

烟草 I 类几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达

李继红 邵寒霜 郑学勤

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 对经过修饰的烟草 I 类几丁质酶(I-chitinase, I-Chi)和 β -1, 3-葡聚糖酶(I-glucanase, I-Glu)cDNA 分别构建了原核表达载体,并转化大肠杆菌 BL21。经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 法证明表达产物 I-Chi 和 I-Glu 的分子量分别约为 30kDa 和 31kDa,在菌内以包涵体形式存在。经包涵体的收集、洗涤、裂解和复性,两种表达产物在体外均表现出较强的抑病原真菌活性,且 I-Chi 的抑菌活力大于 I-Glu,二者具有很强的体外抑菌协同性。

关键词 几丁质酶, β -1, 3-葡聚糖酶, cDNA, 基因表达, 抑菌
学科分类号 Q789

真菌病害一直是造成作物产量损失的主要原因之一,也可使农产品品质下降,甚至引起人畜中毒。虽然在病害防治中采取了综合防治措施,并取得了一定的成效,但各种方法都有其局限性,如化学防治造成病原菌的耐药性和环境污染,传统抗病育种周期长,而新品种又易被新的病原真菌毒性生理小种所淘汰等缺点。近年来随着植物分子生物学的迅速发展,抗病基因工程应运而生,它为人们提供了一种既不污染环境又稳定有效的防病方法^[1]。

几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶可分别水解许多病原真菌细胞壁所含有的两大主要成分:几丁质和 β -1, 3-葡聚糖,是研究得最多的两种抗病原真菌的蛋白质^[2]。根据酶的氨基酸顺序,可将植物几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶分成 3 类。I 类是碱性酶,体外具强抑真菌活性,位于液泡内。另外两类是酸性酶,体外无抑菌活性,主要分布于细胞间隙内。I 类几丁质酶和 I 类 β -1, 3-葡聚糖酶联合作用时,可加强抑菌效果^[3]。但多数真菌侵染始于细胞间隙,然后穿入细胞,而烟草中有强抑菌活性的 I 类几丁质酶和 I 类 β -1, 3-葡聚糖酶只在液泡中存在并不会随着感染渗透到细胞外的空间中。这也是一些实验室虽获得了转基因的工程植株,但组成型表达的转基因植株并未表现出抗病性的主要原因^[4]。为此, Melchers 等^[5]对 I 类酶基因进行了改造,分别去除它们的 C-端液泡定位信号的编码序列,并一起导入烟草,结果转基因烟草中的两种水解酶都表达于细胞间隙,但还未对转基因植株进行抗病性鉴定。

本文将经过修饰的烟草中 I 类几丁质酶和 I 类 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 片段^[6]在大肠杆菌中得到表达,并用表达产物进行了对病原真菌 *Fusarium oxysporum* 两个专化型的抑菌试验,为这两种基因的深入研究及应用于广谱抗真菌病害的植物基因工程打下了基础。

收稿日期:1997-04-27,修回日期:1997-11-13。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒: *E. coli* DH α , pBS 由本室保存, *E. coli* BL21, pET-22b⁽⁺⁾ 由沈庆喜先生提供。

1.1.2 供试病原真菌: *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. lycopersici 由本室保存, *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. niveum 由新疆八一农学院马国斌先生提供。

1.1.3 试剂: X-Gal; IPTG 购自美国 Promega 公司; 工具酶和其它分子生物学试剂购自华美生物工程公司上海分公司; 常用化学试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌表达载体的构建: 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 的重组质粒 pCHA、pGLA^[6] 分别用限制酶 Xba I 和 Xho I 彻底消化, 接着用 Klenow 大片段将粘性末端补平, 经酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提纯化, 再分别用 Hind III 和 BamH I 酶切。与此同时用 Nde I 消化质粒载体 pET-22b⁽⁺⁾, 用 Klenow 大片段补平后再分别用 Hind III 和 BamH I 酶切, 按常规方法^[7] 回收目的片段, 最后进行连接反应与阳性重组子的鉴定。

1.2.2 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达与检测: 阳性重组子分别转化 *E. coli* BL21 菌株, 并挑选有氨苄青霉素 (Amp) 抗性的转化体单菌落接种于 2ml NZCYM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C, 300r/min 振荡培养过夜, 培养物的诱导及对表达产物的分析按常规方法^[7] 进行。

1.2.3 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 表达产物的抑菌试验: (1) 细胞的裂解、包涵体的洗涤与纯化、包涵体的溶解和蛋白质的复性等操作均按文献^[7] 进行。(2) 抑菌试验: 抑菌试验参照文献^[1] 略有改动进行。将供试真菌接种在 PDA 平板上, 当菌落生长到直径约为 1cm 时, 在离菌落边缘

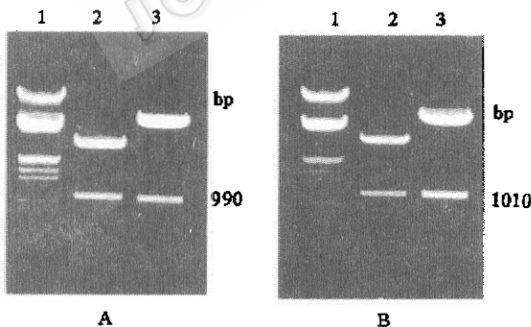


图 1 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 大肠杆菌表达载体构建酶切电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of *E. coli* expression vector for cDNA of Chi and Glu

A. pCHI

B. pGLI

Note: 1 λ DNA/Hind III + EcoR I

Note: 1 λ DNA/Hind III + EcoR I

2 pCHA/Xba I + Hind III

2 pGLA/Xba I + BamH I

3 pCHI/Xba I + Hind III

3 pGLI/Xba I + BamH I

2cm 处打孔, 向各孔中分别加入复性后的 50 μ l 几丁质酶, 35 μ l β -1, 3-葡聚糖酶的初步纯化物及两种酶各 50 μ l 和 35 μ l 的混合物, 于 4 $^{\circ}$ C 放置几小时, 待溶液完全渗入培养基后于 28 $^{\circ}$ C 培养 48h 后观察抑菌结果。

2 结果和分析

2.1 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 大肠杆菌表达载体 pCHI 和 pGLI 的构建

pCHA 用 Xba I 消化后补平, 再用 Hind III 切下含有编码

几丁质酶的 DNA 片段, 低融点琼脂糖凝胶电泳回收后, 克隆到 pET-22b⁽⁺⁾/Nde I (补平)-HindIII 位点, 用 Xba I + HindIII 酶切分析, 酶切结果(图 1A)表明几丁质酶 cDNA 已插入 pET-22b⁽⁺⁾, 获得重组质粒 pCHI(图 2), pCHI 中几丁质酶 cDNA 是正向插入在 T7 启动子下游的。Xba I + BamH I 酶切结果(图 1B)表明: β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 已插入 pET-22b⁽⁺⁾中, 获得重组子 pGLI(图 2), pGLI 中 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 正向插入在 T7 启动子下游。

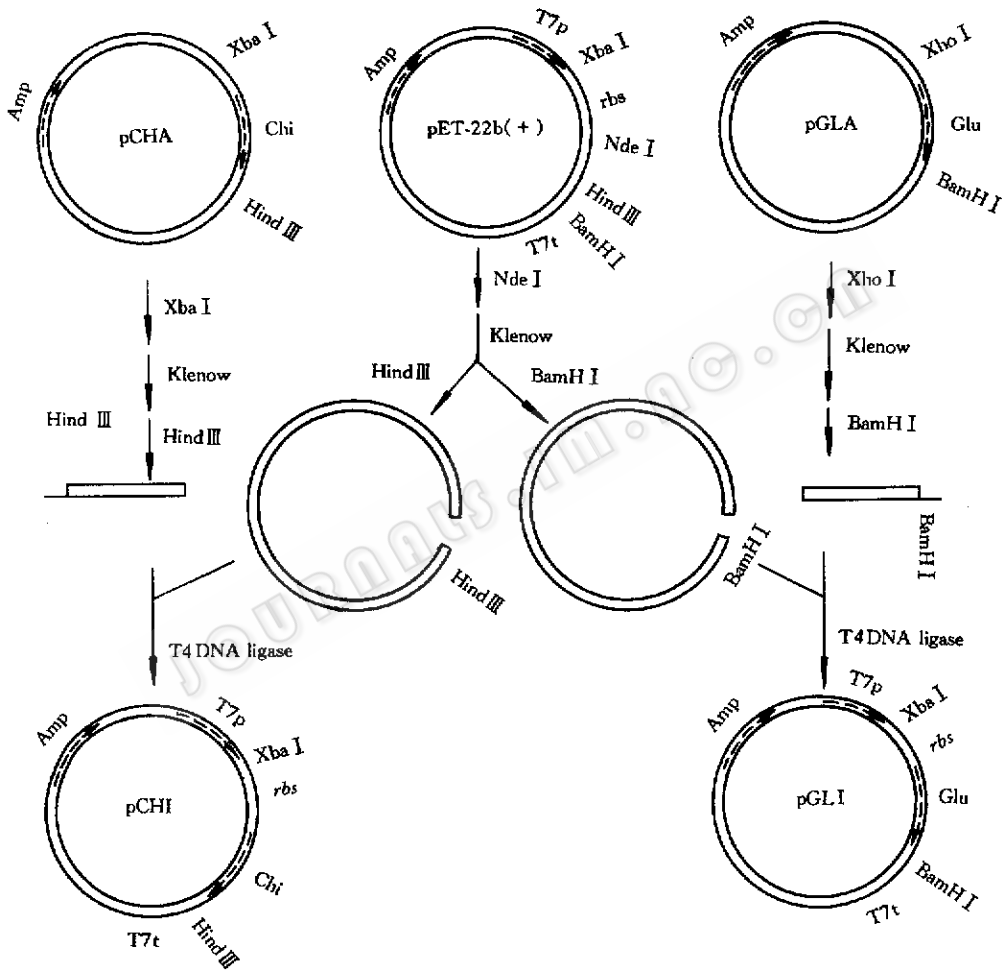


图 2 表达质粒 pCHI 和 pGLI 的构建

Fig.2 Construction of expression plasmid pCHI and pGLI

2.2 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达

将上述表达载体质粒转化大肠杆菌 BL21, 得到的菌株经 37℃ 培养, IPTG 诱导后, 使溶源菌 BL21 中受 lac UV5 启动子控制下的 T7RNA 聚合酶基因表达, 同时又使位于 pEO 上的 lac 操纵基因活化, 最终使几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 表达。由于几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 均含有起始密码子 ATG 且直接接在 SD 序列的下游, 故为胞内表

达。用 SDS-PAGE 法检测表达产物,结果见图 3,表明几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中均得到正确表达,分子量大约为 30kDa 与 31kDa,对照菌株[含 pET-22b⁽⁺⁾]经同样处理则没有此特异带。

2.3 表达产物的初步纯化及抑菌试验

几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的表达产物均在细菌体内形成了包涵体,经细菌裂解、包涵体的获得、洗涤及裂解后,再经过复性,得到了具有天然活性的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶初步纯化产物。根据比色法测定结果,分别取 50 μ l 和 35 μ l 复性初产物进行体外抑菌试验,结果见表 1 和图 4。由表 1 及图 4 可见,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶在体外对尖孢镰刀菌均有抑制作用,并对各专业化型的抑制作用无显著差异,在两种酶用量基本相等的情况下,几丁质酶的抑菌效果强于 β -1,3-葡聚糖酶,一是几丁质酶在体外较稳定,二是真菌细胞壁组成中几丁质含量远远高于葡聚糖;两者有较强的协同作用,共同作用时抑菌活性明显增强。说明去除胞内 C-端液泡定位信号(I-Chi 和 I-Glu 分别去除 C-端 7 个和 22 个氨基酸残基)的全部编码序列的 cDNA 仍具有生物学活性,且对表达产物的抑菌活性无影响。

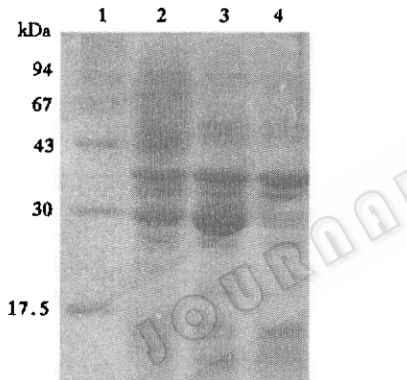


图 3 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达结果

Fig.3 The results of Chi and Glu cDNA express in *E. coli*

1. Protein MW Marker, 2. pCHI(induced),
3. pGLI(induced), 4. CK-pET-22b⁽⁺⁾(induced)

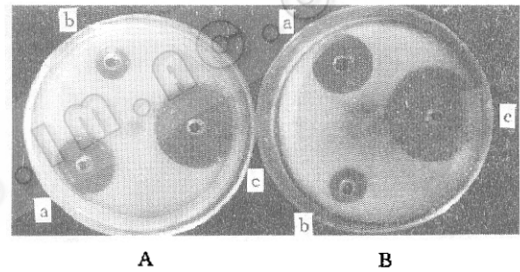


图 4 BL21/CHI 和 BL21/GLI 表达产物抑菌结果

Fig.4 The results of anti-fungus by the expression products of Chi and Glu

- A. *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. lycopersici
- B. *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. niveum
- a. BL21/CHI, b. BL21/GLI,
- c. BL21/CHI & BL21/GLI

表 1 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 大肠杆菌表达产物体外抑菌活性

Table 1 The anti-fungus activities *in vitro* for expression products of Chi and Glu cDNA in *E. coli*

Fungus	Vitreous circle		
	I-Chi/ μ g	I-Glu/ μ g	Mixture of I-Chi and I-Glu/ μ g
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. lycopersici	1.9	1.5	3.5
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. niveum	2.0	1.4	3.4

3 讨 论

根据 Marianne B. Sela-Burlage^[3]报道,烟草中 I 类几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶在体外具有较强的抑菌活性并有一定的协同作用,但它们却在细胞的液泡内表达,影响了植物体内的抑菌效果。为此,我们在进行 I 类几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 的克隆时^[6],分别去除了 C-端液泡定位信号的全部编码序列。为了证明这种修饰是否会影响它们的表达产物的抑菌活性,我们在克隆到这两个基因后就构建了大肠杆菌表达载体 pCHI, pGLI 并转化 *E. coli* BL21。两种表达产物依然表现出体外对病原真菌的抑制活力和协同作用,这表明 C-端的液泡定位信号肽段不是酶发挥抑菌活性所必需的。本实验中使用的 T7 启动子的强度较为理想,对几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 的转录水平较高。鉴于我们的最终目的是要培育出广谱抗真菌病害的作物品种,因此我们还构建了几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 的植物双价表达载体。目前,正在进行番茄、西瓜等作物的转化工作。

参 考 文 献

- 1 陈三凤等. 植物病理学报, 1992, 4:323~327
- 2 姚泉洪等. 植物生理学通讯, 1995, 31(4):303~307
- 3 Marianne B. Sela-Burlage *et al.* Plant Physiol, 1993, 101:857~863
- 4 Neuhaus J-M *et al.* Plant Mol Biol, 1991, 16:141~147
- 5 Melcher LS *et al.* Plant Mol Biol, 1993, 21(4):583~594
- 6 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. 农业生物技术学报, 1997, 5(2):125~130
- 7 金冬雁译, 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992

Expression of Tobacco I -chitinase and I -glucanase cDNA in *Escherichia coli*

Li Jihong Shao Hanshuang Zheng Xueqin

(National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CT AAS, Haikou 571101)

Abstract The modified genes of I -chitinase(I -Chi) and I -glucanase(I -Glu) were cloned into expression vector of pET-22b⁽⁺⁾ and transfected into *E. coli* BL21. SDS-PAGE analysis revealed that expression products were Mr. 30kDa and Mr. 31kDa and formed inclusion body. After refolding by Air Oxidation, the anti-fungus activities of I -Chi and I -Glu were shown. The activity of I -Chi was more high than I -Glu and they were cooperative at anti-fungus.

Key words I -chitinase, I -glucanase, cDNA, expression, anti-fungus