

水稻抽穗期基因酵母双杂交 cDNA 文库的构建及分析

彭 强 吴昌银

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究水稻开花调控的分子网络, 构建了水稻品种中花 11 幼穗分化前倒二叶叶片的酵母双杂交 cDNA 文库。制备了高质量的总 RNA, 用 Oligo(dT) 引物反转录合成 cDNA 第一链和 Long Distance PCR 合成双链 cDNA, 通过 SMART 同源重组交换技术在酵母菌株 AH109 中建立酵母双杂交所需的水稻倒二叶叶片 cDNA 文库。文库质量检测结果表明: cDNA 文库的转化率为 $1.178 \times 10^6 / 3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec, 文库滴度为 2.65×10^8 cfu/mL, 重组率为 94.7%, 插入片段长度为 350~2 000 bp。该文库可用来筛选水稻抽穗期基因的互作蛋白。

关键词 水稻抽穗期基因; 酵母双杂交; SMART 技术; cDNA 文库; 水稻倒二叶

中图分类号 S 511.503; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-404-06

蛋白质作为植物生理调控机制的参与者和执行者, 分析和鉴定其与 DNA、RNA、蛋白质等生物元件的互作关系成为阐述植物开花调控分子机制的前提和基础。在众多检测蛋白质互作的技术中, 酵母双杂交(yeast two-hybrid, Y2H)技术是目前应用最为广泛、获得蛋白质互作数据最多的方法^[1]。构建 cDNA 文库(即捕获文库)是进行大规模酵母双杂交检测蛋白质互作的前提和保障, 该方法已在酵母基因组内检测出大量的蛋白质互作关系, 并建立复杂的蛋白质互作图谱^[2-3]。SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术是特别适合酵母双杂交 cDNA 合成与扩增的系统^[4-7]。

植物开花分子机制的研究一直是科学的研究的前沿和热点, 对植物遗传改良和培养新品种有重大的指导意义。通过对大量开花突变体材料的遗传研究及其基因的功能研究, 发现酵母双杂交系统对水稻开花基因的功能研究、建立蛋白调控网络和完善水稻开花分子调控网络具有重要意义。Bernier^[8]研究表明, 成花素(florigen)是可移动的开花信号, 产生于叶片组织, 通过维管束运输到茎顶端并诱导植物开花。Hd3a/FRT1 蛋白具有天然的成花素特性, 是水稻长短日开花的必需因子^[9], 而 GF14c (a 14-3-3 protein) 是利用酵母双杂交技术筛选 cDNA

文库获得的 Hd3a 互作蛋白, 它通过与 Hd3a 蛋白互作而抑制水稻开花^[10]。OsMADS14 和 OsMADS15 是拟南芥 APETALA1 (AP1) 的同源基因, 是用水稻开花基因 OsMADS1 筛选水稻幼穗 cDNA 文库所分离克隆的新基因^[11], 两者均是 Hd3a 基因下游的促进水稻开花转换基因。本研究利用 SMART 重组交换技术在酵母 AH109 菌株中建立水稻开花转换之前倒二叶叶片组织的 cDNA 文库, 旨在筛选笔者所在实验室克隆的水稻抽穗期基因的互作蛋白, 为阐述水稻开花的分子网络提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种中花 11(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. *zhonghua11*, ZH11)种植在华中农业大学试验田, 在成花转换前 2 d 取倒二叶叶片作为试验材料。

MatchmakerTM Library Construction & Screening Kits User Manual 购自 Clontech 公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司。

酵母菌株 AH109, 载体 pGADT7-Rec 购自 Clontech 公司。

1.2 总RNA的抽提

用液氮研磨叶片组织,采用Trizol试剂(Invitrogen公司)抽提组织总RNA,每1mL Trizol试剂抽提0.1g样品;最终加30μL DEPC H₂O溶解RNA样品;具体操作步骤参考Trizol试剂说明书。用NanoDrop 2000分光光度计测量RNA样的 D_{260}/D_{280} 、 D_{260}/D_{230} 值和浓度,并用1.2%甲醛变性胶检测RNA样的质量^[12]。

1.3 双链cDNA合成及其检测

以2μg总RNA样为模板,采用Oligo(dT)引物反转录合成cDNA第一链和Long distance PCR(LD PCR)扩增合成双链cDNA,LD PCR重复2次获得2管双链cDNA产物,LD PCR扩增26个循环。以上具体操作按照Clontech试剂盒说明书进行;采用1%琼脂糖凝胶电泳检测双链cDNA质量。

1.4 双链cDNA产物纯化及其检测

采用CHROMA SPINTM TE-400 Column纯化回收双链cDNA产物,2个TE-400 Column纯化2管双链cDNA产物,最终收集于同一离心管中,备用。具体方法步骤按照Clontech试剂盒说明书进行;采用1%琼脂糖凝胶电泳检测双链cDNA的纯化结果。

1.5 AH109菌株感受态细胞的制备

用YPDA培养基活化和培养酵母AH109菌株,采用NanoDrop 2000分光光度计测量培养菌液的 D_{600} ,用1.1×TE/LiAc溶液制备建库所需的感受态细胞;具体操作步骤按照Clontech试剂盒的大规模制备感受态细胞说明书进行。

1.6 cDNA文库的构建及其保藏

以本文“1.5”制备的感受态细胞为受体细胞,用DMSO增强细胞通透性,采用热激法把质粒pGADT7-Rec载体和本文“1.4”纯化收回的双链cDNA转入感受态细胞;用0.9%NaCl溶液重悬浮沉淀菌体,得到NaCl酵母悬浮液(NaCl yeast resuspend solution, NaCl YRS),涂布在SD/-Leu平皿获得阳性转化子;再用Freezing medium收集菌体,得到Freezing medium酵母悬浮液(freezing medium yeast resuspend solution, FM YRS),即为所需构建的酵母双杂交cDNA文库;最后将FM YRS分装在2mL无菌离心管中,置于-80℃冰箱中长期保存;具体方法参考按照Clontech试剂盒说明书进行。

1.7 转化率及滴度的测定

用Deinoized H₂O将NaCl YRS和FM YRS依次稀释成10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶和10⁻⁷菌液,各取一定体积的稀释菌液分别涂SD/-Leu平皿;30℃恒温箱培养4~6d,根据SD/-Leu平皿的单菌落($d>2$ mm)的数量计算转化效率及cDNA文库浓度。转化率及滴度的计算方法参照Clontech试剂盒说明书进行。

1.8 重组片段大小和重组率的测定

从SD/-Leu平皿随机挑取38个单菌落($d>2$ mm),用YPDA液体培养基扩大培养获得菌液,采用裂解法抽提酵母质粒DNA;以抽提的质粒DNA为模板,用引物3AD LD-Insert:5'-ACTT-GCGGGGTTTTCACTATCTA-3'和5AD LD-Insert:5'-GATGATGAAGATAACCCACCAAAC-3'进行两步法PCR扩增,扩增条件为94℃预变性3min;94℃变性30s;68℃延伸3min,扩增30个循环;68℃延伸5min;最后25℃保存。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。根据PCR扩增出来的外源片段的大小和个数,统计cDNA文库的重组率和插入片段大小的分布情况。

1.9 候选基因验证cDNA文库的筛选

利用一个编码含C3HC4 Ring Finger结构域锌指蛋白的水稻开花基因CDF1(新鉴定的抽穗期基因,未发表)筛选本文所构建的cDNA文库,以检测cDNA文库的质量,详细操作步骤参照Clontech试剂盒所提供的说明书进行。

2 结果与分析

2.1 总RNA的提取

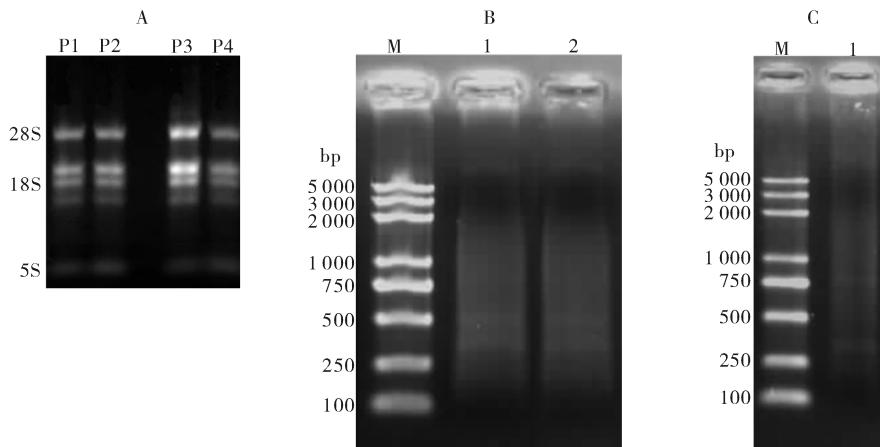
采用Trizol(Invitrogen公司)抽提水稻倒二叶片组织总RNA,由 D_{260}/D_{280} 、 D_{260}/D_{230} 值和RNA浓度可知,P2样品的测量结果最好($D_{260}/D_{280}=2.03$, $D_{260}/D_{230}=2.02$),没有发生任何降解和污染,而其余3个样品虽然没有发生降解,但都有多聚糖污染。图1-A是总RNA样的甲醛变性电泳胶,水稻叶片组织RNA特有的5条带清晰可见,也没有出现拖尾、扩散等降解现象,且28S rRNA条带比18S rRNA条带亮,进一步证明抽提的RNA样质量完好,没有发生降解^[12]。综上所述,最适合用来构建cDNA文库的RNA样品是P2样品。

2.2 双链cDNA的合成

以P2号RNA样为模板,反转录生成cDNA第

一链,再扩增得到双链 cDNA,用 CHROMA SPINTM TE-400 Column 纯化双链 cDNA,去除杂质和小片段 cDNA,图 1-B 和 1-C 分别为双链 cDNA

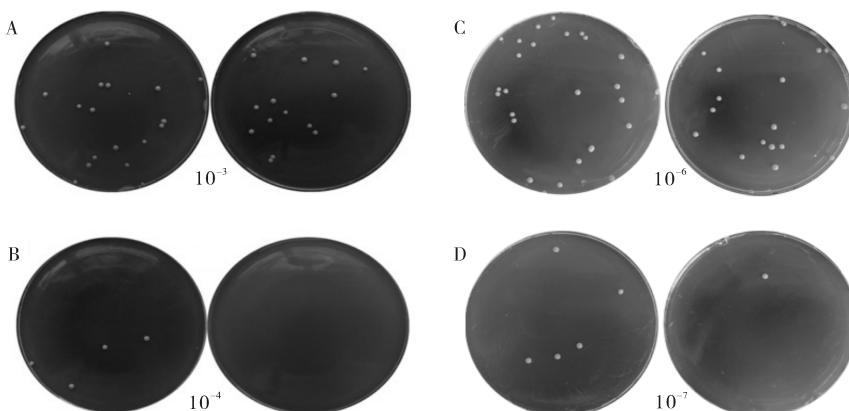
纯化前后的电泳胶图,从图 1 可知,经 TE-400 Column 纯化的双链 cDNA 片段分布在 300 bp~3 kb,与预期结果相吻合。



A:水稻倒二叶片总 RNA 甲醛变性胶电泳 Formaldehyde denaturing gel electrophoresis of total RNA from rice penultimate leaf; B:纯化前的双链 cDNA 琼脂糖胶电泳 Agarose gel electrophoresis of double-strand cDNA; C:TE-400 Column 纯化的双链 cDNA 琼脂糖胶电泳 Agarose gel electrophoresis of the double-strand cDNA which was purified by TE-400 Column; M: Trans 2K Plus DNA Marker; P1, P2, P3, P4, 1, 2: 样品编号 Samples code.

图 1 构建 cDNA 文库中的电泳检测图

Fig. 1 The electrophoresis pictures of constructing cDNA library



A, B 用来计算 cDNA 文库的转化率, 分别表示 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释的 NaCl 酵母悬浮液在 SD/-Leu 平皿的生长情况; C, D 用来统计 cDNA 文库的滴度, 分别表示 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释的 Freezing medium 酵母悬浮液在 SD/-Leu 平皿的生长情况。A and B were used to calculate the transformation efficiency of the cDNA library, which represented the growth of 10^{-3} and 10^{-4} diluted with NaCl yeast resuspend solution on SD/-Leu medium, respectively; C and D were used for counting the titers of cDNA library, which showed the growth of 10^{-6} and 10^{-7} diluted with Freezing medium yeast resuspend solution on SD/-Leu medium, respectively.

图 2 cDNA 文库酵母在 SD/-Leu 平皿上的生长情况

Fig. 2 The growth of the cDNA library yeast on SD/-Leu medium

2.3 cDNA 文库的构建及其保藏

通过同源重组把纯化的双链 cDNA 整合到 pGADT7-Rec 载体上,再转化进入酵母 AH109 菌株中,得到所需的 cDNA 文库。把构建好的 cDNA 文库(即 100 mL Freezing medium 重悬浮沉淀菌体

所得的 FM YRS)分装于 2 mL 离心管(1.5 mL/管),共分装 65 管,长期保存于-80℃冰箱。

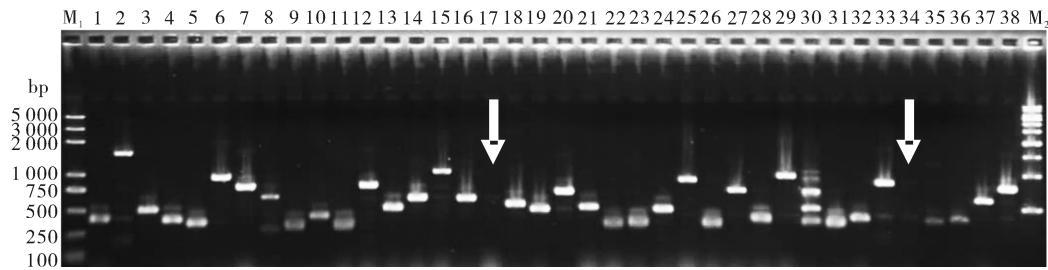
2.4 cDNA 文库的转化率和滴度的测定

用 25 mL 0.9% NaCl 溶液重悬浮 1.5 mL 沉淀菌体,故 NaCl YRS 总体积为 26.5 mL。统计不

同稀释倍数的 NaCl YRS 在 SD/-Leu 平皿上的单菌落($d > 2$ mm)数量,从图 2-A 和 2-B 中可知,800 μL 10^{-3} NaCl YRS 在 SD/-Leu 平皿上长出 36 个单菌落,900 μL 10^{-4} NaCl YRS 在 SD/-Leu 平皿上长出 4 个单菌落;两者的转化率分别为 1.192×10^6 转化子/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec 和 1.178×10^6 转化子/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec,取平均值得到 cDNA 文库的转化率为 1.185×10^6 转化子/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec,均达

到实验要求(1.0×10^6 转化子/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec)。

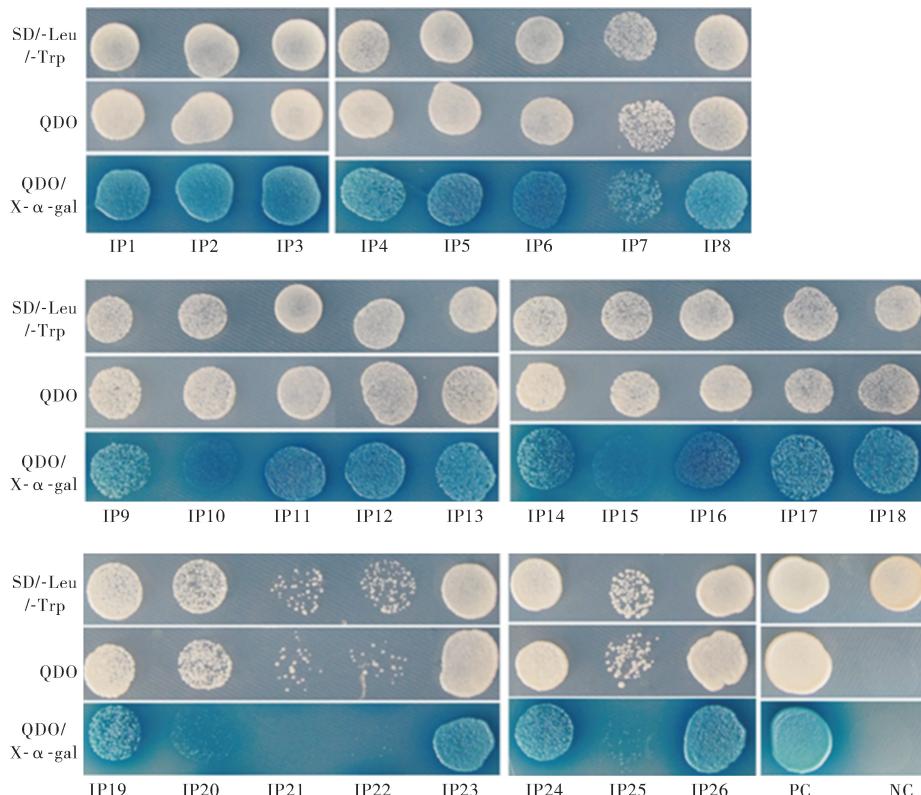
采用同样方法,统计不同稀释倍数的 FM YRS 在 SD/-Leu 平皿上的单菌落($d > 2$ mm)数量(图 2-C,D),200 μL 10^{-6} FM YRS 在 SD/-Leu 平皿上长出 46 个单菌落,200 μL 10^{-7} FM YRS 在 SD/-Leu 平皿上长出 6 个单菌落;故 cDNA 文库的平均滴度为 2.65×10^8 cfu/mL,达到实验要求(2×10^7 cfu/mL)。



1-38: 菌落编号 The number of clone; M₁: Trans 2K Plus DNA Marker; M₂: DSTM 5 000 Marker.

图 3 cDNA 文库的 PCR 检测结果

Fig. 3 The PCR detecting results of the cDNA library



QDO: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp; IP1-IP26: 互作蛋白编号 The number of putative interacting protein; PC: 阳性对照 Positive control; NC: 阴性对照 Negative control.

图 4 共转化验证文库筛选结果

Fig. 4 Confirm the screening results by cotransformation

2.5 cDNA 文库重组率及重组片段大小的鉴定

根据两步法 PCR 扩增结果,统计扩增出外源重组片段的菌落个数及其片段大小,并计算出其占总挑选菌落数的百分数。从图 3 可知,随机挑选的 38 个菌落中除 17 和 34 号菌落没有扩增出任何条带外(如白色箭头所示),其余 36 个菌落均扩增出外源片段,故目的 cDNA 文库的重组率为 94.7%,重组外源片段大小分布区间为 350~2 000 bp,平均大小为 700 bp。

2.6 筛选文库验证

用 CDF1 基因筛选本试验所构建的 cDNA 文库,经过共转化、自激活验证、序列比对和读码框分析,共筛选得到 26 个水稻基因,其中有 5 个基因被多次筛选到。在筛选文库所得的 26 个基因中,有些基因直接得到全长 cDNA 序列,大部分基因得到编码部分蛋白结构域的 cDNA 序列。从图 4 可以看出,所有的转化酵母菌株都能长出菌斑,说明 26 个候选蛋白都能与目的基因编码蛋白互作,进一步证明本文所构建的叶片 cDNA 文库是合格的,能够用来筛选水稻抽穗期基因的互作蛋白。

3 讨 论

评价高质量 cDNA 文库的 2 个重要指标是 cDNA 文库的完整性和代表性。高质量的总 RNA 样品是构建高质量 cDNA 文库的前提,并直接影响 cDNA 文库质量的好坏。本试验中 P2 的总 RNA 样品条带清晰,没有发生降解,且不存在多聚糖、蛋白质等杂质污染,从而具备了构建高质量 cDNA 文库的先决条件。

SMART 技术避免了 mRNA 在分离纯化时发生降解和丢失;而 CHROMA SPINTM TE-400 Column 纯化回收双链 cDNA 可消除小片段 DNA 对 cDNA 文库整合外源片段的不利影响;利用同源重组方法把外源双链 cDNA 定向重组到载体上,有效地避免了繁琐的酶切和连接等步骤,也解决了连接效率低和嵌合克隆等问题,保证 cDNA 文库整合外源双链 cDNA 的方向性和完整性^[13]。

本研究所构建的 cDNA 文库的转化率为 1.185×10^6 转化子/3 μ g pGADT7-Rec,达到了能够筛选出全基因组低拷贝数基因的要求(1×10^6 转化子/3 μ g pGADT7-Rec);而 cDNA 文库的平均库容量(滴度)高达 2.65×10^8 cfu/mL,保证了 cDNA 文库的覆盖度和代表性^[14]。

本研究所构建的 cDNA 文库是以水稻开花转换之前的倒二叶叶片为材料,而开花转换是影响水稻产量的重要生理过程,且水稻开花调控分子机制的研究一直是科学的研究的前沿和热点。因此,本研究所构建的 cDNA 文库可用来筛选水稻开花调控途径中重要的蛋白质互作关系,解析重点开花基因(尤其是水稻开花转换决定基因)行使生理功能的分子机制,建立复杂的水稻开花基因的蛋白调控网络,从而为完善水稻开花调控分子机制提供必备的研究平台。

参 考 文 献

- UHRIG J F. Protein interaction networks in plants[J]. *Planta*, 2006, 224(4): 771-781.
- 储晓洁, 恒康, 胡晓晶, 等. 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 的转录激活作用[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 582-587.
- 胡晓晶, 储晓洁, 恒康, 等. 百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1 和 NSP2 的相互作用[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(2): 132-137.
- ZHU Y Y, MACHELEDER 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.
- LOPATO S, BAZANOVA N, MORRAN S, et al. Isolation of plant transcription factors using a modified yeast one-hybrid system[J]. *Plant Methods*, 2006, 2: 3-17.
- 刘燕, 谷慧琳, 熊小波, 等. 紫云英 AD-cDNA 文库构建及与豆血红蛋白 Lb 相互作用靶蛋白的筛选[J]. 微生物学报, 2010, 50(12): 1607-1612.
- ZHANG J K, ZHAO L F, CHENG J, et al. Screening of genes for proteins interacting with the PS1TP5 protein of hepatitis B virus: probing a human leukocyte cDNA library using the yeast two-hybrid system[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(22): 1884-1891.
- BERNIER G C. A physiological overview of the genetics of flowering time control[J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(1): 3-16.
- KOMIYA R, IKEGAMI A, TAMAKI S, et al. Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice[J]. *Development*, 2008, 135(4): 767-774.
- PURWESTRI Y A, OGAKI Y, TAMAKI S, et al. The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a[J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(3): 429-438.
- LIM J, MOON Y H, AN G, et al. Two rice MADS domain proteins interact with OsMADS1[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(4): 513-527.
- FARRELL R E. RNA methodologies: a laboratory guide for

- isolation and characterization[M]. 3rd ed. 北京:科学出版社, 2007:169-174.
- [13] 肖冬来, 邓慧颖, 谢荔岩, 等. 灰飞虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建及分析[J]. 植物保护, 2011, 37(1):19-23.
- [14] 张军杰, 崔红军, 黄玉碧. 玉米叶片酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5):162-165.

Construction of a yeast two-hybrid cDNA library for gene interaction during heading stage of rice

PENG Qiang WU Chang-yin

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract A yeast two-hybrid cDNA library of penultimate leaf harvested from the rice cultivar Zhonghua11 before its flowering transition was constructed to study the molecular network of flowering regulation. The high-quality total RNA was isolated and the first-strand cDNA was obtained by reverse transcription using primer Oligo(dT). The double-strand cDNA was amplified by using Long Distance PCR. The cDNA library of rice penultimate leaf was generated by using homologous recombination-mediated SMART technology in yeast strain AH109. The testing results of library's quality showed that the transformation efficiency of cDNA library was 1.185×10^6 transformants/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec with the titers of 2.65×10^8 cfu/mL and the recombinant rate of 94.7%. The sizes of inserted fragments were ranged from 350 bp to 2 000 bp. These data indicated that the cDNA library could be used to screen interacting proteins of the flowering time gene in rice.

Key words flowering time gene in rice; yeast two-hybrid; SMART technology; cDNA library; rice penultimate leaf

(责任编辑:张志钰)