

EcbCSL101 菌株 $hrpN$ 基因的克隆、表达及 Harpin_{EcbCSL101}蛋白的生物学活性

林燕燕¹ 陶宗娅^{1*} 崔亚亚² 吴伯骥^{2*}

(1. 四川师范大学生命科学学院 成都 610068)

(2. 中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要: 胡萝卜软腐欧文氏菌甜菜亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*) EcbCSL101 菌株具有很强胞外酶分泌活性, 接种非寄主植物烟草引起过敏反应。Southern blotting结果表明EcbCSL101 菌株中含有 $hrpN$ 基因。PCR扩增含EcbCSL101 完整开放阅读框的DNA片段并克隆到表达载体pET28a(+)中。核苷酸序列分析表明, EcbCSL101 菌株的 $hrpN$ 基因的ORF为 1113 bp, 编码 36.65 kD Harpin_{EcbCSL101}蛋白(GenBank, DQ355519),与其它几种软腐欧文氏菌Harpin蛋白有较高的同源性。将含有 $hrpN$ _{EcbCSL101}基因的重组质粒转化到大肠杆菌JM109(DE3)中进行表达,纯化后的Harpin_{EcbCSL101}能诱导烟草发生过敏反应。

关键词: 胡萝卜软腐欧文氏菌甜菜亚种, $hrpN$ 基因, Harpin 蛋白, 过敏反应

Identification and Expression of $hrpN$ Gene from Strain EcbCSL101 and the Activity of Purified Harpin_{EcbCSL101} Protein

LIN Yan-Yan¹ TAO Zong-Ya^{1*} CUI Ya-Ya² WU Bo-Ji^{2*}

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068)

(2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041)

Abstract: *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum* (Ecb) strain EcbCSL101 produces high levels of extracellular enzymes including pectate lyase (Pel), polygalacturonase (Peh), protease (Prt) and cellulase (Cel) and elicits hypersensitive response (HR) in tobacco leaves. Southern blot analysis using Ecb strain CSDS001 $hrpN$ DNA as probe revealed that EcbCSL101 possesses $hrpN$ gene. A DNA fragment containing entire ORF of EcbCSL101 $hrpN$ was PCR amplified and cloned into vector pET28a(+). Nucleotide sequence analysis reveals that EcbCSL101 $hrpN$ possesses a 1113 bp ORF which encodes a 36.65 kD Harpin_{EcbCSL101} protein. The deduced amino acid sequence of EcbCSL101 $hrpN$ shares high homology with Harpin proteins of several other *Erwinia carotovora* strains (GenBank number DQ355519). Harpin_{EcbCSL101} protein was expressed in *E. coli* strain JM109 (DE3) by IPTG induction. The purified Harpin_{EcbCSL101} effectively elicits the HR in tobacco leaves.

Keywords: *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*, *hrpN* gene, Harpin protein, Hypersensitive response (HR)

Harpin蛋白是由革兰氏阴性植物病原细菌“过敏反应与致病性(*hrp*, hypersensitive response and pathogenity)”基因簇中*hrp*基因编码的、性质和功能相似的一类蛋白质,富含甘氨酸,缺少半胱氨酸,对蛋白酶敏感,对热稳定,大多对寄主植物具有毒性,导致寄主发病,能在非寄主植物上引起过敏反应(HR)^[1,2]。1986年, Lindgren等首次通过突变体研究,在*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*菌株NPS3121中将诱发HR反应的基因定位到5 kb的DNA片段中^[3]。随后,人们对植物病原细菌*hrp*基因的分布、结构、功能等进行了大量研究。1992年Wei等首次报道从梨火疫欧文氏杆菌(*Erwinia amylovora*)中分离到一种由*hrpN*基因编码的产物Harpin蛋白—HarpinEa,其能够在烟草上诱发HR^[2,4],引起人们对研究植物病原细菌产生的Harpin蛋白的广泛关注。

现已证明,*hrp*基因广泛存在于植物病原细菌中,通过Ⅱ型分泌系统,将多种病原菌效应蛋白(包括Avr蛋白)、Harpin蛋白及其他致病性因子分泌到菌体外,在非寄主或抗性植物上激发HR或导致抗病性,在寄主植物上引起病害^[5]。从各类病原菌中寻找产生Harpin的*hrp*基因及研究Harpin诱导防卫机制已成为分子植物病理学的一个新研究热点。1995年Cui等在在胡萝卜软腐欧文氏菌中发现了*hrp*基因,并在次年首次从*E. carotovora* subsp. *carotovora* Ecc71菌株中克隆出*hrpN*基因^[6,7]。目前,国内对胡萝卜软腐欧文氏菌*hrp*基因及其Harpin蛋白的研究已有很大进展。*E. carotovora* subsp. *carotovora* CSSY002以及*E. carotovora* subsp. *carotovora* CSDS001菌株中的*hrpN*基因被成功克隆。这几种菌株中*hrpN*基因表达的Harpin蛋白在分子量大小、氨基酸序列等方面具有不同程度的差异,但均能诱导烟草过敏反应。进一步研究证明,Harpin蛋白能诱导植物抗病性、驱虫性和抗逆性,并显著促进植物生长发育。张珏等报道了使用拟南芥全基因芯片检测Harpin_{CSDS001}蛋白作用后拟南芥全基因表达谱变化,研究Harpin_{CSDS001}诱导植物抗性、促进植物生长发育的作用机制^[8,9]。

本文主要报道高致病性病原菌胡萝卜软腐欧文

氏菌甜菜亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *Betavascularum*) EcbCSL101菌株的胞外酶活性和致病性鉴定、*hrpN*_{EcbCSL101}基因的克隆和测序、*pT7-hrpN*_{EcbCSL101}质粒在大肠杆菌JM109(DE3)中经IPTG诱导后,产物Harpin_{EcbCSL101}蛋白的高效表达及其生物学活性鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒及培养基: EcbCSL101菌株由本实验室收藏;大肠杆菌工程菌株JM109(DE3)(Promega Biotec, USA); pET28a(+)质粒(Novagen, USA);文中用到的LB、微盐培养基成分参见文献[6];选择培养基为含50 μg/mL卡那霉素(Km)的LB培养基。

1.1.2 试剂: PureGene基因组DNA提取试剂盒(Gentra System, USA); DNA纯化试剂盒(Qiagen, USA); Prime-a-Gene DNA标记系统(Promega); α-P³²-dATP(Perkin-Elmer, USA); 硝酸纤维素膜和低熔点琼脂糖(Fisher Scientific, USA); bicinchoninic蛋白分析试剂盒(Pierce, Rockford, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 EcbCSL101菌株的胞外酶活性检测: 将EcbCSL101菌株接种到含0.5%蔗糖的微盐培养基,28℃摇瓶培养至OD₆₀₀=2.5,离心(4℃, 10000 r/min, 10min)收集上清液,取30 μL接到半定量酶活性检测平板,28℃培养。分别于18 h后检测多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, Peh)、果胶酶(Pectate lyase, Pel)及纤维素酶(Cellulase, Cel)活性,30 h后检测蛋白酶(Protease, Prt)活性。琼脂固体平板胞外酶检测培养基配方及酶活性检测方法参见文献[7]。胞外酶分析平板上菌落周围透明圈大小反映其酶活性水平高低。

1.2.2 致病性检测: 将EcbCSL101菌株接种于LB平板,28℃培养24 h,用无菌水稀释成5×10⁹ CFU/mL的菌悬液,接种0.05 mL至西芹茎,28℃保湿培养48 h,根据西芹茎软腐程度判断菌株致病性。

1.2.3 EcbCSL101菌株的过敏反应检测: 将EcbCSL101菌株接种到LB培养基,28℃培养24 h,

挑取菌落用无菌 10 mmol/L (pH7.0)磷酸缓冲液将菌稀释到 2×10^8 CFU/mL菌浓度, 取 0.5 mL注射到烟草叶片, 20 h后观察结果。对照用无菌 10 mmol/L (pH 7.0)磷酸缓冲液。

1.2.4 Southern 杂交鉴定 $hrpN_{EcbCSL101}$ 基因: 用 *EcoR* 消化 *EcbCSL101* 菌株染色体DNA, 然后以 α - P^{32} -dATP标记的 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* 菌株 CSDS001 *hrpN* DNA 为探针进行 Southern blotting。杂交条件: 温度 65 , 杂交液 $6 \times$ SSC, $5 \times$ Denhardt, 5 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)和 100 μ g/mL 变性鲑精 DNA; 漂洗温度 65 , 用 $2 \times$ SSC 漂洗 30 min, 再用 $1 \times$ SSC 和 1 g/L SDS 漂洗 30 min, 最后用 $0.1 \times$ SSC 和 1 g/L SDS 漂洗 30 min。

1.2.5 $hrpN_{EcbCSL101}$ 基因扩增、克隆及测序: 以 CSDS001 *hrpN* DNA序列为参考设计引物, 进行 PCR扩增。

$hrpN_{EcbCSL101}$ -1: TGTGGATCCATGCTTAATTCTCTTGGTGGCGGAG

$hrpN_{EcbCSL101}$ -2: TGTAAGCTTTAGCTGGAGAGCTTCTTCAACCC

PCR 反应条件为 94 5 min; 94 1 min, 55 2 min, 72 3 min, 进行 25 个循环。将 PCR 产物纯化, 经 *Bam*H -*Hind* 酶切, 克隆到质粒载体 pET28a(+)中, 构建 *pT7-hrpN_{EcbCSL101}* 重组质粒 pA001, 基因测序由大连宝生物科技公司完成。根据测序结果, 分析并确定 $hrpN_{EcbCSL101}$ 基因的开放阅读框, 分析基因结构。基因扩增和克隆方法见文献 [9]和[10]。

1.2.6 Harpin_{EcbCSL101} 的诱导表达及纯化: 将质粒 pA001 转化到大肠杆菌JM109(DE3), 接种到含卡那霉素的LB液体培养基中, 37 摇瓶培养至 $OD_{600}=0.6$, 加入 1 mmol/L 终浓度的 IPTG 培养 3 h 诱导外源基因表达, 离心收集菌体, 重溶于 1 倍样品缓冲液中, 煮沸 3 min。用 bicinchoninic 蛋白分析试剂盒测定蛋白质浓度, 并用 12%十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白。Harpin_{EcbCSL101}的纯化方法参见文献[9]和[10]。

1.2.7 Harpin_{EcbCSL101} 的生物学活性检测: 将 200 μ g/mL纯化的 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白悬浮于 5 mmol/L MES 缓冲液稀释成 100 μ g/mL、50 μ g/mL 和 25 μ g/mL 几种浓度注射接种到烟草叶片, 以 5 mmol/L MES 缓冲液为对照, 20 h后检查 HR 枯斑。

2 结果与分析

2.1 EcbCSL101 菌株的胞外酶致病性和过敏反应

半定量酶活性检测结果显示, *EcbCSL101* 菌株能分泌较高活性Pel、Peh、Prt 和Cel, 参见图 1。这 4 种酶均为植物细胞壁降解酶类 (Plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs), 是软腐欧文氏菌类的关键致病因子^[11], 说明这些高活性的胞外酶可能与 *EcbCSL101* 菌株的致病性直接相关。图 2 中接种 *EcbCSL101* 菌株的西芹产生软腐病症, 对照 (CK)不产生软腐病症, 说明 *EcbCSL101* 菌株具有较强致病性。图 3 为 *EcbCSL101* 菌株注入烟草叶片诱导烟草叶片产生的过敏反应症状, 表明 *EcbCSL101* 菌株能引起非寄主植物的过敏反应。

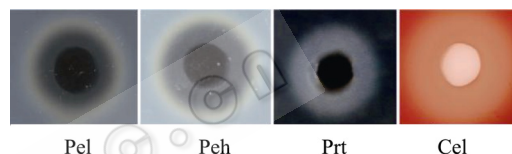


图 1 *EcbCSL101* 菌株分泌的胞外酶

Fig. 1 Extracellular enzymes produced by *EcbCSL101*

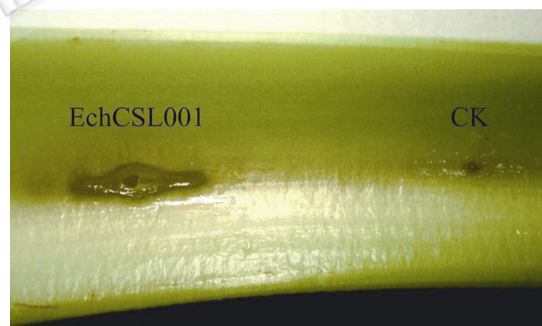


图 2 *EcbCSL101* 菌株引起西芹茎软腐

Fig. 2 Celery tissue soft rot caused by *EcbCSL101*



图 3 *EcbCSL101* 菌株诱导过敏反应

Fig. 3 HR elicited by *EcbCSL101*

2.2 *hrpN*_{EcbCSL101} 基因的鉴定及克隆

图 4 是以 α -P32-dATP 标记的 CSDS001 菌株 *hrpN* DNA 为探针对 *EcoR* 消化的 CSDS001, EcbCSL101 及大肠杆菌 HB101 染色体 DNA 进行 Southern 杂交。结果显示, CSDS001 和 EcbCSL101 的 *EcoR* 阳性杂交带片段大小类似(2.0 kb~2.3 kb), 大肠杆菌 HB101 染色体 DNA 无杂交带出现。表明 EcbCSL101 基因组中含 *hrpN* 基因。

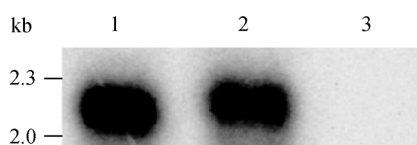


图 4 Southern 杂交结果

Fig. 4 Southern blot analysis

1: CSDS001(阳性对照); 2: EcbCSL101; 3: 大肠杆菌 HB101(阴性对照)
1: CSDS001 (Positive control); 2: EcbCSL101; 3: *E. coli* strain HB101 (Negative control)

PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 5。从图中可以看出, 泳道 1 的条带为 CSDS001 的 *hrpN* 基因扩增片段(阳性对照), 含 1071 个核苷酸; 泳道 2 的条带为 EcbCSL101 的 *hrpN* 基因扩增片段, 比 CSDS001 的 *hrpN* 扩增产物略大。泳道 3 为大肠杆菌 HB101(阴性对照), 无扩增产物。该结果显示 EcbCSL101 的 *hrpN* 基因能用 *hrpN*_{CSDS001} 设计引物扩增, 进一步表明 EcbCSL101 基因组中含 *hrpN* 基因。

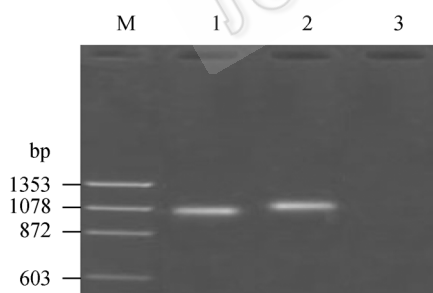


图 5 PCR 结果

Fig. 5 PCR result

M: Marker; 1: CSDS001(阳性对照); 2: EcbCSL101; 3: 大肠杆菌 HB101(阴性对照)

M: Marker; 1: CSDS001 (Positive control); 2: EcbCSL101; 3: *E. coli* strain HB101 (Negative control)

2.3 *hrpN*_{EcbCSL101} 基因的核苷酸序列及其编码蛋白 Harpin_{EcbCSL101} 的氨基酸序列分析

用 T7 及 SP6 引物对质粒 pA001 测序。测序结果表明, *hrpN*_{EcbCSL101} 基因(GenBank 登录号 DQ355519)

编码区为 1113 个核苷酸, 编码由 370 个氨基酸残基组成的 Harpin_{EcbCSL101}, 理论分子量 36.65 kD, 理论等电点 5.43。 *Erwinia carotovora* 菌株 CSDS001、CSDS008、Ecc71、SCC1、EcbCSL101、SCRI1043 的 *hrpN* 基因编码氨基酸比对结果分析可知, EcbCSL101 与其它几个菌株来源的 *hrpN* 编码氨基酸序列同源性较高, 特别是 C 末端高度保守, 推测是其功能区域。这几个 Harpin 蛋白都富含甘氨酸, 在 66~135 段是谷氨酸的高密度分布区, 缺乏半胱氨酸。此外, EcbCSL101 菌株的 *hrpN* 氨基酸序列与 SCRI1043 菌株 *hrpN* 氨基酸序列同源性要相对于其它几个更高一些, 尤其是在 68~74 段, 82~85 段, 107~110 段二者有更高同源性, 是否二者具有其它几种 Harpin 蛋白所不具备的功能, 有待于进一步研究。

2.4 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白的高效表达及检测

12 % SDS-PAGE 结果显示(图 6): 含 *pT7-hrpN*_{EcbCSL101} 质粒(pA001)的 JM109(DE3)经 IPTG 诱导表达与理论 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白分子量相同的蛋白; 纯化的 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白电泳条带与诱导表达的 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白分子量相同; 只含空载体质粒的 JM109(DE3)经 IPTG 诱导后不产生该蛋白条带; 含质粒 pA001 的 JM109(DE3)菌不经 IPTG 诱导则产生微弱的该蛋白条带。这些结果表明 IPTG 能诱导含 *pT7-hrpN*_{EcbCSL101} 质粒的 JM109(DE3) 表达 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白。

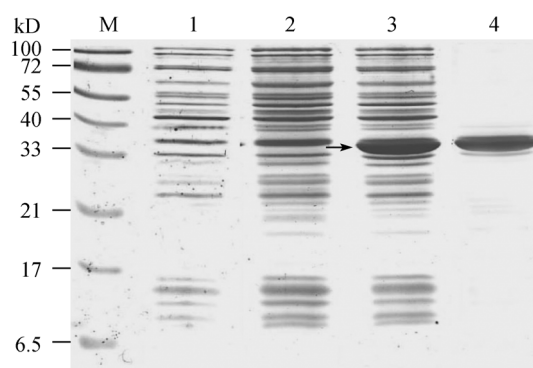


图 6 大肠杆菌 JM109(DE3) 中 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白的表达

Fig. 6 Expression of Harpin_{EcbCSL101} from *E. coli* JM109 (DE3)

M: Marker; 1: JM109(DE3)/pET-28a(+) + IPTG; 2: JM109(DE3)/pA001; 3: JM109(DE3)/pA001 + IPTG; 4: 提纯的 Harpin_{EcbCSL101} 蛋白

M: Marker; 1: JM109(DE3) carrying pET28a(+) + IPTG; 2: JM109(DE3) carrying pA001, no IPTG; 3: JM109(DE3) carrying pA001 + IPTG; 4: Purified Harpin_{EcbCSL101}

2.5 诱导表达的Harpin_{EcbCSL101}蛋白生物学活性检测

为检测诱导表达的Harpin_{EcbCSL101}蛋白是否具有其生物学活性,我们将Harpin_{EcbCSL101}进行纯化,纯度在90%以上(参见图6泳道4)。从图7显示的结果可以看出纯化的Harpin_{EcbCSL101}蛋白能诱导烟草叶片产生过敏反应。50 $\mu\text{g/mL}$ 的Harpin_{EcbCSL101}蛋白即能显著诱导过敏反应,并且随着含量的增加,过敏反应病斑随之扩大,对照MES buffer处理不引起过敏反应。该结果证明在大肠杆菌中诱导表达的Harpin_{EcbCSL101}蛋白经纯化后,仍然保持生物学活性,这与已报道的其它几种Harpin蛋白结果一致。



图7 纯化的Harpin_{EcbCSL101}蛋白诱导过敏反应

Fig. 7 HR elicited by purified Harpin_{EcbCSL101}

1: 25 $\mu\text{g/mL}$; 2: 50 $\mu\text{g/mL}$; 3: 100 $\mu\text{g/mL}$; 4: 200 $\mu\text{g/mL}$

3 讨论

研究发现由hrp基因(*hrpN*, *hrpW*, *hrpZ*等)编码的Harpin蛋白是引发非寄主植物过敏性反应的主要因子, *hrp*基因的遗传组成、表达调控及产物、功能已成为目前研究病原菌及其寄主互作的重点内容。EcbCSL101菌株具有很强的胞外酶分泌活性,这些酶多为植物细胞壁降解酶类,能够降解植物细胞壁,是该菌的关键致病因子,由RsmA/rsmB、RsmC、GacS/A、HexA、KdgR和RpoS等多个调控系统控制分泌,这些酶与其致病性密切相关^[12]。Harpin_{EcbCSL101}编码的氨基酸序列与其它几种*Erwinia carotovora* Harpin蛋白的氨基酸序列同源性很高,尤其是同SCRI1043菌株Harpin_N氨基酸序列同源性更

高。克隆的

*pT7—hrpN_{EcbCSL101}*质粒在大肠杆菌JM109(DE3)中高效表达Harpin_{EcbCSL101}蛋白,纯化后仍具有生物学活性,能诱导烟草HR。表明Harpin_{EcbCSL101}蛋白能诱导植物产生系统获得性抗性,具抗病、抗虫、抗逆、促进生长和发育、提高生物产量和经济产量等特性,为进一步研究新型、安全和高效的生物诱抗剂奠定基础。

参考文献

- [1] 王金生. 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, *et al.* Harpin, elicitor of hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* Science, 1992, **257**(5066): 85–88.
- [3] Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. “*phaseolicola*” controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 1986, **168**(2): 512–522.
- [4] Delaney T, Ukness S, Vernooij B, *et al.* A control role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1994, **266**(5188): 1274–1250.
- [5] He SY, Nomura K, Whittam TS. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1694**(1-3): 181–206.
- [6] Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, *et al.* Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-Oxo-hexanoyl)-L-Homoserine lactone, and pathogenicity in Soft-Rotting *Erwinia* spp.. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(17): 5108–5115.
- [7] Cui Y, Madi L, Mukherjee A, *et al.* The RsmA-mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* strain Ecc71 overexpress *hrpNEcc* and elicit a hypersensitive reaction-like response in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1996, **9**(7): 565–573.
- [8] 曹茂林, 张珏, 汤承, 等. 胡萝卜软腐欧文氏菌CSSY002菌株 *hrpN* 基因的克隆、鉴定及其表达产物Harpin蛋白的活性分析. 应用与环境生物学报, 2007, **13**(2): 161–165.
- [9] 张珏, 曹茂林, 黄玉碧, 等. *HrpNCSDS001* 基因克隆及其表达产物诱导拟南芥基因表达谱变化的研究. 遗传, 2007, **29**(5): 629–636.
- [10] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [11] Chatterjee AK, Dumenyo CK, Liu Y, *et al.* *Erwinia*: genetics of pathogenicity factors. *Academic Press*, 2000, **2**(6): 236–260.
- [12] Cui Y, Chatterjee A, Chatterjee AK. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and Harpin_{Ecc}. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, **14**(4): 516–526.