

网络出版时间:2014-09-10 18:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.055
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.055.html

aiiA 基因原核表达载体的构建与表达

欧阳乐军,梁卓玲,黄真池,沙月娥,曾富华

(湛江师范学院 生命科学与技术学院,广东 湛江 524048)

【摘要】【目的】构建 *aiiA* 基因的原核表达载体,并进行诱导表达,检测 *aiiA* 蛋白的抗病性,为进一步通过转基因技术培育转 *aiiA* 基因植株奠定基础。【方法】从 pMDTM19-T Vector+*aiiA* 质粒中酶切获得 *aiiA* 基因,将其与 pGEX-4T-1 表达载体连接构建重组原核表达载体 pGEX-4T-1+*aiiA*,经双酶切及测序鉴定后,进行诱导表达,并对表达产物的功能进行鉴定。【结果】双酶切与 PCR 检测结果表明,重组原核表达载体 pGEX-4T-1+*aiiA* 构建成功。表达条件优化结果表明,在 25 ℃ 下用 0.2 mmol/L IPTG 诱导 9 h,*aiiA* 蛋白的表达量最高。*aiiA* 重组蛋白抑菌试验结果表明,其能够降解细菌的 AHLs 信号分子,猝灭细菌的群体感应,明显减弱病菌的致病力。转 *aiiA* 基因尾巨桉抗性检测结果表明,转基因植株抗性明显增强,表现为发病时间延迟,病情指数降低,评价为中等抗病水平。【结论】成功构建了 *aiiA* 基因原核表达载体,其诱导表达产物能猝灭细菌的群体感应,明显减弱病菌的致病力。

【关键词】群体感应;*aiiA* 基因;N-酰基高丝氨酸内酯;N-酰基高丝氨酸内酯酶

【中图分类号】Q782

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2014)10-0141-06

Construction and expression of prokaryotic vector for *aiiA* gene

OUYANG Le-jun, LIANG Zuo-ling, HUANG Zhen-chi, SHA Yue-e, ZENG Fu-hua

(Life Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China)

Abstract: 【Objective】Construction expression of prokaryotic vector for *aiiA* gene, then the recombinant plasmid was induced to express disease resistance identification. This work laid the foundations for future transgenic research on *aiiA* gene by the plant transgenic technology. 【Method】The study cloned the *aiiA* gene from pMDTM19-T Vector+*aiiA* by PCR, inserted into pGEX-4T-1 and constructed prokaryotic expression vector pGEX-4T-1+*aiiA*. The recombinant plasmid was identified by restriction endonucleases analysis and protein expression was induced and the induce product was identified. 【Result】Enzyme digestion and PCR showed that the recombinant plasmid pGEX-4T-1+*aiiA* was constructed successfully. The maximum expression was obtained when induced by 0.2 mmol/L IPTG at 25 ℃ for 9 hours. Antibacterial test of recombinant protein showed that recombinant plasmid pGEX-4T-1+*aiiA* could degrade AHLs by suppressing quorum sensing and attenuating pathogenicity of bacteria. Plant inoculation experiment showed that resistance to disease of transgenic *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* with *aiiA* was significantly enhanced by delaying the wilt symptom and decreasing disease index. 【Conclusion】The recombinant plasmid pGEX-4T-1+*aiiA* was constructed correctly.

Key words: quorum sensing; *aiiA* gene; N-acyl-homoserine lactones; N-acyl-homoserine enzymes

【收稿日期】2013-07-02

【基金项目】国家“星火”计划项目(2012GA780019, 2011GA780057); 广东高校边缘热带特色植物资源工程技术开发中心项目(GC-ZX-B1002); 广东省科技计划项目(2012A020602108); 广东省自然科学基金项目(S2013040014690, S2012010008737); 湛江市科技攻关项目(2011C3104010)

【作者简介】欧阳乐军(1976—), 男, 湖南南县人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物抗病基因工程研究。

E-mail: ljouyang@zhjnc.edu.cn

【通信作者】曾富华(1952—), 男, 湖南浏阳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物抗性生理及分子生物学研究。

研究表明,细菌间通过群体感应(Quorum sensing, QS)系统实现信息交流,调控群体行为^[1]。许多致病菌的 QS 系统利用 N-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)为信号分子,据此人们试图从植物或微生物中发现能编码降解 AHLs 酶的基因,通过转基因技术培育产生可降解 AHLs 的转基因植物,破坏病原菌信号分子,从而猝灭植物病原菌的群体感应系统。研究表明,这种方法可有效减弱病原细菌致病力,提高植物的抗病能力^[2]。病原菌群体猝灭基因(*aiiA* 基因)表达产物为 N-酰基高丝氨酸内酯酶(AHL-Lactonase),是一种具有降解 AHLs 分子能力的特异性水解酶。AHL-Lactonase 通过水解 AHLs 分子的内酯键,可降低致病菌群中信号分子的活性,从而极大地减弱致病菌的危害能力^[3]。通过构建基因的原核表达载体,将外源基因在原核生物中表达后,提取其表达产物,从而进一步鉴定其功能是目前基因功能研究常用的方法,但原核表达条件需不断优化,以提高表达量。欧阳乐军等^[4]在前期研究工作中,成功地从枯草芽孢杆菌亚种 Bs-6 菌株中克隆得到 *aiiA* 基因,其序列与已报道 *aiiA* 的同源性为 87%~96%,并通过基因工程方法构建了克隆载体 pMDTM19-T Vector+*aiiA*。在此基础上,本研究将 pMDTM19-T Vector+*aiiA* 的 *aiiA* 基因双酶切回收后,与经同样双酶切的 pGEX-4T-1 相连,构建其原核表达载体,进行诱导表达,并检测了表达产物的抑菌能力以及对病原菌致病力的影响,以期利用基因工程手段培育转 *aiiA* 基因植株以猝灭植物病原菌的 QS 系统,增加植物抗病能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pMDTM19-T Vector + *aiiA*、原核表达质粒 pGEX-4T-1 及青枯菌(*R. solanacearum*)、焦枯菌(*C. quinquesepstatun*)和桃色欧文氏杆菌由湛江师范学院植物工程中心实验室保存; *E. coli* BL21 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA Ladder Marker、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4-DNA ligase 购自大连宝生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂,购自广州化学试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 *aiiA* 基因的获取 采用生工生物工程(上海)有限公司质粒纯化试剂盒提取纯化 pMDTM19-T Vector+*aiiA* 质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对纯化的

pMDTM19-T Vector+*aiiA* 进行双酶切,酶切体系如下:10×K Buffer 8.0 μ L, *Bam*H I (10 U/ μ L) 3.0 μ L, *Xho* I (10 U/ μ L) 3.0 μ L, pMDTM19-T Vector+*aiiA* 6.0 μ L,补充灭菌去离子水至 30 μ L。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,并用生工生物工程(上海)公司琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒回收 *aiiA* 基因目的片段,具体方法按照试剂盒操作说明书进行。

1.2.2 pGEX-4T-1+*aiiA* 原核表达载体的构建及检验 采用生工生物工程(上海)有限公司质粒纯化试剂盒提取纯化 pGEX-4T-1 质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对纯化的 pGEX-4T-1 质粒进行双酶切后,再用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,并用生工生物工程(上海)公司琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒回收酶切大片段。按宝生物工程(大连)有限公司 T4-DNA ligase 操作说明,将 1.2.1 中经过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 *aiiA* 基因连接到经过同样双酶切的原核表达载体 pGEX-4T-1 的 *Bam*H I 与 *Xho* I 酶切位点间,构建原核表达载体 pGEX-4T-1+*aiiA*。连接体系如下:T4-DNA ligase Buffer 4.0 μ L, pGEX-4T-1 2.0 μ L,纯化回收的 *aiiA* 片段 6.0 μ L, T4-DNA ligase (3 U/ μ L) 1.0 μ L,补充灭菌去离子水至 20 μ L。混匀后置 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h 以上。取 5 μ L 连接产物,用热激法转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,具体方法参照 *E. coli* BL21 感受态细胞转化说明书进行。

采用 QIAGEN 公司的质粒纯化试剂盒提取 pGEX-4T-1+*aiiA* 质粒,用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切验证,具体酶切体系如下:10×K Buffer 8.0 μ L, *Bam*H I (10 U/ μ L) 3.0 μ L, *Xho* I (10 U/ μ L) 3.0 μ L, pGEX-4T-1+*aiiA* 6.0 μ L,补充灭菌去离子水至 30 μ L。将上述酶切体系各组分轻微离心混匀后,37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h 以上。酶切结束后,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果。

aiiA 基因 PCR 检测引物由生工生物公司合成,Primer1:5'-ATCATGACAGTAAAGAAGCTT TATTTTCG-3'; Primer2:5'-GTCCTCAACAAGATACTCCTAATGATGT-3'。PCR 反应体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L, 模板 (1 ng/ μ L) 1.0 μ L, 上游引物 (10 μ mol/mL) 1.0 μ L, 下游引物 (10 μ mol/mL) 1.0 μ L, Premix Taq 酶 (2 U/ μ L) 0.5 μ L, 补充灭菌去离子水至 25 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2

min,30 个循环;72 ℃延伸 8 min,4 ℃保存。将酶切和 PCR 检测呈阳性的载体送往生工生物公司测序。

1.2.3 目的蛋白诱导表达条件的优化 取 50 μL 1.2.2 节中构建的含 pGEX-4T-1+*aiiA* 质粒的阳性重组菌,接种于 5 mL LB 培养液中,进行诱导表达培养。根据影响 *E. coli* 中可溶性靶蛋白表达量的因素,按表 1 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化影响可溶

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验编号 Test No.	温度/℃ Temperature	IPTG 浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration of IPTG	氨苄青霉素(Amp)/ (μg · mL ⁻¹) Concentration of Amp	诱导时间/h Induction time
1	37	0.1	100	3
2	37	0.2	150	6
3	37	0.4	200	9
4	31	0.1	150	9
5	31	0.2	200	3
6	31	0.4	100	6
7	25	0.1	200	6
8	25	0.2	100	9
9	25	0.4	150	3

1.2.4 *aiiA* 蛋白对病原菌致病力的影响 将桃色欧文氏杆菌制成 1×10^7 CFU/mL 菌悬液,与等量 *aiiA* 蛋白表达上清液混合接种消毒后的马铃薯片,用未接种桃色欧文氏杆菌、只单独接种桃色欧文氏杆菌以及接种桃色欧文氏杆菌+未诱导表达菌液的马铃薯片作为对照,将培养皿密封后置于 25 ℃培养箱中培养 2 d,观察马铃薯片的腐烂情况,并拍照记录结果。

将 1.2.3 节中 9 号试验的 *aiiA* 蛋白与青枯菌液混合后,以伤根接种法^[5]接种尾巨桉,24 h 后观察植株病症情况,以未加 *aiiA* 蛋白的青枯菌接种的尾巨桉为对照。

1.3 转 *aiiA* 基因植株的获得及抗性分析

利用农杆菌介导法将 *aiiA* 基因转入尾巨桉,选取分子检测^[5]呈阳性的植株接种焦枯菌后,调查植株的抗性。植株病情指数计算参照方仲达^[6]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 *aiiA* 基因的获取

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对纯化的 pMDTM 19-T Vector+*aiiA* 进行双酶切后,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,得到与预期长度一致的 2 条条带,一条为目的基因 *aiiA*,另一条为 pMDTM 19-T Vector 大片段(图 1)。回收 *aiiA* 基因片段,用于原核表达载体的构建。

性靶蛋白表达量的因素。将诱导表达后的菌体用离心管收集后重悬于预冷的 PBS 溶液(含 150 mmol/L NaCl、16 mmol/L Na₂HPO₄、4 mmol/L NaH₂PO₄,pH 7.3)中,用超声破碎法破碎菌体 4 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行 SDS-PAGE 检测。

2.2 *aiiA* 基因原核表达载体的鉴定

提取重组质粒 pGEX-4T-1+*aiiA* 后,用 PCR 检测获得了与 *aiiA* 基因长度一致的条带(图 2-A),*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果获得了与预期长度相一致的 2 条条带(图 2-B)。同时,重组质粒 pGEX-4T-1+*aiiA* 测序结果证实,插入的外源目的基因序列与克隆载体中的 *aiiA* 基因序列一致。上述结果表明,原核表达载体 pGEX-4T-1+*aiiA* 构建成功。

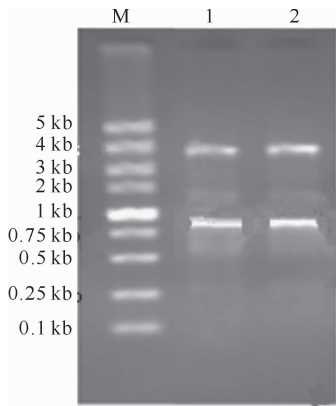


图 1 双酶切 pMDTM 19-T Vector+*aiiA* 质粒获取的 *aiiA* 基因

M. 5 000 bp DNA Ladder Marker;
1~2. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果
Fig. 1 Double enzyme digestion of recombinant pMDTM 19-T Vector+*aiiA*
M. 5 000 bp DNA Ladder Marker;
1~2. *Bam*H I and *Xho* I enzyme digestion products

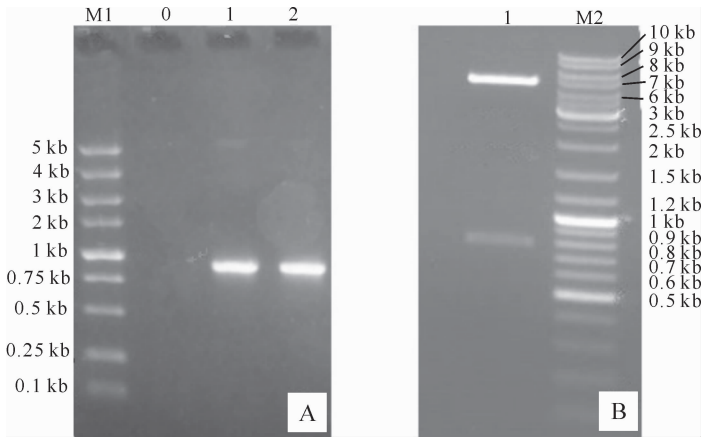


图 2 重组质粒 pGEX-4T-1+aiiA 的鉴定

A. 重组质粒 pGEX-4T-1+aiiA 的 PCR 结果,M1. 5 000 bp DNA Ladder Marker,0. 为阴性对照,1~2. *aiiA* 基因的 PCR 结果;
B. 重组质粒 pGEX-4T-1+aiiA 的双酶切结果,M2. 10 kb DNA Ladder Marker,1. 重组质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of recombinant pGEX-4T-1+aiiA

A. PCR identification of the recombinant,M1. 5 000 bp DNA Ladder Marker,0. Negative control,1-2. PCR products;
B. Enzyme digestion identification of the recombinant,M2. 10 kb DNA Ladder Marker,1. Product digested by *Bam*H I and *Xho* I

2. 3 pGEX-4T-1+aiiA 诱导表达条件的优化

正交试验结果表明,温度是影响靶蛋白表达量的主要因素,当温度保持在 37 ℃ 时,其他 3 个处理因素无论是否改变,都不影响靶蛋白的表达量,31 ℃ 时也出现相似的结果;而当诱导温度降至 25 ℃ 时,靶蛋白的表达量最高,目的条带的位置与融合蛋白的分子质量 54 ku (26 ku+27.5 ku)相当(图 3)。

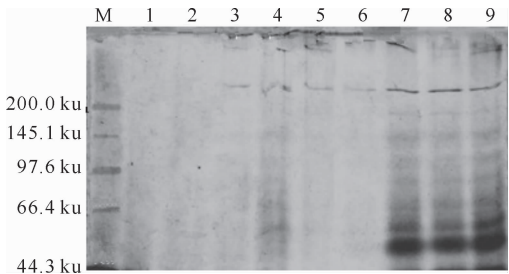


图 3 重组 aiiA 蛋白原核诱导表达条件的优化

M. 蛋白分子质量标准;1~9. 试验编号,同表 1
Fig. 3 Optimization conditions for prokaryotic induced expression of recombinant aiiA protein
M. Standard protein molecular;
1-9. Test numbers,the same for table 1

2. 4 aiiA 蛋白的抗病性测定

2. 4. 1 对桃色欧文氏杆菌致病力的影响 由图 4 可见,aiiA 蛋白可以抑制桃色欧文氏杆菌对马铃薯的致病性,用 aiiA 蛋白上清液与桃色欧文氏杆菌一起接种后,马铃薯片腐烂程度明显减轻,说明 aiiA 蛋白对桃色欧文氏杆菌引起的腐烂有较好的抑制效果,而未添加 aiiA 蛋白的马铃薯片腐烂明显。

2. 4. 2 对青枯菌致病力的影响

尾巨桉接种青枯菌 24 h 后,对照植株表现出缺水迹象,植株萎蔫,叶片下垂,浇水不能减轻缺水症状;而接种青枯菌与 aiiA 蛋白混合液的尾巨桉植株形态正常,枝叶挺拔,无明显的感病症状(图 5),说明 aiiA 蛋白能有效降低青枯菌的致病力,延缓植株病症的发生。

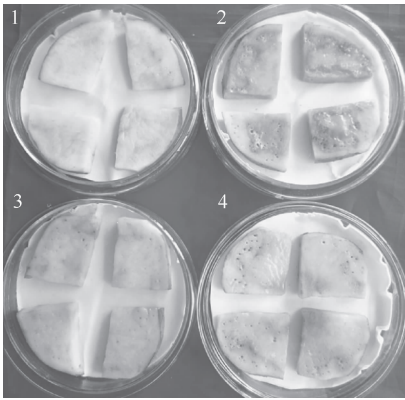


图 4 aiiA 蛋白对桃色欧文氏杆菌致病力的影响

1. 未接种的马铃薯片;2. 接种桃色欧文氏杆菌的马铃薯片;
3. 接种桃色欧文氏杆菌+aiiA 蛋白(诱导)上清液的马铃薯片;
4. 接种桃色欧文氏杆菌+aiiA 蛋白(未诱导)上清液的马铃薯片

Fig. 4 Effect of aiiA protein on pathogenicity of

E. carotovora sp. *carotovora*

1. Potato without inoculation;2. Potato with inoculation of *E. carotovora*;3. Potato with inoculation of *E. carotovora* and BL21 containing pGEX-4T-1+aiiA (induced);4. Potato with inoculation of *E. carotovora* +BL21 containing pGEX-4T-1+aiiA (not induced)

2. 5 转 aiiA 基因尾巨桉植株对焦枯菌抗性的检测

尾巨桉接种焦枯菌 3 d 时,部分非转基因植株

叶片出现病斑,呈烫伤状,少数叶片焦枯、皱缩、卷曲;枝条出现少数点状病斑(图 6);接种 6 d 时,非转基因植株病情指数达到 19.3%,12 d 时达到 67.3%,16 d 时为 97.6%(图 7)。转 *aiaA* 基因植株

接种 3 d 时未见异常(图 6),第 6 天时也未见异常,病情指数为 0,接种 16 d 时病情指数为 67.1%(图 7)。根据病情指数的大小可判定,转 *aiaA* 基因尾巨桉较非转基因对照植株对焦枯菌的抗性明显提高。

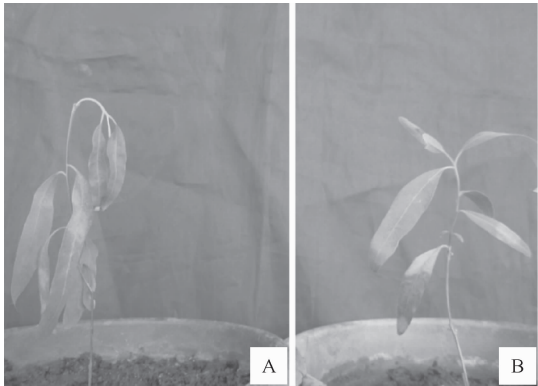


图 5 *aiaA* 蛋白对青枯菌致病力的影响

A. 接种青枯菌的尾巨桉;
B. 接种青枯菌和 *aiaA* 蛋白的尾巨桉

Fig. 5 Effect of *aiaA* protein on pathogenicity of *R. solanacearum*

A. *E. urophylla*×*E. grandis* of induction with *R. Salanacearum*; B. *E. urophylla*×*E. grandis* of induction with *R. sulanacearum* and *aiaA* protein

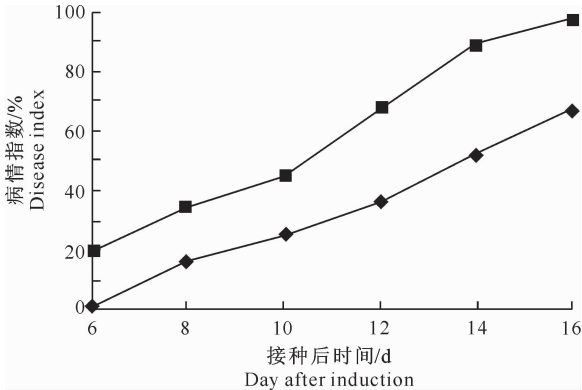


图 7 转 *aiaA* 基因植株接种焦枯菌后病情指数的变化

—◆—,转基因尾巨桉植株;—■—,非转基因尾巨桉植株

Fig. 7 Disease index variation of *E. urophylla*×*E. grandis* plant with *aiaA* gene after induction with *C. quinqueseptatum*

—◆—, *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* plant with *aiaA* gene;
—■—, *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* plant without *aiaA* gene

3 讨论与结论

随着群体感应与病原菌致病关系研究的不断深入,人们发现细菌自身诱导物 AHLs 是病原菌群体感应系统的主要信号分子,AHLs 浓度降低时不能激活病原菌致病基因的表达^[7-8]。随着此方面研究的深入,有望从植物或微生物中发现降解多种细菌



图 6 转 *aiaA* 基因对焦枯菌致病力的影响

NT, 非转基因尾巨桉植株;T, 转基因尾巨桉植株

Fig. 6 Effects of *aiaA* gene on pathogenicity of *C. quinqueseptatum*

NT, *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* plant without *aiaA* gene; T, *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* plant with *aiaA* gene

群体感应信号分子的酶,根据植物对细菌 QS 系统的反应,通过转基因技术培育产生含 AHLs 降解酶的转基因植物,进而猝灭病菌的群体感应,提高植物抗病性^[9-11]。笔者在前期的研究中,从 Bs-6 菌株中克隆了 *aiaA* 基因,并对其进行了生物信息学分析,在线 BLAST 分析时发现,Bs-6 的 *aiaA* 基因与 GenBank 中已报道的 *aiaA* 基因同源性达 87%~96%,且推导的氨基酸序列同源性为 89.2%~98.4%,说明从 Bs-6 中成功克隆了 *aiaA* 基因,且该基因编码的 AHL-Lactonase 具有降解 AHLs 分子的性质,能够起到猝灭革兰氏阴性致病菌 QS 系统的作用。

原核生物表达系统中的 *E. coli* 表达系统具有高效性和稳定性^[12],因而运用最广泛,其遗传背景研究也最清楚。本研究应用的表达载体 pGEX-4T-1 含有谷胱甘肽 S 转移酶(GST)基因,能将外源基因表达为 GST(分子质量为 26 ku)的融合蛋白,以增加外源目的蛋白的可溶性。据以往的报道可知,本研究中正交试验设计的 4 个因素是影响 *E. coli* 中可溶性靶蛋白表达量的主要因素。其中诱导温度对可溶性靶蛋白的表达量影响最为显著;同时,诱导时间对可溶性靶蛋白的表达量也有很大的影响,随着诱导时间的延长,靶蛋白的表达量增加;适宜浓度

的 Amp 能提供一定的选择压力,增强 pGEX-4T-1 质粒的稳定性,以提高可溶性靶蛋白的表达量。本试验结果表明,诱导温度是最主要的影响因素,这与以往报道结果是一致的。这主要是由于较低的生长温度使蛋白质的合成速度降低,同时,无活性聚集体的形成速率也降低,这些聚集体是疏水性的,相互作用较弱,从而可减少包涵体的形成^[13]。本试验对原核表达的条件进行了优化,提高了可溶性靶蛋白的表达量,避免对包涵体蛋白质进行变性与复性处理过程,为后续外源蛋白活性测定奠定了基础。

aiiA 蛋白可以抑制桃色欧文氏杆菌对马铃薯的致病性,用 aiiA 蛋白上清液与致病菌一起接种后,马铃薯片的腐烂程度明显减轻,说明 aiiA 蛋白对桃色欧文氏杆菌引起的腐烂有较好的抑制效果,降低病菌的致病力。同时,aiiA 蛋白与青枯菌混合接种尾巨桉后,因 aiiA 蛋白能有效降低青枯菌的致病力,植株病症的发生得到了延缓。利用病原菌信号分子群体猝灭机制以及植物抗病基因诱导表达策略,能显著增强抗病基因的表达效率,从而将病原菌信号分子猝灭,增强转基因植株的广谱抗性。本研究中,转 aiiA 基因尾巨桉接种焦枯病菌后,抗性水平比未转基因对照植株有明显提高,达到中等抗病水平。本研究结果对利用基因工程手段培育转 aiiA 基因植物,从而通过猝灭植物病原菌群体感应信号来破坏其 QS 系统,降低其致病力,提高植物的抗病害能力有一定的参考意义。

[参考文献]

- [1] Ryan W S, Steven E L. Applied and environmental microbiology, No. 1 two dissimilar N-Acyl-Homoserine lactone acylases of pseudomonas syringae influence colony and biofilm [J]. Morphology January, 2009, 75: 45-53.
- [2] Ryan R P, Dow J M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria [J]. Microbiology, 2008, 154 (7): 1845-1858.
- [3] Woppper J, Cardona S T, Huber B. A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-Regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72 (2): 1579-1587.
- [4] 欧阳乐军, 黄真池, 沙月娥, 等. 植物病原菌群体猝灭基因克隆及诱导表达载体构建 [J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 18-23.
- [5] Ouyang L J, Huang Z C, Sha Y E, et al. Cloning and plant expression vector construction of quorum sensing gene of plant bacterial pathogens [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(1): 18-23. (in Chinese)
- [6] He L Y, Sequeira L, Kelman A. Characterisrics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China [J]. Plant Disease, 1983, 12: 1357-1361.
- [7] 方仲达. 植物研究法 [M]. 北京: 农业科学出版社, 1998: 8-18.
- [8] Fang Z D. Research methods in plant pathology [M]. Beijing: Agriculture Science Press, 1998: 8-18. (in Chinese)
- [9] Ryan W, Shepherd S E, Lindow. Two dissimilar N-Acyl-Homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 45-53.
- [10] Chen C N, Chen C J, Liao C T, et al. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity [J]. BMC Microbiology, 2009, 9(89): 1-11.
- [11] Xie Y, Wetlaufer D B. Control of aggregation in protein refolding: The temperature-leap tactic [J]. Protein Sci, 1996, 5: 517-523.
- [12] 邱健, 李承光, 贾振华, 等. 酰基高丝氨酸内酯酶 SS10 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探 [J]. 植物病理学报, 2007 (6): 629-636.
- [13] Qiu J, Li C G, Jia Z H, et al. Enzymatic characterization and function of N-acylhomoserine lactonase SS10 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007(6): 629-636. (in Chinese)
- [14] 张争, 徐进, 许景升, 等. 植物青枯菌 *aac* 基因克隆及猝灭群体感应信号功能的研究 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2651-2656.
- [15] Zhang Z, Xu J, Xu J S, et al. Cloning of *aac* gene of *Ralstonia solanacearum* and function research on quenching quorum-sensing signal [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(9): 2651-2656. (in Chinese)
- [16] 张付凯, 乔亚奇, 王磊, 等. 抗对硫磷基因工程四价抗体在大肠杆菌中高效表达与鉴定 [J]. 核农学报, 2012, 26(1): 118-122.
- [17] Zhang F K, Qiao Y Q, Wang L, et al. High level expression of genetically engineered tetravalent antibodies against parathion in *E. coli* and its identification [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26(1): 118-122. (in Chinese)
- [18] 李立芹. 烟草 WRKY12 基因的分离、表达与多克隆抗体的制备 [J]. 核农学报, 2011, 25(3): 461-468.
- [19] Li L Q. Isolation, expression and antibody preparation of WRKY12 from *Nicotiana tabacum* K326 line [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2011, 25(3): 461-468. (in Chinese)