

## 小麦条锈菌效应蛋白 Pst-1374 的表达纯化及初步结构特征

方 涵<sup>1</sup>, 智东明<sup>1</sup>, 赵海斌<sup>2</sup>, 王晓杰<sup>2</sup>, 康振生<sup>2</sup>, 陶 虎<sup>3</sup>, 邓汉卿<sup>1</sup>, 王媛媛<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100;

3. 西北农林科技大学化学与药学院, 杨凌 712100)

**摘 要:** 由条形柄锈菌小麦专化型 (*Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*, *Pst*) 引起的条锈病是小麦上最具破坏性的病害之一。在条锈菌侵染小麦过程中, 条锈菌向小麦细胞分泌效应蛋白, 改变宿主的防御反应。效应蛋白 Pst-1374 来源于条锈菌小种 PST-78, 将 *Pst-1374* 基因插入 pET-32a 载体并在大肠杆菌中表达, 使用镍柱亲和和层析和高效液相色谱 (HPLC) 纯化重组效应蛋白 Pst-1374, 然后通过液质联用质谱 (LC-MS)、动态光散射 (DLS)、凝胶过滤层析 (GFC) 和圆二色谱 (CD) 研究了 Pst-1374 的结构特征。结果表明, 溶液中的 Pst-1374 大部分为无规则卷曲结构, 只有小部分为规则的二级结构; 三氟乙醇 (TFE) 可以稳定 Pst-1374 的结构, 增加  $\alpha$ -螺旋的比例。这些结构特点的发现为其他效应蛋白的结构研究提供了思路。

**关键词:** 条锈菌; 效应蛋白; 表达与纯化; 本质上非结构蛋白

中图分类号: Q51; S435.121.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)06-1010-06

### Expression, purification and characterization of effector protein PST-1374 from wheat stripe rust

FANG Han<sup>1</sup>, ZHI Dongming<sup>1</sup>, ZHAO Haibin<sup>2</sup>, WANG Xiaojie<sup>2</sup>, KANG Zhensheng<sup>2</sup>,

TAO Hu<sup>3</sup>, DENG Hanqing<sup>1</sup>, WANG Yuanyuan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100;

2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100;

3. College of Chemistry and Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100)

**Abstract:** Strip rust caused by *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici* is one of the most devastating diseases in wheat. In the process of infecting wheat with stripe rust, effector proteins were secreted to wheat cells, changing the host's defense response. The effector protein Pst-1374 was derived from Pst isolate PST-78, therefore, *Pst-1374* gene was selected to insert into pET-32a vector and expressed in *E. coli*, and the recombinant effector protein Pst-1374 was purified using Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The structural characteristics of Pst-1374 were then investigated by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), dynamic light scattering (DLS), gel filtration chromatography (GFC) and circular dichroism (CD). The results showed that: most of Pst-1374 in solution is of random coil, and only a small part is in a regular secondary structure; trifluoroethanol (TFE) stabilizes the structure of Pst-1374 and increases the proportion of  $\alpha$ -helix. The discovery of these structural features may provide ideas for the study of the structure of other effector proteins.

**Key words:** stripe rust; effector protein; expression and purification; intrinsically unstructured proteins

小麦条锈菌 (*Pst*) 是一种气传性真菌, 对小麦的产量造成极大的危害。由于 *Pst* 的基因组很容易发生突变, 导致小麦条锈病很难防治<sup>[1-3]</sup>, 原因可能是因为专性寄生条锈菌的基因组与非专性真菌病原体相比呈现高度杂糅的状态<sup>[4]</sup>。条锈菌生理小种

CY32 的 110-Mb 基因组中竟含有 25 288 个蛋白质编码基因<sup>[5]</sup>。条锈菌通过吸器从寄主细胞中获取营养物质, 并且能向寄主细胞分泌改变其防御反应的物质—效应蛋白, 即“真菌病原体分泌的能够改变宿主细胞防御反应的小分子蛋白”<sup>[6]</sup>。真菌病原体

收稿日期: 2019-04-26

基金项目: 国家自然科学基金 (21403168) 资助。

作者简介: 方 涵, 硕士。E-mail: fanghan@nwsuaf.edu.cn

\* 通信作者: 王媛媛, 博士, 讲师。E-mail: yywang@nwsuaf.edu.cn

通过分泌效应蛋白改变寄主的信号通路、代谢通路等,病原体的效应蛋白可以直接与植物免疫受体结合,改变寄主细胞的信号通路:如黑粉菌的效应蛋白 CmuI 能够调节水杨酸代谢水平,使寄主体内的水杨酸含量下降<sup>[7]</sup>。病原体的效应蛋白也可以作用于植物的蛋白泛素化系统,改变寄主的代谢反应,如稻瘟菌效应蛋白 AvrPiz-t 可以抑制 RING E3 泛素连接酶 APIP6<sup>[8]</sup>。因此,病原菌效应蛋白可以改变寄主细胞的防御反应,但效应蛋白的转运和致病机理尚不清楚。通过对效应蛋白的结构进行研究,发现在植物和病原菌的互作进化中,效应蛋白通常要面对来自寄主细胞的恶劣生存环境,这使得它不得不进化出更加稳定的结构来面对这些困难,二硫键的增加是一种有效的办法,半胱氨酸形成的二硫键有更加牢固的分子键,能够更好地稳定效应蛋白的三维结构,发挥其功能<sup>[9-11]</sup>;许多的效应蛋白都是病原菌所特有的,在其他物种中往往没有同源基因和保守的结构域<sup>[12]</sup>。

对 *Pst* 的效应蛋白进行同源性分析,发现大多数效应蛋白物种间的同源性很低,并且没有保守的结构域<sup>[13]</sup>。这与本质上非结构蛋白 (Intrinsically unstructured proteins, IUP) 的定义有很多相似之处<sup>[14]</sup>。IUP 通常被定义为“真核生物基因组中缺少良好三维结构的整个或大部分蛋白,在物种之间无序区域是高度保守的,无序区域通常是与靶标蛋白结合之后的功能区,它在与靶标蛋白结合之后发生折叠。而其他区段构成在大分子阵列组装中起柔性接头的作用<sup>[15-17]</sup>”。IUP 通常与靶标蛋白结合之后才会折叠形成三维结构,这给我们研究蛋白的结构带来了很大的困难。三氟乙醇 (TFE) 是一种具有很强吸电能力的有机化合物,能稳定蛋白质和水之间的氢键,形成有生理活性的三维结构<sup>[18-19]</sup>。通过加入 TFE,促使 IUP 形成稳定有活性的三维结构<sup>[20]</sup>,有利于 IUP 的结构的研究。

*Pst-1374* 基因来自条锈菌小种 PST-78 的基因组 (PSTG-01157),编码 109 个氨基酸残基,包括 6 个半胱氨酸残基。通过在烟草上的瞬时表达试验发现,它能抑制由 BAX 蛋白诱导的细胞坏死 (数据未发表)。本研究对效应蛋白 *Pst-1374* 进行分子克隆,构建表达载体 pET-32a-*Pst-1374*,在大肠杆菌表达 *Pst-1374*,得到电泳纯蛋白,通过圆二色谱、动态光散射、凝胶过滤层析等技术对其结构进行初步表征,为效应蛋白在条锈菌侵染小麦过程中的转运和致病机制奠定理论上的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

表达载体 pET-32a (含有 PreScission 蛋白酶酶切位点)、大肠杆菌菌株 Turbo 和 BL21 (DE3) 为本实验室保存;效应蛋白 *Pst-1374* 质粒为西北农林科技大学康振生院士馈赠。分子克隆相关试剂如: Pfu DNA Polymerase、限制性内切酶 (*Nco* I 和 *Xho* I) 均购于 TaKaRa 公司;蛋白质 Marker 购于 Thermo 公司; Ni-NTA agarose、Superdex 75 Increase 10/300GL 和标准蛋白样品均购于美国 GE 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;高效液相色谱仪 FL2200 购买于浙江福利分析仪器有限公司;其他相关试剂均为购自国药集团。

### 1.2 方法

**1.2.1 表达载体的构建与鉴定** 分析效应蛋白 *Pst-1374*, 去除信号肽序列,将基因序列构建在 pET-32a 载体。pET-32a 载体经过本实验室改造,在 N 端 His 标签与酶切位点之间含有 preScission 蛋白酶酶切位点。用上游引物 (F: 5' -CCATGGCTATGTT TTTCTGCCCGGTTGA-3') 和下游引物 (R: 5' -CTC GAGTAAAACAGCGGGCGCGGTTGA-3') 扩增 *Pst-1374* 基因,将其连在 T 载体上,用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 分别对载体 pET-32a 和目的基因进行双酶切,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接,将连接产物转化进 DH5 $\alpha$  感受态中,对得到的阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定和 DNA 测序结果分析。将测序结果正确的菌株转化进 BL21(DE3) 中,于 -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 目的蛋白的表达、纯化与鉴定** 挑取 pET-32a-*Pst-1374* 的 BL21(DE3) 的单菌落于 50 mL 的 LB 培养基中,在 37  $^{\circ}$ C、250 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 条件下培养过夜。将培养好的菌液按 1:100 (V/V) 的比例转接于 1 L 的 LB 培养基中,培养至细菌的 OD<sub>600</sub> 在 0.6~0.8 之间。将培养基放在冰水混合物中冰浴 30 min,向培养基中加入终浓度为 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 IPTG 溶液。在 18  $^{\circ}$ C、250 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的条件下诱导 12~14 h。用 16.5% 的 Tricine-SDS-PAGE 分析 *Pst-1374* 的表达水平。

用 4  $^{\circ}$ C、8 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>、10 min 的条件收集菌体,称重、-80  $^{\circ}$ C 保存。用 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris、300 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl 及 pH8.0 的裂解液洗涤菌体沉淀 3 次,按 1 g 菌体加 10 mL 裂解液的比例在菌体沉淀中加入裂解液重悬。向裂解体系中加入终浓度为 150  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>

溶菌酶、20 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇、1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 PMSF 及 1:10 000 (V/V) 核酸酶, 冰浴 30 min 后超声破碎, 再在 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 30 min。收集上清, 用 0.22 μm 的滤膜过滤。

用含有 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑的裂解液(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris、300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH8.0) 平衡 Ni 柱柱材, 将上清与 Ni 柱柱材 4℃ 孵育 2 h, 之后分别用含有 20 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑和含有 250 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑的裂解液清洗柱材。收集含有 250 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑的洗脱液, 向其中加入 5 μmol·L<sup>-1</sup> 的 PreScission protease 酶切, 在 4℃ 的条件下透析过夜, 除去洗脱液中的咪唑。将酶切后的蛋白样品在 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 10 min 除去其中的杂质。将蛋白样品加载至高效液相色谱 (HPLC), 用含有 0.1% 的水溶液和含有 0.1% 的三氟乙酸乙腈溶液混合洗脱, 将收集到的样品用冻干机冻干, 用 16.5% 的 Tricine-SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

将冻干的蛋白样品用 ABI API2000 Q-Trap 质谱仪分析, 测定 Pst-1374 的分子大小。

**1.2.3 Pst-1374 的结构预测和分析** 用 SWISS-MODEL 网站对 Pst-1374 进行三维建模<sup>[21-22]</sup>, 并在 NCBI 数据库中搜索 Pst-1374 的同源蛋白质序列, 对其进行同源性分析。

**1.2.4 圆二色谱分析 Pst-1374 的二级结构** 将不同浓度的三氟乙醇 (TFE) (0、10%、20% 和 30%, V/V) 加入 120 μmol·L<sup>-1</sup> 蛋白样品 (20 mmol·L<sup>-1</sup>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) 中。用圆二色谱仪扫描其在 195~260 nm 处的旋光值, 测定其二级结构<sup>[23]</sup>, 判断 TFE 浓度对蛋白质二级的影响。

**1.2.5 动态光散射分析 Pst-1374 的均一性**<sup>[24]</sup>

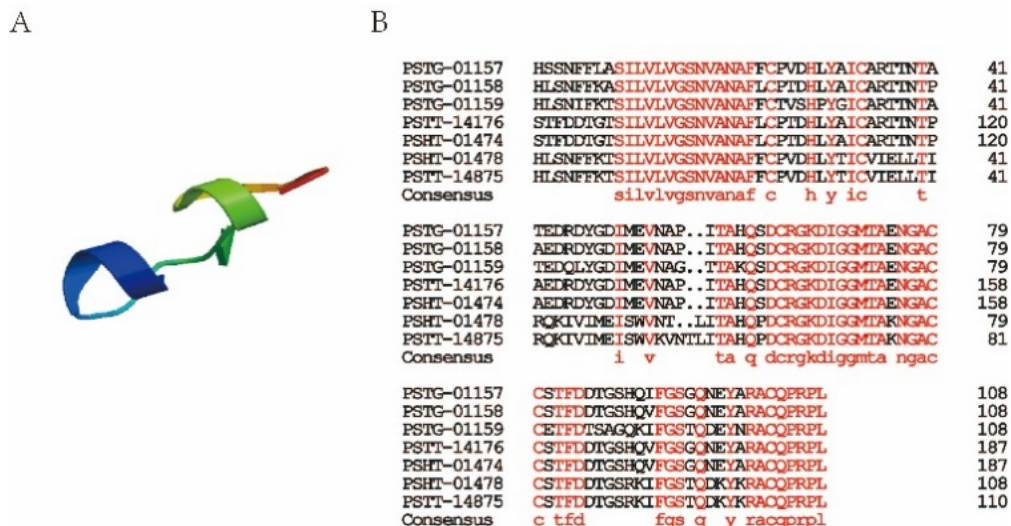
Pst-1374 的样品浓度为 120 μmol·L<sup>-1</sup> (20 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)。将样品在 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 10 min 以除去大的杂质, 并在室温下平衡 10 min。在室温下用激光粒度分析仪对样品进行测定, 收集数据并分析结果。

**1.2.6 凝胶过滤层析分析 Pst-1374 聚集状态** 将 3 mg Pst-1374 溶于 1 mL (20 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) 缓冲液中, 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 用 0.22 μm 的滤膜过滤。将样品和标准蛋白在 AKTA Pure 25 上用 Superdex 75 Increase 10/300 GL 进行凝胶过滤层析, 验证 Pst-1374 的聚集状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 Pst-1374 的结构预测和分析

Pst-1374 的 SWISS-MODEL 三维建模结果如图 1A 所示。预测结果大多数为无规则卷曲结构, 包含少量 α-螺旋, 位于 36~41 位残基。在 NCBI 数据库中搜索 Pst-1374 的同源蛋白质序列, 结果见图 1B。Pst-1374 的同源物只在条锈菌中发现, 其功能尚不清楚。保守结构域预测 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 未找到其保守结构域。

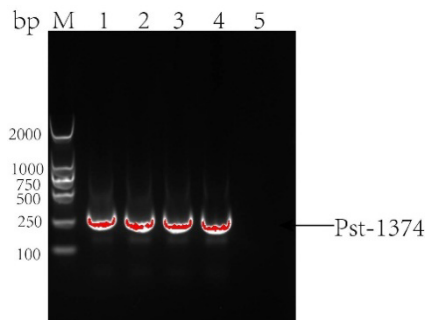


A. Pst-1374 的 SWISS-MODEL 建模结果; B. Pst-1374 的同源蛋白序列分析。7 个效应蛋白均来自小麦条锈菌, 其中 PSTG-01157、PSTG-01158 和 PSTG-01159 来源于条锈菌小种 PST-78

A. The results of SWISS-MODEL modeling of Pst-1374; B. The alignment sequence analysis of Pst-1374 with other orthologous proteins. The seven effector proteins are all from the wheat stripe rust, PSTG-01157, PSTG-01158 and PSTG-01159 are derived from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolate PST-78, the same as Pst-1374

图 1 Pst-1374 的结构预测和同源序列分析结果

Figure 1 Structure prediction and homologous sequence analysis results of Pst-1374



M: TaKaRa DL2000 marker; 1-4 号泳道为 4 个阳性克隆, 5 号泳道为阴性对照

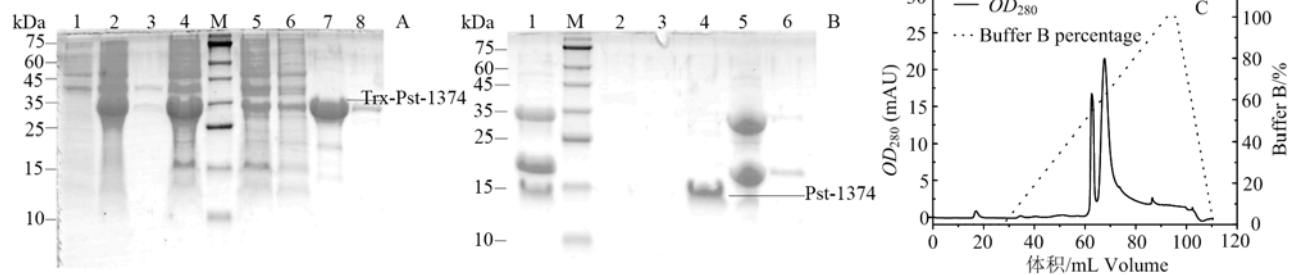
M: TaKaRa DL2000 marker; Lanes 1-4 are four positive clones and Lane 5 is a negative control

图 2 *Pst-1374* 菌落 PCR 鉴定结果

Figure 2 Colony PCR identification results of *Pst-1374*

## 2.2 构建 pET-32a-*Pst-1374* 载体

通过 PCR 技术扩增 *Pst-1374* 序列, 经过 T-A



A. *Pst-1374* 诱导前后、沉淀和上清以及 Ni 柱的层析的电泳图, 泳道 1—8 分别为未诱导、诱导后、沉淀、上清、20、250 和 400  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱液; B. 蛋白酶切和 RP-HPLC 的电泳图, 泳道 1—6 分别为酶切后、18、40、63、68 和 87 mL 洗脱峰; C: RP-HPLC 分离流程图和 *Pst-1374* 吸收峰谱

A. Comparison of the supernatant of the precipitate before and after the induction of *Pst-1374*, and an electrophoretogram of the affinity chromatography of the Ni column. Lanes 1-8 are before induced, induced, precipitated, supernatant, flow-through, eluted with 20, 250 and 400  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole, respectively; B. An electropherogram of PreScission protease cleavage and RP-HPLC. Lanes 1-6 are after digestion, 18, 40, 63, 68, and 87 mL elution peak, respectively; C. The specific passage separated by RP-HPLC

图 3 *Pst-1374* 纯化流程

Figure 3 *Pst-1374* purification process

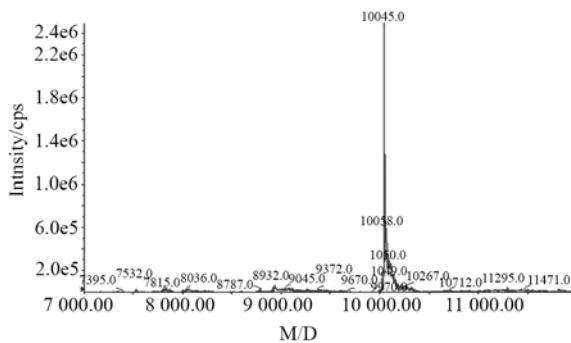


图 4 *Pst-1374* 的 LC-MS 鉴定结果

Figure 4 The LC-MS identification result of *Pst-1374*

## 2.4 *Pst-1374* 的分子量

*Pst-1374* 的测定分子量为 10 045 Da, 与预测值

克隆、双酶切、酶连之后, 挑选 DH5 $\alpha$  转化后的阳性菌株进行菌落 PCR 鉴定, 所得结果如图 2 所示, 条带位置正确, 再经过 DNA 测序鉴定, 测序结果与 *Pst-1374* 序列一致, 确定载体构建成功。

## 2.3 *Pst-1374* 的表达与纯化

*Pst-1374* 纯化过程如图 3A 所示。加入 IPTG 后, 在 25~35 kDa 之间出现新的条带, 这与融合蛋白的预测分子量 27 kDa 是一致的。破碎 20 min 后, 融合蛋白存在于上清液中。通过 Ni 柱亲和层析纯化后, 大部分融合蛋白在 250  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑裂解缓冲液中洗脱 (图 3A, 泳道 7)。如图 3B 所示, 泳道 1 中, 约一半的融合蛋白被 PreScission 蛋白酶切割。HPLC 分离的结果显示在图 3C 中。*Pst-1374* 在 63 mL 处被洗脱下来, 此时的乙腈浓度为 61.4% (图 3B, 泳道 4)。

10 042.13 Da 相差 3 Da。原因可能是蛋白质的半胱氨酸没有形成二硫键, 导致实际测量值大于预测值 (图 4)。

## 2.5 *Pst-1374* 圆二色谱分析

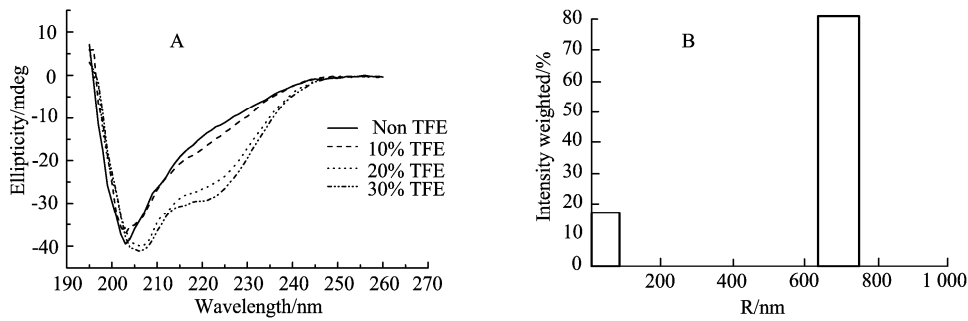
TFE 浓度从 0 增加到 30%, 205 nm 处的负峰往 208 nm 处移动, 并且在 222 nm 处形成新的负峰。这表明溶液中蛋白质的  $\alpha$ -螺旋含量随着 TFE 浓度的增加而增加, *Pst-1374* 能够在有序结构和无规则卷曲之间变换, 证明 *Pst-1374* 是 IUP (图 5A)。

## 2.6 *Pst-1374* 动态光散射分析

动态光散射测量溶液中 *Pst-1374* 的粒径。*Pst-1374* 在溶液中具有 2 种粒径, 一种粒径小, 粒径为 38.75 nm, 所占比例为 16.2%; 另一种粒径大,

粒径为 720.4 nm, 所占比例为 83.8%。动态光散射说明溶液中主要以大分子的无规则卷曲状态存在,

结合圆二色谱的实验结果进一步证明 Pst-1374 在溶液中主要为 IUP (图 5B)。

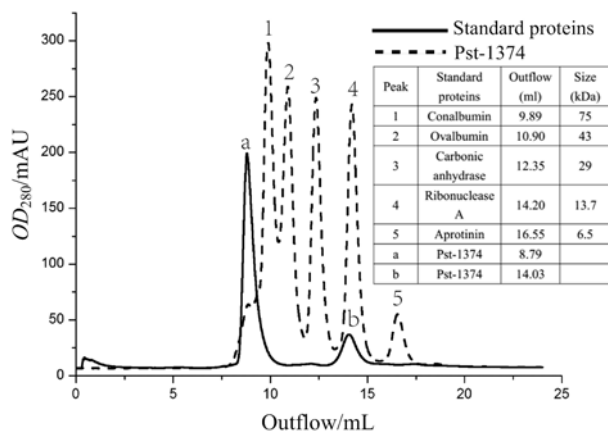


A. Pst-1374 在 195~260 nm 处的 CD 结果, TFE 浓度从 0 增加到 30%; B. PBS 中 Pst-1374 的粒径大小

A. The CD results of Pst-1374 at 195-260 nm with increasing TFE concentration from 0 to 30%; B. The particle size of Pst-1374 in PBS

图 5 Pst-1374 的二级结构特征

Figure 5 Secondary structure characteristics of Pst-1374



实线代表 Pst-1374, 虚线代表 5 种标准蛋白

The solid line represents Pst-1374, and the dashed line represents five standard proteins

图 6 Pst-1374 的 GFC 验证结果

Figure 6 GFC verification results of Pst-1374

## 2.7 Pst-1374 的凝胶过滤层析

凝胶过滤层析的结果所示, Pst-1374 具有 2 个峰。大峰的流出体积在 75 kDa 的标准蛋白之前, 对应的流出体积为 8.79 mL, 所占比例约为 79.0%。小峰的流出体积在 29~13.7 kDa 标准蛋白质之间, 对应的流出体积为 14.03 mL, 所占比例约为 21%。根据标准蛋白所绘制的标准曲线, 小峰的分子量相当于 15.4 kDa。根据 CD 和 DLS 结果, 这些结果证明 Pst-1374 在溶液中主要为 IUP (图 6)。

## 3 结论

本研究通过分子克隆技术, 构建表达载体 pET-32a-Pst-1374, 经过 Ni 柱亲和层析、高效液相色谱层析、质谱鉴定等手段得到电泳纯的 Pst-1374。

通过圆二色谱、动态光散射、凝胶过滤层析对 Pst-1374 进行初步的表征, 推测 Pst-1374 可能是一个 IUP。Pst-1374 结构多为无规则卷曲结构, 且 Pst-1374 含有丰富的二硫键。Pst 的前期结果研究表明, 半胱氨酸可能参与效应蛋白结构稳定, 所以 Pst-1374 的结构识别可能与相关的半胱氨酸有关。这些结果的发现为 Pst-1374 三维结构的研究、Pst-1374 与靶标蛋白之间的互作研究以及 Pst-1374 的侵染和致病机制奠定理论上的基础, 也为小麦条锈病的防治提供更有效的帮助。

致谢: 感谢西北农林科技大学康振生院士馈赠的效应蛋白 Pst-1374 的质粒模板。

## 参考文献:

- [1] CHEN X M. Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat[J]. Can J Plant Pathol, 2005, 27(3): 314-337.
- [2] CHEN X M, MOORE M, MILUS E A, et al. Wheat stripe rust epidemics and races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2000 [J]. Plant Dis, 2007, 86(1): 39-46.
- [3] NEWTON M, JOHNSON T, BROWN A M. A preliminary study on the hybridization of physiologic forms of *Puccinia graminis tritici* [J]. Scientific Agriculture, 1930, 10(11): 721-731.
- [4] RAFFAELE S, KAMOUN S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(6): 417-430.
- [5] ZHENG W M, HUANG L L, HUANG J Q, et al. High genome heterozygosity and endemic genetic recombination in the wheat stripe rust fungus[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2673.
- [6] HOGENHOUT S A, VAN DER HOORN R A L, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms[J]. MPMI, 2009, 22(2): 115-122.

- [7] DJAMEI A, SCHIPPER K, RABE F, et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector[J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 395-398.
- [8] PARK C H, CHEN S, SHIRSEKAR G, et al. The mag-naporthe oryzae effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(11): 4748-4762.
- [9] STERGIOPOULOS I, COLLEMARE J, MEHRABI R, et al. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(1): 67-93.
- [10] DUPLESSIS S, CUOMO C A, LIN Y C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi[J]. *PNAS*, 2011, 108(22): 9166-9171.
- [11] MARTIN F, AERTS A, AHRÉN D, et al. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis [J]. *Nature*, 2008, 452(7183): 88.
- [12] WICKER T, OBERHAENSLI S, PARLANGE F, et al. The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(9): 1092-1096.
- [13] 翟龙飞 丁俐文, 谢蓉蓉, 等. 小麦条锈菌效应蛋白基因 *pst-2511* 的克隆、表达和初步结构研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(5): 932-937.
- [14] DYSON H J, WRIGHT P E. Intrinsically unstructured proteins and their functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(3): 197-208.
- [15] TOMPA P. Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion [J]. *Bioessays*, 2003, 25(9): 847-855.
- [16] DYSON H J, WRIGHT P E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12(1): 54-60.
- [17] DUNKER A K, OBRADOVIC Z, ROMERO P, et al. Intrinsic protein disorder in complete genomes[J]. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 2000, 11: 161-171.
- [18] VIKASH KUMAR D, ASHU S, MEDICHERLA VENKATA J, et al. Effect of organic solvents on the molten globule state of procerain: beta-sheet to alpha-helix switchover in presence of trifluoroethanol [J]. *Protein Pept Lett*, 2006, 13(6): 545-547.
- [19] BUCK M, RADFORD S E, DOBSON C M. A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(2): 669-678.
- [20] DU H J, SAMUEL R L, MASSIAH M A, et al. The structure and behavior of the NA-CATH antimicrobial peptide with liposomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2015, 1848(10): 2394-2405.
- [21] GUEx N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [22] BENKERT P, BIASINI M, SCHWEDE T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 343-350.
- [23] KELLY S M, JESS T J, PRICE N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2005, 1751(2): 119-139.
- [24] STETEFELD J, MCKENNA S A, PATEL T R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences[J]. *Biophys Rev*, 2016, 8(4): 409-427.