PHÂN LẬP, BIỂU HIỆN, TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA CHITINASE TỪ *LECANICILLIUM LECANII* 43H TRONG *PICHIA PASTORIS* X33

Nguyễn Hữu Quân[2], Đỗ Thị Tuyên[1], Quyền Đình Thi[1]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[2]*Trường Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên*

Ngày nhận bài: 12.8.2014
Ngày nhận đăng: 30.8.2014

TÓM TẮT

Chitinase là enzyme thủy phân liên kết 1,4-β-glycoside trong phân tử chitin và được sinh ra từ nhiều tổ chức cơ thể khác nhau. Chitinase đã được sử dụng để chống lại các loài nấm bệnh và côn trùng hại thực vật. Gần đây, gene mã hóa chitinase từ một số chủng vi sinh vật đã được nhân dòng và biểu hiện trong các cơ thể vật chủ khác nhau và enzyme tái tổ hợp này đã được tinh sạch; đánh giá tính chất lý hóa. Trong bài báo này, chúng tôi đã phân lập được gene mã hóa chitinase từ chủng *Lecanicillium lecanii* 43H có chiều dài 1269 bp mã hóa cho protein có khối lượng phân tử khoảng 45 kDa, gồm 423 amino acid, chứa 1 tín hiệu peptide (20 amino acid). Gene cDNA này được đăng kí trong GenBank với mã số JX665045 và biểu hiện trong nấm men *P pastoris* X33 thông qua vector biểu hiện pPICZαA. Dòng biến nạp (S18) có hoạt tính chitinase cao đã được lựa chọn. Chitinase tái tổ hợp (rChit) được sinh tổng hợp với hàm lượng cao nhất trong môi trường YP sau khi cảm ứng methanol 1,5% trong 96 h nuôi cấy. rChit được tinh sạch qua cột sắc kí trao đổi ion DEAE-Sephadex A-50 thu được một băng protein kích thước khoảng 45 kDa, hoạt tính riêng đạt 11,93 U/mg protein, độ sạch 1,8 lần. rChit hoạt động mạnh nhất ở 40°C và pH 5,5.

Từ khóa: *Biểu hiện, chitinase, Lecanicillium lecanii, nhân dòng, Pichia pastoris X33, tinh sạch*

MỞ ĐẦU

Chitin là một polysaccharide được tạo nên từ các đơn phân N-acetyl glucosamine thông qua liên kết 1,4-β glycoside. Chitin là hợp chất hữu cơ chiếm tỷ lệ thứ 2 trong tự nhiên sau cellulose. Chitin tồn tại trong thành tế bào của nấm, vỏ ngoài của động vật không xương sống (côn trùng, giáp xác và động vật thân mềm).

Chitinase là nhóm enzyme thủy phân có khả năng phân cắt liên kết β-1,4-glycoside giữa C_1 và C_4 của hai phân tử N-acetyl glucosamine liên tiếp nhau trong phân tử chitin, chitobiose và chitotriose. Chitinase gồm: Endochitinase (EC.3.2.1.14) thủy phân điểm cắt bên trong phân tử chitin tạo ra các phân tử có khối lượng thấp như chitotriose, chitotetraose và diacetylchitobiose. Chitobiosidase (EC 3.2.1.29) xúc tác quá trình phân cắt các vi sợi chitin ở đầu không khử giải phóng ra các diacetylchitobiose. N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) phân cắt các oligomer (sản phẩm của sự thủy phân bởi endochitinase và chitobiosidase) để tạo ra các đơn phân N-acetylglucosamine (Patil *et al.*, 2002).

Chitinase tham gia vào quá trình thủy phân chitin trong đại dương. Ngoài ra, chitinase còn được sử dụng để tạo ra các chitooligosaccharide, có vai trò trong quá trình kháng khuẩn (Wen *et al*, 2002). Trong nông nghiệp, chitinase còn được sử dụng để chống lại tác nhân gây bệnh cho thực vật và làm thủy phân lớp vỏ ngoài của côn trùng một cách hiệu quả (Dahiya *et al.*, 2005). Chitinase được tạo ra bởi các tổ chức sinh vật khác nhau như vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật. Hiện nay, nhiều gene mã hóa chitinase từ vi khuẩn và nấm đã được nhân dòng, biểu hiện và đánh giá tính chất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân dòng, biểu hiện gene mã hóa chitinase từ *L. lecanii* 43H trong nấm men *P. pastoris* X33 dưới sự kiểm kiểm soát của promoter AOX1 nhằm nâng cao năng suất và dễ dàng tinh sạch trong quá trình tinh sạch phục vụ cho sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất

3,5-dinitrosalisilic acid mua từ Fluka (Trung Quốc); agarose, peptone, cao nấm men từ Bio basic INC (Canada); D-glucose, methanol, glycerol từ

Merck (Đức;), chitinase từ HiMedia (Mumbai, India); sorbitol từ Scharlau (Tây ban nha).

Chủng giống và vector

Chủng nấm *L. lecanii* 43H được cung cấp từ Phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tế bào *E. coli* DH5α và vector pJET1.2/blunt (Fermentas) dùng để nhân dòng gene. Nấm men *P pastoris* X33 và vector pPICZαA (Invitrogen) dùng để biểu hiện chitinase.

Tách RNA tổng số

Sợi nấm (1.5 g) từ *L. lecanii* 43H được nghiền nhanh trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ và chuyển vào ống Eppendorf 2 ml. Bổ sung 1 ml trizol reagents, đảo đều trong 5 phút và chiết với 200 µl hỗn hợp chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Hỗn hợp được ly tâm 12500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, chuyển dịch nổi sang ống Eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung 500 µl isopropanol, lắc nhẹ để RNA kết tủa ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và ly tâm thu tủa RNA ở 12500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Rửa tủa bằng dung dịch ethanol 70% bổ sung DEPC 0,01% (v/v), ly tâm 12500 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Làm khô RNA ở nhiệt độ phòng và hòa tan trong nước đã bổ sung DEPC 0,01% (v/v).

Tổng hợp sợi đơn cDNA và khuếch đại gene chitinase

Sợi cDNA được tổng hợp từ mRNA bằng kit của hãng Fermentas. Sợi đơn cDNA được dùng làm khuôn để khuếch đại gene chitinase sử dụng cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gene mã hóa chitinase từ chủng *Verticillium lecanii* (DQ412945.1), bổ sung điểm cắt của hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *XbaI* để tiện chuyển gene vào vector biểu hiện pPICZαA: pPChit-F (GC GAA TTC ATG TTG AGC CTA CTC AAA) và pPChit-R (GC TCT AGA TC TTT CAT GCC ATT CTT GA). Hỗn hợp phản ứng PCR (với tổng thể tích là 10 µl) bao gồm: 1µl đệm PCR 10x; 0,6µl 25mM $MgCl_2$; 0,8µl 2,5mM dNTP; 1µl DNA khuôn; 5,9µl nước cất; 0,5µl mỗi mồi loại; 0,2µl *Taq* polymerase 5U. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95°C/5 phút; 35 chu kỳ (95°C/45 giây; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút); 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose và được tinh sạch theo kit tinh sạch của hãng Qiagen (Venlo, the Nethelands). Trình tự DNA được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Phần mềm DNAStar và BLAST được sử dụng để phân tích và so sánh trình tự gene và amino acid.

Thiết kế vector biểu hiện pPChit

Sản phẩm PCR được chèn vào vector pJET1.2/blunt tạo ra vector pJChit và chuyển vào trong *E. coli* DH5α để nhân dòng gene. Sau đó gene ngoại lai *Chit* trong vector pJChit được cắt bởi *EcoRI* và *XbaI* và đưa vào vector pPICZαA tạo ra vector pPChit. DNA plasmid được thực hiện theo mô tả trước đây (Quyen *et al.*, 2007).

Biến nạp và biểu hiện gene

Vector pPChit được cắt mở vòng bằng *PmeI* sau đó được biến nạp vào *P. pastoris* X33 bằng phương pháp xung điện. Các dòng biến nạp được sàng lọc trên đĩa môi trường YPD chứa 1% zeocin. Sự hội nhập của gene chitinase trong nấm men được kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng DNA của nấm men làm khuôn với cặp mồi pPChit-F/pPChit-R.

Xác định hoạt tính chitinase

Hoạt tính chitinase được xác định bằng cách đo hàm lượng đường N-acetyl glucosamine giải phóng khi thủy phân chitin huyền phù bởi enzyme. Hỗn hợp của 100 µl chitinase được ủ với 300 µl của 0,5% (w/v) chitin huyền phù pha trong đệm 20 mM Tris-HCl pH 7,0 ở 40°C trong 2 h. Để xác định lượng đường giải phóng trong hỗn hợp phản ứng, 1 ml DNS (Miller, 1959) được bổ sung và đun sôi trong 10 phút. Các ống được làm lạnh xuống nhiệt độ phòng và ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Lượng đường giải phóng được xác định bằng cách đo độ hấp phụ ở 540 nm, dựa vào cường độ màu tạo phức với thuốc thử. Một đơn vị hoạt tính (U) của chitinase được xác định là lượng enzyme phân giải chitin huyền phù thành đường khử tương đương với 1 µmol N-acetyl glucosamine trong 1 h ở điều kiện thí nghiệm.

Điện di gel polyacrylamide (PAGE) và xác định nồng độ protein

Khối lượng phân tử của chitinase được xác định bằng điện di trên gel polyacrylamide chứa 12,5% polyacrylamide bằng thiết bị của Biometra. Protein được hiện màu với thuốc nhuộm 0,1% $AgNO_3$. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp đo Braford.

Tinh chế rChit

Dịch nuôi cấy sinh tổng hợp rChit được ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút. 50 ml dịch ngoại bào (1,11 U/ml) được cô lại bằng cột Millipore 10

kDa. Dịch cô mẫu (9 ml) được cho qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-Sephadex A-50 (26×6 cm), đã được rửa và cân bằng với đệm 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Protein được thôi ra với đệm 50 mM Tris-HCl pH 7,0 chứa 0-1,0 M NaCl, tốc độ chảy 24 ml/h cho đến khi OD_{280} < 0,01. Mỗi phân đoạn được thu lại với thể tích 1,5 ml. Các phân đoạn có hoạt tính enzyme cao được tập hợp lại và sử dụng để đánh giá tính chất chitinase. Tất cả các bước tinh sạch được thực hiện ở 4°C.

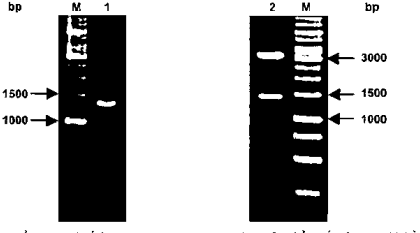
Xác định nhiệt độ và pH tối ưu

Nhiệt độ và pH tối ưu của chitinase được xác định theo phương pháp đã mô tả ở trên sử dụng đệm sodium acetate 20 mM (pH 3,5-6,0) và đệm sodium photphate 20 mM (pH 6,0-8,0); nhiệt độ thay đổi trong khoảng 30-60°C tại pH 7,0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gene mã hóa chitinase từ chủng *L. lecanii* 43H

RNA tổng số sau khi tinh sạch được thực hiện chạy RT-PCR tạo cDNA. Sau đó, cDNA này dùng làm khuôn để khuếch đại gene chitinase với cặp mồi đặc hiệu PpLeF/PpLeR. Sản phẩm PCR được khuếch đại có kích thước khoảng 1,3 kb đúng như lý thuyết (Hình 1, giếng 1). Gene mã hóa chitinase (*Chit*) đã được đưa vào pJET1.2/blunt tạo thành plasmid pJEChit. Sản phẩm cắt kiểm tra gene *Chit* bằng *Eco*RI và *Xba*I trong pJEChit cho 2 băng tương ứng với kích thước của gene *Chit* (~1,3 kb) và pJET1.2/blunt (~3 kb) (Hình 1, giếng 2). Trình tự cDNA gene *Chit* được nhân dòng từ mRNA dài 1269 bp.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gene *Chit* từ cDNA (1) và sản phẩm cắt của pJEChit bằng *Eco*RI và *Xba*I trên gel agarose (2); M: DNA chuẩn.

Cùng với việc khuếch đại gene *Chit* từ cDNA, gene *Chit* cũng được nhân từ khuôn DNA để xác định cấu trúc hoàn chỉnh của gene mã hóa chitinase từ *L. lecanii* 43H cũng như kích thước các đoạn exon. Sản phẩm PCR được chèn vào vector nhân dòng pJET1.2/blunt và biến nạp vào *E.coli* DH5α. Plasmid tái tổ hợp được tinh sạch và xác định trình tự. Kết quả đọc trình tự cho thấy, trình tự nucleotide của gene *Chit* nhân từ khuôn DNA có 4 exon với kích thước 140, 99, 50 và 631 bp (tổng đúng bằng kích thước cDNA gene *Chit* nhân từ khuôn mRNA, không bao gồm các nucleotide của bộ ba mở đầu và kết thúc) và 3 intron có kích thước 57, 51 và 52 bp. Trình tự gene mã hóa *Chit* từ *L. lecanii* 43H được đăng kí trong GenBank với mã số JX665045.

cDNA gene *Chit* thu được (JX665045) có độ tương đồng 99,9% so với các trình tự trong GenBank từ chủng *L. lecanii* 432 (DQ412944), *L. attenuatum* CGMCC5328 (KC904797), 99,8% từ chủng *Cordyceps confragosa* (KF041477) và 67,2-90,1% với Chit từ các chủng *L. lecanii* DAOM 175104 (AY705927) và *Trichothecium roseum* (GU361767) (Hình 2A).

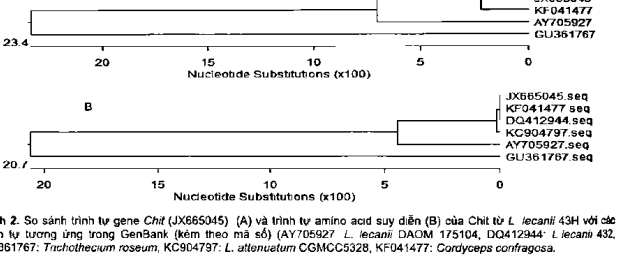
Trình tự amino acid suy diễn của *Chit* có độ tương đồng 100% so với chitinase từ các chủng *L. lecanii* 432 (DQ412944), *L. attenuatum* CGMCC5328 (KC904797); 99,8% với Chit từ chủng *C. confragosa* (KF041477) và 69-91% với Chitinase từ các chủng *L. lecanii* DAOM 175104 (AY705927) và *T. roseum* (GU361767) (Hình 2B).

Như vậy, cDNA gene *Chit* từ *L. lecanii* dài 1269 bp (gồm cả mã mở đầu và kết thúc), thuộc họ 18 thủy phân liên kết glycoside. Trình tự amino acid suy diễn dài 423 amino acid, trong đó 20 amino acid đầu N là peptide tín hiệu (phân tích bằng DNAStar và signal peptide SignalP-3.0 (http //www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)). Theo phân tích lý thuyết, protein này có khối lượng phân tử khoảng 45 kDa, gồm 36 amino acid mang tính base mạnh, 41 amino acid có tính acid mạnh, 147 amino acid kỵ nước và 126 amino acid phân cực.

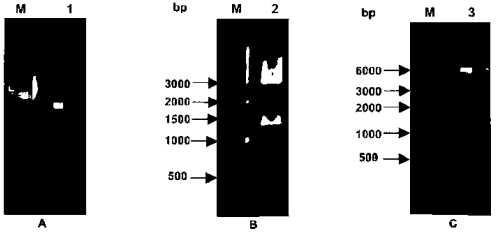
Tạo chủng biểu hiện *P. pastoris* X33/pPChit

Gene *Chit* trong plasmid pJEChit được gắn vào vector pPICZαA tạo plasmid tái tổ hợp pPChit. Plasmid tái tổ hợp pPChit có kích thước lớn hơn, nên nằm cao hơn so với vector pPICZαA (Hình 3A, giếng 1). Plasmid tái tổ hợp pPChit tinh sạch được cắt bằng *Eco*RI và *Xba*I cho hai băng là pPICZαA (~3,6 kb) và gene *Chit* (1269 bp) (Hình 3B, giếng 2). Plasmid pPChit được cắt mở vòng bằng *Pme*I tạo cấu trúc thẳng trước khi biến nạp với kích thước khoảng 6 kb (Hình 3C, giếng 3). Gene *Chit* trong plasmid pPChit đã được khẳng định bằng giải trình tự gene.

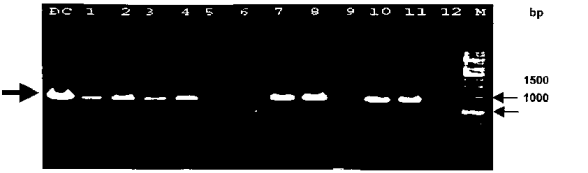
Các dòng nấm men tái tổ hợp được nuôi trong môi trường YPG qua đêm sau đó tách DNA và chạy PCR với cặp mồi đặc hiệu gene *Chit* để kiểm tra. Một số khuẩn lạc (1-4, 6-11) (Hình 4) có kích thước tương ứng với cDNA gene *Chit*. Như vậy, có thể kết luận các dòng *P. pastoris* X33 tái tổ hợp có chứa đoạn gene mã hóa *Chit*.



Hình 2. So sánh trình tự gene *Chit* (JX665045) (A) và trình tự amino acid suy diễn (B) của Chit từ *L. lecanii* 43H với các trình tự tương ứng trong GenBank (kèm theo mã số) (AY705927: *L. lecanii* DAOM 175104, DQ412944: *L lecanii* 432, GU361767: *Trichothecium roseum*, KC904797: *L. altonuetum* CGMCC5328, KF041477: *Cordyceps confragosa*.



Hình 3. Thiết kế vector biểu hiện pPChit dùng để biểu hiện gene trong *P. pastoris*. A: 1: Plasmid pPChit; B, plasmid pPICZαA, B: 2: sản phẩm cắt pPChit với *Eco*RI và *Xba*I; C: 3 sản phẩm cắt mở vòng pPChit với *Pme*I; M: DNA chuẩn 1kb.



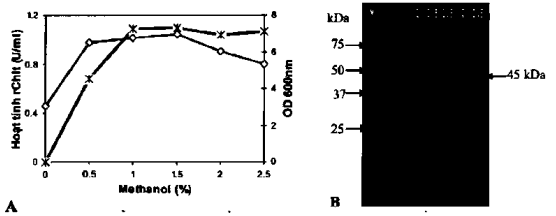
Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR gen *Chit* trong các dòng *P. pastoris* tái tổ hợp. ĐC: DNA khuôn là pPChit, 1-11. DNA khuôn là DNA của các chủng tái tổ hợp; 12: DNA khuôn là DNA từ chủng gốc X33; M: DNA chuẩn.

Sàng lọc các dòng *P. pastoris* X33/pPChit tái tổ hợp

Để kiểm tra mức độ biểu hiện rChit, 31 dòng tái tổ hợp có genome mang đoạn chèn được nuôi biểu hiện trong môi trường YP bổ sung methanol 1% sau mỗi 24 h. Sau 72 h cảm ứng thu được 29 dòng biểu hiện có hoạt tính rChit, 3 dòng không có hoạt tính. Trong số 29 dòng có hoạt tính rChit, dòng số 18 có hoạt tính chitinase cao nhất (đạt 0,636 U/ml, Bảng 1). Dòng này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Hoạt tính chitinase của các dòng *P. pastons* X33/pPChit tái tổ hợp

Dòng	U/ml dịch nổi	Dòng	U/ml dịch nổi	Dòng	U/ml dịch nổi
S1	0,602 ± 0,0002	S12	0,272 ± 0,0014	S23	0,274 ± 0,0003
S2	0,427 ± 0,0003	S13	0,581 ± 0,0006	S24	0,368 ± 0,0014
S3	0,456 ± 0,0019	S14	0,392 ± 0,0013	S25	0,268 ± 0,0004
S4	0,382 ± 0,00 6	S15	0,521 ± 0,0004	S26	0 ± 0
S5	0,367 ± 0,0009	S16	0,374 ± 0,0004	S27	0,265 ± 0,0001
S6	0,434 ± 0,0004	S17	0 ± 0	S28	0,258 ± 0,0002
S7	0,296 ± 0,0003	**S18**	**0,636 ± 0,0002**	S29	0,253 ± 0,0004
S8	0,454 ± 0,0006	S19	0,255 ± 0,0003	S30	0,336 ± 0,0003
S9	0,296 ± 0,0003	S20	0,323 ± 0,0002	S31	0,326 ± 0,0005
S10	0,316 ± 0,0002	S21	0,274 ± 0,0004	ĐC	0 ± 0
S11	0,534 ± 0,0002	S22	0,309 ± 0,0002		



Hình 5. Khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng tái tổ hợp khi được cảm ứng ở các nồng độ methanol khác nhau. A: Hoạt tính chitinase, B: điện di đồ kiểm tra protein trong dịch ngoại bào.

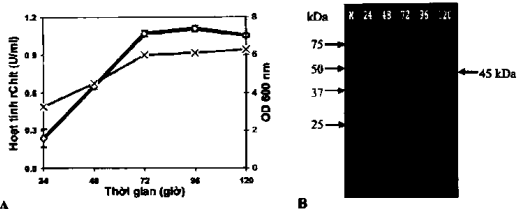
Lựa chọn nồng độ methanol

Trong quá trình biểu hiện, methanol đóng vai trò cảm ứng promoter AOX1 kiểm soát quá trình sinh enzyme. Mức độ biểu hiện rChit khác nhau khi tiếp methanol ở các nồng độ khác nhau. Nồng độ methanol tăng từ 0-2,5% hoạt tính rChit tăng dần và đạt cực đại (1,09 U/ml) ở nồng độ methanol 1,5% (Hình 5A). Trên điện di đồ protein tổng số biểu hiện tối ưu nồng độ methanol, băng 45 kDa ở nồng độ 1,5% methanol rất đậm (Hình 5B).

Lựa chọn thời gian nuôi biểu hiện

Khi nuôi cấy chủng X33 tái tổ hợp hoạt tính rChit cao nhất (đạt 1,11 U/ml) sau 96 h nuôi cấy và giảm dần ở 120 h (đạt 1,05 U/ml) (Hình 6A). Trên điện di đồ protein tổng biểu hiện thời gian nuôi cấy, băng 45 kDa đậm dần theo thời gian nuôi (Hình 6B).

Kết quả biểu hiện rChit của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của các tác giả trên thế giới. Gan *et al.*, (2007) nhân dòng gene chitinase (*Lpchi1*) từ chủng *L. psalliotae* và biểu hiện thành công trong nấm men *P. pastoris* GS115 sử dụng vector pPIC9K. Hoạt tính chitinase đạt 12,3 mU/ml sau 5 ngày nuôi (Gan *et al.*, 2007). Zhu *et al.*, (2008) đã nhân dòng và đọc trình tự gene mã hóa chitinase (Vlchit1) từ chủng *V. lecanii* và biểu hiện thành công trong *E. coli* DH5α. Trình tự nucleotide dài 1567 bp chứa gene chitinase đã được xác định và thu được một khung đọc mở 1272 bp mã hóa cho endochitinase gồm 423 amino acid (có 1 tín hiệu peptide gồm 22 amino acid và 201 amino acid mã hóa chitinase trưởng thành; hoạt tính riêng đạt 121,52 mU/mg (Zhu *et al.*, 2008).



Hình 6. Khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng tái tổ hợp ở các khoảng thời gian khác nhau. A. Hoạt tính chitinase; B. điện di đồ kiểm tra protein trong dịch ngoại bào.

Tinh chế rChit

rChit từ chủng *P. pastoris* X33 sau 96 giờ nuôi cấy có hoạt tính 1,11 U/ml (hoạt tính riêng đạt 11,21 U/mg protein). Dịch enzyme này được cô lại bằng cột Millipore 10 kDa và qua cột sắc khí trao đổi ion DEAE sephadex-A50. Hoạt tính chitinase đạt 11,54 U/mg protein sau khi cô mẫu, độ sạch là 1 và hiệu suất thu hồi đạt 92%. Chitinase sau khi cô lại được đưa lên cột DEAE-Sephadex A-50. Chitinase này đã được tinh sạch với độ sạch 1,8 lần và hiệu suất thu hồi đạt 10%. rChit tinh sạch này có hoạt tính 11,93 U/mg protein (Bảng 2) và chỉ ra một băng protein duy nhất trên bản gel nhuộm bằng 0,1% $AgNO_3$, khối lượng phân tử của protein này khoảng 45 kDa (Hình 7). Như vậy, rChit từ nấm men *P. pastoris* X33 đã được tinh sạch.

Bảng 2. Các bước tinh sạch chitinase từ enzyme thô của chủng *L. lecanii* 43H.

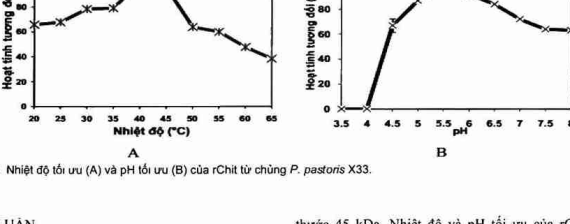
Bước tinh sạch	Protein tổng số (mg)	Hoạt tính tổng số (U/ml)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Độ sạch	Hiệu suất (%)
Enzyme thô	4,96	55,5	11,21	1	100
Qua cột Millipore	4,41	50,9	11,54	1,0	92
DEAE-sephadex	0,27	5,4	19,93	1,8	10

Hình 7. Phân tích protein trong các phân đoạn tinh chế rChit từ dịch lên men trên gel polyacrylamide. DN: dịch nổi; LC: dịch lên cột; 11-18 ứng với các phân đoạn qua cột DEAE-Sephadex A-50 có hoạt tính; M: marker

Nhiệt độ và pH tối ưu của rChit

rChit từ *P. pastoris* X33 hoạt động ở dải nhiệt độ rộng từ 20-65°C. Hoạt tính chitinase tăng dần từ 15,79 U/mg protein đến tối đa 23,85 U/mg ở 40°C và giả dần đến 9,24 U/mg protein ở 65°C (Hình 8A). Ở dải pH khảo sát, rChit bị mất hoàn toàn hoạt tính ở pH 3,5-4,0. Hoạt tính chitinase tăng dần từ 12,53 U/mg protein ở pH 4,5 đến tối đa 18,78 U/mg protein ở pH 5,5 và giảm xuống đến 11,85 U/mg protein ở pH 8,0 (Hình 8B).

Các công bố trước đây cho thấy, Lpchi1 từ *P. pastoris* GS115 hoạt động tốt nhất ở 37,6°C và pH 7,0 (Gan *et al.*, 2007). Chitinase A tái tổ hợp (ChiA) từ *Pseudomonas* sp. BK1 trong *E coli* hoạt động tốt nhất ở pH 5,0 và nhiệt độ 40°C (Jang *et al.*, 2005). Trong khi, chitinase tái tổ hợp (PtChiA) từ nấm ưa nhiệt *Paecilomyces thermophila* trong *E. coli* hoạt động tốt nhất ở 50°C và pH 4,5 (Kopparapu *et al.*, 2012). Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác so với một số kết quả được công bố.



Hình 8 Nhiệt độ tối ưu (A) và pH tối ưu (B) của rChit từ chủng *P. pastoris* X33.

KẾT LUẬN

Phân lập được gene chitinase từ *L. lecanii* 43H gồm 1269 bp và đăng kí trên GenBank với mã số JX665045. Xây dựng được hệ thống biểu hiện pPChit và biểu hiện thành công trong *P. pastoris* X33. Chủng tái tổ hợp có hoạt tính chitinase đạt 1,11 U/ml. rChit từ *P. pastoris* X33 đã tinh sạch có kích thước 45 kDa. Nhiệt độ và pH tối ưu của rChit là 40°C và pH 5,5.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được sự hỗ trợ bởi chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và PTNN đến năm 2020, đề tài: "Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm từ nấm Lecanicillium spp. để*

diệt rệp muội (Aphididae) gây hại cây trồng" Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2010-2013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dahiya N, Tewari R, Tiwari RP, Hoondal GS (2005) Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Electron J Biotechnol* 8(2) DOI: 10.2225/vol8-issue2-fulltext-6.

Gan Z, Yang J, Tao N, Liang L, Mi Q, Li J, Zhang KQ (2007) Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpchi1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Appl Microbiol Biotechnol 76: 1309-1317

Jang MS, Lee YM, Cho YS, Choi YL, Kim CH, Lee YC (2005) Overexpression and characterization of a novel chitinase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. BK1 Indian J Biochem Biophys 42: 339-344.

Kopparapu NK, Zhou P, Zhang S, Yan Q, Liu Z, Jiang Z (2012) Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. Carbohydr Res 347: 155-160.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar Anal Chem 31: 426-428.

Patil RS, Ghormade V, Desphande MV (2002) Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme Microb Technol 26: 473-483.

Quyen DT, Dao TT, Nguyen SLT (2007) A novel estrase from *Ralstonia* sp. M1. gene cloning, sequencing, high-level expression and characterization Protein Expr. Purif 51: 133-140.

Wen CM, Tseng CS, Cheng CY, Li YK (2002) Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol Appl Biochem 35: 213-219.

Zhu Y, Pan J, Qiu J, Guan X (2008) Isolation and characterization of a chitinase gene from entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Braz J Microbiol 9: 314-320.

ISOLATION, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *LECANICILLIUM LECANII* 43H IN *PICHIA PASTORIS* X33

Nguyen Huu Quao[2], Do Thi Tuyen[1]·, Quyen Dinh Thi[1]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*
[2]*Thai Nguyen University of Education*

SUMMARY

Chitinase is an enzyme catalyzing hydrolysis of 1,4-β-glycoside bonds in chitin and produced by a wide variety of organisms. Chitinase has been used in controlling pathogenic fungi in plants and insects. Recently, the gene encoding the chitinase from several microbial strains have been cloned and expressed in heterologous host cells and recombinant enzymes have been purified and characterized. In this study, a gene coding for a chitinase, of the glycosyl hydrolase family 18 and derived from *L. lecanii* 43H, was cloned and sequenced. The cDNA sequence, 1269 bp, and its putative chitinase, a 423 aa protein with a predicted molecular mass 45 kDa and a pH 6.1 exhibited 99.9% identities with cDNA sequences their corresponding chitinase from *L. lecanii* strains from the GenBank. The nucleotide sequence encoding recombinant chitinase from *L. lecanii* 43H has been deposited in the GenBank with an accession number of JX665045. The cDNA was overexpressed in *P. pastoris* X33 under the control of an AOX1 promoter, using an expression vector pPICZαA. The transformant expressing the highest level of the chitinase (1.11 U/ml supernatant) was selected. The recombinant chitinase was produced at the highest level in YP medium after induction of 1.5% methanol for 96h. The molecular mass of purified recombinant chitinase, determined by SDS-PAGE, was 45 kDa, with a specific activity of 165.7 U/mg protein. Optimum temperature and pH for the enzyme activity were observed at 40°C and 5,5, respectively. Thus, based on molecular mass, recombinant chitinase of *L. lecanii* 43H is classified group III with molecular weight of 40-50 kDa, it could be an endochitinase. This result was similar to some previous study.

Keywords: *Chitinase, cloning, expression, Lecanicillium lecanii, Pichia pastoris X33, purification*

· *Author for correspondence*: Tel: *+84-4-37568260;* Fax: *+84-4-38363144;* E-mail: *dttuyen@ibt.ac.vn*