

柑橘类枯草杆菌蛋白酶基因 *CcSubtilisin* 的克隆及遗传转化^①

吴天利^{1,2}, 李 菊³, 张永艳², 胡敏伦²,
闫化学², 姜 波², 谢 丹², 袁超力², 钟广炎²

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 广东省农业科学院 果树研究所, 广州 510640;
3. 四川省农业科学院 园艺研究所, 成都 610066

摘要: 以克里曼丁橘 [*Citrus clementina*] 叶片 RNA 为材料, 采用 RT-PCR 技术克隆获得了一个编码类枯草杆菌蛋白酶的基因, 命名为 *CcSubtilisin*. 该基因的开放阅读框(ORF)长度为 2 337 bp, 预测可编码 778 个氨基酸残基的多肽. 分析发现 *CcSubtilisin* 与拟南芥、蓖麻、番茄、毛果杨、大豆、挪威云杉、欧洲桉木、百合等 18 个物种的同源蛋白具有相同的 4 个保守区域, 属于枯草杆菌蛋白酶. 通过构建该基因的超表达载体并以沙田柚为材料进行遗传转化, 获得了该基因的 9 个转基因沙田柚株系. 实时定量 PCR 结果表明, 4 个用于检测的株系中有 3 株的表达量明显高于对照.

关键词: 丝氨酸蛋白酶; 枯草杆菌蛋白酶; 基因克隆; 序列分析; 遗传转化

中图分类号: S666.2; Q785

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)07-0059-08

丝氨酸蛋白酶(Serine protease)是一类催化活性依赖于丝氨酸残基的蛋白水解酶, 参与种子萌发、幼苗发育^[1-2]、超敏反应(Hypersensitive response, HR)^[3]、细胞分裂、组织分化、器官衰老^[4]、果实成熟^[5]、细胞程序性死亡及细胞凋亡^[6]等过程. 丝氨酸蛋白酶可大致分为 30 个家族, 6 个大类^[7]. 其中类枯草杆菌蛋白酶类由 200 多个不同的家族成员组成^[8]. 在植物中已有大量关于类枯草杆菌蛋白酶基因的研究报道, 包括拟南芥(*Arabidopsis*) *ALE1*^[2], *AIR3*^[9], *SDD1*^[10], *Ara12*^[11]; 番茄(*Tomato*) *P69(A-D)*^[12], *P69(E-F)*^[8]; 普通赤杨(*Alnus glutinosa*) *agl2*^[5]; 大豆(*Soybean*) *SCS1*^[1], *SLP1*, *SLP2*^[13] 和木麻黄(*Casuarina glauca*) *cg12*^[14]等.

类枯草杆菌蛋白酶基因与抗病性相关. 番茄 *P69B* 和 *P69C* 在丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) 感染和水杨酸(*Salicylic acid*) 诱导下表达^[12], *P69E* 和 *P69F* 也参与对病原入侵的抵御^[8]. 在本实验室前期研究中, 钟云^[15]以黄龙病(HLB)侵染的红橘根系为材料, 通过转录组测序发现一个类枯草杆菌蛋白酶基因(*CICLE_v10027863mg*, *CcSubtilisin*) 的表达上调达 5.53 倍, 通过 iTRAQ 分析发现该基因编码的蛋白水平上调 3.9 倍, 说明该基因及其蛋白受 HLB 侵染诱导, 可能在柑橘宿主与黄龙病菌的互作中起重要作用. 本试验以克里曼丁橘(*Citrus clementina*) 为材料, 对该基因进行了克隆

① 收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 国家国际科技合作项目(2012DFA30610); 广东省自然科学基金(S2013010015149); 广东省科技计划项目(2012A020200016, 2012B091100169); 广东省科技计划项目(2012B050700006).

作者简介: 吴天利(1988-), 女, 四川宜宾人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究.

通信作者: 钟广炎, 研究员.

和序列分析. 同时还获得了一批过量表达该基因的转基因沙田柚植株, 为了解 *CcSubtilisin* 在柑橘抗病防御中的作用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

叶片采自广东省农业科学院果树研究所温室里正常生长的克里曼丁橘. 沙田柚 [*Citrus maxima* (L.) Osbeck cv ‘Shatianyou’] 果实购自广东梅龙柚股份有限公司. 用于基因克隆的连接载体 pEASY-T1 和大肠杆菌 (*E. coli* DH5 α) 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司. pFGC5941 载体和 EHA105 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌种由广东省农业科学院果树研究所保存.

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 和 RNA 提取及 cDNA 的合成

利用东盛生物科技有限公司植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA. 使用百泰克生物技术有限公司多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒提取叶片 RNA. 用于基因克隆的 cDNA 的合成使用 TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit. 实时定量 cDNA 用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 来合成.

1.2.2 *CcSubtilisin* 基因的克隆及序列分析

以克里曼丁橘叶片 cDNA 为模板, 用特异基因引物 SubtilisinF(tt GGC GCG CCA TGG CAA A TT TCA ATC CTT TCA) 和 SubtilisinR(ctag TCT AGA TCA CGG CCA GTG ACC GG) 进行 PCR 扩增得到目的序列. 为便于过量表达载体的构建, SubtilisinF/R 引物 5' 端分别添加了 *Asc* I 和 *Sma* I 酶切位点及保护碱基(划线部分). 所得 PCR 产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定所得扩增片段与目的基因片段大小一致后, 再将 PCR 产物送往北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 以进一步验证所得扩增片段的核苷酸序列.

利用 BioEdit 软件对测序结果进行分析, 核苷酸和氨基酸序列相似性分析分别使用 NCBI 在线网站 Blastn\Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 DNAMAN 软件. 蛋白质氨基酸组成等分析使用 ExPASy-ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析软件. 进化树构建使用 MEGA5.0 的邻接法(Neighbor joining, NJ). 启动子序列分析利用启动子预测网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和顺式作用元件预测软件 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>).

1.2.3 基因过量表达载体的构建及农杆菌转化

使用 pFGC5941 来构建 *CcSubtilisin* 的过量表达载体. 用酶 *Asc* I 和 *Sma* I 对基因和载体 pFGC5941 进行双酶切, 再用 DNA Ligase Kit(TaKaRa) 连接目的片段和载体骨架, 进行遗传转化并扩繁培养. 重组质粒经基因特异引物 SubtilisinF/SubtilisinR 和载体引物 P1(AGC AAG TGG ATT GAT GTG AC-3')/P2(GGT AAG GAT CTG AGC TAC AC) 双重 PCR 鉴定为阳性后, 得到过量表达载体 pFGC5941-*CcSubtilisin*. 并用电激法将重组质粒转入根癌农杆菌 EHA105, 命名为 pFGC5941-*CcSubtilisin*-105. 农杆菌转染柑橘上胚轴具体的方法步骤参考贝学军等人^[16]的方法. 待嫁接成活的抗性幼芽长出 5~6 片幼叶时, 采叶片提取 DNA^[17]. 用载体 Basta 基因引物 BAR F(TGC ACC ATC GTC AAC CAC TAC ATC)/BAR R(GCT GCC AGA AAC CCA CGT CAT) 进行 PCR 检测, 以鉴定是否含转基因 DNA.

1.2.4 实时荧光定量分析

转基因植株中 *CcSubtilisin* 基因的表达情况分析采用该基因特异性引物 RT-SubtilisinF/R, 以柑橘 β -actin 作为相对定量的内参基因. 提取 4 株转基因沙田柚(Sub-1, Sub-2, Sub-3, Sub-4) 和 1 株嫁接于酸柚上的非转基因沙田柚叶片总 RNA^[18], 以其为模板合成 cDNA. 实时荧光定量 PCR 扩增反应在 Bio-RAD CFX

Connect™ Real-Time System(美国)上进行. 反应体系(20 μ L): 10 μ L 2 $\times$ SYBR® Premix Ex Taq, 正反引物各 0.5 μ L, cDNA1.0 μ L, 补足双蒸水至 20 μ L. PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 共 40 个循环, 再从 75 $^{\circ}$ C 每隔 10 s 上升 0.2 $^{\circ}$ C 最终至 95 $^{\circ}$ C.

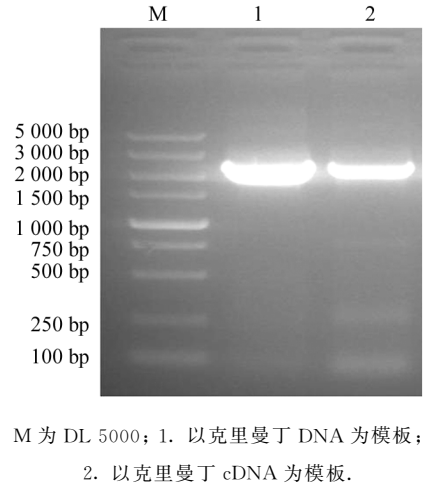
2 结果与分析

2.1 基因的克隆及序列分析

以克里曼丁橘叶片为材料提取 RNA, 反转录成 cDNA 并以其为模板用特异基因引物 SubtilisinF 和 SubtilisinR 进行 PCR 扩增, 克隆扩增子后测序. 结果表明: 克隆得到的 *CcSubtilisin* cDNA 特异条带大小约为 2 300 bp, 测序证实为 2 337 bp, 与克里曼丁橘相应基因的编码序列(CICLE_v10027863mg)仅相差 3 个碱基. 该基因的起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA, 表明已获得全长开放读码框. 用基因组 DNA 作为模板, 在相同的 PCR 条件下扩增出一条与上述编码序列长度相同的片段(图 1), 说明该基因不含内含子.

2.2 基因编码氨基酸序列推导及理化性质分析

根据 *CcSubtilisin* 基因的编码序列, 推导出开放阅读框可编码含有 778 个氨基酸残基的蛋白质(图 2). 该蛋白含有类枯草杆菌蛋白酶共有的 PA 结构域, 分子式为 C₃₇₈₆H₅₇₉₉N₁₀₀₉O₁₁₂₆S₂₈, 分子量为 84 364.4, 理论等电点为 6.39, 不稳定指数为 47.03, 脂肪系数值为 80.67. 由于其总平均亲水指数为-0.087, 故该蛋白属于亲水性蛋白. 分析其氨基酸组成, 发现含量最高的是丙氨酸 Ala(10.2%), 其次是丝氨酸 Ser(8.6%)、甘氨酸 Gly(8.0%), 其中, 带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 66, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 59.



M 为 DL 5000; 1. 以克里曼丁 DNA 为模板;
2. 以克里曼丁 cDNA 为模板.

图 1 克里曼丁中 *CcSubtilisin* 基因的克隆

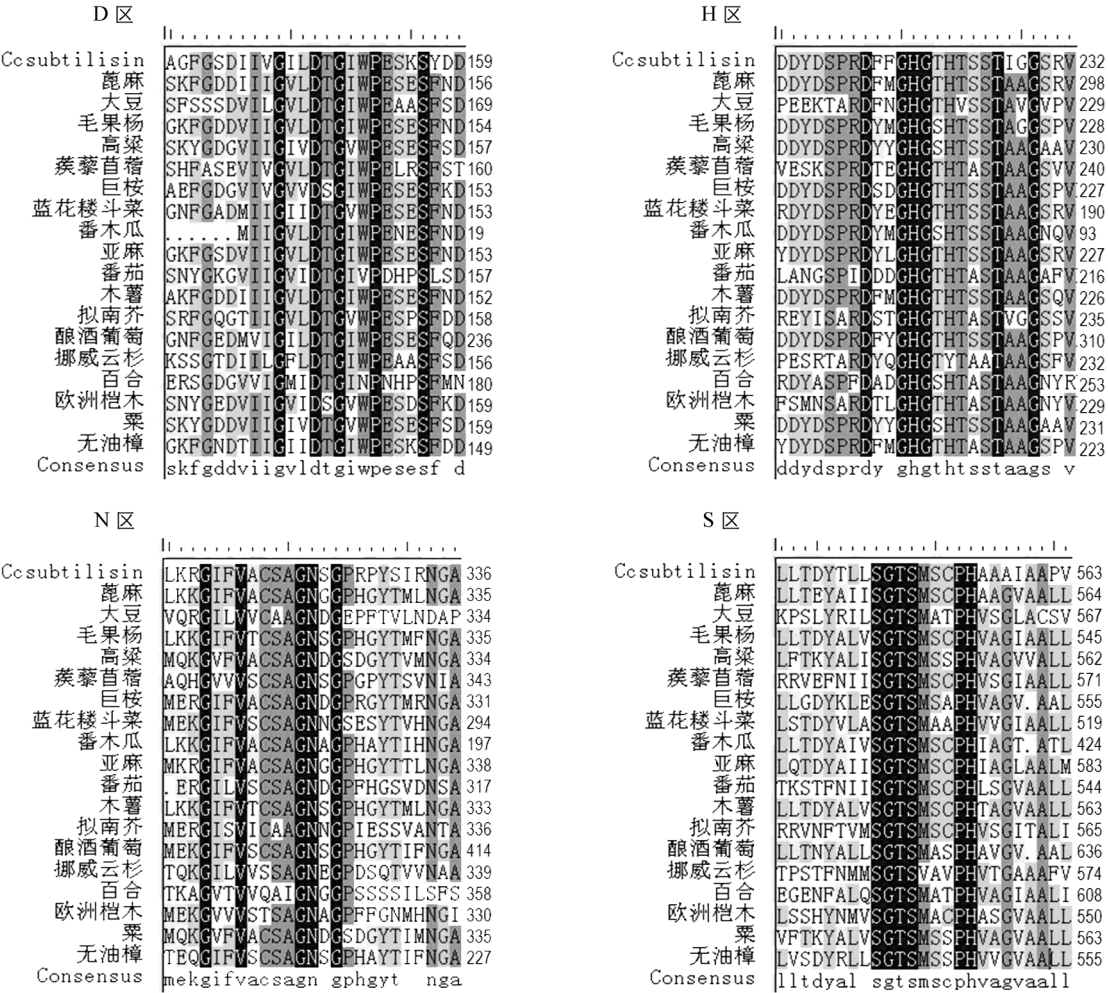


圆点表示蛋白质形成的催化三联体活性位点(D区、H区和S区)和保守的天冬酰胺位点(N), 黑色线条表示蛋白质结构域 PA 结构域.

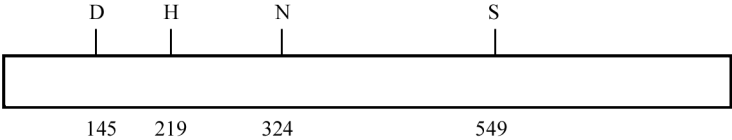
图 2 *CcSubtilisin* 基因的编码序列及推导的氨基酸序列

2.3 氨基酸同源性分析及分子进化树的构建

Blastn 比对分析结果显示, *CcSubtilisin* 与各物种同源蛋白的核苷酸序列相似性比较低. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、大豆(*Glycine max*)、挪威云杉(*Picea abies*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、欧洲桤木(*Alnus glutinosa*)和百合(*Lilium longiflorum*)等 18 个物种的同源蛋白氨基酸多重序列比对结果表明, 柑橘 *CcSubtilisin* 及其它植物的枯草杆菌蛋白酶均有 4 个十分保守区域(天冬氨酸 D 区、组氨酸 H 区、天冬酰胺 N 区和丝氨酸 S 区)(图 3(a)). 其中 D₁₄₅, H₂₁₉ 和 S₅₄₉ 残基形成一个催化三联体活性位点(图 3(b)), N₃₂₄ 残基是底物结合位点.



(a) *CcSubtilisin* 及其同源蛋白氨基酸序列上 4 个保守区的多重序列比对结果



(b) 催化三联体活性位点 (D, H 和 S 残基) 和保守区的多重序列比对结果

图 3 氨基酸同源性分析

以柑橘及其它 18 个物种的 *Subtilisin* 同源蛋白的氨基酸序列聚类结果构建的蛋白质分子进化树见图 4. 图 4 中显示, 与柑橘 *CcSubtilisin* 亲缘关系最为相近的是番木瓜的同源蛋白序列, 其次是木薯.

2.4 启动子分析

从 NCBI 网站下载到克里曼丁基因组中 *CcSubtilisin* 基因上游 1 500 bp 核苷酸序列, 分析其所含作

用元件, 发现有许多重要的与逆境相关的调控元件, 包括感应水杨酸及伤害信号的元件 W-Box, 乙烯反应元件 ERE, 赤霉素上调蛋白表达响应元件 CAREs(CAACTC 调控元件), 生长素响应元件 CATATG, 感应病原入侵和盐胁迫元件 GT-1 motif, 参与调控脱水胁迫的元件 MYBCORE 和 MYC, 赤霉素诱导元件 Pyrimidine box, 糖胁迫元件 SRE, 感应生长素和水杨酸的 ASF1MOTIF, 以及典型的 CAAT-box 和 TATABOX 元件等.

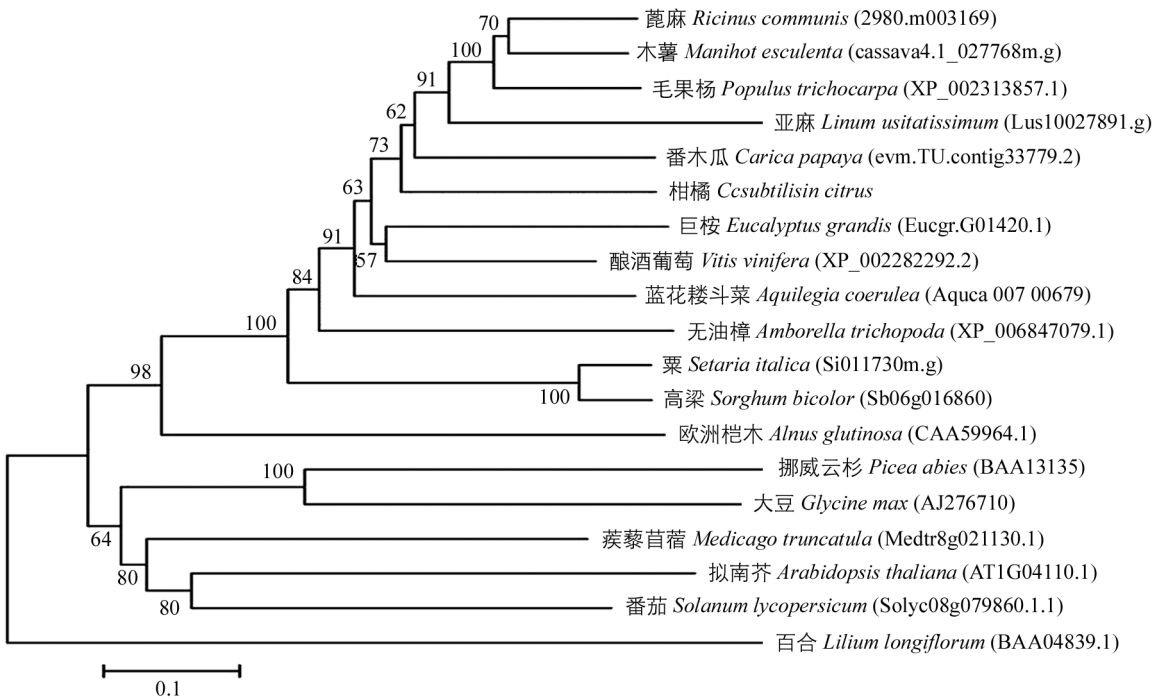


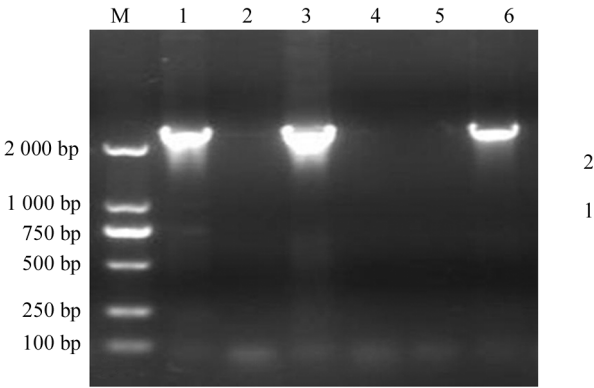
图 4 柑橘 *CcSubtilisin* 与其他物种中相似蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

2.5 过量表达载体 pFGC5941-*CcSubtilisin* 的构建及转入根癌农杆菌

将克隆获得的含 *CcSubtilisin* cDNA 的质粒与载体 pFGC5941 质粒分别进行 *Asc* I / *Sma* I 双酶切, 胶回收目的基因片段和载体骨架片段, 连接二者, 然后转化、培养大肠杆菌, 提取重组质粒用基因特异引物进行 PCR 验证. 重组质粒 pFGC5941-*CcSubtilisin* 经电击法转入根癌农杆菌 EHA105. 转化子在含有卡那霉素和利福平的 LB 平板上筛选培养, 挑取抗性单克隆进行 PCR 检测, 结果表明载体已成功转入农杆菌(图 5).

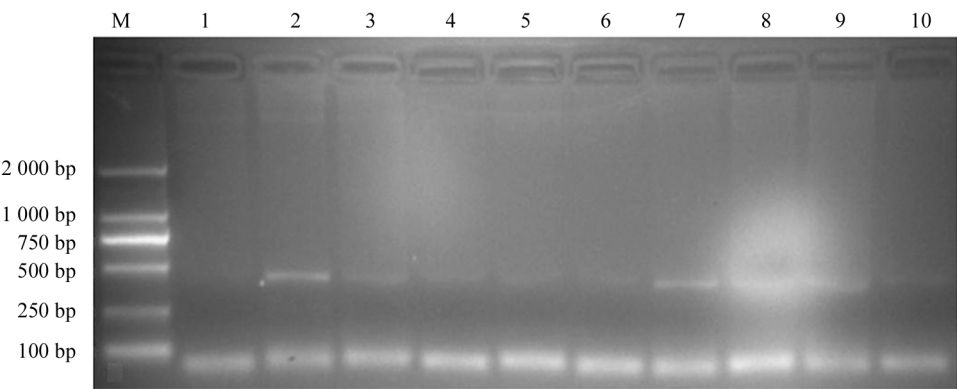
2.6 沙田柚转基因植株的鉴定

通过将沙田柚幼苗的上胚轴与根癌农杆菌共培养转化后置抗性培养基上培养, 获得抗性再生芽. 待抗性芽幼叶长至呈深绿色时, 将其连同上胚轴嫁接到一年生的酸柚砧木上. 待嫁接苗长出 5~8 片真叶时, 取叶片提取 DNA, 用 BAR 引物进行 PCR 检测. 结果表明共得到 9 棵阳性植株(图 6).



M 为 DL2000 DNA marker; 1—6 为待检测的农杆菌, 其中 1,3,6 号检测为阳性菌株.

图 5 农杆菌菌液 PCR 检测



M 为 DL2000 DNA marker; 1—10 为待检测的转基因植株。

图 6 转基因植株 BAR 引物检测结果

2.7 转基因植株 *CcSubtilisin* 表达分析

提取 4 株转基因沙田柚 (Sub-1, Sub-2, Sub-3, Sub-4) 和 1 株嫁接于酸柚上的非转基因沙田柚叶片总 RNA, 用于实时定量分析转基因植株中 *CcSubtilisin* 基因的表达情况. 结果表明 4 株转基因沙田柚中, 有 3 株转基因沙田柚的 *CcSubtilisin* 表达量高于对照, 其中 Sub-1 的表达量最高, 约为对照的 3.5 倍(图 7).

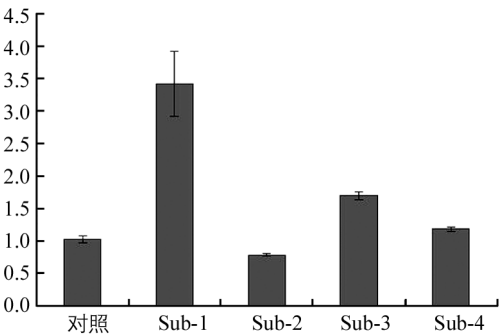


图 7 转基因植株中 *CcSubtilisin* 基因的表达分析

3 讨 论

本实验通过 RT-PCR 从克里曼丁叶片的 cDNA 中成功克隆了一个受 HLB 诱导的柑橘枯草杆菌蛋白酶基因 *CcSubtilisin*. *CcSubtilisin* 蛋白具有类枯草杆菌蛋白酶家族蛋白的保守 PA 结构域和 4 个高度保守区(D 区、H 区、N 区和 S 区). 丝氨酸蛋白酶是重要的蛋白水解酶, 约有 30 个家族, 分属于六大类: A 类, 糜蛋白酶(Chymotrypsin); B 类, 类枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin-like protease); C 类, 羧肽酶 C(Carboxypeptidase C); E 类, 丙氨酸蛋白酶(D-Ala-D-Ala-Peptidase); F 类, 阻遏蛋白 LexA(Repressor LexA); G 类, 三磷酸腺苷依赖型丝氨酸蛋白酶(ATP-Dependent serine peptidases)^[7]. 其中, B 类, 即类枯草杆菌蛋白酶家族, 是丝氨酸蛋白酶中最大的家族之一, 根据功能域活性位点的特征, 其又可分为 5 大亚家族, 即枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin thermitase)、kexin、Pyrolysin、蛋白酶 K(Proteinase K)和羊毛硫细菌素蛋白酶(Lantibiotic peptidase)亚家族^[19].

尽管类枯草杆菌蛋白酶在结构上有相似性, 但在其表达和功能上存在差异. 在番茄中, *P69A* 在除根和花之外的所有植物器官中表达且与细胞延伸相关; *P69D* 除不在根中表达外, 在其他器官中都有表达, 与细胞分裂、延伸相关^[12]. 在拟南芥中, *SDD1* 在气孔前体细胞中强烈表达^[10], 与调节气孔密度的信号传导有关; *ALE1* 基因在种子萌发过程中特异表达, 与拟南芥胚发育过程中的角质层形成和表皮分化时信号肽的产生有关^[2]; *AIR3* 在侧根形成过程中表达^[9], 参与调控侧根原基数量; *Ara12* 在角果、茎及叶片中表达^[11], 参与植株形态建成. 大豆中, *SCS1*^[1] 在种皮中表达量最高, 与厚壁组织的分化有关; *SLP-1* 在处于发育期种子的种皮中表达, 而 *SLP-2* 主要在发芽种子的子叶中表达^[13], 这两个基因都参与种子萌发. 粗枝木麻黄中, *cg12* 在根瘤形成早期受弗兰克氏菌(*Frankia*)诱导表达^[14], 参与粗枝木麻黄和弗兰克氏菌的共生过程.

可见, 植物类枯草杆菌蛋白酶在植物生长发育和抗病反应中扮演着重要的角色. 但在柑橘中有关类枯

草杆菌蛋白酶基因的研究未见报道. 在本研究中, 我们通过构建柑橘 *CcSubtilisin* 基因过量表达载体转化柑橘, 获得了 9 株 *CcSubtilisin* 转基因植株. 由于该基因受 HLB 细菌的诱导, 可能在柑橘抗病反应中起重要作用, 我们获得的转基因植株将有助于解析这个问题.

参考文献:

- [1] BATCHELOR A K, BOUTILIER K, MILLER S S, et al. The Seed Coat-Specific Expression of a Subtilisin-Like Gene, SCS1, from Soybean [J]. *Planta*, 2000, 211(4): 484—492.
- [2] TANAKA H, ONOUCHI H, KONDO M, et al. A Subtilisin-Like Serine Protease is Required for Epidermal Surface Formation in Arabidopsis Embryos and Juvenile Plants [J]. *Development* (Cambridge, England), 2001, 128(23): 4681—4689.
- [3] ANTÃO C M, MALCATA F X. Plant Serine Proteases: Biochemical, Physiological and Molecular Features [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(7): 637—650.
- [4] AZEEZ A, SANE A P, BHATNAGAR D, et al. Enhanced Expression of Serine Proteases During Floral Senescence in Gladiolus [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(10): 1352—1357.
- [5] RIBEIRO A, AKKERMANS A D, VAN KAMMEN A, et al. A Nodule-Specific Gene Encoding a Subtilisin-Like Protease is Expressed in Early Stages of Actinorhizal Nodule Development [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(6): 785—794.
- [6] ROBERTS I N, MURRAY P F, CAPUTO C P, et al. Purification and Characterization of a Subtilisin-Like Serine Protease Induced During the Senescence of Wheat Leaves [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(4): 483—490.
- [7] BARRETT A J, RAWLINGS N D. Families and Clans of Serine Peptidases [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 318(2): 247—250.
- [8] JORDÁ L, CONEJERO V, VERA P. Characterization of P69E and P69F, Two Differentially Regulated Genes Encoding New Members of the Subtilisin-Like Proteinase Family from Tomato Plants [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(1): 67—74.
- [9] NEUTEBOOM L W, VETH-TELLO L M, CLIJDESDALE O R, et al. A Novel Subtilisin-Like Protease Gene from Arabidopsis Thaliana is Expressed at Sites of Lateral Root Emergence [J]. *DNA Research*, 1999, 6(1): 13—19.
- [10] BERGER D, ALTMANN T. A Subtilisin-Like Serine Protease Involved in the Regulation of Stomatal Density and Distribution in Arabidopsis Thaliana [J]. *Genes & Development*, 2000, 14(9): 1119—1131.
- [11] HAMILTON J M U, SIMPSON D J, HYMAN S C, et al. Ara12 Subtilisin-Like Protease from Arabidopsis Thaliana: Purification, Substrate Specificity and Tissue Localization [J]. *Biochemical Journal*, 2003, 370(1): 57—67.
- [12] JORDÁ L, COEGO A, CONEJERO V, et al. A Genomic Cluster Containing Four Differentially Regulated Subtilisin-Like Processing Protease Genes is in Tomato Plants [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(4): 2360—2365.
- [13] BEILINSON V, MOSKALENKO O V, LIVINGSTONE D S, et al. Two Subtilisin-Like Proteases from Soybean [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(4): 585—597.
- [14] LAPLAZE L, RIBEIRO A, FRANCHE C, et al. Characterization of a Casuarina Glauca Nodule-Specific Subtilisin-Like Protease Gene, a Homolog of Alnus Glutinosa ag12 [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(1): 113—117.
- [15] 钟云. Candidatus Liberibacter Asiaticus 诱导的柑橘转录组学及蛋白组学研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [16] 贝学军. 柑橘伤害诱导蛋白基因的功能解析 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [17] 彭爱红, 雷天刚, 许兰珍, 等. 转基因锦橙中甲型肝炎病毒外壳蛋白融合基因的遗传和表达稳定性研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(10): 31—35.
- [18] 程春振, 贝学军, 阳佳位, 等. 应用 SSH 技术鉴定枳抗 CTV 相关基因 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(12): 35—41.
- [19] SIEZEN R J, LEUNISSEN J A. Subtilases: the Superfamily of Subtilisin-Like Serine Proteases [J]. *Protein Science*, 1997, 6(3): 501—523.

Cloning and Genetic Transformation of a Citrus Subtilisin-Like Gene, *CcSubtilisin*

WU Tian-li^{1,2}, LI Ju³, ZHANG Yong-yan²,
HU Min-lun², YAN Hua-xue², JIANG Bo²,
XIE Dan², YUAN Chao-li², ZHONG Guang-yan²

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. Institute of Horticulture Research, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: Reverse-transcription PCR (RT-PCR) was applied to clone a subtilisin-like gene (designated as *CcSubtilisin*) using the leaf RNA of *Citrus clementina* as material. The cloned gene contained an open reading frame (ORF) 2337 bp long, which could encode a 778-amino acid polypeptide. Sequence analysis showed that the deduced protein shared 4 conserved regions of the subtilisin family with its 18 homologous proteins from *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Solanum lycopersicum*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max*, *Picea abies*, *Alnus glutinosa*, *Lilium longiflorum* and other 10 plant species. An over-expression vector was constructed and engineered into shatianyou pomelo (*Citrus maxima*) via *Agrobacterium*-mediated transformation. After PCR detection, a total of 9 independent transgenic plants were obtained. Quantitative real time PCR showed that the expression level of 3 out of the 4 transgenic lines used for expression study was higher than that of the control. The study here could provide materials for functional characterization of the citrus subtilisin gene in plant defense response to stresses.

Key words: serine protease; subtilisin; gene cloning; sequence analysis; genetic transformation

责任编辑 潘春燕

