



两端融合表达几丁质结合结构域提高几丁质酶抗真菌活性

谷天燕, 刘晓楠, 李玲聪, 刘妍池, 胡少锋, 吕晨茵, 刘华, 赵国刚*

河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071000

摘要:【目的】通过两端融合表达几丁质结合结构域来提高几丁质酶的活性和生物防治植物病原真菌能力。【方法】以苜蓿链霉菌(*Streptomyces alfae*) ACCC40021 中唯一的 GH19 家族几丁质酶为模板, 构建两端融合表达几丁质结合结构域的几丁质酶, 并进行原核表达; 利用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定几丁质酶活。【结果】成功构建了 CatD_{ChiB} (催化结构域)、rChiB (含 N-端几丁质结合结构域)、DChBD_{ChiB} (含两端几丁质结合结构域)三种形式的酶, 并在大肠杆菌中得到了高效表达; 与 CatD_{ChiB} 和 rChiB 相比, DChBD_{ChiB} 显著地提高了对 α -几丁质、胶体几丁质和黑曲霉几丁质的结合能力和活性; 同时增强了其对病原真菌长枝木霉的抑制作用。【结论】两端融合表达几丁质结合结构域是简单有效的提高几丁质酶活性及抗真菌活性的策略。

关键词: 碳水化合物结合模块(CBMs), 几丁质结合结构域(ChBD), 苜蓿链霉菌(*Streptomyces alfae*), 几丁质酶, 植物真菌病害

碳水化合物结合模块(carbohydrate binding modules, CBMs)是糖苷水解酶结构中没有催化多糖水解功能的底物识别模块^[1]。CBMs 在底物识别和催化活性两方面对酶起着至关重要的作用^[2-3]。CBMs 能够增强糖苷水解酶对不溶性多糖底物(例如几丁质、纤维素)的结合能力, 进一步提高其催化活性^[4-5]。根据氨基酸序列的相似性, CBMs 分为 84 个家族, 其中识别几丁质的几丁质结合结构域(chitin-binding domain, ChBD)属于 CBM5、

CBM12 和 CBM18 家族^[1]。

几丁质酶是一种作用于几丁质产生 N-乙酰葡萄糖胺和几丁寡糖的糖苷水解酶^[6-7]。根据序列同源性, 可分为 GH18 家族的几丁质酶和 GH19 家族的几丁质酶^[8-9], GH18 家族的几丁质酶存在于细菌中, GH19 家族的几丁质酶主要存在于高等植物中, 仅在放线菌和海洋细菌中发现了 GH19 家族的几丁质酶^[10]。放线菌中的 GH19 家族的几丁质酶来源于植物同源基因的水平转移, 使其能够

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201100); 河北省留学人员科技活动项目(优秀类)(C2015005015); 农业部饲料生物技术重点实验室开放基金

*通信作者。Tel: +86-312-7528250; Fax: +86-312-7528272; E-mail: zhgg@hebau.edu.cn

收稿日期: 2018-09-25; 修回日期: 2018-10-15; 网络出版日期: 2018-12-06

分解真菌细胞壁的几丁质, 在抗真菌的过程中处于优势地位^[11]。大多数几丁质酶的结构主要由信号肽、几丁质催化域和几丁质结合结构域 ChBD 三部分组成^[12]。植物来源的几丁质酶中的 ChBD 主要在 N 端, 属于 CBM18 家族; 而细菌和真菌来源的几丁质酶 ChBD 在 N 端或 C 端, 属于 CBM5 或 12 家族^[13]。研究表明, 几丁质结合结构域对于几丁质酶酶活和抗真菌活力至关重要^[1,14-15]。

植物真菌病害是造成世界范围内粮食作物和蔬菜水果减产或死亡的主要原因。目前, 对植物真菌病害的防治主要依赖化学杀菌剂。化学杀菌剂的长期使用容易引起植病真菌产生抗性, 从而降低其效果; 另一方面, 化学杀菌剂的生产和使用造成了生态系统的破坏以及对人类健康的潜在威胁。而生物防治植物真菌病害具有高效、无污染的特点, 是科学研究和社会可持续发展的重要方向。几丁质酶能够分解真菌的细胞壁以抑制真菌生长, 因而被作为最有潜力的生防试剂。迄今为止, 已有很多不同来源的几丁质酶被发现和性质表征。但是, 天然几丁质酶的低活力和高生产成本限制了其广泛使用。因此, 利用基因工程技术, 开发新型高效几丁质酶是必要的。

苜蓿链霉菌(*Streptomyces alfae*) ACCC40021 属于放线菌, 是从陕西泾阳分离出的有益根际细菌, 已经广泛地用作商品化的土壤微生物肥料和抑制植物病原真菌的生防制剂^[16-17]。通过对苜蓿链霉菌 ACCC40021 的基因组序列 (GenBank accession No. CP015588) 进行 CAZy (Carbohydrate active enzyme database) 分析, 发现唯一的 GH19 家族的几丁质酶 SaChiB 基因。结构分析表明在 SaChiB N-端具有 1 个几丁质结合结构域。本研究通过构建并表达 CatD_{ChiB} (催化结构域)、rChiB (含 N-端几丁质结合结构域)、DChBD_{ChiB} (含两端几丁

质结合结构域) 三种形式的几丁质酶蛋白, 进行抗真菌功能分析, 证明简单的两端融合表达 ChBD 能够显著地增强几丁质酶对不同几丁质的活性和抗真菌活性。

1 材料和方法

1.1 菌株

苜蓿链霉菌 ACCC40021 (*Streptomyces alfae* ACCC40021)、病原真菌长枝木霉 (*Trichoderma longibranchiaum*) ACCC 31615 由中国农业微生物菌种保藏中心提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 和 BL21 (DE3) 购自全式金生物(北京)有限公司。

1.2 主要试剂

Pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 连接酶购自全式金生物(北京)有限公司。硫酸卡那霉素、异丙基 β -D-半乳糖苷 (IPTG)、黑曲霉、几丁质和其他化学试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。 α -几丁质购自 Sigma (美国)。

黑曲霉几丁质的制备: 0.2 mL 的碱性蛋白酶 2.4 L FG 加到 5% 的黑曲霉水溶液中, 在 60 °C 下温育 12 h 后, 12000 r/min 离心 15 min。沉淀在 100 °C 下煮沸 15 min 后, 水洗 3 次, 在 65 °C 下干燥 12 h, 得到的黑曲霉粉重新称重, 备用。

胶体几丁质制备: 10 g 几丁质加 200 mL 浓盐酸, 放转子搅拌至沉淀溶解, 于 4 °C 放置 24 h 后, 加 500 mL 50% 乙醇, 搅拌 5 min, 离心去上清, 加蒸馏水调 pH 至 7 左右, 最后用蒸馏水定容至 500 mL, 得到 2% 胶体几丁质, 4 °C 保存备用。

1.3 pET-30a(+)-CatD_{ChiB}、pET-30a(+)-rChiB 和 pET-30a(+)-DChBD_{ChiB} 的构建

从 NCBI 中获取蛋白 SaChiB 的核苷酸序列

(GenBank accession No. MH828721)以及氨基酸序列(Refseq: WP0766829881), 用 signal IP 预测其信号肽, 得到其成熟蛋白的序列。通过 SMART 预测出其 ChBD 序列, 且分别设计专一性引物(表 1)。

以苜蓿链霉菌 ACCC40021 基因组为模板, 以 rChiB F 和 rChiB R 为上下游引物扩增编码成熟几丁质酶 SaChiB (去除信号肽)的目的片段 rChiB, 片段长度为 810 bp; 以 CatD_{ChiB} F 和 CatD_{ChiB} R 为上下游引物扩增 CatD_{ChiB}, 片段长度为 660 bp; 以 ChBD_{ChiB} F 和 ChBD_{ChiB} R 为上下游引物扩增 ChBD_{ChiB}, 片段大小为 150 bp。PCR 反应体系为: 1 μ L 10 μ mol 上游引物 F 和下游引物 R, 10 μ L 5 \times TransStart FastPfu Fly Buffer, 4 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 1 μ L TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase, 1 μ L 链霉菌 ACCC40021 基因组, ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 程序为 98 $^{\circ}$ C 3 min, 98 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。核酸电泳检测其大小, 回收目的片段, 目的片段 rChiB、CatD_{ChiB} 和载体 pET-30a(+)用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, T4 连接酶连接, 转化到大肠杆菌 Trans1-T1 感受态中, 挑选阳性克隆, 送华大基因测序得到重组质粒 pET-30a(+)-rChiB 和 pET-30a(+)-CatD_{ChiB}; 将目的片段 ChBD_{ChiB} 和

测序正确的重组质粒 pET-30a(+)-rChiB 用 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切, T4 连接酶连接, 转化到大肠杆菌 Trans1-T1 中, 挑选阳性克隆送华大基因测序得到重组质粒 pET-30a(+)-DChBD_{ChiB}, DChBD_{ChiB} 大小为 966 bp, 与预期一致。

1.4 重组几丁质酶的原核表达及纯化

将 pET-30a(+)-CatD_{ChiB}、pET-30a(+)-rChiB 和 pET-30a(+)-DChBD_{ChiB} 转化到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中, 涂布于带有 50 mg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单克隆接种于 2 mL (含 50 mg/mL 硫酸卡那霉素) LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养。以 1/100 的接种量接种于 200 mL 含 50 mg/mL 硫酸卡那霉素 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2–3 h, 当 OD_{600} =0.6–0.8 时, 加入诱导剂终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 20 $^{\circ}$ C、200 r/min、20 h, 于 12000 r/min、10 min、4 $^{\circ}$ C 下离心, 收集沉淀, 将沉淀溶于 20 mL lysis buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)中, 在冰上用超声波细胞破碎仪进行破碎, 以 40% 的振幅超声破碎后, 细胞裂解液于 12000 r/min、10 min、4 $^{\circ}$ C 离心收集, 上清即为粗酶液, 粗酶液用 Ni-NTA 纯化, 纯化步骤为: 将粗酶液加载到 Ni 柱填料中, 用 washing buffer (50 mmol/L

表 1. 实验所用引物

Table 1. Primers used in the study

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site
rChiB F	<i>CGCGAATTC</i> ACGGCGTCCGCGGCC	<i>EcoR</i> I
rChiB R	AGCAAGCTTGCAGCTCAGGTTGGAGC	<i>Hind</i> III
CatD _{ChiB} F	ATATATGAATTCGGCGCCTGCGGCGGCGGCAC	<i>EcoR</i> I
CatD _{ChiB} R	AGCAAGCTTGCAGCTCAGGTTGGAGC	<i>Hind</i> III
ChBD _{ChiB} F	<i>CGCAAGCTT</i> ACGGCGTCCGCGGCC	<i>Hind</i> III
ChBD _{ChiB} R	ATATATCTCGAGCGCGTCCGCCAGACGTCGG	<i>Xho</i> I

Italics sections are protective bases, and underlined sequences are restriction enzyme sites.

NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 去除杂蛋白, 再用 250 mmol/L elution buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 和 350 mmol/L elution buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 350 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱并收集带有活性的蛋白, 全程 4 °C 操作, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测其纯化程度。得到的纯蛋白用 30 kDa 的超滤管 (Sigma, 美国) 去除咪唑, 最后溶在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=8) 中, 放在 -20 °C 待用。

1.5 几丁质酶的活性测定

用 3,5-二硝基水杨酸法 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 测定还原糖的方法检测其活性^[6], 标准体系为: 0.1 mL 几丁质酶, 0.2 mL 2% 胶体几丁质, 0.3 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=8), 45 °C 反应 1 h 后用 DNS 终止反应, 100 °C 加热 10 min, 在 λ=540 nm 下测定其吸光度。一个酶活单位定义为: 在最适条件下, 每分钟分解胶体几丁质释放 1 μmol GlcNAc 所需的酶量。

1.6 重组几丁质酶对不同几丁质的活性

在最适条件 (45 °C, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH=8) 下, 分别对 CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 进行活性测定, 底物为胶体几丁质、α-几丁质和黑曲霉几丁质。

1.7 重组几丁质酶对不溶性底物结合能力分析

取 2 μmol/L CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 分别与 1 mg/mL 胶体几丁质、α-几丁质和黑曲霉于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=8) 中充分混匀, 于 4 °C 下, 在旋转混合器上反应 1 h 后, 10000 r/min、5 min 收集上清, 上清即为未结合的蛋白, 通过 BCA

法测蛋白浓度, 蛋白结合率按照公式(1)计算^[18]。

$$\text{蛋白结合率(\%)} = \frac{(\text{总蛋白量} - \text{未结合蛋白量}) \times 100}{\text{总蛋白量}}$$

公式(1)

1.8 抗真菌实验

以病原真菌长枝木霉作为测试菌株进行抗真菌实验, 将其转接在 PDA 培养基上活化, 25 °C 培养 48 h 后, 用直径为 0.6 cm 的打孔器打取菌盘, 接种到新的具有 PDA 培养基的培养皿的中央位置, 25 °C 培养 24 h 后, 用直径为 0.6 cm 的打孔器在距离菌盘中央四周 10–20 mm 处打 4 个孔^[11], 分别加入对照 (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH=8)、0.67 pmol 纯化的 rChiB (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH=8)、0.67 pmol 纯化的 CatD_{ChiB} (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH=8) 和 0.67 pmol 纯化的 DChBD_{ChiB} (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH=8), 培养 48 h 后观察抑制情况。

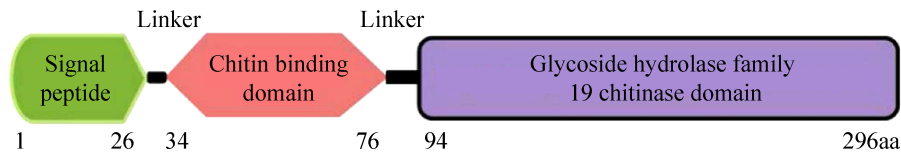
1.9 数据分析

所有数据至少设置 3 个独立重复实验, 均使用 GraphPad Prism 5 计算其平均值及标准偏差 (Standard Deviation, SD) (平均值 ± SD), 方差分析 (One-way ANOVA), 并且对于小于或等于 0.05 的 P 值被认为是统计学显著。

2 结果和分析

2.1 SaChiB 蛋白序列分析

通过 NCBI CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析其结构, 如图 1 所示, SaChiB 属于 GH19 家族的几丁质酶, 其结构由信号肽、几丁质结合结构域和催化结构域 (GH19 几丁质酶) 三部分构成, 其中几丁质结合结构域属于 CBM5 家族。

图 1. *SaChiB* 结构示意图Figure 1. Schematic structures of *SaChiB*.

2.2 重组几丁质酶的构建及原核表达

成功构建了去除 ChBD、N 端带有 ChBD 和两端带有 ChBD 的三种重组质粒 pET-30a(+)-CatD_{ChiB}、pET-30a(+)-rChiB 和 pET-30a(+)-DChBD_{ChiB}，其结构示意图如图 2-A 所示；将成功构建并测序正确的重组质粒转化到大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 进行原核表达，经 Ni-NTA 纯化后，进行 SDS-PAGE 分析，如图 2-B 所示，三种蛋白经 Ni-NTA 纯化后得到了单一的目的条带，且蛋白大小 CatD_{ChiB} 为 31.0 kDa，rChiB 为 36.3 kDa，DChBD_{ChiB} 为

41.5 kDa，与预计大小一致。

2.3 重组几丁质酶对不溶性底物结合能力分析

CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 对不溶性底物 α -几丁质、胶体几丁质、黑曲霉的结合能力如图 3 所示，CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 对 α -几丁质的结合能力分别为 34.24%、58.29%、60.52%；对胶体几丁质的结合能力分别为 22.29%、50.52%、52.10%；对黑曲霉的结合能力分别为 47.39%、54.94%、78.42%。结果证明，融合表达 ChBD 能够增强几丁质酶对 α -几丁质、胶体几丁质、黑曲霉的结合能力。

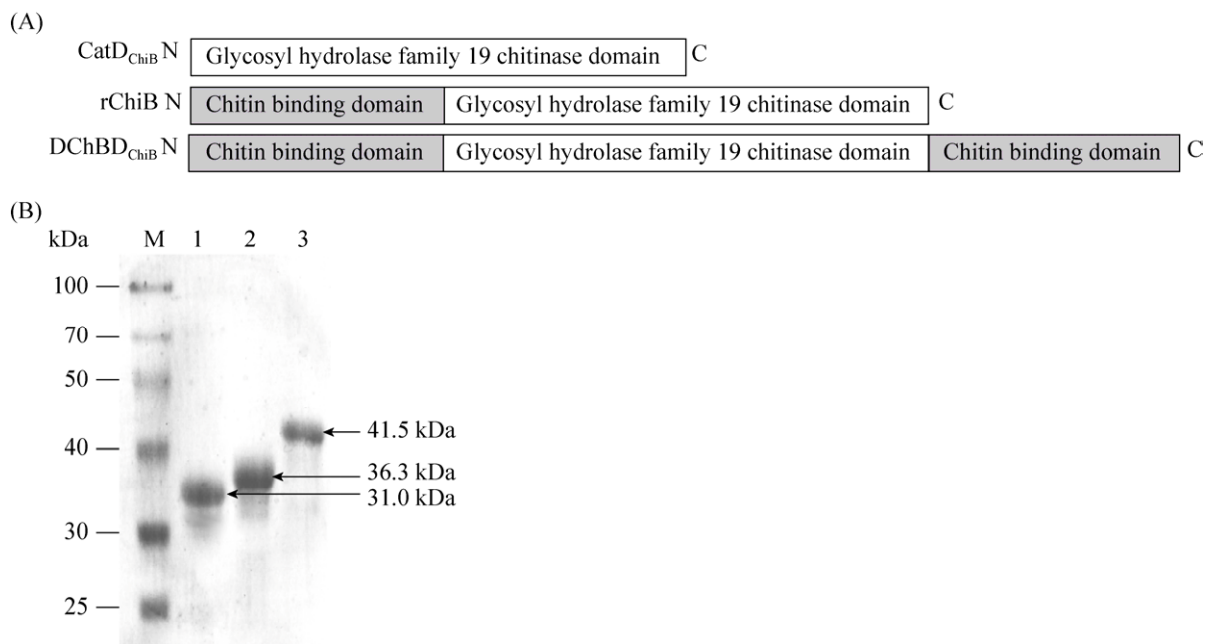
图 2. CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 的结构示意图和 SDS-PAGE 分析

Figure 2. Schematic structures and SDS-PAGE analysis of CatD_{ChiB}, rChiB and DChBD_{ChiB}. A: Schematic structures of CatD_{ChiB}, rChiB and DChBD_{ChiB}. B: SDS-PAGE analysis of CatD_{ChiB}, rChiB and DChBD_{ChiB}. Lane M: Standard protein marker; lane 1: purified protein CatD_{ChiB} after Ni-NTA; lane 2: purified protein rChiB after Ni-NTA; lane 3: purified protein DChBD_{ChiB} after Ni-NTA.

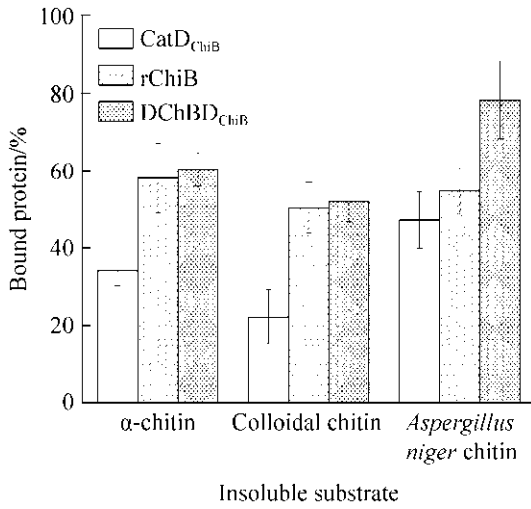


图 3. CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 对不溶性底物的结合能力

Figure 3. Insoluble substrate binding ability of CatD_{ChiB}, rChiB and DChBD_{ChiB}. Data are presented as mean±SD and are representatives of three independent experiments.

2.4 重组几丁质酶对不同几丁质的活性

CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 分别在 45 °C、50 mmol/L 磷酸盐(pH=8)缓冲液下测定其对胶体几丁质、α-几丁质和黑曲霉的活性，如表 2 所示，DChBD_{ChiB} 对胶体几丁质、α-几丁质和黑曲霉的活性最高，rChiB 次之，CatD_{ChiB} 最低，DChBD_{ChiB} 与 rChiB、CatD_{ChiB} 相比差异显著。

表 2. 重组几丁质酶对不同几丁质的活性

Table 2. Recombinant chitinases activity towards different chitin

Substrate	CatD _{ChiB} / (U/mg)	rChiB / (U/mg)	DChBD _{ChiB} / (U/mg)
Colloidal chitin	23.55±0.03	28.37±0.50	33.19±0.46 ^{***}
α-chitin	0.93±0.13	2.40±0.06	2.81±0.02 [*]
<i>Aspergillus niger</i> chitin	0.47±0.05	0.50±0.02	0.93±0.12 ^{***}

Data are presented as mean±SD and asterisk indicates to be statistically significant compared with rChiB (* represents $P<0.05$; *** represents $P<0.01$).

2.5 抗真菌活性

CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 对长枝木霉的抗真菌活性如图 4 所示，对照对长枝木霉没有抑制作用，DChBD_{ChiB} 相较于 CatD_{ChiB} 和 rChiB 有较明显抑制区域，且 CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 的抑制区域为 6.76 mm、11.91 mm、17.93 mm。这说明两端加入 ChBD 能够明显增强几丁质酶活性进而增强其对植物病原真菌长枝木霉的抑制作用。

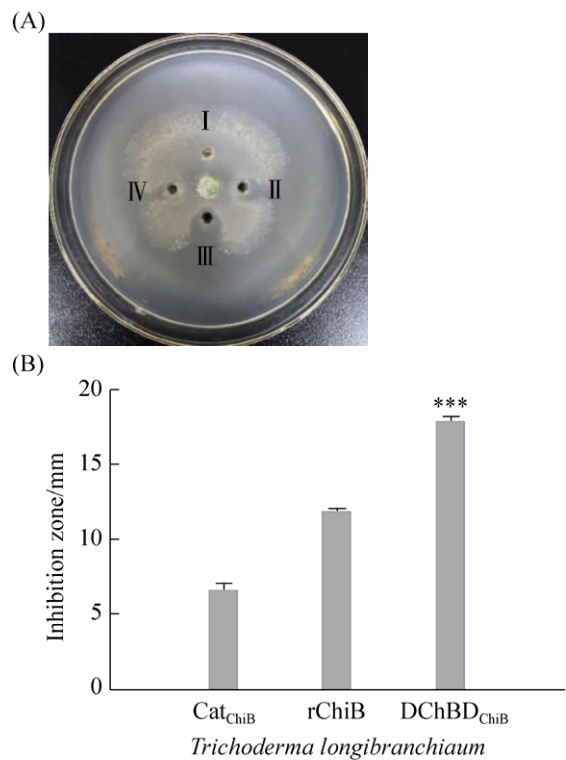


图 4. CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB} 抗真菌活性

Figure 4. Antifungal activity of CatD_{ChiB}, rChiB and DChBD_{ChiB}. (A): *Trichoderma longibranchiaum*. (I) control (10 mmol/L citrate buffer pH 8 without enzyme); (II) 0.67 pmol of purified rChiB (in 10 mmol/L citrate buffer pH 8); (III) 0.67 pmol of purified DChBD_{ChiB} (in 10 mmol/L citrate buffer pH 8); (IV) 0.67 pmol of purified CatD_{ChiB} (in 10 mmol/L citrate buffer pH 8). (B): inhibition zone diameter of pathogenic fungal growth. Data are presented as mean±SD and *** indicates to be statistically significant compared with rChiB ($P<0.01$).

3 讨论

本研究通过构建三种重组蛋白 CatD_{ChiB}、rChiB 和 DChBD_{ChiB}，并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中得到了高效表达，首次成功构建了两端带有 ChBD 的几丁质酶，并研究了其对不同几丁质的活性和抗真菌活性。

ChBD 能够增强对不同几丁质的结合能力和活性。来源于 *Bacillus circulans* WL-12 中的 ChBD 对粉末几丁质和胶体几丁质有明显提高^[19]。来自 *Trichoderma atroviride* PTCC5220 的 C 端融合表达 ChBD 的几丁质酶 Chit42 与原酶相比，对不溶性几丁质的活性为(1.4±0.3) U/mL、(2.4±0.1) U/mL，提高了 1.71 倍，对胶体几丁质的活性为(7.76±0.6) U/mL、(10.0±0.7) U/mL，提高了 1.29 倍^[14]；在 *Aeromonas* sp. No. 10S-24 GH19 家族的几丁质酶中，去除 ChBD 的几丁质酶比原酶对胶体几丁质、晶体几丁质的活性分别下降了 30%、65%^[15]。本研究通过重组几丁质酶对不溶性底物结合实验表明(图 3)：DChBD_{ChiB}、rChiB 较 CatD_{ChiB} 对 α-几丁质、胶体几丁质和黑曲霉的结合能力分别提高了 1.76 倍、1.70 倍；2.34 倍、2.27 倍；1.65 倍、1.16 倍；重组几丁质酶对不同几丁质活性实验表明(表 2)，DChBD_{ChiB}、rChiB 较 CatD_{ChiB} 对 α-几丁质、胶体几丁质和黑曲霉分别提高了 3.02 倍、2.58 倍；1.4 倍、1.2 倍；1.98 倍、1.06 倍。两端融合表达 ChBD (DChBD_{ChiB})对底物结合能力和活性最强，且不影响酶的催化结构域的结构和活性中心。本研究融合表达的 ChBD 根据氨基酸序列同源性分类，属于 CBM5。CBM5 是 Type A 类“表面结合”碳水化合物结合模块(surface-binding CBMs)，具有独立的空空间结构，可以结合不溶性、高度结晶的几丁质或纤维素，进一步提高糖苷水解酶的催化活性^[1]。本

研究结果证明，两端融合表达 ChBD 不影响几丁质酶的催化结构域和活性中心的结构，显著地提高了酶对不溶性底物的结合能力和酶活。

ChBD 对于几丁质酶抗真菌的作用有显著影响。来自 *Streptomyces griseus* HUT6037 的 ChiC 是第一个被发现的来自细菌的 GH19 家族的几丁质酶^[20]，抑制 *T. reesei* 实验表明，带有 ChBD_{ChiC} 的天然的 ChiC 与 CatD_{ChiC} 相比，抗真菌活性提高了 10 倍左右^[21]；来自 *Trichoderma atroviride* PTCC5220 的 Chit42 的 C 端加入一个 ChBD 之后，明显地提高了抗真菌活性^[14]。我们通过抗真菌实验(图 4)发现，DChBD_{ChiB}、rChiB 较 CatD_{ChiB} 的抗真菌作用分别提高了 2.65 倍、1.76 倍，这说明两端带有 ChBD_{ChiB}(DChBD_{ChiB})能明显增强对长枝木霉的抑制作用。本研究是首次报道两端融合表达 ChBD 来提高几丁质酶对长枝木霉的抗真菌能力，该重组几丁质酶可作为一种潜在的生防制剂应用于农业领域。

本研究成功构建了 pET-30a(+)-CatD_{ChiB}、pET-30a(+)-rChiB 和 pET-30a(+)-DChBD_{ChiB} 并在大肠杆菌中得到了高效表达，DChBD_{ChiB} 相较于 CatD_{ChiB} 和 rChiB 而言，其在底物结合、活性以及抗真菌活性上都有显著提高。我们的研究结果表明两端融合表达 ChBD 是简单高效地提高几丁质酶的活性和抗真菌能力的策略；同时也提供了一种潜在的、新型高效的防治植物真菌病害的生防制剂。

参考文献

- [1] Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 2004, 382(3): 769–781.
- [2] Igarashi K, Koivula A, Wada M, Kimura S, Penttilä M, Samejima M. High speed atomic force microscopy visualizes

- processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(52): 36186–36190.
- [3] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, Wada M, Kimura S, Okamoto T, Penttilä M, Ando T, Samejima M. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science*, 2011, 333(6047): 1279–1282.
- [4] Arola S, Linder MB. Binding of cellulose binding modules reveal differences between cellulose substrates. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35358.
- [5] Chhabra SR, Kelly RM. Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without a carbohydrate binding module (CBM). *FEBS Letters*, 2002, 531(2): 375–380.
- [6] Yang SQ, Fu X, Yan QJ, Jiang ZQ, Wang J. Biochemical characterization of a novel acidic exochitinase from *Rhizomucor miehei* with antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(2): 461–469.
- [7] Fu X, Yan QJ, Wang J, Yang SQ, Jiang ZQ. Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 973–979.
- [8] Mallakuntla MK, Vaikuntapu PR, Bhuvanachandra B, Das SN, Podile AR. Transglycosylation by a chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* generates longer chitin oligosaccharides. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5113.
- [9] Vaikuntapu PR, Rambabu S, Madhuprakash J, Podile AR. A new chitinase-D from a plant growth promoting *Serratia marcescens* GPS5 for enzymatic conversion of chitin. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 200–207.
- [10] Prakash NAU, Jayanthi M, Sabarinathan R, Kanguane P, Mathew L, Sekar K. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *Journal of Molecular Evolution*, 2010, 70(5): 466–478.
- [11] Kawase T, Yokokawa S, Saito A, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(4): 988–998.
- [12] Kezuka Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J, Mitsutomi M, Watanabe T, Nonaka T. Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 358(2): 472–484.
- [13] Limón MC, Margolles-Clark E, Benítez T, Penttilä M. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 198(1): 57–63.
- [14] Matroodi S, Motallebi M, Zamani M, Moradyar M. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(8): 1517–1523.
- [15] Kojima M, Yoshikawa T, Ueda M, Nonomura T, Matsuda Y, Toyoda H, Miyatake K, Arai M, Fukamizo T. Family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24: role of chitin-binding domain in the enzymatic activity. *The Journal of Biochemistry*, 2005, 137(2): 235–242.
- [16] Tao TS, Yue YY, Liang SF, Sang JL, Yin SY. The antibiotic strain 5406—*Streptomyces jingyangensis* N. SP. *Acta Microbiologica Sinica*, 1979, 19(3): 249–254. (in Chinese) 陶天申, 岳莹玉, 梁绍芬, 桑金隆, 尹莘耘. 5406 抗生素——泾阳链霉菌新种. *微生物学报*, 1979, 19(3): 249–254.
- [17] She WQ, Sun ZF, Yi L, Zhao SM, Liang YX. *Streptomyces alfalfae* sp. nov. and comparisons with its closest taxa *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces flavofungini* and *Streptomyces intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(1): 44–49.
- [18] Suma K, Podile AR. Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 213–220.
- [19] Hashimoto M, Ikegami T, Seino S, Ohuchi N, Fukada H, Sugiyama J, Shirakawa M, Watanabe T. Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(11): 3045–3054.
- [20] Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(17): 5065–5070.
- [21] Itoh Y, Kawase T, Nikaidou N, Fukada H, Mitsutomi M, Watanabe T, Itoh Y. Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(5): 1084–1092.

Enhancing antifungal activity of chitinase by fusion of chitin binding domain at both termini

Tianyan Gu, Xiaonan Liu, Lingcong Li, Yanchi Liu, Shaofeng Hu, Chenyin Lv, Hua Liu, Guogang Zhao*

College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China

Abstract: [Objective] To develop a simple method to improve the enzymatic and antifungal activity of chitinase by fusion of chitin binding domain at both termini. [Methods] The chimeric and truncated chitinases were constructed using the unique glycoside hydrolase family 19 chitinase in *Streptomyces alfae* ACCC40021 as template, and expressed in *Escherichia coli*. The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to determine the enzyme activity with colloid chitin as the substrate. [Results] CatD_{ChiB} (catalytic domain), rChiB (N-terminal chitin-binding domain) and DChBD_{ChiB} (double chitin-binding domain) were successfully constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3). Compared to CatD_{ChiB} and rChiB, DChBD_{ChiB} improved the binding ability and activity towards colloidal chitin, α -chitin and chitin from *Aspergillus niger*. Furthermore, antifungal activity was enhanced against plant pathogenic fungus *Trichoderma longibranchiatum*. [Conclusion] A simple, feasible and efficient method was developed to improve the enzymatic and antifungal activity of chitinase by fusion of chitin binding domain on both C- and N- terminus of protein.

Keywords: carbohydrate binding modules, chitin-binding domain, *Streptomyces alfae*, chitinase, phytopathogenic fungi

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Plan of China (2017YFD0201100), by the Science Project Grant for Oversea Personnel in Hebei Province (Excellent Class) (C2015005015) and by the Open Project Program of Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, China

*Corresponding author. Tel: +86-312-7528250; Fax: +86-312-7528272; E-mail: zhgg@hebau.edu.cn

Received: 25 September 2018; Revised: 15 October 2018; Published online: 6 December 2018