



西花蓟马酵母双杂交文库及 TSWV 膜蛋白诱饵载体的构建*

万岩然^{1**} 郑晓斌² 袁江江² 张友军² 吴青君^{2***}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071000; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要 【目的】为筛选西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 与番茄斑萎病毒的互作蛋白。【方法】利用 Make Your Own “Mate & Plate™” Library System 构建西花蓟马酵母双杂交初级 cDNA 文库以及 Y187 酵母次级文库, 利用 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 构建 TSWV 膜蛋白 G_N 及 G_C 诱饵载体。【结果】建立的西花蓟马初级 cDNA 文库库容为 5.6×10^6 cfu, 其插入片段平均长度大于 1 000 bp, 重组率约为 100%。建立的 Y187 酵母次级文库转化效率为 5×10^6 cfu/ μ g, 文库滴度为 2.97×10^8 。构建的 pGNKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体能够在 Y2HGold 酵母菌株中正确表达, 无自激活活性且无毒性。【结论】成功构建了西花蓟马酵母双杂交文库以及番茄斑萎病毒膜蛋白诱饵载体, 可用于后续筛库实验。

关键词 西花蓟马; 番茄斑萎病毒; 酵母双杂交文库; 诱饵载体

Construction of a western flower thrip yeast two-hybrid library and TSWV membrane protein bait vectors

WAN Yan-Ran^{1**} ZHENG Xiao-Bin² YUAN Jiang-Jiang² ZHANG You-Jun² WU Qing-Jun^{2***}

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract [Objectives] To screen proteins involved in the interaction between western flower thrips and the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). [Methods] A western flower thrip cDNA library and a Y187 yeast library were constructed using the Make Your Own “Mate & Plate™” Library System, and TSWV GN and GC bait vectors were constructed using the Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System. [Results] The capacity of the western flower thrip cDNA library was 5.6×10^6 cfu, the average library recombination rate was about 100%, and the average amplification sizes of insert fragments in the cDNA library were above 1 kb. The transformation ratio and titer of the Y187 yeast library were 5×10^6 cfu/ μ g and 2.97×10^8 , respectively. The constructed pGNKT7-GN and pGBKT7-GC bait vectors were well expressed in yeast and had no self-activation and toxicity. [Conclusion] A western flower thrip yeast library and TSWV membrane protein bait vectors were successfully constructed and can be used for further hybrid library screening.

Key words *Frankliniella occidentalis*; *tomato spotted wilt virus*; yeast two hybrid library; bait vector

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 寄主植物多达 62 科 200 多种, 包括许多重要的经济作物、蔬菜和花卉等 (Lewis, 1997)。我国是一种世界性的农业害虫 (Ullman *et al.*, 2002),

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目(31572037); 现代农业产业技术体系北京市叶类蔬菜创新团队(BAIC07-2018); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

**第一作者 First author, E-mail: zhibao090102@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuqingjun@caas.cn

收稿日期 Received: 2018-03-30; 接受日期 Accepted: 2018-07-13

自 2003 年首次发现西花蓟马以来 (张友军等, 2003), 目前该虫已在北京、云南、山东、贵州、西藏等地区广泛分布 (吴青君等, 2007; 郑长英等, 2007; 袁成明等, 2008; 王海鸿等, 2013), 成为保护地蔬菜花卉上最具威胁的害虫之一 (张友军等, 2011)。西花蓟马除以锉吸式口器危害植物的茎叶、花及果实等 (Kirk and Terry, 2003) 以及在植物组织内产卵造成危害之外, 更为重要的是能够传播包括番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) 在内的多种植物病毒病 (Ullman *et al.*, 2002; Jones, 2005; Whitfield *et al.*, 2005), 从而造成更大的危害 (van de Wetering *et al.*, 1996; Adkins, 2000)。

番茄斑萎病毒属于布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*), 西花蓟马是该病毒最有效的传播介体 (Ullman *et al.*, 2002), 因其广泛的寄主范围和造成的巨大经济损失被列为世界危害最大的十种植物病毒之一 (Scholthof *et al.*, 2011)。番茄斑萎病毒粒子为直径约 80-110 nm 球状体或呈多面体颗粒, 外面有一层源于寄主的脂质膜包裹, 表面有 G_N 和 G_C 两种糖蛋白 (Moritz *et al.*, 2004)。蓟马以持续增殖的方式传播 TSWV (Wijkamp *et al.*, 1993; Ullman *et al.*, 2002), 对 TSWV 的获取是通过 G_N 和 G_C 与蓟马中肠上皮细胞表面受体互动而介导的胞吞作用而进行 (Nagata *et al.*, 2000), 因此特异性受体与病毒的识别是蓟马成功传播 TSWV 的第一步。然而, 番茄斑萎病毒属病毒作为布尼亚病毒唯一感染植物的病毒, 与其传毒介体蓟马的互作蛋白尚未明确。虽然 Medeiros 等 (2000) 和 Kikkert 等 (1998) 分别筛选到 50 ku 和 94 ku 的疑似与西花蓟马互作的蛋白, 但至今未有进一步的证明。

研究昆虫介体与病毒互作的常用方法包括病毒粒子覆盖 (Virus overlay protein binding assay, VOPBA)、双向差异凝胶电泳 (Two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)、活性蛋白质表达谱分析技术 (Activity-based protein profiling, ABPP)、噬菌体展示技术 (Phage surface display techniques, PSDT)、酵

母双杂交系统等。基于真核生物 GAL4 转录调控系统的酵母双杂交系统最早是由 Fields 和 Song (1989) 建立后经 Clontech 公司改进, 该系统从核酸到蛋白的方向筛选互作蛋白, 筛选到的蛋白所对应的基因序列可通过质粒挽救和测序技术获得, 可用于高通量筛选, 因此成为目前研究蛋白质互作最常用的方法。利用 GAL4 酵母双杂交系统筛选了大量能与病毒蛋白互作的寄主植物蛋白 (Seo *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009), 筛选病毒与其传毒介体蛋白互作的研究也取得一定成功 (Morin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011)。利用酵母双杂交技术探索 TSWV 与西花蓟马互作蛋白需要构建高质量的 cDNA 文库以及能够在酵母中正确表达的诱饵蛋白, 因此, 本研究利用 Clontech 公司的 GAL4 酵母双杂交系统, 建立西花蓟马酵母文库, 并构建含 TSWV 膜蛋白 G_N 和 G_C 的诱饵蛋白质粒, 旨在为筛选与 TSWV 膜蛋白互作的西花蓟马蛋白, 为通过干扰西花蓟马对 TSWV 的获取来切断传播途径达到防治目的奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

2003 年采自于中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室, 室内 (温度 (25 ± 1) , 光周期 16L: 8D) 采用四季豆 *Phaseolus vulgaris* L. 饲养至今。

1.2 供试 TSWV 病毒株系及植物

TSWV (TSWV-YN) 病毒株系 (Zhang *et al.*, 2013) 以西花蓟马活体传的方式在曼陀罗 *Datura stramonium* 植株上保存。实验用携带病毒植株通过人工摩擦的方法接种于曼陀罗上。曼陀罗植物培养于人工气候培养箱内 (温度 (26 ± 1) , 光周期 16L: 8D, 相对湿度 80%-90%)。

1.3 主要试剂

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit, La-Taq, Make Your Own "Mate & Plate™" Library System, In-fusion HD Cloning kit, QuickCut™ *EcoR* I, QuickCut. *BamH* I,

Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System, Aureobasidin A, X- α -Gal, Yeast Protein Extraction Reagent, GAL4 DNA-BD Monoclonal Antibody, Lambda EcoT14 digest, 250 bp DNA ladder 购于宝生物工程(大连)有限公司。TRIzol Reagent 购于 Life Technologies。Biofuraw Precast Gel 4%-20%预制胶购于上海天能科技有限公司。质粒小提中量试剂盒, DNA Marker 购于天根生化科技(北京)有限公司。One Step Western Kit HRP (Mouse), eECL Western Blot Kit 购于康为世纪生物科技有限公司。

1.4 主要仪器

SANYO MLR-351 植物培养箱, 日本 SANYO 公司; SpectraMax M2 酶标仪, 美国分子仪器公司; S-1000 Thermal Cycler PCR 仪, Molecular Imager ChemiDOC 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; 冷冻离心机 SK15, 美国 Sigma 公司; 组织研磨仪, VE 680 微型垂直电泳槽, VE 586 转移电泳槽, Tanon 5 200 全自动化学发光图像分析系统, 上海天能科技有限公司。

1.5 西花蓟马酵母双杂交文库构建

1.5.1 试虫处理 将干净新鲜的豆角放置于蓟马成虫养虫罐内供成虫产卵 24 h 后, 取出豆角置于干净的养虫罐内, 将养虫罐放置于人工气候箱内饲养(温度(26 \pm 1), 光周期 16L: 8D, 相对湿度 50%-60%)。待若虫孵出后, 用小毛笔将部分初孵若虫转移至 TSWV 感染的离体曼陀罗叶片上取食 24 h, 之后将处理过的若虫转移至新的养虫罐中, 豆角为饲料继续饲养, 获得携带 TSWV 病毒试虫。另取约 1 000 头初孵若虫置于 1.5 mL PE 管中于 -80 冰箱内冻存储用, 剩余初孵若虫在豆角上继续培养。分别在 2 龄若虫期、蛹期、成虫期取带毒及不带毒处理的试虫约 100 头置于 1.5 mL PE 管中于 -80 冰箱内冻存储用。

1.5.2 西花蓟马 GAL cDNA 文库构建 RNA 提取: 将收集到的各龄期试虫混合后分为 3 份提取 RNA。RNA 提取方法为, 每份试虫中加入 1 mL TRIzol 试剂及 2-3 颗研磨珠后置于组织研磨仪上

70 Hz 低温研磨 1 min, 短离心将管壁及管盖上的液体收集至管内, 加入 200 μ L 预冷的氯仿后剧烈震荡 2 min, 静置分层, 13 000 r/min 离心 10 min 后, 将上清液体转移至新的离心管内, 加入上清等量的预冷的异丙醇上下颠倒混匀后静置 15 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入预冷的 75%乙醇 1 mL 颠倒混匀后, 13 000 r/min 离心 5 min, 尽量弃去上清, 开盖吹干酒精后加入 30 μ L 无 DEPC 水溶解 RNA 后保存于 -80 冰箱。

cDNA 合成: 按照 Make Your Own "Mate & Plate" Library System 文库说明书构建文库。具体步骤为: 使用 SMART cDNA Library Construction Kit 及 Advantage 2PCR kit 合成 cDNA 后, 使用 CHROMA SPIN TE-400 column 对合成的 cDNA 进行纯化。使用 TRIMMER DIRECT cDNA Normalization Kit 对纯化后的 cDNA 进行均一化处理, 处理的 cDNA 用 Advantage 2 PCR Kit 进行 PCR 扩增, 对扩增得到的 cDNA 进行纯化处理, ddH₂O 溶出后使用限制性内切酶 *Sfi* 对 cDNA 进行酶切处理, 然后使用 CHROMA SPIN-1000-TE 对酶切后的 cDNA 进行过柱处理, 去除短片段, 经 PCI/CI 净化处理后, 乙醇精制, ddH₂O 溶出。

初级文库构建: 使用 DNA ligation Kit 将 pGADT7-*Sfi* vector 与上步的 cDNA₁₂ 进行 O/N 连接, 对获得的连接液进行纯化后得到初级的 cDNA 文库。取少量初级文库连接液, 电转化感受态细胞 HST08 后涂布氨苄抗性 LB 平板, 37 过夜倒置培养, 通过平板上生长的菌落数计算初级文库库容。取 16 个菌斑用 pGADT7 载体引物做菌液 PCR, 检测插入片段分布范围。对 96 个单克隆进行测序验证均一化效果。通过库容检测数据, 取 100 万克隆的量, 计算需要的连接液体积, 转化至感受态细胞 HST08 中, 涂布 10 个 25 cm \times 25 cm LB 平板 37 培养过夜。回收扩增菌落, 进行质粒提取。取 100 ng 扩增文库质粒进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。剩余 cDNA 初级文库连接液及扩增文库质粒保存于 -20 备用。

1.5.3 西花蓟马 Y187 酵母文库构建 参照 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 使用说明制备 Y187 酵母感受态, 将 15 μg 上述制备的扩增文库质粒转入 Y187 酵母感受态后, 涂布 150 个直径 15 cm 的 SD/Leu 平板, 封口膜封口后, 30 ℃ 倒置培养 3-5 d。同时取 100 μL 转化的菌液进行 1/10、1/100、1/1 000 稀释后涂布直径 9 cm 的 SD/Leu 平板, 封口膜封口后, 30 ℃ 倒置培养 3-5 d, 统计菌落数, 计算转化效率, 转化效率 = (菌落数 × 涂布菌液体积) / (总转化液体积 × 质粒数量)。收集所有 15 cm SD/Leu 平板上的菌液, 保存为甘油菌。取 10 μL 文库甘油菌进行 1/100 及 1/10 000 稀释后涂布 9 cm 的 SD/Leu 平板, 封口膜封口后, 30 ℃ 倒置培养 3-5 d, 统计菌落数, 计算文库滴度, 计算公式为菌落数 / (涂布菌液体积 × 稀释倍数)。

1.6 番茄斑萎病毒 pGBKT7-GN、pGBKT7-GC 诱饵蛋白载体构建

1.6.1 诱饵载体构建 将约 10 mg 带毒曼陀罗叶片按上述方法提取 RNA 后, 用 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒按照试剂盒说明书反转成 cDNA, -20 ℃ 保存。

根据 In-fusion HD Cloning kit 说明书设计带 In-fusion 接头序列的 PCR 引物 (表 1)。20 μL PCR 反应体系为: LA-Taq 酶 0.2 μL, dNTP 2 μL, buffer 2 μL, 引物各 0.5 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 13.8 μL。反应程序为 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 55/60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 目的带切胶回收后 -20 ℃ 保存。将 pGBKT7 载体用 *Bam*H 及 *Eco*R I 进行双酶切, 双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 目的带切胶回收。根据 In-fusion HD Cloning kit 说明书将上述 PCR 产物及线性化 pGBKT7 载体进行连接、转化并挑斑测序。测序无误的单克隆摇菌扩增后, 按照天根载体小提中量试剂盒说明书提取载体后存于 -20 ℃ 备用。

1.6.2 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体在 Y2H Gold 酵母菌株中的自激活及毒性检测

将 pGBKT7-GN、pGBKT7-GC 载体以及 pGBKT7 DNA-BD 空载体按照 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 使用说明转入 Y2HGold 酵母菌株, 分别涂布 SD/-Trp、SD/-Trp/X-a-Gal、SD/-Trp/X-a-Gal/AbA 后, 30 ℃ 倒置培养 3-5 d 后, 观察生长状况和颜色反应。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列 Sequence
G _N -F	CATGGAGGCCGAATTCAAAGTAGAAATAATTCGTGGAGAC
G _N -R	GCAGGTCGACGGATCCCTTTTTGAATATTTGATTATGCAAT
G _C -F	CATGGAGGCCGAATTCAAATTTGAAAAATGCCCTGGAAAA
G _C -R	GCAGGTCGACGGATCCGGCTCTTAATATAATCCCAGAAGC

1.6.3 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体在 Y2HGold 酵母菌株中的表达检测 分别挑取一个生长两周内的含 pGBKT7-GN、pGBKT7-GC 及 pGBKT7 DNA-BD 空载体和 pGBKT7 53 阳性对照载体酵母单克隆至 3 mL SD/Trp (50 mL 无菌 PE 管) 培养基中, 220 r/min 转速下 30 ℃ 培养至 OD 值为 0.4 时, 取 1 mL 菌液按照 Yeast Protein Extraction Reagent 试剂盒说明书提取蛋

白后加入蛋白电泳上样缓冲液后煮沸 10 min, 冷却后取 20 μL 上样, 所用凝胶为 Biofuraw Precast Gel 4%-20% 预制胶。按照该预制胶说明书进行电泳后, 将蛋白转膜到 PVDF 膜上, 加入封闭液封闭过夜。参照康为 One Step Western Kit HRP (Mouse) 以及 eECL Western Blot Kit 试剂盒进行后续的抗体孵育、洗膜及显色反应。显色反应后使用 Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系

统拍摄图片。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马酵母双杂交文库构建

2.1.1 西花蓟马 GAL cDNA 文库构建 提取的西花蓟马 RNA 其 OD_{260/280} 为 2.01, OD_{260/230} 为 1.86, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图如图 1 (A) 所示, 符合建库标准。将总 RNA 合成 cDNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳如图 1 (B) 所示。合成的 cDNA 经均一化处理, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳如图 1 (C) 所示。将所得的 cDNA 经限制性内切酶 Sfi 酶切, 去除短片后纯化, 溶解于 ddH₂O, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳如图 1 (D) 所示。

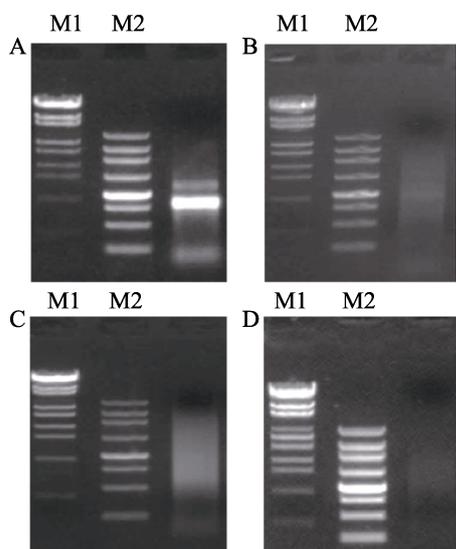


图 1 西花蓟马总 RNA (A) 合成 cDNA (B)、均一化 cDNA (C)、酶切后 cDNA (D) 电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of cDNA (B) synthesized by total RNA of *Frankliniella occidentalis* (A), normalized cDNA (C) and digested cDNA (D)

M1: Lambda EcoT14 digest; M2: 250 bp DNA ladder. 下同。The same below.

获得的酶切后 cDNA 与 pGADT7-Sfi 载体连接后经纯化精制, 得到初级 cDNA 文库。经检测, 得到的初级文库库容大于 5.6×10^6 cfu。其插入片段分布范围约 400-2 000 bp, 平均长度大于 1 000 bp (图 2), 重组率约为 100%。取初级文库的 96 个单克隆测序, 结果表明 96 个克隆测序结果中冗余序列为 1, 冗余率约为 1%。

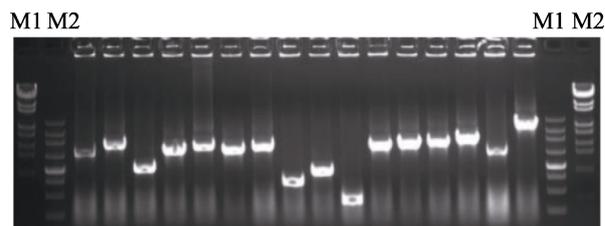


图 2 西花蓟马初级 cDNA 文库插入片段检测电泳图
Fig. 2 The electrophoretogram of amplification products of cDNA library of *Frankliniella occidentalis*

2.1.2 西花蓟马 Y187 酵母文库构建 通过库存检测数据, 进行初级 cDNA 文库的百万克隆扩增及质粒提取, 取 100 ng 扩增质粒进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 3 所示。扩增文库质粒转入 Y187 酵母感受态后, 计算其转化率为 5×10^6 cfu/ μ g (要求大于 1×10^5 cfu/ μ g)。检测其文库滴度为 2.97×10^8 , 符合筛库要求。

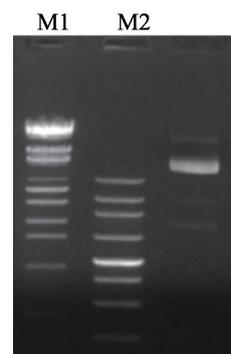


图 3 西花蓟马扩增文库质粒电泳图
Fig. 3 The electrophoretogram of amplified library plasmid of *Frankliniella occidentalis*

2.2 番茄斑萎病毒 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵蛋白载体构建

2.2.1 诱饵载体构建 将 pGBKT7 载体用 *Bam*H 及 *Eco*R I 进行双酶切, 双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后如图 4 (A), 目的带切胶回收。以带毒植物 RNA 合成的 cDNA 为模板, 用特异引物进行 PCR 反应, 得到的产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳如图 4 (B, C)。根据 In-fusion HD Cloning kit 说明书将 G_N 及 G_C 的 PCR 产物及线性化 pGBKT7 载体进行连接、转化并挑斑测序, 测序无误的质粒经扩增回收后备用。构建的诱饵载体 pGBKT7-GN 和 pGBKT7-GC 图谱如图 5 所示。

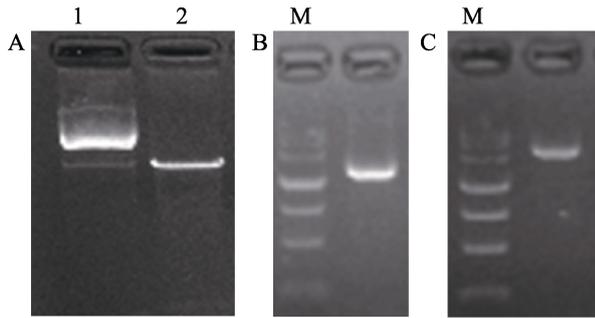


图 4 pGBKT7 双酶切产物 (A) 以及 G_N (B)、 G_C (C) PCR 产物电泳图

Fig. 4 The electrophoretogram of pGBKT7 double enzyme digestion production (A) and G_N (B), G_C (C) PCR production

A1: 未酶切 pGBKT7; A2: 酶切后 pGBKT7 产物;
M: DNA Marker
A1: Undigested pGBKT7; A2: Digested pGBKT7;
M: DNA Marker

2.2.2 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体在 Y2H Gold 酵母菌株中的自激活及毒性检测

将两个诱饵载体转入 Y2HGold 酵母菌株中涂布 3 种选择性平板,如图 6 所示,生长状况与对照诱饵载体一致,表明两个诱饵载体对 Y2HGold 酵母菌株无毒性且无自激活活性。

2.2.3 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体在 Y2HGold 酵母菌株中的表达检测

将带有 pGBKT7-GN 及 pGBKT7-GC 诱饵载体的 Y2HGold 酵母菌株摇菌培养后,提取总蛋白进行 Western blot,如图 7 所示,两个诱饵蛋白在 Y2HGold 菌株中均正确表达。

3 讨论

西花蓟马对 TSWV 具有独特的获毒传毒方式,即西花蓟马只有在 1 龄若虫期获毒后成虫期才能传毒,成虫期获毒则不能传毒 (van de Wetering *et al.*, 1996)。考虑到这一特点,本研究在构建该西花蓟马酵母双杂交文库时,所使用的试虫中约 50% 为 1 龄若虫。此外,试虫收集时,加入了部分 TSWV 病毒处理过的各龄期试虫,目的是为富集西花蓟马各龄期 TSWV 病毒侵染后所触发表达的蛋白。

本实验将 TSWV ssRNA-M 基因编码的西花蓟马获毒传毒相关的糖蛋白 G_N 和 G_C 的基因分别插入到 GAL 酵母双杂交系统的诱饵载体质粒 pGBKT7 上 构建了 pGBKT7-GN 和 pGBKT7-GC 两个诱饵质粒。后续实验结果表明,两个诱饵质粒对该系统的 Y2HGold 酵母菌株无毒性和自激活活性且能够表达出正确的诱饵蛋白,可用于筛选文库。在 GAL4 酵母双杂交系统中,互作的蛋白首先必须进入细胞核内,即诱饵蛋白必需是可溶性蛋白,而 G_N 和 G_C 均为膜蛋白,因此在构建诱饵载体时,参考 Whitfield 等 (2004) 的方法,在构建诱饵载体时,去掉了其信号肽、跨膜区及相邻的胞质尾区,保留了与西花蓟马中肠上皮细胞有互作的胞外区。Montero-Astúa 等 (2014) 研究表明在番茄植株中转入这种可溶性的 G_N -S 基因后,这种转基因植物所表达的 G_N -S 蛋白与 TSWV 病毒 G_N 膜蛋白竞争结合蓟

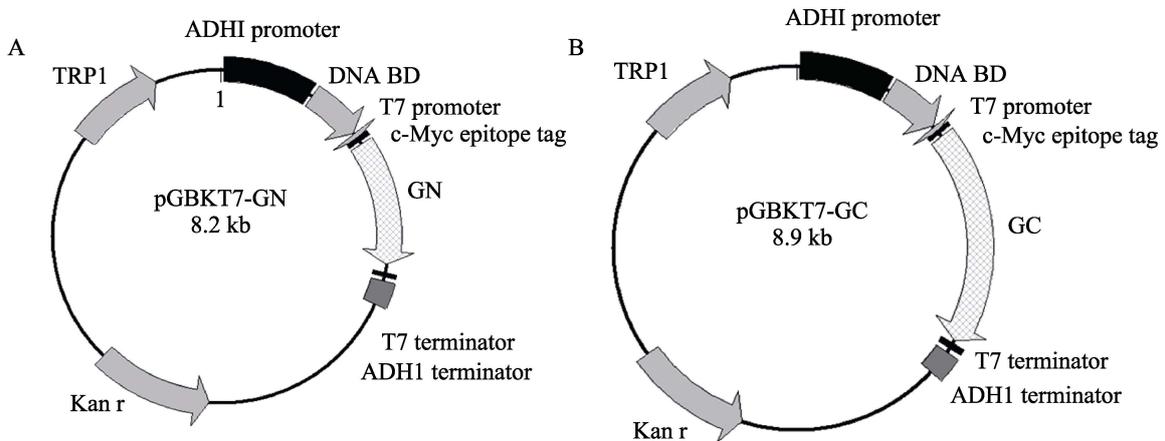


图 5 pGBKT7-GN (A) 和 pGBKT7-GC 质粒图谱 (B)
Fig. 5 The map of pGBKT7-GN (A) and pGBKT7-GC (B)

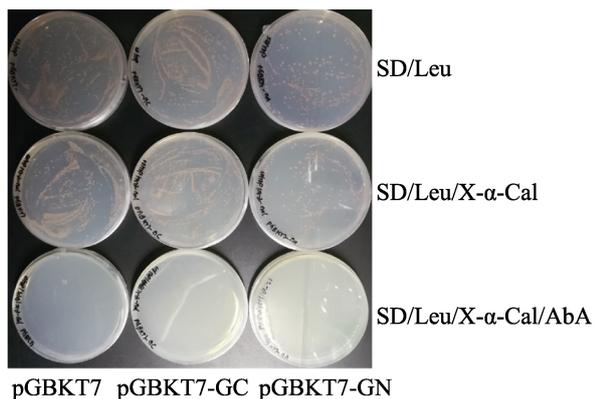


图 6 pGBKT7-GN 和 pGBKT7-GC 诱饵载体的毒性和自激活检测

Fig. 6 Detection of the toxicity and self-activation of pGBKT7-GN and pGBKT7-GC bait vectors

马中肠上皮细胞受体, 减少 TSWV 进入蓟马体内的数量从而使蓟马传毒效率降低 87%, 说明这种可溶性形式的 G_N 蛋白仍具有与蓟马受体蛋白识别的能力。

通过 GAL4 酵母双杂交系统筛选的蛋白可能存在一定假阳性, 需要通过其他方法进一步确认其互作关系, 如双分子荧光互补技术, 免疫共沉淀 (Co-IP) 技术以及 Pull-down 检测等方法。此外还可以利用 Split-ubiquitin 膜酵母双杂交系统构建另一套寻找 TSWV 病毒与蓟马互作蛋白的双杂交体系。本研究基于 GAL4 酵母双杂交系统构建了酵母文库及诱饵质粒, 在此基础上可通过后期的筛库实验筛选到西花蓟马与 TSWV 的互作候选蛋白。番茄斑萎病毒与其传毒寄主西花蓟马在协同进化过程中形成了其独特的获毒传毒机制, 通过构建传毒寄主酵母 cDNA 文库及病毒诱饵载体, 再用诱饵载体筛选出与病毒蛋白互作的传毒寄主因子, 可为明确 TSWV 与西花蓟马的互作机制从而为西花蓟马 TSWV 的防治提供新思路和新途径。

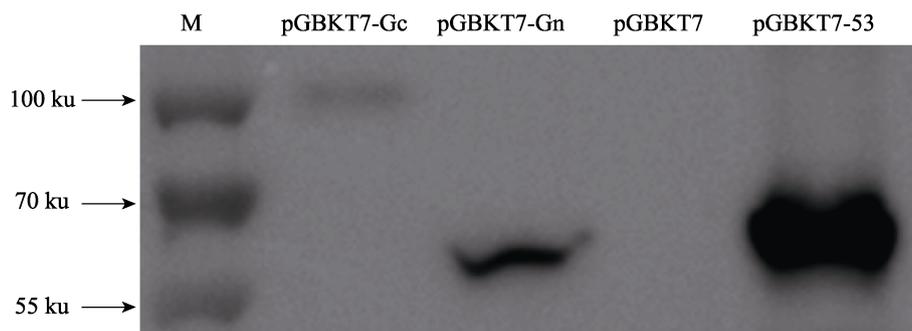


图 7 pGBKT7-GN 和 pGBKT7-GC 表达的 Western blot 检测

Fig. 7 Western blot detection for pGBKT7-GN and pGBKT7-GC bait vectors

pGBKT7: 空载对照; pGBKT7-53: 阳性对照, 其表达蛋白的大小约为 57 ku。

pGBKT7: Negative control; pGBKT7-53: Positive control, the size of the expressed protein is 57 ku.

参考文献 (References)

- Adkins S, 2000. Tomato spotted wilt virus positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1(3): 151–157.
- Fields S, Song O, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245–246.
- Jones DR, 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, 113(2): 119–157.
- Kikkert M, Meurs C, van de Wetering F, Dorfmüller S, Peters D, Kormelink R, Goldbach R, 1998. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology*, 88(1): 63–69.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips

- Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301–310.
- Lewis T, 1997. Thrips as Crop Pests. London: Cambridge Press. 1–13.
- Li S, Xiong RY, Wang XF, Zhou YJ, 2011. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between rice stripe virus and vector. *PLoS ONE*, 6(10): e26585.
- Lin L, Shi YH, Luo ZP, Lu YW, Zheng HY, Yan F, Chen J, Chen JP, Adams MJ, Wu YF, 2009. Protein-protein interactions in two potyviruses using the yeast two-hybrid system. *Virus Research*, 142(1/2): 36–40.

- Medeiros RB, Ullman DE, Sherwood JL, German TL, 2000. Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: a candidate receptor component for a tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. *Virus Research*, 67(2): 109–118.
- Montero-Astúa M, Rotenberg D, Leach-Kieffaber A, Schneweis BA, Park S, Park JK, German TL, Whitfield AE, 2014. Disruption of vector transmission by a plant-expressed viral glycoprotein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3): 296–304.
- Morin S, Ghanim M, Sobol I, Czosnek H, 2000. The Gro EL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 276(2): 404–416.
- Moritz G, Kumm S, Mound L, 2004. *Tospovirus* transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*, 100(1): 143–149.
- Nagata T, Inoue-Nagata AK, Prins M, Goldbach R, Peters D, 2000. Impeded thrips transmission of defective *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Phytopathology*, 90(5): 454–459.
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD, 2011. Top 10 plant virus in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938–954.
- Seo JK, Hwang SH, Kang SH, Choi HS, Lee SH, Sohn SH, Kim KH, 2007. Interaction study of soybean mosaic virus proteins with soybean proteins using the yeast-two hybrid system. *The Plant Pathology Journal*, 23(4): 281–286.
- Ullman DE, Medeiros RB, Campbell LR, Whitfield AE, Sherwood JL, German TL, 2002. Thrips as vectors of tospoviruses. *Advances in Botanical Research*, 36(1): 113–140.
- van de Wetering F, Goldbach R, Peters D, 1996. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology*, 86(9): 900–905.
- Wang HH, Lei ZR, Li X, Dai AG, Chen HQ, 2013. An important invasive pest, *Frankliniella occidentalis*, inspected in Tibet. *Plant Protection*, 39(1): 181–183. [王海鸿, 雷仲仁, 李雪, 代安国, 陈翰秋, 2013. 西藏发现重要外来入侵害虫——西花蓟马. *植物保护*, 39(1): 181–183.]
- Whitfield AE, Ullman DE, German TL, 2004. Expression and characterization of a soluble form of *tomato spotted wilt virus* glycoprotein G_N. *Journal of Virology*, 78(23): 13197–131206.
- Whitfield, AE, Ullman DE, German TL, 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1): 459–489.
- Wijkamp I, van Lent J, Kormelink R, Kormelink R, Godbach R, Peters D, 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, 74(3): 341–349.
- Wu QJ, Xu BY, Zhang ZJ, Zhang YJ, Zhu GR, 2007. Distribution and species of thrips in Beijing, Zhejiang, Yunnan region. *China Plant Protection*, 27(1): 32–34. [吴青君, 徐宝云, 张治军, 张友军, 朱国仁, 2007. 京、浙、滇地区植物蓟马种类及其分布调查. *中国植保导刊*, 27(1): 32–34.]
- Yuan CM, Zhi JR, Li JZ, Zhang Y, 2008. The distribution and integrated management of vegetables thrips in Guizhou Province. *Hubei Agricultural Science*, 47(12): 1442–1444. [袁成明, 鄧军锐, 李景柱, 张勇, 2008. 贵州省蔬菜蓟马的种类、分布及综合防治. *湖北农业科学*, 47(12): 1442–1444.]
- Zhang YJ, Wu QJ, Xu BY, Zhu GR, 2003. Dangerous invasive pest-*Frankliniella occidentalis* occurred in Beijing. *Plant Protection*, 29(4): 58–59. [张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物-西花蓟马在北京发生危害. *植物保护*, 29(4): 58–59.]
- Zhang YJ, Zhu GR, Chu D, Wu QJ, Wang SL, 2011. Occurrence, damage and control of important invasive insect pests on the vegetable crops in China. *Plant Protection*, 37(4): 1–6. [张友军, 朱国仁, 褚栋, 吴青君, 王少丽, 2011. 我国蔬菜作物重大入侵害虫发生、危害与控制. *植物保护*, 37(6): 1–6.]
- Zhang ZJ, Zhang PJ, Li WD, Zhang JM, Huang F, Yang J, Bei YW, Lu YB, 2013. *De novo* transcriptome sequencing in *Frankliniella occidentalis* to identify genes involved in plant virus transmission and insecticide resistance. *Genomics*, 101(5): 296–305.
- Zheng CY, Liu YH, Zhang NQ, Zhao XL, 2007. Invaded insect pest-*Frankliniella occidentalis* first reported in Shandong province. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 24(3): 172–174. [郑长英, 刘云虹, 张乃芹, 赵希丽, 2007. 山东省发现外来入侵有害生物-西花蓟马. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 24(3): 172–174.]