

冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 冰核基因 *iceA* 的原核表达及冰核活性分析

姚润贤^{1,2}, 袁哲明^{1,2*}

(1.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省植物病虫害生物学与防控重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为获得具有高冰核活性的基因工程菌, 从冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 扩增冰核基因 *iceA*, 将其克隆到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 单、双酶切鉴定并测序; 阳性克隆目的片段亚克隆到表达载体 pET-23a(+) 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 单、双酶切鉴定重组质粒; 阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 并经 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测表明, 冰核基因 *iceA* 能够并以包涵体形式表达, 相对分子质量约为 180 000。冰核活性测定结果表明, 重组菌 BL21(DE3)pLysS/pET-*ice* 的冰核活性与野生冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 在 -5、-4、-3、-2 °C 下无明显差别。

关 键 词: 冰核细菌; 原核表达; 冰核蛋白; 冰核活性

中图分类号: S433; Q81

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0354-05

Prokaryotic expression of *iceA* gene from ice nucleation active bacteria *Erwinia ananas* 110 and analysis of ice nucleation activity

YAO Run-xian^{1,2}, YUAN Zhe-ming^{1,2*}

(1.Hunan Provincial Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: To obtain recombinant strain with high ice nucleation activity, *iceA* gene were amplified by PCR from ice nucleation active bacteria *Erwinia ananas* 110 and cloned into vector pMD19-T which was transformed into *E.coli* DH5 α . The recombinant clones were screened by single and double digestion before sequenced. From the positive recombinant strain, *iceA* gene was subcloned into prokaryotic expression vector pET-23a(+), resulting in recombinant plasmid pET-23a(+)-*ice* which was transformed into *E.coli* BL21(DE3)pLysS and induced by IPTG. SDS-PAGE indicated that ice nucleation active protein was expressed as inclusion bodies with molecular weight of about 180 000. Ice nucleation activity test showed there was no difference in ice nucleation activity under -5, -4, -3, and -2 °C between recombinant *E.coli* BL21(DE3)pLysS and wild ice nucleation active bacteria *Erwinia ananas* 110.

Key words: ice nucleation active bacteria; prokaryotic expression; ice nucleation active protein; ice nucleation activity

冰核活性细菌(ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌)是一类能在低温条件下催化水分子形成细腻规则冰晶, 在水由液态向固态转化过程中起冰

核作用的微生物, 常见于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)^[1-5]。

收稿日期: 2013-03-09

基金项目: 湖南省杰出青年基金(10JJ1005)

作者简介: 姚润贤(1985—), 男, 广东肇庆人, 硕士研究生, 主要从事害虫生物防治研究, saiman131415@163.com; *通信作者, zhmyuan@sina.com

Yankofsky 等^[6]根据冰核活性细菌形成冰核所需的最高温度将冰核蛋白(ice nucleation active protein, INP)分为3种类型:A型冰核(Type A),在-5~-2℃就有冰核活性;B型冰核(Type B),在-7~-5℃有冰核活性;C型冰核(Type C),在-10~-7℃有冰核活性。1990年,Turner 等^[6]将3种冰核活性的温度范围更精确地划分为-4.4℃以上、-4.8~-5.7℃和-7.6℃以下。由于冰核细菌有成冰核特性,它的研究与应用已广泛涉及促冻杀虫^[7-9]领域。对许多农业害虫来说,其越冬死亡率高低往往是决定翌年危害程度的重要因素,因此,利用冰核细菌降低越冬虫源基数是控制害虫发生的有效措施^[10]。笔者拟构建A型冰核基因的原核表达载体,为开展含冰核基因促冻杀虫重组病毒的构建及其应用研究做好准备,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 由中国农业科学院植物保护研究所孙福在先生提供;感受态大肠杆菌 DH5 α 为湖南省植物病虫害生物学与防控重点实验室保存;感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 为北京康为世纪生物科技有限公司产品。

1.1.2 主要试剂

细菌基因组DNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;HotStar LAMP DNA Polymerase、dNTP、细菌蛋白抽提试剂盒、包涵体蛋白溶解液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、ProteinShow G250 蛋白快速染色试剂、SDS-PAGE上样缓冲液(还原,5 \times)购自北京康为世纪生物科技有限公司;限制性核酸内切酶 *Sma* I、*Nde* I 和 *EcoR* I 为纽英伦生物技术(北京)有限公司产品;*T4* DNA连接酶、克隆载体pMD19-T为宝生物工程(大连)有限公司产品;氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、氯霉素(Chloromycetin, Chl)为生工生物工程(上海)股份公司产品;表达载体pET-23a(+)为Novagen公司产品。试验所使用引物由生工生物工程(上海)股份公司合成。

1.2 方法

1.2.1 冰核细菌基因组的提取

按天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组DNA提取试剂盒使用说明书操作。

1.2.2 冰核基因 *iceA* 的PCR扩增

参考文献[11-12],用Primer5.0设计引物F-ice、R-ice。

上游引物 F-ice 5'-GCGGGTTTTACATATGAAAGAAG-3'(下划线标出部分为 *Nde* I 识别位点);

下游引物 R-ice 5'-GCGAAGAATTCCTCTGTATGGC-3'(下划线标出部分为 *EcoR* I 识别位点)。

以冰核细菌基因组DNA为模板,PCR反应体系为:LAMP DNA Polymerase 1 μ L(5 U/ μ L),dNTP Mix(2.5 mol/L each) 4 μ L,模板DNA 1 μ L(100 ng/ μ L),10 \times LAMP PCR Buffer 5 μ L,F-ice 1 μ L(10 μ mol/L),R-ice 1 μ L(10 μ mol/L),ddH₂O 37 μ L,共50 μ L。PCR反应条件为:95℃预变性3 min;94℃变性45 s;55℃退火1 min;72℃延伸5 min;25个循环;72℃终延伸10 min。PCR扩增产物用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳分离,检测目的条带是否在合适位置,并切胶回收。

1.2.3 重组克隆载体 pMD19-T-ice 的构建

克隆载体连接体系:PCR产物(100 ng/ μ L) 2 μ L、pMD19-T Vector(50 ng/ μ L) 1 μ L、Solution I 5 μ L、ddH₂O 2 μ L,总体积10 μ L。22℃水浴连接3 h。连接产物全量转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,经蓝白斑和氨苄青霉素筛选,挑取白色菌落,摇菌,提质粒,以 *Sma* I (在载体pMD19-T内有唯一 *Sma* 酶切位点,且在冰核基因 *iceA* 内无此酶切位点)作单酶切,以 *Nde* I 和 *EcoR* I 作双酶切鉴定,阳性质粒pMD19-T-ice 送生工生物工程(上海)股份公司测序,用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切测序正确的质粒,切胶回收目的条带。

1.2.4 重组表达载体 pET-23a(+)-ice 的构建

用 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切表达载体pET-23a(+),并切胶回收纯化,与上一步回收目的条带16℃过夜连接,65℃灭活10 min,将10 μ L连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂LB平板(含Amp 100 μ g/mL),37℃过夜倒置培养,挑取生长菌落,摇菌,提质粒,*Nde* I 和 *EcoR* I 作单、双酶切鉴定。

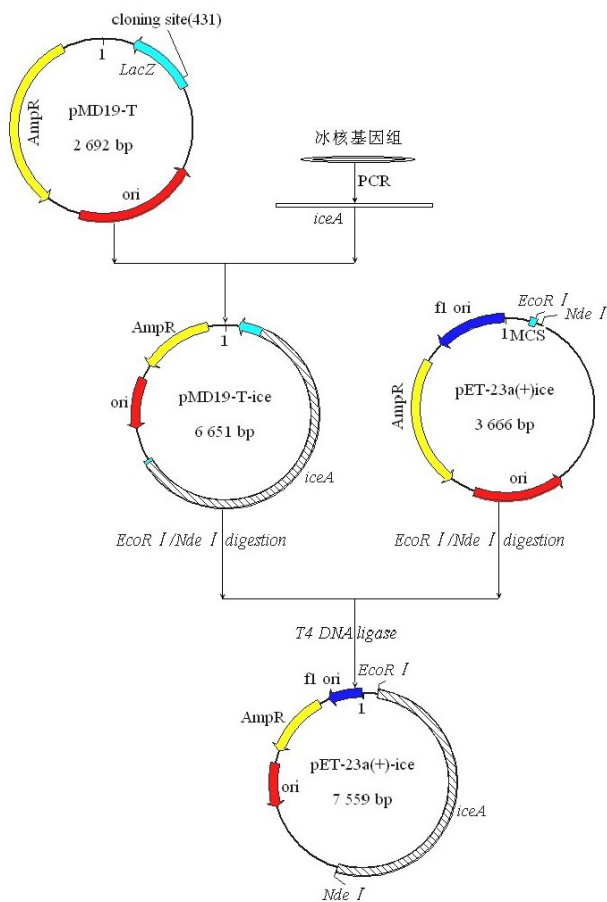


图 1 表达载体 pET-23a(+)-ice 构建图

Fig.1 Construction of expression vector pET-23a(+)-ice

1.2.5 pET-23a(+)-ice、pET-23a(+) 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS

pET-23a(+)-ice、pET-23a(+) 分别转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 涂 LB 平板(含 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 Chl 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 下同), 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑取生长菌落, 摇菌, 取菌液在 LB 平板(含 Amp 和 Chl)上划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜倒置培养, 挑重组子单菌落于 5 mL LB 培养液(含 Amp 和 Chl)中, 过夜培养, 获得重组菌 BL21/pET-ice 和 BL21/pET 的菌液, 备用。

1.2.6 蛋白表达和 SDS-PAGE 分析

准备 5 个灭菌三角瓶(编号为 1、2、3、4、5), 1~4 号瓶接种 500 μL 菌液 BL21/pET-ice 并补充 50 mL 新鲜 LB 培养液(含 Amp 和 Chl), 5 号瓶接种 500 μL 菌液 BL21/pET, 并补充 50 mL 新鲜 LB 培养液(含 Amp 和 Chl), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养, 当菌液 $OD_{600\text{ nm}}=0.6$ 时, 在 1、2、3、5 号三角瓶中均加入

IPTG(200 mg/mL), 使终浓度为 0.6 mol/L^[13], 以诱导表达。1~5 号菌液继续 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至 $OD_{600\text{ nm}}=1.0\sim 2.0$ 。

上述 1~5 号菌液按北京康为世纪生物科技有限公司包涵体蛋白溶解液使用说明纯化包涵体蛋白。取 20 μL 样品, 加入 5 μL 5 \times 蛋白上样缓冲液煮沸 3~5 min, 使蛋白质变性, 立即上样。6%分离胶、5%浓缩胶 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.7 冰核活性测定

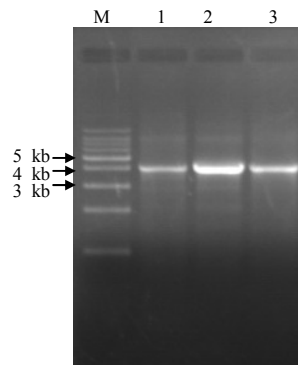
冰核活性测定前处理: 上述 1~5 号菌液各取 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清, 称取湿菌质量, 如湿菌体质量为 0.011 7 g, 即加 1 170 μL ddH₂O 制成菌悬液。

用 Vali 小液滴冻结法测定菌悬液冰核活性^[14]: 用二甲苯为溶剂配制 1%石蜡油, 均匀喷在锡箔纸上, 烘干后将锡箔纸折成敞口小盒, 用移液枪取待测菌液滴在小盒上。各处理菌悬液在 -5、-4、-3、-2 $^{\circ}\text{C}$ 下测定, 每次每处理测定 30 滴菌悬液, 每滴 10 μL , 重复 3 次, 3 min 后记录冻滴数, 并计算冻滴率(v)=冻滴数/测定滴数 $\times 100\%$ 。温度越高, 冻滴数越多, 冻滴率越高, 表明冰核活性越强。

2 结果与分析

2.1 冰核基因 iceA 扩增和重组克隆载体 pMD19-T-ice 鉴定

以冰核细菌基因组 DNA 为模板, 以 F-ice、R-ice 为引物, PCR 扩增得到约 3.97 kb 条带, 检测到的条带大小与目的片段大小相符, 结果见图 2。

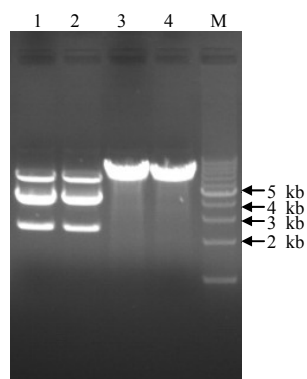


M 1 kb DNA Ladder; 1~3 PCR 产物。

图 2 冰核基因 iceA PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of ice nucleation active gene

切胶回收目的条带与克隆载体 pMD19-T 连接后转化大肠杆菌 DH5 α ，经蓝白斑和氨苄青霉素筛选，重组载体单、双酶切结果见图 3。*Sma* I 单酶切时，只有唯一酶切条带，大小在 6~7 kb，与构建载体 pMD19-T-*ice* 大小相符(*iceA* 约 3.97 kb，pMD19-T 约 2.7 kb)，同时 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切时，可看到约 3.97 kb 目的条带和约 2.7 kb 载体条带。测序结果证明，扩增的 *iceA* 基因开放阅读框正确。



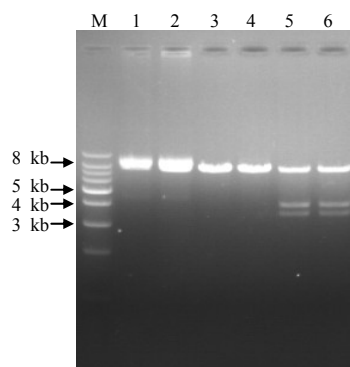
1、2 *Nde* I / *Eco*R I 双酶切 pMD19-T-*ice*；3、4 *Sma* I 单酶切 pMD19-T-*ice*；M 1 kb DNA Ladder。

图 3 载体 pMD19-T-*ice* 单、双酶切结果

Fig.3 Restriction endonuclease digestion of vector pMD19-T-*ice*

2.2 重组克隆载体 pET-23a(+)-*ice* 鉴定

载体 pMD19-T-*ice* 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切连接到同样经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pET-23a(+)载体上，构建 pET-23a(+)-*ice* 表达载体。酶切结果(图 4)表明，得到了 *iceA* 基因的原核表达载体 pET-23a(+)-*ice*。



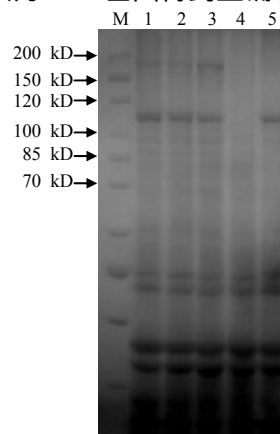
M 1 kb DNA Ladder；1、2 *Eco*R I 单酶切 pET-23a(+)-*ice*；3、4 *Nde* I 单酶切 pET-23a(+)-*ice*；5、6 *Nde* I / *Eco*R I 双酶切 pET-23a(+)-*ice*。

图 4 载体 pET-23a(+)-*ice* 单、双酶切结果

Fig.4 Restriction endonuclease digestion of vector pET-23a(+)-*ice*

2.3 蛋白表达与 SDS-PAGE 分析

从图 5 可看出，各处理菌液纯化的包涵体蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后，仅 1~3 泳道(含 pET-23a(+)-*ice* 载体样品)显示出相对分子质量约为 180 000 的蛋白带，与报道的冰核蛋白相对分子质量大小相符，而非诱导表达菌 BL21/pET-*ice*(4 泳道)与诱导表达菌 BL21/pET(5 泳道)均无相应表达条带，初步认为 *iceA* 基因得到正确表达。



M Protein marker；1~3 IPTG 诱导重组菌 BL(DE3)/pET-*ice*；4 无 IPTG 诱导重组菌 BL(DE3)/pET-*ice*；5 IPTG 诱导重组菌 BL(DE3)/pET。

图 5 表达蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE of expressed protein

2.4 表达蛋白冰核活性分析

各处理菌悬液用 Vali 小液滴冻结法测定的冰核活性结果为：在-5、-4、-3、-2℃下重组菌 BL21/pET-*ice* 的冰核活性与野生冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 的变化趋势相同，在-5、-4、-3℃下冻滴率为 100%，-2℃时冻滴率为 0，而重组菌 BL21/pET 和宿主菌 BL21 在-5、-4、-3、-2℃下冻滴率均为 0，说明重组菌 BL21/pET-*ice* 与野生冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 具有冰核活性的最高温度为-3~-2℃，重组菌 BL21/pET 与宿主菌 BL21 具有冰核活性的最高温度为-5℃以下或没有冰核活性。至此，说明本实验成功构建了重组菌 BL21/pET-*ice*，并表现为 A 型冰核活性。

3 讨论

Wolber 等^[15]在研究冰核基因 *iceZ* 原核表达时检测到 *iceZ* 基因产物表观相对分子质量为 153 000 (预

测值为 119 000), 本试验检测到的 *iceA* 基因产物相对分子质量约为 180 000 (预测值为 130 000), 这些研究结果都是冰核基因原核表达产物表观相对分子质量比预测相对分子质量大。唐朝荣等^[13]对此解释为: (1) 冰核基因表达产物经历了翻译后的修饰过程, 一些脂类、低聚糖类等共价结合到冰蛋白上, 增加了基因产物的相对分子质量; (2) 冰核蛋白序列中存在的大量甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸会降低 SDS 对蛋白的亲合度, 从而降低蛋白的电泳迁移率, 增加蛋白的表观相对分子质量; (3) 冰核蛋白的高度致密结构使其在 SDS-PAGE 电泳条件下仍不能充分变性舒展, 导致迁移率降低, 表观相对分子质量增加。

生物冰核可显著提高害虫的过冷却点。有研究人员^[16-18]用冰核细菌喂养害虫, 可使印度谷螟(*Plodia interpunctella*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、谷蠹(*Rhizopertha dominica*)过冷却点-16、-13、-15℃分别提高到-6、-5、-3.3℃。本试验克隆的 *iceA* 基因在-3℃仍具有冰核活性, 且表现为 A 型冰核活性。下一步研究将以降低害虫的越冬率和虫源基数为目的, 开发含冰核基因杆状病毒双价杀虫剂, 从而探索一条防治农业害虫的新途径。

参考文献:

- [1] Mortazavi R, Hayes C T, Ariya P A. Ice nucleation activity of bacteria isolated from snow compared with organic and inorganic substrate[J]. Environ Chem, 2008, 5: 373-381.
- [2] Li Qianqian, Yan Qi, Chen Jinsi, et al. Molecular characterization of an ice nucleation protein variant(InaQ) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli*[J]. Biol Sci, 2012, 8: 1097-1108.
- [3] 孙福在, 赵廷昌. 冰核细菌生物学特性及其诱发植物霜冻机理与防霜应用[J]. 生态学报, 2003, 23(2): 336-346.
- [4] 徐荣荣, 邓开野, 丁力行. 冰核活性细菌成冰的分子生物学基础及其在食品冷冻中的应用[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2012, 25(3): 67-71.
- [5] Hidehisa, Kawahara. The structures and function of ice crystal-controlling proteins from bacteria[J]. Biosci and Bioeng, 2002, 94(6): 492-496.
- [6] 刘健, 陈庆森. 冰核活性细菌特有动力学初探[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 21-25.
- [7] 唐朝荣, 孙福在. 冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 冰核基因克隆、序列分析和促冻杀虫基因工程菌构建[J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 373-374.
- [8] 唐朝荣, 孙福在, 赵廷昌. 利用细菌冰核基因构建促冻杀虫基因工程菌[J]. 科学通报, 2003, 48(1): 64-69.
- [9] 张新建, 孙福在, 赵廷昌, 等. 促冻杀虫基因工程菌的构建[J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 227-232.
- [10] 唐朝荣, 孙福在, 赵廷昌. 细菌冰核基因的应用研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 407-410.
- [11] Keiko A, Satoshi W, Yasufumi E, et al. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity[J]. FEBS Letters, 1989, 258(2): 297-300.
- [12] 唐朝荣, 孙福在, 赵廷昌, 等. 冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 冰核基因克隆和序列分析[J]. 微生物学报, 2002, 9(4): 45-51.
- [13] 唐朝荣. 冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 冰核基因克隆、序列分析和促冻杀虫工程菌构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2001.
- [14] 韦建福, 张世珖. 冰核细菌的研究方法[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(2): 165-167.
- [15] Watabe S, Abe K, Hirata A, et al. Large scale production of an *Erwinia ananas* ice nucleation protein and evolution of its ice nucleation activity[J]. Biosci, Biotech and Biochem, 1993, 57(4): 603-606.
- [16] 冯玉香, 何维勋. 细菌冰核提高印度谷螟过冷却点的研究[J]. 昆虫学报, 1996, 39(1): 53-57.
- [17] 朱红, 孙福在, 张永祥, 等. 冰核细菌对棉铃虫结冰温度影响的研究[J]. 中国农业科学, 1994, 27(6): 23-27.
- [18] Lee R E, Strong-gunderson J M, Lee M R, et al. Ice-nucleating active bacteria decrease the cold-hardiness of stored grain insects[J]. Econ Entomol, 1992, 85(2): 371-374.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维