

梅 PGIP 基因的克隆及全序列分析

李广平¹ 房经贵¹ 蔡斌华¹ 章 镇^{1*} 张长青²

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²金陵科技学院园艺系, 南京 210038)

摘 要: 通过 PCR 扩增, 从梅基因组中得到 1 条全长 1 192 bp 的多聚半乳糖醛酶抑制蛋白 (PGIP) 基因序列。该序列包含有 1 个完整的开放阅读框和 1 个内元。比对结果表明, 克隆到的序列与桃、马哈利樱桃中相应序列一致度分别为 96% 和 95%, 其蛋白质序列与桃、马哈利樱桃的蛋白质序列一致度分别为 97% 和 94%。该蛋白质序列中包含着一段亮氨酸重复序列。

关键词: 梅; PGIP 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S 662.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 01-0125-03

Cloning and Sequencing of PGIP Gene from *Prunus mume* Sieb

Li Guangping¹, Fang Jinggui¹, Cai Binhua¹, Zhang Zhen^{1*}, and Zhang Changqing²

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Department of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: A 1 192 bp sequence of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene (Genbank locus: AY764131) was isolated by polymerase chain reaction (PCR) from *Prunus mume*. This sequence had a intron and a full open reading frame encoding the polygalacturonase-inhibiting protein. Its gene and derived protein were both highly homologous to those from *Prunus persica* and *Prunus mahaleb*. A conserved leucine-rich fragment had existed in the derived protein sequence.

Key words: *Prunus mume*; PGIP gene; Cloning; Sequencing

1 目的、材料与方法

多聚半乳糖醛酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP) 能专一性地抑制真菌的内切多聚半乳糖醛酶活性, 促进植物体内寡聚半乳糖醛酸积累, 有效阻断真菌侵染过程和抑制相应病害的发生^[1]。目前, 已从大豆^[2]、苹果^[3]、梨^[4]、树莓^[5]、番茄^[6]、马铃薯^[7]等种植物上克隆到了该蛋白质的完整基因或部分片段。作者以梅为试材, 克隆了该基因 (Genebank 登录号为 AY764131)。

采集梅 (*Prunus mume* Sieb.) 品种 ‘大粒’ 8 年生植株展叶期的幼叶, 提取 DNA。以 5'-CGTTCACCCGCAA TCACA TTICTTA TCC-3' 和 5'-TGGCCGTGGGAA TTA TTTGCA GCTTG-3' 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系及条件: 10 ×PCR Taq buffer 2 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, dNTP (10 mmol/L each) 1 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA (20 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 9 μL。94 预变性 2 min; 94 变性 1 min, 61 退火 2 min, 72 延伸 2 min, 35 次循环; 72 延伸 10 min。扩增产物克隆于 PGEM-T Easy 载体上, 转化感受态大肠杆菌。载体连接反应体系为: 2 ×Rapid ligation buffer 5 μL, PGEM-T Easy vector (50 ng) 1 μL, PCR product 60 ng, T₄DNA ligase (3 weiss U/μL) 1 μL, ddH₂O 补至 10 μL。转化后的大肠杆菌在 37 °C, 150 r/min, 振荡培养 1.5 h 之后, 吸取 100 μL 菌液至 LB 固体培养基 (Amp 100 mg/L、x-gal 0.8 mg/mL、IPTG 0.8 mg/mL) 上, 37 °C 培

收稿日期: 2004 - 12 - 08; 修回日期: 2005 - 05 - 12

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com)

养过夜。挑取白色单菌落，经 PCR 初步鉴定后送上海申能博彩公司测序。对测序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 DNAMAN 4.0 绘制序列聚类图。

2 结果与讨论

以梅基因组 DNA 为模板，扩增出了 1 条长约 1 200 bp 的目的条带（图 1）。测序结果表明，该条带的实际长度为 1 192 bp（图 2）。

BLASTn 比对表明，该 DNA 片段与 Genbank 中登录的桃、马哈利樱桃的 PGIP 基因序列长度相同，一致度分别达 96% 和 95%，E 值都为 0。结构分析发现，该序列基因的实际长度为 1 140 bp，含有两个外元（41 ~ 581 bp 和 729 ~ 1 180 bp）和 1 个内元（581 ~ 729 bp），内元两端具有真核生物典型的 GT-AG 拼接点序列特征（图 2）。BLASTp 比对表明，该基因的蛋白质序列与桃、马哈利樱桃的一致度分别达 97% 和 94%，E 值分别为 0 和 e^{-180} ，表现出了极高的一致性。序列保守性分析发现，该蛋白质还具有 1 段 24 个残基长的亮氨酸重复序列（163 ~ 186 bp），这是多数植物 PGIP 抗病基因表达蛋白特有的保守序列（LXXLXXLXXLXXNXLXGXIPXX）^[8]。

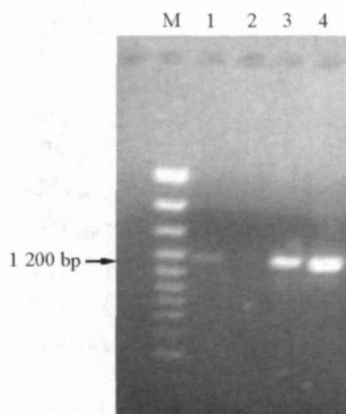


图 1 梅 PGIP 基因的 PCR 扩增

M: DNA marker; 1, 3, 4: PCR 扩增产物电泳的 3 次重复;
2: DNA 空白对照。

Fig 1 PCR amplification of PGIP gene from *Prunus mume*

M: DNA marker; 1, 3, 4: Three repeats of PCR amplified fragment; 2: DNA blank control

```

CGTTACCCCGCAATCACATTCTTATCCAGAACCACAAATGGACGTCAAGTTCCCCACCCCTCC TCTGCTTGACCCCTACTCTTCT CCGCCAT CCTAAACCC
M D V K F P T L L C L T L L F G A I L N P
AGCGCTCTCTGAGCTCTGCAACCAGGAAGACAAGAAAGTTCTCTCAAAATCAAGAAAGCCTTCAACGACCCCTACGCTCTTGACCTCATGGAAGCCAGAGAC
A L S E L C N Q E D K K V L L Q I K K A F N D P Y V L T S W K P E T
AGACTGCTGTGACTGTGACTGTGTACCTGTGACTCCACCACAAACCGCATCAACTCCCTCACCATATTCGCGGCCAAGTCTCCGGTCAAATTCGCGGCCA
D C C D W Y C V T C D S T T N R I N S L T I F A G Q V S G Q I P A Q
AGTCGGTGACTTGCGTATCTGAAACACTTGAGTTTCAACAAGCAACCAATCTCACCGGACCAATCAACCCCTCCATTGTAAAGCTAAAGAGCCTGAAGTT
V G D L L P Y L E T L E F H K Q P N L T G P I Q P S I V K L K S L K F
CCTGCGCTCAGCTGGACCAACATCTCCGGCT CTG TACCTGACTT CCTCAGCCAACTCAAGAACCTCACCCTTCTTGATCTCT CAITCAGTAACCTCACAGG
L R L S W T N I S G S V P D F L S Q L K N L T F L D L S F S N L T G
CTCCATCCCCAGCTGCTTCTCAGCTTCCCAACCTCAACGCTCTTCATCTAGACCGTAACAAGCTCACAGGTCCTGCTCTCTCTGACATATATCTTCTAAA
S I P S S L S Q L P N L N A L H L D R N K L T G
AAGTGCCAGAAAGAAAGATACAACTTTGTCAAAATTTTCATATAATTTAATCTTGATACC GATGGTTAATAATTTTCCGTAACTTCCATAGTTAATACCCCT
TGCTTGCTCAGAGTTCCGAAGTCAATTTGGAGAATTCATGGCAGTGTTCCAGAGCTCTATCTCTCCCAACACAGCTCTCAGGCAACATACCAAC
H I P K S F G E F H G S V P E L Y L S H N Q L S G N I P T
CTCAITAGCCAACTGGAAGTCAACCGCATAGACTTCTCCCGGAACAAGCTCGAAGGCGATGCATCCATGATCTTGGATTGAACAAGACAACCCAGATTGT
S L A K L D F N R I D F S R N K L E G D A S M I F G L N K T T Q I V
GGATCTGTGCGAAGAACTTCTGGAATTTAATCTGTCAAAGGTGGAGTTTTCGAAGAGCTTGATTTTCGTTGGAATCTTAAACCAACAAGATCAAGGTGGTAT
D L S R N L L E F N L S K V E F S K S L I S L D L N H N K I T G G G I
TCCGGTGGGCTGACCCAAGTGGATTGCAATTCGTAACGTGAGCTCAACAAGATTGTGTGGTCAGATTCCAGTGGGCGGAAGTTCAGAGCTTCGAC
P V G G L T Q V D L Q F L N V S Y N R L C G Q I P V G G K L Q S F D
TCCTCCACTTATTTCCATAACCGCTGCTGTGCGGTGCTCCACTCCCAAGCTGCAAAATAATCCACGGCCA
S S T Y F H N R C L C G A P L P S C K *

```

图 2 梅 PGIP 基因核酸序列及推导的氨基酸序列

核酸序列中的阴影部分为内元区，氨基酸序列中的阴影部分为亮氨酸重复区。*表示终止子。

Fig 2 Nucleic acid sequence of PGIP gene and its protein sequence from *Prunus mume*

The sequence line with shade of nucleic acid represents intron, and that of protein indicates leucine-rich repeat * Terminator

由序列聚类图（图 3）来看，所有的 PGIP 基因序列大致分为 4 组，梅、桃和马哈利樱桃为一组；砂梨、西洋梨和大椴为一组；温州蜜橘、金橘、拉提普橘、澳洲指橘和枸橘为一组；大豆和菜豆为一组，基本表现出属内同源性很高、属间相对较低的特点。

有研究表明：不同来源的 PGIP，其抑菌效果存在差异^[9]。因此，本研究需要进一步对克隆到的 PGIP 基因进行真核生物表达研究，验证其抑菌效果。

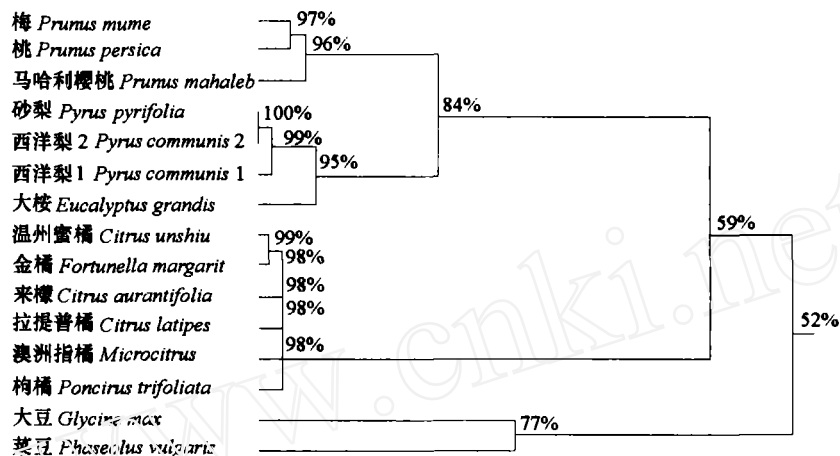


图 3 PGIP 基因序列聚类图

Fig 3 Homology tree of nucleic acid sequence of PGIP

参考文献:

- 1 D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting protein and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1696: 237 ~ 244
- 2 Favaron F, D'Ovidio R, Porceddu E. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta*, 1994, 195: 201 ~ 206
- 3 Yao C, Conway W S, Sas C E. Purification and molecular characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology*, 1995, 85: 1373 ~ 1377
- 4 Stotz H U, Powell A L T, Danon S E. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Bartlett. *Plant Physiology*, 1993, 102: 133 ~ 138
- 5 Johnston D J, Ramanathan V, Williamson B. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 44: 971 ~ 976
- 6 Stotz H U, Contos J J A, Powell A L T. Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25: 607 ~ 617
- 7 Machinandiarena M F, Olivieri F P, Daleo G R, Oliva C. Isolation and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from potato leaves: accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39: 129 ~ 136
- 8 Jones D A, Jones I D G. The role of leucine-rich repeats in plant defences. *Advances in Botanical Research*, 1997, 24: 89 ~ 167
- 9 Favaron F, Castiglioni C, D'Ovidio R. Polygalacturonase inhibiting proteins from *Auion pomum* L. and their role in plant tissue against fungal endopolygalacturonases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 50: 403 ~ 417

新书推荐

《新编拉汉英植物名称》 王宗训主编

本书收集具有经济价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称约 55 800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照,按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。

本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用,也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价: 185 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。