

兼具凝集素活性的芥菜几丁质酶 BjCHI1

欧阳石文¹ 赵开军^{1,2*} 冯兰香¹ CHYE Mee-Len³ RAM Sathishkumar³

¹(中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京 100081)

²(中国农业科学院作物育种栽培研究所、农业部作物遗传育种重点实验室,北京 100081)

³(香港大学植物系,中国香港)

摘 要 利用毕赤酵母表达系统表达芥菜几丁质酶基因 *BjCHI1* 及其两个衍生基因 *BjCHI2* 和 *BjCHI3*, 获得相应的蛋白质。经 FPLC 纯化后, 测定了 3 种蛋白质的几丁质酶活性, 发现它们均能降解 CM-chitin-RBV 和胶状几丁质。以 CM-chitin-RBV 为底物时的 K_m 值分别为 0.799mg/mL、0.544mg/mL 和 0.793mg/mL, 差别甚微。而以胶状几丁质为底物时的 K_m 值分别为 0.281mg/mL、0.388mg/mL 和 1.643mg/mL, 表现一定的差别, 说明几丁质结合域影响了酶对不溶性底物的亲和力。3 种蛋白中, 只有 *BjCHI1* 在 33 μ g/mL 以上浓度具有凝集素活性, 而 *BjCHI2* 和 *BjCHI3* 的浓度即使高达 800 μ g/mL 也无凝集素活性, 表明 2 个几丁质结合域是 *BjCHI1* 具有凝集素活性的必需条件, 这是植物中发现的第一个兼有几丁质酶和凝集素活性的蛋白质。

关键词 *BjCHI1*, 几丁质酶, 凝集素, K_m

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0572-06

植物几丁质酶是一种能够降解几丁质的 PR 蛋白, 提纯的植物几丁质酶对真菌具有抑制作用, 转几丁质酶基因的作物增强了对某些真菌病的抗性^[1~3]。随着越来越多的植物几丁质酶基因被克隆, 近年国际上将植物几丁质酶分成 9 类, 其中属 *Chia2* 和 *Chid2* 的几丁质酶没有几丁质结合域; *Chia6* 几丁质酶只有半个几丁质结合域; *Chia1*, *Chia4*, *Chib1*, *Chic1* 和 *Chid1* 几丁质酶具有 1 个几丁质结合域; *Chia5* 所编码的几丁质酶前体含有 2 个几丁质结合域, 但在蛋白成熟过程中, 几丁质酶催化区与 2 个几丁质结合域被切离^[4]。

Zhao 等从芥菜中克隆了 1 个新型几丁质酶基因的全长 cDNA, 命名为 *BjCHI1* (GenBank Accession No.: AF098302)。*BjCHI1* 包含 2 个几丁质结合域编码区, 所编码的成熟酶是目前所知的唯一具有 2 个几丁质结合域 (CBD) 的植物几丁质酶^[5]。利用大肠杆菌表达系统难以获得 *BjCHI1* 所编码的蛋白质^[5], 故我们改用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统, 获得了成功^[6]。为研究 2 个几丁质结合域的作用, 我们对 *BjCHI1* 进行了改造, 得到两个衍生基因 *BjCHI2*

和 *BjCHI3*。*BjCHI2* 只含其中 1 个几丁质结合域编码区, 而 *BjCHI3* 不含几丁质结合域编码区, 它们的其它区域与 *BjCHI1* 相应区域完全相同。并利用毕赤酵母表达系统获得了 *BjCHI2* 和 *BjCHI3* 相应的蛋白质, 对这 3 种蛋白质的酶活性 (K_m 值) 和凝集素活性进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒和菌株: 毕赤酵母表达质粒 pPIC9K、毕赤酵母菌 KM71、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10F⁺ 均购自 Invitrogen 公司; 含全长 *BjCHI1* cDNA 的质粒 pBj17 和含缺失其中一个几丁质结合域编码区的几丁质酶基因 (*BjCHI2*) 的质粒 pBj28 由香港大学 Chye ML 提供, 其中 *BjCHI2* 是用 *Hind* III 将 *BjCHI1* 第 153 至 305 位碱基切除后重新连接而得。

培养基: LB、YEPD 培养基; RDB 平板 (18.6% 山梨醇, 2% D-葡萄糖, 1.34% YNB, 0.00004% 生物素, 0.005% 氨基酸混合物); BMGY 培养液 (0.1mol/L 磷酸钾缓冲液, pH6.0, 1% 酵母抽提物, 2% 蛋白胍,

1.34% YNB, 1% 甘油, 0.00004% 生物素); BMMY 培养液(BMGY 中的甘油换成 0.5% 的甲醇)。

几丁质底物: CM-chitin-RBV (carboxymethyl/chitin/Remazol Brilliant Violet 5R) 购自 Loewe Biochemica GmbH 公司; 几丁质为 Sigma 产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒微制备、限制性酶切反应、琼脂糖电泳、琼脂糖中 DNA 片段的回收、连接、大肠杆菌的转化、PCR 扩增等均参照 Sambrook J 等^[7]或相应试剂盒操作手册进行。

1.2.2 重组质粒转化酵母 参照 Invitrogen *Pichia* 操作手册, 用 *SacI* 将重组质粒线性化后, 电激法转化酵母 KM71。转化后用 RDB 平板筛选转化子。对于阳性菌落(His⁺)再用含 G418 的 YEPD 筛选高抗菌株。

1.2.3 酵母染色体 DNA 的提取及 PCR 鉴定 按 Invitrogen *Pichia* 操作手册进行酵母染色体 DNA 的提取。用 PCR 法鉴定目的片段是否整合到酵母染色体。

1.2.4 外源基因在酵母中诱导表达 :将含有 *BjCHI1*、*BjCHI2* 和 *BjCHI3* 的重组酵母菌接入 BMGY 培养液中, 250r/min, 30℃ 培养至 OD_{600} 达 2 ~ 6, 室温 3000 g 离心收集菌体, 重悬于 BMMY 培养基, 继续振荡培养, 每天补加 100% 甲醇至终浓度 0.5%, 并取出 1mL 培养液用于 SDS-PAGE 电泳检查蛋白表达情况。

1.2.5 表达产物的检测及 FPLC 蛋白快速液相层析 纯化 SDS-PAGE 采用 5% 的浓缩胶和 12% 分离胶, 在 Bio-Rad 公司的 Mini-protein II 装置上 200V 恒压电泳 1h, 经考马斯亮蓝 R-250 染色和脱色后进行观察, Western 杂交则参照 Sambrook J 等^[7]所述方法进行, 特异性抗体由 Zhao *et al* 制备^[5]; FPLC 程序参考 Iseli 等(1993)^[8]所述方法。

1.2.6 CM-chitin-RBV 为底物的几丁质酶活性测定 按照 Wirth *et al* (1990)^[9]方法进行。取 CM-chitin-RBV 水溶液(0.1 mL, 2mg/mL), 0.2 mol/L 醋酸缓冲液(0.2 mL, pH5), 和酶样品溶液(0.2mL)混合于 eppendorf 管中, 于室温(25℃)下反应 12 h。加入 0.1mL 的 1.0mol/L HCl 以终止反应, 立即离心(14900 g, 5min)取上清测定 OD_{550} 。用无酶液的混合物作空白对照。每处理重复 3 次。根据 CM-chitin-RBV 水溶液浓度与 OD_{550} 之间的关系确定降解底物量。

1.2.7 胶状几丁质的制备 按照陈崇顺等(1993)^[10]

所述方法进行。

1.2.8 以胶状几丁质为底物的几丁质酶活性测定 :按照《现代植物生理学实验指南》(1999)^[11]所述方法进行。取胶状几丁质 1.5mL(0.4mg/mL), 加入 0.4mL 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH4.5), 0.4mL 酶液, 0.1mL 75 μ mol/L 叠氮钠溶液, 混匀。于 37℃ 保温 2 h 后, 加入 0.5 mL 0.8mol/L 硼酸钠缓冲液(pH9.1), 10 000r/min 离心 10min。取上清液 1.5mL, 加入 2mL 高铁氰化钾溶液, 于 100℃ 水浴 15min, 于 420nm 测定光密度值, 以蒸馏水调零。以不加酶液的处理为标准对照。以光密度差值(标准对照光密度值 - 样品液光密度值), 从标准曲线上求出产生的 N-乙酰氨基葡萄糖的量。以每小时产生 1 μ g 的 N-乙酰氨基葡萄糖的量为一个酶活性单位。

1.2.9 凝集素活性的测定 :参照 Does 等(1999)^[12]所述方法利用兔红细胞进行。

2 结果

2.1 酵母表达载体 pP17、pP28 和 pCat 的构建

2.1.1 引物设计和 PCR 扩增 :根据 *BjCHI1* 和 *BjCHI2* 基因的编码序列设计下列 3 条引物, 即:

上游引物 C1 : 5' CTGAATTCCTCTCCGGTGAGCAA TGCG3'

上游引物 C21 : 5' CTGAATTCGGGGATCTTTCTGG CATC 3'

下游引物 C2 : 5' GCGACTGCGGCCGCGTTACTC CTTCATTAACG 3'

对应于 pPIC9K 的多克隆位点, 在上游引物加有 *EcoR I* 位点, 下游引物加有 *Not I* 酶切位点(黑体), 斜体示酶切位点的保护碱基。引物由上海生工生物公司合成。

以 pBj17 和 pBj28 质粒为模板, 用 C1 和 C2 为引物对, 采用高保真 Pfx DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 获取从成熟蛋白的第 1 密码子至最后一个密码子间的 DNA 片段, 分别为 1110bp 和 963bp, 称为 *BjCHI1* 和 *BjCHI2* 片段。以 pBj17 为模板, 用 C21 和 C2 为引物对扩增获取几丁质酶催化区的编码片段, 为 738bp, 称为 *BjCHI3* 片段。

2.1.2 表达载体的构建 :上述 PCR 产物用酚/氯仿处理纯化。纯化产物用 *EcoR I* 和 *NotI* 进行双酶切, 琼脂糖电泳, 回收纯化, 再与经 *EcoR I* 和 *Not I* 双酶切的 pPIC9K 进行连接反应, 转化大肠杆菌 TOP10F'。挑选阳性菌落进行质粒微制备, 做双酶切鉴定分析。通过酶切鉴定表明它们均含有预期条

带,即 pP17 的 1110bp、pP28 的为 963bp、pCat 的为 738bp 条带。将 3 种重组质粒中的插入片段进行测序验证,证实了所扩增片段在 PCR 过程没有发生序列错误,因而包含全长 *BjCHI1*、含一个和没有几丁质结合域编码区的几丁质酶基因(即 *BjCHI2* 和 *BjCHI3*)的酵母表达载体 pP17、pP28 和 pCat 构建成功。

2.2 酵母的转化和 PCR 鉴定

将经测序验证的重组质粒 pP17、pP28 和 pCat,用 *Sac* I 酶切,琼脂糖电泳查看酶切完全与否。酚/氯仿纯化酶切产物后,用电激法转化酵母 KM71 的感受态细胞,涂布于 RDB 平板上,28℃ 倒置培养至长出单菌落。用 1mL 灭菌水悬浮起 RDB 平板上的 His⁺ 菌落,并涂布于含 G418 的 YEPD 平板上,28℃ 倒置培养 2~5d,分别获得了 6 个抗 1.0mg/mL G418 的重组菌 KM71-pP17、2 个重组菌 KM71-pP28 和 2 个重组菌 KM71-pCat。为确定目的片段是否整合到酵母染色体上,利用前述引物分别对 3 种重组酵母菌染色体 DNA 进行了 PCR 鉴定(每种选取一个菌落),分别获得了预期条带(图 1),因而可以用于蛋白诱导表达。

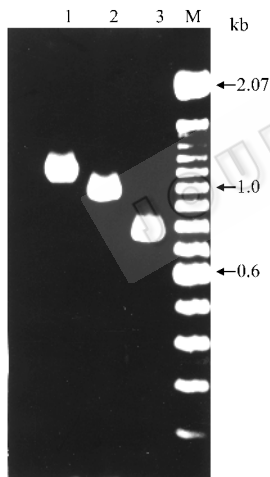


图 1 重组酵母菌的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR analysis of yeast recombinants

1 2 3. *BjCHI1*, *BjCHI2*, *BjCHI3*, respectively;

M. 1.0kb DNA marker

2.3 蛋白的诱导表达和 FPLC 纯化

按 Invitrogen *Pichia* 操作手册进行蛋白诱导表达,SDS-PAGE 分析表明重组菌分泌表达的 *BjCHI1*、*BjCHI2* 和 *BjCHI3* 的表观分子量分别约为 60kD、47kD 和 31kD,大于按照 DNA 序列预测值(分别为 41kD、36kD 和 28.5kD),其原因主要是 SDS-PAGE 的误差所致,其他人的研究也出现类似情况。Western

分析显示所分泌的蛋白质均能与专化性抗体发生反应(图 3),表明重组菌表达了预期的蛋白质。3 种重组菌的蛋白表达量均在诱导后第 2~3 天达到最大值,故大量表达时在诱导后第 2 天收集表达的蛋白质。由于杂蛋白少,故用 60% 饱和度的硫酸铵沉淀蛋白后,直接按照 Iseli 等^[8]所述方法进行 FPLC 纯化,获得了比较纯的蛋白质(图 4),可以用于活性分析。

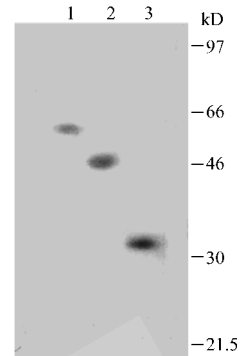


图 2 3 种蛋白的 Western 分析

Fig.2 Western blotting of *BjCHI1* (1), *BjCHI2* (2) and *BjCHI3* (3)

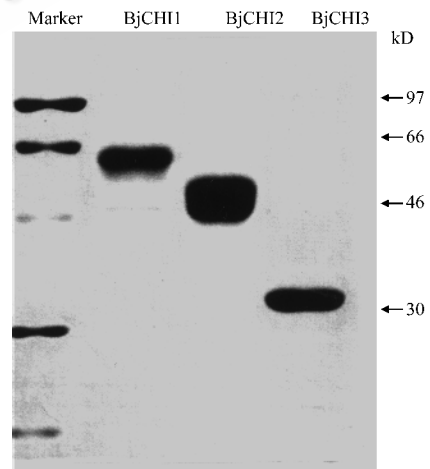


图 3 经 FPLC 纯化后的 SDS-PAGE 蛋白条带

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the proteins purified by FPLC

2.4 几丁质酶水解 CM-chitin-RBV 的 K_m 值测定

按照实验程序均能测出 3 种几丁质酶降解 CM-chitin-RBV 的活性。由于 K_m 值与 pH 值和温度有关系,故为了避免误差,3 种蛋白对不同浓度底物的酶活性分析均在相同条件下进行,根据底物浓度 $[S]$ ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 和反应速度 v ($\mu\text{g}/\text{h}$),计算出反应速度倒数 ($1/v$) 和底物浓度倒数 ($1/[S]$),利用 Linweaver-Burk 双倒数作图法求其 K_m 值。得到回归方程和 K_m 值如下:*BjCHI1* 双倒数作图的回归方程为:

$y = 0.0262x + 0.0328$, $K_m = 0.799\text{mg/mL}$ (图 4A);

BjCHI2 的回归方程为:

$y = 0.0231x + 0.0425$, $K_m = 0.544\text{mg/mL}$ (图 4B);

BjCHI3 的回归方程为:

$y = 0.0272x + 0.0343$, $K_m = 0.793\text{mg/mL}$ (图 4C)。

由此可见, 3 种几丁质酶的 K_m 值差别不大, 说明几丁质结合域的数目对酶降解可溶性底物 CM-chitin-RBV 的影响很小。

2.5 几丁质酶水解胶状几丁质的 K_m 值测定

3 种几丁质酶亦能降解胶状几丁质底物。在相同条件下测定 3 种酶对不同浓度的胶状几丁质的水

解活性, 利用双倒数作图法求它们的 K_m 值。得到 BjCHI1 的回归方程为: $y = 0.0517x + 0.1839$, 其 $K_m = 0.281\text{mg/mL}$ (即 0.692mmol/L), 相关系数为 0.9850 (图 5A);

BjCHI2 的回归方程为 $y = 0.0833x + 0.2145$, 其 $K_m = 0.388\text{mg/mL}$ (即 0.956mmol/L), 相关系数为 0.9862 (图 5B);

BjCHI3 的回归方程为: $y = 0.1212x + 0.07374$, 其 $K_m = 1.643\text{mg/mL}$ (即 4.0470mmol/L), 相关系数为 0.9881 (图 5C)。可见 BjCHI 3 的 K_m 值最大, 表明它与不溶性底物的亲和能力要低于 BjCHI 1 和 BjCHI 2。后两者的 K_m 值差别不大, 表明相对于 1 个几丁质结合域而言, 2 个几丁质结合域对于酶与底物的亲合能力的增强作用不是很明显。

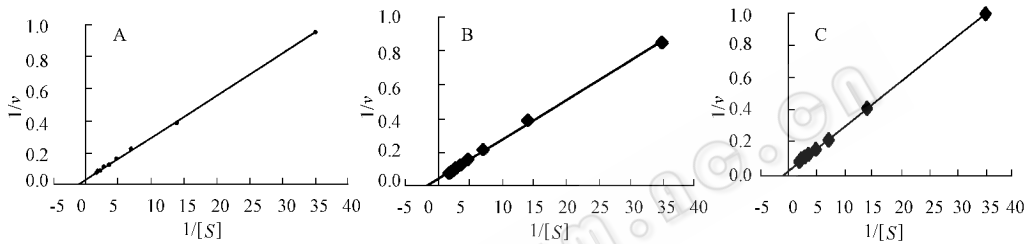


图 4 几丁质酶降解 CM-chitin-RBV 的 K_m 值测定

Fig. 4 Determination of Michaelis constant (K_m) of the chitinases for CM-chitin-RBV

A. BjCHI1; B. BjCHI2; C. BjCHI3

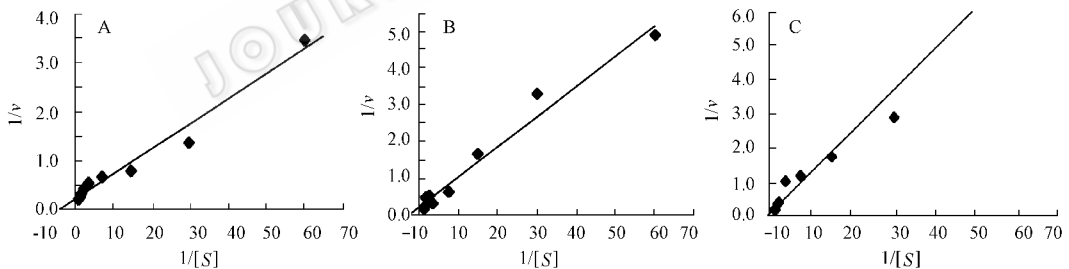


图 5 几丁质酶降解胶状几丁质的 K_m 值测定

Fig. 5 Determination of Michaelis constant (K_m) of the chitinases for colloidal chitin

A. BjCHI1; B. BjCHI2; C. BjCHI3

2.6 凝集素活性的测定

在凝血小板孔上, 每孔加入含有不同量 (0.125、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、24.0 μg) 的纯化蛋白的 $30\mu\text{L}$ 0.9% NaCl 溶液, 再加入 $30\mu\text{L}$ 2% 的兔红细胞进行凝集素活性测定, 发现 BjCHI1 在 $1.0\mu\text{g}$ (即 $33\mu\text{g/mL}$) 或更高蛋白水平即显示凝集素活性, 而低于 $1.0\mu\text{g}$ 蛋白水平即观察不到此活性。对于 BjCHI2 和 BjCHI3 在高达 $24\mu\text{g}$ ($800\mu\text{g/mL}$) 蛋白水平仍未有凝集素活性 (图 6)。说明两个几丁质结合域是凝集素活性所必需的。

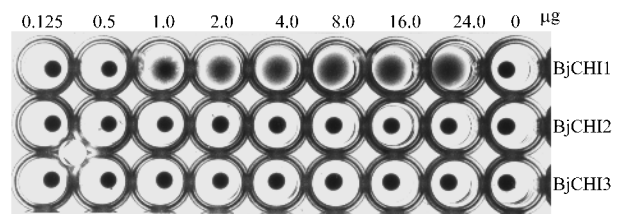


图 6 几丁质酶的凝集素活性测定

Fig. 6 Agglutination analysis of BjCHI1, BjCHI2 and BjCHI3

3 讨论

几丁质结合域在几丁质酶中的作用已有诸多研

究。Iseli 等将烟草的 class I 几丁质酶的几丁质结合域编码区切去,比较具有一个几丁质结合域的几丁质酶和不具几丁质结合域的几丁质酶的生化及功能特性的差别。结果表明几丁质结合域对几丁质酶活性不是必不可少的,但它能增强对几丁质的亲和性而提高其酶活性,具一个几丁质结合域的酶的抗菌能力比不具几丁质结合域的要高 3 倍,且能在更低的 pH 条件下起作用^[8]。黑麦种子中有 3 种几丁质酶,其中几丁质酶 α (RSC-a) 含有一个几丁质结合域,而几丁质酶 γ (RSC-c) 没有。RSC-a 对乙二醇几丁质的水解酶活性与 RSC-c 相当,但对胶状几丁质的活性却是 RSC-c 的 3 倍。用 β -巯基乙醇还原 RSC-a 的 5 个二硫键或将其几丁质结合域去掉,均降低了酶对胶状几丁质的活性。由此认为几丁质结合域通过对不溶性几丁质的结合而增强了催化区的水解活性,但对可溶性几丁质可能没有此效应^[13]。对细菌的几丁质酶的研究也有类似的结果,认为几丁质结合域对于酶完全裂解胶状几丁质酶是非常重要的^[14]。Does 等将 UDA 的两个几丁质结合域编码区与烟草 class I 几丁质酶的催化区的编码区连接起来形成编码具两个几丁质结合域的嵌合几丁质酶基因,并将其转化到烟草中研究其功能。虽然所得到的嵌合蛋白具有凝集素活性,但对 CM-chitin-RBV 的催化活性比烟草 class I 几丁质酶的活性要低 3.6 倍^[12]。

在我们的实验中,不管用可溶性或不溶性底物,无论有无几丁质结合域,几丁质酶均表现出水解活性。BjCHI1、BjCHI2 和 BjCHI3 对 CM-chitin-RBV 的活性的 K_m 值区别甚微,3 者的 K_m 值分别为 0.799mg/mL、0.544mg/mL 和 0.793mg/mL,似乎说明几丁质结合域的数目对于几丁质酶降解可溶性底物的亲和力没多大影响。但用胶状几丁质为底物,3 种几丁质酶表现有一定的区别。虽然 BjCHI1 的 K_m 值与 BjCHI2 的差别不大,但 BjCHI3 的 K_m 值分别是它们的 5.85 倍和 4.23 倍。Iseli 等^[8]研究的结果类似,含有几丁质结合域的烟草几丁质酶 K_m 值(3.5mmol/L)远小于切除了几丁质结合域的酶的 K_m 值(23mmol/L)。说明在催化过程中,几丁质结合域能够协助几丁质酶与不溶性底物的结合,提高几丁质酶与不溶性底物的亲和力,因而相对于没有几丁质结合域的几丁质酶,只需较低的底物浓度即可很容易地达到最大反应速度(v_{max})。但具一个几丁质结合域的几丁质酶与具两个几丁质结合域的几丁质酶的 K_m 值仅相差 0.1mg/mL,可能说明对于提高几丁

质酶与不溶性底物的亲和力,一个几丁质结合域即足够了,再增加几丁质结合域数目效用变得不明显。

芥菜 BjCHI1 是一个独特的几丁质酶,是目前为止发现的唯一既有几丁质酶活性又有凝集活性的天然植物蛋白质^[4,15],只有同时具备两个几丁质结合域的 BjCHI1 才表现凝集素活性,切除一个几丁质结合域,即使其丧失凝集素活性。BjCHI1 既然又是凝集素,则其功能可能也是多样的,有可能在抗真菌、细菌甚至抗虫方面发挥作用^[16]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Broglie K, Chet I, Holliday M *et al.* Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 1991, **254**: 1194 ~ 1197
- [2] Marcant R, Davey M R, Lucas J A *et al.* Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of black-spot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding*, 1998, **4**: 187 ~ 194
- [3] Datta K, Tu J, Oliva N *et al.* Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica cultivars. *Plant Science*, 2001, **160**(3): 405 ~ 414
- [4] Neuhaus J M, Fritig B, Linthorst H J M *et al.* A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Bio Repr*, 1996, **14**(2): 102 ~ 104
- [5] Zhao K J, Chye M L. Methyl jasmonate induce expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. *Plant Mol Biol*, 1999, **40**: 1009 ~ 1018
- [6] OUYANG S W (欧阳石文), ZHAO K J (赵开军), FENG L X (冯兰香) *et al.* Expression of a novel Chitinase gene from *Brassica juncea* by *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2002, **10**(1): 33 ~ 35
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Iseli B, Boller T, Neuhaus T M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol*, 1993, **103**: 221 ~ 226
- [9] Wirth S J, Wolf G A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods*, 1990, **12**: 197 ~ 205
- [10] CHEN C S (陈素顺), XU F (徐凤彩), LI M (李明启). Studies on the chitinase system in leaves from 41 plant species (var.) related to 21 families. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境), 1993, **4**(4): 28 ~ 33
- [11] Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy Sciences (中国科学院上海植物生理所) / Shanghai Society for Plant Physiology (上海市植物生理学会编). *Guide to Advanced Experi-*

- Science Press. Beijing, 1999, pp. 129 ~ 130
- [12] Does M P, Cornelissen B J C. A chimera of *Urtica dioica* agglutinin and tobacco chitinase displays both agglutination and chitinase activity. *Plant Science*, 1999, **148**: 121 ~ 129
- [13] Yamagani T, Funatsu G. The complete amino acid sequence of chitinase - a from the seeds of rye. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58** (2): 322 ~ 329
- [14] Tantimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A *et al.* Multiple chitinase enzymes from a single gene of *Bacillus licheniformis* TP-1. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85** (3): 259 ~ 265
- [15] GAO Y (高莹), QU L X (瞿礼嘉), CHEN Z I (陈章良). Study on the molecular biology of plant lectin. *Biotechnology Information* (生物技术通报), 2000, (5): 18 ~ 22
- [16] Peumans W J, Van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 1995, **109**: 347 ~ 352

BjCHI1 from *Brassica juncea* Displays both Chitinase and Agglutination Activity

OUYANG Shi-Wen¹ ZHAO Kai-Jun^{1,2*} FENG Lan-Xiang¹ CHYE Mee-Len³ RAM Sathishkumar³

¹(*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

²(*Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Genetics & Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China*)

³(*Department of Botany, The University of Hong Kong, Hong Kong, China*)

Abstract The proteins encoded by the *Brassica juncea* chitinase gene *BjCHI1* and its derived genes *BjCHI2* and *BjCHI3* were expressed by Multi-copy *Pichia* expression system. The chitinase activity of FPLC purified *BjCHI1*, *BjCHI2* and *BjCHI3* were tested and the results showed that all the three proteins degraded both CM-chitin-RBV and colloidal chitin. The Km values of *BjCHI1*, *BjCHI2* and *BjCHI3* for CM-chitin-RBV were estimated as 0.799mg/mL, 0.544mg/mL and 0.793mg/mL, respectively. When the colloidal chitin was used as substrate, the Km values were 0.281mg/mL, 0.388mg/mL and 1.643mg/mL, respectively indicating chitin-binding domain can increase affinity of chitinase to insoluble substrate. In the agglutination activity assay, only *BjCHI1* shows activity when the protein concentration was more than 33 μ g/mL, while *BjCHI2* and *BjCHI3* without agglutination activity even when the concentration was increased as high as 800 μ g/mL. This means that the two chitin-binding domains in *BjCHI1* are essential for agglutination and *BjCHI1* is the first protein which shows both chitinase and agglutination activity identified so far in plants.

Key words *BjCHI1*, chitinase, agglutination, Km

Received : 03-28-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 39970518).

* Corresponding author. Tel : 86-10-68918751 ; Fax : 86-10-68975212 ; E-mail : zhaokj@mail.caas.net.cn