

网络出版日期:2018-01-12
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180112.0934.014.html

小麦条锈菌效应蛋白原核表达、纯化及其溶解性研究

赵海斌¹,王媛媛²,陶虎¹
(1.西北农林科技大学 化学与药学院;2.西北农林科技大学 生命科学学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 将3个小麦条锈菌效应蛋白基因 *pst-1374*、*pst-1178* 和 *pst-8713*, 构建原核表达载体 pET-32a-PP-*pst-1374*、pET-22b-*pst-1178/8713*,并将其转入大肠杆菌 BL21(DE3),重组阳性克隆经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 检测。结果表明:效应蛋白 *pst-1374* 和 *pst-8713* 正确表达且分子质量与理论值一致,而 *pst-1178* 基因表达后可能是以多聚体的形式存在,采用镍柱亲和层析、HPLC 和离子交换柱进行纯化,获得可溶性的效应蛋白。
关键词 条锈菌;效应蛋白;原核表达;蛋白纯化
中图分类号 Q786 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)01-0038-05

由专性寄生型真菌条形柄锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, Pst)引起的小麦条锈病是一种气传病害,不仅是一种重要的世界性病害,也是长期影响中国小麦安全生产的严重生物灾害,一般流行年份可以造成约 10%~30%产量损失,即年均约 1 亿人的口粮损失,特大流行年份减产可达 60%以上,甚至使小麦颗粒无收。作为活体营养型的锈菌在侵害寄主的过程中,形成与寄主细胞有着非常紧密联系的唯一侵染结构——吸器。病原锈菌可以通过吸器从寄主细胞获取营养物质^[1],同时通过吸器向寄主细胞分泌大量的效应蛋白以抑制寄主的防御反应,这对锈菌的成功入侵至关重要。Voegelé 研究小组克隆鉴定青豆锈菌吸器分泌蛋白 RTP1,是首例被证明在植病亲和互作中于吸器特异表达,然后转移到寄主细胞内的效应蛋白^[2]。亚麻锈菌的 AvrM 和 AvrL567 效应蛋白在病原菌侵染的过程中也从吸器被转运到寄主的细胞中,并且 AvrM 和 AvrL567 在不依赖病原菌转运系统的情况下也能够进入寄主细胞,它们的跨膜转运依赖于其 N 端的转运信号,说明它们的转运可能是利用寄主细胞的转运机制^[3]。

虽然现有研究已经表明吸器与寄主细胞之间存在大量分子转运,但目前对绝大多数效应蛋白

的转运机制和致病机理仍不清楚。虽然在 AvrL567 氨基酸序列上找不到任何同源的结构域信息,但根据三维结构的拓扑学相似性在 PDB 数据库中找到一个可能具有同样功能的小麦褐斑病菌的毒素蛋白 ToxA。而 ToxA 具有一个 Arg-Gly-Asp 结构域,可以被寄主细胞膜上的类似整合素样受体识别,经过胞吞作用进入寄主细胞,这个结果暗示 AvrL567 可能的转运机制^[4]。对 AvrM 的结构研究揭示它能形成一个二聚体蛋白且具有一小块保守的疏水表面,可以跟质膜结合,对于该蛋白为什么在不依赖病原转运系统的时候也能进入寄主细胞有了更深的认识^[5]。而这两项研究充分说明蛋白质结构生物学是开展效应蛋白功能深入研究的重要手段,为揭示效应蛋白的转运机制奠定基础,对解析锈菌的致病机理具有重要意义。

目前,可以使用蛋白质结构生物学方法来解析效应蛋白的结构,通过比对已有的蛋白质结构数据库(Protein Data Bank),找到相似的结构域,来推理效应蛋白的功能,之后通过生化方面的方法来验证^[6]。本文初步对 3 个小麦条锈菌效应蛋白进行原核表达、纯化以及溶解性研究,为核磁共振法或 X-射线晶体衍射法解析其蛋白质结构^[7]和研究小麦条锈菌侵染机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

表达载体 pET-22b(+), pET-32a-pp(+), 大肠杆菌菌株 Turbo, BL21(DE3)都由西北农林科技大学化学与药学院蛋白质三维结构实验室保存并改造;效应蛋白模板由西北农林科技大学康振生教授馈赠;Taq 酶、PCR Mix、限制性内切酶(*Nde* I、*Nco* I 和 *Xho* I)、TA 克隆试剂盒、T₄ DNA 连接酶均购于宝生物工程(大连)有限公司;DNA Marker(DM2000)、质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均由北京康为世纪生物科技有限公司提供;蛋白质 Marker 购于 Thermo Fisher Scientific 公司;Ni-NTA agarose 柱购自美国 GE 公司;HPLC 的型号 FL2200 购买于浙江福利分析仪器有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建与鉴定^[8] 以康振生教授馈赠的质粒为模板,进行 PCR 扩增获得目的基因 *pst-1178*、*pst-1374* 和 *pst-8713*, 并进行 TA 克隆。使用 *Nde* I 和 *Xho* I 位点,分别将 *pst-1178*、*pst-8713* 与载体 pET-22b 进行重组,获得重组表达载体 pET-22b-*pst-1178*、pET-22b-*pst-8713*。使用 *Nco* I 和 *Xho* I 位点,将 *pst-1374* 与载体 pET-32a-pp 进行重组,获得重组表达载体 pET-32a-pp-*pst-1374*。将测序正确的表达载体转化 BL21(DE3)。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达^[9] 挑取含有重组质粒的 BL21 单克隆过夜扩大培养,以体积比 1:500 转接至 1 L 含 100 mg Amp 的液体 LB 培养基,37 °C 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6~0.8,待培养基冷却至室温后,加入终浓度 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)。pET-22b-*pst-8713*、pET-32a-pp-*pst-1374* 是 20 °C 诱导 12 h;pET-22b-*pst-1178* 为 37 °C 诱导 5 h。6 000 r/min, 4 °C 离心 5 min 收集菌体后用磷酸盐缓冲液(PBS, 20 mmol/L KH₂PO₄, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.9)重悬,加入 150 μg/mL 的溶菌酶,1:104(核酸酶与裂解液的体积比)核酸酶,1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),混合均匀后冰浴 30 min,每 5 min 混匀 1 次。超声波破碎 30 min (250 W, 工作 5 s, 间歇 5 s)后。12 000 r/min, 4 °C 离心 30 min。上清分离 SDS-PAGE 检测,之后用 0.22

μm 的聚醚砜膜过滤后,备用。

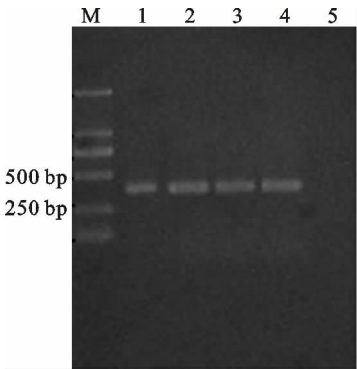
1.2.3 蛋白质的纯化 目的蛋白 *pst-1178* 和 *pst-8713* 的纯化:首先用含 10 mmol/L 咪唑的 Tris 缓冲液(20 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.9)平衡镍柱(Ni-NTA),将上述得到的上清液以 1 mL/min 匀速上样;然后用洗涤溶液(20 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.9)冲洗 3~5 柱体积,最后用洗脱溶液(20 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.250 mol/L 咪唑, pH 7.9)洗脱目的蛋白。之后测定洗脱的蛋白浓度,把配好的 buffer A($\varphi = 0.1\%$ TFA)和 buffer B($\varphi = 0.08\%$ TFA, $\varphi = 70\%$ 乙腈)分别抽滤后,超声除去气泡。洗脱的目的蛋白先用 0.22 μm 滤膜过滤,在 10 000 r/min 离心 2 min 除去气泡,用 HPLC 纯化。经 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白质纯化效果,纯化好的蛋白质样品,用真空冷冻机冻干,得到干粉,−80 °C 保存。

目的蛋白 *pst-1374* 的纯化:镍柱纯化方法与蛋白 *pst-1178* 和 *pst-8713* 一致,然后用洗脱得到的目的蛋白中以体积比 1:100 加入自备的 Precision Protease 酶^[10](1 mg/mL)酶切并用 1 L 透析液(20 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.9)透析 12 h 除去咪唑,降低盐浓度。用 buffer A(20 mmol/L Tris, pH 7.9)平衡 HiTrap Q 柱,将透析得到的蛋白液经 0.22 μm 的聚醚砜膜过滤后用 AKTA 蛋白纯化系统以 0.8 mL/min 流速上柱,上完样品后继续以 buffer A 冲洗 10~15 min,直至基线走平。然后以 buffer A、buffer B(20 mmol/L Tris, 1 mol/L NaCl, pH 7.9)进行线性梯度洗脱,经 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白质纯化效果。给纯化好的蛋白质样品中加入 1 mmol/L 苯甲脒和 $\varphi = 0.02\%$ 的 NaN₃,液氮速冻后−80 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建与鉴定

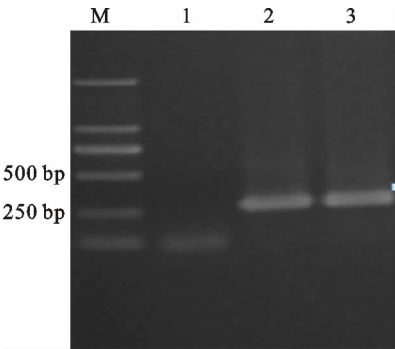
从长有含重组表达质粒的 3 个 Turbo 平板上分别挑取单克隆摇菌并分别提取质粒做 PCR 检测(图 1、图 2、图 3)条带大小与理论值一致。并送其质粒至华大基因公司测序,结果与目的基因完全一致,表明表达载体 *pet-22b-pst-1178*(图 1)、*pet-32a-pp-pst-1374*(图 2)和 *pet-22b-pst-8713*(图 3)构建成功。



M. TaKara DL2000 marker;1~4. 4 个单克隆 PCR products of recombinant plasmids from four different monoclonal cells;5. 阴性对照 Negative control

图 1 阳性重组质粒 pET-22b-*pst-1178* 的菌落 PCR

Fig. 1 PCR products of pET-22b-*pst-1178* recombinant expression vectors



M. TaKara DL2000 marker;1. 阴性对照 Negative control; 2~3. 2 个单克隆 PCR products of recombinant plasmids from two different monoclonal cells

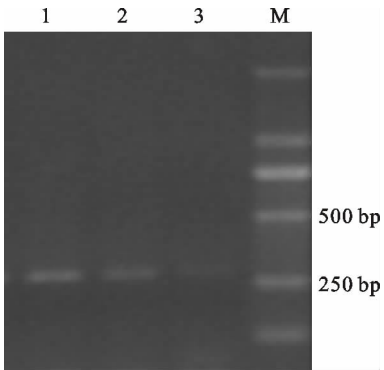
图 2 阳性重组质粒 pET-32a-PP-*pst-1374* 的菌落 PCR

Fig. 2 PCR products of pET-32a-PP-*pst-1374* recombinant expression vectors

2.2 目的蛋白表达与纯化

2.2.1 *pst-1178* 的表达纯化 将诱导表达的菌体破碎,离心后上清过镍柱,将洗脱得到的融合蛋白经 HPLC 纯化,获得比较纯的目的蛋白(图 4)。纯化后蛋白条带与理论值(13 ku)不一致,大约是理论值的 3 倍。根据其他试验得出效应蛋白 *pst-1178* 是以多聚体形式存在于盐溶液中。

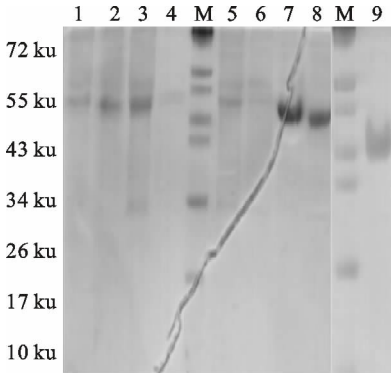
2.2.2 *pst-1374* 的表达纯化 将诱导表达的菌体破碎,离心后上清过镍柱,经 Elution buffer 洗脱得到的融合蛋白约 27 ku,用 Prescission Protease 酶酶切后得到约 10 ku 蛋白和 17.2 ku 标签蛋白。由于没有酶切完全,所以图中也有融合蛋白的条带。经 HiTrap Q 纯化后得到单一条带的电泳纯目的蛋白且分子质量与理论值一致(图 5、图 6)。



1~2. 2 个单克隆 PCR products of recombinant plasmids from two different monoclonal cells;3. 阴性对照 Negative control;M. TaKara DL2000 marker.

图 3 阳性重组质粒 pET-22b-*pst-8713* 的菌落 PCR

Fig. 3 PCR products of pET-22b-*pst-8713* recombinant expression vectors



1~4. 蛋白表达的部分 The parts of expression;1. 未诱导的大肠杆菌 The cell lysate before induction;2. IPTG 诱导后 The cell lysate after induction;3. 超声破碎后的上清 The supernatant;4. 离心后的沉淀 The supernatant and pellet of cell lysate;M. 蛋白分子量标尺 Protein molecular weight marker (Thermo # 26617);5~8. 镍柱纯化过程 The parts of nickel column purification;5. 穿入 Flowthrough of supernatant of cell lysate during loading;6. 10 mmol/L 咪唑的洗脱液 The wash of 10 mmol/L imidazole after loading;7、8. 250 mmol/L 咪唑的洗脱液 Purification product eluted with 250 mmol/L imidazole lysis buffer;9. HPLC 纯化后的电泳纯蛋白 Results of HPLC purification

图 4 Tricine-SDS-PAGE 分析 *pst-1178* 效应蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化过程

Fig. 4 Expression and purification of His-tagged *pst-1178* on Tricine-SDS-PAGE

2.2.3 *pst-8713* 的表达纯化 将诱导表达的菌体破碎,离心后上清过镍柱,经洗脱得到融合蛋白,再经 HPLC 纯化获得比较纯的目的蛋白,其分子质量与理论值(11 ku)一致(图 7)。

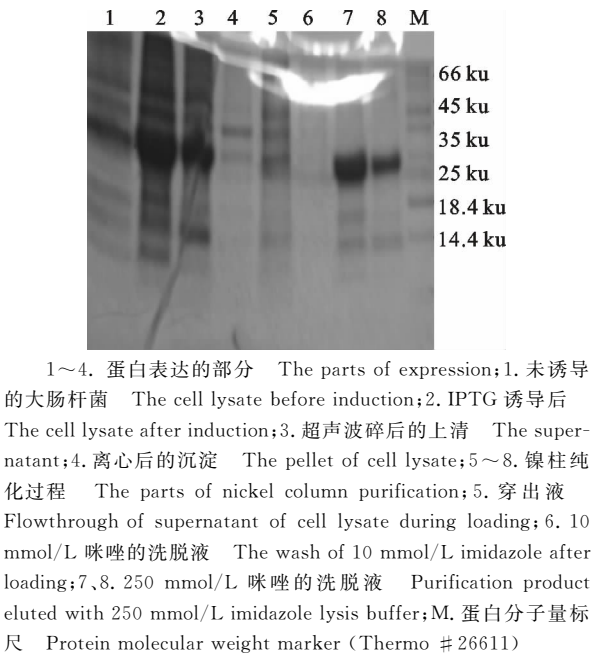
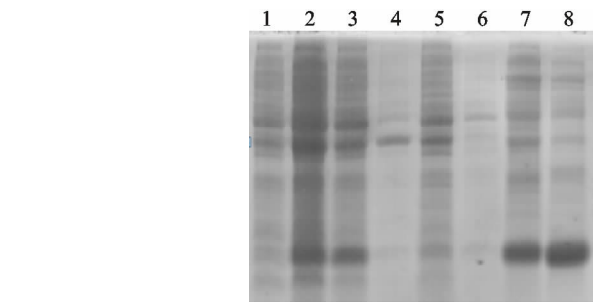


图 5 Tricine-SDS-PAGE 分析 pst-1374 效应蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化过程

Fig. 5 Expression and purification of His-tag pst-1374 on Tricine-SDS-PAGE



1~4. 蛋白表达的部分 The parts of expression;1. 未诱导的大肠杆菌 The cell lysate before induction;2. IPTG 诱导后 The cell lysate after induction;3. 超声波碎后的上清 The supernatant;4. 离心后的沉淀 The pellet of cell lysate;5~8. 镍柱纯化过程 The parts of nickel column purification;5. 穿出液 Flowing through of supernatant of cell lysate during loading;6. 10 mmol/L 咪唑洗脱液 The wash of 10 mmol/L imidazole after loading;7,8. 250 mmol/L 咪唑洗脱液 Purification product eluted with 250 mmol/L imidazole lysis buffer;M1. 蛋白分子量标尺 (Thermo # 26611) Protein molecular weight marker (Thermo # 26611);9-10. HPLC 纯化后的电泳纯蛋白 Present results of HPLC purification

图 7 Tricine-SDS-PAGE 分析 pst-8713 效应蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化过程

Fig. 7 Expression and purification of His-tagged pst-8713 on Tricine-SDS-PAGE

3 结论与讨论

小麦条锈菌效应蛋白,是一类吸器分泌性蛋白,与条锈菌侵染和致病性密切相关。本试验对于效应蛋白的研究,为以后揭开条锈菌侵染途径提供基础。

本研究证实效应蛋白在原核表达系统中可溶性表达。用常规的纯化方法来纯化,可得电泳纯的蛋白质。纯化后 3 个效应蛋白的水溶性很好,浓缩后都未发生蛋白质沉淀,为下一步通过核磁方法研究效应蛋白结构奠定基础。

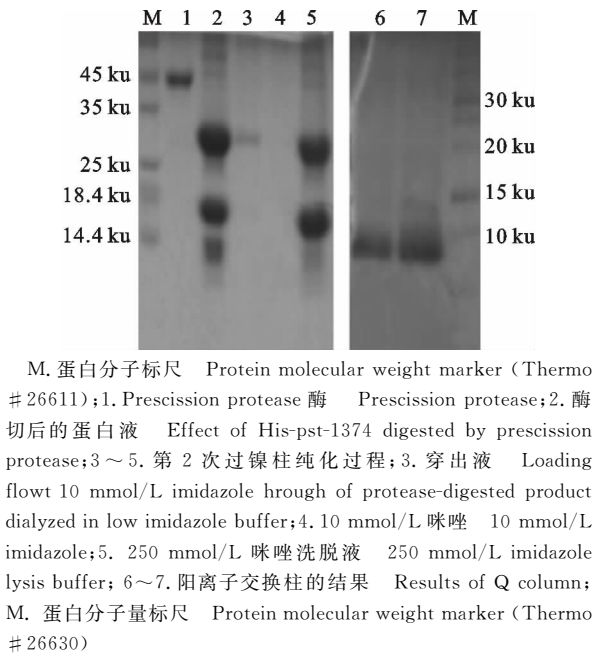
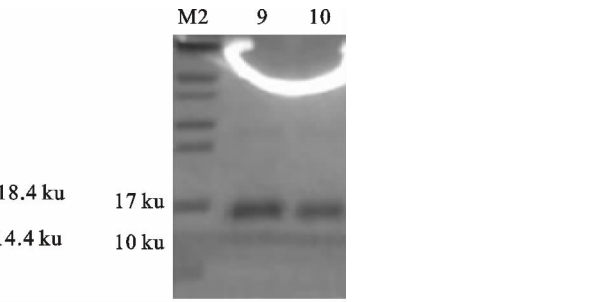


图 6 Tricine-SDS-PAGE 分析 pst-1374 效应蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化过程

Fig. 6 Expression and purification of His-tagged pst-1374 on Tricine-SDS-PAGE



在 pst-1178 的纯化过程中,发现 Tricine-SDS-PAGE 电泳条带分子质量大小与理论值不符合,通过不同盐浓度下 pst-1178 的 15N-HSQC 二维谱证明这个蛋白可能是聚合物^[11],进一步可采用动态光散射等方法来测定其分子质量并加以确证^[10]。

图 7 Tricine-SDS-PAGE 分析 pst-8713 效应蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化过程

Fig. 7 Expression and purification of His-tagged pst-8713 on Tricine-SDS-PAGE

今后,将通过解析效应蛋白的三维结构以及它们的体外、体内的蛋白互作试验,深入探索效应蛋白的调控通路,为寻找跨膜方式和阐明条锈菌侵染机制,及更有效长久地防治小麦条锈菌提供借鉴。

参考文献 Reference:

- [1] STRUCK C, HAHN M, MENDGEN K. Plasma membrane H^+ -ATPase activity in spores, germ tubes, and haustoria of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1996, 20: 30-35.
- [2] KEMEN E, KEMEN A C, RAFIQI M, *et al.* Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2005, 18: 1130-1139.
- [3] RAFIQI M, GAN P H, RAVENSDALE M, *et al.* Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22: 2017-2032.
- [4] WANG C I, GUNCAR G, FORWOOD J K, *et al.* Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 2898-2912.
- [5] VE T, WILLIAMS S J, CATANZARITI A M, *et al.* Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110: 17594-17599.
- [6] 汤春雷. 条锈菌与小麦互作中效应蛋白及诱导寄主细胞坏死基因的鉴定与功能分析[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
TANG CH L. Characterization and functional analyses of effectors and host cell death inducing genes in wheat and *Puccinia striiformis* interactions [D]. Yangling Shaanxi; Northwest A&F University, 2013.
- [7] 龚泽茂, 邱水, 王媛媛, 等. 大肠杆菌二氢硫辛酸转乙酰基酶的外周亚基结合结构域的溶液构象[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 6: 624-629.
GONG Z M, QIU SH, WANG Y Y, *et al.* Solution conformation of peripheral subunit-binding domain of *E. coli* dihydrolipoyl transacetylase [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 6: 624-629.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂译. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 611-633.
SAMBROOK J, RUSSELL D W, HUANG P T, *tran.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3 edition. Beijing: Science Press, 2002: 611-633.
- [9] COLIGAN J E, DUNN B M, PLPEGH H L, 等. 李慎涛译. 精编蛋白质科学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 90-96.
COLIGAN J E, DUNN B M, PLPEGH H L, *et al.* LI SH T, *tran.* Short Protocols in Protein Science [M]. Beijing: Science Press, 2007: 90-96.
- [10] 龚泽茂. 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶与二氢硫辛酸转乙酰基酶间的相互作用机制初步研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
GONG Z M. Preliminary study on the interaction mechanism between Pyruvate dehydrogenase and dihydrolipoamide acetyltransferase of *E. coli* [D]. Yangling Shaanxi; Northwest A&F University, 2015.
- [11] ARBELY E, NEUWEILER H, SHARPE T D, *et al.* The human peripheral subunit-binding domain folds rapidly while overcoming repulsive coulomb forces [J]. *Protein Science*, 2010, 19(9): 1704-1713.

Prokaryotic Expression, Purification and Solubility of Three Effectors from Wheat Stripe Rust Fungus

ZHAO Haibin¹, WANG Yuanyuan² and TAO Hu¹

(1. College of Chemistry & Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Haustorium is the only specialized infection structure of wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). The fungus takes nutrients from the host by haustorium and delivers effectors directly into host cells in order to establish an intimate feeding relationship during infection. In this study, three effectors (*pst-1374*, *pst-1178* and *pst-8713*) were cloned to pET-32a-PP-*pst-1374*, pET-22b-*pst-1178*/8713 vectors and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells. The positive recombinant clones were induced by IPTG and the expressed proteins were analyzed by SDS-PAGE. The results indicated the effectors *pst-1178* and *pst-1374* were expressed correctly and the molecular mass of effectors estimated were in consent with the theoretical values. Meanwhile, preliminary studies suggested the effector *pst-1178* existed as polymer in solution. The target proteins were purified by Ni-NTA, HPLC and ion-exchange column and the soluble protein were obtained.

Key words Stripe rust; Effector proteins; Expression; Purification

Received 2016-08-15

Returned 2017-04-06

Foundation item Special Talent Recruitment Fund of Northwest A&F University (No. Z111021101); the National Natural Science Foundation of China (No. 21403168).

First author ZHAO Haibin, male, master student. Research area: protein-protein interaction and structural resolution. E-mail: 543441552@qq.com

Corresponding author TAO Hu, male, professor. Research area: protein-protein interaction and structural resolution. E-mail: taohu@nwsuaf.edu.cn (责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)