

# 马铃薯抗菌肽 *SN1* 基因的克隆、 原核表达及其抑菌活性

蒋雯, 刘欣, 张增艳

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

**摘要:** 马铃薯抗菌肽 *SN1* 是一种新型抗菌肽。为明确 *SN1* 是否抑制小麦重要土传真菌小麦纹枯菌(禾谷丝核菌)、小麦根腐菌(平脐蠕孢菌)的生长, 本文克隆了马铃薯抗菌肽基因 *SN1* 的全长编码序列, 将该基因编码序列亚克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 上, 构建成 GST-*SN1* 融合蛋白表达载体。经异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 获得了以包涵体形式表达的 GST-*SN1* 重组蛋白。经过裂解、洗涤、溶解、复性等处理, 获得了纯化的 GST-*SN1* 融合蛋白。体外抑菌试验表明, *SN1* 显著抑制禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌丝生长, 可作为上述植物病害抗性育种的潜在基因。

**关键词:** 抗菌肽; 克隆; 复性; 抑菌活性; 禾谷丝核菌; 平脐蠕孢菌

## Cloning and Overexpression of Defensin *SN1* in *Escherichia coli* and its Antifungal Assay

JIANG Wen, LIU Xin, ZHANG Zeng-yan

(National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute  
of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Potato *SN1* is a new type of antimicrobial peptide. In this study, the full ORF of *SN1* gene was isolated and was sub-cloned in frame to the 3'-terminus of the ORF of Glutathione S-transferase (GST) in the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. This allowed the recombinant protein GST-*SN1* to be highly expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein GST-*SN1* can be expressed in the form of inclusion bodies after induction by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside. The protein GST-*SN1* was solubilized, denatured, refolded, and purified. The results of antifungal assay *in vitro* showed that *SN1* exerted obvious inhibition against the growth of phytopathogenic fungi, such as *Rhizoctonia solani* and *Bipolaris sorokiniana*. *SN1* gene may be useful for improving wheat resistance against the above pathogenic fungi.

**Key words:** Antimicrobial peptide; Cloning; Refolding; Antifungal activity; *Rhizoctonia cerealis*; *Bipolaris sorokiniana*

近年来, 由于耕作制度和气候条件等因素的改变, 土传真菌病对我国小麦生产的危害呈加重态势。如由禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 等引起的小麦纹枯病已成为我国长江流域麦区、黄淮海区的主要病害之一, 一般造成减产 10% ~ 30%, 严重地块减产超过 50%。据全国农业技术推广总

站报道, 2005 - 2008 年, 我国每年遭受纹枯病为害的麦田面积约 670 万 ~ 800 万  $\text{hm}^2$ , 经济损失在数十亿元以上<sup>[1]</sup>。由平脐蠕孢菌 (*Bipolaris sorokiniana*, 其有性态为禾旋孢腔菌 *Cochliobolus sativus*) 等引起的小麦根腐病在世界各国均有发生<sup>[2]</sup>, 在我国以东北、西北麦区、黄淮北片和华北麦区尤为

收稿日期: 2010-03-26 修回日期: 2010-10-05

基金项目: 国家重大科技专项课题 (2008ZX08002-001)

作者简介: 蒋雯, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: jw85rbd@126.com

通讯作者: 张增艳, 研究员, 博导, 主要从事小麦抗病分子育种研究。E-mail: zhangzy@mail.caas.net.cn

严重,一般减产 10%~30%。选育和推广抗病小麦品种是控制上述病害最经济、有效和安全的措施。然而,由于抗纹枯病、根腐病的小麦种质匮乏,常规育种进展缓慢。因此,发掘有效的抗真菌蛋白,开展小麦抗病基因工程育种是解决上述问题的重要途径。

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)具有抗菌谱广、分子量小、基因操作容易等特点。这类蛋白主要通过形成离子通道直接破坏细胞膜以杀灭病原真菌,且病原真菌很难对其产生抗性。更为重要的是抗菌肽仅作用于原核细胞和发生病变的真核细胞<sup>[3-5]</sup>。萝卜抗菌肽 Rs-AFP2 是从萝卜(*Raphanus sativus*)种子中分离的 r-硫基类抗菌肽,由 80 个氨基酸组成,包括 29 个氨基酸的信号肽和 51 个氨基酸的成熟肽<sup>[6]</sup>。Rs-AFP2 通过破坏病原菌细胞膜正常结构、改变膜的透性以及引起胞内还原氧(ROS)增加,影响病原菌细胞正常的生理过程,最终导致病原菌细胞死亡,而且对细菌和人体培养细胞没有影响<sup>[6-8]</sup>。体外抑菌研究证明,Rs-AFP2 可抑制多种植物重要病原真菌的菌丝生长,如小麦纹枯病菌(禾谷丝核菌,*R. cerealis*),水稻纹枯病菌(立枯丝核菌,*Rhizoctonia solani*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、麦类德氏霉菌(*Pyrenophora tritici-repentis*)、稻瘟菌(*Pyricularia oryzae*)等生长有抑制作用<sup>[6-9]</sup>。研究发现,表达的 Rs-AFP2 提高了转基因植物的抗病原菌作用。如转 Rs-AFP2 基因的烟草对 *Alternaria brassicicola* 抗性增强<sup>[7]</sup>、转 Rs-AFP2 基因小麦对纹枯病抗性得到提高<sup>[10]</sup>,Rs-AFP2 的表达提高了转基因水稻对稻瘟菌、纹枯病抗性<sup>[11]</sup>。

马铃薯抗菌肽 SN1 是从马铃薯块茎中分离的一种富含半胱氨酸的新型抗菌肽,可以显著抑制以下病原菌[番茄溃疡病菌(*Clavibacter michiganensis*),立枯镰孢菌(*Fusarium solani*),玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*),黄瓜炭疽病(*Colletotrichum lagenarium*),灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)]的生长<sup>[12]</sup>。SN1 基因过表达显著增强了转 SN1 基因马铃薯对立枯丝核菌、软腐菌抗性<sup>[13]</sup>。然而,SN1 对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌丝生长抑制情况以及在小麦抗病基因工程上应用潜力的研究至今还未见报道。

本研究从马铃薯块茎中克隆出 SN1 的全长编码序列,构建了该基因编码蛋白 SN1 的原核表达载体,并使 SN1 蛋白在大肠杆菌细胞中得到大量表达,提取、纯化出 SN1 和 RsAFP2 蛋白,进行体外抑

菌试验,比较 SN1 和 Rs-AFP2 对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌等菌丝生长的抑制情况,探索抗菌肽 SN1 在小麦抗纹枯病、根腐菌基因工程育种上的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

马铃薯块茎购自超市。禾谷丝核菌 R0301 引自江苏省农业科学院,平脐蠕孢菌购自中国农业科学院植物保护研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 马铃薯抗菌肽基因 SN1 序列的获得** 根据 SN1 基因的 mRNA 序列(GU1373071)设计引物(SN1-F: 5'-ATGAAGTTATTTCTATTAACCTC-3'; SN1-R: 5'-TCAAGGGCATTCTAGACTTGC-3')。利用 PLANTeasy 试剂盒提取马铃薯块茎总 RNA,采用 Invitrogen 公司第一链 cDNA 合成试剂盒将该 RNA 反转录、合成 cDNA。以该 cDNA 为模板用 plus Taq 酶扩增得到 SN1 基因全长编码序列,将其连接到 pMD18-T 载体(Takara)的多克隆位点间,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,通过菌落 PCR 筛选出阳性克隆,挑选 3 个阳性克隆进行测序分析。

**1.2.2 表达载体的构建** 以测序正确的 SN1 基因载体质粒 DNA 为模板,在 SN1 基因的两端分别添加 BamHI、EcoRI 酶切位点,利用引物(序列 SN1-BF: 5'-CTA GGATCC atgaagtatttctattaactc-3', 带下划线的序列为 BamHI 酶切位点,SN1-EIR: 5'-CAC GAATTC aggccatttagacttgc-3', 带下划线的序列为 EcoRI 酶切位点)进行 PCR 扩增,然后克隆到 pMD18-T 载体上,获得含 BamHI、EcoRI 酶切位点的 SN1 基因中间载体 pTSN1;用 BamHI、EcoRI 双酶切 SN1 基因中间载体 pTSN1 以及原核表达载体 pGEX-4T-1;利用 T4 连接酶将 BamHI、EcoRI 双酶切的 SN1 基因片段连接到 BamHI、EcoRI 酶切处理的 pGEX-4T-1 载体上,构建成重组蛋白 GST-SN1 的原核表达载体 pGST-SN1,转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,进行菌落 PCR 筛选、测序分析,把测序正确的重组蛋白质粒命名为 pGST-SN1。再将 pGST-SN1 质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,以进行重组蛋白的表达。

**1.2.3 pGST-SN1 在大肠杆菌中的表达** 参照路妍等<sup>[9]</sup>报道的方法,用 LB 液体培养基(含 50 μg/ml Amp)培养含重组蛋白 pGST-SN1 的 BL21 细胞,OD<sub>600</sub>达到 0.6~0.8 时,加入异丙基-β-D-硫代半乳

糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L, 继续培养 4h。将上述菌液在 8000r/min 离心 10min, 弃上清液, 加 0.1 倍培养体积的 PBS 缓冲液重悬沉淀, 5ml 细胞悬浮液加入溶菌酶 (50mg/ml) 50 $\mu$ l 室温消化 5min, 期间不断搅拌, 液氮中反复冻融 10 次后, 超声波 (30s-ON/10s-OFF, 20kHz) 裂解 30min, 12000r/min 离心 15min, 各取 10 $\mu$ l 上清液和重新悬浮的沉淀加入等体积的 2  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 10min, 取 10 $\mu$ l 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (4% 浓缩胶, 12% 分离胶) 电泳, 分析蛋白表达结果。

**1.2.4 包涵体的复性与纯化** 参照路妍等<sup>[9]</sup>的方法, 将破碎后离心收集的沉淀 (包涵体) 用 3 倍体积的包涵体洗涤缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 300mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1% TritonX-100 和 1mol/L urea) 洗涤 1 次, 室温放置 5min, 离心, 弃去上清液, 收集沉淀。所得沉淀用无菌水洗涤 5 次, 每次洗涤后均在 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 10min。所得包涵体溶解于相当于沉淀 10 倍体积的溶解缓冲液 [50mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% (w/v) Tween20, 8mol/L Urea], 室温放置 1h, 期间不断搅拌。4 $^{\circ}$ C, 10000r/min 离心 20min, 收集上清。

包涵体溶解液逐滴加入改进的复性 buffer (0.4mol/L L-Arginine, 2mmol/L DTT, 0.5mol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0), 并不断搅拌, 4 $^{\circ}$ C 放置 24h。

蛋白浓度测定, 用 BSA (牛血清白蛋白) 作标准曲线, 采用 Lowry 等<sup>[14]</sup>报道的方法测定蛋白质浓度。

**1.2.5 体外抗真菌活性测定** 采用菌丝生长抑制法<sup>[9,15]</sup>, 以抑菌圈半径的大小表示样品的抗真菌活性。在装有 PDA 培养基的培养皿 ( $d = 9$ cm) 中心及距中心等距处打孔 ( $d = 0.5$ cm), 将孔径相同、生长旺盛的禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌块接种于中心孔内, 25 $^{\circ}$ C 倒置暗培养 2d。待菌落直径至 2~3cm 时, 将 4 $\mu$ mol/L 复性的 GST-SN1 蛋白、Rs-AFP2、GST 分别加于周围 3 个、2 个孔中, 待蛋白完全渗入周围培养基后, 于 25 $^{\circ}$ C 继续倒置培养 48h, 观察抑菌效果。

在均匀涂布 GST-SN1 蛋白的 PDA 培养基与涂布复性 buffer 的 PDA 培养基上接种禾谷丝核菌核, 置于 25 $^{\circ}$ C 暗培养箱倒置培养。观察禾谷丝核菌核的萌发情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 SN1 的克隆与原核表达载体的构建

通过 RT-PCR 的方法, 从马铃薯 cDNA 中扩增至 SN1 基因的全长编码序列 (图 1), 长度 267bp。用 BamHI、EcoRI 酶切的 SN1 基因中间载体 pTSN1 和 pGEX-4T-1 载体的质粒 DNA, 回收 BamHI、EcoRI 酶切的 pTSN1 和 pGEX-4T-1 的目的片段, 连接、转化, 通过菌落 PCR 检测, 进行测序分析。结果表明, 该表达载体中 SN1 基因的全长编码序列长度为 267bp, 与 pGEX-4T-1 中 GST 基因 3' 端序列相融合, 形成可通读的 GST-SN1 融合蛋白编码序列。鉴定出含目标基因序列且连接方向正确的克隆载体, 提取质粒并转化 BL21 (DE3) 进行诱导表达。

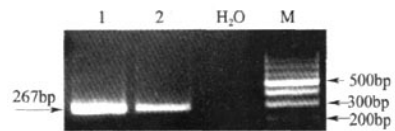


图 1 SN1 基因编码序列的扩增产物

Fig. 1 Amplification product of coding sequence of potato SN1 gene

1, 2: SN1 编码序列; M: 100bp DNA 分子量标尺;  
箭头指 SN1 扩增产物

1 and 2: Coding sequence of potato SN1 gene; M: 100bp DNA ladder;  
Arrow indicates the amplification product of SN1 ORF

### 2.2 SN1 蛋白的诱导表达及包涵体复性

通过 SDS-PAGE 检测 GST-SN1 融合蛋白的表达。结果如图 2 所示, 经 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 诱导 4h 后, 含有 GST-SN1 的 *E. coli* BL21 培养物沉淀中有 1 条约 35.6kD 的 GST-SN1 蛋白表达带, 上清液中则无该蛋白表达带, 含质粒 pGEX-4T-1 对照培养物上清液有 1 条约 26kD 的 GST 蛋白质条带, 说明 GST-SN1 基因在大肠杆菌细胞中以包涵体形式得到了表达。

将包涵体沉淀洗涤、离心、溶解, 得到包涵体溶解液, 再将包涵体溶解液逐滴加于复性 buffer 中, 置于 4 $^{\circ}$ C 复性 24h 以上, 离心, 取上清液进行 SDS-PAGE 检测。结果表明, 复性后的 GST-SN1 为纯合蛋白 (图 2 第 8 泳道)。

### 2.3 SN1 的体外抗真菌活性

本实验室以往的研究表明, Rs-AFP2 可以抑制禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌的菌丝生长<sup>[10]</sup>, 并且本实验室创制了抗纹枯病的转 Rs-AFP2 基因小麦<sup>[10]</sup>。为明确 SN1 对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌丝生长的

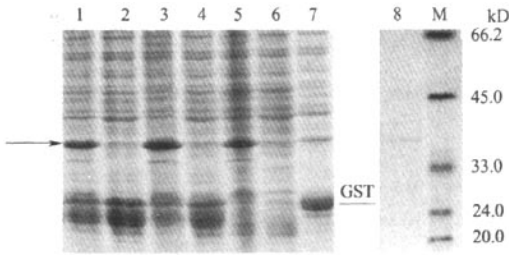


图2 SDS-PAGE 检测融合蛋白  
GST-SN1 的诱导表达和纯化结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of GST-SN1  
protein expressed and refolded

1,2:分别为0.5mmol/L IPTG 诱导的 pGST-SN1 培养物沉淀和上清液;3,4:分别为1mmol/L IPTG 诱导的 pGST-SN1 培养物沉淀和上清液;5,6:分别为0.1mmol/L IPTG 诱导的 pGST-SN1 培养物沉淀和上清液;7:1mmol/L IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 培养物上清液;8:复性、纯化的重组蛋白 GST-SN1;M:蛋白质分子量标准;箭头指 GST-SN1

1,2:Precipitation and supernatant of pGST-SN1 culture after induction with 0.5 mmol/L IPTG, respectively;3,4: Precipitation and supernatant of pGST-SN1 culture after induction with 1mmol/L IPTG respectively;5,6:Precipitation and supernatant of pGST-SN1 culture after induction with 0.1 mmol/L IPTG, respectively;7: Supernatant of pGEX-4T-1 culture after induction with 1mmol/L IPTG;8: Refolded GST-SN1 protein. Arrow indicates recombinant protein GST-SN1

抑制情况以及在小麦抗病基因工程上的应用潜力,比较了 SN1 与 Rs-AFP2 对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌丝生长的抑制效果。结果表明(图3A-B), $4\mu\text{mol/L}$  复性的 GST-SN1 与 GST-Rs-AFP2 均可明显抑制病菌的菌丝生长,而 GST 对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌菌丝生长没有抑制作用,说明 SN1 与 Rs-AFP2 一样可以显著抑制其菌丝生长。从抑菌范围和强度看,和 Rs-AFP2 相比,SN1 对禾谷丝核菌菌丝生长的抑制作用更强,对平脐蠕孢菌的抑制作用稍弱(图3A-B)。

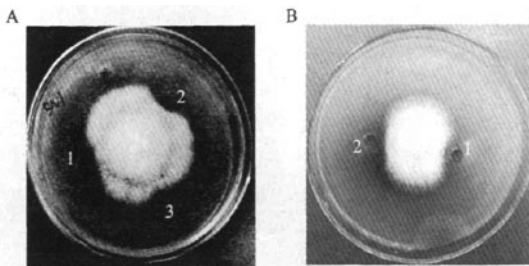


图3 SN1、Rs-AFP2 对禾谷丝核菌(A)  
和平脐蠕孢菌(B)菌丝生长的抑制作用

Fig.3 Inhibitory activity of SN1 and Rs-AFP2 towards  
*R. cerealis* (A) and *Bipolaris sorokiniana* (B)

1:复性的  $4\mu\text{mol/L}$  GST-SN1 蛋白;  
2:复性的  $4\mu\text{mol/L}$  GST-Rs-AFP2; 3:GST

在加有 GST-SN1 的 PDA 培养基上接种禾谷丝核菌菌核,接种 48h 后这些菌核仍没有生长(图4-A);而在 PDA 培养基上,菌核可以正常萌发(图4-B),说明 SN1 还抑制菌核的萌发,进一步证明 SN1 对小麦纹枯菌具有抑制作用。

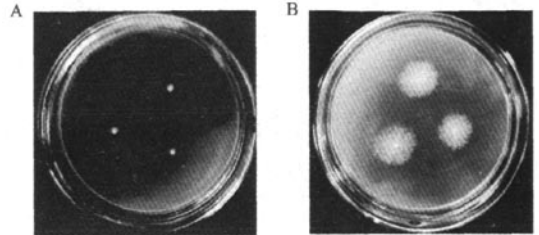


图4 SN1 对禾谷丝核菌菌核的抑制作用

Fig.4 Effect of purified potato SN1 on the germination  
of *R. cerealis sclerotia*

A:在添加  $4\mu\text{mol/L}$  GST-SN1 的 PDA 培养基上接种  
48h 的菌核不能萌发;B:对照 PDA 上菌核的萌发

A:*R. cerealis sclerotia* did not germinate at PDA medium plus  
 $4\mu\text{mol/L}$  SN1 at 48h after inoculation;B:the sclerotia germinated  
at PDA plus PBS medium at 48h after inoculation

### 3 讨论

随着分子生物学、植物基因工程的发展,报道的抗真菌蛋白基因日益增多。为了尽快明确这些抗真菌蛋白在植物基因工程育种上的应用潜力,一般可将抗真菌蛋白基因克隆出来,使其在大肠杆菌中高效表达,再把表达的抗真菌蛋白分离、纯化出来,进而研究这些抗真菌蛋白的抑菌活性。

为发掘抗小麦土传病害的潜在基因,本研究克隆了马铃薯抗菌肽 SN1 的编码序列,构建了 GST-SN1 重组蛋白的原核表达载体,并使其在大肠杆菌中获得高效表达,但 GST-SN1 重组蛋白在该原核表达系统中以包涵体形式存在。以往研究也报道,在高效的原核表达系统中重组蛋白的表达产物往往会形成包涵体<sup>[9,16]</sup>。由于以包涵体形式存在的蛋白没有活性,因此,本文采用洗涤、溶解包涵体及稀释法复性等处理,成功地使包涵体中 GST-SN1 得到复性,从而用于后续的抑菌试验。

体外抑菌试验结果表明,与 Rs-AFP2 相似,SN1 抗菌蛋白对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌均有不同程度的抑制作用。本试验中,就抑菌范围和抗真菌活性强度而言,与 Rs-AFP2 相比,SN1 对禾谷丝核菌菌丝生长的抑制作用更强,而且 SN1 还可抑制该真菌菌核的萌发。结果说明 SN1 可作为 1 个新的潜在基

因进行小麦病害抗性基因工程育种。

#### 参考文献

- [1] Chen L, Zhang Z Y, Liang H X, et al. Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat [J]. *J Exper Bot*, 2008, 59: 4195-4204
- [2] Kumar J, Schäfer P, Hüchelhoven R, et al. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control [J]. *Mol Plant Pathol*, 2002, 3: 185-195
- [3] Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 437-455
- [4] Thevissen K, Terras F R G, Broekaert W F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 5451-5458
- [5] Thevissen K, Osborn R W, Acland D P, et al. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 54-61
- [6] Terras F R G, Goderis I J, Leuven F V, et al. *In vitro* antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to non-specific lipid transfer proteins [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100: 1055-1058
- [7] Terras F R G, Eggermont K, Kovaleva V, et al. Small cyteine-rich antifungal proteins from radish; their role in host defense [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 573-588
- [8] Aerts A M, Francois I E J A, Meert E M K, et al. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans* [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007, 13: 243-247
- [9] 路妍, 刘宝业, 井金学, 等. 抗菌肽 Rs-AFP2 的原核表达及抑菌活性 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(4): 84-88
- [10] 路妍, 张增艳, 任丽娟, 等. 转 *Rs-AFP2* 基因小麦的分子分析及其纹枯病抗性 [J]. *作物学报*, 2009, 35(4): 640-646
- [11] Jha S, Chattoo B B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens [J]. *Transgenic Res*, 2010, 19: 373-384
- [12] Segura A, Moreno M, Madueño F, et al. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12: 16-23
- [13] Almasia N, Bazzini A, Hopp H E, et al. Overexpression of *snakin-1* gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants [J]. *Mol Plant Pathol*, 2008, 9: 329-338
- [14] Lowry O, Rosebrough N, Farr A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275
- [15] 胡辛, 安成才, 李毅, 等. 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 [J]. *微生物学报*, 1999, 39(3): 234-240
- [16] Kirubakaran S, Sakthivel N. Cloning and overexpression of anti-fungal barley *chitinase* gene in *Escherichia coli* [J]. *Protein Express Purif*, 2007, 52: 159-166

# 马铃薯抗菌肽SN1基因的克隆、原核表达及其抑菌活性

作者: 蒋雯, 刘欣, 张增艳, JIANG Wen, LIU Xin, ZHANG Zeng-yan  
作者单位: 中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京, 100081  
刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU  
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES  
年, 卷(期): 2011, 12(2)

## 参考文献(16条)

1. Aerts A M;Francois I E J A;Meert E M K The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*[外文期刊] 2007(4)
2. Kirubakaran S;Sakthivel N Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*[外文期刊] 2007(1)
3. Lowry O;Rosebrough N;Farr A Protein measurement with the Folin phenol reagent 1951
4. Almasia N;Baazini A;Hopp H E Overexpression of snakin1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants[外文期刊] 2008
5. Segura A;Moreno M;Madue(n)o F Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens[外文期刊] 1999(1)
6. Jha S;Chattoo B B Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens[外文期刊] 2010
7. 路妍;张增艳;任丽娟 转Rs-AFP2基因小麦的分子分析及其纹枯病抗性[期刊论文]-作物学报 2009(04)
8. 路妍;刘宝业;井金学 抗菌肽Rs-AFP2的原核表达及抑菌活性 2010(04)
9. Terras F R G;Eggermont K;Kovaleva V Small cyteine-rich antifungal proteins from radish:their role in host defense[外文期刊] 1995
10. Terras F R G;Goderis I J;Leuven F V In vitro antifungal activity of a radish(*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to non-specific lipid transfer proteins[外文期刊] 1992
11. Thevissen K;Osborn R W;Acland D P Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia(*Dahlia merckii*)on fungal cells are required for antifungal activity[外文期刊] 2000(1)
12. Thevissen K;Terras F R G;Broekaert W F Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth[外文期刊] 1999(12)
13. Theis T;Stahl U Antifungal proteins:targets, mechanisms and prospective applications[外文期刊] 2004
14. Kumar J;Sch(a)fer P;Hückelhoven R *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern:Cytological and molecular approaches towards better control 2002
15. Chen L;Zhang Z Y;Liang H X Overexpression of TiERFI enhances resistance to sharp eyespot in tranagenic wheat[外文期刊] 2008(15)
16. 胡苹;安成才;李毅 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 1999(03)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201102019.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201102019.aspx)