

引用格式:

邓杰夫, 李魏, 雷玲, 洪艳云, 刘双清, 戴良英, 易图永. 柑橘黄龙病菌分泌蛋白 04580 基因的克隆及原核表达[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 294–297.

DENG J F, LI W, LEI L, HONG Y Y, LIU S Q, DAI L Y, YI T Y. The cloning and prokaryotic expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus CLIBASIA-04580* gene[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(3): 294–297.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 柑橘黄龙病菌分泌蛋白 04580 基因的克隆及原核表达

邓杰夫<sup>1,2</sup>, 李魏<sup>1,2</sup>, 雷玲<sup>1,2</sup>, 洪艳云<sup>1,2</sup>, 刘双清<sup>1,2</sup>, 戴良英<sup>1,2</sup>, 易图永<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**为进一步了解柑橘黄龙病菌亚洲种 CLAs 的致病机理, 从 Prasad 预测的 166 种分泌蛋白中选取 1 个在柑橘植株中表达量较高的 *CLIBASIA-04580* 基因进行研究。提取感染柑橘黄龙病的柑橘叶片总 DNA, 经 PCR 扩增得到 *CLIBASIA-04580* 基因, 切胶回收 PCR 产物, 双酶切连接到 pET-28 $\alpha$  载体上, 使用菌落 PCR 和限制性内切酶双酶切鉴定筛选阳性克隆; 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导重组蛋白表达融合组氨酸标签的 *CLIBASIA-04580* 重组蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白的表达水平, 再用蛋白纯化镍柱进行纯化。结果表明, 携带组氨酸标签的 *CLIBASIA-04580* 重组蛋白得到表达, 且异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)浓度为 1.5 mmol/L 时相对表达量达到峰值, 通过 SDS-PAGE 凝胶分析, 与未经过镍柱纯化的蛋白原液比较, 可知纯化了 *CLIBASIA-04580* 重组蛋白。

**关键词:** 柑橘黄龙病菌; 分泌蛋白; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S436.661.1<sup>+</sup>; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)03-0294-04

## The cloning and prokaryotic expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus CLIBASIA-04580* gene

DENG Jiefu<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1,2</sup>, LEI Ling<sup>1,2</sup>, HONG Yanyun<sup>1,2</sup>, LIU Shuangqing<sup>1,2</sup>, DAI Liangying<sup>1,2</sup>, YI Tuyong<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Pests, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** *CLIBASIA-04580*, which highly expressed in citrus plants, was selected from 166 secreted proteins predicted by Prasad and was investigated to further understand the pathogenesis of *Candidatus Liberibacter asiaticus*(CLAs). The total DNA of citrus leaves identified as infected with citrus Huanglongbing(HLB) was extracted, and the *CLIBASIA-04580* gene was obtained by PCR. The PCR product was extracted and connected to the pET-28 $\alpha$  vector by double enzyme digestion, and the positive clones were screened by colony PCR and restriction endonuclease double digestion. The recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3) was induced to express the fusion histidine-labeled recombinant protein 04580 by isopropyl thiogalactoside(IPTG)(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L). The expression level of the recombinant protein was detected by polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE), and then purified by protein purification nickel column. The results showed that the recombinant protein 04580 with histidine label was successfully expressed, and the expression reached the peak when the concentration of IPTG was 1.5 mmol/L. By SDS-PAGE gel analysis, the recombinant protein 04580 was

收稿日期: 2021-09-14

修回日期: 2022-01-10

基金项目: 科学技术部国家重点研发计划(2021YFD1400800); 湖南省科学技术厅重点研发计划项目(2022NK2052); 湖南农业大学双一流学科建设项目(SYL2019027)

作者简介: 邓杰夫(1995—), 男, 湖南株洲人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究, 443623253@qq.com; \*通信作者, 易图永, 博士, 教授, 主要从事植物病理学研究, yituyong@hunau.net

successfully purified compared with the original protein solution which was not purified by nickel column.

**Keywords:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*; secretory protein; prokaryotic expression; protein purification

柑橘黄龙病(*Citrus Huanglongbing*, HLB)病原菌为韧皮部杆菌(*Candidatus Liberibacter* spp.),革兰阴性菌,由于难以在培养基上纯培养,对其开展形态学、生物学、病原学等方面的研究难度较大。已知的细菌分泌系统有 9 种,在植物病原菌中仅发现其中 6 种(T1SS、T2SS、T3SS、T4SS、T5SS、T6SS)<sup>[1]</sup>。已经测定的多个柑橘黄龙病菌的菌株全基因序列,对其分泌系统及分泌蛋白进行的预测和分析,发现柑橘黄龙病菌亚洲种具有完整的 I 型分泌系统和完整的 SEC(普通分泌途径)<sup>[2]</sup>。研究较为深入的黄龙病菌分泌蛋白有 Serralysin 蛋白(CLIBASIA-01345),依靠 I 型分泌系统转运到细胞膜外,是一类进攻型分泌蛋白,属于金属类蛋白水解酶,对氧化胰岛素的  $\beta$  链有特异识别切割作用<sup>[3-4]</sup>; SDE1 蛋白(CLIBASIA-05315)依赖 SEC 途径转运,与柑橘类木瓜蛋白酶(PLCPs)相互作用,与  $H_2O_2$  的积累有关,同时引起离子泄露、胼胝质沉积等<sup>[5]</sup>; SDE15 蛋白(CLIBASIA-04025)依赖 SEC 途径转运,与 CsACD2 互作,抑制由柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种(*Xanthomonas citri* subsp.)引起的过敏性坏死反应(HR)以及降低免疫相关基因的表达<sup>[6]</sup>; SDE70(CLIBASIA-02470)蛋白依赖 SEC 途径转运,与多个柑橘内蛋白互作,通过作用于膜泡运输和信号转导相关蛋白来调节寄主抗病反应<sup>[7]</sup>。

笔者从 Prasad 预测的 166 个分泌蛋白中选择在柑橘植株内表达相对较高的 CLIBASIA-04580 蛋白,进行基因克隆及原核表达,以期为进一步阐明 CLIBASIA-04580 蛋白在黄龙病菌侵染柑橘过程中的功能和其在柑橘中的互作蛋白提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于湖南省永州市顺一农业科技开发有限公司(111°48'E、26°49'N)采摘携带柑橘黄龙病菌亚洲种 CLas 病原菌的柑橘叶片,保存于植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室。

pET-28 $\alpha$  表达载体自北京擎科生物科技有限公司购得;大肠埃希菌(*E.coli*)感受态 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)

菌株自上海唯地生物技术有限公司购得;细菌总蛋白提取试剂盒自北京酷来博科技有限公司购得;切胶回收、Ni-NTA 镍柱纯化试剂盒自北京全式金生物技术有限公司购得。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CLIBASIA-04580 蛋白基因的生物信息学分析

通过 SignalP-5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/abstract.php>)预测蛋白质信号肽序列;NCBI 网站 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析蛋白质保守结构域,利用网站(<https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测跨膜结构域;利用 CONG 等<sup>[8]</sup>创建的网站([http://prodata.swmed.edu/liberibacter\\_asiaticus/](http://prodata.swmed.edu/liberibacter_asiaticus/))获得 CLIBASIA-04580 蛋白相关信息。

#### 1.2.2 模板扩增以及构建载体

利用 CTAB 法提取感染 CLas(经 OI1/OI2:GGG TATAAGCACTTAGGCTTTAAGAAACC\TCACG TCGTAAAGACATCCTGCCT 检测)柑橘叶片样品 DNA。根据 CLas-psy62 基因组(GenBank 登录号为 CP001677)的 CLIBASIA\_04580 序列及转录分析,删除 04580 基因的信号肽序列后,使用 Primer 5.0 设计原核表达引物 C8F/R(上游 AAAGGATCCCA ACCTTTTTTGAAGAGACGGA,下游 AAGCTCG AGCTAATGATGCGACGGCAAA)分别插入 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点,并设置 3 个保护碱基<sup>[9]</sup>。引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。以感染 CLas 样品 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 最终延伸 5 min,4 °C 保存。

切胶回收 PCR 产物双酶切到 pET-28 $\alpha$  载体上,并转化 *E.coli* DH5 $\alpha$ ,经过 PCR 和测序筛选阳性克隆。

#### 1.2.3 IPTG 诱导及镍柱纯化分泌蛋白

将阳性克隆质粒通过热激法转化 *E.coli* BL21(DE3),挑取单菌落于 200 mL 加入卡那霉素(终质量浓度为 50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,37

℃、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  值为 0.6~0.8<sup>[10]</sup>, 分别加入终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 的 IPTG 溶液, 28 ℃ 过夜诱导表达; 10 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 使用细菌总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 加入蛋白 loading buffer 后 95 ℃ 煮沸 5 min, 处理样品后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测, 确定诱导分泌 04580 重组蛋白的 IPTG 的最佳浓度。

在 IPTG 最佳诱导浓度下诱导 04580 重组蛋白, 使用 Ni-NTA 镍柱纯化试剂盒纯化 CLIBASIA-04580 重组蛋白, 选取 50、100、150、200、250 mmol/L 的咪唑溶液洗脱目的蛋白。

## 2 结果与分析

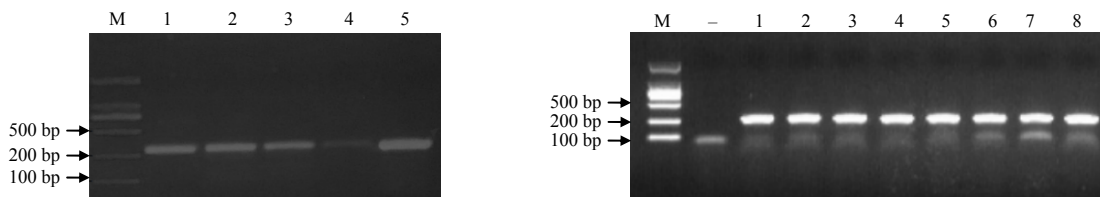
### 2.1 CLIBASIA-04580 蛋白的生物信息学预测

对 CLIBASIA-04580 蛋白的信号肽进行的预测结果表明, CLIBASIA-04580 蛋白全长包含 116 氨基酸, 信号肽长 23 氨基酸; 其保守结构域包含 1 个未知功能结构域 DUF5330, 其同源性较高的为柑

橘黄龙病美洲种和非洲种中的分泌蛋白以及斑马片菌(*Candidatus Liberibacter solanacearum*)<sup>[11]</sup>和根瘤菌属(*Rhizobium*)中一些分泌蛋白; 经 TMHMM 预测发现, 该蛋白无跨膜结构域, 在 CONG 等创建的网站中搜索到 04580 蛋白, 对其基本信息进行了补充, 该蛋白存在无序区域, 26~41 为无序区域, 42~98 为 DUF5330 结构域, 104~116 为无序区域。

### 2.2 CLIBASIA-04580 基因的克隆及其表达载体的构建

除去 SP(1~23 氨基酸)基因序列后, 使用 Primer5 设计 04580 引物, 采用 OI1/OI2 检测为柑橘黄龙病阳性的柑橘叶片 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到约为 282 bp 的片段, 扩增条带与目的条带大小一致(图 1)。测序结果经 NCBI Blast 分析表明, 该序列与 CLIBASIA-04580 及其他柑橘黄龙病亚洲种的相似性为 100%。使用该扩增片段连接至表达载体 pET-28 $\alpha$  上, 并使用 SnapGene 软件对其整体序列进行质粒图谱构建(图 2)。



M 为 Mark; 左 1~5 分别为感染 CLas 样本扩增; 右 1~8 为不同单菌落 PCR 扩增; - 为阴性对照。

图1 CLIBASIA-04580的扩增和菌落PCR验证

Fig.1 Amplification of CLIBASIA-04580 gene and colony PCR products

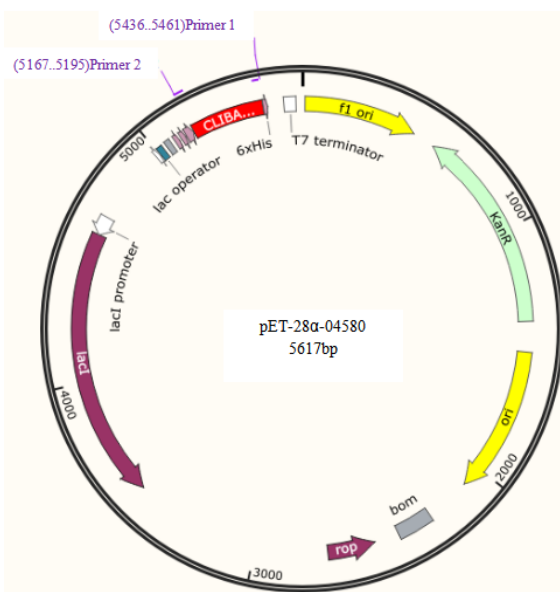
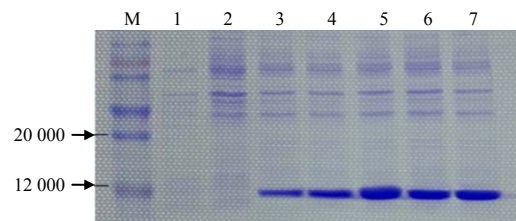


图2 CLIBASIA-04580蛋白原核表达载体质粒图谱

Fig.2 Vector map for the prokaryotic expression of CLIBASIA-04580 secretory proteins

### 2.3 CLIBASIA-04580 蛋白的表达及纯化

将构建的重组质粒 pET-28 $\alpha$ -04580 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 经不同终浓度 IPTG 诱导后, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 得到 IPTG 的最佳诱导: 浓度为 1.5 mmol/L, 重组蛋白表达量最大(图 3)。

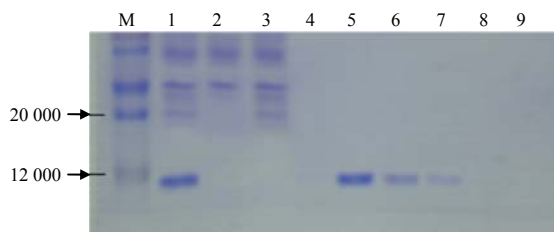


M 蛋白分子质量标记; 1 1.0 mmol/L IPTG 诱导的 BL21 菌株; 2 1.0 mmol/L IPTG 诱导的 pET-28 $\alpha$ ; 3 不加 IPTG 的 pET-28 $\alpha$ -04580; 4~7 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L IPTG 诱导的 pET-28 $\alpha$ -04580。

图3 pET-28 $\alpha$ -04580经IPTG诱导的 SDS-PAGE凝胶电泳结果

Fig.3 The SDS-PAGE gel electrophoresis of pET-28 $\alpha$ -04580 induced by IPTG at different concentrations

使用 Ni-NTA 镍柱纯化试剂盒, 50、100、150 mmol/L 咪唑溶液成功洗脱重组蛋白, 得到纯化的 04580 重组蛋白, 其中 50 mmol/L 咪唑洗脱浓度下的重组蛋白含量最高(图 4)。



M 蛋白分子质量标记; 1 1.5 mmol/L IPTG 诱导的 pET-28 $\alpha$ -04580; 2~3 上样流出液; 4 缓冲洗涤液; 5~9 50、100、150、200、250 mmol/L 咪唑平衡缓冲液洗脱获得的蛋白。

图4 04580重组蛋白经Ni-NTA纯化的SDS-PAGE凝胶电泳结果

Fig.4 The SDS-PAGE gel electrophoresis map of pET-28 $\alpha$ -04580 purified by Ni-NTA

### 3 讨论

CLas 的分泌蛋白对于其信息传递、生存和生长发育都有重要意义。分泌蛋白是 CLas 入侵寄主时影响其防御反应、降低寄主抗性、直接导致寄主病变的重要毒力因子, 目前只能通过对其全基因组序列的分析, 研究其噬菌体、转录调控、转运系统、代谢途径、分泌系统和抗逆基因的表达来了解 CLas 的作用机理<sup>[12]</sup>。有关这类分泌蛋白的研究都表明, 柑橘黄龙病菌可能通过多个分泌蛋白的共同作用来协助病菌侵染并产生症状<sup>[13]</sup>。笔者克隆了柑橘黄龙病菌分泌蛋白 *CLIBASIA-04580* 基因, 诱导并纯化了 04580 重组蛋白, 后续将通过体外 PULL DOWN 试验进一步寻找其在柑橘中的互作蛋白并研究其功能。

#### 参考文献:

[1] LOMOVATSKAYA L A, ROMANENKO A S. Secretion systems of bacterial phytopathogens and mutualists (review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2020, 56(2): 115–129.

[2] DUAN Y P, ZHOU L J, HALL D G, et al. Complete genome sequence of *Citrus huanglongbing* bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(8): 1011–1020.

[3] 郝俊. 柑橘黄龙病 Serralysin 蛋白的重组表达和纯化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.

[4] 侯卫真. 柑橘黄龙病 Serralysin 蛋白的表达纯化及两种重要病原的分子检测[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.

[5] PITINO M, ARMSTRONG C M, CANO L M, et al. Transient expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 982.

[6] PANG Z Q, ZHANG L, COAKER G, et al. *Citrus* CsACD2 is a target of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in huanglongbing disease[J]. *Plant Physiology*, 2020, 184(2): 792–805.

[7] 龙俊宏, 赵珂, 杜美霞, 等. 柑橘中黄龙病菌效应子 SDE70 的表达特征及寄主互作蛋白解析[J]. *园艺学报*, 2020, 47(8): 1451–1462.

[8] CONG Q, KINCH L N, KIM B H, et al. Predictive sequence analysis of the *Candidatus Liberibacter asiaticus* proteome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41071.

[9] 赵国欢, 张小兵, 李凡, 等. 柑橘黄龙病病原 *CLIBASIA\_03230* 基因的克隆及其编码蛋白的原核表达[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2019, 34(1): 9–14.

[10] 晏建红, 关巍, 宾羽, 等. 柑橘黄龙病菌分泌蛋白 05150 的筛选、原核表达及抗血清制备[J]. *果树学报*, 2020, 37(9): 1384–1393.

[11] 李志强. 马铃薯斑马片病研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2012, 32(8): 14–16.

[12] 王春庆, 钟八莲, 卢占军, 等. 柑橘黄龙病菌分泌蛋白的预测和原核表达[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2020, 49(3): 313–319.

[13] YAN Q, SPEEDHARAN A, WEI S P, et al. Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(4): 391–404.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维