

卢美欢,李利军,马英辉. 马铃薯 StPR-1b 蛋白的原核表达及抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):85-88.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.020

# 马铃薯 StPR-1b 蛋白的原核表达及抑菌活性

卢美欢<sup>1,2</sup>, 李利军<sup>1</sup>, 马英辉<sup>1</sup>

(1. 陕西省微生物研究所,陕西西安 710043; 2. 西北农林科技大学植物保护学院,陕西杨凌 71200)

**摘要:**为探索马铃薯病害生物防治和抗病育种的有效途径,构建马铃薯病程相关蛋白 StPR-1b 的 pET30A 原核表达体系,用镍柱分离纯化该融合蛋白,结果表明,经 0.5 mmol/L 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷诱导后,StPR-1b 蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达;纯化得到预期大小(约 15 ku)的融合蛋白;StPR-1b 蛋白对马铃薯软腐病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌有一定的抑制作用,蛋白浓度越大,抑制效果越强。

**关键词:**StPR-1b 蛋白;原核表达;马铃薯;抑菌作用;胡萝卜软腐果胶杆菌

**中图分类号:**S435.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)23-0085-03

病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins,简称 PRP 或 PRs)是指植物在病理或病理相关的环境下诱导产生的,普遍存在的具有广谱抗性的诱导的可溶性蛋白质,是植物产生诱导抗病性的一种生化机制。PRP 相对分子质量为 10~40 ku,积累于病原侵染寄主植物部位和未侵染部位的细胞内和细胞间,主要通过固化寄主细胞壁、提高抗菌活性和参与细胞信号转化等方式参与植物的诱导抗病性<sup>[1-2]</sup>,能够抵抗蛋白酶、糖苷酶、重金属、尿素、低 pH 值和高温(60℃)等逆境环境,具有较强的稳定性<sup>[3-6]</sup>。大多数 PRP 具有几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性,在植物体内和体外显示出抗真菌活性,与植物过敏性坏死反应(hypersensitive response,简称 HR)和系统获得性抗性(systematic acquired resistance,简称 SAR)有密切关系,PRP 在寄主中的诱导表达常作为 SAR 建立的标志<sup>[7]</sup>,因此人们可通过构建 PRP 基因的方法获得抗菌谱广、作用持久的抗病新品种。

马铃薯软腐病是马铃薯产区发生最严重的细菌性病害,在苗期和窖藏期容易发生,马铃薯是我国重要的经济作物和蔬菜品种,营养丰富,产量很高,但目前我国多数马铃薯主产区都受到了马铃薯软腐病的严重威胁,对我国马铃薯的生产造成极大的破坏,2000 年福建省福鼎市马铃薯软腐病发生面积为 251.07 hm<sup>2</sup>,是总种植面积的 82%,造成了严重的经济损失<sup>[8]</sup>。

本研究对病程相关蛋白 StPR-1b 进行原核表达,通过构建原核表达系统将融合蛋白大量表达和分离纯化,探索该蛋白对马铃薯软腐病原菌的抑制作用,以期开发安全无害的抗生素,并为该基因在马铃薯抗病育种中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 生物材料 马铃薯软腐病原菌、表达载体 pET30a 载体、pET30A-StPR-1b 质粒,均为笔者所在实验室保存;表达宿主为大肠杆菌感受态细胞,购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶和试剂 T<sub>4</sub> 连接酶、DNA Marker、Nde I 和 Xho I 内切酶,均购自 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG),购自 Sigma 公司;PVDF 膜,购自 Millipore 公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 StPR-1b 基因序列,利用引物设计软件 Primer 5.0 设计合成引物,引物序列:上游 5'-GACACGACACCATATGCAGAACTCTCCGAGGATTAT-3',下游 5'-GTGTCCTCGAGGTACGGACGCTGACCAACCCAG-3',以含 StPR-1b 全长的 pET30A-StPR-1b 质粒为模板进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增。

1.2.2 PCR 反应条件 以 pET30A-StPR-1b 质粒为模板,在总体积为 50  $\mu$ L 的 EP 管中依次加入 1  $\mu$ L dNTP (25 mmol/L)、5  $\mu$ L 高温聚合酶(Pfu) Buffer(10 $\times$ )、2  $\mu$ L 上游引物、2  $\mu$ L 下游引物、0.4  $\mu$ L Pfu(5 U/ $\mu$ L),用 ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。扩增程序:95℃预变性 3 min,95℃变性 22 s,53℃退火 20 s,72℃延伸 60 s,24 个循环,72℃修复延伸 5 min。

1.2.3 PCR 电泳及回收 将 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶在 1 $\times$ TAE 缓冲液,电压为 150 V,电流为 100 mA 条件下,20 min 电泳观察。将目的条带切下,按试剂盒回收 StPR-1b 片段,回收纯化好的片段备用酶切。酶切体系为 1  $\mu$ g 纯化回收好的片段、5  $\mu$ L 酶切 Buffer(10 $\times$ )、1  $\mu$ L 限制性内切酶 Nde I (10 U/ $\mu$ L) 和 1  $\mu$ L 限制性内切酶 Xho I (10 U/ $\mu$ L),用 ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L,在温度为 37℃恒温水浴锅中反应 2 h。

1.2.4 目的片段与载体连接、转化和筛选 回收纯化好的目的 DNA 片段 8  $\mu$ L、T<sub>4</sub> 连接酶 Buffer 2  $\mu$ L、pET30A 载体 4  $\mu$ L、T<sub>4</sub> 连接酶 1  $\mu$ L,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L,在 16℃条件下反应 4 h;然后将其转入 oneshort 感受态细胞中,检测筛选出阳性

收稿日期:2018-10-31

基金项目:陕西省科学院科技计划(编号:2015K-05);陕西省科技厅农业攻关计划(编号:2014K02-13-02、2016NY-197);西安市科技局农业创新计划[编号:2017050NC/NY009(4)]。

作者简介:卢美欢(1981—),女,广东罗定人,硕士,副研究员,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:lu\_meihuan@sina.com。

通信作者:李利军,研究员,主要从事微生物物资开发与利用研究。E-mail:lijun\_llj@163.com。

克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序正确的菌液使用质粒提取试剂盒 SK8191 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒 DNA。

**1.2.5 原核表达载体的构建** 用 *Nde* I 和 *Xho* I 内切酶对测序正确的 pET30A-StPR-1b 质粒和表达载体 pET30A 分别进行双酶切,切胶回收目的片段用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接到 pET30A(+)载体上,将连接产物转化到 oneshort 感受态细胞中,提取转化子的质粒 DNA,经 PCR 检测和酶切检测证实含目的基因的片段已经插入原核表达载体中并成功转入表达宿主菌中,得到重组表达载体。

**1.2.6 融合蛋白的诱导表达及纯化** 挑取表达菌株的单菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中,在 37 ℃、220 r/min 下过夜培养。然后按 1:100 稀释培养液,在 37 ℃、220 r/min 下培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6 时,添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 220 r/min,温度分别为 20、37 ℃ 条件下诱导过夜;37 ℃ 诱导 4 h,以未加 IPTG 诱导剂的处理作为阴性对照。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,弃上清,菌体用 500  $\mu\text{L}$  PBS(pH 值为 7.4)缓冲液悬浮,添加终浓度为 0.5 mmol/L 的溶菌酶,超声破碎 6 min,破碎 0.5 s 停 1.5 s,分别离心收集上清和沉淀,沉淀用 500  $\mu\text{L}$  包涵体溶解液(8 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl,300 mmol/L NaCl,pH 值为 8.0)溶解,分别取 40  $\mu\text{L}$  样品和 10  $\mu\text{L}$  5 $\times$  protein loading buffer 混匀,沸水浴 10 min,离心后取上清,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 SDS-PAGE)检测。准备 12% 的 SDS-PAGE,Tris-Gly 电泳缓冲液(Tris 3.0 g,甘氨酸 14.4 g,SDS 1.0 g,定容至 1 L),上样量为 10  $\mu\text{L}$ ,浓缩胶条件:80 V 20 min,分离胶条件:120 V 60 min,凝胶电泳结束用考马斯亮蓝染色 20 min,脱色后观察蛋白条带。

将培养的菌液按 1:100 比例接种于 3 L 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 ℃、220 r/min 条件下培养,当  $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.6 时,添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 20 ℃、220 r/min 条件下诱导过夜,离心收集细胞菌体,采用镍琼脂糖亲和层析进行蛋白纯化后,-80 ℃ 保存。

**1.2.7 蛋白免疫印记试验(Western Blot)** 将纯化好的 HIS-StPR-1b 蛋白进行 Western Blot 检测,蛋白经过 SDS-PAGE 转移至 PVDF 膜后,用 5% 的脱脂奶粉,在 37 ℃ 条件下缓慢振荡 2 h,加兔抗 his 标签的一抗(1:500 稀释)在 37 ℃ 条件下缓慢振荡 60 min。加羊抗兔的二抗孵育 60 min,最后用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色鉴定。

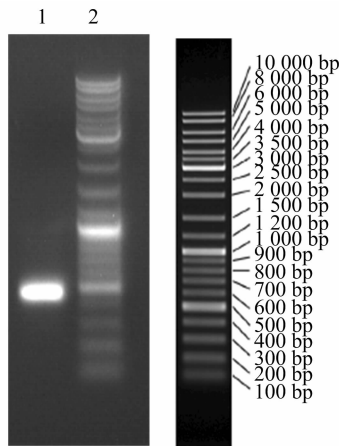
**1.2.8 纯化的 HIS-StPR-1b 蛋白对马铃薯软腐病原菌的抑制试验** 将 HIS-StPR-1b 蛋白用无菌双蒸水配制成 1 mg/mL 蛋白溶液,再稀释成不同浓度梯度备用。将保存的马铃薯软腐病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌活化,在 LB 液体培养基中培养 24 h。在已灭菌的 EP 离心管中加入 880  $\mu\text{L}$  液体 LB 培养基,20  $\mu\text{L}$  软腐病原菌菌液,同时加入稀释好的 HIS-StPR-1b 蛋白溶液 100  $\mu\text{L}$ ,32 ℃ 振荡培养 12 h,每个浓度做 3 次重复,测定  $D_{600\text{ nm}}$ 。同时做空白对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 StPR-1b 原核表达载体的构建

以 pET30a-StPR-1b 质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增

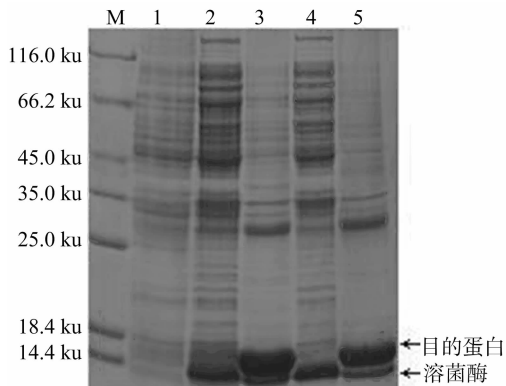
出与预期大小一致的 417 bp 条带(图 1),对目标条带进行琼脂糖电泳、回收。回收产物亚克隆于 pET30a 载体中。对含有 *StPR-1b* 基因的重组 pET30a 质粒进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,PCR 检测和酶切鉴定结果显示,*StPR-1b* 基因已成功导入到原核表达载体 pET30a 中,目标片段大小与该基因编码区大小一致。



1—StPR-1b 片段; 2—DNA marker  
图1 StPR-1b 片段 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

### 2.2 StPR-1b 蛋白的诱导表达

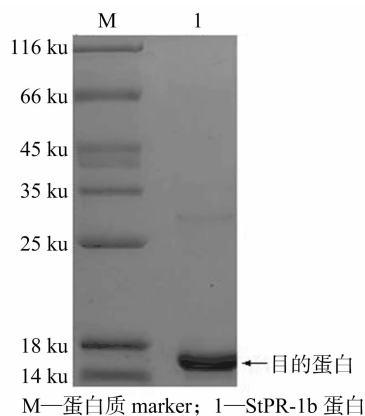
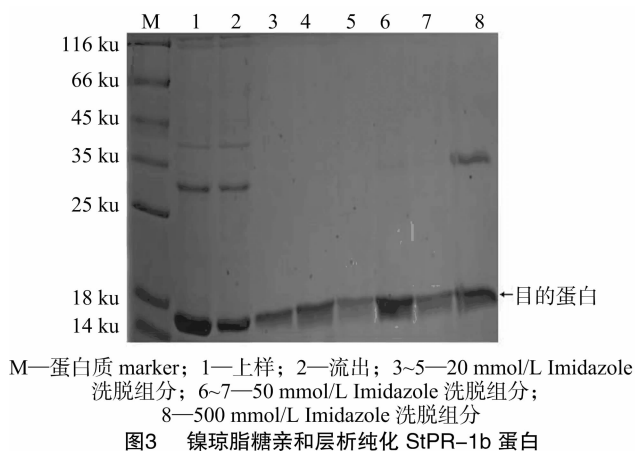
将原核表达载体 pET30a-StPR-1b 转化至大肠杆菌 oneshort 感受态细胞,在 IPTG 诱导下 StPR-1b 能成功表达,菌体中检测到高表达量的蛋白条带(图 2 的泳道 3 和泳道 5)。考察不同温度诱导 StPR-1b 蛋白表达的影响,结果显示,在 20、37 ℃ 2 个温度处理中,37 ℃ 诱导更有利于 StPR-1b 蛋白的表达。表明不同诱导温度对 StPR-1b 蛋白表达的影响较明显。



M—蛋白质 marker; 1—诱导前总蛋白; 2—20 ℃ 上清; 3—20 ℃ 沉淀; 4—37 ℃ 上清; 5—37 ℃ 沉淀  
图2 不同温度对 StPR-1b 蛋白的诱导表达

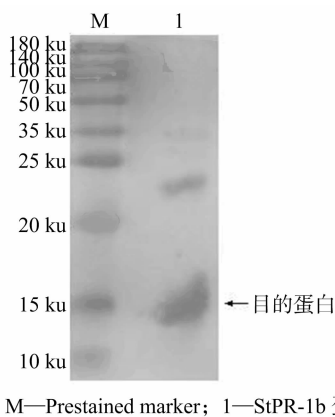
### 2.3 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

采用镍琼脂糖亲和层析对在大肠杆菌中大量表达的重组 StPR-1b 蛋白进行纯化,采用不同浓度的咪唑基(Imidazole)洗脱液洗脱,发现 20 mmol/L Imidazole 洗脱组分能较好地分离 StPR-1b 蛋白(图 3),收集蛋白洗脱液冷冻干燥,经检测蛋白浓度为 84%。StPR-1b 融合蛋白经过纯化,SDS-PAGE 电泳分析在约 15 ku 出现明显条带,表明融合蛋白成功得到了纯化(图 4)。



#### 2.4 StPR-1b 融合蛋白的 Western Blot 分析

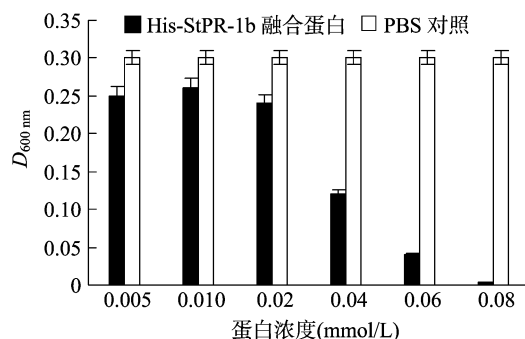
为了进一步确定 StPR-1b 融合蛋白是否在大肠杆菌中成功表达,用抗 his 标签的一抗和加羊抗兔的二抗进行 Western Blot 检测,用 TMB 显色鉴定。结果表明,在预期的 15 ku 位置有特异性条带出现(图 5),证明 StPR-1b 融合蛋白表达成功。



#### 2.5 StPR-1b 蛋白对马铃薯软腐病病原菌的抑制作用

配制不同浓度 StPR-1b 融合蛋白溶液,研究其对软腐病病原菌的抑制作用。结果(图 6)显示,在 0.005~0.08 mmol/L 蛋白溶液浓度范围内,His-StPR-1b 融合蛋白对马铃薯软腐病病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌有一定的抑制作用,蛋白浓

度越大,抑制效果越强,当 His-StPR-1b 融合蛋白浓度为 0.08 mmol/L 时,抑制率达到 90.0%。



### 3 结论

马铃薯软腐病在世界范围内广泛发生,是马铃薯产区发生最严重的细菌性病害,严重影响马铃薯产量。积极培育抗病品种,是缓解马铃薯软腐病的有效途径。本研究通过构建原核表达载体,将 StPR-1b 基因成功在大肠杆菌中得到表达。在原核表达系统中,不同诱导条件对 StPR-1b 蛋白表达的影响较明显,本研究经多次诱导及 SDS-PAGE 分析后发现,StPR-1b 蛋白最佳诱导温度为 37℃,采用镍亲和层析进行蛋白纯化,最佳纯化条件为 20 mmol/L Imidazole 洗脱组分,获得了纯度为 84% 的蛋白,这为进一步研究 StPR-1b 蛋白的生物活性及在马铃薯抗病方面的生物学功能奠定了基础。

植物在受到真菌、细菌和病毒等病原体入侵时合成抗毒素、抗菌肽或一些病程相关蛋白,PRs 与寄主植物抗病性和系统获得性具有密切关系,是植物自我抗御机制中的可诱导组分,目前已知的蛋白根据序列同源性、血清学关系和生物活性被划分为 17 个家族。抗病防卫反应中表达的基因主要是编码病程相关蛋白和植保素合成相关酶基因,而 PRs 在植物抗病性和系统获得抗性中起重要作用,是因为不同 PRs 基因的表达水平和抗病性之间紧密相关。StPR-1b 蛋白属于 PR-1 家族成员,StPR-1b 基因编码 1 个含有 159 个氨基酸的蛋白质,在 N 端存在长为 24 个氨基酸的信号肽。本研究通过 PCR 技术扩增了马铃薯病程相关蛋白 StPR-1b 基因,并使克隆的 StPR-1b 基因在大肠杆菌中得到成功表达,优化表达体系为纯化产物验证体外生物活性及后期培育抗病转基因马铃薯提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] Loon L V, Strien E V. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 1999, 55(2): 85-97.
- [2] Christensen A B, Cho B H, Näsby M, et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins[J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3(3): 135-144.
- [3] 王勇刚, 曾富华, 吴志华, 等. 植物诱导抗病与病程相关蛋白[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(2): 177-182.
- [4] Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens[J]. Biochemical Society Transactions, 2002,

姚思扬,赵春莉,刘子平,等. 响应面法优化草莓品种红颜离体繁殖的增殖条件[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):88-91.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.021

# 响应面法优化草莓品种红颜离体繁殖的增殖条件

姚思扬,赵春莉,刘子平,刘翰升,刘 珮

(吉林农业大学,吉林长春 130118)

**摘要:**为了研究优化红颜草莓继代增殖培养的条件,以草莓品种红颜继代组培苗为试验材料,利用响应面法对其增殖条件进行优化。在单因素的试验基础上,根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,以琼脂浓度、光照度、pH 值为试验因子,以增殖系数为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计。结果表明:3 因素对植株增殖系数的影响力大小为光照度 > pH 值 > 琼脂浓度,最终得到的二元回归方程显示,红颜草莓增殖条件的优化结果如下:琼脂浓度为 7.1 g/L, pH 值为 5.37,光照度为 2 177 lx。在此条件下,最佳增殖系数预测值为 10.930 5,实际操作结果为 10.73。

**关键词:**草莓品种;离体繁殖;增殖条件;响应面法

**中图分类号:** S668.404<sup>+</sup>.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0088-04

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是蔷薇科草莓属多年生草本植物,红颜 (Benihoppe) 为著名的日本品种,是以幸香和章姬为亲本杂交选育而来的,其果实鲜红饱满,味道香甜可口,产量高,耐储存耐运输<sup>[1]</sup>,深受广大种植者和消费者的喜爱,具有较高的经济价值,拥有广阔的市场。草莓的传统繁殖方法是匍匐茎繁殖和分枝繁殖,效率低,易感染病毒,长久的病毒累积使品种退化,产量降低<sup>[2]</sup>。经过茎尖脱毒培养后进行离体快繁,不受季节限制,产量高,培养周期短,是获得大量无病毒原种苗的有效手段。

目前,关于草莓组培的相关研究,大部分集中于探讨培养基内激素的种类及浓度,旨在筛选出每个阶段的最佳培养基<sup>[3-7]</sup>,但关于其他培养条件的优化研究鲜有报道。本试验旨在探讨增殖阶段, pH 值、光照度、琼脂浓度对其增殖率的影响。并在单因素的试验基础上,参考 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,用响应面法将各因子的相互关系进行拟合分析,研究各因子与响应值的关系,从而优化红颜草莓的组培条件,以期今后相关研究提供理论实践基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

收稿日期:2018-09-05

基金项目:吉林省重点科技攻关项目(编号:20140204026NY)。

作者简介:姚思扬(1994—),女,山东寿光人,硕士研究生,主要从事观赏植物资源引种驯化及繁殖技术研究。E-mail:1575603119@qq.com。

通信作者:赵春莉,博士,副教授,主要从事观赏植物资源引种驯化及繁殖技术研究。E-mail:zcl8368@163.com。

30(6):930-935.

[5] Bertini L, Leonardi L, Caporale C, et al. Pathogen - responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding[J]. Plant Science, 2003, 164(6):1067-1078.

[6] Ziadi S, Poupard P, Brisset M N, et al. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR - 10 transcripts inducible by

试验材料为吉林农业大学温室的当年生草莓匍匐茎尖,于 2017 年 5 月采摘,在园艺学院园林生物技术实验室内经初代培养后,选取长势一致的、高 2 cm 左右的红颜草莓继代组培苗为试验材料。在预试验的基础上,所用的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L,蔗糖浓度 30 g/L。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 pH 值对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内,光照度为 2 000 lx,光照时间为 14 h/d,培养室温度为 (25 ± 2) °C, pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,琼脂粉浓度为 7 g/L。每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.1.2 光照度对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内, pH 值为 6.0,光照时间为 14 h/d,培养室温度为 (25 ± 2) °C,光照度为 1 200、1 500、1 800、2 100、2 400 lx。琼脂粉浓度为 7 g/L,每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.1.3 琼脂浓度对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内, pH 值为 6.0,光照时间为 14 h/d,光照度为 2 000 lx,培养室温度为 (25 ± 2) °C,琼脂浓度为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 g/L,每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.2 响应面优化试验 在单因素试验的基础上,用响应面分析法,根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,以 pH 值、光照度、琼脂浓度为试验因子,增殖系数为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计,见表 1。每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

### 1.3 数据分析

用 SPSS 和 Design - Expert 8.0.6 软件对数据进行分析。增殖系数 = 培养 30 d 后不定芽总数/接种的不定芽数。

acibenzolar - S - methyl, a functional analogue of salicylic acid[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 59(1):33-43.

[7] 范志金,刘秀峰,刘凤丽,等. 植物抗病激活剂诱导植物抗病性的研究进展[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1):87-92.

[8] 马 宏. 我国马铃薯软腐病防治的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(1):42-44.