北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

蜡样芽孢杆菌NJSZ-13中蛋白酶ATP-α与ClpX的杀线虫活性研究

孙玉凤 谈家金 袁裕超 赵晓佳 叶建仁

Prokaryotic expression of nematicidal proteases ATP-α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13

Sun Yufeng, Tan Jiajin, Yuan Yuchao, Zhao Xiaojia, Ye Jianren

引用本文:
孙玉凤, 谈家金, 袁裕超, 赵晓佳, 叶建仁. 蜡样芽孢杆菌NJSZ-13中蛋白酶ATP-α与ClpX的杀线虫活性研究[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(4):84-90. doi: 10.12171/j.1000-1522.20220231
Sun Yufeng, Tan Jiajin, Yuan Yuchao, Zhao Xiaojia, Ye Jianren. Prokaryotic expression of nematicidal proteases ATP-α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(4):84-90. doi: 10.12171/j.1000-1522.20220231

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20220231

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

松材线虫VAPs蛋白的原核表达、多抗制备及表达模式分析

Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and expression pattern analysis of venom-allergen proteins from *Bursaphelenchus xylophilus*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 38-50. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210202

松材线虫细胞色素*cyp*-13*A*11基因RNA干扰载体的构建及其功能分析

Construction and its function analysis of RNA interference vector of cytochrome *cyp*-13*A*11 gene in *Bursaphelenchus xylophilus*

北京林业大学学报, 2021, 43(1): 96-102. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200025

杀线虫真菌Sr18发酵液对松材线虫超微结构的影响

Effects of nematicidal filamentous fungus Sr18 metabolites on the ultrastructure of *Bursaphelenchus xylophilus*

北京林业大学学报, 2017, 39(7): 69-75. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170048

松材线虫P糖蛋白在药物代谢过程中的功能研究

Functional analysis of P-glycoprotein in drug metabolism of *Bursaphelenchus xylophilus*

北京林业大学学报, 2021, 43(11): 71-78. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200387

刺激植物响应蛋白基因*Epl1*克隆、原核表达及功能初探

Cloning, prokaryotic expression and function of the eliciting plant response protein of *Trichoderma asperellum*

北京林业大学学报, 2018, 40(1): 17-26. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170249

松材线虫生防放线菌的筛选、鉴定及其毒性因子初步研究

Screening and identification of actinomycetes for biological control of *Bursaphelenchus xylophilus* and preliminary study on their toxicity factors

北京林业大学学报, 2019, 41(4): 99-106. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20180302

DOI:10.12171/j.1000−1522.20220231

蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 中蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的杀线虫活性研究

孙玉凤　谈家金　袁裕超　赵晓佳　叶建仁
（南京林业大学林草学院，南方现代林业协同创新中心，江苏 南京 210037）

摘要:【目的】阐明蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 中杀线蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的杀线分子机制，构建杀线蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的原核表达载体。**【方法】**克隆杀线蛋白酶编码基因 *atpA* 与 *clpX*，利用基因工程手段对杀线蛋白酶编码基因进行 PCR 扩增，并与载体 pET-21b 连接构建重组载体，提取重组质粒转入蛋白表达载体大肠杆菌 BL21（DE3）。利用菌落 PCR 和测序验证转化效果。加入 IPTG 诱导蛋白表达，使用 Ni-NTA 柱进行重组蛋白的纯化，利用 SDS-PAGE 与 Western blot 验证 ATP-α 与 ClpX 纯化效果并进行杀线活性测定。**【结果】**菌落 PCR 验证和测序表明，重组载体中含有蛋白酶编码基因 *atpA* 与 *clpX*，且基因序列与参考序列一致，证明目的基因已经成功插入 BL21（DE3）表达载体中。SDS-PAGE 与 Western blot 验证表明，重组蛋白得到正确诱导与纯化，成功构建杀线蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的原核表达载体。杀线活性测定结果表明 ATP-α 与 ClpX 均具有较强的杀线效果。ATP-α 在 72 h 达到 66.75% 的杀线率，ClpX 在 72 h 达到 75.46% 的杀线率。同时，两个蛋白酶共同作用杀线能力显著增强，24 h 便达到 66.32% 的杀线率，72 h 杀线率达到 91.01%。**【结论】**ATP-α 与 ClpX 经原核表达及纯化后具有较高的杀线活性，且两者共同处理松材线虫，杀线效果更强，证明蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 是重要的杀线因子，为设计和筛选杀线药物提供了新的线索和依据。

关键词：蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13；松材线虫；ATP-α；ClpX；原核表达
中图分类号：S763.18　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2024)04−0084−07
引文格式：孙玉凤，谈家金，袁裕超，等. 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 中蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的杀线虫活性研究［J］. 北京林业大学学报，2024，46(4)：84−90. Sun Yufeng, Tan Jiajin, Yuan Yuchao, et al. Prokaryotic expression of nematicidal proteases ATP-α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(4): 84−90.

Prokaryotic expression of nematicidal proteases ATP-α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13

Sun Yufeng　Tan Jiajin　Yuan Yuchao　Zhao Xiaojia　Ye Jianren
(Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry and Grassland, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract:［**Objective**］In order to elucidate the molecular mechanism of nematicidal proteases ATP-α and ClpX in *Bacillus cereus* NJSZ-13, prokaryotic expression vectors of nematicidal proteases ATP-α and ClpX were constructed.［**Method**］The nematicidase-encoding genes *atpA* and *clpX* were cloned, PCR-amplified the nematicidase-encoding gene by means of genetic engineering and connected with the vector pET-21b to construct a recombinant vector. The recombinant plasmid was extracted and transferred into the protein expression vector *E. coli* BL21 (DE3). The transformation effect was verified by colony PCR and sequencing. IPTG was added to induce protein expression, and the recombinant protein was purified using a Ni-NTA column. The purification effect of ATP-α and ClpX was verified by SDS-PAGE and Western blot, and the nematicidal activity was determined.［**Result**］Colony PCR verification and sequencing showed that

收稿日期: 2022−06−10　**修回日期:** 2023−06−27
基金项目: 国家重点研发计划（2021YFD1400900）。
第一作者: 孙玉凤。主要研究方向：微生物学。Email：2045798382@qq.com　地址：210037 江苏省南京市龙蟠路 159 号南京林业大学。
责任作者: 谈家金，博士，教授。主要研究方向：森林保护学。Email：tanjiajin@njfu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

the recombinant vector contained protease-encoding genes *atpA* and *clpX*, and the gene sequence was consistent with the reference sequence, proving that the target genes had been successfully inserted into the BL21 (DE3) expression vector. SDS-PAGE and Western blot showed that the recombinant protein was correctly induced and purified, and the prokaryotic expression vectors of nematicide protease ATP-α and ClpX were successfully constructed. The results of nematicidal activity assay showed that both ATP-α and ClpX had strong nematicidal effects. ATP-α reached a nematicidal rate of 66.75% at 72 h, and ClpX reached a nematicidal rate of 75.46% at 72 h. At the same time, the ability of the two proteases working together to kill the nematodes was greatly enhanced, showing that the nematicidal rate of 66.32% in 24 h and 91.01% in 72 h. [**Conclusion**] ATP-α and ClpX have higher nematicidal activity after prokaryotic expression and purification, and the two together have stronger nematicidal effect on *B. xylophilus*. It is proved that protease ATP-α and ClpX are important killing factors, which provides new clues and basis for the design and screening of killing drugs.

Key words: *Bacillus cereus* NJSZ-13; *Bursaphelenchus xylophilus*; ATP-α; ClpX; prokaryotic expression

松材线虫病是由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引起的一种全球性重大检疫性森林病害，成灾面积巨大，对我国林业生产和生态环境产生极大影响，造成巨大经济损失[1]。目前针对松材线虫病的防治对策包括疫木除治隔离、培育抗病树种、媒介昆虫防治、化学药剂防治等[2]。利用化学药剂治理松材线虫病见效快，效果好，但化学药剂易污染生态环境，且长期频繁使用易使线虫产生抗药性，使得利用化学药剂治理松材线虫受到一定限制。基于使用药物治理松材线虫可能引起的环境和健康问题，开发生防剂控制松材线虫显得尤为重要[3]。各国科学家开始以真菌、细菌等为研究对象，探索致死松材线虫的毒力因子。生防细菌可以通过产生毒素、分泌胞外蛋白酶以及捕食线虫等多种方式杀死松材线虫[4]。例如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、放线菌等均能够分泌毒素杀死松材线虫[5−6]，在松材线虫的防治中得到了广泛的研究和应用。Huang 等[7−8]报道了水解酶参与宿主感染的步骤。Niu 等[9−10]研究发现芽孢杆菌 B16 能够分泌丝氨酸蛋白酶 Bace16 和中性蛋白酶 Bae16，均能够破坏线虫体壁，降解线虫体表角质层。现已发现苏云金芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、穿刺芽孢杆菌(*Bacillus penetrans*)等多种对植物寄生线虫有拮抗活性的细菌[11]。研究发现在健康植物体内或植物附近土壤中能够筛选到对松材线虫具有高效拮抗活性的细菌，李亮亮等[12]从南京中山陵湿地松(*Pinus elliottii*)茎部分离到一株蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13，研究表明该菌株对松材线虫有显著的杀线作用。

本研究从蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 与松材线虫混合后的上清中获得蛋白酶 ATP synthase subunit alpha(ATP-α)与 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX(ClpX)，通过构建蛋白酶编码基因 *atpA* 与 *clpX* 原核表达载体，在大肠杆菌中异源表达并进行杀线活性测定，以确定 ATP-α 与 ClpX 是否具有杀线活性，为全面解析蛋白酶功能提供参考，也为松材线虫病的生防菌剂研究提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材　料

蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13、松材线虫 AMA3、质粒 pET-21b 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 均由南京林业大学森林病理实验室保存。Ni-NTA 1 mL 购自上海生工生物工程股份有限公司，ECL 显影液购自上海 biosharp 公司，质粒提取试剂盒与胶回收试剂盒购自南京诺唯赞公司，反转录试剂与蛋白表达载体 BL21(DE3)感受态购自北京全式金生物，PCR 产物纯化试剂盒与感受态制备试剂购自北京 TAKARA 生物，一抗 His-Tag(2A8)Mouse mAb 与二抗 Goat Anti-Mouse IgG-HRP 购自上海 ABMART，限制性内切酶 EcoR V 购自北京 NEB 公司，细菌 RNA 提取试剂盒(Bacterial RNA Kit R6950)购自上海吉诺生物科技有限公司。

1.2　方　法

1.2.1　基因组 RNA 的提取及 *atpA* 与 *clpX* 的克隆

提取 NJSZ-13 细菌 RNA 并反转录合成 cDNA，以 cDNA 基因组为模板，根据基因序列设计 *atpA* 与 *clpX* 的特异引物(表 1)并进行 PCR 扩增。PCR 反应条件：95 ℃ 预变性 3 min；95 ℃ 变性 15 s，61 ℃ 退火 15 s，72 ℃ 延伸 2 min 30 s，共 35 个循环；72 ℃ 彻底延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证，切取目的片段利用 Vazyme 胶回收试剂盒收集纯化产物。

1.2.2　原核表达载体的构建

提取载体 pET-21b 质粒并使用 EcoR V 进行单

表 1 PCR 引物

Tab. 1 Polymerase chain reaction primers

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
atpA	AATGGGTCGGGATCCGAATTCATGAGCATCAGAGCTGAAGAAATT	TTGTCGACGGAGCTCGAATTCTTCAGAAGCTACGAATACTTTC
clpX	AATGGGTCGGGATCCGAATTCATGTATTTACATACGATACATTTATCGTGTAC	TTGTCGACGGAGCTCGAATTCTGCAGATGTTTTTGTATCAAGTACAGTA

注：划线部分为同源臂序列。Note: the underlined part is the sequence of the homologous arms.

酶切，将 *atpA* 和 *clpX* 的 PCR 纯化产物与酶切载体 pET-21b 连接。制备大肠杆菌 DH5α 感受态，将连接产物转入感受态细胞中，加入 Luria-Bertani（LB）液体培养基摇培 1 h 后涂布于含有氨苄青霉素（Amp）的 LB 平板上 37 ℃ 培养 12 ~ 16 h，挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定。鉴定正确后送南京思普金生物科技有限公司测序。提取测序正确的阳性转化子提取重组质粒，将重组质粒转入蛋白表达载体大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，并在含有 Amp 的 LB 平板上 37 ℃ 培养 12 ~ 16 h。挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定并送至南京思普金公司测序。

1.2.3 ATP-α 和 ClpX 的诱导表达

挑取验证正确的阳性菌株接入含 Amp 的 LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 的条件下过夜活化培养。按 1∶50 的比例将过夜活化的培养物接入含 Amp 的 LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 约为 0.4 ~ 0.6，以使大肠杆菌处于最适合表达外源蛋白的生长状态。向 3 瓶菌液中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside，IPTG）至终浓度为 0.5 mmol/L，分别置于 16 ℃、110 r/min 摇培 16 h，25 ℃、180 r/min 摇培 12 h，37 ℃、200 r/min 摇培 3 h，诱导蛋白表达。使用细胞破碎仪超声破碎菌体，分别收集上清和沉淀，沉淀用 1 × PBS 缓冲液重悬，进行 SDS-PAGE 验证蛋白表达情况。

1.2.4 ATP-α 和 ClpX 的纯化

选择最优诱导条件按 1.2.3 所述方法进行重组蛋白的大量诱导，收集诱导后的菌体上清使用 Ni-NTA 蛋白纯化柱进行重组蛋白酶的纯化，并进行 SDS-PAGE 验证重组蛋白酶的纯化效果。

1.2.5 原核表达蛋白酶的 Western blot 鉴定

纯化蛋白酶 ATP-α 和 ClpX 经 SDS-PAGE 后电转至 PVDF 膜，一抗按 1∶5 000 比例稀释，将膜置于一抗中孵育 1.5 h，结束后 1 × PBST 洗涤 3 次。二抗按 1∶10 000 比例稀释，将膜浸没于二抗中室温避光孵育 30 min，结束后 1 × PBST 洗涤 3 次。将 PVDF 膜平铺于成像仪 X 光胶片暗盒中，并滴加 ECL 显影液进行显色。扫描图片，观察结果。

1.2.6 ATP-α 和 ClpX 杀线活性测定

在 1.5 mL 离心管中分别加入 200 μL 纯化蛋白酶 ATP-α、ClpX 以及 100 μL ATP-α 与 100 μL ClpX 的混合物，随后向每个离心管中分别加入 200 μL 松材线虫虫液（约 2 000 条），置于 25 ℃ 黑暗条件下静置。每隔 24 h 从每个离心管中吸取 20 μL（大约 50 条松材线虫）样本，通过显微镜观察线虫的运动状态来判断其死亡情况（以针持续戳刺不动视为死亡）。以 1 × PBS 为对照处理，每个处理组重复 5 次。使用 SPSS 对试验数据进行单因素方差分析，分析各处理组之间杀线活性的差异。

2 结果与分析

2.1 杀线蛋白酶编码基因 *atpA* 与 *clpX* 的克隆

杀线蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的编码基因 *atpA* 与 *clpX* 经 PCR 扩增、连接转化试验和菌落 PCR 验证后结果如图 1、2 所示。图 1 中经凝胶电泳检测显示扩增片段位于 1 000 ~ 2 000 bp 之间，与 ATP-α 预测（1 509 bp）符合。未经过 EcoR V 酶切的 pET-21b 载体与经 EcoR V 单酶切的载体比较显示载体被成功切开。菌落 PCR 产物电泳检测结果显示，条带大小与 ATP-α 克隆片段（1 509 bp）符合。图 2 中扩增片段稍高于 1 000 bp，与 ClpX 预测（1 335 bp）符合。菌落 PCR 产物电泳条带与 ClpX 克隆片段（1 335 bp）大小符合。测序结果显示，重组载体中含有 *atpA* 基因与 *clpX* 基因，且基因序列与参考序列一致，表明杀线蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 的编码基因得到成功克隆。

2.2 原核表达载体的构建

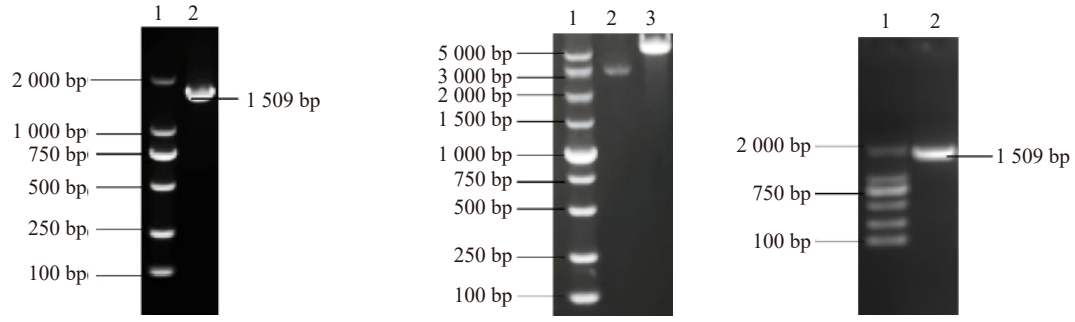
将转入重组质粒的大肠杆菌 BL21（DE3）进行 PCR 菌落鉴定，结果显示条带位置与预期位置一致（图 3）。将阳性转化子送南京思普金公司进行测序，证明目的基因已经成功插入 BL21（DE3）表达载体中。

2.3 ATP-α 与 ClpX 的诱导表达

在 16、25、37 ℃ 条件下，原核表达蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 均获得表达（图 4）。与对照组相比，目标蛋白酶 ATP-α 和 ClpX 分别于 55 kDa 和 48 kDa 处获得集中表达。并且 ATP-α 与 ClpX 在 16 ℃、110 r/min 摇培 16 h 的诱导条件下获得集中表达且包涵体较少。因此，16 ℃、110 r/min 摇培 16 h 为最佳诱导条件。

2.4 ATP-α 与 ClpX 的纯化

将经 IPTG 诱导表达后的 ATP-α 与 ClpX 使用



a *atpA* 全长的 PCR 扩增
PCR amplification of the full length of *atpA*

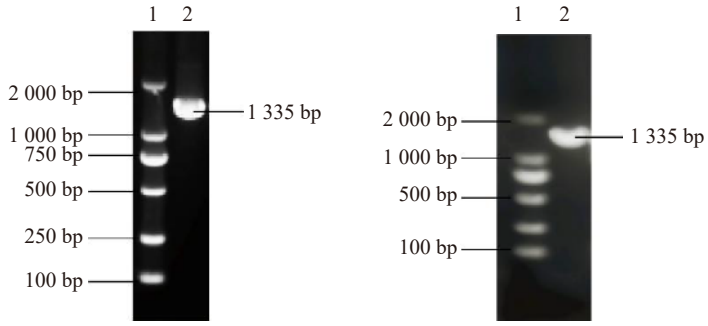
b pET-21b 载体过 EcoR V 单酶切验证
pET-21b vector verified by EcoR V single digestion

c 菌落 PCR 验证
Colony PCR validation

图 a：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *atpA* 克隆条带。图 b：1 表示 5 000 bp DNA ladder + marker；2 表示未经过 EcoR V 酶切的 pET-21b 载体；3 表示经过 EcoR V 酶切的 pET-21b 载体。图 c：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *atpA* 转化子（DH5α）。In Fig. a, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *atpA* clone band. In Fig. b, 1 indicates 5 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates pET-21b vector not digested with EcoR V, 3 indicates pET-21b vector digested with EcoR V. In Fig. c, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *atpA* transformant (DH5α).

图 1　ATP-α 蛋白编码基因 *atpA* 基因的克隆

Fig. 1　ATP- α cloning of the protein coding gene *atpA*



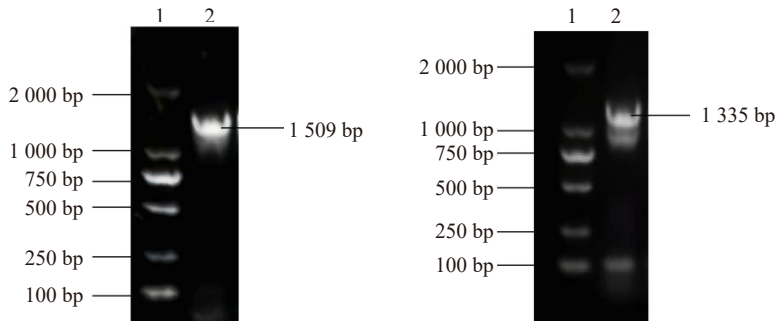
a *clpX* 全长的 PCR 扩增
PCR amplification of the full length of *clpX*

b 菌落 PCR 验证
Colony PCR validation

图 a：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *clpX* 克隆条带。图 b：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *clpX* 转化子（DH5α）。In Fig. a, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *clpX* clone band. In Fig. b, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *clpX* transformant (DH5α).

图 2　ClpX 蛋白编码基因 *clpX* 基因的克隆

Fig. 2　Cloning of ClpX protein coding gene *clpX*



a *atpA* 基因菌落 PCR 验证
atpA gene colony PCR verification

b *clpX* 基因菌落 PCR 验证
clpX gene colony PCR verification

图 a：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *atpA* 转化子 [BL21(DE3)]。图 b：1 表示 2 000 bp DNA ladder + marker；2 表示 *clpX* 转化子 [BL21(DE3)]。In Fig. a, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *atpA* transformant [BL21(DE3)]. In Fig. b, 1 indicates 2 000 bp DNA ladder + marker, 2 indicates *clpX* transformant [BL21(DE3)].

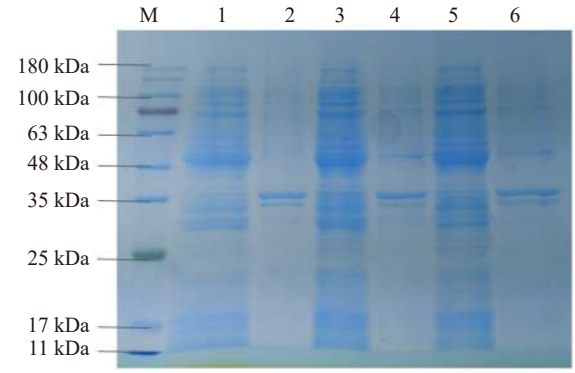
图 3　*atpA* 与 *clpX* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的诱导表达

Fig. 3　Inducible expression of *atpA* and *clpX* in *E. coli* BL21(DE3)

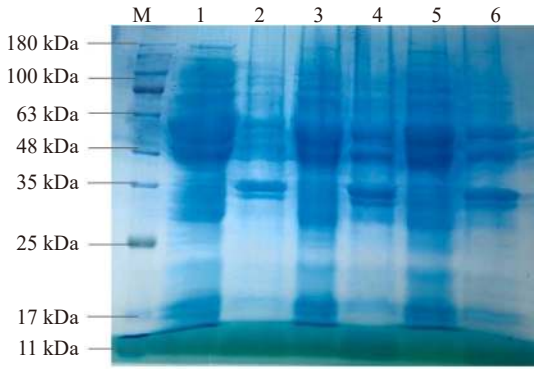
Ni 柱纯化后进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果显示原核表达蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 均呈现为单一条带（图 5），表明 ATP-α 与 ClpX 得以彻底纯化。

2.5　原核表达蛋白酶的 Western blot 鉴定

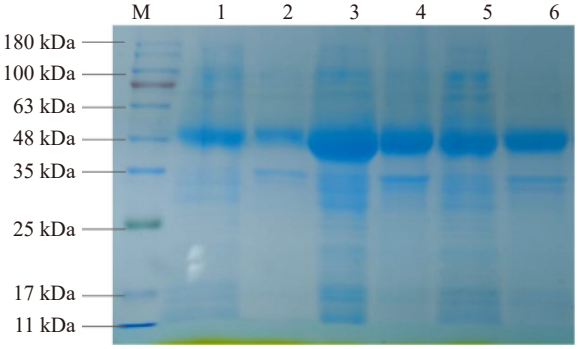
由于所构建的杀线蛋白酶原核表达载体 pET-21b 带有 His 检测标记，应用特异性 His 标签抗体，通过



a 载体 pET-21b 诱导表达 SDS-PAGE 验证
Vector pET-21b induced expression verified by SDS-PAGE



b ATP-α 诱导表达 SDS-PAGE 验证
ATP-α-induced expression verified by SDS-PAGE

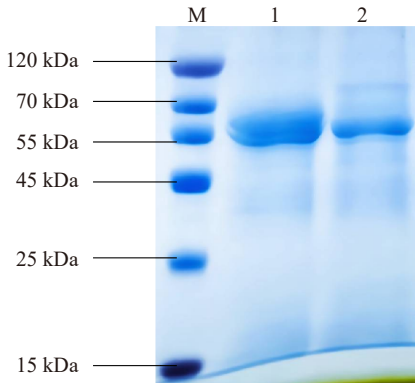


c ClpX 诱导表达 SDS-PAGE 验证
ClpX-induced expression verified by SDS-PAGE

M. 蛋白分子量彩虹 marker。1. 16 ℃ 上清；2. 16 ℃ 沉淀；3. 25 ℃ 上清；4. 25 ℃ 沉淀；5. 37 ℃ 上清；6. 37 ℃ 沉淀。M, protein molecular mass rainbow marker. 1, 16 ℃ supernatant; 2, 16 ℃ precipitation; 3, 25 ℃ supernatant; 4, 25 ℃ precipitation; 5, 37 ℃ supernatant; 6, 37 ℃ precipitation.

图 4 ATP-α 与 ClpX 诱导表达 SDS-PAGE 分析

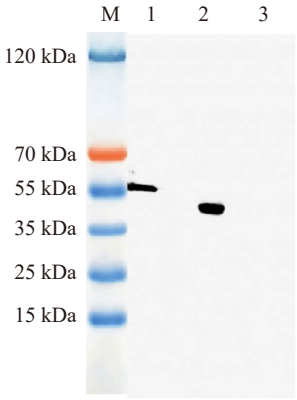
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of induced expression of ATP-α and ClpX



M. 蛋白分子量彩虹 marker；1. ATP-α；2. ClpX。M, protein molecular mass rainbow marker; 1, ATP-α; 2, ClpX.

图 5 ATP-α 和 ClpX 的纯化结果分析

Fig. 5 Analysis of purification results of ATP-α and ClpX



M. 蛋白分子量彩虹 marker；1. ATP-α；2. ClpX；3. 空载体对照。M, protein molecular mass rainbow marker; 1, ATP-α; 2, ClpX; 3, empty vector control.

图 6 ATP-α 和 ClpX 的 Western blot 检测

Fig. 6 Western blot detection of ATP-α and ClpX

免疫印迹试验对原核表达蛋白酶 ATP-α 和 ClpX 的纯化效果进行检测和鉴定。结果显示在全菌裂解液上清中，ATP-α 和 ClpX 均有 His 抗体检测阳性的目标蛋白表达，而对照组没有检测出带有 His 标签的阳性蛋白(图 6)。上述结果与 SDS-PAGE 的检测结果相吻合，说明在上述诱导条件下，实现了 ATP-α 和 ClpX 的原核表达，且 ATP-α 和 ClpX 大小分别为 55 kDa 和 48 kDa，与预期分子量一致。

2.6 原核表达蛋白酶的杀线活性测定

使用纯化蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 处理松材线虫，结果显示，ATP-α 与 ClpX 在 24 h 是杀线率较低，但仍显著高于对照组 PBS 处理的杀线率，随着时间推移杀线率越来越高，ATP-α 在 72 h 达到了 66.75% 的杀线率，ClpX 在 72 h 达到了 75.46% 的杀线率(表 2)，与对照相比差异显著。此外，用两个蛋白酶

同时处理松材线虫，杀线能力大大增强，24 h 便达到 66.32% 的杀线率，72 h 杀线率达 91.01%。

表 2　ATP-α 与 ClpX 的杀线活性测定

Tab. 2　Determination of nematode activity of ATP-α and ClpX

处理 Treatment	松材线虫死亡率 *B. xylophilus* mortality/%		
	24 h	48 h	72 h
ATP-α	12.33 ± 1.74 c	34.84 ± 2.45 b	66.57 ± 2.13 c
ClpX	18.75 ± 2.17 b	33.34 ± 2.05 b	75.46 ± 2.64 b
ATP-α + ClpX	66.32 ± 1.53 a	74.91 ± 1.57 a	91.01 ± 0.62 a
PBS	2.74 ± 0.56 d	5.91 ± 0.78 c	7.78 ± 1.18 d

注：同列不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$）。Note: the lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

3　讨　　论

近年来利用细菌防治松材线虫成为新的突破口[13]。线虫的角质层是一种坚硬的具有多层细胞外结构的外骨骼，由结构成分、可溶性蛋白和脂质组成，是防止松材线虫受到外界损害的有效屏障[14]。因此，蛋白酶、胶原酶和几丁质酶等在松材线虫生物防治中越来越受到重视[15]。据报道，多种细菌能够分泌蛋白酶或晶体蛋白等毒性物质，对松材线虫有很好的杀线效果[16]。牛秋红等[17]从土壤样本中分离得到 6 株松材线虫生防细菌，其中菌株 NS-3 的上清蛋白粗提物处理松材线虫 48 h 后死亡率达到 100%。对致病菌而言，宿主免疫应答与蛋白降解系统紧密联系，蛋白酶一直被认为是致病菌的重要毒力因子。研究发现结核分枝杆菌可分泌 16 类蛋白酶，其中蛋白酶与结核分枝杆菌的致病性相关[18]。克隆具有杀线活性的毒性蛋酶编码基因，利用该基因的编码产物或通过转基因技术来防治线虫，现已成为松材线虫生物防治中最具前景的一个方面。

蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 最初均发现于大肠杆菌，分别由 *atpA* 基因与 *clpX* 基因所编码，广泛分布于原核生物和真核生物中[19−20]。*atpA* 基因突变可导致细菌中氨基酸的变化[21]。ATP 合成酶 F1 亚单位 α 亚基（ATP-F1-α）可作为感染宿主的感染相关蛋白，在细菌的毒力和致病性方面起重要作用。鸭疫里默氏杆菌（*Riemerella anatipestifer*）中的 ATP-F1-α 蛋白酶可增强细菌的毒力[22]。Clp 蛋白酶复合体在细菌的蛋白质降解和平衡稳定中发挥重要作用[23]。Clp 家族的一些成员已被证明与许多细菌的发病有关[24−25]。ClpX 是依赖于 ATP 的普遍保守的蛋白家族成员之一，可介导底物的降解[26]。ClpX 在调节细菌毒力表达、能力发展、细菌毒素产生、生物膜形成和应激反应等方面至关重要，还能够以特定蛋白质为目标，直接降解蛋白质[27−28]。对于致病菌而言，ATP-α 与 ClpX 是细菌毒力所必需的因子。熊曦[29]发现蜡样芽孢杆菌中 ClpX 能够降解蛋白。Frees 等[30]发现金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）致病性与其所分泌的蛋白质息息相关，其致病力强弱主要取决于细菌所产生的毒素和侵袭性酶。ClpX 在细菌的生理和毒力方面具有重要作用，而缺乏 ClpX 蛋白酶的突变体产生的几种胞外毒力因子减少。目前关于蛋白酶 ATP-α 与 ClpX 对松材线虫的作用尚未报道，本研究首次从蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 中分离纯化到两种杀线虫蛋白酶类物质——ATP-α 与 ClpX，分别由 *atpA* 基因与 *clpX* 基因所编码。经原核表达纯化并进行杀线虫活性测定后发现均有较好的杀线虫作用，两者共同作用于松材线虫后杀线效果更好，为利用细菌进行高效防治松材线虫奠定了基础。

参　考　文　献

[1] 张旭, 赵京京, 闫峻, 等. 2017 年中国大陆松材线虫病灾害经济损失评估 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(10): 96−106.
Zhang X, Zhao J J, Yan J, et al. Economic loss assessment of pine wilt disease in mainland China in 2017[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(10): 96−106.

[2] 叶建仁, 吴小芹. 松材线虫病研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2022, 41(3): 1−10.
Ye J R, Wu X Q. Research progress of pine wilt disease[J]. Forest Pest and Disease, 2022, 41(3): 1−10.

[3] Duncan L W. Current options for nematode management[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29(1): 469−490.

[4] 张弘弢, 赵宇, 李晓岩, 等. 生防细菌杀松材线虫的作用机制及应用 [J]. 中国森林病虫, 2021, 40(4): 26−33.
Zhang H T, Zhao Y, Li X Y, et al. Mechanism and application of biocontrol bacteria against pine wood nematode[J]. Forest Pest and Disease, 2021, 40(4): 26−33.

[5] 金娜, 刘倩, 简恒. 植物寄生线虫生物防治研究新进展 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 789−800.
Jin N, Liu Q, Jian H. Advances on biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 789−800.

[6] 黄冰纷, 陈俊梅, 李文鹏, 等. 松材线虫生防放线菌的筛选、鉴定及其毒性因子初步研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(4): 99−106.
Huang B F, Chen J M, Li W P, et al. Screening and identification of actinomycetes for biological control of *Bursaphelenchus xylophilus* and preliminary study on their toxicity factors[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(4): 99−106.

[7] Huang X W, Tian B Y, Niu Q H, et al. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5−6): 719−727.

[8] Huang X W, Zhao N H, Zhang K Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host[J]. Research in Microbiology, 2004, 155(10):

811−816.

[9] Niu Q H, Huang X W, Zhang L Q, et al. Functional identification of the gene bace16 from nematophagous bacterium *Bacillus nematocida*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1): 141−148.

[10] Niu Q H, Huang X W, Tian B Y, et al. *Bacillus* sp B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6): 722−730.

[11] 余子全, 周燚, 孙明, 等. 苏云金芽胞杆菌防治植物寄生线虫的研究进展 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 418−424.
Yu Z Q, Zhou Y, Sun M, et al. Progress of researches on activity of *Bacillus thuringiensis* against plant-parasitic nematodes[J]. Journal of Plant Protection, 2004, 31(4): 418−424.

[12] 李亮亮, 谈家金, 陈凤毛. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2017, 41(4): 37−41.
Li L L, Tan J J, Chen F M . The screening and identification of two bacterial strains with nematicidal activityagainst *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2017, 41(4): 37−41.

[13] 牛秋红, 黄晓玮, 徐进, 等. 细菌在线虫生防中应用的研究进展 [J]. 生物技术, 2006(1): 90−94.
Niu Q H, Huang X W, Xu J, et al. Study on applications of bacteria in the biocontrol of nematodes[J]. Biotechnology, 2006(1): 90−94.

[14] Cox G N, Kusch M, Edgar R S. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization[J]. The Journal of Cell Biology, 1981, 90(1): 7−17.

[15] Maizels R M, Blaxter M L, Selkirk M E. Forms and functions of nematode surfaces[J]. Experimental Parasitology, 1993, 77(3): 380−384.

[16] 江宇航, 李宏伟, 蔡赛波, 等. 马尾松毛虫肠道细菌的分离鉴定与产蛋白酶细菌的筛选 [J]. 浙江农业学报, 2020, 32(8): 1446−1456.
Jiang Y H, Li H W, Cai S B, et al. Isolation and identification of intestinal culturable bacteria of *Dendrolimus punctatus* and screening of protease-producing bacteria[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(8): 1446−1456.

[17] 牛秋红, 董冰雪, 黄思良, 等. 松材线虫生防细菌的筛选、鉴定及其毒性因子的初步研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(8): 76−81.
Niu Q H, Dong B X, Huang S L, et al. Screening identification and virulence factor determination of the bacteria with nematicidal activity to *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. China Biotechnology, 2010, 30(8): 76−81.

[18] Ribeiro-Guimarães M L, Pessolani M C V. Comparative genomics of mycobacterial proteases[J]. Microbial Pathogenesis, 2007, 43(5): 173−178.

[19] Weber J, Senior A E. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase[J]. Febs Letters, 2003, 545(1): 61−70.

[20] 姚雪, 马洌扬, 张博, 等. 棉铃虫 ATP 合酶亚基 α 对 Cry2Ab 毒理的影响 [J]. 植物保护学报, 2021, 48(5): 1034−1042.
Yao X, Ma L Y, Zhao B, et al. The effects of ATP synthase subunit α on the toxicity of Cry2Ab to cotton bollworm *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(5): 1034−1042.

[21] Souza A R V, de Pina S E C M, Costa N S, et al. Description of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* due to an uncommon mutation in the *atpA* gene and comparison with previously identified *atpC* mutants from Brazil[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 7936−7946.

[22] 邢林林, 卢凤英, 愈慧, 等. 鸭疫里默氏杆菌 ATP 合成酶 F1 亚单位 α 亚基的部分生物学特性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(4): 266−269.
Xing L L, Lu F Y, Yu H, et al. Study on some biological characters of ATP synthase F1 subcomplex alpha subunit of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(4): 266−269.

[23] 白嘉诚, 迟明哲, 胡亚文, 等. 耻垢分枝杆菌 ClpC 和 ClpX 敲低表达菌株的构建及表型分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 13−22.
Bai J C, Chi M Z, Hu Y W, et al. Construction and biological characteristics of ClpC and ClpX knock-down strains in *Mycobacterium smegmatis*[J]. China Biotechnology, 2021, 41(6): 13−22.

[24] Rath P, Singh P K, Batra J K. Functional and structural characterization of *Helicobacter pylori* ClpX: a molecular chaperone of Hsp100 family[J]. Protein and Peptide Letters, 2012, 19(12): 1263−1271.

[25] 王大林, 宋健, 丛春林, 等. Clp 蛋白酶复合体亚基 ClpX 在肝细胞癌中的表达及意义 [J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(3): 291−296.
Wang D L, Song J, Cong C L, et al. Expression and significance of Clp protease complex subunit ClpX in hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2020, 12(3): 291−296.

[26] 王琳, 谢建平. 细菌 ClpX 蛋白酶的结构和功能 [J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1281−1287.
Wang L, Xie J P. Bacterial ClpX protease structure and function: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(10): 1281−1287.

[27] Fetzer C, Korotkov V S, Thänert R, et al. A chemical disruptor of the clpx chaperone complex attenuates the virulence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(49): 1−7.

[28] Gurung V, Biswas I. ClpX/P-dependent degradation of novel substrates in streptococcus mutans[J]. Journal of Bacteriology, 2022, 48(5): 1034−1042.

[29] 熊曦. 蜡样芽孢杆菌蛋白质量控制系统 ClpX/Hsp100 家族组分的生理功能分析 [D]. 开封: 河南大学, 2017.
Xiong X. The role of ClpX/Hsp100 protein family components in *Bacillus cereus*[D]. Kaifeng: Henan University, 2017.

[30] Frees D, Qazi S N, Hill P J, et al. Hanne (I): alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1565−1578.

（责任编辑 范 娟
责任编委 张 真）