

甜瓜 *PGIP* 基因的克隆及表达初步分析

段玉娟¹ 郭庆勋¹ 刘志伟¹ 宋 阳¹ 怀凤涛²

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062 2. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以甜瓜叶片基因组 DNA 为模板 *PGIP* 基因保守序列设计引物, PCR 扩增到 1 条全长 978 bp 的目的片段。该基因包含有 1 个完整的开放阅读框, 没有内含子, 编码 326 个氨基酸, 其编码的氨基酸序列中含有一段典型的亮氨酸重复序列。序列比对表明: 该基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中的 *PGIP* 基因氨基酸序列(AAP41199) 同源性为 100%; RT-PCR 表达分析表明, 该基因在甜瓜叶、茎、根、果实中表达, 在花中不表达。为植物分子抗病育种提供了 1 条基因资源。

关键词: 甜瓜; *PGIP* 基因; 基因克隆; 表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0038-05

Cloning and Expression of *PGIP* Gene from *Cucumis melon* L.

DUAN Yu-juan¹ GUO Qing-xun¹ LIU Zhi-wei¹ SONG Yang¹ HUAI Feng-tao²

(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. College of Horticulture of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A target fragment with a full length of 978 bp was amplified with genomic DNA of *Cucumis melon* L. leaves as the templates and the conservative sequences of *PGIP* gene as the primers. This sequence had a full open reading frame encoding the polygalacturonase-inhibiting protein. The total ORF were comprised by 975 bp of deoxynucleotide encoding 325 amino acid. A conserved leucine-rich fragment had existed in the derived protein sequence. Sequencing analysis showed that it was 100% identical with the sequences of *PGIP* gene which had been cloned. RT-PCR analysis showed that the *PGIP* gene was expressed in roots, stems, leaves and fruits of *cucumis melon* L. As a result, a gene resource was provided for molecular breeding of plants.

Key words: *Cucumis melon* L.; *PGIP* Gene; Genetic cloning; Expression

多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(Polygalacturonase-inhibiting protein, *PGIP*) 是一种富含亮氨酸 LRR 的蛋白质家族成员之一, 能够非竞争性地抑制多种植物病理性真菌的内聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, *PGs*) 的酶活性, 促进寡半乳糖醛酸酶的增加, 抑制植物细胞壁果胶的溶解, 增加植物的抗毒素, 激活植物的防御系统^[1,2]。因而, *PGIP* 基因受到国内外研究者的高度重视并成为抗病虫害基因工程和果实耐贮藏基因工程研究的重点。

国内外已从大豆^[3]、苹果^[4]、梨^[5]、树莓^[6]、梅^[7]、中国李^[8]、青花菜^[9]等多种植物中克隆到了

该蛋白质的完整基因或部分片段。甜瓜是北方夏季人们喜爱的水果, 但由于真菌性病害的危害, 使甜瓜的生产受到很大威胁, 既影响了生产者的效益, 又影响市场的均衡供应, 同时甜瓜果实货架期短, 不耐贮藏, 因此, 选育出抗病、耐贮运的甜瓜品种是急需解决的问题。虽然甜瓜 *PGIP* 基因 mRNA 序列在 GenBank 中已经登录, 但有关该基因是否含有内含子, 基因的表达还未见报道。本研究以甜瓜嫩叶为材料, 对其 *PGIP* 基因进行克隆、测序及表达初步分析, 为构建植物表达载体培育抗病耐贮甜瓜新品种提供基因资源。

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 吉林大学农学部博士启动基金项目(430505010203); 长春市科技局国际合作计划项目(2D5070046202)

作者简介: 段玉娟(1986-), 女, 陕西人, 在读硕士, 主要从事辣椒种质资源研究。

通讯作者: 郭庆勋(1966-), 男, 黑龙江人, 副教授, 博士, 主要从事园艺植物种质资源与生物技术研究。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2008 年 8 月至 2009 年 8 月在吉林大学植物科学学院园艺植物研究室进行。甜瓜叶片采集于吉林大学植物科学学院实验教学基地。

1.2 方法

1.2.1 甜瓜叶片基因组 DNA 提取 取甜瓜叶片用 CTAB 法提取基因组 DNA ,经核酸测定仪和琼脂糖电泳确认质量和产量后 ,于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 根据 GenBank 中已发表的 *PGIP* 基因序列(AY288911) 设计出 1 对特异引物 5'端引物序列为 5'-ATGCATTCTCACAACCTCCTCCTCC-3' ,3'端引物序列为 5'-TCATCATTTGCAGCTACCAAGT-GGT-3' ,引物由上海生工生物工程有限公司合成。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 ,反应程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 1 min ,55℃ 退火 2 min ,72℃ 延伸 2 min ,35 次循环; 72℃ 延伸 10 min ,4℃ 保存。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测扩增结果 ,用上海华舜试剂盒回收。回收产物与 pGEM-T Easy 载体连接 ,连接产物转化 DH5α 感受态细胞 随机挑取抗性克隆 ,碱裂解法小批量提取质粒 DNA。然后将酶切以及 PCR 鉴定后的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

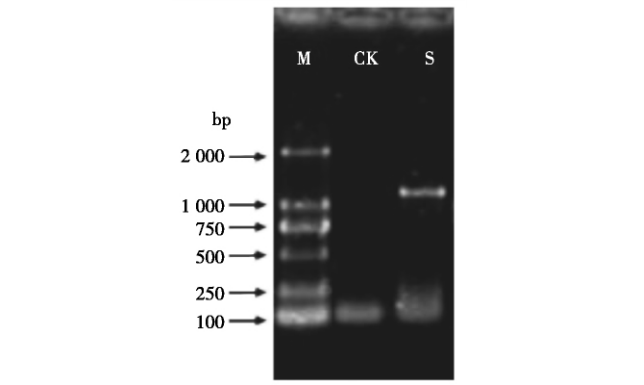
1.2.4 生物信息学分析 测定得到的核酸序列和推导的氨基酸序列分别用 BLASTn 和 BLASTp 进行相似性搜索 ,用 DNAsar 绘制序列聚类图。用 BioEdit 软件分析蛋白质疏水性和亲水性; 将推测甜瓜 *PGIP* 基因的蛋白序列在 ESyPred3DWeb Server1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 进行 3 级结构预测 ,预测结果用 Rasmol Version2.6 进行观察。

1.2.5 甜瓜 *PGIP* 基因组织表达分析 用 TRIzol 法提取甜瓜根、茎、叶、花、果实的 RNA ,以 RNA 为模板 ,克隆的 *PGIP* 基因序列的设计特异引物进行 RT-PCR ,分析 *PGIP* 基因在甜瓜不同组织的表达。

2 结果与分析

2.1 甜瓜 *PGIP* 基因的克隆

通过 PCR 扩增 ,从甜瓜基因组中得到了 1 条目的条带。该片段长度大小约为 1 000 bp ,无其他杂带 (图 1)。



M. DNA Marker; S. PCR 扩增产物; CK. 空白对照。
M. DNA Marker; S. PCR amplified fragment; CK. DNA blank control.

图 1 *PGIP* 基因 PCR 扩增电泳检测图
Fig.1 PCR amplification of *PGIP* gene from *Cucumis melon* L.

2.2 甜瓜 *PGIP* 基因测序

将目的片段进行回收纯化后连接到 pGEM-T easy 载体上 ,转化大肠杆菌 DH5α。挑 5 个白斑菌落进行 PCR 扩增和质粒酶切鉴定 ,依据鉴定结果挑选其中 2 个克隆进行测序。测序结果表明 ,该条带的实际长度为 978 bp(图 2)。

2.3 甜瓜 *PGIP* 基因的序列分析

核苷酸序列分析表明 ,该序列基因的实际长度为 978 bp ,包含 975 bp 完整阅读框核苷酸序列 ,编码 325 个氨基酸 ,不含有内含子。利用 DNAMAN 对获得的基因片段翻译后 ,通过 BLASTp 对 NCBI 的蛋白质数据搜索 结果表明 ,该基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中的 *PGIP* 基因氨基酸序列 (AAP41199.1) 同源性为 100%。*PGIP* 基因编码的氨基酸序列与其他草本植物 *PGIP* 基因氨基酸序列的长度相似 ,但同源性较差 ,与拟南芥的同源性最高也只有 60.0%(图 3)。蛋白质序列分析发现 ,该序列具有一段由 24 个氨基酸残基组成的亮氨酸重复序列 (图 2 中阴影部分) LXXLXXLXXLXXNX-LXGXIPXX ,这是多数植物 *PGIP* 基因编码蛋白特有的保守序列 ,也是 *PGIP* 基因与病原真菌 endo-PG 相互发生作用的功能区。

2.4 甜瓜 *PGIP* 基因编码蛋白的功能分析

分析甜瓜 *PGIP* 基因编码的蛋白发现 ,该蛋白含有 326 个氨基酸 ,包含参与生物组成的所有氨基酸 相对分子质量为 36 621.1 kDa ,等电点为 8.27。其中非极性氨基酸为 146 个占 44.8% ,极性氨基酸占 55.2%。蛋白质疏水性和亲水性分析结果表明: 该疏水区域位于蛋白质 N 端 ,由 27 个氨基酸残基组成 ,使甜瓜 *PGIP* 靶向内膜系统 ,输出到胞外空间 (图 4)。

Fig.4 Analysis hydrophilic/hydrophobicity on amino acid sequence of *PGIP* gene from *Cucumis melon* L.

2.5 甜瓜 *PGIP* 三级结构分析

EsyPred3D 预测三级结构结果发现 13 段 α -螺旋 24 段 β -折叠 39 个 β -转角,中心 LRR 结构域由 10 个串联的 LRR 基序组成(图 5)。

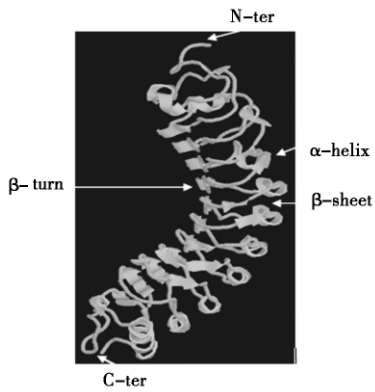
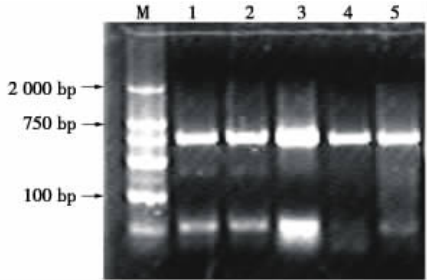


图 5 甜瓜 *PGIP* 三维结构预测图

Fig. 5 Predicted *PGIP* three dimensional model from *Cucumis melon* L.

2.6 甜瓜 *PGIP* 基因组织表达分析

以 *Actin* 基因为内标基因,以克隆的甜瓜 *PGIP* 基因序列设计引物,对该基因在甜瓜植株不同部位的表达情况进行 RT-PCR 表达分析。结果发现,该基因在根、茎、叶、果实中有表达信号,在叶中表达量较高,果实中表达较低,在花中不表达(图 6),说明该基因表达具有组织特异性。



M. DL2000; 1. 根; 2. 茎; 3. 叶; 4. 花; 5. 果实。

M. DL2000; 1. Root; 2. Stem; 3. Leaf; 4. Flower; 5. Fruit.

图 6 甜瓜 *PGIP* 基因在不同组织的 RT-PCR 分析

Fig. 6 RT-PCR analysis of *PGIP* gene in different tissues from *Cucumis melon* L.

3 讨论

多聚半乳糖醛酸抑制蛋白属于高等植物 LRR 蛋白家族,具有典型的 LRR(LXXLXXLXXLXX- NXLXGXIPXX) 结构。这是多数植物 *PGIP* 抗病基因表达蛋白特有的保守序列。*PGIP* 抑制 PG 的活性正是通过 LRR 结构暴露于外表面的氨基酸残基来完成的^[10]。本研究所克隆的甜瓜 *PGIP* 基因也具有典型的 LRR 基序。

研究表明,将异源 *PGIP* 基因整合到植物基因组中,使其表达可以提高植物的抗病性。1993 年

Willamson 等^[11]首次克隆了 *PGIP* 基因,并用于果实的抗病基因工程和果实的耐贮藏育种。2000 年, Powell 等^[12]在番茄中转入梨 *PGIP* 基因并使其过表达 *PGIP*,发现由 *B. cinerea* 引起的病症减轻,这是 *PGIPs* 首次在转基因植物体内表现出对病原物侵染的有限抑制。在转梨 *PGIP* 基因的葡萄中也取得了相似的结果^[13]。大豆 *PGIP* 基因转入玉米,获得了对玉米穗腐病菌(*Stenocarpella maydis*) 的抗性^[14]; 2006 年 Joubert 等^[15]在转基因烟草中转入酿酒葡萄 *PGIP* 基因并使其表达,能够降低灰霉病的易感性和有区别地抑制真菌的 PGs。此类发现为应用 *PGIP* 基因改良农作物抗病性提供了较好的前景。

果实的软化与多聚半乳糖醛酸酶(PG) 活性的增强直接相关^[16],研究认为在苹果、桃、柑橘、番茄、香蕉等果实成熟软化中主要是 PG 起作用。通过 PG 的反义 RNA 技术,可有效抑制果实的软化,但乙烯、果胶酯酶等活性并未受到任何影响,果实仍然正常成熟,没有象预期的那样推迟软化或减少软化程度。真菌侵染植物时,往往会释放 PG,使植物细胞壁遭到破坏,植物则相应产生 *PGIP* 来抑制 PG 酶的活性^[17]。针对转 PG 反义基因的缺点,考虑到 *PGIP* 能够非竞争性地抑制多种植物病理性真菌的内聚半乳糖醛酸酶的活性,促进寡半乳糖醛酸酶的增加,抑制植物细胞壁果胶的溶解,增加植物的抗毒素,激活植物的防御系统。许多研究者探索新的抑制果实软化和抵抗真菌侵染的途径,即从植物体中分离 *PGIP* 基因,构建植物表达载体使 *PGIP* 基因在转基因植物中过量表达,从而抑制 PG 活性推迟果实的软化和增强植物防御系统。

本研究克隆了甜瓜 *PGIP* 基因 DNA 序列,其编码的氨基酸序列与 GenBank 中的 *PGIP* 基因氨基酸序列(AAP41199. 1) 同源性为 100%,从而证明克隆的基因为甜瓜 *PGIP* 基因,为通过转基因技术培育抗病耐贮运的甜瓜新品种提供基因资源,但该 *PGIP* 基因抑菌种类及抑菌效果如何还需要深入的探讨。

参考文献:

- [1] DI Matteo A, Federici L, Mattei B, et al. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein(*PGIP*), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003, 100: 10124 - 10128.
- [2] Simpson C G, MacRae E, Gardner R C. Cloning of a polygalacturonase inhibiting protein from Kiwifruit(*Actinidia deliciosa*) [J]. Plant Physiol, 1995, 108: 1748.
- [3] Favaron F, D'Ovido R, Porceddu E, et al. Purification and

- molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein [J]. *Planta*, 1994, 195: 80 – 87.
- [4] YAO C, Conway W S, Sams C E. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit [J]. *Phytopathology*, 1995, 85: 1373 – 1377.
- [5] Stotz H U, Powell A L T, Damon S E, et al. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Bartlett [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102: 133-138.
- [6] Johnston D J, Ramanathan V, Williamson B. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 44: 971 – 976.
- [7] 李广平, 房经贵, 蔡斌华, 等. 梅 *PGIP* 基因的克隆及序列分析 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 125 – 127.
- [8] 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, 26(9): 1870 – 1873.
- [9] 张 强. 青花菜 *BoPGIP1* 基因的分子克隆及其生物信息学分析 [J]. *华北农学报*, 2009, 24(3): 26 – 30.
- [10] DiMatteo A, Federici L, Mattei B, et al. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein(PGIP) a leucine-rich repeat protein involved in plant defense [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 10124 – 10128.
- [11] Williamson B, Johnston D. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44(262): 971 – 976.
- [12] Powell A L, van Kan J, ten Have A, et al. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization [J]. *Molecular Plant Microbe Interact*, 2000(13): 942 – 950.
- [13] Agüero C B, Uratsu S L, Greve C. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear *PGIP* gene [J]. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6: 43 – 51.
- [14] Berger D. Crop genetic engineering for disease resistance – an African perspective [M]. *International Center of Genetic Engineering and Biotechnology China Workshop on Plant Biotechnology*. Beijing, 1999: 19 – 22.
- [15] Joubert D A, Slaughter A R, Kemp G, et al. The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein(VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases [J]. *Transgenic Research*, 2006, 15(6): 687 – 702.
- [16] 金勇丰, 张上隆, 陈昆松. 果实成熟的分子生物学 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(5): 390 – 396.
- [17] 杨崇林, 陈章良. 高等植物 LRR 蛋白: 结构与功能 [J]. *生物工程进展*, 1997, 17(6): 43 – 48.