

表达多肽抗生素 apidaecin 的转基因烟草及其抗病性的初步分析

王晖** 孙超 彭学贤*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 将多肽抗生素 apidaecin 基因与病程相关蛋白的信号肽序列融合,构建了 apidaecin 的分泌型植物表达载体,apidaecin 与另一多肽抗生素 Shiva-I 的双价分泌型植物表达载体,以本实验室原来构建的 Shiva-I 分泌型植物表达载体做对照,转化了模式植物烟草。对 3 种转基因植物进行了分子检测,转化再生苗 95% 为 PCR 阳性,Southern 杂交结果进一步证明外源基因已经整合到了烟草基因组中,RT-PCR 检测表明外源基因可以在转基因烟草内正常转录。对 T₀ 代转基因烟草进行烟草野火病的抗病性实验,从 3 种转基因烟草中都得到了抗病植株,病情指数分析的初步结果显示,双价转基因烟草抗病性最好,apidaecin 的次之,Shiva-I 的最差。

关键词 多肽抗生素, apidaecin, Shiva-I, 转基因烟草, 抗病性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0423-06

由病原细菌引起的植物病害在世界上约有 300 多种,我国有 70 种以上,几乎每种作物、果树、蔬菜及花卉都受到一种或几种病原细菌的侵染。植物细菌病害可给农业生产带来巨大损失,如水稻白叶枯病是我国华东、华中和华南稻区的一种主要病害,在我国每年发病面积可占全国水稻种植面积的 4%,发病后一般减产 10%~30%,严重时减产 50% 以上,每年带来直接经济损失折合人民币近 10 亿元。

在植物中表达异源多肽抗生素基因是提高植物抗细菌病能力的一条有效途径。apidaecin 是一类来源于膜翅目昆虫的富含脯氨酸的多肽抗生素,一般由 16~18 个氨基酸组成^[1]。尽管目前对该类多肽抗生素的作用机理还不完全清楚,但是已有实验证明 apidaecin 是通过膜上受体的介导而杀死细胞的,这与天蚕素 cecropin 及其类似物,如 Shiva-I 等裂解肽通过裂解细胞膜杀菌的作用机理完全不同^[2]。在体外试验中,apidaecin 对多种植物致病菌具有极强的抗菌作用,并且对植物原生质体没有毒性^[3]。因此 apidaecin 有可能在植物抗细菌病基因工程中发挥重要作用。Shiva-I 是一种典型的可形成双亲螺旋结构的裂解肽,具有广谱抗菌作用,已经用于植物抗细菌病基因工程^[4]。

我们以 Shiva-I 为对照,构建了 apidaecin 单价和

apidaecin & Shiva-I 双价分泌型植物表达载体,并转化模式植物烟草,对 T₀ 代转基因烟草进行了分子检测和抗病性分析,研究了 apidaecin 在植物抗细菌病基因工程中应用的可行性。

1 材料与方 法

1.1 质粒、细菌菌株及植物材料

植物表达载体 pBin438^[5] 由田颖川等人构建;农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 及植物材料烟草 K326 (*Nicotiana tabacum* cv. K326) 来自本实验室。丁香假单胞菌烟草致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (烟草野火病菌) 由沈阳农业大学吴元华教授惠赠。

1.2 试剂

各种限制酶和修饰酶分别购自 LTI 公司、Roche Molecular Biochemicals 等公司;同位素 α -³⁵S-ATP 购自美国 NEN 公司;RT-PCR 试剂盒和随机引物试剂盒购自 Promega 公司;Shiva-I 和 apidaecin 的兔抗血清由协和医科大学基础医学研究所刘景生教授制备。

1.3 烟草基因组 DNA 和烟草总 RNA 的提取

烟草基因组 DNA 的提取参照 Michaels 等人的方法^[6],略做改动。烟草总 RNA 的提取参照文献 [7] 进行。

收稿日期 2000-11-03, 修回日期 2001-02-12。

* 通讯作者。Tel 86-10-62522107; Fax 86-10-62560912; E-mail pengxx@sun.im.ac.cn

** 山东大学生命学院生物学硕士研究生。

1.4 寡核苷酸链的合成及转基因烟草的 PCR 检测

寡核苷酸链由 LTI 公司和上海生物工程公司合成并经过 PAGE 纯化。

1) 按植物偏嗜密码子合成的 apidaecin 基因编码链:

5'-GGAAACAACAGACCAGTTTACATCCCCTCA
ACCACGTCTCCACACCCTAGCTTTAGTAAG-3'

2) 按植物偏嗜密码子合成的 apidaecin 基因非编码链:

5'-AATTCTTACTAAAGCCTAGGGTGTGGAGGACG
TGGTTGAGGGATGTAATGCTCTGTTGTTTCC-3'

3) PR 信号肽 5'引物(P1):

5'-TCTCAAATGCCATCCTTCTTT-3'

4) apidaecin 基因 3'引物(P2):

5'-TACTAAAGCCTAGGGTGTGG-3'

5) Shiva-I 基因 3'引物(P3):

5'-ACCAACTGCGGGCGTC-3'

6) 35S 引物:

5'-CTGACGTAAGGGATGACGC-3'

PCR 反应条件如下:94℃ 变性 30s,52℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min。用引物 P1 和 P2 配对,扩增 PR 信号肽和 apidaecin 的融合基因片段;用 P1 和 P3 配对扩增 PR 信号肽和 Shiva-I 的融合基因片段。

1.5 转基因烟草的 Southern 印迹分析

参照文献 [8] 进行。以非转基因烟草作为阴性对照,以转基因烟草相应的植物表达载体中含 apidaecin 和 Shiva-I 基因的 *Hind*III 和 *Eco*RI 酶切小片段做阳性对照。探针标记按 Promega 公司 Prime-a-Gene Labeling System 进行。

1.6 转基因烟草的 RT-PCR 分析

本实验利用 Promega 公司的 Access RT-PCR System 一步法完成的,它把反转录和多聚酶链式反应

合二为一。操作按照试剂盒说明进行。

1.7 烟草外植体的转化

参考 Horsch 等人的方法进行^[9]。

1.8 转基因烟草的抗野火病试验

T₀ 代转基因烟草扩繁后移入盆中,长至 5~6 片叶子时,在供试烟草的叶片背面靠近主脉处注射 3 × 10⁶ CFU/mL 的烟草野火病菌菌液,每点注射约 10 μL,每片叶子注射 6~10 个点。以非转基因烟草 K326 作对照。保持高温高湿的条件(25~30℃),接菌 5d 后调查病情,记录每株烟草的发病情况。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 多肽抗生素 apidaecin 和 Shiva-I 分泌型植物表达载体的构建

Shiva-I 的分泌型植物表达载体 pBinPRSI 的构建参见文献 [10],其结构示意图见图 1。质粒 pSKPR 由本实验室保存,其中含有烟草 PR1b 信号肽序列,在信号肽序列的 3' 末端具有 *Mlu*I 位点。根据植物偏嗜密码子人工合成了抗菌肽 apidaecin 基因的两条链,退火后得到 apidaecin 基因,其 5' 为平末端,3' 带有 *Eco*RI 的粘性末端。pSKPR 用 *Mlu*I 酶切,T4 聚合酶补平,再用 *Eco*RI 酶切,回收载体片段,与 apidaecin 基因连接,得到中间载体 pSKPRHbI。测序证明了核苷酸序列的正确性。用 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切 pSKPRHbI,再经 T4 聚合酶处理,载体自连得到 pSKPRHbI303。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切该载体,回收含有 PR1b 信号肽和 Apidaecin 融合基因的小片段,与经同样酶切的双元载体 pBin438 连接,得到 Apidaecin 的单价植物表达载体 pBinPRHbI(结构示意图见图 1)。

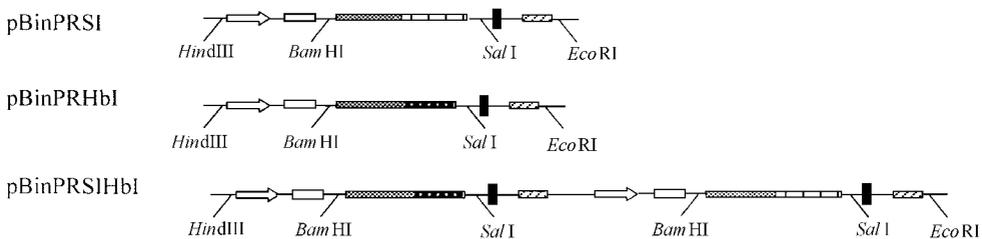


图 1 三种植物表达载体的结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of the organization of three plant expression vectors

⇒ 35S promoter; □ Ω sequence; ▨ Signal peptide of PR protein;
□ Shiva-I gene; ▨ Apidaecin gene; ■ UTT; ▨ Nos terminator

用 *Hind*III 和 *Eco*RI 分别酶切 pBinPRHbI 和 pBinPRSI,回收小片段,并分别与相同酶切的 pKS(+)相连,得到中间载体 pKPRHbI 和 pKPRSI。pKPRSI 经 *Hind*III 酶切,T4 聚合酶补平,再用 *Not*I 酶

切,回收含 PRSI 基因的片段;pKPRHbI 经 *Eco*RI 酶切,T4 聚合酶补平,再用 *Not*I 酶切,与上述片段相连得到中间载体 pKPRSIHbI。该载体经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后,回收含 PRSI 和 PRHbI 基因的片

段 与经同样酶切的双元载体 pBin438 连接 ,得到 apidaecin 和 Shiva-I 的双价植物表达载体 pBinPRSIH-b(结构示意图见图 1)。

2.2 转基因烟草的获得

用农杆菌介导转化法 ,分别将上述 3 种植物表达载体转入烟草中 ,各获得 Kan 抗性植株 50 株。在下面的文章中 ,Shiva-I 转基因烟草 ,apidaecin & Shiva-I 双价转基因烟草和 apidaecin 转基因烟草 ,分别被称为烟草 A ,B 和 C 组。转基因烟草植株形态正常 ,且能正常结籽 ,部分转基因烟草已经收获种子。

2.3 转基因烟草 PCR 鉴定

为了初步鉴定外源基因在烟草基因组中的整合情况 ,我们对转基因烟草进行了 PCR 检测。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图略。从 apidaecin & Shiva-I 双

价转基因烟草和 apidaecin 单价转基因烟草的基因组 DNA 中扩增到约 150bp 的含 apidaecin 基因的 DNA 片段 ,从双价转基因烟草和 Shiva-I 单价转基因烟草的基因组 DNA 中扩增到约 210bp 的含 Shiva-I 基因的 DNA 片段。转基因烟草的 PCR 阳性率约为 95%。

2.4 Southern 印迹分析

为了进一步鉴定外源基因在烟草基因组中的整合情况 ,我们在三类转基因烟草中 ,分别随机选取 3 株 PCR 阳性的烟草进行 Southern blotting 检测 ,烟草基因组 DNA 经 EcoRI 和 HindIII 双酶解后进行 Southern 分析 ,结果见图 2。除 C 组烟草中的一株外 ,其他被测烟草植株在与阳性对照大小相当的位置都有杂交带 ,而阴性对照在该位置没有杂交带 ,进一步证明外源基因已经整合到了烟草基因组中。

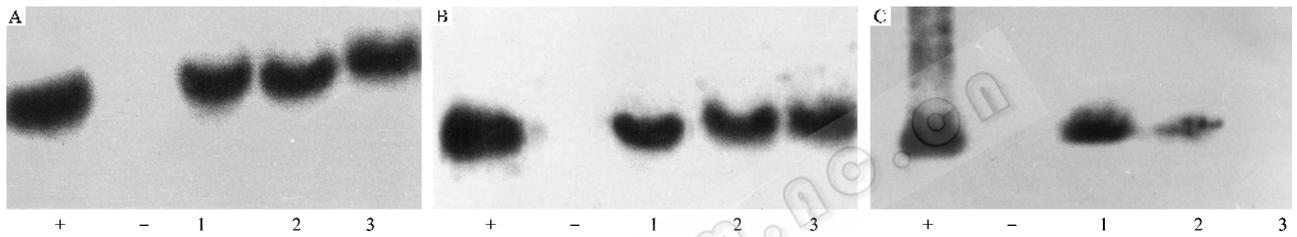


图 2 转基因烟草的 Southern blotting 分析

Fig.2 Southern analysis of transgenic tobacco

A. Transgenic tobacco of Shiva-I ;B. Transgenic tobacco of apdaecin and Shiva-I ;C. Transgenic tobacco of apidaecin
+ . Positive control ; - . Negative control ; Lane 1 ~ 3 are transgenic strains

2.5 转基因烟草的 RT-PCR 分析

为验证各抗菌肽基因在转基因烟草中的转录水平 ,选择 Southern blotting 阳性的烟草进行了 RT-PCR 检测。其中 Shiva-I 转基因植株 1 株 ,apidaecin 转基因烟草和 Shiva-I & apidaecin 的转基因烟草各 2 株。

除了扩增 apidaecin 片段时所用上游引物为 35S 通用引物外 ,其他的引物与烟草基因组 DNA 的 PCR 扩增引物相同。结果见图 3。B 组的 1 株烟草在 RT-PCR 扩增含 Shiva-I 的片段时 ,结果为阴性 ,其它转基因烟草都扩增到了与预期大小一致的产物。含 apida-

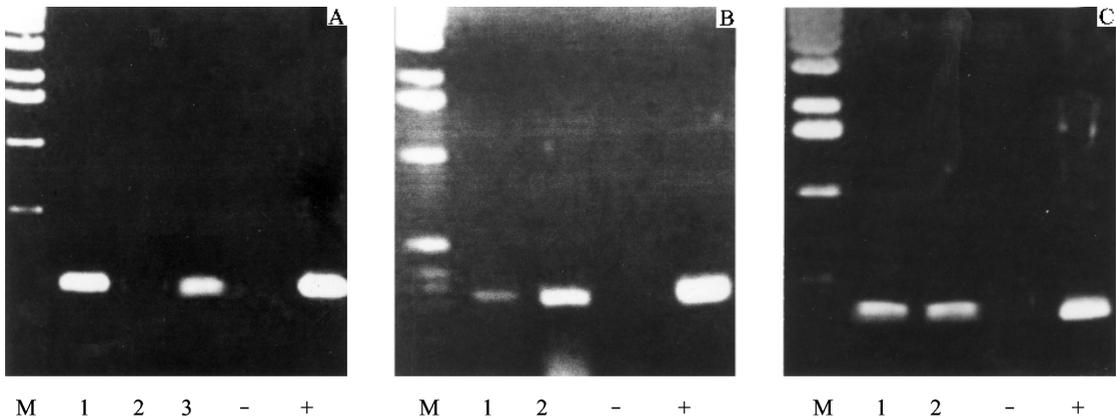


图 3 转基因烟草的 RT-PCR 检测

Fig.3 RT-PCR analysis of transgenic tobacco

A. Transcription analysis of Shiva-I gene in transgenic tobacco of group A (lane 3)and group B (lane 1 ~ 2); B. Transcription analysis of apidaecin gene in transgenic tobacco of group B ; C. Transcription analysis of apidaecin gene in transgenic tobacco of group C

ecin 基因的产物约 300bp,含 Shiva-I 基因的产物约 210bp。扩增的所有片段大小均与预期的相同。由此推断 apidaecin 基因和 Shiva-I 基因可以在转基因烟草中进行转录。

2.6 转基因烟草的野火病抗性试验

烟草野火病由丁香假单胞菌烟草致病变种(*P. syringae* pv. *tabaci*)引起,是主要危害烟草叶部组织的一种细菌病害。病叶初呈水渍状圆形褪绿小斑点,后病斑逐渐扩大,中心变褐,四周有宽的黄晕,合并成不规则的大斑,上有轮纹。天气潮湿时病斑表面有薄层溢脓,干燥后枯焦破碎,穿孔脱落。多雨潮湿及幼苗密集时,病害迅速蔓延,引起幼苗成片腐烂,倒伏死亡,似火烧状。

我们以非转基因烟草 K326 做对照,对转基因烟草进行了接种烟草野火病菌的试验。在 20 株转 Shiva-I 基因的烟草中,有 7 株的抗病性高于对照,只有 1 株抗性较显著;在 24 株转 apidaecin 基因的烟草中,有 11 株的抗病性高于对照,其中 6 株抗性显著;在 22 株转 Shiva-I & apidaecin 基因的烟草中,有 7 株的抗病性高于对照,其中 4 株抗性显著。部分接菌

实验的结果见彩版 Plate II。在图中,接菌 5d 后非转基因的对照植株(CK)出现明显的黄色枯斑,转 Shiva-I 基因的烟草(A9)在注射点附近有退绿现象,而转 apidaecin 基因的烟草(C6)和双价转基因烟草(B43)未表现任何感病症状。

为了对不同转基因烟草之间的抗病性进行比较,我们引入植病研究中的病情指数和病级的概念,对抗病实验的结果进行了统计学分析,参照青枯病的病情调查方法,将病情严重程度分为以下几级:

0 级:所有接种点没有病斑;1 级:1/4 以下的接种点为病斑;2 级:1/4 ~ 1/2 的接种点为病斑;3 级:1/2 ~ 3/4 的接种点为病斑;4 级:3/4 以上的接种点为病斑;5 级:接种点全为病斑。

病级和病情指数的计算参照文献[12]进行,计算结果见表 1。统计分析的结果表明,Shiva-I 转基因烟草对烟草野火病的抗病性为中感级,转 apidaecin 和转 apidaecin & Shiva-I 的烟草为抗病级。从参试植株中健株比例及病株的病情指数可以得出转双基因的烟草抗性优于转单价 apidaecin 的抗性,转 Shiva-I 烟草的抗性最差的初步结论。

表 1 转基因烟草的抗病性分析结果

Table 1 Resistance analysis of transgenic tobacco

Group	Foreign gene	No. of strains	No. of uninfected strains	Disease index	SBWS*
Group A	Shiva-I	20	1	67	3.35
Group B	Apidaecin & Shiva-I	24	8	28.4	1.42
Group C	Apidaecin	22	4	32	1.60
K326	No foreign gene	8	0	100	5

* Scoring of bacterial wilt severity

3 讨 论

为了降低植物蛋白酶对表达产物的降解,同时也为了在病原菌破坏植物细胞之前,使表达产物与病原菌直接作用起到抗菌效果,我们在多肽抗生素 apidaecin 和 Shiva-I 基因的上游分别融合了 PR 蛋白的信号肽序列,使它们可以分泌到胞外。

为了验证各转基因烟草中多肽抗生素基因在翻译水平上的表达情况,我们提取了其可溶性蛋白,进行了 Western 印迹分析。但没有检测到多肽抗生素 apidaecin 和 Shiva-I 的存在。推测可能的原因是由于这 2 种多肽抗生素在转基因植物中的含量过低或者是由于小肽的 Western 检测灵敏度较差。

病情指数和病级测定是植病研究中用来分析某一作物品种或转基因株系的抗病能力的方法。为了比较 3 种转基因烟草的抗病力,我们借用这两个概

念对 T_0 代的转基因烟草的抗病性进行了统计学分析。尽管在转基因烟草中没有检测到多肽抗生素基因的表达产物,但是抗病性统计分析结果表明,3 种转基因植物对烟草野火病的抗性都有所提高。说明了外源基因在植物中有一定水平的表达。初步的统计结果表明,双价转基因烟草的抗性最强,apidaecin 的次之,Shiva-I 的最差。Shiva-I 转基因烟草抗病性较差,可能与其对烟草野火病的抗菌活性较低有关。

多肽抗生素抗菌活性高,抗菌谱广,不易产生抗性突变株,对高等真核生物无害,在植物抗菌病基因工程的研究中具有广阔的应用前景。目前用于植物抗病基因工程的多肽抗生素主要是具有双亲螺旋结构的裂解肽或植物来源的多肽抗生素。但是裂解肽在亲水环境下不能形成高级结构,容易被植物蛋白酶降解。植物来源的多肽抗生素则存在同源序列引起的基因沉默等问题[12]。为了克服上述困难,我

们选择富含脯氨酸的线性多肽 apidaecin 进行了植物抗菌病基因工程的研究。apidaecin 具有良好的热稳定性和酸稳定性,对多种植物致病细菌具有很强的抗菌活性^[3]。apidaecin 作用机制不同于一般裂解细胞膜的多肽抗生素,联合使用不同作用机制的多肽抗生素不仅有可能增加转基因植物所抗菌病的种类,而且可能降低植物致病菌发生抗性突变的频率。通过对 apidaecin 的研究,可能为植物抗病基因工程探索出一条新途径。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Casteels P, Romagnolo J, Castle M *et al.* Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 26107 ~ 26115
- [2] Casteels P, Tempst P. Apidaecin-type peptide antibiotic function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **199**: 339 ~ 345
- [3] SUN CH (孙超), WANG H (王晖), PENG X X (彭学贤). Study on the antibacterial activity of the peptide antibiotic—apidaecin against some plant bacterial pathogens and its toxicity against tobacco protoplast. *Phytopathology Acta* (accepted)
- [4] Jaynes J M, Nagpala P, Destefano-Beltran L *et al.* Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas aolanacearum*. *Plant Sci*, 1993, **89**: 43 ~ 53
- [5] LI T Y, TIAN Y C, QIN X F *et al.* Transgenic tobacco plants with efficient insect resistance. *Science in China*, 1994, **37**: 1479 ~ 1488
- [6] Michaels S D, John M C, Amasino R M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*, 1994, **17**: 274 ~ 276
- [7] De Vries S, Hoge H, Bisseling T. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In Gelvin B, Schilperoort RA, and Verma DPS, eds. *Plant Mol Biol Manual*, 1991, Kluwer Academic Publishers
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning. Second edition, 1989, Cold spring harbor laboratory press
- [9] Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL *et al.* A simple and general method of transferring genes into plants. *Science*, 1985, **227**: 1229 ~ 1231
- [10] HUANG W J (黄文晋), CUI X J (崔晓江), TIAN Y C (田颖川) *et al.* Construction of high antibacterial plant expression vectors. *Acta Microbiologica Sinica*, 1994, **34**: 261 ~ 265.
- [11] FANG Z D (方中达). *Methods in Phytopathology*. 3rd ed, Beijing: Chinese agricultural press (中国农业出版社), 1998
- [12] Meyer P, and Saedler H. Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1996, **47**: 23 ~ 48

Construction of Plant Expression Vectors Harboring a Peptide Antibiotic-apidaecin Gene and Resistance Analysis of the Transgenic Tobacco

WANG Hui² SUN Chao¹ PENG Xue-Xian^{1*}

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

²(College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Two plant expression vectors (pBinPRHbI and pBinPRSIHbI) were constructed: Firstly, apidaecin gene were fused to the signal peptide coding sequencing of a PR-protein, and cloned into a binary vector pBin438 to form pBinPRHbI. Then, the cassette consisting of 35S promoter, PR signal peptide coding sequencing and apidaecin gene was cut off from pBinPRHbI and inserted into another plant expression vector pBinPRSI to produce a bivalent plant expression vector pBinPRSIHbI. pBinPRSI was constructed previously in our lab and contained PR signal peptide and Shiva-I fusion gene under control of 35S promoter. The three plant expression vectors were introduced into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. The positive rate of PCR was 95% in all putative transgenic plants. Results from Southern blot indicated that foreign genes were integrated into tobacco genome and RT-PCR analysis proved that the foreign gene was transcribed in transgenic tobacco. The transgenic tobacco showed higher resistance to *P. syringae pv tabaci*, the causal agent of tobacco wild fire disease, than their original cultivars. From the disease index, the transgenic plants carrying apidaecin and Shiva-I genes had highest resistance among three kinds of transgenic plants, and the plants carrying Shiva-I gene alone had lowest resistance.

Key words peptide antibiotic, apidaecin, Shiva-I, transgenic tobacco, resistance