



稻瘟病菌坏死和乙烯诱导肽1样蛋白的原核表达、纯化与活性分析

林悦龙^{1,2}, 郑燕梅^{1,2}, 王福祥^{1,2}, 王颖姮^{1,2}, 何炜^{1,2}, 蔡秋华^{1,2}, 谢华安^{1,2}, 张建福^{1,2*}

1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;

2. 农业农村部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/国家水稻改良中心福州分中心/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室/福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/水稻国家工程研究中心, 福州 350003

* 联系人, E-mail: jianfzhang@163.com

2022-08-27 收稿, 2022-10-09 修回, 2022-10-13 接受, 2022-10-14 网络版发表

国家水稻产业技术体系项目(CARS-01-20)、福建省人民政府-中国农业科学院农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021001)、福建省科技重大专项(2020NZ08016)和福建省省属公益类科研专项(2020R1023008)资助

摘要 坏死和乙烯诱导肽1(necrosis and ethylene-inducing peptide 1, Nep1)样蛋白(Nep1-like proteins, NLPs)是一类广泛存在于细菌、真菌及卵菌中的分泌型蛋白。本研究通过生物信息学分析了稻瘟病菌中的4个坏死和乙烯诱导肽1样蛋白的家族基因成员的相关信息, 克隆了它们的编码区序列, 分别将它们构建到了pGEX-6P-1载体中。通过优化诱导条件对它们进行了原核表达、纯化, 获得了相应的可溶性目的蛋白, 进一步将纯化的目的蛋白注射到烟草叶片中, 发现N端融合GST标签的MoNLP1、MoNLP4蛋白仍具有生物学活性, 可以明显诱发烟草叶片组织产生细胞坏死。该研究为进一步深入研究该基因家族在稻瘟病菌中的功能与作用以及开发更多潜在的植物蛋白激酶子奠定基础。

关键词 稻瘟病, 坏死和乙烯诱导肽1样蛋白, 原核表达, 蛋白纯化, 细胞坏死

坏死和乙烯诱导肽1(necrosis and ethylene-inducing peptide 1, Nep1)样蛋白(Nep1-like proteins, NLPs)是一类广泛存在于细菌、真菌及卵菌中的分泌型蛋白。第一个NLP成员Nep1蛋白由Bailey^[1]于1995年从尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的培养滤液中分离纯化得到, 该蛋白能诱发双子叶植物组织产生细胞坏死并产生乙烯, 但对所测试的单子叶植物都不敏感^[2]。此外, Nep1及相关NLPs还能诱导植物体产生防御相关反应, 包括病程相关基因的表达、胼胝质沉积、活性氧积累及超敏反应等^[3-6]。

许多植物的病原菌基因组中都含有数量与类型不

同的NLP成员^[7]。在数量上, 不同的病原菌差异较明显。例如, 小麦壳针孢(*Mycosphaerella graminicola*)仅含有一个编码NLP蛋白的基因^[8], 而大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)^[9]和辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)^[10]则分别含有33和39个NLP成员。研究表明, NLPs蛋白在植物与病原菌的互作中具有双重功能, 它们不仅作为一种溶细胞毒素能使植物细胞膜透化和裂解^[11], 同时也作为一类微生物相关分子模式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs)让植物体识别到非己成分而触发天然免疫反应^[12-15]。

稻瘟病菌的基因组中含有4个编码NLP成员的基

引用格式: 林悦龙, 郑燕梅, 王福祥, 等. 稻瘟病菌坏死和乙烯诱导肽1样蛋白的原核表达、纯化与活性分析. 科学通报, 2023, 68: 791–800

Lin Y L, Zheng Y M, Wang F X, et al. Prokaryotic expression, purification and activity analysis of necrosis and ethylene-inducing peptide 1 (Nep1)-like protein from *Magnaporthe oryzae* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 791–800, doi: [10.1360/TB-2022-0890](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0890)

因^[16], 分别都在侵染水稻的不同时间段出现高表达, 但敲除这些基因后却对病原菌的致病力正常生长及产孢没有显著影响^[17,18]. 为了进一步探究这些NLP成员在病原菌侵染水稻中的潜在功能以及可能作为一种潜在的免疫诱导因子来调节植物免疫反应, 本研究分别从稻瘟病菌中克隆了这4个成员, 通过构建原核表达载体成功地在大肠杆菌中诱导并纯化了这些蛋白, 进一步注射烟草后发现, GST-MoNLP1、GST-MoNLP4融合蛋白仍具有生物学活性, 可以较明显地在烟草中诱发典型的坏死反应.

1 材料与方法

1.1 供试菌株和质粒

稻瘟病菌生理小种“四川-43”由中国农业科学院作物科学研究所雷财林研究员提供, 大肠杆菌*Trans1-T1*感受态细胞和Rosetta(DE3)感受态细胞分别购自北京全式金和博迈德生物公司, 原核表达载体pGEX-6P-1由本实验室保存.

1.2 主要酶等分子试剂

Phanta超保真DNA聚合酶、同源重组酶Exnase II、Bradford蛋白定量试剂盒购自诺唯赞生物公司, 限制性内切酶购自NEB公司, LB肉汤培养基、TransZol Up Plus RNA Kit提取试剂盒、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover反转录试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、蛋白Marker、DNA分子量标准Marker、氨苄青霉素、IPTG等试剂分别购自上海生工、北京全式金生物、TOYOBO、Promega、TaKaRa、Biosharp等公司.

1.3 供试烟草植株

本实验室盆栽的营养生长期本氏烟草植株.

1.4 引物设计

根据稻瘟病菌的4个NLPs成员基因号登录到NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载到相应参考编码区序列, 选用pGEX-6P-1载体上的*EcoR*I酶切位点进行酶切, 设计编码区扩增与重组反应引物如表1, 其中*MoNLP1*、*MoNLP4*构建表达载体时不包含预测得到的信号肽序列, 而*MoNLP2*、*MoNLP3*未预测到有信号肽的存在, 则使用全长编码区进行蛋白表达. 由于

*MoNLP2*基因在稻瘟病菌株“四川-43”中存在其他序列的插入, 可能为不表达的基因, 根据基因的序列特征, 设计引物从基因组DNA中扩增*MoNLP2*基因的CDS序列, 并通过引物序列将缺失的头尾编码区序列补全, 从而得到完整的*MoNLP2*编码区序列.

1.5 MoNLPs蛋白质序列的分析

在NCBI网站下载得到4个基因的参考蛋白质序列, 并用GeneDoc2.7软件进行多序列比对; 蛋白质信号肽由SignalP-5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测得到; 分子量及等电点由ProtParam网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)获得.

1.6 MoNLPs基因编码区的扩增与载体构建

1.6.1 稻瘟病菌的活化、培养以及DNA、RNA提取

将滤纸保存的稻瘟病菌株接种到活化培养基上, 25℃倒置培养活化5 d, 再将边缘新生菌丝体转接到米糠培养基上, 25℃倒置继续培养5 d左右, 然后用载玻片刮取少量生长的菌丝并利用CTAB法和RNA提取试剂盒分别提取稻瘟病菌的基因组DNA和RNA. 提取的RNA使用反转录试剂盒进行反转录反应(约1 μg总RNA, 20 μL体系), 合成相应的cDNA.

1.6.2 PCR扩增与产物回收

以稻瘟病菌cDNA和DNA为模板, 使用相应的扩增引物及Phanta Max超保真酶分别扩增*MoNLP1*、*MoNLP3*和*MoNLP2*的编码区序列. 反应体系为: 2 × Phanta Max Buffer 10 μL, dNTP Mix 0.4 μL, 引物F 0.8 μL, 引物R 0.8 μL, Phanta Max DNA聚合酶0.4 μL, 稀释10倍的cDNA或50 ng/μL DNA 2 μL, 加灭菌超纯水补至总体积为20 μL.

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增程序为: 第1步, 95℃预变性5 min; 第2步, 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 第3步, 72℃彻底延伸5 min; 第4步, 12℃保温; PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳验证与胶回收.

1.6.3 载体酶切与同源重组反应

用限制性内切酶*EcoR*I酶切pGEX-6P-1质粒载体并回收酶切后的线性化质粒, 通过Exnase II同源重组酶将线性化质粒与相应的PCR胶回收产物进行同源重组反应, 构建得到N端融合GST蛋白的原核表达载体(图1), 反应体系与步骤详见说明书. 将重组后产物转化*Trans1-T1*感受态细胞, 涂布于Amp⁺(100 μg/mL)的LB

表 1 构建载体所用引物序列^{a)}

Table 1 The primer sequences for the construction of prokaryotic expression vectors

引物名称	正向引物F(5'→3')	反向引物R(5'→3')
<i>MoNLP1</i> -NS-osc-6P-1	CTGGGATCCCCGGAATTC CGACCCCTCGCGGCCCGG	CCGCTCGAGTCGACCCGGTCATTGGAAAACCTTGGC
<i>MoNLP2</i> -osc-6P-1	CTGGGATCCCCGGAATTC ATGCCTAAGCCT-GCATCCTGCGGTGCGTCTCCGGTGCCGG	CCGCTCGAGTCGACCCGGCTACAACCTGCCACC-GCTGCCGTCATCTTTACTGCTATCAAACCCCGGAG
<i>MoNLP3</i> -osc-6P-1	CTGGGATCCCCGGAATTC ATGACTAGCAGCGTGTCG	CCGCTCGAGTCGACCCGGTTAGCCTTGGCTCGTAGC
<i>MoNLP4</i> -NS-osc-6P-1	CTGGGATCCCCGGAATTC TCCCCGTCGAGAGCGAC	CCGCTCGAGTCGACCCGGCTATTGGGCGTTGTTGAG

a) 加粗字体和下划线标注的分别为同源重组序列与酶切位点

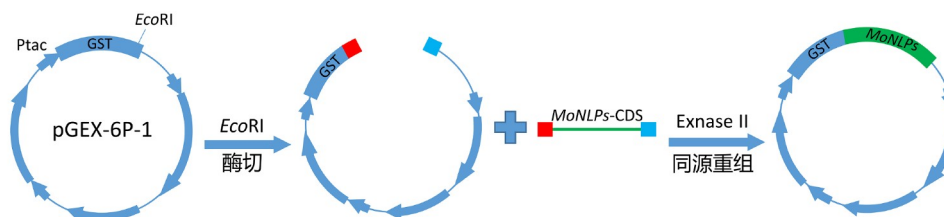


图 1 (网络版彩色)pGEX-6P-1-MoNLPs重组质粒构建示意图

Figure 1 (Color online) The schematic diagram of construction of pGEX-6P-1-MoNLPs recombinant plasmid

固体平板上37℃倒置过夜培养，挑选转化子进行摇菌与菌液PCR验证，将阳性菌落送往公司进行测序。

1.7 MoNLPs蛋白的诱导与纯化

抽提测序正确的重组质粒转化大肠杆菌Rosetta (DE3)感受态细胞，菌液PCR阳性即为原核表达的转化子，添加等体积30%甘油混匀后液氮速冻保存至-80℃。

重组蛋白在不同温度与诱导时间条件下的表达：解冻甘油菌，在超净工作台中，以2%(v/v)的接种量接种菌体于40 mL Amp^r抗性的LB液体培养基中，置于37℃摇床中220 r/min摇菌至A值0.5~0.8之间，将40 mL菌液等分成8份，每份约5 mL菌液，每两份为一组，一份添加IPTG(终浓度0.5 mmol/L)，另一份为不添加IPTG的对照组，分别在16℃诱导16 h、23℃诱导12 h、30℃诱导6 h、37℃诱导4 h，转速均为150 r/min的条件下进行蛋白诱导表达，完成后，吸取100 μL菌液，加入25 μL 5 × SDS-PAGE Loading Buffer，漩涡混匀，沸水煮10 min后进行SDS-PAGE凝胶电泳检测蛋白诱导情况。

重组蛋白的可溶性分析：将诱导后的菌液离心(8000×g, 2 min)收集菌体，弃培养液，并用等体积0.01 mol/L的PBS(pH 7.4)重悬清洗菌液2~3次，最后加入等体积的PBS溶液，置于冰上，在超声破碎仪中破碎

15~20 min(新芝超声波细胞粉碎机Scientz-IID，变幅杆φ06，功率20%，超声开3.0 s，超声关2.0 s)，吸取破碎后的菌液1 mL于EP管中，4℃，12000×g，离心5 min，吸100 μL上清于EP管中，转移并保存多余的上清液，再用1 mL的PBS重悬沉淀，取适量重悬的沉淀和上清，加入蛋白Loading Buffer后沸水煮10 min，然后进行SDS电泳检测，剩余上清可用于后续纯化或保存于-80℃。

重组蛋白的纯化：在合适的诱导条件下对相应的重组蛋白进行适当扩大培养与诱导，收集菌体、清洗、破碎、离心后，将上清吸出置于冰上备用，吸取500 μL的谷胱甘肽-琼脂糖凝胶4B均匀打在纯化柱(10 mL)底部，用5 mL PBS缓冲液清洗2~3次，先将底部出口密封，后将破碎后的上清倒入凝胶柱，密封顶部后横放埋于冰中，50 r/min，孵育2~3 h，打开底部出口，将上清滤出，并用5 mL PBS缓冲液清洗凝胶5~6遍，最后加入0.5~1 mL的还原型谷胱甘肽洗脱液，室温孵育10 min左右，收集洗脱液，可重复洗脱收集5~8次，并进行SDS-PAGE检测。

1.8 MoNLPs蛋白浓度的测定与活性检测

使用Bradford蛋白定量试剂盒对洗脱的蛋白浓度进行测定，具体步骤详见说明书，将重组蛋白及空载GST蛋白的浓度分别调整到100 nmol/L和1 μmol/L，用

不含针管的注射器吸取适量相应浓度的蛋白洗脱液注射到长势健康的烟草叶片里,以GST蛋白洗脱液、还原型谷胱甘肽洗脱液作为对照。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌MoNLPs蛋白的序列与结构分析

通过相应的基因号及相关网站获取到了稻瘟病菌的4个NLPs成员的相关基因序列信息(表2),它们的编码长度较相近,蛋白分子量均在25~30 kD之间,但4个成员的序列相似性较低(表3),其中, *MoNLP1*、*MoNLP4*成员在蛋白质序列上的相似性约44%,而*MoNLP2*、*MoNLP3*相似性约为45%,其余成员之间的序列比对相似性仅在26%~31%之间,说明它们之间具有一定的分化时间,可能在功能上存在一些分化。

大多数NLP成员具有一个典型的NPP1蛋白家族保守结构域(pfam05630)。根据蛋白序列中所含有的保守半胱氨酸个数,可以将NLP家族成员分为3种类型^[7,19],其中*MoNLP1*、*MoNLP4*属于Type I类型,含有2个保守的可以形成二硫键的半胱氨酸,而*MoNLP2*、*MoNLP3*则为Type II类型,含有4个保守半胱氨酸。此外,它们都含有相对保守的nlp24结构域和核心的“GHRHDWE”七肽基序(heptapeptide motif)(图2)。

2.2 稻瘟病菌*MoNLPs*基因的克隆与载体构建

通过PCR从稻瘟病菌株“四川-43”的cDNA或DNA中扩增获得相应的编码区序列,扩增片段大小与参考相符(图3(a)),使用Exnase II同源重组酶将胶回收目的片段连接到pGEX-6P-1载体后进行测序,在编码的氨基酸序列上,稻瘟病菌株“四川-43”中的4个成员与70-15

表2 稻瘟病NLPs基因的相关序列信息^{a)}

Table 2 The sequence information of *MoNLPs*

基因名	基因号	编码区长度 (bp)	氨基酸长度 (aa)	蛋白信号 肽位置	分子量 (kD)	GST融合蛋白 分子量(kD)	GST融合蛋白分子量 (切除信号肽)(kD)	等电点 (pI)
<i>MoNLP1</i>	MGG_08454	708	235	1~18	25.3	52.5	50.7	8.95
<i>MoNLP2</i>	MGG_00401	795	264	/	29.2	56.4	/	5.78
<i>MoNLP3</i>	MGG_02332	810	269	/	30	57.2	/	6.55
<i>MoNLP4</i>	MGG_10532	744	247	1~17	26.5	53.7	52	6.29

a) “/”表示未预测到

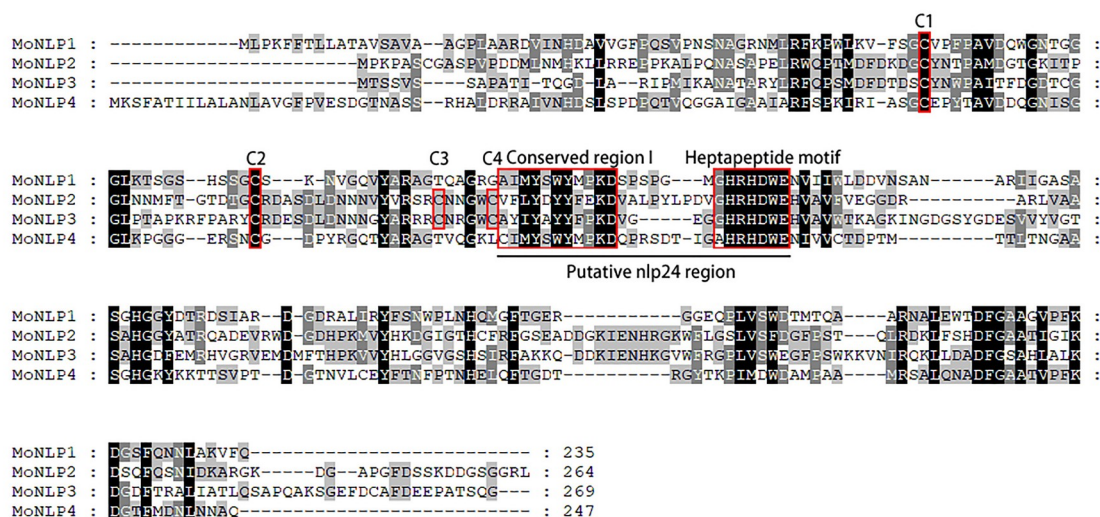


图2 (网络版彩色)稻瘟病菌NLP成员的蛋白质序列比对^[7,14,19],保守的半胱氨酸、区域I和七肽基序用矩形框标识

Figure 2 (Color online) Protein sequence alignment of *MoNLPs*^[7,14,19]. Conserved cysteine residues, conserved region I, and heptapeptide motif were shown in box

表 3 稻瘟病菌NLP基因的相似性矩阵

Table 3 Percent identity matrix of coding and amino acid sequences among *MoNLP* genes

	<i>MoNLP1</i>	<i>MoNLP2</i>	<i>MoNLP3</i>	<i>MoNLP4</i>
<i>MoNLP1</i>		51	50	62
<i>MoNLP2</i>	31		57	50
<i>MoNLP3</i>	30	45		49
<i>MoNLP4</i>	44	26	27	

菌株参考序列不存在差异, 这与Fang等人^[17]所发现的4个成员基因序列在中国多个稻瘟病菌小种中高度保守的结果相一致, 但未能在“四川-43”的cDNA中扩增得到

*MoNLP2*编码区序列, 将基因组中扩增得到的序列与参考序列比对, 发现“四川-43”菌株中的*MoNLP2*在基因区比参考序列多出了一段492 bp的插入序列(图3(b)), 推测该段序列的插入可能导致*MoNLP2*在稻瘟病菌“四川-43”中的正常表达出现异常(图3(c)).

2.3 稻瘟病MoNLPs蛋白原核表达条件的优化

通过不同的诱导条件诱导后, 电泳检测重组蛋白的表达情况. 从诱导蛋白表达的电泳图(图4)可以看出, 4个重组蛋白在不同温度下的菌液培养中可能都存在一定的泄漏表达, 以*MoNLP2*最显著, 但添加IPTG诱导剂后, 与理论大小基本一致的目的重组蛋白条带都对照显著, 且产量随着培养温度的升高而提高(图4(a)).

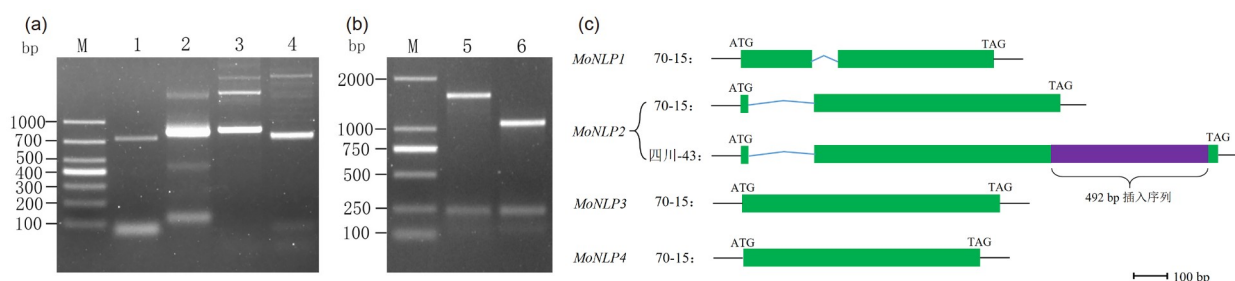


图 3 (网络版彩色)稻瘟病*MoNLPs*基因序列的扩增. (a) *MoNLPs*基因编码区的扩增; M: DL1000 DNA Marker; 1~4泳道分别为*MoNLP1*~*MoNLP4*基因在四川-43中的编码区PCR扩增产物. (b) *MoNLP2*在基因组中的扩增产物; M: DL2000 DNA Marker; 5~6泳道为*MoNLP2*在稻瘟病菌株四川-43和70-15基因组中的PCR扩增产物. (c) *MoNLPs*在稻瘟病菌株四川-43和70-15基因组中的基因结构示意图

Figure 3 (Color online) Amplification of the gene sequences of *MoNLPs*. (a) Amplification of the coding sequences of *MoNLPs*; M: DNA Marker; Lane 1–4 represent the PCR product of the coding sequences of *MoNLP1*–*MoNLP4* amplified from Sichuan-43. (b) Amplification of *MoNLP2* in the genome; M: DL2000 DNA Marker; Lane 5–6 represent the PCR product of *MoNLP2* in the genome of *M. oryzae* isolate Sichuan-43 and 70-15 using the primers for amplification of the coding regions. (c) The gene structure of *MoNLPs* in the genome of the *Magnaporthe oryzae* isolate 70-15 and Sichuan-43

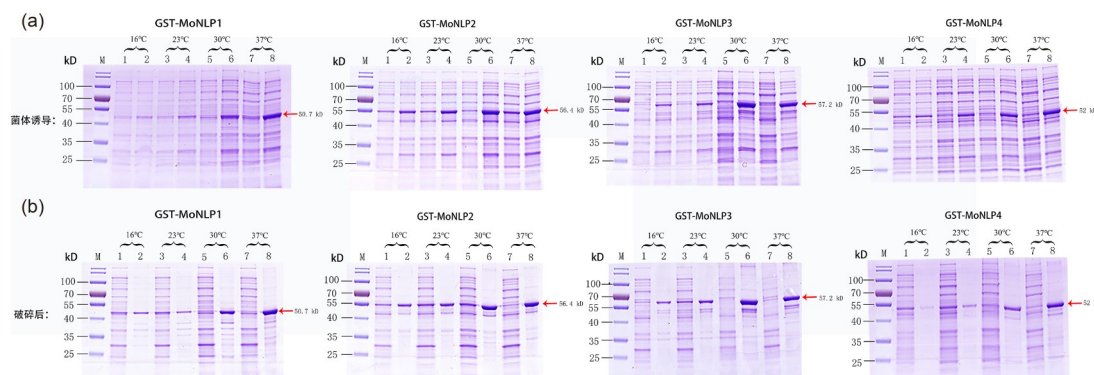


图 4 (网络版彩色)原核表达*MoNLPs*重组蛋白的诱导条件优化. (a) 菌体的总蛋白电泳. 奇数电泳道为不加IPTG的对照组; 偶数电泳道为加IPTG的诱导表达组. (b) 菌体破碎分离后的蛋白电泳. 奇数电泳道为菌体破碎后的上清蛋白; 偶数电泳道为菌体破碎后的沉淀蛋白

Figure 4 (Color online) Optimization of induction conditions for prokaryotically expressed *MoNLPs* recombinant fusion protein. (a) Total protein electrophoresis of bacteria. Odd-number of electrophoresis lanes were the control groups without IPTG addition; even-number of electrophoresis lanes were the induction group supplemented with IPTG. (b) Protein electrophoresis of bacteria after ultrasonic fragmentation and separation. Odd-number of electrophoresis lanes were the soluble proteins in the supernatant; even-number of electrophoresis lanes were the insoluble proteins in the precipitation

进一步将添加IPTG诱导的实验组进行菌体破碎分离出的上清与沉淀分别进行SDS电泳后发现,诱导培养的温度高虽然能明显增加重组蛋白的产量,但也明显降低了重组蛋白的可溶性,仅MoNLP2蛋白在30°C诱导下的上清中仍有较好的可溶性,其余3个成员都在23°C诱导12 h的条件下能在上清中得到较多的可溶性蛋白,而在最低16°C的诱导条件下,4个重组蛋白的可溶性也都较好,但产量比在23°C的条件下较低(图4(b)).

2.4 MoNLPs纯化蛋白的活性检测

在23°C诱导12 h的条件下,4个重组蛋白均能在上清中得到较多的可溶性蛋白,通过扩大诱导培养体积及GST蛋白纯化(图5(a)),采用Bradford法对洗脱得到的

重组蛋白进行浓度测量,并绘制相应标准曲线(图5(b)),再分别将重组蛋白的浓度调整为 $1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $100\ \text{nmol/L}$ 两个梯度,对长势健康的本氏烟草叶片进行无针头注射,注射后放回原培养环境继续培养,3 d后观察并拍摄结果.在 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的蛋白浓度注射下,重组的GST融合蛋白MoNLP1、MoNLP4都能较明显地诱发所注射部位细胞组织的坏死与透化,并使叶片产生局部的枯白现象(图6),而且这种效应在较嫩、较薄的烟草叶片中更加明显(图6(b)).同样,在 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的蛋白浓度下,重组的GST融合蛋白MoNLP2、MoNLP3以及GST空载蛋白注射烟草则没有观察到明显的叶片组织坏死,说明它们在实验条件下并没有诱发烟草细胞坏死的活性.不过,当融合GST的MoNLP1、MoNLP4蛋

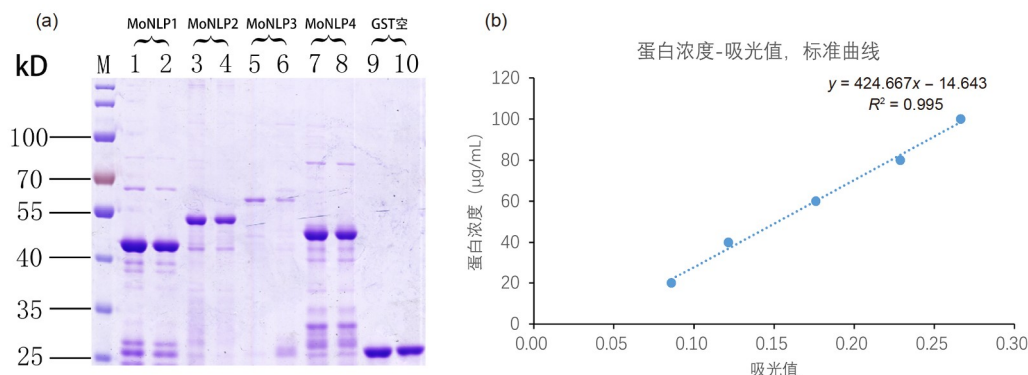


图5 (网络版彩色)重组蛋白的纯化与浓度测定. (a) 稻瘟病菌坏死和乙烯诱导肽1样蛋白家族成员GST重组蛋白纯化后的电泳检测图; (b) Bradford法蛋白浓度测定标准曲线

Figure 5 (Color online) Purification and concentration detection of recombinant protein. (a) Electrophoresis of purified recombinant GST protein of MoNLPs; (b) standard curve for the measurement of protein concentration of Bradford method

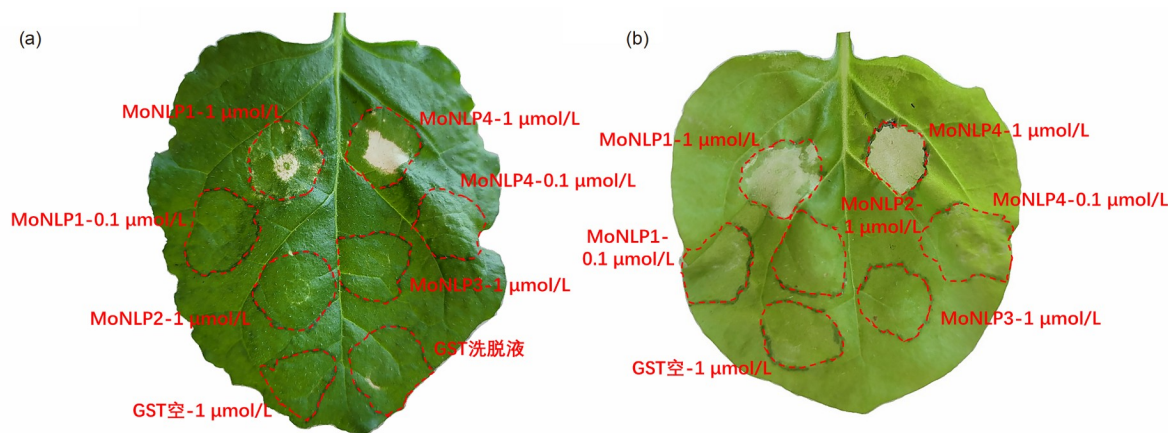


图6 (网络版彩色)纯化的稻瘟病菌坏死和乙烯诱导肽1样蛋白家族成员注射本氏烟草叶片. (a) 烟草老叶片; (b) 烟草嫩叶片

Figure 6 (Color online) Leaves from tobacco were infiltrated with the purified recombinant GST protein of MoNLPs. (a) Infiltration assay in old tobacco leaf; (b) infiltration assay in young tobacco leaf

白在浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的注射条件下,也无法明显观察到叶片组织细胞的坏死(图6),说明NLP蛋白诱发植物细胞坏死需要具有一定的蛋白浓度。

3 讨论

本研究克隆了水稻稻瘟病菌四川-43的MoNLPs基因成员,并通过载体构建、优化诱导条件对它们进行了原核表达及纯化,得到了融合GST的重组NLP蛋白,同时也进一步通过注射烟草叶片,对表达的融合蛋白进行了活性检测。在扩增测序了四川-43的4个成员序列后发现,它们编码的氨基酸序列与参考序列相一致,但MoNLP2成员的基因组序列比参考的70-15菌株多了一段序列的插入,因此可能破坏该基因的正常表达与功能。

在原核表达蛋白的诱导条件优化中发现,温度对4个融合蛋白的产量及可溶性影响较大,融合蛋白产量与诱导温度呈正相关,即温度越高,诱导表达的目的蛋白产量越高,而温度越低,目的蛋白产量较低,但目的蛋白的溶解性则与之温度呈负相关,即温度越高,目的蛋白的可溶性较差,而温度越低,则目的蛋白的可溶性越好,在30、37°C的诱导温度条件下,除了MoNLP2蛋白外,其余3个成员诱导表达的融合蛋白溶解性都较差。

通过注射烟草叶片发现,重组的GST-MoNLP1、GST-MoNLP4蛋白能对烟草叶片组织产生明显的细胞坏死现象,说明N端融合的GST标签没有使这两个NLP蛋白产生构象失活,但纯化的GST-MoNLP2没有在烟草叶片中产生明显的细胞坏死,可能是由于表达全长蛋白而未切除信号肽所导致,也可能是由于实验中的蛋白注射浓度较低所导致。而GST-MoNLP3注射烟草没有产生细胞坏死,则与先前报道相一致^[17,20]。在NLP家族蛋白的保守序列中,两个保守的半胱氨酸C1、C2和七肽基序中的H101、R102、H103、D104、E106,以及前端的K92、D93保守位点对蛋白的植物细胞毒性起着关键作用^[6,11]。此外,Cabral等人^[21]则发现,在N端第1个保守的半胱氨酸基团前的a区结构域,其头部暴露于蛋白表面的4个氨基酸的亲水性与疏水性对蛋白活性也起着重要作用,稻瘟病菌中的4个NLP成员都具有这些关键的保守性位点(图2),但MoNLP3成员a区头部的4个氨基酸“TITQ”含较多亲水性氨基酸,推测该区域的变异可能是该成员不具备裂解活性的原因之一。

Oome和Van den Ackerveken^[19]研究发现,在533个NLP成员中,有超过95%的成员携带有外泌的信号肽序

列。Wang等人^[22]将稻曲菌的UvNLP基因通过农杆菌介导的方式注射到烟草后发现,该基因编码的蛋白仅能引起较弱的组织细胞坏死,原因在于其自身外泌信号肽功能较弱所造成,说明NLP蛋白的外泌活性也与细胞坏死的程度相关联。这与本实验中低浓度的MoNLP1和MoNLP4融合蛋白无法诱发烟草叶片细胞坏死的结果相符,外泌信号肽的缺失同样也导致瓜类炭疽病菌的NLP1成员无法诱发宿主的免疫反应^[23],通过农杆菌注射烟草或MoNLP3纯化的全长蛋白都不能诱发植物细胞坏死,说明MoNLP3蛋白失去细胞裂解活性可能不是由于缺失信号肽所造成。

研究表明,并非所有病原菌的NLP成员都具有植物细胞毒作用,还有相当一部分不具备植物细胞毒性的NLP成员存在于病原微生物的基因组中^[7,9]。例如,大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中的8个NLP成员,仅有VdNLP1、VdNLP2成员具有植物细胞毒性^[24],大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)的19个NLP成员则有11个不具备裂解活性^[9],而专性活体营养生长的寄生霜霉(*Hyaloperonospora arabidopsidis*)所含有的12个NLP成员都无法对烟草和拟南芥叶片产生坏死的细胞毒作用^[21],这些在进化中保留的不具裂解植物细胞活性的基因成员可能在功能上存在一定的分化。不过,部分不具备裂解活性的成员本身仍具有触发植物体免疫活性的功能,例如,在拟南芥中组成型表达寄生霜霉的HaNLP2、HaNLP3、HaNLP4等成员能激活植物的免疫反应,并显著提高对寄生霜霉的抗性,但同时也导致了植物体的生长发育受阻,而如果使用雌二醇诱导的启动子则可以克服生长发育受阻问题,这也使得这些成员具备有作为植物免疫激活因子的潜能。值得注意的是,NLP蛋白对拟南芥的预处理能显著提高其对寄生霜霉的抗性,但寄生霜霉本身却能正常侵染拟南芥,说明病原菌自身就可能存在某些效应蛋白来抑制NLP蛋白触发的免疫反应^[14]。Mogga等人^[20]研究也发现,稻瘟病菌自身所分泌的MoHEG13蛋白能够抑制MoNLPs蛋白所诱发的细胞死亡。事实上,仅需要NLP蛋白中保守的nlp20肽段就足以激发一些植物的免疫反应^[13],但如番茄、土豆及本氏烟等植物则无法识别并响应nlp20多肽,暗示不一样的植物对NLP蛋白的识别机制也存在差异,例如,拟南芥的RLP23能通过识别nlp20来激活免疫反应^[15],而来自瓜类炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)NLP1蛋白C端的32个氨基酸肽段就能被黄瓜、冬瓜等葫芦科植物所识别并激活免疫反应^[23]。

对于广泛存在且保守的病原相关分子模式, NLP成员在病原菌中发挥的功能以及对侵染毒力的影响却值得讨论. 虽然许多研究表明, 植物病原菌中的NLPs蛋白会在其侵染过程中大量表达, 例如, 小麦壳针孢仅有的一个NLP成员会在感染后快出现病斑前的时期高表达^[8], 稻瘟病的4个成员也在侵染的各个不同时间段出现高表达^[17], 而大豆疫霉的*PsojNIP*基因^[25]、致病疫霉(*Phytophthora infestans*)的NPP1.1基因^[26]以及瓜类炭疽病菌等^[23,27]NLP成员则主要表达在活体营养转变为死体营养的阶段被诱导表达, 即使是没有裂解活性的寄生霜霉部分NLP成员, 也会在侵染的不同时期出现表达峰值^[21]. 但敲除小麦壳针孢及稻瘟病菌中的这些基因成员却对病原菌的致病力没有显著影响^[8,17]. 不过, 一些NLP成员的确影响到了病原菌的侵染毒力, 例如, 胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)的*Nip*基因缺失会降低其对马铃薯块茎的侵染力^[28]. 而在NLP基因缺失的胡萝卜软腐果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)中表达来源于卵菌的NLP_{pcc}和NLP_{pp}蛋白则能恢复其对马铃薯块茎的侵染力^[11]. 大丽轮枝菌*VdNLP1*成员的缺失不仅影响了菌体的正常生长与产孢, 同时也降低了毒力^[24]. 另外, 在球炭疽菌(*Colletotrichum coccoodes*)中过表达来自镰刀霉的*NEPI*基因则能够明显提高对苘麻草(*Abutilon theophrasti*)的致病力^[29]. Lenarčič等人^[30]发现, NLP毒蛋白的作用底物为植物细胞膜上的糖基肌醇磷酸神经酰胺(glycosylinositol phosphoceramides, GIPCs), 而单子叶植物和双子叶植物所产生的主要GIPCs种类的差异是造成其对NLP蛋白不敏感的主要原因.

主要原因.

稻瘟病菌虽然含有4个高度保守的NLP成员, 但4个成员的同时缺失突变并没有对菌株的生长及毒力产生明显的影响^[17], 因此, *MoNLPs*基因在进化中保留的功能值得被进一步探讨, 例如, 这些蛋白为什么在侵染水稻时会出现高表达? 它们是否对水稻细胞本身具有细胞毒功能? 它们是否充当着功能上冗余的效应因子? 或者它们的功能对不同品种的水稻也具有差异性等. 最新研究则表明, 一些由单子叶植物病原菌所分泌的NLP蛋白, 对它们的宿主细胞也具有细胞毒活性. 例如, 由葱鳞葡萄孢菌(*B. squamosa*)所分泌的BsNep1蛋白, 虽然其缺失突变也没有对其致病力产生影响, 但也暗示了该家族成员在广泛单子叶植物病原菌中可能的潜在作用^[31]. 此外, 稻瘟病菌自身分泌的MoNLPs蛋白如果能被水稻细胞所识别从而激活水稻植株自身的免疫系统, 那么也就可能作为一种潜在的免疫激发子来增强水稻对稻瘟病的抗性. 在拟南芥中, 由AtRLP23受体识别NLP蛋白并触发植物免疫反应, 而水稻中是否也存在相关同源受体蛋白能识别NLP家族蛋白并触发免疫反应? 它们的识别机制是否与AtRLP23一样, 仅需要NLP蛋白保守的20个氨基酸肽段? Chen等人^[32]还发现, MoNLP1还会与分泌于胞质的仅包含LRR结构域的NTCD4蛋白互作, NTCD4能够明显地促进NLP蛋白的低聚化并提高NLP蛋白的毒素效应, 后续还需要更多的研究来进一步探究和解析该家族成员在稻瘟病菌中的具体作用与功能以及它们可能作为一种免疫激发子来调节植物免疫并在生产中存在一定的应用价值^[33,34].

参考文献

- 1 Bailey B A. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, 1995, 85: 1250–1255
- 2 Bailey B A, Collins R, Anderson J D. Factors influencing the herbicidal activity of Nep1, a fungal protein that induces the hypersensitive response in *Centaurea maculosa*. *Weed Sci*, 2000, 48: 776–785
- 3 Jennings J C, Apel-Birkhold P C, Mock N M, et al. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Sci*, 2001, 161: 891–899
- 4 Keates S E, Kostman T A, Anderson J D, et al. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1610–1622
- 5 Bae H, Kim M S, Sicher R C, et al. Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1056–1067
- 6 Fellbrich G, Romanski A, Varet A, et al. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 32: 375–390
- 7 Seidl M F, Van den Ackerveken G. Activity and phylogenetics of the broadly occurring family of microbial Nep1-like proteins. *Annu Rev Phytopathol*, 2019, 57: 367–386
- 8 Motteram J, Küfner I, Deller S, et al. Molecular characterization and functional analysis of *MgNLP*, the sole NPP1 domain-containing protein, from

- the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 790–799
- 9 Dong S, Kong G, Qutob D, et al. The NLP toxin family in *Phytophthora sojae* includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25: 896–909
- 10 Chen X R, Huang S X, Zhang Y, et al. Identification and functional analysis of the NLP-encoding genes from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293: 931–943
- 11 Ottmann C, Luberacki B, Küfner I, et al. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10359–10364
- 12 Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, et al. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell*, 2006, 18: 3721–3744
- 13 Bohm H, Albert I, Oome S, et al. A conserved peptide pattern from a widespread microbial virulence factor triggers pattern-induced immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004491
- 14 Oome S, Raaymakers T M, Cabral A, et al. Nep1-like proteins from three kingdoms of life act as a microbe-associated molecular pattern in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 16955–16960
- 15 Albert I, Böhm H, Albert M, et al. An RLP23-SOBIR1-BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nat Plants*, 2015, 1: 15140
- 16 Gijzen M, Nürnberger T. Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPPI domain across taxa. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1800–1807
- 17 Fang Y L, Peng Y L, Fan J. The Nep1-like protein family of *Magnaporthe oryzae* is dispensable for the infection of rice plants. *Sci Rep*, 2017, 7: 4372
- 18 Fang Y L. The functional study of MoNLP family in *Magnaporthe oryzae* (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: China Agricultural University, 2017 [房雅丽. 稻瘟菌MoNLP基因家族的功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2017]
- 19 Oome S, Van den Ackerveken G. Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014, 27: 1081–1094
- 20 Mogga V, Delventhal R, Weidenbach D, et al. *Magnaporthe oryzae* effectors MoHEG13 and MoHEG16 interfere with host infection and MoHEG13 counteracts cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 1169–1185
- 21 Cabral A, Oome S, Sander N, et al. Nontoxic Nep1-like proteins of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: Repression of necrosis-inducing activity by a surface-exposed region. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25: 697–708
- 22 Wang Y, Qu J, Liu Y, et al. Identification and characterization of the Nep1-like protein UvNLP in rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*. PREPRINT (Version 1) available at Research Square, 2020, <https://doi.org/10.21203/rs.2.19940/v1>
- 23 Azmi N S A, Singkaravanit-Ogawa S, Ikeda K, et al. Inappropriate expression of an NLP effector in *Colletotrichum orbiculare* impairs infection on cucurbitaceae cultivars via plant recognition of the C-terminal region. *Mol Plant Microbe Interact*, 2018, 31: 101–111
- 24 Santhanam P, van Esse H P, Albert I, et al. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, 26: 278–286
- 25 Qutob D, Kamoun S, Gijzen M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J*, 2002, 32: 361–373
- 26 Kanneganti T D, Huitema E, Cakir C, et al. Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNP1.1 and INF1 elicitor. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 854–863
- 27 Irieda H, Maeda H, Akiyama K, et al. *Colletotrichum orbiculare* secretes virulence effectors to a biotrophic interface at the primary hyphal neck via exocytosis coupled with SEC22-mediated traffic. *Plant Cell*, 2014, 26: 2265–2281
- 28 Mattinen L, Tshukina M, Mäe A, et al. Identification and characterization of nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 1366–1375
- 29 Amsellem Z, Cohen B A, Gressel J. Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1035–1039
- 30 Lenarčič T, Albert I, Böhm H, et al. Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science*, 2017, 358: 1431–1434
- 31 Steentjes M B F, Valderrama A L H, Fouillen L, et al. Cytotoxic activity of Nep1-like proteins on monocots. *New Phytol*, 2022, 235: 690–700
- 32 Chen J, Bao S, Fang Y, et al. An LRR-only protein promotes NLP-triggered cell death and disease susceptibility by facilitating oligomerization of NLP in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2021, 232: 1808–1822
- 33 Sun Y J, Huang L, He Q, et al. Progress on research of protein elicitor (in Chinese). *Guangdong Chem Ind*, 2010, 37: 81–83 [孙义军, 黄乐, 何群, 等. 蛋白激发子研究进展. 广东化工, 2010, 37: 81–83]
- 34 Yang B, Wang Y C. Application progress of plant immunity inducers (in Chinese). *China Plant Protect*, 2019, 39: 24–32 [杨波, 王源超. 植物免疫诱抗剂的应用研究进展. 中国植保导刊, 2019, 39: 24–32]

Summary for “稻瘟病菌坏死和乙烯诱导肽1样蛋白的原核表达、纯化与活性分析”

Prokaryotic expression, purification and activity analysis of necrosis and ethylene-inducing peptide 1 (Nep1)-like protein from *Magnaporthe grisea*

Yuelong Lin^{1,2}, Yanmei Zheng^{1,2}, Fuxiang Wang^{1,2}, Yingheng Wang^{1,2}, Wei He^{1,2}, Qiuhua Cai^{1,2}, Huaan Xie^{1,2} & Jianfu Zhang^{1,2*}

¹ Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;

² Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture and Rural/Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding/Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding Between Fujian and Ministry of Sciences & Technology/Base of South-China, National Key Laboratory of Hybrid Rice/National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou 350003, China

* Corresponding author, E-mail: jianfzhang@163.com

Necrosis and ethylene-inducing peptide 1 (Nep1)-like proteins (NLPs) are kinds of secreted by a range of plant-associated microorganisms including bacteria, fungi, and oomycetes. The first member of NLP families is Nep1 protein isolated and purified from the culture filtrates of *Fusarium oxysporum* by Bailey in 1995. The protein induced ethylene and necrosis in leaves of a variety of dicotyledoneae but not in members of the monocotyledoneae tested. In addition, the Nep1 and some members of NLP family can also induce defense-related responses, including the expression of pathogenesis-related genes, callose deposition, accumulation of reactive oxygen species (ROS), and hypersensitive-like response in plants.

Previous studies have shown that the Nep1 and some members of NLP family play dual roles in plant-pathogen interactions. They not only act as a cytolytic toxin that causes plasma membrane permeabilization and cytolysis in plant cells but also represent a class of microbial-associated molecular patterns (MAMPs) that trigger plant innate immune response. Many plant pathogen genomes contain different numbers and types of NLP family members. Different pathogens differ significantly in the number of NLP members, for example, the genome of *Mycosphaerella graminicola* contains only a single NLP homologue, whereas the number of NLP members in the genome of *Phytophthora sojae* and *Phytophthora capsici* up to 33 and 39, respectively. Recently, the NLP toxins are reported to target the plant cell-surface GIPC sphingolipids, and the difference in predominant GIPC series produced by the Eudicot and monocot determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. However, recently, some NLP toxins produced by the pathogen of monocot were also proved to have cytotoxic activity on various monocot plant species and legitimize their presence in monocot-specific plant pathogens.

The *Magnaporthe grisea*, causal agent of rice blast disease, contains four NPP1 domain-containing gene (MoNLP) in the fully sequenced genome. Although they are all highly induced during the infection of rice, the quadruple Δ MoNLP *M. grisea* mutant strains do not compromise its virulence. Therefore, the function and significance of their presence are still largely unknown.

To further explore the potential function of these NLP members during the interactions between rice and *Magnaporthe oryzae* as well as the possibility that they may act as potential plant immunity inducers to modulate the plant immune response, the coding region sequences were cloned and ligated into the pGEX-6P-1 vector to prokaryotically express and purify these proteins by analyzing their sequence through bioinformatics methods. The results indicated that the solubility of prokaryotically expressed protein decreased obviously with the induction temperature increasing, but the expressed recombinant protein also increased. These corresponding purified and soluble proteins were then further infiltrated into the leaves of tobacco, indicated that the MoNLP1 and MoNLP4 fused with N-terminal GST tag were bioactive and induced the obvious leaf tissue necrosis of tobacco. However, the purified GST-MoNLP2 protein did not induce tissue necrosis in tobacco leaves, which may be due to expressed fusion protein with unexcised signal peptide or low protein concentration for injection. Our study laid a foundation for further investigating the function of this gene family in rice blast fungus and exploiting more potential protein elicitors for plants.

rice blast, Nep1-like proteins, prokaryotic expression, protein purification, cell necrosis

doi: [10.1360/TB-2022-0890](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0890)