

刘利娟, 刘裕峰, 杨帅, 刘应高. 川西云杉几丁质酶基因 *PICHI* 的克隆、表达与生物信息学分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(4): 503~512
 Liu LJ, Liu YF, Yang S, Liu YG. Cloning, expression, and bioinformatics analysis of the chitinase gene *PICHI* in *Picea likiangensis* var. *balfouriana* [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(4): 503~512

川西云杉几丁质酶基因 *PICHI* 的克隆、表达与生物信息学分析

刘利娟, 刘裕峰, 杨帅, 刘应高*

(四川农业大学林学院, 成都 611130)

摘要: 以川西云杉 (*Picea likiangensis* var. *balfouriana* (Rehd. et Wils.) Hillier ex Sisvin) 为材料, 利用 RT-PCR 技术, 克隆获得几丁质酶基因 *PICHI* 的 cDNA 全长序列, 并对该基因的序列特征及基因表达情况进行分析。结果显示, *PICHI* 的开放阅读框长 1017 bp, 共编码 338 个氨基酸; 蛋白序列结构域分析结果表明, *PICHI* 为 Class I 类几丁质酶, 属 19 家族, 兼具溶菌酶活性; 该序列与其他植物几丁质酶的蛋白序列相似性较高。系统发育分析结果显示, 川西云杉 *PICHI* 序列与北美云杉 (*Picea sitchensis* (Bong.) Corr.)、黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.) 等松科植物亲缘关系最近。进一步将 *PICHI* 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 表达出约 45 kD 的蛋白, 主要以包涵体形式存在, 且在 25℃下采用 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 时蛋白的表达量最佳。

关键词: 川西云杉; 几丁质酶; 基因克隆; 生物信息学; 原核表达

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A

文章编号: 2095-0837(2019)04-0503-10

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.40503

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning, expression, and bioinformatics analysis of the chitinase gene *PICHI* in *Picea likiangensis* var. *balfouriana*

Liu Li-Juan, Liu Yu-Feng, Yang Shuai, Liu Ying-Gao*

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The full-length cDNA of the chitinase gene *PICHI* was cloned from *Picea likiangensis* var. *balfouriana* (Rehd. et Wils.) Hillier ex Sisvin by RT-PCR, with sequence characteristics and gene expression levels then analyzed. Results showed that the open reading frame of *PICHI* was 1017 bp in length and encoded a protein with 338 amino acids. Protein sequence domain analysis indicated that *PICHI* was a class I chitinase that belonged to the 19 family and exhibited lysozyme activity. The sequence of *PICHI* had high similarity to the protein sequences of other plant chitinases. Phylogenetic analysis showed that the *PICHI* sequence was closely related to Pinaceae plants such as *Picea sitchensis* (Bong.) Corr. and *Pinus thunbergii* Parl. In this study, we further transferred the *PICHI* recombinant plasmid into *E. coli* BL21 (DE3) to express a protein of about 45 kD, which was mainly in the form of an inclusion body. The optimal expression conditions of the gene were 0.2 mmol/L IPTG at 25℃ for 4 h induction.

Key words: *Picea likiangensis* var. *balfouriana*; Chitinase; Gene cloning; Bioinformatics; Prokaryotic expression

收稿日期: 2019-01-11, 退修日期: 2019-03-04。

基金项目: 四川省教育厅重点项目(09ZA068)。

This work was supported by a grant from the Key Project of Education Department of Sichuan (09ZA068).

作者简介: 刘利娟(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为森林保护学(E-mail: 1914164609@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lyg927@263.net)。

几丁质是真菌细胞壁的主要成分之一，在高等真菌如担子菌纲(*Basidiomycetes*)、子囊菌纲(*Ascomycetes*)和半知菌纲(*Deuteromycetes*)中，几丁质可占其真菌细胞壁干重的40%~60%，主要以网状微纤丝的形式错落包埋于真菌菌丝体以及孢子的细胞壁和结构膜中^[1-3]。几丁质酶是一类与植物抗病性相关的次生水解复合酶，能够水解真菌细胞壁中的几丁质，对真菌表现为广谱抗性^[4]。据报道，植物几丁质酶抑制真菌生长的机制可能是通过碱性几丁质酶在菌丝体尖端水解几丁质链，导致细胞壁变薄并破坏原生质体，新合成的几丁质被酸性几丁质酶降解成几丁质寡糖，导致菌丝的伸长和生长受到抑制，菌体孢子萌发率降低^[5]。同时，降解产生的真菌细胞壁碎片还可发挥诱导物的作用，刺激寄主植物产生抗病反应^[6]。在患病植物组织中，植物几丁质酶的积累可减缓病原体的生长，减少孢子形成^[7]。在未患病部位中，产生的几丁质酶可引起植物获得系统性抗性，使受影响的植物免遭病原菌的进一步侵染^[8]。

为研究植物几丁质酶基因的进化、表达和功能，Broglie等^[9]首次从菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)中克隆出几丁质酶基因，发现经乙烯处理的菜豆幼苗体内几丁质酶表达量明显增加。随后，许多植物中相继克隆获得了该基因。如水稻(*Oryza sativa* L.)^[10]、罗望子(*Tamarindus indica* L.)^[11]和沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)^[12]等植物经真菌诱导后几丁质酶表达量明显增加，且酶活性显著提高。体外抑菌实验结果表明，不同来源的植物几丁质酶对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Ktih.)^[13]、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)^[14]和瓜果腐霉菌(*Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp.)^[15]等多种病原真菌具有明显的拮抗作用，可以抑制其菌丝生长和孢子萌发。利用基因工程手段将异源几丁质酶基因转入植物体内并成功表达，也能对真菌产生一定的抑制作用，如马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[16]、油菜(*Brassica napus* L.)^[17]、水稻^[18]等转几丁质酶基因植物的抗性均明显高于对照。因此，几丁质酶在植物抵御真菌病害的侵染中具有重要作用。

几丁质酶基因在松科植物中已有一些报道，包括樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica* Litv.)^[19]、加州山松(*Pinus monticola* Dougl. ex

D. Don)^[20]等。在云杉属(*Picea*)植物中报道较多的为挪威云杉(*Picea abies* Karst.)。研究发现，畸雌腐霉(*Pythium irregular Buisman*)和白腐病菌(*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref)分别侵染挪威云杉幼苗后，其根部木质化程度增加，且几丁质酶活性显著提高^[21, 22]。Johnk等^[23]从根腐病侵染的挪威云杉幼苗中检测出了7种IV类几丁质酶亚型，均与真菌细胞壁降解有关。但目前对于川西云杉(*Picea likiangensis* var. *balfouriana* (Rehd. et Wils.) Hillier ex Slsvin)几丁质酶的研究尚未见报道。因此，本研究以川西云杉为材料，从中克隆出几丁质酶基因*PICHI*的cDNA全长序列，对其核苷酸和氨基酸序列进行比对分析，明确其序列的结构特征；并将该基因导入大肠杆菌中进行原核表达，以期为川西云杉抗病的分子机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

川西云杉采自四川省甘孜州二郎山林场，以其嫩叶为实验材料。

1.2 *PICHI*基因的克隆

采用RNA提取试剂盒提取川西云杉总RNA，并反转录成cDNA。参考NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中云杉属其他植物几丁质酶基因的核苷酸序列，采用Primer 5.0软件设计川西云杉*PICHI*基因的特异性引物*PICHI-F*和*PICHI-R*(表1)并进行PCR扩增，程序如下：94℃预变性3 min，94℃变性30 s，54℃退火1 min，72℃延伸1.5 min，共40个循环；最后72℃延伸7 min，于4℃保存。扩增产物经回收、纯化后与pMD 19-T载体连接。将重组质粒pMD 19-T-*PICHI*转入DH5α感受态细胞，阳性克隆经鉴定后送测序。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>PICHI-F</i>	ATGAAGTCGATTAGGTTCTCCG
<i>PICHI-R</i>	TTAAACCACGGTTTGATAAGGC
<i>PICHI</i> Bam HI	CGGGATCCATGAATTGTATTTGCGCTCTGC
<i>PICHI</i> Hind III	CCCAAGCTTTAACACCACGGTTTGATAAGGC

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件对 *PICHI* 基因的核苷酸和氨基酸序列进行比对分析, 通过 ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) 工具查找开放阅读框; 利用 ClustalX 1.81 软件对蛋白质序列进行同源性分析; 利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测蛋白质的理化性质; 利用 NetPhos 3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 在线软件预测氨基酸潜在磷酸化位点; 采用 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线工具预测氨基酸潜在磷酸化位点; 采用 ScanProsite 工具 (<https://prosite.expasy.org/scanprosite>) 分析蛋白质功能位点和功能域; 利用工具 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 预测蛋白质二级结构; SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白质三级结构; 利用 MEGA 5.05 软件进行系统进化分析。

1.4 *PICHI* 基因原核表达载体的构建

将测序得到的重组质粒 pMD 19-T-*PICHI* 进行质粒提取, 以纯化质粒为模板, 利用特异性引物 *PICHI**Bam* HI 和 *PICHI**Hind* III (表 1) 扩增含有 *Bam* HI 和 *Hind* III 酶切位点且不含信号肽的 *PICHI* 基因序列。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1.5 min, 共 40 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min。回收特异性片段, 利用限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Hind* III 双酶切目的片段和 pET-32a 载体, 纯化、回收后采用 T4 DNA 连接酶连接, 然后转入 DH5 α 感受态细胞中, 阳性克隆送测序。

1.5 重组蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

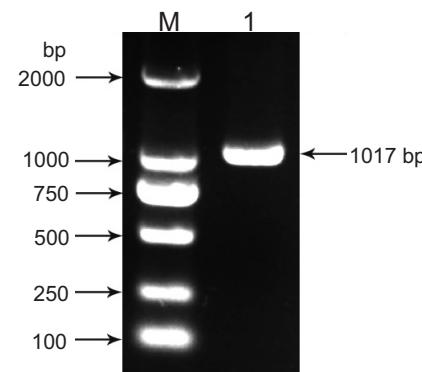
将构建好的表达载体质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 挑取单菌落于 LB 液体培养基 (含 100 mg/L Amp) 中 37°C、200 r/min 过夜振荡培养, 次日 PCR 检测表达载体是否转入成功, 并筛选重组蛋白最适诱导条件 (包括最佳 IPTG 浓度、最佳诱导时间和最佳诱导温度)。最适 IPTG 浓度的筛选: 将已过夜培养的菌液按照 1:100 的比例加入 LB 液体培养基 (含 100 mg/L Amp) 中, 于摇床中 37°C、200 r/min 活化 2.5 h, 分别加入诱导剂 IPTG (IPTG 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、

1.0 mmol/L) 诱导 3 h, 以不加 IPTG 诱导的菌液、IPTG 诱导的空载体和不加 IPTG 诱导的空载体为对照, SDS-PAGE 电泳检测诱导情况。以最适 IPTG 浓度进行最适诱导时间的筛选, 时间梯度分别设为 2、4、6、8、10 h, 对照同上。以最适 IPTG 浓度和最佳诱导时间进行最佳诱导温度的筛选, 温度梯度分别设为 20°C、25°C、30°C、37°C, 对照同上。以筛选出的最佳诱导条件进行重组蛋白的诱导表达, 参考刘裕峰等^[24] 的方法对诱导后的样品进行处理。

2 结果与分析

2.1 *PICHI* 基因全长 cDNA 克隆

以川西云杉 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经检测后得到约 1000 bp 的单一条带 (图 1)。经测序, 该核苷酸片段长度为 1017 bp (GenBank 登录号: MK054239)。



M: DL2000; 1: PCR product of cDNA.

图 1 川西云杉 *PICHI* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of *PICHI* from *Picea likiangensis* var. *balfouriana*

2.2 *PICHI* 基因 cDNA 序列全长分析

序列分析结果显示, *PICHI* 基因序列包含一个完整的开放阅读框 (ORF), 共编码 338 个氨基酸 (图 2)。且该基因的核苷酸序列与松科植物的基因序列一致性均在 90% 以上, 其中与杂交云杉 (*Picea engelmannii*-*glauca*) 的序列一致性高达 97%, 与北美云杉 (*Picea sitchensis* (Bong.) Corr.) 的序列一致性达 94%, 表明 *PICHI* 基因为云杉几丁质酶基因家族的一员。

2.3 蛋白理化性质分析

PICHI 蛋白理化性质分析结果显示, 该蛋白的分子式为 $C_{1578}H_{2372}N_{446}O_{480}S_{22}$, 相对分子量为

1 ATGAAGTCGATTAGGTTCTCCGCGATGGCGATCCGCTTGGTTACAATGGCGACAATGAATTGTATTTGCGTCT
 1 M K S I R F S A M A I A L V T M A T M N L Y F A S
 76 GCAGAACATGCGGACGGCAAGCAAGTGGAGCGCTCTGTCCCGTGGCTGTGCTGCAGCAAATGGGGATGGTGC
 26 A E Q C G R Q A S G A L C P G G L C C S K W G W C
 151 GGCAACACAGAGGCCATTGGGGCAGGATTGCCAAGTCAGTCGGAGGATCGACTCCCACGCCCTCCCTCACCC
 51 G N T E A H C G Q D C Q S Q C G G S T P T P P S P
 226 ACTCCGGTGGACAGGGAGTCTCATCTGTATCACTGAAAGCATTTCACGATTATTGAAGCACAGAACGAC
 76 T P G G Q G V S S V I T E S I F N D L L K H R N D
 301 GCCGGTTGCAAGGCCAAGGATTCTACTCCTACGCCCTTCATTGCCGCTGCCATGCTTCCCCGGTTCGGC
 101 A G C K A K G F Y S Y A A F I A A A A N A F P G F G
 376 ACCACAGGGATCTCGTACTCGAAAAGAGAGCTCGCTGCTTTCTTGGCCAAACCTCCACGAAACCACAGGC
 126 T T G D L A T R K R E L A A F F G Q T S H E T T G
 451 GGATGGCCGGCGCCCCAGACGGCCGTACGGTGGGTTATTGTTCAAAGAGGAGCAAGGAATCCTCCGGC
 151 G W P A A P D G P Y A W G Y C F K E E Q G N P P G
 526 GAGTACTGCCAGGCATCTCCAAATGGCCCTGCCATCTGGAAAGAGATACTACGGACGAGGGCCGTTCAAATA
 176 E Y C Q A S S Q W P C A S G K R Y Y G R G P V Q I
 601 TCCTGGAACTACAATATGGACGGCCGGAGGGCAATTGGGTTGACGGCATAAACACCCGGACATTGGTGGC
 201 S W N Y N Y G P A G R A I G F D G I N N P D I V A
 675 AACGATGCCACTGCTCTTTAACGAGCAGTGTTGATGACCGCCAGCTCAAAGCCTCCGAC
 226 N D A T V S F K T A V W F W M T A Q S P K P S C H
 751 GACGTGATGACCGGGAGATGGAGTCGGTCCGGCACGCACCCGGGAGAGCGGGATATGGAGTGGT
 251 D V M T G R W S P S G S D T A A G R A A G Y G V V
 826 ACAACATCATCACGGCGGTTGGAGTGCAGGAAAGGCAGCGACTCGAGGCAGCAGGACCGCATGGTTCTAC
 276 T N I I N G G L E C G K G S D S R Q Q D R I G F Y
 901 AAAAGATACTGCGACATTCTGGCTGAGCTACGGATCAAATCTGGACTGAAACACAGAGGGCTTCGGCTT
 301 K R Y C D I L G V S Y G S N L D C N N Q R P F G F
 976 GCGGCTCAATCTCACCTCGCCTTATCAAACCGTGGTTAA
 326 A A Q S Q P R L I K T V V *

ATG 为起始密码子；* 为终止密码子。

ATG indicates start codon; * indicates stop codon.

图 2 *PICHI* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 *PICHI* gene cDNA sequence and its encoded amino acid sequence

35.98 kD, 理论等电点为 8.42。该蛋白由 20 种氨基酸组成, 不稳定性指数为 42.6, 为不稳定性蛋白; 亲水性平均值 -0.340, 属亲水性蛋白。该蛋白的氨基酸序列具有 30 个潜在的磷酸化位点, 且在氨基酸序列的第 26 和第 27 位间存在一个概率为 0.664 的潜在信号肽断裂位点, 表明该蛋白中存在信号肽, 属分泌蛋白。

2.4 蛋白结构预测

PICHI 蛋白进行二级结构预测结果表明(图 3), 其主要由 4 部分组成, 包括无规则卷曲、 α -螺旋、延伸链和 β -转角, 所占比例分别为 57.69%、29.29%、9.17% 和 3.85%。SWISS-MODEL 在线软件预测该蛋白的三级结构主要由无规则卷曲和螺旋等 2 个元件组成(图 4), 与二级结

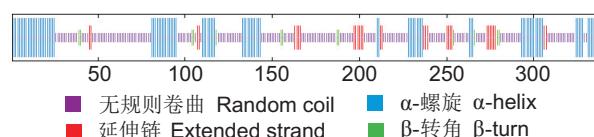


图 3 预测的 *PICHI* 蛋白二级结构
Fig. 3 Secondary structure prediction of *PICHI* protein

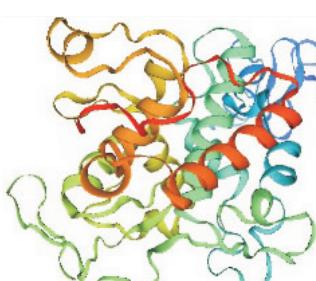


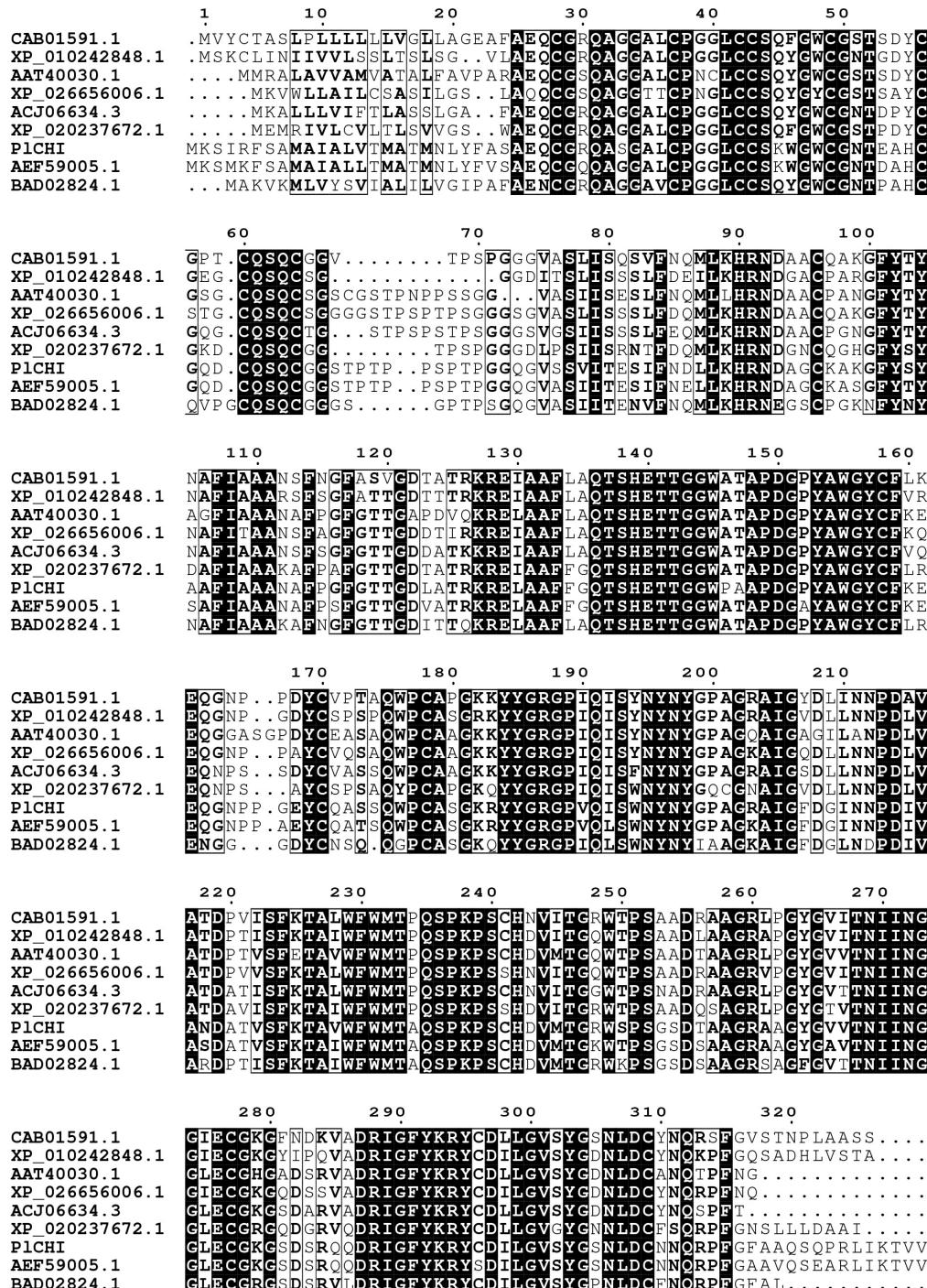
图 4 预测的 *PICHI* 蛋白三级结构

Fig. 4 Tertiary structure prediction of *PICHI* protein
<http://www.plantscience.cn>

构预测结果相符; 同时, 该蛋白 3D 模型与粳稻 (*Oryza sativa L. subsp japonica*) I 类几丁质酶蛋白结构相似, 推测两者具有相似的功能。

2.5 蛋白序列同源性分析

PICHI 蛋白氨基酸序列进行多重比对结果显示 (图 5), *PICHI* 氨基酸序列与黑松 (*Pinus thunbergii*)



CAB01591.1: 鳝梨; XP_010242848.1: 荷花; AAT40030.1: 二倍体多年生大刍草; XP_026656006.1: 海枣; ACJ06634.3: 野生蕉; XP_020237672.1: 小果野蕉; AEF59005.1: 黑松; BAD02824.1: 落羽杉。
 CAB01591.1: *Persea americana* Mill.; XP_0010242848.1: *Nelumbo nucifera* Gaertn.; AAT40030.1: *Zea diploperennis* L.; XP_026656006.1: *Phoenix dactylifera* L.; ACJ06634.3: *Musa* spp., AB Group; XP_020237672.1: *Musa acuminate* L.; AEF59005.1: *Pinus contorta* Dougl.; BAD02824.1: *Taxodium distichum* (L.) Rich.

图 5 *PICHI* 氨基酸序列与其他物种的多重比对

Fig. 5 Multiple alignment of amino acid sequences of *PICHI* with other species

Parl.)的同源性达90%，与其余8种植物的同源性也都在67%以上，且功能区的氨基酸序列较为保守，说明PICH1与其他植物几丁质酶蛋白具有相似的功能。PICH1氨基酸序列在第28~65位处存在两个几丁质结合结构域，包含7个碳水化合物结合位点。同时，在第8~317位氨基酸残基间存在一个几丁质酶19超家族，说明该蛋白为19家族的成员之一，其中还具有3个催化残基位点和7个糖结合位点；同时该蛋白还具有一个类溶菌酶超家族基因的保守结构域，推测该蛋白兼具溶菌酶活性。

2.6 系统进化分析

为阐明川西云杉PICH1蛋白与其他植物间的系

统进化关系，本研究筛选出与该蛋白同源关系较近的蛋白序列，构建了几丁质酶蛋白的系统发育树。结果显示(图6)，川西云杉与同科的杂交云杉的几丁质酶序列同源性最高，其次为北美云杉和黑松，而与禾本科植物的亲缘关系最远。由此推测，PICH1与松科几丁质酶蛋白的亲缘关系最近。

2.7 原核表达载体的构建与鉴定

本研究将扩增得到的PICH1基因片段和pET-32a构建表达载体，经酶切、连接后转化至DH5 α 感受态细胞中，经过菌落PCR检测，得到与目的片段一致的特异性条带(图7)。测序结果

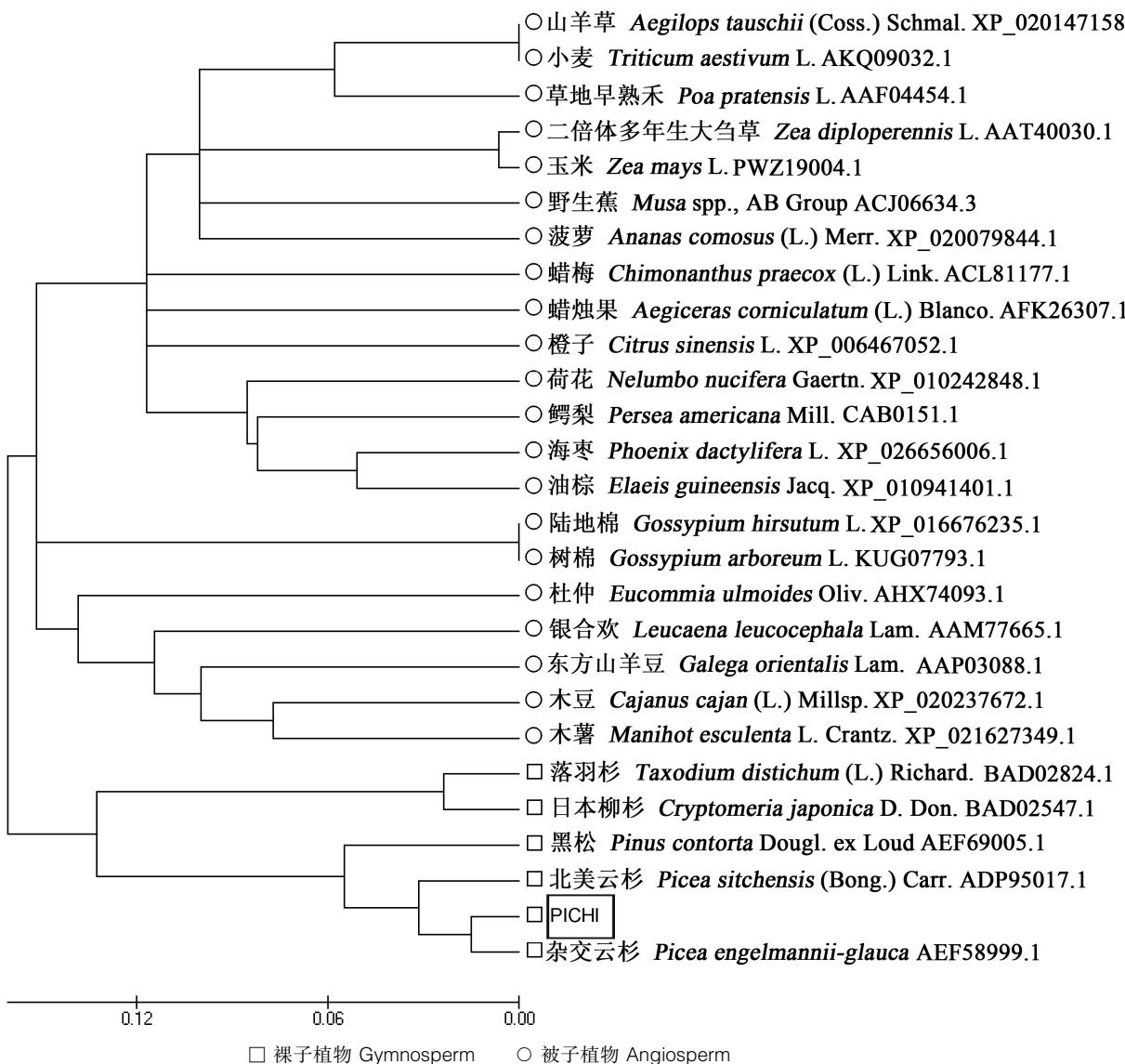


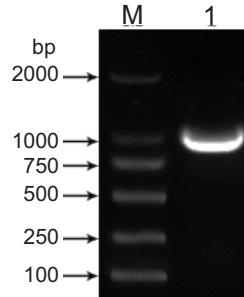
图6 PICH1与其他植物几丁质酶蛋白序列的系统发育分析
 Fig. 6 Phylogenetic analysis of chitinase proteins from PICH1 and other species

表明 pET-32a-PICH1 表达载体的序列与目标基因序列一致。

2.8 重组表达载体质粒的诱导表达及电泳分析

本研究将构建好的 pET-32a-PICH1 表达载体质粒转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中, 得到与目的基因大小一致的条带(图 8)。最佳 IPTG 诱导结果显示(图 9: A), 对照无融合蛋白表达, 不同 IPTG 浓度诱导下均有目的蛋白出现, 与预期大小相符。确定 IPTG 终浓度 0.2 mmol/L 为最佳诱导浓度进行诱导时间实验。

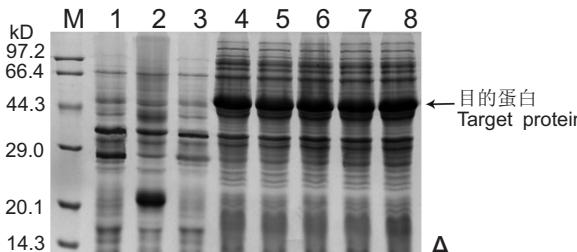
本研究发现, 不同诱导时间下均能诱导出目的蛋白(图 9: B), 但随着诱导时间的增加, 目的蛋白的表达量变化不大, 确定 4 h 为最适诱导时间并进行诱导温度实验。不同温度条件下蛋白诱导实验结果显示(图 9: C), 各温度下均有大量目的蛋白出现, 在 25°C 和 30°C 下蛋白表达最为丰富, 且二者差异不大。在上清液中无明显目的蛋白条带出现, 其主要以包涵体的形式存在。



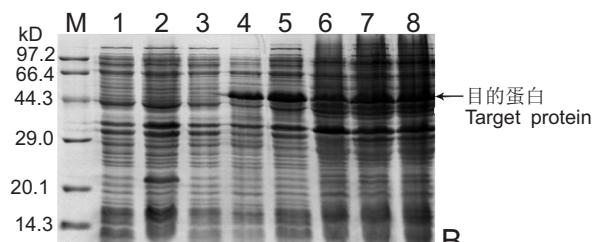
M: DL2000; 1: pET-32a-PICH1-DH5α.

图 7 PET-32a-PICH1 扩增条带

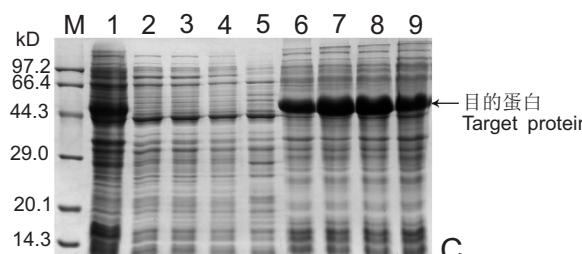
Fig. 7 Detection of pET32a-PICH1 colony PCR



A



B



C

M: 蛋白质分子量标准。A: 最佳 IPTG 诱导浓度的筛选。1: 不加 IPTG 诱导的 pET-32a 空载体; 2: 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 pET-32a 空载体; 3~8: IPTG 诱导浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L。B: 最佳诱导时间的筛选。1: 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 pET-32a 空载体 4 h; 2: 不加 IPTG 诱导的 pET-32a 空载体; 3: 不加 IPTG 诱导的菌液; 4~8: 0.2 mmol/L 的 IPTG 分别诱导 2、4、6、8、10 h。C: 最佳诱导温度的筛选。1: 诱导全菌液; 2~5: 分别以 20°C、25°C、30°C 和 37°C 诱导上清中蛋白表达; 6~9: 分别以 20°C、25°C、30°C 和 37°C 诱导沉淀中蛋白表达。

M: Protein Marker. A: Screening of optimal IPTG induced concentration. 1: pET-32a empty vector without IPTG; 2: IPTG (0.5 mmol/L) induced pET-32a empty vector; 3~8: pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) was induced by 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L IPTG. B: Screening of optimal induction time. 1: IPTG (0.2 mmol/L) induced pET-32a empty vector; 2: pET-32a empty vector without IPTG; 3: pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) without IPTG; 4~8: pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) was induced by IPTG (0.2 mmol/L) in 2, 4, 6, 8, 10 h. C: Screening of optimal induction temperature. 1: pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) was induced at 37°C; 2~5: Supernatant of pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) was induced at 20°C, 25°C, 30°C, and 37°C; 6~9: Precipitation of pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) was induced at 20°C, 25°C, 30°C, and 37°C.

图 9 pET-32a-PICH1-BL21 (DE3) 诱导条件的优化

Fig. 9 Optimization of induction conditions of pET-32a-PICH1-BL21 (DE3)

3 讨论

几丁质酶是一类与植物抗病性有关的防御酶,也被称作病程相关蛋白,他们在植物体的大多数器官中均有分布,催化几丁质中N-乙酰葡萄糖残基之间的 β -1,4-糖苷键水解生成N-乙酰氨基葡萄糖寡聚体或N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖单体,成为植物防御真菌病原体系统的诱导物^[25, 26]。研究表明,许多几丁质酶是针对病原体诱导产生,因此其主要参与防御细胞壁中含有几丁质的真菌^[27]。本研究克隆获得PICH1基因的全长序列,且该基因序列与前人报道的二色补血草(*Limonium bicolor* (Girard) Kuntze)^[14]、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)^[28]等物种的基因序列长度一致,表明PICH1基因与其他植物源几丁质酶基因具有较高的同源性。氨基酸序列多重比对结果显示,PICH1与其他植物源几丁质酶蛋白的序列和功能相似,且功能区域的氨基酸序列较为保守。作为一种糖基水解酶,几丁质酶大小约为20~120 kD。不同来源的几丁质酶分子量大小差异较大,其中细菌为60~110 kD,真菌一般大于30 kD,而植物为25~40 kD^[29]。本研究中,PICH1蛋白约为36 kD,与油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)^[26]、木麻黄(*Casuarina equisetifolia* Forst.)^[2]等植物的蛋白分子量相近。然而,本研究中蛋白电泳分析结果显示,经BL21(DE3)原核表达的蛋白分子量略大,约为45 kD,推测可能是pET-32a表达载体本身所带的His-Tag标签序列所致。

根据氨基酸序列初级结构和特定的结构域特征,植物几丁质酶基因被分为18和19两大家族^[30]。18家族不仅在植物中存在,还广泛分布于许多真菌、细菌、昆虫和哺乳动物中^[31]。19家族主要存在于植物中,如茶(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)^[32]、日本柳杉(*Cryptomeria japonica* (L. f.) D. Don)^[29]等,多为糖基化水解酶,与植物对病原物的防御机制有关^[33]。根据他们的氨基酸序列特征,可将植物几丁质酶划分为I~VII等7类,其中I类几丁质酶具有最高的抗真菌活性,原因可能是其存在几丁质结合结构域^[34, 35]。由PICH1蛋白功能域分析结果可知,PICH1属19家族,且包含N-端信号肽区、几丁质结合结构域、可变交联区和催化功能区4大部分,无C末端延

伸,属Class I类几丁质酶。与III、V类几丁质酶属18家族,其余类型和部分链霉菌几丁质酶属19家族的报道一致^[30],推测其具有较强的几丁质分解活性,对病原菌有一定的抑制作用。许多植物几丁质酶不仅对几丁质有分解活性,还同时具备溶菌酶活性。本研究发现,PICH1不仅属19家族,同时还是类溶菌酶超家族中的一员,推测该蛋白兼具溶菌酶活性,研究结果也与已报道的微甘菊(*Mikania micrantha* Kunth.)^[36]、豇豆(*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)^[37]等几丁质酶的功能相吻合。

SDS-PAGE电泳分析结果发现,25℃下采用0.2 mmol/L IPTG诱导菌株表达4 h时,目的蛋白表达量最大,但蛋白主要以包涵体的形式存在,且降低诱导温度对促进蛋白溶解作用不大。一般情况下,在大肠杆菌中过表达的重组蛋白容易以包涵体的形式存在^[38]。Graca等^[2]对木麻黄结节的III类几丁质酶过表达,得到的目的蛋白全部为包涵体。Singh等^[39]将小麦(*Triticum aestivum* L.)的VII类几丁质酶基因导入大肠杆菌中融合表达,得到的目的蛋白也几乎全部为包涵体,但复性后的包涵体对茶轮纹病菌(*Pestalotia theae* Saw.)、立枯丝核菌等多种病原菌均表现出抗性。由此推断,经复性后的几丁质酶包涵体仍具有活性,可进一步探究其蛋白功能及表达特性。

参考文献:

- [1] Zhang JY, Guo ZR, Qu SC, Zhang Z. Identification and molecular characterization of a class I chitinase gene (*Mhchit1*) from *Malus hupehensis* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(3): 760~767.
- [2] Graca I, Liang JS, Guilherme M, Tavares P, Ferreira-Pinto MM, et al. Cloning, overexpression and functional characterization of a class III chitinase from *Casuarina glauca* nodules [J]. *Symbiosis*, 2016, 70(1~3): 139~148.
- [3] 蒋选利,李振岐,康振生,闫海林.几丁质酶与植物的抗病性[J].西北农业学报,2002,11(3): 71~75.
Jiang XL, Li ZQ, Kang ZS, Yan HL. Chitinase and plant disease resistance [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2002, 11(3): 71~75.
- [4] 荀艳,谢天,蒲莉,王刚刚.解淀粉芽孢杆菌MY001菌株对几丁质的降解及对芦笋茎枯病菌的拮抗作用[J].应用与环境生态学报,2018,24(6): 1318~1323.
Gou Y, Xie T, Pu L, Wang GG. The degradation of Chitin

- and antagonism on *Phomopsis aspasagi* by *Bacillus amyloliquefaciens* MY001 [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2018, 24(6): 1318–1323.
- [5] He X, Miyasaka SC, Fitch MM, Moore PH, Zhu YJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) with a rice chitinase gene for improved tolerance to a fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(5): 903–909.
- [6] 罗晶晶, 张仁英, 齐晓花, 徐强, 陈学好. 黄瓜几丁质酶基因克隆及与白粉病抗性关系的初步研究 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(7): 1584–1591.
- Luo JJ, Zhang RY, Qi XH, Xu Q, Chen XH. A preliminary study on cloning of chitinase gene and relationships to resistance of powdery mildew in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(7): 1584–1591.
- [7] Samac DA, Shah DM. Developmental and pathogen-induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(10): 1063–1072.
- [8] Dong S, Tredway LP, Shew HD, Wang GL, Sivamani E, et al. Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases [J]. *Plant Sci*, 2007, 173(5): 501–509.
- [9] Broglie KE, Gaynor JJ, Broglie RM. Ethylene-regulated gene expression: Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(18): 6820–6824.
- [10] Park SM, Kim DH, Truong NH, Itoh Y. Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2002, 30(6): 697–702.
- [11] Rao DH, Gowda LR. Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (*Tamarindus indica*) seed serves as the major storage protein [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(6): 2175–2182.
- [12] Lin SY, Kwan HS. Effect of chitinase on resistance to fungal pathogens in sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, and cloning of class I and III chitinase genes [J]. *Biochem Genet*, 2012, 50(7–8): 600–615.
- [13] Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2005, 83(1): 83–96.
- [14] Liu ZH, Wang YC, Qi XT, Yang CP. Cloning and characterization of a chitinase gene *Lbchi31* from *Limonium bicolor* and identification of its biological activity [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(5): 2447–2453.
- [15] Ye XY, Ng TB. A chitinase with antifungal activity from the mung bean [J]. *Protein Expr Purif*, 2005, 40(2): 230–236.
- [16] Khan A, Nasir IA, Tabassum B, Aaliya K, Tariq M, et al. Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 128(3): 563–576.
- [17] Moradyar M, Motallci M, Zamani MR, Aghazadeh R. Pathogen-induced expression of chimeric chitinase gene containing synthetic promoter confers antifungal resistance in transgenic canola [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2016, 52(2): 119–129.
- [18] Rajesh T, Maruthaslam S, Kalpana K, Poovannan K, Kumar KK. Stability of sheath blight resistance in transgenic ASD16 rice lines expressing a rice *chi11* gene encoding chitinase [J]. *Biol Plantarum*, 2016, 60(4): 749–756.
- [19] Pirttil AM, Laukkonen H, Hohtola A. Chitinase production in pine callus (*Pinus sylvestris* L.): a defense reaction against endophytes? [J]. *Planta*, 2002, 214(6): 848–852.
- [20] Liu JJ, Chan D, Sturrock R, Sniezko RA. Genetic variation and population differentiation of the endochitinase gene family in *Pinus monticola* [J]. *Plant Syst Evol*, 2014, 300(6): 1313–1322.
- [21] Kozlowski G, Metraux JP. Infection of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings with *Pythium irregularare* Buisman and *Pythium ultimum* Trow: histological and biochemical responses [J]. *Eur J Plant Path*, 1998, 104(3): 225–234.
- [22] Asiegbu FO, Daniel G, Johansson M. Defense related reactions of seedling roots of Norway spruce to infection by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1994, 45(1): 1–19.
- [23] Johnk N, Hietala AM, Fossdal CG, Collinge DB, Newman MA. Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bincorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.) [J]. *Tree Physiol*, 2005, 25(12): 1533–1543.
- [24] 刘裕峰, 朱天辉, 刘应高, 李姝江, 龙旭梅, 等. 板栗咖啡酸氧甲基转移酶基因 *CmCOMT* 的克隆及原核表达 [J]. *西北植物学报*, 2017, 37(12): 2332–2341.
- Liu YF, Zhu TH, Liu YG, Li SJ, Long XM, et al. Cloning and prokaryotic expression of caffeic acid o-methyltransferase gene *CmCOMT* from *Castanea mollissima* Bl [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, 37(12): 2332–2341.
- [25] 朱晨, 张舒婷, 常笑君, 赵姗姗, 王仲, 等. 茶树几丁质酶基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析 [J]. *热带作物学报*, 2017, 30(5): 894–902.
- Zhu C, Zhang ST, Chang XJ, Zhao SS, Wang Z, et al. Cloning and its expression analysis of chitinase under drought stress in *Camellia sinensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 30(5): 894–902.
- [26] Yeoh KA, Othman A, Meon S, Abdullah F, Ho CL. *Se*
<http://www.plantscience.cn>

- quence analysis and gene expression of putative oil palm chitinase and chitinase-like proteins in response to colonization of *Ganoderma boninense* and *Trichoderma harzianum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 147–158.
- [27] Kang JN, Kang HJ, Sun HJ, Kwon YI, Yang DH, et al. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from zoysiagrass (*Zoysia Japonica* Steud.) [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2016, 10(3): 171–183.
- [28] Pulla RK, Lee OR, In JG, Parvin S, Kim YJ, et al. Identification and characterization of class I chitinase in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 95–102.
- [29] Takashima T, Ohnuma T, Fukamizo T. NMR assignments and ligand-binding studies on a two-domain family GH19 chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen [J]. *Biomol NMR Assign*, 2017, 11(1): 85–90.
- [30] Oelofse D, Gazendam I, Veale A, Tchatchou AD, Berger D. Functional characterization of a defense-related class-III chitinase promoter from *Lupinus albus*, active in legume and monocot tissues [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2016, 146(4): 923–936.
- [31] Kitaoku Y, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Taira T, et al. A class III chitinase without disulfide bonds from the fern, *Pteris ryukyuensis*: crystal structure and ligand-binding studies [J]. *Planta*, 2015, 242(4): 895–907.
- [32] Chandra S, Dutta AK, Chandrashekara NK, Acharya K. In silico characterization, homology modeling of *Camellia sinensis* chitinase and its evolutionary analyses with other plant chitinases [J]. *Proc Natl Acad Sci India B*, 2017, 87(3): 685–695.
- [33] Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, et al. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(3): 389–400.
- [34] Singh HR, Deka M, Das S. Enhanced resistance to blight in transgenic tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by overexpression of class I chitinase gene from potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(4): 461–480.
- [35] 程笑笑, 冯自力, 冯鸿杰, 赵丽红, 师勇强, 等. 真菌源几丁质酶在植物抗真菌病害中的应用 [J]. 植物保护, 2017, 43(3): 29–35.
- Chen XX, Feng ZL, Feng HJ, Zhao LH, Shi YQ, et al. Applications of fungal chitinase in the fungal disease-resistant plants [J]. *Plant Protection*, 2017, 43(3): 29–35.
- [36] Li DM, Staehelin C, Wang WT, Peng SL. Molecular cloning and characterization of a chitinase-homologous gene from *Mikania micrantha* infected by *Cuscuta campestris* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(1): 90–101.
- [37] Landim PGC, Correia TO, Silva FDA, Nepomuceno DR, Costa HPS, et al. Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action [J]. *Biochimie*, 2017, 135: 89–103.
- [38] Oneda H, Inouye K. Refolding and recovery of recombinant human matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from inclusion bodies expressed by *Escherichia coli* [J]. *J Biochem*, 1999, 126(5): 905–911.
- [39] Singh A, Kirubakaran SI, Sakthivel N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat [J]. *Protein Express Purif*, 2007, 56(1): 100–109.

(责任编辑:周媛)