

密级：

论文编号：

中国农业科学院

学位论文

灰葡萄孢菌 35kDa 激活蛋白的纯化 及其 cDNA 文库构建

Purification of 35kDa Activator Protein from *Botrytis cinerea* and the cDNA library Construction

硕士研究生：武晓丽

指导教师：邱德文 研究员

申请学位类别：理学硕士

专 业：生物化学与分子生物学

研 究 方 向：蛋白药物工程

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院
植物保护研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Master Dissertation

**Purification of 35kDa Activator Protein from *Botrytis cinerea*
and the cDNA library Construction**

Candidate: WuXiaoli

Advisor: Prof. Qiu Dewen

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Specialty: Biopesticide Engineering

Institute of Plant Protection
Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

基金来源声明

本学位论文是国家“863”计划（项目编号：2006AA10A210）
和国家“973”计划（项目编号：2003CB114204）的部分内容。

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

激活蛋白 (Activator Protein) 是一类源于真菌的新型蛋白激发子, 前期研究发现该蛋白激发子具有诱导植物抗性和促进植物生长的作用。本研究以灰葡萄孢菌为实验材料, 首次从中提取出一种分子量为 35kDa 的激活蛋白, 生物活性测定表明, 该蛋白可显著提高烟草悬浮细胞过氧化氢含量的增加, 并可促进豌豆幼苗生长, 提高番茄对灰霉病的抗性。灰葡萄孢菌源激活蛋白的发现丰富了激活蛋白家族, 为激活蛋白作用机理的深入研究奠定了基础。

1. 首次利用 AKTA (GE explorer 10) 纯化出灰葡萄孢菌激活蛋白: 先经 Hitrap Q FF 离子交换柱层析, 再利用 HitrapSuperdex 75 分子筛层析进一步纯化; 经 SDS-PAGE 电泳检测得到 35kDa 的单一条带, 该蛋白可显著促进烟草悬浮细胞过氧化氢含量的增加, 说明利用该方法可分离出灰葡萄孢菌激活蛋白。质谱鉴定出三条肽段信息: 该纯化蛋白的两条肽段 NILFVINQPEVYK, SPTSNTYIVFGEAK 与脉孢菌的肽段 2-3 高度相似, 同时, 肽段序列 SPTSPTYVIFGEAK 与水稻 alpha-NAC 蛋白 gi|46575976 保守序列相同; 肽段 ESTLHLVLR 经比对与泛素化蛋白 gi|2551 中多肽序列同源。
2. 生物活性检测结果首次证明了该蛋白不仅能促进豌豆幼苗的生长; 还可有效抑制番茄灰霉病, 结果表明, 经灰葡萄孢菌激活蛋白处理的幼苗叶片病指由 16.02 下降到 7.31, 病叶率降低 21%, 控制效果达 50.51%; 此外, 研究发现, 该蛋白还可诱导豌豆幼苗的醇脱氢酶活性的提高, 说明灰葡萄孢菌激活蛋白可增强植物的抗涝性。
3. 成功利用磁珠构建出灰葡萄孢菌cDNA文库: 得到库容总量为 8.8×10^7 , 滴度为 8.8×10^6 cfu/ml, 阳性克隆率为 98.6%, 平均插入片段大小超过 1200bp 的高质量cDNA文库。
4. 用简并引物通过 PCR 扩增灰葡萄孢菌总 cDNA, 得到 261bp 的基因片断, 待验证其可靠性后, 下一步实验再将其作为探针, 从 cDNA 文库中调取全长基因, 为获得灰葡萄孢菌激活蛋白全长编码基因奠定了基础。

关键词: 灰葡萄孢菌; 激活蛋白; 纯化; 活性检测; cDNA 文库;

Abstract

Activator Protein is a kind of newly discovered proteinaceous elicitor isolated from fungi. Previously studies have demonstrated that it is not only able to increase plant growth but also could induce resistance to pathogen. This study reported the purification and characterization of a 35kDa proteinaceous elicitor isolated from *Botrytis cinerea*. Meanwhile, the cDNA library of *Botrytis cinerea* was constructed and a probe was obtained for cloning the full-length gene in future.

1. A series of purification procedures of this proteinaceous elicitor with AKTA (GE explorer 10) were set up: the crude protein extraction was first eluted through HitrapQFF ion exchange chromatography and then purified with HitrapSuperdex 75 column; a signal band of 35kDa protein was shown in SDA-PAGE gel, this pure 35kDa protein is able to trigger production of H₂O₂ in tobacco suspension cells. Mass spectrogram analysis showed that the amino acid sequence of NILFVINQPEVYK, SPTSNTYIVFGGEAK is highly similar with that of *Neurosporacrassa* peptide 2-3; in addition, this purified protein has highly homologous part with conservative sequence of alpha-NAC, amino acid sequence of SPTSPTYVIFGEAK is totally homologous with conservative sequence of alpha-NAC protein gi|46575976 in rice; meanwhile, sequence ESTLHLVLR is homologous with ubiquitination protein gi|2551.
2. Bioactivities test results confirmed that this pure protein could increase pea seedling growth as well as enhance resistance to gray mold efficiently, after treatment with pure protein, the disease index decreased from 16.02 to 7.31, the rate of disease leaves declined by 21% and defensive effect reached 50.51%. In addition, the pure protein could also increase alcohol dehydrogenase of pea seedling. It is implied that this protein is also able to enhance plant resistance to water stress.
3. Total RNA of *Botrytis cinerea* was isolated to construct cDNA library by using of magnetic bead. The average capacity of the cDNA library is about 8.9×10^7 , titer reached 8.9×10^6 cfu/ml, and the average length of cDNA inserts was over 1200bp. These results demonstrated that a high quality cDNA library was constructed successfully for gene cloning.
4. A 261bp nucleic acid sequence was amplified from cDNA by PCR amplification. It could be act as a probe to acquire the full-length gene of activator protein from *Botrytis cinerea* cDNA library.

Key Words: *Botrytis cinerea*; Activator Protein; Purification; Bioactivities; cDNA library;

目 录

第一章 文献综述.....	1
1.1 蛋白激发子的种类及研究现状.....	1
1.1.1 过敏蛋白 Harpin.....	1
1.1.2 激发素 Elicitin.....	2
1.1.3 激活蛋白 Activator Protein.....	3
1.2 激发子诱导植物获得抗性的机制及早期事件.....	4
1.2.1 植物抗病性反应机制.....	4
1.2.2 激发子诱导植物抗性发生的早期事件.....	5
1.3 cDNA 文库的构建方法研究进展.....	9
1.3.1 固相 cDNA 文库构建法.....	9
1.3.2 oligo-capping 法.....	10
1.3.3 Cap-trapper 法.....	10
1.3.4 SMART 法.....	11
1.3.5 CAPture 法.....	11
1.3.6 利用体外特异位点重组反应构建 cDNA 文库.....	12
1.4 研究目的与意义.....	12
第二章 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化及生物活性测定.....	14
2.1 材料.....	14
2.1.1 菌种和植物材料.....	14
2.1.2 实验试剂.....	14
2.1.3 培养基及缓冲液的配制.....	14
2.1.4 实验仪器.....	15
2.2 方法.....	16
2.2.1 灰葡萄孢菌的培养.....	16
2.2.2 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化.....	16
2.2.3 样品的制备及电泳.....	16
2.2.4 烟草愈伤组织和悬浮细胞的获得.....	17
2.2.5 纯化过程各个步骤得到的激活蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响.....	17
2.2.6 纯化蛋白的鉴定氨基酸序列测定.....	17
2.2.7 灰葡萄孢菌激活蛋白的生物活性测定.....	17
2.3 结果与分析.....	18
2.3.1 灰葡萄孢菌最适培养基的确定.....	18

2.3.2 烟草愈伤组织和悬浮细胞的获得	19
2.3.3 灰葡萄孢菌激活蛋白的分离纯化及纯化蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响	20
2.3.4 质谱鉴定纯化蛋白及氨基酸序列测定	22
2.3.5 激活蛋白生物活性测定结果	24
2.4 小结与讨论	26
第三章 灰葡萄孢菌 cDNA 文库的构建及基因克隆	29
3.1 材料	29
3.1.1 菌株和载体	29
3.1.2 主要试剂	29
3.1.3 缓冲液配制	29
3.1.4 主要实验仪器及耗材	30
3.2 试验方法	30
3.2.1 灰葡萄孢菌总 RNA 的提取	30
3.2.2 用磁珠 PCR 法获得灰葡萄孢菌总 cDNA	30
3.2.3 灰葡萄孢菌 cDNA 文库的构建	33
3.2.4 文库滴度检测与保存	34
3.2.5 灰葡萄孢菌激活蛋白基因的克隆	35
3.3 结果与分析	37
3.3.1 总 RNA 的提取	37
3.3.2 cDNA 合成与纯化	38
3.3.3 cDNA 文库滴度与重组效率	38
3.3.4 基因的克隆	39
3.4 小结与讨论	40
第四章 全文结论	42
参考文献	43
致谢	51
作者简介	52

第一章 文献综述

1.1 蛋白激发子的种类及研究现状

蛋白激发子是病原菌-植物相互识别的重要信号分子,被激发子诱导后,相关的植物防御基因可迅速地得到表达,经过一系列反应过程诱导抗性。蛋白类激发子作为一种新型微生物农药具有传统农药所不具备的特点和优势,传统生物农药是直接作用于防治对象(病原菌),而蛋白激发子在体外不表现杀菌作用,仅通过启动植物体内的防御机制而在抗病性中发挥作用,诱导植物本身的抗病基因或防卫反应基因的表达从而达到抗病、促进生长的作用。因此在当前化学防治造成严重生态恶化、抗病育种无法解决抗性不稳定等难题的情况下,蛋白激发子将成为农业生态系统中病害控制的新思路(赵淑清&郭剑波,2003)。蛋白激发子多年来得到了国内外的广泛关注与研究,目前发现的植物蛋白激发子大体上分为以下几类:过敏蛋白 Harpin、激发素 Elicitin 以及本实验室新近分离纯化得到的激活蛋白 Activator Protein。

1.1.1 过敏蛋白 Harpin

1992年,美国 Cornell 大学韦忠民博士等人首次报道了植物病原欧氏杆菌 hrp 基因,试验人员从梨火疫病的病原细菌(*Erwinia amylovora*)中分离到一种由 hrp 基因编码的约 44KD、能激发 HR 的蛋白类激发子 Harpin(常用 HarpinEa 表示),继而对细菌产生的 Harpin 蛋白的研究广泛开展,近年来,有很多关于 Harpin 的报道,见表 1-1

表 1-1 已报道的过敏蛋白(Harpin)

Table 1-1 Harpin proteins and their encoding genes				
蛋白名称	来源	编码基因	分子量	参考文献
Harpin _{Ech}	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>hrpNEch</i>	36kD	Bauer D W <i>et al.</i> , 1995
Harpin _{Ecc}	<i>E. c. pv. carotovora</i>	<i>HrpNEcc</i>	36kD	Mukherjee A <i>et al.</i> , 1997
Harpin _{Ea}	<i>E. amylovora</i>	<i>hrpNEa</i>	44kD	Wei Z M <i>et al.</i> , 1992
HrpW	<i>E. amylovora</i>	<i>hrpW</i>	42.9 kD	Charkowski A O <i>et al.</i> , 1998
HrpW	<i>E. amylovora</i>	<i>hrpW</i>	54kD	Gaudriault S <i>et al.</i> , 1998
HrpW	<i>P.s. pv. tomato</i>	<i>hrpW</i>	42.9kD	Charkowski A O <i>et al.</i> , 1998
Harpin _{Pss}	<i>P.s. pv. syringae</i>	<i>hrpZ</i>	34.7kD	Preston G <i>et al.</i> , 1995
Harpin _{Psg}	<i>P. s. pv. glycinea</i>	<i>hrpZ</i>	35.3kD	Preston G <i>et al.</i> , 1995
Harpin _{Pst}	<i>P. s. pv. tomato</i>	<i>hrpZ</i>	36.5kD	Preston G <i>et al.</i> , 1995

PopA1	<i>Rolatonia Solaniciarium</i>	<i>popA1</i>	38kD	Arlat M <i>et al.</i> , 1994
HrpA1	<i>X. o. pv. vesicator</i>	<i>hrpA1</i>	64kD	Wengeling K <i>et al.</i> , 1996
HrfA _{Xoo}	<i>X. o. pv. oryzae</i>	<i>hrpAXoo</i>	15.3kD	闻伟刚 等, 2001
HrfAXoo	<i>X. o. pv. oryzicola</i>	<i>hrpA</i>	15.6kD	闻伟刚 等, 2001

对目前分离获得的 Harpin 蛋白研究表明, Harpin 蛋白具有亲水性, 富含甘氨酸, 缺少半胱氨酸, 无四级结构, 对热稳定。Harpin 蛋白分子经 100℃处理 10min, 诱导非寄主产生 HR 的能力不会丧失, 但对蛋白酶及紫外线敏感(Wei *et al.*, 1992; Bauer *et al.*, 1995; He, 1996)。

Harpin 蛋白能诱导烟草、马铃薯、番茄、矮牵牛、大豆、黄瓜、辣椒以及拟南芥菜等多种植物的多个品种产生过敏反应(王钧, 1995; He *et al.*, 1993), 其本身又是寄主植物的一种致病因子(王金生, 1999; He *et al.*, 1993), 从病原菌中清除其基因, 会降低或完全消除病原菌对寄主的致病力和诱导非寄主产生过敏反应的能力。Harpin 的作用机理与常用农药相比, 主要有两点显著区别: 1. 对病原生物和害虫没有毒性, 不能直接杀菌防病和杀虫, 而是靠提高植物自身的免疫力和植株的素质抵御病虫害危害和其他不良影响; 2. Harpin 不是激素, 也不含激素, 但是有激素的作用。Harpin 蛋白作为一种信号物质和植物表面受体接触后, 产生的信号传入植物体内起生长调节作用, 它是一种非特异性激发子, 多种植物都存在接受它的信号的受体, 通过信号传导系统诱导植物产生广谱性诱导抗病性及促进生长的生理效应(梁元存等, 2001)。

1.1.2 激发素 Elicitin

Elicitin 是一种来源于疫霉菌的抗病信号传导蛋白, 自从发现以来, 一直是植物病理学和分子生物学的研究热点之一。随着 elicitin 研究的深入, 新的 Elicitin 蛋白不断被发现, 同时其生物活性也逐步被阐明。迄今为止已发现 17 种疫霉菌中存在 Elicitin 活性蛋白(Pernollet *et al.*, 1993), 根据其等电点和烟草的防御反应可分为 α -elicitin(酸性)和 β -elicitin(碱性)两类, 两种类型 Elicitin 蛋白的氨基酸序列同源性达到 60%以上(Ricci *et al.*, 1989)。

大部分 Elicitin 蛋白的氨基酸序列高度相似和保守, 蛋白质前体含 19 或 20 个氨基酸的信号肽, 成熟蛋白质含 98 个氨基酸, 分子量一般为 10 kD, 只有少数 Elicitins 略有不同(Kamoun *et al.*, 1993)。Elicitin 中有 6 个保守的半胱氨酸形成 3 对二硫键, 使 Elicitins 成球状(Boissy *et al.*, 1996)。通过比较 2 种 α -Elicitin (capsicein and parasiticein)与 2 种 β -Elicitin(cryptogein and cinnamomin)的结构发现, α -Elicitin 第 13 位的氨基酸是缬氨酸, 而 β -Elicitin 在此位上是赖氨酸(Ricci *et al.*, 1989), 因此 β -elicitin 有更高的亲水性, 更易溶解。两种类型蛋白引发可见防御反应所需的浓度有很大差别, β -elicitin 在低于 100pmol/ml 的浓度即可引发可见反应, 而 α -elicitin 引起可见反应的浓度为 10 nmol/ml(Ricci *et al.*, 1989)。

Elicitin 能诱导烟草和十字花科的油菜, 萝卜等发生过敏反应及系统性抗性防御反应, 以避免进一步感染(Kamoun *et al.*, 1993)。研究证明, Elicitin 是通过水杨酸介导抗病信号途径, 激发

植物获得系统性抗性(SAR),同时产生活性氧自由基、脂过氧化物、植保素(PA)、病程相关蛋白(PR)等防御反应相关物质。

在众多 Elicitin 蛋白中,隐地蛋白(cryptogein)受到了更为广泛的关注和更加深入的研究。隐地蛋白(cryptogein)一种由隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)所分泌的蛋白类激发子,属于 β -elicitin, 分子量为 10kDa,等电点为 9.8,由 98 个氨基酸组成,在培养液中很丰富(Boissy *et al.*,1996),在极低浓度(100pmol / mL)便可诱导烟草产生 HR 及 SAR 反应 (Ricci, 1997)。蒋冬花等(2002)从隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)中成功克隆了隐地蛋白(cryptogein)基因,并构建植物表达载体转化烟草,获得了抗黑胫病的转基因植株。该研究还发现,隐地蛋白(cryptogein)13 位上的赖氨酸在诱导细胞死亡中起着关键的作用。

1.1.3 激活蛋白 Activator Protein

激活蛋白 Activator Protein 是本实验室从多种病原真菌如:交链孢菌 (*Alternaria spp.*)、纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、黄曲霉菌 (*Aspergillus spp.*)、葡萄孢菌 (*Botrytis spp.*)、稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*)、青霉菌 (*Penicillium spp.*)、木霉菌 (*Trichoderma spp.*)和镰刀菌 (*Fusarium spp.*)中分离纯化出新型耐热蛋白。相关核心技术已获得 1 项发明专利,公开两项专利,研究证明,从交链孢菌和稻瘟菌分离得到的激活蛋白氨基酸序列和核酸序列均不同于过敏蛋白和隐地蛋白,是一类新型的蛋白类激发子 (邱德文, 2006)。

植物激活蛋白并不直接作用于病原菌,而是通过激活植物本身的防御系统和生长系统,从而抵御病虫害的侵袭,促进植物生长,该蛋白不诱导烟草植株的过敏反应,这与过敏蛋白(Harpin)和激发素 (Elicitin)均诱导烟草等非寄主植物产生过敏反应不同。近年来,本实验室对激活蛋白的研究取得了一系列有意义的成果,得到了突破性进展。赵利辉等(2005)研究表明经植物激活蛋白处理后,水稻幼苗增强了对稻瘟菌的抗性,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性提高,且酶活性的变化趋势与稻瘟菌抗性的变化趋势接近,表明它们可能介入了激活蛋白诱导的水稻幼苗对稻瘟菌抗性的提高。徐锋等 (2006) 利用抑制性消减杂交技术 (SSH) 成功构建了激活蛋白处理水稻与非处理组水稻中差异表达的消减 cDNA 文库,从文库中筛选到 1756 个克隆,通过反向 Northern 杂交,从中得到 264 个有效克隆并测序,利用 BLAST 在 GenBank 数据库进行序列相似性比对分析,获得 28 个上调表达差异基因。其中一些基因与植物的光合作用、营养物质的运输代谢等多种植物的生理生化功能相关。活性测定研究发现,稻瘟菌激活蛋白可明显提高丝瓜、番茄等发芽率,促进种子发芽整齐,同时对促进植物幼苗生长、健壮也有明显的作用。处理水稻后,控制稻瘟菌效果达 50.68%;抗旱综合指数也从 55 提高到 92。经激活蛋白处理后,植物的纤维素酶和醇脱氢酶活性增强,过氧化氢和脯氨酸的含量也提高,这些酶和活性物质在促进植物生长抗逆方面能发挥重要作用(徐锋等, 2006)。此外,激活蛋白对白术根腐病和斑枯病的诱抗效果分别达 53.9%-81.2% 和 39.7%-63.3%,产量提高 46%以上 (苏朝安等, 2006);对蚕豆赤斑病,根腐病,病毒病诱抗效

果分别达 59.1%，76.4%和 85.6%（吴全聪等，2006）；对脐橙日灼病，脐黄病，裂果病三大病害达 32.18%-50.54%的诱抗效果（吴全聪等，2006）。激活蛋白能显著诱导烟草抑制花叶病的发生和发展，枯斑抑制率达 70.18%，且对改善烟草品质有明显作用（邱德文等，2005）。进一步研究表明，激活蛋白对甜菜夜蛾幼虫生长和幼虫体内的蛋白合成有抑制作用，同时激活蛋白与 Bt 混用后，大幅度提高了幼虫死亡率，表明激活蛋白可作为苏云金杆菌的新型增效剂（邱德文等，2005）。

随着可持续农业的不断发展以及化学农药抗性和污染问题的日益严重，生物农药越来越受到重视，并成为综合防治的主要部分。激活蛋白农药是基于诱导增强植物抗病性，抗逆性而研制的新型蛋白质农药，产品安全无毒，不会引起植物的抗性，对植物有显著抗病增产作用，同时能提高作物品质，生产上可以减少或不使用化学农药，生产的产品可以达到绿色产品和有机食品的要求，特别是在有机蔬菜和果品生产中将发挥重要作用，符合当前我国农业产业结构调整，有利于提高农产品附加值，增加农民收入，具有非常广阔的市场前景和良好的市场竞争力，具有较好的综合效益（邱德文&杨秀芬，2006）。

1.2 激发子诱导植物获得抗性的机制及早期事件

1.2.1 植物抗病性反应机制

植物体在生长发育过程中会遭受到各种侵害，这些引起植物病害的因素包括：病毒，细菌，真菌及有害昆虫。然而，病害仅在特定条件下发生，因为植物自身具有防御系统，如覆盖在植物体表层的表皮细胞及细胞壁结构，都是天然的物理屏障，可以阻止病原菌的侵入，此外，在非特异性侵染时，植物体还可分泌一些物质来消灭病原菌，进行自我保护。但是，当发生特异性侵染时，病原菌就会越过植物体的这些自身保护屏障进而对植物造成危害。特异性侵染又可分为两种情况，一种为非亲和性互作，当植物体识别入侵病原菌后就会快速激发一系列防御反应，继而阻止了病原菌的进一步侵害。在发生非亲和性互作时，植物体感染处的细胞会发生过敏反应(HR)，这部分的细胞死亡可以延缓或抑制病菌的生长和扩散，也使得这部分细胞与周围的健康细胞相区别（Lorrain *et al.*, 2003），同时来源于感染处的信号分子诱导植物的其余部分产生局部获得抗性或系统获得抗性（SAR），以防止病菌的扩散和植株第二次受病菌感染。HR 和 SAR 反应均由相互连接的通路控制，包括水杨酸途径，茉莉酸途径和乙烯通路。腐生病原菌激发了由茉莉酸途径和乙烯途径控制的防御反应，而水杨酸途径控制的防御反应是由寄生病原菌激发的（Thomma *et al.*, 2001）。一些研究还表明，由水杨酸途径控制的反应会和由茉莉酸途径或乙烯途径控制的反应相互抑制，说明这些途径会相互交叉，使得植物体在遭受不同类型病原菌入侵时激发相关的反应（Reymond *et al.*, 1998; Spoel *et al.*, 2003）。另一种为亲和性互作，在这种情况下，植物体无法识别入侵病原菌或经过一段时间后才能激发防御反应，这就使病原菌可进入植物体进而造成病害。早期研究表明，很多植物是依靠植物抗性基因 R 基因和病原菌无毒基因 Avr 基因之间的互作引发抗

病性反应的(Flor *et al.*, 1947)。R 基因的产物可直接或间接的作为 Avr 蛋白受体(Keen *et al.*, 1972), 这两种分子的互作可以引发植物体一系列的防御反应。但是, 在大部分 R 基因与 Avr 蛋白相互作用引发植物体防御反应的机制中, Avr 蛋白并未被明确指出, 导致这种模式只局限于某些互作反应中 (Jia *et al.*, 2000; Leister *et al.*, 2000; Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996)。研究发现, 许多 Avr 信号在病原菌致病过程中扮演重要角色, 尤其是寄主植物体不能表达相关的 R 基因时。这种防御模式的模拟机制是, AVR 蛋白触发了植物体内可在基础水平引发植物防御反应的某种蛋白, 在这种情况下, R 蛋白可识别 Avr 蛋白复合物, 并可激发植物的防御反应 (Dangl *et al.*, 2001; McDowell *et al.* 2003; Nimchuk *et al.*, 2003)。然而, 植物体并不仅仅是通过特定的 Avr 产物激发防御反应触发抗性基因的表达这一种途径而获得抗病性的, 激发子也可诱导多种植物发生防御反应, 进而获得抗性。激发子是一大类化学物质的总称, 包括: 蛋白, 糖蛋白, 多糖, 脂类物质和一些合成的分子物质, 激发子可以是病原菌的组成成分或分泌物, 还可以是寄主植物体的细胞壁被酶解释放出的物质。

关于激发子信号传导途径的早期研究发现, 动物体与植物体遭受病原菌侵害时, 激发子引发的信号传导途径十分形似。这些研究强调指出, 各种生物体在进化过程中, 与激发防御反应相关的信号传导系统都有着高度的保守性, 从而使生物体获得了先天的免疫防御功能 (Dangl *et al.*, 2001)。早期事件, 如蛋白的磷酸化或产生多种信号分子 (NO, 活性氧物质或胞质钙离子等) 这些控制多种反应的相互关联途径, 通过影响代谢途径引发了一系列生理反应, 特别是当这些早期事件引发了激素合成基因的改变时, 就会影响生物体激素代谢的平衡。对植物-病原菌互作系统的研究发现, 不同类型的病原菌可以引发植物体相应的防御反应, 而这些反应的控制因素各异 (Ton *et al.*, 2002)。

总之, 无论是由微生物还是激发子引发的信号传导途径, 均导致以下结果: 植物体细胞壁的增厚; 产生抑制病原菌的代谢物, PR 蛋白以及保护性的过氧化物酶; 植物体木质化的发生; 发生过敏性反应 (HR) 以延缓或抑制病菌的生长和扩散。这些反应会引发植物体获得系统获得抗性 (SAR), 可有效抗击大量广谱病原菌 (Ricci, 1997)。

1.2.2 激发子诱导植物抗性发生的早期事件

以悬浮细胞系及完整植株为研究对象, 运用多种细胞生物学, 生物化学以及基因技术鉴定了多项激发子诱导产生的早期事件。研究发现, 受激发子诱导产生的信号不是以线性形式进行传递的, 而是通过复杂的多分支传递网络被逐步放大, 每一路分支都由不同的二级信号控制, 这些次级信号包括: 钙离子, 活性氧, NO, cGMP, cADPR, 膜电势和 pH 的变化及某些初级代谢产物等。此外, 在激发子引发植物体防御反应的最初几 min 内, 磷酸戊糖途径和三羧酸循环也发生了一些重要变化 (Pugin *et al.*, 1997), 并会伴随着糖运输能力的降低和线粒体活动的减弱 (Bourque *et al.*, 2002)。

1.2.2.1 植物防御反应时蛋白质的磷酸化和去磷酸化

植物体内某些蛋白质的去磷酸化是由激发子引发的最早期事件,这是由于激发子很容易被位于细胞膜上的蛋白激酶受体(RLKs)识别,很多报道已经指出,CDPK和MAPK类蛋白激酶在植物防御反应中发挥重要作用。例如,细菌源激发子flagellin,就是与Arabidopsis的一种名为FLS2的蛋白激酶受体相互作用,FLS2是一种转膜蛋白,具有胞内PK区域及胞外富含亮氨酸区域(Gomez *et al.*, 2000)。对烟草和Arabidopsis的研究表明,MAPK对防御基因的转录和抗性的提高都发挥了积极的作用(Asai *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Menke *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001)。此外,在烟草细胞内,激发子诱导产生的钙离子流信号可以激活CDPK(Lecourieux *et al.*, 2000),而活性氧的产生可能是激活MAPK的必要条件,由于过氧化氢可以激活MAPK,活化后的MAPK可能会反馈作用于活性氧,导致生成的活性氧增多或减少(Moon *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2002)。

通过培养被不同激发子处理过的细胞,提取蛋白,应用双向电泳技术进行蛋白质磷酸化的研究(Droillard *et al.*, 1997; Lecourieux *et al.*, 2000; Peck *et al.*, 2001),已经鉴定出了三种磷酸化蛋白质,相信随着磷酸化蛋白质数据库及质谱技术的发展,在不久的将来,越来越多的磷酸化蛋白将被鉴定出来(Nuhse *et al.*, 2004)。

1.2.2.2 植物防御反应时体内的离子流信号

钙离子是植物体内的重要二级信使,它将细胞表层获得的信号传导到细胞内部,充当了“Ca²⁺传感器”的作用(Hetherington *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2002)。对于钙离子是如何将不同信号与多种特定反应联系在一起仍有待进一步研究,已经有科学家提出了不同的猜想及假说(Hetherington 2004, Plieth 2005),但钙离子在植物防御反应中所起的信号作用是毋庸置疑的,当钙离子流传导受阻时,防御反应的多种信号也相应的被抑制(Nurnberger *et al.*, 1994; Stab *et al.*, 1987; Tavernier *et al.*, 1995)。钙调蛋白是普遍存在的钙离子受体,钙离子通过与目标蛋白作用进行信号传导(Bouche *et al.*, 2005),许多研究已经证实,CaMs参与了植物的防御反应。CaM蛋白由植物体受病原菌感染后的转录和转录后水平的控制,例如,在受真菌侵染的大豆和受TMV侵染的烟草细胞内均发现了特定的CaM差异表达现象(Heo *et al.*, 1999; Yamakawa *et al.*, 2001)。

在激发子处理的细胞内发现,阴离子流是早期发生的信号事件之一,例如,激发子处理5分钟后的欧芹,大豆及烟草细胞内,氯离子流显著增强(Ebel *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997)。此外,被隐地蛋白(cryptogein)处理的烟草细胞内快速出现NO₃⁻流,这意味着胞内的NO₃⁻在1小时内下降了60%(Wendehenne *et al.*, 2002)。应用药理学方法研究显示,阴离子流在病原菌或激发子诱导的植物体防御反应早期事件中承担着调节作用,这些早期事件包括:活性氧的生成,MAPK的激活以及防御基因的转录(Jabs *et al.*, 1997; Wendehenne *et al.*, 2002)。另外,有数据表明,阴离子流是过敏性反应(HR)发生的先决条件,被隐地蛋白(cryptogein)处理的烟草悬浮细胞和叶片以及被Pseudomonas syringae pv.glycinea处理的大豆细胞及叶片显示,阴离子

通道阻塞导致了HR反应显著抑制以及坏死细胞的快速蔓延 (Levine *et al.*, 1996; Wendehenne *et al.*, 2002)。尽管阴离子流和HR之间的反应机制还有待研究,但很可能会涉及植物体内的重要二级信使——钙离子。

1.2.2.3 植物防御反应时的 NO 信号

过去 20 年的研究发现,在动物细胞内,高度扩散的 NO 在很多生理过程中都行使信号分子的功能。此外,在病理条件下,NO 能够杀灭病原菌及癌细胞,NO 是由依赖 CaM 的血红蛋白氮氧合成酶 (NOS) 催化合成的 (Wendehenne *et al.*, 2001)。在植物体内,负责合成 NO 的酶是硝酸还原酶 (NR) 和源自 *Arabidopsis thaliana* 的 AtNOS1 (Guo *et al.*, 2003)。AtNOS1 属于进化保守,依赖 CaM 的一类酶,它具有类似于血红蛋白氮氧合成酶 (NOS) 的活性但与哺乳动物的 NOS 没有序列同源性。研究发现,AtNOS1 位于线粒体内,可以保护植物免受暗由于活性氧的积累和氧化作用而导致的暗诱导衰老 (Guo *et al.*, 2005)。这些研究都表明,NO 在植物生理过程中发挥了广谱作用。

应用药理学,生物化学及新兴的基因技术进行研究发现,植物细胞受到无毒病原菌和激发子攻击时会生成内源 NO (Delledonne *et al.*, 2005)。用隐地蛋白处理烟草悬浮细胞及叶片组织可发现一过性 NO 快速升高现象 (Lamotte *et al.*, 2004)。研究表明,AtNOS1 是构成植物防御反应体系的重要组成部分 (Zeidler *et al.*, 2004)。除 AtNOS1 外,在植物体内,已发现了多种类似 NOS 的酶 (Corpas *et al.*, 2004)。已有多项研究证明,NO 是激发子诱导植物细胞产生的内源性信号之一,在转录水平上,NO 能够调节多个防御基因的表达,包括编码 PR 蛋白和次级代谢的相关蛋白 (Parani *et al.*, 2004)。在转录后水平上,胞外的 NO 可以促进植物防御反应中的代谢酶类和与氧化还原相关酶或 S-nitrosylation 的合成 (Lindrmayr *et al.*, 2005)。NO 还可诱导植物过敏性反应 (HR) (Delledonne *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003),经证实,NO 参与了隐地蛋白诱导烟草叶片细胞坏死的反应 (Lamotte *et al.*, 2004)。

1.2.2.4 植物防御反应时活性氧 (AOS) 的猝发

植物发生防御反应时可快速生成大量有毒的活性氧物质,在生理条件下,氧分子 O_2 首先形成超氧离子 O_2^- 和过氧羟自由基 HO_2^- ,接着转化生成过氧化氢 H_2O_2 ,最后通过Fenton反应在铁离子或铜离子存在条件下生成羟基自由基 HO^\cdot (Mori *et al.*, 2004)。 O_2^- 和 HO^\cdot 的半衰期都非常短,而不带电荷的 H_2O_2 则相对更稳定且可以跨膜扩散。

大量植物体与病原菌非亲和性互作研究表明,植物细胞分别在 20 分钟和 4 至 6 小时后出现活性氧猝发高峰,这些都与诱导植物体抗性密不可分 (Allan *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 1997)。最近的研究已经证实有 152 种蛋白参与了维持活性氧的动态平衡 (Mittler *et al.*, 2004)。 O_2^- 可自发歧化生成 H_2O_2 ,但在超氧化物歧化酶的作用下,转化速率将大大提高;过氧化氢酶可高效的降解 H_2O_2 ,而且抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶也能抑制 H_2O_2 的积累。

起初, 活性氧被认为可高效的杀灭植物细胞, 因为活性氧的促发常伴随着过敏性反应的发生 (Apel *et al.*, 2004), 但事实上, H_2O_2 抑制病原菌的作用被高估了 (Dat *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 1999)。隐地蛋白处理的烟草叶片, 在光照条件下, H_2O_2 通过引发由AOS调节的过氧化反应而杀灭植物细胞 (Montillet *et al.*, 2005), 但在暗培养条件下, 隐地蛋白诱导的细胞灭亡是 H_2O_2 非依赖性的, 而与生成大量自由脂肪酸过氧化氢物有关 (Montillet *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 1999)。另外一些实验也已证明, 活性氧的促发于杀灭细胞没有直接的关系 (Torres *et al.*, 2002)。

活性氧作为植物防御反应的早期事件还体现在它是调节基因应答环境胁迫的信号 (Apel *et al.*, 2004; Laloi *et al.*, 2004)。在信号传导时, 活性氧还可激活MAPK, 协助生成钙离子以及调节细胞的氧化还原状态, 尤其是后两种事件, 都是在有 H_2O_2 积累的前提条件下才被监测到 (Rentel *et al.*, 2004)。活性氧可诱导编码抗氧化的酶以及防御反应及信号传导相关蛋白的基因表达, 如激酶, 转录因子等。此外, 活性氧还可通过可加厚植物细胞壁 (Brisson *et al.*, 1994), 增强植物体木质化 (Kawasaki *et al.*, 2006), 这些都有助于提高植物抗性, 抵抗病原菌的入侵。

1.2.2.5 植物防御反应的其他早期事件

1. 防御基因的表达

编码各种防御反应组分的基因的转录激活是产生抗病性的决定性事件。在激发子诱导产生的一系列防御反应如细胞壁加固、抗生素合成、PRs产生中, 除胼胝质产生和活性氧反应之外, 大多数防御反应取决于大量的植物防御基因的转录 (Dixon *et al.*, 1994)。防御基因的表达产物直接参加对病原物侵染及致病机制的抵御作用。其有效性取决于三个条件: 一是防御基因表达的程度和速度, 相应的基因产物积累的量 and 速度; 二是产物的病理功能; 三是不同防御基因同步表达的能力, 相应的产物的协同作用等 (梁元存&刘爱新, 2001)。

2. 病程相关蛋白的合成

病程相关蛋白 (PRs) 是一类由 *PR* 基因编码、分子量小于 100 000、前体带有 N-端或 C-端信号肽的蛋白, 这些蛋白质在未被侵染的健康植株中是没有的, 后来发现其它病原菌侵染或以一定的化学物质处理也会发生类似的蛋白质积累。已经证实一些 PRs 具有 β -1, 3-葡聚糖酶活性, 一些具有壳多糖酶和 (或) 溶菌酶的活性, 一些具有过氧化物酶活性 (蔡新忠等, 1995)。

3. 次生代谢物质的积累

植物次生代谢物质是指植物体中一大类并非生长发育所必需的小分子有机化合物, 其产生通常具有种属、器官、组织和生长发育的特异性。参与植物防御的次生代谢物质包括各种类型的植保素、木质素和其他一些次生代谢物质。激发子不仅诱导植物次生代谢物质含量的增加, 而且可改变次生代谢物质合成中相关酶的活性。

1.3 cDNA 文库的构建方法研究进展

cDNA 文库是指以生物某一发育时期的 mRNA 为模板,在反转录酶的作用下反转录成 cDNA,再与载体连接而形成的克隆的集合。其中,每个单克隆只代表一种 mRNA 信息,足够数目克隆的总和则包含细胞的全部 mRNA 信息。由于天然状态的 RNA 极不稳定且难以扩增,因此将 RNA 编码的信息转换成稳定的 DNA 双链(cDNA),再将其插入能自我复制的载体,这样就可获得 cDNA 文库形式的信息,便于分离和分析表达的遗传信息。自 1976 年 Hofstetter 成功构建了第一个 cDNA 文库以来,构建和筛选 cDNA 文库已成为获得目的基因的主要手段之一。cDNA 文库构建一般有以下几个步骤:1)总 RNA 的提取和 mRNA 纯化;2)cDNA 的一链和二链合成以及分级分离;3)与各种接头连接并连接到载体上;4)转染或转化入宿主菌;5)文库的质量检测和保存(Gubler U *et al.*, 1983)。

cDNA 文库在研究特定类型细胞基因组的表达状态以及表达基因的功能鉴定方面具有特殊的优势,尤其在制备 cDNA 探针或在细菌中表达高等生物的基因时,cDNA 克隆是必需的。构建 cDNA 文库,并用适当的方法从中筛选目的基因,已成为从真核生物细胞中分离纯化目的基因的常规方法,因而在个体发育、细胞分化、细胞周期调控、细胞衰老和凋亡调控、健康与疾病发生的分子机理等生命现象的研究中具有广泛的应用价值,是研究工作中最常使用的基因文库。

传统的构建 cDNA 文库方法在其文库构建或后续步骤中,由于不可避免地要使用限制性内切酶,cDNA 片段总是存在着被限制性内切酶切开而无法得到完整的基因序列的风险,而且随着 cDNA 片断的增大这种风险越大;同时,对于大片段 cDNA,传统 cDNA 文库构建技术还存在着连接效率不高和 cDNA 合成产量偏低的问题,如从 mRNA 模板反转录合成 cDNA 第一链的效率只有 50%,而最终获得双链 cDNA 的效率通常只有其中 30%。造成这种低效率的主要原因是传统构建 cDNA 文库方法中需要应用多步的体外酶学反应。由于无法做到在每步酶学反应结束后纯化出反应产物以进行下一步的酶学反应,故只能采取折衷的策略,将所有的酶学反应都放在一个经优化的基础缓冲条件下进行的。这种优化的反应条件,并不是各种酶最佳的活性条件。因此,在传统 cDNA 文库构建过程中,许多酶学反应并未能发挥出酶的最佳催化活性导致其反应效率低。

针对传统 cDNA 文库构建方法的缺陷,研究者一直致力于构建方法的研究,使 cDNA 文库构建更加迅速、简便、高效、高质量、满足研究的需要。自 1976 年 Hofstette 成功的构建了首例 cDNA 文库以来,构建 cDNA 文库的技术方法日臻完善。目前,构建 cDNA 文库的常见方法主要有:固相 cDNA 文库构建法, Oligo-capping, Cap-trapper 及 SMART 等。

1.3.1 固相 cDNA 文库构建法

1998 年, Roeder 建立了固相法构建 cDNA 文库的新方法,它基于传统的 cDNA 文库合成方法,

包含通常所需的全部步骤。在反转录引物 oligo (dT)或随机引物的 5'端预先设计上一个稀有的酶切位点,并通过 5'端偶联在惰性材料的固相介质上(如磁珠等),用这种固相化的引物起始 cDNA 合成的各步反应。由于 cDNA 固定在固相介质上,这样在反应中就可以简便而迅速的实现酶和缓冲液的更换,大大减少了构建文库所需的时间,简便了 cDNA 合成的操作,且在进行缓冲液更换时既没有 cDNA 的丢失之忧,也无其他物质污染之忧,所构建的文库适合于大多数的研究目的。

其优点在于每步反应完成后,可以通过固相介质分离,几乎毫无损失地使反应中间产物获得纯化,用于下一步的酶学反应,这样就能使每一步的酶学反应都能在各自最佳的反应体系中进行,最大限度地提高每步反应产物的产量。同时整个过程操作十分简单。在双链 cDNA 合成完成之后,可用识别引物 5'端酶切位点的稀有限制酶进行酶切,就可将合成的双链 cDNA 与固相介质分离,进行重组克隆操作。另外,用此方法可以得到真实的代表性文库,它包含有短小的 cDNA,这是因为在克隆之前省去了分级分离的步骤。总之,固相法简便易行,可靠低廉,结合了传统的 cDNA 合成的优点并弥补了其不足。

1.3.2 oligo-capping 法

1994年, Marnyama 和 Sugano 建立了一种构建全长 cDNA 文库的方法——Oligo-capping 法。该方法根据完整 mRNA 分子含有 5' 末端帽子结构,而部分降解的 mRNA 分子则缺少此帽子结构,并分别用磷酸和羟基基团取代 mRNA 的 5'末端。

首先用细菌碱性磷酸酶(Bacterial alkaline phosphatase, BAP)去除不完整 mRNA 5'末端游离的磷酸基团,并用羟基取代,而完整 mRNA 由于其 5'端有帽子结构得到保护而不受影响。然后用磷酸基团替代经烟草酸性磷酸酶(Tobacco acid pyrophosphatase, TAP)处理后的完整 mRNA 5'端帽子结构,并将一段寡核糖核苷酸通过 T4 RNA 连接酶连接到 mRNA 5'端,由于 RNA 连接酶需要 3'端羟基受体和 5'端磷酸供体,而不完整 mRNA 分子缺乏 5'端磷酸结构,因而不能连接寡核糖核苷酸。mRNA 分子连接上寡核糖核苷酸后,反转录为 cDNA,再用相应的引物扩增,克隆到合适的载体上建立全长 cDNA 文库。

oligo-capping 法只需少量的 RNA,即可得到全长 cDNA 比例较高的文库,且其 5'端序列能够得到有效的富集。在文库中可以检测到长达 5Kb 的序列,但其平均长度要比这小得多。但由于该方法用到 PCR 扩增,可能使 cDNA 文库发生长度偏移。

1.3.3 Cap-trapper 法

1996年, Carninci 等建立了一种 Cap-trapper 法。该方法的原理是 mRNA 分子经氧化后可与生物素结合而被标记。在 cDNA 第一链合成的同时,生物素标签结合到 RNA-DNA 杂合物上;经 RNase I 消化,使所有 RNA 分子 3'末端的生物素标签被去除,但只有不完全 cDNA 5'末端的生物

素标签被降解。理论上,只有连接在全长 cDNA 5'端的生物素标签由于被保护而未被降解。结合生物素标签的 cDNA 会被免疫磁珠吸附而富集,开始合成第二链。

该方法使用锚定引物合成cDNA,保证了cDNA的合成从Poly A尾巴处开始;因RNA 3'端生物素在RNase I消化时得不到保护,增加了特异性;由于该方法不使用PCR技术,减少了理论上的偏移和冗余性,cDNA的获得率和产量较以前的方法提高了10~50倍,能够得到较完整的全长基因,全长比率可达95%以上。但是,该方法由于氧化试剂的使用和反应时间过长增加了RNA降解的机会;而且5'端部分降解的RNA也可以被生物素标记,可能会造成5'端假阳性的出现。

1.3.4 SMART 法

SMART 系统由 Clontech 公司创建,用于 cDNA 合成和文库构建。该方法充分利用了反转录酶的末端转移酶活性。该酶为 MMLV 反转录酶的点突变产物,没有 RNase H 活性,保留反转录活性,并且长距离反转录能力较强;还具有较强的末端转移酶活性,能够在双链核酸的 3'端添加几个 dC。

在合成 cDNA 的反应中加入 3'末端带 Oligo dG 的 SMART 引物,在逆转录酶作用下以 Oligo dT 为引物合成 cDNA;当到达 mRNA 5'末端时碰到 mRNA 特有的帽子结构,借助其末端转移酶活性在合成的 cDNA 单链末端连续加上几个 dC,这几个 dC 与 SMART 引物的 Oligo dG 配对,SMART 引物成为 cDNA 继续延伸的模板,得到的所有 cDNA 单链的一端含有 Oligo dT 起始引物序列,另一端含有 SMART 引物的互补序列;合成第二链后,即可利用 Oligo dT 起始引物和 SMART 引物进行扩增。而非全长 cDNA 末端由于没有 dC 无法得到扩增。

该方法只需 25ng 的 mRNA 或者 50ng 的总 RNA 即可得到高质量和高产量的 cDNA 文库,且得到的 cDNA 能够代表原有样品中的 mRNA 的丰度,而且 SMART 引物含有限制性酶切位点,易实现片段的定向克隆。但是该方法由于 PCR 或其它原因导致表达谱的偏移或克隆测序中的冗余,实际研究表明,用这种方法构建的 cDNA 文库全长基因的比例最高只能达到 80%。

1.3.5 CAPture 法

CAPture 法最早由 Edery I 提出,它充分利用真核生物 mRNA 的帽子结构和帽子结合蛋白(转炉起始因子 eIF-4e)相互作用的动力学原理来捕获全长 cDNA。首先,在反转录酶的作用下将 mRNA 转录为 cDNA,形成 cDNA/mRNA 双链复合体;接着,用 RNaseA 对双链分子进行酶切。如果反转录不彻底,那么靠近 5'端的 mRNA 将以单链形式存在,RNaseA 就将这类 mRNA 的帽子结构切除掉,因此这类 cDNA/mRNA 双链分子就不再携带帽子结构,这样,就可利用帽子结合蛋白分离全长 cDNA,最后,根据动力学原理,可将帽子结合蛋白上的 mRNA 帽子替换下来,从而达到洗脱全长 cDNA 的目的。

从原理上分析, 这种办法可有效而巧妙的分离得到全长 cDNA, 但在实际操作相当复杂, 而且对 mRNA 的需求量特别大 (100ug 左右), 且受各种因素影响, 较难获得全长 cDNA, 因此这种方法构建的文库中全长 cDNA 的比例不是很高 (60%-70%)。

1.3.6 利用体外特异位点重组反应构建 cDNA 文库

最近, 由Invitrogen公司推出的CloneMiner™ cDNA文库构建试剂盒, 是基于λ噬菌体特异位点重组系统(attB x attP <--->attL x attR)的体外特异位点重组技术, 由LR和BP两个反应组成。其基本原理是在λ噬菌体整合酶(Int)和整合宿主因子(IHF)的催化下, 使两端接有重组位点的外源片断与带有对应重组位点的载体发生重组反应将外源片断转入载体之中, 从而避免了使用限制性内切酶和连接酶, 并可以方便地将目的片断转入带有对应重组位点的各种不同的载体中。

该方法相对于传统方法有着明显的优势, 由于无需使用限制性内切酶和连接酶, 基本克服了常规 cDNA 文库构建方法的缺陷, 建成的文库可以通过重组反应方便地转入任何其它带有对应重组位点的载体中, 既保证了 cDNA 片段尤其是大片段的 cDNA 的完整性又提高文库的 cDNA 插入片段的平均长度; 同时由于特定的重组位点只能与对应的位点定向重组, 自身之间不发生反应, 在保证阅读框的正确方向的同时还可避免嵌合体的产生。另外, 在载体的 att 位点间引进大肠杆菌 F 质粒编码的毒性基因——CcdB 基因, 在合适的宿主细胞中, 由于重组体中的 CcdB 基因被插入的 cDNA 所取代, 这样在转化后就只有含重组体的细胞能够成活, 无需再进行双抗药性基因或蓝白斑筛选阳性克隆。

以上介绍的 cDNA 文库构建方法都是比较常用的方法, 但每种方法都存在一定的缺陷。目前, 还没有一种完善的构建全长 cDNA 文库的方法。最佳的策略是根据所要研究材料和研究问题的特点, 选择不同的方法, 构建出满足研究要求的 cDNA 文库。

1.4 研究目的与意义

本实验室自首次发现交链孢菌激活蛋白开始, 已陆续从稻瘟菌等其他菌株中提取到与其类似的其他类型激活蛋白。虽然这几种激活蛋白源自不同真菌, 而且它们的分子量和部分性质也有所差异, 但其共同点为均可诱导植物产生抗病性及促进植物生长。经检测这些源于病原菌的激活蛋白都具有激发子的基本特性, 但与早期发现的过敏蛋白 Harpin, 激发素 Elicitin 有本质的不同, 说明这是一类新型的蛋白激发子。初步研究结果表明, 激活蛋白是通过引发植物的信号传导系统, 引起植物体内一系列代谢反应, 诱导和激活植物自身免疫系统和生长系统, 从而对病虫害产生抗性, 促进植物生长的。前期研究发现, 激活蛋白性能稳定, 产品无毒, 无残留, 可用于植物的拌种, 浸种, 浇根和叶面喷施, 具有良好的开发前景和理论研究价值, 随着全球对环保和食品安全的日益重视, 激活蛋白将会有十分广阔的应用前景。

灰霉病是一类对蔬菜，果树及花卉等多种植物危害严重的植物病害，灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）是其中一类重要的致病菌。本研究以灰葡萄孢菌为实验材料，通过建立灰葡萄孢菌源激活蛋白的纯化技术路线和方法，确定该激活蛋白的生物功能，以期寻找到灰葡萄孢菌源的新类型激活蛋白，丰富激活蛋白家族，为获得蛋白晶体，了解蛋白的高级结构奠定基础；此外，灰葡萄孢菌源激活蛋白基因的获得，对解析激活蛋白的作用途径与分子机制，揭示激活蛋白与植物的相互作用具有十分重要的意义。

第二章 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化及生物活性测定

蛋白激发子是病原菌-植物相互识别的重要信号分子,被激发子诱导后,相关的植物基因可迅速地得到表达,蛋白激发子与寄主的受体蛋白结合,经过一系列反应过程诱导植物产生抗性。由于蛋白激发子能在植株体内诱导多种防御反应,因此在过去的10多年中,许多的研究工作都致力于它的作用机制上。笔者所在研究室首次从等多种病原真菌中分离出具有良好抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长等生物活性的蛋白激发子,被命名为激活蛋白(Activator Protein)。在研究过程中,发现灰葡萄孢菌来源的激活蛋白能显著促进烟草悬细胞过氧化氢含量的增加,故将其作为鉴定跟踪目标蛋白的指标。

本章探讨了从灰葡萄孢菌中分离激活蛋白的技术路线和方法,并对其进行了质谱鉴定,为进一步研究激活蛋白的功能及发掘新的激活蛋白奠定技术基础。通过测定灰葡萄孢菌激活蛋白对植物生长及抗病性等方面的影响,以期深入探讨激活蛋白的作用机理提供事实依据及理论参考。

2.1 材料

2.1.1 菌种和植物材料

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)简称灰霉菌,由中国农业科学院植物保护研究所药物工程实验室保存。烟草珊西烟,中蔬6号番茄种子及其他试验种子均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

2.1.2 实验试剂

蛋白 marker 为上海生工的产品,其他各种化学试剂等为国产分析纯试剂。

2.1.3 培养基及缓冲液的配制

马铃薯培养基 PDA: 马铃薯提取液 1 L/L (削皮马铃薯 200 g, 切块, 加水 1000ml 煮沸半个小时, 纱布过滤后, 滤液加水补足至 1000 ml), 蔗糖 20g/L, 调整 pH 值至 7.0, 15psi(1.05 kg/cm²) 高压蒸汽灭菌 20 min, 室温备用。

燕麦培养基: 燕麦片 1 L/L (燕麦片 30 g 加水 1000 ml, 在沸水浴上加热 1hr, 纱布过滤后滤液加水补足至 1000 ml), 蔗糖 20 g/L;

完全培养基 YPD: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L;

蛋白上样缓冲液 (2×): 100 mmol/L Tris-HCl (pH6.8)、200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)、4

% SDS、0.2% 溴酚蓝、10% 甘油；

30% 丙烯酰胺溶液：29 g 丙烯酰胺，1g N, N'-亚甲叉丙烯酰胺，溶于 100mL 水；

考马斯亮蓝染液：0.24 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 90 mL 甲醇:水 (1:1, v/v) 和 10mL 冰乙酸中，过滤取滤液；

SDS-PAGE 脱色液：10% 冰乙酸；

MS培养基：NH₄NO₃ 1650 mg、KNO₃ 1900 mg、CaCl₂·2H₂O 440mg、MgSO₄·7 H₂O 370 mg、KH₂PO₄ 170 mg、Na₂-EDTA 37.3 mg、FeSO₄·2 H₂O 27.8mg、MnSO₄·4 H₂O 22.3mg、ZnSO₄·7 H₂O 8.6 mg、H₃BO₃ 6.2mg、KI 0.83 mg、Na₂MoO₄·2 H₂O 0.25 mg、CuSO₄·5 H₂O 0.025 mg、CoCl₂·6 H₂O 0.025 mg、盐酸硫胺素 0.1 mg、烟酸 0.5 mg、盐酸吡哆醇 0.5 mg、肌醇 100 mg、甘氨酸 2 mg、蔗糖 30 mg、蒸馏水 1000 ml, pH 5.8, 固体培养基中加入琼脂粉 6 g, 半高温灭菌。

TCA 溶液：取 10 g TCA，溶于双蒸水中，定容到 100 ml。

KI 溶液：166g KI 溶于双蒸水中，定容到 1000 ml。

醇脱氢酶抽提液：50 mmol/L、pH=7.5 的磷酸缓冲液，5 mmol/L的MgCl₂，5 mmol/L的巯基乙醇。

醇脱氢酶反应缓冲液：1 mol/L、pH=8.0 的Tris溶液 15 ml，0.01mol/L的NAD⁺ 3ml，82 ml H₂O₂，混匀

2.1.4 实验仪器

蛋白质纯化系统 (GE ÄKTA explore 10)

HiTrap_Q_Sepharose_XL (Amersham pharmacia biotech)

Superdex_75_HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech)

电子分析天平(Sartorius)

高速冷冻离心机(Heraeus D37520 Osterode)

微型离心机(Eppendorf 5415D)

凝胶成像系统(Multigenins Syngene)

超纯水仪(Millipore ZMQ55VOTI)

紫外可见光分光光度计(Shimadzu UV-2550)

蛋白电泳系统(Bio-Rad)

2.2 方法

2.2.1 灰葡萄孢菌的培养

2.2.1.1 灰葡萄孢菌在固体培养基上的培养

将实验室保存的灰葡萄孢菌用接种针蘸取，接种到 PDA、YPD 和燕麦固体培养基的中央，于 28℃ 恒温培养箱中培养，6 d 后用电子数显卡尺测菌落的直径，比较直径大小。

2.2.1.2 灰葡萄孢菌在液体培养基中的培养

取保存菌株在 PDA 固体培养基上活化培养 7d 后，取直径 1 cm 的固体培养菌块接种到 PDA、YPD 和燕麦液体培养基 500 ml 中，于 28℃、180rpm 的水平旋转摇床中振荡培养，在 5d 时，即液体培养基中全部长满菌丝体时，利用真空抽滤器，通过滤纸过滤，获得的菌丝体经双蒸水洗涤 3 次，抽干至不再滴水为止，在分析天平上称量菌块重量。

2.2.2 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化

2.2.2.1 粗蛋白的提取

1、取保存菌株在 PDA 固体培养基上活化培养 7d 后，用 YPD 液体培养基于 25℃、180 r/min 恒温振荡培养 5d，培养液经真空抽滤，获得的菌丝体经双蒸水洗涤 3 次后，-80℃ 保存备用。

2、取灰葡萄孢菌菌丝体 10.0 g 液氮冷冻条件下研磨成粉末，迅速加入 40 ml 提取缓冲液(0.025 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 8.0, 0.002 mol/L EDTA)，沸水浴 20 min，之后于 4℃、12000 r/min 离心 15 min，上清液即为蛋白质粗提液。

2.2.2.2 蛋白质的纯化

1、取 1ml 蛋白质粗提液用预装离子柱 Hitrap Q FF 进行离子交换层析。首先用起始缓冲液(0.025 mol/L 磷酸钾缓冲液，0.001 mol/L EDTA，pH8.0)平衡层析柱，用洗脱缓冲液(0.025 mol/L 磷酸钾缓冲液，1 mol/L KCl，0.001 mol/L EDTA，pH8.0)进行浓度梯度洗脱，流速为 1 ml/min，分别收集各洗脱峰，测定各峰对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的变化，确定目的峰，进行电泳检测。

2、收集的目的峰再用分子筛柱 HitrapSuperdex75 进行分离，流动相为 Millipore 超纯水，收集各流出峰，测定对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的变化，确定目的峰，进行电泳检测。

3、纯化后的蛋白用于质谱测序，性质鉴定及生物活性测定。

2.2.3 样品的制备及电泳

1、样品的制备

将纯蛋白液 30 μl ，加入 6 μl 6 \times 凝胶上样缓冲液，沸水浴 3-5min，取 15 μl 点样。浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%。

2、电泳 13mA 电泳至溴酚蓝进入分离胶后 17mA 电泳至溴酚蓝到胶板底部。

3、小心取出凝胶，用考马斯亮兰 R-250 染色液染色 15—20min，用脱色液脱色 2—3 次，至蛋白条带清晰，背景透明为止。

2.2.4 烟草愈伤组织和悬浮细胞的获得

参照 Kuchitsu 等（1993）法制备烟草悬浮细胞，取烟草种子先用 75% 的乙醇浸泡 30 秒，然后在 10% 次氯酸钠溶液中消毒 10 min，用无菌水清洗三次后，放到无菌水中 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置一天，再重复前面的消毒步骤。放到 MS 培养基上让其萌发，长叶，获得无菌苗。从无菌苗上切取幼嫩叶片，放到含 1 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养一星期，获得愈伤组织。

切下愈伤组织进行继代培养，以后每 14 天继代培养一次，直到获得疏松、生长迅速的愈伤组织为止。

取出疏松的愈伤组织 1g，转移到含 1 mg/L 2,4-D 的 MS 液体培养基中，25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下 120rpm 振荡培养。每周继代一次，直到得到生长迅速、分散良好的悬浮细胞系。

2.2.5 纯化过程各个步骤得到的激活蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响

1、将 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的滤灭后的灰葡萄孢菌激活蛋白加入含有烟草悬浮培养细胞的培养液中，孵育 30 min 后，取 1 ml 至 1.5 ml 离心管中，以相应缓冲液为对照，测定过氧化氢含量；

2、过氧化氢含量测定参照 Sergiev 方法进行。悬浮细胞中加入 20 μl 10%TCA 在冰浴中用组织研磨器研磨，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g 离心 20 min,取上清；

3、取 0.5 ml 上清液,加入 0.5 ml 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.8) 和 1 ml KI 溶液，混匀，45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min 后，室温静置 20 min，测定 OD 390 值。以相应缓冲液为对照，计算过氧化氢含量。过氧化氢含量以 ng. g-1FW 表示。

2.2.6 纯化蛋白的鉴定氨基酸序列测定

纯化的蛋白经 SDS-PAGE 检测，单一蛋白条带经胰蛋白酶酶解后，用电喷雾串联质谱进行鉴定并测定肽段的氨基酸序列（军事医学科学院，北京生命科学研究所）。

2.2.7 灰葡萄孢菌激活蛋白的生物活性测定

2.2.7.1 灰葡萄孢菌激活蛋白的浓度测定

按照 1.2.2 的方法，从灰葡萄孢菌中制备植物激活蛋白，以小牛血清白蛋白为标准, Bradford

法测纯化蛋白的浓度(Xu, 2004), 然后调整浓度配制成母液 2 mg/ml, 保存于-20℃冰箱中, 使用前配成 1 μg/ml。

2.2.7.2 激活蛋白对植株生长的影响

取健康饱满的豌豆种子 60 粒分别用 10 μg/ml、1 μg/ml 纯化蛋白和蒸馏水浸种 6 h, 用清水洗涤种子两次后催芽 24 h, 置于铺有滤纸的培养皿中, 于 25℃培养。5 d 后测量苗高, 各处理均重复三次。

2.2.7.3 激活蛋白对番茄抗灰霉病的诱导作用

灰葡萄孢菌孢子悬浮液的制备和对番茄的接种采用李丽等(2005)方法进行, 用 1 μg/ml 纯化蛋白喷雾处理番茄幼苗, 以清水作对照, 每处理 30 株苗。处理 7d 后, 将灰葡萄孢菌孢子悬浮液(105/ml)用喷雾法接种, 48h 保湿, 一周后进行病情指数调查, 计算防治效果, 各处理均重复三次。

数据分析

按照下面公式进行计算, 统计各项指标:

$$\text{病叶率} = \frac{\text{病叶总数}}{\text{调查总叶数}} \times 100$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总叶数} \times 9} \times 100$$

$$\text{防治效果} (\%) = \frac{\text{CK 病指数}}{\text{CK 病指数} - \text{T 病指数}} \times 100$$

2.2.7.4 激活蛋白对碗豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

- 1、用 1 μg/ml 的激活蛋白液喷雾处理碗豆幼苗, 以蒸馏水为对照, 1 h 后取样;
- 2、称取 0.2 g 的新鲜碗豆叶片, 用液氮研磨后, 全部转入离心管中, 加醇脱氢酶抽提液 0.8 ml 摇匀, 4℃ 15000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 上清为粗酶提取物;
- 3、参照初燕侠等(1994)方法, 醇脱氢酶反应缓冲液 (0.15 M Tris、3 mM NAD⁺) 2.85 ml 加粗酶提取物 200 μl, 混匀后加 95%的乙醇 30 μl 启动反应, 用分光光度计测定 5min 内的 OD340 值的变化。以每分钟 ΔA340 增加 0.001 为一个酶活性单位 (U), 酶活性用 U/mg 表示。

2.3 结果与分析

2.3.1 灰葡萄孢菌最适培养基的确定

灰葡萄孢菌在 PDA、YPD 和燕麦固体培养基上菌落直径随着时间的延长而增加, 经测量发现,

灰葡萄孢菌在 PDA 固体培养基上的生长最迅速，在 6 d 时达到 45.56 mm，在 YPD 培养基上的生长次之，6 d 后达 42.37 mm，而在燕麦培养基上的生长最慢只有 35.66 mm，因此在固体分离纯化和培养灰葡萄孢菌时采用 PDA 培养基较好。

从图 2-1 可看到，YPD 液体培养基培养获得灰葡萄孢菌菌丝体鲜重最高，略高于 PDA 液体培养基中菌丝体的鲜重，而在燕麦培养基中灰葡萄孢菌相对生长最慢，产量最低。为了能尽快获得较大产量的灰葡萄孢菌菌丝体，选用 YPD 液体培养基培养灰葡萄孢菌。

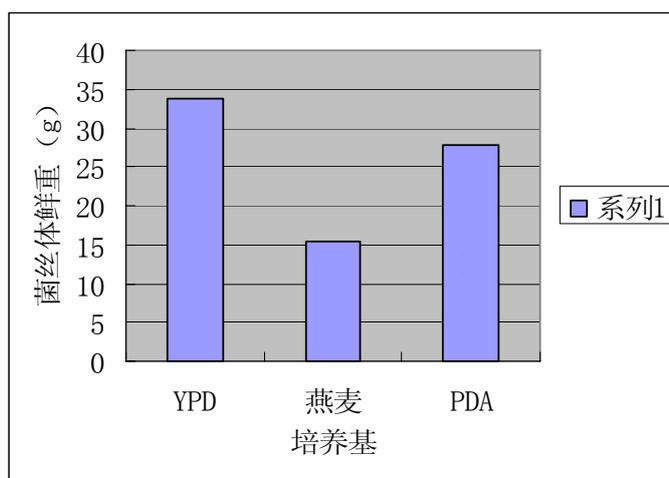


图 2-1 液体培养基中灰葡萄孢菌菌丝体鲜重

Figure2-1: Fresh weight of *Botrytis cinerea* mycelium in liquid medium

2.3.2 烟草愈伤组织和悬浮细胞的获得

从烟草无菌苗上切取幼嫩叶片，置于 MS 培养基上，25℃暗培养，在叶片的边缘形成愈伤组织；切下烟草愈伤组织进行继代培养，获得疏松、生长迅速的愈伤组织 (如图 2-2)；疏松的愈伤组织转移到 MS 液体培养基中，得到生长迅速、分散良好的悬浮细胞系,可用于测定纯化蛋白引起的过氧化氢含量的变化。



图 2-2: 疏松的愈伤组织

Figure2-2: The callus tissues

2.3.3 灰葡萄孢菌激活蛋白的分离纯化及纯化蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响

灰葡萄孢菌菌丝体研磨后，迅速加入提取缓冲液(0.025 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH8.0, 0.002mol/L EDTA), 沸水浴之后离心，上清即为灰葡萄孢菌激活蛋白粗提液。



图 2-3 灰葡萄孢菌激活蛋白粗提液

Figure2-3: SDS-PAGE of crude protein isolated from *Botrytis cinerea*

注: 1: 分子筛洗脱蛋白 2: Marker;

Note: 1 Crude protein of *Botrytis cinerea*; 2 Marker

蛋白质粗提液进行离子交换层析时，采用三个浓度梯度(12.5%、25%、100%)洗脱，获得多个峰(图 2-4)，检测各洗脱峰对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响，发现第二个洗脱峰中的蛋白显著促进烟草悬浮细胞过氧化氢含量的增加(表 2-1)，而穿透峰和其他洗脱峰与相应盐浓度的对照无显著差异，表明该洗脱峰中含目的蛋白，说明它可被 250 mM KCl 洗脱下来。进一步用

分子筛柱对目的蛋白峰溶液进行纯化（图 2-5），同样测定洗脱峰对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响，发现第一个洗脱峰中含目的蛋白，SDS-PAGE 检测为单一条带的蛋白（图 2-6），分子量约为 35KDa。

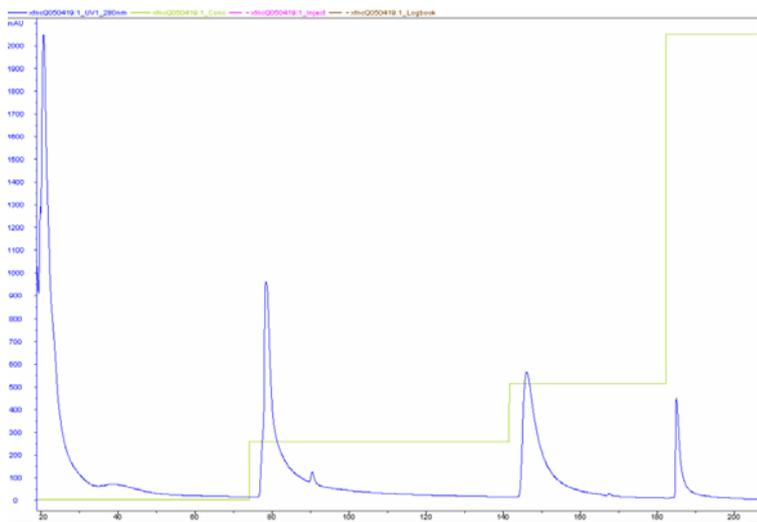


图 2-4 Hitrap: Q FF 蛋白离子交换层析过柱图谱

Figure2-4: The eluted curve of Hitrap Q FF ion exchange chromatography

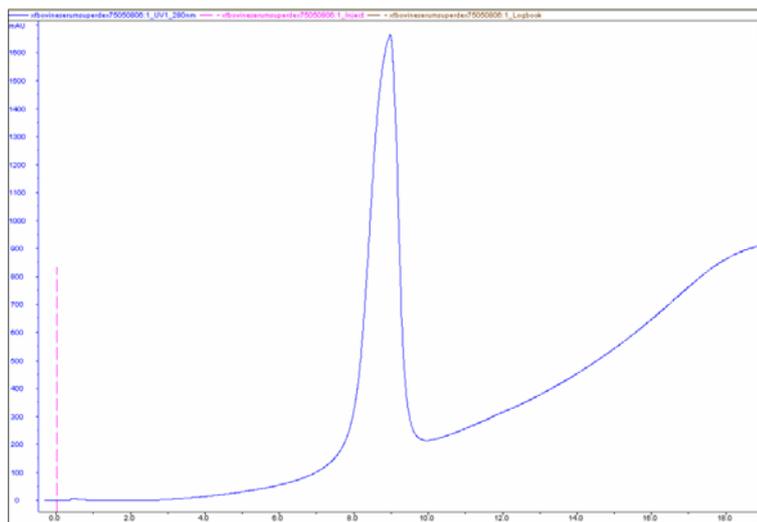


图 2-5: 过 HitrapSuperdex75 柱的图谱

Figure 2-5: The eluted curve of HitrapSuperdex75

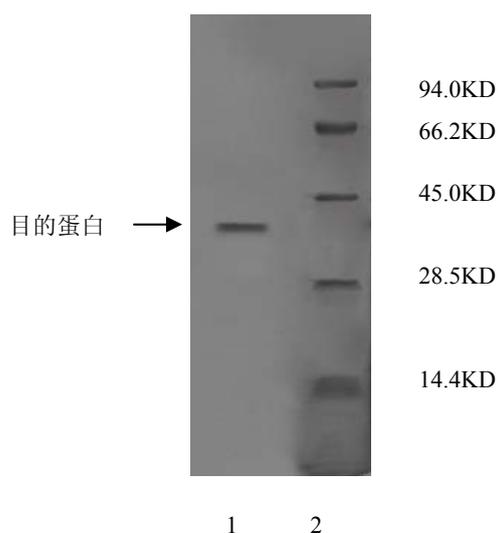


图 2-6: 灰葡萄孢菌激活蛋白的 SDS-PAGE

Figure 2-8: SDS-PAGE of the activator protein from *Botrytis cinerea*

注: 1: 分子筛洗脱蛋白 2: Marker;

Note 1 Protein eluted by molecular sieve: 2 Marker

表 2-1 各纯化步骤中烟草悬浮细胞过氧化氢含量变化

Table 2-1 Variations of H₂O₂ content in tobacco suspension cells in the process of protein purification.

	蛋白质粗提液 (ng. g-1FW)	离子柱第一洗脱峰 (ng. g-1FW)	分子筛第一洗脱峰 (ng. g-1FW)
蛋白溶液	7.52±0.76A	8.02±0.53A	8.27±0.66A
对照	3.86±0.54B	4.93±0.35B	5.05±0.25B

注: 表中数据后不同大写字母表示显著水平为 P<0.01

Note: Means ± SD values followed by the same letter in the same column are not significantly different at P<0.01

2.3.4 质谱鉴定纯化蛋白及氨基酸序列测定

2.3.4.1 蛋白质氨基酸序列测定

纯化的蛋白经 SDS-PAGE 检测, 单一蛋白条带经胰蛋白酶酶解后, 用电喷雾串联质谱测定。质谱测序共获得三段肽段的序列, 分别是 NKELPDNEPTK, SPTSNTYIVFGEAK, NILFVINQPEVYK, 与 GenBank 里数据库比对后, 发现有两个肽段(SPTSNTYIVFGEAK, NILFVINQPEVYK)与编号为肽段 2-3 的脉孢菌序列理论蛋白序列较为一致, 第三个肽段未能发现有相一致的序列。

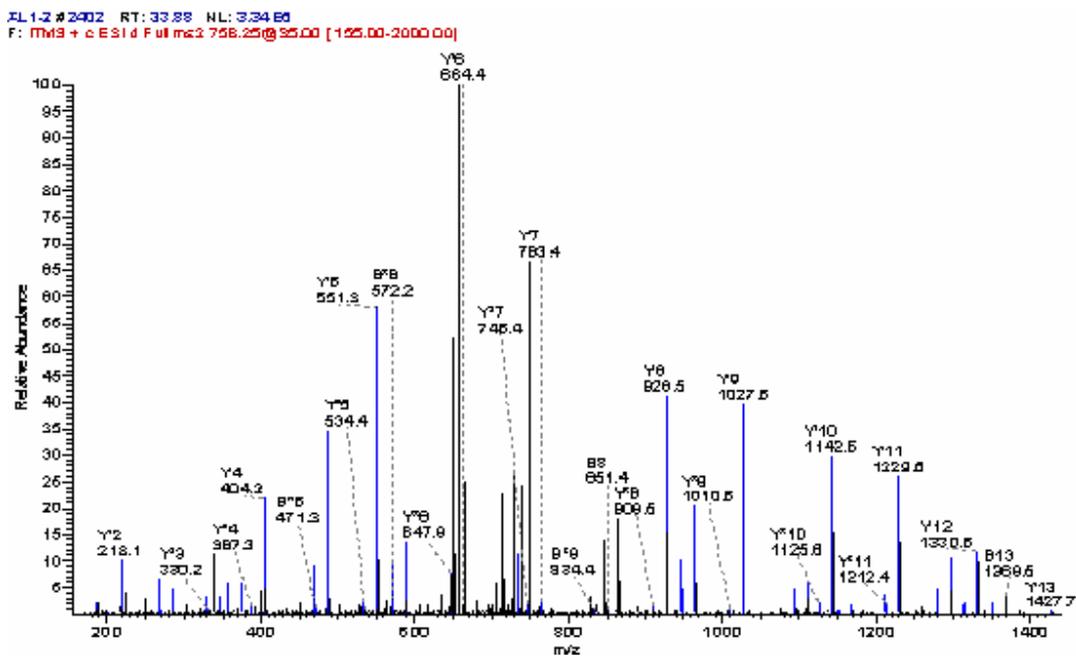


图 2-8 肽段序列 SPTSPTYVIFGEAK 二级质谱图

Figure2-8: Secondary mass spectrometry of peptide SPTSPTYVIFGEAK

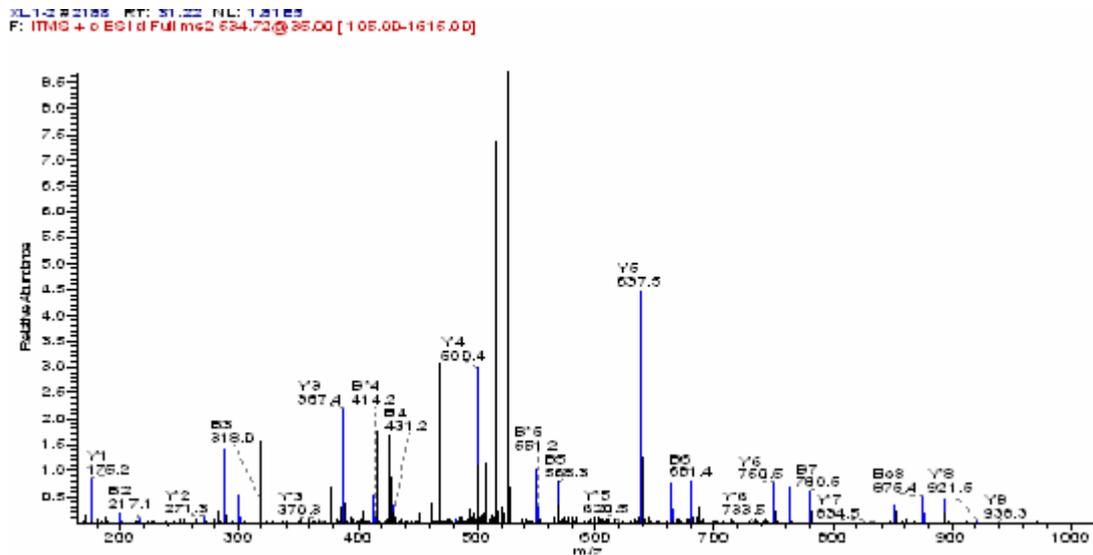


图 2-9 肽段序列 ESTLHLVLR 二级质谱图

Figure2-9: Secondary mass spectrometry of peptide ESTLHLVLR

2.3.5 激活蛋白生物活性测定结果

2.3.5.1 激活蛋白对植物豌豆生长的促进作用

5 天后，测量豌豆幼苗高度，发现用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化蛋白处理的豌豆苗高度均高于对照，达极显著水平（表 2-2）。说明灰葡萄孢菌激活蛋白对豌豆幼苗的生长有明显的促进作用。

表 2-2: 纯化蛋白对豌豆生长的影响

Tab.2-2: Effect of activator protein on growth of pea seedlings

蛋白浓度 protein concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	豌豆苗高 height of pea seedlings (cm)	
	纯化蛋白 Activator	对照 CK
10	17.88 \pm 0.72A	16.42 \pm 1.12B
1	18.05 \pm 0.98A	15.33 \pm 1.26B

注：表中数据后不同大写字母表示显著水平为 $P < 0.01$ $n=60$

Note: Means \pm SD values followed by the same letter in the same row are not significantly different at $P < 0.01$ $n=60$

2.3.5.2 激活蛋白对番茄抗灰霉病的诱导作用

分别用纯化蛋白和清水喷雾处理番茄叶片 7 天后，用灰葡萄孢菌孢子悬浮液喷雾法接种番茄叶片，发现纯化蛋白能明显提高番茄幼苗对番茄灰霉病的抗性，所处理的幼苗叶片病指由 16.02 下降到 7.31，病叶率降低约 21%，控制效果达 50.51%，各处理均达极显著水平（表 2-3）。

表 2-3: 纯化蛋白对番茄幼苗抗番茄灰霉病的诱导效果

Tab.2-3: Resistance to gray mold of tomato induced by activator protein

处理 treatment	诱导抗病性 resistance to gray mold		
	病叶率 disease leaves rate (%)	病指 disease index	防效 defensive effect (%)
纯化蛋白 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30.21 \pm 2.33A	7.31 \pm 0.66 A	50.51
对照 CK	51.05 \pm 6.27B	16.02 \pm 7.43 B	

注：表中数据后不同大写字母表示显著水平为 $P < 0.01$ $n=30$

Note: Means \pm SD values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $P < 0.01$ $n=30$

2.3.5.3 激活蛋白对豌豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化蛋白处理豌豆幼苗 1 h 后，醇脱氢酶活性单位平均值比对照有所提高，说明灰葡萄孢菌激活蛋白能够诱导豌豆幼苗组织内的醇脱氢酶活性的升高，见表 3-9。

表 2-4: 纯化蛋白对豌豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

Tab. 2-4: Effect of activator protein on alcohol dehydrogenase of pea seedling

处理 treatment	醇脱氢酶活性 dehydrogenase activity (U·mg-1)
纯化蛋白 Activator 1 μ g/ml	9.35 \pm 0.57A
对照 CK	7.93 \pm 0.26 B

注: 表中数据后不同大写字母表示显著水平为 $P < 0.01$

Note: Means \pm SD values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $P < 0.01$

2.4. 小结与讨论

灰霉病是危害蔬菜, 果树及花卉等多种植物的重要病害, 在保护地果蔬生产中尤为突出。世界各地也有葡萄, 草莓等遭受灰霉病侵害的报道。灰霉病最初只是流行于欧洲和美洲, 自 20 世纪 80 年代以来才开始在我国发生蔓延 (李保聚, 1999)。近年来, 随着我国果蔬设施栽培面积迅速扩大, 而大棚内小气候环境十分有利于植物病害的发生和发展, 灰霉病等次要病害已上升为主要病害, 对茄果类, 瓜类, 葱韭类, 浆果类果蔬的产量造成很大的影响, 成为果类蔬菜生产的主要限制因素。如茄子, 黄瓜, 番茄, 韭菜, 西葫芦等蔬菜灰霉病发生面积达 60% 以上, 平均减产 20%-40%, 严重可达 60% 以上。引起作物灰霉病的病原菌有十多种, 其中主要有两种: 一种是灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*), 可侵染番茄, 茄子, 黄瓜, 西葫芦, 草莓, 葡萄, 苹果, 菜豆等多种作物; 一种是葱鳞葡萄孢菌 (*Botrytis squamosa* J. CWaeker), 可以侵染 200 多种寄主, 是韭菜, 葱, 蒜等作物灰霉病的病原菌 (甘晓静&黎起秦, 2004)。

对灰霉病防治效果突出的杀菌剂种类并不多, 长期使用单一品种的农药可促使病菌抗药性的增强, 并容易对人体健康和环境造成负担。随着人民生活水平的提高和个人健康意识的增强, 对农产品质量的要求越来越高, 蔬菜的无公害生产将是今后的发展方向, 近年来, 生物防治灰霉病在国内外已有多种报道, 如利用木霉菌可有效防止葡萄灰霉病及番茄灰霉病。本研究结果表明, 灰葡萄孢菌激活蛋白可有效抑制番茄灰霉病, 所处理的幼苗叶片病指由 16.02 下降到 7.31, 病叶率降低约 21%, 控制效果达 50.51%。此外, 该蛋白同时还能促进幼苗生长发育。这些结果与交链孢菌, 稻瘟菌激活蛋白的防病促生长效果相吻合, 进一步说明了激活蛋白作为一类新型的生物蛋白农药具有广阔的应用前景和开发价值。

此外,本研究还发现,灰葡萄孢菌激活蛋白能够诱导豌豆幼苗组织内的醇脱氢酶活性的升高。醇脱氢酶是以乙醇为底物、以 NAD^+ 为电子受体的氧化还原酶,反应后 NAD^+ 还原成 NADH ,其还原速度与酶活性成正比。土壤渍水危害是渍水造成的缺氧环境使植物根系和地上部的有氧呼吸受到抑制和无氧呼吸得到加强所致,作为植物对渍水(或缺氧)胁迫的一种反应,常表现为醇脱氢酶活性的显著上升。测定发现处理后豌豆幼苗醇脱氢酶活性提高,说明灰葡萄孢菌激活蛋白可增强植物的抗涝性,在一定程度上可以保护受渍水危害的植物。

本实验建立了灰葡萄孢菌 35KDa 激活蛋白的纯化方法:首先从提取灰葡萄孢菌激活蛋白粗提液,先经 Hitrap Q FF 离子交换柱层析,通过洗脱峰对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的变化确定目的蛋白峰,再经 HitrapSuperdex 75 分子筛层析对目的蛋白峰进行进一步纯化,SDS-PAGE 检测得到分子量为 35KDa 的单一蛋白条带。质谱分析测定到该蛋白的两条肽段 NILFVINQPEVYK, SPTSNTYIVFGAEK 与脉胞菌的肽段 2-3 高度相似;同时,该蛋白也与 α -NAC 蛋白保守序列有高度同源性,肽段序列 SPTSNTYIVFGAEK 与水稻 α -NAC 蛋白 gi|46575976 保守序列相同;此外,多肽序列 ESTLHLVLR 与泛素化蛋白 gi|2551 高度同源。生测结果证明,本实验成功建立了比较完善的灰葡萄孢菌激活蛋白分离纯化技术路线,为进一步发掘新的激活蛋白奠定了技术基础。

本实验还确立了目标蛋白跟踪方法:烟草悬浮细胞过氧化氢含量的变化。1983年,Doke首次报道了一种有别于传统认知的植物防御反应,那就是 O_2^- 和 H_2O_2 的生成。随着研究的深入,已经在多种植物体—病原菌互作过程中发现了 O_2^- 和 H_2O_2 ,活性氧物质的生成被认为是发生过敏反应的一个显著特征,是植物体受到病原菌入侵时激发的最早期防御反应(Dixon *et al.*,1994; Mehdy *et al.*,1994; Baker *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*,1996)。但是,也有报道指出,胞外活性氧物质的积累与过敏反应的发生没有必要的联系(Baker *et al.*, 1995; Glazener *et al.*,1996)。本实验室的研究工作也表明,稻瘟菌激活蛋白可以引起烟草悬浮细胞过氧化氢的积累,但未发现烟草叶片生成病斑,这就意味着激活蛋白没有引起烟草的过敏反应。但大量实验结果表明,过氧化氢是激发子诱导植物发生防御反应的早期信号是毋庸置疑的。本研究正是利用了蛋白激发子的这一特性,通过检测过氧化氢在烟草悬浮细胞的积累监测纯化过程中目标蛋白的流向,实验证明,经Hitrap Q FF离子交换柱和HitrapSuperdex 75 分子筛柱洗脱的蛋白均可显著提高烟草悬浮细胞过氧化氢的含量。

质谱鉴定发现,纯化得到的 35kDa 灰葡萄孢菌激活蛋白与 NAC 蛋白具有同源性。NAC 蛋白(新生多肽复合体 nascent-polypeptide-associate complex)是 Wiedmann B 等于 1994 年发现的一类新型蛋白,这种蛋白可以阻止胞质内新生核糖体结合多肽与相关蛋白的不正确连接。在核糖体信号肽序列在被完全翻译出时,NAC 会结合在新生多肽的特定区域,研究发现,即使在信号肽序列存在的条件下,NAC 蛋白的缺失也会引起信号识别蛋白与多肽的错误结合。迄今为止,NAC 蛋白被认为是第一个被鉴定出的与新生多肽链相关的核糖体结合蛋白。后期的酶解试验进一步证明,NAC 蛋白起到了防止新生多肽链与胞质内因子的非正常结合作用(Wang *et al.*, 1995)。NAC

蛋白的结合与释放是以“quantal unit”为单位的，而非以单个氨基酸为单位，在共翻译过程中，NAC蛋白的结合与折叠都具有高保真性。NAC蛋白还被认为可以通过调控核糖体接近内质网中的转运核心（translocation pore）从而影响蛋白转运过程（Lauring *et al.*, 1995; Moller *et al.*, 1998）。在真核生物细胞内，NAC蛋白有 alpha-NAC 和 beta-NAC 两种存在形式，且二者有很高的同源性（Moller *et al.*, 1998）。

多项研究发现，NAC蛋白还具有其他多种功能，不仅仅局限于翻译过程，例如，人体细胞内的 alpha-NAC 蛋白就具有与转录相关的功能（Yotov *et al.*, 1998），酵母细胞的 NAC 蛋白在将蛋白转运至线粒体内发挥作用（Funfschilling *et al.*, 1999）。NAC 蛋白体内的重要性还体现在其果蝇和秀丽线虫的突变体导致胚胎早期死亡（Markesich *et al.*, 2000）。在细胞相互作用层面上，NAC 蛋白的改变常引起许多人类疾病，比如 Alzheimer, Trisomy21, AIDS 和恶性脑瘤，NAC 蛋白与 apoptosis 的关系近期已有报道（Kim *et al.*, 2002; Bloss *et al.*, 2003）。在真核生物中，从低等真核生物到高等生物人类，NAC 蛋白是高度保守的。NAC 的基因的两个亚基是有不同的基因编码的，但是两个亚基之间存在很大的保守序列。在古细菌（*M.marburgensis*）的基因组中，只有一个 NAC 基因，经过序列分析发现从古细菌到高等生物，所有的 NAC 蛋白都有一个 NAC 功能域（Makarova *et al.*, 1999）。部分的 NAC 蛋白还有泛素结合区域（Ubiquitin-associated domain UBA）揭示了 NAC 与泛素化和细胞凋亡有一定的联系。本研究通过质谱鉴定发现该蛋白与 alpha-NAC 具有同源性，说明灰葡萄孢菌激活蛋白可能具有 NAC 蛋白的某些功能，但此类蛋白引发植物的抗性尚未见报道。

第三章 灰葡萄孢菌 cDNA 文库的构建及基因克隆

3.1 材料

3.1.1 菌株和载体

灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*), 由中国农业科学院植物保护研究所药物工程实验室保存。pMD18-T Vector 和 *E.coli* JM109 高效感受态细胞购于 TaKaRa 公司。

3.1.2 主要试剂

Magnetight Oligo(dT) Particle (Novagen公司)

T4 DNA聚合酶、末端脱氧核糖核酸转移酶 (BioLab公司产品)

SuperScript™ III反转录酶、Trizol试剂 (Invotrigen公司)

RNase H (北京新经科生物技术公司)

2×Pfu PCR MasterMix (北京天根生物技术公司)

DEPC (Sigma公司)

其他常规试剂都购于北京市的各生物技术公司。

3.1.3 缓冲液配制

焦炭酸二乙酯(DEPC)处理水: 向蒸馏水中加入 DEPC 至终浓度为 0.1%, 搅拌至少 12h, 然后 121°C 灭活 DEPC 30 min。

磁珠洗涤液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 150mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA。

5×第一链合成缓冲液: 250 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT。

RNaseH 缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT。

10×PCR反应缓冲液: 200mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 25mmol/L MgCl₂, 250mmol/L KCl, 0.5 %Tween-20, 1mg/ml 高压过的明胶。

溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0); 溶液 I 可成批配制, 每瓶 100ml, 高压灭菌 15 min, 储存于 4°C 冰箱;

溶液 II: 0.1 mol/L NaOH, 1%SDS;

溶液 III: 5 mol/L KAc 60ml, 冰醋酸 11.5ml, H₂O 28.5ml, 定容至 100ml, 过滤灭菌, 保存

在 4℃。

3.1.4 主要实验仪器及耗材

电子分析天平(Sartorius)
紫外可见光分光光度计(Shimadzu UV-2550)
高速冷冻离心机(Heraeus D37520 Osterode)
微型离心机(Eppendorf 5415D)
超速冷冻离心机(Beckman Optima L-looxp)
凝胶成像系统(Multigenins Syngene)
蛋白电泳系统(Bio-Rad)
超纯水仪(Millipore ZMQ55VOT1)
电转仪(Bio-Rad Trans-Blot SD cell)

3.2 试验方法

3.2.1 灰葡萄孢菌总 RNA 的提取

用 Trizol 试剂 (Invotrigen 公司) 法提取灰葡萄孢菌的总 RNA。为防止 RNA 的降解, 提取 RNA 所用的器具均用 0.1%DEPC 室温下浸泡 12h 以上, 然后 121℃ 高温处理。

- 1、取适量菌饼(经液氮速冻后保存于超低温冰箱)置于研钵内, 加液氮, 研磨成粉末;
- 2、取加有 1 ml Trizol 试剂的 1.5 ml 离心管, 将 50~100mg 研磨好的样品加入离心管, 混匀, 室温放置 5min 后, 4℃, 12000 rpm/min 离心 5min;
- 3、将上清液转入新离心管中, 加 200 ul 氯仿, 振荡混匀后, 室温放置 15 min, 4℃, 12000 g 离心 15 min;
- 4、小心吸取上层水相至另一离心管中, 加 0.5 ml 异丙醇, 混匀, 室温放置 5~10 min。4℃, 12000 g 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉于管底;
- 5、加 1 ml 75%乙醇, 温和振荡离心管。4℃, 8000g 离心 5 min, 尽量弃上清;
- 6、室温凉干或真空干燥 5-10 min (RNA样品不要过于干燥, 否则很难溶解), 用 50ul 无 RNA 酶水溶解 RNA 样品, 从总 RNA 样品中吸取 10μl 稀释 300 倍, 用分光光度计测 OD₂₆₀, OD₂₈₀, 按照 1 OD₂₆₀=40 μg/ml, 计算样品浓度; OD₂₆₀/ OD₂₈₀ 比值检测样品纯度。取 1μl 总 RNA 样品, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。立刻进行下一步的实验或 -80℃ 冰箱保存。

3.2.2 用磁珠 PCR 法获得灰葡萄孢菌总 cDNA

参照张学敏等(1999)方法, 用磁珠和 PCR 方法自小量 RNA 中获得 μg 级甚至 mg 级的 cDNA。

3.2.2.1 cDNA 第一链合成

1、向离心管中加入 10 μl (100 μg) 磁珠，置于磁性铁架上，磁珠将靠近磁铁的一侧管壁，小心移去上清，不要搅动磁珠；

2、取下离心管，用 25 μl 2 \times 结合缓冲液轻柔重悬磁珠，如上移去上清，再加入 25 μl 2 \times 结合缓冲液，轻柔重悬磁珠；

3、取总 RNA 约 200 ng，稀释至 25 μl ，将重悬液 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min，然后迅速移至冰上放置 1 min，然后加入到含磁珠的离心管中，充分混匀，混匀后 22 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min，使磁珠上的 oliga dT 与 mRNA 杂交，如上将离心管中的未结合的核酸和结合缓冲液移去；

4、再在离心管中加入 50 μl 洗涤缓冲液洗涤磁珠，如上小心移去洗涤缓冲液；重复此步骤 2 次；

5、在离心管中加入 50 μl 2 \times 第一链合成缓冲液洗涤磁珠，如上小心移去合成缓冲液，以除去任何残留的洗涤缓冲液；

6、配制反转录混合物（使用前临时配制）：

10 μl	DEPC 处理水
4.0 μl	5 \times 第一链合成缓冲液
2.0 μl	0.1mol/L DTT
1.0 μl	10mmol/L dNTP 混合物
1.0 μl	RNasin (10U/ μl)

总体积 18 μl

向磁珠中加入加入 18 μl 反转录混合物，轻柔重悬磁珠，37 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min，加入 1 μl 反转录酶，混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min，以磁珠上 oliga dT 为引物，从其 3'端开始延伸。然后温度提高到 42 $^{\circ}\text{C}$ ，温育 1 h，温育过程中每间隔 15 min 摇动反应管，使磁珠保持悬浮状态，然后自然冷却到室温。

3.2.2.2 cDNA 第二链合成与 cDNA 的扩增

1、配制 T4 DNA 聚合酶反应混合物（使用前临时配制）：

41.5 μl	超纯水
5.0 μl	10 \times T4 DNA 聚合酶反应缓冲液
2.5 μl	10mmol/L dNTP 混合物 (0.1 mmol/L dTTP 或不含)
1 μl	T4 DNA 聚合酶

总体积 50 μl

吸附共价连接有 cDNA 的磁珠，移去反转录反应溶液，加入 50 μl T4 DNA 聚合酶反应混合物，轻柔重悬磁珠，16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。磁珠上未杂交的 oliga dT 可被 T4 DNA 聚合酶的外切活性去除。离心管在振荡器上剧烈振荡 30 s，然后 75 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min，灭活 T4 DNA 聚合酶，吸附磁珠，移去缓冲液；

2、配制 RNaseH 反应混合物（使用前临时配制）：

20 μ l	RNaseH 缓冲液
0.5 μ l (0.5U)	RNaseH

总体积 20.5 μ l

加入 20 μ l RNaseH 反应混合物, 轻柔重悬磁珠, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 以除去 mRNA, 移去 RNaseH 反应混合物。加入 50 μ l 1 mmol/L EDTA, 于 75 $^{\circ}$ C 加热 5 min。吸附磁珠, 去除 EDTA 溶液;

3、配制末端转移酶反应混合物 (使用前临时配制):

15.5 μ l	超纯水
10 μ l	5 \times TdT 反应缓冲液
12.5 μ l	0.1%BSA
10 μ l	10 mmol/L dATP
2 μ l	末端脱氧核糖核酸转移酶

总体积 50 μ l

加入 20 μ l 末端转移酶反应混合物, 轻柔重悬磁珠, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 给 cDNA 第一链加上 polyA 尾巴, 然后加入 2 μ l 500mmol/L EDTA 终止反应, 吸附磁珠, 去除缓冲液。

4、配制 Pfu 聚合酶反应混合物 I (使用前临时配制):

22 μ l	超纯水
3 μ l	T1 引物(10 μ mol/L)
25 μ l	2 \times Pfu PCR MasterMix

总体积 50 μ l

加入 50 μ l Pfu 聚合酶反应混合物 I(含 30 pmol T1 引物), 轻柔重悬磁珠, 30 $^{\circ}$ C 放置 3min, 40 $^{\circ}$ C 放置 3 min, 72 $^{\circ}$ C 放置 20 min, 使引物延伸, 合成 cDNA 的第二链, 然后慢慢冷却至室温, 吸附磁珠, 去除 Pfu 聚合酶反应混合物。

5、取 15 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液稀释至 150 μ l, 取 50 μ l 稀释液轻柔重悬磁珠, 吸附磁珠, 去除稀释液, 重复洗涤两遍, 以完全去除多余的 T1 引物。

6、配制 Pfu 聚合酶反应混合物 II (使用前临时配制):

48 μ l	超纯水
50 μ l	2 \times Pfu PCR MasterMix

总体积 100 μ l

加入 100 μ l Pfu 聚合酶反应混合物 II, 轻柔重悬磁珠, 加热至 95 $^{\circ}$ C 2 min 以释放第二链 cDNA, 在 95 $^{\circ}$ C 下吸附磁珠, 移取 Pfu 聚合酶反应混合物 II 至另一预冷的离心管中, 迅速置于冰上。保存好磁珠备用。

7、在 Pfu 聚合酶反应混合物 II 加入 0.5 μ l T2 引物 (1 μ mol/L), 30 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 40 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 72 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 使得 T2 引物得以延伸, 合成出新的 cDNA 第一链。立刻升温到 95 $^{\circ}$ C, 加入 3 μ l amp1 引物 (10 mmol/L), 持续 2 min。按照下面步骤开始循环: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30s;

72℃, 15min (循环次数 15 次)。然后升温至 95℃, 加入 3 μl amp2 引物 (10 mmol/L), 持续 2 min。按照下面步骤进行 PCR 扩增 cDNA: 95℃, 30 s; 60℃, 30s; 72℃, 15min (循环次数 15 次)。最后 72℃延伸 30 min。

8、取 5 μl 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分离, 对扩增产物进行分析。如果未能看到 cDNA 弥散带, 取 15 μl 扩增产物, 进行 2 次扩增。

配制 Pfu 聚合酶反应混合物 III (使用前临时配制):

34 μl	超纯水
3 μl	amp1 引物(10 μmol/L)
3 μl	amp2 引物(10 μmol/L)
40 μl	2×Pfu PCR MasterMix
总体积 80 μl	

把 80 μl Pfu 聚合酶反应混合物 III 与 15 μl 扩增产物混合均匀, 按照下面步骤进行 PCR 扩增 cDNA: 95℃, 30 s; 60℃, 30s; 72℃, 15min (循环次数 15 次)。最后 72℃延伸 30 min。取 5 μl 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

3.2.3 灰葡萄孢菌 cDNA 文库的构建

3.2.3.1 连接

1、取 50 μl PCR 扩增产物通过层析离心柱(chromaspin-100 离心柱), 收集含大片断的 cDNA, 去除引物和小 cDNA 片段;

2、加入 3 倍体积的无水乙醇和 1/10 醋酸钠缓冲液到离心管中, 于 -20℃ 放置 15 min;

3、13000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 75%乙醇洗沉淀一次, ;

4、将沉淀重悬于 50 μl Tag PCR 反应缓冲液, 72℃ 反应 10 min;

5、加入 3 倍体积的无水乙醇和 1/10 醋酸钠缓冲液到离心管中, 于 -20℃ 放置 15 min;

6、13000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 75%乙醇洗沉淀一次, 在真空干燥沉淀;

7、沉淀用 H₂O 溶解, 调整浓度, 取 7.5 μl 约 400 μg 的 cDNA 到新离心管中, 1 μl T 载体和 1 连接 buffer, 再加入 0.5 μl T4 DNA 连接酶, 一共 10 μl 连接反应体系, 于 16℃ 连接过夜;

3.2.3.2 转化

1、从 -70℃ 冰箱中取出高效感受态细胞 JM109 (TAKARA, 转化效率达到 10⁹)

2、按照 5.0 μl 连接产物与 100 μl 感受态细胞混匀, 转移到预冷的电转杯中, 冰上放置 5 min;

- 3、按以下电转设置在 BIO-RAD 公司的电转仪上进行电转化：电压 1.8 kV，电阻 200 Ω ，电容 25 μ F；
- 4、加入 1ml 液体 LB 培养基(不含 Amp)到管中混和均匀，于 37 $^{\circ}$ C，200 rpm 振荡培养 10~40 min；
- 5、按照每块平板加入 100 μ l 菌液，涂布于含 Amp/X-gal/IPTG 的筛选平板上，正面向上放置半小时；
- 6、待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。

3.2.4 文库滴度检测与保存

- 1、分别以稀释浓度为 10^2 ， 10^3 ， 10^4 文库样品涂布 LB 平板，每板涂布量为 100 μ l；
- 2、37 $^{\circ}$ C 培养 12 h，根据涂板检测结果计算每一平板的滴度

$$\text{每一平板的滴度(cfu/ml)} = \frac{\text{平板上的克隆数} \times \text{稀释浓度}}{\text{涂布体积(ml)}}$$

- 3、根据每一平板的滴度计算整个 cDNA 文库的平均滴度及总容量；
- 4、随机挑取 25 个单克隆，提取质粒，用 amp1 和 amp2 引物进行 PCR 检测文库平均插入片段大小。操作如下：
 - (1) 从文库中随机挑取 25 个阳性克隆，分别接种于 5ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中，220rpm，37 $^{\circ}$ C，振荡培养 12h。
 - (2) 培养后菌液 13000 rpm 离心 1 min，弃上清。
 - (3) 把沉淀完全悬浮于 100 μ l 悬浮液（溶液 I）中。
 - (4) 加入 200 μ l 裂解液（溶液 II），室温下轻轻混匀，放置 5min。
 - (5) 加入 150 μ l 中和液（溶液 III），室温下轻轻混匀 3min。
 - (6) 13000 rpm 离心 10 min，将上清液转入一个新的 2ml Eppendorf 离心管中，加入 0.8ml 纯化树脂（使用前摇匀），混匀 3 min。
 - (7) 取 0.8ml 混和液盛于离心纯化柱中，13000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，再取剩下的混和液盛于离心纯化柱中，13000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液。
 - (8) 加入 600 μ l 80%异丙醇（或乙醇），13000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液。
 - (9) 重复步骤 8 两次，最后一次 13000 rpm 离心 3 min，尽量将异丙醇（或乙醇）去除干净。
 - (10) 取出离心纯化柱，将其套入一个干净的 1.5 ml 或 2 ml Eppendorf 离心管中，加入 50 μ l 消毒 TE 缓冲液于纯化树脂上。室温下放置 5 min 后，13000 rpm 离心 1min。
 - (11) 离心管中收集的液体即是洗脱下来的质粒 DNA，取 2 μ l 电泳（1%琼脂糖）检测。
 - (12) 稀释质粒，按照下面的反应体系，用 amp1 和 amp2 引物扩增，琼脂糖电泳检测插入片

段的情况。

PCR 检测反应体系如下：

稀释质粒 DNA	1 μ l
Amp1(2.5 mM)	1 μ l
Amp2(2.5 mM)	1 μ l
10 \times Buffer	2.5 μ l
dNTP(10 mM)	0.4 μ l
Taq DNA 酶(2 U/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O	18.6 μ l

按以下程序进行反应：

Step 1	95 $^{\circ}$ C	3 min
Step 2	95 $^{\circ}$ C	0.5 min
Step 3	60 $^{\circ}$ C	0.5 min
Step 4	72 $^{\circ}$ C	1 min
Step 5	Goto step2	32 cycles
Step 6	72 $^{\circ}$ C	10 min

每个 PCR 反应产物取 5 μ l 电泳（1%琼脂糖）检测。

5、将所有平板中每个加入 3 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，充分洗脱菌落，将每个平板的洗脱液混合，37 $^{\circ}$ C 震荡培养 3 小时，加入等体积的 50% 灭菌甘油，分装成 500 μ l /管，-70 $^{\circ}$ C 保存为永久性文库。

3.2.5 灰葡萄孢菌激活蛋白基因的克隆

3.2.5.1 引物设计

根据蛋白质谱测序结果，依据此设计简并引物：

1U: 5'-CCNGAYAAAYGARGARCCNACNAA-3'

1D: 5'-TTNGTNGGYTCYTCRTRTCNGG-3'

2U: 5'-ACNTAYATHGTNTTYGG-3'

2D: 5'-CCRAANACDATRTANGT-3'

3U: 5'-ATHAAYCARCCNGARGT-3'

3D: 5'-ACYTCNGGYTGRTT DAT-3'

其中获得氨基酸序列中有两段 SPTSNTYIVFGEAK, NILFVINQPEVYK 与脉胞菌中的一理论蛋白部分序列较为一致, 故设计特异引物:

NCA1: 5'-AAGGCCATTGAGAAGCTGC-3'

NCA2: 5'-GCCATGATGGAGTTGACG-3'

NCB1: 5'-GGAGGAGGTTAAGAAGACCC-3'

NCB2: 5'-CAAGCTCGATGTCCTTGTC-3'

TOP1: 5'-ATGGCCGATCCCAGAGTT-3'

引物用 DNAMAN 5.2.2 软件设计和分析评价, 由上海生物工程公司合成, PAGE 方式纯化。

3.2.5.2 从 cDNA 中 PCR 扩增探针

以灰葡萄孢菌 cDNA 为模板进行目的基因的扩增, PCR 反应体系如下:

Pfu MarsterMix	10 μ l
Primer 1	1.0 μ l
Primer 2	1.0 μ l
模板	1.0 μ l
去离子水	7.0 μ l
<hr/>	
总体积	20 μ l

进行常规 PCR 或降落 PCR, 扩增片段。

3.2.5.3 PCR 片段与 T 载体的连接

配制加 A 反应混合物 (使用前临时配制):

33 μ l	回收 PCR 片段
4 μ l	10 \times PCR Buffer
2 μ l	dNTP (10mmol/L)
1 μ l	Tag 酶
<hr/>	
总体积	40 μ l

把加 A 反应混合物 72 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 加 120 μ l 无水乙醇和 4 μ l 乙酸钠, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 20 min, 13000 rpm 离心 15 min。再用 70%乙醇洗, 13000 rpm 离心 5 min。沉淀真空干燥 10 min 后

用 4.5 μL 无菌水溶解，用于与 pMD18-T 载体连接。

按照 TaKaRa 的 pMD18-T Vector 说明配制连接反应混合物：

4.5 μl	DNA 片段
0.5 μl	pMD18-T 载体
5 μl	Solution I
<hr/>	
总体积	10 μl

把连接反应混合物在 16 $^{\circ}\text{C}$ 保温 12-16 小时。然后加 1 μl 乙酸钠 (1/10 体积) 和 33 μL 无水乙醇(3 倍体积), -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 20 min, 13000 rpm 离心 15 min。再用 70%乙醇洗, 13000 rpm 离心 5 min。沉淀真空干燥 10 min 后用 5 μL 无菌水溶解。

3.2.5.4 连接产物的转化

- (1) 从-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出感受态细胞置于冰浴上融化；
- (2) 取待转化的连接产物 5.0 μl 和试剂 A 20 μl 到反应管中，再用无菌水稀释至 100 μl 冰上备用；
- (3) 将以上混合液加入到一感受态细胞管 (80~100 μl)，混匀，冰浴 20min，随后室温放置 10 min；
- (4) 向管中加入 400 μl 液体 LB 培养基(不含 Ampicillin)，混匀；
- (5) 混匀后的培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 振荡培养 10~40min；
- (6) 取 100 μl 涂布于含 Ampicillin 的筛选平板上，正面向上放置半小时；
- (7) 待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h。

3.2.5.5 克隆的初步鉴定与测序

随机挑取 3 个白色菌落接种到 5.0 ml 含 80 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 小时，取 3.0 ml 培养液抽提质粒 DNA，用 *EcoRI* 和 *Hind III* 酶切鉴定阳性克隆，然后由上海申能博采生物技术公司进行序列测定。

3.3 结果与分析

3.3.1 总 RNA 的提取

RNA 质量的高低直接影响 cDNA 的质量，而在实际操作中 RNA 极易被 RNA 酶(RNase)降解。在提取 RNA 和分离 mRNA 时，应极力避免外源 RNase 的污染，抑制内源性 RNase 的活力，尽力减少 RNA 酶对它们的降解作用。实验用品应在经过处理后使用，耐热的仪器如研钵可在实验前 150 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 小时；枪头等塑料制品可用 0.01%(v/v)的 DEPC 水处理，每次现用现配不重复使用；

不耐高温的实验用品也可用 0.5M NaOH 处理 10 minutes，清水冲洗后灭菌备用。

提取的灰葡萄孢菌总RNA经 1%琼脂糖凝胶电泳检测（结果见图 3-1），电泳图中可看到 28S 亮度约是 18S 两倍，5.8S 的亮度弱，表明RNA完整性很好；经紫外分光光度计测定 $OD_{260}=0.835$ ， $OD_{280}=0.450$ ，总RNA浓度为 $10.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ， OD_{260}/OD_{280} 值为 1.856 说明无DNA、蛋白质等污染，RNA纯度较高。检测结果表明RNA质量完全能够满足实验要求。

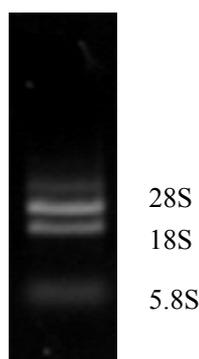


图 3-1: 灰葡萄孢菌总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 3-1: Agrose gel electrophoresis of *Botrytis cinerea* total RNA

3.3.2 cDNA 合成与纯化

最后合成双链 cDNA 经琼脂糖电泳分析(见图 3-2)，双链 cDNA 在凝胶上呈弥散状分布，主要弥散 0.5kb 至 2.0kb 之间，弥散最上端超过 3kb，表明总 cDNA 质量较好，可用于文库的构建。

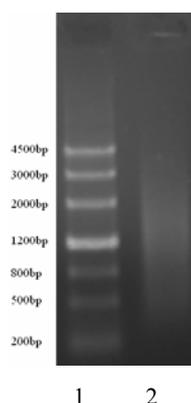


图 3-2: 反转录扩增获得总 cDNA

Figure 3-2: Amplification of total cDNA by reverse transcription

Note: 1 Marker; 2 Total cDNA

3.3.3 cDNA 文库滴度与重组效率

将双链cDNA过柱，除去小片段和多余的引物后，末端加A后，与T载体连接转化，计数生长

的白色菌落，并计算文库滴度为 8.8×10^6 cfu/ml，库容总量为 8.8×10^7 ，阳性克隆率为 98.6%。随机挑取的 25 个克隆，插入片段小于或等于 500 bp 有 2 个，超过 2 kb 的有 10 个，其他的插入片段大小在 1200 bp 左右。故所构建的文库是一个高质量的 cDNA 文库。

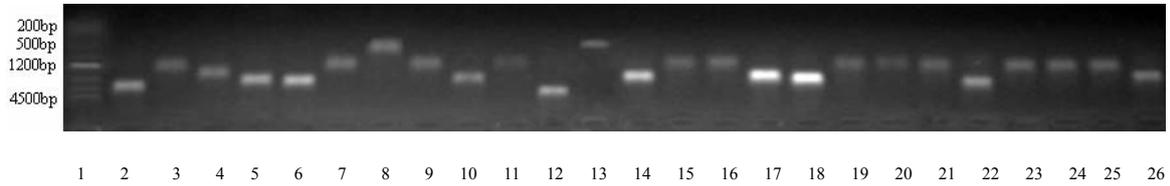


图 3-3 灰葡萄孢菌 cDNA 文库插入片段的 PCR 鉴定

Figure 3-3 PCR analysis of inserts from cDNA library of *Botrytis cinerea*

Note: 1 Marker; 2-26 The insert fragments

3.3.4 基因的克隆

用简并引物通过 PCR 扩增获得多条谱带，考虑片段大小的因素，选取其中一条 250bp 左右的条带（图 3-4）。

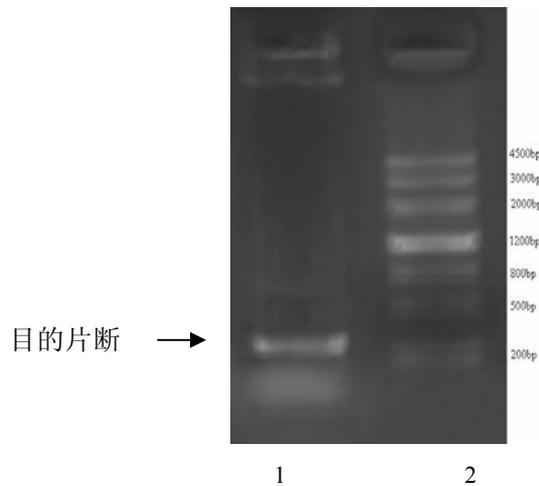


图 3-4: 扩增获得目的 cDNA 片断

Figure3-4: Obtained DNA fragment by PCR amplication

Note: 1 Amplified fragment; 2 Marker

将该片断连接载体转化后，挑取白斑，酶切鉴定后，测序结果得结果（去除引物后得到的序列）：

CTCATCAGCACACTGTCACCACAACAGCCACCAACTCCTCTCAACTTCTTGATCCGGCGG
CGGCGGCAAGATGTTTCGGCGGCGGCGGCGGCGGGAGGAAGCCGCTGGACTACGAGGA

```
GCTGAACGAGAACGTGAAGAAGGTGCAGTACGCGGTGCGGGGGGAGATGTACCTGCGCGC  
CTCCGAGCTCCAGAAGGAGGGCAAGAAGATCATCTTACCAACGTCGGCAACCCACACGCG  
CTCGGCCAGAAGCCGCTC
```

从 cDNA 文库中扩增到了这段部分片段,待验证后,作为探针进一步获得全长编码基因序列。

3.4 小结与讨论

在研究生物体系时,经常不能得到大量的起始材料。而常规的 cDNA 文库构建需要微克量级的 mRNA,所以一般情况下很难从少量材料中直接获得 cDNA 克隆。此外大多数构建 cDNA 文库的方法均需要多轮的纯化或沉淀步骤,去除引物或变更反应缓冲液,导致材料的严重丢失,并局限了最终文库的质量。本文所采用的方法合成 cDNA 所用的酶和试剂与传统方法完全相同,不同的是 cDNA 的合成和修饰均在固相支持物—磁珠上完成。通过共价键连接着寡聚 oligo-dT 的磁珠纯化出 mRNA,并用这段寡聚 oligo-dT 序列为引物引导第一链 cDNA 的合成,这样合成的第一链 cDNA 也通过共价键连接在磁珠上。只需要将反应管置于磁性支架上,此时管内的磁珠吸附于一侧管壁,即可简便而迅速的实现酶和缓冲液的更换,而且能最大限度地减少操作中 cDNA 的丢失,也减少了其它物质污染之忧。用此方法合成的 cDNA 可用于构建高质量的文库,并且构建的文库适合大多数的研究目的。

合成 cDNA 二链时,本文采用的是末端转移酶加尾法,这样避免购买昂贵的二链合成试剂盒,方法更为简单,在 1d 内可从 5-200ng mRNA 中获得 μg 级的 cDNA,相比连接衔接子的方法,更加简便易行,可用于产生优质文库。

用本文合成扩增 cDNA 相比其他合成方法要注意一些额外的细节,首先要注意磁珠的结合能力有限,100 μg 的磁珠对应的 RNA 总量不宜超过 200ng。可根据需要按比例放大磁珠的用量,但不易缩小,因为磁珠本身会对移液器吸嘴和反应管等产生一些非特异性的吸附。其次合成 cDNA 一链后,磁珠上未杂交的 oligo dT 需要利用 T4 DNA 聚合酶的外切活性去除,因为未结合的 oligo dT 可以同样被加尾并被扩增。为了维持较好的基因代表性,进行尽量少的循环数是很必要的。如果循环数过高,扩增超过指数增长阶段时,就会出现 ssDNA 的积累,不适合进行 cDNA 后期操作如克隆或者差减。此外,循环数越高,聚合酶出错的几率就越高,PCR 的保真度相应就会降低。因此,为了获得高质量的 cDNA,稳定循环数在认可的参数之内是非常重要的。

本文在张学敏等人的方法上改进,采用了两种 T₁₅-引物,目的是在 cDNA 的两端引入不同的序列,方便直接从 cDNA 上扩增 5'和 3'端序列,而不要专门进行 5'RACE和 3'RACE。两条 T 引物上各有两个不同的限制性内切酶识别位点,且 5'末端分别是 CC 和 TT,可通过限制性酶切或 T4DNA

聚合酶单链化,定向连接到表达载体上,构建表达文库时可以减少对库容量的要求。为减少T1引物对后期T2引物的污染,需要在合成二链后,通过多次洗涤磁珠,尽可能完全除去多余的T1引物。通过T1和T2引物为cDNA两端引入已知序列,这些步骤类似3'RACE,在较低温度时,T₁₅-引物中的(dT)₁₅可与polyA尾退火结合,引导新链的合成。建议在加尾的时候,可以进一步改进,尝试不加polyA尾,换成polyC或polyG尾,这样在cDNA第二链(对应mRNA序列)的5'端是寡聚G或C,3'端是polyA尾,这样更容易在cDNA两端引入不同的已知序列,也不会出现两种引物的交叉污染。

本试验通过进一步扩增灰葡萄孢菌总cDNA,获得了261bp的基因片断。由于灰葡萄孢菌全基因组序列尚未公布,故在短时间内获得全长编码基因序列较为困难,但本试验结果获得了261bp的基因片段,加大了得到全长编码基因的可能性,待下一步试验验证其可靠性后再将其作为探针,从文库中调取全长基因。

第四章 全文结论

1 从灰葡萄孢菌中提取到激活蛋白粗提液，先经 Hitrap Q FF 离子交换柱层析，再经 HitrapSuperdex 75 分子筛层析进一步纯化，得到了分子量为 35KDa 的单一蛋白条带，该蛋白可促进烟草悬浮细胞过氧化氢含量的增加。质谱分析表明，该蛋白的两条肽段 NILFVINQPEVYK，SPTSNTYIVFGGEAK 与脉胞菌的肽段 2-3 高度相似，同时，肽段序列 SPTSNTYIVFGGEAK 与水稻 alpha-NAC 蛋白 gi|46575976 保守序列相同；多肽序列 ESTLHLVLR 与泛素化蛋白 gi|2551 高度同源。

2 对纯化蛋白进行生物活性检测，结果表明，灰葡萄孢菌激活蛋白可促进豌豆幼苗的生长；并可有效抑制番茄灰霉病，所处理的幼苗叶片病指由 16.02 下降到 7.31，病叶率降低约 21%，控制效果达 50.51%；此外，该蛋白还可诱导豌豆幼苗的醇脱氢酶活性的提高，说明灰葡萄孢菌激活蛋白可增强植物的抗涝性，在一定程度上可以保护受渍水危害的植物。

3 以灰葡萄孢菌菌丝体为材料提取总RNA，利用磁珠构建cDNA文库。该方法通过共价键连接的寡聚oligo-dT磁珠纯化mRNA，并以磁珠上的oligo-dT为引物引导第一链cDNA的合成；利用末端转移酶加尾法合成第二链cDNA。得到了库容总量为 8.8×10^7 ，滴度为 8.8×10^6 cfu/ml，阳性克隆率为 98.6%，平均插入片段大小超过 1200bp的cDNA文库。

4 通过 PCR 由简并引物扩增总 cDNA，得到 261bp 的基因片断，待验证其可靠性后，下一步试验再将其作为探针，从文库中调取全长基因。

参考文献

- [1] 蔡新忠, 宋凤鸣, 郑重. 植物病程相关蛋白. 植物生理学通讯, 1995, 31 (2): 129-136.
- [2] 初燕侠, 林维秀, 路培新等. 人血清醇脱氢酶活性及其与肝炎的关系. 青岛医学院学报, 1994, 30 (3): 217-219
- [3] 甘晓静, 黎起秦. 作物灰霉病综合防治技术. 广西植保, 2004, 17 (4) : 13-15
- [4] 蒋冬花, 郭泽建, 郑 重. 隐地蛋白(*cryptogein*)基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 399-406
- [5] 李保聚. 番茄灰霉病在果实上的侵染部位及防治新技术. 植物病理学报, 1999, 29 (1) :63 – 671
- [6] 李丽, 邱德文, 刘峥. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用. 中国生物防治, 2005, 21(4):265 – 268
- [7] 梁元存, 潘军, 刘爱新, 董汉松, 徐文联. 抗赤星病烟草的防卫基因的表达与基因组 DNA 结构的变化. 中国烟草科学, 2000, 4: 1-5.
- [8] 梁元存, 刘爱新, 商明清. 激发子诱导植物抗性的作用机制. 植物生理学通讯, 2001, 37 (5): 442-446
- [9] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质. (中国)专利申请号: 0112866.0 2001 年 10 月, 专利公开号: CN1344727A 专利公开日期: 2002 年 4 月 17 日《中国专利公报》18(16)期.
- [10] 邱德文 杨秀芬 等. 植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响. 中国烟草学报, 2005, 11 (6): 33-36
- [11] 邱德文 曾凡荣 等. 植物激活蛋白对甜菜夜蛾幼虫生长和发育的影响. 植物保护学报, 2005, 32 (3): 329-330
- [12] 邱德文, 杨秀芬. 蛋白质农药研究与产业化进展. 中国农业科技导报, 2006, 8 (6): 1-4
- [13] 苏朝安, 吴全聪, 杨秀芬, 邱德文. 植物激活蛋白对白术的抗病增产作用. 中国生物防治, 2006, 22: 98-101
- [14] 王金生. 分子植物病理学, 1999, 北京: 中国农业出版社.
- [15] 王 钧. 诱导植物产生过敏反应的病原蛋白 harpin 和 elicitin. 植物生理学通讯, 1995, 31(6): 451-454
- [16] 闻伟刚, 邵 敏, 陈功友, 王金生. (2003) 水稻白叶枯病菌蛋白质激发子 Harpin-(Xoo) 诱导植物的防卫反应. 农业生物技术学报. 2.
- [17] 吴全聪, 杨秀芬, 邱德文. 植物激活蛋白诱导脐橙抗病促生作用. 中国生物防治, 2006, 22: 102-105
- [18] 吴全聪, 杨秀芬, 邱德文. 3%植物激活蛋白诱导蚕豆抗病性应用技术. 植物保护, 2006, 32 (6): 149-152
- [19] 徐 锋, 杨 勇, 谢馥交, 刘 峥, 邱德文, 杨秀芬. 激活蛋白处理水稻引发基因差异表达的研究. 生物技术通报, 2006, 4: 82-85
- [20] 徐 锋, 杨 勇, 谢馥交, 刘 峥, 邱德文, 杨秀芬. 稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响. 华北农学报, 2006, 21 (5): 1-5

- [21] 张学敏, 王宜强. 靶向新基因的分子克隆策略-理论与方法. 1999
- [22] 赵利辉, 邱德文, 刘 峥, 杨秀芬. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1358-1363
- [23] 赵淑清, 郭剑波. 植物系统性获得抗性及其信号转导途径. 中国农业科学, 2003, 36(7): 781-787.
- [24] Allan A C and Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 1997, 9:1559-1572
- [25] Alvarez M E and Lamb C. Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, ed. J Scandalios. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1996
- [26] Apel K and Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 2004, 55:373-399
- [27] Arlat M *et al.* PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J*, 1994, 13: 543-553
- [28] Asai T *et al.* MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 2002, 415: 977-983
- [29] Baker C J and Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol*, 1995, 33:299-321
- [30] Bauer DW *et al.* *Erwinia chrysanthemi* harpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 484-491
- [31] Boissp G *et al.* Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora crypdogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, 1996, 4: 1429-1439
- [32] Bloss T A, Witze E S and Rothman J H. Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, 424: 1066-1071
- [33] Bouche N *et al.* Plant-specific camodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 435-466
- [34] Bourque S *et al.* The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiol*, 2002, 130: 2177-2187
- [35] Brisson L F *et al.* Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 1994, 6:1703-1712
- [36] Carninci P *et al.* High-efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. *DNA Res*, 1997, 4(1):61-66
- [37] Charkowski A O *et al.* The *Pseudomonas syringe* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J. Bacteriol*, 1998, 180: 5211-5217
- [38] Corpas F J *et al.* Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 2004, 136:2722-2733
- [39] Dangl J L and Jones J D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*,

- 2001, 411: 826-833
- [40] Dat J F *et al.* Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J*, 2003, 33:621-632
- [41] Delledonne M. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2005, 8:390-396
- [42] Delledonne M *et al.* Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998,394:585-588
- [43] Dixon R A, Harrison M J, Lamb C J. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, 1994, 32: 479-496
- [44] Doke N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol*, 1983,23:345-47
- [45] Droillard M J *et al.* Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. *Planta*, 1997, 202: 341-348
- [46] Ebel J *et al.* Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can J Bot*, 1995, 73: 506-510
- [47] Edery I, Chu L L, Sonenberg N, Pelletier J. An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture). *Mol Cell Biol*, 1995, 15 (6): 3363-3371
- [48] Flor H H. Inheritance of reaction to rust in flax. *J Agric Res*, 1947, 74, 241-262
- [49] Funfschilling U and Rospert S. Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 3289-3299
- [50] Gaudriault S, Brisset M N and Barny M A. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett*, 1998, 428: 224-228
- [51] Glazener J A., Orlandi E W and Baker C J. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol*, 1996, 110:759-763
- [52] Gomez-Gomez L and Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 2000, 5: 1003-1011
- [53] Gubler U and Hoffman B J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 1983, 25:263-269
- [54] Guo F-Q and Crawford N M. *Arabidopsis* nitric oxide synthase I is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 2005, 17:3436-3450
- [55] Guo F-Q *et al.* Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 2003, 302:100-103
- [56] Heo W D *et al.* Involvement of specific camodulin isoforms in salicylic and acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96:766-771
- [57] Hetherington A M and Brownlee C. The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 401-427
- [58] He S Y. Elicitation of the plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol*, 1996, 112:

- 865-869
- [59] He S Y, Huang H C and Collmer A. Pseudomonas syringae pv. syringae harpinss: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 1993,73: 1255-1266
- [60] Jabs T *et al.* Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Pro Natl Acad Sci*, 1997, 94: 4800-4805
- [61] Jia Y *et al.* Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 2000, 19: 4004-4014
- [62] Kamoun S *et al.* Extracellular protein elicitors from Phytophthora: Host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1993, 6, 15-25
- [63] Kawasaki T *et al.* Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103:230-235
- [64] Keen N T, Partridge J and Zaki A I. Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenetically resistant to phytophthora megasperma var glycinea. *Phytopathology*, 1972, 62: 768-769
- [65] Kim S H, Shim K S and Lubec G. J. Human brain nascent polypeptide-associated complex alpha subunit is decreased in patients with Alzheimer' s disease and Down syndrome. *Investig. Med*, 2002, 50, 293-301
- [66] Kuchitsu K, Kikuyama M, Shibuya N. N-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*, 1993, 174:79-81
- [67] Laloi C *et al.* Reactive oxygen signaling: The latest news. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2004, 7:323-328
- [68] Lamb C and Dixon R. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 1997, 48:251-275
- [69] Lamotte O *et al.* Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*, 2004, 135:516-529
- [70] Lauring B, Sakai H, Kreibich G and Wiedmann M. The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995, 92:5411-5415
- [71] Lecourieux-Ouaked F, Pugin A and Lebrun-Garcia A. Phospho-proteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 821-829
- [72] Leister R T and Katagiri F. A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *Plant J*, 2000, 22:345-354
- [73] Levine A *et al.* Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol*, 1996, 6: 427-437

- [74] Lindermayr C *et al.* Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2005, 137:921-930
- [75] Liu Y and Zhang S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, 16; 3386-3399
- [76] Lorrain S, Vaillau F, Balague C and Roby D. Lesion mimic mutants: Key for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 63-271
- [77] Makarova K S *et al.* Comparative genomics of the Archaea (Euryarchaeota): evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res*, 1999, 9:608-628
- [78] Markesich D C, Gajewski K M, Nazimiec M E and Beckingham K. Bicaudal encodes the Drosophila beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development*, 2000, 127: 559-572
- [79] Maruyama K and Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene*, 1994, 138: 171-174
- [80] McDowell J M and Woffenden B J. Plant disease resistance genes: Recent insights and protein application. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 178-183
- [81] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 1994, 105: 467-472
- [82] Menke F L H, van Pelt J A and *et al.* Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, 16: 897-809
- [83] Mittler R *et al.* Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogeninduced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol. Biol*, 1999, 39:1025-1035
- [84] Mittler R *et al.* Reactive oxygen network of plants. *Trends Plant Sci*, 2004,9:490-498
- [85] Moller I *et al.* Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett*, 1998, 441: 1-5
- [86] Moller I *et al.* A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998, 95: 13425-13430
- [87] Montillet J L *et al.* Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 2005, 138:1516-1526
- [88] Mori I C and Schroeder J I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol*, 2004, 135:702-708
- [89] Mukherjee A. Y *et al.* Molecular characterization and expression of the Erwinia carotovora hrpNEcc gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1997, 10: 462-71
- [90] Nimchuk Z *et al.* Recognition and response in plant immune system. *Annu Rev Genet*, 2003, 37: 579-609
- [91] Nuhse T S *et al.* Phospho-proteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new

- phosphorylation site database. *Plant Cell*, 2004, 16: 2394-2405
- [92] Nurnberger T *et al.* High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, 1994, 78: 449-460
- [93] Parani M *et al.* Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotechnol. J*, 2004, 2:359-366
- [94] Peck S C *et al.* Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, 2001, 13: 1467-1475
- [95] Pernollet J-C *et al.* Elicitins isoforms from seven Phytophthora species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1993, 42:53-67
- [96] Plieth C. Calcium: Just another regulator in the machinery of life? *Ann Bot (Lond)*, 2005, 96:1-8
- [97] Preston G, Huang H, He S Y and Collmer A. The HrpZ proteins of Pseudomonas syringae pvs. syringae, glycinea, and tomato are encoded by an operon containing Yersinia ysc homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 717-32
- [98] Pugin A *et al.* Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose pathway. *Plant cell*, 1997, 9: 2077-2091
- [99] Rentel M C and Knight M R. Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2004, 135:1471-1479
- [100] Reymond P and Farmer E E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr opin Plant Biol*, 1998, 1: 404-411
- [101] Ricci P *et al.* Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora: Eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 1989, 183:555-563
- [102] Ricci P and Stacey N T K. *Plant Microbe Interactions*, New York : Chapman and Hall, 1997, 53-75
- [103] Ricci P. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: The case of elicitors. 1997, *Mol Plant-Microbe Interact*, 3: 53-57
- [104] Roeder T. Solid Phase cDNA library construction, a versatile approach. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26:3451-3452
- [105] Rustérucci C *et al.* Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J. Biol. Chem*, 1999, 274:36446-36455
- [106] Sanders D *et al.* Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell (Suppl)*, 2002, 14: S401-417
- [107] Scofield S R *et al.* Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, 1996, 272: 2063-2065
- [108] Sergievi, Alexievav, Karanove. Effect of spermine, atrazine and combination between them on

- some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 1997, 51:121-124
- [109] Sopel S H *et al.* NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense path-ways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 2003, 15: 760-770
- [110] Stab M R and Ebel J. Effects of Ca²⁺ on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 257: 416-423
- [111] Tang X *et al.* initiation of plant disease resistance by physical interaction of avrPto and Pto kinase. *Science*, 1996, 274: 2060-2063
- [112] Tavernier E *et al.* Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Sci*, 1995, 104: 117-125
- [113] Thomma B P, penninckx I A, Broekaer W F and Cammue B P. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin immunol*, 2001, 13: 63-68
- [114] Ton J *et al.* Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15:27-34
- [115] Torres M A. *et al.* *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2002, 99:517-522
- [116] Wang S, Sakai H and Wiedmann M. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J. Cell Biol*, 1995, 130: 519-528
- [117] Wei Z M *et al.* Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066): 85-88
- [118] Wendehenne D *et al.* Nitrate anion efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, 2002, 14: 1937-1951
- [119] Wendehenne D *et al.* Nitric oxide: Comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:177-183
- [120] Wengelnik K and Bonas U. HrpXv, and AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol*, 1996, 178: 3462-3469
- [121] Wiedmann B, Sakai H, Davis T A and Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 1994, 370:434-440
- [122] Xu M Z, Ma S H, Hu C Q. Gel Filtration Chromatography Combined with Bradford Method for Determination of Total Residual Protein in Ferment Antibiotics. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2004, 13(4); 262-266
- [123] Yamakawa H *et al.* Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 camodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J*

- Biochem*, 2001, 268: 3916-3929
- [124] Yang K Y, Liu Y D and Zhang S Q. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathways is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 741-746
- [125] Yotov W V, Moreau A and St-Arnaud R. The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 1303-1311
- [126] Zeidler D *et al.*. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, 101:15811-15816
- [127] Zhang C *et al.* Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 2003, 16:962-972

致 谢

首先要感谢我的导师邱德文研究员，在我这三年的学习期间导师给了我很多无微不至的关怀和帮助，在邱老师孜孜不倦的教诲和严格要求下，本文才得以完成，可以说论文以及实验的每一个细节无不凝聚着老师的心血。邱老师渊博的学识，严谨的治学态度和工作作风为我在以后的学习和工作树立了榜样，在此我表示衷心的感谢。

感谢中国农科院植保所药物工程实验室的杨秀芬老师、曾红梅老师、刘峥老师、袁京京老师以及曾繁荣老师、蒋伶俐老师、杨怀文老师在生活、学习和实验上给予的关心、帮助和指导，在老师们的教导下，论文才得以顺利完成。

感谢实验室的同学们：尚威硕士、金鑫硕士、李承雷硕士、刘文平硕士、赵明治硕士、姚庆硕士以及各位师兄师姐：赵利辉博士、龚永兴博士、顾成波博士、张云华博士、毛建军博士、张志刚博士、冯飞博士、董健伸硕士、张宁硕士、龙承祖硕士和师弟们：刘权博士、刘延锋硕士、李明勇硕士、李杰硕士、刘华硕士，汤付领等同学以及周红运女士、陈晓玲师傅，忘不了你们对我的关心和帮助，也忘不了在实验室里和你们一起度过的日日夜夜。感谢所有中国农业科学院植保所药物工程实验室的诸位老师和同学，你们使我受益良多，能与你们一起工作是我的荣幸。

感谢寝室同学杨捷硕士，孙岩硕士，王晓男硕士和李香蕊女士，与你们在一起度过三年硕士生活我感到非常快乐！

感谢我的男友徐锋博士，他不仅在生活上关心照顾我，更在实验工作上给予我莫大的帮助，是我的良师益友。

最后，我要对我的父母和妹妹表示深深地感谢，他们为我提供了良好的物质保障和精神支持，使我能完成学业，他们多年来默默的关怀和殷切的希望，正是我不断前进的动力。

总之，论文的顺利完成与家人、朋友的关怀和鼓励是不开的，在此向所有指导、帮助和关心我的家人、朋友致以诚挚的谢意。

武晓丽

2007年6月

作者简历

武晓丽，女，1981年10月生于河北省石家庄市。

求学经历：

2000-2004：河北农业大学，资源与环境科学学院，农业资源与环境专业

2004-2007：中国农业科学院研究生院；植物保护研究所，生化与分子生物学专业

实践经历：

2004年3月-2004年6月 在中国农科院植保所从事激活蛋白抗虫增产机理研究工作

2005年-至今 在中国农科院植保所从事灰霉菌激活蛋白的分离纯化、基因分离以及作用机理的研究

硕士在读期间发表论文：

利用磁珠构建灰霉菌 cDNA 文库 华北农学报 已接收

Purification and Activity detection of Activator protein from *Botrytis cinerea* (待发表)