

叶倩, 卢冰心, 魏艳, 等. 番茄斑萎病毒侵染的西花蓟马酵母双杂交 cDNA 文库的构建和分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (9): 1203–1208.

YE Q, LU B X, WEI Y, et al. Construction of Yeast Two-hybrid cDNA Library on Tomato Spotted Wilt Tospovirus-infected *Frankliniella occidentalis* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (9): 1203–1208.

番茄斑萎病毒侵染的西花蓟马酵母双杂交 cDNA 文库的构建和分析

叶倩^{1,2}, 卢冰心², 魏艳^{1,2}, 陈建斌², 刘勇², 张松柏², 章松柏^{1*}, 郑立敏^{2*}

[1. 农林病虫害预警与调控湖北省工程技术研究中心 (长江大学), 湖北 荆州 434025;

2. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 湖南 长沙 410125]

摘要:【目的】探明番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt tospovirus, TSWV) 和介体西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) 之间的分子互作关系, 探索介体因子如何参与病毒侵染过程, 以期解析西花蓟马蛋白调控介体传毒机理奠定基础。【方法】通过若虫期饲毒获得高带毒西花蓟马群体, 借助 SMART 技术构建 TSWV 侵染的西花蓟马酵母双杂交三框 cDNA 文库。【结果】3 种读码框初级 cDNA 文库的库容量分别为 3.0×10^6 、 2.0×10^6 和 2.0×10^6 cfu, 文库实际扩增基数大于 1.5×10^6 cfu (3 种读码框均大于 5×10^5)。扩增文库平均插入片段主要分布在 0.5~3.0 kb。对文库随机挑选 16 个克隆, 测序后与 GenBank 数据库比对, 结果显示各插入片段具有同源序列。【结论】构建的 cDNA 文库具有较高的库容量和重组率, 可用于后续筛选西花蓟马与 TSWV 互作的蛋白。

关键词: 番茄斑萎病毒; 西花蓟马; 酵母双杂交 cDNA 文库

中图分类号: S 436

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 09-1203-06

Construction of Yeast Two-hybrid cDNA Library on Tomato Spotted Wilt Tospovirus-infected *Frankliniella occidentalis*

YE Qian^{1,2}, LU Bingxin², WEI Yan^{1,2}, CHEN Jianbin², LIU Yong²,
ZHANG Songbai², ZHANG Songbai^{1*}, ZHENG Limin^{2*}

(1. Hubei Engineering Research Center for Pest Forewarning and Management, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: 【Objective】A two-hybrid cDNA library was constructed for studying the interaction between tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) and *Frankliniella occidentalis* to decipher the mechanism of the disease transmission by thrip and the factors involved in the virus infection. 【Method】A highly infected *F. occidentalis* population was created by inoculating TSWV into the thrip nymphs. Thereby, a yeast two-hybrid three-frame cDNA library on TSWV-infected *F. occidentalis* was constructed using the SMART technology. 【Result】The established 3 reading frame cDNA libraries had the capacities of 3.0×10^6 , 2.0×10^6 , and 2.0×10^6 cfu. The actual amplification base of the library was more than 1.5×10^6 cfu or 5×10^5 cfu each with an average insert fragment of 0.5–3.0 kb in length. From the library 16 clones were randomly selected, sequenced, and compared with the GenBank database for of homology verification on the insert fragments. 【Conclusion】The established cDNA library had an ample capacity and high recombination rate adequate for studies on the interactions between TSWV and *F. occidentalis*.

Key words: Tomato spotted wilt tospovirus; *Frankliniella occidentalis*; yeast two-hybrid cDNA library

收稿日期: 2022-06-26 初稿; 2022-08-18 修改稿

作者简介: 叶倩 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病毒与分子生物学 (E-mail: 1300379532@qq.com)

* 通信作者: 章松柏 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子病毒学 (E-mail: yangtze2008@126.com); 郑立敏 (1985-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物病毒与介体昆虫互作 (E-mail: lmzheng66@126.com)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFE0112600); 国家自然科学基金项目 (31871935); 长沙市杰出创新青年培养计划项目 (kq2009006); 湖南省农业科技创新资金项目 (2020CX38)

0 引言

【研究意义】西花蓟马 (*F. occidentalis*) 属于缨翅目 (Thysanoptera), 蓟马科 (Thripidae), 花蓟马属 (*Frankliniella*), 是一种世界性害虫, 其寄主范围广泛, 食性杂^[1], 可通过传播植物病毒病给作物造成重要经济损失, 而目前国内外对植物病毒病害的防控仍缺乏有效方法, 因此探明病毒在介体昆虫中增殖传毒的关键因子, 进而阻断病毒的传播, 可为虫传病毒的有效控制提供理论依据。【前人研究进展】20 世纪 70 年代末开始, 西花蓟马在北美西部的本土范围广泛传播^[2]。随着经济全球化的发展, 国际贸易的兴起, 特别是花卉贸易加速了西花蓟马的扩散, 目前已遍及多个国家和地区, 成为世界性的害虫之一^[3]。2003 年张友军等^[4]首次报道其出现在北京市郊某大棚的辣椒上。西花蓟马是一种多食性昆虫, 目前已知的寄主植物有 66 科 200 余种, 包括蔬菜、花卉等重要的经济作物^[5]。西花蓟马通过取食植物组织对经济作物产生直接危害^[6], 但最大的危害是其传播番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt tospovirus, TSWV) 病造成的损失^[7]。TSWV 属于布尼亚病毒目, 主要由西花蓟马以持久增殖型方式传播, TSWV 侵染西花蓟马和其他布尼亚病毒侵染哺乳动物类似, 可以在介体昆虫的多个器官内增殖^[8]。在介体西花蓟马的生命周期中, 仅一龄若虫时期和二龄若虫前期能够获取病毒, 并且在二龄若虫后期和成虫时期传播病毒^[9]。西花蓟马的中肠上皮细胞是 TSWV 侵染的初始位置, 病毒在中肠复制后转移到肌纤维包围的中肠外层肌肉组织并进入到唾液腺^[10-11]。在病毒和介体昆虫的互作研究中, 越来越多的研究表明介体昆虫蛋白在传毒过程中扮演着重要角色^[12-13]。有研究表明, TSWV 糖蛋白 G_N 可以和蓟马中肠发生互作, 在介体获毒和传毒中发挥重要作用, 并且利用酵母双杂交技术 (Yeast two-hybrid, Y2H) 和双分子荧光互补技术 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 在西花蓟马一龄若虫鉴定到与 TSWV G_N 互作的 6 个功能未知蛋白 (Cuticular protein-V、Endocuticle structural glycoprotein-G_N、Endocuticle structural glycoprotein-V、Enolase、Mitochondrial ATP synthase α -subunit、Cyclophilin), 有助于了解介体传毒机制^[14]。TSWV 非结构蛋白 NSs 也被报道参与西花蓟马持毒和传毒^[15]。因此研究介体昆虫与病毒互作是探究介体获毒及传毒机理的重要前提。【本研究切入点】目前, 关于西花蓟马带毒群体酵母双杂交 cDNA 文库

的构建还有待深入研究。【拟解决的关键问题】构建高质量酵母双杂交文库, 为筛选西花蓟马与 TSWV 互作的蛋白及病毒传播的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料: 西花蓟马系湖南省农业科学院植物保护研究所饲养保存。TSWV 毒源由湖南省农业科学院提供, 保存于 -80 °C 并在本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 上进行扩繁。

试验试剂: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DB3.1 感受态细胞、cDNA Library Construction Kit、mRNA 纯化试剂盒、CHROMA SPIN TE-1000 分离柱、载体 pGADT7-*Sfi* I vector (三框)、*Sfi* I 内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TAKARA 公司 (日本); Trizol[®] 试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (美国); FastTrack[®] 2.0 Kit 购自 Invitrogen 公司 (美国); NucleoBond Xtra Maxi EF 购自 MN 公司 (德国); 高级肉汤培养基 (Super optimal broth with catabolite repression, SOC) 购自全式金试剂销售有限公司 (长沙)。

1.2 试验方法

1.2.1 带毒西花蓟马群体总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化 鉴于西花蓟马主要通过一龄若虫获毒, 而一龄若虫较小, 不易挑选进行饲毒, 本试验通过将成虫转移到 TSWV 侵染的番茄上产卵, 48 h 后挑取若虫转移到健康四季豆, 随机选取 10 头西花蓟马若虫提取 RNA, 根据 TSWV N 基因 (GenBank 登录号: JF960235.1) 序列设计引物 (表 1) 进行 PCR 扩增反应, 检测西花蓟马带毒率。PCR 反应体系为: 去离子水 19 μ L, 2 $\times$ Phanta Max Buffer 25 μ L, 上下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L, dNTP Mix (10 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶 1 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 150 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。西花蓟马成长为成虫后, 利用 Trizol[®] 试剂法提取带毒西花蓟马的总 RNA, 再用 DNase I 处理提取的总 RNA 进行 DNA 的消化, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 FastTrack[®] 2.0 Kit (Invitrogen) 从总 RNA 中纯化 mRNA。琼脂糖凝胶电泳和分光光度计 OD_{260/280} 检测分离的 mRNA 质量和浓度。

1.2.2 cDNA 的合成和纯化 根据 TAKARA 公司 (日本) SMART cDNA Library Construction Kit 操作手册合成 cDNA: 首先以纯化的 mRNA 为模板, 加入

CDS III/3' PCR Primer 和 SMART IV Oligonucleotide, 72 ℃ 条件下反应 2 min, 冰上冷却 2 min。之后加入 5×First-Strand Buffer、dNTP Mix (10 mmol·L⁻¹)、SMARTScribe MMLV Reverse Transcriptase、DTT (20 mmol·L⁻¹), 42 ℃ 条件下合成第一链 cDNA。以合成好的第一链 cDNA 为模板, 加入 5' PCR Primer、聚合酶 Mix、dNTP Mix 和 CDSIII/3' PCR Prime 等进行双链 cDNA 的 PCR 扩增, 反应条件为: 95 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 65 ℃ 30 s, 68 ℃ 6 min, 22 个循环。扩增的双链 cDNA (4 μL) 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效率。而后依次用 Proteinase K 和 *Sfi* I A/B 消化 cDNA 后, 采用 CHROMA SPIN TE-1 000 柱层析法分离纯化双链 cDNA。

表 1 引物信息
Table 1 Information on primers

名称 Names	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
N-F	ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGAAA
N-R	TTAAGCAAGTTCTGCAAGTTTGTGTC
pGADT7-F	GGAGTACCCATACGACGTACC
pGADT7-R	TATCTACGATTCATCTGCAGC

1.2.3 初级 cDNA 文库的构建 使用 *Sfi* I 内切酶酶切酵母载体 pGADT7-*Sfi* I, 回收后与经 *Sfi* I 酶切消化的双链 cDNA 进行连接反应, 总体积为 20 μL, 置于 4 ℃ 条件下反应 12 h。取 1 μL 连接产物电转化入 50 μL *E.coli* HST08 Stellar Electrocompetent Cells 感受态细胞内 (BIO-RAD's Gene Pulser, 1.5 kV, 25 μF, 200 Ω), 电击后迅速向电转杯中加入 1 mL SOC 培养基, 然后迅速转移至无菌的 10 mL 离心管中, 37 ℃ 下 250 r·min⁻¹ 震荡培养 1 h, 然后取 100 μL 培养物分别稀释 10²、10³、10⁴ 和 10⁵ 倍, 涂布于 LB/Amp 平板。平板 37 ℃ 倒置培养过夜后, 使用血球计数板测定文库中总克隆数。测定初级 cDNA 文库总克隆数 cfu: 将 10 μL 转化后的细菌原液 (2 mL) 稀释 10³ 倍, 取 10 μL 涂布于 LB 平板上, 倒置培养过夜, 第 2 天进行计数。总克隆数 cfu= (平板上的克隆数/10 μL) × 1000 倍 × 2 mL。从平板上随机挑取 16 个克隆, 用表 1 所列引物进行菌落 PCR 验证, 鉴定 cDNA 插入片段大小。PCR 反应体系如 1.2.1 中所述。

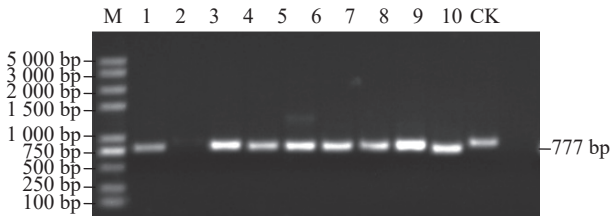
1.2.4 cDNA 文库构建 将剩余 19 μL 连接产物电转化入大肠杆菌 HST08 感受态细胞内 (1 μL 连接产物: 50 μL 感受态细胞), 然后将所有转化产物收集到无菌的 50 mL 三角瓶中。37 ℃ 下 250 r·min⁻¹ 震荡

培养 1 h, 然后涂布于 12 个直径为 24 cm 的 LB/Amp 平板, 37 ℃ 过夜培养。平板中加入 5 mL LB 液体培养基, 用玻璃棒将平板上所有克隆收集到 2 L 三角瓶内, 再次加入 5 mL 培养基收集剩余克隆, 将收集到的所有克隆分别转移到两个 2 L 三角瓶中。首先取 10 mL 菌液与甘油混合, 使甘油含量为 20%, 保存于 -80 ℃ 冰箱。再取 100 μL 培养菌稀释 10²、10³、10⁴ 和 10⁵ 倍后, 分别涂布于 LB/Amp 平板, 每个稀释度涂布 3 个平板作为 3 次重复。37 ℃ 过夜培养, 血球计数板测定文库滴度和克隆总数, 文库滴度=菌落数/ (涂布菌液体积 × 稀释倍数)。最后提取剩余约 1.5 L 菌液的质粒, 用分光光度计测量质粒浓度和质粒总量。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马带毒率检测

随机挑取 10 头西花蓟马若虫, Trizol 法提取总 RNA, RT-PCR 扩增 *N* 基因片段 (777 bp), 检测西花蓟马带毒率。结果显示 10 头西花蓟马若虫均检测到 *N* 基因片段 (图 1), 仅有一个泳道 PCR 产物浓度较低, 说明 TSWV 成功侵染西花蓟马, 饲毒后的西花蓟马群体带毒率较高, 为 90% 以上, 因此该批次带毒的蓟马可用于构建酵母双杂交 cDNA 文库。



M: DNA marker DL5 000; 1–10: 饲毒西花蓟马; CK: 健康西花蓟马。
M: DNA marker DL5 000; 1–10: *F. occidentalis* feeding on TSWV-infected plants; CK: *F. occidentalis* feeding on healthy plants.

图 1 西花蓟马带毒率检测
Fig. 1 Infection rates of TSWV in *F. occidentalis*

2.2 西花蓟马总 RNA 提取

提取剩余带毒西花蓟马总 RNA。对 RNA 进行 DNase I 处理后, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示出 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 的明显条带, 并且 18S rRNA 亮度高于 28S rRNA, 可能是由于西花蓟马 28S rRNA 发生隐裂 (Hidden break) 现象^[16] (图 2-A)。该结果表明, 从西花蓟马中提取的总 RNA 具有较好的完整性, 质量和纯度相对较高, 表明提取的 RNA 可满足建库要求。

2.3 双链 cDNA 的合成及纯化

以 2 μg mRNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链, 再以第一链 cDNA 为模板合成双链 cDNA (ds

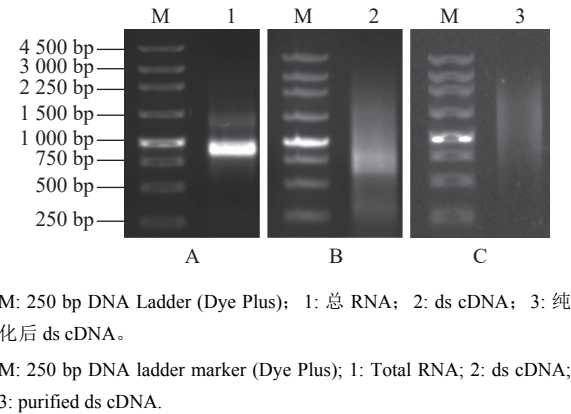


图2 携带 TSWV 西花蓟马总 RNA (A)、合成的双链 cDNA (B) 纯化的双链 cDNA (C) 电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from TSWV-infected *F. occidentalis* (A), synthetic double-strand cDNA (B), and purified double-strand cDNA (C)

cDNA)。凝胶电泳显示(图 2-B)，合成的双链 cDNA 为弥散状且亮度不均匀，表明不同片段大小的 cDNA 均被有效转录，并且基因转录产物表达丰度不同。通过 CHROMA SPIN TE-1000 柱层析法去除小片段 cDNA，分离纯化大于 1000 bp 的 cDNA 片段(图 2-C)。

2.4 初级 cDNA 文库的构建

将 *Sfi* I 酶切后的 pGADT7 载体与 ds cDNA 进行连接反应，取 1 μL 连接产物转化入大肠杆菌 HST08 感受态细胞，并涂布于 LB/Amp 固体培养基上，37℃ 倒置过夜培养，利用血球计数板检测文库的独

立克隆数量。3 种读码框初级 cDNA 文库的库容量分别为 3.0×10^6 、 2.0×10^6 和 2.0×10^6 cfu。每个阅读框挑取 16 个单一克隆进行菌落 PCR 检测，如图 3 所示，PCR 产物大小 0.5~3.0 kb，并随机选取 16 个单克隆菌液委托北京擎科新业生物技术有限公司测序，经过 BLAST 比对，均具有同源序列(表 2)，表明文库具有良好的多态性，符合后续试验要求。

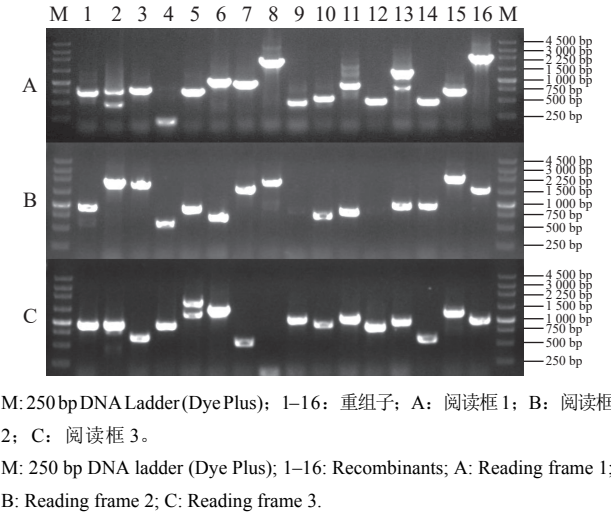


图3 酵母双杂交 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

Fig.3 PCR on cDNA fragments inserted in yeast two-hybrid cDNA library

2.5 酵母初级文库的扩增

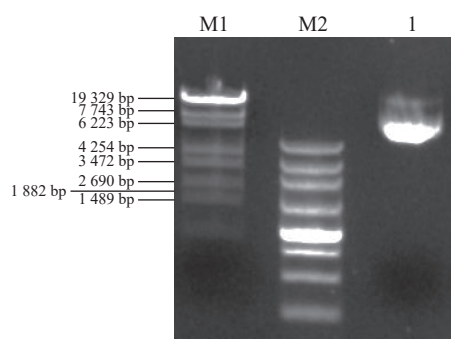
将 20 μL 连接产物电转化入 HST08 感受态细胞

表 2 16 个基因序列分析结果

Table 2 Sequences of 16 genes

序号 No.	基因名 Gene names	片段长度 Length of fragments/bp	GenBank 登录号 GenBank No.
1	未知 Unknown	1493	XM_026425612
2	小泛素相关调节剂 Small Ubiquitin-Related Modifier	695	XM_026421163
3	类NEDD4-结合蛋白1 NEDD4-Binding Protein 1-like	2998	XM_026417919
4	Ras相关蛋白Rab-32 Ras-related Protein Rab-32	2217	XM_026428517
5	40S 核糖体蛋白 S20 40S Ribosomal Protein S20	534	XM_026422691
6	类电压依赖性阴离子选择性通道 Voltage-Dependent Anion-Selective Channel-like	1392	XM_026416490
7	增殖细胞核抗原 Proliferating Cell Nuclear Antigen	1148	XM_026418051
8	类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Fray2 Serine/Threonine-Protein Kinase Fray2-like	2491	XM_026431489
9	类热休克 70 kDa 蛋白 14 Heat Shock 70 kDa Protein 14-like	1968	XM_026415955
10	相扑偶联酶UBC9 SUMO-conjugating enzyme UBC9	875	XM_026435799
11	类左旋酶 Levanase-like	2404	XM_026432066
12	类蛋白聚糖4 Proteoglycan 4-like	2246	XM_026434373
13	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12 26S Proteasome Non-ATPase Regulatory Subunit 12	1760	XM_026430561
14	胞质Fe-S簇组装因子GII1683 Probable Cytosolic Fe-S Cluster Assembly Factor GII1683	1652	XM_026421405
15	类氨基磷酸核糖转移酶 Amidophosphoribosyltransferase-like	2108	XM_026421671
16	动态肌动蛋白亚基4 Dynactin Subunit 4	1853	XM_026420837

内，涂布于 12 个直径 24 cm 的 LB/Amp 平板上，同时对培养物稀释 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 倍，分别取 100 μ L 涂布 LB/Amp 平板，37 $^{\circ}$ C 过夜孵育，计算每块平板的克隆数，最终文库库容达到 1.5×10^6 cfu。试验过程中，每个稀释度均涂布 3 个平板，发现相同处理下文库库容仅相差万个克隆，对数量级影响不大，说明文库能稳定转化。收集所有克隆到 2 L 的三角瓶中，加入 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 2~3 h，取出 10 mL 与甘油混合后，-80 $^{\circ}$ C 保存。剩余培养物进行质粒的大量提取，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行测定，如图 4 所示。通过分光光度计测定质粒质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，总质量为 3.0 mg。



M1: Lambda EcoT14 I digest; M2: 250 bp DNA Ladder marker (Dye Plus); 1: 文库质粒。

M1: Lambda EcoT14 I digest; M2: 250 bp DNA ladder marker (Dye Plus); 1: Library plasmid.

图 4 质粒电泳检测

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of plasmid

3 讨论

本研究选择带毒西花蓟马群体，构建酵母双杂交 cDNA 文库，有利于获得病毒诱导昆虫上调表达的基因序列，为后续研究 TSWV 与西花蓟马相互作用奠定基础。影响 cDNA 文库质量的两个重要因素包括 RNA 完整性和纯度以及 cDNA 的数量与质量^[17]。本研究提取到的昆虫 5S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 条带清晰，证明 RNA 无明显降解，虽然存在隐裂现象，但对 RNA 质量没有影响^[16]；同时只采用纯化后片段大小大于 1 000 bp 的双链 cDNA，增加了文库中全长目的 mRNA 的数量，从而保证所插入 cDNA 片段的完整性，以满足文库构建要求。

对构建的西花蓟马酵母双杂交 cDNA 文库进行分析，从库容标准来看，文库的库容量达到 1.5×10^6 cfu（高于文库构建标准的 1×10^6 cfu），保证了文库的覆盖度^[18]；从 cDNA 序列完整性来看，本文库插入片段长度分布在 0.5~3.0 kb，保证了西花蓟马 cDNA 文库重组率^[19]，说明所建文库质量较好。此外，由

于 mRNA 翻译成蛋白质是以三联体密码子策略进行编码的，本研究使用 SMART 技术构建了一个包含 3 个阅读框的酵母双杂交 cDNA 文库，与普通 cDNA 文库相比，插入片段读码框得到有效保证，文库质量更高，能够保证筛选获得有效的介体蛋白^[20]。

目前，研究 TSWV 和西花蓟马的互作都是通过转录组学和蛋白质组学，因为许多蛋白质产物难以基于其同源序列了解其具体功能，通过蛋白之间的互作才有机会进行深入了解，而高通量功能分析能将大量未识别的开放阅读框转化为生物学信息，目前已有研究将高通量测序技术与酵母双杂交技术相结合，用于快速鉴定出大量互作蛋白^[21]，酵母双杂交 cDNA 文库的建立则有助于快速筛选大量互作蛋白，二者结合能有效筛选并鉴定互作蛋白，为了解蛋白功能奠定基础。已有大量研究通过酵母双杂交 cDNA 文库获得可能直接与昆虫传毒相关的介体蛋白，例如 Mar 等^[22]运用酵母双杂交 cDNA 文库筛选到白背飞虱（*Sogatella furcifera* Horváth）体内可能与南方水稻黑条矮缩病毒（Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV）互作的 153 个互作蛋白；Rana 等^[23]以番茄卷叶病毒（*Tomato leaf curl virus*, ToLCV）和棉花曲叶病毒（*Cotton leaf curl virus*, CLCuV）的外壳蛋白为诱饵，进行烟粉虱（*Bemisia tabaci*）肠道酵母双杂交 cDNA 表达文库的筛选，筛选出中肠蛋白（Midgut protein, MGP）与番茄卷叶病毒和棉花曲叶病毒相互作用，并证明 MGP 参与病毒传播。Ohnesorge 等^[24]运用酵母双杂交系统筛选到烟粉虱 cDNA 文库中与番茄黄化曲叶撒丁岛病毒（*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV）外壳蛋白（Coat protein, CP）互作的蛋白（BtHSP16）。本研究选用带毒西花蓟马构建 cDNA 文库，可以直接应用于西花蓟马和 TSWV 的互作研究，为揭示病毒传播的分子机制提供研究材料。

4 结论

本研究以携带 TSWV 的西花蓟马为材料，构建了西花蓟马酵母双杂交 cDNA 文库。文库库容量较高，可达 1.5×10^6 cfu，平均插入片段分布在 0.5~3.0 kb，说明文库质量较好，可用于研究西花蓟马和 TSWV 之间互相作用关系，探究 TSWV 侵染过程中介体蛋白扮演的功能，为防治西花蓟马传播病毒奠定理论基础，对进一步防治介体昆虫传播 TSWV 具有重要的意义。

参考文献：

[1] BRØDSGAARD H F. Cold hardiness and tolerance to submergence in

- water in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) [J]. *Environmental Entomology*, 1993, 22 (3) : 647–653..
- [2] KIRK W D J, TERRY L I. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2003, 5 (4) : 301–310.
- [3] 陈建斌, 刘勇, 郑立敏, 等. 番茄斑萎病毒及其与传播介体西花蓟马互作研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2017 (4) : 54–58.
- CHEN J B, LIU Y, ZHENG L M, et al. Advances in tomato spotted wilt virus and interaction of its vector *frankliniellaoccidentalis* [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2017 (4) : 54–58. (in Chinese)
- [4] 张友军, 吴青君, 徐宝云, 等. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害 [J]. 植物保护, 2003, 29 (4) : 58–59.
- ZHANG Y J, WU Q J, XU B Y, et al. Dangerous invasive pest *Frankliniella occidentalis* occurred in Beijing [J]. *Plant Protection*, 2003, 29 (4) : 58–59. (in Chinese)
- [5] REITZ S R. Biology and ecology of the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae): the making of a pest [J]. *Florida Entomologist*, 2009, 92 (1) : 7–13.
- [6] 吕要斌, 贝亚维, 林文彩, 等. 西花蓟马的生物学特性、寄主范围及危害特点 [J]. 浙江农业学报, 2004 (5) : 317–320.
- LU Y B, BEI Y W, LIN W C, et al. The biology, host and damage of western flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2004 (5) : 317–320. (in Chinese)
- [7] PARRELLA G, GOGNALONS P, GÉBRÉ-SÉLASSIÉ K, et al. An update of the host range of *Tomato Spotted Wilt Virus* [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2003, 85 (4) : 227–264.
- [8] WHITFIELD A E, ULLMAN D E, GERMAN T L. Tomato spotted wilt virus glycoprotein G(C) is cleaved at acidic pH [J]. *Virus Research*, 2005, 110 (1/2) : 183–186.
- [9] WETERING, DE V, GOLDBACH R, et al. *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission [J]. *Phytopathology*, 1996, 86 (9) : 900–905.
- [10] MONTERO-ASTÚA M, ULLMAN D E, WHITFIELD A E. Salivary gland morphology, tissue tropism and the progression of *Tospovirus* infection in *Frankliniella occidentalis* [J]. *Virology*, 2016, 493: 39–51.
- [11] SCHNEWEIS D J, WHITFIELD A E, ROTENBERG D. Thrips developmental stage-specific transcriptome response to tomato spotted wilt virus during the virus infection cycle in *Frankliniella occidentalis*, the primary vector [J]. *Virology*, 2017, 500: 226–237.
- [12] 史晓斌, 谢文, 张友军. 植物病毒病媒介昆虫的传毒特性和机制研究进展 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (7) : 841–848.
- SHI X B, XIE W, ZHANG Y J. Advances in the characteristics and mechanisms of the transmission of plant viruses by insect vectors [J]. *Science China Earth Sciences*, 2012, 55 (7) : 841–848. (in Chinese)
- [13] 傅意茗, 陈婵珊, 黄芳, 等. 植物病毒与媒介昆虫互作促进其传播的研究进展 [J]. 植物保护学报, 2022 (3) : 711–720.
- FU Y M, CHEN C S, HUANG F, et al. Advances in the transmission of plant viruses promoted by the interaction between the viruses and insect vectors [J]. *Journal of Plant Protection*, 2022 (3) : 711–720. (in Chinese)
- [14] BADILLO-VARGAS I E, CHEN Y, MARTIN K M, et al. Discovery of novel *Thrips* vector proteins that bind to the viral attachment protein of the plant bunyavirus tomato spotted wilt virus [J]. *Journal of Virology*, 2019, 93 (21) : e00699–e00619.
- [15] MARGARIA P, BOSCO L, VALLINO M, et al. The NSs protein of tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis* [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88 (10) : 5788–5802.
- [16] FUJIWARA H, ISHIKAWA H. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: Implication based on structural studies [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14 (16) : 6393–6401.
- [17] LIN J T, PRAMANIK J, WANG C R, et al. Study on construction of cDNA library of the treated changliver cell and quality analysis [J]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2004, 19 (2) : 181–183.
- [18] 刘露露, 曲俊杰, 郭泽西, 等. 霜霉菌侵染后葡萄叶片酵母双杂交 cDNA文库构建 [J]. 南方农业学报, 2020 (4) : 829–835.
- LIU L L, QU J J, GUO Z X, et al. Construction of a yeast two-hybrid cDNA library from *Vitis vinifera* leaves infected by downy mildew [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020 (4) : 829–835. (in Chinese)
- [19] 雷龔, 谢倩, 陈婷, 等. 炭疽菌侵染后刺葡萄果皮酵母双杂交 cDNA文库构建 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (12) : 1330–1335.
- LEI Y, XIE Q, CHEN T, et al. Yeast Two-hybrid cDNA Library Constructed from *Vitis davidii* Föex Pericarps Infected by Grape Ripe Rot Pathogen, *Colletotrichum viniferum* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (12) : 1330–1335. (in Chinese)
- [20] 李珣, 陈思宇, 胡传活, 等. PK-15细胞酵母双杂交三框cDNA文库构建及鉴定 [J]. 南方农业学报, 2016 (5) : 726–730.
- LI X, CHEN S Y, HU C H, et al. Construction and identification of yeast two-hybrid three-frame cDNA library of PK-15 cells [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016 (5) : 726–730. (in Chinese)
- [21] YANG F, LEI Y Y, ZHOU M L, et al. Development and application of a recombination-based library versus library high-throughput yeast two-hybrid (RLL-Y2H) screening system [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 46 (3) : e17.
- [22] MAR T, LIU W, WANG X. Proteomic analysis of interaction between P7-1 of Southern rice black-streaked dwarf virus and the insect vector reveals diverse insect proteins involved in successful transmission [J]. *J Proteomics*, 2014, 102: 83–97.
- [23] RANA V S, POPLI S, SAURAV G K, et al. A *Bemisia tabaci* midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission [J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18 (5) : 663–678.
- [24] OHNESORGE S, BEJARANO E R. *Begomovirus* coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18 (6) : 693–703.