

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):641-646; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

水稻白叶枯病抗性基因 *Xa21* 和稻瘟病抗性基因 *Pi-d2* 激酶蛋白质在毕赤酵母中的表达及条件优化

李晓明¹, 王书利¹, 李莉云¹, 李晓兵², 王静², 刘国振^{1*}

(¹ 河北农业大学生命科学院, 保定 071001)

(² 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要:【目的】白叶枯病和稻瘟病是最主要的水稻病害, *Xa21* 是水稻白叶枯病抗性基因, *Pi-d2* 是稻瘟病抗性基因, 二者都编码类受体激酶蛋白质。本研究旨在毕赤酵母系统中表达 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质。【方法】用 *Xa21* 和 *Pi-d2* 的激酶区 PCR 产物, 构建了 pPICZ α A-*Xa21K*、pPICZ α A-*Pi-d2K* 重组质粒, 酶切及测序验证后, 将重组质粒线性化, 转化到毕赤酵母菌株中, 系统地比较了不同酵母菌株 (KM71、GS115、X33), 不同甲醇浓度 (1%、2%、3%), 不同 pH (pH5、pH6、pH7、pH8) 值, 不同诱导时间 (24 h、48 h、72 h) 条件下激酶蛋白质的表达情况。【结果】XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质可以在毕赤酵母中表达, 但表达的蛋白质不能分泌到培养基上清中, 而只能在菌体中检测到, 对表达条件的系统比较发现, 毕赤酵母菌株 KM71 和 X33、2% 的甲醇诱导浓度、pH5 和 48 h 以上的诱导时间有利于激酶蛋白质的表达, 最后我们在酵母裂解物上清中获得了纯化的考染可见的激酶蛋白质。【结论】在毕赤酵母中表达了 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质, 为下一步生化特性研究奠定了基础。

关键词: 水稻; 白叶枯病; 稻瘟病; 抗病基因; 毕赤酵母; 蛋白质表达

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0641-06

水稻是最重要的粮食作物之一, 是全世界一半以上人口的主要食物来源。水稻病害的发生会导致减产甚至绝收, 白叶枯病和稻瘟病是水稻的两大主要病害, 对抗病基因介导的分子机理研究对水稻生产具有重要的意义。 *Xa21* 对水稻白叶枯病具有广谱抗性, 编码的蛋白质是一个类受体激酶^[1], 细菌体外表达的 XA21 激酶区及水稻体内纯化的 XA21 蛋白质均具有激酶活性, 邻近跨膜区的 3 个磷酸化位点影响 XA21 蛋白质的稳定性, 从而影响植株的抗性^[2-3]。稻瘟病是真菌性病害, *Pi-d2* 抗稻瘟病基因最早在水稻品种地谷中发现, 并定位在第 6 号染色体上^[4], 经图位法克隆后, 发现 *Pi-d2* 也编码一个

类受体激酶^[5]。在酿酒酵母中, 曾进行了 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质的表达, 但表达量较低, 难以用于生化和晶体结构分析^[6]。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 具有高表达、高分泌、高稳定等特点, 已经用于许多蛋白质的高效表达, 在每升培养基中的表达水平有的可以达到数克甚至十几克^[7], 利用毕赤酵母表达 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质尚未见报道。为此, 我们用激酶区构建了毕赤酵母表达载体, 并系统地进行了表达条件的优化, 获得了纯化的考染可见的蛋白质, 为进一步的生化分析、蛋白质-蛋白质相互作用研究等奠定了基础。

基金项目: 国家自然科学基金 (30670175, 30730007)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528787; E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

作者简介: 李晓明 (1984 -), 男, 河北省衡水人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: lixiaoming_mbb@126.com

收稿日期: 2009-10-18; 修回日期: 2010-01-22

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10F', 分泌型表达载体 pPICZ α A, 毕赤酵母菌株 (*Pichia pastoris*) GS115 (Mut⁺)、X33 (Mut⁺) 与 KM71 (Mut^s) 购自美国 Invitrogen 公司产品; *EcoR* I、*Xba* I、*Kpn* I、*Sac* I 和蛋白质 Marker 购自大连宝生物工程有限公司; 1 kb DNA ladder 购自美国 Amersham Biosciences 公司; 琼脂糖、Yeast nitrogen base、SDS 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;

抗 His 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自上海午立生物技术有限公司; 镍离子亲和层析柱购自美国 QIAGEN 公司; PCR 仪购自德国 Biometra 公司; 电击仪、蛋白质电泳和 Western blot 湿转系统购自美国 Bio-rad 公司; 台式高速冷冻离心机 (型号 6K15) 购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 引物:根据毕赤酵母表达载体 pPICZ α A 的多克隆位点及 XA21 激酶和 PI-D2 激酶区序列, 设计了相应的特异扩增引物, 如表 1 所示, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 XA21 和 PI-D2 的激酶区扩增引物序列及扩增片段长度

Table 1 List of PCR primers and fragment length of XA21 and PI-D2 kinase domain.

Primer	Primer sequence(5' (3')	Product size/bp	Restriction site
XA21K-F	GCCGGT <u>ACC</u> CACAAGAGA <u>ACT</u> AAAAAGGGAGC	1050	<i>Kpn</i> I
XA21K-R	GCTCTAGAGCGAATTC <u>AAG</u> GCTCCACCTTC		<i>Xba</i> I
PI-D2K-F	GCGAATTCGCTGGTTCATCGGAAGATGATG	1061	<i>EcoR</i> I
PI-D2K-R	GCCTCTAGAGCTCTGGACCAGAGAGCTCACA		<i>Xba</i> I

Underlined letter are restriction enzyme recognition site.

1.2 PCR 扩增

PCR 反应采用 25 μ L 体系, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。XA21K 扩增的模板来自美国佛罗里达大学植病系宋文源博士实验室, PI-D2K 扩增的模板来自中科院遗传与发育生物学研究所朱立煌教授实验室。

1.3 重组质粒的构建及酵母转化

将纯化后的 Xa21 的 PCR 产物与 pPICZ α A 载体分别用 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切, *Pi-d2* 的 PCR 产物与 pPICZ α A 载体分别用 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切, 连接后转化 *E. coli* TOP10F' 感受态细胞, 涂布于含 25 μ g/mL Zeocin 的 LB 低盐平板上, 挑单克隆, 提取重组质粒先酶切验证筛选, 再进行测序验证, 测序工作由北京华大基因研究中心完成。为了使重组质粒能够有效的整合到酵母基因组上, 先将重组质粒 pICZ α A-Xa21 和 pICZ α A-Pi-d2 用 *Sac* I 酶切线性化, 电转化毕赤酵母菌株 KM71、GS115 和 X33 (电转化条件为: 电压 1.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω)。涂布于含 100 μ g/mL Zeocin 的 YPD (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose, 2% Agar) 平板上。待菌落长出后, 挑取能抗 Zeocin 且生长良好的单菌落, 采用微波 1 min, 液氮冷冻处理 5 min, 再微波 1 min 的方法简单破碎, 加无菌水 20 μ L 用于 PCR 模板进行扩增, 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 激酶蛋白质的诱导表达及优化

参照文献^[8]上的方法对 Mut⁺ 表型 (甲醇利用野生型) 重组酵母和 Mut^s 表型 (甲醇利用迟缓型) 重组酵母进行诱导表达, 离心收集培养基上清和菌体沉淀, SDS-PAGE 电泳分离后, 用抗 His 抗体进行 Western blot 检测。通过比较 3 个酵母表达菌株 (KM71、GS115、X33), 3 种甲醇浓度 (1%、2%、3%), 4 种 pH 值 (pH5、pH6、pH7、pH8), 3 个时间点 (24 h、48 h、72 h) 的表达情况进行了激酶蛋白质表达条件的优化。

1.5 酵母表达蛋白质的检测及纯化

以最佳条件诱导酵母菌株, 离心收集菌体, 参照文献^[6]中的方法进行菌体破碎及蛋白纯化, 加入预冷的裂解缓冲液和适量钴珠 (直径 2 mm), 4 $^{\circ}$ C 剧烈振荡, 12000 r/min, 离心 10 min 取上清, 用抗 His 抗体对培养基上清、破碎菌体上清及破碎菌体沉淀进行 Western Blot 检测。将裂解上清与 His Resin (QIAGEN) 4 $^{\circ}$ C 平衡 1 h, 离心后取沉淀, 用溶液 I (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% β -巯基乙醇, 0.5 mmol/L PMSF) 和溶液 II (50 mmol/L HEPES, pH7.5, 100 mmol/L NaCl, 10% 甘油) 分别洗 3 次, 每次 3000 r/min 2 min, 得到的沉淀即为 His 融合蛋白质, 利用 10% SDS-PAGE 分离检测。

2 结果

2.1 激酶基因的克隆及酵母转化

构建了融合蛋白表达载体 pICZ α A-*Xa21* 和 pICZ α A-*Pi-d2*, 重组质粒的酶切结果和测序结果表明: 所构建的重组质粒的序列和预期序列完全相符, 未发生氨基酸突变。用 *Sac* I 酶切将重组质粒线性化, 电转化分别导入毕赤酵母菌株 KM71、GS115 和 X33 中, 采用 PCR 法对转化酵母菌株进行鉴定, 电泳结果表明, 挑选的菌落 PCR 扩增得到与预期大小片段都符合的 DNA 条带, 表明目标基因已整合到毕赤酵母基因组中(数据未附)。

2.2 XA21K 蛋白质在毕赤酵母中表达条件的优化

首先按常规条件(甲醇浓度 0.5%, pH6, 诱导时间 96 h)比较了不同菌株的表达情况, 经 Western

Blot 检测可见(图 1-A), 在菌株 KM71 和 X33 的沉淀中, 目标蛋白质的表达量较高, 而在 GS115 沉淀中表达量较低, 在所有菌株的培养基上清中均没有检测到 XA21K 的表达, 说明表达的蛋白质并没有分泌到上清中, 接下来我们用 KM71 菌株进行了不同甲醇浓度下诱导效果的比较(图 1-B), 发现 2% 的甲醇浓度条件下, 目标蛋白质的表达量最高, 3% 浓度次之, 而在 1% 浓度条件下, 检测不到蛋白质的表达, 表明甲醇浓度过低或过高都会影响蛋白质的合成; 在不同 pH 值条件下(图 1-C), pH5 时目标蛋白质的表达最高, pH6 时蛋白质表达量降低, 表明过高的 pH 值对蛋白质的表达有抑制作用; 比较不同的诱导时间可以发现(图 1-D), 在诱导 24 h 时, 目的蛋白质不表达, 在诱导时间为 48 h 和 72 h 时, 目标蛋白质的表达量基本持平。

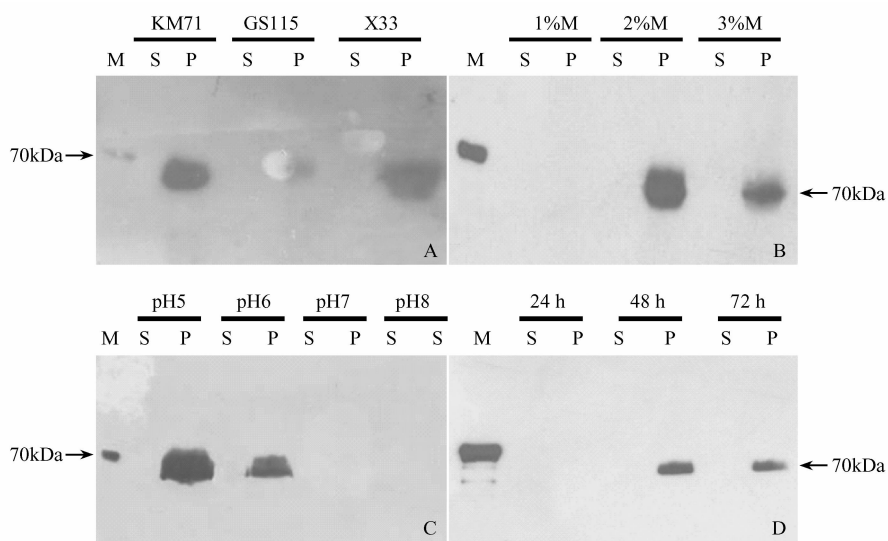


图1 XA21K 蛋白质在毕赤酵母中表达条件的优化

Fig. 1 Conditional optimization of XA21K protein expression in *Pichia pastoris*. A: The comparison of yeast strains; B: The comparison of methanol concentration; C: The comparison of medium pH value; D: The comparison of induction time. M. Marker; S. Supernatant; P. Pellet.

2.3 PI-D2K 蛋白质在毕赤酵母中表达条件的优化

对 PI-D2 蛋白质在毕赤酵母中的表达条件也进行了系统的优化, 在常规条件(甲醇浓度 0.5%, pH6, 诱导时间 96 h)比较不同菌株的表达情况, 经 Western Blot 检测可见(图 2-A), 在菌株 KM71 和 X33 的沉淀中, 目标蛋白质的表达量较高, 在菌株 GS115 的沉淀中, 目标蛋白质不表达, 在所有菌株的培养基上清中均没有检测到 PI-D2K 的表达, 说明表达的蛋白质并没有分泌到上清中, 接下来我们用 X33 菌株进行了不同甲醇浓度下诱导效果的比较(图 2-B), 1%、2% 和 3% 的甲醇浓度对目标蛋白的

表达影响不大; 在不同 pH 值条件下(图 2-C), pH5 时目标蛋白质的表达最高, pH6 时蛋白质表达量降低, pH7 和 pH8 时目标蛋白质不表达; 比较不同的诱导时间可以发现(图 2-D), 在较短的诱导时间条件下, 没有检测到目标蛋白质的表达, 诱导 48 h 时有目标蛋白质的表达, 诱导时间延长到 72 h, 目标蛋白质表达量也随之增加。

2.4 激酶蛋白质表达的检测及纯化

我们以最优条件(诱导时间 72 h、甲醇浓度 2%、pH5)诱导 pICZ α A-*Xa21* (KM71 菌株) 和 pICZ α A-*Pi-d2* (X33 菌株) 表达重组蛋白质, 用抗 His 抗体对菌体破碎后的上清(SP)、培养基上清

(S)及菌体沉淀(P)进行 Western blot 检测,发现在菌体破碎后的上清(SP)中有目标蛋白质的表达(图 3-A、图 3-B),对这些上清中存在的蛋白质,进行了进一步的纯化,用镍离子亲和层析对目的蛋白进行

纯化,对样品进行 SDS-PAGE 分离后,考染结果可以见到纯化的目的蛋白(图 3-C),从而实现了目的蛋白质的纯化。

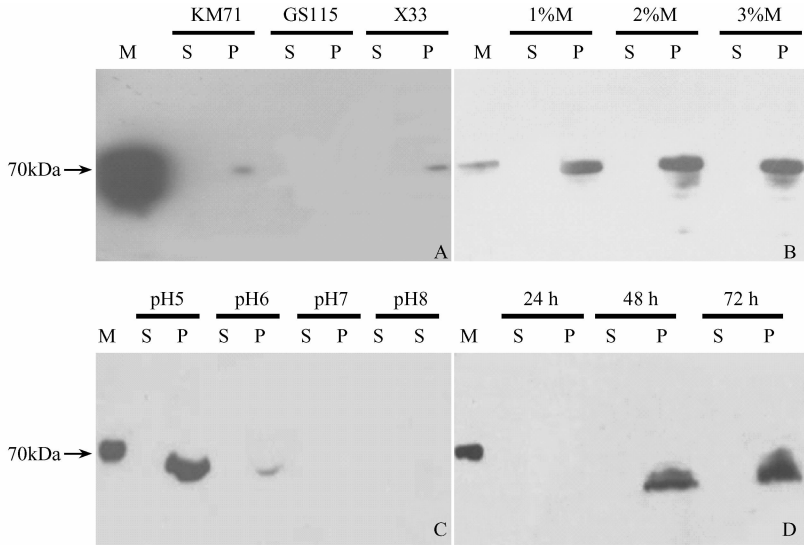


图 2 PI-D2K 蛋白质在毕赤酵母中表达条件的优化

Fig. 2 Conditional optimization of PI-D2K protein expression in *Pichia pastoris*. A: The comparison of yeast strains; B: The comparison of methanol concentration; C: The comparison of medium pH value; D: The comparison of induction time. M. Marker; S. Supernatant; P. Pellet.

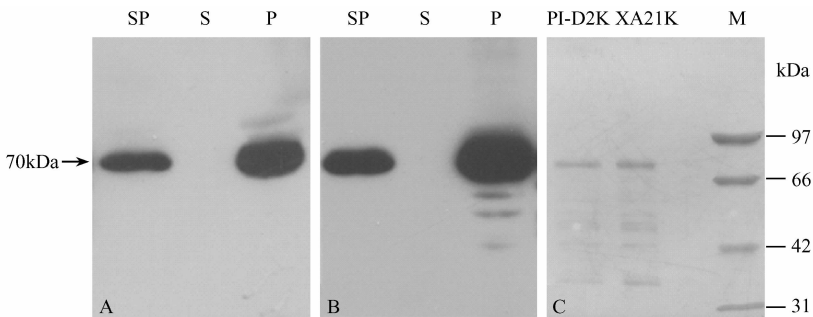


图 3 毕赤酵母中表达的 XA21K 和 PI-D2K 蛋白质的 Western blot 检测 (A, B) 及 SDS-PAGE 分离 (C)

Fig. 3 Western blot detection (A, B) and SDS-PAGE separation (C) of XA21K and PI-D2K proteins expressed in *Pichia pastoris*. A: Western blot detection of expressed XA21K protein; B: Western blot detection of expressed PI-D2K protein; C: SDS-PAGE separation of XA21K and PI-D2K proteins. M. Marker; SP. Supernatant of lysated pellet; S. Supernatant; P. Pellet.

3 讨论

毕赤酵母表达系统是一个高效的真核表达系统,与大肠杆菌及酿酒酵母表达系统相比往往具有较高的表达能力,迄今已经有许多成功表达的报道^[9]。本实验用毕赤酵母对 XA21K 和 PI-D2K 激酶蛋白质进行了表达,结果表明在培养基上清中没

有目的蛋白质的表达,而在菌体沉淀中检测到了蛋白质的表达,经改变培养条件,虽然使蛋白质表达量有所提高,但仍没有改变蛋白质的表达部位,最后我们从破碎的菌体细胞上清中,纯化获得了考染可见的蛋白质。从表达量上看,XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质在毕赤酵母中的表达量约 0.5 mg/L 培养基,与酿酒酵母中的表达量接近^[6]。

本实验中我们对 2 个水稻激酶蛋白质进行了表达,发现它们在毕赤酵母中的表达特征极为相似,如它们都只能在菌体中表达,对菌株、甲醇诱导浓度、pH 值和诱导时间的反应相似,甚至表观分子量都接近,提示我们这些表现具有一定的共性。以前,我们曾用酿酒酵母表达系统表达了 GST 融合的 XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质,电泳表观分子量与理论分子量相符(67 kDa)^[6];本文中在毕赤酵母中表达的是由 6 × His 与目标蛋白质构成的融合蛋白质,理论分子量为 40 kDa,但电泳表观分子量接近 70 kDa,大于预期分子量,推测在毕赤酵母中表达的蛋白质发生了修饰。实际上,毕赤酵母中表达蛋白质糖基化修饰已多有报道^[10],此外,XA21 全长蛋白质的理论分子量为 110 kDa,而在水稻植株中表达的 XA21 表观分子量为 130 kDa,实验证明分子量的差别是由于糖基化修饰(未发表数据)。为了证明所表达的蛋白质为目标激酶,我们用 XA21 和 PI-D2 蛋白质的特异抗体分别进行了 Western blot 检测,证明表达蛋白质能够被抗体特异识别(数据未附)。

毕赤酵母的分泌信号 α 因子对引导小分子量蛋白质的分泌表达有效,如对表皮生长因子(EGF)、单链抗体 Fv 片段、凝血因子等的表达都是很好的例子^[11],本实验中经修饰后的目标蛋白质分子量接近 70 kDa,较大的分子量可能是影响分泌的因素之一。

已报道的毕赤酵母表达条件优化方案还有密码子优化^[12]、GC 含量调整^[13]等,此外筛选高拷贝重组子^[14]、用发酵罐进行连续培养^[15]等也可能有一定效果,我们将在本实验基础上,继续改进诱导培养条件,实现 XA21K 和 PI-D2K 蛋白质的更高效表达。

参考文献

- [1] Song WY, Wang GL, Chen LL, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270(5243): 1804-1806.
- [2] Liu GZ, Pi LY, Walker JC, et al. Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277(23): 20264-20269.
- [3] Xu WH, Wang YS, Liu GZ, et al. The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. *The Plant Journal*, 2006, 45(5): 740-751.
- [4] Chen XW, Li SG, Xu JC, et al. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(1511): 1-9.
- [5] Chen XW, Shang JJ, Chen DX, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *The Plant Journal*, 2006, 46(5): 794-804.
- [6] 王书利, 李莉云, 尚俊军, 等. XA21 和 PI-D2 激酶蛋白质在酿酒酵母中的表达及其自我磷酸化研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(6): 1009-1012.
- [7] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 1989, 28(9): 4117-4125.
- [8] 杨国武, 袁保红, 何国平, 等. 人 DNA 拓扑异构酶 I 在毕赤酵母中的表达及发酵条件优化. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2004, 20(2): 181-186.
- [9] Centurion-lara A, Arroll T, Castillo R, et al. Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among *Treponema pallidum* subspecies and strains and other pathogenic treponemes: genetic and antigenic analyses. *Infection and Immunity*, 1997, 65(4): 1440-1444.
- [10] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66.
- [11] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190(1): 55-62.
- [12] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母. *中国科学(C辑) (Science in China Serices C: life Sciences)*, 1998, 28(3): 237-243.
- [13] Withers-Martinez C, Carpenter EP, Hackett F, et al. PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A + T-rich malaria genome. *Protein Engineering*, 1999, 12(12): 1113-1120.
- [14] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, et al. High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9(5): 455-460.
- [15] Wood MJ, Komives EA. Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Journal of Biomolecular NMR*, 1999, 13(2): 149-159.

Expression optimization of rice bacterial blight resistance gene *Xa21* and blast resistance gene *Pi-d2* protein kinases in *Pichia Pastoris*

Xiaoming Li¹, Shuli Wang¹, Liyun Li¹, Xiaobing Li², Jing Wang², Guozhen Liu^{1*}

(¹ College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

(² Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] Bacterial blight and blast are the most severe rice diseases. *Xa21* confers resistance to bacterial blight, while *Pi-d2* confers resistance to rice blast. Both *Xa21* and *Pi-d2* encode receptor-like kinase proteins. The aim of this study was to express kinase domain of XA21 and PI-D2 proteins in *Pichia pastoris* yeast system. [**Methods**] We amplified the coding regions for the kinase domains of *Xa21* and *Pi-d2* and constructed recombinant plasmids pPICZ α -*Xa21K* and pPICZ α -*Pi-d2K*, respectively. Restriction enzyme digestion and sequence verified plasmids were linearized and transformed into yeast strains. We compared the expression of recombinant proteins in three *Pichia pastoris* strains (KM71, GS115 and X33), with various methanol concentration (1%, 2% and 3%), pH (pH5, pH6, pH7 and pH8) and induction time (24 h, 48 h and 72 h). [**Results**] The recombinant kinase domain of XA21 and PI-D2 proteins were expressed in yeast, however, they were detected only in pellet of yeast cells but not in the supernatant of medium. This indicated that the recombinant proteins were not secretive. Comparison results revealed that *Pichia pastoris* strains (KM71 and X33), 2% methanol, pH5 and 48 h or longer induction time were optimal for the expression of the two rice kinase domain proteins. Finally, we purified soluble recombinant proteins and detected them by SDS-PAGE. [**Conclusion**] We obtained purified domain of XA21 and PI-D2 proteins from *Pichia pastoris* expression strain, which will facilitate the investigations of their biochemical properties.

Keywords: rice; bacterial blight; rice blast; disease resistance gene; *Pichia pastoris* yeast; protein expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (30670175, 30730007)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528787; E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: 18 October 2009/Revised: 22 January 2010