104)。

作者简介: 肖登攀(1982—), 男, 河北张北人, 博士, 副研究员, 主要从事气候变化与农业生态相关研究。E-mail: xiaodengpan168@163.com。

[4] Tabassum B, Nasir I A, Khan A, et al. Short hairpin RNA engineering; in planta gene silencing of potato virus Y [J]. Crop Protection, 2016, 86: 1–8.

[5] 李向东, 李怀方, 范在丰, 等. 马铃薯 Y 病毒属病毒 HC-Pro 研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(4): 437–440.

[6] Mlotshwa S, Verver J, Sithole – Niang I, et al. Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance [J]. Virus Genes, 2002, 25(1): 45–57.

[7] 苏海娣, 梁学超, 崔百明, 等. 新疆加工番茄上一种类似南方番茄病毒的分子检测[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(3): 271–275.

[8] 张强, 崔百明, 郑银英, 等. 新疆加工番茄上南方番茄病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 118–122.

[9] Elvira – Gonzalez L, Puchades A V, Carpino C, et al. Fast detection of Southern tomato virus by one – step transcription loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 241: 11–14.

[10] 韩泽群, 姜波. 加工番茄品种多性状综合评价方法研究[J]. 中国农业科学, 2014, 47(2): 357–365.

[11] 张强, 陈英杰, 向本春, 等. 辣椒上 CMV 亚组 I B CP 基因克隆与原核表达[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(12): 2257–2261.

[12] 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): 392–396.

[13] 黄大辉, 张增艳, 辛志勇. 利用酵母双杂交系统研究植物与病毒蛋白相互作用的进展[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(4): 477–483.

[14] Lin L, Shi Y, Luo Z, et al. Protein – protein interactions in two potyviruses using the yeast two – hybrid system [J]. Virus Research, 2009, 142(1/2): 36–40.