

枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化

刘 静^{1,2} 王 军¹ 姚建铭¹ 潘仁瑞¹ 余增亮^{1*}

(¹ 中国科学院离子束生物工程学重点实验室 合肥 230031)

(² 新疆大学离子束生物工程中心 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 枯草芽孢杆菌 JA 分泌物中具有抑菌作用的粗提液通过 DEAE-Sepharose FF、SOURCE 15 PHE、Sephacryl S-200HR 和反相 HPLC 多步柱层析分离纯化后, 获得 3 种对水稻纹枯和小麦赤霉病菌均有抑菌作用的抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3。MALDI-TOF 质谱法测得其分子量分别为 1462.645D、1476.390D 和 1490.530D。氨基酸组成分析结果表明, AFP1 和 AFP3 由苏氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、脯氨酸等多种氨基酸组成。目标产物热稳定性好、对蛋白酶有一定的耐受性, 推断很可能是低分子量的环状脂肽。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 分离纯化, 抗菌肽

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)04-0511-04

芽孢杆菌能产生多种抗菌物质, 其中大部分是多肽, 主要抑制革兰氏阳性菌; 有些多肽还能抑制革兰氏阴性菌、霉菌和酵母。其中有一些抗菌肽已被应用于治疗人类、动物和植物的疾病, 同时也可作为生物表面活性剂、食品防腐剂、饲料添加剂和分子生物学的研究工具^[1,2]。植物病原真菌是引起植物病害, 造成农业损失的主要原因之一, 枯草芽孢杆菌能产生多种抑制植物病原真菌的抗菌物质, 且对人畜无害, 不污染环境, 因而在生物防治植物病害中起着重要的作用^[3]。迄今为止, 国内外多家实验室通过分离纯化芽孢杆菌的发酵产物, 得到了一些高分子量蛋白类的抗菌物质^[4-9] 和低分子量的抗菌肽^[10,11,13,14]。本实验室成功分离了一株对多种植物病原真菌都有抑制作用的 JA 菌株, 并经中国科学院微生物研究所鉴定为枯草芽孢杆菌。我们对 JA 菌株发酵粗提液部分性质进行了研究, 并且分离纯化了粗提液的抗菌物质, 研究了纯化产物的部分性质。

1 材料和方法

1.1 菌株

1.1.1 拮抗菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* JA) 为本实验室自行分离。

1.1.2 检测菌: 水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*), 小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*), 西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f. niveum*), 安徽农业大学惠

赠; 番茄青枯病菌(*Tomato bacterial wilt*) 安徽农业大学惠赠; 黄瓜灰霉菌(*Botrytis cinerea*), 黄瓜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 上海生物农药研究所保存。

1.1.3 指示菌: 黑曲霉(*Aspergillus niger*), 本实验室保存。

1.2 柱分离材料和分离系统

柱层析填料 DEAE-Sepharose FF、SOURCE 15 PHE 和 Sephacryl S-200HR 均为 Pharmacia 公司产品, Diamonsil™ C18 柱系 Dikma 公司产品; 所用仪器为 LKB 层析系统及 Waters 公司的 HPLC。

1.3 抗菌物粗提液的制备

将 *Bacillus subtilis* JA 接种到 KMB^[10] 液体培养基中, 30℃ 摇瓶培养(200r/min) 48h 后, 常温 8000r/min 离心 30min, 弃沉淀。上清液经 Millipore 公司的 Mini-Pellicon 切向流超滤系统超滤浓缩后(截留分子量为 1000D) 6000r/min 离心取上清液, 即得到粗提液。

1.4 粗提液的抑菌活性

1.4.1 离体生测试验: 管碟法^[12] 测定粗提液对不同检测菌的抑菌活性: 牛津杯内加入粗提液 200μL, 以抑菌圈直径表示抑菌活性的大小。

1.4.2 活体生测试验: 在一叶期黄瓜幼苗上喷洒粗提液, 待粗提液干后将黄瓜灰霉病菌(*B. cinerea*) 和菌核病菌(*S. sclerotiorum*) 的菌丝块(厚 0.1cm, 直径为 0.4cm) 直接贴在黄瓜叶面中央, 处理后的试材置

基金项目: 国家攻关项目(2001BA302B-4); 安徽省自然科学基金项目(01041401)

* 通讯作者。Tel: 86-551-5592189; Fax: 86-551-5591310; E-mail: zlyu@ipp.ac.cn

作者简介: 刘 静(1974-), 女, 河南鄆陵县人, 新疆大学离子束生物工程中心教师, 现中国科学院合肥物质研究院等离子体所 03 级博士, 主要从事离子束生物应用研究。E-mail: liujing@ipp.ac.cn

收稿日期: 2003-09-15, 修回日期: 2003-12-07

于 21℃ 恒温保湿箱中培养发病 5d 后考察各处理的防治效果。该试验由上海生物农药所协助测定。

1.5 粗提液稳定性的测定

1.5.1 热稳定性 :将粗提液分别经 108℃、115℃ 和 121℃ 高压灭菌处理,以孔径为 0.22μm 的微孔滤膜过滤的样品作为对照,用管碟法测抑菌活性,对照的抑菌活性定为 100%。

1.5.2 pH 稳定性 :通过直接调节粗提液的 pH 值考察环境酸碱度对抗菌物抑菌活性的影响,以未经酸碱调节的粗提液 (pH 为 7.0) 作为对照,其抑菌活性定为 100%。

1.5.3 蛋白酶稳定性 :37℃ 水浴条件下,用反应浓度均为 1mg/mL 的蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理粗提液不同时间,测酶处理液的抑菌活性,以不加酶处理的粗提液作为对照,抑菌活性定为 100%。

1.6 抗菌肽的分离纯化

粗提液经阴离子交换柱 DEAE-Sepharose FF、疏水柱 SOURCE 15 PHE、分子筛柱 Sephacryl S-200HR 和反相 C18 柱多步分离纯化,得到几个对黑曲霉、小麦赤霉病菌和水稻纹枯病菌均有抑制作用的活性组份,将得到的活性成分冷冻干燥后进一步分析。

1.7 抗菌肽分子量的测定

抗菌肽的分子量用两种不同的方法测定:首先用不连续的 SDS-PAGE 法,分离胶浓度为 14%,浓缩胶的浓度为 5%,SDS 的浓度为 0.1%,电泳后用考马斯亮兰染色;其次用 MALDI-TOF 质谱法进行抗菌肽分子量精确地测定,由中国科学技术大学生命科学实验中心采用 BIFLEXTM III 型 MALDI-TOF 协助测定。

1.8 抗菌肽氨基酸组成的分析

分离纯化得到的样品冻干后由中国医学科学院药物研究所采用日立 L-8500 氨基酸分析仪协助测定。

2 结果

2.1 粗提液抑菌活性

离体生测试验结果表明粗提液对水稻纹枯病菌、小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌和番茄青枯病菌有强烈的抑制作用;活体生测试验显示粗提液对黄瓜灰霉和菌核病菌有强烈的抑菌作用,同时对红蜘蛛有杀虫效应。

2.2 粗提液的稳定性

粗提液经 108℃、115℃ 和 121℃ 分别处理 10min,其抑菌活性均没有降低,即使 121℃ 处理

120min 后抑菌活性也仅下降 25%;由此表明粗提液中的抗菌物具有较好的热稳定性;对不同酸碱度的试验表明抗菌物的最适 pH 范围是 6.0~7.5,当 pH < 5.5 或者 pH > 9.0 时抑菌活性有明显的降低;粗提液用两种蛋白酶处理不同时间后,抑菌活性降低不明显,说明粗提液对蛋白酶 K、胰蛋白酶具有一定的耐受性。

2.3 抗菌肽的分离纯化

2.3.1 DEAE-Sepharose FF 柱层析 :将粗提液用 A 缓冲液 (20mmol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液) 充分透析,8000r/min 离心取上清液,过 A 缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱,用含 0.02~1.0mol/L (NH₄)₂SO₄ 的 A 缓冲液进行线性梯度洗脱,收集对黑曲霉、小麦赤霉病菌和水稻纹枯病菌均有抑菌作用的活性峰,并将收集的活性洗脱液经 Millipore 公司的 Stirred Cells 8050 超滤杯浓缩后(截留分子量为 1 kD)用含 1.0mol/L (NH₄)₂SO₄ 的 A 缓冲液充分透析。

2.3.2 SOURCE 15 PHE 柱层析 :将阴离子柱收集的活性组份上 A 缓冲液预平衡过的 SOURCE 15 PHE 柱,用 A 缓冲液淋洗至基线,再用含 0.02~1.00mol/L (NH₄)₂SO₄ 的 A 缓冲液进行线性梯度洗脱,最后用蒸馏水洗脱得到 3 个活性峰,收集合并后浓缩。

2.3.3 Sephacryl S-200HR 柱层析 :浓缩后的样品过含 0.5mol/L (NH₄)₂SO₄ 的 A 缓冲液预平衡的分子筛 Sephacryl S-200HR 柱,然后以同样的缓冲液洗脱,得到两个洗脱峰,收集活性峰样品浓缩,再经 Milli-Q 水充分透析。

2.3.4 反相 HPLC 分离 :100% 乙腈 (0.1% TFA) 平衡 C18 柱,将经分子筛后收集的活性组份上柱,用 30%~80% 乙腈 (0.1% TFA) 进行线性梯度洗脱,收集到若干分子量在 1000D 至 1500D 左右的多肽,在乙腈浓度达到 50% 左右时得到 3 种有活性的目标纯化产物(图 1)。收集抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3,冷冻干燥后得到白色粉末状的固体。

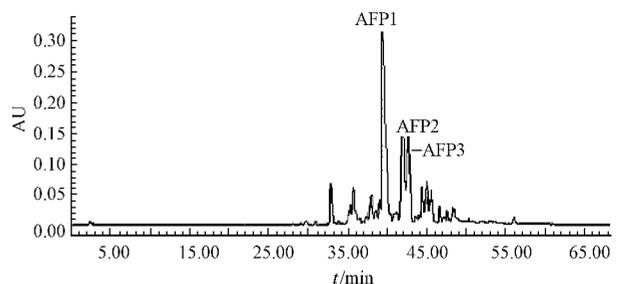


图 1 抗菌肽的 RP-HPLC 上的分离

Fig. 1 Purification of antimicrobial peptides on RP-HPLC column

2.4 抗菌肽分子量的测定

用 SDS-PAGE 测得抗菌肽的分子量在 10kD 左右 经 MALDI-TOF 质谱法测定,3 种主要的抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3 均为单一组份,分子量分别为 1462.645D、1476.390D 和 1490.530D。

2.5 抗菌肽抑菌活性的测定

管碟法试验结果表明 3 种抗菌肽对水稻纹枯病菌和小麦赤霉病菌都有抑制作用(图 2)。

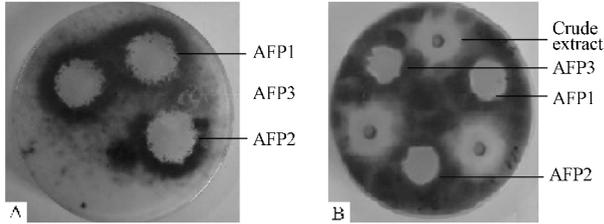


图 2 3 种抗菌肽对试验菌的抑菌活性

Fig.2 Inhibitory activity of antimicrobial peptides against the test microorganisms

A. *Rhizoctonia solani*; B. *Fusarium graminearum*.

2.6 氨基酸组成分析

样品经 6mol/L HCl 于 110℃ 氮气保护下水解 24h 采用日立 L-8500 氨基酸分析仪分析。结果表明分子量相差 28D 的 AFP1 和 AFP3 在氨基酸组成上相近(表 1),氨基酸组成分析表明 AFP1 由 1 个 Ala,1 个 Ile,1 个 Pro,1 个 Thr,3 个 Glx(Glu 或 Gln),2 个 Tyr 和 1 个可能存在的 Om 组成,而 AFP3 是 Ala 由 Val 代替,也含有 10 个氨基酸。AFP2 提取的样品较少,尚未作氨基酸组成分析;AFP1 和 AFP3 两者的区别只是 Val 与 Ala 的不同。

表 1 抗菌肽 AFP1 与 AFP3 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of antimicrobial peptides AFP1 and AFP3

Amino acid	Content/mol%		No. of residues	
	AFP1	AFP3	AFP1	AFP3
Thr	10.67	9.69	2.43(1)	2.24(1)
Glx (Glu or Gln)	34.83	33.59	7.95(3)	7.77(3)
Ile	8.77	8.65	2.00(1)	2.00(1)
Tyr	19.60	18.54	4.47(2)	4.29(2)
Pro	10.81	10.43	2.47(1)	2.41(1)
Val		10.51	0	2.23(1)
Ala	10.18		2.33(1)	
Om	It may be Om at 24.62min	It may be Om at 24.57min		

3 讨论

芽孢杆菌能产生多肽类的抗生素,这些抗菌肽

包括 Eleines, Bacitracins 及 Gramicidins 等,具有线状或环状结构,它们分子量小,热稳定性好,含有 D-氨基酸,能耐受蛋白酶的水解作用^[2]。对枯草芽孢杆菌 JA 粗提液性质的研究表明该抗菌物热稳定好且对蛋白酶 K 和胰蛋白酶都有一定的耐受性,这与抗菌肽分子量小和它可能有环状结构有关。

据已知的芽孢杆菌产生的抗菌肽如 1973 年 Peypoux 报道的 Iturin^[13];1986 年 Deleu 分离纯化得到的 Fengycin^[14,15]等,它们都是有环肽结构的脂肽,其家族中的抗菌肽除了氨基酸组成的微小差别外,它们的脂肪烃侧链的长度也存在较大的变化,从 JA 菌株发酵液提纯得到的抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3 其分子量大小相差 14D 或 28D,正好相当于一个或两个亚甲基的分子量,因此推断它们可能属于这一类的抗菌肽,因而 AFP2 的氨基酸组成很可能与 AFP1 和 AFP3 相似。

抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3 经 SOURCE 15 PHE 柱层析时,当用蒸馏水洗脱时才得到活性组份,再用反相 HPLC 分离目标产物,乙腈达到大约 50% 抗菌肽才能被洗脱,说明抗菌肽具有强疏水性。推断它们的强疏水性与可能存在脂链有关。SDS-PAGE 测定的分子量高于 MALDI-TOF 的测定结果,推测可能脂肽侧链的存在影响 m/z 从而影响抗菌肽电泳时的迁移率,所以测得的分子量偏大。得到的 3 个抗菌肽在测定用的 3 种检测菌的抑菌试验中均有抑菌活性,它们的分子量均为 1400D 以上且含有 10 个氨基酸与 FengycinA 与 FengycinB 在分子量和氨基酸组成上十分相似,但是理化性质不尽相同,如 3 个抗菌肽的水溶性都非常好,文献报道的 Fengycin^[14]不溶于水。有关抗菌肽脂肪酸部分的结构有待进一步的测定,以确定是否是新的抗菌肽。

某些抗菌肽对许多危害严重的病原真菌都表现出很强的抑菌活性,在农牧业中有很好的应用前景;另外抗菌肽能够在细菌质膜上形成离子通道,破坏膜势,引起胞内物质泄漏,从而杀死细菌,一般不易产生耐药性和交叉抗性,很可能成为新药的来源。本实验室从 JA 菌株分离纯化得到的抗菌肽对多种植物病原真菌有强抑制作用,并且对某些植物细菌和人类致病真菌也有抑制作用,相关实验正在研究中。

致谢 感谢安徽大学生命科学院肖亚中教授给予了支持和悉心指导。

参 考 文 献

- [1] BoDnszky M , Perlman D. Peptide Antibiotics. *Science* , 1969 , **163** : 352 - 358.
- [2] Bulla L A Jr , Hoch J A. Biology of the Bacilli. In : Demain A L , Solomn N A. ed. Biology of industrial microorganisms. 1985 , 57 - 78.
- [3] 喻子牛主编. 微生物农药及其产业化. 北京 : 科学出版社 , 2000 , 1 - 11.
- [4] 刘伊强 , 王雅平 , 潘乃穰 , 等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 B I 的纯化和部分特性. *植物学报* , 1994 , **36** (3) : 197 - 203.
- [5] 刘进元 , 潘乃穰 , 陈章良. 抗菌蛋白 LC II B 的纯化及性质. *微生物学报* , 1993 , **33** (4) : 268 - 273.
- [6] 林 东 , 徐 庆 , 刘忆舟 , 等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化. *农业生物技术学报* , 2001 , **9** (1) : 77 - 80.
- [7] 胡 剑 , 赵永岐 , 王岳五. 枯草杆菌 BS-98 分泌的抗真菌蛋白的分离纯化及其部分性质的研究. *微生物学通报* , 1997 , **24** (1) : 3 - 7.
- [8] 谢 栋 , 彭 憬 , 王津红 , 等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98 III 的纯化与性质. *微生物学报* , 1998 , **38** (1) : 13 - 19.
- [9] 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* , 1999 , **39** (4) : 339 - 343.
- [10] 裴 炎 , 李先碧 , 彭红卫 , 等. 抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性. *微生物学报* , 1999 , **39** (4) : 344 - 49.
- [11] 刘 颖 , 徐 庆 , 陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析. *微生物学报* , 1999 , **39** (5) : 441 - 447.
- [12] 徐积恩 , 朱明珍. 抗生素. 北京 : 科学出版社 , 1982 , 152.
- [13] Peypoux F , Guinand M , Michel G , et al. Structure of iturin A , an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* , 1978 , **17** (19) : 3992 - 3996.
- [14] Vanittanakom N , Loeffler W , Koch U , et al. Fengycin—A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiotics* , 1986 , **39** (7) : 888 - 901.
- [15] Deleu M , Razafindralambo H , Popineau Y , et al. Colloids surfaces A. *Physicochem Eng Aspects* , 1999 , **152** : 3 - 10.

Properties of The Crude Extract of *Bacillus subtilis* and Purification of Antimicrobial Peptides

LIU Jing WANG Jun YAO Jian-Ming PAN Ren-Rui YU Zeng-Liang*

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering , Chinese Academy of Sciences , Hefei 230031 , China)

Abstract : Three types of antimicrobial peptides , named AFP1 , AFP2 and AFP3 , which all had strong inhibitory activity against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium graminearum* were purified from the crude extract of *Bacillus subtilis* JA . Their molecular weights were 1462.645D , 1476.390D and 1490.530D respectively , determined by MALDI-TOF mass spectrometry . The amino acid compositions of the two antimicrobial peptides were analyzed and the results showed that the purified materials were composed of Thr , Ile , Pro , Val , Glx (Glu or Gln) and so on . The peptides were found to be thermostable and partial resisted proteinases . It appeared that the peptides may be cyclic lipopeptides .

Key words : *Bacillus subtilis* JA , Purification , Antibacterial peptide

Foundation item : National Key Technologies R & D Program of China (2001BA302B-4) ; Natural Science Foundation of Anhui Province (01041401)

* Corresponding author. Tel : 86-551-5592189 ; Fax : 86-551-5591310 ; E-mail : zlyu@ipp.ac.cn

Received date : 09-15-2003

《微生物学报》综述文章投稿说明

本刊一些综述类来稿存在一些问题 , 主要表现为 : 篇幅庞大 , 罗列文献 , 内容空泛 , 缺乏观点 . 为使此栏目更加新颖并具有可读性 , 特提出几点说明 , 欢迎大家根据要求 , 踊跃投稿 , 并提出你们对该栏目的建议和想法 .

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review) , 来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献) .
2. 综述的选题要有新意 , 对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值 .
3. 参考文献应控制在 40 篇以内 , 近 3 年发表的文献不少于 10 篇 .
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 , 不要泛泛罗列文献 , 只述不评 .
5. 应结合自己的研究工作 , 就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点 .
6. 欢迎投送 ' 能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义 ' 的述评类文章 .