

文章编号:1674-7054(2010)01-0001-07

果蔗 *SoSgt 1* 基因的克隆表达与植物反义表达载体的构建

林生^{1,2}, 潘大仁^{1,2}, 周以飞^{1,2}, 陈观水¹, 张绪璋², 吴子峰¹

(1. 福建省作物分子与细胞生物学重点实验室 福建农林大学, 福建 福州 350002;

2. 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室 福建农林大学, 福建 福州 350002)

摘要: 利用不同作物的 *Sgt 1* 基因的 SGS 保守区域的氨基酸保守位点设计简并引物, 从果蔗的 cDNA 中克隆分离出果蔗 *SoSgt 1* 基因片段。以果蔗 *SoSgt 1* 基因片段为探针, 利用电子克隆和序列拼接方法并通过 RT-PCR 验证获得了一个全长 1 438 bp 的 cDNA 序列。通过 ORF 软件分析, 预测得到的蛋白质具有 362 个氨基酸。利用 NCBI 数据库中的 Protein Blast 分析 *SoSgt 1* 蛋白氨基酸序列, 得出含有 SGT 1 蛋白的 3 个典型的保守结构域 (TPR, CS 和 SGS), 与其他作物的 SGT 1 蛋白比较具有较高的相似性。利用稍腐病原 *Gibberella fujikuroi* 接种福安果蔗叶片, 检测到 *SoSgt 1* 基因的转录水平逐渐提高, 并用果蔗 *SoSgt 1* 基因的 cDNA 片段设计 2 个酶切位点, 反向插入到植物真核表达载体 pCAMBIA1301, 构建反义表达载体 pCAM-SGT。

关键词: 果蔗; *SoSgt 1* 基因; 克隆; 半定量 RT-PCR; 载体构建

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

果蔗 (Chewing Cane, *Saccharum* L.) 在我国南方的广大地区是一种重要的果品和经济作物, 并形成一定规模的产业^[1]。我国果蔗种质资源十分丰富, 其中蕴藏着各种抗病性状的基因, 但果蔗在生长过程中仍受到许多不同病害的威胁, 如凤梨病、根腐病、赤腐病和花叶病等^[2]。这些病害的蔓延速度很快, 严重地影响果蔗的品质和产量, 从而造成了巨大的经济损失。

植物在进化的过程中形成了一套复杂的抵抗病原的有效机制, 而植物遭到病原侵染后, 在受侵染部位会产生细胞坏死的症状, 其他未受到侵染的部位是由于植物 R 基因 (抗病基因, resistance genes) 产物特异识别相应病原并激发植物抗病信号而获得抗性^[3]。在植物抗病反应信号传导途径中, 许多信号传导相关因子如 NPR 1, SGT 1, RAR 1, SNI 1, NDR 1, EDS 1 和 PAD 4 等被克隆并得到鉴定^[4-8]。其中 SGT 1 因子 (suppressor of the G2 allele of *skp 1*) 是多种植物抗病基因介导的抗病信号途径的必要组件。有学者对多种植物的 *Sgt 1* 基因的研究表明, SGT 1 蛋白以多种形式参与调控植物抗病反应, SGT 1 与 RAR 1、HSP 90 互作调节 R 蛋白复合体的积累水平^[10-12]; SGT 1 与 HSP 90 等蛋白共同调控植物的病原侵染点的超敏反应^[9, 13-14]; SGT 1 还与植物非宿主抗性密切相关^[15], 但是, *Sgt 1* 基因的突变或沉默将会导致多种植物 R 基因介导抗病性的丧失。

目前, *Sgt 1* 基因已经从拟南芥、海岛棉、小麦、水稻和中间偃麦草等植物中分离并得到鉴定^[4, 16-19]。

收稿日期: 2009-10-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30370900); 福建省自然科学基金 (2003N001)

作者简介: 林生 (1981-), 男, 福建莆田人, 福建农林大学 2007 级在读博士生。

通信作者: 潘大仁, 博士, 教授, E-mail: pandaren@163.com.cn

但有关果蔗的 *Sgt 1* 基因的分离及其在抗病反应中的作用未见报道。本研究利用其他作物的 *Sgt 1* 基因序列信息设计简并引物克隆福安果蔗 *SoSgt 1* 基因的 cDNA 片段, 以其为探针, 利用 NCBI 中的 tblastn 搜索甘蔗 EST 库, 用搜索到的甘蔗 EST 序列拼接得到 *SoSgt 1* 基因全长, 并设计引物进行了验证。利用梢腐病病原 *Gibberella fujikuroi* 接种果蔗福安叶片, 在不同的时间段用半定量 RT-PCR 检测 *SoSgt 1* 基因的转录水平, 并构建果蔗 *SoSgt 1* 基因的植物反义表达载体, 为深入研究果蔗 *SoSgt 1* 基因在果蔗抗病分子机理中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 福安果蔗是福建地区主要栽培品种, 由本实验室保存, 种植于福建农林大学试验田。果蔗梢腐病病原 *Gibberella fujikuroi*, 由福建农林大学功能基因组学实验室分离鉴定。当果蔗进入分蘖期, 将 *Gibberella fujikuroi* 接种于福安果蔗主茎的倒三叶片, 然后分别取接种 0, 6, 12, 24, 48, 72 h 后的叶片作为样品。

1.2 果蔗 mRNA 的提取及简并引物的设计 果蔗 mRNA 提取按文献[20]中周以飞等的方法, 略作修改。根据大麦 SGT 1(AF439974)、水稻 SGT 1(AF192467)、烟草 SGT 1(AAW82048) 和拟南芥 SGT 1a(AF439975) 的 SGS 保守区域设计一对简并引物为 SGTF: 5'-GACTGGGAYAARHTDGCARGCT-3', SGTR: 5'-CCAYTTCTTGARCTCCATNCC-3'。

1.3 果蔗 *SoSgt 1* 基因片段的克隆与测序 cDNA 第 1 链合成参照 M-MLV 逆转录酶的 20 μL 标准反转录体系, 以福安果蔗接种 *Gibberella fujikuroi* 后 24 h 的叶片 mRNA(2 μg) 为模板, 取 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Oligo-dT 1 μL , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPMix 1 μL , 加 ddH₂O 补足 12 μL 。65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 冰上骤冷 30 s, 加入 5 \times First-Strand Buffer 4 μL , 取 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT 2 μL , 40 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RNA 酶抑制剂 1 μL , 200 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 M-MLV 反转录酶 1 μL , 轻微混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 中止反应, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR 扩增反应总体积为 20 μL , 其中包含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl(pH 8.3), 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物浓度, DNA 模板 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶 1.5 U。将样品放入 Eppendorf DNA 扩增仪中进行 PCR 扩增。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 70 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

使用 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物电泳分离。目的片段使用北京天为时代科技有限公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。回收的产物用 pMD-18T cloning kit(TAKARA) 试剂盒连接, 氯化钙法转化 *E. coli* DH 5 α 的感受态细胞, 涂于含有 IPTG, X-gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取白色菌落, LB 液体培养, 并用相应引物进行菌落 PCR 检测。有插入片段的阳性克隆送 Takara 公司进行测序, 获得的核苷酸序列使用 Blast 程序在 GenBank 数据库中进行同源性序列搜索比对。

1.4 果蔗 *SoSgt 1* 全长序列的拼接与验证 以克隆到的果蔗 *SoSgt 1* 基因片段作为探针, 利用 NCBI 中的 tblastn 搜索甘蔗 EST 库, 得到包含有 *SoSgt 1* 基因保守结构域的一系列甘蔗 EST 序列, 在拼接的基础上以拼接好的 EST 重叠群为新探针重复搜索, 直到没有新的 EST 可供拼接为止。通过人工拼接得到可能的新基因序列, 并以新基因为模板设计引物 SGTF 1: 5'-TCATCGTCTGGTCTCTTCTC-3', SGTR 1: 5'-AAG-TAGCACTCAGACACGC -3', 进行 RT-PCR 验证。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经过回收, 由 Takara 公司进行测序。测序获得的核苷酸序列利用 DNAMAN6.0 翻译成氨基酸序列, 再用 Clustal W1.8 与大麦 SGT 1(AF439974)、水稻 SGT 1(AF192467)、烟草 SGT 1(AAW82048)、中间偃麦草(EF534375.1) 和拟南芥 SGT 1a(AF439975)

进行序列比对,以及推导出它们之间的亲缘关系。

1.5 半定量 RT-PCR 检测果蔗 *SoSgt1* 的表达 果蔗半定量 RT-PCR 参照陈观水等^[21]的方法,略作修改。以福安果蔗接种 *Gibberella fujikuroi* 0, 6, 12, 24, 48, 72 h 后的叶片 mRNA 作为样品,引物为 Sgt 1 F2: 5'-TCTTCAGCTCCATTCCATC-3', Sgt 1 R2: 5'-CTTGATGGTGATGCTGC-3'。内标基因为 GAPDH,上下游引物分别是 GAPDH F: 5'-AAGGGTGGTGCCAAGAAGG-3' 与 GAPDH R: 5'-CAAGGGGAGCAAGGCAGTT-3'。PCR 条件与程序参照方法 1.3。

1.6 果蔗 *SoSgt1* 基因片段的植物反义表达载体 pCAM-SGT 的构建 根据从果蔗 cDNA 克隆的 *SoSgt1* 基因片段分别设计上游引物 SGT 1 F3: GCTAAGCTTTCCCTTCCACCACCTTTGA, 下游引物 SGT 1 R3: GCTGAATTCGCATCAGGAGAAGGAAGA, 并分别在上下游引物引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。

分别以 SGT 1 F1 与 SGT 1 R1 引物进行 PCR 扩增,电泳检测后回收 PCR 扩增产物。反应程序为: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 50 s, 55 °C 55 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切目的片段和 pCAMBIA1300 经回收后,用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和 pCAMBIA1300,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,经卡那霉素筛选后提取重组质粒,用酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 果蔗 *SoSgt1* 基因片段的克隆与全长的获得 提取的果蔗总 RNA 经普通琼脂糖凝胶电泳检测,表明 RNA 质量较好。用引物 SGTF 和 SGTR 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到 1 条约 200 bp 的条带(见图 1)。对 PCR 产物进行回收、克隆测序,序列长度为 202 bp。

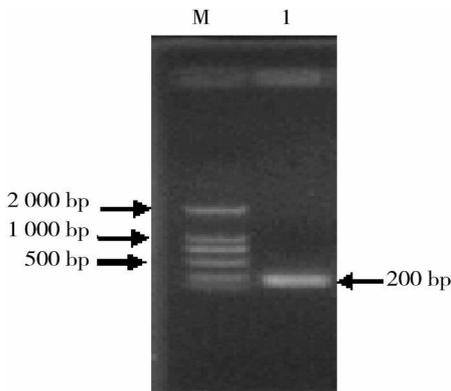


图 1 果蔗 *SoSgt1* 的 RT-PCR 扩增

M: 分子标记 100 bp; 1: *SoSgt1* 基因片段

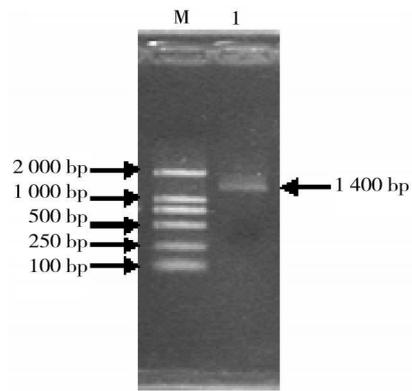


图 2 果蔗 *SoSgt1* 全长序列的 RT-PCR 扩增

M: 分子标记 100 bp; 1: *SoSgt1* 基因片段

以果蔗 cDNA 扩增出的 *SoSgt1* 基因片段序列为信息探针,利用 NCBI 中的 tblastn 搜索甘蔗 EST 序列,得到包含有 *SoSgt1* 基因保守结构域的一系列甘蔗 EST 序列 CA227695.1, CA229980.1, CA262995.1, 用 DNAMAN 6.0 对这些序列进行拼接获得一个全长 1 400 bp 左右的 cDNA 序列。用引物 SGTF1 和 SGTR1 进行 RT-PCR 扩增(见图 2),片段回收测序后通过 ORF 软件分析,推导得出该序列编码 362 个氨基酸(见图 3)。使用 NCBI 数据库中的 Protein Blast 分析 SGT1 蛋白氨基酸全长序列中可能有的蛋白功能结构域。分析结果表明:该蛋白含有 SGT1 蛋白的 3 个典型的保守结构域,分别是 TPR, CS, SGS 结构域(见图 3)。用 Clustal W1.8 与大麦 SGT1(AF439974)、小麦 SGT1(EF546432)、水稻 SGT1(AF192467)、烟草 SGT1(AAW82048)、中间偃麦草(EF534375.1)和拟南芥 SGT1a(AF439975)等进行序列比对,其中与水稻的相似性最高,达到 94%,与单子叶植物的相似性高于与双子叶植物的相似性(见图 4)。

```

1      GGTCTAGTTACCGGGTTCGACCCACGGCTCCGGCCCGAGTCACTCGTCTGGTCTTTCTC
61     GTATACGCCCCAAGCCCGGAGGGGGTGCATGATGCCCGCCGGTCCGATCTGGAGAGCAAGG
1      M A A A S D L E S K
121    CCAAGGAGGCCTTCGTGACGACGACTTCGAGCTGGCCGCCGAGCTTACACCCAGGCCA
11     A K E A F V D D D F E L A A E L Y T Q A
181    TCGACGGCCGGCCCGCCACCGCCGACCTCTACGCCGACCGCGCCACGGCGCACATCAAGC
31     I D A G P A T A D L Y A D R A Q A H I K
241    TCGGCACTACACTGAGGCTGTTGCCGATGCTAACAAAGCAATTGAECTTGATCTTACGA
51     L G N Y T E A V A D A N K A I E L D P T
301    TGCATAAAGCCTACTACCGGAAAGGTGCTGCATGCATTAAGCTTGAAAGAATACCAAAGT
71     M H K A Y Y R K G A A C I K L E E Y Q T
361    CAAAGGCTGCTCTTGAGTTGGGTTCTTCTATGCATCAGCGGATCAAGGTTTACTCGTC
91     A K A A L E L G S S Y A S G D S R F T R
421    TATTGAAGCAATGTGATGAGCGCATCCCTGAGGAATCTAGCCAGGCACCAGTAAAGCAAG
111    L L K E C D E R I A E E S S Q A P V K K
481    TTGAGCCTCCTGTGGCTGCTACTGTTGAGGACAAGGAGGATGCCACAAATATGGAGAATA
131    V E A P V A A T V E D K E D A T N M E N
541    CACCGCCAGTGGTAGAACCCCAAGCAAACCTAAATACAGGCATGACTACTACAAACAGTG
151    T P P V V E P P S K P K Y R H D Y Y N S
601    CCACAGAAGTGGTGGTGCACAATATTTGCTAAGGCTGTTTCTGCTGATAGTGTAGTCATTG
171    A T E V V L T I F A K G V P A D S V V I
661    ATTTTGTGAACAGATGTTAAGTGTATCCATTGAAGTCCCTGGTGAAGAACCATACCATT
191    D F G E Q M L S V S I E V P G E E P Y H
721    TTCAGCCCCGTCTGTTTTCTAAGATTATCCCTGAGAAATGCAAAATCAAGTCTTATCCA
211    F Q P R L F S K I I P E K C K Y Q V L S
781    CCAAGTTCGAAATACGCCCTTCAAAAAGCTGAGCAGGTGACATGGACAAACCTGGATTATA
231    T K V E I R L A K A E Q V T W T T L D Y
841    GTGGAAGACCAAAGGCTGTTCCCCAGAAGATAAGCACGCCAGCTGAAACAGCCCCAAGAC
251    S G R P K A V P Q K I S T P A E T A P R
901    CTTCATACCCATCTTCAAAGGCCAAAAAAGACTGGGATAAACTGGAAGCTGAAGTCAAAA
271    P S Y P S S K A K K D W D K L E A E V K
961    AGGAGGACAAGGAAGAAAAAAGTTCATGCTGATGCTGCATTGAACAAATTTCCCGTGACA
291    K E E K E E K L D G D A A L N K F F R D
1021   TCTACAAGGATGCTGATGAAGATATCGGAGGGCCATGATGAAGTCAATTCGTGCAATCTA
311   I Y K D A D E D M R R A M M K S F V E S
1081   ATGGCCTGTTCTCTCAACCAATTGGAAAAGATGTTGGATCAAAGGTTGGTGAAGGGAGCC
331   N G T V L S T N W K D V G S K V V E G S
1141   CTCCTGATGCTATGGAGCTTAAGAAGTGGGAATACTAAAGTTCCGACTTGCCCCGCTCTT
351   P P D G M E L K K W E Y *
1201   GTAAATCCAGCTCTTGGGAATTATGACCTAGTAACGTCACCCATTTGGTGCCATGAGCT
1261   TGGTTAAGTCTTCTGCTTTTGTAAAGCTTTCTGTATATGACAGTCTAGCGTGTCTGAGTGC
1321   TACTTGCCGTAATTTTTGATGGACATCTGGTATGCTATCTGTGCTATCGACTCCGAAAC
1381   ATTTTGGTAAACCAAGACACCAAACATAAATCTGTGGAATGGCTATTCTTTTTGGTCT

```

图3 果蔗 SoSgt 1 基因序列全长与氨基酸推导 (划线区域分别是 TPR, CS, SGS 结构域)

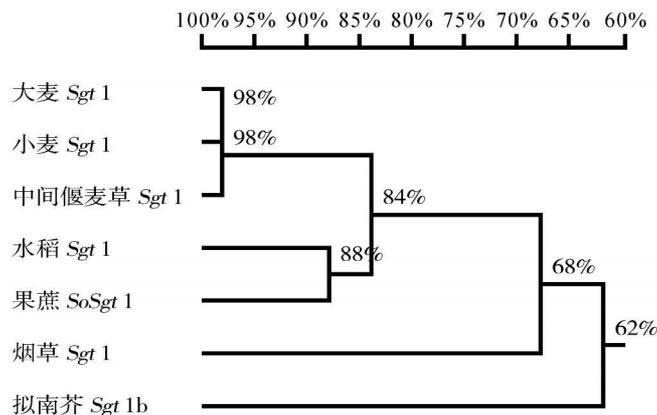


图4 果蔗 SoSgt 1 基因氨基酸序列与其他植物 SGT 1 氨基酸序列的比较

2.2 果蔗接种梢腐病病原 Gibberella fujikuroi 后 SoSgt 1 的表达检测 福安果蔗叶片在接种梢腐病病原 Gibberella fujikuroi 后,叶片的症状逐渐加深,在 24 h 时出现黄色的条纹,48 h 后出现棕色斑点,72 h 的

叶片症状与 48 h 的没有明显的差别。通过半定量 RT-PCR 检测, *SoSgt1* 基因在叶片中的表达呈逐渐上升的趋势, 在 48 h 的表达量达到最大, 72 h 的表达量与 48 h 相比没有出现明显的变化(见图 5)。

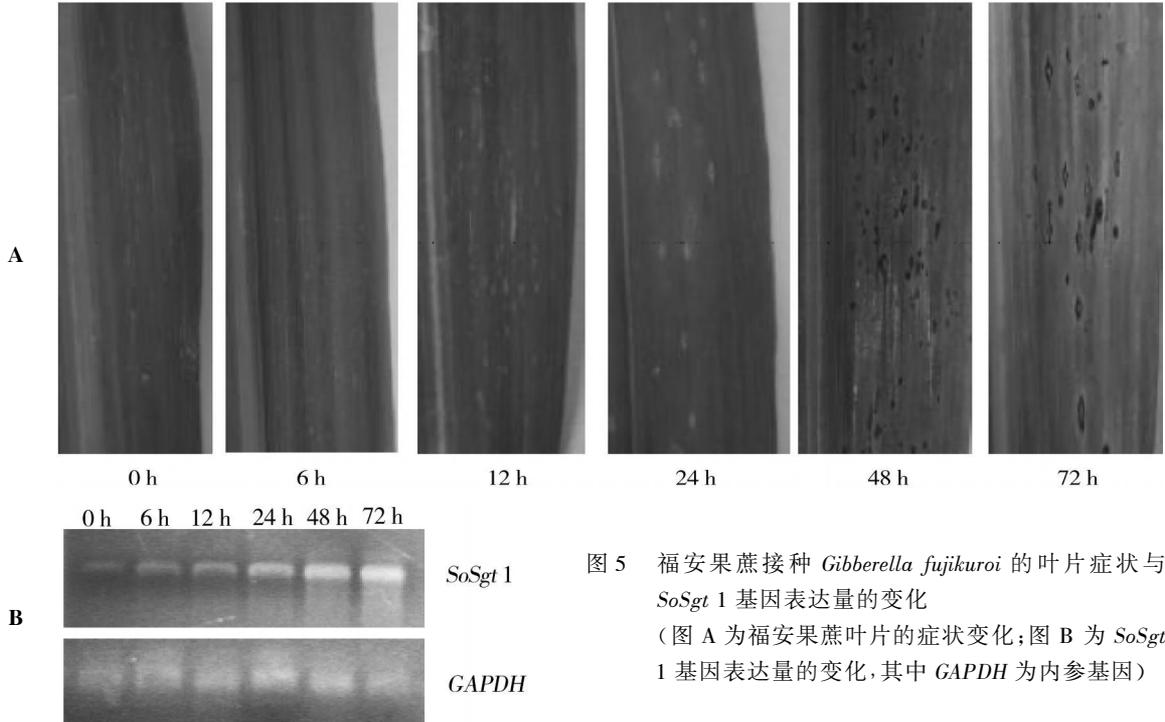


图 5 福安果蔗接种 *Gibberella fujikuroi* 的叶片症状与 *SoSgt1* 基因表达量的变化 (图 A 为福安果蔗叶片的症状变化; 图 B 为 *SoSgt1* 基因表达量的变化, 其中 *GAPDH* 为内参基因)

2.3 植物反义表达载体 pCAM-SGT 的构建 用带有酶切位点的引物 SGT 1 F1 和 SGT 1 R1 对果蔗 cDNA 进行 PCR 扩增, 所得 200 bp 左右的产物与质粒 pCAMBIA1301 通过酶切连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 经卡那霉素筛选后提取重组质粒 pCAM-SGT(见图 6), 用酶切进行鉴定验证。重组质粒经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 通过普通琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 1 条约 200 bp 产物和 11 800 bp 左右的质粒(见图 7)。

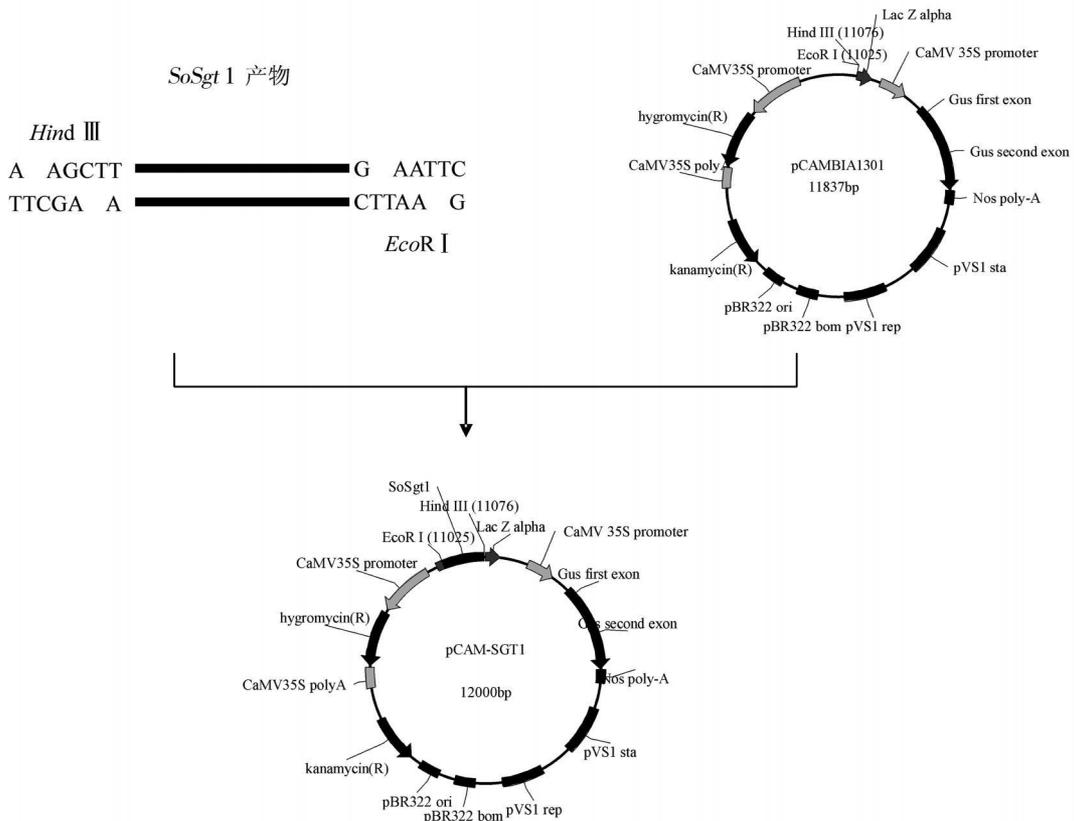


图 6 果蔗 *SoSgt1* 基因片段植物反义表达载体的构建

3 讨论

植物存在抗病基因保守结构域,通过人工合成与已知抗病基因产物的保守序列类似的简并引物,以植物总 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,这样就可能得到该种植物的抗病相似基因。多种作物的 SGT 1 基因通过保守区域的简并引物和 RACE 技术对总 DNA 和 cDNA 进行 PCR 扩增得到克隆,如海岛棉 *GbSgt 1*、水稻、小麦、中间偃麦草等。李为民等用棉花黄萎病菌接种海岛棉后 *GbSgt 1* 基因在转录水平上的表达量显著增加,并构建植物表达载体 pSgt 转化烟草品种 NC 89,得到的转基因烟草植株对赤星病的抗性明显提高,验证了海岛棉 *GbSgt 1* 在海岛棉的抗病反应中起到重要的作用^[19]。王凯等用大麦黄矮病毒、白粉病菌、纹枯病菌和赤霉病菌感染小麦均可诱导小麦 SGT 1 基因转录水平上调,说明 SGT 1 可能参与了小麦不同抗病反应^[16,17]。本研究根据其他作物已克隆的 SGT 1 基因的 SCS 保守区域的 2 个氨基酸保守位点,设计

上、下游简并引物,用果蔗基因组 cDNA 进行 PCR 扩增,得到相似的果蔗 *SoSgt 1* 基因片段序列,并通过电子克隆与 RT-PCR 验证得到全长 1 438 bp 的 cDNA 序列。已推导出的 362 个氨基酸序列,通过序列比对表明与其他作物 SGT 1 蛋白之间的相似性很高。在福安果蔗的叶片中, *SoSgt 1* 基因的表达在接种梢腐病原 *Gibberella fujikuroi* 后逐渐提高,初步表明果蔗 *SoSgt 1* 基因与果蔗和病原之间的病理反应相关。

植物基因的功能一般通过基因突变或基因过量表达等方法得到鉴定。利用植物反义表达载体转化原植物研究植物基因的功能是一个有效的方法途径。Oeller 等在番茄中转入 ACC 合酶反义基因,成功培育出耐贮藏转基因番茄^[22]。李明亮构建了 ACC 合酶反义基因植物表达载体,首次将该反义基因转化美洲黑杨获得了转基因植株。有研究证明外源 ACC 合酶反义基因能够在木本植物美洲黑杨中表达并能有效地抑制其乙烯的生物合成^[23]。本研究在果蔗 SGT 1 基因的 cDNA 片段正义链两端设计 *Hind* III 和 *Eco* R I 两个酶切位点,用 *Hind* III 和 *Eco* R I 酶进行双酶切,然后反向插入到同样双酶切的 pCAMBIA1301,成功构建反义表达载体 pCAM-SGT,可以进行下一步的转化研究。通过转基因植株检测果蔗 *SoSgt 1* 基因的抑制情况,并用不同的病原接种果蔗转基因植株与未转基因植株,观察田间农艺性状 *SoSgt 1* 基因的表达变化,为果蔗的病理反应和抗病育种的研究提供一些理论依据。

参考文献:

- [1] 张树河, 李海明, 李瑞美, 等. 南方果蔗主要品种特征特性及栽培要点[J]. 中国糖料, 2007(3): 40-42.
- [2] 鲁国东, 黎常窗, 潘崇忠, 等. 中国甘蔗病害名录[J]. 甘蔗, 1997, 4(4): 19-23.
- [3] JONES J D, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444: 323-329.
- [4] AUSTIN M J, MUSKETT P, KAHN K, et al. Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses[J]. Science, 2002, 295(5562): 2077-2080.
- [5] MUSKETT P, PARKER J. Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signaling[J]. Microbes Infect, 2003(5): 969-976.
- [6] TAKAHASHI A., CASAIA C. HSP90 interacts with RARL and SGT1 and is essential for RPS2 mediated disease resistance in Arabidopsis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 11777-11782.
- [7] TORNERO P, MERRITT P, SADANANDOM A, et al. RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed[J]. Plant Cell, 2002, 15: 1005-1015.
- [8] KITAGAWA K, SKOWYRA D, ELLEDGE S J, et al. SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex[J]. Mol Cell, 1999, 4: 21-33.
- [9] HOLT B F, BELKHADIR Y, DANGL J L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system[J]. Science, 2005, 309: 929-932.
- [10] BANSAL P K, ABDULLE R, KITAGAWA K. SGT1 associates with Hsp90: an initial step of assembly of the core kinetochore complex[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(18): 8069-8079.
- [11] LIU Y, BURCH-SMITH T, SCHIF M, et al. Molecular chaperone HSP90 associates with resistance protein N and its signaling protein SGT1 and RAR1 to modulate an innate immune response in plant[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 2101-2108.

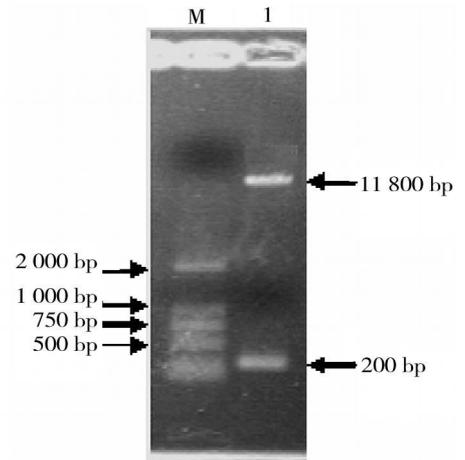


图7 酶切后的重组质粒电泳检测结果
M:分子标记 100 bp; 1:酶切后的重组质粒

- [12] MUSKETT P R, KAHN K, AUSTIN M J, *et al.* Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 979 – 992.
- [13] YAN Z, STEPHAN D, MICHAL S, *et al.* Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS 1, SGT 1 and HSP90[J]. *The Plant Journal*, 2004, 40: 213 – 224.
- [14] YOUSSEF B, RAJAGOPAL S, JEFFERY L D. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 391 – 399.
- [15] PEART J R, LU R, SADANANDAM A, *et al.* Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and non host disease resistance in plants[J]. *Proceeding of the National Academy of Science*, 2002, 99(16) : 10865 – 10869.
- [16] 王凯, 杜丽璞, 张增艳, 等. 中间偃麦草 SGT1 基因的克隆及其抗病功能的分析[J]. *作物学报*, 2008, 34(3) : 520 – 525.
- [17] 王凯, 张增艳, 黄璜, 等. 小麦 SGT1 基因的克隆与表达特性分析[J]. *麦类作物学报*, 2007, 27(6) : 952 – 956.
- [18] 王亚玲, 胡国富, 李群, 等. 水稻抗病调控因子 OsSGT1 原核表达载体构建和表达蛋白纯化[J]. *东北农业大学学报*, 2004, 35(3) : 285 – 289.
- [19] 李为民, 王志兴, 张永强, 等. 海岛棉 GbRac1 基因过量表达提高转基因烟草离体叶片对赤星病的抗性[J]. *自然科学进展*, 2004, 14(4) : 410 – 416.
- [20] 吴杨, 周会, 潘大仁. 甘蔗线虫病抗性基因的 PCR 检测研究[J]. *作物学报*, 2006, 32(6) : 939 – 942.
- [21] 陈观水, 潘大仁, 周以飞. 甘薯 NPR1 基因半定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2007, 36(1) : 56 – 59.
- [22] OELLER P W, TAYLOR L P. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA[J]. *Science*, 1991, 254: 437 – 439.
- [23] 李明亮, 韩一凡, 邱德有. 乙烯在植物生长发育的抗病反应中的作用及其生物合成的反义抑制[J]. *林业科学*, 1999, 35(3) : 11 – 15.

Cloning of *SoSgt1* from Chewing Cane and Construction of Antisense Vector

LIN Sheng^{1,2}, PAN Da-ren^{1,2}, ZHOU Yi-fei^{1,2}, CHEN Guan-shui¹, ZHANG Xu-zhang², WU Zi-feng¹

(1. Key Laboratory of Crop Molecular and Cell Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Key Laboratory of Ministry of Education of Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Based on SGS conservative amino acid region of *Sgt1* gene from different crops, degenerate primers were designed and RT-PCR was used to amplify *SoSgt1* cDNA fragment of chewing cane. The results indicated that *SoSgt1* full length cDNA from chewing cane includes 1438 bp, 362 amino acids. Protein Blast from NCBI database was used to analysis its amino acid sequence, and the results showed that the *SoSgt1* protein have three SGT1 typical conserved domains eg. TPR, CS and SGS, and the similarity among SGT1 of other crops were very high. The expression levels of *SoSgt1* increased after inoculating with *Gibberella fujikuroi*. Based on *SoSgt1* cDNA, two restriction sites were designed and antisense expression vector pCAM-SGT were constructed, in which plant eukaryotic expression vector, pCAMBIA1301, were used as backbone.

Key words: chewing cane; *SoSgt1* gene; cloning; semi-quantitative RT-PCR; vector construction