

327

植物分子生物学丛书-3

植物基因工程研究(Ⅱ)

陈章良 主编



A0946348

北京大学出版社
• 北 京 •

图书在版编目(CIP)数据

植物基因工程研究(Ⅰ)/陈章良主编. —北京:北京大学出版社,2001
ISBN 7-301-02127-5

I. 植… II. 陈… III. 植物-基因工程-论文集 IV. Q6

书 名: 植物基因工程研究(Ⅰ)

著作责任者: 陈章良主编

责任编辑: 李宝屏

标准书号: ISBN 7-301-02127-5/Q·56

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn/cbs.htm>

电 话: 出版部 62752015 发行部 62754140 编辑部 62752038

电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

发 行 者: 北京大学出版社

印 刷 者: 北京大学印刷厂

经 销 者: 新华书店

787毫米×1092毫米 16开本 48.25印张 1265千字

2001年2月第1版 2001年2月第1次印刷

定 价: 80.00元

前 言

时光飞逝,日月如梭。从1993年我们出版植物分子生物学丛书的第一本论文集《植物基因工程研究》至今,已经过去整整七年了。在这七年当中,我们植物基因工程实验室得到了国家科技部、教育部等各级领导和北京大学等各方的大力支持,承担了国家转基因植物研究与产业化专项计划、国家863高技术计划、“九五”攻关项目、国家自然科学基金等的多项国家重大重点科研项目以及省校合作科研项目;在我们实验室工作过的同事和朋友走走来来,换了一拨又一拨;应该说,经过大家的努力,实验室做出了一些成绩。作为一个工作总结,我们把本实验室自1993年至1999年七年间在国内外学术杂志上发表的一百多篇学术论文汇编成册,出版这本植物分子生物学丛书的第二本论文集《植物基因工程研究(Ⅱ)》。从这本论文集中可以清晰地看到这些年实验室研究水平逐步提高的发展历程,也可以从中看到我们不懈的努力。

为了便于读者对本实验室研究项目的了解,本书将论文以发表时间为序进行排列,并在每一篇论文最后注明其发表时间及学术杂志的名称和卷页号。由于各学术杂志对于参考文献的排列方式要求不一,我们在整理时没有作统一处理,以维持原学术杂志的论文发表格式。

本书汇编时间仓促,疏漏之处在所难免,敬请各位读者谅解。我们衷心希望本书成为以后本实验室同国内外同行交流合作的纽带和基础,也希望读者提出宝贵意见,以利于我们今后工作水平的提高。

陈章良

2000年

主 编 陈章良

副主编 瞿礼嘉 顾红雅

编 委 潘乃穉 安成才 徐 庆

目 录

细菌中一种抗菌蛋白的分离纯化及特性分析	张 宁 潘乃璁 陈章良(1)
抗病毒烟草及三种类型烟草烟气的相气相色谱分析	王永华 朱玉贤 孙宝俊等(7)
Rubisco 融合基因的构建及其在 <i>E. coli</i> 中的表达	李 兵 吴光耀 陈章良等(10)
马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因在转基因烟草植株中的表达及抗病	王春香 杨美珠 潘乃璁等(18)
利用原生质体融合技术选育防治植物病虫害的基因重组菌株	刘伊强 王雅平 潘乃璁等(25)
小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性	王雅平 刘伊强 施 磊等(33)
光敏色素与基因表达	赵鸿娟 刘芝华 朱玉贤(39)
基因工程在医药上的应用	于丽红 欧阳文军 陈章良(47)
高等植物花器官的特异性基因	顾红雅 陈章良(51)
枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产效应的研究	王雅平 刘伊强 潘乃璁等(61)
Cloning, Sequencing, High-level Expression and Activity Analysis of a Rice Calmodulin cDNA	Liu Zhihua Zhu Yuxian Zhao Hongjuan et al(67)
Plant Biotechnology in China	Chen Zhangliang Gu Hongya(75)
豌豆钙调蛋白基因的克隆及七种来源钙调蛋白基因的分析	姚 瑾 曹晓风 刘芝华等(79)
芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究	刘伊强 王雅平 潘乃璁等(85)
成熟天花粉蛋白基因在酵母中的表达	吕万革 党 伟 张光明等(90)
拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性	刘伊强 王雅平 潘乃璁等(95)
对转基因香料烟 PK-873 几个重要质量性状的研究	朱玉贤 潘乃璁 陈章良等(102)
水稻矮缩病毒基因组第六号片段编码区的 cDNA 克隆及序列分析	刘一飞 李 毅 潘乃璁等(108)
甜菜坏死黄脉病毒 RNA3 序列分析及在大肠杆菌中的表达	李 毅 王 琰 刘一飞等(114)
Infectious <i>in vitro</i> Transcripts from Cloned cDNA of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA3 and RNA4 and their Functional Study	Li Yi Wei Chunhong Tian Bo et al(125)
水稻矮缩病毒基因组第五号片段编码区的 cDNA 克隆及序列分析	李 玮 李 毅 潘乃璁等(136)
双抗(抗病毒及抗虫)植物表达载体的构建及番茄的转化鉴定	梁小友 米景九 朱玉贤等(144)
香蕉钙调蛋白基因的克隆及序列分析	冀洁敏 金志强 孔德赛等(151)
番茄丛矮病毒组(Tombusviruses)成员外壳蛋白是一种单双链 DNA 结合蛋白	李 毅 魏春红 潘乃璁等(158)
真菌传杆状病毒组(Furovirus)内四种病毒的细胞病理学	

比较研究	李 毅 魏春红 潘乃缇等	(165)
水稻矮缩病毒第十二号基因组份的 cDNA 合成与分子克隆及		
全序列分析	李 毅 薛志宏 刘一飞等	(171)
烟草双抗(抗病抗虫)基因工程	梁小友 米景九 潘乃缇等	(178)
修饰的 <i>B. t. k-δ</i> -内毒素基因在大肠杆菌及烟草中表达的抗虫性		
.....	梁小友 郑 琦 米景九等	(185)
水稻中一种抗真菌蛋白的分离与特性分析	刘 虹 顾红雅 陈 新等	(192)
外源甜蛋白 THAUMATIN I 基因转入烟草的研究	周 平 潘乃缇 刘春清等	(197)
Prevention of Disease Development in Transgenic Plants Expressing the		
Trichosanthin Gene	Zhou Ping Zhu Yuxian Zheng Weihong et al	(201)
番茄多聚半乳糖醛酸酶的 cDNA 克隆及反义基因转化植物		
.....	党 伟 吕万革 曹晓风等	(206)
Transformation of Mature Wheat Embryos by Particle Bombardment		
.....	Yang Shuli Zhu Yuxian Qiang Que et al	(214)
Preliminary Studies on the Phylogeny of <i>Kalimeris yomena</i> subsp. <i>yomena</i> and Other		
Two Taxa Using RFLP Analysis	Gu Hongya Zhao Xiaolan Qu Lijia et al	(220)
Production of Virus Resistant and Insect Tolerant Transgenic Tobacco Plants		
.....	Liang Xiaoyou Zhu Yuxian Mi Jingjiu et al	(226)
中国河南西峡恐龙蛋化石中 18S rDNA 部分片段的克隆及序列分析		
.....	安成才 李 毅 朱玉贤等	(233)
中国河南西峡晚白垩世恐龙蛋化石基因分离及序列分析	李 毅 安成才 朱玉贤等	(240)
水稻矮缩病毒基因组第八号片段的 cDNA 克隆序列分析及在大肠杆菌中的表达		
.....	李 玮 李 毅 张 旭等	(244)
蜘蛛杀虫肽基因的合成及其在植物中表达质粒的构建	蒋 红 朱玉贤 王雅平等	(252)
PCR 产物的 RFLP 分析在黄芪亚族(豆科)系统学研究中的应用初探		
.....	丁士友 顾红雅 瞿礼嘉等	(257)
查尔酮合酶基因的克隆、全序列分析及在大肠杆菌中的高效表达		
.....	邵 莉 李 毅 潘爱华等	(263)
Molecular Cloning, Sequencing and Expression in <i>Escherichia coli</i> of		
the Chalcone Synthase Gene	Shao Li Li Yi Pan Aihua et al	(268)
水稻富硫 10 kD 醇溶谷蛋白基因的克隆和序列分析比较	尤立如 谢 明 瞿礼嘉等	(273)
水稻矮缩病毒基因组第九号片段的 cDNA 克隆及序列分析		
.....	曲 林 李 毅 朱玉贤等	(280)
水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cDNA 的克隆和序列分析比较		
.....	张建华 谢 明 瞿礼嘉等	(286)
转化 CMV-cp 基因番茄对 CMV 病毒抗性鉴定	杨荣昌 徐鹤林 余文贵等	(296)
水稻 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的 cDNA 基因克隆和结构分析		
.....	瞿礼嘉 纪 梅 蓝 宁等	(302)
植物病毒胞间运动的分子生物学和细胞学研究进展	李 毅 陈章良	(311)

Cloning, Sequencing and Analysis of a Gene Encoding *Escherichia coli*

- Proline Dehydrogenase Xia Mian Zhu Yuxian Cao Xiaofeng et al(319)
- Cloning of ACC Synthase cDNA and Transforming Tomato with Antisense Gene
..... Cao Xiaofeng Zheng Weihong Yang Meizhu et al(327)
- Elevated Endogenous Isopentenyl Adenine Content is Correlated with an Extremely
Shooty Rice Phenotype Zhu Yuxian Qin Ruizhen Shan Xueyan et al(335)
- 导入蜘蛛杀虫肽基因的烟草具有抗虫性 蒋红 朱玉贤 陈章良(342)
- 利用 TMV-U1 作为载体表达鼠肝炎病毒 S 糖蛋白片段 张光明 潘乃缦 陈章良等(348)
- 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因在转基因马铃薯中的表达 曹晓风 杨美珠 朱玉贤等(360)
- 一种水稻蛋白酶抑制剂基因的克隆及其结构分析 谢明 陈新 瞿礼嘉等(365)
- 蜘蛛杀虫肽在大肠杆菌中的表达及其活性分析 蒋红 朱玉贤 陈章良(372)
- 烟草花叶病毒运动蛋白基因的 cDNA 克隆、序列测定及植物转化
..... 余晓红 朱玉贤 应华澄等(377)
- 查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响 邵莉 李毅 杨美珠等(382)
- 水稻矮缩病毒第 11 号组分基因序列和编码蛋白的功能分析
..... 肖锦 李毅 全胜 (392)
- 水稻矮缩病毒第四号片段序列及编码蛋白的功能分析 赵晓岚 李毅 刘一飞等(399)
- 水稻矮缩病毒第七号基因的序列分析及在大肠杆菌中的表达
..... 曲林 李毅 全胜等(409)
- DNA 水平上的植物系统学研究进展 丁士友 张春林 顾红雅等(418)
- 抗除草剂旱稻转基因植株的获得 于志华 陈敏勇 顾红雅等(430)
- 温度对香石竹组织培养及其试管苗玻璃化的影响 胡庆阳 于志华 郑宏红等(436)
- GUS 和 HPT 基因的基因枪法转化水稻 陈敏勇 于志华 明小天等(440)
- Immunodetection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA3-encoded Protein in
Different Host Plants and Tissues Y. Li C. Wei P. Tien et al(446)
- The Effects of 2ip and 2,4-D on Rice Calli Differentiation
..... Zhu Yuxian Ouyang Wenjun Li Yan et al(455)
- 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄抗黄瓜花叶病毒侵染
..... 程英豪 吴光 王继伟等(462)
- 高等植物的过敏原研究 陈祝 瞿礼嘉 顾红雅等(469)
- 植物抗病基因的分子生物学研究进展 朱国峰 瞿礼嘉 顾红雅等(475)
- 二羟基黄酮醇还原酶基因的克隆、全序列分析及在大肠杆菌中的表达
..... 颜华 李毅 宋云等(487)
- 查尔酮异构酶基因的克隆序列分析及在大肠杆菌中的表达
..... 颜华 宋云 李翊云等(495)
- 高等植物的 LRR 蛋白:结构与功能 杨崇林 陈章良(501)
- 光敏色素与光调控 顾雪松 陈章良 朱玉贤(507)
- 微磁球法分离转基因烟草细胞壁 CaMBP 顾雪松 陈章良 朱玉贤(515)
- Recovery of Transgenic Rice Plants Expressing the Rice Dwarf Virus Outer

Coat Protein Gene (S8)	H. H. Zheng Y. Li Z. H. Yu et al(519)
A Chalcone Synthase-like cDNA from Rice Anther	Qu Li-Jia Zhang Yi Xie Ming et al(529)
Molecular Cloning, Sequencing, Functional Analysis and Expression in <i>E. coli</i> of Major Core Protein Gene (S3) of Rice Dwarf Virus Chinese Isolate	F. Zhang Y. Li Y. Liu et al(533)
Rice Dwarf Phytoreovirus Segment S11 Encodes a Nucleic Acid Binding Protein	Xu Hong Li Yi Mao Zhijuan et al(545)
水稻过敏原基因 cDNA 原核表达产物的功能分析	金建华 张侯斌 瞿礼嘉等(556)
A Simple PCR-based Method for Scoring the <i>ph1b</i> Deletion in Wheat	L. -J. Qu T. N. Foote M. A. Roberts et al(559)
对一个在水稻雄蕊中大量表达的 cDNA 的结构和表达分析	张 毅 瞿礼嘉 刘美华等(568)
Structural and Expressional Analysis of a cDNA that Expresses Predominantly in Rice Stamens	Zhang Yi Qu Lijia Liu Meihua et al(574)
高等植物开花的基因调控	安利忻 李 毅 刘荣维等(581)
The 42 K Protein of Rice Dwarf Virus is a Post-translational Cleavage Product of the 46 K Outer Capsid Protein	Z. J. Mao Y. Li H. Xu et al(587)
番茄抗病基因 <i>Cf9</i> 的 3'UTR 区含有内含子序列	杨崇林 汪 敏 李 毅等(594)
水稻矮缩病毒基因组分析与部分基因片段的表达及功能研究	李 毅 徐 洪 程明非等(599)
水稻矮缩病毒第一号组分基因和编码蛋白的序列分析	肖 锦 李 毅 张 净等(610)
Extracellular Calmodulin Stimulates RbcS-GUS Expression of Etiolated Transgenic Tobacco Plants in Full Darkness	Zhu Yuxian Gu Xuesong Zhao Hongjuan et al(621)
普通小麦基因组最可能的 4 个供体的 ITS1 和 ITS2 序列及其亲缘关系	张文驹 瞿礼嘉 高 巍等(630)
Purification and Characterization of a Novel Anti-fungal Protein from <i>Gastrodia elata</i>	Xu Qing Liu Ying Wang Xiaochen et al(638)
转基因植物内源基因与外源基因共抑制问题研究进展	李 艳 李 毅 陈章良(649)
The Refolding, Purification, and Activity Analysis of a Rice Bowman-Birk Inhibitor Expressed in <i>Escherichia coli</i>	Li Na Qu Lijia Li Yueyi et al(654)
原核表达的天花粉蛋白和另外两种蛋白具有体外抗真菌活性	胡 革 安成才 李 毅等(663)
水稻矮缩病毒最外层外壳蛋白基因(S ₂)cDNA 克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达	鲁瑞芳 李 毅 杨崇林等(672)
抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析	刘 颖 徐 庆 陈章良(682)
Recovery of Transgenic Orchid Plants with Hygromycin Selection by Particle Bombardment to Protocorms	Yu Zhihua Chen Minyong Nie Lin et al(689)
水稻核糖体蛋白 S4 基因的克隆及表达特性研究	瞿礼嘉 李东辉 张 毅等(697)

Cloning and Expression of a cDNA Encoding Ribosomal Protein S4 from Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Qu Lijia Li Donghui Zhang Yi et al(704)
稻瘟病病原物诱导启动子的构建及表达	吕华飞 明小天 瞿礼嘉等(712)
Construction of Chimeric Inducible Promoters by Elicitors of Rice Fungal Blast Pathogen and their Expression in Transgenic Rice	Lü Huafei Ming Xiaotian Qu Lijia et al(719)
用 ITS 序列确定小麦 B 基因组的可能供体间的关系	张文驹 瞿礼嘉 高 巍等(726)
天麻中一种抗真菌蛋白基因的克隆	王晓晨 Willson Ardiles Diaz Guy Bauw 等(734)
天麻中一种凝集素类似蛋白对植物病原真菌的抑制作用	王晓晨 徐 庆 刘 颖等(742)
Effect of Caffeic acid on the Tumor Cells U937 Evaluated by an Electrochemical Voltammetric Method	Jian Hongyan An Chengcai Feng Jun et al(747)
A Fast, Sensitive and Specific Method for Rice Dwarf Virus Detection by Northern Blot Hybridization	L. Yu Y. Li G. Gu et al(749)
The Study of Anti-tumor Activity of Trichosanthin by Cyclic Voltammogram	Xu Gang An Cheng Cai Feng Jun et al(755)

细菌中一种抗菌蛋白的分离纯化及特性分析

张 宁 潘乃璁 陈章良

(北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘 要

T3是从水稻田细菌中分离出的能拮抗多种水稻病害菌的一株芽孢杆菌(*Bacillus* spp.), 本实验系统地研究了 T3 的抗菌谱及其所产拮抗蛋白的特性。T3 的培养液上清液经 70% 硫酸铵沉淀, 粗蛋白经分子筛 Sephadex G-100 层析柱, DEAE52 离子交换层析柱以及 FPLC Superose 12 柱, 分离纯化出了一种拮抗蛋白 Tz1。此蛋白的分子量为 6.9 kD, 等电点为 7.8。将 Tz1 进行了氨基酸组成分析及部分氨基酸序列测定。

关键词 抗菌蛋白; 分离纯化; 氨基酸序列测定

水稻是我国一种主要粮食作物, 种植面积相当广泛, 但是每年受病原菌的侵害, 损失很严重^[7]。带病种子和稻草是病害的初次侵染来源, 在田间借风雨传播蔓延^[1], 至今无有效的防治措施^[10]。用常规育种技术筛选抗病品种, 一是费时太长, 二是找到独立的抗病株很困难。自 1986 年美国 Washington 大学 Beachy 实验小组把病毒外壳蛋白基因导入植物获得抗性株以来^[11], 人们就期待用植物基因工程技术将抗性基因导入植物获得抗细菌、真菌的优良植株。研究人员一方面从水稻和植物本身分离抗菌蛋白, 继而克隆此抗性基因导入植物^[8], 另一方面从微生物工程方面考虑, 筛选能拮抗植物致病菌的细菌, 再将拮抗菌的抗性基因导入植物培育抗病品种。我们从一株芽孢杆菌(*Bacillus* spp.) 分离纯化了一种抗菌蛋白。本文系统地研究了此抗菌蛋白的特性, 完成了它的氨基酸组成测定及序列测定。并根据其氨基酸序列合成探针来克隆此抗性基因。

材料和方法

(一) 菌株及培养基

供试菌株(细菌、真菌)及 T3 拮抗菌来自本实验室。

供细菌生长的培养基全部采用 KMB 培养基^[2], 真菌培养基一律采用马铃薯培养基。

(二) 抗菌活性测定

见文献[3]。

(三) 抗菌蛋白的粗提取

将 T3 接种于 KMB 培养基, 30℃ 下振荡培养(200 r/min) 48 小时后, 6000 r/min 4℃ 下离心 10 分钟弃菌取上清液, 在上清液中加入硫酸铵至 70% 饱和度^[9], 4℃ 下静置过夜。8500 r/min 4℃ 下离心 20 分钟弃上清液, 沉淀用 50 mmol/L, pH8.0 的 Tris 缓冲液悬浮, 加蒸

馏水透析 2 天除盐,冷冻干燥供抗菌活性检测及进一步的分离纯化。

(四) 温度及蛋白酶对粗提物的处理

粗提物悬浮液在不同温度下处理 30 分钟,取一定量进行抗菌活性测定。

一定浓度的粗提物悬浮液经胰蛋白酶(华美公司生产)和蛋白酶 B. P(华美公司生产)在 37℃ 下处理 90 分钟,取一定量检测抗菌活性。

(五) 抗菌蛋白的分离纯化

经步骤(三)提取的粗蛋白,离心后取上清液,上经 Tris 缓冲液(50 mmol/L, pH8.0)平衡过的 Sephadex G-100 柱(2.6 cm×60 cm, Pharmacia 公司产品),收集活性峰,冷冻干燥后再上经相同缓冲液平衡过的 DEAE52 柱(1.5 cm×20 cm, Whatman 公司产品),淋洗至基线,再用 0—0.6 mol/L 含 NaCl 的同缓冲液线性梯度洗脱,收集所有的峰,将其中之一的活性峰上经相同缓冲液平衡过的 FPLC Superose 12 柱(Pharmacia 公司产品),收集活性峰,加蒸馏水透析,冷冻干燥后,作理化性状分析。

(六) 电泳分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按文献^[5]的方法进行,分离胶浓度为 15%,标准分子量蛋白购自 Pharmacia 公司。聚丙烯酰胺凝胶等电电泳(IEF)参照文献^[4]的方法进行。凝胶含有 0.75% 的两性电解质(Pharmacia, pH3—10),浓度为 7%,10℃ 下聚焦 2 小时,以标准蛋白(Pharmacia, pH3.5—10)为参照测定样品的 P1 值。

(七) N 末端测定

参照文献^[4]中的方法进行。

(八) 氨基酸组成及部分氨基酸序列测定

样品经 5.7 mol/L 沸盐酸水解 18 小时,水解物用自动氨基酸分析仪(Beckman, 121MB)分析其全组成。部分序列分析在一台 Applied Biosystem 470A 型气相蛋白质序列仪中进行。从 N 末端依次降解的氨基酸衍生物——苯异硫氰酸氨基酸 PTH-aa 用 Applied Biosystem 120 型 PTH 分析仪分析。

结果和讨论

(一) 粗提物对温度及蛋白酶的敏感性

1. 将粗蛋白取 150 μ l(21.2 mg/ml)分别在 20℃、40℃、60℃、80℃、100℃、121℃ 处理 30 分钟,取 100 μ l 检测抗菌活性,结果见图 1。如图所示,在高温常压下蛋白的抗菌活性变化不大,而在高温高压下活性全部丧失,表明抗菌物质的抗菌活性只与其一级结构有关。

2. 粗蛋白经胰蛋白酶(100 μ g/ μ l)和蛋白酶 B. P(100 μ g/ μ l)在 37℃ 下处理 90 分钟后,活性全部丧失。说明此抗菌物质为蛋白性物质,这些特点与细菌素^[6]一致。

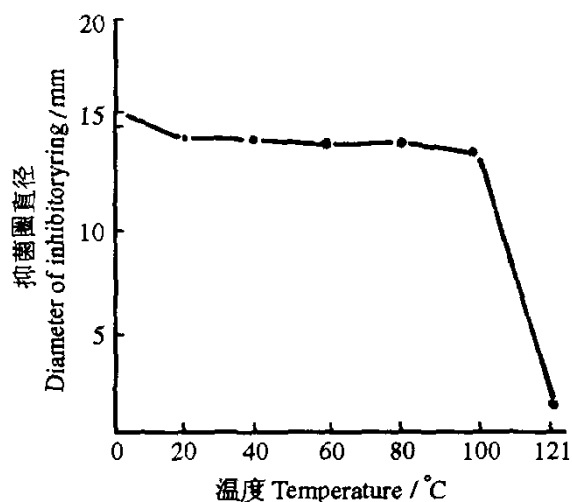


图1 温度对抗菌蛋白的影响

Fig. 1 Effect of temperature on antagonistic protein

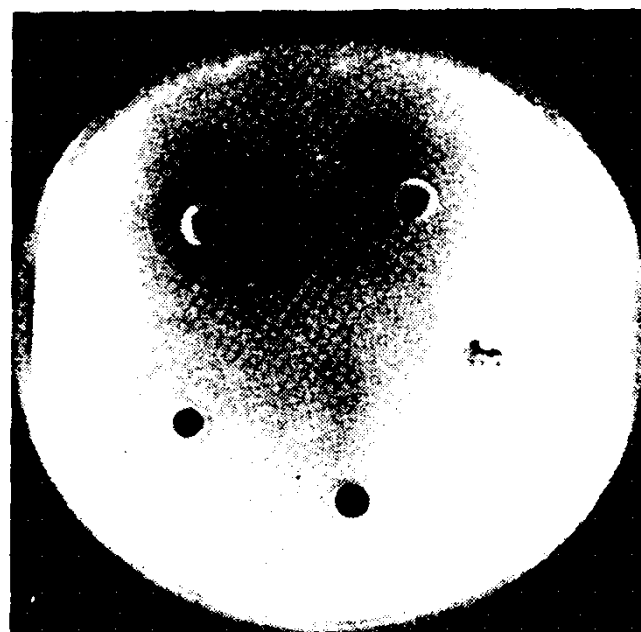


图2 抑菌蛋白 Tz1 对水稻白叶枯 G 株系的抑菌活性

Fig. 2 Inhibition activity of antagonistic protein Tz1 against the pathogen of rice leaf blight disease (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* G)

(二) T3 拮抗菌的抗菌谱

用 8 株植物病原菌对 T3 的抗菌总蛋白进行了抗菌谱的测定(表 1)。抗菌蛋白对水稻白叶枯 G 株系(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* G)、木霉(*Trichoderma reesei*)有很强的抑菌效果,抑菌直径分别达 16.2 mm 和 15.1 mm。

纯化的 Tz1 蛋白对上述的两种菌也有很强的抑菌效果,在 5 mmol/L 浓度下抑菌直径达 11.8 mm 和 12.1 mm。此蛋白对水稻白叶枯 G 的抑菌结果见图 2,图 2 中的抑菌直径为 11.2 mm。

表 1 T3 抗菌总蛋白的抑菌活性*

Table 1 Activity of antagonistic protein (T3)

病原菌 pathogens	抑菌活性 Inhibiting activity
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> G	+++
<i>Trichoderma reesei</i>	+++
<i>Rhizoctonia salani</i>	++
<i>Fusarium oxysporium</i> f. <i>niveum</i>	+
<i>Alternaria longipes</i>	+
<i>Gibberella saubinetii</i>	—
<i>Piricularia oryzae</i>	—
<i>G. zeae</i> F4	—

* 抑菌圈法测定,每孔加入 100 μ l 抗菌蛋白溶液(100 μ mol/L)。抑菌直径(mm):+, 5—10; ++, 10.1—15; +++, 15.1—20; —, 无抑菌活性

Bioassay using the inhibition zone method, 100 μ l of antagonistic protein solution (100 μ mol/L) added per hole, Inhibited zone diameter (mm) designated as: +, 5—10; ++, 10.1—15; + + +, 15.1—20; —, no activity

由结果(二)中可以看出,T3 抗菌蛋白的抑菌活性不完全是 Tz1 的作用,以后的实验证明,粗蛋白中含有与 Tz1 作用效果相似的另外几种抗菌蛋白。

(三) 抗菌蛋白 Tz1 的纯化及部分特性

按材料与方法中的步骤(五),粗蛋白经分子筛 Sephadex G-100 柱后,分为两个主峰(图 3),以水稻白叶枯 G 株系为指示菌,用抑菌圈法测抗菌活性,证明峰 II 有清晰透明的抑菌圈。

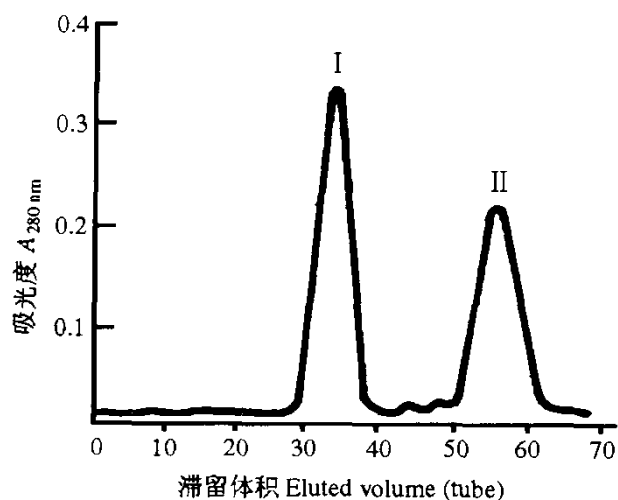


图 3 抗菌蛋白在分子筛 Sephadex G-100 上的图形

Fig. 3 Profile of antagonistic protein on Sephadex G-100 column

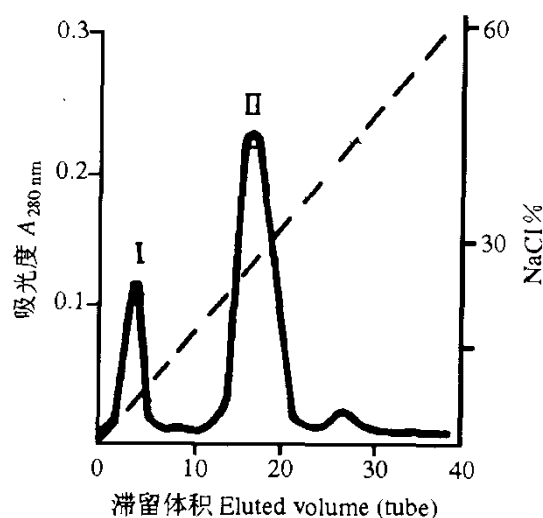


图 4 峰 II (T2) 在 DEAE52 的图形

Fig. 4 Profile of antagonistic protein T2 on DEAE column

将峰 II 冷冻干燥后,上经 Tris 缓冲液 (50 mmol/L, pH8.0) 平衡过的 DEAE52 离子交换柱,用相同缓冲液淋洗至基线,再用 0—0.6 mol/L 含 NaCl 的相同缓冲液线性梯度洗脱,结果如图 4。

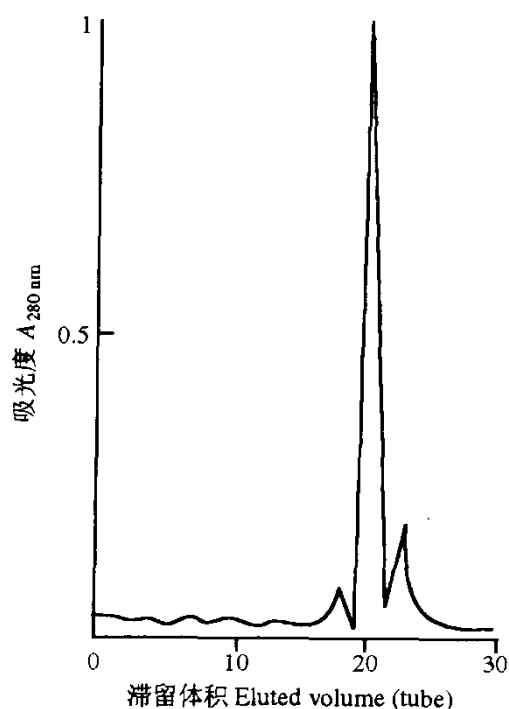


图 5 抗菌蛋白 Tz1 在 FPLC Superose 12 上的图形

Fig. 5 Profile of antagonistic protein Tz1 with superose 12 column of FPLC

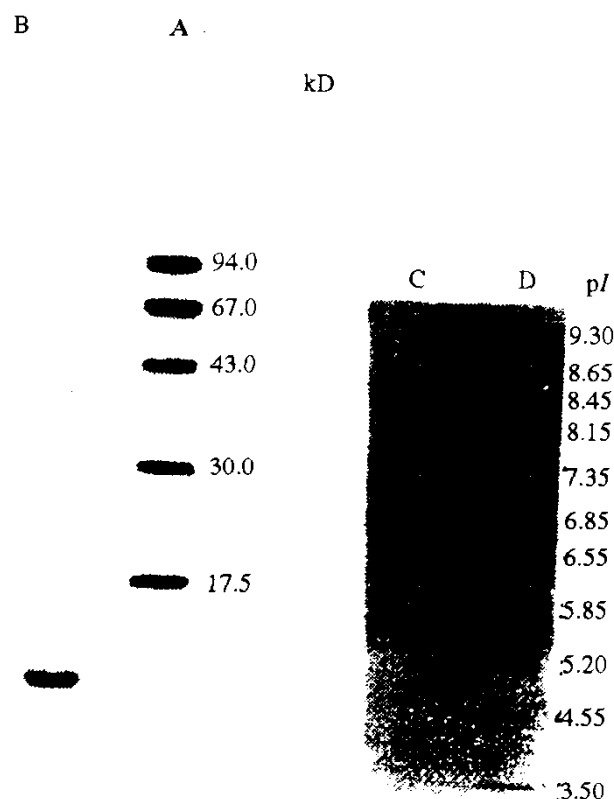


图 6 Tz1 的电泳行为

A, D. 标准蛋白 B, C. 抗菌蛋白

Fig. 6 Profile of antagonistic protein Tz1 on SDS-PAGE (left) and IEF (right)

A, D. Standard protein B, C. Antagonistic protein

将活性峰 I 脱盐浓缩后上 FPLC Superose 12 柱,得到一个活性主峰(图 5)命名为抗菌蛋白 Tz1,此抗菌蛋白在 SDS-PAGE 和 IEF 胶上均形成单一条带(图 6),其表现分子量 6.9 kD, $pI=7.8$ 。经 N 末端测定,聚丙烯酰胺薄膜在紫外光 254 nm 下观察为单一绿色亮点,经与标准氨基酸图谱对照为赖氨酸,这一点与测序结果一致。

Tz1 的氨基酸组成如表 2 所示,它富含碱性氨基酸和甘氨酸,碱性氨基酸与除去碱性氨基酸的亲水性氨基酸分别占总氨基酸量的 13.27%和 49.3%。

部分序列测定结果见图 7,在 43 个氨基酸中甘氨酸占 6 个,赖氨酸占 6 个,测定结果与氨基酸组成相符。计算机检索 EMBL 蛋白质文库,没有发现有效的同源性,表明是一种新的功能蛋白。

表 2 抗菌蛋白 Tz1 的氨基酸组成分析*
Table 2 Amino acid composition of antagonistic protein Tz1

氨基酸 Amino acid	摩尔浓度 nmol/ml	百分比 %
Asp *	151.984	11.40
Thr	54.543	4.09
Ser	103.363	7.76
Glu *	149.76	11.24
Pro	59.529	4.47
Cly	170.551	12.80
Ala	25.407	1.91
Cys	23.265	1.75
Val	85.313	6.40
Met	42.093	3.16
Ile	58.961	4.42
Leu	41.207	3.09
Tyr	154.629	11.60
Phe	27.919	2.09
Lys	121.864	9.14
His	• 4.921	0.37
Arg	54.992	4.13

* 包括相应的酰胺 Including the corresponding amide

水稻白叶枯病菌是水稻生产上的一大有害病原菌。人们花费了很大力量来防治此菌,但效果都不是很大。我们纯化的 Tz1 蛋白能有效地抑制它的生长。现在正在进行抗性基因的定,以期能准确地调出该基因导入到水稻中,获得较好的抗菌效果。

H₂N-Lys-Thr-Lys-Ile-Val-Glu-Gln-Phe-Gly-Pro-Tyr-Asn-Ser-Arg-Asn-Glu-Ile-Pro-Asn-Val-Tyr-Asp-Asp-Gly-Val-Tyr-Lys-X-Tyr-Leu-Lys-Gly-Val-Thr-Ser-X-Ser-Gly-Ile-X-Tyr-Gly-Asn

图 7 Tz1 的部分氨基酸序列

Fig. 7 Partial amino acid sequence of antagonistic protein Tz1

X: not dertermined

参 考 文 献

- [1] 方中达,1961,水稻白叶枯病. 南京:江苏人民出版社,1—12.
- [2] 中国微生物菌种保藏委员会,1983,中国菌种目录. 北京:轻工业出版社,404—422.

- [3] 刘进元,1991,拮抗菌 A014 的筛选及其分泌抗菌蛋白的条件. 植物学报, **33**: 157—161.
- [4] 张龙翔、吴国利,1989,高级生物化学实验选编. 北京:高等教育出版社, 1—6, 23—29.
- [5] 袁晓华、杨中汉,1983,植物生理生化实验. 北京:高等教育出版社, 57—65.
- [6] 谢道昕、范云六、何礼远,1989,植物青枯菌细菌素的纯化及其性质的研究. 微生物学报, **29**: 284—292.
- [7] 韩玉梅、赵荣杰,1988,野生稻对白叶枯病的抗性研究. 植物保护学报, **15**: 45—48.
- [8] Gasser, C. S. and R. Fralby, 1989: Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, **244**: 1293—1299.
- [9] Jetten, A. M., G. D. Vogels and F. D. E. Windt, 1972: Production and purification of a staphylococcus epidermidis bacteriocin, *J. Bacteriol.*, **112**: 235—242.
- [10] New, T. W., 1987, Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**: 359—382.
- [11] Powell-Abel, P., R. S. Nelsen, D. E. Barum, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley and R. N. Beachy, 1986, Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic coat protein gene. *Science*, **232**: 738—743.

Purification and Partial Characterization of an Antagonistic Protein Tz1

Zhang Ning Pan Naisui Chen Zhangliang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,
Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Abstract

A strain of *Bacillus* spp. has been screened from paddy field. It can secrete large amount of antagonistic proteins and has a strong inhibiting activity against several pathogens of rice. The authors studied the inhibiting spectrum and the characterization with antagonistic protein of T3. Total proteins were precipitated with ammonium sulfate at 70% saturation from cell-free culture. One of the proteins was purified from the crude extract with Sephadex G-100, DEAE52 and FPLC superose 12 columns. This protein (Tz1) was subjected to the 15% SDS-PAGE and only single band with 6.9 kD was observed. The protein on IEF showed single band with pI 7.8. The amino acid composition of the protein was analyzed and sequenced. Work is in progress to clone the gene encoding this protein.

Key words Antagonistic protein; Isolation and purification; Analysis of amino acid sequence

原载: 植物学报, 1993, 35(5): 342—348.

抗病毒烟草及三种类型烟草烟气气相色谱分析

王永华* 朱玉贤 孙宝俊** 潘乃璁 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 100871)

70年代GC/MS联用成功以来,人们对烟草烟气化学成分的研究日益深入,已经鉴定出烟气成分近千种,不同品种的烟草或同一品种而产地不同其烟气化学成分也略有不同,这些烟气成分中有些是原有的组份,但多数是烟草在高温下燃烧裂解氧化还原和裂解后再合成的产物。这些组分几乎包括有机化合物的所有类型例如烷烃、芳烃、醇、醛、酮、酯、酸、酚、胺、杂环等等^[1],对其中的致香成份虽然曾经有过一些研究^[2],但其说法不一,现在也还很难确定其中哪些成份起主要的致香作用,值得进一步深入研究。国内对烟气成份的研究报道较少,且主要集中在多环芳烃上,王永华等应用GC/FTIR技术对卷烟香烟烟气挥发性组分的研究也只确定了25个组分^[3]。应用转基因工程技术培育出带抗病毒基因的香料烟和烤烟后,我们还没看到过有关这种抗病毒基因烟草烟气中化学成分的研究报道。

本文通过在相同实验条件下,对转抗病毒基因香料烟“PK-873”和烤烟型烟草“90082”及它们的基本型——国际著名香料烟“巴什马”以及良种“G28”作了气相色谱测定,试图通过GC方法,对这两种抗病毒基因烟草的品质给出客观的评价,并逐步建立起一种评价烟草质量的GC标准,为了比较几种不同类型烟草间的色谱差异,还对我国特产“关东烟”进行测定,并对这几种烟草的气谱图进行了对比分析。显而易见,这项研究工作对于发展烟草工业保护烟民健康都有重要意义。

实验部分

1. 仪器 GC-9A气相色谱仪,C-R2A色谱数据处理机,均为日本岛津公司生产。

2. 色谱条件 FID检测器,高纯氮载气,SE-30弹性石英毛细柱50MX0.24mm,柱流量0.5ml/min,分流比10:1,进样量2 μ l,检测器和注入口温度250 $^{\circ}$ C,空气300ml/min,尾吹气40ml/min,柱程序升温50 $^{\circ}$ C 20min/2min—230 $^{\circ}$ C,量程范围10,记录纸速5mm/min,衰减4。

3. 样品处理 烟气样品的处理主要有低温冷凝法,溶剂吸收法和树脂吸附法。本文采用后一种方法,先称经室内恒温恒湿后的烟草3.5克装入自制的吸烟器内在缓慢抽吸下点燃烟草,烟草灰份由玻璃砂滤去,烟气高沸点组分和部分水汽经室温冷却后留在接收瓶内,挥发性组分经XAD-7吸附剂管被吸附。燃烧温度近800 $^{\circ}$ C,与正常吸烟时的温度大致相同,燃毕取下吸附管,用5mlCS₂分5次洗提,合并洗提液,加少许Na₂SO₄干燥后,转移至KD浓缩器中,于室温挥发至1.0ml。

* 北京大学城市与环境学系,通讯联系人。

** 丹东市农科所烟草室。

4. XAD-7 吸附剂的处理 取适量 XAD-7 大孔网状吸附树脂,粒度为 20—60 目,用玻璃纤维棉包好,装入索氏提取器内,先用甲醇浸泡清洗三次,再用二氯甲烷和甲醇各提取 2 天,经气相色谱检查合格。

结果与讨论

抗病毒基因香料烟“PK873”的气相色谱分析结果见图 1。在 230℃ 柱温和 76 min 以内可检测到的色谱峰大约 130 个。从样品处理开始作三次独立的分析所得色谱图一致。

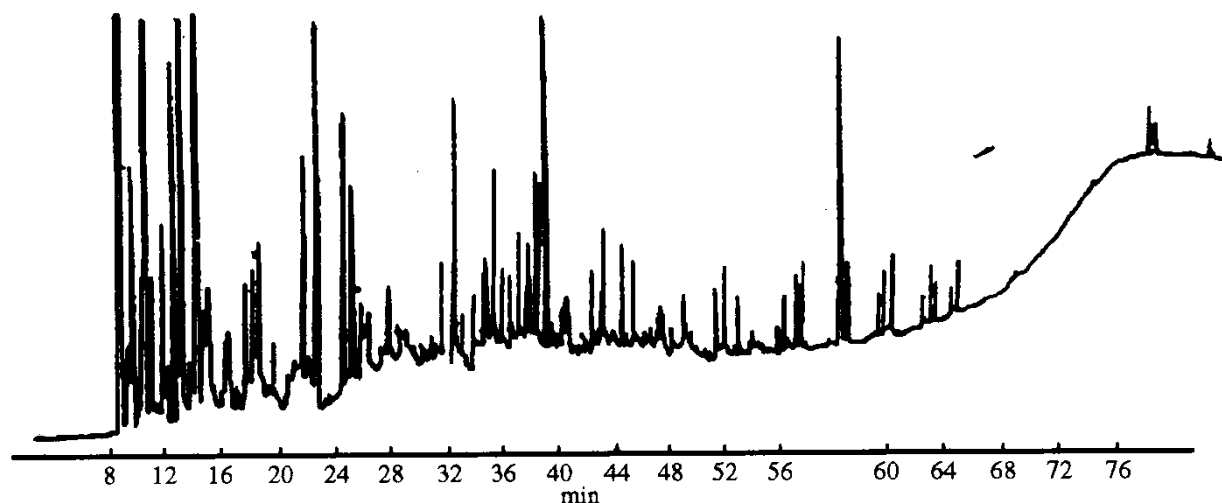


图 1 PK873 香料烟气相色谱图

在完全相同的实验条件下,对来自中东的香料烟“巴什马”进行分析,结果见图 2。

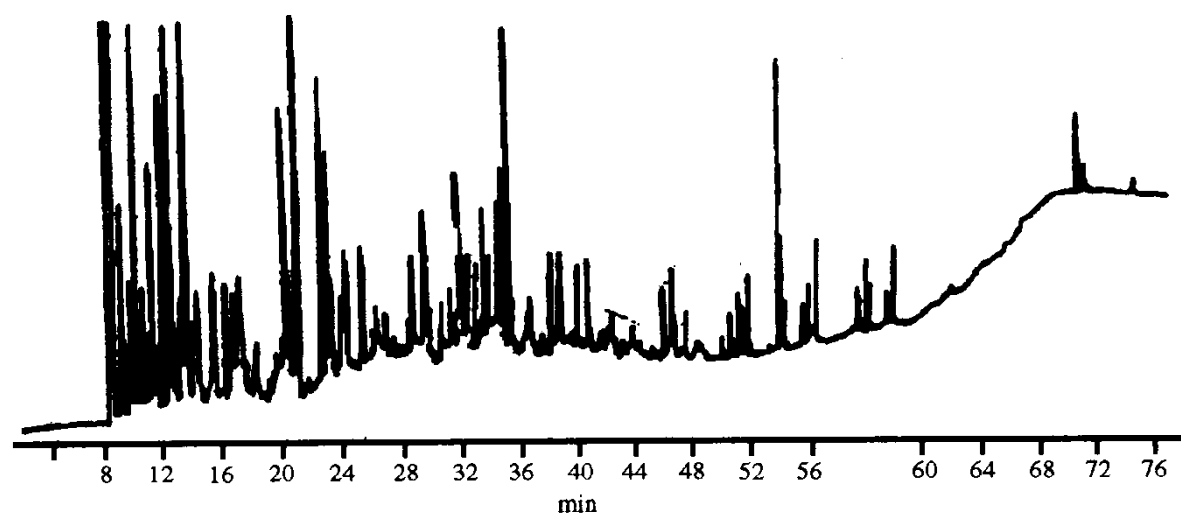


图 2 “巴什马”香料烟气相色谱图

与图 1 比较两者的色谱图相当一致,因此可以说我国自己研制的抗病毒基因工程香料烟“PK873”与世界著名香料烟的 GC 品质一致,对带抗病毒基因烤烟烟草“90082”和它的对照材料“G28”的分析结果也很近似,但与香料烟比较,烤烟的色谱图则有显著的不同。说明不同类型烟草之间的差别较大,GC 结果证明抗病毒基因转入烟草提高了烟草的抗病毒能力,对受体植株其他方面的性质没有影响,能够保持它们原有的品质。为了进一步比较不同类型的情况,又从市场直接购买了一些“关东烟草”进行分析,结果是该烟草的高沸点组分甚多,处理后的样品溶液呈黑红色。据此可以推断该烤烟烟草是在有机质含量甚高的土壤上种植的。三种不同类型烟草的气谱分析对比说明:香料烟草的烟气成分中,以低分子有机成分为主,而“关东烟”