

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae* HN1) 几丁质酶与谷胱甘肽S 转移酶 GST 在大肠杆菌中的高效融合表达

任文彬^{1,2}, 张世清, 黄俊生

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571101; 2. 仲恺农业工程学院, 广东广州 510225)

摘要 使用 RT-PCR 方法, 从高毒力金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* HN1 中, 克隆得到一个全长为 1 275 bp 的几丁质酶基因, 经 Blast 分析此基因序列与 *M. anisopliae* EB 的 *chi1* 基因 (AF02749) 同源率为 96%。将此基因克隆到 pGEX 6p-1 载体上, 使之与载体上一个约 26 kD 大小的谷胱甘肽S 转移酶 (GST) 相连, 构建 pGEX *chi* 融合表达载体, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL 21 中, 经 SDS-PAGE 结果分析显示: 表达出的融合蛋白大小为 68 kD, 此目的蛋白占表达总量的 64.5%。经破碎处理后可检测到几丁质酶活性。

关键词 金龟子绿僵菌; 几丁质酶基因; 融合蛋白; 大肠杆菌

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-07900-03

High efficient Fusion Expression of Chitinase and GST from *Metarhizium anisopliae* HN1 in *Escherichia coli*

REN Wenbin et al (Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571101)

Abstract Chitinase genes from *Metarhizium anisopliae* that is an important entomopathogenic fungus were considered one of the key factors to invade their hosts. Total RNA was extracted from *Metarhizium anisopliae* HN1 strain and chitinase gene was amplified by RT-PCR. The whole length of this gene was 1 275 bp, and the nucleotide sequence of the gene was 96% similarity to that of the *M. anisopliae* EB (AF02749). Then the gene was subcloned into prokaryotic expression vector pGEX 6p-1 and connected with GST. The clones were identified by enzyme digestion and sequenced. This expression plasmid was transformed into *E. coli* strain BL 21 and effective fusion was expressed. SDS PAGE analysis indicated that the recombinant fusion protein was 68 kD. The level of expression fusion protein was about 64.5% of total expressed proteins. The activity of chitinase could be detected after fragmentation treatment.

Key words *Metarhizium anisopliae*; Chitinase gene; Fusion protein; *E. coli*

自从 1879 年首次利用金龟子绿僵菌防治金龟幼虫以来^[1], 其后人们发现其对土壤中地下害虫防治效果较好, 且对人、畜、作物安全^[2]。据不完全统计, 约有 150 种昆虫用于小规模田间防治试验, 从防治规模看, 绿僵菌已发展成为仅次于白僵菌的真菌杀虫剂^[3]。绿僵菌作为一种寄主范围广、致病力强的昆虫病原真菌, 用于害虫微生物的防治具有广阔的前景。但至今, 绿僵菌对昆虫的入侵机理还不是十分的清楚, 基本的侵染方式是通过在昆虫体表形成附着胞等特殊结构, 同时分泌各种相应的酶类, 破坏害虫体表, 侵入昆虫体内^[4]。几丁质是真菌入侵昆虫的一种物理屏障, 故几丁质酶是入侵宿主的一个重要毒力因子^[5]。几丁质酶基因一般在侵染过程的后期表达, 它们与侵染过程中的其他酶类如蛋白酶等协同作用降解昆虫体壁^[6]。目前, 国内外对绿僵菌的入侵相关基因进行了较深的研究, 在金龟绿僵菌中克隆到的基因有 *Pr1A*、*Pr1B*、*Chy1*、*Chitinase*、*MeCPA*、*nrr1*、*Chit1*、*SgA*、*Prz*、*Pes* 和 *Grl*^[7]。除蛋白酶 (*pr*) 外^[8], 几丁质酶同样也被认为是入侵寄主的重要酶类之一^[9]。现在虽然已经知道绿僵菌在入侵寄主表皮时, 会产生几丁质酶等一些水解酶类, 但这些酶的具体作用机理仍有待更深入的研究。

为研究绿僵菌几丁质酶融合表达的情况, 笔者根据 NCBI 上已登录的绿僵菌几丁质酶基因序列合成引物, 利用 RT-PCR 方法, 从 *Metarhizium anisopliae* HN1 中克隆到绿僵菌几丁质酶基因 *chi*, 并将其克隆到融合表达载体 pGEX-6p-1 上, 使其在大肠杆菌 BL 21 中进行表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒。金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae* HN1) 由黄俊生实验室分离与保存, *E. coli* JM109 和表达宿主菌 *E. coli* BL21 及表达载体 pGEX-6p-1 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所实验室保存。

1.1.2 试剂与引物合成。Tizol 试剂购自长沙赢润生物技术有限公司; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、IPTG、蛋白质标准 Marker, 均购自 TaKaRa 公司; PCR 产物回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯, 购自海口曙光生物技术有限公司; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.3 培养基。马铃薯培养基 (PDA)、LB 培养基参考《分子克隆实验指南》配制^[10]。

1.2 方法

1.2.1 绿僵菌 RNA 的提取。用 Tizol 试剂提取菌株总 RNA, 以 Oligo d(T)₁₅ 为引物反转录获得 cDNA 作为 PCR 的模板。

1.2.2 引物的设计。根据 GenBank 中登录的绿僵菌几丁质酶 *chi* 基因序列, 设计合成了以下 2 对引物:

Chi-L: 5'-GTGGATCCATGCCGTCGTTAATTG-3', 下划线表示 BamH 酶切位点; **Chi-R:** 5'-CGGTCGACCTAAGCCATCTGCTTC-3', 下划线表示 SalI 酶切位点。

1.2.3 几丁质酶基因的克隆。PCR 扩增参数为: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s; 68 退火 30 s; 72 延伸 1 min; 循环 35 次; 72 延伸 10 min。回收目的片段, 将回收片段克隆到 pMD19-T Vector, 分别导入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 得到重组质粒 pMD*chi*。

PCR 产物酶切、电泳、连接、感受态制备、转化、小量质粒提取等具体步骤均见《分子克隆实验指南》^[10]。

基金项目 国家科技支撑计划 (2007BAD48B00)。

作者简介 任文彬 (1979-), 女, 湖南源江人, 博士, 讲师, 从事农业微生物研究。

收稿日期 2009-03-02

1.2.4 原核表达载体的构建。pMDchi 质粒和原核表达载体 pGEX-6p-1 经双酶切后,分别回收1 275 bp 大小的chi 基因片段和载体pGEX-6p-1 大约4 900 bp 的片段。在T₄ DNA 连接酶的作用下,将chi 基因片段亚克隆到原核表达载体中,导入 E. coli JM109,构建 chi 基因片段的原核表达载体 pGEX-chi。重组质粒经酶切分析正确后,寄往 TaKaRa 公司进行测序。

1.2.5 chi 在大肠杆菌中的表达。将构建好的重组质粒 pGEX-chi 转化 E. coli 宿主菌 BL21,挑取单克隆,接种到含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C,280 r/min 振荡培养至 OD 值为 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 °C,280 r/min 分别振荡培养 3 h 后,离心收集菌体,加入 100 μl 1 倍样品缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, pH 为 6.8,10% 甘油,2% SDS,5% 巯基乙醇,0.1% 溴酚蓝),超声破碎 20 s,100 °C 煮沸 5 min,冷却后准备上样。

1.2.6 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)。参考《分子克隆实验指南》^[10]。

1.2.7 酶活性鉴定。胶体几丁质(Colloidal chitin)的制备参考文献[11]。几丁质酶活性鉴定参照文献[12]的方法,分光光度计测定 OD_{540nm}。以 N 乙酰氨基葡萄糖(NAG)为产物对照。酶活力单位(U)定义:在上述条件下,每小时释放 0.5 μmol NAG(0.09 ng) 的量为 1 个酶活力单位(1 U = 0.5 μmol/h)。

1.2.8 蛋白质含量的测定。采用 Bradford 的方法^[13],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆与鉴定 以 PDA 液体培养基培养 4 d 后的绿僵菌为材料,提取 RNA,反转录获得 cDNA 为模板,PCR 扩增得到一条约 1 275 bp 大小的片段。将其连接到 pMD19-T Vector 上,分别转化克隆宿主菌 E. coli JM109,得到重组子 pMDchi,经双酶切鉴定,目的片段已插入到载体上。

2.2 表达载体的构建及鉴定 从 T vector 上切下目的片段与 pGEX-6p-1 双酶切后的片段相连接,获得重组表达载体质粒,再用双酶切进行鉴定,如图 1 所示,证明在原核表达载体 pGEX-6p-1 的基础上成功地构建了含目的基因 chi 的表达载体 pGEX-chi。

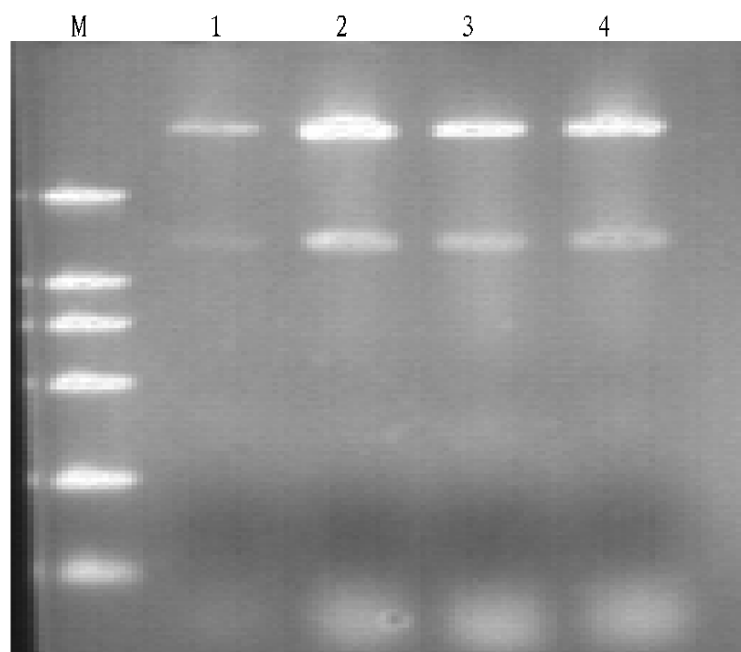
2.3 M. anisopliae HN1 几丁质酶基因的序列分析 将含有 pGEX-chi 质粒的重组子寄往大连宝生物工程有限公司测序,测序结果显示有一个 1 275 bp 大小的开放阅读框,编码 423 个氨基酸,基因登录号为 DQ11865;与 GenBank 中已知的 chi1 基因序列相比较,同源性极高,在 NCBI 中进行 BLAST 分析,此基因序列与 M. anisopliae EB 的 chi1 基因(AF02749)同源率达 96%,与 M. anisopliae 324 菌株中的 chi1 基因(AJ243014)同源率达 95%。

2.4 chi 在大肠杆菌中的融合表达 如方法“1.2.5”所述,经 IPTG(1 mmol/L) 诱导 4 h 后,收集菌体,裂解后,经 SDS-PAGE 分析,在约 68 kD 处有一明显的蛋白表达带(图 2)。在 E. coli JM109 和 E. coli BL21 中均能表达此融合蛋白。

chi 基因编码的蛋白大小约为 42 kD,笔者曾将此基因克隆到 pEF22b(+) 中,研究了其单独的表达情况,证实在 42

kD 处得到了大量表达的目的带。而载体 pGEX-6p-1 中的 GST 大小为 26 kD,故理论上,目的蛋白与 GST 融合表达的大小应为 68 kD 这与实验表达出的大小相符。

利用 Fluor chem 5500 高分辨数字图象分析系统,分析在 E. coli BL21 宿主菌中表达的目的蛋白的含量,发现在 6 h 内,随着诱导时间的延长,融合蛋白的表达量呈增加趋势,但是其他杂带量也逐渐增加,影响目标蛋白的表达量;到 4.5 h 时,表达的目的蛋白达到最高水平,占总表达量的 64.5%(图 3),说明融合蛋白得到了高效的表达。

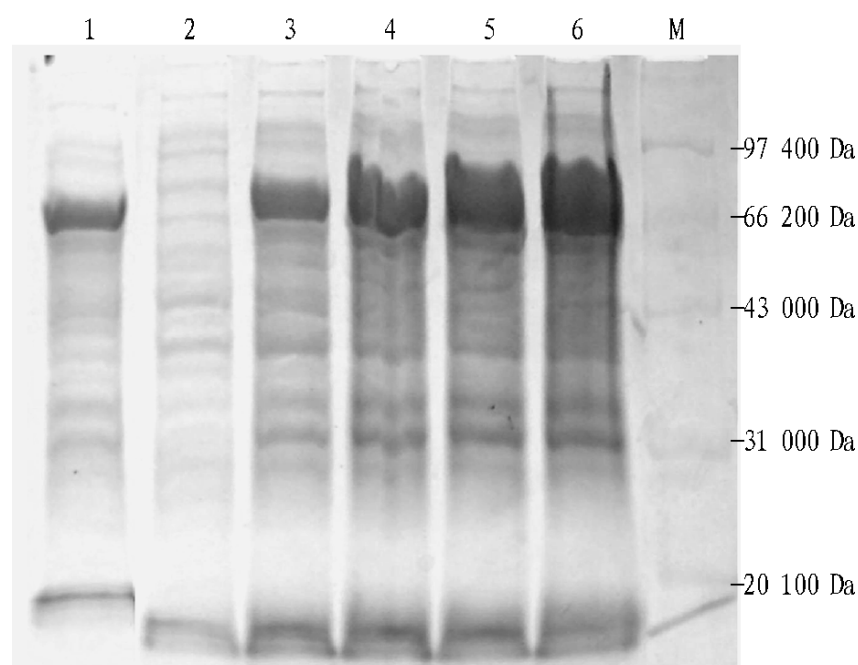


注:M,15 000 bp DNA 标准对照;1~4. BamHI/SalI 双酶切重组质粒。

Note: M,15 000 bp DNA standard control;1-4, The recombinant plasmid digested by BamHI and SalI.

图1 阳性重组表达质粒pGEX-chi 的双酶切鉴定

Fig.1 The identification of positive recombinant expression plasmid pGEX-chi by double enzyme digestion



注:M,蛋白 Marker;1.在 E. coli JM109 中 3.0 h 后的诱导表达;2.在 E. coli BL21 中未诱导的对照;3~6.分别为在 E. coli BL21 中 1.5、3.0、4.5、6.0 h 诱导表达的样品。

Note: M, Protein Marker; 1, Induced expression in E. coli JM109 after 3.0 h; 2, The non-induced control in E. coli BL21; 3-6, The samples in E. coli BL21 after the induced expression for 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 h resp.

图2 诱导表达的重组蛋白 12% SDS PAGE 考马斯亮蓝染色分析
Fig.2 12% SDS PAGE analysis of the recombinant protein by inducti on expression with coomassie brilliant blue staining

2.5 酶比活力的分析 在 500 ml 培养基中,对阳性重组转

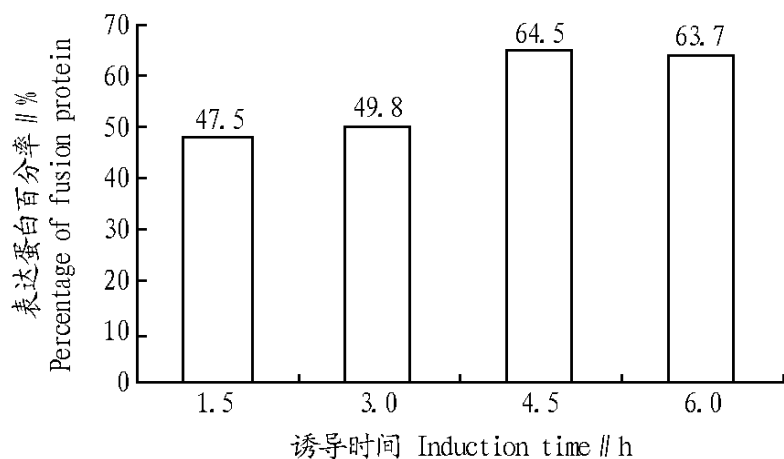


图3 融合蛋白表达量占总表达量百分比分析

Fig 3 The percentage analysis of the expression amount of fusion protein in total expression amount

化子诱导培养4.0 h, 收集菌体进行冷冻与超声波破碎处理后, 按方法“1.2.7”所述, 测得总酶活为2 820 U, 总蛋白含量为133.15 ng, 故酶比活为21.18 U ng; 而对含空载体的转化子进行同样的处理, 没有测得酶活性。

3 讨论

大肠杆菌表达系统是一种操作方便、遗传背景清楚且能大量培养的优良表达系统。在进行外源蛋白表达时, 表达量是最需解决的问题之一。影响表达量的因素很多, 就宿主和载体本身而言, 存在着调控元件的影响, 如启动子、SD 及 RBS 序列, 载体在宿主中的复制能力, 以及外源蛋白在宿主菌中的稳定性等^[14]。很多研究发现, 采用 P_L、T7 等强启动子, 重组蛋白虽可获得高效转录, 但往往易聚集在胞内或结合在内膜内侧形成包涵体, 而采用中等强度的启动子如 lac_{tac} 等则可以减少包涵体的形成^[15]。

以融合表达的方式表达重组蛋白, 不仅可以获得外源基因的高效表达, 减少蛋白酶的降解, 还可以根据融合蛋白的特性选择简单特异的纯化方法。pGEX 载体是一种较好的融合蛋白表达载体, 它使用 tac 启动子, 而且含 GST 融合蛋白, 表达出的融合蛋白大部分可溶。GST 与目的蛋白之间易于分离, 因为在它们之间含有凝血酶(或 Xa 因子)的识别位点, 可以用识别特异性位点的蛋白酶如凝血酶切除 GST。而且 GST 和未被凝血酶作用的融合蛋白仍可用谷胱甘肽吸附去除, 这样就可得到高纯度的目的蛋白^[14]。

该实验将绿僵菌几丁质酶基因克隆到 pGEX-6p-1 载体上与 GST 一起融合表达, 由于受到质粒 pGEX 中 lac 阻遏物调控, 不同的宿主菌对融合蛋白的表达量影响不大。构建好的表达载体转化 JM109 受体菌, 其阳性重组菌株在 IPTG 的诱导下即能产生大量的融合蛋白; 在 E. coli BL21 的表达宿

主菌中经诱导也能大量地表达几丁质酶与 GST 组成的融合蛋白。

研究还表明不同的诱导时间对融合蛋白的表达量有一定的影响。在前 6 h 内, 随着诱导时间的增加, 表达量也呈上升趋势, 但到 4 h 后表达量虽有增长, 但其他非目的蛋白即本底表达的蛋白量也开始增加, 这可能是由于培养时间长后菌体浓度过高, 代谢产物增加, 抑制了目的蛋白的表达, 使其表达速度降低, 因此, 选择 4 h 为其合适的表达高峰期, 表达的目的蛋白量可达最高水平, 占总表达量的 64.5%。

该实验还发现表达的细胞经破碎后, 融合蛋白部分可溶于缓冲液。经酶活测定, 可测得几丁质酶比活力为 21.18 U ng。故该实验成功地利用 pGEX-6p-1 为载体, 在大肠杆菌中高效融合表达了绿僵菌几丁质酶, 为以后对绿僵菌几丁质酶性质与作用的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 王清海, 万平平, 黄玉杰, 等. 虫生真菌在害虫生物防治中的应用研究[J]. 山东科学, 2005, 18(4): 37-41.
- [2] 裴晖, 吴振强, 梁世中. 金龟子绿僵菌及其杀虫机理[J]. 农药, 2004, 43(8): 342-345.
- [3] 黄勃, 樊美珍, 李增智. 绿僵菌属系统分类的研究进展 综述[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 169-172.
- [4] 王海川, 尤民生. 绿僵菌对昆虫的入侵机理[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 71-72.
- [5] CHARNLEY A K, ST LEGER R J. Fungal spore disease initiation in plants and animals[M]. New York: Plenum Press, 1991: 267-287.
- [6] 裴炎, 方卫国, 张永军. 昆虫病原真菌致病寄主的机制和基因工程改良[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 221-226.
- [7] JOH L, ST LEGER R J, ROBERTS D W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (H1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display RT-PCR[J]. Gene, 1997, 197: 1-8.
- [8] ST LEGER R J, STAPLES R C, ROBERTS D W. Cloning and regulatory analysis of starvation stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*[J]. Gene, 1992, 120(1): 119-124.
- [9] MARCIA VANUSA DA SILVA, LUCILIA SANI, CHARLEY CHRISTIAN STAAIS, et al. Guide-induced endo/exocytic chitinase CHT30 from *Metarhizium anisopliae* encoded by an ortholog of the *chi3* gene[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(3): 382-392.
- [10] JOSEPH SAMBROOK, RUSSELL D W. Molecular cloning[M]: A Laboratory Manual 3rd. Science Publishing Company, 2002.
- [11] SUN CHUL KANG, SANGGYU PARK, DONG GYU LEE. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 73(3): 276-281.
- [12] 李力, 黄胜元, 关雄. 产几丁质酶的苏云金杆菌菌株筛选及酶合成条件的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15(1): 94-97.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 周宇荀, 魏东芝, 王二力. 融合蛋白表达载体 pGEX 及其应用[J]. 生命科学, 1998, 10(3): 122-124.
- [15] 谢磊, 孙建波, 张世清. 大肠杆菌表达系统及其研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2004, 10(2): 16-20.
- [16] 管生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(4): 123-134.
- [17] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定[J]. 种子, 1992(6): 33-36.
- [18] 李秀菊, 朱坤华, 张永军, 等. 营养元素与植物生长调节剂对油菜花粉萌发的影响[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(1): 24-26.
- [19] 段黄金, 何天明, 张娟. 硼处理对香梨花粉萌发的效应[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(4): 177-178.
- [20] LI X J, LI X, SHU H R. Influences of boron, urea and plant growth of apple pollen[J]. Plant Physiology Communication, 1998, 34(2): 96-100.
- [21] GONG M, YANG Z H, CAO Z X. Involvement of calcium nodulin in pollen germination and pollen tube growth[J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1994, 20(3): 240-248.
- [22] VOYATZIS D G, PARASKEVOPOULOU PARCOSSI G. Factor affecting the quality in vitro germination capacity of strawberry pollen[J]. Acta Horticulturae, 2000, 77(2): 200-203.
- [23] 薛晓敏, 王金政, 张安宁, 等. 植物生长调节物质对桃花粉萌发和花粉

(上接第7883页)