

灰葡萄孢菌激发子 *pebC1* 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性分析

张云华, 杨秀芬, 刘延锋, 玉山江, 邱德文

中国农业科学院植物保护研究所 农业部作物有害生物综合治理综合性重点实验室, 北京 100081

摘要: 为了实现激发子 *PebC1* 编码基因在毕赤酵母中的分泌表达, 采用 PCR 方法从灰葡萄孢菌 BC-4-2-2-1 菌株中扩增获得激发子 *PebC1* 的编码序列, 将其亚克隆至酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中, 以此片段构建了 pPIC9K-*pebC1* 重组表达质粒。重组表达质粒经 *Bgl* II 线性化处理, 电击转化至毕赤酵母宿主菌 GS115, 经 MD、G418-YPD 平板和 PCR 法筛选, 获得了重组毕赤酵母菌 GS115/pPIC9K-*pebC1*。用甲醇诱导重组酵母菌表达目标蛋白, 发酵液经 SDS-PAGE 电泳分析, 在约 39 kDa 处出现特异目标条带。Western blotting 检测结果说明, 重组表达产物具有良好的抗原性。生物活性检测表明, 酵母重组表达蛋白 *PebC1* 能够诱导拟南芥和黄瓜幼苗对灰霉病的抗性。

关键词: 激发子, *pebC1* 基因, 毕赤酵母, 生物活性

Expression of a protein elicitor *pebC1* from *Botrytis cinerea* in *Pichia pastoris*

Yunhua Zhang, Xiufen Yang, Yanfeng Liu, Shanjiang Yu, and Dewen Qiu

Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In order to express *PebC1* in *Pichia pastoris*, the *pebC1* sequence was amplified from genome *Botrytis cinerea* BC-4-2-2-1 by PCR and subcloned into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K to generate pPIC9K-*pebC1*. The recombinant plasmid was linearized by *Bgl* II and transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Recombinant *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-*pebC1* was screened by MD and G418-YPD plates and further confirmed by PCR. The protein expression was induced by methanol and analyzed by SDS-PAGE. SDS-PAGE analysis showed a special band about 39 kDa and western blotting indicated a good antigenicity of the expressed protein. Bioassay results showed that the recombinant protein *PebC1* can induce resistance to gray mould disease of cucumber and *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: elicitor, *pebC1* gene, *Pichia pastoris*, biological activity

Received: May 4, 2011; Accepted: July 30, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A210).

Corresponding author: Dewen Qiu. Tel: +86-10-82105929; E-mail: qiudewen@caas.net.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10A210) 资助。

激发子 (Elicitor) 是一类能够诱导植物产生防卫反应的信号分子^[1], 对于启动寄主植物的抗性表达起着关键作用。激发子包含的物质范围很广, 主要有寡糖、多肽、蛋白和各种脂类等^[2]。激发子与植物作用后, 首先与植物细胞表面原生质膜上的受体结合, 通过构型变化激活胞内有关酶的活性和蛋白质磷酸化, 形成第二信使, 信号因而放大, 最终通过对特殊基因的调节激发植物产生防卫反应^[3-4]。近年来, 利用激发子诱导抗病性保护的植物范围已从多种双子叶植物扩展到单子叶植物^[5], 防治的病害种类也越来越广泛, 涉及多种真菌、细菌和病毒引起的病害。

本实验室从灰葡萄孢菌中分离纯化出了一种分子量为 36 kDa 的酸性、热稳定的蛋白激发子, 将其命名为 *PebC1*。已经明确该激发子能诱导提高番茄抗病性和小麦抗旱性^[6]。

构建基因工程菌株并实现高效表达是开发基因工程农药的基础。2001 年美国 EDEN 生物科学公司将由梨火疫病菌 *hrpN* 编码的 *harpin_{Ea}* 在大肠杆菌 *E. coli* 中表达, 成功开发成具有广谱性的无公害生物农药 Messenger^[7]。赵梅勤等将水稻条斑病细菌 *hpa1* 基因在大肠杆菌中表达, 研发了新型的蛋白质生物农药 *harpin_{Xoc}*, 用于稻瘟病、纹枯病和稻曲病等水稻主要病害的防治^[8]。

巴斯德毕赤酵母表达系统具有表达量高、能进行蛋白质翻译后修饰、遗传稳定性较好、容易大规模生产、成本低等特点, 目前已有数百种蛋白在此系统中成功表达, 且有的蛋白的表达量达到每升十几克。本研究旨在实现激发子 *PebC1* 编码基因在毕赤酵母中的高效分泌表达, 为新型蛋白激发子生物农药的开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* BC-4-2-2-1, 由北京市农林科学院植物保护研究所提供; 大肠杆菌

Escherichia coli DH5 α 菌株、毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 菌株、分泌型酵母表达载体 pPIC9K 均由本实验室保存; 含有 *pebC1* 基因的原核表达载体 pET-28a (+) -*pebC1* 由本实验室构建。

1.2 植物材料

拟南芥哥伦比亚野生型 *Arabidopsis thaliana* Columbia 由本实验室保存。黄瓜品种中农 8 号由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.3 工具酶与试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Bgl* II 购于 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购于 NEB 公司; *Taq* 酶、蛋白质分子量标准、DNA marker、质粒提取试剂盒购于 TIANGEN 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 OMEGA 公司; 氨苄青霉素钠、卡那霉素、G418、D-生物素购于 Merck 公司; IPTG、丙烯酰胺、琼脂糖购自 Sigma 公司; 酵母提取物、蛋白胍购于 OXOID 公司; 酵母无氨基酸基本氮源培养基 YNB 购于 Difco 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 重组酵母表达载体 pPIC9K-*pebC1* 的构建

用 *EcoR* I 和 *Not* I 分别双酶切质粒 pET-28a (+) -*pebC1* 和酵母表达质粒 pPIC9K, 凝胶电泳回收目的片段。酶切后的酵母表达质粒 pPIC9K 与酶切后的目的基因片段用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, PCR 方法鉴定后测定序列。

1.5 毕赤酵母的转化

将重组表达载体 pPIC9K-*pebC1* 用 *Bgl* II 酶切使之线性化, 电击转化毕赤酵母菌 GS115。将转化的菌液涂布于 MD 平板上, 30 °C 进行培养, 直至出现菌落。用相同的方法转化空载体作对照。本实验所涉及的方法参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行 (Invitrogen Corporation. A manual of methods for expression of recombinant proteins. USA)。

1.6 阳性转化子的 PCR 鉴定

采用煮-冻-煮的方法^[9]制备酵母基因组 DNA, 以此为模板, 选用载体 pPIC9K 通用引物

中的上游引物和扩增目的基因所用引物中的下游引物进行 PCR 扩增, 上游引物为: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'; 下游引物为: 5'-TTGCGGCCGCCTATATGCTTAGAGCCATGATG GAA-3'。

扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.7 重组酵母的诱导表达

选取 PCR 鉴定正确的酵母重组子单菌落接种到 20 mL BMGY 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600}=2\sim6$; 室温下 $3\ 000\times g$ 离心 5 min, 收集菌体, 用 20 mL 含 0.5% 甲醇的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 30 °C、200 r/min 继续振荡培养, 诱导 *PebC1* 蛋白的表达。每隔 24 h 补加 100% 甲醇 0.1 mL, 在诱导 48、72 h 时分别取 1 mL 培养液, 13 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 用于 SDS-PAGE 检测。

1.8 重组酵母表达产物的鉴定

以从灰葡萄孢菌中纯化的 *PebC1* 蛋白免疫家兔, 制备多克隆抗体。抗体制备由北京康为世纪生物科技有限公司完成。采用 ELISA 方法^[10]检测免疫家兔抗血清的效价。重组酵母分泌表达的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 进行 Western blotting, 方法参见《分子克隆实验指南》^[11]。

1.9 重组酵母表达蛋白的生物活性测定

1.9.1 重组酵母表达蛋白对拟南芥抗灰霉病的诱导作用

用重组酵母菌诱导表达的上清液 (浓度分别为 5、10 mg/L) 喷雾处理 8~10 叶期的拟南芥叶片, 诱导 4 d 后接种灰葡萄孢菌孢子悬液 (10^5 个孢子/mL), 稀释后的浓度为 80~100 个孢子/ μL , 取 5 μL 点滴在标记的叶片上。灰葡萄孢菌孢子悬液的制备和接种均参考文献^[12]。每个处理 6 株, 重复 3 次。以空载体诱导表达的上清液作为对照, 黑暗下保湿 24 h, 1 周后进行病级调查, 计算诱抗效果。按 Bradford^[13]方法测定蛋白质的含量, 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.9.2 重组酵母表达蛋白对黄瓜抗灰霉病的诱导作用

用重组酵母菌诱导表达的上清液 (浓度分别为 5、10 mg/L) 喷雾处理 3~4 叶期的黄瓜叶片, 处理 3 d 后喷雾接种灰葡萄孢菌孢子悬液 (10^5 个孢子/mL)。每个处理 6 株, 重复 3 次。用相应浓度空质粒表达液作为对照。黑暗保湿 48 h, 1 周后进行病级调查, 计算诱抗效果。

2 结果与分析

2.1 真核表达载体的构建与鉴定

构建含有灰葡萄孢菌激发子 *pebC1* 基因片段的重组表达载体 pPIC9K-*pebC1*。重组质粒经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切鉴定 (图 1) 和 PCR 检测, 均得到约 700 bp 产物, 表明 pPIC9K-*pebC1* 构建成功。

2.2 *pebC1* 重组表达载体的序列分析

测序结果表明, 表达片段完整, 全长 639 bp, 与灰葡萄孢菌激发子基因 *pebC1* 序列一致, 表达片段以正确的阅读框架插入到 pPIC9K 的多克隆位点 *EcoR* I 和 *Not* I 之间。

2.3 酵母的电击转化与表达菌株的筛选

将 *Bgl* II 酶线性化处理的 pPIC9K-*pebC1* 重组质粒和空载体 pPIC9K 分别电击转化导入毕赤酵母 GS115 后, 分别涂布于 MD 平板上。用含不同浓度 G418 抗生素的 YPD 平板筛选后, 获得了能在含 G418 抗生素高浓度平板上生长良好的菌落。挑选的

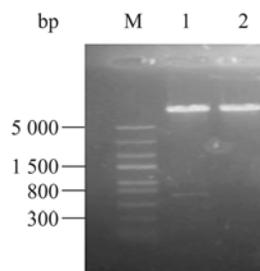


图 1 重组表达载体 pPIC9K-*pebC1* 的酶切结果

Fig. 1 Enzyme digestion result of recombinant expression vector pPIC9K-*pebC1*. M: DNA marker; 1: digested with *EcoR* I and *Not* I; 2: empty vector digested with *EcoR* I and *Not* I.

重组子经菌落 PCR 扩增后电泳均得到一条与预期片段大小相符的 DNA 条带。说明 *pebC1* 基因片段在毕赤酵母中转化成功。

2.4 酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析及 Western blotting 检测

挑取表达菌株接种于 20 mL BMGY 培养基中, 振荡培养至 OD_{600} 约为 4.0, 离心收集菌体, 再用含 0.5% 甲醇 BMMY 培养基重悬菌体, 诱导 *PebC1* 蛋白的表达。诱导培养 48 h 后, 表达上清液经 12% SDS-PAGE 检测, 结果表明上清液在约 39 kDa 处有一条明显的蛋白条带, 与预测蛋白的分子量大小相符, 而同样条件诱导培养的对照无此条带 (图 2)。重组酵母菌诱导表达上清液的 Western blotting 分析显示, 上清液中有一条特异性条带, 对照无此条带图 (图 3)。表明表达蛋白具有良好的抗原性。

为了比较不同时间 *pebC1* 在毕赤酵母 GS115 中的表达情况, 分别在诱导后 48 h 和 72 h 取样, 进行 SDS-PAGE 检测, 结果表明 (图 4), 48 h 和 72 h 蛋白的表达量没有明显差异, 说明重组毕赤酵母菌的最佳诱导表达时间是 48 h。

2.5 酵母表达产物诱导拟南芥抗灰霉病的效应

不同浓度的重组蛋白处理均能明显降低拟南芥的病情指数 (表 1)。拟南芥幼苗的病情指数与重组蛋白浓度呈现规律性的变化趋势, 即随着蛋白浓度的逐渐升高, 病情指数下降, 诱抗效果增加。10 mg/L 重组蛋白处理对拟南芥灰霉病的诱抗效果为 31.98%。说明重组表达蛋白能够增强拟南芥对灰霉病的抗性。

2.6 酵母表达蛋白对黄瓜抗灰霉病的诱导效应

不同浓度的表达蛋白处理黄瓜幼苗后, 对黄瓜抗灰霉病均有明显的诱导效果 (表 2), 黄瓜接种灰葡萄孢菌后处理的病叶率和病情指数均低于对照, 诱抗效果达 41.83%~62.21%。不同处理之间可以看出, 蛋白含量越高, 对黄瓜的诱抗效果越好。说明较高浓度的重组蛋白更利于诱导黄瓜对灰霉病的抗性。

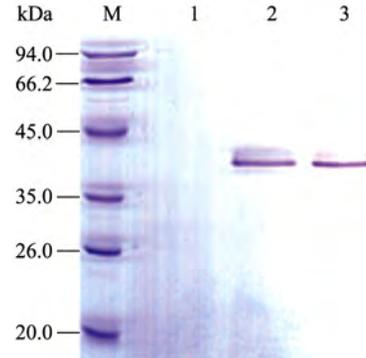


图 2 GS115/pPIC9K-*pebC1* 表达上清的 SDS-PAGE 分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed *PebC1* from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-*pebC1*. M: protein marker; 1: GS115/pPIC9K; 2, 3: GS115/pPIC9K-*pebC1*.

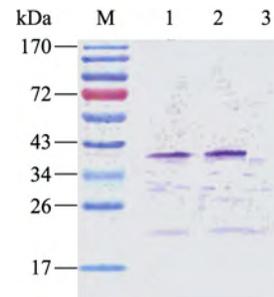


图 3 GS115/pPIC9K-*pebC1* 表达上清的 Western blotting 分析

Fig.3 Western blotting analysis of expressed *PebC1* from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-*pebC1*. M: protein marker; 1, 2: GS115/pPIC9K-*pebC1*; 3: GS115/pPIC9K.

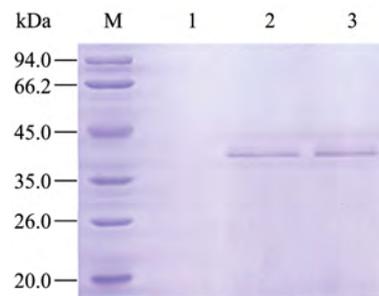


图 4 不同甲醇诱导时间表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 Expression of *PebC1* in different time after induction with methanol by SDS-PAGE analysis. M: marker; 1: GS115/pPIC9K; 2, 3: cultural supernatant of GS115/pPIC9K-*pebC1* after 48 h and 72 h induction respectively.

表 1 表达蛋白诱导拟南芥对灰霉病的抗性效果

Table 1 Effects of recombinant protein *PebC1* on *Arabidopsis thaliana* against *B. cinerea*

Treated (mg/L)	Disease index	Effect of induced resistance (%)
0	86.93±0.52 A	
5	67.77±1.49 B	22.05
10	59.13±1.32 C	31.98

Note: The different letters after the data in the same line show the significant difference at 1% level. The same as follow.

表 2 表达蛋白诱导黄瓜对灰霉病的抗性效果

Table 2 Effect of recombinant protein *PebC1* on cucumber against *B. cinerea*

Concentration of expressed protein (mg/L)	Disease index	Effect of induced resistance (%)
0	15.11±0.31 A	
5	8.79±0.46 B	41.83
10	5.71±0.77 B	62.21

3 讨论

灰霉病是由灰葡萄孢引发的一种真菌病害^[14], 可危害果树、蔬菜、花卉等 200 多种植物, 尤其在大棚种植的蔬菜上引起果实腐烂, 损失比较严重^[15]。目前防治灰霉病主要采用化学方法, 长期施用化学杀菌剂, 致使灰葡萄孢产生了抗药性, 田间防治效果明显下降, 甚至丧失^[16-18]。人们对该病害的生物防治寄予了很大希望。激发子可诱导植物产生抗病性, 因此将激发子作为一种病害防治的应用方法成为可能^[19]。Calonrec 等利用激发子诱导的小麦抗性, 可使小麦白粉病的发病程度控制在 44%~57%^[20]。*PebC1* 能诱导单子叶植物和双子叶植物的广谱抗性, 而且诱导抗性持久, 是利用前景较好的蛋白激发子。

毕赤酵母是一种新型的外源基因表达系统, 它既具有原核表达系统的表达量高、可大规模培养的优点, 又具有分泌表达的优势, 同时外源蛋白基因遗传稳定性较好。毕赤酵母表达系统在折叠方面优于用原核表达系统表达的蛋白, 存在着糖基化修饰的特点^[21], 因此更适合来自真核生物基因的生物学功能的研究。另外, *pebC1* 在大肠杆菌中表达后,

需要经过离心收集菌体和超声破碎细胞等过程, 才能获得表达蛋白, 且杂蛋白较多, 得到纯化蛋白相对困难, 步骤繁多, 成本较高。而毕赤酵母菌自身蛋白分泌量少, 外源蛋白分泌量大, 有利于后续的分选纯化工作。

本实验将灰葡萄孢激发子基因克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上, 通过甲醇诱导获得了分泌表达的 *PebC1* 蛋白。得到的甲醇利用型转化子, 更有利于发酵工艺的简化。生物活性研究表明, 毕赤酵母表达的 *PebC1* 蛋白处理植物后, 增强了拟南芥和黄瓜幼苗对灰霉病的抗性, 诱导了植物的系统抗性。该研究为灰霉病的生物防治提供了有效方法, 也为开发与研制新型生物农药提供了参考。

REFERENCES

- [1] Ji CY, Li YF, Wang ZZ. Purification and identification of a glycoprotein elicitor (CSBI) from *Magnaporthe grisea*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32(5): 587-592.
纪春艳, 李云锋, 王振中. 稻瘟菌糖蛋白激发子 (CSBI) 的纯化及其鉴定. *植物生理与分子生物学报*, 2006, 32(5): 587-592.
- [2] Montesano M, Brader G, Palva ET. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant*

- Pathol, 2003, 4(1): 73-79.
- [3] Yoshikawa M, Keen NT, Wang MC. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiol*, 1983, 73(2): 497-506.
- [4] Cosio EG, Pöppel H, Schmidt WE, et al. High-affinity binding of fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fractions and protoplasts. *Eur J Biochem*, 1988, 175(2): 309-315.
- [5] Liang YC, Shang MQ, Liu AX, et al. On effects of pathogenic elicitor to induce tobacco resistance against brown spot. *J Shandong Agric Univ: Nat Sci*, 2000, 31(1): 8-10.
梁元存, 商明清, 刘爱新, 等. 病原激发子诱导烟草抗赤星病的研究. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2000, 31(1): 8-10.
- [6] Zhang YH, Yang XF, Liu Q, et al. Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiol Res*, 2010, 165(2): 142-151.
- [7] Zhao MQ, Wang L, Zhang B, et al. Harpin_{Xooc}, a proteinaceous elicitor of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, triggering hypersensitive response in tobacco and inducing disease resistance in rice. *Chin J Biol Control*, 2006, 22(4): 283-289.
赵梅勤, 王磊, 张兵, 等. 植物抗病激活蛋白 harpin_{Xooc} 防治水稻病害的研究. *中国生物防治*, 2006, 22(4): 283-289.
- [8] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45-66.
- [9] Ju H, Liang DC, Guo G, et al. Comparison of four methods to prepare *Pichia* genomic DNA for PCR. *Tianjing Med J*, 2003, 31(5): 270-272.
尉海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较. *天津医药*, 2003, 31(5): 270-272.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology (A Laboratory Manual)*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 352.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- [12] Li L, Qiu DW, Liu Z, et al. Disease resistance induced by plant activator protein in tomato. *Chin J Biol Control*, 2005, 21(4): 265-268.
李丽, 邱德文, 刘峥, 等. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用. *中国生物防治*, 2005, 21(4): 265-268.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [14] Edwards SG, Seddon B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. *J Appl Microbiol*, 2001, 91(4): 652-659.
- [15] Zhao JH, Li JZ. A preliminary study on the resistance of tomato induced by the extract of *Botrytis cinerea*. *J Henan Agric Sci*, 2003(10): 55-56.
赵继红, 李建中. 灰霉菌菌丝体提取物诱导番茄抗病性的初步研究. *河南农业科学*, 2003(10): 55-56.
- [16] Liu B, Ye ZY, Liu JF, et al. Studies on multiple resistant strain *Botrytis cinerea* to carbendazim and dicarboximide. *J Nanjing Agric Univ*, 1993, 16(3): 50-54.
刘波, 叶钟音, 刘经芬, 等. 对多菌灵、速克灵具有多重抗性的灰霉菌菌株性质的研究. *南京农业大学学报*, 1993, 16(3): 50-54
- [17] Beever RE, Laracy EP, Pak HA. Strain of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathol*, 1989, 38(3): 427-437.
- [18] Lyon GD, Newton AC. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathol*, 1997, 46(5): 636-641.
- [19] Calonnec A, Goyeau H, de Vallavieille-Pope C. Effects of induced resistance on infection efficiency and sporulation of *Puccinia striiformis* on seedlings in varietal mixtures and on field epidemics in pure stands. *Eur J Plant Pathol*, 1996, 102(8): 733-741.
- [20] Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066): 85-88.
- [21] Ludovic O, Eric R, Sonia L, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-2937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*, 2000, 267(6): 1619-1625.