

doi:10.11937/bfyy.20170730

## 番茄 II 型 metacaspase 蛋白 SlMC7 抗体效价检测及其在果实中表达特性分析

王志超<sup>1,2</sup>, 马秋敏<sup>2</sup>, 叶彦雄<sup>2</sup>, 温 帅<sup>2</sup>, 曹景顺<sup>2</sup>, 曲桂芹<sup>2</sup>

(1. 河南省食品药品审评查验中心, 河南 郑州 450046; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要:**以原核表达的番茄 SlMC7 重组蛋白为抗原, 制备 SlMC7 多克隆抗体, 采用 ELISA 和蛋白质点杂的方法, 研究了番茄 II 型 metacaspase 蛋白(SlMC7)的抗体效价和表达特性, 并对 SlMC7 蛋白及基因在番茄果实发育过程中的表达差异进行了研究, 以期为后续的 SlMC7 在番茄果实中功能性研究提供材料基础和参考依据。结果表明: SlMC7 多克隆抗体效价在 256 000 以上, 在 1:10 000 的稀释度下, 可识别低至 1.6 ng 的纯蛋白。对各时期番茄果实 Western-blot 和 Real time PCR 结果表明, 相对于绿熟期, SlMC7 蛋白及基因在破色期果实中表达量显著上升, 表明 SlMC7 与番茄果实成熟存在一定相关性。

**关键词:** metacaspase 蛋白; 抗体; 蛋白表达; 番茄

**中图分类号:** S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)16-0050-06

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine aspartic acid specific, caspase) 是在动物细胞中发现的一类进化上非常保守的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶<sup>[1-3]</sup>。借助蛋白序列结构性分析与基因组测序技术, UREN 等<sup>[4]</sup>于 2000 年在植物、真菌、原生动物中发现了与 caspase 具有序列结构同源性的蛋白, 命名为 metacaspase(MCs)。MCs 是存在于植物<sup>[5]</sup>、真菌<sup>[6]</sup>以及原生生物<sup>[7-8]</sup>中的一种半胱氨酸蛋白酶。MCs 根据结构和序列相似性分为 I 型和 II 型 2 种<sup>[9]</sup>。

近年来的研究表明, MCs 在细胞凋亡, 细胞自噬, 细胞分化和抗病等生理过程中发挥着重要作用。其中大多数工作集中在拟南芥中, BOLLHONER 等<sup>[10]</sup>研究发现拟南芥 II 型 MCs At-

MC9 在木质部细胞死亡的过程中具有重要作用, 其能够在导管壁细胞液泡破裂后参与细胞内容的降解。对于拟南芥中 I 型 MCs, COLL 等<sup>[11]</sup>发现 AtMC1 具有与自噬作用类似的功能, 即 MCs 和自噬作用一起都具有触发细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 的功能, 在幼苗中调节超敏反应 (hypersensitive reaction, HR) 型的细胞死亡, 减缓成熟植株衰老。

除了拟南芥, MCs 在其它物种中也开展了相应的功能研究, 在本氏烟草抵御大豆炭疽病时, 研究人员发现病毒诱导烟草 II 型 metacaspase 基因 NbMCA1 沉默的植株在感染 *Colletotrichum destructivum* (一种豇豆的真菌病原体) 以后病变症状增强, 但感染丁香假单胞菌后并没有上述变化<sup>[12]</sup>, 说明烟草 NbMCA1 在不同的病害反应中作用不同。MININA 等<sup>[13]</sup>的研究发现, 挪威云杉 mcII-Pa 是胚柄细胞死亡的一种关键蛋白酶, 其中挪威云杉胚胎胚柄细胞死亡过程中涉及到的细胞自噬和 II 型 MCs mcII-Pa 有密切的联系, 自噬的活化过程处于 mcII-Pa 的下游, mcII-Pa 基因被敲除之后, 相关的细胞自噬以及体细胞发育

**第一作者简介:** 王志超 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物生理。E-mail: wangzhichao101@126.com.

**责任作者:** 曲桂芹 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为果蔬成熟衰老生理及转基因植物功能分析。E-mail: quguiqin2000@sina.com.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (31672207)。

**收稿日期:** 2017-04-05

过程被终止。

番茄中具有 6 种 I 型和 2 种 II 型 MCs。番茄中 MCs 研究最早发现灰霉菌侵染番茄叶片后可诱导 II 型 MCs (SiMC7) 表达量上调<sup>[2]</sup>。近些年的研究也表明,体外重组表达的番茄 II 型 MCs (SiMC7) 呈现自水解自激活现象<sup>[14]</sup>。MCs 作为植物中与动物 PCD 关键因子 caspase 蛋白酶家族结构相似的一类蛋白,其功能的研究还处在起步阶段。目前对于番茄 II 型 metacaspase 的研究尚在起步阶段,目前报道的国内外相关的研究比较少。虽然在植物的发育和胁迫反应中 MCs 基因的表达发生了变化,但是否在蛋白表达层面也有改变就需要获得 MCs 的抗体。该研究在克隆 II 型番茄 MCs (SiMC7) 基础上,诱导并纯化了原核表达的番茄 SiMC7 蛋白,制备了 SiMC7 蛋白多克隆抗体,并初步研究了 SiMC7 在番茄果实发育过程中的表达差异,以期为后续的 SiMC7 在番茄果实中功能性研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试番茄品种为“中蔬四号” (*Lycopersicon esculentum* cv. zhongshu);大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 番茄 metacaspase SiMC7 基因原核表达载体 pET28a-LeM 由中国农业大学食品科学与营养工程学院食品生物技术实验室提供。酶标二抗、Rosetta 购于北京全式金生物技术有限公司。M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司。Bio-Rad 荧光实时定量 PCR 仪。供试小白鼠由中国科学院遗传与发育生物学研究所(简称中科院遗传所)提供。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 SiMC7 蛋白的原核表达及纯化

参考马秋敏等<sup>[15]</sup>的方法。将含点突变的 SiMC7 基因的原核表达载体 pET28a-LeM (C139) 转入 Rosetta 菌株中,37 °C、1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达。菌体经超声破碎,按 GE 公司试剂盒亲和层析,获取纯化蛋白。

#### 1.2.2 SiMC7 蛋白多克隆抗体的制备及检测

抗体的制备:将纯化后的重组蛋白送往中科院遗传所制备 SiMC7 多克隆抗体,取 7 只小鼠,

每只小鼠一次性注射 200  $\mu$ g 纯重组蛋白,取多克隆抗血清进行检测。同时做空白对照。

酶联免疫分析 (ELISA):用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> pH 9.6 碳酸盐包被缓冲液将已知抗原稀释 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>;在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL,4 °C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用 3% 牛血清白蛋白封闭,洗涤,加一定稀释的待检样品 (未知抗体) 0.1 mL 于上述已包被反应孔中,置 37 °C 孵育 1 h 后再加入酶标二抗 0.1 mL,孵育洗涤;加底物液显色:于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 °C 孵育 10~30 min;于各反应孔中加入 2 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸 0.05 mL 终止反应。结果判定:在 ELISA 检测仪上,于 450 nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,大于阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即判定为阳性。

蛋白质点杂 (protein dot blot):参考马秋敏等<sup>[16]</sup>的方法。将硝酸纤维素膜 (0.45  $\mu$ m) 浸泡于 TBST 缓冲液润湿,晾干后将膜放在酶标板上轻轻压印使其出现加样穴;将纯化的 SiMC7 139 催化位点突变融合蛋白作为抗原直接加到膜上,样品预先用 50 mmol · L<sup>-1</sup> 碳酸钠 (pH 9.6) 稀释,确保穴中的蛋白质含量依次为 51.2、25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 ng;按 Western-blot 方法进行封闭和检测,该试验所用的抗体稀释度为 1:10 000。

#### 1.2.3 番茄果实 SiMC7 蛋白的提取及 Western-blot 分析

SiMC7 蛋白的提取:取 0.5 g 果实样品粉末与 1.5 mL 10% 三氯乙酸丙酮溶液混合均匀;15 000 r · min<sup>-1</sup> 低温离心弃上清;产物用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 乙酸铵 80% 甲醇溶液混匀;离心弃上清,用 80% 丙酮洗涤沉淀;加入酚/SDS 溶液 (Tris-酚:SDS 溶液体积比为 1:1) 和 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 乙酸铵 80% 甲醇溶液置于 -20 °C 静置过夜,离心弃上清;用 80% 丙酮溶液洗涤产物,用 100  $\mu$ L SDS 缓冲液重悬产物;采用 Bradford 牛血清蛋白法测定蛋白质浓度。

Western-blot 分析提取:取变性后蛋白 5  $\mu$ g 上样,进行 SDS-PAGE 电泳试验,80 V 30 min,120 V 80 min。将分离后的蛋白质通过电转法转移到 0.45  $\mu$ m 硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉室

温封闭 2 h,一抗孵育过夜,二抗室温孵育 2 h。ECL 发光后暗室显影,分析蛋白条带。Western-blot 结果用 Quantity one 进行光密度值扫描,用 SPSS 17.0 软件对数据进行差异显著性分析, $P<0.05$  为差异显著, $P<0.01$  为差异极显著。

#### 1.2.4 番茄果实 RNA 提取及 SIMC7 表达量分析

番茄果实 RNA 提取:取研磨好的样品粉末移入液氮预冷的 10 mL 离心管中,加入 4 mL Trizol 提取液(现加 2%  $\beta$ -巯基乙醇),涡旋振荡充分混合均匀,室温静置 10 min 后,每管加入 2 mL 氯仿/异戊醇(49:1),360  $\mu$ L 无水乙醇,快速混匀,室温静置 2 min;低温离心;取上清,加入 4 mL 无水乙醇及 200  $\mu$ L 醋酸钠(3 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> pH 5.2),混匀沉淀 1 h(-20  $^{\circ}$ C);低温离心,弃上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀,离心弃上清;产物溶于适量 DEPC 处理水中;1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品质量。将 28S 和 18S 条带明亮、清晰、锐利(指条带边缘清晰),并且 28S 的亮度在 18S 条带的 2 倍左右的 RNA 样品认定为质量良好,检测后将合格的 RNA 样品分装,于-80  $^{\circ}$ C 低温条件下保存,避免反复冻融。

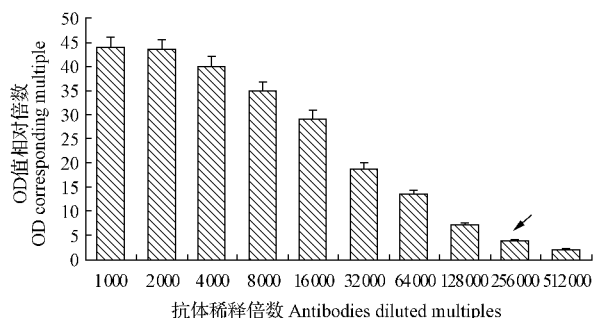
SIMC7 表达量分析:将番茄组织 RNA 进行反转录,然后进行实时定量 PCR。扩增体系为:2.5  $\times$  Real Master Mix/20  $\times$  SYBR solution 11.25  $\mu$ L、上游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L、下游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L、模板 cDNA 1  $\mu$ L、高纯水 11.75  $\mu$ L。设计番茄内参基因(*ubi-3* 基因,Accession No. X58253)引物并由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列如下:*ubi3* sense: 5'-GAAGACCTACACCAAGCCAAAGA-3'; *ubi3* antisense: 5'-ACTCCTTACGAAGCCTCTGAAC-3'。设计番茄 *LeMCA1* 基因实时定量引物: *LeM-RT*sense: 5'-CAAGCAAGGTGATGACGATGAAGG-3'; *LeM-RT*antisense: 5'-ATGAGAGTGGAAGAGGCAAGGAC-3'。

扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,68  $^{\circ}$ C 30 s,以此条件扩增 40 个循环;结束后在 60~95  $^{\circ}$ C 条件下分析熔解曲线。每个 cDNA 样品平行检测 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 SIMC7 多克隆抗体的制备与检测

用纯重组蛋白免疫小鼠后,采集小鼠血清,之后用酶联免疫和蛋白点杂的方法检测抗体的效价和灵敏度指标。由图 1 可知,随着抗体稀释倍数的增加,OD 值的相对倍数逐渐下降,当抗体稀释倍数达到 256 000 倍时,仍表现为阳性。说明 SIMC7 多克隆抗体效价在 1:256 000 以上。



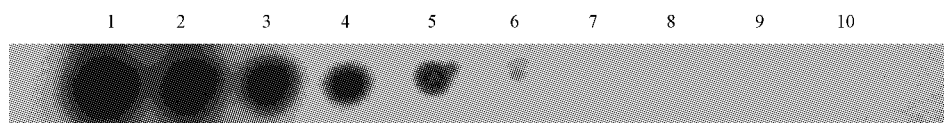
注:箭头所指为大于阴性吸光值 2.1 倍对应的抗体稀释倍数。

Note: The arrow indicates the dilution times, of which the absorbance values is 2.1 times of control.

图 1 SIMC7 蛋白的多克隆抗体酶联免疫分析

Fig. 1 ELISA analysis for SIMC7 polyclonal antibody

在 1:10 000 抗体浓度下进行多克隆抗体的灵敏度检测。如图 2 所示,随着纯重组蛋白量的减少,多克隆抗体灵敏度的信号呈现减弱的趋势,在 1.6 ng 时达到检测信号的下限。表明 SIMC7 多克隆抗体灵敏度在 1:10 000 稀释倍数下可达到 1.6 ng,具有很高的灵敏度。



注:1. 51.2 ng; 2. 25.6 ng; 3. 12.8 ng; 4. 6.4 ng; 5. 3.2 ng; 6. 1.6 ng; 7. 0.8 ng; 8. 0.4 ng; 9. 0.2 ng; 10. 0.1 ng。

图 2 SIMC7 多克隆抗体蛋白质点杂分析

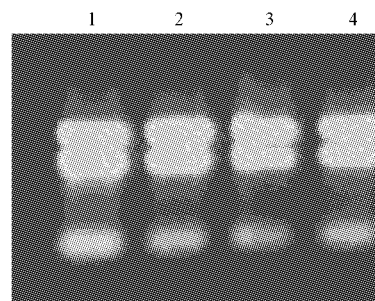
Fig. 2 Protein dot plot analysis for SIMC7 polyclonal antibodies

## 2.2 不同时期番茄果实 *SIMC7* 基因和蛋白质表达变化

由图 3 可知,总 RNA 提取消化后所得量很高,使得 28S 与 18S 条带比例不明显,但总 RNA 未发生降解,且  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.8~2.0(数据未显示),说明总 RNA 受蛋白质及其它有机试剂的污染少,可用于后续试验。

Western-blot 结果显示(图 4A、B),*SIMC7* 蛋白在绿熟期番茄果实果皮中表达量最低,与破色期、粉红色期以及红熟期番茄果实有显著差异( $P<0.05$ ),在粉红色期番茄果实中表达量最高。Real time PCR 结果显示(图 4C),*SIMC7* 在绿熟期番茄果实中表达量最低,破色期达到最高。Western-blot 和 Real time PCR 结果显示 *SIMC7* 在番茄成熟过程中表达量变化的大体趋势一致,与绿熟期相比,*SIMC7* 蛋白在破色期、粉红色期表

达量显著升高,推断 *SIMC7* 蛋白可能与番茄的成熟存在一定相关性。

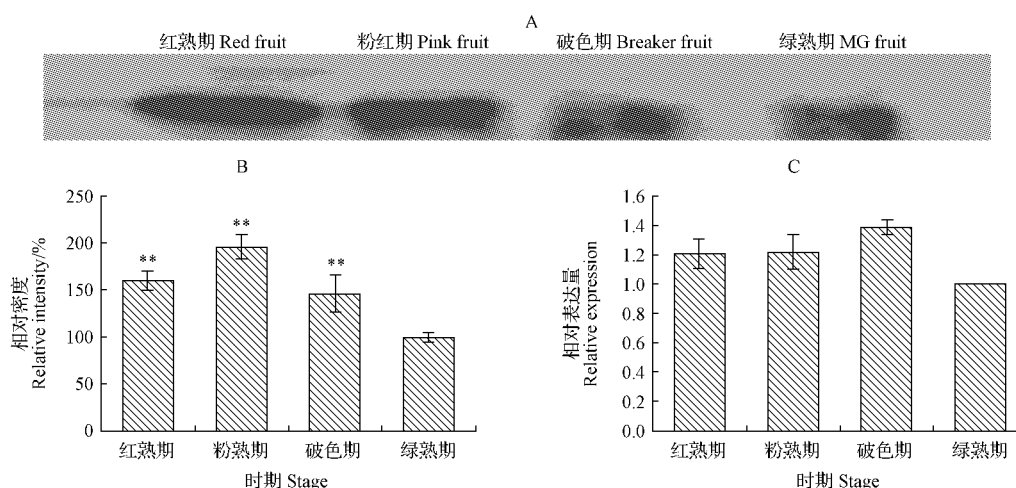


注:1. 绿熟期;2. 破色期;3. 粉红色期;4. 红熟期。

Note: 1. Mature green (MG) fruit; 2. Breaker fruit; 3. Pink fruit; 4. Red fruit.

图 3 不同时期番茄果实总 RNA

Fig. 3 Total RNA of different stage of *Lycopersicon esculentum* fruits



注:A. Western-blot 检测结果;B. 对 Western-blot 的光密度扫描值;C. Real time PCR 检测结果。

Note: A, Western-blot analysis; B. Intensity analysis for Western-blot results; C. Real time PCR analysis.

图 4 不同时期番茄果实中 *SIMC7* 基因和蛋白质的表达变化

Fig. 4 Expression level of *SIMC7* gene and protein in *Lycopersicon esculentum* fruits at different stages

## 3 结论与讨论

近年来植物 metacaspase 的功能性研究已经成为植物科学中的热门领域,而番茄作为一种重要的模式植物,其自身的 metacaspase 相关研究尚在起步阶段,而番茄 metacaspase 的功能性研究无疑会具有重要的意义。该试验在克隆 II 型番茄 MCs *SIMC7* 基因基础上,诱导并纯化了原

核表达的催化位点 139 突变(C139)番茄 *SIMC7* 蛋白,制备了 *SIMC7* 多克隆抗体,并进行了效价分析。并对 *SIMC7* 在番茄果实发育过程中的表达差异做了初步探讨。通过对番茄 *SIMC7* 蛋白表达的变化分析,为后续通过抗体进行的免疫共沉淀获取和体内与 *SIMC7* 作用的蛋白研究奠定了一个良好的基础。

通过对不同时期番茄果实 Western-blot 和

Real time PCR 检测发现,在 4 个时期果实中, *SIMC7* 基因都有表达,绿熟期果实中 *SIMC7* 表达量相对较低,与破色期、粉红期以及红熟期有显著差异。在转录水平上,破色期出现表达高峰,到粉红期直至红熟期有所下降。在蛋白质水平上, *SIMC7* 在粉红期出现表达高峰,红熟期有所下降,表达高峰相对于转录水平有所延迟,但总体趋势不变,推测 *SIMC7* 可能与番茄果实成熟有一定的相关性。

MCs 与动物细胞凋亡关键蛋白酶 caspase 在蛋白质结构上具有相似性,那么 MCs 是否在 PCD 中发挥着一定的功能。HOEBERICHTS 等<sup>[16]</sup>研究表明,番茄 *SIMC7* 在番茄灰霉病菌诱导的 PCD 中表达量上调,说明 *SIMC7* 可能参与了番茄灰霉病菌诱导的 PCD。SUAREZ 等<sup>[17]</sup>研究表明,挪威云杉体细胞胚胎发生过程中,其 MCs(mcll-Pa)从细胞质转移到细胞核并最终使细胞分化,说明 MCs 在挪威云杉体细胞胚胎发生中是 PCD 的参与者。由此可见,MCs 可能在植物生长发育过程中或者对病害的抵御过程中发挥了重要的作用。该研究中 *SIMC7* 为 II 型 MCs,且根据之前蛋白质序列比对结果, *SIMC7* 蛋白与拟南芥中 metacaspase 4 以及挪威云杉 metacaspase 都具有较高的同源性,后续试验将开展 *SIMC7* 在番茄果实发育和胁迫中功能性的研究。

## 参考文献

- [1] CRYNS V, YUAN J. Proteases to die for [J]. *Genes Dev*, 1998(12):1551-1570.
- [2] LOS M, STROH C, JANICKE R U, et al. Caspase: More than just killers[J]. *Trends Immunol*, 2001(22):31-34.
- [3] THORNBERRY N A, LAZEBNIK Y. Caspases: Enemies within[J]. *Science*, 1998, 281:1312-1316.
- [4] UREN A G, O'ROURKE K, ARAVIND L, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(4):961-967.
- [5] VERCAMMEN D, van de COTTE B, de JAEGER G, et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:45329-45336.
- [6] MADEO F, HERKER E, MALDEN C, et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast[J]. *Mol Cell*, 2002(9):911-917.
- [7] SZALLIES A, KUBATA B K, DUSZENKO M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Lett*, 2002, 517:144-150.
- [8] MOTTRAM J C, HELMS M J, COOMBS G H, et al. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa[J]. *Trends Parasitol*, 2003(19):182-187.
- [9] TRZYNA W C, LEGRAS X D, CORDINGLEY J S. A type-1 metacaspase from *Acanthamoeba castellanii*[J]. *Microbiol Res*, 2008, 163:414-423.
- [10] BOLLHONER B, ZHANG B, STAEL S, et al. Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements[J]. *New Phytol*, 2013, 200:498-510.
- [11] COLL N S, VERCAMMEN D, SMIDLER A, et al. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death[J]. *Science*, 2010, 330:1393-1397.
- [12] BASKETT J A. A type II metacaspase interacts with rps1-k-2 in soybean and analysis of the soybean metacaspase gene family[D]. Ames: Iowa State University, 2012.
- [13] MININA E, LADA H, KAZUTAKE F, et al. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants[J]. *J Cell Biol*, 2013, 203:917-927.
- [14] LIU H, LIU J, WEI Y X. Identification and analysis of the metacaspase gene family in tomato[J]. *Biochem Biophys Res C*, 2016, 479:523-529.
- [15] 马秋敏, 张雅丽, 刘金娜, 等. 番茄 Metacaspase 基因 (*LeM*) 的克隆及其在大肠杆菌 Rosetta 中的高效表达[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2):258-262.
- [16] HOEBERICHTS F, HAVE A, WOLTERING E. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves[J]. *Planta*, 2003, 217(3):517-522.
- [17] SUAREZ M F, FILONOVA L H, SMERTENKO A, et al. Metacaspase dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis[J]. *Curr Biol*, 2004(14):339-340.

## Antibody Titer Detection and Expression Characteristic Analysis in Fruit of Type II Tomato Metacaspase SIMC7 Protein

WANG Zhichao<sup>1,2</sup>, MA Qiumin<sup>2</sup>, YE Yanxiong<sup>2</sup>, WEN Shuai<sup>2</sup>, CAO Jingshun<sup>2</sup>, QU Guiqin<sup>2</sup>

(1. Henan Provincial Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Zhengzhou, Henan 450046; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

doi:10.11937/bfyy.20170161

# 不同种衣剂对辣椒幼苗生长及立枯病防效的影响

李 进<sup>1,2</sup>, 李 杰<sup>1</sup>, 丁 媛<sup>3</sup>, 张 升<sup>1</sup>, 雷 斌<sup>1,2</sup>

(1. 新疆绿洲兴源农业科技有限责任公司, 新疆 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业科学院 核技术生物技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘 要:**以辣椒品种“天椒 11 号”为试材, 采用 2.5% 咯·恶霉灵、10% 苯醚·嘧菌酯、10% 甲霜·锰锌和 17% 多·福悬浮种衣剂包衣辣椒种子, 以未包衣种子为对照, 通过室内试验和田间试验研究不同种衣剂对辣椒幼苗生长和立枯病的防治效果, 以期筛选出适于新疆辣椒生产的种衣剂, 为辣椒高产栽培提供参考依据。结果表明: 与对照相比, 4 种种衣剂处理均能提高辣椒种子发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数, 增加幼苗株高、根长、茎粗、叶龄、鲜干质量, 抑制辣椒立枯病病菌效果较好, 5 种浓度下抑菌率在 44.67%~91.33%, 田间立枯病防效为 61.97%~86.21%。综合各指标, 10% 苯醚·嘧菌酯悬浮种衣剂处理效果最佳。

**关键词:**辣椒; 种衣剂; 立枯病; 防治效果

**中图分类号:**S 641.304<sup>+</sup>.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)16-0055-06

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科辣椒属一年生或多年生草本植物, 适应性强、栽培区域广

泛, 果实色泽鲜艳, 富含维生素 C, 风味独特, 营养价值高, 深受消费者喜爱<sup>[1-2]</sup>。辣椒是新疆红色支柱产业, 2015 年种植面积已达 6.05 万 hm<sup>2</sup>, 产量 235.47 万 t<sup>[3]</sup>, 但随着辣椒种植面积扩大及种植方式多样, 苗期立枯病发生为害日益加剧, 严重制约新疆辣椒高产高效栽培的可持续发展<sup>[4-6]</sup>。种衣剂能有效防治种传、土传病害, 促进植物生长发育。诸葛龙等<sup>[7]</sup>研究发现 18% 瓜菜专用种衣剂(E<sub>18</sub>)处理辣椒种子发芽率、发芽指数和活力指数均较对照有所增加; 朱红霞等<sup>[8]</sup>证实 50% 多菌

**第一作者简介:**李进(1990-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为农药制剂。E-mail: 939050971@qq.com.

**责任作者:**雷斌(1973-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为农药研制及作物化控。E-mail: leib668@xaas.ac.cn.

**基金项目:**乌鲁木齐市沙依巴克区科学技术计划资助项目(20130113); 乌鲁木齐市科学技术计划资助项目(Y131220004)。

**收稿日期:**2017-04-06

**Abstract:** SIMC7 prokaryotic expression recombinant protein was used as test materials. SIMC7 polyclonal antiserum was obtained from immunized mice by using purified SIMC7 recombinant protein from *Escherichia coli*. ELISA and protein dot plot methods were used to detect the antibody titer and expression characteristics and the expression difference at different stages, providing material foundation and reference basis for subsequent SIMC7 functional research in tomato fruits. The results showed that the titer of SIMC7 polyclonal antibodies was more than 1 : 256 000 and sensitivity of SIMC7 polyclonal antibodies was 1.6 ng at the dilution of 1 : 10 000. SIMC7 protein was detected at different stages, SIMC7 had a higher expression in breaker fruits. SIMC7 might be relevant to the fruit ripening of tomato.

**Keywords:** metacaspase protein; antibody; protein expression; tomato