

花椰菜 *BoPGIP2* 基因的克隆与表达水平分析

赵风治¹, 王雪莹¹, 王欣蕾¹, 马昕玮¹, 江汉民², 陈成彬¹

(1. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津科润蔬菜研究所, 天津 300384)

摘要:以 3 个品系花椰菜为试材, 采用同源克隆的方法, 克隆了花椰菜 *BoPGIP2* 基因, 并对表达水平进行分析。结果表明: 该基因与油菜的 *PGIP2* 基因序列有较高的相似性; ExPASy 分析发现 *BoPGIP2* 理论分子量为 37.02 kDa, 等电点为 8.51, 分子式为 $C_{1672}H_{2604}N_{436}O_{487}S_{13}$, 不稳定系数为 34.95, 为稳定蛋白, 脂肪族指数为 92.48, GRAVY 值为 -0.096, 表明其在一级结构上的亲水性、疏水性差异不显著。亚细胞定位预测分析表明, 此蛋白属于分泌途径信号肽蛋白; qRT-PCR 分析发现 *BoPGIP2* 基因在花椰菜高抗菌核病品系、中抗菌核病品系中均是茎和叶中相对表达量较高, 而在易感菌核病品系中则是根中相对表达量最高, 叶和茎中相对表达量较低, 这与抗菌核病强弱具有一致性, 推测此基因很可能在调节花椰菜的抗菌核病中起着重要作用。

关键词: *PGIP2* 基因; 花椰菜; 基因克隆; 表达水平分析; 核盘菌

中图分类号: S 635.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2016)07-0077-08

花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 为甘蓝变种, 种植始于地中海东部沿岸^[1], 19 世纪引入我国, 最先在南方地区种植^[2]。目前主要栽种在全国各大城市的近郊地区, 已成为我国秋冬季主栽品种之一, 总产量居世界首位^[3]。

十字花科菌核病是由核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) 等引起的一种真菌性疾病, 在世界范围内造成了花椰菜等经济作物的严重减产^[1], 它可以感染向日葵、鹰嘴豆、油菜等 400 多种重要作物^[4-5]。核盘菌还可以引起农作物和蔬菜在贮藏与运输过程中的腐烂, 在美国, 由于核盘菌侵染而造成的农作物减产, 带来高达 2 亿美元的经济损失^[6]。核盘菌主要通过菌丝和气生孢子来感染植物^[7]。其发病部位主要集中在茎、叶片、叶柄、花球和种荚上, 其中茎和叶子受菌核病的影响最大^[8-9]。

至今人们已经从各种经济作物和其它的植物中克

隆出至少 48 个抗病基因^[10]。根据表达产物的不同将这些抗病相关基因分为 5 类: 蛋白激酶、毒素降解酶、胞外受体和受体基因、核苷酸结合位点 (NBS)、富含亮氨酸重复序列 (LRR) 蛋白^[11-12]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIPs) 基因是国内外比较关注的一种抗病基因^[13], PGIPs 是一种与植物自身免疫功能相关蛋白, 属于富含亮氨酸重复序列 (LRR) 蛋白家族, 当植物被真菌侵染了以后, 会分泌这些蛋白^[14], 它们可以通过特异性结合多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 来抑制其部分活性^[15]。PGIP 蛋白已被报道在多种农作物中具有抗真菌病害作用, 如草莓、油菜、水稻、苹果、辣椒、白菜、中国李等^[16-21]。其中 PGIP2 是 PGIP 家族中比较有代表性的一种抗性蛋白, 已被证明在油菜 (*Brassica napus* L.) 等作物中具有较好的抗性^[14], 而在花椰菜中尚鲜见报道。课题组前期采用温室苗期叶片活体琼脂块保湿接种法, 建立花椰菜菌核病苗期鉴定体系^[22]。并对 50 份花椰菜种质进行抗性筛选筛选出高抗种质 1 份; 抗病种质 4 份; 中抗病种质 11 份; 中感病种质 13 份; 感病种质 13 份; 高感病种质 8 份。该试验以花椰菜高抗菌核病品系 ('13_ZY-32', 编号 25)、花椰菜中抗菌核病品系 ('KHM37-2-1', 编号 44)、花椰菜感菌核病品系 ('津品 70', 编号 70) 为试验材料, 采用同源序列克隆的方法, 克隆 *PGIP2* 基因并进行生物信息学分析, 同时对花椰菜 *PGIP2* 基因在花椰菜各器官的转录、表达水平分布及抗菌核病中的作用等进行研究。

第一作者简介: 赵风治 (1990-), 男, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学。E-mail: zhaofengzhi145@163.com

责任作者: 陈成彬 (1972-), 男, 河北冀州人, 博士, 副教授, 研究方向为细胞分子遗传学。E-mail: chenccb@nankai.edu.cn

基金项目: 天津市自然科学基金重点基金资助项目 (13JCZDJC29000); 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般资助项目 (14JCYBJC31000)。

收稿日期: 2016-01-07

1 材料与方法

1.1 试验材料

花椰菜高抗菌核病品系(25)、花椰菜中抗菌核病品系(44)、花椰菜感菌核病品系(70)种子均由天津科润蔬菜研究所提供,种植于南开大学生命科学学院温室。抗感病筛选鉴定采用温室苗期叶片活体琼脂块保湿接种法,即在温室中利用花椰菜苗期的真叶进行菌核病抗性鉴定。当花椰菜植株生长到6片叶时,分别取3个材料的根、茎、叶迅速放入液氮冷冻后,置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 制备 采用 Trizol 法提取花椰菜总 RNA。取花椰菜叶片于研钵中加液氮研磨成细末,取其中 0.2 g 粉末迅速转入加了 1 mL 预冷的 Trizol reagent 的 1.5 mL 离心管中,剧烈振荡 1 min,室温静置 10 min。在离心管中加入 200 μ L 的氯仿,剧烈振荡 30 s,室温放置 3 min。4℃,12 000 r/min 离心 10 min, RNA 溶于上层水相中。吸取上清转移到新离心管中,加入等体积异丙醇沉淀,-20℃沉淀 20 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min。倒掉上清,用 1 mL 75%乙醇轻轻洗涤 2 遍。倒掉乙醇,瞬时离心后吸干残余乙醇,晾干后加入 50 μ L DEPC 水溶解。除去 RNA 中的 DNA 后,按如下步骤进行 cDNA 的制备。RNA 2 μ g, Oligo d(T)18(500 ng/ μ L)1 μ L,70℃保温 5 min,立即放于冰上 3 min,M-MLV 5 \times Buffer 4 μ L,dNTP 2 μ L,RNase Inhibitor(40 U/ μ L)1 μ L,M-MLV RT(200 U/ μ L)1 μ L, RNA-free 水补至 20 μ L,轻轻震荡混匀,42℃反应 1 h,70℃灭活酶活性,-20℃保存备用。

1.2.2 引物设计与 PGIP2 基因全长 cDNA 的克隆

根据 GenBank 已记录的甘蓝型油菜 PGIP2(登录号为 EU142024)序列设计一对特异性引物,上游引物:5'-ATGGATAAGACAACGACACT-3';下游引物:5'-TTACTTGCAACTATCAAGAG-3',以 cDNA 为模板,PCR 扩增其 CDS 编码序列,体系为 25 μ L,反应程序为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃退火 1 min 15 s,30 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物置于 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,用紫外凝胶成像仪观察结果。采用凝胶回收试剂盒(TaKaRa,大连)回收目的片段,将回收产物与 pEASY-T1 载体(TransGen,北京)连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,与 IPTG 和 X-gal 一同涂于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,过夜培养,挑取白色克隆于含有氨苄青霉素的液体培养基振荡培养 8 h 后,进行菌液 PCR 筛选阳性克隆,送上海英俊公司进行测序。

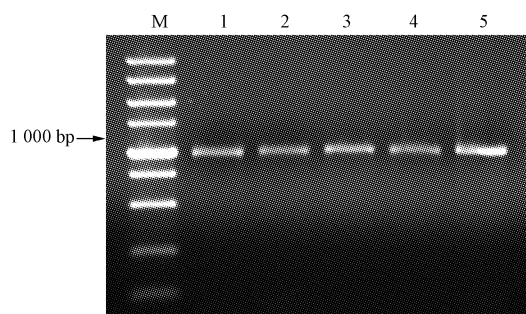
1.2.3 PGIP2 基因的 cDNA 序列及其推导氨基酸序列的生物信息学分析 利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 和 <http://www.expasy.org/> 等工具网站对推导出的蛋白质的各种理化性质进行分析,利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 网站^[23-24] 对推导蛋白的信号肽及亚细胞定位进行预测分析,应用 DNAMAN 软件将已克隆测序的基因推导氨基酸序列,并与 GenBank 已公布的甘蓝型油菜的 PGIP2 基因及氨基酸序列进行比对,分别利用 UCL Department of Computer Science 工具和 SWISS-MODEL^[25-27] 工具对推导蛋白的二级、三级结构进行分析与预测。应用 MEGA 5 软件构建 NJ (Neighbor-joining) 进化树。

1.2.4 PGIP2 基因的表达分析 在相同的培养条件下,取各品种花椰菜的根、茎、叶提取 RNA。按照 SYBR Green Master(ROX)(Roche)操作指导,于 Bio-Rad 公司荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 检测目的基因的表达量。以 β -actin 基因作为内参基因,正向引物:5'-GCTCCTCTTAACCCAAAGGC-3',反向引物:5'-CACCATCACCAGAATCCAGC-3'。根据扩增得到的基因序列设计,正向引物:5'-AGTCATTGGGTCGTTTCCAG-3',反向引物:5'-CGTCGTTCTGTTGGCTCCA-3'。总反应体系为 25 μ L:12.5 μ L SYBR Green Master(ROX)(2 \times),1 μ L 正向引物,1 μ L 反向引物,1 μ L cDNA 模板,9.5 μ L ddH₂O。具体程序为:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 个循环,95℃ 1 min,55℃ 1 min,55℃开始 81 个循环,每个循环上升 0.5℃升至 95℃。数据采用 Bio-Rad iQ 5 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 BoPGIP2 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

依据 GenBank 中已公布的甘蓝型油菜的 PGIP2 基因序列(EU142024)设计引物:上游引物:5'-ATGGATAAGACAACGACACT-3';下游引物:5'-TTACTTGCAACTATCAAGAG-3',并以花椰菜 cDNA 为模板,扩增出长度约为 1 000 bp 大小的条带(图 1)。经克隆、测序,测得其大小为 996 bp。应用 DNAMAN 软



注:M,DL 5 000 Marker;1~5,PGIP2 cDNA。

Note:M,DL 5 000 Marker;1-5,PGIP2 cDNA.

图 1 BoPGIP2 基因全长 cDNA 的扩增

Fig. 1 Amplification of the full-length cDNA of BoPGIP2 gene

件将已克隆、测序的基因与 GenBank 已公布的甘蓝型油菜的 *PGIP2* 基因进行比对,结果显示,该基因与油菜的 *PGIP2* 基因序列有 21 个碱基存在差异(图 2),相似性为

97.89%。说明该基因与油菜具有较高的同源性。由此可见克隆到的基因即为花椰菜中的 *PGIP2* 基因 cDNA 全长,将其命名为 *BoPGIP2* 基因。

```

1   ATGGATAAGACAACGACACTGCTTTTGTCTCTTCTTGTTCACATTCTCAGCACTTCT
1   ATGGATAAGACAACGACACTGCTTTTGTCTCTTCTCATGTTTACATTCTCAGCACTTCT
61  TTCTCTAAAAACCTATGTAACCAAGATGACAAAAACCACTCTCTCAAGATCAAGAAAGCC
61  TTCTCTAAAAACCTATGTAACCAAGATGACAAAAACCACTCTCTCAAGATCAAGAAAGCC
121 CTAACAACCCCTTACCACCTCGCTCGTGGGACCCCTCGAACAGACTGTTGCTCCTGGTAC
121 CTAACAACCCCTTACCACCTCGCTCGTGGGACCCACAAACAGACTGTTGCTCCTGGTAC
181 TGCCTCGAGTGCGGCGACGCCACCGTTAACCAACCGCGTCACCGCCCTAACCATATTTTCC
181 TGCCTCGAGTGCGGCGACGCCACCGTTAACCAACCGCGTCACCGCCCTAACCATATTTTCC
241 GGTACAGATCTCCGGTCAGATCCCGCCAGAGGTTGGTGACTTGTCTGATCTACAGACCCTT
241 GGTACAGATCTCCGGTCAGATCCCGCCAGAGGTTGGTGACTTGTCTGATCTACAGACCCTT
301 GTCTTCCGCAAACTCACTAACCTCACCGGTGAGATCCACGACCATCGCCAAGCTCAAG
301 GTCTTCCGCAAACTCACTAACCTCACCGGTGAGATCCACGACCATCACTAAGCTCAAG
361 TATCTCCGGAGCCTCAGGCTCAGCTGGACGAATCTGACCGGTCCAGTTCTGCTTTTCTC
361 TATCTCCGGAGCCTCAGGCTCAGCTGGACGAATCTGACCGGTCCAGTTCTGCTTTTCTC
421 AGTGAGCTCAAGAATCTCCAGTGGGTAGACCTTTCTTCAATGATCTCTCTGTTTCAATA
421 AGTGAGCTCAAGAATCTCCAGTGGGTAGACCTTTCTTCAACGATCTCTCTGTTTCAATA
481 CCGAGTTCTCTGTCTTTGTTACCTAATCTTGTGTCCTTGATCTCAGCAGGAACAAGCTT
481 CCGAGTTCTCTGTCTTTGTTACCTAATCTTGTGTCCTTGATCTCAGCAGGAACAAGCTT
541 ACAGGTTCTATACCAGAGTCATTTGGGTCGTTTCCAGCAAAAGTACCTGATCTTTACCTA
541 ACAGGTTCTATACCAGAGTCATTTGGGTCGTTTCCAGCAAAAGTACCTGATCTTTACCTA
601 TCACACAACCAAGCTCTCCGGTTATATACCAAAAACACTAGGCAATCTTGATTTAGCAAG
601 TCACACAACCAAGCTCTCCGGTTATATACCAAAAACACTAGGCAATCTTGATTTAGCAAG
661 ATAGATTTCTCTCGGAACAAGCTCGGAGGCGATGCTTCGATGTTGTTAGAGCCAACAAA
661 ATAGATTTCTCTCGGAACAAGCTCGGAGGCGATGCTTCGATGTTGTTAGAGCCAACAAA
721 ACGACGTGGTACATTGATTTATCAAGAAACATGTTACAGTTTCGATCTCTCTAGAGTTGTG
721 ACGACGTGGTACATTGATTTATCAAGAAACATGTTACAGTTTCGATCTCTCTAGAGTTGTG
781 ATCCCTAAGACACTTGGTATCTTGGACTTGAACCAACGGAATCACAGGGAATATCCCG
781 ATCCCTAAGACACTTGGTATCTTGGACTTGAACCAACGGAATCACAGGGAATATCCCG
841 GTTCAGTGGACCGAAGCTCCTCTTCAATGTTAGCTATAACAGATTGTTGTGGA
841 GTTCAGTGGACCGAAGCTCCTCTTCAATGTTAGCTATAACAGATTGTTGTGGA
901 CACATCCCCACAGAGGGACACTTCAGGAATTCGATACTATTCTATTTTCAACAAG
901 CACATCCCCACAGAGGGACACTTCAGGAATTCGATACTATTCTATTTTCAACAAG
961 TGTGTTGTGTTGACCTCTTGATAGTTGCAAGTAA
961 TGTGTTGTGTTGACCTCTTGATAGTTGCAAGTAA

```

图 2 花椰菜 *PGIP2* 基因(下排)与甘蓝型油菜 *PGIP2* 基因(上排)比对

Fig. 2 The results of *PGIP2* gene of *Brassica napus* (upper) compared with *PGIP2* gene sequence of *Brassica oleracea* (lower) published in NCBI

2.2 *BoPGIP2* 蛋白一级结构的分析

根据 NCBI 中(登录号 ABX46549.1)已公布的甘蓝型油菜的 *PGIP2* 蛋白的氨基酸序列(下排)与克隆测序

的 *PGIP2* 基因序列推导的氨基酸序列(上排),应用 DNAMAN v6 进行氨基酸序列比对(图 3),结果显示有 12 个氨基酸存在差异,同源性为 96.07%。

```

MDKTTTLLFFSMFTFLTTSFSKNLCNQDDKTTLLKIKKALNNPYHLASWDPQTDCSWY
MDKTTTLLFFFLFTFLTTSFSKNLCNQDDKTTLLKIKKALNNPYHLASWDPRTDCSWY
CLECGDATVNHRTALTIFSGQISGQIPPEVGDLSYLQTLVFRKLTNLTGQIPRTITKLL
CLECGDATVNHRTALTIFSGQISGQIPPEVGDLSYLQTLVFRKLTNLTGQIPRTIAKLL
YLRSLRLSWTNLTGPVPGFLSELKNLQFIDLFSFNDLSGVPSSLSLLPNLLSLDLNRNKL
YLRSLRLSWTNLTGPVPGFLSELKNLQWVDSFNDLSGIPSSLSLLPNLVSLDLNRNKL
TGSIPESFGSFPKVPDLYLSHNQLSGYIPKTLGNLDFNRIDFSRNKLGGDASMLFGANR
TGSIPESFGSFPKVPDLYLSHNQLSGYIPKTLGNLDFSKIDFSRNKLGGDASMLFRANK
TTWYIDLNRNMLQFDLSRVVIPKTLGILDNLHNGITGNIPVQWTEAPLQFFNVSYNRLCG
TTWYIDLNRNMLQFDLSRVVIPKTLGILDNLHNGITGNIPVQWTEAPLQFFNVSYNRLCG
HIPTGGTLQEFDSYSYFHNKCLCGAPLDSCK
HIPTGGTLQEFDTYSYFHNKCLCGAPLDSCK

```

图 3 克隆测序的 *PGIP2* 基因序列推导的氨基酸序列(上排)与 NCBI 中公布的甘蓝型油菜的 *PGIP2* 蛋白的氨基酸序列(下排)比对

Fig. 3 The results of deduced *PGIP2* protein of *Brassica oleracea* (upper) compared with *PGIP2* gene sequence of *Brassica napus* (lower) published in NCBI

BoPGIP2 基因 cDNA 包含有 996 bp 的开放阅读框,编码一个含有 331 个氨基酸残基的多肽,其理论分子量为 37.02 kDa,等电点为 8.51,分子式为 $C_{1672}H_{2604}N_{436}O_{487}S_{13}$,亮氨酸含量最高,占氨基酸残基总数的 15.7%;甲硫氨酸含量最低,占氨基酸残基总数的 1.2%;其负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)数为 25,正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)数为 29。理论上在体外哺乳动物红细胞中的半衰期为 30 h。不稳定系数为 34.95,为稳定蛋白,脂肪族指数为 92.48,GRAVY 值为 -0.096(图 4),表明其在一级结构上的亲水性、疏水性差异不是特别显著。

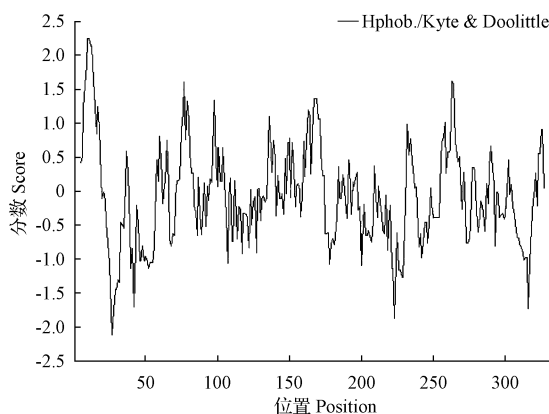


图 4 BoPGIP2 蛋白疏水性分析

Fig. 4 Hydrophobicity analysis of BoPGIP2 protein

2.2.1 BoPGIP2 蛋白的信号肽分析 根据信号肽序列特征,采用神经网络方法(neural networks, NN)或隐马氏模型方法(hidden markov model, HMM),利用 Signal P 4.1 Server 对 BoPGIP2 蛋白的信号肽位置及切割位点进行预测,结果显示 1~22 个氨基酸是信号肽,信号肽裂解位点位于第 22、23 个氨基酸之间(图 5),经 Target P 1.1 Server 对 BoPGIP2 蛋白的亚细胞定位进行预测分析(表 1),线粒体靶向肽 mTP (mitochondrial targeting pep-

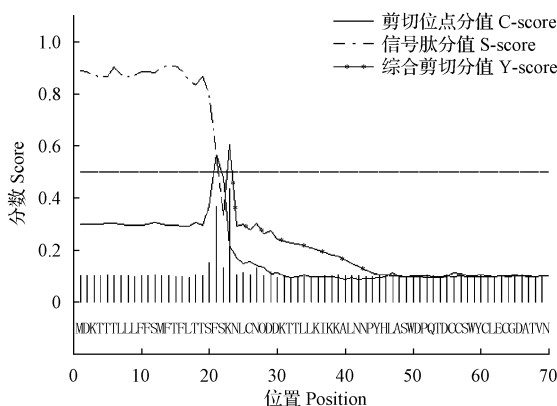


图 5 BoPGIP2 蛋白的信号肽预测

Fig. 5 The prediction of signal peptide of BoPGIP2 protein

tide) 和叶绿体转运肽 cTP (chloroplast transit peptide)值分别为 0.012、0.015,分泌通路信号肽 SP (secretory pathway signal peptide)值为 0.933,接近 1,表明此蛋白属于分泌途径信号肽蛋白(SP)。

表 1 BoPGIP2 蛋白的亚细胞定位预测

Table 1 The prediction of subcellular localization analysis of BoPGIP2 protein

	长度	cTP 值	mTP 值	SP 值	其它	定位	置信度
	Len	cTP value	mTP value	SP value	Other	Loc	Reliability class
BoPGIP2	331	0.015	0.012	0.933	0.365	S	3
Cutoff	—	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

注:cTP,叶绿体转运肽;mTP,线粒体导肽;SP,分泌通路信号肽。

Note:cTP, chloroplast transit peptide; mTP, mitochondrial targeting peptide; SP, secretory pathway signal peptide.

2.2.2 BoPGIP2 蛋白的 N-糖基化位点预测 根据 NetNGlyc 1.0 Server 对 BoPGIP2 蛋白的 N-糖基化位点进行预测(图 6),发现其上具有 4 个潜在的 N-糖基化位点,分别位于第 107、131、239、292 个氨基酸处。

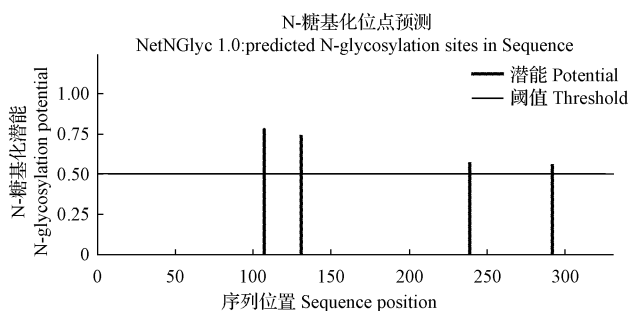


图 6 BoPGIP2 蛋白的 N-糖基化位点预测

Fig. 6 The prediction of BoPGIP2 protein N-glycosylation sites

2.3 BoPGIP2 蛋白二级结构的预测与分析

运用 UCL Department of Computer Science 工具对 BoPGIP2 蛋白的二级结构进行预测与分析(图 7),结果显示,有 3 个 α -螺旋,16 个 β -折叠,19 个 C-无规则卷曲。形成典型的 LRR 结构,更加印证了 BoPGIP2 蛋白属于 LRR 蛋白家族,与其它 LRR 蛋白类似,其对 PG 的识别主要依靠 LRR 区,而单个氨基酸的位置等对于 BoPGIP2 与 PG 的互作起着关键作用。

2.4 BoPGIP2 蛋白三级结构的分析与预测

采用同源建模的方法,应用 SWISS-MODEL 工具对 BoPGIP2 蛋白三级结构进行预测,结果显示 BoPGIP2 蛋白的凸面主要由 α -螺旋构成,凹面主要是由 β -折叠与 β 转角构成。从图 8 可以看出,BoPGIP2 蛋白的单体由 α -螺旋和 β -折叠形成一个保守的马蹄形结构。其中间部位形成的一个大的沟,可能与 PG 的互作有关。



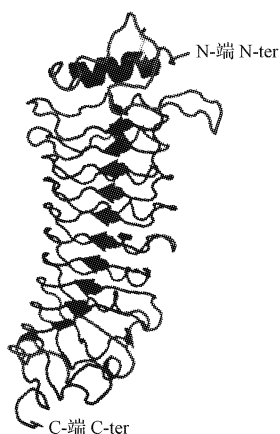


图 8 BoPGIP2 蛋白三维结构预测

Fig. 8 The prediction of three dimensional of BoPGIP2 protein

2.5 系统发育树分析

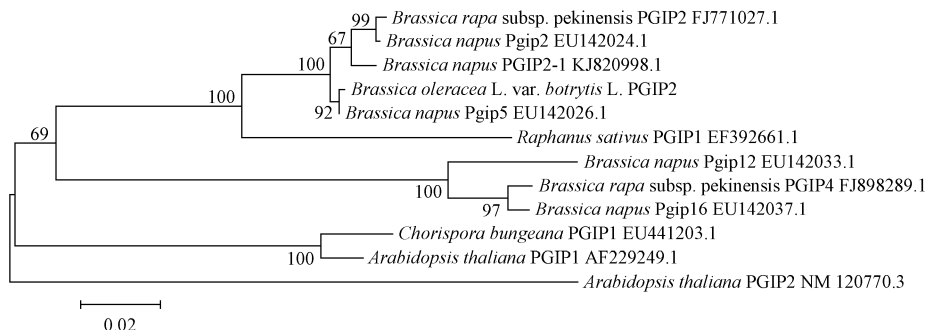
对花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) PGIP2 基因碱基序列与已知的不同来源物种的 11 条 PGIP 基因的碱基序列进行聚类分析,构建 NJ 进化树。由图 9 可知,BoPGIP2 与油菜中的 PGIP 遗传距离最近,表明了花椰菜与甘蓝型油菜之间很近的亲缘关系。亲缘关系较近的物种聚集在一起,而关系较远的蛋白之

间也具有一定的同源性,说明 BoPGIP2 在进化上还是比较保守的。

2.6 BoPGIP2 基因在不同品种、组织中的表达分析

利用 qRT-PCR 的方法,对 BoPGIP2 基因在不同抗病花椰菜品种的根、茎、叶各器官的转录、表达水平进行分析。由图 10 可知,BoPGIP2 基因在不同品种花椰菜中根、茎、叶均有表达,其中在高抗菌核病品系(25)的叶片和茎中表达水平较高;在花椰菜中抗菌核病品系(44)的茎中表达水平较高,在花椰菜感菌核病品系(70)的根中表达水平较高。由图 11 可以看出,BoPGIP2 基因在不同品种同一组织中表达情况。在根中花椰菜感菌核病品系(70)表达量最高,在茎中花椰菜中抗菌核病品系(44)表达量最高,在叶中花椰菜高抗菌核病品系(25)表达量最高。

因花椰菜茎和叶子受菌核病影响较大,所以 BoPGIP2 基因在茎和叶子中的表达水平的高低可以直接的影响植株对核盘菌的耐受性,从而表现出良好的抗性。而在根中的表达水平的高低则没有直接的影响。从定量结果可知,在高抗和抗病品系叶片和茎中表达水平较高,可能由于表达的 BoPGIP2 蛋白与 PG 的直接互动,导致后者活性降低或丧失,从而提高了植株对核盘菌的抗性。



注:标尺上的数字代表碱基替代率;分支上的数字代表 Bootstrap 验证基于 1 000 次重复该节点可信度。

Note: The numbers in the ruler show the substitution rate of base; the numbers on the branches show the reliability percent of bootstraps values based on 1 000 replications.

图 9 BoPGIP2 基因与其它 PGIP 基因的碱基序列的进化树分析

Fig. 9 The phylogenetic tree of BoPGIP2 gene

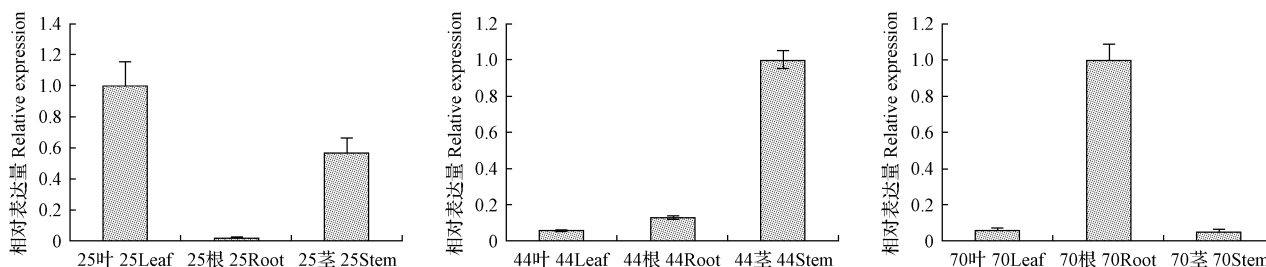
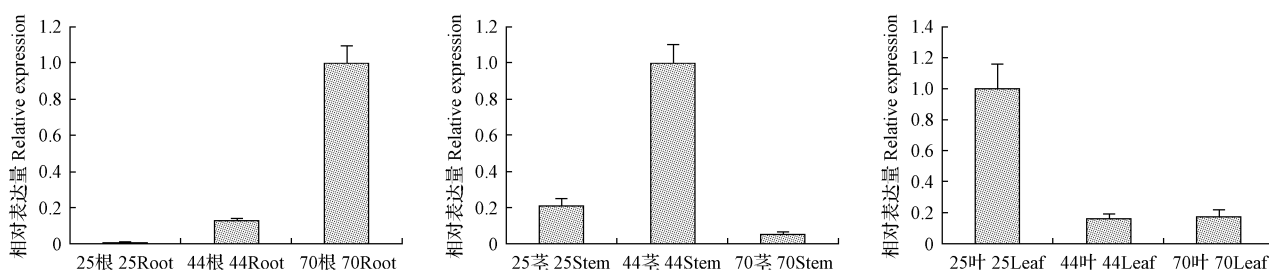


图 10 BoPGIP2 基因在同一品种不同组织中表达

Fig. 10 Expression analysis of BoPGIP2 gene in different organs of the same species

图 11 *BoPGIP2* 基因在不同品种同一组织中表达Fig. 11 Expression analysis of *BoPGIP2* gene in the same organ of the different species

3 讨论

PGIP2 基因作为一种重要的抗菌核病基因,已在多种作物中被研究报道,但在花椰菜中尚鲜见报道。该试验克隆了花椰菜中 *PGIP2* 基因,并命名为 *BoPGIP2* 基因,其开放阅读框为 996 bp, NJ 进化树表明 *BoPGIP2* 与油菜中的 *PGIP* 遗传距离最近,表明了花椰菜与甘蓝型油菜之间的亲缘关系很近。BENKERT 等^[28] 对油菜中 *BnPGIP2* 基因在原核系统的表达条件进行了探索与优化,发现其在 37℃, IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时高效表达,做可溶性分析发现没有可溶性的蛋白存在,均是以包涵体形式表达。此时蛋白的生物活性会降低或丧失。陈夕军等^[17] 将油菜中 *BnPGIP2-1* 基因转入大肠杆菌中,进行原核表达,其表达产物完全不溶于水,证实 *PGIP2* 蛋白主要以包涵体形式存在。可能与氨基酸的组成及后期的修饰有关。通过在线分析的亚细胞定位推测 *BoPGIP2* 蛋白并不存在于线粒体或叶绿体上,主要存在于细胞壁、内质网和高尔基体等细胞器,属于分泌途径信号肽蛋白(SP)。然而在线预测尚存在一定的局限性,拟通过构建亚细胞定位载体,并转入洋葱表皮细胞来进行进一步的试验证明。

对 *BoPGIP2* 蛋白二级结构预测显示其属于 LRR 家族, LRR 区可能为其识别功能区;三级结构则是一个保守的马蹄形,中间的一个巨大的裂缝区可能是与 PG 进行互相作用的功能区域,而且其中不同氨基酸的性质及空间构象可能会影响到其结构域对 PG 的识别以及结合等。MILAGROS 等^[29] 通过 Western blot 发现,马铃薯叶子在通过损伤、水杨酸(SA)和致病疫霉处理后,其叶片内的 *PGIP* 蛋白表达量显著上调,因此推测 *PGIP* 基因可能被 SA 等生物或非生物条件诱导表达。由此可能解释不同植物来源的同一种 *PGIP* 家族蛋白对于同一真菌的入侵会表现出不同的抵抗力,亦或同一植物在不同的真菌入侵的情况下,会采取的不同的自身免疫反应,产生不同的 *PGIP* 家族蛋白抵抗病菌。因此有必要从水杨酸依赖性信号转导途径、茉莉酸/乙烯依赖性信号转

导途径等不同的信号控制途径来研究、揭示 *PGIP* 在其中的抗病机理。

利用 qRT-PCR 的方法,对 *BoPGIP2* 基因在不同抗病花椰菜品种的根、茎、叶各器官的转录、表达水平进行分析。通过对 *BoPGIP2* 基因在同一品种不同组织中表达情况及在不同品种同一组织中表达情况的分析,发现 *BoPGIP2* 基因在不同品种花椰菜的表达具有明显的组织特异性,在 *BoPGIP2* 基因在抗病品种中的茎和叶中表达量较高,根中表达量最低;在感病品种中的根中表达量最高,茎和叶中表达量较低。因核盘菌主要侵染茎和叶^[8-9],所以结果论证了 *BoPGIP2* 基因表达量高低与抗病性强弱的关系。*BoPGIP2* 基因在植株体内的作用力强弱还尚不明确,有待进一步验证。

参考文献

- [1] 李素文,赵前程,孙德岭,等. 国内外花椰菜种植面积及产量变化趋势[J]. 中国蔬菜, 2005(3): 36-37.
- [2] 张凯,徐艳辉. 花椰菜的分子遗传与育种研究进展概述[J]. 辽宁农业科学, 2003(1): 31-34.
- [3] 王燕,朱隆静,柳李旺,等. 花椰菜生物技术育种研究进展[J]. 分子植物育种, 2008(3): 549-554.
- [4] BOLAND G, HALL R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Can J Plant Pathol, 1994(16): 93-108.
- [5] PURDY L. *Sclerotinia sclerotiorum*: history diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact[J]. Phytopathology, 1979, 69: 875-890.
- [6] BOLTON M D T B. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen[J]. Molecular Plant Pathology, 2006(1): 1-16.
- [7] JAMAUX J, GELIE B, LAMARQUE C. Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy[J]. Plant Pathol, 1995, 44: 22-30.
- [8] 庞超,赵卫,谢永江. 油菜菌核病的危害症状及防治对策[J]. 现代农业科技, 2015(9): 137-142.
- [9] 杨子祥,苏银玲,沙毓沧. 花椰菜菌核病的发生与防治技术[J]. 长江蔬菜, 2012(21): 46-47.
- [10] 王忠华,贾育林,夏英武. 植物抗病分子机制研究进展[J]. 植物学通报, 2004(5): 521-530.
- [11] HAMMOND-KOSACK K E, JONES J D J. Plant disease resistance

- genes[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48(4):575-607.
- [12] STASKAWICZ B J, AUSUBEL F M, BAKER B J, et al. Molecular genetics of plant disease resistance[J]. Science, 1995, 268(5211):661-667.
- [13] 李文娟. *PGIP* 的基因克隆及抗真菌活性研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2010.
- [14] HUANGFU H Y, GUAN C Y, JIN F R, et al. Prokaryotic expression and protein function of *Brassica napus* *PGIP2* and its genetic transformation[J]. Plant Biotechnology Reports, 2014, 8(2):171-181.
- [15] 桂枝, 高建明, 袁庆华. 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIP)的研究进展概述[J]. 天津农学院学报, 2011(3):36-41.
- [16] 罗娅, 汤浩茹, 张勇, 等. 草莓多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因(*PGIP*)的克隆及组织特异性表达[J]. 农业生物技术学报, 2010(3):424-430.
- [17] 陈夕军, 张磊, 陈羽, 等. 油菜 *Bnpgip2-1* 基因的克隆表达与生物信息学分析[J]. 中国油料作物学报, 2014(6):701-706.
- [18] 陈夕军, 刘晓维, 左示敏, 等. 水稻多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因(*Ospgip1*)原核表达及编码产物生物信息学分析[J]. 中国水稻科学, 2011(2):136-142.
- [19] 符聪慧, 王建平, 张冲, 等. 苹果 *PGIP* 基因部分家族成员启动子的克隆与功能分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(11):2169-2178.
- [20] 王秀菊. 辣椒多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因克隆及功能研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2011.
- [21] 刘颖, 吴剑锋, 卢海宇, 等. 普通白菜 *PGIP* 基因 *BcPGIP* 分子特征研究[J]. 核农学报, 2010(2):281-286.
- [22] 李广平, 乔玉山, 陶建敏, 等. 中国李 *PGIP* 基因的克隆及序列分析[J]. 西北植物学报, 2006(9):1870-1873.
- [23] 李宽. 花椰菜菌核病抗性评价体系的建立及抗性相关基因的表达研究[D]. 天津:南开大学, 2014.
- [24] HENRIK N, JACOB E, SØREN B, et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites[J]. Protein Engineering, 1997(10):1-6.
- [25] OLOF E, HENRIK N, SØREN B, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence[J]. J Mol Biol, 2000, 300:1005-1016.
- [26] MARCO B, STEFAN B, ANDREW W, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42:252-258.
- [27] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006(22):195-201.
- [28] BENKERT P, BIASINI M, SCHWEDE T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models[J]. Bioinformatics, 2011(27):343-350.
- [29] MILAGROS F M, FLORENCIA P O, GUSTAVO R D, et al. Isolation and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from potato leaves: Accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001(2):129-136.

Cloning and Expression Analysis of *BoPGIP2* Gene From *Brassica oleracea*

ZHAO Fengzhi¹, WANG Xueying¹, WANG Xinlei¹, MA Xinwei¹, JIANG Hanmin², CHEN Chengbin¹

(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071; 2. Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300384)

Abstract: Taking 3 strains *Brassica napus* as materials, using homologous cloning method, the *PGIP2* gene of *Brassica oleracea* was cloned and the expression level was analysed. The results showed that *BoPGIP2* had high similarity with *PGIP2* gene of *Brassica napus*. The ExPASy analysis showed that molecular weight of *BoPGIP2* was 37.02 kDa, theoretical pI was 8.51. The instability index (II) was 34.95, and this showed the protein was stable. Grand average of hydropathicity was -0.096, so it was not a hydrophilic protein. The subcellular localization analysis indicated that *BoPGIP2* was a signal peptide of secretory pathway. qRT-PCR found that *BoPGIP2* has high expression in stems and leaves in both high resistant varieties and resistant varieties, whereas *BoPGIP2* expressed highly in root in susceptible varieties, it was consistent with their resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Therefore, it might play an important role in the regulation of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of *Brassica oleracea*.

Keywords: *PGIP2* gene; *Brassica oleracea*; gene clone; expression analysis; *Sclerotinia sclerotiorum*