

绿色木霉 LTR-2 β -1, 3-葡聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

高雯¹, 吴远征², 杨合同^{1, 2*}

(¹山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

(²山东省科学院中日友好生物技术研究中心, 济南 250014)

摘要: 根据从 GenBank 中检索到的木霉菌 β -1, 3-葡聚糖酶基因序列设计引物, 以高产 β -1, 3-葡聚糖酶菌株——绿色木霉 LTR-2 的 cDNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增得到内切 β -1, 3-葡聚糖酶基因(*glu*)。将 *glu* 克隆至载体 pMD18-T 上, 进行了全序列测定。序列分析表明该基因由 2289 个核苷酸残基组成, 含有一个开放阅读框架, 可以编码 762 个氨基酸, 与报道基本相同。翻译后的氨基酸序列含有两个 β -1, 3-葡聚糖酶的保守区 RVVYIPPGTY 和 AASQNKVAYF。基因与已发表的木霉 β -1, 3-葡聚糖酶基因有较高的同源性, 其中和哈茨木霉 bgn3.1 和绿木霉 bgn13.1 的同源性达到 93%。序列已经提交 GenBank, 登录号为 EF176582。将 *glu* 基因插入到巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)穿梭载体 pPIC9K 中, 获得重组质粒 pGLU14, 经线性化后转化毕赤酵母菌株 KM71。经大量平板筛选, 获得能有效分泌表达 β -1, 3-葡聚糖酶的毕赤酵母工程菌株 KGLU14, 菌落 PCR 扩增证实了 *glu* 基因已经整合到酵母基因组中。SDS 电泳结果表明其 β -1, 3-葡聚糖酶的分子量大约为 80kDa, 和理论推测值大致相同。摇瓶发酵结果表明, 培养基中 β -1, 3-葡聚糖酶的活力可达 889U/mL。

关键词: β -1, 3-葡聚糖酶, 克隆, 序列分析, 分泌表达

中图分类号: Q949.32; S476 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0239-05

β -1, 3-葡聚糖酶可以催化 β -1, 3-葡聚糖的水解反应, 而很多植物的病原真菌细胞壁的主要成份都是 β -1, 3-葡聚糖和几丁质, 因此该酶的水解活性能够抑制真菌的生长与增殖。 β -1, 3-葡聚糖酶是生物防治作用的主要相关因子之一^[1]。

绿色木霉是一种资源丰富的拮抗微生物, 在植物生防中具有重要的、不可忽视的作用, 其中的多数生防菌株都可以产生 β -1, 3-葡聚糖酶^[2]。*Trichoderma virid* LTR-2 是由山东省科学院中日友好生物技术研究中心筛选的植物病害生物防治菌株, 1997 年在农业部获得新农药登记(登记号: LS97348), 2005 年申请国

家发明专利。该菌株产生的 β -1, 3-葡聚糖酶活性较高。

目前国内外有关木霉 β -1, 3-葡聚糖酶基因的克隆表达研究较少, 只有少数哈茨木霉、绿木霉 β -1, 3-葡聚糖酶基因克隆方面的报道, 绿色木霉中内切 β -1, 3-葡聚糖酶基因克隆表达方面的研究在国内外仍是空白^[3-5]。本文首次报道了绿色木霉内切 β -1, 3-葡聚糖酶基因 *glu* 的克隆, 利用生物学软件进行了序列分析, 并将该段基因插入到表达载体 pPIC9K 中, 转化毕赤酵母 KM71, 获得了有效分泌表达的 β -1, 3-葡聚糖酶的毕赤酵母基因工程菌株 KGLU14。该基因可以用于植物生防菌的遗传改造, 提高相关工程菌的生物防

基金项目: 国家“863计划”(2006AA10A211)

*通讯作者。Tel: +86-531-82605386; Fax: +86-531-82965634; E-mail: yanght@keylab.net

作者简介: 高雯, (1983-), 女, 硕士研究生, 从事微生物研究。

收稿日期: 2007-05-08; 修回日期: 2007-11-05

治活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 绿色木霉 *Trichoderma virid* LTR-2 和 *E.coli* Top10 F' 为本实验室保存, 毕赤酵母 *Pichia Pastoris* KM71 和表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, 质粒 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司, 昆布多糖购自 Sigma 公司, DNA Marker、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自天根公司, 总 RNA 提取试剂 Trizol、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生工, 蛋白 Marker 购自 MBI。其他试剂为国产分析级纯。

1.1.3 培养基: LB、YPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。茯苓粉诱导培养基: 0.68%KH₂PO₄, 1.798%K₂HPO₄, 0.5%酵母提取物, 0.4%茯苓粉, 0.01%苯胺蓝, 1.5%琼脂。

1.2 RNA 的提取与纯化与反转录

在茯苓粉诱导培养基中接种 *Trichoderma virid* LTR-2, 28℃ 恒温培养 3d, 过滤收集菌丝以提取总 RNA。操作方法参照上海生工 Trizol 试剂盒说明进行。cDNA 合成参照 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明进行。

1.3 绿色木霉 *glu* 成熟蛋白编码基因的克隆

根据从 GenBank 中检索到的 β-1, 3-葡聚糖酶基因的序列, 利用引物设计软件 Primer5.0 设计了上下游引物 Primer A 和 Primer B, 并分别在 5' 端添加 *EcoR* 酶切位点序列(下划线处)。

Primer A: 5'-CGGAATTCATGTTGAAGCTCACGGCG-3'
Primer B: 5'-CGGAATTCGTATAACGGGCAACGTC-ACCACCTCC-3'。以合成的 cDNA 为模板进行扩增 *glu* 的全长序列。PCR 反应采用 50μL 体系。反应条件为: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 58℃ 1.5min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min。回收 PCR 产物并连接 pMD18-T Vector, 转化 *E.coli* Top10 F', 获得重组质粒 pMD18-T-*glu*, 测序鉴定。测序工作由上海生工公司完成。

1.4 毕赤酵母重组表达载体的构建、转化和筛选

重组质粒 pMD18-T-*glu* 经 *EcoR* 酶切后, 去磷酸化, 插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 的多克隆位点, 转化 *E.coli* Top10 F'。以 pPIC9K 5' AOX 1 为上游引物、*glu* Primer B 为下游引物进行 PCR, 筛选插入方向正

确的转化子, 使其位于 α-因子信号肽序列的下游, 并与之同框。得到重组质粒 pGLU14, 并进行限制性酶切及测序鉴定。重组质粒 pGLU14 经 *Sac* I 线性化后, 采用 PEG1000 的方法转化毕赤酵母 KM71 感受态细胞。转化之后的酵母细胞在 MD 平板上培养 3~5d, 直至长出菌落。用灭菌牙签挑取转化子分别点种到筛选培养基 MM 和 MD 平板上, 30℃ 培养 3d, 在 MD 上生长正常而在 MM 上生长缓慢或不生长的转化子为阳性转化子。用牙签挑取阳性转化子置于 EP 管中, 用 10μL ddH₂O 稀释, 煮沸 5min, 立即放入 -20℃ 冷冻 5min, 重复一次, 使酵母细胞壁破裂, 取 1μL 菌液作为模板进行菌落 PCR。所用引物、反应程序见上。

1.5 重组毕赤酵母工程的诱导表达

将阳性转化子接种于 50mL BMGY 中, 30℃ 220r/min 摇床培养 48h, 离心收集菌体。将菌体转移至 25mL BMMY 诱导培养, 30℃ 220r/min 继续培养, 每 24h 补加甲醇使其浓度保持 0.5%。每 24h 取样, 4℃ 6000r/min 离心 5min, 收集上清, 即为粗酶液。

1.6 酶活性的测定

1.6.1 茯苓粉平板检测酶活: 取不同转化子甲醇诱导 48h 的粗酶液各 20μL, 加入到含 0.4% 茯苓粉的苯胺蓝平板孔穴中, 37℃ 放置过夜, 酶解圈的大小可大致反映菌株产重组 β-1, 3-葡聚糖酶活力的高低^[6]。

1.6.2 重组 β-1, 3-葡聚糖酶活性测定: 采用砷钼酸法测定 β-1, 3-葡聚糖酶的活性, 以昆布多糖为底物, 测定方法参照文献[7]。定义 1min 内产生 1μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶单位(U)。

1.7 重组毕赤酵母表达产物的 SDS-PAGE 电泳

分别取诱导发酵 72h 的粗酶液 20μL, 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析重组蛋白的表达情况。

2 结果和分析

2.1 绿色木霉 β-1, 3-葡聚糖酶编码基因的克隆

以绿色木霉 LTR-2 的 cDNA 为模板, PCR 扩增获得约 2.3kb 的片段, 与预期大小相符。将该片段克隆到 pMD18-T Vector 上, 得到重组质粒 pMD18-T-*glu*。该质粒经 *EcoR* 酶切后, 得到大小分别为 2.7kb 和 2.3kb 的两个片段。

序列测定结果表明 *glu* 基因片段共 2289bp, 含有一个开放阅读框架(ORF), 可以编码 762 个氨基酸。翻译后的氨基酸序列含有两个 β-1, 3-葡聚糖酶的保守区 RVVYIPPGTY(292-321)和 AASQNKVAYF

(1255-1284)。

将该序列在 GenBank 中进行 Blastn 软件进行同源性检索, 发现该序列与很多已发表的 β -1, 3-葡聚糖酶基因有较高的同源性, 表 1 列出了一些同源性较高的基因。从表中可以看出绿色木霉 *glu* 与哈茨木霉 *bgn3.1* 和绿木霉 *bgn13.1* 的同源性较高, 达到了 93%, 而和绿木霉 *bgn2* 的同源性较低, 仅有 81%。该序列已经提交 GenBank, 登录号为 EF176582。

表 1 绿色木霉 LTR-2 *glu* 基因在 GenBank 中的 Blastn 检索结果

Accession	Description	Identities/%
X84085	<i>Trichoderma harzianum</i> mRNA for endo-1,3(4)-beta-glucanase (<i>bgn3.1</i>)	2161/2302(93)
EF426722	<i>Hypocrea virens</i> endoglucanase (<i>bgn13.1</i>) mRNA	2162/2303(93)
EF426721	<i>Hypocrea virens</i> endoglucanase (<i>bgn13.1</i>) gene	1720/1831(93)
AF395756	<i>Hypocrea virens</i> beta-1, 3-glucanase precursor (<i>bgn2</i>) gene	1513/1863(81)

根据基因序列推测该 β -1, 3-葡聚糖酶基因编码的氨基酸序列, 将该序列提交 ExPASy 网站服务器, 应用 ProtParam 软件对蛋白质的一级结构的一些理化性质进行了分析。该序列编码区共 2289 个核苷酸, 翻译成 762 个氨基酸, 计算的理论分子量为 80685.7Da。共含有带负电的氨基酸(Asp+Glu)50 个, 带正电的氨基酸(Lys+Arg)41 个, 酶蛋白的理论等电点为 5.9。

2.2 毕赤酵母表达载体的构建

将 *glu* 的成熟蛋白编码序列进行 EcoR 单酶切, 去磷酸化后, 将插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 转化 *E.coli* Top10 F', 获得重组质粒 pGLU14。利用 pPIC9K 上的 5' AOX 1 为上游引物、*glu* 的 Primer B 为下游引物进行 PCR, 筛选插入方向正确的转化子 pGLU14(图 1)。提取 pGLU14 质粒, 经 EcoR 酶切验证得到 2289bp 电泳结果与理论值相符(图 2)。测序结果表明插入片段在 pPIC9K 中位于 α -因子信号肽序列的下游, 有正确的阅读框。

2.3 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

经过 MD 和 MM 筛选培养基的筛选, 得到 23 个阳性转化子。以阳性转化子的染色体 DNA 为模板, 通过菌落 PCR, 进行扩增。由图 3 可以看出, PCR 扩增产物大小和目的片段 *glu* 相同, 这表明目的片段已经克隆到毕赤酵母中。

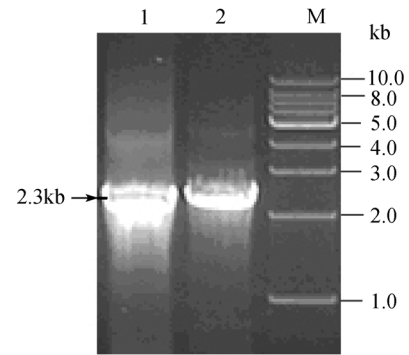


图 1 重组质粒 pPIC9K-*glu* 的 PCR 筛选

Fig. 1 PCR Results of pPIC9K-*glu*. M: DL-1Kb; 1,2: PCR Results of pGLU14.

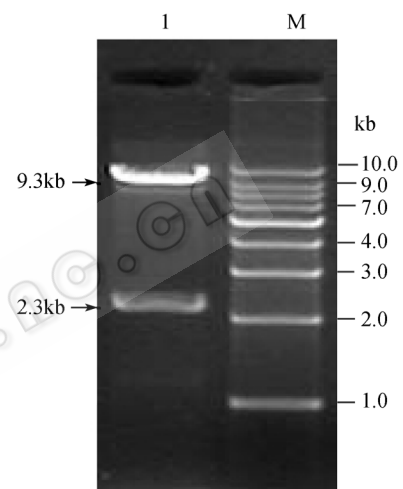


图 2 重组质粒 pGLU14 EcoR I 酶切鉴定

Fig. 2 Digestion Results by EcoR of pGLU14. M: DL-1Kb; 1: Digestion Results by EcoR

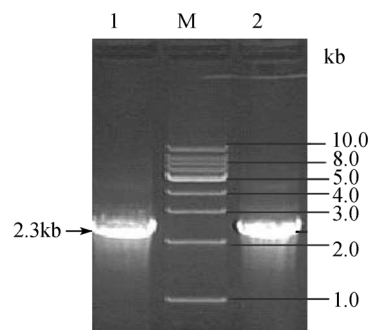


图 3 重组酵母的 PCR 验证电泳图

Fig. 3 PCR Results of the Recombinant *Pichia* Strains. M:DL-1Kb;1:PCR Result of KGLU8;2: PCR Result of KGLU14.

2.4 砷钼酸法测定酶活

在 BMGY 和 BMMY 中诱导表达阳性转化子, 取诱导 72h 的培养物上清液, 利用砷钼酸法测定 β -1, 3-葡聚糖酶的酶活, 筛选到酶活较高的 KGLU8 和 KGLU14, 其中 KGLU14 的酶活可达 889U/mL(表 2)。将 KGLU8 和 KGLU14 诱导 72h 的粗酶液加入到含

0.4%茯苓粉的苯胺蓝平板孔穴中,观察酶解圈的大小,可大致反映菌株产重组 β -1,3-葡聚糖酶活力的高低,结果如图4所示。

表2 酵母重组子中 β -1,3-葡聚糖酶表达量
Table 2 Expression of β -1,3-glucanase of the Recombinant *Pichia* Strains

Strains	Enzyme activity of β -1,3-glucanase (U/mL)	The increase in multiples of the recombinant <i>Pichia</i> strains comparing with the original strain
<i>T.virid</i> LTR-2	236	1
<i>P.pastoris</i> KM71	-	-
<i>P.pastoris</i> KGLU 8	670	2.83
<i>P.pastoris</i> KGLU14	889	3.76

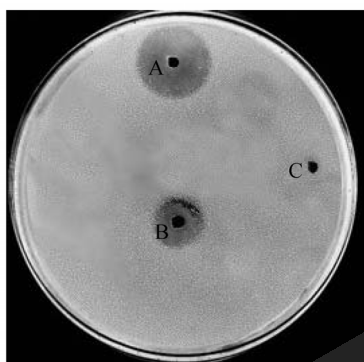


图4 重组酵母 KGLU8、KGLU14 粗酶液的活性检测
Fig. 4 Activity Detection of Crude Enzyme of the Recombinant *Pichia* Strains. A: Crude Enzyme of KGLU14; B: Crude Enzyme of KGLU8; C: Crude Enzyme of KM71.

2.5 重组毕赤酵母 KGLU14 的诱导表达和 SDS-PAGE 电泳

以甲醇诱导表达重组毕赤酵母 KGLU14, 每 24h 取样, 测定培养基中分泌表达的 β -1,3-葡聚糖酶活力。发现 β -1,3-葡聚糖酶的活力在诱导培养 72h 达到高峰, 活

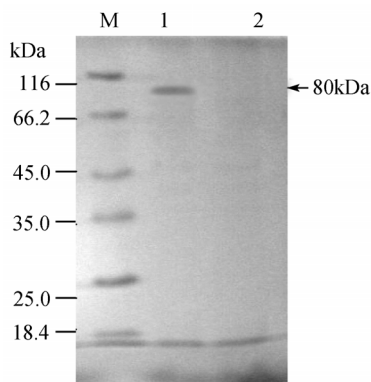


图5 重组毕赤酵母 KGLU14 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE Result of KGLU14. M: MBI SM0431; 1: Crude Enzyme of KGLU14; 2: Crude Enzyme of KM71.

力为 898U/mL。SDS-PAGE 电泳分析结果表明表达产物分子量约为 80kDa, 和理论推测值大致一样(图 5)。

3 讨论

β -1,3-葡聚糖酶是重要的病原真菌拮抗物质。作为最为广泛研究的植病生防菌之一的木霉菌, 是 β -1,3-葡聚糖酶的优秀产生菌^[8]。近年来, 有关木霉菌 β -1,3-葡聚糖酶的基因克隆研究较少, 尤其是绿色木霉内切 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆及表达在国内外仍属空白。目前, β -1,3-葡聚糖酶与植物病害关系的研究正在越来越多地受到重视, 其最有前途和价值的应用领域应当在植病生防菌和农作物品种的改良方面, 将其应用于植物抗真菌病基因工程中。外源 β -1,3-葡聚糖酶既可单独地被导入植物发挥作用, 又可与其它防卫蛋白、抗菌素等基因一起转入植物协同表达^[9,10]。今后应加强对抗病分子机制及表达机制的深入研究, 注意克服真菌分泌物对 β -1,3-葡聚糖酶的抑制作用, 并选择抑菌活性强的 β -1,3-葡聚糖酶类型, 或对其基因进行必要的修饰、改造, 进一步增强植物对病原真菌的抗性^[11]。在深入研究生化和分子生物学的基础上, 进一步了解 β -1,3-葡聚糖酶编码基因的调控, 不但能为植物抗病育种提供良好的抗源基因, 还可为植物病害生物防治菌的遗传改良提供有力工具, 已经进行的研究虽然还不多, 但也展现了诱人的前景^[12]。

本文首次报道了绿色木霉内切 β -1,3-葡聚糖酶基因的 PCR 扩增, 并将该基因在巴斯德毕赤酵母中进行了表达, 表达活力比原始菌株提高了近 4 倍, 具有很大的应用潜力。序列分析表明, *glu* 基因由 2289 个核苷酸残基组成, 含有一个开放阅读框架(ORF), 可以编码 762 个氨基酸, 与报道基本相同。翻译后的氨基酸序列含有两个 β -1,3-葡聚糖酶的保守区: RVVYIPPGTY 和 AASQNKVAYF。 *glu* 与哈茨木霉 *bgn3.1* 和绿木霉 *bgn13.1* 的同源性较高, 达到了 93%。将克隆到的 β -1,3-葡聚糖酶序列连接到穿梭载体 pPIC9K, 构建重组质粒 pGLU14, 转化毕赤酵母 KM71, 菌落 PCR 扩增证实了 β -1,3-葡聚糖酶基因已整合到酵母基因组中。毕赤酵母重组子 KGLU14 经诱导表达, β -1,3-葡聚糖酶能有效分泌表达, 表达产物具有正常的生物学活性。通过 SDS 电泳分析发现毕赤表达的木霉 β -1,3-葡聚糖酶基因表达产物的分子量大约为 80kDa, 和理论推测值大致相同。本研究中重组酵母的产酶量较低, 酶活性不高, 下一步拟对发

酵条件进行摸索与改进。

参 考 文 献

- [1] 刘春琴, 王庆雷. 食用菌污染菌—绿色木霉生物学特性及防治. 中国农学通报(*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 1998, 14(3): 51–52.
- [2] 杨合同, 唐文华, M Ryder. 木霉菌与植物病害的生物防治. 山东科学(*Shandong Science*), 1999, 12(14): 7–15.
- [3] Rachel Cohen-Kupiec, Karen E. Broglie. Molecular characterization of a novel β -1, 3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene*, 1999, 226(2): 147–154.
- [4] De la Cruz, J, Pintor-Toro, J, A. Llobell and L. C. Romero. A novel endo- β -1, 3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol*, 1995, 177(23): 6973–6945.
- [5] Kim DJ, JM Baek, and P Uribe, et al. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Curr. Gene T*, 2002, 40(6): 374–384.
- [6] 杨合同, 郭勇, 李纪顺, 陈凯. 木霉菌平板抗菌、几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性与病害防治效果. 山东科学(*Shandong Science*), 2003, 16(2): 1–6.
- [7] 毛世宏. β -1, 3-葡聚糖酶的纯化及基因克隆. 中国农业大学硕士学位论文, 1993.
- [8] 于新, 田淑慧, 徐文兴, 刘开启. 木霉菌生防作用的生化机制研究进展. 中山大学学报-自然科学版(*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*), 2005, 144(12): 86–90.
- [9] 徐同. 木霉分子生物学研究进展. 真菌学报(*Mycosystema*), 1996, 15(2): 143–147.
- [10] 蓝海燕, 王长海, 陈正华, 田颖川. 农杆菌介导法将 β -1, 3-葡聚糖酶基因导入油菜的研究初报. 中国油料作物学报(*Chinese Journal of Oil Crop Sciences*), 2000, 22(1): 6–10.
- [11] 蓝海燕, 田颖川, 王长海等. 表达 β -1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究. 遗传学报(*Acta Genetica Sinica*), 2000, 27(1): 70–77.
- [12] 蔡应繁, 叶鹏盛, 张利等. β -1, 3-葡聚糖酶及其在植物抗真菌病基因工程中的应用. 西南农业学报(*Southwest China Journal of Agricultural Sciences*), 2001, 14(2): 78–81.

Cloning of β -1,3-glucanase gene from *Trichoderma virid* LTR-2 and its expression in *Pichia pastoris*

Wen Gao¹, Yuanzheng Wu², Hetong Yang^{1, 2*}

⁽¹⁾ College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China

⁽²⁾ Biotechnology Center of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: Text We designed a pair of primers according to fungal glucanase genes obtained from GenBank and cloned a novel β -1,3-glucanase gene (glu) from *Trichoderma virid* LTR-2 cDNA by PCR. Then we linked the fragment with pMD18-T vector and sequenced it. The sequence analysis indicated that glu was composed of 2289 nucleotide residues. The fragment contained an Open Reading Frame coding 762 amino acids and was similar to previous reports. Translated amino acids sequence of glu contained two Conservative Districts of β -1,3-glucanase which were RVVYIPPGTY and AASQNKVAYF. By nucleotide blasting in NCBI glu showed high homology to three β -1,3-glucanase genes from *Trichoderma* sp., especially with *T.harzianum* bgn3.1 and *Hypocrea virens* bgn13.1, which the homology reached 93%. The sequence was submitted to GenBank and the Accession Number is EF176582. Then we connected glu gene with the *Pichia pastoris* shuttle vector-pPIC9K. The recombinant plasmid named pGLU14 was transformed into methylotropic yeast *P. pastoris* KM71 after linearization. The recombinant strain KGLU14 expressing β -1,3-glucanase at high level was obtained through plate screening. The SDS-PAGE result indicated that molecular weight of the recombinant β -1,3-glucanase was about 80kDa and the activity of the recombinant enzyme could reach 889U/mL in liquid culture.

Keywords: β -1, 3-glucanase; clone; sequence analysis; expression of secreted

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A211)

*Corresponding author. Tel: +86-531-82605386; Fax: +86-531- 82965634; E-mail: yanght@keylab.net

Received: 8 May 2007/ Revised: 5 December 2007