

# 萝卜抗真菌蛋白基因 *R<sub>s</sub>-AFPs* 在大肠杆菌中的表达及其转化番茄的研究

邓晓东<sup>1</sup> 费小雯<sup>2</sup> 胡新文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101; <sup>2</sup> 中山大学生命科学学院生物工程中心, 广州 510275)

**摘要:** 通过基因工程手段将萝卜抗真菌蛋白基因 *R<sub>s</sub> AFP<sub>1(2)</sub>* 插入大肠杆菌表达载体 pTrxFus 中并诱导表达, 其融合表达产物约 22 kD, 约占总可溶蛋白的 0.45% (0.5%)。抑菌活性试验表明: 重组 *R<sub>s</sub> AFP<sub>1(2)</sub>* 有抑菌活性, 其中 *R<sub>s</sub> AFP<sub>2</sub>* 较 *R<sub>s</sub> AFP<sub>1</sub>* 抑菌活性强。构建了 *R<sub>s</sub> AFP<sub>2</sub>* 基因的植物表达载体 pBIAFP<sub>2</sub>。利用农杆菌介导法将 pBIAFP<sub>2</sub> 导入番茄中, 并诱导出完整的植株 32 株。对其中 28 株进行 PCR 和 PCR-Southern Blot 检测, 其中 17 株呈阳性。对经 PCR-Southern Blot 检测呈阳性的植株进行 Southern Blot 检测, 6 株呈阳性。

**关键词:** 萝卜抗真菌蛋白; 基因; 大肠杆菌; 表达; 转基因; 番茄

中图分类号: Q 78; S 641.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 04-0361-03

## 1 目的、材料与方法

萝卜抗真菌蛋白 (Raphanus sativus antifungal proteins, *R<sub>s</sub> AFPs*) 是 Terras 等<sup>[1]</sup>从萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 分离的一类 5.5 kD 富含半胱氨酸的抗真菌蛋白质。本研究拟将 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>1(2)</sub>* 基因导入大肠杆菌中表达, 以获得具有抑菌活性的表达产物, 并通过构建植物表达载体, 将 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>2</sub>* 基因导入番茄中, 以期获得抗病番茄材料。

含 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>1</sub>* 和 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>2</sub>* 基因的质粒 pAFP<sub>1</sub> 和 pAFP<sub>2</sub> 由胡新文博士构建<sup>[2]</sup>, 其余载体和菌株均由本实验室提供。为了便于操作, 设计并合成如下引物: p1: 5'-CTGTGGATC-CACAGAAGTTGTGCGAAAG-3'; p2: 5'-CTGTGGATCCACAGAAGTTGTGTCAGAG-3'; p3: 5'-CAAGCACTTAGTGATTGG-3'; sp6: 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'。分别以 p1、sp6 和 p2、sp6 为引物, 对 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>1(2)</sub>* 成熟肽基因 PCR 扩增, *Bam*HI+ *Sal*I 酶切后, 插入 pTrxFus 表达载体中, 转化 *E. coli* GI724。重组质粒经诱导表达后进行 SDS-PAGE, 并用 BACKMAN 公司 DU-70 光谱扫描仪对表达的融合蛋白进行薄层扫描定量。按参考文献 [3] 方法, 收集表达后菌液, 初步纯化蛋白, 进行抑菌试验。与此类似, 构建了植物表达载体 pBIAFP<sub>2</sub>, 通过三亲交配的方法将 pBIAFP<sub>2</sub> 转入农杆菌, 并通过叶盘法将外植体与农杆菌共培养, 将经 Kan 50 mg/L 筛选得到的抗性芽转入含 Kan 50 mg/L 的生根培养基上生根, 而后将植株移栽至花盆, 以 PCR、PCR-Southern Blot 和 Southern Blot 对再生植株进行检测。

## 2 结果与分析

2.1 大肠杆菌表达载体的构建及在 *E. coli* GI724 中诱导表达 重组质粒 pTrxAfp<sub>1(2)</sub> 经 PCR 鉴定, 能扩增出约 230 bp 的片断, 证明外源基因 *R<sub>s</sub>-AFP<sub>1(2)</sub>* 已插入其中。经 SDS-PAGE 后, pTrxAfp<sub>1(2)</sub> 在 *E. coli* GI724 中有表达。与空载质粒 pTrxFus/GI724 比较, 在 22 kD 处多出一条蛋白带 (图 1)。其中, pTrxAfp<sub>2</sub>/GI724, pTrxAfp<sub>1</sub>/GI724 所产生的融合蛋

白经薄层扫描后测定其含量约占总可溶蛋白的 0.45% 和 0.5%。抑菌试验表明,  $R_s$ -AFP<sub>1(2)</sub> 表达产物均有一定生物活性。其中重组  $R_s$ -AFP<sub>2</sub> 的抑菌活性高于重组  $R_s$ -AFP<sub>1</sub>(图 2)。

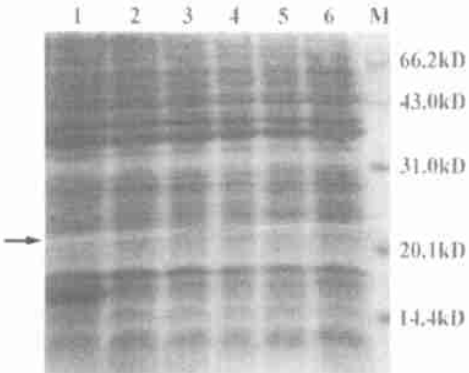


图 1 pTrxAFP<sub>1(2)</sub> 在 *E. coli* G1724 中诱导表达结果

Fig. 1 The results of pTrxAFP<sub>1(2)</sub> expressing in *E. coli* G1724

1. pTrxFus/G1724, induced for 4 h; 2. pTrxAFP<sub>2</sub>/G1724, induced for 4 h; 3. pTrxAFP<sub>2</sub>/G1724, induced for 3 h;
4. pTrxAFP<sub>2</sub>/G1724, induced for 2 h; 5. pTrxAFP<sub>2</sub>/G1724, induced for 1 h; 6. pTrxAFP<sub>1</sub>/G1724, induced for 4 h.

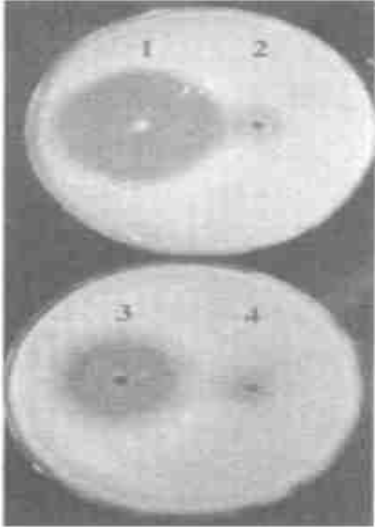


图 2 表达产物抑菌实验

Fig. 2 The inhibition experiment of expression products

1. pTrxAFP<sub>2</sub>/G1724; 2. pTrxFUS/G1724;
3. pTrxAFP<sub>1</sub>/G1724; 4. pTrxFUS/G1724.

2.2 转基因植株的检测结果  $R_s$ -AFP<sub>2</sub> 基

因插入表达载体 pBI121 中, 构建出植物表达载体 pBIAFP<sub>2</sub>。含 pBIAFP<sub>2</sub> 质粒的农杆菌转化番茄 (美国 1 号) 共得到 32 株再生苗。对其中 28 株进行 PCR 检测, 17 株呈阳性。部分植株检测结果如图 3, A。Lane 4~6、8~11 样品对应于植株 1~3、5~8, 有约 230 bp 的目的 DNA 片段扩增出来。Lane 2 为正常番茄植株总 DNA PCR 扩增结果 (CK<sup>-</sup>), Lane 3 为质粒 pBIAFP<sub>2</sub> PCR 扩增结果 (CK<sup>+</sup>)。Lane 7 样品未扩增出目的带 (对应于植株 4)。上述 PCR 产物呈阳性的 17 株经 PCR-Southern Blot 检测也呈阳性。对 1~8 株检测结果如图 3, B。上述经 PCR-Southern Blot 检测呈阳性的植株, 取其总 DNA 10 μg 经 *Bam*HI+ *Sac*I 酶切后进行



图 3 转基因植株的 PCR (A) 和 PCR Southern Blot (B) 检测结果

1. 分子量标准; 2. 正常番茄 PCR 扩增结果 (CK<sup>-</sup>); 3. pBIAFP<sub>2</sub> PCR 扩增结果 (CK<sup>+</sup>);
- 4~11. Kan 抗性筛选的植株 1~8 扩增结果。

Fig. 3 The PCR (A) and PCR Southern (B) analysis of transgenic plants

1. PCR Marker; 2. The PCR results of non transgenic tomato (CK<sup>-</sup>); 3. The PCR results of pBIAFP<sub>2</sub> (CK<sup>+</sup>);
- 4~11. The PCR results of plantlets (1~8) screened from Kan medium.

Southern Blot 检测, 其中 6 株检测呈阳性。部分样品检测结果如图 4 所示, 对照于总 DNA 电泳后的 Marker, 可知 Lane 2~ 5, 7 的杂交条带约为 230 bp, 说明 *R<sub>s</sub>AFP<sub>2</sub>* 基因已插入上述植株基因组 DNA 中。

本试验中, 重组 *R<sub>s</sub>AFP<sub>2</sub>* 抑菌效果较好。由于 *R<sub>s</sub>AFP<sub>1(2)</sub>* 有较强的热稳定性和耐酸碱能力, 故有极好的作为生物杀菌剂开发的潜力。本试验通过基因工程的方法向番茄良种导入抗真菌蛋白的基因, 但要保持该基因的稳定遗传及获得较好的抗病效果, 还有较多的工作要做。

参考文献:

1 Terras F R, Toorekens S, Van Leuven F, et al. A new family of basic cysteine rich plant antifungal proteins from *Brassicaceae* species. FEBS. Lett, 1993, 316: 233~ 240  
2 胡新文, 郭建春, 郑学勤. 抗真菌蛋白 *R<sub>s</sub>AFPS* 基因克隆与序列分析. 热带作物学报, 1998, 19 (3): 57~ 63  
3 胡新文, 郭建春, 郑学勤. 抗真菌蛋白 *R<sub>s</sub>AFPS* 生物学活性的研究. 热带作物学报, 1998, 19 (2): 36~ 42

The Expression of *Raphanus sativus*-Antifungal Protein Gene and Its Transformation into Tomato

Deng Xiaodong<sup>1</sup>, Fei Xiaowen<sup>2</sup>, and Hu Xinwen<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101; <sup>2</sup>The College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract:** *Raphanus sativus* antifungal proteins (*R<sub>s</sub>AFP<sub>s</sub>*) are cysteine rich, antifungal proteins. The *R<sub>s</sub>AFP<sub>1(2)</sub>* genes were inserted into the vector pTrxFus and transferred into *E. coli* G124. The fusion protein from recombinant pTrxAFP<sub>1(2)</sub> was about 22 kD and taking up 0.4 and 0.5 percent of the total proteins respectively. Inhibition experiment showed that the expressed products had antifungal activity to *Colletotrichum musae*. Expressed products from pTrxAFP<sub>2</sub> showed much stronger inhibitory activity than that from pTrxAFP<sub>1</sub>. A plant expression vector pBIAFP<sub>2</sub> was constructed, which had been transferred into tomato by *Agrobacterium* mediated transformation. 32 plantlets had been obtained and 28 of them detected by PCR and PCR-Southern Blot. The results showed that 17 of them were positive, and the results of Southern Blot showed 6 of them were positive.

**Key words:** *Raphanus sativus*-antifungal proteins (*R<sub>s</sub>AFP<sub>s</sub>*); Gene expression; *E. coli*; Transgenic; Tomato

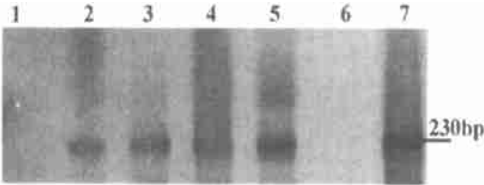


图4 转基因植株的 Southern Blot 检测结果  
1. 正常番茄总 DNA/ *Bam*HI+ *Sac*I Southern Blot 结果 (CK<sup>-</sup>); 2~ 7. 植株 3, 5, 18, 20, 23, 25 总 DNA/ *Bam*HI+ *Sac*I Southern Blot 结果。  
**Fig. 4 The Southern Blot results of transgenic plants**  
1. The Southern Blot results of nontransgenic tomato total DNA/ *Bam*HI+ *Sac*I (CK<sup>-</sup>); 2~ 7. The Southern Blot results of plantlets (3, 5, 18, 20, 23, 25) total DNA/ *Bam*HI+ *Sac*I.

信 息 中国园艺学会设施园艺分会成立

“中国园艺学会设施园艺分会成立大会暨学术讨论会”于 2001 年 8 月 18 日在中国农业科学院蔬菜花卉研究所召开。中国园艺学会理事长朱德蔚、学会及分会挂靠单位中国农业科学院蔬菜花卉研究所所长屈玉玉以及来自全国 20 多个单位的代表参加了会议。李天来、王志强、周长吉做了学术报告。中国农业科学院蔬菜花卉研究所张志斌研究员当选为分会会长。代表们就分会章程及工作计划进行了讨论。