

白粉菌诱导的番茄叶片 AD-cDNA 文库的构建及初步分析

刘 严^{1,2}, 张 怡², 康静敏^{1,2}, 刘 柯², 张 超², 李鹏坤²,
安一博², 周 晗², 黄 辉², 李成伟²

(1. 郑州大学 生命科学学院, 河南 郑州 450001; 2. 周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

摘要:为了研究番茄白粉菌与番茄相互作用的分子机制,以白粉菌诱导的番茄叶片为材料,利用 SMART 技术构建了番茄的 AD-cDNA 文库。该文库总库容量为 3.77×10^{10} cfu,重组率达到 96%,插入片段长 400 ~ 2 000 bp,平均长度约为 1 000 bp。随机挑取 50 个克隆进行测序,利用生物信息学软件进行初步分析,表明获得的文库质量较高。

关键词:番茄;番茄白粉菌;SMART 技术;AD-cDNA 文库

中图分类号:Q78;S436.412 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)02-0047-04

doi:10.7668/hbxb.2015.02.009

Construction and Primary Analysis of Tomato Leaf AD-cDNA Library Induced by Powdery Mildew Fungus

LIU Yan^{1,2}, ZHANG Yi², KANG Jing-min^{1,2}, LIU Ke², ZHANG Chao²,
LI Peng-kun², AN Yi-bo², ZHOU Han², HUANG Hui², LI Cheng-wei²

(1. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: In order to study the interaction between powdery mildew fungus and tomato, the AD-cDNA library of tomato leaves infected by *Oidium neolycopersici* was constructed using SMART technology. The titer of the constructed cDNA library was 3.77×10^{10} cfu, and the recombination rate of the library was about 96%, the insert fragments ranged from 400 bp to 2 000 bp, and the average length of the library was about 1 000 bp. Fifty clones were randomly picked from the library for sequencing and functional analysis. The results indicated that the library was qualified for the study on the interaction between powdery mildew fungus and tomato.

Key words: Tomato; *Oidium neolycopersici*; SMART technology; AD-cDNA library

番茄是一种重要的经济作物,在蔬菜生产和食品加工行业具有重要地位^[1]。番茄白粉病是一种世界性真菌病害,严重影响了番茄的产量和质量,对番茄的生产特别是温室生产造成很大损失^[2]。目前,主要依靠喷施杀菌剂对其进行防治,然而杀菌剂的大量喷施造成了严重的环境污染和蔬菜农药残留。虽然多种野生番茄被发现具有抗病性^[3],但由于抗病番茄品种较少,且抗病基因在植物与病原菌

的进化中易丢失,致使获取持久、广谱的番茄抗性品种较难^[4]。

近年来,番茄白粉病在我国台湾、新疆、黑龙江、云南、辽宁和吉林等地频频爆发^[5-8],李成伟对番茄白粉菌中国生理小种进行了形态学和 ITS 序列的分析^[9],发现导致该病害的番茄白粉菌(*Oidium neolycopersici*)是一种产生非链式分生孢子的活体寄生真菌病原^[10],只侵染番茄表皮细胞,很难在培养基上

收稿日期:2015-02-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31071807;31272168)

作者简介:刘 严(1989-),女,河南鹤壁人,硕士,主要从事植物与微生物互作研究。

通讯作者:李成伟(1972-),男,河南商丘人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物与微生物互作研究。

生长。迄今为止,仅有豌豆白粉菌、十字花科白粉菌和大麦白粉菌完成了基因组测序^[11],对番茄白粉菌的研究进展较少,尤其是有关其基因组信息还较少。

cDNA 文库已成为研究功能基因组学的有效手段之一,可直接从 cDNA 文库中筛选所需目的基因,并用于基因的表达分析^[12-14]。利用 SMART(Switching mechanism at 5'end of RNA transcript)技术构建全长 cDNA 文库,可直接从中发现和确定候选基因,从而实现转基因技术在生产上广泛应用^[15]。酵母双杂交技术(Y2H)可以在活体酵母中研究蛋白互作,常用于发现新蛋白和蛋白的新功能^[16-19]。为充分开发和利用番茄抗病基因,以番茄 Micro-Tom(*Solanum lycopersicum*)为材料,利用 SMART 技术构建白粉病菌诱导的番茄叶片 Y2H 的 AD-cDNA 文库,测定了文库的滴度和重组率,并随机挑选 50 个单克隆,对测序成功的序列进行初步的生物信息学分析,为白粉菌与番茄互作机制和基因克隆提供了平台。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选取生长 28 d 的番茄 Micro-Tom 无菌苗,接种 1×10^6 个/mL 纯净白粉菌孢子悬浮液,20 d 后取样。

TRIzol 试剂即 RNAiso Plus(9108)购自 TaKaRa 公司,文库构建试剂盒 Make Your Own "Mate & Plate" Library System User Manual(630490)购自 Clontech 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取 采用 TRIzol 法提取白粉菌诱导的番茄叶片的总 RNA,具体方法参考说明书 9108,在核酸蛋白测定仪上检测总 RNA 浓度及纯度,同时利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 cDNA 的合成与纯化 以总 RNA 为模板,参照文库构建试剂盒 630490 说明书,分别以 CDS III 和 CDS III/6 PCR Primer 合成第 1 链,然后以 3' PCR Primer 和 5' PCR Primer 为引物通过 LD-PCR 合成双链 cDNA。将双链 cDNA 经 CHROMA SPIN + TE-400(Clontech)分离柱去除 200 bp 以下短片段 DNA。

1.2.3 文库的构建 将分离纯化后的 20 μ L 双链 cDNA 与质粒载体 pGADT7-Rec 连接,然后用 PEG/LiAc 法转化酵母感受态 Y187,涂布于 100 个 SD/-Leu 培养基平板($\Phi 150$ mm),同时涂布 100 μ L 的 1:100、1:1 000 的稀释液于 SD/-Leu 平板培养基上,计算转化效率。3~5 d 后,采用玻璃珠法,将所有酵母克隆收集下来溶于 YPDA 液体培养,混匀后与 75% 的甘油以 2:1 的比例混合保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

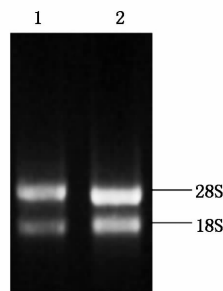
1.3 cDNA 文库的质量检测

取收集好的酵母菌液 10 μ L 稀释 10 000 倍后,从中取出 50 μ L 涂布 SD/-Leu 平板,培养 3~5 d,计算出文库滴度。文库滴度 = 平板上的克隆数/0.05 mL $\times 10^{-4}$ cfu/mL;总克隆数 CFU = 文库滴度 \times 悬浮体积(mL)。随机挑取 50 个单菌落,以 pGADT7-Rec 载体上的引物(5-T7: 5'-TAATACGACTCACTATA GGGCGA-3'; 3-AD: 5'-AGATGGTGCACGATGCACA G-3')进行 PCR 扩增,验证插入片段大小,之后测序(南京金斯瑞科技有限公司),在茄科植物基因组学网站(sol genomics network,SGN)(<http://www.sgn.cornell.edu/>)对测序结果进行比对与分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 和 cDNA 的质量

2.1.1 RNA 的质量 高质量 RNA 的获取直接关系到 cDNA 文库的构建成功与否,采用 TRIzol 法提取白粉病菌诱导的番茄叶片总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可看出,提取的样品总 RNA 可见十分清晰的 18S、28S RNA 条带,基本具有 1:2 的关系,没有明显的 RNA 降解(图 1)。经测定,样品 1 OD_{260/280} 为 1.93,OD_{260/230} 为 2.09,质量浓度为 5.6 g/L,表明该样品总 RNA 纯度很高、污染少;而样品 2 OD_{260/280} 为 2.21,OD_{260/230} 为 2.15,质量浓度为 7.8 g/L,表明该样品可能存在少量杂质污染。说明样品 1 的总 RNA 更符合构建文库的要求,可以用于双链 cDNA 的合成。



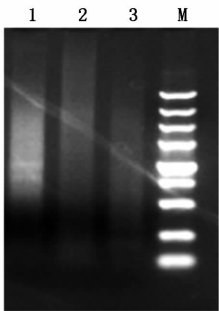
1~2. 白粉菌诱导的番茄叶片样品总 RNA。

1~2. The total RNA of tomato leaves induced by powdery mildew fungus.

图 1 白粉菌诱导的番茄叶片总 RNA 凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the total RNA of tomato leaves induced by powdery mildew fungus

2.1.2 cDNA 的质量 以 Oligo(dT)为引物合成 cDNA,得到的双链 cDNA 带呈弥散状均匀分布(图 2),说明总 RNA 降解量少,质量合格。经 CHROMA SPIN + TE-400 树脂柱纯化后的双链 cDNA 带富集在 400~4 500 bp,并且得到了浓缩,其质量和浓度都满足建库的要求。



1. 用 CDS Ⅲ Primer 扩增的白粉菌诱导的番茄叶片的 ds cDNA;2. 用 CDS Ⅲ/6 PCR Primer 扩增的白粉菌诱导的番茄叶片 ds cDNA;3. 用 CDS Ⅲ Primer 扩增的 control RNA;M.5 000 bp DNA Ladder。
1. CDS Ⅲ Primer amplification of tomato leaves induced by powdery mildew fungus ds cDNA;2. CDS Ⅲ/6 PCR Primer amplification of tomato leaves induced by powdery mildew fungus ds cDNA;3. CDS Ⅲ Primer amplification of control RNA;M.5 000 bp DNA ladder.

图 2 白粉菌诱导的番茄叶片的 ds DNA 电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of ds DNA for tomato leaves induced by powdery mildew fungus

2.2 文库的质量鉴定

AD-cDNA 文库构建在酵母菌中,酵母的转化效率对文库质量的影响至关重要。根据说明书的要求,库效率的期望值要求达到每 3 μg pGADT7-Rec 质粒有 1 × 10⁶ 个转化子。本研究所构建的酵母双杂交 AD-cDNA 文库,通过稀释平板计数转化效率,其文库转化效率约为 7.87 × 10⁶ cfu/μg。

经滴度检测,白粉病菌诱导的番茄叶片 cDNA 文库初级文库库容约为 3.77 × 10¹⁰ cfu。取转化后的酵母菌原液通过血球计数板计数,所得文库的酵母细胞浓度为 9 × 10⁷ cfu/mL,达到了酵母双交所需要的细胞浓度。

随机挑选 50 个酵母菌落做 PCR,扩增质粒上插入的 cDNA 片段,检查文库的空载率以及插入片段平均长度。结果表明,文库质粒的空载率约为 4%,重组率达到 96%,插入片段长 400 ~ 2 000 bp,平均长度约为 1 000 bp(图 3)。

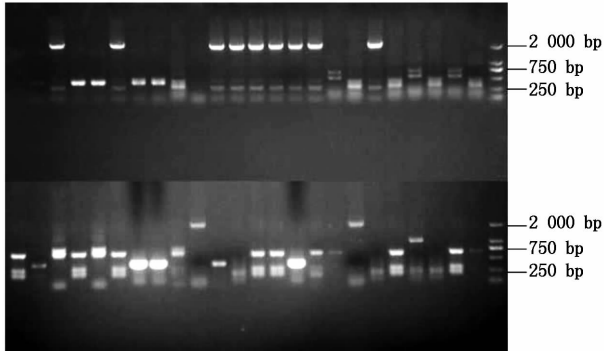


图 3 文库随机菌落 PCR 电泳检测

Fig.3 Electrophoresis of PCR products of random colonies from the library

测序结果经 Blast 和 DNAMAN 多序列比对结果显示,共有 21 个无重复序列,在 SGN 上进行序列比

对,共有 21 组基因(表 1),编码 19 种已知蛋白,2 种未知蛋白。

表 1 文库克隆测序基因

Tab.1 Gene information of sequenced clones

同源基因编号 Homologous gene code	编码蛋白 Encoding protein	染色体 号码 Chr. No.	出现次数 Number of occurrence
Solyc01g108240.2	乙烯响应转录因子 2b	1	2
Solyc01g107840.2	葡萄糖基转移酶	1	3
Solyc02g094050.2	蓝铜蛋白	2	1
Solyc02g094000.1	钙调素类蛋白	2	3
Solyc03g045070.1	铵离子转运蛋白	3	1
Solyc03g019890.2	β-半乳糖苷酶	3	2
Solyc03g094020.2	α-葡糖苷酶	3	3
Solyc04g078470.2	细胞周期蛋白	4	2
Solyc04g071070.2	未知蛋白	4	2
Solyc05g009310.2	锌指蛋白	5	2
Solyc06g072430.1	BAG 家族蛋白	6	2
Solyc06g068500.2	DnaJ 1 分子伴侣	6	2
Solyc07g043500.1	葡萄糖基转移酶	7	3
Solyc08g078700.2	热休克蛋白 22	8	1
Solyc09g075590.1	未知蛋白	9	2
Solyc09g066150.1	细胞色素	9	3
Solyc09g092130.2	蔗糖磷酸合成酶	9	3
Solyc10g055390.1	Nodulin 家族蛋白	10	3
Solyc11g012120.1	植物特有的 TIGR01615 家族蛋白	11	2
Solyc11g018800.1	过氧化物酶	11	2
Solyc11g022590.1	胰蛋白酶抑制剂	11	4

3 讨论

文库的检测指标是指 cDNA 文库的滴度、重组率、插入片段的大小及片段完整性。总 RNA 样品的质量直接影响 cDNA 文库质量的好坏,本试验中总 RNA 样品条带清晰,且不存在多糖、酚类、蛋白等污染,具备了构建高质量 cDNA 文库的先决条件^[20]。

SMART 技术操作简单且获得全长比例较高,已广泛用于文库的构建^[21-24]。该技术避免了 mRNA 在分离纯化时发生降解和丢失;而 CHROMA SPINTM TE-400 纯化柱可减少小片段对 cDNA 文库的不利影响;利用同源重组技术把外源双链 cDNA 高效重组到载体上,可通过大量测序获得一些有价值的基因片段和新基因^[25]。

番茄基因组测序已完成,全基因组共注释了 34 727 个基因^[26]。根据 Clack-Carbon 的公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - 1/n)$ (N 为实际所需克隆数, P 为要求的概率, n 为一种类型的 mRNA 在总 mRNA 所占的相对比例),当要求克隆到某低丰度 mRNA 的概率为 99.9% 时,文库的重组子数不得低于 $1.7 \times 10^{[27]}$ 。

本研究构建的白粉病菌诱导的全长 cDNA 文库转化效率约为 7.87×10^6 cfu/ μg , 初级文库库容约为 3.77×10^{10} cfu, 重组率达到 96%, 插入片段集中在 400 ~ 2 000 bp, 平均长度约为 1 000 bp, 不仅达到了要求标准, 还可以利用酵母双杂交技术进行后续大规模的白粉病菌与番茄互作蛋白的筛选。利用该文库来筛选和挖掘番茄受白粉病诱导相关的胁迫基因, 可为番茄白粉病抗性育种提供丰富的基因资源。

参考文献:

- [1] Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H. Genes that influence yield in tomato[J]. Breeding Science, 2013, 63(1): 3–13.
- [2] Jones H, Whipps J M, Guu S J. The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2001(2): 303–309.
- [3] Lindhout P, Beek H, Pet G. Wild Lycopersicon species as sources for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*): mapping of the resistance gene Ol-1 on chromosome 6 of *L. hirsutum*[J]. Acta Hort, 1993(376): 387–394.
- [4] Huibers R P, Loonen A M, Gao D, et al. Powdery mildew resistance in tomato by impairment of SIPMR4 and SID-MR1[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67467.
- [5] 贾菊生. 新疆番茄病害一新记录——番茄白粉病[J]. 植物保护, 1990, 16(4): 54.
- [6] 程志明. 黑龙江番茄新病害——番茄白粉病[J]. 北方园艺, 1992(6): 40.
- [7] 王媛媛, 陈立杰, 段玉玺, 等. 沈阳地区温室番茄发生白粉病[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 91–91.
- [8] 刘 微, 刘淑艳, 李 玉, 等. 番茄白粉病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 11–15.
- [9] 李成伟. 番茄与白粉菌互作的细胞学和转录组学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [10] Kiss L, Cook R A, Saenz G S, et al. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world[J]. Mycological Research, 2001, 105(6): 684–697.
- [11] Spanu P D, Abbott J C, Amselem J, et al. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism[J]. Science, 2010, 330(610): 1543–1546.
- [12] Colin P L, Npriss S R, Wheeler G L, et al. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999(96): 4198–4203.
- [13] 蔡宁波, 黄湘文, 庄伟建. 花生种子全长 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. 花生学报, 2007, 36(2): 1–5.
- [14] 朱利军, 长孙东亭, 罗素兰. 全长 cDNA 文库构建方法及应用研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2009, 27(2): 185–190.
- [15] 张 冲, 蔡铁城, 陈 华, 等. 青枯菌诱导的烟草叶片全长 cDNA 文库的构建和初步分析[J]. 分子植物育种, 2013, 11(5): 624–629.
- [16] Ezaki J, Ezaki M T, Koike M, et al. Characterizations of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein[J]. J Neurochem, 2003(87): 1296–1308.
- [17] Ezaki J, Tanida I, Kanehagi N, et al. Alysosomal proteinase, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene (CLN2) product, is essential for degradation of a hydrophobic protein, the subunit c of ATP synthase[J]. Journal of Neurochemistry, 1999, 72(6): 2573–2583.
- [18] Golabek A A, Kida E, Walus M, et al. CLN3 proteins regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid- β protein precursor and cathepsin D in human cells[J]. Mol Genet Metab, 2000(70): 203–213.
- [19] Puranam K L, Guo W X, Qian W H, et al. CLN3 defines a novel antiapoptotic pathway operative in neurodegeneration and mediated by ceramide[J]. Mol Genet Metab, 1999(66): 294–308.
- [20] 彭 强, 吴昌银. 水稻抽穗期基因酵母双杂交 cDNA 文库的构建及分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(4): 404–409.
- [21] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction[J]. BioTechniques, 2001, 30(4): 892–897.
- [22] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, et al. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 36.
- [23] 张 娟, 张军鸽, 李秀花, 等. 芜菁夜蛾斯氏线虫 G26 侵染期幼虫 cDNA 文库的构建及表达序列标签分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 72–76.
- [24] 许延芳, 潘丽娜, 刘晓颖, 等. 小麦 cDNA 文库构建方法的改进及优化[J]. 天津农业科学, 2012, 18(3): 22–25.
- [25] 王清连, 石明旺. 野生大豆种子 cDNA 文库构建及其球蛋白基因克隆[J]. 河南农业科学, 2006(1): 29–32.
- [26] Sato S, Tabata S, Hirakawa H, et al. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution[J]. Nature, 2012, 485(740): 635–641.
- [27] 程 宇, 蔺瑞明, 欧阳宏雨, 等. 小麦条锈菌诱导性小麦 cDNA 文库的构建及其质量评价[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 184–187.