

条锈菌诱导的小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因 编码区的克隆及原核表达

刘 博¹,崔素萍²,王晓杰¹,黄丽丽¹,康振生^{1,2}

(1 西北农林科技大学 植保学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为研究小麦与条锈菌互作过程中 β -1,3-葡聚糖酶基因的功能,根据小麦 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 全长序列设计合成引物,通过 RT-PCR 方法获得小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因编码区,将其克隆至 pGEM T-easy Vector,经 Hind III 和 BamH I 双酶切回收目的片断,并将其定向克隆到 pET-32a(+) Vector 中构建表达载体 GLU-pET-32a(+),转化 *E. coli* BL 21(DE3),用 IPTG 进行诱导表达。结果表明,小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因在大肠杆菌中得到了高效表达,获得了分子量约为 49 ku 的融合蛋白,表达量约占菌体总蛋白的 19%。最佳诱导条件为:0.3 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导 4 h。

[关键词] 条锈菌;小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因;克隆;原核表达

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0125-05

Cloning and prokaryotic expression of a wheat β -1,3-glucanase gene induced by *Puccinia striiformis* Westend f. sp *tritici* Eriks in *E. coli*

LIU Bo¹, CUI Su-ping², WANG Xiao-jie¹, HUANG Li-li¹, KANG Zhen-sheng^{1,2}

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : To determine the function of β -1,3-glucanase in wheat to stripe rust resistance, the encoding region of a wheat β -1,3-glucanase gene induced by *Puccinia striiformis* Westend f. sp *tritici* Eriks was engineered via reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified fragments were first cloned into pGEM T-easy Vector, after restriction analysis the gene was transferred to an *E. coli* strain BL 21 (DE3) expression behind T7 promoter-pET-32a(+) system. The recombinant gave rise to a 49 ku fusion protein in response to the IPTG induction; under the best inducement condition (37 °C, 0.3 mmol/L IPTG, 4 h) its content was about 19 % of the total cell protein by Gene Genius Bio Imaging System.

Key words : *Puccinia striiformis*; wheat; β -1,3- glucanase gene; cloning; prokaryotic expression

β -1,3-葡聚糖酶是一类重要的病程相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, PRs),能催化 β -1,3-葡聚糖多聚体(大多数植物病原真菌细胞壁的主要成分之一)的水解,从而抑制真菌的生长与增殖^[1]。目前,已从大麦、烟草、大豆、玉米、小麦、亚

麻、香蕉等多种植物中分离到 β -1,3-葡聚糖酶,其中多数具有体外抑菌活性^[2-4]。锈菌与麦类作物互作关系的研究表明,在锈菌侵染与发育过程中,寄主细胞发生了一系列的防卫反应与病理变化^[5]。进一步的生化分析证实,在小麦与叶锈菌非亲和互作中,寄

[收稿日期] 2006-05-15

[基金项目] 教育部重大科技培育项目(2004-295);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IR T0558)

[作者简介] 刘 博(1982-),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事植物与病原菌互作的分子生物学研究。

[通讯作者] 康振生(1957-),男,四川安岳人,教授,博士生导师,主要从事植物与病原菌互作的细胞学和分子生物学研究。

主抗菌水解酶类在接种后增加迅速,且含量明显高于亲和组合^[6-7]。崔素萍^[8]利用源于大麦 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA (M62907) 保守区的引物扩增得到条锈菌诱导的小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因片段,并进一步采用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 获得了该基因的 cDNA 全长序列。本研究对条锈菌诱导的小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因编码区进行了克隆与原核表达,以期为进一步研究 β -1,3-葡聚糖酶基因的功能,揭示 β -1,3-葡聚糖酶基因在小麦与条锈菌互作中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试小麦品种水源 11,条锈菌 CY23 号生理小种,均为西北农林科技大学植保学院植物免疫研究室提供,二者构成非亲和组合。小麦幼苗的培育及接种参照康振生等^[9]的方法。接种 24 h 后取小麦叶片,迅速投入液氮中冷冻后,在 -70 °C 贮存备用。

1.1.2 菌株及质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、*E. coli* BL 21(DE3) 为西北农林科技大学植保学院植物免疫研究室保存;pGEM T-easy Vector 购自 Promega 公司;pET-32a(+) Vector 为西北农林科技大学植保学院植物免疫研究室保存。

1.1.3 试剂 凝胶回收试剂盒、质粒微量抽提试剂盒购自安徽 U-gene 公司,Qiagen RNA 抽提纯化试剂盒购自 Qiagen 公司,限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bam*H I 及 *Taq* DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,RNase 抑制剂购自 TOYOBO 公司,其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因的扩增

1.2.1 引物设计及合成 根据小麦 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号:DQ090946) 设计引物 GP₁: 5'-CGC GGA TCC ATG GCT GGA AAG-3' (*Bam*H I), GP₂: 5'-CCC AAG CTT TTA GAA CTG GA T-3' (*Hind* III),均由上海生工生物工程公司合成。

1.2.2 RNA 提取 小麦叶片总 RNA 的提取参照 RNA 抽提纯化试剂盒手册。

1.2.3 cDNA 的合成 取小麦叶片总 RNA 2.0 μ g,加入 Oligo (dT)₁₈ 1.0 μ g,RNase-free water 补足体系至 10 μ L,混匀后在 70 °C 反应 5 min,立即冰

浴 5 min 后加入 M-MLV 逆转录酶 5 $\times$ 缓冲液 5.0 μ L,10 mmol/L dNTP 1.25 μ L,RNase 抑制剂 25 U,M-MLV RT 200 U,RNase-free water 补足体系至 25 μ L,混匀后在 37 °C 反应 1 h,95 °C 保温 3 min,冰浴 5 min 终止反应。

1.2.4 β -1,3-葡聚糖酶基因编码区的扩增 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:反转录产物 3.0 μ L,10 $\times$ *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μ L,MgCl₂ 2.0 μ L,10 mmol/L dNTP 1.0 μ L,引物 GP₁ 和 GP₂ 各 1.0 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L,加水至 50 μ L。反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 50 s,54 °C 1 min,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 10 min。

1.3 小麦 β -1,3-葡聚糖酶融合表达载体的构建

将上述 PCR 产物用凝胶回收试剂盒进行纯化回收后插入克隆载体 pGEM T-easy Vector,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp 平板上挑选白色克隆,提取质粒经 *EcoR* I 酶切和 DNA 测序鉴定后,获得的重组质粒 GLU-pGEM-T 经 *Hind* III *Bam*H I 双酶切回收目的片段,定向插入 *Hind* III *Bam*H I 双酶切的原核表达载体 pET-32a(+) Vector 中,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,经双酶切和 DNA 测序鉴定筛选后,得到重组质粒 GLU-pET-32a(+). 具体构建过程见图 1。

1.4 小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因的原核表达及纯化

用构建的表达载体 GLU-pET-32a(+) 转化宿主菌 *E. coli* BL 21(DE3),挑选单菌落接种于含 Amp (100 μ g/mL) 的 LB 中,37 °C、160 r/min 震荡培养过夜,次日按体积分数 5% 转接到新鲜培养基中,37 °C、160 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~1.0。

1.4.1 IPTG 诱导浓度的筛选 在培养液中加入终浓度分别为 0.01,0.1,0.3,0.6,1.0 和 1.5 mmol/L 的 IPTG,37 °C 诱导表达 3 h。分别取 1 mL 菌液,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,加 1 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 °C 煮沸 3 min,离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 检测。

1.4.2 诱导时间的筛选 以筛选的最佳 IPTG 浓度,在 37 °C 诱导表达 1,2,3,4,5 和 6 h。分别取 1 mL 菌液,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,加 1 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 °C 煮沸 3 min,离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 检测。

1.4.3 表达蛋白的纯化 参照 HisTrap HP 亲和层析柱使用说明,利用 ÄKTA 高压液相层析系统对目的蛋白进行纯化。

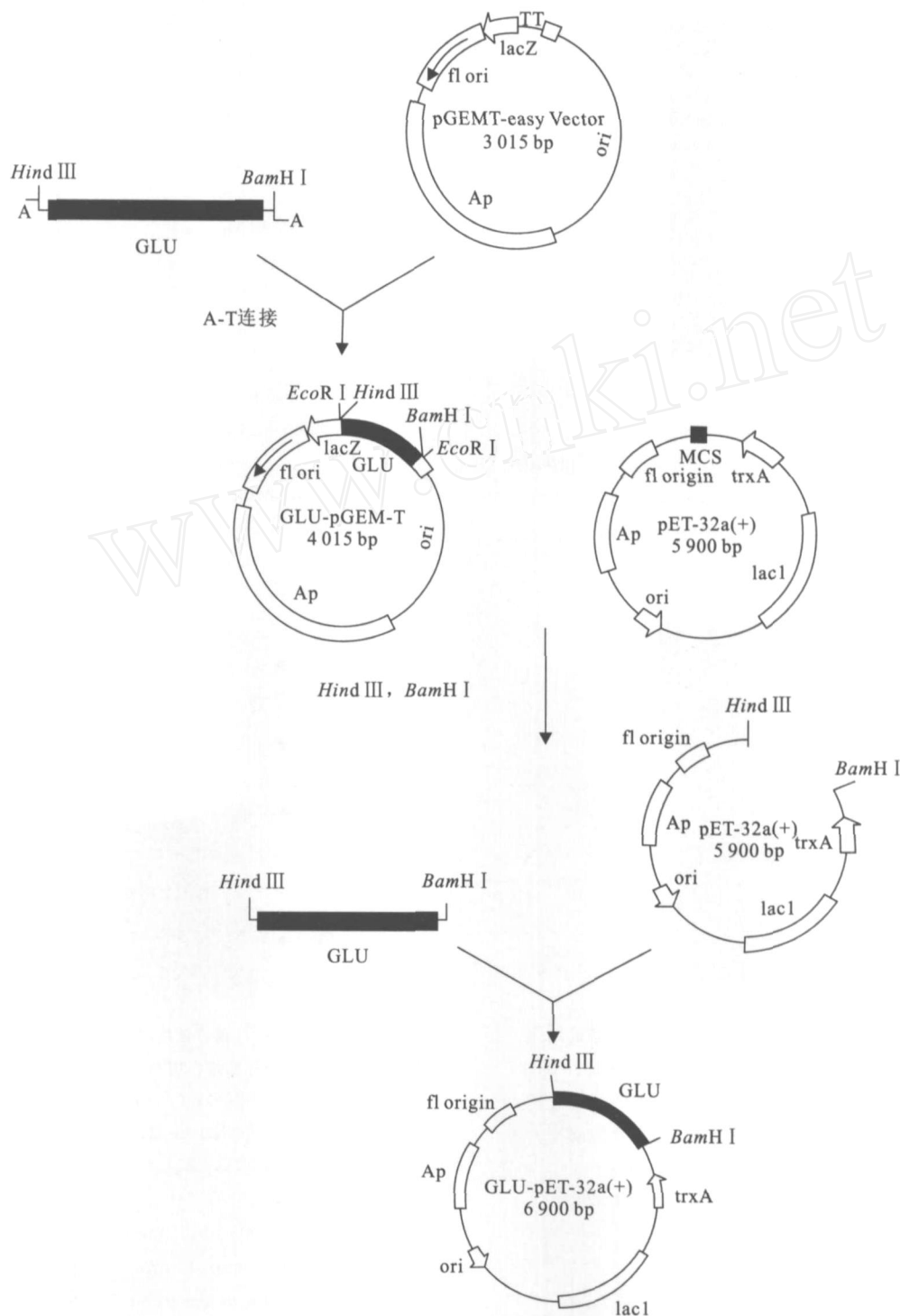
图 1 小麦 β -1,3-葡聚糖酶融合表达载体的构建示意图

Fig. 1 Map for recombinant vector construct

2 结果与分析

2.1 β -1,3-葡聚糖酶基因编码区的克隆

将大小为 1 000 bp 左右的 RT-PCR 扩增产物 (图 2) 与 pGEM T-easy Vector 连接,重组质粒 GLU-pGEM-T 经 *EcoR* I 酶切,得到相同大小的片段 (图 3),测序结果表明目的片段序列无误。

2.2 β -1,3-葡聚糖酶融合表达载体的构建

构建的表达载体 GLU-pET-32a(+) 经 *Hind* III, *Bam* H I 双酶切得到一条 1 000 bp 左右的片段 (图 4),长度与扩增的 β -1,3-葡聚糖酶基因片段相同,说明目的基因已经整合到 pET-32a(+) Vector 上,测序结果表明目的片段序列无误,插入表达载体的位置和读码框正确。

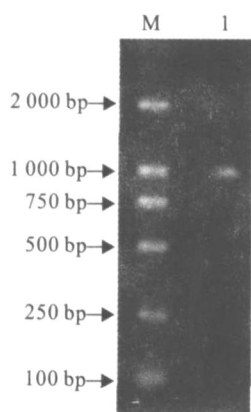


图 2 RT-PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. PCR 扩增产物

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

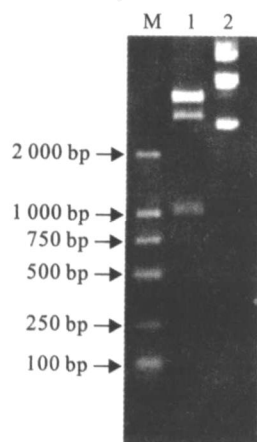
M. DNA Maker DL2000; 1. PCR product amplified with primers GP₁ and GP₂

图 4 表达载体 GLU-pET-32a(+) 双酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. GLU-pET-32a(+) *Hind* III, *Bam* H I 双酶切产物; 2. GLU-pET-32a(+)

Fig. 4 Restriction analysis of GLU-pET-32a(+)

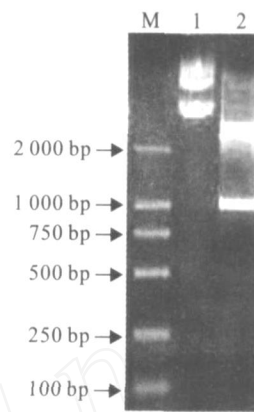
M. DNA Maker DL2000; 1. GLU-pET-32a(+) digested with *Hind* III, *Bam* H I; 2. GLU-pET-32a(+)

图 3 重组质粒 GLU-pGEM-T 酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. GLU-pGEM-T; 2. GLU-pGEM-T *Eco*R I 酶切产物

Fig. 3 Restriction analysis of GLU-pGEM-T

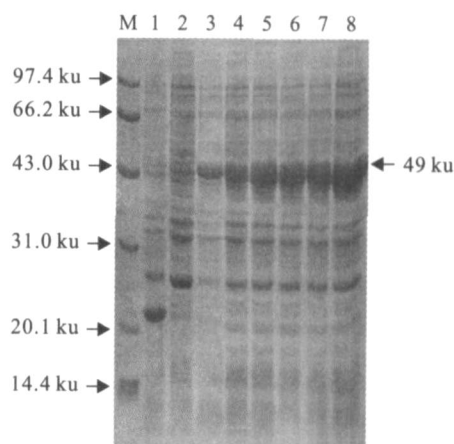
M. DNA Maker DL2000; 1. GLU-pGEM-T; 2. GLU-pGEM-T digested with *Eco*R I

图 5 不同 IPTG 诱导浓度对融合蛋白表达的影响

M. 低分子量标准蛋白质; 1. 0.01 mmol/L IPTG

诱导的 pET-32a(+)-BL 21 (DE3);

2. 未诱导的 GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3); 3~8. 不同 IPTG 浓度(0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5 mmol/L) 诱导 3 h 的 GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3)

Fig. 5 Effects of different IPTG inducing concentrations on protein expression

M. Low molecular protein Maker; 1. pET-32a(+)-BL 21 (DE3) induced with 0.01 mmol/L IPTG; 2. GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3) without IPTG inducing; 3 - 8. GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3) induced with different IPTG concentrations (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5 mmol/L) 3 h

2.3 β -1,3-葡聚糖酶基因的原核表达及纯化

由图 5 可见,与未经诱导的 GLU-pET-32a(+) 相比,诱导菌体在约 49 ku 均产生一条新的条带, 0.3 mmol/L IPTG 为最佳的诱导浓度;以此最佳诱导浓度诱导,随着诱导时间的增加,融合蛋白的表达

量在前 4 h 增加明显,以后趋于稳定,最佳诱导时间为 4 h(图 6),经凝胶成像系统分析表明,此时表达量约占菌体总蛋白的 19%。采用 HisTrap HP 亲和层析柱($\ddot{A}$ KTA HPLC System)对融合蛋白进行纯化,电泳检测为单一条带(图 7)。

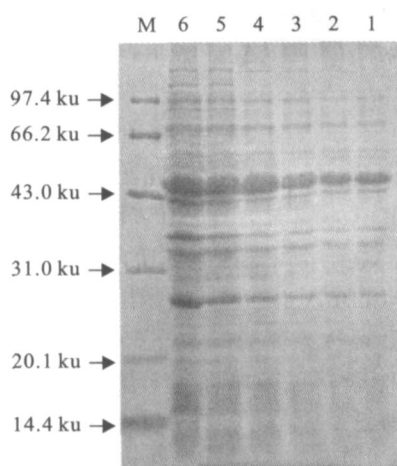


图6 不同诱导时间对融合蛋白表达的影响

M. 低分子量标准蛋白质;1~6. GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3) 0.3 mmol/L IPTG 37 °C诱导1~6 h

Fig. 6 Effects of different inducing times on protein expression

M. Low molecular protein Maker;1 - 6. GLU-pET-32a(+)-BL 21 (DE3) induced with 0.3 mmol/L IPTG 1 - 6 h

3 讨论

大肠杆菌由于遗传背景清楚,易培养,能大规模发酵,以及大量可供选择的克隆和表达载体,使其成为克隆和表达外源基因的首选菌株^[10]。本研究用pET-32a(+)-Vector载体及宿主菌*E. coli* BL21 (DE3)成功表达了49 ku的小麦 β -1,3-葡聚糖酶融合蛋白,它约占菌体总蛋白的19%。表达产物带有S·Tag、His·Tag、Trx·Tag 3种融合标签,Trx·Tag的序列可以增加融合蛋白的溶解性,His·Tag与S·Tag使融合蛋白易于纯化,也方便进行下游精确定量以及Western blot检测。

在长期进化过程中,为了抵御病原微生物的侵害,植物逐渐形成了复杂而有效的保护措施,互作过程涉及复杂的生理与生化变化,是一系列防卫反应基因协同作用的结果。病程相关蛋白类的 β -1,3-葡聚糖酶在植物不同组织或组成型、诱导型表达,并运送到不同部位,对植物抵御病原真菌攻击具有积极意义。本研究对小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因编码区进行克隆与表达,一方面,获得的融合蛋白可进行抗体制备,进一步利用免疫胶体金和激光扫描共聚焦技术研究蛋白的亚细胞定位及表达情况;另一方面,可设计特异性探针,通过实时荧光定量PCR或Northern blot在分子水平上研究该酶的时空表达特征,最终确定其在小麦与条锈菌互作过程中的作用。

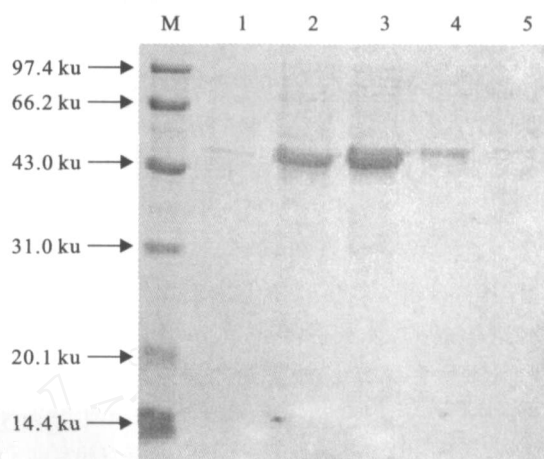


图7 洗脱蛋白的 SDS-PAGE

M. 低分子量标准蛋白质;1~5. 目的蛋白洗脱峰不同收集片段

Fig. 7 SDS-PAGE of different purification fractions

M. Low molecular protein Maker;1 - 5.

Different fractions of peak 2

[参考文献]

- [1] Selitrennikoff C P. Antifungal proteins[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2883-2894.
- [2] Anuratha C S, Zen K C, Cole K C, et al. Introduction of chitinases and beta-1,3-glucanases in *Rhizoctonia solani*-infected rice plants: isolation of an infection-related chitinase cDNA clone[J]. Physiol Plant, 1996, 97: 39-46.
- [3] Hrmova M, Garrett T P, Fincher G B, et al. Subsite affinities and disposition of catalytic amino acids in the substrate-binding region of barley 1,3- β -glucanase implicational in plant-pathogen interactions[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 14556-14563.
- [4] Linthorst H, Melchers L, Maayer A, et al. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8756-8760.
- [5] 李振岐. 中国小麦锈病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 16-26; 109-121.
- [6] Kemp G. Disease development and β -1,3-glucanases expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1999, 55: 45-52.
- [7] Münch-Garhoff S, Neuhaus J M, Bollner T, et al. Expression of β -1,3-glucanases and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5-or Sr24-specified race-specific rust resistance [J]. Planta, 1997, 201(2): 235-244.
- [8] 崔素萍. 小麦受条锈菌侵染后防卫基因的表达及其克隆[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [9] 康振生, 李振岐. 罗夫林 10 常温致病新菌系的发现[J]. 西北农学院学报, 1984, 4: 18-28.
- [10] Fischer G B, Sumner I, Goodenough P. Isolation and renaturation of bioactive proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies[J]. Arzneimittelforschung, 1992, 42(12): 1512-1515.