

芹菜 NHL-like 蛋白基因克隆与表达分析

李岩, 王枫, 谭国飞, 贾晓玲, 蒋倩, 熊爱生

(南京农业大学园艺学院作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 南京 210095)

摘要:植物生长发育过程中会遭遇各种病原物的攻击,植物为了应对这些危害并适应外界的生存竞争,逐渐演化出了复杂的防御机制。NHL 基因家族庞大,部分 NHL 基因受病原物诱导后会过量表达,增强植物对多种病原菌的抗性,是与植物防御机制密切相关的蛋白。本研究以津南实芹和美国西芹 2 个芹菜品种为试验材料,分别克隆出 NHL-like 蛋白基因 *AgNHL*。序列分析表明,上述 2 种芹菜的 *AgNHL* 基因序列均含 636 bp 的开放阅读框,编码 211 个氨基酸。2 种芹菜碱基序列,只有第 36 位不同,津南实芹为 T,美国西芹为 C,2 种碱基序列相似性高达 99.84%,编码的氨基酸序列相同。进化分析显示,2 种芹菜的 NHL-like 蛋白与葡萄、大豆等植物的相似度较高,在第 80~185 氨基酸间含一个 LEA₂ 蛋白保守结构域。荧光定量 PCR 结果表明,*AgNHL* 基因主要在芹菜茎中表达,根中表达量最低,有明显组织特异性,品种差异也很显著。对 2 种芹菜分别进行 4 °C 低温、38 °C 高温、20% PEG 处理、0.2 mol/L NaCl 处理 2 h 表达分析显示,低温、盐处理下该基因表达量明显上升。

关键词:芹菜;NHL-like 蛋白;基因克隆;荧光定量 PCR;表达分析

Cloning and Expression Pattern Analysis of NHL-like Protein Gene in Celery

LI Yan, WANG Feng, TAN Guo-fei, JIA Xiao-ling, JIANG Qian, XIONG Ai-sheng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Plant is frequently exposed to various pathogens environments during its growth and can withstand most attacks by inducing appropriate defense systems. Most of the NHL genes appear to be involved in pathogen-resistance mechanisms in higher plant. The steady-state transcription levels of some NHL genes could be altered when plants are attacked by bacterial pathogens. NHL-like proteins play important roles in the defense systems in higher plants. In this study, bioinformatics approach was utilized for analyzing nucleotide and amino acid sequences of *AgNHL* gene, which were cloned from celery (*Apium graveolens*) cultivars Jinnan Shiqin and Meiguo Xiqin, respectively. Sequence analysis indicated that the *AgNHL* gene contained a 636 bp ORF, which encoded 211 amino acid residues. There was only one nucleotide site and no amino acid site difference between the *AgNHL* genes from the two cultivars. NHL-like protein of celery had a high homology with other higher plants, such as *Vitis vinifera* and *Glycine max*. Among the amino acids, 80-185 had a conserved domain of LEA-2. Real-time quantitative PCR analysis showed that the *AgNHL* gene was tissue-specific expressed mainly in the stem, but expression level was low in the root. The expression profiles of the *AgNHL* gene were also detected by real-time quantitative PCR under 4 °C, 38 °C, NaCl, and PEG treatments for 2 hours in the two celery varieties. The gene expression was significantly induced under low temperature and salt stresses.

Key words: *Apium graveolens*; NHL-like protein; gene clone; real-time quantitative PCR; gene expression

芹菜 (*Apium graveolens*) 属伞形科芹属一、二年生草本植物,原产地为地中海沿岸,目前全世界普遍

栽培。我国芹菜栽培历史悠久,芹菜具有浓郁香气,又称香芹。芹菜营养丰富,富含蛋白质、胡萝卜素、

收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-15 网络出版日期:2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1420.012.html>

基金项目:国家自然科学基金项目(31272175);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0670);江苏省杰出青年基金项目(BK20130027);江苏高校优势学科建设项目(2011PAPD);江苏省双创计划(2011JSSC)

第一作者研究方向为蔬菜分子生物学研究。E-mail:2012104078@njau.edu.cn

通信作者:熊爱生,研究方向为蔬菜分子生物学。E-mail:xiongaisheng@njau.edu.cn

维生素、微量元素等^[1-2]。本研究所采用的津南实芹是天津津南区选育的优良地方品种,美国西芹是从美国引进的产量高、品质优的西芹品种之一。

植物 *NHL* 基因家族庞大,目前已从烟草、拟南芥、咖啡、葡萄等多种植物中分离克隆出该类基因。植物受病原物诱导后,*NHL* 基因过量表达可以增强对病原菌的抗性,已发现拟南芥 *NHL3*、*NHL25* 等编码的与植物防御机制密切相关的蛋白质^[3]。*NHL* 基因编码的蛋白质一般都有 1~2 个跨膜结构域和 3 个保守功能域序列。目前已发现拟南芥有 45 种 *NHL* 基因,利用系统进化树将拟南芥 *NHL* 家族与烟草 *HIN1* 基因比对分析大致将 45 种 *NHL* 基因分为 4 类,同类亲缘关系较近,基因的同源性较高。研究较多的是第 1 类的 *NHL2*、*NHL3*、*NHL8*、*NHL9*、*NHL10* 以及第 4 类的 *NDR1* 和 *NHL16*^[4-6]。*NDR1* 和 *HIN1* 基因在 *NHL* 基因家族中比较特殊,与多种植物 *NHL* 基因序列有一定同源性,编码蛋白质的功能也与多种 *NHL*-like 蛋白相似,一般归为 *NHL* 基因家族^[7]。

NHL 类基因在植物防御机制的信号传导中起重要作用,可通过调节活性氧的生成在植物抗病过程中起作用^[8]。转 *AtNDR1* 基因的烟草对赤星病和晚疫病的抗性显著提高,拟南芥 *NHL3* 基因的过表达也可增强对番茄细菌性叶斑病的抗性,葡萄 *VvNHL1* 基因在抗病信号转导中起重要作用,*NHL* 类基因对广谱抗病基因工程的研究有重要意义^[9-10]。目前对 *NHL* 类基因的研究主要集中在信号转导和逆境调控等方面^[11-14],*NHL* 类基因结构、功能等方面的基础研究还不够深入。

植物生长发育过程中会遭遇各种病原物的攻击,环境中的致病因素会导致植物产量降低、品质下降。为了应对这些危害并适应自然界激烈的生存竞争,植物内部逐渐演化出了复杂的防御机制^[15-16]。克隆与芹菜抗病相关的基因,研究其结构功能有利于揭示芹菜抗病机制,利用基因工程培育抗病芹菜新品种,提高产量和品质。本研究分别以来源不同、生长环境不同的 2 种芹菜为试验材料,分别克隆得到 *NHL* 基因,并对其结构和功能做详细分析。采用实时荧光定量 PCR 对其不同部位及 4 种处理下的表达量进行分析,为探讨芹菜 *NHL*-like 蛋白的功能、作用奠定试验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌种与质粒

试验材料津南实芹和美国西芹种植于南京农业

大学园艺学院江浦实验农场。幼苗种植于南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室人工气候室。2013 年 5 月分别以 1 株津南实芹和美国西芹的根、茎、叶、花为材料,提取总 RNA,反转录成 cDNA。对津南实芹和美国西芹 2 月龄苗进行 4 ℃ 低温、38 ℃ 高温、20% PEG 处理、0.2 mol/L NaCl 处理 2 h,对照不作任何处理。提取叶片总 RNA 进行反转录成 cDNA,用于实时定量 PCR。

大肠杆菌菌株 DH5 α ,由本实验室保存;载体 pMD18-T、*Ex-Taq* PCR 聚合酶、DL marker 2000 和 Prime Script RT reagent Kit 等购自大连 TaKaRa 公司, RNA simple Total RNA Kit 购自北京 Tiangen 公司, Real-Time PCR Kit (SYBR Green) 购自上海诺伦生物医药技术有限公司, DNA 胶回收试剂盒购自杭州爱思进公司。

1.2 芹菜 *AgNHL* 基因的克隆

采用 RNA 试剂盒 (Tiangen) 分别从津南实芹、美国西芹的鲜嫩叶片中提取总 RNA。采用 Prime Script RT reagent Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA。反转录体系 20 μ L, 反应条件为总 RNA 和 50 μ mol/L Oligo(dT)₁₈ 混合后 70 ℃ 水浴 10 min, 加入 M-MLV 反转录酶 (200 U)、dNTP (10 mmol/L)、RNase 抑制剂 (40 U) 和双蒸水, 42 ℃ 水浴 1 h, 最后 70 ℃ 水浴 15 min。

以早芹的 *NHL* 基因 (登录号: JF776633) 的 cDNA 序列作参考, 设计一对引物: F-NXR07 (5'-AT-GTCTCAAATCCATGTAAAATC-3') 和 R-NXR08 (5'-TCAAACAGCAGTGGTACTACTGAG-3')。分别以津南实芹、美国西芹的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后采用 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 回收产物连接 pMD18-T 载体后转化大肠杆菌 DH5 α 进行蓝白斑筛选, 挑取质粒进行摇菌, 菌液经鉴定后, 送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.3 序列分析

利用 NCBI 网站 BLAST 程序进行基因和蛋白质预测, 利用 DNAMAN 6.0 软件进行 *NHL* 序列的分析、比对, 利用 MEGA5 软件进行进化树分析, 采用邻接法 (neighbor joining method) 构建进化树^[17-18]。氨基酸和蛋白的基本性质分析利用网站 <http://web.expasy.org> 相关软件完成。

1.4 实时定量 PCR 反应

荧光定量 PCR (real-time quantitative RT-PCR) 采用 ABI 7300 Real-time PCR System 和 7300 System

software 进行反应和分析。采用芹菜 *actin* 基因作为内参基因,与目标基因一起扩增,内参基因引物为: *actin-F* (5'-CTTCCTGCCATATATGATTGG-3') 和 *actin-R* (5'-GCCA GCACCTCGATCTTCATG-3')。根据从芹菜中扩增的 *NHL* 序列分别设计表达检测引物 *NXR17* (5'-TAAATGGCAGACTGAGGT-3') 和 *NXR18* (5'-TCCAAAGGG CATAATAGC-3')。实时定量 PCR 体系 20 μ L,反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环后进行溶解曲线分析。相对定量采用内参基因的 ΔC_{T1} 法,表达差异等于 $2^{-\Delta C_T}$, $\Delta C_T = C_{T, \text{目标基因}} - C_{T, \text{actin}}$ [19]。

2 结果与分析

2.1 芹菜 *AgNHL* 基因的克隆

分别以津南实芹、美国西芹的 cDNA 为模板,以 *NXR07* 和 *NXR08* 为引物,经 PCR 扩增后分别得到 600 bp 左右的片段。序列测定与分析表明,津南实芹和美国西芹的 *AgNHL* 序列均含有一个 636 bp 的开放阅读框,分别编码 211 个氨基酸,两者的核苷酸序列仅有 1 个位点的差异。津南实芹的第 36 位碱基为 T,而美国西芹为 C,该核苷酸位点的变化没有导致编码组氨酸的改变(图 1)。

```

1      ATGTCCTCAAATCCATGTAATAATCCACACCAATGTGCCAAGAAAATTTAAGCATTGAC
   MSQIHVKSPQHCKAKKNLSID
61     AAGCGCTACAAGAACTATTCACGCTTTCTTACGTGCCTGTTTCAGTFTTATCAATC
   KRYKLLFYAFFTCLFLSFLSI
121    ATATTCAATTATATTTTCTCCACACCCCTCCAAGCCAGAATTTCCVCTTAAGAAGCC
   IFIIYFLLHPSKPEFSLKEA
181    GATATCTACCAACTAACCCTCTCCAGAACCTCAACTGTGCAACTCTCTATTACGCTC
   DIYQCLNLFLTNPQLVNSAIIQL
241    ACCCTGCTCTAAGAATCCTAACAGAAAGTTGGCACTTACTACGATCACTACTAGTT
   TLLSKNPNQKVGIIYYDELLV
301    CATGCATCTTACAAGGGCAGCAGATACAGTTCCTACATCGCTTCTCCATTTTACCAA
   HASYKGGQITVSTSLPPFYQ
361    GGCCATGAAGGTACTAACCTCCTAACAGCTTCTTTGACAGGAAATGGAGTACCTGTGGCT
   GHEGTNLLTASLTGNGVPPVA
421    TCCTCTTTTCGCTATGAAGTAATACGGGATACAACCTGTAGGAAGATGGTCATGAATCTT
   SFRYEYVIRDDTTVVGKMMVNNL
481    AAAGTAAATGGCAGACTGAGGTGGAAGTTAGTACTTGGGTTTCAAGAAAGTATAGATTT
   KVNGRLLRWKLGITWVSRKYRF
541    AATGTAATTTGCTGCTATTATGCCCTTTGGACCTCAATACCATCAGGCTCCTCTCAGC
   NVNCAAIMPFGPSIPSGPLS
601    TCCAAGCAAGGACTCAGTGTACCACTGCTGTTGA
   SKQGTQCTTAV*

```

图 1 津南实芹 *AgNHL* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *AgNHL* gene from Jinnan Shiqin

2.2 芹菜 *AgNHL* 蛋白的氨基酸序列比对与理化分析

运用 Blast 同源性检索与比对 [20], 结果表明: 葡萄 (*Vitis vinifera* 登录号: ABU43058. 1)、碧桃 (*Prunus*

persica 登录号: EMJ19602. 1)、草莓 (*Fragaria vesca* subsp. *Vesca* 登录号: XP_004307931. 1)、番茄 (*Solanum lycopersicum* 登录号: XP_004235025. 1)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* 登录号: XP_002321350. 1)、蓖麻 (*Ricinus communis* 登录号: XP_002524430. 1)、大豆 (*Glycine max* 登录号: XP_003523316. 1)、百脉根 (*Lotus japonicus* 登录号: AFK35623. 1)、牵牛花 (*Ipomoea nil* 登录号: BAE94402. 1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* 登录号: NP_200184. 1) 等物种的 *NHL*-like 蛋白或相似蛋白与本研究克隆的芹菜的 *AgNHL* 蛋白相似度较高。其中,与葡萄 *NDR1/HIN1*-like 蛋白的相似度高达 71%,与拟南芥 *LEA* 蛋白相似度达 59%。根据 NCBI-CDS [21] 在线分析表明,该蛋白在第 80~185 个氨基酸间有一个 *LEA*.2 蛋白保守结构域,属于 *LEA*.2 超级家族。将芹菜 *AgNHL* 蛋白与上述植物的 *NHL*-like 蛋白序列进行多重序列比对,发现在保守区域中保守位点较多,6 个丝氨酸、6 个亮氨酸、6 个脯氨酸、6 个甘氨酸、6 个酪氨酸残基、4 个天冬酰胺残基、4 个赖氨酸残基、3 个谷氨酰胺、3 个半胱氨酸残基等完全保守(图 2)。

用 ProtParam 工具对上述芹菜中的 *AgNHL* 蛋白进行氨基酸组成成分及理化性质分析 [22], 结果表明: 芹菜 *AgNHL* 蛋白含有 211 个氨基酸,包含 20 种基本氨基酸,理论分子量 23734. 6,理论等电点为 9. 76,其水溶液在 280 nm 处的消光系数约为 26150,脂肪系数是 91. 42,平均亲水系数为 -0. 052,具有疏水性。脂肪族占 24%,芳香族氨基酸占 11%,带负电的氨基酸占 4%,带正电的占 13%,该蛋白的不稳定系数为 33. 30,表明该蛋白性质稳定。对上述其他物种类似蛋白质进行氨基酸组成成分及理化性质分析,结果发现: 这些植物类似 *NHL* 蛋白的氨基酸残基数变化幅度很小,在 210 左右,分子量变化也不大,在 23 kD 左右。各种植物类似蛋白质中碱性氨基酸数目普遍多于酸性氨基酸,可见该类蛋白大都偏碱性,等电点在 9. 35~9. 69 之间(表 1)。

2.4 芹菜 *AgNHL* 蛋白疏水性/亲水性分析

疏水性/亲水性是蛋白质重要的理化性质,疏水性/亲水性氨基酸的相互作用对维持蛋白质的三级结构、维持生物膜的结构有重要意义。对本试验克隆的芹菜 *AgNHL* 基因推导的氨基酸序列进行了疏水性/亲水性分析,结果表明: 该蛋白的第 41 位异亮氨酸 (Ile) 疏水性最强,疏水性强的位点还出现在第 80 位亮氨酸 (Leu) 和第 184 位半胱氨酸 (Cys); 第 22 位精氨酸 (Arg) 亲水性最强,其次,亲水性强的位点

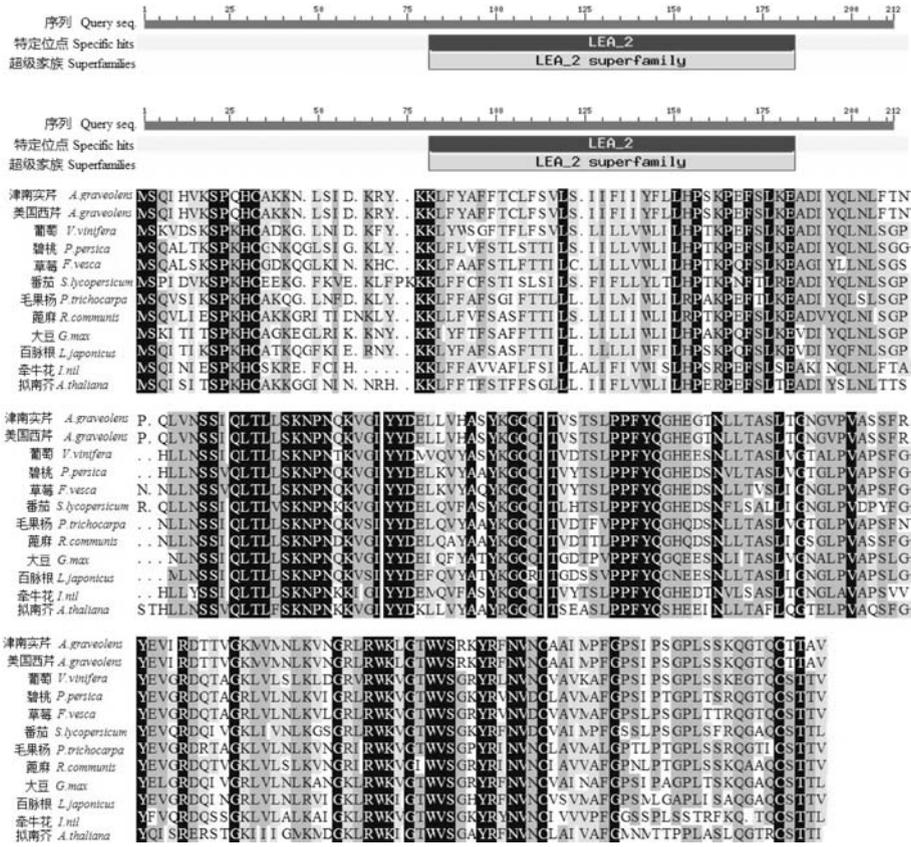


图 2 芹菜 AgNHL 蛋白保守域预测及其他物种类似蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 2 Prediction of the conserved domain and alignment of amino acid of AgNHL protein with other plants

出现在第 58 位赖氨酸 (Lys)。图 3 表明,芹菜 AgNHL 蛋白总体上属于疏水性蛋白。对其他植物类似蛋白亲水性/疏水性分析显示大部分植物该蛋白呈疏水性,个别有微弱的亲水性。

表 1 不同植物来源的 NHL-like 蛋白氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 Comparison of composition, physical and chemical characterization of amino acid sequences from NHL-like protein among the different plants

物种 Species	氨基酸残 基数 No. of amino acid	理论分子量 (D) Theoretical MW	理论等 电点 Theoretical pI	碱性氨基 酸比例 (%) Percentage of basic amino acid	酸性氨基 酸比例 (%) Percentage of acid amino acid
芹菜	211	23734.6	9.76	11	4
葡萄	210	23178.8	9.35	10	7
碧桃	211	23090.8	9.64	10	5
草莓	212	23333.2	9.68	10	4
番茄	213	23990.9	9.48	11	7
毛果杨	210	23243.1	9.68	10	5
蓖麻	212	23320.1	9.58	10	6
大豆	210	23255.0	9.69	10	5
百脉根	210	23422.2	9.60	10	5
牵牛花	207	23206.0	9.67	10	4
拟南芥	213	23910.8	9.65	10	5

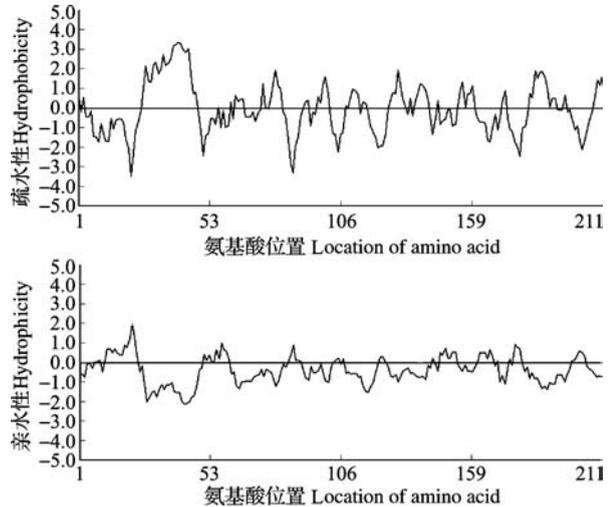


图 3 芹菜 AgNHL 蛋白氨基酸序列的疏水性和亲水性
Fig. 3 Predicted hydrophobicity and hydrophilicity of deduced amino acid sequences of the AgNHL protein

2.5 芹菜 AgNHL 蛋白的进化树分析

芹菜 AgNHL 蛋白与其他多种植物相似蛋白的氨基酸序列进行进化树分析(图 4),结果显示 12 种植物的 NHL-like 蛋白具有共同的进化起源,其中芹菜与旋花科牵牛花属 (Ipomoea) 牵牛花在进化亲缘关系上最近,其次是茄科茄属 (Solanum) 的番茄。

同属蔷薇科 (*Rosaceae*) 的碧桃和草莓在进化树的同一分支,二者与葡萄科 (*Vitaceae*) 的葡萄亲缘关系很近。同是豆科 (*Leguminosae*) 的大豆和百脉根位于同一进化分枝,杨柳科 (*Salicaceae*) 的毛果杨和大戟科 (*Euphorbiaceae*) 的蓖麻虽不是同一科,但进化关系依然很近。

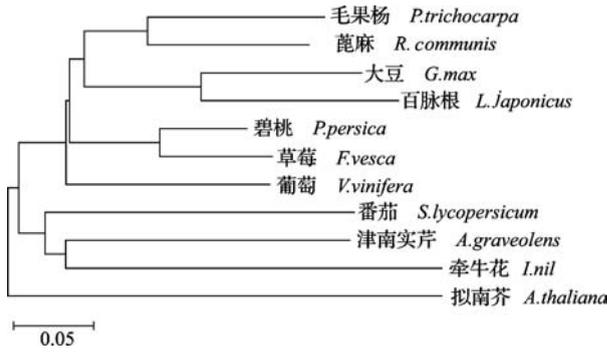


图4 部分植物中 NHL-like 蛋白氨基酸序列的系统进化树
 Fig.4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the NHL-like protein from several plant species



图5 芹菜 AgNHL 蛋白二级结构预测
 Fig.5 Prediction of secondary structure of the AgNHL protein

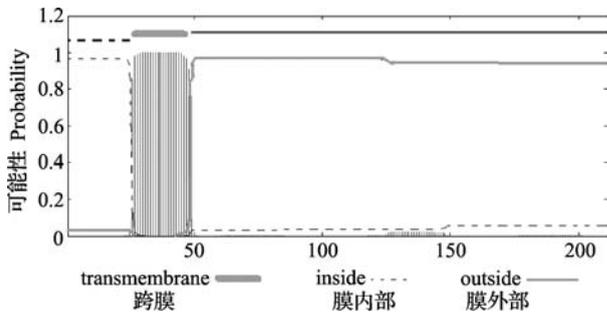


图6 芹菜的 AgNHL 蛋白跨膜结构预测
 Fig.6 TMHMM posterior probabilities for the AgNHL protein

2.7 芹菜 AgNHL 基因不同组织部位的表达分析

通过荧光定量 PCR 检测 *AgNHL* 基因在津南实芹、美国西芹不同组织中的表达情况结果表明,不同品种 *AgNHL* 基因表达量不同。*AgNHL* 基因在 2 个品种中根的表达量均处于较低水平,在茎的表达量

2.6 芹菜 AgNHL 蛋白高级结构的预测与分析

按照 SOPMA 方法对芹菜 AgNHL 蛋白进行分析^[23],结果表明该蛋白由 16.59% 的 α -螺旋、30.80% 的延伸主链、4.74% 的 β -转角、47.87% 的无规则卷曲组成,因此该蛋白高级结构的主要组成部分为无规则卷曲、延伸主链, α -螺旋、 β -转角散布其中。用 JPRED 3^[24] 分析具体氨基酸形成高级结构的方式,结果显示:21 ~ 48 位的氨基酸易形成螺旋,多处位点的氨基酸易形成折叠,体现了蛋白质高级结构与一级结构的关系(图5)。

TMHMM v2.0^[25] 分析结果显示:有 1 个由 26 ~ 48 位点共 23 个氨基酸组成的跨膜区,该结果有 96.7% 的可信性(图6)。用 PSORT-B Prediction 对 AgNHL 蛋白的亚细胞定位结果表明^[26]:该蛋白有 79.0% 的可能是细胞质膜,39.8% 的可能是叶绿体类囊体膜,32.5% 的可能是微体膜,30.0% 的可能性为高尔基体膜,结合跨膜结构预测结果看,该蛋白最可能定位于细胞质膜上。

美国西芹高于津南实芹,在叶中的表达量基本无品种间差异性,在花中津南实芹的表达量明显高于美国西芹(图7)。

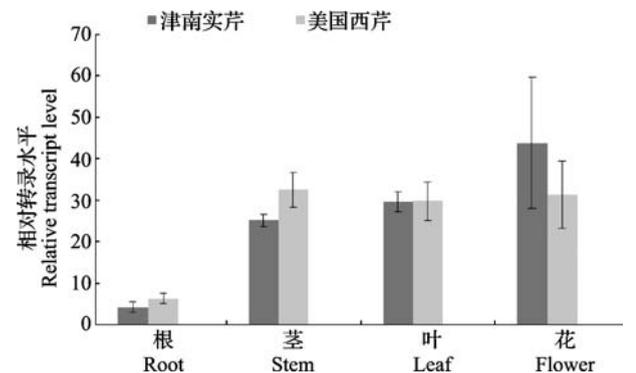


图7 *AgNHL* 基因在不同品种不同组织中的表达水平
 Fig.7 Expression analysis of *AgNHL* gene in different tissues

2.8 芹菜 *AgNHL* 基因不同处理下的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测津南实芹、美国西芹在高温、低温、干旱和盐胁迫 4 种处理 2 h 的表达量,结果表明,高温处理下 *AgNHL* 基因的表达量变化不明显,低温和盐处理后 *AgNHL* 基因表达量增加较大。干旱条件下津南实芹、美国西芹 *AgNHL* 基因的表达量差异较大,分别是对照的 0.87 倍、10.89 倍,美国西芹该基因对干旱响应更灵敏。在低温条件下津南实芹、美国西芹 *AgNHL* 基因的表达量分别是对照的 22.36 倍、14.79 倍。在盐处理下津南实芹、美国西芹 *AgNHL* 基因的表达量分别是对照的 3.37 倍、1.96 倍(图 8)。

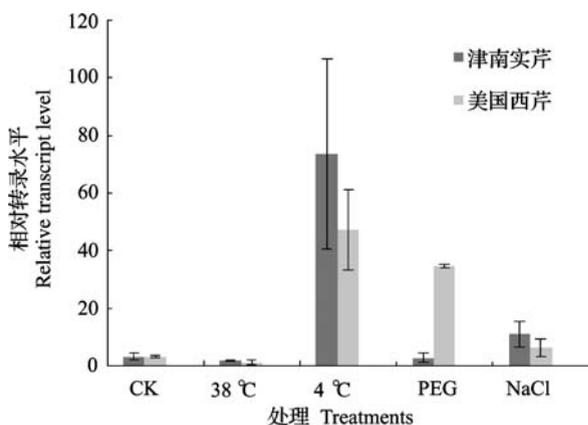


图 8 *AgNHL* 基因在不同品种不同处理下的表达水平

Fig. 8 Expression analysis of *AgNHL* gene in different treatments

3 讨论

津南实芹和美国西芹品种特性、地域差异较大,是具有地域代表性的优良品种。本研究从这 2 个品种中分别克隆出 *AgNHL* 基因,发现该基因高度保守,只有 1 个核苷酸位点差异,翻译氨基酸序列无差异。该基因编码的蛋白质属于 NHL-like 蛋白,在多种植物中与抗病防御作用密切相关^[27]。*NHL1*、*NHL2*、*NHL3*、*NHL25*、*NDR1*、*HIN1* 等的表达受病原体诱导并引发过敏反应^[28]。研究发现植物抗病基因(R 基因)可增强植物对各种细菌、真菌病原体的抗性,而 *NHL* 基因参与调控 R 基因主导的抗病信号的转导,因此 *NHL* 基因突变的植物更易感病^[29]。*NHL* 基因编码的蛋白有很多相似性,大部分都含有 1~2 个跨膜域:拟南芥 *NHL10* 蛋白的 2 个跨膜结构域分别在 52~75 的氨基酸之间和 30~50 之间的一段富含半胱氨酸的区域^[7,30]。拟南芥 *NDR1* 基因编码 219 个氨基酸,跨膜区在 19~36 和 202~218

位点的氨基酸之间^[31],本研究发现芹菜 *AgNHL* 基因编码蛋白的跨膜域在 26~48 氨基酸之间。*NHL-like* 蛋白非常保守可能与其在植物抗病防御过程中发挥的重要作用有关。

本研究发现芹菜 *NHL-like* 蛋白基因保守的结构域属于 LEA_2 超级家族,LEA 蛋白是生物体中广泛存在与渗透调节有关的一类家族蛋白,编码该蛋白的基因在种子胚胎发育晚期表达量丰富,在干旱、低温等环境胁迫下也大量表达^[32],因此该保守结构域的存在间接证明芹菜 *AgNHL* 基因与抗性防御功能相关。

进化树分析表明,芹菜中该类蛋白与旋花科牵牛花属的牵牛花的类似蛋白在进化亲缘关系上最近,其次是茄科茄属的番茄,同一科、属植物类似蛋白也呈现较近的亲缘关系。对多种植物该类蛋白的理化性质分析,表明不同植物该蛋白氨基酸残基数目、分子量、等电点、酸/碱性氨基酸比例等变化都不大,可见该类蛋白质在漫长的进化过程中比较保守,保证了 *NHL-like* 蛋白功能的稳定性,确保了植物抗病性的稳定,有利于植物生存繁衍。

有学者用 Northern 法分析发现拟南芥不同器官 *NHL* 基因表达量不同;*NHL10* 在衰老的莲座叶中表达量最高,其他器官较低,茎和花几乎没有表达,*NHL12* 在叶、茎、花中都表达,但在根、长角果中表达量低,*NHL8*、*NHL9*、*NHL11* 在所有器官中都几乎没有检测到转录表达信号,*NDR1* 在根、茎、叶中表达,花中不表达^[6]。本研究对 2 种旱芹 *AgNHL* 基因表达分析显示,*AgNHL* 基因在根、茎、叶、花中都表达,表达水平有芹菜品种差异性和组织特异性。*AgNHL* 基因在高温、低温、干旱、盐等胁迫处理下均表达,干旱、高盐、低温胁迫对 *AgNHL* 基因表达起明显上调作用,表达水平依然有品种间的差异。可见 *AgNHL* 基因不仅在芹菜抗病防御中起作用,还可能对植物干旱、高盐、低温有一定作用,是植物重要的抗性基因。不同品种抵御环境胁迫的能力不同,栽培时可根据当地环境特点栽培不同品种,更利于提高产量^[33]。

结合亚细胞定位分析芹菜 *NHL-like* 蛋白,发现该蛋白可能定位于细胞膜上,对定位于细胞膜上的拟南芥 *NDR1* 抗病蛋白研究发现,该蛋白在靠近细胞膜区易形成局部的高浓度,易与病原菌识别,从而提高敏感性^[34-35]。由此推测芹菜 *NHL-like* 蛋白可能参与识别病原体、转导抗病信号、快速引发过敏反应,达到抗病防御的目的。

参考文献

- [1] 王武台, 古瑜, 韩启厚, 等. 芹菜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 中国蔬菜, 2011(8): 22-27
- [2] 王述民, 李立会, 黎裕, 等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告(1)[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 1-12
- [3] Varet A, Parker J, Tornero P, et al. *NHL25* and *NHL3*, two *NDR1/HINI-like* genes in *Arabidopsis thaliana* with potential role(s) in plant defense[J]. Mol Plant Microbe In, 2002, 15: 608-616
- [4] Lu H, Zhang C, Albrecht U, et al. Overexpression of a citrus *NDR1* ortholog increases disease resistance in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2013, 4: 157
- [5] Shapiro A D, Zhang C. The role of *NDR1* in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2001, 127: 1089-1101
- [6] Dörmann P, Gopalan S, Benning C, et al. A gene family in the *Arabidopsis thaliana* with sequence similarity to *NDR1* and *HINI* [J]. Plant Physiol Biochem, 2000, 38: 786-796
- [7] Cacas J L, Petitot A S, Bernier L, et al. Identification and characterization of the Non-race specific Disease Resistance 1 (*NDR1*) orthologous protein in coffee [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11: 144
- [8] 刘志文, 王英, 沙爱华. 活性氧物质在植物抗病中的作用[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1705-1707
- [9] 窦道龙, 王冰山, 朱生伟, 等. 转 *NDR1* 基因烟草对赤星病和晚疫病的抗性增强 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(10): 1120-1124
- [10] Julie C, Gaele L H, Christophe B, et al. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera* [J]. Plant Physiol Biochem, 2008, 46: 469-481
- [11] 丁秀英, 苏宝林, 张军, 等. 水杨酸在植物抗病中的作用[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 163-168
- [12] Delker C, Stenzel I, Hause B, et al. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*-enzymes, products, regulation [J]. Plant Biol, 2006, 8: 297-306
- [13] Verbeme M C, Verpoorte R, Bol J F. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 779-783
- [14] Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, et al. Involvement of reactive oxygen species in the spermine-induced expression of tobacco *HINI* gene [J]. Plant Cell Physiol, 2003, 44: 113
- [15] Yamaguchi S K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. Plant Biol, 2006, 57: 781-803
- [16] 马静, 王枫, 侯喜林, 等. 芹菜韧皮部蛋白基因的分离与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 523-529
- [17] Altschul S F, Lipman D J. Protein database searches for multiple alignments [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 5509-5513
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2001, 28: 2731-2739
- [19] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucl Acids Res, 2001, 29: 45
- [20] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389-3402
- [21] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 225-229
- [22] Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. Biotechnology, 1996, 14: 61-65
- [23] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. CABIOS, 1995, 11: 681-684
- [24] Cole C, Barber J D, Barton G J. The Jpred 3 secondary structure prediction server [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 197-201
- [25] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes [J]. J Mol Biol, 2001, 305: 567-580
- [26] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343-350
- [27] Coppinger P, Repetti P P, Day B, et al. Overexpression of the plasma membrane-localized *NDR1* protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2004, 40: 225-237
- [28] Vilaine F, Kerchev P, Clément G, et al. Increased expression of a phloem membrane protein encoded by *NHL26* alters phloem export and sugar partitioning in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25: 1689-1708
- [29] Azinheira H G, Silva M C, Medeira C, et al. Non-host resistance responses of *Arabidopsis thaliana* to the coffee orange rust fungus (*Hemileia vastatrix*) [J]. Botany, 2010, 88: 621-629
- [30] Zheng M S, Takahashi H, Miyazaki A, et al. Up-regulation of *Arabidopsis thaliana NHL10* in the hypersensitive response to cucumber mosaic virus infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement [J]. Planta, 2004, 218: 740-750
- [31] Jean-Luc C, Anne-Sophie P, Louis B, et al. Identification and characterization of the Non-race specific Disease Resistance 1 (*NDR1*) orthologous protein in coffee [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11: 144
- [32] Goyal K, Walton L J, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress [J]. Biochem J, 2005, 388: 151-157
- [33] 刘彦丹, 英生, 张登峰, 等. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 775-781
- [34] Varet A, Hause B, Hause G, et al. The *Arabidopsis NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 [J]. Plant Physiol, 2003, 132: 2023-2033
- [35] Knepper C, Savory E A, Day B. The role of *NDR1* in pathogen perception and plant defense signaling [J]. Plant Signal Behav, 2011, 6: 1114-1116