

果蔗SoSGT1与*Gibberella fujikuroi*侵染下果蔗叶片蛋白的互作研究

林生^{a,b}, 陈婷^{a,b}, 周明明^{a,b}, 陈观水^a, 林文雄^{a,b}

(福建农林大学, a. 生命科学学院; b. 农业生态研究所, 福州 350002)

摘要: 为了解果蔗(*Saccharum officinarum* L.)在防御 *Gibberella fujikuroi* 过程中与 SoSGT1 互作的蛋白,利用 GST 蛋白标签载体 pGEX-6p-1 与果蔗 *SoSgt1* 基因构建 pGEX-6p-1-sgt1 表达载体,诱导表达 GST-SoSGT1 融合蛋白,并通过 GST pull down 技术捕捉到 7 个与 SoSGT1 互作蛋白。这些蛋白的功能主要归类为信号转导、抗逆与能量代谢相关蛋白,其中一些蛋白可能与果蔗 SoSGT1 直接互作,如 HSP90 与 RAR1 蛋白,另外一些蛋白与果蔗 SoSGT1 可能产生次级互作。在 *G. fujikuroi* 侵染果蔗‘福农’叶片时, HSP70、14-3-3 蛋白、2-半胱氨酸-过氧化物酶与吡哆醇生物合成蛋白的编码基因呈上调表达,初步说明这些蛋白可能与 SoSGT1 蛋白互作共同参与了果蔗防御梢腐病病原 *G. fujikuroi* 的病理过程。

关键词: 果蔗; *Gibberella fujikuroi*; SoSGT1 蛋白; GST pull down; 蛋白互作

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.004

Studies on Interaction between SoSGT1 and Proteins in Leaves of Chewing Cane Infected by *Gibberella fujikuroi*

LIN Sheng^{a,b}, CHEN Ting^{a,b}, ZHOU Ming-ming^{a,b}, CHEN Guan-shui^a, LIN Wen-xiong^{a,b*}

(a. School of Life Science; b. Institute of Agricultural Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to understand the interaction proteins with SoSGT1 during chewing cane (*Saccharum officinarum* L.) in denfense *Gibberella fujikuroi*, *SoSgt1* and vector pGEX-6p-1 was used to construct vector pGEX-6p-1-sgt1, which expressed fusion protein of GST-SoSGT1. Seven proteins were obtained by GST pull down. The function of these proteins was classified into signal transduction, stress resistance and energy metabolism, in which might directly interact with SoSGT1, such as HSP90 and RAR1, and others might indirectly interact with SoSGT1. When the leaves of chewing cane ‘Fuan’ were infected by *G. fujikuroi*, the expression of coding genes of HSP70, 14-3-3 protein, 2-Cys-peroxiredoxin and pyridoxine biosynthesis protein was up-regulated, which indicated that these proteins might interact with SoSGT1 and associate with the resistance of chewing cane to *G. fujikuroi*.

Key words: Chewing cane; *Gibberella fujikuroi*; SoSGT1 protein; GST pull down; Protein interaction

果蔗(*Saccharum officinarum* L.)为多年生禾本科(Poaceae)甘蔗属草本植物,是一种果糖兼用的重要经济作物,近年来逐渐成为农村一项重要的经济收入来源以及推动农村经济发展的一个重要的种植产业^[1-2]。但是与糖蔗一样,果蔗在栽培生产的

过程中也会受到各种病害的影响,主要病害有梢腐病、赤腐病、凤梨病、锈病、根腐病、花叶病与黄斑病等^[3-6]。这些病害的蔓延速度很快,严重影响到果蔗的品质与产量。另外,果蔗在保鲜过程中,易感染赤腐病、凤梨病,致使蔗茎变黑变红,产生毒素,

收稿日期: 2014-10-13

接受日期: 2014-12-19

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2013J05043); 福建省教育厅重点项目(JA11075); 国家自然科学基金项目(31401950)资助

作者简介: 林生(1981~),男,博士,讲师,主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: lsjk1958@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wenxiong181@163.com

影响了果蔗的质量,限制了果蔗的供应,产生“旺季烂,淡季断”的现象。因此,通过研究果蔗与病原微生物之间的互作机理与果蔗的抗病分子机制,结合植物基因工程培育优良的抗病果蔗品种,是防治果蔗病害、提高品质的迫切需要与有效途径。

植物在长期的进化过程中,为了抵御病原微生物的侵害,逐渐形成了一系列复杂而有效的识别与保护机制。这些机制主要包括植物抗病基因介导的侵染部位细胞程序化死亡(Programmed cell death, PCD)、局部发生超敏反应(Hypersensitive reaction, HR)与系统获得抗性(System acquired resistance, SAR)等^[7-10]。其中,由不同抗病信号传导相关基因构成的 SAR 是植物抵御病原微生物的一个重要机制。SAR 的一个重要特点就是它具有广谱抗性,一种病原诱导的 SAR 往往对多种病毒、细菌及真菌病原表现出 SAR,植物产生 SAR 后,能在较长时间内保持对多种病原菌的增强抗性^[11-14]。因此,通过调节 SAR 反应来获得植物的广谱抗病性,是一条很有潜力的途径。近年来,已从不同植物基因组中分离出与 SAR 有关的基因,如 *NPR1*、*SGT1*、*RAR1*、*SN1*、*NDR1*、*EDS1* 和 *PAD4* 等^[10,15-18]。*SGT1* (Suppressor of the G2 allele of *skp1*)、*RAR1* (Require for MLa12 resistance)和 *NPR1* (Non-expression of *PR* genes)是已鉴定的几个植物抗病防卫反应的重要调控蛋白,这些蛋白质本身对病原物并无抑制作用,但作为信号元件参与不同植物抗病防卫反应途径的调控,且对病原菌没有严格的种属专一性^[10,16-20]。通过导入 SAR 调控蛋白编码基因,如 *SGT1*、*NPR1*、*RAR1* 等,理论上可以调节植物的 SAR 反应,且不会因为病原菌小种的变异而失去效果,这就相当于导入了多个 *R* 基因,可以起到广谱抗病性的功能^[21-28]。因此,植物 SAR 调控蛋白的编码基因 *SGT1*、*NPR1*、*RAR1* 等可以作为植物广谱抗病性改良的潜在基因资源。

本研究已从果蔗中获得抗病信号传导相关基因 *SoSgt1*,但果蔗基因组庞大、遗传背景复杂,对 *SoSgt1* 的功能还需进行深入研究。由于 *SoSgt1* 是信号传导因子,可能参与了果蔗抗病的多条途径。因此,对 *SoSgt1* 参与了果蔗哪些抗病途径,并在这些途径中与哪些蛋白产生互作,都需进一步探索。本研究在前期工作基础上,通过构建 GST (Glutathione S transferase)-*SoSGT1* 的整合表达载体,分离纯化 GST-*SoSGT1* 融合蛋白,利用 GST pull down 技术,

将果蔗 GST-*SoSGT1* 蛋白与稍腐病病原菌侵染后的果蔗叶片天然蛋白进行互作,分离出互作蛋白,通过液相色谱-串联质谱(Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC/MS/MS)对互作蛋白进行鉴定,并采用实时荧光定量 RT-PCR 检测这些互作蛋白的编码基因在受到稍腐病病原菌诱导后的表达水平,探讨果蔗 *SoSGT1* 与互作蛋白间构成的病理反应相关的分子机制,以期为果蔗抗病基因工程的研究寻找新的有效基因资源。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以果蔗(*Saccharum officinarum* L.)品种‘福安’为材料,种植于福建农林大学试验田。果蔗稍腐病病原菌由本实验室分离鉴定与保存。当果蔗进入分蘖期,将培养了 3 d 的 *Gibberella fujikuroi* 接种于果蔗主茎的倒三叶片,接种 48 h 后取叶片提取天然蛋白,接种后 0、24、48 和 72 h 分别取叶片用于不同基因转录水平检测。采集的叶片置液氮中速冻,贮藏于 -80℃ 冰箱中备用。

1.2 *SoSGT1*的生物信息学分析

利用 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam> 网站对果蔗 *SoSGT1* 蛋白进行理化性质预测,使用 NCBI 的 Protein BLAST 软件分析蛋白中可能具有的功能结构域。通过 ExPasy 工具的 Swiss-Model 把果蔗 *SoSGT1* 蛋白的氨基酸序列生成 PDB 格式的原子坐标,然后利用软件 spdbv 观看 *SoSGT1* 蛋白的三维立体结构。

1.3 表达载体的构建和融合蛋白的纯化

以果蔗全长基因 *SoSgt1* 的 TA 克隆(pMD-18T-*sgt1*)为模板,进行 PCR 扩增,上游引物 *sosgt1-up* 添加 *EcoR* I 酶切位点:5'-GTAGAATTCATGGCCGC-CGCGTCG-3',下游引物 *sosgt1-down* 添加 *Xho* I 酶切位点:5'-GTAAGTCGAGGGTATTCCCCTTC-3'。PCR 扩增体系包含 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, pMD-18T-*sgt1* 0.5 μL,引物 *sosgt1-up* 和 *sosgt1-down* 各 1.0 μL, BSA 0.7 μL, *rTaq* DNA 聚合酶 0.3 μL, 无菌水 16 μL, 总体积 25 μL。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;然后 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环;最后 72℃

延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用胶回收试剂盒(购自上海生物工程有限公司)进行 DNA 产物纯化回收。

EcoR I 与 *Xho* I 分别对 *SoSgt1* 基因与 pGEX-6p-1 质粒进行双酶切。双酶切体系为 10×H Buffer 2.5 μL,模板 18.0 μL, *EcoR* I 1 μL, *Xho* I 1 μL, 无菌水 2.5 μL,总体积 25.0 μL, 37°C 温育 5 h,回收试剂盒直接回收双酶切产物。

连接 *SoSgt1* 与 pGEX-6p-1 质粒双酶切产物。连接体系为 Ligase buffer 1.0 μL, Ligase 1.0 μL, *SoSgt1* 3 μL, pGEX-6p-1 1.5 μL, 无菌水 3.5 μL, 总体积 10 μL, 16°C 水浴过夜。将构建的 pGEX-6p-1-*sgt1* 基因表达载体转化感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta (DE3) 菌株,转 LB 培养液(含 Ampicillin 50 μg mL⁻¹),于 37°C 下 150×g 振荡过夜培养。利用质粒小量抽提试剂盒(购自 TIANGEN 公司)提取 pGEX-6p-1-*sgt1* 质粒,并进行 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切验证。

吸取含有 pGEX-6p-1-*sgt1* 质粒的 Rosetta (DE3) 菌株,于 5 mL 含 Ampicillin 的 LB 液体培养基中,在 37°C 下 150×g 振荡培养 1.5~2 h,加入总浓度为 1.0 mmol L⁻¹ 的 IPTG,于 28°C 下 150×g 诱导表达培养 4.5 h,用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。诱导的表达产物用 GST 蛋白纯化柱(购自 GE 公司,型号为 GST SpinTrapTM 28-9523-59)进行纯化,纯化蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.4 果蔗叶片天然蛋白提取

在液氮中充分研磨果蔗叶片,按照 0.5 g 干粉加入 1 mL 蛋白提取缓冲液[50 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 0.1 mmol L⁻¹ PMSF, 5 μg mL⁻¹ Leupeptin, 0.5% NP-40],在旋涡混合器上振荡充分混匀,在 4°C 下 12000×g 离心 15 min,取上清,用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.5 与 SoSGT1 互作蛋白的钓取

将 GST-SoSGT1 融合蛋白结合到 GST 蛋白纯化柱上,与果蔗叶片天然蛋白于 4°C 进行过夜孵育,用 PBS 缓冲液(含 140 mmol L⁻¹ NaCl, 2.7 mmol L⁻¹ KCl, 10 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 1.8 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, pH 7.3)漂洗杂蛋白,取 200 μL 还原型谷胱甘肽 Tris-HCl 混合液在室温下洗脱,收集洗脱液。部分

洗脱液经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,另一部分洗脱液于 -20°C 保存。

1.6 SoSGT1 互作蛋白的消化和鉴定

参照 Lin 等^[29]的方法将 GST pull down 钓取的 SoSGT1 互作蛋白用胰蛋白酶进行消化。蛋白利用 LC/MS/MS 进行鉴定。液相条件(Liquid chromatography, LC):高效液相色谱仪为 Thermo Scientific Surveyor System;色谱柱为 BioBasic C18 Column (100 mm × 0.18 mm, particle size: 5 μm);样品量为 10 μL;流动相为 A (0.1% 甲酸水溶液)和 B (0.1% 甲酸乙腈溶液);梯度为 5%~35% B (95%~75% A) 20 min, 35%~95% B (75%~5% A) 2 min;流速为 2.5 μL min⁻¹。质谱条件(Mass spectrometry, MS):质谱仪为 LTQ-XL (Thermo Scientific);毛细管温度为 275°C;喷雾电压为 3.5 kV;鞘气流速为 15 arb;母离子扫描范围为 400~2000 amu;分离宽度为 2 Da。二级质谱条件为 AGC Target 1e4, 1 microscans;碰撞能量为 35% CID。利用软件 Proteome Discoverer 1.2 进行数据库的检索与相对定量分析。搜索过程所使用的数据库为从 NCBI 下载的绿色植物蛋白库。

1.7 SoSGT1 互作蛋白基因的表达

果蔗叶片总 RNA 提取与 cDNA 反转录参照 Lin 等^[29]的方法。选取几个 SoSGT1 互作蛋白,根据从 NCBI 网站上查找的甘蔗表达序列标签 (Expressed sequence tags, EST) 序列设计引物。HSP70 蛋白的引物根据 CA257994 设计, HSP-F: 5'-GAGGGCTAAGTTTGAAGAG-3' 和 HSP-R: 5'-GC-CACCAACAAGAATAACC-3'; 14-3-3 蛋白的引物根据 JN591759 设计, 1433-F: 5'-AGACTGGTGCT-GAGAGGAAG-3' 和 1433-R: 5'-GCCCAAGCCTT-ATCGGATGT-3'; 吡哆醇生物合成蛋白的引物根据 CA184081 设计, PDB-F: 5'-TCGGCATCAACCTC-AACGA-3' 和 PDB-R: 5'-TCGTTGAGGTTGATGC-CGA-3'; 2-半胱氨酸-过氧化物酶的引物根据 CA192512 设计, PRX-F: 5'-CCTTGATTTCACC-TTCGTC-3' 和 PRX-R: 5'-CCTCAGTGTTCAACTT-CTCG-3'; 苹果酸脱氢酶的引物根据 CA248136 设计, MLD-F: 5'-CTCTTCAACATCAACGCCG-3' 和 MLD-R: 5'-GGTAGTCACACCAAACAGC-3'; 内标基因为 *GAPDH* (EF189713), 引物 GAPDHF: 5'-AA-

GGGTGGTGCCAAGAAGG-3' 和 GAPDHR: 5'-C-AAGGGGAGCAAGGCAGTT-3'。实时荧光定量PCR反应与分析参照林生等^[30]的方法。

2 结果和分析

2.1 SoSGT1蛋白的特征分析

利用网站 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam> 对 SoSGT1 蛋白的理化性质进行分析, 结果表明, SoSGT1 蛋白的分子式是 C₁₇₈₅H₂₈₀₁N₄₆₇O₅₇₀S₁₁; 分子量为 40.28 kDa; 理论等电点(pI)为 4.99; 不稳定系数(Instability index)是 39.49, 表明较稳定; 总平均亲水性为 -0.614, 说明是一个疏水蛋白。SoSGT1 蛋白由 20 种氨基酸组成, 其中 Lys (10.2%)、Glu (10.5%)、Ala (12.4%) 的含量最丰富, Cys (0.8%) 的含量最少。

通过 ExPASy 工具中的 Swiss-model 功能, 把果蔗 SoSGT1 蛋白的氨基酸序列生成 PDB 格式的原子坐标, 然后用软件 spdbv 观看 SoSGT1 蛋白的三维立体分子结构(图 1), SoSGT1 蛋白具有 β-折叠与螺旋结构。

利用 NCBI 的 Protein BLAST 对 SoSGT1 蛋白可能具有的功能结构域进行分析。结果表明, SoSGT1 蛋白具有 3 个功能保守结构域(图 2), 分别



图 1 SoSGT1 蛋白的三维结构预测

Fig. 1 Three-dimensional structure prediction of SoSGT1 protein

是 SGS、CS 与 TPR。通过 CBS 的 Profun 软件进行预测分析, SoSGT1 蛋白的功能包括信号转导、结构蛋白、转录调控和离子通道等 14 种(表 1), 其中转录调控、转录、信号转导和生长因子功能的可能性分别为 0.819、0.517、0.478 和 0.449。

2.2 表达载体 pGEX-6p-1-sgt1 的构建

以 pMD-18T-sgt1 质粒为模板, 用引物 sosgt1-up 和 sosgt1-down 通过 PCR 扩增两端含有 *EcoR* I 与 *Xho* I 酶切位点的 *SoSgt1* 基因序列, PCR 产物通过纯化回收后, 用 *EcoR* I 与 *Xho* I 进行双酶切。

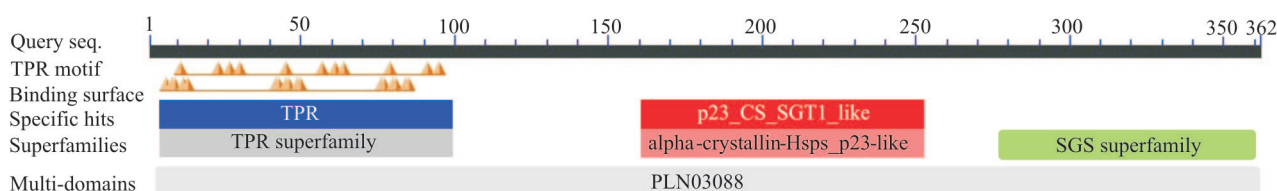


图 2 SoSGT1 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of SoSGT1 protein

表 1 SoSGT1 蛋白功能预测

Table 1 Function prediction of SoSGT1 protein

蛋白功能 Protein function	概率 Probability	可能性 Odds	蛋白功能 Protein function	概率 Probability	可能性 Odds
信号转导 Signal transducer	0.102	0.478	阳离子通道 Cation channel	0.010	0.215
受体 Receptor	0.004	0.021	转录 Transcription	0.066	0.517
荷尔蒙 Hormone	0.001	0.206	转录调控 Transcription regulation	0.102	0.819
结构蛋白 Structural protein	0.003	0.113	胁迫应答 Stress response	0.102	0.095
运载体 Transporter	0.025	0.230	免疫应答 Immune response	0.018	0.215
离子通道 Ion channel	0.009	0.162	生长因子 Growth factor	0.006	0.449
电压门控离子通道 Voltage gated ion channel	0.007	0.315	金属离子转移 Metal ion transport	0.009	0.021

将经过双酶切的 *SoSgt1* 基因连接到同样用 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切的 pGEX-6p-1 质粒上,于 16℃ 连接过夜,连接产物转化到 Rosetta (DE3) 后经氨苄青霉素筛选得到 Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* 阳性克隆菌。用 *EcoR* I 与 *Xho* I 对重组质粒 pGEX-6p-1-*sgt1* 进行双酶切鉴定(图 3),得到约 1000 bp 的片段,表明 pGEX-6p-1-*sgt1* 表达载体构建成功。

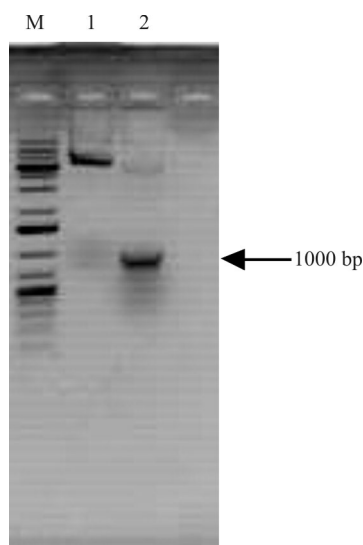


图3 pGEX-6p-1-*sgt1* 重组质粒的酶切验证。M: Marker; 1: 重组质粒; 2: 重组质粒 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切。

Fig. 3 Digestion of recombinant plasmid pGEX-6p-1-*sgt1*. M: Marker; 1: Recombinant plasmid; 2: pGEX-6p-1-*sgt1* digested by *EcoR* I and *Xho* I.

2.3 GST-SoSGT1融合蛋白的表达与纯化

将 Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* 重组菌株与空载体 Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1 菌株分别转入 LB 培养基中,经诱导表达后进行 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳检测。结果表明,诱导表达的重组菌株约在 70 kD 处有明显的条带(图 4),阴性对照空载体菌株没有明显的条带,说明 GST-SoSGT1 融合蛋白能高效正确表达。重组菌株 Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* 经过诱导表达后,在 4℃ 下离心收集菌体,于 PBS 缓冲液中悬浮,冰上破壁 5~10 min 后,于 4℃ 下与 GST 纯化柱结合,经 PBS 缓冲液漂洗和还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱,得到纯化的 GST-SoSGT1 融合蛋白。经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,结果表明在 70 kD 处有单一的条带,说明 GST-SoSGT1 融合蛋白纯化成功(图 4)。

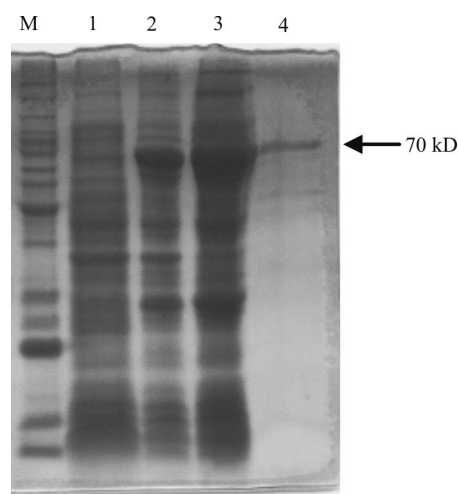


图4 Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* 表达产物的 SDS-PAGE 分析。M: Marker; 1: Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1 总蛋白; 2,3: Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* 总蛋白; 4: GST 纯化蛋白。

Fig. 4 SDS-PAGE assay of Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1* purified products. M: Marker; 1: Total protein of Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1; 2,3: Total protein of Rosetta (DE3)/pGEX-6p-1-*sgt1*; 4: Purified protein by GST.

2.4 SoSGT1互作蛋白的获得与质谱鉴定

将纯化的 GST-SoSGT1 融合蛋白亲和到 GST 柱上,再与甘蔗叶片天然蛋白孵育,经漂洗、洗脱,洗脱液经 SDS-PAGE 检测,分离得到与 GST-SoSGT1 融合蛋白的互作蛋白(图 5)。切取凝胶上的蛋白条带,用胰蛋白酶消化,进行蛋白质质谱分析

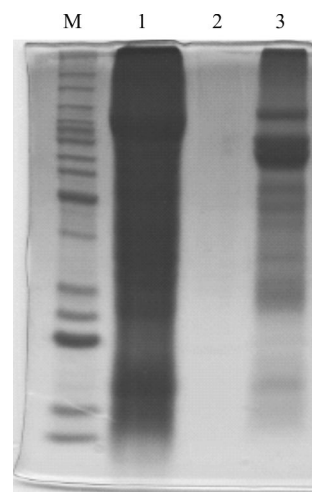


图5 GST pull down SDS-PAGE 电泳检测。M: Marker; 1: 天然蛋白; 2: 天然蛋白与 GST 柱互作; 3: GST-SoSGT1 钩取蛋白。

Fig. 5 SDS-PAGE gel of interaction proteins by GST pull down. M: Marker; 1: Nature protein; 2: Nature protein interacted with GST; 3: GST-SoSGT1 interacted with GST.

及蛋白质数据检索,结果表明含有 SoSGT1 蛋白和 7 个互作蛋白(表 2)。而天然蛋白与 GST 柱孵育后的洗脱液经 SDS-PAGE 检测,没有出现蛋白条带,这也说明 GST pull down 的结果是正确的。

2.5 SoSGT1互作蛋白的编码基因表达

从图 6 中可以看出,果蔗‘福安’叶片中的 HSP70、14-3-3 蛋白、吡哆醇生物合成蛋白(Pyridoxin biosynthesis protein PDX1, PDB)与 2-半胱氨酸-过氧化物酶(2-Cys-peroxiredoxin, PRX)的编码基因受

稍腐病病原菌侵染后被诱导表达,且侵染时间不同其表达量也不同。随侵染时间的延长, HSP70、14-3-3 蛋白与 PRX 的编码基因在叶片中的表达变化相似,都呈现“先上升后下降”的趋势。PDB 编码基因的表达与他们不同,呈逐渐上升的趋势,侵染 72 h 的表达水平与侵染 48 h 的无显著差异。苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MLD)的编码基因在稍腐病病原菌侵染后的表达水平变化不大,侵染不同时间没有显著差异。

表 2 GST pull down 捕捉的 SoSGT1 互作蛋白质谱鉴定
Table 2 Identification of interacted proteins with SoSGT1 by GST pull down

功能 Function	登录号 Accession No.	名称 Name	植物 Species	分子量 (kD) Molecular weight	等电点 PI	得分 Score	覆盖率 Coverage (%)	匹配肽段数 Number of match peptide
信号转导 Signal transduction	GQ864255	SGT1	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	40.3	5.08	89.80	27.90	15
	GQ864256	RAR1	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	24.9	7.74	76.85	22.65	6
	AY744160	Putative 14-3-3 protein	<i>Zea mays</i>	29.0	4.87	19.66	21.72	2
抗逆 Defense	L03299	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	<i>Pisum sativum</i>	75.50	5.22	63.75	10.65	4
	JX992841	Heat shock protein 90	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	80.12	4.90	66.35	9.26	4
	AJ005006	2-Cys-peroxiredoxin	<i>Riccia fluitans</i>	29.8	6.92	18.43	13.53	2
	EQ974076	Pyridoxin biosynthesis protein PDX1	<i>Ricinus communis</i>	29.9	8.16	11.16	5.34	1
能量代谢 Energy metabolism	XM_002441510	Malate dehydrogenase	<i>Sorghum bicolor</i>	35.4	6.09	5.53	4.22	1

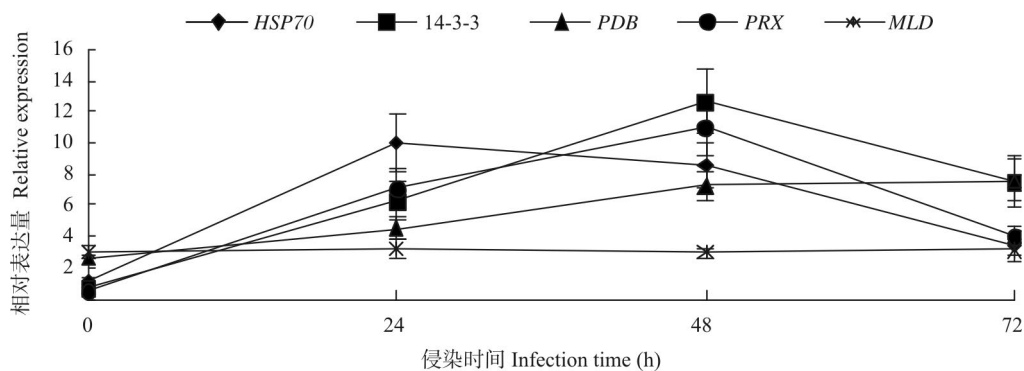


图 6 ‘福安’叶片接种 *Gibberella fujikuroi* 后一些基因的表达。PDB: 吡哆醇生物合成蛋白基因; PRX: 2-半胱氨酸-过氧化物酶基因; MLD: 苹果酸脱氢酶基因。

Fig. 6 Expression of some genes in leaves of ‘Fuan’ inoculated with *Gibberella fujikuroi*. PDB: Pyridoxin biosynthesis protein PDX1 gene; PRX: 2-Cys-peroxiredoxin gene; MLD: Malate dehydrogenase gene.

3 讨论

在农业生产中,作物病害是导致减产的主要因素之一。栽培措施的改进与农药的施用不能从根本上解决作物病害问题,而种植抗病品种被认为是最有效的防治方法。抗病品种的获得往往是通过常规育种与基因工程两种手段。但是常规育种很难在短期内育成具有多基因联合水平的抗性优良品种。通过基因工程将抗病基因转入异源植物具有高效、快速的优点。然而,由于抗病基因所介导的抗病性具有高度专化性,只针对一种病原菌的1个或几个小种,抗病谱比较窄,而且会随着病原菌小种的变异而失去效果。因此,开发广谱的抗病新资源,培育持久抗病新品种是当前的主要任务。

植物抗病反应调控蛋白的编码基因是一类可以作为植物广谱抗病性改良的重要潜在基因资源。在前期工作中,本课题组利用序列拼接方法已获得果蔗 *SoSgt1* 全长序列,比对表明与其它作物 SGT1 蛋白的编码基因存在较高的相似性^[31]。利用梢腐病病原菌 *Gibberella fujikuroi* 接种果蔗叶片后,检测到 *SoSgt1* 基因的转录水平逐渐提高^[31],并且不同果蔗品种受到 *G. fujikuroi* 侵染后呈现差异性表达。通过 CBS 的 Profun 软件对 SoSGT1 蛋白功能进行预测,结果表明 SoSGT1 蛋白具有信号转导、转录、转录调控与生长因子功能的可能性最高,说明了作为一个重要的植物抗病反应调控蛋白,SoSGT1 蛋白可能参与调控果蔗体内的一些抗病防卫反应途径。

目前,蛋白质之间的互作是蛋白功能研究的热点,所采用的研究方法与技术主要是酵母双杂交、免疫共沉淀、GST pull down、Far Western 和计算机预测等^[32]。GST pull down 技术是通过高效表达的谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白作为诱饵蛋白,在体外通过亲和层析来钓取与诱饵蛋白相互作用的蛋白质,是一种行之有效、操作简便的蛋白互作研究方法^[33-35]。本研究将果蔗的 *SoSgt1* 基因构建到 pGEX-6p-1 载体上,获得高效表达的 GST-SoSGT1 融合蛋白后,经 GST 柱与受到 *G. fujikuroi* 侵染的果蔗叶片蛋白进行互作,钓取到 7 个蛋白。这些蛋白的功能主要归类为信号转导、抗逆相关与能量代谢相关蛋白。我们的前期研究中,果蔗品种‘福安’叶片受到 *G. fujikuroi* 侵染后,有 20 个蛋白呈上调表达,4 个下调表达,其中有与果蔗病

理反应的相关蛋白(几丁质酶、热激蛋白与抗病蛋白 RPP1-WsA 等)、抗氧化防卫相关蛋白(过氧化物酶与超氧化物歧化酶)、抗性蛋白(海藻糖-6-磷酸合酶与半胱氨酸蛋白酶)、激酶类蛋白(蛋白磷酸酶 2C 和钙调蛋白激酶)和其它不同代谢途径的蛋白(查尔酮异构酶、乙烯受体、天门冬氨酸转移酶、反转录蛋白与辅酶 II 依赖性苹果酸酶等)^[29]。本研究钓取的一些蛋白功能类似于果蔗与梢腐病病原菌互作时叶片的一些差异表达蛋白,例如热激蛋白(HSP90 与 HSP70)与抗氧化防卫相关蛋白(2-Cys-peroxiredoxin),说明这些蛋白可能与 SoSGT1 蛋白互作,共同参与果蔗防御梢腐病病原菌 *G. fujikuroi* 的病理过程。

在所钓取的蛋白中, RAR1 与 14-3-3 属于信号转导蛋白。有研究表明,SGT1/RAR1/HSP90 在植物免疫体系内以蛋白复合体形式扮演着重要的角色^[16],通过调控与介导使多种 NB-LRR 类的 R 蛋白(Resistance protein)得到正确折叠并保持稳定^[17]。提高小麦(*Triticum aestivum*) *Lr21* 基因对叶锈病的抗性,就需要 *RAR1*、*SGT1* 和 *HSP90* 基因的增强表达^[36]。当果蔗叶片受到梢腐病病原菌 *G. fujikuroi* 侵染时,果蔗的 *SGT1*、*RAR1* 和 *HSP90* 基因的表达量在侵染前期呈上升趋势^[31,37-38]。并且,SoSGT1 蛋白同时钓取到 RAR1、HSP90 和 HSP70 蛋白,说明在果蔗叶片中,SoSGT1 与 RAR1、HSP90 或 HSP70 是以蛋白复合体的形式行使信号元件的功能。另外,14-3-3 蛋白在生物体内也是与其它蛋白互作形成复合体,主要是与已磷酸化的靶蛋白相结合,通过调节靶蛋白与其他结合蛋白间或两个靶蛋白间的相互作用,增强或抑制靶蛋白的催化活性,调节靶蛋白的核浆转运与亚细胞定位等机制来发挥调控作用^[39]。在植物体内,14-3-3 蛋白是一个多基因家族,被认为是一个具有众多复杂功能的调节性蛋白家族,通过多种蛋白互作方法在植物中可以钓取多达 750 多种蛋白^[39],如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 14-3-3 蛋白有 15 个家族成员(包括两个假定基因)^[40]。但是,这些钓取的蛋白中可能有很大一部分是次级互作蛋白,即与 14-3-3 蛋白复合体上的其它蛋白进行互作。在果蔗或糖蔗的基因组中,14-3-3 蛋白的家族成员尚未清楚,对其蛋白功能也知之甚少。本研究通过甘蔗 14-3-3 蛋白的 1 个 EST 序列设计引物,利用 qRT-PCR 初步检测 14-3-3 蛋白编码基因的转录水平,

该基因呈上调表达,表明该基因在梢腐病原菌 *G. fujikuroi* 侵染果蔗叶片时呈诱导表达。

另外,两个与抗逆相关的 2-半胱氨酸-过氧化物酶(2-Cys-peroxiredoxin)与吡哆醇生物合成蛋白(Pyridoxin biosynthesis protein, PDX1)的编码基因也呈上调表达,而归类为能量代谢的苹果酸脱氢酶编码基因的转录水平没有发生变化。Peroxiredoxin (Prx)是一类广泛存在于原核与真核生物体内的过氧化物酶,属于抗氧化蛋白家族,Prx 家族成员根据 Cys 残基的数目及其保守性可划分为 1-Cys Prx、典型 2-Cys Prx 和非典型 2-Cys Prx^[41]。在植物体内, 2-半胱氨酸-过氧化物酶翻译后被转运到叶绿体中,保护光合膜免受氧化损伤^[42-43]。当植物遭遇强氧化作用或热胁迫时,小分子量的 2-半胱氨酸-过氧化物酶会迅速转变为大分子量的蛋白复合物,其功能也相应的从抗氧化蛋白转变为分子伴侣,一方面进行信号传递或是调控下游信号途径,另一方面也可以保护自身免受胁迫伤害^[44]。目前,对于植物 Prx 蛋白的研究主要集中于它们作为抗氧化蛋白、细胞信号转导途径的调节因子与氧化还原过程中的传感器时的不同功能^[45]。而在植物病害生理与分子机制研究中,抗氧化作用蛋白被划分病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PR),如 PR-9 蛋白^[46]。我们的前期研究中,当 *G. fujikuroi* 侵染果蔗叶片时,过氧化物酶与超氧化物歧化酶皆呈上调表达,其编码基因的转录水平也皆呈上调表达^[29-30]。本研究中 2-半胱氨酸-过氧化物酶的编码基因也呈上调表达。吡哆醇生物合成蛋白是维生素 B₆ 代谢途径中的一个关键限速酶,在整个维生素 B₆ 合成过程中起重要作用^[47]。而维生素 B₆ 是所有生物所必需的元素,也是许多代谢途径中的辅酶因子。一些研究表明,维生素 B₆ 还是一种强抗氧化剂^[48]。虽然,吡哆醇生物合成蛋白没有直接参与植物抵抗逆境的生理过程,可能通过调控维生素 B₆ 合成过程间接参与植物抗逆过程中。这些说明 2-半胱氨酸-过氧化物酶与吡哆醇生物合成蛋白也参与了果蔗病理反应过程,但其具体的功能还需要进一步的研究。

综上所述,果蔗 SoSGT 蛋白与 GST 标签构建成融合蛋白,利用 pull down 技术钓取到信号转导、抗逆相关与能量代谢相关蛋白。所钓取的蛋白中,部分蛋白已证明与 SGT 蛋白存在互作关系,并在植物防御病原侵害时调控不同的代谢途径,

如 HSP90 与 RAR1 蛋白。另外一些蛋白虽然未见报道与 SGT1 蛋白有直接的互作关系,但是它们在植物中也可以与其它蛋白互作形成蛋白复合体而行使特定的功能,如 HSP70、14-3-3 蛋白与 2-半胱氨酸-过氧化物酶,因此在后续的研究中,可以利用其它蛋白互作方法对这些蛋白与果蔗 SoSGT1 间的互作关系进行精确的验证。另外,也可以构建 SoSGT1 与其它标签蛋白的融合蛋白,或是构建 SoSGT1 所钓取蛋白与标签蛋白的整合蛋白,通过不同的蛋白互作方法研究其它蛋白在果蔗或糖蔗中参与病理反应的分子机制,从而为甘蔗抗病基因工程获得更多种质资源做一些铺垫工作。

参考文献

- [1] Wu S H, Zhang S H, Lin Y X. Developing Fujian's chewing-cane industry and realizing cycle low carbon agriculture [J]. *Guangxi Trop Agri*, 2010(4): 48-50.
吴松海, 张树河, 林一心. 发展福建省果蔗产业 实现循环低碳农业 [J]. *广西热带农业*, 2010(4): 48-50.
- [2] Lin Y X. Discussion on organic chewing cane development in China [J]. *Sugar Crops China*, 2011(2): 72-74.
林一心. 对我国有机果蔗发展的思考 [J]. *中国糖料*, 2011(2): 72-74.
- [3] Lu G D, Li C C, Pan C Z, et al. Sugarcane diseases in China [J]. *Sugarcane*, 1997, 4(4): 19-23.
鲁国东, 黎常窗, 潘崇忠, 等. 中国甘蔗病害名录 [J]. *甘蔗*, 1997, 4(4): 19-23.
- [4] Li L S. Simple list of common sugarcane diseases [J]. *Fujian Sugarcane*, 2005(2): 29-32.
李腊生. 甘蔗常见病简易检索表 [J]. *福建甘蔗*, 2005(2): 29-32.
- [5] Zhou G H, Xu D L, Shen W K. On sugarcane major diseases and their controlling [J]. *Sugar Cane*, 2005(1): 11-16.
周国辉, 许东林, 沈万宽. 甘蔗重要病害研究及防治策略 [J]. *甘蔗糖业*, 2005(1): 11-16.
- [6] Wang B H. The occurrence status and the research progress of sugarcane disease in China [J]. *Sugar Crops China*, 2007(3): 48-51.
王伯辉. 我国甘蔗病害的发病现状与研究进展 [J]. *中国糖料*, 2007(3): 48-51.
- [7] Feys B J, Parker J E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(10): 449-455.
- [8] Dangl J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 826-833.
- [9] Meur G, Budatha M, Gupta A D, et al. Differential induction of NPR1 during defense responses in *Brassica juncea* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2006, 68(4-6): 128-137.
- [10] Pajeroska-Mukhtar K M, Emerine D K, Mukhtar M S. Tell me

- more: Roles of NPRs in plant immunity [J]. Trends Plant Sci, 2013, 18(7): 402–411.
- [11] Bhaskar P B, Raasch J A, Kramer L C, et al. *Sgt1*, but not *Rar1*, is essential for the *RB*-mediated broad-spectrum resistance to potato late blight [J/OL]. BMC Plant Biol, 2008, 8: 8. doi: 10.1186/1471-2229-8-8.
- [12] Kadota Y, Amigues B, Ducassou L, et al. Structural and functional analysis of SGT1-HSP90 core complex required for innate immunity in plants [J]. EMBO Rep, 2008, 9(12): 1209–1215.
- [13] Chen G S, Zhou Y F, Hou L L, et al. Cloning and characterization of full length cDNA of a CC-NBS-LRR resistance gene in sweet potato [J]. Agri Sci China, 2009, 8(5): 538–545.
- [14] Wu Y L, Yi G J, Peng X X, et al. Systemic acquired resistance in Cavendish banana induced by infection with an incompatible strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. J Plant Physiol, 2013, 170(11): 1039–1046.
- [15] Cuzick A, Lee S, Gezan S, et al. NPR1 and EDS1 contribute to host resistance against *Fusarium culmorum* in *Arabidopsis* buds and flowers [J]. Mol Plant Pathol, 2008, 9(5): 697–704.
- [16] Seo Y S, Lee S K, Song M Y, et al. The HSP90-SGT1-RAR1 molecular chaperone complex: A core modulator in plant immunity [J]. J Plant Biol, 2008, 51(1): 1–10.
- [17] Han S W, Jung H W. Molecular sensors for plant immunity, pattern recognition receptors and race-specific resistance proteins [J]. J Plant Biol, 2013, 56(6): 357–366.
- [18] Hou S, Zhang C, Yang Y, et al. Recent advances in plant immunity: Recognition, signaling, response, and evolution [J]. Biol Plant, 2013, 57(1): 11–25.
- [19] Rochon A, Boyle P, Wignes T, et al. The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines [J]. Plant Cell, 2006, 18(12): 3670–3685.
- [20] Zhou F S, Mosher S, Tian M Y, et al. The *Arabidopsis* gain-of-function mutant *ssi4* requires *RAR1* and *SGT1b* differentially for defense activation and morphological alterations [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21(1): 40–49.
- [21] Li W M, Wang Z X, Jia S R. Over expression of *GbRac1* gene in transgenic tobacco enhances disease resistance to *Alternaria alternata* *in vitro* [J]. J Agri Biotechn, 2004, 12(4): 353–356.
李为民, 王志兴, 贾士荣. 海岛棉*GbRac1*基因过量表达提高转基因烟草离体叶片对赤星病的抗性 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 353–356.
- [22] Wang X J, Dou D L, Wang Z X, et al. Cloning full-length cDNA of *GbNPR1* gene from *Gossypium barbadense* and its expression in transgenic tobacco [J]. Sci Agri Sin, 2006, 39(5): 886–894.
王旭静, 窦道龙, 王志兴, 等. 海岛棉*GbNPR1*基因全长cDNA的克隆及其在烟草中的表达 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 886–894.
- [23] Liao Y, Zhang Z Y, Du L P, et al. Isolation of *RAR1* gene from *Thinopyrum intermedium* and analysis of its function in wheat background [J]. Sci Agri Sin, 2007, 40(8): 1667–1674.
廖勇, 张增艳, 杜丽璞, 等. 中间偃麦草*RAR1*基因的分离及其在小麦背景中的功能分析 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(8): 1667–1674.
- [24] Wang K, Du L P, Zhang Z Y, et al. Isolation and preliminarily functional analysis of *SGT1* gene of *Thinopyrum intermedium* [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(3): 520–525.
王凯, 杜丽璞, 张增艳, 等. 中间偃麦草*SGT1*基因的克隆及其抗病功能的分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(3): 520–525.
- [25] Cai X Z, Xu Q F, Wang C C, et al. Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the *RPS2*-dependent resistance signalling pathways in *Arabidopsis* [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62(1/2): 223–232.
- [26] Shang Y L, Li X Y, Cui H T, et al. RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(50): 19200–19205.
- [27] Yuan Y X, Zhong S H, Li Q, et al. Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility [J]. Plant Biotechn J, 2007, 5(2): 313–324.
- [28] Thao N P, Chen L T, Nakashima A, et al. RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice [J]. Plant Cell, 2007, 19(12): 4035–4045.
- [29] Lin S, Zhou Y F, Chen G S, et al. Molecular responses to the fungal pathogen *Gibberella fujikuroi* in the leaves of chewing cane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. Sugar Techn, 2010, 12(1): 36–46.
- [30] Lin S, Zhou M M, Chen T, et al. The expression analysis of pathogenesis-related protein encoding genes in chewing cane leaves infected by *Gibberella fujikuroi* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2012, 20(2): 141–148.
林生, 周明明, 陈婷, 等. *Gibberella fujikuroi*侵染果蔗叶片病程相关蛋白编码基因的表达分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(2): 141–148.
- [31] Lin S, Pan D R, Zhou Y F, et al. Cloning of *SoSgt1* and construction from chewing cane of antisense vector [J]. J Trop Organ, 2010, 1(1): 1–7.
林生, 潘大仁, 周以飞, 等. 果蔗*SoSgt1*基因的克隆表达与植物反义表达载体的构建 [J]. 热带生物学报, 2010, 1(1): 1–7.
- [32] Wang Y F, Zhang Y, Jia L L. A Guide to the Protein-protein Interaction Experiments [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 1–183.
王玉飞, 张影, 贾雷立. 蛋白质相互作用实验指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 1–183.

- [33] Wang H, Zeng X. Analysing protein-protein interactions using a GST-fusion protein to pull down the interacting target from the cell lysate [J]. *Techn Tips Online*, 2000, 5(1): 26–30.
- [34] Ren L, Chang E, Makky K, et al. Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin [J]. *Anal Biochem*, 2003, 322(2): 164–169.
- [35] Meng Q S, Rao L Q, Pan Y H. Enrichment and analysis of rice seedling ubiquitin-related proteins using four UBA domains (GST-qUBAs) [J]. *Plant Sci*, 2014, 229: 172–180.
- [36] Scofield S R, Huang L, Brandt A S, et al. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2165–2173.
- [37] Lin S, Pan D R, Zhou Y F, et al. Construction of antisense expression vector of *Rar1* fragment and transforming into chewing Cane [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2009, 25(21): 64–68.
林生, 潘大仁, 周以飞, 等. 果蔗*Rar1*基因反义载体的构建及遗传转化初步研究 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(21): 64–68.
- [38] Lin S, Pan D R, Zhou Y F, et al. Electronic cloning and sequencing of *HSP90* gene from chewing cane [J]. *Chin J Trop Crops*, 2009, 30(12): 1824–1830.
林生, 潘大仁, 周以飞, 等. 果蔗*HSP90*基因的电子克隆及序列分析 [J]. *热带作物学报*, 2009, 30(12): 1824–1830.
- [39] de Boer A H, van Kleeff P J M, Gao J. Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(2): 425–440.
- [40] Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, et al. Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes: Expression is demonstrated for two out of five novel genes [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(1): 142–149.
- [41] Kim S Y, Jang H H, Lee J R, et al. Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress [J]. *Plant Sci*, 2009, 177(3): 227–232.
- [42] Baier M, Dietz K J. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: Its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants [J]. *Plant J*, 1997, 12(1): 179–190.
- [43] Dietz K J, Jacob S, Oelze M L, et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(8): 1697–1709.
- [44] Jang H H, Lee K O, Chi Y H, et al. Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function [J]. *Cell*, 2004, 117(5): 625–635.
- [45] Kim M D, Kim Y H, Kwon S Y, et al. Overexpression of 2-cysteine peroxiredoxin enhances tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress and high temperature in potato plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(8): 891–897.
- [46] van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 135–162.
- [47] Li R, Meng X P, Hu Y K, et al. The clone and phylogenetic analysis of pyridoxine biosynthesis gene in *Truncate alfalfa* [J]. *Jiangsu Agri Sci*, 2007(1): 81–84.
李蕊, 孟宪萍, 胡英考, 等. 截形苜蓿吡哆醇生物合成基因的电子克隆和进化分析 [J]. *江苏农业科学*, 2007(1): 81–84.
- [48] Wang H B, Liu D C, Liu C G, et al. The pyridoxal kinase gene *TaPdxK* from wheat complements vitamin B₆ synthesis-defective *Escherichia coli* [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(9): 1053–1060.