

豇豆几丁质酶 N 端序列测定及 与其它植物的比较

陈崇顺^{1,2}, 朱雪峰², 郁志芳³

(1. 南京师范大学生命科学学院分子医学生物技术实验室, 江苏南京 210097; 2. 南京农业大学园艺系, 江苏南京 210095; 3. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

摘要: 通过自动 Edman 降解程序, 测定了经诱导、纯化的豇豆几丁质酶 N 端 10 个氨基酸的序列, 并将该序列与其它植物几丁质酶 N 端相应部分的氨基酸序列进行了比较分析。结果表明, 该豇豆 (*Vigna sesquipedalis*) 几丁质酶 N 端 10 个氨基酸的序列为 EQCGSQAGGA, 与 I 类几丁质酶同一部分同感序列同源性高达 100%; 而与 II、III 及 IV 类几丁质酶的相应序列均无同源性。结合考虑此酶的等电点 (8.3) 及分子量 (33 kD), 可推测该豇豆几丁质酶属于 I 类几丁质酶。其 N 端序列的高度保守性提示, 该段序列可作为 I 类几丁质酶的一段主要特征序列, 并可据其合成核酸探针, 以分离、克隆其它 I 类几丁质酶编码基因。

关键词: 豇豆; 几丁质酶; N 端氨基酸序列; 测定; 比较

中图分类号: Q946.91⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)02-0177-06

Determination of the N-terminal amino acid sequence of a chitinase from *Vigna sesquipedalis* and its comparison with those of the same regions from other plant chitinases

CHEN Chong-shun^{1,2}, ZHU Xue-feng², YU Zhi-fang³

(1. *Molecular & Medical Biotechnology Laboratory, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;* 2. *Dept. of Horticulture, Nanjing Agric. Univ., Nanjing 210095, China;* 3. *College of Food Science and Technology, Nanjing Agric. Univ., Nanjing 210095, China*)

Abstract: The sequence of ten N-terminal amino acids was determined by automatic Edman degradation, for an induced and purified chitinase from *Vigna sesquipedalis*, and compared with those of the same regions of other plant chitinases. The results indicated that the first ten N-terminal amino acids for the chitinase from *V. sesquipedalis* were sequenced in EQCGSQAGGA. The sequence shared a 100% homology with the consensus sequence of the other sequenced chitinases class I, however, presented no homology to the sequences of ten N-terminal amino acids from the chitinases of class II, class III and class IV, respectively. With its isoelectric point (8.3) and molecular weight (33kD), it was deducible that the chitinase from *V. sesquipedalis* was one of the chitinases class I. The

收稿日期: 2000-07-19

作者简介: 陈崇顺 (1958-), 男, 生物学博士, 主要从事生物工程及分子生物学等方面的研究与教学。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670515)

fact that the first ten N-terminal amino acids were very high conservative within the chitinases class 1 suggested that the sequence could serve as a main characteristic sequence for class 1. And some oligo-nucleotide probes, synthesized on the basis of it, could be used to isolate and clone the genes encoding the chitinases of class 1.

Key words: *Vigna sesquipedalis*; chitinase; N-terminal amino acid sequence; determination; comparison

几丁质酶(EC 3.2.1.14)是一种能降解几丁质(N-乙酰氨基葡萄糖线性同聚物)的糖苷酶。由于具有抗真菌活性等多重作用,所以植物几丁质酶的酶学及分子生物学研究受到了越来越多的关注。近年来,植物几丁质酶及其基因更成为抗真菌病基因工程研究的焦点^[1]。为了充分发挥作为目的基因的几丁质酶基因的抗真菌作用,在分离、克隆、制备该目的基因前,首先必须了解其表达产物的抗真菌活性及其它相关特性。这是因为同一植物可能含有不止一种几丁质酶,并非所有几丁质酶都有抗真菌活性^[2]。同时,同一几丁质酶对不同真菌的抑制作用不尽相同^[3];另一方面,同一真菌对不同几丁质酶的敏感程度也有差异^[4]。上述这些不同之处至少涉及到几丁质酶的不同类型、不同来源等。如 *Fusarium solani* 在烟草 I 类几丁质酶的作用下菌丝尖端解体,生长受抑;而对烟草 II 类几丁质酶的作用则不敏感^[5]。鹰嘴豆碱性几丁质酶能使 *Rhizoctonia solani* 等供试真菌菌丝生长受抑;而其酸性几丁质酶则对前述相同供试菌无抑制作用^[6]。因此,为了开展豇豆几丁质酶抗枯萎病基因工程的研究,笔者首先从豇豆幼苗中诱导、纯化出了一种对 *Fusarium oxysporum* 等批试真菌具强抑制作用的几丁质酶^[6]。本论文则报告以前未见研究的、具强抗真菌活性的该豇豆几丁质酶 N 端氨基酸序列的测定结果,同时将其与其它植物几丁质酶 N 端相应片段的氨基酸序列进行比较,力图在为进行豇豆几丁质酶基因工程研究奠定重要基础的同时,通过对该段测定序列可能意义的探讨,为开展其它抗真菌的几丁质酶基因的分子生物学研究等创造良好的条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物材料 早熟二号豇豆(*Vigna sesquipedalis*)购于南京市蔬菜种子公司(赣州地区群力种籽公司产品)。

1.1.2 主要化学试剂用品 3-环己胺-1-丙磺酸(CAPS)为 Sigma 公司产品;聚乙烯二氟(PVDF)膜为 ABI 公司产品。其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 几丁质酶的诱导与纯化 用 0.25 mg/mL 西瓜尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. *niveum*)胞壁碎片及孢子混合液以浸根法诱导处理‘早熟二号’豇豆幼苗。4 d 后取其全株提取几丁质酶。经热变性(60 °C, 30 min)、硫酸铵沉淀(60%饱和度, 4 °C)、亲和层析(以再生脱乙酰几丁质为层析介质)纯化程序,将经诱导的豇豆几丁质酶提纯^[6]。

1.2.2 SDS-PAGE 电泳及电转移 参考夏其昌的方法^[7]。制备好经诱导特异表达的豇豆几丁质酶纯化样品,采用 5%的浓缩胶和 12%的分离胶,室温下恒压电泳到溴酚蓝前沿跑至凝胶末端(浓缩胶 60 V, 分离胶 160 V)。电泳结束后,将凝胶用 10%甲醇和 10 mmol/L 的 CAPS(pH 为 11.0)缓冲液浸泡 5 min;另将经甲醇和 CAPS 缓冲液预处理过的一张 PVDF 膜置于两张定量滤纸上,再将浸泡过的凝胶置于膜上,盖两张经 CAPS 缓冲液预处理过的定量滤纸。将其置半干式电转移仪,用 100 mA 恒流转移 1 h。待转移结束后,取下 PVDF 膜,用考马斯亮蓝 R-250 染色 50 s。待脱色后即可见蛋白质条带。

1.2.3 N 端氨基酸序列的测定 用刀片切取蛋白质条带,上 ABI 491A 蛋白质测序仪测定 N 端氨基酸残基序列。

2 结果与讨论

2.1 豇豆几丁质酶 N 端氨基酸序列的测定

豇豆几丁质酶纯化样品经 SDS-PAGE 电泳处理后,能很好地被半干式电转移仪从凝胶中转移到 PVDF 膜上。经 ABI 491A 蛋白质测序仪测定,该豇豆几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸的序列为 E-QCGSQAGGA(图 1)。

2.2 豇豆与其它植物几丁质酶 N 端氨基酸序列的比较分析

将本研究所测得的豇豆几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸残基序列与从 GenBank 及相关文献中检索到的其它有代表性、分类确定的植物几丁质酶的相应序列(纯化蛋白质测序的直接资料或据其编码基因推得

的氨基酸序列)分列于表 1。由表 1 可得, I 类几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸的同感序列为 EQCGSQAGGA(该类绝大多数几丁质酶与此同感序列的同源性高达 90%~100%;与此同感序列同源性最低也有 60%,且只有 1 个); II 类几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸的同感序列为 GGIAIYWGQN(该类各个几丁质酶与此同感序列的同源性也高达 60%~100%)。然而,

未能找到 III 类及 IV 类几丁质酶相应片段各自的同感序列,这两类下属的不同几丁质酶 N 端 10 个氨基酸残基序列彼此之间有些相差不大,而有些则完全不一。另外,除个别位置残基相同外,上述 4 大类几丁质酶该段序列相互之间亦不相同。笔者得到的该豇豆几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸序列与 I 类几丁质酶上述同感序列同源性高达 100%;而与其它各类几丁质

表 1 豇豆几丁质酶 N 端氨基酸序列(第 1~10 个残基)与其它植物几丁质酶相应序列的比较

Table 1 Comparison of the N-terminal amino acid sequence(residues 1~10) of a chitinase from *Vigna sesquipedalis* with those of chitinases from other plants

几丁质酶的来源及类型 Source and class of chitinases	N 端氨基酸序列(第 1~10 个残基) N-terminal amino acid sequence (residues 1~10)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Vigna sesquipedalis</i>	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
Class I Consensus	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Arabidopsis thaliana</i> ⁽⁸¹⁾	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A
<i>Capsicum annuum</i> ⁽²¹⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Daucus carota</i> ⁽²²⁾	E	Q	C	G	K	Q	A	G	N	A
<i>Lycopersicon esculentum</i> ⁽¹⁵¹⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁽¹³²⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Oryza sativa</i> ⁽¹²⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Phaseolus vulgaris</i> ⁽¹⁷⁾	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A
<i>Solanum tuberosum</i> ⁽¹⁴⁾	Q	N	C	G	S	Q	G	G	G	K
<i>Solanum tuberosum</i> ⁽¹⁵¹⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
<i>Theobroma cacao</i> ⁽¹⁴¹⁾	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A
<i>Triticum aestivum</i> ⁽¹⁷⁾	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A
Class I										
<i>Hordeum vulgare</i> ⁽¹³³⁾	S	V	S	S	I	V	S	R	A	G
<i>Lycopersicon esculentum</i> ⁽¹⁶²⁾	Q	D	V	G	T	I	V	T	S	D
<i>Lycopersicon esculentum</i> ⁽¹⁶³⁾	Q	N	A	G	S	I	V	T	R	E
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁽¹³²⁾	Q	G	I	G	S	I	V	T	N	D
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁽¹³³⁾	Q	G	I	G	S	I	V	T	S	D
Class II Consensus	G	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N
<i>Arabidopsis thaliana</i> ⁽⁸²⁾	G	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N
<i>Cucumis sativus</i> ⁽²⁰⁾	A	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁽²¹⁾	G	D	I	V	I	Y	W	G	Q	N
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁽²¹⁾	G	D	I	V	V	Y	W	G	Q	D
<i>Parthenococcus quinquefolia</i> ⁽²²⁾	G	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N
<i>Phytolacca americana</i> ⁽²¹¹⁾	G	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N
<i>Vigna angularis</i> ⁽²⁴⁾	G	G	I	S	V	Y	W	G	Q	N
Class IV										
<i>Brassica napus</i> ⁽²⁵⁾	Q	N	C	G	C	A	P	N	L	C
<i>Daucus carota</i> ⁽⁵⁷⁾	Q	N	C	N	C	A	A	G	L	C
<i>Phaseolus vulgaris</i> ⁽³⁹⁾	M	G	P	K	N	V	S	A	Q	N

酶的相应序列几乎没有同源性。

2.3 豇豆几丁质酶的分类及其 N 端测定序列的意义

根据酶蛋白一级结构的不同,高等植物几丁质酶目前公认可分为 4 类,参考单丽波等⁽²⁷⁾,见图 2。I 类:N 端信号肽(长约 24 个残基,富含疏水氨基酸)+几丁质结合区(长约 40 个残基,富含半胱氨酸)+铰合区(长约 20 个残基,富含脯氨酸)+催化功能区(长约 240 个残基)。I 类几丁质酶又依其是否具有 C 端扩展区(长约 6 个氨基酸)而被分为 I 类 a 型(Ia)和 I 类 b 型(Ib)。Ia 几丁质酶之 C 端扩展区使其定

位于液泡中;II 类催化功能区与 I 类相应区段高度同源,这两类几丁质酶之间存在血清学交叉反应,具有共同的抗体反应簇;III 类多为兼具几丁质酶和溶菌酶活性的双功能酶。其催化功能区与上述两类相应区段同源性很低,在血清学上无交叉反应;IV 类的几丁质结合区和催化功能区结构类似于 I 类的相同区域,但其中缺失了一些片段,使其上述区域减小。因此,该类的氨基酸残基数大大低于一般 I 类几丁质酶成熟蛋白所含 300 个左右氨基酸的水准。另外,其几丁质结合区虽与 I 类几丁质酶的几丁质结合区相类似,也富

含半胱氨酸(约为 7 个),但该区的氨基酸残基序列却与 I 类几丁质酶的相应区域大不一样。一般几丁质酶基因首先被翻译成含有信号肽的前体蛋白;蛋白质正确定位后,其信号肽被切除而被加工为成熟形式。

I 类几丁质酶多为 I a 类型,碱性,位于细胞内液泡中。在病原真菌侵染植物细胞时,积累在液泡中的几丁质酶会非常迅速地大量释放出来以降解真菌侵染结构,具有强抗真菌的作用;II 类几丁质酶位于

细胞间隙。在植物防卫反应中,其主要作用不是直接杀灭侵染真菌,而是释放诱导因子,从而诱导周围细胞的抗真菌活性;III 类几丁质酶亦位于细胞间隙。其抑菌能力的研究少于其对植物生长发育作用的研究;IV 类几丁质酶也位于细胞间隙,具有一定的抗真菌能力^[21]。迄今无论是纯几丁质酶离体抑菌效果,还是转几丁质酶基因植物对病害的反应多以 I 类几丁质酶抗真菌活性为最强。因此, I 类几丁质酶在植物对病

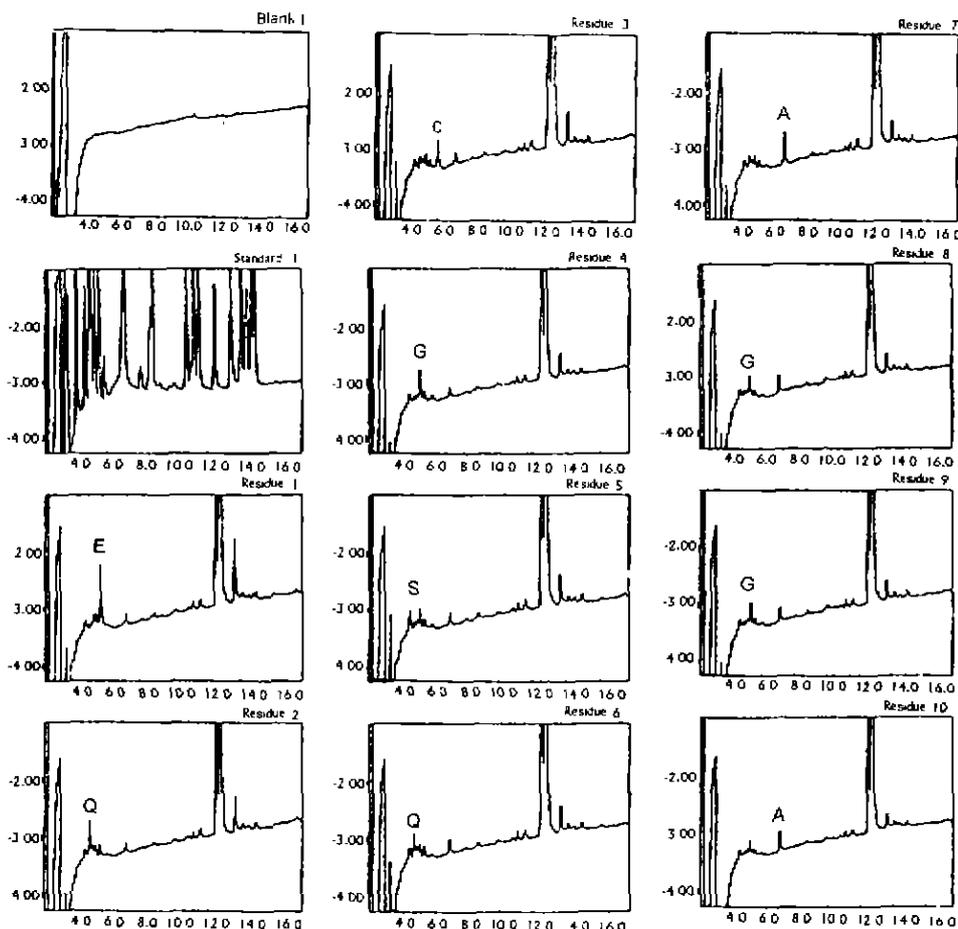


图 1 豇豆几丁质酶 N 端序列测定的 PTH-氨基酸色谱图

Fig. 1 PTH-amino acid chromatogram of N-terminal amino acid sequencing of a chitinase from *Vigna sesquipedalis*

原真菌侵染的防卫反应中作用最大。

笔者首先诱导、纯化了文献中未见报道的豇豆(*Vigna sesquipedalis*)几丁质酶,并测定了该纯酶的等电点、分子量等特性。本文报告的该纯豇豆几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸的序列也即为其几丁质结合区 N 端最先 10 个残基之序列。其与 I 类几丁质酶相应片段同感序列同源性高达 100%;因 II、III 两类几丁质酶均无几丁质结合区,故其与它们均无同源性;其与 IV 类几丁质酶几丁质结合区的相应片段也无同源性。

另一方面,结合考虑笔者测定的其等电点(8.3)和分子量(33 kD)等研究结果^[29],可推测该豇豆几丁质酶可能属 I 类几丁质酶。进一步的研究也表明其对枯萎病菌等供试真菌具强抑制作用^[3]。该酶成熟形式 N 端前 10 个氨基酸序列的测定为其基因克隆及基因工程研究打下了良好的基础;同时,笔者报告的该段序列在 I 类几丁质酶中的高度保守性亦提示, E-QCGSQAGGA 可作为 I 类几丁质酶分类的一段主要特征序列。据此,可初步了解某一待研几丁质酶及其

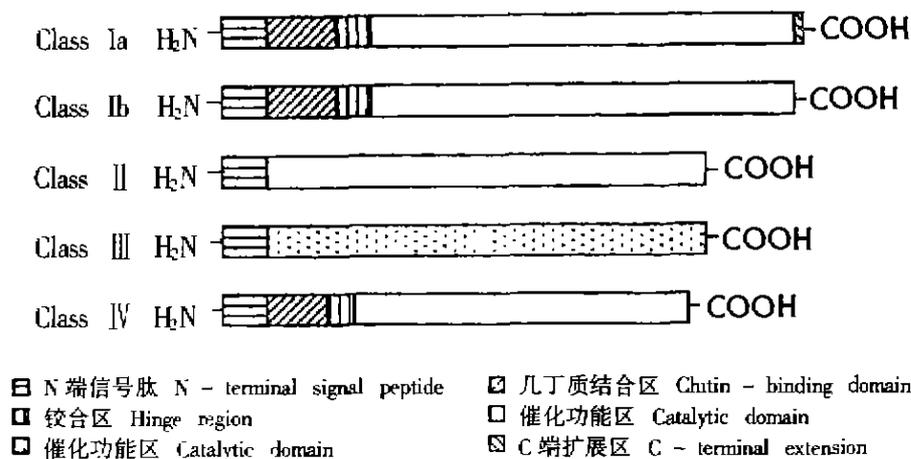


图 2 四类几丁质酶一级结构特点比较

Fig. 2 Comparison of characteristics of the primary structure among the four classes of chitinases

基因在抗真菌病基因工程中的应用价值;可合成核酸探针,分离、克隆出其它 I 类几丁质酶基因,以便对其作分子生物学的进一步研究。

N 端氨基酸序列的测定得到北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点开放实验室沈一萍老师的帮助,特此致谢。

参考文献:

- 高必达. 转几丁质酶基因防植物病害研究: 进展、问题与展望[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 21—28.
- Kim Y J, Hwang B K. Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 48: 417—432.
- 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶纯酶液对不同真菌的作用[J]. 植物保护学报, 2000, 27(4): 375—376.
- Sela-buurlage M B, Ponstein A S, Bres-Vloemans S A, et al. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1, 3-glucanases exhibit antifungal activity [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 857—863.
- Vogelsang R, Barz W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1, 3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Planta*, 1993, 189(1): 60—69.
- 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶的诱导与纯化[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 351—355.
- 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 250.
- Samac D A, Hironaka C M, Yallaly P E, et al. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1990, 93: 907—914.
- Kragh K M, Hendriks T, de Jong A J, et al. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant tsll [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31: 631—645.
- Danhash N, Wagemakers C A M, van Kan J A L, et al. Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22: 1017—1029.
- Shinshi H, Mohnen D, Meins F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme; Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 89—93.
- Zhu Q, Lamb C J. Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 226: 289—296.
- Brogie K E, Gaynor J J, Broghe R M. Ethylene-regulated gene expression; Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 6820—6824.
- Gaynor J J. Primary structure of an endochitinase mRNA from *Solanum tuberosum* [J]. *Nucleic Acid Research*, 1988, 16: 5210.
- Meins F, Neuhaus J M, Sperisen C, et al. The primary structure of plant pathogenesis related glucanohy-

- drolases and their genes[A]. In: Boller T, Meins F. Genes Involved in Plant Defense [C]. Vienna: Springer, 1992. 245—282.
- [16] Snyder-Leiby E T, Furtek D B. A genomic clone from *Theobroma cacao* L. with high similarity to plant class I endochitinase sequences[J]. *Plant Physiol*, 1995, **109**: 338.
- [17] Molano J, Polascheck I, Duran A, et al. An endochitinase from wheat germ [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, **254**: 4901—4907.
- [18] Leah R, Tommerup H, Svendsen I, et al. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 1564—1573.
- [19] Payne G, Abl P, Moyer M, et al. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 98—102.
- [20] Metraux J P, Burkhardt W, Moyer M, et al. Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme / chitinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 896—900.
- [21] Lawton K, Ward E, Payne G, et al. Acidic and basic class II chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, **19**: 735—743.
- [22] Bernasconi P, Locher R, Pilet P E, et al. Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured in vitro [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **915**: 245—260.
- [23] Ohta M, Yamagami T, Funatsu G. Purification and characterization of two chitinases from the leaves of pokeweed (*Phytolacca americana*) [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(4): 656—661.
- [24] Ishige F, Yamazaki K, Mori H, et al. The effects of ethylene on the coordinated synthesis of multiple proteins: accumulation of an acidic chitinase and a basic glycoprotein induced by ethylene in leaves of azuki bean, *Vigna angularis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**(5): 681—690.
- [25] Rasmussen U, Bojsen K, Collinge D B. Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, **20**: 277—287.
- [26] Margis-Pinheiro M, Metz-Boutigue M H, Awade A, et al. Isolation of a complementary DNA encoding the bean PR4 chitinase; an acidic enzyme with an amino-terminus cysteine-rich domain [J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17**: 243—253.
- [27] 单丽波, 贾旭. 几丁质酶及其在抗真菌病基因工程中的应用[J]. *生物工程进展*, 1998, **18**(3): 37—40.
- [28] Graham L S, Sticklen M B. Plant chitinases [J]. *Can J Bot*, 1994, **72**: 1057—1083.
- [29] 朱雪峰, 陈崇顺, 郁志芳. 豇豆几丁质酶部分酶学特性的研究[J]. *生物技术*, 1999, **9**(6): 15—19.