

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0044 - 06

## 总状毛霉甲壳素脱乙酰酶(CDA2)全长 cDNA 的克隆及原核表达

蒋霞云<sup>1</sup>, 袁襄南<sup>2</sup>, 魏福卫<sup>1</sup>, 周培根<sup>1</sup>, 邹曙明<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

**摘要:** 采用快速扩增 cDNA 末端(RACE)克隆技术,通过设计甲壳素脱乙酰酶简并引物,从总状毛霉(*Mucor racemosus*)菌丝体中克隆了 CDA2 的基因(EF468349)及其全长 cDNA(DQ678929)序列。与已获得的总状毛霉菌 *cda1* 基因相比, *cda2* 基因中不含内含子。总状毛霉 *cda2* 全长 cDNA 为 1 378 bp, 包含 23 bp 5' 端非翻译区、1 254 bp 开放阅读框和 101 bp 3' 端非翻译区, 编码一条由 418 个氨基酸残基组成的多肽链, 其 N 端包含一段 21 个氨基酸残基组成的信号肽, 在 150 ~ 272 氨基酸残基区存在一个多糖脱乙酰酶保守结构域。通过构建 pET28a-*cda2* 表达载体和进行原核表达研究, 结果显示: 原核表达产生的重组蛋白 CDA2 的分子量约为 46 ku, 表达形式以包涵体为主, 纯化获得的重组蛋白 CDA2 具有甲壳素脱乙酰酶催化活性。本研究为进一步研究总状毛霉 CDA2 的结构和功能奠定了基础。

**研究亮点:** 采用 RACE 技术、设计简并引物, 从总状毛霉中克隆得到另一甲壳素脱乙酰酶基因 *cda2*, 对其进行原核表达、纯化得到了有活性的重组蛋白 CDA2, 为 CDA 基因功能的解析和酶学性质的研究提供了有用的信息。

**关键词:** 甲壳素脱乙酰酶; 甲壳素脱乙酰酶 2 基因; cDNA 克隆; 总状毛霉; 原核表达

**中图分类号:** Q 939.9

**文献标识码:** A

甲壳素脱乙酰酶(EC3.5.1.41, CDA)能够催化甲壳素分子中 N-乙酰氨基葡萄糖单元的乙酰氨基基团的水解, 产物为聚氨基葡萄糖, 故能用于酶法生产壳聚糖, 以替代现有的碱法, 从而避免环境、能源等诸多棘手问题, 在壳聚糖及其衍生物的生产中有着较高的应用价值。早期发现的 CDA 主要存在于一些真菌类微生物中, 如鲁氏毛霉(*Mucor rouxii*), 菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*), 蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*), 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)等<sup>[1]</sup>。但是, 由于这些生物中的 CDA 含量低, 很难通过传统提取制备方法大量获得, 因此利用基因工程技术表达重组酶是一种有效提高产量的途径。近年来, 我们分离得到了一株 CDA 高产野生菌株-总状毛霉(*Mucor racemosus*)<sup>[2]</sup>, 并发现该菌株中存在 2 个 CDA 编码基因(*cda1* 和 *cda2*), 在先前

CDA1 全长 cDNA 克隆的基础上<sup>[3]</sup>, 本文进行了 CDA2 全长 cDNA 的克隆, 并对 CDA2 的原核表达和重组酶活性开展研究, 为后期深入研究 CDA2 酶的结构、性质和功能奠定了必要的基础。

### 1 材料

#### 1.1 菌种

总状毛霉(*M. racemosus*)为本实验室分离并保存。

#### 1.2 试剂

总 RNA 提取试剂盒、*Taq* 酶、dNTP 混合物、DNA Marker 购自天根生物科技有限公司; 反转录试剂盒、pMD-19T 载体连接系统购自宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)由本实验室保存; 胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司; 核酸和蛋白质电泳试剂购自上海华美生物工程公司。Ni<sup>2+</sup>-Sepharose 预装柱

收稿日期: 2010-06-08

修回日期: 2010-09-28

基金项目: 上海海洋大学博士启动基金项目(080219); 上海海洋大学优秀青年教师基金(080236)

作者简介: 蒋霞云(1974 - ), 女, 博士, 副教授, 主要从事水产品加工与贮藏方面的研究。E-mail: jiangxy@shou.edu.cn

(1 mL)购自安玛西亚生物技术公司;酶活测定试剂(包含辅酶 A、柠檬酸合酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶及辅酶 I 等)

购自 Roche 或 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯或以上纯度。所有引物委托上海生工生物工程有限公司合成,其序列、位置及用途见表 1。

表 1 实验所用引物列表

Tab. 1 Sequences of oligonucleotide primers

引物	序列(5' - > 3')	位置 (mRNA)	用途
T17 AP	gactcgagtcgacatcgatgttttttttttttt	-	3' - 和 5' -RACE 通用
AP	gactcgagtcgacatcg	-	3' - 和 5' -RACE 通用
GSP1	gatgatgmcyyaactgyc	正向 484 - 503bp	3' -RACE
GSP4	tcggctactgttttagtcagg	反向 895 - 875bp	5' -RACE
GSP5	accgtctgaataccacgcat	反向 641 - 621bp	5' -RACE
CDA2-F	gcggatcccttacttctgacacaatttta	正向 67 - 88bp	PCR 扩增
CDA2-R	ccgctcggagttaagacagtaaagaaccaag	反向 1257 - 1237bp	PCR 扩增
CDA2-S-R	gaggaagaatagcctgtcatg	反向 371 - 351bp	测序

注: m = a/c, y = c/t。

## 2 方法

### 2.1 5' -和 3' -RACE<sup>[4]</sup>

收集对数生长中期的菌丝体,用总 RNA 抽提试剂盒获得总状毛霉总 RNA,以变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 质量。采用引物 T17 AP 进行第一轮 3' 末端逆转录反应,总体积为 20  $\mu$ L,30 个循环;第二轮反应以 3' 端第一链 cDNA 为模板,以 AP 和 GSP1<sup>[5]</sup>为引物进行 PCR 扩增,扩增程序为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,57  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。进行 PCR 产物的回收、克隆和测序。

依据 3' 末端序列设计基因特异性引物 GSP4,逆转录反应得到第一链 5' 端 cDNA,加入 RNase H 降解 mRNA,分离第一链 5' 端 cDNA,并将其多聚腺苷酸化,纯化产物先后进行两轮巢式 PCR 反应,具体为:第一轮反应,以 GSP5 和 T17AP 为引物,30 个循环;第二轮反应采用引物为 AP 和 GSP5,扩增程序如上所述,进行 PCR 产物的回收、克隆和测序。

### 2.2 序列分析

采用 BioEdit 7.0 软件进行序列分析。通过 CLUSTAL W<sup>[6]</sup>程序、拼接 5' -RACE 和 3' -RACE 片段得到全长 cDNA,在 NCBI 的 BLAST n/p 搜索工具上进行序列同源性搜索,蛋白的分子量及等电点等性质预测在 <http://us.expasy.org/>上进行<sup>[7]</sup>,采用 MEGA 4.1<sup>[8]</sup>构建系统发生分析图,用 Signal P3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

SignalP/)<sup>[9]</sup>软件分析信号肽序列。

### 2.3 cda2 基因的扩增

采用试剂盒、从总状毛霉菌丝体中抽提得到全基因组 DNA,使用引物 CDA2-F/R、PCR 扩增得到 *cda2* 基因片段,克隆并测序。

### 2.4 cda2 原核表达载体的构建

以总状毛霉菌丝体第一链 cDNA 为模板,采用 CDA2-F(引入 *Bam*HI 酶切位点)和 CDA2-R(引入 *Xho*I 酶切位点)进行 PCR 扩增,*cda2* 扩增产物和质粒 pET28a 分别用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切,再用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接,所得的 pET28a-*cda2* 表达载体转化入 *E. coli* BL21 (DE3)细胞,由双酶切图谱和测序进行重组质粒的鉴定。

### 2.5 CDA2 重组蛋白的表达和纯化

将含有重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3)接种入含卡那霉素(20  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养约 2 h,待菌悬液的 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 后,加入 1 mmol/L IPTG 诱导一定时间后,10 000 g 离心 1 min 收集细胞,将细胞置于磷酸缓冲液(pH = 7.2)中、进行超声波破碎 20 min(以 10 s 超声、10 s 间隔为一个循环),裂解液以 12 000 g 离心 10 min,用 SDS-PAGE 分析各组分的蛋白质组成,用 BandsScan 软件估算蛋白质的含量。

用上述方法收集得到细菌细胞,在缓冲液 A(2 mol/L 尿素,20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,2% Triton X-100,pH = 8.0)、冰浴中超声

破碎细胞,低温下离心分离包涵体蛋白质,将其溶解于缓冲液 B(6 mol/L 盐酸胍, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT, pH = 8.0)。用缓冲液 C(6 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT, pH = 8.0)平衡 Ni<sup>2+</sup>-Sephrose 预装柱,样品液经微孔滤膜过滤后进样,采用尿素线性梯度(6~0 mol/L)洗脱过程进行柱上复性,流速为 0.5 mL/min,复性过程为 30 个床体积;随后用缓冲液 D(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT, pH = 8.0)平衡柱子,用咪唑线性梯度(10~500 mmol/L)洗脱重组蛋白,洗脱过程为 10 个床体积,流速为 1 mL/min,收集各部分洗脱液,SDS-PAGE 法分析蛋白质组分。以上层析操作均在 AKTA Purifier 工作站上进行。

## 2.6 壳素脱乙酰酶酶活<sup>[10]</sup>及蛋白质浓度测定

以部分脱乙酰甲壳素为底物,取底物含量为 5 g/L 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.2)2 mL, 50 °C 预热 10 min 后,加入 1 mL 甲壳素脱乙酰酶酶液,50 °C 准确反应 30 min 后、沸水浴 3 min 终止反应,对照组为先将酶液沸水浴 3 min、后 50 °C 准确反应 30 min,过滤反应液,用酶法<sup>[11]</sup>测定滤液中的乙酸含量,以样品与对照的乙酸含量差值计算酶的活力。酶活单位定义为:1 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.2)中 50 °C 反应 30 min 后,生成 1 μmol 乙酸的酶量。

蛋白质浓度测定采用福林-酚法,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

## 3 结果

### 3.1 总状毛霉 CDA2 全长 cDNA 及基因克隆

根据相关物种甲壳素脱乙酰酶 cDNA 的保守区域设计简并引物<sup>[5]</sup>,采用 RACE 方法,分别获得了大小为 900 bp 和 850 bp 的 3'-和 5'-RACE 产物(图 1),经测序、拼接和序列比对,得到一条新的总状毛霉 CDA2 全长 cDNA 序列-*cda2* (GenBank 登录号: DQ678929)。总状毛霉 *cda2* 的 cDNA 全长为 1 378 bp,包含 23 bp 5'端非翻译区、1 254 bp 开放阅读框和 101 bp 3'端非翻译区序列;该基因编码一条由 418 个氨基酸残基组成的多肽链,其 N 端含有一段由 21 个氨基酸残基构成的信号肽序列,预测分子量为 45.7 ku,等电

点为 4.45。与总状毛霉另一甲壳素脱乙酰酶 CDA1 的 cDNA 相似<sup>[3]</sup>,CDA2 的 150~272 氨基酸残基区域也含有一个保守的多糖脱乙酰酶结构域,表明该结构域在 CDA 脱乙酰催化过程中起着重要作用<sup>[3,12-13]</sup>。根据总状毛霉 CDA2 的 cDNA 序列设计引物,克隆得到其相应的基因序列(EF468349),与已获得的总状毛霉 *cda1* 基因相比,*cda2* 基因中不含内含子。总状毛霉中的 *cda1* 及 *cda2* 基因均可归入第五类甲壳素脱乙酰酶基因,即未发现甲壳素结合围食膜 A 结构域(chitin-binding peritrophin-A domain)和低密度脂蛋白受体 A 类结构域(low-density lipoprotein receptor class A domain)<sup>[13]</sup>。

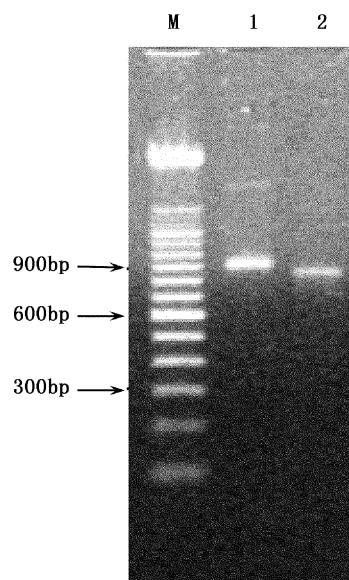


图 1 3'-和 5'-RACE 扩增电泳图  
Fig.1 Electrophoretic profiles of 3'- and 5'-RACE fragments

M. DNA marker; 1. 3'-RACE 片段; 2. 5'-RACE 片段。

### 3.2 列分析

总状毛霉 (*M. racemosus*) CDA2 基因与其 CDA1 基因(DQ538514)、米根霉 (*Rhizopus oryzae*) CDA(AY225513)、卷柄根霉 (*Rhizopus circinans*) CDA1 (AY861444)、CDA2 (AY861445) 和 CDA3 (EU086737)、鲁氏毛霉 (*M. rouxii*) CDA (Z19109)、卵形孢球托霉 (*Gongronella butleri*) CDA (AF411810)、匍枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*) CDA (AY779045)、布拉克须霉 (*Phycomyces blakesleeanus*) CDA (AB046690)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) CDA1 (AY557948) 和 CDA2 (AY557951) 的 cDNA 序列同源性分别为:55%、

51%、55%、53%、54%、68%、43%、35%、15%、14%和13%;对应氨基酸序列同源性分别为:52%、52%、54%、49%、52%、66%、47%、33%、32%、23%和24%。根据CDA推测氨基酸序列进行了聚类分析(图2),结果与真菌经典分类法完全一致。

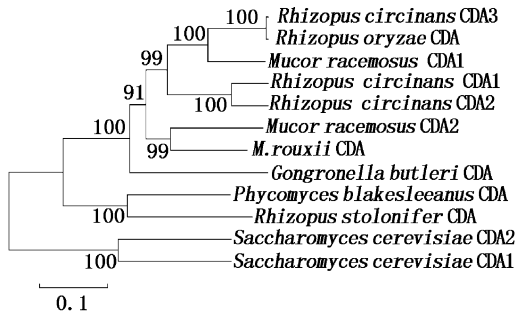


图2 不同真菌甲壳素脱乙酰酶推测氨基酸残基序列的聚类分析(NJ法)

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic analysis of CDAs from various fungi by their deduced amino acid residue sequences

此外,在总状毛霉、卷柄根霉和啤酒酵母中均存在多个CDA,卷柄根霉和酿酒酵母自身的CDA1和CDA2相似度最高(图2),总状毛霉的CDA1与米根霉CDA最为接近,而其CDA2与鲁氏毛霉CDA亲缘关系最近,表明总状毛霉CDA1或CDA2可能存在不同的起源,类似的现象还有:卷柄根霉的CDA3与米根霉最为接近。

### 3.3 *cda2* 的原核表达

将*cda2*插入原核表达质粒pET28a,构建重组质粒pET28a-*cda2*,经限制性内切酶谱和测序验证,表明*cda2*片段插入载体的位置和序列正确,未发生移码及有义突变。重组质粒转化入大肠杆菌BL21(DE3),诱导表达,并进行SDS-PAGE电泳。结果表明:重组蛋白CDA2可正确表达,其分子量约为46ku,符合预期;表达的形式以包涵体为主,占蛋白总量的30%以上。

### 3.4 CDA2的纯化

经柱上复性和亲和层析洗脱分离的方法,从包涵体中分离得到电泳纯的甲壳素脱乙酰酶重组蛋白CDA2(图4),重组蛋白的纯度为94%(表2)。由表2可知,尽管回收率较低,仅为5.5%,但在洗脱峰收集液中可检测到该酶对甲壳素底物的脱乙酰基催化活性,比活为0.05U/mg(表2)。

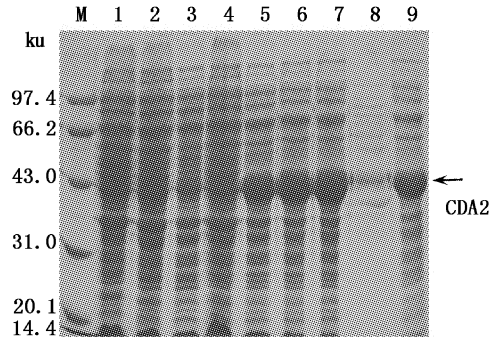


图3 原核表达的CDA2的SDS-PAGE分析  
Fig.3 SDS-PAGE analysis on expression of recombinant CDA2 protein in *E. coli* BL21(DE3)

M. 蛋白分子量标准;1. 不含质粒的BL21(DE3)细胞;2、3. 未诱导和诱导条件下的含pET28a的BL21(DE3)细胞;4、5、6、7. 分别诱导0、1、2和3h的含pET28a-*cda2*的BL21(DE3)细胞;8、9. 诱导3h的含pET28a-*cda2*的BL21(DE3)细胞经超声波破碎后的上清液和沉淀。

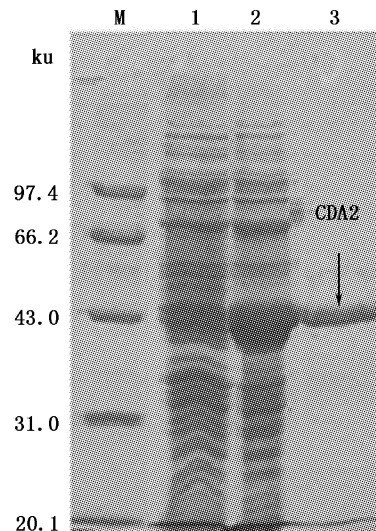


图4 重组蛋白CDA2亲和层析纯化过程的SDS-PAGE分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purification of recombinant CDA2 by affinity chromatography

M. 蛋白质分子量标准;1. 未诱导的含pET28a-*cda2*的BL21(DE3)细胞;2. 诱导的含pET28a-*cda2*的BL21(DE3)细胞;3. 亲和层析咪唑洗脱峰收集部分。

表2 重组蛋白CDA2的纯化过程  
Tab.2 Summary of recombinant protein CDA2 purification

纯化步骤	总蛋白量 (mg)	纯度 (%)	比活 (U/mg)	回收率 (%)
包涵体	180	30	未测定	100
洗脱峰收集液	9.8	94	0.05	5.5

注:蛋白质纯度由SDS-PAGE结果进行灰度扫描而得。

## 4 讨论

甲壳素、纤维素和淀粉是自然界中含量最丰富的三种多糖。甲壳素的化学结构为由  $\beta$ -1, 4-糖苷键相连的多聚-N-乙酰氨基葡萄糖。甲壳素分子具有规整的晶体结构,致使其几乎不溶于所有现有的溶剂系统<sup>[14]</sup>,这极大限制了其应用范围。壳聚糖作为甲壳素的脱乙酰产物,能够溶于多种酸性水溶液,因此在工业、农业等诸多领域得到了广泛的使用<sup>[15]</sup>。目前,甲壳素的脱乙酰反应主要采用碱法进行,即在非均相反应系统中,与浓碱( $>40\%$ )搅拌混合,在较高的温度( $>80^\circ\text{C}$ )下进行脱乙酰反应。采用碱法进行甲壳素脱乙酰反应存在诸多缺点,如能耗高,强碱对管道和设备腐蚀大,污水处理成本高及产物性质不易控制等。因此,探索采用酶法制备甲壳素已成为国内外相关科技人员的主攻方向之一。

甲壳素脱乙酰酶能够对甲壳素底物进行脱乙酰基催化作用,在壳聚寡糖和壳聚糖的生产中有着重要的应用潜力。但是其来源一直困扰着它的应用,由于自然界中甲壳素脱乙酰酶的含量低且只分布于一些低等生物中,所以利用基因工程的方法来大量、快速的获得酶蛋白,不失为一种便捷、有效的办法。迄今为止,已发现的甲壳素脱乙酰酶主要来自于低等真菌及病原微生物,如鲁氏毛霉(*M. rouxii*)<sup>[16]</sup>,构巢曲霉(*A. nidulans*)<sup>[1]</sup>,蓝色犁头菌(*A. coerulea*)<sup>[1]</sup>,米根霉(*R. oryzae*)<sup>[17]</sup>,卷柄根霉(*R. circinans*)<sup>[18-19]</sup>,菜豆炭疽病菌(*C. lindemuthianum*)<sup>[20]</sup>,绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)<sup>[21]</sup>,粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)<sup>[22]</sup>,啤酒酵母(*S. cerevisiae*)<sup>[23]</sup>,短帚霉(*Scopulariopsis brevicaulis*)<sup>[24]</sup>等。本研究克隆的基因来自毛霉属微生物,原核表达得到了预期的重组蛋白CDA2,该蛋白纯化后显示了甲壳素脱乙酰基活性,为后续酶的结构和功能研究奠定了基础。

关于甲壳素脱乙酰酶的酶活性测定,有很多种方法,原理大致基于对反应前后产物乙酸含量变化的测定,但所采用底物各不相同,如水溶性较好的六-N-乙酰壳聚六糖(hexa-N-acetylchitohexaose)<sup>[23-24]</sup>,乙二醇甲壳素(glycol chitin)<sup>[17-19]</sup>,四-N-乙酰壳聚四糖(tetra-N-acetylchitotetraose)<sup>[20]</sup>及水溶性稍好的酸溶胀甲壳素

(acid-swollen chitin)<sup>[21]</sup>。本文采用了部分脱乙酰基的甲壳素为底物,即底物的溶解性较差,可能也是导致重组酶活力不高的原因之一,但此方法旨在鉴别、分离出对近晶体底物有较高亲和力的酶,以期破解甲壳素的脱乙酰过程。

## 参考文献

- [1] TSIGOS I, MARTINO A, KAFETZOPOULOS D, et al. Chitin deacetylase: New versatile tools in biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(7):305-312.
- [2] 蒋霞云,周培根,李燕,等. 几种霉菌产甲壳素脱乙酰酶活力比较及部分酶学性质[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2):211-215.
- [3] JIANG X Y, ZOU S M, ZHOU P G. Cloning and sequence analysis of complete cDNA of chitin deacetylase from *Mucor racemosus*[J]. Chin J Agr Biotechnol, 2007, 4(1):167-172.
- [4] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社, 2005.
- [5] MAW T, TAN T K, KHOR E, et al. Complete cDNA sequence of chitin deacetylase from *Congronella butleri* and its phylogenetic analysis revealed clusters corresponding to taxonomic classification of fungi[J]. J Biosci Bioeng, 2002, 93(4):376-381.
- [6] THOMPSON J, HIGGINS D, GIBSON T, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucl Acids Res, 1994, 22(22):4673-4680.
- [7] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(13):3784-3788.
- [8] TAMURA K, DUKLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol and Evol, 2007, 24(8):1596-1599.
- [9] BENDTSEN J D, NIELSEN H, HEIJNE G V, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. J Mol Biol, 2004, 340(4):783-795.
- [10] KOLODZIEJSKA I, CIECWIERSZ M, LERSKA A. Properties of chitin deacetylase from crude extracts of *Mucor rouxii* mycelium[J]. J Food Biochem, 1999, 23(1):45-57.
- [11] BDRGMEYER H U. Methods of enzymatic analysis[M]. New York: Academic Press, 1974.
- [12] LUSCHNIG S, BATZ T, ARMBRUSTER K, et al. Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*[J]. Curr Biol, 2006, 16(2):186-194.
- [13] DIXIT R, ARAKANE Y, SPECHT A C, et al. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects[J]. Insect Biochem Molec, 2008, 38

- (4):440–451.
- [14] MORLEY K L, CHAUVE G, KAZLAUSKAS R, *et al.* Acetyl xylan esterase-catalyzed deacetylation of chitin and chitosan [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 63(3):310–315.
- [15] PILLAI C K S, PAUL W, SHARMA P C. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation[J]. *Prog Polym Sci*, 2009, 34(7):641–678.
- [16] KAFETZOPOULOS D, MARTINO A, BOURIOTIS V. Bio-conversion of chitin to chitosan: Purification and Characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(7):2564–2568.
- [17] CHATTERJEE S, CHATTERJEE S, CHATTERJEE P B, *et al.* Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones [J]. *Int J of Biol Macromol*, 2008, 42(2):120–126.
- [18] JERAJ N, KUNIC B, LENASI H, *et al.* Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2006, 39(6):1294–1299.
- [19] GAUTHIER C, CLERISSE F, DOMMES J, *et al.* Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*[J]. *Protein Expres Purif*, 2008, 59(1):127–137.
- [20] SHRESTHA B, BLODEAU K, STEVENS W F, *et al.* Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization[J]. *Protein Expres Purif*, 2004, 38(2):196–204.
- [21] NAHAR P, GHORMADE V, DESHPANDE V M. The extra-cellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests[J]. *J Invertebr Pathol*, 2004, 85(2):80–88.
- [22] MATSUI Y, TANAKA K, MATSUDA H, *et al.* *cda1*<sup>+</sup>, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(12):2737–2743.
- [23] MARTINO A, KOUTSIOLIS D, BOURIOTIS V. Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32(6):757–763.
- [24] CAI J, YANG J H, DU Y, *et al.* Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 65(2):211–217.

## Complete cDNA cloning and prokaryotic expression of chitin deacetylase CDA2 from *Mucor racemosus*

JIANG Xia-yun<sup>1</sup>, YUAN Xiang-nan<sup>2</sup>, WEI Fu-wei<sup>1</sup>, ZHOU Pei-gen<sup>1</sup>, ZOU Shu-ming<sup>2</sup>

1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The complete cDNA (GenBank accession number DQ678929) and its corresponding gene (EF468349) of chitin deacetylase CDA2 from *Mucor racemosus* mycelium had been cloned by rapid amplification cDNA end (RACE) with specific degenerate primers. In contrast to previously obtained gene *cda1*, *cda2* contained no intron sequence. It consisted of 1 378 bp nucleotides, comprising 23-bp 5' untranslated region (UTR), 1 254-bp open reading frame (ORF) and 101-bp 3' UTR. The ORF encoded 418 amino acid (a. a.) residues including a 21 a. a. N-terminal signal peptide and a conserved polysaccharide deacetylase domain were located in an area of 150–272 a. a. residues. The results from subsequent construction of expressional vector pET28a-*cda2* and prokaryotic expression revealed that molecular weight of recombinant protein CDA2 was about 46 ku and it was mainly found in inclusion bodies. The purified CDA2 showed chitin deacetylating activities. This work is necessary for further structural and functional exploration in chitin deacetylase CDA2 from *M. racemosus*.

**Key words:** chitin deacetylase; *cda2*; cDNA cloning; *Mucor racemosus*; prokaryotic expression