

## 一种几丁质酶基因的克隆表达及酶解产物分析

肖景惠 李美玉 孙淼 王晓辉\*

(大连大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622)

**摘要:**【目的】克隆耐冷菌假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. DL-6)的几丁质酶基因并进行原核表达,纯化重组蛋白并研究其酶解产物。【方法】采用 PCR 扩增法从 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 中克隆几丁质酶基因(*chiA*), 连接到表达载体 pET28a, 导入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行诱导表达。SDS-PAGE 检测几丁质酶 ChiA 的分子量与纯度, 4-甲基伞形酮荧光底物 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> 测定酶活, 电喷雾质谱(ESI-MS)检测酶解产物。【结果】*chiA* 基因(GenBank 登录号 KF234015)在大肠杆菌中高效表达, Ni-NTA 亲和层析柱纯化几丁质酶 ChiA 的总活力可达 168.68 U。ESI-MS 检测结果表明重组蛋白酶解 1%胶体几丁质的产物为几丁寡糖。【结论】利用内切几丁质酶 ChiA 水解几丁质生产几丁寡糖, 为其在食品、医药和农业等领域的潜在应用提供有利参考。

**关键词:** 几丁质酶, 基因克隆, 原核表达, 纯化, 几丁寡糖

## Cloning and Expression of a Novel Chitinase Gene and the Analysis of Its Hydrolysis Products

XIAO Jing-Hui LI Mei-Yu SUN Miao WANG Xiao-Hui\*

(College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

**Abstract:** [Objective] A novel chitinase gene was cloned from the genomic DNA of psychrophilic bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant protein was purified and the enzymatic hydrolysates were analyzed. [Methods] The chitinase gene, *chiA*, was amplified from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 by using a PCR protocol, linked to pET28a, and finally expressed in *E. coli* BL21(DE3). The molecular weight and purity were determined by SDS-PAGE, and enzymatic activity was detected by 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobioside (4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>). The hydrolysis products were identified by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). [Results] The *chiA* (GenBank: KF234015) was efficiently expressed in *E. coli* BL21(DE3), and the total activity of purified ChiA was 168.68 U using Ni-NTA resin. ESI-MS analysis showed that the hydrolysis

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31500039); Students Innovation and Entrepreneurship Training Program of Liaoning Province (No. 201511258003)

\*Corresponding author: E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

**Received:** October 31, 2015; **Accepted:** February 23, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 08, 2016

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31500039); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目(No. 201511258003)

\*通讯作者: E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

**收稿日期:** 2015-10-31; **接受日期:** 2016-02-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-08

products of 1% colloidal chitin after ChiA digestion consisted of a series of chitin oligomers. **[Conclusion]** The research provided a reference for endo-type ChiA used in the food, pharmaceutical and agricultural industry.

**Keywords:** Chitinase, Gene cloning, Prokaryotic expression, Purification, Chitooligosaccharides

几丁质(Chitin), 俗称甲壳素, 是一种可从虾蟹壳等废弃物中提取的天然多糖, 其结构为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(约 50%–100%)和少量 D-氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4-糖苷键(约 0–50%)连接而成, 自然界中每年由生物体合成的甲壳素为  $10^{11}$  t<sup>[1]</sup>, 是海洋环境中含量最丰富, 自然界中仅次于纤维素的第二大可再生的生物质来源<sup>[2]</sup>。几丁质酶(Chitinase, Chi, EC3.2.1.14)可降解几丁质制备高附加值几丁寡糖, 几丁寡糖具有良好的生物相容性、生物降解性, 而且还表现出调节免疫力、抗菌、抗肿瘤、诱导植物抗病性和促进植物生长等生物活性, 可广泛应用于医药工业、食品工业、农业和养殖业等众多领域<sup>[3-4]</sup>。

CAZy 数据库 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)基于氨基酸序列保守性, 将几丁质酶归为糖苷水解酶(Glycosyl hydrolases, GH)第 18、19、23 和 48 家族。18 家族的几丁质酶广泛存在于细菌、古生菌、病毒到高等生物如植物、昆虫及哺乳动物体内, 具有相同的催化机理以及水解  $\beta$ -1,4-糖苷键连接的几丁质多聚物的酶学活性<sup>[5]</sup>。但不同生物中的几丁质酶发挥不同的生理功能和生态作用, 导致几丁质酶的酶学性质会存在一定的差异。本研究几丁质酶来自于海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 (CGMCC No. 8580), 本实验室早期研究报道<sup>[6-7]</sup>菌株 DL-6 为典型的耐冷菌, 至少产生并向胞外分泌 3 种以上不同分子质量

的几丁质酶。截止目前, 国内外仅有 10 多种海洋几丁质酶系基因被克隆、测序及初步的生化性质表征<sup>[8-12]</sup>, 仅解析了 1 种来源于海洋细菌 *Moritella marina* 的 MmChi60 的结晶结构<sup>[13]</sup>。本研究拟克隆 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 的几丁质酶基因 *chiA*, 构建其 pET 系列的原核表达载体, 表达纯化该重组蛋白, 并对其酶解产物进行解析, 为今后工业化制备几丁寡糖奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及培养基:** 假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp. DL-6)菌株由本实验室分离并保存; 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli* Top10)和 *E. coli* BL21(DE3)为本实验室保存, 分别为基因克隆和表达宿主菌。LB (Luria-Bertani)液体培养基(g/L)<sup>[14]</sup>: 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, pH 7.2。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基的基础上, 琼脂粉含量为 1.5%。培养基在用之前  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.1.2 载体:** 质粒 pMDI9-T 用作克隆载体, pET28a 用作表达载体; 引物合成和基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

**1.1.3 引物:** 如表 1 所示。

### 1.2 主要试剂和仪器

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、TaKaRa

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequence (5'→3')      | 用途<br>Use  |
|---------------------|--------------------------------------|--|
| <i>chiA</i> -F      | ATGAGCTCACGKAAAATAATAAMAAATGCC       | 正向引物, 扩增全长目的基因的保守片段                              |
| <i>chiA</i> -R      | TTACAGGCTACAACCTTAARSTCCAATC         | 反向引物, 扩增全长目的基因的保守片段                              |
| <i>chiA</i> F       | CCCGGATCCGTCAACTGATTGCAGTACATTAACG   | 去除信号肽, 克隆 <i>chiA</i> 的正向引物, 加 <i>Bam</i> H I 位点 |
| <i>chiA</i> R       | CCGCTCGAGCAGGCTACAACCTTAAAGTCCAATCTG | 去除终止密码子, 克隆 <i>chiA</i> 的反向引物, 加 <i>Xho</i> I 位点 |

LA $Taq$ <sup>TM</sup> DNA polymerase、pMD<sup>TM</sup>19-T vector cloning kit 等购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA marker 购自上海玉博生物科技有限公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Ni-NTA His-Bind Resins 购自美国 Novagen 公司;其它生化试剂和抗生素均为进口或国产生化或分析纯级试剂。SDS-PAGE 电泳仪 Power Pac 300 购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司;Hybaid PCR 仪购自上海普迪生物技术有限公司;荧光分光光度计购自美国 Molecular Devices 公司;电喷雾质谱仪 (ESI-MS)购自美国 Bruker Daltonics 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 *chiA* 基因的克隆与转化:** NCBI 数据库检索同属的几丁质酶基因序列, 结果发现基因组测序的假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas undina* NCIMB 2128、*Pseudoalteromonas citrea* NCIMB 1889、*Pseudoalteromonas* sp. SM 9913 和 *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570 的基因组中存在假定的几丁质酶 A 基因, 序列比对后设计简并引物 *chiA*-F/*chiA*-R (表 1)。

按照 TaKaRa 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 的基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 体系: dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 8.0  $\mu$ L, 10 $\times$ LA $Taq$  buffer II (Mg<sup>2+</sup> plus) 5.0  $\mu$ L, LA $Taq$ <sup>TM</sup> DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 引物 *chiA*-F/*chiA*-R (10  $\mu$ mol/L)各 2.0  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 补加超纯水至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增的目的片段连接至 pMD19-T 载体, 并将其转化至 *E. coli* Top10, 通过含有 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的选择平板对重组子进行筛选。通过质粒提取试剂盒提取重组质粒, 由生工生物工程(上海)股份有限公司测序后, 基因序列提交至 GenBank 数据库。

采用 Vector NTI Suite 软件进行开放阅读框 (Open reading frames, ORF)分析。通过 NCBI (National Center for Biotechnology Information,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)完成序列的同源分析。采用 SignalP 4.1 进行信号肽预测。采用在线的 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行序列结构域分析。采用 Vector NTI Suite 软件的 AlignX 程序进行氨基酸序列的多重比对。

**1.3.2 重组几丁质酶的表达与纯化:** 以重组质粒 pMD19-T-*chiA* 为模板, 通过正向引物 *chiA*F 和反向引物 *chiA*R 使用 TaKaRa LA $Taq$ <sup>TM</sup> DNA polymerase 扩增得到不含信号肽的低温几丁质酶基因序列。将该 DNA 序列连接到 pMD19-T 载体, 构建 pMD19-T-*chiA* 质粒转化至 *E. coli* Top10, 得到阳性转化子。用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 将 *chiA* 基因片段从 pMD19-T-*chiA* 上切下, 连接到 pET-28a 表达载体上, 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 通过菌落 PCR、酶切筛选鉴定阳性克隆子, 命名为 pET28a-*chiA*。

将重组 *E. coli* BL21(DE3)以 1%接种量接入含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基<sup>[14]</sup>中, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。当 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 左右, 以 0.2 mmol/L IPTG 16  $^{\circ}$ C、100 r/min 诱导 6 h。诱导表达结束后, 4  $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 洗涤菌体并用缓冲液重悬菌体, 冰上进行超声破壁。收集上清液, 即为粗蛋白。采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化几丁质酶。所有纯化步骤在 4  $^{\circ}$ C 下进行。

**1.3.3 SDS-PAGE 电泳:** SDS-PAGE 电泳采用浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白带。

**1.3.4 几丁质酶的酶活测定<sup>[15]</sup>:** 利用 4-甲基伞形酮荧光底物 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> 进行酶活测定, 酶活测定体系: 175  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 20  $\mu$ L 1 mmol/L 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>, 5  $\mu$ L 酶液, 将反应体系在 20  $^{\circ}$ C 温育 10 min, 加入 1.8 mL 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 混匀后用荧光分光光度计测定荧光强度, 激发波长为 370 nm, 发射波长为 448 nm。设定 3 个重复。

酶活力单位(U)定义为在上述实验条件下,每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  4-甲基伞形酮所需的酶量。比活力用每毫克蛋白所含的酶活力单位数表示。

**1.3.5 蛋白质浓度测定:** 蛋白浓度通过 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定。

**1.3.6 酶的降解产物分析:** 1 mL 反应体系中加入 0.5  $\mu\text{mol/L}$  纯化的 ChiA (168.68 U), 1 g/L 的胶体几丁质, 于 DH-II 旋转混合仪 20 °C 反应 24 h 的酶解产物经  $\text{C}_{18}$  柱料除盐、Sevage 法除蛋白, 然后浓缩、干燥并复溶于甲醇中。利用基质辅助电喷雾质谱(ESI-MS)分析酶解反应的产物组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 *chiA* 基因的克隆与鉴定

**2.1.1 *chiA* 基因全序列的电泳检测:** 以 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 菌株基因组 DNA 为模板, 利用简并引物扩增出目的片段(图 1)。测序结果表明该基因全长 3 160 bp, 编码 1 053 个氨基酸, 其理论分子量为 113.544 85 kD, 预测值为 4.49, 将其命名为 *chiA*, 提交 NCBI 数据库, 登录号为 KF234015。

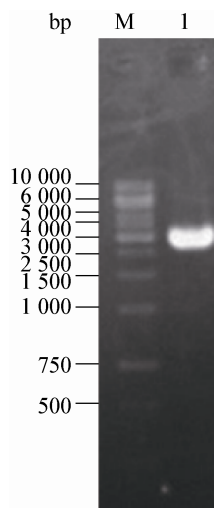


图 1 几丁质酶 *chiA* 的琼脂糖凝胶电泳分析

**Figure 1** Argarose gel electrophoresis of the *chiA* gene  
Note: M:  $\lambda$  DNA/*Hind* III marker; I: The PCR products of the *chiA* gene.

SMART 数据库分析 *chiA* 基因编码氨基酸序列的保守结构域。*chiA* 编码氨基酸的 N 端 1–27 位氨基酸构成信号肽, N 端 34–79 位和 C 端 1 012–1 053 位氨基酸构成类型 3 几丁质结合域 (Type-3 chitin-binding domains, ChtBD3), N 端 102–181 位和 194–280 位氨基酸为成人多囊肾病结构域 (Polycystic kidney disease, PKD), 323–786 位氨基酸为 18 家族几丁质酶催化域 (GH18 catalytic domain, Glyco\_18)。

**2.1.2 *chiA* 编码氨基酸序列分析:** BLAST 检索结果显示 *chiA* 的氨基酸序列与来源于深海菌株 *Pseudoalteromonas undina* NCIMB 2128 (登录号 WP\_010389313.1) 和 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (登录号 YP\_004065201.1) *chiA* 序列一致性分别为 95% 和 87%, 两株深海菌株都已完成全基因组测序, 其几丁质酶基因是通过序列比对预测结果, 目前还未见功能研究的文献报道。因此深入研究本课题 *chiA* 对于深海环境中几丁质的降解代谢也具有一定参考价值。*chiA* 与来源于 *Pseudoalteromonas* sp. S9、*Pseudoalteromonas piscicida*、*Hahella chejuensis* KCTC 2396 和 *Simiduia agarivorans* SA1=DSM 21679 进行功能研究的几丁质酶分别具有 71%、68%、51% 和 56% 的一致性。

为分析 *chiA* 编码序列保守氨基酸残基信息, 利用 Align X 软件与已知晶体结构的几丁质酶的氨基酸序列比对分析(图 2)。几丁质酶比对分析所选序列包括粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)几丁质酶 A (PDB: 1EDQ)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)几丁质酶 (PDB: 3B8S)、海洋细菌(*Moritella marina*)低温几丁质酶 *MmChi60* (PDB: 4HMC)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans* W1-12)几丁质酶 A1 (PDB: 1ITX)。尽管不同来源几丁质酶的功能及编码氨基酸序列差异较大, 但催化域关键氨基酸高度保守。ChiA 具有 18 家族糖苷水解酶的负责结合底物及催化降解功能的典型保守模块 SxGG 和 DxxDxDxE<sup>[5]</sup>(图 2 黑框), 这说明 *chiA* 具有 18 家族

几丁质酶“底物辅助保留机理(Substrate-assisted retaining mechanism)”的催化机制。

本研究 ChiA 为 18 家族几丁质酶, 其催化模块“DxxDxDxE”中谷氨酸(Glu, E)活性位点为酸碱催化氨基酸(图 2 ↓)。靠近谷氨酸的两个天冬氨酸一方面保证多糖链的 N-乙酰基在-1 位正确结合, 辅助该基团的羧基氧作为亲核试剂攻击异头碳; 同时可降低谷氨酸的 pKa 等。chiA 基因的编码产物不仅具有较高的序列相似度, 也存在高度的保守位点。Uchiyama 等<sup>[16]</sup>通过定点突变表明环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans* W1-12)几丁质酶 A1 (PDB: 1ITX)上的 Trp<sup>164</sup> 和 Trp<sup>285</sup> (等同 chiA 的 Trp<sup>428</sup> 和 Trp<sup>580</sup>) 在晶体几丁质与其他底物的降解中尤为重要。此外, Tyr<sup>279</sup> 和 Trp<sup>433</sup> (等同 chiA 的 Tyr<sup>574</sup> 和

Trp<sup>821</sup>) 在 18 家族几丁质酶中高度保守是酶催化反应的关键氨基酸(图 2★)。

2.1.3 几丁质酶在大肠杆菌的表达与纯化: 将测序正确的重组质粒 pET28a-chiA 在 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达。通过 SDS-PAGE 分析目标蛋白表达情况。如图 3A 所示, 泳道 2 约 110 kD 蛋白带与 ChiA 理论分子量(110 592.53 Da, 去除信号肽)相一致, 由此推测 IPTG 成功诱导大肠杆菌表达目的蛋白。

以阴性对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a 相比, 基因工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-chiA 在约 110 kD 位置出现特异蛋白谱带(图 3B), 与预测的重组蛋白质条带大小(110 592.53 Da)基本一致, 说明 ChiA 在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达。

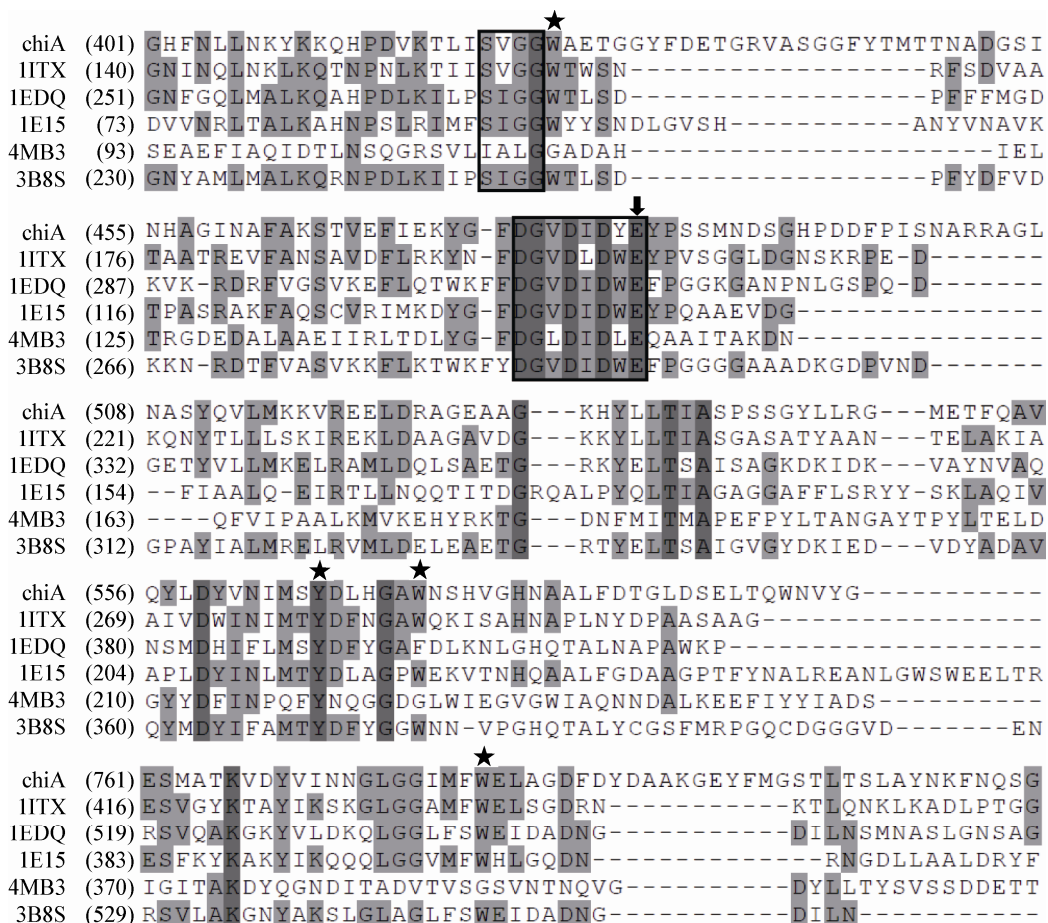


图 2 *chiA* 编码产物的多重序列比对  
 Figure 2 Multiple sequence alignments of the *chiA*

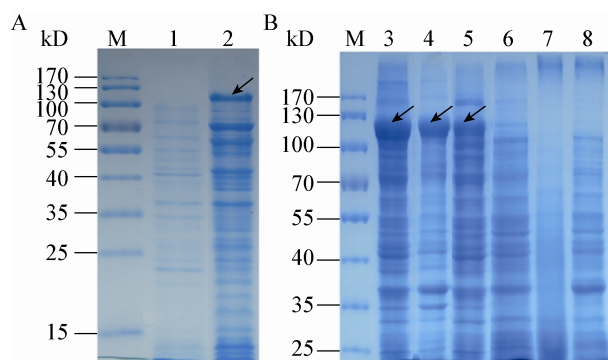


图3 重组几丁质酶 ChiA 的诱导表达

Figure 3 The inducible expression of the recombinant ChiA

Note: M: PageRuler Prestained Protein Ladder; 1: Cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a without IPTG; 2: Cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*chiA* with IPTG; 3: Cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*chiA*; 4: Soluble fractions of cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*chiA*; 5: Insoluble fractions of cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*chiA*; 6: Cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a; 7: Soluble fractions of cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a; 8: Insoluble fractions of cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a.

通过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析法纯化重组蛋白(图4)。纯化 ChiA 总蛋白含量为 33.74 mg, 比活力为 42.17 U/mg, 总活力为 168.68 U, 总回收率为 63.25%, 纯化倍数为 7.32 (表 2)。

## 2.2 降解产物分析

利用 ESI-MS 分析 ChiA 酶解胶体几丁质的产物, 推测 ChiA 的降解模式。如图 5 所示, 在正离子模式下,  $m/z$  为 244、447/463、650、852/871 的离子峰代表聚合度为 2-5 寡糖的钠或钾或氢加合物  $[(\text{GlcNAc})_{2-9}\text{-H}_2\text{O}+\text{Na/K/H}]$ 。ChiA 降解胶体几丁质的酶解产物中几丁二糖离子峰( $m/z$  447)的相对丰度达到最大值 100%。三糖( $m/z$  650)的相对丰度超过 30%, 四糖( $m/z$  852)的相对丰度超过 50%。从结果

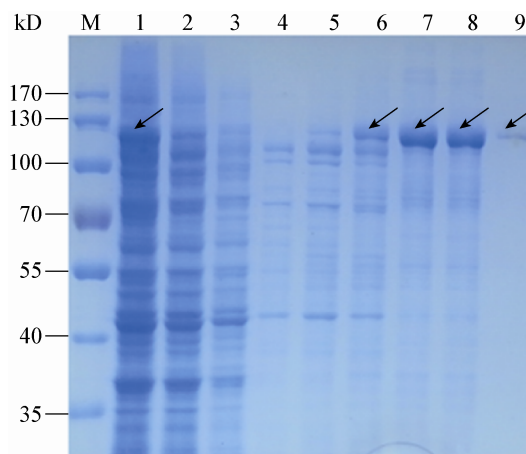


图4 重组几丁质酶 ChiA 的分离纯化

Figure 4 Purification of the recombinant ChiA

Note: M: PageRuler Prestained Protein Ladder; 1: Soluble fractions of cell extract of strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*chiA*; 2: Fractions that flowed through Ni-NTA resin; 3: Wash with bind buffer; 4: Wash with 20 mmol/L imidazole; 5: Wash with 40 mmol/L imidazole; 6: Elution with 60 mmol/L imidazole; 7: Elution with 120 mmol/L imidazole; 8: Elution with 150 mmol/L imidazole; 9: Elution with 300 mmol/L imidazole.

可见 ChiA 为一种 18 家族的内切几丁质酶, 随机水解底物生成几丁寡糖。

## 3 讨论

结构域分析表明 ChiA 为多结构的几丁质酶, 包含催化域、ChtBD3、PKD 等结构域。Watanabe 等<sup>[17]</sup>报道 ChtBD3 结构域在酶降解几丁质中发挥关键作用, ChtBD3 更利于几丁质酶催化域与底物结合, 可持续作用几丁质底物并具有脱乙酰功能, 但具体机理并未完全阐述清楚。Orikoshi 等<sup>[18]</sup>定点突变菌株 *Alteromonas* sp. strain O-7 几丁质酶 A 的 N 端 PKD 结构域关键芳香族氨基酸, 结果表明其

表 2 重组 ChiA 的纯化

Table 2 Purification summary of the recombinant ChiA

| 纯化步骤                   | 总蛋白量                        | 总活力                | 比活力                      | 纯化倍数              | 得率        |
|------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|-----------|
| Purification procedure | Total protein quantity (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Purification fold | Yield (%) |
| 破菌后上清液                 |                             |                    |                          |                   |           |
| Cell extract           | 46.31                       | 266.70             | 5.76                     | 1.00              | 100       |
| Ni-NTA 柱               |                             |                    |                          |                   |           |
| Column of Ni-NTA       | 33.74                       | 168.68             | 42.17                    | 7.32              | 63.25     |

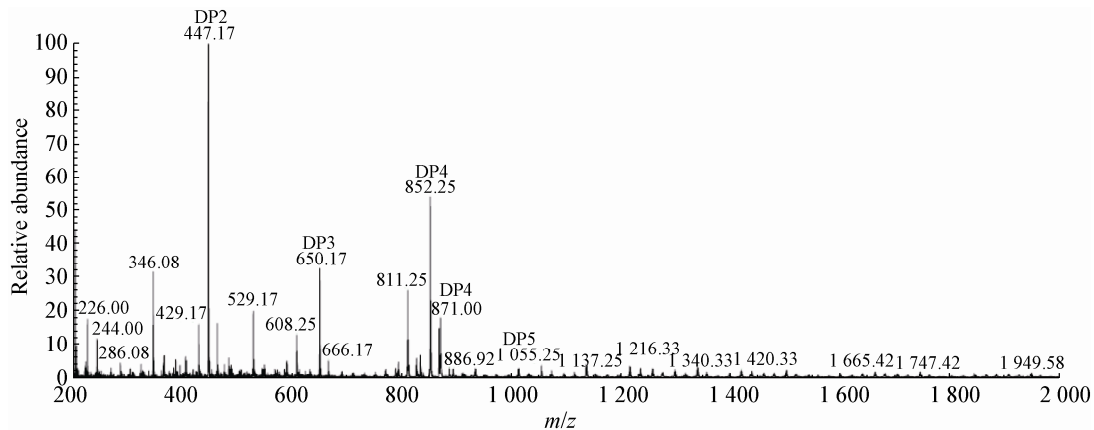


图5 ESI-MS分析ChiA降解胶体几丁质的酶解产物

Figure 5 ESI-MS spectra of the ChiA hydrolysis products of colloidal chitin

Note: DP indicates the degree of polymerisation of chitin oligosaccharides from the enzymatic reaction.

中 W30 和 W67 与几丁质底物紧密结合而实现高效降解, 此外, PKD 结构域可以与不溶底物粉状几丁质、纤维素及壳聚糖特异结合。然而, 目前已研究的大多数几丁质酶只有一个 ChtBD3 或 PKD 结构域, 但本研究 ChiA 包含两个 ChtBD3 和两个 PKD, 这种特殊的结构可能更利于酶在海洋等低温环境下结合不溶晶体底物、促进酶的水解功能。

*E. coli* 表达系统优点在于遗传背景研究深入清楚、繁殖快、成本低、表达量高以及有大量可利用的表达载体、宿主和纯化系统等特点, 成为目前应用最广的表达体系<sup>[19]</sup>。但海洋环境来源的微生物大多具有冷适应性, 分泌的酶因最适作用温度较低, 异源表达较困难<sup>[20]</sup>, 且本研究重组蛋白 ChiA 分子量约 110 kD, 也为体外正确折叠造成一定困难, 极大地限制了其在工业上的应用。因此, 通过在大肠杆菌中采用 16 °C 低温诱导、低浓度 IPTG (0.2 mmol/L)、低摇床转数(100 r/min)并更换表达载体等方法成功获得满足研究需求的重组蛋白, 并分离纯化获得纯酶。

目前已报道<sup>[11,21-22]</sup>的细菌内切几丁质酶降解胶体几丁质可生成聚合度为 2-4 或 4-9 的寡糖, 而 ChiA 可降解胶体几丁质产生聚合度 2-5 的几丁寡糖。通过酶解产物分析表明 ChiA 为一种来源于海洋环境的 18 家族内切几丁质酶。目前本实验室深

入研究其生化性质, 为酶的晶体解析, 探讨其降解机制、规模化制备几丁寡糖应用于食品、医药和农业等领域奠定基础。

## 参考文献

- [1] Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sorlie M, et al. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*- a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides[J]. FEBS Journal, 2013, 280(13): 3028-3049
- [2] Souza CP, Almeida BC, Colwell RR, et al. The importance of chitin in the marine environment[J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(5): 823-830
- [3] Chavan SB, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential[J]. Biotechnology Progress, 2013, 29(4): 833-846
- [4] Zhang C, Kim SK. Chapter 28-application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2012, 65: 423-435
- [5] Adrangi S, Faramarzi MA. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1786-1795
- [6] Wang XH, Zhao Y, Zhao XM, et al. Screening, Identification and zymogram analysis of a marine cold-adapted Chitinase-producing strain[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2014, 23(9): 92-97 (in Chinese)  
王晓辉, 赵勇, 赵小明, 等. 海洋低温几丁质酶菌株筛选、鉴定及酶谱分析[J]. 西北农业学报, 2014, 23(9): 92-97
- [7] Wang XH, Yue M. Optimization of fermentation conditions for chitinase production by the *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 using the response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(12): 312-315,329 (in Chinese)  
王晓辉, 岳敏. 交替假单胞菌产几丁质酶的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 312-315,329
- [8] Ramli ANM, Mahadi NM, Rabu A, et al. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 94
- [9] Park HJ, Kim D, Kim IH, et al. Characteristics of cold-adaptive endochitinase from Antarctic bacterium *Sanguibacter antarcticus*

- KOPRI 21702[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45(5): 391-396
- [10] Han Y, Yang BJ, Zhang FL, et al. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(1): 132-140
- [11] Jang MS, Lee YM, Cho YS, et al. Overexpression and characterization of a novel chitinase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. BK1[J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2005, 42(6): 339-344
- [12] Orikoshi H, Nakayama S, Miyamoto K, et al. Roles of four chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD) in the chitin degradation system of marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1811-1815
- [13] Malecki PH, Raczynska JE, Vorgias CE, et al. Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium[J]. Acta Crystallographica Section D, 2013, 69(5): 821-829
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 2344
- [15] Hoell IA, Klemsdal SS, Vaaje-Kolstad G, et al. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1748(2): 180-190
- [16] Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, et al. Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 41343-41349
- [17] Watanabe T, Ariga Y, Sato U, et al. Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin[J]. Biochemical Journal, 2003, 376(Pt 1): 237-244
- [18] Orikoshi H, Nakayama S, Hanato C, et al. Role of the N-terminal polycystic kidney disease domain in chitin degradation by chitinase A from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(3): 551-557
- [19] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(2): 211-222
- [20] Baker KN, Rendall MH, Patel A, et al. Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies[J]. Trends Biotechnology, 2002, 20(4): 149-156
- [21] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2007, 27(1): 21-28
- [22] Wang SL, Liu CP, Liang TW. Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(3): 1305-1313

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，应包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择理论和实践中具有重要意义学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势，即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介，并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现，同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。