

贡莎莎,孟庆玲,乔 军,等. 少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-801 基因的分子特征分析及其多克隆抗体制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):23-27.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.006

# 少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-801 基因的分子特征分析及其多克隆抗体制备

贡莎莎<sup>1</sup>, 孟庆玲<sup>1</sup>, 乔 军<sup>1</sup>, 钟文强<sup>1</sup>, 陈 英<sup>1</sup>, 才学鹏<sup>2</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃兰州 730046)

**摘要:**为了研究捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌几丁质酶的生物学功能,对少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶 AO-801 基因进行克隆和分子特征分析,通过大肠杆菌表达 AO-801 重组几丁质酶,利用镍柱纯化技术纯化目的蛋白,免疫小鼠后制备 AO-801 几丁质酶多克隆抗体。结果显示,几丁质酶 AO-801 基因序列与少孢节丛孢菌标准株 [*Arthrobotrys oligospora* Fres., 美国模式培养物集存库 (American type culture collection, 简称 ATCC) 24927] 的核苷酸序列同源性为 95.96%, 氨基酸序列的同源性为 97.34%。几丁质酶 AO-801 属于糖苷水解酶 18 家族,具有典型的几丁质酶催化区保守序列 SIGGW 和 LDGVDVDWE,无信号肽序列,其二级结构以无规则卷曲、 $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠为主要结构元件,三级结构中有  $(\alpha/\beta)_8$  的圆桶形结构。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western Blot) 分析表明,重组几丁质酶蛋白的分子量约为 59ku,与预期大小一致,与少孢节丛孢菌阳性血清能发生特异性反应。间接酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, 简称 ELISA) 法的检测结果显示,获得的抗 AO-801 多克隆抗体血清效价达到 1:25 600。

**关键词:**少孢节丛孢菌;几丁质酶;原核表达;蛋白纯化;多克隆抗体

**中图分类号:** S432.4<sup>+</sup>5; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0023-05

现有的研究发现,捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌产生的侵染性胞外蛋白酶在其侵染线虫时能够发挥重要作用<sup>[1-5]</sup>。然而,以往的研究多集中在探讨捕食线虫性真菌胞外酶丝氨酸蛋白酶的机制和功能上,鲜有对捕食线虫性真菌

少孢节丛孢菌的几丁质酶的相关报道。Yang 等已经从少孢节丛孢菌 (*Arthrobotrys oligospora*) 全基因组中鉴定出 16 个开放阅读框 (ORF) 编码假定的几丁质酶<sup>[5]</sup>,对其进行功能结构域、分子量和转录分析表明,大多数几丁质酶在碳源缺乏、含有几丁质底物或植物病原真菌时表达量上调,提示少孢节丛孢菌几丁质酶可能发挥重要作用。

少孢节丛孢菌是目前研究最多的一种捕食线虫性真菌,在自然界中广泛分布<sup>[2]</sup>。2011 年, Yang 等首次对捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌进行了全基因组测序<sup>[4]</sup>,对基因组编码的侵染性胞外蛋白酶进行了生物信息学分析,共发现和鉴定出 16 个几丁质酶,然而这些几丁质酶的生物学功能尚未

收稿日期:2017-08-21

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31460654, 31260601); 新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目 (编号:XJGRI2015038)。

作者简介:贡莎莎 (1991—), 女, 新疆博乐人, 硕士研究生, 主要从事动物寄生虫学研究。E-mail:1558560806@qq.com。

通信作者:孟庆玲, 博士, 教授, 主要从事动物寄生虫学研究。E-mail:xjmlqj@163.com。

root tips[J]. Plant Physiology, 1998, 117(3):745-751.

[41] Papernik L A, Bethea A S, Singleton T E, et al. Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat [J]. Planta, 2001, 212(5/6):829-834.

[42] Pellet D M, Papernik L A, Kochian L V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat (roles of root apical phosphate and malate exudation) [J]. Plant Physiology, 1996, 112(2):591-597.

[43] Akeson M A, Munns D N. Lipid bilayer permeation by neutral aluminum citrate and by three  $\alpha$ -hydroxy carboxylic acids [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 984(2):200-206.

[44] Shi B, Haug A. Aluminum uptake by neuroblastoma cells [J]. Journal of Neurochemistry, 1990, 55(2):551-558.

[45] Zhang W H, Ryan P R, Tyerman S D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots [J]. Plant Physiology, 2001, 125(3):1459-1472.

[46] Nishizono H, Ichikawa H, Suzuki S, et al. The role of the root cell

wall in heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* [J]. Plant and Soil, 1987, 101(1):15-20.

[47] Malone C, Koeppe D E, Miller R J. Localization of lead accumulated by corn plants [J]. Plant Physiology, 1974, 53:388-394.

[48] Kim S Y. Recent advances in ABA signaling [J]. Journal of Plant Biology, 2007, 50(2):117-121.

[49] 金 晶. 玉米逆境响应相关基因 *ZmUBP* 的功能鉴定与 *WRKY* 基因家族进化分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.

[50] 潘 妍. 柞柳 *Lea* 基因抗重金属功能及与 *eIF5A* 共转化山新杨的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.

[51] 唐东民, 伍 钧, 唐 勇, 等. 重金属胁迫对植物的毒害及其抗性机理研究进展 [J]. 四川环境, 2008, 27(5):79-83.

[52] 刘大丽. 谷胱甘肽合成相关酶在重金属污染生物修复中的分子机制及比较研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.

[53] 范兆乾. *AtATM3* 和 *CYP2E1* 基因增强转基因紫花苜蓿抗重金属和有机物能力研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2013.

被深入研究。为了研究少孢节丛孢菌在侵染线虫中高表达的几丁质酶 AO-801 的生物学功能,本研究对少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶 AO-801 基因进行克隆,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,拟纯化获得重组 AO-801 蛋白酶,制备高效价的多克隆抗体,为研究少孢节丛孢菌中该蛋白酶作用的分子机制奠定前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及试剂

捕食线虫性真菌少孢节丛孢菌新疆分离株 XJ-A1、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌株、*Escherichia coli* BL21(DE3)菌株和表达载体 pET32a,由石河子大学动物科技学院实验室保存。2 $\times$  Taq PCR Master Mix、透析袋,购自广州东盛生物科技有限公司。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、pMD19-T 载体、组氨酸标签(His-tag)融合蛋白纯化柱(SinoBio),购自 TaKaRa 公司。EZ Spin Column Fungal RNA Isolation Kits 试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。鼠抗 His 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,购自北京全氏金生物技术有限公司。Soluble TMB Substrate Solution,购自天根生化科技(北京)有限公司。 $T_4$  DNA 连接酶,购自 Promega 公司。

### 1.2 几丁质酶 AO-801 引物的设计

根据 GenBank 中登录的 AO-801 基因序列,用 Primer 5 软件设计合成 1 对特异引物,上、下游引物分别引入 *EcoR* I、*Xho* I 限制性内切酶位点,上游引物:5'-CCGGAATTC ATGAAGGCCATCTATGGACGTAAC-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点),下游引物:5'-CCGCTCGAGTCA AGCGCAAGCGCTGCG-3'(下划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

### 1.3 几丁质酶 AO-801 基因的扩增与克隆

将少孢节丛孢菌 XJ-A1 分离株接种于 YPSSA 培养基上,于 20 $^{\circ}\text{C}$  霉菌培养箱内培养 1 周。取适量菌丝,用 TaKaRa 真菌 RNA 提取试剂盒提取 XJ-A1 分离株 RNA,用 RT 试剂盒反转录成 cDNA,进行逆转录 PCR(RT-PCR)扩增。20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系:9  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,8  $\mu\text{L}$  PCR Mixture,各 0.5  $\mu\text{L}$  上下游引物,2  $\mu\text{L}$  提取的 cDNA 模板。AO-801 基因扩增反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$  5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  50 s,65 $^{\circ}\text{C}$  40 s,72 $^{\circ}\text{C}$  120 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收。将回收的 AO-801 基因片段与 pMD19-T 载体连接后转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选及菌液 PCR 验证后,送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

### 1.4 几丁质酶 AO-801 分子特征分析

将测序结果与少孢节丛孢菌标准株[美国模式培养物集存库(American type culture collection,简称 ATCC) 24927]的几丁质酶 AO-801 进行比对分析,并利用生物在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>,<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>,<http://www.expasy.org/tools/>, SMART, Prabi, SWISS-MODEL 等)进行相关生物信息学分析。

### 1.5 原核表达质粒 pET-AO801 的构建

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对 pMD19-T-AO801 和

pET32a 质粒进行双酶切,回收 pET32a 载体片段和 AO-801 目的片段,在  $T_4$  DNA 连接酶作用下,于 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜连接后转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在氨苄抗性平板上于 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养,挑取单菌落,再经菌液 PCR 和双酶切方法筛选阳性克隆(命名为 pET-AO801)。

### 1.6 目的蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析鉴定

将重组质粒 pET-AO801 转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,挑取阳性克隆于含氨苄抗性的 5 mL 液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 过夜培养,再取 3 mL 菌液接种于 200 mL 液体 LB 培养基中,培养至  $D_{600\text{nm}}$  约为 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside,简称 IPTG),进行诱导表达。诱导 6 h 后收集菌体,对重组菌的表达产物进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,简称 SDS-PAGE)和蛋白质印迹法(Western Blot)分析。

### 1.7 重组几丁质酶 AO-801 的纯化及多克隆抗体制备

诱导 6 h 后于 8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,加 15 mL 裂解液(lysis buffer)裂解菌体,用镍柱亲和层析法纯化重组蛋白。将纯化的重组蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混匀后按 0.2 mL/只的剂量皮下注射接种给小鼠,14、21 d 后再将纯化的蛋白与弗氏不完全佐剂混匀并注射小鼠,采血分离血清。

### 1.8 重组几丁质酶 AO-801 多克隆抗体效价的测定

用包被缓冲液将纯化的重组蛋白稀释为 10  $\mu\text{g/mL}$ ,酶标板各加入 100  $\mu\text{L}$ /孔,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。扣干,加入 300  $\mu\text{L}$ /孔洗涤缓冲液洗 3 次;用 150  $\mu\text{L}$ /孔封闭液于 37 $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h;洗涤 3 次后,加入不同稀释度的血清,100  $\mu\text{L}$ /孔,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,洗涤清洗 5 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:2 000)溶液,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。洗涤缓冲液清洗 5 次后,加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 TMB 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 min,加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 2 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

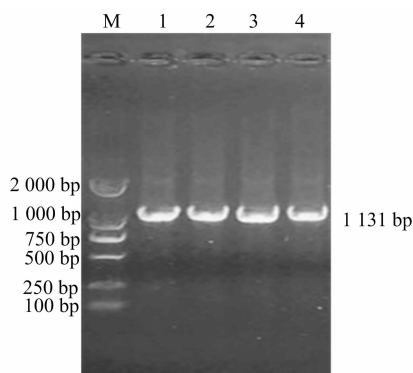
## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 扩增结果

以少孢节丛孢菌的 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明,PCR 扩增产物大小约为 1 100 bp,与 GenBank 中提供的 AO-801 基因片段大小一致(图 1)。

### 2.2 测序结果及序列分析

经测序,AO-801 基因全长 1 448 bp,有 3 个内含子序列,分别位于第 139~204、442~513 和 1 183~1 361 位核苷酸,内含子具有保守的 5'-GT、3'-AG 末端,符合真菌内含子特征;有 1 个 1 131 bp 的开放阅读框(ORF),编码 376 个氨基酸,无信号肽序列(图 2);与少孢节丛孢菌标准株(ATCC 24927)的几丁质酶基因 AO-801 核苷酸序列的同源性为 95.96%,氨基酸序列的同源性为 97.34%。Scanprosite 软件分析发现,该几丁质酶属于糖苷水解酶 18 家族,其特征序列为第 120~128 位氨基酸的 LDGVDVDWE;有 2 个高度保守的



M—DNA 分子质量标准; 1~4—RT-PCR 扩增产物

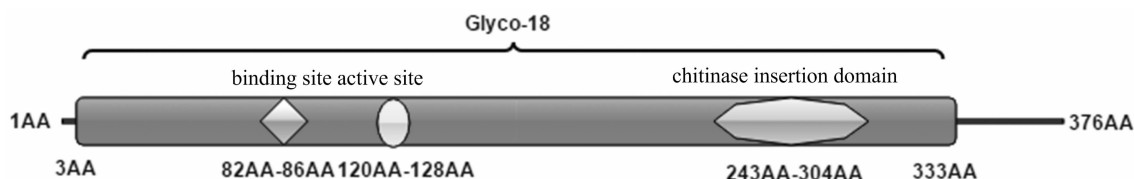
图1 *AO-801* 基因的 RT-PCR 扩增产物

区域 SIGGW、LDGVDVDWE, SIGGW 位于第 82 ~ 86 位氨基酸, 为底物结合位点, LDGVDVDWE 位于第 120 ~ 128 位氨基酸, 为水解酶催化活性位点。

经过 SMART 在线分析, *AO-801* 编码的蛋白具有 1 个

1	ATGAAGCCATCTATGGACGTAACCTCAAACCAAGACTTGAATGCCAAACAGTACACCCAGCTTGTGTCATTGCGCAAGATCAAT
1	M K A I Y G R N F K P Q D L N A K Q Y T H V L F A F A K I N
91	GGGCGAGCTGGAGAAATCGGTCTTGCTGACCCCTGGGCTGATACAGACATTCATTGGGATGAACCTGGGACCAACCGGGACCAACCTC
31	G Q T G E I G L A D P W A D T D I H W D E P W D Q P G T N L
181	TTCGGCATTGTTGGCAGCTTTACAAGCTCAAACGTCGCAACCGAAAGCTCAAGGTGATGTTATCCATAGGTGGATGGACTTACTCCCAG
61	F G I F W Q L Y K L K R A N R K L K V M L S I G G W T Y S Q
	substrate binding site
271	GACGGAGACCTCCCTGGCGGTGCGAGTACTCCCGAAGCTCGAGATACATTCGCTCGTACGCCGTGCAAAATGGTCAGAAATTTTGGCCCTC
91	D G D L P G G A S T P E R R D T F A R T A V E M V R N N F G L
361	GACGGTGTGACGTCGACTGGGAATACCCAAATGATGCAACTGAAGTCGCAACTTTGTCGATCTTTAAGACGCATCCGCCAGTACCTC
121	D G V D V D W E Y P N D A T E V A N F V D L L R R I R Q Y L
	active site
451	GACATATGAATCTCGGTTTGAGATCTCAGTTGCTGTACCATGTGGTCTTGACCAGCTCCAAAACTTGACGCTGCTGGAATGGACAAA
151	D I L N P R F E I S V A V P C G L D Q L Q K L D A A G M D K
541	TATCTCAGCTTCTGGAATTTGATGGCCTACGACTTTTCAGGTCCGTGGTCTGCTGTTTCGGGACATGCTTCAAACGTTTATTATTCGAAG
181	Y L S F W N L M A Y D F S G P W S S V S G H A S N V H Y S K
631	ACGAACCCAGCCTCGACAGACTATTTCATTCGATAAACTCTCGACTTTTCAAGGGTCCGTAAAGCCAGAGAAAATGGTGATGGGAATG
211	T N P A S T D Y S F D K T L D F F K G S V K P E K L V M G M
721	CCGTTATATGGCCGAGGTTTTCGCGACACAGATGGGCCGGGAAAACCGTACAATGGTGGCGGTGCCGGGCACTGGGAGGCAGGCGTCTGG
241	P L Y G R G F A D T D G P G K P Y N G G A G H W E A G V W
	chitinase insertion domain
811	GATTATAAAGATCTCCCGTTGGCAGGTTGCAAGTCAATGAGGATCCGTATGCTATCGCCGCTGGAGCTATGATGCCCTACAAAATA
271	D Y K D L P L A G S K V N E D P Y A I A A W S Y D A A T K L
901	ATGGTATCGTTTGACACACCAACGTTGCCAAGTGAAGGCCAGTATATCAAGGCAAGGGGCTGGGAGGAGCGATGTGGTGGGAGACT
301	M V S F D T P N V A K W K A Q Y I K A K G L G G A M W W E T
991	AGTGGGGACAAAGTCGGTTCGGAGTCTCTCGTTTCAGACTGTTATAGATGCCCTGGGAGGGACGAAAGCATTGGATACGCACAAGAATACG
331	S G D K V G S E S L V Q T V I D A L G G T K A L D T H K N T
1 081	ATTGCATATCTGGATCTAAATACGACAATGTTTCGACGCTTTCGCTTGA
361	I A Y P G S K Y D N V R S A C A *

双下划线区域表示糖基水解酶18家族保守的水解区域 (SIGGW, LDGVDVDWE), substrate binding site表示底物结合位点, active site表示酶活性位点; 单下划线区域表示几丁质酶插入区域(chitinase insertion domain)

图2 少孢节丛孢菌几丁质酶 *AO-801* 核苷酸序列和氨基酸序列图3 少孢节丛孢菌几丁质酶 *AO-801* 基因编码蛋白的结构域模式

Glyco-18 结构域, 位于第 3 ~ 333 位氨基酸; Interpro 软件预测结果显示, 几丁质酶 AO-801 存在 1 个几丁质酶插入域, 位于第 243 ~ 304 位氨基酸位置 (图 3)。SWISS-MODEL 软件的三级结构预测结果 (图 4) 显示, 几丁质酶 AO-801 具有 ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> 的三磷酸异构酶 (triosephosphate isomerase, 简称 TIM) 桶形结构域 (简称 TIM 桶), 与烟曲霉 YJ-407 的几丁质酶结构相似。

### 2.3 重组质粒 pET-AO801 的双酶切鉴定

重组质粒 pET-AO801 经 PCR 和双酶切鉴定, 得到大小约为 1.1 kb 的插入片段, 与预期一致 (图 5)。测序结果表明, 插入片段大小为 1 131 bp, 为目的基因片段, 表明开放阅读框正确。

### 2.4 重组蛋白 AO-801 的诱导表达、纯化及 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析

阳性菌落经 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后提取蛋白, 表达产物经 SDS-PAGE 分析 (图 6) 后, 在相对分子质量约为 59 ku 处可见特异性反应条带, 分子量与预期值相同。利用镍柱纯化

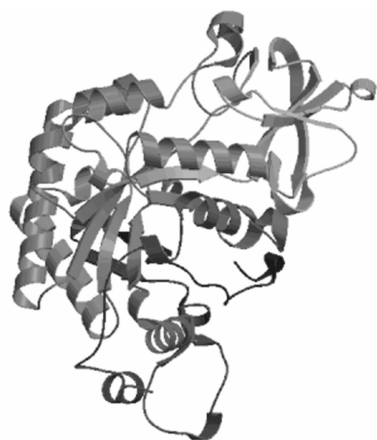
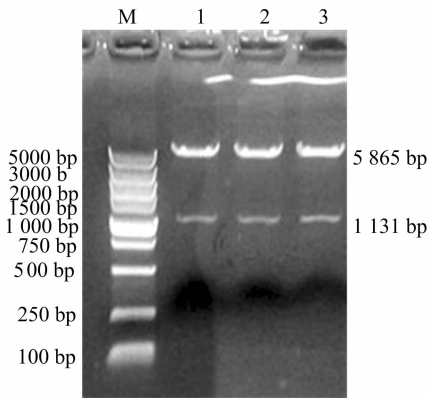


图4 AO-801 几丁质酶三级结构的预测结果



M—DNA 分子质量标准；  
1~3—pET32a-AO801 重组质粒的双酶切产物  
图5 重组质粒 pET-AO801 的双酶切鉴定结果

技术纯化重组蛋白酶，经 SDS - PAGE 分析，得到单一条带，且与预期大小一致。Western Blot 分析(图 7)表明，表达的重组

对照 1 对照 2

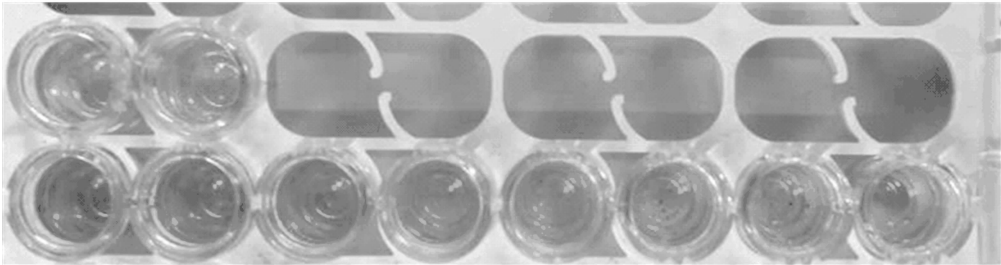
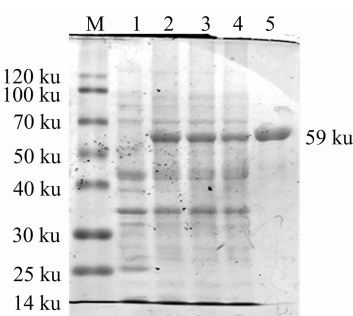


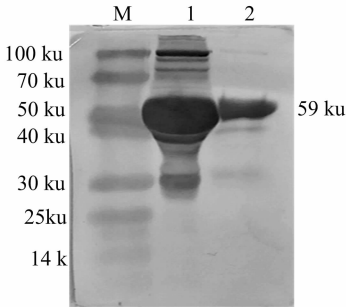
图8 间接 ELISA 检测多克隆抗体结果

3 讨论

目前国内外已有报道表明，少孢节丛孢菌在侵染线虫过程中分泌的胞外水解酶(蛋白酶、胶原酶和几丁质酶)在侵入线虫表皮和降解线虫细胞的过程中发挥着重要作用<sup>[2-4]</sup>。几丁质是由 N - 乙酰 -  $\beta$  - D - 氨基葡萄糖以  $\beta$  - 1,4 糖苷键连接而成的链状高分子化合物，是含量仅次于纤维素的第二大生物高聚物，也是大多数线虫体壁及其虫卵外壳的主要成分<sup>[5]</sup>。已有研究表明，许多真菌在其整个生长过程中都会产生几丁质酶，源于致病性真菌的几丁质酶能催化几丁质  $\beta$  -



M—蛋白分子质量标准；1—pET32a 空载体；2~4—重组载体 pET32a-AO801 诱导 6 h；5—纯化重组 AO801 蛋白酶  
图6 重组目的蛋白AO-801 SDS-PAGE 分析结果



M—蛋白分子质量标准；1—未纯化的重组 AO801 蛋白酶；  
2—纯化的重组 AO801 蛋白酶  
图7 重组目的蛋白 AO-801 的 Western-Blot 分析结果

蛋白酶能与少孢节丛孢菌阳性血清发生特异性血清学反应。  
2.5 间接酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, 简称 ELISA) 检测多克隆抗体

用间接 ELISA 测定抗 AO - 801 多克隆抗体效价。将抗血清稀释至不同浓度 (1 : 200 ~ 1 : 25 600) , 检测结果显示，多克隆抗体效价达到 1 : 25 600 (图 8)。

1,4 糖苷键水解，对真菌侵入线虫表皮屏障并进一步降解宿主细胞有重要的作用<sup>[1,3-5]</sup>。

1989 年 Dackman 等在捕食线虫性真菌培养液中检测到几丁质酶活性，并发现几丁质酶的活力水平与致病性密切相关<sup>[6]</sup>。近年来，Taib 等在烟曲霉中发现了 14 个几丁质酶<sup>[7]</sup>，且烟曲霉 YJ - 407 几丁质酶的晶体结构已有初步研究<sup>[8]</sup>。此外，Dünkler 等在白色念珠菌中发现 4 个几丁质酶<sup>[9]</sup>，在丝状真菌构巢曲霉中发现了 18 个几丁质酶，在绿僵菌中发现了 24 个几丁质酶<sup>[10]</sup>，越来越多的有功能的几丁质酶不断在细菌、病毒、真菌、植物以及动物等不同生物上被发现。

本研究中对少孢节丛孢菌新疆分离株 XJ - A1 几丁质酶基因 AO - 801 进行了克隆和分子特征分析,发现 AO - 801 酶属于糖苷水解酶 18 家族,也具有类似的结构域,含有几丁质底物结合位点、水解酶催化活性位点<sup>[11-14]</sup>,同时还发现 1 个几丁质酶插入域(chitinase insertion domain,简称 CID)。许多 GH18 中的几丁质酶含有 CID,通常 CID 由 5 个或 5 个反平行  $\beta$  - 折叠和 1 个  $\alpha$  - 螺旋组成,并且其插入 TIM 桶的第 7 个  $\alpha$  - 螺旋和第 7 个  $\beta$  - 折叠之间<sup>[15]</sup>。CID 与 TIM 桶能够使几丁质酶和底物牢固结合,从而更有利于底物的降解。Li 等将来自古细菌、细菌、真菌、植物和动物的共 27 个含有几丁质酶插入域的几丁质酶序列进行比对和分析,确定了 1 组高度保守的疏水残基对几丁质酶的折叠和结构稳定性很重要,并推测 TIM 桶结构域 + CID 可以通过提供深的底物结合裂缝来结合长链底物,但是关于 CID 在几丁质酶发挥功能中的作用尚未完全确定<sup>[16]</sup>。少孢节丛孢菌几丁质酶 AO - 801 存在的 TIM 桶结构域和 CID 可能预示其能更好地与底物结合,可能在真菌捕食线虫的过程中发挥重要作用。此外,Arakane 等发现,高度糖基化的接头可以保护几丁质酶免于发生蛋白水解,而在 AO - 801 中并未发现存在糖基化位点<sup>[17]</sup>。

真菌在其整个生长过程中能产生多种几丁质酶,不同真菌几丁质酶的生物学功能及其在致病过程发挥的作用也存在差异<sup>[18-19]</sup>。Arnold 等报道的 GH18 可能参与线虫的蜕皮以及幼虫孵化等过程<sup>[20-21]</sup>。Khan 等将拟青霉菌的几丁质酶作用于爪哇根结线虫虫卵,发现几丁质酶显著改变了卵壳结构,并且卵黄层被分裂并失去其完整性<sup>[22]</sup>。少孢节丛孢菌是新疆地区分布广泛的捕食线虫性真菌,通过对捕食线虫性真菌胞外水解酶——几丁质酶功能的深入研究将有助于开发适合新疆地区的线虫防控真菌制剂。

#### 参考文献:

- [1] Tzelepis G, Dubey M, Jensen D F, et al. Identifying glycoside hydrolase family 18 genes in the mycoparasitic fungal species *Clonostachys roseae* [J]. Microbiology, 2015, 161 (7): 1407 - 1419.
- [2] Zhao H, Qiao J, Meng Q, et al. Expression of serine proteinase P186 of *Arthrobotrys oligospora* and analysis of its nematode - degrading activity [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108 (6): 1485 - 1494.
- [3] 赵海龙, 孟庆玲, 乔 军, 等. 少孢节丛孢菌 XJ - A1 几丁质酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24 (3): 26 - 32.
- [4] Yang J K, Wang L, Ji X L, et al. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode - trap formation [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7 (9): e1002179.
- [5] Yang J, Yu Y, Li J, et al. Characterization and functional analyses of the chitinase - encoding genes in the nematode - trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* [J]. Archives of Microbiology, 2013, 195 (7): 453 - 462.
- [6] Dackman C, Chet I, Nordbring - Hertz B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity [J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 62 (3): 201 - 208.
- [7] Taib M, Pinney J W, Westhead D R, et al. Differential expression and extent of fungal/plant and fungal/bacterial chitinases of *Aspergillus fumigatus* [J]. Archives of Microbiology, 2005, 184 (1): 78 - 81.
- [8] Hu H Y, Wang G G, Yang H T, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a native chitinase from the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* YJ - 407 [J]. Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography, 2004, 60 (5): 939 - 940.
- [9] Dünkler A, Walther A, Specht C A, et al. *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the CtsI chitinase of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42 (11): 935 - 947.
- [10] Junges A, Boldo J T, Souza B K, et al. Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e107864.
- [11] Funkhouser J D, Aronson N N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family [J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7 (1): 96.
- [12] Huang Q S, Xie X L, Liang G, et al. The GH18 family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions [J]. Glycobiology, 2012, 22 (1): 23 - 34.
- [13] Tellam R L. Protein motifs in filarial chitinases: an alternative view [J]. Parasitology Today, 1996, 12 (7): 291.
- [14] Hollis T, Monzingo A F, Bortone K, et al. The X - ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* [J]. Protein Science, 2000, 9 (3): 544 - 551.
- [15] Arimori T, Kawamoto N, Shinya S, et al. Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A - 471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288 (26): 18696.
- [16] Li H, Greene L H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin - binding [J]. PLoS One, 2010, 5 (1): e8654.
- [17] Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, et al. Properties of catalytic, linker and chitin - binding domains of insect chitinase [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 33 (6): 631.
- [18] 张丹丹, 刘廷辉, 赵 丹, 等. 球孢白僵菌胞外酶的活性与其毒力的相关性 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (2): 93 - 95.
- [19] 刘蒲临, 程德勇, 缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌 M64 的产酶条件优化及部分酶学性质研究 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44 (10): 468 - 471.
- [20] Arnold K, Brydon L J, Chappell L H, et al. Chitinolytic activities in *Heligmosomoides polygyrus* and their role in egg hatching [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1993, 58 (2): 317 - 323.
- [21] Adam R, Kaltmann B, Rudin W, et al. Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271 (3): 1441 - 1447.
- [22] Khan A, Williams K L, Hkm N. Effects of paecilomyces lilacinus protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles [J]. Biological Control, 2004, 31 (3): 346 - 352.