

油菜菌核病菌激发子基因 *SsXYN* 克隆及表达载体构建

蒋冰心, 吴 群, 高智谋, 张华建*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘 要: 以核盘菌菌株 NGA₄ 提取的总 RNA 为模版, 利用 RT-PCR 技术扩增获得 *SsXYN* 基因的全长 cDNA 片段, 将其克隆到 pMD19-T 载体上, 菌落 PCR、酶切鉴定和 cDNA 测序结果表明成功克隆了核盘菌 *SsXYN* 基因。从 pMD19-T : *SsXYN* 载体上, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切切下目的基因片段, 将该基因片段连接到原核表达载体 pET32a 中。菌落 PCR 和酶切鉴定结果显示成功构建了表达载体 pET32a : *SsXYN*。利用热击法将该重组表达载体导入大肠杆菌 BL21, 获得携带 *SsXYN* 基因的大肠杆菌菌株, 为进一步研究激发子诱发植物抗病性机理奠定了基础。

关键词: 核盘菌; *SsXYN*; 激发子

中图分类号: S435.654

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0631-05

Cloning of *Sclerotinia sclerotiorum* elicitor gene *SsXYN* and the expression vector construction

JIANG Bing-xin, WU Qun, GAO Zhi-mou, ZHANG Hua-jian

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Total RNA was extracted from *Sclerotinia sclerotiorum* NGA₄ mycelia and used as the template to amplify the full length of cDNA of *SsXYN* gene by RT-PCR, and the gene fragment was subsequently cloned into pMD19-T vector. The results of bacterial colony PCR, enzyme analysis and sequencing analysis indicated that the *S. sclerotiorum* *SsXYN* gene was successfully cloned. *SsXYN* gene was digested completely from pMD19-T : *SsXYN* by *Bam*H I and *Sal* I, and then was cloned into expression vector pET32a. The results of bacterial colony PCR and enzyme analysis showed the expression vector pET32a : *SsXYN* was successfully constructed. After that, the recombinant expression vector was carried into *E. coli* BL21 by heat-shock transformation, and the strain of *E. coli* BL21 carrying *SsXYN* gene was obtained. The study provides a basis for our understanding of the elicitor *SsXYN* downstream signaling pathway in plant immunity.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; *SsXYN*; elicitor

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) 是一种世界性植物病原真菌, 主要分布于温带与亚热带地区, 其寄主范围十分广泛, 可寄生 75 科 400 多种植物^[1]。由该菌引致的油菜菌核病是我国油菜主要病害之一, 一般可使油菜减产 20%~40%, 严重时可达 50% 以上, 已成为当前油菜生产的主要障碍。目前, 对于该病的防治主要采取以种植抗病品种为基础、改进栽培管理、适时化学防治的综合治理策略。然而, 目前生产上缺乏高抗品种, 农业防治费时费工且收效甚微, 化学防治又易导致“3R”问题。因此, 对于此病的防治必须寻求新的途径。激发子

是一类能激活寄主植物产生防卫反应以达到抗病、防病的目的的特殊化合物^[2-8]。其从化学组成上可分为多糖类、糖蛋白、多肽类等^[9-14], 其中蛋白以及多肽类激发子包括疫霉属产生的激发素 (elicitins)、细菌 (harpins) 蛋白、木聚糖酶、植物病毒的蛋白类激发子以及与寄主抗病基因相对应的病原菌专化性无毒基因 (avirulence gene) 产物无毒蛋白等。激发子可以代替化合物, 诱发植物的抗病性, 从而阻止或者限制病害的发生和扩展; 此外, 正调控和负调控激发子信号的基因也可以应用到抗病育种中, 使植物获得对病原菌的广谱抗性。由于

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31101426) 和公益性行业 (农业) 科研专项 (201103016) 共同资助。

作者简介: 蒋冰心, 女, 硕士研究生。

* 通信作者: 张华建, 女, 博士, 副教授。E-mail: hjzhang@ahau.edu.cn

激发子诱发的非寄主抗性具有稳定和持久的特点，因此克隆油菜菌核病菌来源的激发子基因，并进行蛋白的激发子活性测定，对研究激发子诱发的非寄主抗性分子机理及油菜菌核病的防治具有深远的意义和广阔的应用前景。*SsXYN* 是通过油菜核盘菌基因组芯片信息中筛选出的可能诱导植物产生非寄主抗性的基因。本研究利用 RT-PCR 技术克隆 *SsXYN* 基因，并构建了 pET32a : *SsXYN* 原核表达载体，旨在为揭示激发子诱发的非寄主抗性分子机理和应用激发子防治油菜菌核病奠定基础。本研究对于开发以病原菌激发子为主要成分的新型生物农药，设计高效、低毒的植物病害控制策略也具有重要的实践指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒载体 pET32a 为南京农业大学植保学院提供；pMD19-T 质粒为宝生物工程(大连)有限公司产品；大肠杆菌 DH5 α 、BL21 及核盘菌 NGA₄ 菌株由安徽农业大学植保学院真菌研究室保存提供。

1.1.2 主要试剂 胶回收试剂盒，First-Strand cDNA Synthesis kit, TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit 均购于宝生物工程(大连)有限公司；质粒提取试剂盒为 Axygen 公司产品；限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I 购于 Fermentas 公司；其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 常规分子克隆实验技术 电泳、DNA 切胶回收、大肠杆菌感受态的制备、酶切、转化，提取质粒等操作方法参见文献^[15]。

1.2.2 核盘菌 NGA₄ 菌株的培养 接取 NGA₄ 菌体于 PDA 培养基中，28℃ 摇菌培养 4 d 直至其长出大量菌丝。

1.2.3 油菜菌核病菌 *SsXYN* 基因的克隆 采用 TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit 提取油菜菌核病菌菌丝总 RNA。油菜菌核病菌 cDNA 合成以菌丝总 RNA 为模版，采用 First-Strand cDNA Synthesis kit 使用说明合成 cDNA。油菜菌核病菌 *SsXYN* 基因 cDNA 的 PCR 扩增所用引物是根据 GenBank 中 *SsXYN* 基因 mRNA 序列，在上游和下游引物的 5' 端分别加入 *Bam*H I、*Sal* I 酶切位点和保护性碱基。

上游引物：

5'-CGCGGATCCATGCTTACGGTATCCAACC-3'

下游引物：

5'-ACGCGTCGACCTACAAAGCTGCCAATATGG-3'

以 cDNA 为模版进行 PCR 扩增，反应条件为 95℃ 预变性 4 min，94℃ 变性 30 s，54℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 90 s，共 30 个循环，72℃ 延伸 10 min，4℃ 终止反应。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，并回收纯化。

油菜菌核病菌 *SsXYN* 基因 TA 克隆与鉴定。将回收纯化后的 *SsXYN* 基因片段用 ligation solution 与 pMD19-T 载体连接，通过热击法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，平板涂布于 50 μ g·mL⁻¹ 的氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 培养基上筛选阳性克隆。挑取单菌落在装有含有 50 μ g·mL⁻¹ Amp LB 的离心管中 37℃ 培养过夜，取 2 μ L 上清进行 PCR 检测。菌落 PCR 验证后的菌液抽提质粒，用双酶切 (*Bam*H I 和 *Sal* I) 切下目的条带，电泳检测，并回收纯化。将经抽提质粒双酶切 (*Bam*H I 和 *Sal* I) 并做 PCR 鉴定后的阳性克隆质粒送至 Invitrogen 公司测序。

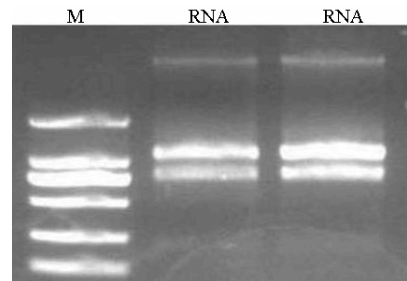
1.2.4 原核表达载体的构建 取经测序鉴定的 pMD19-T : *SsXYN* 质粒，用 *Bam*H I 和 *Sal* I 完全双酶切切下目的基因片段电泳检测并回收纯化。pET32a 载体用 *Bam*H I 和 *Sal* I 完全酶切，电泳检测并回收目标载体片段。将该载体片段与目的基因片段用 T4 DNA 连接酶连接，继而转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，使用含有 Amp 抗性的 LB 培养基进行筛选并菌落 PCR 和酶切鉴定。

将经鉴定的 pET32a : *SsXYN* 质粒转化入大肠杆菌 BL21 感受态细胞，37℃ 过夜，进行菌落 PCR 检测，甘油菌保存备用。

2 结果与分析

2.1 *SsXYN* 基因 PCR 扩增

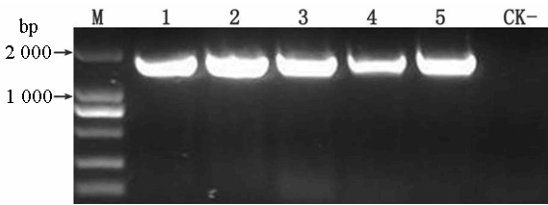
提取核盘菌 NGA₄ 总 RNA (图 1)，用反转录酶反转录得 cDNA。以反转录 cDNA 为模版，用引物 *SsXYN*-F、*SsXYN*-R 进行扩增，可扩增出一条带约为 1 500 bp 的特异性片段，片段大小与预期结果相符 (图 2)。



M: DNA marker; RNA: 核盘菌 NGA₄ 总 RNA
Total RNA extracted from NGA₄ mycelia

图 1 NGA₄ 核盘菌总 RNA

Figure 1 *Sclerotinia sclerotiorum* NGA₄ mycelia total RNA



M: DNA marker; 1~5: DNA 部分片段 Amplified partial DNA fragments; CK-: 阴性对照 Negative control

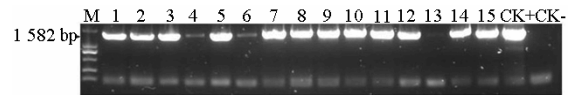
图 2 *SsXYN* 基因的 cDNA 克隆

Figure 2 Clone of *SsXYN* from *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2 *SsXYN* 基因的 TA 克隆与鉴定

SsXYN 基因与 pMD19-T 载体连接, 并将连接产物通过热击法导入大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞中, 用含 50 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性单克隆。*SsXYN* 基因 TA 克隆菌落 PCR 鉴定 (图 3), 结果表明所挑选的菌落中都含有重组质粒的阳性克隆, 其大小与扩增产物对比后发现大小基本一致。

选取已验证菌液送至上海生物工程公司测序。测序结果表明, 扩增结果与数据库中的核苷酸序列完全一致 (图 4), 表明高保真聚合酶的扩增准确无误, 基因克隆正确。经完全双酶切 (*Bam*H I 和 *Sal* I) 获得的基因片段, 可用于原核表达载体的构建。



M: DNA marker; 1~15: 检测片段 Detected fragments; CK+: 阳性对照 Positive control; CK-: 阴性对照 Negative control

图 3 *SsXYN* 基因 TA 克隆菌落 PCR 鉴定

Figure 3 Bacteria colony PCR of pMD19-T: *SsXYN*

2.3 pET32a: *SsXYN* 重组质粒构建

选取 pMD19-T: *SsXYN* 阳性克隆, 摇菌培养, 抽提质粒。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 完全双酶切切下目的基因片段 (图 5), 电泳检测并回收纯化。

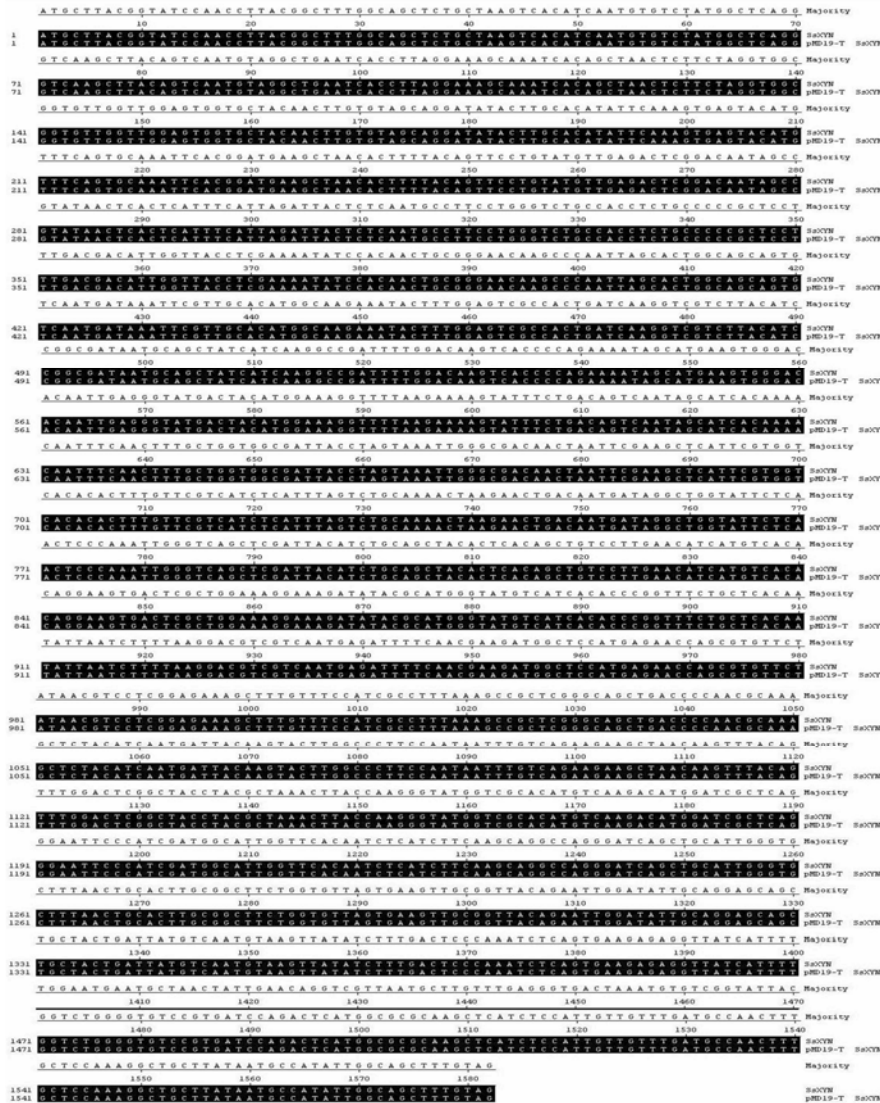
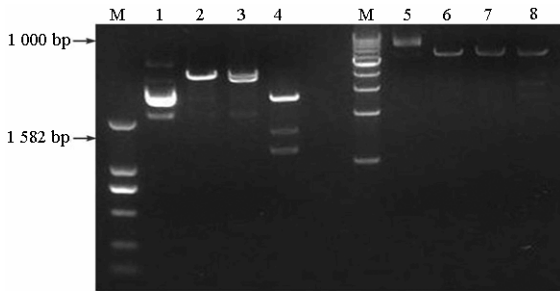


图 4 *SsXYN* 基因序列比对

Figure 4 Sequence alignment of *SsXYN* from pMD19-T: *SsXYN* and *Sclerotinia sclerotiorum* database



M. DNA Mark; 1: pMD19-T: SsXYN 质粒; 2: pMD19-T: SsXYN 质粒 *Bam*H I 单切; 3: pMD19-T: SsXYN 质粒 *Sal* I 单切; 4: pMD19-T: SsXYN 质粒 *Bam*H I、*Sal* I 双切; 5: pET32a 质粒; 6: pET32a 质粒 *Bam*H I 单切; 7: pET32a 质粒 *Sal* I 单切; 8: pET32a 质粒 *Bam*H I、*Sal* I 双切

1. Plasmid of pMD19-T: SsXYN; 2. Single digestion of plasmid of pMD19-T: SsXYN by *Bam*H I; 3. Single digestion of plasmid of pMD19-T: SsXYN by *Sal* I; 4. Double digestion of plasmid of pMD19-T: SsXYN by *Bam*H I and *Sal* I; 5. Plasmid of pET32a; 6. Single digestion of plasmid pET32a by *Bam*H I; 7. Single digestion of plasmid pET32a by *Sal* I; 8. Double digestion of pET32a plasmid by *Bam*H I and *Sal* I

图 5 pMD19-T: SsXYN 和 pET32a 质粒酶切
Figure 5 Enzyme digestion of pMD19-T: SsXYN and pET32a

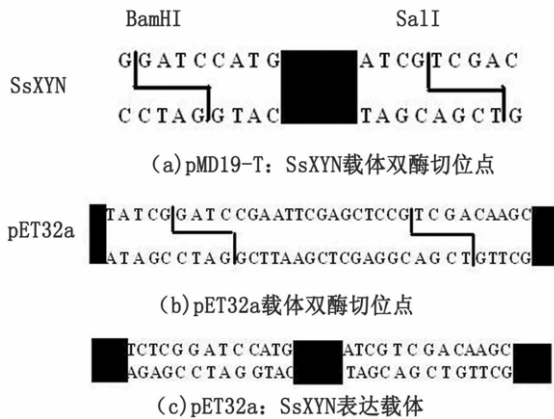
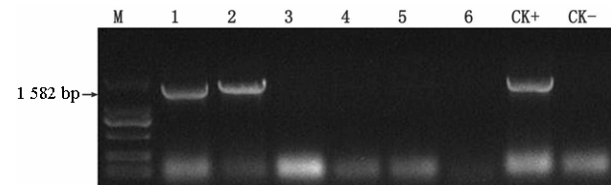


图 6 pET32a: SsXYN 载体的构建
Figure 6 Construction of recombinant plasmids pET32a: SsXYN



M: DNA marker; 1~6: 检测片段; CK+: 阳性对照; CK-: 阴性对照
1-6: detected fragments; CK+: positive control; CK-: negative control

图 7 pET32a : SsXYN 重组质粒菌落 PCR 检测
Figure 7 Bacteria colony PCR of pET32a : SsXYN

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 将 pET32a 载体完全酶切, 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收酶切产

物。从 pMD19-T: SsXYN 质粒切下的 *SsXYN* 目的基因片段与 pET32a 载体切下的表达载体片段具有互补的粘性末端 (图 6)。

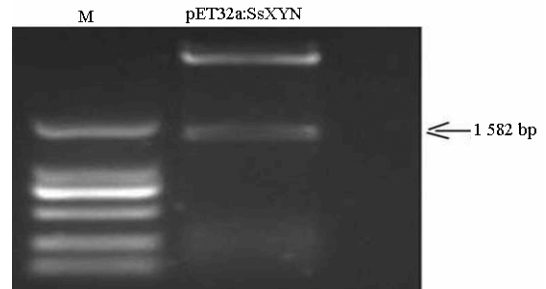


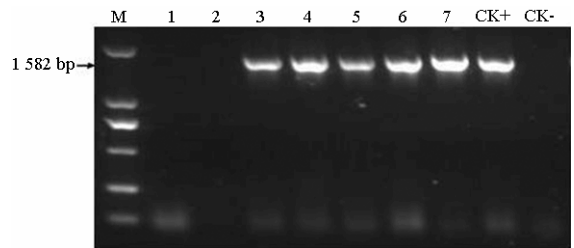
图 8 重组质粒 pET32a: SsXYN 酶切鉴定
Figure 8 Enzyme digestion of pET32a: SsXYN

酶切获得的 *SsXYN* 与载体 pET32a 按照摩尔比为 10:1 比例用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物用热击法转入大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞。在含有 Amp 的 LB 平板上培养, 阳性菌落可在 12~24 h 后长出。

从转化平板上选取单菌落进行 PCR 验证, 结果表明阳性克隆中含有 *SsXYN* 基因片段 (图 7)。抽提已 PCR 验证菌液的质粒, 并用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 电泳检测, 结果也表明阳性克隆中含有 *SsXYN* 基因片段 (图 8)。从菌落 PCR 和酶切结果鉴定结果可知, 载体构建成功, 可用于后期的蛋白的诱导表达。

2.4 重组载体导入大肠杆菌 BL21 感受态细胞

将重组质粒 pET32a: SsXYN 导入大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 平板上进行培养, 继而菌落 PCR 检测筛选阳性克隆 (图 9)。结果显示筛选的阳性菌落携带质粒 pET32a: SsXYN, 可用于后期原核蛋白的诱导和活性测定。



M: DNA marker; 1-7: 检测片段; CK+: 阳性对照; CK-: 阴性对照
1-7: detected fragments; CK+: positive control; CK-: negative control

图 9 重组质粒 pET32a: SsXYN 导入 BL21 细胞中菌落 PCR 鉴定
Figure 9 Bacteria colony PCR of pET32a: SsXYN in *E. coli* BL21

3 讨论

植物细胞壁主要由胞间层、初生壁、次生壁组成, 对植物起着机械防护和失水保护的作用, 是植物抵抗病原菌侵入的第一道障碍。木聚糖是植物次生壁中半纤维素的主要成分, 占次生壁组分的 20%~30%, 木聚糖酶是一种由病原菌产生的对细胞壁组分有降解作用的酶类。一方面, 木聚糖酶由于能分解植物细胞壁而可能促进病原菌侵染; 另一方面, 木聚糖酶还可能诱发植物的抗病防御系统。目前, 国内外众多学者对木聚糖酶进行了大量的研究, 工作主要集中在致病过程中的功能研究, 而其在植物防御中的作用还未见报道。本研究采用 RT-PCR 技术克隆到编码 *S. Sclerotiorum* 木聚糖酶的 *SsXYN* 基因, 构建了 pET32a: *SsXYN* 表达载体, 并将该载体导入易于表达的大肠杆菌 BL21 细胞中。可为后续通过原核诱导蛋白, 研究 *SsXYN* 基因是否在激发植物免疫信号和植物对病原菌的非寄主抗性中起作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Boland G J, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Pathol*, 1994, 16(2): 93-108.
- [2] Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation[J]. *Plant Physiol*, 1983, 73(2): 497-506.
- [3] Wendehenne D, Binet MN, Blein JP, et al. Evidence for specific, high affinity binding sites for a preteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane[J]. *FEBS Lett*, 1995, 374(2): 203-207.
- [4] Namberger T, Nennstiel D, Jabs T, et al. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses[J]. *Cell*, 1994, 78(3): 449-460.
- [5] Legendre L, Heinsteinst PF, Low PS. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(28): 20140-20147.
- [6] Sticher L. Systemic acquired resistance [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35(1): 235-270.
- [7] Ward E R, Uknes S J, Williams S C, et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(10):1085-1094.
- [8] Kuc J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants [J]. *Crop Protection*, 2000, 19(8/10): 859-861.
- [9] Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, et al. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19(7): 711-724.
- [10] Cruickshand I, Perin DR. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*[J]. *Life Sci*, 1968, 7(10): 449-456.
- [11] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 272-285; 305-332.
- [12] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 366-369.
- [13] Mukherjee A, Cui Y, Liu, Y, et al. Molecular characterization and expression of the *Erwinia carotovora* hrpN_{Ecc} gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, 10(4): 462-471.
- [14] Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. *Science*, 1992, 257(5066): 85-88.
- [15] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 26-395.