

抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性*

裴 炎 李先碧 彭红卫¹ 陈祥贵² 刘建国³

(西南农业大学生物技术研究中心 重庆 400716)

摘 要 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) S-1 菌株对多种作物真菌性病害有良好的防效。本文报道了 S-1 菌株产生的抗真菌物质的纯化及其部分特性。该菌株的发酵液经过酸沉淀和有机溶剂抽提、Sephadex G100 与 DEAE 52 柱层析等步骤后,抗真菌物质得到纯化,硅胶薄层层析显色为单点。该物质在 275nm 处有吸收峰,对蛋白酶有一定耐受性,茚三酮反应呈阴性,但酸水解后,茚三酮反应呈阳性,双缩脲反应也呈阳性。氨基酸组分分析结果表明,该物质由谷氨酸、天门冬氨酸、酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和一种异常氨基酸组成。推测该物质为一种环状多肽,命名为 APS-1。紫外光照射和高压灭菌处理后,APS-1 的抗真菌活性损失不大。平板抑菌试验结果表明,APS-1 对 9 种供试真菌的孢子萌发有抑制作用,其完全抑制浓度因真菌种类不同而有差异。

关键词 蜡状芽孢杆菌, 抗真菌多肽, 纯化, 特性

分类号 Q516 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)04-0344-49

植物病害常常给农业生产带来重大损失。化学杀菌剂在作物病害的控制中有重要的作用。但是,病原真菌的多样性和变异性给病害的化学防治带来困难;而且,化学杀菌对环境的污染和生态平衡的破坏,也引起广泛的关注。因此,植物病害的生物防治日益受到重视。同时,研究利用新的抗菌物质,对人畜疾病的防治,也有重要意义。

我们从棉花维管束中分离出蜡状芽孢杆菌 S-1 菌株,它对多种植物病原真菌有明显的抑制作用。田间试验中,表现出对棉花苗病、枯萎病、黄萎病^[1]、小麦白粉病等的良好防效。在此基础上,进一步对该菌株产生抗真菌物质的纯化及其性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) S-1 菌株系本实验室分离。黑曲霉(*Aspergillus niger*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由四川省食品发酵研究设计院何丰先生提供。小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw.)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* (Atk.) Snyder et Hansen)、棉花炭疽病菌(*Colletotrichum gossypii*

* 农业部生物技术及四川省科委应用基础资助项目

1) 现在工作单位:中国科学院成都生物所

2) 现在工作单位:四川工业学院

3) 现为中国科学院化工冶金研究所博士研究生

收稿日期:1997-11-17, 修回日期:1998-02-12

Southw)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis* Nishikado et Miyake)、甘薯黑斑病菌(*Ceratocystis fimbriata* Ell. et Halsted)、甘薯软腐病菌(*Rhizopus batatas* Nakaz)、瓜果腐霉菌(*Pythium aphanidermatum* (Edson)Fitz)、水稻稻瘟病菌(*Piricularia grisea* Cav)由本校植保系提供。试验中以黑曲霉为抗真菌活性检验菌。

1.2 主要试剂

DEAE 52 纤维素, Whatman 公司产品; Sephadex G100 Pharmacia 公司产品; 硅胶 GF254, 青岛海洋化工厂产品; 胰蛋白酶, Difco 产进口分装; 蛋白酶 K, BM 产品; 碱性蛋白酶, 无锡酶制剂厂生产。

1.3 培养基

KMB 培养基: 每升含 Triptone 20g, 甘油 10g, K_2HPO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, pH7.0; GPS 培养基: 每升含柠檬酸钠 0.35g, KH_2PO_4 0.7g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g, 葡萄糖 10g, Peptone 2.5g。

1.4 S-1 菌的培养

将菌接入 KMB 培养基, 振荡培养(30℃ 200r/min)24h, 按 1:10 接种同一培养基, 30℃ 下静置培养 96h。

1.5 抑菌物的提取与纯化

1.5.1 抑菌物的粗提: 将培养液过滤后调 pH 至 3.5, 5000r/min 离心, 沉淀用少量蒸馏水溶解, 调 pH 至 7.0, 真空干燥后加 80% 甲醇充分提取, 提取液 4000r/min 离心, 取上清液加 2.5 倍体积乙醚迅速搅拌后 4000r/min 离心, 所得上清液浓缩干燥得粗提物。

1.5.2 Sephadex G100 层析和 DEAE 52 纤维素层析: 在 LKB 自动柱层析系统上进行。将 Sephadex G100 用 0.05mol/L $NaHCO_3$ 缓冲液(pH8.0)平衡后装柱(16mm×800mm), 上样 100mg, 用平衡缓冲液洗脱, 流速为 18mL/h, 275nm 处检测, 洗脱液分部收集, 每管 3mL, 滤纸圆片法测各管抑菌活性。将经预处理后的 DEAE 52 纤维素用 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)平衡后装柱(16mm×100mm), 上样 50mg, 用 50mL 缓冲液冲洗后, 再用含 0~0.8mol/L NaCl 的上述缓冲液梯度洗脱, 流速为 10mL/h, 滤纸圆片法测各管抑菌活性。

1.5.3 硅胶薄层层析: 用硅胶 GF254 制备薄层层析板(20cm×20cm×0.25mm), 薄层在 105℃ 活化 1h 后, 用 DEAE 52 层析后的 S-1 抗真菌物质的水溶液点样, 经筛选后, 选用下列展层剂展层: 乙醇: 乙酸: 水(100:5:20), 正丁醇: 乙酸: 水(100:5:20), 正丁醇: 乙醇: 乙酸: 水(30:70:5:20), 甲醇: 丙酮: 乙酸: 水(75:25:5:20), 展层完毕后干燥, 碘显色, 测定 R_f 值。同时, 用黑曲霉孢子进行生物显影。

1.6 抗真菌物质特性研究

1.6.1 抗真菌物质的溶解性: 将经酸沉淀后的 0.1g 干燥粗粉分别用水、甲醇、乙醇、丙酮、苯、乙醚、三氯甲烷各 2mL 浸提, 取 20 μ L 浸提液于滤纸片上, 吹干后, 贴在有黑曲霉孢子液的 PDA 双层平板上, 置 28℃ 培养 48h, 测定抑菌圈直径大小, 重复四次。

1.6.2 抗真菌物质的离子特性: 分别在 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液(pH4.0)和 0.05 mol/L 的巴比妥缓冲液(pH8.6)中纸电泳(新华 1 号滤纸, 1.5cm×25cm), 电压 300V, 时间 2h, 电泳完毕后生物显影, 以黑曲霉作指示菌, 测定抗真菌物质的迁移距离, 重复四次。

1.6.3 抗真菌物质的官能团:将经过硅胶层析后有抑菌活性的部分刮下,甲醇浸提浓缩后,然后再进行 TLC,薄层板为 20cm×220cm×0.25mm,活化 1h,展层剂用丁醇:乙酸:水(65:10:25),室温下展层。展层完毕经干燥后,喷雾接种黑曲霉孢子进行生物显影,同时分别用茚三酮、双缩脲试剂、二苯胺、联苯胺、铁氰化钾—三氯化铁、酪氨酸显色剂作喷雾显色。

1.6.4 抗真菌物质的吸收光谱:取经纯化后的 S-1 抗菌物质,用双蒸水稀释至适宜浓度,在岛津 UV-240 紫外可见分光光度计上进行紫外扫描。

1.6.5 抗真菌物质对蛋白酶敏感度:取经纯化的 S-1 抗菌物质,配成 1mg/mL 的水溶液(pH8.0)分别加蛋白酶 K(0.3mg/mL),胰蛋白酶(3mg/mL),碱性蛋白酶(5u/mL)55℃反应 5h,测定反应液抑菌活性。

1.6.6 抗真菌物质的稳定性:将 0.2g 粗粉溶解在 20mL 无菌水中,经微孔滤膜(0.22μm)过滤除菌后,分别作如下处理:(1)经高温高压灭菌(1.5kg/cm², 30min)处理;(2)30W 紫外灯,距离 30cm 照射 24h 处理。

取 10μL 上述各处理液和不加处理的对照样液点在滤纸片上,吹干后,贴在有黑曲霉孢子悬浮液的 PDA(20mL/皿)双层平板上。重复四次,测量抑菌圈的大小。

1.6.7 抗真菌物质对真菌孢子萌发的抑制:孢子萌发试验参照 Broekaert 等^[2]的方法,供试孢子悬浮于含有不同浓度纯化抗真菌物质的 GPS 培养基中,孢子浓度 3~4×10³/mL 左右。试管直径 16mm,每管 300μL,25℃下保温保湿培养,显微镜下观察孢子萌发情况,以不加抗真菌物质的处理为对照。

1.7 抗真菌物质的氨基酸组成测定

取经纯化的 S-1 抗菌物质,用 6mol/L HCl 在 110℃水解 22h,水解液在 60℃中蒸干,加 5mL 0.02mol/L HCl 溶解后上 83-50 型氨基酸自动分析仪测试。

2 结果和分析

2.1 抗真菌物质的分离与纯化

2.1.1 Sephadex G100 和 DEAE 52 纤维素层析:经 pH3.5 酸沉淀后,活性部分主要存在于沉淀中,再经甲醇萃取,乙醚沉淀,得到浅黄色粗品,经 Sephadex G100 层析,活性部分集中在第一峰(图 1)。

收集活性部分,再经 DEAE 52 纤维素层析,得到三个洗脱峰。抗真菌活性峰在第三峰(图 2)。

2.1.2 硅胶薄层层析:将活性峰部分浓缩后,进行硅胶层析,用 4 种经筛选出来的展层剂展层,显色后均为单点。看来经酸沉淀、甲醇萃取和乙醚沉淀、Sephadex G100 和 DEAE 52 纤维素层析后,样品得到了纯化。

2.2 抗真菌物质的特性

2.2.1 溶解特性:抗真菌物质在甲醇、乙醇和水中的溶解度最大,丙酮次之,脂溶性溶剂乙醚、苯和三氯甲烷中均无抑菌活性(表 1),说明这种抑菌物质的水溶性和醇溶性大,且溶剂极性大,溶解度也大。

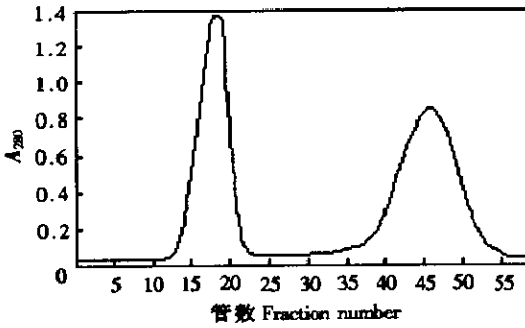


图 1 S-1 菌株抗真菌多肽的 Sephadex G100 层析洗脱图

Fig. 1 Elution profile of antifungal peptide on Sephadex G100 column

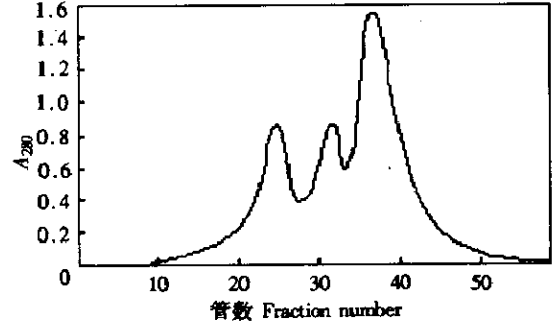


图 2 S-1 菌株抗真菌多肽的 DEAE 52 纤维素层析洗脱图

Fig. 2 Elution profile of antifungal peptide on DEAE 52 cellulose column

表 1 S-1 粗提物在不同溶剂中的抗真菌活性

Table 1 Antifungal activities of crude extraction of S-1 in different solvents

溶 剂	水	甲 醇	乙 醇	丙 酮	乙 醚	苯	三氯甲烷
Solvent	Water	Methanol	Ethanol	Acetone	Ethyl ether	Benzene	Chloroform
抑菌圈直径/mm							
Inhibition zone	24.8±2.0	24.2±2.1	23.8±1.8	18.6±1.5	0	0	0

2.2.2 吸收光谱:扫描结果表明,抗真菌物质的纯化学品在 275nm 处有吸收峰,与典型蛋白质吸收峰相同。

2.2.3 离子特性:纸电泳结果表明,S-1 抗真菌物质在 pH4.0 的缓冲液中,迁移距离为 0.0cm,而在 pH8.6 的缓冲液中迁移距离为 4.6cm,该拮抗物质为弱酸性。

2.2.4 对水解蛋白酶的敏感度:抗真菌物质对不同蛋白酶其敏感度有差异,经胰蛋白酶、蛋白酶 K 和碱性蛋白酶处理后,其活性分别为未经处理的对照的 82%、75% 和 71%。这个结果说明,该物质对上述蛋白酶均有一定的耐受性,具有环肽的特点。

2.2.5 官能团呈色反应:经硅胶薄层层析后,用不同官能团显色剂处理,二苯胺-联苯胺反应呈阴性,表明该物质无糖基存在,铁氰化钾-三氯化铁反应呈阳性,表明有酚基存在,酪氨酸反应呈阳性,但茚三酮反应阴性,将纯化学品用酸水解后,茚三酮反应则呈阳性,结合该物质的紫外吸收特性和对蛋白酶不敏感等特性,推测该抗菌物质为一种环状多肽,命名为 APS-1。

2.2.6 APS-1 的氨基酸组成:APS-1 的氨基酸组分分析表明(表 2),它由 10 种氨基酸组成,包括一种未知异常氨基酸。在鉴定出的 9 种氨基酸中,酸性氨基酸(Glu 和 Asp)的相对含量为 47.49%,极性氨基酸(Glu、Asp、Tyr、Ser、Thr)为 76.28%,缺乏碱性氨基酸。氨基酸组成与 APS-1 呈弱酸性,溶于极性溶剂等特性相符。

表 2 APS-1 的氨基酸组成

Table 2 Amino acid component of APS-1

相对含量/%	氨基酸 Amino acids									
	Glu	Asp	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ieu	Val	未知氨基酸
Relative content	25.06	22.43	20.60	4.56	3.63	3.28	4.41	3.89	5.36	6.81

表 3 APS-1 抗真菌活性对热和紫外光的稳定性

Table 3 The heat and ultraviolet stability of antifungal activity of APS-1

处 理	高压灭菌	紫外光照射	对 照
Treatment	Autoclave	Ultraviolet	Control
抑菌圈直径/mm			
Inhibition zone	18.2 ± 3.3	18.8 ± 2.7	19.0 ± 2.6

2.2.7 抗真菌物质的稳定性:经高压灭菌和紫外光照射处理后,仍保持 96% 左右的活性。可见该物质有较强的耐热和紫外光耐受性(表 3)。

2.3 APS-1 对真菌孢子的抑制

从表 4 可以看出,APS-1 对供试真菌孢子萌发均有抑制作用。其中,对黑曲霉和瓜果腐霉完全抑制浓度最小,为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而对小麦赤霉病菌孢子萌发的抑制浓度则较大,为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

芽孢杆菌能产生肽类抗生素,这些抗生素的肽链多数呈闭合环状,几乎没有游离氨基和羧基,能耐受蛋白酶的作用^[5]。蜡状芽孢杆菌 S-1 菌株产生的抗真菌物质 APS-1,在 275nm 有吸收峰,双缩脲反应呈阳性,茚三酮反应为阴性,但酸水解后,茚三酮反应呈阳性,对水解蛋白酶有一定耐受性,这些特点与报道的芽孢杆菌产生的环肽类抗生素一致^[3,4]。APS-1 水解产物的氨基酸组分分析结果证实,它由 9 种常见氨基酸和一种异常氨基酸组成,推断 APS-1 是一种环状多肽。

在芽孢杆菌产生的抗菌肽中,多数抗细菌,只有少数抗真菌^[5,6]。在报导的芽孢杆菌抗真菌多肽类抗生素中,多数抑菌活性不强,抗菌谱窄,不能同时抑制丝状真菌和酵母菌。Wakayama 等^[4]。从蜡状芽孢杆菌中纯化出一种抗真菌环状多肽 Mycocerin,抑菌谱广、活性强,能同时对丝状真菌和酵母起作用,而且耐热性和稳定性好。我们从蜡质芽孢杆菌 S-1 菌株中分离纯化得到的抗真菌多肽 APS-1,也具有上述特性,但氨基酸组成明显不同。

近年来,多肽类抗生素日益受到重视,这是因为多肽类抗生素可以通过基因定点突变

表 4 APS-1 对真菌孢子萌发的抑制

Table 4 Inhibition of APS-1 on fungal spore germination

真 菌 名 称	完全抑制浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Fungi	Complete inhibition concentration
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i> Schw.	30
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisia</i>	20
玉米小斑病菌 <i>Helminthosporium maydis</i> Nishikado et Miyake	20
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. Vasinfectum	15
甘薯黑斑病菌 <i>Ceratocystis fimbriata</i>	10
水稻稻瘟病菌 <i>Piricularia grisea</i> Cav	10
棉花炭疽病菌 <i>Colletotrichum gossypii</i>	8
甘薯软腐病菌 <i>Rhizopus batatas</i> Nakaz	5
瓜果腐霉菌 <i>Pythium aphanidermatum</i>	2

技术对其分子结构进行修饰,^[3,5,7,8]以提高其活性。例如,Chen 等^[8]采用该技术修饰抗菌肽 Magainin II,使其活性提高了 100 倍。与其它抗生素的化学或半合成修饰相比,既方便,成本也较低。

抗菌多肽的编码基因还可导入其它微生物或植物中,以构建新型农用微生物和提高作物的抗病性。因此,分离纯化抗真菌多肽,进一步研究其分子结构与基因,有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 裴 炎,张正圣,张凤鑫等.高技术、新技术农业应用研究.北京:中国科学技术出版社,1991,984~987.
- [2] Broekrt W F, Parijs J V, Allen A K *et al.* *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1983,**33**:319~331.
- [3] Chung, Y J. Hansen J N. *J Bacteriol*, 1992,**174**:6699~6702.
- [4] Wakayama s, Ishikawa F, Oishi K. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984,**26**(6):939~940.
- [5] Hansen J N. *Annu Rev Microbiol*, 1993,**47**:535~64.
- [6] Katz E, Demain A L. *Bacteria Rev*, 1977,**41**:449~474.
- [7] Banerjee S, Hansen J N. *J Biol Chime*, 1988,**263**:9508~9514.
- [8] Chen H C, Brown J H. *FEBS Lett*, 1988,**236**:426~466.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL ANTIFUNGAL PEPTIDE APS-1 PRODUCED BY *BACILLUS CEREUS*

Pei Yan Li Xianbi Peng Hongwei Chen Xianggui Liu Jianguo

(*Biotechnology Research Center, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716*)

Abstract In previous study, we isolated an antagonist *Bacillus cereus* strain: S-1 from cotton plant. In field experiments, this bacterium was shown strong inhibition to several plant diseases. In this paper, we reported the purification of the antifungal substance produced by the bacterium and its properties. After the steps of acid precipitation, methanol and ethyl ether extraction, Sephadex G100 and DEAE52 column chromatography, the antifungal material was purified. The purified material had absorption peak at 275nm, and was exhibited negative in biuret color reaction. However after hydrolyzed with HCl, this substance shown positive in the same reaction. Amino acid analysis to the hydrolysate of APS-1 showed that APS-1 was composed of Glu, Asp, Tyr, Ser, Thr, Pro, Leu, Ile, Val and an unknown amino acid. Combining with its partial resistance to proteinases, it was suggested that this antifungal material was a cyclic peptide. This peptide, named APS-1, with strong inhibition on the germination of spores of the phytopathogens tested, was shown high stability against ultraviolet radiation and heat. APS-1 may have potential role in plant diseases biological control.

Key words *Bacillus cereus*, Antifungal peptide, Purification, Characterization