

羊草几丁质酶 Class II 基因的克隆、生物信息学分析及原核表达

李蕊沁¹, 冯树丹¹, 于莹², 吕召志¹, 黎莉¹,
徐明华¹, 尹悦佳³, 郝东云³

(1. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150080; 2. 吉林大学, 长春 130023; 3. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要:根据已报道的羊草几丁质酶基因的 EST 序列,利用 RACE 技术,从 100 mmol/L Na₂CO₃ 胁迫的羊草叶片中克隆得到羊草几丁质酶基因 cDNA 序列全长(GenBank 登录号为 GQ397277),命名为 *LcChi2* 基因。经序列测定和生物信息学分析,结果表明该序列开放阅读框为 771 bp,编码 256 个氨基酸,为 II 类几丁质酶,属于 19 家族,分子量约为 27.4 kDa,预测等电点为 8.67,与小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、黑麦(*Secale cereale*)和水稻(*Oryza sativa*)等植物的几丁质酶具有高度的同源性,序列相似性分别为 96.5%、96.5%、95.2% 和 80.5%,推测 *LcChi2* 蛋白与其他几丁质酶执行相似的功能。在大肠杆菌中进行了原核表达,为后期植物转化的验证准备多克隆抗体。本研究所获得的信息为今后对羊草几丁质酶基因功能的进一步研究奠定了基础。

关键词:羊草;几丁质酶;RACE 技术;生物信息学;原核表达

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.02.19

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2010)02-0103-08

Cloning, Bioinformatics Analysis and Prokaryotic Expression of Chitinase Class II Gene in *Leymus chinensis*

LI Rui-qin¹, FENG Shu-dan¹, YU Ying², LV Zhao-zhi¹, LI Li¹,
XU Ming-hua¹, YIN Yue-jia³, HAO Dong-yun³

(1. Harbin Normal University, Harbin 150080; 2. Jilin University, Changchun 130023;

3. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract:Based on the reported EST from *Leymus chinensis*, the chitinase Class II gene (GenBank accession number GQ397277) from leaves of *Leymus chinensis* under 100 mmol/L Na₂CO₃ stress, named *LcChi2* gene, was cloned by RACE. The sequencing and bioinformatic analysis revealed that the opening reading-frame (ORF) of this gene was 771 bp and encoding 256 amino acid. *LcChi2* protein belonged to chitinase Class II, Family 19. The molecular weight of the protein was 27.4 kDa and the isoelectric point was 8.67. *LcChi2* protein was highly identified with chitinase in *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* and *Oryza sativa*, sharing 96.5%、96.5%、95.2% and 80.5% homology, respectively, indicating that they had similar biological functions. The gene was expressed in *E. coli* for preparation of its polyclonal antibody used for detection of transgenic plant. The data predicted by bioinformatics are helpful for further analysis of *LcChi2*.

Key words:*Leymus chinensis*; chitinase; RACE; bioinformatics; prokaryotic expression

几丁质广泛存在于昆虫围食膜及外骨骼、甲壳类外壳以及真菌细胞壁中,高等植物本身不含几丁质。植物几丁质酶(chitinase, CHI, EC3.2.

1.14) 是一种酸性或碱性蛋白,分子量 26~43 kDa,通过水解病原微生物细胞壁几丁质中 β -1,4 糖苷键产生 N-乙酰氨基葡萄糖寡聚体或单体而

收稿日期:2009-12-02;修回日期:2010-03-10

基金项目:吉林省省长基因项目(20076016);吉林省科技厅创新工程项目(20086029)资助。

作者简介:李蕊沁,硕士研究生,主要从事耐盐基因功能验证的研究。E-mail:ruiqinli6616@163.com。通讯作者:冯树丹,副教授,研究方向为应用生化工程。E-mail:fsd6616@sohu.com;郝东云,教授,研究方向为植物功能基因组学。E-mail:dyhao@cjaas.com

起到抑菌作用^[1]。当植物受到真菌、细菌和病毒感染时,几丁质酶活性迅速提高^[2],重金属、高盐、干旱、臭氧、机械损伤、植物激素等都能诱导植物几丁质酶的表达来抵抗逆境^[3]。转基因实验表明,组成型表达 CHI 可增强植物对体外侵染真菌^[4]和细菌^[5]的抗性,从而说明 CHI 积极参与植物防御病原微生物的过程,并能赋予植物一定的抗病性。根据几丁质酶氨基酸序列的结构特征,Meins 等^[6]将植物 CHI 分为 Class I ~ Class V,且不同种类的 CHI 具有不同的催化活性、物理特征、细胞定位和作用方式。

土壤盐渍化是当今世界普遍关注的问题之一,严重影响农业生产和生态环境。羊草(*Leymus chinensis* Trin),别名碱草,为禾本科赖草属多年生草本植物,主要分布在我国北方温带草原。羊草具有繁殖力强、生产力高、耐干旱和耐盐碱等生物学特性,是克隆耐盐及其他与逆境胁迫相关基因的好材料,同时可作为研究植物耐盐机制的模式植物。而几丁质酶被认为与植物对病原真菌和逆境胁迫的抗性有关,因此研究羊草几丁质酶基因的结构与功能有着重要的现实意义。

本文根据已报道的羊草几丁质酶基因 EST 序列(GenBank 登录号为 CD808914)^[7],采用 3'-RACE 技术^[8],克隆得到羊草几丁质酶基因 cDNA 序列的全长,对其进行了测序和生物信息学分析,并在大肠杆菌中进行了原核表达。有关羊草中此类基因全长的克隆工作目前尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料与处理 羊草(*Leymus chinensis*)种子由黑龙江省农业科学院草业研究所提供。待羊草幼苗长至三叶期,用 100 mmol/L Na₂CO₃胁迫处理 24 h。

1.1.2 分子生物学及生化试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3) pLysS 菌种和表达载体 pET32a 由吉林省农业科学院生物技术研究中心实验室保存。总 RNA 提取试剂盒、DNA marker、Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶和各种限制性内切酶购自大连宝生物公司;反转录试剂盒购自 Promega 公司;SmartTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;DNA 片段回

收试剂盒、EDTA、RNase A、DEPC、MOPS、IPTG、X-Gal、SDS 和 Tris 购自上海生工生物工程有限公司;其他药品均为进口或国产分析纯级。引物合成及测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 羊草叶片 RNA 的提取 依照总 RNA 提取试剂盒的方法提取总 RNA。

1.2.2 3'-RACE 按照 SmartTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书操作步骤进行。根据报道的羊草几丁质酶基因 EST 序列信息^[7],在 NCBI 进行 BLAST 分析,发现只需要做 3'-RACE,即可获得该基因 cDNA 序列全长。先利用试剂盒中所提供的引物(SMART IITM A 寡聚核苷酸)合成 3'-RACE-Ready cDNA,利用 Primer 5.0 软件设计 2 条特异性上游引物 GSP1: 5'-CCGCCGCCAACACCTTCC-3'; GSP2: 5'-CCGACCAGTTCCAATGGG-GCT-3';下游引物为 SMART IITM A 寡聚核苷酸。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过 2 次 PCR 获得 3'-RACE 扩增产物,通过琼脂糖凝胶电泳分离此 PCR 产物,切下条带提取纯化后,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转入大肠杆菌 DH5 α ,经过氨苄青霉素抗性和蓝白斑筛选,挑取白斑划线,经菌落 PCR 筛选确认后,挑选 5 个克隆菌体繁殖,然后提取质粒 DNA,提交上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.2.3 cDNA 全长的获得 根据 3'-RACE 结果进行电子序列拼接,设计 RT-PCR 巢式引物, S1: 5'-GCTGAAGGTGAGTTGGCATGGC-3'; S2: 5'-GAGTTGGCATGGCGAGGTTTG-3'; A1: 5'-GCCGTGGGACCTGCATACTTC-3'; A2: 5'-CGTAACGCCTGTGTACTACTGTG-3'。反转录合成 cDNA,第 1 轮 PCR 使用的引物对为 S1/A2,第 2 轮 PCR 使用的引物对为 S2/A1。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳分离此 RT-PCR 产物,目的条带经胶回收纯化后,连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.2.4 *LcChi2* 基因序列的分析及氨基酸序列的生成 核酸组成成分分析、理化性质分析和氨基酸序列的生成采用 DNASTar 6.13 和 DNAMAN5.0

软件;开放阅读框(open reading frame, ORF)的查找使用 NCBI 中的 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行在线分析。

1.2.5 LcChi2 蛋白的生物信息学分析 依据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ebi.ac.uk/>, <http://www.cbs.dtu.dk/>, <http://cn.Ex-pasy.org/> 等网站提供的各类生物信息学软件进行在线分析。核苷酸和氨基酸序列的同源性比对用 BLAST 在线工具和 DNAMAN5.0 软件完成;蛋白质二级结构、信号肽、跨膜结构域和亲水性/疏水性的分析用 SOPMA、SignalP 3.0 Server、SOSUI、ProtScale 完成;蛋白质的保守结构域、翻译后修饰位点、三级结构和亚细胞定位预测用 InterProScan、MotifScan、SWISS-MODEL、PSORT II 完成。

1.2.6 LcChi2 基因在 *E. coli* 中的表达 ①原核表达载体的构建。为了制备多克隆抗体,将该基因在大肠杆菌中进行表达。以 pMD18-T-chi 为模板进行 PCR 扩增,所用引物为 PC1: 5'-CCG-GAATTCATGGCGAGTTTGTCTGCCCTCG-3' 和 PC2: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAGCTAGCGAAGTTTCGCTGGGTG-3'。下划线处表示引入引物 5' 端的 *EcoR* I 和 *Not* I 位点。将 PCR 产物克隆到 pET32a 的 *EcoR* I 和 *Not* I 位点处,经菌落 PCR、酶切鉴定和测序分析确定片段以正确的读码框插入到载体的下游,命名为 pET32a-chi。

②外源基因的诱导表达。从 LB 培养板上挑取含有重组质粒的转化菌及空质粒转化菌各 1 个,分别接种到 5 mL LB 培养液(含 50 mg/L 氨苄青霉素,34 mg/L 氯霉素)中,37℃ 过夜培养。按 0.1% (V/V) 接种于新鲜的 LB 培养液(含 50 mg/L 氨苄青霉素,34 mg/L 氯霉素),继续振荡培养至 $A_{600nm} = 0.5 \sim 0.6$ 时,加入 IPTG 使其终浓度达到 1 mmol/L。37℃ 诱导培养 3 h,离心收集菌体,弃上清。PBS 洗涤并重悬菌体,超声破碎,离心后分别收集上清和沉淀,分别加入 SDS 电泳上样缓冲液。100℃ 水浴 5 min,沉淀离心后上样,进行 15% (W/V) SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果与分析

2.1 LcChi2 基因 3'-RACE 片段和具完整编码区 cDNA 的获得

根据羊草几丁质酶基因 EST 序列设计引物,从羊草叶片中提取总 RNA 并反转录,采用 3'-

RACE 的方法扩增 *LcChi2* 的 3' 端。对 3'-RACE 的巢式 PCR 的产物进行电泳检测,结果表明:第一轮 PCR 后,得到的是弥散的条带(图略),进而进行了第二轮 PCR 反应,扩增出 1 条约 720 bp 的 DNA 片段(图 1-A),测序后比对证实为 *LcChi2* 的 3' 端完整序列。

根据 3'-RACE 产物测序结果,进行电子拼接,并设计 RT-PCR 巢式引物。经巢式(Nested) PCR 扩增得到 1 条约 770 bp 的 DNA 片段(图 1-B),与所推测的片段大小一致,测序后经比对,证实为具完整 ORF 的 *LcChi2* 序列。将该 cDNA 片段在 GenBank 中进行了登记,命名为 *LcChi2* (登录号: GQ397277)。

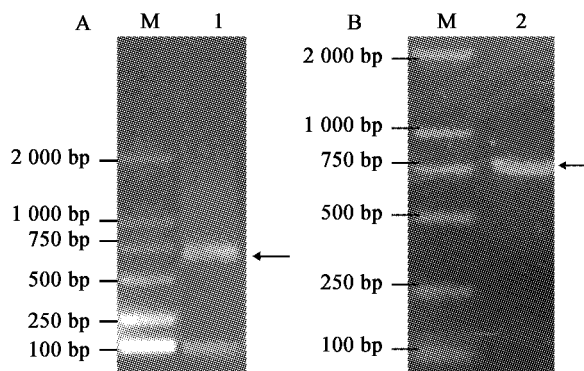


图 1 *LcChi2* 基因全长 cDNA 的获得

Fig. 1 Cloning of full-length *LcChi2* gene cDNA.

A. 3'-RACE; B. RT-PCR.

M: DL2000 分子量对照; 1: 3'-RACE 扩增产物; 2: *LcChi2* RT-PCR 扩增产物

M: DL2000 marker; 1: 3'-RACE product; 2: RT-PCR product of *LcChi2*.

2.2 LcChi2 基因的核苷酸序列及编码的氨基酸序列分析

LcChi2 基因全长 cDNA 1 048 bp, 5'-非翻译区 85 bp, 3'-非翻译区 192 bp, 开放阅读框为 771 bp (包括终止密码子), 编码 256 个氨基酸。用 DNASTar 6.13 软件分析核酸序列可知: *LcChi2* 基因编码序列中含 262 个 C (33.98%); 241 个 G (31.26%); 147 个 A (19.07%); 121 个 T (15.69%); 其中 (G + C) % 为 65.24%, 熔点为 91℃。

2.3 LcChi2 蛋白的理化性质

用 ProtParam 软件分析 *LcChi2* 蛋白序列可知: 蛋白质分子式为 $C_{1204} H_{1846} N_{342} O_{362} S_{14}$, 共有 3 768 个原子, 分子量为 27.4 kDa, 理论等电点 pI 为 8.67, pH 7.0 时的电荷为 4.03; 碱性氨基酸

(K,R)22 个;酸性氨基酸(D,E)18 个;疏水氨基酸(A,I,F,W,V)91 个;极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y)76 个。理论推导其半衰期分别为:在体外及哺乳动物的网织红细胞内 30 h;酵母细胞内体内大于 20 h;大肠杆菌体内大于 10 h。氨基酸组成中丙氨酸最多(14.1%),组氨酸最少(0.8%),其他氨基酸组成分别为:甘氨酸占 11.7%,苏氨酸占 8.6%,精氨酸占 6.6%,天冬酰胺和亮氨酸均占 5.9%,缬氨酸占 5.5%,酪氨酸占 5.1%,丝氨酸、天冬氨酸和苯丙氨酸均占 4.7%,异亮氨酸和脯氨酸均占 3.9%,半胱氨酸、谷氨酰胺和蛋氨酸均占 2.7%,谷氨酸占 2.3%,赖氨酸占 2.0%,色氨酸占 1.6%。含量较多的丙氨酸、苏氨酸和甘氨酸及其衍生物属于有机渗透调节物质,在一定程度上与抗渗透胁迫相关。其中含有 18 个带

负电荷的氨基酸残基,22 个带正电荷的氨基酸残基,因此,在进行蛋白质纯化时,需选择弱阳离子介质进行离子交换色谱。氨基酸组成与微生物绿色木霉^[9]和几种鳞翅目昆虫^[10]中的几丁质酶十分相似,说明几丁质酶基因在不同物种间的进化上存在保守性。不稳定指数(instability index)为 32.08,属于稳定型蛋白质。脂肪指数(aliphatic index)为 68.01。

2.4 LcChi2 蛋白的保守结构域

利用 ExPasy 中的 InterProScan 对氨基酸序列保守结构域进行预测,结果见图 2。

该氨基酸序列有 4 个保守结构域,分别为几丁质酶催化结构域、糖苷水解酶 19 家族保守区以及几丁质酶 19 家族的两个保守结构域。

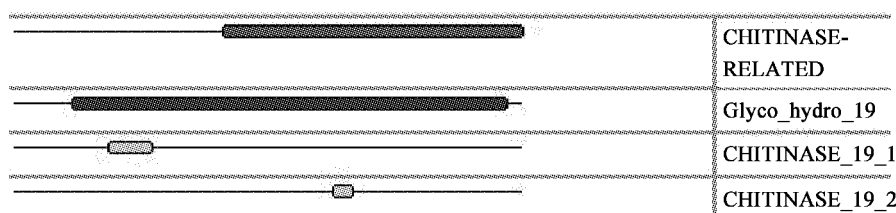


图 2 LcChi2 蛋白的保守区域预测

Fig. 2 Conserved domains of LcChi2 protein.

利用 InterProScan 对氨基酸序列保守结构域进一步预测,发现 Cys49-Gly71 区段具有 CHI 家族 19_1 标签(chitinases family 19_1 signature, PS00773)“C-X(4,5)-F-Y-[ST]-X(3)-[FY]-LIVMF]-X-A-X(3)-[YF]-X(2)-F-[GSA]”序列特征,Val161-Met171 区段与 CHI 家族 19_2 标签(PS00774)“[LIVM]-[GSA]-F-X-[STAG](2)-[LIVMFY]-W-[FY]-W-[LIVM]”序列基本一致,推测其属于 19 家族。

19 家族几丁质酶(Class I, Class III, Class IV)存在于植物和细菌中^[9]。Class I 和 Class II 几丁质酶的催化结构域很相似。Class I 几丁质酶 N 端为富含半胱氨酸的几丁质结合区,C 端是高度保守的催化功能区,中间由富含脯氨酸和甘氨酸的铰链区连接而成。II 类酶与 I 类酶相比缺少 N 端富半胱氨酸区和铰链区。IV 类与 I 类相似,但由于催化序列有 4 处缺失,所以功能区较短^[11]。LcChi2 不具备 N 端富含半胱氨酸区和铰链区这两个保守区域,推测其为 II 类酶。

2.5 LcChi2 蛋白的修饰位点分析

利用 MotifScan 搜索 LcChi2 蛋白的 Motif,结果显示 LcChi2 蛋白含有多个潜在的翻译后修饰位点,包括:8 个 N-豆蔻酰化位点(21~26 位,71~76 位,96~101 位,175~180 位,204~209 位,212~217 位,236~241 位,244~249 位);3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(132~134 位,162~164 位,250~252 位);5 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点(35~38 位,75~78 位,90~93 位,135~138 位,191~194 位);1 个丙氨酸富集区(2~29 位);1 个 cAMP-和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(186~189 位)。众多的磷酸化位点说明 LcChi2 蛋白参与多种信号转导过程。在信号传导过程中,可以通过蛋白激酶和蛋白质磷酸酶使蛋白磷酸化或去磷酸化,进而调节相关基因的表达。多个豆蔻酰化位点表明豆蔻酰化在蛋白质功能中起重要作用。豆蔻酰化残基可能结合到疏水核心,从而起到稳定蛋白质结构的作用。豆蔻酰化在膜的结合中也有重要作用,它经常存在并穿梭于膜

之间的蛋白质中,豆蔻酰化残基插入质膜内脂层使膜容易相互作用^[12]。

2.6 LcChi2 蛋白的信号肽、亲水/疏水区及跨膜结构域预测

采用在线蛋白质序列信号肽分析工具 SignalP3.0 Server 对 LcChi2 蛋白质信号肽进行分析。利用神经网络模型(NN)和隐马尔可夫模型(HMM)得出结果一致,LcChi2 蛋白 N 端具有一段信号肽,其可能的切割位点位于第 25 位与第 26 位氨基酸之间。因此可以认为 LcChi2 蛋白是一种分泌蛋白。

用 ProtScale 预测 LcChi2 蛋白氨基酸序列的亲水性/疏水性的结果见图 3。多肽链第 178 位的脯氨酸(Pro)具有最低的分值(-1.978),第 16 位的亮氨酸(Leu)具有最高的分值(3.267)。依据氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强的规律,可以看出,在第 178 位的 Pro 亲水性最强,第 16 位的 Leu 疏水性最强,在整个肽链中,亲水性氨基酸均匀分布,且多于疏水性氨基酸。因此,整个多肽链表现为亲水性,只在前 25 个氨基酸表现明显的疏水性,预测为信号肽。可认为 LcChi2 蛋白是亲水性蛋白。

运用 SOSUI 来预测分析 LcChi2 蛋白的跨膜区域,结果显示 LcChi2 蛋白质是一个具有 1 个跨膜螺旋的膜蛋白,根据亚细胞定位预测结果,N 端 8 个氨基酸在膜内,长的 C 端在膜外,其跨膜区域位于 9~31 位肽段,长度为 23 个氨基酸(图 4)。

2.7 LcChi2 蛋白的二级结构、三级结构和亚细胞定位预测

通过 SOPMA 预测 LcChi2 蛋白的二级结构表明该蛋白质含约 34.8%的 α -螺旋、5.86%的 β -折叠、48.05%的不规则卷曲和 11.72%的延伸链。根据 Burkhard^[13]的理论,LcChi2 蛋白为混合型蛋白质。

利用 SWISS-MODEL 预测 LcChi2 蛋白的三级结构,得到一个蛋白质结构数据 3cqlA,如图 5。预测结果表明该蛋白质为一个结构较为松散的球状蛋白,含有 7 段 α -螺旋,5 段 β -折叠。采用同源建模方法^[14],该蛋白质与数据库中提供的模板同源率为 60.91%,可认为该结果可靠。

PSORT 程序分析表明,LcChi2 蛋白的亚细胞定位可能性为:77.8%于细胞外,包括细胞壁;

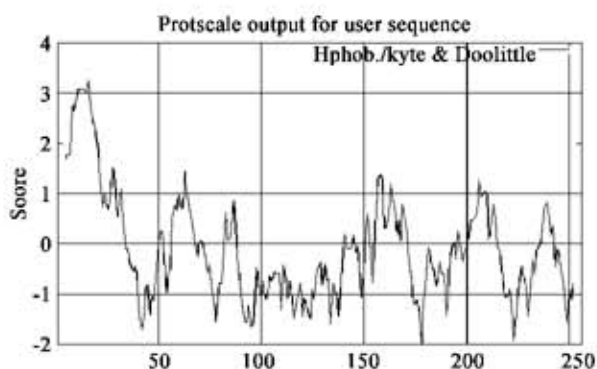


图 3 LcChi2 蛋白疏水性/亲水性的预测

Fig. 3 Prediction of hydrophobicity/hydrophilic for LcChi2.

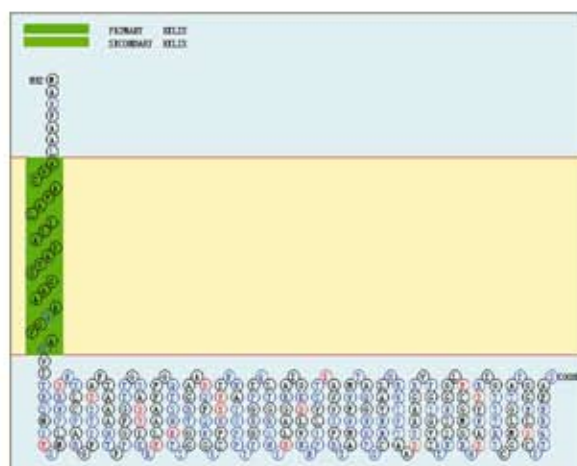


图 4 LcChi2 蛋白的跨膜区域预测

Fig. 4 Prediction of the transmembrane region of LcChi2 protein.



图 5 LcChi2 蛋白的三维结构预测

Fig. 5 The predicted three-dimensional model of LcChi2 protein.

11.1%于液泡;11.1%于内质网。蛋白质定位于细胞外也就是细胞间隙中的可能性较大。多数真菌侵染植株始于细胞间隙,然后穿入细胞,一些真菌如尾孢菌属(*Cercospora*)几乎仅在细胞间隙生长。推测 II 类几丁质酶 LcChi2 蛋白可在胞间水

解侵染菌丝,产生几丁质寡聚体,几丁质寡聚体在植物防卫反应中可充当信号分子,诱导周围的细胞对病原菌作出反应,使胞内几丁质酶含量升高^[15]。

2.8 LcChi2 蛋白质的同源性比较分析及系统进化树的构建

利用 BLASTP 程序对 LcChi2 蛋白的氨基酸序列进行同源比对,结果表明 LcChi2 的氨基酸序

列与其他植物几丁质酶氨基酸序列具有广泛的同源性。

利用在线 ClustalW 软件绘制系统进化树,如图 6。结果表明,LcChi2 蛋白与小麦、大麦、黑麦和水稻等来源几丁质酶有很近的进化关系,序列相似性分别为 96.5%、96.5%、95.2% 和 80.5%,但与云杉、二色补血草、橡胶树和玉米来源的几丁质酶的氨基酸序列相似性相对较低。

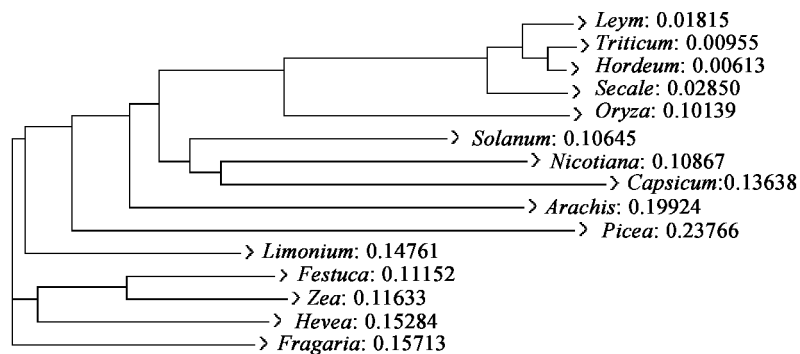


图 6 LcChi2 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Analysis of phylogenetic tree of LcChi2 protein.

羊草 *Leymus chinensis* LcChi2(GQ397277);小麦 *Triticum aestivum* TaCHI1(AB029934);大麦 *Hordeum vulgare* HvCh2a(X78671);黑麦 *Secale cereale* ScCHI2(AF280438);水稻 *Oryza sativa* OsReht2(AB016497);番茄 *Solanum lycopersicum* SlChi17(Q05540);烟草 *Nicotiana tabacum* NtCHI(X51425);高羊茅 *Festuca arundinacea* FaChi1(EU837265);辣椒 *Capsicum annuum* CaChi2(AF091235);云杉 *Picea abies* PaChi2(AY544781);二色补血草 *Limonium bicolor* LbChi1(DQ431248);橡胶树 *Hevea brasiliensis* LaCIC(AJ431363);花生 *Arachis hypogaea* AhChi2(X82330);草莓 *Fragaria x ananassa* FaChi2-2(AF420225);玉米 *Zea mays*ZmChiI(EU724453)。

2.9 LcChi2 基因原核表达的结果

2.9.1 原核表达质粒 pET32a-chi 的构建和鉴定

将 *LcChi2* 基因片段定向克隆到原核表达载体 pET32a 中,构建原核表达质粒,进行 PCR 鉴定(图 7)和 *EcoR* I/*Not* I 双酶切鉴定(图 8)。PCR 获得一条 750 bp 左右特异性条带;双酶切可得到 1 条约 750bp 的条带和 1 条 pET32a 空载体条带(5.9 Kb),均与预计相同,表明几丁质酶基因已正确插入原核表达质粒中。测序及序列比对结果也确定原核表达载体构建成功。

2.9.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达 将含有重组质粒的转化菌及空质粒转化菌用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37℃ 诱导培养 3 h 后,取重组质粒转化菌诱导前后和空质粒转化菌诱导后的裂解液上清和沉淀进行 15% SDS-PAGE 检测。检测结果证实,含有重组质粒宿主菌诱导后的裂解液沉淀在 41 kDa 处有一条深染的蛋白质表达条带(图 9,箭头表示),为目的基因和部分载体片段的表达产物,而空质粒转化菌则没有表达,表明含

pET32a-chi 重组质粒的宿主菌经 IPTG 诱导表达产生包涵体。切取包涵体目的蛋白免疫小鼠以制备多克隆抗体,为后续转基因植物在蛋白水平上的检测提供一抗。

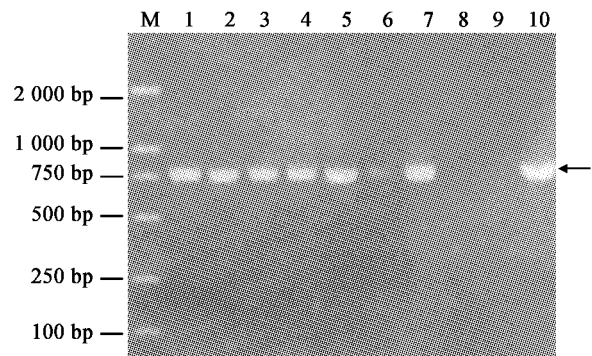


图 7 重组质粒 pET32a-chi 的 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR identification of recombinant plasmid pET32a-chi.

M: DL 2000 分子量标准;1~7: 重组质粒 pET32a-chi;8:空载体 pET32a;9:空白对照;10:阳性对照
M: DL 2000 marker; 1~7: Plasmid pE32a-chi; 8: Empty vector pET32a; 9: Blank control; 10: Positive control

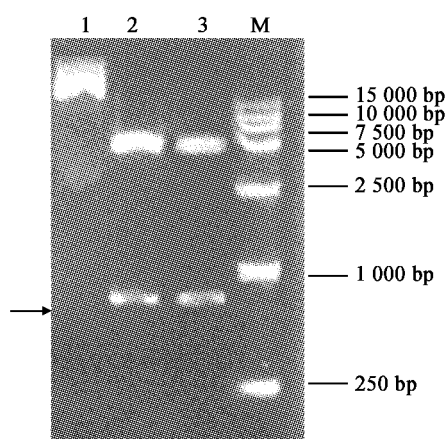


图 8 重组质粒 pET32a-chi 的酶切鉴定

Fig. 8 Restriction endonucleases digestive identification of recombinant plasmid pET32a-chi.

M: DL 2000 分子量标准; 1: 重组质粒 pET32a-chi; 2 ~ 3: 重组质粒 pET32a-chi 双酶切产物

M: DL 2000 marker; 1: Recombinat plasmid pET32a-chi; 2 ~ 3: Double digestive product of recombinat plasmid pET32a-chi

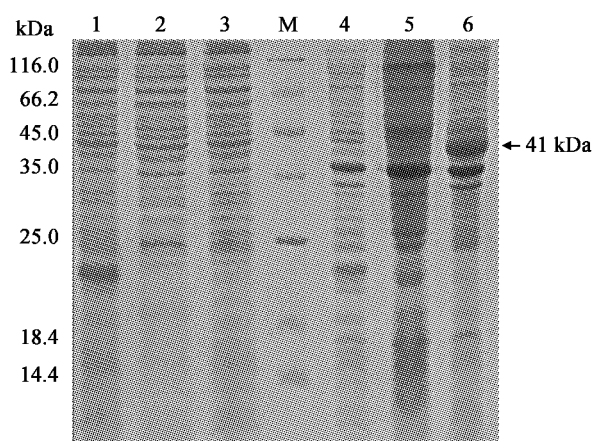


图 9 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of expressed products of recombinant plasmid.

M: 蛋白质分子量标准; 1: pET32a 诱导上清; 2: pET32a-chi 未诱导上清; 3: pET32a-chi 诱导上清; 4: pET32a 诱导沉淀; 5: pET32a-chi 未诱导沉淀; 6: pET32a-chi 诱导沉淀

M: Protein molecular marker; 1: Induced supernatant of pET32a; 2: Non-induced supernatant of pET32a-chi; 3: Induced supernatant of pET32a-chi; 4: Induce precipitation of pET32a; 5: Non-induced precipitation of pET32a-chi; 6: Induced precipitation of pET32a-chi.

3 讨论

随着 RACE 技术的发展,为已知功能基因片段的进一步延伸和全长 cDNA 的克隆提供了更有效的方法。本研究利用已报道的羊草几丁质酶基

因的 EST 序列,并结合 RACE 技术得到羊草 *LcChi2* 基因的全长序列。

生物信息学与传统的生物学研究方法相比,具有高效、可预见性及综合性强的特点,可为传统生物学研究方法提供理论先导。利用生物信息学方法对新基因进行分析,指导实验工作的设计,可避免实验的盲目性和不必要的重复。

植物几丁质酶的富含 8 个半胱氨酸的几丁质结合区域是广泛存在并且是高度保守的,可变铰链区的后 14 个氨基酸也是高度一致的,并且富含甘氨酸^[16]。利用生物信息学手段分析氨基酸序列和保守结构域可知,*LcChi2* 蛋白不具备几丁质结合区和可变铰链区,只有前端 25 个氨基酸的导肽和 C 端的几丁质催化功能区,所以推测该几丁质酶为 II 类酶,并属于 19 家族。*LcChi2* 蛋白有一段由 25 个氨基酸组成的信号肽,推测为一种分泌蛋白,有一个跨膜结构域,属于亲水蛋白,这与预测其可能定位于细胞外相吻合。根据同源性比较分析,该蛋白质在进化上很保守,与多种植物的氨基酸序列极为相似,推测执行相似的功能。通过 SWISS-MODEL 的预测,该蛋白质的三维结构与大麦种子几丁质酶 Class II 相似。Hart 等^[17]用多同晶替换法 (MIR) 对大麦种子几丁质酶 Class II CHI 作晶体分析,发现其在催化活性部分明显与溶菌酶相似,并从理论上提出了六聚糖与酶活性中心的结合模型,说明该结构有利于与几丁质的结合。

本文所用的原核表达载体 pET32a 带有 T7 噬菌体启动子,表达效率高。大肠杆菌作为基因表达的宿主有许多优越性:易于培养,生长快;易于进行遗传操作;有多种可供选择的表达载体和不同基因型的菌株;多数基因在大肠杆菌中的表达量高。但它也存在缺点:如不能进行翻译后的加工,难形成二硫键,许多表达的重组蛋白不能形成正确的高级结构,重组蛋白遭大肠杆菌蛋白酶的降解等。重组蛋白在大肠杆菌中超量表达,常在细胞质或壁膜间隙形成包涵体^[18]。本研究在大肠杆菌中表达羊草几丁质酶基因,形成包涵体,对于制备多克隆抗体是可行的。

Linthort^[2]认为几丁质酶属于病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PRprotein) 中的 PR3。PR 蛋白的共同特点是:分子量较低;在低 pH 下能被选择性的提取;对蛋白水解酶有抵抗作用;主要存在于细胞间隙;进化上相对保守。根据生物

信息学分析, LcChi2 具备以上特点, 因此推测其具有抗真菌病害的能力, 在植物的防御反应中起作用。

自人们对植物几丁质酶开始认识以来, 许多学者关注的是其降解几丁质, 对多种真菌表现出的抑制作用^[19~21], 由于本研究所克隆的几丁质酶基因是从耐盐碱性植物羊草通过盐碱胁迫克隆得到的, 因此, 推测几丁质酶不仅可以抵御病原真菌的侵害, 在植物其他抗逆过程中可能也发挥了重要作用。近些年来, 人们逐渐趋向于认同几丁质酶的诱导表达是植物应对逆境的一种保护机制。Howie 等^[22]的研究表明, 盐胁迫、干旱和低温等不利因素均能诱导植物体内几丁质酶的迅速表达。而 Schneider^[23]的试验结果也进一步证明了这种观点的正确性。他发现很多因素诱导引起的几丁质酶活性升高与植物体内 Ca^{2+} 变化关系密切。而 Ca^{2+} 是植物体内重要的胞内第二信使, 在植物逆境胁迫的信号传导中不可忽视, 所以判断几丁质酶是植物体内的一种重要的逆境蛋白。因此 LcChi2 在盐碱胁迫条件下过量表达表明它可能参与植物抗盐碱的过程, 具体的作用机制及基因功能有待下一步试验研究。

参 考 文 献

- [1] Collinge D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, *et al.*. Plant chitinase[J]. *Plant J.*, 1993, 3:31-40.
- [2] Linthorpe H M. Pathogenesis-related proteins of plants[J]. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1991, 10:123-150.
- [3] Lin W, Aunrath C S, Datta K, *et al.*. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight[J]. *Biotechnology*, 1995, 13:686-691.
- [4] Pasonen H L, Seppanen S K, Degefu Y, *et al.*. Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*); resistance to fungal diseases[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 109: 562-570.
- [5] Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, *et al.*. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene[J]. *Nat. Biotech.*, 1996, 14: 643-646.
- [6] Meins F, Fritig B, Linthorpe H J M, *et al.*. Plant chitinase genes[J]. *Plant Mol. Bio. Rep.*, 1994, 12:S22-S28.
- [7] Jin H, Plaha P, Park J Y, *et al.*. Comparative EST profiles of leaf and root of *Leymus chinensis*, a xerophilous grass adapted to high pH sodic soil[J]. *Plant Sci.*, 2006, 170:1081-1086.
- [8] 唐克轩, 开国银, 张磊, 等. RACE 的研究及其在植物基因克隆中的应用[J]. *复旦学报*, 2002, 41(6):704-709.
- [9] 章惠惠. 绿色木霉内切几丁质酶基因的克隆及其在大肠杆菌中表达的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 硕士学位论文, 2008.
- [10] 樊东. 几种鳞翅目昆虫几丁质酶基因的克隆与表达研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 博士学位论文, 2004.
- [11] Selitrennikoff C P. Antifungal proteins[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(7):2883-2894.
- [12] 赵宏亮, 冯仁军, 苏伟, 等. 香蕉中 *Maas1* 基因的生物信息学分析[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17:336-340.
- [13] Burkhard R. Predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks[J]. *Methods Enzymol.*, 1996, 266:525-539.
- [14] Al-Lazikani B, Jung J, Xiang Z, *et al.*. Protein structure prediction[J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 5:51-56.
- [15] Jacobsen S, Hauschild M Z, Rasmussen U. Induction by chromium ions of chitinase and poly amines in barley (*Hordeum vulgare* L.) and rape (*Brassic napus* L. spp. *oleifera*) [J]. *Plant Sci.*, 1992, 84:119-128.
- [16] Beitema J J. Structure feature of plant chitinase and chitin-binding protein[J]. *FEBS Lett.*, 1994, 350(2-3):159-162.
- [17] Hart P J, Pfluger H D, Monzingo A F, *et al.*. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution[J]. *J. Mol. Biol.*, 1995, 248:402-413.
- [18] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(4):482-485.
- [19] 王维荣, 郑春辉, 蔡侗, 等. 黄瓜几丁质酶的诱导、提取纯化及其基本性质(简报)[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(5):333-336.
- [20] Ye X Y, Wang H X, Ng T B. Dolichin, a new chitinase-like antifungal protein isolated from field beans (*Dolichos lablab*) [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 269(1):155-159.
- [21] Kim Y J, Hwang B K. Purification, N-terminal amino acid sequence and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride [J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1996, 48(6):417-432.
- [22] Howie W, Joe L, Newbiggin E, *et al.*. Transgenic tobacco plants which express the chiA gene from *Serratia marcescens* have enhanced tolerance to *Rhizoctonia solani* [J]. *Transg. Res.*, 1994, 3:90-98.
- [23] Schneider S, Ullrich W R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic inductors[J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1994, 45:291-304.