中国油料作物学报 2016,38(3):292 - 299
Chinese Journal of Oil Crop Sciences doi:10.7505/j.issn.1007 - 9084.2016.03.004

甘蓝型油菜温敏 GMS TE5A 幼蕾酵母双杂交 cDNA 文库的构建及筛选

李可琪[1,2],王莎莎[1],曾新华[1],闫晓红[1],吴 刚[1*]
(1.中国农业科学院油料作物研究所,农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室,湖北 武汉,430062;
2.中国农业科学院研究生院,北京,100081)

摘要:为进一步解析甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系(GMS)TE5A 的不育机理,筛选与育性蛋白 BnaA.tsMs 互作的重要蛋白。提取不育系 TE5A 的幼蕾(直径≤2mm)总 RNA,利用 SMART (switching mechanism at 5′ end of the RNA transcript)技术构建酵母双杂交 cDNA 文库和诱饵载体 pGBKT7 - BnaA.tsMs,转化酵母菌株 Y2H gold,检测其毒性和自激活活性,通过 Mating 方法筛选与蛋白 BnaA.tsMs 互作的蛋白,并根据基因注释推测其功能。结果成功地构建了甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系 TE5A 幼蕾酵母双杂交 cDNA 文库,文库库容量为 2×10^7cfu,重组率达到 100%,插入片段平均长度大于 1.8kb。发现诱饵载体 pGBKT7 - BnaA.tsMs 对酵母没有毒性,没有自激活活性。筛选出 49 个候选互作蛋白,其中有丝分裂纺锤体检测点蛋白(BUBR1)、周期蛋白 D3(cyclin - D3)和 F - box 蛋白(FBW2)三个互作蛋白可能与该不育蛋白相互作用,共同调控该不育系 TE5A 的育性。

关键词:甘蓝型油菜;温敏细胞核雄性不育;酵母双杂交 cDNA 文库;*BnaA.tsMs*;互作蛋白
中图分类号:S565.403 **文献标识码**:A **文章编号**:1007 - 9084(2016)03 - 0292 - 08

Construction and screening of yeast two - hybrid cDNA library of flower bud from a dominant thermo - sensitive genic male sterile line TE5A in *Brassica napus*

LI Ke - qi[1,2], WANG Sha - sha[1], ZENG Xin - hua[1], YAN Xiao - hong[1], WU Gang[1*]
(1. *Oil Crops Research Institute*, *Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops*, *the Ministry of Agriculture*, *Wuhan* 430062, *China*;
2. *Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100081, *China*)

Abstract: To reveal sterility mechanism of a dominant thermo - sensitive genic male sterile line TE5A in *Brassica napus*, host proteins interacting with BnaA.tsMs protein were screened. Sterile flower buds (diameter ≤2mm) RNA from TE5A were sampled. Yeast two - hybrid (Y2H) cDNA library was constructed by SMART technique. Bait vector of pGKBT7 - BnaA.tsMs was constructed and transformed into Y2H gold. Results showed that Y2H cDNA library of flower bud from TE5A was successfully constructed. The library capacity was about 2×10^7 cfu. The average cDNA length were more than 1.8 kb with a recombination frequency of 100%. Bait vector of pGKBT7 - BnaA.tsMs was constructed. The plasmid had no virulence and self - activity to yeast. 49 interactive factors were obtained. Among them, 3 interactive proteins (BUBR1, cyclin - D3 and FBW2) were especially found interacting with BnaA.tsMs, which might regulate the fertility of TE5A.

Key words: *Brassica napus*; Thermo - sensitive genic male sterility; Yeast two - hybrid cDNA library; *BnaA.tsMs*; Interacting protein

油菜是我国主要油料作物之一,同时也是杂种 优势利用最为成功的作物之一[1]。细胞核雄性不

收稿日期:2015-12-22
基金项目:湖北省自然科学基金(2014CFB320)
作者简介:李可琪(1990 -),女,硕士研究生,从事油菜细胞核雄性不育的机理研究,E - mail:likeqi1218@sina.com
*通讯作者:吴 刚(1976 -),男,博士,研究员,从事转基因安全检测和基因工程研究,E - mail:wugang@caas.cn

育系因为恢复源广、易获得强优势杂交组合已成为杂种优势利用的重要途径[2]。甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系 TE5A 是本课题组从甘蓝型油菜品系 TE5 中发现的一种温敏细胞核雄性不育突变类型[3]。TE5A 的细胞学观察显示其花粉母细胞停留在减数分裂时期,没有形成二分体及四分体,从而不能产生花粉粒,研究表明其育性受一对显性基因 *BnaA. tsMs*[3] 控制,目前本课题组已经定位并克隆了该基因(文章待发表)。本研究拟通过构建甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系 TE5A 的幼蕾酵母双杂交 cDNA 文库,采用酵母双杂交系统筛选与育性蛋白 BnaA. tsMs 互作的蛋白,从而为解析该材料的不育机理奠定基础。

目前,已经报道的甘蓝型油菜细胞核雄性不育材料包括:S45A[4]、9012A[5]、宜 3A[6]、K121S[7]、373S[8]、Huiyou50S[9] 和 TE5A[3] 等。Yi 等将甘蓝型油菜隐性核不育 S45A 的恢复基因 *BnMs*1 精细定位到 0.1 cM 和 0.3 cM 的范围,并认为该基因可能参与绒毡层代谢途径[10,11]。Lei 等[12] 将甘蓝型油菜隐性核不育 S45A 的恢复基因 *BnMs*2 定位到 0.038 和 0.075cM 范围内,并进一步分析证明 *BnMs*2 和 *BnMs*1 是重叠基因,其生物学功能相同。Huang 等在开发与甘蓝型油菜隐性核不育两型系 9012AB 中 *BnMs*3 紧密连锁的分子标记的基础上,将 *BnMs*3 锁定在遗传距离在 0.4cM 的范围内[13,14]。He 等利用与 *BnMs*3 连锁的分子标记序列信息与拟南芥的共线性关系,将 *BnMs*3 锁定到左右两侧各 0.07cM 的遗传距离内[15]。Dun 等利用 IP 标记和染色体登陆的方法最终克隆了 *BnMs*3 基因[16,17],Zhou 等通过差减 cDNA 文库筛选,最终发现该基因编码 Tic40 蛋白,主要调控绒毡层的发育[18]。虽然近年来对影响油菜细胞核雄性不育基因及其恢复基因进行了大量研究,但国内外对油菜细胞核雄性不育分子机理的研究仍比较薄弱,其作用机理及编码蛋白的功能仍不清晰。酵母双杂交技术是检测蛋白质互作的有效方法,也是应用最为广泛、获得蛋白互作数据最多的方法之一[19]。酵母双杂交 cDNA 文库是通过酵母双杂交技术来筛选未知蛋白和检测蛋白之间相互作用的前提和保障[20]。Fujii[21] 和 Ronnberg[22] 等通过此方法分别筛选出与水稻不育恢复基因 *RF*2 相互作用的 RIF2 蛋白和与小鼠 NSs 蛋白相互作用的 ACBD3 蛋白。Singh 等[23] 通过该方法构建了与水稻促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)相互作用的蛋白调控网络。

该不育材料 TE5A 为功能获得型突变,并且其不育时期发生在减数分裂时期,因此选取该材料的不育幼蕾来构建酵母双杂交 cDNA 文库,筛选与 BnaA. tsMs 互作的蛋白,为进一步解析其不育机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝型油菜温敏显性细胞核雄性不育系 TE5A 种植于光照 16h、温度 22℃ 的温室内,在抽薹开花期,环境温度高于 20℃ 时表现为完全不育,随机选取 5 株处于减数分裂旺盛时期的幼蕾(直径 ≤ 2mm)混合后,立即放入液氮中速冻后于超低温冰箱保存,用于总 RNA 提取。

Qiagen RNeasy Micro kit 和 QIAquick PCR Purification Kit 均购自上海玉博生物技术有限公司;SMART™ cDNA Library Construction Kit、酵母菌株 Y2H gold、Y187 及载体 pGADT7、pGBKT7、pGBKT7 – 53、pGADT7 – T 等均购自 CLONTECH 公司;NucleoBond Xtra Maxi EF 购自 MN 公司;RNase – free DNase I、T4 DNA 连接酶、*Sfi*I 内切酶、蛋白酶 K、DNA Marker、酵母培养所用培养基等常用试剂均购自宝生物工程有限公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 TE5A 不育系幼蕾初级 cDNA 文库的构建

1.2.1 RNA 的提取 称取 1g 幼蕾放在液氮预冷过的研钵中研磨,用 Qiagen RNeasy Micro kit 试剂盒提取总 RNA。之后用 NanoDrop2000 微量分光光度计估算 RNA 的浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值),并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 双链 cDNA 的合成 按照 SMART™ cDNA Library Construction Kit 说明书进行操作,取 1μg RNA 为模板,引物 SMART™ Oligonucleotide:5′ – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG – 3′和 CDS Ⅲ/3′PCR Primer:5′ – ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG – d(T)$_{30}$N – 1N – 3′(N = A,G,C,或 T;N – 1 = A,G 或 C)各 1μL,合成 cDNA 第一条链。再以 cDNA 第一条链为模板,以 5′ PCR Primer:5′ – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT – 3′和 CDS Ⅲ/3′PCR Primer 为引物进行 LD – PCR,合成 cDNA 第二条链。接着通过 CHROMA SPIN – 400 层析柱纯化双链 cDNA 并去除小于 400bp 的片段,最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化前后双链 cDNA 质量。

1.2.3 pGADT7 载体的改造 为了将双链 cDNA 连接到载体 pGADT7 上,对载体 pGADT7 多克隆位点处的序列进行了改造,在不改变原载体读码框的

前提下,将原 *Sfi*I 酶切位点改造为 *SfiI* A 和 *SfiI* B 两个酶切位点[24]。

1.2.4 初始 cDNA 文库的构建、扩增及质量鉴定 取 4μL pGADT7、4μL cDNA、1μL 10 × Buffer 和 1μL T4 DNA 连接酶,混匀后 16℃连接过夜。将连接产物在 1.8kV,200Ω 的条件下电击转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞后加入 1mL LB 培养基,放在 37℃恒温摇床振荡培养 1h,即得到初始 cDNA 文库。取上述培养液 1μL 分别稀释 10、100、1 000 和 10 000 倍,测算文库滴度。对 cDNA 初始文库进行扩增后,用 NucleoBond Xtra Maxi EF 试剂盒抽提质粒,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.3 TE5A 不育系幼蕾 Y187 酵母双杂交 cDNA 文库构建及质量鉴定

通过 PEG/LiAc 化学转化法转化酵母 Y187 菌株。取 15μg 上述文库重组质粒和 600μL Y187 感受态细胞混匀后,于 30℃水浴 30min 后,42℃热激 25min。然后 3 000r/min 离心 5min 除上清,重悬细胞于 800μL YPDA 液体培养基中,培养 2h。然后取培养液 1μL 分别稀释 10、100、1 000 和 10 000 倍,涂布在 SD/ - Leu 平板上,并对平板单克隆计数,测算文库滴度。从平板上随机挑取 16 个分离良好的单菌落进行培养,并对这些单菌落进行菌落 PCR 鉴定,所用引物为:pGADT7 - F(5′ - GGAGTACCCATACGACGTACC - 3′) 和 pGADT7 - R(5′ - TATCTACGATTCATCTGCAGC - 3′)。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,统计文库插入片段的大小和重组率,分析文库的多态性。

文库重组率(%) = (有插入片段的反应个数/总挑选菌落数) × 100。

1.4 诱饵蛋白载体构建及蛋白表达检测

首先把基因 *BnaA. tsMs* 通过双酶切位点 *Eco*RI 和 *Pst*I 构建到 pGBKT7 载体中,所用引物为:上游引物 F: TACGAATTCATGAGTAATTCTGCGCCTGGAGGGT 和下游引物 R: TTACTGCAGTTACTCAGAGTCGGGCACAAGCTGA。然后通过 PEG/LiAc 化学转化法转化酵母菌株 Y2H gold。为了检测诱饵蛋白是否在宿主酵母菌中表达,用玻璃珠破碎酵母细胞,提取酵母蛋白,用 Western Blot 方法对提取的表达蛋白进行检测,一抗为 c - Myc 单克隆抗体,通过化学发光检测诱饵蛋白的表达。

1.5 诱饵蛋白毒性及自激活活性检测

1.5.1 诱饵蛋白毒性检测 把空载体 pGBKT7 转入 Y2H gold,分别挑取一个直径 2 ~ 3mm 的诱饵酵母单菌落及空载体酵母单菌落接种于含有 50mL SD/ - Trp 液体培养基的锥形瓶中,30℃培养 5、10、15、20、25、30h 后,用紫外分光光度计测定 OD_{600} 值,分析 pGBKT7 - BnaA. tsMs 对酵母菌生长的影响。

1.5.2 诱饵蛋白自激活活性检测 将含有 pGBKT7 - BnaA. tsMs 重组质粒的酵母菌株 Y2H gold 涂布到 SD/ - Trp (SDO)、SD/ - Trp/x - α - gal (SDO/x)、SD/ - Trp/x - α - gal/AbA(SDO/x/A)平板,30℃倒置培养 3 ~ 5d,观察平板菌落生长情况,分析 pGBKT7 - BnaA. tsMs 对酵母是否具有自激活活性。同时采用 Mating 方法设置自激活实验的阴性对照和阳性对照,Y2H gold [pGBKT7 - Lam] × Y187[pGADT7 - T] 为阴性对照组,Y2H gold[pGBKT7 - p53] × Y187[pGADT7 - T] 为阳性对照组。

1.6 酵母文库筛选

1.6.1 文库 mating 筛选 用 Mating 方法进行酵母文库筛选,方法参照 CLONTECH 公司的 Matchmaker Gold Yeast Two - Hybrid System User Manual。具体如下,挑取新鲜培养的诱饵酵母菌落,在 50mL SD/ - Trp 培养基中过夜培养 16 ~ 20h,使 OD_{600} 达到 0.8,3 000r/min 离心 5min 后用 4 ~ 5mL SD/ - Trp 重悬,与上述制备好的酵母双杂交 cDNA 文库混匀,在 45mL 2 × YPDA 培养基中培养 20 ~ 24h,在显微镜下观察成二倍体接合型后,3 000r/min 离心 3min,用 10mL 0.5 × YPDA 培养基重悬,把酵母菌液涂布在直径 150mm 的 SD/ - Trp - Leu/x - α - gal/AbA(DDO/x/A)平板上,30℃避光培养 3 ~ 5d,把平板上的蓝色菌落转移到 SD/ - Trp - Leu - Ade - His/x - α - gal/AbA(QDO/x/A)平板上 30℃避光培养 7 ~ 10d。

1.6.2 文库阳性克隆的鉴定 上述平板倒置培养后,观察菌落在 QDO/X/A 平板的生长情况,挑取直径超过 2mm 的蓝色菌落,接种于 SD/ - Leu/ - Trp 培养基中进行扩繁,以 pGADT7 载体通用引物 pGADT7 - F 和 pGADT7 - R 进行菌落 PCR 扩增,分析插入片段的大小并排除重复克隆。

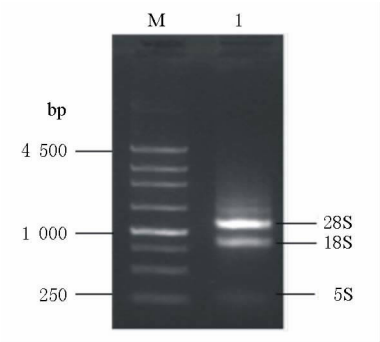
1.6.3 阳性克隆的测序和生物信息学分析 直接取上述筛选出的酵母单克隆在 SD/ - Leu/ - Trp 培养基中进行扩繁,然后取 0.5mL 培养液送公司测序。测得的序列在 NCBI 数据库进行 BLAST,找到同源序列,统计序列长度、基因登录号、读码框完整性、基因注释和读码框一致性等信息。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

经测定,油菜花蕾总 RNA A_{260}/A_{280} = 1.961,

A_{260}/A_{230} = 2.53,浓度为 3.13μg/μL,表明该 RNA 纯度高,无蛋白质和其它杂质污染。RNA 琼脂糖凝胶电泳条带较清晰,无拖尾、扩散等降解现象(图 1),并且 28S 条带亮度是 18S 条带亮度的 2 倍以上,进一步证明抽提的 RNA 质量好,没有发生降解。综上所述,该 RNA 纯度和完整性高,完全满足建库的要求,可以用来构建 cDNA 文库。



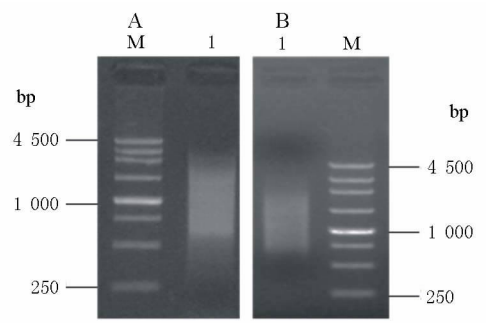
注/Note:M:250 bp DNA ladder;
1:总 RNA Total RNA

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2 双链 cDNA 的合成

采用 SMART 方法合成单链 cDNA,再通过 LD-PCR 扩增得到双链 cDNA,双链 cDNA 片段集中在 250~4 000bp 之间,呈弥散状(图 2A),说明该材料幼蕾不同大小和丰度的 mRNA 都进行了有效反转录及扩增,可用于酵母双杂交 cDNA 文库的构建。如图 2B 所示,当用 CHROMA SPIN-400 层析柱对双链 cDNA 纯化后,基本将 400bp 以下的片段去除掉。



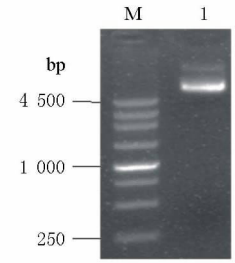
注/Note: M:250 bp DNA ladder;
A:1:纯化前双链 cDNA ds cDNA before purification;
B:1:纯化后双链 cDNA ds cDNA after purification

图 2 纯化前后双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total ds cDNA before and after purification

2.3 大肠杆菌 cDNA 文库构建

通过酶切、连接的方法将纯化的双链 cDNA 连接到载体 pGADT7 上,电击转化到大肠杆菌 DH5α 中,进一步培养得到初级 cDNA 文库,文库滴度为 2.3×10^6cfu。将文库扩增后,用 NucleoBond Xtra Maxi EF 试剂盒提取大肠杆菌 cDNA 文库质粒,如图 3 所示,凝胶电泳主带明亮,几乎没有杂带,说明该质粒比较完整,质量好。



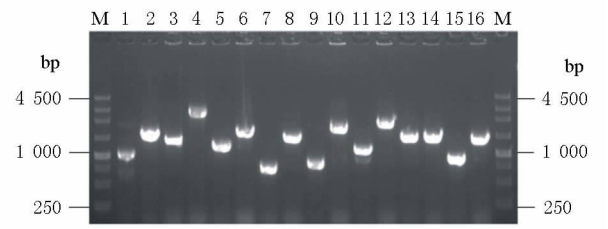
注/Note:M:250 bp DNA ladder;1:质粒 Plasmid

图 3 初级 cDNA 文库扩增后质粒琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis for plasmid of primary cDNA library after modification

2.4 Y187 酵母双杂交 cDNA 文库构建及质量鉴定

将上述大肠杆菌 cDNA 文库质粒转化到酵母 Y187 菌株中,获得酵母双杂交所用的 Y187 酵母双杂交 cDNA 文库,其文库滴度达到 2×10^7cfu。如图 4 所示,随机挑选的 16 个酵母文库单克隆进行菌落 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳显示外源重组片段分布在 750~3 000bp 之间,文库插入片段平均长度大于 1.8kb,说明该文库具有很好的多态性,文库重组率为 100%。结果表明 Y187 酵母文库中 cDNA 片段长度适合进行酵母双杂交筛选,文库质量较高。



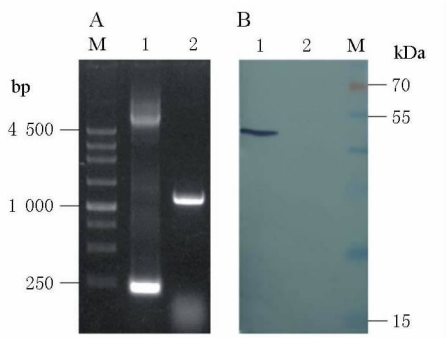
注/Note:M:250 bp DNA ladder;
1-16:菌落编号 Codes of clones

图 4 酵母双杂交 cDNA 文库 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR detection of yeast cDNA library

2.5 诱饵载体构建及在酵母菌中的表达检测

诱饵基因通过 PCR 扩增,以 *EcoR*I 和 *Pst*I 酶切位点连入 pGBKT7 载体中,通过菌落 PCR 扩增,证实 *BnaA. tsMs* 成功构建到载体中(图 5A)。目的基因 *BnaA. tsMs* 与载体中的 GAL4-BD 蛋白区域构成融合蛋白 GAL4-BD-BnaA. tsMs,约为 52.8kD,通过 TCA 丙酮法提取融合蛋白,并通过 Western Blot 检测到融合蛋白 GAL4-BD-BnaA. tsMs 正确表达(图 5B)。



注:A 诱饵基因重组载体构建的菌落 PCR 电泳鉴定图:M:250 bp DNA Ladder; 1:阴性对照 pGBKT7; 2:pGBKT7 – BnaA. tsMs 诱饵重组载体; B:诱饵蛋白 western 表达检测: 1:融合蛋白 GAL4 – BD – BnaA. tsMs; 2:阴性对照; M: Thermo No. 26616

Note:A Electrophoresis of the target gene and confirmation of the bait by colony PCR:M:250 bp DNA Ladder; 1:Negative control pGBKT7; 2:Target gene and confirmation of bait pGBKT7 – BnaA. tsMs. B:Expression of GAL4 – BD – BnaA. tsMs fusion protein was analyzed by Western Blot:1:GAL4 – BD – BnaA. tsMs fusion protein; 2:Negative control; M: Thermo No. 26616

图 5 诱饵基因重组载体构建及诱饵蛋白表达检测

Fig. 5 Construction of bait gene recombinant vector and GAL4 – BD – BnaA. tsMs fusion protein expression

2.6 诱饵蛋白毒性检测及自激活检测

分别取含有 pGBKT7 – BnaA. tsMs 诱饵载体及对照空质粒 pGBKT7 的 Y2H gold 转化菌培养,每 5h 检测 OD_{600} 吸光度值。pGBKT7 和 pGBKT7 – BnaA. tsMs诱饵载体转化 Y2H gold 的 OD_{600} 几乎没有差异(图 6),说明该酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7 – BnaA. tsMs与对照空质粒转化菌生长情况相似,证明该诱饵载体对酵母菌没有毒性。此外,Y2H gold[pGBKT7 – BnaA. tsMs]在 SD/ – Trp/x – α – gal 平板上有白色菌落生长;在 SD/ – Trp/x – α – gal/AbA 平板上没有菌落生长;阳性对照在 SD/ – Trp – Leu – Ade – His/x – α – gal/AbA 平板有明显的蓝色克隆子出现,而阴性对照无克隆子出现(表 1)。这表明 pGBKT7 – BnaA. tsMs 在酵母细胞中没有激活报告基因 *AUR*1 – *C* 和 *MEL*1,无自身转录激活作用发生。

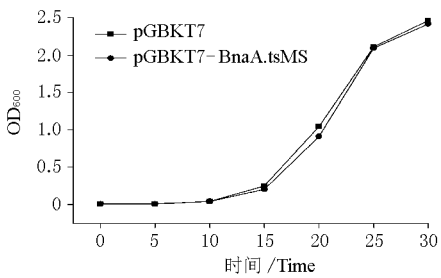


图 6 诱饵蛋白毒性检测

Fig. 6 Toxicological test of bait protein

表 1 重组质粒 pGBKT7 – BnaA. tsMs 自激活作用检测

Table 1 Test of pGBKT7 – BnaA. tsMs bait for auto activation

样品 Sample	SDO SDl/ – Trp	SDO/X SDl/ – Trp/X – α – Gal	SDO/X/A SD/ – Trp/AbA/X – α – Gal	QDO/X/A SD/ – Trp/ – Leu/ – Ade/ – His/AbA/X – α – Gal
pGBKT7 – BnaA. tsMs	+	+ 白色 White	–	–
阳性对照 Positive control	/	/	/	+ 蓝色 Blue
阴性对照 Negative control	/	/	–	–

注/Note: + :生长 Growth; – :不生长 No growth; /:未转平板 Non – existnce

2.7 酵母文库筛选

通过 Mating 方法,以 BnaA. tsMs 为诱饵,对甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系 TE5A 的幼蕾酵母双杂交 cDNA 文库进行筛选,统计 SD/ – Ade/ – His/ – Leu/ – Trp/X – α – Gal 平板上共有 143 个蓝色阳性菌落,挑取阳性菌落在 SD/ – Trp – Leu 培养基培养后进行菌落 PCR,显示 cDNA 插入片段大小在 400 ~ 1 000bp。在测序过程中,由于部分阳性克隆存在高级结构,导致测序没有成功,同时排除重复克隆序列,最后获得 49 个基因序列。其中存在 15 个未知功能的蛋白,剩余 34 个基因通过 Gene Ontology 进行基因分子功能分类,共分为 9 类(图 7):核糖体结构蛋白、DNA 结合蛋白、锌离子结合蛋白、蛋白绑定因子、转移酶活性、ATP 结合蛋白、GTP 结合蛋白、特异性 DNA 结合蛋白及核酸结合蛋白。鉴于该细胞核雄性不育材料的不育性与减数分裂异常有关,根据候选互作蛋白的功能注释,其中有丝分裂纺锤体检测点蛋白(BUBR1)、周期蛋白 D3(cyclin – D3)及 F – box 蛋白(FBW2)与减数分裂相关(表 2)。这 3 个蛋白 BUBR1、cyclin – D3、FBW2 可能与 BnaA. tsMs 相互作用,导致减数分裂异常,影响小孢子发育进程,从而调控温敏细胞核雄性不育系 TE5A 的育性。

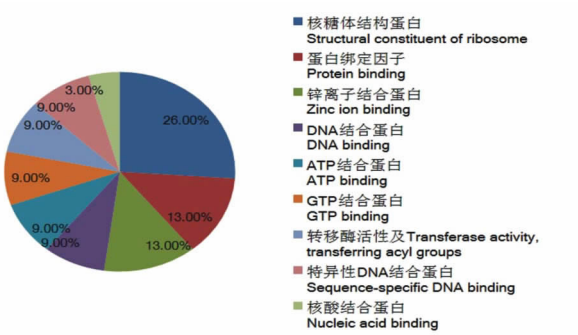


图 7 基因分子功能分类

Fig. 7 Classfication of the function of screened genes

表 2 BnaA. tsMs 为诱饵筛选到的重要互作基因信息

Table 2 Information of 3 important genes interaction with BnaA. tsMs screening by yeast two – hybrid system

基因 Gene	大小 Size/bp	ORF 完整性 ORF integrity	GenBank 登录号 Accession	注释 Annotation	读码框一致性 ORF coherence
*BUBR*1	1 344	完整 Integrity	XM_013882409	mitotic spindle checkpoint protein	一致 Coincident
*FBW*2	956	完整 Integrity	XM_013775182	F – box protein	一致 Coincident
cyclin – D3	1 058	完整 Integrity	XM_013781160	cyclin – D3 – 3 – like	一致 Coincident

3 讨论

高质量的 cDNA 文库是通过酵母双杂交进行大规模蛋白筛选的前提[25],RNA 样品的质量直接影响 cDNA 文库的质量及库容量。本研究采用 Qiagen 方法提取的总 RNA 完全满足构建高质量 cDNA 文库的先决条件。采用 CLONTECH 公司推出的 SMART 方法合成的双链 cDNA,其两端分别带有 *Sfi*I A 和 *Sfi*I B 酶切位点,我们将该载体 pGADT7 原来的 *Sfi*I 酶切位点改造为 *Sfi*I A 和 *Sfi*I B 两个酶切位点,从而保证 cDNA 片段可以定向插入到载体中,避免了其他方法构建文库时 cDNA 片段插入方向不确定的情况。

文库的库容量和文库重组率是评价 cDNA 文库质量的两个主要指标。经测定,本研究构建的酵母双杂交 cDNA 文库库容量为 2×10^7cfu,重组外源片段在 750 ~ 3 000bp 之间,文库插入片段平均长度大于 1.8kb,重组率达到 100%,远远大于构建 cDNA 文库的基本要求(库容量大于 1×10^6cfu,插入 cDNA 片段≥300bp,平均 >1 000bp)。因此,本研究所构建的酵母双杂交 cDNA 文库库容量、重组率及文库插入片段平均长度均达到较高的水平,完全满足高质量 cDNA 文库的标准,可以用来进行下一步的酵母双杂交筛选。本研究通过将诱饵载体 pGBKT7 – BnaA. tsMs 转化到 CLONTECH 公司最新推出的黄金酵母 Y2H gold 菌株中,增加了 *AbA* 筛选压力,大大降低了文库筛选的假阳性率[26]。

利用酵母双杂交技术,以 BnaA. tsMs 为诱饵对 cDNA 文库进行大规模筛选,共获得 34 个有功能注释的基因。该不育材料的败育与减数分裂异常有关,在筛选到的候选互作蛋白中,有 3 个互作蛋白与减数分裂相关,包括有丝分裂纺锤体检测点蛋白 BUBR1,周期蛋白 D3(cyclin – D3)和 F – box 蛋白(FBW2),我们接下来将对筛选到互作蛋白通过 BiFC[27]、GST – pull down[28]或免疫共沉淀实验进行验证[29]。*BubR*1 在哺乳动物卵母细胞减数分裂中具有重要作用,该基因调控第一次减数分裂过程中染色体的正常分离[30]。*BubR*1 在植物中也同样发挥重要作用,Wang 等研究发现在水稻(*Oryza sativa*)中 *BubR*1 发生突变,导致减数分裂过程中姐妹染色单体提前分离,从而导致水稻不育[31]。Collins 等通过功能缺失研究表明拟南芥周期蛋白 cyclin D3 参与形成层细胞增殖和次生生长调控过程,并影响微管的发育[32],在配子生成过程中,cyclin D3 参与生殖细胞的有丝分裂、减数分裂及细胞分化等过程[33]。F – box 蛋白是 E3 泛素连接酶组成部分[34],在植物中广泛参与多个过程,包括生长素反应过程[35]、育性调控及致病原的抗性反应[36]、花分生组织的发育及花模式的构建过程[37]。Lai 等研究发现在金鱼草中编码 F – box 蛋白的基因 *AhSLFS*2 在绒毡层、小孢子和花粉粒中特异表达[38]。Jain 等通过芯片分析发现:与正常可育材料相比,在水稻 *udt*1 – 1 不育突变体中,有 8 个 F – box 蛋白家族成员的表达显著下调[39]。因此,我们筛选出的这些互作蛋白,将有助于解析该不育材料的不育机理。

参考文献:

[1] Fu D H, Xiao M L, Hayward A, et al. Utilization of crop heterosis: a review[J]. Euphytica, 2014, 197: 161 – 173.

[2] 易 斌,涂金星,傅廷栋. 甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育的研究及利用[J]. 中国科学,2014,44(8):752 – 757.

[3] Zeng X H, Li W P, Wu Y H, et al. Fine mapping of a dominant thermo – sensitive genic male sterility gene (*BntsMs*) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP – and *Brassica rapa* – derived PCR markers[J]. Theor Appl Genet, 2014, 127: 1 733 – 1 740.

[4] 李树林,周志疆,周熙荣. 甘蓝型油菜隐性核不育系 S45AB 的遗传[J]. 上海农业学报,1993,9(4):1 – 7.

[5] 陈凤祥,胡宝成,李强生,等. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育材料 9012A 的发现与初步研究[J]. 北京农业大学学报,1993,19:57 – 61.

[6] 杨光圣,瞿 波,傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育系宜 3A 花药发育的解剖学研究[J]. 华中农业大学学报,1999,18(5):405 – 410.

[7] 李石开,苏振喜,吴学英. 油菜 K121S 温敏核不育的遗传初探[J]. 西南农业学报,2004,17:49 – 54.

[8] 于澄宇,李 玮,常建军,等. 油菜温敏雄性不育系 373S 的选育[J]. 中国农学通报,2007,23(7):245 – 248.

[9] 徐献锋,胡玉梅,于澄宇,等. 甘蓝型油菜反型温敏核不育 Huiyou50S 的生理特征及遗传分析[J]. 华北农学报,2014,29(3):147 - 152.

[10] Yi B, Chen Y N, Lei S L, et al. Fine mapping of the recessive genic male - sterile gene (*Bnms*1) in *Brassica napus* L. [J]. Theor Appl Genet,2006,4:643 - 650.

[11] Yi B, Zeng F Q, Lei S L, et al. Two duplicate *CYP*704*B*1 - homologous genes *BnMs*1 and *BnMs*2 are required for pollen exine formation and tapetal development in *Brassica napus*[J]. The Plant Journal,2010,6: 925 - 938.

[12] Lei S, Yao X, Yi B, et al. Towards map - based cloning: fine mapping of a recessive genic male - sterile gene (*BnMs*2) in *Brassica napus* L. and syntenic region identification based on the *Arabidopsis thaliana* genome sequences[J]. Theor Appl Genet,2007,115:643 - 651.

[13] Ke L P, Sun Y Q, Hong D F, et al. Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed rape, *Brassica napus*[J]. Plant Breeding,2005,124(4):367 - 370.

[14] Huang Z, Chen Y F, Yi B, et al. Fine mapping of the recessive genic male sterility gene (*Bnms*3) in *Brassica napus* L[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(1):113 - 118.

[15] He J P, Ke L P, Hong D F, et al. Fine mapping of a recessive genic male sterility gene (*BnMs*3) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP - and *Arabidopsis* - derived PCR markers[J]. Theor Appl Genet, 2008, 117 (1):11 - 18.

[16] Dun X L, Zhou Z F, Xia S Q, et al. *BnaC. Tic*40, A plastid inner membrane translocon originating from *Brassica oleracea*, is essential for tapetal function and microspore development in *Brassica napus*[J]. The Plant Journal,2011,68(3):532 - 545.

[17] Dun X L, Shen W ,Hu K, et al. Neofunctionalization of duplicated *Tic*40 genes caused a gain - of - function variation related to male fertility in *Brassica oleracea lineages*[J]. Plant physiology,2014,166(3):1 403 - 1 419.

[18] Zhou Z F, Dun X L, Tu J X, et al. *BnMs*3 is required for tapetal differentiation and degradation, microspore separation, and pollen - wall biosynthesis in *Brassica napus*[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 2 041 - 2 058.

[19] Rajagopala S V, Uetz P. Analysis of protein - protein interactions using high - throughput yeast two hybrid screens[J]. Methods Mol Biol,2011,781:1 - 29.

[20] Mehla J, Caufield J H, Uetz P. The yeast two - hybrid system: A tool for mapping protein - protein interactions [J]. Cold Spring Harb Protoc,2015(5):263 - 268.

[21] Fujii S, Kazama T, Ito Y, et al. A candidate factor that interacts with RF2, a restorer of fertility of Lead rice - type cytoplasmic male sterility in rice[J]. Rice,2014, 1(7):1 - 4.

[22] Rönnberg T, Jääskeläinen K, Blot G, et al. Searching for cellular partners of hantaviral nonstructural protein NSs: Y2H screening of mouse cDNA library and analysis of cellular interactome[J]. PloS one,2012,7(4): e34307.

[23] Singh R, Lee J E, Dangol S, et al. Protein interactome analysis of 12 mitogen - activated protein kinase kinase kinase in rice using a yeast two - hybrid system[J]. Proteomics,2014,14:105 - 115.

[24] 鹿连明,秦梅玲,牛晓庆,等. 两个水稻品种(系)酵母双杂交 cDNA 文库的构建和比较分析[J]. 激光生物学报,2008,17(5):656 - 662.

[25] Cao S H, Yan L L. Construction of a high - quality yeast two - hybrid (Y2H) library and its application in identification of interacting proteins with key vernalization regulator TaVRN - A1 in wheat[J]. BioMed Central,2013,81:6.

[26] Wang X, Li C, Zhou L, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus counteracts the porcine the porcine intrinsic virus restriction factors - IFITM1 and Tetherin in MARC - 145 cells[J]. Virus Research, 2014,191:92 - 100.

[27] Gookin T E, Assmann S M. Significant reduction of BiFC non - specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G - protein interactors[J]. The Plant Journal,2014,80:553 - 567.

[28] Lyzenga W J, Hong X L, Schofield A. Arabidopsis CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin - proteasome system[J]. Journal of Experimental Botany, 2013,64(10):2 779 - 2 791.

[29] Kim H J, Kieber J J, Schaller G E. The rice F - box protein KISS ME DEADLY2 functions as a negative regulator of cytokinin signalling[J]. Plant Signaling & Behavior,2013,8(12):e26434.

[30] Touati S A, Buffin E, Hached K, et al. Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest[J]. Nature Communications, 2015,6:6 946.

[31] Wang M, Tang D, Luo Q, et al. BRK1, a bub1 - related kinase, is essential for generating proper tension between homologous kinetochores at metaphase I of rice meiosis[J]. The Plant Cell,2012,24:4 961 - 4 973.

[32] Collins C, Maruthi M N, Jahn C E. CYCD3 D - type cyclins regulate cambial cell proliferation and secondary

growth in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany,2015,10:1 093.

[33] Zhang Q, Wang X Y, Wolgemuth D J. Developmentally regulated expression of cyclin D3 and its potential *in vivo* interacting proteins during murine gametogenesis[J]. Endocrine Society,1999,140:2 790 – 2 800.

[34] Elledge S J, Harper J W. Proteolysis in cell cycle control and cancer[J]. Biochim Biophys Acta,1998,1 377: 61 – 70.

[35] Ruegger M, Dewey E, Gray W M, et al. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast GRR1[J]. Genes Dev, 1998,12:198 – 207.

[36] Xie D X, Feys B F, James S, et al. *COI*1:an *Arabidopsis* gene required for jasmonate – regulated defense and fertility[J]. Science,1999,280:1 091 – 1 094.

[37] Samach A, Klenz J E, Klhalmi S E, et al. The unusual floral organs gene of *Arabidopsis thaliana* is an F – box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem[J]. The Plant Journal,1999,20:433 – 445.

[38] Lai Z, Ma W, Han B. An F – box gene linked to the self – incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum[J]. Plant Molecular Biology,2002,50:29 – 42.

[39] Jain M, Nijhawan A, Arora R, et al. F – box proteins in rice Genome – wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress [J]. Plant Physiolo,2007,143:1 467 – 1 483.

(责任编辑:郭学兰)