

# 球孢白僵菌 HFW -05 几丁质酶基因的克隆与序列分析

甄 伟<sup>1,2</sup>, 杜立新<sup>2</sup>, 曹伟平<sup>2</sup>, 王容燕<sup>2</sup>, 宋 健<sup>2</sup>, 王金耀<sup>2</sup>, 冯书亮<sup>2</sup>

(1. 河北大学 生命科学院, 河北 保定 071000; 2. 河北省农林科学院 植物保护研究所,  
河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000)

**摘要:**通过对粉虱、小菜蛾高效的球孢白僵菌 HFW -05 几丁质酶基因的克隆及序列分析,旨在从分子水平上了解 HFW -05 菌株的几丁质酶特性。根据已发表的几丁质酶基因序列 (EU828354)设计几丁质酶基因全长引物,扩增 *HFWB bchitl* 全长基因,与大肠杆菌 (*Escherichia coli*)克隆载体 pMD19-T连接获得含有 *HFWB bchitl* 全长基因的重组质粒 pMDchitl 并测序。该基因的编码区包括 1 047 bp,编码了 348个氨基酸,分子量约为 36 795 kDa,进行同源性比较分析结果表明:其基因序列与球孢白僵菌菌株 NCM1216 几丁质酶基因 (EU828354)和球孢白僵菌菌株 Bb0062 几丁质酶基因 (AY145440)的核苷酸同源性最高,同源性达到 98%。氨基酸序列与球孢白僵菌菌株 Bb0062 几丁质酶 (AAN41259)同源性达到 99%。

**关键词:**球孢白僵菌;几丁质酶基因;克隆

**中图分类号:** S182; S476<sup>+</sup>. 12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091 (2010) 01 - 0036 - 04

## Cloning and Analysis of a Chitinase Gene from *Beauveria bassiana* HFW -05

ZHEN Wei<sup>1,2</sup>, DU Li-xin<sup>2</sup>, CAO Weiping<sup>2</sup>, WANG Rong-yan<sup>2</sup>,  
SONG Jian<sup>2</sup>, WANG Jin-yao<sup>2</sup>, FENG Shu-liang<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071000, China; 2. Institute of Plant Protection,  
Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, IFM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China)

**Abstract:** To study characters of chitinase from *Beauveria bassiana* HFW -05 highly toxic to *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*, the chitinase gene *HFWB bchitl* was firstly cloned from *Beauveria bassiana* HFW -05. According to the published sequences of chitl genes (EU828354), a pair of primers was designed for full length DNA cloning of *HFWB bchitl* gene by PCR. Subsequently, the amplified fragment of *HFWB bchitl* gene was inserted into *Escherichia coli* cloning vector pMD19-T and sequenced. Sequence analysis revealed a DNA sequence with a length of 1 047 bp and encoded an open reading frame consisting of 348 amino acids of 70 kDa peptide. The analysis shows that the gene sequence exhibited 98% identity to that of *Beauveria bassiana* NCM1216 chitinase (EU828354) and *Beauveria bassiana* Bb0062 (AY145440). The deduced amino acid sequence exhibited 99% identity to that of *Beauveria bassiana* Bb0062 chitinase (AAN41259) respectively.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; Chitinase gene; Cloning

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*)作为目前最常见的昆虫病原真菌之一,具有寄主范围广、致病力强,对人、畜无毒害,不伤害天敌,不污染环境等优点,广泛应用于害虫的生物防治。球孢白僵菌主要通过分泌多种胞外水解酶降解昆虫体壁侵入寄主,其分泌的水解酶主要包括蛋白酶、几丁质酶、脂酶等。

在昆虫、线虫、真菌、某些藻类<sup>[1]</sup>以及酵母<sup>[2]</sup>中

陆续发现几丁质酶 (Chitinase)的存在,几丁质酶可催化水解几丁质的 -1, 4 糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖 (NAG),几丁质酶基因作为重要的害虫防治因子被广泛研究<sup>[3]</sup>。几丁质是多数昆虫体表和中肠围食膜的主要结构成分,过量分解昆虫几丁质可引起昆虫严重的生理失调,从而达到防治害虫的目的<sup>[4]</sup>。白僵菌在穿透昆虫体壁过程中,几丁质酶

收稿日期: 2009 - 11 - 02

基金项目: 国家科技支撑项目 2008BADA5B03

作者简介: 甄 伟 (1986 - ),女,河北衡水人,在读硕士,主要从事微生物杀虫剂研究。

通讯作者: 冯书亮 (1957 - ),男,河北邢台人,研究员,主要从事杀虫微生物研究。

参与穿壁过程<sup>[5,6]</sup>。不同微生物或者同种微生物的不同菌株产生的几丁质酶存在差异,对不同几丁质酶基因进行克隆分析,有助于揭示几丁质酶在昆虫体壁水解过程中的重要作用。本研究以对粉虱、小菜蛾有很高杀虫活性的球孢白僵菌 HFW-05 菌株为供试菌株, HFW-05 菌株是通过田间分离到的球孢白僵菌进行孢子紫外诱变选育,获得的一毒力较高、性能稳定的突变株,对 2 龄烟粉虱若虫的 6 d 平均累计致死率为 96.4%;对 1、2 龄烟粉虱若虫的  $LC_{50}$  分别为  $1.87 \times 10^6$ ,  $2.09 \times 10^6$  孢子 /mL<sup>[7]</sup>,克隆球孢白僵菌 HFW-05 几丁质酶基因并分析其基因序列,旨在了解 HFW-05 菌株的几丁质酶特性,为该菌株对粉虱、小菜蛾的致病机理提供分子水平上的科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

球孢白僵菌 HFW-05 菌株为本实验室分离保存,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

### 1.2 培养基

SDY 培养基, LB 培养基。

### 1.3 主要试剂

Taq 聚合酶, 1 kb DNA Marker, pMD19-T 克隆载体购自 Takara 公司; DNA 回收试剂盒购自爱思进 Axygen 公司。

### 1.4 白僵菌 DNA 提取

参考 Khemika Songjang 等<sup>[8]</sup>的方法略加修改。

### 1.5 PCR 反应及片段回收

参考球孢白僵菌 NCM1216 几丁质酶基因序列 (EU828354), 设计 PCR 引物 (正向引物 Bbchit1F: 5'-ATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAAGCCT-3', 反向引物 Bbchit1R: 5'-TTACGCA GTCCCAAA GTCCCCT-3'), 由上海生工合成。PCR 扩增 50  $\mu$ L 反应体系包括: 1  $\mu$ L DNA 模板, 0.5  $\mu$ L Taq 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L, 购自 Takara 公司) 和 5  $\mu$ L 10  $\times$  Taq 酶缓冲液, 10 mmol/L 正向和反向引物各 1  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 无菌水补足到 50  $\mu$ L 体系。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 下预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物 3  $\mu$ L 凝胶电泳检测。目的片段回收参照回收试剂盒 (爱思进生物技术有限公司)。

### 1.6 DNA 克隆、测序

回收片段按试剂盒说明书 (购自 Takara 公司) 连接到 pMD19-T 载体上, 转化 E. coli JM109 感受态, 进行蓝白斑筛选, PCR 菌落鉴定<sup>[9]</sup>。大肠杆菌

感受态细胞制备及克隆转化具体方法参考《分子克隆实验指南》。上海生工完成测序。

### 1.7 序列及进化分析

序列分析用 DNAMAN 软件和 NCBI 网站上的 BLAST 程序完成。用 ClustalX 软件进行序列比对, 进行系统进化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 球孢白僵菌 HFW-05 几丁质酶基因的克隆

提取球孢白僵菌 HFW-05 基因组 DNA, 参考球孢白僵菌菌株 NCM1216 几丁质酶基因 (EU828354) 设计引物 (Bbchit1F; Bbchit1R)<sup>[10]</sup> 进行 PCR 扩增, 获得与预期片段大小相当的 DNA 片段。将 PCR 扩增产物回收, 连接到 pMD19-T 载体, 转化到 E. coli 感受态细胞, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子, 进一步通过 PCR 检测其中的 11 个阳性克隆, 电泳分析表明其中 10 个阳性克隆中插入了目的基因片段, 大小为 1 000 bp 左右, 酶切电泳检测 (图 1), 将阳性克隆送测序公司进行测序。

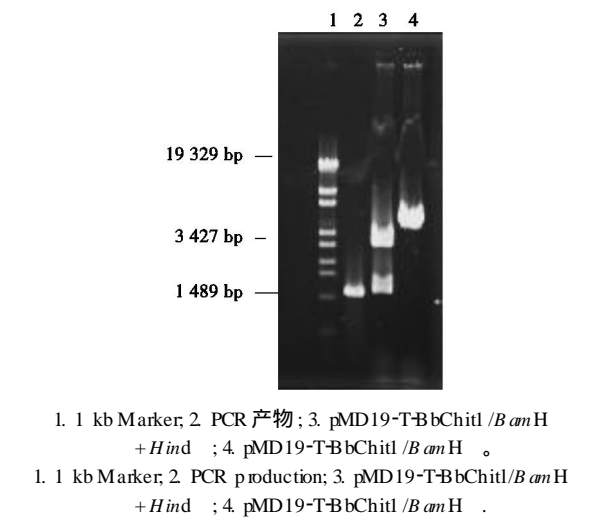


图 1 重组质粒的酶切分析

Fig 1 Digestion analysis of HFW BbChit1

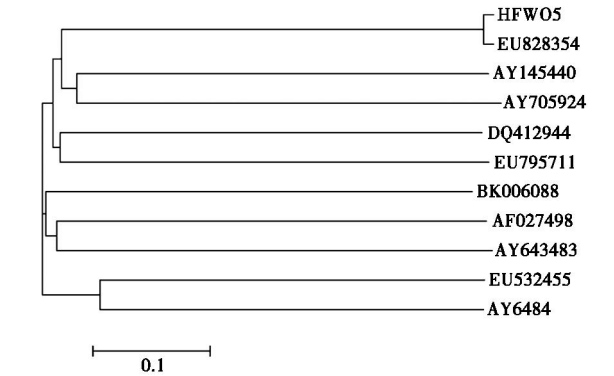
### 2.2 序列测定结果及结果分析

序列测定结果表明, 基因片段大小为 1 047 bp, 编码了 348 个氨基酸 (图 2), 这个基因和编码的蛋白分别被命名为 HFWBbchit1 和 HFWBbCHIT1。将基因序列在 NCBI Genbank 数据库通过 BLAST 进行同源基因搜索, 采用 ClustalX 软件将球孢白僵菌 HFW-05 的几丁质酶基因序列和其他物种的几丁质酶基因或同物种不同的几丁质酶基因进行同源比对, 进行系统进化分析 (图 3), HFWBbchit1 基因与球孢白僵菌菌株 NCM1216 (EU828354) 和来源于小菜蛾虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因 (AY145440) 的核苷酸同源性最高, 同源性达到 98%。HFW-05Bbchit1

1 ATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAQCCTCGCGCTCCTTCCATTGTTGGCTTCCACCATGTC  
1 M A P F L Q T S L A L L P L L A S T M V  
61 AGCGCTCGCCATTGGCGCCGCGACGACCTGCGCAACCAAGGCGCGCGCCGCGC  
21 S A S P L A P R A D T C A T K G R P A G  
121 AAAGTGTCCAGGCTACTGGGAGAACTGGGACGGTGCCAAGAACGGCGTGCAACCTCCG  
41 K V L Q G Y W E N W D G A K N G V H P P  
181 TTTGGCTGGACGCCATCCAAAACCCGACATTCGCAAGCAGCGCTACAACGTCATCAAT  
61 F G W T P I Q N P D I R K H G Y N V I N  
241 GCTGCCTTTCCCATCATCCAGCCGACGGCACCAGCTCTGGGAGGACGGCATGGACACG  
81 A A F P I I Q P D G T A L W E D G M D T  
301 GGCGTCAAGGTGGCGAGCCCGCCGACATGTGCGAGGCCAAGGCAGCGGTGCCACCATC  
101 G V K V A S P A D M C E A K A G A G A T I  
361 TTGATGTCGATTGGCGGTGCTACTGCGGCCATTGACCTGAGCTCGTGGCTGTGGCTGAC  
121 L M S I G G A T A A I D L S S S A V A D  
421 AAGTTGTCTCGACCATTTGCGGATTCTGAAAAAGTACAACCTTGACGCGATTGATATC  
141 K F V S T I V P I L K K Y N F D G I D I  
481 GACATTGAATCCGGCTCACAGCCAGCGAAACATAAACACCTGTCCACCTCGCAGACC  
161 D I E S G L T G S G N I N T L S T S I Q W  
541 AACCTGATTAGAATCATTGATGCGTCTCTCGCGCAGATGCCCGCAACTTTGGCTTACC  
181 N L I R I I D G V L A Q M P A N F G L T  
601 ATGGCGCCAGAGACTGCCTACGTTACCGGTGGGACTATTACGTACGGATCAATCTGGGCG  
201 M A P E T A Y V T G G T I T Y G S I W G  
661 TCCTACCTCCCCATCATCAAAAAGTACCTCGACAACGGTCGTCTCTGGTGGCTCAACATG  
221 S Y L P I I K K Y L D N G R L W W L N M  
721 CAGTACTACAATGGCGAAATGTACGGCTGCTCTGGCGACTCGCACAAAGGCGGTACTGTC  
241 Q Y Y N G E M Y G C S G D S H K A G T V  
781 GAAGGTTGCTTGTCTAGACCGACTGCTGAATAAGGGACTTACTATTACGGGCGTGACA  
261 E G F V A Q T D C L N K G L T I Q G V T  
841 ATCAGATTCCCTATGACAAGCAAGTGCCTGGCCTTCTGCCAGCCTGGGCTGGCGGC  
281 I T I P Y D K Q V P G L P A Q P G A G G  
901 GGCCACATGTCCCGTCCAACGTGGCGCAAGTTCTCTCCCACTACAAGGGCGCTTTGAG  
301 G H M S P S N V A Q V L S H Y K G A L K  
961 GGATTGATGACTTGGTCTCTGAACCTGGGACGGCTCCAAGAATTGGACATTGGCGACAAT  
321 G L M T W S L N W D G S K N W T F G D N  
1021 GTCAAGGGGACTTTGGGACTGCGTAA  
341 V K G T L G T A \*

图 2 球孢白僵菌 HFW-05 几丁质酶基因 HFWB bchit1 核苷酸编码序列及其编码的氨基酸

Fig 2 DNA sequence and deduced amino acids of sequence of HFWB bchit1



AF027498. *Metarhizium anisoplia*; AY145440. *Beauveria bassiana*;  
AY643483. *Drosophila melanogaster*; AY643484. *Drosophila melanogaster*;  
AY705924. *Lecanicillium lecanii*; DQ412944. *Lecanicillium lecanii*;  
EU532455. *Ostrinia nubilalis*; EU795711. *Nomophila noctuella*;  
*Beauveria bassiana*; HFW05. *Beauveria bassiana*; BK006088. *Hypocrea jecorina*.

图 3 球孢白僵菌 HFW-05 的几丁质酶基因 HFWB bchit1 的系统进化分析

Fig 3 Phylogenetic analysis of HFWB bchit1

编码的氨基酸序列进行理化性质分析,发现几丁质酶分子量约为 36.795 kDa,分子式为 C<sub>1648</sub>H<sub>2559</sub>N<sub>431</sub>O<sub>494</sub>S<sub>15</sub>,等电点为 5.94。其中 12 种氨基酸含量超过 5% (即 A 9.8%、N 5.2%、D 5.5%、G 12.1%、I 6.9%、L 8.3%、K 5.2%、P 6.0%、S 6.6%、T

8.0%、V 5.2%),而 C 只有 4 个,含量最低 (1.1%)。通过 BLAST 进行同源氨基酸序列搜索,用 ClustalX 软件将球孢白僵菌 HFW-05 的几丁质酶的氨基酸序列与其他物种或同物种不同的几丁质酶氨基酸序列进行同源比对,其编码蛋白 HFWB-bCHIT1 与球孢白僵菌菌株 Bb0062 几丁质酶 (AAN41259) 同源性达到 99%。其次与里氏木霉菌所编码的几丁质酶 (DAA05863) 同源性较高,氨基酸序列同源性达到 78%。

3 讨论

在自然界中几丁质是重要的可再生资源,它的生物降解主要通过自然界的微生物,但研究发现各种来源几丁质酶的合适底物不同<sup>[11]</sup>,说明几丁质的降解要求不同种几丁质酶协同才能完成。球孢白僵菌中存在多种几丁质酶,在穿透寄主体壁过程中的作用可能大不相同,因此有必要从昆虫病原真菌中克隆更多的几丁质酶基因,用遗传转化等手段验证它们在感染寄主过程中各自的作用。从本研究获得的球孢白僵菌 HFW-05 几丁质酶基因 HFWB bchit1 与已发表的真菌和细菌的几丁质酶基因的同源性比

较来看,几丁质酶基因在真菌和细菌中具有很高的保守性,如与球孢白僵菌菌株 NCM1216 (EU828354)和球孢白僵菌菌株 Bb0062 (AY145440)几丁质酶基因的核苷酸同源性高达98%,氨基酸序列也具有很高的同源性。因此,克隆出更多的几丁质酶基因有助于揭示几丁质酶在侵染昆虫过程中的重要作用,推测其与杀虫活性存在的相关性。

昆虫病原真菌侵染寄主是一个十分复杂的过程,目前已有证据表明几丁质酶在这个过程中起着至关重要的作用,但也有证据表明单一过量表达几丁质酶基因并不会增强菌株的毒力,这可能是由于昆虫病原真菌存在着多种与毒力相关的基因和编码蛋白,并且蛋白在侵染寄主以及发挥毒力的过程中具有很好的协同作用。要搞清楚这些基因的功能和具体作用,有待于将这些基因通过遗传转化的方法敲除染色体相关基因或过量表达相关基因,通过转化子的生物活性测试,才能更好的揭示这些基因的功能,为球孢白僵菌的基因改良提供分子水平上的理论依据。

参考文献：

[1] Kramer K J,Muthukrishnana S Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticide [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1997, 27: 887 - 900

[2] Kuranda M J,Robbins P W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 19758 - 19767.

[3] Kramer K J,Compuz L,Choi H K, *et al* Sequence of a cDN A and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinase of *Manduca sexta* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1993, 23: 691 - 701.

[4] Ding X F, Gopalakrishnana B, Johnson L B, *et al* Insect resistant of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene[J]. Transgenic Res, 1998, 7: 77 - 84.

[5] 金 洁,张作法,时连根,等. 昆虫病原白僵菌的分子生物学研究进展 [J]. 科技通报, 2007, 23 (6): 842 - 846

[6] 林海萍,魏锦瑜,毛胜凤,等. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性 [J]. 中国生物防治, 2008, 24 (3): 290 - 292

[7] 曹伟平,王金耀,冯书亮,等. 球孢白僵菌 HFW-05的诱变筛选及其对烟粉虱若虫的毒力测定 [J]. 中国生物防治, 2007, 23 (2): 133 - 137.

[8] Khemika Songjang, Tawee Donchai, Paranya Chaiyawat, *et al* Cloning and expression of Chitinase gene isolated from insect pathogenic fungi, *Beauveria bassiana* in *Escherichia coli*[J]. Chiang Mai J Sci, 2006, 33 (3): 347 - 355.

[9] 贾海丽,韩立强,杨国宇,等. *CD147*基因在家兔肠道的克隆与结构预测 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (1): 93 - 96

[10] 刘永斌,荣威恒,王 峰,等. 蒙古羊 BMP15 全长 DNA序列的克隆与分析 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (1): 55 - 59.

[11] Tronsmo A, Haman G E Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels[J]. Anal Biochem, 1993, 208 (1): 74 - 79.