

蒜芥茄 *PR-10* 基因的克隆与表达分析

程捷^{1,2}, 张涵雪¹, 蔚亚楠^{1,2}, 尹梦莹^{1,2}, 董相书¹, 吴丽艳^{2*}, 杜光辉^{1*}

1. 云南大学资源植物研究院, 云南昆明 650500; 2. 云南省农业科学院园艺作物研究所, 云南昆明 650205

摘要: 黄萎病是由轮枝菌属 (*Verticillium* spp.) 真菌引起的一种土传病害, 是茄子生产中的重要病害之一, 严重影响茄子的产量和品质。目前, 对于茄子黄萎病的防治还限于嫁接和化学防治, 但二者均不能较好防止该病的发生, 而挖掘茄子中黄萎病抗性基因, 结合基因工程技术培育抗病品种, 是防治黄萎病的最佳途径。蒜芥茄 (*Solanum sisymbriifolium* Lam.) 为云南野生茄, 对黄萎病具有高抗性。*PR* 基因是编码植物病程相关蛋白 (pathogenesis related protein) 的基因, 与植物抗病防御密切相关, 其中, *PR10* 蛋白是具有核酸酶相似结构的一类蛋白, 但其在蒜芥茄中的抗病作用机制尚不明确。本研究以蒜芥茄为试验材料, 利用前期建立的蒜芥茄转录组数据库, 通过 RT-PCR 技术从中分离并克隆得到 *PR10* 同源基因, 命名为 *SsPR-10*, 测序得到 645 bp, 其中基因编码区长 480 bp, 共编码 159 个氨基酸。将测序得到的编码区序列进行生物信息学分析, 结果显示: *SsPR-10* 蛋白是分子量为 17.71 kDa、等电点为 5.54 的酸性亲水蛋白; 跨膜区和信号肽预测显示 *SsPR-10* 蛋白无跨膜区和信号肽; 亚细胞定位结果表明 *SsPR-10* 定位于细胞质; 保守结构域预测结果显示, *SsPR-10* 含有“P-LOOP”环 (47~52 位) 和保守序列 PATHOGENESIS_BETVI (88~120 位)。序列比对与系统进化树分析结果表明, *SsPR-10* 蛋白与黄果茄 *PR10* 蛋白同源性最高, 其次是马铃薯 *STH-2* 蛋白。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术对 *SsPR-10* 基因的表达进行分析, *SsPR-10* 在蒜芥茄根部的表达量最高, 具有组织特异性; 在接种大丽轮枝菌 (*V. dahliae*) 24 h 后, *SsPR-10* 的表达量达到初始表达量的 8.16 倍, 表明黄萎病病菌可能诱导 *SsPR-10* 的表达。本研究对野生蒜芥茄 *PR-10* 基因进行了克隆和表达分析, 为进一步研究 *SsPR-10* 基因响应黄萎病等生物胁迫的机制提供一定的理论基础。

关键词: 蒜芥茄; *PR10* 蛋白; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S436.411 文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of *PR-10* Gene from *Solanum sisymbriifolium* Lam.

CHENG Jie^{1,2}, ZHANG Hanxue¹, YU Yanan^{1,2}, YIN Mengying^{1,2}, DONG Xiangshu¹, WU Liyan^{2*}, DU Guanghui^{1*}

1. Institute of Plant Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Institute of Horticultural Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China

Abstract: *Verticillium* wilt, a soil-borne disease caused by *Verticillium* spp., is one of the most important diseases in eggplant production. It seriously affects the yield and quality of eggplant. At present, the control methods for eggplant *verticillium* wilt are limited to grafting and chemical controls, but neither of them can prevent the occurrence of *verticillium* wilt. The best way to control *Verticillium* wilt is to explore the *verticillium* wilt resistance genes in eggplant and to breed some resistant eggplant varieties with genetic engineering technology. *Solanum sisymbriifolium* Lam. is a wild eggplant in Yunnan, China with a high *Verticillium* wilt resistance. *PR* genes encode pathogenesis-related proteins, which are closely related to plant disease defense. Among them, *PR10* protein is a nuclease-like protein, and the defense mechanism of *PR10* protein in *S. sisymbriifolium* is still unclear. In this study, a wild eggplant *S. sisymbriifolium* was

收稿日期 2022-09-08; 修回日期 2022-10-09

基金项目 云南省科技厅科技计划项目 (No. 202201AT070074, No. 2019FB059); 国家自然科学基金项目 (No. 31960594)。

作者简介 程捷 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茄果类蔬菜分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 杜光辉 (DU Guanghui), E-mail: dgh2012@ynu.edu.cn; 吴丽艳 (WU Liyan), E-mail: wly@yaas.org.cn。

used as the experimental material. The pathogenesis related protein 10 (PR10) homologous gene was isolated and cloned by reverse transcription PCR (RT-PCR) technology from the previously established transcriptome database of *S. sisymbriifolium* and named as *SsPR-10*. The cloned sequence length of *SsPR-10* was 645 bp, and its coding region was 480 bp long, encoding a protein of 159 amino acids residues in total. And the bioinformatics analysis showed that *SsPR-10* protein was an acidic hydrophilic protein with a molecular mass of 17.71 kDa and a theoretical isoelectric point (pI) of 5.54. The prediction of transmembrane region and signal peptide showed that *SsPR-10* protein had no transmembrane region and signal peptide. The prediction for subcellular localization showed that *SsPR-10* was localized in the cytoplasm of plant cell. The results of conserved domain prediction showed that *SsPR-10* contained a "P-LOOP" circle structure (sequence positions at 47–52 bp) and conserved sequence PATHOGENESIS_BETVI (sequence positions at 88–120 bp). The sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *SsPR-10* protein had the highest homology with PR10 protein from *S. virginianum*, followed by STH-2 protein from *S. tuberosum*. The expression of *SsPR-10* gene was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) experiments, and the expression level of *SsPR-10* was the highest in the root than in other organs of *S. sisymbriifolium*, showing a tissue specificity. The expression level of *SsPR-10* was multiplied to 8.16 times at 24 h after inoculation with *V. dahliae*, indicating that verticillium wilt might induce the expression of *SsPR-10*. In this study, *SsPR-10* gene was cloned and its expression pattern was analyzed in the wild eggplant *S. sisymbriifolium* for the first time, which will provide a theoretical basis for further studying the mechanism of *SsPR-10* responding to *Verticillium* wilt and other biological stresses.

Keywords: *Solanum sisymbriifolium*; PR10 protein; gene cloning; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.006

病程相关蛋白 (pathogenesis related proteins, PRs) 是植物受生物或非生物胁迫后诱导产生并积累的一类蛋白质总称。PR 蛋白主要分为 17 个亚类^[1], 广泛存在于单子叶和双子叶植物中。部分 PR 蛋白 (PR2、PR3、PR4、PR8) 具有几丁质酶或葡聚糖酶的活性, 对于真菌有一定抑制性^[2]。而 PR10 具有核糖核酸酶活性, 可以裂解入侵病毒的 RNA, 在植物抗病毒途径中发挥着重要作用^[3]。除此之外, PR10 对植物的生长、发育和衰老也有一定作用^[4]。*PR10* 基因受多种激素诱导表达, 如 JA、SA、ABA、GA₃, 也受部分病原体或冷害、干旱等非生物胁迫的诱导表达, 一些外源物质 H₂O₂、CuCl₂ 也可以诱导 *PR10* 基因的表达^[5]; *PR10* 在植物不同组织器官中的表达量也不同, 如, *PR10* 基因在大豆的根、茎及叶中均有表达, 其中叶部表达最高^[6]。多个研究表明, PR10 蛋白是分子量为 16~19 kDa, 等电点偏酸性的小分子量蛋白; 该蛋白作为一种胞内蛋白, 一般定位在细胞质中^[7-9]。PR10 蛋白可分为特异性细胞因子结合蛋白和乳胶蛋白两大类^[10]。虽然, PR10 蛋白参与植物抗病相关途径的调控, 但 PR10 受各种因素诱导表达的机制尚不明确; PR10 蛋白具有核酸酶活性和体外抑菌的特性, 但其如何抵御病菌的侵害也有待揭示。

黄萎病是影响茄子产量、由轮枝菌 (*Verticillium* spp.) 引起的一种土传病害, 发病快、危害

面积广。有研究表明, PR10 蛋白具有高效的抗真菌作用^[11], 对轮枝菌也表现出一定的抗性。例如, 棉花的 *GaPR10* 基因在受到大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 侵染时, 表达水平显著增高, 该基因可能参与了相应的防御反应^[12-13]; ZANDVAKILI 等^[14]发现玉米 PR10 蛋白有良好的体外抗真菌活性, 在接种了黄萎病病菌、菌核病菌等 4 种真菌后, PR10 蛋白均可不同程度地抑制其孢子萌发和菌丝生长。并且, *PR10* 基因对烟草花叶病毒 (TMV) 也表现出很高的抗性, 辣椒 *CaPR10*^[3]、刺茄 *SsPR10*^[4] 与烟草 *NtPR10*^[15] 基因在 TMV 侵染过程中表达水平显著上调, 有很好的抗 TMV 的作用。除此之外, PR10 蛋白对疫霉菌^[3]、稻瘟病菌^[4]、青霉菌^[16] 等多种病菌都表现出一定的抑制作用, 在植物抗病方面发挥重大作用。

蒜芥茄 (*Solanum sisymbriifolium* Lam.), 为茄科、茄属植物, 一年生草本, 属于野生茄的一种。蒜芥茄由于长期在野外生存, 具有良好的抗逆性, 研究表明, 蒜芥茄是黄萎病的高抗材料^[17]。本研究在前期建立的蒜芥茄转录组数据库^[18]的基础上, 通过 RT-PCR 技术, 从蒜芥茄中克隆获得病程相关蛋白 *PR-10* 基因, 即 *SsPR-10*。并对该基因进行生物信息学分析及预测, 利用荧光定量 PCR 技术检测 *SsPR-10* 基因在蒜芥茄不同器官的表达特性以及接种黄萎病病菌后表达水平的变化, 对蒜芥茄 *SsPR-10* 基因应对生物胁迫的表达

机制提供一定的理论基础, 有助于进一步开发利用蒜芥茄优良的抗病性状。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料野生蒜芥茄由云南省农业科学院园艺作物研究所提供。将蒜芥茄种子用 500 mg/L 的赤霉素 (GA_3) 溶液催芽 24 h, 待种子露白转移到育苗基质, 取成熟期的根、茎、叶进行混样, 作为基因克隆和表达分析材料; 待第一片真叶完全展开时用大丽轮枝菌菌株 QZ-S (*V. dahliae* Kleb.) 接种, 接菌后 0、24、48、72 h 取叶片进行 RNA 提取, 用于目的基因表达分析。

1.2 方法

1.2.1 *SsPR-10* 基因克隆 采用 Plant RNA Kit 试剂盒 (Omega, 美国) 提取蒜芥茄不同器官 (根、茎、叶) 的 RNA, 并用分光光度计检测 RNA 的纯度。再采用 5×all-In-One RT MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit) 试剂盒 (ABM, 加拿大) 将 RNA 反转录为 cDNA, 具体操作按试剂盒说明书进行。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (F: AAAGGCAAATACTAATCAAAC; R: AGAAAACACACAACAAAAAAC), 以 cDNA 为模板, 进行目的基因 ORF 的扩增, 引物合成委托昆明擎科生物科技有限公司进行。PCR 扩增体系 (25 μ L) 为: cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的正反引物各 1 μ L, ddH₂O 12 μ L, Es Taq Master Mix (Dye) 10 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L 的 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将目的基因条带进行回收后送昆明擎科生物科技有限公司进行测序, 将测序结果应用 DNAMAN 软件进行序列比对。通过 NCBI 在线网站的 ORF Finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 *SsPR-10* 进行开放阅读框预测。

1.2.2 生物信息分析及系统进化树构建 利用 ExPasy 在线 ProtParam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 对 *SsPR-10* 蛋白氨基酸的理化性质、亲水性、稳定性等进行预测; 使用 ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 对亲水性进行进一步分析。分别用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), SWISS-MOD-

EL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线网站分析 *SsPR-10* 蛋白的二、三级结构, 再用 Cell-PLoc 2.0 在线网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测 *SsPR-10* 的亚细胞定位。使用推定的 ORF 序列在网站 NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 中预测 *SsPR-10* 蛋白的磷酸化位点。在 TMHMM 2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 上预测 *Ss-PR-10* 蛋白的跨膜区; 利用 InterProScan 在线网站 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 对 *SsPR-10* 蛋白进行保守结构域分析预测。利用 NCBI 数据库 Blast 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *SsPR-10* 蛋白的氨基酸序列进行同源序列比对, 并选取相似度高的蛋白序列应用 DNAMAN 软件进行序列比对分析, 再使用 MEGA 软件利用邻接法 (neighbor-joining, NJ), 构建系统进化树。

1.2.3 基因表达分析 应用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术对 *SsPR-10* 基因在蒜芥茄不同器官中的表达进行分析。引物设计通过 Primer Premier 5.0 软件进行, 以 *CYP* 为内参基因 (表 1)。对蒜芥茄接种大丽轮枝菌, 并在一定时间内 (0、24、48 h) 测定 *SsPR-10* 基因的表达, 以无菌水处理为对照, 具体接种方法参照吴丽艳等^[19]进行。试剂盒选用 MonAmp™ SYBR® Greb qPCR Mix (Low Rox) (莫纳生物科技有限公司), 具体操作按照试剂盒说明书进行。通过实时荧光定量 PCR 仪进行试验, 每个样品设置 3 次重复。PCR 反应体系如下: MonAmp™ SYBR® Greb qPCR Mix 10 μ L, cDNA 溶液 1 μ L, 正向引物及反向引物各 0.8 μ L, ddH₂O 7.4 μ L, 共 20 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 继续 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
qRT-1-F	AGCCAAAGAGAGAGGCTTACA
qRT-1-R	CATCGTCTCTCACGTGTAGGT
qRT-2-F	TGTAGCCAAAGAGAGAGGCTT
qRT-2-R	CGTCTCTCACGTGTAGGTCT
CYP-F	ATCCTGTCCATGGCTAATGC
CYP-R	ATGCCCTCAACAACCTTGTC

2 结果与分析

2.1 *SsPR-10* 基因的克隆与 ORF 序列分析

以蒜芥茄为材料，提取 RNA (图 1A)，反转录后获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到与预期长度符合的 *PR10* 基因 (图 1B)。测序后，获得基因序列，全长 645 bp，命名为 *SsPR-10*。

将克隆得到的 *SsPR-10* 基因与转录组测序的 cDNA 序列进行比对，相似度为 99.85%，其中只有 1 个碱基变异 (图 2)。以测序结果为准，利用 NCBI 的 ORF Finder 基因开放阅读框分析工具进行预测，结果显示开放阅读框为 480 bp，共编码 159 个氨基酸 (图 3)。

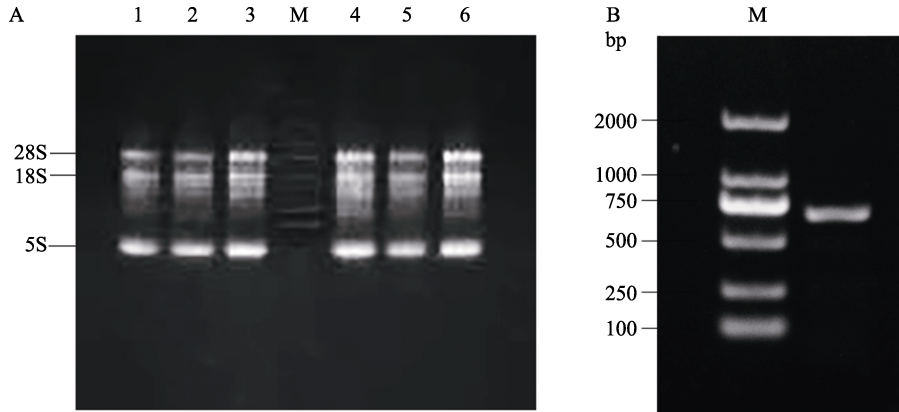


图 1 蒜芥茄 RNA (A) 和 *SsPR-10* 克隆 (B) 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of RNA (A) and *PR-10* gene cloning (B) from *S. sisymbriifolium*

SsPR-10	ATCAAACATTATGGGTGTGAATACCTATACTCATGAGTCCACAACCATTGTTGACCCTAC	60
转录组测序cDNA	ATCAAACATTATGGGTGTGAATACCTATACTCATGAGTCCACAACCATTGTTGACCCTAC	60
Consensus	atcaaacattatggggtgtgaatacctatactcatgagtcacacaaccattggtgaccctac	
SsPR-10	AAGGCTATTCAAAGCTTTGGTTCCTTGATTTTGACAACCTTGTACCTAAAGTGTGCCACA	120
转录组测序cDNA	AAGGCTATTCAAAGCTTTGGTTCCTTGATTTTGACAACCTTGTACCTAAAGTGTGCCACA	120
Consensus	aaggctattcaagccttgggtccttgatTTTGACAACCTTGTACCTAAAGTGTGCCACA	
SsPR-10	TGAGGTAAGAACATTGAGACTATTGAGGGAGATGGTGTGGAAAGCATCAAGAAGATAAA	180
转录组测序cDNA	TGAGGTAAGAACATTGAGACTATTGAGGGAGATGGTGTGGAAAGCATCAAGAAGATAAA	180
Consensus	tgaggtaaagaacattgagactattgagggagatgggtgtggaagcatcaagaagataaa	
SsPR-10	CTTTGTGGAAGGCAGTCCAATACAGTACTTGAAGCACAAGATGCATGTGATTGATGACAA	240
转录组测序cDNA	CTTTGTGGAAGGCAGTCCAATACAGTACTTGAAGCACAAGATGCATGTGATTGATGACAA	240
Consensus	ctttgtggaaggcagtccaatacagtacttgaagcacaagatgcatgtgattgatgacaa	
SsPR-10	GAACTTAGAACAATAATTCACITATTGAAGGTGATGTTCTTGGAGACAAATTGGAATC	300
转录组测序cDNA	GAACTTAGAACAATAATTCACITATTGAAGGTGATGTTCTTGGAGACAAATTGGAATC	300
Consensus	gaacttagaacaataatattcacttattgaaggtgatgTTCTTGGAGACAAATTGGAATC	
SsPR-10	AATTACTATGATATCAAAATAGAAGCTTCTGGAAATGGAGGCTGTGTTTTAAGACAAC	360
转录组测序cDNA	AATTACTATGATATCAAAATAGAAGCTTCTGGAAATGGAGGCTGTGTTTTAAGACAAC	360
Consensus	aattactatgatatcaaaatagaagcTTCTGGAAATGGAGGCTGTGTTTTAAGACAAC	
SsPR-10	AAGTATTACCAACAAGGTGATCATGTTTTACTGAAGAAGAACACAATGTAGCCAA	420
转录组测序cDNA	AAGTATTACCAACAAGGTGATCATGTTTTACTGAAGAAGAACACAATGTAGCCAA	420
Consensus	aagtattaccacacaaggtgatcatgTTTTACTGAAGAAGAACACAATGTAGCCAA	
SsPR-10	AGAGAGAGGCTTACATATTTCAAAGCCGTCGAAGCGCACCTCCTTGCCAAATCCTTCTGC	480
转录组测序cDNA	AGAGAGAGGCTTACATATTTCAAAGCCGTCGAAGCGCACCTCCTTGCCAAATCCTTCTGC	480
Consensus	agagagaggcttacatatttCAAAGCCGTCGAAGCGCACCTCCTTGCCAAATCCTTCTGC	
SsPR-10	CTACGCTTAAATATCGATGAAAAATAATCAGACCTACACGTGAGAGACGATGTATGTGTT	540
转录组测序cDNA	CTACGCTTAAATATCGATGAAAAATAATCAGACCTACACGTGAGAGACGATGTATGTGTT	540
Consensus	ctacgctTAAATATCGATGAAAAATAATCAGACCTACACGTGAGAGACGATGTATGTGTT	
SsPR-10	GTGACATTGTGTGATCAATAATAAAAAATGACGTATGCGCTTTCTTAAGAAGTTTAA	600
转录组测序cDNA	GTGACATTGTGTGATCAATAATAAAAAATGACGTATGCGCTTTCTTAAGAAGTTTAA	600
Consensus	gtgacattgtgtgatcaataataAAAAATGACGTATGCGCTTTCTTAAGAAGTTTAA	
SsPR-10	ACTCTTAAATAAAAAACGAAAAAAGTCGATTGATTATAGTTTTT	645
转录组测序cDNA	ACTCTTAAATAAAAAACGAAAAAAGTCGATTGATTATAGTTTTT	645
Consensus	actctTAAATAAAAAACGAAAAAAGTCGATTGATTATAGTTTTT	

图 2 *SsPR-10* 的克隆序列与转录组测序 cDNA 比对

Fig. 2 *SsPR-10* sequence alignment from cloning and transcriptome sequencing

```

10      20      30      40      50      60
1      ATGGGTGTGAATACCTATACTCATGAGTCCACAACCATTGTTGACCCTACAAGGCTATTC
1      M G V N T Y T H E S T T I V D P T R L F

70      80      90      100     110     120
61     AAAGCTTTGGTCTTGTATTTTGACAACCTTGTACCTAAAGTGTGCCACATGAGGTAAAG
21     K A L V L D F D N L V P K V L P H E V K

130     140     150     160     170     180
121    AACATTGAGACTATTGAGGGAGATGGTGTGGGAGCATCAAGAAGATAAACCTTTGTGGAA
41     N I E T I E G D G V G S I K K I N F V E

190     200     210     220     230     240
181    GGCAGTCCAATACAGTACTTGAAGCACAAAGATGCATGTGATTGATGACAAGAACTTAGAA
61     G S P I Q Y L K H K M H V I D D K N L E

250     260     270     280     290     300
241    ACAAATATTCACCTTATTGAAGGTGATGTTCTTGGAGACAAATTGGAATCAATTACCTAT
81     T K Y S L I E G D V L G D K L E S I T Y

310     320     330     340     350     360
301    GATATCAAATTAGAAGCTTCTGGAAATGGAGGCTGTGTTTTTAAGACAACACTGATTAC
101    D I K L E A S G N G G C V F K T T T D Y

370     380     390     400     410     420
361    CACACAAAAGGTGATCATGTTTTTACTGAAGAAGAACAATGTAGCCAAAGAGAGAGGC
121    H T K G D H V F T E E E H N V A K E R G

430     440     450     460     470     480
421    TTACATATTTCAAAGCCGTCGAAGCGCACCTTGCCTTCTGCCTACGCTTAA
141    L H I F K A V E A H L L A N P S A Y A *
    
```

斜体加粗位点为预测的磷酸化位点，下划线为局部保守序列 PATHOGENESIS_BETVI。

The bold italic site is the predicted phosphorylation site and the underscore is the locally conserved sequence PATHOGENESIS_BETVI.

图 3 *SsPR-10* 的 DNA 和预测的氨基酸序列

Fig. 3 DNA and predicted amino acid sequence of *SsPR-10*

2.2 *SsPR-10* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *SsPR-10* 蛋白理化特性预测 利用在线网站 ProtParam 对 *SsPR-10* 进行分析，结果表明 *SsPR-10* 编码的蛋白分子式为 C₇₉₄H₁₂₄₇N₂₀₇O₂₄₅S₃，总分子量 17.71 kDa，共编码 159 个氨基酸，其中带正电荷残基数(Arg+Lys)17 个，带负电荷残基数(Asp+Glu) 25 个，理论等电点为 5.54，推测该蛋白为酸性蛋白；不稳定系数 (II) 为 34.34，小于 40；该蛋白的亲水性平均值 (GRAVY) 为-0.325，为亲水性蛋白。在 ProtScale 程序中，对该蛋白的亲疏水性进一步分析 (图 4)，第 23 位亮氨酸的疏水

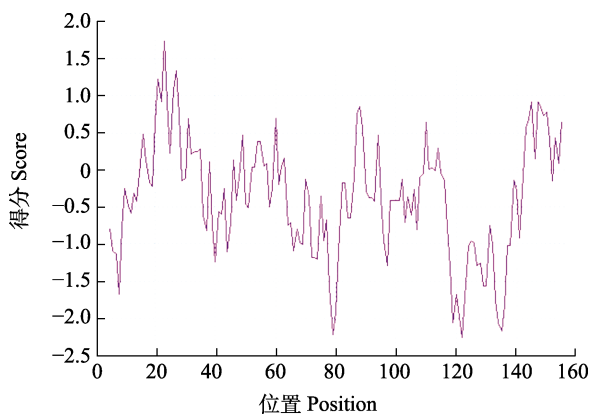


图 4 *SsPR-10* 蛋白亲疏水性预测

Fig. 4 Prediction of hydrophilicity of *SsPR-10* protein

性最高为 1.733，第 122 位苏氨酸亲水性最高为 -2.267。总体来看，疏水区主要集中在前部，亲水区集中在中部、后部，预测该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 *SsPR-10* 蛋白二、三级结构和亚细胞定位分析 利用在线软件 SOPMA 进行 *SsPR-10* 蛋白质二级结构预测 (图 5A)，结果显示 *SsPR-10* 蛋白二级结构主要由 4 种结构构成，分别为 43.40% 的 α -螺旋、23.27% 的 β -折叠、8.81% 的 β -转角、24.53% 的无规卷曲。在线网站 SWISS-MODEL 对 *SsPR-10* 的三级结构进行预测 (图 5B)，结果显示 *SsPR-10* 的三级结构与草莓过敏原 Fra a 1-2 的相似度达到 53.16%，以 6stb.1.A 作为模板构建。通过 Cell-PLoc2.0 在线网站对 *SsPR-10* 进行亚细胞定位，结果显示 *SsPR-10* 定位在细胞质中。

2.2.3 *SsPR-10* 蛋白磷酸化位点及信号肽分析 通过在线网站 NetPhos 对 *SsPR-10* 蛋白进行磷酸化位点的预测 (磷酸化位点阈值为 0.5)，共预测了 12 个磷酸化位点 (图 3)，第 10、52、84、107 位的丝氨酸；第 12、99、117、122 位的苏氨酸；第 83、100、120 位的酪氨酸。信号肽预测结果显示该蛋白无信号肽。

2.2.4 *SsPR-10* 蛋白跨膜区和结构域分析 利用 TMHMM 2.0 在线软件对 *SsPR-10* 蛋白跨膜区进

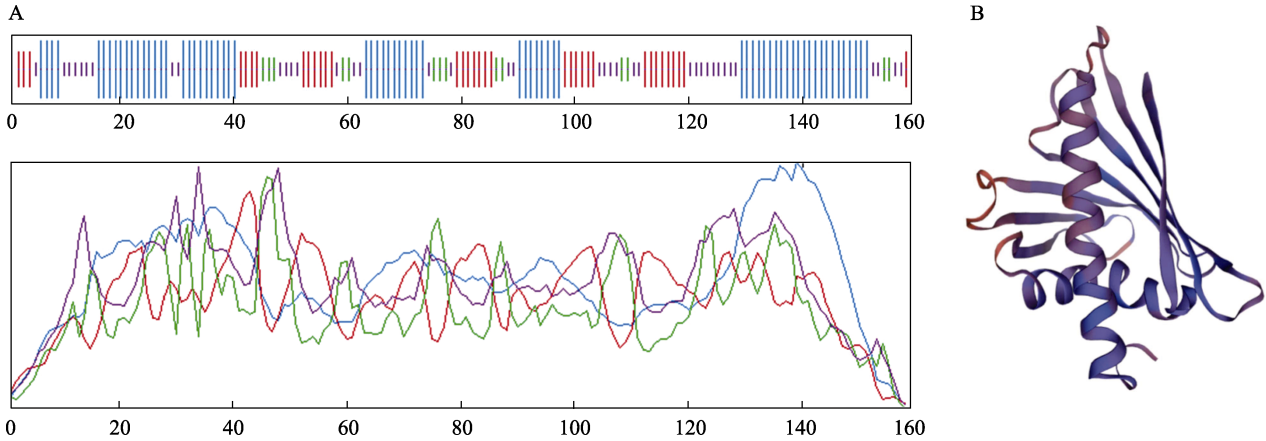


图 5 SsPR-10 蛋白的二级 (A)、三级 (B) 结构预测

Fig. 5 Prediction of secondary (A) and tertiary structure (B) of SsPR-10 protein

行分析,发现该蛋白无跨膜区(图 6A)。通过 InterProScan 在线网站对 SsPR-10 蛋白进行保守结构域分析预测(图 6B),发现其含有 1 个 Bet v I 过敏原结构域 (IPR024949),其中 88~120 位存在局部保守序列(图 3);1 个 START 脂质结合结构域 (IPR023393);1 个 Bet vI/MLP 乳胶蛋白结构域 (IPR000916)。

2.2.5 SsPR-10 蛋白同源序列比对和系统进化分析 利用 NCBI 在线网址中 BLAST 的功能检索与蒜芥茄 SsPR-10 蛋白序列相近的其他植物,发现 SsPR-10 与黄果茄 (*Solanum virginianum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 等的识别度较高。再通过 DNAMAN 软件将 SsPR-10 蛋白序列和这几种植物 PR10 蛋

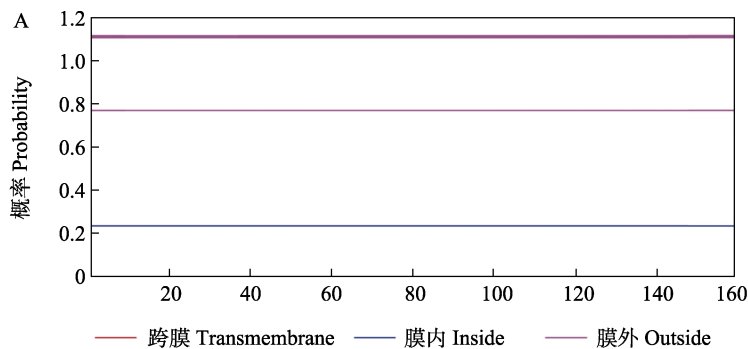
白序列进行序列比对分析(图 7),发现它们在位置 47~52 有一个保守序列,富含甘氨酸的环状结构“P-LOOP”环。

选择上述与蒜芥茄 SsPR-10 蛋白序列相似度较高的植物蛋白序列和 SsPR-10 序列进行比对(图 7),运用 MEGA 软件构建系统进化树(图 8),结果显示,蒜芥茄 SsPR-10 蛋白与黄果茄的 PR10 蛋白亲缘关系最近,其次与马铃薯的 STH-2 蛋白较近。

2.3 SsPR-10 基因的表达分析

利用 RT-qPCR 技术对 SsPR-10 基因在蒜芥茄根、茎、叶中表达情况进行分析(图 9),结果显示, SsPR-10 在根部表达最高,其次是叶,在茎部表达较低。

用黄萎病菌接种蒜芥茄,对接种后 0、24、



B

ACCESSION	NAME	SOURCE DATABASE	MATCHES
IPR024949	Bet_v_I_allergen	InterPro	50 100 150
IPR023393	START-like_dom_sf	InterPro	50 100 150
IPR000916	Bet_v_I/MLP	InterPro	50 100 150

图 6 SsPR-10 蛋白跨膜区分析 (A) 与结构域预测 (B)

Fig. 6 Transmembrane analysis (A) and domain prediction (B) of SsPR-10 protein

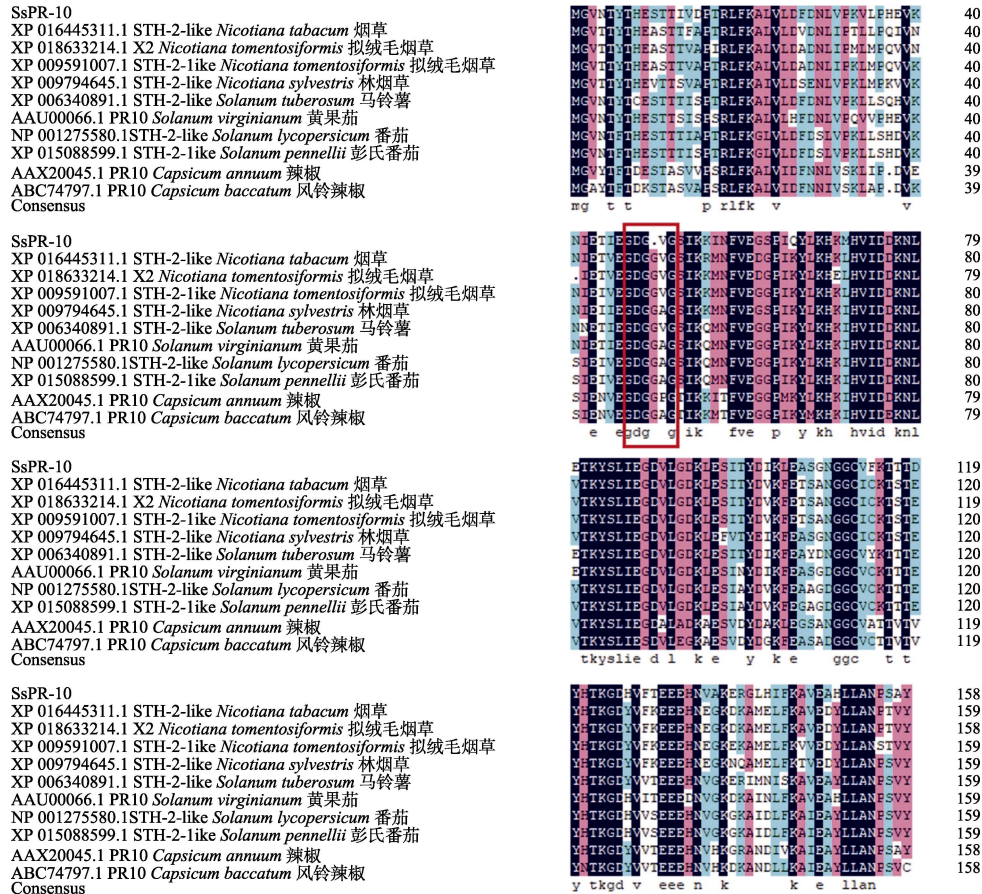


图 7 蒜芥茄 SsPR10 蛋白序列与其他植物的 PR10 相关蛋白质的多序列比对分析

Fig. 7 Multi-sequence alignment analysis of SsPR-10 protein sequences and PR10-related proteins of other plants

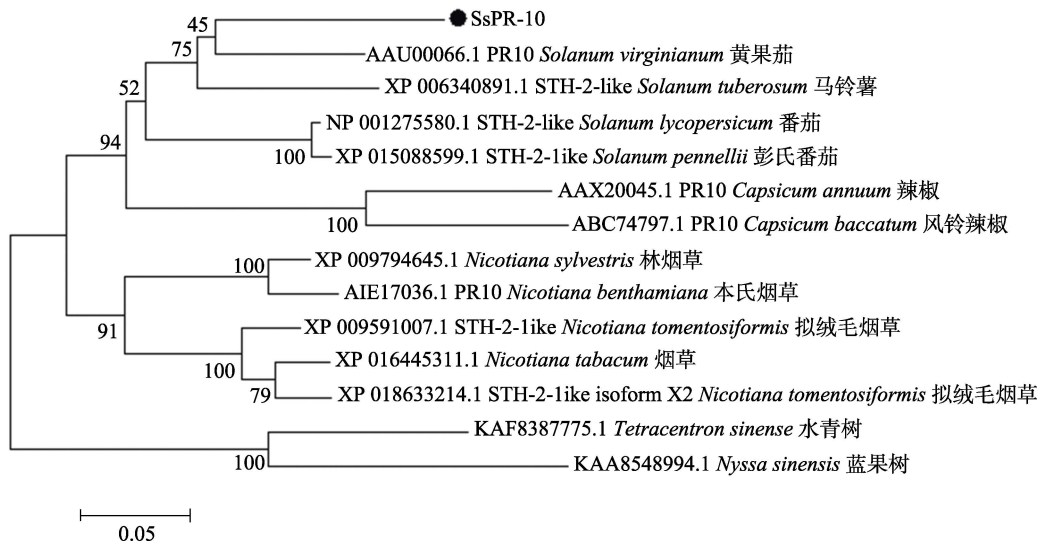


图 8 蒜芥茄 SsPR-10 和其相近物种的系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of SsPR-10 in *S. sisymbriifolium* and other PR10 in its related species

48、72 h 的 *SsPR-10* 基因的表达情况进行分析(图 10), 发现接种后 *SsPR-10* 总体表达情况呈先上升后下降的趋势。当接菌 24 h 后, *SsPR-10* 表达水

平增加了 3 倍左右, 且达到最高水平; 48 h 后, 其表达水平明显下降且低于对照; 72 h 后, 对照组与接种病菌组中基因表达水平相差不大。

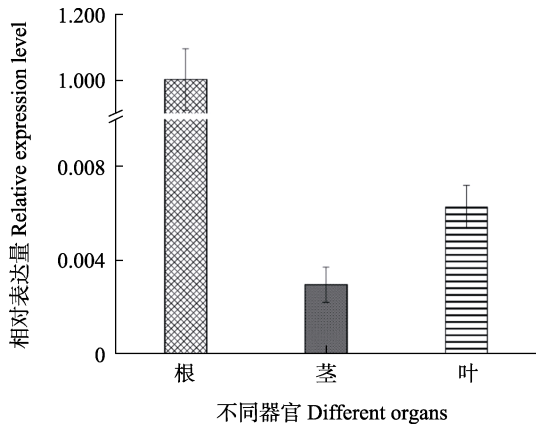


图 9 *SsPR-10* 基因在蒜芥茄不同器官中的表达分析
Fig. 9 Expression of *PR-10* gene in different organs of *S. sisymbriifolium*

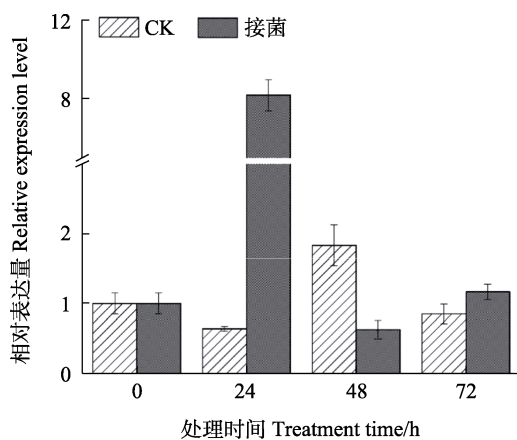


图 10 接菌后蒜芥茄 *SsPR-10* 基因的表达状况
Fig. 10 Expression of *PR-10* gene in *S. sisymbriifolium* after inoculation with *V. dahliae*

3 讨论

PR10 蛋白是植物病程相关蛋白家族中的第 10 类蛋白, 因其具有一定核酸酶活性, 在植物生长发育、抵御病原菌和非生物胁迫方面都有作用, 并且在多种植物, 如苹果^[20]、大豆^[6]、棉花^[12]、百合^[21]等中都有发现, 而受广大研究者的关注。多个研究表明, *PR10* 基因编码的氨基酸中都具有一个高度保守的 GXGGXG (X 是任意氨基酸) 序列模型, 被称为“P-LOOP”环^[5, 22], 这一保守结构可能与 PR10 蛋白的磷酸化有关。PARK 等^[3]研究发现, 辣椒 CaPR10 蛋白磷酸化的活性比未磷酸化的活性高约 12 倍, 并预测了其丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点; 同样, OZYIGIT 等^[22]预测了大豆、水稻、番茄等 6 种植物的 PR10 蛋白三级结构和它们的配体结合位点, 这些结合位点上的残基有着更高层次的变异, 可能形成具有不同功能、新的催化位点。

蒜芥茄作为重要的野生茄资源, 其部分抗病性状比栽培茄更有优势, 但对其有利基因的挖掘还不深入。目前, 关于蒜芥茄抗黄萎病相关基因 *Ve* 基因与泛素结合酶 (*E2s*) *UBC* 基因的分子机制已经得到初步分析^[17, 23], 而对于蒜芥茄 *PR-10* 基因的研究还未被报道。本研究通过 RT-PCR 技术获得蒜芥茄 *PR-10* 基因的序列, 并对其进行相关生物信息学分析和表达分析。对预测的蛋白序列进行理化检测发现 SsPR-10 蛋白大小为 17.71 kDa, 等电点为 5.54, 属于亲水性蛋白, 而 LIU 等^[4]研究刺茄 SsPR10 蛋白, 发现其大小为 17.58 kDa, 等电点为 5.29, 共编码 160 个氨基酸。ZHOU 等^[12]从棉花中分离的 *GaPR-10* 基因所编码的 PR10 蛋白分子量为 17.3 kDa, 等电点为 4.95, 编码 159 个氨基酸; 张弛等^[9]研究了杨树 *PR10* 基因编码的蛋白, 发现其分子量为 17.6 kDa, 等电点为 5.20, 编码 158 个氨基酸, 也为亲水性蛋白。以上研究结果与本研究相近, 可证明 PR10 蛋白为小分子量 (不超过 20 kDa) 酸性亲水性蛋白。本研究预测了 SsPR-10 蛋白在细胞中的定位, 结果显示在细胞质中, 对 SsPR-10 进行跨膜区分析, 发现 SsPR-10 无跨膜区; 信号肽分析也表明 SsPR-10 无信号肽。张玉等^[15]研究了烟草 NtPR10 蛋白的定位, 发现其定位在细胞质, 并对 NtPR10 蛋白进行了信号肽和跨膜结构域预测, 发现该蛋白无信号肽和跨膜结构域; NAOKI 等^[24]在研究水稻 PR 蛋白时, 也发现其定位在细胞质, 这些研究结果与本研究预测蒜芥茄 PR10 蛋白的定位一致, 而 OZYIGIT 等^[22]对于海岛棉、王百合和藏红花的亚细胞定位结果显示 PR10 蛋白在叶绿体和细胞质中。这些结果表明 PR10 蛋白是不含信号肽的胞内蛋白。

本研究对 SsPR-10 以及其近缘物种进行序列比对, 发现存在保守序列 GXGXG (47~51 位, X 为任意氨基酸), 称为“P-LOOP”结构, 且存在结构域 Bet.v1。“P-LOOP”是一个有关磷酸结合激酶以及核苷酸结合蛋白的结构域, 是 PR10 蛋白家族的特征结构。而 Bet v I 相关蛋白家族由许多结构相关的植物过敏原组成; 该结构中存在若干疏水配体结合位点, 这些位点可以形成一个大的“Y”型疏水配体结合口袋, 可以结合油菜素内酯 (brassinolide, BR) 等并起到转移极性配体的作用, 可能参与到植物的病理防御作用^[21]。前人研究表明, 刺茄的 SsPR10 蛋白^[4]以及辣椒

的 CaPR10 蛋白^[3]均含有保守序列 GXGGXG(47~52 位), 与本研究结果相比较这 2 种蛋白在第 50 位多了一个甘氨酸; 而马铃薯的 PR10 蛋白在第 45~47 位含有保守序列 GXG^[4], 这与本研究结果也有一定差异。推测不同的 P-LOOP 模式和甘氨酸残基的位置变化可能是 *PR10* 基因进化过程中替换、缺失和插入的结果。

有研究表明, 在植物的根、侧根和根尖等易受机械干扰和病原菌侵袭的部位, *PR10* 表达量会显著增加^[22, 25]。本研究发现 *SsPR-10* 基因在根部的表达明显高于在茎、叶的表达量, 存在明显的组织特异性。在接种大丽轮枝菌 24 h 后, 蒜芥茄 *PR-10* 基因的表达量最高, 相当于对照组的 4~5 倍; 而 24~48 h, *PR-10* 的表达量下降较多, *SsPR-10* 表达水平由上调变为下调; 72 h 后, 该基因表达量与对照组相差不大。亚洲棉 *GaPR10* 基因^[12]在根部有低水平的转录, 而在叶片、花、茎中都不表达, 也属于组成型表达; 杨树 *PR10* 基因^[9]与刺茄的 *PR10* 基因^[4]在根系的表达量也高于叶片和茎。但是, 大豆 *PR10* 基因在叶部的表达量高于茎部和根部^[6]。辣椒和刺茄在接种 TMV 后, 其 *PR10* 基因表达量均大幅增加^[3-4]; 同样, 亚洲棉用大丽轮枝菌处理后, *PR10* 基因在 12 h 内达到最高水平的表达, 并在 24 h 内保持高水平的表达^[12], 这与本研究 *SsPR-10* 响应大丽轮枝菌接种的反应相近。虽然 *SsPR-10* 在根、茎、叶等部位可以表达, 但比接种病菌后其表达是明显较低的, 这表明 *SsPR-10* 受到病菌诱导时, 表达水平会显著上升。

4 结论

本研究从蒜芥茄中克隆得到了病程相关蛋白 *SsPR-10* 基因, 该基因编码区全长 480 bp, 共编码 159 个氨基酸。SsPR-10 蛋白无跨膜区和信号肽, 属于胞内蛋白, 与黄果茄 PR10 蛋白亲缘关系最近。蒜芥茄 *SsPR-10* 基因的表达具有组织特异性, 并受大丽轮枝菌的诱导而高表达, 说明 *SsPR-10* 基因可能参与蒜芥茄抗黄萎病的应答过程。

参考文献

- [1] LOON L V, REP M, PIETERSE C. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44(1): 135-162.
- [2] LOON L, STRIEN E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 1999, 55(2): 85-97.
- [3] PARK C J, KIM K J, SHIN R, PARK J M, SHIN Y C, PAEK K H. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway[J]. Plant Journal, 2004, 37(2): 186-198.
- [4] LIU X, HUANG B, LIN J, FEI J, CHEN Z, PANG Y, SUN X, TANG K. A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(5): 546-556.
- [5] JWA N S, AGYAWAL G K, RAKWAL R, PARK C H, AGRAWAL V P. Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, *JIOsPR10*, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2001, 286(5): 973-983.
- [6] 陈华涛, 陈新, 顾和平, 张红梅, 袁星星, 崔晓艳. 大豆中 2 个编码 PR10 蛋白新基因的克隆与分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(4): 7-12.
- [7] CHEN H T, CHEN X, GU H P, ZHANG H M, YUAN X X, CUI X Y. Cloning and analysis of two new genes PR10 members in soybean[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28(4): 7-12. (in Chinese)
- [8] CHEN Z Y, BROWN R L, RAJASEKARAN K, DAMANN K E, CLEVELAND T E. Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production[J]. Phytopathology, 2006, 96(1): 87-95.
- [9] 谢纯政, 梁炫强, 李玲, 刘海燕. 花生抗黄曲霉相关 *ARAhPR10* 基因克隆及其原核表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(2): 237-244.
- [10] XIE C Z, LIANG X Q, LI L, LIU H Y. Cloning and prokaryotic expression of *ARAhPR10* gene with resistance to *Aspergillus flavus* in peanut[J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(2): 237-244. (in Chinese)
- [11] 张弛, 王宇婷, 顾咏梅, 贾丰璘, 周博如. 杨树 *PR10* 基因应答杨树叶枯病与非生物胁迫表达[J]. 东北林业大学学报, 2021, 49(12):103-107, 131.
- [12] ZHANG C, WANG Y T, GU Y M, JIA F L, ZHOU B R. Expression of *PR10* gene is in response to *Alternaria alternata* and abiotic stress in poplar[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2021, 49(12): 103-107, 131. (in Chinese)
- [13] OSMARK P, BOYLE B, BRIASSON N. Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38(6): 1243.
- [14] 杨丹, 包焱, 陈丽梅, 崔秀明, 李昆志. 三七病程相关蛋

- 白 *PR10-2* 基因的克隆、表达及功能初步分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(16): 3106-3111.
- YANG D, BAO Y, CHEN L M, CUI X M, LI K Z. Molecular cloning, bacterial expression analysis and functional characterization of pathogenesis-related *PR10-2* gene in *Panax notoginseng*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(16): 3106-3111. (in Chinese)
- [12] ZHOU X J, SHAN L, XU Y H, WANG J W, CHEN X Y. A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity[J]. Plant Science, 2002, 162(4): 629-636.
- [13] 张桂荣. 棉花 PR 蛋白家族分析及 PR10、PR17 的功能研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- ZHANG G R. Analysis of PR protein family and functional study of PR10 and PR17 in cotton[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2015. (in Chinese)
- [14] ZANDVAKILI N, ZAMANI M, MOTALLEBI M, JAHR-OMI Z M. Cloning, overexpression and *in vitro* antifungal activity of *Zea mays* PR10 protein[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2017, 15(1): 42-49.
- [15] 张玉, 张增林, 蒋彩虹, 常爱霞, 杨爱国, 罗成刚, 王绍美, 王元英. 烟草病程相关蛋白 *NtPR10* 基因克隆与表达分析[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(3): 1-7.
- ZHANG Y, ZHANG Z L, JIANG C H, CHANG A X, YANG A G, LUO C G, WANG S M, WANG Y Y. Cloning and expression analysis of pathogenesis related protein *NtPR10* in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(3): 1-7. (in Chinese)
- [16] HWANG H J, KIM H, YU H J, OH M H, LEE I, KIM S G. Gene encoding pathogenesis-related 10 protein of *Lithospermum erythrorhizon* is responsive to exogenous stimuli related to the plant defense system[J]. Plant Science, 2003, 165(6): 1297-1302.
- [17] 吴丽艳, 尹梦莹, 念润, 黎志彬, 鲍锐, 董相书, 龚亚菊, 杜光辉. 蒜芥茄 *SsVe1* 和 *SsVe2* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(23): 7680-7687.
- WU L Y, YIN M Y, NIAN R, LI Z B, BAO R, DONG X S, GONG Y J, DU G H. Cloning and expression analyses of *SsVe1* and *SsVe2* genes from *Solanum sisymbriifolium* L.[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(23): 7680-7687. (in Chinese)
- [18] WU L Y, DU G H, BAO R, LI Z B, GONG Y J, LIU F H. *De novo* assembly and discovery of genes involved in the response of *Solanum sisymbriifolium* to *Verticillium dahliae*[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2019, 25(4): 1009-1027.
- [19] 吴丽艳, 郭志祥, 曾莉, 鲍锐, 黎志彬, 龚亚菊. 云南野生茄资源黄萎病苗期人工接种抗性鉴定分析[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1046-1054.
- WU L Y, GUO Z X, ZENG L, BAO R, LI Z B, GONG Y J. Resistance identification and analysis of Yunnan wild eggplant resource to *Verticillium wilt*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(6): 1046-1054. (in Chinese)
- [20] PUEHRINGER H M, ZINOECKER I, MARZBAN G, KATINGER H, LAIMER M. MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1[J]. Gene, 2003, 321(1): 173-183.
- [21] HUANG J C, CHANG F C, WANG C S. Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34(4): 681-686.
- [22] OZYIGIT I I, VATANSEVER R, FILIZ E. Comparative analyses of pathogenesis-related protein-10 (PR10) in plants[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2017, 16: 325-333.
- [23] 董轩名, 蔡佳文, 郑妍, 于丽杰, 肖玮, 金晓霞, 董延龙. 蒜芥茄 *SsUBC* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5591-5600.
- DONG X M, CAI J W, ZHENG Y, YU L J, XIAO W, JIN X X, DONG Y L. Cloning and expression analysis of *SsUBC* gene in *Solanum sisymbriifolium* Lam.[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5591-5600. (in Chinese)
- [24] NAOKI M, MICHIKI I. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice[J]. Plant & Cell Physiology, 1996, 37(1): 9-18.
- [25] CHAKRAVARTHI M, SYAMALADEVI D P, HARUNI PRIYA P, AUGUSTINE S M, SUBRAMONIAN N. A novel PR10 promoter from *Erianthus arundinaceus* directs high constitutive transgene expression and is enhanced upon wounding in heterologous plant systems[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(1): 17-30.