

## 拟南芥突变体 *npr1-2* 的鉴定及水杨酸感受性分析\*

任 杰<sup>1,2#</sup>, 吴 嘉<sup>1,2#</sup>, 张照利<sup>2,3</sup>, 乔菊香<sup>1</sup>, 王云月<sup>1\*\*</sup>, 杨红玉<sup>2\*\*</sup>

(1. 云南农业大学, 生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214;

3. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:**【目的】拟南芥的 *NPR1* (nonexpresser pathogenesis-related gene 1) 是植物系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 的关键调节基因, SAR 是一种有效的先天免疫反应, 提供广谱抗病性。大量的研究表明: 水杨酸为诱导 SAR 的细胞外信号, 而 *NPR1* 蛋白作为水杨酸的受体串联并启动细胞内的反应。拟南芥突变体 *npr1-2* 是研究拟南芥水杨酸信号转导途径的材料之一。为了筛选出纯合的 *npr1-2* 突变体, 测定纯合突变体中 *NPR1* 基因的表达水平, 鉴定突变幼苗对水杨酸的敏感性。【方法】采用 PCR 扩增、DNA 测序、定量 RT-PCR 以及水杨酸敏感性鉴定等方法。【结果】鉴定并筛选出了 *npr1-2* 纯合突变体, 发现突变体 *NPR1* 基因表达量下调为野生型的 30% 左右, 突变体幼苗对水杨酸的敏感性降低。【结论】*npr1-2* 纯合突变体为进一步的研究奠定了材料基础。

**关键词:** *NPR1*; *npr1-2*; 纯合体; 水杨酸感受性

中图分类号: S 332.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 05-0964-05

## Identification and Salicylic Acid Sensitivity Analysis of *Arabidopsis* Mutant *npr1-2*

REN Jie<sup>1,2</sup>, WU Jia<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhaoli<sup>2,3</sup>, QIAO Juxiang<sup>1</sup>, WANG Yunyue<sup>1</sup>, YANG Hongyu<sup>2</sup>

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Agrobiodiversity and Pest Management, Yunnan Agricultural University,

Kunming 650201, China; 2. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming 650214,

China; 3. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

**Abstract:** [ Purpose ] *NPR1* (nonexpresser of pathogenesis-related gene 1) is a key regulator of SAR (systemic acquired resistance) in *Arabidopsis thaliana*. SAR is an effective innate immune response that provides protection against a broad range of pathogens. Numerous studies have revealed that *NPR1* as a salicylic acid (SA) perception chains together extracellular SA signaling and intracellular resistant reaction. Mutant *npr1-2* is one of the materials for studying SA signal transduction pathway in *Arabidopsis*. The objective of this research is to screen out homozygous *npr1-2* mutants, detection of *NPR1* gene expressional level in homozygous mutants and identification of the sensitivity of mutant seedlings to SA. [ Method ] PCR amplification, DNA sequencing, quantitative RT-

收稿日期: 2017-02-22

修回日期: 2018-07-01

网络出版时间: 2018-10-15

\*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760078, 31260062)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。任杰 (1990—), 男, 山西临汾人, 硕士, 主要从事植物保护学研究。E-mail: 466141779@qq.com; 吴嘉, (1982—), 女, 云南昆明人, 博士研究生, 主要从事植物病理研究。E-mail: wujia020@sina.com

\*\*通信作者 Corresponding authors: 王云月 (1962—), 女, 贵州遵义人, 博士, 教授, 主要从事利用生物多样性控制病虫害促进种质资源保护研究。E-mail: 1371209436@qq.com; 杨红玉 (1960—), 女, 云南昆明人, 博士, 教授, 主要从事植物生理学与分子生物学研究。E-mail: yanghongyukm@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201702032](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201702032)

PCR detection and SA sensitivity analysis approaches were used in this study. [Result] The homozygous *npr1-2* mutant was obtained. And the dramatic reduction in expression of *NPR1* in the homozygous *npr1-2* mutant, to about 30% of wild type plants has been found by qRT-PCR detection. Compared with the wild type, the sensitivity of homozygous *npr1-2* seedling roots to high concentration SA was decreased. [Conclusion] The homozygous mutant of *npr1-2* can provide the material for further research.

**Keywords:** *NPR1*; *npr1-2*; homozygote; salicylic acid sensitivity

*NPR1* (nonexpresser of pathogenesis-related genes1) 基因在植物的系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 中起关键的作用<sup>[1]</sup>。SAR 为存在于植物中、以病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR) 表达为特征的广谱抗性, 并需要水杨酸 (salicylic acid, SA) 信号转导的诱导<sup>[2]</sup>。CAO 等<sup>[3]</sup>在 1994 年分离到 1 株缺乏水杨酸-2, 6-二氯异烟肼 (2,6-dichloroisonicotinic acid, INA) 表达的拟南芥 *npr1* 突变株, 该植株不能对各种 SAR 诱导物处理做出应答反应。随后 *NPR1* 得到了广泛深入的研究<sup>[4]</sup>, 并成为植物水杨酸介导的抗病信号转导通路的标志基因。因此, 在涉及水杨酸信号转导途径的研究中, *npr1* 是一个重要的实验材料。本研究对经 EMS (ethylmethane sulfonate) 诱变的拟南芥 *npr1-2* 突变体的纯合性进行了检测, 然后利用 qRT-PCR 技术对 *NPR1* 基因表达水平进行测定, 并用水杨酸敏感性试验加以验证, 为进一步研究 *NPR1* 与其他基因的关系, 以及为水杨酸信号途径的功能研究提供试验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和种植管理

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Columbia (Col-0) 生态型。*npr1-2* 突变体购自美国 Lehle seeds 公司, 为 Col-0 生态型背景。种子用次氯酸钠消毒液浸泡 10~15 min 进行表面消毒; 灭菌水冲洗 3~5 次, 确保冲洗干净。将种子点播在固体 Murashige Skoog (MS) 培养基上, 培养皿用 parafilm 封口膜封口, 置于 4 °C 冰箱中 2~3 d 进行春化处理。然后移入 12 h 光照/12 h 黑暗、22 °C 的光照培养箱中。培养 1 周后, 将幼苗逐苗移栽到装有 *V*(营养土):*V*(蛭石) 为 2:1 的小盆中, 浇适量水后盖上透明塑料薄膜并放入组培室中培养, 3 d 后揭去薄膜, 在拟南芥的生长过程中注意定期浇水和除虫管理。用于水杨酸敏感性试验的拟

南芥种子播于含有 28 μmol/L 水杨酸的 MS 培养基上, 进行垂直培养, 以便观察根的生长情况。组培室的条件为: 光照强度约 50 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 12 h 光照/12 h 黑暗, 相对湿度 60%~70%, 温度 22~23 °C。

### 1.2 基因组 DNA 提取

按 Edwards 法提取<sup>[5]</sup>: 从拟南芥植株上剪取叶子 1~2 片, 置于 1.5 mL 的离心管中研磨成匀浆。加入 400 μL 的 Edwards 提取液研磨后 12 000 r/min 离心。上清转移用异丙醇混匀, 冰浴或 -20 °C 放置 5~10 min。12 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 70% 的乙醇洗 1 次, 在空气中干燥, 溶于 20~50 μL 的灭菌水中, -20 °C 保存备用。

### 1.3 纯合突变体的鉴定

*npr1-2* 为经化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (ethylmethane sulfonate, EMS) 诱变的点突变体<sup>[3]</sup>, 在 *npr1-2* 的突变点附近, 设计 *NPR1* 鉴定引物: 5'-A GACTCTTGCCCTCTTAGTGT-3'; 5'-GAGCGAAA CTATATGACGCC-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。进行 PCR 反应, 琼脂糖凝胶电泳, DNA Marker 为 Biomed 公司的 BM2000+。电泳后, 将清晰明亮的条带切下, 由上海 life 有限公司测序, 将测序结果与网站序列进行比对。

### 1.4 荧光实时定量 PCR

利用 Trizol 法提取拟南芥组织总 RNA, 用分光光度计 (NanoDrop 2000 Thermo Scientific, USA) 测定浓度及 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照 HiScript II Q RT SuperM.ix for qPCR (+gDNA wiper)(Vazyme, R223-01) 说明操作, 将待测 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录完毕后加入 90 μL Nuclease-free H<sub>2</sub>O 储存在 -20 °C 冰箱备用。实时荧光定量 RT-PCR 测定利用 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit 试剂盒 (Qia gen, Germany) 在 LightCycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪 (Roche, Swiss) 上进行反应, 以 18S rRNA 基因作为内参, 每个样品做 3 次重复。

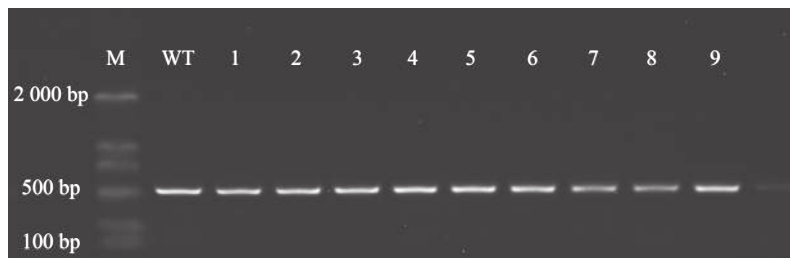
## 2 结果与分析

### 2.1 突变位点和纯合性鉴定

*npr1-2* 为 EMS 诱变碱基替换突变, 在突变位置附近设计引物, *npr1-2* 的两引物之间的长度为 575 bp; 试验提取了 9 个不同 *npr1-2* 突变体株系叶片的 DNA, 用所设引物进行 PCR 扩增, 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果得到了 9 条预期

的扩增条带 (图 1)。切割条带, 进行 DNA 碱基序列的测定 (图 2)。

将测序结果在 TAIR 网上与 *NPR1* 基因的序列进行对比, 结果显示: *npr1-2* 突变体的第 152 个碱基 G 突变成了 A, 即由野生型的半胱氨酸 TGC 突变为酪氨酸 TAC, 符合 *npr1-2* 所产生的点突变 (图 2)<sup>[1]</sup>。同时检测到 *npr1-2* 的杂合体和纯合体 (图 3), 保存纯合的 *npr1-2*。



注: M. BM2000+ Marker; WT. 野生型; 1~9. 9 个不同 *npr1-2* 株系。

Note: M. BM2000+ Marker; WT. wild type; 1~9. nine different strains of mutant *npr1-2*.

图 1 *npr1-2* 突变位点片段的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of mutant segment in *npr1-2* plant by PCR

```

001-050 GGCCTTAGAG GGAGATGACT CCAACAACAC CGCCGCCGTG AAGCTCGAGC
051-100 TTAAGGAGAT TGCCAAGGAT TACGAAGTCG GTTTCGATTC GGTTGTGACT
101-150 GTTTTGGCTT ATGTTTACAG CAGCAGAGTG AGACCGCCGCCTAAAGGAG
151-200 TTTCTGAAATACAGACGAG AATTGCTGCC ACGTGGCTTG CCGGCCGGCG
201-250 GTGGATTTC TGTGGAGGT TCTCTATTG GCTTTCATCT TCAAGATCCC
251-300 TGAATTAATT ACTCTCTATC AGGTAAAACA CCATCTGCAT TAAGCTATGG
301-350 TTACACATTC ATGAATATGT TCTTACTTGA GTACTTGTAT TTGTATTCA
351-400 GAGGCACTTA TTGGACGTTG TAGACAAAGT TGTTATAGAG GACACATTGG
401-450 TTATACTCAA GCTTGCTAAT ATATGTGGTA AAGCTTGTAT GAAGCTATTG
451-500 GATAGATGTA AAGAGATTAT TGTCAGTCT AATGTAGATA TGGTTAGTCT
501-550 TGAAGAGTCA TTGCCGGAAG AGCTTGTTAA AGAGATAATT GATAGACGTA
551-575 AAGAGCTTGG TTTGGAGGTA CCAAA
  
```

图 2 *npr1-2* 突变片段的测序结果以及突变位点检测

Fig. 2 The sequencing results of mutant segment in *npr1-2* plant

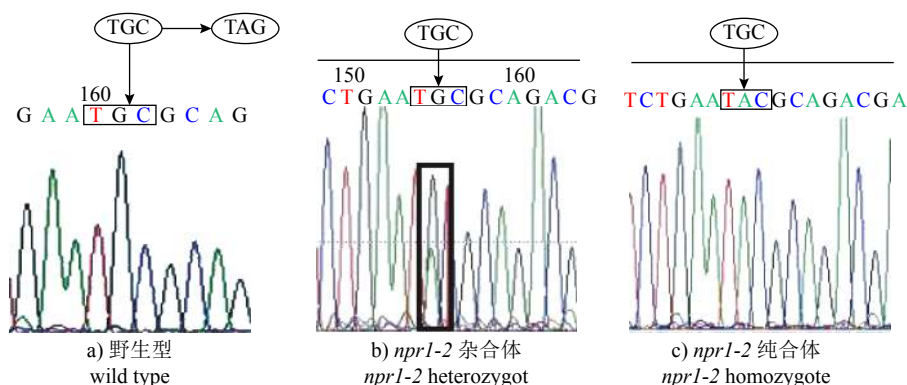


图 3 *npr1-2* 突变体的测序以及突变纯合性鉴定

Fig. 3 Identification of point mutation in *npr1-2* plant

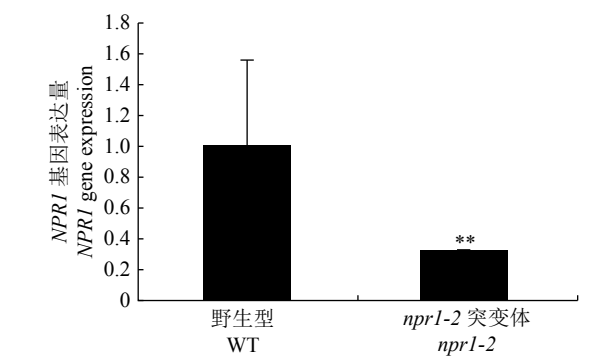
## 2.2 纯合突变体 *npr1-2* 中 *NPR1* 基因的表达水平检测

通过利用荧光实时定量 PCR 对 *npr1-2* 纯合突变体植株中 *NPR1* 基因的表达量进行分析发现: 突变体突变后, *NPR1* 基因表达量明显下调(图 4)。

## 2.3 突变体对水杨酸的敏感性试验

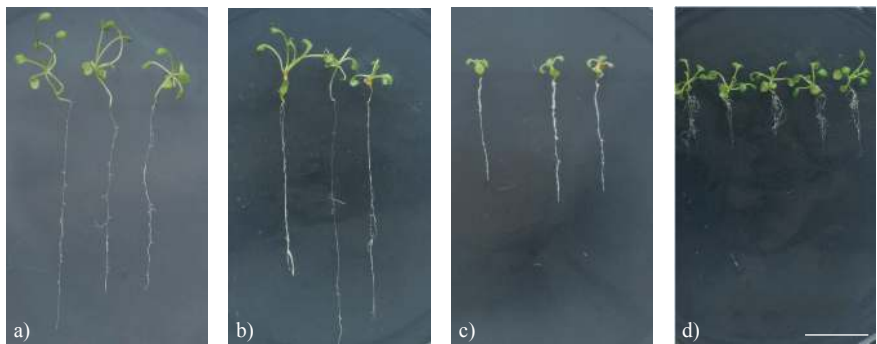
*NPR1* 在植物系统获得性抗性诱导中发挥作用的分子机制目前比较清楚, *NPR1* 蛋白被认为是水杨酸的受体, 通过感受和调节水杨酸的信号转导来启动病程相关基因 (*PR*) 的转录<sup>[4, 6]</sup>。因此 *NPR1* 突变后, 植株对水杨酸的敏感性降低。利用高浓度水杨酸会抑制拟南芥根生长的特性, 本研究将拟南芥种子播种于含水杨酸的 MS 培养基上, 观察拟南芥幼苗的根生长情况, 以了解突变体对水杨酸的响应变化。将 *npr1-2* 纯合突变体和野生型种子播于含有 28  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸的培养基上, 20 d 时观察到野生型幼苗生长受到严重抑制, 而

*npr1-2* 突变体幼苗的生长受抑程度显著低于野生型, 即其根长明显长于野生型(图 5, 表 1)。上述研究结果表明: *npr1-2* 纯合突变体对水杨酸敏感性下降是由 *NPR1* 基因表达量下调引起的。



注: \*\*表示差异性达 1% 极显著水平。  
Note: \*\* indicates significant difference at 1% level.

图 4 野生型和 *npr1-2* 突变体中 *NPR1* 基因表达量  
Fig. 4 Expression of *NPR1* gene in wild type and *npr1-2* mutant plants



注: a) 野生型幼苗在不含 SA 的培养基上根生长情况; b) *npr1-2* 幼苗在不含 SA 的培养基上根生长情况; c) *npr1-2* 幼苗在含 28  $\mu\text{mol/L}$  SA 的培养基上根生长情况; d) 野生型幼苗在含 28  $\mu\text{mol/L}$  SA 的培养基上根生长情况。  
Note: a) root growth of WT seedlings on medium without SA; b) root growth of *npr1-2* seedlings on medium without SA; c) root growth of *npr1-2* seedlings on medium containing 28  $\mu\text{mol/L}$  SA; d) root growth of WT seedlings on medium containing 28  $\mu\text{mol/L}$  SA.

图 5 野生型与 *npr1-2* 根对水杨酸的敏感性试验 (Bar=1 cm)

Fig. 5 Response of wild type and *npr1-2* seedlings to salicylic acid treatment

表 1 水杨酸处理后野生型与 *npr1-2* 突变体根生长长度

Tab. 1 Length of roots in wild type and *npr1-2* mutant plants treated with salicylic acid

| 植物类型 plant type                           | 处理 treatment                      | 根长度/cm length of roots |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 野生型 wild-type                             | 未处理 untreated                     | 3.448±0.566 a          |
| <i>npr1-2</i> 突变体 mutant of <i>npr1-2</i> | 未处理 untreated                     | 3.137±0.664 ab         |
| 野生型 wild-type                             | 水杨酸处理 treated with salicylic acid | 0.802±0.035 Ac         |
| <i>npr1-2</i> 突变体 mutant of <i>npr1-2</i> | 水杨酸处理 treated with salicylic acid | 1.731±0.050 BC         |

注: 同列中不同小写字母表示差异性达 5% 显著水平; 不同大写字母表示差异性达 1% 极显著水平。  
Note: Different lowercases within the same column indicate significant difference at 5% level; different capital letters within the same column indicate significant difference at 1% level.

### 3 讨论

通过试验得到了拟南芥水杨酸信号转导缺陷突变 *npr1-2* 纯合植株, 以此为材料, 进行了实时荧光定量 RT-PCR 以及水杨酸敏感性鉴定实验, 结果显示: 纯合突变体 *npr1-2* 中 *NPR1* 基因表达量明显下调, 并且突变体幼苗对水杨酸的敏感性显著降低。NPR1 蛋白含有 2 个保守的蛋白-蛋白互作结构域, 即 N 末端的 BTB/POZ 和中部的锚蛋白重复结构域, *npr1-2* 突变发生在锚蛋白重复结构域中, 使半胱氨酸 (150 氨基酸残基) 突变为酪氨酸 (400 氨基酸), 导致无义密码子, 产生丢失 194 个氨基酸 C 末端缺乏的水杨酸受体位点消失的截短蛋白<sup>[1]</sup>。CAO 等<sup>[1]</sup>研究表明: *npr1* 突变体具有对外施高浓度 (5 mmol/L) 水杨酸敏感的类型, 认为是 *npr1* 突变体解毒功能下降所致, 但没有呈现具体的实验结果。本研究将纯合的 *npr1-2* 突变体和野生型种子播种于含 28  $\mu$ mol/L 水杨酸的 MS 中, 垂直培养 20 d, 发现水杨酸抑制了植物幼苗根的生长, 但 *npr1-2* 幼苗根的生长抑制程度明显低于野生型, 我们推测 *npr1-2* 突变体对水杨酸感受的顿挫, 导致其对较低浓度作为信号分子的水杨酸的敏感性降低。

### [ 参考文献 ]

- [1] CAO H, GLAZE BROOK J, CLARKE J D, et al. The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. Cell, 1997, 88(1): 57. DOI: [10.1016/S0092-8674\(00\)81858-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81858-9).
- [2] KUMAR D. Salicylic acid signaling in disease resistance [J]. Plant Science, 2014, 228: 127. DOI: [10.1016/j.plantsci.2014.04.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014).
- [3] CAO H, BOWLING S A, GORDON A S et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. Plant Cell, 1994, 6: 1583. DOI: [10.1105/tpc.6.11.1583](https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1583).
- [4] PAJEROWSKA-MUKHTAR K M, EMERINE D K, MUKHTAR M S. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18: 402. DOI: [10.1111/j.1365-2966.2011.18381.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2011.18381.x).
- [5] EDWARDS K J, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genome DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 1349. DOI: [10.1093/nar/19.6.1349](https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349).
- [6] WU Y, ZHANG D, CHU J Y, et al. The *Arabidopsis* *NPR1* protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid[J]. Cell Reports, 2012, 1(6): 639. DOI: [10.1016/j.celrep.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008).

责任编辑: 何承刚