

粉红聚端孢几丁质酶基因 *Trchi2* 在毕赤酵母中的表达及其酶学性质

于松尼^{1*} 贾鹏飞^{1*} 李雅华^{1,2} 咸洪泉^{1,2**}

1 青岛农业大学 生命科学学院, 青岛 266109; 2 山东省应用真菌重点实验室, 青岛 266109

*同等贡献作者

**通讯作者, hqxian0517@163.com

摘要 粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)是一种重要的菌寄生真菌,能够通过菌寄生作用抑制病原微生物的生长,可以有效防治多种植物病原真菌。几丁质酶(chitinase, chi)在粉红聚端孢寄生和抑菌过程中发挥重要作用,本研究旨在实现粉红聚端孢几丁质酶 *Trchi2* 基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达,并明确其酶学性质,采用逆转录 PCR (reverse transcriptase PCR, RT-PCR)克隆粉红聚端孢几丁质酶 *Trchi2* 基因,构建毕赤酵母重组表达载体,转入毕赤酵母 GS115,筛选获得的酵母转化子通过甲醇诱导表达,获得 *Trchi2* 蛋白,测定其几丁质酶活性并进行酶学性质的研究。本研究成功构建了毕赤酵母重组表达载体 pPIC9K-*Trchi2*,获得了分泌表达几丁质酶 *Trchi2* 的工程菌 GS115-*Trchi2*-2-8;诱导培养 7 d 产酶量最高,酶活力达 3.96 U/mL,表达的几丁质酶 *Trchi2* 表观分子量为 50 kD,酶解胶体几丁质的产物为几丁二糖;在 45 °C、pH 6.0 时酶活性最高,在 pH 4~7.5、30~55 °C 条件下相对稳定;当催化反应体系中存在 50 mmol/L 的 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 时, *Trchi2* 酶活性受到强烈抑制。本研究对几丁质酶 *Trchi2* 的基本性质进行了研究,为其结构功能的深入发掘和生产应用提供了理论依据。

关键词 粉红聚端孢;几丁质酶 *Trchi2*;毕赤酵母;酶学性质

中图分类号 S182 **文献标识码** A

Expression of *Trichothecium roseum* Chitinase Gene *Trchi2* in *Pichia pastoris* and Its Enzyme Characterization

YU Song-Ni^{1*} JIA Peng-Fei^{1*} LI Ya-Hua^{1,2} XIAN Hong-Quan^{1,2**}

1 College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2 Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao 266109, China

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, hqxian0517@163.com

Abstract *Trichothecium roseum* is a kind of mycoparasites, which can inhibit the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and other pathogenic bacteria. Chitin is the major component of the most fungal cell wall, the chitinase of *T. roseum* plays an important role in the parasitism and bacteriostasis. In order to achieve the expression of the chitinase *Trchi2* gene from *T. roseum* and clarify its enzymological properties, *T. roseum* chitinase gene *Trchi2* was cloned by reverse transcriptase PCR (RT-PCR), the recombinant expression vector was constructed and transferred into *Pichia pastoris* GS115. The yeast transformants were screened and identified by PCR, and the engineered yeast was cultured with methanol to obtain the protein *Trchi2* and studied its enzymatic properties. The results showed that the recombinant plasmid pPIC9K-*Trchi2* was

successfully constructed, and the engineered yeast GS115-*Trchi2*-2-8 that expressed chitinase *Trchi2* were obtained. The enzyme production was the highest after induction for 7 d, the enzyme activity reached 3.96 U/mL, the apparent molecular weight of chitinase *Trchi2* was 50 kD. The main product of chitin decomposition by chitinase *Trchi2* was N, N-diacetyl-chitobiose. The optimum temperature and pH of enzyme reaction were 45 °C and 6.0, respectively. Under 30 to 55 °C, the enzyme reaction was relatively stable. The enzyme solution treated at 60 °C for 1 h still had 25% relative activity. While pH between 4 to 7.5, the relative activity was stable at more than 50%. When there were Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} at a concentration of 50 mmol/L in catalytic system, activity was strongly inhibited, and the relative activity was less than 5%. Na^+ , K^+ and Ca^{2+} had no significant effect on chitinase *Trchi2*. The activity range of the expressed chitinase was similar to that of most fungal chitinases, with a wide range of temperature adaptability. This study lays a foundation for the further study of chitinase *Trchi2* and also promotes the production and application of chitinase.

Keywords *Trichothecium roseum*; Chitinase *Trchi2*; *Pichia pastoris*; Enzymatic characterization

真菌几丁质酶的种类丰富(Goughenour et al., 2021)、生物学功能多样,真菌几丁质酶可参与真菌细胞壁的形成、菌丝生长、获取营养(Langner, Göhre, 2016)、分生孢子萌发、真菌间的竞争和寄生、真菌与植物互作等多个生物学过程(Tzelepis, Karlsson, 2019)。大多数植物病原真菌的细胞壁是由几丁质组成的,因此,几丁质酶通常被认为是菌寄生过程中一种重要的酶(Loc et al., 2020)。

粉红聚端孢菌(*Trichothecium roseum*)是一种菌寄生真菌,可以在多种植物病原菌上寄生,其菌丝能够穿透核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的细胞壁,产生分支破坏菌核并抑制其生长,是一种有重要潜力的生防菌(Huang, Kokko, 1993; 魏毅等, 2004)。粉红聚端孢具有显著的抗真菌能力,其代谢产物对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有较强的拮抗作用,能够有效抑制其菌丝生长,菌核形成、萌发和活力(Jayaprakashvel et al., 2010);粉红聚端孢产生的胞外几丁质酶在抑菌防病过程中发挥着重要作用,能有效抑制病原菌的孢子和菌丝生长,对烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)等多种病原菌都有良好的抑制作用(Li et al., 2004)。将粉红聚端孢几丁质酶基因转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,能高效地产生大量有活性的几丁质酶,这种融合几丁质酶具有很高的抗真菌活性(Pan et al., 2006)。将粉红聚端孢几丁质酶基因 *Trchi1* 转入烟草(*Nicotiana tabacum*)中能够有效提高烟草对炭疽病的抗性(Xian et al., 2012),转入水稻(*Oryza sativa*)能明显增强水稻对纹枯病的抗性(贺焜, 2014)。

粉红聚端孢菌株 M1 几丁质酶 *Trchi2* 基因

(GenBank No. KC845245), 编码 1 个 488 aa 的蛋白(GenBank No. AHJ60250.1), 几丁质酶含有两个保守氨基酸序列“DXXDXDXE”和“SXGG”, *Trchi2* 中的这两个结构域氨基酸序列分别为“DGVDIDWE”和“SIGG”(周玉玲等, 2021), 与奇异弯颈霉(*Tolyposcladium paradoxum*)内切几丁质酶 B1 氨基酸序列相似性最高为 53.44%, 是 1 个新的几丁质酶基因, 其酶学性质尚不清楚。利用毕赤酵母表达系统进行外源基因表达是研究基因功能和蛋白质性质的重要方法, 本研究根据几丁质酶基因 *Trchi2* 序列设计引物, 克隆 *Trchi2* 基因, 构建重组表达质粒, 在毕赤酵母中进行几丁质酶 *Trchi2* 基因的真核表达, 明确几丁质酶 *Trchi2* 的酶学性质, 以期为进一步研究其结构功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIzol 购自博迈德(北京), PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sac* I、*Avr* II、*EcoR* I, 高保真 DNA 聚合酶 *Ex Taq* 以及其他工具酶、氨卞青霉素、DNA Marker 均购自大连宝生物公司, 质粒提取试剂盒购自 OMEGA (美国), X-gal、D-葡萄糖(D-glucose)、酵母浸粉(yeast extract)、G418 antibiotic 和几丁质购自生工生物(上海)公司, 胰蛋白胍购自北奥博星生物技术(北京)有限公司, 生物素(D-Biotin)购自 Sandleland (美国), 牛血清蛋白(albumin bovine)、无氨基酸酵母氮源购自北京索莱宝, N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetamidoglucose, NAG)、聚合度为 1~6 的几丁寡糖

标准品(chitosan-oligosaccharides mixture 1~6)购自 Sigma (美国), 甲醇等化学试剂为国产分析纯。

粉红聚端孢(*T. roseum*)菌株 M1 由本实验室保存, 毕赤酵母(*P. pastoris*) GS115 菌株、酵母表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen (美国), 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa (大连)公司, 引物由擎科生物(北京)合成。

胶体几丁质、DNS 试剂配置见参考文献(罗鑫, 于存, 2019)。

1.2 粉红聚端孢菌 cDNA 第 1 链的合成

于几丁质诱导培养基刮取诱导培养 5 d 的粉红聚端孢菌丝, 采用 TRIzol 法获得总 RNA (于恺, 2008)。以提取的总 RNA 为模板, 使用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 获取 cDNA。

1.3 几丁质酶成熟肽基因序列的获取

根据几丁质酶 *Trchi2* 基因序列(GenBank No. KC845245), 分别使用 DNAMAN 6.0 软件和在线软件 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>)分析几丁质酶基因酶切位点及信号肽。设计 1 对特异引物 M8505ps 和 M8505pa, 扩增不包含信号肽的 *Trchi2* ORF 片段, 为保证几丁质酶基因定向插入载体 pPIC9K 中, 分别在上下游引物 5'端插入 *EcoR* I、*Avr* II 的酶切位点。

M8505ps: 5'-CCGAATTCTCTCCTTTGGCTGTCGT-3';

M8505pa: 5'-CGCCTAGGTTACTGGCCACGGATG-3'。

以粉红聚端孢菌 M1 的 cDNA 为模板, 以 M8505ps 和 M8505pa 为上下游引物进行 PCR 扩增, 从而获得几丁质酶成熟肽序列。

PCR 反应体系: 模板 DNA 40 ng、10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L、dNTP 2 μ L、Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L、10 \times buffer 2.5 μ L, 用灭菌双蒸水补足 25 μ L, PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 49 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将大小符合预期的片段回收与载体 pMD18-T 连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 测序验证后, 将含有正确读码框的质粒命名为 pMD18-T-*Trchi2*。

1.4 酵母表达载体的构建

提取质粒 pMD18-T-*Trchi2*, 用 *EcoR* I 和 *Avr* II 双酶切质粒 pMD18-T-*Trchi2* 和毕赤酵母表达载体

pPIC9K, 使用 *T*₄ 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转入克隆宿主 DH5 α , 获得的阳性克隆进行菌落 PCR 验证, 提取出的质粒使用 *EcoR* I 和 *Avr* II 双酶切进一步验证目的片段是否插入表达载体, 将验证正确的质粒命名为 pPIC9K-*Trchi2*。

1.5 质粒 pPIC9K-*Trchi2* 电击转化 GS115 感受态细胞

使用 *Sal* I 对质粒 pPIC9K-*Trchi2* 进行线性化, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 将没有进行酶切处理的质粒 pPIC9K-*Trchi2* 作为对照, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 回收目的片段, 电击转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 电击方法参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册, 涂布 MD (Minimal Dextrose Medium) 选择平板。

1.6 重组酵母转化子筛选

1.6.1 筛选 His⁺Mut⁺表现型的酵母转化子

参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册, 将选择平板长出的酵母转化子对应点接在 MM (minimal methanol medium)、MD 平板上继续培养, 筛选 His⁺Mut⁺型酵母转化子。

以菌液为模板, 使用载体通用引物 5'AOX1、3'AOX1 和基因 *Trchi2* 特异引物 M8505ps、M8505pa 分别进行 PCR 扩增, 进一步筛选酵母阳性转化子。

1.6.2 多拷贝转化子筛选

阳性酵母转化子依次点接于含不同浓度(1, 2, 3, 4 mg/mL) G418 的 YPD (yeast extract peptone dextrose medium) 平板, 筛选能在高浓度 G418 平板上生长的含有多拷贝整合的转化子, 获得表达 *Trchi2* 的酵母工程菌。

1.7 重组酵母的诱导表达

将 1.6 筛选得到的酵母工程菌进行诱导表达(汤伟等, 2012), 诱导开始后, 每隔 24 h 添加甲醇至终浓度 0.5%, 并取菌液 1 mL, 离心分离上清液和菌体分别于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冷冻保存, 防止蛋白质变性, 连续取样 9 d。

1.8 表达产物 SDS-PAGE 分析以及几丁质酶活测定

将保存的上清液进行 SDS-PAGE 分析, 确定最佳诱导天数, 收集第 7 天的发酵液, 离心取上清液

作为粗酶液,采用DNS法测定粗酶液中几丁质酶的活性(张奇等,2021)。酶活力单位(U)定义为每分钟产生相当于1 μg的还原糖所需的酶量。蛋白质含量测定采用Bradford法,以牛血清蛋白为标准蛋白,具体操作方法参照文献(李娟等,2000)。

1.9 几丁质酶 *Trchi2* 酶学性质分析

1.9.1 *Trchi2* 最适反应温度

在30~75 °C之间,每5 °C设定为1个温度梯度,分别测定各反应温度下 *Trchi2* 的活性,将最高酶活性定义为100%,结果以相对酶活性表示。

1.9.2 *Trchi2* 温度稳定性

将几丁质酶 *Trchi2* 粗酶液在不同温度下(30~60 °C, 每5 °C为1个梯度)分别保温10~60 min,每10 min为一个时间梯度,检测剩余的酶活力。

1.9.3 *Trchi2* 最适反应pH

将 *Trchi2* 粗酶液和胶体几丁质混合后在不同pH条件下(pH 3~9)反应,测定几丁质酶 *Trchi2* 的酶活力。

1.9.4 *Trchi2* 酸碱稳定性测定

将 *Trchi2* 粗酶液在不同pH值条件下(pH 3~8.5) 45 °C保温1 h,检测几丁质酶的活性。

1.9.5 金属离子对 *Trchi2* 活力影响的测定

Trchi2 粗酶液与胶体几丁质混合后加入不同金属离子,至金属离子终浓度为0.05 mol/L,对照加去离子水,并将其酶活定义为100%,结果以相对酶活表示。

1.9.6 *Trchi2* 酶解产物的分析

采用薄层层析法分析酶解产物(陈小娥,2008)。将酶解反应后的上清液点样于已活化的GF254硅胶板上,以聚合度为1~6的混合几丁寡糖为对照,用正丁醇:水:乙酸:氨水(10:5:5:1)展层后,在0.5%茚三酮溶液中浸泡5 min,于80 °C烘烤5 min进行显色。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶 *Trchi2* 成熟肽基因序列的分离

以粉红聚端孢菌的cDNA为模板,M8505ps和M8505pa为上下游引物进行PCR扩增,获得的基因序列长度约为1 400 bp(图1)。PCR产物与

pMD18-T载体连接,转化 *E. coli* DH5α感受态细胞,菌液PCR筛选阳性克隆;经测序,序列与预期相同,成功获得重组质粒并命名为pMD18-T-*Trchi2*。

2.2 酵母表达载体的构建和鉴定

使用 *EcoR* I 和 *Avr* II 对 pMD18-T-*Trchi2* 重组质粒和酵母表达载体 pPIC9K 同时进行双酶切处理,回收1 432 bp的 *Trchi2* 基因片段和9.3 kb的 pPIC9K 载体片段,连接转化 *E. coli* DH5α感受态细胞,提取阳性质粒,经双酶切验证正确(图2),将获得的重组表达载体命名为pPIC9K-*Trchi2*。

2.2.1 酵母转化子的PCR鉴定

线性化的 pPIC9K-*Trchi2* 电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞,选择 His⁺Mut⁺ 型酵母转化子,使用通用引物 5'AOX1、3'AOX1 进行 PCR 扩增,获得 1 条约 1 900 bp 的条带;使用 *Trchi2* 基因特异性引物 M8505ps、M8505pa 扩增获得 1 条约 1 400 bp 的条带(图3),两条片段大小都与预期长度一致,说明 *Trchi2* 基因成功整合到毕赤酵母 GS115 中。

2.2.2 *Trchi2* 基因多拷贝整合子的筛选

通过G418抗性筛选,获得了在4个浓度G418平板上均能生长的酵母转化子20株,对这些酵母转化子分别进行诱导表达和活力测定,其中编号为GS115-*Trchi2*-2-8的转化子诱导7 d降解胶体几丁质活性最高,为3.96 U/mL(图4)。SDS-PAGE电泳

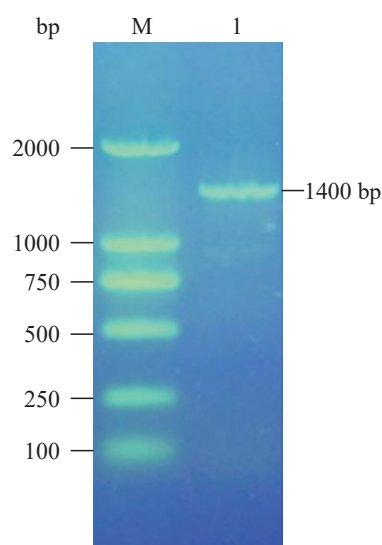


图1 PCR产物的1%琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 1 1% agarose gel electrophoresis analysis of PCR product

M: DL2000 DNA Marker; 1: *Trchi2*

结果显示,表达产物分子量约为 50 kD (图 5),与几丁质酶 *Trchi2* 预测大小(50.83 kD)相符,表明 *Trchi2* 在毕赤酵母中获得了大量表达。

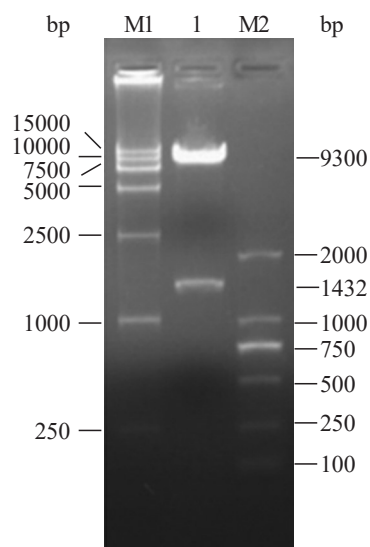


图2 pPIC9K-*Trchi2* 双酶切鉴定
Figure 2 Identification of pPIC9K-*Trchi2* by restrictive enzyme digestion

M1: DL15000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: *EcoR* I 和 *Avr* II 双酶切 pPIC9K-*Trchi2*
1: pPIC9K-*Trchi2* digested by *EcoR* I and *Avr* II

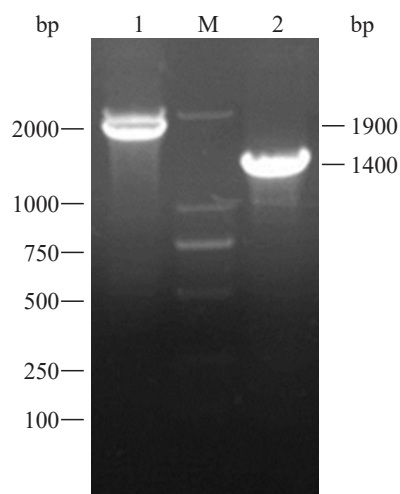


图3 酵母转化子的PCR鉴定
Figure 3 PCR determination of *P. pastoris* transformant

M:DL2000 DNA Marker; 1:用 5'AOX1 和 3'AOX1 扩增的重组酵母基因组 DNA 的 PCR 产物;2:用 M8505ps 和 M8505pa 扩增的重组酵母基因组 DNA 的 PCR 产物

1: PCR product of the recombinant yeast genomic DNA amplified with 5'AOX1 and 3'AOX1; 2: PCR product of the recombinant yeast genomic DNA amplified with M8505ps and M8505pa

2.3 几丁质酶 *Trchi2* 的酶学性质

2.3.1 几丁质酶 *Trchi2* 最适温度

温度对几丁质酶 *Trchi2* 酶活力有明显影响(图 6),在 30~55 °C 的温度范围内,酶活性相对稳定(相对活性 >50%)。反应温度为 45 °C 时 *Trchi2* 活性最高。温度大于 55 °C 时,酶活性急剧下降,70 °C 时的相对活力仅为 20%,当温度达到 75 °C 时,几丁质

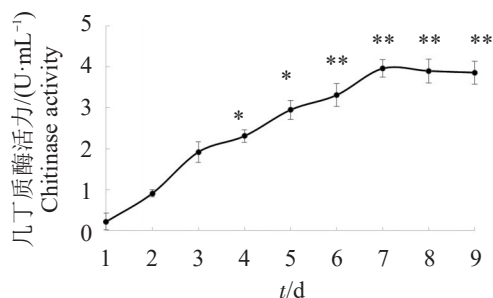


图4 几丁质酶转化子 GS115-*Trchi2*-2-8 酶活曲线
Figure 4 The chitinase activities curve of the transformed GS115-*Trchi2*-2-8

与 1 d 相比,*:差异显著($P < 0.05$);**:差异极显著($P < 0.01$)
Compared with 1 d, *: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

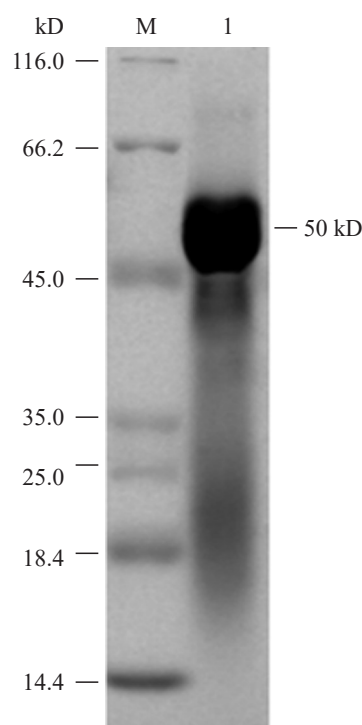


图5 几丁质酶 *Trchi2* 的 SDS-PAGE 分析
Figure 5 SDS-PAGE analysis of chitinase *Trchi2*
M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化后的蛋白
M: Standard protein marker; 1: Purified protein

酶 Trchi2 几乎失活。

2.3.2 几丁质酶 Trchi2 温度稳定性

温度对几丁质酶 Trchi2 稳定性有明显影响(图7),该酶热稳定性较好,在 30~40 °C 保温 1 h 后酶活力变化不明显,温度在 45~55 °C 时,酶活性随保温时间的延长逐渐下降,但处理 1 h 后仍能保留 50% 以上的相对活性,酶液经 60 °C 处理后酶活力显著下降,处理 1 h 后依旧有 25% 的活性,说明几丁质酶 Trchi2 的耐热性较好且温度适应范围较广。

2.3.3 几丁质酶 Trchi2 最适反应 pH

Trchi2 最适反应 pH 为 6, pH 3~6 时相对酶活在 50% 以上,且随 pH 升高逐渐增强, pH 大于 6 时活性随 pH 的升高明显下降,当 pH 达到 8.5 时相对酶活

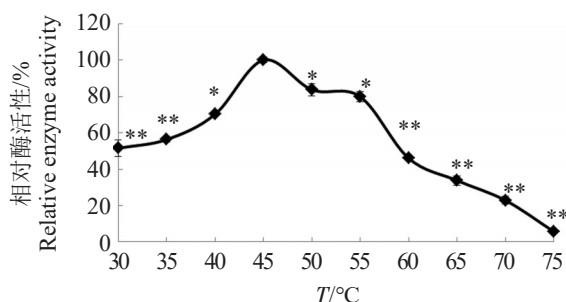


图6 Trchi2 的最适反应温度

Figure 6 The optimal reaction temperature of Trchi2
与 45 °C 相比, *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$)

Compared with 45 °C, *: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

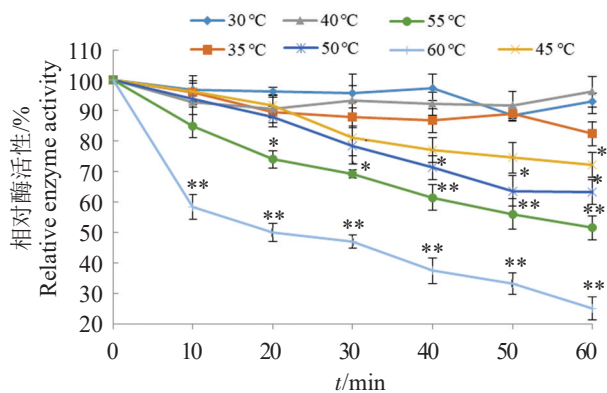


图7 Trchi2 的温度稳定性

Figure 7 The thermostability of Trchi2
与 0 min 相比, *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$)

Compared with 0 min, *: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

为 29.88%, pH 达到 9 时,几丁质酶 Trchi2 几乎失活(图8),由此表明几丁质酶 Trchi2 更适应酸性条件,碱性条件下活性较低。

2.3.4 几丁质酶 Trchi2 的 pH 稳定性

几丁质酶 Trchi2 在 pH 4~7.5 中保温 1 h 活性依旧较稳定 ($> 50%$), pH 大于 7.5 时活性迅速下降(图9),在 pH 8.5 环境中处理 1 h 后相对活性仅剩 10%,说明该酶酸稳定性好,在碱性环境中十分不稳定,几丁质酶 Trchi2 最适保存环境为 pH 6.0。

2.3.5 金属离子对几丁质酶 Trchi2 的影响

几丁质酶 Trchi2 对 0.05 mol/L Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 的耐受力较强,酶活性几乎不受影响,经过 0.05 mol/L Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 处理后几丁质酶 Trchi2 活性受到不同程度的抑制,当反应体系中含有 0.05 mol/L Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 时,Trchi2 几丁质酶活性受到强烈抑制,相对活性在 5% 以下(表1)。

2.3.6 Trchi2 酶解产物的薄层层析分析

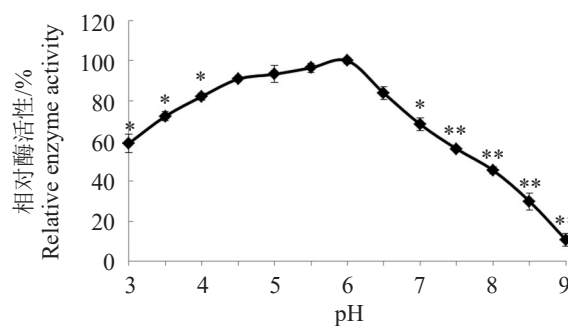


图8 Trchi2 的最适反应 pH

Figure 8 The optimal reaction pH of Trchi2
与 pH 6 相比, *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$); 下同

Compared with pH 6, *: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

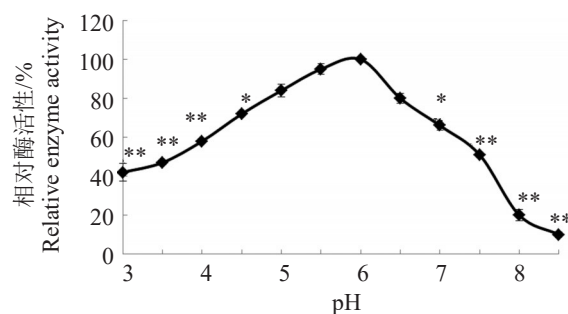


图9 Trchi2 的 pH 稳定性

Figure 9 The pH stability of Trchi2

将几丁质酶 *Trchi2* 与胶体几丁质反应 1 h, 离心后取上清液, 经浓缩 10 倍后点样于 GF254 硅胶板上, 结果显示, 几丁质酶 *Trchi2* 分解几丁质的主要产物为几丁二糖 (N, N-diacetylchitobiose, GlcNAc2)(图 10)。

3 讨论

不同菌寄生真菌产生的几丁质酶酶学特性也存在差异, 大部分真菌几丁质酶分子量在 27~190 kD, 反应适宜 pH 4.0~7.0, 最适反应温度 20~60 °C, 反应体系中各种金属离子对其影响不同(Li, 2006; Li et al., 2004)。对于生防真菌几丁质酶基因的研究现在大多集中在木霉菌, 从贵州木霉(*Trichoderma guizhouense*) NJAU4742 菌株中克隆得到的几丁质酶 *Chi8* 在 30~40 °C 有很高的活性, 最适 pH 6.0, Ca^{2+} 存在时酶活性显著提高, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 有明显的抑制作用, 降解几丁质的产物主要是几丁二糖(王小松等, 2021)。毕赤酵母表达的棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)几丁质酶 *Tachi* 在 40 °C, pH 6.0 时活性最高, 外源表达的几丁质酶 *Tachi* 显著抑制大豆核盘菌的生长, 并通过诱导 ROS 积累和抗性酶活性提高大豆对核盘菌的抗性(张福丽等, 2016)。

粉红聚端孢作为一种菌寄生真菌能够有效的防治多种病原菌, 而几丁质酶是粉红聚端孢感染病原菌、破坏菌核的重要作用因子。张世宏等(2002)从粉红聚端孢菌中分离纯化了 1 个分子量约为 39 kD 的胞外几丁质酶, 最佳反应温度和 pH 作用范围分别为 40 °C、4.0~7.0, 对多种病原菌都有良好的防治效果, 其编码基因未见报道。Pan 等(2006)从粉红聚

端孢菌 s24 中克隆了 1 个开放阅读框为 1 143 bp、编码 380 个氨基酸、分子量为 41.6 kD 的几丁质酶, 并进行了原核表达, 得到的几丁质酶最佳反应温度 40 °C, 最适 pH 4.5~6.5, 当 Hg^{2+} 存在时活性大幅下降、 Cu^{2+} 对其几乎无影响, Ag^{+} 、 Zn^{2+} 对其抑制较弱。

目前, 对粉红聚端孢几丁质酶的研究较少, 本研究通过毕赤酵母外源基因真核表达的方式, 获得了几丁质酶 *Trchi2*, 其最适作用温度和 pH 与大部分真菌几丁质酶作用范围相符; 温度适应范围较广, 温度稳定性强, 有利于在工业生产中保持稳定; 几丁质酶 *Trchi2* 在酸性条件下酶活性较为稳定, 推测其可能是粉红聚端孢在酸性环境下为了水解几丁质产生的酶; *Trchi2* 与胶体几丁质反应产物为几丁二糖; 几丁质酶 *Trchi2* 酶活力达 3.96 U/mL, 为满足实际生产需要可通过优化培养, 分析结构域和催化位点, 通过酶工程技术进行突变等方法提高其催化活性(He et al., 2019), 以达到生产要求。 *Trchi2* 蛋白分子量约为 50 kD, 与其他真菌几丁质酶相比, 其分子量较大。几丁质酶 *Trchi2* 和 *Trchi1* (GU361767) 均来自粉红聚端孢 M1 菌株, 二者蛋白质的氨基酸序列相似性为 39.71%, 其最适反应温度、pH、对金属离子的敏感性和热稳定性均不相同, *Trchi2* 的热稳定性优于 *Trchi1* (咸洪泉, 2011)。 *Trchi1* 和 *Trchi2* 可能是粉红聚端孢 M1 菌株在不同

表 1 不同金属离子对 *Trchi2* 活性的影响

Table 1 Effect of different metallic ions on *Trchi2* activity

| 金属离子 Metalions | 相对活性/% Relative activity | 金属离子 Metalions | 相对活性/% Relative activity |
|-------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| CK | 100.00 | Ag^{+} | 2.57** |
| Cu^{2+} | 1.92** | K^{+} | 91.98 |
| Ca^{2+} | 95.42 | Na^{+} | 92.16 |
| Mn^{2+} | 27.00** | Mg^{2+} | 55.47** |
| Fe^{2+} | 2.69** | Ba^{2+} | 89.31* |
| Hg^{2+} | 0.00** | Zn^{2+} | 68.00* |

与对照 CK (H_2O) 相比, *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$)

Compared with CK (H_2O), *: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

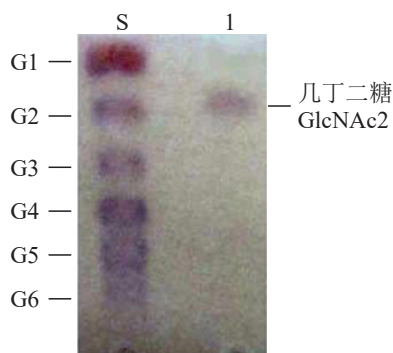


图 10 *Trchi2* 酶解胶体几丁质产物的薄层层析分析

Figure 10 TLC of hydrolysis by *Trchi2* from colloidal chitin

S: 几丁寡糖标准品; 1: *Trchi2* 降解胶体几丁质产物; G1: N-乙酰氨基葡萄糖; G2: 几丁二糖; G3: 几丁三糖; G4: 几丁四糖; G5: 几丁五糖; G6: 几丁六糖

S: Standard chitin oligosaccharides; 1: Hydrolysis products by *Trchi2* from colloidal chitin; G1: GlcNAc; G2: N, N-Diacetylchitobiose (GlcNAc2); G3: GlcNAc3; G4: GlcNAc4; G5: GlcNAc5; G6: GlcNAc6

生长时期或为适应不同环境而分泌的两种几丁质酶,二者可能在粉红聚端孢生长繁殖或水解不同真菌的细胞壁过程中发挥协同作用。

4 结论

本研究通过利用毕赤酵母外源基因表达系统,构建了毕赤酵母工程菌 GS115-*Trchi2*-2-8,诱导表达的重组几丁质酶 *Trchi2*,大小为 50 kD,催化胶体几丁质降解产物主要为几丁二糖(GlcNAc₂);重组几丁质酶 *Trchi2*在温度为 45 °C、pH 6.0 时酶活性达到最大,在 pH 4~7.5、30~55 °C 条件下相对稳定;0.05 mol/L 的 Ag⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 强烈抑制几丁质酶活性。本研究对几丁质酶 *Trchi2* 的基本性质进行了研究,为其功能的深入发掘和生产应用提供了理论依据。对于几丁质酶 *Trchi2* 在寄生、真菌与植物互作等方面的作用有待进一步深入研究。

参考文献

陈小娥,方旭波,余辉,等. 2008. 壳寡糖的薄层层析分析[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 27(4): 361-365. (Chen X E, Fang X B, Yu H, et al. 2008. TLC analysis of chitooligosaccharides[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 27(4): 361-365.)

贺焜. 2014. 利用粉红聚端孢几丁质酶 *Trchi1* 基因和嗜热真菌 *Mnsod* 基因提高水稻抗性的研究[D]. 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 李多川, pp. 149-155. (He K. 2014. Expression of *Trichothecium roseum* chitinase *Trchi1* gene and thermostable *Mnsod* gene in rice enhances resistance[D]. Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Li D C, pp. 149-155.)

李娟,张耀庭,曾伟,等. 2000. 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, 13(2): 118-120. (Li J, Zhang Y T, Zeng W, et al. 2000. Determination of total protein content by Bradford[J]. Chinese Journal of Biologicals, 13(2): 118-120.)

罗鑫,于存. 2019. 拟康宁木霉 *Hailin* 产几丁质酶条件优化及其抑菌能力评价[J]. 中国植保导刊, 39(11): 14-22. (Luo X, Yu C. 2019. Optimization of chitinase production of *Trichoderma koningiopsis* *Hailin* and evaluation of its antibiotoxic ability[J]. China Plant Protection, 39(11): 14-22.)

汤伟,李雅华,刘露,等. 2012. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 *Tachi1* 的酶学性质研究及表达条件优化[J]. 微生物学报, 52(03): 345-352. (Tang W, Li Y H, Liu L, et al. 2012. Characterization and production optimization

of a chitinase (*Tachi1*) from *Trichoderma asperellum* in recombinant *Pichia pastoris* expression system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 52(03): 345-352.)

王小松,马磊,刘志颖,等. 2021. 贵州木霉 NJAU4742 几丁质酶基因 *Chi8* 的克隆、表达和酶学特性研究[J]. 南京农业大学学报, 44(01): 111-118. (Wang X S, Ma L, Liu Z Y, et al. 2021. Cloning, expression and enzymology characteristics of an endo-chitinase gene *Chi8* from *Trichoderma guizhouense* NJAU4742[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 44(01): 111-118.)

戚洪泉. 2011. 菌寄生真菌几丁质酶基因的克隆及功能研究[D]. 博士学位论文, 山东农业大学, 导师: 李多川, pp. 92-95. (Xian H Q. 2011. Cloning, expression and functional analysis of chitinase gene from mycoparasitic fungus[D]. Thesis for PhD., Shandong Agricultural University, Supervisor: Li D C, pp. 92-95.)

魏毅,刘开启,张传云,等. 2004. 粉红聚端孢菌 *TrEn39* cDNA 基因的原核表达[J]. 吉林农业大学学报, 26(04): 399-401; 410. (Wei Y, Liu K Q, Zhang C Y, et al. 2004. Prokaryotic expression of the *TrEn39* cDNA of *Trichothecium roseum* in *Escherichia coli*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 26(04): 399-401, 410.)

于恺. 2008. 嗜热子囊菌光孢变种几丁质酶基因的克隆和表达[D]. 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 李多川, pp. 26-28. (Yu K. 2008. Gene cloning and expression of chitinase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* [D]. Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Li D C, pp. 26-28.)

张福丽,和玉婷,张可,等. 2016. 毕赤酵母异源表达几丁质酶对大豆核盘菌的生防潜能分析[J]. 天津农业科学, 22(11): 6-10. (Zhang F L, He Y T, Zhang K, et al. 2016. Biocontrol potential of chitinase expressed in *Pichia pastoris* [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 22(11): 6-10.)

张奇,王一兵,申乃坤,等. 2021. 产几丁质酶菌株 GXUN-20 的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 42(24): 119-127. (Zhang Q, Wang Y B, Shen N K, et al. 2021. Screening and identification of chitinase-producing strain GXUN-20 and optimization of its enzyme producing conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 42(24): 119-127.)

张世宏,李多川,魏毅,等. 2002. 粉红聚端孢菌胞外几丁质酶纯化、特性及抗菌活性[J]. 植物病理学报, 48(03): 262-266. (Zhang S H, Li D C, Wei Y, et al. 2002. Purification properties and antifungal activity of an extracellular chitinase produced by *Trichothecium roseum* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 48(03): 262-266.)

周玉玲,蒋思婧,贺妮莎,等. 2021. 微生物几丁质酶研究进

- 展及其在 N-乙酰氨基葡萄糖制备中的应用[J]. 微生物学报, 61(08): 2192-2204. (Zhou Y L, Jiang S J, He N S, et al. 2021. Research progress of microbial chitinase and its application in the preparation of N-acetylglucosamine [J]. Acta Microbiologica Sinica, 61(08): 2192-2204.)
- Goughenour K D, Whalin J, Slot J C, et al. 2021. Diversification of fungal chitinases and their functional differentiation in *Histoplasma capsulatum*[J]. Molecular Biology and Evolution, 38(4): 1339-1355.
- He J, Tang F, Chen D, et al. 2019. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*[J]. PLOS ONE, 14(1): e0210548.
- Huang H C, Kokko E G. 1993. *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Canadian Journal of Botany, 71(12): 1631-1638.
- Jayaprakashvel M, Selvakumar M, Srinivasan K, et al. 2010. Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003[J]. European Journal of Plant Pathology, 126(2): 229-239.
- Langner T, Göhre V. 2016. Fungal chitinases: Function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions [J]. Current Genetics, 62(2): 243-254.
- Li D C. 2006. Review of fungal chitinases[J]. Mycopathologia, 161(6): 345-360.
- Li D C, Zhang S H, Liu K Q, et al. 2004. Purification and partial characterization of a chitinase from the mycoparasitic fungus *Trichothecium roseum*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 50(1): 35-39.
- Loc N H, Huy N D, Quang H T, et al. 2020. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34[J]. Mycology, 11(1): 38-48.
- Pan H Y, Wei Y, Xin F R, et al. 2006. Characterization and biocontrol ability of fusion chitinase in *Escherichia coli* carrying chitinase cDNA from *Trichothecium roseum*[J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 61(5-6): 397-404.
- Tzelepis G, Karlsson M. 2019. Killer toxin-like chitinases in filamentous fungi: Structure, regulation and potential roles in fungal biology[J]. Fungal Biology Reviews, 33(2): 123-132.
- Xian H Q, Li J R, Zhang L Q, et al. 2012. Cloning and functional analysis of a novel chitinase gene *Trchi1* from *Trichothecium roseum*[J]. Biotechnology Letters, 34(10): 1921-1928.

(责任编辑 崔学平)