

大丽轮枝菌酵母双杂交 cDNA 文库的构建

康静敏^{1,2}, 刘 坤², 刘 严^{1,2}, 张 怡², 李成伟², 谭光轩²

(1. 郑州大学 生命科学院, 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:为了分离克隆与植物互作的大丽轮枝菌致病相关蛋白基因,利用 SMART 技术构建了大丽轮枝菌酵母双杂交 cDNA 文库。结果表明,构建的文库滴度为 5.2×10^7 cfu/mL,库容为 3.9×10^7 cfu;文库 cDNA 插入片段长度主要分布在 0.5~2.0 kb,平均为 1 kb;文库重组率为 96%。表明文库质量较好,为筛选与植物互作的大丽轮枝菌致病蛋白基因奠定了基础。

关键词:黄萎病;大丽轮枝菌;酵母双杂交文库;SMART 技术

中图分类号:S432.1;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)02-0051-04

doi:10.7668/hbxb.2015.02.010

Construction of Yeast Two-hybrid cDNA Library of *Verticillium dahliae*

KANG Jing-min^{1,2}, LIU Kun², LIU Yan^{1,2}, ZHANG Yi², LI Cheng-wei², TAN Guang-xuan²

(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: To seek out the *V. dahliae* proteins involved in the interaction of plant with *V. dahliae*, a yeast two-hybrid library of *V. dahliae* was constructed using SMART technique. Results showed that the titer of cDNA library was 5.2×10^7 cfu/mL, the library contained 3.9×10^7 cfu independent clones, the size distribution of insert fragments ranged from 0.5–2.0 kb, and the recombination rate was about 96%. These data demonstrated that the library could meet the requirements of standard cDNA library, which laid a foundation for screening the interaction proteins from *V. dahliae*.

Key words: *Verticillium* wilt; *Verticillium dahliae* Kleb.; Yeast two-hybrid cDNA library; SMART technique

黄萎病是一种由真菌侵染引起的土传维管系统病害^[1-2],其致病菌在分类学上属于半知菌亚门淡色孢科的轮枝菌属,主要包括大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)和黑白轮枝菌(*V. albo-atrum* Reinke & Berth.)。黑白轮枝菌引起的病害较少,且只在美国等少数国家有报道^[3],大丽轮枝菌的毒性强于黑白轮枝菌^[4],其是严重危害植物的一种主要腐生真菌,寄主范围极广,可危害 400 多种植物,包括草本植物、多年生植物和木本植物^[5]。大丽轮枝菌以休眠菌丝、厚垣孢子和微菌核等形式存活在土壤中,成为植物的侵染源。当环境条件适宜时,大丽轮枝菌借助蒸腾作用向上扩散,最终导致植株矮小,危害严重时植株枯萎死亡^[6]。

传统上通过作物轮作、夏季高温日晒土壤和化学烟熏消毒等方法防治这种病害,但是,不仅费时费力,而且可能污染环境,又难以根除病菌的危害,收效甚微,所以这些防治方法的应用受到很大限制^[6]。随着分子生物学及 DNA 重组技术的迅速发展,科学家开始从分子水平上研究大丽轮枝菌致病及植物抗病机制,克隆大丽轮枝菌致病及植物抗病的关键基因,尝试利用遗传工程手段实现黄萎病的防治^[7-8]。目前,已经克隆出许多可以提高植物抗病性的基因,其中 *Ve* 是番茄中特异的抗黄萎病基因^[9]。

植物抗黄萎病能力的形成和黄萎病菌侵染能力的大小本质上是两者互作的结果,包含许多蛋白互

收稿日期:2015-02-23

基金项目:国家自然科学基金项目(31440076;31272168)

作者简介:康静敏(1988-),女,河南焦作人,硕士,主要从事植物与病菌互作研究。

通讯作者:谭光轩(1964-),男,河南周口人,教授,博士,主要从事植物与病菌互作研究。

作的过程。只有克隆分离出与植物互作的黄萎病致病蛋白编码基因,才能弄清楚黄萎病菌侵染植物时植物与病原菌互作的过程,诠释植物与黄萎病菌互作的分子机制,也才可以为设计防治黄萎病的分子药物、开发新型杀菌剂提供支撑。

cDNA 文库的构建是近年来发展较快的克隆基因的主要方法^[10],为发现新互作基因和研究基因功能提供了新工具。自 20 世纪 70 年代该技术建立以来,cDNA 文库的构建方法有了很大的改良和进步。其中,利用 SMART (Switching mechanism at 5's end of RNA transcript) 技术构建 cDNA 文库具有所需起始材料少,试验过程快速、简单,全长率较高等优点而得到广泛应用^[11]。本研究利用 SMART 技术构建大丽轮枝菌 cDNA 酵母双杂交文库,分析其质量,以期筛选黄萎病互作蛋白分子基因,进一步研究大丽轮枝菌致病的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

棉花黄萎病强致病力菌株大丽轮枝菌 Vd08061 由中国农业科学院棉花研究所植物病理室提供;cDNA 文库构建试剂盒 Make Your Own “Mate & Plate” Library System Kit 购自 Clontech 公司;RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 购自 Ambion 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 应用察氏液体培养基在 25 ℃、200 r/min 条件下,振荡培养大丽轮枝菌 7~10 d 后,用纱布过滤收集培养物,滤纸吸干多余水分,放入液氮中速冻,最后于 -80 ℃ 保存备用。将收集好的大丽轮枝菌培养物放入经 180 ℃ 烘烤 4 h 的研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末,取 50~100 mg 转移至 1.5 mL EP 管,加入 1 mL TRIzol 混匀。后续步骤按 TRIzol 提取方法进行,经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.2.2 双链 cDNA(ds cDNA)的合成与纯化 大丽轮枝菌 ds cDNA 的合成按照酵母双杂交文库构建试剂盒说明书进行操作,分别以 control RNA 和黄萎病菌 RNA 为模板,用 CDS III 和 CDS III/6 两种引物,结合 SMART III Oligonucleotide 在 SMART MMLV 反转录酶作用下合成 cDNA 第一条链。取 2 μL 第一链合成反应物和 2 μL 3 × PCR 引物 (5'-GTATCGATGCCCCACCTCTAGAGGCCGAGGCG GCCGACA-3')、2 μL 5 × PCR 引物 (5'-TTCCACCCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG-3'),利用 50 ×

Advantage 2 PCR kit,于 PCR 仪上以长距离法扩增 ds cDNA。反应参数为:95 ℃ 变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s,68 ℃ 复性延伸 6 min,30 个循环,每个循环复性增加 5 s;68 ℃ 复性延伸 5 min。参照试剂盒操作程序,准备 CHROMA SPIN™ TE-400 纯化柱,将 ds cDNA 加入纯化柱的中心,过滤掉 500 bp 以下的小片段。

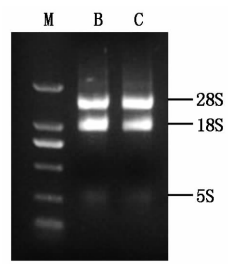
1.2.3 酵母感受态的制备与 ds cDNA 纯化产物的转化 取 Y187 酵母菌液在 YPDA 琼脂板上划线,倒置培养 3~5 d,挑取直径约 3 mm 的单克隆,按照试剂盒说明书,用 PEG/LiAc 法制备酵母感受态。将 ds cDNA 纯化产物与 pGADT7-Rec、酵母 carrier DNA 共同加入制备好的酵母感受态细胞中,涂布于缺亮氨酸的琼脂板上,每板涂 150 μL 的酵母菌液,在 30 ℃ 条件下培养 3~5 d。

1.2.4 cDNA 文库的收集与质量检测 将培养好的酵母平板放到 4 ℃ 条件下冷却 3~4 h,每板加入 4 mL 的 YPDA,用无菌的玻璃珠将平板上的菌落分离下来,所有的菌液加入 75% 的甘油,分装入无菌的单管中。使用血球计数板计算细胞密度,若细胞密度 $< 2 \times 10^7$ 个/mL,可通过离心削减上清液的体积,使细胞密度 $> 2 \times 10^7$ 个/mL。取收集好的 cDNA 酵母双杂交文库菌液,分别稀释 100,10 000 倍,各取 50 μL 涂布于缺亮氨酸的琼脂板上,培养 3~5 d,根据公式:库容量 = 每块平板的平均克隆子数目 × 稀释倍数 × 悬浮体积,文库滴度 = 每板克隆数/涂板体积 (mL) × 稀释倍数,计算出 cDNA 文库库容及文库的滴度。同时随机选取单克隆,利用 Match-maker™ Insert Check PCR Mix 进行 PCR,计算文库重组率及平均插入片段大小。

2 结果与分析

2.1 大丽轮枝菌总 RNA 的提取与分析

提取 2 个大丽轮枝菌样品 B 和 C 的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,发现 B 样品的 28S rRNA 与 18S rRNA 量比较接近,而 C 样品的 28S rRNA 与 18S rRNA 条带规则,比较清晰,且 28S 的量大约是 18S 的 2 倍,说明其总 RNA 没有降解,完整性良好 (图 1)。通过核酸蛋白测定仪检测总 RNA,B 样品 $OD_{260/280} = 2.05$,质量浓度为 2.16 μg/μL,说明该样品可能有少量杂质残存;而 C 样品 $OD_{260/280} = 1.98$,质量浓度为 1.26 μg/μL,表明提取的 C 样品总 RNA 纯度高,且其浓度大小也能够满足下一步合成 ds cDNA 及构建文库的需要。因此,选用 C 样品的 RNA 合成 ds cDNA。



M, DL2000; B, C. 大丽轮枝菌的总 RNA。
M, DL2000; B, C. Total RNA of *V. dahliae*.

图 1 大丽轮枝菌总 RNA
Fig. 1 Total RNA of *V. dahliae*

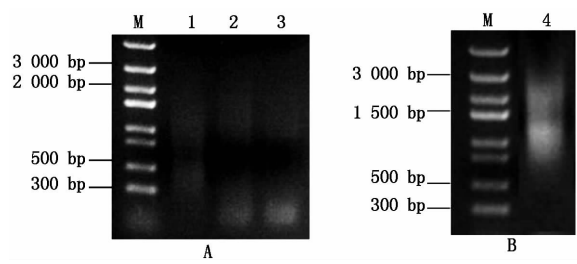
2.2 cDNA 的合成与纯化

高质量的 cDNA 文库必须富含大量长度不等的全长 cDNA,其由 mRNA 反转录而来。应用琼脂糖凝胶电泳检测可以看出,采用 CDS III 合成的 cDNA 比 CDS III/6 合成的 cDNA 条带规则,连续性好且 cDNA 带型弥散在 0.3 ~ 3.0 kb, cDNA 长度主要集中在 0.5 ~ 2.0 kb(图 2-A),因此选用 CDS III 合成的 cDNA 进行后续试验。纯化后的 cDNA 经琼脂糖凝胶电泳检测,发现长度在 0.5 kb 以下的条带明显减少,浓度变大, cDNA 的分布更为集中(图 2-B),其质量满足建库的要求。

2.3 酵母双杂交 cDNA 文库质量的评价

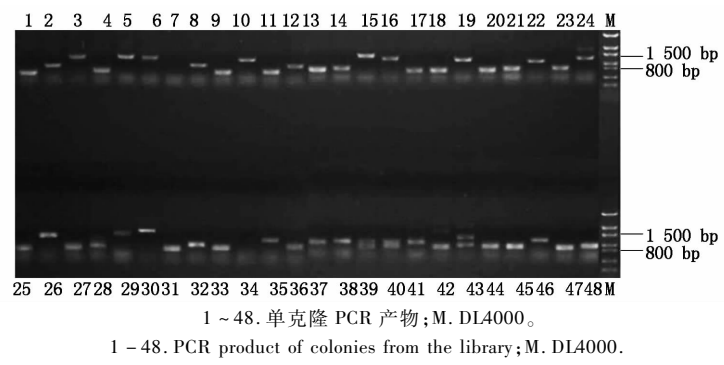
将纯化的 cDNA 转化 Y187 酵母菌液后涂布培

养,对细胞观察计数发现,库容量为 3.9×10^7 cfu,文库滴度为 5.2×10^7 cfu/mL。从文库中随机挑选 48 个单克隆进行 PCR 检测,结果显示有 46 个单克隆扩增出条带,且长度集中分布于 0.5 ~ 2.0 kb(图 3)。其中 1 ~ 2 kb 有 14 个克隆,0.8 ~ 1.0 kb 有 25 个,0.5 ~ 0.8 kb 有 7 个,所建文库平均插入片段长度在 1 kb,文库的重组率为 96%,表明本试验获得的酵母双杂交 cDNA 文库质量较好。



A. 合成的 ds cDNA; B. 纯化后的 ds cDNA。M. DL5000; 1. CDS III 合成的大丽轮枝菌 cDNA; 2. CDS III/6 合成的大丽轮枝菌 cDNA; 3. CDS III/6 合成的 control RNA cDNA; 4. 纯化后的 ds cDNA。
A. The synthetic ds cDNA; B. The purified ds cDNA. M. DL5000; 1. CDS III synthetic cDNA of *V. dahliae*; 2. CDS III/6 synthetic cDNA of *V. dahliae*; 3. CDS III/6 synthetic cDNA of control RNA; 4. Purified ds cDNA.

图 2 合成及纯化后的大丽轮枝菌 ds cDNA
Fig. 2 The synthetic ds cDNA of *V. dahliae* and its purification effect



1 ~ 48. 单克隆 PCR 产物; M. DL4000。
1 ~ 48. PCR product of colonies from the library; M. DL4000.

图 3 文库中单克隆的 PCR 检测
Fig. 3 Monoclonal PCR of randomly selected colonies from the library

3 讨论

SMART 技术是 Chenchik 等^[12]1996 年提出的,利用 SMART 技术建库,可以得到全长的 cDNA 文库。从其他研究利用 SMART 技术构建的 cDNA 文库结果来看,该技术有其独特的优点:首先,试验需要的材料少,一般样品仅要求 0.5 ~ 1.0 μ g,而 CAP TRAPPER、OLIGO-CAPPING 等方法需要 10 μ g 材料提取的 mRNA 才能构建一个文库,所以,对于珍稀材料 SMART 技术非常具有应用价值^[13];其次,无需对 mRNA 和中间产物进行复杂的处理,试验过程简单,速度快;第三,获得的 cDNA 全长比例高^[14]。

因此,本试验利用 SMART 技术构建了大丽轮枝菌酵母双杂交 cDNA 文库。

提取纯度高、完整性好的 RNA 是构建 cDNA 文库的基础^[15]。真菌细胞壁厚,不易破碎且含有多糖^[16],给 RNA 的提取带来一定的困难。本试验采用 TRIzol 提取方法,经过不断优化,得到了质量较高的大丽轮枝菌总 RNA。电泳显示在 28S、18S 处有清晰明亮的条带,二者含量比为 2:1,测定 $OD_{260/280} = 1.98$,说明 RNA 信息链完整,没有发生降解。纯化后的 ds cDNA 呈现弥散分布,片段大小在 0.5 kb 以上,1.5 kb 处较多,对所建文库进行 PCR 检测也发现,片段大小分布集中在 0.5 ~ 2.0 kb。从 cDNA 文

库质量一般评价标准来看,库容为 3.9×10^7 cfu,文库滴度达到 5.2×10^7 cfu/mL;平均插入片段长度为 1 kb;文库的重组率为 96%。说明所建文库具有完整的 cDNA 序列和较高的覆盖度,达到了大丽轮枝菌酵母双杂交 cDNA 文库所应具备的质量标准,可以满足下一步的互作蛋白筛选试验要求。

黄萎病作为棉花、番茄等植物的重要病害,对其病原菌侵染及植物的病理已有大量的研究,但关于大丽轮枝菌致病基因的分离克隆研究则尚未见报道^[6],对黄萎病的发病机制还缺乏足够的了解。目前,大丽轮枝菌的全基因组测序已经完成,发现其共有 8 条染色体,单倍体基因组大小约为 33.8 Mb,包括 10 535 个基因^[17-19],为研究大丽轮枝菌致病基因提供了参考基因组。借助本研究构建的大丽轮枝菌表达文库,通过酵母双杂交筛选技术,可以大规模快速分离克隆大丽轮枝菌的相关致病功能基因。

参考文献:

- [1] Fradin E F, Zhang Z, Ayala J C J, *et al.* Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1* [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 320 - 332.
- [2] Fradin E F, Abd-El-Halim A, Masini L, *et al.* Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 2255 - 2265.
- [3] Mohan R, Kolattukudy P E. Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors of *Verticillium albo-atrum* [J]. *Plant Physiol*, 1990, 92: 276 - 280.
- [4] Church V J, McCartney H A. Occurrence of *Verticillium dahliae* on sunflower (*Helianthus annuus*) in the UK [J]. *Annals of Applied Biology*, 1995, 127(1): 49 - 56.
- [5] Berlanger I, Powelson M L. *Verticillium* wilt [EB/OL]. *The Plant Health Instructor*, 2000, DOI: 10. 1094/PHI-I-2000 - 0801 - 01. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Verticillium-Wilt.aspx>.
- [6] Yadeta K A, Thomma B P H J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 1 - 12.
- [7] 王孝坤, 王春燕, 谢成建, 等. 黄萎病菌致病及植物抗黄萎病分子机制研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2014, 43(1): 1 - 6.
- [8] 谷素静, 汪 敏, 桑 茜, 等. 棉花黄萎病菌 T-DNA 插入突变体库的构建及致病缺陷突变体筛选 [J]. *河南农业科学*, 2014, 43(1): 69 - 73, 83.
- [9] Kawchuk L M, Hachey J, Lynch D R, *et al.* Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(11): 6511 - 6515.
- [10] Gubler H, Hoffman B J. A simple and very efficient method for generating cDNA library [J]. *Gene*, 2003, 25(2-3): 263 - 269.
- [11] 张 震, 王教瑜, 杜新法, 等. 稻曲病菌 cDNA 文库的构建 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(5): 462 - 467.
- [12] Chenchik A, Moqadam F, Siehert P. A new method for full-length cDNA cloning by PCR [M]//Krieg P A. *A laboratory Guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis*. New York: Wiley Liss, 1996: 273 - 321.
- [13] Schuler G D. Pieces of the puzzle expressed sequence tags and the catalog of human genes [J]. *Mol Med*, 1997, 75: 694 - 698.
- [14] Sugahara Y, Carninci P, Itoh M, *et al.* Comparative evaluation of 5-end-sequence quality of clones in CAP trapper and other full-length cDNA libraries [J]. *Gene*, 2001, 63: 93 - 102.
- [15] 王 晨, 王文艳, 初建青, 等. 夏黑葡萄花及果实全长 cDNA 文库的构建及鉴定 [J]. *华北农学报*, 2010, 25(4): 30 - 34.
- [16] 林剑青, 王成成, 肖春华, 等. 一种用于黄曲霉高质量总 RNA 提取方法与应用 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2012, 51(6): 107 - 111.
- [17] Klosterman S J, Subbarao K V, Kang S, *et al.* Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002137.
- [18] Pantou M P, Typas M A. Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245(2): 213 - 220.
- [19] Pantou M P, Kouvelis V N, Typas M A. The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*: a novel gene order for *Verticillium* and a diagnostic tool for species identification [J]. *Current Genetics*, 2006, 50(2): 125 - 136.