

刘永惠, 沈 一, 陈志德. 花生干旱及高盐胁迫下的酵母双杂交文库构建[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 40-43.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.006

花生干旱及高盐胁迫下的酵母双杂交文库构建

刘永惠, 沈 一, 陈志德

(江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 干旱、高盐等胁迫对花生的产量和品质影响较大, 为了挖掘花生耐干旱和高盐胁迫相关基因, 并阐释其编码蛋白质间的互作关系, 本研究利用 SMART 技术, 构建了花生干旱及高盐胁迫下的酵母双杂交文库。结果表明, 构建的文库容量为 1.26×10^6 CFU, 文库滴度达到 1.07×10^8 CFU/ml, 从随机挑选的 16 个克隆的 PCR 结果来看, 插入片段大小差异明显, 主要分布在 500~2 000 bp, 重组率为 100%。说明该文库具有较高的质量, 可以用于进一步的筛选工作。

关键词: 花生; 干旱; 高盐; 酵母双杂交 cDNA 文库

中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0040-04

Construction and identification of a yeast two-hybrid cDNA library of peanut under drought and high salinity stress

LIU Yong-hui, SHEN Yi, CHEN Zhi-de

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Yield and quality of peanut (*Arachis hypogaea* L.) were affected by water stress such as drought and high salinity. In order to mine genes related to water stress tolerance in peanut, and describe the interaction among encoded proteins, a yeast two-hybrid cDNA library of peanut under drought and high salinity stress was constructed by SMART (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) technique. The results showed that the average capacity of the cDNA library was about 1.26×10^6 independent clones, and the titer was up to 1.07×10^8 CFU/ml. The PCR amplification of 16 clones randomly selected from the cDNA library revealed that the lengths of inserted cDNA fragments ranged from 500 bp to 2 000 bp, with the recombination rate of 100%. It is indicated that the cDNA library was constructed with a high quality, and was applicable for screening interaction proteins.

Key words: peanut; drought; high salinity; a yeast two-hybrid cDNA library

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是世界范围内广泛分布的经济和油料作物^[1]。中国是世界上最大的

花生生产、消费和出口国, 花生产业的发展对于增加农民收入和保障国家食用油安全具有重要意义。干旱及高盐等极端条件是植物生长过程中所面临的主要逆境胁迫因子^[2]。在中国, 花生主要分布在干旱半干旱地区, 干旱、高盐等胁迫成为提高花生产量和品质的首要限制因子之一。作物的抗旱耐盐性是由多基因控制的复杂性状^[3]。与水稻、大豆等作物相比, 花生抗旱、耐盐性状的分子研究还处于起始阶

收稿日期: 2015-08-15

基金项目: 国家现代农业花生产业技术体系项目 (CARS-14); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(14)2001]

作者简介: 刘永惠 (1985-), 女, 江苏盐城人, 硕士, 助理研究员, 主要从事花生资源研究工作。 (Tel) 13770633970

通讯作者: 陈志德, (Tel) 13851834013

段。抗旱研究主要集中在抗旱育种及筛选方法的探索上^[4-5];耐盐相关基因目前报道的仅 *AhNCED1* 基因^[6]。因此,要实现花生抗旱耐盐性状的改良,必须对花生耐水分胁迫的分子机理进行较为深入的研究。

酵母双杂交系统是目前研究生物体内蛋白质互作,探索分子机理的有效手段^[7]。其利用 SMART 技术,通过 PowerScript™ RT 反转录酶将少量的 mRNA 或总 RNA 反转录得到大量双链 cDNA^[8]。该方法操作简单,构建的 cDNA 文库代表性和完整性均能达到分离筛选目的基因的要求^[9-10]。因此,本研究利用 SMART 技术构建花生幼苗在干旱、高盐胁迫下的酵母双杂交文库,用来筛选花生耐水分胁迫关键基因的互作蛋白质,为研究花生耐水分胁迫的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 取抗旱性较强的花生品种丰花 1 号的 15 粒种子,萌发后于光照培养箱中生长至 3 叶期,将 3 叶期幼苗分别进行干旱胁迫处理(20% PEG6000)、高盐(170 mmol/L NaCl)胁迫处理 24 h 后,分别取幼苗叶片,液氮速冻后于-80℃保存。

1.1.2 试剂 试验中使用的总 RNA 提取试剂盒(E. Z. N. A.™ Plant RNA Kit)购自 OMEGA 公司;SMART™ 酵母文库构建试剂盒(含酵母菌株、载体、培养基等)购自 Clontech 公司;酵母质粒提取试剂盒购自 Tiangen 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 将预先保存的干旱处理及高盐处理的花生幼苗叶片,等量混合放入研钵中,在液氮下快速研磨成粉状,利用 RNA 提取试剂盒提取样品的总 RNA,并用 DNase I 进行消化处理。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, NanoDrop-2000 型分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。

1.2.2 双链 cDNA 的合成 利用 Clontech 公司的 Make Your Own 'Mate &Plate' Library System 试剂盒进行反转录合成 cDNA 第 1 链。用 Advantage 2 Polymerase Mix 试剂盒 PCR 扩增 cDNA 第 2 链,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ds cDNA 的质量。用 CHROMA SPIN™+ TE-400 Columns 筛选大于 200 bp

的 cDNA,用 NanoDrop-2000 及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化后 ds cDNA 的浓度及质量。

1.2.3 文库的构建 将纯化后的 ds cDNA 片段与线性化处理后的 pGADT7-SfiI (Clontech 公司生产)载体同时转化酵母 Y187 感受态细胞,感受态细胞制备及转化方法参考林振等^[9]的方法。采用 PEG/LiAc 法转化,利用 SD/-Leu 缺失培养基进行筛选,30℃,倒置培养 3~5 d 后收集克隆,将长出克隆的酵母琼脂板放置于 4℃冻存 3~4 h。每个板加入 5 ml 冻存液(25% 甘油+YPDA),使 5 mm 的玻璃珠(15~20 个)缓缓地在培养板上摇晃,玻璃珠均匀地滚动于培养基表面将菌落分离,分离后的菌落溶于冻存液中,收集所有液体在大的烧瓶中使用细胞计数器估计细胞密度,使细胞密度>1 ml 2×10^7 。

1.2.4 文库的鉴定 文库的鉴定指标主要包括文库容量、滴度、重组率和多态性分析。一方面将转化后的菌液稀释 100 倍后,取 50 μ l 涂布于含 SD/-Leu 培养基的平皿上,涂布 3 皿,30℃倒置培养 3~5 d,统计平皿上的克隆数。文库容量=每皿平均克隆数/涂布体积(0.05 ml) \times 稀释倍数(100) \times 转化体积(15 ml);另一方面取部分文库收集液稀释 10^4 倍后,同样取 50 μ l 涂布于 SD/-Leu 的平皿上,涂布 3 皿,30℃倒置培养 3~5 d,统计平皿上的克隆数。文库滴度(CFU/ml)=每皿平均菌落数/涂布体积(0.05 ml) \times 稀释倍数(10^4);同时随机挑取 16 个克隆进行培养,使用酵母质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,用插入片段检测引物(引物为 pGADT7-F Primer: 5'-GGAGTACCCATACGACGTACC-3'; pGADT7-R Primer: 5'-TATCTACGATTCATCTGCA-GC-3')进行 PCR 扩增,验证插入片段。文库重组率=阳性克隆数/检测克隆总数 $\times 100\%$,并分析文库插入片段多态性。

2 结果

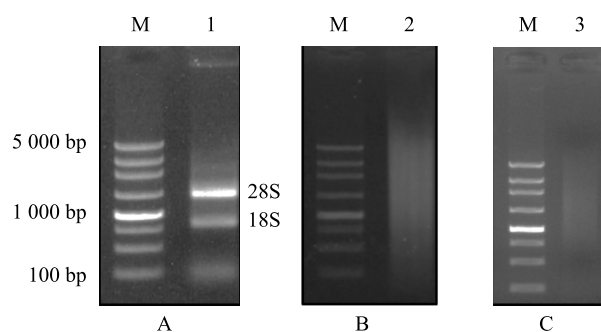
2.1 花生抗旱耐盐总 RNA 的提取

利用 RNA 试剂盒提取了经干旱及高盐处理的花生幼苗混合叶片总 RNA,经 NanoDrop-2000 测定分析,总 RNA 浓度约为 0.439 μ g/ μ l, $OD_{260}/OD_{280}=2.15$,表明所提 RNA 纯度较高。同时经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1A),可见 18S rRNA 和 28S rRNA 的条带清晰,且浓度及亮度比值约为 2,表明总 RNA 的完整性较好,降解较少,可满足后续

构建文库的要求。

2.2 双链 cDNA 的合成与纯化

利用 SMART 技术将提取的总 RNA 进行反转录,合成双链 cDNA。如图 1B 所示,经 PCR 反应扩增后得到的 ds cDNA,电泳检测其条带呈弥散状,主要分布在 100~5 000 bp,表明不同大小和不同丰度的 RNA 被反转录。再进一步通过 CHROMA SPIN™ + TE-400 Columns 对 ds cDNA 进行纯化,去除杂质及小片段 cDNA,再次凝胶电泳显示 200 bp 以下的片段基本被去除(图 1C),与预期结果一致,可以用于 cDNA 文库的构建。



M: DL5000 DNA marker; 1: 总 RNA; 2: ds cDNA; 3: 纯化后的 ds cDNA。

图 1 花生叶片总 RNA (A) 及合成双链 cDNA (B)、纯化双链 cDNA (C) 电泳

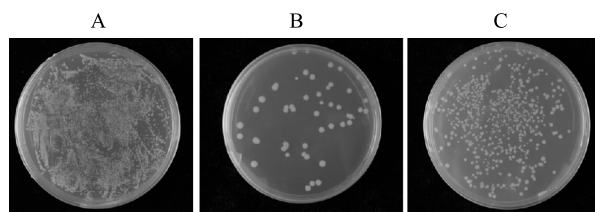
Fig.1 Electrophoresis of total RNA (A) isolated from peanut, synthesized ds cDNA (B), and purified ds cDNA (C)

2.3 文库的构建及鉴定

根据同源重组的原理,将纯化后的 ds cDNA 片段与载体 pGADT7-SfiI 同时转化酵母 Y187 感受态细胞,经过 SD/-Leu 缺失培养基筛选,3 d 左右长出菌落(图 2A)。利用冻存液及玻璃珠分离并收集菌落于大烧瓶中,通过细胞计数器估计细胞密度,结果显示细胞密度 $>1 \text{ ml } 2 \times 10^7$,符合文库构建要求。另外,将转化后的菌液稀释 100 倍后,涂布培养,长出的平均克隆数为 42 个(图 2B),因此折算后文库容量 $=1.26 \times 10^6 \text{ CFU}$;而由图 2C 可见,将文库收集液稀释 10^4 后,涂布培养,长出的平均克隆数为 537 个,由此文库滴度为 $1.07 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$,从结果来看,文库容量及文库滴度的值都大于 10^6 ,表明都已达到了建库要求。

为进一步分析文库重组子情况,随机挑选的

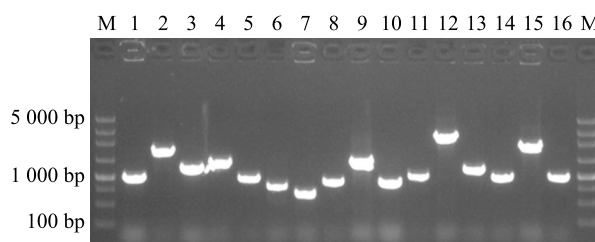
16 个克隆,提取酵母质粒进行 PCR 扩增检测。结果(图 3)显示:16 个均检测到片段,且片段大小差异明显,分布在 500~2 000 bp,主要集中在 1 000 bp 左右,说明文库多态性较好,信息丰富。文库重组率为 100%,达到了文库重组率需 $>80\%$ 的质量要求。



A: 转化培养后菌落生长情况; B: 计算文库容量的菌落; C: 计算文库滴度的菌落。

图 2 文库质量鉴定

Fig.2 Identification of the cDNA library quality



M: DL5000 DNA marker; 1~16: 插入片段。

图 3 文库插入片段检测

Fig.3 Detection of the cDNA library inserts

3 讨论

据统计,中国干旱、半干旱耕地约占总耕地面积的 53%^[12],另有 $3.67 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 的盐碱地有待开垦利用^[13]。花生抗旱耐瘠,是发展旱作农业的理想作物,同时在利用盐碱地方面也具有特殊的地位^[14]。目前生产上的栽培种花生多为异源四倍体,基因组十分庞大,而已知的基因信息还比较少。因此花生分子基因组学研究进展缓慢,有大量的基因及其功能待挖掘。蛋白质是基因功能的执行者和体现者。酵母双杂交技术自 1984 年建立以来,一直被认为是研究蛋白质功能的重要手段^[15-16]。它可以通过研究基因组编码的蛋白质之间的互作,来探究未知基因与已知基因在生物学功能上的联系。目前酵母双杂交技术已在动植物细胞周期与分化、信号传导和

基因表达调控等蛋白质互作研究方面得到了广泛的应用^[17]。

在我们的前期研究中,利用转录组测序技术,挖掘了一批与花生抗旱相关的基因,为了进一步明确这些基因功能,拟借助酵母双杂交技术,通过构建花生干旱高盐胁迫下的酵母双杂交 cDNA 文库筛选出互作蛋白,从而为阐释花生耐干旱胁迫分子机制奠定基础。一般认为酵母双杂交 cDNA 文库的质量是决定酵母双杂交试验能否顺利开展的关键因素。一个高质量的 cDNA 文库主要体现在文库的代表性及插入片段的序列完整性上。本研究中构建的文库容量及文库滴度都超过了 1×10^6 ,且插入片段大小差异明显,范围在 500~2 000 bp,重组率为 100%,表明构建的酵母双杂交文库具有较高的质量,这为接下来的筛选工作打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] 葛道阔,金之庆. 气候变化对我国花生生产的影响[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(1): 55-59.
- [2] 王景晨,陈信波. 植物非生物胁迫应答相关转录因子研究进展[J]. 湖南农业科学, 2011(17): 9-12.
- [3] 曾华宗,罗利军. 植物抗旱、耐盐基因概述[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(3): 270-273.
- [4] 王传堂,张建成. 花生遗传改良[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 360-376.
- [5] 刘永惠,沈 一,陈志德. 花生种质苗期抗旱性鉴定与评价[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 108-111.
- [6] WAN X R, LI L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of Arabidopsis by ectopic expression of a peanut 9-cis- epoxy-carotenoid dioxygenase gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(4): 1030-1038.
- [7] BRAUN P, AUBOURG S, VANLEENE J, et al. Plant protein interactomes [J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 161-187.
- [8] ZHU Y Y, MAEHLEDER 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.
- [9] 何晓兰,许 玲,徐照龙,等. 大豆高盐胁迫下根部组织酵母双杂交文库的构建与分析[J]. 上海农业学报, 2013, 29(6): 20-23.
- [10] 唐立群,黄世文,侯雨萱. 水稻种子酵母双杂交体系的构建及种子特异表达蛋白 ONAC023 互作蛋白的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 16-20.
- [11] 林 振,江建明,袁 亮,等. 乳鼠成骨细胞酵母双杂交 cDNA 文库构建[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 9(19): 930-933.
- [12] 张智猛,万书波,戴良香,等. 不同花生品种对干旱胁迫的响应[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(3): 631-638.
- [13] 朱统国,高华援,周玉萍,等. 花生耐盐性鉴定研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 19-23.
- [14] 刘永惠,沈 一,陈志德,等. 不同花生品种(系)萌发期耐盐性的鉴定与评价[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2): 168-173.
- [15] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246.
- [16] OENDER K, NIEDERMAYR P, HINTNER H, et al. Relative quantitation of protein-protein interaction strength within the yeast two-hybrid system via fluorescence beta-galactosidase activity detection in a high-throughput and low-cost manner [J]. Assay and Drug Development Technologies, 2006, 4(6): 709-719.
- [17] SOELLICK T R, UHRIG J F. Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses [J]. Genome Biol, 2001, 2(12): 1-7.

(责任编辑:陈海霞)