

# 哈茨木霉几丁质酶 cDNA 基因的克隆及在酿酒酵母中的表达

刘丕钢 杨 谦\*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

**摘 要:** 为研究哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的生物防治机制并获得与生物防治相关基因, 通过构建哈茨木霉菌丝生长期的 cDNA 文库及对部分表达序列标签序列的测定与生物信息学分析, 成功获得了哈茨木霉几丁质酶 V (ChiV) 基因的全长 cDNA 序列。该基因的编码框长度为 1194bp, 编码 397 个氨基酸, 理论分子量为 44kD。将该基因构建到酿酒酵母诱导型表达载体 pYES2 上, 转化到酿酒酵母 H158 菌株中, 通过 Northern 杂交检验后, 确定该基因在酿酒酵母转录水平上表达。在  $\beta$ -半乳糖诱导下, 转化子在培养 60h 时产生的酶活活性最高, 几丁质酶 V 最适活性温度为 37°C, 在 pH 6 和 pH 8 时活性较高。

**关键词:** 哈茨木霉, 几丁质酶, 表达

中图分类号: Q814, Q812, Q55 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0253-05

几丁质是由 N-乙酰氨基葡萄糖组成的大分子物质, 是植物病原真菌细胞壁的主要组成成分<sup>[1]</sup>。几丁质酶 (Chitinase, EC 3.2.1.14) 能将几丁质降解成几丁质寡糖和单糖, 从而破坏病原真菌的细胞壁, 起到防治真菌病害的作用<sup>[2]</sup>。每年自然界生成的几丁质约为  $10^{11}$  吨, 并几乎以相同的速度被消耗掉, 在这个过程中微生物起了非常重要的作用<sup>[3]</sup>。多种细菌、放线菌以及霉菌能够生产几丁质酶, 而霉菌中以木霉菌研究得最多<sup>[4]</sup>。

由于哈茨木霉几丁质酶对病原真菌细胞壁中的几丁质的水解作用, 在生物防治中具有广泛的应用前景。在植物病害防治中, 几丁质酶在有效地防治植物病原真菌的同时, 还可以刺激植物分泌几丁质酶, 从而增强植物对病原菌的抵抗力<sup>[5]</sup>。近年来, 科学家致力于将来源于微生物的几丁质酶基因转入植物中, 以增强植物的抗菌能力。在英国, 已经成功获得的转基因植物包括烟草、大豆、棉花、水稻和玉米, 这些植物表达几丁质酶的生物活性, 不仅可以抗真菌, 还对其它一些病原微生物具有抗性<sup>[6]</sup>。

本研究通过构建哈茨木霉菌丝体生长期的 cDNA 文库, 经过 EST 序列测定与生物信息学分析后, 获得了哈茨木霉几丁质酶 V 的全长 cDNA 序列。通过表达载体构建后, 转化到酿酒酵母中并获得表达, 为构建具有高效表达能力的酿酒酵母工程菌株以及进一步利用该基因进行植物转化奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 哈茨木霉 T<sub>88</sub> 菌株 (*Trichoderma harzianum*) 由河北农业大学提供; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存; 酿酒酵母大肠杆菌穿梭质粒 pYES2、酿酒酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*) H158 为山东大学微生物技术国家重点实验室鲍晓明老师惠赠。

**1.1.2 试剂:** 植物小量总 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司; Northern 杂交的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自 Roche Applied Science 公司; ET 试剂购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、EX-Taq DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司; 其他生化试剂为国产分析纯。

**1.1.3 培养基:** SC-U A 液: 腺嘌呤 (Adenine) 精氨酸 (Arginine) 半胱氨酸 (Lysteine) 亮氨酸 (Leucine) 苏氨酸 (Threonine) 色氨酸 (Tryptophan) 各 2.5g/L。B 液: 天冬氨酸 (Aspartic acid) 组氨酸 (Histidine) 异亮氨酸 (Isoleucine) 蛋氨酸 (Methionine), 苯丙氨酸 (Phenylalanine) 脯氨酸 (Proline) 丝氨酸 (Serine) 缬氨酸 (Valine) 酪氨酸 (Tyrosine) 各 1.25g/L。SC-U 基本培养基配制: 0.1g/L A 液, 0.05g/L B 液, 6.7g/L yeast nitrogen base, 20g/L 琼脂 (固体), 1.05g/cm<sup>2</sup>、

基金项目: 国家 863 计划 (2003AA241140)

\* 通讯作者。Tel 86-451-86412282 Fax 86-451-86412952 E-mail: yangjian84@hotmail.com

作者简介: 刘丕钢 (1969 - ) 男, 黑龙江省哈尔滨市, 博士研究生, 主要从事真菌功能基因组的研究。E-mail: lpgkevin@sohu.com

收稿日期: 2004-09-22, 修回日期: 2004-12-22

121.3℃条件下灭菌 20min。

**1.1.4 引物 cDNA 合成引物(奥科合成):**依据真核生物的 poly(A)尾的特点设计引物,同时引入 *Xho* I 酶切位点以利于定向文库的构建。poly(T)<sub>30</sub>:5'-GAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。PCR 引物根据所获得的几丁质酶 cDNA 序列,用 DNAMAN 软件设计引物用于分子检测。P1:5'-GAGACGGCTTTCGTTTCAGTC-3'; P2:5'-CGTGTCAATCCACGACTCAC-3'。

## 1.2 cDNA 文库的构建

用 Oligotex mRNA Kit(Qiagen)试剂盒分离出 mRNA 后,以含 *Xho* I 酶切位点的 poly(T)<sub>30</sub> 寡核苷酸为引物,通过逆转录酶(Superscript II)合成双链 cDNA。双链 cDNA 经 T4 DNA 聚合酶末端补平后,用 T4 DNA 连接酶加上 *Eco*R I 接头后,双链 cDNA 末端磷酸化并用 *Xho* I 酶切,采用胶回收试剂盒回收大于 1kb 的双链 cDNA,与载体 pBluescript II SK+(pBK)连接后,用电转仪(Bio-RAD)在 2.1kV 条件下转化大肠杆菌感受态细胞(*E. coli* DH5 $\alpha$ ),将转化产物置于 37℃ 220r/min 振荡 1h, -80℃ 保存。

## 1.3 模板的制备和序列测定

**1.3.1 模板制备:**随机选取 4128 个克隆转至含有 5mL YT 液体培养基的 96 孔板中培养过夜,采用质粒快速提取试剂盒提取质粒。

**1.3.2 序列测定:**用快速纯化试剂盒纯化后,以 T3 作引物进行 PCR 扩增,反应体系(6 $\mu$ L):ET 1.5 $\mu$ L, T3 引物 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2 $\mu$ L, 模板 1.5 $\mu$ L。反应条件:94℃ 10min; 94℃ 10s, 50℃ 15s, 60℃ 60s, 35 个循环; 72℃ 10min。用测序仪(MegaBase1000)从 5'端进行单向测序。

**1.3.3 序列分析及同源性判定:**所测 EST 序列经过聚类分析后,通过 NCBI 中的 BLAST 程序完成同源性比对分析,获得几丁质酶 EST 片段,经 T3 和 T7 引物双向测通后,获得几丁质酶的全长 cDNA 序列,通过国际互联网注册。

## 1.4 几丁质酶基因表达载体构建

将含几丁质酶基因的克隆载体 pBK 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后,回收目的片段,纯化后连接到预先用 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切过的表达载体 pYES2 上。

## 1.5 酵母转化

酿酒酵母转化采用 Invitrogen 公司提供的 pYES2 的转化方法。获得的酵母转化子经菌落 PCR 检验,反应体系(25 $\mu$ L):Ex-Taq 酶 0.125 $\mu$ L(5U/ $\mu$ L), 10 $\times$  Ex-Taq 缓冲液 2.5 $\mu$ L, dNTP 混合物 2.5 $\mu$ L(各

2.5mmol/L), 引物各 0.5 $\mu$ L(10.8mmol/L), ddH<sub>2</sub>O 18.875 $\mu$ L。反应条件:94℃ 5min; 94℃ 30s; 60℃ 30s; 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min。选取 PCR 检验的阳性菌落提取酵母质粒,再次转化大肠杆菌,扩增质粒后酶切检验。

## 1.6 Northern blot

酵母总 RNA 提取采用上海华舜生物工程公司植物小量总 RNA 提取试剂盒。总 RNA 变性及电泳采用常规方法<sup>[7]</sup>, Northern 杂交的探针标记与检测方法参照 Roche 试剂盒说明书。

## 1.7 转化子诱导表达

将带有 pYES2-ChiV 的酵母阳性克隆接种到含有 2% 蜜三糖的 SC-U 培养基中, 30℃、160r/min 振荡培养,待 OD<sub>600</sub> 为 0.8 左右时,取 5mL 菌液转入含 2%  $\beta$ -D-半乳糖 SC-U 培养基进行诱导 60h, 培养液经离心、盐析再用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解后,用 DNS 还原糖法检测几丁质酶活性,对不同培养时间的几丁质酶活性以及最适酶解温度和 pH 值进行测定; 实验设一个用葡萄糖抑制 ChiV 基因表达的负对照, 3 次重复。

几丁质酶活性检测方法采用 DNS 还原糖法<sup>[8]</sup>, 以胶态几丁质为作用底物,在 40℃ 反应 30min, 测定 OD<sub>530</sub> 值并计算还原糖含量。在实验条件下每分钟产生 1 微摩尔还原糖为 1 个酶活单位(U)。

## 2 结果

### 2.1 几丁质酶 V 全长 cDNA 序列的克隆及生物信息学分析

对哈茨木霉菌丝体 cDNA 文库的随机克隆进行 EST 测序分析后,经 BLASTx 与 GenBank 中非冗余蛋白数据库比对分析后,其中编号为 hzm-000902 的 EST 序列与里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的几丁质酶的氨基酸序列的同源性为 89%, 比对结果显示该序列具有完整的 5'端氨基酸序列,推测可能是具有全长 cDNA 序列的哈茨木霉几丁质酶基因。通过以 T3 和 T7 通用引物双向测通后,获得了哈茨木霉几丁质酶 V 的全长 cDNA 序列。该序列长度为 1360bp, 具有完整的编码框,由起始密码子 ATG 至终止密码子 TGA, 共由 1194 个碱基组成, 编码 397 个氨基酸。其理论分子量为 44kD, 理论等电点为 5.18, GC 含量为 56%。在 3'端具有真核生物的加尾信号 AATAAA 以及完整的 poly(A)尾巴,通过国际互联网将该基因成功地登录到 GenBank, 登录号为 AY634683, 命名为 ChiV。

通过 BLAST 程序,在互联网上将所获得的哈茨木霉几丁质酶 V 序列与 NCBI 数据库中的序列在核苷酸水平和氨基酸水平进行了同源性比较,结果表明,在核苷酸水平上,ChiV 与里氏木霉(*T. reesei*)的几丁质酶 V 序列的同源性为 89%,与深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)内切几丁质酶序列同源性为 88%,与其它序列的同源性很低。在氨基酸水平上,与里氏木霉的几丁质酶 V 的同源性为 89%,有 21 个氨基酸不同,在氨基酸水平上具有较高的保守性。ChiV 基因的成功克隆,说明通过 cDNA 文库筛选并结合生物信息学分析手段,是获得全长 cDNA 序列的有效手段,为进一步对该基因的功能验证以及基因转化,从而构建出具有高效生物防治能力的基因工程菌株提供可能。

## 2.2 酵母表达载体的构建

将测序分析后含有目的基因片段的克隆载体 pBK 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,回收目的片段。把回收的目的基因连接到预先用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切的带有高效启动子的酿酒酵母表达载体 pYES2 上,得到 pYES2-ChiV 重组质粒。将该质粒转化大肠杆菌,经选择性培养后,挑选阳性克隆菌株,培养后提取质粒,再用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后电泳检测,得到大小为 5.9kb 空质粒条带和约 1.4kb 的 ChiV 插入片段条带,初步验证将几丁质酶基因构建到表达载体中。经过对所构建载体的序列的重新测定及生物信息学分析,证实了几丁质酶 V 基因与 pYES2 重组成功并在大肠杆菌中复制。保存重组质粒 pYES2-ChiV,用于后续酿酒酵母转化。

## 2.3 酿酒酵母转化子获得

将重组质粒 pYES2-ChiV 转入酿酒酵母后,在 SC-U 平板上进行筛选,酿酒酵母 H158 菌株不能在缺少尿嘧啶的 SC-U 平板上生长,而含有 pYES2 质粒的转化子因为 pYES2 质粒上有 URA3 基因,可以编码合成尿嘧啶,因此可以在 SC-U 平板上生长,通过该方法筛选后获得了数量大于 500 个菌落的酵母转化子。

## 2.4 酵母转化子鉴定

选取 4 个酵母转化子于去离子水中,同时平板划线培养该菌落。以含有空质粒的酵母菌 H158 作对照,进行菌落 PCR 后电泳检验,结果 4 个转化子都获得了特异性条带(图 1),含有空质粒的酵母菌 H158 的电泳结果成阴性,说明几丁质酶基因在酵母转化子中复制表达。培养菌落 PCR 结果呈阳性的转化子提取质粒,回转大肠杆菌,质粒扩增后用

*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,获得了预期的目的片段及载体条带(图 2),进一步证明了酵母转化成功。

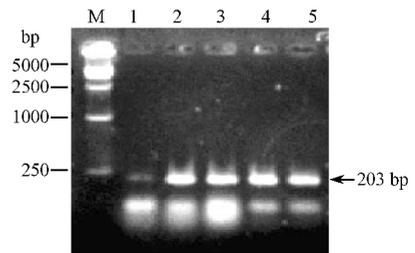


图 1 转化子菌落 PCR 结果

Fig.1 The PCR result of transformants

M Marker of DL15000 ; 1. Empty plasmid ; 2 ~ 5. PCR product from transformants .

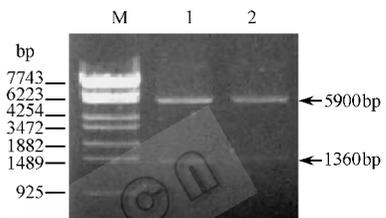


图 2 酵母转化子双酶切鉴定结果

Fig.2 The identification result of yeast transformants by double digestion

M. Marker  $\lambda$ -EcoT14 I digest ; 1 and 2. Yeast transformant digestion by *EcoR* I and *Xho* I .

## 2.5 Northern 杂交结果

分别提取葡萄糖抑制表达的转化子总 RNA、经半乳糖诱导培养 48h 转化子的总 RNA 和诱导培养 60h 转化子的总 RNA,各取 25 $\mu$ L 总 RNA ( $OD_{260}/OD_{280} = 1.986$ ) ,在预先经过严格处理的电泳槽中进行甲醛凝胶变性电泳。经过印迹转膜后,用哈茨木霉几丁质酶基因的 cDNA 片段随机标记探针进行杂交过夜。经放射自显影处理后,结果显示(图 3),葡萄糖抑制的负对照 RNA 泳道没有杂交信号,在诱导表达 48h 和 60h 的转化子 RNA 泳道上得到杂交条带,而且诱导 60h 的杂交信号明显强于诱导 48h 的杂交信号,证明几丁质酶 V 基因在酿酒酵母转录水平上表达。

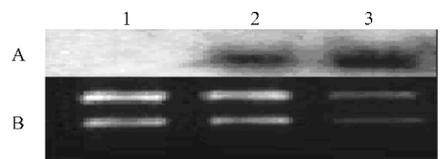


图 3 酵母转化子 Northern 杂交结果

Fig.3 The Northern blot analysis of total RNA from the yeast transformants

A :Northern blot result ; B : Total RNA from yeast transformants .

1. Transformants inhabited by glucose ; 2. Transformants cultured for 48h ; 3. Transformants cultured for 60h .

## 2.6 转化子诱导表达最佳培养时间确定

以胶态几丁质为底物,测定了酿酒酵母转化子在 $\beta$ -半乳糖诱导培养条件下,不同培养时间对转化子酶活的影响,分别测定了培养 36h、48h、60h、72h、84h、96h 的几丁质酶的活性,结果转化子在诱导培养 60h 时所产生的几丁质酶活性达到最高值 19.7U;从 60h 到 96h 几丁质酶活性逐渐降低,初步确定 60h 为转化子的最佳诱导培养时间。

## 2.7 几丁质酶最适活性条件测定

通过对诱导培养 60h 的酵母转化子发酵液的盐析处理后,测定不同反应温度对几丁质酶活性的影响。结果表明,几丁质酶的最适活性温度为 37℃,从 20~37℃ 酶活迅速升高,在 37℃ 时达到最高,随着温度继续提高,酶活迅速下降,确定酵母转化子产生的几丁质酶的最适反应温度为 37℃。

不同 pH 值对几丁质酶的活性影响较大。通过对不同 pH 值条件下几丁质酶活性的检测,该酶在 pH6 和 pH8 时具有较高的酶活性,适于在微酸或微碱性条件下发挥作用。当 pH 值大于 8 时,酶的活性迅速下降,说明该酶不适合在强碱条件下发挥作用。

## 3 讨论

哈茨木霉通过重寄生作用、竞争作用、抗性物质作用、蛋白酶作用等多种机制的协同作用而达到生物防治的目的<sup>[9]</sup>。哈茨木霉通过产生几丁质酶、纤维素酶等物质降解病原真菌细胞壁中的几丁质、纤维素,从而达到崩解病原真菌细胞壁结构,杀灭病原真菌的目的。关于几丁质酶的研究已经很多<sup>[10,11]</sup>,但是关于哈茨木霉几丁质酶 V 的研究还未见报道。哈茨木霉几丁质酶 V 全长 cDNA 序列的获得,为进一步利用该基因生产几丁质酶,以及进行基因转化提供可能。同源植物中的几丁质酶相比较,源于微生物中的几丁质酶的研究具有迅速、高效且易于研究的特点,因此在防治植物病害的应用中具有广阔的前景。

通过将几丁质酶 V 基因成功地构建到表达载体 pYES2 中,构建出携带几丁质酶基因的重组体 pYES2-ChiV,用于酿酒酵母的进一步转化的研究。由于表达载体 pYES2 是一种穿梭质粒,既可以在大肠杆菌中扩增,又可以在酿酒酵母中诱导表达,因此 pYES2-ChiV 的成功构建,既可以实现酿酒酵母的转化与表达,研究该基因的生物学活性以及表达条件,又有利于实现原核质粒扩增后的相关检测。通过对

处于对数生长中期的酿酒酵母的转化,获得了数量大于 500 个菌落的转化子,转化效果比较理想。在对所获得转化子的鉴定中,阳性率为 100%,没有假阳性的转化子出现,说明转化效率很高。本研究中酵母转化子的成功获得以及几丁质酶基因在酵母中的成功表达,为进一步利用几丁质酶进行生物防治提供了广阔的应用前景。首先,可以通过大规模发酵技术生产几丁质酶,将发酵产物加工成具有生物防治能力的生物农药,用于生物防治的实践中。其次,可以通过现代生物技术构建出具有高效杀灭病原真菌的生物工程菌株,实现真正意义上的生物防治。最后,通过转基因技术可以将本研究中所获得几丁质酶基因转化到包括烟草、大豆、棉花、水稻和玉米等多种作物中,构建出具有生防能力的转基因作物,减少化学农药的使用量,实现可持续发展战略。

虽然不同微生物所产生的几丁质酶在性质上有所差异,但一般来说,微生物的几丁质酶在 pH3~9 的范围内具有比较稳定的活性<sup>[12]</sup>,其中在 pH4~8 的条件下几丁质酶的活性最高;室温条件下几丁质酶具有活性,40~50℃ 酶的活性最高。本研究中通过对酵母转化子所表达的几丁质酶的活性检验结果分析,几丁质酶的最适反应温度为 37℃,与大多数微生物产生的几丁质酶的温度作用范围一致;该几丁质酶在两个不同的 pH 值条件下表现出较高的活性,将有利于扩展该酶的应用范围,其机理有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Susanne Z, Christiane G. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, **26**: 131-140.
- [2] Nemat O, Saul R. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **473**: 108-122.
- [3] Reid J, Ogrzydzak D. Chitinase-overproducing mutants of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**: 664-669.
- [4] 孙胜利, 喻子牛. 微生物几丁质酶的研究和应用进展. *生物技术* 2001, **11**(5): 47-50.
- [5] Cirano J, John F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol*, 1992, **14**: 236-240.
- [6] 欧阳石文, 谢丙炎. 转几丁质酶基因研究进展. *生物技术通讯* 2001, **3**: 28-31.
- [7] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001, 518-519.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 8 ] 王 玮. 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖. 北京:高等教育出版社,2000:197-199.
- [ 9 ] 王 芊. 木霉菌在生物防治上的应用及拮抗机制. 黑龙江农业科学,2001,1:41-43.
- [ 10 ] Baek J M, Howell C. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* in the biocontrol of rhizoctonia. *Curr Genet*, 1999, 35:41-50.
- [ 11 ] Bolar J P, Norelli J L, Hayes C K. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology*, 2000, 90:72-77.
- [ 12 ] Leger R, Joshi L, Roberts D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2):709-713.

## Cloning and expression in yeasts of the class V chitinase cDNA gene from *Trichoderma harzianum*

LIU Pi-gang YANG Qian\*

( Department of Life Science and Engineering , Harbin Inst of Technology , Harbin 150001 , China )

**Abstract:** To explore the integrated bio-control mechanism of *Trichoderma harzianum* and acquire some bio-control associated novel genes, a *Trichoderma harzianum* mycelium cDNA library has been constructed and thereby randomly selected clones were sequenced and analyzed by bioinformatics analysis. Full-length cDNA, encoding class v chitinase (ChiV), successfully cloned. The results indicated that the ORF of ChiV was 1194bp, encoding 397 aa, deduced molecular weight 44kD. The gene was ligated to the vector of pYES2 and thereby transformed to the yeast of H158 species. The enzyme activity reached the peak expression after cultured for 60h induced by beta-galactose. The optimal temperature of ChiV is 37°C and the optimal pH is 6 and 8.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*, Chitinase, Expression

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2003AA241140)

\* Corresponding author. Tel 86-451-86412282; Fax 86-451-86412952; E-mail: yangqian84@hotmail.com

Received date: 09-22-2004