

枣疯病植原体致病因子 Zaofeng3 的原核表达

曹懂懂¹, 李君毅¹, 姚佳¹, 王梦丽¹, 李萌¹, 李继东²

(1.河南农业大学林学院河南郑州 450000; 2.单位名称所在城市邮编; ...)

摘要:枣疯病是枣栽培过程中一种致死性病害, 枣树一旦感染枣疯病, 小树 2-3 年, 大树 4-5 年就会整株死亡, 给我国枣产业带来巨大的经济损失。实验室前期以枣疯病植原体基因组信息为研究基础, 共获得 694 个编码蛋白的基因。根据植原体效应因子的特性从中共筛选得到 8 个含有 N 端信号肽、不含有跨膜区域且定位于潜在移动元件 (PMU) 区域的枣疯病植原体效应因子。根据其在枣疯病植原体基因组中的基因定位顺序, 依次命名为 Zaofeng1-Zaofeng8。其中 Zaofeng3 属于 SAP54 类效应因子。为了研究枣疯病植原体致病因子 *Zaofeng3* 基因的功能, 利用生物信息学和 PCR 方法对该基因序列进行分析, 并从感染枣疯病 (*Jujube witches' broom*, JWB) 的病枣叶片总 DNA 中克隆基因 *Zaofeng3* CDS 区, 测序结果显示该基因大小为 366 bp, 和 GenBank 里的 CDS 序列相符 (GenBank 登录号 AYJ01078.1), 利用 ProtParam 软件在线分析 *Zaofeng3* 蛋白序列, 结果显示其氨基酸的分子量大小为 14.24943 KDa, 等电点为 7.89, 属于弱碱性氨基酸。蛋白序列的平均亲水性数值为 -0.630, 属于亲水性蛋白。不稳定指数大小为 44.62, 归为不稳定蛋白。蛋白质的跨膜区通过 TMHMM 在线软件预测, 结果发现 *Zaofeng3* 蛋白序列具有明显的跨膜区域, 跨膜区域的位置在第 10 至 27 个氨基酸之间, 同时去除信号肽后不含有额外的跨膜区。综上, *Zaofeng3* 符合分泌蛋白的结构, 与 signalP 分析结果一致, 可以分泌到胞外发挥其功能。利用 PSIPRED 在线软件分析 *Zaofeng3* 蛋白二级结构, 结果显示 *Zaofeng3* 蛋白主要由 α 螺旋组成, 没有发现 β 折叠。以表达载体 pET-15b 为骨架, 构建了 *Zaofeng3* 基因的原核表达载体 pET-15b-*Zaofeng3*, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中, 挑单克隆阳性单菌落摇菌, 在菌液 OD 值达到 0.6-0.8 左右, 诱导 *Zaofeng3* 蛋白表达, 设置不同 IPTG 浓度 (0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L)、不同诱导时间 (0 h、2 h、4 h、6 h、8 h), 并采用 SDS-PAGE 电泳方法进行检测, 分析诱导该蛋白表达的较好条件。结果显示: *Zaofeng3* 基因编码 122 个氨基酸, 融合蛋白分子质量为 15.08 kDa, 与预测蛋白大小相符, 该蛋白在大肠杆菌中最佳诱导条件是在菌液中加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG, 在 37°C 诱导 4 h。研究结果为 *Zaofeng3* 蛋白的功能分析奠定了理论及材料基础。

关键词:枣; *Zaofeng3*; 基因克隆; 原核表达; 表达体系优化