

费尔干猪毛菜病程相关蛋白基因 (*SfPR-1*) 的克隆及在盐胁迫下的表达分析

王艳*, 陈西, 杨中敏, 刘登辉

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 利用抑制消减杂交法从藜科猪毛菜属盐生植物费尔干猪毛菜 (*Salsola ferganica*) 中分离得到了一个盐胁迫响应的 cDNA 片段, 结合 SMARTTM RACE 技术获得了费尔干猪毛菜病程相关蛋白基因的 cDNA, 命名该基因为 *SfPR-1* (GenBank 登录号: JQ670917)。序列分析表明, *SfPR-1* 长 817 bp, 含有 501 bp 的阅读框、65 bp 的 5'-UTR 和 251 bp 的 3'-UTR, 编码 166 个氨基酸, 分子质量为 18.01 kD, 理论等电点为 9.37。通过 BLAST 同源序列比对分析, 结果显示该基因编码的蛋白与已知甜菜、拟南芥、烟草及玉米的病程相关蛋白 PR-1 同源性分别为 73.6%、57.8%、55.5% 和 53.9%, 且具有 PR-1 家族特有的 6 个半胱氨酸保守结构域。半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-qPCR 分析表明, 该基因在盐胁迫后表达呈明显上调, 初步推测病程相关蛋白基因 *SfPR-1* 可能与费尔干猪毛菜的耐盐性相关。

关键词: 费尔干猪毛菜; *SfPR-1* 基因; 克隆; 盐胁迫; 表达分析

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)02-0164-07

Cloning of Pathogen-Related Protein Gene (*SfPR-1*) from *Salsola ferganica* and Its Expression Analysis under Salt Stress

WANG Yan*, CHEN Xi, YANG Zhong-Min, LIU Deng-Hui

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering,

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: A cDNA fragment was isolated from *Salsola ferganica* by suppression subtractive hybridization and its full-length cDNA with 817 bp was cloned by SMARTTM RACE, and was named *SfPR-1* gene (GenBank accession number: JQ670917). The *SfPR-1* gene consisted of a 501 bp open reading frame encoding 166 amino acids with molecular weight of 18.01 kDa and an isoelectric point of 9.37, a 65 bp 5'-UTR and 251 bp 3'-UTR. The deduced amino acid sequence of *SfPR-1* showed high identity of 73.6%, 57.8%, 55.5% and 53.9% to those of pathogen-related protein 1 from *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* and *Zea mays*, respectively, and had a conserved six-cysteine motif. Reverse transcriptase PCR and Real-time PCR methods were used to investigate the expression profile of the *SfPR-1* gene under salt stress. *SfPR-1* showed up-regulated expression patterns under salt treatment. Based on our results, we concluded that the *SfPR-1* gene might be involved in salt response and an important component for the salt tolerant pathway in *Salsola ferganica*.

Key words: *Salsola ferganica*; *SfPR-1* gene; Clone; Salt stress; Expression analysis

收稿日期: 2012-06-26, 修回日期: 2012-11-17。

基金项目: 新疆自治区青年自然科学基金资助项目 (2012211B06)。This research work was supported by the Youth Foundation of Xinjiang Natural Science Foundation (2012211B06)。

作者简介: 王艳 (1978 -), 女, 理学博士, 副教授, 研究方向为植物抗逆生理生化与分子机制。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: wangyan7899@gmail.com)。

当植物受到病原体感染时会引发对这种刺激的识别,随后产生信号复合物将信号从感染位点系统性传播至整个植物组织,因而建立了植物对这种病原体再次感染的抗性^[1],把植物应对外界生物胁迫的反应称为系统获得性抗性(SAR)。病程相关蛋白 PR(Pathogen-Related protein) 常常作为 SAR 中的指示分子,是植物在各种病原体如病毒、细菌、真菌和一些类似病原体感染或刺激物下通过化学分子的诱导而产生的蛋白质。根据血清学和序列分析将 PR 蛋白分为五种典型的群体(PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 和 PR-5)、两个亚类^[2](酸性病程相关蛋白和碱性病程相关蛋白)和 17 个基因家族成员^[3]。自 1980 年第一个病程相关蛋白家族 PR-1 被分离鉴定以来^[4],目前已从许多双子叶和单子叶植物中陆续分离出很多类似的 PR-1 蛋白^[5-10]。

多数 PR-1 基因在植物受到病原体感染和昆虫啃食时表达会发生明显改变,且在转基因植物中表现出对病原体的抗性^[10-14],然而最近从苹果中分离得到的 3 个 PR-1 基因,它们在病原体或相关刺激因素下均无应答^[15]。部分研究也显示 PR-1 基因表现出某些受发育和环境调控的生物学功能^[3,16-18],如叶片衰老、花粉成熟、花青素的合成^[19]及冷、渗透和光胁迫^[20-22]。尽管在已研究过的所有植物中 PR-1 家族含量最丰富,且高度保守,然而目前有关 PR-1 基因的生物学功能尚不清楚^[23]。

费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica*)属藜科一年生草本盐生植物,生长于中亚荒漠地区,是适应盐碱生境为数不多的先锋植物之一,作为盐碱地的“生物脱盐器”,它可以在收获时将盐带走,降低土壤含盐量,具有重要的经济和生态价值^[24]。基于我们课题组^[25]前期以费尔干猪毛菜在正常和盐胁迫下差异表达的片段,BlastX 分析表明,其中一个片段编码的氨基酸与 GenBank 中甜菜病程相关蛋白的同源性达 75%。本研究在此基础上利用 5'-RACE 和 3'-RACE 获得了费尔干猪毛菜病程相关蛋白基因,命名为 *SfPR-1*,并对其在盐胁迫下的表达进行了初步研究,为进一步了解病程相关蛋白基因在盐生植物中的耐盐分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

费尔干猪毛菜种子(*Salsola ferganica* Drob.) 采自新疆 103 团通古特沙漠。在温室中于珍珠岩和蛭石(3:1)的混合基质中进行种子萌发,平均培养温度 25℃,光照 16 h/d,相对湿度 40%。以生长 2 个月左右的费尔干猪毛菜幼苗为材料,600 mmol/L NaCl 胁迫处理 0、1、6、24 h,取茎叶后迅速放入液氮中冷冻,置 -80℃保存备用。

1.1.2 实验试剂

植物总 RNA 提取试剂盒 RNAprep pure、RNA-Free DNase I 试剂及 PCR 回收纯化试剂盒购自 TIANGEN 公司; M-MLV Reverse Transcriptase、Ex Taq、T/A 克隆试剂盒 pMD20-T Vector 酶和实时荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ 购自 TaKaRa 公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。*E. coli* DH5α 由本实验室保存。其它抗生素类均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

称取 0.1 g 费尔干猪毛菜茎叶组织,根据天根生化科技有限公司植物组织试剂盒(RNAprep pure Tissue Kit)的操作说明并结合该公司的 RNA-Free DNase I 试剂提取植物总 RNA, RNA 的浓度和纯度用 NanoDrop™ 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行检测。5'-RACE-Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 的合成按照 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 进行。根据 TaKaRa 公司 M-MLV Reverse Transcriptase 反转录合成 cDNA 第一链,用于基因全长的克隆和定量分析。

1.2.2 5'cDNA 和 3'cDNA 的扩增

委托上海生物工程技术服务有限公司合成本试验中使用的引物序列(见表 1)。根据费尔干猪毛菜盐抑制文库中 *Sf8d6* 的 EST (GenBank 登陆号: GW403454) 序列,按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 要求,利用软件 Primer4.0 分别设计了两条 5'-RACE 引物(*Sf8d6GSP1* 和 *Sf8d6NGP1*) 和 3'-RACE 引物(*Sf8d6GSP2* 和 *Sf8d6NGP2*)。参照

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of used PCR primers

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5' -3')
Sf8d6GSP1	CCTTTTCCGCCACCCACATCTTT
Sf8d6NGP1	GCACAGTCGCCCTTCCTTTGGTT
Sf8d6GSP2	CGTAAAGATGTGGGTGGCGGAAAAG
Sf8d6NGP2	AAGTGGTTTGGCGTAAGTCGGTTCG
Sf8d6FP1	ATGGCTTTATCAAAAAAGT
Sf8d6FP2	TTAGTAAGGTTTTTGGCCA
Sf8d6P1	GCAGGTCAAAATCTCCACA
Sf8d6P2	CCACTTGAGTGTAAATGCCCA
β -actinP1	AAGATCTGGCACCACACCTTC
β -actinP2	CACACCATCACCAGAATCGA

SMARTer™ RACE cDNA 试剂盒说明书进行扩增,得到 3'端及 5'端序列后再与已知 EST 片段拼接即为该基因全长 cDNA 序列。

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用 TIANGEN 公司 PCR 产物回收试剂盒纯化后,将回收产物连接到 TaKaRa 公司的 pMD20-T 载体上,通过转化大肠杆菌 DH5 α ,利用蓝白斑筛选,挑选白斑,过夜摇菌 8~10 h,经菌液 PCR 鉴定正确后送北京华大公司测序。

1.2.3 基因全长的扩增

通过对已知 EST 和扩增所获得的 5' cDNA 及 3' cDNA 三段序列进行拼接的结果,设计扩增开放阅读框的引物 Sf8d6FP1 和 Sf8d6FP2,以茎叶的 cDNA 为模板,采用 TaKaRa 公司的 *Ex Taq* 酶进行 RT-PCR 扩增,反应体系参照说明书进行,反应程序为: 94℃变性 30 s 后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30 个循环,再 72℃延伸 10 min。PCR 产物的检测、回收、转化及测序同上 1.2.2。

1.2.4 生物信息学分析

测序结果利用 DNAMAN 软件进行序列校对,获得基因的 cDNA 全长序列信息,登陆 NCBI 网站 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 BLAST 分析工具对 GenBank 的非冗余蛋白数据库序列进行比对分析。由 DNAMAN 软件完成多序列比对。用在线软件 Computer pl/Mwtool, ExPASy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 计算蛋白质的等电点及分子量;利用 PmtSeale PmtSeale ([\[expasy.org/tools/pmtseale.html\]\(http://expasy.org/tools/pmtseale.html\)\) 和 ProtParam \(<http://expasy.org/tools/pmtparam.html>\) 进行疏水性/亲水性预测。使用 SWISS-MODEL \(<http://swissmodel.expasy.org/>\) 预测和分析蛋白空间结构。](http://</p></div><div data-bbox=)

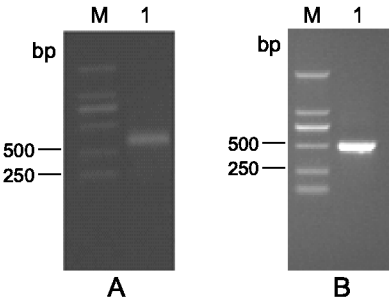
1.2.5 基因表达分析

分别提取费尔干猪毛菜对照和盐处理组茎叶总 RNA,以此为模板使用 M-MLV 反转录酶 (TAKARA) 合成第一链 cDNA,基因特异性引物为 Sf8d6P1 和 Sf8d6P2,看家基因 β -actin 为内参,进行半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR 分析,确定基因的相对表达量。半定量 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。利用 ABI PRISM7500 实时定量仪进行 Real-time PCR 分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据。每个取样点设 3 个技术重复,试验共设 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 *SfPR-1* 基因的克隆

根据前期研究构建的费尔干猪毛菜在 600 mmol/L NaCl 胁迫下的抑制差减文库,其中表达序列标签 *sf8d6* 长 382 bp, BlastX 分析表明该序列与甜菜病程相关蛋白的同源性高达 75% [23]。在该片段序列信息基础上分别设计了两个 5'-RACE 和两个 3'-RACE 的外侧扩增引物和巢式引物,通过 5'-RACE 和 3'-RACE 技术分别获得了约 350 bp (图 1:A) 和约 500 bp (图 1:B) 的片段。将 *sf8d6* 序列和所获得的 5' 和 3' 序列拼接,并通过 ORF 软件分析, cDNA 长为 817 bp, 含有 501 bp 完整的开放阅读框, 该序列上游有起始密码子 ATG, 下游有终止密码子 TAA。此外还有 65 bp 的 5' 调控区和 251 bp 的 3' 非编码区 (图 2:A), 基因序列结果已提交 GenBank, 命名该基因为 *SfPR-1*, 登录号为 JQ670917。序列分析显示该核苷酸序列的 3' 非编码区含有 1 个“AATAAA”的 mRNA 加尾信号 (如图 2:A 中椭圆标记序列) 和 16 个碱基组成的 polyA 尾 (如图 2:A 中单下划线标记序列)。根据拼接好的序列设计引物对该基因编码区进行扩增,得到了一条约 500 bp 左右的特异条带 (图 2:B), 序列测定结果与拼接结果一致。



A: 5'-RACE 扩增结果; B: 3'-RACE 扩增结果 (M 为 DL2000 marker)。
A: Amplification of 5'-RACE; B: Amplification of 3'-RACE (M: DL2000 marker)。

图 1 费尔干猪毛茛 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增结果
Fig. 1 Amplification of 5'-RACE and 3'-RACE from *Salsola ferghanica*

2.2 序列分析及同源性比对

通过生物信息学分析,该 cDNA 包含 501 bp 的开放阅读框,编码 166 个氨基酸。登录 GenBank 数据库,该蛋白的氨基酸序列与甜菜 (*Beta vulgaris*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和玉米 (*Zea mays*) 的同源性分别为 73.6%、57.8%、55.5% 和 53.9%,且具有 PR-1 家族中所特有的保守的 6 个半胱氨酸残基(图 3:A)。

运用 ExPASy Proteomics Server-ProtParam

(<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>)在线服务软件分析 *SfPR-1* 基因氨基酸理化性质表明,其分子量大小为 18.01 kD,理论等电点为 9.37。采用 ProtScale 和 ProtParam 对 *SfPR-1* 氨基酸进行疏水性/亲水性预测。结果表明,第 65 和 66 位具有最低分值 -2.478,亲水性最强,第 12、13、14 位具有最高分值 2.756,疏水性最强,蛋白的总平均亲水性值(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为 0.278,说明该蛋白为疏水性蛋白。运用 SWISS-MODEL 对费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 氨基酸序列进行同源三级结构建模。模型构建的氨基酸范围从第 28 个氨基酸到第 166 个氨基酸;其建模参考模板为番茄 PR-1b (PDB ID 为 1cfe),目标蛋白与参考蛋白序列比对同源性为 60.432%;模型评估 E 值为 2.61e-41,模型中可见典型的 α 螺旋和 β 结构(图 3:B)。

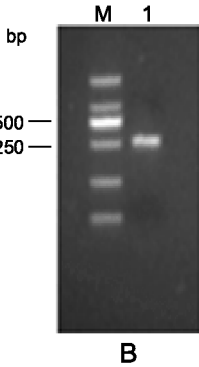
2.3 *SfPR-1* 在盐胁迫下的表达规律

以费尔干猪毛茛 β -actin 为内参基因,采用半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 对 *SfPR-1* 进行表达分析。两种方法分析表明,*SfPR-1* 在正常生长条件下不表达,当胁迫 6 h 时表达急剧升高,随盐胁迫时间的推

```

                                     acgcg      5
gggaatcacaacaactgatcaactctactacaataatagccaataacaataataaaaaaa 65
ATGCGCTTTATCAAAAAAGTTTGCAACTATTGCATTATGTTTCATTTTGGCAACCGTAACA 125
M A L S K K F A T I A L C F I L A T V T 20
CTAGCCCAAAATGTGCCATGCCCAAAATTCCTCACAAAGACTATGTAAACGCCACAAATGCT 185
L A Q M C H A Q N S P Q D Y V N A H N A 40
GCTAGGGCGGCTGTGGGCGTCGGAATAATCAATGGGATGGCAAAATTAGCGGCGTATGCT 245
A R A A V G V G K I Q W D G K L A A Y A 60
CAGCAATATGCCAACCAAGGAAGGGCGACTGTGCCCTGAACATTCAGGTGGGCCCTAC 305
Q Q Y A N Q R K G D C A L K H S G G P Y 80
GGCGAGAATATTGCCGTAGGGGGTGGTCCGTTACCGGTAGAGATGCCGTAAAGATGTGG 365
G E N I A V G G G P F T G R D A V K M W 100
GTGGCGGAAAAGGCCAATGACTATAATTCCAACCTTTGTCGCGCAATAAGGTGTGT 425
V A E K A N Y N Y N S N T C A A N K V C 120
GGGCATTACACTCAAGTGTTGGCGTAAGTCGGTTCGTTGGATGTGCTAGGTTCCA 485
G H Y T Q V V W R K S V R V G C A R V P 140
TGTAACAGTGGGCCCTATTCTGACTCTGCTATTGTAGCTATGATCCTCGAGGCAATTAT 545
C N S G P Y S Y F V I C S Y D P R G N Y 160
GTTGGCCAAAACCTTAACTAA 566
V G Q K P Y * 166
taattatcctttaattccattaaccttgcttggctaaatgaataagtcattaattagag 626
catttgggttcgttgtgacttgggttaataaaatcataccaactatatatagataatag 686
gtacaagctaagtgttaaagtgttgtgtgtgcatagtaggtttcttttctgtgagatga 746
ggatcgagaccatatgtttgtactgtatctgtatgtcttaattgttccaaaaaa 806
aaaaaaaaag 817
```

A



B

A: 费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列; B: 费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 基因扩增结果。A 中 ATG 为翻译起始点;终止信号 TAA 用“*”标出; mRNA 加尾信号用椭圆标记;PolyA 用单下划线标记。

A: Sequences of nucleotide and deduced amino acid of *SfPR-1*; B: PCR amplification of *SfPR-1* gene. Translation initiation site (ATG) and stop codon (TAA) are highlighted and boxed; Ellipse represents tail signal of mRNA; PolyA is highlighted and underlined in A.

图 2 费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列及全长的扩增

Fig. 2 Sequences of nucleotide and deduced amino acid of *SfPR-1* and amplification of the *SfPR-1* gene

SfPR-1	..MALSKKFATIA..LCFILATVTLAQMCHAQNSPQDYVNA	37
AtPR-1	...MNFTGYSRFL..IVFVALVGLVLPSCAQDSPQDYLRV	36
NtPR-1	MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAQNSQQDYLDA	40
BvPR-1	..MNLPKNLASY..LCFFATLALAQMCHAQNSPQDYVNA	36
ZmPR-1	..MEASNKLAVLL..LWLVMAAATAVHPSYSENSPQDYLTPT	37
SfPR-1	HNAARAAVGVGKIQWDGKLAAYAQQYANQRKGDCAALKHSG	77
AtPR-1	HNQARGAVGVGPMQWDERVAAYARSYAEQLRGNCRLIHSG	76
NtPR-1	HNTARADVGVPELTWDDQVAAYAQNYSQAADCNLVHSH	80
BvPR-1	HNDARAAVGVGNIQWDDQVAAPAAQQYADQRKGDVQLQHSG	76
ZmPR-1	QNSARAAVGVGPTWSTKLQQAQEKYAAQRAGDCRLQHSG	77
SfPR-1	G..PYGENIAGGGP...FTGRDAVKMWVAEKANYNYSN	112
AtPR-1	G..PYGENLAWGSGD...LSCVSAVNMWVSEKANYNYAAN	111
NtPR-1	G..QYGENLAEGSGD...FMTAAKAVEMWVNEKQYYDHDSN	116
BvPR-1	GGGRYGENLAGSGPGLVLTATTAVQMVAEKADYDYSN	116
ZmPR-1	G..PYGENIFWGSAG..FDWKAVDVRSWVDEKQWNYATN	114
SfPR-1	TCANKVCCHYTVVWRKSVRVGCAARVPCNSGPYSYFVIC	152
AtPR-1	TCNG..VCGHYTVVWRKSVRLCAKVRCCNNG..GTIISC	147
NtPR-1	TCACQVCCHYTVVWRNSVRVGCARVCCNNG..GYVVTIC	154
BvPR-1	TCASCKVCCHYTVVWRDSVRLGCARVCCDNG..GIFVTC	154
ZmPR-1	SCAAGKVCCHYTVVWRATTSCARVVCRDNR.GVFITIC	153
SfPR-1	SYDPRGNYVGQKPY	166
AtPR-1	NYDPRGNYVNEKPY	161
NtPR-1	NYDPPGNYRGESPY	168
BvPR-1	NYDPPGNFVGQKPY	168
ZmPR-1	NYEPRGNIAGMKPY	167



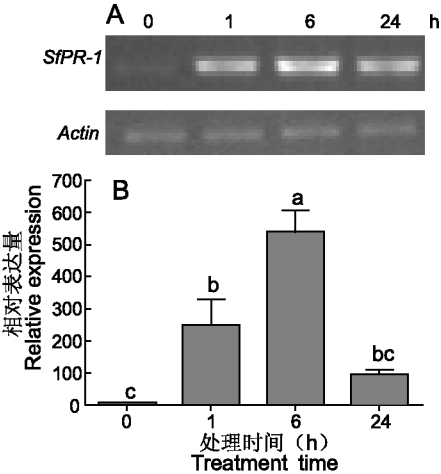
A: 费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 同源性比较分析; B: SWISS-MODEL 预测费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 蛋白同源三级结构模型。A 中进行比对的 PR-1 基因包括: AtPR-1 (*Arabidopsis thesis*, m90508); NtPR-1 (*Nicotiana tabacum*, x06930); BvPR-1 (*Beta vulgaris*, CAP66260.1); ZmPR-1 (*Zea mays*, q00008)。方框中的氨基酸代表在 PR-1 中保守的 6 个半胱氨酸残基。

A: Alignment of deduced protein sequences of *SfPR-1* with other PR-1 proteins; B: Three-dimensional structure prediction of *SfPR-1*. The PR-1 genes compared are AtPR-1 (*Arabidopsis thaliana*, m90508); NtPR-1 (*Nicotiana tabacum*, x06930); BvPR-1 (*Beta vulgaris*, CAP66260.1); and ZmPR-1 (*Zea mays*, q00008). Boxed residues are the six-cysteine motif in PR-1 type proteins in A.

图 3 费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 同源性比较分析和三级结构模型预测

Fig. 3 Three-dimensional structure model of *SfPR-1* and its alignment analysis

移表达虽有下降但仍高于对照组(图 4)。



A: 通过 RT-PCR 检测费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 在盐胁迫下的时间表达模式; B: 通过 RT-qPCR 检测费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 在盐胁迫下的表达模式。实验结果为 3 次实验数据的平均值。

A: Temporal expression of *SfPR-1* gene of *Salsola ferganica* under salt-stress condition by RT-PCR; B: Temporal expression of *SfPR-1* gene of *Salsola ferganica* under salt-stress condition by Real-time PCR. Values are the mean $\pm$ SE from three independent experiments.

图 4 费尔干猪毛菜 *SfPR-1* 在盐胁迫下的时间表达模式

Fig. 4 Temporal expression of *SfPR-1* gene of *Salsola ferganica* under salt-stress conditions

3 讨论

目前已从多种植物中分离获得了 PR 基因,然而大多数研究仅集中在将这些基因作为病原体感染和系统获得性抗性 SAR 中的指示分子^[3],转基因工作的开展也仅是对 PR 蛋白在抗病系统中的功能提供了有限的信息。

Hamamouch 等通过对拟南芥 PR 家族 5 个成员表达模式的检测发现,PR 基因对不同病原菌的感染在不同组织部位呈现出不同的时空表达规律,过表达植株也表现出对不同病原菌的抗病差异^[23],有趣的是高盐胁迫会影响拟南芥 PR 基因的表达,其中 PR-1、PR-2 和 PR-3 受高盐诱导,而 PR-4 和 PR-5 不受影响,但转基因拟南芥中仅过表达 PR-3 的植株在种子萌发阶段表现出对盐的抗性,大多数的 PR 蛋白在机体防御反应中具有抗病原菌的生物活性,然而一些 PR 家族成员则可能在特定的发育阶段当环境发生细微改变时发挥作用,提示不同的 PR 基因可能担负不同的生物学功能。

本试验通过 SMARTTM RACE 技术获得了费尔干猪毛茛病程相关蛋白基因, 该基因编码的蛋白具有 PR-1 家族中典型的 6 个保守半胱氨酸残基结构域^[26](图 3:A), 与拟南芥、烟草、甜菜及玉米中发现的 4 个已知病程相关蛋白基因序列比对后, 发现费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 氨基酸序列与他们既具有较高的同源性也存在一定的差异, 推测他们可能在功能上也具有一定异同。采用盐胁迫处理研究费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 基因在 600 mmol/L NaCl 胁迫下处理不同时间时的表达特性, 结果发现该基因在盐胁迫处理前无表达, 短暂胁迫 1 h 和 6 h 后该基因表达明显上调, 随胁迫时间的延长尽管表达量有所下降但仍高于对照组(图 4), 说明该基因对盐胁迫能够做出积极响应。

通过对费尔干猪毛茛 *SfPR-1* 氨基酸序列进行同源三级结构建模(图 3:B), 显示该蛋白含有 4 个 α 螺旋和 3 个反向平行的位于螺旋之间的 β 折叠, 成为一个紧凑的 α - β - α 夹心结构, 这与番茄 PR-1b^[27]、烟草 PR-1a^[28] 和大麦 PR-1a^[29] 的结构特征相似, 反映出 PR-1 蛋白在三级结构上的高度稳定性及对蛋白酶的抗水解特性, 这些特征对其抗病防御功能具有重要的意义, 然而有关其结构与植物耐盐性间的关系还未见报道。

在植物的防御信号通路中, 植物激素可通过蛋白的磷酸化与去磷酸化作用调节病程相关蛋白的表达^[30], 而盐胁迫下 *SfPR-1* 的表达可能是由于盐分刺激了内源植物激素的积累从而引起了 PR 蛋白转录本的积累。我们计划下一步将分析该基因在植物激素刺激下的表达规律和测定在盐胁迫下植物内源激素的含量。

目前还不清楚 *SfPR-1* 基因在费尔干猪毛茛中的具体作用机制, *SfPR-1* 基因的克隆和盐胁迫下的表达分析将为下一步研究 *SfPR-1* 在费尔干猪毛茛中的作用机制打下基础。

参考文献:

- [1] Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2004, 42: 185–209.
- [2] Sato F, Koiwa H, Sakai Y, Kato N, Yamada Y. Synthesis and secretion of tobacco neutral PR-5 protein by transgenic tobacco and yeast[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211: 909–913.
- [3] Van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 135–162.
- [4] Antoni W J F, Ritter C E, Pierpoint W S, Van Loon L C. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV[J]. *J Gen Virol*, 1980, 47: 79–87.
- [5] Ohshima M, Matsuoka M, Yamamoto N, Tanaka Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y, Kato A, Harada N, Ohashi Y. Nucleotide sequence of the PR-1 gene of *Nicotiana tabacum*[J]. *FEBS Lett*, 1987, 225: 243–246.
- [6] Tornero P, Gadea J, Conejero V, Vera P. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development[J]. *MPMI*, 1997, 10: 624–634.
- [7] Maleck K, Levine A, Eulger T, Morgan A, Schmid J, Lawton K A, Dangl J L, Dietrich R A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance[J]. *Nat Genet*, 2000, 26: 403–410.
- [8] Liu Q, Xue Q. Computational identification of novel PR-1-type genes in *Oryza sativa*[J]. *J Genet*, 2006, 85: 193–198.
- [9] Mitsuhashi I, Iwata T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y. Characteristic expression of twelve rice PR-1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (120/180)[J]. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 415–427.
- [10] Li Z T, Dhekney S A, Gray D J. PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1–11.
- [11] Alexander D, Goodman R M, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J A. Increased tolerance to two Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7327–7331.
- [12] Lawton K, Uknes S, Friedrich L, Gaffney T, Alexander D, Ryals J A. Overexpression of a tobacco pathogenesis-related protein in transgenic tobacco confers increased tolerance to bacterial wilt and virus yellow vein disease[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 1235–1246.

- der D, Goodman R, M'ettraux J P, Kessmann H, Ahl-Goy P, Gut Rella M, Ward E, Ryals J. The molecular biology of systemic acquired resistance [C]//Fritig B, Legrand M, eds. *Mechanisms of Plant Defense Responses*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993: 422–432.
- [13] Hong J K, Hwang B K. Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic PR-1 gene in *Arabidopsis* [J]. *Physiol Plant*, 2005, 124: 267–277.
- [14] Sarowar S, Kim Y J, Kim E N, Kim K D, Hwang B K, Islam R, Shin J S. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24: 216–224.
- [15] Bonasera J M, Kim J F, Beer S V. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora* [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 23.
- [16] Linthorst H J, Meuwissen R L, Kauffmann S, Bol J F. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection [J]. *Plant Cell*, 1989, 1: 285–291.
- [17] Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor releasing factor, b-1,3-endoglucanase, from soybean [J]. *Naturwissenschaften*, 1993, 80: 417–420.
- [18] Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, Kikuchi N, Kayano T, Hibi T, Akutsu K. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 159–164.
- [19] Aslanzadeh V, Ghaderian M. Homology Modeling and functional characterization of PR-1a protein of *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* [J]. *Biomed Inform*, 2012, 8(17): 807–811.
- [20] Hon W C, Griffith M, Mlynarz A, Kwok Y C, Yang D S C. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 879–889.
- [21] Broekaert W F, Terras F R G, Cammue B P A. Induced and performed antimicrobial protein [C]//Slusarenko A J, Fraser R S S, van Loon L C, eds. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000: 371–477.
- [22] Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2875–2886.
- [23] Hamamouch N, Li C, Seo P L, Park C M, Davis E L. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection [J]. *Mol Plant Pathol*, 2011, 12(4): 355–364.
- [24] 黄俊华. 中国猪毛菜属植物的地理分布特点 [J]. 干旱区地理, 2005, 28(3): 325–329.
- [25] Guan B, Jiang G Q, Wang Y X, Wang Z C, Haxim Y, Bao Q, Hu Y Z, Zhang F C, Wang Y. Identification of differentially expressed transcripts involved in the salt-stress response of *Salsola ferganica* by suppression subtractive hybridization [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 103: 343–352.
- [26] Van Loon L C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 85–97.
- [27] Ferndndez C, Szyperski T, Bruyere P. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein p14a [J]. *J Mol Biol*, 1997, 266(3): 576–593.
- [28] 李佳, 郑清川, 杜林方. 烟草病程相关蛋白 PR-1a 的三维模型和荧光光谱 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 466–468.
- [29] Sharma M, Corges-Crua M, Ahern K R, McMullen M, Brutnell T P, Chopra S. Identification of the Pr1 gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize [J]. *Genetics*, 2011, 188(1): 69–79.
- [30] Van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 135–162.
- [31] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274(1): 157–165.