

DOI: 10.1360/yc-007-0629

*HrpN*_{CSDS001} 基因克隆及其表达产物诱导拟南芥基因表达谱变化的研究

张珏^{1,3}, 曹茂林², 黄玉碧^{1,3}, 吴伯骥²

1. 四川农业大学玉米研究所, 雅安 625014;
2. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041;
3. 四川农业大学教育部作物基因资源与遗传改良重点实验室, 雅安 625014

摘要: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* CSDS001 菌株具有可直接诱导烟草过敏反应特征, 从构建的 CSDS001 菌株基因组文库, 鉴定、克隆到 *hrpN*_{CSDS001} 基因, GenBank 登录号 AY939927; 构建的重组 *hrpN*_{CSDS001} 基因工程菌株经 IPTG 诱导培养, 获得的高效表达 Harpin_{CSDS001} 蛋白, 可诱导烟草发生过敏反应。30 μg/mL Harpin_{CSDS001} 蛋白喷施拟南芥后, 分析第 3 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 拟南芥全基因组表达动态变化, 结果显示发生显著表达差异 (log ratio -1 或 1) 的基因数分别为 912、1787、2393、1833 和 1755。对被诱导发生显著表达差异的转录因子基因分析表明, 有 13 个转录因子家族: ZIM、BES1、TCP、C2C2、AP2/EREBP、WRKY、bHLH、bZIP、GARP、MYB、NAC、HB、C2H2 与 Harpin_{CSDS001} 蛋白作用相关, 这些转录因子家族主要参与调控植物抗性、光合作用、生长发育、开花等相关功能基因表达。

关键词: *hrpN*_{CSDS001}; Harpin_{CSDS001} 蛋白; 克隆; 基因芯片分析

Study of *hrpN*_{CSDS001} and the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* induced by Harpin_{CSDS001}

ZHANG Jue^{1,3}, CAO Mao-Lin², HUANG Yu-Bi^{1,3}, WU Bo-Ji²

1. Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China;
3. Key Laboratory of Crop Genetic Resource and Improvement, National Ministry of Education of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* CSDS001 elicits hypersensitive reaction (HR) in tobacco. From the genomic libraries of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* CSDS001, the *hrpN*_{CSDS001} gene (GenBank number AY939927), was isolated. The *hrpN*_{CSDS001} fusion protein was produced in *Escherichia coli*, and was used to induce HR by injecting into tobacco. We further examined the global regulation of *Arabidopsis thaliana* genes in response to Harpin_{CSDS001} at a concentration of 30 μg/mL. We indicated that 912, 1787, 2393, 1833 and 1,755 genes that were regulated significantly (log ratio -1 or 1) at 3 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h respectively after the treatment. Analysis of some transcription factors (TF) showed that 13 TF families responded to Harpin_{CSDS001} including ZIM, BES1, TCP, C2C2, AP2/EREBP, WRKY,

收稿日期: 2006-07-04; 修回日期: 2006-12-05

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(编号: IRT 0453)资助[Supported by Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT 0453)]

作者简介: 张珏(1976—), 女, 成都人, 博士研究生, 研究方向: 应用分子生物学。Tel: 028-81779360; E-mail: zjthebest@gmail.com

通讯作者: 吴伯骥(1946—), 男, 研究员, 研究方向: 细胞生物学。Tel: 028-85212691; E-mail: wbjmlq8888@163.com

黄玉碧(1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物化学与分子生物学。Tel: 0835-2882331; E-mail: yubihuang@sina.com

bHLH, bZIP, GARP, MYB, NAC, HB, C2H2. These families mainly function in biological processes of plant defense, photosynthesis, development and flowering.

Keywords: *hrpN*_{CSDS001}; *Harpin*_{CSDS001}; clone; gene chip analysis

Harpin 蛋白由部分植物革兰氏阴性致病菌的 *hrpN*(*hrpZ*、*hrpW*) 基因编码产生, 是病原菌对非寄主植物的过敏诱导因子, 同时也是对寄主植物的致病因子。因此, 研究植物病原菌的 *hrp*(hypersensitive reaction and pathogenicity) 基因簇及其表达产物 Harpin 蛋白对植物体的作用机制, 对解析植物病原菌与植物体的互作关系、病原菌的致病机理以及植物抗性机制等都具有重要意义。目前已经在 *Erwinia*^[1]、*Ralstonia*^[2]、*Xanthomonas*^[3] 以及 *Pseudomonas*^[4] 等菌属中发现 Harpin 蛋白, 不同病原菌来源的 Harpin 蛋白在分子量大小、氨基酸序列等方面具有不同程度的差异, 但它们都具有一些共同特征: 富含甘氨酸、不含半胱氨酸、无四级结构、热稳定性以及对蛋白酶敏感, 并能诱导烟草过敏反应。

研究发现, 将一定浓度的 Harpin 蛋白施用到植物体后, 能诱导植物产生抗病性、抗虫性以及促进植物生长发育^[5]。对 Harpin 蛋白诱导植物抗性作用机制的研究表明, Harpin 蛋白是通过水杨酸信号通路和乙烯信号通路^[6,7], 诱导植物产生系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR), 从而使植物体对病原物的进一步侵染具有抵抗能力。

本实验以中国科学院成都生物研究所非载体室分离纯化保存的 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(*Ecc*)CSDS001 菌株为试材, 研究 CSDS001 菌株的致病性和诱导过敏反应等特性; 构建 CSDS001 菌株的基因组文库为研究 CSDS001 菌株奠定基础; 利用菌落原位杂交方法从 CSDS001 基因组文库中筛选、克隆到 *hrpN*_{CSDS001} 基因; 通过构建重组大肠杆菌基因工程菌, 获得高效表达 Harpin_{CSDS001} 蛋白; 最后通过使用拟南芥全基因芯片检测 Harpin_{CSDS001} 蛋白作用后拟南芥全基因表达谱变化, 初步探讨 Harpin_{CSDS001} 诱导植物抗性、促进植物生长发育的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Ecc CSDS001 菌株由本室分离获得; 大肠杆菌

工程菌株 JM109(DE3)(Promega, USA)。pET28a(+) 质粒购自 Novagen; pBluescript-II SK(+) (Stratagene, USA)。野生型欧文氏菌培养基为 LB 培养基, 含抗性标记菌株的培养基为 LB 加相应抗生素, LB、基础盐培养基参考文献[8]。

基因芯片分析实验用拟南芥为 Columbia(Col-0) 生态型, 植株莲座叶片生长到 14 片, 生长阶段为 1.14, SD 为 2.6, CV 为 10.2, 生长时间 25 天左右。此供试实验材料的描述根据 Douglas C Boyes 等公布标准^[9]。

ATH1 基因芯片购于 Affymetrix 公司, 芯片介绍及质量控制标准参见 Affymetrix 公司 ATH1 使用说明。

荧光 real-time PCR 实验主要试剂为 TaKaRa SYBR Premix Ex *Taq* (DRR041A); 使用仪器为 Rotor Gene RG-3000 Real Time Thermal Cyclor (Corbett Research, Sydney, Australia); Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0 软件被用于分析 PCR 过程检测的样本 Ct(Threshold cycle)值。

1.2 CSDS001 菌株致病性、胞外酶活性和过敏反应检测

接种 CSDS001 菌株到 LB 固体培养基, 28 培养 24 h, 挑取菌落, 用无菌水稀释到 5×10^9 个/mL, 注射 0.05 mL 菌悬液到大白菜, 28 保湿培养 17 h, 观察 CSDS001 对大白菜的致病性;

参考文献[8], 使用半定量检测法, 检测 CSDS001 分泌产生的果胶酶(pectate lyase, Pel), 多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, Peh)、蛋白酶(protease, Prt)和纤维素酶(cellulase, Cel)的活性高低, 检测点周围晕圈大小衡量酶活性的高低。

接种 CSDS001 菌株到 LB 固体培养基, 28 培养 24 h, 挑取菌落, 用蒸馏水稀释到 2×10^8 个/mL, 注射 1 mL 菌悬液到烟草叶片, 20 h 后观察是否诱导烟草发生过敏反应。

1.3 *hrpN*_{CSDS001} 基因的克隆及序列测定

CSDS001 菌株基因组文库的构建方法参考文献[10]。以 α -³²P-dATP 标记的 *Ecc* Ecc71 的 *hrpN* DNA^[8] 为探针, 采用菌落原位杂交法从构建的

CSDS001 菌株基因组文库筛选 *hrpN_{CSDS001}* 阳性克隆。

将筛选到的阳性克隆质粒经多种内切酶消化, 通过Southern杂交选取含有 *hrpN_{CSDS001}* 基因的片段, 根据Southern杂交结果, 将含有 *hrpN_{CSDS001}* 基因片段经 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 用DNA纯化试剂盒纯化该DNA片段, 将纯化后的DNA片段克隆到质粒 pBluescript-II SK(+), 供测序。根据测序结果, 分析并确定 *hrpN_{CSDS001}* 基因的开放阅读框。

1.4 Northern 杂交

为初步分析 CSDS001 菌株的 *hrpN_{CSDS001}* 基因的表达水平与环境、营养因子关系, 将 CSDS001 接种到营养丰富 LB 培养基, 28 ℃ 摇瓶培养至 $OD_{600}=2.0$, 提取菌株 RNA; 同时将 CSDS001 分别接种到含 0.5% 葡萄糖或含 0.5% 蔗糖的基础盐培养基, 28 ℃ 摇瓶培养至 $OD_{600}=2.0$, 提取菌株 RNA, 以 *hrpN_{CSDS001}* 为探针进行Northern杂交, 杂交实验方法参考文献[10]。

1.5 重组基因工程菌的构建及 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白的高效表达

根据测定的 *hrpN_{CSDS001}* 基因序列设计PCR引物如下:

hrpN_{CSDS001}-1:
TGTGGATCCATGCTTAATTCTCTTGGTGGCG
GAG

hrpN_{CSDS001}-2:
TGTAAGCTTTAGCTGGAGAGCTTCTTCAAC
CC

以 *hrpN_{CSDS001}*+质粒DNA为模板, 参考文献[10], 进行PCR扩增反应。PCR扩增片段经纯化后, *Bam*H^I-*Hind* III 双酶切, 连接到经过相同酶切的表达载体 pET28a(+) 的 T7 启动子后, 构建成表达质粒 *pT7-hrpN_{CSDS001}*, 将阳性质粒转化到 *E. coli* JM109(DE3)。将含有 *pT7-hrpN_{CSDS001}* 质粒的 JM109(DE3) 接种到 LB+卡那霉素培养基中, 37 ℃ 摇瓶培养至 $OD_{600}=0.6$ 时, 加入异丙基硫代-β-D半乳糖苷(IPTG)继续诱导培养 3 h, IPTG终浓度 1 mmol/L。离心收集菌体, 重溶于 1×SDS-PAGE样品缓冲液煮沸 3 min, 12% SDS-PAGE电泳分析目标蛋白。

1.6 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白的纯化及过敏反应检测

培养含有 *pT7-hrpN_{CSDS001}* 质粒的 JM109(DE3) 250 mL, IPTG诱导外源基因表达后, 离心(4,000 r/min, 15 min, 4 ℃)收集菌体, 将菌体重悬于 3 倍体积的蒸馏水中。在冰浴上用超声波破碎后, 离心(15,000 r/min,

15 min, 4 ℃)收集破碎液, 沉淀重悬于 9 倍体积含表面活性剂的清洗液, 混合成均相后离心(15,000 r/min, 15 min, 4 ℃), 将沉淀(含 *Harpin_{CSDS001}* 包含体)重悬于 9 倍体积含 8 mol/L 盐酸胍的缓冲液, 混合均匀后, 沸水浴中保温 10 min, 冷却后, 离心(15,000 r/min, 15 min, 4 ℃), 将上清液置 8~14 kDa 透析袋内, 对 100 倍体积的不含盐酸胍缓冲液透析, 4 ℃。收集透析袋内容物, 离心(20,000 r/min, 20 min, 4 ℃), 上清为纯化的 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白。

将 200 μg/mL 纯化的 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白注到在烟草叶片; 对照为相同浓度 BSA 溶液和含表达载体质粒 pET28a(+) 的 JM109(DE3) 经相同培养后的细胞破碎液, 蛋白总量浓度为 200 μg/mL, 20 h 后检测是否诱导过敏反应发生。

1.7 基因芯片分析实验设计

为检测 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白处理后引起的拟南芥基因表达动态变化, 实验设为 6 组, 每组使用一株拟南芥, 第 1~5 组为实验组, 分别在喷施 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白后第 3 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 取样, 第 6 组为对照组, 不喷施 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白。

将 30 μg/mL 的 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白试剂 3 mL 均匀喷施于实验组拟南芥, 喷施时, 均严格与其它参与实验的植株隔离。

每组取拟南芥地上部分, 液氮保存, 送上海生物芯片公司, 完成总 RNA 提取、芯片杂交以及数据提取等工作。

相对定量荧光 real-time PCR 实验检测样本中所选择基因表达情况, 反应条件如下: 95 ℃, 2 min; 接着进行 45 个循环, 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 15 s, 72 ℃, 20 s。设未处理样本为对照, 管家基因 β-actin 为内参, 计算实验组样本目的基因 $\Delta\Delta C_t = (\text{样本目的基因 } C_t - \text{样本管家基因 } C_t) - (\text{对照目的基因 } C_t - \text{对照管家基因 } C_t)$ 。

2 结果和分析

2.1 CSDS001 菌株致病力、胞外酶活性及过敏反应诱导性

实验结果显示 CSDS001 菌株对大白菜具有强致病力、分泌较高活性植物细胞壁降解酶类, 诱导非寄主植物烟草产生过敏反应。

将 CSDS001 接种到大白菜, 17 h 后出现明显的软腐症状, 参见图 1, 证明 CSDS001 具有强致病力。

半定量酶活性检测结果显示, CSDS001 菌株能分泌较高活性Pel、Peh、Pri和Cel, 参见图 2。这 4 类酶属于植物细胞壁降解酶类(Plant Cell Wall-Degrading Enzymes, PCWDEs)^[11], 是*Ecc*的重要致病因子, 在病原菌侵入植物体和从中获取养分中发挥重要作用。因此, 分泌产生高活性PCWDEs的*Ecc*菌株, 通常具有较高的致病力。

HR测试结果显示CSDS001 菌株能够直接诱导烟草叶片产生典型的过敏反应, 参见图 3, 该特征与报道的野生型软腐欧文氏菌不能诱导HR反应产生不同^[8]。Cui^[12,13]等指出, RsmA/rsmB双因子控制系统调控*Ecc*的胞外酶、N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserine Lactone(OHL)的合成和*hrp*基因的表达。*Ecc*71 菌株的负向调控因子RsmA突变体能够诱导产生过敏反应^[8], 由此Asita Mukherjee等^[14]1997 年首次报道了*Ecc*71 含有*hrp*基因簇, 证实其中的*hrpN*基因编码产生Harpin蛋白能在非寄主植物如烟草上引起过敏反应。CSDS001 菌株能够直接诱导烟草叶片产生典型的过敏反应, 表明可能CSDS001 菌株表达Harpin能力大于*Ecc*71, 两者分泌调控系统具有差异。

2.2 *hrpN*_{CSDS001}基因的克隆

通过构建CSDS001 菌株基因组文库的方法, 实现*hrpN*_{CSDS001}基因克隆。CSDS001 菌株基因组文库含有 1,000 个菌落, 每个菌落含大小约 30 kb菌株染色体DNA。以*Ecc*71 菌株的*hrpN* DNA为探针, 通过菌落原位杂交筛选到一个含*hrpN*_{CSDS001}基因的阳性克隆。

将含*hrpN*_{CSDS001}基因的阳性克隆质粒经不同内切酶消化, Southern杂交显示 1.5 kb *EcoR* 片段含有CSDS001 的*hrpN*_{CSDS001}基因, 参见图 2, 将该DNA片段克隆到质粒pBluescript-II SK(+), 供片段的核苷酸序列测试。

2.3 Northern 杂交结果分析

Northern杂交结果显示在营养丰富培养基中*hrpN*_{CSDS001}基因表达受抑制, 而在以葡萄糖或蔗糖为碳源的基础盐培养基(类似植物细胞基质)中,*hrpN*_{CSDS001}基因表达被激活, 参见图 3, 证实CSDS001 菌株的*hrpN*_{CSDS001}基因是被诱导表达, 受外界环境如碳源、氮源、pH值因素调控。

2.4 *hrpN*_{CSDS001}基因及蛋白序列分析

*hrpN*_{CSDS001}基因测序委托大连宝生物公司完成, 结果显示*hrpN*_{CSDS001}基因的编码区为 1, 071 bp, 根据核苷酸序列推测其编码蛋白含有 356 个氨基酸残基, 理论分子量 35.55 kDa, 理论等电点 5.5。*hrpN*_{CSDS001}基因的GenBank登录号为AY939927。

使用 Blast 和 Cluster X, 将 CSDS001 的 Harpin_{CSDS001} 蛋白与*Ecc* 菌株*Ecc*71、SCC1 以及*E.c.subsp. atroseptica* 菌株SCRI1043 和*E. chrysanthemi* 菌株EC16的Harpin蛋白氨基酸进行比对分析, 参见图 4。结果显示Harpin_{CSDS001}与这几个菌株来源的Harpin蛋白C末端高度保守, 推测C末端应该是Harpin蛋白功能区域。

Harpin_{CSDS001}蛋白与*Ecc*71 和SCC1 菌株来源的 Harpin 蛋白高度同源, 但是与*E.c.subsp. atroseptica* SCRI1043 和*E. chrysanthemi* EC16的氨基酸序列差异较大, 说明相同菌属来源的Harpin蛋白具有多样性。Harpin_{CSDS001}与*Ecc*71 的Harpin蛋白有 6 个氨基酸差异, 分别是 70 S-G、113 G-S、115 A-V、249 G-A、317 R-A和 352 K-Q。值得注意的是在C末端*Ecc*71 的Harpin蛋白含有RGD三肽残基, D'Souza等^[15]曾报道RGD三肽在蛋白与受体识别方面具有重要作用而Harpin_{CSDS001}在相应位点为AGD, 这与第一个被发现的Harpin_{Ea}蛋白相同。

2.5 Harpin_{CSDS001}蛋白的高效表达、分离纯化及生物学活性

12%SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示含 *pT7-hrpN*_{CSDS001}质粒的JM109(DE3)菌经IPTG诱导产生的高效表达蛋白与理论预期Harpin_{CSDS001}蛋白分子量相同, 不加IPTG诱导则在相应位点产生微弱的蛋白条带, 含空载质粒pET28a(+)的JM109(DE3)经IPTG诱导无该蛋白条带, 参见图 5, 证明构建的重组基因工程菌是成功的, 经过IPTG诱导后, 产生高效表达 Harpin_{CSDS001}蛋白。

12%SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, 将含 Harpin_{CSDS001}蛋白的包含体反复清洗后, 溶解于盐酸胍, 再通过透析, 能大量获得纯度达 95% 以上的 Harpin_{CSDS001}蛋白, 参见图 6。

将经过纯化的Harpin_{CSDS001}蛋白注射到烟草叶片后, 20 h左右检测到过敏反应, 相同浓度的BSA和含空载质粒pET28a(+)的JM109(DE3)细胞破碎液不能诱导过敏反应产生, 参见图 7。证明纯化后的

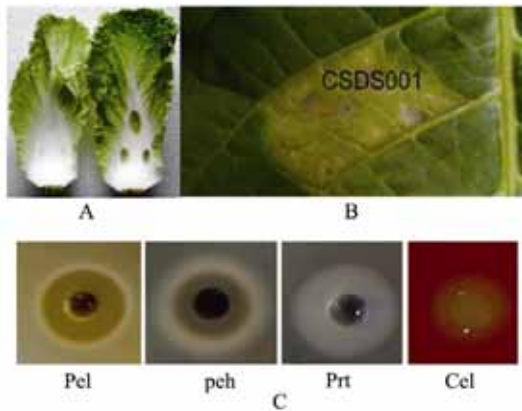


图 1 CSDS001 致病性以及诱导过敏反应
 A: CSDS001 引起大白菜软腐病; B: CSDS001 诱导烟草产生过敏反应;
 C: CSDS001 胞外酶活性检测。
Fig. 1 The pathogenicity and eliciting HR of CSDS001
 A: CSDS001 caused Chinese cabbage maceration; B: CSDS001 elicited HR in tobacco leaves; C: CSDS001 extracellular enzymatic activities.

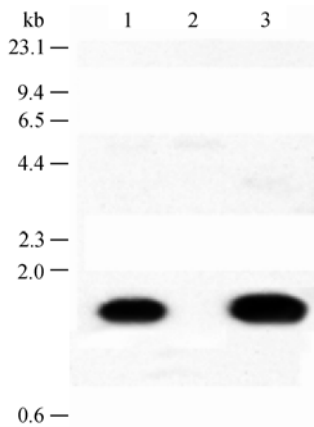


图 2 Southern 杂交结果
 1: CSDS001 菌株染色体DNA; 2: pLARF5 载体; 3: *hrpN_{CSDS001}* 及 pLARF5 载体DNA。
Fig. 2 Results of Southern blot
 1: CSDS001 chromosomal DNA; 2: Vector pLARF5; 3: *hrpN_{CSDS001}* plus Vector pLARF5.

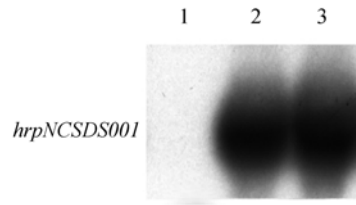


图 3 Northern 杂交结果
 1: CSDS001 生长于 LB 培养基; 2: CSDS001 生长于基础盐培养基 (0.5% 葡萄糖); 3: CSDS001 生长于基础盐培养基 (0.5% 蔗糖)。
Fig. 3 Result of Northern blot
 1: CSDS001 grown in LB; 2: CSDS001 grown in minimal salt plus glucose; 3: CSDS001 grown in minimal salt plus sucrose.

Harpin_{CSDS001} 蛋白仍然具有生物学活性, 可以用于基因芯片分析实验。

2.6 Harpin_{CSDS001} 蛋白诱导的拟南芥基因表达时程动力学分析

通过分析基因芯片在 5 个实验组样本中检测到的有效基因数(Present gene)和发生显著表达差异基因数(基因表达量与对照基因表达量相比之 log ratio -1 或 1), 结果显示在 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白作用后的第 3 h、12 h、24 h、36 h 以及 48 h, 检测到的有效基因数相近, 发生显著表达差异基因数分别为 912、1787、2393、1833 和 1755, 发生显著表达差异基因/有效基因百分数分别为 6.9%、14.0%、17.5%、14.0% 和 13.2%, 参见表 1。拟南芥发生显著表达差异基因数随着 *Harpin_{CSDS001}* 作用后的时间逐步上升, 到 24 h 达到最高值, 随后逐渐缓慢下降, 但相比对照和初始检测点(3 h) 仍然维持较高水平。证明 *Harpin_{CSDS001}* 作用于植物体后, 诱导的植物整体反应是一个渐进过程, 在 24 h 左右达到峰值, 并且 *Harpin_{CSDS001}* 蛋白的作用具有时间上的持续性, 推测这与 *Harpin* 蛋白诱导植物产生系统获得性抗性等相关。

在所有发生显著表达差异的基因中, 有 208 个基因在 5 个样本均显著表达上调, 其中 96 个基因因为

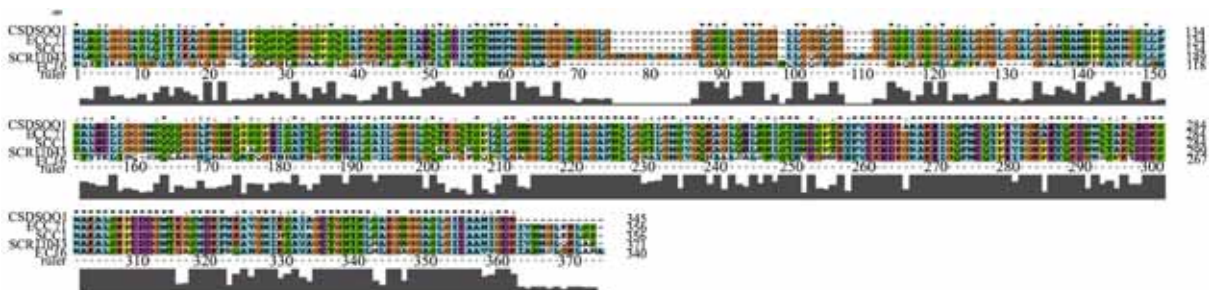


图 4 CSDS001、Ecc71、SCC1、SCRI1043、EC16 菌株 Harpin 氨基酸序列比对
Fig. 4 The comparison of amino acid sequences of Harpins from CSDS001、Ecc71、SCC1、SCRI1043、EC16

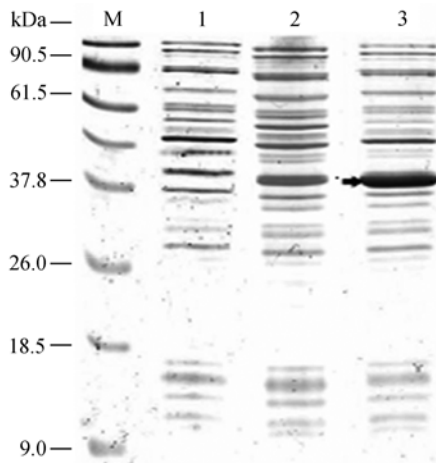


图 5 12% SDS-PAGE 电泳检测蛋白

1: JM109(DE3) 含 pET28a(+) 经 IPTG 诱导; 2: JM109(DE3) 含 pT7-hrpNCSDS001 未经 IPTG 诱导; 3: JM109(DE3) 含 pT7-hrpNCSDS001 经 IPTG 诱导。

Fig. 5 12% SDS-PAGE test the proteins

1: JM109(DE3) carrying pET28a(+) with IPTG; 2: JM109(DE3) carrying pT7-hrpNCSDS001 without IPTG; 3: JM109(DE3) carrying pT7-hrpNCSDS001 with IPTG.

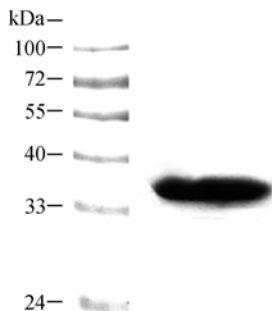


图 6 经纯化的 Harpin_{CSDS001} 蛋白

Fig. 6 Purified Harpin_{CSDS001}



图 7 Harpin_{CSDS001} 诱导烟草过敏反应

1: 注射 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 初步纯化的 Harpin_{CSDS001}; 2: 注射 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA; 3: 注射含 pET28a(+) 的 JM109(DE3) 细胞破碎液, 蛋白浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Fig. 7 Harpin_{CSDS001} elicited HR in tobacco

1: Was infiltrated with suspension of partially purified Harpin_{CSDS001} at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2: Was infiltrated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA; 3: Was infiltrated with the lysate of *E. coli* JM109(DE3) carrying vector pET28a(+) at a protein concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

未知功能基因, 23 个基因功能与植物激素相关, 18 个基因与植物抗逆性相关, 20 个为转录因子蛋白基因, 37 个基因功能与光合作用、能量传递相关, 其他功能基因为 15 个。在与植物激素相关基因中, 生长素相关基因 12 个, 芸苔素 1 个, 赤霉素 7 个, 乙烯 2 个, 细胞分裂素 1 个。由此推测 Harpin_{CSDS001} 可能通过诱导生长素、芸苔素、乙烯、细胞分裂素、赤霉素等信号通路促进植物生长发育, 提高抗逆性。

在 208 个持续表达上调的基因中, 有几个基因值得注意:

植物病程相关蛋白 PR-1(At2g14610) 和 PR-5(At1g18250), PR-1 和 PR-5 是水杨酸依赖途径诱导植物产生系统获得性抗性的标志基因, 植物产生抗病性的生化指标^[16], 这两个基因的持续表达上调证明 Harpin_{CSDS001} 诱导拟南芥产生系统获得性抗性。另外检测到 3 个 thaumatin-like 蛋白基因(At1g73620、At2g28790、At4g38660) 表达显著上调, 其功能与植物体抵抗真菌和其他病原菌相关^[17]。

基因 At2g27080 功能未知, 根据其 cDNA 序列推测属于 Harpin 诱导蛋白家族(Harpin-induced family protein)^[18], Harpin_{CSDS001} 蛋白作用后诱导 At2g27080 持续表达上调初步证实 At2g27080 的表达与 Harpin 类蛋白作用相关, 但 At2g27080 是否确实属于 Harpin 诱导蛋白家族基因以及其表达产物功能等, 还有待进一步研究证明。

使用荧光 real-time PCR(RT-PCR) 技术检测基因 At2g14610、At1g18250、At2g28790 以及 At2g27080 在 5 个样本中的表达情况, $\Delta\Delta Ct$ 结果参见表 2, 从检测结果可以看出, 实验组样本中的 4 条基因 $\Delta\Delta Ct < 0$, 证明 Harpin_{CSDS001} 处理后, 诱导 At2g14610、At1g18250、At2g28790 以及 At2g27080 基因持续表达上调, 与芯片检测结果一致。

生物信息网站 <http://datf.cbi.pku.edu.cn/> 提供的 Database of *Arabidopsis* Transcription Factors DATF 将已知和预测的拟南芥 1,827 个转录因子分为 56 个家族。根据每个家族中发生显著变化的基因数, 筛选与 Harpin_{CSDS001} 作用关系密切转录因子家族, 筛选条件参见文献[19]。

分析表明, 在 5 个实验组样本中, 筛选到的转录因子家族及其种类既有相同之处又具有差异。整个实验中, 涉及 39 个转录因子家族中的基因表达发生显著变化, 3 h 组涉及基因表达发生显著变化的转录因子家族 21 个, 12 h 组 32 个, 24 h 组 26 个, 36 h

表 1 样本有效基因数及显著表达差异基因数

Table 1 Present genes and regulated genes in the samples

时间(小时) Time(h)	有效基因数 Present genes (P)	显著表达差异基 因数 Regulated genes (R)	显著差异基因 数/有效基因数 百分比 R/P(%)
3	13198	912	6.9
12	12788	1787	14.0
24	13711	2393	17.5
36	13053	1833	14.0
48	13269	1755	13.2

组 25 个, 48 h 组 21 个。

分析表明, 有 13 个转录因子家族在 5 个实验组样本中都筛选到, 分别是: ZIM、BES1、TCP、C2C2、AP2/EREBP、WRKY、bHLH、bZIP、GARP、MYB、NAC、HB 和 C2H2 家族, 这些转录因子家族主要和以下几个方面生理反应相关: 植物抗性相关, 如 AP2/EREBP^[20]、C2H2^[21]、NAC^[22]、MYB^[23]、bZIP^[24]、WRKY^[25] 家族; 植物开花相关, 如 ZIM^[26]、TCP^[27]、C2H2^[21]、bZIP^[28]、C2C2^[29]、TCP^[30] 家族; 植物光合作用、生长相关, 如 BES1^[31]、TCP^[27]、C2C2^[29]、C2H2^[21]、HB^[32]、GARP^[33]、bHLH^[34] 家族。

其他筛选到的转录因子家族所调控的基因的功能也主要涉及植物抗性和生长发育, 但是在发生时间和持续性上具有差异。

Harpin_{CSDS001} 蛋白处理拟南芥后, 处理不同的时间所诱导发生的生理反应是有差异的, 同时可能诱导植物体发生某些共同的生理反应, 这些生理反应主要涉及诱导植物产生系统获得性抗性和促进植物生长发育, 与宏观可见的 Harpin_{CSDS001} 蛋白生物学效应具有相关性。

表 2 RT-PCR 检测样本中目的基因 $\Delta\Delta Ct$ 值Table 2 The $\Delta\Delta Ct$ of the 4 genes in the sample test by RT-PCR

	3 h	12 h	24 h	36 h	48 h
At2g14610	-1.38	-3.88	-2.4	-4.85	-4.61
At1g18250	-2.46	-2.53	-4.88	-3.88	-3.64
At2g28790	-1.13	-1.51	-1.94	-1.46	-1.55
At2g27080	-2.46	-2.49	-2.84	-3.12	-1.2

参考文献(References):

[1] Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066): 85–88.

[2] Van Gijsegem F, Vasse J, Camus JC, Marendia M, Boucher C. *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment

of bacteria to plant cells. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(2): 249–260.

- [3] Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1991, 4: 81–88.
- [4] Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. “*phaseolicola*” controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 1986, 168(2): 512–522.
- [5] Agrawal AA, Tuzun S, Bent E. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. APS Press, St. Paul, MN, 1999.
- [6] Dong HS, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired silencing pathway mediated by salicylic acid and the NIMI gene. *Plant J*, 1999, 20: 207–215.
- [7] Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol*, 2004, 136(3): 3628–3638.
- [8] Cui Y, Madi L, Mukherjee A, Dumenyo CK, Chatterjee AK. The RsmA-mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain Ecc71 overexpress *hrpN_{Ecc}* and elicit a hypersensitive reaction-like response in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1996, 9(7): 565–573.
- [9] Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R. Growth Stage-Based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1499–1510
- [10] Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔(黄培堂等译). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Chatterjee AK, Dumenyo CK, Liu Y, Chatterjee A. *Erwinia*: genetics of pathogenicity factors. *Academic Press*, 2000, 2: 236–260.
- [12] Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserine lactone, and pathogenicity in Soft-Rotting *Erwinia* spp. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(17): 5108–5115.
- [13] Cui Y, Chatterjee A, Chatterjee AK. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia*

- carotovora* subsp. *carotovra* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and Harpin_{Ecc}. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14(4): 516–526.
- [14] Mukherjee A, Cui Y, Liu Y, Chatterjee AK. Molecular characterization and expression of the *Erwinia carotovora* *hrpN_{Ecc}* gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(4): 462–471.
- [15] D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): A cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(7): 246–250.
- [16] LI Ru-Gang, FAN Yu-Liu. Advances on genetic engineering of plant resistance against fungal diseases. *Progress in Biotechnology*, 2000, 20(2): 9–13.
李汝刚, 范云六. 植物抗菌物质病害的遗传工程研究进展. *生物工程进展*, 2000, 20(2): 9–13.
- [17] Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule AJ. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics*, 2006, 6(1): 301–311.
- [18] Takahashi Y, Berberich T, Yamashita K, Uehara Y, Miyazaki A, Kusano T. Identification of tobacco HIN1 and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the tobacco mosaic virus-induced hypersensitive response and during leaf-and flower-senescence. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(4): 613–622.
- [19] Hennig L, Gruissem W, Grossniklaus U, Kohler C. Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, 135(3): 1765–1775.
- [20] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Shinozaki KY. DNA-binding specificity of the ERF. AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-Inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(3): 998–1009.
- [21] Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal*, 2001, 25(3): 247–259.
- [22] He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 903–916.
- [23] Olszewski N, Sun TP, Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism and response pathways. *The Plant Cell*, 2002, 14: 61–80.
- [24] Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(6): 1988–1993.
- [25] Li J, Brader G, Palva ET. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 319–331.
- [26] Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T. Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(7): 1402–1409.
- [27] Faivre-Rampant O, Bryan GJ, Roberts AG, Milbourne D, Viola R, Taylor MA. Regulated expression of a novel TCP domain transcription factor indicates an involvement in the control of meristem activation processes in *Solanum tuberosum*. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(398): 951–953.
- [28] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F, Parcy F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(3): 106–111.
- [29] Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamonedá I, Carbonero P. A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of Gibberellin-Responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiol*, 2002, 130(1): 111–119.
- [30] Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, 1999, 18(2): 215–222.
- [31] Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 120(2): 249–259.
- [32] Morelli G, Ruberti I. Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(9): 399–404.
- [33] Fitter DW, Martin DJ, Copley MJ, Scotland RW, Langdale JA. GLK gene pair regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J*, 2002, 31(6): 713–727.
- [34] Kim JA, Lee M, Kim YS, Woo JC, Park CM. A Basic Helix-Loop-Helix transcription factor regulates cell elongation and seed germination. *Mol Cells*, 2005, 19(3): 334–341.