



主持人: 缪卫国

绿色木霉碱性蛋白酶基因 *TvALP* 的克隆与原核表达

徐杨玉^{1,2}, 刘付香³, 洪彦彬¹, 陈小平¹, 李海芬¹, 温世杰¹,
李杏瑜¹, 李玲⁴, 梁炫强¹

(1. 广东省农业科学院作物研究所, 广州 510640; 2. 广东农垦热带农业研究院有限公司, 广州 511365;
3. 广东省中山市实验中学, 广东 中山, 528404; 4. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要: 基于绿色木霉中抗菌蛋白质的 de-novo 质谱测定得到的部分肽段序列, 通过 BLASTp 数据库检索, 发现该肽段由碱性蛋白酶基因编码, 采取同源克隆技术扩增出目的基因片段。生物信息学分析揭示, *TvALP* 基因 (GenBank 编号 KJ659907) 完整开放阅读框为 1 230 bp, 并编码了一个由 409 个氨基酸组成的蛋白质。该蛋白质的预测分子量约为 43 kD, 且含有一段由 20 个氨基酸组成的信号肽。根据分类, 该蛋白质属于 Peptidase inhibitor_I9 超家族, 并且是枯草杆菌蛋白酶家族丝氨酸蛋白酶 S8 家族的一个成员。利用双酶切法将测序正确的质粒连接至原核表达载体 pET30a 中, 在宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 中诱导表达。结果在 45 kD 处显示出 1 条特异蛋白质条带, 与生物信息学预测目的蛋白大小一致, 表明切除信号肽的表达质粒 pET30a- Δ *TvALP* (“ Δ ”表示切除信号肽) 在宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 中成功表达。经超声波破碎后, 蛋白形成了包涵体。但经体外复性技术, 未能获得有活性的蛋白进行抗菌机理研究。

关键词: 绿色木霉; 碱性蛋白酶基因; 原核表达; 包涵体

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 06-0683-08

徐杨玉, 刘付香, 洪彦彬, 等. 绿色木霉碱性蛋白酶基因 *TvALP* 的克隆与原核表达 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(6): 683-690. doi: 10.15886/j.cnki.rds wxb.20240077

木霉属真菌 (*Trichoderma* spp.) 属于丝孢纲 (Hyphomycetes) 丝孢目 (Moniliales) 丛梗孢科 (Moniliales), 广泛分布于土壤与植物根系中^[1-3], 是一种拮抗真菌, 能提高非生物胁迫耐受性及真菌病原体拮抗活性, 常用于制备微生物肥料、改良土壤以及生物防治等^[4]。前人研究表明, 木霉菌针对番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等常见作物的病害具有良好的防治效果^[5-6]。木霉菌中绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 应用较为广泛, 有促进植物种子萌发与生长发育、绿色安全、价格便宜等诸多优势^[7-8]。前人主要研究绿色木霉菌产生一系列几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶, 有关蛋白酶生物防治的研究未见报道, 直至 1978 年才有学者证实了绿色木霉 (*T. viride*) 蛋白酶对防治白绢病

(*Sclerotium rolfsii* Sacc.) 有效^[9]。由此, 针对此类研究才揭开序幕, 随后更是受到了广泛的关注。

最早在猪的胰脏中发现的碱性蛋白酶 (最适 pH 9 ~ 11, MV 26 000 ~ 34 000 Da) 活性中心含丝氨酸^[10-11], 在碱性条件下, 可将多肽链水解为氨基酸, 其在食品、医疗、肥料及环保等多个领域中有较高应用价值^[12-13]。前人研究与挖掘碱性蛋白酶往往在于细菌来源^[14-16], 绿色木霉真菌中的碱性蛋白酶生防机制为重寄生作用。作用机理为首先对植物病原真菌细胞壁进行降解, 达到抑制病原真菌的孢子萌发, 导致菌丝和孢子的崩解, 最终成功杀灭病原菌^[17-20]。POZO 等^[21]的研究表明, 绿木霉 (*Trichoderma virens*) 胞外丝氨酸蛋白酶 *tvsp1* 基因的过量表达可显著提高木霉菌株抗棉苗枯萎病菌 (*Rhizocto-*

收稿日期: 2024-05-05 修回日期: 2024-06-15

基金项目: 2023 年国家花生产业技术体系遗传改良研究室岗位科学家项目 (CARS-13); 广东省自然科学基金重点项目 (07117967)

第一作者: 徐杨玉 (1987-), 男, 高级农艺师。研究方向: 花生黄曲霉生物防治。E-mail: 574301612@qq.com

通信作者: 梁炫强 (1964-), 男, 博士, 研究员。研究方向: 花生抗黄曲霉研究。E-mail: Liang804@yahoo.com

nia solani Kühn)的生物防治能力。也有学者推测,哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)产生的蛋白酶通过阻碍类病原菌的萌发,导致病原菌的酶钝化,破坏病原菌侵入植物细胞的侵染能力^[22]。

本研究前期研究表明^[23],绿色木霉菌发酵液具有明显的抗黄曲霉菌丝生长和孢子萌发以及抑制毒素产生并降解黄曲霉毒素B1功能。并初步筛选出3个抗性相关蛋白,对其中1个蛋白进行 de-novo 质谱测定,得到了部分肽段序列。本研究利用同源克隆技术获得目的基因片段,利用双酶切法及切除信号肽法构建原核表达载体实现在大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS 中成功诱导表达。本成果可为研究绿色木霉碱性蛋白酶基因相关功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体质粒 本实验室前期获得的菌株绿色木霉;黄曲霉(*Aspergillus flavus*)菌株 GIM3.493 购自中国科学院微生物研究所,其菌株侵染与产毒能力较强;大肠杆菌 DH5 α 与 BL21 (DE3)pLysS 以及载体 pUM-T Vector 与 pET30a Vector 由本实验室保存。

1.2 化学试剂与酶 RNA 提取试剂盒、纯化试剂盒;各限制性内切酶、反转录试剂盒、DNA Marker、T4 连接酶等;BioTeke 2 \times Power Taq PCR Master Mix;蛋白 Marker、Gel Extraction Kit;质粒提取试剂盒;氨苄青霉素、氯霉素等。

1.3 常用溶液及培养基 LB 液体、固体培养基;PDB 液体、固体培养基;50 \times TAE 等。

1.4 绿色木霉菌丝总 RNA 的提取和 cDNA 合成 本实验采用 OMEGA 真菌 RNA 提取试剂盒(购自 Omega 公司)抽提绿色木霉菌 28 $^{\circ}$ C 发酵培养 7 d 过滤收集的菌丝总 RNA。利用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(购自 TaKaRa 公司)合成第一链 cDNA。

1.5 兼并引物的设计 由北京大学深圳研究院对绿色木霉抗菌发酵液中 3 个差异蛋白点进行 de-novo 序列测定和数据库分析,得到的 3 个部分肽段序列如表 1 所示。将样品 1 的肽段序列进行 BLASTp 本地检索,发现该肽段由碱性蛋白酶基因编码,根据核酸序列的同源性设计一对特异性兼并引物(引物合成由华大基因公司完成),用 T1、T2 表示,用该引物扩增目的片段。所用引物序列详见表 2。

1.6 获得目的片段 利用从绿色木霉菌丝体提取

表 1 差异蛋白的部分肽段分析

Tab. 1 The peptide analysis of differential protein

蛋白名称 Protein	部分肽段序列 Partial peptide sequence
Sample 1	ALTTQSGAPWGL[I]GTVSHR
Sample 2	L[I][L]QYTFHGGPNQQWR
Sample 3	SAI[L]SQHQPVVDNQASNPTGR

表 2 所用引物序列

Tab. 2 The primer sequences use

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	酶切位点 Enzyme cleavage site
T1	ATGAGCAGCATTCGTCGT	-
T2	TTAAGCACTGTTTCGGTTGA	-
M1	CGGGGTACCATGAGCAGCATTCTCGT	Kpn I
M2	CCCAAGCTTTTAAGCACTGTTTCCGTTGA	Hind III
M3	CGGGGTACCATGGCTCCCGCAGCTCTTCATA	Kpn I
M4	CCCAAGCTTTTAAGCACTGTTTCCGTTGA	Hind III

的总 RNA 经反转录生成的 cDNA 作为模板,通过引物 T1 和 T2 对目标片段进行扩增。反应体系配置为:2 \times PCR Master Mix (Bioteke 公司购买)10 μ L;每对引物各 1.0 μ L;模板 1.0 μ L,余下部分用双蒸水补充至 20 μ L。反应过程设定为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,循环 35 次;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳的检测和鉴定,确认无误后,根据 DNA 凝胶回收试剂盒(Omega 公司)的指南进行纯化回收。将纯化后的目的片段与 pUM-T vector 连接,连接反应按照试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行,22~25 $^{\circ}$ C 反应 10~30 min。取连接产物转化 DH5a,筛选阳性重组子,进行菌液 PCR 鉴定,PCR 反应体系和程序同上,将预变性延长到 15 min。鉴定正确后送华大测序。测序正确的重组质粒命名为 pUM-T- Δ TvALP。

1.7 生物信息学分析 用在线软件 SignalP 4.1 预测蛋白的信号肽序列。采用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)的 ProtParam 和 ProScale 预测蛋白质的氨基酸组成和理论等电点等基本理化性质,通过 GOR4 法分析碱性蛋白酶基因编码蛋白的

二级结构,并采用 SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)预测其三级结构。利用网站 NCBI 链接的 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)分析碱性蛋白酶的功能区域。BLAST 分析比较序列的相似性,利用软件 DNAMAN 进行同源性分析、构建系统进化树。

1.8 重组表达质粒的构建与鉴定 以重组质粒 pUM-T- Δ *TvALP* 为模板,使用引物 M1 和 M2 以及切除信号肽引物 M3 和 M4 (表 2) 进行 PCR 扩增。回收纯化扩增产物,连接到 pUM-T 载体 (购自 Bioteka 公司),测序鉴定。通过碱裂解法获得的重组质粒 pUM-T-*TvALP*、pUM-T- Δ *TvALP* (“ Δ ”表示切除信号肽,下同)和表达载体 pET30a (购自 Novagen 公司),使用 *Kpn* I 和 *Hind* III (购自 TaKaRa 公司)进行双酶切。酶切后的 DNA 片段经过纯化,然后与大肠杆菌 DH5 α 连接并转化。挑选出单克隆,在 37 °C 下振荡培养过夜。采用碱裂解法提取质粒 (购自 Axygen 公司),并通过 PCR 和双酶切进行鉴定。测序验证正确的重组质粒被命名为 pE30a-*TvALP* 和 pE30a- Δ *TvALP*。

1.9 融合蛋白的表达、鉴定 将重组质粒 pET30a-*TvALP* 和 pET30a- Δ *TvALP* 转化入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中。挑选单克隆菌落,并在含有 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin 和 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chloramphenicol (购自北京鼎国生物技术发展中心)的 5 mL LB 液体培养基中于 37 °C 下培养过夜。第 2 天,按 1% 的比例转接至新鲜 LB 培养基中进行扩大培养。当培养物的 OD_{600} 值达到 0.4 ~ 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,分别诱导 0、2、4、6 h。同时,以转化有空载体 pET30a 的 BL21 (DE3) pLysS 作为阴性对照。诱导后,离心收集菌体,并加入 1/10 体积的 2 \times SDS 上样缓冲液,进行 SDS-PAGE 电泳分析。电泳完成后,按照文献^[24]的方法进行染色、拍照和观察。

1.10 融合蛋白的纯化和复性 将沉淀按 5:1 的比例加入 1 \times Binding Buffer (8 \times Binding Buffer:40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,160 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.9; 不含尿素)悬浮直至细菌拉丝不再出现,使用 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速离心 15 min; 去除上清液,按照 20:1 的比例加入含有 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 1 \times Binding Buffer,再次悬浮沉淀,然后置于冰浴 1 h。接着,以 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 30 min,收集上清液并通过 0.45 μm 滤膜过滤。最后进行包涵体纯化:

(1)先用 10 mL 含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 1 \times Binding Buffer 过柱平衡;(2)缓慢倒入蛋白提取液;(3)再用 10 mL 含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 1 \times Binding Buffer 过柱;(4)10 mL 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Wash Buffer (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Wash Buffer:100 mL=11 mL 含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 1 \times Binding Buffer+6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的洗涤缓冲液(4.1 mL Wash Buffer+去离子水定容至 100 mL)去除多余的蛋白质;(5)使用 5 mL 含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 1 \times Elut Buffer (4 \times Elut Buffer 成分:2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑,80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.9)来洗脱目标蛋白,从而得到纯化的包涵体;通过 SDS-PAGE 电泳对纯化后的包涵体进行检测。进行包涵体的复性:(1)测定蛋白浓度^[25];(2)将蛋白转移到处理好的透析袋中,放入含有 1 L 复性液 (Tris-HCl 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,氧化型谷胱甘肽 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,还原型谷胱甘肽 0.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,尿素 0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,过滤除菌)的烧杯中,置于 4 °C 下搅拌透析 1 h;(3)将透析袋转移到另一个含有 1 L 复性液的烧杯中,继续在 4 °C 下搅拌 2 h;(4)将透析袋放入含有 1 L TE 缓冲液 (Tris-HCl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0),EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0)的烧杯中,继续在 4 °C 下搅拌 2 h;(5)最后,用少量聚乙二醇(PEG)包裹透析袋进行浓缩干燥,并测定蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 绿色木霉总 RNA 的提取及目的片段扩增 将反转录得到的 cDNA 作为模板,使用引物 T1、T2 (表 2)进行 RT-PCR 扩增,在 1 200 bp 附近显示明亮的特异条带 (图 1)。将其克隆至 DH5 α ,随后菌液 PCR 扩增。鉴定结果 (图 2)表明,菌液 PCR 检测在 1 200 bp 附近有明亮条带,与目的条带的位置一致,视为拟阳性克隆,送华大测序。

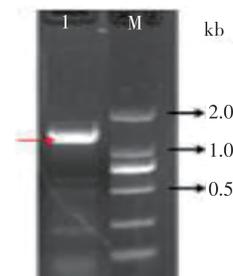


图1 PCR 扩增目的片段的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis diagram of the PCR-amplified target fragment

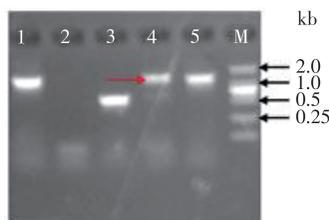


图2 pUM-T-TvALP ORF的菌落PCR检测
Fig. 2 Electrophoresis diagram of PCR detection of bacterial liquid pUM-T-TvALP ORF

2.2 生物信息学分析

2.2.1 碱性蛋白酶基因序列基本信息分析 测序结果显示, *TvALP* 基因的 ORF 全长为 1 230 个碱基对, 编码了 409 个氨基酸。SignalP 4.1 分析表明, *TvALP* 蛋白含有 1 段长为 20 个氨基酸的信号肽序列。推导的氨基酸序列与前期 de-novo 质谱测序获得的部分肽段序列相匹配, 有颜色标记的氨基酸序列为匹配上的, 结果表明(图 3), 两者匹配一致。

MSSIRRLALYLGAALLPAVLAAPAALHKKPEAVPNKFIVTLKEGASIDTDSLAWVND
LHRRSLTKRSTAGVEKTYNIRTWASAYAGEFDDTEHQIKSSPDV ASVEPDYIMYLSDF
IVEDKRALITQSCAPWGLGTVSHRITSGSTSIYIDSSAGACTFAVVVDSGINTSHQQF
CGRASLGYNAAGGQHVDTLGHGTHVSGTIAGSTYGVAKQASLSVKVFSGDSSTISI
ILDGYNWAVNDIVSRNRASKSAINMSLGGPASTWTTAINAAFNQGVLTVAAGNGD
SLGNPQVSSSTSPANVPNAITVAALDINWRTASFTNYGAGVDVFPAGVNVVSSWIGS
NTATNTISGCTSMATPHVGLALYLSLEGLSTPTAVTNRKALATTGRVTGSLRCS
NSIIFNGNSA

图3 推导出的氨基酸序列与 de-novo 序列的完全匹配
前 20 个氨基酸序列为信号肽。

Fig. 3 Complete match of the deduced amino acid sequence and the de-novo sequence

The first 20 amino acid sequences are signal peptides.

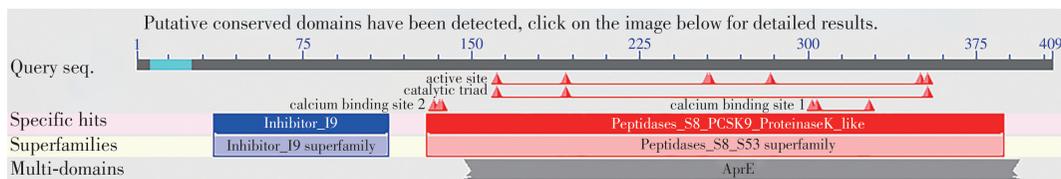


图4 *TvALP* 蛋白功能区域的预测

Fig. 4 Prediction of the function domain of *TvALP* protein

2.2.3 多序列比对及系统发育树分析 BLAST 搜索其他物种碱性蛋白酶的氨基酸序列, 然后使用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 结果显示, 碱性蛋白酶在氨基酸水平上与 *Trichoderma hamatum* 的 *alkaline protease* (gb|AAP15044.1)、*Hypocrea lixii* 的 *serin endopeptidase* (embl|CAL25580.1) 同源性达 45%, 与 *Gibberella zeae* PH-1 的 *hypothetical protein FG03315.1* (refl|XP_383491.1) 片段相似性为 39% (图 5)。

因此, 绿色木霉抗菌发酵液中 3 个差异蛋白中的样品 1 为碱性蛋白酶。

2.2.2 碱性蛋白酶的组成分析与结构预测 根据软件 DNAMAN 推测, 绿色木霉碱性蛋白酶的分子量约为 43 kD, 等电点为 7.96。应用 GOR4 法分析碱性蛋白酶基因编码蛋白的二级结构, 结果显示, 在该氨基酸序列中, 共有 α -螺旋 (Alpha helix) 91 处, 占总二级结构的 22.25%; 延伸链 (Extended strand) 104 处, 占总二级结构的 25.43%; 无规则卷曲 (Random coil) 214, 占总二级结构的 52.32% (附图 3 *TvALP* 蛋白的二级结构预测)。由此可见, 无规则卷曲在碱性蛋白酶二级结构中最多, 而 α -螺旋和延伸链分散于整个蛋白中。SWISSMODEL 进行三级结构预测, 结果显示碱性蛋白酶有多个 α -helix 结构、 β -sheet 片层结构及多条连接 loop 构成。蛋白质的功能实现依赖于其空间结构和功能区域, 这些功能区域可能含有进化相关的信息。因此, 预测其功能区域至关重要。如图 4 所示, 通过 NCBI 网站提供的 CDD 工具对该碱性蛋白酶的功能区域进行分析, 发现碱性蛋白酶为肽酶抑制因子 (Peptidase inhibitor_I9) 超家族、枯草杆菌蛋白酶家族丝氨酸蛋白酶 S8 家族的一个成员, 且包含 Asp/His/Ser 催化三联体位点, 丝氨酸活性位点 (GTSMATPHVVG351-361)、组氨酸活性位点 (HGTHVSGTIAG192-202) 和天冬氨酸活性位点 (AYVVDSGINTSH158-168), 同时还具有 2 个钙离子结合位点。

2.3 原核表达载体的构建与鉴定 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切质粒 pET30a、重组克隆质粒 pUM-T-*TvALP* 和 pUM-T- Δ *TvALP*, 连接、转化宿主菌 BL21 (DE3)pLysS 感受态细胞。对碱裂解法获得的重组质粒 pET30a-*TvALP*、pET30a- Δ *TvALP* 进行 PCR 和双酶切鉴定, 结果如图 6、7 显示, PCR 和双酶切在相同的位置均有出现目的条带, 证明重组质粒中含有目的片段, 表明 pET30a-*TvALP* 和 pET30a- Δ *TvALP* 表达载体已构建完成。

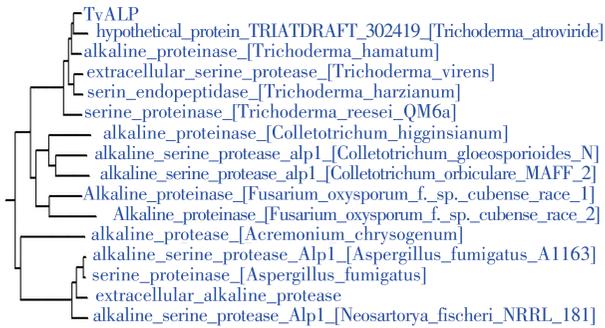


图5 绿色木霉 *TvALP* 蛋白与其他物种碱性蛋白酶的系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *TvALP* protein of *Trichoderma viride* and alkaline proteases of other species

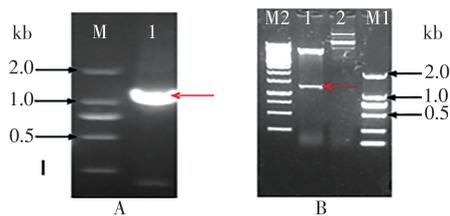


图6 重组质粒 *pET30a-TvALP* 的PCR及双酶切鉴定

A: 1. 重组质粒 *pET30a-TvALP* 的PCR检测; M: DL2000 DNA Marker; B: 1. 重组质粒 *pET30a-TvALP* 双酶切; 2. 重组质粒 *pET30a-TvALP* 酶切负对照; M1. DL2000 DNA Marker; M2. 1kb ladder DNA Marker.

Fig. 6 Identification of the recombinant plasmid *pET30a-TvALP* by PCR and double enzyme digestion

1. PCR confirmation of the recombinant plasmid *PET30a-TvALP*; M. DL2000 DNA Marker; B. 1. The restriction digestion of the recombinant plasmid *pET30a-TvALP* by *Kpn* I and *Hind* III; 2. The recombinant plasmid *PET30a-TvALP* (Enzyme digestion negative control); M1. DL2000 DNA Marker; M2. 1kb ladder DNA Marker.

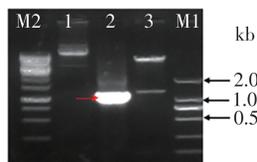


图7 重组质粒 *pET30a-ΔTvALP* 的PCR及双酶切鉴定

1. *pET30a-ΔTvALP* 重组质粒酶切负对照; 2. *pET30a-ΔTvALP* 重组质粒PCR; 3. *pET30a-ΔTvALP* 重组质粒双酶切; 4. M1. DL2000 DNA Marker; M2. 1kb ladder DNA Marker.

Fig. 7 PCR and double enzyme digestion identification of the recombinant plasmid *pET30a-ΔTvALP*

1. The recombinant plasmid *PET30a-ΔTvALP* (Enzyme digestion negative control); 2. PCR confirmation of the recombinant plasmid *PET30a-ΔTvALP*; 3. The restriction digestion of the recombination plasmid *pET30a-ΔTvALP* by *Kpn* I and *Hind* III; M1. DL2000 DNA Marker; M2. 1kb ladder DNA Marker

2.4 重组质粒在大肠杆菌中表达、纯化及复性 *pET30a-TvALP* 重组质粒的菌株未能诱导出蛋白, 切除信号肽的 *pET30a-ΔTvALP* 重组质粒的菌株在 45 kD 处出现一条新生蛋白带, 与预期蛋白大小相近。然后将切除信号肽的重组蛋白经超声波破碎至半透明后, 分别取上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 发现重组蛋白主要聚集在沉淀中, 形成包涵体。

本研究为了增加重组蛋白的可溶性, 通过改变诱导条件为温度降低至 20 °C, IPTG 浓度降低至 0.5 mmol·L⁻¹, 转速降低至 100 r·min⁻¹, 如图 8 所示, 发现重组蛋白最终仍聚集在沉淀中, 形成包涵体 (图 8-A)。对该包涵体进行纯化, 在 45 kD 附近有单一的目的蛋白条带 (图 8-B)。随后对其进行变性和复性, 发现包涵体重新形成聚集体, 导致复性失败, 无法进行下一步重组蛋白的抑菌活性验证。

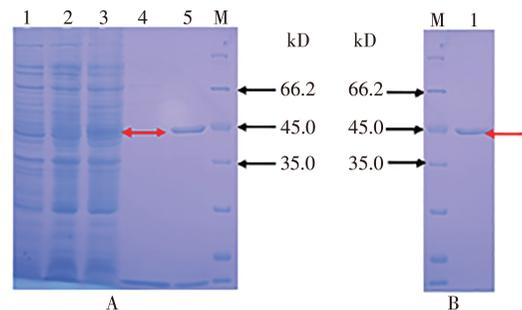


图8 切除信号肽重组蛋白的SDS-PAGE电泳分析及其纯化

A: 1. BL21 (DE3) pLysS/pET30a 诱导 6 h; 2. BL21 (DE3) pLysS/pET30a- Δ *TvALP* 未诱导; 3. BL21 (DE3) pLysS/pET30a- Δ *TvALP* 诱导 6 h; 4. 超声上清; 5. 超声沉淀; M. 蛋白 Marker; B: M. 蛋白 Marker; 1. 诱导 6h 的 BL21 (DE3) pLysS/pET30a- Δ *TvALP* 的纯化蛋白。M. 蛋白 Marker; 1. 诱导 6h 的 BL21 (DE3) pLysS/pET30a- Δ *TvALP* 的纯化蛋白。

Fig. 8 SDS-PAGE electrophoresis analysis and purification of the recombinant protein with the signal peptide removed

A: 1. Induced BL21 (DE3) pLysS with pET30a for 6 hours; 2. Non-induced BL21 (DE3) pLysS with pET30a- Δ *TvALP*; 3. Induced BL21 (DE3) pLysS with pET30a- Δ *TvALP* for 6 hours; 4. Ultrasonic supernatant; 5. Ultrasonic precipitation; M. protein molecular weight marker. B: M: protein molecular weight marker; 1. Purification of the induced protein of BL21 (DE3) pLysS with pET30a- Δ *TvALP* for 6 hours.

3 讨论

3.1 同源克隆法 同源克隆法是近年来国内外广泛采用的基因克隆技术。该方法利用不同物种间

具有相同或相似功能的基因中的保守区域,通过设计兼并引物进行PCR扩增以获得目标片段,再结合cDNA末端快速扩增技术(RACE)和染色体步移技术来获取全长cDNA和基因^[26]。目前,该方法已成功克隆了多种植物基因,包括胁迫应答基因、品质相关基因、抗病相关基因以及发育调节基因等,同时也是克隆植物抗性基因类似物(RGA)的重要手段^[27-28]。本研究基于前期获得的蛋白质谱肽段序列,采用同源克隆技术,从绿色木霉菌中成功克隆了碱性蛋白酶基因的ORF序列,并且推导出的氨基酸序列与蛋白质谱肽段序列完全匹配。

3.2 碱性蛋白酶(*TvALP*)基因在大肠杆菌中表达分析 大肠杆菌表达系统以其快速的发酵能力和高效的基因产物合成而闻名。到目前为止,它是人类研究最为透彻且在实际应用中最广泛使用的表达系统。与其他表达系统相比,大肠杆菌表达系统具有操作简便、遗传背景明确和发酵成本较低等优势,因此成为外源基因表达的首选。pET30a系列载体是目前最广泛使用的原核表达载体,已在大肠杆菌中成功实现了多种异源蛋白的表达^[29-30]。本研究以pET30a质粒为表达载体,以*E.coli* BL21(DE3)pLysS为宿主表达菌,成功构建了重组表达载体pET30a-*TvALP*、pET30a- Δ *TvALP*,通过降低温度为20℃,减少IPTG浓度为0.5 mol·L⁻¹以及调整转速为100 r·min⁻¹等系列条件优化在宿主菌BL21(DE3)pLysS中,切除信号肽的重组表达质粒pET30a- Δ *TvALP*成功实现诱导表达。大部分真核生物的信号肽在原核生物中诱导表达时不具有分泌功能,且始终与活性蛋白融合在一起,对活性蛋白的正确折叠与功能发挥产生影响。因此,切除信号肽序列才是成功诱导表达的关键。

本研究通过同源克隆技术首次成功获得的*TvALP*基因(GenBank编号KJ659907)为目的片段,接着利用双酶切法分别构建成功pET30a-*TvALP*载体和切除信号肽的pET30a- Δ *TvALP*载体,结果显示,切除信号肽的表达载体在宿主菌中成功实现诱导表达,在45 kD处显示出一条特异蛋白条带,与生物信息学预测目标蛋白大小一致。后经超声波破碎后,蛋白形成了包涵体。经体外复性技术,最终未能获得有活性的蛋白。下一步考虑通过真核表达或添加柔性多肽序列构建融合蛋白以期获得有活性的目的蛋白,为研究其拮抗机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] 曾立,程万里,余豪,等.多粘类芽孢杆菌KM2501-1发酵液对番茄根结线虫的防治效果[J].应用与环境生物学报,2020,26(5):1046-1050.
- [2] 范亚磊,赵敏,邓晟,等.侵染江苏猕猴桃的北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)形态学描述和分子特征分析[J].江苏农业学报,2021,37(1):75-82.
- [3] 李通,毛维兴,薛应钰,等.绿色木霉B3菌株发酵液杀线活性分析及其稳定性测定[J].西北农业学报,2019,28(9):1535-1542.
- [4] PENG K C, LIN C C, LIAO C F, et al. Expression of L-amino acid oxidase of *Trichoderma harzianum* in tobacco confers resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* [J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2021, 303: 110772.
- [5] SWAIN H, ADAK T, MUKHERJEE A K, et al. Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice [J]. Microbiological Research, 2018, 214: 83-90.
- [6] YOUSSEF S A, TARTOURA K A, ABDELRAOUF G A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani* [J]. Biological Control, 2016, 100: 79-86.
- [7] 刘畅,张欣玥,蔡汶好,等.绿色木霉与哈茨木霉对黄瓜幼苗促生作用机理的研究[J].江苏农业科学,2020,48(16):156-160.
- [8] 王禹佳,武佶,李享,等.发根农杆菌与绿色木霉对玉米幼苗根系生长的影响[J].江苏农业科学,2020,48(15):112-117.
- [9] RODRIGUEZ-KABANA R, KELLEY W D, CURL E A. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfii* in soil [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1978, 24(4): 487-490.
- [10] 叶思帆,赵媛.微生物源碱性蛋白酶的生产及其应用[J].青海科技,2018,25(2):73-76.
- [11] 王兴吉,佟新伟,王克芬,等.芽孢杆菌产碱性蛋白酶的研究进展[J].食品与发酵科技,2019,55(1):62-65.
- [12] KUMAR C G, TAKAGI H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint [J]. Biotechnology Advances, 1999, 17(7): 561-594.
- [13] RAJAN S, MURUGESAN A. Optimization and Production of Alkaline Protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste [J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2014, 3(6): 36-44.
- [14] BARZKAR N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 1216-1229.

- [15] SHARMA K M, KUMAR R, PANWAR S, et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties [J]. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2017, 15(1): 115–126.
- [16] BHATT H B, SINGH S P. Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 941.
- [17] SZEKERES A, KREDICS L, ANTAL Z, et al. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(2): 215–222.
- [18] SUÁREZ M B, VIZCAÍNO J A, LLOBELL A, et al. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach [J]. *Current Genetics*, 2007, 51(5): 331–342.
- [19] 纪明山, 李博强, 陈捷, 等. 绿色木霉 TR-8 菌株对尖镰孢的拮抗机制 [J]. *中国生物防治*, 2005, 21(2): 104–108.
- [20] 迟玉杰, 杨谦, 宋颖琦. 对哈茨木霉转化子菌体形态观察及抗药性测定 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2002, 34(6): 784–788.
- [21] POZO M J, BAEK J M, GARCÍA J M, et al. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(3): 336–348.
- [22] KAPAT A, ZIMAND G, ELAD Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1998, 52(2): 127–137.
- [23] 徐杨玉, 刘付香, 洪彦彬, 等. 绿色木霉对花生黄曲霉毒素污染的防治 [J]. *热带生物学报*, 2019, 10(4): 367–371. DOI:10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.04.010.
- [24] 康彬, 童哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(2): 210–211.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [26] RAWLINGS N D, BARRETT A J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases [J]. *Methods in Enzymology*, 1994, 244(26): 19–61.
- [27] 黄萱, 徐子勤, 陈立余, 等. 小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定 [J]. *分子细胞生物学报*, 2006, 39(2): 91–96.
- [28] YAHIAOUI N, SRICHUMPA P, DUDLER R, et al. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2004, 37(4): 528–538.
- [29] 姜海霞, 刘永生, 杨孝朴, 等. 人肌蛋白基因的克隆与原核表达 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2006, 41(3): 11–15.
- [30] 王晓东, 牟玉莲, 张莉, 等. 近交五指山小型猪 *SLA-DQA* 基因的克隆及在大肠杆菌的原核表达 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2006, 41(4): 23–26.

The cloning and prokaryotic expression of the alkaline protease gene *TvALP* from *Trichoderma viride*

XU Yangyu^{1,2}, LIU Fuxiang³, HONG Yanbin¹, CHEN Xiaoping¹, LI Haifeng¹, WEN Shijie¹,
LI Xingyu¹, LI Ling⁴, LIANG Xuanqiang¹

(1. Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640; 2. Guangdong Agribusiness Tropical Agriculture Research Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 511365; 3. Guangdong Zhongshan Experimental Middle School, Zhongshan, Guangdong 528404; 4. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract: A peptide sequence was identified from antimicrobial proteins in *Trichoderma viride* based on the de novo mass spectrometry determination. Through BLASTp database searching, it was found that this peptide sequence is encoded by a *alkaline proteinase* gene, and the target gene fragment was amplified using homology-based cloning. Bioinformatics analysis reveals that the *TvALP* gene (GenBank number KJ659907) has a complete open reading frame of 1 230 bp and encodes a protein composed of 409 amino acids. This protein has a predicted molecular weight of about 43 kD, and an isoelectric point of 7.96, and contains a signal peptide composed of 20 amino acids. According to classification, the protein belongs to the peptidase inhibitor_I9 superfamily and is a

member of the subtilisin serine protease S8 family. The sequenced plasmid was ligated into the prokaryotic expression vector pET30a using double digestion, and the expression was induced in the host bacterium BL21 (DE3)pLysS. The result showed a specific protein band at 45 kD, which was consistent with the predicted size of the target protein, indicating that the expression plasmid pET30a- $\Delta TvALP$ (“ Δ ” Signaling peptide excision) was successfully expressed in the host bacterium BL21(DE3)pLysS. After sonication, the protein formed inclusion bodies. However, after *in vitro* renaturation, no active protein was obtained for antibacterial mechanism research.

Keywords: *Trichoderma viride*; alkaline proteinase gene; prokaryotic expression; inclusion bodies

(责任编辑:潘学峰)