

烟草PR10蛋白生物活性及赤星病菌 *Alternaria alternata* 诱导下的表达分析

张 玉^{1,2} 王 杰¹ 周世奇^{1,2} 郑甜甜¹ 罗成刚^{1*} 王元英^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 为深入研究植物PR10蛋白的生物学功能,以烟草PR10蛋白(NtPR10)为研究对象,采用冷休克蛋白表达载体pCold II,构建烟草PR10融合蛋白原核表达系统,优化表达及纯化条件,获得高纯度NtPR10融合蛋白;分别采用底物法和滤纸片法体外分析其核酸酶活性及抑菌活性;并利用荧光定量PCR方法分析了烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* 侵染下, *NtPR10* 基因在抗、感烟草品种内不同时间点的表达差异。结果表明, 15°C、0.1 mmol/L IPTG 过夜条件下可诱导获得大量可溶性目的蛋白, 50、100 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱能够获得较高纯度的目的蛋白;纯化后的NtPR10蛋白能够降解烟草总RNA,具有核酸酶活性,且1.0、0.5、0.25 μg/μL的NtPR10蛋白溶液均对烟草赤星病菌的菌丝生长具有显著的抑制作用,但随着蛋白浓度的降低,抑菌作用减弱;荧光定量PCR结果显示,接种烟草赤星病菌后, *NtPR10* 基因在感病品种和抗病品种中均显著上调表达,但其在抗病品种的响应速度和表达量显著高于感病品种,表明 *NtPR10* 应答了烟草赤星病菌的侵染过程。

关键词: 烟草; PR10蛋白; 原核表达; 活性; 表达

Biological activity of tobacco PR10 protein and expression analysis induced by *Alternaria alternata*

Zhang Yu^{1,2} Wang Jie¹ Zhou Shiqi^{1,2} Zheng Tiantian¹ Luo Chenggang^{1*} Wang Yuanying^{1*}

(1. Research Institute of Tobacco, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to investigate the biological function of the plant pathogenesis-related protein PR10, the tobacco PR10 protein (NtPR10) was studied. The cold shock protein expression vector pCold II was used to construct the prokaryotic expression system of NtPR10 by the method of seamless cloning; the expression and purification conditions were optimized and the nuclease activity and antifungal activity was analyzed by using substrate method and filter paper method, respectively. The expression pattern of gene *NtPR10* in the resistant and susceptible cultivars was studied by RT-qPCR. The results showed that soluble protein was obtained under the conditions of 15°C and 0.1 mmol/L IPTG induction overnight; the pure target protein was obtained by using 50, 100 mmol/L imidazole buffer elution. The activity analysis showed that NtPR10 could degrade tobacco total RNA and inhibit *Alternaria alternata* growth, indicating that NtPR10 had ribonuclease activity and antifungal activity. The gene *NtPR10* was significantly up-regulated in both resistant and susceptible cultivars after *A. alternata* infection. However, in resistant cultivar, the response rate and expression level were significantly higher than in susceptible cultivar, suggesting that the *NtPR10* might have an important function in the process of *A. alternata* infection.

基金项目: 国家自然科学基金(31240013), 中国农业科学院烟草研究所青年科学基金(2016B04), 四川省烟草专卖局科技重点项目(SCYC201501)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: luochenggang@caas.cn, wangyuanying@caas.cn

收稿日期: 2017-03-19

Key words: tobacco; PR10 protein; prokaryotic expression; activity; expression

病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PR蛋白)是植物体受到细菌、真菌、病毒及非生物胁迫时产生的响应诱导蛋白,在植物抵御疾病、响应外界压力以及适应不良环境方面发挥着重要作用(Niskanen & Dris, 2004)。van Loon et al. (2006)首次在TMV病毒侵染过的烟草叶片中检测到PR蛋白的存在。根据病程相关蛋白家族成员的氨基酸组成、结构及生物学功能等特点,可将PR蛋白分为17个家族,即PR1~PR17,它们广泛存在于单、双子叶植物中。PR蛋白参与的抗病、抗逆等过程与其自身所具有的生物活性息息相关,PR2、PR5蛋白具有葡聚糖内切酶活性,PR3、PR4、PR8及PR11蛋白具有几丁质酶活性,PR6蛋白家族具有蛋白酶抑制活性,PR9蛋白具有过氧化物酶活性(Wang et al., 2005; 魏嵘等, 2016)。对于病程相关蛋白的深入研究,不仅能揭示植物抗病、抗逆反应的分子机制,还能为植物抗病分子育种以及病害防治奠定理论基础。

近年来,PR10蛋白因其具有核酸酶活性及抑菌活性成为了研究热点(Finkina et al., 2017)。PR10蛋白最先在用激发子处理过的欧芹培养细胞中被发现,后来在辣椒(Park et al., 2004)、水稻(Hashimoto et al., 2004)、花生(Chadha & Das, 2006)、刺茄(Liu et al., 2006)、小麦(张岗等, 2009)、葡萄(Xu et al., 2010)、菊花(Deng et al., 2011)、苜蓿(Samac et al., 2011)、丹参(Zhao et al., 2015)等20多种植物中被发现,并进行了基因及蛋白序列特征和相关功能的研究。Park et al. (2004)等利用底物法和滤纸片法研究证实,辣椒PR10蛋白(CaPR10)具有核酸酶活性且可以抑制辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 的菌丝生长,并发现这种核酸酶活性在抗病毒途径中能降解病毒RNA,抑制病毒侵染;He et al. (2013)用底物法证明了从葡萄中分离的PR10蛋白(VpPR10.2)同时具有DNA酶活性和RNA酶活性,并利用菌丝生长抑制法发现了VpPR10.2蛋白对烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* 的生长具有抑制作用;Chadha & Das (2006)利用菌丝生长抑制法研究了不同浓度的花生PR10融合蛋白(AhPR10)对尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 和立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 的抑制作用,表明AhPR10蛋白具有体外抗真菌活性;Wu et al. (2016)研究表明PR10蛋白超表达可以增强水稻对生物胁迫和非生物胁迫的抗性。

目前,对于植物病程相关蛋白PR10结构和功能

的研究已取得显著进展,但其参与生物学功能的机制仍不清楚,烟草作为重要的植物病理学和生理学研究的模式植物,具有开展相关研究的优势,但迄今未见关于PR10蛋白功能相关研究的报道。本研究以烟草PR10蛋白(NtPR10)为研究对象,优化原核表达条件,分离纯化融合蛋白,分析NtPR10蛋白生物活性,并研究其在病原菌诱导下的基因表达水平,以期为进一步明确PR10蛋白在植物抗病、抗逆过程中的生物学功能及其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及质粒:NtPR10基因质粒由中国农业科学院烟草研究所遗传育种研究中心实验室保存,于-80℃保存在大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 菌株中。烟草赤星病菌由中国农业科学院烟草研究所遗传育种中心提供。

烤烟品种:净叶黄为抗赤星病品种,NC82为感赤星病品种,均由中国烟草种质资源平台提供。

试剂及培养基:限制性内切酶 *Nde*I 和 *Hind* III,宝生物工程(大连)有限公司;Infusion同源重组连接酶,上海睿铂赛生物科技有限公司;DNA Marker、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、大肠杆菌DH5α、BL21(pG-Tf2)感受态,北京全式金生物技术有限公司;pCold II表达载体,上海北诺生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。LB(Luria-Bertani)液体培养基:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 氯化钠、蒸馏水1 L;LB(Luria-Bertani)固体培养基:LB液体培养基中添加20 g/L 琼脂糖;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:200 g/L 马铃薯、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 琼脂糖、蒸馏水1 L。

仪器:DYY-6C型电泳仪、DYY-6B型蛋白电泳仪,北京六一仪器公司;EC3凝胶成像系统,美国UVP公司;ABI 7500 Fast Real-time PCR仪,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 NtPR10基因的原核表达载体构建

以带有烟草PR10基因全长ORF(GenBank登录号:JQ041907)的阳性质粒为模板,设计含有原核表达载体pCold II的 *Nde*I 和 *Hind* III酶切位点同源序列的特异引物,对目的片段进行PCR扩增。Pcold-

PR10F: 5' -CATCATCATCATCATATGGGTGT-CACAACCTATACTCATG-3', Pcold-PR10R: 5' -A-GACTGCAGGTCGACAAGCTTTTAGGCATAGAC-CGGTAGAATTGG-3', 其中下划线序列 CATCAT-CATCATCATCAT 和 AGACTGCAGGTCGACAAG-CTT 分别为含有 *Nde*I 和 *Hind* III 酶切位点的 pCold II 的同源序列, 目标产物大小为 522 bp。50 μ L PCR 扩增反应体系: 2 $\times$ Buffer (Mg^{+2}) 25 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 4 μ L、10 mmol/L 正反向引物各 1.5 μ L、阳性质粒模板 1 μ L、5 U/ μ L primerStar 高保真酶 0.5 μ L, ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, PCR 产物取 5 μ L 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。其余 PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化, 得到的 *NtPR10* 基因序列两端含有 *Nde*I 和 *Hind* III 酶切位点并且与 pCold II 载体部分序列同源。

同时用 *Nde*I 和 *Hind* III 双酶切 pCold II 载体, 80 μ L 反应体系包含 10 $\times$ Buffer 8 μ L、pCold II 10 μ g、*Nde*I 1 μ L、*Hind* III 1 μ L, 加 ddH₂O 至 80 μ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜, 酶切产物经胶纯化获得酶切后的线性化载体 pCold II。将回收纯化后的 PCR 产物及线性化的 pCold II 载体利用 infusion 方法连接, 反应体系: infusion 酶 2 μ L、10 $\times$ Buffer 1 μ L、回收的 PCR 产物 4 μ L、线性化质粒 2 μ L, 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min。将连接好的重组载体利用 42 $^{\circ}$ C 热击的方法转入大肠杆菌感受态 DH5 α , 涂于氨苄青霉素抗性 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜, 经菌液 PCR 及质粒酶切鉴定后, 选择阳性质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。并将测序正确的质粒按照相同的转化方法转入大肠杆菌感受体 BL21(pG-Tf2) 中, 为在大肠杆菌中诱导蛋白表达做准备。

1.2.2 *NtPR10* 在大肠杆菌中的诱导表达及条件优化

挑取测序正确的大肠杆菌 BL21(pG-Tf2) 阳性克隆单菌落于氨苄青霉素浓度为 100 mg/L 的 LB 液体培养基 1 000 μ L 中培养, 37 $^{\circ}$ C 摇床 230 r/min 过夜, 按照 1:60 将过夜菌液转接到 60 mL LB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀=0.6 时, 加入 10 ng/mL 四环素, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min, 冷却, 将 60 mL 菌液均匀分为 3 部分, 测试诱导条件: (1) 0.1 mmol/L IPTG, 15 $^{\circ}$ C 诱导过夜; (2) 1 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 3 h; (3) 以未加 IPTG 诱导的 pCold II-*NtPR10* 菌液为阴性对照, 收菌。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌液并用 Binding Buffer 按照 1:10 的比例对离心沉淀进行稀释, 取 5 mL

稀释后的菌液进行超声波破碎, 然后以 10 000 r/min 的转速离心 10 min 分离上清和沉淀; 上清和沉淀样品中分别加入 100 μ L ddH₂O 和 100 μ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴 10 min; 取 10 μ L 在 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶的 SDS-PAGE 中进行检测分析。

1.2.3 *NtPR10* 融合蛋白的分离纯化

按照 0.1 mmol/L IPTG, 15 $^{\circ}$ C 诱导过夜的条件进行大量诱导, 超声波破碎后, 12 000 r/min 收集到滤液并用 2 μ m 过滤器过滤一遍, 将滤液利用蛋白标签亲和层析柱 (Chelating FF (Ni) column) 进行纯化。步骤为: 将 Chelating FF (Ni) column 用 20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、pH 8.0 缓冲液平衡, 加入 20 mL 滤液使目的蛋白吸附在层析柱上, 分别用 20、50、100、500 mmol/L 咪唑缓冲液进行梯度洗脱, 洗脱馏分经 20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、pH 8.0 缓冲液脱盐得到纯化蛋白。

1.2.4 *PR10* 纯化蛋白的活性分析

底物法分析烟草 *PR10* 蛋白核酸酶活性。取等量烟草总 RNA (300 ng) 共 5 份, 分别加入 DEPC H₂O 5 μ L、蛋白溶解缓冲液 5 μ L、1 μ g/ μ L *PR10* 纯化蛋白溶液 5 μ L、10 μ g/ μ L RNaseA 0.5 μ L, 为进一步验证烟草 *PR10* 蛋白的核酸酶活性, 5 μ L *PR10* 纯化蛋白溶液加入 40 U/ μ L 核酸酶抑制剂 5 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 0.5 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测烟草总 RNA 的降解结果。

滤纸片法分析烟草 *PR10* 蛋白体外抑菌活性。以 ddH₂O、蛋白溶解缓冲液作为阴性对照, 以对赤星病菌有抑制作用的 2.0 μ g/mL 菌核净作为阳性对照, 并对烟草 *PR10* 蛋白分为 1.0、0.5、0.25 μ g/ μ L 共 3 个浓度梯度进行抑菌效果分析。将烟草赤星病菌在 PDA 培养基上进行活化, 于黑暗条件下 28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d, 待菌落扩展至直径 3~4 cm 时, 将直径 6 mm 经干热灭菌的滤纸片分别蘸取 *NtPR10* 蛋白溶液、蛋白溶解缓冲液、ddH₂O、菌核净溶液放置于菌落周围, 每点放置 1 片滤纸片, 3 次重复, 于黑暗条件下 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 记录抑菌情况。

1.2.5 荧光定量 PCR 试验

待烟株长至 8 叶期时, 将第 2~3 片叶取下, 正面向下置于装有 300 mL 蒸馏水和 21 cm $\times$ 10 cm $\times$ 4 cm 海绵的 21 cm $\times$ 15 cm $\times$ 8 cm 透明保鲜盒中。将烟草赤星病菌在 PDA 培养基上进行活化, 于黑暗条件下 28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d, 待菌落扩展至直径 3~4 cm 时, 采用 8 mm 打孔器沿菌落边缘打取含白色菌丝的菌饼, 用镊子将打好的菌饼放于叶片上, 将保鲜盒置于

28℃、L:D=16 h:8 h的人工气候室,为确保接种效果,每个叶片接种4块菌饼。接种后0 h、6 h、12 h、1 d、3 d、5 d取样,用液氮速冻后于-80℃保存备用。

根据*NtPR10*序列设计荧光定量PCR引物(F: CCTATACTCATGAGGCATCAACCA; R: AACAC-CACCATCACCTTCGACAG),选择烟草肌动蛋白基因 *Actin* (Accession No. U60495)作为内参基因(F: GCAGCATGAAGATTAAGGTTGTTG; R: GT-GCTAAGGGATGCGAGGAT)。以6个取样时间点的cDNA为模板,进行Real-time PCR扩增。反应程序:95℃ 1 min,95℃ 10 s,56℃ 20 s,72℃ 40 s,40个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和溶解曲线,用Prizm 4统计分析软件进行数据统计分析。20 μL PCR反应体系:2×SG Green qPCR Mix 10 μL、10 μmol/L Forward Primer 0.4 μL、10 μmol/L Reverse Primer 0.4 μL、ROX 0.4 μL、cDNA 1 μL、去离子水7.8 μL。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 18.0软件进行统计分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *NtPR10*原核表达系统的构建

以*NtPR10*基因阳性质粒为模板,利用特异引物(Pcold-PR10F/Pcold-PR10R)PCR扩增*NtPR10*基因编码框,扩增产物大小为522 bp(图1),与预期大小相符,且无非特异扩增带。将目的片段回收纯化后,利用infusion方法与经过*Nde*I和*Hind*III双酶切的pCold II载体重组。将重组载体利用热击化学法转

化DH5α感受态细胞,通过菌液PCR、酶切筛选阳性克隆,并对阳性克隆测序验证,结果显示序列完全一致,说明pCold II-*NtPR10*原核表达载体已构建成功。最后将测序正确的质粒转化到大肠杆菌BL21(pG-Tf2)中,进行蛋白诱导表达。

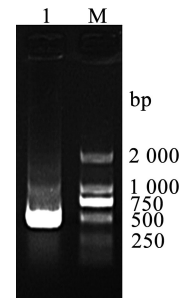


图1 含有酶切位点的*NtPR10*基因序列扩增

Fig. 1 Amplified product of *NtPR10* containing restriction sites

M: DNA marker; 1: *NtPR10*扩增片段。M: DNA marker; 1: the amplified fragment of *NtPR10*.

2.2 *NtPR10*基因的原核表达条件优化及分离纯化

为了优化pCold II-*NtPR10*诱导表达所需要的最佳条件,分别用0.1 mmol/L IPTG 15℃诱导过夜,1 mmol/L IPTG 37℃诱导3 h。SDS-PAGE检测结果表明,2种条件下目的蛋白均被诱导表达,分子量大小在19 kD左右,与预期结果相符合,在15℃下,用0.1 mmol/L IPTG诱导过夜,*NtPR10*融合蛋白表达量较大;经超声波破碎后,15℃条件下得到的融合蛋白具有可溶性表达(图2-A),而在37℃条件下诱导表达的融合蛋白以包涵体的形式存在,超声波破碎后也不具有可溶性表达。因此,后续试验均采用15℃条件下0.1 mmol/L IPTG诱导过夜。

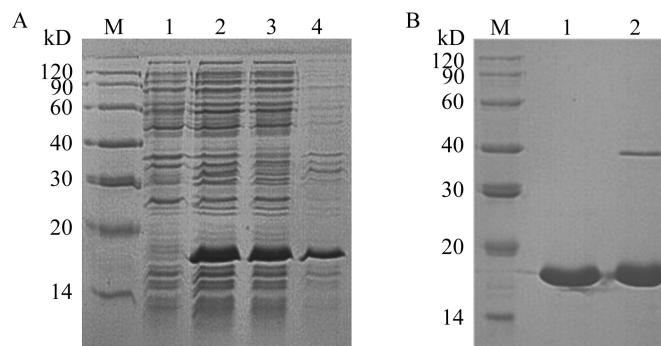


图2 *NtPR10*融合蛋白的可溶性表达及分离纯化

Fig. 2 The solubility analysis and purification of *NtPR10* recombinant protein

A: 0.1 mmol/L IPTG 15℃过夜条件下*NtPR10*融合蛋白可溶性分析, M: 蛋白 marker; 1: 未诱导; 2: 诱导后表达情况; 3: 经超声波破碎后上清液蛋白表达情况; 4: 经超声波破碎后沉淀蛋白表达情况。B: SDS-PAGE蛋白胶检测*NtPR10*纯化蛋白, M: 蛋白 marker; 1~2: *NtPR10*纯化蛋白。A: The solubility analysis of *NtPR10* recombinant protein (0.1 mmol/L IPTG, 15℃, overnight). M: Molecular weight marker; 1: non-induced; 2: induced crude clone; 3: supernatant of cell lysate; 4: precipitation of cell lysate. B: The *NtPR10* purified protein in SDS-PAGE gel. M: Molecular weight marker; 1~2: the purified *NtPR10* protein.

为保证最大的蛋白纯化量和较高的蛋白纯度,蛋白标签亲和层析柱以20 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 8.0平衡液平衡,平衡后上样60 mL,然后分别用含20、50、100、500 mmol/L咪唑的20 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 8.0的洗脱液洗脱。其中50、100 mmol/L咪唑洗脱缓冲液洗脱效果最好,洗脱馏分透析到最终缓冲液中,浓缩后作为蛋白产品保存。采用SDS-PAGE检测蛋白浓度,结果表明,融合蛋白条带大小19 kD左右,没有出现杂带,目的蛋白纯度较高(图2-B)。

2.3 NtPR10蛋白的活性分析

对纯化后的烟草PR10融合蛋白的核酸酶活性分析试验结果表明,烟草PR10融合蛋白同RNase A一样,均可使底物RNA显著降解,ddH₂O、蛋白溶解缓冲液对RNA的降解作用不明显,且烟草PR10融合蛋白加入核酸酶抑制剂后抑制了底物RNA的降解,从而说明了纯化后的烟草PR10蛋白具有体外核酸酶活性(图3)。体外抑菌试验表明,烟草PR10蛋白与杀菌剂一样对赤星病菌生长表现出了显著的抑制效果,且不同浓度的烟草PR10蛋白溶液均可抑制赤星病菌的生长,但随着蛋白溶液浓度的降低,抑制效果有所减弱(图4)。

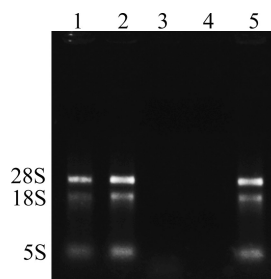


图3 烟草PR10蛋白核酸酶活性分析

Fig. 3 The ribonucleolytic activity analysis of NtPR10

1: DEPC H₂O; 2: 蛋白溶解缓冲液; 3: NtPR10纯化蛋白溶液; 4: RNase A; 5: 核酸酶抑制剂。1: DEPC water; 2: the protein solution buffer; 3: RNase A; 4: the purified NtPR10; 5: ribonuclease inhibitor.

2.4 赤星病菌诱导下的 *NtPR10* 表达分析

实时荧光定量PCR检测结果显示,接种赤星病菌后,*NtPR10*基因在感病品种NC82和抗病品种净叶黄中的表达量差异显著(图5)。感病品种NC82在接种赤星病菌后12 h、1 d,*NtPR10*基因的表达量出现微弱增长,接种后2、3、5 d,*NtPR10*基因的表达量显著升高,分别达到11.08、15.11、13.13倍,差异达到极显著水平($P<0.01$);在抗病品种净叶黄中,*NtPR10*基因在赤星病菌侵染后12 h表达量即显著增

长,达到了32.71倍,侵染后2、3、5 d,*NtPR10*基因的表达量呈现出了快速增长的趋势,分别达到65.72、300.15、571.46倍,差异均达极显著水平($P<0.01$)。表明*NtPR10*应答了烟草赤星病菌的侵染过程,且其在抗病品种中的响应速度和表达量显著高于感病品种。

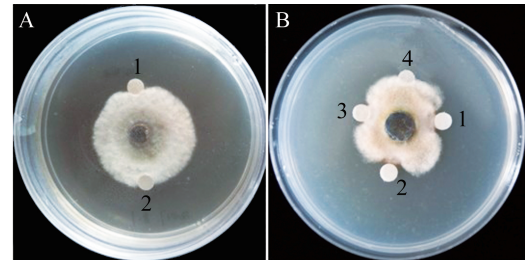


图4 烟草PR10蛋白抑制烟草赤星病菌活性分析

Fig. 4 The antifungal activity of NtPR10 inhibiting *Alternaria alternata*

A: 杀菌剂对赤星病菌生长的抑制作用, 1: dd H₂O; 2: 2.0 µg/mL 菌核净。B: 不同浓度烟草PR10蛋白溶液对烟草赤星病菌生长的抑制作用, 1: 1 µg/µL PR10蛋白; 2: 0.5 µg/µL PR10蛋白; 3: 0.25 µg/µL PR10蛋白; 4: 蛋白溶解缓冲液。A: The antifungal activity of fungicide. 1: ddH₂O; 2: 2.0 µg/mL fungicide. B: The antifungal activity of different concentrations of PR10 protein solutions. 1: 1 µg/µL purified NtPR10; 2: 0.5 µg/µL purified NtPR10; 3: 0.25 µg/µL purified NtPR10; 4: the protein solution buffer.

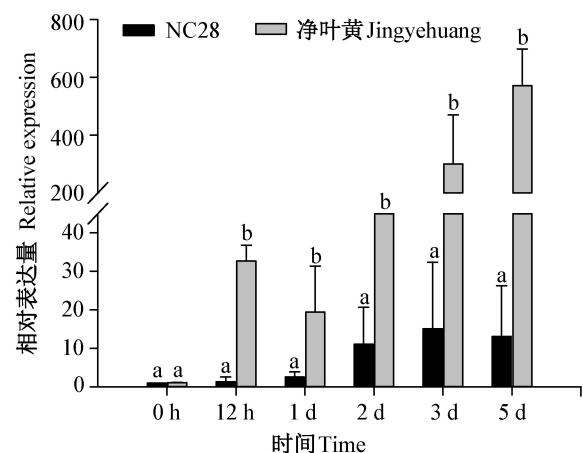


图5 烟草赤星病菌诱导后不同时期 *NtPR10* 在感病品种和抗病品种中的表达情况

Fig. 5 The expression pattern of *NtPR10* in different periods after *Alternaria alternata* induction

图中数据为平均数±标准差。相同时期下不同字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different letters above the bars at the same time indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

阐明蛋白质的结构和功能是后基因组研究的一个重要课题,高效率的蛋白质表达系统是研究这些课题不可缺少的基本技术。在已有研究报道中,最常用的原核表达载体为pET载体(江彤等,2017;袁向东等,2017),本研究利用pCold II低温表达载体,采用无缝克隆技术构建了烟草PR10融合蛋白大肠杆菌高效表达系统。为确定NtPR10融合蛋白诱导表达所需要的最佳条件,分别用0.1 mmol/L IPTG在15℃的低温下诱导过夜,1 mmol/L IPTG在适宜大肠杆菌生长的温度37℃下诱导3 h,结果显示,在15℃条件下诱导,NtPR10融合蛋白表达量较大,且经超声波破碎具有可溶性表达,而37℃条件下,NtPR10融合蛋白表达量较低,且超声波破碎后也不具有可溶性表达。分析低温下NtPR10融合蛋白表达量较高的原因,是由于本研究采用了pCold II低温表达载体,低温下降低了宿主蛋白的表达,从而使目的蛋白得以特异性的诱导表达。因此,低温下诱导有利于去除杂质,获得高纯度且足量的融合蛋白。为获得最佳洗脱效果,本研究采用了20、50、100、500 mmol/L咪唑缓冲液进行梯度洗脱,结果显示50、100 mmol/L咪唑缓冲液洗脱效果最好,从而保证了NtPR10融合蛋白的数量和纯度。Wang et al. (2017)采用pCold II低温表达载体,用0.3 mmol/L IPTG在16℃条件下诱导48 h,获得了高纯度的东方百合 *Lilium genus* 的PR4蛋白,并开展了Western Blot试验,进一步证明了pCold II载体可以高效获得原核表达融合蛋白。

本研究证明了烟草PR10蛋白具有核酸酶活性。然而,已有研究表明并非所有的植物PR10蛋白都具有核酸酶活性,从棉花(Zhou et al., 2002)、红薯(Wu et al., 2003)、辣椒(Park et al., 2004)、花生(Chadha & Das, 2006)、刺茄(Liu et al., 2006b)、人参(Lee et al., 2012)、黄羽扇豆(Fernandes et al., 2013)中分离纯化的PR10蛋白均证实具有体外核酸酶活性,而从马铃薯(Matton & Brisson, 1989)和苜蓿(Samac et al., 2011)中分离纯化的PR10蛋白却无体外核酸酶活性,这可能与PR10家族不同成员间性质差异和结构差异相关。烟草NtPR10基因ORF全长483 bp,编码160个氨基酸组成的蛋白序列,含有病程相关蛋白家族Betv1保守域,不含跨膜区、无信号肽、具有胞内蛋白特征,具有与核酸酶活性相关的“P-Loop”结构,而马铃薯PR10蛋白结构发现其不具有“P-Loop”结

构(张玉等,2017),进一步说明“P-Loop”结构与核酸酶活性的相关性。在抑菌活性试验中,本研究发现烟草PR10蛋白可以显著抑制烟草赤星病菌的生长,与He et al. (2013)对于葡萄PR10蛋白的研究结果一致。Zandvakili et al. (2017)克隆得到了玉米PR10蛋白基因,并证明其对灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea*、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、尖孢镰刀菌、大丽轮枝菌 *Verticillium dahlia* 和链格孢菌 *A. solani* 具有抑制作用,结合近年来不同植物PR10蛋白抑菌活性的研究报道,可以得出植物PR10蛋白具有广谱的抗真菌活性。

植物中PR10蛋白基因的诱导激发因子很多,在不同植物中,PR10蛋白编码基因的诱导表达既有共同的激发因子也存在特异的激发因子,这可能是植物对多样化逆境胁迫的一种适应。本研究中,在烟草赤星病菌的诱导下,NtPR10基因出现了应答反应,在抗、感品种中均显著上调表达,且在抗病品种中的表达量显著高于感病品种,说明烟草赤星病菌是NtPR10基因诱导表达的激发因子。本课题组在前期的研究中证明了TMV可诱导NtPR10基因的表达,但在抗病品种中出现了先上调表达后下调表达的趋势(张玉等,2017)。分析不同病原菌侵染下NtPR10基因在抗病品种和感病品种中的表达差异原因,是因为烟草对2种病原菌的抗性机制不同,TMV侵染试验中采用的抗病品种具有N基因介导的对TMV的垂直抗性,属显性单基因控制;而烟草对烟草赤星病菌的抗性是由多基因控制的数量性状,是多个基因共同作用的结果(Duan et al., 2016),由此推测,烟草PR10蛋白参与了抗性品种对赤星病菌的抗性。

除具有核酸酶活性和抑菌活性外,近年来大量研究证明了植物PR10蛋白可以应答非生物胁迫,具有抗逆功能。Takeuchi et al. (2016)研究发现,将水稻PR10蛋白基因RSOsPR10转入一种本特草中,可以提高对干旱和盐胁迫的耐性;Han et al. (2017)将旱柳PR10蛋白基因SmPR10转入拟南芥,证实可提高对盐胁迫的抗性。虽然对植物PR10蛋白的抗病、抗逆功能已开展了较多研究,但对其作用机理仍然了解较少。Chadha & Das (2006)通过对花生PR10蛋白(AhPR10)抗病机制进行研究,认为AhPR10蛋白以主动运输方式进入病原菌细胞并发挥核酸酶活性降解病原核酸从而抑制病原菌的生长;也有一些研究表明,PR10蛋白通过结合细胞分裂素(Fujimoto et al., 1998)、油菜素内酯(Mogensen et al., 2002)、

黄酮类化合物 (Koistinen et al., 2005) 以及脂肪酸 (Liu & Ekramoddoullah, 2006) 等物质来参与植物的生长发育及调节作用, 其是否通过核酸酶活性来参与植物对病原物的抑制受到质疑。因此, 对于植物PR10蛋白参与的抗病、抗逆机理机制仍需深入研究。本研究以模式植物烟草作为研究对象, 获得了高纯度的烟草PR10原核表达融合蛋白, 分析了其生物学活性及烟草赤星病菌侵染下 *NtPR10* 基因在抗、感品种内的转录水平, 为深入解析植物PR10参与的生物学功能及机理机制奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

- Chadha P, Das RH. 2006. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta*, 225 (1): 213–222
- Deng W, Bian WP, Xian ZQ, Yang YW, Li ZG. 2011. Molecular cloning and characterization of a pathogen-related protein PR10 gene in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) flower response to insect herbivore. *African Journal of Biotechnology*, 10(84): 19514–19521
- Duan S, Ma X, Chen W, Wan W, He Y, Ma X, Ma Y, Long N, Tan Y, Wang Y, et al. 2016. Transcriptomic profile of tobacco in response to *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata* infections. *Scientific Reports*, 6: 25635#
- Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS Journal*, 280(5): 1169–1199
- Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Ovchinnikova TV. 2017. Plant pathogenesis-related proteins PR-10 and PR-14 as components of innate immunity system and ubiquitous allergens. *Current Medicinal Chemistry*, 24(17): 1772–1787
- Fujimoto Y, Nagata R, Fukasawa H, Yano K, Azuma M, Iida A, Sugimoto S, Shudo K, Hashimoto Y. 1998. Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *European Journal of Biochemistry*, 258(2): 794–802
- Han X, He X, Qiu W, Lu Z, Zhang Y, Chen S, Liu M, Qiao G, Zhuo R. 2017. Pathogenesis-related protein PR10 from *Salix matsudana* Koidz exhibits resistance to salt stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 141: 74–82
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshiba T. 2004. A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and Cell Physiology*, 45(5): 550–559
- He MY, Xu Y, Cao JL, Zhu ZG, Jiao YT, Wang YJ, Guan X, Yang YZ, Xu WR, Fu, ZF. 2013. Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma*, 250(1): 129–140
- Jiang T, He ZL, Zhang XX, Xia WW, Li XY. 2017. Prokaryotic expression of protein encoded by gene *S7-1* and cloning of genome *S7* of Anhui isolate of *Southern rice black-streaked dwarf virus*. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 467–472 (in Chinese) [江彤, 何志龙, 张享享, 夏伟伟, 李祥宇. 2017. 南方水稻黑条矮缩病毒安徽分离物 *S7* 片段的克隆及其 *S7-1* 基因编码蛋白的原核表达. *植物保护学报*, 44(3): 467–472]
- Koistinen KM, Soininen P, Venäläinen TA, Häyrynen J, Laatikainen R, Peräkylä M, Tervahauta AI, Kärenlampi SO. 2005. Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry*, 66(21): 2524–2533
- Lee OR, Pulla RK, Kim YJ, Balusamy SRD, Yang DC. 2012. Expression and stress tolerance of *PR10* genes from *Panax ginseng* CA Meyer. *Molecular Biology Reports*, 39(3): 2365–2374
- Liu JJ, Ekramoddoullah AK. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1): 3–13
- Liu X, Huang B, Lin J, Fei J, Chen Z, Pang Y, Sun X, Tang K. 2006. A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible. *Journal of Plant Physiology*, 163(5): 546–556
- Matton DP, Brisson N. 1989. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(6): 325–331
- Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, Otzen DE. 2002. The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26): 23684–23692
- Niskanen R, Dris R. 2004. Pathogenesis-related proteins — an important group of plant-derived allergens. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2(2): 14–24
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal*, 37(2): 186–198
- Samac DA, Penuela S, Schnurr JA, Hunt EN, Foster-Hartnett D, Vandenberg KA, Gantt JS. 2011. Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Pathology*, 12 (8): 786–798
- Takeuchi K, Hasegawa H, Gyohda A, Komatsu S, Okamoto T, Okada K, Terakawa T, Koshiba T. 2016. Overexpression of *RSOsPR10*, a root-specific rice PR10 gene, confers tolerance against drought stress in rice and drought and salt stresses in bentgrass. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(1): 35–46
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Reviews of Phytopathology*, 44: 135–162
- Wang L, Guo ZH, Zhang YB, Wang YJ, Yang G, Yang L, Wang RY,

- Xie ZK. 2017. Isolation and characterization of two distinct class II PR4 genes from the oriental lily hybrid Sorbonne. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(5): 707–717
- Wang X, El Hadrami A, Adam LR, Daayf F. 2005. Genes encoding pathogenesis-related proteins PR-2, PR-3 and PR-9, are differentially regulated in potato leaves inoculated with isolates from US-1 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(1): 49–56
- Wei L, Zhang L, Wang WW, Yu ZY, Yu DY, Liu LJ. 2016. Bioinformatics analysis on soybean pathogenesis-related protein (PR-5) and its homology proteins TPLs. *Soybean Science*, 35(3): 380–387 (in Chinese) [魏嵘, 张丽, 王伟威, 于志远, 喻德跃, 刘丽君. 2016. 大豆病程相关蛋白 PR-5 及其同源蛋白 TPLs 的生物信息学分析. *大豆科学*, 35(3): 380–387]
- Wu F, Yan M, Li Y, Chang S, Song X, Zhou Z, Gong W. 2003. cDNA cloning, expression, and mutagenesis of a PR-10 protein SPE-16 from the seeds of *Pachyrrhizus erosus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(3): 761–766
- Wu J, Kim SG, Kang KY, Kim JG, Park SR, Gupta R, Kim YH, Wang Y, Kim ST. 2016. Overexpression of a pathogenesis-related protein 10 enhances biotic and abiotic stress tolerance in rice. *The Plant Pathology Journal*, 32(6): 552–562
- Xu Y, Yu H, He M, Yang Y, Wang Y. 2010. Isolation and expression analysis of a novel pathogenesis-related protein 10 gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* induced by *Uncinula necator*. *Biologia*, 65(4): 653–659
- Yuan XD, Zhang WN, Zhao M, Liang GM. 2017. Cloning, expression and functional analysis of alkaline phosphatase 2 (*alp2*) in the midgut of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection*, 44(1): 8–15 (in Chinese) [袁向东, 张万娜, 赵曼, 梁革梅. 2017. 甜菜夜蛾中肠碱性磷酸酶 *alp2* 基因的克隆、表达及功能分析. *植物保护学报*, 44(1): 8–15]
- Zandvakili N, Zamani M, Motallebi M, Moghaddassi M, Jahromi ZM. 2017. Cloning, overexpression and *in vitro* antifungal activity of *Zea mays* PR10 protein. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(1): 42–49
- Zhang G, Li YM, Zhang Y, Dong YL, Wang XJ, Wei GR, Huang LL, Kang ZS. 2009. Cloning and characterization of a pathogenesis-related protein gene *TaPR10* from wheat induced by stripe rust pathogen. *Agricultural Sciences in China*, 42(1): 110–116 (in Chinese) [张岗, 李依民, 张毅, 董艳玲, 王晓杰, 魏国荣, 黄丽丽, 康振生. 2009. 条锈菌诱导的小麦病程相关蛋白 *TaPR10* 基因的克隆及特征分析. *中国农业科学*, 42(1): 110–116]
- Zhang Y, Zhang ZL, Jiang CH, Chang AX, Yang AG, Luo CG, Wang SM, Wang YY. 2017. Cloning and expression induced by TMV of a pathogenesis related protein gene *NtPR10* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Chinese Tobacco Science*, 38(3): 1–7 (in Chinese) [张玉, 张增林, 蒋彩虹, 常爱霞, 杨爱国, 罗成刚, 王绍美, 王元英. 2017. 烟草病程相关蛋白 *NtPR10* 基因克隆与表达分析. *中国烟草科学*, 38(3): 1–7]
- Zhao L, Ma LG, Wang ZS, Chen ML, Shen Y, Huang LQ. 2015. Molecular cloning and characterization of a pathogenesis-related protein SmPR10-1 from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(10): 205#
- Zhou XJ, Lu S, Xu YH, Wang JW, Chen XY. 2002. A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity. *Plant Science*, 162(4): 629–636

(责任编辑:高峰)