

Gateway 技术构建酵母双杂 分析用辣椒 cDNA 文库

邱爱连, 刘林林, 蔡汉阳, 朱万里, 黄木坤, 陈雄, 何水林*, 张健*

(福建农林大学 生命科学学院 福建 福州 350002)

摘要: 构建 cDNA 文库是利用酵母双杂交技术开展特定 cDNA 分离的重要基础工作。利用 Gateway 技术, 在成功提取辣椒总 RNA 并分离 mRNA 的基础上, 合成了 3 种读码框的双链 cDNA, 通过 BP 反应构建其相应的入门文库, 再通过 LR 反应将 cDNA 迅速且定向地重组到酵母双杂分析用目的载体 pDESTTM22 上, 构建成高质量目的文库。经检测入门文库和目的文库滴度均达到 $(4.0 \sim 5.0) \times 10^6$ cfu/mL, 文库总容量为 $(2.4 \sim 3.0) \times 10^7$ cfu, 平均插入片段大小为 1 250 bp, 其质量完全满足于进一步利用酵母双杂体系分析目的基因互作蛋白 cDNA。

关键词: 辣椒; 入门文库; 目的文库; Gateway; 酵母双杂

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0791-06

Construction of a cDNA Library of Pepper for Yeast Two-hybrid Analysis Using Gateway Technology

QIU Ai-lian, LIU Lin-lin, CAI Han-yang, ZHU Wan-li,
HUANG Mu-kun, CHEN Xiong, HE Shui-lin*, ZHANG Jian*

(College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: It's an important prerequisite work to construct a cDNA library for isolating a specific cDNA using yeast two-hybrid technology. In this study, after successfully extracting total RNA and isolating mRNA of pepper, the authors synthesized three-frame cDNAs, performed BP reactions to generate corresponding entry libraries and then performed LR reactions to transfer cDNA into destination vector of pDESTTM22 directionally and quickly to form a high-quality destination library using Gateway technology. It has been detected that both entry library and destination library in this report have a high titer of $(4.0 \sim 5.0) \times 10^6$ cfu/mL and contain a total clones of $(2.4 \sim 3.0) \times 10^7$ cfu, with an average insert size of about 1 250 bp, it can be suitable for analyzing the interaction protein cDNA of the interested destination gene of pepper by two-hybrid system.

Key words: pepper; entry library; destination library; Gateway; yeast two-hybrid

植物的生长、发育和对环境的适应是基因型与环境互作的结果, 是由受发育调控的大量基因在时间上、空间上选择性表达, 最后通过复杂的生理生化过程实现的^[1-7]。植物生长发育和对环境适应的分子机制的阐明一直是人们孜孜以求的目标, 对于植物遗传改良及对生长发育和对环境适应等的有效调控

收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571128)、福建省自然科学基金重点项目(2008J003、2008J0049)和福建省创新人才项目(2007F3013)

作者简介: 邱爱连(1977-), 女, 博士, 主要从事植物分子生物学及生物技术研究, E-mail: qiual888@sina.com; * 通讯作者: 何水林, 博士, 教授, 博士生导师; 张健, 副教授, 博士, 主要从事植物生物技术和蔬菜育种研究。

均具有十分重要的意义。分离特定条件下表达的基因或 cDNA, 分析其表达产物之间的互作及其对植物表型的影响是植物分子遗传学的重要研究课题, 而建立高效、完整的表达基因文库是开展上述课题研究的重要基础性工作。自 20 世纪 80 年代以来, 基于基因表达文库的基因差异展示技术、基因芯片技术以及酵母单双杂交技术等植物功能基因组学研究中得到了广泛的应用, 大大促进了植物分子遗传学研究的进程。与此同时, RNA 提取、mRNA 分离、反转录和克隆载体及克隆技术等构建基因表达文库的相关技术创新方面也不断取得了新的进展, 为构建高质量的植物基因表达文库提供了有力的技术支撑。

与其他方法构建文库相比, Gateway 技术法利用 λ 噬菌体位点特异重组系统的 BP 和 LR 双向反应, 首先将 cDNA 克隆到入门载体上, 形成入门文库, 然后可以根据目的不同选择不同的表达载体, 通过 LR 反应使 cDNA 迅速方便而且定向地重组到任何 Gateway 化的表达载体上, 形成各种表达文库。整个过程无需限制酶切、无需连接, 而且典型的克隆效率高达 95% 以上。尽管已有大量关于基因功能分析的文献报道采用了 Gateway 技术将基因克隆于各种系统和载体上^[8-10], 但将 Gateway 技术应用于文库构建的却不多。在国外, Ohara 等^[11-12] 最早将此技术应用于定向 cDNA 文库的构建。2003 年, 美国 Invitrogen 公司进一步将 Gateway 技术糅合于文库构建中, 开发了 CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit, 这使得 cDNA 文库的构建更加高效简便。但在国内仍鲜有相关文献报道, 至今只见龙松华, 黄炜等^[13-14] 应用此技术构建真菌 cDNA 文库的报道, 而在植物上应用该技术构建 cDNA 文库, 尤其是酵母双杂分析用 cDNA 文库仍未见相关报道。

辣椒是典型的茄科植物, 也是一种重要的蔬菜和工业原料作物。生产中辣椒病害较为严重, 阐明辣椒抗病分子机制既可为辣椒抗病遗传改良奠定重要基础, 也可为茄科植物的抗病机制的阐明提供借鉴。为了利用 ProQuest™ 酵母双杂体系分离与辣椒 ROP、WRKY 等在防御反应中起重要调节作用蛋白质的互作蛋白, 进一步阐明辣椒防御反应的分子机制, 本研究应用 Gateway 技术构建 SA 处理的酵母双杂分析用辣椒目的 cDNA 文库, 为进一步分离上述基因互作蛋白相应的 cDNA 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 辣椒品种 提取总 RNA 的辣椒品种采用江西省莲花县的地方辣椒品种 120[#], 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 TRIzol Reagent、CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit、LR Clonase Enzyme Mix、PureLink™ HiPure Plasmid DNA Midiprep Kit 等购于美国 Invitrogen 公司; Oligotex™ - dT30 (Super) mRNA Purification Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司; 限制性内切酶 *Bsr*G I 购于 NEB 公司。

1.1.3 接头设计与合成 为了构建含有 3 种读码框的 cDNA 文库, 本研究分别设计了其相应的 cDNA 5' 端 3 种 attB1 接头序列:

读码框 A (RFA): 5' - TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGG - 3'
3' - CCCCTGTTGAAACATGTTTTTTCAACCP - 5';

读码框 B (RFB): 5' - TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGA - 3'
3' - CCCCTGTTGAAACATGTTTTTTCAACCTp - 5';

读码框 C (RFC): 5' - TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGAA - 3'
3' - CCCCTGTTGAAACATGTTTTTTCAACCTp - 5';

以上引物均委托 Invitrogen 公司合成并纯化。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 mRNA 的分离纯化 鉴于所构建文库主要用于辣椒对水杨酸(salicylic acid, SA) 介导的相关防御反应分子机制研究, 本研究采用无菌栽培 20 d 的辣椒幼苗, 经 20 μ mol/L SA 类似物浸根处理 12 h 后, 取样提取总 RNA。总 RNA 的提取采用 TRIzol 提取法, 先对约 1 g 样品液氮研磨, 转移至含有 10 mL TRIzol 试剂的无 RNase 离心管中震荡混匀, 然后按照 TRIzol 提取方法提取总 RNA, 并以分光光度计检测其浓度, 以琼脂糖凝胶及甲醛变性胶检测其完整性。取 600 μ g 高质量的总 RNA, 参照 Oligotex™ - dT30 (Super) mRNA 纯化试剂盒说明进行 mRNA 的分离纯化, 以分光光度计检测纯度、浓度, 以 10 g/L 琼脂糖胶检测片段大小。

1.2.2 cDNA 合成与片段大小分级、汇总 为了获得 3 种读码框的文库,一开始便进行 3 个独立的 cDNA 合成反应,每个反应各取 2 μg 起始 mRNA,参照 CloneMiner™ cDNA 文库构建操作指南进行反转录反应、聚合反应以及连接反应,合成含相应 attB1 接头的 3 种读码框双链 cDNA。采用色谱柱分级法对 3 种读码框 cDNA 分别进行片段分级,分级后产生片段从大到小的 1-20 管产物。采用传统的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度检测相结合的方法对 cDNA 大片段进行汇总,先从第 11-20 管中各取 5 μL cDNA 溶液检测其大小与浓度,再根据结果检测第 9、10 管的 cDNA 大小与浓度,以尽可能减少大片段的丢失。根据检测结果,丢弃含接头较多,片段偏小的第 11-20 管 cDNA。考虑到进行下游的 BP 反应所需 cDNA 量较少及基因的全长问题,只汇总了第 3、4、5、6、7/2 管的分级产物,其余的先置于 -20 °C 中保存。对所汇总的 cDNA 进行相应的沉淀、洗涤、溶解处理后再次检测其浓度与片段大小以备用于下游反应。

1.2.3 入门文库的构建 参照文库构建操作指南,在无菌的 1.5 mL 离心管中添加 10 μL BP 反应体系所需成分: cDNA (100 ng/μL) 1 μL pDONR™222 (250 ng/μL) 1 μL 5 × BP Clonase™ Reaction Buffer 2 μL 及 TE Buffer (pH 8.0) 3 μL,混合均匀后,在每个反应管中加入 3 μL 的 BP Clonase™ Enzyme mix,温和混匀后置于 2~5 °C 下进行 BP 重组反应 16~20 h。通过电转化作用将反应产物导入 DH10B 宿主细胞中,经预表达培养后,同一读码框文库混在一起并加入等量的含体积分数为 40% 甘油的 SOC 培养基,均匀混合后,取其中 100 μL 用于滴度与质量检测,其余的分成多份妥善保存于 -80 °C 中待用。

1.2.4 测定入门文库滴度、评价入门文库质量 (1) 滴度测定。以 SOC 培养基对上述 100 μL 入门文库菌液进行 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 系列梯度稀释,从每个梯度中取 100 μL 涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,每个梯度各两皿。待克隆长出后按以下公式计算文库滴度与文库总容量:

$$\text{文库滴度 (cfu/mL)} = \text{平板克隆数} \times \text{稀释因子} / \text{涂板体积 (mL)} \quad (1)$$

$$\text{每种文库的总容量 (Total cfu)} = \text{平均文库滴度 (cfu/mL)} \times \text{该文库总体积 (mL)} \quad (2)$$

(2) 入门文库质量的检测。从 3 种不同的读码框对应的入门 cDNA 文库中各随机挑取 22 个克隆,采用 Gateway 载体重组位点上特有的 *BsrGI* 酶切位点对重组克隆质粒进行酶切分析,或根据入门载体 pDONR™222 上特有的序列设计引物 [M13 Forward (-20): 5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3', M13 Reverse: 5' - CAGGA AACAGCTATGAC - 3'] 对克隆质粒进行 PCR 检测,分析文库的重组率及插入片段大小。

1.2.5 目的文库的构建与检测 (1) 入门文库质粒的准备。取 1/2 入门 cDNA 文库菌液于 50 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中,200 r/min、37 °C 下培养 6 h (*OD* 值 ≈ 1.0),采用 PureLink™ HiPure 质粒 DNA 中量提取试剂盒提取入门 cDNA 文库质粒并以适量 TE 溶解。

(2) 目的文库构建。取等量的 3 种读码框入门文库质粒 DNA 混匀,取 50 ng 混合后的质粒 DNA 和目的载体 pDEST™22 参照文库构建操作指南进行 LR 重组反应并电转化 DH10B 感受态细胞,采用与 1.2.4 同样的方法检测目的文库滴度,评价目的文库质量,PCR 鉴定序列为: 22F: 5' - TATAACGCGTTTGAA TCACT - 3', 22R: 5' - AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC - 3'。

2 结果与分析

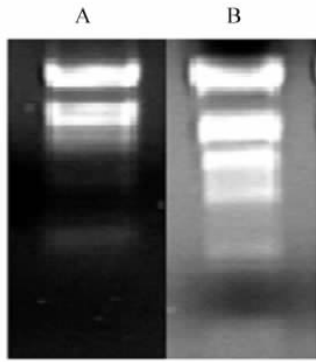
2.1 总 RNA 的提取与 mRNA 的分离纯化

经分光光度计检测总 RNA 的 $OD_{260/280} = 2.11$, 质量浓度 1 μg/μL, 共得 600 μL; 10 g/L 琼脂糖胶和甲醛变性凝胶电泳检测显示,总 RNA 呈现明显的 28 S 和 18 S 两条带,且 28 S rRNA 亮度大致为 18 S rRNA 2 倍,另有一亮度较弱的 5 S rRNA 条带,说明所提取的总 RNA 具有较好的纯度和完整性(图 1)。

应用 Oligotex™ - dT30 (Super) mRNA 纯化试剂盒分离的 mRNA 在琼脂糖胶上呈 0.5~12 kb 弥散条带,且隐约可见几条 rRNA 弱带,说明纯化所得 mRNA 质量较好(图 2)。经分光光度计检测本研究分离到的 mRNA 总量达 6 μg,可完全满足后续 cDNA 文库构建需要。

2.2 双链 cDNA 的合成、片段大小分级及汇总

为了尽可能降低小片段 cDNA 以及接头对文库质量的干扰,对所获得的双链 cDNA 进行了大小分级,以去除接头和小片段产物。鉴于分级后产生片段从大到小的 1-20 管产物中,11-20 管所含接头与较小片段比例逐渐增多(图 3),本研究汇集了第 3、4、5、6、7/2 管的分级产物,其大小主要分布在 1~2.5 kb(图 4),满足构建 cDNA 目的文库质量要求。



A: 10 g/L 琼脂糖胶 B: 甲醛变性胶。
A: 10 g/L agarose gel B: Formaldehyde denaturing gel.

图 1 辣椒总 RNA 电泳

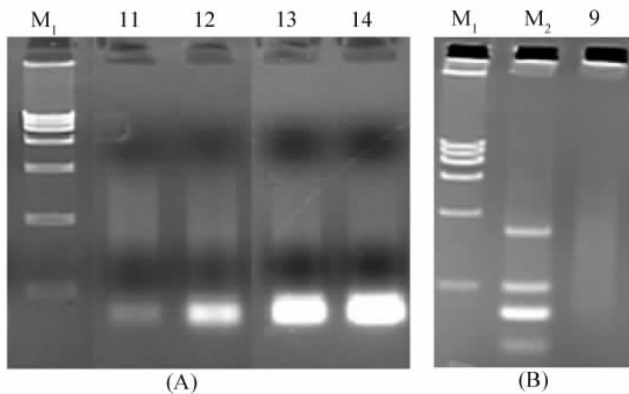
Fig. 1 Electrophoresis of pepper total RNA



M: DL15 000 Marker.

图 2 辣椒 mRNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of mRNA

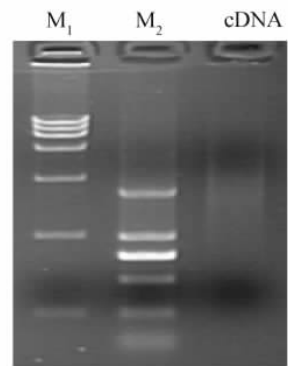


A: 管 11 - 14; B: 管 9; A: tube 11 - 14; B: tube 9.

M₁: DL15 000 Marker; M₂: DL2 000 Marker.

图 3 双链 cDNA 分级产物的琼脂糖胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of size fractionated cDNA



M₁: DL15 000 Marker; M₂: DL2 000 Marker.

图 4 管 3 - 管 6 及 1/2 管 7 cDNA 汇总后凝胶电泳

Fig. 4 The pooled cDNA of tube 3 - tube 6

and half of tube 7

2.3 入门文库的构建及其质量评价

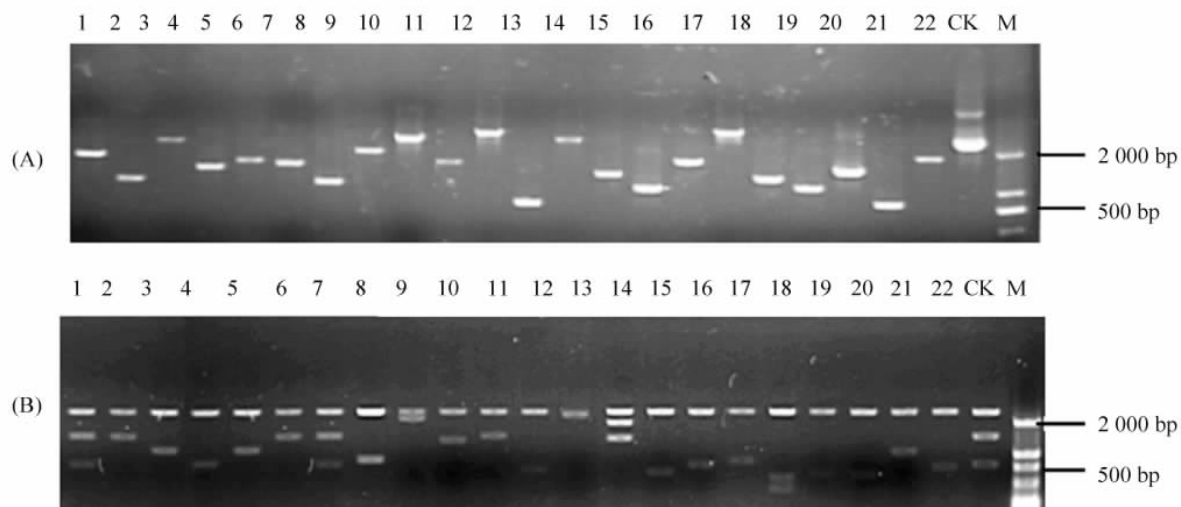
由于本研究所合成的含 3 种可能开放读码框的双链 cDNA 上都带有 attB1 和 attB2 区域,可利用 Gateway 克隆技术通过 BP 重组反应将双链 cDNA 定向克隆到入门载体 pDONR™222 上,形成相应的入门 cDNA 文库。经检测 3 种开放读码框相应的入门 cDNA 文库平均滴度约为 4.0×10^6 cfu/mL,总容量约为 2.4×10^7 cfu/mL。随机挑取 22 个克隆进行 PCR 鉴定或质粒酶切鉴定(图 5,读码框 A 部分鉴定图谱)结果表明文库重组率为 100% 插入片段大小范围为 0.5 ~ 3.0 kb,平均片段大小为 1.3 kb。参照文库构建操作指南中优质文库的标准,本研究所获得的辣椒入门 cDNA 文库质量较高,可用于 EST 测序、目标基因 cDNA 筛选以及各种目的文库的构建等工作。

2.4 目的文库的构建及其质量评价

通过 LR 重组反应将入门文库 cDNA 克隆到目的载体 pDEST™22 上,形成目的 cDNA 文库。经检测目的文库总容量为 3.0×10^7 。随机挑取 24 个克隆进行 PCR 检测(图 6 读码框 A 部分鉴定图谱),阳性重组率 100% 插入片段分布在 0.5 ~ 3.0 kb,平均大小为 1.2 kb。参照文库构建操作指南标准,本研究所构建的目的 cDNA 文库是一个高质量目的文库,可直接应用于酵母双杂分析。

3 小结与讨论

构建文库是现代分子生物学研究的基础,因此有效利用单次所构文库并尽可能提高后续研究工作的效率是构建文库时值得考虑的两个方面。Gateway 技术是一种基于 λ 噬菌体特异位点重组特性之上

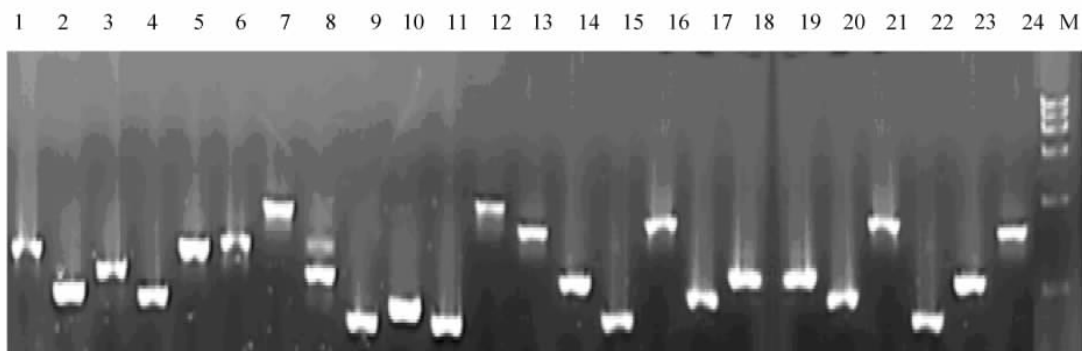


1 - 22: 22 个克隆; CK: pDONR222; A: PCR 检测; B: 酶切分析。

1 - 22: 1 - 22 clones; CK: pDONR™222; A: PCR detection; B: Restriction analysis; M: DL2 000Marker.

图 5 读码框 A 入门 cDNA 文库质量检测

Fig. 5 Qualifying the entry cDNA library of reading frame A



1 - 24: 1 - 24 个克隆。1 - 24: 1 - 24 clones; M: DL15 000 Marker.

图 6 目的 cDNA 文库 PCR 检测

Fig. 6 PCR detection of the destination cDNA library

的高通量克隆方法,由 BP 和 LR 双向反应组成。通过 BP 反应将 DNA 定向克隆到入门载体上,再根据实验目的通过 LR 反应即可将之定向转移至特定的目的载体上,省去了反复的 PCR、酶切、连接等繁琐的亚克隆过程。将该技术糅合于成熟的文库构建体系中,通过 BP 反应将大量的 cDNA 保存于入门克隆中,再根据研究目的通过 LR 重组反应将 cDNA 定向且快速转移至各种目的载体上,包括各种表达载体、酵母单双杂猎物载体等,这样可以大大提高单次构建文库的利用率。另外在后续的兴趣目的基因进一步研究工作中可直接通过 BP 和 LR 双向反应进行载体构建,无需 PCR 与重复测序过程,可明显提高后续研究工作效率。

由于 mRNA 上 5' 端碱基的脱离具有一定的随机性,为了所构建文库的所有 cDNA 序列在 N 端含有融合蛋白的表达载体中都能获得其正确的表达产物,本研究通过采用 3 种不同读码框对应的 attB₁ 接头,分别合成了其相应的双链 cDNA,并最终形成了含 3 种读码框的酵母双杂用猎物文库。

cDNA 的分级分离及大片段的汇总是文库构建工作中的重要环节,本实验在 cDNA 大片段的汇总上放弃采用试剂盒操作指南中的平板斑点分析法(plate spotting assay,PSA),主要基于两方面的原因:第一是操作难度较大;二是该方法对 cDNA 浓度的估算主观性太强。本研究采用了传统的琼脂糖凝胶电泳检测与分光光度计检测相结合的方法进行大片段 cDNA 的收集与汇总。为了尽可能减少大片段的丢失,检测分段进行,先检测第 11 - 20 管,再依次检测第 9 管和第 10 管。最后根据检测结果淘汰小片段,保存中等片段,汇总大片段。结果表明该方法结果可靠且易于操作。

本文中所构文库的材料是以 SA 类似物处理的辣椒幼苗为材料,而 SA 在植物响应逆境信号途径中起重要作用,以外源 SA 类似物处理植株,可能激活植株中 SA 信号途径相关蛋白及其控制的防御反应相关基因的表达^[6-7]。故以 SA 类似物处理后辣椒的 mRNA 为材料构建的 cDNA 文库可用于 Proquest™ 酵母双杂体系分离 SA 信号途径重要蛋白的互作蛋白,为辣椒 SA 信号途径的剖析提供工具。

参考文献:

- [1] Desikan R, Cheng M K, Bright J et al. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(395): 205–212.
- [2] Neill S R, Desikan R, Hancock J, Hydrogen peroxide signalling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 388–395.
- [3] Konigshofer H, Trombala H W, Loppert H G. Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production [J]. *Plant Cell Environ* 2008, 31(12): 1771–1780.
- [4] Miller G, Suzuki IV, Rizhsky L et al. Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development and response to abiotic stresses [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(4): 1777–1785.
- [5] Boussiba S, Rikin A, Richmond A, The role of abscisic acid in cross-adaptation of tobacco plants [J]. *Plant Physiol*, 1975, 56(2): 337–339.
- [6] Vasiukova N I, Ozeretskovskaia O L. Induced plant resistance and salicylic acid: A review [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2007, 43(4): 405–411.
- [7] Yalpani N, Raskin I. Salicylic acid: a systemic signal in induced plant disease resistance [J]. *Trends Microbiol*, 1993, 1(3): 88–92.
- [8] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination [J]. *Genome Res* 2000, 10(11): 1788–95.
- [9] Wu X, Webster S R, Chen J. Characterization of tumor-associated Chk2 mutations [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2971–2974.
- [10] Gomes M D, Lecker S H, Jagoe R T et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(25): 14440–14445.
- [11] Ohara O, Temple G, Directional cDNA library construction assisted by the in vitro recombination reaction [J]. *Nucleic Acids Res* 2001, 29(4): 22.
- [12] Ohara O, Temple G. Characterization of size-fractionated cDNA libraries generated by the in vitro recombination-assisted method [J]. *DNA Res* 2002, 9(2): 47–57.
- [13] 龙松华, 张宁, 邱德文, 等. Gateway 技术构建交链孢菌 JH505 cDNA 文库 [J]. *微生物学报* 2005, 45(6): 963–965.
- [14] 黄炜, 张宁, 龙松华, 等. 利用体外特异位点重组反应构建黄瓜灰霉菌 cDNA 文库 [J]. *新疆农业大学学报* 2005, 28(2): 1–4.