

抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析*

刘 颖 徐 庆 陈章良

(北京大学生命科学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

摘 要 拮抗菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)TG-26 分泌产生的小肽经两次盐酸沉淀、丙酮分级沉淀和 Hi-pore 反相柱两次纯化,分离得到一种新的抗真菌的小肽,命名为 LP-1。经 MALDI-TOF 质谱鉴定,分子量为 1057.3,等电聚焦测得其 pI 为 4.75。LP-1 对温度有较高的稳定性,100℃ 保温 30min,仍能保持 75% 的活性。抑菌谱表明,该抗菌肽对瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、玉蜀黍赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、长柄链格孢(*Alternaria longipe*)和番茄萎蔫座镰孢霉(*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*)等植物病原真菌有很强的抑制作用。LP-1 可造成绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌丝生长形态异常:菌丝端部膨大,菌丝扭曲,分支加剧,菌丝内细胞质分布不均匀,发生凝聚。茚三酮反应以及测序结果均证实其为环肽。

关键词 枯草芽孢杆菌 TG-26,抗菌肽,抑菌谱,环肽

分类号 Q516 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0441-47

植物真菌病害是造成农业损失的主要原因之一^[1],施用杀真菌化学农药尽管有一定效果,但价格昂贵,而且长期使用也会增加病原菌的抗性。另外,农药的大量使用还会造成环境污染。利用微生物来抑制植物病原真菌为真菌病害的防治提供了新的可能。通过研究细菌所产生的抗真菌肽的抗菌机理,可望找到低污染乃至无污染的有效的生物防治途径。本室从丝瓜根部分离到一株强烈抑制玉蜀黍赤霉病菌的拮抗菌(*Bacillus subtilis*)TG26,并从中分离到两种抗真菌蛋白 B I、B II,这两种蛋白除对玉蜀黍赤霉病菌多个生理小种表现出强烈抑制作用外,对水稻稻梨孢、长柄链格孢、玉米小斑病菌及绿色木霉也有强烈的抑制作用^[2~4]。本文报道 TG26 菌株产生的另一种抗菌肽 LP-1 的分离纯化及其性质研究,它是一种与 B I 和 B II 不同的小分子量广谱抗菌环肽。

1 材料和方法

1.1 菌株

拮抗菌 *Bacillus subtilis*TG26 由本室筛选得到;玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*)来自江苏省;长柄链格孢(*Alteraria longipe*)、稻梨孢(*Piricularia oryzae*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)来自中国科学院微生物研究所;梨黑腐皮壳(*Valsa ambiens*)、番茄萎蔫座镰孢霉(*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)来自本室。

* 此项目部分由北京大学预研基金资助

联系人 徐 庆

收稿日期:1998-04-03,修回日期:1998-07-24

1.2 主要仪器及试剂

高速冷冻离心机(HITACHI CR21)、高压液相色谱系统(Bio-Rad Model 402)、冰冻干燥机(Labconco)、MALDI-TOF 质谱仪、倒置显微镜(Nikon)、751G 分光光度计(上海)、小型等电聚焦电泳槽(Bio-Rad Model 111)、Hi-Pore™反相柱(Bio-Rad)、等电聚焦标准蛋白(Pharmacia pH 3-10)、两性电解质 Bio-Lyte 3/10(Bio-Rad)、茚三酮(Sigma)。

1.3 TG-26 菌株的培养

参考文献[4]。

1.4 抗菌肽的分离纯化

1.4.1 粗样品的制备 将发酵培养液离心去除菌体,向上清液中加入浓盐酸,调节 pH 至 2.5,9000 r/min 离心 15 min,弃去上清。沉淀用 80% 乙醇抽提三次,抽提液真空抽干^[5],将所得干粉悬浮在少量去离子水中,用 2mol/L NaOH 调至 pH7.0,使其全部溶解。再次用 1mol/L 的 HCl 调至 pH2.5,12000r/min 离心 10min,收集沉淀,向沉淀中加入少量 1% 的碳酸氢铵溶液,使其全部溶解。将此溶液冷冻干燥,得到淡黄色粉末状粗样品。

1.4.2 丙酮分级沉淀 将粗样品溶解在 0.02mol/L pH6.8 磷酸缓冲液中(0.1g/mL),加入 6 倍体积冰浴的丙酮,12000 r/min 4℃ 离心 10min,弃去沉淀。在上清中继续加入原体积 10 倍的预冷的丙酮,12000 r/min 4℃ 离心 10min,收集沉淀^[6],溶解于少量 0.02mol/L pH6.8 磷酸缓冲液中。

1.4.3 高压液相色谱(HPLC)反相分析 将经丙酮沉淀得到的样品溶液用经 0.02mol/L pH6.8 磷酸缓冲液平衡的 Bio-Rad Hi-pore 反相柱吸附,用 0%~100% 的乙腈梯度洗脱,流速 1mL/min,收集有抗菌活性的色谱峰。冻干后,重新溶解于少量 0.02 mol/L pH7.5 碳酸氢铵缓冲液中,再次用以 0.02mol/L pH7.5 碳酸氢铵缓冲液平衡的 Hi-pore 反相柱吸附,0%~100% 的乙腈梯度洗脱,流速 1mL/min,收集有抗菌活性的色谱峰,即为 LP-1,将其冷冻干燥备用。

1.5 抗菌肽的性质

1.5.1 蛋白质浓度的测定 采用 Lowry 法^[7],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.5.2 平板抑菌实验 接种指示真菌于含马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的 9cm 培养皿中,28℃ 培养至菌落大小为 4 cm 左右,在菌落前方 0.5cm 处滴加 5μL 待测样品,置 28℃ 下培养 10h,观察抑菌圈形成,测量抑菌圈直径。

1.5.3 分子量的测定 采用 MALDI-TOF MS(Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)仪,以 70% 乙腈水溶液为溶剂。

1.5.4 等电点的测定 具体方法参照 Bio-Rad 111 型小型等电聚焦电泳槽使用手册。

1.5.5 氨基酸组成分析 样品经 6 mol/L HCl 于 110℃ 氮气保护下水解 24h,用 Beckman 121MB 氨基酸分析仪分析。

1.5.6 热稳定性实验 纯化的 LP-1(溶于 0.02 mol/L pH6.8 磷酸缓冲液中 0.3mg/mL)分别置 40℃~100℃ 处理 30min,检测对绿色木霉(*Trichoderma viride*)的抑菌活性。以未经处理的样品作对照,其抑菌活性定为 100%,按抑菌圈大小,换算成活性百分比^[4]。

1.6 最低抑制浓度测定

以绿色木霉为指示菌,将 0.3mg/mL 的 LP-1 水溶液做 2 倍系列稀释后,进行抑菌活

性测定 相同样品重复 3 次 ,能产生肉眼可见抑菌圈的最小浓度即为最低抑制浓度。

1.7 抑菌谱的测定

将指示真菌接种于含 PDA 培养基的 9cm 平板中 28℃ 培养至菌落大小为 4cm 左右 ,在菌落前方 0.5cm 处滴加 5μL 0.3mg/mL 的溶于 0.02mol/L pH6.8 磷酸缓冲液中的 LP-1 ,同时以无菌水、相同的磷酸缓冲液为对照 28℃ 继续培养 10h 测量抑菌圈的直径。

1.8 LP-1 对真菌菌丝形态的影响

将绿色木霉接种于含 PDA 培养基的 9cm 透明培养皿中 28℃ 培养至菌落大小为 3cm 左右 ,在菌落前方 0.5cm 处滴加 5μL 0.3mg/mL 的 LP-1 ,置 28℃ 下继续培养 ,从开始出现抑菌圈起 ,定时将平皿置于倒置显微镜下观察。

1.9 茚三酮反应性实验

参考文献 [8] 进行。

2 结果和讨论

2.1 抗真菌小肽的分离纯化

经过两次酸沉淀后 ,冷冻干燥得到淡黄色粉末状粗样品 ,含有很多色素物质 ,丙酮分级沉淀能有效地去除这些杂质。

第一次 Hi-pore 反相柱层析后 ,分离出很多峰 ,仅峰 6 具有抗真菌活性(图 1) 。第二次反相柱层析时 ,得到的几个峰也只有峰 2 有活性(图 2) 。第二次用 Hi-pore 反相柱纯化样品时 ,改变缓冲液很关键 ,仍用原来的磷酸缓冲液 ,样品在改变洗脱梯度的情况下也不发生分离 ,色谱图上仅表现为一个尖锐的单峰 ,这表明 pH7.5 的碳酸氢铵缓冲液能有效改变图 1 中峰 6 中一些组份的疏水性 ,促进它们的分离。

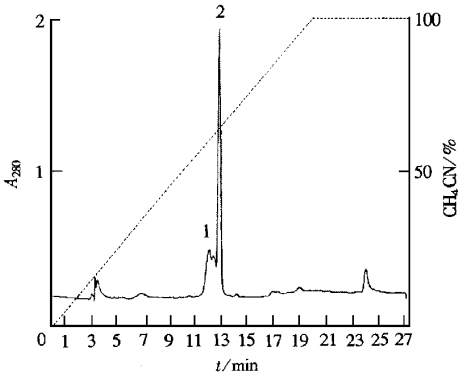
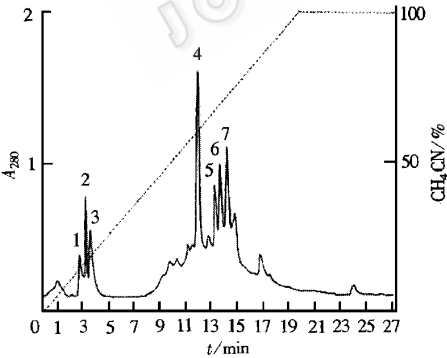


图 1 第一次用 Hi-pore 反相柱分离 LP-1 的色谱图(pH6.8 磷酸缓冲液)

图 2 第二次用 Hi-pore 反相柱分离 LP-1 的色谱图(pH7.5 碳酸氢铵缓冲液)

Fig.1 Isolation of LP-1 on Hi-pore reversed phase column(in phosphoric buffer of pH6.8)

Fig. 2 Purification of LP-1 on Hi-pore reversed phase column (in ammoniumbicarbonate buffer of pH7.5)

最后得到的样品 LP-1 为白色粉末状 ,1L 发酵的细菌培养液可得到 2mgLP-1 纯品。

LP-1 易溶于水、甲醇、乙醇和乙腈 ,不溶于丙酮和乙醚。在水溶液中 ,当 pH 低于 4.5 时 , LP-1 发生沉淀。

2.2 抗菌肽 LP-1 的部分理化性质

2.2.1 分子量测定 :经 MALDI-TOF 质谱仪测定 ,LP-1 样品为单一分子组份 ,分子量为 1057.3D(图 3)。由于 LP-1 的分子量较小 ,用常规的 SDS-PAGE 或者凝胶过滤色谱无法测定。

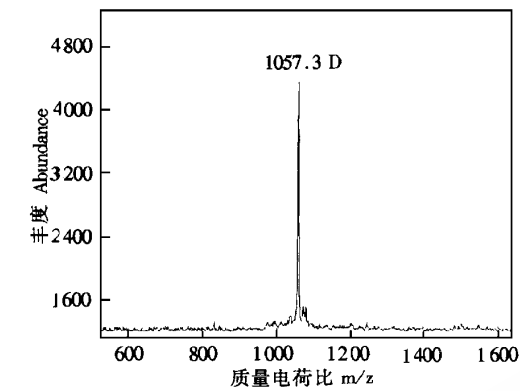


图 3 抗菌肽 LP-1MALDI-TOF 质谱图谱

Fig.3 MALDI-TOF MS profile of LP-1

2.2.2 等电点测定 :经薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测定 ,LP-1 的等电点为 4.75(图 4)。因为 LP-1 溶于甲醇 ,等电聚焦的考马斯蓝染液以及脱色液中均含有甲醇 ,染色和

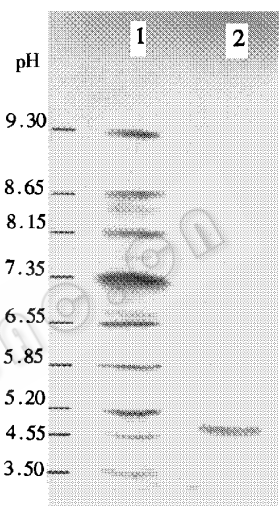


图 4 抗菌肽 LP-1 PAG-IEF 图谱

Fig.4 PAG-IEF analysis of LP-1

- 1. 标准等电点蛋白 Standard pI proteins ;
- 2. 抗菌肽 LP-1 Antifungal peptide LP-1.

脱色时间过长都会导致条带消失 ,所以染色仅用了 20min ,脱色也只用了 15min。

2.2.3 氨基酸组成分析 :氨基酸组成(表 1)表明 ,LP-1 仅含 5 种氨基酸 ,氨基酸残基数为 9。天冬氨酸的含量最高 ,达 33% ,另外还含 15% 的谷氨酸 ,可能正是由于 LP-1 富含酸性氨基酸 ,才使它的等电点偏酸性。

2.2.4 热稳定性实验 :抗菌肽 LP-1 的热稳定性实验表明 ,随着处理温度的提高 ,活性逐渐下降 ,但很缓慢。在 100℃ 下处理 30min ,活性仍能保持原有活性的 75%(图 5)。

2.2.5 最低抑制浓度测定 :通过二倍系列稀释法测得 LP-1 最低抑制浓度 0.019mg/mL ,表明 LP-1 在较低浓度下即具有抗菌活性。

表 1 抗菌小肽 LP-1 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of antifungal peptide LP-1

氨基酸	含量	残基数
Amino acid	Content/mol%	No. of residues*
天冬氨酸 Asp	33.45	2.97(3)
谷氨酸 Glu	15.08	1.35(1)
丝氨酸 Ser	25.52	2.34(2)
苏氨酸 Thr	7.86	0.72(1)
酪氨酸 Tyr	18.10	1.62(2)

* The values were calculated on the basis of the molecular weight 1057D determined by MS.

表 2 抗菌肽 LP-1 抗菌谱

指示菌	抗菌活性
Indicator strains	Antifungal activity
长柄链格孢	+++
<i>Alternaria longipes</i>	
黑曲霉	+++
<i>Aspergillus niger</i>	
番茄萎萎座镰孢霉	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	
玉蜀黍赤霉 JF-3	+++
<i>Gibberella zeae</i> JF-3	
玉蜀黍赤霉 F-17	+++
<i>Gibberella zeae</i> F-17	
玉蜀黍赤霉 H-28	+++
<i>Gibberella zeae</i> H-28	
稻梨孢	+
<i>Piricularia oryzae</i>	
瓜果腐霉	+++++
<i>Pythium aphanidermatum</i>	
绿色木霉	+++
<i>Trichoderma viride</i>	
梨黑腐皮壳	++
<i>Valsa ambiens</i>	

* The antifungal activity is expressed by the diameter of inhibition zone , + 3~5mm , + + 5~10mm , + + + 10~15mm , + + + + 15~20mm , + + + + + >20mm

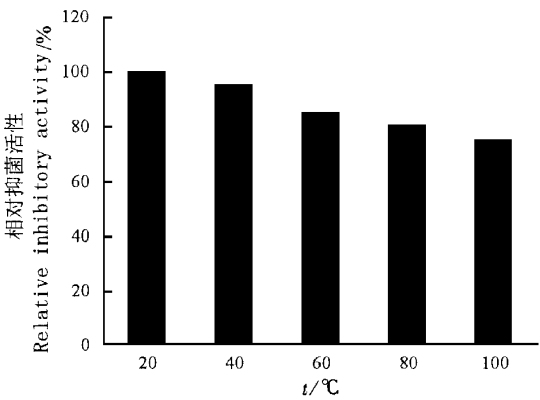


图 5 温度对 LP-1 抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the inhibitory activity of LP-1

2.2.6 平板抑菌实验 选择 10 种不同的植物病原真菌为指示菌 ,检测 LP-1 的抗真菌活性 ,抗菌谱见表 2。抗菌肽 LP-1 对检测的 10 种植物病原真菌均表现出不同程度的抑制活性 ,其中对瓜果腐霉的生长抑制最强 ;对玉蜀黍赤霉的 3 个生理小种、长柄链格孢、黑曲霉、番茄萎萎座镰孢霉和绿色木霉都有很强的抑制作用 ;对梨黑腐皮壳作用居中 ;对稻梨孢的抑制活性较小。

2.2.7 对真菌菌丝形态的影响 待观测绿色木霉

于 28℃ 下培养 4h 后 ,当菌丝生长至点样部位 ,抑菌圈刚出现时 ,菌丝顶端膨大 ,出现泡状物(图 6-A) ;当培养至 24h ,抑菌圈部位的菌丝变得短而细 ,出现扭曲 ,分支加剧 ,一些菌丝顶端仍存在泡状物 ,菌丝内原生质体分布不均匀 ,发生凝集(图 6-B) 。这同 Schreiber 等人报道的 BS1 所造成的菌丝形态异常很相似^[9]。对照未点样部位菌丝光滑、均匀(图 6—C)。

2.2.8 茚三酮反应性实验 :LP-1 的茚三酮反应呈阴性 ,氨基酸自动测序结果也证实 LP-1 无自由 N 端 ,因此 ,可基本确定 LP-1 为一环肽。

自从 1952 年 J. Babad 等人从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗真菌肽以来^[9] ,又陆续分离出多种抗真菌肽^[10~15]。这些小肽有许多共同特征 :分子量很小 ,仅 1000D 左右 ;基本都是环状结构 ,含有一些特殊氨基酸 ,如 D-氨基酸、β-氨基酸。LP-1 是否含 D-氨基酸和 β-氨基酸 ,还需进一步验证。从已知的性质来看 ,LP-1 同文献报道的各种小肽类抗生素都有一定差别。芬枯草菌素 A (Fengycin-A) 不溶于水 ,而且分子量为 1447D ,同 LP-1 有很大区别^[11] ;尽管 LP-1 与伊枯草菌素 A (Iturin A)^[6,12]、杆菌霉素 D (Bacillomycin D)^[13]和杆菌霉素 F (Bacillomycin F)^[14]接近 ,但有一显著差别 :LP-1 不含脯氨酸 ,而后三者均含一脯氨酸 ;1995 年 Kajimura 等人分离得到的杆菌肽素 (Bacillopeptin)^[15]在氨基酸组成上同

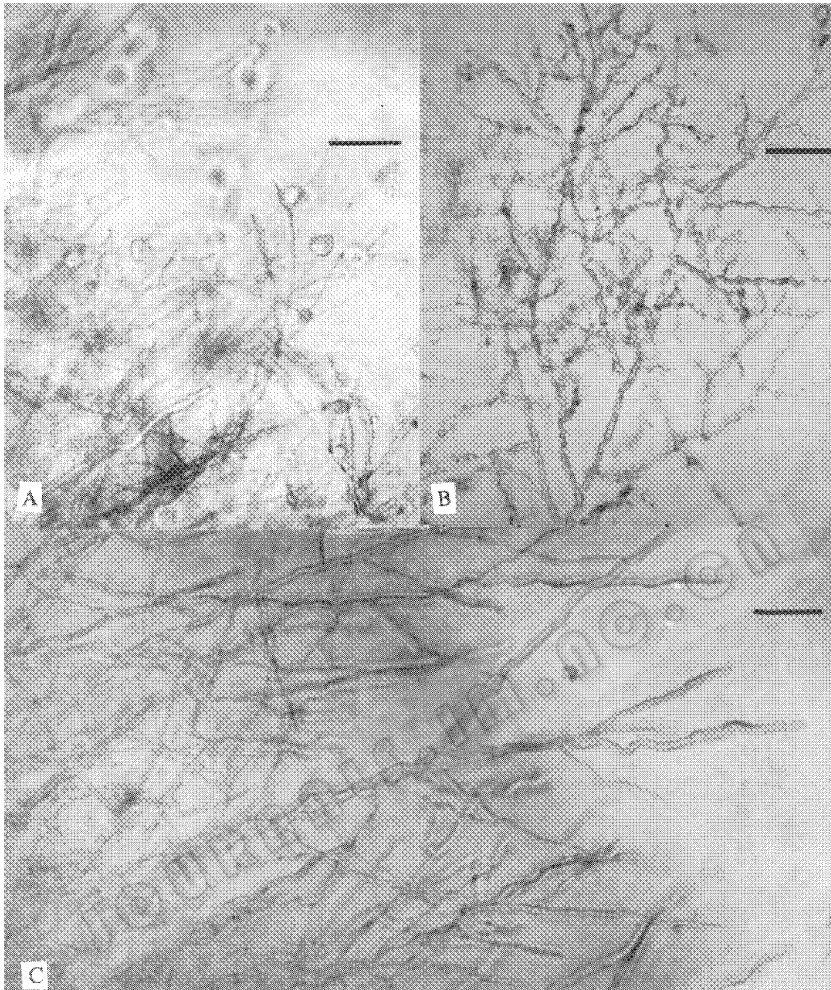


图 6 在 LP-1 作用下绿色木霉菌丝形态的变化

Fig. 6 Effects of LP-1 on the hyphal morphology of *Trichoderma viride*

A. Abnormal hyphal morphology of *T. viride* after cultured for 4 hours B. Abnormal hyphal morphology of *T. viride* after cultured for 24 hours C. Normal hyphal morphology of *T. viride* (Bars represent 0.1mm).

LP-1 最为相似,但即使是三种杆菌肽素中分子量最大的杆菌肽素 C,也只有 1048D,与 LP-1 相差 9D,而质谱测量精度可达千分之一 D,不可能是由质谱误差造成的,所以两者肯定不是同一种物质。综上所述,LP-1 为一种新的抗真菌小肽。

LP-1 的抗菌谱表明它是一种广谱的抗植物病原真菌的抗菌小肽,对许多危害严重的病原真菌都表现出很强的抗菌活性,在农业中有很好的应用前景。LP-1 的抗真菌机理还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Cornelissen B, Melchers L. *Plant Physiol*, 1993, **101**(3):709~712.
[2] 王雅平,刘伊强,潘乃穰等. *植物学报*, 1993, **35**(3):222~228.
[3] 刘伊强,王雅平,潘乃穰等. *植物学报*, 1994, **36**(3):197~203.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] 王雅平 , 刘伊强 , 潘乃穰等 . 生物化学与生物物理学报 , 1993 , 25 (4) : 391 ~ 397 .
- [5] McKeen C D , Reilly C C , Pusey P L . *Phytopathology* , 1986 , 76 (2) : 136 ~ 139 .
- [6] Besson F , Peypoux F , Michel G *et al.* *J Antibiotics* , 1976 , 29 (10) : 1043 ~ 1049 .
- [7] Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L *et al.* *J Biol Chem* , 1951 , 193 (1) : 265 ~ 275 .
- [8] 李建武 , 肖能珏 , 余瑞元等 . 生物化学实验原理和方法 . 北京 : 北京大学出版社 , 1994 . 150 ~ 155 .
- [9] Shreiber L R , Gregory G F , Krause C R *et al.* *Can J Bot* , 1988 , 66 (11) : 2338 ~ 2346 .
- [10] Babad J , Pinsky A , Turner-Graff R *et al.* *Nature* , 1952 , 170 (4328) : 618 ~ 619 .
- [11] Vanittanakom N , Loeffler W . *J Antibiotics* , 1986 , 39 (7) : 888 ~ 901 .
- [12] Peypoux F , Guinand M , Michel G *et al.* *Biochem* , 1978 , 17 (19) : 3992 ~ 3996 .
- [13] Peypoux F , Besson F , Michel G . *J Antibiotics* , 1980 , 33 (10) : 1146 ~ 1149 .
- [14] Mhammedi A , Peypoux F , Besson F *et al.* *J Antibiotics* , 1982 , 35 (3) : 306 ~ 311 .
- [15] Kajimura Y , Sugiyama M , Kaneda M . *J Antibiotics* , 1995 , 48 (10) : 1095 ~ 1103 .

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIFUNGAL PEPTIDE LP-1 *

Liu Ying Xu Qing Chen Zhangliang

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

Abstract An antifungal peptide LP-1 from *Bacillus subtilis* TG26 strain was purified by acid precipitation , acetone precipitation and Hi-pore reversed phase column chromatography . The molecular weight of LP-1 is 1057.3 D as determined by MALDI-TOF mass spectrometry , and its pI is 4.75 by PAG-IEF . It was also found to be thermostable . Its antifungal spectrum showed that LP-1 has strong inhibitory activity against many plant pathogenic fungi , such as *Pythium aphanidermatum* , *Gibberella zeae* , *Alternaria longipe* , *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* , etc . . The abnormal hyphal growth of *Trichoderma viride* caused by LP-1 such as swollen tips , twisted , short growth and cytoplasm condensation was also observed . Both ninhydrin reaction and peptide sequencing suggested that LP-1 is a cyclic peptide .

Key words *Bacillus subtilis* TG-26 , Antifungal peptide , Antifungal spectrum , Cyclic peptide

* This Project was Partially Supported by Pro-research Foundation of Peking University