

网络出版时间:2012-03-21 17:20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120321.1720.012.html>

香蕉枯萎病菌 2 个生理小种 *PL* 基因真核表达载体的构建与表达

董章勇^{1,2}, 秦世雯², 王振中²

(1 仲恺农业工程学院 植物保护系, 广东 广州 510225; 2 华南农业大学 资源环境学院 植物病理生理学研究室, 广东 广州 510642)

【摘要】 **【目的】** 构建香蕉枯萎病菌 1 号小种(FOC1)和 4 号小种(FOC4)果胶裂解酶(Pectate lyases, *PL*)基因的真核表达载体, 并进行诱导表达, 为进一步研究 *PL* 在病原菌致病过程中的作用奠定基础。**【方法】** 将质粒 pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 和真核表达穿梭载体 pPICZαA 进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切反应, 回收目的片段连接, 转化至 DH5α 进行筛选扩繁, 对菌落进行 PCR 鉴定后抽提质粒进行 PCR 和 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切鉴定。将阳性载体线性化后电击转化毕赤酵母 SMD1168 感受态细胞, 用甲醇进行诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 分析。**【结果】** 成功构建了 FOC1 和 FOC4 *PL* 基因的真核表达载体 pPICZαA-pl-foc1 和 pPICZαA-pl-foc4, 经甲醇诱导表达后分别获得了重组的 *PL* 蛋白, 其分子质量约为 23.4 ku。**【结论】** FOC1 和 FOC4 2 个香蕉枯萎病菌小种的 *PL* 基因在酵母中得到了成功表达。

【关键词】 香蕉枯萎病; 香蕉枯萎病菌; 果胶裂解酶; 载体构建; 真核表达

【中图分类号】 S432.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)04-0102-05

Construction of eukaryotic expression vector with pectate lyase gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 and their eukaryotic expression

DONG Zhang-yong^{1,2}, QIN Shi-wen², WANG Zhen-zhong²

(1 Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China;

2 Laboratory of Physiological Plant Pathology, College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: **【Objective】** The study constructed *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (FOC1) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC4) pectate lyases (*PL*s) genes' eukaryotic expression vectors, and induced expression in order to provide further research of the pathogenicity in the fungi. **【Method】** The plasmid pMD18-pl-foc1, pMD18-pl-foc4 and eukaryotic expression shuttle vector pPICZαA were linearized by double digestion of *EcoR* I and *Xba* I. Then the ligation fragment was subcloned into DH5α. The plasmids were identified by PCR and double restriction enzyme digestion with *EcoR* I and *Xba* I. The positive vector linearized *Pichia pastoris* SMD1168 electroporation competent cells. After induction by methanol, the reaction was analyzed by SDS-PAGE. **【Result】** The eukaryotic expression vectors of pPICZαA-pl-foc1 from FOC1 and pPICZαA-pl-foc4 from FOC4 were constructed. Protein was expressed by methanol in-

* [收稿日期] 2011-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671349); 国家自然科学基金-广东联合基金项目(u0771001); 公益性行业(农业)科研专项(200903049-05)

[作者简介] 董章勇(1981—), 男, 广东化州人, 讲师, 博士, 主要从事微生物学和分子植物病理学研究。

E-mail: dongzhangyong@hotmail.com

[通信作者] 王振中(1956—), 男, 广东广州人, 教授, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: zzwang@scau.edu.cn

duction after clone selection by yeast genome PCR and the PL bands of the recombinant were obtained respectively. Protein of molecular mass was about 23.4 ku. 【Conclusion】 The PLs of two races had been functionally expressed in yeast cells.

Key words: Fusarium wilt of banana; *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; pectate lyase; construction of expression vector; eukaryotic expression

香蕉(*Musa* spp.)是中国华南地区四大佳果之一,也是世界著名的热带、亚热带水果,对人类的生活和经济发展有着很大的影响,全世界每年的产量约为8 800万t^[1-2]。随着香蕉生产的发展,香蕉病害的危害也日益严重,其中香蕉枯萎病(*Fusarium* wilt of banana)严重威胁着香蕉种植业的发展。香蕉枯萎病病原菌是尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, FOC),又称香蕉枯萎病菌,其可破坏维管束导致植株死亡^[3]。迄今为止,人们已发现的香蕉枯萎病菌有FOC1~FOC4 4个小种,其中FOC1能侵染大蜜哈(Gros Michel, AAA)及龙牙蕉类(AAB),矮香蕉(Dwarf Cavendish, AAA)较抗病;FOC4几乎能侵染所有香蕉品种,如Cavendish、大蜜哈、矮香蕉和棱指蕉,其危害最大^[4-7]。Grimm^[8]认为,FOC4一旦在拉丁美洲的香蕉产区爆发,该洲的香蕉种植业将面临覆灭的危险。

植物细胞壁是寄主与病菌互作的重要场所,是寄主抵御病原真菌侵入的屏障。降解酶是病原产生的对寄主细胞壁组分有降解作用的酶类,其能使真菌穿入并侵染寄主植物组织,也可在真菌生活史中的某一阶段起到营养作用。降解酶的种类很多,绝大多数能分泌到体外,根据其作用于植物部位的不同,分为角质层降解酶和细胞壁降解酶等。细胞壁降解酶包括果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶、木质素降解酶和蛋白酶等,在病原菌致病过程中起摄取营养和降解寄主组织的重要作用^[9],其中降解果胶类物质的一种果胶酶——果胶裂解酶(Pectate lyases, PL)能通过 β -消除的方式催化聚半乳糖醛酸 α -(1,4)键断裂形成双键,降解植物细胞壁,导致植物组织软化,有可能参与了病原菌的致病作用^[10-11]。董章勇等^[12]研究表明,细胞壁降解酶在香蕉枯萎病菌入侵寄主的过程中起着重要的作用。

本试验前期研究表明,FOC1和FOC4的PL基因编码区序列均为723 bp,其推导氨基酸序列相似度达到99.17%,仅109位和202位氨基酸存在差异,109位氨基酸FOC1为V,而FOC4为I;202位氨基酸FOC1为N,而FOC4为D。本研究将FOC1和FOC4 2个小种的PL基因与真核质粒pPICZ α A

连接,构建真核表达载体pPICZ α A-pl-foc1和pPICZ α A-pl-foc4,用其转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) SMD1168感受态细胞,并用甲醇进行诱导表达,旨在为进一步研究PL的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体和质粒 毕赤酵母SMD1168菌株及真核表达穿梭载体pPICZ α A、含FOC1 PL基因的质粒pMD18-pl-foc1和含FOC4 PL基因的质粒pMD18-pl-foc4,由华南农业大学资源环境学院植物病理生理学研究室保存,pMD18-pl-foc1和pMD18-pl-foc4均引入了EcoR I和Xba I酶切位点。

1.1.2 主要试剂 酵母基因组提取试剂盒(TIAN-amp Yeast DNA Kit),购自天根生化科技(北京)有限公司;ZeocinTM 抗生素、Anti-myc-HRP 抗体和His Bind Kits (Novagen),均购自Invitrogen公司;山梨醇、YNB(DifcoTM)、生物素、L-组氨酸,均购自广州威佳科技有限公司;咪唑(Imidazole),购自Sigma公司;其他生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要培养基 LLB(Low salt LB, LLB)培养基:胰蛋白胨1 g,酵母浸出物0.5 g,氯化钠0.5 g,用双蒸水溶解并定容至100 mL,用10 mol/L NaOH调pH至7.5,即为LLB液体培养基;在每100 mL LLB液体培养基中加入2 g琼脂粉即可制得LLB固体培养基。YPDS(Yeast extract peptone dextrose medium with sorbitol, YPDS)培养基:5 g酵母浸出物,10 g胰蛋白胨,91.1 g山梨醇,10 g葡萄糖,用双蒸水溶解并定容至500 mL,即得YPDS液体培养基;在YPDS液体培养基定容前加入10 g琼脂粉即可制得YPDS固体培养基。BMGY(Buffered glycerol-complex medium, BMGY)培养基:溶解10 g酵母浸出物、20 g胰蛋白胨于700 mL双蒸水中,高压灭菌,冷却至室温,加入100 mL 1 mol/L磷酸钾缓冲液、2 mL 500 $\times$ B、100 mL 10 $\times$ YNB、100 mL 10 $\times$ GY。BMMY(Buffered methanol-complex medium, BMMY)培养基:除10 $\times$ GY改为10 $\times$ M外,其余组分及配制方法同BMGY培养基。

1.2 方 法

1.2.1 重组真核表达质粒 pPICZαA-pl-foc1 和 pPICZαA-pl-foc4 的构建 将含有质粒 pMD18-pl-foc1 和 pMD18-pl-foc4 的宿主菌分别接种到 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 μg/mL)中,37 ℃、250 r/min 振荡培养过夜,取菌液,用 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒抽提质粒。将抽提的质粒 pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 和真核表达穿梭载体 pPICZαA 于 37 ℃ 下分别进行 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,电泳后回收目标基因片段,与空载体 pPICZαA 连接,并转化大肠杆菌 DH5α,经蓝白斑试验筛选后,依照载体说明书进行菌落 PCR 鉴定。挑取菌落 PCR 鉴定片段长度合适克隆的相应菌落,接种于 LLB 液体培养基(Zeocin 终质量浓度为 25 μg/mL)中,37 ℃、250 r/min 振荡培养过夜,抽提重组真核表达质粒,进行 PCR 及 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。

1.2.2 重组真核表达质粒 pPICZαA-pl-foc1 和 pPICZαA-pl-foc4 的诱导表达 将重组表达质粒 pPICZαA-pl-foc1 和 pPICZαA-pl-foc4 以及空载体 pPICZαA 用 *Sac* I 单酶切进行线性化反应,电转化感受态毕赤酵母 SMD1168 后,经含 25 μg/mL Zeocin 的 LLB 液体培养基筛选,扩繁后提取酵母基因组,进行转化子 PCR 鉴定。

挑取转化后在 YPDS 平板上的阳性克隆,分别接种于 50 mL BMGY 培养基中,30 ℃、250 r/min 振荡培养 16~18 h,至 OD₆₀₀ 为 2~6 时,室温下 3 000 g 离心 5 min,弃上清;加入 100 mL BMMY 培养基重悬细胞沉淀,30 ℃ 振荡培养,每 24 h 补充甲醇至体积分数 0.5%~1%,同时补充灭菌 ddH₂O,

使发酵液总体积保持不变。连续诱导培养 3 d,期间每 12 h 取菌液样品 1 mL,备用。将菌液样品 12 000 r/min 离心 2 min 后取上清,进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 质粒和空载体 pPICZαA 的双酶切

对质粒 pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 及空载体 pPICZαA 进行 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,结果(图 1)显示,pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 均切出 2 800 和 723 bp 左右的条带,其中 2 800 bp 是 pMD18-T 载体,而 723 bp 是 PL 的编码片段;空载体 pPICZαA 切出的片段约为 3 600 bp。

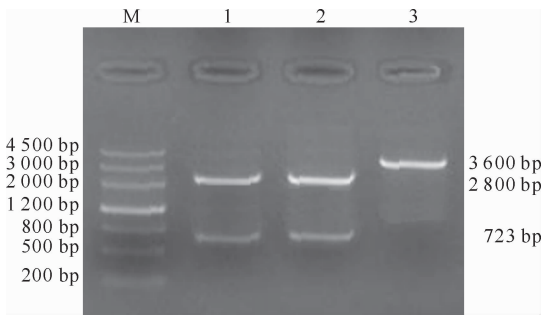


图 1 重组质粒 pMD18-pl-foc1、pMD18-pl-foc4 和空载体 pPICZαA 的 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切结果
M. DNA Marker; 1. pMD18-pl-foc1; 2. pMD18-pl-foc4; 3. pPICZαA
Fig. 1 Agarose gel eletrophoresis for pMD18-pl-foc1, pMD18-pl-foc4 and pPICZαA vectors using double enzyme digestion

2.2 重组真核表达质粒的鉴定

PCR 鉴定结果见图 2,双酶切结果见图 3。

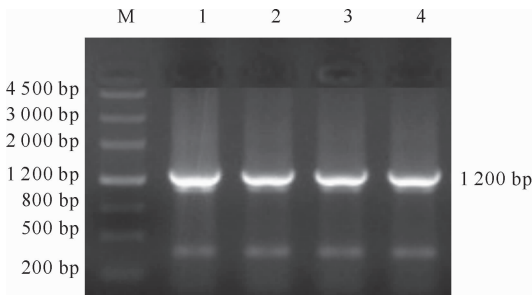


图 2 重组真核表达质粒 pPICZαA-pl-foc1 和 pPICZαA-pl-foc4 的 PCR 鉴定
M. DNA Marker; 1, 2. pPICZαA-pl-foc1; 3, 4. pPICZαA-pl-foc4

Fig. 2 Agarose gel eletrophoresis for the PCR products of pPICZαA-pl-foc1 and pPICZαA-pl-foc4

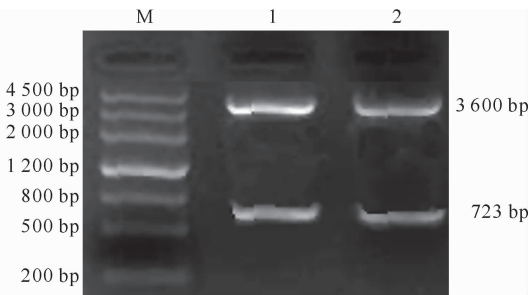


图 3 重组真核表达质粒 pPICZαA-pl-foc1、pPICZαA-pl-foc4 的 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切鉴定
M. DNA Marker; 1. pPICZαA-pl-foc1; 2. pPICZαA-pl-foc4

Fig. 3 Agarose gel eletrophoresis for pPICZαA-pl-foc1 and pPICZαA-pl-foc4 vectors using double enzyme digestion

foc4 均可扩增到长度约为 1 200 bp 的片段,与预期

结果相符。

图 3 表明, pPICZ α A-pl-foc1 和 pPICZ α A-pl-foc4 经 *Eco*R I、*Xba* I 双酶切后分别得到长度约为 3 600 和 723 bp 的片段,与预期结果相符,确定其为阳性重组子。

2.3 重组真核表达质粒的诱导表达

酵母基因组 PCR 鉴定结果(图 4)显示,扩增到长度约 1 200 bp 的片段,与预期结果相符,表明线性化质粒 pPICZ α A-pl-foc1 和 pPICZ α A-pl-foc4 已稳定地整合入酵母基因组内,该酵母菌可作为用于表达的重组菌株。

2.4 重组真核表达质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析

pPICZ α A-pl-foc1、pPICZ α A-pl-foc4 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析结果(图 5 和图 6)表明,目的蛋白在甲醇诱导后 36 h 开始表达,至 72 h 时表达量达到最大。根据蛋白分子标准换算,目的

蛋白的分子质量约为 23.4 ku,与 *PL* 基因推导氨基酸序列的蛋白分子质量相符。

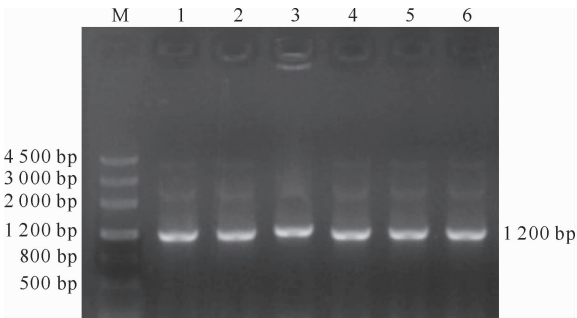


图 4 毕赤酵母转化子基因组 PCR 产物的电泳结果
M. DNA Marker;1~3. pPICZ α A-pl-foc1 转化扩增产物;
4~6. pPICZ α A-pl-foc4 转化扩增产物

Fig. 4 Agarose gel eletrophoresis for PCR products of the transformants

M. DNA Marker;1—3. PCR products of the transformants of pPICZ α A-pl-foc1;4—6. PCR products of the transformants of pPICZ α A-pl-foc4

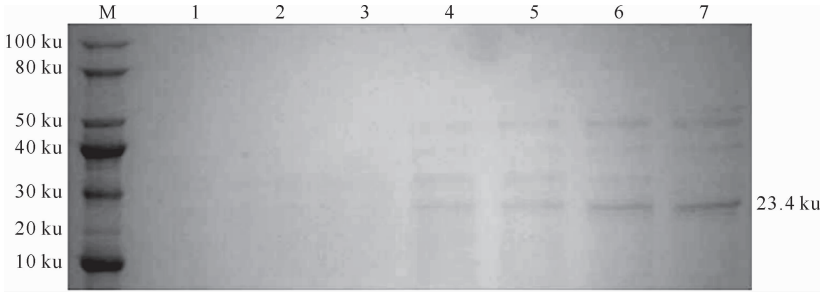


图 5 pPICZ α A-pl-foc1 转化子诱导产物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker;1. pPICZ α A 转化的 SDM1168;2~7. pPICZ α A-pl-foc1 转化的 SMD1168 诱导后 12,24,36,48,60 和 72 h 的样品

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant pPICZ α A-pl-foc1 produced in *P. pastoris*

M. Protein Marker;1. pPICZ α A transformed into *P. pastoris* SMD1168;2—7. pPICZ α A-pl-foc1 transformed into *P. pastoris* SMD1168 induced by 12,24,36,48,60 and 72 h



图 6 pPICZ α A-pl-foc4 转化子诱导产物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker;1. pPICZ α A 转化的 SDM1168;

2~7. pPICZ α A-pl-foc4 转化的 SMD1168 诱导后 12,24,36,48,60 和 72 h 的样品

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant pPICZ α A-pl-foc4 produced in *P. pastoris*

M. Protein Marker;1. pPICZ α A transformed into *P. pastoris* SMD1168;

2—7. pPICZ α A-pl-foc4 transformed into *P. pastoris* SMD1168 induced by 12,24,36,48,60 and 72 h

3 结论与讨论

本研究采用双酶切含有目的片段的克隆载体和空表达载体后进行连接转化的策略构建重组表达载体。重组表达载体的 PCR、*EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定结果表明,克隆得到的 FOC1 和 FOC4 *PL* 基因已分别接入 pPICZ α A 多克隆位点的表达框架上,成功构建了 pPICZ α A-pl-foc1 和 pPICZ α A-pl-foc4 真核表达载体。根据目的片段的插入位点可知,2 个真核表达载体将利用目的片段的起始密码子开始翻译。载体的成功构建,为下一步进行表达条件的摸索奠定了基础。

载体构建是连接克隆与表达的一个重要桥梁,对新获得的一个目的片段,必须克隆到符合表达要求的载体上才能继续开展试验。本研究选用的 pPICZ α A 载体对蛋白的分泌很有优势,其特有的 α -factor 信号肽序列具有很强的分泌效率。目前,许多蛋白经外源表达后在细胞内积累,在细胞内各种酶的作用下,这些蛋白被大量降解,导致产量明显降低,并且对产物的后续纯化带来不便,尤其对于一些原核表达载体来说,该弊端更为明显^[13]。另外,pPICZ α A 具有受甲醇严格诱导控制的 AOX1 启动子,该启动子是专门为毕赤酵母进行基因整合而设计的,是该类酵母表达系统的必备元件,其使表达的可控性大为增加。

将构建好的重组质粒 pPICZ α A-pl-foc1 和 pPICZ α A-pl-foc4 单酶切线性化后电击转化入毕赤酵母 SMD1168 感受态细胞,对经酵母基因组 PCR 筛选的阳性重组菌落,用含有甲醇的 BMMY 培养基进行诱导表达,对表达产物进行 SDS-PAGE 分析,结果表明,利用毕赤酵母 SMD1168 进行 *PL* 的表达具有可行性。

植物细胞壁是植物抵御病原侵染的天然屏障,也是病原物侵染植物的主要底物。植物病原真菌能分泌一系列与致病性密切相关的细胞壁降解酶。香蕉枯萎病产生的典型组织降解症状,显然与病菌分泌的组织降解酶有关,本研究结果对揭示香蕉枯萎病菌的侵染机制有重要意义。

[参考文献]

- [1] 黎永坚,于莉.香蕉枯萎病发病机制及其防治技术研究[J].中国农学通报,2006,22(8):515-519.
Li Y J, Yu L. The study on the pathogenesis and control of banana vascular wilt [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(8): 515-519. (in Chinese)
- [2] Sharrock S, Frison E. Musa production around the world-trends, varieties and regional importance [C]//Networking Banana and Plantain Annual Report 1998. Montpellier, France, 1998: 423-447.
- [3] Ploet R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense [J]. Phytopathology, 2006, 96: 653-656.
- [4] Stove R H. Fusarium wilt of banana [M]. St Paul Minn: APS Press, 1990: 1-9.
- [5] Ploetz R C, Pegg K G. Fusarium wilt [M]// Jones D, Keds. Disease of banana, abaca and enset. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1999.
- [6] Stover R H, Buddenhagen I W. Banana breeding: Polyploidy, disease resistance and productivity [J]. Fruits, 1986, 41(3): 175-191.
- [7] Persly G J, De Langhe E A. Banana and plantain breeding strategies [C]//In Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia; State Mutual Book and Periodical Service, Ltd., 1987.
- [8] Grimm D. Plant genomics: A bunch of trouble [J]. Science, 2008, 322: 1046-1047.
- [9] 王金生. 分子植物病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 33-36.
Wang J S. Molecular plant pathology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 33-36. (in Chinese)
- [10] Willats W G, McCartney L, Mackie W, et al. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 47(1/2): 9-27.
- [11] Barras F, van Gijsegem F, Chatterjee A K. Extracellular enzymes and soft-rot erwinia [J]. Annu Rev Phytopathol, 1994, 32: 201-234.
- [12] 董章勇,王琪,秦世雯,等.香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种细胞壁降解酶的比较 [J]. 植物病理学报, 2010, 40(5): 463-468.
Dong Z Y, Wang Q, Qin S W, et al. Comparison of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 4 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(5): 463-468. (in Chinese)
- [13] Pugsley A P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria [J]. Microbiology Review, 1993, 57: 50-108.