

极细链格孢菌 *peaT1* 基因在毕赤酵母中的表达与功能分析

刘延锋, 曾洪梅, 玉山江, 杨秀芬, 毛建军, 邱德文

中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100081

摘要: 建立了在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中分泌表达 PeaT1 蛋白的技术。将来源于极细链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的基因 *peaT1* 亚克隆至酵母分泌型表达载体 pPIC9K, 构建了重组表达载体 pPIC9K-*peaT1*, 分别用 *Sal* I 或 *Bgl* II 酶切线性化后电击转入毕赤酵母 GS115 菌株中, 经 MD 平板筛选、PCR 鉴定获得整合有外源基因的重组菌株。在 α -Factor 及 AOX1 基因启动子和终止信号的调控下, PeaT1 在酵母中大量表达并分泌到胞外, SDS-PAGE 检测表明表达蛋白的表观分子量约为 35 kD。表达蛋白上清稀释液能诱导烟草产生对 TMV 的抗性, 其枯斑数抑制率可达到 30.37%。每升表达上清液经超滤浓缩和离子交换层析可纯化目的蛋白 16.13 mg, 该纯化蛋白能显著地促进小麦幼苗的生长。

关键词: *peaT1*, 极细链格孢菌, 毕赤酵母

Expression of *peaT1* gene from *Alternaria tenuissima* in *Pichia pastoris* and its function

Yanfeng Liu, Hongmei Zeng, Shanjiang Yu, Xiufen Yang, Jianjun Mao, and Dewen Qiu

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In this study, *peaT1* gene was subcloned into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K, which contained both the methanol-inducible promoter and the transcription terminator of the AOX1 gene, resulting the plasmid pPIC9K-*peaT1*. The recombinant plasmid was linearized by *Sal* I or *Bgl* II and transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation method. Recombinant strain was screened by Minimal Dextrose Medium and further confirmed by PCR. The gene was in frame integrated into the *Pichia* genome through homologous recombination, resulting the recombinant strain. Regulated by the α -Factor, promoter of AOX1 gene and termination signal of yeast genomic, the recombinant protein was expressed and secreted into the supernatant. The SDS-PAGE analysis indicated that the apparent molecular weight of target protein was about 35 kD. Bioassay results showed that the inhibition rate of the expressed protein against TMV was 30.37%. The supernatant was collected and then purified by anion exchange chromatography. This protein can promote seedling growth of wheat obviously.

Keywords: *peaT1*, *Alternaria tenuissima*, *Pichia pastoris*

Received: March 27, 2008; **Accepted:** December 29, 2008

Supported by: National Basic Research Program of China (973 program) (No. 2003CB114204), National High-tech Research and Development Program (863 program) (No. 2006AA10A210), National Natural Science Foundation of China (No. 30571252).

Corresponding author: Dewen Qiu. Tel: +86-10-82109562; E-mail: dewenqiu@hotmail.com

国家重点基础研究发展规划项目(973 项目)(No. 2003CB114204), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA10A210), 国家自然科学基金项目(No. 30571252)资助。

极细链格孢菌是一种常见的环境真菌,属于菌物界半知菌亚门链格孢属。链格孢菌对环境适应性强,可在恶劣的条件下生存,寄主广泛,能够引起多种植物病害;同时链格孢菌还能作为一种生物资源广泛地应用于生物防治、品种选育等方面。据 Spurr 报道,用从烟草上分离的非病原菌 *A. alternata* 的孢子悬浮液喷施烟草,对烟草赤星病的防治效果在室内为 25%~60%,大田为 65%^[1];有研究表明,*A. solani* 的培养滤液中存在抗菌活性物质链格孢酸,它对黄瓜灰霉病和油菜菌核病的防治效果分别达 82.7%和 83.3%^[2]。2000 年邱德文从 *A. tenuissima* 中提取获得一类新型蛋白激酶,它能通过某种途径促进植物生长和使植物产生对病虫害的抗性^[3]。本实验室在研究该类蛋白的过程中,从 *A. tenuissima* JH505 菌株中分离纯化获得一种能诱导植物产生系统抗性、促进植物生长的蛋白 PeaT1,其表观分子量约为 35 kD^[4];同时本实验室克隆了编码该蛋白的基因 *peaT1*(GenBank Accession No. EF030819)并在大肠杆菌中获得了表达,确定了表达蛋白具有诱导烟草抗 TMV 和促进小麦生长的功能。巴斯德毕赤酵母表达系统具有表达量高、能进行蛋白质翻译后修饰、遗传稳定性较好、容易大规模生产、成本低等特点,目前已有数百种蛋白在此系统中成功表达,且有的蛋白的表达量达到每升十几克^[5]。本研究在此基础上,利用基因工程技术将基因 *peaT1* 亚克隆至酵母表达载体 pPIC9K 中,转化毕赤酵母菌 GS115,获得了可分泌表达 PeaT1 的重组菌株,应用基本盐培养基进行甲醇诱导表达,并对表达产物进行了纯化。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

含有 *peaT1* 基因的原核表达载体 pGEX-6p-1-*peaT1* 由本实验室构建。*P. pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen)用于外源蛋白的表达,*P. pastoris* 整合型分泌表达质粒 pPIC9K(Invitrogen)用于在 GS115 中表达外源蛋白,由本实验室保存。

1.2 酶与试剂

限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品,Marker III、低分子量蛋白质标准购于 TransGen 公司,T4 DNA 连接酶购于 NEB 公司,氨苄青霉素、G418、D-生物素购于 Merck 公司,酵母无氨基酸基本氮源培养基

YNB 购自 Difco 公司,酵母提取物和蛋白胨购自 Oxoid 公司,其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 重组酵母表达载体 pPIC9K-*peaT1* 的构建

用 *EcoR*I 和 *Not*I 分别双酶切 pGEX-6p-1-*peaT1* 和 pPIC9K 质粒 DNA,凝胶电泳回收目的条带,按照分子克隆手册^[6]进行连接、转化和阳性克隆的筛选。

1.4 酵母的电击转化

毕赤酵母感受态细胞的制备、转化与表型筛选参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册 (Invitrogen Corporation. A manual of methods for expression of recombinant proteins. USA) 进行。酵母电击转化在 Bio-Rad Gene Pulser 电转化仪上进行。

1.5 重组酵母的 PCR 鉴定

按文献^[7]利用煮-冻-煮方法制作重组酵母 PCR 模板,以 5'端 α -factor primer: 5'-TACTATTGCCAG CATTGCTGC-3'与 3'端 *peaT1* 序列 primer: 5'-CCGC TCGAGCTATATGCTCAGCGCCATGAT-3'进行 PCR 扩增,拟扩增一段约 800 bp 的片段。PCR 反应条件: 95°C 3 min; 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 35 s, 进行 30 个循环; 72°C 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6 重组酵母的诱导表达

选取 PCR 鉴定正确的重组酵母 GS115/pPIC9K-*peaT1* 参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行诱导表达。

1.7 表达上清液对烟草花叶病毒的抑制作用

将三生烟的种子播在防虫温室中 22°C~28°C 下土培生长,待长至 3~4 叶龄时移至直径为 13 cm 的花盆中。选取长势一致的用 100 倍表达上清稀释液,对三生烟进行喷雾处理,清水作空白对照。72 h 后摩擦接种 TMV 病毒(以病叶重/0.01 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液=1 g: 20 mL 的比例研磨成匀浆),以每叶约 150 个枯斑为宜。待出现明显枯斑后,记录枯斑数,计算抑制率=[1-(处理枯斑数/对照枯斑数)] \times 100%。

1.8 表达蛋白的分离纯化

表达上清液经 10 kD 超滤管超滤除掉小分子和盐后,利用 AKTA explorer 10 蛋白纯化仪选用离子柱 HiTrapTM DEAE FF(1 mL)参照文献^[4]进行离子交换层析,BCATM Protein Assay Kit 测定蛋白含量。

1.9 纯化蛋白对小麦幼苗生长的影响

取籽粒饱满的小麦种子(中抗 CA0045), 消毒后用 2.5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化蛋白浸种 8 h, 每处理 15 粒种子, 置于铺有滤纸直径为 9 cm 的培养皿中, 以相同浓度的 BSA 和清水为对照, 重复 3 次。当发芽至约 1 cm 后, 移入 15°C 光照培养箱(光照周期 12L:12D)进行低温胁迫处理, 于第 7 天时测量株高和根长。

2 结果

2.1 重组酵母表达载体 pPIC9K-*peaT1* 的构建

构建含有 *peaT1* 基因表达片段的重组表达载体 pPIC9K-*peaT1*, 用 *EcoR* I 和 *Not* I 从 pGEX-6p-1-*peaT1* 上切下 *peaT1* 片段, 与同样双酶切处理的 pPIC9K 连接。酶切及序列分析证实, *peaT1* 基因以正确的阅读框架与酵母表达载体 pPIC9K 的 α 因子信号肽序列的 3' 端融合。

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

随机挑取 5 个经 PCR 鉴定正确的阳性转化子进行诱导表达。72 h 后离心取上清液, SDS-PAGE (分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%) 电泳分析。结果见图 1, 5 个阳性转化子经甲醇诱导后上清液中均有一条约 35 kD 大小的蛋白带, 而对照的上清液在相应位置没有条带, 表明目的蛋白得到了分泌表达。

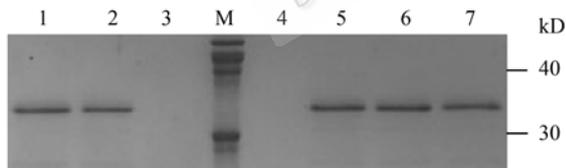


图 1 GS115/pPIC9K-*peaT1* 表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed PeaT1 from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-*peaT1*. M: protein marker; 1, 2, 5, 6, 7: GS115/pPIC9K-*peaT1*; 3, 4: GS115/pPIC9K.

表 1 纯化蛋白浸种处理小麦种子对幼苗生长的影响

Table 1 Effect of purified protein on the growth of wheat (cm)

Sample	Seedling growth			Root growth		
	2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PeaT1	6.08±0.17A	7.42±0.24A	5.34±0.16C	5.71±0.03A	7.13±0.12A	4.98±0.28A
BSA	3.25±0.53B	4.31±0.58C	4.98±0.28C	2.33±0.60B	3.59±0.72C	3.80±0.57C
CK		4.99±0.05C			4.00±0.09C	

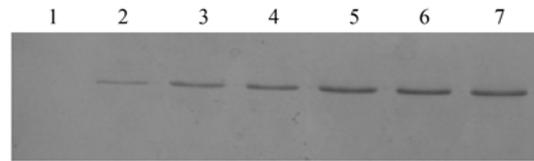


图 2 不同甲醇诱导时间蛋白表达变化的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis the expression of PeaT1 in different time after induction with methanol. 1-7: result of strain 5 after 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h induction respectively.

本实验进一步研究了 5 号转化子蛋白表达量与诱导时间的关系, 将其连续诱导培养 7 d, 每隔 24 h 取样, 上清液经处理后 SDS-PAGE 电泳分析。从图 2 可以看出甲醇诱导的分泌型表达产物随时间的变化而变化, 第 1 天即有表达产物的出现但表达量较低, 随着表达时间的延长, 表达量也逐步增高到第 4 天达到最高, 之后基本保持稳定。

2.3 表达上清液对烟草花叶病毒的抑制作用

三生烟经表达上清稀释液喷雾处理后, 每株枯斑数均值为 249.27, 而对照为 359.44, 在 0.05 显著水平下差异显著, 枯斑数抑制率为 30.37%, 枯斑大小也普遍比对照要小, 表明稀释的表达上清液可以提高烟草对 TMV 的侵染作用。

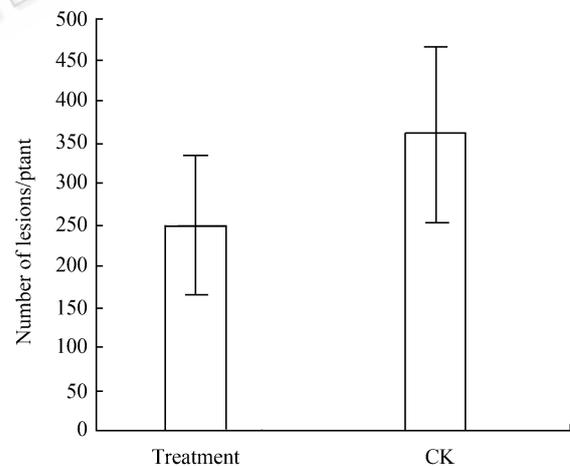


图 3 表达上清液对烟草花叶病毒的抑制作用

Fig. 3 The inhibition effect of expressed protein against TMV.

2.4 表达蛋白的分离纯化及其对小麦幼苗生长的影响

实验结果表明重组蛋白 PeaT1 也可被 0.4 mmol/L NaCl 洗脱下来, 与直接从极细链格孢菌中纯化 PeaT1 蛋白的结果一致^[4]。

有研究表明, PeaT1 蛋白浸种处理可以显著地促进小麦根系的生长, 因此本试验研究了纯化的重组蛋白 PeaT1 对小麦幼苗生长的影响。由表 1 可以看出, 经 2.5、10 和 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PeaT1 重组蛋白浸种处理的小麦, 株高和根长均高于相同浓度的标准蛋白 BSA 和清水对照, 并且在 0.05 显著水平下差异显著, 只有经 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PeaT1 处理的株高在 0.05 显著水平下差异不显著。本试验也用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PeaT1 重组蛋白处理小麦, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果和同浓度的 BSA 间差异不显著, 可能是由于浓度低; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小麦株高和根长要明显高于相同浓度的 BSA。由此, 可以得出 PeaT1 重组蛋白浸种处理能够显著地促进小麦幼苗的生长。从不同浓度的 PeaT1 重组蛋白处理小麦的结果分析可以得知, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 是比较适宜的处理浓度。

3 讨论

1972 年, Keen 等首先将来源于微生物并和微生物一样能诱导植物产生植保素的化合物命名为激发子^[8]。蛋白激发子是一类能激发植物防御反应基因表达与过敏性反应的特殊信号蛋白活性物质^[9]。目前, 在植物-病原菌互作中已发现多种蛋白激发子, 包括疫霉属(*Phytophthora*)产生的 Elicitins^[10]和梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)中产生的 Harpins^[11]等。2007 年本实验室从极细链格孢菌中分离纯化获得一种新型蛋白激发子, 命名为 PeaT1。

蛋白质功能结构域分析结果显示, PeaT1 蛋白由 N 端的 NAC 功能域和 C 端的 UBA 功能域构成, 初步推断 PeaT1 蛋白属于一种 α -NAC 蛋白。NAC 蛋白在真核生物中普遍存在, 是广泛分布于酵母、植物、哺乳动物等各种生物中的一类保守蛋白, 多数由 α -NAC 和 β -NAC 两个亚基组成。NAC 蛋白最早是通过亲和纯化的方法从牛脑中纯化出来的, 能与 SRP 竞争性结合刚从核糖体上合成的多肽^[12]。Masanori 等研究发现烟草(*Nicotiana benthamian*) NbNACa1 蛋白(α -NAC)能通过调节雀麦镶嵌病毒

移动蛋白在胞间联丝的定位, 从而能够影响病毒粒子在烟草细胞间的扩散^[13]。PeaT1 蛋白可能具有类似的功能, 本研究也证实表达上清 100 倍稀释液与对照相比, 对 TMV 的枯斑数抑制率可以达到 30.37%。Yang 等研究发现烟草 NbBTF3(β -NAC)编码基因沉默后, 可在转录水平上使一些质体和线粒体的编码基因的量大大降低, 从而导致叶片形态的不正常和变黄, 影响植株的生长^[14]。本实验室通过酵母双杂交试验证明 PeaT1 能够与拟南芥的 β -NAC 发生相互作用, 因此推测 PeaT1 可能也能与小麦的 β -NAC 蛋白通过某种途径发生相互作用, 从而使小麦 β -NAC 表达量增加, 进而促进小麦的生长。这些推测尚需进一步研究来证明。

本试验选择毕赤酵母表达系统, 使用具有 α 信号肽序列的分泌型酵母表达载体 pPIC9K, 构建了毕赤酵母表达载体 pPIC9K-peaT1, 采用廉价的基本盐培养基成功的分泌表达了 PeaT1 蛋白, 表达的目的蛋白不易降解。每升表达上清经超滤浓缩和离子交换层析可纯化目的蛋白 16.13 mg, 和在大肠杆菌中的差不多。但由于酵母菌自身分泌的蛋白成分少, 并且其培养基中的组成成分简单, 给下游纯化带来了极大的方便, 克服了 PeaT1 在大肠杆菌中表达后需要经过离心收集菌体和超声破碎细胞才能获得表达蛋白的缺点, 降低了生产成本, 且纯度也可以达到更高。有研究表明, 酵母表达的蛋白激发子 Harpin_{Xooc} 在诱导烟草产生过敏反应和促进烟草生长的活性要高于在大肠杆菌表达的 Harpin_{Xooc}^[15]。至于在酵母中表达的 PeaT1 的活性是否比在大肠杆菌中的要高, 尚需进一步研究来证明。

SDS-PAGE 结果表明目的蛋白在总蛋白中的比例很高, 几乎看不到其他杂蛋白, 凝胶扫描分析显示目的蛋白占蛋白总量的 60% 左右。William 研究发现牛脑 α -NAC 在 SDS-PAGE 电泳胶上的分子量约为 33 kD, 而通过质谱分析获得的分子量为 23.49 kD, 说明 α -NAC 类蛋白具有非正常的电泳迁移率^[16]。本试验中也存在类似结果, 重组 PeaT1 蛋白在 SDS-PAGE 电泳胶上的表观分子量约为 35 kD, 而根据核酸序列推导出其理论分子量约为 22.59 kD。推测表观分子量和实际分子量的差别可能是因为 PeaT1 具有非正常电泳迁移特点的缘故。

不同的发酵条件如培养时间、诱导时间、培养

基组成、培养基 pH、温度、通风量等均会影响蛋白的表达量^[17]。因此下一步需要对发酵条件进行进一步优化, 以提高外源蛋白表达水平, 为后续相关研究提供可靠的实验基础。

REFERENCES

- [1] Spurr HW. Protective applications of conidia of nonpathogenic *Alternaria* sp. isolates for control of tobacco brown spot disease. *Phytopathology*, 1977, **67**: 128–132.
- [2] Li SZ, Yue DX, Liu H, et al. The antifungal active substance in culture filtrate of *Alternaria solani*. *Acta Phytopathol Sin*, 1997, **27**(2): 161–165.
李树正, 岳东霞, 刘准, 等. 茄链格孢菌培养滤液抗菌活性物质的研究. *植物病理学报*, 1997, **27**(2): 161–165.
- [3] Qiu DW. Plant multi-function fungi protein: Chinese patent, CN1344727A. 2002.
邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国专利公开号 CN1344727A. 2002.
- [4] Zhao MZ, Yang XF, Zhang M, et al. Purification and bioactivities of a protein growth-activator from *Alternaria tenuissima*. *Chin J Biol Control*, 2007, **23**(2): 170–173.
赵明治, 杨秀芬, 张明, 等. 一种细极链格孢蛋白激活子的分离纯化及其生物活性. *中国生物防治*, 2007, **23**(2): 170–173.
- [5] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**: 249–270.
- [6] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese).
- [7] Ju H, Liang DC, Guo G, et al. Comparison of four methods to prepare *Pichia* genomic DNA for PCR. *Tianjin Med*, 2003, **31**(5): 270–272.
剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较. *天津医药*, 2003, **31**(5): 270–272.
- [8] Keen NT, Horsch R. Hydroxyphaseollin production by various tissue: a warning against the use of unnatural host-parasite systems. *Phytochem*, 1972, **62**: 439.
- [9] Nümberger T, Brunner F. Innate immunity plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, **5**: 1–7.
- [10] Ricci P, Bonnet P, Huet JC, et al. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 1989, **183**: 555–563.
- [11] Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, **257**: 85–88.
- [12] Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, et al. A Protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 1994, **370**: 434–440.
- [13] Kaido M, Inoue Y, Takeda Y, et al. Down regulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant-micro Inter*, 2007, **20**(6): 671–681.
- [14] Yang KS, Kim HS, Jin UH, et al. Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta*, 2007, **225**(6): 1459–1469.
- [15] He D, Liu J, Gao XW, et al. Secreted expression of Harpin_{Xoo} in *Pichia pastoris* and its bioactivity detection. *Chin J Biol Control*, 2008, **24**(1): 46–52.
何丹, 刘俊, 高学文, 等. Harpin_{Xoo} 蛋白在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性检测. *中国生物防治*, 2008, **24**(1): 46–52.
- [16] Wickner W. The nascent-polypeptide-associated complex: having a “NAC” for fidelity in translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(21): 9433–9434.
- [17] Beierley RA, Bussineau C, Siegel RS, et al. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, **589**: 350–362.