

寄生疫霉 *parA1* 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

梁元存¹ 刘爱新¹ 董汉松² 王金生² 张天宇^{1*}

(¹ 山东农业大学植物病理学系 泰安 271018) (² 南京农业大学植物病理学系 南京 210095)

摘 要 根据已报道的寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*) *parA1* 基因的序列设计引物,从 4 株寄生疫霉中国菌株(3 株来自烟草,1 株来自刺槐)中克隆到此基因并进行了重组表达。序列分析表明 4 株寄生疫霉 *parA1* 基因序列高度保守。对表达载体 pET-30a(+) 双酶切,构建表达 Parasiticein 蛋白的表达载体 pET-eli,用 CaCl_2 法转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21,通过诱导在大肠杆菌中进行非融合表达,表达产物在烟草上引起过敏性反应。性质测定表明,表达产物有一定的耐热性,并对蛋白酶 K 敏感。

关键词 寄生疫霉, Elicitins, *parA1* 基因, 克隆, 表达

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2004)02-0202-04

Elicitins 是疫霉(*Phytophthora*)和腐霉(*Pythium*)两个属的植物病原卵菌产生的、在烟草上引起过敏性反应(Hypersensitive response, HR)和系统获得抗性(Systemic acquired resistance, SAR)的一类胞外蛋白质的总称。Elicitins 氨基酸序列高度相似和保守,前体蛋白质含 19 或 20 个氨基酸的信号肽,成熟蛋白质一般含 98 个氨基酸,分子量一般为 10kD,少数 Elicitins 略有不同^[1]。Elicitins 有 α 型(酸性)和 β 型(碱性)。寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)可产生 α 型的 Elicitin,称 Parasiticein^[2]。Elicitins 蛋白具有诱导植物抗病性和程序化细胞死亡信号通路的作用,是研究植物抗病机制的理想材料。

寄生疫霉 *P. parasitica* 能引起包括烟草在内的至少 90 多种植物的病害,在烟草上引起黑胫病。从国内主产烟区采集的烟草黑胫病菌 *P. parasitica* 菌株致病力有明显分化^[3]。已有研究表明对烟草致病力强的菌株 Elicitin 不产生或产量少,但含有编码 Elicitin 的基因^[4],说明 Elicitin 的表达可能影响病菌的致病力。但目前还没有充分的证据支持这一假设,还未见有针对国内疫霉菌株的类似研究。为研究 Elicitins 的产生与病菌致病力之间的关系及其引发的信号传导等问题,我们克隆了编码 Parasiticein 的基因 *parA1*,并转化大肠杆菌进行重组表达。

1 材料和方法

1.1 菌株和载体

寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*) 4 个菌株的来

源和特征见表 1;原核表达载体是 pET-30a(+),其宿主菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等分子生物学试剂购自大连宝生物工程有限公司;其余试剂为国产分析纯。

表 1 菌株来源及特征

Table 1 <i>Phytophthora parasitica</i> isolates used in this study			
Isolate	Host	Pathogenicity	Source
9816	Tobacco	High	Stored in this lab
9822	Tobacco	Weak	Stored in this lab
9704-1	Tobacco	Weak	Stored in this lab
p4	Locust	No Tested	Stored in lab of pathogen, Nanjing Agricultural University

1.2 引物

根据序列同源性,参考已报道的烟草寄生疫霉 *parA1* 基因序列^[4]设计特异引物,上游引物序列为 5'-GGAATTCCATATGAACCTCCGCGCTCT-3'(划线部分为 *Nde* I 酶切位点),下游引物序列为 5'-CGGGATCCTATTACAGTGACGCGCACC-3'(划线部分为 *Bam*HI 酶切位点),引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 寄生疫霉菌基因组 DNA 的提取

用液体培养基(ASYT)^[5]培养寄生疫霉 4 个菌株,26℃培养 2~3 周,收集菌丝体,蒸馏水冲洗数次后,保存于 -20℃ 冰箱中。用 CTAB 法^[6]提取寄生疫霉的基因组 DNA。

基金项目 教育部博士点基金(B200106);山东省自然科学基金重点资助项目(Z99D02)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241274;E-mail tyzhang@sdaa.edu.cn

作者简介 梁元存(1966-)男,山东省新泰市人,副教授,博士,主要从事分子植物病理学研究。E-mail dbyang@sdaa.edu.cn

收稿日期 2003-03-03,修回日期 2004-01-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.4 寄生疫霉 *parA1* 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系:10 × Buffer(含 25mmol/L MgCl₂) 5μL, dNTPs (各 2.5mmol/L) 3μL, 上、下游引物 (10μmol/L)各 2μL, *Ex Taq* DNA 聚合酶(5U/μL) 0.3μL 模板 DNA 4μL, 无菌 ddH₂O 33.7μL, 总体积 50μL。反应条件:94℃ 预变性 5min;94℃ 30s, 60℃ 1min, 72℃ 40s, 35 个循环;72℃ 延伸 7min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 扩增产物的回收、酶切和连接

用以前的方法^[7,8]进行扩增产物的回收、酶切及连接。低熔点胶回收扩增产物。37℃ 酶切过夜,酶切产物用醋酸铵沉淀,以除去寡核苷酸片段。回收片段与经双酶切的 pET-30a(+) 载体连接,然后转化入感受态细胞 BL21。

1.6 重组克隆的酶切和测序

碱裂解法提取质粒^[7],用 *Nde* I 和 *Bam* H I 进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定;DNA 序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

1.7 *ParA1* 基因的诱导表达

将鉴定、测序后的克隆接种到 LB 液体培养基(含 Km 20μg/mL)中,37℃ 培养过夜,取 5 ~ 10mL 转接到 100mL LB 液体培养基中(含 Km 20μg/mL),37℃ 振荡培养 3 ~ 6h 后,加 1mol/L 异丙基-硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1mmol/L,诱导培养 3h。离心收集菌体,5mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH6.5)洗一次,再溶于 1/10 体积的 PBS 中,加 1mmol/L 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)至终浓度为 1mmol/L,超声波破碎(40% 功率,破碎 10min)。然后,10000r/min,4℃ 离心 10min,上清液用于 SDS-PAGE 和活性分析。

1.8 *ParA1* 表达产物的 SDS-PAGE 和活性分析

为获得较好的小分子量蛋白质的分离效果,提高了 Tris 缓冲液的浓度,浓缩胶浓度 3.5%,分离胶浓度 15%^[8]。浓缩胶中电流 10mA,分离胶中电流 20mA,进行 SDS-PAGE。

重组菌破碎产物上清液(含有 Parasiticein 目的蛋白 100nmol/L)和含空载体的出发菌破碎产物上清液分别注射烟草叶片观察过敏反应(HR)以确定活性和性质。分三组处理,第一组,两种上清液直接注射烟草叶片;第二组,重组菌破碎产物上清液煮沸 5、15 和 30min;第三组,在重组菌破碎产物上清液中加入蛋白酶 K(终浓度 0.5μg/mL),37℃ 保温 30min。处理后的样品注射烟草叶片观察有无 HR。

2 结果

2.1 疫霉菌 *parA1* 基因的 PCR 扩增结果

4 株寄生疫霉的基因组 DNA 都扩增出了一条约 350bp 的片段(图 1),大小与设想一致,说明疫霉菌中国菌株中无论寄主是烟草还是刺槐基因组中都可能含有 *parA1* 基因。初步确定扩增出的片段就是要克隆的基因片段。

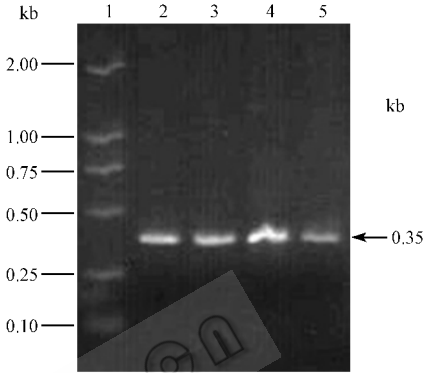


图 1 从疫霉菌 4 个中国菌株扩增 *parA1* 同源物的结果

Fig.1 PCR products amplified from 4 strains of *Phytophthora parasitica* collected from China

1. Marker DL-2000 2 ~ 5. Strains 9816, 9822, 9704-1 and p4.

2.2 重组质粒的酶切鉴定和序列分析

从酶切后的电泳图谱(略)可看出,酶切后的小片段约 350bp,初步表明 *parA1* 已克隆成功。酶切鉴定后,含重组质粒的克隆序列分析表明 4 个菌株的序列与已报道的序列完全一致(序列未列出)。说明 *parA1* 是一段高度保守的序列,无论是烟草还是刺槐分离菌株中都含有此序列。这表明 PCR 扩增出的片段就是 *parA1* 基因的片段。

2.3 *ParA1* 基因表达产物的 SDS-PAGE

经双酶切、测序后的克隆,在 LB 液体培养基中培养,通过 IPTG 诱导以产生 Parasiticein 蛋白质。SDS-PAGE 图谱表明(图 2),在约 10kD 的位置,重组菌比出发菌多出一条明显的条带,可能就是 Parasiticein 蛋白,与预测的大小基本一致;对电泳图谱扫描可知目的蛋白(10kD)占总蛋白量的 8.2%。

2.4 *ParA1* 表达产物的活性分析和性质测定

为确定 *parA1* 表达产物是否有生物活性和性质,进行了注射烟草叶片实验。重组菌破碎产物上清液(含有 Parasiticein 目的蛋白 100nmol/L)注射烟草叶片后,在 12 ~ 24h 内看到典型的过敏性反应,而含有空载体的出发菌破碎产物上清液注射烟草叶片没有发生过敏性反应,进一步表明约 10 kD 的蛋白质是 *ParA1* 基因表达产生的具有生物活性的蛋白。

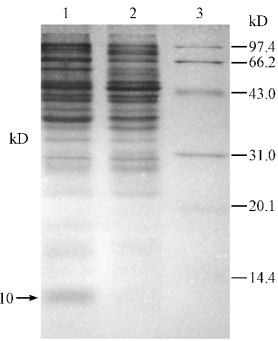


图 2 *ParA1* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of expression product of the *parA1* gene by SDS-PAGE
1. A cell-free solution prepared from recombinant *E. coli* ;2. A cell-free solution prepared from *E. coli* containing the empty vector 3. Marker.

的蛋白。沸水分别处理表达产物 5、15min ,此蛋白仍能保持生物活性 ,而沸水处理 30min 和蛋白酶 K (终浓度 0.5μg/mL)处理后 ,表达产物活性丧失 ,在烟草叶片上不能产生过敏反应 ,说明表达产物有一定的耐热性 ,但对蛋白酶敏感(图 3)。这些结果符合 Elicitins 天然蛋白的性质。

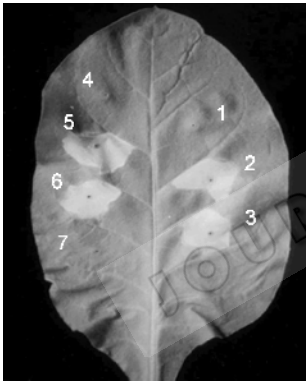


图 3 *ParA1* 基因表达产物在烟草叶片诱发 HR 和性质

Fig.3 The tobacco leaf infiltrated with expression product of the *parA1* gene
The photograph was taken 5d postinfiltration. 1. Proteins from *E. coli* containing the empty vector ; 2. Parasiticein from *E. coli* expressing *parA1* , heated in boiling water for 5min ; 3. Parasiticein from *E. coli* expressing *parA1* , heated in boiling water for 15min ; 4. Parasiticein from *E. coli* expressing *parA1* , heated in boiling water for 30min ; 5. Parasiticein from *E. coli* expressing *parA1* ; 6. Parasiticein from *E. coli* expressing *parA1* , keep at 37℃ for 30min ; 7. Parasiticein treated by protease K at 37℃ for 30min.

3 讨论

研究表明 ,在寄生疫霉中 ,对烟草不同致病性的菌株产生 Elicitin 的能力不同 ,弱致病性菌株比强致病性菌株产生的 Elicitin 多 ,并且 Elicitin 的产生受转录水平的调控^[4]。4 株寄生疫霉 *parA1* 基因的克隆

也为了解寄生疫霉的内部表达调控奠定了基础。

寄生疫霉 *parA1* 基因是一个 354bp 完整的开放阅读框架 (ORF) ,编码 118 个氨基酸的 Pre-parasiticein。Pre-parasiticein 含有 20 个氨基酸的信号肽 ,经过加工产生 98 个氨基酸的成熟 Parasiticein 蛋白 ,分子量 10kD^[4]。根据已知的序列设计引物 ,扩增片段是一完整的 ORF ,测序结果表明 ,无论寄主是烟草还是刺槐寄生疫霉的菌株 ,其 *parA1* 序列完全一致 ,说明此功能片段在进化上高度保守。在液体培养中 ,Elicitins 可由 *Phytophthora* 和 *Pythium* 两个属的植物病原卵菌胞外分泌而产生 ,但产量低。通过 *ParA1* 基因在大肠杆菌中的表达 ,获得了有生物活性蛋白质 ,为进一步研究其诱导的抗病机制提供了物质基础。

过敏反应 (HR) 是植物受到非亲和病原小种侵染时细胞快速死亡的现象 ,HR 一般在 12~36h 内发生 ,常作为一种抗病反应。Elicitins 在烟草叶片上能引起 HR 和 SAR ,HR 是 Elicitins 在烟草上的特异性反应。因此 ,本研究用 HR 和 SDS-PAGE 的结果验证表达产物的正确性。Elicitins 是研究抗病信号传导的好材料 ,因而受到广泛的重视。目前 ,我们正在这一领域进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Yu L M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , **92** :4088 - 4094.
[2] Ricci P , Trentin F , Bonnet P , et al. Differential production of parasiticein , an elicitor of necrosis and resistance in tobacco , by isolates of *Phytophthora parasitica* . *Plant Pathol* , 1992 , **41** : 298 - 307.
[3] 梁元存 ,刘延荣 ,王玉军 ,等 .烟草黑胥病菌致病性分化和烟草品种的抗病性差异 .*植物保护学报* , 2003 , **2** :143 - 147.
[4] Kamoun S , Klucher K M , Coffey M , et al. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica* . *Mol Plant-Microbe Interac* , 1993 , **6** :573 - 581.
[5] Capasso R , Cristinzio G , Evidente A , et al. Elicitin 172 from an isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. *Phytochemistry* , 1999 , **55** :703 - 709.
[6] Edwards K , Johnstone C , Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuc AcidRes* , 1991 , **19** :1349.
[7] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T.金冬雁 ,黎孟枫 ,等译 .*分子克隆实验指南* .第二版 .北京 :科学出版社 ,1989.
[8] 奥斯伯 F ,布伦特 R ,金斯顿 R E.颜子颖 ,王海林译 .*精编分子生物学实验指南* .北京 :科学出版社 ,1999.

Cloning of the *ParA1* Gene from *Phytophthora parasitica* and Its Expression in *Escherichia coli*

LIANG Yuan-Cun¹ LIU Ai-Xin¹ DONG Han-Song² WANG Jin-Sheng² ZHANG Tian-Yu¹ *

(1 Department of Plant Pathology , Shandong Agricultural University , Taian 271018 , China)

(2 Department of Plant Pathology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : Elicitins are a family of small proteins secreted by species of the genus *Phytophthora* and *Pythium* . They can cause a hypersensitive response(HR) and induce systemic acquired resistance(SAR) in tobacco . Here we report cloning and characterization of *parA1* homologs from 4 strains of *Phytophthora parasitica* isolated from tobacco and locust in China . Amplification by PCR (polymerase chain reaction) of DNA from the 4 strains , using primers specific to a *parA1* reported previously , produced 4 products . Their nucleotide sequences are highly conserved and identical to the *parA1* gene previously cloned . Therefore , the *parA1* genes were successfully cloned from the Chinese strains of *P. parasitica* . They were cloned into the vector pET-30a(+) and transformed into *Escherichia coli* BL21 . The expressed product was biologically active , as it caused HR in tobacco leaf panels after direct infiltration ; the protein was thermostable and sensitive to protease K . We have established a recombinant *E. coli* that produces the elicitor . This is the first report of cloning of *parA1* genes from locust isolate of the pathogen .

Key words : *Phytophthora parasitica* , Elicitins , *parA1* , Cloning , Expression

Foundation item : Doctor Point Funds of Educational Department (B200106) ; Natural Science Foundation of Shandong Province (Z99D02)

* Corresponding author . Tel : 86-538-8241274 ; E-mail : tyzhang@sdau.edu.cn

Received date : 03-03-2003

科学出版社生命科学编辑部精品书推荐(微生物类)

微生物生物学 , Brock Biology of Microorganisms , 8th ed.

M. T. Madigan 杨文博 主译

2001 年 8 月出版 , 2004 年 2 月重印 , 16 开 , 1248 页 , 彩色插页 : 16 定价 : 160.00 元

本书是经典微生物教材 , 一版再版。本书从细胞化学和细胞生物学入手 , 详尽地介绍了微生物的营养、代谢、合成 ; 大分子和分子遗传、微生物遗传、遗传工程和生物工程 ; 生长和调控 ; 工业微生物 ; 寄生 - 寄生菌的关系 ; 免疫学和免疫 ; 临床和诊断微生物 ; 流行病学和公共卫生微生物学 ; 主要的微生物疫病 ; 微生物代谢的多样性 ; 微生物生态学 ; 分子体系和微生物进化 ; 病毒、细菌、古细菌和真微生物等内容。

微生物生物技术 , Microbiology Biotechnology

A. Glazer , H. Nikaido (USA) 喻子牛 等译

2002 年 1 月出版 16 开 , 纸面精装 474 页 定价 : 67.00 元

本书内容属应用微生物学 , 特别是工业微生物学方面的一本极有价值的参考书。书中涵盖了微生物在食品加工、生产、杀虫、疫苗、抗生素、生物降解塑料等方面的应用 , 即有基础理论 , 又着重实践指导。

现代微生物学与实验技术

林稚兰、黄秀梨 主编 2000 年 7 月出版 , 大 32 开 400 页 , 定价 : 28 元

本书概述了近几年来在微生物学一些重要领域中的研究进展及其实验技术。主要内容有基因工程(包括基因工程原理、抗生素基因工程、植物抗病毒基因工程、基因重组菌培养工程等)、微生物细胞工程、微生物发酵工程、特殊生理类型微生物的研究进展(包括固氮菌、丝状菌、厌氧菌、极端环境下的微生物)及其他若干领域研究进展(如真核微生物 MT、真菌细胞壁、微生物杀虫毒素)。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址 : 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社 联系人 阮芯 联系电话 010 - 64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致函索书 010 - 64012501

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>