

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01439

玉米中 *QM* 同源基因的克隆及其差异表达分析

王会伟 李洪杰 朱振东 武小菲 王晓鸣*

中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

摘要: 利用 cDNA-AFLP 和 5' RACE 技术在玉米自交系黄早四 *Ht2* 上分离并克隆了 *QM*(编码核糖体蛋白 L10)同源基因(命名为 *ZmQM*)。其 cDNA 全长为 967 bp, 开放阅读框为 738 bp。该基因编码 245 个氨基酸的 *ZmQM* 蛋白, 分子量为 27.78 kD, 等电点为 10.69, 预测含蛋白酶 C 磷酸化位点、N-酰基化位点和酰胺化等位点。玉米 *ZmQM* 蛋白与包括人类等 13 个物种 *QM* 蛋白的同源性比较发现, 氨基酸序列相似性为 66%~92%。RT-PCR 分析表明, 在接种玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*) 1 号小种 12 h 后, 黄早四 *Ht2* 中 *ZmQM* 基因表达量较黄早四中明显上调, 推测 *ZmQM* 基因可能参与黄早四 *Ht2* 对玉米大斑病菌 1 号小种的抗性反应。

关键词: *QM* 基因; 核糖体蛋白 L10; *ZmQM* 基因; 黄早四 *Ht2*; *Exserohilum turcicum*

Cloning and Differential Expression of *QM*-Like Protein Homologue from Maize

WANG Hui-Wei, LI Hong-Jie, ZHU Zhen-Dong, WU Xiao-Fei, and WANG Xiao-Ming*

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Beijing 100081, China

Abstract: A full-length *QM*-like cDNA (designated *ZmQM*) was cloned from maize (*Zea mays* L.) leaf tissues using cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The expression of *ZmQM* was examined in leaves of the *Ht2* isogenic lines Huangzaosi and Huangzaosi*Ht2* carrying gene *Ht2* for resistance to northern corn leaf blight after inoculation with race 1 of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs. Gene *ZmQM* contains an open reading frame 738 bp in length, which encodes 245 amino acids with a predicted molecular weight of 27.78 kD and an isoelectric point of 10.69. Scanning PROSITE motifs indicated that the amino acid sequence of *ZmQM* protein includes a Ribosomal protein L10e signature, an N-glycosylation site, four protein kinase C phosphorylation sites, a casein kinase II phosphorylation site, a tyrosine kinase phosphorylation site, an N-myristoylation site, and an amidation site. The nucleotide sequence of *ZmQM* shared 66–92% identity to *QM* genes isolated from other species. RT-PCR analysis showed that the expression of gene *ZmQM* was up-regulated in Huangzaosi *Ht2* at 12 h after inoculation with race 1 of *E. turcicum* compared with that in Huangzaosi. By inference, *ZmQM* protein may be involved in response of Huangzaosi*Ht2* to inoculation by *E. turcicum* race 1.

Keywords: *QM* gene; Ribosomal protein L10; *ZmQM* gene; Huangzaosi *Ht2*; *Exserohilum turcicum*

玉米大斑病(northern corn leaf blight, NCLB)是由玉米大斑突脉蠕孢菌[*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs]引起的, 是玉米上重要的叶部病害。防治玉米大斑病最为经济、安全、有效的方法是种植抗病品种。近年来, 随着植物分子生物学技

术的发展和应用, 农作物分子育种成为作物遗传育种新的生长点。因此, 对抗病基因的克隆和功能的研究十分重要。

自从 1961 年 Hooker 发现并鉴定出 *Ht1* 基因后^[1], 国内外许多学者在大斑病抗性基因的发掘、鉴定和

本研究由农业部作物种质资源保护项目(NB08-2130135-(25-30)-21)和国家科技支撑计划项目(2006BAD08A06)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王晓鸣, E-mail: wangxm@mail.caas.net.cn

第一作者联系方式: E-mail: whuiwei@163.com

Received(收稿日期): 2009-02-10; Accepted(接受日期): 2009-03-14.

定位方面做了大量工作。迄今, 已报道了 *Ht1*^[1]、*Ht2*^[2]、*Ht3*^[3]、*HtN*^[4]、*HtM*^[5]、*HtP*^[6]、*ht4*^[7] 和 *rt*^[6] 等 8 种大斑病抗性基因, 并对 *Ht1*、*Ht2*、*Ht3* 和 *HtN* 进行了连锁图定位或者原位杂交定位, 部分标记已经应用于品种抗病基因检测。但有关大斑病抗性基因或其抗性相关基因的克隆未见报道。

Ht2 是一个发现较早, 研究较多的大斑病抗性基因, 且对目前我国玉米大斑病原菌优势小种——1号小种^[8](毒力公式 *Ht2Ht3HtN/Ht1*)具有抗性。因此, *Ht2* 基因对玉米抗大斑病育种具有重要的意义。本研究利用 cDNA-AFLP 技术分析了玉米近等基因系黄早四和黄早四 *Ht2* 受玉米大斑病菌 1 号小种侵染后的差异表达, 从黄早四 *Ht2* 上获得了 *QM* 基因的相似序列(GenBank 登录号为 U06108), 利用 5'RACE 技术获得了其全长 cDNA, 命名为 *ZmQM*, GenBank 登录号为 FJ600320, 对其编码的蛋白质性质进行了分析, 并利用 RT-PCR 技术分析了玉米 *QM* 基因在黄早四和黄早四 *Ht2* 接种玉米大斑病菌 1 号小种后的表达情况。

1 材料与方法

1.1 玉米种植与取样

供试玉米为黄早四(HZS)和黄早四 *Ht2* (HZSHt2) 近等基因系。在(30±3)℃的温室中, 待幼苗生长至五叶期时, 选取在 PDA 平板培养基上生长 1 周且产孢好的玉米大斑菌(*E. turcicum*) 1 号小种, 用打孔器取直径 1 cm 的菌饼分别接种于玉米第 4 叶上, 在每个叶片中脉的一侧接 3 个菌饼, 分别于接种后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取叶片中脉另一侧组织, 迅速放入液氮中, 然后保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 RNA 的提取与双链 cDNA 合成

参照 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent Kit 提供的

方法提取总 RNA, 参照 cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 中国大连)提供的方法合成双链 cDNA。

1.3 cDNA-AFLP 分析及差异条带序列相似性分析

采用 Bachem 等^[9]所述的方法进行 cDNA-AFLP 分析。对差异表达条带进行回收, 并克隆到 pGM-T (Tiangen, 中国北京)载体上, 送北京三博有限公司测序。获得的序列运用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)进行相似性搜索。共发现了 86 条差异条带, 其中编号为 45 的序列与其他物种的 *QM* 基因具有一定的相似性, 命名为 *mQM*。

1.4 利用 5'RACE 技术克隆 *mQM* 的全长 cDNA (*ZmQM*)

参照 5'-full RACE Kit (TaKaRa, 中国大连)提供的方法。根据 *mQM* 的核苷酸序列, 运用 Primer 5.0 分别设计特异性外侧引物和内侧引物及 5'-full RACE Kit 提供的 5'RACE 外侧引物和内部引物(表 1)。扩增出的产物克隆到 pGM-T (Tiangen, 中国北京)载体后送北京三博有限公司测序。

1.5 *ZmQM* 的生物信息学分析

用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对 *ZmQM* 的开放阅读框进行预测, 并推导出 *ZmQM* 氨基酸序列。利用 Clustalx 软件 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>)比较 *ZmQM* 和其他物种 *QM* 蛋白氨基酸序列相似性, 并运用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)、PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>)、ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)和 SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)等生物信息学软件分别对 *ZmQM* 蛋白的结构域、功能位点、氨基酸组成、等电点、分子量、电荷分布、亲水性和二级结构等特性进行分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5'-3')
特异外侧引物 Special outer primer	AGGAACGACTGTTGGTG
特异内侧引物 Special inner primer	GCAAGTTCACATAAGGCAC
5'RACE 外侧引物 5'RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'RACE 内侧引物 5'RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
<i>mzACTIN-32F</i>	GTGACAATGGCACTGGAATG
<i>mzACTIN-741B</i>	GACCTGACCACATCAGGCATCTC

1.6 RT-PCR 分析

采用 RT-PCR 技术分析 *ZmQM* 基因在黄早四和

黄早四 *Ht2* 上的表达差异, 同时分析 *ZmQM* 基因在黄早四 *Ht2* 受病原菌处理不同时间后的表达差异,

对照为清水处理后的黄早四和黄早四 *Ht2*。以 ACT3^[10] (mzACTIN-32F 和 mzACTIN-741B) 作内参对照, 引物序列见表 1。ZmQM 基因的扩增引物与 5' RACE 获得有效扩增的引物一致。

2 结果与分析

2.1 mQM 的全长 cDNA 克隆与序列分析

利用 AFLP-cDNA 技术, 在接种玉米大斑病菌 1 号小种后, 与黄早四相比, 黄早四 *Ht2* 上共发现了 86 条差异条带(图 1), 经回收、测序及 Blast 比对, 发现条带 45 与玉米 60S 核糖体蛋白 L10-3 的 1 个 mRNA (GenBank 登录号为 EU976434) 3'末端序列相似性为 99%。因此, 采用 5' RACE 技术扩增条带 45 的全长 cDNA。利用特异性内侧引物和 5'RACE 内侧引物组合获得了有效扩增, PCR 产物经克隆、测序分析, 得知其大小为 967 bp。采用 ORF Finder 预测, 发现该序列从 32 位到 769 位核苷酸为一个开放阅读框, 长 738 bp, 编码 245 个氨基酸(图 2)。进一步通过 Blastn 比对分析, 表明该序列与小麦、水稻等物种的 QM 蛋白基因序列高度相似, 且开放阅读框范围基本一致, 因此认为克隆到的基因具有完整的开放阅读框, 命名为 ZmQM。

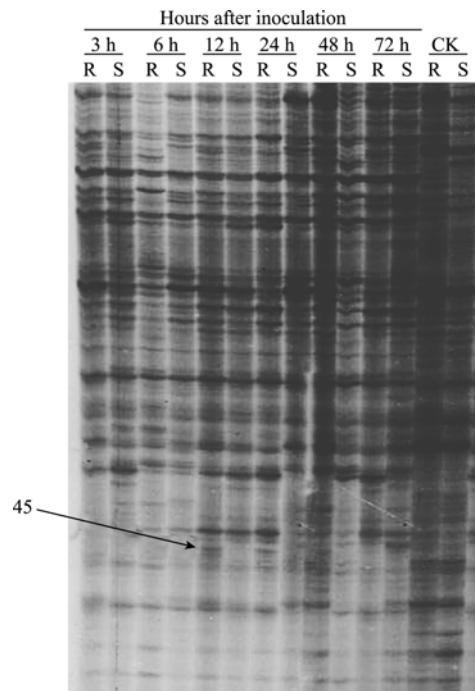


图 1 用 cDNA-AFLP 分析接种玉米大斑病菌 1 号小种不同时间后黄早四 *Ht2* 和黄早四中 *mQM* 的表达差异

Fig. 1 Differential expression of *mQM* analyzed by cDNA-AFLP between Huangzaosi *Ht2* and Huangzaosi inoculated with race 1 of *Exserohilum turcicum*

R: 黄早四 *Ht2*; S: 黄早四。R: Huangzaosi *Ht2*; S: Huangzaosi.

```

1 CACCGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCAGATGGAAACTAGACGCACCCCTTCGTGTT 60
* M E T R R T P S S F
61 TCGCCGCCCTCCGCCGACACCGACTGCGTCGCCCTCACACTGTCGCGCATGGCGAGGCC 120
R R L R R H R L P P S A V V A M G R R P
121 TGCTAGATGCTATCGCCAGATCAAGAACAAQCCGTACCCCTAAGTCCAGGTACTGCCGTGG 180
A R O Y R Q I K N P Y P K S R Y C R G
181 TGTCCCTGACCCCAAGATCAAGATCTACGATGTCGGATGAAAGGAAGATGTCCTCCAGGTGGCGCT 240
V P D P K I R I Y D V G M K R K G V D E
241 GTTCCCTACTGTGTCACCTTGTCTTGAGAGAAAGGAAGATGTCCTCCAGGTGGCGCT 300
F P Y C V H L V S W E K E N V S S E A
301 CGAGGCTGCCCGATTGCCCTCACACAAAGTACATGACCAAGTCTGCAAGGAAAGATGGCTT 360
E A A R I A C N K Y M T K S A G K D A F
361 CCACCTTAAGGGTCCGGGTTACCCGTTCCATGTCCTCCGATCAACAAGATGTCCTTCGTG 420
H L R V R V H P F R L I N K M L S C
421 TGCCGGGGCTGTATAAGGCTCCAGACTGGAAATGAGGGGTGCGCTTGGCAAGCCTCAGGGCAC 480
A G A D R L Q T G M R Q A F G G K P Q G T
481 CTGTGCTAGGGTGGACATTGGTCAGGTCCCTTCCGTCGGATGCAAGGACACAATG 540
C A R V D I Q G Q V L L S V R C K D N N A
541 TGCCCCATGCCAGCGAAGCTCTGCCCTGGCTGCCGTAAGTTCAAGTCCCTGGCGGCCAAAAGAT 600
A H A S E A L R K F K F P G R Q K I
601 CATTGGGAAGCAAGGCTGGGGCTTCACCAAGTCTGCGCCGCTGACTACCTGQAATCAA 660
I G S R K W T K F S R A D Y L K Y K
661 GAGCGAGGGTAGAATTGTTCTGATGGCTCAACCCAAAGCTGCTCGGGCAACCCAGGGAG 720
S E Q R I V P D G V N A K L L G N H G R
721 ACTTGAGAAGCGTGTCTCTGGAGGCTTCCCTGATGCCGTTGCTTAAGTGTGTGATGCG 780
L E K R A P G K D A V A ***
781 AATCTGACGTTTGTGTTAQCCTATCTACTTTGTTCTGQAAACATGAATTTCAAGT 840
841 GTTTGAGGGTATTACAGTGGCTTATGTAQACTTGTGCTACTTGTGCTGAAACATGCGAT 900
901 AATACGCTATTGTGTCCTCATGCCCTTCCGGAGCTCACCAAAAGTGTTCCCTGATGTA 960
961 CGCAGTC 967

```

图 2 ZmQM 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of gene *ZmQM* cloned from maize

* 表示起始密码子, ***表示终止密码子; 核酸序列中加下画线的碱基分别代表 5' 和 3' 端的非转录区域

Start and stop codons are indicated by single- and triple-asterisk, respectively. Nucleotides sequences with underline represent the 5' and 3' untranslated regions.

应用 InterProScan 搜索发现, ZmQM 编码的多肽中含有一个典型的 L10 结构域。根据 Farmer 等^[11]描述的 L10 结构域特点, 对 ZmQM 编码的多肽进行结构分析, 证明在这个多肽中: 从 26 位氨基酸至 56 位氨基酸为第 1 个碱性氨基酸区域 B1, 173 位到 197 位为第 2 个碱性氨基酸区域 B2, 59 位到 69 位含有 11 个带电荷的氨基酸区域 C, 80 位到 93 位为 1 个保守的酸性氨基酸区域 A, 173 位到 197 位为 B1 区域, 从 127 位氨基酸至 147 位氨基酸为富含甘氨酸和丙氨酸区域 G/A, G/A 区域具有结合核苷酸的功能(图 3)。从 GenBank 中搜索了其他 13 个物种中的 L10 结构域的序列, 经过序列比对, 发现这些序列与 ZmQM 的氨基酸序列相似性最高的为水稻(*Oryza sativa* ssp. *indica* cultivar-group, 92%), 最低的为玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*, 66%)(图 2)。

通过 ProtParam 软件分析, 预测 ZmQM 基因编码的多肽分子量为 27.78 kD, 等电点为 10.69, 其氨基酸组成为 Asp 和 Glu 酸性氨基酸残基数比例为 19%、碱性氨基酸 Arg 和 Lys 残基数比例为 54% 的特点, 表明 ZmQM 蛋白为碱性蛋白质。同时, 对多肽的疏水/亲水性分析结果显示, 其疏水性平均值 (average of hydrophobicity) 为 -0.606。与其他已知蛋

		B1			
		C	A	G/A	
<i>B. floridae</i>		MGRPARCYRKCKNPYPKSRFCRGV>D>K R F		34	
<i>H. sapiens</i>		MGRPARCYRKCKNPYPKSRFCRGV>DAK R F		34	
<i>ZmQW</i>		METRRTPSSFRRLRRHRLPPSAVY	MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	59	
<i>O. sativa</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>G. jubata</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>G. sinensis</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>P. trichocarpa</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>S. melongena</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>E. guineensis</i>			MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>A. thaliana</i>			MGRPARCYRQI KGKPYPKSRFCRGV>D>K R Y	34	
<i>P. patens</i>		RGSRRLPRAAV	MGRPARCYRQI KNKPYPKSRYCRGV>D>K R Y	46	
<i>T. aestivum</i>			MGRPARCYRQSKGKPYPKSRFCRGV>D>K R Y	46	
<i>G. reichenbatti</i>			MGRPARCYRKCKNPPEPKSRYCRGV>D>K R Y	34	
<i>U. maydis</i>		WPTFDHTDYIAAFDTALDTGTAAQDDSAFTSLPPPQHPFKKVFM	MGRPARCYRKCKNPPEPKSRYCRGV>D>K R Y	80	
Consensus		*****	*****	*****	
<i>B. floridae</i>	PLC HLVSECEYEVSSSEALEAEGI CCNKYLVKHOGDAFH R RVHPFH IRINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>H. sapiens</i>	DLGRKKAKVDE PLCGHNVSECEYEVSSSEALEAARI CANKYVVKSGDKDFH R RVLPFH IRINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>ZmQW</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKSAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	139		
<i>O. sativa</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKFAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>G. jubata</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKFAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>G. sinensis</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKFAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>P. trichocarpa</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKFAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>S. melongena</i>	DVGWKRKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKSAKGDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>E. guineensis</i>	DVGWKKKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNAKYAGKDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>A. thaliana</i>	DVGWKKKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYVVKAGKDAFLRHL RVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>P. patens</i>	DVGWKKKGVD PFYCVAHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKAGKDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>T. aestivum</i>	DVGWKKKGVD SHGVHLVSWKEENVSSEALEAARI ACKNYNTKAGKDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	126		
<i>G. reichenbatti</i>	DAGMKRADDT PPCGVHLASWEKENVSSEALEAARI ACKNYVVKAGKDAFLRVRVHPFHVL RINKN	SCAGADRLDT	114		
<i>U. maydis</i>	DLGRKKASVDD PPFCGAHLVCEHOITSEALEAARI ACKYITTKTSGKDSFLRVRVHPFH IRINKN	SCAGADRLDT	160		
Consensus	*****	*****	*****	*****	
		B2			
<i>B. floridae</i>	MRGAFGKPGQT VARVH IGOPLISCRAREANKAHV EALRRRAKFKF>GROK TWSKRN GFT KFDDPDYL ELKENDRFVADG		194		
<i>H. sapiens</i>	MRGAFGKPGQT VARVH IGOVI MSIRTKLBNKEHV EALRRRAKFKF>GROK IHSKRN GFT KFNADEFEDIVAEKRL PDG		194		
<i>ZmQW</i>	MRGAFGKPGQT CARVD IGOVLLS SVRKCKDNNAAHASEALRRRAKFKF>GROK I GSRK GFT KF FSRADYLKYKSEGRIVPDG		219		
<i>O. sativa</i>	MRGAFGKPGQT CARVD IGOVLLS SVRKCKDNNAAHASEALRRRAKFKF>GROK I HSRK GFT KF FSRVRVLLKLKAEGRI MSDG		194		
<i>G. jubata</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KYNRTDYLRLWKS ENRIVS..		192		
<i>G. sinensis</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KYNRTDYLRLWKS ENRIVS..		192		
<i>P. trichocarpa</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KFNRTDYLKLKAENKVWPDG		194		
<i>S. melongena</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KFSRTDYLKYKSENRIVPDG		194		
<i>E. guineensis</i>	MRGAFGKPGQT CARVN IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KFSRTDYLKMKSENRIVPDG		194		
<i>A. thaliana</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KFNRADFTKLRLQEKRVVPDG		194		
<i>P. patens</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KFAVVDYVVKWEENRLVNDG		194		
<i>T. aestivum</i>	MRGAFGKPGQT CARVA IGOVLLS SVRKCKDGNSHHA SEALRRRAKFKF>GROK I VSRK GFT KPPXDX.....		178		
<i>G. reichenbatti</i>	MRGAFGKPGQT CARVQ IGOVLLMS IROCRDNHGVA SEALRRRAKFKF>GROK I RSNN GFT ILSRKDFK IFREEGR INDG		194		
<i>U. maydis</i>	MRGAYGKPYD VARVN IGOILL SVRTRDSN KAVV FALRBSRYS FAGROK I LSKKN GET NNREGYA EAKCSNR LKDG		240		
Consensus	**** *	*** *** * *	*** * *	*** *** *** ***	
<i>B. floridae</i>	VGVKLYPNHGLPLAAMKHKVSSN.....		216		
<i>H. sapiens</i>	CGVKYI PSRGPLDKMRALHS.....		214		
<i>ZmQW</i>	VNAKLLGNHGRLEKRAPGKAFLDAV.....		245		
<i>O. sativa</i>	VNAKLLGSHGLRALKRAPGKAFLAETIDRSA.....		224		
<i>G. jubata</i>	..WDPLGCHGPLANRQPGRAFINASA.....		216		
<i>G. sinensis</i>	..WDPLGCHGPLANRQPGRAFINASA.....		216		
<i>P. trichocarpa</i>	VNAKLLGCHGPLANRQPGRAFLOETA.....		220		
<i>S. melongena</i>	VNAKLLGNHGPLAARQPGRAFLSSS.....		219		
<i>E. guineensis</i>	VNAKLLGCHGPLANRQPGKAFLSAAVTEAS.....		224		
<i>A. thaliana</i>	VNAKFLSCHGPLANRQPGSAFLPAHY.....		220		
<i>P. patens</i>	VTAKLLGCHGPLANRQSGRAFIDAIAVATH.....		223		
<i>T. aestivum</i>		178		
<i>G. reichenbatti</i>	SHVKV TNKGPLAEREPODH FIDY>AFKHHTPLHKDE		230		
<i>U. maydis</i>	CYLDY NNHGPLEQNRLRQARVAQK.....		266		
Consensus					

图3 *ZmQM* 与其他物种的13个*QM*基因的氨基酸序列同源性比较Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of *ZmQM* gene from *Zea mays* with 13 *QM* genes from other species

*表示完全一致的序列, B1和B2为碱性氨基酸区域, C为带电荷的氨基酸区域, A为酸性氨基酸区域, G/A为富含甘氨酸和丙氨酸区域。Identical residues between sequences are indicated with an asterisk. B1 and B2 represent basic domains. A: acidic domain; C: charged cluster; G/A: glycine alanine loop. *Branchiostoma floridae*: XP_002202219; *Homo sapiens*: AAB27665; *Oryza sativa*: CAA57339; *Caragana jubata*: AAT74554; *Camellia sinensis*: AAT68777; *Populus trichocarpa*: ABK92819; *Solanum melongena*: P93847; *Elaeis guineensis*: ACF06451; *Arabidopsis thaliana*: NP_563945; *Physcomitrella patens*: XP_001782980; *Triticum aestivum*: AAP80617; *Chlamydomonas reinhardtii*: XP_001694428; *Ustilago maydis*: XP_759469.

白比较, ZmQM 可能是一种可溶性蛋白。

通过搜索 PROSITE 数据库, 获得的 ZmQM 多肽序列中包含 4 个蛋白酶 C 磷酸化位点 TRR (3~5)、SFR (9~11)、SVR (162~164) 和 SRK (193~195), 1 个 N-糖基化位点 NVSS (84~87), 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 SRAD (202~205), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 RKGVDEFPY (65~73), 1 个 N-酰基化位点 GMRGAF (139~144), 1 个酰胺化位点 MGRR (26~29), 此外还存在 1 个核糖体蛋白 L10 特征序列 RGAFGKPQGTCA (141~154)。运用 SOPMA 预测 ZmQM 蛋白的二级结构, 发现它存在 7 个 α 螺旋, 含 11 个 β 折叠和 10 个 β 转角。

2.2 玉米中 *ZmQM* 的差异表达分析

采用 RT-PCR 方法, 分析了 *ZmQM* 基因在黄早四和黄早四 *Ht2* 接种玉米大斑病菌 1 号小种后的表达水平。与清水处理后的黄早四和黄早四 *Ht2* 及玉米大斑菌处理后的黄早四相比, *ZmQM* 基因在接种玉米大斑菌 12 h 后的黄早四 *Ht2* 中表达量明显上调(图 4-A), 且在接种病原菌 12~24 h 达到高峰, 48 h 出现下降趋势, 72 h 后回复到与未接种对照植株基本一致的表达水平(图 4-B)。据此推测, *ZmQM* 基因在黄早四 *Ht2* 抗玉米大斑病菌 1 号小种过程中发挥重要作用, 并且在接种后 12~24 h 之间作用最强。

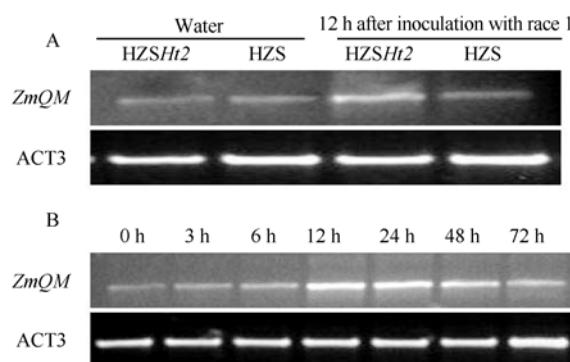


图 4 用 RT-PCR 分析 *ZmQM* 基因的差异表达
Fig. 4 RT-PCR analysis of differential expression of gene *ZmQM* in maize

HZS: Huangzaosi; HZSHt2: Huangzaosi*Ht2*. A: differential expression of gene *ZmQM* in HZS and HZSHt2; B: differential expression of gene *ZmQM* in HZSHt2 at different times after inoculation with race 1 of *E. turcicum*.

3 讨论

自 1991 年 *QM/RPL10* 基因报道以来, 已经从人类和许多动植物中克隆到了 *QM/RPL10* 基因, 并对其生物学性质与功能进行了研究, 发现 *QM* 蛋白具

有核糖体蛋白以外的许多功能, 如参与细胞生长、分化、发育和凋亡等基本生命活动^[12~13]。在植物中, Rivera 等^[14]首次从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了 *QM* 基因, 迄今已从多种植物中克隆了 *QM* 基因, 但其功能仍在研究之中。在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中过量表达番茄(*Lycopersicon esculentum*)的类 *QM* 蛋白, 可以调节细胞间脯氨酸的含量, 从而保护酵母细胞免受由过氧化氢、除草剂百草枯(Paraquat)和高温引起的活性氧积累而造成的伤害^[15]。茶树(*Camellia sinensis*)中 *QM* 基因的转录水平在受到干旱胁迫和脱落酸处理后下调, 但受到赤霉素处理后上调, 表明 *QM* 基因对茶树的生长起促进作用^[16]。Rocha 等^[17]认为 *QM* 蛋白作为由 NIK(核穿梭蛋白互作激酶)介导的抗病毒信号途径下游的效应器发挥作用, 当 *QM* 基因缺失或突变后, 寄主植物对菜豆金色花叶病毒属病毒的抗性明显减弱。*ZmQM* 作为一种类 *QM* 基因, 在玉米中可能参与黄早四 *Ht2* 对玉米大斑病菌 1 号小种的抗性反应。综上所述, *QM* 基因在植物的抗逆反应中可能担负着重要的功能, 即 *QM* 基因可能是一类新的抗逆相关基因。

本研究中发现, *ZmQM* 蛋白比玉米中已克隆 *QM* 蛋白(GenBank 登录号为 NP_001105355)和大多数其他物种的 *QM* 蛋白 N 端多出了 25 个氨基酸残基, 这使 *ZmQM* 蛋白(不稳定系数 II = 44.61>40)与其他 *QM* 蛋白相比较稳定性降低。另外, 在 25 个氨基酸残基中还存在 2 个蛋白酶 C 磷酸化位点 TRR (3~5)、SFR (9~11), 但这 25 个氨基酸残基的存在是否赋予了 *ZmQM* 蛋白的其他功能还有待进一步研究。

RT-PCR 分析表明, 在接种玉米大斑病菌 1 号小种 12 h 后, 黄早四 *Ht2* 中 *ZmQM* 基因表达量比黄早四明显上调。由于玉米大斑病菌 1 号小种对具有 *Ht1* 基因和不含任何 *Ht* 基因的玉米(如黄早四)具有毒力, 侵染后在叶片上形成典型的病斑, 并产生大量的分生孢子, 但对具有 *Ht2* 基因的玉米无毒力, 只引起褪绿坏死斑^[18]。因此, *ZmQM* 基因可能与 *Ht2* 基因调控的抗性表达密切相关, 即 *ZmQM* 基因可能通过自身的表达量来调控 *Ht2* 基因的表达, 或 *ZmQM* 基因的表达量受 *Ht2* 基因的反调控。*ZmQM* 基因在由 *Ht2* 介导抗病反应中的位置及与其他 *Ht2* 相关基因的关系还有待进一步深入研究。

4 结论

从玉米自交系黄早四 *Ht2* 中分离和克隆了 *QM* 同源基因, 命名为 *ZmQM*, 其 cDNA 全长 967 bp, 开放阅读框为 738 bp, 编码 245 个氨基酸, 比大多数的 *QM* 蛋白 N 端多 25 个氨基酸残基。*ZmQM* 基因在接种后的黄早四 *Ht2* 中表达量上调, 而上调时间出现在接菌后 12~24 h。推测 *ZmQM* 基因在黄早四 *Ht2* 抗玉米大斑病菌 1 号小种过程中发挥重要作用。

References

- [1] Hooker A L. A new type of resistance in corn to *Helminthosporium turcicum* in seedling corn. *Plant Dis Rep*, 1961, 45: 780–781
- [2] Hooker A L. A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum* 1. *Crop Sci*, 1977, 17: 132–135
- [3] Hooker A L. Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genet Coop Newslet*, 1981, 55: 87–88
- [4] Gevers O H A. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. *Plant Dis Rep*, 1975, 59: 296–299
- [5] Robbins Jr W A, Warren H L. Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135 “Mayorbela” variety of maize. *Maydica*, 1993, 38: 209–213
- [6] Juliana B O, Marco A G, Isaias O G, Luis E. New resistance gene in the *Zea mays-Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genet Mol Biol*, 2005, 28: 435–439
- [7] Carson M L. A new gene in maize conferring the “chlortic halo” reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Dis*, 1995, 79: 717–720
- [8] Wang Y-P(王玉萍), Wang X-M(王晓鸣), Ma Q(马青). Races of *Exserohilum turcicum*, causal agent of northern leaf blight in China. *J Maize Sci (玉米科学)*, 2007, 15(2): 123–126 (in Chinese with English abstract)
- [9] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Brujin S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, 9: 745–753
- [10] Rodo A P, Brugiere N, Vankova R, Malbeck J, Olson J M, Haines S C, Martin R C, Habben J E, Mok D W S, Mok M C. Over-expression of a zeatin *O*-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *J Exp Bot*, 2008, 59: 2673–2686
- [11] Farmer A A, Loftus T M, Mills A A, Sato K Y, Neill J D, Tron T, Yang M, Trumper B L, Stanbridge E J. Extreme evolutionary conservation of *QM*, a novel c-Jun associated transcription factor. *Human Mol Genet*, 2008, 3: 723–728
- [12] Chan Y L, Diaz J J, Denoroy L, Madjar J J, Wool I G. The primary structure of rat ribosomal protein L10: Relationship to a Jun-binding protein and to a putative Wilms’ tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225: 952–956
- [13] Wool I G. Extra ribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 164–165
- [14] Rivera-Madrid R, Marinho P, Chartier Y, Meyer Y. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a homolog to a suppressor of Wilms’ tumor. *Plant Physiol*, 1993, 102: 329–330
- [15] Chen C, Wanduragala S, Becker D F, Dickman M B. Tomato *QM*-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 4001–4006
- [16] Singh K, Paul A, Kumar S, Ahuja P S. Cloning and differential expression of *QM* like protein homologue from tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 921–927
- [17] Rocha C S, Santos A A, Machado J P B, Fontes E P B. The ribosomal protein L10/*QM*-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology*, 2008, 380: 165–169
- [18] Berquist R R, Masias O R. Physiologic specialization in *Thrichomes-tasphaeria turcica* f. sp. *zeae* and *T. turcica* f. sp. *sorghii* in Hawaii. *Phytopathology*, 1974, 64: 645–649