

王水怡, 刘丹丹, 杜少磊, 等. 圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株几丁质酶 AC-chi6195 基因的克隆表达及生物学活性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 64-74.

WANG S Y, LIU D D, DU S L, et al. Cloning, expression and bioactivity analysis of chitinase AC-chi6195 gene from *Arthrobotrys conoides* AC-XJ strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 64-74.

圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株几丁质酶 AC-chi6195 基因的克隆表达及生物学活性研究

王水怡^{1,2#}, 刘丹丹^{1,2#}, 杜少磊^{1,2}, 刘雨桐^{1,2}, 姜冰冰^{1,2}, 朱慧茹^{1,2},
巴音查汗^{1,2}, 张杨^{1,2}, 李永畅^{1,2}, 张伟^{1,2*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆草食动物新药研究与创制重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 旨在探究圆锥节丛孢菌几丁质酶的生物学功能。在圆锥节丛孢菌新疆株 AC-XJ 全基因组测序基础上, 选取几丁质酶基因 AC-chi6195 为研究对象, 对其进行克隆与分子特征分析并原核表达获得重组蛋白, 采用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法测定该重组蛋白的酶活性, 分析该重组蛋白在不同 pH 值、温度、底物、金属离子及化学试剂条件下的酶学特性, 将其作用于秀丽隐杆线虫及马圆形线虫三期幼虫并分析其生物学功能。结果: AC-chi6195 基因全长 1 453 bp, 有 2 个内含子序列, 共编码 398 个氨基酸, AC-chi6195 属于糖基水解酶 18 家族且三级结构为典型的几丁质酶三磷酸异构酶桶形结构; 遗传进化分析显示其与少孢节丛孢菌 XJ-A1 株几丁质酶 AO-379 亲缘关系相对最近; SDS-PAGE 分析显示, 重组蛋白 AC-chi6195 分子质量约为 42 kDa; 采用 Ni 柱层析法结合 Western blot 检测显示, 获得了纯化的目的蛋白; DNS 还原糖法检测显示, 该重组几丁质酶活性为 102 U/mg; 酶学特性分析显示, 该酶的最适反应条件为 pH=7, 40 °C, 1, 4-二硫代苏糖醇 (DTT)、SDS、Cu²⁺ 对其有抑制作用, 该酶可降解胶体几丁质和少量壳聚糖; 用重组几丁质酶 AC-chi6195 分别处理秀丽隐杆线虫和马圆形线虫三期幼虫 12、24、36 h 后, 秀丽隐杆线虫死亡率分别为 65%、93%、100%, 马圆形线虫三期幼虫死亡率分别为 75%、97%、100%。本研究结果为捕食性真菌高效杀线虫酶制剂的研发提供了依据。

关键词: 圆锥节丛孢菌; 几丁质酶; 酶学特性; 生物学活性

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)05-0064-11

Cloning, expression and bioactivity analysis of chitinase AC-chi6195 gene from *Arthrobotrys conoides* AC-XJ strain

WANG Shuiyi^{1,2#}, LIU Dandan^{1,2#}, DU Shaolei^{1,2}, LIU Yutong^{1,2}, JIANG Bingbing^{1,2}, ZHU Huiru^{1,2},
Bayinchahan^{1,2}, ZHANG Yang^{1,2}, LI Yongchang^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Xinjiang Key Laboratory for Research and Development of New Herbivore Drugs, Urumqi, 830052, China)

Abstract: To explore the biological functions of chitinases from *Arthrobotrys conoides*, this study was focused on the cloning and molecular characterization of chitinase gene AC-chi6195 from the Xinjiang strain (AC-XJ) of *Arthrobotrys conoides*, which was previously sequenced by our research group. The gene was cloned and expressed in prokaryotes to obtain recombinant proteins. The enzymatic activity of the recombinant chitinase was determined using the DNS method; and its enzymatic properties under various conditions such as pH, temperature, substrates, metals, and chemical reagents were analyzed. Furthermore, the biological function of the recombinant chitinase was assessed by treating the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Strongylus equinus* third-stage larvae. The results showed that the AC-chi6195 gene was 1 453 bp in length, and that it contains two intron sequences and encodes 398 amino acids. AC-chi6195 belonged to the glycosyl hydrolase 18 family and had a typical chitinase three-dimensional structure in the form of a barrel. Phylogenetic analysis revealed that it was relatively

收稿日期: 2024-04-30; 修回日期: 2025-03-17

基金项目: 中央引导地方科技发展专项基金项目 (ZYD2023C03-2); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目子课题 (2022A02013-2-6)

第一作者: 王水怡, 女, 硕士研究生; 刘丹丹, 女, 副教授, 硕士生导师。#共同第一作者

* 通信作者: 张伟, 副教授, 主要从事动物寄生虫学研究, E-mail: zw2017xjau@163.com。

closely related to the chitinase AO-379 from the fungus the *Arthrobotrys oligospora* XJ-A1 strain. The SDS-PAGE results indicated that the recombinant chitinase AC-chi6195 had a molecular weight of approximately 42 kDa. The purified target protein was verified through purification by Nickel column chromatography and identification by Western blot. The DNS assay demonstrated that the recombinant chitinase had an activity of 102 U/mg. The enzymatic characterization analysis showed that the optimal reaction conditions for this enzyme were pH = 7 and 40 °C, and DTT, SDS; and Cu²⁺ exhibited inhibitory effects. The enzyme degraded colloidal chitin and a small amount of chitosan. After treating the third-stage larvae of *C. elegans* and *S. equinus* with the recombinant chitinase AC-chi6195 for 12, 24, and 36 hours, the mortality rates were 65%, 93%, and 100%, respectively, for *C. elegans*; and 75%, 97%, and 100%, respectively, for *S. equinus* third-stage larvae. These findings contributed to the development of efficient chitinase biopesticides from predatory fungi.

Keywords: *Arthrobotrys conoides*; chitinase; enzymatic properties; biological activity

胃肠道线虫病是全球畜牧业产量损失的主要原因之一,降低了家畜的生长发育速度和育肥效果,当病情严重时还会造成家畜死亡。目前治疗线虫感染主要使用苯并咪唑类、咪唑类和大环内酯类驱虫药,但化学药物易使线虫产生耐药性,且易产生药物残留,危害人体健康并造成环境污染,因此迫切需要研发新型防控线虫病的绿色环保生物制剂^[1]。捕食性真菌是一种捕获、杀死和消化线虫的微型真菌,其作为自然界控制线虫数量的重要生物因子,能将线虫作为主要营养来源或腐生生活的补充来减少牧场上的线虫数量。捕食性真菌可在不损害宿主动物的情况下,减少寄生性胃肠道线虫的数量,且该类真菌在自然界广泛存在,对环境无污染,具有良好的应用前景^[2]。

捕食性真菌产生专门的捕食结构来捕获线虫,在捕食渗透过程中,真菌通过捕食结构的机械力和胞外水解酶(如蛋白酶和几丁质酶)的组合固定并分解线虫体壁,随后菌丝旺盛生长,侵入线虫,并从感染的线虫中伸出。捕食性真菌分泌的几丁质酶能水解线虫表皮和线虫卵的几丁质层,在线虫的固定、表皮侵入和线虫细胞降解等过程中起重要作用^[3]。在侵袭性真菌如食线虫真菌和昆虫致病性真菌研究中,几丁质酶和蛋白酶均被认为是与毒力相关的主要酶类,如球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[4-5]、红绶曲霉(*Aspergillus nomius*)^[6]、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)^[7]等。在多种真菌中,毒力较高的菌株均表现出较高的蛋白酶和几丁质酶活性,同时蛋白酶与几丁质酶的活性与寄主死亡率高度相关,这些均表明几丁质酶在毒力测定与筛选强毒菌株方面起重要作用。

目前捕食性真菌研究最多的模式真菌是少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*),圆锥节丛孢菌(*Arthrobotrys conoides*)与其在形态与捕食方式上相似,国内外对于圆锥节丛孢菌研究主要集中在该菌的捕食率测定和形态学、分子特征及捕食过程研究上,对捕食机制研究较少^[8]。在近缘真菌少孢节丛孢菌几丁质酶研究中,原核表达纯化后的几丁质酶 AO-483 具有优秀的杀线虫活性,用重组几丁质酶 AO-483 处理秀丽隐杆线虫, I 期幼虫在 6 h 时全部死亡、IV 期幼

虫至 12 h 时全部死亡^[9];真核表达的几丁质酶 AO-801 处理秀丽隐杆线虫 12 h 后线虫全部死亡且体壁收缩,失去弹性;用 AO-801 处理线虫卵,6 h 后虫卵停止发育,12 h 后卵壳溶解^[10];这都表明几丁质酶对高效绿色杀线虫制剂的研制上具有良好应用潜力。然而目前在圆锥节丛孢菌中并未对几丁质酶杀虫作用进行研究。本实验室前期对圆锥节丛孢菌新疆株全基因组测序,共鉴定出几丁质酶基因数量为 20 个,从中选取几丁质酶基因 AC-chi6195 进行原核表达、酶活性测定及酶学性质研究,同时探讨其对线虫的生物学功能。研究结果为进一步探究捕食性真菌胞外几丁质酶作用机制提供理论支持,也为高效杀线虫生物酶制剂提供物质基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及线虫

大肠杆菌 OP50、圆锥节丛孢菌及秀丽隐杆线虫由新疆农业大学寄生虫实验室保存,含有马圆形线虫虫卵的粪便采自乌鲁木齐县某驴场。

1.2 主要试剂

马铃薯葡萄糖水(PD)购自青岛海博生物技术有限公司;线虫生长培养基(NGM)购自上海语纯生物科技有限公司;兔抗 His 标签抗体、HRP-羊抗兔 IgG 购自 Affinity 公司;大肠杆菌 DH5 α 及 Rosetta (DE3) 感受态细胞、cDNA 反转录试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;真菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;柱式真菌总 RNA 抽提纯化试剂盒、RNase Free DNA 清除试剂盒均购自生工生物公司;质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;His 标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)购自碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京盒子生工科技有限公司。

胶体几丁质的制备^[11]:称取 4 g 几丁质粉末与 120 mL 冰醋酸混合,室温搅拌 24 h 后常温下功率 250 W 超声破碎 60 min 后继续搅拌 30 h。调节溶液 pH 值到 5.5,继续超声波破碎 1 h 并常温搅拌 18 h。用去离子水将其配制成浓度为 1% 的胶体几丁质并调

节 pH 至中性。

1.3 几丁质酶 AC-chi6195 的克隆及生物信息学分析

1.3.1 引物设计与合成

实验室前期对圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株进行了全基因组测序，以全基因组测序数据中几丁质酶基因 AC-chi6195 为模板，使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物：上游引物序列为 5'-CGG-GATCCCGATGTTGTTCAAATACA-3'，下划线处为 *Bam*H I 酶切位点；下游引物序列为 5'-CCAAGCTT-GGCTAGCTGGACAAGAAG-3'，下划线为 *Hind* III 酶切位点，引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.3.2 圆锥节丛孢菌基因组 DNA、RNA 提取及 cDNA 合成

菌丝收集：将圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株接种至灭菌 PD 液体培养基中，26 °C 条件下培养 10 d，过滤冲洗并收集菌丝备用。

基因组 DNA 提取：将菌丝按照真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取，置于 -20 °C 保存备用。

RNA 提取及 cDNA 合成：将菌丝按照真菌总 RNA 抽提纯化试剂盒说明书提取圆锥节丛孢菌总 RNA，然后使用 cDNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，置于 -20 °C 保存备用。

1.3.3 几丁质酶 AC-chi6195 基因的克隆测序及生物信息学分析

分别以圆锥节丛孢菌基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，目的片段扩增条件为：94 °C 5 min；94 °C 30 s，61 °C 30 s，72 °C 100 s，30 个循环；72 °C 10 min。PCR 扩增产物经纯化、回收后与载体 pMD19-T 连接，转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，37 °C 过夜培养。挑取单菌落并进行 PCR 鉴定，将 PCR 鉴定为阳性的转化子送往上海生工生物工程公司进行测序。

利用 SignalP、InterPro、Phyre2 等生物分析软件对 AC-chi6195 基因及其编码蛋白进行序列分析和结构预测，并使用 MEGA 6.0 软件以邻接法 (NJ) 对 AC-chi6195 氨基酸序列和 14 个不同真菌几丁质酶氨基酸序列构建系统发育进化树。

1.4 几丁质酶 AC-chi6195 基因的原核表达及纯化

1.4.1 重组 pET28a-AC-chi6195 质粒的构建与鉴定

以圆锥节丛孢菌 cDNA 为模板，PCR 扩增 AC-chi6195 基因，通过琼脂糖凝胶电泳检测目的条带大小并回收目的片段。将 pET-28a 空载质粒与目的片段分别使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切，酶切产物在 T4 连接酶作用下 16 °C 过夜连接。将重组质粒转化

进 Rosetta (DE3) 大肠杆菌表达菌株，并对重组质粒进行菌液 PCR 鉴定、双酶切鉴定及测序。

1.4.2 重组 pET28a-AC-chi6195 质粒的原核表达、诱导条件优化与蛋白纯化

将 1.4.1 鉴定菌液扩大培养至在 600 nm 波长下测定的吸光度值 ($OD_{600\text{nm}}$) 为 0.6~0.8 后，对其进行诱导条件优化：时间筛选范围为 0~8 h，IPTG 诱导浓度筛选范围为终浓度 0~2 mmol/L，诱导温度筛选为 16、25、37 °C。收集在最适条件下诱导的菌液使用 His 标签纯化试剂盒对蛋白进行纯化，同时以兔抗 His 标签抗体为一抗、HRP-羊抗兔 IgG 为二抗对重组蛋白进行 Western blot 鉴定。对纯化后的蛋白复性，具体步骤：将纯化蛋白转移至透析袋中，使用终浓度为 6、4、2、1 mol/L 尿素及 0.01 mol/L PBS 依次透析 6~8 h，收集透析袋中蛋白。

1.5 重组几丁质酶 AC-chi6195 的酶学特性

1.5.1 重组几丁质酶 AC-chi6195 活性测定

按照 BAC 蛋白浓度测定试剂盒说明书对重组几丁质酶 AC-chi6195 蛋白浓度进行测定。

使用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法测定几丁质酶活性：设置煮 10 min 后失活的重组几丁质酶作为阴性对照。将 50 μ L 重组几丁质酶与阴性对照分别与 200 μ L 1% 的胶体几丁质混匀，50 °C 反应 30 min；加入 500 μ L DNS 试剂，沸水浴 5 min，10 000 r/min，5 min，取上清液测定 $OD_{540\text{nm}}$ 值。将吸光度值带入 N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准曲线 (NAG) 计算几丁质酶活性。

1.5.2 pH 值对重组几丁质酶 AC-chi6195 的影响

最适反应 pH 值：在 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 条件下，分别测定重组几丁质酶相应酶活性。

pH 稳定性：将重组几丁质酶分别在 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 条件下 4 °C 放置 12 h，在最适条件下测定重组几丁质酶 AC-chi6195 的 pH 稳定性。

1.5.3 温度对重组几丁质酶 AC-chi6195 的影响

最适反应温度：在反应温度为 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 和 70 °C 条件下，分别测定重组几丁质酶相应酶活性。

热稳定性：将重组几丁质酶分别放置在 20~70 °C 的不同温度下放置 2 h，每隔 20 min 后在最适条件下测定重组几丁质酶 AC-chi6195 的热稳定性。

1.5.4 底物对重组几丁质酶 AC-chi6195 的影响

分别配制 1% 的几丁质粉末、胶体几丁质、壳聚糖、羧甲基纤维素钠作为底物，在最适条件下测定底物对酶活性的影响。

1.5.5 金属离子及化学试剂对重组几丁质酶 AC-chi6195 的影响

分别配制 1 和 5 mmol/L 的 $MgCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 KCl 、 $NaCl$ 等含有金属离子的盐溶液, 在最适反应条件下测定金属离子对酶活性的影响。

分别配制 1 和 5 mmol/L 的二硫苏糖醇 (DTT)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、巯基乙醇、SDS, 在最适反应条件下测定化学试剂对酶活性的影响。

1.6 重组几丁质酶 AC-chi6195 对线虫降解活性影响

1.6.1 线虫悬液的制备

秀丽隐杆线虫悬液的制备: 将 NGM 固体培养基加入 0.6 mL 的大肠杆菌 OP50, 放入 37 °C 的恒温生化培养箱中培养 12 h 后, 将原培养基上密集的秀丽隐杆线虫部分切下来, 转移到新的培养基中。培养 10 d 后, 用蒸馏水冲下来, 保存备用。

马圆形线虫三期幼虫悬液的制备: 将患驴粪便碾

碎至搪瓷盘中, 27 °C 培养约 7~10 d, 将搪瓷盘盖子上线虫用蒸馏水冲下来, 保存备用。

1.6.2 重组几丁质酶对线虫的降解活性

设置磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 为对照组, 50 mg/mL 重组几丁质酶 AC-chi6195^[12] 为试验组, 各组分别加入到 12 孔平底细胞培养板中, 每孔添加 2 mL 对应样品和 200 条线虫, 每组设置 3 个平行试验。在 25 °C 条件下分别在 12、24、36 h 统计各组线虫死亡率, 并观察线虫体壁变化状况。

2 结果与分析

2.1 AC-chi6195 基因的 PCR 扩增与克隆

PCR 结果显示 (图 1), AC-chi6195 以圆锥节丛孢菌基因组 DNA 为模板进行扩增, 得到 1 453 bp 的目的片段; 以圆锥节丛孢菌 cDNA 为模板进行扩增, 得到 1 197 bp 的目的片段, 与全基因组测序数据中预测的基因大小一致。

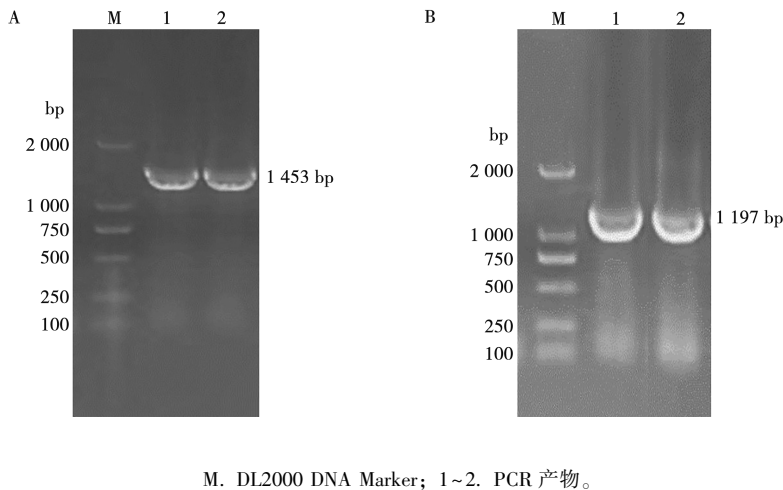


图 1 AC-chi6195 基因 DNA (A) 和 cDNA (B) 扩增电泳产物

2.2 AC-chi6195 基因编码蛋白的分子特征分析

AC-chi6195 序列中包含 2 个内含子, 内含子都以 GT 开头, AG 结尾, 分别位于 210~394、679~751 位核苷酸, 具有真菌内含子的共同特征。AC-chi6195 基因编码 398 个氨基酸, 与少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶 AO-379 基因序列的同源性为 87.04%,

氨基酸序列同源性为 89.50%。AC-chi6195 序列开头第 1~20 位氨基酸为信号肽结构, 第 128~132 为糖基水解酶 18 家族底物结合位点区域, 第 172~180 为水解酶催化活性位点 (图 2)。利用 Phyre2 软件预测蛋白三级结构显示几丁质酶 AC-chi6195 具有典型的 GH18 几丁质酶三磷酸异构酶桶形结构域 (图 3)。

```

1   ATGTGTTCAAATACATCGCCTCCCTCGCCGTCCTGGCATCTTCCGCCGTCGCACAGGCCAGCTACATAGCGGGTACAATGCAGCTTTC
1   M L F K Y I A S L A V L A S S A V A Q A S Y I G G Y N A A F
91  AAGAAATATGACCGTGTCTACTGGGGTCAGAAATGCCGGTGCCAGCGTTGACCCAAACAAGCAATCCAACCTACTCAAGACATGCAATAAC
31  K N H T A V Y W G Q N A G A S V D P N K Q S N L L K T C N N
181 ACCAACATCGATGTGGTCATTATTAGCTTTGTGACCAAGTTCAAAGGAAAGCGGGGGTCCCAATTgttaagacacactctctaotccata
61  T N I D V V I I S F V T K F K G K A G V P I
271 ttcotacccttgtctttttatgtgatctgttgcgcaacggcttccttgcatctgcatgcagtgacoggtttttttgcggtcgggggaatc
361 gatctgcttgtttccgttccatctcgtcgggtgcgtaoactcggatgggttaotgtctttgtagCTCAACCTGTCAAACCAATGC
83                                     L N L S N Q C
451 GGCAATGTCTTCCCTTATCGGGAAAATCCAAGAATCTGACTGATGTCTTGAACGTCTCTGATATTGGAGAAAATGATCACTCAATGCCAG
91  G N V F P Y A E N P K N L T D V L N C P D I G E H I T Q C Q
541 GGACTCGGAAAGAAGGTTCTTTTGTCTTTGGGCGGATCGACTTATCGAGATGCAGCATGGAAAAGTGTCTGATGCCCCGTGATACTAGC
121 G L G K K V L L S L G G S T Y R D A A W K S A A D A R D T S
631 AACACTCTTTGGGCTATGTTTGGCCCTCCAGTTCGTATAAATATCGACCTTTCGGTAATGCAACTGTTGATGGATTGCACTTGGTgagt
151 N T L W A M F G P P S S Y K Y R P F G N A T V D G F D L
721 aacaaaaatgctgattttgtgatcttcatocacatcgggatagaaacttcttaoaaatgtattctctataggACTTCGAAATATGTAGCCAAATCA
179                                     D F E Y V A N Q
811 GCCTTTCACCGACACTTTCGTCGCCATATCAAATCAAATTTGCCCTTGACAAGAAGCGCCAATACCTCCTCACTGCTGCCACACAGTG
186 P F T D T F A A H I K S K F A L D K K R Q Y L L T A A P Q C
901 CCCCCAGCCGACGGTGCCTCAACGTTGCCCTTACCAAGGTTGCATTTCGATGCCATTTTCATCCAATTTTACAACAACCTGTGCCAGAC
216 P Q P D G A L N V A L T K V A F D A I F I Q F Y N N L C Q T
991 CTCGACCTGGGCAAGGGTAAATCCCAAATGAAGAACACCTCCTTCAACTCCAGTTGTTGGGAGAAGTGGGCGCAACAACACAGCGCCAA
246 S T W A K G K S Q M K N T S F N F Q L W E N W A R T N S A N
1081 CAAGAACATCAAGATCTTCATCGGTTTCCCTCGGTTGGTGTTCACGGTACTAGCGGATACGTCACAAGAATATTGCCAACAGATCGT
276 K N I K I F I G F L G G G V P G T S G Y V N K N I A Q Q I V
1171 TGCCGATCTCTCAAGTTCAGAGCTTTCGCCGGTGCATGTTTTGGGACGCATCTATCCTCAATATCAATACTGGAATCTTGCCAGCTGT
306 A D S L K F K S F A G A H F W D A S I L N I N T G I L P A V
1261 CAGGGACGCTCCTGACTGGCAAGGTTGTCATCAAGAAGCGTGAGATTGAGGAGCGTGAAATCAAGGTCCTCTGTTGGAGGTGCTTCCACCTA
336 R D V L T G K V V I K K R E I E E R E I K V P V G G A S T Y
1351 TTCCGCTGAAGACTATATCGAGGTCAGGCCCCGGCCGAGGCTGTTGCAAGTTCAGAGAAAGACACATCCACCACCGTGTGCGGGGCTT
366 S A E D Y I E V K A P A E A V R K F K R R H I H H R R A G F
1441 CTTGTCCAGCTAG
396 L S S

```

深蓝色下划线处为几丁质酶信号肽序列；小写字体为内含子；浅蓝色下划线处为糖基水解酶 18 家族底物结合位点区域；红色字体为水解酶催化活性位点。

图 2 AC-chi6195 基因序列及其推导的氨基酸序列

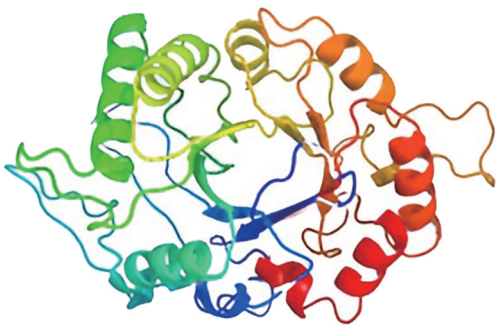


图 3 AC-chi6195 基因编码蛋白的三级结构预测

2.3 AC-chi6195 基因的遗传进化分析

将 AC-chi6195 氨基酸序列与球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*)、布氏白僵菌 (*Beauveria brongniartii*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、粉质虫草

(*Cordyceps farinosa*)、玫烟色虫草 (*Cordyceps fumosorosea*) 共 5 种昆虫致病性真菌几丁质酶，圆锥掘氏梅里霉 (*Drechmeria coniospora*)、大丽轮枝菌 (*Vertillium dahliae*)、刀孢蜡蚧菌 (*Lecanicillium psalliotae*)、厚垣孢普可尼亚菌 (*Pochonia chlamydosporia*)、少孢节丛孢菌 (*Arthrotrrys oligospora*)、弯孢节丛孢菌 (*Arthrotrrys musiformis*)、柱孢隔指孢菌 (*Dactylella cylindrospora*)、环捕节丛孢原变种 (*Arthrotrrys entomopaga*)、捕食性隔指孢菌 (*Dactylellina cionopaga*) 共 9 种食线虫真菌几丁质酶构建系统进化树。结果表明圆锥节丛孢菌 AC-chi6195 与少孢节丛孢菌 AO-379 亲缘关系最近，且二者与捕食性真菌柱孢隔指孢菌、捕食性隔指孢菌和环捕节丛孢原变种亲缘关系相对较近。

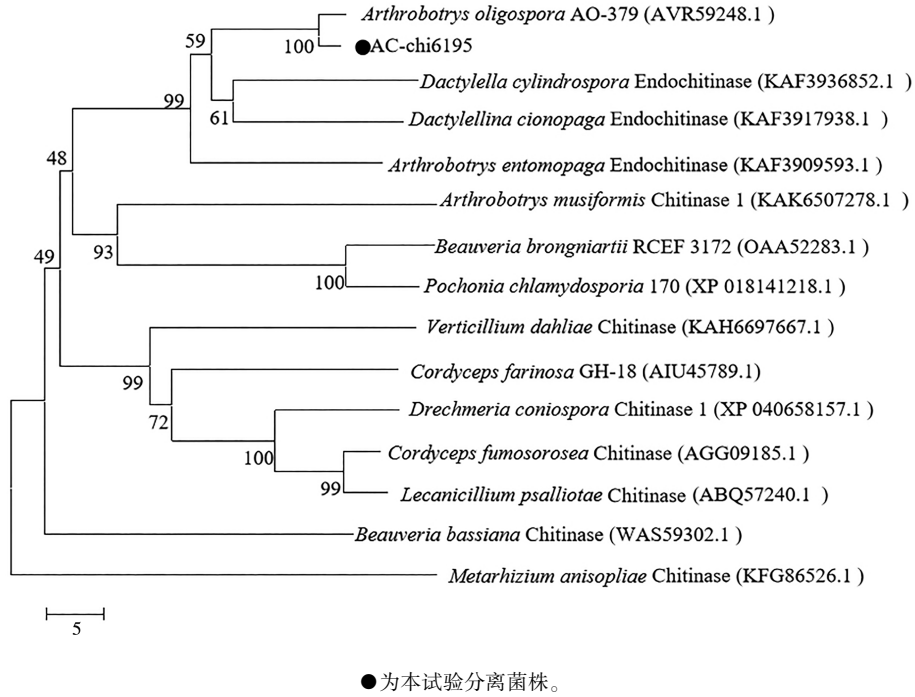
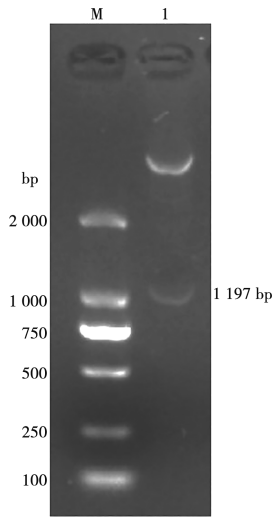


图4 几丁质酶 AC-chi6195 基因的遗传进化分析

2.4 重组质粒 pET28a-AC-chi6195 的双酶切鉴定

使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对 pET28a-AC-chi6195 质粒进行双酶切鉴定, 酶切后片段与目的片段大小相符, 表明重组质粒构建成功 (图5)。



M. DL2000 DNA Marker; 1. AC-chi6195 质粒双酶切。

图5 重组质粒双酶切验证

2.5 重组蛋白诱导条件优化

AC-chi6195 在 IPTG 0.7 mmol/L、37 °C 诱导 4 h 时, 蛋白表达效果最好, 诱导出大小约 42 kDa 的重组蛋白 (图6)。

2.5 重组蛋白纯化及鉴定

使用 His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化, 将纯化后的样品进行 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定, 结果显示 AC-chi6195 纯化效果良好, 纯化出大小约 42 kDa 的重组蛋白 (图7)。

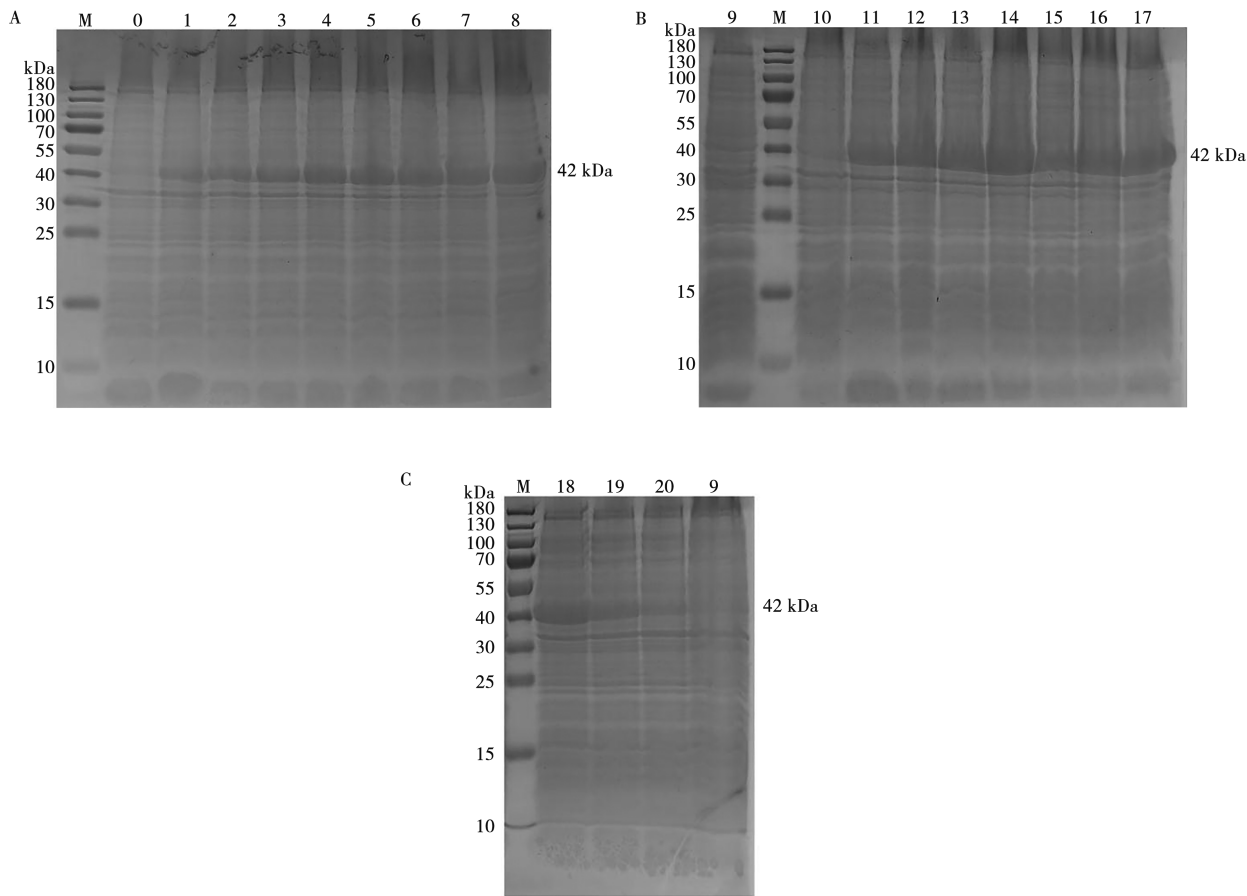
2.6 重组几丁质酶的酶活性及酶学性质

2.6.1 酶活性

使用 BCA 试剂盒测得重组几丁质酶 AC-chi6195 蛋白浓度为 1.42 mg/mL; 根据 NAG 标准曲线计算, 以胶体几丁质为底物, 检测重组几丁质酶 AC-chi6195 酶活性为 102 U/mg。

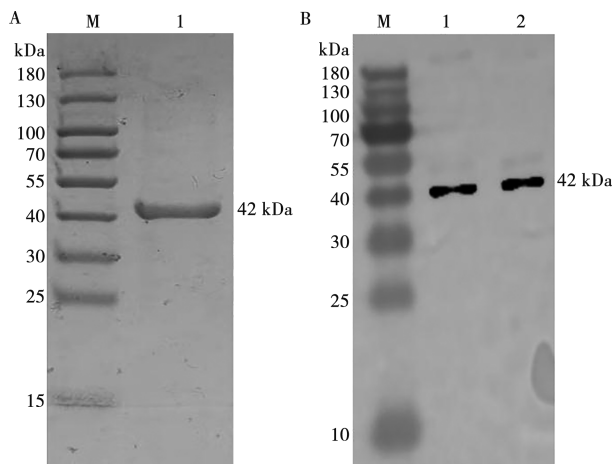
2.6.2 最适反应 pH 值及 pH 稳定性

重组几丁质酶 AC-chi6195 在 pH=7 时酶活性最高, 故为中性酶 (图8)。重组几丁质酶 AC-chi6195 在 pH=6~8 的条件下放置 12 h 后仍然有 65% 以上的酶活性。



M. 蛋白 Marker; 0~8. AC-chi6195 诱导时间 0~8 h; 9. 阴性对照; 10~17. 诱导浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1、1.5、2 mmol/L; 18~20. 诱导温度分别为 37、25、16 °C。

图 6 重组蛋白诱导时间 (A)、诱导浓度 (B) 和诱导温度 (C) 优化



M. 蛋白 Marker; 1~2. 纯化 AC-chi6195。

图 7 重组蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 鉴定

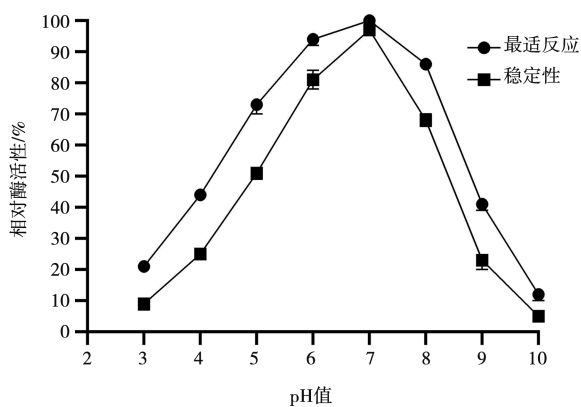
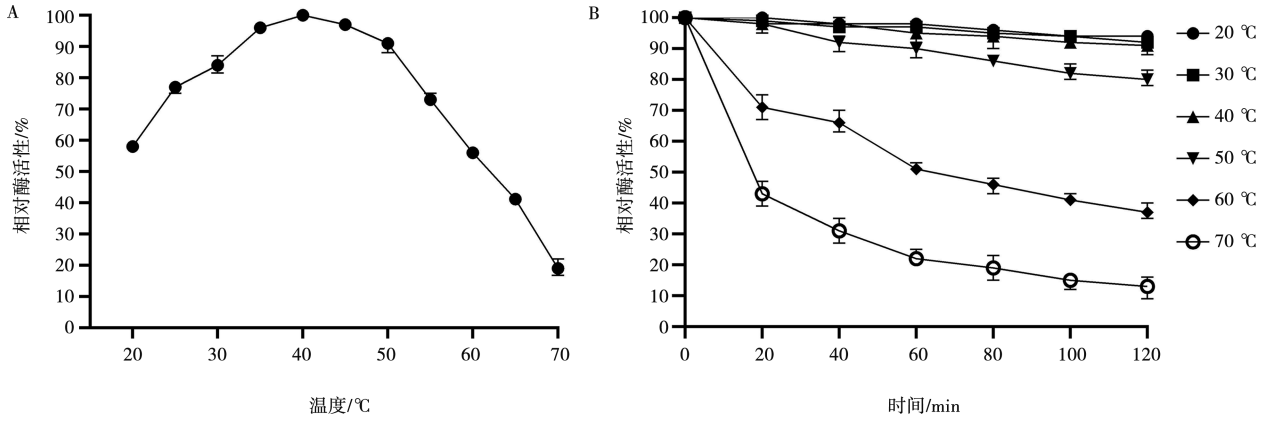


图 8 pH 值对重组几丁质酶 AC-chi6195 活性的影响

2.6.3 最适反应温度和热稳定性

重组几丁质酶 AC-chi6195 的活性随着温度的升高而逐渐增大, 在 40 °C 时达到最大值, 故 AC-chi6195 的最适反应温度为 40 °C。AC-chi6195 在 60 °C 保温 2 h 后酶活性降至 37%, 在 70 °C 保温 2 h 后酶活性降至 13% (图 9)。



A. 最适反应温度; B. 热稳定性。

图9 温度对重组几丁质酶 AC-chi6195 活性的影响

2.6.4 底物特异性

以几丁质粉末、胶体几丁质、壳聚糖、羧甲基纤维素钠为底物检测重组几丁质酶 AC-chi6195 的底物特异性,结果显示重组几丁质酶对胶体几丁质降解活性最佳,对壳聚糖具有一定的降解活性,对羧甲基纤维素钠几乎没有降解活性(表1)。

表1 底物特异性

底物	相对酶活性/%
胶体几丁质	100
几丁质粉末	21
壳聚糖	32
羧甲基纤维素钠	7

2.6.5 不同金属离子及化学试剂对酶的影响

金属离子中 Cu²⁺ 能降低重组几丁质酶 AC-chi6195 的酶活性,其他金属离子对重组酶影响不大;在化学试剂中,DTT 和 SDS 能降低重组酶活性(表2)。

2.7 重组几丁质酶 AC-chi6195 对线虫的降解活性影响

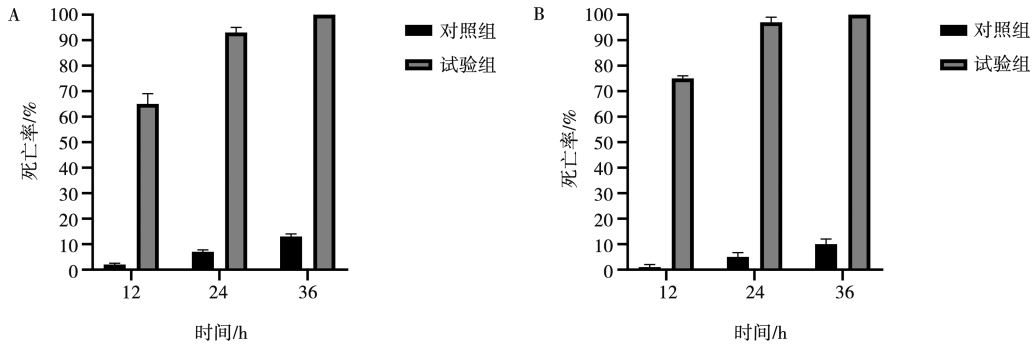
用重组几丁质酶 AC-chi6195 分别处理秀丽隐杆线虫和马圆形线虫三期幼虫 12、24 和 36 h 后,AC-chi6195 组秀丽隐杆线虫死亡率为 65%、93%、100%,马圆形线虫三期幼虫组死亡率为 75%、97%、100%;对照组秀丽隐杆线虫自然死亡率为 2%、7%、

13%;马圆形线虫三期幼虫自然死亡率分别为 1%、5%、10%(图10)。

表2 金属离子及化学试剂对重组几丁质酶 AC-chi6195 活性的影响 %

添加物	添加物浓度	
	1 mmol/L	5 mmol/L
Mg ²⁺	104.2	98.5
Fe ³⁺	95.1	90.2
Zn ²⁺	97.2	94.3
Ca ²⁺	96.5	92.7
K ⁺	97.9	95.4
Na ⁺	98.7	92.5
Cu ²⁺	77.5	37.5
DTT	48.9	20.3
EDTA	99.3	84.6
巯基乙醇	92.8	81.3
SDS	80.5	48.2

在重组酶孵育 24 h 后,线虫表皮降解且悬液中出现了小的线虫碎片和线虫内容物,对照组并无变化,悬液依然澄清;在重组酶孵育 36 h 后,线虫体壁几乎完全降解,部分内部组织也被破坏,且悬液中出现大量线虫溶解物,对照组线虫活动缓慢但体壁完整(图11)。



A. 秀丽隐杆线虫; B. 马圆形线虫三期幼虫。

图 10 重组几丁质酶 AC-chi6195 对线虫死亡率的影响

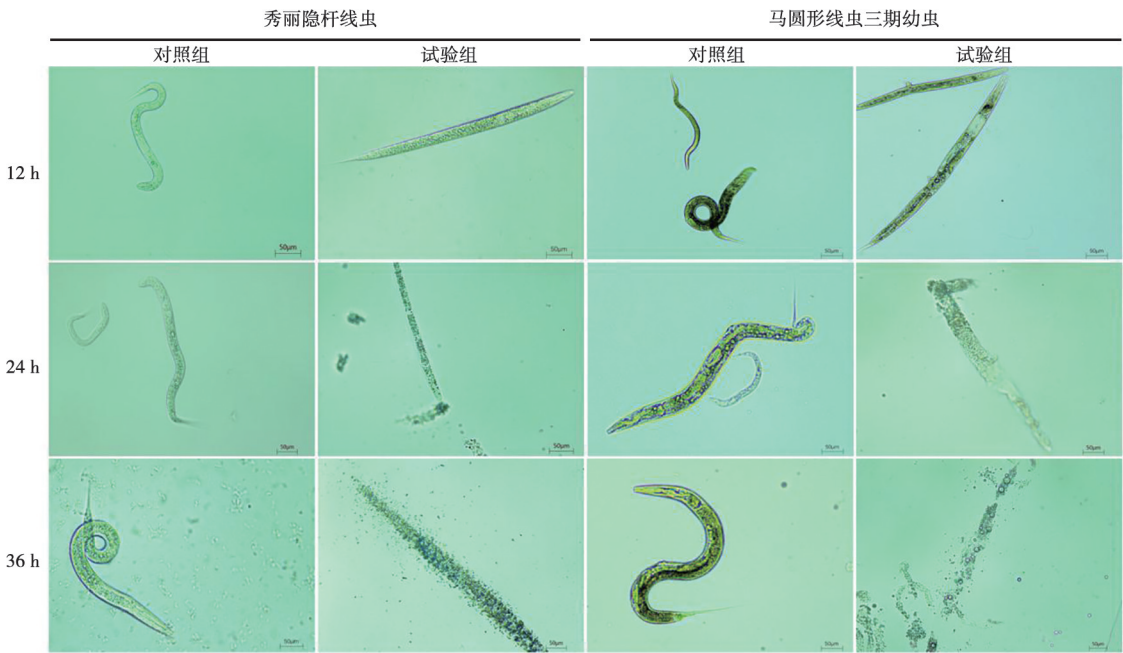


图 11 重组几丁质酶 AC-chi6195 对线虫的降解作用 (100×)

3 讨论

胞外水解酶（蛋白酶、几丁质酶、胶原酶、脂肪酶等）是所有捕食性真菌侵染和消化线虫的必要武器，因线虫表皮及卵壳富含胶原蛋白、角蛋白及几丁质，故与其化学成分对应的水解酶是真菌的主要毒力因子^[13-15]。目前国内外对捕食性真菌胞外水解酶及其酶学性质研究较浅，且大多集中在蛋白酶研究中，但对几丁质酶相关基因研究较少。基于此，本研究通过对圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株几丁质酶 AC-chi6195 克隆表达并研究其酶学特性与对线虫降解作用，以期阐明捕食性真菌几丁质酶侵染线虫机制奠定基础。

本研究成功获得圆锥节丛孢菌 AC-XJ 株胞外几

丁质酶 AC-chi6195 基因序列，对该基因进行分子特征分析发现 AC-chi6195 属于糖苷水解酶 18 家族，其含有的几丁质酶底物结合位点 SLGGS 和几丁质酶催化活性位点 TVDGFLLDF 与少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-379 一致，同时蛋白三级结构显示几丁质酶 AC-chi6195 具有典型的 GH18 几丁质酶三磷酸异构酶桶形结构域。捕食性真菌几丁质酶大多来自 GH18 家族，属于内切几丁质酶，通过将几丁质聚合物切割成相应的寡聚体来发挥作用^[16]。在侵袭性真菌中，例如食线虫真菌和昆虫致病性真菌中过量表达单一几丁质酶，或向这些几丁质酶中添加几丁质结合域，分别提高了这些真菌的寄生潜力和昆虫毒性^[17-21]，AC-chi6195 基因的分子特征分析有望为高效基因工程菌生物防治剂的研发提供参考。

使用 DNS 法以胶体几丁质为底物检测重组几丁质酶 AC-chi6195 的酶活性为 102 U/mg。几丁质酶的酶活性与其表达及纯化方式有较大关联, 如 Karthik 等^[22]通过离子交换层析和凝胶树脂层析纯化出一种链霉菌酸性几丁质酶的酶活性为 161.35 U/mg; El-Sayed 等^[23]从黏质沙雷菌中鉴定出几丁质酶高产菌株 NRC408 的几丁质酶活性为 250 U/mg; 盖佳伟^[24]对少孢节丛孢菌几丁质酶基因 GH18B 进行真核表达出的几丁质酶活性为 48.7 U/mg。利用大肠杆菌原核表达的几丁质酶中, Itoh 等^[25]对类芽孢杆菌几丁质酶基因进行原核表达, 7 种几丁质酶中酶活性最高的 ChiE 为 270 U/mg; 梁凯歌^[26]对桑氏链霉菌几丁质酶基因 SsChi61 进行原核表达纯化出的几丁质酶活性为 104 U/mg; 徐碧锐^[27]对纤维弧菌几丁质酶基因 Cellvibrio 进行原核表达纯化出的几丁质酶活性为 41.08 U/mg; 故本次原核表达出的几丁质酶 AC-chi6195 酶活性在大肠杆菌异源表达几丁质酶中处于中等水平。

几丁质酶的酶学性质与其来源密切相关, 通常反映在酶蛋白的分子量、最适 pH 和温度上, 捕食性真菌几丁质酶研究较少。在捕食性真菌所属的食线虫真菌中, 大多数几丁质酶具有分子量为 30~47 kDa, 最适温度 30~50 ℃, 温度升高时催化活性显著下降, 最佳 pH 值在 3~7.5 等特性, 如厚垣普可尼亚菌的 Chi43 和 PcChi44^[28]、宛氏拟青霉菌的 Chi32 和 Chi46^[29]、刀孢蜡蚧菌的 Lpchil 等^[30]。本研究获得的 AC-chi6195 也符合以上特性。在底物特异性研究中, AC-chi6195 对几丁质类物质有明显降解能力, 但对羧甲基纤维素钠几乎无分解活性, 故 AC-chi6195 有一定的底物特异性。圆锥节丛孢菌最适生长温度为 25 ℃, 同时在 pH=6.5~7.5 时菌丝生长良好, pH=7.0 时产孢能力最强^[31]; AC-chi6195 在 25 ℃时相对酶活在 75%以上, pH=6~8 时相对酶活在 85%以上, 表明该几丁质酶在圆锥节丛孢菌自然生长环境条件下具有较强酶活性, 可能在其捕食线虫过程中发挥重要作用。

目前捕食性真菌几丁质酶杀线虫活性只在模式真菌少孢节丛孢菌中有所研究, 少孢节丛孢菌一共预测了 16 个几丁质酶相关基因, 已克隆表达 AO-14^[32]、AO-31^[33]、AO-190^[34]、AO-379^[35]、AO-483^[9]、AO-587^[33]、AO-801^[10]、AO-492^[36]共 8 个几丁质酶, 目前报道杀线虫活性的有 AO-379^[37]、AO-483、AO-801 和 AO-492。用 AO-483 和 AO-801 处理秀丽隐杆线虫后 12 h 死亡率达到 100%, AO-492 处理后的秀丽隐杆线虫 6 h 后成虫死亡率达到 94%, 幼虫死亡率达到 100%。与本试验几丁质酶 AC-chi6195

基因及氨基酸序列相似度最高的 AO-379 对马圆线虫和秀丽隐杆线虫作用 12、24 和 36 h 后, 对马圆线虫的杀灭率分别为 42%、89% 和 100%, 对秀丽隐杆线虫的杀灭率分别为 50%、90% 和 97%^[37], 其杀虫率与 AC-chi6195 相当。

4 结论

本研究克隆了圆锥节丛孢菌几丁质酶 AC-chi6195 基因序列, 并在大肠杆菌中克隆表达; 纯化复性后的重组几丁质酶 AC-chi6195 对线虫体壁具有一定的降解能力, 并具备杀虫效果。研究结果为圆锥节丛孢菌几丁质酶作用机制提供数据支持, 并对高效绿色杀线虫酶制剂的研发提供科学依据。

参考文献:

- [1] 当知布拉毛. 绵羊胃肠道线虫病及常见驱虫措施 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2022 (4): 42-44.
- [2] BURKE J M, MILLER J E. Sustainable approaches to parasite control in ruminant livestock [J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2020, 36 (1): 89-107.
- [3] 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]. Arch Microbiol, 2013, 195 (7): 453-462.
- [4] SHAHRIARI M, ZIBAE A, KHODAPARAST S A, et al. Screening and virulence of the entomopathogenic fungi associated with *Chilo suppressalis* walker [J]. J Fungi (Basel), 2021, 7 (1): 34.
- [5] 孙明, 任巧云, 漆晶晶, 等. 球孢白僵菌对小亚璃眼蝇的毒力测定及其孢外水解酶活性分析 [J]. 中国动物检疫, 2021, 38 (12): 116-120.
- [6] WANG X, DING X, YUAN Z, et al. Analysis of the virulence, infection process, and extracellular enzyme activities of *Aspergillus nomius* against the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* guenée (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Virulence, 2023, 14 (1): 2265108.
- [7] DONG L Q, YANG J K, ZHANG K Q. Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *Paecilomyces lilacinus* [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103 (6): 2476-2488.
- [8] 李思媛, 王水怡, 张伟, 等. 新疆乌鲁木齐地区捕食性真菌圆锥节丛孢菌的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2023, 44 (6): 28-33.
- [9] 贡莎莎, 孟庆玲, 乔军, 等. 少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶 AO-483 基因的克隆及生物学活性 [J]. 浙江农业学报, 2019, 31 (2): 222-228.
- [10] GONG S, MENG Q, QIAO J, et al. Biological characteristics of recombinant *Arthrobotrys oligospora* chitinase AO-801 [J]. Korean J Parasitol, 2022, 60 (5): 345-352.
- [11] 胡俊, 张大庆, 郑天柱, 等. 一种几丁质胶体的制备工艺: 中国, 201410279790 [P]. 2014-09-03 [2024-04-30].
- [12] 王俊伟. 少孢节丛孢菌侵染性胞外丝氨酸蛋白酶的基因克隆、

- 表达及其杀线虫活性研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2013.
- [13] SOARES A M, WANDERLEY L F, JUNIOR L M. The potential of plant and fungal proteins in the control of gastrointestinal nematodes from animals [J]. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2019, 28 (3): 339–345.
- [14] BERINI F, KATZ C, GRUZDEV N, et al. Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36 (3): 818–838.
- [15] HERRERA-ESTRELLA A, CHET I. Chitinases in biological control [J]. *EXS*, 1999, 87: 171–184.
- [16] HARTL L, ZACH S, SEIDL-SEIBOTH V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93 (2): 533–543.
- [17] BOLDO J T, JUNGES A, DO AMARAL K B, et al. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* [J]. *Curr Genet*, 2009, 55 (5): 551–560.
- [18] FAN Y, FANG W, GUO S, et al. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73 (1): 295–302.
- [19] LIMÓN M C, PINTOR-TORO J A, BENÍTEZ T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase [J]. *Phytopathology*, 1999, 89 (3): 254–261.
- [20] KOWSARI M, MOTALLEBI M, ZAMANI M. Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 68 (4): 495–502.
- [21] XIAO Z, ZHAO Q, LI W, et al. Strain improvement of *Trichoderma harzianum* for enhanced biocontrol capacity: strategies and prospects [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1146210.
- [22] KARTHIK N, BINOD P, PANDEY A. Retracted: purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2015, 188: 195–201.
- [23] EL-SAYED G M, EMAM M T H, HAMMAD M A, et al. Gene cloning, heterologous expression, and in silico analysis of chitinase B from *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera frugiperda* larvae infesting maize crops [J]. *Molecules*, 2024, 29 (7): 1466.
- [24] 盖佳伟. 来源于 *Arthrobotrys* sp. CX1 菌株的几丁质酶筛选与其工程菌的构建 [D]. 大连: 大连工业大学, 2020.
- [25] ITOH T, HIBI T, FUJII Y, et al. Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus* sp. strain FPU-7 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79 (23): 7482–7490.
- [26] 梁凯歌. 桑氏链霉菌几丁质酶基因 SsChi61 的克隆表达与抑菌作用研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2019.
- [27] 徐碧锐. 纤维弧菌 *Cellvibrio* sp. 79 和 *Cellvibrio* sp. OA-2007 热稳定几丁质酶的克隆、表达及酶学性质研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [28] TIKHONOV V E, LOPEZ-LLORCA L V, SALINAS J, et al. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2002, 35 (1): 67–78.
- [29] NGUYEN V N, OH I J, KIM Y J, et al. Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36 (2): 195–203.
- [30] GAN Z, YANG J, TAO N, et al. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpch1* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76 (6): 1309–1317.
- [31] 孙殿明, 张慧梅, 李柠杏, 等. 不同环境和营养条件对捕食线虫真菌圆锥节丛孢菌生长、产孢及几丁质酶表达的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51 (2): 709–718.
- [32] 钟文强, 孟庆玲, 乔军, 等. 少孢节丛孢菌新疆分离株几丁质酶 AO-14 基因的克隆表达 [J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49 (11): 118–123.
- [33] 钟文强, 孟庆玲, 乔军, 等. 少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶基因 AO-587 和 AO-31 的克隆及分子特征分析 [J]. *家畜生态学报*, 2018, 39 (2): 18–23.
- [34] 贡莎莎, 孟庆玲, 乔军, 等. 少孢节丛孢菌 XJ-A1 几丁质酶基因 AO-190 的克隆、表达及其酶活性的测定 [J]. *华北农学报*, 2018, 33 (4): 67–74.
- [35] 钟文强, 孟庆玲, 乔军, 等. 少孢节丛孢菌胞外几丁质酶 AO-379 基因克隆及其表达分析 [J]. *南方农业学报*, 2018, 49 (1): 148–154.
- [36] 张嘉华, 张慧梅, 马喜喜, 等. 少孢节丛孢菌几丁质酶 AO-492 对线虫的降解作用研究 [J]. *生物技术通报*, 2024, 40 (5): 261–268.
- [37] ZHONG W, CHEN Y, GONG S, et al. Enzymological properties and nematode-degrading activity of recombinant chitinase AO-379 of *Arthrobotrys oligospora* how to cite this article [J]. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2019, 25 (4): 435–444.