

• 农业生物技术 •

核盘菌角质酶的克隆、表达及活性分析

吕蕊花, 史琳娜, 张喜荣, 冯昭

陕西中医药大学 医学技术学院, 陕西 咸阳 712046

吕蕊花, 史琳娜, 张喜荣, 冯昭. 核盘菌角质酶的克隆、表达及活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 386-395.

LÜ RH, SHI LN, ZHANG XR, FENG Z. Cloning, expression and activity analysis of cutinase from *Sclerotinia sclerotiorum*. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 386-395.

摘要: 角质酶可降解脂肪族或芳香族聚酯, 对聚对苯二甲酸乙二醇酯也具有较好的降解作用, 但目前市面上角质酶产品非常稀缺, 因此寻求一种高效表达的角质酶用于工程酶的开发非常有必要。本研究从核盘菌中克隆得到 8 个角质酶基因, 利用 PCR 结合 RT-PCR 技术筛选出主效基因 *SsCut-52*, 利用大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 将 *SsCut-52* 进行异源表达并通过镍柱亲和层析的方法分离纯化, 研究重组酶的特性及其致病性。*SsCut-52* 全长为 768 bp, N 端有 17 个信号肽, 进化树分析显示其氨基酸序列和葡萄孢属 (*Botrytis*) 角质酶同源性最高, 和蜡盘菌属 (*Rutstroemia*) 角质酶亲缘关系也较近。*SsCut-52* 在核盘菌侵染植物的过程中高效表达, 在菌丝形成菌核的过程中表达量也高于其他角质酶基因。异源表达检测结果显示, 角质酶以包涵体的形式存在, 复性的 *SsCut-52* 在 pH 6.0 时活性最高, 比活力达到 3.45 U/mg, 在 pH 为 4.0–10.0 时活性均较高。最适温度为 20–30 °C, 当温度高于 50 °C 时该酶的残余活性低于 60%。植物叶片侵染结果表明, *SsCut-52* 对核盘菌侵染板蓝根叶片具有一定的促进作用。

关键词: 核盘菌; 角质酶; 硝基苯丁酸酯; 原核表达; 蛋白活性

Received: September 8, 2021; **Accepted:** November 17, 2021; **Published online:** November 23, 2021

Supported by: Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province, China (2021JQ-725); Discipline Innovation Team of Shaanxi University of Chinese Medicine, China (2019-YS04); General Special Scientific Research Program of Shaanxi Province Education Department, China (21JK0595); Research Expenses of Shaanxi University of Chinese Medicine, China (2017PY01)

Corresponding author: LÜ Ruihua. E-mail: lvruihua1987@163.com

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2021JQ-725); 陕西中医药大学学科创新团队 (2019-YS04); 陕西省教育厅一般专项科研计划 (21JK0595); 陕西中医药大学科学研究计划 (2017PY01)

Cloning, expression and activity analysis of cutinase from *Sclerotinia sclerotiorum*

LÜ Ruihua, SHI Linna, ZHANG Xirong, FENG Zhao

College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

Abstract: Cutinase can degrade aliphatic and aromatic polyesters, as well as polyethylene terephthalate. Lack of commercially available cutinase calls for development of cost-effective production of efficient cutinase. In this study, eight cutinase genes were cloned from *Sclerotinia sclerotiorum*. The most active gene *SsCut-52* was obtained by PCR combined with RT-PCR, expressed in *Escherichia coli* BL21 and purified by Ni-NTA affinity chromatography to study its characteristics and pathogenicity. *SsCut-52* had a total length of 768 bp and 17 signal peptides at the N terminals. Phylogenetic analysis showed that its amino acid sequence had the highest homology with *Botrytis keratinase* cutinase and was closely related to *Rutstroemia* cutinase. *SsCut-52* was highly expressed during the process of infecting plants by *Sclerotinia sclerotiorum*. Moreover, the expression level of *SsCut-52* was higher than those of other cutinase genes in the process of sclerotia formation from mycelium. The heterologously expressed cutinase existed in the form of inclusion body. The renatured *SsCut-52* was active at pH 4.0–10.0, and mostly active at pH 6.0, with a specific activity of 3.45 U/mg achieved. The optimum temperature of *SsCut-52* was 20–30 °C, and less than 60% of the activity could be retained at temperatures higher than 50 °C. Plant leaf infection showed that *SsCut-52* may promote the infection of Banlangen leaves by *Sclerotinia sclerotiorum*.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; cutinase; nitrophenyl butyrate; prokaryotic expression; protein activity

核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 是一种世界性的死体营养型真菌, 可侵染 600 多种植物^[1], 自 1837 年报道以来, 一直是以毁灭性病害的形式出现。病原菌在侵染植物过程中可分泌多种细胞壁裂解酶类物质, 包括果胶酶、纤维素酶、角质酶等, 其中角质酶不仅可以水解植物最外层保护组织——角质层和木栓层^[2-3], 许多植物病原真菌的角质酶还和病原菌的毒性相关, 例如在桃褐腐病菌 *Monilinia fructicola* 中, 过表达 *MfCUT1* 可以增强病原菌侵染李属植物的能力^[4], 在玉米黄斑病菌 *Curvularia lunata* 中, 敲除 *CICUT7* 可降低其对

玉米叶片的毒力^[5]。油菜轻叶斑病菌 *Pyrenopeziza brassicae* 的角质酶单突变株 NH10-1224 在经角质诱导后未检测出角质酶的活性, 扫描电镜下也未在突变株中观察到角质酶渗入到角质层而引起侵染症状, 更加直观地表明角质酶是 *P. brassicae* 侵染油菜角质层的必要前提^[6]。角质酶除参与病原菌的毒性外, 还参与真菌侵染结构和附着胞的形成^[7-8], 此外, 在蚕豆锈病致病过程中, 角质酶通过参与孢子粘贴到寄主表面的方式参与其侵染过程^[9]。

角质酶属于丝氨酸酯酶, 既可催化水解不溶性多聚体角质的酯键, 也可以作用于其他长

链、短链脂肪酯、乳化的甘油三酯等^[10],来源于腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*^[11]和炭疽病菌 *Glomerella cingulata*^[12]角质酶的晶体结构已被解析,它与脂肪酶或酯酶通过共同的 α/β 水解酶进行折叠^[13]。角质酶可降解脂肪族或芳香族聚酯,甚至对聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 也具有较好的降解作用^[14-15],近年来角质酶被人们所重视,将特异腐质霉 *Humicola insolens* 的角质酶进行重组原核表达,发酵条件经优化后发酵罐产生的角质酶酶活最高可达 2 233 U/mL,是摇瓶水平酶活的 13 倍^[16]。在培养基中含有木瓜角质的情况下,镰刀菌 *Fusarium falciforme* 发酵液测得的角质酶活性可达 (3.42 ± 0.24) U/mL^[17]。虽然从病原菌中诱导表达的角质酶报道较多,但目前角质酶活性也仅限于研究层面,市面上角质酶产品非常稀缺,因此寻求一种高效表达的角质酶用于工程酶的开发非常有必要。本研究从具有较强侵染能力的核盘菌中筛选得到高效表达的角质酶基因,采用异源表达的方法得到该角质酶,进一步对其特性进行研究,以期为后期该蛋白的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

核盘菌 (菌株编号: CCTCC AF 2021085 *Sclerotinia sclerotiorum* Ss10715) 为前期从油菜秸秆中分离并保存于实验室, pMD18-T 载体、RNA 提取试剂盒、反转录及定量 PCR 所用试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、*Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司, pET-28a(+) 载体为本实验室保存。4-硝基苯丁酸酯 (4-nitrophenyl butyrate, PNP) 购自上海麦克林生化科技有限

公司, Ni²⁺-NTA 亲和纯化柱子、核酸及蛋白电泳所用试剂均购自生工生物工程 (上海) 有限公司。

1.2 核盘菌角质酶基因 *SsCut* 的克隆与表达分析

收集 PDA 培养基上生长的 4 个不同时期 (PDA 培养基上生长的菌丝、菌丝团渗出液体、开始形成黑色素、成熟的菌核阶段) 的核盘菌,以及菌丝侵染 24 h 的板蓝根叶片为样本,按照 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶检测 RNA 提取质量并用微量紫外分光光度计测定浓度。以提取的总 RNA 为模板, 将其反转录为 cDNA, 以 EF-F/EF-R 为引物检测 cDNA 的质量,检测合格后以此为模板进行 PCR 及 RT-PCR 扩增。从核盘菌基因组数据库中共检索得到 8 个角质酶基因序列, 采用同源克隆的方法设计 PCR 及 RT-PCR 引物 (表 1)。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 结合 RT-PCR 结果筛选出角质酶的主效基因, 将主效基因进行胶回收, 回收产物与 pMD18-T simple vector 连接并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑选 PCR 鉴定为阳性的菌株送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序。

1.3 核盘菌角质酶主效基因 *SsCut-52* 及编码蛋白质进化分析

将克隆得到的角质酶主效基因 *SsCut-52* 序列进行分析, 使用 ExPasy 在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *SsCut-52* 的基本理化性质, 使用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 预测蛋白质信号肽和亚细胞定位。将其氨基酸序列提交 NCBI 进行序列比对, 利用 MEGA 软件邻接法 (neighbor-joining method) 构建 *SsCut-52* 蛋白分子系统发育树。

表 1 PCR 及 qRT-PCR 所用引物

Table 1 Primers used for PCR and qRT-PCR

Primers name	Sequences (5'→3')
Primers used for PCR	
XM_001596490-FF	ATGTATTCACCCATCTTCCT
XM_001596490-FR	CTACTCAATCTTCCCCAAAA
XM_001597636-FF	ATGTCATGCATACATAGGGG
XM_001597636-FR	TTATTTATAAGGCCAGCCAC
XM_001591427-FF	ATGTTCTCACAAACGGTACT
XM_001591427-FR	CTAAAGACATTGCGCATAAT
XM_001590986-FF	ATGAAGACCTCAACCCAACA
XM_001590986-FR	TTACAAACCCGCAGCTTTCT
XM_001586279-FF	ATGAAGTTCTCAGTTTCCCT
XM_001586279-FR	TTAAACAGCACCAACAGCAT
XM_001586084-FF	ATGAAGACTCCACAATACTT
XM_001586084-FR	TTACATACCAGTCGCCGTCT
XM_001589112-FF	ATGCATTCTCTTCTATCCT
XM_001589112-FR	CTACAACAATAATCCCAACC
XM_001585452-FF	ATGAAGCTCAATTTCTCCTCT
XM_001585452-FR	TTATTTAGCGGCAGCAACCA
EF-F	TCCTATCTCCGGTTTCAACG
EF-R	GCAAGCAATGTGAGCAGTGT
Primers used for qRT-PCR	
XM_001596490-F	CTCCAATCCGTCACCTCGTA
XM_001596490-R	CTCCACGGCTGCAATCAAAT
XM_001597636-F	ATGGAAGTTGTGCCACGATG
XM_001597636-R	TCACCACCGGATAGAAACCC
XM_001591427-F	TCTCAGGGTGGCCAAATCAT
XM_001591427-R	GAGCAAATCCTTGGGCTCTG
XM_001590986-F	GGTCACATCGGCTCTATCCA
XM_001590986-R	ATGAGAGGCCTTGAAGTCT
XM_001586279-F	TAGCTCTTCTGTGCGCAGAG
XM_001586279-R	AGCAGCTACTACGGCTGATT
XM_001586084-F	TCCCTATCCTGCCGATGTTC
XM_001586084-R	GAGTTGGCCTCCTTGAGAGT
XM_001589112-F	AACCTCAGCATCAGCTCTGT
XM_001589112-R	TAGACCACCACCAAGACCAC
XM_001585452-F	GCTGGATCAGCTCTGTTGTG
XM_001585452-R	TATTTAGCGGCAGCAACCAC
β-tubulin-F	TTGGATTTGCTCCTTTGACCAG
β-tubulin-R	AGCGGCCATCATGTTCTTAGG

1.4 *SsCut-52* 基因原核表达载体的构建及转化

预测信号肽切割位点, 根据 *SsCut-52* 成熟肽 cDNA 片段设计引物, 上游引物为 5'-CGGAATTCGCGCCATTACCACCGGACC-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物为 5'-CCCTCGAGTTTATGCGGCAGCAACCACAA-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点), 以 cDNA 为模板进行目的基因的扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶回收, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别将 PCR 产物和 pET-28a(+) 质粒进行双酶切, 分别回收酶切产物, 二者经 T4 DNA 连接酶在 25 °C 连接 2 h 后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, PCR 筛选阳性菌株并将双酶切鉴定正确的菌株进行测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pET-28a(+)-*Cut52*, 并将测序正确的质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 经 PCR 验证正确的重组细胞作为诱导菌株。

1.5 重组角质酶 *SsCut-52* 的诱导表达

将导入 pET-28a(+)-*Cut52* 载体的 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞进行扩大培养, 按照 1:100 的体积比接入 LB 液体培养基 (卡那霉素 50 mg/mL) 中进行扩大培养, 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG), 至终浓度为 0.4 mmol/L。28 °C、220 r/min 诱导表达, 每隔 1 h 取 1 mL 样品, 连续诱导 5 h, 将样品进行离心收集菌体, 用 100 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬菌体后加入 20 μL 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液沸水浴 10 min, 离心取上清进行 SDS-PAGE 胶检测其表达量。为了进一步纯化 *SsCut-52*, 将诱导所得菌液离心收集菌体, 加入超声波破碎缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.8) 进行重悬, 混匀后超声破碎 (开 2 s/关 3 s) 30 min, 离心后向沉淀中加入 8 mol/L 的尿素溶解包涵体, 4 °C 过夜溶解并收集上清液。

1.6 重组蛋白的复性、纯化及活性测定

由于角质酶以包涵体形式存在,因此采用梯度透析法进行复性,将包涵体溶解上清液装入透析袋中,4℃条件下依次在不同浓度的透析缓冲液(6 mol, 4 mol, 2 mol, 1 mol, 1×PBS)中进行透析,每个梯度透析12 h以上,SDS-PAGE检测透析效果。为了得到纯化的SsCut-52,采用Ni-NTA亲和层析柱将透析后的蛋白液进行分离纯化,参照蛋白纯化试剂盒说明书进行操作。分别用10 mmol/L, 100 mmol/L、500 mmol/L的咪唑洗脱液进行冲洗,用SDS-PAGE检测洗脱效果。将复性纯化的SsCut-52进行低温冷冻干燥,重组角质酶活性的测定参考Sooksai等^[17]的方法进行,酶活定义为每分钟催化对硝基苯丁酸酯水解生成1 μmol对硝基酚的酶量即为一个酶活单位。

1.7 最适 pH 及最适温度的测定

在30℃条件下测定重组角质酶的活性,配制不同pH值0.1 mol/L的缓冲液[醋酸钠缓冲液(pH 3.0–6.0)、NaH₂PO₄/Na₂HPO₄缓冲液(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl缓冲液(pH 8.0–9.0)和硼酸盐缓冲液(pH 9.0–11.0)]^[17],并以该pH值的缓冲液配制0.1 mol/L的硝基苯丁酸酯作为底物,每个体系里面加入800 μL缓冲液、500 μL底物、100 μL Triton X-100、3 mg SsCut-52纯化蛋白,反应10 min后测重组酶水解底物的水平,每个pH值平行测定5次取平均值分析pH的稳定性。为测得不同温度(20–80℃)对重组酶活性的影响,在pH 6.0条件下测定,反应体系同上,分析其热稳定性。

1.8 SsCut-52 对板蓝根叶片的侵染效果测定

用灭菌牙签将板蓝根植株的真叶表面刺伤,分别接种核盘菌菌丝块,然后在菌丝块周边分别加入100 μL的PBS缓冲液和SsCut-52纯化复性蛋白液,保鲜膜包裹保湿,每个处理

重复3次,置于光照培养箱中进行培养(25℃, 12 h光照/12 h黑暗),每日对其侵染情况进行观察并记录。

2 结果与分析

2.1 核盘菌角质酶基因的克隆与表达分析

以PDA培养基上生长不同阶段的菌丝、菌核,以及核盘菌菌丝侵染48 h的板蓝根叶片为材料,从核盘菌基因组数据库中分析并成功克隆了8个角质酶基因,其条带单一且均已测序获得相关序列。为研究角质酶侵染植物过程中的主效基因,设计定量PCR引物进行qPCR检测,由图1可明显地分析出XM_001585452在核盘菌侵染植物的时候高效表达,在核盘菌生长的4个不同阶段(S1–S4)其表达量也高于其他角质酶基因,因此我们将其确定为主效基因并命名为SsCut-52。

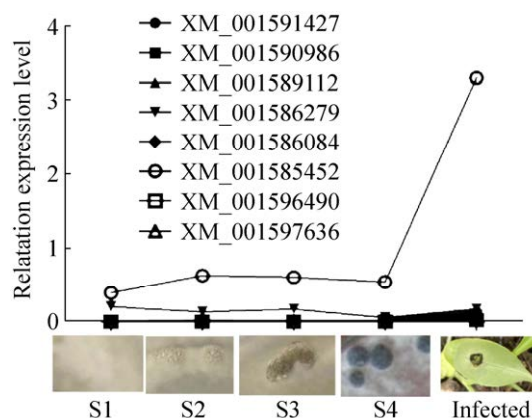


图1 RT-PCR分析核盘菌8个角质酶基因在不同阶段的表达量

Figure 1 Analysis of the expression level of 8 cutinase genes of *Sclerotinia sclerotiorum* at different stages used RT-PCR. S1, S2, S3 and S4 represent the hyphae growing on PDA medium, liquid exudation, melanin begins to form and mature sclerotia, respectively. Infected indicates that *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae-infected leaves of Banlangen for 48 h.

2.2 *SsCut-52* 基因序列的获得与其编码蛋白的基本理化性质

经TA克隆获得的*SsCut-52*基因全长为768 bp, 含一个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码255个氨基酸, 将该序列提交到NCBI并获得序列号MZ611860。在线预测该蛋白质的分子量大小为25.74 kDa, 理论等电点为4.57, N端信号肽为17个。将该cDNA及其编码的氨基酸序列在NCBI网站上进行Blast比对, 采用neighbor-joining作进化树分析, 结果表明, MZ611860和葡萄孢属*Botrytis*角质酶同源性最高, 和蜡盘菌属*Rutstroemia*角质酶亲缘关系也较近, 与小毛盘菌属*Lachnellula*、曲霉属*Aspergillus*、篮状菌属*Talaromyces*等亲缘关系较远(图2)。

2.3 *SsCut-52* 基因原核表达载体的鉴定及其在大肠杆菌BL21中的表达

利用EcoR I和Xho I对重组子和pET28a(+)分别进行双酶切鉴定, 酶切产物经1%琼脂糖凝

胶电泳鉴定分别在5300 bp和700 bp附近出现2条亮带, 而空载则只在5300 bp处出现条带。此外, 重组质粒的测序结果与克隆序列完全一致, 表明*SsCut-52*原核表达载体构建成功。将测序鉴定正确的重组质粒*SsCut-52*转化大肠杆菌BL21(DE3), 经0.4 mmol/L IPTG诱导表达后进行SDS-PAGE分析, 结果显示, 融合蛋白经过28℃诱导后在25–30 kDa间出现蛋白条带, 随着诱导时间的增加其表达量逐渐增大, 其在诱导4 h后表达量最高(图3)。

2.4 *SsCut-52* 的复性及对板蓝根叶片的侵染效果

诱导收集的大肠杆菌BL21(DE3)菌液经超声波破碎, SDS-PAGE检测结果表明上清液中无蛋白条带(图4, lane 1), 目的蛋白以包涵体形式存在(图4, lane 2), 即该融合蛋白不可溶。用8 mol/L尿素对包涵体进行溶解, 大部分目的蛋白可被溶解(图4, lane 3), 经离心采用梯度透析法进行复性, 复性后的蛋白溶液经Ni²⁺-NTA

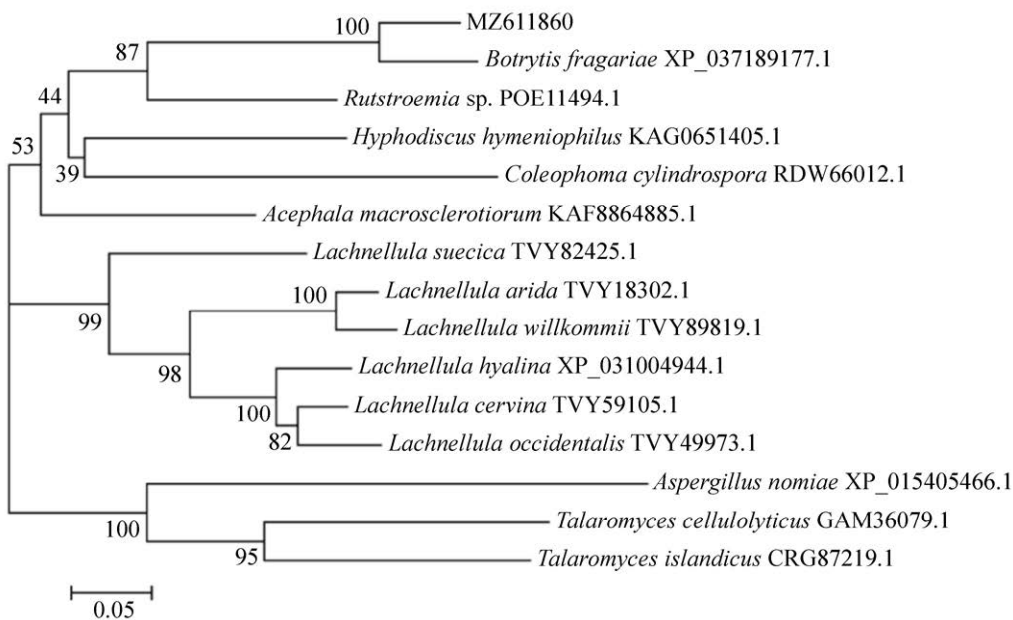


图2 基于邻接法构建的角质酶氨基酸序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of cutinases amino acid sequence constructed by neighbor-joining method.

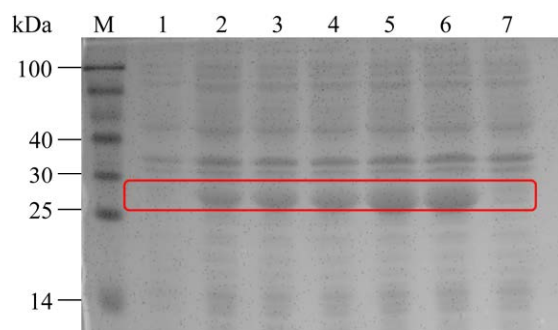


图3 重组 pET-28a(+)-*Cut52* 载体转化 BL21 菌株诱导表达不同时间蛋白表达 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE profile of proteins in strain BL21 transformed with the recombinant vector pET-28a(+)-*Cut52*. M: protein molecular weight standard; 1-6: total proteins of recombinant strain pET-28a(+)-*Cut52* after induced for 5 hours; 7: strains harbouring pET-28a(+) after induced for 5 hours.

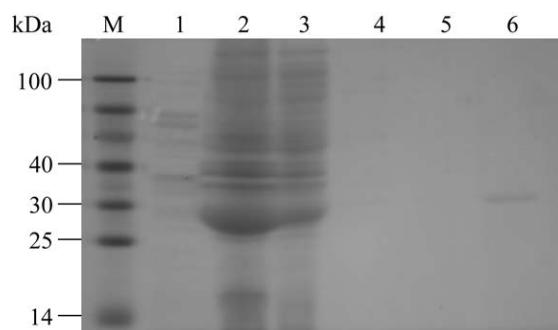


图4 重组蛋白 SsCut-52 的纯化分析

Figure 4 Purification and analysis of recombinant SsCut-52. M: protein molecular weight standard; 1: crushing supernatant; 2: crushing precipitation; 3: dissolution of crushing precipitation using 8 mol/L urea; 4: sample from the eluted solution with 10 mmol/L imidazole; 5: sample from the eluted solution with 100 mmol/L imidazole; 6: sample from the eluted solution with 500 mmol/L imidazole.

亲和层析柱进行分离纯化。用 10 mmol/L 和 100 mmol/L 的咪唑洗脱液不能将目的蛋白洗脱下来 (图 4, lane 4 和 lane 5), 但当用 500 mmol/L 的咪唑洗脱液可以把目的蛋白完全洗脱 (图 4,

lane 6)。将复性纯化的 SsCut-52 进行低温冷冻干燥, 1 mL 纯化的蛋白液可获得 0.03 g 冻干粉。

侵染结果表明, 滴加 PBS 缓冲液的板蓝根叶片接种菌丝后产生的病斑面积明显比滴加纯化的 SsCut-52 叶片病斑面积小 (图 5), 说明核盘菌的角质酶在病原菌侵染板蓝根叶片过程中具有一定的促进作用。

2.5 最适 pH 值及最适温度的测定

由 6 图可以看出, SsCut-52 在 pH 3.0-10.0 均表现出降解底物对硝基苯丁酸酯的活性, 其在 pH 6.0 时活性最高, 达到 3.46 U/mg。当 pH 在 4.0-5.0 或者 7.0-10.0 时, 其残余活性也可达到 60% 以上, 但当 pH 为 3.0 或 11.0 时, SsCut-52 活性迅速下降, 残余活性分别降到 11.7% 和 5.6% (图 6A)。SsCut-52 在温度为 20-30 °C 时活性最高, 之后随着温度的上升蛋白活性逐渐下降, 80 °C 其活性完全丧失, 在温度为 40-70 °C 范围内, 其残余活性也由 89% 降到 17% (图 6B), 表明 SsCut-52 不耐高温。

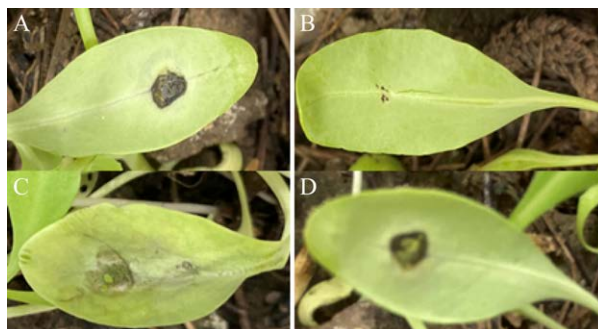


图5 SsCut-52 对于核盘菌菌丝侵染板蓝根叶片的影响

Figure 5 Effects of SsCut-52 on the infection of Banlangen leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae. (A, C) Infection status of 48 h and 72 h, respectively, after dropping refolding protein SS-Cut52. (B, D) Infection status of 48 h and 72 h, respectively, after dropping PBS buffer.

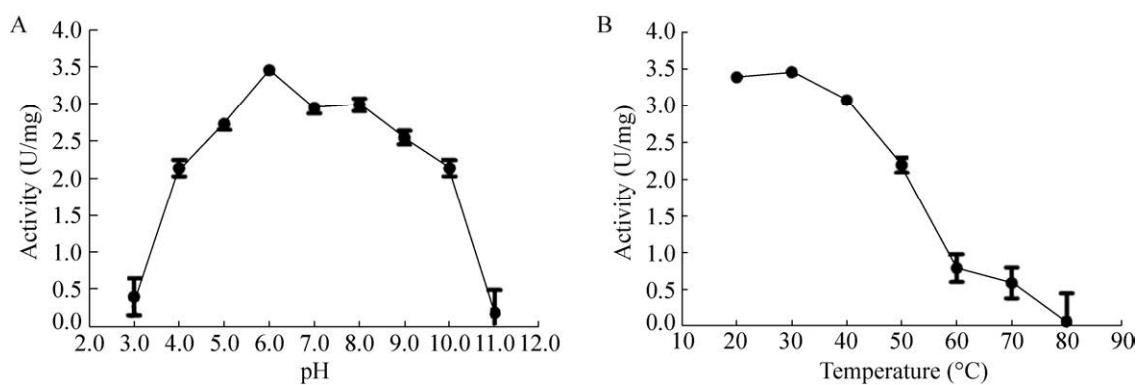


图 6 重组蛋白 SsCut-52 最适 pH 值 (A) 及最适温度 (B) 测定

Figure 6 Determination of optimum pH (A) and temperature (B) of recombinant SsCut-52 protein.

3 讨论

本文从核盘菌中克隆出了 8 个角质酶基因, 并筛选出其主效基因 *SsCut-52*, 该基因在核盘菌侵染植物的时候高效表达, 在核盘菌生长 4 个不同阶段 (S1–S4) 的表达量也明显高于其他角质酶基因, 表明核盘菌的角质酶也是被诱导表达的。植物病原真菌通过分泌少量的角质酶感受与寄主的接触, 通过接触产生角质单体, 从而诱导真菌产生更多的角质酶侵入寄主, 角质酶通过与角质接触激活转录和表达^[18], 核盘菌菌丝接种植物叶片 1 h 内就可以检测到 SsCUTA 的转录表达^[19], 表明角质酶被诱导产生的过程非常迅速。从小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* 获得的角质酶基因 *RcCUT1* 在侵染植物 18–240 h 之间都检测到了表达, 但基因 *RcCUT6* 在整个侵染阶段都没有表达, *RcCUT2–RcCUT5* 不同侵染时间点表达量有差异^[20]。我们检测核盘菌菌丝侵染板蓝根叶片 24 h 角质酶基因的表达, 仅有 *SsCut-52* 高量表达, 其他 7 个角质酶基因都微量表达, 表明不同病原菌在侵染植物过程中角质酶的表达模式有差异。角质酶除了具有诱导酶的特性外还与植物致病性密切相关, 吴群等^[21]用核盘菌角质酶 SsCut 粗蛋白和

纯化蛋白浸润烟草叶片, 可引起烟草叶片的过敏性坏死反应。李丹丹^[22]推测核盘菌角质酶 SsCUT2 可能通过诱发植物活性氧的迸发引起本氏烟草产生类似过敏性反应的细胞死亡, 具有类似激发子的功能。本研究用 SsCut-52 纯化复性蛋白液滴加到核盘菌菌丝块侵染的板蓝根叶片上, 引起的病斑面积明显比对照组大, 表明角质酶在菌丝侵染板蓝根叶片过程中具有一定的促进作用, 这进一步说明核盘菌角质酶具有蛋白激发子的功能, 与植物致病性有关。

本研究从核盘菌中筛选出的主效基因 *SsCut-52* 全长为 768 bp, 预测的蛋白质分子量大小为 25.74 kDa, 测得比活力为 3.45 U/mg。从病原真菌中获得的角质酶其分子量在 15–60 kDa, 大部分角质酶都具有脂肪酶的功能, 且作用于 4-硝基苯丁酸酯 (4-nitrophenyl butyrate, PNP) 的活性较高^[23–27]。将桃褐腐菌 *Monilinia fructicola* 的角质酶基因 *cut1* 连接到 pET-28a 载体上, 诱导 18 h 后测得角质酶活性可达每 100 μ L 4 U^[26]。而嗜热放线菌 *Thermobifida fusca* 中克隆并表达的角质酶 Tfu_0882 和 Tfu_0883 纯化后的活性分别可达 223.1 U/mg 和 458.2 U/mg^[28]。目前已报道的角质酶大都存在于破碎的上清里面, 但本研究将重组质粒进行诱导后检测的重组蛋白以包涵

体形式存在, 因此采用稀释复性的方法对包涵体进行复性, 后通过 Ni-NTA 柱纯化收集目的蛋白, 最终获得具有活性的角质酶。本文虽在复性和纯化过程中会造成一部分角质酶活性的损失, 但这也为角质酶原核表达包涵体蛋白的复性条件提供了参考方法。

本研究从核盘菌中获得的角质酶最适温度为 20–30 °C, 在 pH 4.0–10.0 时活性均较高, 并且可促进核盘菌菌丝侵染板蓝根叶片, 这也与核盘菌的强侵染性及宿主广泛相关, 在春季子囊孢子或菌丝侵染植物, 适宜的温度给病原菌提供了适合大量繁殖的条件, 也为角质酶发挥最大作用提供了可能性。前人报道的角质酶最适 pH 值在 8.0–9.0 范围内, 而在 pH 值中性条件下 (6.0–8.0) 酶活较低^[16,25,29], SsCut-52 在 pH 6.0 时活性最高, 当 pH 在 4.0–5.0 或者 7.0–10.0 时其残余活性也可达到 60%以上, 这就表明 SsCut-52 在相当宽的 pH 值范围内都具有较高的活性, 可为该酶的进一步开发利用提供参考依据。

REFERENCES

- [1] Liang XF, Rollins JA. Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 2018, 108(10): 1128-1140.
- [2] Li D, Sirakova T, Rogers L, et al. Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 7905-7912.
- [3] Wang YX, Chen JY, Li DW, et al. *CgICUT1* gene required for cutinase activity and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of *Camellia oleifera*. *Eur J Plant Pathol*, 2017, 147(1): 103-114.
- [4] Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, et al. Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, *MfCUT1*, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp.. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(2): 176-186.
- [5] Liu T, Hou J, Wang Y, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis in fungal-plant interactions of cutinase gene family and functional analysis of a putative CICUT7 in *Curvularia lunata*. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(3): 1105-1115.
- [6] Li D, Ashby AM, Johnstone K. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(6): 545-552.
- [7] Skamnioti P, Gurr SJ. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2674-2689.
- [8] Auyong AS. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *J Plant Pathol Microbiol*, 2015, 6(3).
- [9] Deising H, Nicholson RL, Haug M, et al. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *Plant Cell*, 1992, 4(9): 1101-1111.
- [10] Dutta K, Sen S, Veeranki VD. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem*, 2009, 44(2): 127-134.
- [11] Longhi S, Czjzek M, Lamzin V, et al. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol*, 1997, 268(4): 779-799.
- [12] Nyon MP, Rice DW, Berrisford JM, et al. Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *J Mol Biol*, 2009, 385(1): 226-235.
- [13] Ollis DL, Cheah E, Cygler M, et al. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng Des Sel*, 1992, 5(3): 197-211.
- [14] Donelli I, Taddei P, Smet PF, et al. Enzymatic surface modification and functionalization of PET: a water contact angle, FTIR, and fluorescence spectroscopy study. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(5): 845-856.
- [15] Guebitz GM, Cavaco-Paulo A, Cavaco-Paulo A. Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalization of synthetic polymers. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(1): 32-38.
- [16] 孙益荣, 吴敬, 宿玲恰. 特异腐质霉角质酶在大肠杆菌中的表达和发酵优化. *食品与机械*, 2018, 34(4): 1-5. Sun YR, Wu J, Su LQ. Expression of *Humicola insolens* cutinase in *Escherichia coli* and its optimization of fermentation. *Food Mach*, 2018, 34(4): 1-5 (in Chinese).

- [17] Sooksai T, Bankeeree W, Sangwatanaroj U, et al. Production of cutinase from *Fusarium falciforme* and its application for hydrophilicity improvement of polyethylene terephthalate fabric. 3 Biotech, 2019, 9(11): 389.
- [18] Woloshuk CP, Kolattukudy PE. Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *psii*. PNAS, 1986, 83(6): 1704-1708.
- [19] Dallal Bashi Z, Rimmer SR, Khachatourians GG, et al. Factors governing the regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* cutinase A and polygalacturonase 1 during different stages of infection. Can J Microbiol, 2012, 58(5): 605-616.
- [20] Lu L, Rong W, Massart S, et al. Genome-wide identification and expression analysis of cutinase gene family in *Rhizoctonia cerealis* and functional study of an active cutinase RcCUT1 in the fungal-wheat interaction. Front Microbiol, 2018, 9: 1813.
- [21] 吴群, 赵同瑶, 唐仕好, 等. 核盘菌激发子基因 SsCut 克隆、原核表达及纯化. 植物保护学报, 2014, 41(5): 630-636.
Wu Q, Zhao TY, Tang SY, et al. Cloning, prokaryotic expression and purification of the elicitor gene SsCut from *Sclerotinia sclerotiorum*. Acta Phytologica Sin, 2014, 41(5): 630-636 (in Chinese).
- [22] 李丹丹. 核盘菌 Sscut2 和 Ssmfs1 基因功能的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
Li DD. Functional study on Sscut2 and Ssmfs1 from *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [23] Chen Z, Franco CF, Baptista RP, et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73(6): 1306-1313.
- [24] 李国田. 小麦条锈菌角质酶基因的克隆、表达及功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
Li GT. Molecular cloning, heterologous expression and characterization of cutinase gene from *Puccinia striiformis* F. sp. *tritici*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2008 (in Chinese).
- [25] 刘辉. 烟草赤星病菌角质酶的纯化、性质及在致病中的作用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
Liu H. Purification and characterization of cutinase from *Alternaria longipes* and its role in pathogenesis[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [26] 麻莹. 桃褐腐菌角质酶的克隆与表达[D]. 北京: 北京化工大学, 2012.
Ma Y. Cloning of cutinase gene from *Monilinia fructicola* and expression[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2012 (in Chinese).
- [27] Villafana RT, Rampersad SN. Diversity, structure, and synteny of the cutinase gene of *Colletotrichum* species. Ecol Evol, 2020, 10(3): 1425-1443.
- [28] 陈晟. 嗜热单孢菌角质酶的基因鉴定、高效表达及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
Chen S. Gene identification, high-efficient expression and molecular modification of *Thermobifida fusca* cutinase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009 (in Chinese).
- [29] Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(5): 1556-1562.

(本文责编 陈宏宇)