

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(2):180-185; 4 February 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 苏云金芽胞杆菌几丁质酶 B 特性及其杀虫抑真菌的作用

刘东, 陈月华\*, 蔡峻, 肖亮, 刘传

(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】本文对苏云金芽胞杆菌科默尔亚种 15A3 菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3, 简称 Bt 15A3) 几丁质酶 (chitinase B, 简称 ChiB) 的特性及其杀虫抑真菌作用作了初步研究。【方法】将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达的 Bt 15A3 菌株的 ChiB, 经过硫酸铵沉淀、透析、Sephadex G-200 凝胶层析, 最终得到初步纯化的几丁质酶。利用酶谱方法确定分子量, 并且对 2 种分子量的酶蛋白进行了质谱鉴定。对各种金属离子对 ChiB 酶活的影响、最适反应温度及 pH、温度及 pH 稳定性等理化特性进行研究, 并且测定了 ChiB 抑制真菌孢子萌发的活性和对甜菜夜蛾和棉铃虫的杀虫增效作用。【结果】ChiB 分子量约为 70 kDa。同时证明检测到的 64 kDa 蛋白为 70 kDa 蛋白 C 端的降解产物。ChiB 最适作用温度为 60°C, 最适 pH 值为 5, 在温度 20°C ~ 60°C 和 pH 4 ~ 8 的范围内均有良好的稳定性。供试金属离子中  $Fe^{3+}$  对 ChiB 的酶活有促进作用,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$  有抑制作用。ChiB 可抑制产黄青霉等真菌孢子的萌发, 半抑制浓度 (median effective inhibitory concentration  $IC_{50}$ ) 约为 4  $\mu$ g/mL。该酶可以分别降低 Bt 晶体蛋白对甜菜夜蛾和棉铃虫的半致死浓度 (median lethal concentration  $LC_{50}$ ) 26% 和 30%。【结论】Bt 科默尔亚种的几丁质酶不但具有较稳定的理化性质, 而且具有抑制真菌生长及明显的杀虫增效作用。

**关键词**: 苏云金芽胞杆菌; ChiB; 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(2009)02-0180-06

几丁质是环境中广泛存在的 N-乙酰氨基葡萄糖聚合物, 其在地球上的拥有量仅次于纤维素, 为大多数真菌、昆虫提供了细胞壁成分及体表的刚性结构<sup>[1]</sup>。几丁质酶能够催化几丁质水解为几丁寡糖和 N-乙酰氨基葡萄糖, 可有效抑制真菌的生长。几丁质也是昆虫中肠围食膜的主要结构成分, 围食膜是昆虫抵御细菌和病毒的物理屏障, 被几丁质酶破坏后, 可加速害虫的罹病进程, 提高死亡率。苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种重要的杀虫细菌, 在生物防治领域已应用半个多世纪。近年来, 已有多篇文献证明, 在 Bt 细胞中表达异源的几丁质酶后可明显提高该菌株的杀虫活性<sup>[2-6]</sup>。

Bt 本身产生的几丁质酶及其对杀虫的作用也有相关报道。如英国学者 Sampson 在 Bt 培养液中加入特异的几丁质酶抑制剂, 证明苏云金芽胞杆菌鲑泽亚种对海灰翅夜蛾幼虫的活性明显降低<sup>[7]</sup>。Arora 等证明, 在大肠杆菌中表达的 Bt HD-1 菌株的几丁质酶可以提高 Bt 营养期杀虫蛋白 (Vegetative Insecticidal Proteins, 简称 Vip) 对甜菜夜蛾的活性<sup>[8]</sup>。

在 Bt 几丁质酶抑制真菌方面, 目前仍处于初始研究阶段, 2001 年的一篇美国专利中公布了 1 株苏云金芽胞杆菌产生的几丁质酶可明显的抑制真菌生长<sup>[9]</sup>。Driss 证明 Bt 培养物上清中的几丁质酶粗酶 Chi25 (74 kDa) 能够抑制黑曲霉的生长<sup>[10]</sup>。2006

基金项目: 国家自然科学基金 (30570052, 30600015)

\* 通信作者。Tel: +86-22-23505964; Fax: +86-22-23508800; E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

作者简介: 刘东 (1981-) 男, 河北石家庄人, 博士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究。E-mail: liudong204@mail.nankai.edu.cn

收稿日期: 2008-07-04; 修回日期: 2008-11-26

年墨西哥学者<sup>[11]</sup>从 Bt 鳃泽亚种发酵上清液中首次纯化出 66 kDa 的几丁质酶,发现其对六种植物病原真菌均有抑制作用,同时分析了酶的各种特性。

国内学者对苏云金芽胞杆菌几丁质酶研究刚刚起步。有关 Bt 几丁质酶的酶学特性以及对杀虫的增效活性、抑真菌活性方面的研究尚未见任何报道。本实验室“九五”期间开发的苏云金芽胞杆菌科默尔亚种 15A3 菌株(*Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3, 简称 Bt 15A3)可组成型表达 2 种几丁质酶,对甜菜夜蛾和棉铃虫均具有较高的杀虫活性<sup>[12]</sup>。为了研究 Bt 15A3 几丁质酶的酶学特性、杀虫增效活性及其抑真菌活性,本论文分离纯化了异源表达的几丁质酶 ChiB 并进行了系统的研究。证明了该酶对害虫的增效作用以及对病原真菌孢子萌发的抑制作用。本文首次报道这些方面的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、试虫、培养基:**大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL-Blue 菌株是苏云金芽胞杆菌科默尔亚种 Bt 15A3 *chiB* 基因的表达宿主,由本室构建<sup>[12]</sup>。病原真菌 棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani*),苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*);产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*),黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)由本系刘方教授提供。供试昆虫:甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)由本室饲养。培养基:LB 培养基用于 *E. coli* 的培养,PDA 培养基用于真菌的培养。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**几丁质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,Sephadex G-200 葡聚糖凝胶购自 Pharmacia 公司。主要仪器有:紫外分光光度计、小型蛋白电泳仪、凝胶成像仪及质谱仪等。

### 1.2 胶体几丁质的制备

参照文献[13]方法进行。

### 1.3 几丁质酶粗酶的制备和纯化

将 *E. coli* XL-Blue(pUCm-*chiB*)按常规方法培养。收集上清液,硫酸沉淀蛋白 4℃透析过夜。将粗酶液经 Millipore 超滤管浓缩后加入缓冲液平衡后的 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶层析柱。用相同的缓冲液进行洗脱。收集酶活组分。

### 1.4 蛋白质浓度与酶活的测定

蛋白质浓度测定采用 Bradford 比色法,以牛血

清蛋白为标准蛋白<sup>[14]</sup>。酶活的测定采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid,简称 DNS)比色法<sup>[15]</sup>。一个单位的酶活定义为:50℃,pH 6.0 条件下,反应 1 h,产生 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)所需要的酶量。酶活测定结果均为 3 次试验的平均值。

### 1.5 几丁质酶 B 的特性分析

**1.5.1 SDS-PAGE 检测与酶谱分析:**SDS-PAGE 的样品处理、胶浓度及电泳操作参照文献[9]方法进行。酶谱分析是在分离胶中添加 0.001% 乙二醇几丁质(glycol chitin)作为底物,待电泳后将凝胶放入含 0.01% Triton X-100 的缓冲液中复性蛋白,然后经荧光染料染色,紫外灯下观察特异几丁质水解带<sup>[16]</sup>。

**1.5.2 胶内酶解及质谱检测:**将电泳得到的 70 kDa 和 64 kDa 的两条蛋白带进行胶内胰蛋白酶酶解,酶解方法参见文献[17]。基质辅助激光解吸/离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS)检测委托北京大学完成。蛋白指纹图谱分析使用软件 MASCOT,登陆网站(<http://www.matrixscience.com>)在 NCBI 及 Swiss-prot 数据库中对内肽序列标签进行查询。

**1.5.3 各种金属离子效应物对酶活影响的测定:**在纯化后的 ChiB 酶液中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ )、 $Cr^{3+}$  ( $CrCl_3$ )、 $Li^+$  ( $LiCl$ )、 $Na^+$  ( $NaCl$ )、 $Cu^{2+}$  ( $CuSO_4$ )、 $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ )、 $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ )、 $Ca^{2+}$  ( $CaCl_2$ )、 $Zn^{2+}$  ( $ZnSO_4$ )、 $Ag^+$  ( $AgCl$ )和浓度为 10 mmol/L 的 EDTA、SDS,同时以不加任何物质的酶液为对照,测定各物质对酶活的影响,重复 3 次取平均值。

**1.5.4 温度、pH 对酶活的影响及酶的稳定性测定:**在 20℃~100℃条件下分别测定 ChiB 的酶活,确定最适温度,将 ChiB 在 20℃~100℃下保温 60 min,然后测定剩余酶活力。在 pH 4~9 的范围内测定酶活力,确定 ChiB 最适 pH。将酶液与上述一系列不同 pH 缓冲液混合 4℃放置 60 min 后,测定剩余酶活力。

### 1.6 ChiB 抑真菌及杀虫增效活性检测

**1.6.1 几丁质酶抑制真菌孢子萌发:**真菌孢子悬液通过 0.45 μm 孔径滤膜除去菌丝,调整孢子浓度为  $1 \times 10^6$  孢子/mL。将 100 μL 孢子溶液、100 μL 0.67 mg/mL 酶活力为 2.1 U/mL 的几丁质酶粗酶液加入 PDA 平板上的牛津杯中,对照组中加入蒸馏水,每个设两个重复。置 28℃培养 72 h 左右,观察菌丝生长情况。

**1.6.2 半抑制浓度测定:**试验方法与数据统计方法

参照文献[18]进行。

**1.6.3 几丁质酶杀虫增效测定** 将 Bt 15A3 的晶体蛋白冻干粉制备成 5 个不同浓度的悬液,分别混入感染饲料,注入 24 孔板,每孔涂布 20  $\mu\text{L}$  蛋白浓度为 0.2 mg/mL,酶活力为 0.63 U/mL 的 ChiB 粗酶,对照组涂布等量的生测缓冲液。待彻底干燥后分别接入供试初孵幼虫。其他均按标准生测方法进行<sup>[19]</sup>, 30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 72 h 后观察结果。

## 2 结果和分析

### 2.1 ChiB 的纯化及酶谱分析

将大肠杆菌表达的 Bt 几丁质酶粗蛋白,经过

Sephadex G-200 葡聚糖凝胶层析柱纯化,分离到多个蛋白峰。如图 1-A 所示。收集到第 25 号组份时开始检测出酶活性,第 37 号的酶活与蛋白含量均达到最高。随后酶活性逐渐降低。将酶活组分进行电泳检测,得到两条分子量分别为 70 kDa 和 64 kDa 的蛋白带,如图 1-B 所示。酶谱分析结果证明:70 kDa 蛋白具有酶活性,在紫外灯下显示特异水解带,而 64 kDa 蛋白没有检测到相应的特异酶活性带,见图 1-C。根据 *chiB* 基因的生物信息学推测其编码蛋白的分子量应为 70.6 kDa,由酶谱方法检测到酶活性的蛋白分子量与预测一致。

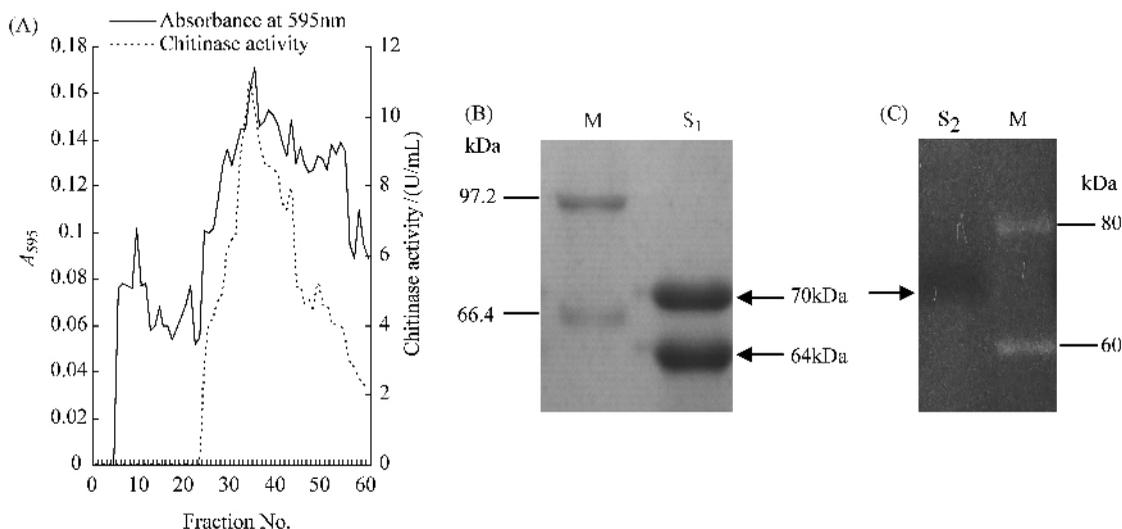


图 1 几丁质酶 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶层析和 SDS-PAGE 及酶谱分析

Fig. 1 Elution profiles of chitinase by Sephadex G-200 and SDS-PAGE of the gel filtration purified active fractions. A: Chromatography: "—" absorbance at 595 nm; "·····" chitinase activity; B: SDS-PAGE of purified chitinase. M: Marker; S<sub>1</sub>: purified chitinase B; C: zymogram analysis of purified enzyme. S<sub>2</sub>: active ChiB; M: Marker.

### 2.2 质谱鉴定

分子量为 70 kDa 的蛋白检测到 15 个内肽序列标签,同源性检索后评分最高的蛋白为 Bt 科默尔亚种几丁质酶。64 kDa 蛋白检测到 13 个内肽序列标签,检索评分在 90 分以上的均为 Bt 与蜡状芽胞杆菌几丁质酶,  $P < 0.00005$ 。因此确定 64 kDa 蛋白是

Bt 分子量为 70 kDa 的 ChiB 在大肠杆菌中被剪切的产物,酶谱分析实验中由于不能正常复性而失去酶活性。质谱结果显示剪切端位于 ChiB 蛋白的 C-端。

### 2.3 不同金属离子与 EDTA、SDS 对 ChiB 酶活性的影响

图 2 证明在实验的 10 种金属离子中  $\text{Fe}^{3+}$  对酶

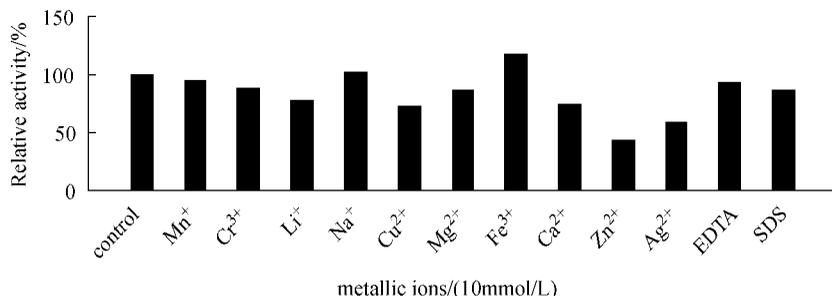


图 2 不同金属离子对 ChiB 酶活的影响

Fig. 2 Effect of the various substances on the relative activity of ChiB.

活性有促进作用,而  $Zn^{2+}$ 、 $Ag^+$  的抑制作用最强,  $Cu^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  也稍有抑制作用。EDTA 对酶活力影响不大,表明 ChiB 不需要金属离子维持其活性。SDS 对 ChiB 活性略有抑制但不是很明显。

### 2.4 几丁质酶的最适 pH 与 pH 稳定性

从图 3 曲线看,ChiB 在过酸或过碱的条件下不太稳定,最适 pH 是 5。在 pH 4~9 范围内,酶活性稳定。当 pH 9 时仍有 63% 的酶活力。

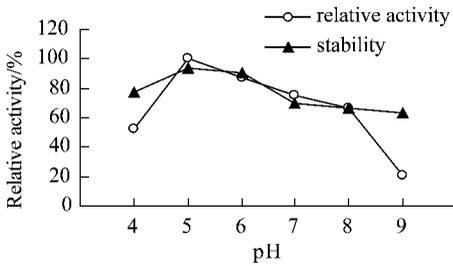


Fig.3 Effects of pH on the relative activity and stability of ChiB.

### 2.5 几丁质酶的最适温度与温度稳定性

ChiB 的最适作用温度为 60℃,20℃~60℃较为

稳定,虽然超过 60℃酶活力急剧下降,但 70℃保温 1 h 后 ChiB 仍保持 45% 的酶活力(图 4)。

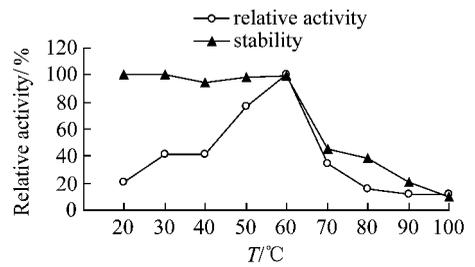


Fig.4 Effect of the temperature on the relative activity and stability of ChiB.

### 2.6 ChiB 抑制真菌孢子萌发

ChiB 抑制真菌孢子萌发效果如图 5 所示。ChiB 对测试的 4 种真菌孢子的萌发抑制达到 100%。4 块平板中的 1 号样品均为对照,孢子萌发后的菌丝生长很茂盛,而加入 ChiB 的 2 号样品没有菌丝生长现象。证明孢子不能正常萌发。

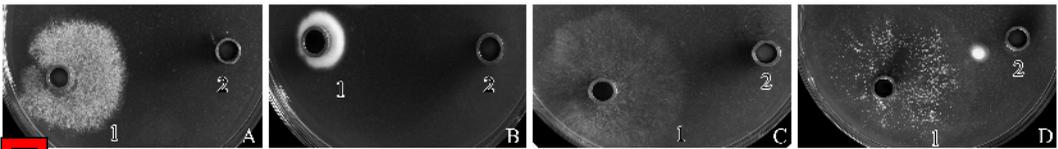


Fig.5 The antimicrobial action of Chitinase ChiB on four kinds of fungi spores. A: *Physalospora piricola*; B: *Penicillium glaucum*; C: *Rhizoctonia solani*; D: *Sclerotinia fucheliana*. 1: control; 2: ChiB + spores.

### 2.7 几丁质酶对真菌的半抑制浓度

几丁质酶对产黄青霉和黄瓜灰霉的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 4  $\mu\text{g/mL}$  左右,具体结果与统计分析见表 1。

表 1 ChiB 对产黄青霉和黄瓜灰霉孢子萌发的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ )

Table 1 The  $IC_{50}$  of ChiB on spore germination of *P. glaucum* and *S. fucheliana*

Fungus species	R	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	95% fiducial limits/ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>P. glaucum</i>	0.92	4.12	3.99 - 4.25
<i>S. fucheliana</i>	0.97	4.02	2.93 - 5.50

### 2.8 ChiB 对 Bt 的杀虫增效作用

ChiB 在与 Bt 15A3 晶体蛋白混合的甜菜叶蛾与

表 2 ChiB 与 Bt. 15A3 晶体蛋白协同对甜菜叶蛾和棉铃虫的生物活性测定

Table 2 Insecticidal activity of ChiB and crystal protein of Bt 15A3 for *S. exigua* and *H. armigera*

Insect species	Samples	$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	95% fiducial limits ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Spodoptera exigua</i>	Bt 15A3 crystal protein	18.77	14.53 - 23.04
	Bt 15A3 crystal protein + ChiB	13.72	3.46 - 18.81
<i>Helicoverpa armigera</i>	Bt 15A3 crystal protein	11.57	10.5 - 12.81
	Bt 15A3 crystal protein + ChiB	8.08	7.36 - 10.54

棉铃虫的生测实验中,表现出了明显的增效作用,添加 ChiB 的样品,可以使 Bt 15A3 晶体蛋白对甜菜叶蛾  $LC_{50}$  降低 26%,对棉铃虫  $LC_{50}$  降低 30%。详细结果及统计分析见表 2。

## 3 讨论

本文将在大肠杆菌中表达的 Bt 15A3 菌株的几丁质酶 ChiB 初步纯化,利用酶谱分析方法确定其分子量约为 70 kDa 左右。这一结果与依据该基因生物学信息学推测的成熟 ChiB 蛋白的分子量应为 70.6 kDa 的大小基本一致<sup>[12]</sup>。对纯化后样品电泳检测时,除 70 kDa 蛋白外还发现分子量大约为 64 kDa

的蛋白。这一分子量蛋白与本实验室在前期 *chiB* 基因克隆表达时检测到的蛋白分子量相同<sup>[12]</sup>, 当时推测是在 *E. coli* 中合成后又被剪切的 ChiB。本文经质谱鉴定结果证明了这一推测, 64 kDa 蛋白确为 70 kDa 蛋白 C 端剪切后的产物。由此我们认为, 64 kDa 蛋白由于缺少了 C 端的约 50 个左右的氨基酸, 而改变了酶蛋白的三维结构, 因此变性后丧失了复性的能力, 故酶谱法检测不到该分子量蛋白的酶活性。最近 Driss 等学者将 Bt 几丁质酶 Chi255 位于 C 端的结合域 Chitin binding domain (简称 CBD) 全部缺失<sup>[20]</sup>, 使该酶分子量由 70.6 kDa 变为 54 kDa 后仍具有酶活。因此推测本研究的 64 kDa 蛋白在 *E. coli* 细胞中是应该具有酶活性的。我们制备并纯化了 Bt 的几丁质酶, 电泳后未见 64 kDa 的蛋白带, 只检测到 70 kDa 的带(结果略)。国外文献也未见在 Bt 中有该剪切现象的相关报道。

酶谱分析技术由 Trudel 等<sup>[21]</sup>建立, 它是基于乙二醇几丁质在凝胶中不随电泳迁移并且能被几丁质酶降解的原理, 既特异又准确。目前这一技术已被国外学者广泛用于确定多种生物几丁质酶的分子量。

对 Bt ChiB 的理化性质研究表明其具有良好的酸碱适应性。ChiB 在 pH 7 ~ 9 时仍保持了 60% ~ 70% 的酶活力。昆虫中肠的 pH 一般在 8 ~ 10 范围内, 属于碱性环境, 此环境中 ChiB 仍然保持较高的酶活力, 这就为几丁质酶的杀虫增效作用提供了科学依据。

Bt 是重要的杀虫微生物, 其主要的杀虫活性来自伴孢晶体蛋白。但已证明其培养液中存在多种增效物质, 如营养期杀虫蛋白、Zwittermicin 和几丁质酶, 前两种物质已有深入研究, 而 Bt 几丁质酶的酶学特性及直接证明该酶的杀虫抑真菌活性, 本研究在国内尚属首次。

## 参考文献

[ 1 ] Shaun MB, Stephen JF, The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 2006, 26 : 799 - 808.

[ 2 ] Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, et al. Expression of chitinase-encoding gene in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Current Microbiology*, 2004, 48 : 175 - 181.

[ 3 ] Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, et al. Improving the insecticidal activity of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* against *spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65 : 183 - 192.

[ 4 ] 丁学知, 罗朝晖, 夏立秋, 等. 苏云金芽孢杆菌 *cry1Ac* 与烟草几丁质酶 *tchiB* 双价基因克隆表达及其杀虫增效作用研究. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(6): 1002 - 1008.

[ 5 ] Mark NS, Graham WG. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 1998, 144(8): 2189 - 2194.

[ 6 ] Wiwat C, Thaihanun S, Pantuwatana S, et al, Toxicity of Chitinase-Producing *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1(G) toward *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76 : 270 - 277.

[ 7 ] Sampson MN, Gooday GW, Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 1998, 144 : 2189 - 2194.

[ 8 ] Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, et al. A constitutively expressed 36kDa exochitinase from *B. thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 307 : 620 - 625.

[ 9 ] Moar WJ, Antifungal *Bacillus thuringiensis* Strain US 6280722, 2001 - 8 - 28.

[ 10 ] 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.

[ 11 ] de la Vega LM, Barboza-Corona JE, Aguilar-Uscanga MG, et al. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52 : 651 - 657.

[ 12 ] 陈艳玲, 卢伟, 陈月华, 等. 苏云金芽孢杆菌 *chiA*, *chiB* 全基因的克隆、表达及其序列分析. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(5): 169 - 174.

[ 13 ] Chen CT, Huang CJ, Wang YH, et al. Two-step purification of *Bacillus thuringiensis* chitinase A1 expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Protein expression and purification*, 2004, 37 : 27 - 31.

[ 14 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 : 248 - 254.

[ 15 ] Joshi S, Kozlowski M, Richens S. et al. Chitinase and chitinase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989, 11 : 289 - 296.

[ 16 ] Sugai M, Akiyama T, Komatsuzawa H, et al. Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*,

- [ 17 ] Yang W , Liu P , Liu YS , et al. Proteomic analysis of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Proteomics* , 2006 , 6 ( 10 ) : 2982 - 2990.
- [ 18 ] 谈满良 , 周立刚 , 汪冶 , 等. 蓝桉果实抗稻瘟菌成分的分离及其活性. *植物病理学报( Acta Phytopathologica Sinica )* , 2007 , 37 ( 5 ) : 535 - 540.
- [ 19 ] 钟连胜 , 谢天健 , 吴继星 , 等. 棉铃虫作供试虫的苏云金杆菌制剂毒力生物测定的研究. *生物防治通报* ( *Chinese journal of biological control* ) , 1990 , 6 : 1 - 5.
- [ 20 ] Driss F , Baanannou A , Rouis S , et al. Effect of the chitin binding domain deletion from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* chitinase Chi255 on its stability in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology* , 2007 , 36 ( 3 ) : 232 - 237.
- [ 21 ] Trudel J , Asselin A , Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* , 1990 , 189 ( 2 ) : 249 - 253.

## Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* and its antagonism and insecticidal enhancing potential

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

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

**Abstract** : [ **Objective** ] We studied the characteristics of chitinase B ( ChiB ) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3 ( Bt 15A3 ) and evaluated its antagonism and insecticidal potential. [ **Methods** ] ChiB was expressed in *Escherichia coli*. Expression product was purified by ammonium sulfate precipitation , dialysis and Sephadex G-200 gel filtration chromatography. The molecular mass of ChiB was directly estimated by zymogram after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ( SDS-PAGE ). The proteins with different molecular weight were identified by mass spectrum ( MS ) and analyzed through bioinformatics. We studied some metal ions ' impacts on chitinase activity ; optimal temperature , pH and its stability at different temperature and pH. We also studied the inhibition effects on sporangia germination of fungi and the synergistic effects of ChiB on larvicidal activity. [ **Results** ] The molecular mass of ChiB was estimated as 70 kDa by zymogram. The protein with 64 kDa was the product of C-terminal degradation of ChiB in *E. coli*. Chitinase activity was improved by  $Fe^{3+}$  and inhibited by  $Zn^{2+}$  and  $Ag^{2+}$ . The optimal temperature for ChiB was 60°C and the optimal pH was 5.0. The enzyme was quite stable at temperature below 60°C and pH between 4.0 and 8.0. ChiB inhibited sporangia germination and the  $IC_{50}$  ( 50% inhibited concentration ) was about 4  $\mu g/mL$ . Moreover , the bioassays showed that ChiB could reduce the  $LC_{50}$  ( 50% lethal concentration ) of the crystal protein of Bt. against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera* larvae by approximately 26% and 30% . [ **Conclusion** ] ChiB was not only stable , but also with good antagonism and insecticidal activity.

**Keywords** : *Bacillus thuringiensis* ; ChiB ; characterization ; antagonism ; insecticidal enhancing

( 本文责编 : 王晋芳 )