

研究报告

几丁质酶基因的克隆表达及酶学性质

郑家敏 梁燕辉 朱凡 叶秀云 林娟*

(福建省海洋酶工程重点实验室 福州大学 福建 福州 350116)

摘要:【背景】几丁质是自然界中储藏量仅次于纤维素的有机物,几丁质酶能降解几丁质生成几丁寡糖,实现废弃物的高值化利用,目前菌株产几丁质酶能力低限制了它的生产应用。【目的】克隆弧菌(*Vibrio* sp.) GR52 的几丁质酶基因,实现其在大肠杆菌中的异源表达,对分离纯化的重组几丁质酶进行酶学性质研究。【方法】以弧菌 GR52 菌株基因组 DNA 为模板,克隆得到几丁质酶基因 *GR52-1*,构建重组基因工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*chiGR52-1*,诱导表达的产物通过 Ni-NTA 树脂纯化后进行酶学性质研究。【结果】重组酶的最适反应 pH 为 6.0,在 pH 5.0–10.0 范围内 37 °C 保温 1 h 仍能保持 85% 以上的相对酶活力,具有较好的 pH 稳定性;最适反应温度为 50 °C,在 45 °C 保温 1 h 其酶活力基本没有损失,在 50 °C 保温 1 h 其残余酶活力仍达 60%;在 1 mmol/L 浓度下, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶具有促进作用, Hg^{+} 对该酶具有明显的抑制作用;在 5 mmol/L 浓度下, Ni^{+} 对该酶具有一定的促进作用, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^{+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{+} 、SDS (十二烷基硫酸钠) 对该酶具有明显的抑制作用。以胶体几丁质为底物时,动力学参数 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} 分别为 0.85 mg/mL、0.19 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 和 7.02 s^{-1} 。底物特异性分析表明该重组酶能特异性降解几丁质。【结论】重组几丁质酶具有良好的酶学性质,为几丁质酶的开发应用奠定基础。

关键词: 几丁质酶, 弧菌, 克隆表达, 酶学性质

Cloning, expression and characterization of the chitinase gene from *Vibrio* sp. GR52

ZHENG Jia-Min LIANG Yan-Hui ZHU Fan YE Xiu-Yun LIN Juan*

(Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

Abstract: [Background] Chitin is the second most abundant natural resource next to cellulose. Chitinase can catalyze chitin into chitosan oligosaccharide which achieved high value utilization of waste. [Objective] The chitinase gene of *Vibrio* sp. GR52 was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the properties of recombinase were characterized. [Methods] The chitinase gene *chiGR52-1* was cloned from the genomic DNA of *Vibrio* sp. GR52 and the recombinant strain

Foundation items: Regional Demonstration Project of Fujian Provincial Oceanic Economy Innovation and Development (2014FJPT02); Foundation of Fujian Provincial Department of Education (JAT160054)

*Corresponding author: Tel: 86-591-22866376; E-mail: ljuan@fzu.edu.cn

Received: July 22, 2017; Accepted: October 25, 2017; Published online (www.cnki.net): November 07, 2017

基金项目: 福建省海洋经济创新发展区域示范项目(2014FJPT02); 福建省中青年教师教育科研项目(JAT160054)

*通信作者: Tel: 86-591-22866376; E-mail: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-22; 接受日期: 2017-10-25; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-07

BL21(DE3)/pET22b-*chiGR52-1* was constructed. The recombinase rchiGR52-1 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and the enzymatic properties were studied. **[Results]** The optimum catalytic pH of rchiGR52-1 was 6.0. It was stable in the pH range of 5.0 to 10.0 and could maintain more than 85% of its relative activity after incubation at 37 °C for 1 hour. The optimum catalytic temperature of the enzyme was 50 °C and 60% of enzyme activity was remained after incubation at 50 °C for 1 hour. At the concentration of 1 mmol/L, Cu^{2+} and Ca^{2+} had stimulation on rchiGR52-1, while Hg^{+} had significant inhibition. At the concentration of 5 mmol/L, Ni^{+} stimulated the chitinase, while Mn^{2+} , Co^{2+} , Li^{+} , Fe^{2+} , Hg^{+} and SDS inhibited the enzyme. The kinetic parameters K_m , V_{\max} and k_{cat} of rchiGR52-1 were 0.85 mg/mL, 0.19 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ and 7.02 s^{-1} , respectively. Substrate specificity analysis showed that rchiGR52-1 could catalyze chitin specifically. **[Conclusion]** Recombinant chitinase has good enzymatic properties which provide a theoretical foundation for chitinase applications.

Keywords: Chitinase, *Vibrio* sp., Cloning and expression, Characterization

几丁质(Chitin)是由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性多糖^[1]。几丁质是自然界中蕴藏量仅次于纤维素的有机物,主要存在于真菌细胞壁、虾壳、蟹壳、甲壳动物的外壳和肠道中,全世界每年能合成 100 亿 t 左右几丁质^[2-4]。几丁质物理性质稳定,难溶于水、碱、稀酸和一般有机溶剂,仅能溶于浓盐酸、磷酸等无机强酸中并伴随着严重的降解,因此很难被有效利用^[5]。随着海洋生物资源的不断开发利用和寡糖生理活性研究的深入,几丁质寡糖的应用价值逐渐被揭示。研究表明,几丁质降解产物及其衍生物具有调节人体 pH、增强免疫、降低血糖血脂、抗菌消炎、抑制肿瘤生长、改善土壤微生物、诱导植物抗病等生物活性^[6-14]。几丁质酶作为降解几丁质的工具酶,具有作用条件温和、高效、环保、酶解副反应少、产物安全性高等优点,将逐步取代传统的酸降解法^[15]。因此,几丁质酶的开发应用引起了国内外研究者的广泛关注。

几丁质酶来源广泛,在细菌、真菌、放线菌、病毒和动植物中均被发现^[2],目前研究最深入的是微生物几丁质酶。虽然产几丁质酶的微生物种类丰富,但应用到工业生产的菌株仅粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、链霉菌(*Streptomyces*)和木霉(*Trichoderma*)等少数几类微生物。目前已报道的产几丁质酶菌株酶活力普遍较低,同时几丁质酶对虾

壳、蟹壳、污水等废弃物中的金属离子比较敏感。不同来源的几丁质酶,其酶学性质有所差异,在分子量、最适反应 pH 和温度、金属离子的作用等方面也各不相同。本文采用基因工程方法克隆几丁质酶基因,构建重组工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*chiGR52-1*,诱导表达重组酶 rchiGR52-1 并进行分离纯化和酶学性质研究,以期为几丁质酶的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

弧菌 GR52 菌株从广西北海红树林底泥中筛选获得;基因克隆宿主菌 *Escherichia coli* Top10 为本实验室保存菌株;表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)购于 Novagen 有限公司;质粒 pET-22b(+)购自北京全式金(TRANS)有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

Pfu DNA polymerase, 北京全式金(TRANS)有限公司;质粒提取试剂盒,OMEGA 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白 Marker, Thermo Fisher Scientific 公司;IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside), Amresco 公司。

梯度热循环 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;凝胶成像仪,上海培清科技有限公司;电泳仪和电泳槽,日本 ATTO 公司;高压蒸汽灭菌锅,SHENAN

公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司。

LB 培养基参照文献[3]配制。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆

设计引物 *chiGR52-1-F* (5'-CATGGATCCGGCA CCTTCAGCTCCGTC AATCGATC-3') 和 *chiGR52-1-R* (5'-TCGAAGCTTAGGCGTCTGGCACTCGGC CG-3'), 以弧菌 GR52 菌株 DNA 为模板, PCR 扩增 *chiGR52-1* 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Pfu PCR Master 25 μ L, *chiGR52-1-F* (20 μ mol/L) 1.5 μ L, *chiGR52-1-R* (20 μ mol/L) 1.5 μ L, 基因组 DNA (20 ng/ μ L) 3 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 10 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳验证, 回收目的片段。

1.2.2 表达载体构建

将 *chiGR52-1* 基因和质粒 pET-22b(+) 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 回收的目的基因片段和酶切质粒用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pET-22b-*chiGR52-1*, 转化至感受态细胞 *Escherichia coli* Top10, 挑选阳性克隆子送至 Invitrogen 公司测序, 将序列正确的重组质粒转化至感受态细胞 *Escherichia coli* BL21(DE3)。

1.2.3 序列分析

采用 ExPASy 中 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测几丁质酶 *chiGR52-1* 基因的蛋白质分子量以及等电点等; 采用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质信号肽以及剪切位点, 为目的蛋白表达提供一定基础条件; 利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线对几丁质酶进行同源建模。

1.2.4 重组酶 rchiGR52-1 的诱导表达

将构建的大肠杆菌工程菌接种到 LB 液体培养

基(含 100 mg/L Amp)中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养。菌液 OD_{600} 达到 0.5–0.8 时, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 进行诱导, 以未添加 IPTG 诱导作为对照组。将菌液 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液并测定几丁质酶活力。

1.2.5 重组酶 rchiGR52-1 的酶活力检测

采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法测定还原糖含量^[16]。取 0.1 mL 酶液与 0.9 mL 的 0.5% 胶体几丁质底物, 于 50 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min 后, 加入 1.5 mL DNS 并煮沸 5 min 显色; 同时以灭活酶液组作为空白对照。6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 540 nm 测定吸光值, 根据 N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准曲线计算还原糖含量。酶活力单位定义为: 在该反应条件下, 1 min 催化底物产生 1 μ mol N-乙酰-D-氨基葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6 重组酶 rchiGR52-1 的分离纯化

利用中空纤维柱对诱导上清液进行初步浓缩; 通过 Ni-NTA 亲和层析对重组酶 rchiGR52-1 进行分离纯化, SDS-PAGE 检测纯度。

1.2.7 重组酶 rchiGR52-1 的比活力测定

采用考马斯亮蓝染色(Bradford)法测定纯化重组酶的蛋白含量^[17-18]; 在最适反应条件下测定重组酶活力, 计算比活力(酶活力/蛋白含量)。

1.2.8 重组酶 rchiGR52-1 的酶学性质研究

(1) 最适反应 pH 和 pH 稳定性研究: 在 50 $^{\circ}$ C 条件下, 分别测定在不同 pH 缓冲溶液配制的胶体几丁质底物中的重组酶 rchiGR52-1 酶活力, 以测得的最高酶活力值为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应 pH; 将重组酶 rchiGR52-1 置于不同 pH 缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 条件下保温 1 h, 在最适 pH 和温度下测定酶活力, 以未处理组的酶活力为 100% 计算各 pH 下几丁质酶的残余酶活百分比。

(2) 最适反应温度和热稳定性研究: 在最适 pH 条件下, 分别测定在不同温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C) 下的重组酶 rchiGR52-1 酶活力, 以测得的最高酶活力为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应温度; 将重组酶 rchiGR52-1 分别置于不同温度中保温不

同时间(2、5、8、15、30、45、60 min),并在最适 pH 和温度下测定酶活力,以未处理组的酶活力为 100%,计算各温度条件下几丁质酶的残余酶活百分比。

(3) 不同金属离子及化学试剂对酶活力的影响:在最适反应条件下,比较浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 16 种金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Ag^+ 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+})和 3 种化学试剂[EDTA (乙二胺四乙酸)、SDS (十二烷基硫酸钠)、 β -巯基乙醇]对重组酶 rchiGR52-1 酶活力的影响,以相同条件下未加金属离子和化学试剂的酶促反应为对照。

(4) 重组酶 rchiGR52-1 的 K_m 值和 V_{\max} 值测定:配制不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、5.0 g/L)的胶体几丁质底物,在最适反应条件下测定酶活力,重复 3 次,计算酶促反应速度,利用双倒数法求得 K_m 值和 V_{\max} 值^[19]。

(5) 酶底物特异性研究:分别配制 0.5% (质量体积比)的胶体几丁质、细粉几丁质、虾壳粉、壳聚糖、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)底物,在最适条件下测定重组酶 rchiGR52-1 酶活力,确定该重组酶对不同底物的作用特异性。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶全长基因调取及序列分析

以弧菌 GR52 菌株基因组 DNA 为模板,设计全长特异性引物进行 PCR 扩增得到一条 2 500 bp 左右的片段(图 1)。将该片段测序获得的序列利用 Vector NT I 进行分析,寻找开放阅读框,在 NCBI 数据库中进行蛋白序列比对,确认该序列为完整的几丁质酶全长基因,记为 *chiGR52-1*。

几丁质酶基因 *chiGR52-1* 全长 2 553 bp,编码 850 个氨基酸和 1 个终止密码子,经预测,等电点为 4.39,分子量为 87.22 kD。将核酸序列翻译成氨基酸序列,采用 NCBI 中的 BLASTp 功能,与数据库中的蛋白序列进行比对。在数据库中,最相似的蛋白是 Chitinase [*Vibrio fluvialis*] WP044365306.1 和 WP032080440.1,一致性均只有 80%,因此,

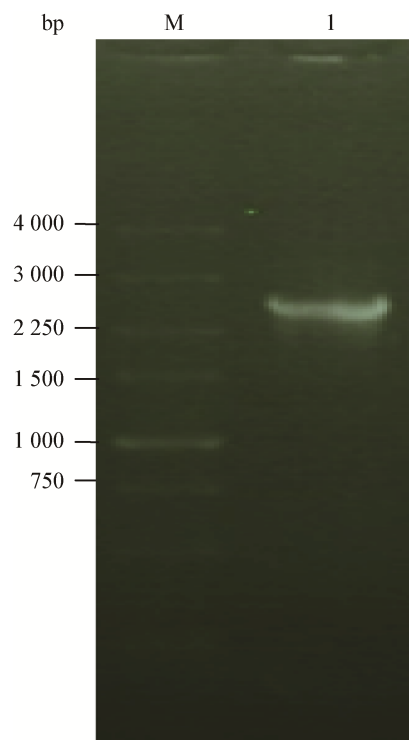


图 1 几丁质酶基因 *chiGR52-1* 的 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR products of chitinase gene *chiGR52-1*

注: M: 5 000 bp DNA Marker; 1: PCR 扩增产物。

Note: M: 5 000 bp DNA Marker; 1: PCR products.

chiGR52-1 蛋白是一个比较新颖的蛋白。SignalP4.1 在线预测结果表明该蛋白有强信号肽,信号肽切割位点在第 26 和 27 个氨基酸之间。SWISS-MODEL 在线对几丁质酶 *chiGR52-1* 进行同源建模,以 3arr.1 作为模型,对全长 850 个氨基酸的几丁质酶 *chiGR52-1* 第 27–593 个氨基酸进行结构模拟,得到一个蛋白质结构(图 2A),一致性为 79.79%。一般来说,当 2 个蛋白质序列一致性大于 50%,其结构上的相似性能够达到 90%;当 2 个蛋白质序列一致性低于 30%时,二者结构上的相似性就较低^[20]。通过 Saves 服务器(<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>)和 ProSA^[21](<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)对模拟的结构进行了多种参数的检验,ERRAT、ProSA、Verify-3D 值分别为 95.471、-11.04、99.82%,表明该蛋白结构是合理的。通过 Pymol 软件分析蛋白的静电势分布情况(图 2B),图中红色部分表示负电,蓝色部分表示正电。

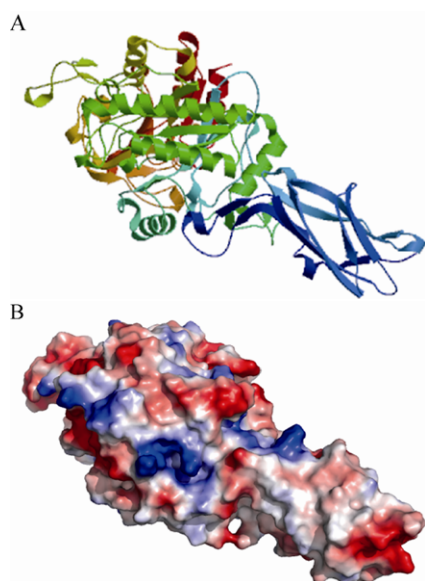


图2 几丁质酶 *chiGR52-1* 蛋白三维结构图(A)和表面电势图(B)

Figure 2 Three-dimensional structure (A) and surface (B) of *chiGR52-1*

2.2 重组酶 *rchiGR52-1* 的表达与纯化

重组工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*chiGR52-1* 经 IPTG 诱导分泌重组酶 *rchiGR52-1*。诱导结束后,离心收集上清液测定几丁质酶活力并进行 SDS-PAGE 检测(图 3)。结果发现经过 IPTG 诱导的发酵上清液在 90 kD 处出现一条明显的蛋白条带,与预测的理论分子量大小(87.22 kD)一致,说明重组几丁质酶基因 *chiGR52-1* 在大肠杆菌中诱导表达成功。

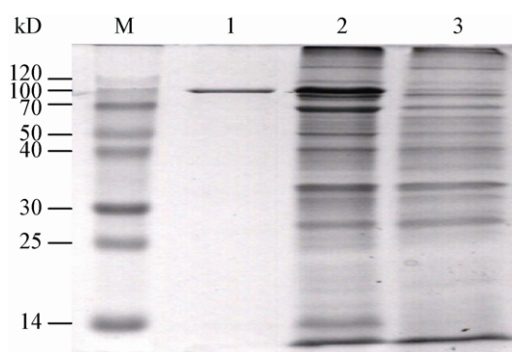


图3 SDS-PAGE 分析纯化重组酶 *rchiGR52-1*

Figure 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant *rchiGR52-1*

注: M: Protein marker; 1: 纯化重组酶; 2: 经 IPTG 诱导发酵上清液; 3: 未经 IPTG 诱导发酵上清液。

Note: M: Protein marker; 1: The purified *rchiGR52-1*; 2: Fermentation with IPTG; 3: Fermentation without IPTG.

将诱导和未经诱导的发酵上清液经过中空纤维柱初步浓缩、镍柱纯化后得到单一条带(图 3 泳道 1),表明重组酶 *rchiGR52-1* 已获得纯化。在最适反应条件下测定重组酶 *rchiGR52-1* 比活力为 4.33 U/mg。

2.3 重组酶 *rchiGR52-1* 的性质分析

2.3.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性

将 *rchiGR52-1* 置于不同 pH 缓冲液中测定酶活力,结果表明该重组酶的最适反应 pH 为 6.0;当 pH<3.0 或 pH>11.0 时,酶活力基本为 0 (图 4A)。将 *rchiGR52-1* 置于不同 pH 缓冲液中 37 °C 保温 1 h 并测定残余酶活力,结果表明该酶在 pH 5.0–10.0 范围内稳定性较好,能保持 86% 以上的相对酶活力;在 pH 低于 4.0 条件下该酶完全失活(图 4B)。

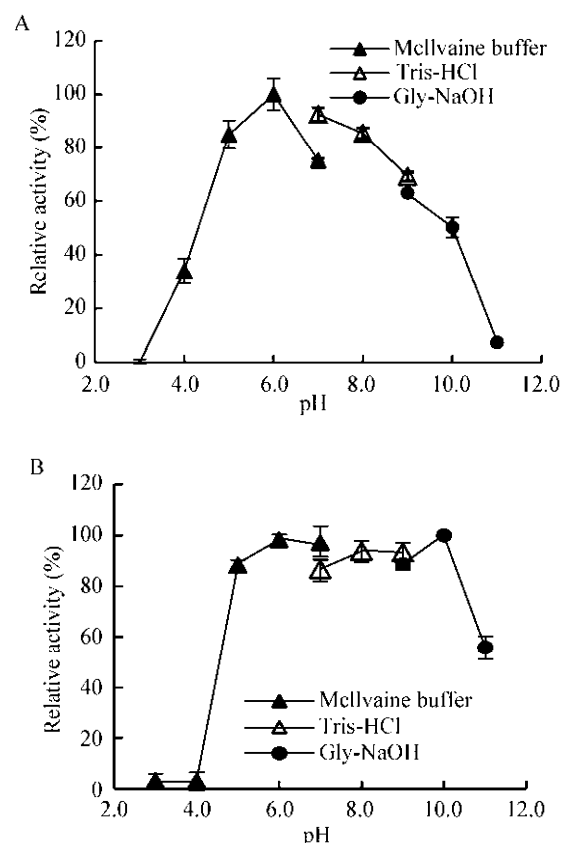


图4 重组酶 *rchiGR52-1* 最适反应 pH (A)和 pH 稳定性(B)

Figure 4 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of *rchiGR52-1*

2.3.2 最适反应温度和热稳定性

将 rchiGR52-1 置于不同温度中测定酶活力, 结果表明该重组酶的最适反应温度为 50 °C (图 5A)。将 rchiGR52-1 置于不同温度中保温 1 h 并在最适反应条件下测定残余酶活力, 结果表明该酶在 45 °C 以下稳定性较好, 在 50 °C 保温 1 h 能保持 60% 以上的相对酶活力, 超过 50 °C 酶快速失活(图 5B)。

2.3.3 不同金属离子及化学试剂对重组酶 rchiGR52-1 的影响

测定 16 种不同金属离子及化学试剂在 1 mmol/L

和 5 mmol/L 浓度下对重组酶 rchiGR52-1 酶活力的影响(表 1)。结果表明: 在 1 mmol/L 浓度下, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^+ 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、SDS 对该酶具有不同程度的抑制作用, 其中 Hg^{2+} 对该酶有强烈的抑制作用, 残余酶活只有 1.2%, Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对该酶则有 27.8% 和 31.5% 的促进作用; 在 5 mmol/L 浓度下, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^+ 、SDS、 Fe^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 对该酶有明显的抑制作用, 其中 Hg^{2+} 对该酶的抑制作用为 100%, Ni^{2+} 对该酶具有一定的促进作用, 其他离子和化学试剂对该酶没有明显的影响。

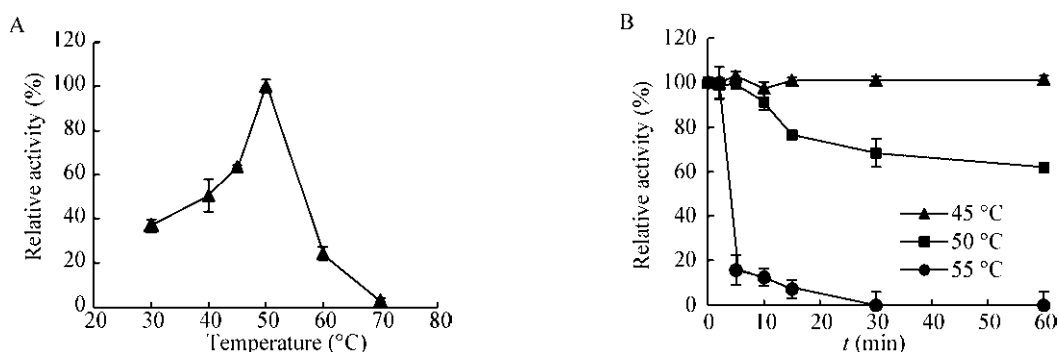


图 5 重组酶 rchiGR52-1 最适反应温度(A)和热稳定性(B)

Figure 5 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of rchiGR52-1

表 1 不同金属离子和化学试剂对重组酶 rchiGR52-1 酶活力的影响

Table 1 Effects of different factors on rchiGR52-1 activity

试剂 Additives	浓度 Concentration (mmol/L)	相对酶活 Relative activity (%)	浓度 Concentration (mmol/L)	相对酶活 Relative activity (%)
Control	—	100.0±0.0	—	100.0±0.0
Na^+	1	110.5±4.2	5	110.4±1.0
Mn^{2+}	1	76.7±2.8	5	56.8±5.1
Cu^{2+}	1	127.8±3.4	5	107.2±1.0
Ni^{2+}	1	100.8±1.0	5	124.7±3.4
Mg^{2+}	1	97.2±5.2	5	83.8±4.2
Gr^{3+}	1	102.7±2.8	5	104.8±0.2
Co^{2+}	1	83.5±1.0	5	62.3±3.4
Li^+	1	60.9±1.2	5	49.5±5.0
Ca^{2+}	1	131.5±2.7	5	111.8±2.2
Fe^{2+}	1	104.6±3.6	5	67.5±6.5
Fe^{3+}	1	110.4±6.8	5	102.3±7.6
Hg^{2+}	1	1.2±1.4	5	0.0±0.0
Ag^+	1	87.6±6.1	5	70.8±6.7
Zn^{2+}	1	93.1±4.5	5	88.2±4.6
K^+	1	95.5±4.6	5	94.8±4.0
Pb^{2+}	1	96.5±0.9	5	96.1±3.5
SDS	1	79.1±5.5	5	40.2±4.0
EDTA	1	93.7±4.5	5	84.7±4.7
β -巯基乙醇 β -Mercaptoethanol	1	103.1±4.2	5	95.6±1.4

Note: —: Without treatment.

2.3.4 酶促反应动力学参数测定

采用 Lineweaver-Burk 作图法, 测得重组酶 rchiGR52-1 的 V_{\max} 为 $0.19 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, K_m 为 0.85 mg/mL , k_{cat} 为 7.02 s^{-1} (表 2)。

2.3.5 重组酶 rchiGR52-1 的底物特异性

以 0.5% (质量体积比) 胶体几丁质、细粉几丁质、虾壳粉、壳聚糖、羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 为底物, 测定重组酶在不同底物下的酶活力, 以底物为胶体几丁质的酶活力为 100% 计算其他底物的相对酶活力。结果如表 3 所示, 重组酶 rchiGR52-1 对胶体几丁质有很高的酶活力, 对细粉几丁质只有 10.9% 的酶活力, 对虾壳粉有微弱的酶活力, 对壳聚糖和羧甲基纤维素钠没有酶活力。可见, 重组几丁质酶 rchiGR52-1 只能特异性地降解几丁质, 不能降解壳聚糖、纤维素等几丁质结构类似物。推测其底物作用方法与纤维素酶不同, 只能特异地与几丁质结合。

3 讨论与结论

以弧菌 GR52 基因组 DNA 为模板, 克隆几丁质

酶基因 *chiGR52-1* 全长, 构建工程菌——大肠杆菌 BL21(DE3)/pET22b(+)-*chiGR52-1* 进行诱导表达, 对重组酶 rchiGR52-1 进行分离纯化和酶学性质研究。

重组酶的最适反应 pH 为 6.0, 最适反应温度为 50°C , 在 pH 5.0–10.0、 45°C 以下稳定性较好; 低浓度 (1 mmol/L) 下 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶具有一定促进的作用, 而高浓度 (5 mmol/L) 下 Ni^{2+} 则具有促进作用; 在 1 mmol/L 和 5 mmol/L 浓度下, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^{+} 、 Hg^{+} 、 Ag^{+} 和 SDS 对该酶都具有抑制作用, 其中 Hg^{+} 对该酶的抑制作用为 100%。酶促反应参数 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} 分别为 0.85 mg/mL 、 $0.19 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 和 7.02 s^{-1} , 底物特异性分析表明该重组酶能特异性降解几丁质。吕梦圆等^[4]采用重组大肠杆菌表达几丁质酶 LICHI18A, 以胶体几丁质作为底物的催化动力学参数 K_m 、 V_{\max} 分别为 2.913 mg/mL 、 $2.836 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, k_{cat} 为 0.024 s^{-1} (表 2)。相比之下, 本文构建表达的重组几丁质酶 rchiGR52-1 具有较好的底物亲和力和较高的催化效率。

陶勇^[3]和 Konagaya 等^[22]的研究结果表明革兰氏阴性细菌来源几丁质酶的最适反应温度为 $35\text{--}45^\circ\text{C}$, 最适反应 pH 分别为 4.6 和 5.0, 在 pH 5.0–7.0 范围内较为稳定; 革兰氏阳性细菌来源几丁质酶的最适反应温度为 40°C , 最适反应 pH 为 5.0, 在 pH 5.0–8.0 范围内较为稳定。吕梦圆等^[4]研究表明, 重组几丁质酶在大肠杆菌中表达的最适反应温度和 pH 分别为 37°C 和 3.8, 在 35°C 以下热稳定性较好。Huo 等^[23]从 *Aeromonas veronii* B565 中克隆到一条产几丁质酶基因并成功表达, 重组酶的最适反应温度和 pH 分别为 40°C 和 6.0, 在 50°C 下保温 1 h 剩余酶活力仅为 20%, 在 pH 5.0–6.0 范围内稳定性较好。相比之下, 本文构建表达的重组几丁质酶 rchiGR52-1, 具有较高的最适反应温度 (50°C) 和良好的热稳定性 (在 50°C 下保温 1 h 仍能保持 60% 以上的相对酶活力), 并具有宽广的 pH 作用范围 (pH 5.0–10.0), 而且专一性强, 这可能与蛋白表面电势有关, 为拓宽几丁质酶的应用奠定了良

表 2 酶促反应动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of enzymatic reaction

几丁质酶 Chitinase	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$)	K_m (mg/mL)	K_{cat} (s^{-1})
rchiGR52-1	0.190	0.850	7.020
LICHI18A ^[4]	2.836	2.913	0.024

表 3 重组酶 rchiGR52-1 的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of rchiGR52-1

底物 Substrate	相对酶活力 Relative activity (%)
胶体几丁质 Colloidal chitin	100.0±2.6
细粉几丁质 Powdery chitin	10.9±0.2
虾壳粉 Shrimp shell meal	3.8±1.4
壳聚糖 Chitosan	No detected
羧甲基纤维素钠 CMC-Na	No detected

好的基础。Hao 等^[24]研究表明, 几丁质酶 CHI I 和 CHI II 蛋白结构稳定, 表面具有较多的碱性氨基酸, 可以吸收负电荷, 对其稳定性起到了重要的作用。

REFERENCES

- [1] Hao ZK, Cai YJ, Liao XR, et al. Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(1): 177-186
- [2] Wang ZW, Liu ZM. Advance in study and application on chitinase produced by microbes[J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(3): 439-442 (in Chinese)
王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 439-442
- [3] Tao Y. Identification of a chitinase-producing bacterial strain, characterization, gene cloning and expression of the chitinase[D]. Chengdu: Doctoral Dissertation of Sichuan University, 2006 (in Chinese)
陶勇. 一株产几丁质酶细菌的鉴定、酶的性质及其基因的克隆与表达[D]. 成都: 四川大学博士学位论文, 2006
- [4] Lv MY, Shi JX, Xia X, et al. Enzymatic properties of chitinase from recombinant *Escherichia coli* with different substrates and analysis of hydrolysates[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(3): 26-32 (in Chinese)
吕梦圆, 石佳仙, 夏祥, 等. 大肠杆菌表达几丁质酶对不同底物的酶学性质及其降解产物分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 26-32
- [5] Zhang YT. High-yield expression, characterization and application in aquaculture of two chitinolytic enzymes from an *Aeromonas veronii* strain B565[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese)
张宇婷. 来源于维氏气单胞菌 B565 的两个几丁质降解酶基因的高效表达、性质研究及水产养殖应用[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2012
- [6] Ubhayasekera W, Karlsson M. Bacterial and fungal chitinase *chiI* orthologs evolve under different selective constraints following horizontal gene transfer[J]. BMC Research Notes, 2012, 5: 581
- [7] Zhang HB, Liu MY, Tian YJ, et al. Comparative characterization of chitinases from silkworm (*Bombyx mori*) and bollworm (*Helicoverpa armigera*)[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2011, 61(2): 267-275
- [8] Langner T, Göhre V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions[J]. Current Genetics, 2016, 62(2): 243-254
- [9] Anuradha V, Revathi K. Antifungal potentiality of marine microbial chitinases isolated from crustacean shells[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2011, 5(1): 87-96
- [10] Zhang XB. Effects of chitosan oligosaccharide on the expression of IL-1 β and TNF- α in macrophages[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2002 (in Chinese)
张小边. 壳寡糖对巨噬细胞 IL-1 β 、TNF- α 基因表达的影响[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2002
- [11] Yang MD, Qu ZH, Li YR, et al. The application of chitin, chitosan and its derivatives in food industry[J]. Food Science, 2001, 1(5): 97-99 (in Chinese)
- [12] Song GM. Construction on chitinase produced by recombinant *Bacillus subtilis*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
宋光明. 产几丁质酶重组枯草芽孢杆菌的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008
- [13] Yao YP, Wang JM, Zhang ZG, et al. Role of N-acetyl-chito-oligosaccharides in plant diseases biological control of *Trichoderma* spp.[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 194-196 (in Chinese)
姚艳平, 王建明, 张作刚, 等. 几丁寡糖在木霉菌生物防治中的作用[J]. 山西农业科学, 2013, 41(2): 194-196
- [14] Lv MY, Lv YL, Xia X, et al. Expression and inclusion body renaturation of recombinant chitinase in *E. coli* and its enzymology properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 168-172 (in Chinese)
吕梦圆, 吕永玲, 夏祥, 等. 大肠杆菌重组几丁质酶的表达、包涵体复性及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 168-172
- [15] Li J, Zeng ZW, Ouyang SW. Characters, gene expression regulation and applications of microbial chitinases[J]. Microbiology, 2001, 28(4): 84-87 (in Chinese)
李君, 曾中文, 欧阳石文. 微生物几丁质酶的特性、基因表达调控及应用[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 84-87
- [16] Liu D, Cai J, Xie CC, et al. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3/4): 252-256
- [17] Li J, Zhang YT, Zeng W, et al. Determination of total protein content applications Coomassie brilliant blue[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2000, 13(2): 118-120 (in Chinese)
李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [19] Dixon M, Webb EC. Enzymes[M]. 3rd ed. New York: Academic Press, 1979
- [20] Spezio M, Wilson DB, Karplus PA. Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase[J]. Biochemistry, 1993, 32(38): 9906-9916
- [21] Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1993, 17(4): 355-362
- [22] Konagaya Y, Tsuchiya C, Sugita H. Purification and characterization of chitinases from *Clostridium* sp. E-16 isolated from the intestinal tract of the South American sea lion (*Otaria flavescens*)[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(2): 187-193
- [23] Huo FM, Ran C, Yang YL, et al. Gene cloning, expression and characterization of an exo-chitinase with high β -glucanase activity from *Aeromonas veronii* B565[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(5): 787-803
- [24] Hao ZK, Wu HG, Yang ML, et al. Cloning, expression and 3D structure prediction of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 825