

## 剑麻均一化文库构建及 PnRXLR5863 靶蛋白筛选

杨子平, 杨倩, 汪询, 柯智, 鹿志伟, 张燕梅, 谌惠邦, 周文钊\*

中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/湛江市热带作物遗传改良重点实验室, 广东湛江 524091

**摘要:** 剑麻是硬质纤维的主要来源, 由烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*) 引起的斑马纹病是剑麻生产的重要病害。RXLR 效应蛋白是卵菌第一大类效应蛋白, 能通过直接的蛋白质相互作用, 靶向寄主防卫相关蛋白, 干扰和抑制寄主防卫。利用转录组分析不同侵染阶段的烟草疫霉, 发现 *PnRXLR5863* 表达量较高, 并且其编码的蛋白含有信号肽、RXLR-EER 和 WY 结构域, 瞬时表达发现 *PnRXLR5863* 能引起烟草细胞死亡, 推测 *PnRXLR5863* 在烟草疫霉侵染剑麻过程发挥重要作用, 但是它作用于剑麻的靶蛋白和致病机制还未知。为了筛选 *PnRXLR5863* 的剑麻靶蛋白, 应用 Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript (SMART) 和 Duplex-Specific Nuclease (DSN) 技术构建了剑麻均一化酵母 cDNA 表达文库, 并筛选了与 *PnRXLR5863* 相互作用的蛋白。结果显示, 构建的文库库容为  $5.32 \times 10^7$  CFU/mL, 文库总克隆数为  $1.064 \times 10^8$  CFU, 文库片段平均大小为 1000 bp, 重组率为 100%; 构建的 pGBKT7-*PnRXLR5863* 诱饵载体无自激活性; 利用酵母双杂交系统, 以 pGBKT7-*PnRXLR5863* 诱饵载体, 从构建的文库中筛选获得 23 个与 *PnRXLR5863* 相互作用的蛋白。获得的候选靶蛋白主要参与分子功能和生物过程, 涉及泛素化过程、蛋白质合成、蛋白质翻译和蛋白质修饰等生理事件, 暗示 *PnRXLR5863* 效应蛋白可能作用于剑麻的蛋白质代谢。剑麻均一化酵母表达文库的构建和 *PnRXLR5863* 靶蛋白的筛选, 为进一步深入研究 *PnRXLR5863* 的致病机理奠定基础。

**关键词:** RXLR 效应蛋白; 剑麻; 均一化文库; 蛋白质相互作用; 斑马纹病

中图分类号: S432.1 文献标识码: A

## Construction of Yeast Two-hybrid Normalized Library and Screening of Interaction Proteins of PnRXLR5863 in *Agave hybrid* No.11648

YANG Ziping, YANG Qian, WANG Xun, KE Zhi, LU Zhiwei, ZHANG Yanmei, SHEN Huibang, ZHOU Wenzhao\*

South Subtropical Crops Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Zhanjiang Key Laboratory of Tropical Crop Genetic Improvement, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

**Abstract:** *Agave* spp. is main resource of hard fiber. Zebra disease, caused by the pathogen *Phytophthora nicotianae*, is one of the most devastating sisal oomycete diseases. RXLR effector proteins are important cytoplasmic effectors of oomycete and more than 300 RXLR effector genes were identified in the genomes of *P. nicotianae*. RXLR effectors have the ability to manipulate or suppress host immunity by directly binding host proteins. A typical RXLR effector (named PnRXLR5863) that induced programmed cell death (PCD) was identified from *P. nicotianae*, but the targets in *Agave* were still unknown. This study aims to obtain the host plant proteins that are interacting with PnRXLR5863 in *A. hybrid* No.11648. A normalized cDNA library was constructed by combining Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript (SMART) and Duplex-Specific Nuclease (DSN) technology. The capacity of cDNA library was  $5.32 \times 10^7$  CFU/ml, the independent clones was  $1.064 \times 10^8$  CFU, and the lengths of inserts ranged from 0.5 kb to 3.0 kb, with the recombination rate of 100%. A total of 23 proteins interacting with PnRXLR5863 were obtained by sequencing and

收稿日期 2022-05-10; 修回日期 2022-06-24

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. CARS-16); 海南省自然科学基金面上项目 (No. 320MS088); 广东省自然科学基金面上项目 (No. 2022A1515011841)。

作者简介 杨子平 (1984—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 植物分子生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 周文钊 (ZHOU Wenzhao), E-mail: zwenzhao@163.com。

homology analysis. Some of target proteins involve several physiological events, such as ubiquitination, protein synthesis, protein translation and protein translation, suggesting that PnRXLR5863 effector may act on protein metabolism of *Agave* spp. This research would lay a foundation for further study of the pathogenic mechanism of PnRXLR5863.

**Keywords:** RXLR effector protein; *Agave hybrid* No.11648; normalized library; protein interaction; zebra disease

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.02.003

效应蛋白是病原微生物产生的一类有利于病原微生物侵染的蛋白质。卵菌中存在数量庞大的效应蛋白基因,其中 RXLR 类效应蛋白的数量最多。大豆疫霉约含有 396 个编码 RXLR 效应蛋白的基因,拟南芥霜霉菌有 134 个,橡树疫霉菌有 374 个,马铃薯疫霉菌有 563 个,葡萄霜霉菌有 100 个,烟草疫霉存在超过 300 个<sup>[1-2]</sup>。RXLR 效应蛋白的 N 端含有约 20 个氨基酸的信号肽,在第 40~90 位氨基酸处含有一个保守 RXLR 基序,之后为序列多态性的效应分子功能区域,存在数量不等的 W、Y 或者 L 基序<sup>[3]</sup>。RXLR 为胞内效应蛋白,可以抑制植物 ROS 的产生、胼胝的沉淀和 SA 的含量等基础防卫反应。进一步研究发现, RXLR 效应蛋白能通过 C 端功能域结合寄主内靶蛋白,调节寄主靶蛋白功能,抑制或者干扰寄主多个生理事件。例如 *Hyaloperonospora arabidopsidis* 的 HaRxLL470 与 HY5 相互作用并抑制防御相关基因的转录<sup>[4]</sup>; 大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 的 PsAvr3c 与剪切体 SKRP 蛋白互作,导致防卫相关蛋白的 Pre-mRNA 剪切异常<sup>[5]</sup>; 致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 的 PITG20303 靶向并稳定马铃薯免疫负调控因子丝裂原活化蛋白激酶 StMKK1,影响水杨酸信号通路<sup>[6-7]</sup>; 大豆疫霉 (*P. sojae*) 的 PsAvh262 稳定内质网蛋白 BiPs,引起细胞坏死<sup>[8-9]</sup>。

卵菌属烟草疫霉引起的斑马纹病,是剑麻生产中的主要病害。烟草疫霉通过游动孢子侵染剑麻的叶片,初期引起斑马纹的病症,之后逐步引起叶腐和茎腐<sup>[10]</sup>。目前关于剑麻斑马纹病的研究还处在病原物的分离鉴定、病原流行性方面,而对烟草疫霉侵染剑麻的致病机制缺乏深入研究。本课题组已对侵染剑麻不同时间的烟草疫霉进行了转录组测序,转录组检测到 214 个编码 RXLR 的基因。其中 *PnRXLR5863* 表达水平高且表达水平变化显著,其编码的蛋白 N 端含有信号肽和 RXLR-EER 结构域, C 端含有 W 和 Y 功能结构域。在烟草叶片中瞬时表达 *PnRXLR5863*,能引起细胞死亡,推测 *PnRXLR5863* 是侵染剑麻的关键 RXLR 效应蛋白,但是 *PnRXLR5863* 作用剑麻

的靶蛋白和作用分子机制还不清楚。因此,本研究构建了剑麻酵母双杂交均一化 cDNA 表达文库,筛选了与 *PnRXLR5863* 相互作用的靶蛋白。结果为深入研究 *PnRXLR5863* 的致病机制奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

剑麻 (*Agave hybrid* No.11648) 采自中国热带农业科学院南亚热带作物研究所剑麻种质保存圃; Trizol 购自 Invitrogen 公司; Oligo(dT)、DNA clean beads 和 PCR mix 磁珠购自诺唯赞公司; 均一化试剂盒购自 Evrogen 公司; 反转录试剂盒、Hi-Fusion 试剂盒、*EcoR* I、双链 cDNA 纯化、酵母转化和文库构建试剂盒购自 Clontech 公司; 用于配制酵母培养基的试剂和其他试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。引物合成与 DNA 测序委托广州艾基生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采集 *Agave hybrid* No.11648 植株叶片,液氮速冻。将样品研磨成粉, Trizol 法提取其总 RNA。采用 Oligo (dT) 磁珠纯化 mRNA。

1.2.2 RNA 的反转录 反应体系中加入 1.0  $\mu$ L CDS III 和 1.0  $\mu$ L SMART III 引物, 1~500 ng 的 mRNA, DEPC H<sub>2</sub>O 补齐到 5  $\mu$ L, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 立即置于冰上。之后依次加入 1.0  $\mu$ L DTT, 1.0  $\mu$ L dNTP, 1.0  $\mu$ L MMLV Reverse Transcriptase, 2.0  $\mu$ L 5 $\times$ First-Strand buffer, 42 $^{\circ}$ C 90 min, 然后 70 $^{\circ}$ C 15 min 终止, 冷却至室温, 加入 1  $\mu$ L RNase H, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 产物存放于-80 $^{\circ}$ C 保存。CDS III 引物和 SMART III 引物序列见表 1。

1.2.3 双链 cDNA 的合成 2.0  $\mu$ L 单链 cDNA, 2.0  $\mu$ L 5' PCR 和 3' PCR 引物, 25  $\mu$ L Advantage 2 Polymerase Mix 合成双链 cDNA, 加水补齐到 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 15 s; 72 $^{\circ}$ C 6 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 30 个循环。5' PCR 引物和 3' PCR 引物序列见表 1。

1.2.4 双链 cDNA 的纯化 将 1.2 倍样品体积的磁珠液与双链 cDNA 混匀, 室温孵育 10 min, 转

移到磁力架上,待溶液澄清后(约 5 min),小心移除上清。200  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠(不要搅动磁珠),室温孵育 30 s,小心移除上清;室温下开盖干燥磁珠 5~10 min,加入 30~50  $\mu$ L 无核酸酶 ddH<sub>2</sub>O,室温静置 2 min,小心吸取上清至一个新的无核酸酶 EP 管中。

1.2.5 cDNA 均一化 按照以下体系进行杂交: 1 g ds cDNA, 8  $\mu$ L 2 $\times$ Hybridization buffer, 水补齐到 16  $\mu$ L,将上述溶液平均分成 4 份,置于 0.2 mL PCR 管中;PCR 仪上 98 $^{\circ}$ C 放置 2 min,迅速转移到准备好的 68 $^{\circ}$ C PCR 仪中 5 h。按照以下体系进行 DSN 消化: 4  $\mu$ L 杂交后的 cDNA, 5  $\mu$ L 2 $\times$ DSN master buffer (68 $^{\circ}$ C 预热), 1  $\mu$ L DSN solution (分别为 DSN, 1/2 DSN, 1/4 DSN, control), 水补齐到 16  $\mu$ L, 68 $^{\circ}$ C 反应 25 min。按照以下体系进行 PCR 放大: 10  $\mu$ L 2 $\times$ DSN stop buffer, 室温放置 5 min。5  $\mu$ L 10 $\times$ Advantage 2 PCR buffer, 1  $\mu$ L 50 $\times$ dNTP Mix, 1.5  $\mu$ L Primer M1, 1  $\mu$ L 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix, 1  $\mu$ L 消化后产物(即 DSN, 1/2 DSN, 1/4 DSN, control), 水补齐到 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 66 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 3 min, 11 个循环。

1.2.6 cDNA 小片段去除 预先将 CHROMA SPIN<sup>TM</sup> TE-400 纯化柱中胶体和缓冲液混合均匀,瞬时离心弃液体。将 93  $\mu$ L 双链 cDNA 加入纯化柱胶体, 700 g 离心 5 min。向收集液中加入 2.5 倍体积无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠 (NaAc), 置于-20 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA。用 20  $\mu$ L 无菌水溶解沉淀物,并测定双链 cDNA 浓度。

1.2.7 双链 cDNA 与 pGADT7 (lineared) 同源重组 按照以下体系进行同源重组: 2  $\mu$ L ds cDNA,

50~200 ng pGADT7, 4  $\mu$ L 5 $\times$ CE II buffer, 2  $\mu$ L Exnase II, 水补齐到 20  $\mu$ L, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 置于冰上。按照以下体系进行产物纯化: 20  $\mu$ L 重组产物, 2  $\mu$ L 核酸助沉剂, 55  $\mu$ L 100%乙醇, 混匀后于-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 13 000 r/min 离心 15 min, 弃上清;加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀, 8000 r/min 离心 2 min, 弃上清;室温下晾 5~10 min, 加入 10  $\mu$ L TE buffer 溶解沉淀。

1.2.8 文库构建 将 10  $\mu$ L 重组产物电击转化至 50  $\mu$ L 电转感受态中,取 10  $\mu$ L 菌液稀释 10 000 倍后,从中取 100  $\mu$ L 涂布于含 Amp 抗生素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。剩余菌液加入甘油至终浓度为 20%即为文库菌液。

1.2.9 文库质量检测 文库库容 (CFU/mL) = 克隆数/涂布体积 $\times$ 稀释倍数。总克隆数 (CFU) = 库容 $\times$ 菌液总体积。PCR 克隆鉴定体系如下, 10  $\mu$ L 2 $\times$  PCR Mix, 1  $\mu$ L T7-F, 1  $\mu$ L 3'AD, 水补齐到 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 55 $^{\circ}$ C 15s; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 25 个循环。

1.2.10 诱饵载体构建 设计携带 *EcoR* I 酶切位点的特异引物(表 1), 扩增 *PnRXLR5863* 编码框。将 *PnRXLR5863* 编码框插入 pGBKT7 载体, 构建诱饵载体。

1.2.11 诱饵载体自激活检测 将 pGBKT7-*PnRXLR5863* 载体转化 AH109 酵母菌株, 转化液涂布于不含色氨酸的培养基 (SD/-Trp), 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~4 d。随机挑取 6 个点, 用 pGBKT7 的载体引物进行 PCR 验证, 随机取 3 个正确克隆点板至 SD/-Trp、SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-His/-Ade、SD/-Trp/-His/-Ade+X- $\alpha$ -gal 板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。其中 pGBKT7 为阴性对照。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers of this study

引物名称 Primer name	用途 Usage	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	酶切位点 Restriction site
SMART III Oligo CDS III primer	For first-strand cDNA synthesis	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30VN	
5'PCR primer 3'PCR primer	For cDNA amplification	TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG GTATCGATGCCACCCTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACA	
PGAD-5' PGAD-3'	For sequencing of pGADT7	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT	
PGBK-5' PGBK-3'	For sequencing of pGBKT7	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCC TTCGTTTTAAACCTAAGAGTCACTTTAAA	
BK-PnRXLR5863-F BK-PnRXLR5863-R	For constructing of bait vector	atgccatgaggccgaattcATGTGCGACGAATGTCGAACAA cgctgcagtgcaagatcccGCTTTTGTCTCTTGTGTGTGTA	<i>EcoR</i> I <i>EcoR</i> I

1.2.12 互作蛋白筛选 制备 AH109 酵母感受态, 将文库质粒和诱饵质粒 pGBKT7-*PnRXLR5863* 共转化 AH109 酵母菌, 转化液涂布于 SD/-Trp/-His/-Ade 筛选平板。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取

为了鉴定所提取的 RNA 是否可用于下游建库, 从中吸取 2  $\mu$ L 进行琼脂糖电泳检测和分光光度计测量。结果显示, 能清晰地看到 28S 和 18S 两条带, 5S 条带很弱甚至无, 表明所提 RNA 完整性好, 无降解 (图 1A)。 $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8~2.2 之间, 表明 RNA 纯度高;  $OD_{260}/OD_{230}$  大于 2, 表明糖类、盐类、有机溶剂等去除干净。因此, 所提取 RNA 可用于下游建库。

### 2.2 cDNA 的合成

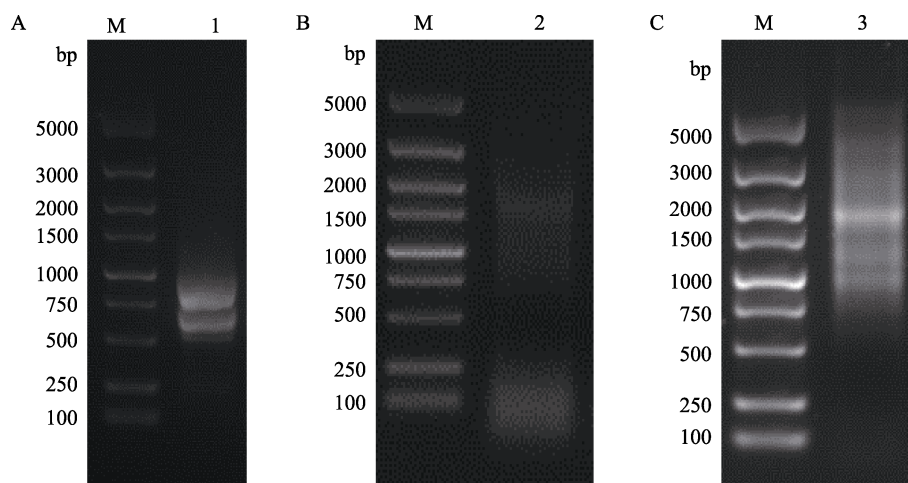
为了判断所获得的 ds cDNA 是否合成, PCR 结束后取 5  $\mu$ L 进行琼脂糖电泳检测。结果显示 ds cDNA 呈现弥散条带 (图 1B), 表示各种大小的条带都有, 合成的 cDNA 质量较好。

### 2.3 cDNA 的纯化

为了检测小片段是否去除, 从纯化后的溶液里边吸取 5  $\mu$ L 进行琼脂糖电泳检测。结果显示 ds cDNA 呈弥散条带, 500 bp 以下几乎看不到条带, 表明小片段去除干净 (图 1C)。

### 2.4 克隆计数

为了确定文库库容, 对电转化液稀释 10 000 倍。经培养, 平板上克隆约为 532 个, 根据公式计算得到库容为  $5.32 \times 10^7$  CFU/mL, 总克隆数为  $1.064 \times 10^8$  CFU (图 2)。



1: 剑麻总 RNA; 2: 未纯化的双链 cDNA; 3: 纯化的双链 cDNA; M: DL5000 DNA marker.  
1: Total RNA; 2: Unpurified ds cDNA; 3: Purified ds cDNA; M: DL5000 DNA marker.

图 1 剑麻总 RNA (A) 及双链 cDNA (B、C)

Fig. 1 Total RNA (A) and double-strand cDNA (ds cDNA) (B, C)

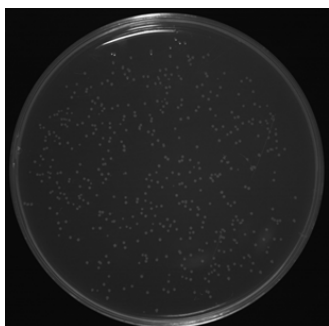


图 2 文库菌落

Fig. 2 Independent clones of library

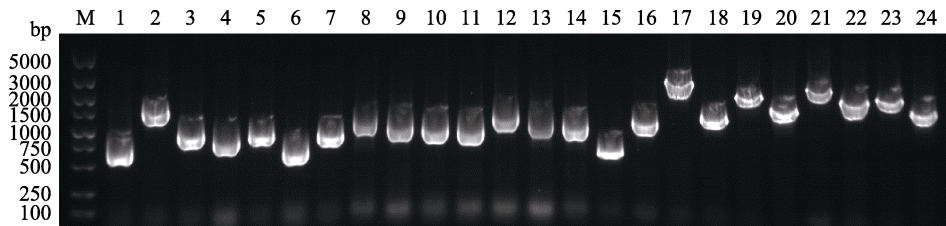
### 2.5 文库质量鉴定

为了检测文库的条带分布, 从平板上随机挑

选 24 个克隆进行菌落 PCR。检测结果显示, 文库条带在 1000 bp 上下出现, 说明文库片段平均大小在 1000 bp (图 3)。

### 2.6 自激活检测

为了检测诱饵载体是否有自激活, 将含诱饵载体的酵母菌点至 SD/-Trp、SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-His/-Ade、SD/-Trp/-His/-Ade+X- $\alpha$ -gal 平板上。结果显示, 阴性对照 pGBKT7 能在 SD/-Trp 平板上生长, 在 SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-His/-Ade、SD/-Trp/-His/-Ade+X- $\alpha$ -gal 平板上均不能正常生长。实验组与对照组生长一致 (图 4)。结果说明诱饵载体无自激活现象。



M: DL5000 DNA marker.

图 3 文库片段检测

Fig. 3 Insert fragments detection of library by PCR

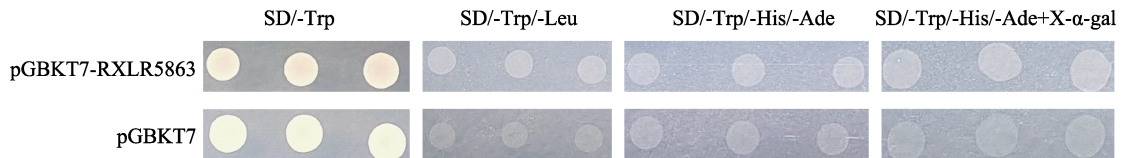
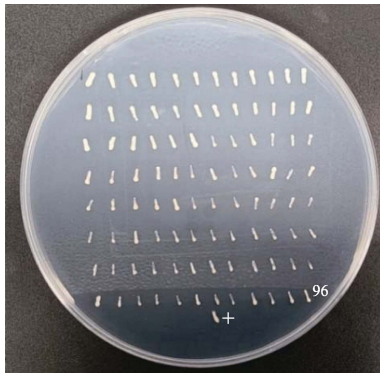


图 4 自激活检测结果

Fig. 4 Autoactivation detection of bait vector

## 2.7 靶蛋白筛选

为了获得阳性克隆,从 SD/-Trp/-Leu/-His 筛库平板上挑取了 96 个克隆(图 5),转板培养一次,对这 96 个克隆进行 PCR 扩增并对 PCR 产物测序,测序结果与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对分析,去除重复获得 23 个阳性克隆(表 2)。蛋白功能注释结果显示,这些蛋白主要参与分子功能和生物过程,涉及泛素化过程、蛋白合成、蛋白翻译和蛋白修饰等生理事件。



+ : 阳性对照 (pGADT7-largeT+ pGBKT7-p53)。

+ : Positive control (pGADT7-largeT+ pGBKT7-p53)。

图 5 转板阳性克隆

Fig. 5 Potential positives on SD/-Trp/-Leu/-His

## 2.8 阳性克隆回转验证

将阳性克隆与诱饵载体共转化 AH109 酵母菌,点板至 SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/Ade 和 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade+X-α-gal 缺陷平板,进行阳性克隆的回转验证。结果显示(图 6),阳性对照能在 SD/-Trp/-Leu、SD/-

Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/Ade 和 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade+X-α-gal 缺陷平板上生长,并能在 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade+X-α-gal 缺陷平板上显蓝色;阴性对照仅在 SD/-Trp/-Leu 平板上能生长,而在其他平板均不能生长。

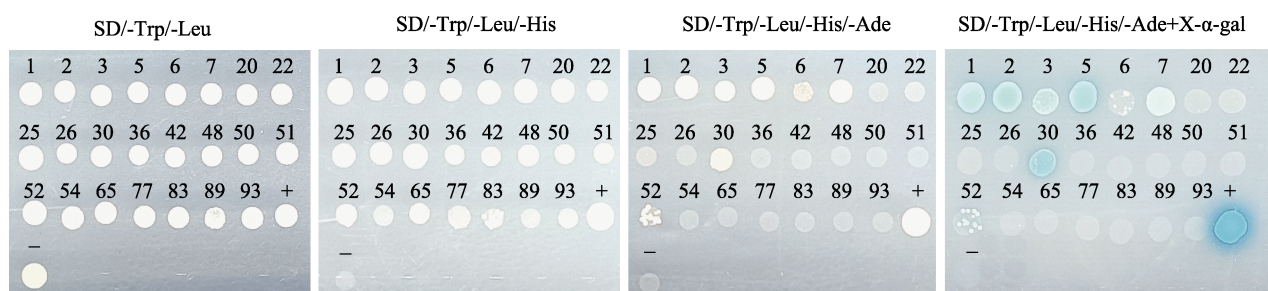
23 个阳性克隆能在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His 缺陷型平板上生长,8 个阳性克隆能在 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade、SD/-Trp/-Leu/-His/Ade+X-α-gal 平板上生长,并能在 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade+X-α-gal 缺陷平板上显蓝色。

## 3 讨论

酵母双杂交是目前能够进行高通量筛选相互作用蛋白的技术之一,文库质量直接影响互作蛋白的筛选。通常通过文库基因的完整性和复杂性来评估 cDNA 文库的质量。cDNA 序列的完整性和丰度决定了文库的完整性, mRNA 序列的完整直接影响 cDNA 系列的完整性。采用 SMART 技术构建 cDNA 文库,要求实验材料少、操作简单、快速<sup>[11]</sup>,能够较真实地反映样品中转录本的表达水平,但是低丰度表达基因容易在文库构建过程中丢失,且不利于筛选获得低丰度表达基因,高丰度表达基因也会给筛选带来一定的困难<sup>[12]</sup>。而利用 DSN 酶处理 cDNA,能降低高表达基因的拷贝,增加低丰度基因的拷贝<sup>[13]</sup>,提高筛库获得低丰度表达基因的几率。文库的完整性可以通过库容来进行量化评估,高质量文库的库容至少为 10<sup>6</sup> CFU,低于此指标,不利于获得阳性克隆<sup>[11]</sup>。文库片段正确表达可以增加文库的复杂性,通过

表 2 与 PnRXLR5863 相互作用的蛋白  
Tab. 2 List of proteins interacted with PnRXLR5863

编号 No.	蛋白名称 Protein name	cDNA 长度 cDNA length/bp	功能 Function
1	PREDICTED: uncharacterized protein	873	Unknown protein
2	PREDICTED: ferrochelatase-1	957	Molecular Function: ferrochelatase activity
3	PREDICTED: 60S ribosomal protein L12-like	916	Molecular Function: structural constituent of ribosome
4	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-1	1070	Biological Process: protein peptidyl-prolyl isomerization
5	PREDICTED: uncharacterized protein	932	Unknown protein
6	Hypothetical protein AMTR_s00007p00132320	1003	Molecular Function: structural constituent of ribosome
7	PREDICTED: uncharacterized protein	987	Unknown protein
8	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 32-like	920	Biological Process: ubiquitin-dependent protein catabolic process
9	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tricalbin-3-like	1253	Unknown protein
10	PREDICTED: oxygen-evolving enhancer protein 3-2	1038	Molecular Function: calcium ion binding
11	Hypothetical protein	966	Molecular Function: electron transfer activity
12	PREDICTED: dnaJ protein homolog isoform X2	943	Molecular Function: ATP binding
13	Uncharacterized protein	1103	Unknown protein
14	PREDICTED: putative pleiotropic drug resistance protein 7	766	Molecular Function: ATP binding
15	PREDICTED: protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1-like	800	Molecular Function: transporter activity
16	PREDICTED: 60S ribosomal protein L18a-2	819	Molecular Function: structural constituent of ribosome
17	S-adenosyl-L-methionine synthetase	848	Molecular Function: methionine adenosyltransferase activity
18	S-adenosyl-L-methionine synthetase	1130	Molecular Function: methionine adenosyltransferase activity
19	PREDICTED: mannose-specific lectin-like	1042	Unknown protein
20	PREDICTED: beta-glucosidase 18-like	651	Molecular Function: hydrolase activity
21	Hypothetical protein	486	Unknown protein
22	PREDICTED: small nuclear ribonucleoprotein E	754	Biological Process: mRNA splicing, via spliceosome
23	PREDICTED: acyl carrier protein 1	913	Biological Process: fatty acid biosynthetic process



+: 阳性对照 (pGADT7-largeT+ pGBKT7-p53); -: 阴性对照 (pGADT7-largeT+ pGBKT7-laminC).  
+: Positive control (pGADT7-largeT+ pGBKT7-p53); -: Negative control (pGADT7-largeT+ pGBKT7-laminC).

图 6 阳性克隆回转变证

Fig. 6 Confirm interaction in yeast

合成三框 cDNA 来实现文库复杂性, 目的是保证文库片段都能表达出与样本体内相同的蛋白<sup>[13]</sup>。这样, 一方面能增加获得互作蛋白的概率, 另一方面也能减少假阳性。为了构建高质量的剑麻酵母 cDNA 表达文库, 本研究从总 RNA 中纯化了 mRNA, 采用三框引物合成 cDNA, 利用 DSN 对 cDNA 进行均一化, SMRT 技术构建重组文库质粒,

最后将质粒电击转化大肠杆菌, 构建了一个文库片段平均大小在 1000 bp、库容为  $5.32 \times 10^7$  CFU/mL、总克隆数为  $1.064 \times 10^8$  CFU 的均一化文库。

在之前的研究中, 为了筛选与剑麻 AhKNOX2 蛋白相互作用的蛋白, 以健康剑麻叶片总 RNA 反转录获得的 cDNA 为材料, 采用体内同源重组的方式, 在酵母体内构建了一个酵母双杂交文库,

其文库总容量为  $3.9 \times 10^6$  CFU, 插入片段大小主要分布于 0.5~3.0 kb 之间, 重组率为 92%<sup>[14]</sup>。与前一个文库构建不同的是, 为了筛选与病原菌效应蛋白互作的剑麻靶蛋白, 选用烟草疫霉侵染的剑麻叶片为材料, 目的是激发剑麻抗病基因的表达。为排除文库编码核糖体蛋白的 cDNA 的插入, 以及确保文库插入 cDNA 能正确表达, 从总 RNA 中纯化 mRNA, 并采用了三框引物对 mRNA 进行反转。为了降低高表达基因的丰度和提高低表达量基因的丰度, 本研究对合成的双链 cDNA 进行了均一化。此外, 为了提高转化效率, 本次采用体外同源重组和电击转化, 在大肠杆菌中构建表达文库。由文库质量评估可知, 新文库的库容量达到  $10^7$ , 比前一个文库提升一个数量级。剑麻 CDS 平均长度为 1087 bp (未公布的基因组数据), 新老文库筛选获得的阳性克隆插入片段平均长度为 920 bp 和 1050 bp, 排除由于诱饵蛋白功能导致的靶蛋白的差异, 2 个文库的插入片段均有较好的完整性。

RXLR 是卵菌中第一大类效应蛋白, 能够通过与其宿主防御蛋白结合, 在表观修饰水平抑制抗病基因转录<sup>[15-16]</sup>; 在转录水平抑制宿主防卫基因的转录<sup>[4, 17-18]</sup>; 在转录后水平干扰宿主防卫基因的翻译<sup>[5, 19]</sup>; 干扰宿主信号转导<sup>[6-7, 20-22]</sup>; 调控自噬<sup>[23]</sup>; 调控细胞间运输<sup>[24]</sup>; 介导内质网应激<sup>[8-9]</sup>; 操纵活性氧信号<sup>[25]</sup>。本研究以 PnRXLR5863 为诱饵, 通过酵母双杂交从剑麻文库中获得 23 个互作蛋白。已知功能的 16 个蛋白, 涉及泛素化过程、蛋白合成、蛋白翻译和蛋白修饰等生理事件。推测烟草疫霉侵染剑麻过程, PnRXLR5863 效应蛋白可能作用于剑麻的蛋白代谢。

## 参考文献

- [1] LIU H, MA X, YU H Q, FANG D H, LI Y P, XIAO W X, WANG W, YANG D Y, XIAO B G. Genomes and virulence difference between two physiological races of *Phytophthora nicotianae*[J]. *Gigascience*, 2016, 5(1): 3.
- [2] YIN L, AN Y H, QU J J, LI X L, ZHANG Y L, DRY I, WU H J, LU J. Genome sequence of *Plasmopara viticola* and insight into the pathogenic mechanism[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46553.
- [3] POPPEL P M, JIANG R H, SLIWKA J, GOVER F. Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(5): 611-620.
- [4] CHEN S Y, MA T, SONG S R, LI X L, FU P N, WU W, LIU J Q, GAO Y, YE W X, DRY I B, LU J. *Arabidopsis* downy mildew effector HaRxLL470 suppresses plant immunity by attenuating the DNA-binding activity of bZIP transcription factor HY5[J]. *New Phytologist*, 2021, 230(4): 1562-1577.
- [5] HUANG J, GU L F, ZHANG Y, YAN T X, KONG G H, KONG L, GUO B D, QIU M, WANG Y, JING M F, XING W M, YE W W, WU Z, ZHANG Z G, ZHENG X B, GIJZEN M, WANG Y C, DONG S M. An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity[J]. *Nature Communications*, 2017, 12, 8(1): 2051.
- [6] DU Y, CHEN X C, GUO Y L, ZHANG X J, ZHANG H X, LI F F, HUANG G Y, MENG Y L, SHAN W X. *Phytophthora infestans* RXLR effector PITG20303 targets a potato MKK1 protein to suppress plant immunity[J]. *New Phytologist*, 2021, 229: 501-515.
- [7] ZHANG H X, LI F F, LI Z Z, CHENG J, CHEN X K, WANG Q H, JOOSTEN M H A, SHAN W X, DU Y. Potato StMPK7 is a downstream component of StMKK1 and promotes resistance to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(6): 644-657.
- [8] JING M F, GUO B D, LI H Y, YANG B, WANG H N, KONG G H, ZHAO Y, XU H W, WANG Y, YE W W, DONG S M, QIAO Y L, TYLER B M, MA W B, WANG Y C. A *Phytophthora sojae* effector suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated immunity by stabilizing plant binding immunoglobulin proteins[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11685.
- [9] JING M F, WANG Y C. Plant pathogens utilize effectors to hijack the host endoplasmic reticulum as part of their infection strategy[J]. *Engineering*, 2020, 6(5): 500-504.
- [10] GAO J M, LUO P, GUO C M, LI J Z, LIU Q L, CHEN H L, ZHANG S Q, ZHENG J L, JIANG C J, DAI Z Z, YI K X. AFLP analysis and zebra disease resistance identification of 40 sisal genotypes in China[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 6379-6385.
- [11] 苏玲, 李彬, 王青, 胡颖, 罗聪, 何新华. 金柑花蕾酵母双杂交 cDNA 文库构建及评价[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(7): 3169-3173.
- [12] SU L, LI B, WANG Q, HU Y, LUO C, HE X H. Construction and evaluation of yeast two hybrid cDNA library of floral buds from Rongan kumquat[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(7): 3169-3173. (in Chinese)
- [12] OSAMU O, GARY T. Directional cDNA library construction assisted by the *in vitro* recombination reaction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(4): e22.

- [13] ZHANG Z X, ZHANG F D, TANG W H, PI Y J, ZHENG Y L. Construction and characterization of normalized cDNA library of maize inbred Mo17 from multiple tissues and developmental stages[J]. *Molecular Biology*, 2005, 39(2): 198-206.
- [14] 杨子平, 孙艺桓, 杨倩, 鹿志伟, 张燕梅, 李俊峰, 周文钊. 剑麻酵母双杂交 cDNA 表达文库的构建及与 AhKNOX2 相互作用蛋白的筛选[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(9): 1748-1755.
- YANG Z P, SUN Y H, YANG Q, LU Z W, ZHANG Y M, LI J F, ZHOU W Z. Construction of yeast two-hybrid library of *Agave hybrid* No. 11648 and screening of proteins interacting with AhKNOX2[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(9): 1748-1755. (in Chinese)
- [15] KONG L, QIU X, KANG J, WANG Y, CHEN H, HUANG J, QIU M, ZHAO Y, KONG G H, MA Z C, WANG Y, YE W W, DONG S M, MA W B, WANG Y C. A *Phytophthora* effector manipulates host histone acetylation and reprograms defense gene expression to promote infection[J]. *Current Biology*, 2017, 27(7): 981-991.
- [16] LI H Y, WANG H N, JING M F, ZHU J Y, GUO B D, WANG Y, LIN Y C, CHEN H, KONG L, MA Z C, WANG Y, YE W W, DONG S M, TYLER B, WANG Y C. A *Phytophthora* effector recruits a host cytoplasmic transacetylase into nuclear speckles to enhance plant susceptibility[J]. *eLife*, 2018, 7: e40039.
- [17] HARVEY S E, KUMARI P, LAPIN D, GRIEBEL T, HICKMAN R, GUO W B, ZHANG R X, PARKER J E, BEYNON J, DENBY K, STEINBRENNER J. Downy mildew effector HaRxL21 interacts with the transcriptional repressor TOPLESS to promote pathogen susceptibility[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8): e1008835.
- [18] MA T, CHEN S C, LIU J Q, FU P N, WU W, SONG S R, GAO Y, YE W X, LU J. *Plasmopara viticola* effector PnRXLR111 stabilizes VvWRKY40 to promote virulence[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 22(2): 231-242.
- [19] HUANG J, LU X Y, WU H W, XIE Y C, PENG Q, GU L F, WU J Y, WANG Y C, REDDY A N, DONG S M. *Phytophthora* effectors modulate genome-wide alternative splicing of host mRNAs to reprogram plant immunity[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(10): 1470-1484.
- [20] CAILLAUD M C, ASAI S, RALLAPALLI G, PIQUEREZ S, FABRO G, JONES J D. A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in *Arabidopsis* by interacting with the host mediator complex[J]. *PLoS Biology*, 2013, 11(12): e1001732.
- [21] LI Q, WANG J, BAI T, ZHANG M, JIA Y L, SHEN D Y, ZHANG M X, DOU D L. A *Phytophthora capsici* effector suppresses plant immunity via interaction with EDS1[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(4): 502-511.
- [22] REN Y, ARMSTRONG M, QI Y T, MCLELLAN H, ZHONG C, DU B W, BIRCH P R, TIAN Z D. *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune-signal transduction pathway[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(4): 2227-2239.
- [23] PANDEY P, LEARY A Y, TÜMTAS Y, SAVAGE Z, BOZKURT T O. The Irish potato famine pathogen subverts host vesicle trafficking to channel starvation-induced autophagy to the pathogen interface[J]. *BioRxiv Preprint*, 2020, DOI: 10.1101/2020.03.20.000117.
- [24] TOMCZYNSKA I, STUMPE M, DOAN T G, MAUCH A. *Phytophthora* effector protein promotes symplastic cell-to-cell trafficking by physical interaction with plasmodesmata-localised callose synthases[J]. *New Phytologist*, 2020, 227(5): 1467-1478.
- [25] LIU R Q, CHEN T T, YIN X, XIANG G Q, PENG J, FU Q Q, LI M Y, SHANG B X, MA H, LIU G T, WANG Y J, YAN XU Y. A *Plasmopara viticola* RXLR effector targets a chloroplast protein PsbP to inhibit ROS production in grapevine[J]. *The Plant Journal*, 2021, 106(6): 1557-1570.