

樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶基因9和10的克隆、测序及其遗传转化研究*

巩振辉¹, Arvid Gotesson², David A. Jones²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 Plant Cell Biology, Research School of Biological Science, Australian National University, Canberra ACT 2601, Australia)

[摘要] 研究优化了樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶基因9(*Pcpg 9*)和*Pcpg 10*基因克隆的PCR条件, 并对其进行了克隆、测序和遗传转化研究。克隆获得了2个基因, 其大小前者1 059 bp, 后者1 290 bp; 通过构建表达载体和遗传转化获得了2个基因的转基因菌系; 2个基因均能指导合成相应的PG酶蛋白, 其中转化*Pcpg 10*基因的酵母菌所分泌的PG酶活性最强, 对照*A npg I*的PG酶活性次之, *Pcpg 9*的PG酶活性最弱。Western blotting表明, 所克隆的2个基因所指导合成的PG酶蛋白均有不同程度的糖基化。

[关键词] 病原菌; *Pcpg* 基因; 克隆; 测序; 遗传转化; PG活性

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0001-06

植物细胞壁是植物抵御病原菌的物理屏障。病原菌通过分泌细胞壁降解酶分解寄主植物细胞壁, 不仅为其顺利侵入寄主植物组织打开了屏障, 而且从其酶解过程中获得了满足自身生长、繁殖及定殖于寄主植物必需的营养物质。细胞壁降解酶包括多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶裂解酶、果胶甲基酯酶和 β -半乳糖苷酶, 通过作用于中性支链残基而使果胶聚合体的分子质量降低^[1]。由于PG是病原菌侵染寄主植物首先分泌的细胞壁降解酶, 因此, PG的研究受到了广泛的关注。

人们已从许多病原菌中分离出多种PG, 并对其实生化特性进行了较为详尽的研究^[2~10]。然而人们对严重危害生态环境的樟疫霉(*P. cinnamomi*)PG的认识极其浅薄。查新结果表明, 有关*P. cinnamomi* PG(PcPG)的研究尚未见报道。澳大利亚国立大学植物病原菌与植物互作关系研究实验室从构建的PcPG基因组文库中, 筛选出包含多个不同*Pcpg*基因的重组子, 并对这些重组子的PC基因组片段进行了测序分析, 认为PC基因组含有19个*Pcpg*基因(其中2个*Pcpg*基因序列不完整, 3个*Pcpg*假基因, 3个含有突变的*Pcpg*基因)。但对这些基因表达的完整序列、所表达的PG酶活性、是否所有*Pcpg*基因都是有功能的基因尚缺乏认识。围绕这些

问题, 本研究以已有较多研究的*A npg I*(*A. niger*)为对照, 以筛选的携带不同*pg*基因的克隆子——质粒DNA或*P. cinnamomi*基因组DNA为模板, 采用PCR技术克隆获得了*Pcpg 9*和*Pcpg 10*基因; 通过构建2个*Pcpg*基因的表达载体, 将目的基因导入酵母菌, 研究*Pcpg*基因的表达PG酶活性, 旨在进一步分析这些*Pcpg*基因所表达的PG活性及其生化特性, 揭示*Pcpg*基因的分子生物学基础, 为开展疫霉属病原菌抗病基因工程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与来源

供试的樟疫霉菌(*Phytophthora cinnamomi*)系H1000, 酵母菌W303-1B, 大肠杆菌DH5 α 和MJ110以及转化*A npg I*基因的酵母菌菌种, 均由澳大利亚国立大学植物病原菌与植物互作关系研究实验室提供。

1.2 DNA的提取

樟疫霉菌基因组DNA的提取方法按常规方法进行。用于克隆、酶切分析和转化的质粒DNA的提取采用碱解法^[16]。用于测序的质粒DNA的提取和纯化采用QIA GEN公司的QIA prep Spin M in iprep

* [收稿日期] 2003-06-23

[基金项目] 中澳合作项目; 陕西省自然科学基金项目(2001SM11); 陕西省农业分子生物学重点实验室基金项目

[作者简介] 巩振辉(1957-), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术、蔬菜育种与种质资源研究。E-mail: gzh168@yahoo.com.cn

Kit, 提取与纯化方法参照供应商说明。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 PCR 引物设计与耐热聚合酶来源 根据试验初次克隆含有 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因的 PC 基因组片段的重组子序列 *pg* 基因预测信号肽、前肽切割位点近接的 *pg* 基因 5 和 3 的序列(未发表)设计引物, 其引物 PcpG9E1-F (ggcgccatggaaagccgaggatgg)、PcpG9E1-R (gtcgacggttgccaccgcg)、PcpG9E2-F (gtcgacgattcctccactgtgcg)、PcpG9E2-R (tctagactacacagcaatgttt)、PcpG10-F (ggcgccatggaaagccgaggacg) 和 PcpG10-R (tctagactacatcaatgttt) 由 Sigma Genosys Australia Pty. Ltd 公司和 GeneWorks Pty. Ltd 公司合成。PCR 反应所用的耐热聚合酶有 Vent^R 和 RED TaqTM。Vent^R 是 New England Bio-Labs 公司的产品; RED TaqTM 是 SIGMA 公司的产品。

1.3.2 PCR 反应液组成与 PCR 反应条件

Pcpg 9 以基因组 DNA 为模板, *Pcpg 10* 以质粒 DNA 为模板扩增目的基因, 根据测序结果优化 PCR 反应液组成成分的浓度(体积)或改变应用不同的耐热聚合酶, 以扩增获得无突变序列。PCR 扩增在 GeneWorks 的 PTC-200 DNA Engine PCR 机上进行。在对不同基因的 PCR 反应条件进行了优化后, 扩增获得了不同基因或基因片段用于连接和测序。

1.3.3 PCR 产物的纯化、连接与转化大肠杆菌 PCR 反应液经琼脂糖电泳后, 采用 QIA GEN 公司的 QIA quick Gel Extraction Kit 进行目的基因的分离与纯化。其方法步骤参照供应商说明进行。所获得的 PCR 产物, 用 Invitrogen Life Technologies 公司的 pCR-B lunt II -TOPO 或 pCR 2.1 Vector PCR Cloning Kit 进行连接和转化大肠杆菌。其连接与转化方法按供应商提供的说明进行。

1.4 酶切分析与测序

酶切分析所用的限制性内切酶 *A sc I* (10 000 U/mL) 和 *Xba I* (20 000 U/mL) 是 New England BioLabs 公司的产品; *Sal I* (10 000 U/mL) 是 SIGMA 公司的产品。酶解均在 37℃ 下温育 2 h 后, 进行电泳和酶切结果分析。

测序反应液总体积为 10 μL, 其中携带待测序列的质粒 DNA 200 ng, Big Dye terminator (ABI Prism Cycle Sequencing kit) 4 μL, M 13 Forward Primer (1.6 μmol/L) 或 M 13 Reverse Primer (1.6 μmol/L) 1 μL, 最后用 dH₂O 补足 10 μL。测序反应在 PCR 仪上进行, 共进行 24 个循环。每个循环的主要参数是, 变性 95℃ 30 s, 退火 50℃ 15 s, 延伸 60℃ 4 m in, 温度升降时速为 0.5℃ /s。反应后, 将 10 μL 的反应液移至一新的 1.5 mL 离心管, 再加入 3 mol/L 的醋酸钠 (pH 5.2) 1 μL, 无水乙醇 25 μL, 混匀; 放置于 -20℃ 下处理 15~30 m in, 在 15 000 r/m in 下离心 30 m in, 沉降 DNA, 后用 2 倍体积 70% 乙醇冲洗并在室温下干燥。将干燥样品送至澳大利亚国立大学 John Curtin School of Medical Research Biomolecular Resource Facility 上机进行测序。

1.5 酵母菌的遗传转化与质粒DNA的提取

酵母菌的遗传转化按 Daniel 等^[17]的方法进行。酵母菌质粒 DNA 的提取采用 PIERCE 公司的 Y-PERTM Yeast Protein Extraction Reagent 产品, 提取方法参照供应商的说明进行。

1.6 蛋白质的分离与 Western blotting

1.6.1 PG 蛋白质的诱导与分离 为了确定 PG 蛋白质诱导的适宜时间, 以转化 *Anp g I* 的酵母菌为试验材料, 将其接种于 YPD (Bacto-yeast extract 10 g, Bacto-peptone 20 g, Glucose 20 g, H₂O to 1 L, Bacto-agar 20 g) 液体培养基上, 在 30℃, 280 r/m in 下过夜培养。经 1 500 r/m in 离心 5 m in, 弃去培养基, 收集酵母菌于 1.5 mL 离心管。再向离心管中加 1 mL PG 蛋白质诱导培养基 (1 L 转化 PG 基因选择培养基 + 20 g 半乳糖), 然后在 30℃, 280 r/m in 下, 经 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 诱导培养, 在 13 000 r/m in 下离心 5 m in 后, 分别收集酵母菌繁殖体和培养液, 酵母菌繁殖体再经无菌水冲洗和离心 1 次, 最后收集无培养液的酵母菌繁殖体, 并提取其蛋白质。将收集的培养液和提取的蛋白质同时进行 SDS-PAGE 及 Western blotting。根据 Western blotting 结果确定适宜的 PG 蛋白质诱导时间。

1.6.2 Western blotting SDS-PAGE 和 Western blotting 参照文献[16]提供的方法进行。

SDS-PAGE 采用 10% 的分离胶(每次用量 10 mL) 和 5% 的积层胶(每次用量 5 mL)。

Western blotting 采用电转膜(用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 30 mA, 1.5 h)。第一抗体(老鼠单克隆抗体)Anti-HA (使用时用 TBS-T 缓冲液稀释 2 000 倍) 是 Roche 公司产品; 第二抗体 AntiMouse IgG (使用时用 TBS-T 缓冲液稀释 1 000 倍) 是 SIGMA 公司产品。

1.7 PG 活性的检测

PG 活性的检测参照 McKey^[18] 的方法进行。

2 结果与分析

2.1 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因的克隆与测序

以樟疫霉菌(*Phytophthora cinnamomi*)基因组DNA为模板进行PCR扩增,获得了无突变的*Pcpg 9*基因E₁和E₂片段的克隆。

对克隆获得的*Pcpg 10*基因经测序表明,有两处发生同义突变,一处是第400个氨基酸-缬氨酸V(GTA)错配为GTG,另一处是第410个氨基酸-亮氨酸L(TTG)错配为CTG;此外,第390个氨基酸与基因组文库机读结果不一致,基因组文库机读结

果是GCC(丙氨酸A),克隆后测序是GGC(甘氨酸G),在重新核对2次机读序列曲线图后发现,基因组文库机读结果有误。故所克隆获得的*Pcpg 10*基因可用于转化及表达研究。

2.2 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因的连接与遗传转化

2.2.1 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因表达载体的构建与连接 PCR扩增获得了*Pcpg 9*基因的E₁和E₂片段,经测序后,按3段连接法,同时插入pYES2.1酵母菌表达载体的EcoR I-Xba I位点。连接反应液转化大肠杆菌后,菌落PCR(图1)和酶切分析(图2)表明,获得了*Pcpg 9*基因的表达载体。

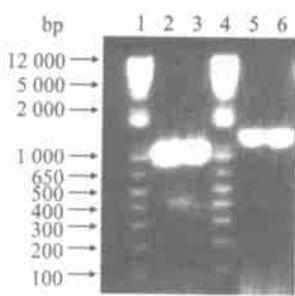


图1 转化*Pcpg 9*和*Pcpg 10*基因的大肠杆菌菌落PCR
1,4. 1 kb plus DNA ladder; 2,3. 转化*Pcpg 9*基因的大肠杆菌
菌落PCR; 5,6. 转化*Pcpg 10*基因的大肠杆菌菌落PCR

Fig. 1 Colony PCR for transformed *E. coli*
lines of *Pcpg 9* and *Pcpg 10*
1,4. 1 kb plus DNA ladder; 2,3. Colony PCR for
transformed *E. coli* lines of *Pcpg 9*;
5,6. Colony PCR for transformed *E. coli* lines of *Pcpg 10*

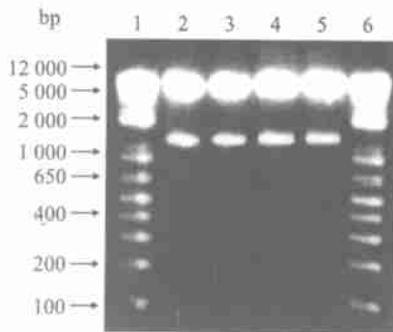


图2 pYES2.1::*Pcpg 9* 表达载体酶切分析
1,6. 1 kb plus DNA ladder; 2~5. *Asc* I-Xba I 双酶解
转化*Pcpg 9*基因的大肠杆菌 1~4号菌落质粒DNA
Fig. 2 Enzyme digestion of pYES2.1::*Pcpg 9*
gene expression vector
1,6. 1 kb plus DNA ladder; 2~5. Plasmid DNA
of colony No. 1,2,3 and 4 in transformed *E. coli*
lines of *Pcpg 9* digested with *Asc* I and *Xba* I

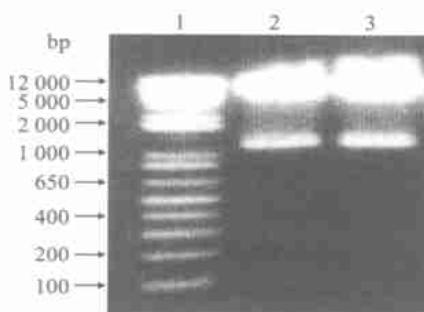


图3 pYES2.1 *Pcpg 10*表达载体酶切分析
1. 1 kb plus DNA ladder; 2~3. *Ascl* I-Xba I 双酶解转化
*Pcpg 10*基因的大肠杆菌 1 和 2 号菌落质粒DNA

Fig. 3 Enzyme digestion of pYES2.1 *Pcpg 10*
gene expression vector
1. 1 kb plus DNA ladder; 2~3. Plasmid DNA
of colony No. 1 and 2 in transformed *E. coli* lines of
Pcpg 10 digested with *Ascl* I and *Xba* I

基因组序列分析表明,*Pcpg 10*基因是一连续完整基因,不含内含子。因此,利用PCR技术分别获

得具有*Ascl* I-Xba I粘性末端的*Pcpg 10*基因,将其连接于pYES2.1酵母菌表达载体的*Ascl* I-Xba I位点。连接反应液转化大肠杆菌后,菌落PCR(图1)和酶切分析(图3)表明,获得了*Pcpg 10*基因的表达载体。

2.2.2 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因的遗传转化 酵母菌菌种W 303-1B与植物不同,不含有*p_g*基因,自身不能合成PG,是研究*p_g*基因遗传转化的理想宿主。将所构建的*Pcpg 9*和*Pcpg 10*基因表达载体分别导入尿嘧啶缺陷型宿主酵母菌种W 303-1B。由于所构建的*p_g*基因表达载体携带尿嘧啶合成基因,因此非转化*p_g*基因系不能在不含尿嘧啶(选择培养基)的培养基上生长,只有转基因系能在选择培养基上生长。通过遗传转化,在选择培养基上分别获得了大量转化上述2个基因的转化菌落。菌落PCR表明,供检测菌落100%携带被转化基因(图4),未发现假阳性现象。这一结果,一方面说明已将2个基因

分别导入了酵母菌,另一方面说明利用尿嘧啶缺陷型选择转化系十分有效。

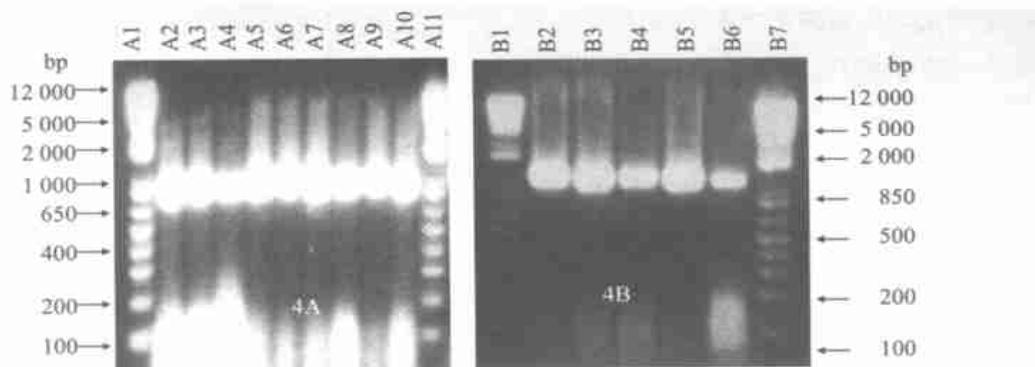


图4 转化 *Pcpg 9* 和 *Pcpg 10* 基因的酵母菌菌落 PCR

A1, A11 和 B1, B7 是 1 kb plus DNA ladder; A2~A10 是转化 *Pcpg 9* 基因的酵母菌 1~9 号菌落 PCR;
B2~B6 是转化 *Pcpg 10* 基因的酵母菌 1~5 号菌落 PCR

Fig. 4 Colony PCR for transformed yeast lines of *Pcpg 9* and *Pcpg 10*

A1, A11, B1 and B7 are 1 kb plus DNA ladder; A2~A10 show colony PCR products from colony 1 to colony 9 of transformed *Pcpg 9* gene; B2~B6 show colony PCR products from colony 1 to colony 5 of transformed *Pcpg 10* gene

2.3 转化 PG 基因系的 Western blotting 与 PG 活性检测

2.3.1 转化 PG 基因系的 Western blotting *pg* 基因的表达载体含有 α 因子前体蛋白序列, 它在 PG 被分泌之前, 通过在信号缩氨酸酶切位点上的信号缩氨酸酶, 及在 Kex2 酶切位点的 Kex2 蛋白酶的酶解作用下, 将 PG 蛋白质裂解下来分泌在细胞外。为了确定转化 *pg* 基因的酵母菌在含有半乳糖的培养液中的适宜诱导培养时间, 进行了 0~24 h 诱导培养试验, 结果表明, *pg* 基因经 4 h 的诱导即可获得较为理想的 Western blotting 结果。

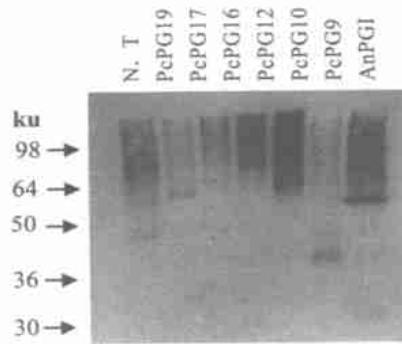


图5 转化 *Pcpg* 基因酵母菌在诱导 4 h 时 PG 蛋白质的 Western blotting

N. T 代表非转化酵母菌

Fig. 5 PG protein Western blotting of transformed *Pcpg* gene yeast line under 4 h inducing with galactose
N. T represents non-transformed yeast line

转化不同 *Pcpg* 基因的酵母菌在含有半乳糖的 PG 诱导培养基上分别经 4 h 的诱导, 采集不同菌系

的诱导培养液作为 SDS-PAGE 样品, 采用第一抗体 Anti-HA (转基因菌系携带 3×HA 标记) 和第二抗体 Anti-Mouse IgG 进行 Western blotting, 结果表明, 同转化 *Anpg 1* 基因的酵母菌菌系一样, 所有供试转化的 *Pcpg* 基因的菌系均出现了大小不同、深浅不一、连续的多条印迹带(图 5)。这一结果同 *A. niger* 和 *B. cinerea*^[15, 19] PG 的报道一致, 说明 PG 的糖基化是一个普遍现象。PG 蛋白质的糖基化可发生在 N-端, 也可发生在 C-端, 其可能功能一是提供稳定性^[20]; 二是对恶劣环境所分泌的酶产生抗性^[21]; 三是 PG 酶活性的关键因素^[22]。

2.3.2 PG 活性的检测 利用含多聚半乳糖醛酸的琼脂糖培养基检测真菌 PG 活性是 Mackay 建立的, 目前已在细菌、真菌和转化 *pg* 基因的酵母菌所分泌的 PG 活性检测上得到了广泛应用。钌红能渗入菌落周围被 PG 酶降解的多聚半乳糖醛酸的琼脂糖培养基的底部, 而使菌落周围培养基着色; 但钌红不能渗入菌落周围未被 PG 酶降解的多聚半乳糖醛酸的琼脂糖培养基的底部, 只能在培养基表面形成一紫红色薄层, 且容易被水冲洗掉。因此, 能分泌具有 PG 活性的转化 *pg* 基因的酵母菌菌落经钌红染色后可在其菌落周围形成紫红色晕圈, 不能分泌具有 PG 活性的转化 *pg* 基因的酵母菌菌落经钌红染色后其菌落周围未发生变化。从理论上来说, 一个酵母菌在相同条件和相同时间培养下, 其菌落经钌红染色后所形成的晕圈越大、越深, 则该菌所分泌的 PG 活力越强; 反之, PG 的活力越弱。

以转化 *A npg I* 基因的酵母菌作为阳性对照, 以未转化的酵母菌 W 303-1B 作为阴性对照, 将转化 *Pcp g 9* 和 *Pcp g 10* 基因的酵母菌接种在含多聚半乳糖醛酸的琼脂糖培养基, 在 28℃ 培养条件下, 分别在第 2 天和第 3 天进行钌红染色。结果表明, *Pcp g 9* 和 *Pcp g 10* 都是有功能的基因, 其转化的酵母菌所分泌的 PG 酶降解了培养基中的多聚半乳糖醛酸, 使钌红渗入其菌落周围培养基而引起着色(图 6)。

除未转化 *pg* 基因的酵母菌所分泌的蛋白质没有 PG 酶活性外, 转化菌均具有活性。但转化不同 *pg* 基因的酵母菌所分泌的 PG 酶活性有差异。转化 *Pcp g 10* 基因的酵母菌所分泌的 PG 酶活性最强, 其次是对照转化 *A npg I*, 而转化 *Pcp g 9* 基因的酵母菌所分泌的 PG 酶活性最弱。

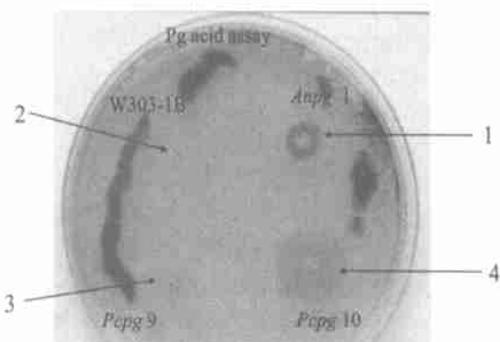


图 6 转化 PG 基因酵母菌 PG 酶活性的测定

1. 阳性对照(*A npg I*); 2. 阴性对照(非转化酵母菌);

3. *Pcp g 9*; 4. *Pcp g 10*

Fig. 6 PG activity of different yeast lines of *Pcp g 9* and *Pcp g 10*

1. Positive control (*A npg I*); 2. Negative control (non-transformed yeast line);

3. PG activity of yeast lines of *Pcp g 9*;

4. PG activity of yeast lines of *Pcp g 10*

[参考文献]

- [1] De Veaal E J I, Grous K C, Huber D J, et al Degradation and solubilization of pectin by γ -galactosidases purified from avocado mesocarp [J]. *Physiol Plant*, 1993, 87: 279- 285.
- [2] Cole A L J. Pectin enzyme activity from *Phytophthora infestans* [J]. *Phytochemistry*, 1969, 9: 337- 340.
- [3] Isshiki A, Akimitsu K, Nishio K, et al Purification and characterization of an endopolygalacturonase from the rough lemon pathotype of *Altinaria alternata*, the cause of citrus brown spot disease [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 52: 155- 167.
- [4] Jarvis M C, Threlfall D R, Friend J. Potato cell wall polysaccharides: Degradation with enzymes from *Phytophthora infestans* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1981, 32: 1309- 1319.
- [5] Lei S P, Lin H C, Heffernan L, et al Evidence that polygalacturonase is a virulence determinant in *Erwinia carotovora* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164: 831- 835.
- [6] Martel M B, Letourneau R, Fevre M. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 1998, 158: 133- 138.
- [7] Martel M B, Letourneau R, Fevre M. Purification of endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: Multiplicity of the complex enzyme system [J]. *Current Microbiology*, 1996, 33: 243- 248.
- [8] Panabieres F, M Araujo A, Le Berre J Y, et al Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryp togea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 996- 1003.
- [9] Pieterse C M J, Van West P, Verbaek H M, et al Structure and genomic organization of the *ipB* and *ipD* gene clusters of *Phytophthora infestans* [J]. *Gene*, 1994, 138: 67- 77.
- [10] Van Santen Y, Benen J A E, Schroter K H, et al 1. 68 Å crystal structure of endopolygalacturonase I from *A sp ergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30474- 30480.
- [11] George J G Ruijter, Jaap Visser. Characterization of *A sp ergillus niger* phosphogluco isomerase. Use for quantitative determination of erythrose 4-phosphate [J]. *Biochimie*, 1999, 81: 267- 272.
- [12] Jacques A E Benen, Harry C M Kester, Jaap Visser. Kinetic characterization of *A sp ergillus niger* N 400 endopolygalacturonases I, II and C [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 259: 577- 585.
- [13] Lucie Parenicova, Harry C M Kester, Jacques A E Benen, et al Characterization of a novel endopolygalacturonase from *A sp ergillus niger* with unique kinetic properties [J]. *FEBS Letters*, 2000, 467: 333- 336.
- [14] Jeffrey W Cary, Robert Brown, Thomas E, et al Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *A sp ergillus parasiticus* [J]. *Gene*, 1995, 153: 129- 133.
- [15] Yovka van Santen, Jacques A E Benen, Klaus-Hasso Schroter, et al 1. 68 Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *A sp ergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1999, 274 (43): 30474- 30480.

- [16] Joseph Sambrook, David W Russell Molecular cloning, a laboratory manual (third edition) [M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [17] Daniel Gietz R, Robin A Woods Transformation of yeast by the lithium acetate/Single-stranded carrier DNA /PEG method[J]. Methods in Microbiology, 1998, 26: 53- 65
- [18] McKay A M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion[J]. FEMS Microbiology Letters, 1988, 56: 355- 358
- [19] Wubben J P, Mulder W, ten Have A, et al Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea* App1[J]. Environ Microbiol, 1999, 65(4): 1596- 1602
- [20] Wyss D F, Wagner G. The structural role of sugars in glycoproteins[J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7: 409- 416
- [21] Rudd P M, Elliott T, Cresswell P, et al Glycosylation and the immune system [J]. Science, 2001, 291: 2370- 2376
- [22] Stratilova E, Markovic O. The glycoprotein character of multiple forms of *A. spargillus* polygalacturonase[J]. J Protein Chem, 1998, 17: 173- 179

Studies on cloning, sequencing and genetic transformation of *Pcpg* (*Phytophthora cinnamomi* polygalacturonase) 9 and *Pcpg* 10

GONG Zhen-hui¹, Arvid Gotesson², David A Jones²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Plant Cell Biology, Research School of Biological Science, Australian National University, Canberra ACT 2601, Australia)

Abstract: *Pcpg* (*Phytophthora cinnamomi* polygalacturonase) 9 and *Pcpg* 10 genes were cloned based on the studying of the PCR composition and its reaction condition of the genes. The sequence and their expression vectors of the genes were done and the genes were transformed to a yeast line of W 303-1B. Then the PG activity of transgenic lines was investigated. The genes were cloned and the size of *Pcpg* 9 was 1 059 bp and *Pcpg* 10 was 1 290 bp. The transgenic yeast lines of *Pcpg* 9 and *Pcpg* 10 genes were obtained respectively. *Pcpg* 9, *Pcpg* 10 and the control, *Anpg* (*A. spargillus niger* polygalacturonase) I could guide to synthesize the PGs. The PG activity of transgenic line of *Pcpg* 10 was the strongest, and that of the *Pcpg* 9 gene was the weakest. Western blotting results showed that there were different degree glycosylation of PGs which were encoded by *Pcpg* 9 and *Pcpg* 10 genes.

Key words: *Phytophthora cinnamomi*; *Pcpg* gene; cloning; sequencing; genetic transformation; PG activity