

文章编号: 1674-7054(2012)02-0147-08

Harpin 类蛋白纳米粒的制备及促生作用

李琳, 万三连, 刘文波, 张宇, 缪卫国, 郑服丛

(海南大学 环境与植物保护学院, 海南 海口 570228)

摘要: Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xcm} 分别来自水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Xoo) 和棉花角斑病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* Xcm), 都具有 Harpin 的特性。笔者将 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xcm} 蛋白制成纳米粒剂型进行诱导烟草过敏反应等研究, 结果表明, 这 2 种蛋白与其蛋白纳米粒都能在烟草叶片上激发过敏反应和氧爆发现象, 对烟草种子萌发具有促进作用, 尤其 Harpin_{Xcm} 蛋白纳米粒能更好地激发烟草产生氧爆发, 促生效果达 104.5%。Harpin_{Xoo} 与 Harpin_{Xcm} 蛋白纳米粒在释放的初始阶段即出现突释, 至 48 h 时分别达到 83.9% 和 84.5%, 起到持续性的促生效果。

关键词: Harpin_{Xoo}; Harpin_{Xcm}; 纳米粒; 过敏反应; 氧爆发

中图分类号: Q 945.8

文献标志码: A

Harpin 是由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因编码, 能引起非寄主植物产生过敏反应, 能诱导植物产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等一系列防卫反应, 外源施用可激发植物对多种病虫害产生抗性, 同时还有促进植物生长、提高农作物品质等作用^[1]。Harpin_{Xoo} 是由水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌株 JXO III *hrp* 基因簇中 *hpa1* 基因编码产生的蛋白, 分子质量为 15 600, 具有富含甘氨酸、缺少半胱氨酸、对热稳定等 Harpin 共同的特征^[2]。Harpin_{Xcm} 是缪卫国等^[3]从棉花角斑病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* nov. comb. nov. nom. nov.) 中克隆出的 *hpa_{Xcm}* 基因编码的蛋白, 相对分子质量为 13 300, 具有 Harpin 的共同特征, 但是它对植物的作用机理等其他一些理化及生物学效应还有待研究。Harpin 的应用主要表现在转基因植物对病虫害的抗性方面^[4-5], Harpin 本身并不具有任何杀菌活性, 但可以诱导植物产生一系列抗性反应, 在生物农药开发应用方面具有良好的前景^[6-7]。目前, 已经成型的 Harpin 生物制剂产品有美国 Eden 公司生产的 Messenger, 南京农业大学分子植病实验室研制的 *w* = 1% 的 Harpin_{Xoo} 可溶性微颗粒制剂 (伊特利)。但是, 其蛋白在体外容易发生变性或被降解, 很难直接应用, 因此, 需要一种良好的载体来对其进行有效保护并能缓慢将其释放, 从而达到更好的生物作用效果。

纳米尺寸的物质具有显著的表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应, 在能源及医药等行业已有广泛应用^[8]。壳聚糖 (Chitosan, CS) 是自然界中唯一带正电荷且大量存在的天然多糖^[9,10], 具有良好的生物相容性、组织黏附性及可生物降解性, 被用作化学药物、蛋白多肽、抗体及基因类药物的载体^[8]。目前, 医药和农药方面的纳米粒制剂, 多以壳聚糖为载体, 包封率高, 突释效应显著。湛江等^[11]将来自水稻条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xooc) 的 harpin_{Xooc} 制成纳米粒, 显示纳米粒能使 harpin 缓释, 虽然 *Xanthomonas* harpin 具有 harpin 的共有特性, 但不同 harpin 还具有其特殊性^[12]。因此, 本实验采用可降解并与生物有良好兼容性的壳聚糖为载体, 将 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xcm} 制备成纳米粒^[11], 以

收稿日期: 2012-05-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31160359); 国家重大基础研究计划 (2011CB111612); 国家农业产业技术体系建设 (CARS-34-GW8); 教育部博士点基金 (20104601110004); 海南大学科研启动资金 (kyqd1006)

作者简介: 李琳 (1986-), 女, 黑龙江绥化人, 海南大学环境与植物保护学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 缪卫国 (1969-), 男, 博士, 教授, 从事分子植物病理学研究。E-mail: weiguomiao1105@yahoo.com.cn; 郑服丛 (1956-), 男, 教授, 从事植物病理学研究。E-mail: zhengfucong@163.com

期为抗病激活蛋白 Harpin 的实际应用提供更多的科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株及载体 植物材料: 三生烟 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养至 5~7 叶, 种子由南京农业大学植物保护学院农业部病虫害监测与治理重点开放实验室提供。

菌株: 大肠杆菌 DH5 α 本实验室保存。

E. coli 菌株 BL21 (DE3) 作为重组融合蛋白 GST-hpa $_{\text{Xm}}$ 和 GST-hpa1 $_{\text{Xoo}}$ 表达的宿主菌株, 氨苄青霉素 (齐鲁制药有限公司, 济南; Amp, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 抗性。

载体: pBI121, pGEM-hpa1 $_{\text{Xoo}}$ 和 pGEM-hpa $_{\text{Xm}}$ 均为本实验室保存。

1.2 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白粗提液的制备及浓度测定

1.2.1 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白粗提液的制备 参考李明等^[4]的方法, 挑取 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 或者 harpin $_{\text{Xm}}$ 表达菌株 BL21 (DE3) / GST-hpa $_{\text{Xm}}$ 和 BL21 (DE3) / GST-hpa1 $_{\text{Xoo}}$ 单菌落接种于含有 $\rho = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基^[5]中, 37°C $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡过夜培养。按 1% 的比例转接于含有 $\rho = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养基中, 37°C $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养约 1.5 h 至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时, 加入终浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside) 28°C $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡诱导培养 3~5 h。 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4°C 离心 10 min, 收集菌体, 将菌体重悬于 1/10 体积的冰冷磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer solution, PBS) 中。超声波破碎细胞直至溶液半透明, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4°C 离心 5 min, 除去菌残体和杂蛋白, 上清液即为 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 或 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白粗提液。

1.2.2 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白粗提液浓度测定 选用 Easy Protein Quantitative 试剂盒 (北京全世金公司, 北京), 采用 Bradford 法, 其原理是: 在酸性条件下, 考马斯亮蓝 G-250 和蛋白质结合产生特殊的蓝色, 最大吸收波长在 595 nm 处, 颜色反应可在 5~10 min 内完成, 通过比色分析在几分钟内快速测定蛋白质含量。

1.3 纳米粒的制备

1.3.1 空白纳米粒的制备 参照 Janes, Tang 以及 Gan 等^[13-15]的方法, 将一定量的 CS 溶于 $\varphi = 1\%$ 的醋酸溶液中, 磁力搅拌 2 h 后经滤纸过滤, 制得质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的壳聚糖溶液。在每 8 mL 壳聚糖溶液中加入 1 mL 去离子水, 搅拌后用 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调 pH 至 5.8, 再将质量浓度为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多聚磷酸钠 (Tripolyphosphate, TPP) 溶液 1 mL 缓慢加入到制得的壳聚糖溶液中, 并调 pH 至 6.3, 在室温下匀速振荡 1 h 使其结合, 制得空白壳聚糖纳米粒, 作为对照。

1.3.2 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 纳米粒的制备 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 纳米粒的制备, 根据 1.3.1 的方法, 用 1 mL Harpin $_{\text{Xoo}}$ 蛋白溶液 ($\rho = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 代替 1 mL 去离子水, pH 值调至 5.8, 此时 $\text{pH} > \text{pI}$, Harpin $_{\text{Xoo}}$ 带负电, 可以与带正电的 CS 溶液聚合形成 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 蛋白纳米粒^[11]。

Harpin $_{\text{Xm}}$ 纳米粒的制备方法同上。

1.4 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 纳米粒在烟草上的过敏性反应观察 按龚晓崇的方法^[5], 分别取质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Harpin $_{\text{Xoo}}$ 蛋白溶液、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白溶液、灭菌水、CS ($\rho = 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、TPP ($\rho = 0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、Harpin $_{\text{Xoo}}$ 蛋白纳米粒溶液 ($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Harpin $_{\text{Xm}}$ 蛋白纳米粒溶液 ($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 50 μL , 在烟草叶片上选取蛋白注射位点, 将其从叶片正面注射到叶肉细胞内, 并用记号笔画出蛋白液浸入的范围, 24 h 后观察叶片是否有过敏性反应 (Hypersensitive response, HR)。

1.5 H_2O_2 含量测定 将 Harpin 蛋白或 Harpin 蛋白纳米粒液均匀喷洒到烟草叶片上, 以没有雾滴滴落为准。吸收 1 h 摘下处理的叶片, 用直径为 1.5 cm 的打孔器打 2 张叶圆片 (约 140 mg)。

参照 Jiang 和 Zhang^[16]的方法, 使用 H_2O_2 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 南京), 取处理过的烟草叶圆片, 加 1 mL PBS 缓冲液 (pH 7.3), 在研钵内研碎成汁, 低速离心, 取上清液测定 H_2O_2 与钼酸络合物在 405 nm 处的 OD 值。

计算公式如下:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{OD(\text{测定管}) - OD(\text{空白管})}{OD(\text{标准管}) - OD(\text{空白管})} \times \text{标准品浓度}(163 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{样品测试前稀释的倍数}。$$

1.6 H_2O_2 定位检测 小心将处理过的叶片放入现配的 $\rho = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3,3-二氨基联苯胺(diaminobenzene, DAB) 染色液(pH 3.8) 中 25°C 光照下染色 8 h; 除去染色液后, 加入 $\varphi = 96\%$ 的乙醇脱色 12 h; 水悬浮, 镜检, 拍照^[17]。在过氧化物酶的作用下, DAB 能与 H_2O_2 结合形成红褐色聚合物, 通过定性观察叶片是否出现红褐色沉淀及沉淀的多少, 来直接反映叶片产生 H_2O_2 的强弱^[1, 18]。

1.7 Harpin_{xoo} 和 Harpin_{xm} 纳米粒释放效果测定 参照文献[11, 15]的方法, 分别取 2 mL Harpin_{xoo} 蛋白纳米粒溶液和 2 mL Harpin_{xm} 蛋白纳米粒溶液离心($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min, 25°C), 弃上清液, 加入 2 mL 磷酸缓冲液(PBS, pH 6.3) 后轻微振荡, 分别在 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 和 48 h(取样时间 i) 离心, 从上清液中取 100 μL 测定蛋白浓度, 同时向原样品补入 100 μL PBS 继续振荡, 每个样品测定 4 次。按公式(1) 算出 Harpin_{xoo} 蛋白和 Harpin_{xm} 蛋白在 i 时间的总释放量 M_i 。再由公式(2) 计算出蛋白纳米粒的释放率。

$$M_i = C_i \times 2 + \sum C_{i-1} \times V_s, \quad (1)$$

$$\text{蛋白释放率} = M_i / \text{蛋白总量} \times 100\%, \quad (2)$$

式中: C_i 是 i 时间上清中蛋白的浓度, V_s 是样品体积。

1.8 Harpin_{xoo} 和 Harpin_{xm} 纳米粒对烟草种子根长的促生作用 分别用 Harpin_{xoo} 蛋白溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Harpin_{xm} 蛋白溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、灭菌水、CS($\rho = 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、TPP($\rho = 0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、空白壳聚糖纳米粒溶液、Harpin_{xoo} 蛋白纳米粒溶液和 Harpin_{xm} 蛋白纳米粒溶液, 参照胡重怡等^[19]方法浸泡烟草种子 24 h, 用灭菌的纱布包好, 在 $\varphi = 75\%$ 的乙醇中浸泡 30 s, 再用 $\varphi = 10\%$ 的 H_2O_2 浸泡 10 min 后, 用无菌水冲洗 5 次, 每次 1 min, 最后将种子接种于含有 MS 培养基^[20] 的方形培养皿上, (25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 光照培养箱中直立培养。于第 17 天观察并测量种子的根长。按公式(3) 计算烟草根系的促生效果。

$$\text{促生效果} = (\text{样品处理的烟草根长} - \text{水处理的烟草根长}) / \text{水处理的烟草根长} \times 100\%。 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 Harpin_{xoo} 和 Harpin_{xm} 蛋白粗提液质量浓度 根据 1.2.2 的方法, 测得 Harpin_{xoo} OD_{595} 为 1.36, Harpin_{xm} OD_{595} 为 1.38, 根据蛋白定量试剂盒提供的 BSA (Bovine serum albumin), 测定不同质量浓度 BSA 蛋白的吸光值, 制做标准曲线(见图 1), 获得回归方程式 $y = 4.2884x + 0.0052$, 根据回归方程式推算 Harpin 蛋白的浓度, 结果表明, 提取到的 Harpin_{xoo} 蛋白粗提液质量浓度约为 $316 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Harpin_{xm} 蛋白粗提液质量浓度约为 $321 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 载 Harpin_{xoo} 和 Harpin_{xm} 纳米粒在烟草上产生过敏性反应 按照 1.3.2 的方法, 每用 1 mL Harpin_{xoo} 或者 Harpin_{xm} 蛋白($\rho = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可制得 Harpin_{xoo} 或者 Harpin_{xm} 纳米粒溶液 10 mL, 质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

用 Harpin_{xoo} 蛋白纳米粒溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Harpin_{xm} 蛋白纳米粒溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理烟草叶片后, 与 Harpin_{xoo} 蛋白溶液、Harpin_{xm} 蛋白溶液一样, 均在烟草叶片上产生了过敏性反应(图 2)。由于 Harpin 蛋白具有耐热性^[21], 因此, 笔者分别将 Harpin_{xoo} 蛋白纳米粒溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、Harpin_{xm} 蛋白纳米粒溶液($\rho = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 Harpin_{xoo} 蛋白溶液、Harpin_{xm} 蛋白溶液煮沸 10 min, 再次注射到烟草叶片上, 结果显示, 烟草叶组织中也产生了过敏性反应, 而作为对照的 CS、TPP 和清水处理,

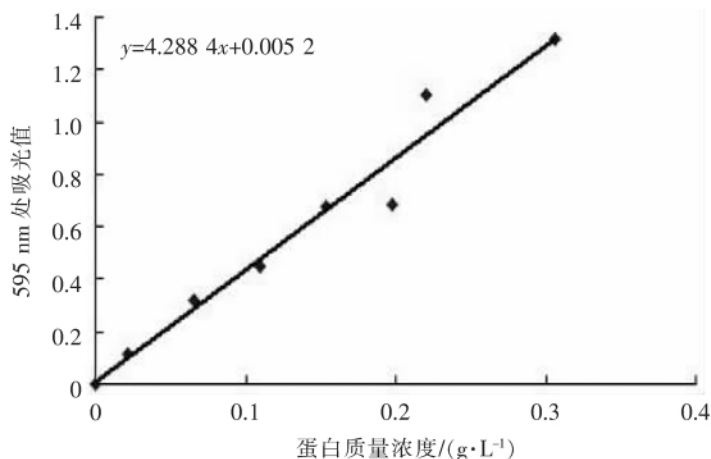


图1 BSA 蛋白质量浓度标准曲线

均不能产生过敏反应。这说明制备出的 Harpin_{X_{oo}} 和 Harpin_{X_m} 蛋白纳米粒能保持 Harpin 蛋白原有的主要特性和功能。

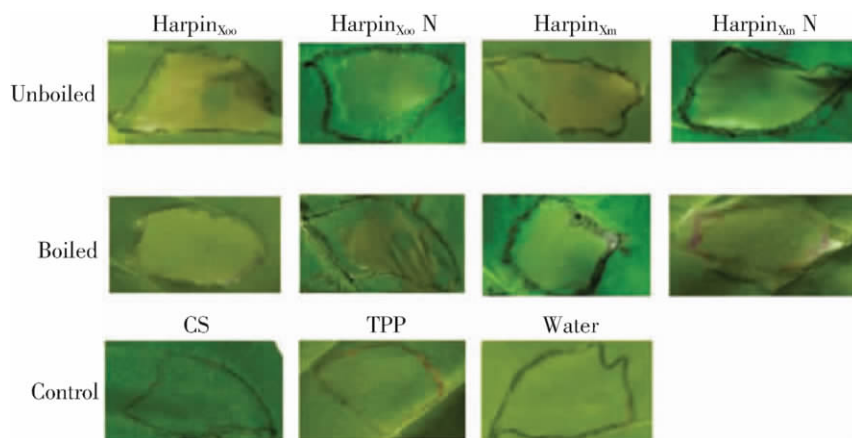


图2 Harpin_{X_{oo}} 和 Harpin_{X_m} 及其纳米粒不同处理后烟草叶片的过敏反应

2.3 载 Harpin_{X_{oo}} 和 Harpin_{X_m} 纳米粒激发烟草产生活性氧 H₂O₂ 的积累是氧爆发生成的主要标志,在过敏反应中起着重要作用^[22],Harpin 能够激发非寄主植物(如烟草)产生活性氧^[23]。本研究结果表明, Harpin_{X_{oo}} 和 Harpin_{X_m} 蛋白处理后 1 h 均能激发烟草产生活性氧,在烟草叶组织中产生明显的褐色积累,即氧爆发现象,被处理的叶组织中 H₂O₂ 含量分别为 226.61, 154.19 mmol · L⁻¹; Harpin_{X_m} 纳米粒处理后 1 h 也能激发烟草产生活性氧,在烟草叶组织中产生明显的深褐色积累,其 H₂O₂ 含量为 190.78 mmol · L⁻¹; Harpin_{X_{oo}} 纳米粒处理烟草后 1 h,其 H₂O₂ 含量为 180.21 mmol · L⁻¹,有较微弱的褐色积累;作为载体的 CS 在处理烟草后没有明显的褐色积累,其 H₂O₂ 含量仅为 84.50 mmol · L⁻¹,低于清水处理烟草后的 H₂O₂ 含量 137.40 mmol · L⁻¹,清水处理烟草无氧爆发现象(见图 3)。研究显示,用清水处理烟草叶肉细胞 0 ~ 12 h 内测得的 H₂O₂ 含量在 130.08 ~ 141.76 mmol · L⁻¹ 范围。

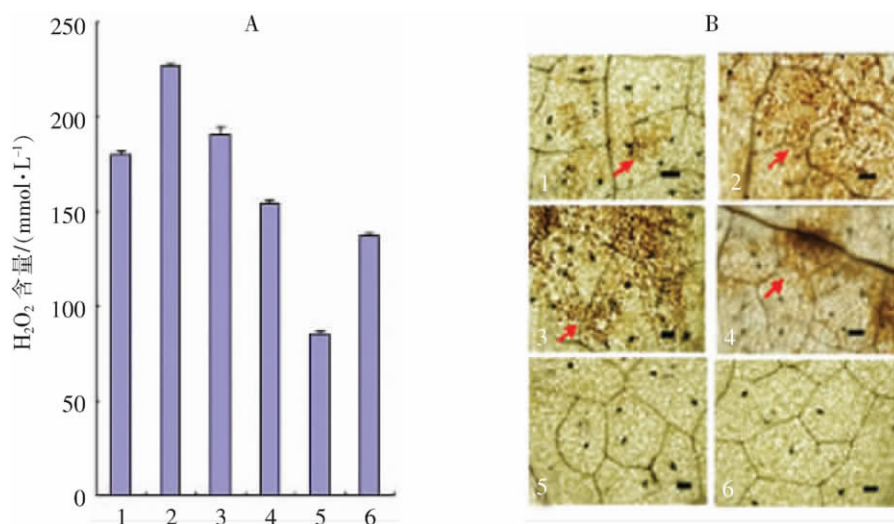


图3 Harpin 类蛋白处理后烟草叶肉组织中的 H₂O₂ 含量及定位检测

A: 不同蛋白诱导烟草 1 h 测得的 H₂O₂ 含量 (mmol · L⁻¹); B: 不同蛋白诱导烟草 1 h H₂O₂ 定位检测。

图中箭头指示的位置即为 H₂O₂ 产生的位置,标尺为 100 μm。1. Harpin_{X_{oo}} 蛋白纳米粒; 2. Harpin_{X_{oo}}; 3. Harpin_{X_m} 蛋白纳米粒; 4. Harpin_{X_m}; 5. CS; 6. 清水。

2.4 载 Harpin_{X_{oo}} 和 Harpin_{X_m} 纳米粒释放效果 湛江^[11]等曾用从水稻条斑病中克隆出的 *hrf2* 基因编码的 Harpin_{X_{oo}} 蛋白纳米粒做释放实验,认为 Harpin_{X_{oo}} 蛋白纳米粒的突释有利于其发挥药效。本实验中,

Harpin_{X00}蛋白与 Harpin_{Xm}蛋白在释放的初始阶段即出现突释,4 h 时分别达到 59.2% 和 55.8%,16 h 时分别达到 76.7% 和 76.9%,48 h 时分别达到 83.9% 和 84.5% (见图 4),这说明 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒与 Harpin_{X00}蛋白纳米粒都能起到持续性的促生作用,这与文献[11]的研究结果一致。从实验结果看,虽然在 4 h 的 Harpin_{X00}蛋白纳米粒的释放率略高于 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒的,但在 8 h 后, Harpin_{Xm}蛋白纳米粒的释放率逐渐升高,而且在 8~48 h 期间,其释放率一直高于 Harpin_{X00}蛋白纳米粒的。

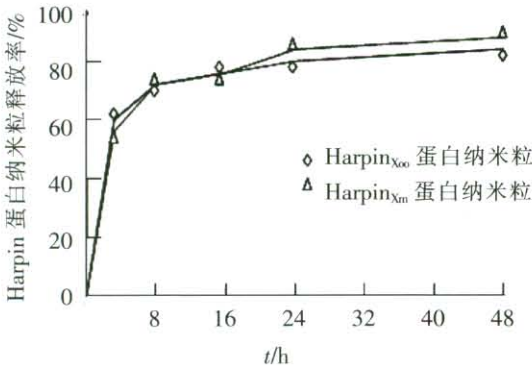


图4 载 Harpin_{X00}和 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒释放率

表1 Harpin _{X00} 和 Harpin _{Xm} 蛋白纳米粒对烟草的促生效果 $\bar{x} \pm s$		
处理	根长/cm	促生效果/%
Harpin _{X00}	1.76 ± 0.25cd	97.7
Harpin _{X00} 纳米粒	1.73 ± 0.16cd	94.4
Harpin _{Xm}	1.64 ± 0.12b	84.3
Harpin _{Xm} 纳米粒	1.82 ± 0.21d	104.5
空白纳米粒	1.64 ± 0.35bc	84.3
TPP	1.51 ± 0.05ab	69.7
CS	1.50 ± 0.22ab	68.5
CK	0.89 ± 0.04a	—

注:不同字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。

2.5 Harpin_{X00}和 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒对烟草有促生效果 按照 1.8 的方法,于第 17 天测量烟草种子根长。以灭菌水处理的烟草作为对照(见图 5A),其根长为 0.89 cm; Harpin_{X00}蛋白纳米粒溶液处理的烟草根长为 1.73 cm,促生效果为 94.4%,比 Harpin_{X00}蛋白溶液处理的烟草根长 1.76 cm 略低(见图 5B,图 5C)。

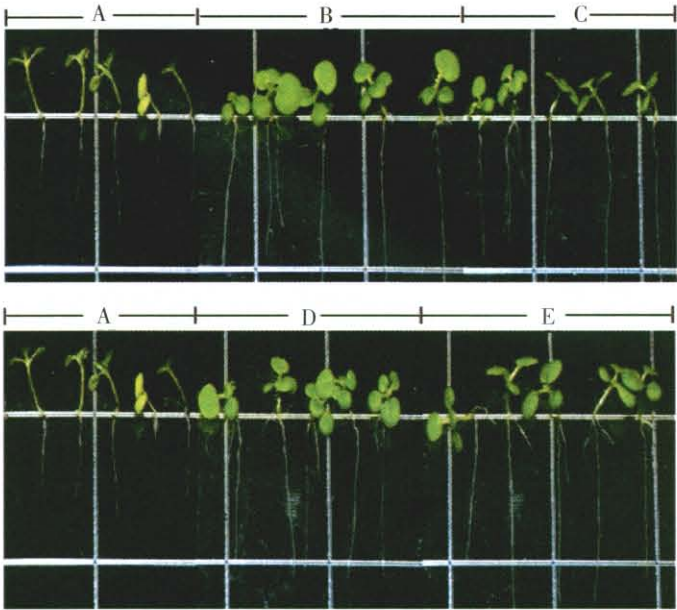


图5 Harpin_{X00}和 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒对烟草根的促生作用

注:A. 灭菌水;B. Harpin_{X00};C. Harpin_{X00}蛋白纳米粒;
D. Harpin_{Xm};E. Harpin_{Xm}蛋白纳米粒。

而 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒溶液处理的烟草根长为 1.82 cm,促生效果达到了 104.5%,显著高于 Harpin_{Xm}蛋白溶液处理的烟草根长 1.64 cm ($P < 0.05$) (表 1,图 5D,图 5E)。由此可看出, Harpin_{X00}蛋白纳米粒和 Harpin_{Xm}蛋白纳米粒能较好地发挥其缓释作用,与 Harpin_{X00}蛋白、Harpin_{Xm}蛋白均具有促进植物生长的效果,但 2 种蛋白纳米粒存在差异, Harpin_{Xm}蛋白纳米粒在促进生长方面优于其原蛋白。

3 讨 论

Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 均具有 Harpin 的共有特性, 具有耐热性, 在非寄主上能激发植物产生 HR 和氧爆发等防卫反应, 2 种蛋白的氨基酸序列相似性达 70.7%, 具有较高的同源性^[24]。本研究结果显示, Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 及其蛋白纳米粒均能诱导烟草产生过敏性反应, 但 Harpin_{Xoo} 与 Harpin_{Xm} 及其衍生物激发的过敏性反应程度具有一定差异, 即 Harpin_{Xoo} 比 Harpin_{Xm} 明显, 而 Harpin_{Xoo} 纳米粒与 Harpin_{Xm} 纳米粒激发的过敏性反应比较, Harpin_{Xm} 则高于 Harpin_{Xoo}。同样, 在 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 纳米粒激发烟草产生活性氧的实验中, Harpin_{Xoo} 蛋白处理 1 h 的 H₂O₂ 含量高于 Harpin_{Xm} 蛋白, 而 Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒激发烟草产生的 H₂O₂ 含量却明显高于 Harpin_{Xoo} 纳米粒的, 同时, 对 2 种蛋白激发活性氧的时序性检测结果表明 2 种蛋白在 0~12 h 期间均能产生双峰现象(另文报道), 表现出抗病品种的特性^[25], 但是 Harpin_{Xm} 和 Harpin_{Xoo} 形成第 1 峰的时间分别为 0.5 h 和 1 h。在本研究中这 2 种蛋白显示在 1 h 时激发活性氧有差异, 这可能是因为经 Harpin_{Xoo} 处理的烟草叶片在 1 h 时 H₂O₂ 含量出现明显的峰值, 而 Harpin_{Xm} 蛋白产生的 H₂O₂ 含量此时正处在下降阶段, 其峰值在处理后的 0.5 h 即已出现, 但是 2 种蛋白纳米粒却产生了相反的结果, 这说明纳米粒可能影响 Harpin 类蛋白的活性功能。本实验证明, Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 蛋白及其纳米粒以及 CS 均对烟草种子萌发有促进作用, Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒的促生作用与 Harpin_{Xm} 蛋白原液的促生作用相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。目前, 已报道黄单胞菌 Harpin 有 8 种, 均具有 Harpin 共有特性, 如富含甘氨酸而缺少半胱氨酸, 对酸、碱不敏感, 对热稳定, 100 °C 处理 10 min 不会使其失活; 对蛋白酶 K 和紫外线敏感, 但事实上, 不同 Harpins 表现出的功能却存在一定差异, 如 XopA (Xanthomonas outer protein A) 对植物生长很重要, 但它不像其他 Harpin 蛋白, 不具有激发 HR 的活性^[26]; Harpin_{Xoo} 等同于 HpaG/HpaI^[27], 但 Harpin_{Xoo} 含有 3 个 GGG(N)GG, 而 HpaI 含有 4 个^[27-28]; Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 具有诱导抗病性作用^[24-29], 但 Harpin_{Xoo} 诱导烟草抗 TMV 的效果要优于 Harpin_{Xm}。笔者将 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 制成纳米粒进行研究, 初步结果表明, 纳米粒能够改进原有蛋白的活性功能, 对不同 Harpin 活性的调控作用具有差异性。因此, 进一步研究不同 Harpin 蛋白的纳米粒应用效果及其相关机理, 将会对植物与病原互作机制、病害有效防控等具有重要的意义。

壳聚糖是一种天然安全的载体, 具有良好的生物相容性和药物缓释性的特点, 同时其本身还具有调节植物生长发育及诱导植物抗性等优点^[30]。本研究以壳聚糖为载体, 将 Harpin_{Xoo} 或 Harpin_{Xm} 制成 Harpin_{Xoo} 或 Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒, 依然表现出比原蛋白更理想的促生效果, 持效久, 缓释作用明显, 符合实际生产应用。Chirkov^[31] 认为壳聚糖对烟草、番茄等茄科植物诱导抗性反应较弱, 惠娜娜^[32] 在壳聚糖诱导抗性实例的研究中, 用壳聚糖处理某些植物后, 未能诱导其产生坏死枯斑, 而是存在非过敏性坏死类型的抗病机制。本实验采用的 CS 质量浓度为 1 g·L⁻¹, 而载 Harpin 蛋白纳米粒中的 CS 质量浓度为 0.8 g·L⁻¹, pH 为 6.3。笔者将 $\rho = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CS 及 pH 6.3 $\rho = 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CS 分别注射到烟草叶肉细胞中, 结果显示, pH 6.3 $\rho = 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CS 溶液并未引起过敏性反应, 没有出现大面积的枯斑。分析其原因, 可能是 CS 溶解在 $\varphi = 1\%$ 的醋酸中, 由于单一醋酸有一定的酸性, 从而对叶片产生了伤害。而在最终制备的 Harpin_{Xoo} 蛋白纳米粒溶液和 Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒溶实验中, pH 都在 6.3 左右, 此时 CS 的溶解性好, 纳米粒稳定性高, 同时, 调节 pH 的 NaOH 也中和了很多醋酸的成分, 因此, CS 未对烟草叶组织产生类似 HR 现象。但是, 在本研究中, CS 注射入烟草叶肉组织中就会立即产生类似 HR 现象, 同时激发产生氧爆发现象, 如褐色积累出现明显, 但 H₂O₂ 含量却低于清水处理的, 所以, Harpin_{Xoo} 蛋白纳米粒溶液和 Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒溶液产生的过敏性反应, 是由于其本身含有 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 成分而引起的, 往往在处理 24 h 后才产生, 是诱导烟草产生的防卫反应^[21-23]。因此, CS 产生的类似 HR 现象并非理论上的 HR, 而应当解释为 CS 对植物产生的一种伤害。笔者进一步调整 CS 溶剂醋酸的 pH 值后, 并单独使用 CS 也未能在烟草叶组织中产生类似的 HR, 因此, 可排除 CS 对本实验结果的影响。

在本研究中, 每用 1 mL 的 Harpin_{Xoo} 或者 Harpin_{Xm} 蛋白 ($\rho = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可制得 Harpin_{Xoo} 或者 Harpin_{Xm} 纳米粒溶液 10 mL, 且对 Harpin 蛋白的活性没有较大影响, 甚至能够提高一些 Harpin(如 Harpin_{Xm} 和 Harpin_{Xoo}) 的活性功能^[11], 这有利于节省成本, 促进类似 Harpin 的生物抗病激活剂的广泛使用。但是,

载 Harpin_{Xoo} 和 Harpin_{Xm} 蛋白纳米粒的其他性质,如理化性质、药效的持久性等还有待于进一步验证,以便为 Harpin 或者纳米粒在农业领域的应用提供更全面的理论依据。

参考文献:

- [1] 缪卫国,宋从凤,乔子辰等. 转 *hpa1_{Xoo}* 基因棉花活性氧产生及防卫相关基因的表达[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(2): 61–66.
- [2] 李平,陆徐忠,邵敏,等. 水稻黄单胞细菌 Harpin 蛋白的遗传多样性及其诱导烟草过敏反应和抗病性功能[J]. 中国科学, 2004, 34(2): 136–143.
- [3] MIAO W G, SONG C F, ZHENG F C, et al. The defense function and secondary structure analysis of *hpa_{Xm}* from *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* [J]. Amino Acids, 2011(41): 69–70.
- [4] 李明. HarpinX 蛋白的纯化、抗体制备及转 *hrfX* 基因棉花的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [5] 龚晓崇. 生长素对 Harpin 蛋白激发 HR 的调控机制初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [6] ZHANG S, KLESSIG D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. Trends Plant Sci, 2001(6): 520–527.
- [7] SAMUEL M A, MILES G P, ELLIS B E. Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signaling in plants [J]. Plant J, 2000, 22(4): 367–376.
- [8] 李俊芳,闫妍,卢晓静,等. 纳米粒子的生物安全性研究进展[J]. 材料导报, 2011, 1(25): 49–52.
- [9] 陈红丽,吕洁丽,晏杰,等. 壳聚糖修饰的 PLGA 纳米粒作为蛋白多肽类药物载体的研究[J]. 功能材料, 2011(2): 202–205.
- [10] 冯博华,张子勇. 鱼藤酮-壳聚糖接枝物农药纳米粒子水分散制剂研究[J]. 农药学报, 2011, 13(1): 64–70.
- [11] 湛江,杨扬,宁辉,等. 载 Harpin_{Xoo} 蛋白纳米粒的制备及生物学效应测定[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(3): 57–61.
- [12] 缪卫国. 转 *hpa1_{Xoo}* 基因棉花抗病虫防卫反应与全基因组转录谱分析及棉花角斑病菌 *hpa_{Xm}* 基因的功能[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [13] JANES K A, CALVO P, ALONSO M J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 47: 83–97.
- [14] TANG Z X, SHI L E, QIAN J Q. Neutral lipase from aqueous solutions on chitosan nano-particles [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34: 217–223.
- [15] GAN Q, WANG T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 59(1): 24–34.
- [16] JIANG M, ZHANG J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidase damage in leaves of maize seedlings [J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42: 1265–1273.
- [17] TRUJILLO M, KOGEL K H, HÜCKELHOVEN R. Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2004, 17: 304–312.
- [18] 刘爱新,李多川,董汉松,等. Harpin_{Xoo} 诱发烟草过敏性反应早期 H₂O₂ 变化及有关基因表达[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 163–168.
- [19] 胡重怡,郑少清,陈兴江,等. 烟草无菌苗培养前的种子消毒技术研究[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2): 45–46.
- [20] 桂耀林. 培养基的配置与简化—植物组织培养技术(II) [J]. 生命世界, 1985(5): 39–41.
- [21] WEI Z M, LABY R J, ZUMOFF C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. Science, 1992, 257: 85–88.
- [22] LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response [J]. Cell, 1994, 79: 583–593.
- [23] MIAO W G, WANG X B, LI M, et al. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaxoo* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 67.
- [24] MIAO W G, WANG J S. Hpa_{Xm} from *Xanthomonas smithii* pv. *smithii* is a novel harpin protein with signal peptide [J]. Amino acids, 2008(37): S120–S121.
- [25] BAKER C J, ORLANDI E W, MOCK N M. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 1341–1344.

- [26] NÈOL L , THIEME F , NENNSTIEL D , et al. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island [J]. *J Bacteriol* , 2002 , 184: 1340 – 1348.
- [27] ZHU W , MAGBANUA M M , WHITE F F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *J Bacteriol* , 2000 , 182: 1844 – 1853.
- [28] PENG J L , BAO Z L , REN H Y , et al. Expression of harpin in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death [J]. *Phytopathology* , 2004 , 94: 1048 – 1055.
- [29] WANG X Y , SONG C F , MIAO W G , et al. Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein *hpa1* from *Xanthomonas oryzae* cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2008 , 81: 359 – 369.
- [30] 陈惠萍 徐朗莱. 壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展 [J]. *云南植物研究* 2005 27(6) : 613 – 619.
- [31] CHIRKOV S N. The antiviral activity of chitosan [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology* , 2002 , 38(1) : 1 – 8.
- [32] 惠娜娜. 壳寡糖诱导烟草抗烟草花叶病的若干特点研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学 2007.

Preparation and Bioassay of Harpin Nanoparticles

LI Lin , WAN San-lian , LIU Wen-bo , ZHANG Yu , MIAO Wei-guo , ZHENG Fu-cong

(College of Environment and Plant Protection , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Harpin_{Xoo} and Harpin_{Xm} are derived from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* , respectively , and have the characteristics of Harpin. Harpin_{Xoo} and Harpin_{Xm} were prepared as nanoparticle agents. Both the two proteins and their protein nanoparticles induced hypersensitive response and oxidative burst in tobacco leaves , playing a beneficial role in the process of tobacco seed growing , especially Harpin_{Xm} nanoparticles which promoted oxidative burst of tobacco by 104.5% . Harpin_{Xoo} and Harpin_{Xm} nanoparticles showed a burst release at the initial stage , and their release rates increased to 83.9% and 84.5% , respectively , within 48 h. These two nanoparticles played a role in promoting protein activity continuously.

Key words: Harpin_{Xoo}; Harpin_{Xm}; nanoparticles; hypersensitive response; oxidative burst