
研究报告

桔草杆菌 BS-98 分泌的抗真菌蛋白的分离 纯化及其部分性质的研究

胡 剑* 赵永岐 王岳五

(南开大学生命科学学院微生物系 天津 300071)

摘要 拮抗菌(*Bacillus subtilis*)BS-98 菌株在 BPY 液体培养基中产生的蛋白质经硫酸铵分级盐析、Sephadex G-100 柱层析、DEAE-纤维素柱层析和 Sephadex G-100 柱再层析后,分离纯化得到的抗菌蛋白在电泳中显现出三条带。经初步纯化的抗菌蛋白对热稳定,对蛋白酶部分敏感。抑菌谱测定表明,抗菌蛋白对芦笋茎枯病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌、棉花黄萎病菌、灰霉菌、立枯丝核菌等病原真菌及黄瓜角斑病菌都具有强烈的抑制作用。

关键词 拮抗菌, 抗真菌蛋白质, 纯化, 抑菌活性, 芦笋茎枯病菌

由芦笋茎枯病菌(*Phoma asparagi* Sacc.)引起的芦笋茎枯病是芦笋作物的一种毁灭性病害^[1~3]。本室分离得到一株强烈抑制芦笋茎枯病菌等植物病原真菌的拮抗菌 BS-98^[4]。本文报道了该菌株分泌的抗菌蛋白的纯化及其部分特性。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及培养基

拮抗菌 BS-98 及指示菌参见文献[4]。

细菌采用 BPY 培养基^[5], 病原真菌用 PDA 培养基^[5]。

1.2 BS-98 菌株的培养

挑选抑制芦笋茎枯病菌生长作用较强的单菌落接种于 BPY 液体培养基(pH8.0), 30℃ 振荡培养(120r/min)48h。

1.3 抑菌活性测定

指示菌悬液的制备参见文献[6]。

环柱测定法^[4,7]。

1.4 抗菌蛋白的纯化

1.4.1 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析饱和度的确定^[8]: 发酵液于 4℃, 9000r/min 离心 20min 取上清液, 加入 30% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄, 4℃ 静置过夜。收集沉淀, 溶于少量磷酸缓冲液

(20mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH6.5), 稀释至一定蛋白浓度, 检测其抑菌活性。上清液调整 (NH₄)₂SO₄ 饱和度至 40%, 同上制备得到 30%~40% 的盐析蛋白。依此类推, 分别制备出 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90% 盐析蛋白溶液, 稀释至相同的蛋白浓度, 检测抑菌活性, 然后确定分级盐析的两个饱和度。

1.4.2 柱层析纯化抗菌蛋白: 将分级盐析后得到的粗蛋白液加入透析袋(截留分子量 8000u)内, 对上述磷酸缓冲液透析脱盐后, 用 PEG 6000 干粉进行浓缩^[8]。浓缩后的粗蛋白液加到预先用同种缓冲液平衡过的 Sephadex G-100 柱(2.5cm×80cm)上, 用同一缓冲液洗脱, 流速为 18ml/h。收集活性组分, 上 DEAE-纤维素层析柱(2.0cm×30cm), 用 0~1mol/L NaCl 的同种磷酸缓冲液做梯度洗脱, 收集活性组分, 透析浓缩后再经 Sephadex G-100 柱层析, 方法与第一次相同; 收集活性组分后再次用 PEG6000 浓缩。蛋白质浓度测定参考文献[9]。

* 现在中国农业大学生物学院 邮编 100094

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献[10]方法进行电泳,分离胶浓度为7.5%,浓缩胶浓度为4%,染色脱色方法参考文献[11]。

1.6 抗菌蛋白的部分性质

1.6.1 对温度的敏感性:初步纯化后的抗菌蛋白分别置于40、60、80、100℃处理30min,以不处理的样品作对照(抑菌活性定为100%),检测其对芦笋茎枯病菌的抑菌活性。

1.6.2 对蛋白酶的敏感性:抗菌蛋白与Proteinase K、Trypsin、Pronase及Pepsin在最适酶促条件下,37℃反应60min(酶液反应浓度1mg/ml),分别测其抑菌活性,以不加酶液处理的作对照(抑菌活性定为100%)。

1.6.3 对芦笋茎枯病菌的抑制机制:取50ml芦笋茎枯病菌孢子悬液^[11]滴入凹玻片,再加入50μl的抗菌蛋白,28℃保湿培养15h,观察计数孢子萌发率;对照为50μl孢子悬液加50μl的蒸馏水。

2 结果

2.1 抗真菌蛋白的分离纯化

2.1.1 (NH₄)₂SO₄分级盐析结果:由表1可见,在70%以上饱和度条件下,抑菌活性不再加强,说明70%饱和度时抗菌活性物质已基本沉淀完全。在30%饱和度以下,抑菌活性较小,说明沉淀出的大量蛋白多为杂蛋白。出于提纯的考虑确定分级盐析的两个饱和度为30%和70%。实际操作时先在发酵上清液中加入(NH₄)₂SO₄至30%饱和度,4℃过夜去沉淀,上清补加(NH₄)₂SO₄至70%饱和度,收集沉淀留待过柱层析。

表1 (NH₄)₂SO₄分级盐析对提取抗菌活性物质的影响

(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级盐析饱和度(%)	30	30 ~ 40	40 ~ 50	50 ~ 60
抑菌圈(mm)	18	22	28	18
(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级盐析饱和度(%)	60 ~ 70	70 ~ 80	80 ~ 90	
抑菌圈(mm)	25	20	0	

2.1.2 第一次 Sephadex G-100 柱层析:分离得到两个蛋白峰(图1)。以芦笋茎枯病菌及小麦赤霉病菌为指示菌,分别检测两个峰的抑菌活性。结果表明,峰A显示出很强的抑菌活性,而峰B无抑菌活性。于峰A和B上分别取a~l管检测其抑菌活性。结果表明,峰A的a~h管显示出抑菌活性变化与A₂₈₀的洗脱曲线峰形重叠一致,峰B的i~l管无抑菌性。由此说明,抗菌物质为蛋白质。

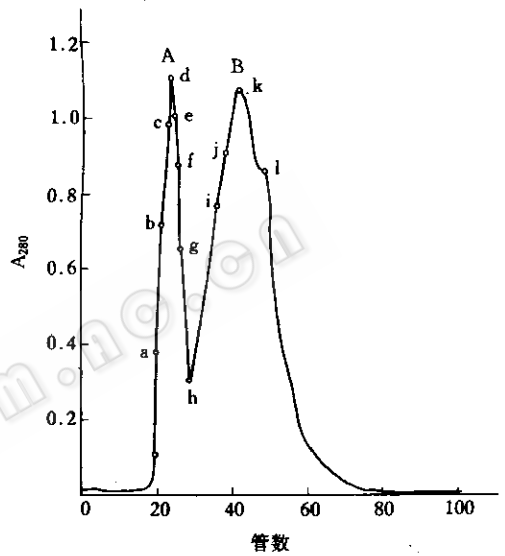


图1 抗菌活性物质第一次 Sephadex G-100 柱层析图

柱: 2.5×80cm 缓冲液: 20mmol/L磷酸缓冲液 (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH6.5) 流速: 18ml/h
○ — ○ A₂₈₀

2.1.3 DEAE-纤维素柱层析:收集活性峰A组分经DEAE-纤维素(DE52)柱分离得到3个蛋白峰(图2)。经检测峰II、III都有很强的抑菌活性,收集其中活性较大的峰II组分。

2.1.4 第二次Sephadex G-100柱层析:活性峰II再经Sephadex G-100柱分离后得到两个峰(图3),检测结果表明峰I'为活性峰,收集活性峰I'组分。

2.1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳:由图4可见,分级盐析后经Sephadex G-100柱纯化,

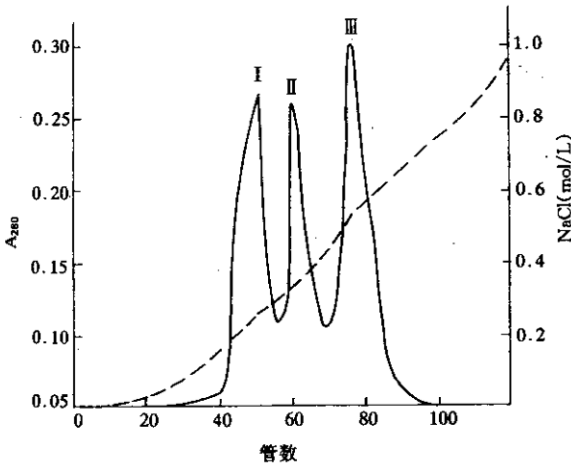


图2 抗菌活性物质 DEAE-纤维素柱层析图
柱: 2.0×30cm 缓冲液: 20mmol/L 磷酸缓冲液
($\text{NaH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH6.5) 流速: 18ml/h
— A_{280} , --- NaCl 浓度

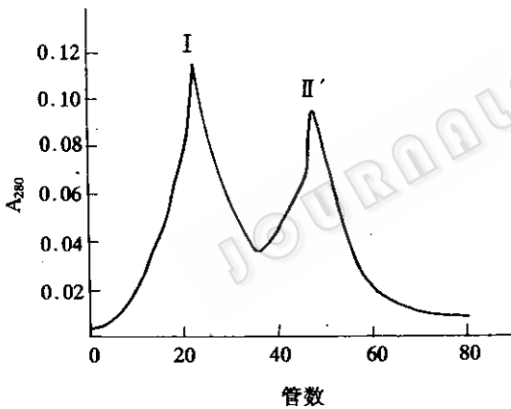


图3 抗菌活性物质的第二次 Sephadex G-100 柱层析图
柱: 2.5×80cm 缓冲液: 20mmol/L 磷酸缓冲液
($\text{NaH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH6.5) 流速: 18ml/h
— A_{280}

DEAE-纤维素柱层析, Sephadex G-100 柱再层析后样品纯度明显提高。最终纯化的抗菌蛋白在电泳图谱中显示出明显的三条带。对此三条带尚应分别回收进行抑菌活性的测定。

2.2 抗菌蛋白的部分特性

2.2.1 对温度的敏感性: 抗菌蛋白在 80℃ 以下处理 30min 仍保持原有的抑菌活性(100%),

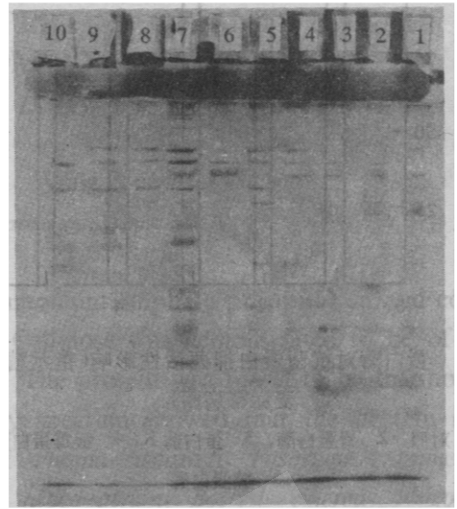


图4 初步纯化的抗菌蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
1~6: 分别为(NH_4)₂SO₄ 分级盐析 30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80% 样品。
7: 第一次 Sephadex G-100 柱纯化样品(峰 A 第 23 管)
8: 第二次 Sephadex G-100 柱纯化样品(峰 I' 第 22 管)
9: DEAE-纤维素柱纯化样品(峰 II 第 60 管)
10: DEAE-纤维素柱纯化样品(峰 III 第 76 管)

当温度提高至 100℃ 处理 30min, 活性下降了 17.5%, 可见此抗真菌蛋白具有很好的热稳定性。

2.2.2 对蛋白酶的敏感性: 用 4 种蛋白酶处理后的结果见图 5。经蛋白酶 K 处理后活性保持 100%, 经胃蛋白酶处理后活性下降了 10%, 经链霉菌蛋白酶和胰蛋白酶处理后抑菌活性下降了 20%~25%, 说明此抗菌蛋白对蛋白酶 K 不敏感, 对链霉菌蛋白酶较敏感。

2.2.3 对芦笋茎枯病菌的抑制作用: 抗菌蛋白(200μg/ml) 强烈抑制芦笋茎枯病菌的孢子萌发, 经三个批次处理, 结果表明抑制率达 100%。

2.3 抗真菌蛋白的抑菌谱

试验表明, 抗菌蛋白对芦笋茎枯病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌的抑制作用最强, 对棉花黄萎病菌、灰霉菌、立枯丝核菌的作用居中, 对黄瓜角斑病菌的抑制活性较小(表 2)。

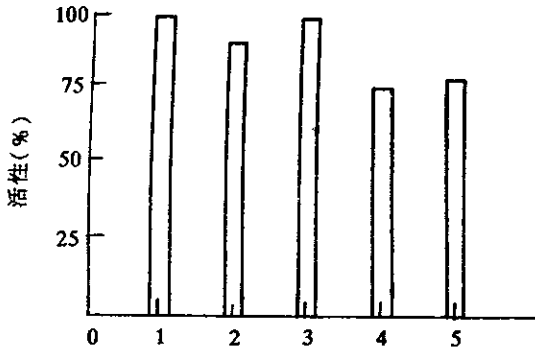


图5 蛋白酶对抗菌蛋白抑菌活性影响(指示菌为小麦赤霉病菌)

1. 对照, 2. 胃蛋白酶, 3. 蛋白酶 K, 4. 链霉菌蛋白酶, 5. 胰蛋白酶

表2 初步提纯的抗菌蛋白(1mg/ml)抑菌谱

指示菌	抑菌圈直径(mm)
芦笋茎枯病菌	40
小麦赤霉病菌	34
棉花枯萎病菌	30
棉花黄萎病菌	24
灰霉菌	28
立枯丝核菌	26
黄瓜角斑病菌	20

3 讨论

枯草芽孢杆菌具有良好的分泌细菌素的特性^[13], 但不同于放线菌类产生的抗生素, 它具有蛋白质的性质。Bradley (1967) 把细菌素分为两大类: 一种是分子量比较小, 在一般电镜下看不到, 对胰蛋白酶敏感而耐热; 另一种是分子量较大, 在电镜下有一定形状, 很象无头的噬菌体尾部, 对胰蛋白酶不敏感也不耐热^[14]。从本文结果看, 经三次柱层析纯化的抗

菌蛋白于 100℃ 处理 30min 后抑菌活性仍保持 80% 以上, 4℃ 下保存 75d 抑菌活性 100%, 对蛋白酶 K 不敏感, 对胰蛋白酶、胃蛋白酶、链霉菌蛋白酶部分敏感。说明此抗真菌蛋白相当稳定, 具有特殊的性质。此抗菌蛋白尚需进一步纯化, 进行其它理化特性的研究。

本文对抗菌蛋白抑制芦笋茎枯病菌的作用作了初步探讨。细菌素的作用机制比较复杂, 它常常影响多种代谢, 因此, 病原菌产生对细菌素的抗性的可能性不象对抗生素产生抗性来得那么容易, 这对于病害防治有着重要的意义。细菌的产细菌素特性多由细菌的质粒基因控制^[14]。探讨细菌所产生的拮抗物质与细菌质粒的相关性亦将有助于转基因植物工程的研究。

参 考 文 献

- [1] Choi K K. Korean Journal of Plant Protection, 1981, 20(2): 83 ~ 86.
- [2] Reifschneider F J B, Lopes C A. FAO Plant Protection Bulletin, 1982, 30(3 ~ 4): 157.
- [3] Lui T M E, Hwang J S. Plant Protection Bulletin, 1988, 30(1): 24 ~ 30.
- [4] 胡 剑, 林心怡, 张九一等. 微生物学通报, 1996, 23(6): 323 ~ 327.
- [5] 中国微生物菌种保藏委员会编著. 中国菌种目录, 轻工业出版社, 1983, 404 ~ 422.
- [6] Phae C G, Shoda M, Kubota H. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 69(1): 1 ~ 7.
- [7] 方中达. 植物研究方法. 北京: 农业出版社, 1982, 231.
- [8] 何忠效. 酶学研究方法(上册), 北京: 科学出版社, 1987, 16 ~ 22.
- [9] Bradford M M. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 ~ 254.
- [10] B D 哈密斯, D 利克伍德著, 刘毓英译, 蛋白质的凝胶电泳实践方法, 北京: 科学出版社, 1986.
- [11] 李明霞. 真菌学报, 1990, 9(1): 50 ~ 55.
- [12] 张玉芬. 植物病理学报, 1994, 24(2): 147 ~ 152.
- [13] Swinburne T R. Ann Appl Biol, 1976, 82: 365 ~ 368.
- [14] 王金生. 生物防治通报, 1985, 1(2): 36 ~ 40.

**PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ANTIFUNGAL
PROTEIN SECRETED FROM ANTAGONISTIC
BACILLUS SUBTILIS BS-98**

Hu Jian Zhao Yongqi Wang Yuewu

(Nankai University, Department of Microbiology, Tianjin 300071)

Abstract The antifungal protein purified by ammonium sulphate precipitation and column chromatography on Sephadex G-100, and DEAE-Cellulose was demonstrated to be of three protein bands by polyacrylamide gel electrophoresis. The protein was found to be thermostable and partially sensitive to proteinases. The inhibitory spectrum showed that the protein had a strong inhibiting activity against the pathogens of *Phoma asparagi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Key words Antagonistic bacterium, Antifungal protein, Purification, Inhibiting activity, *Phoma asparagi* Sacc.