

灰飞虱高带毒 (RSV) 群体酵母双杂交 cDNA 文库的构建

李 硕^{1,2,#}, 孙丽娟^{1,2,#}, 李 醒², 熊如意², 徐秋芳², 周益军^{2,*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095;

2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏省植物病毒病诊断检测技术中心, 南京 210014)

摘要: 为了研究灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén 与水稻条纹病毒 (rice stripe virus, RSV) 互作机制, 本研究构建了灰飞虱高带毒群体酵母双杂交 cDNA 文库。以实验室筛选的灰飞虱高带毒群体为材料, 分离纯化 mRNA, 反转录合成双链 cDNA, 并连接三框型接头, 层析柱分级纯化。采用同源重组反应制备三框型 cDNA 入门文库, 再通过同源重组将入门文库转移到 Gateway 兼容载体 pGADT7-DEST 上, 构建获得酵母双杂交 cDNA 文库。检测结果表明: 文库库容量为 3.68×10^7 cfu, 扩增文库滴度为 2.62×10^{10} cfu/mL; 文库重组率大于 95%, cDNA 插入片段平均长度 > 1 kb, 达到了标准 cDNA 文库的要求。灰飞虱高带毒群体酵母双杂交 cDNA 文库的构建为开展昆虫介体与水稻条纹病毒互作机制的研究奠定了基础。

关键词: 灰飞虱; 水稻条纹病毒; 同源重组; cDNA 文库; 酵母双杂交 cDNA 文库

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)11-1324-05

Construction of yeast two-hybrid cDNA library of high-viruliferous (RSV-infected) populations of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

LI Shuo^{1,2,#}, SUN Li-Juan^{1,2,#}, LI Xing², XIONG Ru-Yi², XU Qiu-Fang², ZHOU Yi-Jun^{2,*} (1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Technical Service Center of Diagnosis and Detection for Plant Virus Diseases, Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to research the interaction between the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén, SBPH) and rice stripe virus (RSV), yeast two-hybrid cDNA library of high-viruliferous (RSV-infected) SBPH populations was constructed. SBPH infected with RSV was maintained in our laboratory. The mRNA was isolated and purified from high-viruliferous populations, and used as the template to synthesize the double-strand cDNAs. The cDNAs were ligated with three-frame adapter and purified by the cDNA size fractionation columns. By using homologous recombination reaction, the cDNA entry library was prepared and then recombined into Gateway compatible vector pGADT7-DEST to construct yeast two-hybrid cDNA library. Detection of the library indicated that it contained 3.68×10^7 independent clones, and the titer of the amplified library was 2.62×10^{10} cfu/mL. The recombination rate was above 95%, and the average size of inserts was above 1 kb in the cDNA library. The results demonstrate that the library database meets the requirements of the standard cDNA library. The yeast two-hybrid cDNA library of high-viruliferous SBPH will be useful for the future research on the interaction between insect vector and RSV.

Key words: Small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*); rice stripe virus; homologous recombination; cDNA library; yeast two-hybrid cDNA library

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973”计划) 项目 (2010CB126203); 国家自然科学基金项目 (30970132); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201003031); 江苏省自然科学基金项目 (BK2010018)

作者简介: 李硕, 男, 1984 年 5 月生, 山东淄博人, 博士研究生, 主要从事植物病毒与昆虫介体互作研究, E-mail: lishuolstonn989@163.com; 孙丽娟, 女, 1985 年 6 月生, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒学研究, E-mail: 2009102016@njau.edu.cn

#共同第一作者 Authors with equal contribution

* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 023-68251019, E-mail: yjzhou@jaas.ac.cn

收稿日期 Received: 2011-07-29; 接受日期 Accepted: 2011-09-25

水稻条纹叶枯病是水稻重要病害之一,近年来在我国广大稻区暴发流行(周益军, 2010),该病是由灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén (small brown planthopper, SBPH) 传播水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)引起的,病毒能在灰飞虱体内循环并增殖,并由灰飞虱以持久方式经卵传播(Falk and Tsai, 1998)。水稻条纹叶枯病的流行和暴发与灰飞虱的广泛发生有着非常密切的关系(Hibino, 1996; 周益军, 2010),因此,了解灰飞虱对 RSV 的专化性识别和传播机制是防治该病毒病害的关键。

目前,灰飞虱与 RSV 互作的分子机制还不清楚,寻找病毒互作蛋白是研究 RSV 与介体互作的基础。早期研究病毒互作蛋白的方法,如病毒覆盖检测(virus overlay assay)、免疫共沉淀等,受条件所限,仅能找到少量病毒互作蛋白。构建酵母双杂交 cDNA 文库,可以用某个病毒蛋白作为诱饵,借助酵母双杂交技术平台,对 cDNA 文库进行大规模、高通量的蛋白筛选,从而在较短时间内高效寻找到与诱饵蛋白具有互作关系的蛋白,进而研究互作的意义和蛋白的功能(鹿连明等, 2008)。Lu 等(2009)应用此方法,从水稻 cDNA 文库中筛选获得了若干 RSV 互作蛋白。因此,高质量的灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建对研究 RSV 与介体互作具有重要意义。

本研究以实验室多代筛选获得的高带毒(RSV)灰飞虱群体总 RNA 为模板,采用 BP 同源重组反应制备了灰飞虱三框型 cDNA 入门文库,再通过 LR 同源重组将入门文库转移到 Gateway 兼容的酵母双杂交载体 pGADT7-DEST,构建获得了酵母双杂交 cDNA 文库。以期从该文库中筛选能够与 RSV 蛋白具有互作关系的介体蛋白,并分析互作蛋白在介体专化性识别、传播 RSV 过程中的作用,对于研究灰飞虱与 RSV 互作的分子机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

为了最大限度地分离到与 RSV 互作的灰飞虱蛋白,选取实验室多代筛选获得的灰飞虱带毒(RSV)高亲和性群体为建库材料。高亲和性群体参照刘海建等(2007)的方法筛选获得。将田间采集的灰飞虱单头雌虫分别饲养在一玻璃瓶中(每瓶有 3~4 颗两叶期水稻幼苗,品种为武育梗 3 号),并对每头灰飞虱做好标记,产卵 3~4 d 后取出,检测

母本灰飞虱的带毒(RSV)情况,其后代继续饲养备用。选取孵化率高的母本带毒家系,饲养 4~5 代后检测其后代带毒情况,后代带毒率 80% 以上的,称为带毒高亲和性群体。本实验所选用的带毒高亲和性群体,带毒率为 90%。

1.2 菌株和载体

宿主菌 DH10B,载体 pDONRTM 222, pDEST22 购自 Invitrogen 公司;载体 pGADT7 购自 Clontech 公司。

1.3 主要试剂

TRIzol Reagent, FastTrack[®] 2.0 Kit, CloneMinerTM II cDNA Library Construction Kit 和 PureLinkTM HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit 均购自 Invitrogen 公司。

1.4 总 RNA 的提取

取 3 g 灰飞虱样品,液氮研磨,用 Trizol 试剂提取样品总 RNA(参照 Trizol 试剂说明书进行)。取少量 RNA 用紫外分光光度计测定 OD 值和浓度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.5 mRNA 的分离纯化

利用 FastTrack[®] 2.0 Kit 分离纯化总 RNA (> 500 μg)中的 mRNA(参照说明书进行),并用紫外分光光度计检测 mRNA 的质量。

1.6 cDNA 的合成

cDNA 的合成方法参照 CloneMinerTM II cDNA Library Construction Kit 说明书进行:取纯化的 mRNA 为模板,以 biotin-attB2-Oligo(dT) Primer(5' 端标记生物素)和 SuperScript III 反转录酶,合成 cDNA 第一链,再以 cDNA 第一链为模板,在 *Escherichia coli* RNase H, *E. coli* DNA Polymerase I 和 *E. coli* DNA Ligase 的共同作用下,合成第二链,合成的第二链 cDNA 在 T4 DNA Polymerase 的作用下产生平末端。获得的双链 cDNA 与重组接头 attB1 Adapter 连接(三框型接头,各连接一份),产生 attB-flanked cDNA,柱层析法将 cDNA 分级分离并收集。

1.7 BP 重组反应构建 cDNA 入门文库(Uncut 型)

参照 CloneMinerTM II cDNA Library Construction Kit 说明书进行 cDNA 入门文库的构建:取纯化后的 attB-flanked cDNA 用 Bp ClonaseTM II Enzyme Mix 与 pDONRTM 222 载体进行 BP 同源重组反应,重组产物经乙醇-NH₄OAc-Glycogen 纯化后,电转化感受态细胞(The ElectroMAXTM DH10BTM T1 Phage

Resistant Cells, 转化效率 $> 1 \times 10^{10}$ cfu/ μg DNA), 电击条件设置为: 2.0 kV, 200 Ω , 25 μF 。电转产物加入 SOC 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 振荡培养 1.5 h。培养结束后, 取 10 μL 菌液用于库容量鉴定, 10 μL 菌液逐级稀释 10, 100 和 1 000 倍后, 分别取 50 μL 涂布 LB/Kan 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。总克隆数 $\text{CFU} = (\text{平板上的克隆数}/50 \mu\text{L}) \times \text{稀释倍数} \times 1 \times 10^3 \mu\text{L}$ 。剩余培养物加甘油至终浓度 20%, -80°C 保存, 即为 cDNA 入门文库菌液。

1.8 pGADT7 载体的改造

为了利用 LR 重组将入门文库转换为酵母双杂交 cDNA 文库, 需将最终表达载体 pGADT7 (酵母双杂交 Prey 载体) 改造成为 Gateway 兼容载体 pGADT7-DEST。改造内容为在不改变原载体读码框的前提下, 将载体多克隆位点区域替换为重组臂 attR1-ccdB-Cm^R-attR2。设计引物 DEST-F: 5'-CGCATATGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAACG-3', DEST-R: 5'-CACTCGAGCACCCTTTGTACAAGAAA GCTGAACG-3', 上下游分别添加 *Nde* I/*Xho* I 酶切位点, 以 pDEST22 质粒为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物酶切、回收, 与 *Nde* I/*Xho* I 酶切的 pGADT7 载体连接, 转化到 *ccdB*-Survival 细胞, 挑取单克隆测序, 筛选出序列正确的克隆, 即完成载体改造。

1.9 酵母双杂交 cDNA 文库的构建

提取验证合格的 cDNA 入门文库质粒和 pGADT7-DEST 载体质粒, 两种质粒 (各 300 ng) 在 LR ClonaseTM II Enzyme Mix 的作用下进行 LR 同源重组反应, 重组产物经乙醇-NH₄OAc-Glycogen 纯化后, 按照 1.7 节的方法, 电转化感受态细胞, 获得酵母双杂交 cDNA 文库菌液。取 10 μL 菌液按照 1.7 节的方法, 涂布 LB/Amp 平板, 鉴定库容量, 其余菌液加甘油至终浓度 20%, -80°C 保存。

1.10 文库扩增和滴度测定

为了获得足量的独立克隆和文库质粒用于酵母双杂交文库筛选, 需要对 cDNA 初始文库进行扩增。向 100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 Amp 半固体培养基中加入约 2×10^6 cfu 文库菌液, 混匀, 置冰水上使培养基凝固为半固体, 30 $^{\circ}\text{C}$, 50 r/min 培养 35 ~ 40 h。将培养物于 10 400 g 离心 20 min, 小心弃上清, 加入 2 mL 含有 Amp 的 LB 培养基悬匀沉淀, 取 10 μL 菌液按照 1.7 节的方法, 涂布 LB/Amp 平板, 鉴定文库滴度, 其余菌液加甘油至终浓度 20%, -80°C 保存, 即为扩增文库菌液。

2 结果与分析

2.1 灰飞虱总 RNA 的提取及 mRNA 的分离纯化

用 Trizol 试剂提取灰飞虱总 RNA 后, 利用 FastTrack[®] 2.0 Kit 分离纯化获得 mRNA。紫外分光光度计测定, 总 RNA 纯度为 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.962$, 浓度为 1.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 总量为 580 μg , mRNA 纯度为 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.974$, 浓度为 0.152 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 总量为 7.6 μg 。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 可观察到总 RNA 有 18S 和 28S 两条清晰的带, 且 28S 条带亮度约为 18S 条带的 2 倍, 无拖尾现象, mRNA 有一条弥散的带。由此表明, 提取的总 RNA 和分离纯化的 mRNA 含量高、纯度高, 且未发生降解, 无 DNA、蛋白质及小分子污染, 质量评判合格, 满足建库的要求。

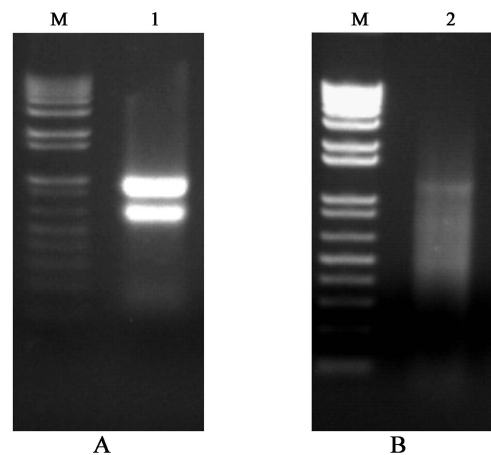


图 1 灰飞虱总 RNA (A) 和 mRNA (B) 电泳图

Fig. 1 Total RNA (A) and mRNA (B) isolated from the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*)

M: 1 kb DNA Ladder; 1: 总 RNA (Total RNA); 2: 纯化的 mRNA (Purified mRNA).

2.2 双链 cDNA 的合成及纯化

以 3 μg mRNA 反转录合成 cDNA 第一链, 再以第一链为模板合成双链 cDNA。双链 cDNA 连接三框型重组接头 attB1 Adapter, 获得 attB-flanked cDNA, 以柱层析法分离纯化。如图 2 所示, 合成的双链 cDNA 电泳呈弥散状, 大小分布在 500 ~ 4 000 bp 范围内, 与 mRNA 的条带相对应, 说明不同大小和不同丰度的 mRNA 都得到了有效的反转录, 可以用于 cDNA 文库的构建。

2.3 cDNA 入门文库的鉴定

取 10 μL 入门文库菌液逐级稀释 10, 100 和

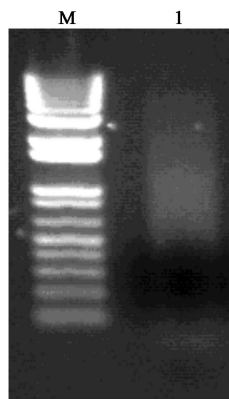


图2 双链 cDNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of double-strand cDNA

M: 1 kb DNA Ladder; 1: 合成的双链 cDNA (Synthesized ds-cDNA).

1 000倍后, 分别取 50 μL 涂布 LB/Kan 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。根据公式, 总克隆数(库容量) $\text{CFU} = (\text{平板上的克隆数}/50 \mu\text{L}) \times \text{稀释倍数} \times 1 \times 10^3 \mu\text{L}$, 计算得入门文库的库容量为 $2.56 \times 10^7 \text{ cfu}$ 。菌落 PCR 检测文库重组率和 cDNA 插入片段的大小, 根据文库重组率 = (有插入片段的反应个数/反应总数) $\times 100\%$, 计算得入门文库的重组率大于 95%, 文库插入片段平均长度 $>1 \text{ kb}$, 且具有良好的多样性(图 3)。高质量的入门文库保证了后面 LR 重组的质量。

2.4 酵母双杂交 cDNA 文库的鉴定

入门文库质粒与 pGADT7-DEST 载体进行 LR 重组反应后, 获得酵母双杂交 cDNA 文库。取 10 μL 文库菌液逐级稀释 10, 100 和 1 000 倍后, 分别

取 50 μL 涂布 LB/Amp 平板。根据公式(同 2.3 节), 计算文库的库容量为 $3.68 \times 10^7 \text{ cfu}$ 。菌落 PCR 和质粒酶切鉴定 cDNA 插入片段的大小, 如图 4 所示, 文库 cDNA 插入片段平均长度 $>1 \text{ kb}$, 且具有良好的多样性。质粒酶切鉴定结果与 PCR 检测结果一致。根据文库重组率计算公式(同 2.3 节), 计算得文库重组率大于 95%。对 cDNA 文库进行扩增, 扩增文库滴度为 $2.62 \times 10^{10} \text{ cfu/mL}$ 。较高的库容量和文库质量保证了 cDNA 文库的完整性和覆盖度, 达到了标准 cDNA 文库的要求。

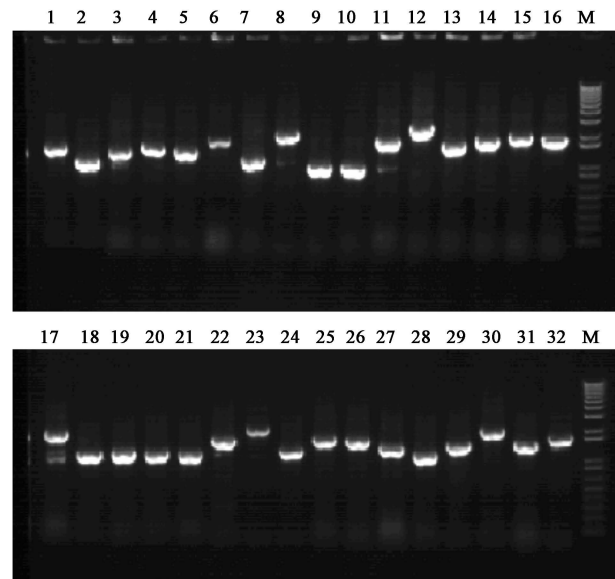


图3 入门文库中 cDNA 插入片段的 PCR 检测

Fig. 3 PCR identification of cDNA inserts in the entry library

M: 1 kb DNA Ladder; 1-32: 重组子 Recombinants.

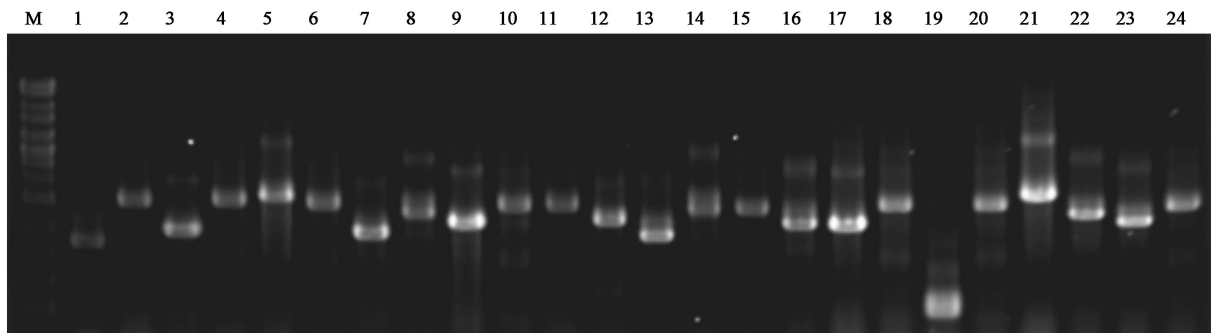


图4 酵母双杂交 cDNA 文库中插入片段的 PCR 检测

Fig. 4 PCR identification of inserts in the yeast two-hybrid cDNA library

M: 1 kb DNA Ladder; 1-24: 重组子 Recombinants.

3 讨论

高质量的 cDNA 文库是准确分析基因结构和功

能信息的保证。对 cDNA 文库质量的评价主要体现在两个方面(晏慧君等, 2006), 一为文库的代表性, 即文库中包含的重组 cDNA 片段所反映 mRNA 种类的完整性, 是体现文库质量的最重要指标, 文

库的代表性可用库容量来表示,库容量取决于来源组织中 mRNA 的种类和每种 mRNA 的拷贝数。因此, RNA 的提取和 mRNA 的分离纯化是 cDNA 合成和文库构建过程中最为关键的一步。本研究严格按照试剂盒说明抽提并纯化 mRNA,通过质量评价确定所提取的 RNA 和 mRNA 产量高、纯度好且未发生降解。测定 cDNA 文库库容量为 3.68×10^7 cfu (大于 1.0×10^6 cfu),保证了文库的完整性和覆盖度。文库质量评价的另一个方面是重组 cDNA 片段的序列完整性,要准确分析基因的结构和功能信息,就要求文库中 cDNA 序列尽量完整。本研究利用 *E. coli* RNase H、DNA Polymerase I、DNA Ligase 几种酶的共同作用完成 cDNA 第二链的合成,与 SMART 方法相比,没有引入任何 PCR 过程,cDNA 完全忠实于样品本身,尽可能保证了 cDNA 序列的完整性。

另外,酵母双杂交 cDNA 文库较之普通 cDNA 文库,插入片段读码框的正确性也是一个重要的评价指标。因为利用酵母双杂交系统筛选文库研究蛋白的互作,是建立在蛋白在酵母细胞内正确翻译表达的基础之上,蛋白不表达或不正确表达都会使研究失去意义。本研究通过运用 Gateway 技术将 cDNA 克隆到载体,不需要使用限制性内切酶,并且由于 3'端用生物素标记,接头只能连接在 5'端,大大提高了连接效率。重组时,由于双链 cDNA 上下游分别连有重组接头 attB1 和 attB2,这样就保证了 cDNA 片段定向插入到载体中。由于蛋白是以三联体密码子策略进行编码的,即 3 个碱基编码一个氨基酸,不同的读码框会得到不同的产物,因此即使片段定向插入到 Prey 载体中,也只有 1/3 的可能得到正确的表达产物。针对这一问题,我们将双链 cDNA 上游的重组接头 attB1 设计为三框型接头,使克隆的 cDNA 以可能的 3 种读码框进行表达,尽可能地保证了 cDNA 片段得到正确表达。

酵母双杂交 cDNA 文库的构建是当前研究蛋白质相互作用的基础。利用酵母双杂交系统可以从高质量的 cDNA 文库中高效、大规模地筛选获得在真核细胞体内与已知蛋白有互作关系的蛋白,从而有效地分离新基因进而研究基因的功能和蛋白互作的意义。目前,灰飞虱与 RSV 互作的分子机制还不

清楚,灰飞虱的获毒、病毒在昆虫体内的运动、增殖、卵传后代以及灰飞虱释放 RSV 的过程必然存在着一系列复杂的蛋白互作机制,筛选灰飞虱体内参与 RSV 互作相关蛋白因子,对于研究灰飞虱传毒机制具有重要意义。灰飞虱高带毒群体 cDNA 文库的构建为该研究的顺利开展奠定了基础。本研究所构建的灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库经分析评价确定其质量达到了酵母双杂交研究的标准,可以用来进行大规模的互作蛋白筛选实验。我们可用 RSV 各蛋白作为诱饵,筛选与其互作的蛋白,分析互作蛋白可能的功能,进一步研究蛋白互作的意义,从而逐步明确灰飞虱传播 RSV 的分子机制。

参 考 文 献 (References)

- Falk BW, Tsai JH, 1998. Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 139 - 163.
- Hibino H, 1996. Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34: 249 - 274.
- Liu HJ, Cheng ZB, Wang Y, Wei BQ, Ren CM, Zhou YJ, Fan YJ, 2007. Preliminary study on transmission of rice stripe virus by small brown planthopper. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 23 (5): 492 - 494. [刘海建,程兆榜,王跃,魏邦庆,任春梅,周益军,范永坚,2007. 灰飞虱传递水稻条纹病毒研究初报. 江苏农业学报, 23(5): 492 - 494]
- Lu LM, Du ZG, Qin ML, Wang P, Lan HH, Niu XQ, Jia DS, Xie LY, Lin QY, Xie LH, Wu ZJ, 2009. Pc4, a putative movement protein of rice stripe virus, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. *Virus Genes*, 38(2): 320 - 327.
- Lu LM, Qin ML, Niu XQ, Lan HH, Wang P, Xie LY, Wu ZJ, Xie LH, 2008. Construction and comparative analysis of yeast two-hybrid cDNA libraries of two rice cultivars (strains). *Acta Laser Biology Sinica*, 17(5): 656 - 662. [鹿连明,秦梅玲,牛晓庆,兰汉红,王萍,谢荔岩,吴祖建,谢联辉,2008. 两个水稻品种(系)酵母双杂交 cDNA 文库的构建和比较分析. 激光生物学报, 17(5): 656 - 662]
- Yan HJ, Huang XQ, Cheng ZQ, 2006. Advances of the studies on construction strategy and analysis of cDNA library. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21(1): 1 - 6. [晏慧君,黄兴奇,程在全,2006. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展. 云南农业大学学报, 21(1): 1 - 6]
- Zhou YJ, 2010. Rice Stripe Virus Disease. Jiangsu Science & Technology Press, Nanjing. 2 - 3, 118 - 143. [周益军,2010. 水稻条纹叶枯病. 南京: 江苏科学技术出版社. 2 - 3, 118 - 143]

(责任编辑:赵利辉)