

新型抑菌蛋白 APn5 抑制胡萝卜软腐欧文氏菌

韩冬梅, 班慧芳, 余子全, 喻子牛, 孙明*

(华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 【目的】魔芋软腐病是一种由胡萝卜软腐欧文氏菌引起的病害, 严重影响了魔芋产业的发展。枯草芽胞杆菌 BSn5 所产生的蛋白 APn5 对胡萝卜欧文氏菌具有良好的抑菌效果, 本文将对该蛋白进行鉴定和性质分析。【方法】用饱和度为 30% 的硫酸铵沉淀和超滤离心的方法从枯草芽胞杆菌 BSn5 的发酵上清液中分离纯化 APn5 蛋白。以滤纸片法检测 APn5 蛋白的抑菌谱。用不同的温度、pH 条件和蛋白酶处理 APn5 蛋白, 并检测其抑菌活性变化。测定菌株 BSn5 的生长周期, 同步检测其发酵上清液的抑菌活性。利用基质协助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾四极杆飞行时间串联质谱(Q-TOF)分析 APn5 蛋白。【结果】APn5 蛋白对于魔芋软腐病菌具有较好的抑菌活性, 抑菌谱较窄, 主要对细菌性植物病原菌具有较强的抑制作用; 对高温敏感, 对蛋白酶 E 敏感, 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶部分敏感; 在酸性环境下其抑菌活性稳定, 碱性环境下活性不稳定。在菌株 BSn5 的生长周期中, 该蛋白的抑菌活性不能稳定存在, 其发酵上清液在对数生长期抑菌活性逐渐升高, 进入稳定期后抑菌活性开始下降, 直至完全消失。质谱分析未发现其与已知蛋白具有高度相关性。【结论】APn5 蛋白具有不同于已报道的枯草芽胞杆菌所产生的抑菌物质的性质, 推测为一种新型的抑菌蛋白。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 抑菌蛋白; 抑菌谱; 性质鉴定

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 09-1192-06

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种在自然界中广泛存在的非致病菌, 也是常见的植物内生菌, 可以定殖在植物的各个器官^[1]。枯草芽胞杆菌具有发达的分泌系统和较强的环境适应性、抗逆性, 能够产生多种具有抗菌生物活性的代谢产物, 对多种病原菌具有拮抗性能, 在农业生产、医药领域具有广泛的应用^[2]。枯草芽胞杆菌产生的抗菌物质主要分为两大类, 一类是低分子量抗菌肽和少量蛋白类抑菌物质, 抗菌肽主要包括环状肽或环状脂肽, 也有些为线状肽, 如表面活性素(Surfacin)、伊枯草菌素(Iturins)和 Fengycins 等, 分子量约 1000 Da (介于 300 Da-3000 Da), 能耐受高温, 对 pH 变化不敏感, 抗蛋白酶, 这

一大类占枯草芽胞杆菌抑菌物质的绝大部分; 另一类主要包括聚酮类、氨基糖类以及脂肽类等抗生素^[3-6]。目前, 对枯草芽胞杆菌所产生的低分子量抗菌肽类物质的作用机制、自身免疫机制、合成途径以及基因克隆等方面已有较为深入的研究^[7, 8], 但对分子量较大的蛋白类抑菌物质的报道较少, 国内外对该类抑菌物质的研究多集中在活性鉴定、理化性质研究等方面^[9-16]。例如 Hou 等从油菜菌核病菌(*sclerotinia sclerotiorum*)菌核伴生的枯草芽胞杆菌中分离出来一种大小为 20 kDa 的蛋白, 对真菌具有抑菌活性^[9]; Liu 等从枯草芽胞杆菌 B-916 中分离出来的对真菌具有较强抑菌活性的蛋白 Bacisubin, 大小为 41.9 kDa,

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA02Z174)

*通讯作者。Tel: +86-27-87283455; Fax: +86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 韩冬梅(1983-), 女, 天津市人, 硕士研究生, 主要从事芽胞杆菌分子生物学研究工作。E-mail: hdm00@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2008-02-29; 修回日期: 2008-04-22

具有一定耐热性,对蛋白酶敏感,具有较宽的 pH 适应范围, MALDI-TOF-MS 和 Q-TOF 测序发现该蛋白与草酸盐脱羧酶具有显著相关性^[10];谌晓曦等用 20% 饱和度的硫酸铵对多种植物病原真菌具有较强拮抗作用的枯草芽胞杆菌 A30 中分离出分子量大于 30 kDa 的拮抗蛋白,该蛋白抗酸、抗碱、抗热以及抗蛋白酶^[11]。除上述外,已分离到的分子量较大的蛋白类抑菌物质,大部分表现出耐热性、对酸碱环境不同的适应性以及对蛋白酶的敏感性,这些性质与低分子量的抑菌肽类有所不同^[12-16]。

枯草芽胞杆菌 BSn5 分离自在组织培养过程中被细菌感染的花魔芋愈伤组织,经检测对能够引起魔芋软腐病的胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 具有抑菌作用,并从中分离纯化出一种大小约为 31.6 kDa 的抑菌蛋白,命名为 APn5^[17]。在以上研究的基础上,本研究对枯草芽胞杆菌 BSn5 和蛋白 APn5 进行了更深入的鉴定和性质研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:枯草芽胞杆菌菌株 BSn5,本研究室分离自魔芋(*Amorphophallus konjac*)愈伤组织。病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)SCG1、茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、水稻细条病菌(*Xanthomonas campestris* pv *oryzicola*)、草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)、杓兰欧文氏菌(*Erwinia crypripedii*)、青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)以及带化红球菌(*Rhodococcus fascians*)由本研究室保存。番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)以及玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)由华中农业大学植物科学与技术学院李国庆教授提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:蛋白胨、酵母粉、NaCl、(NH₄)₂SO₄、琼脂粉、PDA 培养基、聚丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠等生化试剂均购自武汉天源生物技术有限公司。超滤管购自 millipore 公司。离心机型号为 5415D,购自 Eppendorf 公司;恒温摇床型号为 HQL150C,购自中国科学院武汉科学仪器厂;生化培养箱型号为 LRH-250A,购自广东省医疗器械厂;光学显微镜为 Olympus Microscope。

1.2 培养基与培养条件

细菌培养使用 LB(Luria-Bertani)培养基^[17]。真菌

培养使用 PDA(Potato Dextrose Agar)培养基(BD Difco)。各种细菌、真菌培养条件均为 28℃。

1.3 抑菌蛋白 APn5 的提取与截留纯化

接种枯草芽胞杆菌 BSn5 于 LB 培养液中,28℃ 培养 20 h,以 13000 × g 离心 10 min,弃沉淀收集培养液上清。按照 164 g/L 的浓度缓慢加入(NH₄)₂SO₄,并不断振荡最终使(NH₄)₂SO₄ 饱和度达到 30%。静置 2 h 以上,以 13000 × g 于 4℃ 离心 20 min,弃上清,用适量的去离子水溶解沉淀,移至透析袋(截留分子量为 8~10 kDa),于去离子水中 4℃ 透析 48 h,用聚乙二醇 10000 (PEG10000)粉末铺在透析袋表面进行浓缩处理,最终获得 APn5 蛋白提取液。用 SDS-PAGE 检测蛋白提取液,Bradford 法测定 APn5 蛋白提取液浓度。

分别用 5 kDa、10 kDa 和 30 kDa 截留量的超滤管 4000 × g 离心 20 min 过滤 APn5 蛋白提取液,去除小分子物质,收集滤出液和管内液,并分别检测其对胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 的抑菌活性。

1.4 抑菌蛋白 APn5 抑菌谱检测

APn5 蛋白的抑菌活性检测采用滤纸片法。对于细菌性植物病原菌,将约 10⁹ cfu/mL(colony forming unit, cfu)的病原菌悬液 0.2 mL 加入无菌培养皿中,倒入已冷却至 40℃ 左右的 LB 固体培养基,充分摇匀,制成混菌平板。在平板上放置直径为 8 mm 的无菌滤纸片,将 100 μg APn5 蛋白少量多次点加在滤纸片上,28℃ 过夜培养,观察形成抑菌圈的情况。对于真菌性病原菌,在 PDA 培养基上培养病原真菌,待长出新鲜菌落后,用打孔器制成直径约为 8 mm 的菌丝块,移至 PDA 平板中央,待菌丝生长后,在距离菌丝边缘 1.5 cm 处放置无菌滤纸片,按上述方法点加 100 μg APn5 蛋白和 5 μL 过夜活化的 BSn5 菌液,28℃ 过夜培养。

1.5 抑菌蛋白 APn5 的性质

1.5.1 抑菌蛋白 APn5 热稳定性检测:各取抑菌蛋白 APn5 100 μg,分别置于 20、40、60、80、100 和 120℃ 处理 30 min,然后以胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 作为指示菌检测抑菌活性。该实验重复 3 次,测定形成抑菌圈的平均直径。

1.5.2 抑菌蛋白 APn5 对蛋白酶敏感性检测:各取抑菌蛋白 APn5 100 μg,分别加入胰蛋白酶(终浓度为:1 mg/mL)、蛋白酶 K(终浓度为:50 μg/mL)和蛋白酶 E(终浓度为:1 mg/mL),37℃ 温浴 1 h 充分酶解,然

后以胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 作为指示菌检测抑菌活性。该实验重复 3 次,测定形成抑菌圈的平均直径。

1.5.3 酸碱对 APn5 蛋白抑菌活性影响检测:各取抑菌蛋白 APn5 100 μg ,调整其溶液 pH 分别至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12,4 放置过夜,将 pH 值调整至初始值,以胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 作为指示菌检测抑菌活性。该实验重复 3 次,测定形成抑菌圈的平均直径。

1.6 枯草芽胞杆菌 BSn5 抑菌活性与生长状态的关系检测

绘制枯草芽胞杆菌 BSn5 生长曲线^[18],同步每隔 2 h 取发酵液上清 200 μL ,分别以胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 作为指示菌检测抑菌活性。该实验重复 3 次,测定形成抑菌圈的平均直径。

1.7 抑菌蛋白 APn5 的质谱分析与氨基酸序列测定

将纯化后的 APn5 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,胶上原位酶切(胰蛋白酶)APn5 蛋白后进行基质协助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾四极杆飞行时间串联质谱(Q-TOF)分析(由中国军事医学科学院生物医学分析中心测定)。将质谱分析结果在 Matrix Science 数据库(<http://www.matrixscience.com>)中进行鉴定。

2 结果

2.1 抑菌蛋白 APn5 的截留纯化

以饱和度为 30% 的硫酸铵溶液提取出的蛋白提取液经 SDS-PAGE 检测,只有一条大小为 31.6 kDa 的 APn5 蛋白带(图 1),测定 APn5 蛋白的浓度为 0.87 mg/mL。将 APn5 蛋白提取液用截留量为 5 kDa、10 kDa 和 30 kDa 的超滤管处理,去除 SDS-PAGE 检测不到的小分子量肽段,分别检测滤出液和管内液的抑菌活性发现,3 种截留量的超滤管的管内液均具有抑菌活性,而滤出液均不具有抑菌活性(图 2),说明具有抑菌活性的是大于 30 kDa 的蛋白,即 APn5 蛋白。

2.2 抑菌蛋白 APn5 的性质分析

在不同温度下温浴处理 APn5 蛋白提取液 30 min 后检测抑菌活性,抑菌蛋白在 40 以下抑菌活性相对稳定;当温度高于 60 时,抑菌活性随温度的升高而降低;温

度达到 100 以上时,抑菌活性完全消失(表 1)。不同于已报道的分离自枯草芽胞杆菌的抑菌蛋白和低分子量抑菌肽,APn5 蛋白不具有对高温的耐受性。

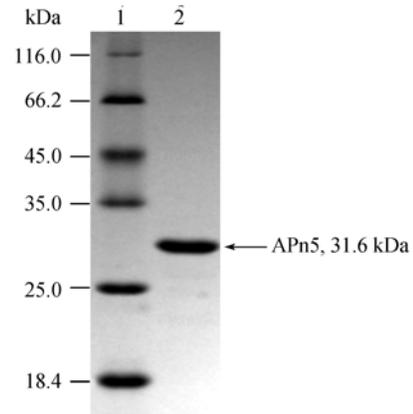


图 1 提取的 APn5 蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 SDS-PAGE detection of extracted APn5. 1. Protein Marker; 2. APn5.

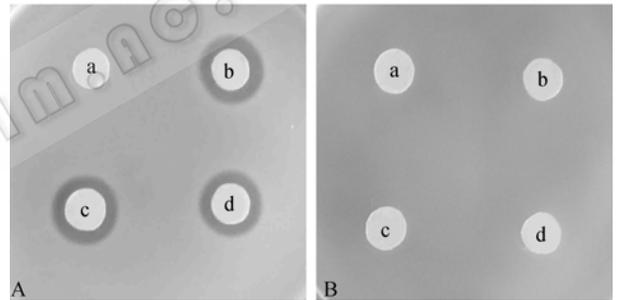


图 2 蛋白 APn5 经不同超滤处理后的抑菌活性

Fig. 2 Inhibitory activities of APn5 treated with different ultrafiltration. A: ultrafiltrate of protein APn5; B: filtrate of protein APn5. a, distilled water; treated by ultrafiltering tube with b, 5 kDa molecular weight limit; c, 10 kDa molecular weight limit; d, 30 kDa molecular weight limit.

用不同蛋白酶处理 APn5 蛋白提取液,发现抑菌蛋白 APn5 的抑菌活性均收到影响。在蛋白酶 E 处理下,APn5 抑菌活性完全消失;胰蛋白酶使 APn5 的抑菌圈直径下降了 63.64%,且形成的抑菌圈呈混浊状;蛋白酶 K 对 APn5 的抑菌活性影响最小,抑菌圈直径下降了 31.25%(表 2)。与已报道的蛋白类抑菌物质相似,APn5 蛋白表现出蛋白类物质所具有的对于蛋白酶的敏感性。

表 1 不同温度处理对蛋白 APn5 抑菌活性的影响

Table 1 Effect of different temperature on inhibitory activities of protein APn5

Temperature()	4	20	40	60	80	100	120
Average diameter of inhibitory zone(mm)	16.0 \pm 0.2	15.9 \pm 0.1	15.9 \pm 0.1	15.6 \pm 0.2	10.0 \pm 0.1*	-	-

*: unclear inhibitory zone; -: no inhibitory zone.

表 2 不同蛋白酶处理对蛋白 APn5 抑菌活性的影响
Table 2 Effect of different enzymes on inhibitory activities of protein APn5

Enzymes	Control	trypsin	proteinase K	pronase E
Average diameter of inhibitory zone(mm)	15.6±0.3	8.7±0.4*	11.0±0.1	-

*: unclear inhibitory zone; - : no inhibitory zone.

在不同的 pH 值下处理 APn5 蛋白提取液, 调整回原始 pH 值后检测抑菌活性, 发现在 pH 2~8 的条件下, 抑菌蛋白 APn5 的抑菌活性相对稳定; 而当 pH 值高于 9 时, 抑菌蛋白 APn5 的抑菌活性随 pH 值的升高而降低; 当 pH 值达到 12 时, 抑菌蛋白 APn5 的抑菌活性完全消失(表 3)。不同于已报道的抑菌肽, APn5 蛋白没有较宽的 pH 适应范围, 对碱性条件具有敏感性。

表 3 不同 pH 处理对蛋白 APn5 抑菌活性的影响
Table 3 Effect of different pH on inhibitory activities of protein APn5

pH	Average diameter of inhibitory zone/mm	pH	Average diameter of inhibitory zone/mm
2	16.0±0.1	8	16.1±0.1
3	16.1±0.2	9	13.0±0.1
4	16.0±0.1	10	11.1±0.2
5	16.0±0.1	11	8.2±0.3 *
6	16.0±0.1	12	-
7	16.1±0.2		

*: unclear inhibitory zone; -: no inhibitory zone.

2.3 APn5 蛋白的抑菌谱分析

在对植物细菌性病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌、茄科雷尔氏菌、水稻细条病菌、草生欧文氏菌、杓兰欧文氏菌、青枯劳尔氏菌、带化红球菌, 以及真菌性病原菌番茄叶霉病菌、西瓜枯萎病菌以及玉米小斑病菌的抑菌性检测中发现, 抑菌蛋白 APn5 仅对胡萝卜软腐欧文氏菌、带化红球菌、玉米小斑病菌具有较强的抑菌活性, 对番茄叶霉病菌和西瓜枯萎病菌具有较低的抑菌活性(图 3)。结果表明, 抑菌蛋白 APn5 的抑菌谱较窄, 仅对少数细菌性植物病原菌具有较好的抑制作用, 而对真菌性植物病原菌则具有不同程度的抑菌活性。

2.4 枯草芽胞杆菌 BSn5 抑菌活性与生长状态的关系

在枯草芽胞杆菌 BSn5 的对数生长期, 其发酵上清液所形成的抑菌圈直径逐渐升高; 进入稳定生长期后, 其发酵上清液的抑菌活性开始逐渐下降, 直至完全消失(图 4), 此时通过显微镜观察, BSn5 已经形成

芽胞。已报道的低分子量抑菌肽通常具有较好的稳定性, 在其来源菌的生长过程中, 能够较好的保持抑菌活性。

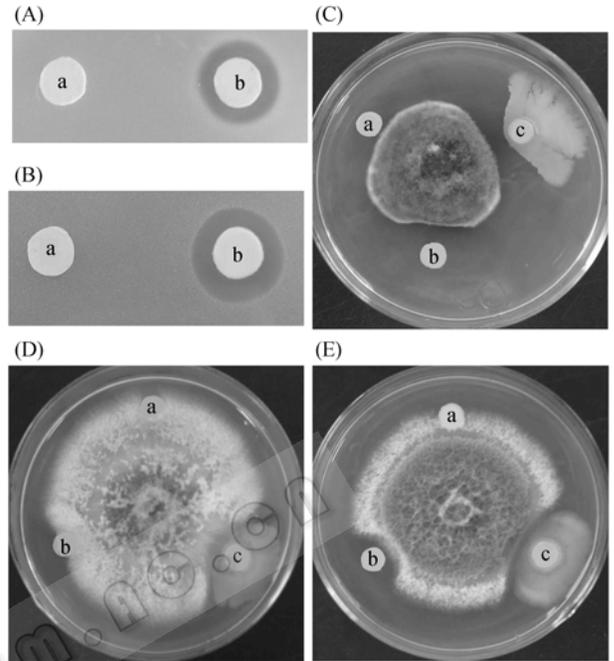


图 3 APn5 蛋白提取液抑菌活性

Fig. 3 Inhibitory activities of protein APn5. (A) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; (B) *Rhodococcus fascians*; (C) *Bipolaris maydis*; (D) *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; (E) *Fulvia fulva*. a. distilled water; b. protein APn5; c. *B. subtilis* strain BSn5.

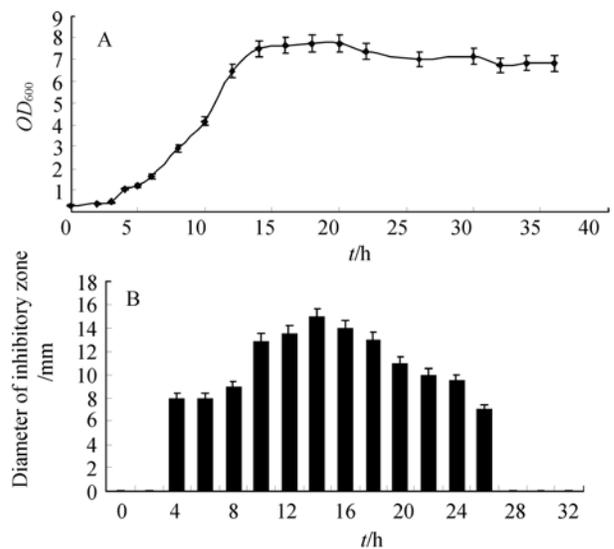


图 4 枯草芽胞杆菌 BSn5 在不同生长周期的抑菌活性

Fig. 4 Inhibitory activities of *B. subtilis* BSn5 on different growth stage. (A), Growth curve of *B. subtilis* BSn5; (B), Average diameter of inhibitory zone of *B. subtilis* BSn5 fermentation supernatant.

2.5 抑菌蛋白 APn5 的质谱分析与氨基酸序列测定

利用 MALDI-TOF-MS 分析纯化后的蛋白 APn5 胰蛋白酶酶解产物,在 Matrix Science 数据库中鉴定未发现与已知蛋白具有显著相关性。Q-TOF 分析获得 4 个肽序列标签,分别为: AGDDAAGLAISEK; GAMLSAVAA-ALAR; AGDDAGREDALK; KTEAQIELASK。在 Matrix Science 数据库中鉴定,以上 4 个肽序列标签依次分别与芽孢杆菌(*Bacillus*)的鞭毛蛋白靠近 N-端部分、依赖 FMN 的 α 羟羧酸脱氢酶(FMN-dependent α -hydroxy acid dehydrogenase)、糖苷水解酶(glycoside hydrolase 15-related)和双鸟苷酸环化酶/磷酸二酯酶(diguanylate cyclase/phosphodiesterase)的 GGDEF & EAL 结构域具有 100% 一致性。

3 讨论

本研究中的抑菌物质,具有多种不同于已报道的低分子量抑菌肽和高分子量抑菌蛋白的性质。在温度高于 80 时,BSn5 产生的抑菌物质活性显著下降直至丧失,这与已报道的短肽类抑菌物质和蛋白类抑菌物质的高温耐受性完全不同^[4,5,9-16]。在 pH 适应范围上,短肽类的抑菌物质表现出了较宽的适应范围,在酸碱条件下均表现出较稳定的抑菌活性,而蛋白类抑菌物质则表现出对于酸碱性不同的适应能力^[4,5,9-16]。本研究中 BSn5 所产生的抑菌物质活性在酸性条件下稳定,而在碱性条件下显著下降。此外,抑菌肽类具有一定的抗蛋白酶性质^[3-5],而蛋白类的抑菌物质则对各种蛋白酶表现出了不同程度的敏感性^[9-16]。本研究中 BSn5 的抑菌物质在胰蛋白酶、蛋白酶 K 和蛋白酶 E 的作用下均不能稳定保持活性,对不同的蛋白酶具有不同程度的敏感性。在抑菌范围上,目前报道的短肽类抑菌物质和抑菌蛋白多对病原性真菌具有广谱的抑菌活性^[4,5,9-16],对于细菌性病原菌的报道相对较少,而本研究中 BSn5 的抑菌物质抑菌谱较窄,对于细菌性植物病原菌的抑菌活性较对真菌性病原菌明显。在枯草芽孢杆菌 BSn5 的生长过程中,其抑菌物质活性不能稳定存在,进入稳定期后逐渐丧失,而抑菌肽类物质在其产生菌的生长周期中,不易丧失活性^[3]。综合以上性质,枯草芽孢杆菌菌株 BSn5 所产生的抑菌物质具有蛋白质的特性,为蛋白类抑菌物质,根据分离纯化后的检测结果,该蛋白即为 APn5 蛋白,它在抑菌谱、抑菌活性以及理化性质上与已报道的抑菌蛋白表现出了一些不同的特点。

通过 MALDI-TOF-MS 分析,APn5 蛋白与 Matrix Science 数据库中已知蛋白均不具有高度相关性,为一类未报到的新型蛋白。Q-TOF 分析显示,该蛋白的 4 个肽序列标签不能证明 APn5 蛋白与某一类蛋白具有高度相关性,鞭毛蛋白、 α 羟羧酸脱氢酶、糖苷水解酶和双鸟苷酸环化酶/磷酸二酯酶均未见其与抑菌活性相关的报道。利用肽序列标签,无法确定 APn5 蛋白的属性与分类。综合质谱分析结果,APn5 蛋白很可能是一种新功能的抗菌蛋白,具有自己的抑菌特点。

基于抑菌蛋白 APn5 仅有 31.6 kDa,并且对尚未有良好防治方法、引起魔芋软腐病的病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种具有较强且较为专一的抑菌活性,克隆该蛋白基因,作为植物遗传改良的基因资源具有一定意义。此外,有关该基因的克隆工作也在进行中。

参 考 文 献

- [1] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展. 上海农业学报(*Acta Agriculturae Shanghai*), 2006, 22: 109-112.
- [2] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390: 177-183.
- [3] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*, 2005, 56: 845-857.
- [4] Wu S, Jia S, Sun D, *et al.* Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Current Microbiol*, 2005, 51: 292-296.
- [5] Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, *et al.* Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 2002, 6: 499-506.
- [6] Moyne AL, Cleveland TE, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234: 43-49.
- [7] Marahiel MA, Nakano MM, Zuber P. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol Microbiol*, 1993, 7: 631-636.
- [8] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, *et al.* Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68: 207-233.
- [9] Hou X, Boyetchko SM, Brkic M, *et al.* Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. Associated with sclerotia

- from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 644–653.
- [10] Liu Y, Chen Z, Ng TB, *et al*. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides*, 2007, 28: 553–559.
- [11] 谌晓曦, 陈卫良, 马志超, 等. 抗水稻纹枯病菌拮抗蛋白的理化性质研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版)[*Journal of zhejiang university (agriculture & lifesciences)*], 1999, 25: 491–494.
- [12] 刘永峰, 陈志谊, 张杰, 等. 枯草芽孢杆菌 B_916 胞外抗菌蛋白的性质. 江苏农业学报(*Jiangsu journal of agricultural sciences*), 2005, 21: 288–293.
- [13] 沈锦玉, 尹文林, 曹铮, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质. 水生生物学报(*Acta hydrobiologica sinica*), 2005, 29: 689–693.
- [14] 董有仁, 马志超, 陈卫良等. 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: 339–343.
- [15] 谢栋, 彭憬, 王津红等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98III的纯化和性质. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1998, 38: 13–19.
- [16] 刘伊强, 王雅平, 潘乃穰, 等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性. 植物学报(*Journal of Integrative Plant Biology*), 1994, 36: 197–203.
- [17] 周盈, 陈琳, 柴鑫莉, 等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47: 1076–1079.
- [18] Kanjo N, Nakahigashi K, Oeda K, *et al*. Isolation and characterization of a cDNA from soybean and its homolog from *Escherichia coli*, which both complement the light sensitivity of *Escherichia coli hemH* mutant strain VS101. *Genes Genet Syst*, 2001, 76: 327–334.

Identification and characterization of novel antimicrobial protein APn5 against *Erwinia carotovora*

Dongmei Han, Huifang Ban, Ziquan Yu, Ziniu Yu, Ming Sun*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] *Amorphophallus* soft rot disease, caused by *Erwinia carotovora*, affects *Amorphophallus* industry development. We identified and characterized protein APn5 against *Erwinia carotovora*, isolated from *Bacillus subtilis* strain BSn5. [Methods] Protein APn5 was purified from BSn5 culture by ammonium sulfate precipitation with 30% relative saturation and ultrafiltration. Inhibition activity was tested by agar well diffusion assay. Protein APn5 was treated at different temperatures, pH conditions and proteinase. The growth curve of BSn5 was examined; meanwhile, the inhibition activity of supernatant of BSn5 culture in different growth phase was tested. Amino acid sequence of protein APn5 was analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and quadrupole-time-of-flight (Q-TOF). [Results] Protein APn5 showed a narrow inhibition spectrum, mainly strongly inhibiting the growth of a few plant pathogenic bacteria. Protein APn5 was sensitive to high temperature and alkaline pH, and partial sensitive to trypsin, proteinase K and pronase E. During strain BSn5 growth phase, the inhibition activity was unstable, which would gradually lose on stationary phase and disappeared finally. [Conclusion] On the basis of the difference on inhibition spectrum and characteristics, protein APn5 was suggested as a novel antimicrobial protein.

Keywords: *Bacillus subtilis*; antimicrobial protein; inhibition spectrum; characterization