

拟南芥HyPRP蛋白AZI1在大肠杆菌中的表达及其抗真菌活性分析

王晓燕*, 杜改亮*, 韩瑶瑶, 刘梦欣, 马燕勤, 冯欢, 徐子勤**

西北大学生命科学学院, 陕西省生物技术重点实验室, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安710069

摘要: *AZII* (*AZELAIC ACID INDUCED 1*)基因位于拟南芥4号染色体上, 编码产物是脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTP)家族的一个成员。该基因在系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)中具有重要功能, 名称来自它可以被壬二酸(azelaic acid, AzA)诱导。已有的研究结果显示, 在拟南芥中由AzA和甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate, G3P)诱导的SAR反应需要AZI1和DIR1, 这两个脂质转移蛋白有助于G3P的积累。为了确定AZI1蛋白是否具有抗真菌活性, 本工作构建了原核表达载体pET28a-*AZII*, 利用大肠杆菌BL21 (DE3)受体细胞制备了没有信号肽的AZI1重组蛋白。Western免疫印迹分析发现通过半乳糖类似物IPTG诱导表达的AZI1重组蛋白主要以包涵体的形式存在。体外抑菌实验以及激光共聚焦显微观察结果表明, 用镍离子亲和层析树脂纯化的AZI1重组蛋白对灰霉菌、赤霉菌、棉花枯萎病菌和酿酒酵母细胞的生长/分裂均具有抑制作用。

关键词: 拟南芥; AZI1; 蛋白纯化; 系统获得抗性; Western印迹分析; 抑真菌作用

Expression of *Arabidopsis* HyPRP Family Member AZI1 in *Escherichia coli* and Antifungal Activity Analysis of the Recombinant Protein

WANG Xiao-Yan*, DU Gai-Liang*, HAN Yao-Yao, LIU Meng-Xin, MA Yan-Qin, FENG Huan, XU Zi-Qin**

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: *AZII* (*AZELAIC ACID INDUCED 1*) locates on the fourth chromosome of *Arabidopsis* and encodes a member of lipid transfer protein (LTP) family. It possesses important functions in systemic acquired resistance (SAR) and is named after the inducible expression by azelaic acid (AzA). Previous researches in *Arabidopsis* showed that *AZII* and *DIR1* (*DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1*) were involved in SAR triggered by AzA and glycerol-3-phosphate (G3P), and the LTPs encoded by them contributed to the accumulation of G3P. In order to determine whether AZI1 has the antifungal activity, a prokaryotic expression vector pET28a-*AZII* was constructed and the recombinant protein lacking the signal peptide was prepared using BL21 (DE3) strain of *Escherichia coli* in the present work. Western blotting analysis indicated that the recombinant AZI1 produced in *E. coli* cells after induction with IPTG, an analogue of galactoside, mainly existed as inclusion bodies. Anti-microbial tests *in vitro* and observation under the laser confocal microscopy confirmed that the recombinant AZI1 purified with immobilized nickel-ion affinity chromatography resin could inhibit the growth or division of *Botrytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, and *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; AZI1; protein purification; systemic acquired resistance (SAR); Western blotting analysis; fungistasis

AZII (*AZELAIC ACID INDUCED 1*)基因属于HyPRP (hybrid proline-rich protein)家族, 编码产物由氨基末端的信号肽、中间位置的富脯氨酸结构域(proline-rich domain, PRD)和羧基末端的八半胱氨酸基序(eight-cysteine-motif, 8CM)构成。N端的信号肽能够使AZI1蛋白通过分泌途径合成并定位到细胞表面, 亲水性PRD与其他细胞壁结构蛋白有高度的相似性, 疏水性8CM的存在说明该蛋白与细胞膜有着密切的联系(Zhang和Schläppi 2007)。

HyPRP广泛存在于高等植物中, 是富脯氨酸蛋白(proline-rich protein, PRP)的一个亚类。PRP是五类细胞壁结构蛋白中的一类, 它们在植物生长和发育

收稿 2014-11-24 修定 2014-12-28

资助 国家自然科学基金(30870194和J1210063)、陕西省重点实验室科研计划(12JS103和2010JS090)和西北大学研究生创新计划(YZZ13068)。

* 同等贡献。

** 通讯作者(E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn; Tel: 029-88303484)。

过程中决定特殊的细胞壁结构,在植物受到生物和非生物胁迫时起防卫功能(Minorsky 2002)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中包含28个*HyPRP*基因,它们分布在1号至5号染色体上,可以被激素和环境胁迫诱导(Dvořáková等2007; Josè-Estanyol和Puigdomènech 2000)。*AZII*和*HyPRP*家族的其他三个成员*EARLII* (AT4G12480)、AT4G12490、AT4G12500串联排列在拟南芥的4号染色体上,被归类为*EARLII*亚家族。系统进化分析结果显示,在*EARLII*亚家族中*AZII*和*EARLII*更为接近。

*AZII*基因编码一个16.76 kDa的分泌性蛋白,N端信号肽裂解后产生一个由PRD和8CM构成、大小为14.09 kDa的蛋白质。由于8CM的存在,也将*AZII*归类于脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTP)/蛋白酶抑制剂(protease inhibitor)/种子贮藏蛋白(seed storage protein)家族。LTP是一类非常重要的脂类结合蛋白,广泛存在于植物、动物和微生物中,占细胞内可溶性总蛋白的4%。从许多植物的不同组织中分离得到的LTP对脂类分子的亲和作用没有选择性,所以也被称为非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid transfer protein, nsLTP) (Kader 1996)。早期的研究根据分子量大小将植物LTP蛋白分为LTP₁和LTP₂两大类。LTP₁主要存在于植物地上部分的组织和器官中,分子量约为10 kDa; LTP₂主要存在于植物根部,分子量约为7 kDa。X射线晶体衍射与核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)实验结果显示, LTP₁和LTP₂的球形结构内部具有一个疏水腔,负责结合脂类物质(Lee等1998; Shin等1995)。后来发现,有几种花药特异性蛋白与植物nsLTP表现一定的同源性,被建议作为第三类植物LTP (Lauga等2000)。近年来,又从拟南芥和水稻(*Oryza sativa*)基因组中鉴定出了6种新型的nsLTP,所以迄今共发现9种类型的nsLTP。拟南芥没有VII型nsLTP,而IX型nsLTP只存在于拟南芥中(Boutrot等2008)。植物nsLTP具有多种功能,它们参与了蜡质的合成与运输过程,能够促进细胞壁的扩展或者松弛,具有蛋白酶抑制剂活性,可以防止细胞融合,在体细胞胚胎发生以及抗逆和抗病反应中起重要作用。

在自然进化过程中,植物形成了一系列针对活体营养型(biotrophy)和坏死型(necrotrophy)病原体的

防御机制。在与活体营养型病菌相互作用中,很多植物能够通过“基因对基因”模式产生超敏反应,达到抑制病原菌侵染的效果,进而引发系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)。活体营养型病菌侵染植物后引发的SAR构成了一个复杂的信号转导网络(Hammond-Kosack和Parker 2003)。与此不同,植物对坏死型病菌的抗性主要是通过茉莉酸/乙烯(jasmonic acid/ethylene, JA/ET)和水杨酸(salicylic acid, SA)途径来调控的(Zhang等2013)。拟南芥*aziI* T-DNA插入突变体SALK_017709和SALK_085727在丁香假单胞杆菌侵染后不能产生系统获得抗性,但局部抗性不受影响(Jung等2009)。与Col-0野生型植株相似,*aziI*突变体植株在病原菌侵染位点可以积累SA,表达*PR1* (*PATHOGENESIS-RELATED 1*)基因。将壬二酸(azelaic acid, AzA)或者收集的引发了SAR的Col-0野生型拟南芥的叶柄渗出液渗入到*aziI*突变体中,突变体可以对有毒病原体*PmaDG3* (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* DG3)产生系统抗性。这一结果说明,AzA有可能是SAR反应中的一个长距离移动信号,它可以使未受无毒菌侵染的其他组织积累SA,通过SA信号途径引发相关抗性基因的表达。

壬二酸能够诱导*AZII*基因表达,产生的*AZII*蛋白与SAR信号转移有关。Yu等(2013)发现在拟南芥中由AzA和甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate, G3P)诱导的SAR需要脂质转移蛋白*AZII*和*DIRI*,它们有助于G3P的积累。张欣等(2011)发现转*AZII*酵母细胞在SC-URA平板上的生长能力明显低于转pESC-URA空载体的对照组酵母细胞,在拟南芥中过表达*AZII*基因可以提高个体对蒜薹灰霉菌的抗性。以上研究报道显示,*AZII*在拟南芥对生物胁迫的抗性反应中具有重要功能。由于*AZII*具有潜在的蛋白酶抑制剂活性,推测它对真菌细胞可能具有直接的破坏作用。本工作建立了*AZII*蛋白的原核表达体系,利用纯化的不含信号肽的重组蛋白分析了*AZII*对真菌细胞生长和分裂的抑制作用。

材料与方法

1 试验材料

植物材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Heynh Col-0 (Columbia-0)生态型植株。基因克隆

实验的受体细胞为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株。原核表达体系的受体细胞为大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株, 购自北京康为世纪生物公司; 载体为pET28a。体外抑菌实验采用蒜薹灰霉菌(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. of Garlic Sprout)、赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*)和携带pESC-URA空载体的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A MATa菌株(*leu2-3,112; trp1-1; can1-100; ura3-1; ade2-1; his3-11,15*)。

2 试验方法

2.1 原核表达载体的构建

根据AZI1基因的PRD-8CM编码序列设计上下游引物, 上游引物为5'-CGCGGATCCGAAT-TCACAAATTGCAACTGCAAGCC-3' (直线表示BamHI酶切位点, 虚线表示EcoRI酶切位点), 下游引物为5'-CGCCTCGAGTCAAGCACATTGGAAACCAG-3' (直线表示XhoI酶切位点)。以拟南芥Col-0基因组DNA为模板, 使用高保真DNA聚合酶Pfu扩增不含信号肽编码区的AZI1基因。PCR反应步骤包括: 94 °C预变性10 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。对回收后的PCR产物和pET28a进行EcoRI和XhoI双酶切, 然后用T4 DNA连接酶连接目的片段与载体大片段。连接反应的条件为4 °C、12 h。用连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行菌落PCR和双酶切鉴定, 将阳性克隆送上海生工生物技术公司测序。

2.2 AZI1重组蛋白的诱导表达

挑取pET-28a和pET28a-AZI1转化的BL21 (DE3)抗性克隆, 接种到含有50 mg·L⁻¹卡那霉素的液体LB培养基中, 于37 °C过夜培养。第2天将菌液转接到新培养基中进行大体积繁殖, 继续培养至OD₆₀₀=0.6~0.8。将1 mL对照和1~6 h采集的菌液在13 570×g离心1 min收集菌体, 用40 μ L 1×SDS上样缓冲液重悬沉淀, 放入沸水浴中煮8 min。13 570×g离心10 min后取20 μ L上清液上样, 用15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离(Li等2012)。

2.3 AZI1重组蛋白的Western免疫印迹分析

挑取含有pET-28a或pET28a-AZI1质粒的BL21 (DE3)细菌克隆, 在附加50 mg·L⁻¹卡那霉素的液体

LB培养基中于37 °C培养至OD₆₀₀=0.6, 加入IPTG (终浓度1 mmol·L⁻¹) 在28 °C诱导8 h。13 570×g、4 °C离心10 min收集菌体, 加入1/10体积的超声裂解缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 8.0), 于冰上超声处理40次(每次超声10 s, 间隔5 s)。13 570×g、4 °C离心15 min, 收集的上清液记为A液。向沉淀中加入适量体积的包涵体洗涤液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, 1% TritonX-100, pH 8.0), 重悬沉淀进行超声处理。再次离心后向获得的沉淀中加入适量的包涵体溶解液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, 8 mol·L⁻¹ 尿素, pH 8.0), 4 °C过夜溶解, 离心收集的上清液记为B液。向A液和B液中加入100 μ L 2×SDS-PAGE上样缓冲液, 沸水浴中煮10 min, 离心后取20 μ L上样。电泳结束后采用半干电转移装置将凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上。将PVDF膜取出置于含有5% 脱脂奶粉的1×TBS缓冲液中, 在室温下封闭3 h后加入兔抗His-tag多克隆抗体(Abcam, 1:1 000), 室温孵育2 h后于4 °C过夜。第2天用TBS-T (1×TBS+0.05% Tween-20)洗涤3次, 每次10 min。再加入带有碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G (康为世纪, 1:2 000), 室温孵育1 h后用TBS-T洗涤3次, 每次10 min。最后用NBT/BCIP作为底物进行显色。

2.4 AZI1重组蛋白的纯化

携带pET28a-AZI1的BL21 (DE3)大肠杆菌细胞经IPTG诱导后, 收集菌体进行超声裂解。对包涵体沉淀进行洗涤和溶解处理, 经13 570×g、4 °C离心15 min后将上清液转移到透析袋中, 用含有6、4、2 mol·L⁻¹尿素和不含尿素的缓冲液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ NaCl)进行梯度透析。用0.45 μ m滤膜过滤透析后的上清液, 缓慢上样到镍离子螯合层析柱上进行纯化。平衡缓冲液含50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 8.0; 洗涤缓冲液含50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 8.0; 洗脱缓冲液含50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 250 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 8.0。将含有重组蛋白的洗脱液分阶段收集到2 mL离心管中, 进行冷冻干燥, 再用1×PBS溶解后进行15% SDS-PAGE凝胶电泳。

2.5 AZI1蛋白对真菌生长的抑制作用

在分析AZI1蛋白对灰霉菌、赤霉菌和棉花枯

萎病菌等真菌的抗性时,首先在马铃薯培养基(potato dextrose agar, PDA)上对保存的蒜薹灰霉菌等真菌进行划线后在28 °C培养4 d。用无菌水悬浮孢子,并用玻璃棉过滤除去菌丝,再用1/4马铃薯培养基将悬浮液稀释成 5×10^4 个(孢子)·mL⁻¹。取孢子悬浮液与纯化的AZI1蛋白混合, AZI1蛋白终浓度为100、200和300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对照组为不含AZI1重组蛋白的孢子悬浮液或含BSA (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的孢子悬浮液,并用马铃薯培养基将各处理的孢子终浓度调整一致。向小圆形培养皿中倒入15 mL PDA培养基,凝固后将3片经高压灭菌的直径为0.6 cm的滤纸片放于培养基表面,将20 μL AZI1重组蛋白与灰霉菌等真菌孢子混合液滴加到滤纸片上,在28 °C倒置培养72 h,观察灰霉菌等真菌的孢子萌发和菌丝生长状况。该实验重复3次,并对灰霉菌等真菌孢子萌发后菌斑的直径进行统计学分析。在分析外施AZI1蛋白对赤霉菌等真菌侵染拟南芥叶片的影响时,取孢子悬浮液与纯化的AZI1蛋白混合, AZI1蛋白终浓度为100、200和300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对照组为含有100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA的孢子悬浮液。将20 μL AZI1重组蛋白与真菌孢子混合液滴加到野生型拟南芥叶片上,4 d后观察侵染效果。

2.6 AZI1蛋白对酵母细胞生长的抑制作用

在分析AZI1蛋白对酿酒酵母细胞的抑制作用时,将冻存于-80 °C的携带pESC-URA空载体的酿酒酵母*W303-1A MATa*菌株接种于SC-URA固体培养基上,28 °C培养3 d后从平板上挑取单克隆接种于5 mL SC-URA液体培养基培养10 h。将2 μL 酵母菌液稀释10、100和1 000倍,取4 μL 不同稀释倍数的酵母菌液,与6 μL 浓度为200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的AZI1蛋白混合(AZI1重组蛋白终浓度为120 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 对照为4 μL 菌液加6 μL dH₂O。将混合液滴加到SC-URA培养基上,吸收后置于28 °C倒置培养,分别在24与72 h后观察酵母菌的生长状况。

2.7 酵母细胞膜通透性分析

细胞膜通透性分析采用SYTOX green荧光染色法(Chen和Xu 2011)。挑取携带pESC-URA空载体的酿酒酵母*W303-1A MATa*单克隆,接种于5 mL SC-URA液体培养基中,在28 °C、180 r·min⁻¹条件下振荡培养10 h。在1 mL酵母菌液中加入1 000 U制霉菌素(阳性对照)、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA (阴性对

照)或终浓度为200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的AZI1重组蛋白,在28 °C培养4 h。各取100 μL 菌液于1.5 mL无菌离心管中,加入SYTOX green荧光染料(终浓度为0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$),在28 °C培养箱中孵育30 min,期间混匀数次。将30 μL 菌液滴加到载玻片中间,封片后用OLYMPUS激光共聚焦显微镜进行观察。激发光波长450~490 nm,发射光波长500 nm。统计具有荧光信号的细胞数和明视野下的细胞总数,采用*t*-检验方法进行显著性差异分析。

实验结果

1 AZI1重组蛋白的Western blotting分析

经IPTG诱导后,对携带pET28a-AZI1和pE-T28a质粒的BL21 (DE3)大肠杆菌细胞进行超声处理,收集可溶性组分和尿素溶解后的包涵体组分,各上样20 μL 进行Western blotting分析。从图1可以看出,包含pET28a的BL21 (DE3)大肠杆菌细胞的可溶性组分和包涵体组分中都不存在AZI1蛋白,携带pET28a-AZI1的BL21 (DE3)大肠杆菌细胞中表达的AZI1重组蛋白以不溶性的包涵体形式存在,大小约为15 kDa,与预期结果一致。这说明利用BL21 (DE3)表达的AZI1重组蛋白以包涵体的形式存在于细胞中(Li等2012)。

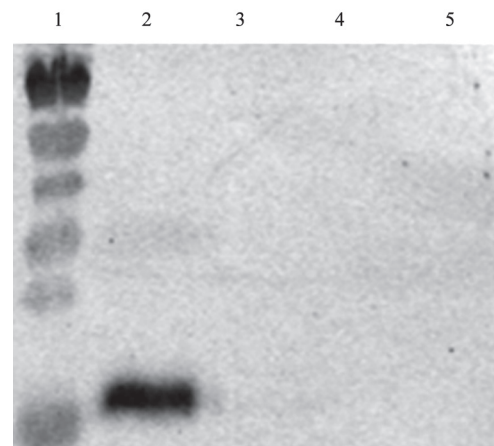


图1 AZI1重组蛋白在大肠杆菌细胞中表达的可溶性分析
Fig.1 Soluble analysis of recombinant AZI1 expressed in *E. coli*

1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder RDM604; 2: pE-T28a-AZI1转化大肠杆菌经IPTG诱导后的包涵体组分; 3: pE-T28a-AZI1转化大肠杆菌在IPTG诱导后的可溶性组分; 4: pET28a转化大肠杆菌经IPTG诱导后的包涵体组分; 5: pET28a转化大肠杆菌在IPTG诱导后的可溶性组分。

2 AZI1重组蛋白的纯化

携带pET28a-AZI1的大肠杆菌细胞经IPTG诱导后, 收集菌体进行超声裂解。用尿素对分离的包涵体进行溶解, 用镍离子亲和层析柱纯化AZI1重组蛋白, 然后进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果显示, 采用镍离子亲和层析柱可以得到高纯度的AZI1重组蛋白(图2-A)。进一步采用

冻干法对洗脱的AZI1重组蛋白溶液进行了浓缩处理, 从电泳图中可以清楚地观察到大约15 kDa的蛋白质条带(图2-B)。采用六组氨酸标签抗体对浓缩之后的AZI1重组蛋白进行了Western免疫印迹分析, 结果显示除了AZI1单体, 还存在少量的二聚体(图2-C)。SDS-PAGE和Western印迹分析结果显示由于8CM的存在, 不含信号肽的AZI1重组蛋白可

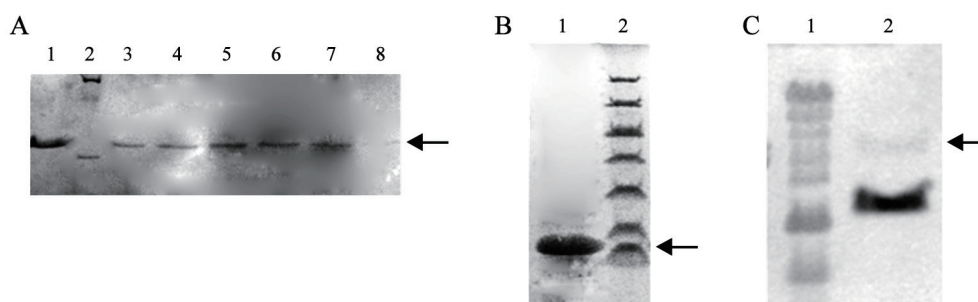


图2 AZI1重组蛋白的纯化和鉴定

Fig.2 Purification and identification of recombinant AZI1

A: AZI1重组蛋白的纯化, 其中1: 第一次洗脱液; 2: Unstained Protein Molecular Weight Marker SM0431 (Fermentas China, Shenzhen), 分子量从大到小依次为116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4和14.4 kDa; 3~8: 第二至第七次洗脱液; 箭头所指为AZI1重组蛋白。B: 浓缩的AZI1重组蛋白, 其中1: 浓缩后的AZI1重组蛋白; 2: Unstained Protein Molecular Weight Marker SM0431; 箭头所指为AZI1重组蛋白。C, 纯化AZI1重组蛋白的Western免疫印迹分析; 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder RDM604; 2: 纯化后的AZI1重组蛋白; 箭头所指为AZI1重组蛋白二聚体。

能会形成空间结构十分复杂的聚合体。

3 AZI1重组蛋白对真菌生长的抑制作用

抑菌实验结果表明, AZI1蛋白对真菌生长具有一定的抑制作用。不用AZI1重组蛋白处理时, 72 h后可以看到灰霉菌孢子在培养基上能够有效萌发并生长形成菌丝。用终浓度为100或200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的AZI1重组蛋白处理时, 灰霉菌孢子的萌发能力明显下降(图3-A), 说明AZI1重组蛋白对灰霉菌的生长具有抑制作用。当用终浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的AZI1重组蛋白处理赤霉菌(图3-B)和棉花枯萎病菌(图3-C)时, 孢子几乎不能萌发。通过3次独立重复实验, 从图3-D可以看到不加AZI1重组蛋白时, 灰霉菌等真菌孢子萌发形成的菌斑直径最大, 随着AZI1重组蛋白浓度的升高, 真菌孢子萌发形成的菌斑直径变小, 当加入终浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的AZI1重组蛋白时, 真菌孢子几乎不萌发。在拟南芥叶片上滴加AZI1重组蛋白和真菌孢子混合液, 随着AZI1重组蛋白浓度的增高, 拟南芥

叶片损伤程度逐渐减轻(图4)。当AZI1重组蛋白的浓度达到300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 在叶片上可看到侵染位点, 但叶片其它部分仍然保持绿色。说明AZI1重组蛋白能够抑制真菌孢子的萌发, 并且能够增强拟南芥叶片对病原体的抗性。在与真菌相互作用中, AZI1蛋白有可能插入到真菌细胞的细胞膜中, 通过引起细胞膜穿孔、导致细胞破裂、使细胞内部离子流出来抑制真菌孢子的萌发, 降低菌丝的生长能力(郑灿伟和宾金华2008)。张欣等(2011)发现与野生型植株相比, AZI1基因过表达植株对灰霉菌具有明显的抗性, 本工作得到的结果进一步说明在大肠杆菌中表达的AZI1重组蛋白对灰霉菌等真菌病原体的生长也具有抑制作用。

4 AZI1重组蛋白对酵母细胞生长的抑制作用

张欣等(2011)将AZI1基因导入酿酒酵母, 发现细胞内表达的AZI1蛋白也会降低细胞的生长速度。本工作用AZI1重组蛋白处理酵母细胞, 发现它同样能够抑制酵母细胞的生长。稀释10倍的酿

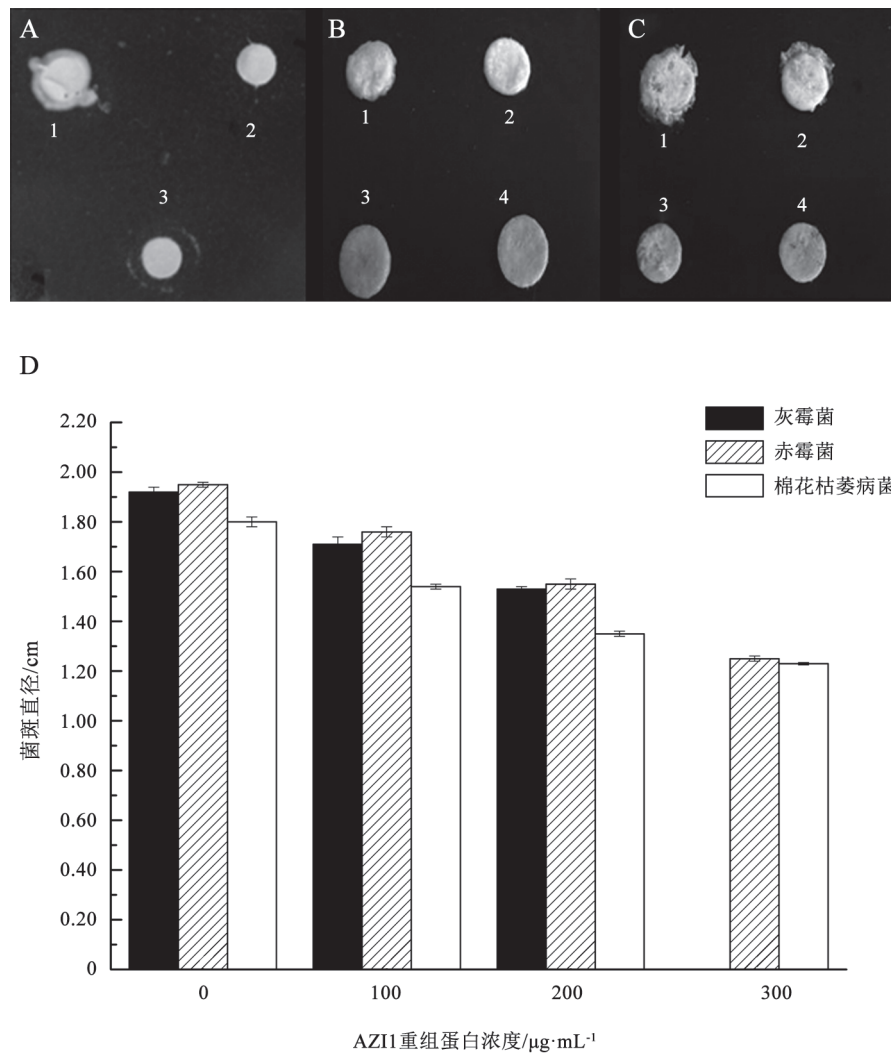


图3 AZI1重组蛋白对灰霉菌、赤霉菌和棉花枯萎病菌的抑制作用

Fig.3 Antifungal activity of recombinant AZI1 against *Botrytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi* and *Fusarium oxysporum*

A~C: 孢子萌发情况, 其中A: 灰霉菌孢子; B: 赤霉菌孢子; C: 棉花枯萎病菌孢子; 各图中1: 不含AZI1重组蛋白(对照); 2: $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白; 3: $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白; 4: $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白。D: 菌斑直径的统计学分析。

酒酵母细胞在SC-UAR培养基上生长72 h以后, AZI1处理组与对照组的生长速度虽有所不同, 但差异不是十分明显。将稀释100或1 000倍的酵母细胞与AZI1重组蛋白混合, 在固体培养基上培养24和72 h后可以清楚地看到AZI1能够降低酵母细胞的分裂和生长速度(图5)。

5 AZI1重组蛋白对酵母细胞质膜通透性的影响

采用SYTOX green荧光染料对酵母细胞进行染色, 发现AZI1处理能够增加细胞膜的通透性。激光共聚焦显微观察结果显示, 用AZI1重组蛋白处理后能够吸收SYTOX green的死细胞数量明显增加

(图6-A~F)。本实验以制霉菌素为阳性对照, 以牛血清白蛋白BSA为阴性对照。制霉菌素能够与真菌细胞膜上的甾醇结合, 通过改变细胞膜的通透性使细胞内容物泄漏, 导致真菌细胞死亡。对不同处理后酵母细胞的死亡率进行统计, 结果显示AZI1重组蛋白对酵母细胞有一定的抑制作用, 死亡细胞数量介于制霉菌素处理和BSA处理之间(图6-G)。

讨论

本实验利用高保真耐热DNA聚合酶*Pfu*从拟南芥Col-0生态型基因组DNA扩增产生不含信号肽

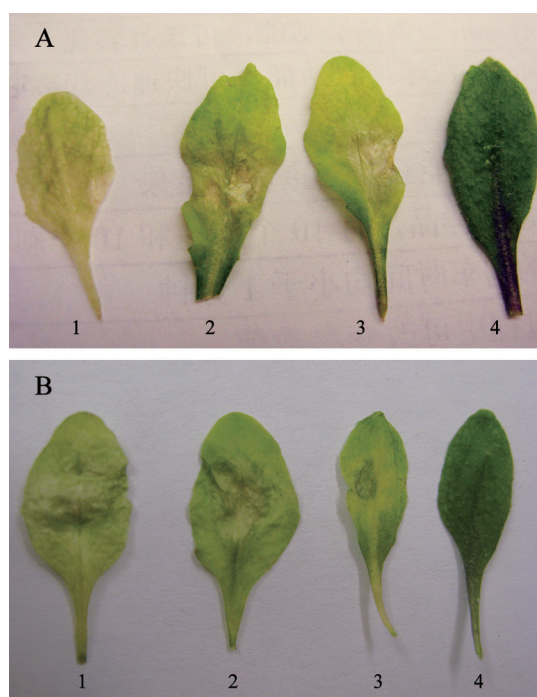


图4 AZI1重组蛋白对拟南芥真菌抗性的促进效果
Fig.4 Promotion of recombinant AZI1 to fungal resistance of *Arabidopsis thaliana*

A: 赤霉菌孢子; B: 棉花枯萎病菌孢子。各图中1: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA; 2: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白; 3: $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白; 4: $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白。

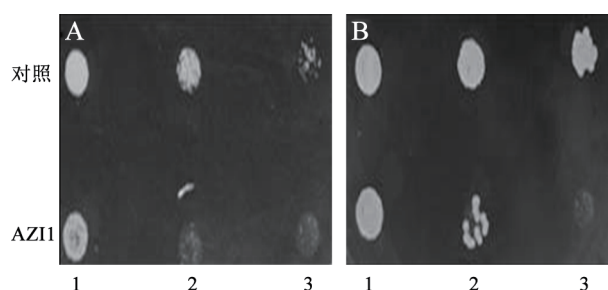


图5 AZI1重组蛋白对酿酒酵母生长的抑制作用
Fig.5 Inhibitory effect of recombinant AZI1 to the growth of *Saccharomyces cerevisiae*

A: 24 h后的生长状况; B: 72 h后的生长状况。各图中1: 稀释10倍的酵母细胞; 2: 稀释100倍的酵母细胞; 3: 稀释1 000倍的酵母细胞。AZI1重组蛋白浓度为 $120 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

编码序列的AZI1基因, 经限制性内切酶XhoI和EcoRI对目的基因片段和pET28a载体进行双酶切后, 采用T4 DNA连接酶构建得到原核表达载体, 并通过菌落PCR、双酶切方法对转化大肠杆菌

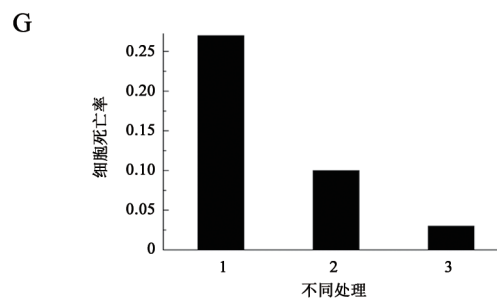
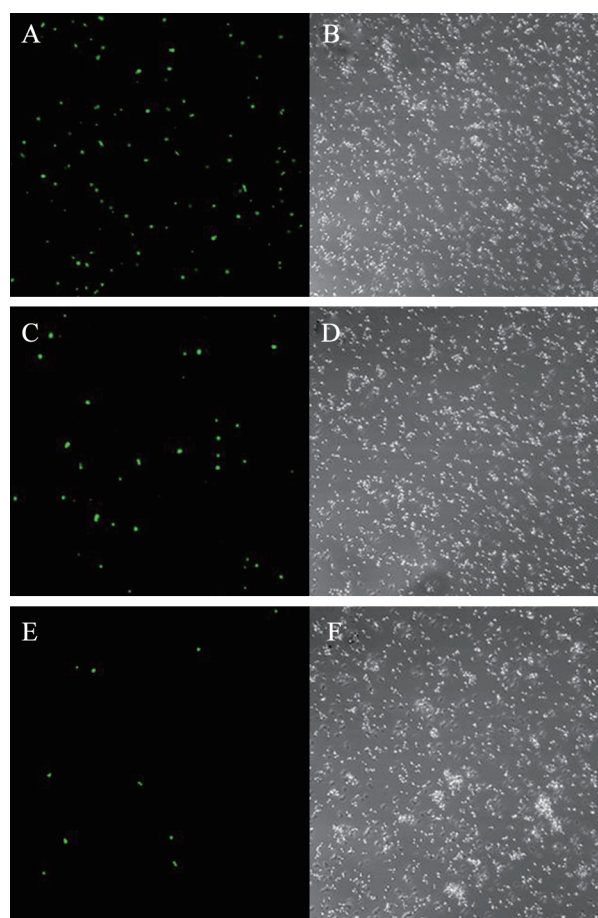


图6 AZI1重组蛋白对酵母细胞膜通透性的影响
Fig.6 Influence of recombinant AZI1 on membrane permeability of yeast cells

A~F为细胞膜通透性观察, 其中A和B: 1 000 U制霉菌素; C和D: $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白; E和F: $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA。A、C、E, SYTOX green荧光; B、D、F, 明视野; B、D、F的菌液浓度相同。G: 酵母细胞死亡率的统计学分析, 其中1: 1 000 U制霉菌素处理; 2: $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AZI1重组蛋白处理; 3: $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA处理。

DH5 α 感受态细胞以后形成的抗性克隆进行了鉴定。测序结果表明, 克隆的AZI1基因序列与GenBank数据库中登录的序列完全一致。进一步将测序结果正确的重组质粒导入大肠杆菌BL21 (DE3)

表达菌株,通过IPTG诱导表达了AZI1重组蛋白。

IPTG诱导结果显示,利用BL21 (DE3)大肠杆菌表达的AZI1重组蛋白以包涵体的形式存在于细胞中,需要用含有尿素的裂解缓冲液进行处理才能溶解。包涵体的形成与多种因素有关。较高的温度容易使蛋白质变性和聚集。表达水平较高时重组蛋白会形成错配的二硫键,不能正确折叠,进而通过非特异性结合聚集到一起。大肠杆菌细胞不能对真核蛋白进行糖基化,由于溶解度降低,很容易形成不溶性的包涵体。氨基酸组成也会影响重组蛋白的溶解度,含硫氨基酸越多越容易形成包涵体。重组蛋白折叠时形成的中间体发生聚合是包涵体形成的主要原因,pH可以影响处于部分变性状态的中间体的稳定性,pH越接近等电蛋白质越容易聚集。培养条件欠佳时,也会产生包涵体(罗莉等2012)。包涵体的形成也有有利的方面,目的蛋白与包涵体中含量很低的杂蛋白只需要简单的低速离心就能够被分离纯化,表达水平也会比较高(麻晓庆等2007)。包涵体形式的重组蛋白需要用含有尿素、盐酸胍或SDS等解离剂的裂解缓冲液进行处理才能溶解。尿素与蛋白质的氢键相互作用可以破坏蛋白质的高级结构。但在包涵体溶解过程中尿素容易析出,因此作用时间不能太长;温度也不应太高,以避免对蛋白质进行共价修饰(顾玮彦等2006)。

以包涵体形式存在的重组蛋白,往往不具有生物学活性(Cardamone等1995)。本工作对尿素溶解后的重组蛋白进行梯度洗脱,用镍离子亲和层析柱纯化得到了具有生物活性的AZI1重组蛋白。进一步通过冻干法对AZI1重组蛋白进行浓缩处理,并用于抗性分析。抑菌实验结果表明,AZI1重组蛋白能够抑制灰霉菌、赤霉菌和棉花枯萎病菌的孢子萌发和菌丝生长过程。在长势良好的Col-0野生型拟南芥叶片上滴加AZI1重组蛋白和赤霉菌、棉花枯萎病菌孢子混合液,在培养箱中黑暗处理4 d后,可观察到该蛋白能够明显增加拟南芥对真菌病原体的抗性。在对照处理中(含100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA的孢子悬浮液),拟南芥叶片的损伤程度极为严重,呈湿腐状。随着AZI1重组蛋白浓度的上升,拟南芥叶片对真菌侵染的抗性逐渐增强。当AZI1蛋白的浓度达到300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,叶片

的颜色几乎保持鲜绿色,可观察到对真菌病原体有明显的抗性。由此说明纯化得到AZI1重组蛋白具有生物活性,能够抑制真菌孢子的萌发。

AZI1重组蛋白也能够抑制酿酒酵母细胞的生长。AZI1重组蛋白(120 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)对稀释10倍的酵母细胞的抑制效果和对照处理相似,没有多大的差异。但是当酵母细胞的稀释倍数达到100和1 000时,AZI1重组蛋白对酵母细胞生长的抑制作用十分明显。进一步采用SYTOX green荧光染料对酵母细胞进行染色,发现AZI1处理能够增加酵母细胞膜的通透性。对不同处理后酵母细胞的死亡率进行统计分析发现,AZI1处理后酵母细胞的死亡率介于制霉菌素处理和BSA处理之间。AZI1、EARL11、AT4G12490和AT4G12500同属于EARL11亚家族,氨基酸序列比对及系统进化分析结果显示AZI1和EARL11是高度相似的横向(种内)同源基因,而AT4G12490与AT4G12500的关系更为密切(Zhang和Schläppi 2007)。EARL11亚家族成员都具有信号肽,它们具有亲水性的PRD结构域和疏水性的8CM结构域,前者可能与细胞壁结合且位于细胞外表面,后者可能与细胞膜结合。Li等(2012)的研究结果表明EARL11重组蛋白能够通过增加细胞膜的通透性抑制酵母细胞生长。Chassot等(2007)发现组成性表达AZI1、EARL11和AT4G12500可以显著提高拟南芥对葡萄灰霉菌的抗性,其中以AZI1过表达个体的抗性最强。这些研究报道与本工作得到的结果一致。

已有的研究结果显示,LTP家族中的其他成员LtpV.2、LtpV.3、XYP1和XYP2也具有防御功能,其中XYP1在灰霉菌侵染早期发挥功能,灰霉菌侵染25 h后这四个基因的表达会下调(Boutrot等2008; Windram等2012)。另外,迄今已经发现了许多与植物对灰霉菌抗性相关的转录因子,其中ERF家族和WRKY家族成员与植物防卫反应的关系最为密切(Jalali等2006),并且已经证明有部分转录因子直接参与了植物对灰霉菌侵染的响应过程(Thomma等1998, 1999; Audenaert等2002; Pandey等2005)。病原菌侵染高等植物后通常会诱导病程相关(pathogenesis-related, PR)蛋白的表达,这些蛋白质可以抑制病原菌的生长和蔓延,并激发产生SAR。目前已经确定了14种类型的病程相关蛋

白, 其中包括LTP。大多数从植物中分离纯化的LTP具有抗菌功能, 其机制与多种信号转导途径构成的复杂网络有关。LTP参与激发子触发植物细胞过敏性反应的信号转导过程, 它们能够通过和JA、几丁质酶等互作从而促进长距离信号的传递。另外, LTP与钙调素结合蛋白具有相同的钙调素结合活性, Ca^{2+}/CaM 信号系统可能参与植物转脂蛋白功能的调节(范芸等2011)。

LTP在抗菌信号转导中的功能还包括它参与了SAR反应。拟南芥至少编码70个LTP蛋白, 其中DIR1和DIR1-like已被发现在拟南芥SAR中参与长距离信号的转移(Champigny等2013)。AZI1蛋白具有8CM结构域, 也属于LTP家族。过表达AZI1和DIR1的拟南芥植株可以产生SAR, 但系统叶片中SA和SAG(水杨酸-2-O- β -葡萄糖苷)的含量并没有上升。AZI1过表达个体与*dir1*突变体的杂交后代以及DIR1过表达个体与*azi1*突变体的杂交后代都可以产生SAR, 并且G3P的含量比它们相应的突变体要高。进一步研究发现向*azi1*突变体注射G3P以后可以在一定程度上使SAR得到恢复, DIR1蛋白的表达量也有所增加, 说明DIR1蛋白可能在SAR中起重要作用, 也说明G3P诱导的SAR需要DIR1和AZI1共同发挥功能(Yu等2013)。在拟南芥中, AZI1能够通过增加角质的合成来抵抗灰霉菌的侵染(Chassot等2007)。AZI1也可能通过影响木质素的合成提高拟南芥对丁香假单胞杆菌*Psm* ES4326的抗性(高航等2013)。已有的研究表明, AZI1与DIR1形成的多聚复合体与SAR信号的传递有关。拟南芥*dir1-1*突变体(*defective in induced resistance 1-1*)不能产生SAR, *PR*基因在系统叶片中也不表达(Maldonado等2002)。将*dir1-1*的叶柄渗出液接种到叶片上, 不会产生或转移SAR所需的信号分子。拟南芥DIR1在烟草SAR中也具有活性, 它编码的脂质转移蛋白能够结合脂类衍生物, 形成的复合体在SAR中起长距离信号的作用(Liu等2011)。本工作发现在大肠杆菌中表达的AZI1重组蛋白能够抑制灰霉菌和酵母菌等真菌的生长。通过激光共聚焦观察到AZI1重组蛋白能够增加酵母细胞质膜的通透性, 说明AZI1可能通过破坏细胞膜结构来抑制真菌细胞的生长。

参考文献

- 范芸, 周晓燕, 王幼平(2011). 脂质转移蛋白在植物抗病中的作用. 分子植物育种, 9: 1245~1252
- 高航, 杜改亮, 麻力, 徐子勤(2013). 拟南芥抵抗丁香假单胞杆菌过程中AZI1基因功能研究. 西北植物学报, 33: 429~436
- 顾玮彦, 黄磊, 徐志南, 岑沛霖(2006). 利用his-tag纯化和复性基因工程产物肠激酶. 食品与生物技术学报, 25: 18~25
- 罗莉, 李坤, 王保成, 王明蓉(2012). 包涵体变复性技术研究进展. 中国医药生物技术, 7: 290~293
- 麻晓庆, 王继红, 韩晓曦, 褚丹, 张丕桥, 李庆伟(2007). 基因重组蛋白L243诱导表达包涵体的变性、复性与纯化. 吉林医药学院学报, 28: 1~3
- 张欣, 徐之艳, Schläppi M, 徐子勤(2011). 拟南芥AZI1基因对酿酒酵母细胞生长和蒜薹灰霉菌侵染的抑制作用. 植物生理学报, 47: 57~62
- 郑灿伟, 宾金华(2008). 植物抗真菌蛋白的抗菌机制. 植物生理学通讯, 44: 989~996
- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. Plant Physiol, 128: 491~501
- Boutrot F, Chantret N, Gautier MF (2008). Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp)* gene families and identification of wheat *nsLtp* genes by EST data mining. BMC Genomics, 9: 86
- Cardamone M, Puri NK, Brandon MR (1995). Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies. Biochemistry, 34 (17): 5773~5794
- Champigny MJ, Isaacs M, Carella P, Faubert J, Fobert PR, Cameron RK (2013). Long distance movement of DIR1 and investigation of the role of DIR1-like during systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Front Plant Sci, 4: 230
- Chassot C, Nawrath C, Métraux JP (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. Plant J, 49: 972~980
- Chen XJ, Xu HH (2011). Expression and purification of recombinant MP-GFP protein in *Escherichia coli*. Agric Sci China, 10: 394~403
- Dvořáková L, Cvrčková F, Fischer L (2007). Analysis of the hybrid proline-rich protein families from seven plant species suggests rapid diversification of their sequences and expression patterns. BMC Genomics, 8: 412
- Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr Opin Biotechnol, 14: 177~193
- Jalali BL, Bhargava S, Kamble A (2006). Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. J Phytopathol, 154: 65~74
- Josè-Estanyol M, Puigdomènech P (2000). Plant cell wall glycoproteins and their genes. Plant Physiol Biochem, 38: 97~108
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT

- (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324: 89~91
- Kader JC (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 627~654
- Lauga B, Charbonnel-Campaa L, Combes D (2000). Characterization of *MZm3-3*, a *Zea mays* tapetum-specific transcript. *Plant Sci*, 157: 65~75
- Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1998). Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J Mol Biol*, 276: 437~448
- Li L, Zhang C, Xu D, Schläppi M, Xu ZQ (2012). Expression of recombinant EARL11, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 506: 50~61
- Liu PP, von Dahl CC, Park SW, Klessig DF (2011). Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol*, 155: 1762~1768
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419: 399~403
- Minorsky PV (2002). The wall becomes surmountable. *Plant Physiol*, 128: 345~353
- Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li L, Luan S (2005). ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 1185~1193
- Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW (1995). High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure*, 3: 189~199
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 15107~15111
- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF (1999). Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, 121: 1093~1102
- Windram O, Madhou P, McHattie S, Hill C, Hickman R, Cooke E, Jenkins DJ, Penfold CA, Baxter L, Breeze E et al (2012). *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell*, 24: 3530~3557
- Yu K, Soares JM, Mandal MK, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2013). A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Rep*, 3: 1266~1278
- Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *J Genet Genomics*, 40: 23~35
- Zhang Y, Schläppi M (2007). Cold responsive EARL11 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants. *Planta*, 227: 233~243