

玉米细菌性枯萎病菌 EGase 内切葡聚糖酶蛋白 纯化研究初探

厉艳*, 邵秀玲, 张京宣, 王英超, 封立平, 王简

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002)

摘要: **目的** 研究玉米细菌性枯萎病菌 EGase 内切葡聚糖酶蛋白纯化的方法。**方法** 以玉米细菌性枯萎病菌(*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)菌株为材料, 分离纯化其内切葡聚糖酶 Egase。制备 EGase 浓缩液, 浓缩液经 Sephadex™ G-75 凝胶过滤层析和 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱层析等提纯步骤, 获得了凝胶电泳均一的内切葡聚糖酶。**结果** 经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为一条电泳带, 纯化后的 EGase 是单体蛋白, 分子量约为 72.3 kDa。Egase 酶反应的最适温度是 60 °C, 最适 pH 为 5.0。**结论** 本研究从玉米细菌性枯萎病菌中分离得到了一种新的内切葡聚糖酶, 对其部分性质进行了表述, 为后续 EGase 基因的克隆及表达研究提供了研究基础。

关键词: 玉米细菌性枯萎病菌; 内切葡聚糖酶; 蛋白纯化

Primary studies of endoglucanase purified from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

LI Yan*, SHAO Xiu-Ling, ZHANG Jing-Xuan, WANG Ying-Chao, FENG Li-Ping, WANG Jian

(Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the purification method of endoglucanase (EGase) from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Methods** With the material of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. strain, EGase fermented liquid was prepared, and then eluted using Sephadex™ G-75 and on DEAE-Sephrose Fast Flow anion exchange. SDS-PAGE was used to determine the EGase activity after purification. **Results** Endoglucanase was purified from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. It was monomer protein and its molecular size was 72.3 kDa. The optimum reaction temperature of endoglucanase was 60 °C and the optimum pH was 5.0. **Conclusion** Endoglucanase was purified firstly from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* and its properties were described. This study will provide an important base for cloning and expression of endoglucanase gene research.

KEY WORDS: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*; endoglucanase; protein purification

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK293, 2014IK021, 2015IK213)

Fund: Supported by the National Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision (2013IK293, 2014IK021, 2015IK213)

*通讯作者: 厉艳, 高级农艺师, 主要研究方向为植物检疫。E-mail: standciq@163.com

*Corresponding author: LI Yan, Senior Agronomist, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: standciq@163.com

1 引 言

玉米细菌性枯萎病(bacterial wilt of corn or Stewart's wilt)是玉米的一种重要病害,一旦感染,会给玉米生产带来毁灭性打击。其病原是一种革兰氏阴性细菌—玉米细菌性枯萎病菌(*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*),该细菌被我国列为禁止入境的检疫性有害生物^[1,2]。目前,玉米细菌性枯萎病菌的检测方法主要有分离培养检测、酶联免疫检测、分子生物学检测等。分离培养检测和酶联免疫检测虽然不需贵重的检测仪器,但操作繁琐、耗时较长;分子生物学检测方法灵敏度较高,但需要贵重的仪器,只能作为专业技术人员在实验室使用的标准方法,这些方法均难以实现现场检测^[3],发展操作更加简单的快速检测方法将适于该病菌的现场快速筛查。

玉米细菌性枯萎病菌宿主细胞壁降解酶(CWDE)是包括 *Xylella fastidiosa*, *Ralstoniaso lanacearum*, *Xanthomonas campestris* 等许多植物病原菌的重要的毒力因子^[3-8]。宿主细胞壁降解酶可以分解植物细胞壁中的果胶、纤维素、半纤维素和蛋白质成分,增强微生物加速在微管组织里的运动能力。通过对玉米细菌性枯萎病菌的基因组进行分析,发现其含有几个能够编码 CWDE 降解酶的开放阅读框^[4],其中内切葡聚糖酶(EGase)在玉米细菌性枯萎病菌的毒力及吸附上起着重要的作用。进一步研究发现,玉米细菌性枯萎病菌的 EGase 属于糖苷水解酶家族 8^[5-11],是一种 O 型糖基水解酶,能够水解两个碳水化合物或一个碳水化合物与另外一个非碳水化合物之间的糖苷键成分。人们普遍认同,由玉米细菌性枯萎病菌的 EGase 基因编码的胞壁降解酶首先通过消化宿主木质的基膜来帮助其吸附到宿主中,然后通过消化宿主中木质部分的丰富碳源等营养物质来提高自身的运动能力,因此内切葡聚糖酶 EGase 对于玉米细菌性枯萎病菌的毒力是十分重要的^[11,12]。本研究分离纯化玉米细菌性枯萎病菌中的内切葡聚糖酶 EGase,并对其氨基酸序列进行初步研究。

2 材料与方 法

2.1 供试材料

菌株:玉米细菌性枯萎病菌,购于美国典型微生物菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC 8199)。

主要试剂:葡聚糖凝胶(SephadexTM G-75 凝胶,瑞典 Amersham 公司);凝胶缓冲液(30 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0); DEAE-Sepharose Fast flow 阴离子交换凝胶(瑞典 Amersham 公司); DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子柱缓冲液(20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH6.5)。

主要仪器设备:蛋白质纯化系统(瑞典 ÄKTATM prime with HitrapTM, Amersham);超滤管(美国 Millipore 公司);凝胶成像系统(英国 GENE:BOX HR)。

2.2 方 法

2.2.1 培养基制备

营养肉汤酵母膏(NBY)培养基:牛肉汁 8.0 g, 酵母膏 2.0 g, 磷酸氢钾 2.0 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 葡萄糖 2.5 g, 琼脂 15 g, 水 1 L, 灭菌后加 1 mL 过滤灭菌的 1 mol/L 硫酸镁(7 结晶水)溶液。

2.2.2 EGase 浓缩液的制备

玉米细菌性枯萎病菌在 NBY 平板上划线, 28 °C 培养 48 h 后, 挑取单菌落接入 NBY 液体培养基中, 培养过夜, 制成 OD_{600 nm} 为 2.0 种子液。吸取 1 mL 接到 200 mL NBY 培养基中, 25 °C、170 r/min 培养 48 h 后 4 °C、8000 r/min 条件下离心 5 min, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.6)洗 2 次, 15 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)重悬, 超声波破碎细胞, 12000 g 离心 10 min, 收集上清, 即为制备的 EGase 浓缩液。

2.2.3 分离纯化^[14]

2.2.3.1 SephadexTM G-75 凝胶过滤层析

12g SephadexTM G-75 凝胶, 10 倍体积稀释, 100 °C 水浴 2 h, 冷却, 凝胶缓冲液洗涤数次装柱, 与蛋白质纯化系统相连。装好的层析柱在上样前, 用洗脱缓冲液在柱压 0.2 Mpa、流速 0.5 mL/min 下平衡冲洗, 待纯化系统中蛋白吸收值稳定后加入浓缩样品。3 mL 粗酶液在柱内壁转动加样, 用洗脱缓冲液加满层析柱, 在柱压小于 0.1 Mpa、流速 0.5 mL/min 条件下洗脱, 蛋白质纯化系统在 280 nm 下测定流出层析柱样品的吸收值, 洗脱之初吸收值设为 0, 吸收值增加时, 收集样品, 每管收集 3.0 mL, 测定每个收集管中 EGase 活力和总蛋白含量。

2.2.3.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析

将凝胶层析柱收集到的有 EGase 活性的样品收集于透析袋内, 放入阴离子柱缓冲液中 4 °C 下透析过夜。阴离子交换凝胶 60 mL, 阴离子柱缓冲液浸泡洗涤后装柱, 层析柱与蛋白质纯化系统相连。透析后样品全部上样至阴离子交换层析柱中, 在柱压小于 0.3 Mpa、流速 1 mL/min 下阴离子柱缓冲液冲洗 1.5 h, 相同条件下 1 mol/L NaCl 离子交换缓冲液梯度洗脱, 每管收集 3.0 mL, 测定每个收集管中 EGase 活力和总蛋白含量。

2.2.3.3 超滤浓缩收集液

经阴离子交换层析柱收集到的有 EGase 的样品用 3000 Da 离心超滤离心管, 4 °C、14000 r/min 离心浓缩至 200 μL。

2.2.4 酶学性质分析

2.2.4.1 分子量和纯度测定

采用 SDS-PAGE 垂直板电泳法^[15]。制备凝胶板, 其中浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度 12%, 进行 SDS-PAGE 电泳使用蛋白 Marker 包括以下蛋白: 肌球蛋白(myosin, 200 kDa)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase, 116 kDa)、磷酸化酶(phosphorylase B, 97.2 kDa)、血清白蛋白(serum albumin,

66.4 kDa)、卵清蛋白(ovalbumin, 44.287 kDa)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase, 29 kDa)。取下凝胶后, 进行考马斯亮蓝染色 5 h, 脱色液脱色 5 h。凝胶成像系统对电泳结果进行拍照和分析。

2.2.4.2 温度和 PH 对酶活的影响

取纯化的 EGase 酶液, 分别在不同的温度(20、30、40、50、60、70、80、90 °C)下^[16]测定 EGase 活力, 以最高活力为 100%, 计算不同温度条件下 EGase 活性。在不同 pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)条件下, 测定 EGase 活性, 以最高活性为 100%, 计算不同 PH 条件下酶活力。

3 结果与讨论

3.1 Sephadex™ G-75 凝胶柱层析

从玉米细菌性枯萎病菌培养液中制备的 EGase 浓缩液加入到 Sephadex™ G-75 凝胶柱层析后, EGase 浓缩液进行了部分纯化。测定每个收集管中的 EGase 活力和总蛋白含量。酶活性检测表明, 只有在第 1 个蛋白质峰位置收集的洗脱液具有水解葡聚糖的活力, 在其他 3 个蛋白质峰的位置没有检测到酶活性, 洗脱结果如图 1 所示。因此收集所有检测到 EGase 活性的洗脱液进行合并, 超滤浓缩后进行下一步纯化, 同时分析可知, 经过 Sephadex™ G-75 凝胶柱纯化可以去除大量杂蛋白, 样品中的目的蛋白质纯度已有较大程度的提高。

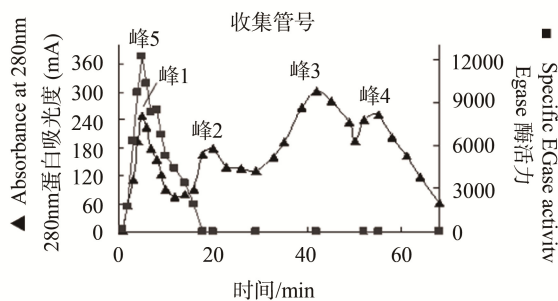


图 1 EGase 液流经分子筛 Sephadex™ G75 层析图

Fig. 1 Elution profile of EGase from *Pantoea stewartii* on Sephadex™ G-75

3.2 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析柱纯化

经过 Sephadex™ G-75 柱部分纯化浓缩后的有 EGase 活性的样品收集并透析后, 经 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析柱进一步纯化, 经 1 mol/L 氯化钠溶液梯度洗脱, 结果如图 2 所示。

图 2 表明, 洗脱曲线中有 3 个蛋白吸收峰出现, 其中只有第 3 个蛋白质峰位置收集的洗脱液有较高的 EGase 活

性。从洗脱曲线可以看出, 用起始缓冲液洗脱时, 得到蛋白峰而没有检测到酶活, 说明洗脱出的是杂蛋白, EGase 全部被吸附到离子交换剂上。

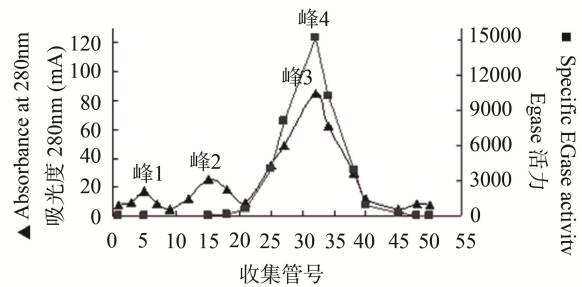


图 2 产 EGase 经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子凝胶柱层析图

Fig. 2 Elution profile of EGase on DEAE Sepharose Fast Flow anion exchange

3.3 纯化后 EGase 不连续 SDS-PAGE 分析和分子量测定

将纯化后的 EGase 样品在不连续 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 测定 EGase 内切葡聚糖酶蛋白的纯度和分子量大小, 结果如图 3 所示。

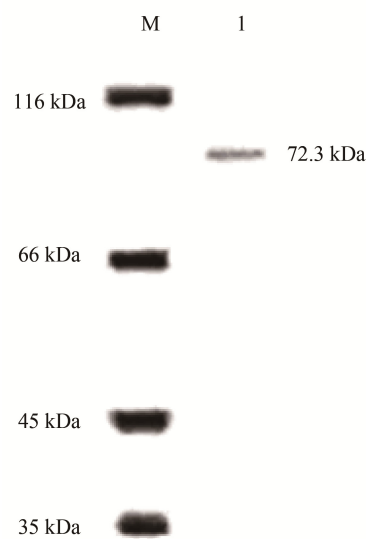


图 3 纯化的 EGase SDS-PAGE 分析(M: Marker;

1: 纯化的 EGase 样品)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the fractions showing EGase activity obtained during the purification (M: Marker;

1: purified EGase sample)

分析结果可知, EGase 发酵液经 Sephadex™ G-75 凝胶层析和 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱层析之后的样品纯度已经很高, 为单一的 EGase。在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图上表现为单一电泳带(根据已知分子量的

标准蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,推测出玉米细菌性枯萎病菌所产 EGase 分子量为 72.3 kDa),说明纯化后的 EGase 是单体蛋白。

3.4 温度和 pH 对酶活力的影响

在不同温度条件下测定 EGase 酶的活力,结果如图 4 所示,分析可知,玉米细菌性枯萎病菌 EGase 内切葡聚糖酶在 40~70 °C 之间活性较高,最适反应温度在 60 °C 左右。分析图 5 结果可知,该酶的最适 pH 为 5,随着 PH 的升高酶活力逐渐下降。

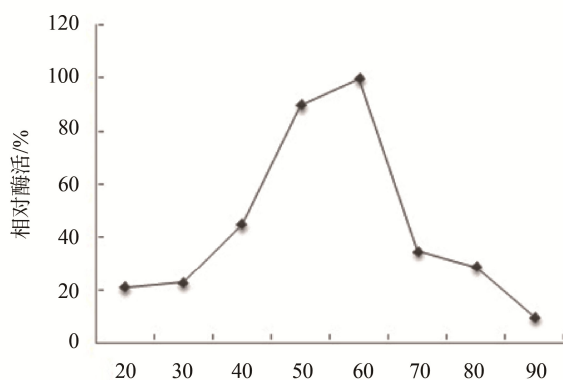


图 4 温度的影响
Fig. 4 Effect of temperature

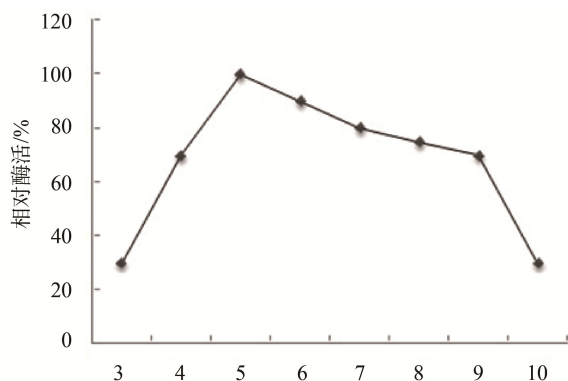


图 5 PH 的影响
Fig. 5 Effect of PH

3.5 N 端与 C 端测序

将纯化得到的 EGase 送上海生工分别进行 N 端与 C 端测序,得到序列如下:N 端:MKNKKI, C 端:LGQNSF。为进一步研究该酶基因的测序与克隆打下分子基础。

4 结论与讨论

本研究从玉米细菌性枯萎病菌中分离得到了一种新的内切葡聚糖酶,对其部分性质进行了表述,并测定了其 N 端与 C 端氨基酸序列,为后续 EGase 基因的克隆及表达研究提供了研究基础。通过克隆得到玉米细菌性枯萎病菌细胞壁降解酶基因及其编码的氨基酸序列,对明确该病的病理生理学特征及致病机制提供了重要理论依据,将该基因序列克隆到大肠埃希菌中表达,表达的蛋白则可以快速地用于制备特异性单克隆抗体,作为口岸检疫过程中快速检测玉米细菌性枯萎病菌的一种高效手段,同时也为玉米细菌性枯萎病菌的病理学深入研究奠定新的基础。有关该酶基因的克隆、分析,以及选择合适的载体及表达宿主实现 EGase 基因的高效表达,将在后续工作中进行系统和深入的研究。

参考文献

- [1] 郑雅楠,王晓鸣,吕国忠,等.玉米细菌病害及其防治策略[J].作物杂志,2006,1:62-65.
Zheng YN, Wang XM, Lv GZ, et al. Corn bacterial diseases and control strategy [J]. J Crops, 2006, 1: 62-65.
- [2] 朱金国,莫瑾,彭梓,等. PCR-DHPLC 技术快速检测玉米细菌性枯萎病菌[J].植物检疫,2009,23(5):15-18.
Zhu JG, Mo J, Peng Z, et al. PCR-DHPLC method of rapid detecting the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* [J]. Plant Quarant, 2009, 23(5): 15-18.
- [3] 齐玲玲,金涌,邹明强,等.胶体金免疫层析试纸条快速检测玉米细菌性枯萎病菌[J].检验检疫学刊,2010,20(1):1-5.
Qi LL, Jing Y, Zou MQ, et al. A colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of *Erwinia Stewartii* subsp. *stewartii* [J]. J Inspect Quarant, 2010, 20(1):1-5.
- [4] Dow JM, Davies HA, Daniels MJ. A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11: 1085-1093.
- [5] Gonzalez ET, Allen C. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16:536-544
- [6] Huang Q, Allen C. An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum* [J]. J Bacteriol, 1997, 179: 7369-7378.
- [7] Liu H, Zhang S, Schell MA, et al. Pyramiding unmarked deletions in *ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2005, 18(12):1296-305.
- [8] Roper MC, Greve LC, Warren JG, et al. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2007, 20: 411-419.
- [9] Bauer WD, Talmadge KW, Keegstra K, et al. Structure of plant-cell walls 2.hemicellulose of walls of suspensionculturedsycamore cells [J]. Plant Physiol, 1973, 51: 174-187.
- [10] Carpita NC. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses [J]. Ann

- Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47(1): 445-476.
- [11] Glasner JD, Rusch M, Liss P, *et al.* ASAP: A resource for annotating, curating, comparing, and disseminating genomic data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 41-45.
- [12] Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry and molecular biology of plants* [M]. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [13] Saile E, McGarvey JA, Schel MA, *et al.* Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum* [J]. *Phytopathology*, 1997, 87: 1264-1271.
- [14] 盛军. 海洋金黄色隐球酵母葡聚糖酶发酵生产、酶的分离纯化以及基因克隆的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学.
Sheng J. The study on production, purification, characterization of extracellular inulinase and molecular cloning of extracellular inulinase gene from a marine yeast *Cryptococcus aureus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [15] 郭尧君. 蛋白电泳试验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
Guo RJ. Protein electrophoresis experiment technology [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [16] Shi YJ, Shi YJ, Wang X, *et al.* Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulose activity in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 89(1): 31-38.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



厉 艳, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为植物检疫。

E-mail: standciq@163.com