

• 药材与资源 •

三七多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因的克隆及表达分析

陈 瑞, 李金晶, 关瑞攀, 杨 野, 葛 锋, 崔秀明, 刘迪秋*

昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

摘 要:目的 克隆三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP) 基因 (PnPGIP) 的全长 cDNA 序列, 分析该基因的表达特性。方法 根据三七中编码 PGIP 的 EST (expressed sequence tag) 序列设计引物, 采用 cDNA 末端快速扩增技术克隆 PnPGIP 基因的全长 cDNA 序列; 用 qRT-PCR 分析 PnPGIP 基因的表达水平。结果 PnPGIP 基因的 cDNA 全长为 1 171 bp, 含有 981 bp 的开放阅读框, 13 bp 的 5'-非翻译区以及 177 bp 的 3'-非翻译区, 编码含 326 个氨基酸的蛋白质, PnPGIP 蛋白的相对分子质量约为 36 770, 等电点约为 5.83; qRT-PCR 分析结果显示, PnPGIP 基因的表达量分别在三七接种茄腐镰刀菌和人参链格孢后 4 h 和 2 h 内迅速上升; 此外, 信号分子茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、乙烯利 (ethylene, ETH)、H₂O₂、水杨酸 (salicylic acid, SA) 处理均能不同程度地诱导 PnPGIP 基因的表达水平。结论 PnPGIP 基因在转录水平响应茄腐镰刀菌和人参链格孢的侵染, 并受几种逆境胁迫相关信号分子的诱导, PnPGIP 基因可能参与三七对茄腐镰刀菌和人参链格孢的防卫反应。

关键词: 三七; 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白; 茄腐镰刀菌; 人参链格孢; 基因克隆; 防卫反应

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)24-4420-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.021

Cloning and expression analysis of polygalacturonase-inhibiting protein gene from *Panax notoginseng*

CHEN Rui, LI Jin-jing, GUAN Rui-pan, YANG Ye, GE Feng, CUI Xiu-ming, LIU Di-qiu

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence of PnPGIP gene encoding polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Panax notoginseng* and analyze the expression levels of PnPGIP. **Methods** Based on *P. notoginseng* expressed sequence tag (EST) encoding PGIP, specific primers were designed and the full-length cDNA of EST was cloned with the method of rapid amplification of cDNA ends (RACE). The expression levels of PnPGIP were analyzed by qRT-PCR. **Results** The full-length cDNA of PnPGIP was 1 171 bp and contained an intact open reading frame (ORF) of 981 bp, a 13 bp 5'-untranslated region (UTR), and a 177 bp 3'-UTR. The deduced amino acid sequence of PnPGIP has 326 amino acid residues which form a 36 770 polypeptide with a calculated pI of 5.83. qRT-PCR analysis indicated that the expression of PnPGIP was quickly induced after inoculation with *Fusarium solani* and *Alternaria panax*, and the highest transcription level was achieved at 4 h and 2 h post inoculation, respectively. Moreover, the expression of PnPGIP was induced in different degrees by methyl jasmonate (MeJA), ethylene (ETH), H₂O₂, and salicylic acid (SA). **Conclusion** PnPGIP responds to *F. solani* and *A. panax* infection in the transcription level, and it is induced by several kinds of adversity stresses related signaling molecules. Therefore, PnPGIP may be involved in defense response of *P. notoginseng* against *F. solani* and *A. panax*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; polygalacturonase-inhibiting proteins; *Fusarium solani*; *Alternaria panax*; gene cloning; defense response

多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIPs) 是一种富含亮氨酸重复序列 (extracellular leucine-rich repeat, eLRR) 的植

物细胞壁糖蛋白, 它能抑制真菌所分泌的多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonases, PGs) 水解植物细胞壁活性, 并在植物体内积累能激活多种防御反应

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560610); 云南省应用基础研究计划项目 (2014FA003)

作者简介: 陈 瑞 (1989—), 女, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学。Tel: 18487094103 E-mail: crsq2010@163.com

*通信作者 刘迪秋 (1979—), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学。Tel: (0871)65920621 E-mail: diqiuliu@126.com

的长链寡聚半乳糖醛酸(oligogalacturonides, OGs),从而抑制真菌的侵染^[1-2]。PGIPs 的结构是由 10 个不完整的 eLRR 组成,每一个 eLRR 由 24 个残基组成,且氨基酸序列通常为 LxxLxxLxLxxNxLt/sgxIPxxLGx^[3],这 10 个 eLRRs 组成 2 个 β -折叠,其中一个 β -折叠(sheet B1)位于 PGIPs 的凹面,其包含的氨基酸残基决定 PGIPs 和 PGs 的相互作用^[4]。

PGIPs 作为一种植物防御蛋白,在植物对病原菌的防卫反应中具有重要作用。病原真菌 *Bipolaris sorokiniana* 侵染小麦 *Triticum aestivum* L. 后,小麦中 Tapgip1 和 Tapgip2 基因的表达水平上调,过表达 Tapgip1 和 Tapgip2 基因的转基因烟草植株在受 *B. sorokiniana* 感染 12 h 时,其对 *B. sorokiniana* 的抗性最强,与野生型烟草相比, Tapgip1 和 Tapgip2 转基因烟草对 *B. sorokiniana* 的抗性分别增加了 22 倍和 16 倍^[5]。油菜 *Brassica napus* L. Bnpgip1 和 Bnpgip2 基因的表达均受死体营养型真菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 的诱导,过表达 Bnpgip1 和 Bnpgip2 的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 植株延迟了 *S. sclerotiorum* 侵染引起的病害症状^[6],过表达 Bnpgip2 的转基因油菜显著减轻了 *S. sclerotiorum* 侵染造成的腐烂症状^[7]。大豆 *Glycine max* (L.) Merr 中 Gmpgip5 和 Gmpgip7 基因的表达也受 *S. sclerotiorum* 诱导, *S. sclerotiorum* 侵染大豆 48 h 时, Gmpgip5 基因的表达量显著增加(大于 1 000 倍),而 Gmpgip7 基因的表达量在 *S. sclerotiorum* 侵染的最初 24 h 内缓慢增加,48 h 时表达水平最高^[8]。此外,表达大豆 Gmpgip3 基因的转基因小麦对分别由病原真菌 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 和 *B. sorokiniana* 引起的全蚀病和根腐病表现出较强抗性,其病害症状分别减轻了 47%~83%和 42%~60%^[9]。

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科(Araliaceae)人参属 *Panax* L. 多年生草本植物,是我国传统的名贵中药材,其主要药用活性成分是三七总皂苷(*Panax notoginseng* total saponins, PNS)。研究表明三七总皂苷具有抗肿瘤、抗病毒、活血祛瘀等多种生物活性,是预防心脑血管疾病的重要药物^[10-11]。随着对三七药用价值的不断研究,其应用范围越来越广泛。然而,三七的生长周期长,一般生长 3 年以上的三七才可入药。此外,三七生长条件极其苛刻,适宜在温暖阴湿的环境下生长,其独特的生长环境易诱发多种病虫害的发生,其中

真菌病害尤为严重。云南文山三七主产区中的三七所遭受的真菌病害主要是根腐病和黑斑病,常年发病率为 5%~20%,严重时高达 60%以上^[12],严重影响了三七的产量。在本实验的前期研究中发现三七根腐病的主要致病菌是茄腐镰刀菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc,黑斑病的主要致病菌是人参链格孢 *Alternaria panax* Whetz,同时还发现,三七感染黑斑病后更容易导致根腐病的发生,所以把这 2 种病害放在一起研究。另外,前期研究还发现外源茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)预处理三七可显著增强三七对茄腐镰刀菌的抗性。MeJA 预处理三七受茄腐镰刀菌侵染过程中,三七根中一个 PGIP 基因的表达量上升,为了深入研究茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号途径介导的三七对茄腐镰刀菌的抗性防卫反应机制,本实验克隆了上述 PGIP 基因的全长 cDNA,并进行了表达特性分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物材料三七购买自文山三七主产区,种于温室中培养,实验所用茄腐镰刀菌和人参链格孢菌株均由本实验室分离、鉴定并保存。

大肠杆菌 DH5 α 感受态购于北京全式金生物科技有限公司,TRIGene 总 RNA 提取试剂盒购自北京 GenStar Biosolutions 公司, NucleoTrap[®] mRNA Midi Kit 购自德国 Macherey-Nagel 公司, SMART RACE cDNA Amplification kit 购自美国 Clontech 公司, pMD18-T 载体购自日本 TaKaRa 公司, GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System 购自美国 Promega 公司,本实验所用的引物及相关测序均在上海生工生物工程有限公司完成,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

选取温室中生长状态良好且株高一致的一年生三七作为待处理材料,处理前用剪刀在三七根部或叶片形成伤口,将供试三七分为 9 组(30 棵/组),每组分别进行以下处理:第 1 组和第 2 组分别采用 100 μ mol/L MeJA 和无菌水(CK)预处理三七根部 30 min,处理方法为蘸根法,然后分别将 MeJA 和无菌水预处理的三七种于陶瓷花钵中,24 h 后同样采用蘸根法接种新鲜的茄腐镰刀菌分生孢子悬液(浓度为 2×10^6 个孢子/mL),接种 30 min 后将 2 组三七移栽至陶瓷花钵中,收集接种后 4、12、24、48、72 h 的三七根;第 3 组和第 4 组分别用活化的

人参链格孢菌丝和无菌水 (CK) 接种三七叶片, 用保鲜膜包裹所接种叶片以保湿, 并在接种 2、12、24、48、72、96 h 时采集三七的叶片; 第 5~9 组分别用 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA、200 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸 (salicylic acid, SA)、1 mmol/L 过氧化氢 (H_2O_2)、1 mmol/L 乙烯利 (ethylene, ETH) 以及无菌水 (CK) 浸泡三七根部 30 min, 然后将这 5 组三七种于花钵中培养, 分别在处理后 4、12、24、48、72 h 时采集三七的根。所有采集的样品经液氮速冻后于 -80°C 保存备用。

1.2.1 RNA 提取及 mRNA 分离 采用 TRIgene 总 RNA 提取试剂盒提取各样品中的总 RNA。取适量上述各样品提取总 RNA, 从各 RNA 样品中取等量混匀, 并按照 NucleoTrap[®] mRNA Midi Kit 说明书从中分离 mRNA, 以分离的 mRNA 为模板逆转录合成 RACE 模板。

依据三七转录组测序产生的 PGIP EST 序列, 设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性引物。5'-RACE 特异性引物为 5'-GAAGGGAGAGTGGAATTGAGCCAT-AGAG-3', 3'-RACE 特异性引物为 5'-CCTCAAGA-GACTTCGGCTTCACAAGATG-3'。RACE PCR 产物经 TA 克隆后连接到 pMD18-T 载体中, 并将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆测序。

1.2.2 三七 PGIP (PnPGIP) 基因全长最大开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的克隆以及生物信息学分析 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的 bl2seq 工具将 PnPGIP 基因的 5'-RACE 扩增序列、3'-RACE 扩增序列与 EST 序列进行拼接, 并利用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 PnPGIP 基因拼接序列中的 ORF。根据拼接的全长 cDNA 序列设计扩增 PnPGIP 基因全长 ORF 的特异引物, 并对全长 ORF 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 TA 克隆后测序。ORF 扩增特异引物序列为 5'-GGAAGACCAATGTTGTT-ACTCCTCT-3' 和 5'-TCCATTGAGTACTAGGGAA-ACCATG-3'。使用 NCBI 中的 BLAST 在线分析工具来分析 PnPGIP 基因及其编码的蛋白质序列的同源性 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。使用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 来完成 PnPGIP 的信号肽序列预测。利用 MEGA6 软件进行多重序列比对和聚类分析。借助 ProtParam (<http://www.au.expasy.org/tools/protpatam.html>) 在线分析工具完成 PnPGIP 理化性质的预测。采用

PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) 在线工具来分析 PnPGIP 的二级结构并进行亚细胞定位预测。PnPGIP 的三维结构分析由 WISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线分析工具完成。

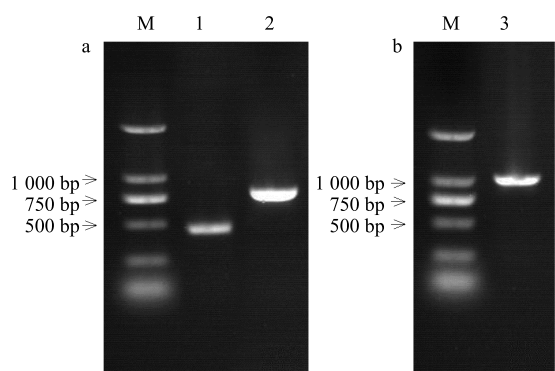
1.2.3 PnPGIP 基因的表达特性分析 采用 qRT-PCR 分析 PnPGIP 基因在三七受茄腐镰刀菌、人参链格孢侵染过程中的表达特性以及是否在转录水平响应 MeJA、 H_2O_2 、SA、ETH 4 种信号分子的处理。以三七 PnACT2 (KF815706.1) 作为内参基因。PnPGIP 基因特异引物为 5'-CATACCTCAAGA-GACTTCGGCTTC-3' 和 5'-AGGGAGAGTGGAAT-TGAGCCAT-3'。内参基因 PnACT2 的特异引物序列分别为 5'-TCCAAGGGT GAATATGATGAATCG-3' 和 5'-AACCTCTCCAAAGAGAATTTCTGAGT-3'。反应体系和条件均参考 GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System。反应条件为 95°C 、2 min; 95°C , 15 s, 60°C 、1 min, 40 个循环; 之后是熔解曲线分析。每个 qRT-PCR 反应均设置 3 次重复, 以正常生长发育三七根中 PGIP 基因的表达量为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 PGIP 基因在其他样品中的相对表达水平。

1.2.4 统计分析 三七受茄腐镰刀菌和人参链格孢侵染以及 MeJA、ETH、 H_2O_2 、SA 处理后, PnPGIP 基因的相对表达水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示。与处理前 (对照) 相比, 处理后 PnPGIP 基因相对表达水平的差异显著性采用 t 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 PnPGIP 基因全长 cDNA 的克隆

基于前期研究中三七转录组测序产生的编码 PGIP 的 EST 序列 (未公开), 通过 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增获得该 EST 的全长 cDNA 序列。RACE 扩增结果如图 1-a 所示, 测序分析显示 5'-RACE 产物长约 464 bp, 3'-RACE 产物长约 804 bp。经过序列拼接获得 PGIP 的全长 cDNA, 序列长 1 171 bp, 其包含一个 981 bp 的 ORF、13 bp 的 5'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 以及 177 bp 的 3'-UTR, ORF 编码一个具有 326 个氨基酸的蛋白质。根据拼接的全长 cDNA 序列设计特异性引物, 成功扩增出了长度为 1 029 bp 包含全长 ORF 的 cDNA (图 1-b)。分别以三七 cDNA 和 DNA 为模板, 用 PnPGIP 基因 ORF 引物进行 PCR, 琼脂糖凝胶电泳检测发现, 分别以三七 cDNA 和 DNA 为模板得到的 PCR 产物片段大小一致, 说明 PnPGIP 基因中不含有内含子。后续的生物信息学分析表明克隆得



M-Marker 1-5'-RACE 扩增产物 2-3'-RACE 扩增产物
3-PnPGIP 基因全长 ORF 的扩增产物
M-Marker 1-amplification product of 5'-RACE 2-amplification product of 3'-RACE 3-amplification product of ORF

图 1 PnPGIP 基因的 RACE 扩增产物 (a) 及其全长 ORF 扩增产物 (b)

Fig. 1 Amplification results of RACEs (a) and full-length ORF of PnPGIP gene (b)

到的 cDNA 序列编码 PGIP 蛋白, 将该基因命名为 PnPGIP, GenBank 登录号为 KU361076。

2.2 序列同源性分析、多重序列比对以及进化树构建

BLASTn 分析表明 PnPGIP 的第 735~989 位核苷酸序列与芝麻 *Sesamum indicum* Linn. PGIP (SiPGIP, XM_011088934.1) 的第 747~998 位核苷酸序列具有 74% 的同源性。BLASTp 分析结果显示 PnPGIP 所编码 PGIP 蛋白与葡萄 *Vitis vinifera* L. PGIP (VvPGIP, XP_010659524.1) 和向日葵 *Helianthus annuus* L. (HaPGIP, AIF27224.1) 的序列同源性较高, 分别为 62% 和 59%。保守结构域分析结果显示, PnPGIP 包含 8 个 LRR 结构域(图 2-a)。此外, PnPGIP 与 HaPGIP、SiPGIP、VvPGIP 以及人参 *P. ginseng* C. A. Mey PGIP (PgPGIP, ACU27355.1) 的多重序列比对见图 2-b, 尽管三七和人参都属于人参属, 但 PnPGIP 与 HaPGIP、SiPGIP、VvPGIP 的蛋白序列同源性较高, 而与

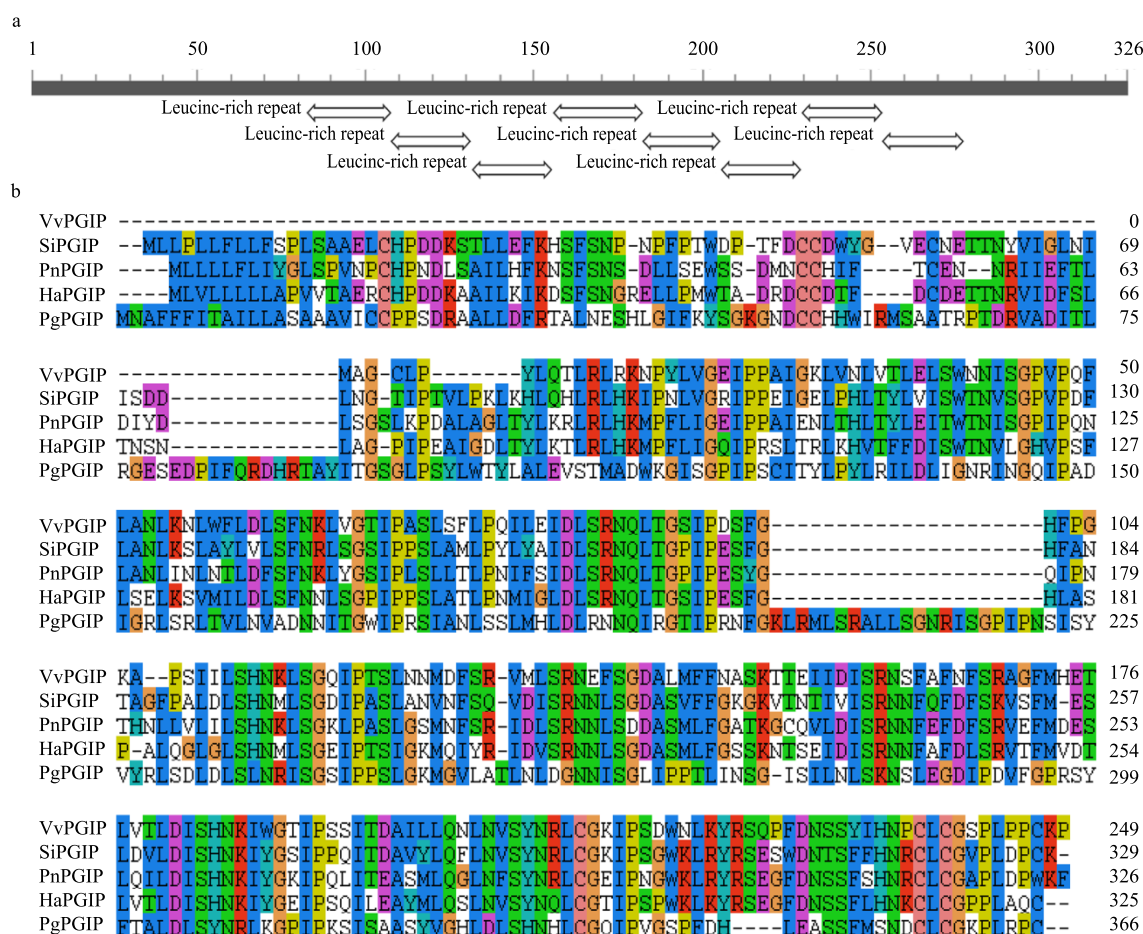
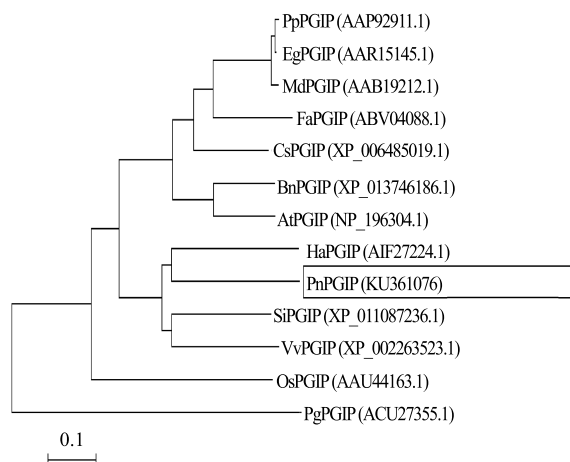


图 2 PnPGIP 蛋白质序列的保守结构域分析 (a) 以及 PnPGIP 与 4 种植物 PGIPs 的多重序列比对 (b)

Fig. 2 Conserved domains analysis of PnPGIP (a) and multiple alignment of amino acid sequence of PnPGIP and four plant PGIPs (b)

PgPGIP 的蛋白序列相似性仅为 30%。PgPGIP 蛋白序列中第 1~4、58~61、80~92 和 201~221 位的氨基酸残基在 PnPGIP 蛋白序列中缺失, 而 PnPGIP 蛋白序列中第 301~304 位的氨基酸残基在 PgPGIP 蛋白序列中缺失。使用 MEGA6 软件对来自于沙梨 *Pyrus pyrifolia* Nakai PGIP (PpPGIP)、巨桉 *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden PGIP (EgPGIP)、苹果 *Malus domestica* Borkh. PGIP (MdPGIP) 等与 PnPGIP 进行多重序列比对, 并构建系统进化树 (图 3)。进化树中 13 个 PGIPs 聚类为 2 大支, 人参 PgPGIP 单独为一支, PnPGIP 和其他 12 个物种的 PGIPs 聚为另一大支。PnPGIP 所在的这一大支又分为 3 小支, 水稻 *Oryza sativa* L. PGIP (OsPGIP) 单独为一小支, PnPGIP、HaPGIP、SiPGIP、VvPGIP 聚为一小支, 其余 7 个 PGIPs 聚为一小支。进化树分析结果再次表明 PnPGIP 与 HaPGIP、SiPGIP、VvPGIP 具有很高的同源性。



PnPGIP 用方框标识; 括号内分别为各物种 PGIPs 的登录号

PnPGIP is indicated with frame; GenBank numbers of plant species PGIPs are given in parentheses, respectively

图 3 PnPGIP 与几种植物 PGIPs 的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of PnPGIP and several plant PGIPs

2.3 PnPGIP 编码蛋白质的理化性质及信号肽预测

利用 ProtParam 在线工具预测 PnPGIP 的理化性质, 结果显示 PnPGIP 的相对分子质量约为 36 770, 等电点约为 5.83。该蛋白在酵母和大肠杆菌中的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。SignalP 4.1 分析结果表明 PnPGIP 中存在信号肽, 剪切位点位于第 16 和第 17 个氨基酸残基之间。去掉信号肽的成熟 PnPGIP, 相对分子质量约为 34 980, 等电点为 5.84。此外, PredictProtein 预测 PnPGIP 蛋白质可能定位

于细胞质膜。

2.4 PnPGIP 编码蛋白质的二级结构及三维结构预测

根据 PredictProtein 分析结果, PnPGIP 蛋白具有 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲, 它们所占的百分比分别为 26.38%、11.66%和 61.96%。其二级结构中共包含 13 个 α -螺旋和 23 个 β -折叠。蛋白质的三级结构在很大程度上决定了蛋白质的功能, 为了研究 PnPGIP 的结构和功能之间的关系, 以菜豆 *Phaseolus vulgaris* L. PvPGIP2 (1OGQ_A) 为模板构建了 PnPGIP 的三维模型, PnPGIP 与 PvPGIP2 的氨基酸序列相似性为 42.09%。PnPGIP 的主链信息和折叠模式与 PvPGIP2 的结构特征高度相似。在 PnPGIP 的三维结构中, 在中心 LRR 结构域的凹面有一条长的 β -折叠, 在蛋白质的凸面有一系列 3_{10} 螺旋, 另外, 还有一条延伸的 β -折叠与其前面的二级结构连接 (图 4)。

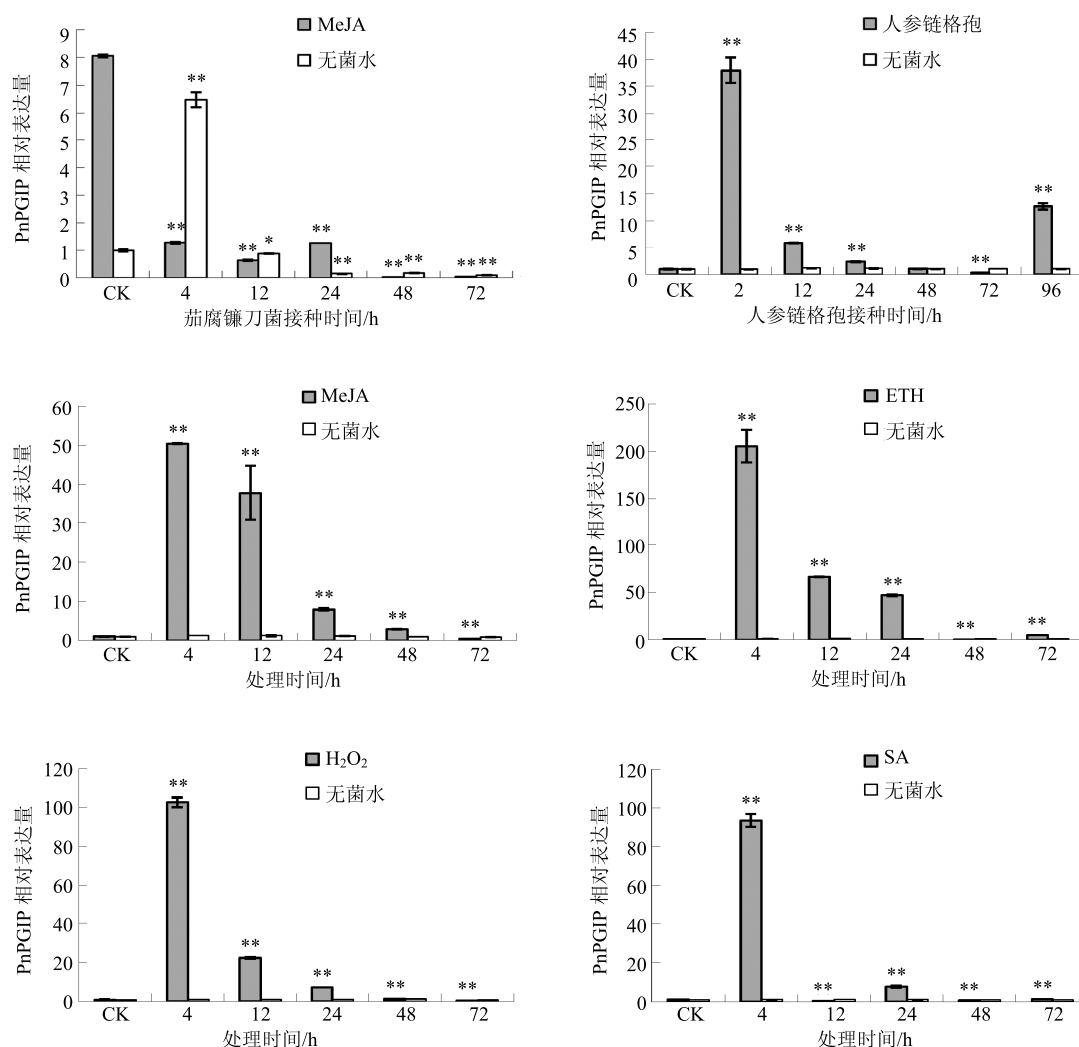


图 4 PnPGIP 的三维结构模型

Fig. 4 Putative 3D structure of PnPGIP

2.5 PnPGIP 基因的表达特性分析

前期研究发现 MeJA 预处理三七根部明显提高三七对茄腐镰刀菌的抗性, 本实验采用 qRT-PCR 对 PnPGIP 基因在 MeJA 和无菌水预处理三七受茄腐镰刀菌侵染过程中的表达变化进行了分析。无菌水预处理三七 (CK) 接种茄腐镰刀菌后, PnPGIP 基因的表达量急剧上升, 并在 4 h 时, 其表达量达到最高水平, 约为接种前的 5 倍, 之后表达量急剧降低, 到 72 h 时, 只能检测到微弱的表达量; PnPGIP 基因的表达受外源 MeJA 诱导, MeJA 预处理三七 24 h 后 PnPGIP 基因的转录水平大幅度提高, 接种茄腐镰刀菌后 12 h 内, MeJA 预处理三七中 PnPGIP 基因的表达量逐渐降低, 12 h 后 PnPGIP 基因的表达量又缓慢上升, 24 h 后表达量又迅速下降 (图 5)。



*表示与接种（处理）前差异显著（ $P < 0.05$ ），**表示与接种（处理）前差异极显著（ $P < 0.01$ ）

*indicated significant difference ($P < 0.05$) compared with controls (before inoculation/treatment), **indicated highly significant difference ($P < 0.01$) compared with controls (before inoculation/treatment)

图 5 茄腐镰刀菌和人参链格孢感染过程中及 MeJA、ETH、 H_2O_2 、SA 处理后 PnPGIP 基因的表达水平

Fig. 5 Expression levels of PnPGIP during *F. Solani* and *A. panax* infection as well as after treatment by MeJA, ETH, H_2O_2 , and SA

同时还分析了 PnPGIP 基因在人参链格孢感染三七和 4 种信号分子 JA、ETH、 H_2O_2 、SA 处理三七后的表达水平。人参链格孢接种三七后，PnPGIP 基因的表达量急剧上升，在接种后 2 h 时达到最高水平，约为正常表达水平的 19 倍，随后表达量逐渐降低，到 96 h 时表达量又大幅上升，约为接种前表达量的 7 倍。4 种信号分子 JA、ETH、 H_2O_2 、SA 处理三七均会迅速诱导三七根中 PnPGIP 基因的表达，并且 PnPGIP 基因的表达量均在处理后 4 h 时达到最高水平，但 PnPGIP 基因受这 4 种信号分子的诱导程度不同，ETH 最高， H_2O_2 和 SA 次之，

而 MeJA 的诱导幅度最低(图 5)。综上所述，PnPGIP 基因在转录水平响应茄腐镰刀菌和人参链格孢的感染，并受几种逆境胁迫相关信号分子的诱导，PnPGIP 基因可能参与三七对茄腐镰刀菌和人参链格孢的防卫反应。

3 讨论

本研究从三七中分离了 1 种新的 PGIP 基因，PnPGIP 基因的全长 ORF 为 981 bp，编码含有 326 个氨基酸的蛋白质，该蛋白质的序列与来自于向日葵和葡萄的 PGIP 序列有较高的同源性。PnPGIP 具有 8 个保守的 LRR 结构域，多重序列比对显示位于

LRR 结构域的残基比其他位置的残基更加保守,在与 PG 配体结合的亲和性和特异性方面,PGIP 的 LRR 结构域起关键作用^[13]。尽管人参 PgPGIP 以及三七 PnPGIP 的一级结构相似性较低,但三级结构模型上,人参 PgPGIP 以及三七 PnPGIP 均与菜豆 *P. vulgaris* L. PvPGIP2 高度相似^[14]。不同物种 PGIPs 的 3D 结构的高度保守性表明 PGIP 家族在进化过程中高度保守,这种保守的结构对于维持 PGIP 的功能是必需的。

在单子叶植物和双子叶植物中,PGIPs 是与细胞壁相连的糖蛋白,生物信息学分析表明 PnPGIP 中具有 6 个 N-糖基化位点。来自于西洋梨 *Pyrus communis* L. 的 PGIP 有 7 个 N-糖基化潜在位点,其中一些位点只被 N-糖基化所修饰,而其他位点可以被多糖糖基化和非糖基化共同修饰^[15],这表明糖基化修饰对于维持蛋白质的结构和功能至关重要,尤其在蛋白质和蛋白质相互作用方面起重要作用。PnPGIP 中富含的糖基化修饰可能参与 PnPGIP 与真菌分泌的 PGs 之间的相互作用。以前的研究表明葡萄 VvPGIP1 对葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 有较高的抗性^[16],在系统发育树中,PnPGIP 与 VvPGIP 基因位于相近的位置,暗示 PnPGIP 可能也具有抗真菌活性。

PGIPs 是重要的植物防卫蛋白质,大量研究结果表明 PGIPs 能有效地抑制真菌入侵,且 PGIP 的表达水平与植物对真菌的抗性相关联^[17]。OGs、JA、ETH、SA、机械损伤、真菌侵染等因素均不同程度地诱导 PGIPs 基因的表达水平。桃 *Prunus persica* L. Batch 经外源水杨酸处理后,与对照组相比,其 PPGIP1 基因的表达水平明显增加^[18]。拟南芥 PGIP2 的表达受伤口、茉莉酸和 *B. cinerea* 侵染的诱导,过表达 *Atpgip2* 的拟南芥植物不仅减少了由 *B. cinerea* 引起的病害症状^[19],同时还降低了对半活体营养型病原真菌 *Fusarium graminearum* Petch 的敏感性^[20],相反地,由反义 *Atpgip* 引起的基因沉默导致拟南芥对 *F. graminearum* 的敏感性增加^[21]。PvPGIP2 基因的表达不仅受伤害、SA、葡聚糖和 OGs 等的诱导^[17],还受茉莉酸处理的诱导,外源 MeJA 处理菜豆后,PvPGIP1、PvPGIP2、PvPGIP3 基因的表达量均显著增加,并且增强了菜豆对 *S. sclerotiorum* 的抗性^[22]。本实验中,qRT-PCR 分析表明在接种茄腐镰刀菌和人参链格孢后 PnPGIP 基因在三七根中的表达量迅速上升,且分别在接种后 4 h 和 2 h 表达量增加至正常水平的 7 倍和 19 倍,

暗示 PnPGIP 基因可能参与三七应对茄腐镰刀菌和人参链格孢入侵的防卫反应。同时 PnPGIP 基因的转录水平明显受到信号分子 MeJA、ETH、H₂O₂ 以及 SA 的诱导。本实验的前期研究发现 MeJA 预处理三七根部能明显增强三七对茄腐镰刀菌的抗性,本实验分离的三七 PnPGIP 基因响应 MeJA 预处理,可能参与 JA 信号途径介导的三七对茄腐镰刀菌的抗性机制。

PGIPs 是一类与植物自身免疫相关的多功能蛋白,通过抑制病原真菌的 PGs 活性来提高植物对真菌的抗性,在植物抵御病原菌侵染的防卫反应中扮演着重要角色。本研究结果表明,PnPGIP 基因参与三七对茄腐镰刀菌和人参链格孢的防卫反应,因此有必要对其功能以及生物学活性进行深入分析。接下来,本课题组将构建 PnPGIP 基因的原核表达载体,分析 PnPGIP 重组蛋白的活性以及对不同真菌 PGs 的识别特性,并采用反向遗传学的方法验证 PnPGIP 基因的生物学功能。

参考文献

- [1] De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39: 313-335.
- [2] 李文娟,刘迪秋,葛峰,等.多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的结构、功能以及应用研究进展[J].*生物学杂志*, 2010, 27(5): 77-80.
- [3] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6): 725-732.
- [4] Di Matteo A, Federici L, Mattei B, et al. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense [J]. *PNAS*, 2003, 100(17): 10124-10128.
- [5] Janni M, Bozzini T, Moscetti I, et al. Functional characterisation of wheat *Pgip* genes reveals their involvement in the local response to wounding [J]. *Plant Biol*, 2013, 15(6): 1019-1024.
- [6] Bashi Z D, Rimmer S R, Khachatourians G G, et al. *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor proteins inhibit *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants [J]. *Can J Microbiol*, 2013, 59(2): 79-86.
- [7] Huang F H, Guan C, Jin F, et al. Prokaryotic expression and protein function of *Brassica napus* PGIP2 and its

- genetic transformation [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 8(2): 171-181.
- [8] Kalunke R M, Cenci A, Volpi C, *et al*. The pgip family in soybean and three other legume species: evidence for a birth-and-death model of evolution [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 189-200.
- [9] Wang A, Wei X, Rong W, *et al*. GmPGIP3 enhanced resistance to both take-all and common root rot diseases in transgenic wheat [J]. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(3): 375-381.
- [10] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [11] 贺旭, 葛金文, 邓长青, 等. 三七总皂苷抑制大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1337-1344.
- [12] 蒋妮, 覃柳燕, 叶云峰. 三七病害研究进展 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(9): 1070-1074.
- [13] Leckie F, Mattei B, Capodicasa C, *et al*. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): A single amino acid substitution in the solvent-exposed beta-strand/beta-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability [J]. *EMBO J*, 1999, 18(9): 2352-2363.
- [14] Sathiyaraj G, Srinivasan S, Subramaniam S, *et al*. Polygalacturonase inhibiting protein: Isolation, developmental regulation and pathogen related expression in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(7): 3445-3454.
- [15] Lim J M, Aoki K, Angel P, *et al*. Mapping glycans onto specific N-linked glycosylation sites of *Pyrus communis* PGIP redefines the interface for EPG: PGIP interactions [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 673-680.
- [16] Joubert D A, Slaughter A R, Kemp G, *et al*. The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases [J]. *Transgenic Res*, 2006, 15(6): 687-702.
- [17] D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, *et al*. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2424-2435.
- [18] Liang F S, Zhang K C, Zhou C J, *et al*. Cloning, characterization and expression of the gene encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) of peach [*Prunus persica* (L.) Batch] [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(2): 481-486.
- [19] Ferrari S, Vairo D, Ausubel F M, *et al*. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 93-106.
- [20] Ferrari S, Sella L, Janni M, *et al*. Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum* [J]. *Plant Biol*, 2012, 14(1): 31-38.
- [21] Ferrari S, Galletti R, Vairo D, *et al*. Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana* AtPGIP1 gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19(8): 931-936.
- [22] Oliveira M B, Junior M L, Grossi-de-Sá M F, *et al*. Exogenous application of methyl jasmonate induces a defense response and resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean plants [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 182: 13-22.