

# 白藜受菜豆細菌性斑點病菌誘導過敏性反應過程中 Rubisco 活化酵素基因之表現

蔣本慈<sup>1</sup> 黃秀珍<sup>1,2</sup>

1 台中市 國立中興大學生物科學研究所

2 聯絡作者：電子郵件 hchuang@dragon.nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22861905

接受日期：中華民國 92 年 4 月 28 日

## 摘要

蔣本慈、黃秀珍. 2003. 白藜受菜豆細菌性斑點病菌誘導過敏性反應過程中 Rubisco 活化酵素基因之表現. 植病會刊 12:93-102.

白藜 (*Chenopodium quinoa*) 受到竹嵌紋病毒 (*Bamboo mosaic virus*; BaMV-S) 或菜豆細菌性斑點病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain 61, Pss61) 感染時，會被誘導產生過敏性反應。為探討竹嵌紋病毒所誘導的白藜過敏性反應之機制，曾使用 cDNA subtraction 方式選殖經病毒誘導過敏反應後第三天表現的基因時，選殖到 pTA2-9 之選殖株，其所含的插入片段序列內含有部分的 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase 活化酵素 (Rubisco activase, *rca*) 基因序列。進一步以 5' 及 3' RACE 選殖得到 1809 bp 長片段，包括 5 端 121 bp 的非轉譯序列、1314 bp 轉譯區及 3 端 374 bp 之非轉譯序列。而轉譯區可轉譯出含 438 個氨基酸的蛋白質、分子量為 47.8 kDa、等電點 (pI) 為 6.875，此胺基酸序列與同為藜科的菠菜 RCA 蛋白最為相似。RCA 蛋白為光合作用暗反應中，固定二氧化碳的酵素 Rubisco 的活化子，經南方雜合術分析確定 *rca* 以單套基因形式存在於白藜基因體內。以水稻的 RCA 蛋白之血清進行西方墨點術分析及利用 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 方式分析，結果顯示白藜葉內含有 L 及 S 型的 RCA 蛋白，但以 S 型含量較高。依據 *rca* 的 cDNA 衍生胺基酸序列推論，本研究所選殖到的 *rca* 之 cDNA 所轉譯的蛋白質屬於 S 型，又將此基因在大腸桿菌中以 T7-RNA polymerase dependent 系統表現，並以西方墨點術確認此蛋白質為 S 型。在 Pss61 所誘發的過敏性反應過程中，其 mRNA 的表現量於第 6-9 小時後開始有顯著下降的趨勢，約為對照組 *rca* mRNA 的表現量的 0.98 至 0.55 倍。而以西方墨點術分析顯示白藜在經 Pss61 所誘導產生之過敏性反應中，RCA 蛋白質的累積量與對照組相比較並無顯著差異，顯示此蛋白質可能很穩定，而 *rca* mRNA 累積量有下降的趨勢，可能是因過敏反應引發植物細胞生理代謝改變後之基因調控結果。

關鍵詞：白藜、過敏性反應、Rubisco 活化酵素、菜豆細菌性斑點病菌

## 緒言

在植物綠色的組織中含有大量的 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)，以菠菜為例，其 Rubisco 蛋白是由 8 個大小為 53 kDa 以及上下層各 4 個 14 kDa 的次單位組成，參與光合作用暗反應中二氧化碳固定的步驟，即將大氣的二氧化碳與五碳糖磷酸 (Ribulose-1,5-bisphosphate) 結合，再轉化成兩個 3-phosphoglyceric acid。未與基質 (二氧化碳) 結合的 Rubisco 則與五碳糖磷酸有更強的結合力，並且不易解離，以致 Rubisco 無法有效率的執行其酵素活性，導致二氧化碳的同化率降低。而 Rubisco 活化酵素 (RCA) 則可將 Rubisco

從結合緊密之醣磷酸-Rubisco 中解離出來，使得 Rubisco 回復成活化狀態，繼續執行固定二氧化碳的反應，因此 RCA 可為 Rubisco 的活化子<sup>(6,11)</sup>。

菠菜或水稻的 *rca* 基因所轉錄的 pre-mRNA 因 alternative splicing 造成切位的不同，會產生兩種成熟的 *rca* mRNA，此二者所轉譯出的蛋白質 C 端也因此不同，而有所謂的 large (L) 及 small (S) 型存在<sup>(18,20,21,25)</sup>，至目前為止調節這種 alternative splicing 的機制尚不清楚，但在有些植物上只發現一種形式的 RCA 蛋白質，例如：菸草<sup>(15)</sup>。位於細胞質的 RCA 蛋白利用其 N 端的引導肽 (leading peptide)，可將 RCA 送入葉綠體的基質 (stroma) 內<sup>(6,11)</sup>。經由胺基酸序列突變分析證實，RCA 之胺基酸序列有上兩

個 ATPase 區域是具有水解 ATP 的功能，以提供能量做為活化 Rubisco 之用<sup>(4,6,19,22)</sup>。

RCA 基因表現或其酵素活性常受到環境因子影響，水稻葉片 RCA mRNA 的累積即隨著光暗周期頻率 (oscillating circadian rhythm) 而改變<sup>(18)</sup>。在阿拉伯芥的葉綠體基質內，因 thioredoxin-f 造成的氧化還原態趨勢或 ADP/ATP 比率，也會調整 RCA 酵素活性<sup>(23,24)</sup>。在常溫下，玉米的 L 型 RCA 不存在，但在熱休克 (45 °C) 時 L 型會累積，但溫度回復常溫下隨即分解<sup>(16)</sup>。而大麥在高溫 (38 °C) 下，S 型的表現量較 L 型多 30%，且 L 及 S 型之間量的調節是屬於後轉錄作用<sup>(8)</sup>。在熱逆境下，在菠菜葉的 RCA 蛋白質構形會改變，而與葉綠體之類囊體 (thylakoid) 上的核糖體 (ribosome) 有緊密結合的現象，極可能影響核糖體的蛋白質轉譯功能<sup>(13)</sup>。因此在高溫下，RCA 可能具有 chaperone 的功能<sup>(16)</sup>，而在生物逆境下，rca 基因之調控或 RCA 蛋白質累積情形則完全未知。

白藜 (*Chenopodium quinoa*) 被大部分種類的植物病毒感染皆會引發其過敏性反應，常被當作病毒的指示植物<sup>(10)</sup>，因此可做為探討植物防禦機制之理想材料。竹嵌紋病毒 (*Bamboo mosaic virus, BaMV*)<sup>(9)</sup> 及細菌性菜豆斑點病菌 (*P. syringae* pv. *syringae* strain 61, Pss61) 在白藜上也可以誘導過敏性反應。竹嵌紋病毒為長絲狀病毒，其遺傳物質為 6.4 kb 單股正極之 RNA，具有五個轉譯區 (ORFs)：分別轉譯出複製蛋白酵素、三個移動蛋白 (triple gene block) 及外鞘蛋白，寄主主要為竹，但以人工接種方式，在菸草 *Nicotiana benthamiana* 可為系統性感染<sup>(9)</sup>。而菜豆細菌性斑點病菌 Pss61 之寄主為菜豆，可在非寄主植物例如菸草引起過敏性反應<sup>(5)</sup>。為了探討白藜過敏性反應之分子機制，蔣曾採用 cDNA subtraction 選殖經竹嵌紋病毒誘導過敏反應後第三天表現之基因。經由此選殖到一個含部分 cDNA 片段之選殖株稱為 pTA2-9，其插入片段序列含有兩個不同基因序列，一為 osmotin 基因序列，osmotin 基因在病毒感染白藜後其表現會增加；另一部分序列與菠菜 rca (Rubisco activase) 基因相似，根據北方雜合法分析之結果，顯示在 BaMV 誘導的過敏性反應中，rca 基因表現有下降趨勢<sup>(2)</sup>。在本研究中，為進一步探討細菌誘導的過敏性反應中 rca 基因的表現情形，因此由此序列設計專一性引子進行 5' 及 3' RACE 選殖，得到全長 rca cDNA 基因，並且探討菜豆細菌性斑點病菌誘導過敏性反應發生時，rca mRNA 累積的變化及植物體所含 RCA 蛋白質的特性。

## 材料與方法

### 白藜植株與病原接種

以種植於 28 °C 溫室中，約 2 個月大的白藜植株作為接種材料，此時植株長出約七至八葉，接種病原前先去除

黃化之下位葉及葉面積小於 10 cm<sup>2</sup> 之葉片。接種病毒時，取感染竹嵌紋病毒的白藜病葉稱重，加少許無菌水於研鉢內充分磨碎，再補加無菌水至 10 倍體積 (v/w) 即為接種源。將接種源塗抹於灑有金剛砂的葉片上，接種後十分鐘再將金剛砂洗掉。接種菜豆細菌性斑點病菌 (*P. s. pv. syringae* 61) 時，將細菌平板劃線於含 20 µg/ml nalidixic acid 之 King's B 培養基 (每公升含 proteose peptone 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g, glycerol 10 ml 及 agar 12 g)<sup>(7)</sup>，於 30 °C 下隔夜培養後，刮取菌落懸浮於無菌水，並調整接種源濃度至 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.3 (約為 10<sup>8</sup> cfu/ml)，將此細菌懸浮液以無針頭之注射筒注射到白藜葉肉組織<sup>(1)</sup>。對照組均以無菌水取代接種源進行接種。

### 總量 RNA 的抽取、訊息 RNA (mRNA) 的分離及單股 cDNA 的合成

本實驗依據 Rompf 及 Kahl 所發展的方法<sup>(14)</sup> 進行總量 RNA 的抽取。白藜葉片秤重後加入液態氮研磨，再加入 12 倍體積 (v/w) 的萃取緩衝液 (0.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 20 mM EDTA, 1% SDS) 混合均勻，經等體積的酚/氯仿/異戊醇 [phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI) 25/24/1] 處理，以 10000 × g 在室溫下離心 10 分鐘，取上清液加入 0.35 倍體積的 95% 酒精，置冰上 20 分鐘，以 10000 × g 在 4 °C 離心 10 分鐘，取上清液加入 1 倍體積的 95% 酒精，於 -80 °C 放置 30 分鐘，以 10000 × g 在 4 °C 離心 20 分鐘，沉澱物以 70% 酒精清洗，真空乾燥後，以每克葉片材料加 750 µl 的比例加水充份溶解，加入等量 8 M LiCl 置於冰上 20 分鐘，以 10000 × g 在 4 °C 離心 10 分鐘，沉澱物以 70% 酒精清洗，真空乾燥後，以每克葉片材料加 200 µl 的比例加水溶解即為總量 RNA 溶液，置於 -80 °C 下備用。mRNA 的分離乃參照 Dynabeads® mRNA Purification Kit (Dynabeads®, Dynal Inc., NY, USA) 提供之方法進行，純化出 mRNA 之後，進一步利用 Smart™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) 合成單股之 cDNA 片段。

### 以 5' 及 3' RACE 方法選殖 rca 之 cDNA 片段

依據質體 pTA2-9<sup>(2)</sup> 的 rca 部分核酸序列設計兩個專一引子 (RCA R7 及 RCA F6)，實驗中使用引子對 RCA R7 (5'-GGATTACCTTGACCTTGCC-3') 及 Smart II (5'-AAGCAGTGGAACACGCAGAGTACGCGGG-3') 合成 5' 端的 rca cDNA 片段，另外以引子對 RCA F6 (5'-TTGTTGTTCACATCACCA-3') 及 CDS (5'-AAGCAGTGGT AACAAACGCAGAGTACT<sub>10</sub>-3') 合成 3' 端的 rca 之 cDNA 片段。進行 polymerase chain reaction (PCR) 時以 300 ng 之白藜單股 cDNA 為模板，反應液內包含 1 × KlenTaq PCR buffer、0.2 mM dNTP、0.2 µM primer、1 × Advantage

KlenTaq Polymerase Mix (Clontech Inc.)，置於PCR反應器 (TRIO-Thermoblock<sup>TM</sup>, Biometra, Germany) 進行增幅。PCR反應程式為 95 °C 變性(denature)反應 1 分鐘後，先以 95 °C 變性反應 15 秒、55 °C 黏合(annealing)反應 30 秒、68 °C 延伸(extension)反應 1 分鐘組合循環 3 次，繼以 95 °C 15 秒、65 °C 30 秒、68 °C 3 分鐘條件進行 30 次循環，得到 5' 及 3' 的 cDNA 片段。取約 100 ng PCR 產物與 25 ng pGEM<sup>®</sup>-T Easy 輽體(Promega) 接合，並轉形至 *E. coli* DH10B，所得到的重組質體分別為 p5'RCA22 及 p3'RCA1。根據白藜 *rca* 的 5'、3' cDNA 片段之重組質體經核酸定序結果，再設計一組引子 RCA-5'ORF (5'-CATACGTAGGATTGAAATGGC-3') 及 RCA-3'ORF (5'-AATGAGCTCCTAGAAAGTGTAGAT-3')，以合成完整的 *rca* 之 cDNA 片段，PCR 反應液同上，反應程式為 95 °C 1 分鐘 1 次，95 °C 15 秒、45 °C 30 秒、68 °C 3 分鐘循環 5 次，95 °C 15 秒、55 °C 30 秒、68 °C 3 分鐘循環 5 次，95 °C 15 秒、65 °C 30 秒、68 °C 3 分鐘循環 20 次，PCR 產物同樣地選殖至 pGEM<sup>®</sup>-T Easy 輽體，得重組質體 pNCHU639。

### 白藜總量DNA之抽取

將白藜葉片秤重後加入液態氮研磨，再加入 10 倍體積(v/w)的尿素萃取緩衝液 [7 M urea; 0.3125 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine)] 混合均勻，經等體積 PCI 於室溫萃取 15 分鐘，以 5600 × g 室溫離心 10 分鐘，重複 1 次。取上清液加入 0.1 倍體積之 4.4 M NH<sub>4</sub>OAc 及 0.7 倍體積 iso-propanol 靜置室溫至少 30 分鐘以沉澱 DNA，經 5600 × g 室溫離心 3 分鐘，沉澱物以每克組織加入約 400 μl 的 TE-RNAse (1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 100 μg/ml RNAse) 溶解，37 °C 作用 1.5 小時。以等體積的 PCI 萃取 2 次後，加入 1/3 倍體積的 4.4 M NH<sub>4</sub>OAC 及 3 倍體積的 95% 酒精，置於 -20 °C 至少 30 分鐘以沉澱 DNA，再以 13000 × g 於 4 °C 離心 15 分鐘，所得沉澱物以 75% 酒精清洗 2 次，真空乾燥後以每克材料加 360 μl 的水溶解即為總量 DNA 溶液。

### 南方雜合分析

將 50 μg 總量 DNA 經適當的限制酵素處理後，以 0.5X TBE 緩衝液 (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA) 配製之 0.8% (w/v) 琼脂凝膠進行水平式電泳，之後將瓈脂凝膠置於 0.25 N HCl 溶液輕搖 20 分鐘，再移入變性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) 輕搖 30 分鐘，最後於中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8.0) 輕搖 30 分鐘，再以 Hybaid Vacu-Aid (Hybaid<sup>TM</sup> Inc., Franklin, MA, USA) 將 DNA 轉漬至 nylon 膜 (Hybond-N, Amersham pharmacia Ltd., Buckinghamshire, England)。完成 DNA 轉漬之 nylon 膜以

2X SSPE (300 mM NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 2 mM EDTA) 清洗 5 分鐘，經 UV cross-linker (UV stratalinker 1800, Stratagene Inc., Cedar Creek, USA) 固定 DNA 於 nylon 膜上。探針的製備係以 Boehringer Mannheim (BM, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 公司所發展出利用 alkali-labile Digoxigenin DIG-dUTP 之非放射性標識，使用前以沸水煮 10 分鐘後置冰上 5 分鐘以保持單股狀態。將轉漬膜置於雜合瓶中，加入預雜合溶液 [5X SSC, 1.0% (w/v) blocking reagent (BM), 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS)] 於 60 °C 進行反應 1.5 小時，然後加入探針於 60 °C 進行雜合反應 8 小時以上。轉漬膜以 Wash I 溶液 (2X SSC, 0.1% SDS) 於 37 °C 下清洗 10 分鐘並重複一次，再以 Wash II 溶液 (0.1X SSC, 0.1% SDS) 於 60 °C 下清洗二次，每次 15 分鐘。進行偵測時，轉漬膜加入 Buffer I (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20) 於 37 °C 沖洗 5 分鐘共二次，再加入 Buffer II/0.5% blocking reagent 作用 30 分鐘後，與 5 ml 之 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate (1:5000, BM) 於 37 °C 下作用 30 分鐘，轉漬膜以 Buffer I 沖洗三次，每次為 15 分鐘，之後於 Buffer III (0.1 M Tris-base pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl) 中浸泡 2 分鐘。取 CDP-Star<sup>TM</sup> (TROPIX Inc., Bedford, Massachusetts, USA) 試液使其均勻分布於轉漬膜上，反應後以 X 光片壓片進行偵測。或以 <sup>32</sup>P 放射性同位素標定的探針進行偵測分析，其方法與步驟與以下敘述之北方雜合分析相同。

### 利用 T7 RNA polymerase dependent 系統表現 RCA 蛋白

設計引子對 RCAF57aa (5'-GACCGGAATTCCGGCTGAC-3') 及 RCA3'ORF (5'-AATGAGCTCCTAGAAAGTGTAGAT-3')，以質體 pNCHU639 為模板，利用 PCR 增幅不含葉綠體引導勝肽 (chloroplast leader polypeptide) 序列之 *rca* cDNA 片段，經 EcoRI 與 BamHI 限制酵素處理後，次選殖於表現載體 pT7-7<sup>(17)</sup> 上，得重組質體 pNCHU711，並經細胞轉形作用送入大腸桿菌 BL21 (DE3)。欲表現 RCA 蛋白時，供試菌株以 3 ml LB (含 100 μg/ml ampicillin) 於 37 °C 隔夜培養，取 500 μl 的隔夜菌液加入新鮮之 5 ml LB (含 100 μg/ml ampicillin)，置於 37 °C 培養至 OD600 達 0.6 - 0.8，加入 IPTG 使其終濃度為 1 mM，置 37 °C 培養 2 小時後，加入終濃度為 0.2 mg/ml 之 rifampicin 繼續培養 1 小時。培養液以 2000 × g 室溫離心 10 分鐘以收集菌體，將菌體溶於 0.5 ml 緩衝液 (50 mM Tris pH 8.0, 8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 0.1% lysozyme) 並以超音波 (Sonicator XL-2020, Heat Systems-Ultrasonics, NY, USA) 震破，此菌液以 2000 × g 離心 5 分鐘，所得沉澱物即為含有 RCA 蛋白質的包含體 (inclusion bodies)。

## 植物總量蛋白之萃取

取約0.2 g 的白藜葉片置於1.5 ml 微量離心管中，加入液態氮以玻璃杵將其磨成粉末，加入2倍體積緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 2% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol)混勻，煮沸5分鐘後以10000  $\times g$  離心5分鐘，上清液即為植物總量蛋白溶液。

## 西方墨漬術

實驗用RCA蛋白抗體係源自於抗水稻L型RCA蛋白質之兔子血清，由中央研究院植物所陳淑貞博士所提供之蛋白質樣品經15%的SDS-PAGE電泳膠體分析後，以轉漬器(Semi-dry transfer units TE-70, Hoefer Scientific Inc., San Francisco, CA, USA)將蛋白質轉漬至Immobilon<sup>TM</sup>-N PVDF膜(Millipore Inc., Bedford, Massachusetts, USA)，轉漬膜以TSWV緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25% gelatin, 0.9% NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS)漂洗15分鐘2次後，加入RCA蛋白抗體(1:625稀釋於TSWV)作用1小時以上，轉漬膜以TSWV漂洗(程序如上)，再加入二次抗體[Anti-Rabbit-IgG-alkaline phosphatase (BM)以1:5000比例稀釋於TSWV]作用1小時以上，並以TSWV漂洗。轉漬膜最後以Buffer III(0.1 M Tris pH 7.2, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)漂洗，然後浸泡於CDP-Star<sup>TM</sup>溶液於室溫下進行酵素螢光反應，並以X光底片進行偵測。

## 白藜葉片rca mRNA之偵測

為了檢測白藜rca基因所轉錄mRNA的種類(指可轉譯出不同型蛋白的mRNA)，以CDS及RCA-F14(5'-AAGAGAATGTCAAGAGAG-3')為引子，取單股cDNA片段為模板進行RT-PCR增幅，反應液內含物如上述，反應程式為94 °C 1分鐘1次，94 °C 30秒、55 °C 1分鐘、68 °C 1分鐘共循環32次。PCR產物以1.2% 琼脂電泳分離並轉漬於膜上，之後以DIG標識p3'RCA1為探針進行DNA雜合反應。

## 北方雜合分析

將20  $\mu$ g之總量RNA溶於10 mM sodium phosphate(pH 7.0), 50% DMSO, 1 M glyoxylal混合均勻，於50 °C加熱1小時，加入0.2倍體積5X loading buffer(50% glycerol, 10 mM sodium phosphate(pH 7.0), 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)，將已glyoxylation的RNA樣品以0.1 M sodium phosphate(pH 7.0)配製的0.8% 琼脂凝膠進行電泳分離。之後，瓊脂膠片置於50 mM NaOH溶液內輕搖10分鐘，再以100 mM Tris-HCl(pH 7.6)漂洗15分鐘，將RNA以Hybaid Vacu-AID(Hybaid<sup>TM</sup>)轉漬至nylon膜，轉漬膜以2X SSPE(300 mM NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>pH 7.4, 2

mM EDTA)漂洗5分鐘，再以UV cross-linker固定RNA於nylon膜。所需的探針以Rapid Multiprime DNA labelling kit(Amersham pharmacia Ltd)提供的方法製備，利用放射性同位素[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP進行標識，再以Sephadex G-50 column進行純化，探針使用前經100 °C加熱5分鐘後置冰上備用。進行雜合反應時，將轉漬膜浸泡於前雜合緩衝液[5X SSPE(0.75 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>pH 7.4, 5 mM EDTA), 5X Denhart's(0.2% bovine serum albumin, 0.2% Ficoll<sup>TM</sup>400, 0.2% Polyvinylpyrrolidone), 0.5% SDS, 20  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA]中，於65 °C作用1小時，之後加入探針於65 °C作用12小時以上，轉漬膜於溫室下以2X SSPE/0.1% SDS清洗10分鐘共2次，再以1X SSPE/0.1% SDS於65 °C下清洗15分鐘共2次，風乾轉漬膜並以X光片壓片進行偵測。

## 基因銀行序號(Genbank accession No.)

白藜rca基因之cDNA選殖株核酸序列已登錄於基因銀行(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，其序號為AY117142。

## 結果

### Rubisco活化酵素的cDNA之選殖及定序分析

藉由5'及3' RACE選殖所得到的白藜Rubisco活化酵素cDNA選殖株，經定序分析後，結果顯示此片段共含1809 bp，包含5'端121 bp的非轉譯序列、3'端374 bp之非轉譯序列及1314 bp的轉譯區，可轉譯出含438個氨基酸的蛋白質，分子量為47.8 kDa、等電點為6.875。此氨基酸序列含有葉綠體引導訊息序列和兩個ATP結合區域(圖一)。以DNA Star mega-alignment program進行RCA氨基酸序列相似性比較時，與分離自菠菜(*Spinacia oleracea*)、菸草(*Nicotiana tabacum*)、阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)及水稻(*Oryza sativa*)的RCA蛋白相同度分別為88%, 79%, 77%及77%(圖二)，與來自同屬藜科的菠菜RCA蛋白相似度最高。

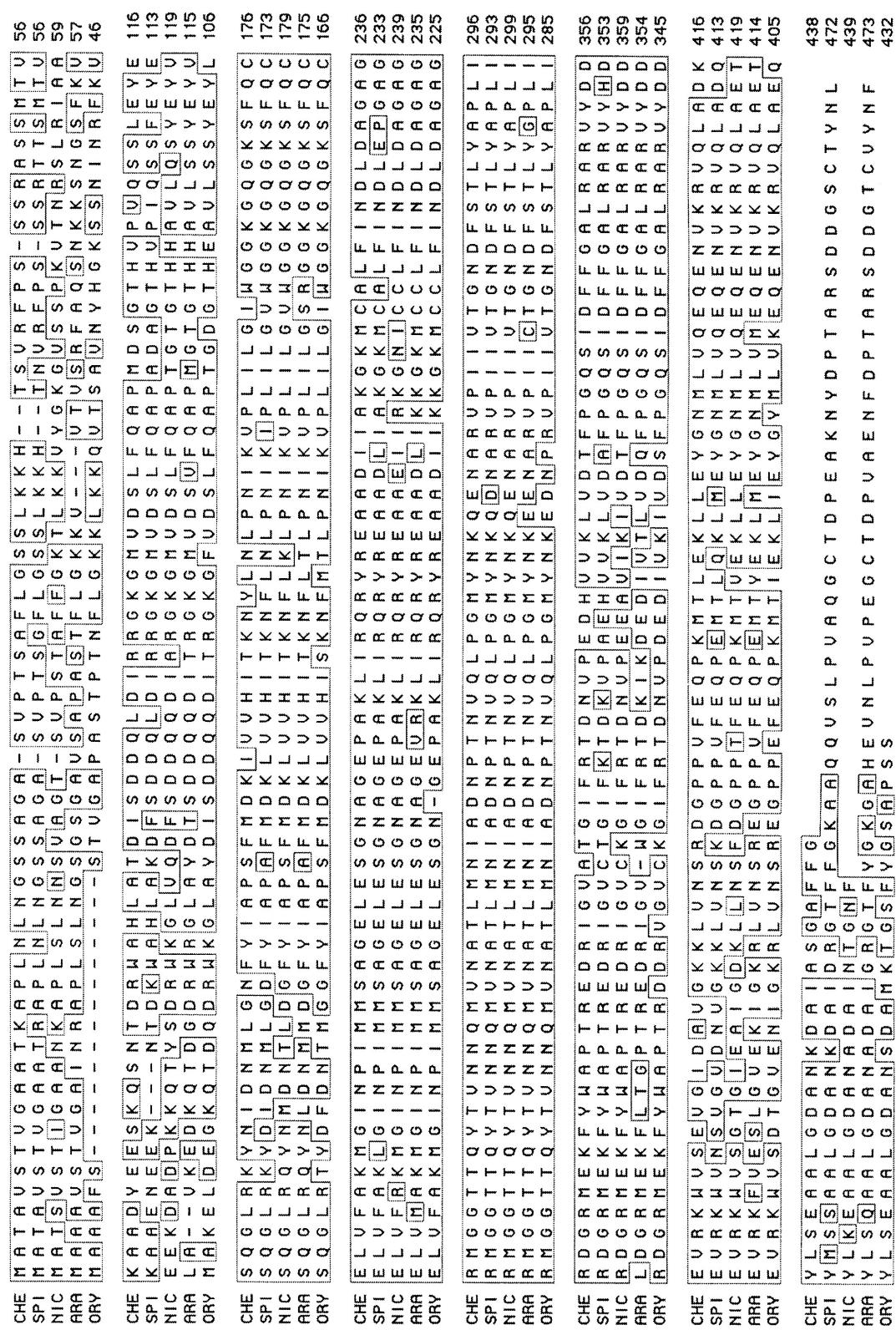
### rca以單套基因形式存在於白藜基因組

rca cDNA基因核酸序列具有三個HincII的切位，而無SspI或NotI的切位。以<sup>32</sup>P標定全長rca片段為探針，利用南方雜合法偵測HincII、SspI或NotI酵素處理之白藜基因體DNA，得到雜合片段數目分別為四、三及一個片段(圖三)。依據HincII及NotI酵素切割，所得到雜合片段數目顯示rca在白藜基因組中應只存在一套基因。而SspI酵素處理得到三段雜合片段則顯示rca在白藜基因組中，其intron的位置可能有兩個SspI切位。綜合以上結果推測rca在白藜基因組中應只存在一套基因，並至少含有兩段

CTACTATAAGTTCTACCTTCCACACACTAGCTAATCCTCAGGAATTCTCAAGTAAATAT  
 TAAAATTCTAAAAATAATTTGAAAGCTCTCTTAGGATCTCAGCCGTTGGATTGAA  
 ATGGCTACTGCTGTCTAACCGTCGGAGCTGCTACCAAGGCACCTTGAACTTGAATGGC  
 M A T A V S T V G A A T K A P L N L N G 20  
 TCGAGCGCTGGGGCATCGTCCCACCTCAGCTTCTTAGGGAGCAGCTAAAGAACAT  
 S S A G A S V P T S A F L G S S L K K H 40  
 ACAAGTGTGAGATTCCAAGCAGCTCTAGGGCGAGCTCAATGACCGTCAGGCGCTGAC  
 T S V R F P S S S R A S S M T V K A A D 60  
 TACGAGGAGAGCAAGCAGTCCAACACGGACAGATGGCTCATTGGCTACAGACATCTCT  
 Y E E S K Q S N T D R W A H L A T D I S 80  
 GATGATCAACTCGACATCCGTAGGGTAAGGGTATGGTGAECTCCCTTCCAAGCTCCG  
 D D Q L D I R R G K G M V D S L F Q A P 100  
 ATGGACTCCGGCACCCACGTTCCAGTTCAAGAGTCACTCGAACATACGAGAGTCAGGTCTT  
 M D S G T H V P V Q S S L E Y E S Q G L 120  
 AGGAAGTACAACATCGACAACATGGTAACTTCTACATTGCCCTTCTTCATGGAC  
 R K Y N I D N M L G N F Y I A P S F M D 140  
 AAGATTGGTGTTCACATCACCAAGAAACTACTTGAACCTGCCTAACATCAAGGTTCCCTG  
 K I V V H I T K N Y L N L P N I K V P L 160  
 ATCTGGTATTGGGAGGCAAAGGTCAAGGTAATCTCCAATGTGAGCTGTGTT  
 I L G I W G G K G Q G K S F Q C E L V F 180  
 GCCAAGATGGAATCAACCCCATCATGATGAGTGGGGAGAATTGAAAGTGGAAACGCA  
 A K M G I N P I M M S A G E L E S G N A 200  
 GGAGAGCCAGCAAAGTTGATCAGGCAAAGGTACCGTGAGGCAGCAGACATAATTGCCAAG  
 G E P A K L I R Q R Y R E A A D I I A K 220  
 GGAAAGATGTGCTCTGTTCATCAACGATCTGACCGGGTGGACGTATGGAGGC  
 G K M C A L F I N D L D A G A G R M G G 240  
 ACCACACAAATACACCGTGAACAACCAGATGGTTAACGCCACCCATGAACATTGCTGAC  
 T T Q Y T V N N Q M V N A T L M N I A D 260  
 AACCCCCACCAATGTCCAACTCCCTGGTATGTACAACAAGCAAGAGAACGCCGTGTT  
 N P T N V Q L P G M Y N K Q E N A R V P 280  
 ATTATCGTCACTGGTAACGACTTCTCCACCTTGTACGCTCCCTATCCGTGATGGTCGT  
 I I V T G N D F S T L Y A P L I R D G R 300  
 ATGGAGAAGTTCTACTGGCTCCACCCGTGAGGACCGTATCGGTGTTGCCACCGGTATC  
 M E K F Y W A P T R E D R I G V A T G I 320  
 TTCAGGACCGACAATGTTCTGGTCAAGCTCGACACCTTCCCTGGC  
 F R T D N V P E D H V V K L V D T F P G 340  
 CAATCTATTGATTTCTCGGTGCCTGAGGGCTCGTATACGATGATGAAGTAAGGAAG  
 Q S I D F F G A L R A R V Y D D E V R K 360  
 TGGGTTCTGAAGTAGGAATTGACGCCGTAGGAAAGAACGCTCGTAAACTCAAGGGACGGA  
 W V S E V G I D A V G K K L V N S R D G 380  
 CCACCAAGTGTGAAACAACCAAAATGACCTTGGAAAAGTGTGCTGAATACGGAAACATG  
 P P V F E Q P K M T L E K L L E Y G N M 400  
 CTTGTGCAAGAGCAAGAGAATGTCAAGAGAGTCACCTGCTGACAAGTACTTGAGCGAG  
 L V Q E Q E N V K R V Q L A D K Y L S E 420  
 GCTGCTCTGGAGATGCTAACAAAGATGCTATTGCATCCGGAGCTTCTCGGTTAAGTG  
 A A L G D A N K D A I A S G A F F G \* 438  
 TCCCTAACCTGGAGGCCAAGCAGCTCAGCAAGGAGATTGCCGTTCTGAAGGTTGTAC  
 TGACCCGAATGcGAAGAACATTGATCCAACCGAAGGAGTGCAGATGGAAGCTGCATCTA  
 CACTTTCTAGGCCTTAATTTCATTTAATTGTTGCATATATGAGAAAAGGGAAACAAT  
 TTTTAGTTGGATCTCTTAATTAGAGGGATTTATTATTATCCACTCTGTATACTTCCC  
 TATGTTTTCTCTTTGTGTTGGATTTGCTGTTGGTGAATTGTTGCTGTAATTGTGTAAGAAT  
 TCACCATCATCTTGTGTTGTGAAATTGATAATTGGTTATTGATTGTACCCCTTTTC  
 TCAAAATT

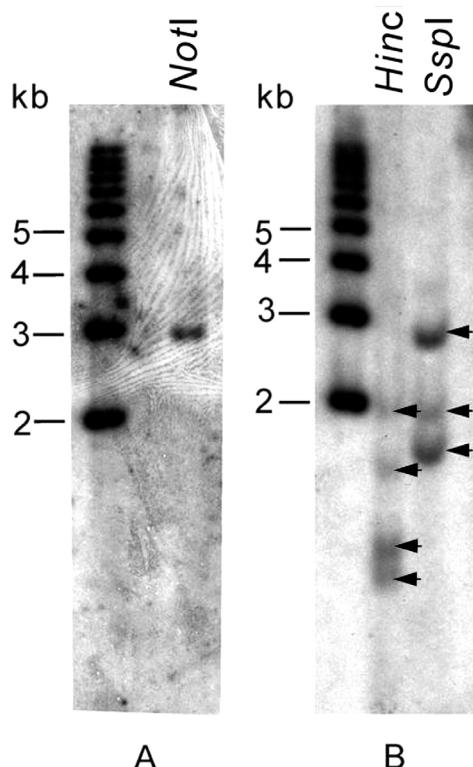
圖一、含白藜*rca*全長的cDNA選殖株的核酸序列及其推演RCA蛋白質的胺基酸序列。

**Fig. 1.** Nucleotide sequence of the 1809 bp *rca* cDNA clone and the deduced amino acid sequence of RCA protein. The underlined amino acid sequence denotes the predicted signal peptide. Consensus nucleotide binding sites are in boxes. The grey region is AAA (ATPase family associated with various cellular activities) motif.



圖二、來自不同植物的RCA蛋白質之胺基酸序列之比對。

**Fig. 2.** Alignment of the predicted amino acid sequences for RCA proteins from *C. quinoa* (CHE), *Spinacia oleracea* (SPI), *Nicotiana tabaccum* (NIC), *Arabidopsis thaliana* (ARA) and *Oryza sativa* (ORY) using the cluster method of DNA Star software. The amino acid in identities is shown in box. The accession numbers are AY117142 (CHE), S45033 (SPI), Z14980 (NIC), X14212 (ARA) and U74321 (ORY).



圖三、白藜基因體以 $^{32}\text{P}$ 標定的rca之cDNA為探針進行的雜合分析結果。

**Fig. 3.** Southern blot analysis of *C. quinoa* genomic DNA. A 50  $\mu\text{g}$  genomic DNA was digested with *Not*I (panel A), *Hinc*II and *Ssp*I (panel B), fractionated on 0.8% agarose gel, blotted onto nylon membrane and then probed with  $^{32}\text{P}$  labeled rca cDNA fragment.

帶有*Ssp*I 切位的intron。而來自菠菜的rca基因則含有6個intron<sup>(21)</sup>。

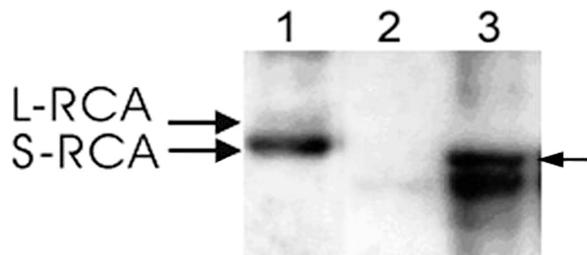
### 白藜葉內RCA蛋白質之累積

欲了解RCA蛋白在白藜葉片存在的種類，及本研究中所選殖的RCA中基因產物是屬於何種類型，因此先構築已去除葉綠體引導勝肽之rca cDNA片段於表現載體pT7-7，經由T7 RNA polymerase dependent系統大量表現RCA蛋白質。另一方面由葉片萃取全蛋白質，再利用西方墨點術偵測，結果顯示選殖株所表現的RCA蛋白其分子量大小，相當於萃取自植物之RCA蛋白質中分子量較小的S型RCA(圖四, Lane3)，並且在白藜葉片中S型RCA的累積量較多(圖四, Lane 1)。

### RT-PCR方式偵測白藜葉內的RCA蛋白之成熟mRNA的種類

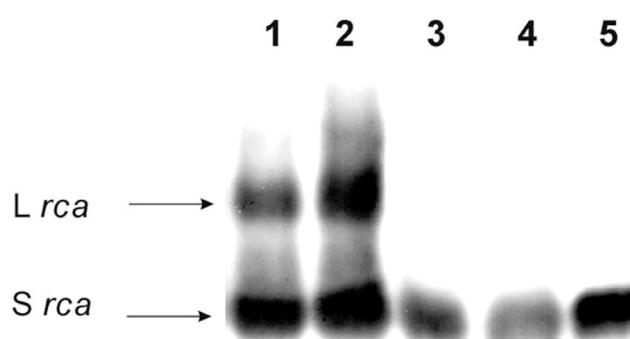
進一步確認植物體rca基因所轉錄的mRNA種類及本研究所選殖的rca之cDNA是屬於何種類型，利用RT-PCR增幅3' rca cDNA片段並結合南方雜合法分析，可偵

測到兩段不同大小之3' rca cDNA(圖五)，證實白藜確實含有可轉譯L及S兩種大小蛋白的mRNA存在，並且S型mRNA的表現多於L型mRNA(圖五，比較lane1與3或lane2與4之DNA pattern)。以所選殖到的rca cDNA為模板所得之PCR產物，與植物體mRNA為模板所得RT-PCR



圖四、以西方墨點術分析白藜葉片產生的RCA蛋白及在 *E. coli* 大量表現的RCA蛋白質。

**Fig. 4.** Western analysis of the RCA in *C. quinoa* and in *E. coli* carrying rca cDNA gene. Lane 1: total proteins extracted from *C. quinoa*. Lane 2 and 3: total proteins extracted from *E. coli* (pNCHU711) without or with IPTG induction respectively in T7 RNA polymerase dependent expression system. Total proteins were fractionated on 15% SDS-PAGE. After blotting, the protein was probed with anti-rice RCA serum.



圖五、以南方雜合法分析白藜3'端之rca mRNA之RT-PCR產物。

**Fig. 5.** Analysis of the 3'-end region of rca mRNA using RT-PCR and Southern blot. Total RNA (2.5  $\mu\text{g}$ ) and poly(A) mRNA (150 ng) were reversely transcribed with a poly(T) primer (CDS). The RT-products gained from using poly(A) mRNA-RT reaction (lane 1 and lane 3) or using total RNA-RT reaction (lane 2 and 4) were then used as templates in following PCR reactions. One-10th (lane 1, 2) or one-40th (lane 3, 4) amounts of each RT product used in PCR reaction were amplified using 5' primer RCA-F14 and 3' primer CDS. The PCR products were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred to a nitrocellulose membrane. The blot was hybridized with DIG-labeled rca gene probe. Lane 5 showed the PCR product by using p3'RCA1 as a template.

產物的 S 型大小相同，顯示本研究中所選殖到的 *rca* cDNA 選殖株可轉譯 S 型的蛋白。

### 白藜受菜豆細菌性斑點病菌誘發過敏性反應中 *rca* mRNA 的累積情形

白藜葉片注射菜豆細菌性斑點病菌 24 小時之後，被接種之區域發生薄化，漸漸產生脫水及皺縮，最後褐化壞疽，即所謂過敏性反應。以北方雜合法偵測在此過敏性反應中 *rca* mRNA 的表現量。結果顯示 *rca* mRNA 在接種 6 - 9 小時後的累積量為同期之對照組的 0.98 至 0.55 倍，有顯著下降的趨勢，在接種 12 小時後，已不易偵測 *rca* mRNA 之表現(圖六)。

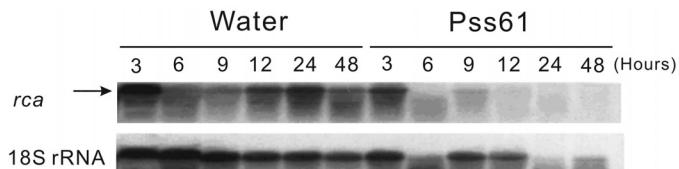
### 白藜受菜豆細菌性斑點病菌誘發過敏性反應中 RCA 蛋白質的累積情形

以水稻 RCA 的抗血清進行西方墨點術，分析白藜 RCA 蛋白質在受菜豆細菌性斑點病菌誘發的過敏性反應中的累積情形。結果顯示病原細菌在白藜所誘導之過敏性反應過程中，RCA 蛋白質的累積量並無改變(圖七)，推測植物葉片雖已形成壞疽，但 RCA 蛋白質仍可穩定的存在細胞中。

## 討 論

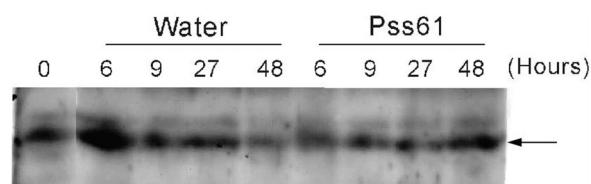
*Rubisco activase (RCA)* 為活化 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) 的酵素<sup>(6,22)</sup>，在本研究中，由白藜選殖得到的 RCA 之 cDNA 基因乃以單一套基因形式存在於基因體內。在白藜葉片所含 RCA 蛋白質具有 2 種不同大小的型式，但以 S 型的量較多，而所選殖的 *rca* cDNA 其轉譯的蛋白質即為 S 型。白藜由菜豆細菌性斑點病菌所誘發的過敏性反應過程中，在接種後 6 - 9 小時 *rca* mRNA 的表現量有顯著下降的趨勢，但以西方墨點術分析白藜的 RCA 蛋白質的量在過敏反應中並無顯著改變，顯示 RCA 蛋白在植物被誘導過敏性反應下很穩定存在。

多數植物的 *rca* 基因都是單一套存在，但其所轉錄的 pre-mRNA 却因 alternative splicing 之故，可產生 3' 端不同的 2 種成熟 mRNA，導致轉譯出兩種大小不同的 RCA 蛋白質<sup>(18,20,21,25)</sup>。在本研究中，我們也發現白藜具有 2 種大小不同的 RCA 蛋白質，而以 S 型的量較多，但因未選殖到另一 L 型的 cDNA，所以無法得知白藜 *rca* pre-mRNA 的剪切位置。又根據報告指出 *rca* 基因或 RCA 蛋白酵素活性常受非生物環境因子影響，但其 S 型的 RCA 蛋白通常累積較高的量<sup>(8,13,16,18,23,24)</sup>，而在本研究中也顯示 S 型 RCA 蛋白質的量比較多，即使在病原細菌誘導之過敏反應中，S 型 RCA 蛋白質的量也維持不變，顯示 RCA 蛋白一旦被



圖六、以北方雜合法分析白藜經菜豆細菌性斑點病菌誘導過敏性反應過程中之 *rca* mRNA 累積情形。

**Fig. 6.** Northern analysis of the *rca* mRNA accumulation in the hypersensitive response of *C. quinoa* induced by *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Pss61). Total RNA was fractionated on phosphate buffer gels. After blotting, the RNA was hybridized with <sup>32</sup>P-labeled *rca* cDNA and 18S rRNA cDNA, respectively. Time is indicated in hour postinfected by Pss61.



圖七、以西方墨點術分析白藜經菜豆細菌性斑點病菌誘導過敏性反應過程中之 RCA 蛋白累積情形。

**Fig. 7.** Western analysis of the RCA in *C. quinoa* during the hypersensitive response induced by *P. syringae* pv. *syringae* 61. Total proteins were fractionated on 15% SDS-PAGE. After blotting, the protein was probed with anti-rice RCA serum. Time is indicated in hour postinfected by Pss61.

轉譯合成後非常穩定，而在此生物逆境下，L 型 RCA 的量仍舊很低並未見到增加，與玉米的 L 型的 RCA 在熱逆境下會增加累積量<sup>(16)</sup>，顯然很不同。

植物因為防禦病原的為害而在感染之處產生過敏性反應，其細胞乃以制約式死亡 (programmed cell death) 限制病原的繁殖<sup>(3)</sup>。在過敏性反應的發展中，植物的生理作用例如呼吸及光合作用皆受影響<sup>(12)</sup>，在本研究中白藜受細菌誘導過敏性反應發展時，由葉片上選殖到的 *rca* 基因其 mRNA 的累積量呈現衰退，此結果並不令人驚奇，因為此反應過程中葉綠體有衰竭趨勢，因此可以合理期待光合作用勢必減弱，連帶調節與光合作用有關基因的轉錄作用。

白藜雖非經濟作物，但對多數植物病毒而言，是非常理想的非寄主植物，可被誘導過敏反應造成局部病斑，因此能以分離單斑方式純化病毒之用<sup>(9)</sup>，在本研究中我們發現 *Pseudomonas syringae* 群之病原細菌也能在此植物葉片造成很顯著的過敏性反應。過敏性反應是植物防禦機制之一，探討防禦機制將利於未來的病害防治。本研究是首次以白藜為材料，研究與病原之不親和反應之分子機制，而 *rca* 的 cDNA 選殖株是繼一段葉綠體核酸序列 (accession No. Z98202) 及 *olp-4* 基因 (AF516207)<sup>(2)</sup> 之後，第三個從白藜中選殖出來的基因。

## 謝 辭

本研究承行政院國家科學委員會生物處經費補助(NSC 87-2322-B005-008, NSC 88-2311-B-005-003-B11, NSC 89-2311-B-005-029-B11)，謹此致謝。除此之外，特別感謝中央研究院植物所陳淑貞博士提供水稻RCA蛋白質之抗血清，及感謝中興大學生物科技所徐堯輝博士提供竹嵌紋病毒材料。

## 引用文獻

1. Baker, C. J., Atkinson, M. M., and Collmer, A. 1987. Concurrent loss in Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of the ability to induce the hypersensitive response and host plasma membrane K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in tobacco. *Phytopathology* 77:1268-1272.
2. Chiang, B. T. 2002. The expression of osmotin-like protein and Rubisco activase during the hypersensitive response of *Chenopodium quinoa* induced by bamboo mosaic virus-S and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain 61. National Chung Hsing University, Ph. D Thesis.
3. Dangl, J. L., Dietrich, R. A., and Richberg, M. H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-Microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
4. Feller, U., Crafts-Brandner, S. J., and Salvucci, M. E. 1998. Moderately high temperature inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) activase-mediated activation of rubisco. *Plant Physiol.* 116:539-546.
5. Huang H. C., Schuurink, R., Denny, T. P., Atkinson, M. M., Baker, C. J., Yucel, I., Hutcheson, S. W., and Collmer, A. 1989. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J. Bacteriol.* 170:4748-4756.
6. Jensen, R. G. 2000. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12937-12938.
7. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
8. Law, R. D., and Crafts-Brandner, S. J. 2001. High temperature stress increase the expression of wheat leaf Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 386:261-267.
9. Lin, N. S., Lin, B. Y., Lo, N. W., Hu, C. C., Chow, T. Y., and Hsu, Y. H. 1994. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* 75: 2513-2518.
10. Marrou, T., and Messiaen, C. M. 1967. The *Chenopodium quinoa* test: a critical method for detecting seed transmission of lettuce mosaic virus. *Proceedings of the international seed testing Association* 32:49-57.
11. Portis A. R., Jr. 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1015:15-28.
12. Roebuck, P., Sexton, R., and Mansfield, J. W. 1978. Ultrastructural observations on the development of the hypersensitive reaction in leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Red Mexican inoculated with *Pseudomonas phaseolicola* (race 1). *Physiol. Plant Pathol.* 12:151-157.
13. Rokka A., Zhang, L., and Aro, E.-M. 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* 25:463-471.
14. Rompf, R., and Kahl, G. 1997. mRNA differential display in agarose gels. *BioTechniques* 23:28-32.
15. Salvucci, M. E., Werneke, J. M., Ogren, W. L., and Portis, A. R., Jr. 1987. Purification and species distribution of rubisco activase. *Plant Physiol.* 84:930-936.
16. Sanchez de Jimenez, E., Medrano, L., and Martinez-Barajas, E. 1995. Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochem.* 34: 2826-2831.
17. Tabor, S., and Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Acad. Sci. USA* 82:1074-1078.
18. To, K. Y., Suen, D. F., and Chen, S. C. G. 1999. Molecular characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves. *Planta* 209: 66-76.
19. van de Loo, F. J., and Salvucci, M. E. 1998. Involvement of two aspartate residues of Rubisco activase in coordination of the ATP  $\gamma$ -phosphate and subunit cooperativity. *Biochem.* 37:4621-4625.
20. Werneke, J. M., Zielinski, R. E., and Ogren, W. L. 1988. Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:787-791.
21. Werneke, J. M., Chatfield, J. M., and Ogren, W. L. 1989. Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1: 815-825.
22. Wolosiuk, R. A., Balicora, M. A., and Hagelin, K. 1993. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* 7:622-637.
23. Zhang, N., and Portis, A. R., Jr. 1999. Mechanism of light regulation of rubisco: a specific role for the larger rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9438-9443.
24. Zhang, N., Kallis, R. P., Ewy, R. G., and Portis, A. R., Jr. 2002. Light modulation of rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger rubisco activase isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3330-3334.
25. Zhang, Z., and Komatsu, S. 2000. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two isoforms of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice (*Oryza sativa* L.) *J. Biochem.* 128:383-389.

## ABSTRACT

Chiang, B. T.<sup>1</sup>, and Huang, H. C.<sup>1,2</sup> 2003. Expression of *rca* gene in *Chenopodium quinoa* during the hypersensitive response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathol. Bull. 12:93-102. (<sup>1</sup>Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: hchuang@dragon.nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22861905)

A full-length *rca* cDNA encoding Rubisco activase was isolated from leaf tissues of *Chenopodium quinoa* using subtractive hybridization and following 5' and 3' RACE-PCR cloning. This clone comprises 1809 bp, consisting of a 121-bp 5'unstralated region, a 1314 bp coding sequence of *rca* cDNA , and 374-bp 3'unstralated region. The deduced sequence of RCA includes 438 amino acid residues of Mr 47.8 kDa and pI 6.875. A single copy of *rca* gene is detected in the genome of *C. quinoa* based on Southern blot assay. According to western blot analysis with a rice RCA serum and RT-PCR experiment, the results indicated that there are two isoforms of RCA protein present in *C. quinoa* and the S-form is abundant. The clone isolated here encodes S-form RCA. Furthermore, the northern blot assay showed that the *rca* mRNA expression of *C. quinoa* declined 6-9 hr after the hypersensitive response (HR) induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain Pss61. However, the accumulation of RCA protein during the HR was the same based on the western blot analysis.

Key words : *Chenopodium quinoa*, hypersensitive response, Rubisco activase, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain Pss61