

# 大丽轮枝菌及激素处理后棉花酵母双杂交文库的构建

许艳<sup>1#</sup>, 李冉<sup>2#</sup>, 宋健<sup>2</sup>, 王丹<sup>2</sup>, 周雷<sup>2</sup>, 李俊娇<sup>2</sup>,  
张丹丹<sup>2</sup>, 陈捷胤<sup>2</sup>, 戴小枫<sup>2\*</sup>, 杨星勇<sup>1\*</sup>

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物化学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 大丽轮枝菌是引起棉花、马铃薯等重要作物黄萎病的土传病原真菌,其分泌的胞外蛋白是侵染寄主的重要毒力因子,因此研究胞外蛋白与寄主的相互作用具有重要意义。本研究旨在构建高效的棉花酵母双杂交 cDNA 文库,并通过已知大丽轮枝菌效应子 VCR1 互作蛋白的筛选来评价构建文库的质量。分别采用大丽轮枝菌及茉莉酸甲酯、水杨酸和乙烯处理海岛棉‘海 7124’以诱导其抗病基因表达,混合 RNA 样品构建酵母双杂交 cDNA 文库,文库滴度达  $1.18 \times 10^8$  cfu/mL,检测重组率 100%,插入片段在 300~2 000 bp 之间。以效应子 VCR1 为诱饵筛选获得 27 个潜在互作蛋白,并进一步确证了 1 个与 VCR1 互作的靶标蛋白。本研究构建的酵母双杂交文库将为筛选与大丽轮枝菌效应子互作的蛋白及后续互作机理研究提供重要的研究基础。

**关键词** 大丽轮枝菌; 植物激素; 酵母双杂交; cDNA 文库; 互作蛋白

**中图分类号:** S 432.23 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019691

## Construction of a sea-island cotton yeast two-hybrid library under the conditions of infection with *Verticillium dahliae* and treatment with hormones

XU Yan<sup>1#</sup>, LI Ran<sup>2#</sup>, SONG Jian<sup>2</sup>, WANG Dan<sup>2</sup>, ZHOU Lei<sup>2</sup>, LI Junjiao<sup>2</sup>, ZHANG Dandan<sup>2</sup>,  
CHEN Jieyin<sup>2</sup>, DAI Xiaofeng<sup>2\*</sup>, YANG Xingyong<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** *Verticillium dahliae* is a soil-borne fungal plant pathogen that causes the destructive vascular wilt on many hosts, including economically important cotton and potato crops. Generally, the extracellular proteins secreted by *V. dahliae* play a crucial role in its virulence on the host. The objective of this study was to construct a yeast two-hybrid library from cotton infected with *V. dahliae* and treated with hormones, and evaluate the library quality by screening the interaction proteins of a known *V. dahliae* effector VCR1. To construct the library, the RNA was extracted from the cultivar *Gossypium barbadense* ‘Hai 7124’ inoculated with *V. dahliae* or treated with hormones. The high quality of library was assessed by the high cDNA library titer ( $1.18 \times 10^8$  cfu/mL), the distribution length of insertion size is 300–2 000 bp, and the absolute recombination efficiency. Subsequent screening of this library for the known *V. dahliae* effector VCR1 yielded 27 candidate interaction proteins, and one of them was proven to interact with VCR1 when validated using the yeast two-hybrid system. In conclusion, a high-quality sea-island cotton yeast two-hybrid library with good efficiency for identifying the interaction proteins of *V. dahliae* effectors was constructed in this study, which would be helpful for revealing molecular mechanisms underlying the interactions between *V. dahliae* and cotton.

**Key words** *Verticillium dahliae*; plant hormones; yeast two-hybrid system; cDNA library; interaction proteins

收稿日期: 2019-12-15

修订日期: 2020-02-20

基金项目: 国家重点研发计划(SQ2018YFE011242,2017YFD0201904);国家自然科学基金(31772245,31970142)

\* 通信作者 E-mail:戴小枫 daixiaofeng\_caas@126.com;杨星勇 yangxy94@swu.edu.cn

# 为并列第一作者

黄萎病是由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 引起的世界性真菌病害,每年造成棉花、马铃薯、蔬菜等农作物损失数十亿美元,严重威胁农业生产安全<sup>[1-4]</sup>。感染黄萎病的植物通常表现出叶片萎蔫、黄化、卷曲或坏死症状,维管束变褐,并随着病程进展最终枯萎死亡<sup>[5-6]</sup>。

大丽轮枝菌分泌大量具有毒力的胞外蛋白是成功侵染寄主的重要策略之一,如其分泌的细胞壁降解酶类在侵染寄主过程中通常参与降解细胞壁的作用,表现为毒力功能<sup>[7-8]</sup>。另外一类分泌蛋白则参与了病原与寄主互作过程,如大丽轮枝菌的无毒因子 Ave1 能够被番茄的抗性蛋白 Ve1 识别而诱导寄主免疫反应<sup>[9-10]</sup>;大丽轮枝菌中小分子量的富含半胱氨酸蛋白 VdSCP41 能与寄主植物的转录因子 CBP60g 互作而激发免疫反应<sup>[11]</sup>。此外,通过在模式植物烟草中瞬时表达大丽轮枝菌分泌的胞外蛋白,还筛选出了多个参与寄主互作的毒力因子,如糖苷水解酶 VdEG1 和 VdEG3<sup>[12]</sup>、角质酶 VdCUT1<sup>[13]</sup>、小分子量富含半胱氨酸蛋白 VdSCP7<sup>[14]</sup>、坏死和乙烯诱导蛋白 NLPs<sup>[15-16]</sup>。目前,多个参与病原与寄主互作的效应蛋白已经被鉴定并确定了其在侵染过程中的毒力功能,但其是如何识别寄主或被寄主识别并发挥作用的机制仍不清楚。

酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system, Y2H)是研究蛋白相互作用的常用方法之一,最早在 1989 年由 Fields 和 Song 提出,其原理是利用真核生物转录因子的 DNA 结合结构域-BD 和 DNA 转录激活结构域-AD,如 GAL4 和 GCN4 等,将 2 个待研究的蛋白分别与 BD 和 AD 结构域连接并共同导入酵母菌中,若 2 个蛋白相互作用则转录因子的 BD 和 AD 结构域相互靠近,即可以转录激活下游报告基因的表达来检测这种相互作用的发生<sup>[17]</sup>。除应用于 2 个已知蛋白间的相互作用的检测外,酵母双杂交体系也广泛应用于与已知蛋白具有潜在相互作用的蛋白筛选。但这一技术在大丽轮枝菌效应子与寄主植物相互作用的研究中很少报道,因此,在明确参与大丽轮枝菌与寄主互作效应子的前提下,通过构建植物寄主酵母双杂交文库并筛选与病原效应子互作的靶标蛋白,对揭示大丽轮枝菌侵染寄主过程的致病分子机理具有重要意义。

本研究以大丽轮枝菌及激素处理的棉花为材料,构建了用于大丽轮枝菌效应子互作蛋白筛选的酵母双杂交文库,并对文库的质量进行评估;以实验室筛选的具有诱导细胞坏死且定位于植物细胞核的效应子 VCR1(未发表)为例,通过互作蛋白筛选、基因功能分析和验证进一步评价了构建的酵母双杂交文库的应用价值。本研究建立的棉花酵母双杂交 cDNA 文库将为大丽轮枝菌效应子互作蛋白的筛选鉴定及深入研究病原与寄主互作分子机制的研究提供有力支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植物材料:海岛棉‘海 7124’*Gossypium barbadense* ‘Hai 7124’,生长条件为 L//D=14 h//10 h,温度 28℃。

菌株:落叶型强致病力大丽轮枝菌 Vd991、酵母菌株 Y187 和 Y2H 均由本实验室保存,大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司。

质粒:酵母双杂交所用的诱饵质粒 pGBKT7、文库质粒 pGADT7、对照质粒 pGBKT7-Lam、pGBKT7-53 和 pGADT7-T 购自美国赛默飞公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 海岛棉样品处理及 RNA 提取

大丽轮枝菌于马铃薯葡萄糖琼脂(potato Dextrose agar, PDA)培养基 25℃ 条件下培养 7 d,无菌水收集孢子并制备成  $2 \times 10^7$  个/mL 孢子悬浮液。取 20 株 2 周龄海岛棉幼苗(2 片真叶完全展平)浸泡于 50 mL 上述孢子悬浮液,30 min 后移栽回含有灭菌土的营养钵,处理后分别于 12、24、48、96 h 和 144 h 取根部样品液氮速冻, -80℃ 保存。制备 10 mmol/L 水杨酸(salicylic acid, SA)、5 mmol/L 乙烯利溶液(ethephon, ET)和 100 μmol/L 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA),其中乙烯利用水溶,水杨酸和茉莉酸甲酯用乙醇促溶后用水稀释到目标浓度<sup>[18]</sup>,3 种激素分别喷施于 20 株上述海岛棉幼苗,进行单独处理,处理后于 2、6、12、24、48 h 和 72 h 后取叶片迅速置于液氮中速冻, -80℃ 保存。RNA 提取使用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(北京原平皓生物技术有限公司),通过 1.0% 琼

脂糖电泳检测提取 RNA 的完整性,使用 Nano-Drop2000 检测提取 RNA 的质量与浓度。

### 1.2.2 酵母双杂交 cDNA 文库构建

根据检测浓度将大丽轮枝菌和激素处理的所有植株 RNA 样品等量混合,利用 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒(美国赛默飞公司)构建酵母双杂交 cDNA 文库。以上述 2  $\mu$ L 的 RNA 为模板合成第 1 条 cDNA 链,然后通过 LD-PCR 扩增 cDNA 得到第 2 条链,并利用柱层析剔除 250 bp 以下的双链 cDNA。利用 PEG/LiAc 法将所得 cDNA 产物和 6  $\mu$ L 的 pGADT7-Rec 线性质粒共转入 Y187 酵母感受态细胞内,用 15 mL 的 NaCl 溶液(0.9%)重悬菌体并涂布于缺少亮氨酸(Leu)的酵母培养基(synthetic dropout nutrient medium, SD)SD/-Leu 培养基,30℃倒置培养 3~4 d 后收集菌体,得到的酵母细胞即为处理样品的酵母双杂交 cDNA 文库,按 1.0 mL/管分装于 1.5 mL 离心管中,液氮速冻存于 -80℃ 备用。

### 1.2.3 cDNA 文库转化效率及滴度检测

从上述重悬菌液吸取 100  $\mu$ L 并用 0.9% NaCl 10 倍梯度稀释至  $10^{-4}$ ,涂布于 SD/-Leu 培养基后于 30℃ 条件下倒置培养 3~4 d,通过单菌落数计算转化效率。将无菌水收集的菌体稀释至  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-4}$ ,分别吸取 50  $\mu$ L 涂布于 SD/-Leu 培养基上,30℃ 倒置培养 3 d,根据单菌落数计算文库滴度。

### 1.2.4 cDNA 文库平均插入片段大小及重组率分析

在 SD/-Leu 平板上随机挑取 23 个单菌落,使用上游引物(5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3')和下游引物(5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3')进行菌落 PCR 扩增。扩增条件:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,扩增 34 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增产物使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,依据扩增产物片段大小计算 cDNA 文库的平均插入片段大小,阳性克隆比率以及 cDNA 文库的重组率。

### 1.2.5 诱饵载体构建

以实验室筛选的定位于寄主植物细胞核、引起细胞坏死的大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1(未发表)为研究对象,构建诱饵载体并开展酵母双杂交文库的筛选。利用带 *EcoR* I 酶切位点的特异

性引物(上游引物:5'-CATATGGCCATGGAGGC-CGAATTCATGGCACCAGTCCCGGCT-3';下游引物:5'-AGGTCGACGGATCCCCGGAATTCG-CATGTGTTGAGCATGCT-3')对 VCR1 基因进行 PCR 扩增,*EcoR* I 对诱饵表达载体 pGBKT7 酶切消化,再通过 ClonExpress II One Step Cloning Kit(诺唯赞,南京)将 VCR1 基因片段连接到 pGBKT7 上;获得重组质粒 pGBKT7-VCR1 转入 Trans1-T1 大肠杆菌感受态细胞,使用 pGBKT7 载体通用引物(上游引物:5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3';下游引物:5'-TAAGAGTCACTTTAAAATTT-GTAT-3')进行 PCR 扩增验证。

### 1.2.6 重组诱饵载体自激活及毒性检测

将上述构建的诱饵载体 pGBKT7-VCR1 及 pGBKT7 质粒分别转入 Y2H 酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp-His 和 SD/-Trp-His-Ade 培养基,通过转化后酵母细胞在上述培养基上的生长情况检测 VCR1 的自激活活性。将上述转化体系涂布 SD/-Trp 和酵母膏葡萄糖琼脂(YFDA)培养基,通过观察其在平板上生长情况鉴定 VCR1 对酵母是否具有毒性。

### 1.2.7 酵母双杂交文库的筛选

酵母文库筛选:上述携带有诱饵载体的菌株于 30 mL SD/-Trp 液体培养基中扩大培养,离心收集菌体并用 5 mL 的 SD/-Trp 液体培养基重悬,随后与构建的酵母双杂交文库混匀,并于 45 mL 的 2× YFDA 培养基(卡那霉素,50  $\mu$ L/L)中混匀融合培养,30℃、45 r/min 振荡培养 20 h。待观察到有合子出现后继续培养 4 h,典型的合子呈现三耳突状,分别代表两个母细胞和一个子细胞。之后收集菌体,用 0.5× YFDA(卡那霉素,50  $\mu$ L/L)培养液重悬菌体 2 次,最后定容至 10 mL。将上述重悬的酵母细胞涂布于直径 15 cm 的 SD/-Trp-Leu-His(TDO)培养基上,每个涂布 200  $\mu$ L,共 50 个平板,30℃ 倒置培养 3~5 d。将 TDO 培养基上长势较好的阳性克隆转接到 SD/-Trp-Leu-His-Ade(QDO)培养基上,30℃ 倒置培养观察其生长情况。

结合效率测定:取上述重悬的酵母菌体 100  $\mu$ L,按 10 倍梯度稀释至  $10^{-4}$  后每个梯度都分别涂布于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp-Leu(DDO)培养基平板上,每种培养基涂 5 个平板,30℃ 倒置培养 3~

5 d。待长出菌落后,统计二倍体、文库和诱饵克隆数,在相同稀释倍数的前提下,计算结合效率。结合效率=二倍体克隆数/文库或诱饵克隆数 $\times 100\%$ 。

潜在互作转化子测序:挑取在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上正常生长的酵母细胞,于 SD/-Trp-Leu-His-Ade 液体培养基进行扩大培养,利用 pGADT7 载体通用引物(上游引物:5'-TAATAC-GACTCACTATAGGGC-3';下游引物:5'-AGAT-GGTGCACGATGCACAG-3')扩增转化子的 cDNA 插入片段并测序分析。

### 1.2.8 潜在互作蛋白基本特性分析

对上述获得的潜在互作转化子序列进行初步生物信息学分析:通过 NCBI 数据的 BlastP 比对推测潜在互作蛋白的编码序列;利用 SMART([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1))预测编码蛋白的保守结构域;采用 WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)预测编码蛋白的亚细胞定位;通过 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)预测编码蛋白是否具有信号肽序列特征。

### 1.2.9 互作蛋白验证

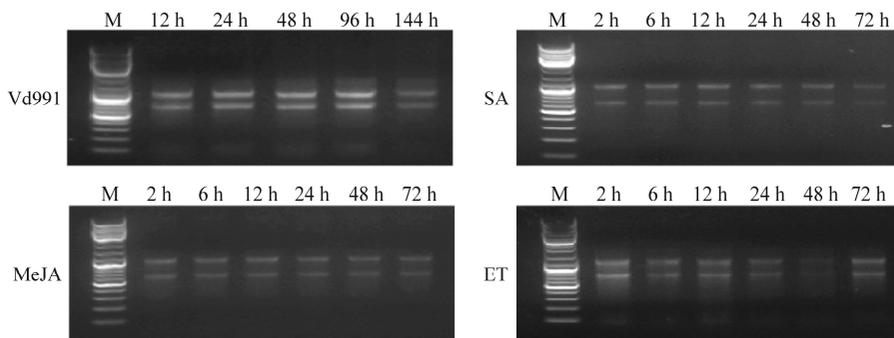
对筛选的阳性克隆与本研究的大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 进行验证:随机选取 5 个可能定位于细胞核的潜在互作基因,合成全长 cDNA 序列并构建于 pGADT7 载体上,将其分别与诱饵载体

pGBKT7-VCR1 共转化至 Y2H 酵母感受态细胞中,以 pGADT7-T 和 pGBKT7-53、pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 分别作为阳性和阴性对照,涂布 SD/-Trp-Leu(DDO)培养基,30℃ 倒置培养 3~5 d。观察 SD/-Trp-Leu 培养基上酵母的生长情况,将阳性克隆转接到 SD/-Trp-Leu-His-Ade(QDO)和 SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal(QDO/X)培养基上,30℃ 倒置培养 5~7 d 后观察生长和显色情况,验证筛选的基因与靶标效应蛋白的互作情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建酵母双杂交文库的样品处理及 RNA 提取

‘海 7124’是抗黄萎病棉花品种,落叶型强致病力大丽轮枝菌 Vd991 侵染 5~6 d 后病原仍停留在皮层,病原菌无法繁殖扩展<sup>[19]</sup>;同时,激素 SA、ET 和 MeJA 处理下可诱导植物抗病相关基因表达<sup>[20]</sup>。为构建有效的抗病相关基因诱导表达文库,本研究收集了大丽轮枝菌 Vd991 侵染以及激素 SA、ET 和 MeJA 处理的‘海 7124’样品,并提取了所有样品的总 RNA,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明 28S 及 18S 条带清晰,完整性好。依据紫外吸收光谱检测发现上述提取的 RNA 样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.97~2.02 之间,浓度在 500.4~2 086.4 ng/ $\mu$ L(图 1),表明 RNA 质量较好,可以用于文库构建。



Vd991: 强致病力落叶型大丽轮枝菌; SA: 水杨酸处理; ET: 乙烯处理; MeJA: 茉莉酸甲酯处理; M: 1 kb DNA Ladder  
Vd991: Highly virulent strain of *Verticillium dahliae*; SA: Salicylic acid; ET: Ethylene; MeJA: Methyl jasmonate. M: 1 kb DNA Ladder

图 1 海岛棉酵母双杂交文库样品的总 RNA 提取

Fig. 1 Total RNA extraction of samples for the sea-land cotton yeast two-hybrid library

### 2.2 海岛棉酵母双杂交 cDNA 文库构建及评价

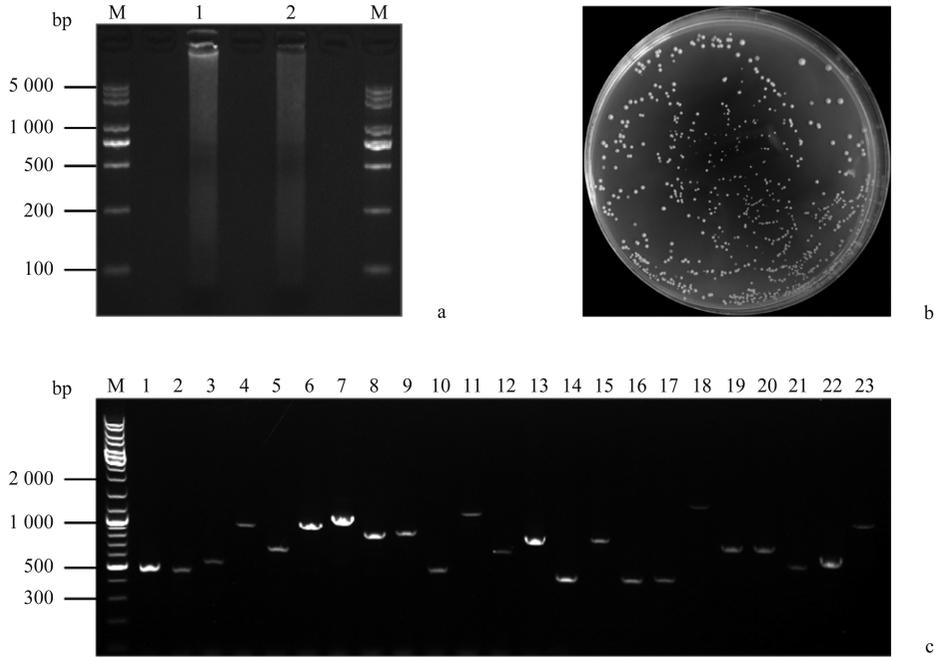
上述 4 组处理样品(大丽轮枝菌侵染及 3 种激素处理)的总 RNA 等量混合,反转录合成 cDNA 第一链,使用此 cDNA 合成双链 cDNA(图 2a)并利用

柱层析剔除 250 bp 以下的双链 cDNA(ds-cDNA)。将获得的 ds-cDNA 与酵母双杂交文库载体 pGADT7 获得共转化 Y187 酵母菌株进行同源重组,最终获得海岛棉在上述 4 种处理条件下的酵母

双杂交文库。用 SD/-Leu 培养基收集 cDNA 文库的菌体,得到约 130 mL 菌悬液并分装于 1.5 mL 离心管, -80℃ 冻存备用。

文库转化完成后,通过梯度稀释涂布 SD/-Leu 培养基对酵母文库的转化效率和滴度进行检测。通过统计,稀释至  $10^{-4}$  平板平均菌落数为 590 个(图 2b),计算得酵母文库的转化效率为  $5.9 \times 10^7 / 3 \mu\text{g pGADT7-VCR1}$ , 高于  $1 \times 10^6 / 3 \mu\text{g pGADT7-Rec}$  的试验要求,并且文库滴度达到  $1.18 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ ,

同样高于  $1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$  的文库构建标准。为验证本研究酵母文库插入片段情况,从上述计算转化效率的平板中随机挑取 23 个菌落进行 PCR 扩增,结果显示,挑取的克隆菌落均可扩增出插入片段,重组率达 100%,并且扩增片段大小分布在 300 ~ 2 000 bp 之间(图 2c)。综上结果说明,本研究构建的大丽轮枝菌及激素处理下棉花酵母双杂交 cDNA 文库质量良好,可用于后续大丽轮枝菌效应蛋白的筛选鉴定。



a: 双链cDNA的合成; b: 稀释的酵母悬浮液( $10^{-4}$ )涂布在SD/-Leu培养基上,通过计算菌落数滴度检测文库滴度; c: 菌落PCR检测酵母双杂交文库插入片段大小。M: DNA ladder (1 kb DNA Marker和5 000 bp DNA Marker)  
a: Synthesized double-strand cDNA; b: Detection of the library titer by diluted yeast suspension ( $10^{-4}$ ) on SD/-Leu medium. The colony number was counted and calculated for library titer; c: colony PCR identification of the insertion size range of the yeast two-hybrid cDNA library. M: DNA Ladder (1 kb DNA Marker, 5 000 bp DNA Marker)

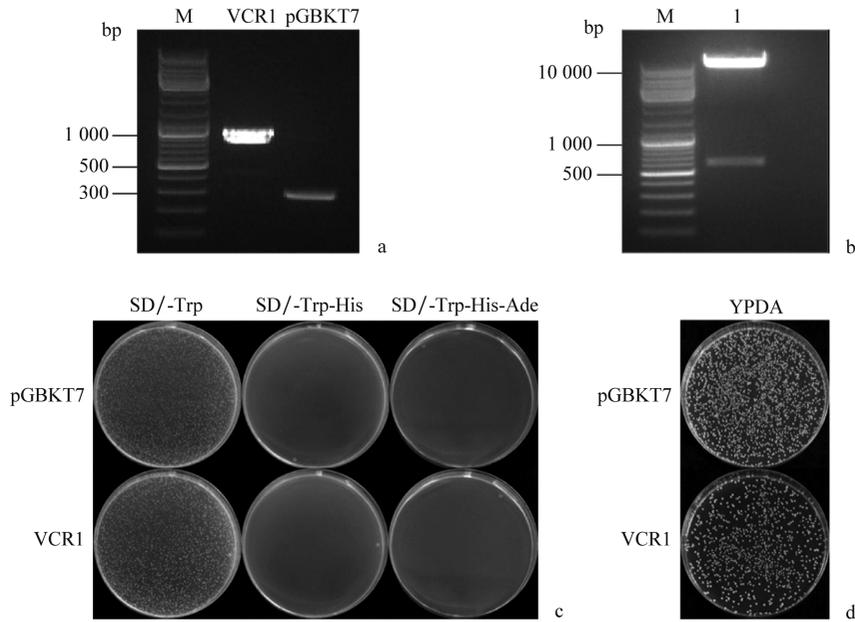
图 2 棉花酵母双杂交文库构建及质量评价

Fig. 2 Construction and evaluation of the yeast two-hybrid cDNA library

### 2.3 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 诱饵载体构建

使用 pGBKT7 通用引物对连接转化后平板上的阳性克隆进行分子鉴定,并以空载体为对照。结果显示,构建的诱饵载体扩增出的条带与空载体扩增出的条带差值大小与 VCR1 片段大小相近,约 580 bp,进一步提取构建好的诱饵载体质粒,用 *EcoR* I 内切酶进行酶切验证,并进行测序,结果与预期一致,表明大丽轮枝菌 VCR1 基因成功整合到诱饵载体 pGBKT7 (pGBKT7-VCR1) (图 3a, 3b)。为验证 VCR1 的自激活性,将 pGBKT7-VCR1 转化

至 Y2H 酵母并涂布于相应培养基上,结果显示转化 pGBKT7-VCR1 诱饵载体与 pGBKT7 载体的酵母在 SD/-Trp 培养基上正常生长,在 SD/-Trp-His 和 SD/-Trp-His-Ade 培养基上不生长(图 3c),表明 VCR1 基因在酵母菌株中没有自激活性。同时,含有 pGBKT7-VCR1 诱饵载体和 pGBKT7 载体的酵母菌株在 YPDA 培养基上生长一致(图 3d),表明 VCR1 对 Y2H 酵母菌株没有毒性。因此,大丽轮枝菌 VCR1 可以用于下一步与酵母双杂交文库互作蛋白的筛选。



a: VCR1 诱饵载体的分子验证; b: 酶切鉴定重组质粒 pGBKT7-VCR1; c: VCR1 自激活活性检测; d: VCR1 毒性检测  
a: Identification of the VCR1 recombinant in the bait vector of pGBKT7; b: Confirmation of pGBKT7-VCR1 by digestion; c: Verification of the self-activation of VCR1 in the yeast-hybrid system; d: Identification of the toxicity of VCR1 in the yeast-hybrid system

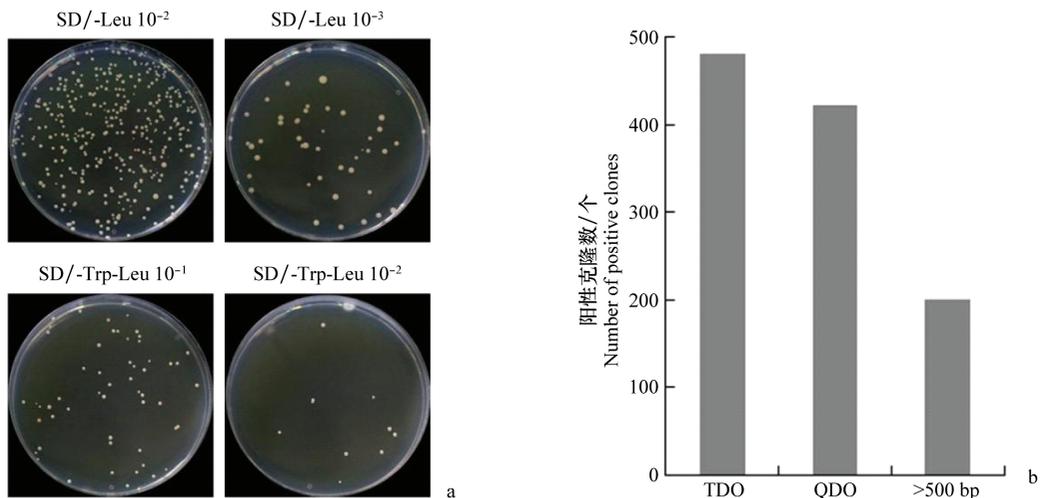
图 3 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的诱饵载体构建

Fig. 3 Construction of a bait vector of the *Verticillium dahliae* effector VCR1

## 2.4 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的候选互作蛋白筛选

使用上述诱饵载体 pGBKT7-VCR1 筛选文库, 经统计 SD/-Leu 培养基上稀释 100 倍的菌落数为 415 个, 1 000 倍的 48 个, SD/-Trp-Leu 培养基上稀释 10 倍的菌落数为 55 个, 100 倍的 10 个, 计算得出

酵母双杂交结合效率约为 1.33% (图 4a)。进一步从 SD/-Trp-Leu-His 培养基上筛选出生长正常的克隆 480 个接种于 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基上二次筛选, 最终获得生长正常的克隆 422 个, 使用 pGADT7 通用引物对 422 个克隆进行 PCR 鉴定, 获得插入片段大于 500 bp 的克隆 201 个 (图 4b)。



a: 诱饵载体 pGBKT7-VCR1 与酵母双杂交文库结合效率检测; b: 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的候选互作蛋白筛选情况, TDO: SD/-Trp-Leu-His 培养基筛选获得生长正常的克隆; QDO: SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基筛选获得生长正常的克隆

a: Binding efficiency of the bait vector pGBKT7-VCR1 with the yeast two-hybrid library; b: The number of clones during the yeast two-hybrid screening procedures. TDO and QDO represent the positive clones grown on SD/-Trp-Leu-His and SD/-Trp-Leu-His-Ade media, respectively

图 4 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的候选互作蛋白筛选

Fig. 4 Screening the candidate interaction proteins of the *Verticillium dahliae* effector VCR1

## 2.5 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的候选互作蛋白验证

根据上述克隆测序结果分析发现,本研究共筛选到了与大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 潜在互作的蛋白 27 个(表 1)。通过序列比对与功能注释表明,其中 18 个为假定蛋白(功能未知)。结果显示,效应蛋白 VCR1 与其中 4 个潜在互作蛋白(VCR1-IP001、VCR1-IP005、VCR1-IP009 和 VCR1-IP027)与阴性

对照(pGADT7-T+pGBKT7-Lam)仅在 SD/-Trp-Leu 培养基上正常生长,在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal 培养基上皆不生长;而效应蛋白 VCR1 和 VCR1-IP003 与阳性对照(pGADT7-T + pGBKT7-53),在 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal 培养基上均能够正常生长,表明 VCR1 可以与 VCR1-IP003 互作(图 5)。

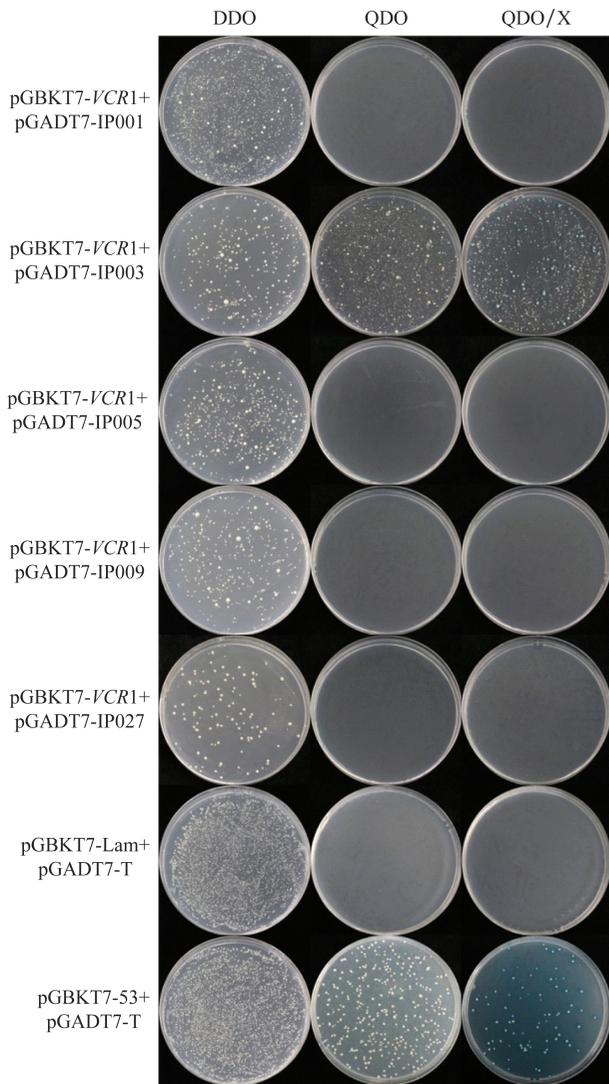
表 1 大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的候选互作蛋白<sup>1)</sup>

Table 1 The candidate interaction proteins of the VCR1 effector in *Verticillium dahliae*

基因编号 Gene code	克隆数/个 Number of clones	功能 Function	亚细胞定位 Subcellular localization	长度/bp Length	跨膜结构域 Transmembrane domain	信号肽 Signal peptide
VCR1-IP001	7	假定蛋白	nucl: 7, cyto: 3, chlo: 1, mito: 1	768	0	N
VCR1-IP002	7	假定蛋白	nucl: 4, cyto: 4, plas: 3, chlo: 2	354	0	N
VCR1-IP003	5	假定蛋白	mito: 7, nucl: 4, chlo: 3	891	0	N
VCR1-IP004	4	假定蛋白	extr: 7, cyto: 5, chlo: 2	189	0	N
VCR1-IP005	3	假定蛋白	nucl: 13, extr: 1	720	0	N
VCR1-IP006	2	假定蛋白	cyto: 10, nucl: 3, plas: 1	528	0	N
VCR1-IP007	2	假定蛋白	chlo: 14	438	0	N
VCR1-IP008	2	假定蛋白	nucl: 6, chlo: 5, mito: 2, cyto: 1	477	0	N
VCR1-IP009	2	泛素结构域	cyto: 9, cyto_nucl: 8, nucl: 3, chlo: 1	1 299	0	N
VCR1-IP010	2	假定蛋白	E. R. : 4.5, E. R. _plas: 3.5, nucl: 3, cyto: 2	1 785	0	N
VCR1-IP011	1	假定蛋白	chlo: 9, nucl: 4, mito: 1	1 332	0	N
VCR1-IP012	1	假定蛋白	extr: 7, cyto: 6, golg: 1	300	0	N
VCR1-IP013	1	假定蛋白	mito: 11, chlo: 3	429	0	N
VCR1-IP014	1	假定蛋白	extr: 7, cyto: 6, chlo: 1	501	0	N
VCR1-IP015	1	假定蛋白	chlo: 9, mito: 4, nucl: 1	921	0	N
VCR1-IP016	1	卷曲螺旋区域	pero: 13, cyto: 1	1 761	0	N
VCR1-IP017	1	WD40 结构域	chlo: 11, vacu: 2, nucl: 1	1 566	0	N
VCR1-IP018	1	假定蛋白	plas: 8.5, cyto_plas: 5, E. R. : 4, golg: 1	1 461	0	N
VCR1-IP019	1	MIF4G 结构域	cyto: 11, chlo: 1, cysk: 1, golg: 1	1 236	0	N
VCR1-IP020	1	跨膜结构域	plas: 8, E. R. : 3, chlo: 2, nucl: 1	2 208	1	N
VCR1-IP021	1	锚蛋白结构域/STYKc 结构域	cyto: 6, nucl: 4, mito: 2, plas: 1	1 425	0	N
VCR1-IP022	1	假定蛋白	chlo: 11, nucl: 2, plas: 1	1 356	0	N
VCR1-IP023	1	螺旋	nucl: 6, cyto: 4, cysk: 3, pero: 1	993	0	N
VCR1-IP024	1	假定蛋白	nucl: 5, chlo: 2, cyto: 2, mito: 2	2 130	0	N
VCR1-IP025	1	假定蛋白	chlo: 14	1 620	0	Y
VCR1-IP026	1	跨膜结构域/SapB 结构域	chlo: 8, vacu: 4, extr: 2	1 545	1	Y
VCR1-IP027	1	跨膜结构域/Amb 结构域	nucl: 12, extr: 2	1 365	1	Y

1) nucl: 细胞核; cyto: 细胞质; chlo: 叶绿体; mito: 线粒体; plas: 细胞膜; extr: 胞外; ER: 内质网; golg: 高尔基体; pero: 过氧化物酶; vacu: 液泡; cysk: 细胞骨架。跨膜结构域中 0 表示没有跨膜结构域; 1 表示含有 1 个跨膜结构域。信号肽中 Y 表示含有信号肽; N 表示没有信号肽。

nucl: Nucleus; cyto: Cytoplasm; chlo: Chloroplast; mito: Mitochondria; plas: Plasma membrane; extr: Extracellular; ER: Endoplasmic reticulum; golg: Golgi apparatus; pero: Peroxidase; vacu: Vacuole; cysk: Cytoskeleton. 0 indicates no transmembrane domain, while 1 indicates one transmembrane domain. Y indicates there is signal peptide, N indicates no signal peptide.



pGBKT7-53+pGADT7-T和pGBKT7-Lam+pGADT7-T分别为酵母双杂交验证体系的阳性对照和阴性对照。DDO: SD/-Trp-Leu培养基; QDO: SD/-Trp-Leu-His-Ade培养基; QDO/X: SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal培养基

pGBKT7-53+pGADT7-T and pGBKT7-Lam+pGADT7-T represents the positive and negative controls in the yeast two-hybrid system, respectively. DDO, QDO and QDO/X represent the SD/-Trp-Leu, SD/-Trp-Leu-His-Ade media and SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- $\alpha$ -gal, respectively

图 5 酵母双杂交回转变验证大丽轮枝菌效应蛋白 VCR1 的互作蛋白

Fig. 5 Validation of the candidate interaction proteins with the *Verticillium dahliae* effector VCR1 by using the yeast two-hybrid system

### 3 讨论

植物在病原菌侵染时会诱导抗性基因表达来抵御病原菌的侵染<sup>[21-23]</sup>。此外,植物激素也可以作为免疫信号分子激活防御反应,如茉莉酸、水杨酸、乙烯等<sup>[20]</sup>。水杨酸能够激活针对活体、半活体营养寄

生物的抗性防卫反应<sup>[24]</sup>;茉莉酸能够与乙烯协同发挥作用,激活对死体营养病原菌的防御反应<sup>[25-26]</sup>。定位于细胞膜上的棉花枯草杆菌酶(subtilase) *GbSbT1* 同时受大丽轮枝菌、茉莉酸和乙烯诱导,并进入细胞质中发挥功能<sup>[27]</sup>。因此,参与病原与寄主互作的基因往往在病原侵染、激素处理条件下被大量诱导表达。海岛棉对黄萎病具有较高的抗性,部分品种对黄萎病菌免疫,与陆地棉相比,更适用于筛选抗病基因;‘海 7124’是抗病基因鉴定与功能研究的常用材料<sup>[28-30]</sup>。因此,本研究综合采用大丽轮枝菌侵染、激素处理等条件诱导‘海 7124’抗病相关基因表达,对处理的样品提取 RNA 并混合构建酵母双杂文库。本研究所构建的文库可以覆盖多种诱导条件下的抗病相关基因,文库抗性相关基因种类和丰度优于单一处理条件下构建的酵母双杂交文库,从而提高了筛选到与大丽轮枝菌效应子互作蛋白的概率。应用本研究构建的酵母文库,成功筛选到诱饵蛋白 VCR1 的 27 个潜在互作蛋白。

高质量 cDNA 文库构建是利用酵母双杂交筛选互作蛋白的关键,酵母文库的好坏直接影响互作蛋白的筛选效率。良好的酵母文库需要有较高的转化效率( $>1 \times 10^6 / 3 \mu\text{g pGADT7-Rec}$ )、重组率、较长的插入片段以及足够的文库滴度( $>1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$ )。有研究报道利用水稻构建的酵母双杂交文库,转化效率达到  $6.65 \times 10^6 / 3 \mu\text{g pGADT7-Rec}$ ,重组率为 100%<sup>[31]</sup>。经质量检测,本研究构建酵母文库转化效率为  $5.9 \times 10^7 / 3 \mu\text{g pGADT7-VCR1}$ ,连接片段检测重组率为 100%,且插入片段分布在 300 ~ 2 000 bp;此外,本研究构建的酵母双杂交 cDNA 文库滴度为  $1.18 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ ,约为标准量的 10 倍。综上所述,本研究利用大丽轮枝菌及激素处理下的混合样品,成功建立了高效的酵母双杂交 cDNA 文库,这为后续筛选与大丽轮枝菌效应子互作的靶标蛋白提供了重要的材料基础。

酵母双杂交系统是在真核酵母细胞内研究蛋白之间相互作用的一种方法,此方法灵敏度高,应用广泛。本研究应用酵母双杂交技术成功筛选到 27 个与 VCR1 潜在互作的蛋白,这表明构建的酵母双杂交文库具有较好的筛选效果。利用棉花测序的基因组信息,分析获得对应基因的全长序列并进行功能预测,发现鉴定的 27 个潜在互作蛋白中,18 个为未知蛋白,其功能尚不明确;其中 24 个蛋白质均无信

号肽。16 个潜在互作蛋白预测定位于细胞核,与效应子 VCR1 在寄主植物的亚细胞定位(细胞核)相同,具有很高的可信度。随机选取 5 个定位于细胞核的潜在互作蛋白进行回转验证,确证了与效应子 VCR1 互作的候选蛋白(VCR1-IP003)。上述结果一定程度上客观反映了酵母双杂交技术自身存在假阳性高的局限性,但也说明本研究构建的酵母双杂交文库可以有效应用于病原与寄主互作蛋白的筛选。

综上,本试验成功构建了海岛棉‘海 7124’在大丽轮枝菌侵染和激素处理下的酵母双杂交 cDNA 文库,文库具有较高的转化效率和重组效率,并通过大丽轮枝菌效应子 VCR1 互作蛋白的筛选系统评价了构建的棉花酵母双杂交文库,为后续筛选与大丽轮枝菌胞外蛋白(效应子)互作的靶标蛋白及其互作机理研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] KOMBRINK A, ROVENICH H, SHI-KUNNE X, et al. *Verticillium dahliae* LysM effectors differentially contribute to virulence on plant hosts [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(4): 596 - 608.
- [2] JING Rui, LI Haiyuan, HU Xiaoping, et al. *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* and *V. nonalfalfae* in potato in Northern China [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(10): 1958 - 1964.
- [3] FRADIN E F, THOMMA B. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(2): 71 - 86.
- [4] INDERBITZIN P, SUBBARAO K V. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it [J]. *Phytopathology*, 2014, 104(6): 564.
- [5] ZHANG Dandan, WANG Jie, WANG Dan, et al. Population genomics demystifies the defoliation phenotype in the plant pathogen *Verticillium dahliae* [J]. *New Phytologist*, 2019, 222(2): 1012 - 1029.
- [6] LI Feng, SHEN Hao, WANG Ming, et al. A synthetic antimicrobial peptide BTD-S expressed in *Arabidopsis thaliana* confers enhanced resistance to *Verticillium dahliae* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(4): 1647 - 1661.
- [7] CHEN Jieyin, XIAO Hongli, GUI Yuejing, et al. Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1709. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01709.
- [8] ZHANG Wenqi, GUI Yuejing, SHORT D, et al. *Verticillium dahliae* transcription factor VdFTF1 regulates the expression of multiple secreted virulence factors and is required for full virulence in cotton [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(4): 841 - 857.
- [9] FRADIN E F, ZHANG Zhao, JUAREZ A J C, et al. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1 [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 320 - 332.
- [10] DE J R, PETER V E H, MARUTHACHALAM K, et al. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(13): 5110 - 5115.
- [11] QIN Jun, WANG Kailun, SUN Lifan, et al. The plant-specific transcription factors CBP60g and SARD1 are targeted by a *Verticillium* secretory protein VdSCP41 to modulate immunity [J]. *Elife Sciences*, 2018, 7: e34902. DOI: 10.7554/eLife.34902.
- [12] GUI Yuejing, CHEN Jieyin, ZHANG Dandan, et al. *Verticillium dahliae* manipulates plant immunity by glycoside hydrolase 12 proteins in conjunction with carbohydrate-binding module 1 [J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(5): 1914 - 1932.
- [13] GUI Yuejing, ZHANG Wenqi, ZHANG Dandan, et al. A *Verticillium dahliae* extracellular cutinase modulates plant immune responses [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(2): 260 - 273.
- [14] ZHANG Lisha, NI Hao, DU Xuan, et al. The *Verticillium*-specific protein VdSCP7 localizes to the plant nucleus and modulates immunity to fungal infections [J]. *New Phytologist*, 2017, 215(1): 368 - 381.
- [15] ZHOU Bangjun, JIA Peisong, GAO Feng, et al. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis-and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(7): 964 - 975.
- [16] SANTHANAM P, VAN E H P, ALBERT I, et al. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(3): 278 - 286.
- [17] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245 - 246.
- [18] LI Nanyang, MA Xuefeng, SHORT D, et al. The island cotton NBS-LRR gene GbaNA1 confers resistance to the non-race 1 *Verticillium dahliae* isolate Vd991 [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(6): 1466 - 1479.
- [19] 肖红利, 孔志强, 包郁明, 等. 大丽轮枝菌侵染抗感棉种的组织学过程观察 [J]. *植物病理学报*, 2014, 44(3): 287 - 294.
- [20] BARI R, JONES J D G. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(4): 473 - 488.

- [21] CAI Yingfan, CAI Xiaoyan, WANG Qianglian, et al. Genome sequencing of the Australian wild diploid species *Gossypium australe* highlights disease resistance and delayed gland morphogenesis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 814–828.
- [22] ZHANG Yihao, SHI Yongqiang, ZHAO Lihong, et al. Phosphoproteomics profiling of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) roots in response to *Verticillium dahliae* inoculation [J]. *ACS Omega*, 2019, 4(19): 18434–18443.
- [23] ZHANG Lin, WANG Maojun, LI Nannan, et al. Long non-coding RNAs involve in resistance to *Verticillium dahliae*, a fungal disease in cotton [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(6): 1172–1185.
- [24] YANG Li, LI Bosheng, ZHENG Xiaoyu, et al. Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids [J/OL]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 7309. DOI: 10.1038/ncomms8309.
- [25] CACAS J, PRÉ M, PIZOT M, et al. GhERF-IIb3 regulates the accumulation of jasmonate and leads to enhanced cotton resistance to blight disease [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(6): 825–836.
- [26] THALER J S, OWEN B, HIGGINS V J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 530–538.
- [27] DUAN Xingpeng, ZHANG Zhidong, WANG Jin, et al. Characterization of a novel cotton subtilase gene *GbSBT1* in response to extracellular stimulations and its role in *Verticillium* resistance [J/OL]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e153988. DOI: 10.1371/journal.pone.0153989.
- [28] CHEN Tian, KAN Jialiang, YANG Yuwen, et al. A Ve homologous gene from *Gossypium barbadense*, *Gbdvr3*, enhances the defense response against *Verticillium dahliae* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98(1): 101–111.
- [29] WANG Hongmei, LIN Zhongxu, ZHANG Xianlong, et al. Mapping and quantitative trait loci analysis of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008(2): 174–182.
- [30] GAO Yulong, GUO Wangzhen, WANG Lei, et al. Isolation and characterization of resistance and defense gene analogs in cotton (*Gossypium barbadense* L.) [J]. *Science in China: Life Sciences*, 2006, 49(6): 530–542.
- [31] 王宇秋, 李国邦, 杨娟, 等. 稻曲病菌侵染水稻颖花的酵母双杂交 cDNA 文库构建与应用 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(5): 865–873.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 27 页)

## 参考文献

- [1] POLLOK B A, HEIM R. Using GFP in applications [J]. *Trends in Cell Biology*, 1999, 9(2): 57–60.
- [2] TSIEH R Y. The green fluorescent protein [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67: 509–544.
- [3] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, PATTERSON G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells [J]. *Science*, 2003, 300(5616): 87–91.
- [4] ZHANG Jin, CAMPBELL R E, TING A Y, et al. Creating new fluorescent probes for cell biology [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3: 906–918.
- [5] LAM A J, ST-PIERRE F, GONG Yiyang, et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(10): 1005–1012.
- [6] SHANER N C, LAMBERT G G, CHAMMAS A, et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 407–409.
- [7] BONNEFOIS T, VERNEREY M S, RODRIGUES V, et al. Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 35–44.
- [8] MASTOP M, BINDELS D S, SHANER N C, et al. Characterization of a spectrally diverse set of fluorescent proteins as FRET acceptors for mTurquoise2 [J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11999. DOI: 10.1038/s41598-017-12212-x.
- [9] XIA Zongping, LIU Yuecheng. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes [J]. *Biophysical Journal*, 2001, 81: 2395–2402.
- [10] FU Shuai, XU Yi, LI Chengyang, et al. *Rice stripe virus* interferes with S-acylation of remorin and induces its autophagic degradation to facilitate virus infection [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11: 269–287.
- [11] ZHANG Yixiang, GAO Peng, YUAN J S. Plant protein-protein interaction network and interactome [J]. *Current Genomics*, 2010, 11(1): 40–46.
- [12] OKAMOTO K, SAKO Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 46: 16–23.

(责任编辑: 田 喆)