

大豆中 2 个编码 PR10 蛋白新基因的克隆与分析

陈华涛, 陈 新, 顾和平, 张红梅, 袁星星, 崔晓艳

(江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 从抗大豆花叶病毒病(SMV)大豆材料科丰 1 号中克隆到 2 个编码 PR10 蛋白的新基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590*, *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因的 ORF 全长均为 477 bp, 编码 158 个氨基酸。序列比对与系统发生树分析结果表明: *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 是大豆中 2 个编码 PR10 蛋白的新基因。*Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因在大豆的根、茎及叶中均有表达; 接种大豆 SMV 后, *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因在大豆科丰 1 号的叶片中的表达均被强烈诱导并高效表达, 显示 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因与大豆 SMV 抗性密切相关。

关键词: 大豆; PR10 蛋白; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0007-06

Cloning and Analysis of Two New PR10 Members in Soybean

CHEN Hua-tao, CHEN Xin, GU He-ping, ZHANG Hong-mei, YUAN Xing-xing, CUI Xiao-yan

(Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Two new soybean genes named *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* which encoding PR10 proteins were cloned from a SMV resistant cultivar Kefeng No. 1. *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* have a 477 bp ORF and coding 158 amino acids. Sequence alignment and evolutionary tree clustering analysis showed that *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* are new PR10 protein genes in soybean. The genes of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* expressed in root, stem and leave by using Real-time PCR analysis in soybean. Expression level of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* were strongly induced and highly expressed in leaves of Kefeng No. 1 after inoculation SMV. We speculate that *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* may be involved for getting resistance to SMV.

Key words: Soybean; PR10 protien; Gene cloning; Expression analysis

PR 蛋白(Pathogenesis-related proteins)即病程相关蛋白,在植物中广泛存在,是植物对病害的侵袭做出抗性反应而产生的蛋白质。烟草中首先报道了 PR 蛋白的存在^[1],目前烟草中已发现 PR1、PR2、PR3、PR4、PR5、PR9、PR10、PR11 及 PR17 等多种类型^[2-4]。截至目前,已有超过 20 种的植物中分离到 PR 蛋白及其编码基因的存在,例如番茄中的 PR6 型蛋白、PR7 型蛋白和黄瓜中的 PR8 型蛋白等^[5];在辣椒属羊草中发现了 PR4^[6];在拟南芥中发现了 PR13^[7];在大麦中发现了 PR17^[8];在人参中发现了 PR10 蛋白家族^[9-10];在高粱中也发现了 PR10 蛋白家族成员^[11-12];在水稻中克隆到抗细菌性条斑病的 PR10 蛋白基因^[13]。小豆中编码 PR3 蛋白的基因已

被克隆和功能分析^[14-15]。关于 PR 蛋白的功能,直到 1987 年 Michel 等^[16]从烟草中分离出 4 个属几丁酶的 PR 蛋白,由此对 PR 蛋白的功能有了突破性的认识。对于 PR 蛋白在植物抗病中的功能,目前有 2 种观点^[17]: PR 蛋白参与植物的局部诱导抗性,这种观点是从研究病毒侵染的过程中得出的。将烟草花叶病毒(TMV)接种烟叶后,PR 蛋白在起过敏反应的抗性植株内的表达量急剧增加,这说明 PR 蛋白在过敏反应中起重要作用,而局部诱导抗性是过敏反应的主要表现之一。PR 蛋白可能参与植物的系统性诱导抗性, Ross^[18]首次提出植物获得性系统抗性的观点,获得系统性抗性的植株再次感染时,不仅对与初次感染相同的病原菌表现出抗性,而且往往对其他类

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目 CX11(1029); 江苏省科技支撑项目(BE2011305); 大豆转基因专项子课题(2011ZX08004-004)

作者简介: 陈华涛(1980-),男,河南周口人,博士,副研究员,主要从事豆类抗逆分子遗传研究。

型的病原菌也起抗性作用。

PR10 蛋白是 PR 家族重要成员之一,具有核酸酶的相似结构,分子量介于 16 ~ 19 kDa,等电点偏酸性,特异定位在细胞质中,部分显示体外核酸酶活性和抗菌活性^[19]。PR10 蛋白的表达与植物系统获得性抗性反应(Systemic acquired resistance, SAR)关系密切,在很多植物对病原菌的防御反应中 PR10 蛋白都有转录表达活性,当植物受到外界逆境胁迫后 PR10 蛋白表达上调进而诱导植物 SAR 的产生,因此,PR10 蛋白在植物防御反应中具有重要作用^[9, 20-23]。大豆(*Glycine max* L. Merr.)是我国重要的油料和经济作物,在食品产业和农业生产中占有重要地位。目前,大豆病毒病病害在我国各大豆主产区均有发生,已上升为影响大豆产量和品质的重要病害之一。有关大豆中 PR 蛋白的研究报道较少^[22-24],本研究从抗花叶病毒病大豆材料中克隆到 2 个编码 PR10 蛋白的新基因,并分析了它们在 SMV 侵染后的表达特性,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆抗花叶病毒病品种科丰 1 号,由江苏省农业科学院蔬菜研究所豆类作物研究室提供。制作感受态细胞的大肠杆菌菌株 DH5 α 由江苏省农业科学院蔬菜研究所豆类作物分子生物学实验室保存。Marker 和反转录酶购自 Takara 公司,TA 克隆连接载体采用 Promega 公司的 T-easy 载体,总 RNA 提取和反转录试剂盒购自天根公司,引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成。将科丰 1 号种子播种于盆钵

之中,等到大豆植株第一簇复叶未完全展开时进行大豆花叶病毒(SC-48,由南京农业大学大豆所智海剑老师提供;同时用磷酸缓冲液作对照接种)的人工接种,在接种后按时间依次取样,并将其冷藏备用。总 RNA 的提取和 cDNA 合成的方法按照相关试剂盒说明。

1.2 方法

1.2.1 大豆中编码 PR10 蛋白的新基因的克隆

利用生物信息学的方法,依据前期从大豆中克隆的 GmPR10 的氨基酸序列^[24],BLAST 大豆基因组数据库(<http://www.phytozome.net/soybean>)和 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),分离到 2 个序列相似性较高的同源基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590*。

采用 Primer 3 设计 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 的 cDNA 克隆引物(<http://frodo.wi.mit.edu/>)(表 1),以大豆叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 程序如下:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 °C 再延伸 7 min。30 μ L 的 PCR 反应体系中包括 10 \times Tag 缓冲液 3.0 μ L,Tag 聚合酶 0.5 μ L,2.5 μ L 的 dNTPs (2.5 mmol/L),MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L,上下游简并引物各 1 μ L (10 pmol/L),最后用 ddH₂O 补至 30 μ L。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离,然后割胶纯化,用 pGEM-T easy 载体连接,将连接产物用热激转化的方法导入 DH5 α 感受态细胞,单克隆的测序由 Invitrogen 公司完成。

表 1 大豆 PR10 蛋白新基因克隆与荧光定量 PCR 分析的引物

Tab. 1 Primers of cDNA cloning and real-time PCR analysis of soybean new PR10 genes

基因名称 Gene name	基因克隆引物 Primers for gene cloning	荧光定量 PCR 引物 Primers for real-time PCR analysis
<i>Glyma09g04530</i>	5'-GTCTTTCTCTATCTCTATCGGTC-3' 5'-TCATTGAGCAGGATTGCCA-3'	5'-CACATTCCACACCAAAGACG-3' 5'-CGACACTTGCTCACAAAGGA-3'
<i>Glyma15g15590</i>	5'-ATCTCTATCGGTCATGGGTGCT-3' 5'-TTAGTTGTAATCAGGATTGGCCA-3'	5'-TGCCAGACACAGTGGAGAAG-3' 5'-CCCTCAAGTGCCTTGAAAAG-3'
qRT-PCR 内参基因(<i>β-tublin</i>) Reference gene for qRT-PCR		5'-ATCACTTGATCTCGCAACC-3' 5'-CATCCCACATTTGCTGTGTC-3'

1.2.2 大豆 PR10 基因保守结构域分析和序列比对 采用在线软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析大豆 PR10 蛋白基因的保守结构。采用 MAFFT(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)进行序列的比对。

1.2.3 系统发生树的构建 以大豆 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 的蛋白质序列为查询序列,检索

GenBank 的蛋白数据库,下载不同作物中同源基因的氨基酸序列,其中在同源基因序列的选择上主要以有文献报道的为主。采用 MEGA 4.1 软件构建系统发生树,首先用 Clustalx 比对,然后用 Neighbor-Joining 方法建树,其中 Bootstrap 1 000 次重复。

1.2.4 Real-time PCR 提取大豆材料科丰 1 号接种 SC-48(同时用磷酸缓冲液作对照接种)后 0, 3, 6,

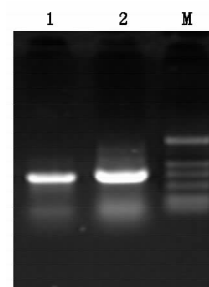
12 24 48 h 大豆叶片的总 RNA ,以 oligodT(16) 为反转录引物 ,在反转录酶 MMLV 作用下 ,将 mRNA 反转录成 cDNA ,然后利用 Real-time PCR 的方法研究大豆 PR10 蛋白新基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 的表达特性 ,以 β -tubulin 基因 (NM_001252709.1) 为内参。Real-time PCR 分析采用 Applied biosystems 7500 Fast(USA) qPCR 仪 ,qPCR 分析的具体操作按照仪器和相关试剂盒使用说明书进行 ,qPCR 分析引物设计见表 1 ,qPCR 程序为 95 ℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 10 s ,60 ℃ 退火 30 s ,70 ℃ 延伸 30 s ,40 个循环; Melt 温度为 70 ~ 95 ℃。基因的表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{SMV 处理样品目的基因的 Ct 的平均值} - \text{SMV 处理样本内参基因的 Ct 平均值}) - (\text{对照样品目的基因的 Ct 平均值} - \text{对照样本的内参基因的 Ct 平均值})$ 。

2 结果与分析

2.1 大豆编码 PR10 蛋白的新基因的克隆与分析

为了在抗 SMV 材料科丰 1 号中克隆大豆 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因 ,以大豆嫩叶的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 ,扩增出与预期结果大小一致的条带(图 1) ,随后对 PCR 产物进行割胶纯化、T 载体连接和热激转化 ,挑取阳性单克隆送 Invitrogen

公司测序。测序结果表明: 从抗 SMV 材料科丰 1 号中克隆到大豆 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因完整的 cDNA 序列 ,大豆 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因的 ORF 均为 477 bp ,编码 158 个氨基酸 ,氨基酸序列均具有病程相关蛋白的 Bet_vI 功能结构域(表 2、图 2) 。通过氨基酸序列比对分析 ,发现 *Glyma09g04530* 和 *GmPR10* 的氨基酸序列相似性为 71.5% ,*Glyma15g15590* 和 *GmPR10* 的氨基酸序列相似性为 89.2% 。将 3 个大豆中编码 PR10 蛋白的基因与植物中的其他 PR10 基因进行氨基酸序列比对 ,发现它们的蛋白质序列之间存在明显差异 ,但是都具有保守的核心结构域(图 3)。



1. *Glyma09g04530*; 2. *Glyma15g15590*.

图 1 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* genes in soybean

表 2 大豆中 2 个编码 PR10 蛋白新基因的信息

Tab. 2 The information of two new genes encoding PR10 proteins in soybean

基因 Gene	外显子 Exon	氨基酸 AA	分子质量 Molecular Weight	等电点 pI	功能结构域 Pfam
<i>Glyma09g04530</i>	2	158	16.53	4.68	Pathogenesis-related protein Bet v I family
<i>Glyma15g15590</i>	2	158	16.86	4.90	Pathogenesis-related protein Bet v I family

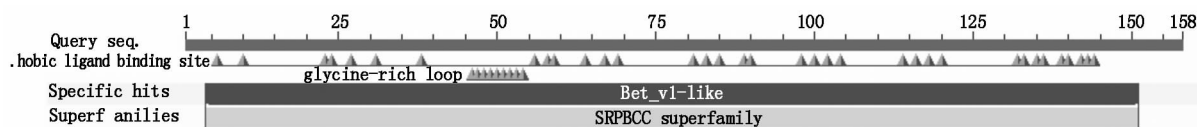


图 2 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因编码氨基酸功能结构域分析

Fig. 2 Functional domain analysis of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* proteins

2.2 大豆中编码 PR10 蛋白的新基因的系统发生树构建与分析

为了进一步了解大豆 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因在植物 PR10 家族和邻近基因家族中的进化情况和亲缘关系 ,本研究利用 MEGA 4.1 软件构建了植物 PR 基因家族的系统发生树 ,依据系统发生树的聚类结果 ,可以明显看出植物中的 PR10 蛋白家族被聚类为 4 个亚家族 ,本研究克隆的编码 PR10 蛋白的新基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 均被聚在了第 4 亚家族 ,而大豆中已报道的编码 PR 蛋白的基因都被聚在了第 2 亚家族 ,进化树分析的结果进一步印证了 *Glyma09g04530* 和

Glyma15g15590 是大豆中 PR10 蛋白基因家族中的新成员(图 4)。

2.3 大豆中编码 PR10 蛋白的新基因的 Real-time PCR 分析

采用 Real-time PCR 的方法分析了 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因在不同组织中的表达情况 ,结果表明 ,它们在所有被检测的组织中都有表达。从 qPCR 的表达量来看 ,*Glyma09g04530* 基因在根中的表达量相对较弱 ,而在茎和叶中的表达量相对较高; *Glyma15g15590* 基因在叶中的表达量相对较高 ,而在根和茎中的表达量相对较弱(图 5) 。人工接种 SMV 后 ,*Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 这 2 个

```
GmPR10      MGVFTFEDETTSPVAPATLYKALVTDADNVIPKAVDAFRSVEVEGNGGPGTIKKITFLE
NP_001236038.1 MGVFTFEDEINSPVAPATLYKALVTDADNVIPKALDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFLE
CAA65727.1   MAVFTFEDQTTSPVAPATLYKALVKDADNIVPKAVDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFLE
CAA43636.1   MAVFTFEDQTTSPVAPATLYKALVKDADNIVPKAVDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFVE
BAA77691.1   MAVFTFEDETTSPVAPATLYKALVKDADNIVPKAVDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFLE
ABS70717.1   MAVFTFEDQTTSPVAPATLYQALVKDADNIVPKAVDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFLE
AGC65589.1   MAVFTFEDETTSPVAPATLYEALVKDADNIVPKAVDSFKTVEVEGNGGPGTIKKITFLE
AAX19889.1   MAVFTFDDQATSPVAPATLYNALAKDADNIIIPKAVGSFQSVVEVEGNGGPGTIKKITFVE
CAA67200.1   MAVFTFEDQTTSPVAPATLYNALAKDADNIIIPKAVDSFKSVEVEGNGGPGTIKKITFVE
Glyma15g15590 MGVFTFEDETTSTVAPARLYKALVKDADNIVPKAVEAIKSVEVEGNGGPGTIKKITFVE
AEV59586.1   MGIFTFEQETTSTVAPAKLYKALVKDADVIIPKAVDVFKSVEVEGNGGPGTIKKITFVE
AES65085.1   MGVFNFEDETTSNVAPATLYKALVTDSDNIPKVIDVIKSVEVEGNGGAGTIKKITFVE
CAA56142.1   MGVFTFEQETASTVPPAKLYKAMVKDADVIIPKAVDAIKTVEVEGNGGPGTIKKITFVE
CAA03926.1   MGIFTFEDESTSTVAPAKLYKALVADANIIIPKAVEAIQSVEVEGNGGPGTIKKITFIE
AAK09428.1   MGVFTFQDESTSTIAPAKLYKALVTDADIIIPKAVETIQSVEVEGNGGPGTIKKITFIE
ACD39391.1   MGVFTFEDEITSTLPPAKLYNAL-KDADTITPKIIDVKSVEVEGNGGPGTIKKITFIE
Glyma09g04530 MGAFAFDEENSSVAPATLYKALTKDADTIIIPKIIIGAIQTIEVEGNGGPGTIKKITASE
* . * * : : * . : * * * : * : : * * : . : : * * * * * : * * * : *
```

```
GmPR10      DGETKFLVHKIEAIDEANLGYSSVVGGLPDTVEKITFECKLAAGANG-GSAGKLTVK
NP_001236038.1 DGETKFLVHKIESIDEANLGYSSVVGGAALPDATAEKITFDSKL VAGPNG-GSAGKLTVK
CAA65727.1   DGETKFLVHKIEGIDEANLGYSSIVGGAALPDATAEKITIDSKLSDGPN-GSVVKSILK
CAA43636.1   DGETKFLVHKIEEIDEANLGYSSIVGGAALPDATAEKISIDSLSDGPN-GSVVKSILK
BAA77691.1   DGETKFLVHKIEAIDEANLGYSSIVGGAALPDATAEKITIDTKLSDGNG-GSVVKSILK
ABS70717.1   DGETKFLVHKIETIDEANLGYSSIVGGAALPDATAEKITIDTNISDGPNG-GSLIKLTIS
AGC65589.1   DAETKFLVHKIETIDEANLGYSSIVGGAALPDATAEKITIDTNISDGPNG-GSLITLTIS
AAX19889.1   DGETKFLVHKIESVDEANLGYSSIVGGYALPDATAEKITIDTKISDGDG-GSLIKLTIS
CAA67200.1   DGETKFLVHKIETIDEANFGYSSIVGGYGLPGECEKITIDTKLSAGPDG-GSLIKLSIS
Glyma15g15590 DGQTKYVLHKVEAIDEANWGYSSVVGGLPDTVEKISFEAKLVEGASG-GSIAKITVK
AEV59586.1   DGETKYVLHKVEAIDEANFGYSSIVGGYGLPETVEKITFEAKLIAGPDG-GSIGKLVKI
AES65085.1   DGETKHVLHKVELVDDANLAYSSIVGGYGLPDTIEKISFEAKLSAGPNG-GSIAKLVNK
CAA56142.1   GGQTLVVLHKIEAIDEANLGYSSIVGGAALSETVERYHFEAKLCEGPN-GSIGKVSVK
CAA03926.1   DGETKYVLHKIEEIDEANLGYSSIVGGYGLPDTVEKITFEKLVGPN-GSIGKVTIK
AAK09428.1   GGESKYVLHKIEAIDEANLGYSSIVGGYGLPDTIEKISFETKLVGANG-GSIGKVTIK
ACD39391.1   DGETKFILHKVESIDEANYAYSSVVGVALPPTAEKITFETKLVGPN-GSIGKLTILK
Glyma09g04530 GDQTSFVLQKVAIDEANLVYSSIVGGYGLHESLEKVTFTQKVVPDGNISIAKATLT
. . : . : * : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* . : . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

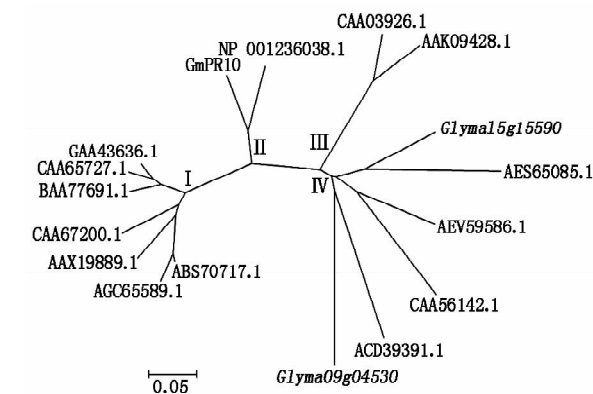
```
GmPR10      YQTKGDAQPNQDLKIGKAKSDALFKAVEAYLLAHPDYN
NP_001236038.1 YETKGDAPNDELKTGKAKADALFKAIEAYLLAHPDYN
CAA65727.1   YHSGDAPPNEDELKTGKAKSDALFKVIEAYLLANA—
CAA43636.1   YHSGDAPPNEDELKAGKAKSDALFKVIEAYLLANP—
BAA77691.1   YHNGDAPPNEDELKAGKAKSDALFKVIEAYQLANA—
ABS70717.1   YHKGDAAPPNEDELKAGKAKSDALFKVIEAYLLANP—
AGC65589.1   YHKGDAAPPNDELKAGKAKSDALFKVIEAYLLANP—
AAX19889.1   YHKGDAAPPNEDELKAGKAKSDALFKAVEAYLLANP—
CAA67200.1   YHSGDAPPNEDELKAGKAKSDALFKAVEAYLLANA—
Glyma15g15590 YQTKGDVNPSEELKSGKAGDALFKALEGYVLANPDYN
AEV59586.1   YQTKGNAEPIENELKEGKAGDALFKATESYVLANPNYN
AES65085.1   YFTKGDVTPSEELKSGKAGDGLFKAIEGYCLANPDYN
CAA56142.1   YQTKGDAKPNEKEVEGKAGDALFKAIEGYVLANPNYN
CAA03926.1   IETKGDAPNDEQEGKAAKARGDAFFKATETYL SAHPDYN
AAK09428.1   IETKGDAPNDEEGKAAKARGDAFFKATESYLSAHPDYN
ACD39391.1   YHTKGDAPNDEELKKGKAGGELFRAIEGYALANPSQY
Glyma09g04530 FHTKDDAPLSDAVRDETKARGAGIFKAIEGYVLANPAQ—
* . : . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Glycine max. NP_001236038.1; *Phaseolus vulgaris*. CAA65727.1 ,CAA43636.1 ;
Vigna unguiculata. BAA77691.1 ,CAA67200.1; *Vigna angularis*. ABS70717.1 ,
AGC65589.1; *Vigna radiata*. AAX19889.1; *Medicago truncatula*. AES65085.1; *Lupinus*
albus. AA03926.1; *Lupinus luteus*. AAK09428.1; *Oxytropis splendens*. AEV59586.1;
Cicer arietinum. CAA56142.1; *Arachis hypogaea*. ACD39391.1.

图 3 大豆 3 个 PR10 蛋白与植物中的 PR10 成员的氨基酸序列比

Fig. 3 Sequences alignment analysis of three soybean PR10 genes and other PR10 genes in plant

新基因均能响应的 SMV 诱导, SMV 处理 3 h 叶中的表达量均有稍微的降低, 在 SMV 处理 12 h 时显著增强, *Glyma09g04530* 基因尤其明显。在被检测的时间内, 随着时间的推移, *Glyma09g04530* 基因在叶中的表达量在 12 h 时达到顶峰, 随后有所下降; *Glyma15g15590* 基因在叶中的表达量呈现逐渐增强的趋势, 在 48 h 的表达量最高。整体来看, *Glyma09g04530* 基因响应 SMV 处理的强度高于 *Glyma15g15590* (图 6)。



Glycine max. NP_001236038.1; *Phaseolus vulgaris.* CAA65727.1, CAA43636.1; *Vigna unguiculata.* BAA77691.1, CAA67200.1; *Vigna angularis.* ABS70717.1, AGC65589.1; *Vigna radiata.* AAX19889.1; *Medicago truncatula.* AES65085.1; *Lupinus albus.* AA03926.1; *Lupinus luteus.* AAK09428.1; *Oxytropis splendens.* AEV59586.1; *Cicer arietinum.* CAA56142.1; *Arachis hypogaea.* ACD39391.1.

图 4 大豆中编码 PR10 蛋白的新基因的系统发生树
Fig.4 Phylogenetic tree analysis of soybean new genes encoding PR10 protien.

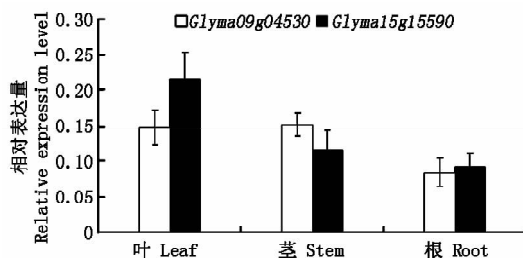


图 5 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因的组织表达分析
Fig.5 Expression of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* analyzed using Real-time PCR in leaf stem and root

3 讨论

植物 PR10 蛋白具有小分子量和偏酸性等电点的特征。Zhou 等^[27]从棉花 cDNA 文库中克隆的 *GaPR-10* 基因编码 159 个氨基酸, 其等电点为 4.95, 属于小分子量酸性蛋白质; 辣椒中的 *CaPR-10* 编码 159 个氨基酸, 等电点为 5.2^[21]; 刺茄中的 *SsPR-10* 基因编码 160 个氨基酸, 等电点为 5.29^[28]; 陈新等^[14]从小豆中克隆的 *Va-PR3* 基因是编码 155 个氨基酸的小分子量酸性蛋白质。由此可见, 在已经报道的 PR10 蛋白均具有小分子量酸性蛋白的特征, 即氨基酸数量在 160 个左右, 等电点在 4.0~5.9。本研究从大豆中分离出的 PR10 蛋白新基

因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590*, 其均编码 158 个氨基酸, 等电点分别为 4.68 和 4.90, 与前期从大豆中克隆的 *GmPR10* 基因一样^[24], 都是具有 PR10 蛋白典型特征的小分子量酸性蛋白。

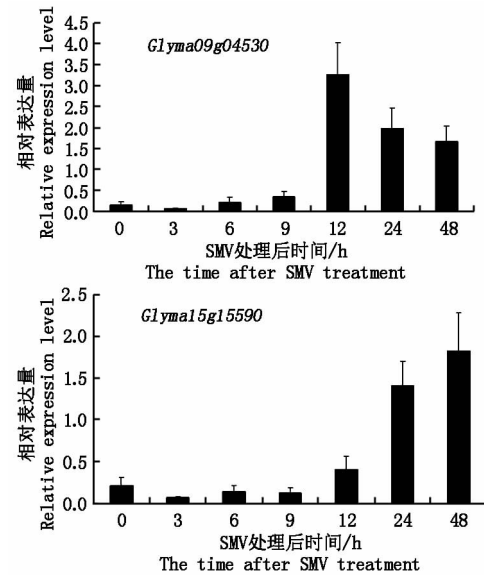


图 6 大豆叶中 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因被 SMV 侵染后的诱导表达

Fig.6 Expression of *Glyma09g04530* and *Glyma15g15590* analyzed using Real-time PCR in leaf after SMV infection

前期的研究显示, 编码 PR10 蛋白的基因有 2 种不同的表达模式, 即组成型和诱导型 2 种表达模式。Sikorski 等^[25-26]从黄花羽扇豆中分离出 2 个编码 PR10 蛋白的基因 *LIPR10.1A* 和 *LIPR10.1B*, 发现 *LIPR10.1B* 是一个在根、茎、叶及叶柄中均表达的组成型表达, 然而 *LIPR10.1A* 却是在茎中和诱导衰老的叶片中才有表达。陈华涛等^[24]报道的 *GmPR10* 在根、茎、叶中都有表达, 是组成型表达模式, 而且其在茎和叶中的表达量要高于在根中的表达量, *GmPR10* 在大豆 SMV 侵染后的叶片中的表达量有显著上升。陈新等^[14]从小豆中克隆的 *VaPR3* 基因在地上部的茎、叶、花、荚等器官中也高效表达, 而在地下部的根中表达量很小, 将大豆花叶病毒病接种到小豆叶片后该基因强烈响应并高效表达; 过量表达 *VaPR3* 的转基因小豆植株的抗病毒病能力得到有效提高^[15]。在本研究中克隆的 PR10 蛋白新基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 在科丰 1 号的根、茎、叶中均有表达, 表现为组成型表达; 人工接种 SMV 后, *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 基因在科丰 1 号叶中的表达量显著增加, 能够强烈响应 SMV 的侵染, 揭示出大豆 PR10 蛋白新基因 *Glyma09g04530* 和 *Glyma15g15590* 与 SMV 抗性密切相关。

参考文献:

[1] Gianinazzi S, Martin C, Valée J C *et al.* Apparition de nou-

- velles macromol cules lorsde la répression de la synthèse vi-
rale [J]. CR Acad Sci Paris ,1970 270D: 2383 – 2386.
- [2] Van Loon L C. Pathogenesis-related proteins [J]. Plant Mol Biol ,1985 4: 111 – 116.
- [3] Antoniwi J F ,Ritter C E ,Pierpoint W S *et al.* Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two culti-
vars of tobacco infected with TMV [J]. J Gen Virol ,1980 47: 79 – 87.
- [4] Shan D M. Genetic engineering for fungal and bacterial dis-
eases [J]. Current Opinion in Biotechnology ,1997 8(2) : 208 – 214.
- [5] Uritani I. Protein changes in diseased plants [J]. Ann Rev Phytopathology ,1971 9: 211 – 234.
- [6] Guevara-morato M A ,De Iacoba M G ,Garc a-luque I *et al.* Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L³ plants with dual RNase and DNase activities [J]. J Exp Bot ,2010 ,61 (12) : 3259 – 3271.
- [7] Rogers E E ,Ausubel F M. *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-I* gene expression [J]. Plant Cell ,1997 9: 305 – 316.
- [8] Christensen A B ,Chol B H ,Nasby M *et al.* The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins [J]. Molecular Plant Pathology 2002 3(3) : 135 – 144.
- [9] Gennady P ,Moiseyeva ,Larisa I *et al.* Primary structures of two ribonucleases from *ginseng calluses*: New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins [J]. FEBS Letters ,1997 407(2) : 207 – 210.
- [10] Pulla R K ,Lee O R ,Ina J G *et al.* Expression and functional characterization of pathogenesis-related protein family 10 gene ,*PgPR10-2* ,from *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology , 2010 74: 323 – 329.
- [11] Clive S C ,Hipskind J D ,Nicholson R L. cDNA cloning of a *Sorghum* pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *cochliobolus heterostrophus* or *colletotrichum sublineolum* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions ,1999 12(6) : 479 – 489.
- [12] Katil S O ,Perumal R ,William L *et al.* Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata* [J]. Molecular Plant Pathology , 2010 11(1) : 93 – 103.
- [13] 郭迟鸣 ,毛 倩 ,杨晓坡 ,等. 水稻 *XIOsPRI O* 基因表达调控的初步研究 [J]. 西北植物学报 2010 30(9) : 1721 – 1727.
- [14] 陈 新 ,易金鑫 ,张红梅 ,等. 小豆抗病相关基因 *Va-PR3* 的克隆与表达分析 [J]. 江苏农业学报 2009 5: 1119 – 1123.
- [15] Chen H T ,Chen X ,Gu H P *et al.* Disease-resistant transgenic adzuki bean plants obtained through an efficient transformation system [J]. Crop and Pasture Science 2013 [http://dx. doi. org/10. 1071/CP12300](http://dx.doi.org/10.1071/CP12300).
- [16] Michel L ,Kauffmann S ,Geoffroy P *et al.* Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases [J]. PNAS , 1987 84(19) : 6750 – 6754.
- [17] 杜良成 ,王 钧. 病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用 [J]. 植物生理学通讯 ,1990(4) : 1 – 6.
- [18] Ross A F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants [J]. Virology ,1961 14: 340 – 358.
- [19] 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] ,Physiological and Molecular Plant Pathology ,1999 55: 85 – 97
- [20] Aglika E. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years [J]. Gen Appl Plant Physiology 2005 31(1 – 2) : 105 – 124.
- [21] Park C J ,Kim K J ,Shin R *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway [J]. Plant J ,2004 37 (2) : 186 – 98.
- [22] Kleine-tebbe J ,Wangorsch A ,Vogel L *et al.* Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean ,SAM22 [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology ,2002 , 110(5) : 797 – 804.
- [23] Graham M Y ,Weidner J ,Wheeler K *et al.* Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology 2003 63(3) : 141 – 149.
- [24] 陈华涛 ,陈 新 ,顾和平 ,等. 大豆 *GmPR10* 基因克隆与植物表达载体的构建 [J]. 江苏农业学报 2011 27 (3) : 494 – 499.
- [25] Sirkorski M M ,Szlagowska A E ,Legocki A B. Structure of *Lupinus luteus* genes *YPR-10. 1a* and *YPR-10. 1b* encoding two homologous pathogenesis-related proteins of PR-10 class [J]. Plant Physiol ,1998 116: 192 – 195.
- [26] Sikorski M M ,Biesiadka J ,Kasperska A E *et al.* Expression of genes encoding *PR10* class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules [J]. Plant Sci ,1999 149: 125 – 137.
- [27] Zhou X J ,Shan L ,Xu Y H *et al.* A cotton cDNA(*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity [J]. Plant Sci 2002 162(4) : 629 – 636.
- [28] Liu X Y ,Huang B B ,Lin J *et al.* A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress-and pathogen-inducible [J]. Journal of Plant Physiology , 2006 163(5) : 546 – 556.