

SMART 技术构建的辣椒疫霉菌与辣椒互作 AD-cDNA 文库

周志国 明月梅

(廊坊师范学院生命科学学院, 河北廊坊 065000)

摘要: 为了分离和克隆辣椒中疫霉菌诱导基因, 以接种辣椒疫霉菌的叶片为材料, 利用 SMART 技术构建辣椒疫霉菌与辣椒互作的双杂交 cDNA 文库。结果表明: 该文库容量为 3.6×10^6 cfu, 重组率 88% 左右, 插入片段集中在 300 ~ 2 000 bp 之间, 平均长度约为 800 bp, 表明获得的文库质量较高, 该文库将为分子育种提供重要的基因资源。

关键词: 辣椒疫霉菌; SMART 技术; 双杂交 cDNA 文库

辣椒是我国重要的蔬菜和加工原料作物, 产值居蔬菜之首(谢思惠等, 2011)。在辣椒生产过程中, 病害种类多, 发生频繁, 其中疫病(*Phytophthora blight*) 是重要的真菌性土传病害, 发病快, 蔓延迅速, 病程期短, 防治困难(杜晓华等, 2005), 常造成辣椒大面积减产甚至绝收, 在我国吉林、辽宁、青海、河北、北京、云南、甘肃、陕西、上海、浙江、湖南、江苏、江西等地均有发生(周启明等, 1984; 关天舒等, 1995; 邹学校等, 2004)。研究人员已对辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*) 的生理

与致病机理、辣椒的疫病病理、栽培方式、化学防治、生物防治等方面进行了相关研究(田林等, 1989; 朱英波和李超, 2002; 李智军等, 2007; 刘学敏, 2007; 江厚春等, 2011), 但抗病育种作为防治辣椒疫病的重要方法, 其抗病资源相对缺乏(程芳, 2007; 史云国, 2007; 徐刘平和郭坚华, 2007)。

cDNA 文库是现代研究功能基因组学的最有效手段之一, 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(Colin et al., 1999; 蔡宁波等, 2007; 朱利军等, 2009)。利用 SMART 技术(Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) 构建全长 cDNA 文库, 可从中发现候选基因, 从而在生产上实现转基因技术的广泛应用(张冲等, 2013)。为充分开发和利用辣椒抗病基因, 本试验以辣椒为材料, 利用 SMART 技术构建辣椒

周志国, 男, 讲师, 主要从事蔬菜作物遗传育种工作, E-mail: zhiguo_zhou@163.com

收稿日期: 2015-06-19; 接受日期: 2015-07-30

基金项目: 河北省科技计划项目(12226306), 河北省高校食用菌应用技术研发中心项目(YF201411)

Abstract: Taking tomato variety 'Yingfen No.8' as test material, this paper used peat and vermiculite as mixed matrix to study in tidal irrigation and under intelligent greenhouse condition the effects of nutrient supplying maintaining time and interval time on quality of tomato seedlings raised on trays with central composite rotatable designs of 2 factors. The results showed when tomato grew 5 leaves and 1 heart, with the increase of nutrient supplying time, the seedling dry matter and strong seedling index showed first increasing then declining trend. While along with the interval time extension of nutrient supplying, the seedling dry matter and strong seedling index showed a declining tendency. The optimal nutrient supplying scheme is in 8-18 min of maintaining time and 198-348 min of interval time. Thus the seedling quality could achieve an ideal situation. We believe under the experiment condition, this solution is the best water and fertilizer supplying scheme.

Key words: Tidal irrigation; Tomato; Plug seedling; Time for nutrient supplying; Strong seedling index

疫霉菌诱导的混合叶片 Y2H 的 AD-cDNA 文库, 测定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生物信息学分析。该文库为筛选辣椒-疫霉互作蛋白分子基因提供丰富资源, 为研究辣椒-疫霉相互作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取 8~10 叶期的卞椒 1 号辣椒无菌苗, 接种疫霉菌孢子悬浮液 (含游动孢子 $1\ 000\ \text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2 mL, 分别于 12、24、48、60、72 h 后取样, 液氮冻存, 用于 RNA 提取。

Trizol 试剂即 TRIzol Reagent (CW0580), 购自康为世纪, 文库构建试剂盒 Make Your Own “Mate & Plate” Library System User Manual (630490) 购自 Clonetechn 公司。

1.2 文库的构建

1.2.1 高质量 RNA 的提取 采用 Trizol 法分别提取辣椒疫霉菌诱导的接种 12、24、48、60、72 h 后叶片的总 RNA, 具体方法参考说明书 CW0580, 利用琼脂糖凝胶电泳检测, 同时用核酸蛋白测定仪检测总 RNA 的浓度及纯度。

1.2.2 cDNA 的合成与纯化 以 Total RNA 为模板, 参照说明书 630490, 以 CDSIII/6 PCR Primer 合成第一链, 然后以 3' PCR Primer 和 5' PCR Primer 为引物通过 LD-PCR 合成双链 cDNA。经 CHROMA SPIN+TE-400 (Clonetechn) 分离柱去除双链 cDNA 中 200 bp 以下短片段。

1.2.3 文库的构建 将质粒载体 pGADT7-Rec 与纯化后的双链 cDNA 连接, 然后转入新鲜制备的酵母感受态 Y187, 涂布于 100 个 SD/-Leu 培养基平板, 同时分别吸取 1:100、1:1 000 转化后的 Y187 细胞稀释液 100 μL 到 SD/-Leu 平板上, 计算转化效率。4 d 后用玻璃珠法, 将收集下来的酵母溶于 YPDA 液体, 混匀后与 75% 的甘油以 2 V:1 V 的比例混合保存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.3 cDNA 文库的检测

将酵母菌液 10 μL 稀释 10 000 倍后, 取出 50 μL 涂布 SD/-Leu 平板, 培养 4 d, 计算文库滴度。

文库滴度 ($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) = 平板上的克隆数 / 0.05 mL $\times 10^{-4}$

库容量 = 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 (参照说明书 680490) 进行 PCR 扩增, 之后测序 (上海生工生物工程有限公司), 在辣椒数据库网站 (<http://peppersequence.genomics.cn>) 对测序结果进行比对与分析。

2 结果与分析

2.1 AD-cDNA 文库构建

2.1.1 RNA 质量检测 提取高质量 RNA 是 cDNA 文库构建成功的关键, 采用 Trizol 法分别提取辣椒疫霉菌诱导的卞椒 1 号叶片总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测可看出, 提取的 5 个样品总 RNA 可见 2 条清晰的 28S、18S RNA 条带, 完整性较好 (图 1)。经核酸蛋白仪测定 (表 1), 5 个样品的总 RNA 均符合文库构建的要求。将 5 个总 RNA 样品分别吸取 1、0.6、0.5、0.6、0.8 μL 混匀, 用于 cDNA 的合成。

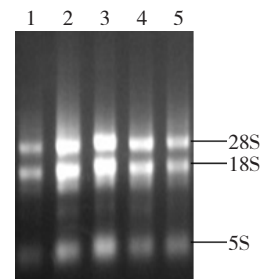


图 1 辣椒疫霉菌诱导的辣椒叶片总 RNA 凝胶电泳结果
1~5: 样品 1~5 的 RNA。

表 1 RNA 质量检测

样品	吸光值 1 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)	吸光值 2 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$)	浓度 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
样品 1 (接种 12 h)	1.90	2.01	2.6
样品 2 (接种 24 h)	1.91	2.05	4.6
样品 3 (接种 48 h)	1.89	1.98	5.0
样品 4 (接种 60 h)	1.95	2.02	4.4
样品 5 (接种 72 h)	1.89	1.93	3.2

2.1.2 cDNA 的合成 以 CDSIII/6 PCR Primer 引物合成 cDNA, 得到的双链 cDNA 带呈弥散状均匀分布 (图 2-a), 质量完全符合建库要求。经 CHROMA SPIN+TE-400 树脂柱纯化后的双链 cDNA 带富集在 400~3 000 bp (图 2-b), 经检测其质量和浓度均达到建库的要求。

2.2 AD-cDNA 文库的质量鉴定

根据同源重组的原理, 将合成的 cDNA 和

pGADT7-Rec 载体共转化酵母 Y187 感受态细胞, 经过 SD/-Leu 平板筛选, 4 d 后获得阳性重组子 (图 3-a)。经统计, 酵母转化液稀释 1 000 倍后涂布获得的重组子数目为 24 个单克隆 (图 3-b), 文库的转化效率为 $4.8 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$, 高于建库要求。文库容量 = $24 \text{ (每皿平均克隆数)} / 100 \mu\text{L} \times 1\,000 \times 15 \times 10^3 \mu\text{L} = 3.6 \times 10^6 \text{ cfu}$ 。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 $2 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 达到酵母双杂交所需要的细胞浓度。

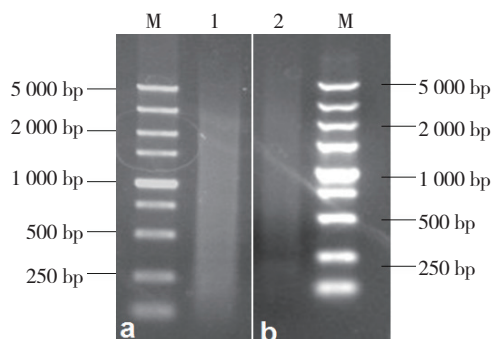


图 2 dsDNA 电泳结果

M: 5 000 bp DNA ladder; 1: 用 CDSIII Primer 扩增的 dsDNA; 2: 纯化后的 dsDNA。

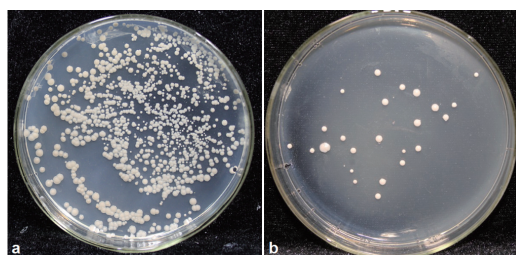


图 3 文库构建与质量评估

a: 酵母转化液涂布 ($150 \mu\text{L} \cdot \text{皿}^{-1}$); b: 酵母转化液稀释 1 000 倍后涂布 ($100 \mu\text{L} \cdot \text{皿}^{-1}$)。

用玻璃珠法收集文库克隆, 取收集的文库菌液稀释 10 000 倍后涂布培养, 观察计数 (图 4), 计算文库滴度 = $286 \text{ cfu} / 0.05 \text{ mL} \times 10^{-4} = 5.72 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

随机挑取 50 个酵母菌落进行 PCR 检测, 检查

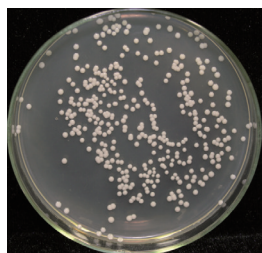


图 4 稀释平板计数文库滴度

文库的空载率以及插入片段的平均长度。其结果表明, 有 6 个单克隆未出现条带, 文库质粒的空载率 12% 左右, 重组率 88%, 插入片段长度为 300 ~ 2 000 bp, 平均长度约为 800 bp (图 5)。

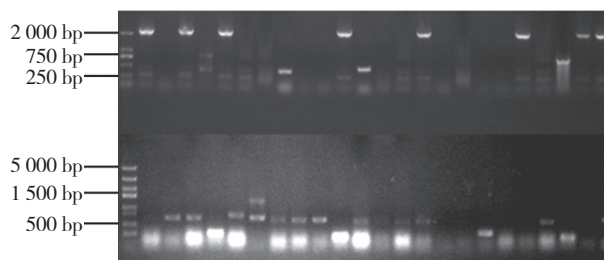


图 5 文库随机菌落 PCR 电泳检测

测序结果经 Blast 和 DNAMAN 多重序列比对, 共有 20 个无重复序列, 在辣椒数据库网站上进行序列比对, 共有 20 组基因, 编码 17 种已知蛋白, 3 种未知蛋白 (表 2)。

表 2 文库克隆测序基因

编号	编码蛋白	序列覆盖率/%	出现次数
1	丝氨酸羟甲基转移酶	98	2
2	葡糖基转移酶	99	2
3	果胶裂解酶	64	3
4	钙调蛋白	98	3
5	聚半乳糖醛酸酶	99	2
6	半乳糖苷酶	98	3
7	细胞周期蛋白	97	3
8	未知蛋白	89	2
9	未知蛋白	92	2
10	锌指蛋白	90	2
11	α -葡糖苷酶	98	4
12	疫霉激酶	96	2
13	乙烯响应因子	97	3
14	热休克蛋白 22	98	1
15	未知蛋白	99	1
16	细胞色素 P450	98	1
17	蔗糖磷酸合成酶	99	2
18	Nodulin 家族蛋白	97	1
19	前纤维蛋白	100	2
20	胰蛋白酶抑制剂	97	3

3 结论与讨论

SMART 技术构建文库操作简单, 且获得全长比例较高。该技术避免了 mRNA 在分离纯化时发生降解和丢失; 利用同源重组把外源双链 cDNA 定向重组到载体上, 解决了连接效率低等问题, 保证了 cDNA 文库的方向性和完整性 (Zhu et al., 2001)。

辣椒基因组测序已经完成, 研究人员构建了高

密度的连锁图谱,并组装得到高质量的基因组精细图谱,基因组大小约为 3.3 Gb,其中约 90% 的基因都锚定在染色体上 (Qin et al., 2014)。本试验所构建的辣椒疫霉菌诱导的辣椒叶片全长 cDNA 文库转化效率约为 4.8×10^6 cfu $\cdot\mu\text{g}^{-1}$,文库滴度为 5.72×10^7 cfu $\cdot\text{ml}^{-1}$,重组率近 90%,插入片段集中在 300~2 000 bp 之间,平均长度约为 800 bp,达到了文库构建要求,还满足蛋白互作实验(酵母双杂交)。通过构建诱饵基因载体,可以在较短时间内从 AD-cDNA 文库中筛选出与诱饵基因互作的基因。

cDNA 文库的重组率、滴度、插入片段的大小及片段完整性是检测文库的重要指标。总 RNA 质量直接决定 cDNA 文库质量的好坏,本文库构建中选取了条带清晰,无酚类、蛋白、多糖等污染的 RNA 样品,符合构建高质量 cDNA 文库的条件。利用多样品混合的文库来筛选和挖掘诱导相关基因,可为培育高产、优质和抗病的新品种辣椒提供丰富的基因资源,为辣椒新品种分子育种奠定基础。

参考文献

- 蔡宁波,黄湘文,庄伟建. 2007. 花生种子全长 cDNA 文库的构建和鉴定. 花生学报, 36 (2): 1-5.
- 程芳. 2007. 辣椒疫霉菌的综合防治. 农村科技, (7): 27.
- 杜晓华,巩振辉,李大伟. 2005. 辣椒抗疫病的遗传与育种. 西北农业学报, 14 (1): 30-36.
- 关天舒,李风云,赵奎华,刘长远,苗则彦,乔勇. 1995. 我国辣椒疫病的研究现状. 辽宁农业科学, (5): 24-27.
- 江厚春,朱辉,王满意,吕国华,李宝聚. 2011. 李宝聚博士治病手记(三十三): 辣椒疫病初侵染来源、传播途径及防治技术. 中国蔬菜, (5): 23-25.
- 李智军,龙卫平,郑锦荣,雷建军. 2007. 广东辣椒疫霉菌分离鉴定及其致病力和生理小种分化研究. 华南农业大学学报, 28 (1): 50-54.
- 刘学敏. 2007. 辣椒疫霉菌侵染模型和侵染条件定量研究. 应用生态学报, 18 (5): 1061-1065.
- 史云国. 2007. 大棚辣椒疫病的发生与综合治理技术. 上海蔬菜, (4): 59-60.
- 田林,沈克功,王有琪,沈克功,李廷群. 1989. 甘肃省辣椒疫病病原菌鉴定及生物学特性研究. 科技情报(兰州), (2): 11-14.
- 谢思惠,魏泽平,张永佳,郑宜清,兰秀英,曹克友. 2011. 辣椒种质资源与育种研究进展. 闽东农业科技, (1): 20-25.
- 徐刘平,郭坚华. 2007. 生防菌 NJ02 防治辣椒疫霉菌病效果及对辣椒根围微生物群落的影响. 江苏农业科学, (1): 59-62.
- 张冲,蔡铁城,陈华,曾建斌,庄伟建. 2013. 青枯菌诱导的烟草叶片全长 cDNA 文库的构建和初步分析. 分子植物育种, 11(5): 624-629.
- 周启明,李林英,杨淑华. 1984. 辣椒疫病的调查研究. 中国蔬菜, (1): 40-43.
- 朱利军,长孙东亭,罗素兰. 2009. 全长 cDNA 文库构建方法及应用研究. 海南大学学报: 自然科学版, 27 (2): 185-190.
- 朱英波,李超. 2002. 辣椒抗性组织病理学初步研究. 中国农学通报, 18 (5): 55-56.
- 邹学校,戴雄泽,马艳青,张竹青,刘荣云,陈文超,李雪峰,周群初. 2004. 湖南辣椒地方品种资源与湘研辣椒品种选育的灰色关联分析. 植物遗传资源学报, 5 (3): 233-238.
- Colin P L, Npris S R, Wheeler G L, Williams E H, Smirnov N, Last R L. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 4198-4203.
- Qin C, Yu C, Shen Y, et al. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111 (14): 5135-5140.
- Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, Li R, Siebert P D. 2001. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. Biotechniques, 30 (4): 892-897.

Construction of AD-cDNA Library for Interaction of *Phytophthora capsici* and Pepper in SMART Technology

ZHOU Zhi-guo, MING Yue-mei

(Life Science Department, Langfang City Normal College, Langfang 065000, Hebei, China)

Abstract: In order to identify the *Phytophthora capsici* stress induced genes of pepper, a double-hybrid cDNA library of *Phytophthora capsici* infected pepper leaves was constructed using SMART technology. The results showed that the cDNA library contained 3.6×10^6 independent clones, and the recombination rate was 88%. Insert fragments ranged from 300 bp to 2 000 bp, and the average length of the library was about 800 bp. These data demonstrate that the library is qualified, and able to provide important genetic resources for molecular breeding.

Keywords: *Phytophthora capsici*; SMART technology; Double-hybrid cDNA library