

# 黄瓜过敏性诱导反应蛋白基因(*CsHIR1*) 原核表达及其多克隆抗体制备

毛双双<sup>1</sup>, 李玉红<sup>1\*</sup>, 周旋<sup>1</sup>, 李万青<sup>1</sup>, 陈菲帆<sup>1</sup>, 程智慧<sup>1</sup>, 陈鹏<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

**摘要:** 该试验用黄瓜霜霉菌侵染黄瓜幼苗, 并通过 PCR 方法克隆其过敏性诱导反应蛋白(HIR)的基因 *CsHIR1*, 构建原核表达载体 pET28a-*CsHIR1*, 实现在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 中的高效表达; 对诱导表达的时间和 IPTG 的浓度进行了优化; 利用钴离子螯合层析纯化了重组蛋白并制备高效价多克隆抗血清。结果表明: 该黄瓜过敏性反应诱导蛋白以包涵体的形式表达, 最佳诱导时间和 IPTG 浓度分别为 4 h 和 0.5 mmol · L<sup>-1</sup>; 经纯化, 得到高纯度的分子量为 34 kD 重组蛋白 *CsHIR1*。Western blotting 显示 *CsHIR1* 的抗体具有较好的特异性。原核表达体系的建立和多克隆抗体的制备为进一步研究 *CsHIR1* 基因在黄瓜中的功能奠定了基础。

**关键词:** 黄瓜; 过敏性反应诱导蛋白基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q785; Q789

文献标志码: A

## Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Cucumber *CsHIR1* Gene

MAO Shuangshuang<sup>1</sup>, LI Yuhong<sup>1\*</sup>, ZHOU Xuan<sup>1</sup>, LI Wanqing<sup>1</sup>,  
CHEN Feifan<sup>1</sup>, CHENG Zhihui<sup>1</sup>, CHEN Peng<sup>2</sup>

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In this study, the cucumber seedlings were infected by *Pseudoperonospora cubensis*, and the gene of hypersensitive induced reaction proteins (*CsHIR1*) was cloned. The prokaryotic expression vector of pET28a-*CsHIR1* was constructed and efficiently expressed in *E. coli* BL21(DE3). The induced expression duration and the concentration of IPTG were optimized. The recombinant protein was purified by cobalt chelating chromatography to prepare the high titer polyclonal antiserum. The results showed that *CsHIR1* were expressed in the form of inclusion body, and the optimal induction duration and IPTG concentration were 4 h and 0.5 mmol · L<sup>-1</sup>, respectively. High purity recombinant protein *CsHIR1* with molecular weight 34 kD was obtained. Western blotting results showed that the antibody of *CsHIR1* has good specificity. The prokaryotic expression system establishment and polyclonal antibodies preparation lay the foundation for further investigating the function of the *CsHIR1* gene in cucumber.

**Key words:** cucumber; *CsHIR1* gene; prokaryotic expression; polyclonal antibodies

霜霉病是黄瓜最主要的病害, 发病后一般减产 10% ~ 20%, 严重时可达 30% ~ 50%, 甚至绝

收稿日期: 2013-12-26; 修改稿收到日期: 2014-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(31071791); 高校基本科研业务费专项资金(YQ2013003); 西北农林科技大学国际科技合作基金

作者简介: 毛双双(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事黄瓜的种质资源与生物技术研究。E-mail: ann001@nwsuaf.edu.cn

\* 通信作者: 李玉红, 博士, 副教授, 主要从事黄瓜的种质资源与生物技术研究。E-mail: liyuhong73@126.com

收<sup>[1-3]</sup>。应用农药虽能减缓霜霉病的发生及蔓延,但会导致环境污染、农药残留及病原菌抗药性的产生等一系列问题<sup>[4-5]</sup>,培育抗病品种是最为经济有效的手段,然而,抗病品种的高效培育依赖于对黄瓜抗病机制的解释,因此加强对黄瓜霜霉病抗性分子机理的研究,对于黄瓜无公害生产及抗病分子育种都具有十分重要的理论和现实意义。

过敏性诱导反应(Hypersensitive-induced reaction, HR)是寄主抵抗活体寄生病原菌侵染的最有效防御机制之一<sup>[6]</sup>,它通过在侵染点处产生局部细胞坏死,抑制病原菌的生长,进而激发一系列的防卫反应<sup>[7-8]</sup>。而过敏性诱导反应蛋白(Hypersensitive-induced reaction proteins, HIR)是一类与 HR 反应有关的蛋白<sup>[8-11]</sup>。虽然已有研究表明 HIR 蛋白可以激发植物发生 HR 反应,并诱导相关防卫基因表达<sup>[9-12]</sup>,但是关于 HIR 蛋白的研究多集中在模式植物拟南芥上<sup>[10-13]</sup>,对于栽培作物研究较少<sup>[8-9, 14-15]</sup>,且研究主要集中在烟草<sup>[9]</sup>、玉米<sup>[16]</sup>、大麦<sup>[14]</sup>、辣椒<sup>[12]</sup>、水稻<sup>[11]</sup>和小麦<sup>[15]</sup>上。与寻找 R 基因及抗性信号通路研究相比,人们关于 HIR 蛋白的认识还非常有限。虽然已克隆了一些 HIR 基因,并报道这些 HIR 蛋白与 HR 反应所诱导的细胞死亡有关,但是很少对 HIR 蛋白的功能进行研究,涉及 HIR 蛋白功能的研究报道仅限于辣椒的 *CaHIR1* 基因、水稻 *O<sub>s</sub>HIR1* 基因以及小麦 *TaHIR1* 和 *TaHIR3* 基因。由于 HR 反应先于系统获得抗性发生,因此对 HIR 蛋白进行研究能更清楚地揭示 HR 反应及阐明抗性本质,但在黄瓜上 HIR 蛋白的研究还未见相关报道。

本课题组通过与美国威斯康星大学合作,筛选出了高抗霜霉病黄瓜种质 NW088,并对 NW088 接种霜霉菌后的 HIR 蛋白基因(暂命名为 *CsHIR1*)进行了 qPCR 分析,结果表明,在抗/感种质上, *CsHIR1* 出现极显著差异表达,在抗病种质上, *CsHIR1* 表达量是感病种质 3~7 倍。为进一步探讨 *CsHIR1* 基因在黄瓜霜霉病抗性中的作用,本研究在对 *CsHIR1* 基因克隆的基础上,通过大肠杆菌(*E. coli*)BL21 菌株进行融合表达并纯化,对获得的蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗血清,Western blotting 免疫印迹检测了抗血清的特异性,为该基因功能验证及后续转基因的检测提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验采用黄瓜高抗霜霉病自交系 NW088,穴盘

育苗,待幼苗长到一叶一心时,接种黄瓜霜霉病菌,1 d 后取叶片样品迅速冻于液氮中, -70 ℃ 冰箱保存备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 *CsHIR1* 基因序列分析** 在黄瓜数据库中对获得的黄瓜 *CsHIR1* 的氨基酸序列进行同源性比较,查找同源序列。同时在 NCBI 数据库用 BLAST 在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对获得的黄瓜 *CsHIR1* 的氨基酸序列进行同源性比较。黄瓜 *CsHIR1* 蛋白质的等电点以及分子量由 Compute pFMw tool([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))进行预测。

**1.2.2 引物设计及 *CsHIR1* 基因克隆** 依据黄瓜数据库中 *CsHIR1* 基因的 CDS 序列设计 PCR 引物, *CsHIR1*-L(5'-CATGAccatgggcGGTAATCTT-TTTTGTGTGTGA-3',下划线为 *Nco* I 酶切位点)和 *CsHIR1*-R(5'-CCGACctctgagGTGAGAAG-TAGCGGCACC-3',下划线为 *Xho* I 酶切位点)送北京天一辉远生物科技有限公司合成。提取接种霜霉菌种质 NW088 的叶片总 RNA,利用反转录试剂盒(PrimeScript™ RT-PCR Kit, TaKaRa 公司)合成 cDNA。以 cDNA 为模板,以 *CsHIR1*-F 和 *CsHIR1*-R 为引物进行目的基因扩增,PCR 扩增采用 Iproof 高保真 DNA 聚合酶进行扩增和延伸。PCR 反应体系(25 μL)为:上、下游引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)各 1 μL、dNTP(10 mmol · L<sup>-1</sup>)0.5 μL、5×PCR 缓冲液 5 μL、Iproof DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL、模板 DNA 1.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25 μL。PCR 扩增程序为 95 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 变性 25 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 30 s,36 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析,用凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技公司)回收 PCR 产物。

**1.2.3 *CsHIR1* 基因原核表达载体构建** 回收 *CsHIR1* 基因片段经 *Xho* I 和 *Nco* I (TaKaRa 公司)双酶切后,定向插入经同样双酶切的 pET28a (TaKaRa 公司)表达载体中,获得重组表达载体 pET28a-*CsHIR1*,转化入大肠杆菌感受态细胞 Top10(北京天根生化科技公司),经挑取单克隆和菌落 PCR 检测后,送去测序。取测序正确的菌液,制备 pET28a-*CsHIR1* 质粒,将重组质粒转化入 BL21(DE3)(本实验室保存)后进行诱导表达。

**1.2.4 *CsHIR1* 重组蛋白的诱导表达与可溶性分析** 挑取单菌落接种到含卡那霉素 50 μg · mL<sup>-1</sup> 的液体 LB 培养基中,37 ℃,200 r/min 振荡培养过

夜。次日以 1:50 扩大培养,37 °C 振荡培养至 OD 值为 0.4 时加 IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷),诱导蛋白表达。将包含重组质粒 pET28a-CsHIR1 的阳性菌经超声波破碎处理后,离心收集沉淀和上清,上清和沉淀分别制样并进行 SDS-PAGE 电泳检测,胶浓度为 12.5%。

**1.2.5 目的蛋白表达条件的优化** (1)诱导时间的优化 取阳性单克隆接菌于含有 Kan 抗生素的 20 mL 液体 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD 值达 0.4 时,加入终浓度为 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 IPTG,37 °C 恒温培养。分别在 0、2、4、6、8、10 h 时取 500 μL 菌液离心收集菌体。将收集的菌体加入 100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴 10 min 后离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

(2)IPTG 诱导浓度的优化 阳性克隆的菌液等量接种于 5 个含有 Kan 抗生素的 5 mL 液体 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD 值达 0.4 左右,分别加入终浓度为 0、0.2、0.5、0.8、1.0 和 1.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG,37 °C 恒温培养 4 h 后分别取 500 μL 菌液,离心收集菌体加入 100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴 10 min 后离心取上清进行 SDS-PAGE。

**1.2.6 目的蛋白的纯化** 目的蛋白的纯化参照李学俊等<sup>[17]</sup>的方法。

(1)包涵体的纯化 收集菌体后加入 1/10 体积的超声裂解缓冲液,超声波功率 235 W 破碎 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。弃上清后加入适量体积的包涵体洗涤缓冲液(pH 8.0,50 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液,1% Trion X-100)重悬沉淀,再次超声。重复以上步骤 4 次。获得的沉淀中加入适量的包涵体溶解液(pH 8.0,0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液,50 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,6 mmol · L<sup>-1</sup> 尿素),室温下溶解 2~3 h。

(2)钴离子螯合层析纯化目的蛋白 将溶解好的包涵体 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,上清与等体积 2×PBS(0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液),含 0.6 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,6 mmol · L<sup>-1</sup> 尿素,pH 8.0)混合,上样于经 1×PBS 平衡的 10 mL Talon resin 柱上,以缓慢的流速通过柱床,用 4 倍柱体积的 1×PBS(含 6 mmol · L<sup>-1</sup> 尿素)洗去杂蛋白。用含 150 mmol · L<sup>-1</sup> 咪唑的 PBS(含 6 mmol · L<sup>-1</sup> 尿素)洗脱目标蛋白。将收集的目标蛋白液体转入透析袋再分别对含有不同浓度尿素(6、4、2 和 0 mmol · L<sup>-1</sup>)的透析液(pH 8.0,50 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,0.1 mmol ·

L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液,50 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl) 进行缓慢梯度透析,每个浓度透析 6~8 h。将透析过的溶液保存于-20 °C。经 SDS-PAGE 电泳检测纯化结果。

**1.2.7 重组蛋白多克隆抗体制备** 为尽可能除去目的蛋白中存在的微量杂蛋白,将金属离子螯合纯化的 CsHIR1 蛋白进行 SDS-PAGE(20 cm×20 cm)电泳,切取目标条带,用灭菌水洗涤后送至武汉三鹰生物技术公司进行兔抗 CsHIR1 多克隆抗体制备。

### 1.2.8 CsHIR1 蛋白的 Western blotting 分析

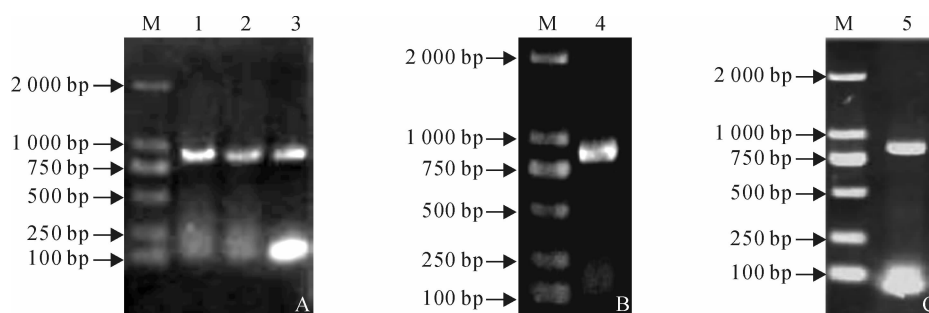
Western blotting 分析参照季英华等<sup>[18]</sup>方法进行。样品蛋白 SDS-PAGE 电泳后,经半干电转仪恒流 50 mA 75 min 转移到硝酸纤维素膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液 4 °C 封闭过夜,PBST 清洗后加入兔多克隆抗体(1:300),于摇床室温孵育 1.5 h,PBST 洗 3 次,每次 10 min;再加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:2 000),摇床室温孵育 1.5 h,PBST 洗 3 次,每次 10 min。取等体积的 ECL 试剂 A 液、B 液混合滴于膜正面,于暗室反应 5 min,用化学发光成像仪拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 CsHIR1 基因克隆及序列分析

以从黄瓜叶片中提取的 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,电泳显示 PCR 扩增出单一条带,其大小约为 860 bp,与预期相符(图 1,A)。经片段回收,Nco I 和 Xho I 酶切,然后克隆到 pET28a 的 Nco I 和 Xho I 酶切大片段上,转入转化 TOP10,挑单克隆后做菌落 PCR 检测(图 1,B),挑选阳性菌株将其菌液送去测序。

序列测定结果表明,克隆的黄瓜 CsHIR1 基因与 NCBI 数据库中的序列相符,全长为 861 bp([http://cmb.bnu.edu.cn/Cucumis\\_sativus\\_v20/](http://cmb.bnu.edu.cn/Cucumis_sativus_v20/), GenBank 序列号为 XP\_004138151),编码 286 个氨基酸残基组成的蛋白质,该蛋白质预测的等电点以及分子量分别为 5.39 和 31 329.76 D,属于酸性蛋白质。经在黄瓜数据库和 NCBI 数据库中比对,CsHIR1 在黄瓜中无同源序列,但是由于黄瓜基因组只测通了 243.5 Mb 的序列,覆盖了黄瓜基因组 72.8% 的区域,因此还不能得出黄瓜过敏性反应诱导蛋白家族中只有 1 个成员的结论,为此,将在本研究中克隆的过敏性诱导反应蛋白基因暂命名为 CsHIR1。

图 1 黄瓜 *CsHIR1* 基因特异扩增结果Fig. 1 The specific PCR products of *CsHIR1* geneM. DL2000; 1~3. *CsHIR1*; 4. pET28a-*CsHIR1*; 5. pET28a-*CsHIR1*

## 2.2 *CsHIR1* 基因原核表达载体构建及重组质粒的鉴定

以 *CsHIR1*-F 和 *CsHIR1*-R 为引物进行 PCR 检测发现,重组原核表达质粒可扩增大小约为 800~900 bp 的片段(图 1,C)。序列测定结果也表明获得的重组克隆载体包含目标基因,与黄瓜数据库中的 HIR 基因大小相同,重组原核表达质粒中 *CsHIR1* 基因序列未突变,且读码框正确,没有移码,表明 *CsHIR1* 基因原核表达载体 pET28a-*CsHIR1* 构建成功。

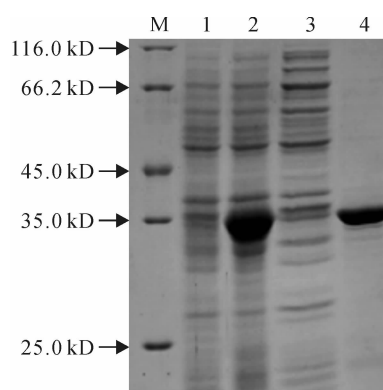
## 2.3 *CsHIR1* 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及表达形式分析

原核表达载体 pET28a-*CsHIR1* 导入大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑取单克隆于 LB 液体培养基中培养,至对数生长期(OD 0.4)时加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 9 h 后,收集菌体以未加 IPTG 诱导的菌为对照,进行 SDS-PAGE 检测。结果表明,与未诱导对照相比,含重组质粒的菌液在约 34 kD 处出现 1 条较高浓度的特异诱导表达条带(图 2),与预期的 *CsHIR1* 融合蛋白分子量相当,表明 *CsHIR1* 基因已经在大肠杆菌 BL21(DE3)中融合表达。

诱导菌经超声波处理后,离心收集上清液和沉淀,分别制样进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明,重组表达菌体裂解的上清液中没有检测出目的融合蛋白,而在沉淀中 34 kD 处有明亮的蛋白条带(图 2),这说明 *CsHIR1* 在大肠杆菌中主要以包涵体的不溶形式表达。

## 2.4 *CsHIR1* 表达条件的优化

本研究对 *CsHIR1* 的蛋白进行了诱导时间和诱导剂浓度的优化,SDS-PAGE 分析结果(图 3)表明, *CsHIR1* 的蛋白表达量随着诱导时间的延长而增加,诱导 4 h 表达量最大,随后表达量下降。阳性重

图 2 *CsHIR1* 表达的 SDS-PAGE 图谱

M. 蛋白 marker; 1. 未加 IPTG 诱导的 BL21(DE3) 菌总蛋白; 2. 加  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 9 h 重组菌的总蛋白; 3. 加  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 9 h 重组菌上清; 4. 加  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 9 h 重组菌沉淀

Fig. 2 The SDS-PAGE of fusion protein expression of the *CsHIR1* gene

M. Protein marker; 1. The total protein of BL21(DE3) without induction with IPTG; 2. The total protein of the recombinant sample was induced by  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG for 9 h;

3. The supernatant of the recombinant sample was induced by  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG for 9 h; 4. The sediment of the recombinant sample was induced by  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG for 9 h 组菌在  $37^\circ\text{C}$  培养条件下,加入 IPTG 分别至终浓度为  $0.2$ 、 $0.5$ 、 $0.8$ 、 $1.0$  和  $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,诱导培养 4 h 后,经 SDS-PAGE 电泳,结果表明 *CsHIR1* 蛋白的表达量在 IPTG  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时表达量最大,随后下降。

## 2.5 重组 *CsHIR1* 融合蛋白的纯化

经  $\text{Co}^{2+}$  亲和层析柱分离纯化后,得到单一峰,将收集液置于透析袋中,进行梯度透析去尿素和 PEG-6000 浓缩后,SDS-PAGE 检测纯化效果,结果出现单一的目的条带(图 4),表明已纯化得到融合 His 标签的 *CsHIR1* 蛋白,纯化效果良好,达到做多

克隆抗体的要求。

## 2.6 抗体的特异性检测

为了检测多克隆抗体的特异性,以免抗 CsHIR1 蛋白多克隆抗血清为一抗,以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔为二抗,对表达产物进行 Western blotting 分析,结果表明, Anti-CsHIR1 能与 pET28a-CsHIR1 诱导菌总蛋白发生特异性反应(图 5,泳道 1),与已经感染霜霉病的黄瓜叶片蛋白也发生了特异性反应(图 5,泳道 2),与未诱导宿主菌总蛋白无反应(图 5,泳道 3)。说明制备的多克隆抗体具有较好的特异性,可用于后续的试验研究。

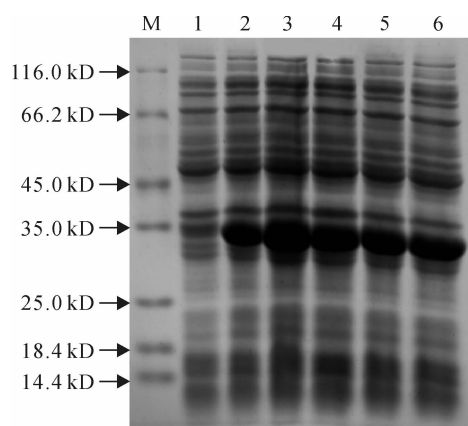


图 3 不同 IPTG 浓度对重组 CsHIR1 表达的影响

M. 蛋白 marker; 1~6. 0、0.2、0.5、0.8、1.0 和 1.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导的菌体

Fig. 3 Effect of IPTG concentration on the expression of recombinant CsHIR1

M. Protein marker; 1~6. Cells containing pET28a-CsHIR1 induction with 0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 and 1.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG

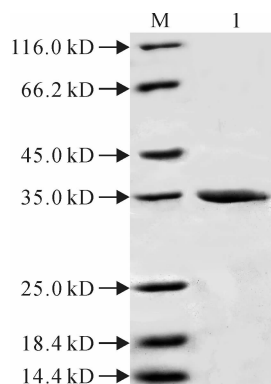


图 4 SDS-PAGE 分离钴柱纯化的 CsHIR1 蛋白

M. Protein marker; 1. 过柱纯化后的 CsHIR1 蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant CsHIR1 purified by cobalt resin

M. Protein marker; 1. The CsHIR1 protein purified by cobalt resin

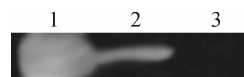


图 5 黄瓜 CsHIR1 蛋白多克隆抗体的

Western blotting 检测

1. 含 pET28a-CsHIR1 的 BL21(DE3) 菌总蛋白;
2. 霜霉菌感染的黄瓜叶片总蛋白; 3. BL21(DE3) 菌总蛋白

Fig. 5 Western blotting analysis of polyclonal antiserum of the CsHIR1 protein

1. The total proteins of BL21(DE3) bacterial cells containing pET28a-CsHIR1; 2. Cucumber leaf inoculated with *P. cubensis*;
3. The total proteins of BL21(DE3) bacterial cells

## 3 讨论

过敏性诱导反应(HIR)基因是一类与 HR 有关的植物防御基因<sup>[14]</sup>。NG1 是第一个从植物中克隆的 HIR 基因,它能激发烟草产生类似 HR 反应的坏死斑,并诱导 PR-2 病程相关蛋白的表达<sup>[9]</sup>。基于植物 HIR 蛋白氨基酸序列的同源性,3 个玉米 HIR 基因 *Zm-HIR1*、*Zm-HIR2* 和 *Zm-HIR3*,和 4 个大麦 HIR 基因 *Hv-HIR1*、*Hv-HIR2*、*Hv-HIR3* 和 *Hv-HIR4* 相继得到了鉴定。在这些基因中,玉米 *ZmHIR3* 基因转录本在病害坏死斑突变体中的表达量显著提高,大麦 *HvHIR3* 转录本在快中子突变体(呈现自发 HR 反应的突变体)中也呈强烈上调表达<sup>[14,16]</sup>。此结果表明,HIR 基因在细胞程序性死亡和防卫反应中具有重要作用<sup>[15]</sup>。在拟南芥上,过量表达质膜定位的辣椒 *CaHIR1* 和水稻 *Os-HIR1* 基因均诱导了 HR 反应和相关防卫基因的表达,而且提高了拟南芥对细菌性病害(*Pseudomonas syringae* 和 *Xanthomonas campestris*)和卵菌(*Hyaloperonospora parasitica*)病害的抗性<sup>[10-12]</sup>。在小麦上,沉默 *TaHIR1* 和 *TaHIR3* 基因均显著降低了小麦对条锈病的抗性<sup>[15]</sup>。Qi 等<sup>[13]</sup>报道拟南芥 HIR 蛋白通过与抗性蛋白 RPS2 结合,形成一个复合体,而在 RPS2 介导的数量性状抗性中发挥重要作用。

在葫芦科上 *CsHIR1* 基因的研究尚未见报道,本研究在进行 PCR 扩增时采用了高保真 Iproof DNA 聚合酶,其错配率比普通 *Taq* 酶低 52 倍,大大降低了碱基错配率,确保了氨基酸序列的正确性。诱导 CsHIR1 蛋白表达时,对表达条件进行优化,尝试了不同 IPTG 浓度、不同诱导时间、不同诱导温度等条件下蛋白的表达情况,结果表明,融合蛋白在 37 °C、IPTG 浓度 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 时即可获得高效

表达。虽然有研究显示,低温诱导包涵体表达可得到可溶性产物,但本试验中融合蛋白一直以包涵体形式表达。由于表达的蛋白带有 His 标签,应用钴柱和组氨酸亲和性得到了很好的纯化效果,将表达的蛋白纯化后制备多克隆抗体,并进行特异性检测,为后续的研究奠定了基础。

在成功获得对 *CsHIR1* 蛋白特异的多克隆抗体的基础上,在后续的研究中主要研究 *CsHIR1* 基因在黄瓜体内的分布情况、不同生物胁迫下的表达以及不同信号通路之间的联系以及免疫组化等。该项研究将有助于阐明过敏性反应蛋白在黄瓜抗病中的作用,加深对黄瓜抗霜霉病机制的理解。

## 参考文献:

- [1] SAVORY E A,GRANKE L,QUESADA-OCAMPO L M,*et al.* The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*[J]. *Molecular Plant Pathology*,2011,**12**(3):217—226.
- [2] LEBEDA A,COHEN Y. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)-biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control[J]. *Eur. J. Plant Pathol.*,2011,**129**(2):157—192.
- [3] ADHIKARIL B N,SAVORY E A,VAILLANCOURT B,*et al.* Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*[J]. *PLoS One*,2012,**7**(4):e34954.
- [4] LI B J(李宝聚). Cucumber downy mildew in North China in 2008[J]. *China Vegetable*(中国蔬菜),2008,10:55—56,72(in Chinese).
- [5] DANIELA P,ECKHARD K,ALAN J S. Effects of garlic (*Allium sativum*) juice containing allicin on *Phytophthora infestans* and downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis*[J]. *Eur. J. Plant Pathol.*,2008,122:197—206.
- [6] VLEESHOUWERS V G A A,VAN DOOIJEWERT W,GOVERS F,*et al.* The hypersensitive response is associated with host and non-host resistance to *Phytophthora infestans*[J]. *Planta*,2000,**210**(6):853—864.
- [7] HEATH M C. *Apoptosis*, programmed cell death and the hypersensitive response[J]. *Eur. J. Plant Path.*,1998,**104**(2):117—124.
- [8] YU X M,ZHAO W Q,YANG W X,*et al.* Characterization of a hypersensitive response-induced gene *TaHIR3* from wheat leaves infected with leaf rust[J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*,2013,**31**(2):314—322.
- [9] KARRER E E,BEACHY R N,HOLT C A. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response[J]. *Plant Mol. Biol.*,1998,**36**(5):681—690.
- [10] JUNG H W,LIM C W,LEE S C,*et al.* Distinct roles of the pepper hypersensitive induced reaction protein gene *CaHIR1* in disease and osmotic stress,as determined by comparative transcriptome and proteome analyses[J]. *Planta*,2008,**227**(2):409—425.
- [11] ZHOU L,CHEUNG M Y,LI M W,*et al.* Rice hypersensitive induced reaction protein 1(*OsHIR1*) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death[J]. *BMC Plant Biol.*,2010,10:290.
- [12] JUNG H W,HWANG B K. The leucine-rich repeat (LRR) protein,CaLRR1,interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein,CaHIR1,and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein[J]. *Mol. Plant Pathol.*,2007,**8**(4):503—514.
- [13] QI Y,TSUDA K,NGUYEN L V,*et al.* Physical association of *Arabidopsis* hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2[J]. *J. Biol. Chem.*,2011,286:31 297—31 307.
- [14] ROSTOKS N,SCHMIERER D,KUDMA D,*et al.* Barley putative hypersensitive induced reaction genes:genetic mapping,sequence analyses and differential expression in disease lesion mimic mutants[J]. *Theor. Appl. Genet.*,2003,107:1 094—1 101.
- [15] DUAN Y H,GUO J,SHI X X,*et al.* Wheat hypersensitive-induced reaction genes *TaHIR1* and *TaHIR3* are involved in response to stripe rust fungus infection and abiotic stresses[J]. *Plant Cell Rep.*,2013,32:273—283.
- [16] NADIMPALLI R,YALPANI N,JOHAL G S,*et al.* Prohibitins, stomatins, and plant-disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation,ion channel regulation,and death[J]. *J. Biol. Chem.*,2000,275:29 579—29 586.
- [17] LI X J(李学俊),GUO Y F(郭彦飞),YAN Q(闫 倩),*et al.* Recombinant expression of tartary buck wheat allergen like protein in *E. coli* and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),2011,**31**(8):1 524—1 530(in Chinese).
- [18] JI Y H(季英华),ZHOU X W(周晓伟),CAI ZH D(蔡振东),*et al.* Prokaryotic expression of V2 gene of tomato yellow leaf curl virus and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报),2013,**43**(2):143—148(in Chinese).