

农业生物技术

利用转基因烟草确定 AtELHYPRP2 蛋白对赤霉菌的抗性及其亚细胞定位特征

柴秋霞, 李本昌, 徐子勤

西北大学生命科学学院 陕西省生物技术重点实验室 西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

柴秋霞, 李本昌, 徐子勤. 利用转基因烟草确定 AtELHYPRP2 蛋白对赤霉菌的抗性及其亚细胞定位特征. 生物工程学报, 2014, 30(3): 472-484.

Chai QX, Li BC, Xu ZQ. Subcellular localization and resistance to *Gibberella fujikuroi* of AtELHYPRP2 in transgenic tobacco. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 472-484.

摘 要: 采用遗传转化技术获得了整合有拟南芥 *AtELHYPRP2* (*EARLII-LIKE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 2*, *AT4G12500*) 基因的转基因烟草株系, 研究了该基因编码蛋白对真菌病原体赤霉菌的抗性及其亚细胞定位特征。以拟南芥 Col-0 生态型基因组 DNA 为模板, 通过聚合酶链反应扩增 *AtELHYPRP2* 基因编码序列, 经限制性酶切后连接至 pCambia1302 载体, 构建产生 pCambia1302-AtELHYPRP2-GFP 融合表达载体。进一步采用农杆菌 LBA4404 转化烟草叶片外植体, 筛选得到转基因烟草植株。RT-PCR、Western blotting 印迹分析结果显示, *AtELHYPRP2* 基因在转化体中可以有效表达。激光共聚焦显微观察发现 AtELHYPRP2-GFP 融合蛋白产生的绿色荧光与碘化丙啶染色后产生的红色荧光能够重合, 说明 AtELHYPRP2 蛋白定位于细胞表面。真菌侵染实验结果显示, 组成性表达 *AtELHYPRP2* 基因能够增强烟草对赤霉菌的抗性, 被侵染部位有明显的 H₂O₂ 积累。转基因烟草植株中 *PR1* 基因的本底表达水平比野生型高, *PR1* 和 *PR5* 基因的系统表达水平比野生型高, 说明 *AtELHYPRP2* 基因可能在 SAR 反应中具有一定的作用。

关键词: *AtELHYPRP2*, 秦烟 95, 赤霉菌, 亚细胞定位, 细胞壁, 系统抗性

Received: June 17, 2013; **Accepted:** December 17, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30870194, J1210063), Research Project of Provincial Key Laboratory of Shaanxi (Nos. 12JS103, 08JZ70, 2010JS090), Research Project of Educational Department of Shaanxi Province (No. 11JK0612), Development Project of Science and Technology Research of Shaanxi Province (the Program for Tackling Key Problems, No. 2010K16-04-01), Graduate Research Project of Northwest University (No. YZZ12053).

Corresponding author: Ziqin Xu. Tel: +86-29-88303484; E-mail: ziqinxu@nwnu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30870194, J1210063), 陕西省重点实验室科研计划 (Nos. 12JS103, 08JZ70, 2010JS090), 陕西省教育厅科研计划 (No. 11JK0612), 陕西省科学技术研究发展计划 (社发攻关, No. 2010K16-04-01), 西北大学研究生创新计划 (No. YZZ12053) 资助。

Subcellular localization and resistance to *Gibberella fujikuroi* of AtELHYPRP2 in transgenic tobacco

Qiuxia Chai, Benchang Li, and Ziqin Xu

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Biotechnology of Shaanxi, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

Abstract: The subcellular localization and the resistance to fungal pathogen *Gibberella fujikuroi* of the protein encoded by Arabidopsis *AtELHYPRP2* (*EARLI1-LIKE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 2*, *AT4G12500*) were investigated using transgenic tobacco plants. The coding sequence of *AtELHYPRP2* was amplified from genomic DNA of Col-0 ecotype. After restriction digestion, the PCR fragment was ligated into pCambia1302 to produce a fusion expression vector, pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP. Then the recombinant plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 and transgenic tobacco plants were regenerated and selected via leaf disc transformation method. RT-PCR and Western blotting analyses showed that *AtELHYPRP2* expressed effectively in transgenic tobacco plants. Observation under laser confocal microscopy revealed that the green fluorescence of *AtELHYPRP2*-GFP fusion protein could overlap with the red fluorescence came from propidium iodide staining, indicating *AtELHYPRP2* is localized to cell surface. Antimicrobial experiments exhibited that the constitutive expression of *AtELHYPRP2* could enhance the resistance of tobacco to fungal pathogen *G. fujikuroi* and the infection sites could accumulate H_2O_2 obviously. The basal expression levels of *PR1* and the systemic expression levels of *PR1* and *PR5* in transgenic tobacco plants were higher than that of the wild-type plants, suggesting *AtELHYPRP2* may play a role in systemic acquired resistance.

Keywords: *AtELHYPRP2*, *Nicotiana tabacum* qinyan 95, *Gibberella fujikuroi*, subcellular localization, cell wall, systemic acquired resistance

细胞壁是植物抵御病原体侵染、极端温度、脱水等生物和非生物胁迫因素的第一道屏障。在胁迫条件下,细胞表面的脂类和蛋白质组分会发生改变和重排,以此来增强细胞壁的牢固性,减轻不利环境对细胞的损伤作用。脂转移蛋白(Lipid transfer protein, LTP)是细胞壁中的主要蛋白质,大小9–10 kDa,具有许多重要的生物学功能^[1–3]。离体实验结果表明,LTP能够在膜之间转移脂质分子,它们与脂质分子的亲合作用没有选择性^[4]。在植物中,角质的形成、花器官亲脂性物质的沉积以及胚胎的早期发生过程均与LTP有关^[5–6]。

在植物抗真菌反应中,LTP能够与细胞膜上

特定的脂蛋白和激发素(Elicitin)受体结合,直接或通过与富含半胱氨酸的硫素蛋白(Thionin)协同作用来增加膜的通透性^[7–8]。LTP蛋白的结构特点是含有8个高度保守的半胱氨酸残基,可形成4个二硫键,三级结构具有一个稳定的疏水性空腔,用于结合与转运脂类物质^[7]。越来越多的证据显示LTP参与了植物的抗病反应,它们能够抑制病原体生长,并可能负责传递与系统性获得抗性(Systemic acquired resistance, SAR)有关的脂类信号分子^[9–12]。

拟南芥 *AT4G12500* 基因编码一个大小为18.35 kDa的蛋白质,与EARLI1蛋白具有很高的同源性^[13],均由N端的信号肽序列、中间位

置的亲水性富含脯氨酸结构域 (Proline-Rich-Domain, PRD) 和 C 端的疏水性八半胱氨酸基序 (Eight Cysteine Motif, 8CM) 构成, 因此本工作将其命名为 *AtELHYPRP2* (*EARLII-LIKE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 2*)。该基因编码蛋白的 8CM 结构域包含 8 个位置十分保守的半胱氨酸, 其中第 3 和第 4 个半胱氨酸是连续的, 第 5 和第 6 个半胱氨酸中间只隔一个氨基酸残基, 这与 LTP 十分相似, 因此也被归类到 LTP 家族中^[14]。*AtELHYPRP2* 蛋白的 PRD 结构域与细胞壁中的富含脯氨酸蛋白 (Proline-Rich-Protein, PRP) 以及伸展蛋白具有较高的相似性, 可能与细胞壁有功能上的联系^[15]。

AtELHYPRP2、*AZII*、*EARLII* 和 *AT4G12490* 四个 EARLII 亚家族基因串联排列在拟南芥的第 4 号染色体上, 基因芯片分析结果显示它们在生物和非生物胁迫条件下具有共表达特征, 但目前尚未见有关 *AtELHYPRP2* 基因功能的专门报道。已有的研究表明, EARLII 重组蛋白能够抑制酿酒酵母和真菌细胞的生长^[16], 同一亚家族基因 *AZII* 对蒜薹灰霉菌具有抗性^[17]。另外, *AZII* 能够和 DIR1 相互作用, 负责转移与 SAR 有关的长距离信号^[18]。本研究通过农杆菌介导的遗传转化方法得到了表达 *AtELHYPRP2*-GFP 融合蛋白的转基因烟草植株, 研究了 *AtELHYPRP2* 蛋白的亚细胞定位特征、对真菌病原体的抗性功能及其在烟草 SAR 中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料与真菌菌株

实验使用的植物材料为拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Col-0 生态型 (Columbia-0) 植株和秦烟

95 *Nicotiana tabacum* 无菌苗。基因克隆实验采用大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞。烟草遗传转化实验使用农杆菌 LBA4404 菌株。

1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Pag* I、*Spe* I、*Nco* I 和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 2 \times *Taq* PCR Mix 购自西安润德生物技术有限公司; *Pfu* DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒购自生工生物工程有限公司; DL2000 DNA Ladder、反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 植物双元表达载体 pCambia1302 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP 融合表达载体的构建

按照 CTAB 法从拟南芥 Col-0 生态型植株叶片提取基因组 DNA, 根据 *AtELHYPRP2* 基因的开放阅读框设计上下游引物 AT4G12500*Pag* I 和 AT4G12500*Spe* I (表 1), 采用 *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段。用 *Pag* I 和 *Spe* I 对纯化的 *AtELHYPRP2* 基因扩增产物进行分步酶切, 得到具有粘性末端的目的片段。用质粒小提试剂盒提取 pCambia1302 质粒, 经 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切得到具有粘性末端的载体片段。用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和载体片段, 转化 DH5 α 感受态细胞后再附加 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基上进行选择培养。对获得的抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 将鉴定正确的菌液送往上海生工生物技术公司进行测序。

1.2.2 转 *AtELHYPRP2* 基因烟草植株的再生

从测序正确的克隆提取 pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP 质粒 DNA, 用液氮冻融法转

化农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 在附加 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素和 20 $\mu\text{g/mL}$ 利福平的 YEB 培养基上进行选择培养。对获得的阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 用鉴定正确的克隆转化秦烟 95 叶片外植体。将叶片放入带有滤纸的培养皿中, 用剪刀将其剪成 1 cm \times 1 cm 大小, 然后浸入 $OD_{600}\approx 0.6$ 的农杆菌菌液中侵染 5 min。用无菌滤纸吸干菌液后, 将叶片外植体转接到附加 1 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 在黑暗条件下共培养 3 d。将暗培养的烟草叶片转移到附加 500 mg/L 头孢霉素、25 mg/L 潮霉素 B 的选择培养基上进行愈伤组织和芽的诱导。将长大的芽转至含 0.1 mg/L NAA 的 1/2 MS 培养基上生根。将完整的再生植株移栽到珍珠岩 蛭石 营养土 (1 : 1 : 2) 基质中培养, 生长条件为 16 h 光照/8 h 黑暗、65%湿度、21 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 转基因烟草的分子鉴定

从具有潮霉素 B 抗性的转基因烟草中提取基因组 DNA, 用 *AtELHYPRP2* 基因开放阅读框上下游引物进行 PCR 鉴定。取 0.2 g 转基因烟草叶片, 在液氮中研磨后用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取总 RNA。经紫外定量后, 将 RNA 稀

释到合适浓度, 用 ExScript RT Reagent Kit (TaKaRa 公司) 合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用 *AtELHYPRP2* 基因开放阅读框上下游引物进行 RT-PCR, 检测转移基因的表达水平。RT-PCR 以烟草 *Actin* 基因为内部参照, 上下游引物序列分别为 Tobacco F 和 Tobacco R (表 1)。

1.2.4 赤霉菌侵染分析

赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 菌株在马铃薯培养基上于 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 4 d 后, 用 1/4 液体马铃薯培养基悬浮孢子。经玻璃棉过滤除去菌丝后, 将赤霉菌孢子与马铃薯培养基混匀, 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 4 d; 然后用打孔器将培养基打成直径为 1 cm 的小圆盘, 接种于秦烟 95 野生型和转基因植株叶片上, 于 22 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光照/8 h 黑暗、90%湿度条件下培养。5 d 后观察叶片形态及赤霉菌侵染程度。侵染实验重复 3 次。

为了检测 H_2O_2 的积累情况, 侵染 2 d 后用 0.5% DAB (3,3-二氨基联苯胺) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 对野生型和转基因烟草叶片进行过夜染色, 经乙醇脱色后用 80%甘油封片观察。同时, 用 0.4%台盼蓝对侵染 2 d 后的野生型和转基因烟草叶片于 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 1 h, 在 85%乙醇中煮 10 min 脱去叶绿素,

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primers used in PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
AT4G12500 <i>Pag</i> I	GGTCATGACGGCTTCAAAGAACTCAACCT	<i>Pag</i> I
AT4G12500 <i>Spe</i> I	GGACTAGTAGCACATTG GAAATCAGACG	<i>Spe</i> I
Tobacco F	GGCATCAT ACATTTTACAACG	
Tobacco R	GATCAGTCAAGTCACGACCAG	
PR1F	GATGCCCATAACACAGCTCG	
PR1R	TTTACAGATCCAGTTCTTCAGAGG	
PR3F	GCCATAGGAGTGGACCTGCTAAAC	
PR3R	AAAAGACCTCTGGTTGCCGC	
PR5F	GATGGCCAACAACATGGGCAAC	
PR5R	CTATTAACCATTAGGACAAAAG	

The underlined regions represent the restriction sites.

用 80% 甘油封片后在显微镜下观察细胞的存活状态。

1.2.5 AtELHYPRP2 蛋白的亚细胞定位

取野生型秦烟 95、AtELHYPRP2-GFP 转基因烟草和 GFP 转空载烟草的叶片和根, 平铺在加有 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 荧光染料碘化丙啶 (PI) 的载玻片上, 浸润 15–30 min 后压片。在 OLYMPUS 激光共聚焦扫描显微镜下观察 GFP 产生的绿色荧光和 PI 结合细胞壁后产生的红色荧光, 确定 AtELHYPRP2 蛋白的存在部位。GFP 的激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 507 nm。PI 的激发光波长为 535 nm, 发射光波长为 615 nm。

1.2.6 SAR 相关 PR 基因的表达分析

赤霉菌在马铃薯培养基中倒置培养 4 d 后, 切成 1 cm \times 1 cm 的小块, 接种于野生型秦烟 95 和转基因植株下部的叶片上, 于 22 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光照/8 h 黑暗、90% 湿度条件下培养。5 d 后取侵染叶片和上部未侵染叶片, 用 Trizol 试剂提取总 RNA。经紫外定量后, 将 RNA 稀释到合适浓度, 用 ExScript RT Reagent Kit (TaKaRa) 合成 cDNA。将 cDNA 稀释到 200 ng/ μL , 作为模板, 用 SAR 相关 PR 基因的上下游引物进行 RT-PCR, 检测 PR 基因在野生型与转基因植株中的表达情况。RT-PCR 以烟草 *Actin* 基因为内部参照, *PR1* 基因的上下游引物分别为 PR1F 和 PR1R, *PR3* 基因的上下游引物分别为 PR3F 和 PR3R^[19], *PR5* 基因的上下游引物分别为 PR5F

和 PR5R (表 1)。

2 结果与分析

2.1 AtELHYPRP2 蛋白的结构分析

AtELHYPRP2 基因的开放阅读框包含 534 个碱基对, 无内含子, 编码的蛋白质由 177 个氨基酸构成。AtELHYPRP2 蛋白的理论等电点和分子量分别为 8.93 kDa 和 18.35 kDa。预测该蛋白由 N 端的信号肽序列 (1–26)、中间富含脯氨酸的亲水性结构域 PRD (27–94) 和 C 端保守的疏水性 8CM (95–177) 组成 (图 1)。对 Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/>) 数据库中的芯片实验结果进行分析, 发现 *AtELHYPRP2* 基因可以被生物和非生物胁迫因素诱导, 说明该基因在拟南芥抗逆性方面可能具有一定的作用。采用 DNASTar MegAlign 中的 Clustal W 算法进行序列比对, 结果显示 AtELHYPRP2 与 EARLI1 之间具有很高的同源性 (图 2)。

2.2 pCAMBIA1302-AtELHYPRP2-GFP 融合表达载体的构建

AtELHYPRP2 基因没有内含子, 可根据开放阅读框设计一对引物, 以基因组 DNA 为模板扩增它的编码序列。本实验所用的载体为 pCAMBIA1302, 在 35S 启动子和 *gfp* 报告基因之间有 3 个酶切位点, 在构建融合表达载体时选择了 *Nco* I 和 *Spe* I 两个酶切位点。由于 *AtELHYPRP2*

```

MASKNSTSLALFFALNILFFTLTTATDCRCNLSPKPRTVPSPKVPSPKYSPSPSIPSPSVPTPSV
PTPSVPTSPVSPNPPTVTPRTPGSSGNCPIDALRLGVCANVLSGLLNVLGQPSAQPCCS
LIQGLVDLDAATCLCTALRANVLGINLNPISLSVLLNVCNRRRLPSDFQCA

```

图 1 AtELHYPRP2 蛋白(NP192987)的氨基酸序列

Fig. 1 Deduced amino acid sequence of AtELHYPRP2. The signal peptide is underlined, 8CM is framed, and the conservative cysteine residues are shadowed.

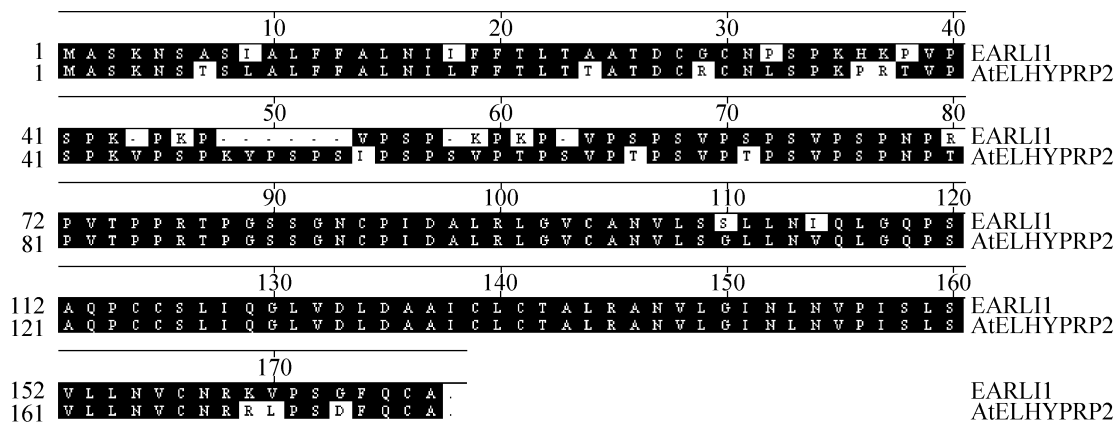


图 2 AtELHYPRP2 与 EARLI1 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences between AtELHYPRP2 and EARLI1.

基因内部存在 *Nco* I 酶切位点,所以在扩增目的片段时,上游引物 5'-端引入了 *Nco* I 同尾酶 *Pag* I 的识别和切割位点,下游引物 5'-端引入了 *Spe* I 限制性酶切位点。因为 *Pag* I 和 *Spe* I 限制性内切酶所用的缓冲液不同,所以对纯化的 *AtELHYPRP2* 基因扩增产物进行了分步酶切,用 *Nco* I 和 *Spe* I 内切酶对 pCAMBIA1302 质粒载体进行了双酶切。进一步用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和载体片段,转化 DH5 α 感受态细胞后在附加 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基上进行选择培养。对获得的抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定,可以扩增产生 534 bp 的条带 (图 3A),符合预期大小。将鉴定正确的克隆送往上海生工生物技术公司进行测序,结果显示本实验克隆的 *AtELHYPRP2* 基因在序列上与 GenBank 中登录的数据完全一致。

2.3 AtELHYPRP2-GFP 转基因烟草植株的再生

用液氮冻融法将pCAMBIA1302-AtELHYRP2-GFP 质粒导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞,挑取抗性克隆,进行菌落 PCR 检测,结果产生符

合预期大小的条带 (图 3B)。对鉴定正确的农杆菌克隆进行扩大培养, 采用叶圆盘转化法对秦烟 95 无菌苗叶片进行遗传转化。将侵染过的叶片在附加 1 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中暗培养 3 d。将共培养的叶片外植体转入含 500 mg/L Cef、25 mg/L HmB、1 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中进行选择培养, 大约 1 个月后长出愈伤组织。将愈伤组织转接到相同培养基中进行继代培养, 20 d 后分化出芽, 然后转至附加 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基生根。将完整植株移栽到混合基质中, 长大后进行分子生物学鉴定。

2.4 转基因烟草的分子鉴定

采用 CTAB 法从具有潮霉素 B 抗性的转基因烟草提取基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定, 结果显示 7 株再生植株中有 6 株整合有 *AtELHYPRP2-GFP* 转移基因 (图 4A)。从 6 株 *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草 (分别命名为 T1、T2、T3、T4、T5、T6) 叶片提取总 RNA, 进行 RT-PCR, 结果表明转移基因可以表达产生 mRNA (图 4B)。通过 Quantity One 软件对转基因烟草中目的基

因与组成性表达的 *Actin* 基因的转录水平进行分析, 并以两者的比值作为不同转基因株系中目的基因的相对表达量, 结果显示转基因株系 1–6 中 *AtELHYPRP2* 基因的相对表达量分别为

1.406 25、1.609 8、0.598 3、2.485 4、1.486 9 和 0.507 7。从 6 株转基因植株中选取 5 株提取总蛋白进行 Western blotting 印迹分析, 结果显示在这 5 个转基因株系中都能够检测到目的蛋白 (图 5)。

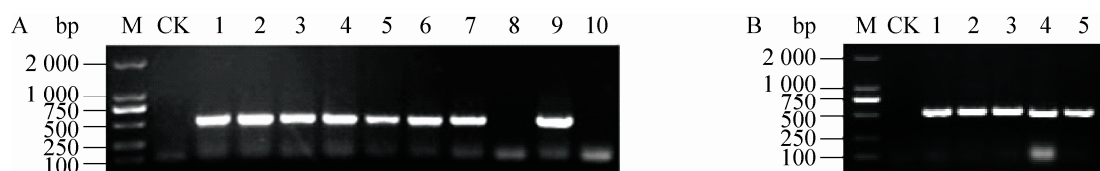


图 3 pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP 转化大肠杆菌 DH5α 细胞 (A) 及农杆菌 LBA4404 细胞 (B) 的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Colony PCR of *Escherichia coli* DH5α and *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformed by pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP. (A) Colony PCR of *Escherichia coli* DH5α. M: DL2000 DNA ladder; CK: negative control; 1–10: different colonies transformed by ligation product. (B) Colony PCR of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. M: DL2000 DNA ladder; CK: negative control; 1–5: different colonies transformed by pCambia1302-*AtELHYPRP2*-GFP.

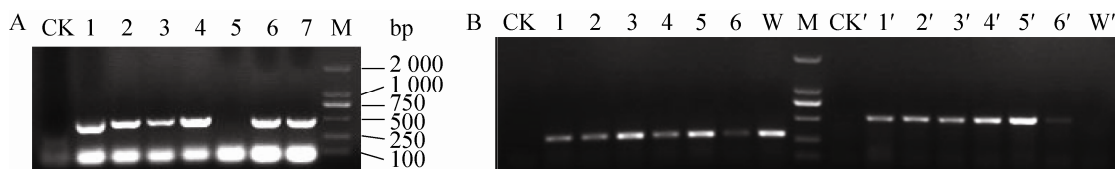


图 4 *AtELHYPRP2*-GFP 转基因烟草的 PCR 检测及 RT-PCR 分析

Fig. 4 PCR identification and RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants containing *AtELHYPRP2*-GFP. (A) PCR identification of transgenic tobacco plants. CK: wild-type tobacco plant; 1–7: putative transgenic plants; M: DL2000 DNA ladder. (B) RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants. CK: negative control, without template; 1–6: RT-PCR of *Actin* gene in different transgenic tobacco plants (T1–T6); W: RT-PCR of *Actin* gene in wild-type tobacco plant; M: DL2000 DNA ladder; CK': negative control, without template; 1'–6': RT-PCR of *AtELHYPRP2*-GFP in different transgenic tobacco plants (T1–T6); W': RT-PCR of *AtELHYPRP2*-GFP in wild-type tobacco plant.

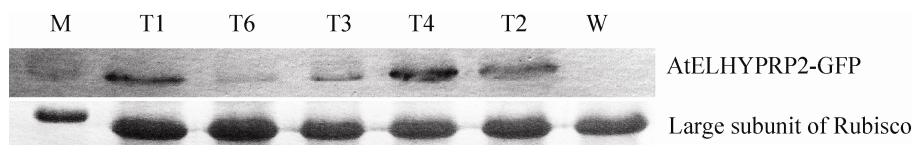


图 5 *AtELHYPRP2*-GFP 转基因烟草的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of transgenic tobacco plants containing *AtELHYPRP2*-GFP. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder RDM604; W: total protein of wild-type tobacco plant; T1, T2, T3, T4, T6: total protein of different transgenic tobacco plants. Top panel: Western blotting analysis of *AtELHYPRP2*-GFP expression in different transgenic tobacco plants. Lower panel: Rubisco was adopted to show the loading amount of different samples.

2.5 赤霉菌侵染分析

为了检测 *AtELHYPRP2* 基因对真菌病原体的抗性, 切取第 1 代不同转基因烟草株系和不同野生型烟草个体同一部位、大小接近相同的叶片, 进行赤霉菌侵染, 结果显示侵染 5 d 后野生型烟草叶片侵染点周围的细胞逐渐坏死, 损伤程度明显比转基因烟草叶片严重; 同时, 野生型烟草叶片明显变黄 (图 6)。这说明整合有 *AtELHYPRP2* 基因的转基因烟草植株对赤霉菌具有明显的抗性。同时, 对赤霉菌侵染 8 d 后的坏死斑大小进行了统计学分析, 结果显示转基因烟草的坏死斑明显小于野生型烟草, 且具有统计学差异 (图 7)。为了检测 *AtELHYPRP2* 基因表达水平与抗菌性的关系, 从 6 株转基因株系中选择 T1、T2、T4、T6 四个株系进行赤霉菌侵染实验, 8 d 后观察侵染情况。结果显示, *AtELHYPRP2* 基因表达量高的烟草叶片上

形成的坏死斑小于表达量低的转基因烟草 (图 8)。

为了检测侵染位点 H_2O_2 的积累情况, 将赤霉菌侵染 2 d 后的转基因和野生型烟草叶片在 DAB 中染色过夜, 经 85%乙醇脱去叶绿素后用甘油封片观察。结果显示, 转基因烟草叶片侵染位点被染成深红棕色的斑, 说明接种后可造成 H_2O_2 的大量积累, 引发超敏反应 (图 9B)。而野生型烟草叶片侵染位点能产生弥散的浅红棕色的区域, 说明接种后产生了低水平的 H_2O_2 积累, 不能引发超敏反应 (图 9A)。为了检测侵染位点的细胞存活状态, 将赤霉菌侵染 2 d 后的转基因和野生型烟草叶片在台盼蓝中染色 1 h, 结果显示转基因烟草叶片侵染位点周围细胞的坏死状况比野生型烟草叶片轻, 病原体没有扩散, 而野生型烟草叶片侵染位点周围病原体已有明显的扩散 (图 10)。

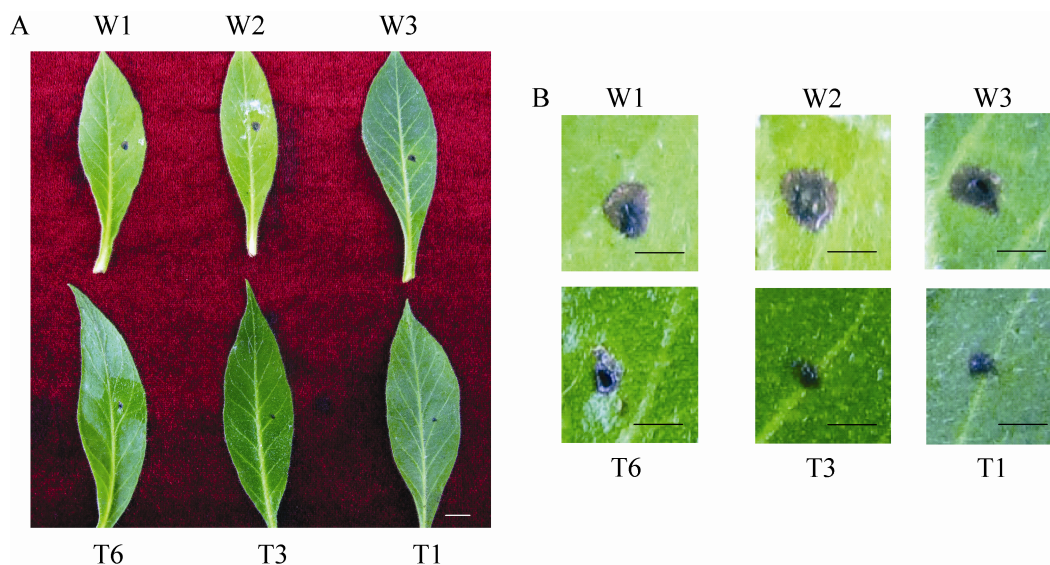


图 6 *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草对赤霉菌的抗性

Fig. 6 Resistance of transgenic tobacco plants containing *AtELHYPRP2-GFP* to *G. fujikuroi*. W1–W3: leaves of different wild-type tobacco plants; T1, T3, T6: leaves came from different transgenic tobacco lines. (A) Bar=1.25 cm. (B) Bar=4.2 mm.

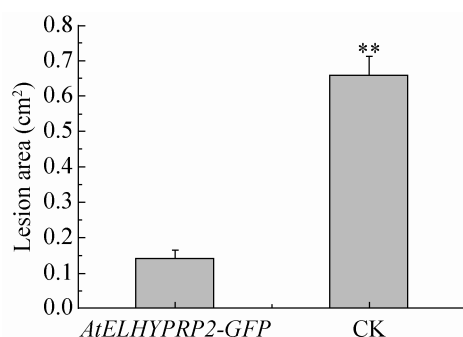


图7 赤霉菌侵染后 *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草及野生型烟草叶片上坏死斑大小的统计学分析

Fig. 7 Statistical analysis of the sizes of necrotic spots on leaves of transgenic tobacco plants harboring *AtELHYPRP2-GFP* and wild-type tobacco plants after infection with *G. fujikuroi*. Data were recorded 8 days post infection and were shown as the $\bar{x} \pm s$ of three replications. *AtELHYPRP2-GFP*: transgenic tobacco plants; CK, wild-type tobacco plants.



图8 不同 *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草株系对赤霉菌的抗性

Fig. 8 Resistance of different transgenic tobacco lines containing *AtELHYPRP2-GFP* to *G. fujikuroi*. T1, T2, T4, T6: different transgenic tobacco lines.

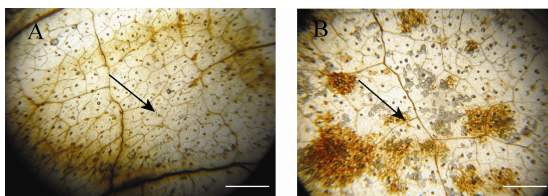


图9 赤霉菌侵染后 H_2O_2 积累水平的 DAB 染色

Fig. 9 DAB staining of H_2O_2 accumulation after infection with *G. fujikuroi*. (A) Leaf of wild-type tobacco plants. (B) Leaf of transgenic tobacco plants. Arrow pointing to the infection site. Bar=1 mm.

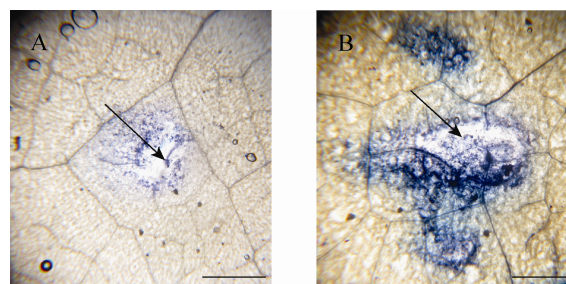


图10 细胞存活状态的台盼蓝染色

Fig. 10 Observation of cell survival by trypan blue staining. (A) Leaf of transgenic tobacco plants. (B) Leaf of wild-type tobacco plants. Arrow pointing to the infection site. Bar=0.5 mm.

2.6 *AtELHYPRP2* 蛋白的亚细胞定位

激光共聚焦显微观察结果显示, *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草根中的绿色荧光分布于细胞表面, 能够与碘化丙啶对细胞壁染色后产生的红色荧光重合, 说明 *AtELHYPRP2* 蛋白在细胞内被翻译合成后, 可通过分泌途径定位到细胞表面, 并且主要存在于细胞壁中 (图 11A-I)。另外, 还可以观察到绿色荧光分布于与粗面内质网相通的细胞核的外膜上, 说明该蛋白也可能存在于内膜系统。已有的研究表明, DIR1、AZI1 蛋白可定位于细胞核外膜、内质网及胞间连丝^[12,18]。本研究发现与 AZI1 属于同一亚家族的 *AtELHYPRP2* 蛋白既可以分泌到细胞表面, 也可能定位于内膜系统。与此相反, 在 pCambia1302 空载体转化的转基因烟草中, GFP 荧光存在于整个细胞中 (图 11J-L)。

2.7 *AtELHYPRP2* 对烟草系统性获得抗性相关基因表达的影响

RT-PCR 结果表明, 在 *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草中, 与 SAR 相关的 *PR1* 基因的本底表达量比野生型高, *PR3*、*PR5* 基因的本底表达水平与野生型相差不大 (图 12A), 说明转基因

烟草中 *AtELHYPRP2* 基因的组成性表达能够影响系统性获得抗性中的主要基因。赤霉菌侵染 5 d 后, *AtELHYPRP2-GFP* 转基因烟草被侵染叶片中 3 个 PR 基因的表达水平与野生型被侵染叶片相差不大。但是在上部未侵染叶片中, 转基因烟草 *PR1* 和 *PR5* 基因的表达量整体比野生型

高 (图 12B), 说明 *AtELHYPRP2* 基因在 SAR 中具有一定的作用。在侵染实验中, 尽管 *PR1* 和 *PR5* 在不同野生型对照个体的系统叶片中的表达水平存在一定差异(图 12B 中 2、4 泳道), 但都明显低于转基因烟草的系统叶片(图 12B 中 6、8 泳道)。

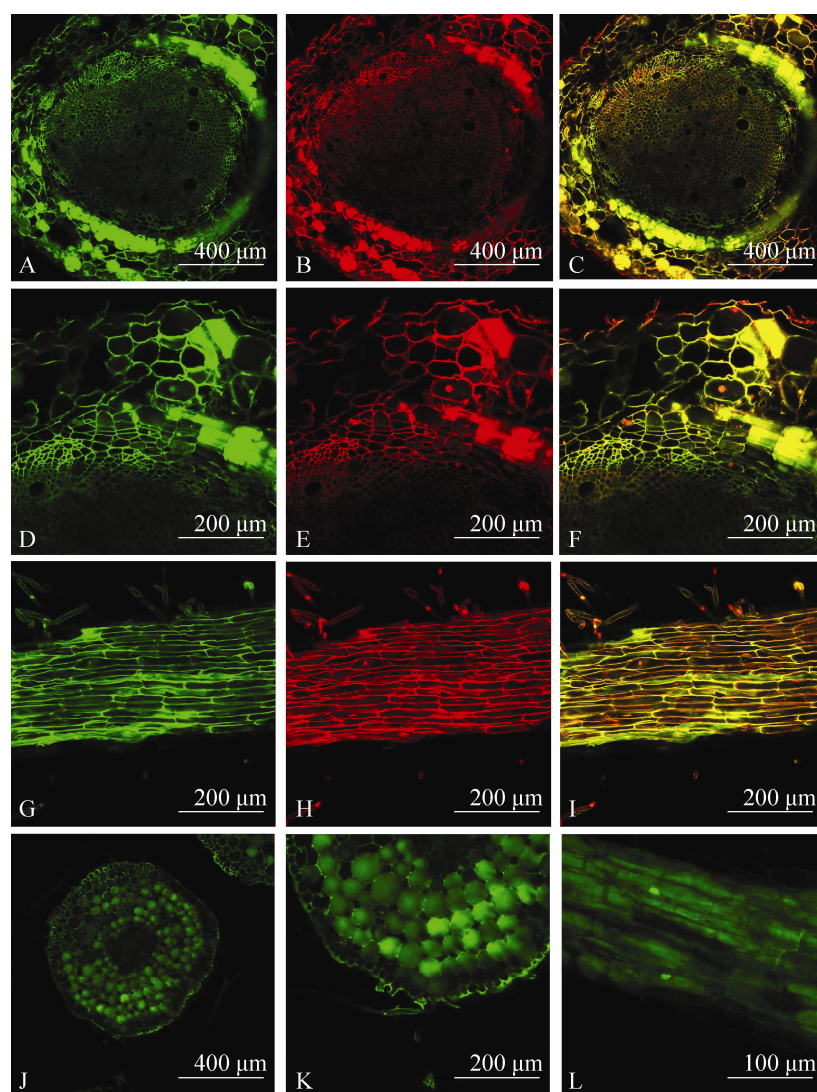


图 11 *AtELHYPRP2* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 11 Subcellular localization of *AtELHYPRP2*. (A–F) Root transection of transgenic tobacco plants harboring *AtELHYPRP2-GFP*. (A, D) Fluorescence of GFP. (B, E) Fluorescence of PI. (C, F) Merge of A, B and D, E, respectively. (G–I) Longitudinal section of root of transgenic tobacco plant harboring *AtELHYPRP2-GFP*. (G) Fluorescence of GFP. (H) Fluorescence of PI. (I) Merge of G and H. (J–L) GFP fluorescence in transgenic tobacco plants transformed by empty vector.

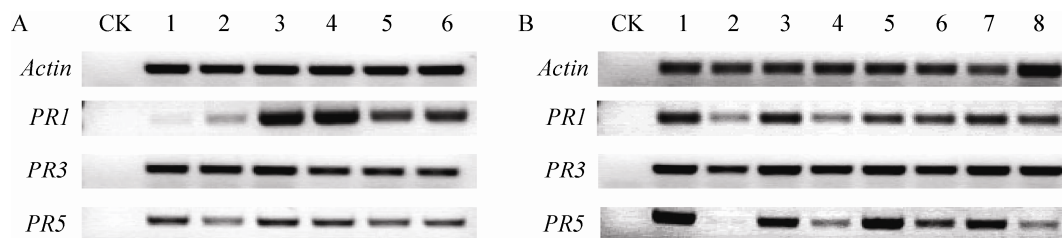


图 12 *AtELHYPR2-GFP* 对烟草中与 SAR 相关的 PR 基因的影响

Fig. 12 Influence of *AtELHYPR2-GFP* to tobacco PR genes related with SAR. (A) Basal expression level of PR genes. CK: negative control, without template; 1–2: wild-type tobacco plants; 3–6: transgenic tobacco lines. (B) Expression level of PR genes after *G. fujikuroi* infection. CK: negative control, without template; 1, 3: local wild-type tobacco leaves infected with *G. fujikuroi*; 2, 4: distal wild-type tobacco leaves after infection with *G. fujikuroi*; 5, 7: local transgenic tobacco leaves infected with *G. fujikuroi*; 6, 8: distal transgenic tobacco leaves after infection with *G. fujikuroi*.

3 讨论

植物对病原体的抗性可以用基因对基因学说加以解释。该学说认为当病原菌具有无毒基因 (*Avr*)、宿主植物具有抗性基因 (*R*) 时, *R* 基因的表达产物和 *Avr* 基因的表达产物相互作用, 会使植物个体表现出抗性^[20]。植物有多条阻止病原体侵染的途径。当植物对病原体具有抗性时, 经常会产生超敏反应 (Hypersensitive response, HR)。HR 指侵染位置的细胞迅速进入程序化死亡过程, 限制病原体向其他部位扩散, 能够使周围的健康组织免受损害。HR 往往伴随着一系列与防御相关的应答反应, 包括过氧化氢等活性氧分子 (Reactive oxygen species, ROS) 的爆发等^[21]。活性氧对于细胞内和周围细胞是一种预警信号, 它们能够引起细胞壁结构的加厚、植物抗毒素的产生、超敏反应和 SAR 反应等^[22]。在病原体侵染时, 有些植物不产生抗毒素, 而是释放酚醛树脂、环烯醚萜苷类、芥子油苷和皂苷等有毒物质, 这些有毒物质在正常情况下是以无毒的糖苷类形式储存于液泡中的^[23]。

DAB 染色可以反映病原体侵染后植物组织

中主要的活性氧分子过氧化氢的积累水平。

DAB 在过氧化氢存在下会失去电子而形成浅棕色不溶性产物, 可用于检测过氧化物酶的活性。本研究发现, 用赤霉菌孢子侵染后, 转基因烟草叶片侵染位点被 DAB 染成了深棕红色, 有大量 H_2O_2 积累, 引发了超敏反应。而野生型烟草叶片侵染位点只被染成弥散的浅棕红色, 不能引发超敏反应。台盼蓝是一种细胞活性染料, 常用于检测细胞膜的完整性。用赤霉菌孢子侵染后, 野生型烟草叶片侵染位点附近细胞的坏死状况明显比转基因烟草严重。

真菌孢子与植物表面接触后, 在合适条件下就会萌发。植物已进化出很多机制来阻止真菌孢子的萌发和萌发管的伸长过程, 包括加厚的角质层等机械屏障和分泌化学物质, 以防止菌丝侵入表皮^[24]。已有的研究报道表明, *EARLII* 和 *AZII* 对真菌病原体及酿酒酵母的生长有明显的抑制作用^[16-17], *AZII* 基因在系统性获得抗性的信号传递过程中具有功能^[11]。*AtELHYPR2* 基因与 *EARLII*、*AZII* 基因属于同一亚家族, 本研究对烟草中与 SAR 有关的基因进行表达分析, 发现组成性表达 *AtELHYPR2-GFP* 基因能

够在本底水平上提高烟草 *PR1* 基因的表达量。在真菌诱导后,转基因烟草中 *PR1* 和 *PR5* 基因的系统表达水平要比野生型烟草高,说明 *AtELHYPRP2* 基因参与了 SAR。另外,本实验室还制备了以 Col-0 为背景的 *AtELHYPRP2* 基因拟南芥过表达株系和 RNA 干扰株系,并且已经筛选出该基因的 T-DNA 插入突变体,发现 *AtELHYPRP2* 基因在拟南芥局部和系统抗性中均具有一定的功能。利用 GFP 标签可以对蛋白质的亚细胞定位特征进行研究, GFP 荧光的产生说明在烟草中表达产生的 *AtELHYPRP2*-GFP 融合蛋白能够正确折叠。本文涉及的在烟草中的实验结果说明该基因具有抗菌特征,并且显示带 GFP 标签的蛋白质是有功能的。

在植物遗传转化实验中,常用的报告基因有 β -葡萄糖醛酸酶 GUS 基因和荧光素酶 LUC 基因。大多数植物种类都没有背景 GUS 活性, 4-甲基伞形酮-D-葡萄糖苷经 GUS 水解产生的 4-甲基伞形酮可以在 365 nm 激发光作用下发出 455 nm 波长的荧光,很容易对基因的表达水平进行量化;另外, GUS 切割 X-Gluc 的糖苷键之后,糖苷配基将氧化脱氢形成二聚体靛蓝色沉淀,可用于显示完整组织中基因的表达模式^[25]。但是, GUS 检测实验对植物细胞是有害的,材料不能存活。在体外添加荧光素的条件下,利用荧光素酶基因可通过视频成像系统观察基因的表达活性^[26-27],但它的测量必须在黑暗条件下进行,这将影响植物的生理特性,还必须把底物导入到植物组织中。绿色荧光蛋白发出的荧光可以直接进行观察,不需要外源底物或辅助因子的参与,并且对植物没有毒害作用^[28],它的应用范围已经超过了 GUS 和 LUC。本研究利用 GFP 在转基因烟草中对 *AtELHYPRP2* 蛋白进行了亚细胞定位,发现它定位于细胞壁上。

作为细胞表面蛋白, *AtELHYPRP2* 可能会破坏病原体细胞,抑制病原性真菌孢子的萌发,激发植物防御系统,并通过产生活性氧来引发植物的超敏反应,阻止真菌病原体向健康组织扩散。*AtELHYPRP2* 在系统性获得抗性信号传递方面是否起作用,可通过后续的野生型-转基因烟草的嫁接实验检测它的移动性加以确定。

REFERENCES

- [1] Guo L, Yang H, Zhang X, et al. Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 2013, 64(6): 1755–1767.
- [2] Nieuwland J, Feron R, Huisman BAH, et al. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 2009–2019.
- [3] Pagnussat L, Burbach C, Baluška F, et al. An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. *J Exp Bot*, 2012, 63(18): 6555–6563.
- [4] Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47(1): 627–654.
- [5] Sterk P, Booi H, Schellekens GA, et al. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 1991, 3(9): 907–921.
- [6] Foster GD, Robinson SW, Blundell RP, et al. A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores. *Plant Sci*, 1992, 84(2): 187–192.
- [7] José-Estanyol M, Gomis-Rüth FX, Puigdomènech P. The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(5): 355–365.
- [8] Blein JP, Coutos-Thévenot P, Marion D, et al. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(7):

- 293–296.
- [9] Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002, 419(6905): 399–403.
- [10] Buhot N, Gomès E, Milat ML, et al. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11): 5047–5052.
- [11] Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, et al. Priming in systemic plant immunity. *Science*, 2009, 324(5923): 89–91.
- [12] Chanda B, Xia Y, Mandal MK, et al. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet*, 2011, 43(5): 421–427.
- [13] Zhang Y, Schläppi M. Cold responsive EARL11 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants. *Planta*, 2007, 227(1): 233–243.
- [14] Arondel V, Vergnolle C, Cantrel C, et al. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2000, 157(1): 1–12.
- [15] Josè-Estanyol M, Puigdomènech P. Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38(1/2): 97–108.
- [16] Li L, Zhang C, Xu D, et al. Expression of recombinant EARL11, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 2012, 506(1): 50–61.
- [17] Zhang X, Xu ZY, Schläppi M, et al. The inhibition function of *Arabidopsis* AZI1 gene to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol J*, 2011, 47(1): 57–62 (in Chinese).
张欣, 徐之艳, Schläppi M, et al. 拟南芥 AZI1 基因对酿酒酵母细胞生长和蒜薹灰霉菌侵染的抑制作用. *植物生理学报*, 2011, 47(1): 57–62.
- [18] Yu K, Soares JM, Mandal MK, et al. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Reports*, 2013, 3(4): 1266–1278.
- [19] Ménard R, Alban S, de Ruffray P, et al. β -1,3 Glucan sulfate, but not β -1, 3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3020–3032.
- [20] Flor HH. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*, 1971, 9(1): 275–296.
- [21] Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, et al. Histochemical studies O_2^- and H_2O_2 on the accumulation of reactive oxygen species in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2007, 71(4/6): 230–239.
- [22] Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48(1): 251–275.
- [23] Osbourn AE. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1821–1831.
- [24] Grayer RJ, Kokubun T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 2001, 56(3): 253–263.
- [25] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901–3907.
- [26] Marsh JL, Erfle M, Wykes EJ. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene*, 1984, 32(3): 481–485.
- [27] Millar AJ, Carré IA, Strayer CA, et al. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science*, 1995, 267(5201): 1161–1163.
- [28] Quaedvlieg NEM, Schlaman HRM, Admiraal PC, et al. Fusions between green fluorescent protein and β -glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(5): 861–873.

(本文责编 郝丽芳)