

研究报告

Research Reports

灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建及分析

肖冬来, 邓慧颖, 谢荔岩, 吴祖建*, 谢联辉*

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建省植物病毒学重点实验室, 福州 350002)

摘要 以灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallen)mRNA 为起始模板, 利用 Gateway 技术构建了灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库。经过检测表明: 构建的初级 cDNA 文库的库容量为 1.85×10^7 cfu; 扩增文库滴度为 7.7×10^8 cfu/mL, 重组率约为 97%; 扩增文库插入片段主要集中在 1 000~1 500 bp 之间。随机挑取 10 个克隆, 经测序与 GenBank 数据库比对结果显示 7 个克隆具有同源序列, 其中 L2、L9 为已公布的灰飞虱序列。灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建为克隆全长目的基因及研究灰飞虱与其传播的水稻病毒间的互作奠定了基础。

关键词 灰飞虱; 酵母双杂交; Gateway 技术; cDNA 文库

中图分类号: S 435.112.3; Q 785 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2011.01.004

Construction of a yeast two-hybrid cDNA library of *Laodelphax striatellus*

Xiao Donglai, Deng Huiying, Xie Liyan, Wu Zujian, Xie Lianhui

(Key Laboratory of Plant Virology of Fujian Province, Institute of Plant Virology of Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract A yeast two-hybrid cDNA library was constructed using the CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit. The results showed that the unamplified library consisted of 1.85×10^7 independent clones; the titer of amplified cDNA library was 7.7×10^8 cfu/mL, and the recombinant rate was about 97%. The sizes of most inserts were 1 000—1 500 bp in length. Random sequence analysis of ten clones showed that seven of the clones had homologous sequences in GenBank. Clones L2 and L9 were the same as the published sequences. Construction of this yeast two-hybrid cDNA library of *Laodelphax striatellus* laid the foundation for cloning of functional genes in *L. striatellus* and studies on *L. striatellus*-virus interactions.

Key words *Laodelphax striatellus*; yeast two-hybrid; Gateway; cDNA library

灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallen)不仅是禾本科作物的重要害虫, 也是一些病毒病的传毒介体。目前已知灰飞虱可传播的病毒有水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)、水稻黑条矮缩病毒(*Rice blackstreaked dwarf virus*, RBSDV)。近年来, 由于水稻种植品种、耕作制度、暖冬气候等原因造成了灰飞虱数量逐年增加^[1]。2004—2005 年, 江苏省 RSV 每年发病面积达 170 万 hm^2 ^[2], 2008 年江苏一些地区的黑条矮缩病平均发病率达到 54.6%, 发病植株几近绝收, 并有逐步蔓延加重的趋势^[3]。近年来, 对这两种病毒的分子生物学研究取得了一些进

展, 病毒编码的一些基因功能得到了鉴定^[4-6], 但关于病毒与寄主互作方面的研究还比较少, 尤其是病毒与介体昆虫之间的互作。

构建 cDNA 文库是研究功能基因组学的主要手段之一, 通过构建酵母双杂交 cDNA 文库, 以某个蛋白为诱饵筛选 cDNA 文库对大规模研究蛋白间的互作有着重要的意义。本研究以灰飞虱 mRNA 为模板, 利用 Gateway 技术构建了初级灰飞虱 cDNA 文库, 并将其转换到载体 pDEST22 中, 构建了高质量的酵母双杂交 cDNA 文库, 为下一步研究灰飞虱与其传播的病毒间的互作奠定了基础。

收稿日期: 2009-12-15 修订日期: 2010-01-18

基金项目: 国家“973”项目(2006CB100203); 公益性行业科研专项(nybyZX07251); 国家自然科学基金项目(30671357)

* 通信作者 E-mail: wuzujian@126.com, fjxlh@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

灰飞虱采自江苏水稻田间,经斑点免疫杂交和 PCR 检测不携带水稻条纹病毒,其后代饲养于台中本地 1 号品种幼苗上,室温保持在 25~28 °C,每 4 d 更换 1 次水稻幼苗,适时浇水。

1.1.2 主要试剂

Trizol、FastTrack[®] 2.0 Kit、CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit、ProQuest[™] Two-Hybrid System、PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Midi Purification Kits 均购自 Invitrogen 公司, T4 DNA Ligase 均购自 NEB 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

称取灰飞虱 1~2 g,在液氮中研磨后,用 Trizol 试剂提取组织总 RNA(具体操作参考说明书),并用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行检测和质量分析。

1.2.2 mRNA 的分离纯化

利用 FastTrack[®] 2.0 Kit 对提取的灰飞虱总 RNA 分离纯化 mRNA(具体操作按参考说明书),利用紫外分光光度计检测 mRNA 的质量。

1.2.3 cDNA 的合成

按照 CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit 的操作手册进行:取 2 μ g mRNA 为模板,加 DEPC-treated water 至 9 μ L,再加入 Biotin-attB2-Oligo(dT) primer、10 mmol/L dNTPs 各 1 μ L,混匀,于 65 °C 孵育 5 min 后 45 °C 冷却 2 min,加入事先混合好的 5 \times First Strand Buffer 4 mL, 0.1 mol/L DTT 2 μ L, DEPC-treated water 1 μ L, 45 °C 2 min;最后加入 2 μ L SuperScript[™] II RT 2 mL,混匀,45 °C 孵育 60 min 合成第 1 链 cDNA;向合成好的第 1 链中加入 92 μ L DDW, 30 μ L 5 \times Second Strand Buffer, 10 mmol/L dNTPs 3 μ L, *E. coli* DNA Ligase 1 μ L, *E. coli* DNA 聚合酶 I 4 μ L, *E. coli* RNaseH 1 μ L, 16 °C 2 h 后加入 2 μ L T4 DNA 聚合酶,混匀,16 °C 2 min 后终止反应;酚氯仿抽提、乙醇沉淀后与 attB1 接头连接,在 50 μ L 连接体系中加入 18 μ L 新合成的双链 cDNA, 10 μ L 5 \times Adapter buffer, 10 μ L attB1 (1 μ g/ μ L), 0.1 mol/L

DDT 7 μ L, 5U T4 DNA 连接酶, 16 °C 连接过夜。将带有 attB 接头的 cDNA 通过 BP 反应构建到 pDONR222 载体上。

1.2.4 初级 cDNA 文库总克隆数 CFU 的鉴定

将插入 cDNA 的 pDONR222 载体转化 ElectroMAX[™] DH10B[™] T1 Phage Resistant 感受态细胞, 37 °C 250 r/min 复苏 1 h 后保存于含 40% 甘油的 SOC 液体培养基中, -80 °C 保存。取转化后的细菌原液(2 mL) 10 μ L 稀释 1 000 倍后,从中取出 50 μ L 涂布 LB 平板(含 50 μ g/mL Kan), 37 °C 倒置培养过夜,总克隆数按照 CFU=平板上的平均克隆数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ /涂布体积(μ L) $\times 2$ 计算。

1.2.5 初级文库平均插入片段及重组率鉴定

随机挑取在平板上生长的单克隆,以 pDONR222 载体上的通用引物 M13F 和 M13R 进行菌液 PCR,检测插入片段的大小。

1.2.6 初级文库 pDONR222 质粒提取

取 3 $\times 10^6$ 个克隆,接种于 50 mL 肉汤培养基(牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1.0 g, NaCl 0.5 g, 水 100 mL, pH 7.0~7.2)中, 37 °C, 275 r/min 振荡,当吸光度到达 A_{600} 约 0.6,细胞的浓度大约是 1.5 $\times 10^{10}$ cells/mL ($1 A_{600} \approx 2.5 \times 10^{10}$ cells/mL)时,停止振荡培养。按照 PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Midi Purification Kits 的方法提取 pDONR222 文库质粒。

1.2.7 酵母双杂交文库构建及扩增

构建完成初级文库并对文库质量初步鉴定后,通过 LR 反应将文库 cDNA 从 pDONR222 载体转换到酵母表达载体 pDEST22 上,反应体系如下: pDONR222 文库质粒 N μ L (300 ng)、pDEST22 (150 ng/ μ L) 3 μ L, 5 \times LR Clonase Reaction Buffer 4 μ L, LR Clonase 6 μ L, 加 TE 至总体积 20 μ L, 25 °C 反应 20 h;乙醇沉淀 LR 重组产物,重悬在 9 μ L TE 中,利用电转法转化大肠杆菌 DH10B 细胞,加入 2 mL SOC 液体培养基, 37 °C 复苏 1 h,转化液用 SOC 液体培养基稀释 10 倍后全部涂于 100 块 15 cm 的 LB 平板(含 100 μ g/mL Amp), 37 °C 倒置培养过夜,无菌操作刮下菌苔,悬浮于 20% 甘油保存液中,分装后 -80 °C 保存,此即为扩增文库。

1.2.8 扩增文库滴度的鉴定

取 10 μ L 扩增文库的原液,进行 10 倍连续梯度稀释,将每个稀释梯度取 100 μ L 涂布 LB 平板(含 100 μ g/mL Amp), 37 °C 倒置培养过夜,计算每个梯

度平板上生长的平均菌落数量。按照公式:文库滴度=平板上的克隆数×稀释倍数× 10^3 /涂布体积(μL)计算。

1.2.9 扩增文库平均插入片段及重组率鉴定

方法同 1.2.5,采用 pDEST22 上的通用引物进行扩增。

1.2.10 cDNA 插入片段测序分析

随机挑取 cDNA 文库中 10 个克隆进行测序,测序结果通过 GenBank 中的 Blast 功能进行比对,寻找相似序列。

2 结果与分析

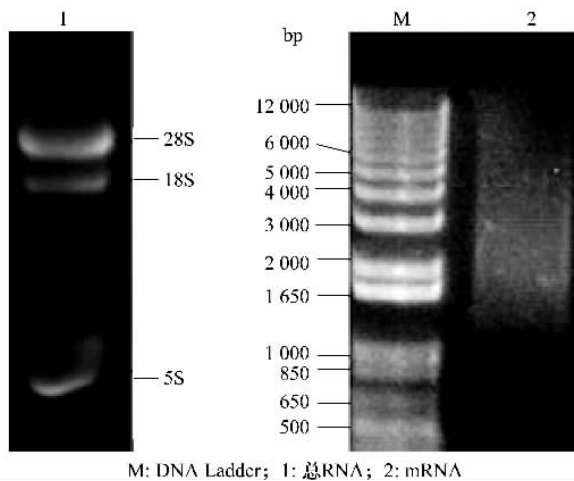
2.1 灰飞虱总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

提取的灰飞虱总 RNA 经紫外分光光度计测定分析, $A_{260}/A_{280}=1.983$,浓度为 $2.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取少量 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示所提取的总 RNA 28S 和 18S 清晰、完整(图 1),表示 RNA 未降解,质量高,纯化的 mRNA 较清晰,大小分布均匀,可用于下步文库的构建。

2.2 初级 cDNA 文库质量的检测

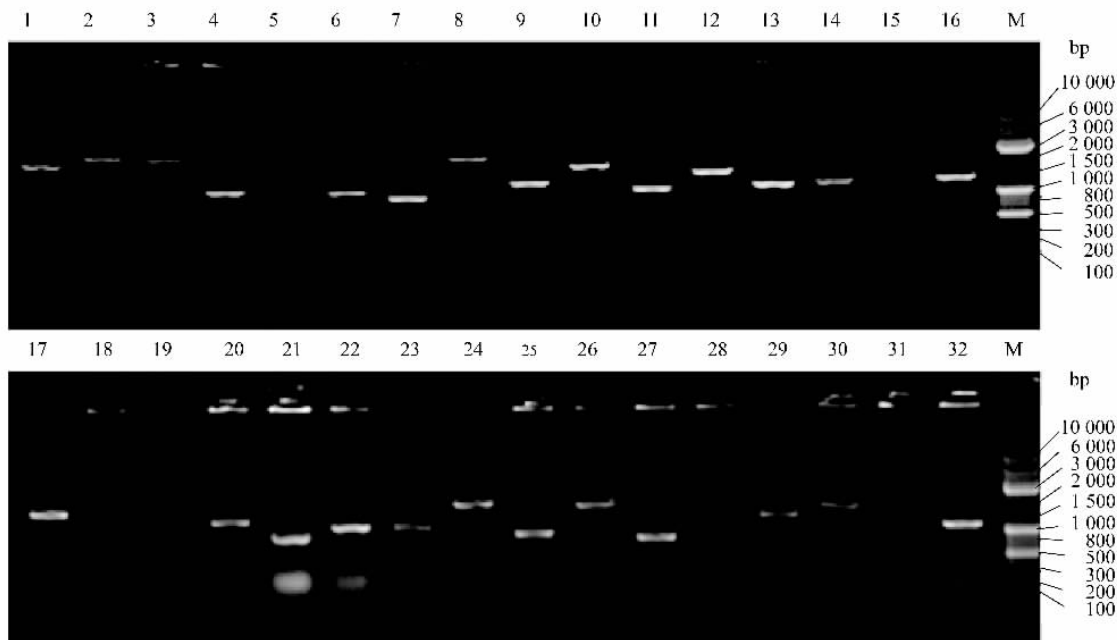
根据 1.2.4 中的总克隆数计算公式得出初级

cDNA 文库的库容量为 1.85×10^7 cfu。从平板上随机挑取 32 个转化子菌落,通过菌液 PCR 检测插入片段及重组率。从图 2 可以看出,灰飞虱初级文库 cDNA 插入片段主要分布在 $1\ 000 \sim 2\ 000$ bp 之间,平均插入片段大于 $1\ 300$ bp,具有良好的多态性。在所检测的 32 个转化子中有 1 个为空载体,根据公式:文库重组率=(有插入片段的转化子/总转化子)× 100% ,计算出文库的重组率约为 97% 。



M: DNA Ladder; 1: 总 RNA; 2: mRNA

图 1 总 RNA 和 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图



1~32:重组子 PCR 产物; M: GeneRuler DNA Ladder

图 2 灰飞虱初级 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

2.3 扩增文库质量的检测

根据 1.2.8 中的文库滴度计算公式,计算出扩增文库的滴度为 7.7×10^8 cfu/mL,总库容

量为 1.5×10^9 cfu。从平板上随机挑取 34 个克隆进行菌液 PCR 鉴定,从图 3 中可以看出扩增文库的插入片段主要集中在 $1\ 000 \sim 1\ 500$ bp 之间,

具有较好的多态性。34 个克隆中有 1 个为空载体,所以扩增文库的重组率约为 97%。较高的文

库滴度、库容量和重组率保证了文库的完整性和覆盖度。

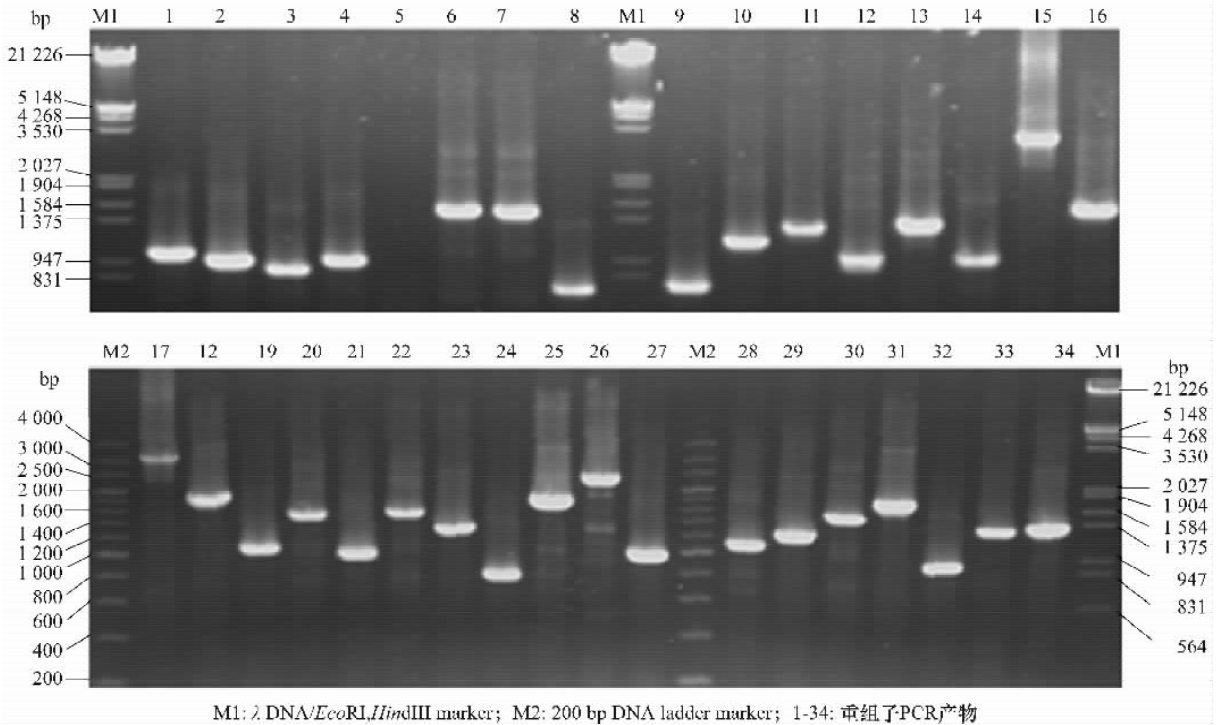


图 3 灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

2.4 cDNA 插入片段测序分析

通过对随机挑取的 10 个克隆进行测序,结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对后分析得知,10 个克隆中有 7 个可以在数据库中找到高度同源的序列,其中 L2、L7 在插入时所编码的蛋白与已知的蛋白读码一致,没有发生移码。

表 1 文库质粒 cDNA 插入片段序列比对分析

克隆	基因注释	E 值
L1	褐飞虱肌球蛋白 2 轻链基因	$3e^{-140}$
L2	灰飞虱细胞色素氧化酶亚基 II 基因	0.0
L3	褐飞虱肌球蛋白 2 轻链基因	$4e^{-162}$
L4	飞虱科 WBYP-2000 16S 核糖体 RNA 基因	$3e^{-69}$
L5	褐飞虱卵黄原蛋白基因	$2e^{-164}$
L6	未发现同源基因	
L7	柑橘木虱 40S 核糖体蛋白 SA 基因	$1e^{-92}$
L8	未发现同源基因	
L9	灰飞虱 α -1 微管蛋白基因	0.0
L10	未发现同源基因	

3 讨论

一个高质量的 cDNA 文库不仅要有高的代表性,也要能保证所插入 cDNA 片段的完整性,所以从 RNA 的提取到 mRNA 的纯化过程都必须严格操

作,避免 RNA 的降解,这是保证所构建文库具有高库容量的先决条件。试验中所提取的灰飞虱总 RNA 质量高,纯化的 mRNA 大都分布在 1~12 kb 之间,达到了文库构建的要求。一个真核生物细胞中约有 5×10^5 个 mRNA 拷贝,扣除操作误差和系统误差,所构建的 cDNA 文库至少应具有 1×10^6 cfu 的库容量^[7]。Invitrogen 公司的酵母双杂交文库构建系统采用了 Gateway 技术,该技术位点特异性重组构建载体,且通过 *ccdB* 基因来筛选阳性克隆,这不仅提高了操作的便捷性、高效性,也提高了阳性克隆率。通过对构建的灰飞虱 cDNA 文库的分析表明,初始文库的库容量为 1.85×10^7 ,从而保证了文库的覆盖度。由于采用的是在 cDNA 两端分别加上 *attB1* 和 *attB2* 接头进行位点特异性重组构建载体,保证了能够定向重组进载体,也避免了限制性酶切和连接的过程,从而保证了插入的 cDNA 片段的方向和序列完整性,同时也降低了嵌合克隆出现的几率^[8],大大提高了文库构建的质量。有研究表明插入片段在 mRNA 中的位置是有一定倾向性的,其位于基因 5'端和 3'端的比例约为 69%和 29%^[9],5'端的非编码区往往带有终止密码子,这就阻碍了

插入片段在酵母中的正确表达,在对灰飞虱文库随机挑取的 10 个克隆进行测序分析中发现能够在酵母中正常表达蛋白没有很快提前终止的有 3 个,而表达的蛋白能够比对到具有较高同源性的只有 2 个(L2、L7)。为了克服由于插入片段中非编码区带有终止密码子造成的提前蛋白翻译终止,Invitrogen 公司还提供了 3 阅读框构建文库的技术,其原理是通过引入 3 个不同接头,使得插入片段能够包含 3 种不同的读码方式,从而进一步保证了文库筛选的完整性。

目前只有少数几种昆虫已经完成了全基因组测序,且在 GenBank 数据库中已报道的灰飞虱基因也很少,随机挑取的 10 个克隆中有 3 个没有比对出具有较高同源性的序列,在其他 8 个克隆中,L2 和 L9 与已经发布的两条灰飞虱序列具有较高同源性,分别为灰飞虱细胞色素氧化酶亚基 II、灰飞虱 alpha 1 微管蛋白。利用该灰飞虱 cDNA 文库,通过直接 PCR,我们已经成功克隆了一些与昆虫核糖体蛋白 L40 同源的灰飞虱基因(未发表结果)。更多的灰飞虱基因的克隆乃至全基因组测序对利用酵母双杂交技术研究一些基因与灰飞虱的互作将起到重要的作用。

通过 cDNA 文库可筛选一些目的基因,对于非模式物种来说是一种具有重要意义的有效手段^[10]。酵母双杂交系统具有快速、灵敏的特点,已被广泛用来研究蛋白间的互作。在植物病毒与昆虫介体的互作研究中也报道^[11-12]。本试验中构建的灰飞虱酵母双杂交文库具有较高的完整性和覆盖度,达到了酵母双杂交筛选的标准,可以用来研究 RSV、RBS-DV 与介体灰飞虱间互作,以这两种病毒的功能蛋白为诱饵筛选与之互作的灰飞虱蛋白,以便更深入

了解昆虫介体传毒机制。

参考文献

- [1] 陈丹,杨国友. 江苏省主要抗水稻条纹叶枯病品种的推广及其应用价值[J]. 上海农业科技, 2006(3):42-46.
- [2] 张恒木,孙焕然,王华弟,等. 水稻条纹病毒分子生物学研究进展[J]. 植物保护学报, 2007,34(4):436-440.
- [3] 李彦红,许永久. 水稻病毒病的防治[J]. 安徽农学通报, 2009,15(12):119.
- [4] Xiong R Y, Wu J X, Zhou Y J, et al. Identification of a movement protein of *Rice stripe tenuivirus*[J]. Journal of Virology, 2008, 82:12304-12311.
- [5] Xiong R Y, Wu J X, Zhou Y J, et al. Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by *Rice stripe tenuivirus*[J]. Virology, 2009, 387:29-40.
- [6] 张凌娣,王朝辉,王献兵,等. 两种植物病毒编码蛋白的基因沉默抑制子功能鉴定[J]. 科学通报, 2005, 50(3):219-224.
- [7] 冯飞,梁佳勇,纪春艳,等. 链格孢菌(*Alternaria tenuissima*) cDNA 酵母表达文库的构建[J]. 中国农学通报, 2009, 25(12):25-29.
- [8] Ohara O, Temple G. Directional cDNA library construction assisted by the in vitro recombination reaction[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(4):e22.
- [9] 武景阳,李朝翠,孔清华,等. 利用修饰的随机引物构建非洲爪蟾酵母双杂交定向 cDNA 文库[J]. 动物学研究, 2008, 29(4):368-372.
- [10] 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.
- [11] Morin S, Ghanim M, Sobol I. The GroEL protein of the whitefly *bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system[J]. Virology, 2000,276(2):404-416.
- [12] Visser P B, Bol J F. Nonstructural proteins of *Tobacco rattle virus* which have a role in nematode-transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein[J]. Journal of General Virology, 1999, 80:3273-3280.

封面照片说明:

菜粉蝶(*Pieris rapae* Linnaeus)是十字花科蔬菜生产的世界性害虫,原分布于欧洲、亚洲,它不断地扩散,于 1860 年到了加拿大,1883 年到了美国的加州,1929 年到澳洲的墨尔本。菜粉蝶可能是唯一一种人类大面积向它喷洒农药却依然相当兴旺的蝴蝶。1 年多代,以蛹越冬(越冬蛹常常褐色,有斑点)。成虫在离地面不高的空中缓慢飞行,遇到地面的绿色植物会停休,不是寄主又会飞离。卵单产在植物的叶背。幼虫取食十字花科的植物,也取食醉蝶花等植物。雌蝶前翅前缘及顶角处的黑纹比雄蝶大而明显;对于老龄幼虫,有时雄性幼虫在体腹部 4~5 节处的背面可显示皮下一对淡黄色肾形斑(精巢),但有时表皮较厚的幼虫则不易辨别。因此可见一对黄色肾形斑者可判断为雄性,而没有此斑的幼虫则不一定全是雌虫。菜粉蝶的雌蝶一生多只交配一次,如果有雄蝶对已交配过的雌蝶示爱,她会拒绝,用下面的体态来表示:在叶子的表面她会降低翅膀,并把腹部上翘。个别未交配过的雌蝶也会做出这种动作。有时雄蝶也会看错,把停休的雄蝶看成雌蝶;这时后者会轻轻拍动几下翅膀,前者会意马上离开。本期刊登了“菜粉蝶在不同温度下的实验种群生命表”,可供参考。

上图 a:菜粉蝶成虫在旋覆花上吸食花蜜;下图 b:停休在扶芳藤上的雌蝶上翘腹部,拒绝右上方的雄蝶求偶;下图 c:菜粉蝶的雄性幼虫,腹部 4~5 节背中处可见 1 对淡黄色肾形斑。