

桃 PGIP 蛋白基因片段的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达

古英洪^{1,2}, 汤浩茹¹, 张义正²

(¹四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014; ²四川大学生命科学学院/四川省分子生物学及生物技术重点实验室, 成都 610064)

摘要:【目的】克隆桃 (*Prunus persica*) 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP) 基因, 并进行原核表达研究。【方法】根据李属植物 *pgip* 保守区域设计 1 对特异引物, 以桃叶片总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获得了约 1 kb 的 cDNA 片段, T/A 克隆后进行序列测定, 并对该序列进行分析。随后将该蛋白成熟肽 cDNA 片段克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 中, 构建融合表达质粒, 转化到 *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS 中进行表达。【结果】测序结果显示, 桃多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 cDNA 编码区长 993 bp, 编码 330 个氨基酸残基, 命名为 *Pppgip*。PpPGIP 分子量为 36.4 kD, 等电点为 7.42, 信号肽为 N 端 24 个氨基酸残基, 具有 7 个潜在的 N-糖基化位点。*Pppgip* 与李属其它 *pgip* 核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 93.2%~94.6% 和 89.7%~92.7%。同源树分析表明, 该基因明显区别于其它 *pgip*, 与马哈利樱桃 *pgip* 的关系较近, 与寿星桃、桃栽培品种‘久保’等 *pgip* 的关系都较远。该基因所编码的蛋白质的三维结构含 11 个 α -螺旋和 21 个 β -折叠, 中心 LRR 结构域由 10 个串联的 LRRs 基序组成。原核表达产物经 SDS-PAGE 分析表明, 重组蛋白主要以包涵体形式出现。【结论】克隆了桃 PGIP 基因, 并可在大肠杆菌中表达。

关键词: 桃; 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白; 基因克隆; 序列分析; 基因表达

Molecular Cloning, Sequence Analysis of Polygalacturonase-Inhibiting Protein Gene from *Prunus persica* and Its Expression in *E. coli*

GU Ying-hong^{1,2}, TANG Hao-ru¹, ZHANG Yi-zheng²

(¹College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan; ²College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Chengdu 610064)

Abstract: 【Objective】Disease resistance mechanism was studied by methods of cloning and expression of the *pgip* gene of *Prunus persica*. 【Method】A cDNA fragment about 1 kb was amplified from the total RNA of peach leaves by reverse transcription PCR (RT-PCR) with a pair of specific primers based on the conserved sequences of the *pgip* genes of genus *Prunus*. The fused expression plasmid was constructed by inserting the cDNA fragment encoding the mature peptide of PGIP into the prokaryotic expression vector pET-32a(+), and then transformed into *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS. 【Result】Sequence analysis showed that the fragment contains a full coding region of 993 bp encoding 330 amino acid residues with a molecular mass of 36.4 kD. This deduced protein has a pI of 7.42, a hydrophobic region of 24 amino acid residues in the N-terminal which was considered to be a signal peptide, and seven potential N-glycosylation sites. The cloned cDNA exhibits a homology of the nucleotide and amino acid sequences of 93.2%-94.6% and 89.7%-92.7%, respectively, aligned with other *pgip* genes from the genus *Prunus*. However, the homology tree shows that it is obviously distinguished from other genes. And the phylogenetic tree shows that it is indeed far from its near species, and belongs to different branches with *P. mahaleb*. The three-dimensional model of the protein contains 11 α -helices and 21 β -sheets, and the center LRR structural domain is composed of ten tandem LRR motifs. The SDS-PAGE displays that the recombinant proteins mainly appeared as inclusion bodies. 【Conclusion】A *pgip* gene of peach was cloned and expressed in *E. coli*.

收稿日期: 2007-09-14; 接受日期: 2007-01-08

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-04-0905); 高等学校全国百篇优秀博士学位论文作者专项基金(200253); 四川省教育厅重点项目(2006ZD004)

作者简介: 古英洪(1980-), 男, 重庆永川人, 硕士, 研究方向为生物技术。Fax: 028-85412738; E-mail: yinghonggu@gmail.com。通讯作者汤浩茹(1963-), 男, 重庆人, 教授, 博士, 研究方向为园艺植物遗传育种和生物技术。Tel: 0835-2882515; E-mail: htang@sicau.edu.cn

Key words: Peach [*Prunus persica* (L.) Batch]; Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs); Gene cloning; Sequence analysis; Gene expression

0 引言

【研究意义】植物的细胞壁是植物病原真菌在侵染过程中所遇到的第一道防线, 植物病原真菌可分泌一系列的酶来降解植物细胞壁。内切多聚半乳糖醛酸酶(Endo-polygalacturonases(EC 3.2.1.15), Endo-PGs)是植物病原真菌首先分泌的最重要的一种酶^[1~4]。然而, 植物产生的多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIPs)能够与病原菌的 PGs 形成一种高亲和复合物, 从而抑制病原菌 PGs 的活性, 并使具有生物活性的寡聚半乳糖醛酸苷(oligogalacturonides, OGs)的稳定期相对延长, 从而引发多种防卫反应, 增强植物抗性^[5,6]。PGIPs 被认为是植物先天免疫系统的成分^[7], 在植物抗病育种中, *pgip* 已成为关注的焦点之一^[1], PGIP-PG 相互作用已成为在分子水平上研究植物富含亮氨酸的重复单位(leucine-rich repeat, LRR)介导的特异识别的一种模式系统^[7,8]。因此, PGIP 基因在植物抗病基因工程以及蛋白相互作用研究方面具有广阔的应用前景。【前人研究进展】PGIPs 最早在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)下胚轴、番茄茎和桐叶槭悬浮培养细胞的蛋白提取物中发现, 它能完全抑制由某些植物病原真菌分泌的 PGs 的活性^[4]。Toubart 等^[9]首次从菜豆中克隆了 2 个 PGIPs 编码基因, 随后在多种双子叶和单子叶植物中克隆到 *pgip*^[8]。转 *pgip* 的植物表现出对某些病原菌的抗性有所增强, 表明 PGIPs 可作为一种提高作物抗性的有用工具^[1,2,10~14]。PGIPs 通常是由 *pgip* 基因家族编码, 不同 PGIPs 对不同 PGs 的抑制能力存在一定的差异^[8]。Di Matteo 等^[15]已解析了菜豆 PGIP 的晶体结构, 研究表明 PGIPs 主要通过 LRR 基序上暴露于表面的可溶性氨基酸残基来发挥其抑制 PGs 的作用^[16~18]。至今的研究表明, 具有功能的 PGIPs 多数只在植物中成功表达。虽然菜豆 PvPGIP2 和大豆(*Glycine max*) GmPGIP1 在大肠杆菌中得到了高水平表达, 但是重组蛋白在纯化和复性后仍以无活性的包涵体形式存在^[8]。【本研究切入点】桃原产于中国, 目前的分布几乎遍及全世界。中国不仅具有悠久的桃栽培历史, 而且具有丰富的桃种质资源^[19,20]。桃已成为研究蔷薇科植物基因组的一种模式植物^[21]。桃具有很多真菌性病害, 据统计, 桃 90% 的病害是真菌病害^[22]。实生桃

树一般作为砧木使用^[23], 除实生选种外, 很少对其遗传背景进行研究。桃可能具有多个 *pgip*^[24], 目前仅从寿星桃^[25]和普通桃的栽培品种‘久保’中克隆了 2 个 *pgip*, 但未见有关桃 *pgip* 的功能及其异源表达的研究报道。【拟解决的关键问题】本文根据李属 *pgip* 序列设计 1 对引物采用 RT-PCR 从实生桃(*Prunus persica*)中克隆到含完整编码区的桃 PGIP 基因 cDNA, 分析其序列特征, 并构建该基因的原核表达质粒, 在大肠杆菌中进行表达, 旨在为研究桃 PGIP 的抑菌活性及确定其与 PGs 的相互作用, 为桃 *pgip* 的开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料、菌株及载体

实生桃树(*P. persica*)健康叶片采自四川大学桃林村。T/A 克隆载体 pMD 18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司, 表达载体 pET-32a(+)、*Escherichia coli* JM109 和 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS 均由四川省分子生物学及生物技术重点实验室保存。

1.2 RNA 的提取以及 *pgip* 的克隆

桃叶片总 RNA 的提取方法见参考文献[26]。第 1 链 cDNA 的合成采用 M-MLV 逆转录酶 Rever Tra Ace, 以 CDS Primer (5'-AAGCAGTGGTAACAACGC AGAGTACT₂₈VN-3') 为起始引物。42℃ 反应 90 min, 然后 99℃ 处理 5 min, -20℃ 保存备用。根据 GenBank 中公布的李属植物的 *pgip* 保守区域, 设计 1 对特异引物(Pr_1F: 5'-TCCGTGGATCCGCAATCACATTTCTT AT-3', Pr_1R: 5'-TAAAGTTCGACGTGGGAATTATTT GCAGC-3', 下划线处为 *Sal* I 酶切位点), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。以第 1 链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 48℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 5 个循环; 再 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 最后一个循环结束后 72℃ 保温 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, PCR 产物用 Biospin 胶回收试剂盒回收。回收产物与 pMD 18-T 载体连接, 连接物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 随机挑取抗性克隆, 碱裂解法^[27]小批量提取质粒 DNA。然后将酶切以及 PCR 鉴定后的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3 序列分析以及原核表达质粒的构建

NCBI 网站上的 BLAST 程序进行相似性搜索; DNAMAN 软件分析 *pgip* ORF, 推导氨基酸序列, 预测蛋白质分子量、等电点、亲水性与疏水性, 分析序列同源性以及构建同源树; PHYLIP 软件以 NJ 法构建系统进化树; SignalP 3.0 Server^[28] 预测信号肽; EasyPred3D^[29] 预测蛋白质三维结构。将桃 PGIP 成熟肽 cDNA 片段克隆到表达载体 pET-32a (+) 中构建融合表达质粒, 其构建过程为: 根据所克隆的 *pgip* 的序列以及原核表达载体 pET-32a (+) 多克隆酶切位点序列, 用 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒和 pET-32a (+), 分别胶回收目的片段, 二者经 T4 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 随机挑取抗性克隆, 提取质粒 DNA 后进行酶切鉴定。

1.4 重组 *pgip* 在大肠杆菌中的表达

重组表达质粒转化 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS 感受态细胞, 挑取抗性单菌落接种于 2 ml 液体 LB 培养基中 (含 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 氨苄青霉素、15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 卡那霉素和 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 氯霉素) 37°C 振荡培养过夜。次日以 1:100 的比例转接到新的液体 LB 培养基中 (所含抗生素及浓度同前) 37°C 振荡培养至 $\text{OD}_{600}\approx 0.5$, 一定温度下加入 IPTG (终浓度 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行诱导表达。同时以 pET-32a (+) 质粒转化菌加 IPTG (终浓度 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导为正对照, 以未加 IPTG 诱导的为负对照。诱导一定时间 (2、4、6 h) 后收集菌体, SDS-PAGE 分析总蛋白及其可溶性。菌体中加入菌液体积 10% 的 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6.8), 2%SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10%甘油, 1% β -巯基乙醇), 100°C 煮沸 5 min, 立即冰浴 2 min, 最大转速离心 5 min, 取一定体积样品 (即为总蛋白) 上样。可溶性分析则是将菌体重悬于菌液体积 10% 的 TE 缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0), 超声波破碎至菌液变澄清, 离心分别收集上清和沉淀。上清中加入 SDS-PAGE 上样缓冲液 (终浓度为 1 \times), 100°C 煮沸 5 min, 立即冰浴 2 min, 最大转速离心 5 min, 取一定体积样品 (即为可溶性蛋白) 上样, 沉淀的上样前处理同总蛋白。SDS-PAGE 的浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 10%。电泳后经考马斯亮兰染色并用凝胶成像系统分析。

2 结果与分析

2.1 桃 *pgip* 序列的获得与分析

以桃叶片总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR, 获得了预期大小的 cDNA 片段。该片段克隆到 pMD 18-T 载体后, 再经酶切、PCR 鉴定和测序表明, 该 cDNA 片段全长为 1 053 bp, ORF 为 993 bp, 编码 1 个由 330 个氨基酸残基组成的蛋白质 (图 1)。该蛋白质的分子量为 36.4 kD, 等电点为 7.42, 酸性氨基酸占 8.5%, 碱性氨基酸占 10.6%, 中性亲水氨基酸占 40.6%, 中性疏水氨基酸占 40.3%, 其中亮氨酸的比例最高 (占 17%)。将该 cDNA 及其推导的氨基酸序列在 NCBI 进行 BLAST 比对表明, 该 cDNA 及其推导的氨基酸序列与已报道的 *pgip* 及其推导的氨基酸的序列同源性最高。表明克隆片段确为桃 *pgip*, 命名为 *Pppgip*, GenBank 登录号为 EF409977。将该基因所编码的氨基酸序列采用隐马尔科夫模型和神经网络方式进行信号肽预测, 结果均表明, 该蛋白质信号肽为 N 端的 24 个氨基酸残基, 蛋白质裂解点位于第 24 和 25 位氨基酸残基之间。蛋白质亲水性和疏水性分析表明, 该蛋白质 N 端 24 个氨基酸残基构成一明显的疏水区域, 这与信号肽预测结果相吻合。序列分析还表明, *Pppgip* 中含有 5 种共 18 个大肠杆菌稀有密码子, 成熟肽氨基酸序列中具有 7 个潜在的 N-糖基化位点, N 端和 C 端还各具有 4 个参与二硫键形成的半胱氨酸残基 (图 1)。PpPGIP 三级结构预测结果表明, 由 PpPGIP 肽链构建的三维模型 (图 2) 含 11 个 α -螺旋和 21 个 β -折叠, 具有 8 个 β -折叠/ β -转角/ β -折叠/ α -螺旋区, 中心 LRR 结构域由 10 个串联的 LRRs 基序组成。其 LRRs 除个别替换、插入或缺失外, 序列高度保守 (图 3)。

2.2 *Pppgip* 与李属其它 *pgip* 的比较

李属 *pgip* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列 (表 1) 同源性分析表明, 李属的 *pgip* 具有很高的同源性。*Pppgip* 与李属其它 *pgip* 核苷酸及其推导的氨基酸序列的同源性分别为 93.2%~94.6% 和 89.7%~92.7%, 其中马哈利樱桃的 *pgip* 与 *Pppgip* 同源性最高 (表 2)。同源树分析表明, *Pppgip* 与李属其它植物 *pgip* 的同源性明显较低 (图 4)。从进化关系来看, *Pppgip* 除与马哈利樱桃的 *pgip* (GenBank 登录号 AF263465) 关系较近外, 与寿星桃 (GenBank 登录号 AY903219)、普通桃的栽培品种 '久保' (GenBank 登录号 AY352426) 等的 *pgip* 的进化关系都相对较远 (图 5)。

2.3 重组 *Pppgip* 在大肠杆菌中的表达

SDS-PAGE 结果显示, 融合表达工程菌在 28°C 下诱导后有预期大小的蛋白条带 (51.8 kD), 融合蛋白

```

1 TCGTggatccGAATCACATTCTTATTCCTCAAAACCCAAAAATGACCTCAAGCTCTCCACCCTTCTCTGCTTGACCTCTCTCTCCACCATCCZAAAACCA
1 M D L K L S T L L C L T L L F S T I L N P
107 GCTCTCTCCgagctcTGCAACCCGAAAGACAAGAAAGTCCCTCZACAAATCAAGAAAGCCITCAACAACCTTAOGTCTTGTCTCATGGGACCCAGAGACAGAC
22 A L S E L C N P K D K K V L L Q I K K A F N N P Y V L S S W D P E T D
212 TGCTGTGACTGGTACTCTGTCAACCTGTACTCCACCACAAACCCGGTCAACTCCCTCCTCCTCTCTCCGGG66ACTCTCOGGTCAAATTOGACCCAAAGTGGT
57 C C D W Y S V T C D S T T N R V N S L T L F S G G L S G Q I P T Q V G
317 GACTTGCCGTATCTGAAACACTTGAGTTTACAAGCAAACCAATCTTACCC66ACCAATCCAAACCTTCCATTGCAAGCTTAAGGCGCTCAAGGAGCTGCGOCTC
92 D L P Y L E T L E F H K Q P N L T G P I Q P S I A K L K R L K E L R L
422 AGCTGGACCAACATCTCCGGCTCTGTCCCTGACTTCTCAGCCAACTCAAAAAOCTCACCTTTCTTGAACCTCTCAITCAATAACCTCACAGGCTCCATCCZAGC
127 S W T N I S G S V P D F L S Q L K N L T F L E L S F N N L T G S I P S
527 TCGCTTCTCAGCTTCCAAACCTGACCGCTCTTACCTAGACCGTAAACAGCTCACAGGTCATATTCGAAAGTCATTCC66GAATTCATGGCAGTGTCCAGAC
162 S L S Q L P N L D A L H L D R N K L T G H I P K S F G E F H G S V P D
632 CTCTATCTCTCTCACAACCAGCTCTCAGGCACCATAACCTCATTAGCCAACTGGACTTTCAGCAOCTGACTTCTCCAG66AACAAGCTCGAAGGGATGCA
197 L Y L S H N Q L S G T I P T S L A K L D F S T V D F S R N K L E G D A
737 TCCATGATCTTTGGATTAAACAAGACTACCCAGATTGTGGATCTGTOGAG66AACTTCTGGAATTTAATCATCAAGGTGGAGTTTCCAAAGCTTGACTTCC
232 S M I F G F N K T T Q I V D L S R N L L E F N L S K V E F S K S L T S
842 TTGGATCTCAACCATAACAAGATCACAGGCAGTATTCGGTGGGGCTGACCCAAGTGGATTGTCAGTTCCGTAAGCTGAGCTACAAACAG66TTGTTGGTCAGATT
267 L D L N H N K I T G S I P V G L T Q V D L Q F L N V S Y N R L C G Q I
947 CCAGTGGGTTGGGAAGTTGACAGGCTTGGATTCTCAACATATATCCATAAACAGCTGCTTGTGCGGTGCTCCACTCCCAAGCTGCAAAATAATTCOCCAGctgacTTTA
302 P V G G K L Q S F D S S T Y I H N Q C L C G A P L P S C K *
    
```

小写字母分别为 *Bam*H I、*Sac* I 和 *Sal* I 酶切位点；单下划线为引物部分；双下划线部分为信号肽序列；ATG 为起始密码子；TAA 为终止密码子；粗斜体显示的为大肠杆菌稀有密码子；粗体显示参与二硫键形成的 Cys 残基；阴影部分为潜在的 N-糖基化位点
 The lower-case characters indicate *Bam*H I, *Sac* I and *Sal* I restriction sites respectively; single underline indicates primer locations; double underline sequence indicates the signal peptide; ATG indicates the start codon; TAA indicates the stop codon; the bold-italic letters indicate the rare codons of *E.coli*; the bold letters indicate the Cys residues contributing to the formation of disulfide bond; dashed areas indicate the potential N-glycosylation sites

图 1 *Pppgip* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Pppgip* cDNA

表 1 用于本研究的李属 *pgip*

Table 1 The *pgip* genes of genus *Prunus* used in this study

代号 Code	GenBank 中 cDNA 的登录号 cDNA accession number	氨基酸序列的登录号 Amino acid accession number	物种学名 Scientific name	物种 Name	品种 Variety
A	DQ364056	AAV33432.1	<i>P. mume</i> Sieb.	梅 Prune	‘Dali’
B	AY903223	AAW72620.1	<i>P. mume</i> Sieb.	梅 Prune	‘longyan’
C	AY986899	AAV32955.1	<i>P. salicina</i> Lindl.	李 Plum	
D	DQ364055	ABA42120.1	<i>P. salicina</i> Lindl.	李 Plum	‘xiaohuangli’
E	AY883417	AAW57429.1	<i>P. americana</i> Marsh.	美洲李 American Plum	
F	AF263465	AAF79181.1	<i>P. mahaleb</i> L.	马哈利樱桃 Mahaleb Cherry	
G	AF020785	AAB80732.1	<i>P. armeniaca</i> L.	杏 Apricot	‘Marille Bauer’
H	AY903219	AAW72616.1	<i>P. persica</i> L.var. <i>densa</i> Makino	寿星桃 Shouxing Peach	
I	AY352426	AAQ56728.1	<i>P. persica</i> (L.) Batch	桃 Peach	‘Jiubao’
J	EF409977	ABO26221	<i>P. persica</i> (L.) Batch	桃 Peach	

约占细胞总蛋白的 20%，并且有小部分存在于细胞破壁后的上清中，大部分在细胞破壁后的沉淀中，未诱导的则无相应蛋白条带（图 6）。这些结果表明，重

组 *Pppgip* 在大肠杆菌中得到了表达，融合蛋白主要以不溶的包涵体形式出现。

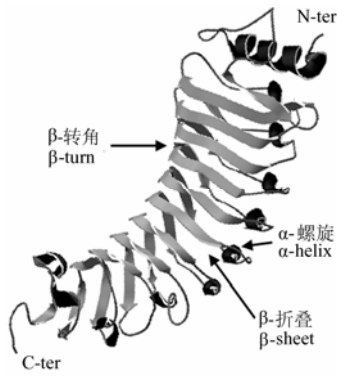


图 2 PpPGIP 三维结构预测图

Fig. 2 Predicted PpPGIP three dimensional model

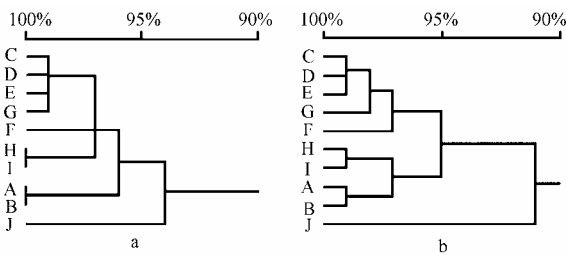
NSLTLFS	GGLSGQIPT	QVGD	DLPYL	lrr1
ETLEFHK	QPNLTGP	IQP	SI AKLKRRL	lrr2
KELRLSW	TNISGSVPD	FLS	QLKLN	lrr3
TFLLELSF	NNLTGSIPS	SLS	QLPNL	lrr4
DALHLDR	NKLTGHIPK	SFG	EFHGSV	lrr5
PDLYLSHN	QLSGTIPT	SLA	KLDF	lrr6
STVDFSR	NKLEGDA	SM	IFGFNKT	lrr7
QIVDL	SRNLL	EFNL	SKVEFSKSL	lrr8
TSLDLNH	NKITG	SIPV	SLTQVD	lrr9
QFLNVS	YNRLCG	QIP	VGGKLS	lrr10
x x L x L x x N x Lt/sG	x I P x x L x x L x x L			保守序列 Conserved sequence

折叠 Sheet 折叠 Sheet 螺旋 Helix

折叠和螺旋区域与图 2 相对应
Sheets and helices are correspond with Fig.2

图 3 PpPGIP 二级结构 LRR 基序

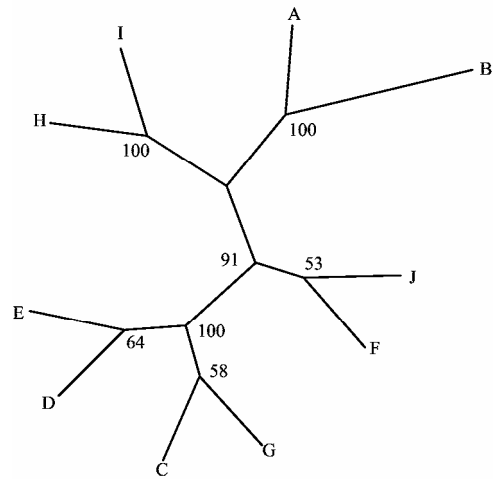
Fig. 3 Secondary structure organization of the LRR motif (residues 73-312) in PpPGIP



代号 A~J 详见表 1
Code designations A-J shown in table 1

图 4 李属 pgip 核苷酸序列 (a) 以及推导氨基酸序列 (b) 同源树

Fig. 4 Homology tree of nucleotide sequences (a) and deduced amino acid sequences (b) of the pgip genes among species of the genus Prunus



分支处的数值表示支持率 (%)；代号 A~J 详见表 1
Numbers beside the branches indicate the bootstrap supports (%); code designations A-J shown in table 1

图 5 邻邻结合法分析李属 pgip 进化关系

Fig. 5 Phyletic evolution analysis of pgip genes of the genus Prunus by neighbor-joining method

3 讨论

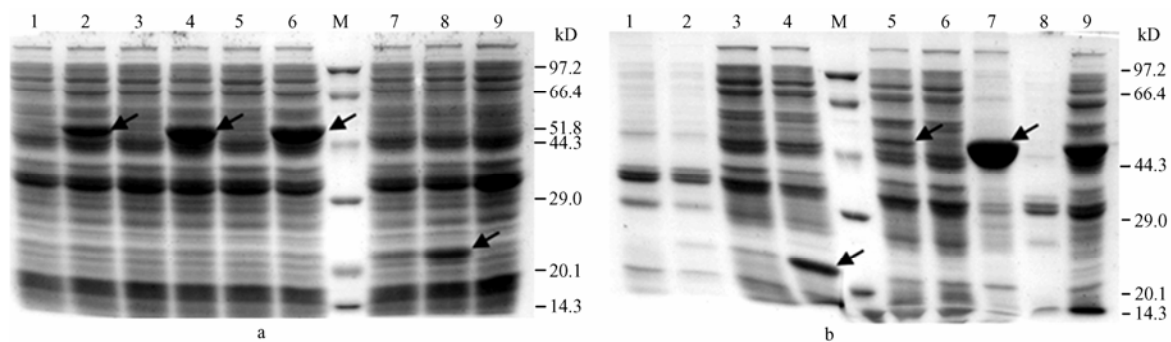
几乎所有的植物致病真菌都产生 PGs，它们有多种同工酶^[8]。在寄主-病原体相互作用的长期进化中，植物也进化出了不同的 PGIPs，以特异识别真菌的多种 PGs。在韭葱 (*Allium porrum*) 中已发现了 20 多种 PGIPs^[30]，菜豆^[31]、油菜^[32]、桃^[24]、水稻以及小麦^[33]等 PGIPs 都是由 *pgip* 基因家族编码，这也许是 PGIPs 与 PGs 为适应自然选择共同进化的结果^[2]。无论是来自不同植物的 PGIPs 还是同一植物中的不同 PGIPs，它们对不同真菌分泌的 PGs 或同一真菌分泌的不同 PGs 均有不同程度的抑制作用^[8]。De Lorenzo 等^[8]对已克隆 *pgip* 的成熟肽进行同源分析发现，豆科植物 PGIPs 与其它植物 PGIPs 明显分属于 2 个群体，同一科植物的 PGIPs 的序列相似性非常高 (>96%)；虽然桉树、苹果、梨在系统发生上相距很远，但它们也存在很高的相似性 (平均相似度 >94%)。李广平等^[34]对 10 多种植物的 *pgip* 进行聚类分析发现，所有 *pgip* 序列大致分为 4 组，基本表现出属内同源性很高、属间相对较低的特点。进化树分析结果也基本表现出近缘属内距离较近、远缘属间相对较远的特点^[35]。本研究所克隆的 *Pppgip* 与普通桃的栽培品种 ‘久保’ 的 *pgip* 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 94.4% 和 92.1%，

表 2 李属 *pgip* 核苷酸序列与推导的氨基酸序列同源性百分比 (%)Table 2 Comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the *pgip* genes among species of the genus *Prunus* (%)

	代号 Code	核苷酸序列同源性 Homology of nucleotide sequence									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
氨基酸序列同源性	A	-	99.7	95.9	96.2	96.4	95.5	96.2	96.7	96.9	93.4
Homology of amino acid sequence	B	99.4	-	95.9	96.2	96.5	95.5	96.1	96.7	96.7	93.2
	C	94.8	94.8	-	98.9	98.9	97.2	98.9	96.8	97.1	94.3
	D	94.8	94.8	98.5	-	99.4	97.3	99.0	97.0	97.3	94.3
	E	95.5	95.5	98.8	99.1	-	97.5	99.1	97.4	97.6	94.6
	F	94.8	94.8	97.6	97.3	97.9	-	97.3	96.1	96.4	94.6
	G	94.5	93.9	97.9	97.6	97.9	96.7	-	97.0	97.4	94.5
	H	96.7	96.7	95.2	95.2	96.1	94.8	94.2	-	99.6	94.2
	I	97.6	97.0	95.8	95.8	96.7	95.5	95.5	98.8	-	94.4
	J	90.3	89.7	92.1	91.2	92.1	92.7	91.2	91.8	92.1	-

表中的序列代号详见表 1

The code designations shown in table 1



M: 蛋白质分子量标准; 箭头所指为目标产物条带; a: 28℃下融合表达工程菌诱导 2、4、6 h (第 2、4 和 6 道) 和未诱导 2、4、6 h (第 1、3 和 5 道) 以及 pET-32a (+) 空载体转化子诱导 2、6 h (第 7 和 8 道) 和未诱导 6 h (第 9 道) 的总蛋白; b: 28℃下融合表达工程菌诱导 6 h 后的总蛋白、菌体破壁的上清和沉淀 (第 9、5 和 7 道), 未诱导 6 h 后的菌体破壁的上清和沉淀 (第 6 和 8 道), 以及 pET-32a (+) 空载体转化子诱导 6 h 后的沉淀、上清 (第 2 和 4 道) 和未诱导 6 h 后的沉淀、上清 (第 1 和 3 道)

M: Protein molecular weight standard; Arrows indicate the target protein bands; a: Total proteins of engineering bacteria strains after induced (lane 2, 4 and 6) or uninduced (lane 1, 3 and 5) for 2, 4 and 6 h, as well as strains harbouring pET-32a(+) after induced (lane 7 and 8) for 2 and 6 h or uninduced (lane 9) for 6 h, respectively; b: Total proteins (lane 9) and supernatants (lane 5 and 6) or precipitates (lane 7 and 8) of post-sonicated engineering bacteria strains after induced or uninduced for 6 h under 28℃, as well as supernatants (lane 4 and 3) or precipitates (lane 2 and 1) of strains harbouring pET-32a(+) after induced or uninduced for 6 h under 28℃, respectively

图 6 重组 *Pppgip* 表达产物 SDS-PAGE 分析Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expressed product of recombinant *Pppgip*

表明所克隆的 *Pppgip* 为桃 *pgip* 基因家族中的一员。从表 2 和图 4 可以看出, 李属的 *pgip* 具有很高的同源性, 但是 *Pppgip* 明显与众不同, 在李属中其同源性最低。除 *Pppgip* 外, 李属其它 *pgip* 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.5%~99.7% 和 93.9%~99.4%。马哈利樱桃的 *pgip* 与 *Pppgip* 同源性最高, 其核苷酸和氨基酸同源性分别为 94.6% 和 92.7%。进一步的系统进

化树分析表明, *Pppgip* 除与马哈利樱桃的 *pgip* 关系较近外, 与寿星桃、普通桃的栽培品种‘久保’等的 *pgip* 都存在相对较远的进化关系 (图 5)。推测 *Pppgip* 的编码产物可能具有特殊的生理特性, 但其是否具有独特的抑菌活性还需进行功能验证。

PGIPs 属于高等植物 LRR 蛋白家族, 具有典型的 LRR 结构^[36], 与其它一些植物抗性基因一样, 具有

xxLxLxxNxLt/sGxIP xxLxxLxxL 共有序列, 这种 LRRs 被认为是参与蛋白质-蛋白质相互作用的区域^[8,16]。PGIPs 主要通过 LRRs 基序上的 β -折叠/ β -转角区与 PGs 特异结合, 如果暴露于表面的某些氨基酸残基发生改变, 则会对 PGIPs 的活性有重要的影响^[16,18]。从预测的 PpPGIP 高级结构来看, 它与菜豆 PGIP2 的结构类似^[15], 但其凹面的 β -折叠长度比后者要长些, 表明 PGIPs 与 PGs 的相互识别具有一定的特异性。

由于转 *pgip* 的植株可能不会表现出对特定 PGs 的抑制^[37], 因此, 在通过转 *pgip* 进行植物抗病育种前有必要进行体外抑菌试验。大肠杆菌是最常用的外源基因表达宿主。Thow 等^[38]将树莓 *pgip* 在大肠杆菌中进行了融合表达, 当 N 端进行系列缺失后均能表达, 但全长基因却未能获得表达。Nalumpang 等^[39]在大肠杆菌中表达柑橘 *pgip* 时, 表达产物主要以不溶的包涵体形式出现, 可溶部分很少, 纯化效率也很低, 但将可溶部分用硫酸铵沉淀后表现出对 PG 有部分抑制作用。本研究将 *Pppgip* 在大肠杆菌中进行了融合表达, 目标蛋白主要以不溶的包涵体形式出现, 但仍有部分是可溶性的。因此, 有必要进一步研究 *Pppgip* 的原核表达, 以便提高表达蛋白的可溶性, 从而利于后续纯化和研究原核表达的 PGIP 对致病真菌 PGs 的抑制效果, 为通过转 *pgip* 获得抗真菌病害植物的育种工作打下基础。

4 结论

本研究从实生桃叶片中成功克隆了含完整编码区的桃 PGIP 基因 cDNA, GenBank 登录号为 EF409977。虽然李属 *pgip* 具有很高的同源性, 但 *Pppgip* 与已报道的李属其它植物的 *pgip* 有明显的区别, 推测 *Pppgip* 的编码产物可能具有特殊的生理特性。在大肠杆菌中成功表达了 *Pppgip*, 这将有助于进一步研究 PpPGIP 的功能及其与 PGs 的相互作用, 为桃 *pgip* 的开发利用奠定基础。

References

- [1] Di C X, Zhang M X, Xu S J, Cheng T, An L Z. Role of polygalacturonase-inhibiting protein in plant defense. *Critical Reviews in Microbiology*, 2006, 32(2): 91-100.
- [2] De Lorenzo G, Ferrari S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 295-299.
- [3] Lang C, Dörnenburg H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(4): 366-375.
- [4] Albersheim P, Anderson A J. Protein from plant cell wall inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971, 68(8): 1815-1819.
- [5] D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1696(2): 237-244.
- [6] 阮期平, 周立, 郑远旗. PGIP 在植物抗病方面的研究进展. *植物学通报*, 2000, 17(1): 60-63.
Ruan Q P, Zhou L, Zheng Y Q. Advance in the reseach of polygalacturonase-inhibiting proteins on disease-resistance of plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000, 17(1): 60-63. (in Chinese)
- [7] Federici L, Di Matteo A, Fernandez-Recio J, Tsernoglou D, Cervone F. Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends in Plant Science*, 2006, 11(2): 65-70.
- [8] De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39: 313-335.
- [9] Toubart P, Desiderio A, Salvi G, Cervone F, Daroda L, De Lorenzo G. Cloning and characterization of the gene encoding the endo polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L.. *The Plant Journal*, 1992, 2(3): 367-373.
- [10] Gomathi V, Gnanamanickam S S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defense. *Current Science*, 2004, 87(9): 1211-1217.
- [11] Oelofse D, Dubery I A, Meyer R, Arendse M S, Gazendam I, Berger D K. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry*, 2006, 67(3): 255-263.
- [12] Richter A, de Kathen A, de Lorenzo, Briviba K, Hain R, Ramsay G, Jacobsen H J, Kiesecker H. Transgenic peas (*Pisum sativum*) expressing polygalacturonase inhibiting protein from raspberry (*Rubus idaeus*) and stilbene synthase from grape (*Vitis vinifera*). *Plant Cell Reports*, 2006, 25(11): 1166-1173.
- [13] Joubert D A, Slaughter A R, Kemp G, Becker J V W, Krooshof G H, Bergmann C, Benen J, Pretorius I S, Vivier M A. The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research*, 2006, 15(6):

- 687-702.
- [14] Powell A L T, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve C, Bennett A B, Labavitch J M. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(9): 942-950.
- [15] Di Matteo A, Federici L, Mattei B, Salvi G, Johnson K A, Savino C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(17): 10124-10128.
- [16] Di Matteo A, Bonivento D, Tsernoglou D, Federici L, Cervone F. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defense: a structural view. *Phytochemistry*, 2006, 67(6): 528-533.
- [17] Kobe B, Kajava A Y. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(6): 725-732.
- [18] Leckie F, Mattei B, Capodicasa C, Hemmings A, Nuss L, Aracri B, De Lorenzo G, Cervone F. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed β -strand/ β -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *The EMBO Journal*, 1999, 18(9): 2352-2363.
- [19] 华南农业大学. 果树栽培学各论(南方本第 2 版). 北京: 中国农业出版社, 2000: 344.
South China Agricultural University. *Fruit Tree Culture for Certain Species* (2nd Southern edition). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 344. (in Chinese)
- [20] 龙兴桂. 现代中国果树栽培(落叶果树卷). 北京: 中国林业出版社, 2000: 419.
Long X G. *Modern Chinese Fruit Tree Culture (Vol. of Deciduous Fruits)*. Beijing: China Forestry Press, 2000: 419. (in Chinese)
- [21] Jung S, Jesudurai C, Staton M, Du Z, Ficklin S, Cho I, Abbott A, Tomkins J, Main D. GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web resources for *Rosaceae* genomics and genetics research. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5(1): 130.
- [22] 曹若彬. 果树病理学(第 3 版). 北京: 中国农业出版社, 2001: 9.
Cao R B. *Pathology of Fruit Tree* (3rd ed). Beijing: China Agriculture Press, 2001: 9. (in Chinese)
- [23] 郝荣庭. 果树栽培学总论(第 3 版). 北京: 中国农业出版社, 2000: 122-127.
Xi R T. *General Introduction to Fruit Tree Culture* (3rd ed). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 122-127. (in Chinese)
- [24] Liang F S, Zhang K C, Zhou C J, Kong F N, Li J, Wang B. Cloning, characterization and expression of the gene encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) of peach [*Prunus persica* (L.) Batch]. *Plant Science*, 2005, 168(2): 481-486.
- [25] 朱春林. 龙眼梅、美国黑李、台湾甜桃及油木奈 PGIP 基因同源克隆. 福建农林大学硕士学位论文, 2005.
Zhu C L. Cloning of PGIP gene from *Prunus mume* Sieb et Zucc. 'longyan mei', *P. salicina* Lindl., *P. persica* (L.) Batsch. and *P. salicina* Lindl. var. *cordata*. Master Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2005. (in Chinese)
- [26] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第 2 版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 147-149.
Lu S D. *Experimental Techniques of Modern Molecular Biology*(2nd ed). Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 147-149. (in Chinese)
- [27] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (3rd electronic ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 4.
- [28] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: *SignalP 3.0*. *Journal Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783-795.
- [29] Lambert C, Léonard N, De Bolle X, Depiereux E. *EaSyPred3D*: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 2002, 18(9): 1250-1256.
- [30] Favaron F. Gel detection of *Allium porrum* polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, 58(6): 239-245.
- [31] Frediani M, Cremonini R, Salvi G, Caprari C, Desiderio A, D'Ovidio R, Cervone F, De Lorenzo G. Cytological localization of the PGIP genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L.. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 87(3): 369-373.
- [32] Li R, Rimmer R, Yu M, Sharpe A G, Séguin-Swartz G, Lydiat D, Hegedus D D. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Planta*, 2003, 217(2): 299-308.
- [33] Janni M, Di Giovanni M, Roberti S, Capodicasa C, D'Ovidio R. Characterization of expressed *Pgip* genes in rice and wheat reveals similar extent of sequence variation to dicot PGIPs and identifies an active PGIP lacking an entire LRR repeat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(7): 1233-1245.
- [34] 李广平, 房经贵, 蔡斌华, 章 镇, 张长青. 梅 PGIP 基因的克隆及全序列分析. *园艺学报*, 2006, 33(1): 125-127.
Li G P, Fang J G, Cai B H, Zhang Z, Zhang C Q. Cloning and sequencing of PGIP gene from *Prunus mume* Sieb. *Acta Horticulturae*

- Sinica*, 2006, 33(1): 125-127. (in Chinese)
- [35] 李广平, 乔玉山, 陶建敏, 高志红, 章 镇. 中国李 PGIP 基因的克隆及序列分析. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1870-1873.
Li G P, Qiao Y S, Tao J M, Gao Z H, Zhang Z. Cloning and Sequencing of PGIP gene in *Prunus salicina*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(9): 1870-1873. (in Chinese)
- [36] 杨崇林, 陈章良. 高等植物的 LRR 蛋白: 结构与功能. 生物工程进展, 1997, 17(6): 43-47.
Yang C L, Chen Z L. LRR proteins in higher plants-structure and function. *Progress in Biotechnology*, 1997, 17(6): 43-47. (in Chinese)
- [37] Gazendama I, Oelofse D, Berger D K. High-level expression of apple PGIP1 is not sufficient to protect transgenic potato against *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 65(3): 145-155.
- [38] Thow G, Simpson C G, Williamson B. Heterologous expression of raspberry PGIP in *Escherichia coli* to investigate the binding and inhibition of fungal endo-PG. In: Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998, Abstracts, Vol. 2: 5.3.24.
- [39] Nalumpang S, Gotoh Y, Tsuboi H, Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K. Functional characterization of citrus polygalacturonase-inhibiting protein. *Journal of General Plant Pathology*, 2002, 68(2): 118-127.

(责任编辑 于 竞)

期刊名称	邮发代号	刊期	年定价(元)	联系人	电话	地址	邮编
中兽医学杂志	44-46	双月刊	30.00	谭志坚	0791-6360234	江西省南昌市福州支路 2 号	330006
中国兽医杂志	2-137	月刊	120.00	张冬梅	010-62733040	北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农大动物医学院	100193
黑龙江动物繁殖	14-264	双月刊	30.00	段晓坤	0451-86644242	黑龙江省哈尔滨市哈平路 243 号	150069
北方牧业	18-323	半月刊	96.00	孙秀娟	13931175960	河北省石家庄市翟营南大街 385 号	050031
兽药市场指南	18-354	月刊	84.00	王越	13932123869	河北省石家庄市建设南大街与槐安路交叉口东岗怡园 6-1-1103	050021
奶牛杂志	18-261	月刊	84.00	朱可意	13231119624	河北省石家庄市翟营南大街 389 号卓达书香园二区 11-5-101	050031
今日畜牧兽医	18-339	月刊	84.00	朱清杰	13933839536	河北省石家庄市翟营南大街 385 号	050031
中国动物保健	82-991	月刊	117.60	张小清	010-62899836	北京海淀中关村南大街乙 8 号	100081
上海畜牧兽医通讯	4-393	月刊	45.00	赵敏	021-62206294	上海市北翟路 2901 号农科院畜牧所	201106
畜牧市场	78-207	月刊	96.00	汪小容	023-63659833	重庆渝中区双钢路 3 号科协大厦	400013
湖南畜牧兽医	42-276	双月刊	24.00	蔡文杰	0731-4615356	湖南省长沙市远大二路泉塘畜牧兽医研究所内	410131
畜禽业	62-184	月刊	96.00	贺之勤	028-85256716	四川省成都市人民南路 4 段 53 号嘉云台乙 8A	610041
中国兽医寄生虫病	4-748	双月刊	30.00	章力勇	021-54081818	上海市闵行区紫竹科学园区紫月路 518 号	200241
中国畜牧杂志	82-147	半月刊	360.00	李 雪	010-82893959	北京市海淀区上地信息路 1 号国际创业园 1 号楼 1305 室	100085
广东畜牧兽医科技	自办发行	双月刊	33.00	岑俏梅	020-37288167	广州市先烈东路 135 号	510500
乳业科学与技术	自办发行	双月刊	60.00	苏永红	021-36030471	上海市闸北区万荣路 467 号	200072
中国畜牧兽医	2-215	月刊	96.00	白如丽	010-62816020	北京市海淀区中国农科院北京畜牧兽医研究所	100094
动物营养学报	80-591	双月刊	90.00	姚琨	010-62817823	北京市海淀区圆明园西路 2 号动科院《动物营养学报》编辑部	100193
猪业科学	6-149	月刊	144.00	李倩	010-64719434	北京市朝阳区望京西园 222 号星源国际 C 座 3A05	100102
中国兽医科学	54-33	月刊	72.00	张文举	0931-8342195	甘肃省兰州市盐场堡徐家坪 1 号	730046
河南畜牧兽医(综合版)	36-193	月刊	96.00	马立新	0371-65778965	河南省郑州市经三路 91 号	450008
河南畜牧兽医(市场版)	36-352	月刊	96.00	马立新	0371-65778965	河南省郑州市经三路 91 号	450008
兽药与饲料添加剂	28-180	双月刊	30.00	刘晓燕	025-83328117	江苏省南京市北京西路 17 号化工大厦九楼	210024
中国畜禽种业	80-222	月刊	96.00	赵薇	010-82106255	北京市中关村南大街 12 号图书馆楼 103 室	100081
中兽医医药杂志	54-55	双月刊	36.00	赵四喜	0931-2656034	甘肃省兰州市小西湖硷沟沿 335 号	730050