第35卷 第2期 植 物 保 护 学 报 Vol. 35 No. 2
2008年 4 月 ACTA PHYTOPHYLACICA SINICA Apr. 2008

灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 的生物功能

张云华[1,2] 邱德文[2*] 张立军[1] 杨秀芬[2] 曾洪梅[2] 袁京京[2]

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院植物保护研究所,
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100081)

摘要: 通过沸水浴、离心、阴离子交换层析等方法,从灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* BC-4-2-2-1 菌丝体中分离纯化出一种激活蛋白,命名为 PEBC2,经 SDS-PAGE 银染显示呈单一条带,相对分子量约为 14 kD。该激活蛋白能显著提高小麦种子的发芽率,促进小麦幼苗生长,增强小麦的抗旱性和番茄对灰霉病的抗性。经激活蛋白处理后小麦发芽率从 75.00% 提高到 98.33%,处理 7、9、11 天时株高分别比对照增加了 17.07%、23.05% 和 17.19%,幼苗抗旱综合系数从 36.53 提高到 57.45;该激活蛋白对番茄灰霉病的诱抗效果达 60.09%。

关键词: 灰葡萄孢菌; 激活蛋白 PEBC2; 纯化; 生物活性

Purification and its bioactivity of an activator protein PEBC2 from *Botrytis cinerea*

Zhang Yunhua[1,2] Qiu Dewen[2*] Zhang Lijun[1] Yang Xiufen[2] Zeng Hongmei[2] Yuan Jingjing[2]

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China; 2. The State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: An activitor protein named as PEBC2 was isolated and purified from the hyphae of *Botrytis cinerea* by boiling water bath, centrifugation, ultra-filtration and anion exchange chromatography, etc. The activator protein appeared as a single band corresponding to molecular weight of approximately 14 kD on SDS-PAGE with silver staining. This protein can obviously promote seed germination, seedling growth and drought tolerance of wheat, it can also induce tomato to gain resistance to gray mould. By treating with this protein, the germination rate of wheat seed increased from 75.00% to 98.33%, the plant height of wheat increased by 17.07%, 23.05%, 17.19% in 7, 9, 11 days respectively, the comprehensive drought-resistance coefficient of wheat seedling improved from 36.53 to 57.45. This protein's effect of induced resistance to gray mould of tomato reached 60.09%.

Key words: *Botrytis cinerea*; activator protein PEBC2; purification; bioactivity

激发子(elicitor)是一类能够诱导植物产生防卫反应的信号分子,对于启动寄主植物的抗性表达起关键作用[1],依照其化合物性质可以分为三大类:寡糖类、糖蛋白类以及蛋白多肽类[2]。蛋白激发子能显著提高植株对多种植物病原物的广谱抗性,且不会使病原物产生抗药性,对环境无污染,符合新型生物农药的要求,受到广泛关注。目前发现的蛋白类激发子主要有过敏蛋白(harpin)、隐地蛋白(cryptogein)、激活蛋白(activator protein)及其它相关蛋白[3]。目前国内外有很多关于过敏蛋白的报道,内容涉及其结构与功能关系、基因克隆与表达、序列及功能域分析、转基因植物等方面。隐地蛋白在国内

基金项目:国家“863”计划(2006AA10A210),北京市重大科技项目(D0706005040431)
作者简介:张云华,女,1972 年生,博士研究生,主要从事分子生物学研究,email: zyhzls@163.com
*通讯作者(Author for correspondence), email: dewenqiu@hotmail.com; 收稿日期:2007-12-12

外也得到了较为系统的研究，在氨基酸序列、空间结构、寄主和非寄主抗病、作用机制、作用靶标、结构与生物活性的相关性以及抗病基因工程等方面取得了较大的进展。激活蛋白是一类从真菌中分离的、具有诱导激发子功能的新型蛋白质[4]。研究证明，来源于稻瘟菌 *Piricularia oryzae* 和极细链格孢菌 *Alternaria tenuissima* 的激活蛋白，氨基酸和核苷酸序列不同于过敏蛋白和隐地蛋白，相关结果获得两项中国发明专利。激活蛋白能诱导多种植物产生系统抗性，促进植物生长，改善作物品质[5-7]。为了进一步发掘具有我国自主知识产权的新型激活蛋白，作者以灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 为材料，利用阴离子交换层析等方法分离获得纯化的激活蛋白，确定该激活蛋白在诱导植物抗病性和抗逆性方面的生物功能，以期为激活蛋白的作用机制、新基因克隆、构建基因工程菌株和转基因植物研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* BC-4-2-2-1，北京市农林科学院植物保护研究所提供；小麦品种 CA0045（中抗条锈病），中国农业科学院作物科学研究所提供；番茄品种中杂 11 号，中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 初始粗蛋白液的获得

将生长在 PDA 固体培养基上的灰葡萄孢菌丝体接种于 YPD 液体培养基（蛋白胨 20 g、蔗糖 20 g、酵母粉 10 g，加蒸馏水定容至 1000 mL）中，于 28 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 4 ~ 5 天，真空抽滤收集菌丝体，用双蒸水反复洗涤 4 次，称重后冻存于 −20 ℃ 冰箱中备用。

取菌丝体 10 g，置于研钵中加液氮研磨成粉末，迅速加入 pH 7.0 的 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液，混合均匀后，沸水浴 20 min，在高速冷冻离心机上 12000 r/min 离心 15 min，收集上清液即为初始蛋白液。

1.3 蛋白质含量的测定与激活蛋白的活性检测

按 Bradford[8] 方法测定蛋白质的含量，以牛血清白蛋白绘制标准曲线。将小麦种子用蛋白液浸种 8 h，蛋白含量分别为 1、5、10、20 μg/mL，每处理 20 粒种子，置于培养皿中，以提取蛋白的缓冲液为对照，每处理均重复 3 次。适时定量补水，观察记录小麦的发芽率，若各处理发芽率明显高于对照，则认为该蛋白处理有激活蛋白活性。

1.4 激活蛋白的纯化

利用 AKTA explorer10 蛋白纯化仪进行蛋白分步纯化[9]，首先选用离子柱 HiTrap™ DEAE FF 1mL 进行离子交换层析，用 5 倍体积 pH 7.0 的 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液平衡离子柱，取离心后的初始蛋白液，体积为 5 mL，流速 1 mL/min，淋洗至基线后，用含 1 mol/L NaCl pH 7.0 的 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液进行梯度洗脱，收集的各洗脱峰用 HiTrap™ Desalting 5 mL 脱盐柱脱盐后，进行活性检测，确定目的峰。取含有目的蛋白的组分 1 mL 加入到 RESOURCE™ Q 1mL 离子层析柱中，用含 1 mol/L NaCl pH 7.0 的 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液进行线性洗脱，收集的蛋白各组分用超滤管脱盐后进行活性检测。利用 SDS-PAGE 电泳和银染法[10] 检测蛋白的纯度并测定分子量。

1.5 纯化蛋白的生物功能

1.5.1 激活蛋白对小麦种子萌发和幼苗生长的影响

取籽粒饱满的小麦种子，消毒后用 1.182 μg/mL 的纯化蛋白浸种 8 h，每处理 20 粒种子，置于铺有滤纸的培养皿中，以 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液（pH 7.0）为对照，12 h 记录发芽率后，分别在每个培养皿中加入 60 g 石英砂用以保水和防止幼苗倒伏，于第 7、9、11 天时测量株高。小麦生长 14 天时停止补水，进行干旱胁迫，当 70% 植株萎蔫、叶片卷成针状时复水，再次干旱胁迫后，再复水，1 天后统计幼苗存活率和叶片抗衰度。计算幼苗抗旱综合系数[11-12]。各处理均重复 3 次。

1.5.2 激活蛋白对番茄抗灰霉病的诱导作用

灰葡萄孢菌孢子悬浮液的制备和接种均参考文献[13]。番茄种子用 1.182 μg/mL 的纯化蛋白浸种 36 h，播于营养钵中，以 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲液（pH 7.0）为对照，每处理 8 株，重复 3 次。当幼苗长至 5 ~ 6 叶时接种灰葡萄孢菌孢子悬浮液（10^4 个/mL），保湿 48 h，9 天后进行病级调查[14]，计算诱抗效果。

2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化

粗蛋白液使用离子柱 HiTrap™ DEAE FF 进行离子交换层析时，根据预备试验采用 8%、13%、26%、100% 四种浓度梯度的洗脱缓冲液进行洗脱，获得一个穿透峰 D1 和四个洗脱峰 D2 ~ D5（图1）。经活

性检测,在 26% 梯度洗脱的蛋白峰 D4 中含有目的蛋白。继续用 RESOURCE™Q 离子柱对其溶液进行纯化,经线性洗脱得到多个洗脱峰,脱盐后,活性检测发现目的蛋白集中在最后一个峰(图 2),经 SDS-PAGE 电泳显示为单一条带,分子量约为 14 kD(图 3),命名为 PEBC2(protein elicitor botrytis cinerea2)。

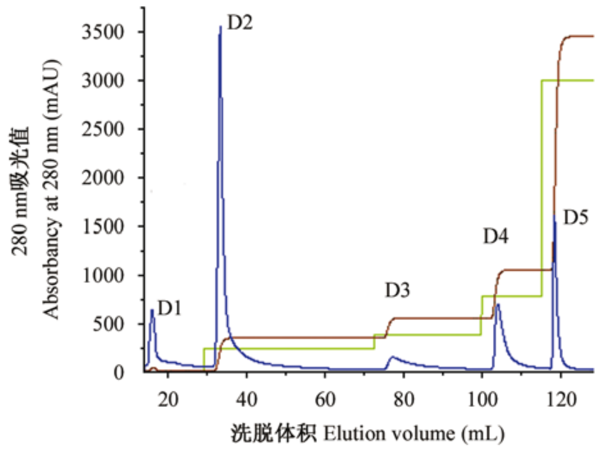

图 1 HiTrap™ DEAE FF 离子交换层析图谱

Fig. 1 Anion exchange chromatography (HiTrap™ DEAE FF)

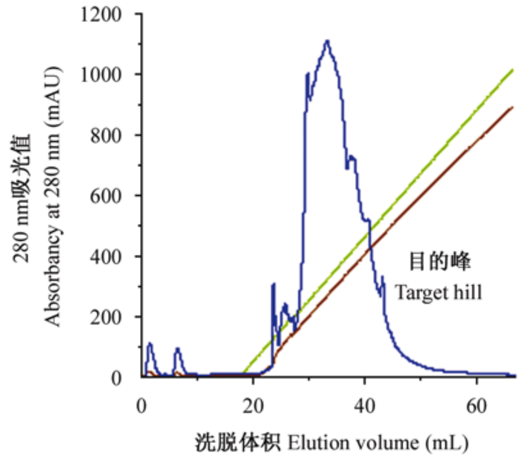

图 2 RESOURCE™Q 离子交换层析图谱

Fig. 2 Anion exchange chromatography (RESOURCE™Q)

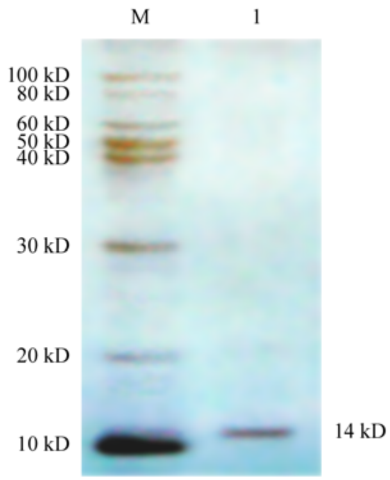

图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 3 Analysis of purified protein by SDS-PAGE

注:M:蛋白分子量标准;1:激活蛋白 PEBC2。Note:M:Molecular weight marker;1:activator protein PEBC2.

2.2 激活蛋白 PEBC2 对小麦种子萌发和幼苗生长的影响

使用激活蛋白 PEBC2 浸种小麦种子后,种子萌发率达 98% 以上,显著高于对照;处理 7、9、11 天时株高比对照分别增加了 17.07%、23.05% 和 17.19%(表 1)。证明灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 能够促进小麦种子萌发和幼苗生长。

2.3 激活蛋白 PEBC2 对小麦抗旱性的影响

对小麦进行干旱胁迫,对照组小麦大部分萎蔫时,处理组小麦仍生长良好,保持直立状态。复水后,经激活蛋白处理的小麦幼苗存活率比对照提高 20.33%,叶片抗衰度提高 21.50%,幼苗抗旱综合系数从 36.53 提高到 57.45(表 2)。说明灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 有助于增强小麦的抗旱性。

2.4 激活蛋白 PEBC2 诱导番茄抗灰霉病的效应

用激活蛋白 PEBC2 处理的番茄幼苗病叶率和病情指数明显低于对照,诱抗效果达 60.09%(表 2)。说明灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 能够显著增强番茄对灰霉病的抗性。

3 讨论

赵明治等[15]已从极细链格孢菌 *Alternaria tenuissima* 中纯化出分子量为 35 kD 的激活蛋白。本研究利用适宜的蛋白纯化技术方案,从灰葡萄孢菌中获得一种 14 kD 激活蛋白,该蛋白同样具有促进小麦种子萌发和幼苗生长、诱导植物产生抗旱和抗病功能,说明小分子量蛋白也具有激活蛋白活性。

有效的蛋白纯化技术是获得活性蛋白的重要环节。作者曾用硫酸铵沉淀的方法分离蛋白质,但损失较大,影响纯化效率,此外,还有大量的胞外多糖随蛋白质一起沉淀,对后续的纯化十分不利。离子交换层析的最大优点是能保持蛋白质的生物活性,通过对层析柱、缓冲液、pH 值、离子强度等条件的大量筛选,改进纯化参数,确定了最佳纯化路线,仅使用 HiTrap™DEAE FF 柱和 RESOURCE™Q 柱进行两步阴离子交换层析即得到了激活蛋白PEBC2,最终

表 1 激活蛋白 PEBC2 对小麦种子萌发和幼苗生长的影响

Table 1 Effect of protein activator PEBC2 on seed germination and seedling growth of wheat

处理 Treatment	发芽率(%) Germination rate	株高 Plant height (cm)					
		7 d	增加率(%) Increment rate	9 d	增加率(%) Increment rate	11 d	增加率(%) Increment rate
激活蛋白 PEBC2	98.33 ± 1.67 A	8.16 ± 0.08 A	17.07	9.93 ± 0.15 A	23.05	10.91 ± 0.18 A	17.19
对照 CK	75.00 ± 2.89 B	6.97 ± 0.12 B		8.07 ± 0.10 B		9.31 ± 0.22 B	

注:表中同列数据后不同大写字母表示 1% 水平时差异显著。下同。Note: The different letters after the data in the same line show the significant difference at 1% level. The same as follow.

表 2 激活蛋白 PEBC2 对小麦抗旱性及番茄抗病性的影响

Table 2 Effect of protein activator PEBC2 on the anti-drought ability of wheat seeding and the resistance to tomato gray mould

处理 Treatment	诱导抗旱性 Drought resistance			诱导抗病性 Resistance to tomato gray mould		
	叶片抗衰度(%) Degree of leaves decline resistance	幼苗存活率(%) Survival rate of seedling	幼苗抗旱综合系数 Comprehensive drought-resistance coefficient	病叶率(%) Diseased leaf rate	病情指数 Disease index	诱抗效果(%) Effect of induced resistance
激活蛋白 PEBC2	41.60 ± 3.84 a	73.30 ± 3.52 A	57.45 ± 3.68 A	14.29 ± 6.63 b	3.60 ± 1.59 b	60.09
对照 CK	20.10 ± 3.24 b	52.97 ± 1.25 B	36.53 ± 2.24 B	33.90 ± 6.01 a	9.02 ± 1.40 a	

注:表中同列数据后不同小写字母表示 5% 水平时差异显著。Note: The different letters after the data in the same line show the significant difference at 5% level.

确定在提取和分离中始终使用同一种缓冲液的方法,省去通常在各步层析纯化之间采取的替换缓冲液的步骤,不仅缩短了纯化时间,还减少蛋白质的降解和损失。

灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 不仅能诱导单子叶植物小麦的抗旱性,还可诱导双子叶植物番茄的抗病性,明显提高植物抗胁迫能力,可能是一种广谱的蛋白激发子。李丽等[13]曾用提取自交链孢菌的激活蛋白喷雾处理番茄幼苗,番茄接种灰葡萄孢菌孢子悬浮液后 21 天对灰霉病的诱抗效果达 71.30%,诱导番茄对灰霉病的抗性可达 1 个月以上。本研究用激活蛋白 PEBC2 浸种后,待番茄长至 5 ~ 6 叶时接种灰葡萄孢菌,诱抗效果达到60.09%。通过基因工程和转基因植物研究,灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 有望在减少化学肥料和农药使用量、降低农产品中农药残留以及农业可持续发展中发挥重要作用。

致谢:北京市农林科学院植物保护研究所李兴红研究员惠赠灰葡萄孢菌,特此致谢。

参 考 文 献(References)

[1] 纪春艳,李云锋,王振中. 稻瘟菌糖蛋白激发子(CSBI)的纯化及其鉴定. 植物生理与分子生物学学报,2006,32(5):587 - 592

[2] Hahn M G. Microbial elicitors and their receptors in plants. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 387 - 412

[3] 孙柏欣,邱德文,纪明山,等. 植物蛋白激发子研究进展. 农业生物灾害预防与控制研究, 2005:292 - 297

[4] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白制品及其制备方法. 中国专利:ZL 01 1 28666.0,2004 - 3 - 17

[5] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展. 中国生物防治,2004, 20(2):91 - 94

[6] 邱德文,杨秀芬,刘峥,等. 植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响. 中国烟草学报,2005,11(6):33 - 36

[7] 左斌,邱德文,罗宽. 植物激活蛋白对水稻秧苗生长及相关酶活性的影响. 科学技术与工程,2005,5(17):1260 - 1262

[8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254

[9] Marshak D, Kadonaga R, Knuth M, et al. Strategies for protein purification and characterization: A laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996

[10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社,2001, 123 - 146

[11] 徐峰. 稻瘟菌激活蛋白基因克隆及功能解析. 中国农业科学院博士学位论文,2006

[12] 安永平,强爱玲,张媛媛,等. 渗透胁迫下水稻种子萌发特性及抗旱性鉴定指标研究. 植物遗传资源学报,2006,7(4):421 - 426

[13] 李丽,邱德文,刘峥,等. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用. 中国生物防治,2005, 21(4):265 - 268

[14] 李亚玲,龙书生,时春喜,等. 25% 多 · 霉威 SC 防治番茄灰霉病的药效试验. 西北农业学报,2004,13(3):70 - 71

[15] 赵明治, 杨秀芬, 张明, 等. 一种促进植物根系生长的极细链格孢菌蛋白质分离、纯化和生物功能. 中国生物防治, 2007, 23(2):170 - 173