

研究报告

桑氏链霉菌几丁质酶 *ChiKJ40* 基因的克隆表达及其抑菌作用

张博阳 朱天辉* 韩珊 王莹 李姝江 譙天敏

(四川农业大学林学院 四川 成都 611130)

摘要:【背景】目前关于桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*)生防基因的研究不多, 仅从其基因组中克隆了2个几丁质酶基因片段, 其单个几丁质酶的完整基因序列相关研究未见报道。【目的】克隆 *S. sampsonii* KJ40 的几丁质酶基因 *ChiKJ40* 并进行原核表达, 纯化重组蛋白并研究其抑菌作用。【方法】采用 PCR 扩增法从 *S. sampsonii* KJ40 中克隆几丁质酶基因 *ChiKJ40*, 连接到表达载体 pET-32a, 导入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行诱导表达。使用 His 标记蛋白质微量纯化试剂盒对重组几丁质酶进行纯化, Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定粗酶液和纯化酶液的浓度, 几丁质酶试剂盒测定粗酶液和纯化酶液的几丁质酶活性。观察重组几丁质酶对桉树焦枯病菌(*Cylindrocladium scoparium*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)、紫丝核菌(*Rhizoctonia violacea*)几种致病真菌的抑菌作用。【结果】*ChiKJ40* 基因(登录号为 MF434484)在 *E. coli* 中经 IPTG 诱导表达, 获得 42 kD 的重组几丁质酶, 不同浓度 IPTG 在 37 °C 诱导 3 h, 蛋白产量无明显变化。0.2 mmol/L IPTG 16 °C 诱导过夜, 重组几丁质酶主要以可溶性形式存在于上清, 小部分以包涵体存在于沉淀中。粗酶液几丁质酶活性为 0.080 U/mL, 酶比活力为 0.041 U/mg, 纯化酶液几丁质酶活性为 0.046 U/mL, 酶比活力为 0.115 U/mg, 纯化倍数为 2.8, 酶活回收率为 57.5%。重组几丁质酶处理后, *C. scoparium*、*C. parasitica* 和 *A. alternata* 菌丝细胞出现分节、膨胀, *R. violacea* 菌丝溶解且部分被破坏成碎片。【结论】*ChiKJ40* 基因的研究补充了 *S. sampsonii* 的生防背景, 为几丁质酶基因找到了新的来源, 并为其应用奠定了理论基础。

关键词: 桑氏链霉菌, 几丁质酶, 克隆, 原核表达, 抑菌作用

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31070578); Sichuan Provincial Department of Education Key Project (14ZA0015)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

Received: July 22, 2017; Accepted: September 20, 2017; Published online (www.cnki.net): October 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31070578); 四川省教育厅重点项目(14ZA0015)

*通信作者: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2017-07-22; 接受日期: 2017-09-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-16

Cloning, expression and antibacterial functions of *ChiKJ40*, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii*

ZHANG Bo-Yang ZHU Tian-Hui* HAN Shan WANG Ying LI Shu-Jiang QIAO Tian-Min

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Background] There are very rare researches on the biocontrol genes of *Streptomyces sampsonii* until now. Only two chitinase gene fragments were cloned, and there is no relevant study in the complete gene sequence of the chitinase. [Objective] To clone and prokaryotic expression of the chitinase gene *ChiKJ40* of *S. sampsonii* KJ40, then purify recombinant protein and investigating antibacterial characters. [Methods] Firstly we cloned the chitinase gene *ChiKJ40* from *S. sampsonii* KJ40 by PCR amplification, then ligated it into vector pET-32a and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). We purified the recombinant chitinase using the His-tagged protein microscopy kit, determined the concentration of the crude enzyme solution and the purified enzyme solution by the Bradford protein concentration assay kit, measured the chitinase activity of the crude enzyme solution and the purified enzyme solution using the chitinase kit. Finally also checked antibacterial characters of the recombinant chitinase on the *Cylindrocladium scoparium*, *Cryphonectria parasitica*, *Alternaria alternata* and *Rhizoctonia violacea*. [Results] We induced expression of the *ChiKJ40* gene (accession number: MF434484) through IPTG in *E. coli*, the recombinant chitinase size is 42 kD. There are no significant differences in production of protein using different concentrations of IPTG at 37 °C inducing 3 h. 0.2 mmol/L IPTG inducing 16 °C overnight, recombinant chitinase mainly existed in the form of soluble supernatant, small existed in inclusions precipitation. The chitinase activities of crude protein and purified protein were 0.080 U/mL and 0.046 U/mL, respectively. The specific activity of crude protein and purified protein were 0.041 U/mg and 0.115 U/mg, the purification ratio was 2.8, the rate of 57.5%. After treating with the purified protein, mycelium cells of *C. scoparium*, *C. parasitica*, *A. alternata* were segmented with inflating the mycelia, and myceliums of *R. violacea* were broken. [Conclusion] This study of *ChiKJ40* provides biocontrol background of *S. sampsonii* and finds a new source for the chitinase genes, and lays a theoretical foundation for its application.

Keywords: *Streptomyces sampsonii*, Chitinase, Cloning, Prokaryotic expression, Antibacterial effect

几丁质又称甲壳素, 是由 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖胺通过 β -1,4 糖苷键连接而成的线性多糖^[1]。几丁质是地球上仅次于纤维素的第二丰富的生物聚合物, 广泛存在于甲壳类如螃蟹和虾的壳、昆虫的外骨骼、真菌、酵母、藻类和其他无脊椎动物的内部结构中^[2]。几丁质酶(EC 3.2.1.14)是一类可水解几丁质的糖基水解酶, 几丁质酶能够降解几丁质成低分子量壳寡糖的功能广泛应用于工业、农业和医疗^[3], 如诱导、抗肿瘤、生物防治植物病原真菌和有害昆虫中的作用^[4]。几丁质酶具有可诱导性、安全无毒副作用等特点, 几丁质酶和产生几丁质酶的菌株除了可以单独用于植物病虫害防治以外, 也可以通过和其他抗生素与杀虫剂共同使用来减少其

他化学试剂的用量, 进而减少对环境 and 人类健康的危害, 因此其在农林业上的应用范围正在不断扩大。

根据几丁质酶的氨基酸序列同源性, 将几丁质酶划分成 5 种类型, 归类为 2 个家族, 即 18 家族和 19 家族糖基水解酶^[5]。但是, 近年来确定了一些几丁质酶属于 20、23 家族和 48 家族的糖基水解酶^[6]。18 家族几丁质酶在生物体中广泛分布, 包括细菌、真菌、植物、哺乳动物、昆虫和病毒等^[7], 19 家族几丁质酶主要存在于植物中, 在一些放线菌中也被发现。桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*)能够产生多种胞外水解酶^[8-10], 几丁质酶是其中之一。*S. sampsonii* KJ40 是本实验室从健康杨树的根际土壤分离到的一株产几丁质酶且对紫丝核菌

(*Rhizoctonia violacea*)生长有明显抑制作用的生防链霉菌,可以预防杨树紫纹羽病的发生,显著提高杨树生长能力^[11]。目前,虽然国内外研究人员从土壤^[8-9,11]和海沉积物^[10]中分离到多株产几丁质酶的 *S. sampsonii*,但对 *S. sampsonii* 几丁质酶的研究主要局限在产几丁质酶菌株发酵粗提液的生物活性上。虽然雷美艳^[12]从 *S. sampsonii* 基因组中扩增并克隆得到 411 bp 和 465 bp 大小的 2 个几丁质酶基因片段,但 *S. sampsonii* 单个几丁质酶完整基因的克隆及其在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的表达未见报道。本研究克隆 *S. sampsonii* 的几丁质酶基因,构建其 pET 系列的原核表达载体,表达纯化重组蛋白,观察重组蛋白抑菌活性,为链霉菌几丁质酶后续理论研究和大规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及培养基

S. sampsonii KJ40 由四川农业大学森林保护林木病理实验室保存提供,该菌株已于 2012 年 4 月 13 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC 5996;桉树焦枯病菌(*Cylindrocladium scoparium*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)、紫丝核菌(*Rhizoctonia violacea*)由四川农业大学森林保护林木病理实验室保存提供。*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)购于北京全式金生物技术有限公司。

pMD19-T 载体用于构建克隆载体,购于宝生物工程(大连)有限公司;pET-32a 载体用于构建表达载体,由四川农业大学森林保护林木病理实验室保存提供;引物合成和基因测序由成都擎科梓熙公司完成。

营养肉汤培养基(NB, g/L):蛋白胨 10.0,牛肉膏 5.0,氯化钠 5.0, pH 7.2–7.4。LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0,氯化钠 10.0, pH 7.0。固体培养基则在每升液体培养基中加琼脂 15 g。

1.1.2 主要试剂和仪器

溶菌酶(Lysozyme)、氨苄青霉素(Ampicillin)、5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-Gal)、1 \times 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2–7.4, 0.01 mol/L)和 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;Solution I、DL2000 DNA marker、DL5000 DNA marker 购于宝生物工程(大连)有限公司;2 \times TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix I、2 \times TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix II 购于北京全式金生物技术有限公司;DNA 限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶购于 NEB (北京)有限公司;His 标记蛋白质微量纯化试剂盒购于天恩泽公司。

梯度 PCR 仪,德国艾本德公司;振荡培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;电泳仪,北京市六一仪器厂;智能人工气候箱,韶关市广智科技设备有限公司;Gel Doc XR 凝胶成像系统,美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 几丁质酶基因克隆载体的构建

通过对 *S. sampsonii* KJ40 全基因组序列进行测序及功能预测分析(基因组 GenBank 登录号为 LORI00000000),获得一个编码几丁质酶的基因。利用软件 Primer Premier 5.0 设计引物,上游引物 F1: 5'-ATGCGTACCCGTCTGATCG-3';下游引物 R1: 5'-TCAGCAGCTGAGGTTGTCG-3'。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系: ddH₂O 10 μ L, 2 \times TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix I 12.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

纯化回收的 PCR 扩增目的片段与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接,之后转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。通过 LB/X-Gal/Amp 平板对重组子进行筛选,

阳性的菌液送往成都擎科梓熙公司进行DNA测序。构建好的克隆载体质粒 pMD19-T-*ChiKJ40*-1 用限制性内切酶 *Hind* III和 *Bam*H I 进行双酶切检测。

1.2.2 基因序列和蛋白质生物信息学预测分析

DNAMAN 软件推测 ORF 及氨基酸序列, 利用 NCBI数据库 BLAST 程序将得到的核苷酸序列和氨基酸序列进行比对; 利用在线 ExPasy 系统中的 ProtParam、Compute pI/Mw 工具预测蛋白的理论分子量和等电点等; ProtScale 预测蛋白质疏水性; TMHMM Server Version 2.0 预测跨膜区域; 在线软件 SignalP 4.1 Server 预测蛋白质信号肽; 在线网站 NPS@SOPMA 预测蛋白的二级结构; 在线软件 SWISS-MODEL 预测蛋白质三级结构。

1.2.3 几丁质酶基因表达载体的构建

以重组质粒 pMD19-T-*ChiKJ40*-1 为模板, 通过上游引物 F2 (5'-CGCGGATCCGACACCCGCGCGCCGCGC-3')和下游引物 R2 (5'-CCGCTCGAGTCAGCAGCTGAGGTTGTCG-3')扩增含 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点而不含信号肽的 *ChiKJ40* 基因序列, 并连接到 pMD19-T 载体, 构建 pMD19-T-*ChiKJ40*-2 质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 得到阳性转化子。以 pMD19-T-*ChiKJ40*-2 质粒为模板, 再次扩增几丁质酶基因, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切目的片段和 pET-32a(+), 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 构建好的表达载体用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切检测。

1.2.4 重组几丁质酶的诱导表达

将构建好的表达载体质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中, 挑取单菌落于 10 mL 的 LB (100 mg/L Amp)培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。将 300 μ L 过夜培养液加入 30 mL 的 LB (100 mg/L Amp)液体培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养 3 h, 取 3 mL 作为不加 IPTG 的空白对照, 剩余培养液分装于 6 只灭菌干燥的试管中, 每只试管 3 mL, 分别加入 IPTG (IPTG 终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L), 以 IPTG 诱导空载体菌液和不加 IPTG 诱导的空载体作对照。

诱导 3 h, 分别取 1 mL 上述培养液, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清。取 1 mL PBS 重悬菌体, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清。60 μ L PBS 重悬菌体, 加入 20 μ L 4 \times Protein SDS-PAGE loading buffer, 沸水浴 10 min 使之变性, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 重组几丁质酶可溶性检测和纯化

取 1 mL 0.2 mmol/L IPTG 16 °C 诱导过夜的菌液, PBS 洗涤重悬, 液氮反复冻融菌液 10 次破细胞壁, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液与沉淀, 沉淀用 60 μ L 8 mol/L 尿素重悬, 4 °C 静置 30 min, 加 4 \times Protein SDS-PAGE loading buffer, 沸水浴 10 min 使之变性, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 观察上清与沉淀的表达产物含量, 确定表达蛋白主要是以可溶性形式存在还是包涵体形式存在。使用天恩泽一站式 His 标记蛋白质微量纯化试剂盒对重组几丁质酶进行纯化。

1.2.6 重组几丁质酶的浓度与活性测定

使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 测定粗酶液和纯化酶液的浓度。使用几丁质酶试剂盒测定粗酶液和纯化酶液的几丁质酶活性。

1.2.7 重组几丁质酶对几种致病真菌菌丝形态的影响

C. scoparium、*C. parasitica*、*A. alternata*、*R. violacea* 在 PDA 平板培养基中 28 °C 培养 7 d, 直到整个平板覆盖满菌丝。用打孔器打取病原菌菌饼($d=5$ mm), 去除菌饼携带的固体培养基, 将菌丝置于 0.40 mg/mL 纯化酶液中反应 24 h, 取 1 滴含病原菌菌丝的酶液于玻璃载玻片上, 用显微镜对菌丝形态进行观察, 以未用重组酶液处理的正常菌丝作对照。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶基因克隆与鉴定

几丁质酶基因 PCR 产物电泳结果见图 1 的 1 号泳道, 得到亮度较大、片段大小约 726 bp 的单一一条带。使用限制性内切酶 *Hind* III和 *Bam*H I 双酶切检测 pMD19-T-*ChiKJ40*-1 载体质粒见图 1 中的 2 号泳道, 双酶切得到约 760 bp 的条带和约 2 690 bp 的

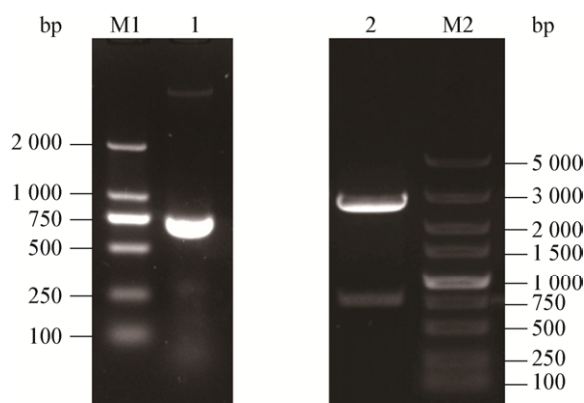


图1 DNA电泳检测

Figure 1 The electrophoresis results of the DNA

注: M1: DL2000 DNA marker; 1: *ChiKJ40* 基因 PCR 产物; M2: DL5000 DNA marker; 2: 载体 pMD19-T-*ChiKJ40*-1 双酶切产物.

Note: M1: DL2000 DNA marker; 1: The PCR products of the *ChiKJ40* gene; M2: DL5000 DNA marker; 2: The products of pMD19-T-*ChiKJ40*-1 vector by restriction enzyme digestion.

条带,证明克隆载体构建成功,将此基因命名为 *ChiKJ40*,提交 NCBI 数据库,登录号为 MF434484。

2.2 基因序列与蛋白质生物信息学预测分析结果

通过 NCBI 网站 BLAST 比对, *ChiKJ40* 基因核苷酸序列与 *Streptomyces albus* SM254 和 *Streptomyces* sp. FR-008 的一段编码几丁质酶 726 bp 大小的核苷酸序列一致性达 99%。利用 DNAMAN 软件分析, *ChiKJ40* 基因开放阅读框(Open reading frame, ORF)大小为 726 bp, 编码 241 个氨基酸,核苷酸序列及其编码的氨基酸见图 2。 *ChiKJ40* 基因编码氨基酸的保守结构域属糖苷水解酶 19 家族,与 *Streptomyces wadayamensis*、 *Streptomyces* sp. FR-008、 *Streptomyces* sp. ScaeMP-6W 和 *Streptomyces* sp. BvitLS-983 编码的几丁质酶基因的氨基酸序列一致性为 100%。预测蛋白质的理论相对分子质量为 25 677.28 Da, 理论等电点为 4.55, 正电荷残基总数(Arg+Lys)为 13, 负电荷残基总数(Asp+Glu)为 25, 分子式为 $C_{1128}H_{1711}N_{311}O_{364}S_7$, 脂肪系数为 72.57, 总平均亲水性为 -0.261, 是稳定蛋白, 亲水性氨基酸总值较大, 表明蛋白为亲水性蛋白。蛋白氨基酸组成见表 1, 共由 20 种氨基酸组

成, 其中甘氨酸(Gly)和丙氨酸(Ala)所占比例最大, 各占 11.2%。预测蛋白存在一个跨膜区域, 位于第 5-27 位氨基酸, 第 1-4 位氨基酸在膜内部, 第 28-241 位氨基酸在膜外部, 存在信号肽, 剪切位点位于第 29-30 位氨基酸, 成熟肽始于第 30 位氨基酸。蛋白二级结构: α 螺旋氨基酸 78 个, 占 32.37%; 延伸链氨基酸 47 个, 占 19.50%; 无规则卷曲氨基酸 81 个, 占 33.61%; β 转角氨基酸有 35 个, 占 14.52%; 整个结构以 α 螺旋和无规则卷曲为主。蛋白三级结构预测见图 3。

2.3 重组几丁质酶的诱导表达

表达载体质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切检测见图 4, 有约 650 bp 大小的条带, 与 *ChiKJ40* 基因去除信号肽后的片段大小一致, 证明重组表达载体构建成功。重组质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达, SDS-PAGE 凝胶鉴定结果见图 5。空载体经诱导表达约 20.4 kD 的标签蛋白, 未诱导的空载体和重组质粒菌液表达蛋白中无突出条带, 而经 IPTG 诱导后, pET-32a(+)-*ChiKJ40* 菌液在约 42 kD 处出现明显条带, 条带大小是去除信号肽后的目的蛋白与标签蛋白大小之和, 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 IPTG 诱导重组质粒菌液表达, 重组蛋白的产量无显著变化。

2.4 重组几丁质酶可溶性检测和纯化结果

由图 6 可见, 16 °C 诱导过夜菌液的重组蛋白主要以可溶性形式存在于上清, 小部分以包涵体存在于沉淀中。由图 7 可发现, 50、100、150、200、250 和 300 mmol/L 浓度的咪唑溶液均可以洗脱重组蛋白, 其中 100 mmol/L 浓度的咪唑溶液洗脱效果最好。

2.5 重组几丁质酶的浓度与活性测定结果

使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定粗酶液和纯化酶液的浓度, 几丁质酶试剂盒测定粗酶液和纯化酶液的几丁质酶活性, 结果见表 2。纯化酶液酶比活力为 0.115 U/mg, 纯化倍数为 2.8, 酶活回收率为 57.5%。

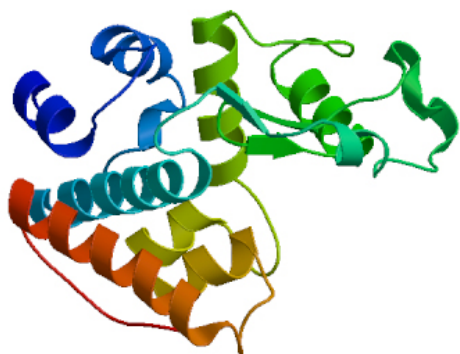
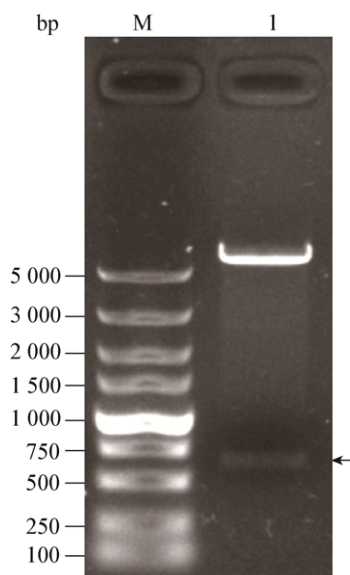


图3 蛋白三级结构预测

Figure 3 Prediction of protein tertiary structure

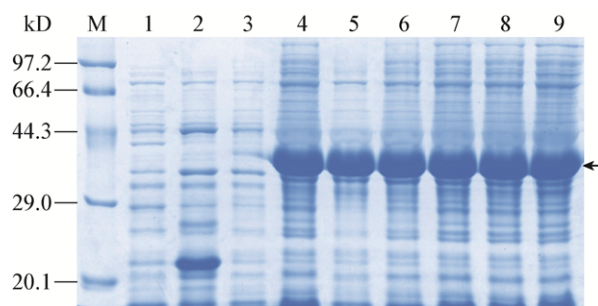
图4 表达载体质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果Figure 4 The identification of expression vector by *Bam*H I and *Xho* I restriction enzymes digestion

注: M: DL5000 DNA marker; 1: 载体 pET-32a(+)-*ChiKJ40* 双酶切产物。

Note: M: DL5000 DNA marker; 1: The products of pET-32a(+)-*ChiKJ40* vector by restriction enzyme digestion.

2.6 重组几丁质酶对几种致病真菌的作用

纯化后的酶液浸泡处理病原菌菌丝后, *C. scoparium*、*C. parasitica*、*A. alternata*、*R. violacea* 菌丝形态与对照相比发生了不同程度的变化, 见图8。重组几丁质酶处理后, *C. scoparium*、*C. parasitica* 和 *A. alternata* 菌丝细胞出现分节、膨胀, *R. violacea* 菌丝溶解且部分被破坏成碎片。

图5 pET-32a(+)-*ChiKJ40* 菌液 IPTG 诱导聚丙烯酰胺凝胶电泳分析Figure 5 SDS-PAGE analysis of pET-32a(+)-*ChiKJ40* induced by IPTG

注: M: 蛋白质 Marker; 1: pET-32a(+)未诱导; 2: pET-32a(+)诱导(IPTG 浓度为 1.0 mmol/L); 3-9: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L IPTG 诱导 pET-32a(+)-*ChiKJ40* (样品为菌液全菌细胞破碎液)。

Note: M: Protein marker; 1: pET-32a(+) not induced; 2: pET-32a(+) induced by IPTG (1.0 mmol/L); 3-9: pET-32a(+)-*ChiKJ40* induced by IPTG, concentration of IPTG was 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mmol/L (the samples were cell homogenates).

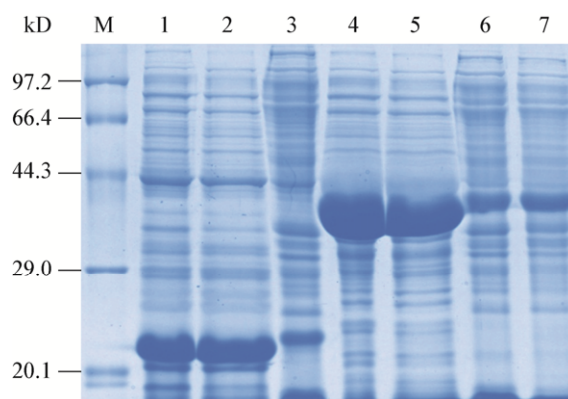


图6 重组蛋白可溶性检测

Figure 6 The soluble detection of recombinant proteins

注: M: 蛋白质 Marker; 1、2: 空载体细胞裂解物上清; 3: 空载体细胞裂解物沉淀; 4、5: 重组载体细胞裂解物上清; 6: 重组载体细胞裂解物沉淀。

Note: M: Protein marker; 1, 2: Supernatant of cell lysate from pET-32a(+); 3: Sediment of cell lysate from pET-32a(+); 4, 5: Supernatant of cell lysate from recombinant vector; 6: Sediment of cell lysate from recombinant vector.

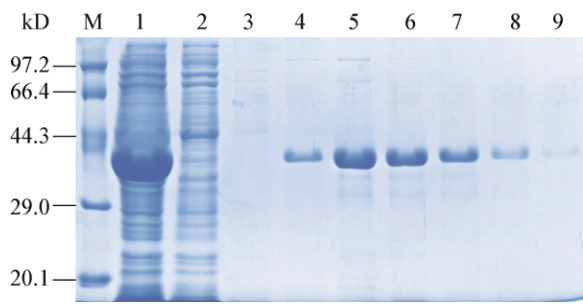


图 7 重组蛋白纯化结果
Figure 7 Purification of recombinant protein
注: M: 蛋白质 Marker; 1: 重组载体细胞裂解物上清; 2-9: 0、10、50、100、150、200、250 和 300 mmol/L 咪唑洗脱液。
Note: M: Protein marker; 1: Supernatant of cell lysate from recombinant vector; 2-9: Liquid were eluted with 0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mmol/L imidazole.

表 2 重组 *ChiKJ40* 的纯化

Table 2 Purification summary of the recombinant *ChiKJ40*

项目 Items	粗酶液 Crude enzyme solution	Ni-Agarose 柱 Column of Ni-Agarose
蛋白浓度 Protein concentration (g/L)	1.94	0.40
几丁质酶活性 Chitinase activity (U/mL)	0.080	0.046
比活力 Specific activity (U/mg)	0.041	0.115
纯化倍数 Purification fold	1.00	2.80
酶活回收率 Recovery rate of enzyme activity (%)	100.0	57.5

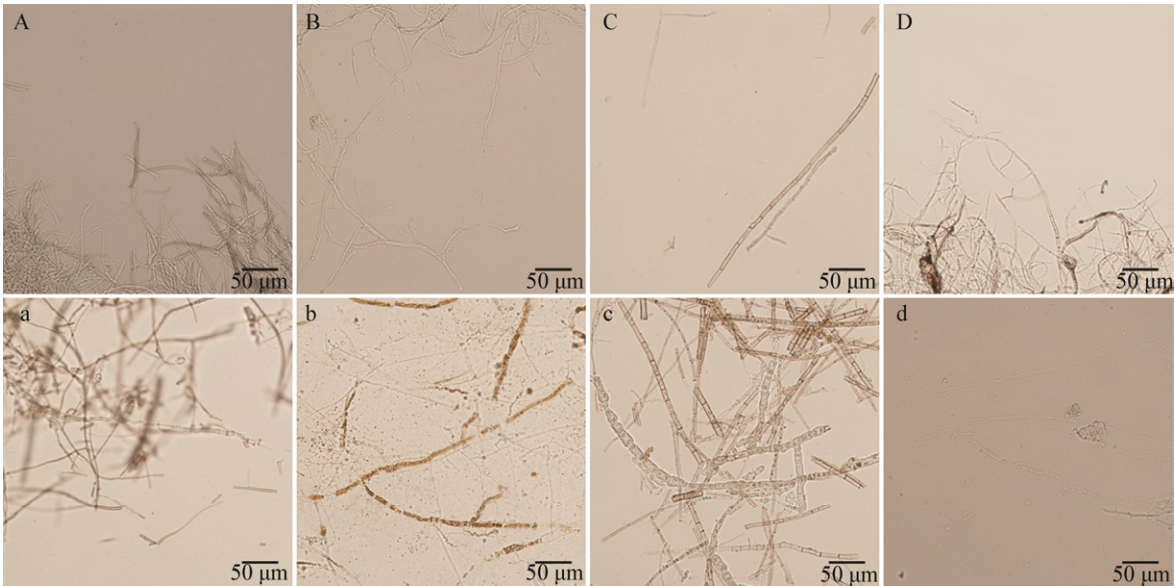


图 8 病原真菌菌丝形态
Figure 8 Hyphae morphology of pathogenic fungal
注: A-D: *C. scoparium*、*C. parasitica*、*A. alternata*、*R. violacea* 正常菌丝形态(400×); a-d: 重组几丁质酶处理后 *C. scoparium*、*C. parasitica*、*A. alternata*、*R. violacea* 菌丝形态(400×)。
Note: A-D: The normal morphology of mycelia from *C. scoparium*, *C. parasitica*, *A. alternata*, *R. violacea* (400×); a-d: The morphology of mycelia from *C. scoparium*, *C. parasitica*, *A. alternata*, *R. violacea* treated by the recombinant chitinase (400×).

3 讨论与结论

几丁质酶多作为生物杀菌或杀虫剂应用在农林业上, 以提高植物的抗病能力。产几丁质酶微生物能够分解植物病原真菌细胞壁的重要成分几丁质, 依据此特性, 传统方式是直接利用几丁质酶产

生菌防治植物真菌病害。孙辉等^[13]研究发现毛壳菌(*Chaetomium* sp. ymf1. 00843)所产胞外几丁质酶有效抑制立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)菌丝的生长。苏明慧等^[14]从短短芽孢杆菌 FM4B 发酵液分离到几丁质酶, 发

现酶液对西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、棘孢青霉(*Penicillium aculeatum*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、根霉(*Rhizopus*)和灰霉(*Botrytis cinerea*)有明显的抑菌作用,且随着酶液质量浓度的增加抑菌效果增大。几丁质酶虽然在生物防治中具有很大的应用潜力,但分离出的几丁质酶活性不高。为了几丁质酶的商业化生产,研究者们不断尝试分离高产菌株或通过改变发酵条件来提高其产量^[15]。由于其调控机理较为复杂以及发酵分离、提取工艺的不成熟,能够成功应用于工业化生产的几丁质酶并不多见。分子生物学技术的发展为解决这一难题提供了一种新的思路:将几丁质酶基因克隆并转入适当载体进行高效表达,以满足大规模生产和研究应用的需要。

S. sampsonii 的 *ChiKJ40* 基因编码氨基酸的保守结构域属糖苷水解酶 19 家族,链霉菌属几丁质酶多属于 19 家族^[7]。19 家族几丁质酶起初在高等植物中被发现,在微生物中只发现了 18 家族几丁质酶。Ohno 等^[16]第一次从高等植物之外的 *Streptomyces griseus* HUT6037 发现编码 19 家族几丁质酶基因,之后 19 家族几丁质酶陆续在其他放线菌中被发现^[17],19 家族几丁质酶三级结构类似于溶菌酶。不同生物来源的几丁质酶分子质量差异很大,一般是 20–90 kD。细菌几丁质酶多为 20–60 kD,与植物几丁质酶(25–40 kD)大小接近,比昆虫几丁质酶(40–85 kD)小^[18]。本研究在 *E. coli* 中表达的重组 *ChiKJ40* 基因分子量约为 25.6 kD,但是在 SDS-PAGE 蛋白质条带分析中,发现表达蛋白条带大小接近 42 kD,该分子量大小和实际的 *ChiKJ40* 基因分子量大小看起来有一定的差距。这主要是因为 pET-32a(+)载体自身表达的蛋白质总分子量大小为 20.4 kD,其中包含大小为 12 kD 的 Trx-tag,2 个大小为 0.8 kD 的 His-tag 和大小为 1.7 kD 的 S-tag,剩下的 5.1 kD 来源于介于这些标签和终止密码子之间的 54 个氨基酸。

E. coli 表达系统的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^[19]。外源蛋白往往在获得高水平表达的同时,容易被宿主蛋白酶降解或者形成包涵体,目前国内外对蛋白质体外复性研究较多,但其过程往往费时、费力且不经济,因此,探索外源蛋白在 *E. coli* 中的可溶性表达具有广泛的应用前景^[20]。通过降低培养温度来降低蛋白合成速度,降低有聚合倾向的中间体的浓度,避免形成包涵体^[21]。*ChiKJ40* 基因通过 pET-32a 载体高效表达,16 °C 诱导过夜,重组蛋白主要以可溶性形式存在于上清,易于纯化。pET 表达质粒含有一段组氨酸标签的基因序列,便于表达蛋白的鉴定和纯化。本研究通过不同浓度咪唑溶液洗脱纯化,100 mmol/L 浓度的咪唑溶液洗脱效果最佳,纯化酶液酶比活力为 0.115 U/mg,纯化倍数为 2.8,酶活回收率为 57.5%。García-Fraga 等^[22]克隆表达海洋来源的被囊假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tunicata*) 19 家族的几丁质酶 *Ptchi19p*,重组蛋白 *Ptchi19p* 粗酶液活性为 0.257 U,纯化酶液活性为 0.228 U,几丁质酶 *Ptchi19p* 对 *F. oxysporum* 和黑曲霉(*Aspergillus niger*)有明显的抑菌作用。Hjort 等^[23]克隆表达苏云金芽孢杆菌 BUPM255 的几丁质酶 *Chi18H8*,纯化后的酶液能够抑制胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、*F. oxysporum* 和 *A. alternata* 的菌丝生长。

几丁质酶能够降解真菌细胞壁的主要组成成分几丁质^[24],目前,植物酶类中发现多种有抑菌活性的 19 家族几丁质酶,而在细菌酶类中发现较少^[25–28]。国内外研究人员^[8,11,29–30]发现 *S. sampsonii* 对 *A. alternata*、*F. oxysporum* 等多种病原真菌菌丝生长有抑制作用。本研究关于 *S. sampsonii* 几丁质酶基因原核表达产物的抑菌活性属首次报道,重组几丁质酶对多种病原菌的细胞结构具有破坏作用,推测 *S. sampsonii* KJ40 产几丁质酶是其具有真菌拮抗能力的重要原因之一。目前,关于 *S. sampsonii*

生防基因的研究不多, 雷美艳^[12]仅从 *S. sampsonii* 基因组中扩增出 2 个几丁质酶基因片段, 未能克隆到一个完整的几丁质酶基因。*ChiKJ40* ORF 大小为 726 bp, 编码 241 个氨基酸, 含编码一个几丁质酶的完整序列, 因此本研究对 *S. sampsonii* 几丁质酶基因 *ChiKJ40* 的研究, 完善和补充了 *S. sampsonii* 的生防背景, 为几丁质酶基因找到了新的来源, 并为其应用奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] Lin YW, Xu C, Lu CH. Medical application of chitin and its derivatives[J]. Journal of Fujian Medical University, 1999, 33(2): 226-228 (in Chinese)
林友文, 许晨, 卢灿辉. 甲壳素及其衍生物的医学应用[J]. 福建医科大学学报, 1999, 33(2): 226-228
- [2] Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin[J]. Progress in Polymer Science, 2001, 26(9): 1921-1971
- [3] Yuli PE, Suhartono MT, Rukayadi Y, et al. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp. 13.26[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(2/3): 147-153
- [4] Mathivanan N, Kabilan V, Murugesan K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(7): 646-651
- [5] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1993, 293(3): 781-788
- [6] Arimori T, Kawamoto N, Shinya S, et al. Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(26): 18696-18706
- [7] Hamid R, Khan MA, Ahmad M, et al. Chitinases: an update[J]. Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences, 2013, 5(1): 21-29
- [8] Malviya MK, Pandey A, Trivedi P, et al. Chitinolytic activity of cold tolerant antagonistic species of *Streptomyces* isolated from glacial sites of Indian Himalaya[J]. Current Microbiology, 2009, 59(5): 502-508
- [9] Kim SS, Kang SI, Kim JS, et al. Biological control of root-knot nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024[J]. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer, 2011, 44(6): 1150-1157
- [10] Augustine D. Actinomycete isolates from Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical, molecular and functional characterization[D]. Cochin: Doctoral Dissertation of Cochin University of Science and Technology, 2014
- [11] Li SJ, Zhu TH, Peng Y, et al. Characteristics of chitinase-produced by *Streptomyces sampsonii* with antimicrobial activity and its biocontrol to *Rhizoctonia violacea*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2014, 42(3): 116-121 (in Chinese)
李姝江, 朱天辉, 彭艳, 等. 桑氏链霉菌产几丁质酶特性及对杨树紫纹病的生防作用[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(3): 116-121
- [12] Lei MY. The features of chitinase and gene cloning of *Chitinase gene* in *Streptomyces sampsonii* KJ42[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
雷美艳. *Streptomyces sampsonii* KJ42 几丁质酶特性及其基因克隆[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2012
- [13] Sun H, Yang JK, Zhang KQ. Enzymatic properties and antibacterial activity of chitinase from *Chaetomium* sp. YMF1.00843[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2015, 43(5): 168-173 (in Chinese)
孙辉, 杨金奎, 张克勤. 毛壳菌几丁质酶的酶学性质及抑菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2015, 43(5): 168-173
- [14] Su MH, Hu XQ, Gu DH, et al. Purification and characterization of chitinase from the fermentation broth of *Brevibacillus brevis* FM4B[J]. Food Science, 2015, 36(19): 176-179 (in Chinese)
苏明慧, 胡雪芹, 顾东华, 等. 短短芽孢杆菌几丁质酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 176-179
- [15] Xie CC, Jia HY, Chen YH. Regulation of chitinase genes expression in bacteria[J]. Hereditas (Beijing), 2011, 33(10): 1029-1038 (in Chinese)
谢池楚, 贾海云, 陈月华. 细菌几丁质酶基因的表达调控[J]. 遗传, 2011, 33(10): 1029-1038
- [16] Ohno T, Armand S, Hata T, et al. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(17): 5065-5070
- [17] Kawase T, Saito A, Sato T, et al. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in *Actinobacteria*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1135-1144
- [18] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2007, 27(1): 21-28
- [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] Zhu HY, Li Q. Strategies for expression of soluble heterologous proteins in *Escherichia coli*[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1): 150-155 (in Chinese)
朱红裕, 李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 150-155
- [21] Urban A, Ansmant I, Motorin Y. Optimisation of expression and purification of the recombinant Yol066 (Rib2) protein from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 786(1/2): 187-195
- [22] García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J, et al. A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T: heterologous expression, characterization and

- antifungal activity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 84-93
- [23] Hjort K, Presti I, Elväng A, et al. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(6): 2819-2828
- [24] Adrangi S, Faramarzi MA. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1786-1795
- [25] Huang LX, Garbulewska E, Sato K, et al. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(3): 293-299
- [26] Kawase T, Yokokawa S, Saito A, et al. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2)[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(4): 988-998
- [27] Kaomek M, Mizuno K, Fujimura T, et al. Cloning, expression, and characterization of an antifungal chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(4): 667-676
- [28] Wong JH, Ng TB, Cheung RCF, et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1221-1235
- [29] Peng Y, Zhu TH, Zhang BY, et al. Isolation, purification and partial characterization of an antifungal protein from *Streptomyces sampsonii* KJ07[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 1980-1987 (in Chinese)
彭艳, 朱天辉, 张博阳, 等. 桑氏链霉菌 KJ07 抗菌蛋白的分离纯化及部分特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 1980-1987
- [30] Jain PK, Jain PC. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2007, 45(2): 203-206

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.1047)