

利用番茄 cDNA 酵母双杂交文库筛选 Pti4 互作蛋白

王洋, 张政, 王莹莹, 冯国栋, 陈丹阳, 周宇, 牛向丽* (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 以番茄的根、叶、花及不同发育时期的果实提取 RNA, 构建酵母双杂交文库。经检测, 文库容量为 1.1×10^7 CFU, 阳性率大于 95%, 插入片段平均长度大于 1 000 bp, 可用于互作蛋白的筛选。依据番茄抗病途径相关基因 *Pti4* 编码序列设计引物, 构建重组诱饵载体并转化酵母菌, 筛选与 *Pti4* 相互作用的蛋白质。经初步检测获得 6 个可能与 *Pti4* 互作的转录因子, 为进一步研究番茄 *Pti* 基因的作用机制提供了基础。

关键词 番茄; 酵母双杂交; *Pti4*; 文库筛选; 蛋白质相互作用

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)18-0111-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.18.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening of *Pti4* Interaction Proteins by Using Yeast Two-hybrid cDNA Library of Tomato

WANG Yang, ZHANG Zheng, WANG Ying-ying et al (School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract RNA was extracted from tomato roots, leaves, flowers and fruits at different development stages to construct yeast two-hybrid library. The detection showed 1.1×10^7 CFU of total capacity of the library, and the positive rate was greater than 95% with average length of inserted fragments longer than 1 000 bp. According to the coding sequence of tomato disease-resistant *Pti4* gene, primers were designed and the recombinant bait vector was constructed, then transformed into yeast to screen the proteins interacting with *Pti4*. The preliminary screening indicated that six transcription factors might interact with *Pti4*, which provided a basis for further investigation on the mechanism of *Pti* genes in tomato.

Key words Tomato; Yeast two-hybrid; *Pti4*; Library screening; Protein interaction

番茄(*Solanum lycopersicum*)作为广泛种植的果蔬类经济作物,同时也是研究果实发育、营养品质调控,以及细菌性病害的模式植物^[1-2]。斑点病是番茄种植生产过程中的主要细菌性病害。从抗病品种中通过图位克隆方法获得了番茄抗病基因 *Pto* (*P.s.pv.tomato*), *Pto* 可以识别病原菌注入植物细胞的效应蛋白、触发下游防御反应,在番茄的抗病过程中发挥着关键作用^[3]。因此,对 *Pto* 介导抗病防御途径的研究有重要意义。利用酵母双杂交, *Pto* 被发现可以与 3 个转录因子相互作用,它们被命名为 *Pto* interaction protein (*Pti*), 即 *Pti4*、*Pti5* 和 *Pti6*^[4-6]。该课题组也进一步利用植物表达系统验证了它们在植物体内的相互作用^[7]。但对 *Pti* 基因的作用机制仍缺乏深入了解。

已有的研究报道认为, *Pti* 可能是 *Pto* 途径下游基因,可以与许多病程相关基因的启动子 GCC box 元件特异结合,激活病程相关基因的表达^[8-9],同时, *Pti* 编码产物类似于烟草乙烯反应元件结合蛋白^[10],而乙烯作为一种植物激素,具有促进果实成熟、参与植物抗病免疫反应等广泛的调控作用^[11]。因此, *Pti4/5/6* 的发现意味着抗病基因与植物激素、基础防御基因,以及生长发育调控之间的必然联系。在拟南芥中转入 *Pti4* 基因,增强了植株对病原细菌的抵抗能力,对真菌致病菌的耐受能力也明显提高。与野生型拟南芥幼苗相比,在不含乙烯时, *Pti4* 过表达幼苗下胚轴的生长受到抑制,在乙烯反应突变体 *ctr* 中, *Pti4* 转化植株幼苗没有表现出根系生长的严重抑制或明显的顶端弯钩。因此, *Pti4* 的表达似乎激活了乙烯的部分应答^[6]。这些结果提示 *Pti4* 基因可

能参与番茄抗病防御、生长发育等多个过程,但近年来对 *Pti* 基因的研究较少。在高等植物中很多转录因子与其他蛋白质相互作用,共同实现对植物生命活动的精细调控。除了 *Pto* 蛋白, *Pti* 的互作蛋白信息也还未见报道。该研究将利用番茄的根、叶、花,以及不同时期的果实用于构建酵母双杂交 cDNA 文库,通过文库筛选获得 *Pti* 互作蛋白信息,以利于后续对其分子作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。所用的野生型番茄品种 AC⁺ 来自美国康奈尔大学 THOMPSON 植物研究所,由该实验室繁育保存。收集番茄根、叶、花、果实组织,用于构建酵母双杂交文库。

1.1.2 菌株与载体。大肠杆菌菌株 *E.coli* 菌株 DH5 α 、KC8, 酵母菌株 EGY48, 以及 pEG202、pJG4-5 载体,由该实验室保存。

1.1.3 试剂与药品。质粒提取试剂盒(Qiagen), Oligotex mRNA Kit (Qiagen), Trizol (Invitrogen)、反转录酶(Invitrogen), DNA 连接酶(NEB), 限制性内切酶(Takara), DNA 聚合酶(Takara), 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷(X-gal, Sigma-Aldrich), 聚乙二醇 3350 (PEG3350, Sigma-Aldrich), 鲑鱼精 DNA (Carrier DNA, Sigma-Aldrich), 酵母氮源[Yeast nitrogen base without amino acid, 生工生物工程(上海)股份有限公司], 棉籽糖[Raffinose, 索莱宝(北京)科技有限公司], 半乳糖[Galactose, 索莱宝(北京)科技有限公司], 葡萄糖[Glucose, 索莱宝(北京)科技有限公司], 醋酸锂[LiAc, 生工生物工程(上海)股份有限公司], 氨基酸[包括色氨酸、组氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸, 所有氨基酸均购于生工生物工程(上海)股份有限公司]。所有试剂与药品均为国外原装或国产分析纯。

作者简介 王洋(1995—), 男, 山东日照人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。* 通信作者, 教授, 从事植物分子生物学方面研究。

收稿日期 2019-05-05

1.2 方法

1.2.1 番茄酵母双杂交 cDNA 文库构建。取野生型番茄品种 AC⁺ 植株的根、叶、花、果实(包括未成熟期、绿熟期、转色期、转色后 10 d, 4 个不同时期), 分别液氮研磨提取 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度与质量。根据 Oligotex mRNA Kit 说明分离纯化 mRNA, 并按 RNA 浓度将各组织样品等量混合, 反转录合成 cDNA 用于建库。

按照 Clontech 公司酵母双杂交文库构建方法, 继续将合成的双链 cDNA 加 5' 接头, 并进行均一化处理。再利用同源重组方法, 将纯化的双链 cDNA 与酶切的双杂交 pJG4-5 载体进行连接, 连接产物纯化后电转化大肠杆菌感受态细胞。

取转化菌液 10 μ L 稀释 100 倍, 从中取出 10 μ L 涂布于加入氨苄青霉素的培养板。统计培养皿上生长的克隆数, 计算文库容量(每皿平均克隆数/涂布体积 \times 稀释倍数 \times 转化体积)。挑取平板上的单克隆, 通过载体特异引物 PJG4-5-F: CCAGCCTCTTGCTGACTGGAGATG、PJG4-5-R: AAGCCGCAACCTTGATTGGAG 进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 鉴定阳性率及插入片段大小。

1.2.2 Pti4 载体构建与酵母转化。根据番茄 *Pti4* 基因(AK319979) 编码区序列设计引物: Pti4-FSacII: TCCCGCGGATGGATCAACAGTTACCACCG; Pti4-RApaI: CATGGCCCT-TAAATGACCAATAGTTGAT GGACACC, 分别引入 *Sac*II、*Apa*I 酶切位点。以番茄叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 将预期大小扩增条带进行胶回收, 连接于载体 pEG202, 转化大肠杆菌。经酶切鉴定、测序, 构建 pEG202-Pti4 钓饵(bait) 载体。

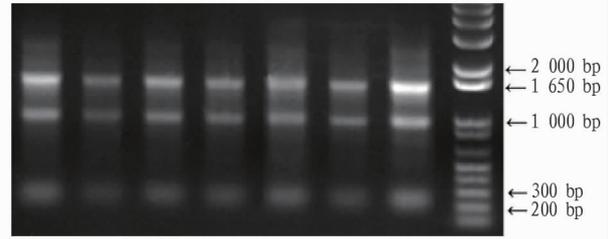
利用 PEG/LiAc 法将 pEG202-Pti4 载体转化酵母 EGY48 感受态, 并对酵母单克隆进行 PCR 菌落鉴定。将转化酵母单克隆划线于带有 X-gal 的培养基进行显色^[13], 检测诱饵载体 pEG202-Pti4 是否对酵母细胞具有毒性, 以及是否具有直接激活报告基因的自激活活性。

1.2.3 酵母双杂交文库筛选 Pti4 互作蛋白。以带有 pEG202-Pti4 质粒的酵母细胞制备感受态。参照 Golemis 等^[3] 所述文库筛选试验方法将上述酵母感受态细胞与所构建文库的质粒、carrier DNA 按比例混合、分装后, 用涂布棒均匀涂布于三缺(-His/-Trp/-Ura) 固体培养基上, 培养生长至单克隆出现, 将菌体刮下加等量甘油保存。取少量上述转化菌液培养后进行梯度稀释分别涂布于四缺(-His/-Trp/-Ura/-Leu) 固体培养基, 待酵母单克隆生长后转移至新的四缺固体培养基。然后再将所生长酵母单克隆转移至三缺固体培养基进行封闭, 最后将酵母单克隆转至含 X-gal 的显色固体培养基, 观察 *LacZ* 及 *Leu* 报告基因的表达情况, 蓝色克隆即为阳性克隆。将阳性克隆进行酵母质粒抽提, 质粒电转化 *E. coli* 菌株 KC8 (仅转入文库质粒的转化菌才能生长)。经菌落 PCR 鉴定 KC8 阳性, 提取质粒用于酵母双杂交验证和测序。对测序获得的文库插入序列进行 Blast 比对分析。

2 结果与分析

2.1 番茄 cDNA 酵母双杂交文库的构建 将野生型番茄 AC⁺ 植株的根、叶、花、不同生长发育时期果实(包括未成熟

期、绿熟期、转色期、转色后 10 d), 分别液氮研磨提取 RNA。琼脂糖凝胶电泳显示, RNA 条带清晰, 核糖体条带清晰且完整(图 1)。RNA 浓度均大于 300 ng/ μ L, A₂₆₀/A₂₈₀ 为 2.01~2.08, 显示 RNA 质量良好, 可用于 mRNA 分离和反转录。



注: 从左至右分别为番茄果实(未成熟期、绿熟期、转色期、转色后 10 d)、根、叶、花组织的 RNA 电泳结果

Note: RNA electrophoresis results of tomato fruits (immature stage, green maturity stage, color conversion stage, 10 days after color conversion), roots, leaves and flowers were obtained from left to right, respectively

图 1 番茄组织 RNA 提取

Fig.1 RNA extraction from tomato tissues

双链 cDNA 加 5' 接头、均一化处理后与 pJG4-5 载体进行连接, 连接产物经纯化后转化大肠杆菌感受态细胞。取 10 μ L 转化菌液稀释 100 倍后取 10 μ L 涂布于加入氨苄青霉素的培养板。培养皿平均生长克隆数为 210, 计算文库容量为: 每皿平均克隆数(210 个)/涂布体积(10 μ L) \times 稀释倍数(100 倍) \times 转化体积(5 000 μ L) = 1.1×10^7 CFU。随机挑取 24 个克隆, 以载体特异引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示均有扩增产物, 插入片段平均长度大于 1 000 bp。结果表明, 所构建酵母双杂交文库质量满足要求。

2.2 Pti4 基因酵母双杂交载体构建 以番茄叶片 cDNA 为模板, *Pti4* 基因编码区序列特异引物扩增得到 702 bp 预期大小 PCR 产物, 纯化后经 *Sac* II、*Apa* I 酶切、胶回收, 连接于 pEG202 载体, 并转化大肠杆菌。经酶切鉴定、测序, 结果表明获得 pEG202-Pti4 钓饵载体(图 2)。将 pEG202-Pti4 载体转化酵母菌株 EGY48 感受态, 并对酵母单克隆进行 PCR 菌落鉴定。阳性转化酵母单克隆划线于 X-gal 显色培养基, 28 $^{\circ}$ C 生长 2 d 后酵母克隆正常生长, 且未显示蓝斑。表明 *Pti4* 的转入并未对酵母细胞显示毒性, 在不转入其他外源基因时 *Pti4* 对报告基因也不具有激活活性。

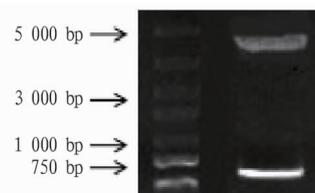


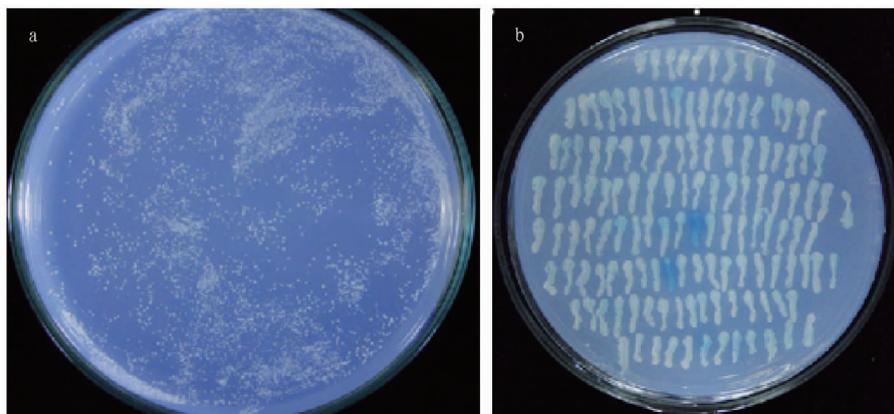
图 2 pEG202-Pti4 载体酶切鉴定

Fig.2 Enzyme digestion identification of pEG202-Pti4 vector

2.3 Pti4 互作蛋白的筛选 按照酵母双杂交文库筛选操作步骤, 以 pEG202-Pti4 转化酵母细胞制备感受态, 然后转入文库质粒, 在培养板上可以看到大量共转化克隆生长(图 3a)。将共转化克隆收集后涂布至四缺固体培养基, 再转移

至三缺固体培养基,最后将酵母单克隆移至 X-gal 固体培养基,观察报告基因的表达情况。28 ℃ 培养 24 h 后开始有蓝

色克隆(图 3b)出现,即为阳性克隆。



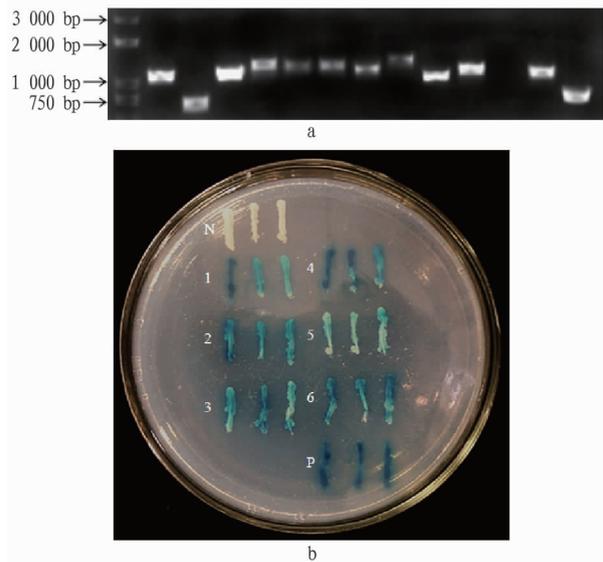
注:a 为在三缺固体培养基上生长的阳性共转化子;b 为在含 X-gal 的四缺固体培养基上生长的酵母单克隆

Note:a is a positive co-transformant grown on three-deficient solid medium;b is a yeast monoclonal grown on a four-deficient solid medium containing X-gal

图 3 Pti4 互作蛋白的筛选

Fig.3 Screening of interaction proteins with Pti4

蓝色单克隆经菌落 PCR 鉴定 KC8 阳性克隆,提取质粒用于 PCR 扩增鉴定,结果如图 4a 所示,根据阳性克隆插入片段大小、酶切情况,去除重复克隆,然后将阳性克隆质粒进行测序(表 1)和酵母回补试验。测序比对结果显示,有 6 个基因注释为转录因子,它们在酵母系统中可以与 Pti4 相互作用,激活报告基因的表达(图 4b)。



注:a 为阳性克隆的 PCR 鉴定结果;b 为 Pti4 与文库筛选转录因子蛋白的相互作用;1~6 为 pEG202-Pti4+pJG4-5-筛选转录因子;P 为阳性对照;N 为阴性对照,pEG202-Pti4

Note:a is the PCR identification result of the positive clone;b is the interaction between Pti4 and the library screening transcription factor protein;1-6 is the pEG202-Pti4+pJG4-5-screening transcription factor;P is the positive control;N is the negative control,pEG202-Pti4

图 4 阳性克隆 PCR 鉴定及酵母回补试验

Fig.4 PCR identification of positive clones and yeast replenishment test

3 讨论

20 世纪 90 年代酵母双杂交技术兴起,成为研究蛋白质之间相互作用的一种有效手段^[18]。该方法是基于观察到真核生物转录因子有 2 个可分离的结构域:DNA 结合结构域(Binding domain, BD)、激活结构域(Activating domain, AD)。DNA 结合域负责转录因子在特定基因组 DNA 序列上的结合,激活域的功能则是促进基因的转录。BD 和 AD 并非一定要存在于同一蛋白质中才能发挥作用,这 2 个结构域在物理上是可分离的,当 2 个结构域非常接近时,目标基因的转录激活也会发生^[19-20]。由此,通过检测报告基因的激活表达情况来标示蛋白质之间是否存在相互作用。在此基础上,通过选择不同组织、发育阶段、诱导处理生物材料,对其所转录全部 mRNA 进行反转录获得 cDNA 片段与载体连接,形成特定条件下功能基因克隆的集合,构建酵母双杂交 cDNA 文库^[21-22],使酵母双杂交技术不仅能检测已知蛋白质间的互作^[7],还可从酵母文库中批量筛选与已知蛋白互作的未知蛋白^[23],进而探究蛋白质间的互作及其所调控生命活动。构建高质量文库是筛选互作蛋白的前提和保障。该研究所构建番茄 cDNA 酵母双杂交文库容量、插入片段大小及阳性率检测结果均符合文库筛选的要求。

笔者进一步以番茄 Pti4 为诱饵蛋白进行互作蛋白文库筛选,初步获得了 6 个可能与 Pti4 互作的转录因子。它们涉及植物成熟、生长发育、环境胁迫应答等多种调控途径,这也与 Pti4 在番茄中的推测作用机制相吻合。当然,这些筛选靶标蛋白是否在植物体内能够与 Pti4 相互作用,还需后续试验在植物体系中进行验证,但仍提供了新的研究线索。而且,由于 Pti4/5/6 基因具有功能机制的相似性,该研究也为 Pti 基因在免疫防御、果实发育等方面功能机制研究奠定了基础。

表1 酵母双杂交文库筛选获得与Pti4互作转录因子及其功能推测

Table 1 Screening of yeast two-hybrid library to obtain transcription factor interacting with Pti4 and its functional prediction

| 序号 Serial number | 基因登录号 Gene accession number | 基因名 Gene name | 推测功能 Speculative function |
|---------------------|--------------------------------|--|--|
| 1 | NM_001247756 | ripening regulated protein DDTFR8 | 数据库注释为成熟调控蛋白 |
| 2 | XM_004239162 | REF/SRPP-like protein | 在机械伤害、外源乙烯利和茉莉酸刺激信号中发挥作用;在橡胶中,是天然橡胶生物合成的主要调控因子 ^[13] |
| 3 | XM_004229984 | U-box domain-containing protein 11 | U-box 结构域蛋白可以作为 E3 泛素连接酶,在植物中发挥多种调控功能 ^[14] |
| 4 | XM_010324112 | zinc finger protein ZAT5-like | C2H2 型锌指转录因子蛋白,在拟南芥中 ZAT5 可被过氧化氢诱导 ^[15] |
| 5 | NM_001279188 | GAGA-binding transcriptional activator | 所结合 DNA 序列含有 GA 重复片段,称为 GAGA 结合转录因子 ^[16] |
| 6 | XM_010317060 | proline-rich protein 4-like | 脯氨酸富含蛋白 PRR4;在拟南芥中 PRR 是发育和抗逆的重要调控蛋白 ^[17] |

参考文献

- [1] 蔡义勇, 巩振辉. 番茄细菌性斑点病的发生和防治[J]. 西北园艺(蔬菜专刊), 2007(6): 21.
- [2] 许志刚, 沈秀萍, 胡白石. 番茄上两种细菌性病害的诊断与防治[J]. 植物检疫, 2007, 21(1): 53-56.
- [3] ZHOU J M, TANG X Y, MARTIN G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [4] TANG X Y, XIE M T, KIM Y J, et al. Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance[J]. The plant cell, 1999, 11(1): 15-29.
- [5] BOGDANOVA A J. Pto update: Recent progress on an ancient plant defence response signalling pathway[J]. Molecular plant pathology, 2002, 3(4): 283-288.
- [6] GU Y Q, WILDERMUTH M C, CHAKRAVARTHY S, et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2002, 14(4): 817-831.
- [7] RAJAGOPALA S V, UETZ P. Analysis of protein-protein interactions using array-based yeast two-hybrid screens[J]. Methods in molecular biology, 2009, 548: 223-245.
- [8] ZHOU J M, TANG X Y, MARTIN G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [9] BOGDANOVA A J. Pto update: Recent progress on an ancient plant defence response signalling pathway [J]. Molecular plant pathology, 2002, 3(4): 283-288.
- [10] SUZUKI K, SUZUKI N, OHME-TAKAGI M, et al. Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting [J]. Plant journal, 1998, 15(9): 657-665.
- [11] SOLANO R, STEPANOVA A, CHAO Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 [J]. Genes and development, 1998, 12(23): 3703-3714.
- [12] GOLEMIS E A, SEREBRIISKII I, FINLEY R L, et al. Interaction trap/ two-hybrid system to identify interacting proteins[J]. Current protocols in protein science, 2001-05 [2019-01-20]. <http://www.doc.88.com/p-9763188181594.html>. doi: 10.1002/0471143030.cb1703s08.
- [13] TONG Z, WANG D, SUN Y, et al. Comparative proteomics of rubber latex revealed multiple protein species of REF/SRPP family respond diversely to ethylene stimulation among different rubber tree clones [J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(5): 958-972.
- [14] ARLANI P, VANDELLE E, WONG D, et al. Comprehensive workflow for the genome-wide identification and expression meta-analysis of the ATL E3 ubiquitin ligase gene family in grapevine [J]. Journal of visualized experiments, 2017, 19(130): 3874-3892.
- [15] ECCO G, IMBEAULT M, TRONO D. KRAB zinc finger proteins [J]. Development, 2017, 144(15): 2719-2729.
- [16] KIM S W, HO S C, HONG S J, et al. A Novel mechanism of thyroid hormone-dependent negative regulation by thyroid hormone receptor, nuclear receptor corepressor (NCoR), and GAGA-binding factor on the rat CD44 promoter [J]. Journal of biological chemistry, 2005, 280(15): 14545-14555.
- [17] ZHAN X Q, WANG B S, LI H J, et al. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2012, 109(44): 18198-18203.
- [18] 杨金丽, 赵小明, 尹恒, 等. 酵母双杂交筛选 OIPK 相互作用蛋白[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(4): 474-477.
- [19] PARRISH J R, GULYAS K D, FINLEY R L. Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping [J]. Current opinion in biotechnology, 2006, 17(4): 387-393.
- [20] IZUMI K M. The yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins [J]. Methods in molecular biology, 2001, 174: 249-258.
- [21] 雷海英, 白凤麟, 段永红, 等. 玉米酵母双杂交 cDNA 文库的构建及 ZmCEN 互作蛋白的筛选[J]. 西北植物学报, 2018, 38(4): 598-606.
- [22] 赵倩倩, 周晓今, 陈茹梅. 玉米籽粒酵母双杂交 cDNA 文库的构建及 ZmSCL1 互作因子筛选[J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 99-107.
- [23] MEHLA J, CAUFIELD J H, UETZ P. The yeast two-hybrid system: A tool for mapping protein-protein interactions[J]. Cold spring harbor protocols, 2015(5): 425-430.
- [1] 蔡义勇, 巩振辉. 番茄细菌性斑点病的发生和防治[J]. 西北园艺(蔬菜专刊), 2007(6): 21.
- [2] 许志刚, 沈秀萍, 胡白石. 番茄上两种细菌性病害的诊断与防治[J]. 植物检疫, 2007, 21(1): 53-56.
- [3] ZHOU J M, TANG X Y, MARTIN G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [4] TANG X Y, XIE M T, KIM Y J, et al. Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance[J]. The plant cell, 1999, 11(1): 15-29.
- [5] BOGDANOVA A J. Pto update: Recent progress on an ancient plant defence response signalling pathway[J]. Molecular plant pathology, 2002, 3(4): 283-288.
- [6] GU Y Q, WILDERMUTH M C, CHAKRAVARTHY S, et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2002, 14(4): 817-831.
- [7] RAJAGOPALA S V, UETZ P. Analysis of protein-protein interactions using array-based yeast two-hybrid screens[J]. Methods in molecular biology, 2009, 548: 223-245.
- [8] ZHOU J M, TANG X Y, MARTIN G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [9] BOGDANOVA A J. Pto update: Recent progress on an ancient plant defence response signalling pathway [J]. Molecular plant pathology, 2002, 3(4): 283-288.
- [10] SUZUKI K, SUZUKI N, OHME-TAKAGI M, et al. Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting [J]. Plant journal, 1998, 15(9): 657-665.
- [11] SOLANO R, STEPANOVA A, CHAO Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 [J]. Genes and development, 1998, 12(23): 3703-3714.
- [12] GOLEMIS E A, SEREBRIISKII I, FINLEY R L, et al. Interaction trap/ting the evolution of antibiotic resistance [J]. PLoS Biology, 2005, 3(6): 1024-1033.
- [10] BEABER J W, HOCHHUT B, WALDOR M K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes [J]. Nature, 2004, 427(6969): 72-74.
- [11] WANG H H, MANUZON M, LEHMAN M, et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(2): 226-231.
- [12] WANG H H, SCHAFFNER D W. Antibiotic resistance: How much do we know and where do we go from here? [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(20): 7093-7095.
- [13] 吴锦艳, 尚佑军, 田宏, 等. 2007—2014 国内外小反刍兽疫流行现状及分析[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(4): 687-693.
- [14] 李玉杰, 王庆伟, 陈志飞. 现代规模化猪场生物安全体系的规划建设[J]. 养猪, 2018(6): 73-76.

(上接第 102 页)