

# 细极链格孢菌 *peaT2* 基因在毕赤酵母中的表达及蛋白功能确定

刘文平<sup>1</sup>, 曾洪梅<sup>2\*</sup>, 刘延锋<sup>2</sup>, 袁京京<sup>2</sup>, 邱德文<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西南大学植物保护学院 重庆 400716)

(<sup>2</sup>中国农业科学院植物保护研究所 北京 100081)

**摘 要:** 从细极链格孢菌表达文库获得阳性克隆子, 序列分析表明, 克隆的 DNA 片段中含有完整的开放阅读框架, 将该基因命名为 *peaT2* (GenBank 登录号为 EF212880)。用 PCR 法扩增 *peaT2* 基因的编码序列并亚克隆到毕赤酵母表达系统的表达载体 pPIC9K 上, 得到重组质粒 pPIC9K/*peaT2*。重组质粒经 *Sac* I 线性化后用电穿孔法导入到毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中, 采用 MD、G418-YPD 平板和 PCR 法筛选 Mut<sup>+</sup> 表型, 获得了分泌表达的重组毕赤酵母。随机挑取一菌株作为表达菌, 用甲醇诱导 *PeaT2* 蛋白表达。SDS-PAGE 及 Western blot 检测结果均表明 *PeaT2* 在毕赤酵母中成功地分泌表达。用 *peaT2* 基因的表达蛋白处理小麦种子, 生物测定表明, 表达蛋白能明显促进小麦的生长, 具有蛋白激发子作用。

**关键词:** *peaT2*; 蛋白激发子; 细极链格孢菌; 毕赤酵母表达系统

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0593-05

微生物病原菌浸染植物会诱发植物某些信号分子水平的增加并且激活特定的防御相关基因的表达, 致使植物抗性水平增加<sup>[1-3]</sup>。植物通过对病原菌激发子的识别可以启动不同的级联信号途径, 最终产生对病原菌的主动防卫反应<sup>[4]</sup>。

1968 年, Cruickshank 和 Perrin 从丛梗孢菌 (*Monilinia fructicola*) 菌丝体中分离到的一种多肽, 能诱导菜豆内果皮形成和积累菜豆素, 这是第一个已报道的真菌激发子<sup>[5]</sup>。邱德文<sup>[6]</sup>于 2000 年从植物病原真菌中提取获得一类新类型蛋白, 它能通过与植物表面受体蛋白的互作, 诱导植物的信号传导, 启动植物体内一系列代谢反应, 激活植物自身生长系统、防卫系统, 从而使植物产生对病虫害的抗性, 促进生长。本文在已构建的细极链格孢菌 JH505 cDNA 文库的基础上<sup>[7]</sup>, 采用免疫技术筛选获得了阳性克隆子基因, 将该基因命名为 *peaT2* (Protein Elicitor from *Alternaria tenuissima* 2), 并进行了 GenBank 登录 (GenBank 登录号为 EF212880)。毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速的一个外源蛋白真核表达系统, 具有真核系统翻译后加工的特点<sup>[8]</sup>, 还兼具诸如大肠杆菌和酿酒酵母等微生物易于操作的特点<sup>[9]</sup>。酵母表达载体 pPIC9K 含有分泌型信号肽, 可有效地将外源基因表达产物分泌到细胞外, 且其

蛋白产物无过度糖基化<sup>[10]</sup>。为了研究 *peaT2* 基因的功能, 本文通过 PCR 扩增技术克隆 *peaT2* 基因到表达载体 pPIC9K 上, 实现 *peaT2* 基因的真核表达并确定表达蛋白对小麦幼苗和根的促生作用, 该研究为将来进一步研究该基因的功能打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试材料:** 小麦品种 CA0045 (中抗) 由本实验室保存。

**1.1.2 基因、菌株和质粒:** 含细极链格孢菌 *peaT2* 基因的质粒 pDEST17-*peaT2*、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 和分泌型酵母表达载体 pPIC9K 都由本实验室保存, pMD18-T (TaKaRa 公司)。

**1.1.3 主要试剂:** 限制性内切酶 *Eco*R I、*Not* I、*Sac* I (TaKaRa 公司), *Taq* 酶、蛋白质分子量标准 (TransGen 公司), T4 DNA 连接酶 (NEB 公司), 氨苄青霉素钠、卡那霉素、G418、D-生物素 (Merck 公司), 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒 (OMEGA 公司), 酵母培养基 Pepton、酵母无氨基酸基本氮源培养基 YNB (Difco 公司), 酵母提取物和蛋白胨 (OXOID 公司), 一抗 (实验室自制), 碱性磷酸酶羊抗兔二抗 (友

基金项目: 国家“973 项目”——重点基础研究发展计划 (2003CB114204), 北京市重大项目 (D0706005040431)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-68919562, E-mail: zenghongmei@hotmail.com

作者简介: 刘文平 (1979 - ) 男, 昆明人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: xisnow2000@163.com

收稿日期: 2006-11-21, 接受日期: 2007-01-25, 修回日期: 2007-01-31

谊中联公司)其它生化试剂均为国产分析纯试剂。

## 1.2 *peaT2* 基因的扩增及其表达载体的构建和鉴定

根据细极链格孢菌 *peaT2* 基因序列设计 PCR 引物。上游引物 P1 :5'-GGAATTCATGGCCCGATA CCTACCTC-3', 下游引物 P2 :5'-TTGCGGCCGCTGAC CTCAGGCCCAACAAGAAG-3'。下划线部分序列分别带有限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 的识别位点。PCR 反应采用 20 $\mu$ L 体系, PCR 反应条件 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。在 1% 琼脂糖凝胶电泳并回收 PCR 扩增产物。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接并转化 DH5 $\alpha$ 。转化菌液涂布在含氨基青霉素钠的 LB 平板上过夜, 挑选阳性克隆子用 PCR 方法鉴定并送三博远志测序。用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切酵母表达质粒 pPIC9K 和成功重组的 pMD18-T/*peaT2* 质粒, 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, 连接产物转化宿主菌 DH5 $\alpha$ 。转化菌液涂布在含卡那霉素的 LB 平板上过夜, 挑选阳性克隆子用 PCR 方法鉴定并送三博远志测序, 鉴定重组质粒 pPIC9K/*peaT2*。

## 1.3 重组质粒转化毕赤酵母菌及转化子的筛选和 PCR 检测

按文献 [11] 的方法将酵母菌 GS115 制备成感受态, 电转经 *Sac* I 线性化的 pPIC9K 和 pPIC9K/*peaT2* 质粒, 分别涂布于 MD 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 孵育 2~4d。转化子的筛选参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书的方法进行, 将 His<sup>+</sup> 的阳性转化子用无菌水稀释 (1 OD<sub>600</sub> 值相当于 5  $\times$  10<sup>6</sup> 的酵母细胞), 然后用 10<sup>5</sup> 的细胞分别涂布于含 G418 抗生素浓度逐渐增高的 G418-YPD (0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0g/L) 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 4d。选取能抗 G418 且生长良好的菌株作为表达株, 并挑取菌落的一半放到 eppendorf 管中, 加入 10 $\mu$ L TE (pH8.0), 放入液氮 3min 后取出置于 37 $^{\circ}$ C 迅速化冻, 并取出 3 $\mu$ L 为模板, 用 pPIC9K 载体上的配对引物扩增 pPIC9K 载体上的 AOX1 基因, 上游引物为 :5'-CTACTATTGCCAGCATTGCTGC-3', 下游引物 P2 :5'-GGCAAATGGCATTCTGACATCCTC-3'。PCR 扩增方法同上, PCR 产物电泳检测。

## 1.4 表达菌株的诱导表达和表达产物的 Western blot 鉴定

取阳性的转化子进行诱导表达, 挑取单菌落接种于 20mL BMGY 培养基中, 以 30 $^{\circ}$ C、250r/min 振荡培养 24h 至 OD<sub>600</sub> 约为 4.0。离心收集菌体, 用

100mL 含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基重悬培养, 诱导 *PeaT2* 蛋白的表达。取样时间参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书的方法进行, 分别于 6h、12h、24h、36h、48h、60h、72h、84h、96h 取样, 每次收集菌液 1mL 并补充 1mL BMMY 培养基和 100% 甲醇 500 $\mu$ L 于诱导培养容器中, 共诱导表达 4d。样品经离心后收集上清, 用于 12% 的 SDS-PAGE 分析、Western blot 检测分析及生物活性测定。

## 1.5 生物活性测定

用 *peaT2* 基因的表达蛋白原液 (初始浓度为 0.2 $\mu$ g/mL) 10 倍稀释液、100 倍稀释液、500 倍稀释液、1000 倍稀释液浸泡健康饱满的小麦种子 8h, 同时用相应浓度空质粒表达液处理小麦种子作为对照。然后用吸水纸吸干残液, 置入垫有湿润滤纸的洁净培养皿中, 于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。每皿 15 粒种子, 每处理 4 次重复。每天调查小麦的生长势, 分别于 24h、48h 测量小麦的株高和 72h 时测量小麦的株高及根长。

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建

从细极链格孢菌表达文库获得的阳性克隆子, 序列分析结果表明, 插入的 DNA 片段含有完整的开放阅读框架。*peaT2* 基因的编码序列长度为 849bp, 编码 283 个氨基酸。根据 *peaT2* 基因的序列设计引物, PCR 扩增不含终止子的 846bp。以 pDEST17-*peaT2* 质粒为模板, 应用引物 P1 和 P2 PCR 扩增出长度为 863bp 的片段。利用 pMD18-T 载体的 T-A 克隆原理把胶回收回来的目的 DNA 片段插入到该载体中, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  并涂布含氨基青霉素钠的 LB 平板, 挑取阳性克隆子用 PCR 法鉴定, 并送三博远志公司测序, 测序结果表明扩增产物序列正确。pMD18-T/*peaT2* 及表达载体 pPIC9K 两个质粒用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后电泳, 并回收目的片段。将两个目的片段用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化宿主菌 DH5 $\alpha$  并涂布含卡那霉素的 LB 平板, 挑取阳性克隆子用 PCR 法确认并送三博远志公司测序, 测序结果表明 *peaT2* 基因被正确地插入到 pPIC9K 质粒中。

### 2.2 表达菌株的筛选

将线性化的重组表达载体 pPIC9K/*peaT2* 和空载体 pPIC9K 分别电转化导入毕赤酵母 GS115 后, 并分别涂布于 MD 平板上。为了获得含多拷贝 *peaT2* 基因的菌株, 待 His<sup>+</sup> 菌落长出, 收集菌落, 用含不

同浓度 G418 抗生素的 YPD 平板筛选后, 获得 12 株能在含 G418 抗生素高浓度平板上生长良好的菌落, 采用 PCR 法对这些重组子进行鉴定。用 pPIC9K 载体上的配对引物扩增 pPIC9K 载体上的 AOX1 基因, 电泳结果表明, 挑选的重组子经菌落 PCR 扩增后电泳都得到一条与预期设想大小片段相符合的 DNA 条带, 可知 *peaT2* 基因片段在毕赤酵母中转化成功。随机挑选一株重组子, 作为蛋白表达的发酵菌株。

### 2.3 蛋白的表达及表达产物的检测

挑取的表达菌株先接种于 20mL BMGY 培养基中, 振荡培养至  $OD_{600}$  约为 4.0, 离心收集活化好的菌体, 再用含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基重悬菌体, 诱导 *PeaT2* 蛋白的表达。取样时间参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书的方法进行, 分不同时间段取样, 表达上清经 12% 的 SDS-PAGE 检测; 在诱导培养 72h 时, 阴性对照在相应位置没有条带, 而 *PeaT2* 的表达上清在该位置出现了蛋白差异带(图 1-A), 大小约为 36kDa, 与预想的结果相符合, 并且在这个时间段表达量达到了最大量。进一步的 Western blot 结果(图 1-B)表明这条带可与实验室制备的抗体发生特

异反应。

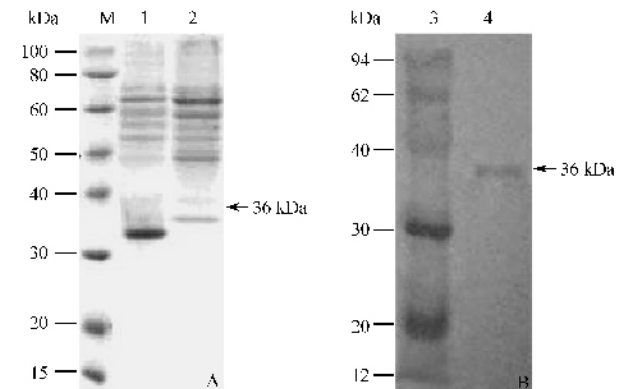


图 1 表达产物 SDS-PAGE (A) 和 Western Blot (B) 检测  
Fig.1 Expressed products analyzed by SDS-PAGE and Western blot.  
M. Protein marker; 1. Expression product; 2. Negative control; 3. Protein marker; 4. Western blot result of expressed protein.

### 2.4 生物活性测定

表达蛋白处理对小麦种子生长势和幼根的影响, 先用各种不同浓度的蛋白溶液浸泡小麦种子 8h, 再培养小麦 24h、36h、48h 和 7d。表 1 为对照和表达蛋白(*PeaT2* 蛋白)处理的小麦株高和幼根的情况。

表 1 表达蛋白处理小麦种子对幼苗株高和幼根生长的影响(mm)

Table 1 Effect of different concentrations of expression protein on the seedling growth and root growth of wheat (mm)

Sample	Seedling growth				Root growth 7d
	24h	36h	48h	7d	
CK	1.080 ± 0.404B	4.989 ± 1.575a	12.370 ± 4.477a	51.683 ± 9.016b	43.879 ± 8.007a
Expression protein	1.431 ± 0.450A	5.336 ± 1.956a	13.213 ± 3.955a	54.275 ± 8.874a	45.310 ± 9.059a
10 × CK	1.747 ± 0.455B	9.694 ± 1.392B	22.503 ± 3.528a	50.460 ± 9.834a	42.187 ± 9.634B
10 × Expression protein	2.374 ± 0.438A	13.618 ± 1.904A	21.619 ± 4.262a	50.221 ± 6.556a	47.839 ± 7.157A
100 × CK	2.963 ± 0.474B	14.407 ± 1.995a	25.065 ± 4.948b	47.856 ± 8.224b	42.812 ± 9.284B
100 × Expression protein	3.424 ± 0.497A	14.491 ± 1.941a	26.875 ± 3.703a	49.418 ± 7.690a	47.956 ± 10.094A
500 × CK	3.303 ± 0.619a	14.346 ± 1.954a	25.458 ± 4.459a	48.485 ± 8.204a	44.352 ± 7.011a
500 × Expression protein	3.725 ± 0.562a	14.868 ± 1.882a	26.369 ± 4.368a	49.928 ± 8.949a	46.457 ± 11.493a

Different letter represented different significant difference.

从表 1 的数据结果可以看出对小麦株高的影响, 在 48h 内用表达蛋白原液(*PeaT2* 蛋白)处理的小麦和对照间没有显著性差异, 可能是由于蛋白浓度过高促进小麦生长的作用效果不明显, 但在 7d 时能明显观察到小麦的生长要比对照处理的好; 在用 10 倍表达蛋白稀释液(*PeaT2* 蛋白)处理小麦, 初期具有促进小麦生长的作用, 后期与对照之间没有显著性差异; 在用 100 倍表达蛋白稀释液处理的小麦与对照相比, 能明显促进小麦的生长, 在小麦萌芽初期更能明显观察到促进小麦生长的作用; 500 倍表达蛋白稀释液对小麦作用效果不明显。本试验也用 1000 倍表达蛋白稀释液处理了小麦, 效果不显著, 可能是由于表达蛋白浓度过稀。从用不同浓度的表

达蛋白处理小麦结果分析可以得知, 100 倍表达蛋白稀释液是比较适宜的处理浓度。

从表 1 的数据结果可以看出对小麦幼根的影响; 用表达原液处理的小麦与对照没有显著性差异, 与生长势结果相似; 用 10 倍表达蛋白稀释液处理的小麦与对照相比较有显著性差异; 用 100 倍表达蛋白稀释液处理的小麦也有比较显著性的差异; 而用 500 倍表达蛋白稀释液处理的小麦作用效果不显著, 1000 倍的表达蛋白稀释液, 结果没有显著性差异。在小麦的生长过程中也可以明显观察到表达蛋白(*PeaT2* 蛋白)处理过的小麦的根比对照的根先长出, 在小麦生长过程中不仅表达蛋白(*PeaT2* 蛋白)处理过的小麦的根其长度明显优于对照, 还可以明

观察到表达蛋白处理过的小麦的根比对照的先长出,且粗壮、须根多。在测量小麦根长时,其长度也明显优于对照。结合表1的结果分析,100倍表达蛋白稀释液是适宜的处理浓度。

### 3 讨论

植物体内存在一系列潜在的、与生长抗病有关的基因,在一定的条件下,某些基因可以被诱导表达,从而使植物产生过敏、抗性或刺激生长等各种反应<sup>[12]</sup>。病原微生物和其它微生物产生的激发子包括真菌的葡聚糖、糖蛋白、脂类物质和其他细胞壁组分,细菌细胞壁结构组分中的脂多糖和鞭毛蛋白,病毒的外壳蛋白,线虫口针和头部的糖蛋白等<sup>[13]</sup>。蛋白激发子是一类能诱导植物产生防卫反应的化合物,也是一类重要的信号分子,它通过与植物细胞膜或其它细胞组分中的受体分子结合,诱导植物在病原侵染点或及其附近组织发生过敏性细胞坏死反应,并通过 SA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等信号分子的传导使整株植物产生系统获得抗性<sup>[14]</sup>。

蛋白比对结果表明,在已知功能的蛋白中,本文中 *peaT2* 基因编码的蛋白与 *Saccharomyces cerevisiae* 的 Prohibitin<sup>[15]</sup> 的同源性最高,为 76%。Prohibitin 是广泛分布于细菌、植物、酵母、原虫及哺乳类等各种生物细胞中的一类保守蛋白,在生物体中对细胞生长、分化、衰老等诸多方面起到重要的作用<sup>[16]</sup>。有关 Prohibitin 的研究大多集中在动物细胞和酵母,最近有文献报道在矮牵牛花的 Prohibitin 编码基因具有影响矮牵牛的发育和衰老的功能<sup>[17]</sup>。植物中 Prohibitin 类似蛋白在玉米、水稻、烟草和拟南芥中也有报道,但其生物功能尚不清楚。到目前为止,来源于丝状真菌的类似的基因研究尚未见有关文献的报道。

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<sup>[18]</sup>,也存在糖基化修饰<sup>[10,18]</sup>的特点,因此更适合研究来自真核生物基因的生物学功能。本实验将来源于细极链格孢菌的 *peaT2* 基因克隆到毕赤酵母表达质粒 pPIC9K 上,通过甲醇诱导获得了 *peaT2* 基因的表达蛋白。前人研究已证明,糖基化修饰可以造成蛋白实际分子量和理论分子量的差别,郭润芳等<sup>[19,20]</sup>在毕赤酵母系统表达嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定几丁质酶基因,表达蛋白的大小比理论推算的大小大 2kDa,分析是由于糖基化位点造成的。本文根据 *peaT2* 基因的序列分析,*peaT2* 基因的编码蛋白分子量理论值应为

31.2kDa,而表达蛋白在 12% SDS-PAGE 上的分子量约为 36kDa,推测也可能是由于糖基化修饰所造成的。生测实验结果表明适当浓度的表达蛋白(如 100 倍稀释液)处理小麦,对小麦的株高和根长有明显的促进作用,并且对根的作用明显优于幼苗。可以推测来自 *Alternaria tenuissima* 的 *peaT2* 基因的表达蛋白与植物的生长有关系,具有蛋白激发子的功效。为了进一步确定该表达蛋白的功能,尚需在其他作物上确定。本文首次采用真核表达系统表达 *peaT2* 基因并确定了表达蛋白对小麦生长的促进作用,该研究为进一步研究 *peaT2* 基因的功能奠定了基础,对 *PeaT2* 的功能阐述提供了可靠的实验依据。

### 参 考 文 献

- [1] 彭金英,黄勇平. 植物防御反应的两种信号转导途径及其相互作用. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(4): 347 - 353.
- [2] Maleck K, Levine A, Eulgem T, et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 403 - 410.
- [3] Reymond P, Weber H, Damond M. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000, 12(5): 707 - 719.
- [4] Yu LM. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4088 - 4094.
- [5] Cruickshank IAM, Perrin DR. The isolation and partial characterization of monilicolin A, A polypeptide with phaseolin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci*, 1968, 7(20): 449 - 458.
- [6] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质. 中国:CN1344727A. 2002.
- [7] 龙松华,张宁,邱德文等. Gateway 技术构建交链孢菌 JH505 cDNA 文库. 微生物学报, 2005, 45(6): 963 - 965.
- [8] Bathuat IC. Protein expression in yeast as approach to production of recombinant malaria antigens. *Am Trop Med Hyg*, 1994, 50(4): 20 - 26.
- [9] Thomas K, Annette FP, Morten H. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29(1): 79 - 86.
- [10] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45 - 66.
- [11] Scorer CA, Clare JJ, Mccombie WR, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia Pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio Technol*, 1994, 12(2): 181 - 184.
- [12] Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Cell*, 2006, 10(2): 353 - 363.
- [13] Hahn MG. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu*

- [ 14 ] Hamm ond-Kosack KE , Jones JDG. Resistance gene dependent plant defence response. *Plant Cell* , 1996 , **8** ( 10 ) : 1773 – 1791 .
- [ 15 ] Dujon B , Albermann K , Aldea M , *et al.* The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature* , 1997 , **387** : 98 – 102 .
- [ 16 ] Nijmans LG , Artal SM , Grivell LA , *et al.* The mitochondrial PHB complex : roles in mitochondrial respiratory complex assembly , ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* , 2002 , **59** ( 1 ) : 143 – 155 .
- [ 17 ] Chen JC , Jiang CZ , Reid MS. Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *Plant* 2005 , **44** ( 1 ) : 16 – 24 .
- [ 18 ] Ludovic O , Eric R , Sonia L , *et al.* Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 and expression in *Pichia pastoris* . *Biochem* , 2000 , **267** ( 6 ) : 1619 – 1625 .
- [ 19 ] 郭润芳 , 李多川. 嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定几丁质酶基因的 cDNA 克隆及表达. 微生物学报 , 2006 , **46** ( 1 ) : 99 – 103 .
- [ 20 ] Grinna L , Tschopp JF , Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast , *Pichia pastoris* . *Yeast* , 1989 , **5** : 107 – 115 .

## Expression of *Alternaria tenuissima* *peaT2* gene in *Pichia pastoris* and its function

LIU Wen-ping<sup>1</sup> , ZENG Hong-mei<sup>2\*</sup> , LIU Yan-feng<sup>2</sup> , YUAN Jing-jing<sup>2</sup> , QIU De-wen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Plant Protection , Southwest University , Chongqing 400716 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Plant Protection , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China )

**Abstract** : A positive clone was screened from *Alternaria tenuissima* expression library . The result of sequencing and gene analysis indicated that the cloned DNA fragment has a complete ORF , which was named *peaT2* ( Protein Elicitor from *Alternaria tenuissima* 2 ) with the GenBank accession number EF212880 . The gene was amplified by PCR and subcloned into the pPIC9K of *Pichia pastoris* expression system . The resulting recombinant plasmid pPIC9K/*peaT2* was verified by sequencing and digested by *Sac* I . The linearized DNA was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation . By means of MD and G418-YPD plates and PCR , the recombinant *P. pastoris* strains ( his<sup>-</sup> mut<sup>+</sup> ) were obtained . A recombinant clone cultivated on YPD plate with high concentration of G418 was randomly selected as expression strain . The protein expression was induced by methanol and analyzed by 12% SDS-PAGE . The results of SDS-PAGE and Western blot indicated that this gene was expressed successfully in *P. pastoris* with the induction of methanol . In BMMY culture medium , the expressed protein reached its maximum amount at 72h , whereas no corresponding protein was detected in the negative control . Bioassay was performed with the expressed protein . After soaking with the expressed protein for 8h , wheat seeds were cultured , the height of seedlings was measured after 24h , 36h , 48h , 7d , respectively , and the root length was measured after 7 days . The results showed that the expressed protein can promote seeding growth and root length obviously in appropriate concentration . It is revealed that *PeaT2* can act as protein elicitor .

**Keywords** : *peaT2* ; protein elicitor ; *Alternaria tenuissima* ; *Pichia pastoris* expression system

Foundation item : Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development ( 2003CB114204 ) ; Beijing Grant Project ( D0706005040431 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-68919562 ; E-mail : zenghongmei@hotmail.com

Received : 21 November 2006 / Accepted : 25 January 2007 / Revised : 31 January 2007

更正 : 发表在本刊 2007 年第 1 期第 110 ~ 114 上的论文《红树林样品不经分离的微生物群体培养物生物活性研究》中有误 , 两个阳性药物写反了 , 即 “ 1.3 ” 节倒数第 5 行的 “ 氟康唑 ” 应为 “ 硫酸卡那霉素 ” , 倒数第 3 行中的 “ 硫酸卡那霉素 ” 应为 “ 氟康唑 ” 。 特此更正 !