



辣椒疫霉质外体疏水小蛋白 SCR82 编码基因的转录特征、异源表达和功能

张子辉^{1#}, 黄沈鑫^{1#}, 陶航¹, 张焯¹, 赵耀², 纪兆林¹, 陈孝仁^{1*}

¹扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

²南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】分析 PcF/SCR 质外体疏水小蛋白 SCR82 编码基因在辣椒疫霉生长发育和侵染寄主阶段的转录特征, 克隆其 cDNA 和基因组全长序列, 分析蛋白性状及其序列保守性, 利用大肠杆菌表达并获得纯化蛋白, 分析其生物学功能。【方法】提取辣椒疫霉菌丝、游动孢子囊、游动孢子、萌发休止孢和 7 个侵染时间点(1.5、3、6、12、24、36、72 h)的本氏烟根部总 RNA, 利用半定量 RT-PCR 分析 *scr82* 的转录表达水平; 通过高保真 PCR 从萌发休止孢 cDNA 和基因组 DNA 中克隆出该基因全长序列; 利用软件对 SCR82 进行生物信息学分析, 挖掘其他物种中的同源序列, 预测蛋白性状; 将 cDNA 全长序列克隆到含 6×His-SUMO 序列的 pET28a(+)中, 在不同温度(22、37 °C)和 IPTG 浓度(0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L)组合条件下利用大肠杆菌 Rossette 2 菌株表达该蛋白, 利用 Ni²⁺亲和层析柱纯化蛋白; 将蛋白浸润本氏烟和拟南芥叶片, 分析它是否引起植物细胞死亡, 蛋白浸润 12、24 h 后利用 RT-qPCR 分析本氏烟中 3 个抗性相关基因(*NbMCI*、*NbSOD*、*NbPOX*)的表达量变化。【结果】*scr82* 基因在辣椒疫霉萌发休止孢和侵染寄主阶段上调表达; 该基因为辣椒疫霉中单拷贝基因, 不含内含子, 开放阅读框为 249 bp; 预测其编码 82 个氨基酸, 包含长度为 21 个氨基酸的信号肽序列和 7 个半胱氨酸但不含有任何已知功能域, 蛋白疏水性强, 二级结构主要为 α -螺旋和不规则卷曲, 在疫霉菌中保守; 含重组质粒的菌株在 22 °C 经 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导过夜(~16 h)产生大小约 24 kDa 的融合蛋白, 纯化获得 30 mg/mL 的可溶性蛋白; 融合蛋白不引起本氏烟和拟南芥叶片的细胞死亡, 但导致本氏烟抗性相关基因均上调表达。【结论】本研究获得了辣椒疫霉胞外疏水小蛋白 SCR82 的原核表达蛋白, 该蛋白不引起植物细胞死亡, 但触发植物的防卫反应。

关键词: 辣椒疫霉, PcF/SCR 效应蛋白, 疏水性, RT-PCR, 原核表达, 植物防卫反应

基金项目: 国家自然科学基金(31671971, 31871907); 2019 年江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19_0895); 2016 年度扬州大学优秀青年骨干教师培养对象项目; 扬州大学高端人才支持计划

#共同第一作者。

*通信作者。Tel: +86-514-87971383; E-mail: xrchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2018-12-23; 修回日期: 2019-02-16; 网络出版日期: 2019-02-25

疫霉属 (*Phytophthora*) 隶属于色菌界 (*Chromista*) 卵菌门 (*Oomycota*), 包含一百多种重要的植物病原菌, 引起的植物疫病常年危害农林业生产^[1]。其中, 辣椒疫霉 (*P. capsici*) 侵染危害茄科 (如辣椒、番茄、茄子等)、葫芦科 (如西瓜、黄瓜和南瓜等) 和豆科中数百种农作物, 引起世界性分布的土传毁灭性病害^[2-3]。近年来, 随着我国种植产业结构的优化调整, 以果蔬为主的设施农业得到快速发展, 由辣椒疫霉引起的植物疫病经常暴发成灾, 对设施农业的威胁日趋严重^[4-5]。由于疫霉菌在亲缘关系上与真菌相差甚远, 多数杀菌剂对防治植物疫病无效, 加之抗性品种利用尚不理想, 一直缺乏针对植物疫病有效的防治手段^[1-3]。从植物免疫抗性的角度入手深入解析辣椒疫霉与植物互作机理, 对设计植物疫病防控新策略具有重要的指导意义。

为建立成功的侵染和定殖, 疫霉菌分泌出两类效应蛋白以影响植物的免疫系统: 进入植物体外空间的效应蛋白 (apoplastic effectors) 以及进入植物细胞内的效应蛋白 (cytoplasmic effectors)^[6-8]。质外体效应蛋白主要包括病原物相关的分子模式 (pathogen/microbe-associated molecular patterns, PAMPs) (例如 elicitors、TGases、CBELs、NLPs 和 GH12 等)、植物防御相关酶的抑制子和 PcF/SCR 蛋白等, 它们在植物细胞之间以及植物细胞膜与细胞壁之间的质外体空间里发挥作用, 操控植物的免疫反应^[6,9-10]。PcF/SCR 效应蛋白是一类与恶疫霉 (*P. cactorum*) 的 PcF 蛋白具有序列同源性且富含半胱氨酸残基 (≥ 4 个) 的小分子量 (≤ 300 aa) 分泌蛋白, 能够引起植物细胞死亡 (plant cell death, PCD)^[6-7]。最先从恶疫霉的培养滤液中发现的 PcF 是一个由 52 个氨基酸残基组成的酸性蛋白质, 含有 6 个半胱氨酸、1 个 4-羟脯

氨酸和 3 个保守的二硫键, 能引起草莓和番茄坏死, 引起植物防御酶苯丙氨酸解氨酶表达的变化^[11-12]。核磁共振发现 PcF 蛋白在空间上具有一个由二硫键稳固住的螺旋-环-螺旋折叠, 结构类似橄榄树花粉过敏原 Ole-e6 蛋白, 推测其可能模拟植物信号蛋白的作用^[13]。随后, 在其他疫霉菌中也发现了 PcF 的同源蛋白^[14-15], 这类蛋白统一称为 PcF/SCR 效应蛋白, 一般依据其编码的氨基酸个数前面冠以“SCR”来命名^[6-7,14]。结构预测这些蛋白表面的一段保守氨基酸 SK(E/C)C 可能是这类效应蛋白引起植物组织死亡的结构决定子^[14-15]。我们最近发现, 除 PcF 外恶疫霉至少还含有 13 个 PcF/SCR 效应蛋白, 进一步分析发现辣椒疫霉、寄生疫霉 (*P. parasitica*)、腐霉菌 (*Pythium* spp.) 和拟南芥明霜霉 (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) 等卵菌中也存在该类效应蛋白^[16-19]。这些效应蛋白的编码基因在疫霉菌侵染植物的过程中上调表达^[17-20]。我们鉴定发现, 恶疫霉的 SCR96 等效应蛋白引起番茄和本氏烟的细胞死亡, 该基因的稳定沉默导致恶疫霉的致病力下降且对活性氧的敏感性增强^[18-19]。综上可知, PcF/SCR 效应蛋白引起 PCD, 在疫霉菌的致病过程中可能发挥重要的作用, 对它们的认知可为破解植物疫病菌的致病机理提供重要的知识。

我们的前期研究利用 PVX 瞬时表达系统分析了疫霉菌 PcF/SCR 效应蛋白诱导本氏烟和番茄细胞死亡的活性^[18-19], 但该系统仅局限于茄科植物^[21]。为进一步分析该类蛋白是否对非茄科寄主及其他非寄主植物具有广谱 PCD 诱导活性, 解析其生物学功能与蛋白三维结构的关系, 获得足量的纯化蛋白显得十分重要。截至目前, 仅恶疫霉 PcF 及其致病疫霉 (*P. infestans*) 同源蛋白等少数几个 PcF/SCR 效应蛋白在酵母和大肠杆菌中得到了

表达,但由于疏水性强存在可溶性蛋白量低等问题^[12-14],尚无后续研究报道。基于前期辣椒疫霉转录组数据^[16],我们鉴定了一个 PcF/SCR 效应蛋白 SCR82。本研究首先分析了 *scr82* 基因在辣椒疫霉生长发育和侵染寄主阶段的转录水平;克隆获得该基因的 cDNA 和基因组全长序列;对蛋白进行了理化性状、二级结构及同源性分析;将该基因整合到含 6×His-SUMO 序列的 pET28a(+)质粒中,利用大肠杆菌进行诱导表达,通过镍柱纯化得到了可溶的融合蛋白;该蛋白不引起本氏烟和拟南芥叶片的细胞死亡,但激发本氏烟的防卫反应。这些结果为进一步分析该蛋白的生物学功能以及深入解析疫霉菌与植物互作机制奠定了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rossette 2 菌株、辣椒疫霉菌株 Pc537 均由本实验室保存。利用 Chen 等(2013)^[16]中的方法获得辣椒疫霉的菌丝、游动孢子囊、游动孢子和萌发休止孢。

1.1.2 供试植物: 本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 栽培于含有无菌土的塑料杯中,置于 22–25 °C、16 h/8 h 光暗交替温室,生长 4–6 w 后使用。灌根接种本氏烟前 2 h 进行浇灌,以保证接种时土壤湿润。接种时,每株本氏烟的根部滴加 5 mL 辣椒疫霉游动孢子悬浮液(1×10^6 孢子/mL),以接种无菌水的本氏烟作为对照。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 生态型 Col-0 的种子低温春化后栽培于基质(蛭石:营养土湿重比=2:1)中,在 16–18 °C、16 h/8 h 光暗交替、湿度为 60%–70% 的生长室中培养,生长

5–6 w 后使用。

1.1.3 质粒: 表达载体 pET28a(+)购自 Novagen 公司,TA 载体 pMD19-T 购自 TAKARA 公司。载体 pRSFDuet-1 (含 6×His-SUMO)由美国加州大学河滨分校马文勃教授提供。

1.1.4 主要试剂: 限制性内切酶(*Nco* I、*Bam*HI、*Hind* III)、T4 DNA 连接酶、反转录酶 M-MLV (RNase H-)、引物 Oligo d(T)₁₈、Recombinant RNase Inhibitor、DNase I、RNAiso Plus 购自 TAKARA 公司。RNA 纯化试剂盒(RNAclean Kit)购自北京天根生物。Phusion 高保真 DNA 聚合酶、Ni-NTA 琼脂糖树脂购自 ThermoFisher 公司。质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州爱思进公司。Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒购自 Solarbio 公司。

1.1.5 主要仪器: 核酸和蛋白分析的电泳仪、电泳槽购自 Bio-Rad 公司。LS-P96G 型 PCR 仪、MaxQ4000 摇床购自 ThermoFisher 公司。

1.2 生物信息学分析和引物设计

将转录组测序获得的 PcF/SCR 效应蛋白基因的 EST 序列^[16]在辣椒疫霉菌基因组数据库[DOE Joint Genome Institute (JGI) LT1534 v11.0] (<http://genome.jgi-psf.org/Phycal1/Phycal1.home.html>) 进行序列比对(程序 tBlastx, 期望值 $E \leq 10^{-70}$), 下载匹配的基因序列。根据基因序列模型(ID 96045)和表达载体克隆需使用的酶切位点设计基因扩增引物对、RT-PCR 引物对(表 1)。在 FungiDB (<http://fungidb.org>)和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库检索蛋白的同源序列(BLASTp, $E \leq 10^{-5}$)。利用 BioEdit 软件对序列进行剪接、拼接、蛋白翻译和比对。

利用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)预测蛋白的信号肽序列。利用

表 1. PCR 所用引物
Table 1. PCR primers used in the study

Primer	Sequence (5'→3')*	Purpose
96045-snpF	ACCAAGCCAAACTCCAGCTA	Full length cloning
96045-snpR	TAGCCAATGCTTCAGTGGTG	Full length cloning
96045-BamH I-F	CACGGATCCATGGAAGACCCGCTTTACTGCCAG	Sense primer for cloning and prokaryotic expression
96045-Hind III-R	TCTAAGCTTGTACAGCGGCTTAGCGCACTTC	Antisense primer for cloning and prokaryotic expression
96045-F	ATGAACTCAAGACCTGCTTCG	Sense primer for RT-PCR analysis
96045-R	TTACAGCGGCTTAGCGCACTTC	Antisense primer for RT-PCR analysis
Ubc-F	GAAGCGGATCAACAAAGAGC	Sense primer for RT-PCR analysis
Ubc-R	AAGCAGTGAGCAGATCGACA	Antisense primer for RT-PCR analysis
NbEF1- α -qRTF	AAGGTCTACCAACCTTGAC	Sense primer for RT-qPCR analysis
NbEF1- α -qRTR	ACGTAGGGGTTTGTCTGAG	Antisense primer for RT-qPCR analysis
Nbmc1-qpF	GCGGTCATGGAACCACATAC	Sense primer for RT-qPCR analysis
Nbmc1-qpR	CTGACTAAAGCCTCCACCCA	Antisense primer for RT-qPCR analysis
Nbpox-qpF	CCCTCTTGATTTACAACACCA	Sense primer for RT-qPCR analysis
Nbpox-qpR	CCAGTCAGCAGCACTTCATC	Antisense primer for RT-qPCR analysis
Nbsod-qpF	GCTCCATGATGCCATTCCA	Sense primer for RT-qPCR analysis
Nbsod-qpR	TCGATAGCCCAACCAAGAGA	Antisense primer for RT-qPCR analysis
sumo-RSF-F	CAAGCTGATCAGACCCCTGAAG	Sense primer for sequencing
T7 terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Antisense promoter for sequencing

*Restriction sites in primer sequences are underlined. Primers were designed based on the gene models (*scr82* ID 96045 and *Ubc* ID 510705) from the *P. capsici* genome database (<https://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html>) and four *N. benthamiana* genes (*NbEF1- α* , *NbMC1*, *NbPOX* and *NbSOD*) from NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

TMHMM Server. v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析跨膜结构域。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白的物理化学性质。利用 PSIPRED 蛋白序列分析工作站 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/#>) 中 PSIPRED 3.3、FFPred 和 DISOPRED3 程序分析蛋白结构。

1.3 核酸提取

利用 RNAiso Plus 提取疫霉和植物样品的总 RNA, 随后用 DNase I 去除总 RNA 中残留的基因组 DNA, 再使用 RNA 纯化试剂盒纯化 RNA 样品。辣椒疫霉菌丝的基因组 DNA 按照 Zelaya-Molina 等(2011)^[22]的方法提取。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 和总 RNA 的完整性, 用紫外分光光度法进行浓度和纯度测定。

1.4 RT-(q)PCR 分析

依据陈孝仁等(2018)^[23]的方法, 利用反转录酶 M-MLV (RNase H-)和引物 Oligo d(T)₁₈ 将纯化过的 RNA 反转录成第 1 链 cDNA。半定量 RT-PCR 的反应体系和程序参照 Chen 等(2013)^[16]的方法进行, 辣椒疫霉泛素连接酶基因 (ubiquitin-conjugating enzyme, *Ubc*)^[16]作为 RT-PCR 分析的内参基因(表 1)。实时定量 PCR (qPCR)参考陈孝仁等(2018)^[23]的方法进行, 本氏烟翻译延长因子 (elongation factor 1-alpha, *NbEF1 α*)基因作为内参基因(表 1), 数据处理按照 Pfaffl (2001)^[24]的方法进行。所有的 RT-(q)PCR 重复 3 次。

1.5 基因全长高保真扩增

利用 Phusion DNA 聚合酶和基因特异引物对

辣椒疫霉 cDNA 样品进行扩增。PCR 扩增体系含有: 5×High Fidelity buffer (含 7.5 mmol/L Mg²⁺) 5 μL, DNA 100–300 ng, DMSO 0.75 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1.25 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, Phusion DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.25 μL, 无菌水补齐到 25 μL。PCR 反应程序为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 33 个循环; 72 °C 5 min。利用引物对 96045-snpF/R(表 1)对基因组 DNA 的扩增和片段 TA 克隆按照陈孝仁等(2018)^[23]的方法进行。

1.6 重组表达质粒的构建

为增强表达蛋白的可溶性便于后续检测, 利用 *Nco* I、*Bam*HI 将载体 pRSFDuet-1^[25]中的 6×His-SUMO 序列切下, 连入同样酶切过的 pET28a(+). 重组质粒转入 DH5α 进行扩繁, 利用引物对 sumo-RSF-F/T7 terminator primer (表 1)测序确认连接正确。

为便于原核表达, 扩增的基因片段不含信号肽编码序列。利用 *Bam*H I、*Hind* III 同时酶切基因片段、表达载体 pET28a(+)-6×His-SUMO, 经电泳后切胶回收。利用 T4 DNA 连接酶将回收片段与载体骨架连接, 使 His-SUMO 标签与目的蛋白 N 端融合。重组质粒转入 DH5α 进行扩繁, 质粒提取后经 sumo-RSF-F/T7 terminator primer (表 1)测序进行验证。构建成功的重组质粒 pET28a(+)-6×His-SUMO::scr82 经热激转入大肠杆菌 Rossette 2 菌株。

1.7 蛋白的原核表达及 SDS-PAGE 分析

将 Rossette 2 单克隆接种到含有卡那霉素 (50 μg/mL)、氯霉素(25 μg/mL)的 5 mL LB 培养液 (含 0.2% 葡萄糖)中, 37 °C、225 r/min 振荡培养 12 h。然后将起始菌液按 1:100 的比例加入到含有相同

抗生素的 400 mL 新鲜 LB 培养液(含 0.2% 葡萄糖)中, 在 37 °C、225 r/min 振荡条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.5–0.6 时, 加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导约 16 h。IPTG 的诱导终浓度分别设置为 0.1、0.2、0.5、1 mmol/L, 诱导温度分别设置为 22 °C、37 °C。

离心(4 °C、4000 r/min 离心 20 min)收集诱导表达后的大肠杆菌, 菌体重新悬浮于 20 mL 的裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 25 mmol/L imidazole, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0)中, 然后置于冰上, 利用超声破碎仪进行细胞破碎: 超声破碎 10 s, 停止 20 s, 功率 <200 W, 持续破碎 15 min。然后 4 °C、12000 r/min 离心 15 min 分离上清和沉淀。

500 μL 上清和对应沉淀中分别加入 500 μL 的 SDS 上样缓冲液(4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8), 悬浮混匀, 煮沸 5 min 后, 于 4 °C、12000 r/min 离心 10 min。取上清 15 μL 进行 SDS-PAGE 分析, 浓缩胶、分离胶浓度分别为 5%、15%, 电泳条件为 150 V、1 h。

1.8 目的蛋白的纯化

轻轻颠倒数次 Ni-NTA 琼脂糖树脂原装瓶, 利用剪去尖头的 1 mL 移液器枪头吸取 1.5 mL 混合液, 放入一个容积为 10 mL、底端孔径为 30–35 μm 纯化柱, 依靠重力让其自然分层, 去掉保护液。加入 5 mL 缓冲液 A (不含 DTT 和 PMSF 的裂解缓冲液), 轻轻颠倒, 重悬树脂, 洗涤树脂和柱子, 重复洗 3 次, 去掉溶液。将超声破碎后的上清液加入到纯化柱中, 盖好盖子后在 4 °C 轻轻晃动 20 min, 去掉上清, 重复加入剩余的细胞破碎溶液。通

过缓冲液 A 洗涤纯化柱和树脂 5 次后, 最后利用 2 mL 缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 250 mmol/L imidazole, pH 8.0) 将蛋白从树脂上洗脱下来, 利用透析法置换为 1×PBS 缓冲液 (1×phosphate-buffered saline)。利用 SDS-PAGE 检测洗脱的蛋白溶液, 利用 Bradford 法测定纯化蛋白浓度。

1.9 叶片浸润和染色

取完全展开的本氏烟和拟南芥叶片渗透接种纯化蛋白。用无菌针头在叶片下表皮造成一个微小伤口, 用无针头的注射器将 10–20 μ L 蛋白溶液注射到叶片中。原核表达的大豆疫霉(*P. sojae*)糖苷水解酶家族 12 (GH12) 蛋白 XEG1 蛋白^[9] (10 mg/mL) 作为本氏烟叶片注射的阳性对照。为避免蛋白浓度影响实验结果, 同时注射稀释 5 或 10 倍的蛋白溶液以进行比较。处理过的叶片置于 22 °C 培养箱中, 第 2 天起观察症状的出现。

为方便观察细胞死亡表型, 注射后的本氏烟叶片置于 Farmer's 溶液(乙酸、乙醇和氯仿按照 1:6:3 的体积比配制)中浸泡 30 s, 再置于 0.05% 的 Trypan blue 溶液中 25 °C 下浸泡 12 h。在用水漂洗干净叶片表面的染料后, 利用 95% 乙醇对叶片进行水浴脱色, 被染成蓝色的即为死亡的植物细胞。

2 结果和分析

2.1 *scr82* 在辣椒疫霉生长发育和侵染寄主阶段的转录模式

前期转录组数据表明该基因在辣椒疫霉生长发育阶段表达^[16]。为了解该基因在侵染过程中发挥的作用, 分别提取辣椒疫霉游动孢子灌根接种 1.5、3、6、12、24、36、72 h 后的本氏烟根部总 RNA, 同时提取辣椒疫霉 4 个生长发育阶段(菌丝、孢子囊、游动孢子和萌发休止孢)的总 RNA, 分析该基因在侵染和生长发育阶段的转录水平。结果(图 1)表明, 除菌丝阶段之外, 其余 3 个生长发育阶段(孢子囊、游动孢子和萌发休止孢)均检测到该基因的转录本。值得注意的是, 萌发休止孢阶段为疫霉菌侵染前期阶段, 该基因在此阶段的转录水平远高于游动孢子囊和游动孢子阶段; 在侵染寄主阶段, 该基因的转录水平普遍高于 3 个生长发育阶段, 在接种后 24 h 该基因的转录达到最高峰, 随后随着时间延长而下降。结果表明, 该基因在辣椒疫霉萌发休止孢和侵染寄主阶段上调表达, 可能参与了辣椒疫霉的侵染过程。

2.2 *SCR82* 编码基因的克隆

前期获得了 *scr82* 在生长发育阶段表达的 EST 序列^[16]。通过与辣椒疫霉菌基因组数据库比对

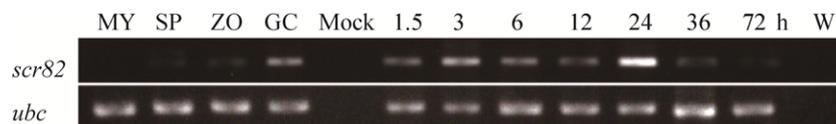


图 1. *scr82* 基因在辣椒疫霉侵染寄主和生长发育阶段的转录水平

Figure 1. The transcriptional pattern of *scr82* during the infection of *N. benthamiana* and developmental stages of *P. capsici*. MY, vegetative mycelia; SP, zoosporangia; ZO, zoospores; GC, germinating cysts; 1.5–72 h, *N. benthamiana* roots at 1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 72 hours post-inoculation. cDNA from sterile water-inoculated plants (Mock) and sterile water (W) were used as negative control templates in RT-PCR.

获得基因模型(JGI gene model 96045), 据此设计引物, 经 RT-PCR 从萌发休止孢的 cDNA 中获得了一条 250–500 bp 的条带(图 2)。经克隆测序, 该 379 bp 的 DNA 片段中包含一个大小为 249 bp 的完整开放阅读框(NCBI 登录号 KT215396), 位于 23–271 bp 区域; 序列的 1–22 bp、272–379 bp 区域分别为 5'-、3'-非翻译区。与从基因组 DNA 中获得的基因序列进行比较, 发现该基因不含内含子。利用 *scr82* 的基因组序列、开放阅读框序列与辣椒疫霉基因组数据库和转录组数据^[16]进行比对, 发现该基因为单拷贝基因, 未发现旁系同源基因。

2.3 SCR82 编码基因推测的氨基酸序列

预测基因 *scr82* 编码的蛋白长度为 82 个氨基酸, N 端头 21 个氨基酸为信号肽序列, 全长序列含有 7 个半胱氨酸残基(cysteine, Cys), 其中成熟肽段含有 6 个 Cys (图 3); SCR82 不存在跨膜结构域, 经 FFPred 预测在质外体空间发挥作用(GO:0005615, extracellular space); 预测蛋白相对

分子量大小约为 8.89 kDa, 理论等电点为 4.54, 脂溶指数(aliphatic index)为 77.32, 亲水性平均系数(grand average hydropathy, GRAVY)为 0.028, 不稳定系数(instability index)为 31.76, 推测 SCR82 是一个稳定的疏水蛋白。

经软件分析, 在二级结构上该蛋白由 α -螺旋(α -Helix)和不规则卷曲(random coil)结构组成(图 3)。将 SCR82 序列在 FungiDB 和 NCBI 数据库中进行序列比对, 挖掘它在真菌、卵菌、细菌等生物中的同源性序列, 结果发现只有 5 个疫霉菌含有该蛋白的同源蛋白, 其中它与恶疫霉 PcF 的序列相似性达 67%, 相同性达 59%; 与致病疫霉 PITG_22677 的序列相似性达 71%, 相同性达 59% (图 3)。推测认为是 PcF 中负责激发 PCD 的保守氨基酸 SK(E/C)C 在 SCR82 中变为 SRDC (图 3)。在蛋白数据库中进行比对, 没有发现该蛋白含有任何已知的功能域。DISOPRED 分析发现, 第 5 至第 12 位、第 55 位至第 63 位的氨基酸序列可能参与蛋白互作(图 3)。

2.4 *scr82* 基因的原核表达及蛋白纯化

前面的生物信息学分析表明, *scr82* 编码的蛋白具有强疏水性。因此, 为增强原核表达蛋白的可溶性, 载体 pRSFDuet-1^[25]中的 6×His-SUMO 片段被 *Nco*I、*Bam*HI 酶切下来, 与同样酶切过的 pET28a(+)连接, 构建出原核表达改进型载体 pET28a(+)-6×His-SUMO, 其表达的标签肽段 6×His-SUMO 大小约为 15 kDa。

不含信号肽的 *scr82* 基因序列克隆进改良载体。含有重组质粒 pET28a(+)-6×His-SUMO::*scr82* 的大肠杆菌 Rossette 2 菌株在不同温度条件(22 °C、37 °C)下受不同浓度(0.1、0.2、0.5、1 mmol/L)的 IPTG 诱导, 测试不同条件组合下的可溶性蛋

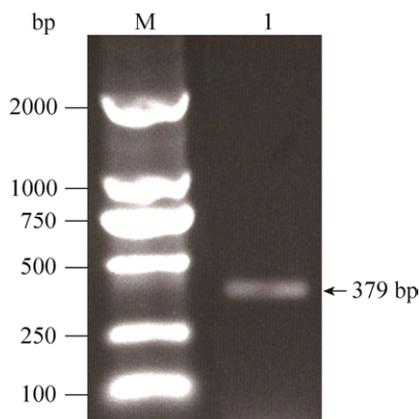


图 2. 基因 *scr82* 的 cDNA 扩增产物

Figure 2. RT-PCR product of the gene *scr82* from cDNA of *P. capsici* germinated cysts. M: DL2000 DNA marker; lane 1: germinated cyst cDNA.

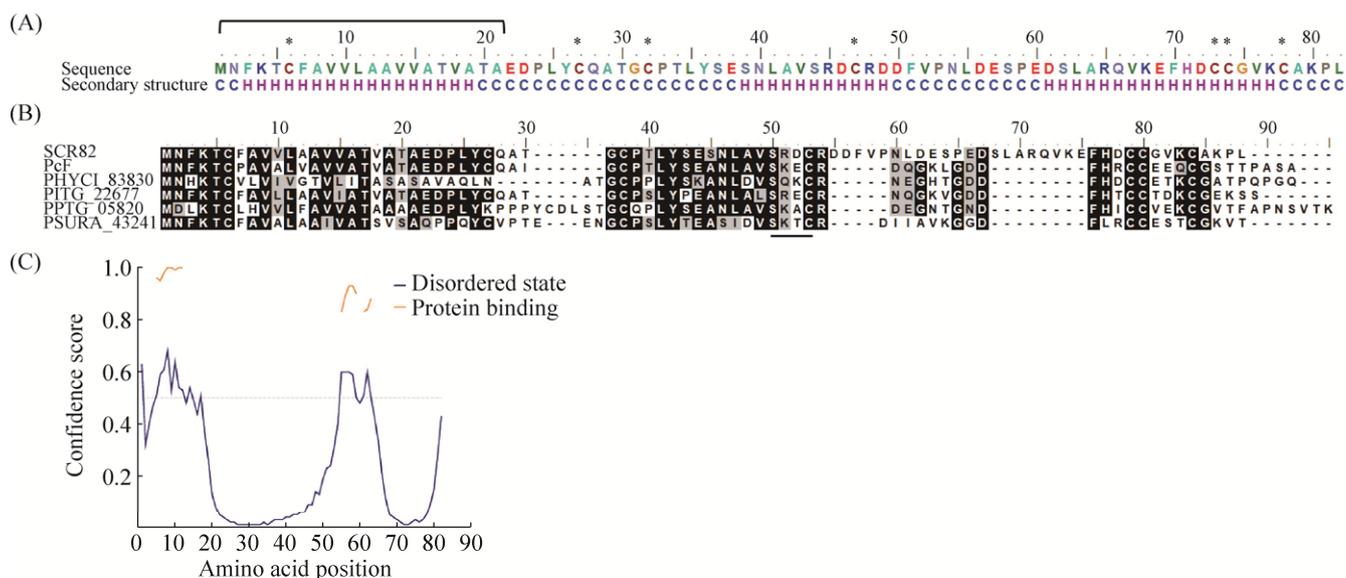


图 3. SCR82 蛋白的二级结构、同源序列和固有不规则结构预测

Figure 3. The secondary structure, homologue sequences and intrinsic disorder profile of SCR82. A: The amino acid sequence and predicted secondary structure of SCR82: *c* random coil, *h* α -helix. The signal peptide on N-terminus is highlighted by a black brace on the top of the sequence. The cysteine residues were marked by black asterisks on the top. B: Protein sequences were aligned and shaded (60% threshold for shading) for consensus using BioEdit. The homologues of SCR82 compared here include PcF from *P. cactorum*, PHYCI_83830 from *P. cinnamomi*, PITG_22677 from *P. infestans*, PPTG_05820 from *P. parasitica*, and PSURA_43241 from *P. ramorum*. The conserved cysteine sites are marked at the top by black asterisks for better visualization. The four amino acids SK(E/C)C thought to be involved in PCD-inducing activity of PcF was underlined. C: Intrinsic disorder profile of SCR82. The disordered regions were identified and annotated by DISOPRED. Amino acid residues were considered disordered when the blue line is above the confidence threshold 0.5 (the grey dashed line). The orange line indicates the disordered residues with protein binding activity.

白的表达情况。结果发现, 在 22 °C 条件下经 0.2 mmol/L IPTG 诱导过夜(~16 h), SDS-PAGE 检测到菌体裂解液中诱导表达的约 24 kDa 的蛋白条带, 分子量大小与预期符合(图 4), 表明其为本研究所需的融合蛋白(标签肽段 15 kDa+目的蛋白 8.89 kDa), 但蛋白表达量不高; 表达产物也存在于菌体沉淀中, 表明该蛋白形成了包涵体。同样条件下检测到空载体表达的 6×His-SUMO 标签肽段(图 4)。未能在其他温度和 IPTG 浓度条件下检测到预期的蛋白条带。

在此基础上, 本研究对该粗蛋白进行镍柱亲和层析纯化, 用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱液将蛋白

洗脱。SDS-PAGE 发现在 15 kDa 附近存在明显的 6×His-SUMO 标签肽段, 在 24 kDa 附近存在明显的诱导表达蛋白(图 4), 表明亲和层析纯化获得了目的蛋白。通过 Bradford 法测定标签肽段浓度为 14 mg/mL, SCR82 融合蛋白的浓度为 30 mg/mL。

2.5 SCR82 融合蛋白不触发本氏烟和拟南芥的 PCD

将融合蛋白注射入本氏烟和拟南芥叶片后观察, 发现其均不能引起两种植物叶片的细胞死亡(图 5)。浸润后第 4 天观察, 在本氏烟叶片上, 30 mg/mL 的蛋白原液及其稀释液均像空载体阴性对照一样不引起肉眼可见的细胞死亡症状; 而阳性对照 XEG1 则引起明显的植物细胞死亡表型,

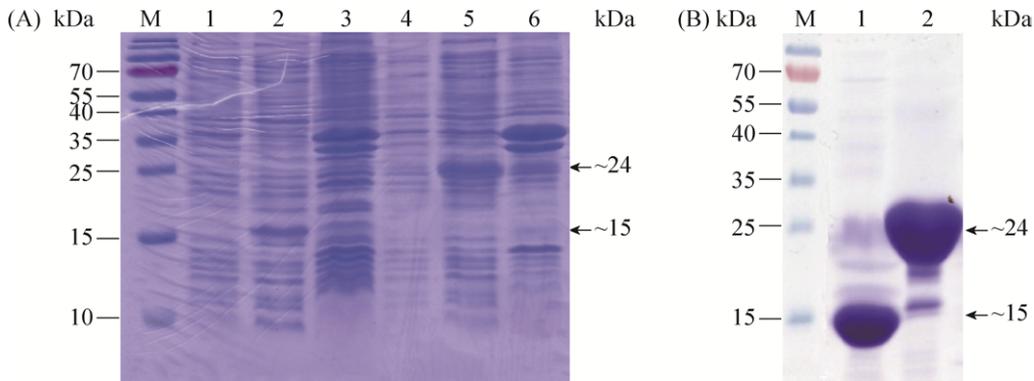


图 4. SCR82 融合蛋白的原核表达和纯化

Figure 4. Prokaryotic expression and purification of SCR82 fused with the 6×His-SUMO tag. The proteins were separated on SDS-PAGE gels and stained by Coomassie blue. A: The crude proteins from *E. coli* cells. M, Protein ladder; lane 1–3, empty expression vector; lane 4–6, SCR82. lane 1 and 4, the supernatants of un-induced cells; lane 2, 3, 5, 6, the induced cells; lane 2 and 5, the supernatants of induced cells. The arrows indicated the 6×His-SUMO tag and recombinant SCR82, respectively; lane 3 and 6, the pellets of induced cells. B: The purified proteins. M, Protein ladder; lane 1, the 6×His-SUMO tag; lane 2, recombinant SCR82.

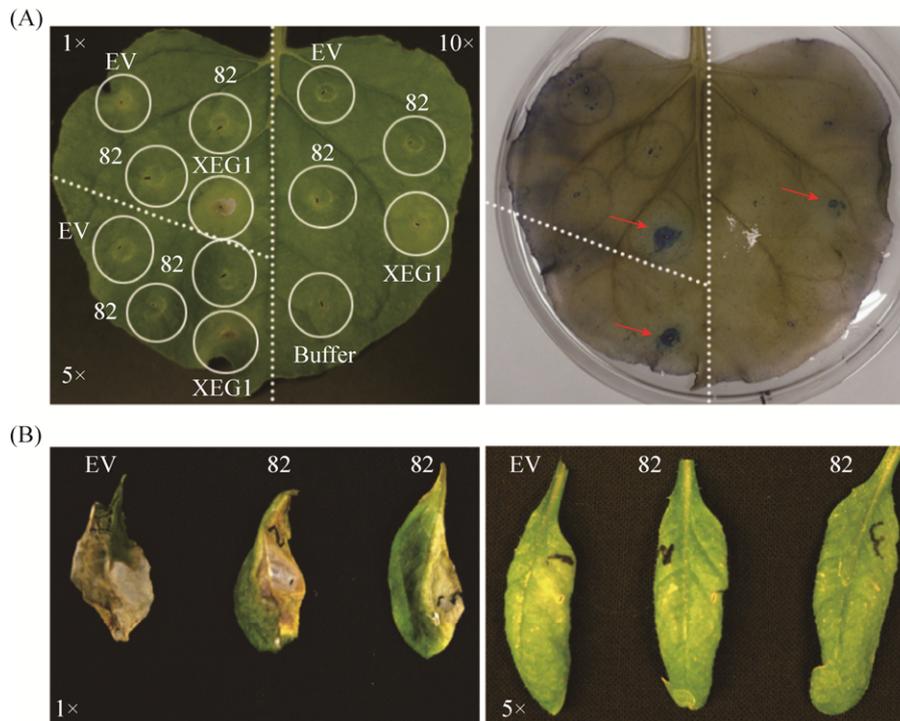


图 5. SCR82 融合蛋白活性检测

Figure 5. Activity test of recombinant SCR82 on *N. benthamiana* and *A. thaliana* leaves. The protein solutions (SCR82, empty vector and XEG1) without dilution (i.e. 1×) or with 5–10 fold dilutions (5×, 10×), and PBS buffer were infiltrated into the lower surface of *N. benthamiana* (A) and *A. thaliana* (B) leaves. Photographs were taken 4 days after infiltration. A: the same *N. benthamiana* leaf without (left panel) or with Trypan blue stained (right panel). The red arrows indicated the lesions caused by the positive control *P. sojae* XEG1. B: *A. thaliana* leaves. To simplify the labelling, SCR82 was shorten into the number '82'. EV, the empty vector pET28a(+)-6×His-SUMO expressing the tag His-SUMO. Buffer, 1× PBS buffer.

即使稀释了 10 倍也具有活性。在拟南芥叶片上, 蛋白原液和空载体阴性对照均导致叶片枯死, 可能是缓冲液对拟南芥叶片具有一定的毒性, 而稀释 5 倍后两者均不能产生明显的症状。进一步延长观察时间, 均未发现融合蛋白引起本氏烟和拟南芥叶片的 PCD。

2.6 SCR82 融合蛋白触发植物的防卫反应

由于融合蛋白不引起本氏烟和拟南芥叶片的 PCD, 我们进一步分析该蛋白是否触发植物的防卫反应。将空载体阴性对照、SCR82 融合蛋白 5 倍稀释液分别浸润本氏烟叶片, 分别于 0、12、24 h 后提取植物总 RNA, 分析植物防卫反应中 3 个标志基因 *NbMCI* (metacaspase 1)、*NbSOD* (superoxide dismutase)、*NbPOX* (peroxidase)^[26] 的转录水平变化。结果(图 6)发现, SCR82 融合蛋白引起本氏烟体

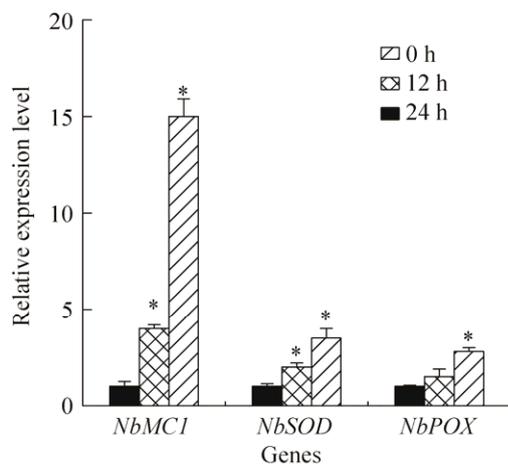


图 6. SCR82 诱导本氏烟抗性相关基因的表达

Figure 6. Expression changes of disease resistance-related genes in *N. benthamiana* triggered by recombinant SCR82. The recombinant SCR82 was infiltrated into *N. benthamiana* leaves and the expression levels of three resistance-related genes, *NbMCI* (metacaspase 1), *NbSOD* (superoxide dismutase) and *NbPOX* (peroxidase) were checked by RT-qPCR at 12, 24 h post-infiltration and compared to those at 0 h (normalized to the value 1). Error bars are s.e. and the asterisks (*) denote statistically significant difference (Student *t*-test, $P < 0.01$).

内这 3 个抗性相关基因的表达量变化; 相比于 0 h 对照, *NbMCI*、*NbSOD* 在蛋白浸润 12 h、24 h 后表达量均显著升高, 而 *NbPOX* 在浸润 24 h 后表达量显著升高。结果说明, SCR82 融合蛋白激发了本氏烟体内防卫相关基因的表达。

3 讨论

前期研究认为, PcF/SCR 是一类在植物体空间起作用的疫霉菌效应蛋白, 能够引起植物细胞死亡^[6-7]。目前, 仅有恶疫霉、致病疫霉中少数几个成员得到克隆^[11,15,18-20], PcF 得到推测的三维结构^[13], 致病疫霉 SCR74、恶疫霉 SCR96 等蛋白的序列多态性和转录表达特征得到分析^[18,20], 通过基因沉默分析了 *scr96* 的功能^[18], 但对 PcF/SCR 的生物学功能的认识仍极其有限, 还不清楚它们在疫霉菌致病过程中所起的作用及其机制。本研究克隆分析了辣椒疫霉中首个 PcF/SCR 效应蛋白 SCR82, 为揭示该效应蛋白的功能以及拓宽我们对该类效应蛋白的认识奠定了物质基础。

已有研究表明, PcF/SCR 编码基因多在疫霉菌侵染植物的过程中上调表达^[17-20]。本研究分析发现, *scr82* 在辣椒疫霉萌发休止孢和侵染寄主阶段上调表达, 说明它可能参与了辣椒疫霉侵染寄主植物的过程(图 1)。克隆后比对发现, SCR82 与恶疫霉 PcF 蛋白具有 67% 的序列相似性, 而且在樟疫霉(*P. cinnamomi*)、致病疫霉、寄生疫霉和橡树疫霉(*P. ramorum*)中也存在高度同源(>60% 的序列相似性)的蛋白(图 3), 但未在真菌、细菌、动物和植物等其他物种中发现同源蛋白; 检索公共数据库未发现该蛋白含有任何已知的功能域, 这些综合说明 SCR82 是一个疫霉菌中保守的新型效应蛋白, 可能具有重要的生物学功能。分析其参与

致病的作用及其机制,有助于帮助理解 PcF/SCR 的生物学功能。通过分析不同物种的 PcF/SCR 的功能也可以来研究病原体-寄主的共同进化关系。

我们前期利用 PVX 系统在烟草和番茄中进行瞬时表达,鉴定出恶疫霉 SCR96、SCR113 等效应蛋白可引起茄科植物的 PCD^[18-19],但发现辣椒疫霉 SCR82 的瞬时表达可能不能引起茄科植物的 PCD。为进一步分析该蛋白的功能,我们构建了带有 6×His-SUMO 标签的 pET28a(+):*scr82* 表达载体,并将该载体导入大肠杆菌中,成功诱导其表达,并经镍柱纯化获得了可溶的纯化蛋白(图 4)。前期分析说明 SCR82 是一个疏水小蛋白。蛋白表达结果表明,利用 SUMO 标签可以使此类疏水蛋白表达后较好地溶于水(图 4),SUMO 标签可用于类似疏水蛋白的表达研究。电泳结果显示,含标签的融合蛋白大小约为 24 kDa,从而判断 SCR82 大小约为 9 kDa,这与经氨基酸序列推断的假定蛋白大小一致,说明 SCR82 的确属于小分子蛋白。我们进一步利用纯化的蛋白注射本氏烟和拟南芥叶片,结果发现融合蛋白未能引起这两种植物的 PCD(图 5)。序列比对发现,PcF 中被认为是负责激发 PCD 的保守氨基酸 SK(E/C)C 基序在 SCR82 中则为 SRDC(图 3)。结合之前 PVX 系统瞬时表达结果,推测 SCR82 可能不引起 PCD。类似地,致病疫霉含有 20 个 PcF/SCR 基因,但目前仅发现 *PcF/SCR.1* 引起本氏烟的 PCD^[15]。最近,我们预测恶疫霉至少含有 14 个 PcF/SCR 基因,结果只发现 *scr96*、*scr113* 可引起本氏烟和番茄的 PCD,而 *scr99*、*scr121* 不能引起本氏烟的 PCD、但可引起番茄的 PCD^[18-19]。这些结果综合表明,不是所有的 PcF/SCR 效应蛋白都可引起 PCD,并且一些 PcF/SCR 效应蛋白的 PCD 触发活性具有寄主选择性。当然,SCR82 不引起 PCD 还有其他可能性,

例如是否是融合的标签过大影响了 SCR82 蛋白本身的性状?或是原核表达系统不适合该类真核蛋白的表达以致影响了其性状?回答这些问题仍需进一步的分析,或利用 Thrombin 蛋白酶去掉融合的标签再进行分析,或选用真核表达系统来进行该类疏水小蛋白的异源表达分析。本研究进一步分析了 SCR82 重组蛋白处理本氏烟后抗性相关基因的表达,发现植物抗性相关的 3 个标志基因剧烈上调表达(图 6),这说明该蛋白诱导了植物防卫反应的产生。类似地,已有研究发现 PcF、SCR74 等效应蛋白能够引起植物防卫反应相关的苯丙氨酸解氨酶表达的变化^[11-12,14]。一直以来,人们认为 PcF/SCR 效应蛋白可能作为 PAMP 分子激活植物的免疫抗性机制^[6-7],但尚无实验证据系统证明。因此,分析 SCR82 是否是一个 PAMP 也成为下一步研究的内容。

目前普遍认为效应蛋白对于疫霉菌侵染致病具有重要作用,但并不清楚 PcF/SCR 效应蛋白参与疫霉菌侵染致病的机制^[6-8]。一些研究者推测,PcF/SCR 可能是疫霉菌中的“孤儿”无毒蛋白(“orphan” avirulence proteins),通过与植物的抗性 R 蛋白或受体结合发挥作用^[20,27]。但是,另外一些研究者则根据一些 PcF/SCR 效应蛋白引致植物坏死的表型,认为它们可能是一类毒素^[6,11]。然而,目前尚未证明上述任一观点,首要的问题就是仍不明确该类效应蛋白对疫霉菌侵染致病的影响以及在植物中的互作因子。为进一步明确 SCR82 在辣椒疫霉侵染过程中所起的作用,我们正利用疫霉菌 CRISPR/Cas9 技术^[28]敲除辣椒疫霉中 *scr82* 基因。SCR82 属于 PcF/SCR 质外体小蛋白,这类蛋白作用的植物靶标可能位于植物细胞壁或细胞膜上^[6-7,18],而蛋白小分子量及其定位空间的特殊性使常规的酵母双杂交等植物互作蛋白筛选难以

进行。本研究获得的 SCR82 蛋白将有利于体外 His Pull-down 及 Co-IP 实验的开展, 通过鉴定与其结合互作的植物蛋白, 可最终阐明其作用机制。

本研究通过转录分析、基因克隆、蛋白性状分析预测及同源性比较、蛋白原核表达及纯化、植物浸润实验和抗性相关基因表达水平分析, 对辣椒疫霉 PcF/SCR 效应蛋白 SCR82 进行了初步研究, 为进一步阐明该效应蛋白在辣椒疫霉侵染致病过程中所起的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Erwin DC, Ribeiro OK. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul: American Phytopathological Society, 1996.
- [2] Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJ, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grünwald NJ, Mukhtar MS, Tomé DF, Tör M, Van Den Ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuzer H, Meijer HJ, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PR, Govers F. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(4): 413–434.
- [3] Lamour KH, Stam R, Jupe J, Huitema E. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 329–337.
- [4] Qiao N, Ma RL, Wang RL, Cheng Y, Jiao YS. Research progress on the happening and resistance of blight in pepper. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2016, 44(6): 885–888. (in Chinese)
乔宁, 马蓉丽, 王瑞丽, 成妍, 焦彦生. 辣椒疫病的发生及抗性研究进展. *山西农业科学*, 2016, 44(6): 885–888.
- [5] Xi YD, Chen GH, Xie BY, Peng HX. Research progress of global spread, damage and biological characteristics of *Phytophthora capsici*. *Northern Horticulture*, 2016, 40(11): 199–203. (in Chinese)
席亚东, 陈国华, 谢丙炎, 彭化贤. 辣椒疫霉菌全球传播与危害及生物学特性研究进展. *北方园艺*, 2016, 40(11): 199–203.
- [6] Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 41–60.
- [7] Wawra S, Belmonte R, Löbach L, Saraiva M, Willems A, van West P. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(6): 685–691.
- [8] McGowan J, Fitzpatrick DA. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. *mSphere*, 2017, 2(6): e00408–17.
- [9] Ma ZC, Zhu L, Song TQ, Wang Y, Zhang Q, Xia YQ, Qiu M, Lin YC, Li HY, Kong L, Fang YF, Ye WW, Wang Y, Dong SM, Zheng XB, Tyler BM, Wang YC. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplast effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science*, 2017, 355(6326): 710–714.
- [10] Wang Y, Wang YC. Trick or treat: microbial pathogens evolved apoplast effectors modulating plant susceptibility to infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(1): 6–12.
- [11] Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, Dalla Rizza M, Mezzetti B, Ruggieri S. Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline-containing factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(24): 21578–21584.
- [12] Orsomando G, Lorenzi M, Ferrari E, de Chiara C, Spisni A, Ruggieri S. PcF protein from *Phytophthora cactorum* and its recombinant homologue elicit phenylalanine ammonia lyase activation in tomato. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60(7): 1470–1476.
- [13] Nicastro G, Orsomando G, Ferrari E, Manconi L, Desario F, Amici A, Naso A, Carpaneto A, Pertinhez TA, Ruggieri S, Spisni A. Solution structure of the phytotoxic protein PcF: the first characterized member of the *Phytophthora* PcF toxin family. *Protein Science*, 2009, 18(8): 1786–1791.
- [14] Orsomando G, Brunetti L, Pucci K, Ruggieri B, Ruggieri S. Comparative structural and functional characterization of putative protein effectors belonging to the PcF toxin family from *Phytophthora* spp. *Protein Science*, 2011, 20(12): 2047–2059.
- [15] Zhao DM, Xu J, Yang ZH, Zhu JH, Zhu LD. Cloning and function analysis of necrosis-inducing gene *PcF/SCR.1* in *Phytophthora infestans*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(6): 744–752. (in Chinese)
赵冬梅, 徐进, 杨志辉, 朱杰华, 朱丽丹. 致病疫霉坏死基因 *PcF/SCR.1* 的克隆及功能分析. *农业生物技术学报*, 2014, 22(6): 744–752.
- [16] Chen XR, Xing YP, Li YP, Tong YH, Xu JY. RNA-Seq reveals

- infection-related gene expression changes in *Phytophthora capsici*. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74588.
- [17] Chen XR, Zhang BY, Xing YP, Li QY, Li YP, Tong YH, Xu JY. Transcriptomic analysis of the phytopathogenic oomycete *Phytophthora cactorum* provides insights into infection-related effectors. *BMC Genomics*, 2014, 15: 980.
- [18] Chen XR, Li YP, Li QY, Xing YP, Liu BB, Tong YH, Xu JY. SCR96, a small cysteine-rich secretory protein of *Phytophthora cactorum*, can trigger cell death in the *Solanaceae* and is important for pathogenicity and oxidative stress tolerance. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(4): 577–587.
- [19] Chen XR, Huang SX, Zhang Y, Sheng GL, Zhang BY, Li QY, Zhu F, Xu JY. Transcription profiling and identification of infection-related genes in *Phytophthora cactorum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293(2): 541–555.
- [20] Liu ZY, Bos JIB, Armstrong M, Whisson SC, Da Cunha L, Torto-Alalibo T, Win J, Avrova AO, Wright F, Birch PR, Kamoun S. Patterns of diversifying selection in the phytotoxin-like *scr74* gene family of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(3): 659–672.
- [21] Chen XR, Wang YC. Advances on the methods used for the functional analysis of oomycete genes. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(5): 568–575. (in Chinese)
陈孝仁, 王源超. 卵菌基因功能分析方法的研究进展. *农业生物技术学报*, 2012, 20(5): 568–575.
- [22] Zelaya-Molina LX, Ortega MA, Dorrance AE. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(4): 715–720.
- [23] Chen XR, Zhang Y, Huang SX, Xing YP, Ji ZL. Sequence polymorphism, gene transcriptional pattern and function analysis of the RXLR effector PcAvh2 from *Phytophthora capsici*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(12): 2204–2215. (in Chinese)
陈孝仁, 张焯, 黄沈鑫, 邢玉平, 纪兆林. 辣椒疫霉 RXLR 型效应子 PcAvh2 的序列多态性、基因转录特征及功能. *微生物学报*, 2018, 58(12): 2204–2215.
- [24] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [25] Ma KW, Jiang SS, Hawara E, Lee D, Pan SQ, Coaker G, Song JK, Ma WB. Two serine residues in *Pseudomonas syringae* effector HopZ1a are required for acetyltransferase activity and association with the host co-factor. *New Phytologist*, 2015, 208(4): 1157–1168.
- [26] Mafurah JJ, Ma HF, Zhang MX, Xu J, He F, Ye TY, Shen DY, Chen YY, Rajput NA, Dou DL. A virulence essential CRN effector of *Phytophthora capsici* suppresses host defense and induces cell death in plant nucleus. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127965.
- [27] Bos JIB, Armstrong M, Whisson SC, Torto TA, Ochwo M, Birch PRJ, Kamoun S. Intraspecific comparative genomics to identify avirulence genes from *Phytophthora*. *New Phytologist*, 2003, 159(1): 63–72.
- [28] Fang YF, Tyler BM. Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(1): 127–139.

Gene transcriptional pattern, prokaryotic expression and functional analysis of an apoplastic, hydrophobic and small effector SCR82 from *Phytophthora capsici*

Zihui Zhang^{1#}, Shenxin Huang^{1#}, Hang Tao¹, Ye Zhang¹, Yao Zhao², Zhaolin Ji¹, Xiaoren Chen^{1*}

¹ College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

² College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim was to analyze the gene transcriptional profiles, express the protein in *Escherichia coli* and analyze functions of the PcF/SCR effector SCR82 from *Phytophthora capsici*. [Methods] Gene transcripts during the developmental stages (mycelia, sporangia, zoospores and germinated cysts) and infection period (1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 72 h post-inoculation) of *Nicotiana benthamiana* by *P. capsici* were checked by semi-quantitative RT-PCR. The cDNA full length was cloned into a modified pET28a(+) expression vector in a way that a 6×His-SUMO tag was fused with the protein N-terminal. Protein was induced using the *E. coli* isolate Rossette 2 at two temperatures (22 °C and 37 °C) combined with different IPTG concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1 mmol/L). Protein was purified by Ni²⁺ column affinity chromatography and infiltrated into the leaves of *N. benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* to test its ability of inducing plant cell death. Meanwhile, the expression changes of three resistance-related marker genes (*NbMCI*, *NbSOD* and *NbPOX*) of *N. benthamiana* was examined at 12 and 24 h post-infiltration of the recombinant protein. [Results] The expression of *scr82* was upregulated during the cyst germination and host infection. The gene was single-copy without any introns and its open reading frame was 249-bp long. The deduced protein was of 82 amino acids consisting of a 21-aa signal peptide and 7 cysteines. It was predicted to be hydrophobic and contain no known domains. The secondary structure consisted of random coil and α -helix. Its homologues existed only in *Phytophthora* spp. After inducing by 0.2 mmol/L IPTG at 22 °C for about 16 h, the recombinant protein of about 24 kDa was observed on SDS-PAGE gels. About 30 mg/mL of purified protein was obtained. The recombinant did not trigger plant cell death, but caused up-regulated expression of *NbMCI*, *NbSOD* and *NbPOX* genes. [Conclusion] The recombinant could not induce plant cell death, but triggered plant defense reaction.

Keywords: *Phytophthora capsici*, PcF/SCR effector, hydrophobicity, RT-PCR, prokaryotic expression, plant defense reaction

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31671971, 31871907), by the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX19_0895), by the Yangzhou University 2016 Project for Excellent Young Key Teachers and by the High-Level Talent Support Program of Yangzhou University

[#]Those authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-514-87971383; E-mail: xrchen@yzu.edu.cn

Received: 23 December 2018; Revised: 16 February 2019; Published online: 25 February 2019