

水稻内生枯草芽孢杆菌 G87 抗菌蛋白的分离纯化及理化特性

陈夕军, 李娟, 孙启利, 童蕴慧, 徐敬友*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州 225009)

摘要:【目的】为得到枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) G87 的抗菌蛋白, 明确其蛋白理化特性。【方法】采用硫酸铵沉淀和柱层析法进行分离纯化。【结果】获得单一抗菌活性蛋白(峰 6-2-1), 此抗菌蛋白分子量为 50.8 kDa, 等电点为 5.90。经初步分析, 抗菌蛋白不含脂, 而含有少量(0.62%)糖; 其蛋白部分具有脯氨酸或羟脯氨酸, 但不含芳香族氨基酸。抗菌蛋白在高温($\geq 60^{\circ}\text{C}$)和较碱($\text{pH} > 8$)环境下活性明显下降, 但较抗紫外线、氯仿和胰蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶。【结论】枯草芽孢杆菌 G87 的抗菌蛋白为不含芳烃的糖蛋白, 对高温和碱性条件敏感, 而对蛋白酶类和紫外线等不敏感。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 抗菌蛋白; 分离纯化; 理化特性; 水稻内生细菌

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1353-05

芽孢杆菌对许多植物病原物有较强的拮抗作用, 因而是一类重要的植物病害生防细菌。一些研究表明, 芽孢杆菌能分泌许多抗菌物质特别是抗菌蛋白, 如多肽、脂蛋白、糖蛋白等^[1–13]。研究这些抗菌蛋白, 一方面可以探明生防菌的防病机制, 并为克隆抗菌蛋白基因及构建转基因工程菌打下基础; 另一方面能够研制以抗菌蛋白为主成分的生物农药, 为植物病害防治寻找新的途径。本实验室曾分离获得具有较高拮抗活性的水稻内生枯草芽孢杆菌 G87 菌株^[14], 该菌株及其培养滤液对稻瘟病菌和稻恶苗病菌的菌丝生长、分生孢子形成与萌发有显著的抑制作用^[15]。因此, 作者在此基础上, 进一步分离、纯化了该菌株分泌的抗菌蛋白, 并对其部分理化特性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)

G87: 自水稻根内分离获得的拮抗细菌^[14], 由本实验室提供。稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*): 作为指示菌用于 G87 抗菌蛋白的抑菌活性测定, 由本实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和过硫酸铵购自北京鼎国生物技术有限责任公司, DEAE Cellulose DE52 (Whatman 公司分装)、Sephadex G-75 和 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia 公司原装) 购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 上海康华生化仪器制造厂 HD 21C-A 核酸蛋白检测仪, 美国 BIO-RAD 公司 041BR 电泳装置。

1.2 粗蛋白提取方法

参照纪兆林等^[13]方法。分别向拮抗细菌培养滤液中加入固体硫酸铵, 使之达到 50、60、70 和 80% 不同饱和度。静置过夜后, 4°C 下 $8500 \times g$ 离心 10 min, 去上清, 沉淀悬浮于原体积 1/10 的 Tris-HCl 缓冲液后装入透析袋(截留分子量为 8.0 kDa), 4°C

基金项目: 国家自然科学基金(30571243)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979313; E-mail: jyxu@yzu.edu.cn

作者简介: 陈夕军(1974–), 男, 江苏阜宁人, 讲师, 在职博士研究生, 主要从事水稻病害与生物防治研究。Tel: +86-514-87979375; E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-30; **修回日期:** 2010-05-07

下透析 48 h (每 8 h 更换一次透析外液)。透析液经滤器过滤后称为粗蛋白。

1.3 抗菌蛋白纯化方法

1.3.1 DE52 离子交换层析: DE52 (Whatman 公司产品) 离子交换柱 (30 cm × 1.7 cm) 用 0.5 mol/L NaOH 清洗后, 以 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 平衡。取 2 mL 粗蛋白上样后, 先用 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 充分淋洗, 后以总体积 500 mL 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 和含有 1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 进行梯度洗脱, 流速为 1.5 mL/min, 收集洗脱蛋白峰。蛋白峰液经 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 透析后, 冷冻干燥, 并测定其抑菌活性。

1.3.2 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析: 用含 1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 平衡 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia 公司产品) 疏水层析柱 (40 cm × 1.7 cm)。取 2 mL 经离子交换层析后的抗菌蛋白上样, 先用含 1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 充分淋洗后, 再用总体积 100 mL 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 和含 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集洗脱蛋白峰。如 1.3.1 所述, 蛋白峰液经透析和冷冻干燥后, 测定其抑菌活性。

1.3.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析: 以 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 平衡 Sephadex G-75 (Pharmacia 公司产品) 凝胶层析柱 (60 cm × 1.7 cm)。取 2 mL 经疏水层析后的抗菌蛋白上样, 用同样的缓冲液洗脱, 流速为 0.3 mL/min。收集洗脱蛋白峰。同 1.3.1, 蛋白峰液经透析和冷冻干燥后, 测定其抑菌活性。最后经凝胶层析并具抑菌活性的蛋白峰液称为精蛋白。

1.4 抗菌蛋白抑菌活性测定

以抑菌圈法^[3]测定抗菌蛋白抑菌活性。移接病菌菌丝块至 PSA 平板中央, 25℃ 下培养。待菌落长至 $\phi 1.5$ cm 时, 用打孔器距中心 3.0 cm 处对称打 4 个孔, 去除孔内培养基。每孔加入 50 μL 抗菌蛋白, 置 25℃ 下培养 3 d, 观察抑菌效果。以加灭菌后的 Tris-HCl 作对照。

1.5 抗菌蛋白理化性质测定

1.5.1 分子量测定: 通过 SDS-PAGE^[16] 测定精蛋白分子量。分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 3%。开始时电流为 10 mA/板, 待样品进入分离胶后, 改为 25 mA/板。以考马斯亮蓝 R250 染色。绘制标准蛋

白 (Phomega 公司产品) 分子量对数与相对迁移率标准曲线, 计算出抗菌蛋白分子量。

1.5.2 等电点测定: 以 IEF-PAGE^[17] 测定精蛋白等电点。阴极加 1 mol/L NaOH 缓冲液, 阳极加 1 mol/L H_3PO_4 缓冲液, 电压为 160 V。绘制凝胶柱长度与 pH 值标准曲线。根据蛋白谱带距离, 计算出抗菌蛋白等电点。

1.5.3 组成分析: 用蒽酮反应^[18] 确定精蛋白中是否含糖, 并以苯酚-硫酸法^[19] 测定含糖量。以油红-O 显色反应^[20] 测定精蛋白中是否含脂。通过茚三酮反应^[21] 测定精蛋白是否含有不具 α -氨基的脯氨酸或羟脯氨酸。经硝酸反应^[18] 测定精蛋白是否含有芳香族氨基酸。

1.5.4 稳定性测定: 参照纪兆林等^[13] 方法。用 40、60、80、100℃ 水浴和 121℃ 蒸汽处理精蛋白 20 min; 将精蛋白液调至不同 pH 值; 以紫外线照射 (20w, 距离 40 cm) 精蛋白 12 h; 将精蛋白液与等量氯仿混合振荡 1 h; 在精蛋白液中分别加入胰蛋白酶、蛋白酶 K 和胃蛋白酶 (浓度为 1 g/L), 37℃ 水浴 1h。以上处理后, 分别测定其抑菌活性。

2 结果和分析

2.1 不同饱和度硫酸铵的盐析效果

G87 菌株培养滤液经不同饱和度硫酸铵盐析后抑菌效果差异较大。当以 60% 硫酸铵盐析时, 沉淀的抑菌活性与培养滤液 (对照) 相近, 且上清无抑菌作用, 这表明该饱和度硫酸铵可使抗菌蛋白完全沉淀 (图 1)。

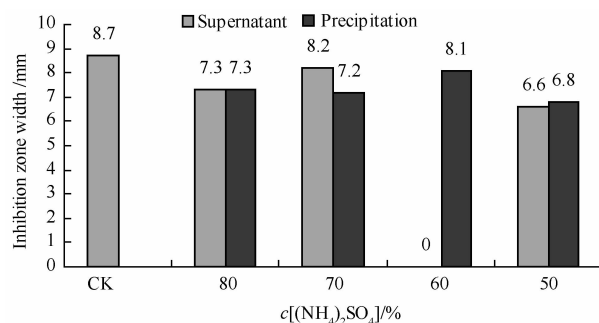


图 1 不同饱和度硫酸铵对抗菌蛋白的盐析效果

Fig. 1 The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at various saturation precipitating the antifungal protein

2.2 抗菌蛋白的纯化

2.2.1 DE52 离子交换层析结果: 将 60% 硫酸铵沉淀和透析后获得的粗蛋白经 DE52 离子交换层析后, 出现 7 个洗脱峰 (图 2), 其中峰 6 蛋白浓度和抑菌活性最大。

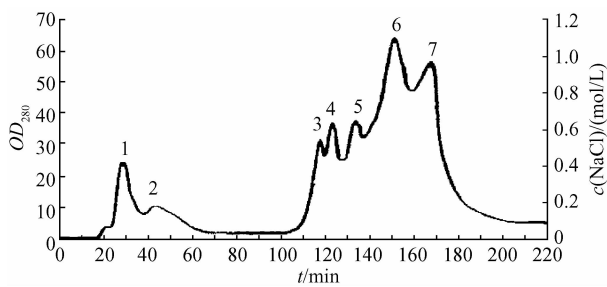


图2 粗蛋白经 DE52 离子交换层析结果

Fig.2 Elution profile of the crude protein by DE52 ion exchange chromatography

2.2.2 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析结果: DE52 离子交换层析后获得的蛋白峰 6 经 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析,出现 2 个洗脱峰(图 3),其中峰 6-2 抑菌活性较大,且蛋白浓度也高。

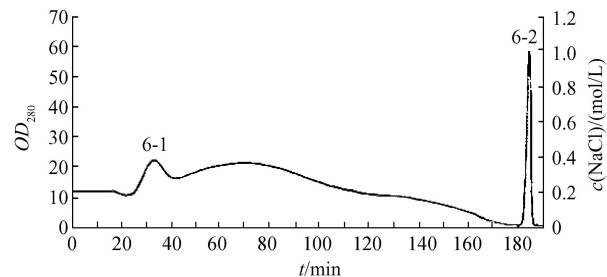


图3 峰 6 经 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析结果

Fig.3 Elution profile of protein peak 6 by Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow affinity chromatography

2.2.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析结果:将疏水层析得到的蛋白峰 6-2 经 SephadexG-75 凝胶过滤层析,出现 3 个洗脱峰(图 4),其中只有峰 6-2-1 具有抑菌活性,且蛋白含量最大。因此,峰 6-2-1 收集液透析后称为精蛋白。

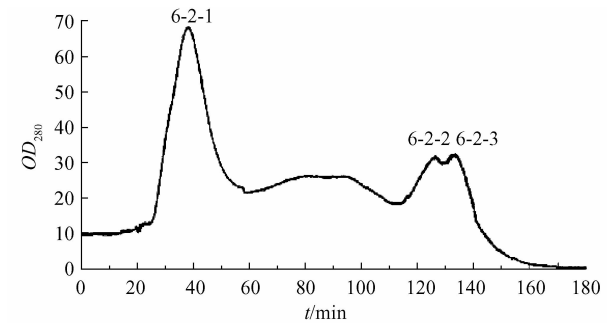


图4 峰 6-2 经 Sephadex G-75 凝胶过滤层析结果

Fig.4 Elution profile of protein peak 6-2 by SephadexG-75 gel filtration chromatography

2.3 抗菌蛋白的分子量与等电点

经凝胶层析后的精蛋白(峰 6-2-1)通过 SDS-

PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色后,只有一条带(图 5)。依据标准蛋白分子量对数与相对迁移率标准曲线($Y = -0.0235X + 5.0463$, Y 为分子量对数, X 为相对迁移率, $R^2 = 0.9823$),计算出抗菌蛋白分子量为 50.8 kDa。

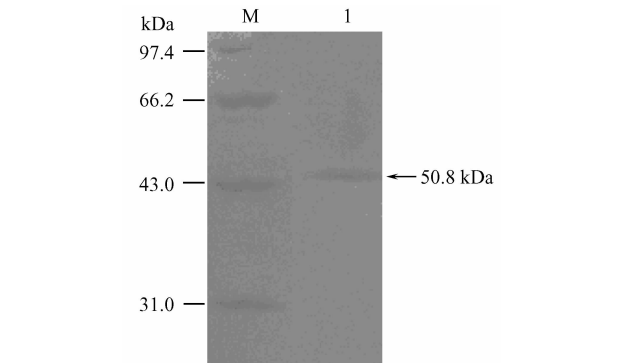


图5 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 SDS-PAGE spectrum of the antifungal protein. M. Marker; 1. Purified protein

IEF-PAGE 结果显示,精蛋白呈现一条清晰的谱带(图 6)。根据蛋白谱带距离和 pH 标准曲线($Y = 1.0111X + 11.218$, Y 为 pH 值, X 为凝胶柱长度 cm, $R^2 = 0.9256$),计算出抗菌蛋白等电点为 5.90。

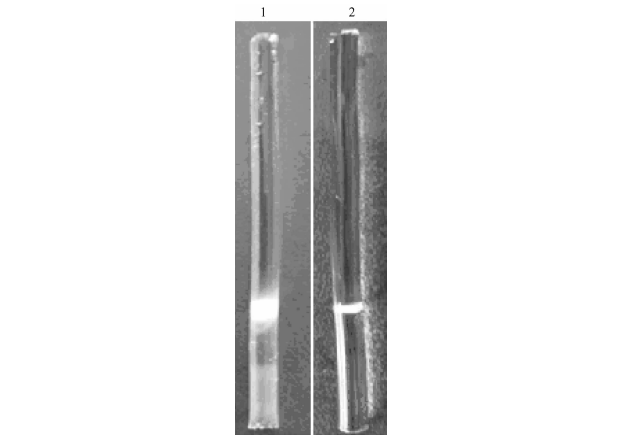


图6 抗菌蛋白 IEF-PAGE 图谱

Fig.6 IEF-PAGE spectrum of the antifungal protein. 1: Crude protein; 2: Purified protein

2.4 抗菌蛋白的组成分析

经蒽酮反应,精蛋白液和葡萄糖液均变成蓝绿色,而对照蒸馏水则颜色不变,说明抗菌蛋白为糖蛋白。通过苯酚-硫酸法测定,精蛋白中含糖量为 0.62%。

以油红-O 染色后,精蛋白点样处颜色不变,而对照脂蛋白呈鲜红色,表明抗菌蛋白不含脂类物质。经茚三酮反应,精蛋白液呈黄色,而不变成蓝色,说明抗菌蛋白中具有不含 α -氨基的脯氨酸或羟

脯氨酸。通过硝酸反应,精蛋白液不变色,而对照苯酚液呈黄色,表明抗菌蛋白中不含芳香族氨基酸。

2.5 抗菌蛋白的稳定性

经不同高温处理后,抗菌蛋白的抑菌活性呈下降趋势,尤其处理温度 $\geq 60^{\circ}\text{C}$ 后,其抑菌活性仅为对照(20°C)的60%左右(图7-A),这说明高温对蛋白活性有较大影响。

在pH5-11范围内,抗菌蛋白均有抑菌活性。当pH6时,其抑菌活性最强;pH>8时,活性显著下降;pH12时,蛋白完全丧失抑菌能力(图7-B)。这表明该蛋白在较碱条件下不够稳定。

另外,分别经紫外线照射、氯仿和胰蛋白酶、蛋白酶K、胃蛋白酶处理后,抗菌蛋白的抑菌活性稍有下降(>90%),但与对照无显著差异,这显示该蛋白对紫外线、氯仿和上述3种蛋白酶均有较强抗性。

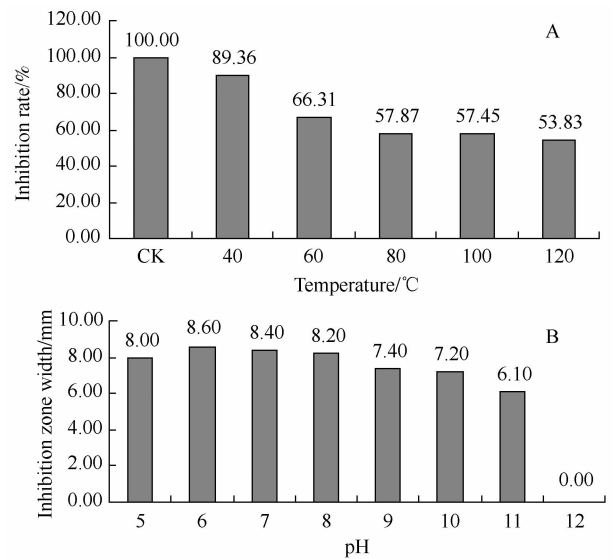


图7 抗菌蛋白经不同高温处理后(A)和在不同pH下(B)的抑菌活性

Fig.7 Inhibition ability of the antifungal protein after treated at higher temperature (A) and in the condition of various pH values (B)

3 讨论

许多报道指出,枯草芽孢杆菌能够分泌多种抗菌蛋白抑制植物病原真菌和细菌的生长与繁殖,从而用于植物病害的防治^[1-9]。本研究将水稻内生枯草芽孢杆菌G87培养滤液经60%硫酸铵沉淀、透析和连续3次层析(DE52离子交换层析、Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow疏水层析和SephadexG-75凝胶过滤层析)后,获得纯化的抗菌蛋白(峰6-2-1)。该抗菌蛋白分子量为50.8 kDa,等电点为5.90;不含脂,而含有少量糖,因此是糖蛋白;具有脯氨酸或

羟脯氨酸,但不含芳香族氨基酸。该蛋白的N-端氨基酸序列以及糖基作用尚在研究中。

本研究表明,枯草芽孢杆菌G87产生的抗菌蛋白在高温($\geq 60^{\circ}\text{C}$)和较碱环境下抗菌活性明显降低,但较抗紫外线、氯仿和胰蛋白酶、蛋白酶K、胃蛋白酶。Wu等^[7]指出,枯草芽孢杆菌JM4两个抗菌多肽抑菌谱宽,耐热性强。Zhang等^[8]报道,枯草芽孢杆菌B-FS抗菌蛋白热稳定好,对pH不敏感。谢栋等^[1]分离获得的枯草芽孢杆菌抗菌蛋白X98Ⅲ是一种含脂的糖蛋白,其对热稳定,但对部分蛋白酶敏感。纪兆林等^[13]研究表明,地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)W10抗菌蛋白是一种糖蛋白,对热稳定,对紫外线、氯仿和部分蛋白酶均不敏感。由此可见,芽孢杆菌不同种类、不同菌株产生的抗菌蛋白差异较大,其抑菌作用及其他特性也不一样。通过研究这些抗菌蛋白的分离纯化技术与理化性质,不仅可为研制以抗菌蛋白为主成分的新型生物农药提供条件,而且可为进一步探明这类生防菌的分子遗传机制奠定基础。

参考文献

[1] 谢栋,彭憬,王津红,胡剑,王岳五. 枯草芽孢杆菌蛋白X98Ⅲ的纯化与性质. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1998, 38(1): 13-19.

[2] 童有仁,马志超,陈卫良,李德葆. 枯草芽孢杆菌B034拮抗蛋白的分离纯化及特性分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39(4): 339-342.

[3] 谌晓曦,陈卫良,马志超,阮红,李德葆. 抗水稻纹枯病菌拮抗蛋白质的理化性质研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版)[*Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*], 1999, 25(5): 491-494.

[4] 刘颖,徐庆,陈章良. 抗真菌多肽LP-1的分离纯化与特性分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, (39): 441-447.

[5] 高学文,姚仕义, Huong Pham, Joachim Vater; 王金生. 枯草芽孢杆菌B2菌株产生的抑菌活性物质分析. 中国生物防治(*Chinese Journal of Biological Control*), 2003, 19(4): 175-179.

[6] 刘永峰,陈志谊,张杰,刘卹洲,周明国. 枯草芽孢杆菌B-916胞外抗菌蛋白质的性质. 江苏农业学报(*Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*), 2005, 21(4): 288-293.

[7] Wu S, Jia S, Sun D, Chen ML, Chen XZ, Zhong J, Huan LD. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Current Microbiology*, 2005, 51: 292-296.

- [8] Zhang T, Shi ZQ, Hu LB, Cheng LG, Wang F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 2008 (24): 783-788.
- [9] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 2003, 33 (2): 97-103.
- [10] 裴炎, 李先碧, 彭红卫, 陈祥贵, 刘建国. 抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1999, 39 (4): 344-349.
- [11] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. Antimicrobiol activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 181-187.
- [12] Kavitha S, Senthilkumar S, Gnanamanickam S, Inayathullah M, Jayakumar R. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process of Biochemistry*, 2005, 40:3236-3243.
- [13] 纪兆林, 唐丽娟, 张清霞, 徐敬友, 陈夕军, 童蕴慧. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白的分离纯化及其理化性质研究. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 2007, 37 (3): 260-264.
- [14] 朱凤, 陈夕军, 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友. 水稻内生细菌的分离及其拮抗性与其潜在致病性测定. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2007, 23 (1): 68-72.
- [15] 陈夕军, 胡长松, 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友. 水稻内生枯草芽孢杆菌对稻瘟病菌和稻恶苗病菌的抑制作用. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2008, 24 (4): 339-344.
- [16] 厉朝龙. 生物化学与分子生物学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, 2000.
- [17] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] 李如亮. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.
- [19] Dubis M, Gilles KA, Hamiltion JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28 (3): 350-356.
- [20] 沈黎明. 基础生物化学. 北京: 中国林业出版社, 1996.
- [21] 徐秀兰. 生物化学实验与指导. 北京: 中国医药科技出版社, 1994.

Isolation, purification and characterization of antifungal protein from rice endophytic bacterim *Bacillus subtilis* G87

Xijun Chen, Juan Li, Qili Sun, Yunhui Tong, Jingyou Xu *

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [**Objective**] In order to obtain the antagonistic protein of *Bacillus subtilis* G87 and definitude its characterization. [**Methods**] Methods of ammonium sulfate precipitating and column chromatography analyzing were used to isolate and purify the protein. [**Results**] A purified protein (peak 6-2-1) was obtained which molecular weight was 50.8 kD by SDS-PAGE and isoelectric point was 5.90 by IEF-PAGE. The antifungal protein contained 0.62% saccharide and some proline or hydroxyproline, but no lipid and aromatic amino acid. The inhibitory activity of the antifungal protein would decreased distinctly at the higher temperature ($\geq 60^{\circ}\text{C}$) and in the condition of alkalinity ($\text{pH} > 8$), but tolerant to ultraviolet radiation, chloroform, trypsin, proteinase K and pepsin. [**Conclusion**] Antifungal protein of *Bacillus subtilis* G87 was a kind of glycoprotein without aromatic hydrocarbon. It was sensitive to higher temperature and tight alkalinity but not to proteinase analog and ultraviolet radiation *et al.*

Keywords: *Bacillus subtilis*; antifungal protein; isolation and purification; characteristics; rice endophytic bacterium

(本文责编:王晋芳)