



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108822210 B

(45)授权公告日 2020.04.17

(21)申请号 201810691316.8

(22)申请日 2018.06.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108822210 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(73)专利权人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 叶恭银 杨蕾 王嘉乐 金虹霞 方琦

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212

代理人 金祺

(51)Int.Cl.

C07K 14/81(2006.01)

C12N 15/15(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

A01H 6/20(2018.01)

(56)对比文件

王磊.蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组与四个毒液蛋白生理功能的分析.《万方学位论文数据库》.2013,参见全文.

Yang L等.Identification and characterization of serine protease inhibitors in a parasitic wasp, *Pteromalus puparum*.《Scientific Reports》.2017,第7卷15755,第1-13页.

严智超等.寄生蜂毒液蛋白组成、功能及进化的研究进展.《中国生物防治学报》.2017,第33卷(第1期),第1-10页.

登录号:XM_003424928.PREDICTED: *Nasonia vitripennis* turriptide Pal9.2-like (LOC100680056), mRNA.《GenBank数据库》.2016,参见序列部分.

审查员 赵楠

权利要求书1页 说明书9页

序列表1页 附图1页

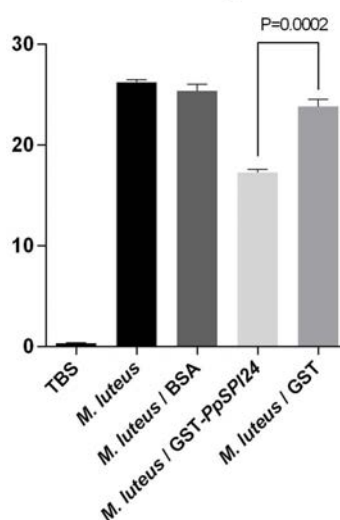
(54)发明名称

蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24蛋白及应用

(57)摘要

本发明公开了一种蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24,其具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。本发明还同时公开了编码上述蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的基因,其具有SEQ ID NO:1中第70-231位的核苷酸序列。本发明的抑制剂能用于抑制菜粉蝶或柑橘凤蝶血淋巴PPO的激活。本发明还同时公开了一种提高十字花科蔬菜对鳞翅目害虫预防力的方法,包括用具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的基因转化十字花科蔬菜细胞,再将转化后的十字花科蔬菜细胞培育成植株。

PPO-GST-PpSPI24



1. 蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24,其特征是:其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2. 编码如权利要求1所述的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的基因,其特征是:其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 如权利要求1所述的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的用途,其特征是:所述PpSPI24蛋白用于抑制菜粉蝶或柑橘凤蝶血淋巴PPO的激活。

4. 提高十字花科蔬菜对鳞翅目害虫预防力的方法,其特征在于:用携带重组质粒pBI121-PpSPI24的农杆菌转化拟南芥,所述PpSPI24的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述鳞翅目害虫为菜青虫。

蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24蛋白及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、基因工程以及蛋白工程领域。特别是一种在蝶蛹金小蜂毒液中表达的Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24及其编码的核酸序列和应用。

背景技术

[0002] 害虫一直严重威胁着全球农作物的安全生产,每年都造成全球粮食产量约1/4的减产,经济损失巨大。在我国,农业害虫也是一直制约农业增产和农产品质量提高的重要制约因素,据统计2014年全国病虫害发生面积年约55亿亩/次。每年通过防治病虫害挽回的粮食损失约占总产的15%-20%,即便如此,每年粮食损失仍可达300亿~500亿斤。

[0003] 自化学农药DDT问世以来,害虫的防治一直主要依赖化学农药,其后果是出现了害虫再猖獗、害虫产生抗药性、农药中毒、农药残留超标、污染严重等问题。人们一直探索寻找新的有效、安全、低毒的害虫防治方法,随着转基因技术的出现,又提供了一种新思路去解决害虫问题。自20世纪90年代中期以来,抗虫转基因作物培育与应用取得成功,使害虫的有效控制出现了新机。据统计,全球转基因种植面积由1996年的约170万公顷猛增到2014年的1.8亿公顷(其中抗虫的占43%),其中也产生了明显的经济与生态效应。

[0004] 但是,随着仅有单一Bt基因抗虫Bt作物的连续种植,靶标害虫对其产生抗性的问题也随之日趋备受关注,且这种担忧已在Bt棉田的美洲棉铃虫*Helicoverpa zea*上已出现迹象。为此,不少学者一方面又再去寻找发现新的Bt抗虫基因,另外还从微生物、植物和动物(主要是蝎子、蜘蛛)中挖掘具有杀虫活性的蛋白/肽基因,通过多基因或融合基因等手段,培育新型抗虫转基因植物,延缓或攻克害虫产生抗性。寄生蜂作为一类重要的害虫生物防治作用物,在传统生防中已得到充分肯定,在减少化学农药使用 and 环境污染方面有着重要作用。寄生蜂能利用自身携带的多种寄生因子(毒液(venom)、多分DNA病毒(polydnavirus,PDV)、类病毒颗粒(virus like particle,VLP)、类病毒纤丝(virus like filament,VLF)、卵巢蛋白(ovarian protein,OP)、畸形细胞(teratocyte)),以破坏寄主免疫反应、调节寄主生长发育、调控寄主血淋巴营养成分以及扰乱寄主生殖和内分泌系统等以保证其后代在寄主血腔或体表正常发育。若能将寄生蜂的寄生因子结合现代生物技术,可望用于研制新型生防制剂或转基因作物,将为害虫生物防治开辟新的途径。例如,已成功将藏红足侧沟茧蜂(*Microplitis croceipes*)畸形细胞的分泌蛋白基因转入烟草,并使烟草天蛾(*Manduca sexta*)生长明显减缓,危害程度明显低于非转基因对照,使烟草具有抗虫性。Rodriguez-Andres等将毁侧沟茧蜂(*Microplitis demolitor*)寄生因子PDV中的Egf1.0蛋白导入塞姆利基森林病毒Semliki Forest virus中,可以显著促进病毒的增值,增强其对埃及伊蚊*Aedes aegypti*的致死效果。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种对常见农业害虫具有免疫抑制作用(抑制血

淋巴黑化)的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24及其编码的基因和用途。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种蝶蛹金小蜂毒液丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24,其具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0007] 备注说明:SEQ ID NO:2包含了信号肽。

[0008] MAKSMLIVAFLLVACMMFMHVSAFTDQDGNNPCATTDDLRYVCGSDGVTYDNESELNCENKCKRSNIQVRFEGKC。

[0009] 作为本发明的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的改进:为蛋白、其保守性变异蛋白、其活性片段或其活性衍生物。

[0010] 本发明还同时提供了编码上述蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type1丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的基因,其具有SEQ ID NO:1中第70-231位的核苷酸序列;或者与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列有至少70%的同源性;或者其核苷酸序列能在40~55℃条件下与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列杂交。

[0011] 作为本发明的基因的改进:PpSPI24序列中包含8~76个连续核苷酸(即SEQ ID NO:1中第70-231位的核苷酸序列中8~76个连续核苷酸)。

[0012] 本发明还同时提供了上述蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的用途:用于制备蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白,该抑制蛋白能用于抑制菜粉蝶血淋巴PPO的激活。

[0013] 本发明还同时提供了一种提高十字花科蔬菜对鳞翅目害虫预防力的方法,包括用具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的基因转化十字花科蔬菜细胞,再将转化后的十字花科蔬菜细胞培育成植株。

[0014] 本发明所提供的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24及其编码的核酸序列,使其能够应用其氨基酸序列、编码序列及其在开发成有应用价值的抗虫作物和生物农药并应用于农业害虫防治等多个领域。

[0015] 本发明利用蝶蛹金小蜂基因组测序获得了毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的全长序列,通过基因合成获得目的基因。获得蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的氨基酸序列后,对其进行了原核表达后非变性条件下纯化,表达的PpSPI24能够抑制农业害虫菜粉蝶(*Pieris rapae*)蛹蛹酚氧化酶前体(prophenoloxidase,PPO)的激活,阻止其形成有活性的酚氧化酶(phenoloxidase,PO),具有抑制寄主体液免疫的功能。

[0016] 本发明具体是通过以下技术方案实现的:在本发明所分离出的DNA分子包括:编码具有蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24的核苷酸序列,而且所述的核苷酸序列与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列有至少70%的同源性;或者所述的核苷酸序列能在40-55℃条件下与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列杂交。较佳的,所述的序列编码具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的蛋白。更佳地,所述的序列具有SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列。

[0017] 本发明分离出的蝶蛹金小蜂毒液丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24包括:具有SEQ ID NO:2氨基酸序列的蛋白、或其保守性变异蛋白、或其活性片段,或者其活性衍生物。更佳地,该蛋白是具有SEQ ID NO:2序列的蛋白。

[0018] 本发明DNA分子包含所述的DNA分子中8-76个连续核苷酸。

[0019] 本发明DNA分子转化的宿主细胞是原核细胞。

[0020] 在本发明中，“分离的”、“纯化的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来，还指该DNA片段已经与天然状态下伴随核苷酸的组分分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

[0021] 在本发明中，蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24编码的核酸序列指：编码具有蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24活性的蛋白的核苷酸序列，如SEQ ID NO:1中第70-231位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于SEQ ID NO:1序列编码框第70-231位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子取代后产生的序列。由于密码的简并性，所以与SEQ ID NO:1中第70-231位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO:1所述的序列。

[0022] 还包括能在中度严紧条件下，更佳的在高度严紧条件下与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。还包括与SEQ ID NO:1中从核苷酸第70-231位的核苷酸序列的同源性至少70%，更佳地至少80%，更佳地至少90%，最佳地至少95%的核苷酸序列。还包括能编码具有天然的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白PpSPI24相同功能的蛋白的SEQ ID NO:1中开放阅读框序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：若干个(通常为1-90个，更佳地1-60个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)核苷酸的缺失、插入/或取代，以及在5' 和/或3' 端添加数个(通常为60个以内，更佳地为30个以内，更佳地为10个以内，最佳地为5个以内)核苷酸。

[0023] 在本发明中蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24或蛋白指：具有蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24活性的SEQ ID NO:2序列的蛋白。该术语还包括具有与天然蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24相同功能的SEQ ID NO:2序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：若干个(通常为1-50个，更佳地1-30个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入/或取代，以及在C末端和/或N端添加一个或数个(通常为20个以内，更佳地为10个以内，更佳地以5个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又别如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24的活性片段和活性衍生物。

[0024] 在本发明中蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24保守性变异蛋白指：与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相比，有至多10个，更佳地至多8个，更佳地至多5个氨基酸性质相似或相近的氨基酸所替换而形成蛋白。

[0025] 本发明还包括蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24或蛋白的类似物。这些类似物与天然Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些蛋白包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可以通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的蛋白并不限于上述列举的代表性的蛋白。

[0026] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的蛋白的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在蛋白的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的蛋白。这种修饰可以通过将蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白。

[0027] 在本发明中,可选用本领域已知的各种载体,如市售的载体,包括质粒,粘粒等。在生产本发明的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24蛋白时,可以将蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24编码序列可操作地连于表达调控序列,从而形成蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24表达载体。

[0028] 如本发明所用的“可操作地连于”指这样一种情况,即线性DNA序列的某些部分能够影响同一线性DNA序列其他部分的活性。例如,如果信号肽DNA作为前体表达并参与蛋白的分泌,那么信号肽(分泌前导序列)DNA就是可操作地连于蛋白DNA;如果启动子控制序列的转录,那么它是可操作地连于编码序列;如果核糖体结合位点被置于能够翻译的位置时,那么它是可操作地连于编码序列。一般,“可操作地连于”意味着相邻,而对于分泌前导序列则意味着在阅读框中相邻。

[0029] 在本发明中宿主细胞为原核细胞。常用的原核宿主细胞指得是大肠杆菌细胞。

[0030] 还可用Northern印迹法技术或荧光定量PCR分析蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24基因产物的表达,即分析蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24的RNA转录物在细胞中的存在与否和数量。

[0031] 此外,本发明中可用作探针的核酸分子,该分子通常具有蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24核苷酸编码序列的8-76个连续氨基酸,较佳地具有15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24的核酸分子。

[0032] 本发明涉及检测样品中是否存在蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24核苷酸序列的方法,它包括用上述的探针与样品进行杂交,然后检测探针是否发生了结合。较佳地,该样品是PCR扩增后的产物,其中PCR扩增引物对应于蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24核苷酸编码序列,并可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为15-50个核苷酸。

[0033] 此外,根据本发明的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24核苷酸序列和氨基酸序列,可以在核酸同源性或表达蛋白质的同源性基础上,筛选蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24同源基因或同源蛋白。

[0034] 本发明的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得到有关序列。

[0035] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0036] 此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。利用本发明的蝶蛹金小

蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24,通过各种常规筛选方法,可筛选出蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24发生相互作用的物质,或者受体等。

[0037] 本发明的其他方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。本发明在十字花科蔬菜重要害虫菜粉蝶血淋巴酚氧化酶激活试验中具有明显的抑制作用,对菜粉蝶的体液免疫有明显抑制效果。我国农业害虫危害非常严重,使用化学农药的负面影响很大,本发明的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24正是对农业害虫有免疫抑制作用的新蛋白,因此,具有很大的应用价值。

附图说明

[0038] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0039] 图1为本发明的PpSPI24原核表达的分离纯化图;

[0040] 注:M为标准蛋白,1道为含pGEX-4T-2-PpSPI24质粒大肠杆菌BL21未诱导全蛋白,2道为含pGEX-4T-2-PpSPI24质粒大肠杆菌BL21诱导后上清,3道为纯化后融合GST标签的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24蛋白,4道为纯化后GST标签蛋白。

[0041] 图2为本发明的原核表达的蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24基因表达物对菜粉蝶血淋巴酚氧化酶激活的抑制效果图;

[0042] 注:M.luteus/GST-PpSPI24代表加入M.luteus的0.5 μ g PpSPI24蛋白。

[0043] 阴性对照为加入M.luteus的TBS缓冲液;加入M.luteus的0.5 μ g标签蛋白GST;加入M.luteus的0.5 μ gBSA标准蛋白;阳性对照为不加M.luteus的TBS缓冲液。

具体实施方式

[0044] 下面结合实验室具体的试验数据和结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0045] 实施例1:

[0046] 1、蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24基因合成:

[0047] 根据蝶蛹金小蜂基因组数据获得的基因序列-----SEQ ID NO:1所述序列,并利用SignalP 4.1在线预测信号肽。基因序列进行单链oligo的设计及合成,利用PCR将合成的oligo拼接成完整的基因序列。连接载体PGEM-Teasy (Promega),经蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,送上海博尚公司测序检验。

[0048] 2、PpSPI24原核表达及纯化

[0049] 获得的PpSPI24全长后以全长ORF(去掉信号肽)设计构建原核表达载体的引物:

[0050] 正向引物pGEX-4T-2-PpSPI24-SP:

[0051] 5'-GATCTGGTTCCGCGTGGATCCTTTACCGACCAGGACGGCA-3',

[0052] 反向引物pGEX-4T-2-PpSPI24-AP:

[0053] 5'-ACGATGCGCCGCTCGAGTCAGCATTTGCCTTCGAACC-3'。

[0054] 以已连接到载体PGEM-T easy (Promega)的基因片段质粒为模板,利用全是金高保真Pfu酶进行PCR扩增,PpSPI24PCR扩增体系为:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 预变性30sec,51 $^{\circ}$ C 退火

30sec, 72℃延伸30sec, 35个循环后72℃延伸8min。PCR结束后经1%琼脂糖凝胶电泳验证后进行切胶回收, 备用。抽提pGEX-4T-2质粒, 用BamHI和XhoI对pGEX-4T-2质粒进行双酶切;

[0055] 酶切步骤如下:

[0056] 1) 酶切反应液:

10×Buffer 2 μL

BamH I 1 μL

[0057] Xho I 1 μL

PCR 扩增产物 6 μL

ddH₂O 10μL

[0058] 2) 离心混匀后, 37℃反应2h, 而后37℃加热20min使酶失活, 酶切产物琼脂糖凝胶电泳验证后进行切胶回收, 获得的为线性化的pGEX-4T-2载体。用ClonExpress Entry One Step Cloning Kit试剂盒进行同源重组。重组步骤如下:

[0059] 同源重组反应液:

5× CE II Buffer 4 μL

线性化克隆载体 50-200ng

[0060] PCR 扩增产物 20-200ng

Exnase II 2 μL

ddH₂O Up to 20μL

[0061] 3)、使用移液器上下吹打数次, 轻轻混匀各组分, 置于37℃反应30min。反应完成后立即将反应管置于冰浴中, 冷却5min。重组质粒随即转化入E. coli BL21大肠杆菌中, 并加入无抗性LB液体培养基中, 37℃培养箱200r培养1小时, 随后吸取100μL接种于含100μg/ml Amp⁺的LB平板过夜培养。次日挑取单菌落于含Amp⁺的LB液体培养基 (Amp⁺的浓度为100μg/ml) 培养并送测序检测表达载体成功构建与否。挑取含表达质粒的单菌落 (经过提取单菌落质粒后测序验证质粒中含有插入PpSPI24序列, 外在表现为在含Amp⁺的LB固体培养基上能够生长) 接种于5ml LB培养基 (含100μg/ml Amp⁺), 37℃震荡培养过夜, 取上述100μl菌液于新鲜的5ml LB培养基中培养至OD 0.6-0.8 (约2~3h), 加入500mM IPTG 10μl至终浓度0.5mM, 37℃诱导表达培养4~5h, 收集细胞。含GST标签的融合PpSPI24 (利用pGEX-4T-2表达载体在大肠杆菌中表达) 的纯化按照Invitrogen™GST Spin Purification Kit纯化试剂盒的说明书进行。表达及纯化的具体结果如图1所示。

[0062] 根据图1, 可得知: 含pGEX-4T-2-PpSPI24质粒大肠杆菌BL21在诱导后上清中大量表达, 纯化后条带单一, 约38kDa左右。

[0063] 3、合成及表达的PpSPI24对菜粉蝶及柑橘凤蝶PPO激活抑制作用的测定

[0064] 在冰上单头取菜粉蝶蛹血淋巴于1.5ml预冷离心管中, 立即置于冰上, 在4℃下, 3300g离心5分钟后, 取上清于一新预冷的1.5ml离心管中, 去除血细胞, 用于酚氧化酶本底的测定。

[0065] 实验加样如下:

[0066] 对PPO激活的影响：
[0067] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴)，
[0068] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴和0.5 μ g M.luteus)，
[0069] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴、0.5 μ g BSA和0.5 μ g M.luteus)，
[0070] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴、0.5 μ g GST和0.5 μ g M.luteus)，
[0071] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴、1 μ l PTU和0.5 μ g M.luteus)，
[0072] 10 μ l TBS (含2 μ l 蛹血淋巴、0.5 μ g GST融合表达的GST-PpSPI和0.5 μ g M.luteus)；
[0073] 25 $^{\circ}$ C放置20min后加入200 μ l L-Dopa (20mM, 溶于PBS)，在470nm吸光值下每分钟检测一次，一共检测30min。每个样品最少重复3次。酚氧化酶活性单位U指每分钟变化的0.001OD₄₇₀的值。数据采用DPS数据分析软件进行方差分析统计分析(唐启义和冯明光, 2007)。具体结果如图2所示。上述试验结果证明：本发明的PpSPI24蛋白对菜粉蝶及柑橘凤蝶的PPO激活有抑制作用。

[0074] 实施例2

[0075] 1、PpSPI24基因植物二元表达载体构建

[0076] 利用植物二元表达载体pBI121中GUS基因两侧花椰菜花叶病毒CaMV 35S启动子和NOS终止子，插入PpSPI24基因构成一个完整的表达框架。本试验选用BamHI和SacI作为酶切位点将GUS基因代换为PpSPI24，从而利用GUS基因两侧的表达框控制PpSPI24基因在拟南芥植物中的表达。

[0077] 根据蝶蛹金小蜂毒液丝氨酸蛋白酶抑制剂的ORF设计带有BamHI和SacI酶切位点的引物，以蝶蛹金小蜂毒腺cDNA为模板PCR扩增以构建植物表达载体。引物序列为：

[0078] PpSPI24-SP: 5'-ACGCGTCGACTTTACCGACCAGGACGGCA-3'，

[0079] PpSPI24-AP: 5'-CGCGGATCCTCAGCATTTGCCTTCGAACC-3'，

[0080] 其中，GGATCC为BamHI酶切位点，GTCGAC为SacI酶切位点。引物由上海生工生物工程公司合成。

[0081] PCR反应条件和体系等同于实施例1-2 (即，反应体系中以“PpSPI24-SP和PpSPI24-AP”分别替代正向引物和反向引物)。PCR产物回收、连接至pMD18-T载体中，转化大肠杆菌Trans T1感受态细胞，经Amp⁺抗性筛选，挑取克隆送上海博尚公司测序。提取pMD18-PpSPI24质粒，利用限制性内切酶BamHI和SacI对pMD18-PpSPI24质粒进行双酶切，切胶回收小片段。

[0082] 从过夜培养的菌液中利用小量质粒抽提试剂盒 (Axygen) 提取pBI121质粒，利用限制性内切酶BamHI和SacI对pBI121质粒进行双酶切，切胶回收大片段。将酶切后的pBI121质粒和pMD18-PpSPI24质粒利用T4DNA连接酶16 $^{\circ}$ C连接过夜，转化大肠杆菌Trans T1感受态细胞，经Kan⁺抗性筛选，挑取pBI121-PpSPI24 (测序所得的序列如SEQ ID NO:1所述) 克隆送上海博尚公司测序，验证插入片段的正确性。

[0083] 2、pBI121-PpSPI24转化农杆菌

[0084] (1) 农杆菌感受态细胞的制备

[0085] a、将EHA105菌株在含有50mg/L Rif的YEP固体培养基上划线培养，28 $^{\circ}$ C培养24~48h；

[0086] b、挑单克隆菌株于5ml含50mg/L Rif的YEP液体培养基中，28 $^{\circ}$ C振荡培养24-48h；

[0087] c、将5ml上述菌液加入到含有50mg/L Rif的100ml YEP液体培养基中,28℃振荡培养5~6h,直到 $OD_{600}=0.8$ 。

[0088] d、在4℃条件下,5000rpm离心15min,收集细胞沉淀。加入50ml冰冷的无菌水,悬浮细菌沉淀;

[0089] e、在4℃条件下,5000rpm离心15min,再用10ml冰冷的无菌水重复操作;

[0090] f、加入10ml预冷的10%无菌甘油,重悬沉淀;

[0091] g、离心,弃上清,用2ml预冷的10%无菌甘油悬浮沉淀,分装并贮存于-70℃。

[0092] (2) 农杆菌的电击转化

[0093] 取出电击杯,先用双蒸水洗两遍,再以75%乙醇洗1~2遍(加入75%乙醇后轻晃两次即可),放入超净台,口向内吹干(大约为10~20分钟),吹干后的电击杯盖上盖子放置于冰上。

[0094] 自-70℃冰箱,取一支农杆菌感受态细胞,放于冰上,等其融化为液态时,于超净台中,向感受态细胞中加入2ul pBI121-PpSPI24质粒,用手轻弹混匀并放于冰上,然后以移液器转移至电击杯的中间夹缝中。打开电击仪,以吸水纸擦干电击杯外面的水,放入电击杯,并将齿轮旋转至紧。调节电击参数(1440HV,125Ω,50uF),电击完毕后放置于冰上2~3分钟,然后轻轻地向电击杯加入800ul LB培养基,轻轻地用移液器吹几下然后转移至EP管中。

[0095] 28℃静置培养48小时,4000rpm离心5分钟,然后涂含有Kan+抗生素的平板。长出的菌落先在另一块平板上划线,再继续生长24小时后,进行PCR验证,因为农杆菌所含质粒拷贝数很低,PCR的循环数要设置为40个循环。

[0096] 3、农杆菌转化拟南芥

[0097] 拟南芥的转化采用花粉管通道法(Clough and Bent 1998)。具体过程如下:

[0098] 挑取生长LB固体培养基上含pBI121-PpSPI24的农杆菌单菌落,于4ml的LB液体培养基中培养过夜,按照1:500的比例扩大培养。待菌液的 OD_{600} 吸收值达到0.6~1.0时,4000rpm离心5分钟收集农杆菌。

[0099] 以5%的蔗糖溶液重悬农杆菌,将菌液稀释至 OD_{600} 约为0.5~0.8左右,在使用前加入0.03%的表面活性剂Silvet L-77。选取生长状态良好的拟南芥,将拟南芥的花蕾浸泡在农杆菌液体中20秒钟。以不透明的塑料布遮光保湿24小时,然后转移至光照培养箱中继续培养。在一周以后重复转化一次。

[0100] 转化后的拟南芥可以放于长日照条件下,使得其快速生长结种子,收取 T_0 代种子。

[0101] 4、转基因拟南芥的鉴定

[0102] (1) 转基因植株的卡那霉素抗性筛选

[0103] a、取收获的 T_0 代种子拟南芥种子约100mg放入到一个1.5ml离心管中;

[0104] b、用70%的酒精消毒5秒,短暂离心后弃上清;

[0105] c、用10%NaHClO₃消毒2~3分钟,短暂离心后弃上清;

[0106] d、加入灭菌的蒸馏水重悬离心弃上清,洗数次;

[0107] e、加入1 ml无菌的0.1%琼脂糖溶液悬浮种子;

[0108] f、把拟南芥种子铺在含50mg/L Kan+的1/2MS培养基上;

[0109] g、4℃低温春化2~5天;

[0110] h、移至拟南芥正常条件下培养,一周后,将出现抗Kan+的拟南芥苗,将抗性苗移栽

到土:蛙石=1:1的花盆中,放到培养室中生长,收集T₁代种子。

[0111] (2) 拟南芥的PCR鉴定

[0112] 取T₁代拟南芥幼苗嫩叶,提取植物基因组DNA,具体方法如下:

[0113] a、采集T₁代幼叶1片于1.5ml的离心管中,注入液氮,将样品研制粉末;

[0114] b、向装有样品的离心管中加入750 μ l提取缓冲液,迅速震荡混匀,将离心管置于65 $^{\circ}$ C保温8~10min;

[0115] c、加入150 μ l 5M LiAc,轻缓的混匀,冰浴15~20min;

[0116] d、在4 $^{\circ}$ C条件下13000rpm离心10min;

[0117] e、将800 μ l上清液转入一个新的离心管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C沉淀10min;

[0118] f、在4 $^{\circ}$ C条件下13000rpm离心10min;

[0119] g、用75%乙醇洗涤沉淀,晾干;

[0120] h、将沉淀溶于10 μ l TE缓冲液中;

[0121] i、将提取的DNA样品稀释5~10倍作为PCR反应模板,按实例1-1方法进行PCR反应,鉴定T₁代转基因情况。

[0122] 用携带重组质粒pBI121-PpSPI24的农杆菌花粉管法转化了70株野生型拟南芥植株,每株收获几千粒种子。通过卡那抗性基因的表达来初步筛选出已经导入外源基因的种子,洒播了约3.5万粒的种子,最后得到了72粒具有卡那抗性的种子。通过塑料袋包裹使植株自花授粉,获得T₁代种子,继续回交培养到T₃代纯合子,用于后续分析。

[0123] 5、转PpSPI24基因拟南芥植株的抗虫分析

[0124] SEQ ID取10头2龄左右的菜青虫放到15cm培养皿中,培养皿中放置浸湿的棉团保湿。每个培养皿中加入等量的莲座8片叶期转PpSPI24拟南芥和野生型拟南芥的叶片任其取食,每个处理设置3个重复,记录各个处理存活和死亡虫数及幼虫生长状况,及时更换新鲜的叶片,统计菜青虫的死亡率。饲喂5天后,取食转PpSPI24拟南芥叶片的菜青虫死亡率为22%,明显高于对照的死亡率4.2%,说明转PpSPI24拟南芥能够抑制菜青虫的存活,对菜青虫有毒杀作用。预计蝶蛹金小蜂毒液蛋白PpSPI24转入其他十字花科蔬菜如甘蓝等对菜青虫等鳞翅目害虫有防治作用。

[0125] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然,本发明不限于以上实施例子,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江大学
- [0003] <120> 蝶蛹金小蜂毒液Kazal-type丝氨酸蛋白酶抑制剂PpSPI24蛋白及应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 231
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 蝶蛹金小蜂 (*Pteromalus puparum*)
- [0010] <400> 1
- [0011] atggccaagt ctatgctcat cgttgctttc ctctcgtcg cctgcatgat gttcatgcac 60
- [0012] gtgagcgcgt ttaccgacca ggacggcaac aactgtccct gtgccaccac tgacgatctc 120
- [0013] agatatgttt gggcagcga cggcgtcacc tacgacaacg agtctgagct caactgcgag 180
- [0014] aacaagtgca aacgatccaa catccaggtt aggttcgaag gcaaatgctg a 231
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 76
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 蝶蛹金小蜂 (*Pteromalus puparum*)
- [0019] <400> 2
- [0020] Met Ala Lys Ser Met Leu Ile Val Ala Phe Leu Leu Val Ala Cys Met
- [0021] 1 5 10 15
- [0022] Met Phe Met His Val Ser Ala Phe Thr Asp Gln Asp Gly Asn Asn Cys
- [0023] 20 25 30
- [0024] Pro Cys Ala Thr Thr Asp Asp Leu Arg Tyr Val Cys Gly Ser Asp Gly
- [0025] 35 40 45
- [0026] Val Thr Tyr Asp Asn Glu Ser Glu Leu Asn Cys Glu Asn Lys Cys Lys
- [0027] 50 55 60
- [0028] Arg Ser Asn Ile Gln Val Arg Phe Glu Gly Lys Cys
- [0029] 65 70 75

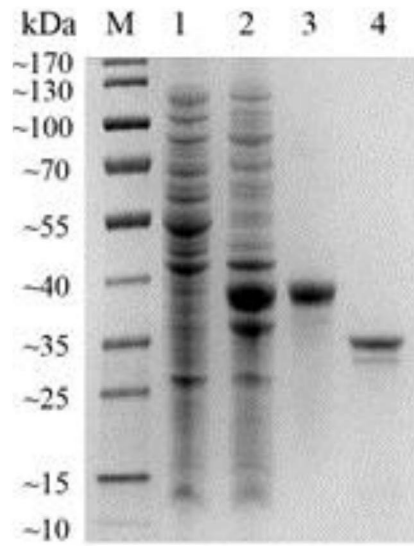


图1

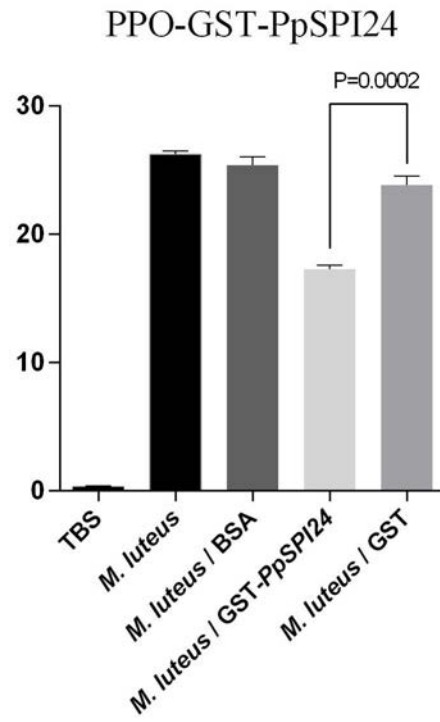


图2