

抗菌蛋白 LC III 的分离纯化及其部分特性

刘进元* 李忠 潘乃穰 陈章良

(北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京)

拮抗细菌 *Bacillus subtilis* A014 培养液上清经硫酸铵沉淀后, 上 CM52 阳离子交换层析柱, 分离出的峰 III 具有对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) 特异性抑制活性。进一步用快速液相色谱 (FPLC) 的 Mono S 层析柱纯化并命名为抗菌蛋白 LC III。此蛋白质的分子量约 26915 Da, 等电点为 9.12。氨基酸组成分析表明富含甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸, 缺少脯氨酸。经 Edman 降解法测出 N 末端 28 个氨基酸残基。根据其部分序列用计算机检索 NBRF 蛋白质文库, 与所收入的已知蛋白质没有显著的同源性, 表明是一种新的功能蛋白质。

关键词 抗菌蛋白; 枯草杆菌; 分离纯化; 水稻白叶枯病; 抗菌活性

植物病害每年给粮食生产造成巨大损失, 防治的根本途径归根到底依赖于培育抗病品种。采用常规方法进行抗病育种, 不仅受到物种间限制, 而且要固定一个抗病性状进入栽培品种费时, 常常需十年之久^[1], 何况要寻找一个具有独立抗病性状的物种也是非常困难的。现代生物技术的发展为抗病育种开辟了一条新途径^[2]。1986 年华盛顿大学的毕齐 (Beachy) 研究小组成功地把病毒外壳蛋白基因导入植物, 获得了抗病毒病的抗病品种, 为植物病毒病的防治提供了一个可行的模型^[3]。可是对于危害严重的植物真菌细菌病害, 运用基因工程技术进行抗病育种的研究, 至今还未见成功报道^[4]。

近年来, 本实验室致力于植物病原菌拮抗微生物的筛选, 试图从我国资源丰富的微生物中克隆抗性基因, 利用基因工程技术来培育抗植物真菌、细菌病害的作物品种。现已筛选出一批强烈抑制植物病原菌的拮抗细菌^[5], 并分离纯化出几种抗菌蛋白^[6]。本文报道其中的一种抗菌蛋白 LC III 的分离纯化及其部分特性。

材料与方 法

(一) 菌株及培养条件

分泌抗菌蛋白的 *Bacillus subtilis* A014 以及用于测定抗菌活性的指示菌的来源, 培养条件, 所用培养基以及抗菌蛋白的粗提取过程详见文献[5]。

(二) 抗菌蛋白的分离纯化

彻底透析去盐的抗菌蛋白粗提液, 离心后取上清液, 上清液通过经 Tris 缓冲液 (50 mmol/L, pH7.8) 平衡过的 CM52 (Carboxymethyl cellulose 52, Whatman 产品) 层析柱 ($\phi 2.6 \times 40\text{cm}$), 用相同缓冲液淋洗至基线, 再用含 0—0.6 mol/L 氯化钠的相同缓冲液线性梯度洗脱, 收集活性组分, 供进一步纯化。经醋酸缓冲液 (50 mmol/L, pH4.8) 透析后的活性部

本文于 1991 年 5 月 3 日收到。

国家教委青年教师基金资助项目。

* 现地址: 清华大学生物科学与技术系。

本研究得到本系杨端教授, 袁洪生老师, 罗静初老师以及本实验室同仁们的大力支持及有益的讨论, 在此一并致谢。

分上 FPLC 的 Mono S 离子交换柱 (Pharmacia 公司产品), 用含有 0—1mol/L 氯化钠的相同缓冲液作线性梯度洗脱, 收集活性组分, 立即对蒸馏水透析, 冷冻干燥后供理化性状分析。

(三) 电泳分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按文献〔7〕的方法进行。分离胶浓度为 12%, 标准分子量蛋白购自 Pharmacia 公司。聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF) 参照文献〔8〕方法, 用含 0.7% 两性电解质 (Pharmacia, pH3.5—10.0) 的 7% 凝胶, 在 24℃ 下聚焦 2h。以标准蛋白 (Pharmacia, pH5.0—10.5) 为参照测定样品的 pI 值。

(四) 氨基酸组成及部分序列分析

样品经 5.7mol/L 沸盐酸水解 24h 后, 水解物用自动氨基酸分析仪 (Bechman, 121 MB) 分析其全组成。半胱氨酸残基用甲磺酸水解, 色氨酸残基用碱水解后分别测定。部分序列分析在 Applied Biosystem 470A 型气相蛋白质序列仪中进行, 从 N 端依次降解的氨基酸衍生物——苯异硫氰酸氨基酸 (PTH) 用 Applied Biosystem 120 型 PTH 分析仪分析。

(五) 抗菌活性测定

抑制植物病原菌生长的抗菌活性测定参照文献〔5〕。

结果与讨论

(一) 抗菌蛋白 LC III 的纯化

B. subtilis A014 的培养液上清经硫酸铵沉淀透析去盐后, 含全部活性的蛋白液上 CM52 离子交换层析柱, 分成 3 个主峰 (图 1)。以水稻白叶枯病菌 G 株系 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* G) 为指示菌, 用抑菌圈法测定其抗菌活

性, 结果都形成清晰透明的抑菌圈, 表明都有很强的抑菌活性。

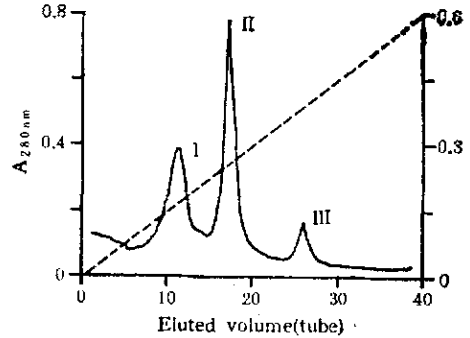


图 1 抗菌蛋白在 CM52 层析柱上的分离
Fig.1 Profile of antibacterial protein on CM52 column

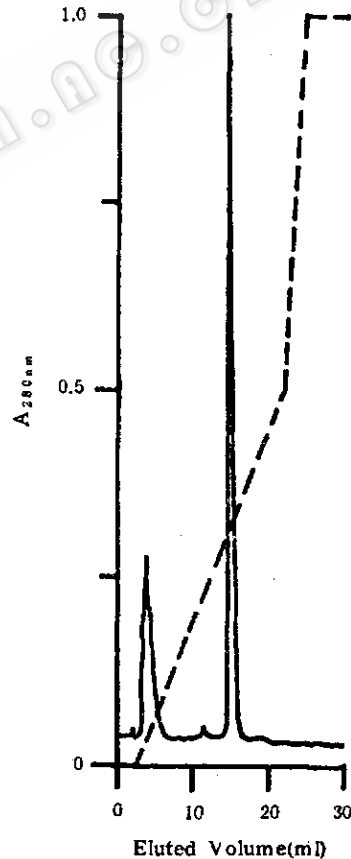


图 2 抗菌蛋白 LC III 在 FPLC 的 Mono S 离子交换柱上的纯化
Fig.2 Purification of antibacterial protein LC III with Mono S column on FPLC

经CM52柱层析得到的活性峰Ⅲ,经透析调整浓度后,用FPLC Mono S层析柱作进一步纯化。结果如图2所示,只出现一个有活性的主峰,此菌所含的抗性物质被命名为抗菌蛋白LCⅢ。此抗菌蛋白在SDS-PAGE上形成单一条带(图3),又经自动Edman降解序列分析鉴定N端氨基酸残基,结果为单一丙氨酸主峰,说明其纯度已能满足一级结构及理化性状的分析。

(二) 抗菌蛋白LCⅢ的部分特性

纯化的抗菌蛋白LCⅢ经SDS-PAGE分析,如图3(左)所示显示单一条带,与标准蛋白比较其表现分子量约为26915Da。IEF结果表明LCⅢ是碱性蛋白,其pI=9.12[图3(右)]。氨基酸组成分析如表1所示,抗菌蛋白LCⅢ由19种氨基酸残基构成,富含甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸,缺少脯氨酸、碱性、亲水性氨基酸分别约占10%和64%。分子量计算值为25203.37Da。此值与表现分子量的相差是在允许的误差范围之内。部分序列测定结果见图

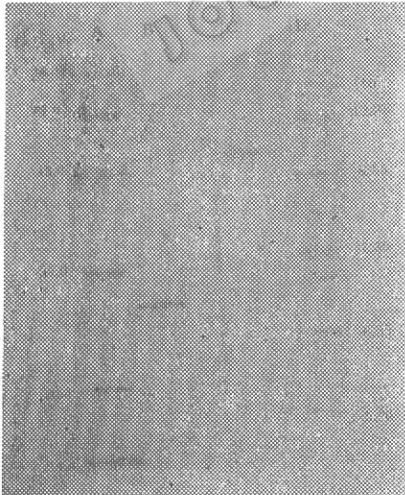


图3 抗菌蛋白LCⅢ在SDS-PAGE(左)和IEF(右)上的电泳图形

Fig.3. Profile of antibacterial protein LCⅢ on SDS-PAGE (left) and IEF (right) A和D,标准蛋白, Standard protein; B和C,抗菌蛋白LCⅢ Antibacterial protein LCⅢ

4,在28个氨基酸残基中,甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸就占13个之多。计算机检索NB-RF蛋白质文库,与已收入的2万多种蛋白质序列比较,没有发现有效的同源性,表明是一种新的功能蛋白。这与麻蝇中的一种抗细菌蛋白质^[9,10]和天麻球基中一种抗真菌蛋白质^[12]的某些性质相似。前者富含甘氨酸及丝氨酸,碱性氨基酸占13%,后者也富含甘氨酸并缺少脯氨酸。

图4 抗菌蛋白LCⅢ的部分氨基酸序列

Fig.4 Partial sequence of antibacterial protein LCⅢ (X,not determined)

表1 抗菌蛋白LCⅢ的氨基酸组成分析

Table 1 Amino acid composition of antibacterial protein LCⅢ

Amino acid	n mol/ml	mol/mol	%
Asp*	116.46	10.05(10)	4.18
Thr	393.86	33.98(34)	14.17
Ser	396.28	34.19(34)	14.17
Glu*	94.216	8.13(8)	3.33
Pro	0	0	0
Gly	430.36	37.13(37)	15.42
Ala	154.07	13.29(13)	5.42
Cys	58.618	5.06(5)	2.08
Val	242.46	20.92(21)	8.75
Met	38.874	3.35(3)	1.25
Ile	94.381	8.14(8)	3.33
Leu	113.18	9.77(9)	4.18
Tyr	289.26	24.96(25)	10.42
Phe	37.770	3.26(3)	1.25
Lys	182.93	15.78(16)	6.67
His	38.681	3.34(3)	1.25
Trp	56.517	4.88(5)	2.08
Arg	43.915	3.79(4)	1.67
合计 Total			239

* 包括相应的酰胺

* Including the corresponding amide

(三) 抗菌蛋白LCⅢ的抑菌活性

在文献[5]中已经报道抗菌蛋白的粗提物能有效地抑制水稻白叶枯病菌及蔬菜细菌性青枯病菌(*Pseudomonas solanac-*

表 2 抗菌蛋白LCⅢ的抑菌活性
Table 2 Activity of antibacterial protein LCⅢ

Bacterial pathogen	Inhibition activity
<i>Xanthomonas campestris</i>	
pv. <i>oryzae</i> G	+++
pv. <i>oryzae</i> COX4	++
pv. <i>oryzae</i> NX17	++
pv. <i>oryzae</i> GXBT	++
<i>Pseudomonas</i>	
<i>solanacearum</i> PO1	+
<i>solanacearum</i> PE1	-
<i>Erwinia carotovora</i>	
subsp. <i>carotovora</i> E	-
<i>Agrobacterium</i>	
<i>tamefaciens</i> A19	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-

* Bioassay by the inhibition zone method, added 50 μ l of antibacterial protein solution (5 μ mol/L) per hole. + showed inhibited zone diameter (mm). +, 7.1—10.0; ++, 10.1—15.0; +++, 15.1—20.0; -, no activity.

earum) 的生长。根据这一结果本试验挑选了来自不同地方的一些植物病原菌, 用抑菌圈法对抗菌蛋白 LCⅢ 的抗菌活性进行了测定, 结果如表 2 所示, 此蛋白质对水稻白叶枯病菌的各株系均表现较强的抑菌活性, 其中对 G 株系的作用最强(图 5) 而对青枯病菌的抑制活性较弱, 对动物病原细菌则无抑制效果。进一步的定量测定及其抗菌机制正在探讨中。

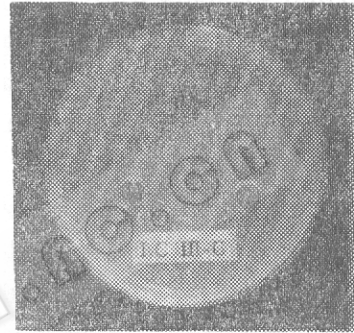


图 5 抗菌蛋白 LCⅢ 对水稻白叶枯病菌的抑制活性
Fig. 5 Inhibition activity of antibacterial protein LCⅢ against the pathogen of rice leaf blight disease (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* G)

参 考 文 献

- [1] 平井笃志等: 植物细胞育种入门, 学会出版センター, 日本东京, pp. 1—8, 1992.
- [2] 潘乃穰, 陈章良: 自然, 13:80—83, 1990.
- [3] Powell Abel, P. et al.: *Science*, 223:738—743, 1986.
- [4] Gasser, C. S. and Robert, T. F.: *Science*, 244:1293—1299, 1989.
- [5] 刘进元等: 植物学报, 33 (2): 157—161, 1991.
- [6] Liu, J. Y. et al.: *Rice Genetic Newsletter*, Volume 7: 151—154, 1990.
- [7] 袁晓华, 杨中汉主编: 植物生理生化实验, 高等教育出版社, 北京, pp. 57—65, 1983.
- [8] 张龙翔, 吴国利主编: 高级生物化学实验选编, 高等教育出版社, 北京, pp. 23—29, 1989.
- [9] Ando, K. et al.: *Biochemistry*, 26: 226—230, 1987.
- [10] Ando, K. et al.: *Biochemistry*, 27: 1715—1721, 1988.
- [11] 胡忠等: 云南植物研究, 10 (4): 373—380, 1988.

Purification and Partial Characterization of An Antibacterial Protein LCⅢ

Liu Jinyuan Li Zhong Pan Naisui Cher Zhangliang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,
Department of Biology, Beijing University, Beijing)

Total proteins were precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from the overnight culture supernatant of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* A014, applied to CM52 column and separated into three main peaks. The preparation of peak Ⅲ was showed to inhibit specifically the growth of rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, further purified with Mono S column on FPLC and named antibacterial protein LCⅢ. The molecular weight of this protein is 26915Da, $\text{pI}=9.12$. Analysis of amino acid composition was revealed to be rich in glycine, threonine and serine, and devoid of proline. 28 amino acids of N-terminal were sequenced by the Edman degradation and computer analysis of this partial sequence found that antibacterial protein LCⅢ is a novel one.

Key words

Antibacterial protein LCⅢ; *Bacillus subtilis*; isolation and purification; *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*; antibacterial activity