

文章编号: 1005-0906(2007)04-0046-03

# 玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁酶基因的克隆与分析

马德良<sup>1,2</sup>, 李启云<sup>1</sup>, 徐文静<sup>1</sup>, 杜 茜<sup>1</sup>, 赵洪锐<sup>1</sup>,  
董英山<sup>1</sup>, 谭云峰<sup>1</sup>, 杨信东<sup>2</sup>

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130124; 2. 吉林农业大学农学院, 长春 130118)

**摘 要:** 球孢白僵菌是最常见的昆虫病原真菌之一, 已成功应用于玉米螟和松毛虫等害虫的生物防治。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。本研究从玉米螟虫生真菌球孢白僵菌中分离到一个几丁质酶基因 *BbChitI*, 该基因的编码区包含 1047bp, 编码了 348 个氨基酸, 氨基酸序列与来源于小菜蛾虫生真菌的白僵菌几丁质酶的同源性高达 99%, 与来源于木霉菌的几丁质酶的同源性达到 82%。

**关键词:** 球孢白僵菌; 几丁质酶基因; 克隆

**中图分类号:** S513; S182

**文献标识码:** A

## Cloning and Analysis of a Chitinase Gene *BbChitI* from *Beauveria bassiana* Isolated from *Ostrinia furnacalis*

MA De-liang<sup>1,2</sup>, LI Qi-yun<sup>1</sup>, XU Wen-jing<sup>1</sup>, DU Qian<sup>1</sup>, et al.

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124;

2. Agricultural College of Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** *Beauveria bassiana* is one of the entomopathogenic fungi and has been successfully applied to bio-control *Ostrinia furnacalis* and *Dendralimus punctatus*. *Beauveria bassiana* mainly depends on cuticle degrading enzymes including proteases, chitinases and lipases to penetrate host's cuticle. In the present study, a chitinase gene *BbChitI* was firstly cloned from *Beauveria bassiana* isolated from *Ostrinia furnacalis*. Sequence analysis revealed a cDNA sequence of 1047bp long and encoded an open-reading from consisting of 348 amino acids. The deduced amino acid sequence exhibited 99% and 82% identity to that of *Cordyceps bassiana* chitinase and *Trichoderma harzianum* chitinase respectively.

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

昆虫病原真菌是真菌中的一大类, 其孢子在昆虫体壁上萌发后, 穿过昆虫体壁进入虫体, 吸收营养, 大量繁殖, 最后导致昆虫死亡。大量报道认为, 昆虫病原真菌的致病性与其胞外水解酶的作用密切相关。迄今已发现多种昆虫病原真菌存在胞外水解酶

系, 主要包括蛋白酶、几丁质酶、脂酶等。

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* Vuillemin)属半知菌纲(*Fungi Imperfecti*)、丛梗孢目(*Moniliales*)、丛梗孢科(*Monoliaceae*)、白僵菌属(*Beauveria*), 是最常见的昆虫病原真菌之一, 寄生范围广、致病力强, 对人、畜、林木作物无毒害, 不伤害天敌, 不污染环境, 广泛应用于害虫的生物防治。球孢白僵菌在东北地区防治玉米螟取得了显著效果。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。几丁质是自然界中除纤维素外储量最大的生物多聚糖, 它是多数真菌细胞壁、无脊椎动物以及昆虫体表和

收稿日期: 2006-12-10

基金项目: 吉林省杰出青年基金(20060101)、吉林省农业科学院博士科研启动基金项目(JLPTC20040801)

作者简介: 马德良(1969-), 男, 硕士, 从事微生物农药研究。

李启云为本文通讯作者。Tel: 0431-87063192

E-mail: qyli@cjaas.com

昆虫中肠围食膜的主要结构成分。几丁质酶(chitinase, EC3.2.1.14) 可催化水解几丁质的  $\beta$ -1,4 糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG), 是降解几丁质的关键酶类。几丁质酶可通过降解真菌菌丝生长末端新合成的几丁质, 破坏菌丝端部生长, 从而抑制病原真菌生长。它还能水解昆虫幼虫体表和中肠围食膜的几丁质, 从而加速幼虫罹病进程, 提高幼虫死亡率。不同微生物或者同一种微生物的不同菌株产生的几丁质酶存在差异, 克隆玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因并对其功能进行鉴定, 对了解几丁质酶特性、球孢白僵菌致病的分子机理等有重要意义。

## 1 材料与方法

(1)菌株。球孢白僵菌菌株由吉林省农业科学院提供, 分离自田间发病的玉米螟虫体; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

(2)培养基。PDA 培养基, 参照白毓谦等; LB 培养基, 参照奥斯伯 F。

(3)主要试剂。ExTaq Premix、pMD18-T 克隆载体购自 Takara 公司; DNA 回收试剂盒和 1Kb DNA Marker 购自北京鼎国生物技术公司; PCR 引物 (正向引物 *BbchitI*F: 5'-ATGGCTCCTTTTCTTCAAACC-3', 反向引物 *BbchitI*R: 5'-TTACGCAGTCCCCAAAGTCC-3') 由北京华大基因研究中心合成。

(4)白僵菌培养参照徐文静等的方法, 白僵菌 DNA 提取参照方卫国等的方法。

(5)PCR 反应及片断回收。PCR 扩增 25  $\mu$ L 反应体系包括: 100 ng DNA 模板, 1.25 U Taq 酶(购自宝生物公司)和 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  Taq 酶缓冲液, 10  $\mu$ M 正向和反向引物各 1  $\mu$ L, 20 mM dNTP 0.5  $\mu$ L, 无菌水补足到 25  $\mu$ L 体系。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 45 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(100Reactions, 北京鼎国生物技术公司)的说明。

(6)DH5 $\alpha$  感受态的制备。DNA 连接、转化, 质粒提取均参照分子克隆。重组质粒 PCR 鉴定反应体系及反应条件同(5)。

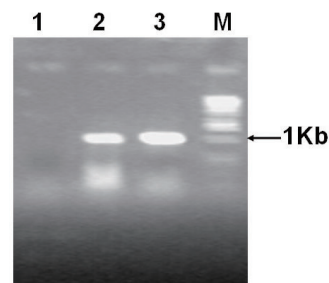
(7)序列测定和序列分析。将通过 PCR 检测的阳性克隆送出测序(北京华大基因研究中心)。根据测序结果, 先用 BlastX 软件从 EMBL 基因和蛋白数据库中调出真菌或细菌相关几丁质酶基因和蛋白质序列, 并利用 Vector NTI Suite 8.0 进行基因编码和同

源序列匹配分析, 通过 Gene Doc 对多序列匹配结果进行校正, 然后利用 MEGA 3.1 软件进行系统进化树的构建, 根据 Neighbor-joining 法, 通过 Poisson distance 法经过 1 000 次 bootstrap 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因的克隆

提取玉米螟虫生真菌球孢白僵菌的基因组 DNA, 利用 PCR 用合成的保守引物(*BbchitI*F; *BbchitI*R)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, 并连接到 pMD18-T 载体, 然后转化到 DH5 $\alpha$  热击感受态细胞, 在含有 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子, 然后进一步通过 PCR 检测其中的 2 个阳性克隆(pMD18-T-*BbChitI* 1 $^{\#}$ , 2 $^{\#}$ ), 电泳分析表明阳性克隆中插入了目的基因片段, 大小为 1 000 bp 左右(图 1), 将这两个阳性克隆送测序公司进行测序。



注: 1 泳道为水对照; 2、3 泳道为阳性克隆 pMD18-T-*BbChitI* 1 $^{\#}$ , 2 $^{\#}$ ; 4 泳道为 1kb Marker。

Note: 1 swimlane is water antitheses; 2, 3 swimlane are positive clones: pMD18-T-*BbChitI* 1 $^{\#}$ , 2 $^{\#}$ ; 4 swimlane is 1kb Marker.

图 1 玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因 *BbChitI* 阳性克隆电泳鉴定

Fig.1 Electrophoresis analysis of *BbChitI* positive clone of *Beauveria bassiana*

### 2.2 序列测定结果及结果分析

序列测定结果表明两个克隆 *BbChitI* 1 $^{\#}$ , 2 $^{\#}$  基因序列完全相同, 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 *BbChitI* 和 BbCHITI。然后将基因序列通过 BLASTX 在网上 Genbank 数据库进行同源基因搜索, 采用 VectorNTI Suite 8.0 软件将 *BbChitI* 编码的蛋白 BbCHITI 与来源于绿僵菌、哈茨木霉、小菜蛾球孢白僵菌、黄绿绿僵菌、天蓝色链霉菌、阿佛曼链霉菌等的几丁质酶、内切几丁质酶、外切几丁质酶等

进行多序列匹配排列, 然后利用 MEGA 3.1 软件进行系统通过 Kimur 双参数校正模型法<sup>[8]</sup>经过 1 000 次 bootstrap 分析构建进化树。聚类结果显示:*BbChitI* 基因与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 99.2%, 其编码蛋白 BbCHITI 与 AAN41259 同源性达到 99%。其次与哈茨木霉菌所编码的几丁质酶(AAM93196)同源性较高, 氨基酸序列同源性达到 82%。

```

M A P F L Q T S L A L L P L L A S T M V
1  ATGGACCTTTCTTCAAACGAGCCTCGCGCTCCTTCGATTGTTGGCTTCACCATGGTC
   S A S P L A P R A D T C A T K G R P A G
61  AGCGCCTCGCCTTGGCGCGGAGCGACACCTGCGCAACGAGGCGCGCGCGCGG
   K V L Q G Y W E N W D G A K N G V H P P
121 AAAGTCTCCAGGGCTACTGGGAGAAGTGGGACGGTGCCAAAGCGGGTGACCCCTCG
   F G W T P I Q N P D I R K H G Y N V I N
181 TTTGGCTGGAGCCCATCAAAACCCGACATGCGAAGCAGCGGTACACGTCAAT
   A A F P I I Q P D G T A L W E D G M D T
241 GCTGCTTCCCATCATCGAGCCTGACGGCAGCGGCTGTTGGGAGGACGCATGGACAG
   G V K V A S P A D M C E A K A A G A T I
301 GGCCTCAAGGTGGCGAGCCGCGGACATGTGCGAGGCCAAGGACGAGGTGCCACCATC
   L M S I G G A T A A I D L S S S A V A D
361 TTGATGTCGATTGGCGGCGCTACTGCGGCGCTTGAAGCTGAGCTGCTGGCTGTGGTAC
   K F V S T I V P I L K K Y N F D G I D I
421 AAGTTTGTCTCGACCATGTGCTCGGATTTGAAAAGTACAACTTTCAGGCGATTGATATC
   D I E S G L T G S G N I N T L S T S Q T
481 GACATTGAATCCGGCTCAGAGCGAGCGGAACATAAAGACCCGTGTCACCTCGCAGACC
   N L I R I I D G V L A Q M P A N F G L T
541 AACCTGATTAGAATCATGACGGCGTTCTCGCGCAGATGCCGCGCACTTTGGCTTGACC
   M A P E T A Y V T G G T I T Y G S I W G
601 ATGGCGCCAGAGACTGCTACGTTACCGGTGGGACTATTACGTACGGATCAATCTGGGG
   S Y L P I I K K Y L D N G R L W W L N M
661 TCTTACCTCCGATTATCAAAAGTACCTGGAACATGCTGCTGCTGGCTGCTCAAGATG
   Q Y Y N G E M Y G C S G D S H K A G T V
721 CAGTACTACAATGGCGAATGTACGGCTGCTGCGGACTCGACACAAGGCGGCTACTGTC
   E G F V A Q T D C L N K G L S I Q G V T
781 GAAGGATTCGTTGCTCAGACGAGCTGCTGGAACAAGGAGCTTAGTATTCAGGGCGTGACA
   I T I P Y I D K Q V P G L P A Q P G A G G
841 ATCAGGATTCGCTATGACAGCAAGTGGCTGGCTTCTGCGCCAGCTGGGGCTGGCGGG
   G H M S P S N V A Q V L S H Y K G A L K
901 GGCCACATGTCGCCGTCAACGCTGGCGAAGTCTCTCCCACTACAAGGCGGCTTTGAAG
   G L M T W S L N W D G S K N W T F G D N
961 GGATTGATGACTTGGTCTGGAAGTGGGAGGCTCCAAGAATTGGACATTTGGCGACAAT
   V K G T L G T A *
1021 GTCAGGGGACTTTGGGAGCTGCGTAA
```

图2 玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因 *BbChitI* 核苷酸编码序列及其编码的氨基酸

Fig.2 DNA sequence and deduced amino acids sequence of *BbChitI*

图3中 AAB81998: *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT42; AAC33265: *Metarhizium anisopliae* chitinase; AAL01372: *Trichoderma harzianum* endochitinase chit36Y; AAM93196: *Trichoderma harzianum* chitinase 37kDa; AAN41259: *Cordyceps bassiana* chitinase; AAN41260: *Beauveria bassiana* endochitinase; AAP10651: *Bacillus cereus* ATCC 14579 Exochitinase; CAB44709: *Metarhizium flavoviride* chitinase; CAB69724: *Streptomyces coelicolor* A3 chitinase; CAC07216: *Metarhizium anisopliae* var. aridum endochitinase CHI2; CAC07217: *Metarhizium anisopliae* var. aridum endochitinase CHI3; NP\_826813: *Streptomyces avermitilis* MA-4680 endochitinase.

3 讨 论

球孢白僵菌中存在多种几丁质酶, 与蛋白酶相似, 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。从本研究获得的玉米螟虫生真菌几丁质酶基因 *BbChitI* 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, 如同属于白僵菌属的玉米螟虫生真菌和小菜蛾的球孢白僵菌<sup>[9]</sup>的两个基因和蛋白序列的同源性都达到了 99% 以上, 但是不同物种来源的几丁质酶蛋白序列也具有很大的差异, 如白僵菌和绿僵菌几丁质酶蛋白同源性最高仅仅 17.6%, 这可能与各自适应于不同寄主及其该酶的杀虫活性都具有很大的相关性。

参考文献:

[1] Charnley A K, St Leger R J. The fungal spore and disease initiation in plants and animals[A]. New York: Plenum, 1991.

[2] 李运帷, 杨嘉寰. 利用昆虫病原真菌防治森林害虫的展望[M]. 中国虫生真菌研究与应用(第一卷), 北京: 学术期刊出版社, 1998.

[3] Broglie K E. Chitinase and plant protection[J]. Rev. Plant Pathol., 1993, 2: 411-421.

[4] 白毓谦, 方善康, 高东, 等. 微生物学实验技术[M]. 济南: 山东大学出版社, 1987.

[5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[6] 徐文静, 马德良, 刘娜, 等. 球孢白僵菌最适培养基筛选和遗传转化筛选标记的研究[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(1): 50-52.

[7] 方卫国, 杨星勇, 张永军, 等. 真菌核酸的一种快速提取方法[J]. 应用与环境学报, 2002, 8(3): 305-307.

(责任编辑: 李万良)

图3 玉米螟虫生真菌球孢白僵菌几丁质酶 I(BbCHITI) 及其同源蛋白聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of BbCHITI and homologous protein