

一个棉花黄萎病抗菌肽基因 25a2 的克隆与表达

张冬冬, 王世英, 郭晓军, 姜军坡, 刘慧娟, 朱宝成*

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要: 将棉花黄萎病抗菌肽 A2 的 N 端 15 个氨基酸序列在 NCBI 进行同源序列比较, 根据同源蛋白的 DNA 序列设计引物, 以解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) RS-25 菌株基因组为模板, 应用 PCR 扩增出一条约 300 bp 的 DNA 片段。序列分析表明, DNA 片段长 354 bp, 编码 117 个氨基酸, 将该基因命名为 25a2。构建表达载体 pET-28a-25a2, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21, 37℃ 培养, 应用终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导, 表达产物经 SDS-PAGE 分析, 得到分子量约 15 kDa 表达蛋白条带, 与理论蛋白分子量相符。

关键词: 棉花黄萎病; 解淀粉芽孢杆菌; 抗菌肽 A2

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)05-0346-05

Cloning and Expression of a Cotton *Verticillium* Wilt Antibacterial Peptide Gene 25a2

ZHANG Dong-dong, WANG Shi-ying, GUO Xiao-jun, JIANG Jun-po, LIU Hui-juan, ZHU Bao-cheng*

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

Abstract: In order to clone the gene which encodes the cotton *Verticillium* wilt antibacterial peptide A2, 15 amino acid residues of N-terminal of the antibacterial peptide A2 was inputted in NCBI to blast and the result showed a protein contained a fragment which was the same with the 15 amino acid residues of A2. Following the protein sequence, the gene of the protein was found and a pair of primers was designed according to the gene. A DNA fragment about 300 bp was obtained by PCR amplification using the genome of strain *Bacillus amyloliquefaciens* RS-25 as template. The PCR production was ligated into pET-28a plasmid by two restriction enzyme sites of *Bam*H I and *Hind* III. After colony PCR and restriction enzyme-digestion analysis, the PCR production was sequenced and sequencing analysis indicated that the PCR production was 354 bp and coded for a protein of 117 amino acid residues. This gene is named 25a2. The constructed expression vector pET-28a-25a2 was transformed into *Escherichia coli* BL21 and colony PCR analysis was used to select the positive clones. The positive single clone was inoculated into LB medium and cultivated overnight with the kanamycin concentration about $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The cultivated bacteria was transferred into fresh medium with 10% inoculum and cultured at 37℃ without antibiotics until the OD_{600} reached 0.5~0.7. Then IPTG was added into the culture with the final concentration about $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to induce the expression. Five hours later, the cultured cells were collected and ultrasonic crushed. SDS-PAGE analysis on expression product shows the molecular weight is about 15 kDa and coincides with the theory analysis.

Key words: cotton *Verticillium* wilt; *Bacillus amyloliquefaciens*; antibacterial peptide A2

收稿日期: 2008-11-28

作者简介: 张冬冬(1981-), 男, 助教, 硕士, zhangdongcumt@163.com; * 通讯作者, zhu2222@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目(398152)

棉花黄萎病(cotton *Verticillium wilt*)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)侵染引起的真菌性维管束系统病害,是棉花最严重的病害之一^[1-2]。多年的生产实践表明,仅靠单一措施防治棉花黄萎病很难达到理想效果,综合防治尤为重要,而以生物防治为主导的综合防治措施的研究将更有前途^[3]。目前的研究对象主要包括真菌、细菌、放线菌和内生真菌在内的棉花黄萎病生防因子及其生防机理、防病基因工程微生物等^[4]。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是一类能产生抗生物质,而且在一定条件下能产生抗逆性内生孢子的化能异养菌。作为植物病害生防细菌之一,其抗菌谱广泛,对多种病原真菌、细菌均有较强的抑制作用^[5-6]。研究表明,该菌的生防机理包括竞争作用、拮抗作用、诱导植物抗性等方面,尤以产生抗生素^[7]、抑菌蛋白^[8-10]和挥发性抗菌物质的拮抗作用最为主要。因此,芽孢杆菌是理想的抗菌基因的资源库。

利用棉花黄萎病的拮抗细菌分离纯化出抗菌蛋白,研究其特性,进一步分离抗菌功能基因,将功能基因转入棉花中,培育出转基因抗病植株,或应用高表达的宿主菌进行拮抗蛋白的高效表达,制备生物药物,是防治此病的有效途径。

本研究应用已经分离的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)RS-25 菌株和分离的抗菌肽 A2 的 N 端序列,试图克隆抗菌肽 A2 的基因序列,并在大肠杆菌中实现该蛋白的高效表达。

1 材料和方法

1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)RS-25 菌株, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* BL21 由本实验室保存。pET-28a 由河北农业大学生命科学学院李莉云教授惠赠。

Pyrobest 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Hind* III 和 *Bam*H I、 λ -*Hind* III digest、DL2000 DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准(低)均购自 TaKaRa 公司。Pfu DNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司。硅胶膜型™ PCR 产物(DNA 片段)纯化试剂盒购自北京赛百盛生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 核酸操作。细菌基因组 DNA 的提取、质粒 DNA 的制备、限制性酶切、连接反应、细菌转化、凝胶电泳、DNA 片段回收等参照文献^[11]或

按供应商提供的相关说明操作。

1.2.2 棉花黄萎病抗菌肽基因 25a2 的 PCR 扩增。根据本实验室分离的抗菌多肽 A2 的 N 端测序,在 NCBI 进行蛋白序列比对,根据同源蛋白的 DNA 序列设计引物,分别在上下游引物引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。具体序列如下:pr1F: CGGGATCC ATGGTACGTCGTTTGTCTGA; pr1R: CCCAAGCTTTTATAAACCGTAATAATAA-GATAG; 有下划线的碱基为酶切位点。PCR 程序为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 cycles; 72℃ 10 min。

1.2.3 DNA 序列的测定和分析。DNA 序列的测定由上海生工完成。DNA 序列的分析由 DNAMAN 软件完成。

1.2.4 表达载体的构建。将 PCR 产物和表达载体 pET-28a 分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上,培养过夜。

1.2.5 目的蛋白的表达。将构建的工程菌接种于 5 mL 含 100 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 过夜培养。按照 10% 的接种量转接到 100 mL 不含有抗生素的 LB 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.7 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol · L⁻¹,继续培养 10 h。取 1 mL 上述的培养菌液到 1.5 mL 的 eppendorf 管中,4℃ 12000 r · min⁻¹ 离心 1 min,弃去上清,沉淀用 100 μ L 20 mmol · L⁻¹ 的磷酸缓冲液(pH=7.0)重新悬浮,冰浴中超声波破碎 10 min,4℃ 保存备用。

1.2.6 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 参照文献^[11],按 4% 浓缩胶,16% 分离胶进行电泳,完成后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病抗菌肽基因 25a2 的 PCR 扩增

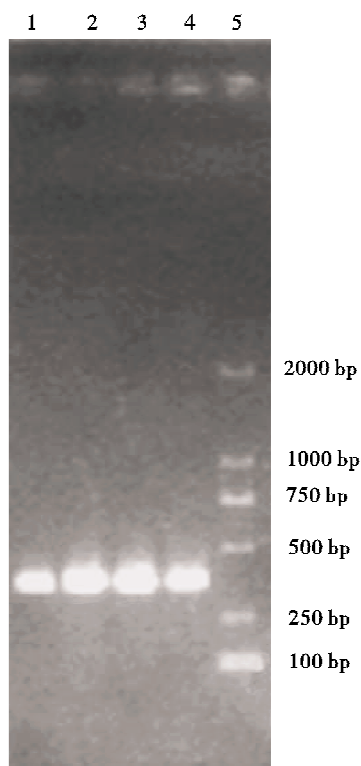
提取解淀粉芽孢杆菌基因组 DNA,用引物 pr1F 和 pr1R 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得约 300 bp 的片段(图 1)。

2.2 载体和 PCR 产物的酶切检测

载体 pET-28a 和 PCR 扩增产物用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,分别回收载体和 PCR 片段,电泳检测(图 2)。

2.3 重组质粒阳性克隆的筛选

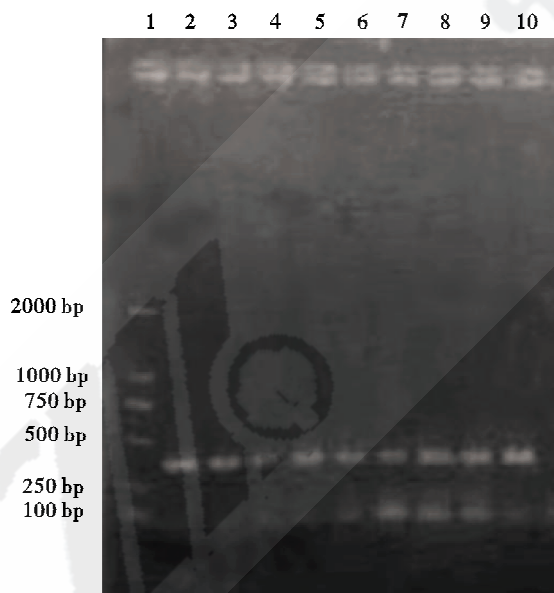
将酶切纯化的质粒 pET-28a 和 DNA 片段用



泳道 1~4: 抗菌肽 $\Lambda 2$ 基因的 PCR 产物; 泳道 5: DNA 分子量标准。

图 1 抗菌肽基因 25a2 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of antibacterial peptide gene 25a2



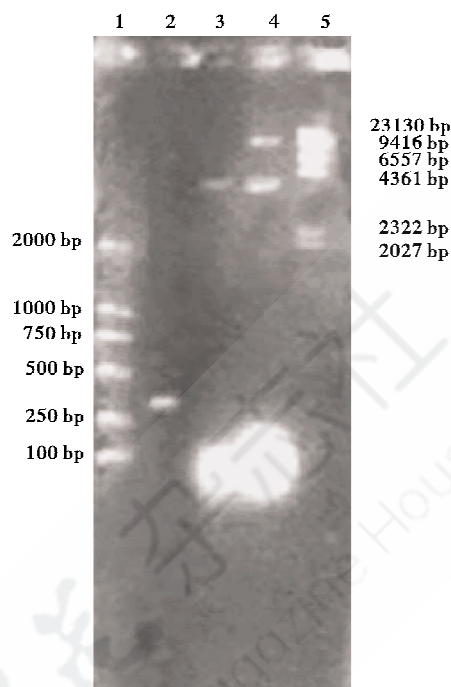
泳道 1: DL 2000 DNA 分子量标准; 泳道 2~10: 菌落 PCR 产物。

图 3 菌落 PCR 筛选阳性克隆

Fig. 3 Colony PCR to select positive clone

T4 DNA 连接酶连接, 将连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 涂布在含有卡那霉素的平板上, 培养过夜, 挑取单菌落应用菌落 PCR 进行筛选。从图 3 中可以看出菌落 PCR 扩增出的 DNA 片段与克隆到的目的基因片段大小相等。

2.4 阳性克隆的双酶切检测

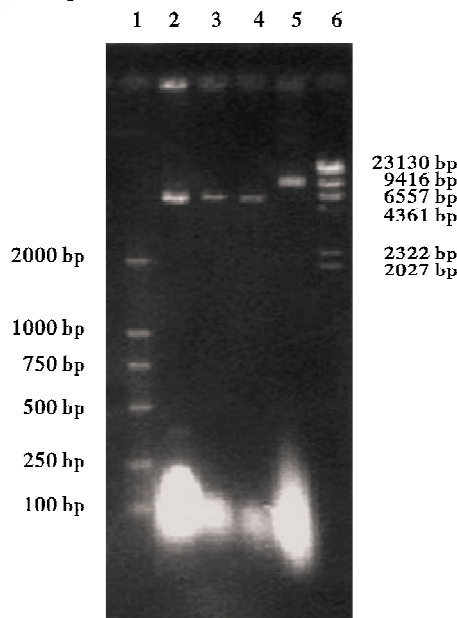


泳道 1: DL2000 DNA 分子量标准; 泳道 2: 抗菌肽 $\Lambda 2$ 基因酶切纯化产物; 泳道 3: 载体 pET-28a 酶切纯化产物; 泳道 4: 载体 pET-28a 对照; 泳道 5: λ -Hind III digest DNA 分子量标准。

图 2 酶切纯化产物的电泳检测

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis analysis of the digestion product

选取阳性克隆提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。由图 4 可见, 重组质粒切出一条约 300 bp 的条带, 与目的基因片段相等。



泳道 1: DL2000 DNA 分子量标准; 泳道 2: 重组载体双酶切; 泳道 3: 重组载体用 *Bam*HI 单切; 泳道 4: 重组载体用 *Hind* III 单切; 泳道 5: 重组载体质粒; 泳道 6: λ -*Hind* III DNA 分子量标准。

图 4 重组载体双酶切鉴定

Fig. 4 Restriction enzyme digest of recombinant vector

2.5 DNA 序列测定和分析

经测序,得到以下 DNA 序列:

```

ATGGTACGTC  GTTTGTTCGAT
CATTTCTTTA  GCCATGATTT
TTGCTGTTTC  TTTATTCGCT
TTTGGCGGCT  CTGCATCAGC
AGCAGCTTTC  AAACCTAAAG
CTGAACCGGA  CGTTTCCATT
TTAGCCAGCG  GGGGCACAGT
CGGTATTTAC  GGTGCTAATA
TGCGCTCATG  CTCTAAGGTC
AGCTGTTCAA  CGATCACAAAC
ATTCTCAAGC  GGTAACAAAAA
TTACAGGTTTC  TTGGGTAACC
GGAGAATATG  TTCAAGGCCA
CTACACCAAT  TCTAATAAAT
GGCTGAAAGT  CACGTATGCA
GGAGCGACAG  GCTACGTTTC
AGTCACCACG  CTATCTTATT
ATTACGGTTT  ATAA
  
```

……表达蛋白的理论序列:

```

MVRRLSIISLAMIFAVSLFAFGGSASAAAFKPKA
EPDVSIL[ASGGTVGIYGANMRS]CSKVSCSTIT
TFSSGKKITGSWVTGEYVQGHYTNSNKWLKV
TYAGATGYVSVTTLSSYYYGL
  
```

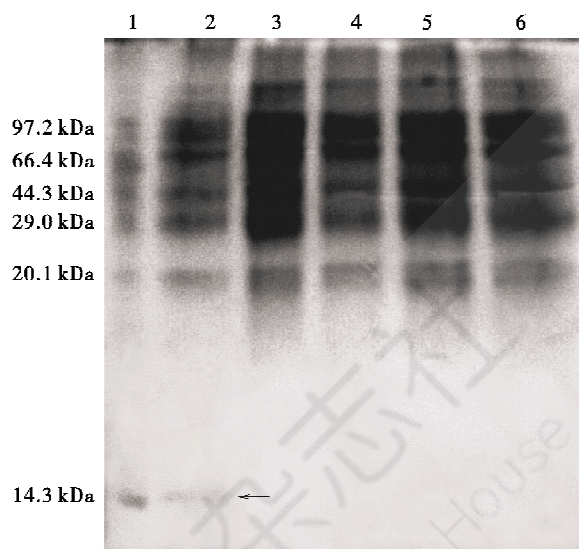
测序得到的 DNA 序列长 354 bp, 编码 117 个氨基酸。将此基因命名为 25a2 并提交 NCBI, 得到检索号 No. FJ225661。方框中及其至 C 端的氨基酸序列的相对分子质量为 8044, 与分得的抗菌肽 A2 的相对分子质量相同。

2.6 25a2 基因在大肠杆菌中的诱导表达

将 pET-28a-25a2 转化宿主菌 *E. coli* BL21, 诱导表达后, 收集菌体超声破碎, 进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 凝胶上, 在 15 kDa 处清晰可见表达的特异蛋白条带(图 5), 与理论值相符合。

3 讨论

本研究成功从解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 中克隆到了一个功能蛋白基因 25a2, 该基因的 DNA 序列和 Chen 等^[12]报道的一个假想蛋白的 DNA 序列完全相同, 并且都来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。武翠红等分离的多肽 A2 相对分子量为



泳道 1: 蛋白质分子量标准; 泳道 2: pET-28a-25a2 在 BL21 宿主菌中用 IPTG 诱导表达; 泳道 3: pET-28a-25a2 在 BL21 宿主菌中没有诱导; 泳道 4: pET-28a 空质粒在 BL21 宿主菌中用 IPTG 诱导表达; 泳道 5: pET-28a 空质粒在 BL21 宿主菌中没有诱导; 泳道 6: 没有质粒的宿主菌 BL21。

图 5 25a2 基因在大肠杆菌 BL21 中表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of 25a2 gene expression product in *E. coli* BL21

8000, 与本研究分离的基因 25a2 表达的蛋白质从方框位置到 C 端的氨基酸残基的相对分子质量基本相同, 并且多肽 A2 的 N 端 15 个氨基酸残基与 25a2 基因表达的蛋白质方框中的氨基酸序列完全相同, 这些都证明了抗菌肽 A2 与本研究克隆得到的 25a2 基因表达的蛋白质是同一个蛋白。

本研究克隆得到的蛋白质与多肽 A2 比较, N 端有 41 个氨基酸多余。这可能是多肽 A2 在分离过程中引起蛋白质的降解, 但丢失的氨基酸序列并不影响多肽的活性, 或者是保留了完整蛋白的部分活性。也有可能是 25a2 基因所表达的蛋白质是功能蛋白质的前体形式, 经过蛋白酶的酶切转变为有活性的功能蛋白质, 相关的试验正在进行中。

具有棉花黄萎病拮抗功能的 25a2 基因的克隆, 为拮抗蛋白的高效表达和转基因棉花的研制奠定了坚实的基础。本研究用 pET-28a 表达载体在 *E. coli* BL21 菌株里实现了目的蛋白的表达, 但目的蛋白主要是以包涵体的形式存在, 可溶性蛋白量很少, 大大影响了目的蛋白的活性。形成包涵体的原因可能是由于在重组蛋白的表达过程中缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子, 或环境不适, 无法形成正确的次级键等原因形成的。本实

实验室正试图采用低温诱导表达和蛋白质变性复性的方法获得有活性的目的蛋白。

参考文献:

- [1] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(3): 20-24.
DU Wei-shi, Du Xiong-ming, Ma Zhi-ying. Studies on SSR markers of resistance gene of *Verticillium* wilt in cotton[J]. Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2004, 32(3): 20-24.
- [2] 陈旭升, 陈永莹, 黄骏麒. 棉花黄萎病菌致病性生理生化研究进展[J]. 棉花学报, 2001, 13(3): 183-187.
CHEN Xu-sheng, Chen Yong-xuan, Huang Jun-qi. Advances of studies on physiological and biochemical properties of pathogenesis caused by *Verticillium dahliae* in Cotton[J]. Acta Gossypii Sinica, 2001, 13(3): 183-187.
- [3] 周艳芬, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 98-101.
ZHOU Yan-fen, Du Hong-fang, Yuan Hong-shui, et al. Isolation and purification of antifungal protein from *Paenibacillus* to *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2007, 19(2): 98-101.
- [4] 贾士荣. 我国棉花基因工程的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2000, 6(2): 18-22.
JIA Shi-rong. Progress in cotton genetic engineering in China[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2000, 6(2): 18-22.
- [5] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文, 等. 芽孢杆菌 BH-1 防治大豆根腐病的效果及机制[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 180-184.
GUO Rong-jun, Liu Xing-zhong, Yang Huai-wen, et al. Mechanism of rhizobacteria BH-1 (*Bacillus* sp.) to suppress soybean root rot disease caused by *Fusarium* spp. [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(4): 180-184.
- [6] 王天云, 陈振风, 王福源, 等. 一种促使乳酸芽孢杆菌大量生成芽孢的方法[J]. 工业微生物, 2001, 31(3): 13-18.
WANG Tian-yun, Chen Zhen-feng, Wang Fu-yuan, et al. A method for facilitate sporulation of *Bacillus* WTFY1001[J]. Industrial Microbiology, 2001, 31(3): 13-18.
- [7] GABRIEL E B, Nicolle R, Anette S, et al. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(7): 3328-3338.
- [8] 张进霞, 袁洪水, 王士英, 等. 几种氨基酸铜对大丽轮枝菌产生毒素蛋白的影响[J]. 棉花学报, 2006, 18(2): 79-82.
ZHANG Jin-xia, Yuan Hong-shui, Wang Shi-ying, et al. Effect of cupric complexes of amino acid on secreted toxic protein from *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2006, 18(2): 79-82.
- [9] 张进霞, 袁洪水, 王士英, 等. 几种氨基酸铜对大丽轮枝菌微菌核形成的抑制作用[J]. 棉花学报, 2006, 18(1): 58-59.
ZHANG Jin-xia, Yuan Hong-shui, Wang Shi-ying, et al. Inhibition of the cupric complexes of amino acid on microsclerotia formation of *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2006, 18(1): 58-59.
- [10] LAURA O, Daniel D, Rbert N G M. Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts[J]. Fitopatol Bras, 2004, 29(4): 441-446.
- [11] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
LI Jian-wu. Principle and method of biochemistry experiment[M]. Beijing: Beijing University Press, 1994.
- [12] CHEN Xiao-hua, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(9): 1007-1014. ●