

· 农业生物技术 ·

## 胡萝卜软腐果胶杆菌 CpxP 蛋白纯化及抑菌功能鉴定

苗兰天, 卢天华, 何晓亮, 周晓辉

河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050000

苗兰天, 卢天华, 何晓亮, 等. 胡萝卜软腐果胶杆菌 CpxP 蛋白纯化及抑菌功能鉴定. 生物工程学报, 2019, 35(5): 847–856.  
Miao LT, Lu TH, He XL, et al. Purification and bacteriostatic identification of CpxP protein from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 847–856.

**摘要:** 胡萝卜软腐果胶杆菌是世界十大植物病原菌之一, 主要侵染十字花科的经济作物和观赏花卉。文中从胡萝卜软腐果胶杆菌的基因组中克隆 1 个抗菌基因 *cpxP* (Gene ID: 29704421), 将其构建在原核表达质粒 pET-15b 上, 并转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 进行表达, 经纯化后进行稳定性和抑菌实验。结果显示, IPTG 的诱导终浓度为 1 mmol/L, 实现了蛋白的高效外源表达, 纯化后电泳无杂蛋白残留, 且该蛋白具有良好的热稳定性和 pH 稳定性。CpxP 蛋白抑菌试验结果显示其对胡萝卜切片的抑菌率可达到 44.89%, 对马铃薯切片的抑菌率可达到 59.41%。为进一步解释其抑菌机理, 研究该蛋白的空间结构可为软腐病的防治和新型蛋白农药靶点研究提供新思路。

**关键词:** 胡萝卜软腐果胶杆菌, CpxP, 纯化, 抑菌

## Purification and bacteriostatic identification of CpxP protein from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Lantian Miao, Tianhua Lu, Xiaoliang He, and Xiaohui Zhou

School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

**Abstract:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* is one of the world's top ten plant pathogens, mainly infecting cruciferous economic crops and ornamental flowers. In this study, an antibacterial gene *cpxP* (Gene ID: 29704421) was cloned from the genome of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, and constructed on the prokaryotic expression plasmid pET-15b, and the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), then stability and bacteriostatic experiments of the purified CpxP protein were performed. The final concentration of IPTG was 1 mmol/L, obtaining high-efficiency exogenous expression of the CpxP protein. There was no other protein after purification, and the destined protein exhibited good thermal stability and pH stability. The antibacterial test results showed that the inhibition rate of the CpxP protein on carrot slice was 44.89% while the inhibition rate on potato slice was 59.41%. To further explain its antibacterial mechanism, studying the spatial structure of this protein can provide new ideas for the control of soft rot and new

**Received:** January 6, 2019; **Accepted:** February 25, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31270077), Key Project of Hebei Province (No. 17223608D), "100 Talent Program" of Hebei Province (No. E2012100005).

**Corresponding author:** Xiaohui Zhou. Tel: +86-311-81668487; E-mail: zhouxh2003@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 31270077), 河北省科技计划项目 (No. 17223608D), 河北省“百人计划”项目 (No. E2012100005) 资助。

protein pesticide targets.

**Keywords:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, CpxP, purification, bacteriostasis

胡萝卜软腐果胶杆菌属于革兰氏阴性菌,是世界十大植物病原菌之一<sup>[1]</sup>,其亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, PC1)是植物细菌性软腐病的主要致病菌<sup>[2]</sup>,常危害胡萝卜、白菜、马铃薯等植物<sup>[3]</sup>。除此之外,在北京市顺义区的芹菜软腐病<sup>[4]</sup>、南京市八卦洲的芦蒿软腐病<sup>[5]</sup>、甘肃省嘉峪关市的洋葱鳞茎软腐病<sup>[6]</sup>、山西省晋中的西葫芦软腐病<sup>[7]</sup>等病害样品中都分离到 PC1 菌株,说明病原菌宿主范围极广。病原菌通过细菌Ⅲ型分泌系统分泌胞外水解酶,如蛋白酶、纤维素酶、果胶酶等引发植物软腐病<sup>[8-9]</sup>。目前,PC1 菌株的全基因代谢网络已成功构建,并用于筛选潜在的致病基因<sup>[10]</sup>。Cpx 双组分调控系统广泛存在于革兰氏阴性菌中,包含两种重要功能蛋白:组氨酸蛋白激酶 CpxA 和反应调节蛋白 CpxR,同时包含一种用于辅助调控系统的周质蛋白 CpxP<sup>[11]</sup>。CpxP 可以通过阻碍 CpxA 的接受域与外界环境信号传导的化学信号相接触,进而有效抑制 CpxA 对于整个调控系统的激活<sup>[12]</sup>。在沙门氏菌等致病性革兰氏阴性菌及大肠杆菌模式菌中 CpxP 的主要功能为通过与 CpxA 的结合从而减少 CpxA 被不恰当诱导的机会,达到微调整 Cpx 系统的活性,使细胞不产生过度侵染反应<sup>[13]</sup>。因此,胡萝卜软腐果胶杆菌的 Cpx 双组分系统对其致病性的调控也具有极其重要的作用<sup>[14]</sup>。目前,国内研究较多的是胡萝卜软腐果胶杆菌的分离鉴定<sup>[15]</sup>和其他一些抑菌基因的研究,如 *clpP*<sup>[16]</sup>、*mreB2*、*flgk*<sup>[17]</sup>等。国外研究较多的是 Cpx 双组分调控和细菌中其他调控系统的相互作用关系<sup>[18-19]</sup>。但是,CpxP 蛋白的外源表达和抑菌功能在胡萝卜软腐果胶杆菌中的研究尚未见报道。

本研究利用分子克隆技术,将 *cpxP* 基因构建于表达载体 pET-15b 中,并在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中实现异源表达,经二级纯化后进行稳定性和抑菌功能分析,为蛋白结晶、结构解析和分子机理研究提供了前期实验基础,同时也为预防和防治胡萝卜软腐果胶杆菌提供了新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究中所使用的菌株是胡萝卜软腐果胶杆菌亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*),菌种号为 DSM-30169,购于德国微生物菌种保藏中心(DSMZ);大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态购于北京全式金生物科技有限公司;大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 购于北京博迈德基因技术有限公司;pET-15b 质粒由柏林洪堡大学 Hunke 教授惠赠。

### 1.2 主要试剂、仪器和培养基

核酸限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*HI、T4 DNA 连接酶均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA marker 购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白 marker、抗生素、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司;引物合成自华大基因;全波长酶标仪购自 BioTek 伯腾仪器有限公司(美国);Ni Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow 和 Sephacryl S-200 预装柱购自 GE Healthcare 公司(美国);快速蛋白液相色谱仪(Fast protein liquid chromatography, FPLC)购自伯乐生命医学产品有限公司(上海);新鲜的娃娃菜 *Brassica pekinensis*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、胡萝卜 *Daucus carota* 购自石家庄南栗市场。培养

基为 Luria-Bertani 培养基。

### 1.3 基因组 DNA 的提取

取过夜培养的菌液 2 mL, 8 000 r/min 离心 1 min; 300  $\mu$ L TE 重悬, 450  $\mu$ L 细胞裂解液于 80  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 裂解细胞; 恢复室温后加入 30  $\mu$ L 10 mg/mL RNA 酶 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min 以清除 RNA; 加入 150  $\mu$ L 蛋白沉淀液, 高速振荡 1 min, 冰浴 5 min; 13 000 r/min 离心 5 min 处理除去蛋白沉淀, 吸取上清液到新的离心管中; 加入 650  $\mu$ L 异丙醇轻柔颠倒直至出现絮状白色 DNA 沉淀; 加入 450  $\mu$ L 70% 乙醇, 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 重复洗涤 1 次; 干燥离心管, 加入 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 水化溶解 DNA 沉淀并于 4  $^{\circ}$ C 保藏备用。

### 1.4 重组质粒 *cpxP*-pET-15b 的构建

从 NCBI 数据库中获取编码 CpxP (Gene ID: 29704421) 蛋白的核苷酸序列, 用软件 Primer Premier 在蛋白的编码区进行引物设计。上游引物序列引入 *Xho* I 酶切位点, 下游引物序列引入 *Bam*H I 酶切位点。引物名称及序列如表 1 所示。

PCR 反应体系: 基因组 1  $\mu$ L、10 mmol/L F-*cpxP* 2  $\mu$ L、10 mmol/L R-*cpxP* 2  $\mu$ L、10 $\times$ HiFi 聚合酶缓冲液 I 10  $\mu$ L、dNTPs 4  $\mu$ L、HiFi 聚合酶 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 补至 100  $\mu$ L 体系。PCR 程序设置: 94  $^{\circ}$ C 5 min、94  $^{\circ}$ C 40 s、57  $^{\circ}$ C 40 s、72  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 5 min, 共 38 个循环; 电泳检测 PCR 结果并进行产物回收, 将回收片段和 pET-15b 质粒分别进行双酶切; 使用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中。挑取转化子进行菌落 PCR 验证, 对阳性菌进行抽提质粒和双酶切验证; 将阳性质

粒送至华大基因测序, 并保藏测序结果正确的菌至 -80  $^{\circ}$ C 冰箱用于后续实验。

### 1.5 重组蛋白的诱导与表达

将上述构建成功的质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 复苏后涂布于含有青霉素和氯霉素的双抗性平板上; 挑取单菌落扩大培养, 用于菌株保藏与种子培养基制备; 按 2% (V/V) 的转接量转接至含有双抗的 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C、170 r/min 恒温培养 2.5 h 至  $OD_{600}$  为 0.5 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行蛋白诱导表达。降低温度与转速继续恒温培养至  $OD_{600}$  为 2 左右, 离心收菌于 -20  $^{\circ}$ C 备用。

### 1.6 重组蛋白的分离纯化及电泳检测

用 80 mL 含有 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、2.5 mol/L NaCl、10% 甘油的细胞悬浮液重新悬浮细胞, 并使用超声破碎仪进行细胞破碎, 工作时间 30 min。将破碎液置于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 高速冷冻离心 10 min。取上清液再次置于 4  $^{\circ}$ C、40 000 r/min 超速冷冻离心 1 h, 得到粗提蛋白样品; 使用镍离子亲和层析柱对粗提蛋白样品进行纯化, 设置不同咪唑浓度的缓冲液进行蛋白洗脱。洗脱下来的蛋白进行凝胶过滤层析, 将纯化后蛋白进行浓缩处理得到高浓度的蛋白。在纯化过程中取样进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.7 重组蛋白稳定性测试

#### 1.7.1 CpxP 蛋白热稳定性实验

将 CpxP 蛋白从 -80  $^{\circ}$ C 解冻后, 各取 500  $\mu$ L 装在 2 个 1.5 mL EP 管中。EP 管分别标记 4  $^{\circ}$ C 和 22  $^{\circ}$ C。每隔 24 h 取样, 取样前需经 60 000 r/min、30 min 超速离心。上清液直接制备样品, 沉淀用等量缓冲液悬浮后制备样品。从 0 时刻开始, 连续取样 6 d, 通过 SDS-PAGE 检测 CpxP 蛋白的热稳定性。

#### 1.7.2 CpxP 蛋白 pH 稳定性实验

使用无菌水, 通过 HCl 溶液和 NaOH 溶液配

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F- <i>cpxP</i>	GGCCTCGAGGAAAGTGGAGACGCC CC
R- <i>cpxP</i>	CCGGATCCCTACTCGGGATTCTCTG TCTCG

制出 pH 值为 4–12 的水溶液。取 9 个 1.5 mL EP 管,分别装 450  $\mu$ L 不同 pH 的水溶液和 50  $\mu$ L CpxP 蛋白样品。混匀后放置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱。24 h 后超速离心,上清液直接制备样品,沉淀用等量缓冲液悬浮后制备样品,通过 SDS-PAGE 检测 CpxP 蛋白的 pH 稳定性。

## 1.8 重组蛋白的抑菌测试

### 1.8.1 CpxP 蛋白抑菌定性实验

平板抑菌定性试验:活化的 PC1 菌液稀释至  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL。取适量的菌液稀释液均匀涂布在 LB 平板上。用无菌镊子夹出牛津杯,小心竖放在平板上的中央位置。用微量移液器吸取蛋白水溶液,滴加到牛津杯中。需将平板在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中放置 3 h,以便蛋白水溶液可以均匀扩散,之后在 28  $^{\circ}$ C 过夜培养。

CpxP 蛋白在娃娃菜叶片上抑菌定性试验:取新鲜娃娃菜叶片,酒精消毒后自然晾干。将培养好 PC1 菌液稀释到  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL, CpxP 蛋白液稀释到 1、4、8 mg/mL;菌液和不同浓度的蛋白液 1:1 混合于 EP 管中。依次取 10  $\mu$ L 混合液连枪头一起打入娃娃菜叶中,待混合液完全渗入菜叶中,拔出枪头;无菌水作为阴性对照,纯菌液作为阳性对照。28  $^{\circ}$ C 培养,实时观察结果。

### 1.8.2 CpxP 蛋白抑菌定量实验

CpxP 蛋白在胡萝卜切片上抑菌定量试验:取新鲜胡萝卜,洗净后切片,并在每片胡萝卜中心做出 1 个小型凹槽,每片胡萝卜凹槽大小相同。酒精消毒后自然晾干,将培养好 PC1 菌液稀释到  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL, CpxP 蛋白液稀释到 1、2、4、8 mg/mL;菌液和不同浓度的蛋白液 1:1 混合于 EP 管中。在每一个凹槽内注入 30  $\mu$ L 混合液。30  $\mu$ L 无菌水和 8 mg/mL 蛋白 1:1 混合液作为阴性对照,纯菌液作为阳性对照。28  $^{\circ}$ C 培养,实时观察结果,测量时每孔测量 3 组数据。

CpxP 蛋白在马铃薯切片上抑菌定量试验:取新鲜马铃薯,洗净后切片,并在马铃薯上做出 5 个相同大小的小型凹槽,酒精消毒后自然晾干。将培养好 PC1 菌液稀释到  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL, CpxP 蛋白液稀释到 1、2、4、8 mg/mL;菌液和不同浓度的蛋白液 1:1 混合于 EP 管中。在每一个凹槽内注入 30  $\mu$ L 混合液。28  $^{\circ}$ C 培养,实时观察结果,测量时每孔测量 3 组数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 *cpxP*-pET-15b 的构建

以提取的胡萝卜软腐果胶杆菌的基因组为模板扩增目的基因 *cpxP*。将基因、质粒酶切后连接转化,挑取转化子菌落 PCR 验证,并提质粒进行双酶切验证。结果如图 1 所示,重组质粒(泳道 2)分子量高于 pET-15b 质粒(泳道 1),且被酶切下的基因片段(泳道 3,约 500 bp)送测序验证结果与 *cpxP* 基因大小相同、相似度为 100%,说明构建成功。

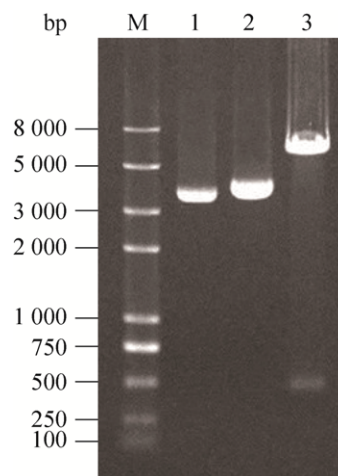


图 1 双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of double digested products. M: DNA marker; 1: pET-15b plasmid; 2: recombinant plasmid; 3: double digestion of recombinant plasmid.

## 2.2 重组蛋白的 Ni-NTA 纯化与分子筛纯化

终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 可诱导 CpxP 蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) 高效表达, 蛋白通过镍离子亲和层析纯化, 如图 2 所示, 左起泳道 NI 为未 IPTG 诱导的重组菌株, 泳道 Cell 为菌株诱导后超声破碎离心的上清液, 对比 NI 可知, Cell 中含有目的蛋白, 泳道 D 为上清穿液, 蛋白胶中未见目的蛋白条带, 表明 CpxP 蛋白已经完全结合到了镍柱上, 而且蛋白量并没有超过镍柱的承载量。经过缓冲液 1 和 2 的冲洗, 可以洗脱非特异性结合在镍柱上的杂蛋白, 之后再用较高浓度的咪唑洗脱目的蛋白。当咪唑浓度提升到 150 mmol/L 时可以洗脱大部分结合在镍柱上的目的蛋白, 随着浓度提升到 500 mmol/L 可完全将目的蛋白洗脱, 收集后浓缩, 进行下一步纯化。

使用 Sephacryl S-200 预装柱进行纯化。如图 3A 所示, 在软件界面只显示一个收集峰, 无其他的杂峰出现, 输出峰的管数为 28–39, 取样进行

SDS-PAGE 分析。如图 3B 所示, 结果显示目的蛋白条带出现在 22 kDa 附近, 且蛋白条带的大小和预测的蛋白分子量是相似的。SDS-PAGE 显示无其他杂蛋白出现, 表明经亲和层析及凝胶过滤层析两步纯化后获得了高纯度的 CpxP 蛋白, 纯度可达 99%。

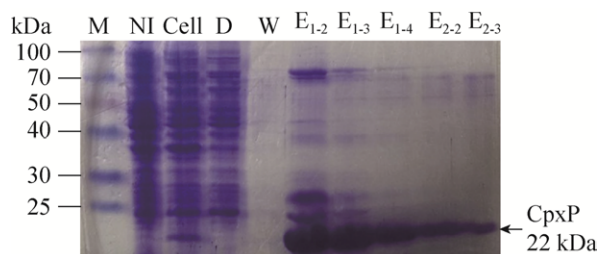


图 2 CpxP 蛋白镍离子亲和层析分析

Fig. 2 Analysis of CpxP protein by nickel ion affinity chromatography. M: low molecular weight protein marker; NI: non-induced control; Cell: inducing supernatant of induced recombinant bacteria; D: flow-through after nickel-chelating affinity column; W: the last drop of buffer 2 eluate; E<sub>1-2</sub>, E<sub>1-3</sub>, E<sub>1-4</sub>: buffer 3 protein eluate; E<sub>2-2</sub>, E<sub>2-3</sub>: buffer 4 protein eluent.

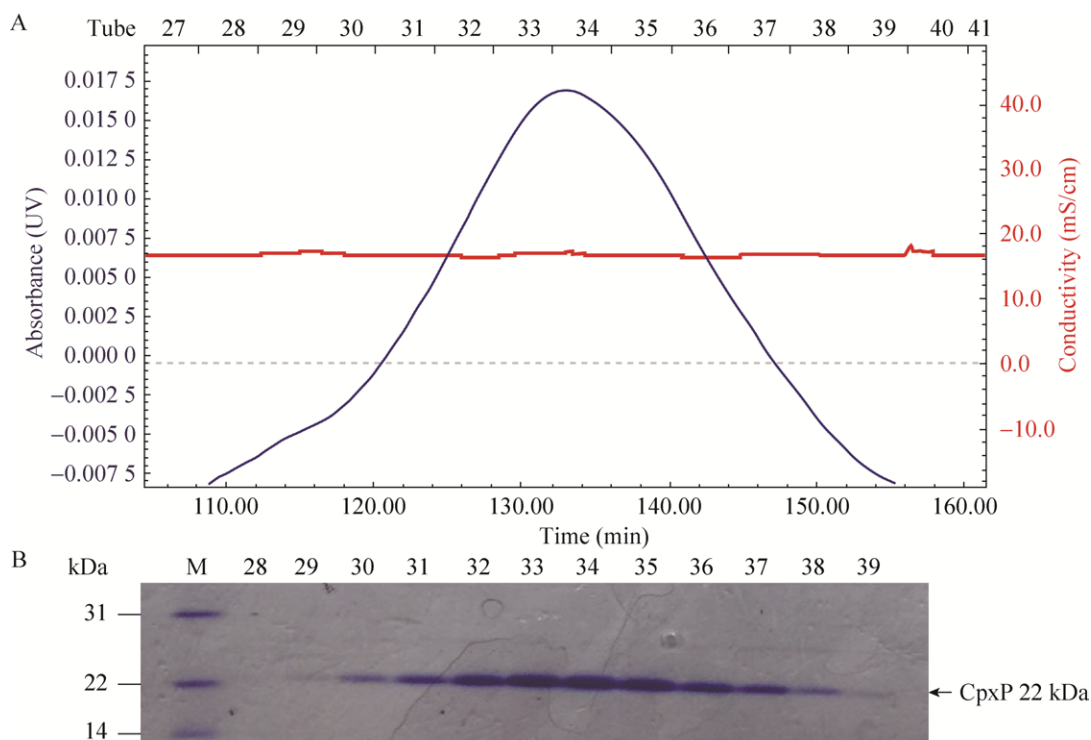


图 3 CpxP 蛋白凝胶过滤层析分析

Fig. 3 Analysis of CpxP protein by gel filtration chromatography. (A) Gel filtration chromatography peak map of CpxP protein. (B) SDS-PAGE verification of gel filtration chromatography results. M: low molecular weight protein marker; 28–39: protein sample of tube 28–39.

### 2.3 重组蛋白的稳定性测试

蛋白热稳定性结果如图 4A 所示, CpxP 蛋白水溶液在 4 °C 和 22 °C 条件下放置 6 d, SDS-PAGE 显示沉淀和上清液条带并无明显变化, 每 24 h 上清液的减少量和沉淀的增加量为 0, 说明其基本无降解, 热稳定性较好。

蛋白 pH 稳定性结果如图 4B 所示, CpxP 蛋白水溶液在不同 pH 值条件下处理 24 h, 蛋白电泳检测条带并没有出现明显的降解情况, 说明 CpxP 蛋白对 pH 值的变化并不敏感, pH 值稳定性较好。

### 2.4 重组蛋白的抑菌测试

在定性抑菌实验中, 平板抑菌试验结果如图 5A 所示, 空白对照 (a 孔和 c 孔) 并没有出现抑菌现象, 而加入蛋白水溶液 (b 孔和 d 孔) 的实验组出现抑菌现象, 随着蛋白量增加, 抑菌圈扩大,

判断 CpxP 蛋白对胡萝卜软腐果胶杆菌有抑制作用。CpxP 蛋白在娃娃菜叶片上的抑菌试验结果如图 5B 所示, 在相同的侵染时间下, 随着蛋白的浓度增大, 侵染面积会减小, 呈现反比例关系。在蛋白浓度为 8 mg/mL 的情况下, 病原菌被完全抑制。

在定量抑菌实验中, CpxP 蛋白在胡萝卜切片上的抑菌试验在 28 °C 恒温箱培养 18 h, 结果如图 6A 所示, a 和 f 分别为阳性对照和阴性对照, 实验组 b、c、d、e 随着蛋白浓度增大, 胡萝卜软腐果胶杆菌的侵染面积下降。统计病斑直径和抑菌率如图 6B 所示, 阳性对照的平均病斑直径为 18.90 mm, 当蛋白浓度为 8 mg/mL 时, 平均病斑直径降低为 14.03 mm, 抑菌率达到了 44.89%。说明 CpxP 蛋白对胡萝卜软腐果胶杆菌有明显抑制作用。

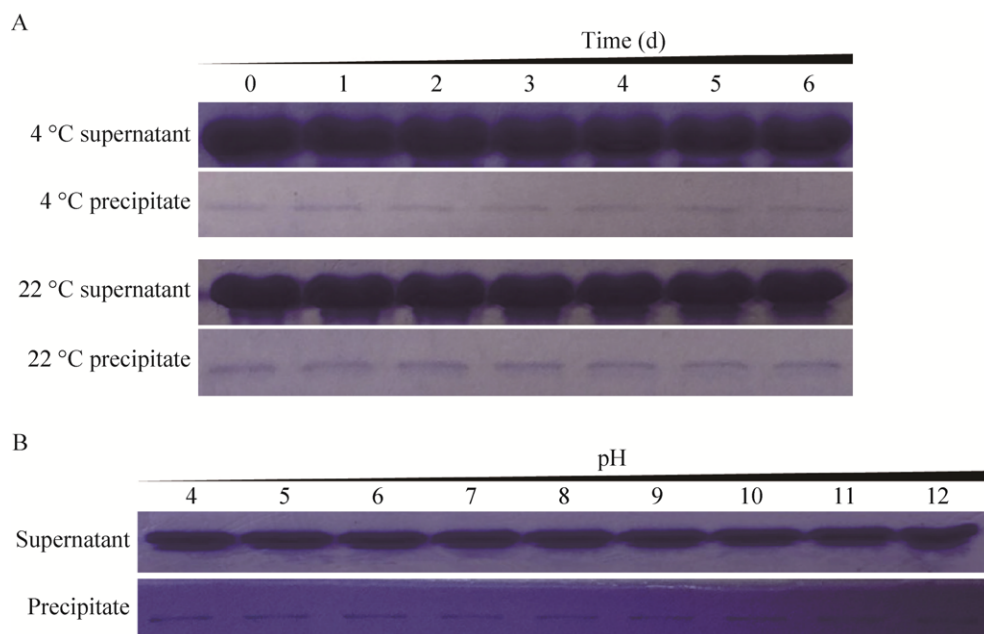


图 4 CpxP 蛋白稳定性分析

Fig. 4 Analysis of CpxP protein stability. (A) Stability of CpxP protein at 4 °C and 22 °C. (B) Stability of CpxP protein under different pH conditions.



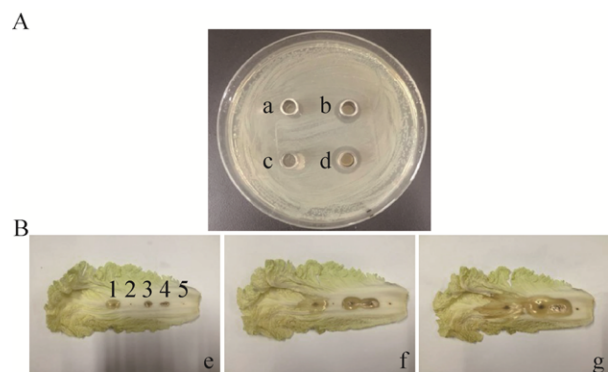


图 5 CpxP 蛋白抑菌定性试验结果分析

Fig. 5 Analysis of antibacterial qualitative test results of CpxP protein. (A) Plate antibacterial test results. a: 50  $\mu$ L sterile water; b: 50  $\mu$ L protein aqueous solution; c: 100  $\mu$ L sterile water; d: 100  $\mu$ L protein aqueous solution. (B) Effects of different infestation time on the leaf of the doll. e: infestation for 18 h; f: infestation for 30 h; g: infestation for 42 h; well 1: 10  $\mu$ L PC1 bacterial solution with water; well 2: 10  $\mu$ L sterile water; well 3–5: 10  $\mu$ L PC1 bacterial solution with 1, 4, 8 mg/mL protein, respectively.

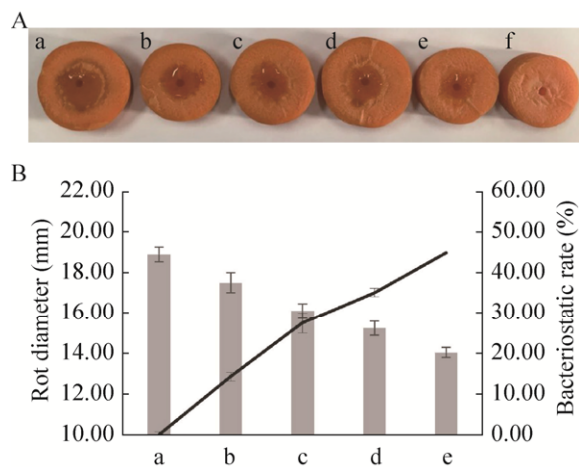


图 6 CpxP 蛋白在胡萝卜切片上抑菌定量试验结果分析

Fig. 6 Analysis of antibacterial quantitative test results of CpxP protein on carrot slice. (A) Quantitative test results of carrot slice bacteriostatic test. a: 15  $\mu$ L PC1 bacterial solution with 15  $\mu$ L sterile water; b–e: 15  $\mu$ L PC1 bacterial solution with 1, 2, 4, 8 mg/mL protein, respectively; f: 15  $\mu$ L sterile water with 15  $\mu$ L 8 mg/mL protein. (B) Carrot slice bacteriostatic quantitative test rot diameter and inhibition rate statistical results.

CpxP 蛋白在马铃薯切片上的抑菌试验在 28  $^{\circ}$ C 恒温箱培养 18 h, 结果如图 7A 所示, a 为阳性对照, 实验组 b、c、d、e 随着蛋白浓度增大, 胡萝卜软腐果胶杆菌的侵染面积同样出现下降的趋势。统计病斑直径和抑菌率如图 7B 所示, 阳性对照的平均病斑直径为 21.33 mm, 说明胡萝卜软腐果胶杆菌更易侵染马铃薯, 但是从抑菌率上看 CpxP 蛋白在马铃薯切片上的效果要好于在胡萝卜切片上的效果。当蛋白浓度为 8 mg/mL 时, 平均病斑直径降低为 13.59 mm, 抑菌率达到 59.41%。

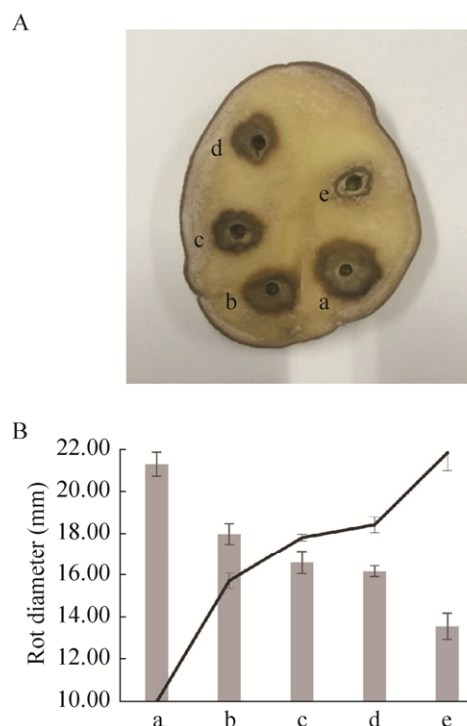


图 7 CpxP 蛋白在马铃薯切片上抑菌定量试验结果分析

Fig. 7 Analysis of antibacterial quantitative test results of CpxP protein on potato slice. (A) Quantitative test results of potato slice bacteriostatic test. a: 15  $\mu$ L PC1 bacterial solution with 15  $\mu$ L sterile water; b–e: 15  $\mu$ L PC1 bacterial solution with 1, 2, 4, 8 mg/mL protein, respectively. (B) Potato slice bacteriostatic quantitative test rot diameter and inhibition rate statistical results.

### 3 讨论

CpxP 存在于细胞的周质空间, 结构上呈现二聚体构型, 是由两个“左手状”单体相互缠绕而形成的功能蛋白<sup>[12,20]</sup>。Stefanie 等<sup>[21]</sup>发现 Cpx 双组分系统可以影响细菌毒力的强弱, 但在不同的菌株中有着不同的外在表现。研究表明将鼠伤寒沙门氏菌中的 *cpxA* 信号接收域敲除后, 该菌对真核细胞的入侵能力明显减弱, *cpxA* 的缺失突变株使该菌在小鼠体内的存活率大大降低<sup>[22]</sup>。Irina 等<sup>[23]</sup>研究发现缺失 Cpx 系统后, 尿道致病性大肠杆菌的毒力降低, 同时侵染力和对抗生素的抗性也出现同步下降的趋势。但是杜克嗜血杆菌的 *cpxAR* 突变株对人类的感染能力明显增强<sup>[24]</sup>, 说明原本存在的 Cpx 系统的激活能够有效增加其致病力。而在胡萝卜软腐果胶杆菌中, Cpx 双组分调控系统的激活也应是依靠外界环境信号的刺激, 如膜压力变化、pH 值变化等。在沙门氏菌等一些致病革兰氏阴性菌中, 当 CpxA 蛋白的输入域接收到外界刺激, 其会自磷酸化, 之后将磷酸基团转移至 CpxR 蛋白上使其构象改变, 从而激活 CpxR 蛋白, CpxR 蛋白控制着病菌的一些毒力基因(*hilD*、*hilA*、*icmR*)表达<sup>[13,25]</sup>, 使得菌株获得侵染性。但是, 课题组前期的研究发现<sup>[12]</sup>, 大肠杆菌中过表达的 CpxP 蛋白可以下调 Cpx 双组分的应激调控。原因在于 CpxP 蛋白的二聚体构象如同“帽子”一般, “扣在”了 CpxA 蛋白上, 这种作用结果是由正负电荷结合带来的, 使得 CpxA 的输入域不能够同信号分子相接触, 从而适时关闭 Cpx 调控系统, 以致 CpxA/R 蛋白不能被激活, 不能控制下游的毒力基因的表达。此时菌体外在的表现为侵染性降低, CpxP 蛋白表现出抑菌效果。由其抑菌机理可知, CpxP 蛋白是间接参与调控 Cpx 双组分的蛋白, 其抑菌作用是抑制 Cpx 双组分系统激活开关的结果<sup>[26]</sup>。本研究通过表达高纯度的 CpxP 蛋白的体外抑菌实验, 确定了 CpxP 蛋白的体外

应用也可起到对胡萝卜软腐果胶杆菌的抑制作用, 其抑菌机理可能是可透过菌体外膜通过抑制其双组分系统的激活从而达到其抑菌效果的。

植物软腐病常见的物理防治有翻耕土壤, 破坏病原菌生存环境或轮作种植、及时清除害病植株、管控施肥并严防虫害等<sup>[27]</sup>, 清除病原菌附着体, 切断病原菌传播路径, 对于预防植物软腐病的发生有着极大的帮助。目前, 不得不承认化学防治依旧是防治植物软腐病的主要手段, 但是化学药剂的长时间大量施用对大自然的生态环境和人类的生命安全也造成了威胁。抗生素防治方法多见于肌霉素、氧霉素、十众霉素、麦芽糖酯酶等<sup>[28]</sup>, 但是长久如此, 病菌耐药性增加, 防治的效果会越来越差。所以寻求合适的生物防治方法尤为迫切, CpxP 蛋白的体外抑菌实验的证实, 为将来的农业应用提供了参考。

### 4 结论

本研究利用基因工程技术成功构建原核表达质粒 *cpxP*-pET-15b, 并在大肠杆菌表达菌株中实现了 CpxP 重组蛋白的高效异源表达, 并通过镍离子亲和层析和凝胶过滤层析得到了高纯度重组蛋白。同时, 验证了 CpxP 蛋白具有良好的热稳定性和 pH 稳定性。抑菌试验中, CpxP 蛋白在胡萝卜切片上的抑菌率为 44.89%, 在马铃薯切片上的抑菌率为 59.41%。以上结果为进一步研究该蛋白的空间结构、抑菌机理提供了物质基础, 也为软腐病的预防和防治提供了新的思路。

### REFERENCES

- [1] Mansfield J, Genin S, Magori S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13(6): 614–629.
- [2] Deng YM, Du S, Wang H, et al. Functional characterization of *mreB* gene from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *J Nanjing Agric*



- Univ, 2014, 37(2): 45–52 (in Chinese).
- 邓亚岷, 杜硕, 王欢, 等. 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *mreB* 基因的功能分析. 南京农业大学学报, 2014, 37(2): 45–52.
- [3] Liu HE, Su JK, Liu Q, et al. Cloning and functional analysis of gene *ubiG* induced by *Zantedeschia aethiopica* tissue extract in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. J Jiangsu Agric Sci, 2013, 29(6): 1304–1312 (in Chinese).
- 刘怀阿, 苏建坤, 刘琴, 等. 白花马蹄莲诱导胡萝卜软腐果胶杆菌 *ubiG* 基因的克隆与功能分析. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1304–1312.
- [4] Jin ZW, Song JW, Xie XW, et al. Isolation and identification of the pathogen causing celery bacterial soft rot. Acta Phytopathol Sin, 2016, 46(3): 304–312 (in Chinese).
- 晋知文, 宋加伟, 谢学文, 等. 芹菜细菌性软腐病原的分离与鉴定. 植物病理学报, 2016, 46(3): 304–312.
- [5] Chen CX, Zhao YQ, Xie HF, et al. Identification of the pathogen causing soft rot of seleng worm wood. Acta Phytopathol Sin, 2017, 47(2): 174–179 (in Chinese).
- 陈传翔, 赵玉强, 谢洪芳, 等. 芦蒿细菌性软腐病的病原鉴定. 植物病理学报, 2017, 47(2): 174–179.
- [6] Lü HP, Wei H, Qi YH, et al. Pathogen identification from soft rot disease of onion bulbs in Jiayuguan, Gansu province. Acta Prata Sin, 2013, 22(4): 153–159 (in Chinese).
- 吕和平, 魏晖, 漆永红, 等. 甘肃省嘉峪关市洋葱鳞茎软腐病病原鉴定. 草业学报, 2013, 22(4): 153–159.
- [7] Dong HL, Wang JM. Isolation and identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of stem soft rot on *Cucurbita pepo* L. J Shanxi Agric Univ: Nat Sci Ed, 2018, 38(5): 11–15 (in Chinese).
- 董海龙, 王建明. 西葫芦细菌性茎基软腐病病原的分离与鉴定. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2018, 38(5): 11–15.
- [8] Chan YC, Wu HP, Chuang DY, et al. Extracellular secretion of Carocin S1 in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* occurs via the type III secretion system integral to the bacterial flagellum. BMC Microbiol, 2009, 9: 181.
- [9] Kazemi-Zaromi S, Baghaee-Ravari S, Khodaygan P, et al. Screening bactericidal effect of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains against causal agent of potato soft rot. J Basic Microbiol, 2016, 56(2): 196–205.
- [10] Wang J, Wang C, Kong DX, et al. Reconstruction of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 metabolic network and its application in screening potential targets. J Comput Biol, 2012, 2(1): 1–9 (in Chinese).
- 王君, 王成, 孔德信, 等. 胡萝卜软腐欧文氏菌代谢网络重构及其在靶标筛选中的应用. 计算机生物学, 2012, 2(1): 1–9.
- [11] MacRitchie DM, Buelow DR, Price NL, et al. Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems//Utsumi R, Ed. Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets. New York, NY: Springer, 2008, 631: 80–110.
- [12] Zhou XH, Keller R, Volkmer R, et al. Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. J Biol Chem, 2013, 285(11): 9805–9814.
- [13] de La Cruz MA, Pérez-Morales D, Palacios IJ, et al. The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. Front Microbiol, 2015, 6: 807.
- [14] Yang Z, Zhou XH, Song JJ, et al. Construction and expression of CpxP protein from plant pathogenic bacteria//2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. Macao, China: IEEE, 2012: 119–122.
- [15] Li XY, Tian Y, Zhao L, et al. Identification of the bacterial soft rot pathogens on Chinese cabbage in Beijing. Acta Agric Bor-Sin, 2018, 33(3): 63–70 (in Chinese).
- 李晓颖, 田宇, 赵亮, 等. 京郊快菜细菌性软腐病

- 病原鉴定. 华北农学报, 2018, 33(3): 63–70.
- [16] Li T, Jiang H, Yang ZL, et al. Functional characterization of *clpP* gene from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. J Nanjing Agric Univ, 2013, 36(2): 58–64 (in Chinese).  
李婷, 蒋欢, 杨钟灵, 等. 胡萝卜软腐果胶杆菌 *clpP* 基因的功能研究. 南京农业大学学报, 2013, 36(2): 58–64.
- [17] Yang ZL, Deng YM, Du S, et al. Function of *flgK* gene in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Acta Microbiol Sin, 2012, 52(6): 703–709 (in Chinese).  
杨钟灵, 邓亚岷, 杜硕, 等. 胡萝卜软腐果胶杆菌鞭毛钩基因 *flgK* 的功能. 微生物学报, 2012, 52(6): 703–709.
- [18] Imamovic L, Martínez-Castillo A, Benavides C, et al. BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages. Infect Immun, 2015, 83(4): 1451–1457.
- [19] Gerken H, Misra R. MzrA-EnvZ interactions in the periplasm influence the EnvZ/OmpR two-component regulon. J Bacteriol, 2010, 192(23): 6271–6278.
- [20] Thede GL, Arthur DC, Edwards RA, et al. Structure of the periplasmic stress response protein CpxP. J Bacteriol, 2011, 193(9): 2149–2157.
- [21] Vogt SL, Raivio TL. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. FEMS Microbiol Lett, 2012, 326(1): 2–11.
- [22] Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, et al. Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype typhimurium. Infect Immun, 2004, 72(8): 4654–4661.
- [23] Debnath I, Norton JP, Barber AE, et al. The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun, 2013, 81(5): 1450–1459.
- [24] Spinola SM, Spinola KR, Baker B, et al. Activation of the CpxRA system by deletion of *cpxA* impairs the ability of *Haemophilus ducreyi* to infect humans. Infect Immun, 2010, 78(9): 3898–3904.
- [25] Altman E, Segal G. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* *icm/dot* components as well as new translocated substrates. J Bacteriol, 2008, 190(6): 1985–1996.
- [26] Xu L, Zhou XH, He XL. Cpx two-component regulatory system in Gram-negative bacteria—a review. Acta Microbiol Sin, 2014, 54(3): 269–275 (in Chinese).  
徐乐, 周晓辉, 何晓亮. 革兰氏阴性菌的 Cpx 双组分调控系统. 微生物学报, 2014, 54(3): 269–275.
- [27] Xia GS, Luo PM. Integrated control of soft rot of cruciferous vegetables. J Jiangxi Agric, 2012, (4): 38 (in Chinese).  
夏桂生, 罗平美. 十字花科蔬菜软腐病的综合防治. 江西农业, 2012, (4): 38.
- [28] Luo K. A survey of studies on soft rot disease of cruciferous vegetables in foreign countries. J Hunan Agric Coll, 1984, (1): 97–103 (in Chinese).  
罗宽. 国外十字花科蔬菜软腐病研究概况. 湖南农学院学报, 1984, (1): 97–103.

(本文责编 陈宏宇)