

# 嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定几丁质酶 基因的 cDNA 克隆及表达

郭润芳<sup>1,2</sup> 李多川<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学植保学院环境生物系 泰安 271018)

(<sup>2</sup> 河北农业大学食品科技学院生物工程系 保定 071000)

**摘 要** 根据 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定几丁质酶 Chit 的 N-端氨基酸序列和同源保守序列设计简并引物,通过 RT-PCR 及快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 的方法,克隆了该几丁质酶的编码基因 *chit*,全长 cDNA 为 1500bp,包含一个由 442 个氨基酸组成的开放阅读框。该基因已在 GenBank 中注册,登录号为 DQ092332。将成熟肽几丁质酶 Chit 阅读框与酵母表达载体 pPIC9K 连接,构建重组质粒 pPIC9K/*chit*,转化毕赤酵母 GS115,在甲醇的诱导下,成功地分泌出具有生物活性的几丁质酶,诱导 6d 后酶活性达 2.261U/mL,酶蛋白表达量为 0.36mg/mL。该酶的最适反应温度和 pH 值分别为 60℃ 和 5.5,该酶在 50℃ 以下稳定,65℃ 的半衰期为 40min。

**关键词** 几丁质酶;RACE;同源性;表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0099-05

几丁质(N-乙酰葡萄糖胺的  $\beta$ -1,4 线性聚合物)是生物圈中含量丰富的碳水化合物,主要分布在虾、蟹壳中<sup>[1]</sup>。其衍生物、低分子量几丁寡糖因具有多种生物活性,在艾滋病和癌症治疗以及口腔医学领域有着广泛应用,它们是目前几丁质工业中高附加值产品<sup>[2]</sup>,但采用化学类控制几丁质降解,难度较大,成本高,且易对环境造成污染。利用几丁质酶实现几丁质的再生利用以及生物活性物质寡聚糖的生产,有广阔的工业前景。专家们认为,较为理想的是采用现代生物技术获得高效表达几丁质酶的基因工程菌株,来解决几丁质工业化生产的技术难关<sup>[3]</sup>。

疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)是真核生物中生长上限温度很高的一种真菌,我们已分离纯化了该菌的热稳定性几丁质酶,该酶活力较高,且耐热耐酸碱,因而有极高的应用价值<sup>[4]</sup>。本文根据测定的 N-端氨基酸序列和同源保守序列设计简并引物,通过 RT-PCR 及 RACE-PCR 的方法,克隆了 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定性几丁质酶的编码基因,并初步研究了该基因在酵母中的表达,为进一步研究其功能及构建高效表达几丁质酶的基因工程菌株提供平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**:疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)菌株由本实验室分离并保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、JM109 菌株购自上海 Sangon 公司;毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 和 pPIC9K 分泌型表达载体购自 Invitrogen 公司;质粒 pGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司。

**1.1.2 酶和试剂**:TRIzol 购自 Invitrogen;DEPC、Tris、RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、及其它工具酶、IPTG、X-Gal、氨卞青霉素、DNA Marker DL2000 等试剂、胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;SMART RACE 试剂盒购自 Clontech 公司。

**1.1.3 培养基**:LB 培养基参见文献[5],YPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

**1.1.4 引物**:基因的克隆与表达所用引物序列如下,引物利用 DNAMAN 软件设计并由上海 Sangon 公司合成。P11: 5'-TACTTYGTCAAYTGCCYAT-3'; P41: 5'-CAGCRTARTCRTAAGCCAT-3'; P3-1: 5'-GCCTGACTTTGTGGCTCTGCTGC-3'; B26 5'-GACTC

基金项目:国家自然科学基金(30270013,30170013);国家“863 计划”(2003AA241162)

\* 通讯作者。Tel 86-538-8249071;E-mail:ldc20@sdau.edu.cn

作者简介:郭润芳(1969-),女,河北怀安人,山东农业大学植保学院博士生,主要从事嗜热酶学研究。E-mail:runfangg@163.com

收稿日期:2005-04-25;接受日期:2005-07-12;修回日期:2005-11-18

TAGACGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; GSP51: 5'-CACCCGCCGATAGACAGCAGAACCCTTG-3'; UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC AACGCAGAGT-3' (由 kit 提供); CH-ep5: 5'-TC GAATTCTCGTTGCATCTGCATACTATC-3' (*EcoR* I 酶切位点); CH-ep3: 5'-TTGCGGCCGCTCACTCTCCCGG GAAGCCAGC-3' (*Not* I 酶切位点)。

## 1.2 热稳定几丁质酶基因全长 cDNA 序列的克隆

### 1.2.1 总 RNA 的提取

在几丁质酶诱导培养基中接种 *Thermomyces lanuginosus* 50°C 恒温培养 3d, 过滤收集菌丝以提取总 RNA。操作方法参照 TRIzol 试剂盒说明进行。

### 1.2.2 RT-PCR

首先是第 1 链 cDNA 的获得 (RT), 按照 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒说明进行。PCR 所用正向引物 P11 是根据纯化的热稳定几丁质酶的 N-端氨基酸序列 (YFVNWAI) 设计的简并引物, 反向引物 P41 是在分析、比较已报道的真菌几丁质酶氨基酸序列的基础上, 根据高度保守的 LMAYDYA 序列设计的简并引物。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): cDNA (10ng/ $\mu$ L) 2 $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer 2.5 $\mu$ L, 10mmol/L dNTP 2 $\mu$ L, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L, 上、下游引物 (5 $\mu$ mol/L) 各 2 $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 12 $\mu$ L。PCR 反应条件: 94°C 3min; 94°C 45s, 49°C 45s, 72°C 1min, 共 30 个循环; 72°C 10min。所得 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段回收纯化后克隆到 pGEM-Teasy Vector 上并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。阳性克隆经 *EcoR* I 酶切验证后进行序列测定。测序工作由上海基康生物技术有限公司在 ABI377 测序仪上完成。

### 1.2.3 3'RACE

根据已测定的序列设计特异引物 P3-1, 用 P3-1 和 B26 进行 PCR 反应。反应条件: 94°C 3min, 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 90s, 共进行 30 个循环; 72°C 10min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.2.4 5'RACE

按照 Clontech 公司的 SMART RACE 试剂盒说明进行。根据已知序列设计特异引物 GSP51, 用 GSP51 和 UPM (由 kit 提供) 进行降落 PCR (Touchdown PCR)。反应条件: 94°C 3min, 72°C 3min, 进行 3 个循环; 94°C 1min, 68°C 1min, 72°C 1min, 共进行 3 个循环; 94°C 1min, 65°C 1min, 72°C 1min, 共进行 25 个循环。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。将目的片段进行回收、连接、转化并测序。

## 1.3 几丁质酶基因的酵母表达

### 1.3.1 酵母表达载体的构建

根据获得的几丁质酶

cDNA 序列设计一对表达引物 CH-ep5 和 CH-ep3, 在引物的 5'端分别引入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对 PCR 产物进行双酶切, 同时用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切酵母表达质粒 pPIC9K, DNA 胶回收试剂盒回收纯化 *chit* 基因及载体 pPIC9K 片段。然后进行体外连接, 重组质粒转化毕赤酵母 GS115, 以空质粒转化 GS115 为对照。在含 Amp 的 LB 转化平板上挑选单菌落, 提取质粒 DNA, 进行 PCR 和酶切鉴定, 测序确认重组质粒的读码框正确。

### 1.3.2 酵母的转化和筛选

将重组表达质粒 pPIC9K/*chit* 和 pPIC9K 空质粒分别用限制性内切酶 *Sac* I (位于 5' AOX1 区内) 线性化后, 采用氯化锂法转化酵母菌株 *P. pastoris* GS115 酵母感受态细胞, 转化方法参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。用灭菌牙签挑取转化子对应点种在 MM 和 MD 平板上, 30°C 培养 2~4d, 挑取在 MD/MM 平板上均生长良好的转化子为阳性转化子。

### 1.3.3 重组酵母的诱导表达

将阳性转化子接种于含 25mL BMGY 培养基中, 30°C、250r/min 摇床培养 24h (*OD*<sub>600</sub> 达 2~6), 离心收集菌体, 将细胞重悬于适当体积的 BMMY 培养基中, 至 *OD*<sub>600</sub> 值为 1.0, 30°C、250r/min 继续培养, 每 24h 补充甲醇至终浓度为 0.5%, 每 24h 取样, 室温 10000  $\times$  g 离心 5min, 取上清进行 SDS-PAGE 分析和酶活性检测。

## 1.4 重组酵母表达产物分析

### 1.4.1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

分别取诱导 48h、72h、96h、120h、144h 和 168h 培养物的上清液进行 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达情况。

### 1.4.2 重组几丁质酶的酶活力检测和蛋白含量测定

采用 DNS 法测定几丁质酶的活性<sup>[6]</sup>。酶活力单位 (U) 定义: 每分钟水解几丁质产生 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶蛋白量。蛋白质含量测定采用 Bradford 法<sup>[7]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

### 1.4.3 重组几丁质酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

在不同的 pH 反应条件下检测几丁质酶的酶活力, 将重组几丁质酶在不同的 pH 缓冲液中 50°C 保温 30min, 检测剩余酶活力。

### 1.4.4 重组几丁质酶的最适反应温度及热稳定性

在不同温度条件下测定重组几丁质酶的酶活力, 将最高的酶活力定义为 100%, 分别计算不同温度条件下几丁质酶的相对酶活性; 将重组几丁质酶在不同的温度下保温 30min, 检测剩余酶活力。

## 2 结果

### 2.1 热稳定几丁质酶基因 *chit* 全长 cDNA 的克隆及序列分析

以 *Thermomyces lanuginosus* 总 RNA 为模板进行 RT-PCR 获得约 600bp 的片段,与预期大小相符。根据测定的片段序列设计特异引物,利用 SMART RACE 法进行 5'RACE 和 3'RACE,分别获得长度约为 480bp 和 900bp 的片段(图 1)。将目的带切下纯化后 T/A 克隆测序。结果表明,5'RACE 和 3'RACE 的插入片段长分别为 470bp 和 910bp。将 RT-PCR、3'RACE 和 5'RACE 的序列进行拼接,拼接处重叠 204bp 和 270bp,拼接的序列长 1500bp。该序列已在 GenBank 中注册,检索号为 DQ092332。

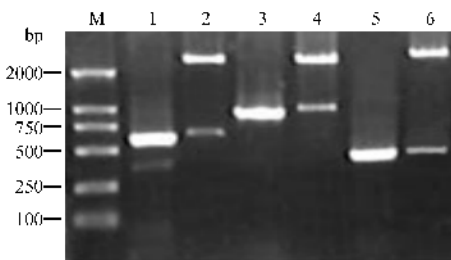


图 1 热稳定几丁质酶基因 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of PCR product from thermostable chitinase gene

M. DNA marker DL2000; 1. RT-PCR product; 2. Recombinant plasmid of RT-PCR digested by *EcoR* I; 3. 3'RACE-PCR product; 4. 3' Recombinant plasmid digested by *EcoR* I; 5. 5'RACE-PCR product; 6. 5' Recombinant plasmid digested by *EcoR* I.

几丁质酶基因 *chit* 的全长 cDNA 序列为 1500bp,包含一个 1326bp(49~1377bp)的开放阅读框(ORF),编码 442 个氨基酸。预测的产物大小为 49kDa。去除信号肽的 N 端氨基酸序列与测定的纯酶 N 端序列完全一致,切割信号肽后成熟肽大小预测为 46kDa,与 SDS-PAGE 检测的纯化蛋白分子量 48kDa 稍有差异,这可能与成熟蛋白的糖基化有关。*chit* 基因编码产物的理论等电点为 5.6,推测该蛋白是酸性蛋白质。氨基酸序列分析还发现两个潜在的 N-糖基化位点。

### 2.2 序列同源性比较

比较 *chit* 和其它 18 家族几丁质酶的氨基酸序列,结果显示几丁质酶 Chit 与该家族几丁质酶有较高的同源性,与丝状真菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、金龟绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)同源性分别达 56.6%、45.2%、46.3%、

57.3%,与酵母 *Candida albicans* 的同源性为 29.9%,而与细菌苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的同源性达 17.2% 和 16.1%。比较几丁质酶的催化区序列,发现有两个保守基序 S-GGW 和 DG-D-DWE 非常保守,有报道这两保守序列为糖基水解酶(glycosylhydrolases) 18 家族活性位点基序。其中, D177、D179、E181 高度保守,与几丁质酶的催化活性相关。因此认为该几丁质酶属于 18 家族几丁质酶。

### 2.3 重组毕赤酵母表达产物的分析

**2.3.1 重组几丁质酶的诱导表达和 SDS-PAGE 分析:** 筛选的重组酵母菌株 GS-CH-8 经诱导表达后,分别取诱导 48h、72h、96h、120h、144h 和 168h 培养物的上清液,进行酶活性检测和 SDS-PAGE 分析。随着诱导时间的延长,单位体积(mL)诱导上清液中的几丁质酶活性不断增加,甲醇诱导 6d 酶活性达到最高(2.26U/mL),酶蛋白表达量为 0.36mg/mL。SDS-PAGE 分析结果显示在 48kDa 处有一条特异蛋白条带,说明几丁质酶基因 *chit* 已经在毕赤酵母中进行了有效的表达,且表达蛋白的表观分子量与理论计算值基本相符。

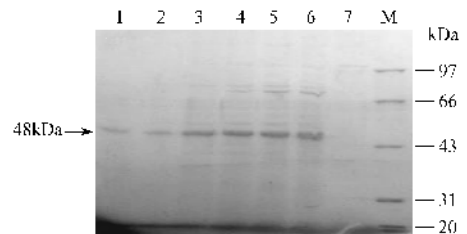


图 2 重组几丁质酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant chitinase from GS-CH-8 strain 1. 48h; 2. 72h; 3. 96h; 4. 120h; 5. 144h; 6. 168h; 7. Negative control (GS115/pPIC9Kafer 168h); M. Molecular weight marker.

**2.3.2 重组几丁质酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性:** 在不同的 pH 反应条件下检测几丁质酶的酶活力,表明重组几丁质酶的最适作用 pH 值为 5.5;将重组几丁质酶在不同的 pH 缓冲液中 50℃ 保温 30min,检测剩余酶活力,在 pH2.0~6.0 之间 *Thermomyces lanuginosus* 几丁质酶较稳定,即使在 pH 值为 2.0 时,仍具有 70% 的剩余酶活性(图 3)。说明重组几丁质酶在酸性环境中非常稳定。

**2.3.3 重组几丁质酶的最适反应温度及热稳定性:** 在不同的温度下(30℃~80℃)检测几丁质酶的活性,结果表明,重组几丁质酶的最适作用温度为 60℃;重组几丁质酶在 55℃ 以下保温 30min,酶活性基本没有损失;65℃ 保温 30min,仍具 70% 的相对酶

活性(图3),结果表明重组几丁质酶具有较高的热稳定性。

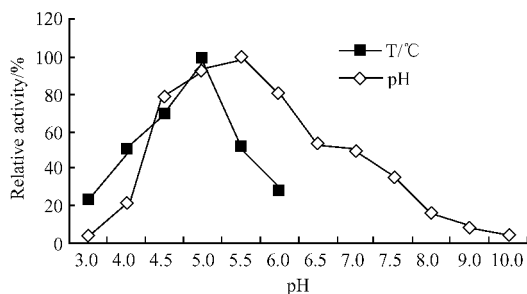


图3 重组几丁质酶的最适反应 pH 和温度

Fig.3 The optimum reaction pH value and temperature of recombinant chitinase

### 3 讨论

我们已报道纯化了疏绵状嗜热丝孢菌几丁质酶,该酶热稳定性高,耐酸耐碱,在几丁质废物的生物转化工业和生物技术中有很好的应用优势<sup>[4]</sup>。但真菌几丁质酶的工业化生产受多方面因素的限制,如真菌的菌丝体向发酵系统中的转移、菌丝体与不溶性底物的混合难度等等<sup>[3]</sup>。因此利用重组微生物实现几丁质酶的工业化生产、提高几丁质酶的活性和产量,是目前较为理想的方法。

已知蛋白质的部分氨基酸序列,要获得其编码基因,RACE-PCR是一个较为快速、简单和高效的方法。本实验中根据测定的纯酶N端氨基酸序列和报道的几丁质酶催化区保守序列设计了一对简并寡核苷酸引物,通过反转录PCR获得一段中间序列,以此设计特异引物进行3'和5'末端序列的分离,成功获得了疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的全长cDNA序列。由核苷酸序列推导的相应氨基酸序列结构包括N端信号肽序列、催化区和C端区。切割信号肽后成熟肽大小预测为46kDa,而纯化的热稳定几丁质酶经SDS-PAGE检测分子量约为48kDa,表现分子量和理论分子量之间的差异,可能是疏绵状嗜热丝孢菌几丁质酶经过了糖基化修饰(氨基酸序列中有两个潜在的糖基化位点)。几丁质酶的催化区序列中有两个基序S-GGW和DG-D-DWE非常保守,有报道这两保守序列为糖基水解酶(glycosylhydrolases)18家族活性位点基序<sup>[8]</sup>。其中不变氨基酸残基Asp和Glu与几丁质酶的催化机制有关。Milewski等<sup>[9]</sup>通过化学修饰证实了Asp/Glu残基对*C. albicans*几丁质酶的催化活性很重要;Watanabe等<sup>[10,11]</sup>利用定点突变提供了强有力的证

据,证明细菌几丁质酶中Asp和Glu残基与几丁质酶的催化活性密切相关,因此该酶应属于几丁质酶18家族。

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)表达系统是一类表达外源蛋白较理想的真核表达系统。迄今为止,已有400多种外源蛋白在此体系中成功表达<sup>[12]</sup>。本实验利用*P. pastoris*表达系统成功地表达了来源于*Thermomyces lanuginosus*的热稳定几丁质酶基因。表达量高达0.36g/L以上,达到了已报道的0.3~12g/L多数高效表达水平<sup>[13]</sup>,而且表达几丁质酶的酶学特性与原始出发菌株*Thermomyces lanuginosus*几丁质酶类似,初步证明了利用酵母表达和生产该几丁质酶是可行的。期望能对该基因进行改造,或进一步优化表达条件,获得真正有工业应用价值的酵母工程菌株。

### 参 考 文 献

- [1] Muzzarelli RA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 1997, **53**: 131-140.
- [2] Felse PA, Panda T. Studies on application of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, 1999, **20**: 505-512.
- [3] Felse PA, Panda T. Production of microbial chitinase-A revisit. *Bioprocess Engineering*, 2000, **23**: 127-134.
- [4] 郭润芳,李多川,王荣.疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 270-274.
- [5] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆试验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社,2002,1595-1604.
- [6] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1951, **31**: 426-428.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-259.
- [8] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993, **293**: 781-788.
- [9] Milewski S, O'Donnell RW, Gooday GW. Chemical modification studies of the active center of *Candida albicans* chitinase and its inhibition by allosamidin. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 2545-2550.
- [10] Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, et al. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 18567-18572.
- [11] Watanabe T, Uchida M, Kobori K, et al. Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 2283-2285.

- [12] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **24**: 45-66.
- [13] 何 诚, 朱运松. 甲醇营养型酵母表达系统的研究进展. *生物工程进展*, 1998, **18**(3): 7-11.

## cDNA cloning and expression of thermostable chitinase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*

GUO Run-fang<sup>1,2</sup>, LI Duo-chuan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of Environmental Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

(<sup>2</sup> Department of Bioengineering, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**Abstract**: A chitinase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus* was cloned by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) using degenerated oligonucleotide primers designed from N-terminal amino acid sequence and the conserved amino acid sequence. The cloned full-length cDNA named *chit*, 1500bp in size, contained an ORF with 442 amino acids. The gene *chit* has been registered in GenBank with accession number DQ092332. The alignment results of putative amino acids sequence showed the catalytic domain of *chit* was high homology with the catalytic domains of the other chitinases in family-18, contained 2 conserved motifs related with catalytic activity of chitinase. The recombinant plasmid was generated by inserting the ORF of mature protein Chit into expression vector pPIC9K, and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The recombinant chitinase was secreted successfully with the expression level of 0.36mg/mL and its activity could reach to 2.261U/mL after methanol induction 6d. The recombinant chitinase exhibited optimum catalytic activity at pH 5.5 and 60°C. The enzyme was stable at 50°C and the half life time at 65°C was 40min.

**Keywords**: Chitinase; RACE; Homology; Expression

Foundation item: Chinese National Nature Science Foundation (30270013, 30170013); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241162)

\* Corresponding author. Tel: 86-538-8249071, E-mail: lide20@sdau.edu.cn

Received 25 April 2005/Accepted: 12 July 2005/Revised: 18 November 2005