

环状芽孢杆菌几丁质酶基因序列分析、 表达和生物活性测定*

王焰玲 王海燕 秦 敏 张义正**

(四川大学生命科学学院 四川省分子生物学与生物技术重点实验室 成都 610064)

关键词 环状芽孢杆菌, 几丁质酶基因, 枯草芽孢杆菌, 稻瘟病菌

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)05-0616-04

真菌病害一直是影响作物的主要病害之一, 每年造成巨大经济损失。几丁质酶可水解许多病原真菌细胞壁所含有的主要成分—几丁质, 是研究得最多的抗真菌蛋白质。许多几丁质酶基因已从微生物中克隆到, 芽孢杆菌是一类重要的几丁质酶产生菌。环状芽孢杆菌可产生并分泌多种多糖降解酶类, 包括几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶、 β -1, 6-葡聚糖酶和半纤维素酶^[1]。Watanabe 克隆了环状芽孢杆菌 WL-12 菌株的几丁质酶基因 *chiA* 和 *chiD*, 对该几丁质酶基因的结构和功能进行了深入研究^[2~4]。我国的陈三凤克隆了黄杆菌的几丁质酶基因, 但该基因在大肠杆菌中的表达活性很低^[5]。李继红克隆了烟草几丁质酶 cDNA, 在大肠杆菌中获得表达并且表达产物对某些病原真菌具有明显的抗性^[6]。

我们曾从土壤中分离到一株环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)C-2^[7], 从中克隆了一个完整的几丁质酶基因 *cht1*, 该基因能在大肠杆菌中表达并把 35.8% 的几丁质酶蛋白分泌到胞外^[8,9]。本文对该几丁质酶基因进行了 DNA 序列测定和同源性分析, 进行了在枯草芽孢杆菌中的表达及对稻瘟病菌的生物防治试验, 为该几丁质酶基因的深入研究及应用于抗真菌病害的植物基因工程打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Escherichia coli* XL1-blue, *Bacillus subtilis* DB104 由本实验室保存; *Bacillus subtilis* WB6000 为六种蛋白酶基因的突变株, 由加拿大 Calass 大学 Dr. Wong 惠赠^[10]。稻瘟病菌株 *Magnaporthe grisea* E3 由四川省农业科学院植物保护研究所病害室从田间经单孢分离获得。

1.1.2 质粒: pCHT1 由郑洪武等构建^[8]; 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒载体 pSUGV4 由本实验室构建^[11]。

1.1.3 培养基: 几丁质培养基按文献^[5]配制。

1.2 方法

1.2.1 DNA 序列测定: 采用 ABI 公司 377 型测序仪进行, 序列分析采用 DNASIS 软件。

1.2.2 枯草杆菌感受态转化法: 参照 Kunst 的方法进行^[12]。

1.2.3 几丁质酶活性的测定: 参照 Boller 的方法^[13]进行, 酶活性测定均为 3 个平行样品的平均值。

1.2.4 对稻瘟病的抗性测验: ①平板法: 将稻瘟病菌 E3 接种在 PGTY 培养基平板的中部, 当菌落生长到直径 3~4cm 时, 在距菌落边缘 1cm 处接种待测菌株, 2~3d 后观察结果。②温室实验: 水稻易感品种 2134 的种子消毒后于 37℃ 催芽 12h, 播种, 在 25℃~28℃ 和 70% 湿度条件下, 培养 14d, 待水稻长到三叶期后即可用于抗稻瘟病感染实验。将供试菌株以合适的条件培养 48h, 离心取上清液喷洒在水稻叶片

* 国家自然科学基金资助项目(39770412 和 39876400) ** 通讯作者

作者简介: 王焰玲(1964-), 女, 四川成都人, 四川大学生命科学学院副教授, 主要从事微生物分子生物学研究。

收稿日期: 2001-12-17, 修回日期: 2002-05-24

上。24h 后再喷洒浓度为 10^4 个/mL 的经同步培养的稻瘟病菌孢子悬液,保持温度 $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 和湿度 85% 约 7~10d 观察发病情况。每种供试细菌做 3 个平行样。

2 结果

2.1 环状芽孢杆菌 C-2 几丁质酶基因 *cht1* 的核苷酸序列分析

对已克隆的环状芽孢杆菌几丁质酶基因 *cht1* 进行序列测定(GeneBankAF265220),推测出对应的氨基酸序列。该序列中编码区长 2151bp,编码一个长 717 氨基酸残基的几丁质酶蛋白前体,推测其 N 末端具有信号肽。根据环状芽孢杆菌 WL-12 几丁质酶基因 *chiA* 信号肽的切割位点推断,推测本研究所克隆的几丁质酶信号肽的切割位点应在 40^{Ala} 和 41^{Ala} 之间,则成熟蛋白具有 677 个氨基酸残基。*cht1* 基因序列中的 SD 序列 GAAGGAGG 位于起始密码子 ATG 上游 11 个核苷酸处,与大肠杆菌 SD 序列非常相似。基因启动子位于编码区上游 167bp 处,与大肠杆菌 $\sigma 70$ 和枯草芽孢杆菌 $\sigma 43$ RNA 聚合酶启动子有明显的同源性,具有 -10 区和“Pribnow Box”TATCCTA 和 -35 区 TTGAA。该几丁质酶基因的 GC 含量为 49.7%,与枯草芽孢杆菌类似。这些结果为 *cht1* 在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的有效表达提供了理论依据。

2.2 环状芽孢杆菌 C-2 几丁质酶基因 *cht1* 的同源性分析

将 *cht1* 基因与 GeneBank 中几丁质酶基因的核苷酸序列进行比较后发现,*cht1* 与来自于环状芽孢杆菌 WL-12、左氏库特氏菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等细菌的几丁质酶基因具有相当高的同源性,结果见表 1。从几丁质酶基因编码的氨基酸序列比较来看,环状芽孢杆菌 C-2 的几丁质酶 CHT1 与左氏库特氏菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌的同源性分别为 90%、58%、55%,与苏云金芽孢杆菌几丁质酶的氨基酸序列同源性较低,仅为 22%。比较还发现环状芽孢杆菌的几丁质酶 CHT1、*chiA* 与左氏库特氏菌几丁质酶的氨基酸同源性很高,而地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的几丁质酶之间的同源性较高。

环状芽孢杆菌 C-2 的几丁质酶基因 *cht1* 与环状芽孢杆菌 WL-12 的几丁质酶基因 *chiA* 的编码区氨基酸序列具有 90% 的同源性,其成熟几丁质酶氨基酸序列的同源性更高达 95%。比较还发现,*cht1* 和 *chiA* 的蛋白质结构相同,都有 3 个明显的结构域:1)几丁质裂解催化区(41~467),这是各种来源的几丁质酶均具有的保守结构;2)两个 96 个氨基酸串联重复的粘蛋白 III 型同源单位同源区(468~657);3)几丁质结合区(658~709)。由于 *Chl1* 终止密码子位置比 *chiA* 推迟了 18 个氨基酸(710~727),故 *cht1* 的几丁质结合区比 *chiA* 多 18 个氨基酸。

2.3 *cht1* 重组表达质粒的构建

pCHT1 经 *Pst* I 酶切分离 2.9kb 几丁质酶基因片段,与 *Pst* I 酶切的穿梭载体 pSUGV4 连接。转化大肠杆菌后得到两种不同大小的重组质粒,将预期大小的重组质粒命名为 pUSCH1(插入片段 2.9kb),变大的重组质粒命名为 pUSCH2(插入片段约 4.0kb),其增加的 DNA 片段位于 *cht1* 基因的 5' 端,原因有待进一步研究。

将含有 pUSCH1 和 pUSCH2 重组质粒的 *E. coli* XL1-blue 转化子分别点种在几丁质平板上,pUSCH2 在接种 3 d 后出现水解圈,与对照 pCHT1 产生水解圈的时间相同,而 pUSCH1 在 5 d 后才产生水解圈。用比色法测定两转化子的胞内几丁质酶活性,pUSCH2 的胞内几丁质酶活性为 12.9U/L,与 pCHT1 的胞内酶活 12.6U/L 相当,pUSCH1 的胞内几丁质酶活性为 6.5U/L。以上结果表明,C-2 几丁质酶基因克隆到穿梭载体 pSUGV4 后,在大肠杆菌中表达的胞

表 1 *cht1* 与其它细菌几丁质酶基因的核苷酸同源性分析

几丁酶基因来源	同源区长度	平均同源性
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 <i>chiA</i>	整个编码区	81%
<i>Kurthia zopfii</i>	整个编码区	79%
<i>Bacillus subtilis</i>	1288bp	64%
<i>Bacillus licheniformis</i> TP	1231bp	73%
<i>Bacillus thuringiensis</i>	130bp	72%
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 <i>chiD</i>	672bp	70%
<i>Serratia marcescens</i> <i>chiB</i>	272bp	63%

内几丁质酶活性有所降低 ,pUSCH2 中增加的 DNA 片段在一定程度上提高了胞内几丁质酶活性。

2.4 *cht1* 基因在枯草杆菌 DB104 和 WB600 中的表达

重组质粒 pUSCH1 和 PUSCH2 分别转化枯草杆菌 DB104 和 WB600 ,在含有 25μg/mL 卡那霉素的平板上长出转化子 ,从中分离出相应的质粒 DNA。将含有重组质粒 pUSCH1 和 pUSCH2 的枯草杆菌 DB104 和 WB600 菌株点种在几丁质平板上 ,经 28℃ 培养 5 d 后出现微弱的水解圈 ,说明环状芽孢杆菌 C-2 几丁质酶基因在两种枯草芽孢杆菌中均得到表达 ,但表达的胞外酶活性较低。进一步对 4 种转化菌株的胞内几丁质酶活性进行了测定 ,几丁质酶基因在 DB104 中表达的胞内酶活性(9U/L)比在 WB600 中的表达活性高(5 ~ 6U/L) ,而质粒 pUSCH2 中增加的一段 DNA 片段对几丁质酶基因在枯草杆菌中的表达无明显影响。同时测得宿主菌 DB104 和 WB600 不具有任何胞内几丁质酶活性。

2.5 转几丁质酶基因枯草芽孢杆菌对稻瘟病菌的防治试验

首先利用平板法测定枯草杆菌所产生的几丁质酶对稻瘟病菌生长的抑制作用 ,2 ~ 3d 后观察发现 ,含 pUSCH1 pUSCH2 的大肠杆菌和不含重组质粒的枯草杆菌受体菌 WB 600 对稻瘟病菌的生长没有明显的抑制作用 ,枯草芽孢杆菌受体菌 DB104 对稻瘟病菌的生长有一定的抑制作用。而 4 种含有几丁质酶基因的枯草芽孢杆菌转化子的抑菌作用明显更高。

虽然 *cht1* 基因在枯草芽孢杆菌中表达产生的胞外几丁质酶较少 ,但是枯草芽孢杆菌在生长后期 ,随着芽孢的释放 ,菌体破裂 ,大量的胞内几丁质酶可以进入培养基 ,因此我们采用培养上清液作为抗稻瘟病菌温室实验的制剂。栽种水稻品种 2134 ,在喷洒枯草芽孢杆菌培养上清液和接种稻瘟病菌孢子 8d 后

表 2 转几丁质酶基因的枯草芽孢杆菌对稻瘟病的温室防治效果

处理 样品	三个平行样病情指数			病指 平均值	生物防治 效率
	I	II	III		
BD104/pUSCH1	7.45	4.24	2.54	4.74	71.67
DB104	12.71	11.62p	13.19	12.51	25.22
Control	16.73			16.73	

记录水稻幼苗发病情况。从表 2 可以看出 ,转几丁质酶基因枯草芽孢杆菌 DB104 在温室实验中产生了对稻瘟病菌的生物防治作用 ,防治效果达到 71.6%。而没有几丁质酶活性的宿主菌 DB104 的防治效果很低 ,只有 25.22%。从该结果可以推

断 ,在枯草芽孢杆菌中表达的几丁质酶产生了防治稻瘟病菌的作用。

3 讨论

细菌几丁质酶通常由分泌信号肽、催化区、粘连蛋白 TypeⅢ 同源区以及几丁质结合区等 4 个基本功能区组成 ,不同来源的细菌几丁质酶氨基酸序列总体上仍有较大的差异 ,但在它们的催化区和几丁质结合区具有不同程度的同源性。1994 年 Watanabe^[3]对几丁质酶 *chiA* 的粘连蛋白Ⅲ区和几丁质结合区的功能进行了精细的研究 ,发现几丁质结合区缺失后 ,几丁质酶将失去对几丁质的结合使其对几丁质的降解活性大大降低(为原来的 45%) ,单独缺失粘连蛋白Ⅲ区不影响几丁质酶对几丁质的结合 ,但明显降低了几丁质酶对几丁质的降解。Watanabe 认为粘连蛋白Ⅲ区是通过几丁质酶与几丁质的结合在几丁质的水解中起重要作用 ,如调整催化区和几丁质结合区的最佳距离和方向 ,更有利于几丁质的降解。我们在研究中发现 ,*cht1* 基因的一个次克隆正好缺失了粘连蛋白区和几丁质结合区 ,它的几丁质酶活性明显低于完整的几丁质酶基因因^[9]。

许多病原真菌 ,如稻瘟病菌对植物的侵染过程是从叶片开始的 ,需要采用叶面微生物作为生物防治菌剂。陈中义曾将 Bt 杀虫蛋白基因导入枯草芽孢杆菌增强其抑菌活性^[14] ,本研究将环状芽孢杆菌几丁质酶基因转入枯草芽孢杆菌 DB104 中进行表达 ,对稻瘟病菌产生生物防治作用。在自然界中 ,真菌细胞壁的降解是一个复杂的过程 ,需要多种酶类共同作用。通过对本研究结果的分析表明 ,这种生物防治作用并不是几丁质酶单独作用的结果 ,而是几丁质酶和其它真菌拮抗物质协同作用的结果。首先 ,表达几丁质酶的大肠杆菌 XLI-blue/pUSCH2 在平板上没有抑制稻瘟病菌的生长 ,枯草芽孢杆菌 DB104 本身没有

几丁质酶活性,但具有较高的 β -内切葡聚糖酶的活性和少量的蛋白酶活性,因此 DB104 在平板培养条件下有一定的抑制稻瘟病菌生长的作用。已有许多研究结果表明:几丁质酶与 β -内切葡聚糖酶共同作用比它们单独作用的抑菌效果更好。所以我们认为转几丁质酶基因的枯草芽孢杆菌 DB104 所产生的对稻瘟病菌的生物防治作用,是由于表达的几丁质酶和 DB104 中 β -内切葡聚糖酶和蛋白酶等协同作用的结果。

参 考 文 献

- [1] Tanaka H ,Watanabe T. *J Ind Microbiol* ,1995 ,**14**(6) :478 ~ 483 .
- [2] Watanabe T ,Suzuki K ,Oyanagi W ,et al . *J Biol Chem* ,1990 ,**15** :15659 ~ 15665 .
- [3] Watanabe T ,Ito Y ,Yamada T ,et al . *J Bacteriol* ,1994 ,**176**(15) :4465 ~ 4472 .
- [4] Ikegami T ,Okada T ,Hashimoto M ,et al . *J Biol Chem* 2000 ,**275**(18) :13654 ~ 13661 .
- [5] 陈三凤 ,李季伦 ,裴维蕃 . 植物病理学报 ,1992 ,**22**(4) :323 ~ 327 .
- [6] 李继红 ,邵寒霜 ,郑学勤 . 生物工程学报 ,1998 ,**14**(3) :309 ~ 313 .
- [7] 孙 迅 ,任 昶 ,刘德明 ,等 . 四川大学学报 ,1995 ,**32** :207 ~ 212 .
- [8] 郑洪武 ,王焰玲 ,张义正 . 生物工程学报 ,1998 ,**14**(1) :28 ~ 32 .
- [9] 王焰玲 ,郑洪武 ,刘旭玲 ,等 . 生物化学与生物物理学报 ,1998 ,**30**(4) :352 ~ 356 .
- [10] Wu X C ,Lee W ,Tran L ,et al . *J Bacteriol* ,1991 ,**173**(16) :4952 ~ 4958 .
- [11] 刘成君 ,黄 庆 ,赵 莲 ,等 . 四川大学学报 ,2001 ,**38**(2) :243 ~ 246 .
- [12] Kunst F ,Rapaport Q . *J Bacteriol* ,1995 ,**177** :2403 ~ 2407 .
- [13] Boller T ,Mauch F . *Meth Enzymol* ,1988 ,**161** :430 ~ 435 .
- [14] 陈中义 ,张 杰 ,曹景萍 ,等 . 生物工程学报 ,1999 ,**15**(2) :215 ~ 220 .

Study on the Sequence Analysis ,Expression and Application of Chitinase Gene From *Bacillus circulans* *

Wang Yanlin Wang Haiyan Qin Min Zhang Yizheng**

(College of Life Science ,Sichuan University ,Sichuan Key Lab of Molecular Biology and Biotechnology ,Chengdu 610064 ,China)

Abstract : Sequence analysis of the chitinase gene *cht1* of *Bacillus circulans* showed that it contained 2151 nucleotides ,which codes the precursor of chitinase CHT1 with 717 amino acid residues . The nucleotide and deduced amino acid sequences of *cht1* showed 81% and 95% homology with those of *ChiA* of *B. circulans* WL-12 ,respectively . The *cht1* gene was cloned into the *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle vector pSUGV4 and two recombinant plasmids , named pUSCH1 and pUSCH2 which contained 2.9kb and 4.0 kb insert respectively ,were obtained . The recombinant plasmids were transformed into *B. subtilis* DB104 and WB600 . Chitinase activity was detected both in transformed *E. coli* and *B. subtilis* . The DB104/pUSCH1 strain was found to be effective in the bio-controlling the infection of *Magnaporthe grisea* under greenhouse condition ,which showed 71.67% decrease in rice disease incidence .

Key words : *Bacillus circulans* , Chitinase gene , *Bacillus subtilis* , *Magnaporthe grisea*

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39770412 and 39876400)

** Communicate author