

棘孢木霉几丁质酶 *tachi2* 基因的原核表达 及酶学性质研究*

张军霞 丛大鹏 李雅华 咸洪泉**

(青岛农业大学 生命科学院 青岛 266109)

摘要 目的:实现棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)几丁质酶基因 *tachi2* 的原核高效表达,研究几丁质酶 Tachi2 的酶学性质。方法:利用 PCR 技术扩增得到几丁质酶基因 *tachi2*,将其克隆到原核表达载体 pEHISTEV 中,测序后,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导后进行 Tachi2 蛋白的纯化和复性。用纯化的目的蛋白 Tachi2 进行几丁质酶酶学性质的研究。结果:*tachi2* 基因在重组大肠杆菌中正确表达,其主要以包涵体形式存在;重组蛋白 Tachi2 分子量约为 44kDa,经过纯化和复性后得到的 Tachi2 有较高的几丁质酶活性。该酶的最适温度为 40℃,最适 pH 值为 7.0,几丁质酶在 40℃ 以下比较稳定、pH 6~9 时酶有较高活性,受 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的强烈抑制。结论:成功实现了棘孢木霉几丁质酶基因 *tachi2* 的原核高效表达,表达纯化了重组蛋白,明确了几丁质酶 Tachi2 的酶学性质,为该几丁质酶的进一步开发利用和深入研究奠定了基础。

关键词 棘孢木霉 几丁质酶 原核表达 酶学性质

中图分类号 Q93

几丁质(又称甲壳素)是由 N-乙酰-D-葡萄糖胺(GlcNAc)单元通过 β -1,4-糖苷键构成的线性同型多聚体,主要分布在甲壳动物、昆虫的外壳以及真菌的细胞壁中,年产量 100~1000 亿吨,是自然界仅次于纤维素居第二位的可再生资源^[1]。几丁质来源广泛,具有多种生物学功能,但由于它们分子量大、结构紧密、不溶于水 and 普通溶剂,故其应用受到很大限制^[2]。几丁质酶(chitinase, EC 3.3.2.14)广泛存在于各种微生物、动物和植物中,是一类能把几丁质降解成 N-乙酰氨基葡萄糖或者寡聚 N-乙酰氨基葡萄糖的水解酶,在自然界的碳循环中具有重要的作用^[3]。此外,几丁质酶与生物体自溶、形态发生和营养代谢具有密切关系,在植物体内,几丁质酶具有增强植物防卫能力的功能^[4,5]。研究发现,几丁质酶能降解真菌细胞壁的主要成分几丁质,从而破坏真菌的细胞壁,使病原真菌细胞生长受

阻,此外还破坏病原菌菌丝尖端新合成的几丁质,从而使菌丝停止生长、缢缩畸形甚至消解等^[6-7]。几丁质酶基因被认为是植物重要的防卫基因,已广泛用于植物抗病基因工程^[8-9]。它在抗植物虫害和病害方面也有良好的应用,如利用烟草天蛾几丁质酶基因的转化子防治朱砂叶螨,转几丁质酶基因玫瑰减少黑子病的发病率^[10-12]。

棘孢木霉(*T. asperellum*)在国外被用作生防菌,可有效抑制植物病害^[13],而在我国则属于新记录的木霉种^[14],目前国内对该菌种的开发利用尚处于起步阶段。前期本实验室分离到 1 株 *T. asperellum*,对其拮抗机制研究发现,它通过竞争和抗生双重作用抑制病原菌的生长^[15]。本研究以 *T. asperellum* 中克隆出的几丁质酶基因 *tachi2* 为研究对象,构建了原核表达质粒,在大肠杆菌中实现了高效表达,重组蛋白进行了纯化和复性,并对几丁质酶 Tachi2 的酶学性质进行了初步的研究,为该酶在生物防治和酶制剂的开发利用方面奠定了基础。

收稿日期:2013-04-01

* 山东省自然科学基金资助项目(ZR2010CM040)

**通讯作者,电子信箱:hqxian0517@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株 *T. asperellum* Tr10^[15], 大肠杆菌 (*E. coli*) DH 5 α 和 BL21 (DE3)、pEHIS-TEV 原核表达载体均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 IPTG (异丙基- β -D-噻半乳糖苷)、氨苄青霉素、卡那霉素为 Promega 生物公司产品; Ni-NTA Agrose 为 Qiagen 公司产品; 柱式 DNA 胶回收试剂盒为北京全式金公司产品; 蛋白质分子量标准、各种工具酶和 DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa 生物公司; 质粒小量提取试剂盒为 Omega 生物技术公司产品。

样品缓冲液: 1 \times PBS, 0.3 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑; 洗涤缓冲液: 1 \times PBS, 0.3 mol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF; 洗脱缓冲液: 1 \times PBS, 0.3 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF; 稀释液: 20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L DTT, pH 7.5; 复性中间液 I: 6 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tricine, 1 mmol/L DTT, pH 7.5; 复性中间液 II: 4 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tricine, 1 mmol/L DTT, pH 7.5; 复性中间液 III: 2 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tricine, 1 mmol/L DTT, pH 7.5; 复性液: 50 mmol/L HEPES, 0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 20 μ mol/L ZnSO₄, pH 7.5。

1.2 原核表达质粒 pEHISTEV/*tachi2* 的构建

试验采用 Trizol 法提取 *T. asperellum* 细胞总 RNA, 利用 TaKaRa 反转录试剂盒反转录合成 cDNA。根据我们已获得的几丁质酶基因 *tachi2* 编码区序列, 设计了一对引物 4PS 和 4PA, 引物 5' 末端分别添加 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点, 以获得编码几丁质酶 Tachi2 的基因序列。4PS: 5'-CGGGATCCTCTGAGGGCGGTTATCGCT-3'; 4PA: 5'-GGGCGGCCGCTTAGTTATTTGGGAATCCAT TCTT-3'。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的 PCR 产物, 并与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 后用质粒小量提取试剂盒提取重组质粒, 将测序鉴定正确的质粒命名为 pMD18-T/*tachi2*。用 *Bam*H I 和 *Not* I 对重组质粒进行双酶切, 回收纯化目的片段, 并与同样双酶切的原核载体 pEHIS-TEV 用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α , 经 Kan 抗性筛选, 挑取转化子经 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后进行 PCR 及酶切鉴定并测序。测序正确重组质粒命名为 pEHISTEV/*tachi2*。

1.3 重组蛋白的诱导表达、鉴定

将构建好的重组质粒 pEHISTEV/*tachi2* 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21, 培养 16 h 后挑取 Kan 抗性单菌落, 菌落 PCR 检测。选取成功转化的单克隆接种于 LB 液体培养基 (含 50 μ g/L 卡那霉素) 180 r/min, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。取过夜培养物按 1:100 的比例转接入含 50 μ g/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养。当菌液的 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 8 h。将 100 μ l 诱导后的菌液 10000 r/min 离心 1 min, 收集沉淀于 2 \times SDS-PAGE loading buffer 中, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 取该处理液 10 μ l 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。用含 pEHISTEV 空质粒的 BL21 菌体做对照, 处理条件与实验组相同。剩余菌液保存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

1.4 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化重组蛋白^[16]

取上述保存备用的菌液于 50 ml 离心管中, 离心收集细胞, 然后用 10 ml 样品缓冲液、蛋白酶抑制剂和 1 mmol/L DTT 重悬沉淀, 于冰浴中超声波破碎细胞 (作用 30 s、间隔 1 min、30 次)。6000 r/min 离心破碎后的细胞 10 min, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。将沉淀变性^[17], 然后收集变性溶解的上清液, 用 0.2 μ m 的滤膜过滤去除不溶性杂质。将滤液注入 Ni-NTA 树脂层析柱中, 流速为 1 ml/min。层析柱用 3 倍体积的 NTA 洗涤缓冲液清洗, 再用洗脱缓冲液从层析柱上洗脱表达蛋白。SDS-PAGE 电泳分析检测目的蛋白在洗脱液中的分布情况。

1.5 重组蛋白的透析法复性

本研究选用透析法进行复性。在纯化后的重组蛋白中加入相应体积的稀释液, 调整蛋白终浓度为 100 mg/L, 室温下放置 1 h; 将其装入透析袋后, 在 4 $^{\circ}$ C 下依次用复性中间液 I、复性中间液 II、复性中间液 III 进行梯度透析各 2 h; 再用复性液在 4 $^{\circ}$ C 下放置 16 h 进行复性; 用 SDS-PAGE 检测透析袋内溶液的蛋白, 并进行酶活测定来检测蛋白复性效果。

1.6 几丁质酶 Tachi2 的酶学性质分析

1.6.1 几丁质酶的酶活力检测 本试验采用 DNS 比色法来测定几丁质酶的活性。0.5 ml 2% 胶体几丁质和 0.5 ml 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 混合后在 37 $^{\circ}$ C 下预热 30 min, 加入 0.5 ml 几丁质酶液, 45 $^{\circ}$ C 下反应 1 h 后, 沸水浴 5 min 中止反应, 并迅速冷却后再加入 1.5 ml DNS 试剂, 于沸水浴中加热 5 min, 冷却至室温后用蒸馏水定容到 25 ml, 摇匀, 离心后取上清, 并以相应反应

体系中加入等量的灭活酶液作空白对照,于 540 nm 波长处读取吸光光度值。酶活力单位(U)定义为在上述条件下,每分钟产生相当于 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.6.2 几丁质酶的最适反应温度 改变反应温度,其他条件不变,按照标准方法测定酶活,测定酶在不同反应温度下所具有的酶活力,以酶活最高者为 100%,考察酶的最适反应温度。

1.6.3 几丁质酶的最适反应 pH 值 将酶反应体系用广泛 pH 缓冲液调为 4.0~9.5,考察酶在不同 pH 下反应所具有的酶活力,以酶活最高者为 100%,确定酶的最适 pH。

1.6.4 几丁质酶的热稳定性 将酶液在 20~70 $^{\circ}\text{C}$ 下保温不同的时间(10、20、30、40、50、60 min)后,立即在 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中冷却,按标准方法测残余酶相对活力,以此考察酶的温度稳定性。

1.6.5 几丁质酶的酸碱稳定性 将酶液用 pH 4~10 的缓冲液稀释,最适温度温浴 40 min 后,以最高酶活定义为 100%,分别计算不同 pH 环境下的剩余酶活占最高酶活的百分比。

1.6.6 金属离子对几丁质酶活的影响 在几丁质酶与其底物进行反应体系中,分别加入不同金属离子,并使其最终浓度为 0.05 mol/L,以不加金属离子的反应体系的酶活定义为 100%,分别测定加入金属离子后各反应体系中几丁质酶的酶活。

2 结果

2.1 原核表达质粒 pEHISTEV/*tachi2* 的构建

以 *T. asperellum* 的 cDNA 为模板,用引物对 4PS/4PA 进行 PCR 扩增得到长约 1200 bp 的条带(图 1),重组质粒 pEHISTEV/*tachi2* 用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切,一条带为载体质粒片段(约 5000 bp),另一条带为目的基因(约 1200 bp),所得的限制性片段与预期结果完全一致(图 2),测序结果表明重组表达载体构建成功。

2.2 重组蛋白的表达、纯化及复性

将重组质粒 pEHISTEV/*tachi2* 成功转化的 *E. coli* BL21 细胞加 IPTG 诱导 6 h 后,收集菌液发现在约 44 kDa 处出现明显的目的蛋白带,而对照菌在 44 kDa 附近未出现蛋白条带(图 3)。将收集的菌液进行超声波破碎,离心后取其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,结果表明沉淀中目的蛋白的量较大(图 4,2 泳

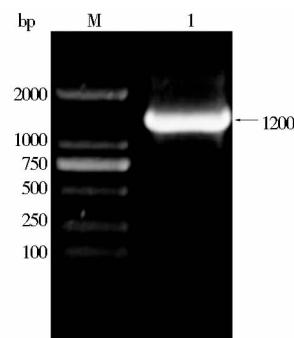


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

M: DL 2000DNA marker; 1: Product of PCR with primers 4PS and 4PA

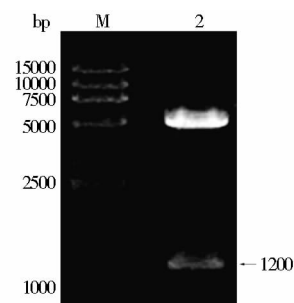


图 2 pEHISTEV/*tachi2* 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pEHISTEV/*tachi2* by restrictive enzyme digestion

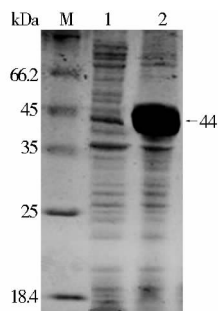
M: DL 15000 DNA marker; 2: pEHISTEV/*tachi2* digested by *Bam*H I and *Not* I

道),而上清中几乎没有目的蛋白(图 4,1 泳道),表明在重组大肠杆菌中表达的重组蛋白以包涵体形式存在。

将包涵体变性后利用 Ni-NTA 树脂层析分离,从层析柱中洗脱出的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳,显示纯化产物只有一条带(图 4,3 泳道),证明纯度很高,有利于下一步的复性和酶学性质分析。复性后蛋白检测(图 4,4 泳道)以及几丁质酶活性测定结果表明,重组蛋白相对分子质量与预期值一致,且具有几丁质酶活性,说明纯化的蛋白确实为 Tachi2。

2.3 几丁质酶 Tachi2 的酶学性质分析

2.3.1 几丁质酶 Tachi2 的最适温度 在不同温度下测定几丁质酶活力,试验结果如图 5,结果表明随着反应温度的升高,降解几丁质效率显著增加,40 $^{\circ}\text{C}$ 为酶反应最佳温度,55 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活力约下降 60%,70 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性虽然较低,但仍具有降解几丁质的能力。

图3 *tachi2* 基因原核表达蛋白 SDS-PAGE 分析Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expression of *tachi2* gene

M: Protein marker; 1: pEHISTEV-transformed BL21 with IPTG induction; 2: pEHISTEV/*tachi2*-transformed BL21 with IPTG induction

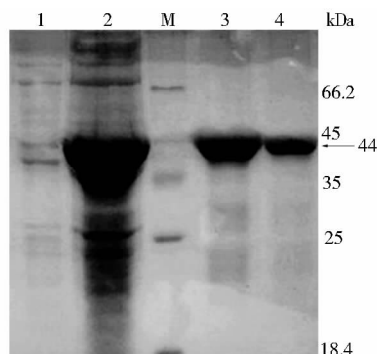


图4 重组蛋白的表达形式、纯化和复性

Fig. 4 The type of fusion protein expression, purification and renaturation

M: Protein marker; 1: Supernatant of BL21 with pEHISTEV/*tachi2* after induction; 2: Pellet of BL21 with pEHISTEV/*tachi2* after induction; 3: Purified target protein; 4: Renatured target protein

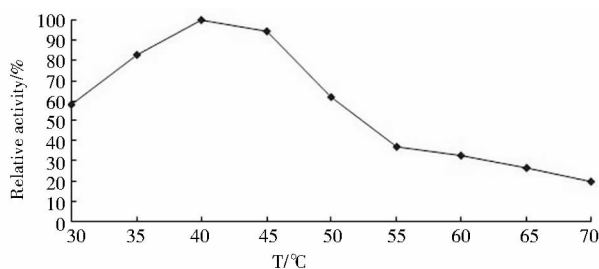


图5 Tachi2 的最适反应温度

Fig. 5 The optimal reaction temperature of Tachi2

2.3.2 几丁质酶 Tachi2 的最适 pH 值 在不同 pH 值的缓冲液体中测定几丁质酶 Tachi2 的活力,结果见图 6。Tachi2 具有较广泛的 pH 适用范围,pH5.5~8.5

时,相对酶活力在 60% 以上,pH7 时酶活力最高,因此最适反应 pH 值为 7。

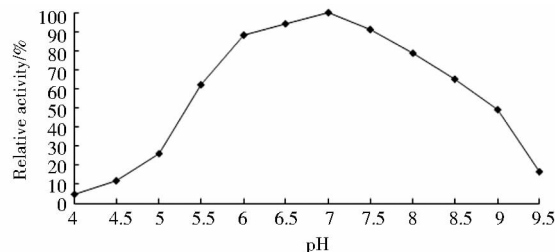


图6 Tachi2 的最适反应 pH

Fig. 6 The optimal reaction pH of Tachi2

2.3.3 几丁质酶 Tachi2 的热稳定性 将几丁质酶 Tachi2 置于 pH7 的缓冲液中,在不同温度下热处理不同时间,分别计算几丁质酶的剩余酶活性。如图 7 所示,几丁质酶 Tachi2 在 40 °C 以下较稳定,50 °C 以上处理 60 min 后,剩余酶活还有 30% 左右,当在高于 60 °C 下热变性 1h 后,酶活力将近为 0。结果表明该酶在常温下具有较好的稳定性,具有较高的实用价值。

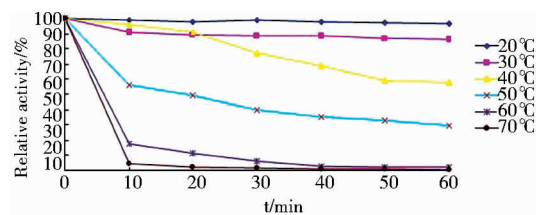


图7 Tachi2 的热稳定性

Fig. 7 The thermostability of Tachi2

2.3.4 几丁质酶 Tachi2 的酸碱稳定性 将几丁质酶 Tachi2 置于不同 pH 缓冲环境下,在 35 °C 下预处理 40 min 后,调整 pH 为 7,标准条件下,计算剩余几丁质酶的酶活性来评价 pH 稳定性,如图 8 所示,Tachi2 在 pH 为 5 时,只有 25% 的剩余酶活性,在 pH 值为 6~9 时具有较高的酶活,说明几丁质酶 Tachi2 在偏碱性环境中非常稳定。

2.3.5 金属离子对几丁质酶 Tachi2 的影响 不同金属离子对几丁质酶 Tachi2 活性的影响不同, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 对几丁质酶 Tachi2 有激活作用,其中 Mn^{2+} 的激活作用最明显,可使相对酶活性提高了 106.2%, Fe^{2+} 次之,使酶活性提高了 54.5%; Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等对几丁质酶 Tachi2 有显著的抑制作用, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对几丁质酶 Tachi2 的抑制作用不明显都只有 20% 左右;而 K^{+} 、 Na^{+} 对酶活性影响不大(图 9)。

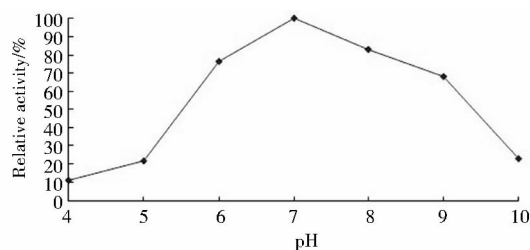


图8 Tachi2 的 pH 稳定性

Fig. 8 The pH stability of Tachi2

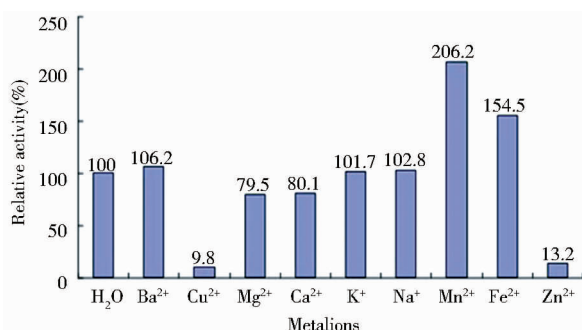


图9 不同金属离子对几丁质酶 Tachi2 活性的影响

Fig. 9 Effects of different metal ions on expression chitinase activity

3 讨论

大肠杆菌具有遗传背景清楚、生长快、培养经济、表达水平高、待选质粒和宿主多等特点,在基因工程技术领域已成为首选的表达系统^[18],在国内外被广泛应用于生产外源蛋白。可利用体外重组技术构建几丁质酶基因原核表达载体,转化大肠杆菌,获得高效表达几丁质酶的工程菌,达到生产几丁质酶的目的。本试验将 *tachi2* 基因插入到载体 pEHISTEV 中成功构建原核表达载体,高效地表达了分子量约为 44kDa 的几丁质酶 Tachi2,并且明确了该酶的酶学性质。

一般外源蛋白在宿主菌,比如大肠杆菌中的表达形式多数为细胞内不溶性表达(即包涵体),少数为细胞外分泌表达,本试验中重组蛋白 Tachi2 主要以不溶性的包涵体形式存在。包涵体的形成便于表达产物的分离纯化,也是宿主细胞对外源性有害蛋白能够进行高效表达的一种保护机制。然而包涵体的缺点是需要经过一系列的变性、复性等复杂处理过程才能得到有活性的可溶性融合蛋白。pEHISTEV 载体中含有表达组氨酸残基的 His-Tag 编码序列,插入 *tachi2* 基因序列后可以表达出含有组氨酸标签的 Tachi2 重组蛋白,经

尿素变性后利用 Ni-NTA 树脂亲和层析法可以达到高效快速纯化重组蛋白的目的。

常用的菌体细胞破碎方法可为匀浆、超声、研磨等传统的机械法和渗透、酶溶、化学裂解、冻融等非机械法。其中一些新的方法也在不断地出现与发展中。为避免目的蛋白或产物的变性或失活,本实验室采用超声波破碎法提取菌体蛋白。其特点是操作简便,易于控制,蛋白损失较少。现在较为成熟的复性技术主要是液相复性(透析复性、稀释复性和超滤复性)和固相复性(各种层析法复性)^[19],本研究采取透析复性法,与其他方法相比,能够减少蛋白质的聚集,复性蛋白的产量和活性相对较高,可以应用于其他以包涵体形式表达的蛋白复性工作。

几丁质酶是一类差异较大的水解酶类,对不同来源的几丁质酶的研究已有报道^[20-23]。本文研究了几丁质酶 Tachi2 的相对分子量、反应温度和酸碱性和酶活力的影响等,结果表明几丁质酶 Tachi2 的分子量约为 44 kDa,该几丁质酶反应的最适温度为 40 ℃,最适 pH7.0。Tachi2 在 20 ℃~40 ℃均保持较高的活力,而此酶与其他部分几丁质酶^[24]相比在常温下热稳定性更好。Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 对 Tachi2 具有强烈的抑制作用,这些金属离子可以使酶变性而导致失活。本研究发现有些金属离子如 Mn²⁺、Fe²⁺ 等可以对几丁质酶活力起到促进作用,Mn²⁺ 的激活作用最明显,可以考虑添加 Mn²⁺ 来扩大 Tachi2 的应用范围。本实验室此前从 *T. asperellum* Tr10 中克隆过一个几丁质酶基因 *tachi1*,并分别进行了真核表达^[2]和原核表达^[25],基因 *tachi1* 的真核表达是通过诱导培养毕赤酵母工程菌来高效表达重组蛋白,与原核表达相比较,*tachi1* 真核表达的几丁质酶酶活更高,同时也远远高于其他已报道的几丁质酶酶活,而原核表达后的重组蛋白以包涵体的形式存在,重组蛋白的纯化复性工作相对繁琐,因此下一步有必要开展基因 *tachi2* 的真核表达以及条件优化等工作。

据报道,一般细菌几丁质酶的最适 pH 为酸性或碱性,而放线菌和真菌的最适 pH 常是酸性的^[19],本研究发现几丁质酶 Tachi2 在 pH6~9 环境中较稳定,为几丁质酶 Tachi2 的深入研究和在几丁质资源利用、植物病虫害的防治等诸多领域的应用提供了科学依据。

参考文献

- [1] Neetu D, Rupinder T, Gurinder S H. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Appl Microbiol Biotechnol,

- 2006, 71(6): 773-782.
- [2] 汤伟,李雅华,刘露,等. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化. 微生物学报, 2012, 52(3): 345-352.
- Tang W, Li Y H, Liu L, et al. Characterization and production optimization of a chitinase (Tachi1) from *Trichoderma asperellum* in recombinant *Pichia pastoris* expression system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 345-352.
- [3] 黄乾生,谢晓兰,陈清西. 几丁质酶的结构特征与功能. 厦门大学学报:自然科学版, 2008, 47(2): 232-235.
- Huang Q S, Xie X L, Cheng Q X. Structure and function of chitinase. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2008, 47(2): 232-235.
- [4] Zhu Q, Maher E A, Masoud S, et al. Enhanced proteion against fungal attack by constitutive co-expressing of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology*, 1994, 12: 807-812.
- [5] Wang S Y, Shao B, Ye X Y, et al. Purification and characterization of a chitinase from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 2008, 32(1): 32-45.
- [6] Ordentlich A, Elad Y, Chet I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 1988, 78(1): 84-88.
- [7] Shapira R, Ordentlich A, Chet I, et al. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology*, 1989, 79(11): 1246-1249.
- [8] Emani C, Garcia J M, Lopata-Finch E, et al. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnology Journal*, 2003, 1(5): 321-336.
- [9] Vellicce G R, Ricci J C, Hernandez L, et al. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry. *Transgenic Research*, 2006, 15(1): 57-68.
- [10] Distefano G, La Malfa S, Vitale A, et al. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*, 2008, 17(5): 873-879.
- [11] McCafferty H R, Moore P H, Zhu Y J. Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene. *Transgenic Research*, 2006, 15(3): 337-347.
- [12] Marchant R, Davey M R, Lucas J A, et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding*, 1998, 4(3): 187-194.
- [13] Cotxarrera L, Trillas-Gay M I, Steinberg C, et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(4): 467-476.
- [14] 章初龙,徐同. 我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述. 菌物学报, 2005, 24(2): 184-192.
- Zhang C L, Xu T. Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang, Yunan and Tibet of China. *Mycosystema*, 2005, 24(2): 184-192.
- [15] 夏伟,颜艳伟,张红,等. 木霉 Tr10 的鉴定及其对几种病原菌的抑制作用. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2424-2426.
- Xia W, Yan Y W, Zhang H, et al. Identification of *Trichoderma* strain Tr10 and study on its inhibition function to fungal pathogens. *Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(5): 2424-2426.
- [16] 闵丹. 斜纹夜蛾核型多角体病毒 II ORF50 基因的研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2010.
- Dan M. The studies on the ORF50 gene of the *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus II. Su Zhou: Su Zhou University, 2010.
- [17] 金喜新,崔保安,魏战勇,等. 猪细小病毒 NS1 基因的原核表达及重组蛋白的复性. 微生物学报, 2007, 47(1): 126-130.
- Jin X X, Cui B A, Wei Z Y, et al. Prokaryotic expression of the NS1 gene of PPV and renaturation of the recombinant protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(1): 126-130.
- [18] 于德强,何询. 重组蛋白复性技术研究进展. 生物技术通讯, 2004, 15(1): 67-69.
- Yu D Q, He X. The research progress of refolding technologies for recombinant proteins. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(1): 67-69.
- [19] 朱红裕,李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略. 过程工程学报, 2006, 2(6): 150-155.
- Zhu H Y, Li Q. Strategies for expression of soluble heterologous proteins in *Escherichia coli*. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, 2(6): 150-155.
- [20] 杨文博,冯波,佟树敏. 链霉菌 SO1 菌株几丁质酶的纯化及性质. 微生物学通报, 1997, 24(2): 84-88.
- Yang W B, Feng B, Tong S M. Purification and properties of chitinase from *Streptomyces* sp. SO1. *Microbiology*, 1997, 24(2): 84-88.
- [21] 彭仁旺,管考梅,黄秀梨. 球孢白僵菌两种胞外几丁质酶的诱导和纯化. 微生物学报, 1996, 36(2): 103-108.
- Peng R W, Guan K M, Huang X L. Induction and purification of two extracellular chitinases from *Beauveria bassiana*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1996, 36(2): 103-108.
- [22] 唐亚雄,赵建,丁诗华,等. 产气肠杆菌几丁质酶的分离纯化及性质研究. 微生物学报, 2000, 41(1): 82-86.
- Tang Y X, Zhao J, Ding S H, et al. Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*. *Acta Microbiologica Sinica*,

- 2000, 41(1):82-86.
- [23] 陈三凤,李季伦. 黄杆菌(*Flavobacterium* sp.) 几丁质酶的纯化和性质. 微生物学报,1994,34(1): 14-19.
- Chen S F, Li J L. Purification and properties of chitinase from *Flavobacterium* sp. Acta Microbiologica Sinica,1994,34(1): 14-19.
- [24] 白复芹,刘晓光,李惠,等. 螺旋毛壳 ND35 几丁质酶的纯化和性质. 莱阳农学院学报,2006,23(4):268-271.
- Bai F Q, Liu X G, Li H, et al. Purification and characterization of a chitinase from endophytic *Chaetomium spirale* ND35. Journal of Laiyang Agricultural College, 2006,23(4):268-271.
- [25] 丛大鹏,李雅华,咸洪泉. 棘孢木霉几丁质酶基因的原核表达、复性、纯化以及酶学性质研究. 中国农学通报,2012,28(11): 34-38.
- Cong D P, Li Y H, Xian H Q. Expression in *Escherichia coli*, purification, renaturation and characterization of chitinase gene from *Trichoderma asperellum*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012,28(11):34-38.

Prokaryotic Expression of *tachi2* Gene from *Trichoderma asperellum* and Characterization of Recombinant Enzyme

ZHANG Jun-xia CONG Da-peng LI Ya-hua XIAN Hong-quan

(College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract Objective: To realize high level prokaryotic expression of the *tachi2* gene from *Trichoderma asperellum* and characterize the recombinant enzyme. Methods: The *tachi2* gene was amplified by PCR, and recombinant plasmid pEHISTEV/*tachi2* was constructed successfully by inserting the *tachi2* gene into pEHISTEV. The recombinant plasmid pEHISTEV/*tachi2* was transformed into *Escherichia coli* BL21, which was induced with isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). The recombinant protein Tachi2 was purified and renatured to analyze enzymatic properties. Results: The recombinant protein Tachi2 was expressed successfully in the form of inclusion body in the recombinant *E. coli*. The molecular weight of Tachi2 was about 44 kDa, Tachi2 was purified and renatured by a serial of treatments, the renatured protein had high chitinase activity. The optimum temperature and pH for the enzyme activity were 40°C and 7.0 respectively. The enzyme activity was stable under 40 °C and in the pH range of 6 ~ 9, its activity was significantly reduced by 0.05 mol/L of Cu²⁺ and Zn²⁺. Conclusion: The recombinant strain *Escherichia coli* BL21 showed high level prokaryotic expression of the *tachi2* gene. And the enzymatic properties were further defined. It will provide theoretical basis for application and further research in this chitinase.

Key words *Trichoderma asperellum* Chitinase Prokaryotic expression Enzymatic properties