

## 苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因的克隆与表达分析

李婷, 吴成成, 李保华, 练森, 梁文星, 王彩霞\*

青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛266109

**摘要:** 以‘富士’苹果(*Malus pumila*)树皮总RNA为模版, 利用RT-PCR技术克隆木葡聚糖酶抑制蛋白基因, 命名为*MpXEGIP1*。通过生物信息学软件对基因cDNA序列、系统进化关系及理化性质进行分析, 采用荧光定量PCR技术测定*MpXEGIP1*的表达量。构建原核表达载体pET-*MpXEGIP1*, 转化大肠杆菌Rosetta (DE3), 利用SDS-PAGE和western blot检测和验证融合蛋白的表达。结果表明, 获得了*MpXEGIP1*的全长cDNA序列(登录号MG515243), 开放阅读框1 344 bp, 编码447个氨基酸。*MpXEGIP1*编码蛋白的理论分子量约48.77 kDa, 为亲水的不稳定蛋白; 57~419位氨基酸为木葡聚糖酶抑制蛋白保守域。序列多重比对及系统进化树分析表明, *MpXEGIP1*编码氨基酸序列与‘金冠’苹果XEGIP完全一致, 其次与梨XEGIP序列相似性81%, 三者亲缘关系较近。‘富士’枝条接种腐烂病菌后, *MpXEGIP1*显著上调表达。原核表达和western blot分析表明, 该蛋白以包涵体形式存在, 能与HIS抗体特异性结合, 证实*MpXEGIP1*编码蛋白得到成功表达。

**关键词:** 苹果; 木葡聚糖酶抑制蛋白基因; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

由黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)引起的腐烂病是苹果上的一种毁灭性病害, 每年造成巨大经济损失, 严重制约了我国苹果产业的健康发展(王彩霞等2012; 李保华等2013)。目前, 由于缺乏对病原菌-寄主互作机制的了解, 导致该病尚无法得到有效控制。腐烂病菌在侵染致病过程中, 可产生多种细胞壁降解酶, 其中包括木葡聚糖酶、纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶等(陈晓林等2012; 许春景等2016)。木葡聚糖酶(EC.3.2.1.8)通过酶解细胞壁的重要组成部分——半纤维素木葡聚糖来破坏植物细胞壁, 导致寄主产生坏死症状, 并为病原菌生长和繁殖提供营养物质(Brito等2006; Shi等2015)。

植物为保护自身免受病原物的侵害, 通过分泌降解酶抑制蛋白阻止酶对植物组织的降解, 同时激活植物的防御系统, 保护细胞壁的完整性(Biely等2008; Vasconcelos等2011)。目前, 已在植物中鉴定出了多种酶抑制蛋白如木葡聚糖酶抑制蛋白(Fierens等2007; Hou等2015; Moscetti等2015)、多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(王晓红等2015; Feng等2016; Kaewwongwal等2017)和木葡聚糖酶抑制蛋白(xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase inhibitor protein, XEGIP)(Qin等2003)等。诸多研究表明, 酶抑制蛋白是一种有效的抗病因子, 能抑制菌丝生长和孢子萌发, 在病害生物防治及抗病育种的应用中, 已显示出巨大的潜力(Moscetti等2015)。从苹果果实中分离的多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白对褐腐病菌(*Monilinia fructigena*)的生长具有显著的抑制作用(王晓利2008)。

目前, 植物木葡聚糖酶抑制蛋白的研究多集中在小麦、玉米和水稻等作物中, 已从小麦中分离出3种不同类型的木葡聚糖酶抑制蛋白TAXI型、XIP型和TLXI型(Fierens等2007; Hou等2015; Moscetti等2015)。3种类型木葡聚糖酶抑制蛋白仅抑制来源于细菌和真菌的木葡聚糖酶活性, 而对植物本身的木葡聚糖酶没有影响, 其在结构上与已知的能抵抗病原菌入侵和参与植物防御作用的蛋白质有序列相似性(Biely等2008; Sanjit等2010)。Vasconcelos等(2011)报道了一个克隆自咖啡的木葡聚糖酶抑制蛋白基因*CaclXIP*, 其原核表达产物对大豆锈病菌(*Phakopsora pachyrhizi*)孢子萌发的抑制率高达45%。此外, 尚未见关于木本植物木葡聚糖酶抑制蛋白的研究报道。

为鉴定苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因, 利用小麦木葡聚糖酶抑制蛋白基因的氨基酸序列, 在phytozome网站查找苹果同源基因, 发现其与苹果木葡聚糖酶抑制蛋白(XEGIP)基因高度同源。本研究以‘富士’苹果为材料, 通过克隆苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因(*MpXEGIP1*), 对其序列进行生物信息学分析, 利用定量PCR技术分析基因表达特性, 并通过原核表达获得重组蛋白, 旨在为进一步研究该基因在苹果抗病性中的作用机制奠定基础。

收稿 2018-02-07 修定 2018-06-07

资助 国家自然科学基金(31272001和31371883)、现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28)、国家重点研发计划(2016YFD0201122)和山东省“泰山学者”建设工程专项。

\* 通讯作者(cxwang@qau.edu.cn)。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

1~2年生‘富士’苹果(*Malus pumila* Mill.)健康枝条,用于提取总RNA,反转录获得cDNA,作为基因克隆的模板。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植物总RNA提取和cDNA合成

利用RNAprep Pure植物总RNA提取试剂盒(北京天根公司)进行总RNA的提取,使用P330超微量分光光度计(德国Implen公司)检测RNA的浓度和质量。以5 μg总RNA为模板, Oligo (dT)<sub>18</sub>为引物,参照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒(大连TaKaRa公司)说明书合成cDNA。

#### 1.2.2 苹果*MpXEGIP1*基因的克隆

根据NCBI数据库中已有的小麦木聚糖酶抑制蛋白基因序列和<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>网站公布的苹果全基因组序列,利用Oligo 7软件设计基因的上下游引物MpXEGIP1Fwd和MpXEGIP1Rev(表1)。以上述cDNA为模板,PCR扩增体系为: 12.5 μL 2×Prime STAR Max DNA Polymerase(大连TaKaRa公司)、上下游引物各0.5 μL、cDNA为0.25 μL, ddH<sub>2</sub>O补足25 μL。PCR反应程序为: 95°C预变性3 min; 90°C变性10 s, 59°C退火15 s, 72°C延伸7 s, 35个循环; 最后72°C延伸10 min。经1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收PCR产物,连接至载体pMD18T,转化大肠杆菌DH5α,筛选阳性克隆提取质粒,委托青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

#### 1.2.3 *MpXEGIP1*序列的生物信息学分析

将克隆得到的*MpXEGIP1*及其推导的氨基酸

序列在NCBI网站进行BLAST分析,用MpXEGIP1与其它具有木葡聚糖酶抑制蛋白结构的序列进行系统进化分析。蛋白质的基本理化性质预测利用ExPASy生物信息学网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)的ProtParam工具进行;使用SOPMA([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl))在线软件进行蛋白质二级结构预测。

#### 1.2.4 *MpXEGIP1*基因的表达分析

选取长势一致的1~2年生‘富士’枝条,用电烙铁造成直径1~2 mm伤口,用活化培养3 d的腐烂病菌接种于枝条烫伤处,用保鲜膜固定并保湿(王彩霞等2012)。接种后12、24、48、72和120 h分别取病健交界处组织,提取样品总RNA,利用Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒反转录获得cDNA。根据*MpXEGIP1*基因序列,设计合成定量PCR引物MpXEGIP1-qF和MpXEGIP1-qR(表1),以苹果*EF1α*基因作为内参,反应体系20 μL: SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 10.0 μL、上下游引物各0.4 μL、cDNA模板1.0 μL、去离子水8.2 μL。反应条件为: 95°C预变性30 s; 95°C变性5 s, 58°C退火20 s, 72°C延伸15 s, 40个循环。上述反转录的cDNA梯度稀释后作为模板,分别进行荧光定量PCR反应,绘制标准曲线,确定引物扩增效率(Zhang等2016; 冀美玲等2017)。以接种PDA的苹果枝条作为对照,每个样品重复3次,根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算*MpXEGIP1*的相对表达量(Livak和Schmittgen 2001)。

#### 1.2.5 *MpXEGIP1*表达载体构建和原核表达

去除MpXEGIP1前23位的信号肽序列,根据*MpXEGIP1*序列及原核表达载体pET32a的多克隆

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in the present study

名称	序列(5'→3')	用途
MpXEGIP1Fwd	ATGGCTTCTTTCCTTCCTAAATTTGGT	扩增 <i>MpXEGIP1</i> 的cDNA全长
MpXEGIP1Rev	TTATGGCTCATCAGTGCACCTCAG	
MpXEGIP1-qF	CTTACCAACTAGCCTCCCACT	qPCR用于检测 <i>MpXEGIP1</i> 表达
MpXEGIP1-qR	CCAACCCCTTGTCTGGTGT	
EF1α-F	ATTCAAGTATGCCTGGGTGC	qPCR检测内参基因
EF1α-R	CAGTCAGCCTGTGATGTTCC	
MpXEGIP1pF	CGCGGATCCGCGACACTCAAACCCAA	<i>MpXEGIP1</i> 原核表达载体构建
MpXEGIP1pR	CCGGAATTCATTATGGCTCATCAGTGCACCTC	

位点, 设计一对带有酶切位点的引物MpXEGIP1pF (划线处为BamHI酶切位点)和MpXEGIP1pR (划线处为EcoRI酶切位点) (表1)。利用BamHI和EcoRI对PCR产物及pET32a进行双酶切, 获得重组表达载体pET-MpXEGIP1。

将重组质粒pET-MpXEGIP1转化大肠杆菌Rosetta (DE3), 挑取阳性单克隆接种到含有50 mg·L<sup>-1</sup>氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37°C、150 r·min<sup>-1</sup>培养过夜。按1%的接种量转接到新鲜的LB培养基中, 待OD<sub>600</sub>达0.6~0.8时, 加入异丙基β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>, 于不同时间(2、4、6、8、10和12 h)取样; 并添加不同终浓度的IPTG (0、0.1、0.25、0.5、1.0和2.0 mmol·L<sup>-1</sup>)分别进行诱导。菌液离心后, 沉淀用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.8)重悬浮, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

### 1.2.6 融合蛋白的可溶性和western blot检测

在15、25和37°C条件下, 分别用IPTG进行诱导, 收集菌体冰浴条件下超声破碎, 于4°C、10 000×g离心10 min, 收集上清和沉淀(付楠霞等2014)。经SDS-PAGE分离后将蛋白电转移至PVDF膜(美国Bio-Rad公司), 首先用5%脱脂奶粉(W/V)室温封闭2 h, 随后加入6×HIS单克隆抗体室温孵育2 h, 用TBST缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.8, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.05% Tween 20)洗涤PVDF膜3次; 加入碱性磷酸酯酶标记的马抗鼠IgG, 室温孵育2 h, 最后用氮蓝四唑/5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐(NBT/BCIP)底物进行显色10 min, 终止反应观察拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 苹果MpXEGIP1基因的克隆和序列分析

选取健康‘富士’枝条提取总RNA, 反转录成cDNA, 用特异性引物进行PCR扩增, 产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 约1 300 bp处有一特异性条带(图1)。将条带进行克隆测序获得1 344 bp的核苷酸序列, 在NCBI数据库中Blastn发现该序列与‘金冠’苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因(登录号XM008-365760.2)序列相似性最高为99.9%, 进一步用推导的氨基酸序列进行Blastp发现, MpXEGIP1还与梨和桃木葡聚糖酶抑制蛋白具有较高相似性。由此

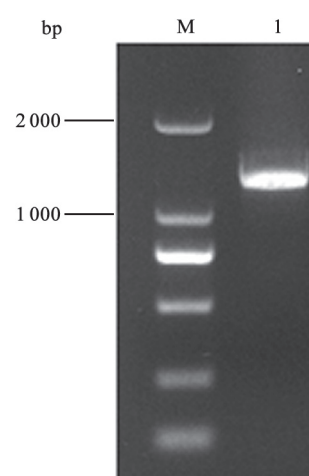


图1 苹果MpXEGIP1的PCR扩增  
Fig.1 PCR amplification of MpXEGIP1 from *M. pumila*  
M: DNA分子量标准; 1: MpXEGIP1 PCR产物。

判断克隆所得的全长cDNA序列为苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因, 命名为MpXEGIP1, 并将序列上传至GenBank数据库(登录号MG515243)。

### 2.2 MpXEGIP1编码蛋白的理化性质和结构预测

利用ExPASy的ProtParam在线分析软件预测, MpXEGIP1的理论分子量约48.77 kDa, 理论等电点8.61, 不稳定系数47.54, 平均疏水系数为0.02, 预测为疏水的不稳定蛋白。氨基酸组成中酸性氨基酸(Asp+Glu) 24个, 碱性氨基酸(Arg+Lys) 30个, 说明MpXEGIP1带正电荷。此外, 该基因编码的氨基酸序列有信号肽, 在23与24位氨基酸之间存在裂解位点, 是一种分泌型蛋白。利用SOMPA在线软件对MpXEGIP1蛋白的二级结构进行分析, 发现其二级结构主要由α-螺旋、β-转角、无规则卷曲和延伸链4种结构类型组成, 其中无规则卷曲含量最高, 占45.41%; 其次为延伸链, 含量占27.04%; 最少的是β-转角, 仅占10.07%。MpXEGIP1有一段类木葡聚糖酶抑制蛋白保守序列(57~419), 257~416位为木葡聚糖酶抑制蛋白的C端, MpXEGIP1与天冬氨酸蛋白酶家族的胃蛋白酶在结构上同源(图2)。

### 2.3 MpXEGIP1编码氨基酸序列的系统进化分析

氨基酸序列多重比对发现, MpXEGIP1与‘金冠’苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因编码氨基酸序列完全一致, 其次与梨相似性为81%, 与桃相似性为68%。利用Blastp进行同源性搜索, 选取不同植物来源的12个木葡聚糖酶抑制蛋白氨基酸序列, 采

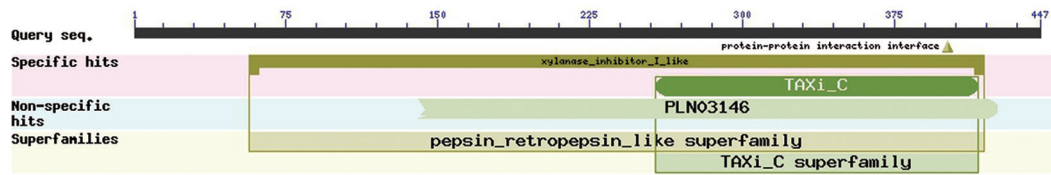


图2 苹果MpXEGIP1功能结构域分析

Fig.2 The conserved functional domains analysis of MpXEGIP1 from *M. pumila*

用MEGA 5.1软件中的邻接法构建系统发育树。结果(图3)显示, 苹果与梨聚在一个分支, 说明MpXEGIP1与梨中XEGIP的亲缘关系较近, 桃子在另一个分支。桑树、苜蓿和番茄单独聚在一个分支, 与MpXEGIP1亲缘关系较远。

#### 2.4 腐烂病菌侵染过程中苹果组织中MpXEGIP1的表达

腐烂病菌LXS080601接种烫伤‘富士’活体枝条, 接种后48 h可观察到明显的发病症状, 病斑面积为 $1.96 \text{ cm}^2$ ; 随接种时间延长, 病斑不断扩展, 120 h时达到 $6.58 \text{ cm}^2$ 。于接种后定期取样, 采用荧光定量PCR技术测定了枝条中MpXEGIP1表达量的时序变化。图4显示, 腐烂病菌接种后24 h, MpXEGIP1的表达量开始显著升高, 随后表达量略有降低, 接种后48 h时与对照无显著差异, 之后表达量急剧升高, 接种后72和120 h分别为对照的2.95和8.21倍。

#### 2.5 MpXEGIP1原核表达条件优化和SDS-PAGE检测

利用BamHI和EcoRI对重组质粒pET-MpXEGIP1进行双酶切验证, 表明原核表达载体pET-MpXEGIP1构建成功。将重组质粒pET-MpXEGIP1转化大肠杆菌Rosetta (DE3), 经 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG诱导后, 于不同时间取样进行SDS-PAGE检测。图5显示, 空载体诱导后和重组质粒未诱导时, 均未出现明显的特异性条带, 而重组质粒经IPTG诱导后产生了一条分子量约66 kDa的特异性条带, 由于载体中HIS表达标签为18 kDa, 所诱导蛋白的实际大小约为48 kDa, 与MpXEGIP1预测结果(48.77 kDa)一致, 表明苹果MpXEGIP1基因在大肠杆菌中已成功表达。融合蛋白在诱导后2 h即开始高效表达, 且一直趋于稳定状态。从图6可看出,  $0.05 \sim 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IPTG均可诱导融合蛋白的表达, 但不同浓度IPTG对MpXEGIP1在大肠杆菌中的表达量没有显著影响。

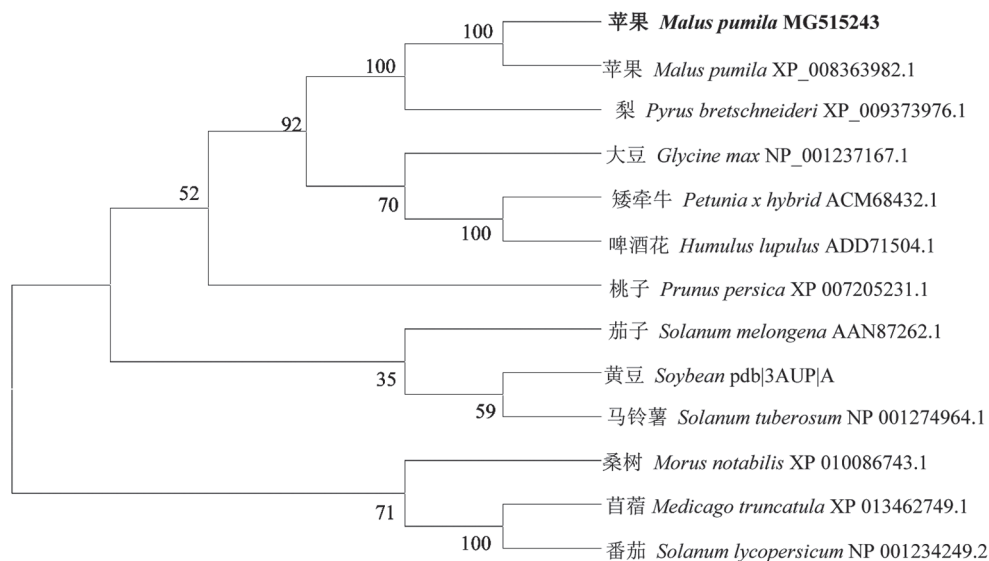


图3 苹果MpXEGIP1与其它植物XEGIP系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of XEGIP from *M. pumila* and other plants

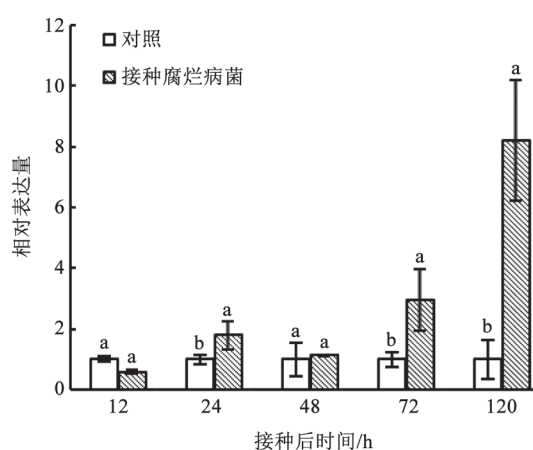


图4 腐烂病菌接种苹果枝条后MpXEGIP1的表达量

Fig.4 The expression level of MpXEGIP1 in *M. pumila* twigs inoculated by *V. mali*

基因相对表达量均为3个生物学重复的平均值±标准差。不同小写字母表示处理与对照差异显著( $P < 0.05$ )。

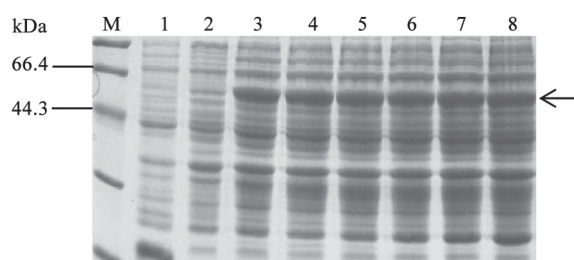


图5 pET-MpXEGIP1在大肠杆菌中表达蛋白的SDS-PAGE检测

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant MpXEGIP1 protein in *E. coli*

M: 蛋白分子量标准; 1: pET32a诱导8 h; 2: pET-MpXEGIP1未诱导; 3~8: pET-MpXEGIP1于37°C诱导2、4、6、8、10和12 h, 箭头所指为目的条带。

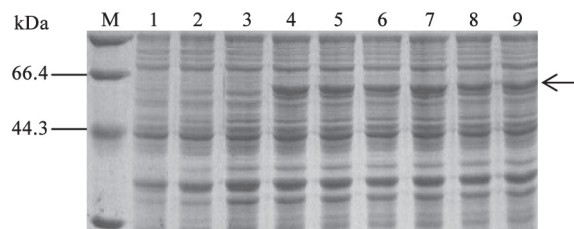


图6 不同IPTG浓度对pET-MpXEGIP1在大肠杆菌中表达的影响

Fig.6 The effect of different IPTG concentrations on recombinant MpXEGIP1 protein expression in *E. coli*

M: 蛋白分子量标准; 1: pET32a未诱导; 2: pET32a诱导后; 3~9: pET-MpXEGIP1于浓度分别为0、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0和2.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG下诱导6 h, 箭头所指为目的条带。

## 2.6 融合蛋白的可溶性和western blot分析

诱导后菌体经超声破碎, 分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE检测。结果(图7)显示, 温度可影响MpXEGIP1在大肠杆菌中的表达, 25°C时蛋白表达量最高, 但不同温度诱导得到的蛋白均为包涵体。用HIS表达标签的特异性单克隆抗体对融合表达蛋白进行western blot分析, 结果(图8)显示, pET-MpXEGIP1经IPTG诱导后产生约66 kDa目标条带与HIS单克隆抗体发生了特异性识别, PVDF膜上出现单一免疫条带, 而与诱导后pET32a空载体和未诱导的pET-MpXEGIP1均无免疫反应, 表明MpXEGIP1编码蛋白得到正确表达。

## 3 讨论

木聚糖是植物细胞壁的主要半纤维素成分, 同时也是最丰富的可再生半纤维素, 由于木聚糖复杂的结构, 因此需要多个水解酶的协同作用才能有效和完全水解(Wang等2011)。植物病原菌的木聚

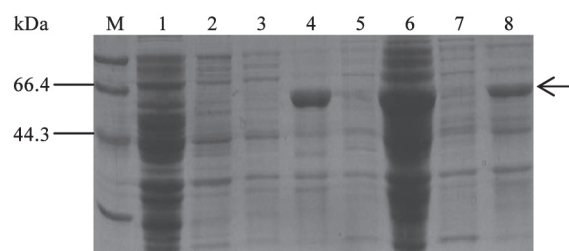


图7 融合蛋白可溶性分析

Fig.7 Solubility analysis of recombinant MpXEGIP1 protein

M: 蛋白分子量标准; 1: pET32a诱导后; 2: pET-MpXEGIP1未诱导; 3和4: 15°C诱导, 菌液超声破碎后上清和沉淀; 5和6: 25°C诱导, 菌液超声破碎后上清和沉淀; 7和8: 37°C诱导, 菌液超声破碎后上清和沉淀, 箭头所指为目的条带。

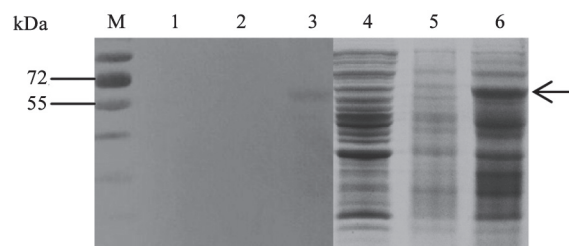


图8 融合蛋白Western blot分析

Fig.8 Western blot analysis of recombinant MpXEGIP1 protein

M: 蛋白分子量标准; 1和4: pET32a诱导8 h; 2和5: pET-MpXEGIP1未诱导; 3和6: pET-MpXEGIP1诱导8 h, 箭头所指为目的条带。1~3用于蛋白印记, 4~6用于考马斯蓝染色。

糖酶在植物与病原菌互作机制研究和植物抗病防御领域中备受关注,植物为保护其自身免受病原木聚糖酶的伤害,也进化出对抗病原菌所分泌木聚糖酶的抑制蛋白。这些抑制蛋白可能通过2种方式抵抗病原菌的侵害,一种是降低病原菌细胞壁降解酶的活性,另一种是确保植物产生具有防御激发子活性的多糖片段,以防这些多糖片段在无抑制蛋白存在的情况下被降解(Enkerli等1999;陈红歌等2009)。目前仅在小麦、大麦、黑麦和玉米等谷物中确定了木聚糖酶抑制蛋白的存在和功能,而其它植物中尚未见报道。

利用小麦木聚糖酶抑制蛋白基因序列,在苹果全基因组序列中进行同源比对,发现其与苹果木葡聚糖酶抑制蛋白序列高度同源。本研究以‘富士’为材料,采用RT-PCR技术获得了苹果木葡聚糖酶抑制蛋白基因的CDS序列,命名为*MpXEGIP1*,开放阅读框1 344 bp,编码447个氨基酸,理论分子量48.77 kDa。NCBI在线软件Blastn、Blastp分析显示*MpXEGIP1*核苷酸及其推导的氨基酸序列与‘金冠’苹果*XEGIP*序列相似性分别为99%和100%。系统进化树分析表明,*MpXEGIP1*与梨木葡聚糖酶抑制蛋白基因亲缘关系较近,聚在一个分支,相似性为81%;而与桃亲缘关系稍远,桃单独自成一个分支,相似性为68%。苹果*MpXEGIP1*具有木聚糖酶抑制蛋白结构域,推测该蛋白具有类似木聚糖酶抑制蛋白的功能。‘富士’枝条接种苹果树腐烂病菌后,*MpXEGIP1*表达水平显著升高,接种后120 h,基因表达量为对照的8.21倍,暗示该基因在苹果抵抗病原菌侵染过程中发挥重要作用。

pET32a载体可用来克隆构建和高水平融合表达带有109个氨基酸Trx标签的蛋白质序列。将基因插入到载体的多克隆位点,能够获得融合表达蛋白质。同时融合蛋白包含His标签和S标签,用于蛋白的表达检测和纯化。Rosetta菌株来源于BL21宿主菌,含有大肠杆菌中稀少的真核细胞密码子,可增加蛋白表达水平。本研究以pET32a为载体,转化大肠杆菌Rosetta (DE3)菌株,在IPTG诱导下高效表达了带有HIS标签的*MpXEGIP1*融合蛋白,但诱导时间和IPTG浓度对蛋白表达量有明显影响。研究发现,温度可影响融合蛋白的表达,25°C条件下诱导融合蛋白的表达量显著高于15和37°C。一

般情况下,较低的诱导温度和IPTG浓度有利于原核表达体系中可溶性蛋白的形成,但本研究中3个温度条件下获得的*MpXEGIP1*融合蛋白均以包涵体形式存在,因此,可能并不是诱导条件而是因为缺乏正确的蛋白折叠和加工修饰,从而导致了*MpXEGIP1*在原核表达系统中形成大量包涵体(曾祥玲等2016)。Fierens等(2007)运用酵母真核表达系统对小麦*TLXI*基因进行了表达,并证明*TLXI*对大部分GH11木聚糖酶具有抑制作用,但*MpXEGIP1*的蛋白表达是否可以借鉴酵母表达系统有待进一步研究。该研究不仅为进一步认识*MpXEGIP1*的基因特性和功能提供了依据,也为全面揭示该基因在苹果抗病性中的作用机制奠定了基础。

#### 参考文献(References)

- Biely P, Leathers TD, Czigarova M, et al (2008). Endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibitor in leaves and roots of germinated maize. *J Cereal Sci*, 48: 27–32
- Brito N, Espino JJ, González C (2006). The endo- $\beta$ -1,4-xylanase *Xyn11A* is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (1): 25–32
- Chen HG, Liu YF, Liu LW, et al (2009). Roles of endoxylanases and their inhibitors in plant-phytopathogen interaction. *Plant Physiol J*, 45 (2): 176–182 (in Chinese with English abstract) [陈红歌, 刘艳芳, 刘亮伟等(2009). 木聚糖酶和木聚糖酶抑制蛋白在植物-病原菌互作中的作用. *植物生理学报*, 45 (2): 176–182]
- Chen XL, Niu CW, Li BH, et al (2012). The kinds and activities of cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa ceratosperma*. *Acta Agric Boreali Sin*, 27 (2): 207–212 (in Chinese with English abstract) [陈晓林, 牛程旺, 李保华等(2012). 苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的种类及其活性分析. *华北农学报*, 27 (2): 207–212]
- Enkerli J, Felix G, Boller T (1999). The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol*, 121 (2): 391–397
- Feng C, Zhang X, Wu T, et al (2016). The polygalacturonase-inhibiting protein 4 (*ospqip4*), a potential component of the *qblsr5a* locus, confers resistance to bacterial leaf streak in rice. *Planta*, 243 (5): 1297–1308
- Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, et al (2007). TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem J*, 403 (2): 583–591
- Fu NX, Zhai F, Jiang M, et al (2014). cDNA cloning sequence analysis and prokaryotic expression of farnesyl pyrophosphate synthase from *Epicauta gorhami* marseul. *Sci Agric Sin*, 47 (2): 273–283 (in Chinese with English abstract) [付楠霞, 翟枫, 姜鸣等(2014). 锯角豆芫菁法尼基焦磷

- 酸合酶的cDNA克隆、序列分析及原核表达. 中国农业科学, 47 (2): 273–283]
- Hou CX, Lv T, Zhan YH, et al (2015). Overexpression of the RIXI xylanase inhibitor improves disease resistance to the fungal pathogen, *Magnaporthe oryzae*, in rice. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 120 (1): 167–177
- Ji ML, Li L, Chen M, et al (2017). Identification and expression analysis of *PMEI* gene family in peach plant. *Plant Physiol J*, 53 (11): 1988–1996 (in Chinese with English abstract) [冀美玲, 李玲, 陈敏等(2017). 桃果胶甲酯酶抑制因子 *PMEI* 基因家族的鉴定及表达分析. 植物生理学报, 53 (11): 1988–1996]
- Kaewwongwal A, Chen J, Somta P, et al (2017). Novel alleles of two tightly linked genes encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (*vrpgip1* and *vrpgip2*) associated with the br locus that confer bruchid (*Callosobruchus* spp.) resistance to mungbean (*Vigna radiata*) accession v2709. *Front Plant Sci*, 8: 1692
- Li BH, Wang CX, Dong XL (2013). Research progress in apple diseases and problems in the disease management in China. *Plant Protect*, 39 (5): 46–54 (in Chinese with English abstract) [李保华, 王彩霞, 董向丽(2013). 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题. 植物保护, 39 (5): 46–54]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402–408
- Moscetti I, Faoro F, Moro S, et al (2015). The xylanase inhibitor TAXI-III counteracts the necrotic activity of a *Fusarium graminearum* xylanase in vitro and in durum wheat transgenic plants. *Mol Plant Pathol*, 16 (6): 583–592
- Qin Q, Bergmann CW, Rose JK, et al (2003). Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *Plant J*, 34: 327–338
- Sanjit K, Nagendra S, Biswajit M, et al (2010). Modulation of inhibitory activity of xylanase- $\alpha$ -amylase inhibitor protein (XAIP): binding studies and crystal structure determination of XAIP-II from *Scadoxus multiflorus* at 1.2 Å resolution. *BMC Struct Biol*, 10 (1): 1–11
- Shi XP, Yu DD, Kong QQ, et al (2015). Optimizing prokaryotic expression of a xylanase gene from the apple pathogen *Valsa mali* var. *mali*. *J Food Sci Tech Mys*, 9 (9): 701–705
- Vasconcelos EAR, Santana CG, Godoy CV, et al (2011). A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. *BMC Biotechnol*, 11 (1): 14
- Wang CX, Dong XL, Zhang ZF, et al (2012). Outbreak and the reasons of apple valsa canker in Yantai apple production area in 2011. *Plant Protect*, 38 (3): 136–138 (in Chinese with English abstract) [王彩霞, 董向丽, 张振芳等(2012). 2011年烟台苹果产区腐烂病发病情况调查与原因分析. 植物保护, 38 (3): 136–138]
- Wang J, Zhang H, Wu M, et al (2011). Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, *Auxyn10A*, from *Aspergillus usami*. *Biotechnol Lett*, 33 (5): 1029–1038
- Wang XH, Zhu PP, Liang YM, et al (2015). Molecular cloning and functional analysis of polygalacturonase-inhibiting protein gene *MaPGIP1* from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb). *Acta Agron Sin*, 41 (9): 1361–1371 (in Chinese with English abstract) [王晓红, 朱攀攀, 梁燕梅等(2015). 桑树多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因 *MaPGIP1* 的克隆及功能分析. 作物学报, 41 (9): 1361–1371]
- Wang XL (2008). The purification of apple PGIP and its inhibition effect against fruit fungi (dissertation). Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [王晓利(2008). 苹果多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的分离纯化与抑菌作用研究(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Xu CJ, Wu YX, Dai QQ, et al (2016). Function of polygalacturonase genes *Vmpg7* and *Vmpg8* of *Valsa mali*. *Sci Agric Sin*, 49 (8): 1489–1498 (in Chinese with English abstract) [许春景, 吴玉星, 戴青青等(2016). 苹果树腐烂病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *Vmpg7* 和 *Vmpg8* 的功能. 中国农业科学, 49 (8): 1489–1498]
- Zeng XL, Zheng RR, Luo J, et al (2016). Cloning and characterization of cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes from *Osmanthus fragrans*. *Acta Horti Sin*, 43 (3): 525–537 (in Chinese with English abstract) [曾祥玲, 郑日如, 罗靖等(2016). 桂花C4H基因的克隆与表达特性分析. 园艺学报, 43 (3): 525–537]
- Zhang Y, Shi XP, Li BH, et al (2016). Salicylic acid confers enhanced resistance to glomerella leaf spot in apple. *Plant Physiol Bioch*, 106: 64–72

## Molecular cloning and expression analysis of *XEGIP* in *Malus pumila*

LI Ting, WU Cheng-Cheng, LI Bao-Hua, LIAN Sen, LIANG Wen-Xing, WANG Cai-Xia\*

College of Plant Health and Medicine, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong, Shandong Province  
Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

**Abstract:** Xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase inhibitor protein (*XEGIP*) gene was amplified by RT-PCR from barks of *Malus pumila* 'Fuji', named *MpXEGIP1*. The full-length cDNA sequence, phylogenetic relationship and physicochemical properties of this gene were analyzed by a variety of bioinformatics software. The expression levels of *MpXEGIP1* were analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR). Then, a recombinant plasmid pET-*MpXEGIP1* was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Recombinant protein expression and solubility of *MpXEGIP1* were detected and verified by SDS-PAGE and western blot. The results showed that the full-length cDNA sequence of *MpXEGIP1* from *M. pumila* was obtained and its GenBank accession number was MG515243. The open reading frame (ORF) of 1 344 bp encodes 447 amino acid residues with a predicted molecular weight of 48.77 kDa. *MpXEGIP1* is an unstable hydrophilic protein and has a conserved domain of xylanase inhibitor at the amino acid residues from 57 to 419. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that the encoded protein had the closest genetic relationship with *M. pumila* 'Golden Delicious' and *Pyrus bretschneideri* *XEGIP* and the similarities of amino acid sequences were 100% and 81%, respectively. qPCR results showed that the expression of *MpXEGIP1* was significantly up-regulated in apple twigs after inoculation by *Valsa mali*. SDS-PAGE and western blot results showed that the fused protein mainly existed in the form of inclusion body, and the protein could be specifically recognized by the HIS monoclonal antibody, which further confirmed that *MpXEGIP1* protein was successfully expressed.

**Key words:** apple (*Malus pumila*); *MpXEGIP1*; cloning; bioinformatic analysis; expression analysis

Received 2018-02-07 Accepted 2018-06-07

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31272001 and 31371883), the Chinese Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-28), the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0201122) and the Taishan Scholar Construction Foundation of Shandong Province.

\*Corresponding author (cxwang@qau.edu.cn).