

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):493-499; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因的克隆与表达分析

王金芳, 刘光英, 翟逸, 万永继*

(西南大学生物技术学院, 重庆 400716)

摘要:【目的】为揭示昆虫病原真菌分泌的几丁质酶对宿主感染致病时的作用,对莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因进行了克隆与表达,并检测了表达产物的活性。【方法】采用 CTAB 法提取菌体 DNA,设计特异性引物,多次 PCR 扩增克隆莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因全序列,并克隆基因的 ORF 片段 *chit1*,与载体 pPIC9K 相连接,构建表达载体 pPIC9K-Chit1,转入毕赤酵母感受态细胞中,然后通过 1.5 mg/L 浓度的 G418 筛选及 PCR 验证,将阳性转化子进行诱导培养,对发酵液分别进行酶活性测定试验、几丁质酶透明圈验证试验和 SDS-PAGE 电泳检测。【结果】莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因全长序列为 2756 bp (NCBI 登录号: EU795711),PCR 扩增得到开放阅读框 ORF 片段 *chit1* 为 1827 bp,其中包含 3 个内含子,5'端非编码区长 76 bp,3'端非编码区 240 bp,编码 424 个氨基酸的几丁质酶前体,理论信号肽剪切位点在 Gly (20) 与 Leu (21) 之间;毕赤酵母重组细胞发酵液中几丁质酶活性随着发酵时间的延长而增加,72 h 达到最大值 482.5 U/100 μ L,透明圈活性验证试验显示,在含 1% 的几丁质平板上可出现明显的透明圈,表达产物 SDS-PAGE 电泳检测其分子量为 41.0 kDa。【结论】本研究克隆到莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因,其 ORF 成功重组到毕赤酵母中并表达出有活性的几丁质酶。基因表达产物的利用对进一步研究病原真菌染病昆虫的机制等具有重要意义。

关键词: 莱氏野村菌;几丁质酶;克隆;表达;产物活性

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0493-07

几丁质是由 N-乙酰- β -D-葡萄糖胺 (N-Acetyl- β -D-Glucosamine, GluNAc) 以 β -1,4 糖苷键连接而成的不分支线性多糖,在昆虫体壁中起着骨架结构作用,占昆虫体壁干重的 17% - 50%。当昆虫体壁的几丁质合成受阻或被昆虫病原真菌降解时,病原真菌穿透体壁的速度得到提高^[1]。昆虫病原真菌在侵染过程中分泌的几丁质酶是一类重要的水解酶,能将几丁质降解成几丁寡糖和单糖,帮助病原真菌菌丝穿透体壁,而且几丁质酶也可以水解幼虫中肠的几丁质,从而有利于细菌或病毒的入侵,加速幼虫罹病速度,提高幼虫死亡率^[2-3]。由于真菌细胞壁也有几丁质组分,几丁质酶可应用于对植物致病性真

菌的生物防治,另一方面几丁质酶对壳聚糖等生物资源的降解开发利用也有着非常重要的作用^[4-6]。

莱氏野村菌 (*Nomurea rileyi*) 为虫生真菌,可作生防菌开发。该菌最早的记录者是 Farlow (1883 年),其后国外有很多文献报道在不同的寄主昆虫发现该菌,但生物学分类名称较混乱,一直到 1974 年 Kish 等建议确定种属名称为 [*Nomurea rileyi* (Farlow) Samson],一直沿用至今^[7-8]。国内 1980 年代后陆续开展用该菌防治害虫的研究,但尚未见到有关菌株生物学性状及分子生物学的报道。莱氏野村菌 Cq 菌株为本实验室分离保存,已就生物学、生态学及几丁质酶发酵条件进行了研究报

基金项目: 西南大学博士基金 (100082); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金

* 通信作者。Tel: +86-23-68251585; E-mail: canbl3312@126.com

作者简介: 王金芳 (1983 -), 女, 吉林人, 硕士研究生, 从事病原微生物分子生物学及生理生化研究。E-mail: jinfang556@163.com

收稿日期: 2009-09-22; **修回日期:** 2010-01-23

道^[9-10]。近年来,昆虫病原真菌的几丁质酶受到关注,在研究几丁质酶基因的表达过程中国内外主要利用原核生物大肠杆菌(*E. coli*)表达系统^[11-14],在真核生物酵母菌系统中的表达研究较少,而莱氏野村菌几丁质酶基因的表达研究尚未见相关报道。本试验选择真核生物毕赤酵母作为表达系统,克隆莱氏野村菌几丁质酶基因并进行重组表达,期望推进莱氏野村菌侵染致病机制及生物防治方面的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及主要载体:莱氏野村菌 cq 菌株(N. rCq20031021)保存于西南大学生物技术学院无脊椎动物病理研究室;毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 菌株及真菌表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶为 TakaRa(大连)公司产品,连接酶、几丁质、胰化蛋白胨和酵母提取物为上海生工(Sangon)产品,胶回收试剂盒为 OMEGA 公司,PCR 引物合成与测序均委托上海英俊生物技术公司完成,N-乙酰-β-D-葡萄糖胺(GluNAc)购自 Sigma 公司;电转化仪 Electroporator2510 为德国 Eppendor 公司产品,TC-312PCR 仪购于英国 Techne 公司。

1.1.3 培养基:YPD、MD、BMGY、BMMY 培养基按 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册配方配制。

1.2 真菌的培养及基因组 DNA 的提取

从萨氏固体培养基上刮取分生孢子到萨氏液体培养基中,浓度为 10^6 /mL, 26℃ 培养 5-7 d 至菌丝大量产生。采用 CTAB 法提取 DNA^[15]。

1.3 几丁质酶全长序列基因的克隆

1.3.1 基因核心片段的克隆:对丝状真菌类的若干几丁质酶进行相似性分析,并在这些几丁质酶之间分析保守的氨基酸区段,根据其中两个保守区段设计合成一对简并引物,上游引物 5'-ATGAARG AYTGGGGYTTYGATGG-3',下游引物 5'-CCCAR ATWCCRITCTCCCAGC-3'。扩增几丁质酶基因核心片段,重复 3 次测序验证。

1.3.2 YADE 法延伸 3' 和 5' 端未知序列:用 *Dra* I 酶切莱氏野村菌基因组 DNA,稀释酶切 DNA 到 4-10 ng/μL 后进行连接,连接方法采用 YADE 法^[15]。

1.4 毕赤酵母重组表达载体的构建

根据全长序列设计带有 *Not* I 和 *Eco* R I 酶切位

点的引物,上游引物 RNA45: 5'-CCAGAATTCCTT GCGGCTCTTGTTC-3',下游引物 RNA1640: 5'-CTTGCGGCCGCTGTATGTGCCAGCAAGAC-3',扩增几丁质酶基因(命名为 *chit1*) ORF 片断,同时用 *Not* I 和 *Eco* R I 分别双酶切空载体 pPIC9K 的 DNA,然后进行连接,16℃ 反应 30 min,然后用内切酶 *Pme* I 将重组质粒 DNA pPIC9k-*chit1* 线性化。连接产物直接用于转化 *E. coli* 感受态细胞。

1.5 毕赤酵母的转化与筛选

电击毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 感受态细胞和重组质粒 pPIC9k-*chit1* DNA 混和液,然后加入冰预冷的山梨醇溶液混匀细胞,并涂布在 MD 平板上,30℃ 培养至单个菌落出现,将单个菌落接种于 96 孔细胞培养板上,30℃ 静置培养 2 d,然后取 1 μL 96 孔细胞培养板中的菌液,分别点接在含 1.50 mg/mL G418 浓度的 YPD 平板上生长筛选。

pPIC9k 空质粒处理同上,转化菌作为阴性对照。

1.6 毕赤酵母转化子的 PCR 验证

挑取 G418 筛选平板上生长的优势菌落进行 PCR 验证,PCR 验证引物为 RNA45、RNA1640。

1.7 重组酵母的表达

将验证正确的单菌落接种于 BMGY 液体培养基,30℃ 摇床培养至 OD_{600} 达到 2-6,低速离心收集菌体,按 $OD_{600} = 1$ 转接到 BMMY 液体培养基中继续摇床培养。每隔 24 h 向其中添加 100% 甲醇至终浓度为 1%,分别于 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 取 1 mL 菌液样品,离心收集上清和菌体。

1.8 表达产物的定性与定量检测

1.8.1 几丁质平板定性检测:定性检测平板的成分为:1% 胶体几丁质,1.7% 琼脂,通过透明圈检测发酵液的几丁质酶。

1.8.2 几丁质酶活性定量检测^[16]:收集上清液,取 250 μL 酶液、250 μL 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(KPB, pH6.4)、200 μL 10 mg/mL 胶体几丁质,混匀,37℃ 反应 1 h,12000 r/min 离心 5 min;将上清液转入另一只离心管,加入 50 μL 蜗牛酶,37℃ 反应 30 min;加入 100 μL 0.8 mol/L 的硼酸钠缓冲液(pH 10.2),沸水浴 3 min,冷却到室温后加入对二甲氨基苯甲醛(DMAB)3 mL 37℃ 反应 20 min,测定吸光值(OD_{540})。几丁质酶 1 个酶活单位定义为:37℃ 保温反应 1 h 降解 1 nmol GluNAc 所需的酶量。

1.8.3 SDS-PAGE 分析:取浓缩后的发酵液进行 SDS-PAGE,检测几丁质酶的分子量。

2 结果

2.1 莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因的结构

莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因全序列为 2756 bp (NCBI 登录号: EU795711), 开放阅读框 (ORF) 1827 bp, 其中包含 3 个内含子, 长度分别为 111 bp, 68 bp, 60 bp, 分别位于序列 220...330; 430...497; 548...607, 内含子含有典型的内含子边界序列 GT...AG, 其 5' 端非编码区长 76 bp, 3' 端非编码区

长 240 bp, 共编码 424 个氨基酸。用 SignalP 程序分析 *N. rileyi* Cq 几丁质酶氨基酸序列表明, 该序列也存在信号肽及前肽序列, 理论信号肽剪切位点在 Gly(20) 与 Leu(21) 之间。推测成熟肽分子量为 44.0 kDa。ORF 与 *Nomuraea rileyi* MJ 菌株的序列 (AAP04616) 相似性达 99% [17]。

2.2 与其他真菌几丁质酶氨基酸的同源性分析

Blastx 及 DNAMAN 软件分析, *Nomuraea rileyi* Cq 菌株的几丁质酶氨基酸与几种不同真菌来源的几丁

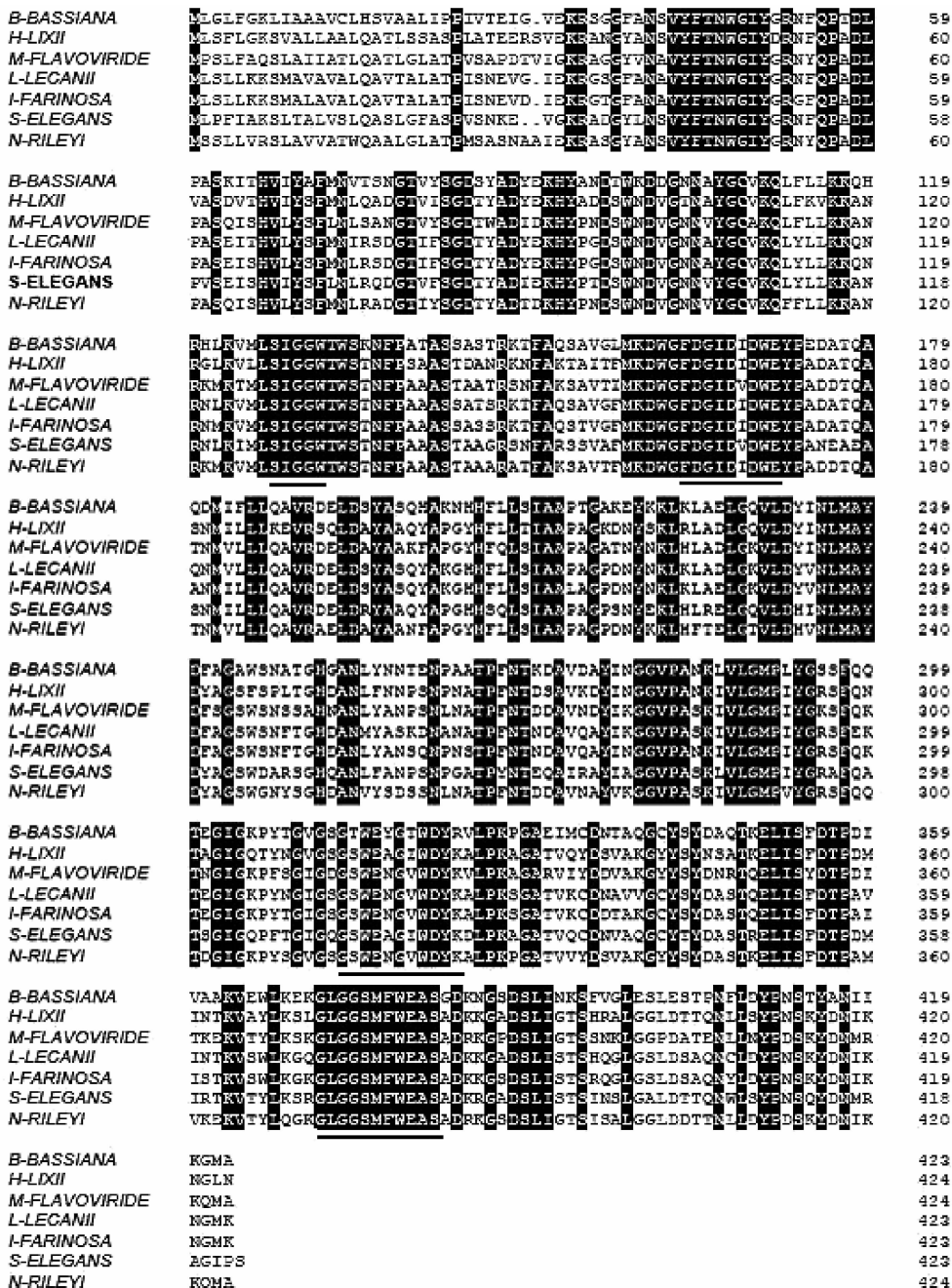


图 1 不同真菌来源几丁质酶氨基酸序列比对

Fig. 1 Comparison results of the amino acid sequences of chitinases from *Nomuraea rileyi* Cq and other fungi. Black areas are high degree homology (100%) and unshaded areas are regions of variability between the chitinases. _ indicate the conserved catalytic domains (SIGGW, FDGIDW) of glycosyl hydrolase family 18 and chitin binding domain (GSWEAGIWDYK, GLGGSWFWEAS).

质酶氨基酸序列具有较高的同源性(图 1)。其中与 *Nomuraea rileyi* MJ 菌株的同源性达到 99%, 与 *Metarhizium flavoviride* (CAB44709)、*Hypocrea lixii* (BAB40589)、*Lecanicillium lecanii* (ABD77096)、*Isaria farinose* (ABD64606)、*Stachybotrys elegans* (AAM70478)、*Beauveria bassiana* (AAN41260) 的同源性分别为 79%、74%、74%、74%、69%、64%。这些几丁质酶都属于糖基水解酶 18 家族, 并包含许多保守序列, 其中 2 个保守序列 SIGGW 和 FDGIDIDWE 是糖基水解酶 18 家族水解活性中心位点, GSWEAGIWDYK 和 GLGGSMFWEAS 两个保守区域是几丁质结合域。具有 SIGGW 和 FDGIDIDWE 保守区域的几丁质酶可降解真菌的细胞壁, 在真菌寄生中起重要作用^[18]。同源性分析表明 *Nomuraea rileyi*Cq 菌株几丁质酶也具有 SIGGW 和 FDGIDIDWE 保守区域。

2.3 毕赤酵母表达载体的构建

将 3 次测序后含有目的基因片段的克隆载体 PMD18-Chit1 质粒经 *Not* I 和 *Eco*R 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 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切的毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上, 得到 pPIC9K-Chit1 重组质粒。转入大肠杆菌感受态使其增殖, 提取大肠杆菌质粒, 然后用 *Not* I 和

*Eco*R I 酶切验证质粒是否为构建成功的 pPIC9K-chit1 载体, 质粒构建图谱和酶切图谱如图 2。从酶切电泳图谱中可以明显的看出两条电泳条带, 与 Marker 比较可以确定两条电泳带分别是线性 pPIC9K 和 Chit1 片段。

2.4 酵母转化子的 G418 筛选及 PCR 验证

用 *Pme*I 线性化的 DNA 经电击转化进入毕赤酵母 GS115 菌株中, 在 MD 平板上培养。将经 YPD 培养的转化子分别于含 1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL 的 G418 平板上进行多拷贝克隆的筛选, 在 1.5 mg/mL 的 G418 平板上得到了多拷贝克隆的有效筛选, 然后将 1.5 mg/mL G418 平板上筛选出生长最好的菌落进行 PCR 测序验证, 筛选得到了重组毕赤酵母。

2.5 几丁质酶在毕赤酵母中的表达分析

2.5.1 透明圈法验证发酵液中几丁质酶的存在: 在几丁质平板上用打孔器打 5 个孔, 1、2 孔为对照分别加入诱导培养基和 72 h 的非转化毕赤酵母发酵液; 3、4、5 孔中分别加入 24 h、48 h、72 h 的诱导表达发酵液, 各孔中所加液体的量均为 50 μ L。结果如图 3, 72 h 发酵液的透明圈为最大且最清楚, 48 h 发酵液的透明圈也可以看出, 但较 72 h 的发酵液孔的透明圈小, 24 h 和两组对照均未见透明圈(图 3)。

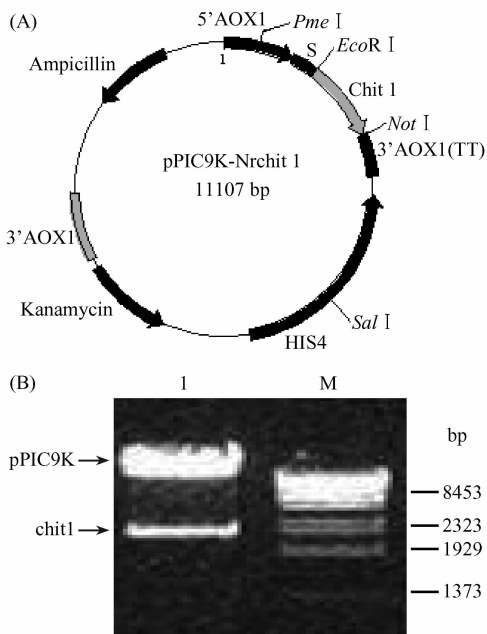


图 2 pPIC9K-chit1 质粒图谱 (A) 和双酶切验证 (B)

Fig.2 The restriction enzyme map of pPIC9K-chit1 (A) and agarose electrophoresis of digested plasmid pPIC9K-chit1 from *Nomuraea rileyi* Cq Strain (B). M. Marker; 1. pPIC9K-chit1 digested by *Not* I and *Eco*R I.

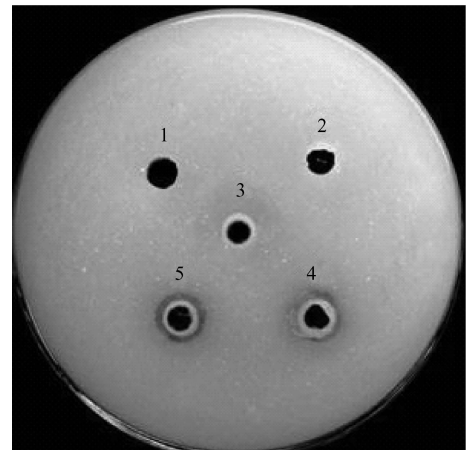


图 3 重组酵母几丁质酶活性透明圈验证

Fig.3 Identification of chitinase activity of the Recombinant *P. pastoris* with *chit1* from *Nomuraea rileyi* Cq on colloidal chitin plate. 1. BMMY culture medium; 2. Fermentation liquor of *P. pastoris* without pPIC9K-chit1 and pPIC9K; 3, 4, 5. 24 h, 48 h, 72 h respectively Fermentation liquor of *P. pastoris* with pPIC9K-chit1 in.

2.5.2 重组酵母表达的几丁质酶活性测定结果: 制作 GluNAc 标准曲线, 以 GluNAc 浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标。

收集 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 发酵液, 以相同的方法处理测定发酵液中几丁质酶活性, 空白对照为非转化子的发酵液, 试验重复 3 次。从表 1 中显示, 在一定时间内几丁质酶活性随着发酵时间的延长而增高, 在 72 h 存在酶活性最高值。

表 1 不同时间 *chit1* 几丁质酶活性分析

Table 1 Chitinase activity of recombinant *P. pastoris* with *chit1* from *Nomuraea rileyi* Cq in different time

Induced time/ h	Chitinase activity/ (mU/100 μ L)	
	C	transformant
0	0	0
24	0	60.5 \pm 4.1 (n=3)
48	0	302.6 \pm 6.7 (n=3)
72	0	482.5 \pm 5.8 (n=3)
96	0	364.4 \pm 4.8 (n=3)

The activity of chitinase is 100 μ L fermentation's activity. C indicates *P. pastoris* with the plasmid of pPIC9K, transformant indicates *P. pastoris* with plasmid of pPIC9K-chit1.

2.5.3 SDS-PAGE 检测: 由 2.5.1 及 2.5.2 分析可知酵母表达的几丁质酶活性在 48 h 和 72 h 已较高, 所以分别选择了同一时段的发酵液进行电泳分析。收集表达的上清液, 采用 TCA 法沉淀蛋白, 处理 1 mL 样品备用, 结果 48 h 和 72 h 两条泳道分别在同一位点出现条带, 与 Marker 相比, 估计表达的几丁质酶蛋白分子量约为 41 kDa (图 4)。

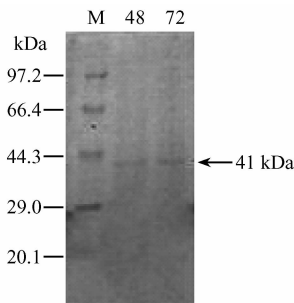


图 4 重组酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant *P. pastoris* with *chit1* from *Nomuraea rileyi* Cq culture supernatant. M. Marker; 48. Supernatant of recombinant *P. pastoris* after 48 h fermentation; 72. Supernatant of recombinant *P. pastoris* after 72 h fermentation.

3 讨论

通过设计特异性引物, PCR 扩增得到莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因完整的 ORF 区段, 包含了几丁质酶基因的分泌信号肽, 因此构建后的表达载

体 pPIC9K-Chit1 中既含有载体 pPIC9K 中的分泌信号肽, 又含有欲表达几丁质酶基因的信号肽, 所以试验中排除了信号肽选择问题而影响外源蛋白表达或甚至不表达的因素。毕赤酵母表达系统的优点是外源蛋白基因能整合到毕赤酵母染色体上, 随染色体的复制而复制, 不易丢失, 本实验采用的载体 pPIC9K 属于整合型载体, 同时构建的重组细胞在实验室已经经过传代表达, 我们认为 pPIC9K-Chit1 能在酵母细胞中稳定遗传, 有利于后续扩大培养中的应用。

在透明圈验证几丁质酶活性试验中, 重组毕赤酵母 48 h 的发酵液已明显检测到几丁质酶的存在, 72 h 的诱导发酵液中几丁质酶活性最高; 因此在 SDS-PAGE 电泳试验中, 选择 48 h、72 h 诱导发酵液进行电泳, 图谱显示出 48 h、72 h 两泳道在同一位置仅存在一条电泳条带, 与 Marker 相比较, 估计其分子量大约为 41 kDa, 与预测分子量 44 kDa 大小相当, 由于毕赤酵母自身几乎不分泌胞外蛋白, 因此可以确定该条带为外源基因表达的产物。

同源性分析表明, 莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因与白僵菌等几种真菌几丁质酶都具有相似的结构域, 具有两个保守的几丁质酶活性位点 (SIGGW, FDGIDIDWE)。该类几丁质酶也可降解真菌的细胞壁, 在真菌寄生中起重要作用。本研究在毕赤酵母中成功表达了莱氏野村菌 Cq 菌株几丁质酶基因, 并在发酵液中检测到有活性的产物, 说明该基因分泌的产物为胞外酶。因此可以推测 *N. rileyi* Cq 菌株几丁质酶可能也有类似的功能, 即分泌到细胞膜外分解昆虫体壁上的几丁质, 与蛋白酶、脂酶等协同作用使真菌芽管突破昆虫体壁屏障。几丁质酶在昆虫病原真菌侵入宿主过程中的作用已知, 通常认为高毒力菌株其几丁质酶活性也高, 但我们认为几丁质酶活性高未必是高毒力菌株, 病原微生物的毒力应包括感染性和致病性, 把几丁质酶在感染时的作用完全作为毒力来认识可能存在偏颇, 菌丝进入昆虫血腔后是否分泌几丁质酶, 发挥怎样的作用尚不得而知。体外成功表达莱氏野村菌 Cq 菌株的几丁质酶及对酶产物的利用将有助于对昆虫病原真菌几丁质酶与毒力关系的研究。

参考文献

- [1] Charnley AK, Leger RJ. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects // Cole GT, Hoch HC. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Planta and Animals*. New York and London: Plenum Press, 1991, 115-126.
- [2] 孙胜利, 喻子牛, 贾新成. 微生物产几丁质酶的研究和应用进展. *微生物学杂志 (Journal of Microbiology)*, 2002, 22(5): 48-49.
- [3] Sminrnoff WA. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1974, 246: 343-348.
- [4] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新, 等. 转番茄几丁质酶基因西瓜植株的获得及其抗病性研究. *西北植物学报 (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 2005, 25(10): 1943-1946.
- [5] 戴富明, 徐同. 农杆菌介导木霉几丁质酶基因转化拟南芥及其 T1 代对油菜菌核病抗性提高. *上海交通大学学报-农业科学版 (Journal of Shanghai Jiaotong University)*, 2005, (1): 37-40.
- [6] 李君, 曾中文, 欧阳石文. 微生物几丁质酶的特性、基因表达调控及应用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2001, 28(4): 84-87.
- [7] Getzen LW. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hubner). *Journal of Insect Pathology*, 1961(3): 2-10
- [8] Kish LP, Samson. RA, Allen G. E. The Genus *Nomuraea* Maublanc. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1974, 24: 154-158.
- [9] 涂增, 翟逸, 万永继. 环境因子对莱氏野村菌 Cq 菌株生长发育的影响. *西南农业大学学报 (Journal of Southwest Agricultural University)*, 2006, 28(1): 49-53.
- [10] 翟逸, 涂增, 王金芳, 等. 莱氏野村菌产几丁质酶条件及酶学性质研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(6): 1082-1085.
- [11] Chernin LS, De la Fuentel L, Sobolev V, et al. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 834-839.
- [12] Baratto UM, da Silva MV, Santi L, et al. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology*, 2003, 49: 723-726.
- [13] 黄彩虹, 杨谦, 宋颖琦. 哈茨木霉几丁质酶基因的 cDNA 克隆及表达. *哈尔滨工业大学学报 (Journal of Harbin Institute of Technology)*, 2008, 40(10): 1609-1612.
- [14] 任文彬, 张世清, 黄俊生. 金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae* HN1) 几丁质酶基因的克隆及高效表达. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2006, 26(7): 31-36.
- [15] 肖月华, 罗明, 方卫国, 等. 利用 YADE 法进行棉花基因组 PCR 步行. *遗传学报 (Journal of Genetics and Genomics)*, 2002, 29(1): 62-66.
- [16] Hsu SC, Lockwood JL. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 1975, 29(3): 422-426.
- [17] Wattanalai R, Wiwat C, Boucias DG, et al. Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 85(1): 54-57.
- [18] Nakahara K, Yoshida K, Ito T, et al. Cloning and sequencing of endochitinase genes from *Gliocladium virens* and *Trichoderma* species. *Archives der Phytopathologie und Pflanzenschutz*. 2000, 33: 519-527.

Cloning and expression of the chitinase gene *Chit1* from entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* CQ

Jinfang Wang, Guangying Liu, Yi Zhai, Yongji Wan*

(College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing, Beibei 400716, China)

Abstract: [**Objective**] In order to understand the role of the entomopathogenic fungal chitinase in invasion and pathogenic process, we cloned and expressed a chitinase gene from *Nomuraea rileyi* CQ strain, and detected chitinase activity in recombinant *Pichia pastori* fermentation supernatant. [**Methods**] Specific primers were used to amplify the complete sequence of chitinase gene and open reading frame (ORF) from genomic DNA of *N. rileyi* Cq Strain extracted by CTAB. The fragment of ORF was linked with vector plasmid pPIC9K to construct the pPIC9K-*chit1* expressing vector and transferred into *Pichia pastori*. The recombinant yeast *P. pastori* was screened by 1.5 mg/L G418 and PCR check. Activity of chitinase in recombinant *P. pastori* fermentation liquid was verified by transparent zone test and OD_{540} determination, and the molecular weight of chitinase was analyzed by SDS-PAGE. [**Results**] The complete sequence length of chitinase gene of *N. rileyi* CQ strain is 2756bp (GenBank accession number EU795711) that contains a 1827bp of ORF *chit1*, a 76bp uncoding region at the 5' end, a 240 bp uncoding region at the 3' end, and 3 introns. The ORF *chit1* encoding 424 amino acids of chitinase precursor, and the theoretical restriction site of single peptide is between Gly (20) and Leu(21). Activity of chitinase expressed by recombinant *P. pastoris* increased with fermentation time, and reached the peak of 482.5 U/100 μ L at 72 h. Hydrolysis test of chitin showed clear transparent zone at the 1% colloidal chitin plate. SDS-PAGE analysis suggested that the molecular weight of chitinase was 41.0 kDa. [**Conclusion**] We cloned the chitinase gene *Chit1* from *N. rileyi* CQ strain and expressed in recombinant *P. pastori* successfully to study the infection and lethal mechanism of pathogenic fungi to insects.

Keywords: *Nomuraea rileyi*; chitinase; clone; expression; product activity

(本文责编:王晋芳)