

## 拟南芥新型脂转移蛋白 AtDH<sub>y</sub>PRP1 的亚细胞定位及其对灰霉菌的抗性

张晨, 李岚, 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

张晨, 李岚, 徐子勤. 拟南芥新型脂转移蛋白 AtDH<sub>y</sub>PRP1 的亚细胞定位及其对灰霉菌的抗性. 生物工程学报, 2012, 28(5): 602-612.

Zhang C, Li L, and Xu ZQ. Subcellular localization and resistance to *Botrytis cinerea* of a new type lipid transfer protein AtDH<sub>y</sub>PRP1 from *Arabidopsis thaliana*. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 602-612.

**摘 要:** 通过遗传转化技术研究了拟南芥脂转移蛋白 AtDH<sub>y</sub>PRP1 在细胞中的定位及其对真菌病原体的抗性。采用 PCR 方法从拟南芥 Ws 生态型克隆了 AtDH<sub>y</sub>PRP1 基因, 构建产生 pRI101-AN-AtDH<sub>y</sub>PRP1 植物双元表达载体和 pCAMBIA1302-AtDH<sub>y</sub>PRP1-GFP 融合表达载体, 经农杆菌介导的叶盘和浸花法得到烟草和拟南芥转基因植株。AtDH<sub>y</sub>PRP1 基因能够明显增加烟草对灰霉菌的抗性, 转 AtDH<sub>y</sub>PRP1 烟草叶片的被侵染部位有大量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累, 激光共聚焦显微观察发现 AtDH<sub>y</sub>PRP1 蛋白定位于细胞表面。说明 AtDH<sub>y</sub>PRP1 蛋白在合成后被分泌到细胞外执行特殊的功能, 与植物抗病防御机制有关。

**关键词:** AtDH<sub>y</sub>PRP1, 秦烟 95, 拟南芥, 蒜茎灰霉菌, DAB 染色, 台酚兰染色, 亚细胞定位

**Received:** September 13, 2011; **Accepted:** January 5, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30870194), Research Project of Provincial Key Laboratory of Shaanxi (Nos. 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 (Nos. 10YSY12, 10YSY13).

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

国家自然科学基金 (No. 30870194), 陕西省重点实验室科研计划 (Nos. 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 (Nos. 10YSY12, 10YSY13) 资助。

# Subcellular localization and resistance to *Botrytis cinerea* of a new type lipid transfer protein AtDH<sub>y</sub>PRP1 from *Arabidopsis thaliana*

Chen Zhang, Lan 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:** Genetic transformation was adopted to analyze the subcellular localization and the resistance to fungal pathogens of Arabidopsis lipid transfer protein AtDH<sub>y</sub>PRP1. The coding sequence of *AtDH<sub>y</sub>PRP1* amplified by PCR from *Ws* ecotype was used to construct the plant binary expression vector pRI101-AN-AtDH<sub>y</sub>PRP1 and the fusion expression vector pCambia1302-AtDH<sub>y</sub>PRP1-GFP. Transgenic tobacco and Arabidopsis plants were produced by leaf disc and floral dip protocols, respectively. *AtDH<sub>y</sub>PRP1* could improve the resistance of tobacco to *Botrytis cinerea* remarkably and the infection sites on transgenic tobacco leaves accumulated large amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observation under laser scanning confocal microscope showed that AtDH<sub>y</sub>PRP1 was localized to cell surface. It suggested that AtDH<sub>y</sub>PRP1 might play special function after secretion to outside of the cell and was involved in plant defense system against pathogens.

**Keywords:** AtDH<sub>y</sub>PRP1, *Nicotiana tabacum* qinyan 95, *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea* Pers.ex of Garlic Sprout, DAB staining, trypan blue staining, subcellular localization

脂转移蛋白 (Lipid transfer protein, LTP) 广泛存在于动物、植物和微生物中, 它们对脂类分子的亲和作用没有选择性, 所以也被称为非特异性脂转移蛋白 (Non-specific lipid transfer protein, nsLTP)。LTP 蛋白最重要的特点是含有 8 个位置高度保守的半胱氨酸, 可以形成 4 个二硫键。它们的三级结构十分稳定, 中间具有一个疏水性空穴, 可以转运多种类型的脂质分子<sup>[1]</sup>。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的生长, 并产生系统性获得抗性 (Systemic acquired resistance, SAR)<sup>[2-3]</sup>, 已被归类到病程相关蛋白 (Pathogenesis-related, PR) PR-14 家族中<sup>[4]</sup>。在离体条件下, 这类蛋白质对病原体也表现出很强的抗性<sup>[5-7]</sup>。植物幼嫩叶片的表面蜡质中包含大量

的 LTP 蛋白, 而在叶片表面发生的主要生物学事件是角质的沉积, 所以很多研究认为 LTP 蛋白的功能是将分泌到细胞外的亲脂性物质如蜡质和角质单体转运到特定的位置<sup>[8]</sup>。

拟南芥 *AT4G22470* 基因编码的蛋白质具有 2 个 8CM 结构域, 2 个富含脯氨酸结构域, 由于对该基因的功能尚未见报道, 本研究将其命名为 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* (*DOUBLE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 1*)。AtDH<sub>y</sub>PRP1 属于蛋白酶抑制剂/种子储藏蛋白/脂转移蛋白家族, 氨基末端存在一段信号肽序列, 在功能上可能与脂类分子的转运有关。GENEVESTIGATOR 数据库中的基因芯片分析结果显示 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因在拟南芥原生质体和成熟叶片中表达水平很高, 它可以被丁香假单胞菌诱导。本研究利用转基因拟南芥和烟草研究

了 AtDH<sub>y</sub>PRP1 蛋白的亚细胞定位和它对灰霉菌的抗性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料和细菌菌株

使用的起始材料为拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Ws 生态型 (Wassilewskija) 种子和秦烟 *Nicotiana tabacum* 95 种子。基因克隆实验的受体细胞为大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 拟南芥和烟草遗传转化实验采用农杆菌 LBA4404。

#### 1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 PCR Mix 购自 Fermentas 公司和西安润德公司, *PFU* DNA 聚合酶、克隆载体 pMD18-T 和植物双元表达载体 pRI101-AN 购自 TaKaRa 公司, 植物双元表达载体 pCAMBIA1302 为本实验室保存, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司, 地高辛杂交检测试剂盒为 Roche 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AtDH<sub>y</sub>PRP1 过表达载体的构建

根据 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的 ORF 设计一对引物, 上下游引物分别为 P1、P2 (表 1)。由于 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因没有内含子, 所以本研究以拟南芥 Ws 野生型植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。将扩增产物连接到 pMD18-T 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经菌液 PCR 鉴定后送上海生工生物技术公司进行测序。用质粒小量提取试剂盒分离 pMD18-T-AtDH<sub>y</sub>PRP1, 经 *Vsp* I 和 *Sac* I 双酶切后用 DNA 回收试剂盒 (OMEGA) 回收大小为 1 128 bp 的 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 目的片段。

同时用 *Sac* I 和 *Vsp* I 同尾酶 *Nde* I 对植物双元表达载体 pRI101-AN 进行双酶切, 回收载体大片段。接着用 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建产生 pRI101-AN-AtDH<sub>y</sub>PRP1 过表达载体, 经菌液 PCR 及酶切鉴定后送上海生工生物技术公司进行测序。质粒 DNA 提取、酶切、连接、转化以及大肠杆菌感受态细胞的制备等参照《分子克隆实验指南》中的常规方法进行<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 AtDH<sub>y</sub>PRP1-GFP 融合表达载体的构建

以测序正确的 pMD18-T-AtDH<sub>y</sub>PRP1 作为模板, 根据 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的开放阅读框设计一对引物, 上下游引物分别为 P3、P4 (见表 1)。采用 *PFU* 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 用 *Nco* I 和 *Spe* I 对纯化的 1 128 bp 的扩增产物和 pCAMBIA1302-GFP 进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶将 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 编码序列插入到 pCAMBIA1302 的 35S 启动子和 *gfp* 报告基因之间, 经菌液 PCR 及酶切鉴定后送上海生工生物技术公司进行测序。

#### 1.2.3 拟南芥的遗传转化与 AtDH<sub>y</sub>PRP1 蛋白的亚细胞定位

将 pCAMBIA1302-AtDH<sub>y</sub>PRP1-GFP 融合表达载体和含有 *gfp* 报告基因的空载体 pCAMBIA1302 通过冻融法分别转化到农杆菌菌株 LBA4404 中, 经菌落 PCR 验证后参照 Bechtold 和 Clough 建立的方法转化拟南芥<sup>[10-11]</sup>。按单株收集转化当代的成熟种子, 在含 25 mg/L 潮霉素的 MS 培养基上进行筛选。采用 CTAB 法从叶片组织提取基因组 DNA<sup>[12]</sup>, 进行 PCR 鉴定。潮霉素抗性植株分析使用的上下游引物分别为 P5、P6 (表 1)。将 T1 代 *AtDH<sub>y</sub>PRP1-GFP* 和 *GFP* 转

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Restriction site
P1	CGC <u>ATTAAT</u> ATGGCCTCAACTACTATAATC	1 128	<i>Vsp</i> I
P2	CGC <u>GAGCTC</u> TTCATGGGCAGCTAAAGCCTTG		<i>Sac</i> I
P3	CATG <u>CCATGG</u> CCTCAACTACTATAATC	1 128	<i>Nco</i> I
P4	GG <u>ACTAGT</u> TGGGCAGCTAAAGCCTT		<i>Spe</i> I
P5	CTATTACACCACTATCAC	570	
P6	ACGTGTCTTGTAGTTCCCGTC		
P7	CCAGCTATTACACCTCCAC	550	
P8	GGAGCATATGCCAACTAGAG		

基因拟南芥种子消毒后播种于附加 25 mg/L 潮霉素的 MS 培养基中, 10 d 后将根切下, 在 OLYMPUS 激光扫描共聚焦显微镜下进行观察。使用 495~511 nm FITC 滤光器拍摄 GFP 荧光, 激发光波长为 488 nm。

#### 1.2.4 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 烟草植株的再生和分子鉴定

采用液氮冻融法将 pRI101-AN-AtDH<sub>y</sub>PRP1 导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 在附加 100 μg/mL 链霉素、50 μg/mL 卡那霉素和 20 μg/mL 利福平的 YEB 培养基上进行选择。抗性菌落经 PCR 鉴定后在附加相同抗生素的 YEB 液体培养基中培养至  $OD_{600} \approx 0.5$ , 用于烟草转化。将烟草无菌苗叶片切成块状, 放入农杆菌悬浮液侵染 5~10 min。在含有 3% 蔗糖、0.65% 琼脂的 MS 固体培养基上暗培养 3 d 后, 将外植体转移到附加 0.5 mg/L IAA、3 mg/L 6-BA、50 mg/L 卡那霉素 (Kan)、500 mg/L 头孢霉素 (Cef)、3% 蔗糖和 0.65% 琼脂的分化培养基上进行选择。将分化出的不定芽从基部切

下, 转移到附加 50 mg/L 卡那霉素 (Kan)、500 mg/L 头孢霉素 (Cef)、3% 蔗糖和 0.65% 琼脂的 MS 培养基上生根。

采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 对具有卡那霉素抗性的烟草植株进行 PCR 检测。PCR 反应所用上下游引物分别为 P7、P8 (表 1)。为了检测 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因在烟草基因组中的拷贝数, 用 *Sac* I 对 20 μg 基因组 DNA 进行单酶切, 用 PCR 扩增产生的 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因 ORF 中间的一段 550 bp 的序列制备探针, 按 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒使用手册进行 Southern 印迹分析。同时用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA, 通过 RT-PCR 和 Northern 印迹技术进行表达分析。在 RT-PCR 试验中, 用 RT-Master Mix 反转录试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA, PCR 反应所用上下游引物分别为 P7、P8 (表 1), 扩增产物大小 550 bp。在 Northern 印迹实验中, 采用甲醛变性胶对提取的 RNA 进行分离, 杂交和检测方法参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection

Starter Kit II (Roche) 说明书进行。

### 1.2.5 蒜薹灰霉菌侵染分析

蒜薹灰霉菌 *Botrytis cinerea* Pers.ex of Garlic Sprout 由本实验室保存。菌株在马铃薯培养基上于 28 °C 培养 4 d 后, 用无菌水悬浮孢子, 经玻璃棉过滤除去菌丝后用 1/4 马铃薯培养基稀释成  $5 \times 10^4$  个孢子/mL 的悬浮液。将 10  $\mu$ L 孢子悬浮液接种于野生型秦烟 95 和 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 转基因烟草叶片表面, 然后置于 22 °C、16 h 光照、90% 湿度条件下, 每隔 5 d 观察叶片的颜色变化情况和灰霉菌的侵染程度。侵染实验重复 3 次, 每次接种 3 片叶子。

为了检测侵染部位 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累水平, 将侵染 5 d 后的叶片用 0.5% DAB (3,3-二氨基联苯胺) 在 37 °C 染色过夜, 经乙醇脱色后用 80% 甘油封片, 在显微镜下观察侵染情况。同时, 在接种 5 d 后用 0.4% 台酚蓝于 37 °C 染色 1 h, 在 85% 乙醇中煮 10 min 脱去叶绿素, 用 80% 甘油封片, 在显微镜下观察细胞的存活状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白的结构特征

*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因 (GenBank Accession No. NM\_118373) 开放阅读框全长为 1 128 个碱基对, 无内含子, 编码的蛋白质由 375 个氨基酸构

成 (图 1)。*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白的氨基酸序列包括 4 个部分, 从氨基末端开始依次为信号肽 (1-23)、富含脯氨酸结构域 PRD (Proline-rich domain) (24-173)、8CM (Eight Cysteine Motif) (174-254)、PRD (255-294) 和 8CM (295-375)。2 个 8CM 只有 2 个氨基酸不同, 分别为 I209/V330 和 P228/R349。

### 2.2 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的分离和载体构建

以拟南芥 *Ws* 野生型植株基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的 ORF 序列, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示有两条带, 一条符合预期大小 (1 128 bp), 一条位于 750~1 000 bp 之间。出现这种结果的原因是 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白有 2 个 8CM, PCR 反应所用的下游引物可以与这 2 个 8CM 编码序列的 3' 端配对。将大片段回收后连接至 pMD18-T 载体, 测序结果表明有 2 个碱基与数据库中下载的来自 Col-0 的 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因序列不同, 分别为 765 位的 T 变成了 A, 811 位的 A 变成了 C。*Ws* 生态型中的第 1 个碱基变化没有引起氨基酸改变, 但第 2 个碱基变化使第 271 位的 K 变为 Q。

用 *Vsp* I 和 *Sac* I 对 pMD18-T-*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 进行双酶切, 得到 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 编码序列。用 *Nde* I 和 *Sac* I 对植物双元表达载体 pRI101-AN 进行双酶切, 得到线性化质粒 DNA。将

```

MASTTIIILFLSFSIIPLLTIVRADNHSVYCPPPPPCICICNPGPPPQDPQPPTPPTFQPAPPANDQPPPPQSTSPPPVA
TTPPALPPKPLPPPLSPPQTTPPPPAITPPPPPAITPPLSPPPPAITPPPPLATTTPPALPPKPLPPPLSPPQTTPPPPAITPP
LSPLV[GICSKNDTELKICAGILAI SDGLLTTGRAEPCCSII RNVS DLD AVT CFCKSVGAPRFSLSPNFGIFFKVCGRR
IPQGFSCP]GPSPTISPPPLPPQTLKPPPPQTTPPPPAITPPLSPLV[GICSKNDTELKICAGILAI SDGLLTTGRAEPCCS
IVRNVS DLD AVT CFCKSVGARRFSLSPNFGIFFKVCGRRI PQGFSCP]

```

图 1 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白 (NP\_193978.2) 的氨基酸序列

Fig. 1 The deduced amino acid sequence of *AtDH<sub>y</sub>PRP1*. The signal peptide is underlined. Two 8CM are framed, the conservative cysteine residues are shadowed, the different amino acid residues between two 8CM are shown in bold.

*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 编码序列与 pRI101-AN 质粒 DNA 连接, 构建产生 pRI101-AN-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*。将 pRI101-AN-*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 送上海生工生物技术公司测序, 结果没有变化, 表明载体构建成功。

以测序正确的 pMD18-T-*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 为模板, 采用高保真 *PFU* DNA 聚合酶扩增 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 编码序列, 上下游引物 5'端分别包含 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点。用 *Nco* I 和 *Spe* I 对扩增产物和植物双元表达载体 pCAMBIA1302 进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶将 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 编码序列连接到 pCAMBIA1302 中的 *gfp* 基因之前, 产生 pCAMBIA1302-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP 融合表达载体。将 pCAMBIA1302-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP 送上海生工生物技术公司测序, 结果显示序列正确, 读码框没有变化。

### 2.3 转基因拟南芥的分子鉴定和 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白的亚细胞定位

用包含 pCAMBIA1302-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP 的农杆菌 LBA4404 通过真空渗透方法转化拟南芥 *Ws* 野生型植株, 在附加 25 mg/L 潮霉素的 MS 培养基上对收获的种子进行筛选。未转化的种子苗在潮霉素抗性培养基上不能正常生长, 逐渐黄化死去, 而转基因植株能够正常生长。用激光共聚焦显微镜观察 PCR 检测阳性的转基因拟南芥植株的根, 结果显示 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 定位于细胞表面, 表明 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白主要分布在细胞膜或细胞壁上 (图 2A)。而 pCAMBIA1302 空载体转化的拟南芥根细胞中 GFP 分布在整個细胞内 (图 2B)。

### 2.4 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草的分子鉴定和表达分析

通过冻融法将重组质粒 pRI101-AN-

*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 转入农杆菌 LBA4404, 采用菌落 PCR 进行鉴定。用含有 pRI101-AN-*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 的农杆菌 LBA4404 对秦烟 95 进行遗传转化, 经卡那霉素筛选和 PCR 检测获得 6 个转基因植株。图 3 为 TT1 和 TT2 两个转基因烟草株系的 PCR 检测结果。

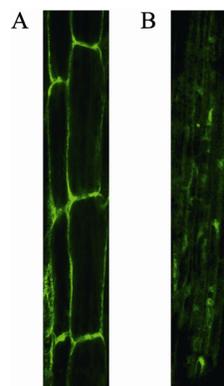


图 2 转基因拟南芥根细胞中 GFP 荧光的观察

Fig. 2 Fluorescence detection of GFP in root cells of transgenic *Arabidopsis*. (A) GFP fluorescence in root cells of pCAMBIA1302-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP transformed *Arabidopsis* plant. (B) GFP fluorescence in root cells of pCAMBIA1302 transformed plant.

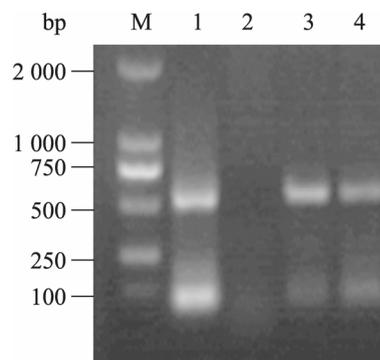


图 3 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草的 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of the transgenic tobacco plants harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*. M: DL2000 DNA marker; 1: pRI101-AN-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*; 2: wild type tobacco plant; 3-4: transgenic tobacco plants with kanamycin resistance (TT1 and TT2, respectively).

从 PCR 鉴定为阳性的转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草提取基因组 DNA，经限制性酶切后进行 Southern 印迹分析，结果显示 TT1 整合有一个拷贝的 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因 (图 4-3)，TT2 整合有两个拷贝的 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因 (图 4-4)。对这 2 个转基因植株进行 RT-PCR (图 5) 和 Northern 印迹 (图 6) 分析，结果表明 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因能够有效表达。

## 2.5 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草对蒜薹灰霉菌的抗性分析

在 3 次重复实验中，共接种 9 个 TT1 叶片，9 个 TT2 叶片，9 个野生型叶片。蒜薹灰霉菌侵染 5 d 后，转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草仍然保持绿色，而野生型叶片四周已经开始褪绿。侵染 8 d 后，野生型烟草叶片上的病斑逐渐扩大，超过 50% 的叶片表面颜色变黄；而 TT1 有 7 个叶片仍

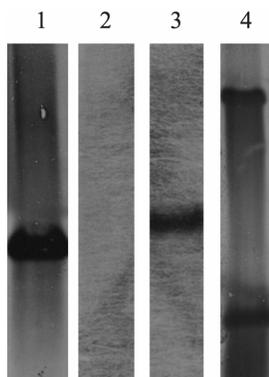


图 4 T0 代转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草的 Southern 印迹分析

Fig. 4 Southern blotting analysis of T0 tobacco plants harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*. 1: pRI101-AN-AtDH<sub>y</sub>PRP1 digested with *Sac* I and *Xba* I; 2: genomic DNA of wild type tobacco plant digested with *Sac* I; 3-4: genomic DNA of transgenic tobacco plants harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1* digested with *Sac* I (TT1 and TT2, respectively).

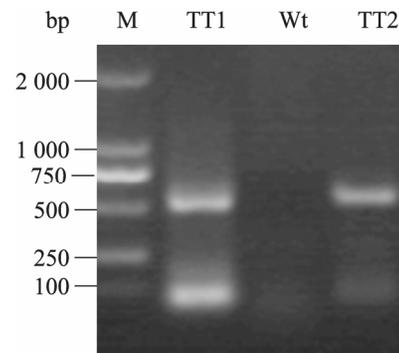


图 5 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR analysis of the transgenic tobacco plants harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*. M: DL2000 DNA marker; TT1: transgenic tobacco line TT1; Wt: wild type tobacco plant; TT2: transgenic tobacco line TT2.

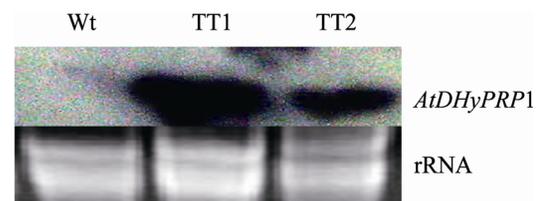


图 6 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草的 Northern blotting 分析

Fig. 6 Northern blotting analysis of the transgenic tobacco plants harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*. Wt: wild type tobacco plant; TT1, TT2: transgenic tobacco plant TT1 and TT2, respectively.

为绿色，2 个叶片在叶边缘出现变黄现象；TT2 有 6 个叶片仍为绿色，3 个叶片在叶边缘出现变黄现象。说明野生型烟草相对于转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 烟草在受到灰霉菌侵染时叶片褪绿的时间要早。侵染 12 d 后，野生型烟草叶片变黄面积超过 90%，其中 3 个叶片已经腐烂；TT1 只有 1 个叶片基本上保持绿色，8 个叶片的边缘已经褪绿，其中 2 个叶片的变黄部分已由边缘向中间扩散，其余 6 片只是在叶边缘出现变黄现象，叶片变黄面积约为 20%；TT2 有 3 个叶片的变黄部位已由

边缘向中间扩散, 6 个叶片只是在叶边缘出现变黄现象, 叶片变黄面积约为 30%, 并且在大部分侵染位点能看到有黄色的斑点, 但斑点与健康组织之间存在明显的界限, 无叶片腐烂现象出现。侵染 20 d 后, 9 个 TT1 叶片都已褪绿, 有 1 片叶边缘出现黄色, 其余叶片进一步变黄, 变黄面积达到 50%; TT2 叶片变黄面积达到 60%; 这时 9 个野生型烟草叶片几乎完全枯死, 3 片软化成为湿腐状, 最终遍及整片叶子, 而 18 个转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草叶片都没有腐烂, 叶片中部仍然保持有绿色 (图 7)。以上结果说明与野生型烟草相比, 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草对灰霉菌具有明显的抗性。

具有抗性的植物在受到病原体侵染时, 会发生超敏反应 (Hypersensitive response, HR)。HR 指病原体入侵后的很短时间内被侵染位点产生的大量活性氧 (ROS) 能够引起细胞死亡, 将病原体的生长限制在一定的范围内, 防止其扩散并造成大面积的伤害。ROS 包括  $H_2O_2$ 、 $O_2^-$  和  $OH$  等。DAB 可以和  $H_2O_2$  反应而显示出红褐色<sup>[13]</sup>。在蒜薹灰霉菌侵染 10 d 后, 野生型烟草叶片经过 DAB 染色可以观察到有少量的染色较浅的区域, 显示灰霉菌侵染引起了较低水平的  $H_2O_2$  积累, 没有产生超敏反应, 病原体可以扩散, 菌丝的生长最终引起整个叶片枯萎 (图 8A)。而转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草叶片经 DAB 染色后可以观

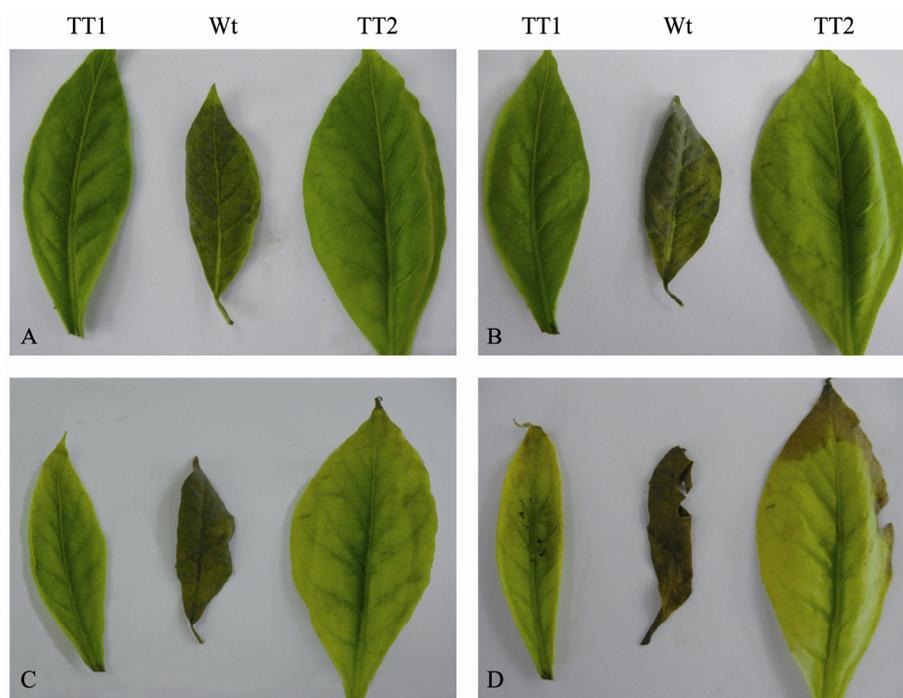


图 7 转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草对蒜薹灰霉菌的抗性分析

Fig. 7 Resistance of the transgenic tobacco plants to *B. cinerea* Pers. ex of Garlic Sprout. (A) 5 d after inoculation with the conidia of *B. cinerea*. (B) 8 d after inoculation with the conidia of *B. cinerea*. (C) 12 d after inoculation with the conidia of *B. cinerea*. (D) 20 d after inoculation with the conidia of *B. cinerea*. TT1 and TT2: transgenic tobacco plant TT1 and TT2, respectively; Wt: wild type tobacco plant.

察到较为集中的染色较深的红褐色区域,显示高水平  $H_2O_2$  积累引发了 HR 反应,灰霉菌不能继续侵染周围的细胞 (图 8B),说明 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因可以明显提高烟草的抗真菌能力。台酚蓝染色结果显示野生型烟草叶片在灰霉菌侵染之后出现大量死亡细胞 (图 9A),而转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草叶片细胞的坏死现象明显减轻 (图 9B)。

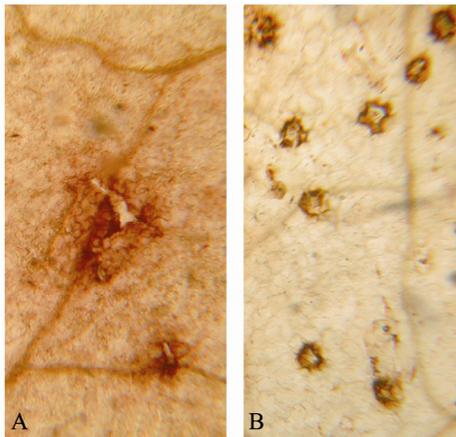


图 8  $H_2O_2$  积累水平的 DAB 染色观察  
Fig. 8 Observation of  $H_2O_2$  accumulation by DAB staining. (A) Leaf of wild type tobacco plant. (B) Leaf of transgenic tobacco plant harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*.

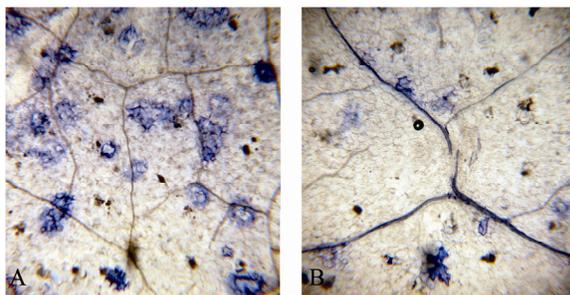


图 9 侵染烟草叶片的台酚蓝染色  
Fig. 9 Trypan blue staining of the tobacco leaves after infection with *B. cinerea*. (A) Leaf of wild type tobacco plant. (B) Leaf of transgenic tobacco plant harboring *AtDH<sub>y</sub>PRP1*.

### 3 讨论

本研究从拟南芥中克隆了 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因,生物信息学分析发现 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 在 N 端具有信号肽序列,显示该蛋白在合成后可能被运送或分泌到植物细胞的表面来执行特殊的功能。对 GENEVESTIGATOR ([www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp](http://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp)) 数据库中的芯片实验结果进行分析,显示 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因在受到丁香假单胞菌侵染诱导时表达水平最高,说明该基因与植物的抗病防御机制有关。本研究通过农杆菌转化方法将 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因导入烟草基因组,蒜薹灰霉菌侵染结果证实组成性表达该基因对病原体确实具有明显的抗性。

*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 蛋白的相对分子质量为 38.79 Da,具有 2 个 8CM 结构域,2 个 PRD 结构域,是一种新型的非特异性脂转移蛋白。尽管对 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 的功能目前还没有研究报道,但是从大规模检测拟南芥个体经不同处理后的基因表达水平的芯片实验数据中,可以找到一些有关该基因的信息。由于包含富脯氨酸序列,*AtDH<sub>y</sub>PRP1* 也被认为是一种 PRP/Hybrid PRP 蛋白<sup>[14]</sup>或类 Extensin 蛋白 (Extensin-like)<sup>[15]</sup>,它可能与细胞周期调控有关,在 G1 期存在表达峰值。用无毒丁香假单胞菌 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) 处理 *gh3.5-1D* 激活标签突变体后,*GH3.5* 在侵染部位和其他组织中都会过量表达,SA 积累水平和 *PR-1* 表达水平均表现增加,在这种系统性获得抗性应答过程中 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的表达水平会上升 3.3 倍<sup>[16]</sup>。用 *Pst hrpA*、*Pst COR<sup>-</sup>hrpS*、*Pst* DC3000 和大肠杆菌等病原体处理拟南芥时 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因的转录水平均表现上升<sup>[17]</sup>。

Mohr 和 Cahill 的微阵列实验结果显示 *Pst* 无毒菌株侵染可以使 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 表达水平明显提高, 同时发现叶片中 ABA 浓度的增加能够使拟南芥对 *Pst* 无毒菌株变得十分敏感, 并伴随着木质素和水杨酸浓度的下降, 以及抗性相关基因表达的抑制<sup>[18]</sup>。以上研究报道说明 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因编码的蛋白质主要参与拟南芥对病原体的抗性应答过程。

在与病原体的相互作用中, LTP 可能参与激发子触发植物细胞过敏性反应的信号转导过程。激发子是一类能诱导寄主植物产生防卫反应的特殊化合物, 与受体分子结合后可通过一定的信号传导途径激发植物产生防卫反应<sup>[19]</sup>。另外, 激发子具有甾醇转移活性, 它们与甾醇形成的复合物可以和植物细胞膜上的受体蛋白互相作用, 引起植物细胞的超敏反应, 从而激活抗病防卫反应的信号转导途径, 诱导植物抗性。发生 HR 反应后, 侵染位点会有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等活性氧 (ROS) 分子的积累。由于 LTP 和激发子在空间结构上有相似性, 所以 LTP 可以竞争性结合激发子的膜受体, 抑制细胞死亡并诱导系统抗性的产生<sup>[20]</sup>。本研究用蒜薹灰霉菌孢子对转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草和野生型烟草叶片进行离体侵染, 从 DAB 染色结果可以明显地看出野生型烟草叶片表面的被侵染位点着色较浅, 病原体可以扩散。而转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草叶片上的侵染位点着色很深, 说明发生了 HR 反应并有大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累, 从而限制了菌体的扩散。台酚兰染色结果也证实灰霉菌侵染可以引起野生型叶片细胞的大量死亡, 而转 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 基因烟草叶片细胞的坏死数量明显减少。

蛋白质是生物功能的具体执行者, 蛋白质的功能与其在细胞中的亚细胞定位密切相关。本研究在构建 pCAMBIA1302-*AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP 植物表达载体的基础上, 通过浸花法获得了表达 *AtDH<sub>y</sub>PRP1*-GFP 融合蛋白的拟南芥转基因植株, 激光共聚焦显微观察显示 *AtDH<sub>y</sub>PRP1* 定位于细胞表面, 这与生物信息学分析和灰霉菌抗性分析结果一致。

## REFERENCES

- [1] 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.
- [2] Suzuki H, Xia YJ, Cameron R, et al. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot*, 2004, 55(395): 169–179.
- [3] 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.
- [4] Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55(2): 85–97.
- [5] Nishimura S, Tatano S, Gomi K, et al. Chloroplast-localized nonspecific lipid transfer protein with anti-fungal activity from rough lemon. *Physiol Mol Plant P*, 2008, 72(4/6): 134–140.
- [6] Molina A, Garcia-Olmedo F. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J*, 1997, 12(3): 669–675.
- [7] Ge XC, Chen JC, Li N, et al. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(6): 603–607.
- [8] Zottich U, Da Cunha M, Carvalho AO, et al. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein

- (LTP) from *Coffea canephora* seeds with  $\alpha$ -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(4): 375–383.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci*, 1993, 316: 1194–1199.
- [11] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.
- [12] Stewart CN Jr, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748–749.
- [13] Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, et al. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2007, 71(4/6): 230–239.
- [14] Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, et al. Using genomic resources to guide research directions. The *Arabinogalactan* protein gene family as a test case. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1448–1463.
- [15] Menges M, Hennig L, Gruißsem W, et al. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 41987–42002.
- [16] Zhang ZQ, Li Q, Li ZM, et al. Dual regulation role of *GH3.5* in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol*, 2007, 145(2): 450–464.
- [17] Thilmony R, Underwood W, He SY. Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J*, 2006, 46(1): 34–53.
- [18] Mohr PG, Cahill DM. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Funct Integr Genomics*, 2007, 7(3): 181–191.
- [19] Liu MF, Zhu XC, Xiao HS. Research progress of elicitor and its signal transduction in plants. *Chin Agric Sci Bull*, 2008, 24(3): 215–220.  
刘梅芳, 朱晓程, 肖华山. 植物激发子及其信号传导之研究进展, *中国农学通报*, 2008, 24(3): 215–220.
- [20] 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.