

## 抗菌蛋白 LCIIB 的纯化及性质

刘进元\* 潘乃穰 陈章良

(北京大学生物学系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

枯草杆菌 A014 培养液经硫酸铵沉淀、CM-52 纤维素柱层析、FPLC 的 Mono S 和 Superose 12 柱层析, 分离纯化出一种抗菌蛋白, 命名为 LCIIB。电泳分析结果表明该蛋白的分子量为 22500Da, 等电点为 9.95。LCIIB 含 19 种不同氨基酸, 缺少半胱氨酸。自动 Edman 降解法从 N 端测出 24 个氨基酸残基, 经计算机分析, 表明与 2 万多种已知蛋白没有有效同源性。纯化后的 LCIIB 对水稻白叶枯病菌有很强的抑制作用, 当浓度在 5 $\mu$ mol/L 时, 能抑制 50% 此菌 G 株系的生长。

**关键词** 抗菌蛋白; 枯草杆菌; 水稻白叶枯病

抗菌蛋白广泛存在于植物<sup>[1]</sup>、微生物<sup>[2]</sup>、昆虫<sup>[3]</sup>及动物<sup>[4]</sup>等生物体内, 分离纯化利用抗菌蛋白一直是人类的主要研究课题之一。已报道的为数不多的抗菌蛋白大部分是从微生物分离来的; 其中可抑制植物病原菌生长的蛋白质, 可应用于进行抗病的植物基因工程, 在当今具有特别重要的研究价值及应用前景<sup>[5]</sup>。

芽孢杆菌的许多菌株产生抗菌物质, 其中大部分是低分子的抗生素<sup>[6]</sup>, 也有一些蛋白性的抗菌物质, 研究得较清楚的是由 *Bacillus megaterium* 所产生的抗菌蛋白 megacin<sup>[2]</sup>, 而在 *B. subtilis* 中发现的蛋白性抗菌物已证明是缺陷型噬菌体<sup>[7]</sup>, 还未见有分离纯化出抗菌蛋白的报道。

近年来, 本实验室成功地分离出一株强抗水稻白叶枯病菌的枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) A014, 并对其拮抗物质进行初步探讨, 发现拮抗作用主要是由其抗菌蛋白来完成的<sup>[8,9]</sup>。本文将详细报道这些抗菌蛋白中的一种——LC IIB 的分离纯化及其性质。

### 材 料 与 方 法

#### (一) 供试菌株及抗菌蛋白的提取

分泌抗菌蛋白的枯草杆菌 A014 和供试指示菌的来源与培养, 以及抗菌蛋白的粗提取步骤详见文献 [8]。

#### (二) 抗菌蛋白的分离纯化

1. 阳离子交换层析: 将 CM-52 纤维素 (Whatman 公司产品) 按常规处理后装柱 ( $\phi$  2.6  $\times$  40cm), 用 Tris-Cl 缓冲液 50 mmol/L, (pH7.8) 平衡。将适量的抗菌蛋白粗提液上样后, 先用同缓冲液淋洗至基线, 再用 0-1mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集活性组分供进一步纯化。

本文于 1991 年 12 月 13 日收到。

\* 现地址: 清华大学生物科学与技术系, 北京。

本研究得到本系杨端教授、袁洪生老师、罗静初老师的大力支持, 谨此一并致谢。

2. 快速液相色谱 (FPLC) 层析: 将上述活性部分用 FPLC 的离子交换柱 Mono S HR 5/5(Pharmacia) 作进一步纯化。上样后以 0—1mol/L NaCl(于 50mmol/L NaAc 缓冲液中, pH 4.8) 线性梯度洗脱, 收集抗菌活性流出液, 上 Superose 12 柱 (Pharmacia) 再次纯化, 纯化后的活性部分供以下试验使用。

### (三) 抗菌活性测定

常规分析用平板扩散法, 以抑菌圈直径表示样品抗菌活力。

抑菌浓度测定采用固体平板法<sup>[10]</sup>, 即将抗菌蛋白按一定浓度加入于 45 °C 保温的培养基 (2ml) 中, 再加入指示菌悬浮液 50 $\mu$ l(约 10<sup>3</sup> cfu/ml), 混匀后倒入内径 3.2cm 小型培养皿中, 凝固后于 28 °C 培养, 3 天后观察菌落数, 计算其抑菌率。

### (四) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照 Laimmli 方法<sup>[11]</sup>, 用 Tris 缓冲系统, 在变性条件下进行。分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 3.5%, 含 0.1% SDS。电泳后用考马斯亮兰染色。

### (五) 等电聚焦电泳

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳参考文献 [12] 的方法, 用含 0.7% 两性载体电解质 (Ampholine pH 3.5—10, Pharmacia), 在 24 °C 下聚焦两小时, 以标准蛋白 (pH5.5—10.5, Pharmacia) 为参照测定样品的 pI 值。

### (六) 氨基酸组成分析

样品经 5.7mol/L 恒沸盐酸于 110 °C 水解 24 小时, 蒸去盐酸后, 溶于 0.2ml/L 的 pH2.2 标准柠檬酸缓冲液中, 用自动氨基酸分析仪 (Beckman 121 MB) 分析其全组成。半胱氨酸残基以甲磺酸水解, 色氨酸残基以碱水解后另行测定。

### (七) N 端氨基酸序列测定

样品溶于 50 $\mu$ l(0.1mol/L) 乙酸中, 上样后, 自动 Edman 降解在一台 Applied Biosystems 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——苯异硫氨酸氨基酸用 Applied Biosystems 120 型 PTH 分析仪分析。

## 结 果

### (一) LCIIB 抗菌蛋白的分离纯化

经硫酸铵沉淀后的抗菌蛋白粗提物, 溶解在 1/15 原提取液体积的 Tris 缓冲液 (50mmol/L, pH 7.8) 中, 对同缓冲液透析 (透析袋截留分子量 3500Da) 后, 进行阳离子交换柱层析, 结果如图 1 所示, 形成 3 个主峰。以水稻白叶枯病菌 G 株系为指示菌, 用平板扩散法测定其抗菌活性, 结果都形成清晰透明的抑菌圈, 表明都有很强的抑菌作用。定量分析结果表明峰 I 的抗菌活性最强, 峰 III 的活性较峰 II 为弱, 峰 I、峰 III 的结果另文发表, 本文报道活性

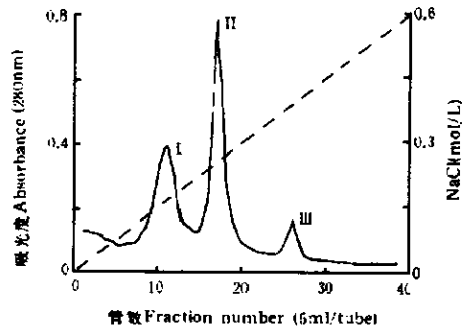


图 1 抗菌蛋白的 CM-52 柱上的分离  
Fig. 1 Isolation of antibacterial protein on CM-52 column

峰 II 的分离纯化及其性质。

经 CM-52 纤维素柱层析后的活性峰 II, 对 50mmol/L 醋酸缓冲液 (pH4.8) 透析去盐, 调整浓度 ( $A_{280} = 1.0$ ) 后, 上 FPLC 的 Mono S 柱, 进行纯化。结果如图 2- I 所示, 形成 2 个主峰, 分别称为 II A、II B。抗菌活性检测结果表明, 峰 II A 没有抗菌活性, 峰 II B 有较高的抗菌活性。活性峰 II B 所含主要物质被命名为 LCIIB。此抗菌蛋白最后上 Superose12, 呈现单一活性主峰 (图 2- II), 表明 LCIIB 已达一定纯度, 可供理化性状分析使用。另外图 2- II 活性主峰两侧的小峰, 经检测无抗菌活性。

## (二) LCIIB 的理化性状

1. 电泳分析: SDS-PAGE 结果如图 3- I 所示, LCIIB 呈单一条带, 其表观分子量为 22500Da, 这与 Superose 12 柱层析分析结果一致 (图略)。等电聚焦电泳分析表明, LCIIB 是碱性蛋白质, 其等电点为 9.95 (图 3- II)。

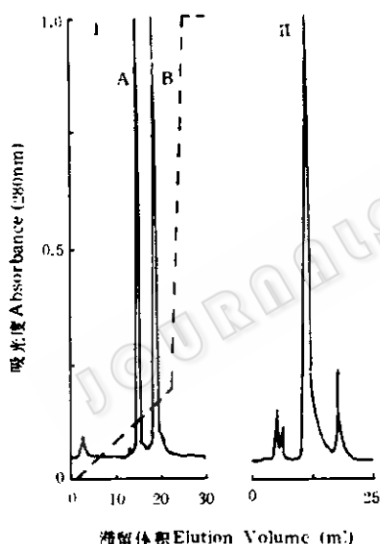


图 2 LCIIB 在 FPLC Mono S 柱 (I) 和 Superose 12 柱 (II) 上的纯化

Fig. 2 Purification of LCIIB by Mono S (I) and Superose 12 (II) on FPLC

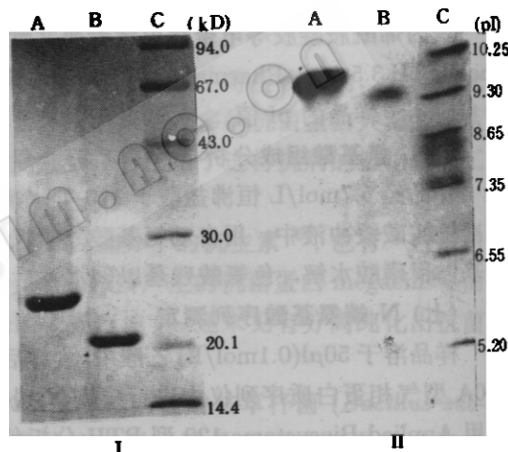


图 3 抗菌蛋白 LCIIB 的电泳分析

I: SDS-PAGE (A. LCIIB; B. LCIIA; C. 标准蛋白);  
II: 等电聚焦电泳 (A. LCIIB; B. LCIIA; C. 标准蛋白)

Fig. 3 Electrophoresis profiles of LCIIB

I: SDS-PAGE (A. LCIIB; B. LCIIA; C. standard proteins)

II: Isoelectric focusing (A. LCIIB; B. LCIIA; C. Standard proteins)

2. 氨基酸组成分析: LCIIB 用盐酸水解后, 在自动氨基酸分析仪上测出所含各种氨基酸残基的摩尔比, 还用甲磺酸水解和碱水解的检测结果来校正相关氨基酸残基的摩尔比。由表 1 可见, LCIIB 由 19 种氨基酸组成, 不含半胱氨酸。其中门冬氨酸和谷氨酸包括其酰胺形式。

3. 部分氨基酸序列: 用自动 Edman 降解蛋白序列仪测定。从 N 末端测出了 24 个氨基酸残基的排列顺序 (图 4), N 端第一位为丙氨酸。这为合成探针和克隆编码 LCIIB 蛋白基因奠定了基础。

表 1 抗菌蛋白 LCIIB 的氨基酸组成\*

Table 1 Amino acid composition of antibacterial protein LCIIB

氨基酸 Amino acid	n mol	摩尔比 (残基数) Molar ratio (Residues)		%
Asp	65.375*	17.34	17	8.54
Thr	78.801	20.90	21	10.55
Ser	79.734	21.15	21	10.55
Glu	66.844*	17.73	18	9.05
Pro	17.669	4.69	5	2.51
Gly	76.491	20.29	20	10.05
Ala	42.830	11.36	11	5.53
Cys	0	0	0	0
Val	49.410	13.11	13	6.53
Met	12.595	3.34	3	1.51
Ile	52.712	13.98	14	7.04
Leu	48.281	12.81	13	6.53
Tyr	38.884	10.31	10	5.03
Phe	20.763	5.51	6	3.02
Lys	54.853	14.55	15	7.54
His	8.659	2.31	2	1.01
Trp	14.692	3.90	4	2.01
Arg	20.649	5.51	6	3.02
合计 Total			199	

\* 包括相应的酰胺

\* Including the corresponding amide

H<sub>2</sub>N-Ala-Ser-Gln-Leu-Ser-Lys-Gly-Ile-  
Gly-Gly-Arg-Ala-Tyr-Lys-Asn-Ser-  
Gln-His-Ser-Val-Leu-Val-Gln-Trp-

图 4 抗菌蛋白 LCIIB 的部分氨基酸排列顺序

Fig. 4 Partial amino acid sequence of antibacterial protein LCIIB

### (三) 抗菌蛋白 LCIIB 的抗菌活性

根据对粗提物抗菌谱测定, 已知对水稻白叶枯病菌及蔬菜青枯病菌有强烈抑制作用。本实验选用了来自不同地区的 6 株白叶枯病菌, 2 株青枯病菌以及数株动物病原菌, 用平板扩散法进行抗菌活性测定, 结果(表 2)表明对所测 6 株白叶枯病菌均有较强抑制作用, 对 G 株系作用最强, 对青枯病菌抑制作用不强, 而对几株动物病原细菌则无抑制效果。

为了定量估价 LCIIB 的抑菌效果, 按上述固体平板法进行测定, 结果是随着培养基中抗菌蛋白浓度上升, 白叶枯病菌的菌落形成率下降, 抑制 50% 的 G 株系生长浓度约为 5 $\mu$ mol/L。

表 2 抗菌蛋白 LCIIB 的抑菌活性  
Table 2 Antibacterial activity of LCIIB

病原细菌	抑菌活性
Pathogenic bacterium	Inhibition activity
<i>Xanthomonas campestris</i>	
<i>pv.oryza</i> G	++++
<i>pv.oryza</i> COX4	++
<i>pv.oryza</i> CNX17	+++
<i>pv.oryza</i> GX01	+++
<i>pv.oryza</i> GXBT	++
<i>pv.oryza</i> JX03	++
<i>Pseudomonas</i>	
<i>solanacearum</i> P01	+
<i>solanacearum</i> PE1	+
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-

\* 平板扩散法测定, 每孔加入 50  $\mu$ l 的抗菌溶液 (5  $\mu$ mol/L)。+ 表示抑菌圈直径 (mm)。+: 7.1—10.0; ++: 10.1—15.0; +++: 15.1—20.0; ++++: 20.1 以上; -: 无抑菌活性

\* Tested by plate diffusion method and added 50  $\mu$ l solution of LCIIB (5  $\mu$ mol/L) per hole. +: showed diameter of inhibiting zone (mm). +: 7.1—10.0; ++: 10.1—15.0; +++: 15.1—20.0; ++++: > 20.1; -: No activity

## 讨 论

自从 1945 年 Johnson 等<sup>[13]</sup>报道枯草杆菌产生抗菌物质后, 近半个世纪来, 人们已从枯草杆菌的不同菌株中发现了数十种抗菌物质<sup>[6,7,14,15]</sup>。经过对这些抗菌物质的化学分析, 弄清了这是一类从简单分子到复杂复合物, 即从杆菌肽<sup>[6]</sup>、大环脂<sup>[14]</sup>、环肽<sup>[15]</sup>到类似噬菌体颗粒<sup>[7]</sup>等这样不同组成的物质, 还未见有分离纯化出抗菌蛋白的报道。本实验室选出的枯草杆菌 A014, 分泌多种杀死植物病原细菌的蛋白, 本文报道的 LCIIB 蛋白为此菌的主要抗菌成分之一。弄清此蛋白的氨基酸残基顺序, 为基础和应用研究提供可靠的依据是十分必要的。

经过 3 次柱层析, 纯化的 LCIIB, 在 SDS-PAGE 上呈单一条带, 分子迁移率较标准蛋白——胰蛋白酶抑制剂稍后, 分子量计算值为 21795.74Da。从它的氨基酸组成及部分序列来看, 所含的碱性氨基酸比例较高, 这与等电聚焦电泳结果 (pI=9.95) 一致, 因此在组分分析中显示的谷氨酸及天冬氨酸含量可能大部分是它的酰胺形式。

在所测的 N 端氨基酸残基顺序中, 疏水性氨基酸占 46%, 碱性氨基酸占 17%, 这与一些杀菌蛋白 N 端分析数据相似<sup>[16]</sup>。经计算机分析, 此蛋白 N 端部分序列与 NBRF 蛋白质文库 2 万多种蛋白序列无有效同源性, 表明这是一种新的功能蛋白。

水稻白叶枯病是水稻的三大病害之一, 在世界主要水稻产区普遍发生, 加之没有有效的防治措施, 危害十分严重<sup>[17]</sup>。现代生物技术的发展为抗病育种开辟了新途径。LCIIB

对水稻白叶枯病菌有很强的专一性的抑制效果, 无疑是应用于水稻抗病育种的好材料。部分氨基酸残基的序列分析已为合成 DNA 探针、克隆编码 LCIIB 蛋白的基因提供了依据。

### 参 考 文 献

- [1] Roberts, W. K. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **880**: 161—170, 1986.
- [2] Von Tersch, M. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **155**: 866—871, 1983.
- [3] Okata, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**: 7174—7177, . 1985.
- [4] Scheit, K. H. et al.: *J. Biochem.*, **97**: 463—471, 1985.
- [5] 潘乃健、陈章良: 自然, **13**: 80—83, 1990.
- [6] 王 岳、方金瑞主编: 抗生素, 第 453—471 页, 科学出版社, 北京, 1988 年.
- [7] Tagg, J.R. et al.: *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722—756, 1976.
- [8] 刘进元等: 植物学报, **33**: 157—161, 1991.
- [9] Liu, J.Y. et al.: *Rice Genetic Newsletter*, **7**: 151—154, 1991.
- [10] 刘进元等: 日本植物病理学报, **52**: 669—674, 1986.
- [11] King, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **62**: 465—473, 1971.
- [12] laas, T. et al.: *Anal. Biochem.*, **101**: 449—461, 1980.
- [13] Johnson, A. B. et al.: *Science*, **102**: 376—377, 1945.
- [14] Zimmerman, S. B. et al.: *J. Antibiotics*, **40**: 1677—1681, 1987.
- [15] Peypoux, F. et al.: *J. Antibiotics*, **39**: 636—641, 1986.
- [16] Preuss, K. D. et al.: *Biochem. Hoppe-Seyler*, **368**: 501—506, 1987.
- [17] Mew, T. W.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**: 359—382, 1987.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBACTERIAL PROTEIN FROM *BACILLUS SUBTILIS*

Liu Jinyuan Pan Naisui Chen Zhangliang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Department of Biology,  
Peking University, Beijing 100871)

An antibacterial protein was purified from the cultures of *Bacillus subtilis* A014 by Mono S and Superose 12 columns on FPLC and named LC IIB. This protein was a single entity on SDS -PAGE and gel permeation chromatography with 22500 Da and had an isoelectric point of 9.95. Amino acid analysis showed that it was devoid of cysteine and comprised of 19 different amino acids. 24 amino acid residues of N -terminator of the protein were sequenced by Edman degradation, and computer analysis of this sequence revealed no significant homology to any other sequences in the NBRF protein library. Purified LCIIB has strong inhibiting activity against the pathogen of rice leaf blight disease (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and could inhibit the growth of 50% G strain of this pathogen at concentration of . 5 $\mu$ mol/L.

**Key words** Antibacterial protein: *Bacillus subtilis*: Rice leaf blight disease