

麻疯树核糖体失活蛋白 Curcin 2 的原核可溶性表达及其抗真菌活性研究*

邵子静 蒋楠 晏华立 詹诚 徐莺** 陈放

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

摘要 Curcin2 是麻疯树幼苗在真菌侵染、干旱及高低温胁迫下诱导产生的一种核糖体失活蛋白。采用分子克隆的方法,从麻疯树基因组中扩增到 Curcin2 成熟肽编码基因,分别连接到质粒载体 pGEX-6p-1、pMAL-c5E 上,转化大肠杆菌最终获得重组菌 PGC (pGEX-6p-1-curcin2) 和 PMC (pMAL-c5E-curcin2)。在不同温度、IPTG 浓度、时间诱导下, Curcin2 在重组菌 PGC 中均以包涵体形式表达,在重组菌 PMC 中主要以可溶性融合蛋白形式表达,且蛋白质的表达量与诱导条件相关。重组菌 PMC 表达可溶性 curcin2 的优化条件为:温度 28℃, IPTG 0.3mmol/L, 时间 8h, 此条件下目的蛋白占总蛋白表达量的 30.6%, 1L 培养物中可获得 19.74mg 电泳纯的重组蛋白。重组蛋白可被 MBP TrapTM HP 柱亲和纯化并与 curcin 抗体发生抗原抗体反应。体外抗真菌活性实验表明,纯化后的 curcin2 融合蛋白有抑制真菌生长作用,且对小麦赤霉、油菜菌核的抑制作用强于 curcin。此蛋白的获得为其相关功能的研究奠定了基础。

关键词 麻疯树 核糖体失活蛋白 原核表达 抗真菌活性

中图分类号 Q344

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating proteins, RIPs) 最早在蓖麻中发现^[1], 在植物界中广泛存在^[2], 具 N-糖苷酶活性, 可特异性地脱去大鼠 28S 核糖体 RNA A₄₃₂₄ 位点上的腺嘌呤从而不可逆地抑制蛋白翻译^[3,4]。根据蛋白质的结构可将 RIPs 分为 3 类: I 型 RIPs 由单条多肽链构成; II 型 RIPs, 由 A、B 两条多肽链组成, A 链具类似 I 型 RIP 的活性, B 链有凝集素功能, 可与真核细胞表面糖蛋白或者糖脂上的半乳糖基结合, 介导 A 链逆向运输进入胞液^[5,6]; 在植物中发现的 RIPs 大多属于 I 型和 II 型, 在玉米、大麦中发现了结构上与 I 型 RIPs 类似的 III 型 RIPs 被认为是无活性的前体蛋白, 需经蛋白酶加工后才可获得活性^[7,9]。前人对多个物种中 RIPs 的功能进行了研究, 如 Evandro 等^[10] 发现苦瓜中的 II 型 RIP MCL 对鼻咽癌 (NPC) 细胞具细胞毒性而对正常 NP 细胞影响较小, 且 MCL 还

具有诱导细胞凋亡、DNA 碎片化、对所有类型 NPC 癌细胞的线粒体有损伤作用; 人们对天花粉蛋白 (TCS) 的研究发现其具有多种生物及药理活性, 如 TCS 对绒毛膜癌、宫颈癌、白血病等多种癌细胞有诱导凋亡作用, 并且有广谱抗真菌、抗 HIV 等病毒活性^[11]; RIPs 表现出的抗真菌、抗肿瘤、抗病毒等作用^[12-14], 使得其在农业和医药领域应用中表现出诱人前景。

麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属的一种油料植物, 在热带及亚热带地区大量分布, 其抗病、耐旱及耐高温能力强, 较之其他油料植更具生长优势^[12, 15]。林娟等^[16-17] 从麻疯树种子中克隆获得其第一个核糖体失活蛋白基因 curcin, 序列分析表明 curcin 为 I 型 RIPs, 体外实验证明其具有抑制蛋白合成及明显抗癌活性; 魏琴等^[18-19] 根据 curcin 基因设计引物, 在麻疯树叶片中克隆到受不同条件诱导, curcin2 基因在胁迫条件下的麻疯树幼苗中诱导产生, 而 curcin 基因只在麻疯树种子中特异表达; 黄明星等^[20] 的转基因实验表明 curcin2 基因可增强

收稿日期: 2013-04-02 修回日期: 2013-04-18

* 国家“十二五”科技支撑项目 (2011DFB22B08)

** 通讯作者, 电子信箱: xuying@scu.edu.cn

烟草对烟草花叶病毒 (TMV) 的抗性。

为进一步研究 *curcin2* 的结构和功能,探讨麻疯树的耐旱、抗病、耐高温机制,并为开发麻疯树毒蛋白用作抗菌抗癌药物奠定基础,实验构建了 *curcin2* 基因的 2 种原核表达载体 pGEX-6p-1-*curcin2* 和 pMAL-c5E-*curcin2*,研究 *curcin2* 原核表达产物的存在形式并纯化了可溶性表达的 *curcin2* 融合蛋白,利用多种真菌,检测了纯化的融合蛋白抗真菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

麻疯树 (*Jatropha curcas* Linn.) 幼叶采自四川攀枝花地区,于液氮中冻存,并转入 -80℃ 冰箱中保存;真菌菌株、大肠杆菌菌株均由本实验室保存;质粒载体

pGEX-6p-1、pMAL-c5E 购自 NEB, pMD-19T、限制性内切酶、连接酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司;E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I 购自 Omega Bio-Tek (美国);PCR 引物由上海生物工程公司合成;PCR 产物纯化试剂盒购自天根公司;Pierce BCA protein Assay Kit、SuperSignal West Pico 均购自 Thermo;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (IgG-AP) 购自北京中杉金桥公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 *curcin 2* 基因片段的获得及其原核表达载体的构建 按照 CTAB 法从麻疯树幼叶中提取总 DNA 后,根据 *curcin2* 基因序列 (GenBank 登陆号:AY435214) 设计扩增成熟肽编码区的特异性引物 (表 1)

表 1 扩增 *Curcin2* 成熟肽编码区的特异性引物

Table 1 The specific-primer designed for the mature *curcin2* ORF amplification

载体名称	引物编号	引物序列
pGEX-6p-1	P1	5'-CGCGGATCC (<i>Bam</i> H I) ATG GCT GGT TCC ACT CCA A-3'
	P2	5'-GCGTGTGAC (<i>Sal</i> I) TCA AAG CCA TGG CAG CCA C-3'
pMAL-c5E	P3	5'- CGGGGTACC (<i>Kpn</i> I) GAT GGC TGG TTC CAC TCC AA-3'
	P4	5'-CGCGGATCC (<i>Bam</i> H I) TCA AAG CCA TGG CAG CCA C-3'

PCR 参数:94℃ 预变性 5min;35 个循环 (94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1min);72℃ 继续延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后所得目的片段连接至 T 载体,将重组子转化大肠杆菌 DH5α 测序 (由华大基因公司完成,下同);将 pGEX-6p-1 载体进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,pMAL-c5E 载体进行 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切,含有 *curcin2* 基因的重组 T 载体进行同样的双酶切,回收载体片段与目的片段连接,转入 BL21 感受态细胞,获重组菌 PGC 和 PMC。在 LB/Amp 培养基上挑选转化子进行双酶切检测和菌落 PCR。同时将 pGEX-6p-1、pMAL-c5E 空载也按同法转入 BL21,获得本底空白对照菌 PG、PM。

1.2.2 *Curcin2* 在两个原核表达系统中的诱导表达 分析不同温度下重组菌诱导表达时,吸取 PGC、PMC 菌液 10μl 分别接种到 10ml LB/Amp 培养基中,37℃ 震荡培养至 OD_{600} 值达 0.6~0.7 时,将各菌液分成 4 份,一份不加 IPTG,其余 3 份 IPTG 终浓度 0.5mmol/L,分别在 18℃、28℃、37℃ 诱导温度下继续震荡培养 12h 后收菌保存于 -20℃;分析不同时间下重组菌的诱导表达时,按上述方法 OD_{600} 值达 0.6~0.7 后,添加 IPTG 终浓

度 0.5mmol/L,PGC 在 18℃ 培养,分别于 12,18,24,36,48h 诱导后取出,PMC 在 28℃ 培养,分别于 2,4,6,8,10h 诱导后取出,保存于 -20℃ 中。分析不同 IPTG 浓度下重组菌的诱导表达时, OD_{600} 值达 0.6~0.7 后,使用 0.05,0.1,0.3,0.5,0.8,1.0 mmol/L 的 IPTG 梯度浓度诱导 PGC 18h,PMC 诱导 8h 后收集菌液。各组均以 pGEX-6p-1、pMAL-c5E 空载为本底表达对照。蛋白质含量通过 Gel Pro 软件进行分析。

1.2.3 原核表达产物的 Western blot 分析 将上述不同条件诱导所得菌液离心所得菌体沉淀,经重悬、超声破碎后制得的细胞上清液及沉淀上清液经 12% SDS-PAGE 后,参照 Nathalie 等^[21] 的方法,将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,以麻疯树种子中所得的 *curcin* 毒蛋白抗血清为一抗 (本实验室保存),磷酸酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) 为二抗,Thermo SuperSignal West Pico 染色试剂盒进行 Western blot 检测。

1.2.4 原核表达产物的纯化和浓度检测 根据 pMAL 融合蛋白纯化系统及 MBP Trip™ 柱说明书进行纯化。将 500ml 菌液 (28℃ 诱导 12h,IPTG 浓度 0.5mmol/L)

收菌, 100ml Column Buffer (20mmol/L Tris-HCl、200mmol/L NaCl, pH7.4) 重悬菌体, 冰浴超声破碎(超声参数: 6s 工作, 9s 间隔, 循环共计 30min)。4℃、12 000r/min 离心 15min, 取上清, 用 Column Buffer 稀释 5 倍混匀后作为样品上柱, 以含 10mmol/L 麦芽糖的 Column Buffer 洗柱并分管收集, SDS-PAGE 检测纯化效果。

蛋白浓度检测根据 Pierce BCA 蛋白分析试剂盒说明书进行。将试剂盒中 A 液和 B 液依照 50:1 的体积比混合配制成工作液, 分别取 200 μ l 工作液与 25 μ l 标准牛血清蛋白 BSA 混匀, 37℃ 水浴 30min 后, 再置于室温环境中 10min。测定 562nm 光吸收值, 并根据吸光值来绘制标准曲线。将待测蛋白液稀释至适当浓度后, 同样各取 25 μ l 与 200 μ l 工作液混匀, 参照标准品的反应条件处理后, 根据标准曲线方程式计算样品中蛋白质的浓度。

1.2.5 Curcin2 融合蛋白的抗真菌活性检测 取生长同步化的真菌菌块(直径 6mm)接种于 PDA 培养基中心位置, 于 28℃ 恒温培养箱培养至菌落直径达 3cm 后, 在距离菌圈 1cm 处放置无菌牛津杯, 单个牛津杯中加入 50ul 样品溶液, 空白对照为超纯无菌水。将平皿置于 28℃ 温箱培养, 待对照菌圈长至牛津杯外缘后观察菌丝生长情况。

按照 Wang 等^[22]的方法测定半抑制浓度, 将抗真菌蛋白与 PDA 液态培养基混合(总积约 4ml), 浓度分别为 0, 100, 200, 300 μ g/ml。混匀后倒入直径 6mm 的小平皿中, 冷却后接种同步化生长的菌块, 28℃ 恒温培养 4d 后, 测量空白对照组的菌圈直径(Dc)和抗菌样品组的菌圈直径(Dn)。抑制率 $I = (Dc - Dn) / Dc$, 据算得的抑制率和对应的样品浓度绘制曲线求的半抑制浓度 IC50。每个浓度下 3 次平行实验, 菌圈取平均值。

2 结果

2.1 Curcin2 基因片段的获得及其原核表达载体的构建

2.1.1 Curcin2 基因的 PCR 扩增 以麻疯树基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出的 Curcin2 基因大小与预期结果一致(约 950bp)(图 1a)。

2.1.2 原核表达载体的鉴定及序列分析 目的基因与 T 载体连接后送交测序, 测序后与 GenBank (GenBank 登录号: AY435214) 上的 curcin2 基因序列比对结果一致。经测序后的 pMD-19-T-Curcin2 质粒目的基因酶切产物分别与 pGEX-6p-1, pMAL-c5E 质粒酶切产物连接并转化后获得阳性克隆并提取质粒进行双酶

切检测后可见约 950bp 的目的片段, 大小与预期相符(图 1b), 表明 curcin2 基因正确插入表达载体, 获得重组子 PGC, PMC。

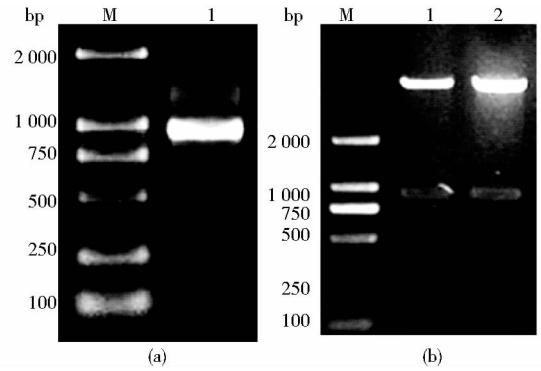


图 1 PCR 扩增目的基因(a)

重组载体的酶切鉴定(b)

Fig.1 Synthesis of Curcin2 gene by PCR (a)

Restriction of recombinant plasmid (b)

M: DL 2000 DNA Marker (a) 1: The molecular weight of the PCR fragment of curcin2 gene (b) 1 ~ 2: Restriction product of recombinant plasmid pGEX-6p-1-curcin2 and pMAL-c5E-curcin2

2.2 curcin2 在两个原核表达系统中的表达及检测

2.2.1 curcin2 在 PGC 及 PMC 中的诱导表达 Curcin2 在两个原核表达系统中诱导表达后经 SDS-PAGE, 凝胶成像如图 2~4。在不同温度诱导下, 重组菌 PGC 比无 IPTG 诱导的 PGC 和 PG 空白对照多一条约 56kDa 的条带(图 2a), 在不同诱导时间、不同 IPTG 浓度诱导下, PGC 表达的融合蛋白(图略)均为包涵体形式; 重组菌 PMC 在所设诱导条件下均比无 IPTG 诱导的 PMC 和 PM 空白对照多一条大约 70kDa 的条带, 上清中均有融合蛋白的表达(图 2b、图 3~4), 蛋白大小与预测结果吻合;

2.2.2 PMC 中重组蛋白表达条件的优化 PMC 在不同诱导条件下表达量不同。不同温度诱导下, 重组子 PMC 都表达出可溶性的 curcin2, 28℃ 条件下, 融合蛋白表达量最大为 24.8% (图 1b); 随着诱导时间的延长, 重组子表达量逐渐提高, 从 2h 到 10h 融合蛋白表达量分别为 9.6%, 11.4%, 14%, 24.5%, 24.8%, 诱导时间达到 8h 后融合蛋白表达量趋于稳定(图 3); 在 IPTG 浓度从 0.05mmol/L ~ 0.8mmol/L 时表达量为 25.8%, 25.9%, 30.6%, 25.7%, 25.5%, IPTG 浓度超过 0.3mmol/L 时融合蛋白表达量最大为 30.6% (图 4); PMC 表达可溶性 curcin2 的优化条件为: 温度 28℃,

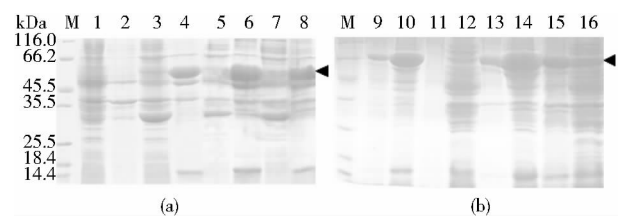


图2 目的蛋白在两个原核表达系统中不同温度下的诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of fusion protein Curcin2 induced from PGC and PMC

M:Protein molecular weight marker (a) (PGC)1~2: PGC and PG without IPTG 4~8: The supernatant and sedimentation produced under 18、28、37℃ (b) (PMC)1~2、5~8:the sedimentation and supernatant produced under 18, 28, 37℃, 3~4: PMC and PM without IPTG

IPTG 0.3mmol/L,时间 8h。

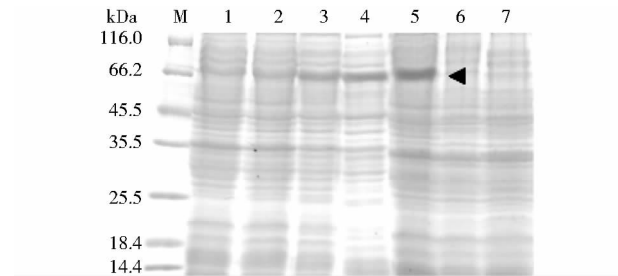


图3 PMC 在不同时间下诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE detection of PMC induced under different time

M: Protein molecular weight marker; 1~5: proteins induced from PMC after 2、4、6、8、10h; 6~7:PMC and PM without IPTG

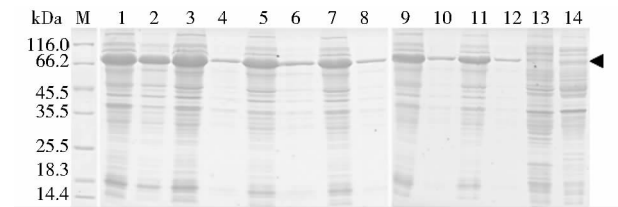


图4 PMC 在不同 IPTG 浓度诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE detection of PMC induced under different IPTG concentration

M: Protein molecular weight marker 1~12: The supernatant and sedimentation production induced from PMC under 0.05,0.1,0.3, 0.5,0.8,1.0mmol/L IPTG 13~14:PMC and PM without IPTG

2.2.3 Curcin2 融合蛋白的纯化 通过以上分析,可证实插入有 curcin2 目的片段的重组菌 PMC,在 28℃、0.3mmol/L IPTG 诱导 8h 后,具有较高的 curcin2 表达量; Western blot 显示 PGC 和 PMC 中新产生的蛋白均能与 curcin 抗体反应(图 5a)。融合蛋白经过 MBP TrapTM Hp 亲和纯化,纯化后蛋白质纯度可达电泳纯(图 5b)。BCA 法测定得融合蛋白 curcin2 的浓度为 1.645mg/ml,培养 500ml 菌液可获得 9.87mg。

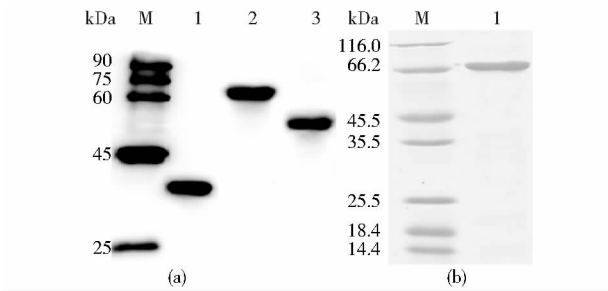


图5 目的蛋白在两个原核表达系统中诱导表达的 Western blot 分析(a)及 MBP-Curcin2 纯化后的 SDS-PAGE 分析(b)

Fig.5 Western blot analysis of fusion proteins from PGC and PMC(a), Western Blot analysis of purified recombinant MBP-Curcin2(b)

M:Protein molecular weight marker (a) 1~3:The western blot of natural curcin、fusion curcin2 induced from PMC、fusion curcin2 produced induced from PGC (b) 1 The purified recombinant MBP-Curcin2

2.3 Curcin2 融合蛋白的活性检测

以小麦赤霉[*Gibberelle zae* (Schw.) Petch.]、油菜菌核[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary]、水稻稻瘟(*Pyricularia oryzae* Cav.)、柑橘绿霉[*Penicillium digitatum* (pers. ex Fr.) Sacc.]、玉米纹枯菌(*Rhizoctonia solani* Kuha.)、总状毛菌(*Mucor racemosus*)六种真菌来检测不同浓度 curcin2 融合蛋白的抑制作用;在 curcin2 融合蛋白浓度为 25ug/ml 就对小麦赤霉、油菜菌核有抑菌效果(表 1);curcin2 融合蛋白对小麦赤霉及油菜菌核的半抑制浓度的测定见图 6,测定各平皿中的菌圈直径,根据所得抑制率(y)和浓度(x)做曲线,求得小麦赤霉病菌的回归方程为 $y = 0.0019x + 0.0012$, $R^2 = 0.9974$,由此可知 curcin2 融合蛋白对小麦赤霉的半抑制浓度为 256.8 ug/ml。同理求出重组蛋白 curcin2 对油菜菌核的抑制浓度为:204.3 ug/ml。

表 2 不同浓度的 curcin2 融合蛋白抑菌圈直径大小的比较(单位 mm)

Tab.2 Compare the size of inhibition zone in different concentration of fusion curcin2 (unit mm)

实验菌株	融合蛋白 Curcin2 浓度(μg/ml)		
	25	50	100
A 小麦赤霉	4.1	7.1	9.4
B 油菜菌核	4.5	7.6	10.2
C 水稻稻瘟	+	6.5	8.0
D 柑橘绿霉	-	-	-
E 玉米纹枯	-	+	5.2
F 总状毛霉	-	-	-

“ - ” No zone of inhibition, “ + ” There is inhibition zone but obvious

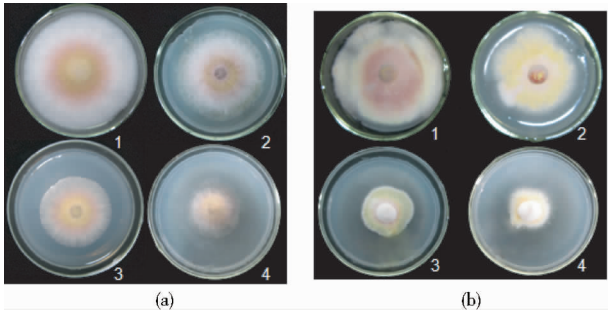


图 6 curcin2 融合蛋白对小麦赤霉(a)、油菜菌核(b)的抑制及其 IC₅₀

Fig.6 The IC₅₀ of recombinant curcin2and toward Gibberella zeae (Schw.) Petch. (a) and Sclerotinia sclerotiorum Lib de Bary (b)

1: Blank control; 2 ~ 4: the final concentrations of 100, 200, 300μg/ml, respectively, in medium

3 讨论

应用基因工程技术将目的基因导入大肠杆菌进行原核表达,是制备及研究植物逆境表达蛋白活性及应用的有效方法。本研究将 Curcin2 基因分别构建到原核表达载体 pGEX-6p-1 和 pMAL-c5E 上并在 E. coli 中都得到表达,但仅在 pMAL 系统中获得可溶性表达,其原因应该是载体所带的麦芽糖结合蛋白 (Maltose Binding Protein, MBP) 促溶标签的作用。麻疯树逆境诱导蛋白 Curcin2 基因的可溶性原核表达,为 Curcin2 功能及应用研究提供了必要条件。从纯化的 MBP-Curcin2 融合蛋白对小麦赤霉、柑橘绿霉、油菜菌核、水稻稻瘟、玉米纹枯菌、总状毛霉生长情况的抑制结果来

看, Curcin2 融合蛋白对小麦赤霉、油菜菌核、水稻稻瘟、玉米纹枯菌的生长起到了一定抑制作用,特别是对小麦赤霉、油菜菌核的抑菌作用较强,添加量在 25μg/ml 时就出现 4mm 左右直径的抑菌圈。

基于以上研究结果,我们发现 Curcin2 及麻疯树种子中胚乳型蛋白 Curcin 在原核系统中的表达情况及抑真菌作用上表现出很大差异。Curcin 的原核可溶性表达相对较为容易,本实验室已实现 Curcin 在 pQE、pET 系统中的可溶性表达^[23],而 Curcin2 在 pQE、pET 及本研究的 pGEX 原核表达系统中的表达均为包涵体形式。造成两者的这种差异的原因可能与其序列及结构差异有关。序列比较分析显示, Curcin2 与 Curcin 仅具有 92% 的 cDNA 同源性, 以及 87% 的相同氨基酸和 5% 的相似氨基酸。即在 ORF 范围内两者有 30 氨基酸不同,特别是 Curcin2 的 C 端较之 Curcin 多了一个 16 氨基酸的肽段^[18]。这些序列上的差异可能导致了两者结构及理化性质的不同,如 Curcin2 的推测等电点为 5.25,是酸性蛋白, Curcin 的等电点却为 8.54,是碱性蛋白。序列上的差异可能会导致其在原核表达过程中折叠情况的不同,进一步影响其可溶性。另外 Curcin2 融合蛋白抑真菌能力与邵彩霞等^[23]原核表达的 curcin 也存在很大差异。如 Curcin2 融合蛋白在 25ug/mL 时就是对小麦赤霉、油菜菌核有抑菌作用,而在相同浓度下 Curcin 融合蛋白对此两种真菌没有抑菌圈出现。值得一提的是 Curcin2 融合蛋白还有较大比例的 MBP 标签 (40kDa), 因此相对于 25μg/ml 的融合蛋白浓度, Curcin2 (30.1kDa) 的真实浓度大约只有 10.7μg/ml。curcin2 的这种较高水平的抑制真菌能力,一方面与其受环境胁迫诱导表达模式有关,有研究者认为 Curcin2 是麻疯树生长发育过程起到防御功能的蛋白^[20],是麻疯树在胁迫环境 (包括真菌侵染) 下诱导表达的, Curcin 是胚乳型蛋白只在麻疯树种子中特异表达^[18-19],两者在麻疯树生长发育当中扮演的角色不同, Curcin2 融合蛋白的抗真菌活性较强与其作为真菌侵染下表达的病程相关蛋白相符。另一方面,如果将来能通过点突变等方式寻找到造成这种差异的序列基础,则在植物抗病基因工程领域里有良好应用前景。

参考文献

[1] Giansanti F, Di Leandro L, Koutris I, et al. Ricin and saporin: plant enzymes for the research and the clinics. Current Chemical Biology, 2010, 4 (2) :99-107.

- [2] Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*,2004,44(4) : 371-383.
- [3] Lin J, Chen Y, Xu Y, et al. Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. 2003,45(7) :858-863.
- [4] Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *Journal of Biological Chemistry*,1988,263(18) :8735-8739.
- [5] Kaur I, Gupta R C, Puri M. Ribosome inactivating proteins from plants inhibiting viruses. *Virologica sinica*,2011,26(6) :357-365.
- [6] May K L, Yan Q, Tumer N E. Targeting ricin to the ribosome. *Toxicon*,2013,69(7) :143-151.
- [7] Seetharaman K, Waniska R D, Rooney L W. Physiological changes in sorghum antifungal proteins. *Journal of Agricultural And food Chemistry*,1996,44(8) :2435-2441.
- [8] Virgilio M D, Lombardi A, Caliandro R, et al. Ribosome-inactivating proteins: From plant defense to tumor attack. *Toxins*, 2010,2(11) :2699-2737.
- [9] Hartings H, Lazzaroni N, Marsan P A, et al. The b-32 protein from maize endosperm: characterization of genomic sequences encoding two alternative central domains. *Plant Molecular Biology*,1990,14(6) :1031-1040.
- [10] Fang E F, Zhang C Z Y, Ng T B, et al. Momordica charantia lectin, a type II ribosome inactivating protein, exhibits antitumor activity toward human nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Prevention Research*,2012,5(1) :109-121.
- [11] Sha O, Niu J, Ng T, et al. Anti-tumor action of trichosanthin, a type I ribosome-inactivating protein, employed in traditional Chinese medicine: a mini review. *Cancer chemotherapy and pharmacology*,2013:1-7.
- [12] Puri M, Kaur I, Perugini M A, et al. Ribosome inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discovery Today*,2012,30(17) :774-783.
- [13] Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. *Toxicon*,2013,24(7) :6-12.
- [14] Fracasso G, Stirpe F, Colombatti M. Ribosome-inactivating protein-containing conjugates for therapeutic use. *Toxic Plant Proteins*, Springer,2010,225-263.
- [15] Devappa R K, Makkar H P, Becker K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010,58(11) :6543-6555.
- [16] Lin J, Yan F, Tang L, et al. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacologica Sinica*,2003,24(3) :241-246.
- [17] 林娟,陈钰,徐莺,等. 麻疯树核糖体失活蛋白基因的克隆和表达(英文). *Acta Botanica Sinica*,2003,7:15.
Lin J, Chen Y, Xu Y, et al. Cloning and expression of curcin, a ribosome -inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas* L. *Acta Bot Sin*,2003,7:15.
- [18] Qin W, Ming-Xing H, Ying X, et al. Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. *Journal of biosciences*,2005,30(3) :351-357.
- [19] 魏琴,赖家业,周锦霞,等. 干旱胁迫下麻疯树毒蛋白的 Western 杂交分析. *北京林业大学学报*,2005,26(5) :26-30.
Wei Q, Lai J Y, Zhou J X, et al. Western blotting analysis of curcin from *Jatropha curcas* upon drought stress. *Journal of Beijing University* (2004) 26 (5) : 26-30.
- [20] Huang M, Hou P, Wei Q, et al. A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco. *Plant Growth Regulation*, 2008,54(2) :115-123.
- [21] Banzet N, Latorse M, Bulet P, et al. Expression of insect cysteine-rich antifungal peptides in transgenic tobacco enhances resistance to a fungal disease. *Plant Science*,2002,162(6) :995-1006.
- [22] Wang H, Ng T B. Ginkbilobin, a novel antifungal protein from ginkgo biloba seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000,279(2) :407-411.
- [23] 邵彩霞,秦小波,蔡峰,等. 麻疯树核糖体失活蛋白 curcin 基因的原核表达及其抗真菌活性的研究. *四川大学学报: 自然科学版*,2009(006).
Shao C X, Qing X B, Cai F, et al. Prokaryotic expression of a ribosome inactivating protein curcin in *Jatropha curcas* and its antifungal activity. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*,2009(006).

The Soluble Prokaryotic Expressed Ribosome-inactivating Protein Curcin2 with Anti-fungal Activity from *Jatropha curcas* L.

SHAO Zi-jing JIANG Nan YAN Hua-li ZHAN Cheng XU Ying CHEN Fang
(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences,
Sichuan University, Chengdu, 610064, China)

Abstract The open reading frame (ORF) encoding mature curcin2 protein, a ribosomal inactivating protein induced by several kinds of stress, was amplified from genomic DNA of *Jatropha curcas* by PCR method. The sequence of *curcin2* gene was synthesized in pMD-19-T. The gene was cloned in pGEX-6p-1 and pMAL-c5E prokaryotic expression vectors and expressed in *E. coli* BL21 strain. Curcin 2 protein could be expressed under different IPTG concentration, temperature and induction time but the soluble recombinant curcin2 could only be obtained in the PMAL expression system. The MBP-curcin2 fusion protein was purified through MBP TrapTM HP column and could be recognized by curcin antibody. Its antibacterial activity was tested *in vitro* and a better inhibition effections were found towards *Gibberelle zeae* (Schw.) Petch and *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary compared with those of curcin. These results may provide valuable clues and foundation to study the functions of curcin2.

Key words *Jatropha curcas* L. Ribosome-inactivating protein Prokaryotic expression Antifungal activity

广 告 索 引

赛多利斯科学仪器(北京)有限公司(封面),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(封二),英潍捷基(上海)贸易有限公司(彩1),默克化工技术(上海)有限公司(彩2),上海森松制药设备工程有限公司(彩3),江苏省科海生物工程设备有限公司(彩4),宝生物工程(大连)有限公司(彩5),镇江东方生物工程设备技术有限责任公司(彩6-7),第三届中国疫苗聚焦大会(彩8),仪器信息网(彩9),利穗科技(苏州)有限公司(彩10),上海派森诺生物科技有限公司(彩11),ATS工业系统有限公司(目次对页),沃特世科技(上海)有限公司(中插1),上海国强生化装备工程有限公司(中插2-3),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(中插4-5),艾本德(上海)国际贸易有限公司(中插6),安琪酵母股份有限公司(封三),纽英伦生物技术(北京)有限公司(封底)