

文章编号: 1673-9868(2008)04-0078-04

# 大麦条纹花叶病毒诱导大麦 cDNA 文库的构建

孙现超<sup>1</sup>, 薛 杨<sup>2</sup>, 安德荣<sup>3</sup>, 青 玲<sup>1</sup>, 杨水英<sup>1</sup>

1 西南大学 植物保护学院, 重庆 400716; 2 中国农业科学院 柑橘研究所, 重庆 400716;  
3 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

**摘要:** 构建病毒诱导的寄主植物 cDNA 文库是利用酵母双杂交方法筛选与病毒相互作用寄主因子的前提条件。该文以大麦条纹花叶病毒接种大麦, 在 ELISA 跟踪检测的病毒复制和运动初期, 采集大麦叶片, 用 TRIZOL 法提取总 RNA, 利用 SMART 原理进行反转录 PCR 获得 ds-cDNA, *Sfi* I / *Xho* I 共切后 1% 琼脂糖凝胶检测并分段回收 ds-cDNA, 分别与 *Sfi* I / *Xho* I 共切的载体连接后, 共同转化 X-blue 感受态细胞构建文库。文库的容量和质量检测结果表明: 文库的容量为  $1.27 \times 10^6$ , 插入片段大于 500 bp, 集中在 1.2 kb 左右, 符合酵母双杂交筛选文库的要求。

**关键词:** 大麦条纹花叶病毒; 诱导; 构建; cDNA 文库

中图分类号: S512.3

文献标识码: A

植物病毒侵染植物、在植物体内复制和运输除了需要病毒自身编码蛋白之间的相互协助作用外, 还需要寄主因子参与<sup>[1-4]</sup>。寻找这些与病毒编码蛋白相互作用的寄主因子, 研究其在植物病毒的生命循环过程中所起的作用, 是利用基因工程进行抗病育种, 从而防治植物病毒的另一条有效途径<sup>[5,6]</sup>。其所用的方法主要有 Far-western, mRNA 差异显示, 基因芯片杂交等, 而目前报道的与 TMV、CMV 等多数病毒编码蛋白相互作用的寄主因子多是用酵母双杂交系统获得的<sup>[7-10]</sup>。在本文中, 我们利用国内分离的 BSMV<sup>[11]</sup> 构建了病毒诱导大麦叶片的 cDNA 文库, 为用酵母双杂交的方法从中筛选与 BSMV 编码蛋白相互作用的寄主因子, 寻找来源于寄主系统的抗病毒靶标奠定了基础。

## 1 材料方法

### 1.1 毒源和种子

大麦条纹花叶病毒于 2003 年 3 月采自北京郊区大麦田,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冻存; 接种大麦种子由西南大学植物保护学院植物病毒学研究室保存。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取和纯化试剂盒购自 TaKaRa(大连宝生物公司); 反转录试剂盒 SuperscriptII 购自 Invitrogen 公司; LA-Taq 酶购自 Clontech 公司; 引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.3 大麦的病毒诱导和 ELISA 检测

温室内播种大麦, 培养至第一叶片 10 cm 左右汁液摩擦接种大麦条纹花叶病毒。接种后每天采集 5 片叶子进行 ELISA 检测病毒, 于病毒开始复制和在大麦体内运输初期, 收集大麦叶片备用。

### 1.4 病毒诱导大麦叶片总 RNA 的提取

病毒诱导大麦叶片的总 RNA 的提取采用北京天根科技生化科技有限公司的 RNA 提取试剂盒。提取

①收稿日期: 2007-11-12

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2007BB1349); 西南大学博士启动基金资助项目(SWUB2006042)。

作者简介: 孙现超(1977-), 男, 河南许昌人, 博士, 副教授, 主要从事植物病毒学及微生物源农药研究。

RNA 用紫外分光光度计检测浓度和纯度, 并进行琼脂糖甲醛变性电泳分析。

### 1.5 dscDNA 的获得

根据所制备的总 RNA 浓度, 以总 RNA (0.5~1 μg) 为模板, 用 oligo(dT) 引物 5'-GAGCAACG-CAGAGTACT20-3', oligo(dG) 引物 5'-CAACGCAGAGTACGCGGG-3', 按 BD SMART(tm) 反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。取 2 μL 第一链 cDNA, 以 5'-GGTGGTGGCCATGGAGGCCCAACG-CAGAGTACGG-3' (划线部分酶切位点为 *Sfi* I) 为上游引物, 5'-ATCGAGCTCGAGCAACGCAGAG-TAG-3' (划线部分酶切位点为 *Xho* I) 为下游引物, 用长距离 PCR (LA-Taq) 合成试剂盒扩增得到双链 cDNA, PCR 反应条件为 72 °C 10 min, 95 °C 1 min; 95 °C 20 sec, 68 °C 6 min, 18 个循环; 4 °C 保存。取 5 μL RT-PCR 产物在 1.1% 琼脂糖凝胶电泳上鉴定双链 cDNA 的分布范围。将 PCR 产物以 *Sfi* I / *Xho* I 共切, 酶切产物用 DNA 回收试剂盒分 500~800 bp、800~1200 bp、1200~2000 bp 和大于 2000 bp 共 4 段回收。

### 1.6 dscDNA 与载体的连接和文库的转化

取 2 μg 回收双链 cDNA 与 *Sfi* I / *Xho* I 共切的 pGADT7 载体 3 μg, 于 4 °C 连接 24~48 h。连接产物经无水乙醇沉淀脱盐后, 分 2 等份, 分别电击转化入大肠杆菌 X-blue 感受态细胞 (Stratagene), 电击条件为: 2.0 kV, 25 μF, 200 Ω。将转化细胞合并涂布在约 80~100 个 LB 平板上 (含有 100 mg/L Ampicilin), 37 °C 培养 16~18 h。收集克隆保存于无菌的冻存管中, 于 -80 °C 备用。

### 1.7 文库容量的检测

将 -80 °C 保存的未扩增文库的菌液在冰上融化, 将菌液按 10 倍稀释法, 分别稀释  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  和  $10^6$  倍。取各种稀释度的菌液 100 μL 涂布在 LB 平板上 (含有 100 mg/L Ampicilin), 每个稀释度做 3 个重复。37 °C 培养箱中倒置培养过夜。检查平板, 记录菌落数, 按下面的公式计算库的容量。

$$\frac{\text{菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 1000}{\text{涂布体积}} = \text{菌落数} / \text{毫升} (\text{cfu} / \text{mL})$$

### 1.8 文库插入片段大小的分析

培养过夜的平板上随机挑取克隆, 在 LB/Amp 液体培养基中 37 °C, 250 rpm 摇床培养 8 h 后进行菌液 PCR, 检测文库中插入片段的大小。引物为质粒 pGADT7 测序通用引物 P1: 5'-CTATTCGATGAT-GAAGATACCCACCAAA CCG-3'; P2: 5'-GTGAACTTGCGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3' 进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果分析

### 2.1 BSMV-CH 诱导大麦的总 RNA 分析

大麦接种 BSMV 后第 4 天在未接种叶片检测到病毒的存在, 表明病毒已经侵染大麦并开始复制运输。采集大麦叶片用试剂盒提取总 RNA, 紫外分光光度计 UV40 测定总 RNA 结果如下: RNA 浓度为 1.52 μg/μL,  $OD_{260/280} = 1.86$ 。琼脂糖甲醛变性电泳分析总 RNA 大小完整 (图 1), 表明总 RNA 可以用于构建文库。

### 2.2 dscDNA 的片段长度

取 5 μL RT-PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, dscDNA 的分布范围主要集中在 1.2 kb 左右, 500 bp 以下的片段明显较少 (图 2)。

### 2.3 cDNA 文库质量的检测和扩增

活化冻存的大麦 cDNA 文库并检测库的容量。涂板时做了 6 个稀释度, 每个稀释度做了 3 个重复。待平板上的菌落生长 12 h 可以计数后, 选择菌落数在 30~300 之间的平板计数, 按照计算公式算出 cDNA 文库的容量。结果稀释度为  $10^3$  的平板上生长的菌落比较均匀而且基本在上述范围内, 其它平板上的菌落由于菌落太多无法计数或只长出 20, 30 甚至几个菌落而不适合用来计数。统计  $10^3$  稀释度平板上的菌落计算出文库的容量为  $1.27 \times 10^6$  (表 1), 表明 -80 °C 保存的病毒诱导大麦叶片的 cDNA 文库可以用来进行酵母双杂交筛选。

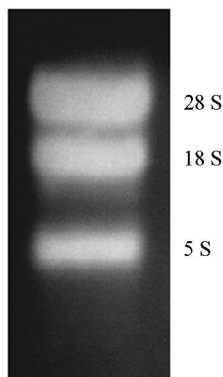


图 1 病毒诱导大麦叶片总 RNA

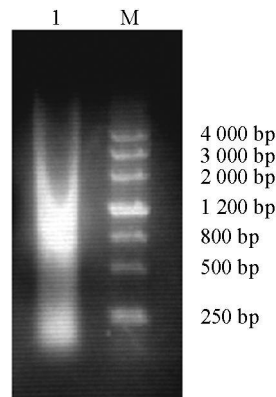


图 2 ds-cDNA 的片段长度

表 1 文库容量检测结果

平板号	菌落数/ cfu	库容量/( cfu · mL <sup>-1</sup> )
1	105	1.05 × 10 <sup>6</sup>
2	113	1.13 × 10 <sup>6</sup>
3	152	1.52 × 10 <sup>6</sup>
平均值		1.27 × 10 <sup>6</sup>

从文库容量测定平板上随机挑取的 10 个克隆, 经液体培养后, 菌液 PCR 扩增结果如图 3, 可见 PCR 产物主要集中在 0.5 kb 以上, 1.2 kb 左右, 可以满足双杂交筛选的需要。

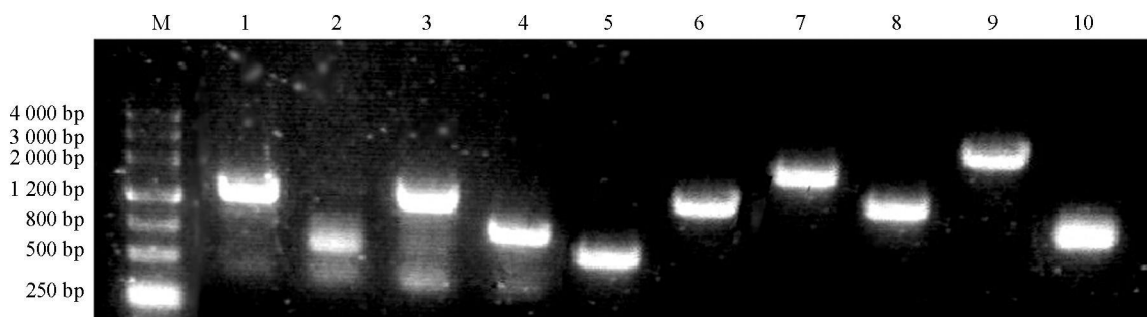


图 3 ds-cDNA 的片段长度

### 3 讨 论

本文库构建的目的是利用酵母双杂交技术获得与 BSMV 相互作用的寄主蛋白, 研究病毒与寄主的相互作用。因此, 在诱导过程中必须寻找到病毒侵染过程中诱导表达的寄主基因。一般在病毒的复制和运动初期寄主体内与病毒互作的基因处于表达上升期, 此时构建的文库获得与病毒互作的寄主基因几率比较大。本试验中通过接种后 ELISA 跟踪检测, 确定该时间为接种病毒后第 4 天。

本实验采用改良的 SMART 技术构建了大麦条纹花叶病毒诱导的大麦 cDNA 文库。从整个实验过程看, 本实验采用的方法要比 Wellenreuther 等构建的分级分离后再扩增的 SMART 文库显得更简单、快捷、易操作<sup>[12]</sup>。构建文库的过程中, 载体与片段连接的步骤, 容易出现小片段连接几率大, 而大片段连接几率小, 从而导致文库中大片段含量少的现象<sup>[13]</sup>。为解决该问题, 我们在获得第 2 链时, 进行了分段回收连接, 即分别割胶回收 500~800 bp、800~1 200 bp、1 200~2 000 bp 和大于 2 000 bp 的片段与载体连接, 连接产物混合后进行电击转化, 结果保证了文库中不同长度片段的丰度, 增加了后续实验的成功率。

#### 参考文献:

- [1] Bastin M, Hall T C. Interaction of Elongation Factor 1 with Aminoacylated Brome Mosaic Virus and tRNA's [J]. Journal of Virology, 1976, 20(1): 117-122.
- [2] Duggal R, Hall T C. Interaction of Host Proteins with the Plus-Strand Promoter of Brome Mosaic Virus RNA-2 [J].

Virology, 1995, 214(2): 638-641.

- [3] Kassanis B, MacFarlane I. Interaction of Virus Strain, Fungus Isolate, and Host Species in the Transmission of Tobacco Necrosis Virus [J]. Virology, 1965, 26(4): 603-612.
- [4] Yamaji Y, Kobayashi T, Hamada K, et al. In Vivo Interaction Between Tobacco Mosaic Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Host Translation Elongation Factor 1A [J]. Virology, 2006, 347(1): 100-108.
- [5] Li Y, Wu M Y, Song H H, et al. Identification of a Tobacco Protein Interacting with Tomato Mosaic Virus Coat Protein and Facilitating Long-Distance Movement of Virus [J]. Archives of Virology, 2005, 150(10): 1993-2008.
- [6] Miyoshi H, Suehiro N, Tomoo K, et al. Binding Analyses for the Interaction Between Plant Virus Genome-Linked Protein (VPg) and Plant Translational Initiation Factors [J]. Biochimie, 2006, 88(3-4): 329-340.
- [7] Wittmann S, Chatel H, Fortin M G, et al. Interaction of the Viral Protein Genome Linked of Turnip Mosaic Potyvirus with the Translational Eukaryotic Initiation Factor (iso) 4E of Arabidopsis Thaliana Using the Yeast Two-Hybrid System [J]. Virology, 1997, 234(1): 84-92.
- [8] Carette J E, Verver J, Martens J, et al. Characterization of Plant Proteins that Interact with Cowpea Mosaic Virus '60K' Protein in the Yeast Two-Hybrid System [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(4): 885-893.
- [9] Ren T, Qu F, Morris T J. The Nuclear Localization of the Arabidopsis Transcription Factor TIP is Blocked by its Interaction with the Coat Protein of Turnip Crinkle Virus [J]. Virology, 2005, 331(2): 316-324.
- [10] Yoshioka K, Matsushita Y, Kasahara M, et al. Interaction of Tomato Mosaic Virus Movement Protein with Tobacco RIO Kinase [J]. Molecular Cell, 2004, 17(2): 223-229.
- [11] 孙现超, 安德荣, 青玲, 等. 大麦条纹花叶病毒北京分离物的鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(10): 51-54.
- [12] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, et al. SMART Amplification Combined with cDNA Size Fractionation in Order to Obtain Large Full-Length Clones [J]. BMC Genomics, 2004, 5(36): 1-8.
- [13] 董志敏, 李英慧, 张宝石, 等. 一种获得大片段克隆的 SMART 全长 cDNA 文库构建方法 [J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 223-227.

## Construction of the cDNA Library of Barley Infected by the *Barley Stripe Mosaic Virus*

SUN Xian-chao<sup>1</sup>, XUE Yang<sup>2</sup>, AN De-rong<sup>3</sup>,  
QING Ling<sup>1</sup>, YANG Shu-ying<sup>1</sup>

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400716, China;
3. College of Plant Protection, Northwest Sci-Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China

**Abstract:** It is necessary to construct the cDNA library of plant infected by virus before screening the host-virus interaction gene of the host. In an experiment reported in this paper, barley was inoculated with *Barley Stripe Mosaic Virus*. At the initial stage of virus replication and movement, leaves infected by *Barley Stripe Mosaic Virus* were collected and total RNA was extracted from them. DscDNA was synthesized by RT-PCR with SMART method. The dscDNA was digested by *Sfi* I / *Xho* I and separated into different parts based on their size by 1.1% agarose gel. Each part of the dscDNA was ligated separately to the vectors digested by *Sfi* I / *Xho* I. All the recombinant vectors were electroporated into *E. coli* X-blue to construct the cDNA library. The detection result showed that the cDNA library contained  $1.27 \times 10^6$  recombinant clones and that all the inserted cDNA fragments were more than 500 bp in size and most were around 1.2 kb.

**Key words:** *Barley Stripe Mosaic Virus*; induce; construct; cDNA library

责任编辑 夏娟