

苏俊,陈璐,马伟荣,等.云红梨 1 号 *HY5* 基因原核表达载体的构建、表达和纯化[J].江苏农业科学,2020,48(20):62-67.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.010

云红梨 1 号 *HY5* 基因原核表达载体的构建、表达和纯化

苏俊¹,陈璐²,马伟荣³,杨谨⁴,黄兴龙⁵,陈霞¹,舒群¹

(1. 云南农业科学研究院园艺作物研究所,云南昆明 650205; 2. 云南农业大学园林园艺学院,云南昆明 650200;
3. 云南省红河州经济作物技术推广站,云南红河 654400; 4. 云南省农业科学院经济作物研究所,云南昆明 650205;
5. 石林县经济作物站,云南石林 652200)

摘要:*HY5* 为调控光形态建成的转录因子,调控花青素的生物合成与累积。通过构建云红梨 1 号 *HY5* 基因的原核表达载体,旨在为研究 *HY5* 蛋白的生物功能奠定基础。将云红梨 1 号的 *HY5* 基因构建到原核表达载体 pGEX-4T-1 上,并对其诱导表达,通过谷胱甘肽-S-转移酶(GST)亲和层析色谱柱纯化融合蛋白。结果表明,重组质粒 pGEX-4T-1-*PyHY5* 的酶切检测及测序结果均正确,表明重组质粒载体构建成功。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示,用 100 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)在 37 ℃、220 r/min 条件下诱导 3 h 后收集诱导菌株,在 BL21 菌株中均有明显的目的条带,诱导表达后的融合蛋白大小约为 43.90 ku;*PyHY5* 蛋白能够与 pGEX-4T-1 载体上的 GST 标签蛋白进行融合表达。通过研究成功构建了 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达载体,诱导表达并纯化出 *PyHY5* 融合蛋白为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

关键词:*HY5* 基因;云红梨 1 号;原核表达载体;诱导表达;纯化

中图分类号: S661.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)20-0062-06

我国是梨生产大国,年产量超过世界总产量的 60%^[1]。梨的果皮有绿色、黄色、褐色、红色等多种颜色,其中红皮梨最受消费者的青睐^[2],选育优质红皮梨已经成为当前国内外的育种目标之一^[3]。目前,云南红梨主要包括早熟早白蜜、中熟 32 号(又称美人酥)和中熟 35 号(又称满天红)、晚熟云红梨 1 号,其中云红梨 1 号是由云南省农业科学研究院从云南省砚山县的种质资源中选育而来的^[4],其果皮着色面积远远超过其他 3 种梨,达 90% 以上。由于云南红梨外观色泽鲜艳、内在品质优良,目前已在云南安宁、江川、德宏、丽江、保山等地大面积种植,产品远销澳大利亚、新西兰、泰国等,市场前景广阔,在国内现已引种到河南^[5-7]、贵州^[8]、

安徽、山东、河北^[9]、甘肃^[10]等省。

HY5 是光形态建成的正调控因子,是光调控植物发育的分子开关^[11]。光诱导果皮着色的过程主要包括光作用于光受体、光受体通过某种途径作用于转录因子、转录因子调控花青素的生物合成和累积等。云南红梨果皮的果色着色,主要是矢车菊素-3-O-半乳糖苷在果皮中合成和累积的结果^[12],影响果皮着色的主要因素是光照^[13]。本研究对笔者所在课题组前期获得的云红梨 1 号 *HY5* 基因的序列进行分析发现,*HY5* 蛋白除了 bZIP 域外,无其他明显的结构域,说明由于缺乏潜在的转录激活域,使得 *HY5* 蛋白要与其他转录因子发生协同作用。pGEX-4T-1 是一种可以高效表达插入的外源基因的融合蛋白表达载体,带有 tac 启动子,具有氨苄青霉素(Amp)抗性,能够克服转录和转录后水平对外源基因的表达可能造成的不利影响^[14]。因此,pGEX-4T-1-*PyHY5* 融合蛋白的成功诱导表达和纯化,为云红梨 1 号依光合成红色果皮以及 *PyHY5* 基因功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验材料 云红梨 1 号果实于 2019 年 9 月

收稿日期:2019-12-30

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(编号:31760562);国家重点研发计划(编号:2018YFD0201400);云南省重大科技专项(编号:2019ZG002);云南省科技计划(编号:2017FB062);云南省技术创新人才培养计划(编号:2015HB101);现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-28-20)。

作者简介:苏俊(1980—),男,云南大理人,硕士,研究员,主要从事梨育种、栽培生理及品质调控等方面的研究。E-mail:57470058@qq.com。

通信作者:舒群,研究员,研究方向为果树育种及栽培技术。E-mail:1057139643@qq.com。

采自云南省安宁市清水河果园,采后于笔者所在实验室中进行试验。使用水果刀迅速削取云红梨 1 号的新鲜红色果皮,立即投入盛有液氮的保温桶中,之后于实验室 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞及表达菌株 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,均购自天根生化科技(北京)有限公司;原核表达载体 pGEX - 4T - 1,购自 GE Healthcare 公司。

1.1.2 主要试剂 试验中所用引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209 - 03) 及质粒小提试剂盒 (DP103 - 02),购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 及 T_4 DNA 连接酶,均购自 TaKaRa 公司;LB 培养基,购自安琪公司;NI Crystarose FF,购自晶诚生物科技公司;异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷 (IPTG),购自 Amresco 公司。

3 L S1(裂解缓冲液)配方:150 mL 1 mol/L Tris (pH 值为 8.0),9 g NaCl,30 mL 500 mmol/L 乙二醇四乙酸(EDTA)。

3 L S2(洗涤缓冲液)配方:150 mL 1 mol/L Tris (pH 值为 8.0),9 g NaCl,30 mL 500 mmol/L EDTA。洗涤时取 40 mL,加入 2 mL 20% Triton X - 100。

20 mL S3(洗脱缓冲液,现配现用)配方:1 mL 1 mol/L Tris (pH 值为 8.0),0.2 g 谷胱甘肽 (GSH),用去离子水定容至 20 mL。

1.1.3 主要仪器与设备 PTC - 200 PCR 仪、SiGMA 3k15 高速离心机、NANODROP 2000 紫外分光光度计、DYY - 10C 型电泳槽和电泳仪,均购自北京六一仪器厂;SYNGENE G: BOX 凝胶成像系统仪,购自英国 Syngene 公司;TS - 1 脱色摇床,购自上海圣科仪器设备有限公司;YLN - III 超强紫外透射仪,购自北京誉朗诺科技有限公司;超声破碎仪,购自南京先欧仪器制造有限公司;NGC Quest 10 蛋白纯化系统仪,购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司 (Bio - Rad)。

1.2 试验方法

1.2.1 云红梨 1 号 HY5 基因的克隆 根据已有的苹果 *MdHY5* 基因序列(登录号:AB710143.1),设计特异性引物(*PyHY5* - F:5' - ATGCAAGAGCAGGC G - 3';*PyHY5* - R:5' - TCAATCCGCATTTGCAC - 3')。以云红梨 1 号红色果皮 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增的反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;98 $^{\circ}\text{C}$

10 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。回收 PCR 产物,加尾,连接到 pGEX - 4T - 1 载体上,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,提取质粒,经 PCR 检测和酶切鉴定后测序。

1.2.2 *PyHY5* 基因和 pGEX - 4T - 1 载体的双酶切

根据试剂盒的说明书提取云红梨 1 号红色果皮的总 DNA,并以此为模板,设计两端分别含有 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点的引物,引物序列:

P991F: 5' - CGGGATCCATGCAAGAGCAGGCC ACCAG - 3';

P2991R: 5' - CCGCTCGAGGTGATGATGATGAT GATGATCCGCATTTGCACTACCATC - 3'。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,33 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测正确后切胶回收。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 处理 3 h,酶切完成后电泳检测,再按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的使用说明切胶回收待用。同时,用热击化法将 pGEX - 4T - 1 载体质粒转入大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中,将其涂布到 LB 固体培养基(含 20 mg/mL 氨苄青霉素)上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,摇菌并挑斑,按照试剂盒使用说明书提取质粒,之后进行双酶切,酶切后进行电泳检测,检测正确后切胶回收待用。

1.2.3 pGEX - 4T - 1 - *PyHY5* 原核表达载体的构建 将“1.2.2”节中经限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切纯化后的目的基因及载体片段在 T_4 DNA 连接酶作用下于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,之后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。培养后挑菌、PCR 鉴定,对大小正确的条带进行检测。

1.2.4 pGEX - 4T - 1 - *PyHY5* 原核表达载体的诱导表达

1.2.4.1 蛋白的小量表达 用 pGEX - 4T - 1 - *PyHY5* 表达载体转化表达菌株 BL21;挑取其中的 5 个单克隆至含有 Amp 的 3 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养;从中取出 1 mL 作为未诱导液(a液),剩余的菌液按照 1:100 的体积比转接到新的含 Amp 的 3 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 3 h。剩余菌液过夜培养后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存,按 1:100 的体积比向菌液中加入 100 mmol/L IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导 3 h,从中取出 1 mL 诱导菌液(b液);将上述 a、b 液于 6 500 r/min 离心 5 min,收菌,去除上清;加入 20 μL PBS 溶液,混匀后加入

10 μL 2 \times loading buffer, 混匀, 沸水浴煮 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上样, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。选取 5 个克隆中表达最好的 3 个菌液保存。

1.2.4.2 蛋白的大量表达 选取保存的克隆表达菌液后,按照 1:100~1:200 的体积比接入 LB 液体培养基(含 Amp,10~20 mL)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养,按照 1:100 的体积比转接到 2 个含有 Amp 的 200 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养约 3 h,按照 1:200 的体积比加入 100 mmol/L IPTG,19 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导过夜。该过程连续进行。共收集 400 mL 菌液,于 6 500 r/min 离心 5 min 收集菌体,去除上清、沥干后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 暂存或直接进行纯化。

1.2.4.3 蛋白可溶性的鉴定 选取上述试验中表达最好的克隆菌液,按照 1:100~1:200 的体积比接入 3 mL LB 培养基(含 Amp)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养;从上述过夜培养的菌液中取出 1 mL 作为未诱导菌液,剩余菌液按 1:100 的体积比转接到新的 3 mL LB 培养基(含 Amp)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 3 h;按 1:200 的体积比向菌液中加入 100 mmol/L IPTG,19 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导过夜;取出 2 mL 诱导菌液,6 500 r/min 离心 5 min 收菌,去除上清,加入 600 μL PBS,混匀,超声破碎 2~4 min,取 20 μL 破碎菌液;将剩余诱导菌液于 12 000 r/min 离心 10 min,取出 20 μL 上清,去除沉淀后加入 100 μL PBS,混匀;将 a 管于 6 500 r/min 离心 5 min,收菌、去除上清后加入 100 μL PBS,向 a、b、c、e 管中分别加入适量上样缓冲液(loading buffer),混匀、沸水浴 10 min 后于 12 000 r/min 离心 5 min,上样,进行 SDS-PAGE 检测,分析目的蛋白是否可溶表达。

1.2.5 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达蛋白的纯化 在大量表达收集的菌液中加入 100 mL S1 溶液、1 mL 1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)、1 mL 100 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),混匀后分装菌液(每份 20~30 mL),超声破碎(6 号探头,功率为 30%,超声 2 s,停止 2 s,持续 10~20 min),直至菌液澄清呈半透明状态。用 50 mL 离心管收集破碎菌液,于 18 000 r/min 离心 10 min,收集上清待纯化。取 2 mL 混匀的商业化谷胱甘肽-S-转移酶(GST)-琼脂糖珠,加入含有 1 mL ddH₂O 的柱中,待珠子沉淀后,将上层液体调节到 1 cm 高度,按照表 1 中的步骤进行处理和纯化。

表 1 GST 标签蛋白的纯化流程

步骤	上柱溶液	流速 (mL/min)	目的
1	30 mL H ₂ O	2	预处理
2	60 mL S1 溶液	2	平衡
3	含有目的蛋白的上清溶液	1	上样
4	60 mL S2 溶液	2	洗涤,去除杂蛋白
5	10~15 mL S3 溶液	1	洗脱目的蛋白
6	30 mL H ₂ O	2	清洗柱子
7	20 mL 20% 乙醇	2	保存柱子

注:上样时,收集 20 μL 从柱子中流出的溶液(记为 f);洗涤时,收集 20 μL 从柱子中流出的溶液(标记为 g)用于后续检测。

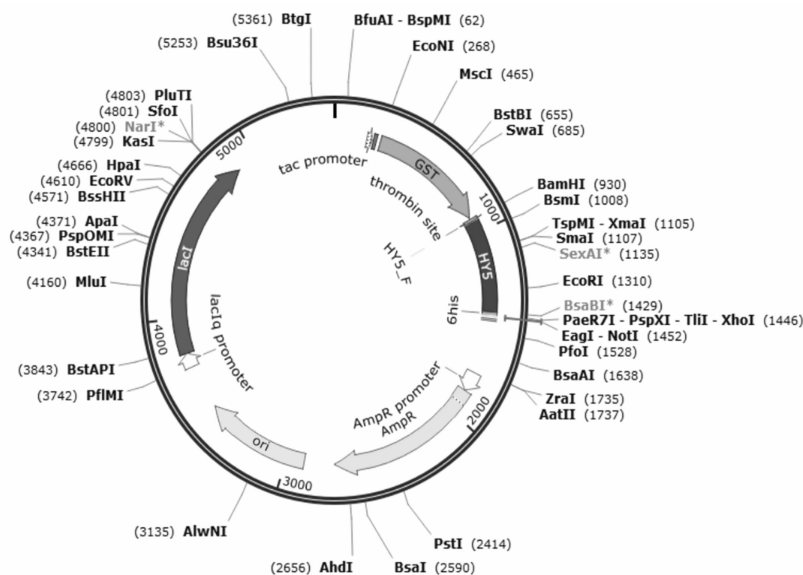
表 1 中第 5 步的目的为洗脱目的蛋白,用多个 1.5 mL 离心管收集洗脱下来的溶液,每个离心管收集 500 μL 蛋白溶液,将收集了蛋白的离心管按收集的先后顺序编号(1~20)。收集后立即向管中加入 50 μL 甘油,混匀,从编号为 1、5、9、13、17、20 的管中取出 20 μL 蛋白用于检测。剩余蛋白用自封袋收集,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在纯化过程中,用 SDS-PAGE 检测收集液及最后待检测的纯化蛋白。观察纯化蛋白各管中的蛋白混度与浓度,选择最好的几管合并,进一步进行透析处理(以去除盐离子和咪唑),确保达到一定的浓度和纯度。

2 结果与分析

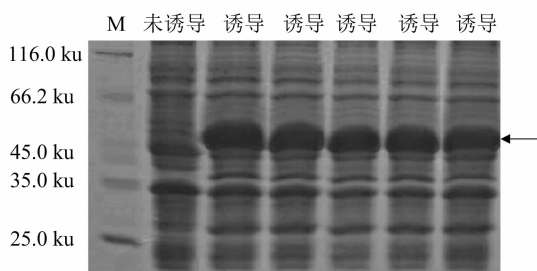
2.1 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达载体的构建 对于构建好的 pGEX-4T-1-*PyHY5*,挑选菌落进行 PCR 鉴定,切取大小正确的条带后,用 PGEX-5(正向通用引物,序列为 5'-GGGCTGGC AAGCCACGTTTGCTG-3')进行测序检测。测序结果表明,序列中有包含双酶切位点(*Bam*H I 和 *Xho* I)的 *PyHY5* 基因片段,大小为 495 bp,且含有双酶切位点 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Xho* I (CTCGAG),与预期的载体片段相符,说明 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达载体构建成功,详见图 1。

2.2 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达载体的表达

将含有重组质粒 pGEX-4T-1-*PyHY5* 的原核表达菌株 BL21(DE3)在 100 mmol/L IPTG、37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 的条件下进行诱导,3 h 后收集诱导菌株。12% SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定结果见图 2。根据生物信息学分析结果,推测 *PyHY5* 的蛋白质大小为 17.9 ku,pGEX-4T-1 载体上所带 GST 标签蛋白大小为 26 ku,因此推测诱导表达出的融合

图1 插入 *PyHY5* 基因的 pGEX-4T-1 载体

蛋白大小为 43.90 ku。由图 2 可知,该融合蛋白在 BL21 表达菌株中均有明显表达,且目的蛋白大小与预测蛋白大小吻合,而未诱导重组质粒 pGEX-4T-1-*PyHY5* 的原核表达菌株 BL21 (DE3) 在 43.90 ku 处没有出现明显条带,证明 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达载体得到了成功表达。



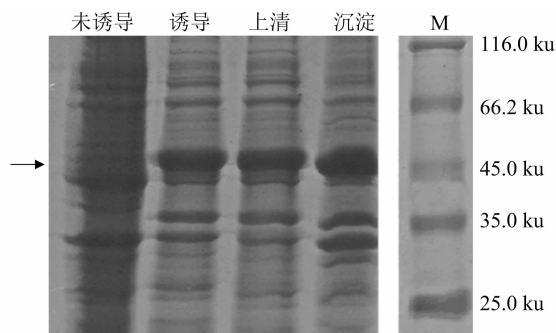
M—蛋白质 marker; 未诱导—未转化的 BL21 菌株(阴性对照); 诱导—BL21 菌株在 100 mmol/L IPTG、37℃、220 r/min 条件下诱导 3 h; 黑色箭头所示为目的蛋白条带

图2 *PyHY5* 蛋白在不同菌株中的诱导表达

2.3 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达蛋白的可溶性鉴定

选取表达最好的诱导菌液,离心收菌、去除上清后加入 600 μ L PBS,混匀后,置于超声破碎离心管中离心,取出上清,向去除上清的沉淀中加入 100 μ L PBS,混匀,分析目的蛋白是否为可溶性表达。用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳进行鉴定,由图 3 可知,pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达蛋白经诱导后在约 43.90 ku 处出现了 1 条蛋白条带,在未经诱导的空白对照中没有出现此条带;同时,在菌液离心后得到的上清液及沉淀中,位置相近的地方也

出现与诱导成功的菌液相同的蛋白条带,表明 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达蛋白在上清中也有表达,且可溶性较好。



未诱导—未转化的 BL21 菌株(阴性对照); 诱导—超声破碎菌液(超声破碎仪参数: 2 号探头, 功率 10%, 超声 2 s, 停止 2 s, 持续 2~4 min); 上清—BL21 菌株的诱导菌液于 12 000 r/min 离心 10 min 后的上清; 沉淀—去除 BL21 菌株的诱导菌液上清后,在沉淀中加入 100 μ L 磷酸缓冲液(PBS),混匀;

M—蛋白质 marker; 黑色箭头所示为目的蛋白条带

图3 *PyHY5* 蛋白在不同菌株中的诱导表达

2.4 pGEX-4T-1-*PyHY5* 原核表达蛋白的纯化

收集 400 mL 大量表达菌体,加入 100 mL S1 溶液、1 mL 1 mol/L DTT 和 1 mL 100 mmol/L PMSF,混匀后超声破碎(6 号探头,功率 30%,超声 2 s,停止 2 s,持续 10~20 min),直至菌液达澄清半透明状态,离心后收集上清,将商业化 GST-琼脂糖珠加入含有 1 mL ddH₂O 的柱中,待珠子沉淀后,对融合蛋白进行处理和纯化。如图 4 所示,*PyHY5* 融合蛋白经过 S1、S2、S3 溶液和 GST-琼脂糖珠处理、纯化后得到单一的目的条带,未出现杂带,该蛋白与大量表达后 *PyHY5* 融合蛋白的位置一致,与预期蛋白大

小相符,蛋白浓度、纯度较高,共获得 8 mL 纯化蛋白,经测定,纯化蛋白的质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

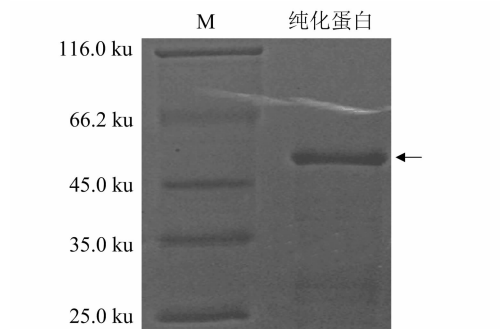


图4 纯化蛋白 SDS-PAGE 检测结果

3 讨论

光在植物生长发育过程中的意义重大,在调控植物光形态建成的过程中,红光、远红光、蓝光、UV -、UV - B 等均会影响 HY5 的积累,而且 HY5 调控光信号转导下游的相关基因^[15]。目前,在部分植物(如津田芜菁^[16]、拟南芥^[17]、油菜^[18]等)中, HY5 的编码基因已经被成功克隆, HY5 可直接与花青素合成的关键基因发生相互作用。在前人研究的植物中, HY5 基因编码的 HY5 蛋白的 C 末端具有 bZIP 结构域,可直接与基因的启动子作用元件 G - box 结合,从而激活并诱导该基因的表达^[11]。Ang 等的研究表明,拟南芥的 HY5 过量表达植株在光下生长时,表现为光形态建成^[19],表明 HY5 是光形态建成过程中的 1 个正调控因子。尽管有学者对植物中的 HY5 进行了一些研究,关于 HY5 的结构、功能及其分子机制也逐渐明晰,但 HY5 与其他蛋白的协同作用尚未明确。因此,开展云红梨 1 号 HY5 基因的原核表达研究,可以为深入研究 HY5 的生物学活性和互作奠定基础。

大肠杆菌原核表达系统制备重组蛋白有诸多优点,目前已被广泛应用于植物蛋白的表达研究中^[20]。将目标基因转移到带有谷胱甘肽 - S - 转移酶(GST)标签的原核表达载体 pGEX - 4T - 1 上,加入诱导剂异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷后, tac 就会被诱导, tac 启动子后的 GST 标签及其后的插入基因就会得到表达^[21]。而 pGEX - 4T - 1 载体表达的蛋白产物在 N 端含有 GST 序列,加入融合标签 GST 后,重组蛋白的大小会随即增加 26.0 ku,蛋白正确折叠,以融合形式表达^[14]。在本研究中,

PyHY5 的蛋白质大小仅为 17.90 ku,因此表达的融合蛋白分子量应为 43.90 ku;此外,由于 pGEX - 4T - 1 在表达菌株中高效表达,因此本试验以 pGEX - 4T - 1 作为表达载体。构建原核表达载体后,在特定条件下被诱导,收集诱导菌株,发现有明显的目的条带,蛋白大小为 43.90 ku,表明 PyHY5 蛋白在 BL21 菌株中高效表达。综上本研究以 pGEX - 4T - 1 作为表达载体,与云红梨 1 号 PyHY5 基因的开放阅读框构建重组质粒,转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)感受态,获得了阳性的原核表达菌株。同时,用 IPTG 诱导原核表达载体 pGEX - 4T - 1 - PyHY5 后, PyHY5 蛋白获得了高效表达,这也为进一步阐明 HY5 调控花青素生物合成的分子机制奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 杜 威. 中国鲜梨国际竞争力研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2016:53.
- [2] 薛华柏,王芳芳,杨 健,等. 红皮梨研究进展[J]. 果树学报,2016,33(增刊1):24-33.
- [3] Kumar S, Kirk C, Deng C H, et al. Fine - mapping and validation of the genomic region underpinning pear red skin colour [J]. Horticulture Research, 2019, 6:29.
- [4] 陶 磅,舒 群,张文炳,等. 晚熟、耐贮红梨新品种“云红梨 1 号”[J]. 园艺学报,2003,30(4):497-498.
- [5] 魏闻东,田 鹏,金新富,等. 3 个红色梨新品种在河南的表现[J]. 中国果树,2009(1):26-28.
- [6] 孙共明. 3 个红色梨品种在河南商丘的表现及栽培技术[J]. 中国果树,2005(3):36-37.
- [7] 冯有才,魏闻东,李含坤. 满天红、美人酥、红酥脆三个红皮梨品种在郑州的栽培表现[J]. 果农之友,2007(9):11.
- [8] 王 荔,马玉华,杨胜俊,等. 云南红梨的引种试验及栽培技术[J]. 贵州农业科学,2012,40(3):165-167.
- [9] 郭 江. 满天红梨引种表现及山地密植高产栽培技术[J]. 果农之友,2006(5):14,30.
- [10] 张红菊,宋振东. 梨品种满天红和美人酥在河西走廊的引种试验[J]. 中国果树,2010(4):31-34.
- [11] Chakraborty M, Gangappa S N, Maurya J P, et al. Functional interrelation of MYC2 and HY5 plays an important role in *Arabidopsis* seedling development [J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2019, 99(6):1080-1097.
- [12] 王立光,李静雯,叶春雷,等. 光调控因子 HY5 及 HYH 在蔗糖诱导花青素积累中作用[J]. 甘肃农业科技,2019(1):21-25.
- [13] 王志冉,王红艳,邓海峰,等. 转录因子 HY5 在植物光形态建成和氮代谢中的调控作用[J]. 中国蔬菜,2018(5):20-27.
- [14] 朱 靖,周 颖,王青元,等. GRIM - 19 原核表达载体的构建及 GST - GRIM - 19 的诱导表达与纯化[J]. 安徽医科大学学报,2011,46(5):493-496.

邓博涵,刘丹蕾,陈秋菊,等. 1 株三型丁香假单胞菌猕猴桃致病变种细菌全基因组扫描图测序及分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):67-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.011

1 株三型丁香假单胞菌猕猴桃致病变种细菌 全基因组扫描图测序及分析

邓博涵¹, 刘丹蕾¹, 陈秋菊¹, 倪培恩¹, 张子蕾¹, 王大鹏¹, 糾松涛¹, 王 磊¹, 马 超¹,
张才喜¹, 王世平¹, 沈叶鑫², 鲍金平³, 许文平¹

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海浦蔬农业科技有限公司, 上海 200240;

3. 浙江省遂昌县农业农村局, 浙江遂昌 323300)

摘要:丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 简称 Ps)是引起猕猴桃细菌性溃疡病的病原菌。对从感染溃疡病的东红猕猴桃枝条中分离得到的 1 株 Ps 野生株(命名为 GX05)进行全基因组测序,获得基因组草图,分析其中毒力基因、耐药基因和致病基因的情况。研究发现,多位点序列分型结果显示 GX05 为 biovar 3,与毒力因子数据库比对,GX05 携带 99 种毒力因子及 692 个相关毒力基因,同源性和匹配度最高的毒力因子是 *PvdL* 和 *Irp1*;与综合抗生素抗性基因数据库比对,GX05 携带 336 种耐药基因,与 29 种抗生素有关;与病原宿主互作数据库比对,不表达导致病原菌致病力减弱的基因数量最多,其中同源性和匹配度最高的是 *PvdL*,此外与增强致病力相关的同源性和匹配度最高的基因是 *hrcC*。通过全基因组测序信息初步分析了 1 株三型 Ps 菌株中存在的毒力、耐药及致病基因情况,对深入研究其致病机制和合理用药有重要意义。

关键词:丁香假单胞菌猕猴桃致病变种;猕猴桃细菌性溃疡病;全基因组测序;毒力基因;耐药基因;致病基因

中图分类号:S436.634.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0067-08

猕猴桃细菌性溃疡病严重威胁着猕猴桃产业的发展,给世界猕猴桃产业造成了巨大损失^[1],丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 简称 Ps)是猕猴桃细菌性溃疡病的致病菌^[2]。研究发现,原本健康的猕猴桃植株在春季初次出现溃疡病症状(如叶斑)后,年底便会死

亡。溃疡病的传播速度快、危害大,1 年便可毁坏整个猕猴桃园^[3-4]。目前还没有直接杀灭病原菌的有效措施^[5],主要的防治方法包括以铜制剂为主的化学防治^[6-7]、以链霉素为主的生物防治^[8-9]、果园管理^[10]和抗性品种选育^[11]等。化学和生物防治可造成植物毒性、药物残留、产生耐药细菌等缺点,并且基因水平转移可使耐药基因在细菌间流动^[12],目前已有报道表明部分 Ps 对链霉素^[13]和铜制剂^[14]产生了抗性。

寻找猕猴桃细菌性溃疡病的有效防治途径是全球猕猴桃产业面临的重要任务。已发现的 Ps 有 5 种生物型,分别为 biovar 1、biovar 2、biovar 3、biovar 5、biovar 6。我国目前只发现 biovar 3 群体^[15],但其

收稿日期:2020-01-02

基金项目:猕猴桃根域限制栽培技术研究及示范(编号:MH235);猕猴桃溃疡病综合防治技术与示范(编号:2018-J15)。

作者简介:邓博涵(1995—),女,湖北荆州人,硕士研究生,研究方向为果树病害的研究。E-mail:bohanded@163.com。

通信作者:许文平,博士,副研究员,从事果实品质生物学、果实采后生物学等研究。E-mail:wp-xu@sjtu.edu.cn。

[15] Chen Z, Huang Y W, Yang W J, et al. The hydrogen sulfide signal enhances seed germination tolerance to high temperatures by retaining nuclear COP1 for HY5 degradation[J]. Plant Science, 2019, 285:34-43.

[16] 周 波,王 宇,孙 梅,等. 津田芜菁 bZIP 蛋白 HY5 cDNA 的克隆及表达特性[J]. 分子植物育种,2008,6(1):59-64.

[17] 张 荔,周 波,李玉花. 植物 HY5 蛋白结构与功能的研究进展[J]. 植物生理学通讯,2010,46(10):985-990.

[18] 郭继平. 油菜 HY5 基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 北

方园艺,2013(23):116-118.

[19] Ang L H, Chattopadhyay S, Wei N, et al. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development[J]. Mol Cell Biol, 1998, 1(2):213-222.

[20] 刘晓庆,徐照龙,许 玲,等. 大豆 *GmNAC8* 基因克隆与原核表达[J]. 江苏农业学报,2013,29(4):734-737.

[21] 唐 琦. 可用作生物杀虫剂的家蚕核型多角体病毒 orf65、orf91 的基因功能分析[D]. 镇江:江苏大学,2013:138.