

SZZ-Harpin 融合蛋白在苏云金芽孢杆菌中的表达及活性测定*

余榕捷¹ 洪 岸¹ 庞 义² 余健秀² 董 春³

(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)¹

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510630)² (华南农业大学农学院 广州 510632)³

摘要: PCR 扩增编码 SZZ 短肽与植物过敏素 (harpin) 融合蛋白的 1.5kb 基因片段, 克隆到苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 表达载体 pHZB1 上, 并置于晶体蛋白 *cryI* 类基因的启动子下游, 从而构建表达质粒 pHSZH。将表达载体 pHSZH 电转化晶体缺陷型的 BtK-CryB 菌株, 获得工程菌 Bt-pHSZH。SDS-PAGE 蛋白分析和生物测定结果显示, 培养 48h 的 Bt-pHSZH 明显表达 SZZ-Harpin 融合蛋白, 表达产物具有诱导烟草过敏反应和系统性获得抗性的功能。

关键词: 植物过敏素, SZZ-Harpin 融合蛋白, 苏云金杆菌, 过敏反应, 系统性获得抗性

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0011-05

EXPRESSION AND BIOLOGICAL ASSAY OF SZZ-HARPIN FUSION PROTEIN IN *BACILLUS THURINGIENSIS*

YU Rong-Jie¹ PANG Yi² YU Jian-Xiu² DONG Chun³ HONG An¹

(Institute of biological engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)¹

(State key laboratory of biological control, Zhongshan University, Guangzhou 510630)²

(South China Agricultural University, Guangzhou 510632)³

Abstract: A 1.5 kb gene which encodes the SZZ-Harpin fusion protein was cloned into the expression vector pHZB1 of *Bacillus thuringiensis* and located on the downstream of *cryI* promoter. The recombinant expression plasmid pHSZH was then transferred into BtK-CryB strain by electroporation, and an engineered Bt strain Bt-pHSZH was obtained. SDS-PAGE indicated that the SZZ-Harpin fusion protein was obviously expressed in Bt-pHSZH cultured for 48 hours. The results of bioassay showed that the fusion protein had the ability of eliciting hypersensitive response (HR). And the strain Bt-pHSZH was able to trigger the systemic acquired resistance (SAR) in tobacco.

Key words: Harpin, SZZ-Harpin fusion protein, Hypersensitive response (HR), Systemic acquired resistance (SAR)

Harpin 蛋白是梨火疫欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*) 产生的一种能引起植物过敏反

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770509)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.39770509)

国家“863”中试项目 (No. Z18-03-29)

收稿日期: 2002-05-24, 修回日期: 2002-07-30

应(hypersensitive response, 简称HR)和诱导植物系统性获得抗性(systemic acquired resistance, 简称SAR)的诱导因子^[1]。Harpin蛋白是由385个氨基酸组成的酸性蛋白,具热稳定性。利用纯化的Harpin蛋白处理植物局部组织,如部分叶片细胞后,处理部位出现枯死斑,并且诱导整个植株对多种病害产生抗性。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种应用最广泛的杀虫微生物,它产生的伴孢晶体对多种经济作物上的主要害虫有毒杀作用^[2]。编码晶体蛋白的*cryI*类基因的启动子是一个强的后期表达启动子,它的激活依赖芽孢的形成^[3]。SZZ序列是以金黄葡萄球菌的胞外蛋白A的信号肽为先导,后接与IgG专一亲和的ZZ序列^[4]。本研究将编码SZZ-harpin融合蛋白的基因导入Bt,由*cryI*类基因的启动子启动表达,在构建既能杀虫又能诱导植物抗性的Bt生防菌方面作初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与植株: pHZB1, 含有晶体蛋白*cryI*类基因的启动子及RBS序列的Bt表达载体, 由中山大学生物防治国家重点实验室余健秀博士构建; pSQ2, 含有编码SZZ-harpin融合蛋白基因的质粒, 由山西大学赵立平教授提供; BtK-CryB, Bt晶体缺陷型菌株, 由美国B. A. Federici实验室提供; DH5 α , 大肠杆菌, 为本实验室保存; *Ralstonia solanacearum* (RS), 烟草青枯病病菌, 由华南农业大学董春老师提供; 烟草(大胖黄), 对青枯病敏感的烟草品系, 由华南农业大学董春老师提供。

1.1.2 培养基: G-Tris 液体培养基, CaCl₂ 0.08g, FeSO₄·7H₂O 0.0025g, CuSO₄·5H₂O 0.05g, ZnSO₄·7H₂O 0.005g, MnSO₄·H₂O 0.05g, MgSO₄ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 2g, Glucose 2g, 50mL 1mol/L tris-HCl (pH8.0), Yeast Extract 1.5g, K₂HPO₄ 0.5g, 调节pH值为7.4, 定容至1L; G-Tris 固体培养基, G-Tris 液体培养基加入15g琼脂粉; LB培养基, SOC培养基均按《分子克隆》制备。

1.1.3 酶与试剂: *Nsi*I、*Sac*I、Tag酶、溶菌酶和T4连接酶均购自Promega公司; PCR Purification Kit、Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 均购自QIAGEN公司; 2倍电激转化液, 400mmol/L Sucrose, 1mol/L MgCl₂, 7mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.0; Bt质粒提取重悬液, 25g/mL Surose, 25mmol/L Tris.Cl (pH8.0), 10mmol/L EDTA, 1mg/mL 溶菌酶(pH8.0)。

1.1.4 扩增 SZZ-harpin 融合蛋白基因的引物: 上游引物, CGGATGCATCAAAAA-GAAAAACATTTATTC, 引物中引入*Nsi*I酶切位点; 下游引物, ACCGAGCTCTCATGGCAT-CAATAC, 引物中引入*Sac*I酶切位点, 引物均由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒DNA的提取、PCR、限制性内切酶反应、琼脂糖凝胶电泳、酶切片段的回收、DNA的连接和转化等均参照相关试剂盒说明或《分子克隆》实验手册进行。

1.2.2 Bt感受态细胞的制备与电激转化: 参照文献[5]进行, 挑Bt单菌落液体活化过夜, 按1:20接新鲜培养基, 培养至OD值为0.2~0.4, 冰浴10min, 1,000 r/min离心10min, 去上清, 用冰冻无菌水洗涤菌体3次, 悬浮菌体于10%无菌甘油中, 使终浓度为10¹⁰细胞/mL, 按每管200 μ L分装, 液氮冻存, 临用前取出解冻, 加入等体积的2倍

电激缓冲液和 $2 \sim 10 \mu\text{L}$ DNA ($0.01 \sim 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 充分混匀, 冰浴 10min, 移入预冷的电激杯中 (0.2mm), 电压 $1,500\text{V}$, 电阻 $400 \sim 800\Omega$, 电容 $25\mu\text{F}$ 进行电激, 使电激时间常数为 $4 \sim 6\text{ms}$, 电激后迅速移入冰浴, 10min 后加入 800mL SOC, $30^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 静置培养 1h, 然后取样, 涂布于抗性平板中。

1.2.3 Bt 菌体的 G-Tris 液体培养: 接 Bt 单菌落于 5mL 的 LB 液体培养基, 28°C 培养过夜, 按 $1:20$ 接于 G-Tris 液体培养基, $200\text{r}/\text{min}$, 28°C 培养。从接种始 72h , Bt 将完成一个完整的生活循环, 芽孢成熟并脱下。

1.2.4 以 Bt 菌体裂解液为 PCR 模板的制备: 挑 Bt 单菌落于 LB 平板, 28°C 培养过夜, 用无菌接种环挑取一环菌体于 $200\mu\text{L}$ 的无菌水, 沸水煮 10min , $12,000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min , 取 $10\mu\text{L}$ 上清作为 PCR 模板。

1.2.5 Bt 菌体的超声波破碎: $3,000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 收集 Bt 菌体, 用 5m mol/L 磷酸缓冲液洗涤两遍, 按 1mg 菌体加 10mL 5m mol/L 磷酸缓冲液的比例重悬, 超声破菌, 离心分离, 所得上清用于 SDS-PAGE 分析和活性测定。

1.2.6 植物过敏反应测定方法: 用针在叶面扎一小孔, 将菌液或破碎产物上清吸入无针头的注射器, 用手指垫在小孔背面, 注射器贴紧小孔正面, 缓缓将液体挤入叶肉细胞间隙中, 注射部位出现水渍斑, 控制水渍斑直径为 2cm , $16 \sim 24\text{h}$ 观察接种部位枯斑反应情况, 同时以无菌水作对照。

1.2.7 防治烟草青枯病的盆栽试验: 将培养 48h 的 Bt 培养物淋在盆栽的对青枯病敏感的烟草品系长脖黄的根部, 每株烟苗淋 20mL , 并对地上部分喷雾。2d 后, 按 $100\text{mL}/\text{苗}$ 、 $10^7\text{CFU}/\text{mL}$, 以淋根法接种青枯病菌 RS, 30d 后统计发病株数。

2 结 果

2.1 SZZ-harpin 融合蛋白表达质粒 pHSHZ 的构建

以含 SZZ-harpin 融合蛋白基因的质粒 pSQ2 为模板, PCR 扩增编码 SZZ-harpin 融合蛋白的 1.5kb 全基因, 接于 Bt 表达载体 pHZB1 的 *Nsi*I 和 *Sac*I 位点间, 构建出表达质粒 pHSHZ。具体构建见图 1。构建结果保留了原 Bt 表达载体的翻译起始位点 (ATG) 及其后编码 9 个氨基酸残基的核苷酸序列 (GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC), 再与 SZZ-harpin 融合蛋白基因的读码框相连, 所以预计表达一个由 509 个氨基酸组成, 大小 55kD 的蛋白。PCR、酶切鉴定与 DNA 测序分析结果表明, 克隆的序列与编码阅读框正确 (图 2)。

2.2 融合蛋白的表达

按方法 1.2.2 将表达质粒 pHSHZ 和 pHZB1 电激

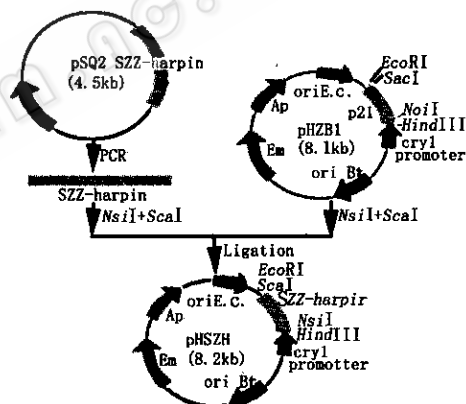


图 1 融合蛋白表达质粒 pHSHZ 构建流程图

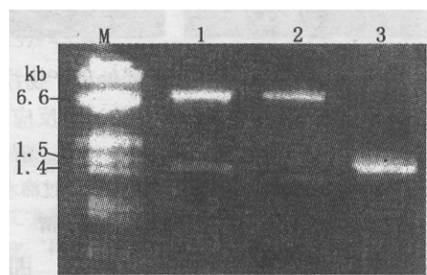


图 2 重组表达载体 pHSHZ 的酶切鉴定

- M λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI marker,
 1 pHSZH/*Hind*III + *Eco*RI,
 2 pHZB1/*Hind*III + *Eco*RI,
 3 pHSZH 的 PCR 产物

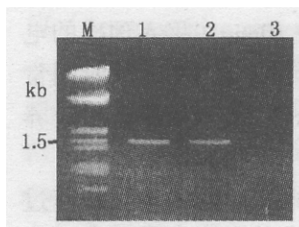


图3 工程菌 Bt-pHSZH 的 PCR 鉴定

M λDNA/*Hind*III + *Eco*RI marker,
1 pHSZH Plasmid, 2 Bt-pHSZH,
3 Bt-pHZB1

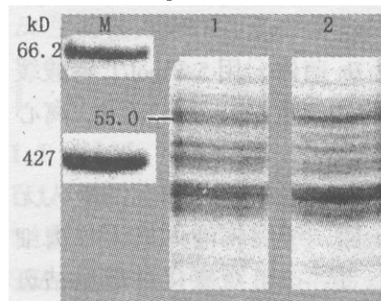


图4 培养48h的 Bt-pHSZH 细胞超声波破碎产物上清的 SDS-PAGE 分析

M protein marker,
1 Bt-pHSZH, 2 Bt-pHZB1

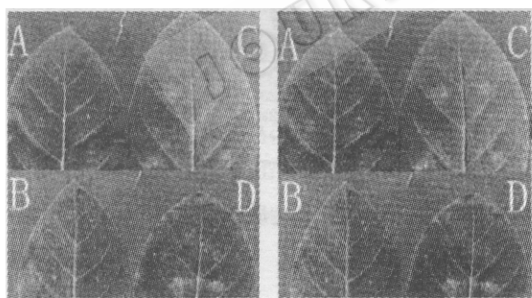


图5 Bt-pHSZH 不同处理产物注射烟草叶片24h后的过敏反应

A 培养上清, B 菌体, C 菌体的超声波破碎产物的上清, D 经过沸水浴处理的超声波破碎产物上清

转化 Bt 晶体缺陷型菌株 BtK.CryB, 得到的转化子分别命名为 Bt-pHSZH 和 Bt-pHZB1, 转化子经 PCR 鉴定 (图3) 后按方法 1.2.3 进行 G-Tris 液体同步培养, 48h 后, 镜检显示菌株均已进入孢子形成期 (图略)。菌体 SDS-PAGE 显示 Bt-pHSZH 在 55kD 处有一条新的蛋白带, 与 *SZZ-harpin* 基因的预期表达的产物大小相吻合 (图4)。将 Bt-pHSZH 和 Bt-pHZB1 进行同步培养 72h 后, 镜检显示孢子囊已经裂解并释放出芽孢, 用提纯 Bt 晶体的差速离心法去掉芽孢和大的细胞碎片, 所得产物进行 SDS-PAGE 分析, 工程菌 Bt-pHSZH 没有明显的 55kD 的蛋白带, 显微镜观察也没有发现类 Bt 伴孢晶体颗粒的存在 (图略)。

2.3 SZZ-Harpin 融合蛋白诱导植物过敏反应活性检测

分离培养 48h 的 Bt-pHSZH 培养物的各个组分, 得到 (A) 不含有菌体的上清; (B) 不含培养基的菌体; (C) 菌体的超声波破碎产物的上清; (D) 经过沸水浴处理的超声波破碎产物上清。将 A, B, C, D 4 种处理的产物按方法 1.2.6 注射生长健康的烟草叶片, 结果显示 A 和 B 均不能诱导典型过敏枯斑, C 和 D 则诱导出典型过敏枯斑 (图5), 以 Bt-pHZB1 作对照, 其所有处理都不能诱导出枯斑 (图略)。结果表明沸水浴不影响 SZZ-Harpin 融合蛋白诱导过敏反应的活性。

2.4 工程菌 Bt-pHSZH 防治烟草青枯病的盆栽试验

按方法 1.2.7, 将 Bt-pHSZH 和 Bt-pHZB1 48h 的培养物淋于烟苗根部, 同时以水做对照。共重复 4 组, 每组的 3 种处理均重复 5 株苗。2d 后接种青枯病病菌, 30d 后统计。统计结果显示工程菌 Bt-pHSZH 具有防治烟草青枯病效用 (图3)。

3 讨论

SZZ-Harpin 融合蛋白在 Bt-pHSZH 中的表达依赖于 *cry1* 启动子, 而 *cry1* 的启动子是与孢子形成密切相关的启动子^[4]。*cry1* 启动子有两个相邻的起始位点: BtI 和 BtII, 前者在孢子形成开始后 1~2h 被激活; 后者在孢子形成的中后期, 即孢子形成开始后 4~5h 被激活, 活性持续至孢子形成开始后的 18h。因此, *SZZ-harpin* 融合基因的转录与芽孢形成密切相关。本研究固定 Bt 的 G-Tris 液体培养条件, Bt-pHSZH 和 Bt-pHZB1 的孢子均在接种后 24~36h; 48h 是孢子形成的稳定期, 也是 *cry1* 启动子的活跃期; 至 72h, 基本完成一个生长循环, 孢子从成熟的孢子囊脱落。因此接种 48h 后, SZZ-Harpin 融合蛋白的产量最高, 诱导过敏反应的活性最强, 这与实验结果相吻合。

SZZ-Harpin 融合蛋白在 Harpin 蛋白的 N-端接了一个信号肽和一个 ZZ 序列, 在信号肽前还保留 Gry1A 类晶体蛋白的 9 个氨基酸残基, 但仍具有诱导植物过敏反应和系统性获得抗性的功能 (图 5、图 6), 表明 Harpin 蛋白的功能域可能位于蛋白的 C-端。已有报道来自假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的 Harpin 类蛋白 C 端两个正向重复序列结构足以具备诱导过敏反应的活性^[5-6]。本研究结果也表明, Harpin 的功能不受 N 端异源蛋白的影响, 对研究 Harpin 蛋白结构与功能的关系有一定的参考价值。经过沸水浴处理的 SZZ-Harpin 融合蛋白仍能诱导出典型的过敏性枯斑 (图 5)。表明 SZZ-Harpin 融合蛋白保留天然 Harpin 蛋白热稳定的特性^[1]。SZZ-Harpin 融合蛋白含有一个与 IgG 特异性亲和的 ZZ 序列, 可以采用 IgG-琼脂糖凝胶柱层析法进行分离和纯化^[7]。

本研究结果显示 SZZ-Harpin 融合蛋白在工程菌 Bt-pHSZH 中并不形成明显晶体, 但不经破碎处理的工程菌 Bt-pHSZH 培养物却能诱导植物抗性 (图 6), 可能是 SZZ-Harpin 融合蛋白随芽孢脱落和孢子囊裂解而释放到外界。诱导植物系统性获得抗性并不需要高浓度的蛋白。将分泌 Harpin 的大肠杆菌喷雾到植物叶片时, 并不引起可见的过敏反应, 却能诱导植物的抗性^[4]。随母细胞裂解而释放的 SZZ-Harpin 融合蛋白足以诱导植物的抗性。*Bt* 是土壤微生物, 有充分的机会与植物根系接触, 并且在土壤中有孢子扩散和自然增殖的能力, 这样便可将 SZZ-Harpin 融合蛋白扩散至植物根系周围。另外, *Bt* 本身就是一种杀虫细菌, 能产生多种杀虫晶体蛋白。本研究在构建既能杀虫又能诱导植物抗病性的多功能生防菌方面作了有创意的探索。

参考文献

- [1] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Science, 1992, 3: 257 (5066): 85 ~ 88.
- [2] 龙策新, 庞义. 昆虫病理学. 广州: 广东科技出版社, 1994. 220 ~ 262.
- [3] Wong H C, Schnepf H E, Whiteley H R. J Biol Chem, 1983, 258 (3): 1960 ~ 1967.
- [4] 赵立平, 梁元存, 刘爱新, 等. 高技术通讯, 1997, 9: 1 ~ 4.
- [5] He S H, Huang H C, Collmer A. Cell, 1993, 73 (7): 1255 ~ 1266.
- [6] Alfano J R, Bauer D W, Milos T M. Mol Microbiol, 1996, 19 (4): 715 ~ 728.
- [7] Lowenadler B, Nilsson B, Abrahamsen L, et al. EMBO, 1986, 5 (9): 2393 ~ 2398.

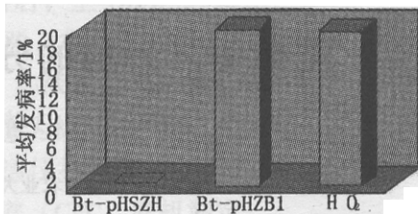


图6 工程菌 Bt-pHSZH 防治烟草青枯病的盆栽试验统计结果