



## C 端结构域截短提高苏云金芽孢杆菌来源几丁质酶的活力

黎欣宇<sup>#</sup>, 邓旭<sup>#</sup>, 蒋思婧, 周玉玲, 欧阳玉茹, 贺妮莎<sup>\*</sup>, 张桂敏<sup>\*</sup>

湖北大学生命科学学院, 湖北省生物资源绿色转化协同创新中心, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

黎欣宇, 邓旭, 蒋思婧, 周玉玲, 欧阳玉茹, 贺妮莎, 张桂敏. C 端结构域截短提高苏云金芽孢杆菌来源几丁质酶的活力. 微生物学报, 2022, 62(4): 1379–1389.

Li Xinyu, Deng Xu, Jiang Sijing, Zhou Yuling, Ouyang Yuru, He Nisha, Zhang Guimin. C-terminal domain truncation improves the activity of chitinase derived from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1379–1389.

**摘要:** 【目的】尝试利用蛋白质结构域工程的手段优化苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* BMB 171)来源的几丁质酶 BtChiA 的酶活力, 并对水解胶体几丁质的产物进行定性和定量分析。【方法】根据 BtChiA 的序列分析其结构域的组成, 构建 BtChiA 及部分结构域缺失的突变体蛋白在大肠杆菌中的表达菌株并进行蛋白的表达纯化; 利用 HPLC 分析几丁质酶水解产物的类型及含量。【结果】异源表达纯化获得了纯度 90%以上, 大小正确的 BtChiA (全长蛋白)和 BtChiA $\Delta$ 50 (截短几丁质结合结构域 CBD 和纤连蛋白结构域 FnIII)。BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质的活力是 BtChiA 的 1.64 倍。两者水解胶体几丁质的产物均为几丁单糖 GlcNAc 和几丁二糖(GlcNAc)<sub>2</sub>, 全长蛋白 BtChiA 的水解产物中(GlcNAc)<sub>2</sub>的含量是 GlcNAc 的 0.97 倍, BtChiA $\Delta$ 50 水解产物中(GlcNAc)<sub>2</sub>的含量是 GlcNAc 的 1.79 倍。【结论】利用蛋白质结构域工程构建了水解活性提高的 BtChiA $\Delta$ 50 突变体, 优化了水解产物的组成。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; 几丁质酶; 蛋白质结构域工程; 酶活力

**基金项目:** 国家自然科学基金(31970059); 湖北省教育厅中青年项目(202010701301003)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970059) and by the Foundation of Educational Commission of Hubei Province of China for Youths (202010701301003)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

**\*Corresponding authors.** Tel: +86-27-88663882; E-mail: HE Nisha, henisha@hubu.edu.cn, ZHANG Guimin, zhangguimin@hubu.edu.cn

**Received:** 14 July 2021; **Revised:** 18 August 2021; **Published online:** 3 September 2021

# C-terminal domain truncation improves the activity of chitinase derived from *Bacillus thuringiensis*

LI Xinyu<sup>#</sup>, DENG Xu<sup>#</sup>, JIANG Sijing, ZHOU Yuling, OUYANG Yuru, HE Nisha<sup>\*</sup>, ZHANG Guimin<sup>\*</sup>

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

**Abstract:** [Objective] Using protein domain engineering to construct and optimize the enzymatic activity of chitinase BtChiA derived from *Bacillus thuringiensis* BMB 171, and constructing qualitative and quantitative analysis of the product of the enzyme hydrolyzing colloidal chitin. [Methods] According to the sequence of BtChiA, the composition of its domain was analyzed. The expression strain of BtChiA and mutant protein with partial domain deletion in *Escherichia coli* was constructed and then the protein was expressed and purified. Analyzing the type and content of chitinase hydrolysates by HPLC. [Results] BtChiA (full-length protein) and BtChiA $\Delta$ 50 (truncated chitin binding domain CBD and fibronectin domain FnIII) were obtained by heterologous expression and purification. The vitality of BtChiA $\Delta$ 50 to hydrolyze colloidal chitin is 1.64 times higher than that of BtChiA. The hydrolyzed products of both are chitin monosaccharide GlcNAc and chitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub>. The content of (GlcNAc)<sub>2</sub> is 0.97 times lower than GlcNAc in the product of BtChiA, the content of (GlcNAc)<sub>2</sub> is 1.79 times higher than GlcNAc in the product of BtChiA $\Delta$ 50. [Conclusion] Protein domain engineering is a feasible strategy to improve the activity of chitinase BtChiA and optimize the composition of the hydrolysates.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; chitinase; protein domain engineering; enzyme vitality

苏云金芽孢杆菌是世界上广泛应用的生物杀虫剂,其体内一系列的Cry蛋白、几丁质酶和植物杀虫蛋白等参与其防御害虫的功能。1976年Regev等首先鉴定了苏云金芽孢杆菌来源的几丁质酶是一种能够水解几丁质的分泌型蛋白<sup>[1]</sup>,随后的研究还发现在苏云金芽孢杆菌体内过表达几丁质酶能增加菌株的抗虫活性,因此苏云金芽孢杆菌来源的几丁质酶吸引了越来越多研究者的目光<sup>[2-3]</sup>。从功能上看,几丁质酶能够通过水解害虫的外壳及围食膜来增加苏云金芽孢杆菌的活力,但是具体的机制并不清楚,关于提高苏云金芽孢杆菌来源几丁质酶活力的研究尚属于空白。

几丁质酶是一种能够专一性地催化GlcNAc-GlcNAc或GlcNAc-GlcNc(GlcNc,脱

乙酰基的几丁质单糖)糖苷键断裂,从而使几丁质降解成为几丁寡糖或者单糖的一类酶的总称<sup>[4]</sup>。根据作用方式的不同,几丁质酶通常分为内切型几丁质酶和外切型几丁质酶。内切型的几丁质酶从几丁质多糖链的内部随机水解几丁寡糖((GlcNAc)<sub>n</sub>, n $\geq$ 2),在水解的初期水解产物以几丁寡糖(GlcNAc)<sub>4</sub>、(GlcNAc)<sub>3</sub>和(GlcNAc)<sub>2</sub>为主,随着时间的增加,最终产物为(GlcNAc)<sub>2</sub>和GlcNAc。外切型的几丁质酶主要是从几丁质酶的还原端或者非还原端以二糖为单位水解几丁质,生成终产物(GlcNAc)<sub>2</sub>,部分外切型的几丁质酶同时具有 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性,能够水解(GlcNAc)<sub>2</sub>生成GlcNAc<sup>[5-6]</sup>。

根据氨基酸序列不同,几丁质酶分为糖苷

水解酶 18、19 家族。18 家族几丁质酶几乎分布在所有的物种中, 即使在体内没有几丁质组成的植物及哺乳动物中同样存在, 不同来源的 18 家族几丁质酶结构域的组成不同, 通常包括催化结构域(catalytic domain)和几个辅助结构域, 例如几丁质的结合结构域(chitin binding domain, CBD)和纤粘蛋白 III 型结构域(fibronectin type-III domain, FnIII), 部分真菌和植物来源的几丁质酶含有多个 CBD 或者不含 CBD 结构域<sup>[7]</sup>。18 家族几丁质酶催化结构域中有一个 8 股( $\beta/\alpha$ )折叠, 8 个  $\beta$  链( $\beta 1-\beta 8$ )被 8 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha 1-\alpha 8$ )所环绕, 催化结构域通常含有 DXXDXDXE 或 DXDXE 保守结构域。19 家族几丁质酶分布在高等植物、线虫和少数细菌如链霉菌、假单胞菌等。19 家族的几丁质酶的催化结构域中  $\alpha$  螺旋的含量高, 与壳聚糖酶和溶菌酶有一些结构上的相似性, 活性中心存在 2 个或 3 个保守的谷氨酸残基, 与 18 家族的几丁质酶保守结构域类似<sup>[8]</sup>。几丁质酶的水解机制主要分为 3 步, 第一步: 底物与活性口袋关键的氨基酸结合, 以活性中心 DXDXE 为例, 当底物与酶没有结合时, 第一个天冬氨酸与第二个天冬氨酸靠近, 远离质子供体谷氨酸; 当底物与酶结合后, 第一个天冬氨酸的侧链转向谷氨酸; 第二步: 底物中间体的形成和糖苷键的断裂, 谷氨酸作为质子供体, 一个天冬氨酸作为亲核试剂使底物质子化, 通过一步法的酸/碱水解完成糖苷键的断裂; 第三步: 产物的释放和水分子的激活, 当底物的糖苷键断裂后, 活性中心的水分子被激活, 引发亲核攻击完成反应, 释放生成的产物。

本研究的对象苏云金芽孢杆菌来源的 ChiA74 属于 18 家族几丁质酶, 由催化结构域、纤连蛋白 III 结构域和几丁质结合结构域组成(图 1)。催化结构域含有几丁质酶保守的氨基酸

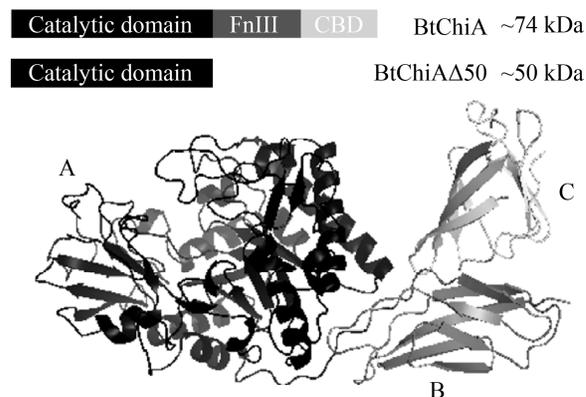


图 1 几丁质酶 BtChiA 的结构域信息

Figure 1 Structural domains of chitinase BtChiA. A: catalytic domain; B: fibronectin type-III domain, FnIII; C: chitin binding domain, CBD.

活性位点; CBD 结构域与底物几丁质的结合相关; FnIII 结构域在真核和原核生物体内广泛分布, 但是具体的作用尚不清楚。在过去的研究中, BtChiA 蛋白能够在大肠杆菌内异源表达获得可溶性良好的蛋白, 并且解析了晶体结构<sup>[9]</sup>。

蛋白往往由多个不同的结构域所组成, 不同结构域独立折叠并维持相对稳定, 发挥各自的功能<sup>[10]</sup>。2006 年科学家提出了蛋白可以分为 2 个大的功能模块, 发挥催化功能的活性中心以及维持催化中心活性的支架蛋白的新概念<sup>[11]</sup>。在此概念的基础上, 蛋白质结构域工程通过结构域的增加、交换或者缺失来改变支架蛋白的结构, 并保证活性中心的稳定, 筛选具有优良性状的功能蛋白。为了提高 BtChiA 的催化活力, 本研究基于蛋白质结构域工程的理念设计了截短 CBD 和 FnIII 结构域的突变体蛋白 BtChi $\Delta$ 50 (BtChiA 含有 644 个氨基酸, BtChi $\Delta$ 50 截短了 453–644 位的氨基酸序列), 并在大肠杆菌 BL21(DE3)宿主内异源表达及纯化得到 BtChiA 和 BtChi $\Delta$ 50, 分析 2 个蛋白水解胶体几丁质的活力、鉴定其产物类型及含量。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

本实验室所用的菌株为苏云金芽孢杆菌 BMB171, 由湖北大学陈守文老师馈赠。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态购自于生工生物工程(上海)股份有限公司。PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶、T5 核酸外切酶、蛋白 Marker 购自于上海雅酶生物科技有限公司。PCR 产物纯化和胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Bradford 蛋白浓度试剂盒购自与 Omega Bio-Tek 公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂购自 GE 公司。几丁质粉末、单糖 GlcNAc、二糖(GlcNAc) $_2$  购自于 Sigma 公司。乙腈购自于弗顿生化科技有限公司。

## 1.2 表达载体构建

以苏云金芽孢杆菌 BMB171 基因组 DNA 作为模板, 利用 PrimeSTAR DNA 聚合酶 PCR 扩增 BtChiA、BtChiA $\Delta$ 50 基因, PCR 引物及酶切位点信息见表 1。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 *EcoR* I 处理 pET28a 使其线性化, 作为重组表达的载体。将 T5 核酸外切酶试剂盒分别连接 BtChiA、BtChiA $\Delta$ 50 与线性化的载体 pET28a, 取 5  $\mu$ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 接种至卡那霉素抗性 LB 固体平板上筛选阳性转化子, 菌落 PCR

及 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定阳性克隆, 将初步验证正确的质粒送到生工工程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的重组表达质粒命名为 pET28a-BtChiA 和 pET28a-BtChiA $\Delta$ 50。

## 1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将构建好的表达载体 pET28a-BtChiA 和 pET28a-BtChiA $\Delta$ 50 分别转入大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取单克隆于 LB 液体培养基(50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素)中, 并将菌体扩大培养至 200 mL。在 *OD* $_{600}$  大约 0.6 左右加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG), 置于 18 $^{\circ}$ C 继续培养 12 h, 诱导重组蛋白表达。培养物在 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将菌体沉淀悬浮于 30 mL 裂解缓冲液(10 mmol/L PBS, pH 8.0)中, 置于冰上利用超声破碎法裂解菌体(600 W 超声 4 s, 间歇 4 s, 超声 10 min)。将超声破菌后的细胞液在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。利用 Ni-NTA 柱亲和纯化蛋白, 将上清液与 2 mL Ni-NTA 柱结合, 然后分别用 5 个柱体积含有 20、50 mmol/L 咪唑的 PBS 除去非特异性结合的杂蛋白, 然后用 4 个柱体积含有 300 mmol/L 咪唑的 PBS 将目的蛋白洗脱出来。通过 SDS-PAGE 检测纯度后, 利用 10 kDa 的超滤管离心交换缓冲液除掉蛋白中的咪唑, 最终将蛋白分装后保存在-80 $^{\circ}$ C, 用 Bio-Rad 快速蛋白测定 Bradford 法测定蛋白浓度。

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
ChiA-F	TGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCAGATTCACCAAAGCAAAGTC
ChiA-R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCTCAGTTTTCGCTAATGACGGTATTT
ChiA50-F	TGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCAGATTCACCAAAGCAAAGTC
ChiA50-R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCTCAAGTATCTTTTTGACTAATAGGT

#### 1.4 胶体几丁质的制备

参照文献进行胶体几丁质的制备<sup>[12]</sup>。(1)称取 3–4 g 几丁质粉末, 缓慢加入到 60 mL 浓盐酸中(边加边搅拌), 在 4 °C 条件下剧烈搅拌过夜至溶液呈黄色;(2)将上述混合物加入到 1 L 冰冷的 95%乙醇中, 快速搅拌后于 4 °C 放置过夜;(3)4 °C、3 800 r/min 离心 15 min, 收集沉淀部分;(4)用大量水反复冲洗沉淀至 pH 接近 5.5, 冲洗完成后加入少量水(50 mL 以内)溶解几丁质沉淀, 转移至离心管中, 然后 10 000 r/min 离心, 收集沉淀部分即为胶体几丁质。称取 5 g 制备好的胶体几丁质溶解在 100 mL pH 8.0 的磷酸缓冲液中即为 5%胶体几丁质。

#### 1.5 重组几丁质酶的比酶活测定

GlcNAc 标准曲线的制作: 准确称取 0.1 g GlcNAc 固体粉末溶解于 100 mL 纯水中获得 1 mg/mL 的 GlcNAc 母液, 然后用 pH 值为 8.0 的 PBS 缓冲液将母液稀释为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL 的 GlcNAc; 分别取 500  $\mu$ L 上述浓度的 GlcNAc 中加入 500  $\mu$ L DNS 溶液, 100 °C 反应 10 min, 反应完毕后冰上冷却, 12 000 r/min 离心 5 min; 取上清液在分光光度计上测定 540 nm 处的吸光值; 实验结果重复 3 次, 根据数据绘制标准曲线(图 2)。

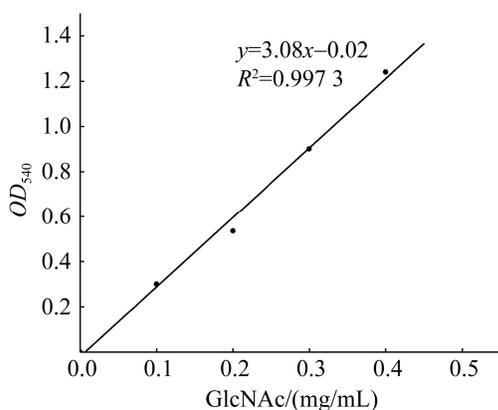


图 2 GlcNAc 的标准曲线

Figure 2 Standard curve of GlcNAc.

比酶活的测定: 将 50  $\mu$ L 纯化后的 BtChiA、BtChiA $\Delta$ 50 分别与 500  $\mu$ L 5%胶体几丁质混合, 37 °C 反应 10 min, 然后加入 500  $\mu$ L DNS 试剂, 100 °C 金属浴 10 min, 迅速放置于冰上冷却, 测定 OD<sub>540</sub>, 设置 3 个重复, 取平均值, 根据 N-乙酰-氨基葡萄糖标准曲线计算酶的比活力。在 37 °C、pH 8.0 的条件下, 定义一个酶活力单位 U 为每分钟水解胶体几丁质释放 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量。

#### 1.6 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质产物的分析

将 100  $\mu$ L BtChiA、BtChiA $\Delta$ 50 分别与 5%胶体几丁质混合, 反应体系为 1 mL, 控制蛋白反应浓度为 15 mmol/L, 37 °C 摇床反应, 对照组不加酶, 于 30 min、1 h、2 h、6 h 时分别取样 100  $\mu$ L, 100 °C 加热终止反应。将反应后的样品利用 SHIMADZU 高效液相色谱进行分析, 80%乙腈和 20%水相在 0–30 min 等梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 色谱柱 Agilent Carbohydrate column (5  $\mu$ mol/L, 4.6 mm $\times$ 250 mm)。

#### 1.7 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 水解(GlcNAc)<sub>2</sub>产物的分析

用 10 mmol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液配制 0.5 mg/mL 的(GlcNAc)<sub>2</sub>, 用终浓度 15 mmol/L 的 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 分别在 37 °C 反应过夜(约 12 h), 100 °C 金属浴加热终止反应。按照 1.6 方法 HPLC 分析产物组分。

#### 1.8 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 几丁质结合能力的测试

称取几丁质粉末 0.15 g, 在两管几丁质粉末中分别加入 300  $\mu$ L 0.5 mg/mL 的 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 蛋白使最终的几丁质浓度为 5% (W/V), 混匀, 于 4 °C 静置 1 h, 期间轻柔振荡数次; 反应完成后, 离心取上清及洗涤数次

后的结合在几丁质粉末上的蛋白和对照(浓度为 0.5 mg/mL 的 BtchiA 和 BtchiA $\Delta$ 50)进行 SDS-PAGE 检测,并测定离心后上清的蛋白浓度,与初始蛋白浓度的比值定义为蛋白对几丁质的结合能力。

## 2 结果与分析

### 2.1 几丁质酶 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 的表达纯化

将含有表达质粒 pET28a-BtChiA 和 pET28a-BtChiA $\Delta$ 50 的 *E. coli* BL21(DE3)在 18 °C 诱导过夜,重组蛋白经镍柱亲和层析纯化,SDS-PAGE 检测纯化结果(图 3)。可以看出 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 均能在大肠杆菌中可溶性表达,经过亲和纯化的蛋白纯度高达 90%以上。BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 分子量大小预测分别接近 74 kDa 和 50 kDa,从 SDS-PAGE 胶上可以看出,表达

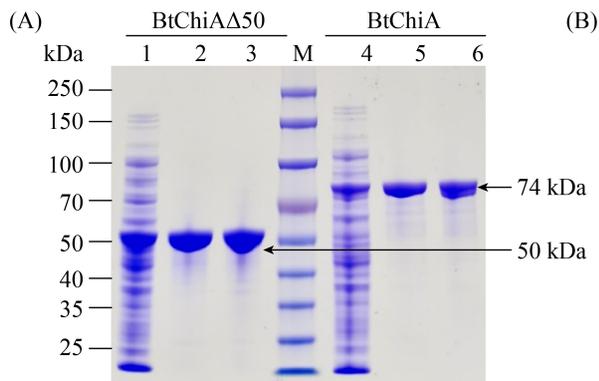


图 3 重组蛋白 BtChiA $\Delta$ 50 (A)和 BtChiA (B)纯化结果

Figure 3 Purification of recombinant BtChiA and BtChiA $\Delta$ 50. M: molecular weight marker, from top to bottom in turn are 250, 150, 100, 70, 50, 40, 35, 25 kDa, lane 1, 4: supernatant of induced BtChiA $\Delta$ 50 and BtChiA; lane 2, 5: eluent of BtChiA $\Delta$ 50 and BtChiA with 300 mmol/L imidazole; lane 3, 6: imidazole free BtChiA $\Delta$ 50 and BtChiA after desalinization.

的蛋白分子量大小正确。2 个蛋白在纯化后期除盐、浓缩的过程中均能以可溶性的状态稳定存在。

### 2.2 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 比酶活的测定

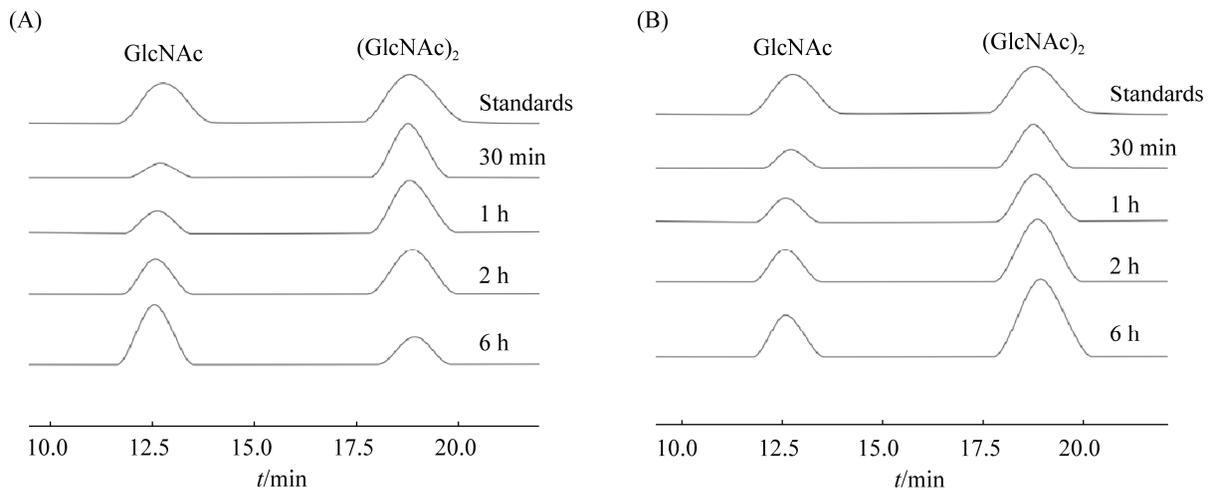
纯化后 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 的蛋白浓度分别为 2.13 mg/mL 与 1.82 mg/mL,计算得出比酶活分别为 19 U/mg 与 31 U/mg,截短 CBD 和 FnIII 后的 BtChiA $\Delta$ 50 的比酶活较 BtChiA 提高了 1.6 倍。

### 2.3 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质的产物分析

按照 1.6 所示的方法用 100  $\mu$ L BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 分别水解 5%胶体几丁质,从 30 min 起始有(GlcNAc) $_2$ 和 GlcNAc 生成,在 2 h 到 6 h 期间, BtChiA 水解体系中(GlcNAc) $_2$ 含量降低, GlcNAc 含量增加,到 6 h 左右反应基本上终止。对比 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 水解 5%胶体几丁质的产物,经过 6 h, BtChiA 水解胶体几丁质得到 49.3%的(GlcNAc) $_2$ 和 50.7%的 GlcNAc, BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质得到 64.2%的(GlcNAc) $_2$ 和 35.8%的 GlcNAc,将 BtChiA 截短 CBD 和 FnIII 结构域后,水解产物中(GlcNAc) $_2$ 的比例增加,而 GlcNAc 的比例降低(图 4)。结合 2019 年 José E. Barboza-Corona 等报道的几丁质酶的晶体结构以及本研究对水解产物的分析,预测 BtChiA 从胶体几丁质的还原端朝着非还原端以二糖为单位生成(GlcNAc) $_2$ ,是一种进程性的外切型几丁质酶<sup>[9]</sup>。部分(GlcNAc) $_2$ 在 BtChiA 作用下生成单糖,尽管 BtChiA $\Delta$ 50 比酶活高于 BtChiA,但是水解(GlcNAc) $_2$ 的活性降低,因此生成(GlcNAc) $_2$ 含量增加,但 GlcNAc 含量降低。

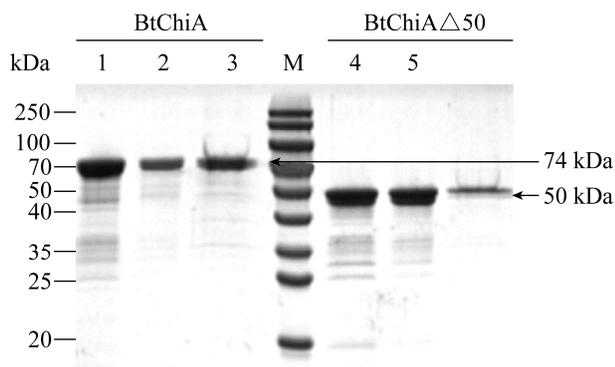
### 2.4 BtChiA 与 BtChiA $\Delta$ 50 几丁质的结合能力测试

按照 1.8 所示的方法将 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 分别与 5%几丁质粉末结合(图 5),



**图 4 HPLC 分析 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质的产物**

Figure 4 HPLC analysis of hydrolysis products of colloidal chitin reacting with BtChiA and BtChiA $\Delta$ 50 separately. A: HPLC analysis hydrolysis products of colloidal chitin reacting with BtChiA and from top to bottom are standard of GlcNAc and (GlcNAc)<sub>2</sub>, the hydrolysis products of colloidal chitin reacting with BtChiA at 30 min, 1 h, 2 h, 6 h separately; B: HPLC analysis hydrolysis products of colloidal chitin reacting with BtChiA $\Delta$ 50, and the illustrations are the same as (A).



**图 5 SDS-PAGE 分析 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 与几丁质的结合性**

Figure 5 SDS-PAGE analysis chitin-bound ability with BtChiA and BtChiA $\Delta$ 50. Lane 1: purified BtChiA with Ni-NTA column. Lane 2: supernatant of BtChiA after binding with chitin. Lane 3: chitin-bound BtChiA. Lane 4: purified BtChiA $\Delta$ 50 with Ni-NTA column. Lane 5: supernatant of BtChiA $\Delta$ 50 after binding with chitin. Lane 6: chitin-bound BtChiA $\Delta$ 50. Lane M: molecular weight marker, from top to bottom in turn are 250, 150, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 20 kDa.

SDS-PAGE 胶显示 BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 均能与几丁质粉末结合, 但是并不能完全结合, 泳道 2 和 5 均含有未结合的上清液, 泳道 3 和泳道 6 的对比说明结合在 BtChiA $\Delta$ 50 上的几丁质比 BtChiA 少。经过定量分析, BtChiA 反应液浓度为 0.500 mg/mL, 与几丁质粉末结合后的上清为 0.119 mg/mL, BtChiA 与几丁质粉末的结合率为 76.2%; BtChiA $\Delta$ 50 反应液浓度为 0.500 mg/mL, 与几丁质粉末结合后的上清为 0.348 mg/mL, BtChiA $\Delta$ 50 与几丁质粉末的结合率为 30.4%, 截短 CBD 和 FnIII 结构域后 BtChiA $\Delta$ 50 比 BtChiA 对几丁质的结合性下降了 2.5 倍。CBD 结构域跟几丁质的结合有关, FnIII 结构域的功能尚不清楚, 但也有研究表明 FnIII 与几丁质以及其他一些生物多聚物分子的结合有关。当 BtChiA 截短 CBD 和 FnIII 结构域后, 尽管蛋白能够稳定存在, 但是结合几丁质的能力明显下降。目前已经报道的几丁质酶截短 C 端结构域

后大多数仍然能够与几丁质有结合,这说明催化结构域也有结合几丁质的能力,多结构域共同存在对几丁质的结合性更强。

### 3 讨论

蛋白质结构域工程是对目标蛋白性质进行多方面优化的重要手段<sup>[10]</sup>。几丁质酶主要由 N 端和 C 端结构域组成,其中 N 端为活性中心所在的催化结构域,C 端包括 FnIII 结构域和 CBD 结构域。每个结构域通常能独立折叠及稳定存在,结构域工程通过对蛋白自身的结构域进行删除、叠加及不同蛋白之间的结构域互换来优化蛋白的性质<sup>[11]</sup>。本研究构建了 BtChiA 和突变体 BtChiA $\Delta$ 50 蛋白的大肠杆菌重组表达菌株,实验结果显示,BtChiA 和 BtChiA $\Delta$ 50 蛋白在 BL21(DE3)中能够可溶性表达,蛋白在纯化的过程中很稳定。2007 年 Driss 等在表达了苏云金芽孢杆菌库斯塔变种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)来源的几丁质酶 Chi255 及截短 CBD 的 Chi255 $\Delta$ 5, Chi255 和 ChiA74 的氨基酸序列有 97%的相似性,与本研究相同的是在纯化过程中 Chi255 与 Chi255 $\Delta$ 5 状态稳定,不同的是,研究者用含有胶体几丁质的平板检测截短蛋白的活性,发现 Chi255 和 Chi255 $\Delta$ 5 有水解胶体几丁质的活性,部分截短或者全部截短 FnIII 结构域的蛋白没有水解胶体几丁质的活性<sup>[13]</sup>;2016 年 Sha 等在大肠杆菌表达了苏云金芽孢杆菌 HZP7 来源的几丁质酶 Chi74、截短 CBD 的 Chi63 及截短 CBD 和 FnIII 的 Chi54,3 个蛋白均很稳定,作者利用 DNS 法对 Chi74 及突变体蛋白的活性进行检测,Chi74、Chi63 和 Chi54 的活性依次下降,但是最适温度及 pH 值没有发生变化。通过对比分析苏云金芽孢杆菌不同亚种来源的几丁质酶,发现 CBD 和 FnIII 结构域为苏云金芽孢杆菌来源几丁质酶的重要

组成部分,但并非维持活性及稳定性的必须结构,这说明 BtChiA 是进行蛋白质结构域工程改造的良好实验材料<sup>[14]</sup>。

几丁质酶水解几丁质能够获得大量几丁寡糖,在医药保健、农业领域有广泛的应用,因此,利用蛋白质结构域工程对几丁质酶的改造已经有了广泛的报道。在结构域的增加方面,2004 年 Limón 等发现哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)来源的几丁质酶 Chit42 和 Chit33 具有抑制部分真菌的活性,但是缺少 CBD。他们将哈茨木霉菌来源的 CBD 分别融合在 Chit42 和 Chit33 的 N 端构建了杂合的 Chit42-CBD 和 Chit33-CBD,Chit42-CBD 水解几丁质的活力相比较 Chit42 提高了 3 倍,Chit33-CBD 水解几丁质的活力相比 Chit33 提高了 2 倍,并且 Chit42-CBD 和 Chit33-CBD 抑制真菌的活性提高了,说明 CBD 有效地提高了几丁质酶对不溶性几丁质的结合性包括真菌的细胞壁组分<sup>[15]</sup>。2019 年谷天燕等在将苜蓿链霉菌(*Streptomyces alfae*)来源的几丁质酶 ChiB 的 N 端融合上自身来源的 CBD,构建好 N 端和 C 端均含有 CBD 的 DChDB<sub>ChiB</sub> 融合蛋白,融合蛋白增强了几丁质酶对几丁质、胶体几丁质和黑曲霉几丁质的结合能力,同时增强了对植物病原真菌长枝木霉的抑制作用<sup>[16]</sup>。在结构域的交流方面,2021 年 Su 等将白长链霉菌(*Streptomyces albolongus*)来源的几丁质酶的 SaChiA4 的 CBD 替换成了环太芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)来源的几丁质酶 ChiA1 的 CBD,融合蛋白 R-SaChiA4 相比较 SaChiA4 水解几丁质粉末的活性提高了 54% (28 U/mg),水解胶体几丁质的活力提高了 49%<sup>[17]</sup>。在结构域缺失方面,2015 年 Lin 等在粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)来源的几丁质酶 smChiC 基础上截短 CBD 获得 SmChiCG426 蛋白,截短 CBD 和 FnII 获得 SmChiCG330 蛋白,

SmChiACG426 和 SmChiCG330 水解胶体几丁质的催化效率( $K_{cat}/K_m$ )是 SmChiA 的 1.06 倍和 2.09 倍<sup>[18]</sup>。2015 年 Chen 等在大肠杆菌中表达了铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)来源的几丁质酶 Pachi 和截短 CBD 的 CHA 突变体蛋白, 相比较野生型的 Pachi 蛋白, CHA 对底物胶体几丁质亲和力下降了 1.85 倍, 但是催化活性提高了 1.26 倍<sup>[19]</sup>。以上文献提到的几丁质酶活性数值见表 2。

本研究首次定量分析了苏云金芽孢杆菌 BMB171 来源的几丁质酶 BtChiA74 及突变体蛋白 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质的活力及水解产物, 通过 DNS 法分析截短了 CBD 和 FnIII 结构域的 BtChiA $\Delta$ 50 水解 5% 的胶体几丁质的比酶活比 BtChiA74 提高了 1.6 倍, BtChiA $\Delta$ 50 对底物的结合性比 BtChiA74 下降了 2.5 倍, 以上结果说明, CBD 并非维持 BtChiA 活性必需的结构域, 但是对于提高几丁质酶与底物结合

能力非常重要。CBD 的功能是提高几丁质酶对于不溶性底物的结合性, CBD 和 FnIII 形成  $\beta$  折叠会造成酶的不稳定并且在结构上阻碍产物的释放, 但是关于 CBD 和 FnIII 对于几丁质酶催化活性的影响目前并不清楚<sup>[20-21]</sup>。BtChiA 水解胶体几丁质生成的 GlcNAc 的含量是(GlcNAc)<sub>2</sub> 的 1.02 倍, BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质生成的(GlcNAc)<sub>2</sub> 含量是 GlcNAc 的 1.79 倍, 突变体 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质生成的(GlcNAc)<sub>2</sub> 含量提高, 而 GlcNAc 的含量降低。2020 年 Song 等在毕赤酵母中表达了地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)来源的几丁质酶 ChiA, ChiA 充分水解 30% 的胶体几丁质产物是 GlcNAc 和 (GlcNAc)<sub>2</sub>, 主要产物是 GlcNAc; 并且 ChiA 以 (GlcNAc)<sub>2</sub> 作为底物, 水解生成 GlcNAc<sup>[22]</sup>。ChiA 和 BtChiA 蛋白序列的同源性高达 67%, 暗示着 BtChiA 也可能具有水解(GlcNAc)<sub>2</sub> 的活力, 相关的实验正在进一步的探索中。本研究是首次

表 2 文献报道的几丁质酶活力

Table 2 The activity of reported chitinase

Strains	Chitinase activity	Resources	Substrate (W/V)	References
BtChiA74	19 U/mg	<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB 171	5% colloidal chitin	This study
BtChiA $\Delta$ 50	31 U/mg			
Chi255	21.26 $\pm$ 0.03 mU/mL	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BUPM255	0.1% colloidal chitin	[13]
Chi255 $\Delta$ 5	34.49 $\pm$ 0.03 mU/mL			
Chi74	3.83 U/mL	<i>Bacillus thuringiensis</i> HZP7	0.5% colloidal chitin	[14]
Chi63	2.51 U/mL			
Chi54	1.2 U/mL			
Chit33	328.00 $\pm$ 23.00 U/mL	<i>Trichoderma harzianum</i> CECT2413	Unsoluble chitin	[15]
Chit33-CBD	649.80 $\pm$ 18.70 U/mL			
Chit42	37.78 $\pm$ 0.73 U/mL			
Chit42-CBD	106.70 $\pm$ 3.12 U/mL			
SaChiA4	66.2 U/mg	<i>Streptomyces albolongus</i>	0.1% colloidal chitin	[17]
R-SaChiA4	98.51 U/mg			
Pachi	316.40 $\pm$ 45.20 U/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	colloidal chitin	[19]
CHA	226.00 $\pm$ 22.60 U/mL			

One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme required to produce 1  $\mu$ mol GlcNAc per min.

通过定性及定量研究几丁质酶及其截短蛋白水解胶体几丁质的产物组成及含量变化, 可供对比分析的例子较少, BtChiA 水解(GlcNAc)<sub>2</sub> 的活性还需要进一步的验证。

本研究基于蛋白质结构域工程的思路, 获得了比酶活提高的突变体蛋白 BtChiA $\Delta$ 50, 利用 HPLC 方法对 BtChiA 水解胶体几丁质的产物进行了定性和定量的分析, 发现截短 CBD 后 BtChiA $\Delta$ 50 水解胶体几丁质生成的(GlcNAc)<sub>2</sub> 含量明显提高。因此, 删除 BtChiA 的 C 端 CBD 结构域能够为获得高活性的几丁质酶、优化产物结构提供一种新策略, 本研究也为深入研究几丁质酶水解产物种类及含量的差异机制提供了基础。

## 参考文献

- [1] Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J, Zilberstein A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3581–3586.
- [2] Smirnoff WA. The symptoms of infection by *Bacillus thuringiensis*+chitinase formulation in larvae of *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1974, 23(3): 397–399.
- [3] Guttman DM, Ellar DJ. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 188(1): 7–13.
- [4] Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(6): 773–782.
- [5] Tran TN, Doan CT, Nguyen MT, Nguyen VB, Vo TPK, Nguyen AD, Wang SL. An exochitinase with N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase-like activity from shrimp head conversion by *Streptomyces speibonae* and its application in hydrolyzing  $\beta$ -chitin powder to produce N-acetyl-D-glucosamine. *Polymers*, 2019, 11(10): E1600.
- [6] Zhang A, He YM, Wei GG, Zhou J, Dong WL, Chen KQ, Ouyang PK. Molecular characterization of a novel chitinase CmChi1 from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 and its use in N-acetyl-D-glucosamine production. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 179.
- [7] Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The FEBS Journal*, 2005, 272(22): 5923–5939.
- [8] Oyeleye A, Normi YM. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, 2018, 38(4). DOI: 10.1042/bsr20180323.
- [9] Juárez-Hernández EO, Casados-Vázquez LE, Brieba LG, Torres-Larios A, Jimenez-Sandoval P, Barboza-Corona JE. The crystal structure of the chitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis* has a multidomain assembly. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2591.
- [10] Yang HQ, Li JH, Shin HD, Du GC, Liu L, Chen J. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 23–29.
- [11] Park HS, Nam SH, Lee JK, Yoon CN, Mannervik B, Benkovic SJ, Kim HS. Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science*, 2006, 311(5760): 535–538.
- [12] Joe S, Sarojini S. An efficient method of production of colloidal chitin for enumeration of chitinase producing bacteria. *Mapana-Journal of Sciences*, 2017, 16(4): 37–45.
- [13] Driss F, Baanannou A, Rouis S, Masmoudi I, Zouari N, Jaoua S. Effect of the chitin binding domain deletion from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* chitinase Chi255 on its stability in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 2007, 36(3): 232–237.
- [14] Sha L, Shao ES, Guan X, Huang ZP. Purification and partial characterization of intact and truncated chitinase from *Bacillus thuringiensis* HZP7 expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(2): 279–284.
- [15] Limón MC, Chacón MR, Mejías R, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Codón AC, Benítez T. Increased antifungal and chitinase specific activities of

*Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(5): 675–685.

- [16] 谷天燕, 刘晓楠, 李玲聪, 刘妍池, 胡少锋, 吕晨茵, 刘华, 赵国刚. 两端融合表达几丁质结合结构域提高几丁质酶抗真菌活性. *微生物学报*, 2019, 59(4): 762–770.
- Gu TY, Liu XN, Li LC, Liu YC, Hu SF, Lü CY, Liu H, Zhao GG. Enhancing antifungal activity of chitinase by fusion of chitin binding domain at both termini. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(4): 762–770. (in Chinese)
- [17] Su HP, Gao L, Sun JN, Mao XZ. Engineering a carbohydrate binding module to enhance chitinase catalytic efficiency on insoluble chitinous substrate. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129462.
- [18] Lin FP, Wu CY, Chen HN, Lin HJ. Effects of C-terminal domain truncation on enzyme properties of *Serratia marcescens* chitinase C. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(8): 3617–3627.
- [19] Chen L, Chen JP, Kumar A, Liu ZD. Effects of domains modification on the catalytic potential of chitinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 78: 266–272.
- [20] Henrissat B. Classification of chitinases modules. *EXS*, 1999, 87: 137–156.
- [21] Linder M, Teeri TT. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, 1997, 57(1/2/3): 15–28.
- [22] Song W, Zhang N, Yang M, Zhou YL, He NS, Zhang GM. Multiple strategies to improve the yield of chitinase a from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* to obtain plant growth enhancer and GlcNAc. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 181.

(本文责编 张晓丽)