

运用 Gibson 克隆技术构建蒺藜苜蓿成熟根瘤的酵母 AD-cDNA 文库

陈琳 余海翔 张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以蒺藜苜蓿(A17)的成熟根瘤为材料,联合应用 Gibson 克隆技术和 SMART cDNA 技术构建 cDNA 文库,其转化效率达到 7.74×10^5 cfu/3 μ g pGADT7-Rec-*New*。随机菌落 PCR 检测结果表明,插入 DNA 片段的大小为 0.5 ~ 2.0 kb,其中插入片段 > 0.75 kb 的占 45.6%,文库的重组效率达到 91.7%,构建的 cDNA 文库以质粒形式保藏备用。采用此法不仅可以构建用于酵母单杂交或双杂交的文库,同样也适用于其他质粒文库的构建。利用酵母单杂交技术,以在根瘤中高表达基因启动子元件为诱饵,筛选构建的文库,得到拟似与 DNA 互作的蛋白质。

关键词 蒺藜苜蓿; 根瘤; AD-cDNA 文库; Gibson 克隆技术

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0023-05

豆科植物能够与土壤微生物根瘤菌形成共生体-根瘤(nodule),根瘤能将氮气(N_2)还原为氨(NH_3)直接供植物所利用。固氮根瘤的形成需要 2 个发育过程:其一是根瘤器官的发生和发育,其二是侵入线的形成、延伸并到达正在发育的根瘤,尽管这 2 个发育过程在遗传学上是独立的,但它们必须在时空上相互协调,以保证根瘤器官发生在细菌感染点上^[1-3]。近几年来,在蒺藜苜蓿中发现了一类固氮缺陷(defective in nitrogen fixation)突变体,其中 *dnf1* 突变体根瘤中细菌能够被释放到根瘤细胞中,但细菌不能分化为类菌体,导致丧失固氮能力^[4]。*dnf2*、*rsd*、*symCRK* 突变体根瘤均呈现固氮缺陷(*dnf*),根瘤发育受阻、出现早衰等现象^[5-7]。最近,Wang 等^[8]从蒺藜苜蓿中分离到一个与激活根瘤防御反应相关的突变体,并命名为 *nad1*(nodules with activated defense 1),在 *nad1* 突变体中,根瘤菌能形成正常的侵染线和不固氮根瘤,但当根瘤菌从侵染线释放到植物细胞后,迅速引起根瘤中强烈的防御反应,导致根瘤菌和共生细胞坏死。然而,有关 *DNF2*、*RSD*、*SymCRK* 这些基因在根瘤中的表达调控及其作用机制还不清楚。本研究以蒺藜苜蓿的成熟根瘤为材料,联合应用 Gibson 克隆技

术^[9-10]和 SMART cDNA 文库构建技术(酵母单杂交操作手册),构建 AD-cDNA 质粒文库,以期从根瘤中分离和鉴定出与这些基因表达调控相关的转录因子(与 DNA 互作的蛋白)以及与这类 DNF 蛋白互作的调控蛋白,为揭示固氮缺陷基因的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)生态型 Jema-long A17 种子,中华苜蓿根瘤菌菌株(*Sinorhizobium meliloti* 2011, Sm2011)由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司,酵母单杂试剂盒购自 Clontech 公司。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 等均购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌感受态细胞(Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell)购自 TransGEN Biotech 公司。引物合成交由武汉擎科及上海生工生物工程公司完成。

1.2 植物结瘤试验

蒺藜苜蓿种子消毒处理及栽培按照文献[8,11]报道的方法进行,待幼苗长出第 1 片真叶时(4 d),

收稿日期: 2017-05-17

基金项目:国家自然科学基金项目(31670240);教育部高等学校博士学科点专项(20130146130003)

陈琳,硕士研究生,研究方向:根瘤菌分子生物学. E-mail: 13125074270@163.com

通信作者: 张忠明,教授,研究方向:共生固氮. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

接种根瘤菌 Sm2011 进行结瘤实验,4 周后从植株上采集成熟固氮根瘤(根瘤表型为红色)。

1.3 RNA 的抽提及双链 cDNA 的合成和纯化

称取 100 mg 根瘤,利用异硫氰酸胍/ β -巯基乙醇方法抽提根瘤总 RNA,具体操作步骤见 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒说明书。双链 cDNA 合成及纯化的具体步骤参见 Matchmaker[®] Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System 操作手册及 Wang 等^[8]报道的方法。

1.4 Gibson 反应及转化

按照 Gibson 反应方法^[9],取 Gibson 反应液 120 μ L、线性化载体 DNA 20 μ L (150 ng/ μ L)、cDNA 片段 15 μ L (134 ng/ μ L)、ddH₂O 5 μ L 组成 20 个反应(1 个体系),50 $^{\circ}$ C 反应 1 h,12 $^{\circ}$ C 保温 5 min。反应完成后转化大肠杆菌感受态细胞(Trans1-T1)并涂布含带有氨苄青霉素(Amp)抗性平板,37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。

1.5 文库质粒大样抽提

将含带有 Amp 抗性平板上长出的单菌落全部收集起来,共获得 35 mL 大肠杆菌悬液,按照 SiO₂ 大样抽提质粒方法^[12],分离和纯化质粒 DNA 并使用微量分光光度计测定样品浓度。

1.6 酵母单杂交筛选 cDNA 文库

将所要研究基因的启动子区域构建于诱饵载体

上,转入诱饵菌株,自激活验证后进行 cDNA 文库筛选。具体的操作步骤见 Matchmaker[®] Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System 操作手册。

2 结果与分析

2.1 酵母杂交载体 pGADT7-Rec 质粒的改造

质粒 pGADT7-Rec 用于构建酵母单、双杂交 AD-cDNA 文库,含有在酵母细胞中用于重组的两段寡核苷酸序列(即 SMART III Oligonucleotide Sequence 和 CDS III Primer Sequence)。为了使该质粒适用于 Gibson 克隆技术,首先利用 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切 pGADT7-Rec 质粒,回收大片段以去除含有 SMART III 和 CDS III 序列的片段。然后设计并合成 2 条碱基互补的寡核苷酸序列,经退火获得双链 DNA 片段。该片段含有 SMART III 和 CDS III 序列,将原有的 *Sma* I 酶切位点替换为 *Xho* I 酶切位点。最后将合成的片段连接到回收的大片段上(pGADT7-Rec 的 *Eco*R I /*Xho* I 位点),同时也封闭了末端的酶切位点。经转化、测序验证获得新的质粒载体 pGADT7-Rec-New(图 1)。

2.2 根瘤 RNA 的抽提及双链 cDNA 的合成和纯化

选取蒺藜苜蓿接种根瘤菌 4 周的成熟根瘤,采用异硫氰酸胍/ β -巯基乙醇抽提根瘤的总 RNA,微

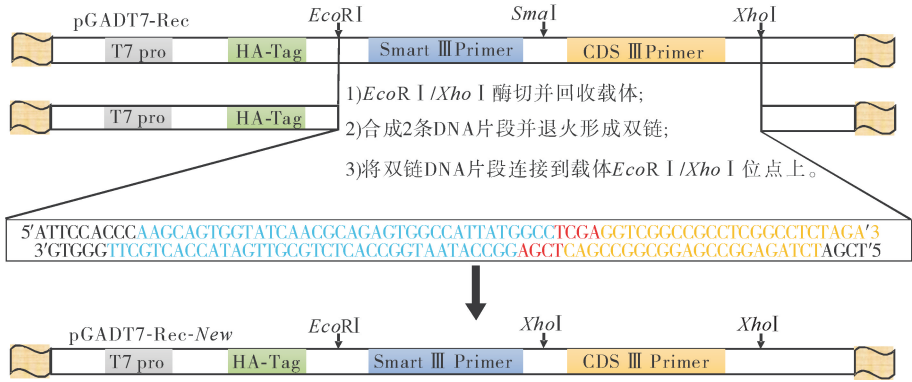


图 1 pGADT7-Rec 质粒的改造示意图
Fig.1 Diagram of retrofitting pGADT7-Rec

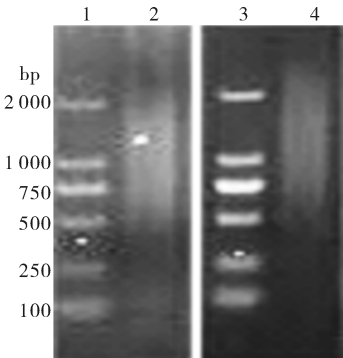
量分光光度计检测 RNA 质量浓度为 1.3 μ g/ μ L。以抽提的总 RNA 为模板、以 SMART III oligo 和 CDS III oligo-dT 为引物对,反转录合成第一链 cDNA;以酵母单杂交试剂盒中提供的 5' PCR Primer 和 3' PCR Primer 为引物对通过长距离 PCR(LD-PCR)合成并扩增双链 cDNA,合成的双链 cDNA 片段大小在 0.1 kb 以上(图 2);去除小于 0.4

kb 的 cDNA 片段,LD-PCR 产物经柱(CHROMA SPIN[™]+TE-400)层析纯化,得到大小为 0.5~2.5 kb 的双链 cDNA 片段(图 2),其质量浓度为 134 ng/ μ L,达到构建 cDNA 文库的要求。

2.3 cDNA 的一步法克隆及重组质粒 DNA 的转化效率

由于合成的 cDNA 在 Gibson 反应时会产生粘

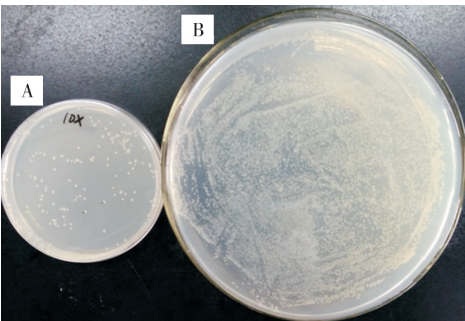
性末端,上述改造的 pGADT7-rec-*New* 质粒经 *Xho* I 酶切并回收后,与纯化的 cDNA 片段通过 Gibson 反应进行连接。连接产物转化大肠杆菌 Trans1-T₁ 菌株,在 LB/Amp 培养基平板筛选转化子。共获得大肠杆菌转化菌液 22 mL,取 20 μL 转化菌液进行平板稀释(图 3A)计数后计算转化效率,所有菌液全部涂大平板(Φ150 mm),每板 250 μL (图 3B),共涂布 88 个平板。统计结果表明,cDNA 文库的转化效率为 7.74×10^5 cfu/3 μg pGADT7-Rec-*New*。



1,3:DL2000 DNA marker; 2:未纯化的双链 DNA; 4:纯化后的双链 DNA。Lane 1,3:DL2000 DNA marker; Lane 2:Double-chain DNA before purification; Lane 4: Double-chain DNA after purification.

图 2 双链 DNA 的合成及纯化

Fig.2 Synthesis and purification of double-chain DNA



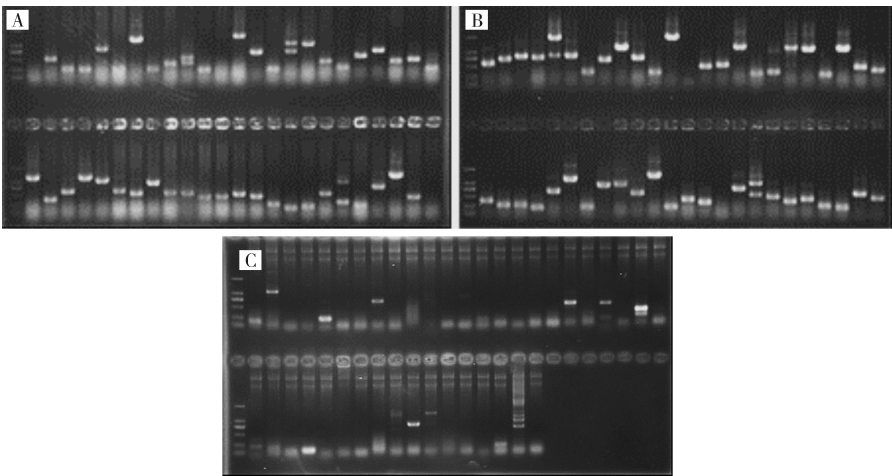
A:用于计算 cDNA 文库的转化效率; B:涂布平板的大小以及单个平板上的菌落数。A was used to calculate the transformation efficiency of the cDNA library; B was used to show the size and the colony of one plate.

图 3 转化 *E. coli* Trans1-T₁ 涂布平板

Fig.3 Transformation *E. coli* Trans1-T₁ and coating plate

2.4 根瘤 AD-cDNA 质粒文库的质量检测

随机挑选平板上 200 多个单菌落,以 pGADT7-rec-*New* 质粒上通用引物 T7 和 3'-AD 序列为引物进行菌落 PCR,统计扩增出片段的大小以及个数。结果表明,91.7%单菌落都能扩出外源 DNA 片段(图 4A、B),其中 0.2~0.5 kb 片段占 28.3%,0.5~0.75 kb 占 17.8%,0.75~2.0 kb 占 45.6%,未扩增出片段占 8.3%(表 1)。按 0.5~2.0 kb 为有效片段计算,根瘤 AD-cDNA 质粒文库有效率达到 63.4%。为了验证质粒文库的有效性,选用在蒺藜苜蓿根瘤中特异表达的 *DNF2*、*NAD1*、*NCR247*、*Lb*、*SST1*



A,B:随机菌落 PCR; C:根瘤已知基因 PCR; A,B,C 图中第一列代表 DL2000 DNA marker。A and B showed the cDNA insert size checked by random colony PCR; C showed to check the cDNA library with known gene's primer.

图 4 根瘤 AD-cDNA 质粒文库的质量检测

Fig.4 Quality test of nodule AD-cDNA library

表 1 菌落 PCR 片段大小及占比
Table 1 Statistics of insert size and ratio
from random colony PCR

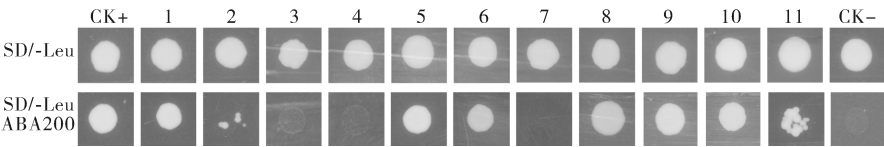
片段大小/kb Fragment size	数目 Amount	比率/% Ratio
0.20~0.50	65	28.3
0.51~0.75	41	17.8
0.76~2.00	105	45.6
未扩出 Not amplified	19	8.3

等基因,以总质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,都能得到相应大小的 DNA 片段(图 4C)。

2.5 根瘤 AD-cDNA 质粒文库的酵母单杂交验证

利用所构建的 AD-cDNA 质粒文库,尝试以已

知在苜蓿根瘤中表达的基因的一个顺式原件(DNA-富含 AT-Box)为诱饵片段,通过酵母单杂交技术分离与该诱饵片段相互作用的蛋白,以验证文库的实用性。将 DNA 顺式元件克隆到 pBait-ABAI 载体上转入 Y1HGold 菌株中作为诱饵菌株,总文库质粒转化诱饵菌株,在含 ABA 的 SD/-Leu 培养基上筛选阳性菌落。结果在筛选平板长出多个菌落,随机挑取 11 个菌落进行复证,其中 6 个能生长,5 个不能生长(为假阳性菌落)(图 5),说明构建的 AD-cDNA 质粒文库完全可用于酵母单杂交和双杂交技术,分离与 DNA 互作和与已知蛋白互作的新蛋白。



11 个克隆涂布于含有(或没有)ABA 的 SD/-Leu 平板上,CK+(p53-ABA/pGADT7-Rec-New-53)为正对照,CK-(p53-ABAI/pGADT7-Rec-New)为负对照。All the 11 clone are spotted onto the plate SD/-Leu with or without ABA,CK+(p53-ABA/pGADT7-Rec-New-53) is the positive control and CK-(p53-ABAI/pGADT7-Rec-New) is the negative control.

图 5 酵母单杂交筛选库结果复证

Fig.5 Further confirmation of screening result

3 讨论

目前,构建 cDNA 文库多数使用 2 种方法,即 GateWay 系统^[13]和 SMART cDNA 技术^[14]。2 种方法的原理均是利用体内同源重组将外源 DNA 片段交换到相应的目标载体上,不同之处在于 GateWay 系统是利用噬菌体 λ 整合酶催化特异性位点发生重组反应,而 SMART 技术则是利用不可逆转座子诱发的同源重组。2 种方法都有各自的优缺点:GateWay 系统的优点是将 DNA 片段连到中间载体上以后,可以通过同源重组到不同功能的载体上,缺点是需要经过两轮重组反应才能将片段连接到最终载体上^[15];而 SMART 技术的优点在于直接用合成的 cDNA 片段和线性化载体共转化,在受体细胞内一次性完成重组,而缺点在于共转化效率难以保障,所建的文库最终存在于酵母细胞中,不利于长期保存和使用。因此,我们在 SMART cDNA 技术的基础上,改造了酵母 AD 载体上 SMART III 和 CDS III 序列间的酶切位点,允许酵母 AD 载体可用于 Gibson 一步法克隆技术,简化了建库步骤,利用大肠杆菌细胞提高了转化效率。所构建的 cDNA 质粒文库便于长期保存和使用。

同时,该方法也有进一步改进的方面,如单酶切线性化载体时,最好利用碱性磷酸酶处理线性化载体,避免载体自连而降低重组效率;也可以设计双酶切位点避免载体自连,从而提高片段与载体连接的效率。另外,使用该建库方法,不仅适用于构建酵母单杂交或双杂交的 cDNA 文库,同样也适用于其他文库的构建。而本研究所构建的 AD-cDNA 文库,具有组织特异性,为研究根瘤中特异表达基因提供了便利,并且本研究所构建的是蒺藜苜蓿根瘤成熟时期的文库,处于该时期的根瘤能够完成固氮的过程,构建该时期的文库能够有利于寻找到上游调控免疫激活或抑制反应的蛋白。笔者所在研究室利用酵母单杂交筛选该文库,初步分离到几个与诱饵 DNA 相互作用的阳性克隆蛋白,深入的研究正在进行中。

参考文献

[1] OLDROYD G E D, MURRAY J D, POOLE P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis[J]. Annual review of genetics, 2011, 45: 119-144.
[2] 田梦洋, 何冬兰, 李晓华, 等. 豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因的抗氧化和共生固氮表型[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 54-60.
[3] 李振鹏, 马春草, 谢福莉, 等. 华葵中慢生根瘤菌 7653R SraG

sRNA 的共生固氮功能[J].华中农业大学学报,2016,35(5): 51-57.

[4] WANG D, GRIFFITTS J, STARKER C, et al. A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis[J]. Science, 2010, 327: 1126-1129.

[5] BOURCY M, BROCARD L, PISLARIU C I, et al. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions[J]. New phytologist, 2013, 197(4): 1250-1261.

[6] SINHARROY S, TORRES-JEREZ I, BANDYOPADHYAY K, et al. The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene *VAMP721a* and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula* [J]. Plant cell, 2013, 25: 3584-3601.

[7] BERRABAH F, BOURCY M, ESCHSTRUTH A, et al. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis[J]. New phytologist, 2014, 203: 1305-1314.

[8] WANG C, YU H X, LUO L, et al. Nodules with activated defense 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula* [J]. New phytologist, 2016, 212: 176-191.

[9] GIBSON D G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides[J]. Nucleic acids research, 2009, 37(20): 6984-6990.

[10] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature methods, 2009, 6: 343-345.

[11] 杨倩倩, 刘元, 陈大松, 等. 蒺藜苜蓿中 1 个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 62-70.

[12] LI J F, LI L, SHEEN J. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology[J]. Plant methods, 2010, 6(1): 1-8.

[13] KIM J K. cDNA library construction of the asian ladybird beetle using gateway cloning system[J]. Thomas telford, 2015, 88: 3-18.

[14] 刘琳玲, 丛波, 赵海平. 利用 SMART 技术构建蓝狐脾脏 cDNA 文库[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.

[15] CAO S, SIRIWARDANA C L, KUMIMOTO R W. Construction of high quality gateway™ entry libraries and their application to yeast two-hybrid for the monocot model plant *Brachypodium distachyon* [J]. BMC biotechnology, 2010, 11: 1-10.

Applying Gibson cloning technique in constructing cDNA library

CHEN Lin YU Haixiang ZHANG Zhongming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The mature nodules of *Medicago truncatula* (A17) were used to construct a cDNA library with Gibson cloning technique and SMART cDNA library construction technique. The result of library testing showed that the transformation efficiency of the library was 7.74×10^5 transformants/ $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec-New. Some colonies were randomly picked to run PCR. Results showed that the inserted DNA fragment size was ranged from 0.5 kb to 2.0 kb, with the recombinant rate of 91.7%. The cDNA library was stored as plasmid. This method can be used to construct library for yeast one or double hybrid and other plasmid library. The library was used to find protein(TF) that can interact with the DNA fragment of interest and some TFs were obtained.

Keywords *Medicago truncatula*; nodule; AD-cDNA library; Gibson cloning technique

(责任编辑: 张志钰)