

枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98Ⅲ的纯化与性质

谢 栋 彭 憬 王津红 胡 剑* 王岳五

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘 要 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS-98 是一株能强烈抑制苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*) 等植物病原真菌的拮抗菌株。BS-98 菌株培养液经硫酸铵分级盐析、Sephadex G-100 柱层析和 DEAE-纤维素 (DE 32) 柱层析后分离纯化出一种抗菌蛋白, 命名为 X98Ⅲ。蛋白电泳分析结果表明, 此蛋白分子量为 59 000, 等电点为 4.50。醋酸纤维膜电泳后经特异染色证明 X98Ⅲ含糖及脂。用 DNS 法测其含糖量为 6%。此蛋白对热稳定, 对蛋白酶部分敏感。氨基酸组分分析表明, 该蛋白含 11 种不同氨基酸, 尤富含谷氨酸和半胱氨酸等, 而缺少天冬氨酸等。纯化后的 X98Ⅲ对苹果轮纹病菌、芦笋茎枯病菌等有很强的抑制作用。X98Ⅲ的抑菌机理主要是溶解细胞壁, 造成菌丝畸形、孢子不发芽或发芽异常。

关键词 枯草芽孢杆菌 BS-98, 抗菌蛋白, 纯化, 苹果轮纹病, 拮抗

分类号 Q936

枯草芽孢杆菌具有抑制植物病害的能力, 又是自然界中广泛存在的非致病细菌, 对人畜无害, 不污染环境^[1]。因此, 自 1945 年 Johnson 等报道枯草芽孢杆菌产生抗菌物质后^[2], 近半个世纪以来, 各国的研究工作者对它可望成为一种生物控制因素而寄予极大的兴趣和关注。其产生的抗菌物质大多为低分子抗生素^[3], 也有一些蛋白类抗菌物^[4]。

迄今大多数抑制植物病原菌和腐生真菌离体生长的蛋白质都是从植物材料中鉴别出来的, 但在微生物中也同样存在^[4,5]。如果将编码此种抗菌蛋白的基因转入植物体内, 使该植物也能合成微生物起源的抗真菌蛋白, 则该植物也同样能显示出抗真菌性。因此, 寻找某些能抑制病原真菌生长繁殖的抗菌蛋白基因, 将其纯化并导入植物体内, 是目前农作物抗真菌病害基因工程研究的一大重点。

本室近年分离到一株枯草芽孢杆菌 BS-98, 对苹果轮纹病菌、芦笋茎枯病菌等有强烈抑制作用, 是具有广谱抗真菌病害的拮抗菌。本文将详细报道该拮抗菌的抗菌活性物质——抗菌蛋白 X98Ⅲ的分离纯化及其性质, 并对其拮抗机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 拮抗菌 *Bacillus subtilis* BS-98 由本室筛选分离; 苹果轮纹病

* 现在中国农业大学生物学院, 北京 100094。

收稿日期: 1996-08-22

菌(*Phylospora piricola*)、芦笋茎枯病菌(*Phoma asparagi*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、黄萎轮枝孢(*Verticillium albo-atrum*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)均由本校元素研究所提供。

1.1.2 试剂: Sephadex G-100为瑞典进口分装, DE32为Whatman产品, 标准分子量蛋白为北京天象人生物工程公司产品, 标准等电点蛋白及pH4~10的Ampholyte carrier为Bio-Rad产品, 胰蛋白酶为华美生物工程公司产品, 胃蛋白酶为上海长城生化制药厂产品, 链霉蛋白酶为德国进口产品, 考马斯亮蓝R-250, G-250为进口分装。

1.2 方法

1.2.1 BS-98菌株的培养: BS-98菌株在如下最佳发酵条件培养: BPY液体培养基(%): 牛肉膏0.5, 蛋白胨1, 酵母粉0.5, NaCl 0.5, 葡萄糖0.5, pH7.0; 装液量100ml / 500ml三角瓶, 30℃, 120r / min振荡培养48h(最佳条件选择见文献[6])。

1.2.2 抗菌活性测定——杯碟测定法^[7]: 在PDA或LB平板上分别加入100 μ l病原真菌或病原细菌的悬液涂布, 制成待测平板, 再将灭菌钢圈(ϕ 8mm \times 10mm)分别置于平板上, 取100 μ l抗菌蛋白(600 μ g / ml)注入钢圈内。病原真菌28℃培养4d, 病原细菌37℃培养24h, 检测抑菌圈大小。

1.2.3 蛋白质浓度测定: 按文献[8]方法。

1.2.4 抗菌蛋白的制备与纯化:

提纯步骤: 离心后的发酵上清液 \rightarrow 硫酸铵分级盐析 \rightarrow 透析, 浓缩粗蛋白液 \rightarrow Sephadex G-100柱纯化 \rightarrow PEG6 000浓缩 \rightarrow DEAE-纤维素柱纯化 \rightarrow 透析, 浓缩得纯品。

硫酸铵分级盐析饱和度的确立: 参见文献[9]。

Sephadex G-100柱层析^[10]: 将Sephadex G-100按常规处理后装柱(ϕ 2.5 \times 80cm)。用20mmol / L pH6.8磷酸缓冲液平衡。将适量的抗菌蛋白粗提液上样后, 用同种缓冲液洗脱, 流速为18ml / h, 收集活性组分供进一步纯化。

DEAE-纤维素(DE 32)柱层析^[10]: 将DE 32按常规处理后装柱(ϕ 1.8 \times 17.8cm), 用磷酸缓冲液平衡。适量的上述活性部分上样后, 先用同种磷酸缓冲液淋洗至基线, 再用0~1mol / L NaCl梯度洗脱, 收集活性组分即为纯品, 供以下试验使用。

1.2.5 蛋白质分子量测定: 按文献[11]方法进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分离胶浓度为10%, 浓缩胶浓度为5%。

1.2.6 蛋白质等电点测定: 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(PAGE-IEF), 参见文献[10, 12]。用含1%两性载体电解质(Ampholine pH 4~10, Bio-Rad)的7.5%聚丙烯酰胺凝胶, 先聚合, 以标准蛋白(pH4.5~10, Bio-Rad)为参照测定样品PI值。

1.2.7 蛋白质含糖、含脂测定: 用醋酸纤维膜电泳法, 并采用特异的糖、脂染色, 醋酸纤维膜电泳参见文献[13], 缓冲液为巴比妥缓冲液(pH8.6, I = 0.0075)。

糖蛋白染色采用甲苯胺蓝染色法, 参见文献[12]。脂蛋白染色采用亚硫酸品红染色法, 参见文献[13](臭氧来自紫外灯)。

1.2.8 含糖量的测定: 采用DNS法, 参见文献[13]。

1.2.9 氨基酸组成分析: 样品经6mol / L HCl于110℃真空水解24h, 用Beckman 6300

氨基酸分析仪分析。

1.2.10 对温度的敏感性实验：纯化抗菌蛋白(600μg/ml)分别置于30~100℃处理30min, 115℃、120℃高温高压下灭菌30min, 用不处理的样品作为对照, 检测其抑菌活性, 将对照的抑菌活性定为100%。

1.2.11 对蛋白酶敏感性实验：提纯蛋白(600μg/ml)与蛋白酶K、胰蛋白酶、链霉蛋白酶及胃蛋白酶在最适酶促条件下37℃反应90min(酶解反应浓度均为1μg/ml), 测其抑菌活性, 不用酶液处理作对照, 定其抑菌活性为100%。

1.2.12 抗菌蛋白抑菌谱：用杯碟法分别检测提纯的抗菌蛋白(600μg/ml)对各种植物病原菌的抑菌活性。

1.2.13 抗菌蛋白的抑菌机制：

喷淋菌落实验：将提纯的抗菌蛋白(600μg/ml)用小型喉头喷雾器喷淋平板培养的苹果轮纹病菌菌落, 每皿2ml, 28℃培养, 定时镜检, 以无菌水喷淋平皿为对照。

孢子萌发实验：接小麦赤霉菌于PDA-小麦平板(%)：马铃薯20, 葡萄糖2, 小麦煎汁20, 琼脂粉1.2, pH自然。28℃暗培养6d, 每皿用10ml无菌水洗下菌苔, 经灭菌的四层纱布过滤制成孢子悬液, 取10μl孢子悬液与10μl抗菌蛋白(600μg/ml)混合, 以凹玻片悬滴法置于纱布保湿的培养皿中, 室温培养, 定时镜检, 对照为10μl孢子悬液加10μl无菌水。

对菌丝的作用：将PDA斜面培养好的苹果轮纹菌及小麦赤霉菌制成菌丝悬浮液, 用提纯的抗菌蛋白(600μg/ml)处理, 作凹玻片悬滴培养于纱布保湿的培养皿中, 无菌水为对照, 定时镜检。

2 结果

2.1 抗菌蛋白 X98Ⅲ的分离纯化

2.1.1 硫酸铵饱和度确立：由图1可见, 70%以上饱和度, 抑菌活性不再增加, 说明70%

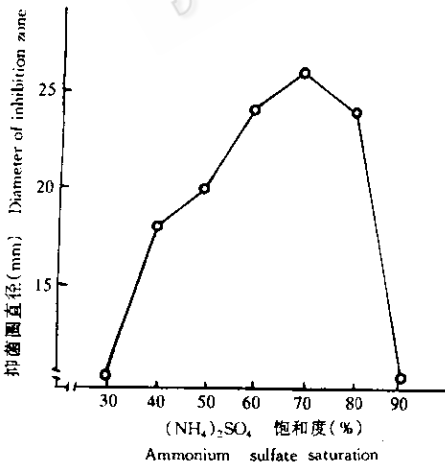


图1 (NH₄)₂SO₄饱和度对提取抗菌蛋白及活性的影响

Fig. 1 Effect of ammonium sulfate saturation on antifungal protein activity

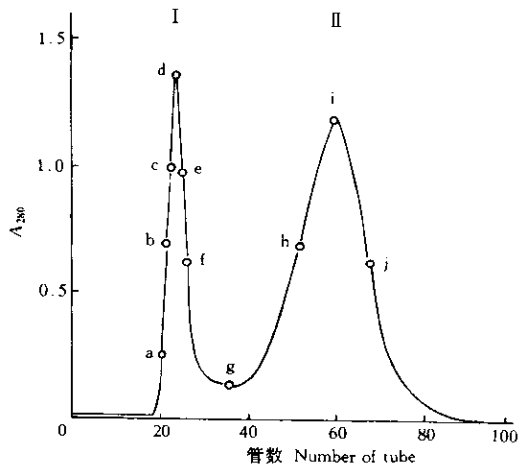


图2 抗菌活性物质Sephadex G-100柱层析图

Fig. 2 Elution profile of antifungal substance by sephadex G-100 chromatography

饱和度时此抗菌蛋白已沉淀完全,在 30% 以下饱和度时,活性几乎为零,表明此饱和度下沉淀出的蛋白大多数为杂蛋白,不含抗菌蛋白,由此可确定分级盐析两饱和度为 30% 及 70%。

2.1.2 Sephadex G-100柱层析: 洗脱结果如图 2 所示,分离得到两个蛋白峰,用苹果轮纹病菌及小麦赤霉病菌为指示菌进行检测,峰 I 有很强的抑菌活性,而峰 II 没有抑菌活性,以活性最大与最小一半处为上、下限,合并收集峰 I,浓缩后至 -20°C 保存。(柱: $2.5 \times 80\text{cm}$; 缓冲液: 20mmol/L 磷酸缓冲液, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}6.5$; 流速: 18ml/h)

2.1.3 DEAE-cellulose (DE32)层析结果: 经 Sephadex G-100 柱层析后的活性峰 I 浓缩后加到预先用磷酸缓冲液平衡的 DE32 柱上,上样后用 $0\sim 1\text{mol/L}$ NaCl 洗脱,洗脱结果如图 3 所示,分离得到三个主峰。经检测峰 I、II 均无抑菌活性,而峰 III 显示出极强的抑菌活性。同上收集活性 III 组分,将此组分蛋白命名为 X98 III。用蒸馏水透析脱盐,浓缩后于 -20°C 保存。(柱: $1.8 \times 17.8\text{cm}$; 缓冲液: 20mmol/L 磷酸缓冲液, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH}6.5$; 流速: 18ml/h)

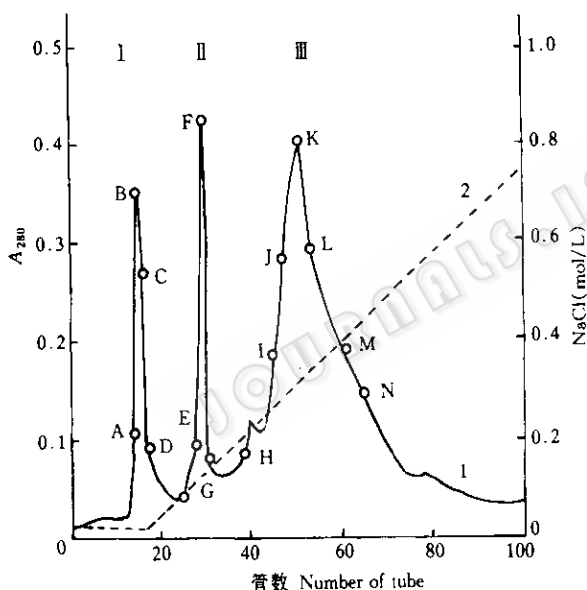


图3 抗菌活性物质DEAE-纤维素层析图

Fig. 3 Elution profile of antifungal substance by DEAE-cellulose chromatography

1. A_{280} ; 2. NaCl .

膜上清晰显示出一条红色的带,由此证明该抗菌蛋白含有脂肪酸,是一种脂蛋白。这是由于臭氧能将脂肪酸的双键氧化,所产生醛基类物质遇到亚硫酸品红后,会生成紫红色复合物的缘故。

2.2.4 含糖量测定: 以 DNS 法测得此蛋白 X98 III 含糖 6%。从分子量计算可知该抗菌蛋白分子量为 59 000。据此结果可粗略估算 X98 III 一个分子所含寡糖数(以葡萄糖为基本单位,分子量为 180)为 20 个。

2.2.5 氨基酸组成分析: 从氨基酸组成(表 1)看, X98 III 含 11 种氨基酸,富含 Glu, Tyr, Lys

2.2 抗菌蛋白 X98 III 的性质

2.2.1 分子量的测定: 经 SDS-PAGE 鉴定此抗菌蛋白 X98 III 为单一的蛋白带,无亚基组成,其表观分子量为 59 000(图 4)。

2.2.2 等电点的测定: 选择 $\text{PI}4.65\sim 9.60$ 标准参照蛋白与抗菌蛋白 X98 III 进行。PAGE-IEF 结果如图 5。X98 III 为单一条带, PI 约为 6.50, 偏酸性。

2.2.3 糖脂检测:

糖的检测: 经糖的特异染色——甲苯胺蓝染色后,醋酸纤维素膜上清楚地显示出一条深蓝色的带,由此证明该抗菌蛋白 X98 III 含有糖组分,是一种含糖蛋白。

脂的检测: 经脂的特异性染色——亚硫酸品红染色后,醋酸纤维素

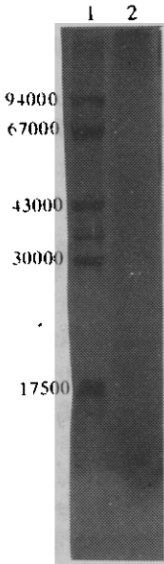


图4 抗菌蛋白 SDS-PAGE图谱

Fig.4 Antifungal protein SDS-PAGE spectrum

1. 标准分子量蛋白 Standard molecular weight protein;
2. 经提纯的抗菌蛋白 X98Ⅲ Purified antifungal protein X98Ⅲ.

及 Thr, 此四种氨基酸占总量的 68%; 而缺少 Asp, Ser, Gly, Met, Phe 及 Arg, 氨基酸残基数约为 370 个。

2.2.6 X98Ⅲ 对温度的敏感性: 在 30~

100℃ 范围内对抗菌蛋白加热处理 30min 后, 可保持 100% 抑菌活性, 而在 115℃ 及 121℃ 灭菌处理 10min 后, 仍可保持 77% 及 54% 的活性, 说明该抗菌蛋白 X98Ⅲ 对热稳定。

表1 抗菌蛋白X98Ⅲ的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of antifungal protein X98Ⅲ

氨基酸 Amino acid	纯化的抗菌蛋白X98Ⅲ Pure pr. X98Ⅲ		氨基酸 Amino acid	纯化的抗菌蛋白X98Ⅲ Pure pr. X98Ⅲ	
	残基数 No. of residues	含量 Content(%)		残基数 No. of residues	含量 Content(%)
苏氨酸 Threonine	48.35(48)	11.45	酪氨酸 Tyrosine	39.25(39)	14.14
谷氨酸 Glutamic acid	103.15(103)	30.17	赖氨酸 Lysine	27.15(27)	7.90
脯氨酸 Proline	29.05(29)	6.65	组氨酸 Histidine	5.0(5)	1.54
丙氨酸 Alanine	36.20(36)	1.39	天冬氨酸 Aspartic acid	0	0
半胱氨酸 Cysteine	26.40(26)	12.61	丝氨酸 Serine	0	0
缬氨酸 Valine	23.20(23)	5.40	甲硫氨酸 Methionine	0	0
异亮氨酸 Isoleucine	25.55(26)	6.66	苯丙氨酸 Phenylalanine	0	0
亮氨酸 Leucine	8.00(8)	2.08	精氨酸 Arginine	0	0

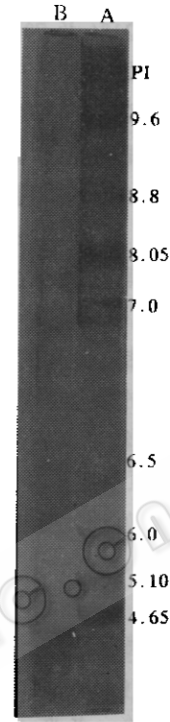


图5 抗菌蛋白 PAGE-IEF图谱

Fig.5 Antifungal protein PAGE-IEF spectrum

- A. 标准等电点蛋白 Standard pI protein;
- B. 抗菌蛋白 X98Ⅲ Antifungal protein X98Ⅲ.

2.2.7 X98Ⅲ对蛋白酶敏感性:胰蛋白酶、链霉蛋白酶及胃蛋白酶可使 X98Ⅲ的抑菌活性分别下降 32%、21% 及 7%, 而蛋白酶 K 对 X98Ⅲ影响不大。由此说明, 该抗菌蛋白对前三种酶部分敏感, 而具抗蛋白酶 K 的特性。

2.2.8 抗菌蛋白 X98Ⅲ的抑菌谱:经测定, X98Ⅲ对 8 种病原菌均有不同程度的抑制作用, 对于苹果轮纹病菌、小麦赤霉病菌及芦笋茎枯病菌有很强的抑菌效果。

2.3 抗菌蛋白 X98Ⅲ的抑菌机制

2.3.1 喷淋菌落:培养 24h 后, 菌落由白色变为无色, 说明表层菌丝溶化; 48h 后, 菌落只剩下一层菌丝薄膜, 可能是由于下层菌丝未沾到雾珠而未溶化。

2.3.2 X98Ⅲ对孢子萌发的影响: X98Ⅲ处理赤霉孢子 12h 后, 在显微镜下观察到大多数孢子的萌发被抑制, 仅有的几个萌发孢子发芽点处畸形细胞明显增大, 出现圆泡状物。24h 后, 孢子长出的菌丝溶解, 泡状物崩解、消融。而对照孢子萌发率为 100%, 菌丝繁茂。

2.3.3 X98Ⅲ对菌丝生长的影响:显微镜下观察, X98Ⅲ处理菌丝 7h 后, 菌丝顶端及中部膨大, 透明度降低, 原生质体凝集; 30h 后, 泡状物增多, 膨大物增大; 48h 后, 菌丝顶端及中部泡状物破裂, 而部分菌丝体凝集后溶解, 原生质体外溢。而对照菌丝仍光滑、均匀和透明。

3 讨论

枯草芽孢杆菌产生的细菌素不同于放线菌产生的抗生素, 它的分子量较大, 是一种具有拮抗作用的蛋白质。本研究结果表明, 经两次柱层析后纯化的抗菌蛋白 X98Ⅲ在 SDS-PAGE 上是单一条带, 无亚基组成, 分子量为 59 000, 等电点为 4.50。由此证明 BS-98 菌株产生的抗菌活性物质为蛋白质。该抗菌蛋白具有相当高的热稳定性, 并对一些蛋白酶部分敏感, 而抗蛋白酶 K 对 X98Ⅲ影响不大, 由此可见, X98Ⅲ是一种相当稳定的蛋白。另外, X98Ⅲ的氨基酸组成极不平衡, 缺少 Asp 等五种氨基酸, 而富含 Glu、Tyr、Cys 及 Thr 等四种氨基酸。对比已报道的抗菌蛋白^[14, 15], X98Ⅲ在洗脱曲线、分子量、等电点、氨基酸组成及其良好的稳定性等方面, 均显示出它为完全不同的另一种蛋白。

1986 年, Patek M. 自 *Corynebacterium* 中分离到一种细菌素类似物, 并证实其为含少量蛋白的糖蛋白^[16]。作者对 X98Ⅲ含糖进行了定性及定量分析, 证明 X98Ⅲ是一种约一个分子含 20 个寡糖的糖蛋白。同时通过实验推测 X98Ⅲ还含有脂成分, 是一种含脂蛋白。这在国内尚未见报道。

目前, 国外报道的枯草芽孢杆菌抗菌物质抑菌机制主要是在抑制孢子萌发上。本研究结果表明, X98Ⅲ抗菌蛋白对病原真菌抑制作用主要有两种方式: 其一为造成细胞畸形, 出现囊泡、肿胀, 继而崩溃溶解; 其二为对细胞壁的破坏, 造成菌丝原生质体从胞壁溶解处泄漏, 菌丝断裂成段, 继而消融。作者还发现, X98Ⅲ对孢子萌发的抑制体现在孢子不能形成正常的芽管, 使其在发育端膨大成球状, 继而胞壁破裂。综上所述, 抗菌蛋白 X98Ⅲ主要是引起病原菌细胞壁的破坏, 导致孢子及菌丝畸形和解。

X98Ⅲ的抑菌谱表明它是一种广谱的抗病原真菌病害的抗菌蛋白, 并具有一些特殊性质, 显示出该抗菌蛋白在以后的抗真菌转基因植物研究中的良好应用前景。

参 考 文 献

- [1] Simpson R T, Neuberger M R. *J Biol Chem*, 1976, **251**: 1936.
- [2] Johnson A B. *Science*, 1945, **102**: 376~377.
- [3] 王 岳. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1986. 453~471.
- [4] Michael A, Von Tersch, Brvce C C. *J Bacteriol*, 1983, **155**: 866~871.
- [5] 胡稳奇. 植物保护, 1992, **18**(3): 30~32.
- [6] 王津红, 彭 憬, 张海波. 南开大学学报(自然科学版), 1996, **29**(4): 89~94.
- [7] 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1982. 231.
- [8] Marion M B. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248~254.
- [9] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 张承圭, 王传怀, 袁玉荪. 生物化学仪器分析及技术. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T(金冬雁译). 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993.
- [12] 何忠效. 电泳. 北京: 科学出版社, 1990.
- [13] 蔡武城. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982.
- [14] 王雅平, 刘伊强, 潘乃穰. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25**(4): 391~397.
- [15] 刘进元, 潘乃穰, 陈章良. 微生物学报, 1993, **33**(4): 268~273.
- [16] Petek M. *Antonie Van Leewenhock*, 1986, **52**: 129~140.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF ANTIFUNGAL PROTEIN X98Ⅲ FROM *BACILLUS SUBTILIS*

Xie Dong Peng Jing Wang Jinhong Hu Jian Wang Yuewu

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract *Bacillus subtilis* BS-98 is one of the antagonistic strains strongly against plant fungal pathogens such as *Physalospora piricola* Nose. The antifungal protein was purified by ammonium sulphate precipitation and column chromatography on Sephadex G-100 and DEAE-cellulose, and it was named X98Ⅲ. Molecular weight of X98Ⅲ is 59 000 by SDS-PAGE and PI value is 4.50 by PAG-IEF, respectively. X98Ⅲ was demonstrated as glycoprotein and lipoprotein by CAM (cellulose acetate membrane) electrophoresis and special staining. We estimated it contains 6% saccharides by using DNS methods. This protein was also found to be thermostabile and partially sensitive to proteinases. The amino acid analysis of the protein X98Ⅲ showed that it comprises of 11 different amino acids and Glu, Tyr, Cys are the abundant amino acids. No Asp, Phe and Met were found. Purified X98Ⅲ has strong inhibiting activity against the pathogens of *Physalospora piricola*, *Phoma asparagi*, etc. The antifungal mechanism of X98Ⅲ was mainly disintegration of the cell wall to make the hyphae abnormal and the spores germinate abnormally or can not germinate at all.

Key words *Bacillus subtilis* BS-98, Antifungal protein, Purification, *Physalospora piricola*, Antagonism