

九台晚李 *PGIP* 基因的克隆及生物信息学分析

郭庆勋, 张春雨, 王晶莹, 周连霞, 王彦涛

(吉林大学植物科学学院, 长春 130062)

摘要:以九台晚李叶片基因组为模板, *PGIP* 基因保守序列设计引物, PCR 扩增到 1 条全长 1192bp 的目的片段 (GenBank 登录号: GU068978)。该基因包含有 1 个完整的开放阅读框, 由 2 个外显子和 1 个内含子构成, 外显子总长 990bp, 编码 330 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。序列分析表明: 该基因与中国李、杏、桃、马哈利樱桃、梅等李属植物的 *PGIP* 基因序列一致性达 95%~99%。系统进化分析显示出属内亲缘关系较近、属间亲缘关系较远的特点。该序列为植物分子抗病育种提供了 1 条新的基因资源。

关键词:九台晚李; *PGIP* 基因; 基因克隆; 生物信息学

Cloning and Bioinformatic Analysis of *PGIP* Gene from Jiutaiwanli

GUO Qing-xun, ZHANG Chun-yu, WANG Jing-ying, ZHOU Lan-xia, WANG Yan-tao

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun, 130062)

Abstract: A target fragment with a full length of 1192 bp (GenBank accession: GU068978) was amplified with genomic DNA of *Prunus salicina* L. cv. Jiutaiwanli 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, and contained two exons interrupted by one intron. The total exons were comprised by 990bp of deoxynucleotide encoding 330 amino acid. A conserved leucine-rich fragment had existed in the derived protein sequence. Sequencing analysis showed that it was 95% to 99% identical with the sequences of *Prunus PGIP* genes including *P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. persica*, *P. mahaleb*, *P. mume*. Phylogenetic tree showed that genetic relationship within the genus was closer and between the genera was farther. As a result, a gene resource was provided for molecular breeding of plants.

Key words: *Prunus salicina* L. cv. Jiutaiwanli; *PGIP* gene; Gene cloning; Bioinformatic Analysis

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原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]等多种植物基因组中克隆到了该蛋白质的完整基因或部分片段。九台晚李 (*Prunus*

salicina L. cv. Jiutaiwan) 是吉林省李树的主栽品种, 具有抗寒、晚熟、丰产、抗病等优良性状。由于九台晚李采收正值 8 月末、9 月初的高温季节, 因此在采后的贮藏、运输、销售过程中果实易软化, 品质下降, 容易腐烂变质。本文以九台晚李为材料, 对其 *PGIP* 基因进行克隆和测序, 以构建植物表达载体, 为培育抗病、耐贮果树新品种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2008 年 8 月在吉林大学植物科学学院园艺植物研究室进行。九台晚李植株的嫩叶采集于

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-04-02

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: 郭庆勋, 博士, 研究方向为园艺植物种质资源。E-mail: qingxunguo@126.com

通讯作者: 张春雨, 博士, 研究方向为园艺植物种质资源评价与生物技术育种。E-mail: chunyu Zhang1979@126.com

吉林大学植物科学学院实验教学基地。

1.2 方法

1.2.1 九台晚李基因组 DNA 提取 取九台晚李嫩叶用 CTAB 法提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 根据 GenBank 中已发表的 *PGIP* 基因序列,分析其保守序列后,设计出 1 对特异引物,F:5'-CGT TCA CCC GCA ATC ACA TTT CTT ATC C-3',R:5'-TGG CCG TGG GAA TTA TTT GCA GCT TG-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 2min;94℃ 变性 1min,61℃ 退火 2min,72℃ 延伸 2min,35 次循环;72℃ 延伸 10min,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 DH5 α 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 DNASTar 软件的 MegAlign 程序,采用 Clustlal W 方法绘制序列聚类图。

2 结果与分析

2.1 九台晚李 *PGIP* 基因的克隆

通过 PCR 扩增,从九台晚李基因组中得到了 1 条目的条带。该片段长度大小约为 1200bp,无其他杂带(图 1)。

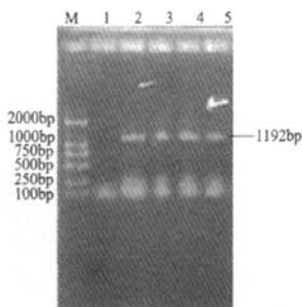


图 1 九台晚李 *PGIP* 基因 PCR 扩增电泳检测图

Fig.1 PCR amplification of *PGIP* gene from

Prunus salicina L. cv. Jiutaiwan

M:DNA marker;1:DNA 空白对照,DNA blank control;

2~5:扩增片段,PCR amplified fragment

2.2 九台晚李 *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 DH5 α 。挑 5 个白斑菌落进行 PCR 扩增鉴定,依据鉴定结果挑选其中 2 个克隆进行测序。结果表明,克隆到的为 1 条长 1192bp 的片段(图 2)。

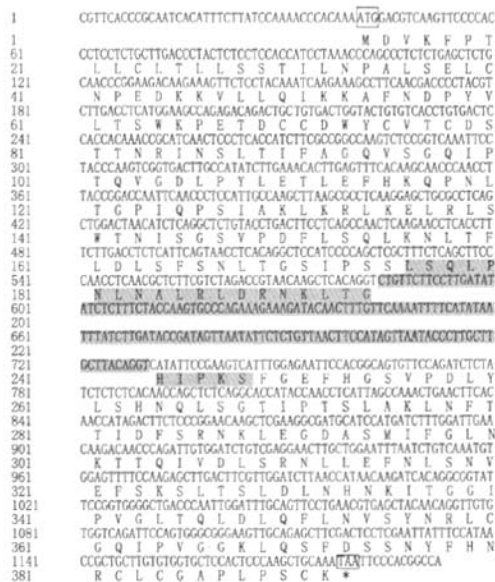


图 2 九台晚李 *PGIP* 基因全长序列和推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleic acid sequence of *PGIP* gene (upper) and the deduced amino acid sequence (listed below)

in *Prunus salicina* L. cv. Jiutaiwanli

核酸序列中的阴影部分为内含子区,氨基酸序列中的阴影部分为亮氨酸重复序列,ATG 为起始密码子,TAA 为终止密码子

The intron in the shaded nucleic acid sequence and the leucine-repeated sequence in the shaded amino acid sequence, ATG indicates the start codon, TAA indicates the stop codon

2.3 九台晚李 *PGIP* 基因的序列分析

基因序列分析结果表明,该序列基因的实际长度为 1192bp,包含完整阅读框的核酸序列,含有 2 个外显子(41~578bp 和 725~1033bp)和一个内含子(578~725bp)。

利用 BLASTn 对 Genbank 中登录的序列进行比对,结果表明:九台晚李 *PGIP* 核苷酸序列与中国李、美洲李一致度分别达 99%,与杏一致度为 98%,与马哈利樱桃、桃、梅等李属植物的一致性均达到 95% 以上,且 E 值都为 0。利用 DNAMAN 软件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:该基因的蛋白质序列与中国

李、杏、马哈利樱桃的一致度均达到 97%, E 值分别为 0, 表现出了极高的一致性。该基因蛋白的功能结构分析发现, 该蛋白质具有 1 段由 24 个氨基酸残基组成的亮氨酸重复 LRR 结构域(LXXLXXLXXLX-LXXNXLGXIPXX)(176bp ~ 199bp)(图 2), 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 九台晚李 *PGIP* 基因编码蛋白的功能分析

对九台晚李 *PGIP* 基因编码的蛋白进行分析发现, 该蛋白含有 330 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 36524.3, 等电点为 7.90。其中非极性氨基酸为 134 个, 占 40.7%, 极性氨基酸占 59.3%。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, 使九台晚李 *PGIP* 靶向内膜系统, 输出到胞外空间(图 3)。PpPGIP 三级结构预测结果表明, 由 PpPGIP 肽链构成的三维模型含 13 个 α -螺旋, 39 个 β -转角(图 4)。

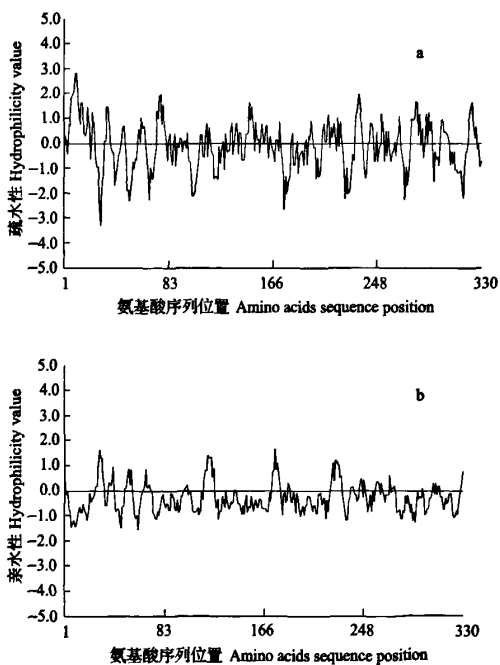


图 3 九台晚李氨基酸序列的疏水性(a)和亲水性(b)分析
Fig.3 Analysis of *PGIP* amino acid sequence hydrophobicity (a) and hydrophilicity (b) from Jiutaiwanli

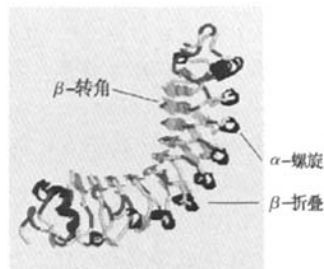


图 4 PpPGIP 三维结构预测图
Fig.4 Predicted PpPGIP three dimensional model

2.5 *PGIP* 基因聚类分析

利用 DNASTar 软件对九台晚李 *PGIP* 基因序列和 GenBank 中收录的含有完整编码区的 6 种果树的 *PGIP* 基因核酸序列进行系统进化分析, 绘制无根进化树(图 5)。结果表明: 27 条 *PGIP* 基因序列大致分为 6 组, 来自同一属的聚在一起。第一组中由核果类的李属植物构成, 九台晚李首先和来自同一种的中国李聚在一起, 之后依次同美洲李、杏、马哈利樱桃、桃和梅聚在一起。第二组由仁果类的梨属和苹果属植物构成, 第三组由草莓属植物构成。这三个组都是由蔷薇科植物构成, 首先聚在一起, 组成一个大组。第四组由芸香科的柑橘属构成。第五组由葡萄科的葡萄属构成, 第六组由杜鹃花科的越橘属构成。基本表现出近缘属内亲缘关系较近、远缘属间亲缘关系较远的点。

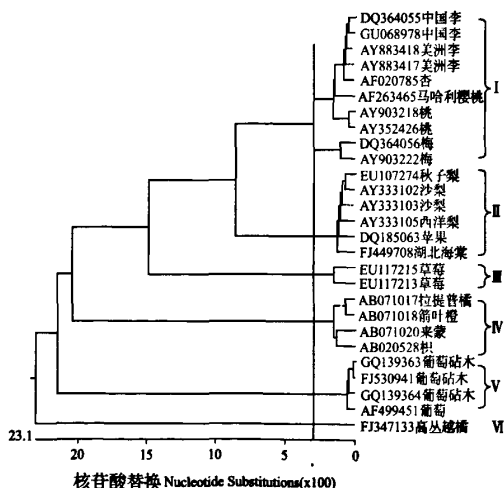


图 5 *PGIP* 基因核苷酸序列聚类图
Fig.5 Homology tree of nucleic acid sequence of *PGIP* gene

3 讨论

本试验克隆到 1 条长 1192bp, 包含完整阅读框的核酸序列。该序列的蛋白的功能结构分析显示其具 *PGIP* 基因典型的 LRR 结构域^[9], 且同中国李、美洲李、杏等的 *PGIP* 一致性均达到 98% 以上, 因此初步确定为一条新的 *PGIP* 基因, 并在 GenBank 中登录, 登陆号为 GU068978。对 GenBank 中收录的含有完整编码区的其他果树树种的 *PGIP* 基因核酸序列进行系统进化分析, 九台晚李首先同来自同一种的中国李另一个品种聚在一起, 并且明显表现出属内同源性很高、属间相对较低的特点^[7]。但对苹果^[10]、栗子^[11]等的研究显示, 同一物种的不同品种 *PGIP* 在表达量上存在差异, 且这种差异与品种间的抗性强弱密切相关。九台晚李为吉林省李树主栽品种, 具有抗寒、抗病等优良性状, 但果实采后软化速度快, 货架寿命期短, 因此本文将为分子抗病育种提供了 1 条新的基因资源。

在果实采后的成熟和衰老过程中, 果实软化是最为明显的变化。果实软化是影响果实采后贮藏期长短的主要因素之一。*PGIP* 是一种特异性结合和抑制真菌内切多聚半乳糖醛酸酶 (endo-PG) 活性的细胞壁结合蛋白^[12-13], 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^[14]。通过过量表达, 可以有效地抑制果实软化和抵抗真菌侵染。但不同来源的 *PGIP*, 其抑菌效果存在差异。过量表达梨 *PGIP* 基因的番茄对抵抗灰霉病侵染的能力明显增强^[15], 而同样过量表达大豆 *PGIP* 基因的抑菌效果却不明显^[16]。因此, 推测不同来源的 *PGIP* 对真菌分泌的内切多聚半乳糖醛酸酶的识别能力存在差异。因此下一步实验需要进行基因的功能鉴定, 进一步验证此基因是否可以提高果实耐贮性。

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'Ovidio 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 micro-organisms [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] Jones D A, Jones I D G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences [J]. Advances in Botanical Research, 1997, 24: 89-167
- [10] Brown A E. Relationship of endopolygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits [J]. Phytopathologische Zeitschrift, 1984, 111: 122-132
- [11] Gao S, Shain L. Activity of polygalacturonase produced by *Phanerochaete parasitica* in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 46: 199-213
- [12] Cervone F, Hahn M G, De Lorenzo G. Host-pathogen interaction XXXIII A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses [J]. Plant Physiol, 1989, 90: 542-548
- [13] Cervone F, De Lorenzo G, Darvill A, et al. Can Phaseolus *PGIP* inhibit pectinase enzymes from microbes and plants? [J]. Phytochemistry, 1990, 292: 447-449
- [14] D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, et al. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1696: 237-244
- [15] Powell A L T, van Kan J, ten Have A, et al. Transgenic expression of pear *PGIP* in tomato limits fungal colonization [J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2000, 13: 942-950
- [16] Favaron F, Castiglioni C, D'Ovidio R, et al. Polygalacturonase inhibiting proteins from *Allium porrum* L. and their role in plant tissue against fungal endo-polygalacturonases [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 50: 403-417

欢迎 订阅

《烟台果树》是烟台市农科院果树科学研究所主办的果树专业性季刊。立足北方水果的主产区山东烟台, 面向全国。经过 31 年的发展, 《烟台果树》已成为我国广大果树业者新观点、新品种、新技术的交流平台, 也是苗木、农药、肥料及各种生产机具等信息发布的平台。每期定价 4 元, 全年 16 元。邮发代号 24-107。

地址: (264008) 山东省烟台市环山路 145 号

电话: 0535-6236524, 6615052 (传真)

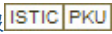
E-mail: ytgshjb@hotmail.com

《山西果树》是山西省农科院果树研究所主办的综合性果树科技期刊, 主要报道果树科研新成果, 交流果树先进实用的管理经验与技术, 普及果树科学知识, 提供果树科技信息服务等。双月刊, 16 开本, 64 页, 每逢单月 10 日出版, 每册定价 4.00 元, 全年 6 册共 24.00 元。邮发代号 22-17。

地址: (030815) 山西省太谷县省果树研究所

电话: 0354-6215005

E-mail: sxgzszs@163.com

作者: 郭庆勋, 张春雨, 王晶莹, 周连霞, 王彦涛, GUO Qing-xun, ZHANG Chun-yu,
WANG Jing-ying, ZHOU Lan-xia, WANG Yan-tao
作者单位: 吉林大学植物科学学院, 长春, 130062
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2010, 11(5)

参考文献(16条)

1. DI Matteo A;Federici L;Mattei B The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein(PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense 2003
2. Jones D A;Jones I D G The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences[外文期刊] 1997
3. 李广平;乔玉山;陶建敏 中国李PGIP基因的克隆及序列分析[期刊论文]-西北植物学报 2006(09)
4. 李广平;房经贵;蔡斌华 梅PGIP基因的克隆及序列分析[期刊论文]-园艺学报 2006(01)
5. Johnston D J;Ramanathan V;Williamson B A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from Botrytis cinerea and other micro-organisms 1999
6. Stotz H U;Powell A L T;Damon S E Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from Pyrus communis L. cv. Bartlett[外文期刊] 1993
7. Favaron F;Castiglioni C;D'Ovidio R Polygalacturonase inhibiting proteins from Allium porrum L. and their role in plant tissue against fungal endo-polygalacturanases[外文期刊] 1997
8. Powell A L T;van Kan J;ten Have A Transgenic expression of pearPGIP in tomato limits fungal colonization 2000
9. D'Ovidio R;Mattei B;Roherti S Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plantpathogen interactions 2004
10. Cervone F;De Lorenzo G;Darvll A Can Phaseolus PGIP inhibit pecti enzyme from microbes and plants 1990
11. Cervone F;Hahn M G;De Lorenzo G Host-pathogen interactionX X XIII A plant protein convoerts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses[外文期刊] 1989
12. Gao S;Shain L Activity of polygalacturonase produced bycryphonectria parasizica in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut 1995
13. Brown A E Relationship of endopolygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits[外文期刊] 1984
14. Yao C;Conway W S;Same C E Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit[外文期刊] 1995(11)
15. Favaron F;D'Ovido R;Porceddu E Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein 1994
16. Simpson C G;MacRae E;Gardner R C Cloning of a polygalacturonase inhibiting protein from Kiwifruit(Actinidia deliciosa) 1995

本文读者也读过(10条)

1. 钟金城, 竺笑, 赵胜, 陈智华, 刘盛纲, ZHONG Jin-cheng, ZHU Xiao, ZHAO Sheng, CHEN Zhi-hua, LIU Sheng-gang 耗

牛HSP72蛋白的生物信息学分析[期刊论文]-生物信息学2006, 4(3)

2. 唐宁, 杨平, TANG Ning, YANG Ping 盐芥ThHKT1基因的生物信息学分析[期刊论文]-药物生物技术2008, 15(6)
3. 杨小兰, Yang Xiaolan 一个葡萄抗逆相关转录因子VvPF1基因的in silico克隆及生物信息学分析[期刊论文]-安徽农学通报2007, 13(22)
4. 庞俊峰, 于卓, 张占路, 房永雨, 唐益雄, 吴燕民, Pang Junfeng, Yu Zhuo, Zhang Zhanlu, Fang Yongyu, Tang Yixiong, Wu Yanmin 木槲CaM基因的克隆及序列分析[期刊论文]-生物技术通报2010(12)
5. 邱明轩, 李峰, 张建宏, 张建平, 覃佐东, 徐燕慧, QIU Ming-xuan, LI Feng, ZHANG Jian-hong, ZHANG Jian-ping, QIN Zuo-dong, XU Yan-hui NAP1基因和ARHP基因启动子区的生物信息学分析[期刊论文]-湖南文理学院学报(自然科学版) 2007, 19(3)
6. 孙阳, 赵雅妮, 王大勇, Yang SUN, Ya-Ni ZHAO, Da-Yong WANG 线虫中有关影响突触结构与功能的遗传位点及其对miRNA的生物信息学分析[期刊论文]-神经科学通报(英文版) 2006, 22(6)
7. 邓云, 王建, 胡亮杉, 卢光琇, DENG Yun, WANG Jian, HU Liang-sha, LU Guang-xiu 小鼠睾丸凋亡基因MSRG-11的人类同源基因SPATA17的克隆[期刊论文]-激光生物学报2006, 15(3)
8. 宋长新, SONG Chang-xin 基于XML的生物信息平台构架[期刊论文]-青海师范大学学报(自然科学版) 2008(3)
9. 张繁, 王松 并行计算在生物信息学中的应用[期刊论文]-科技信息(科学·教研) 2007(36)
10. 福建省计算机学会 计算机在生物学研究中的应用发展报告[期刊论文]-海峡科学2007(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201005025.aspx