

水稻几丁质酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化与活性分析

陈爱葵¹, 俞陆军², 樊剑鸣², 冯冬茹², 王金发²

¹ 广东教育学院生物系, 广州, 510303

² 中山大学生命科学学院, 广州, 510275

摘要: 将克隆并确定序列的水稻(*Oryza sativa* L. Cpslo17)几丁质酶基因 *Oschi* 的 cDNA 序列(此序列已在 GenBank 中注册, 登录号为 EU045451)插入原核表达载体 pGEX-4T-1 中。经酶切、序列鉴定分析后, 用该重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3); 经 IPTG 诱导获得表达, 并对 *Oschi* 蛋白表达条件进行了优化; 在大肠杆菌中表达的几丁质酶经纯化后在一定的浓度、一定的反应时间内能高效地分解几丁质。

关键词: 水稻, 几丁质酶, 基因, pGEX-4T-1

The Expression, Purification and Activity Analysis of the Rice Chitinase Gene in *Escherichia coli*

Aikui Chen¹, Lujun Yu², Jianming Fan², Dongru Feng², and Jinfa Wang²

¹ Biology Department, Guangdong Institute of Education, Guangzhou 510303, China

² School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: The cloned cDNA sequence of rice (*Oryza sativa* L. Cpslo17) chitinase gene *Oschi* was cloned, (which was registered in GenBank, the accession number: EU045451) ligated with the expression vector pGEX-4T-1, and transformed into *E.coli* BL21(DE3). The expression of *Oschi* was induced by IPTG, and the conditions were optimized. After purification the *in vitro* activity of *Oschi* chitinase was analyzed, and the results indicated that it could efficiently degrade chitin.

Keywords: rice, chitinase, gene, pGEX-4T-1

几丁质酶(chitinase)是一种能降解几丁质的糖苷酶, 是植物体中与防御有关的一种次生水解酶, 它能催化真菌细胞壁的重要成分——几丁质的水解, 从而抑制真菌的生长增殖, 提高植物的抗真菌能力。高等植物本身不含几丁质, 但当植物受到真菌、细菌和病毒感染时, 几丁质酶活性迅速提高^[1]。因此, 几丁质酶被认为与植物对病原真菌的抗性有关, 几丁质酶在植物体中诱导与积累, 对于增强植物的抗

病能力有重要作用。在健康的植物中几丁质酶活性很低, 但一些因素的诱导能使其活性迅速增强。例如病原体入侵、重金属、盐溶液、机械损伤、植物激素等都能诱导植物几丁质酶的表达^[2]。

大量研究证明, 提纯的几丁质酶能够抑制 20 多种病原和非病原的真菌菌丝生长与孢子萌发, 刺激宿主植物的抗病反应, 特别是在 β -1,3 葡聚糖酶的协同作用下, 可明显抑制真菌的生长^[3]。由于几丁质酶

Received: June 11, 2007; Accepted: July 31, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30571069).

Corresponding author: Jinfa Wang. +86-20-84039179; Fax: +86-20-84039179; E-mail: lsswjf@mail.sysu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 30571069)。

对病原真菌生长有明显的抑制作用, 所以人们希望通过生物技术手段, 将几丁质酶基因导入植物体中, 使其具有较高的抗真菌病害的能力^[4]。Schlumbaum等^[5]报道纯化的蚕豆几丁质酶能高度抑制绿色木霉的生长, 其有效浓度和病原菌感染或乙烯处理后的蚕豆叶片抽提液中的酶浓度相似。而这种蚕豆叶片抽提液的抗真菌活力几乎可被蚕豆几丁质酶的抗血清完全抑制, 充分说明了几丁质酶是抽提液中抑制菌丝生长的主要成分。

本研究以中山大学生命科学学院遗传实验室克隆大蕉时设计的一对引物, 以 RT-PCR 方法成功从中国水稻(*Oryza sativa* L. Cpslo17)叶片中克隆得到几丁质酶基因 *Oschi* 的 cDNA 序列, 将该基因在大肠杆菌 BL21 中进行了表达和纯化, 并分析了 *Oschi* 蛋白的几丁质酶活性。为进一步研究水稻几丁质酶在抗病性中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻(*Oryza sativa* L. Cpslo17)为中山大学生命科学学院遗传实验室种植保存; 菌种 *E. coli* DH5 α 及 BL21 为实验室保存, 重组质粒 pMD18-T-*Oschi* 为作者在中山大学生命科学学院遗传实验室构建。

PCR 所用试剂为 TaKaRa Biotechnology 公司(大连)产品, DNA 胶回收试剂盒、胶纯化试剂盒为 Sangon 公司产品, pGEX-4T-1 载体系统和 4B 亲和层析柱为 Pharmacia 公司产品, 连接所用酶为 Fermentas 公司的 T4 DNA Ligase, DU-530 蛋白核酸分析仪是 Beckman 公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 克隆水稻几丁质酶基因 *Oschi* 及构建 pGEX-4T-1-*Oschi* 重组质粒

以 pMD18-T-*Oschi* 重组质粒为模板, 设计特异性引物 *OschipGEX F* 和 *OschipGEX R*, 引物两端分别加 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点, 扩增水稻几丁质酶基因 *Oschi*, 引物序列为:

OschipGEX F 5'-GCGGAATTCATGAGAGCGC TCGCTGTGGTGG-3'

OschipGEX R 5'-ATAGTCGACTGGAGCCGAA GGGCCTCTGGC-3'

将 *Oschi* 亚克隆到 pGEX-4T-1 质粒, 连接反应于 16℃ 过夜。

1.2.2 pGEX-4T-1-*Oschi* 重组质粒转化 *E. coli* BL21

将 pGEX-4T-1-*Oschi* 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 提取 pGEX-4T-1-*Oschi* / DH5 α 阳性菌株质粒, 用于测序。用测序正确的质粒转化 *E. coli* BL21, 筛选阳性克隆。

1.2.3 pGEX-4T-1-*Oschi*/BL21 菌株的诱导表达条件的优化

以加入 IPTG 进行诱导时的起始菌体密度和加入 IPTG 的作用浓度及作用时间为变量, 为得到较优的诱导条件, 采用正交方法进行, 即起始菌体密度(OD_{600})为 0.40、0.60、0.80 三个梯度, IPTG 浓度为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 mmol/L 五个梯度, 诱导培养时间为 1、1.5、2、2.5、3 h 五个梯度。经 SDS-PAGE 和光密度扫描检测后, 确定合适的起始菌体密度和 IPTG 浓度及作用时间。

1.2.4 重组蛋白 *Oschi* 的纯化

将经超声破碎处理的液体于 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清每 1 mL, 加 20 μ L 的 50% 的 Glutathione Sepharose 4B, 混匀, 室温放置 5 min, 期间偶尔摇动; 加入 100 μ L 的 1 \times PBS, 混匀, 离心 5 s 以沉淀, 去上清; 重复洗涤 3 次; 加 10 μ L 的谷胱甘肽洗脱液, 重悬, 室温放置 5 min; 500 rcf 离心 5 min, 取上清, 电泳。12 % SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 几丁质酶活测定

吸取酶液 0.5 mL, 加入 0.1 mL 的 NaN_3 (叠氮化钠), 再加入 0.5 mL 的几丁质悬浮液, 37℃ 保温 3 h 后, 加热至 100℃ 5 min 终止反应。在 $A_{544\text{nm}}$ 下测定光密度。在 10 000 r/min 下离心 10 min。去除多余的几丁质, 取上清再测 OD_{544} 值, 得二次测定之差 ΔOD_{544} 值。在 OD_{595} 下测得蛋白质含量, 根据下式算出酶的活力^[6]。

酶活力 = $\Delta OD_{544} / OD_{595} \times (\text{nkatal} \cdot \text{g}^{-1})$

1.2.6 纯化的几丁质酶分解几丁质的能力

在 0.5 mL 的离心管里加入 50 μ L 几丁质, 100 μ L 100 μ mol/L 醋酸钠(pH5.0), 50 μ L 的蛋白样品, 37℃ 水浴 2.5 h 后加入 50 μ L 0.3 N 盐酸以沉淀未分解的几丁质, 放在冰上 10 min 以终止反应, 4℃, 1500 g 离心 10 min 后取 200 μ L 上清测定 A_{550} 的值, 对照为不加酶的反应液。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pGEX-4T-1-*Oschi* 的构建和筛选用特异性引物 *OschipGEX F* / *OschipGEX R* 扩

增的水稻几丁质酶基因 *Oschi* 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见在 1000 bp 附近的扩增产物(图 1)。

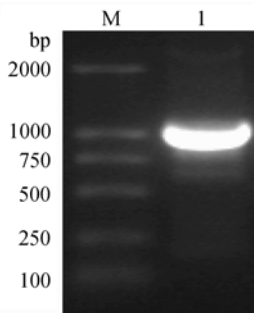


图 1 *Oschi* 基因的扩增结果

Fig. 1 Result of *Oschi* amplification

M: DNA marker DL2000; 1: result of *Oschi* amplification

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切, 连接到 pGEX-4T-1 载体上, 经测序验证结果正确。转化 *E. coli* BL21 细胞, PCR 筛选阳性克隆(图 2)。

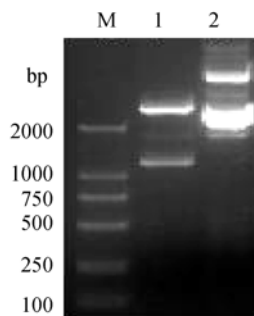


图 2 pGEX-4T-1/*Oschi* 重组质粒酶切鉴定

Fig.2 Digestion result of recombinant pGEX-4T-1/*Oschi*

M: DNA marker DL2000; 1: digested by *EcoR* I and *Sal* I

2: recombinant pGEX-4T-1/*Oschi*

2.2 pGEX-4T-1-*Oschi* 重组质粒的诱导表达及优化条件分析

以重组质粒 pGEX-4T-1-*Oschi* 为表达载体, 对其在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中的表达条件进行分析。对诱导条件的起始菌体密度(菌液的光密度值)和加入 IPTG 的作用浓度和作用时间进行优化实验分析(图 3~5):

结果显示, 随着起始菌体密度(OD_{600})的增大, 其诱导表达的蛋白量也逐渐增大, 当 OD_{600} 增至 0.80 时, 诱导表达的蛋白量为最大(见图 3); 对不同的起始菌体密度而言, 诱导表达的蛋白量随着 IPTG 的浓度增加而逐渐增加, IPTG 的浓度增至 1.0 mmol/L 时(见图 4), 诱导表达的蛋白量已达最大, 当继续增大 IPTG 的浓度时, 诱导表达的蛋白量却不再增加, 这与高浓度 IPTG 对细菌的生长有一定的

抑制作用相符合^[7]; 在 OD_{600} 为 0.8, IPTG 为 1.0 mmol/L 时, 随诱导表达的时间增加, 蛋白表达量也增加, 当诱导时间达 2.5 h 时蛋白表达量已达最大(图 5)。通过试验, 得到了优化的起始菌体密度和 IPTG 工作浓度及作用时间, 即 OD_{600} : 0.8; IPTG 浓度: 1.0 mmol/L; 诱导时间: 2.5 h。在优化的诱导条件下, 诱导表达了一个 33.5 kD 的目的蛋白。

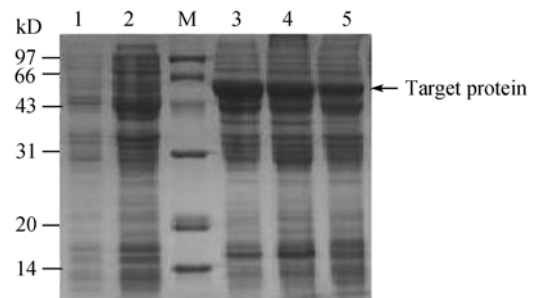


图 3 诱导条件的优化分析——起始菌液密度

Fig 3 Inducing condition analysis—optical density gradient

M: marker; 1: nonrecombinant; 2: uninduced uninduced sample; 3~5: total protein after induced for 3h under OD_{600} 0.8, 0.6, 0.4 by 1.0 mmol/L IPTG

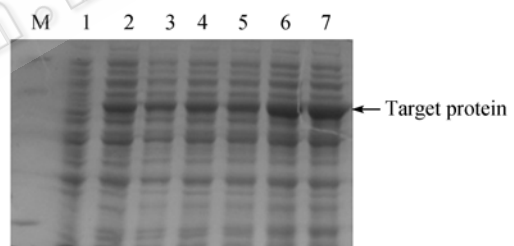


图 4 诱导条件的优化实验分析——IPTG 浓度

Fig.4 Inducing condition analysis—IPTG concentration gradient

M: marker; 1: uninduced sample; 2: total protein of BL21 (DE3); 3~7: protein of pGEX-4T-1-*Oschi*/BL21(DE3) after induced with 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG under OD_{600} /0.80

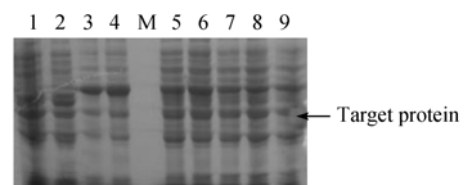


图 5 诱导条件的优化实验分析——诱导时间梯度

Fig 5 Inducing condition analysis—induced time gradient

M: marker; 1: uninduced sample; 2: nonrecombinant; 3, 4: total protein of BL21 (DE3); 5~9: protein of pGEX-4T-1-*Oschi*/BL21(DE3) after induced with 1.0 mmol/L IPTG under OD_{600} /0.80 for 3, 2.5, 2, 1.5, 1 h, respectively

2.3 GST/Oschi 融合蛋白的纯化

SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示, 经过谷胱甘肽琼脂糖亲和纯化, GST/Oschi 融合蛋白被成功地纯化, 无杂带。按照 1.2.6 几丁质酶活性测定方法测得水稻几丁质酶在 37 °C, pH5.0 时的比活力为 0.37 $A_{544}/\mu\text{g}/\text{h}$ 。纯化的蛋白电泳图见图 6。

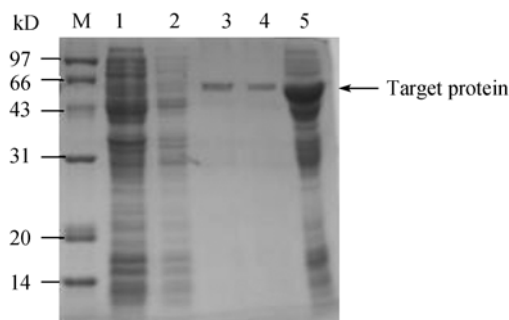


图 6 纯化 GST/Oschi 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig 6 SDS-PAGE analysis of the purified GST/Oschi protein
M: marker; 1: control of not induced;
2: control of vacant plasmid; 3, 4: purified protein;
5: induced unpurified protein

2.4 几丁质酶的活性测定

纯化的水稻几丁质酶具有分解几丁质的能力。用水解胶体几丁质的方法测定纯化的水稻几丁质酶在 37 °C, pH5.0 时的酶活力为 0.36 $\Delta A_{544}/\mu\text{g}/\text{h}$ 。把纯化的水稻几丁质酶(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在 37 °C, pH5.0 的醋酸钠缓冲液中和不同浓度的底物(胶体几丁质)反应 2.5 h 后进行活力测定, 可以看出当底物浓度在胶体几丁质为 2%~5%之间时, 几丁质酶分解底物的能力逐渐增加, 大于 5%时反而快速降低(图 7)。

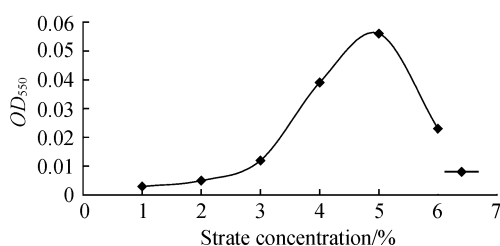


图 7 纯化的水稻几丁质酶在不同底物浓度时分解几丁质的能力

Fig.7 *In vitro* activity of the purified chitinase digesting chitin at different concentrations

3 讨论

自 Schlumbaum 等证明了纯化的蚕豆几丁质酶能高度抑制绿色木霉的生长以来, 已报道了许多从

植物如烟草、马铃薯、黄瓜、菜豆, 豌豆、甜菜、水稻、大麦、小麦、玉米等中提取纯化的几丁质酶, 对立枯丝核菌等 20 多种病原真菌表现出明显的抑菌活性。大量研究证明, 提纯的几丁质酶主要是通过水解真菌的菌丝生长点来抑制真菌生长^[5]。2005 年朱新霞等人构建了小拟南芥 chitinase 基因原核表达载体 pET30a, 转化表达受体菌 *E. coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后表达出一个分子量约为 40 kD 的蛋白^[9]; 植物几丁质酶的原核表达已有很多报道, 如 2003 年李和平等将小麦几丁质酶基因 *Wch2* 克隆到细菌表达载体 pET22b, 在细菌中表达的重组 *Wch2* 具有几丁质酶活性^[8]; 2007 年曲敏等将菜豆几丁质酶基因 *Bchi* 进行原核表达, 以 pQE-30 为原核表达载体, 构建成 pQE-*Bchi* 重组表达载体, 转化表达受体菌 *E. coli* iM15, 经 IPTG 诱导后表达出一个约 35 kD 的蛋白^[10]; 甘德芳等人构建了大白菜几丁质酶 *CHB4* 的原核表达载体 pET-*CHB4*, 并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)得到表达^[11], 在表达过程中出现了包涵体。

本研究以中山大学生命科学学院遗传实验室克隆大蕉时设计的一对引物, 以 RT-PCR 方法成功克隆了水稻几丁质酶基因(*Oschi*), 该基因的核苷酸序列及氨基酸序列已提交 GenBank, 登陆号为 EU045451。将 *Oschi* 插入 pGEX-4T-1, 并转化 *E. coli* BL21, 在体外成功表达了 *Oschi*, 通过实验测定结果, 纯化的 *Oschi* 酶在底物(胶体几丁质)浓度为 2%~5%之间其分解能力逐渐增加。说明该基因与以上报道的植物几丁质酶基因相同, 都有分解几丁质的能力, 只是所用的原核表达载体及受体菌不同, 所表达的几丁质酶蛋白分子量等特性也有不同。以上的研究都说明几丁质酶降解真菌的细胞壁可能在抗植物真菌病害反应中具有重要作用。这些结果说明, 是 *Oschi* 参与水稻真菌反应的重要防卫基因之一。但在水稻抗真菌互作中, 还有哪些其它防卫相关基因同步激活表达, 还需要进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Linthorst HM. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1991, **10**: 123-150.
- [2] Lin W, Aunratha CS, Datta K, *et al.* Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnology*, 1995, **13**: 686-691.
- [3] Mauch F, Hadwiger LA, *et al.* Antifungal hydrolases in

- pea tissue II. *Plant Physiol*, 1988, **88**: 936.
- [4] Jongedijk E, Tiglaar H, Roekel J, *et al.* Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 1995, **85**(1-3): 173-178.
- [5] Schlumbaum A, Mauch M, Vogel U. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 1986, **25**: 324-367.
- [6] Guthrie JL, Khalif S, Castle AJ. An improved method for detection and quantification of chitinase activities. *Can J Microbiol*. 2005, **51**: 491-495.
- [7] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione Stransferase. *Gene*, 1988, **67**: 31-40.
- [8] Li HP, Zhong YW, Zhao CS, *et al.* Cloning and expression analysis of a wheat chitinase gene *Wch2*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, **29**(4): 347-352.
李和平, 钟永旺, 赵纯森, 等. 小麦几丁质酶基因 *Wch2* 的克隆与表达分析. 植物生理与分子生物学学报, 2003, **29**(4): 347-352.
- [9] Zhu XX, Tian LP, Gao JF, *et al.* Construction of prokaryotic expression vector of *Arabidopsis pumila* chitinase and its expression in *Escherichia coli*. *Bulletin of Botanical Research*, 2005, **25**(4): 419-422.
朱新霞, 田丽萍, 高剑峰, 等. 拟南芥 chitinase 基因原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达. 植物研究, 2005, **25**(4): 419-422.
- [10] Qu M, Wang QW, Li XL. Cloning sequencing and expression of chitinase gene from Kidney Bean. *Soybean Science*(), 2007, **26**(2): 121-126.
曲敏, 王全伟, 李新玲, 等. 菜豆几丁质酶基因的克隆、序列分析及其表达. 大豆科学, 2007, **26**(2): 121-126.
- [11] Gan Df, Zhu SW, Fan J, *et al.* Expression analysis on encoding chitinase *CHB4* gene of Chinese Cabbage. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, **16**(2): 216-221.
甘德芳, 朱苏文, 范军, 等. 大白菜几丁质酶 *CHB4* 基因的表达研究. 激光生物学报, 2007, **16**(2): 216-221.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

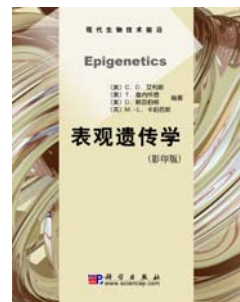
表观遗传学(影印版)

(美)C. D. 艾利斯 (奥)T. 詹内怀恩 (美)D. 赖因伯格 (英)M.L. 卡珀若斯 编著
978-7-03-020774-6 ¥96.00(含光盘) 2008年1月11日出版

表观遗传学是研究非 DNA 序列变化的、可遗传的表达改变的科学, 表观遗传学机制参与个体发育、成体的许多生物学进程中基因表达的调节, 这一过程的异常可导致人类癌症和其他疾病的发生。本书是基础研究专著, 24 章均由知名专家撰写, 分别从不同角度探讨表观遗传学问题。首先介绍表观遗传学简史、基本概念; 然后详细阐释表观遗传调节的分子机制及与之相关的细胞生物学过程; 介绍了组氨酸和 DNA 甲基化, siRNA 和基因沉默, X 染色体失活, 剂量补偿和印记, 以及微生物、植物、昆虫和哺乳动物中的表观遗传机制; 还讨论了细胞分裂和分化中的表观遗传作用, 以及这些途径中发生的错误对癌症和人类肿瘤的影响; 此外, 也阐述了表观遗传在动物克隆中可能发生的影响。

本书可供发育生物学、细胞生物学、遗传学、基因组学、神经生物学和分子生物学等生命科学相关领域的教学研究人员, 以及本科生、研究生参考。

原著正文内彩图集中列于书中所附光盘。



生物活性炭水质净化理论和技术

刘红 谢倍珍 李安婕 等著
978-7-03-020200-0 / Q.1963 ¥38.00 2008年1月4日出版

本书对作者在生物活性炭水处理研究领域近十年所取得的理论和技术成果进行了系统的介绍, 主要包括生物活性炭的机制、生物活性炭流化床处理采油废水技术、生物活性炭深度处理回用水技术, 以及生物活性炭处理微污染水源水技术的研究。

本书可供给排水、环境工程专业的科研设计人员及大专院校相关专业的师生参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目