

苏云金芽孢杆菌 *chiA*, *chiB* 全基因的克隆、表达及其序列分析

陈艳玲* * 卢伟* * 陈月华* 肖亮 蔡峻

(南开大学生命科学学院微生物学系 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘 要:以苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 15A3 菌株基因组 DNA 为模版,用 touchdown PCR 方法扩增几丁质酶 *ChiA* 和 *ChiB* 的全基因序列(GenBank 登录号:EF 103273 和 DQ 512474)。将 PCR 产物连接 pUCm-T 克隆载体,获得重组质粒 pUCm-*chiA* 和 pUCm-*chiB*,分别转化 *E. coli* XL-Blue。克隆的几丁质酶基因可以利用本身的启动子异源表达各自的蛋白,不需要几丁质作为诱导物。表达的几丁质酶能够分泌到胞外。证明 15A3 菌株可组成型表达 2 种几丁质酶。经核苷酸及氨基酸序列分析证明,*chiA* 基因全长 1426bp,含有 343 bp 的上游非编码区和 1083 bp 的 ORF 编码 360 个氨基酸。推测成熟蛋白分子量为 36kD,只有一个几丁质酶催化域。*chiB* 基因全长 2279 bp,含有 248 bp 的上游非编码区和 2031 bp 的 ORF 编码 676 个氨基酸。推测成熟蛋白分子量约为 70.6kD,具有三个功能域。核苷酸序列分析显示 *chiA* 和 *chiB* 的启动子所处的位置及转录起始碱基都不相同,-35 区相同,而 -10 区有两个碱基不同,SD 序列也不完全一致。

关键词:苏云金芽孢杆菌; *ChiA*; *ChiB*; 组成型表达; 序列分析

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)05-0843-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 *Bt*)能够产生杀虫晶体蛋白,已成功用于多种农、林、果、蔬害虫的防治。几丁质酶可有效的抑制真菌的生长从而防治真菌病害^[1]。几丁质酶还能降解昆虫中肠围食膜,加速害虫的罹病进程,具有杀虫增效活性^[2]。近几年来,*Bt* 的几丁质酶越来越受到关注。目前已在 *Bt* 的多个亚种及不同菌株中发现了几丁质酶,约有十余个基因序列已登录 GenBank。这些几丁质酶基因的开放阅读框架(ORF)大小多在 2000bp(1908 ~ 2067 bp),编码的几丁质酶分子量大约为 70kDa 左右^[3]。2003 年 Arora 等在 *Bt* HD-1 菌株中克隆到 ORF 为 1083bp 的几丁质酶基因,编码 36kDa 的几丁质酶^[4]。而这一分子量的几丁质酶在此之前只发现存在于腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, 简称 *Bc*)中。*Bt* 同一菌株中是否会有一种以上的几丁质酶?它们的核苷酸序列及蛋白结构上有什么差异?产生几丁质酶的 *Bt* 菌株都是在含诱导物的平板上筛选出来的,但这些菌合成酶是否必需诱导?这些酶的表达方式怎样?本文首次就这些方面的研究作以报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、培养基、载体:苏云金芽孢杆菌科默尔亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*)15A3 菌株^[5]、苏云金芽孢杆菌以色列亚种 H14(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 简称 *Bt* H14)和 *Bt* 97241 为本室分离并鉴定。培养基:NB(每升水含蛋白胨 10g,牛肉膏 5g,氯化钠 5g,pH 7.2)和 LB^[6]。质粒转化及蛋白表达宿主均为大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL-Blue 本实验室收藏。

1.1.2 主要试剂和仪器:细粉几丁质购自浙江金壳生物化学有限公司;PCR 扩增试剂、DNA Marker、DNA 回收纯化试剂盒、克隆用 pUCm-T 载体及试剂盒、质粒分离纯化试剂盒等购自上海 Sangon 公司。主要仪器有:Bio-Rad Smartspect 3000 紫外分光光度计,Bio-Rad Mini-Protean II 电泳仪和 MJ Research PTC-100 PCR 仪。

1.1.3 PCR 引物设计:为研究 *Bt* 15A3 菌株中是否含有不同分子量几丁质酶编码基因,依据腊状芽孢

基金项目:国家自然科学基金(30570052);天津市自然科学基金(05YFJMJC00900)

* 通讯作者。Tel:86-22-23505964;Fax:86-22-23508800;E-mail:yhchen@nankai.edu.cn

** 作者简介:对本文有同等贡献。陈艳玲,女(1983-),江西人,硕士研究生。E-mail:janeeyre@mail.nankai.edu.cn。卢伟,男(1979-),河北人,硕士研究生。E-mail:reedly@mail.nankai.edu.cn。

其他作者:韩苗苗

收稿日期:2007-05-11;接受日期:2007-06-29;修回日期:2007-07-06

杆菌 *chiA* 基因序列(AB041931)和苏云金芽孢杆菌 *chiB* 基因序列(AF424979)分别设计了两对引物,由

上海 Sangon 公司合成。表 1 为引物序列及扩增片段大小。

表 1 引物序列及预测的片段大小

Table 1 Primers and predicted amplification size

Gene	Forward sequence(5'→3')	Reverse sequence(5'→3')	Amplification size/bp
<i>chiA</i>	AAAGGATCCC AATTAATAAT CAACCTCCTT	AATCTCGAGTA AATGTCCGA TTGATGAG	1400
<i>chiB</i>	GGGGAATTC TCCCATACCA ATCTTTTCG	GGGCTCGAGG TTATTGAGAT GTTTTTGATT TTTC	2300

1.2 15A3 菌株几丁质酶活性测定

将 15A3 活化后分别接种于 NB 培养基和 NB + 2% 几丁质培养基,30℃ 振荡培养 72h。8000r/min 40℃ 离心 10min,收集上清。用常规 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法^[7]测定几丁质酶活性。酶活单位定义为 50℃、pH6.0 条件下,反应 1h 产生 1 μ mol N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)所需的酶量。酶活性测定均为 3 次试验的平均值。胶体几丁质的制备参照文献 8。

1.3 15A3 菌株几丁质酶基因 *chiA*、*chiB* 的扩增

按常规方法制备 15A3 菌株的基因组 DNA 作为 PCR 模版。*chiA* 和 *chiB* 基因扩增均采用 touchdown PCR 程序。扩增 *chiA* 条件:94℃ 5min;94℃ 1min,60℃ ~ 54℃ 复性 1min,每个循环降低 2℃,72℃ 2.5min,小循环 4 次,共计 30 个循环,72℃ 10min。

扩增 *chiB* 时,60℃ ~ 54℃ 复性 1min,每一退火温度循环两次,即:小循环 8 次,其它程序与扩增 *chiA* 相同。PCR 结束后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.4 PCR 产物的克隆与测序

将电泳检测正确的 PCR 扩增片段回收纯化后连接 pUCm-T 克隆载体,连接产物转化 *E. coli* XL-Blue 感受态细胞。提取转化子的重组质粒,酶切鉴定后交公司测序。

1.5 *E. coli* 异源表达几丁质酶的活力测定及粗酶的制备

1.5.1 酶活测定 将含有质粒和重组质粒的 *E. coli* 转化子分别接种于 LB 和添加几丁质的 LB 培养基中,并加抗生素,150r/min 振荡培养 72h,其它步骤同 1.2。

1.5.2 粗酶的制备 将含有质粒和重组质粒的 *E. coli* 转化子参照 1.5.1 的方法培养。8000r/min 4℃ 离心 20min,收集上清。边搅拌,边缓缓加入硫酸铵至其浓度达到 85% 的饱和度。继续搅拌 10 ~ 30min,10000r/min 离心 20min,弃上清,将沉淀物悬浮于 1 ~ 2 倍体积的 50mmol/L (pH6.0) 磷酸钾缓冲液中,置 4℃ 冰箱用相同缓冲液透析,随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳以检测克隆基因的表达。

1.6 核苷酸和氨基酸序列分析

核苷酸序列分析使用 BLAST, BDGP 和 SoftBerry-Bprom 在线分析软件。氨基酸序列分析使用 SignalP, ExPaSy, Smart 和 EMBL-EBI Clustalw 在线分析软件。

2 结果和分析

2.1 15A3 几丁质酶的表达方式

15A3 在有、无几丁质两种培养基中几丁质酶的活力见表 2。参比菌株 *Bt* H14 与 *Bt* 97241 在 NB 培养基中几丁质酶的表达量较低,而在加几丁质的培养基中,酶的表达量提高 1 倍多,几丁质的诱导作用很明显。而 15A3 菌株在两种培养基中,几丁质酶的表达量虽稍有差异,但几丁质的诱导作用并不明显,很可能属于组成型表达,在下述克隆基因的表达结果部分则得到肯定的结论。

表 2 各菌株在两种培养基中的几丁质酶活力(U/mL)

Table 2 The Chitinase activity of different strains in two kinds of medium(U/mL)

Strains	NB	NB + chitin
<i>Bt</i> 15A3	1.628	1.959
<i>Bt</i> H14	0.715	1.788
<i>Bt</i> 97241	0.943	2.409

2.2 几丁质酶基因 *chiA*、*chiB* 的克隆

利用 PCR 方法分别扩增出 *chiA* 和 *chiB* 两种几丁质酶基因片段。经电泳检测证明 *chiA* 片段约为 1400bp, *chiB* 片段约为 2300bp(图略)。将两个片段分别与 pUCm-T 克隆载体连接,获得重组质粒 pUCm-*chiA* 和 pUCm-*chiB*, 酶切验证(图略)无误后测序。经与 GenBank 相关序列比对,与 *Bt* 和 *Bc* 的几丁质酶同源性非常高,证明两个克隆片段均为几丁质酶基因,且都含有各自的 ORF 及上游表达调控区域。随后将获得的序列在 GenBank 登录, *chiA* 和 *chiB* 的序列号分别为 EF103273 和 DQ 512474。

2.3 15A3 菌株 *ChiA* 和 *ChiB* 在 *E. coli* 中的表达

表 3 为 *ChiA* 和 *ChiB* 在 *E. coli* XL-Blue 中表达后的酶活力,同时测得仅含 pUCm-T 质粒的 *E. coli*

不具有任何胞外几丁质酶活性。由于直接取培养物上清测定酶活,说明带有自身启动子的几丁质酶基因不但可以在 *E. coli* 中正常表达,而且能够分泌到细胞外。比较两种酶在不同培养基中的活性可以看出, *ChiA* 和 *ChiB* 的表达均不需要几丁质的诱导,该结果与 15A3 菌株几丁质酶的表达是一致的(表 3),进一步证明这两种几丁质酶属组成型表达。

表 3 *E. coli* XL-Blue 不同转化子在两种培养基中的酶活力(U/mL)

Transformants	LB	LB + chitin
<i>E. coli</i> XL-Blue(pUCm-T)	0	0
<i>E. coli</i> XL-Blue(pUCm- <i>chiA</i>)	1.956	1.914
<i>E. coli</i> XL-Blue(pUCm- <i>chiB</i>)	1.950	1.754

E. coli 不同转化子粗酶提取液的 SDS-PAGE 分析,也可分别检测到含有重组质粒菌株各自几丁质酶基因表达的特定分子量蛋白。*ChiA* 约为 36kDa, *ChiB* 约为 64kDa,见图 1 箭头所示。依据信息学推测,成熟的 *ChiB* 蛋白分子量约为 70.6kD。而实际检测分子量比预测的小。这一结果与国外的几篇报道相同,如腊状芽孢杆菌 CH 菌株 70.602kDa 的 *ChiB* 在 *E. coli* 中表达后,比预测分子量小约 6kDa^[9]。N. Mabuchi 推测 *ChiB* 在腊状芽孢杆菌中很可能会有进一步的蛋白加工过程,但要证实这一假设,必须进行 *ChiB* 的 C 端序列比较。

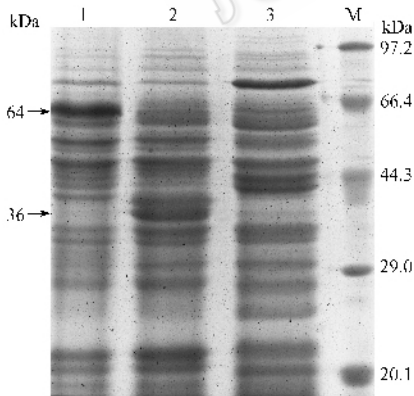


图 1 转化子粗酶提取液的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of crude extracts from three transformants of *E. coli* XL-Blue. M: protein marker; 1: *E. coli* XL-Blue(pUCm-*chiB*); 2: *E. coli* XL-Blue(pUCm-*chiA*); 3: *E. coli* XL-Blue(pUCm-T)

2.4 核苷酸序列分析

2.4.1 *chiA* 基因核苷酸的功能序列分析: 经序列测定及利用相关软件分析发现, 15A3 *chiA* 基因含有一个 1083bp 的 ORF, 编码 360 个氨基酸, 预测成熟蛋白分子量为 36kDa。编码区核苷酸序列与 3 株腊状

芽孢杆菌 *Bc* 28-9(AF510723), *Bc* CH(AB041931) 和 *Bc* 6E1(AF275724) 约 36kD 几丁质酶的同源性分别为 97%、96% 和 93%。

5' 端非编码区有 343bp。潜在的启动子 (CACAATTGTTGAGAAAATTATAGTCCCTTTACAAAAGAAA G AATTTTCAG) 位于起始密码子 ATG 上游 237bp 处, 转录起始位点 +1 为 α (阴影标记)。启动子的 -35 区为 TTGAGA, -10 区为 TTACAA, 均用下划线标出, 两区域间隔 14bp。与 *E. coli* σ^{70} 启动子的 -35 区 (TTGACA) 和 -10 区 (TATAAT) 相比, -35 区的同源性较高, 仅相差 1 个碱基, 而 -10 区同源性相对较低。SD 序列 AGGAG 位于 ATG 上游 7 个核苷酸处, 与 *Bc*.CH *chiA* 的 SD 序列完全相同, 后者位于 ATG 上游 8 个核苷酸处^[9]。

2.4.2 *chiB* 基因核苷酸的功能序列分析: 15A3 *chiB* 基因的 ORF 有 2031bp, 编码 676 个氨基酸, 预测成熟蛋白分子量为 70.6kDa。编码区核苷酸序列与氨基酸序列与 GenBank 上已登录的其它 13 株 *Bt* 70kD 左右的几丁质酶同源性都很高, 均在 96% ~ 99% 之间, 而与 *Bt pakistani* 亚种的几丁质酶同源性较低, 仅为 70% 左右。

chiB 基因的 5' 端非编码区有 248bp, 潜在的启动子 (TTGTATTGAGAAAGTCTTTTTCAACTTAATAAAGCGTTTA C ACTAAATCT) 位于起始密码子 ATG 上游 147bp, 这一序列与 *Bti* 亚种 *Ichi* 基因潜在启动子 (TTGTATTGAGAAAGTATGTTTTAACTTAATAAAGCGTTTACTACTAA)^[10] 同源性非常高。转录起始位点 +1 为 α (阴影标记), -35 区和 -10 区的序列分别为 TTGAGA 和 TTAATA, 与 *E. coli* σ^{70} 启动子的 -35 区和 -10 区也相似。*chiB* 的 SD 序列 GAAAGG 位于 ATG 上游 4 个核苷酸处。该基因的 -35 区、-10 区和 SD 序列与 *Bt kenyae* 亚种 *chiA74*^[11]、*Bt pakistani* 亚种 *chiA71*^[12] 和 *Bt kurstaki* 亚种 *chi255*^[13] 3 个基因的这些功能区完全相同。

2.5 氨基酸序列分析

2.5.1 *ChiA* 蛋白的氨基酸序列分析: *Bt* 15A3 *ChiA* 在 GenBank 中相应的蛋白质序列号为 ABM05818, 与 *Bc* 28-9(AAP47142), *Bc* CH(BAB16890) 以及 *Bc* 6E1(AAK69033) 的同源性分别为 98%、97% 和 95%。而与 *Bt* HD-1^[4] 的氨基酸序列同源性最高, 达到 99%, 说明不但 *Bt* 不同亚种之间的亲缘关系非常近, 而且与 *Bc* 的亲缘关系也非常接近。

经信号肽剪切位点分析, *ChiA* 蛋白的该位点为 Ala²⁷、Ala²⁸ 两个氨基酸之间, N-端 27 个氨基酸为信

号肽,与 *Bt* HD-1 和 *Bc* 的 36kDa 几丁质酶完全相同,且它们的信号肽序列同源性很高(图 2):与 AAP47142 完全相同,与 *Bt* HD-1 和 BAB 16890 仅 1 个氨基酸不同。

ABM05818	MLNKFKFFCCILVMFLLPLSPFQAQA	27
<i>Bt</i> HD-1	MLNRFKFFCCILVMFLLPLSPFQAQA	27
AAP47142	MLNKFKFFCCILVMFLLPLSPFQAQA	27
BAB16890	MLNKFKFFCCILVMFLLPLSPFSQA	27
AAK69033	MLNKFKFFCCILVMFLLPLSPFQAQA	27
	***:**:**:**:**:**:**:**:**:**:**:**:**	

图 2 *Bt* 和 *Bc* ChiA 信号肽序列比较

Fig.2 Amino acid sequence alignment of signal peptide of ChiA from *Bt* and *Bc*. * show the identical amino acids ;: indicate largely conserved amino acids.

ChiA 信号肽剪切后产生一个 36.3kDa 的蛋白,其等电点 pI 为 5.97,成熟蛋白的 N 端氨基酸序列为 Ala-Asp-Asp-Leu-Gly。预测其信号肽的跨膜区为 Phe⁷ ~ Phe²³。催化区有两个保守功能区:105 ~ 109 (SIGGQ)和 137 ~ 145(FDGIDIDLE)两段序列。后者与糖基水解酶 18 家族的典型活性基序^[14]同源。从图 3 可以看出,来自 *Bt* 和 *Bc* 的 36kDa 几丁质酶的两个功能保守区序列完全相同,说明该种几丁质酶催化活性位点是高度保守的。*Bt* 15A3 ChiA 蛋白与其它来源的 36kDa 几丁质酶结构相同,只有一个催化区,而没有 70kDa 几丁质酶所共有的粘蛋白 III 型同源区和几丁质酶结合区,但并不影响 ChiA 的酶活性^[4,6,9,15]。

ABM05818	KIVL	SIGGQ	NGVLLPDNAAKDRFIN	SIQSLIDKYG	FDGIDIDLE	SGIYLN	GN	DTNFKNP	160
<i>Bt</i> HD-1	KIVL	SIGGQ	NGVLLPDNAAKDRFIN	SIQSLIDKYG	FDGIDIDLE	SGIYLN	GN	DTNFKNP	160
AAP47142	KVVL	SIGGQ	NGVLLPDNAAKDRFIN	SIQSLIDKYG	FDGIDIDLE	SGIYLN	GN	DTNFKNP	160
BAB16890	KVVL	SIGGQ	NGVLLPDNASKQRFIN	SIQSLIDKYG	FDGIDIDLE	SGIYLN	GN	DTNFKNP	160
AAK69033	KVVL	SIGGQ	NGVLLPDNAAKQRFIN	SIQSLIDKYG	FDGIDIDLE	SGIYLN	GN	DTNFKNP	160
		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

图 3 *Bt* 和 *Bc* ChiA 催化区氨基酸序列的比较

Fig.3 Amino acid sequence alignment of the catalytic domain of ChiA from *Bt* and *Bc*.

2.5.2 ChiB 蛋白的氨基酸序列分析 经信号肽剪切位点分析,推测 15A3 ChiB 信号肽序列有 34 个氨基酸。该蛋白信号肽的跨膜区位于 Phe⁸ ~ Ile²⁷ 之间。信号肽剪切位点在 Ala³⁴-Asp³⁵ 两个氨基酸之间,与其它 14 种 *Bt* ChiB 的信号肽剪切位点的氨基酸完全相同,只是位置上有些差异,且信号肽序列之间具有较高的同源性。推测成熟蛋白的分子量约为 70.6kDa,N-端序列为 Asp-Ser-Pro-Lys-Gln,等电点 pI 为 5.49。ChiB 具催化区、粘蛋白 III 型同源区和几丁质结合区 3 个结构域。

ChiB 催化区位于 135 ~ 243 之间,活性位点从 203 ~ 211 共 9 个氨基酸,序列见图 4 方框内,与糖基水解酶 18 家族的活性位点序列同源。其中, D²⁰⁷(Asp) D²⁰⁹(Asp)和 E²¹¹(Glu)高度保守,是潜在的质子供体^[3]。ChiB 的催化域与其它 14 株 *Bt* 70kDa 左右的几丁质酶同源性非常高,其中 10 株完全相同。图 4 仅列出几株稍有差异的序列进行比较。在活性位点序列中,ChiB 除了与 *Bt morrisoni* 亚种、*Bt*

toumanoffi 亚种有一个氨基酸不同之外与其它 12 株 *Bt* 的完全相同,证明几丁质酶催化活性位点高度保守。

第 487 ~ 559 位氨基酸序列为粘蛋白 III 型同源区(FLD)。目前已在 *Bacillus*, *Streptomyces* 等细菌的几丁质酶中发现了 FLD。此外, α -淀粉酶、纤维素酶、聚- β -羟基丁酸酯解聚酶等也存在 FLD。虽然 FLD 广泛存在于细菌的多种酶中,但其具体功能仍不清楚,可能与底物的结合有关^[11]。在 15 种 *Bt* ChiB 的 FLD 中,芳香族氨基酸 W(Trp)和 Y(Tyr)高度保守。

推测的 ChiB 蛋白靠近 C-端是几丁质结合区(CBD),位于 587 ~ 629 位氨基酸之间,共 43 个氨基酸。经与其它 14 种 *Bt* ChiB 比较,芳香族氨基酸 Trp 和 Tyr 高度保守。该结构域与纤维素酶、木聚糖酶的 CBD 区域也存在相似性^[3]。另外在某些细菌几丁质酶中,CBD 与几丁质的水解也有关,如环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)WL-12 中的 ChiA^[16]。

ABF57674	135	NFGELKRLKA	----	VAFLRAYG	FDGVDLDWE	----	PEDKQNFILLQDVRNALN	243
ABJ55984	135	NFRQLKRLTA		VSFRLRAYG	FDGLDLDWL		PEYKQNFILLQDVRNALN	243
AAR19091	135	NFGELKRLKA		VSFRLRAYG	FDGADLDWE		PEYKQNFILLQDVRNALN	243
AAR19092	135	NFGELKRLKA	----	VAFLRAYG	FDGVDLDWE	----	PKDKQNFILLQDVRNALN	243
AAM88400	147	NFGELKRLKA	----	VAFLRAYG	FDGVDLDWE	----	PEDKQNFILLQDVRNALN	255

::*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*

图 4 5 种 *Bt* ChiB 几丁质酶催化区氨基酸序列的比较

Fig. 4 Alignment of the catalytic domain of ChiB from 5 strains of *Bt*. Sequence of the catalytic domain shown here are ABF57674 (accession number) from *Bt* 15A3, ABJ55984 from *Bt morrisoni*, AAR19091 from *Bt toumanoffi*, AAR19092 from *Bt alesti* and AAM88400 from *Bt israelensis*.

The active site motif is boxed, the different nucleotide is bolded and shaded. — ellipses, indicate identical amino acids

3 讨论

已报道在一株环状芽孢杆菌和两株 *Bc* 中发现不同的几丁质酶编码基因^[6,9,17-19]。但截止到目前为止,尚无报道在同一株 *Bt* 中具有不同分子量的几丁质酶。本文首次在 *Bt* 15A3 菌株中克隆到 *chiA* 和 *chiB* 两种几丁质酶编码基因。

本研究仅使用了 pUCm-T 克隆载体。该克隆载体上没有任何控制转录的元件, *chiA* 和 *chiB* 在 *E. coli* 中的表达都是受控于自身的启动子。说明克隆的 *chiA* 和 *chiB* 的启动子序列是完整的,而且都可以被大肠杆菌 RNA 聚合酶的 σ 因子识别。*chiA* 和 *chiB* 具有相同的 -35 区 TTGAGA, 而这一序列与 *E. coli* σ^{70} 启动子的 -35 区 TTGACA 仅有一个碱基不同(阴影标出)。可能正是由于 -35 区的高度同源性,使得 *E. coli* RNA 聚合酶能与 *chiA* 和 *chiB* 的启动子区域结合,从而使苏云金杆菌的几丁质酶基因可以在大肠杆菌细胞中正确表达。

与 ChiB 蛋白不同, ChiA 只有催化域而没有 FLDs 和 CBD, 但这不影响它们的活性。*Bt* HD-1^[4] 以及 *Bc* 的 ChiA^[20] 在水解聚合体底物和可溶性几丁质时表现很高的活力。本文在 *E. coli* 中单独表达的 ChiA 同样具有较高的酶活性, 表明对于 36kD 的几丁质酶来讲, FLD 和 CBD 并不是水解几丁质所必需的。

chiA 和 *chiB* 无论在大肠杆菌中还是在 *Bt* 菌株中表达, 均不需要几丁质的诱导。这与 Arora 等^[4] 报道 *Bt* HD-1 组成型表达 36kD 几丁质酶是一致的。除此之外, 有关细菌几丁质酶的表达方式未见任何报道。本研究通过分别克隆 *chiA* 和 *chiB* 两种几丁质酶基因并利用自身启动子在 *E. coli* 中异源表达证明, 15A3 菌株能够组成型表达 ChiA 和 ChiB 两种

几丁质酶。近期的两篇综述文章^[21,22] 认为细菌几丁质酶为诱导型合成或大多为诱导型。从应用角度讲, 组成型比诱导型表达的酶更利于开发。有关 15A3 菌株 ChiA 和 ChiB 各自酶的特性及生物活性方面的研究将另文报道。

参 考 文 献

- [1] 郑爱萍, 李平. 细菌几丁质酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2002, 40(7): 75-79.
- [2] 邱立友, 王明道, 戚元成, 等. 链霉菌 A048 产几丁质酶最佳发酵工艺研究. 微生物学通报, 2006, 33(2): 58-62.
- [3] 卢伟, 蔡俊, 陈月华. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶的研究进展. 微生物学通报, 2007, 34(1): 141-144.
- [4] Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, et al. A constitutively expressed 36kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2003, 307: 620-625.
- [5] 陈月华, 任改新, 吴卫辉, 等. 苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 15A3 株的 *cry* 基因分析及杀虫特性. 微生物学报, 2002, 42(2): 169-174.
- [6] Huang CJ, Chen CT. High-level expression and characterization of two chitinase ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(1): 8-17.
- [7] Rojas-Avelizapa LI, Cruz-Camarillo R, Guerrero MI. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, 15: 299-308.
- [8] 李华, 刘开启, 王革. 利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性. 仲恺农业技术学院学报, 16(1): 19-22, 2003.
- [9] Mabuchi N, Araki Y. Cloning and sequencing of two genes encoding chitinase A and B from *Bacillus cereus* CH. *Can J Microbiol*, 2001, 47: 895-902.
- [10] 钟万芳, 姜丽华, 阎文昭, 等. 苏云金杆菌以色列亚种几丁质酶基因的克隆及序列分析. 遗传学报, 2004, 30(4): 364-369.
- [11] Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco E, Velázquez-Robledo R, et al. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 4023-4029.

- [12] Thamthiankul S , Suan-Ngay S , Panbangred W , *et al.* Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Pakistani*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **56** :395 – 401
- [13] Driss F , Kallassy-Awad M , Zouari N , *et al.* Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. *Journal of Microbiological Methods* , 2005 , **99** : 945 – 953
- [14] Henrissat B , Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* , 1993 , **293** :781 – 788
- [15] Wang S , Moyne A , Singh NK , *et al.* Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microb. Technol* , 2001 , **28** (6) :492 – 498
- [16] Watanabe T , Uchida M , Tamaka H , *et al.* Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 in the chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci Biotechnol Biochem* , 1994 , **58** : 2283 – 2285
- [17] Watanabe T , Suzuki K , Tamaka H , *et al.* Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL – 12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. *J Biol Chem* , 1990 , **265** (26) :15659 – 15665.
- [18] Watanabe T , Oyanagi W , Tamaka H , *et al.* Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinase and class III plant chitinase. *J Bacteriol* , 1992 , **174** (2) :408 – 414.
- [19] Alam M , Nikaidou N , Watanabe T , *et al.* Cloning and sequencing of *chiC* gene of *Bacillus circulans* WL – 12 and relationship of its product to some other chitinase and chitinase-like proteins. *J Ferment Bioeng* , 1995 , **80** :454 – 461.
- [20] Mabuchi N , Hashizume I , Araki Y. Characterization of chitinase excreted by *Bacillus cereus* CH. *Can J Microbiol* , 2000 , **46** :370 – 375.
- [21] 冯俊丽 , 朱旭芬 . 微生物几丁质酶的分子生物学研究 . 浙江大学学报 , 2004 , **30** (1) :102 – 108.
- [22] 陈少波 , 吴根福 . 几丁质酶研究进展 . 科技通报 , 2004 , **20** (3) :258 – 262.

Cloning , expression and sequence analysis of *chiA* , *chiB* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3

CHEN Yan-ling^{**} , LU Wei^{**} , CHEN Yue-hua^{*} , XIAO Liang , CAI Jun

(Department of Microbiology , College of Life Sciences , Nankai University , Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics , Tianjin 300071 , China)

Abstract: Two DNA fragments encoding chitinase A and B were amplified from total genomic DNA of *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3 , and then ligated with pUCm-T cloning vector. The recombinant plasmids pUCm-*chiA* and pUCm-*chiB* were transformed into *Escherichia coli* XL-Blue respectively. Both *chiA* and *chiB* were successfully expressed in *E. coli* with their natural promoters independent of any chitin. Additionally , the expressed ChiA and ChiB could be secreted from *E. coli* cells. It was proved that two chitinases were constitutively expressed in strain 15A3. The nucleotide sequence of *chiA* (GenBank Accession Number : EF103273) with a length of 1426bp included an open reading frame (ORF) of 1083 bp encoding for a protein of 360 amino acids . The deduced amino acid sequence showed that the mature protein ChiA with a predicted molecular mass of 36kDa consisted of a single catalytic domain. The nucleotide sequence of *chiB* (GenBank Accession Number : EF103273) with a length of 2279 bp included an ORF of 2031bp encoding for a protein of 676 amino acid residues . The deduced amino acid sequence showed that the mature protein ChiB with a predicted molecular mass of 70.6kD was composed of three domains : catalytic domain , chitin-binding domain and fibronectin type III-like domain. The comparison of their upstream sequences informed that there were differences between putative promoters of *chiA* and *chiB* .

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; ChiA ; ChiB ; constitutively expressed ; sequence analysis

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30570052) ; Natural Science Foundation of Tianjin (05YFJMJC00900)

* Corresponding author. Tel 86-22-23505964 ; Fax : 86-22-23508800 ; E-mail : yhchen@nankai.edu.cn

** These authors contributed equally to this work .

Other author : HAN Miao-miao

Received : 11 May 2007 / Accepted : 29 June 2007 / Revised : 5 July 2007