

康宁木霉 *cbh2* 基因的克隆与结构特征分析

吴兴泉, 陈士华, 刘昌雄, 张一村, 薛 珍

(河南工业大学 河南省谷物资源转化与利用省级重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要: 克隆得到了康宁木霉 AS3.2774 的 *cbh2* 基因组 DNA 及 cDNA, 序列测定表明: 基因组 DNA 全长 1583 bp, cDNA 全长 1413 bp。对比 *cbh2* 基因组 DNA 序列与 cDNA 序列, 证明该基因由 4 个外显子组成, 被 3 个内含子间断隔开, 编码 470 个氨基酸的多肽。利用 Predictprotein 软件预测, 该蛋白由 9 个 α 螺旋结构和 10 个 β 折叠结构及其他结构组成, 并对其纤维素结构区、2 个糖苷水解酶家族 6 的特征结构区、信号肽等特征性结构区进行了定位。

关键词: 康宁木霉; *cbh2*; cDNA; 序列分析

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0055-04

Cloning and Structure Characteristics of *cbh2* Gene from *Trichoderma koningii*

WU Xing-quan, CHEN Shi-hua, LIU Chang-xiong, ZHANG Yi-cun, XUE Zhen

(The Key Lab of Conversion and Utilization of Grain Resource of Henan Province, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The genome DNA and cDNA of *cbh2* gene of *Trichoderma Koningii* were cloned and sequenced. The sequence analysis showed that the genome DNA and cDNA of *cbh2* gene were 1583bp and 1413bp, respectively. Through comparison, the two DNA sequences showed 4 exons that were separated by 3 introns and could encode a peptide of 470 amino acids. By means of Predictprotein software, the protein had 8 α -helixes, 7 β -sheets and some other structures. The locations of cellulose binding domain, 6 conserved domains of two glycosylhydrolase family and signal peptide in the protein were confirmed.

Key words: *Trichoderma koningii*; *cbh2*; cDNA; Sequence analysis

纤维素占植物干重的 35%~50%, 是地球上含量最丰富的碳水化合物。纤维素的利用与转化对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要的意义, 但目前, 农作物秸秆等富含纤维素的农业副产物未得到充分利用。研究表明, 纤维素酶的水解作用是一种高效、彻底、无污染地分解纤维素的理想途径。多年来, 人们通过大量筛选获得了一批可高产纤维素酶微生物菌株, 但其产酶能力仍远远满足不了日益增大的市场要求。如何提高微生物的纤维素酶生产能力, 降低纤维素酶生产成

本, 成为纤维素酶产业发展的关键。

木霉菌纤维素酶系齐全、产酶效率高、降解效果好, 因此, 进一步提高其产酶能力成为当前研究的热点^[1~3]。木霉可产生纤维二糖水解酶 (CBH I, CBH II), 内切- β -葡萄糖苷酶 (EG) 和 β 葡萄糖苷酶 (BGL) 3 类纤维素水解酶。其中 CBH I 含量最高, 在纤维素的降解过程中占主导地位。研究表明, *cbh1* 基因启动子是强启动子, 可用于其他基因的超量表达研究^[4]。研究表明, CBH II 酶活明显高于 CBH I, 但其浓度却远低于 CBH I, 因此, 研究

收稿日期: 2008-06-07

基金项目: 河南省中青年骨干教师项目; 河南工业大学博士科研启动基金项目

作者简介: 吴兴泉 (1970-), 男, 黑龙江克山人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学与分子生物学研究。

克隆 *cbh2* 基因, 利用 *cbh1* 基因启动子可提高其表达活性, 以增强木霉纤维素酶整体活力。CBH II 所占比例比 CBH I 少, 但 CBH II 酶特异性强, 降解微晶纤维素的能力比 CBH I 高 2 倍^[5]。另外, CBH II 对整个纤维素酶系的表达起着重要的调控作用^[6~8]。可见, 要通过分子改造提高木霉产纤维素酶的能力, 必须进行 *cbh2* 基因的相关研究, 但目前在我国相关的研究报道较少。

1 材料和方法

1.1 试剂

Lambda DNA/*EcoRI* + *Hind* III marker、限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind* III、IPTG、X-Gal、二甲基甲酰胺等购自上海生工生物工程有限公司; DL2000 Marker、LA *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、GC Buffer I、质粒 pMD19-T、胶回收试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit、质粒提取试剂盒等购自大连宝生物工程公司。小量植物总 RNA 提取试剂盒、M-MuLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂(RNasin)购自上海华舜生物工程公司。其余试剂为国产分析纯或化学纯。

1.2 供试菌种

康宁木霉 (*Trichoderma koningii*) AS3. 2774 购自中国科学院微生物研究所。大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α) 本实验室保存。

1.3 *cbh2* 基因组 DNA 及 cDNA 的克隆

1.3.1 引物的设计和合成 根据 GenBank 中已公布的木霉 *cbh2* 基因序列设计 1 对引物, 序列如下: 上游引物 L1: 5'-ATGATTGTCGGCATTCTCACC -3', 下游引物 L2: 5'-TTACAGGAACGATGGGTTTGC-3'。引物在上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.2 *cbh2* 基因的 PCR 扩增 以简化 CTAB 法提取康宁木霉总 DNA 为模板, 利用引物 L1、L2 和 Taakara 的 LA *Taq* 酶进行 *cbh2* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应程序: 94℃预变性 10min; 94℃变性 1min, 48℃退火 2min, 72℃延伸 2min, 共进行 30 个循环; 然后 72℃延伸 10min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 康宁木霉 *cbh2* 基因 cDNA 的 RT-PCR 扩增 *cbh2* 基因是诱导表达基因, 采用麦麸/小麦秸秆为碳源的培养基对康宁木霉进行诱导培养, 5 d 后采用小量植物总 RNA 提取试剂盒进行 RNA 的提取。以康宁木霉总 RNA 为模板, 利用 L2 为引物

进行反转录合成 cDNA 第 1 链, 再以 cDNA 第 1 链为模板, 以 L1 和 L2 为引物进行 PCR 扩增, 反应程序设置及 PCR 产物分析方法同上。

1.3.4 *cbh2* 基因组 DNA 及 cDNA 转化大肠杆菌

将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD19-T vector 克隆载体上, 转化通过 CaCl₂ 法制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。采用碱裂解小量提取法提取阳性克隆质粒, 利用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind* III 进行酶切鉴定。

1.4 *cbh2* 基因的序列测定与结构特点分析

所得阳性克隆均由大连宝生物工程有限公司在 ABI PRISM 377 型 DNA 自动测序仪上进行核苷酸序列测定。对序列测定结果采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中的 BLAST 工具、<http://bioc.columbia.edu/pp/index.html> 网站中的 Predictprotein 和 www.cbs.dtu.dk/services 网站的 SignalP-NN, Signal-HMM 等分析工具进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 *cbh2* 基因及其 cDNA 的 PCR 扩增

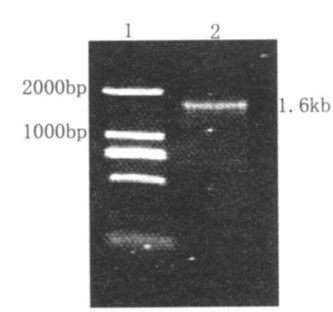
以康宁木霉总 DNA 为模板, L1 和 L2 为引物进行 *cbh2* 基因的 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 得到了一条大小为 1.6kb 的 DNA 条带, 与预期大小相符(图 1)。以康宁木霉总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 扩增 *cbh2* 基因 cDNA, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 得到了一条大小为 1.4kb 左右 DNA 条带, 与预期结果相符(图 2)。

2.2 重组质粒转化大肠杆菌

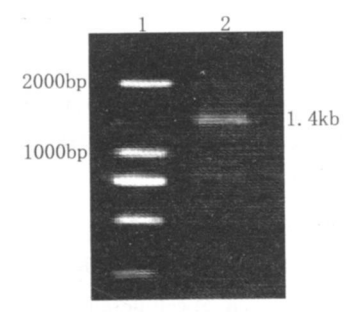
PCR 产物和 RT-PCR 产物经过胶回收试剂盒纯化后, 与 pMD19-T 载体连接, 将其转入大肠杆菌, 挑取白斑经 LB 培养基培养后, 碱法小量提取质粒。因为重组质粒的多克隆位点处具有 *EcoRI* 和 *Hind* III 酶切位点, 因此利用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind* III 进行双酶切。酶切产物电泳检测结果表明得到含有 2.7kb 的质粒 DNA 条带及目的基因(图 3, 图 4)的电泳条带。证明重组质粒已成功转入大肠杆菌。

2.3 *cbh2* 基因序列测定与结构特征分析

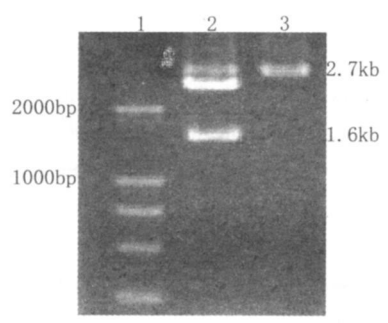
序列测定结果表明, 康宁木霉 *cbh2* 基因片段全长 1583 bp, 其中 A 的含量为 21.73%, T 的含量为 22.68%, G 的含量为 24.13%, C 的含量为 31.46%。与 GenBank 中已公布的木霉 *cbh2* 基因的同源性最



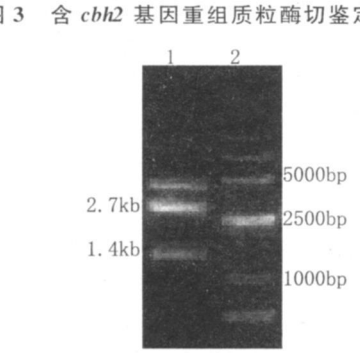
1. DL2000 Marker; 2. PCR 产物
图 1 康宁木霉 PCR 产物



1. DL2000 Marker; 2. RT-PCR 产物
图 2 康宁木霉 RT-PCR 产物



1. DL2000 Marker; 2. 康宁木霉 DNA 质粒酶切结果; 3. 空白质粒酶切结果
图 3 含 *cbh2* 基因重组质粒酶切鉴定



1. DNA Marker; 2. 重组质粒酶切结果
图 4 含 *cbh2* 基因 cDNA 重组质粒酶切鉴定

高达 87.49%。康宁木霉 *cbh2* 基因 cDNA 全长 1413bp, 其中 A 的含量为 21.23%, T 的含量为 22.36%, G 的含量为 24.56%, C 的含量为 31.85%。与 GenBank 中已公布的木霉 *cbh2* 基因的相应核苷酸序列同源性最高可达 91.93%。

对比 *cbh2* 基因组 DNA 及其 cDNA 序列,发现该基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 3 个内含子分别位于 93 ~ 143 bp, 528 ~ 583 bp 和 832 ~ 894bp 间。与其他木霉(如 AF315681, AF302657, M55080.1, M16190.1)*cbh2* 基因内含子进行对比,发现该基因 3 个内含子的核苷酸序列均存在较大变异,而且其 93 ~ 143bp 处内含子长 51 bp, 而其他木霉该内含子只有 49 bp, 该基因 832 ~ 894bp 处内含子长 63 bp, 其他木霉该内含子长 90 bp。其中变异性最大的区域出现在 96 ~ 139 bp 和 840 ~ 856bp 间。

2.4 *cbh2* 基因编码蛋白的结构特征分析

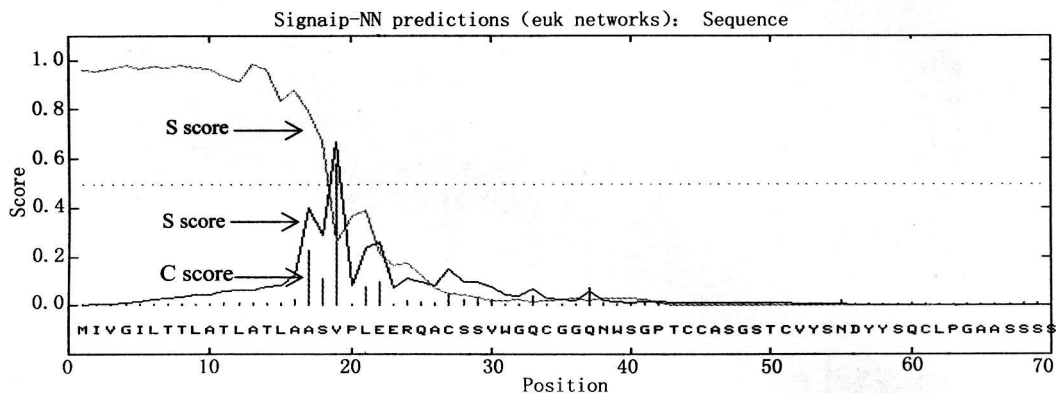
依据 *cbh2* 基因 cDNA 序列可知,该基因可编码 1 个由 470 个氨基酸组成的蛋白质, BLAST 分析表明,该蛋白氨基酸序列与其他木霉 CBH II 蛋白氨基酸序列同源性最高可达 97.45%。Predictprotein 分析表明,该蛋白氨基酸组成中以中性氨基酸为主,酸性氨基酸含量大于碱性氨基酸。分析发现,该蛋白具有 3 个 N 型糖基化位点, 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 4 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 11 个十四酰基化位点。该蛋白纤维素结构区位于 34aa—62aa 间, 序列为 CGGQNWSGPTCCA SGSTCVYSNDYYSQC。具有 2 个糖苷水解酶家族 6 的特征结构区, 分别位于 190aa—106aa 处, 序列为 VVYDLPDRDCAALASNG, 和 238aa—247aa 处, 序列为 LLVIEPDSLA。由此可知,康宁木霉 CBH II 属于糖苷酶家族 6。预测蛋白的二级结构包括 9 个 α 螺旋、10 个 β 折叠和 loop 等其他结构组成, 各二级结构所占比例为: α 螺旋 25.53%、 β 折叠 12.34%, loop 等其他结构占 62.13%。利用 SignalP 软件分析发现其 1—19 位氨基酸为该蛋白信号肽序列(图 5)。

3 结论与讨论

本研究克隆得到了康宁木霉 *cbh2* 基因组 DNA 和 cDNA, 并成功转入 *E.coli*, 通过序列测定结合生物信息学相关软件对其结构特征进行了确定, 为对该基因进一步的分子改良提供了理论依据。

另外,康宁木霉纤维素酶为诱导酶,在以纤维素为唯一碳源时可以被诱导表达。当培养体系中存在葡萄糖等单糖时,纤维素酶系基因的转录和表达受到抑制^[5]。因此,本研究采用以小麦麸皮和秸秆为碳源的基础固态发酵培养基进行培养,以利于纤维素酶系基因的转录。

康宁木霉是一种丝状真菌,有关其 RNA 的提



C score: 酶切位点; 数值越高说明其作为酶切位点的可能性越高; S score: 氨基酸数值; 越高说明该氨基酸作为信号肽部分的可能性越高; Y score: C 值和 S 值的派生值, 更准确地确定酶切位点, 数值最高处为酶切位点

图 5 CBH II 蛋白信号肽分析(SignalP- NN 分析结果)

取方法研究较少, 本研究选用与真菌细胞结构较为接近的植物的 RNA 提取方法成功地提取了康宁木霉总 RNA。试验中发现, 在 RNA 提取时的起始菌体量不能过高, 否则会导致 RNA 的迅速降解, 将严重影响 RNA 的完整性和得率。

参考文献:

[1] 陈书峰, 赵亮, 刘德华. 绿色木霉在稻壳和麸皮混合基质上固态发酵生产纤维素酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30 (1): 9—12.

[2] 张煜, 刘刚, 余少文. 里氏木霉纤维二糖水解酶 II 在毕赤酵母中的高效表达[J]. 菌物学报, 2005, 24 (3): 367—375.

[3] 刘北东, 杨谦, 周麒. 绿色木霉 AS313711 的葡聚糖内切酶基因的克隆与表达[J]. 环境学报, 2004, 9(2): 127—133.

[4] Wang T H, Liu T, Wu Z H. Novel cellulase profile of *Trichoderma reesei* strains constructed by *cbhl* gene replacement with *eg3* gene expression cassette[J]. Acta

Biochim Biophys Sin, 2004, 36(10): 667—672.

[5] Seiboth B, S Hakola, R L Mach. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17): 5318—5320.

[6] Kubicek-Pranz E M, Gruber F, Kubicek C P. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining strains with improved cellulose productivity and specificity[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 20: 83—94.

[7] Fritscher C, Messner R, Kubicek C P. Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis in *Trichoderma reesei*[J]. Experimental Mycology, 1990, 14: 451—461.

[8] Mach R L, Seiboth B, Myasnikov A, et al. The *bgII* gene of *Trichoderma reesei* QM9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16: 687—697.

(上接第 40 页)

[7] Maheswari M, Joshi D K, Saha R, et al. Transverse relaxation time of leaf water protons and membrane injury in wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to high temperature[J]. Annals of Botany, 1999, 84: 741—745.

[8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164—167.

[9] Chance B, Maddy A C. Assay of catalase and peroxidase [M] // Method of Enzymology. Academic Press, New York, USA, 1955: 755—764.

[10] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及

清除机制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 121—124.

[11] 许长成, 邹琦. 大豆叶片早促衰老及其与膜脂过氧化关系[J]. 作物学报, 1993, 19(4): 359—364.

[12] Yan C—S. Antioxidant responses to water stress in plant leaves [J]. J Yantai Normal Univ (Nat Sci), 2002, 18(2): 220—225.

[13] 施大伟, 陈国祥, 张成军, 等. 两种高产小麦旗叶自然衰老过程中生理特性的比较[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 23—26.

[14] 姜春明, 尹燕桦, 刘霞, 等. 不同耐热性小麦品种旗叶膜脂过氧化和保护酶活性对花后高温胁迫的响应[J]. 作物学报, 2007, 33(1): 143—148.