

灰皮支黑豆胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其在胞囊线虫胁迫下的表达分析

刘大伟^{1,2}, 陈立杰², 段玉玺^{2*}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 研究大豆胞囊线虫侵染后胰蛋白酶抑制剂基因的表达情况, 以明确其在大豆抗胞囊线虫机制中的作用。以高抗大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe) 3 号生理小种的大豆品种灰皮支黑豆(ZDD2315)根系的总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术获得了 573 bp 的胰蛋白酶抑制剂基因的 CDS 序列。同时利用 Real-Time Quantitative PCR 技术分析了大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫下胰蛋白酶抑制剂基因在抗(灰皮支黑豆)、感(辽豆 15)品种根内的相对表达量。结果表明: 大豆胞囊线虫侵染后, 胰蛋白酶抑制剂基因在灰皮支黑豆根内的相对表达量始终高于辽豆 15, 并且在大豆胞囊线虫侵染 20 d 时, 灰皮支黑豆根内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量达到最高值, 为辽豆 15 表达量的 5.8 倍。

关键词: 灰皮支黑豆; 胰蛋白酶抑制剂; 大豆胞囊线虫; 实时 PCR

中图分类号: S435.651 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)06-0094-04

Cloning of Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Gene from Huipizhiheidou and Expression Analysis in Soybean Infected by *Heterodera glycines*

LIU Da-wei^{1,2}, CHEN Li-jie², DUAN Yu-xi^{2*}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The objective of this study was to research the expression of Kunitz trypsin inhibitor gene in soybean infected by soybean cyst nematode and to clear its function in the resistant mechanism. The soybean Kunitz trypsin inhibitor gene was obtained from roots of Huipizhiheidou (ZDD2315) with high resistance to *Heterodera glycines* race 3 by RT-PCR, and sequence analysis indicated that the cloned DNA fragment consisted of 573 bp. The expression of Kunitz trypsin inhibitor gene was detected in the resistant Huipizhiheidou and the susceptible Liaodou 15 infected by *Heterodera glycines* race 3 by Real-Time Quantitative PCR. The results showed that the relative expression level of Kunitz trypsin inhibitor gene was higher in Huipizhiheidou than in Liaodou 15 at all times, and it reached the highest in Huipizhiheidou at 20 d after inoculated with *Heterodera glycines* race 3, 5.8 times as high as Liaodou 15.

Key words: Huipizhiheidou; trypsin inhibitor; *Heterodera glycines*; real time PCR

收稿日期: 2013-10-08

基金项目: 国家现代农业产业技术体系大豆岗位科学家专项资助项目(CARS-04-PS13); 农业部公益性行业科研专项(200903040); 东北农业大学博士启动基金项目(2012RCB99)

作者简介: 刘大伟(1983-), 男, 辽宁沈阳人, 讲师, 博士, 主要从事大豆抗胞囊线虫研究。E-mail: liudawei353@163.com

* 通讯作者: 段玉玺(1964-), 男, 辽宁海城人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病原线虫学研究。

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)是世界大豆生产上的一种毁灭性病原物,主要分布于中国、美国、巴西、加拿大、俄罗斯、日本等国家,对大豆生产危害极大。尽管采用化学防治和生物防治等措施防治大豆胞囊线虫病取得了一定进展,但选育抗病品种(系)仍然是防治大豆胞囊线虫病最经济有效的方法,而挖掘大豆胞囊线虫抗性基因是进行分子辅助育种的基础^[1]。

植物蛋白酶抑制剂是广泛存在于植物界的一类天然抗虫物质,具有广谱抗虫的特点。大豆籽粒中含有多种类型蛋白酶抑制剂,其中 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂(KTI)是优势类型,在种子形成过程中进行优势表达,根、茎、叶中也有少量存在^[2]。大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂类型,可抑制不同来源的胰蛋白酶活性,阻碍病原物对蛋白质的消化吸收。因此,大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂在植物抗虫、抗病基因工程中具有广泛的应用价值。赵洪银等^[3]利用 RT-PCR 方法从高抗蚜虫的多年生野生大豆短绒野大豆未成熟子叶中扩增到了大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂同源基因单一目的片段。

本研究利用 RT-PCR 技术获得了高抗大豆胞囊线虫品种灰皮支黑豆的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的序列,并利用 Real-Time Quantitative PCR 技术研究了大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫下 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因在抗、感大豆品种根系内的相对表达量,为明确胰蛋白酶抑制剂基因在大豆抗胞囊线虫机制中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 抗大豆胞囊线虫品种灰皮支黑豆(ZDD2315)和感大豆胞囊线虫品种辽豆 15 均为沈阳农业大学北方线虫研究所保存资源。

1.1.2 线虫 大豆胞囊线虫 3 号生理小种采自沈阳农业大学试验地。

1.2 试验方法

1.2.1 根系总 RNA 的提取 取冲洗干净的灰皮支黑豆幼嫩根系,使用 AXYGEN 公司的 Total RNA Miniprep Kit 提取根系的总 RNA。

1.2.2 RNA 的质量检测 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,再利用 Nanodrop 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。

1.2.3 胰蛋白酶抑制剂基因的 PCR 扩增 参照

TIANGEN 公司的 cDNA 合成系统,以 Oligo(dT)₁₅ 为引物,利用高效的 Quant Reverse Transcriptase 将提取的根系总 RNA 合成 cDNA 第一链。PCR 反应体系:cDNA 模板 2 μ L,10 μ mol/L KTI-RTS 1 μ L,10 μ mol/L KTI-RTA 1 μ L,2 \times Taq PCR Master-Mix 12.5 μ L,灭菌 ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。其中 PCR 的引物根据已发表的大豆胰蛋白酶抑制剂基因的特异性序列(GenBank 登录号:gi5381209)设计,并由 TaKaRa 公司合成。KTI-RTS: 5'-GTGGCTCTCTTTCTACTTTGTGC-3', KTI-RTA: 5'-CTGAAACTGAACCAACAATGGA-3'。

1.2.4 RT-PCR 产物的克隆及测序 利用 AXY-GEN 公司的 DNA Gel Extraction Kit 回收纯化 PCR 产物,利用克隆载体 pGEM-T easy 将其克隆并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取菌落进行 PCR 及酶切检测。经鉴定的重组质粒送大连 TaKaRa 公司进行序列测定。

1.2.5 大豆胞囊线虫胁迫下胰蛋白酶抑制剂基因表达量的 RT-PCR 分析 将供试大豆种子用湿润的医用纱布包裹,置于培养皿中在 25 $^{\circ}$ C 下催芽,期间及时换水。催芽后移至黑色塑料钵中(16 cm \times 16 cm),无菌土栽培。在大豆苗期接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种的卵悬液,每株大约 2 000 粒卵。分别于接种后 0、5、10、15、20、25、30 d 随机取抗病品种灰皮支黑豆和感病品种辽豆 15 的根系,用清水冲洗干净后,利用 AXYGEN 公司的 Total RNA Miniprep Kit 提取大豆根系的总 RNA,然后再合成 cDNA 第一链。

利用 TIANGEN 公司的 RealMasterMix (SYBR Green)进行胰蛋白酶抑制剂基因的荧光定量 PCR 检测,PCR 反应体系:cDNA 模板 5 μ L,2 \times RealMasterMix/20 \times SYBR solution 22.5 μ L,正向引物 KTI1 2 μ L,反向引物 KTI2 2 μ L,ddH₂O 18.5 μ L,以 *actin* 作内参基因。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。引物均由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)合成,序列为 KTI1: 5'-CTCCACAACAGACCACTCGG-3', KTI2: 5'-CCCCAACGGGAAATGAAAGA-3'; *actin4-s*: 5'-GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT-3', *actin4-a*: 5'-GTTTCAAGCTCTTGCTCGTAATCA-3'。

2 结果与分析

2.1 灰皮支黑豆根系总 RNA 的提取结果

使用 AXYGEN 公司的 Total RNA Miniprep Kit 提取灰皮支黑豆根系的总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 18S、28S rRNA 完整(图 1), 这表明 RNA 的完整性良好, 未发生降解。经紫外分光光度计法检测, RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.98, 表明所提取 RNA 的纯度和质量符合试验要求。

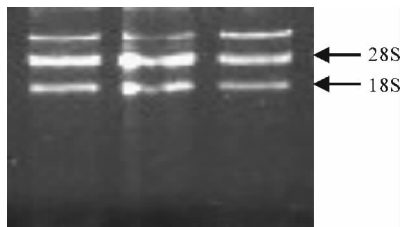
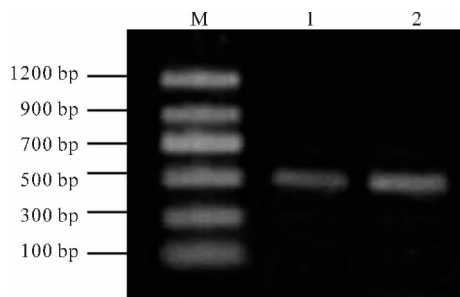


图 1 灰皮支黑豆根系总 RNA 的电泳检测

2.2 灰皮支黑豆胰蛋白酶抑制剂基因的克隆

以灰皮支黑豆根系的总 RNA 为模板, 以 Oligo(dT)₁₅ 引导反转录合成 cDNA, 在优化反应条件的基础上, 利用特异性引物 KTI-RTS 和 KTI-RTA 扩增胰蛋白酶抑制剂基因, 电泳结果显示, RT-PCR 获得了 500 bp 左右大小的特异性谱带(图 2)。扩增产物回收后与 pGEM-T easy 载体连接, 进行克隆并测序, 得到 573 bp 的胰蛋白酶抑制剂基因的 CDS 序列。



M, DNA Marker ||; 1、2. RT-PCR 扩增产物

图 2 灰皮支黑豆胰蛋白酶抑制剂基因的 RT-PCR 产物电泳检测

2.3 大豆胞囊线虫胁迫下胰蛋白酶抑制剂基因的表达分析

2.3.1 样品总 RNA 的质量检测 高质量的 RNA 对于反转录合成 cDNA 和荧光定量 PCR 都非常重要, 本研究利用 AXYGEN 公司的试剂盒提取大豆根系的总 RNA, 紫外分光光度计法检测各样品 RNA 的质量浓度如表 1 所示, OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.9~2.1, 这表明 RNA 的纯度和质量较好, 符合荧光定量 PCR 试验的要求。

表 1 样品总 RNA 的浓度和纯度

样品	质量浓度/ (ng/ μ L)	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}
1	209.89	5.247	2.515	2.09	2.41
2	155.69	3.892	1.874	2.08	2.32
3	143.24	3.581	1.725	2.08	2.30
4	88.37	2.209	1.063	2.08	2.33
5	69.72	1.743	0.840	2.07	2.41
6	58.24	1.456	0.781	2.03	2.29
7	80.43	2.011	0.981	2.05	1.28
8	207.32	5.183	2.470	2.10	2.40
9	146.54	3.663	1.762	2.08	2.31
10	86.57	2.164	1.079	2.01	0.50
11	87.24	2.181	1.058	2.06	0.71
12	48.58	1.214	0.600	2.02	2.17
13	116.20	2.905	1.418	2.05	2.09
14	78.97	1.974	0.954	2.07	1.98

2.3.2 胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量分析

从图 3 可以看出, 抗病品种灰皮支黑豆和感病品种辽豆 15 在大豆胞囊线虫侵染前, 根系内胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量相当。大豆胞囊线虫侵染后 10 d, 辽豆 15 根系内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量降低了 50%, 灰皮支黑豆根系内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量也略有下降, 但其表达量仍高于辽豆 15。大豆胞囊线虫侵染后 20 d, 辽豆 15 根系内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量达到最低值, 而灰皮支黑豆根系内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量达到最高值, 是辽豆 15 的 5.8 倍。大豆胞囊线虫侵染后 25 d、30 d, 灰皮支黑豆根系内的胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量始终高于辽豆 15, 这表明胰蛋白酶抑制剂基因在灰皮支黑豆受大豆胞囊线虫 3 号生理小种侵染后期的抗性反应中起关键作用。

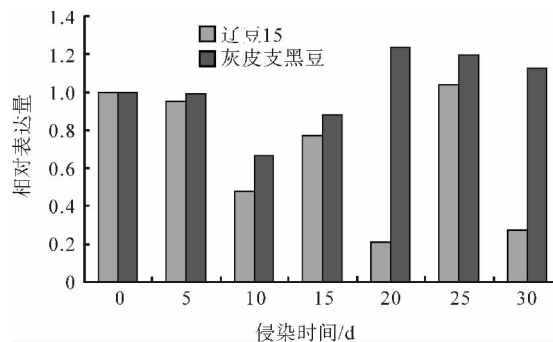


图 3 胰蛋白酶抑制剂基因的相对表达量分析

3 结论与讨论

相对于植物蛋白酶抑制剂抗虫方面的研究而言,关于植物蛋白酶抑制剂抗病作用的研究还比较少,但有研究表明,植物蛋白酶抑制剂与植物的抗病性有一定的关系。Peng 等^[4]研究发现,致病疫霉(*Phytophthora infestans*)感染番茄后,番茄叶片内胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂的含量迅速增高,而且抗病品种蛋白酶抑制剂的增加量明显高于感病品种。Roby 等^[5]观察到,西瓜感染菜豆炭疽菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)后,叶片内的蛋白酶抑制剂含量上升。烟草疫霉(*Phytophthora parasitica*)的培养物能诱导烟草细胞分泌胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶抑制剂^[6]。马铃薯蛋白酶抑制剂能够抑制从病斑中分离出的病原微生物的生长^[7]。有研究表明,病原微生物在侵染与扩展的过程中,要依赖胞外蛋白酶降解寄主组织,才能获得病原菌生长和繁殖所需的氨基酸,而植物则可能通过分泌蛋白酶抑制剂来阻止病原菌蛋白酶对寄主组织的降解,使病原菌营养不足,生长和繁殖受限,侵染与扩展受阻,从而达到抗病的目的^[8]。

关于植物蛋白酶抑制剂在植物抗线虫中的作用研究很少。杨少旭等^[9]比较了大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)在抗、感大豆品种接种大豆胞囊线虫与未接种对照中的表达量,结果表明,在大豆胞囊线虫侵入后,抗、感品种 STI 的表达量明显高于未接种对照,推测 STI 参与了抗病过程。在根染色时发现,抗、感品种根内都有二龄幼虫大量侵入,说明 STI 不能阻止大豆胞囊线虫的侵入,但在后期调查时发现抗病品种的根部不形成胞囊或仅形成少量胞囊,推测 STI 可能抑制大豆胞囊线虫的发育与繁殖。抗大豆胞囊线虫品种灰皮支黑豆是我国特有的优质抗源,其对大豆胞囊线虫的抗性主要与抑制线虫的生长发育有关^[10],本研究结果显示,胰蛋白酶抑制剂基因在灰皮支黑豆受胞囊线虫侵染后期大量表达,说明其与大豆胞囊线虫抗性相关,关于其在灰皮支黑豆抗胞囊线虫的发育与繁殖中的作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 常玮,韩英鹏,胡海波,等. 基于元分析与结构域注释的大豆胞囊线虫抗性基因挖掘[J]. 中国农业科学,2010,43(23):4787-4795.
- [2] 高越峰,朱祯,朱玉,等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其转基因烟草抗虫性初探[J]. 高技术通讯,1997(9):5-9.
- [3] 赵洪锬,李启云,王玉民,等. 多年生野生大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及分析[J]. 大豆科学,2010,29(2):191-194.
- [4] Peng J H, Black L L. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans* [J]. Phytopathology, 1976, 66(8):958-963.
- [5] Roby D, Toppan A, Esquerre-Tugaye M T. Cell surfaces in plant microorganism interaction VIII increases proteinase inhibitors activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction from this fungus [J]. Physiol Mol Plant Physiol, 1987, 30(3):453-460.
- [6] Rickauer M, Fournier J, Esquerre-Tugaye M T. Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* Var. *nicotianae* [J]. Plant Physiol, 1989, 90(10):1065-1070.
- [7] Senser F, Belitz H D, Kaiser K P, et al. Suggestion of a protective function of proteinase inhibitors in potatoes: Inhibition of proteolytic activity of microorganism isolated from spoiled potato tubers [J]. Z Lebensm Unters-Forsch, 1974, 155(1):100-101.
- [8] 卢晓风,夏玉先,裴炎. 植物蛋白酶抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4):328-333.
- [9] 杨少旭,段玉玺,陈立杰,等. 大豆胰蛋白酶抑制剂与大豆抗大豆胞囊线虫的关系[J]. 大豆科学,2008,27(3):487-490.
- [10] 颜清上,陈品三,王连铮. 中国小黑豆抗源对大豆胞囊线虫4号生理小种抗性机制的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4):317-323.