

# 植物防御素 PD5 基因在毕赤酵母中的分泌表达\*

龙良鲲<sup>1</sup> 邓名荣<sup>1</sup> 曲新勇<sup>2</sup> 朱红惠<sup>1\*\*</sup>

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)<sup>1</sup>

(澳大利亚环宇生物反应器有限公司 澳大利亚)<sup>2</sup>

**摘要:** 将植物防御素 PD5 基因克隆到载体 pPIC9 的 *Xho*I 和 *Eco*R I 位点之间, 得到重组载体 pPIC9/PD5。pPIC9/PD5 经 *Bgl* II 线性化, 电转化法转入 *Pichia pastoris* GS115, MD 和 MM 平板筛选表型为 His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup> 的转化子, PCR 鉴定阳性转化子。转化子 D24 用 BMGY 培养至 OD<sub>600</sub> 为 6.0 时, 经 BMM 诱导, 上清液用 Tricinen-SDS-PAGE 可检测到目标条带。同时经平板抑菌试验显示, D24 的诱导发酵上清液可很好的抑制香蕉枯萎菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*) 及甘蓝黑腐菌 [*Xanthomona campestris* (Smith) Dovosen] 的生长。植物防御素 PD5 基因在毕赤酵母中得到表达。

**关键词:** 植物防御素, PD5 基因, 分泌表达, 抑菌活性

**中图分类号:** Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0065-05

## Secreted Expression Plant Defensin PD5 Gene in *Pichia pastoris*\*

LONG Liang-Kun<sup>1</sup> DENG Ming-Rong<sup>1</sup> QU Xin-Yong<sup>2</sup> ZHU Hong-Hui<sup>1\*\*</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of  
Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)<sup>1</sup>

(Huan Yu Biology Reactor Co. Ltd, Australia)<sup>2</sup>

**Abstract:** The plant defensin PD5 gene was cloned into the restriction site between *Xho*I and *Eco*RI of plasmid pPIC9 successfully. The recombinant vector pPIC9/PD5 was linearized with enzyme *Bgl* II and was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electransformation. The transformants were cultured with MD and MM medium plates, and His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup> transformants were isolated. Using PCR method identified true transformants. Transformant D24 was cultured with BMGY medium and induced with BMM medium until the cell density reached an OD<sub>600</sub> = 6.0. The recombinant protein could be detected in the cultured supernatant by Tricinen-SDS-PAGE. Plate test indicated that the supernatant could inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* and *Xanthomona campestris* (Smith) Dovosen evidently. Secreted expression plant defensin PD5 gene in *Pichia pastoris* was successful.

**Key words:** Plant defensin, PD5 gene, Secreted expression, Antimicrobial

植物防御素是一类植物内源性或诱导分泌的抗菌多肽, 其分子量小 (约 5kD, 由 45~54 个氨基酸组成), 呈碱性, 富含半胱氨酸, 具有复杂的三维折叠结构<sup>[1-4]</sup>。其能够抑制一系列植物病原菌 (尤其是丝状真菌) 的生长, 对人、畜及植物细胞无害, 将其应用于植物病害的防治等领域具有广阔的前景。Alves 等曾用酿酒酵母表达了防御素 RS-AFP2, 但表达量较低<sup>[5]</sup>。国内有关植物防御素工程表达的研究报道很少。PD5 是从

\* 广东省科技计划项目 (No. 2003C50204)

广州市科技计划项目 (No. 2004Z3 - K021)

\*\* 通讯作者 Tel: 020-37656629, E-mail: zhuhonghui66@163.net

收稿日期: 2005-12-26, 修回日期: 2006-02-28

澳洲坚果中分离的抗菌多肽，由50个氨基酸组成，含8个半胱氨酸，属植物防御素。通过基因工程的方法对其大量制备，为进一步研究其抗菌特性和机理，以及应用于生产实践具有重要的意义。毕赤酵母表达系统具有易于培养，可高密度发酵，表达量高，诱导表达可用于对毒性蛋白的表达等优点<sup>[6]</sup>。我们借助该系统进行了PD5的表达研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒：质粒 pPIC9，*Pichia pastoris* GS115 (*his4*)，中山大学陆勇军博士惠赠；质粒 PTG/PD5 (含基因 PD5)，*E. coli* Top10；香蕉枯萎菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*) FOC0401，甘蓝黑腐菌 [*Xanthomona campestris* (Smith) Doyosen] XC05，由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂：各种工具酶和 PCR 试剂，购于华美生物工程有限公司；截留分子量 3kD 的超滤管，购于 Millipore 公司；酵母氮源 (YNB)，购于 sigma 公司；琼脂糖、SDS、丙稀酰胺，甲叉双丙稀酰胺等，购于 MBChem 公司；多肽 Marker 购于 BioRad 公司。

1.1.3 培养基：YPD，MD，MM，BMGY，BMMY 等均按 Invitrogen 毕赤酵母表达操作手册配方配制 (www.invitrogen.com)。

### 1.2 方 法

1.2.1 目的基因的获取：根据 PD5 的序列设计引物，引物 P1 的 5' 端引入 *Xho* I 及 *Kex2* 位点；引物 P2 的 5' 端引入 *Eco*R I 位点，序列见表 1。以质粒 PTG/PD5 为模板，用 *pfu*Taq 酶扩增目的基因，电泳检测 (目标片段约 170bp)，纯化备用。

表 1 引物序列

| 引物              | 序列  |
|-----------------|---|
| P1              | 5 'GGC CGC TCGA GAA AAG AGG TAG AAA GCT GTG TG' 3 |
| P2              | 5 'CTG CAG GAA TTC CTA TTA ATG ACA AT' 3          |
| $\alpha$ factor | 5 'TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC' 3'                |
| 3' <i>Aox1</i>  | 5 'GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC' 3                 |

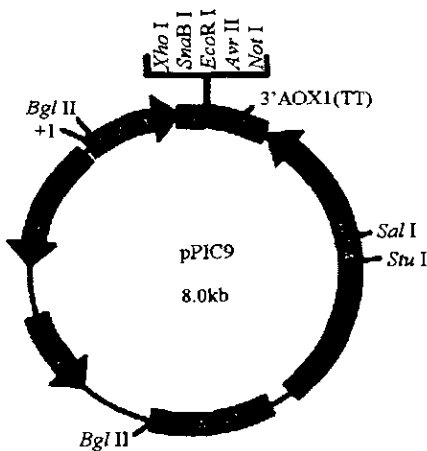


图 1 质粒 pPIC9 的物理图谱

1.2.2 表达载体的构建：参照《分子克隆》的方法<sup>[7]</sup>，PD5 用 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切，产物经纯化后连接至同样酶切的 pPIC9。连接产物转化感受态的 Top10。获取的转化子，以  $\alpha$  因子，3' *Aox1* 为引物 (见表 1)，进行菌落 PCR 筛选阳性转化子。阳性转化子的 PCR 产物大小约为 330bp，本底 pPIC9 的 PCR 产物大小为 195bp。碱裂解法提转化子质粒 DNA，送上海博亚生物工程有限公司测序鉴定。

1.2.3 酵母的转化：取测序正确的重组载体，*Bgl* II 线性化后，参照 Eppendorf 电转化手册 (www.eppendorf.com) 进行电转化 (电转仪，Eppendorf 公司)，pPIC9 作为对照。电转条件：

1,600V, 5mS。取 200 $\mu$ L 转化液涂 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d, 筛选、保存转化子。

**1.2.4 转化子的鉴定:** 表型鉴定, 用灭菌牙签将转化子逐个对应点接到 MD 及 MM 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养, 筛选生长表型为 His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup> (甲醇利用缓慢型) 的转化子。目标基因鉴定, 挑转化子用 MD 液 180r/min, 30 $^{\circ}$ C, 24h 培养, 取 1.5mL 菌液入 1.5mL 离心管, 8,000r/min 离心, 菌体用 100 $\mu$ L TE 液重悬; 加 200 $\mu$ L 裂解液 (2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, PH 8.0), 加 1/3~1/2 体积的无菌石英砂, 高速涡旋 4min; 14,000r/min 离心 5min 收集上清, 酚/氯仿抽提 1 次; 乙醇沉淀 DNA, 20 $\mu$ L (含 RNase) 双蒸水重溶。同 1.2.2, PCR 法筛选阳性转化子。

**1.2.5 转化子诱导表达:** 随机取转化子 10 个 (pPIC9 和 GS115 作为对照) 接种到 50mL BMGY 液中, 30 $^{\circ}$ C、180r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 6, 于 1,500g 离心 5min 收集菌体。菌体用 10mL BMM 液 (pH6.0) 重悬, 30 $^{\circ}$ C, 200r/min 诱导培养。每隔 24h 取 1mL 菌液, 10,000r/min 离心 10min, 并 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜除菌收集上清, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。同时补充终浓度 0.5% 的甲醇, 继续诱导培养。共诱导培养 120h。

**1.2.6 表达产物的 Triciclen-SDS-PAGE:** 取收集的上清, 用 3kD 超滤管浓缩 4 倍。取 10 $\mu$ L, 按张晓楠等的方法<sup>[8]</sup>进行 Triciclen-SDS-PAGE, 银染色观察。目标产物条带大小约 5kD。

**1.2.7 表达产物抑菌活性检测:** 融化的 PSA 培养基 (约 50 $^{\circ}$ C), 加入终浓度 10<sup>5</sup> cfu/mL 的 FOC0401 孢子或 XC05 菌体, 混匀, 制成含菌平板 (厚 5mm)。打孔器打取小孔 ( $\phi$ 4mm), 4 个/板。孔内点接待测上清, 30 $\mu$ L/孔, 30 $^{\circ}$ C 培养, 观察抑菌圈的形成。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组表达载体的构建

PCR 方法扩增的 PD5 基因, 双酶后成功连接到质粒 pPIC9 上。重组载体 pPIC9/PD5 经 PCR 鉴定, 其电泳条带比本底 pPIC9 大 100bp 多, 见图 2。另测序结果显示其碱基序列完全正确。成功获得了含有目标基因的重组表达载体。

### 2.2 重组酵母菌构建

pPIC9/PD5 经 *Bgl* II 线性化后, 电转化法导入 GS115。共获得 49 个转化子, 分别记为 D1、D2、D3...D49。

转化子生长表型鉴定均为 His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup>。随机选取 7 个转化子, D1、D7、D8、D10、D14、D24、D43, 另取一个 pPIC9 的转化子, 以及 GS115 为对照, 提取质粒 DNA。PCR 鉴定表明, D1 的 PCR 产物在 330bp 处无条带, 其余的转化子在 330bp 处有明显条带, 而对照菌株 pPIC9 的产物大小约为 195bp, 受体菌 GS115 无扩增条带, 见图 3。表明 7 个转化子中有 6 个是含目标基因的阳性转化子。

### 2.3 目标产物表达的检测

D24 和对照菌株 pPIC9 的诱导上清液, 经超滤浓缩 4 倍后, Triciclen-SDS-PAGE 分析表明, 两者在 3.5~6.5kD 处有一条很明显的差异带, 见图 4。根据目标条带的大小 (约 5kD) 推测, 该条带为表达产物, 目标基因得到表达。

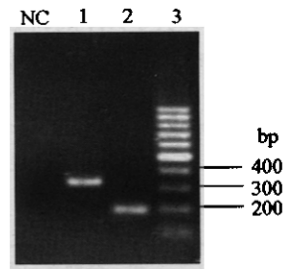


图 2 重组表达载体的 PCR 鉴定  
NC Negative control, 1 pPIC9/PD5, 2 pPIC9, M Marker

诱导上清液做抑菌试验,以菌株 pPIC9 和 GS155 作对照。表明, D24 对两种目标菌均有明显的抑菌圈产生,对照 pPIC9 和 GS115 无抑菌圈,见图 5、6。

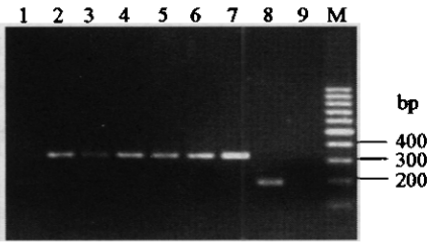


图3 重组酵母的 PCR 鉴定

1 D1, 2 D7, 3 D8, 4 D10, 5 D14, 6 D24, 7 D43, 8 pPIC9, 9 GS115, M Marker

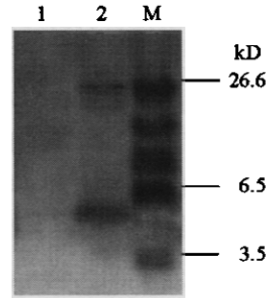


图4 表达产物的 Tricien-SDS-PAGE 分析

1 pPIC9, 2 D24, M Marker

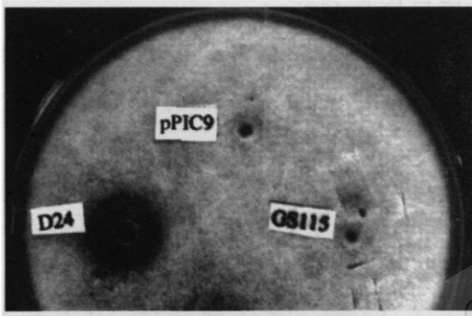


图5 D24 对香蕉枯萎菌的抑制效果

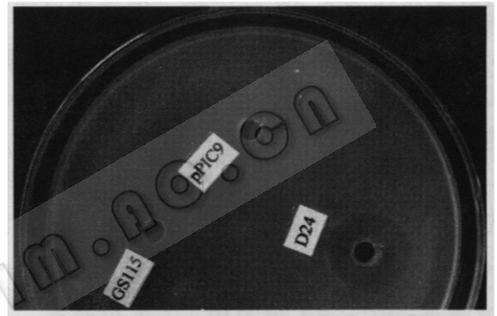


图6 D24 对甘蓝黑腐菌的抑制效果

D24 不同时间取样的抑菌情况不同,诱导后 48h 即可表达一定量的目标产物,可产生抑菌圈。96h 时表达量达较高水平,抑菌效果也最为明显,见表 2。

表 2 D24 不同诱导时间取样的抑菌效果

| 目标菌     | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---------|------|------|------|------|-------|
| FOCO401 | -    | +    | ++   | +++  | +++   |
| XC05    | -    | ++   | ++   | +++  | +++   |

注: +++, ++, + 和 - 分别表示强烈、一般、弱和无抑菌效果

### 3 讨论

植物防御素 PD5 是一种广谱抗菌多肽,尤其对霉菌也具有好的抑制效果。PD5 对毕赤酵母可能具有毒性,我们选择了 GS115-pPIC9 这一诱导表达系统对其进行表达研究。另外,该系统为分泌表达型,利于产物纯化。

通过酶切位点改造,成功的将 PD5 基因亚克隆到 pPIC9 中,构建了重组表达载体 pPIC9/PD5。由于电击转化法易获得高拷贝转化子,利于产物大量表达,我们用该法将 pPIC9/PD5 转入 GS115,并筛选到 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 表型转化子 D24。D24 经甲醇诱导,以诱导上清液为样品,多肽电泳显示其在 3.5~6.5kD 处与对照有一明显差异带,根据目标多肽大小(约 5kD),推测目的基因得到表达。进一步的抑菌活性试验显示,培养上清可以明显的抑制霉菌 *Fusarium oxysperum* 和细菌 *Xanthomona campestris* 的生长,而对照菌株无抑菌圈产生,显然 PD5 基因得到有效的分泌表达。不同诱导时间取样测试显示,

48h 诱导就有一定的表达, 96h 可达到较高水平, 如继续诱导, 菌体可能会衰老死亡, 不利产物的收集。为进一步研究 D24 的大量发酵技术提供了参考。

外源蛋白在毕赤酵母中的表达受多种因素影响<sup>[6]</sup>。我们曾用 MM 培养液对 D24 诱导, 发现不能检测到活性产物。分析可能是 MM 液中不含磷酸缓冲液, 其 pH 值过低的缘故。改用添加磷酸缓冲液的 BMM 培养液诱导, 能够检测出活性产物。由于我们的表达产物存在易降解的问题, 曾在诱导培养液中添加 5mmol/L EDTA, 不能有效解决。改用 BMMY 培养液诱导, 使得产物表达量有了一定的提高, 其原因在于 BMMY 中的酵母浸出物和蛋白胨不但利于菌体的生长, 能提高发酵密度, 其还可作为各类蛋白水解酶的底物, 在一定程度上可减少表达产物的降解。D24 的发酵条件该如何进一步优化, 如何有效减少产物的降解, 产物的抗菌谱如何, 具有怎样的抑菌机理, 该法获得产物的生物安全性如何, 在环境中是否容易降解。还有待进一步深入的研究。

**致谢** 本文整个研究过程中得到中山大学生命科学院陆勇军博士的热心帮助, 在此表示衷心的感谢!

### 参 考 文 献

- [1] Thomma B P H J, Carmue B P A, Thevissen K. *Planta*, 2002, **216**: 193 ~ 202.
- [2] Castro M S, Fontes W. *Protein Pept Lett*, 2005, **12** (1): 13 ~ 18.
- [3] 廖乾生, 林福呈, 李德葆. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2003, **29** (1): 113 ~ 118.
- [4] Anthony J, De L, Thomas J W. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, **43** (1): 1 ~ 11.
- [5] Alves A L V, De samblanx G W, Terras F R, *et al.* *FEBS Letter*, 1994, **38** (4): 228 ~ 232.
- [6] Sue D P, Fazenda D L, Brian M, *et al.* *Yeast*, 2005, **22** (4): 249 ~ 270.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning-a laboratory manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 55 ~ 374.
- [8] 张晓楠, 曹云新, 程司堃, 等. *生物工程进展*, 2001, **21** © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>