

# 枯草芽孢杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析\*

童有仁 马志超 陈卫良 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)

**摘 要** 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)B034 分离自水稻叶面,对水稻白叶枯病菌具有较强的拮抗能力。除去菌体培养液以 70% 饱和度硫酸铵沉淀所得的拮抗物粗提液对热稳定,对胰蛋白酶不敏感,对蛋白酶 K、链霉菌蛋白酶 E 部分敏感,对氯仿部分敏感,其作用的活性 pH 范围低至 4,高至 12 以上,比较耐碱性。粗提液经 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析、DEAE-Sepharose 柱层析和 HPLC 的 Superdex75 HR 10/30 柱层析,得到二个拮抗活性峰:P1 和 P2。P2 经 SDS-PAGE 和 PAGE-IEF 电泳显示为单一蛋白带,分子量 50.3 kD,等电点 6.25。自动 Edman 降解法从 P2 的 N 端测出残基序列为 Ile-Ser-Asn-Pro-X-Ile-Asp-Val。

**关键词** 枯草芽孢杆菌 B034,拮抗蛋白,水稻白叶枯病,分离纯化

**分类号** S432.4 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0339-43

水稻白叶枯病是水稻的重要病之一,至今仍缺乏有效的防治措施,给粮食生产造成很大损失。利用白叶枯病菌的拮抗细菌,研究其拮抗蛋白质特性,以便进一步分离拮抗基因,最后将其转移到水稻中,以得到抗病植株,这是防治此病的一条有效思路。本实验室分离到一批拮抗菌株,对其中的几种拮抗物进行了研究<sup>[1~4]</sup>。枯草芽孢杆菌 B034 是从水稻叶面分离的抗水稻白叶枯病的拮抗菌,初步研究表明,其拮抗物与内生质粒有一定的联系<sup>[5]</sup>。

本文将报道枯草芽孢杆菌 B034 菌株的拮抗蛋白的分离纯化及其部分性质研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

拮抗菌株:*Bacillus subtilis* B034,分离自水稻叶面。

指示菌株:*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 浙-173,购于江苏省农业科学院。

### 1.2 拮抗活性测定

参考文献<sup>[1,6]</sup>,将指示菌株铺于 Wakimoto's 平板上。

### 1.3 拮抗物粗提液的制备

将 B034 接种于 KMB 液体培养基中,30℃ 下振荡培养(200r/min)36 h 后,4℃ 下 6000r/min 离心 10 min 去沉淀。在上清液中加入硫酸铵至 70% 饱和度,4℃ 下沉淀过夜,10 000 r/min 下离心 10 min,沉淀用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)悬浮,以此作为粗提液。

### 1.4 粗提液的稳定性测定

**1.4.1 热稳定性:**粗提液在不同温度下处理 30 min,取一定量进行拮抗活性测定。

\* 国家高技术研究发展计划项目(No.863-101-01)和浙江省自然科学基金资助(No.C020207)

收稿日期:1998-03-23,修回日期:1999-03-10

**1.4.2 对蛋白酶的稳定性:**粗提液分别用胰蛋白酶(Sigma)和蛋白酶 K(Promega)及链霉蛋白酶 E(Merck)在 37℃ 下处理 1h,取一定量进行拮抗活性检测。

**1.4.3 对氯仿稳定性:**粗提液与等量氯仿混合振荡抽提 60 min,离心,分层后取上层水相,待残留氯仿挥发后,取一定量进行拮抗活性检测。

**1.4.4 对 pH 稳定性:**粗提液的 pH 分别调至不同值,取一定量进行拮抗活性检测。

**1.5 拮抗蛋白的分离纯化**

拮抗粗提液加固体硫酸铵至 2mol/L,离心后取上清液,上经含 2mol/L 硫酸铵的 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 预平衡的 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱 (20cm×1cm, Pharmacia 公司产品)。淋洗至基线后,用 2 mol/L 至 0 mol/L 的硫酸铵梯度洗脱,最后用蒸馏水淋洗。收集活性峰,对 20 mmol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 透析,浓缩后再上经 20 mmol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 预平衡的 DEAE-Sephacel 柱 (20×1cm, Pharmacia 公司产品)。淋洗至基线后,再用 0 mol/L 至 0.5 mol/L NaCl (于缓冲液中) 线性梯度洗脱,收集活性峰。浓缩后上经 0.2mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 预平衡的 FPLC Superdex 75HR10/30 柱 (Pharmacia 公司产品),收集活性峰,浓缩,对蒸馏水透析后,作进一步的理化性状分析。

**1.6 电泳分析**

**1.6.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE):**参照文献 [7],分离胶浓度 12.5%,标准蛋白为 Phomega 公司产品。

**1.6.2 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF):**参照文献 [6],凝胶浓度为 5%,以标准蛋白 (Phamacia 产品, pI 3.5~10.0) 为参照,400V 聚焦 16 h。

**1.7 部分氨基酸序列测定**

将 SDS-PAGE 胶上的蛋白条带电转移到 PVDF 膜上,送中国科学院上海生物化学研究所进行序列分析。

**2 结果和讨论**

**2.1 粗提物的稳定性**

**2.1.1 热稳定性:**粗提液分别在不同温度下处理 30 min,取 30μL 检测拮抗活性,结果如表 1。粗提物经 70℃ 处理 30 min 后保持拮抗活性,100℃ 处理 30 min 后仍保持部分拮抗活性,120℃ 处理 30 min 后丧失拮抗活性。

表 1 B034 粗提液经不同温度热处理后的拮抗活性

Table 1 Antagonistic activity of crude extract of B034 treated with various temperatures

处理温度 t/℃	40	60	70	80	100	120	未处理 Control
拮抗圈半径/mm	16.0	16.5	16.5	12.0	9.0	-	16.0
Diameter of inhibition zones							

“ - ” No inhibition

**2.1.2 对蛋白酶的稳定性:**粗提液经不同蛋白酶处理后,取 30μL 检测活性,结果如表 2。粗提液对胰蛋白酶不敏感,对蛋白酶 K 和链霉蛋白酶 E 部分敏感。

表 2 B034 粗提液经不同酶处理后的拮抗活性

Table 2 Antagonistic activity of crude extract of B034 treated with various proteinases

蛋白酶	胰蛋白酶	蛋白酶 K	链霉蛋白酶 E	未处理
Proteinases	Trypsin	Proteinase K	Pronase E	Control
拮抗圈直径/mm	15.0	11.0	13.0	15.0
Diameter of inhibition zones				

2.1.3 对氯仿的稳定性:粗提液经氯仿处理后,用 30 $\mu$ L 样品进行活性检测,结果发现拮抗圈直径为 9mm;而未经氯仿处理的粗提液拮抗圈直径为 17mm。因此粗提液对氯仿部分敏感。

2.1.4 对 pH 值的稳定性:粗提液在不同 pH 值下处理后,拮抗活性检测表明(见表 3),B034 粗提液活性 pH 范围较宽,中性 pH 条件下活性最强,比较耐碱性 pH。

表 3 B034 粗提液在不同 pH 下的拮抗活性

Table 3 Antagonistic activity of crude extract of B034 treated with various pH values

pH	1.9	2.6	3.4	4.5	5.4	6.5	7.5	8.1	9.0	12.4
拮抗活性	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++
Inhibit activity										

“+++, ++, +” Indicated the relative inhibition activities strong, midle and weak, respectively; “-”: No inhibition.

2.2 拮抗蛋白的分离纯化及部分特性

按材料与方法中的实验步骤,将 B034 粗提液上 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱。用蒸馏水洗脱后出现一个活性峰(图 1),表明 B034 的拮抗物具有较强的疏水性。将上述洗脱出的活性峰样品浓缩后,上 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱(AEX),得到一个洗脱主峰,该峰能够抑制水稻白叶枯病菌产生清晰透明的抑菌圈(图 2)。将 AEX 活性峰样品浓缩透析后上 FPLC Superdex 75 HR 10/30 柱,得到两个主要吸收峰(图 3)。经活性检测,这两个吸收峰均有拮抗活性,命名为 P1 和 P2。

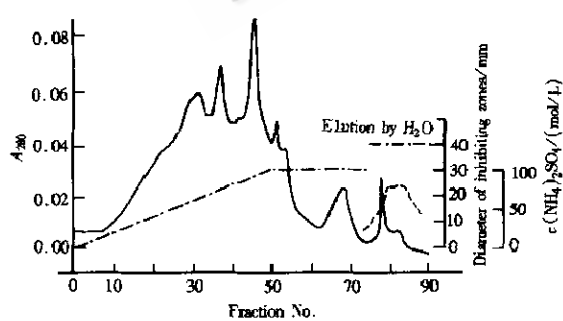


图 1 粗提液经 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱的色谱图

Fig.1 Column chromatography of B034 crude extract on Phenyl-Sepharose

— A<sub>280</sub>; - - - Concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  
..... Antagonistic activity.

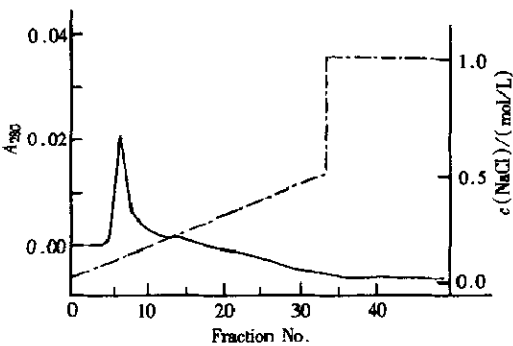


图 2 图 1 中的活性峰经 DEAE-Sephacel 柱的色谱图

Fig.2 Column chromatography of fig.1 activity peak on DEAE-Sephacel

— A<sub>280</sub>; - - - Concentration of NaCl.

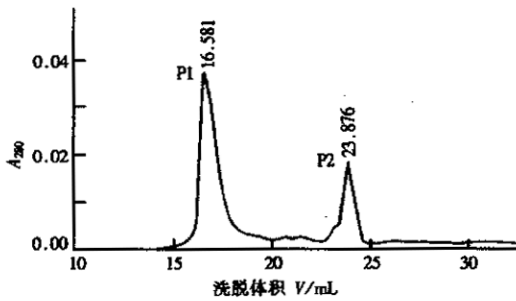


图3 图2中的活性峰经 EPLC Superdex 75 HR 10/30 柱的色谱图

Fig. 3 Column chromatography of fig. 2 activity peak on FPLC Superdex 75 HR 10/30

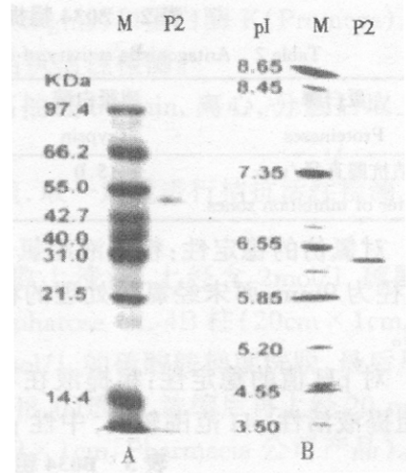


图4 P2 的 SDS-PAGE(A)和 IEF 电泳(B)分析图谱

Fig. 4 SDS-PAGE(A) and PAGE-IEF(B) of antagonistic protein P2(M: Standard protein)

对 P2 进行电泳分析表明, P2 在 SDS-PAGE 和 IEF 胶上均形成单一条带(图 4), 其分子量为 50.3kD, 等电点为 6.25。

经自动 Edman 降解法检测, P2 样品的 N 端 8 个氨基酸残基序列为  $H_2N-Ile-Ser-Asn-Pro-X-Ile-Asp-Val$ 。计算机检索 EMBC 蛋白质文库, 没有发现有效的同源性, 表明是一种新的功能蛋白。

通过本文的研究, 我们自拮抗细菌 B034 菌株中分离纯化到两种拮抗蛋白。由于本文中拮抗物质的分离是按照蛋白质的特性进行分离纯化的, 因此不排除该菌株同时产生其它非蛋白物质的可能。在我们研究过程中发现, 该菌株可能产生其它拮抗物(本文数据未显示)。因此, 本文中粗提物的一些理化性质仅作为一般参考, 并不完全反映该两种拮抗蛋白质的性质。此外, 由于纯化的两种拮抗蛋白质最后的产量很低, 仅进行了它们的拮抗活性测定及其中一种拮抗蛋白质部份理化特性研究。纯化方法的改进, 两种纯化的拮抗蛋白质的其它理化性质和拮抗特性等有待今后进一步研究。

**致谢** 在研究过程中得到中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫先生和浙江农业大学生物技术研究所龚鸿飞、许建平、姜沂春、林福呈等同志的帮助, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 朱伟光, 李德葆, 葛起新. 浙江农业大学学报, 1990, 16: 345~350.
- [2] 朱伟光, 李德葆. 浙江农业大学学报, 1990, 16(增刊 2): 43~47.
- [3] 汪中一, 李德葆, 葛起新. 浙江农业大学学报, 1990, 16(增刊 2): 53~60.
- [4] 陈卫良, 李德葆, 葛起新. 浙江农业大学学报, 1990, 16(增刊 2): 61~67.
- [5] 钟静萍, 陈卫良, 李德葆. 植物病理学报, 1995, 25: 247~251.
- [6] Benkerroum N, Ghouati Y, Sandine W E *et al.* *Appl Microbiol*, 1993, 17: 78~81.
- [7] Bollag D M, Edelstein S J. *Protein Methods*. Wiley-Liss Inc, USA, 1991.

## PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTAGONISTIC PROTEINS FROM *BACILLUS SUBTILIS* B034 \*

Tong Youren Ma Zhichao Chen Weiliang Li Debao

(Biotechnology Institute, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

**Abstract** *Bacillus subtilis* B034, an antagonistic bacteria isolated from the phyllosphere of rice, strongly inhibits the growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* which causes the rice bacterial blight. Crude extract was obtained by precipitation of the cell-free culture of B034 with 70% saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The suspension of the precipitate strongly inhibits *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, and it is thermostable, resistant to trypsin, partial sensitive to proteinase K, pronase E and chloroform. Its active pH range is wide, from 4.0 to more than 12.0, relative more stable in high pH. Two antagonistic peaks were obtained from the crude extract of B034 after Phenyl-Sepharose CL-4B, DEAE-Sephacel and FPLC Superdex 75 HR 10/30 column chromatography. One of these two peaks, named P2, was shoed only single band with 50.3kD and pI6.25 in SDS-PAGE and PAGE-IEF, respectively. The N-terminal partial sequence of protein P2 was analyzed.

**Key words** *Bacillus subtilis* B034, Antagonistic proteins, Rice bacterial blight, Purification

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 863-101-01) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province(C020207)

### 致 读 者

首先感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自 2000 年 40 卷第 1 期开始扩版,双月刊,每册 112 面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部