

## 地衣芽孢杆菌 MY75 菌株几丁质酶基因的异源表达及特性

肖亮, 刘传, 谢池楚, 蔡峻, 刘东, 陈月华\*

(南开大学微生物学系, 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071)

**摘要:**【目的】地衣芽孢杆菌 MY75 菌株的几丁质酶基因的异源表达, 并对表达蛋白的特性进行研究。【方法】制备 MY75 菌株培养上清粗蛋白, 利用酶谱分析确定具有几丁质酶活的蛋白分子量。将该蛋白进行飞行时间质谱分析, 确定其部分氨基酸序列, 设计 PCR 引物对 MY75 菌株的几丁质酶基因进行克隆及异源表达。对表达蛋白的最适反应温度及 pH, 温度耐受性及金属离子对酶活力的影响等特性进行了研究, 并测定了表达蛋白对真菌孢子萌发的抑制活性和对甜菜夜蛾幼虫的杀虫增效作用。【结果】酶谱分析证明 MY75 菌株培养上清液中仅含有一种 55 kDa 的几丁质酶。将该编码基因 *chiMY* 克隆及序列分析后发现, 基因长度为 1797 bp, 编码 599 个氨基酸。在大肠杆菌中异源表达的几丁质酶 ChiMY 蛋白的分子量为 67 kDa。质谱分析证明, 55 kDa 蛋白与 67 kDa 蛋白序列相同。ChiMY 最适 pH 和最适温度分别为 7.0 和 50 °C, 为中性几丁质酶。Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 和 Mg<sup>2+</sup> 离子对表达蛋白的酶活力具有促进作用, Mn<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 和 Ag<sup>+</sup> 离子则能显著抑制酶活力, Cu<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>3+</sup> 离子完全抑制酶活性。生物测定的结果显示, 异源表达的 MY75 几丁质酶能够抑制小麦赤霉及黑曲霉的孢子萌发, 并且对苏云金芽孢杆菌的杀虫活力具有增效作用。【结论】地衣芽孢杆菌 MY75 菌株中仅有一种 55 kDa 几丁质酶, 其编码基因能够在大肠杆菌中大量表达, 表达蛋白分子量与野生型蛋白之间有显著差异, 由此证明 MY75 菌株中存在着几丁质酶的剪切加工过程。明确了地衣芽孢杆菌几丁质酶 ChiMY 具有抑制真菌活性及杀虫增效作用。上述全部研究结论在国内首次报道。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌; 几丁质酶; 质谱; 特性; 抑真菌; 杀虫增效

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0749-06

几丁质是自然界中含量最为丰富的聚多糖物质之一, 在几丁质酶作用下, 可以被分解为氨基葡萄糖单体或几丁寡糖。几丁质酶在化工、食品和医药领域具有广泛的应用前景。由于几丁质组成绝大多数真菌细胞壁的骨架, 又是昆虫表皮及中肠围食膜的主要成分, 故几丁质酶也可用于植物病虫害的生物防治领域<sup>[1-2]</sup>。国内外一些学者已经开始将注意力集中在各种几丁质酶的研究上。

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 作为产酶丰富的细菌, 其工业应用已有数十年历史, 主要用于生产蛋白酶, 淀粉酶, 甘露聚糖酶等等。地衣芽孢杆

菌来源的几丁质酶, 研究报道很少。A. Toharisman 等纯化了 *B. licheniformis* 产生的一种酸性、热稳定几丁质酶, 研究了该酶降解各类底物的特性<sup>[3]</sup>。韩国学者报道一种 62 kDa 的碱性几丁质酶, 着重研究了其结合域的特点, 并将该酶标记作为探针, 用于鉴定某些物质中几丁质的存在<sup>[4]</sup>。Salah 等人<sup>[5]</sup> 从一株地衣芽孢杆菌中克隆到了长度为 2116 bp 的几丁质酶基因, 该基因编码的蛋白大小为 77 kDa。2005 年, 我国学者报道 3 株地衣芽孢杆菌分泌的抑菌蛋白能够有效抑制多株棉花病源真菌<sup>[6]</sup>。但这些地衣芽孢杆菌的抑菌物质究竟是什么, 至今国内未见

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30971957, 30600015)

\* 通信作者。Tel: +86-22-23505964; E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

**作者简介:** 肖亮 (1980 -), 男, 湖南人, 博士研究生, 主要从事芽孢杆菌分子生物学研究。E-mail: xlankai@gmail.com

**收稿日期:** 2009-12-21; **修回日期:** 2010-02-01

任何相关报道。

前期研究中本组首次发现 *B. licheniformis* MY75 菌株能够产生一种从未报道过的 55 kDa 几丁质酶,并且初步证明该酶是主要的抑真菌蛋白<sup>[7]</sup>。GenBank 中没有这种几丁质酶的任何序列信息。为了确定该酶的新颖性、酶学特性及生防潜力,本研究首先通过质谱分析获得了 55 kDa 几丁质酶的内肽序列标签,由此克隆了其编码基因,并在大肠杆菌中成功表达了重组几丁质酶。在对酶特性的研究过程中发现:相同的基因序列在地衣芽孢杆菌和大肠杆菌中被翻译成不同分子量的蛋白,说明 2 种细菌在蛋白加工方面存在显著的差异。而这一现象目前国内尚未见报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、试虫、培养基:**地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) MY75 菌株分离自死亡的棉蚜幼虫,由本室鉴定并保存<sup>[7]</sup>。小麦赤霉 (*Gibberella saubinetii*) 及黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 由本院刘方教授惠赠。甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 由本室饲养。克隆及异源表达所用 *E. coli* XL-Blue 和 *E. coli* BL21 (DE3) 由本室保藏。LB 培养基用于大肠杆菌的培养;PDA 培养基用于真菌的培养。诱导培养基是在 LB 培养基中加入 2% 几丁质粉,用于 MY75 菌株的培养。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**几丁质粉购自浙江金壳生化公司;乙二醇几丁质 (glycol chitin) 和荧光染料 Calcofluor white M2R 购自 Sigma 公司;聚合酶、内切酶均购自宝生物 (大连) 公司。主要仪器有:BioRed 蛋白核酸测定仪及电泳仪、凝胶成像仪、PCR 仪及质谱仪等。

### 1.2 粗蛋白的制备及酶活力测定

MY75 菌株培养上清液粗蛋白的制备参考文献 [8]。利用 Driss 等方法<sup>[9]</sup>测定粗蛋白的几丁质酶活力。1 单位的酶活定义为 50℃, pH 6.0 条件下,反应 1 h,释放出 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 所需要的酶量。大肠杆菌表达的几丁质酶粗蛋白制备方法:8000 g 离心 10 min,收集细胞,用 5–10 mL 50 mmol/L、pH 6.0 磷酸缓冲液将细胞重悬,超声波破碎后,10000 g 离心 15 min,收集上清。

### 1.3 MY75 菌株几丁质酶基因 (*chiMY*) 的克隆及异源表达

根据飞行时间质谱的分析结果,以 GenBank 中

地衣芽孢杆菌的全基因组序列 (登录号:CP000002.3) 为依据设计了 PCR 引物,上游引物:5'-GAAGGATCCATGAACATCGTGTG GTC-3';下游引物:5'-CTTGTGCGACTACTCAGACTCCTTTGTC C-3'。粗体标记部分为用于亚克隆的限制酶切位点。提取 MY75 的全 DNA 作为 PCR 模板,对 MY75 菌株的 *chiMY* 基因进行扩增。所用扩增程序为:94℃ 50 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1.6 min, 30 个循环。

将 PCR 扩增产物连入克隆载体 pMD18-T 并进行测序。利用预先设计的酶切位点,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 将克隆基因片段从克隆载体上切下,再亚克隆连入原核表达载体 pET28a (Novagen),并将该重组质粒 pET-*chiMY* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,用 IPTG 诱导 ChiMY 蛋白表达。

### 1.4 几丁质酶 ChiMY 的特性分析

**1.4.1 蛋白质 SDS-PAGE 检测及酶谱分析:**SDS-PAGE 方法参照文献 [10]。酶谱分析按照本室常规法操作<sup>[8]</sup>。

**1.4.2 飞行时间质谱分析 (time-of-flight mass spectrometry, TOF MS):**将酶谱分析中有几丁质酶活性的蛋白带从凝胶上切下,进行胶内胰蛋白酶水解后用于质谱测定。测定由北京大学生命科学学院蛋白质测序中心协助完成。用 MASCOT 软件分析结果。

**1.4.3 最适 pH、温度及热稳定性测定:**在不同的温度和 pH 值条件下测定异源表达的 ChiMY 酶活力。用 4 种缓冲液来实现 pH 值的变化:pH 3.0–7.0 用柠檬酸、磷酸缓冲液;pH 7.0–8.0 用磷酸缓冲液;pH 8.0–9.0 用 Tris 盐酸缓冲液;pH 9.0–12.0 用甘氨酸、NaOH 缓冲液。缓冲液的离子浓度均为 0.2 mol/L。将酶样品分别在 30℃–90℃ 的不同温度下温浴 1 h,测定酶的热稳定性。所有测定重复 3 次,取平均值。

**1.4.4 金属离子对几丁质酶活力的影响:**在 4℃ 条件下,将酶液与浓度为 10 mmol/L 的各种金属离子混合,放置 1 h 后测酶活力。使用的金属离子包括: Mn<sup>2+</sup> (MnCl<sub>2</sub>), Cr<sup>3+</sup> (CrCl<sub>3</sub>), Li<sup>+</sup> (LiCl), Na<sup>+</sup> (NaCl), Cu<sup>2+</sup> (CuSO<sub>4</sub>), Mg<sup>2+</sup> (MgCl<sub>2</sub>), Fe<sup>3+</sup> (FeCl<sub>3</sub>), Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub>), and Ag<sup>+</sup> (AgCl), 还有作为对照用的 EDTA 钠盐溶液和 SDS 溶液。所有测定重复 3 次,取平均值。

**1.4.5 检测抑真菌活性及杀虫增效作用:**取 1.2 方法中制备的异源表达 ChiMY 酶液,按文献方法<sup>[8]</sup>做抑真菌和杀虫增效的测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 MY75 菌株培养液上清粗蛋白的 SDS-PAGE 及酶谱分析

从图 1-A 酶谱分析的结果可以看出,对应于图 1-B 的 SDS-PAGE 结果中 55 kDa 蛋白条带的位置,有一片深色区域,该区域是由于凝胶中的可溶性几丁质被酶降解而形成的特异条带。虽然 SDS-PAGE 结果可看到几种蛋白条带,但酶谱分析仅显示一条具酶活性的条带,说明 MY75 菌株中只有一种几丁质酶,分子量约为 55 kDa。由于目前还没有此种几丁质酶的研究报道,因此进行了蛋白序列分析。

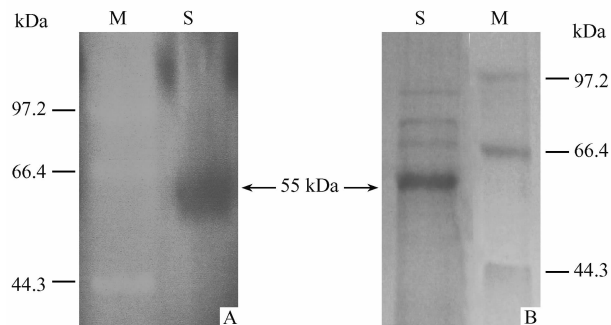


图 1 MY75 菌株培养液上清粗蛋白酶谱及 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Zymogram analysis and SDS-PAGE of the crude proteins from the culture supernatant of strain MY75. (A) zymogram analysis. Proteins were stained with Fluorescent Brightener 28 and observed under UV light. The dark area represents the clearing zone produced by the hydrolysis of glycol chitin. (B) SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

### 2.2 蛋白序列质谱分析

55 kDa 蛋白经酶降解后的质谱分析显示,样品蛋白中从 N-端信号肽后第 56 个氨基酸开始至 C-端第 372 个氨基酸为止,共获得 10 条内肽序列,最短的肽链含 11 个氨基酸,最长的含 29 个氨基酸。经分析比对发现,55 kDa 蛋白的内肽序列与数据库中地衣芽孢杆菌全基因组序列(登录号:CP000002.3)中 67 kDa 几丁质酶高度同源。

### 2.3 MY75 菌株几丁质酶基因的克隆及异源表达

用设计的引物以 MY75 菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到长度为 1902 bp 的产物,将此片段克隆。经测序证明,其开放阅读框长度为 1797 bp,该基因命名为 *chiMY* (登录号:EU822303)。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制酶将 *chiMY* 完整的从克隆载体切下,亚克隆连入 pET28a 表达载体,构建了重组质粒 pET-*chiMY*。将该质粒转化进

表达宿主 BL21 (DE3) 菌株,获得转化子 *E. coli* BL21 (pET-*chiMY*)。经过 IPTG 诱导后,在转化子细胞的破碎上清液中获得大量特异表达的 67 kDa 的重组蛋白(图 2)。

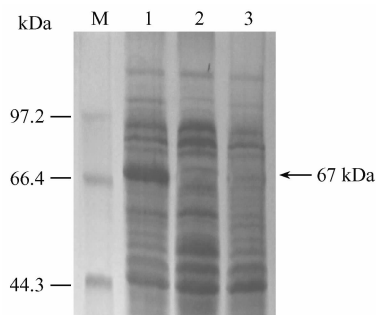


图 2 大肠杆菌异源表达的 ChiMY 蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of ChiMY75 heterologously expressed in *E. coli* BL21 (pET-chiMY75) transformants. 1. induced with IPTG; 2. un-induced; 3. *E. coli* BL21 (pET28a).

### 2.4 异源表达蛋白与 MY75 菌株中的蛋白序列相同

克隆的 *chiMY75* 基因编码 599 个氨基酸,与 GenBank 中已报道的地衣芽孢杆菌几丁质酶氨基酸序列同源性在 97% 以上。估计的蛋白分子量与异源表达分子量相符,约为 67 kDa,包括 N-端长度为 34 个氨基酸的信号肽序列。但该分子量与来自 MY75 菌株的几丁质酶分子量并不一致。我们将异源表达的 ChiMY 的氨基酸序列与质谱分析中测出的 MY75 菌株的几丁质酶内肽序列标签进行了对比,发现检测到的约 55 kDa 几丁质酶的所有序列标签全部包含在异源表达蛋白的氨基酸序列中,且同源性为 100% (图 3)。由此,我们认为二者是同一蛋白。按平均分子量估算,推测 MY75 菌株对该蛋白进行了后加工,从 C-端剪切掉大约 100 个左右的氨基酸。因为从图 3 序列比对可以看出,质谱分析中没有该蛋白 C-端从第 373 - 599 个氨基酸的任何内肽序列。图 3 方框中从第 192 至第 200 个氨基酸序列为 18 家族糖基水解酶的活性位点序列。

### 2.5 异源表达的 ChiMY 主要酶学特性

在大肠杆菌中表达的几丁质酶 ChiMY,其最适作用 pH 为 7.0,将其在 pH 7.0 时的酶活力定为 100%,其它 pH 下的酶活均以相对酶活性表示。在 pH 4.0 时,该酶的酶活力仅存 10% 以下,但当 pH 值达到 5.0 时,该酶活性大幅上升,约为 70% 左右。当 pH 值高于 7.0 之后酶活力迅速下降,在 pH 10.0 时酶活仅存 15%。证明 ChiMY75 为一种中性几丁质酶。

ChiMY 的最佳作用温度为 50℃。在 30℃ 时,其

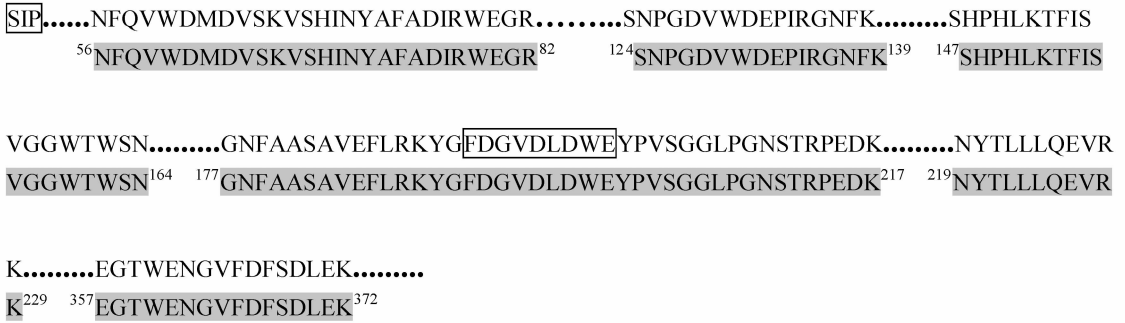


图 3 异源表达的 67 kDa ChiMY 氨基酸序列与 55 kDa 蛋白内肽序列对比

Fig. 3 Comparison of amino acid sequence between 67 kDa ChiMY and 55 kDa chitinase from *B. licheniformis* MY75. The short peptide sequences in the shade, determined by TOF-MS analysis, is of the 55 kDa wild-type chitinase secreted by *B. licheniformis* MY75. The numbers demonstrate the positions of the short peptides sequences. The boxed "SIP" represents the 34aa signal peptides in the N-terminal. The sequence in the box is the active site motif of the catalytic domain of the ChiMY.

酶活力仅为最高酶活力的 30%，随着温度上升，其酶活力也逐渐增高，但在温度超过 55℃ 之后，酶活力开始逐渐下降。该酶在 55℃ 时仍有很好的稳定性，即使在 70℃ 温浴 1 h，仍能保持 30% 的酶活性。

我们对 MY75 菌株培养上清液粗蛋白中的野生型 55 kDa 几丁质酶的酶学特性也进行了测定。发现其最适作用 pH，最适作用温度及温度稳定性方面的性质均与异源表达的 ChiMY 相似（数据略）。

将各种金属离子与 ChiMY 混合，以考察它们对该酶活性的影响。结果显示 Li<sup>+</sup>，Na<sup>+</sup>，Mg<sup>2+</sup> 对酶活力有轻微的促进作用；Mn<sup>2+</sup>，Cr<sup>3+</sup>，Zn<sup>2+</sup>，Ag<sup>+</sup> 4 种离子则能够显著地降低 ChiMY 的活性；而 Cu<sup>2+</sup>，Fe<sup>3+</sup> 两种离子使该蛋白几乎完全失去活性。此外，我们还观察到，SDS 及 EDTA 对 ChiMY 活性也有明显地促进作用，说明该酶的活性不依赖于金属离子配基。

## 2.6 异源表达的 ChiMY 的抑真菌活性

来自大肠杆菌 BL21 (pET-chiMY) 及 BL21 (pET28a) 上清液的蛋白浓度分别为 0.472 mg/mL 和 0.457 mg/mL。它们的几丁质酶活力分别为 6.32 U/mL 和 0.47 U/mL。将后一种蛋白及缓冲液作为实验对照。3 个样品分别与真菌孢子混合，28℃ 培养 4 d。从图 4 可见，作为对照的 2 个处理样品（标记 1 和 2）真菌孢子正常萌发，在牛津杯周围可观察到茂盛生长的菌丝；而含有 ChiMY 的 3 号样品真菌孢子的萌发被完全抑制，没有观察到任何生长现象。由此证明异源表达的 67 kDa 几丁质酶与来自 MY75 菌株的 55 kDa 几丁质酶特性相同，均为抑菌蛋白。

## 2.7 ChiMY 对苏云金芽孢杆菌杀虫的增效作用

几丁质酶 ChiMY 与 Bt 15A3 晶体蛋白冻干粉

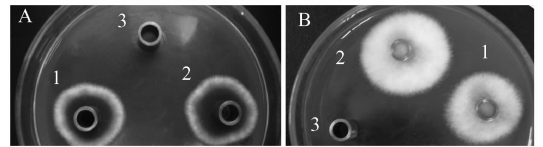


图 4 异源表达的 ChiMY 对 2 种真菌孢子萌发的抑制作用

Fig. 4 The inhibition of spore germination of different fungi. A: *A. niger*, B: *G. saubinetii*. Each cup was filled with 50  $\mu$ l of spore-containing fluid ( $10^6$  spores/mL) and 150  $\mu$ l of different samples; 1: 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) as control; 2: culture supernatant of the sonic-disrupted *E. coli* (pET28a) cells. 3: culture supernatant of the sonic-disrupted *E. coli* (pET-chiMY) cells

对甜菜夜蛾幼虫的生测结果证明，ChiMY 对细菌杀虫剂有明显地增效作用。添加 ChiMY 的样品，其杀虫的半致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 下降达 27%。全部结果及统计分析详见表 1。

表 1 ChiMY75 与 Bt15A3 协同对甜菜夜蛾的生物活性测定

Table 1 Insecticidal activity of ChiMY75 and crystal protein of Bt 15A3 for <i>S. exigua</i>			
Insect	Samples	LC <sub>50</sub> / (mg/L)	95% fiducial limits / (mg/L)
<i>S. exigua</i>	Bt 15A3 crystal protein	21.33	18.67 - 24.53
	Bt15A3 crystal protein + ChiMY	15.55	13.79 - 17.68

## 3 讨论

Tantimavanich 等<sup>[11]</sup>发现地衣芽孢杆菌 TP-1 菌株和大肠杆菌都能够利用同一段基因合成 3 种不同分子量的几丁质酶：68 kDa, 62 kDa 和 50 kDa。因此他们认为，在这 2 类不同的微生物中都存在着几

丁质酶的剪切过程。本研究发现,ChiMY 蛋白在大肠杆菌异源表达过程中并无剪切过程,而经地衣芽孢杆菌 MY75 剪切过的蛋白分子量也与报道的不同,由此说明不同地衣芽孢杆菌对几丁质酶的剪切过程不完全一样。

Chuang 等人证明,将地衣芽孢杆菌几丁质酶的 C-端缺失了 145 个氨基酸之后,其蛋白结构与功能未发生改变<sup>[12]</sup>。依据上述结果及其本研究的质谱分析,我们认为,MY75 菌株产生的 55 kDa 几丁质酶很可能是由 67 kDa 大小的前体蛋白经过 C-端剪切而形成,且这一剪切过程并未影响蛋白的功能。

与目前报道的酸性、碱性几丁质酶不同,ChiMY 酶活力在 pH 6.0 - 7.0 范围内最高,属于中性几丁质酶。本研究还发现,来源不同的几丁质酶受金属离子的影响会截然不同, Mg<sup>2+</sup> 对 ChiMY 有激活作用,却明显地抑制地衣芽孢杆菌的碱性几丁质酶 Chi18B<sup>[4]</sup>。从而进一步证明芽孢杆菌几丁质酶的多样性。

一些微生物来源的几丁质酶的抗真菌活性已有报道<sup>[13-15]</sup>,但关于地衣芽孢杆菌几丁质酶的应用基础研究非常少见。本研究证明异源表达的地衣芽孢杆菌几丁质酶 ChiMY75,对病原真菌的孢子萌发具有显著的抑制效果,同时在对甜菜夜蛾的生物测定中,也表现出明显增效作用,说明地衣芽孢杆菌在农业生物防治方面有潜在的应用价值。

## 参考文献

- [ 1 ] Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71 (6): 773 - 782.
- [ 2 ] Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(7):473 - 483.
- [ 3 ] Toharisman A, Suhartono MT, Spindler-Barth M, Hwang JK, Pyun YR. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 5 (21): 735 - 738.
- [ 4 ] Shah MD, Asraful I, Kye MC, Sun JH, Renukaradhya KM, Jong MK, Myoung GY, Ji JC, Jae YH, Young HL, Hoon K, Han DY. Chitinase of *Bacillus licheniformis* from oyster shell as a probe to detect chitin in marine shells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, DOI 10.1007/s00253-009-2215-1.
- [ 5 ] Mostafa SA, Mahmoud MS, Mohamed ZK, Enan MR. Cloning and molecular characterization of chitinase from *Bacillus licheniformis* MS-3. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2009, 55 (3): 241 - 246.
- [ 6 ] 齐东梅, 梁启美, 惠明, 牛天贵. 棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2005, 32(4):42 - 46.
- [ 7 ] Xiao L, Xie CC, Cai J, Lin ZJ, Chen YH. Identification and characterization of a chitinase-produced bacillus showing significant antifungal activity. *Current Microbiology*, 2009, 58 (5): 528 - 533.
- [ 8 ] 刘东, 陈月华, 蔡峻, 肖亮, 刘传. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶 B 特性及其杀虫抑真菌的作用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (2):180 - 185.
- [ 9 ] Driss F, Kallassy-Awad M, Zouari N, Jaoua S. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 99(4): 945 - 953.
- [ 10 ] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259):680 - 685.
- [ 11 ] Tantimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A, Panbangred W. Multiple chitinase enzymes from a single gene of *Bacillus licheniformis* TP-1. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 1998, 85(3):259 - 265.
- [ 12 ] Chuang HH, Lin HY, Lin FP. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis* - implication of necessity for enzyme properties. *FEBS Journal*, 2008, 275(9): 2240 - 2254.
- [ 13 ] Chang WT, Chen CS, Wang SL. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. *Current Microbiology*, 2003, 47(2): 102 - 108.
- [ 14 ] Chen YT, Hsu LH, Huang IP, Tsai TC, Lee GC, Shaw JF. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(3):714 - 722.
- [ 15 ] Itoh Y, Watanabe J, Fukada H, Mizuno R, Kezuka Y, Nonaka T, Watanabe T. Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1176 - 1184.

# Heterogeneous expression of chitinase gene from *Bacillus licheniformis* MY75 and the characterization of expressed ChiMY

Liang Xiao, Chuan Liu, Chichu Xie, Jun Cai, Dong Liu, Yuehua Chen\*

(Department of Microbiology, Nankai University, Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To heterogeneously express the chitinase gene of *Bacillus licheniformis* strain MY75 in *E. coli*, and to characterize the recombinant chitinase ChiMY. [ **Methods** ] The extracellular crude protein from *B. licheniformis* MY75 was analyzed by zymogram analysis. The partial amino acid sequence of the protein owned chitinase activity was given by time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS). Then the corresponding chitinase gene *chiMY* was cloned and heterogeneously expressed in *E. coli*. The optimum temperature and pH of the ChiMY, and the effect of various metal ions on chitinase activity were studied. The antifungal activity and the synergistic effect on insecticidal activity were demonstrated by bioassays. [ **Results** ] A 55 kDa extracellular protein produced by *B. licheniformis* MY75 exhibited chitinase activity in zymogram analysis. The *chiMY* gene was 1797 bp long and encoded a 599 amino acid protein. The molecular weight of the recombinant protein ChiMY over-expressed in *E. coli* was 67 kDa. The amino acid sequence of the 55 kDa extracellular protein was proved identical to the 67 kDa ChiMY by the TOF-MS. The optimum temperature and pH were 50 °C and 7.0, respectively. The enzyme activity was improved by  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$  and inhibited by  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Ag}^+$ .  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  can inactivate the enzyme. The bioassays demonstrated the heterogeneously expressed ChiMY could inhibit the sporangia germination of *G. saubinetii* and *A. niger*. and reduce the  $\text{LC}_{50}$  (50% lethal concentration) of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* against *S. exigua* by approximately 27%. [ **Conclusions** ] The *B. licheniformis* MY75 could produce a 55 kDa chitinase. The corresponding chitinase gene was over-expressed in *E. coli*. The molecular weight of heterogeneously expressed ChiMY showed significant different to the wild-type chitinase protein. This implicated the the protein processing of chitinase in the *B. licheniformis* MY75. The ChiMY also owned the antifungal activity and could improve the insecticidal activity of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein against *S. exigua*. This is the first report about the chitinase from *B. licheniformis* in China.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*; chitinase; characteristics; mass spectrometry; antifungal activity; synergistic effect

(本文责编:王晋芳)