

微泡菌 ALW1 几丁质酶 Chi18A 的克隆及信息学分析

李鹤宾¹, 梁梅芳², 陈仲巍¹, 姜泽东², 倪 辉², 朱艳冰²

(1. 厦门医学院药理学系, 福建 厦门 361023; 2. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以微泡菌(*Microbulbifer* sp.) ALW1 的基因组为模板, 利用几丁质酶基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 然后将产物插入到 pMD18-T 载体后进行 DNA 序列测定, 并对目的基因编码的蛋白质序列进行信息学分析。结果显示, 克隆的目的基因大小为 1644 bp, 预测编码含有 547 个氨基酸残基的蛋白质。该蛋白质序列与其他菌株来源的几丁质酶序列具有 70% 左右的相似性, 表明预测目的基因编码几丁质酶。该蛋白质具有 2 个几丁质结合结构域和 1 个 GH18 家族酶的催化结构域, 属于糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH) 家族 18, 命名为几丁质酶 Chi18A。模拟的三维结构显示, Chi18A 含有 $(\beta\alpha)_8$ 桶状结构。

[关键词] 微泡菌; 几丁质酶; 克隆; 信息学分析

[中图分类号] S 188

Cloning and Bioinformatics Analysis of the Chitinase Chi18A from *Microbulbifer* sp. ALW1

LI Hebin¹, LIANG Meifang², CHEN Zhongwei¹, JIANG Zedong², NI Hui², ZHU Yanbing²

(1. Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The genomic DNA of *Microbulbifer* sp. ALW1 was used as the template for the amplification of a chitinase gene by PCR with a pair of specific primers. The amplified products were cloned into pMD18-T vector and then sequenced. The deduced protein sequence of this gene was further analyzed by bioinformatics. The results showed that the cloned gene was 1644 bp, encoding 547 amino acid residues. The target protein sequence shared about 70% identity with the chitinase sequences from other strains. So the cloned target gene was predicted to encode an chitinase. The target protein had two chitin binding domains and one GH18 catalytic domain. It belonged to GH18 family and was named Chi18A. The simulated 3D structure showed that Chi18A contained $(\beta\alpha)_8$ barrel structures.

Keywords: *Microbulbifer* sp.; chitinase; cloning; bioinformatics analysis

0 引言

几丁质(chitin)又名甲壳素、壳多糖,是以N-乙酰-D-氨基葡萄糖为单体,通过 β -1,4糖苷键连接而成的高分子多聚物。它广泛分布在节肢动物的外骨骼、甲壳动物的外壳、真菌细胞壁中^[1],在地球上的天然高分子中,其蕴藏量仅次于纤维素,占第二位。尽管几丁质资源丰富,但是,

[收稿日期] 2018-12-05

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2016J01162)

[作者简介] 李鹤宾(1974—),男,副教授,博士,从事微生物学研究。

由于它在水和有机溶剂中难以溶解, 使得其应用非常有限。几丁质降解后可以生成多种产物, 主要包括壳聚糖、几丁寡糖、*N*-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、氨基葡萄糖等^[2], 它们在食品、医药和农业等领域应用广泛^[3-6]。例如: 壳聚糖有强化肝机能、增加肠内有益菌等生物活性, 被广泛用作功能性食品或饮料补充剂; GlcNAc 可用于治疗溃疡性结肠炎、炎症性肠病和骨关节炎等疾病。

几丁质酶作为几丁质的降解工具, 它是一类能将几丁质专一性降解为 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖或寡聚 *N*-乙酰胺基葡萄糖的水解酶, 其来源广泛^[7-9]。几丁质酶不仅在植物的生长发育过程、昆虫的成长蜕皮阶段以及抵御病原真菌入侵方面发挥了巨大的作用, 而且还能将其应用在几丁质废物清理和利用中^[10-13]。

海洋环境中含有丰富的几丁质, 特殊的生存环境使得从海洋环境中分离筛选产几丁质酶的微生物成为可能。先前的研究以腐烂海带为样品, 筛选分离出一株微泡菌 (*Microbulbifer* sp. ALW1)^[14], 该菌株可以产生几丁质酶。本研究拟从微泡菌 ALW1 中克隆几丁质酶基因, 并对其序列进行信息学分析, 以期为今后研究几丁质酶的结构和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

微泡菌 ALW1, 由本实验室从腐烂的海带中筛选分离; *Escherichia coli* DH5 α 菌株作为目的基因的克隆宿主菌, 由本实验室保存。

pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、T₄ DNA 连接酶和 DNA 标准为 TaKaRa 公司产品。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司。柱式 DNA 胶回收试剂盒为天根生化科技 (北京) 有限公司产品。寡核苷酸引物的合成及 DNA 序列的测定均委托厦门铂锐生物科技有限公司完成。几丁质为 Sigma-Aldrich 公司产品, 其余试剂均为分析纯产品。

1.2 主要仪器

C1000 基因扩增仪, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司; BioPhotometer 生物分光光度计, Eppendorf 公司; 5417R 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; SW-CJ-ZFD 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 几丁质酶的活力测定

将微泡菌 ALW1 接种于以几丁质为唯一碳源的培养基 (0.5% 几丁质, 0.2% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 3.0% NaCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 均为质量分数), 25 ℃ 培养 36 h 后, 取 25 mL 培养液在 4 ℃ 下、10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为胞外粗酶液。以质量分数 5.6% 的几丁质胶体溶液作为底物, 采用 DNS 法^[15]测定几丁质酶的活力。取 100 μ L 几丁质胶体溶液, 加入 100 μ L 粗酶液, 在 45 ℃ 下反应 1 h 后, 立即煮沸 10 min, 加入 200 μ L DNS 溶液, 煮沸 10 min, 测定其在 540 nm 处的吸光度值。几丁质酶活力的定义: 在上述条件下, 每分钟催化产生 1 μ g 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.3.2 几丁质酶基因的 PCR 扩增

根据菌株 ALW1 几丁质酶的基因序列设计合成引物, Chi-F: 5'-GTTCGATTGCTCTGTTTGT-3', Chi-R: 5'-AAGCGAATCCAGATACGCC-3'。提取菌株 ALW1 的基因组 DNA, 将其作为模板进行目的基因的 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 30 次循环; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的基因片段。

1.3.3 几丁质酶基因的克隆

将回收的目的基因产物与 pMD18-T 载体在 16 ℃ 连接 16 h, 连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养平板上涂布 IPTG 诱导剂 (10 μ L, 0.5 mol/L)

和 X-gal 底物 (50 μL, 20 g/L) 后, 将转化后的细胞涂布在培养平板上, 37 ℃ 培养 16 h。从平板挑选白色单菌落进行菌落 PCR 鉴定重组子, 并将 PCR 阳性克隆子进行目的基因的测序验证。

1.3.4 基因及其编码产物的生物学信息分析

利用 DNAMAN 软件对目的基因进行序列分析; 利用 NCBI 的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中搜索蛋白质序列的同源性, 并运用 ESPript 3.0 进行蛋白质序列比对分析; 利用 ExPASy 的 ProtParam 工具进行蛋白质的理化性质预测; 利用 Signal P 4.1 工具进行信号肽预测; 利用 SMART 工具进行蛋白质的结构域分析; 利用 NPS 服务器(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)上的 GOR4 法进行蛋白质二级结构的预测; 利用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维结构模拟。

2 结果

2.1 几丁质酶的活力

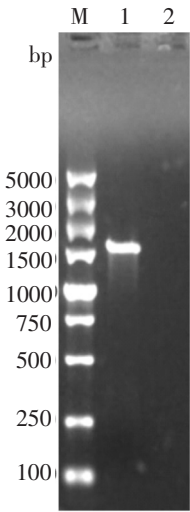
以几丁质胶体为底物, 利用 DNS 法测定菌株 ALW1 所产的细胞外几丁质酶的活性。结果显示, 胞外粗酶液的比活力达 0.8 U/mg。

2.2 几丁质酶基因的 PCR 扩增

以菌株 ALW1 的基因组 DNA 为模板, 用几丁质酶的特异性引物进行 PCR, 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物的分析结果 (见图 1) 显示, 扩增的目的条带在 1600 bp 左右。

2.3 几丁质酶基因的克隆

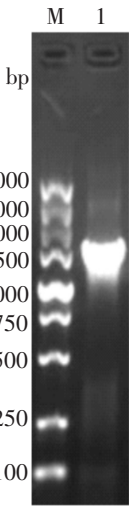
将几丁质酶基因插入 pMD18-T 载体后, 转化至克隆宿主 *E. coli* DH5α 筛选阳性克隆子, 利用 PCR 进行鉴定, 结果为阳性 (见图 2), PCR 条带的大小约为 1600 bp, 说明转化成功。将含有目的基因的重组质粒进行测序分析, 结果显示, 几丁质酶基因的大小为 1644 bp。



说明:M—DL5000 DNA 标准;1—几丁质酶基因 PCR 产物;2—未加模板 PCR 产物
Notes:M—DL5000 DNA marker;1—chitinase gene PCR products;2—PCR products without template

图 1 几丁质酶基因的 PCR 产物

Fig.1 PCR products of the chitinase gene



说明:M—DL5000 DNA 标准;1—菌落 PCR 产物
Notes:M—DL5000 DNA marker;1—colony PCR products

图 2 克隆子的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of clone using PCR

2.4 几丁质酶基因及其编码产物的生物学信息分析

2.4.1 几丁质酶基因及蛋白质序列分析

几丁质酶基因大小为 1644 bp, 预测编码 547 个氨基酸, N 端 1~27 位氨基酸构成信号肽。将基因编码的蛋白质序列在 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性搜索, 显示其与来源于 *Paeniba-*

cillus chimensis (WP_025848198.1)、*Paenibacillus elgii* (WP_010496918.1)、*Paenibacillus tianmuensis* (WP_090670985.1)、*Paenibacillus elgii* (WP_088830943.1)、*Paenibacillus tyrfis* (WP_036675352.1) 和 *Paenibacillus elgii* (WP_063177939.1) 的几丁质酶分别具有 71%、70%、70%、70%、69% 和 69% 的相似性，所以预测目的基因编码产物为几丁质酶。该几丁质酶蛋白质序列与其他来源的几丁质酶序列的比对结果见图 3，结果显示，该几丁质酶含有 GH18 家族几丁质酶的催化模块 DxxDxDxE，其中谷氨酸 (Glu, E) 活性位点为酸碱催化氨基酸残基 (图 3 黑色方框部分 * 所示)。与谷氨酸相近的两个天冬氨酸 (Asp, D) 不但可以保证多糖链的 N-乙酰基正确结合在 -1 位上，还可以降低谷氨酸的 pK_a 值。将本研究的几丁质酶蛋白质序列与 GH 家族的几丁质酶蛋白质序列进行系统发育分析，结果如图 4 所示，该几丁质酶与来自 GH18 家族的几丁质酶聚在同一分支，将其命名为 Chi18A。

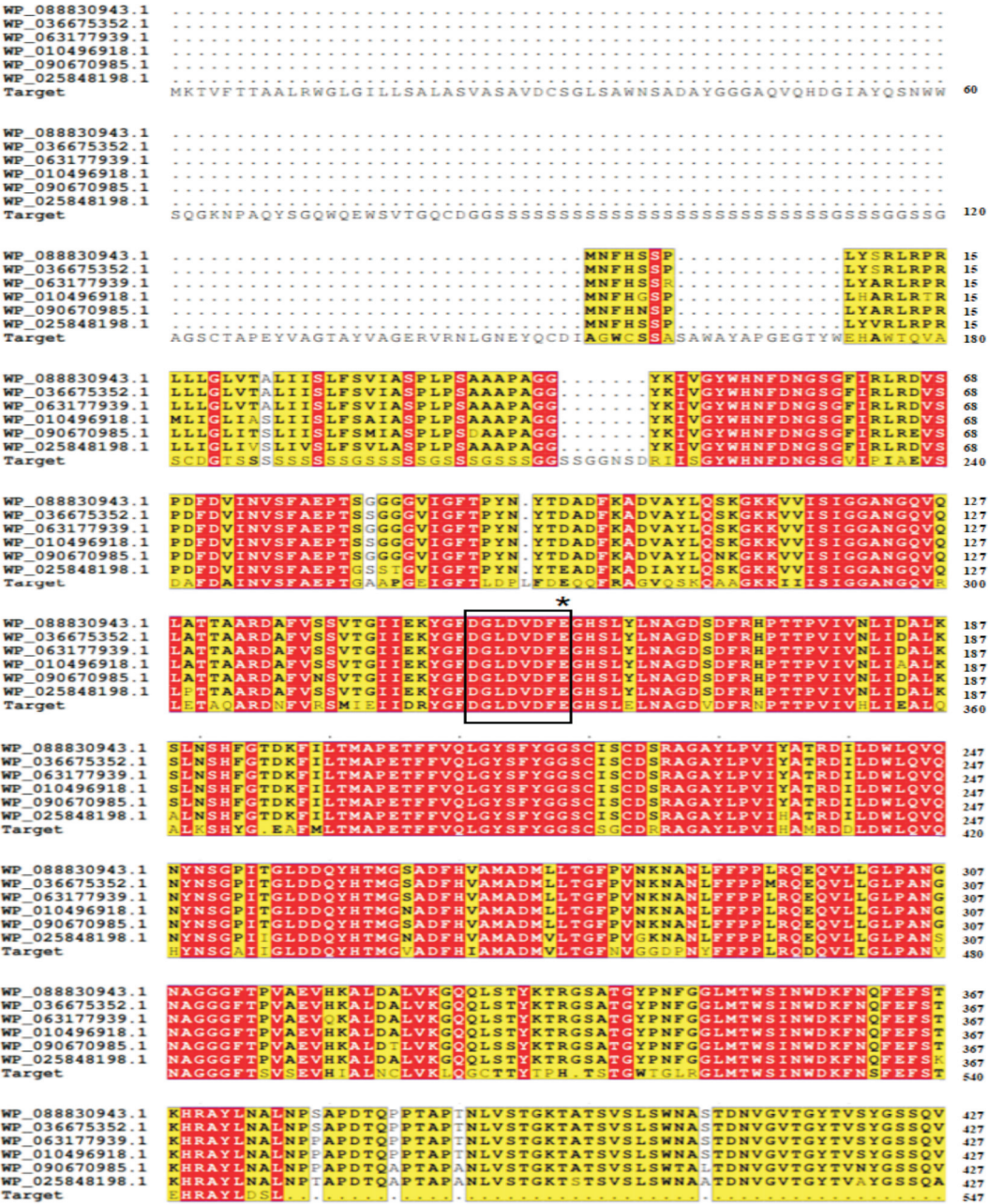


图 3 微泡菌 ALW1 几丁质酶的氨基酸序列与其他几丁质酶序列的比对

Fig.3 Alignment of the amino acid sequences of chitinase from *Microbulbifer* sp. ALW1 with other chitinases



图 6 几丁质酶 Chi18A 保守结构域

Fig.6 The conserved domain of chitinase Chi18A

2. 4. 4 几丁质酶 Chi18A 基因编码蛋白质的三维建模

将菌株 ALW1 的几丁质酶 Chi18A 的蛋白质序列通过 SWISS-MODEL 进行三维模型的构建，结果如图 7 所示。模板为来源于 *Chromobacterium violaceum* 的 GH18 家族几丁质酶的晶体结构，登录号为 4tx8. 1. A，覆盖范围为 125 ~ 546 位氨基酸。几丁质酶 Chi18A 与其他已解析的 18 家族几丁质酶拥有相似的三级结构，即 $\beta\alpha_8$ 的“TIM”桶状结构。中心部分是平行的 β 折叠组成的内桶，外桶由 α 螺旋组成，内外桶紧贴在一起。底物结合位点在筒底部无规则卷曲附近（见图 7）

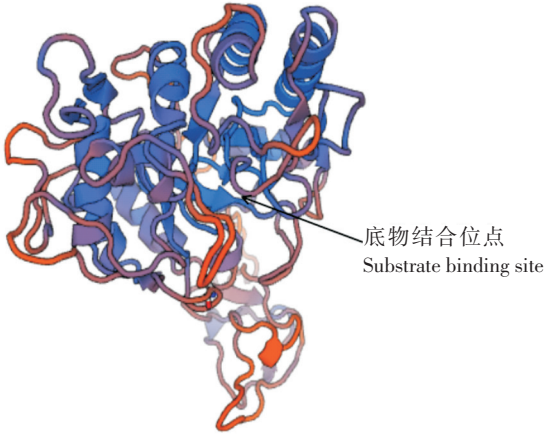


图 7 微泡菌 ALW1 几丁质酶 Chi18A 的三维建模

Fig.7 3-D structure modeling of chitinase Chi18A from *Microbulbifer* sp. ALW1

3 讨论

几丁质酶在食品、农业、能源和环境保护等领域发挥着重要作用。本研究从微泡菌 ALW1 的基因组中成功扩增了 1644 bp 的几丁质酶基因片段，该基因编码的蛋白质与其他菌株来源的几丁质酶具有 70% 左右的相似性。

几丁质酶属于 GH 家族，其中 GH18、GH19、GH23、GH48 含有几丁质酶。大多数细菌来源的几丁质酶属于 GH18 家族，少数真菌来源的几丁质酶属于 GH19 家族。本研究的几丁质酶属于 GH18 家族，该酶的结构域包括 2 个类型 3 几丁质结合结构域（Cht BD3）和一个 GH18 家族酶催化结构域。Watanabe 等^[16]报道 Cht BD3 结构域在酶降解几丁质中发挥关键作用，它可持续作用几丁质底物并具有脱乙酰功能，更有利于几丁质酶催化域与底物结合，但具体机理并未完全阐述清楚。通常情况下，几丁质酶只含有一个几丁质结合结构域，本研究中的几丁质酶 Chi18A 有两个 Cht BD3 结构域，这样的结构有助于酶与不溶性几丁质的结合，从而提高酶水解能力。几丁质酶 Chi18A 的同源建模显示，该蛋白质含有 $(\beta\alpha)_8$ 桶状结构，是 GH18 家族几丁质酶典型的结构。在 GH18 家族中， β_3 和 β_4 链具有相似的结构，是两段高度保守的氨基酸片段，底物结合的部位就在保守序列 β_3 和 β_4 链形成的环状缝隙中。几丁质酶 Chi18A 的信息学分析与同源建模为研究其结构与功能的关系提供了理论参考。

4 结论

本文将来源于微泡菌 ALW1 的几丁质酶基因进行克隆和测序，并将该基因的编码产物进行信息学分析。结果显示，该几丁质酶的氨基酸序列与其他菌株来源的几丁质酶有 70% 左右的相似性。系统发育分析结果显示，该几丁质酶属于 GH18 家族，命名为 Chi18A；二级结构分析预测 Chi18A 主要由无规则卷曲和 α - 螺旋组成，结构域分析预测 Chi18A 有 2 个 Cht BD3 结构域和 1 个 GH18 家族催化结构域，三维结构模拟分析显示该蛋白质含有 $(\beta\alpha)_8$ 桶状结构。在后续的研究中，可进行该几丁质酶基因的体外表达、纯化和酶学性质研究以及几丁质酶 Chi18A 蛋白的分子改造，以改善其酶学性质。

[参考文献]

- [1] BRZEZINSKA M S, JANKIEWICZ U, BURKOWSKA A, et al. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection [J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(1): 71-81. DOI:10.1007/s00284-013-0440-4.
- [2] BHATTACHARYA D, NAGPURE A, GUPTA R K. Bacterial chitinases: properties and potential [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(1): 21-28. DOI:10.1080/07388550601168223.
- [3] CHANG Y F, SITANGGANG A B, WU H S. Optimizing biotechnological production of glucosamine as food ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742 [J]. *Journal of Food Technology*, 2011, 9(2): 75-82. DOI:10.3923/jftech.2011.75.82.
- [4] AZUMA K, OSAKI T, WAKUDA T, et al. Suppressive effects of *N*-acetyl-*D*-glucosamine on rheumatoid arthritis mouse models [J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1462-1465. DOI:10.1007/s10753-012-9459-0.
- [5] SHI S Y, WANG W, LIU L Q, et al. Effect of chitosan/nano-silica coating on the physicochemical characteristics of longan fruit under ambient temperature [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 118(1): 125-131. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.03.029.
- [6] CHEN J K, SHEN G R, LIU G L. *N*-acetyl glucosamine: production and applications [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(9): 2493-2516. DOI:10.3390/md8092493.
- [7] RATHORE A S, GUPTA R D. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives [J]. *Enzyme Research*, 2015, 2015(2): 1-8. DOI:10.1155/2015/791907.
- [8] PURUSHOTHAM P, POIDLE A R. Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4260-4271. DOI:10.1128/JB.06473-11.
- [9] GAO L, SUN J, SECUNDO F, et al. Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414 [J]. *Food Chemistry*, 2018, 261: 329-336. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.04.068.
- [10] YANG S, FU X, YAN Q. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii* [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192(9/10): 1041-1048. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.092.
- [11] WANG S L, LIN T Y, YEN Y H, et al. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase [J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(15): 2507-2515. DOI:10.1016/j.carres.2006.06.027.
- [12] KANG S C, PARK S, LEE D G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73(3): 276-281.
- [13] KIM Y H, PARK S K, HUR J Y, et al. Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a bio-control bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73 [J]. *Plant Pathology Journal*, 2017, 33(3): 318-328. DOI:10.5423/PPJ.FT.01.2017.0022.
- [14] ZHU Y B, WU L Y, CHEN Y H, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. *Microbiological Research*, 2016, 182: 49-58. DOI:10.1016/j.micres.2015.09.004.
- [15] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428. DOI:10.1021/ac60147a030.
- [16] WATANABE T, ARIGA Y, SATO U, et al. Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin [J]. *Biochemical Journal*, 2003, 376(1): 237-244. DOI:10.1042/BJ20030419.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)