

枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素-iturin A 的 纯化及电喷雾质谱鉴定

陈华, 袁成凌, 蔡克周, 郑之明*, 余增亮

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 合肥 230031)

摘要: 枯草芽孢杆菌 JA 产生的抗生素对植物病原真菌具有广谱抗性, 明确抗生素的种类是进一步研究的基础。用 6mol/L 盐酸沉淀 JA 菌株的去菌体培养基, 再用甲醇抽提获得抗生素的粗提物。利用反相 HPLC 系统, 将粗提物过 Diamonsil C₁₈ 柱, 收集有抗小麦赤霉病等病原真菌活性的化合物 1、2。运用电喷雾质谱法 (ESI/MS) 测得其分子量分别为 1042.4D 和 1056.5D。再利用碰撞诱导解离 (CID) 技术获得化合物的典型结构特征离子碎片, 结果表明分子量为 1042.4D 的化合物一级结构为 Pro-Asn-Tyr-βAA-Asn-Tyr-Asn-Gln (βAA 为 14 个碳原子的氨基脂肪酸), 属于脂 iturin A。化合物 1、2 为相差一个亚甲基(-CH₂)的 iturin A 同系物。研究结果提供了一种从枯草芽孢杆菌发酵液中快速分离纯化和鉴定脂肽类抗生素 iturin A 的新方法。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 脂肽类抗生素, 分离纯化, 电喷雾质谱 (ESI/MS), 碰撞诱导解离 (CID), iturin A

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)01-0116-05

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类重要的根际微生物, 能够促进植物抵抗病原菌的侵染, 因而被广泛应用于植物病害的生物防治。*B. subtilis* 能够产生的几十种不同结构的抗生素^[1]。非核糖体合成的脂肽类抗生素是最常见的一类, 主要包括 iturin、surfactin 和 fengycin 3 个家族^[2-4]。脂肽类抗生素由氨基酸链和脂肪酸侧链组成, 稳定性好, 对人畜无害不污染环境, 是具有重要开发价值的新型生物源农药^[5,6]。其中 iturin 家族是一类含有 7 个氨基酸的环状脂肽^[7,8], 具有强烈的抗真菌作用。研究表明, iturin 抗菌作用的机理是将疏水性尾巴插入细胞质膜, 并自动聚集形成离子通道, 从而使细胞质发生泄漏。此外 iturinA 还能释放电解质和高分子集合物, 增加生物质膜的电导率和通透性, 影响细胞膜的表面张力抑制病原菌孢子的形成。国外有报道 iturin 成功应用于生物防治的例子^[9,10], 国内对脂肽的研究主要集中在表面活

性素 surfactin^[5], 而对 iturin 的研究相对较少。

B. subtilis JA 菌株是本实验室分离的一株植物病害生防菌, 对小麦赤霉病、水稻纹枯病等都具有很好的防治效果。明确 JA 产生的抗生素种类是进一步开发和利用该生防菌的基础。前期工作证明, JA 能够产生分子量在 1435.7~1506.0 Da 之间的脂肽类抗生素 fengycin^[11]。本研究针对 JA 产生的活性物质, 通过反相 HPLC 分离, 得到分子量分别为 1042.4Da 和 1056.5Da 的两种化合物, 最后采用 ESI-CID 质谱分析, 表明这两种化合物为脂 iturin A 的同系物。JA 能够分泌 fengycin、iturin A 类抗生素, 是一株具有较大开发潜力的农用生防菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 拮抗菌: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus sub-*

基金项目: 国家自然科学基金(20576132)

*通讯作者。Tel: +86-551-5593145; Fax: +86-551-5591310; E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn

作者简介: 陈华(1980-), 男, 安徽绩溪人, 博士研究生, 主要从事微生物重要活性物质的分离纯化和机理研究。

E-mail: chenhua0563@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-05-22; 修回日期: 2007-10-10

tilis JA)为本实验室自行从土壤中分离;植物病原菌:小麦赤霉病(*Fusarium graminearum*)、水稻纹枯病(*Rhizoctonia solani*)、西瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)、畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)等植物病原菌由安徽农业大学惠赠;灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)购于中国林业菌种保藏中心(CFCC)。

1.1.2 柱分离材料和分离系统: Diamonsil™C₁₈ 层析柱为 Dikma 公司产品,所用仪器为 Waters 公司的 HPLC。甲醇、三氟乙酸和乙腈等试剂均为分析纯或色谱纯。

1.2 菌体培养和脂肽粗提物的制备

Bacillus subtilis JA 液体培养基使用 KMB^[6]培养基。菌株在含有 50mL KMB 培养基的 250mL 三角瓶中,在 30 200r/min 条件下培养 60h。培养结束后,常温 10000r/min 离心 20min 除去菌体。上清液用 6mol/L HCl 调 pH 至 2.0,轻微搅动或过夜。离心收集沉淀,加入甲醇后用索氏抽提器抽提,将抽提液蒸干后用 0.02mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,冷冻干燥后得粗提物。

1.3 反相 HPLC 分离纯化

将粗提物溶解并过 C₁₈ (Diamonsil, 5μm, 250 ×4.6mm)色谱柱来分离脂肽类抗生素。用 100%乙腈平衡 C₁₈ 柱,采用梯度洗脱,流动相 A 为含 0.1% TFA 的乙腈, B 为含 0.1% TFA 的超纯水;历经梯度洗脱的过程是 25 min 内 A:B 由 30:70~55:45,检测波长为 214nm,流速为 1mL/min;脂肽类抗生素 iturin A 在 18~22min 之间被洗脱出来,收集化合物 1、2 进行电喷雾质谱(ESI/MS)分析。

1.4 纯化物抑菌活性的检测

对于 1.3 实验中所获得的纯化物,利用管碟法和二倍稀释法测定其对植物病原真菌的抑制活性和最低抑制浓度 MIC^[4, 10]。

1.5 纯化物的电喷雾质谱分析

实验所用的电喷雾质谱仪是 Finnigan 公司的 LCQ Advantage 型号仪器。将 HPLC 收集的化合物 1、2 通过注射器直接进样。利用 ESI/MS 测定化合物的分子量,电喷雾条件为:毛细管电压 32V、喷雾电压 5kV、毛细管温度 320 °C,检测方式:正离子。利用碰撞诱导解离技术(CID)获得化合物的典型碎片离子,碰撞池中碰撞气体为氦气,碰撞能量根据实验需要进行设定。

2 结果

2.1 脂肽类抗生素的分离纯化

将粗提物(溶于 0.02mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲

液)过 Diamonsil C₁₈ 柱,历经梯度洗脱在 18~22min 之间依次出现 2 个主峰:峰 1 和 2(图 1),分别收集于试管中,冷冻干燥后得到的白色粉末即为脂肽类抗生素的纯品。

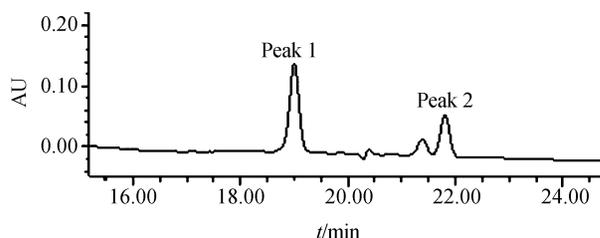


图 1 JA 产生的脂肽类抗生素 iturin 在反相 HPLC 上的分离

Fig. 1 Purification of iturin homologues produced by *B. subtilis* JA on RP-HPLC.

2.2 纯化物的抑菌活性

管碟法试验结果表明化合物 1、2 对小麦赤霉病(*F. graminearum*)、水稻纹枯病(*R. solani*)、西瓜枯萎病(*F. oxysporum*)、畸雌腐霉(*P. irregulare*)和灰葡萄孢霉(*B. cinerea*)等多种植物病原真菌具有较强的抑制作用。其中化合物 1 的 MIC 测定结果如表 1 所示。

表 1 化合物 1 对各种植物病原真菌的最低抑制浓度(MIC)

Phytopathogens	MIC/(μg/mL)
<i>Fusarium graminearum</i>	6.25
<i>Rhizoctonia solani</i>	12.50
<i>Fusarium oxysporum</i>	25.00
<i>Pythium irregulare</i>	50.00
<i>Botrytis cinerea</i>	12.50

2.3 纯化物分子量的测定

将 HPLC 分离到的化合物 1、2 进行 ESI/MS 分析(图 2)。质荷比(m/z)为 1043.4 和 1057.5 的离子峰是化合物 1、2 的质子化峰,1065.5 和 1079.6 是化合物 1、2 的钠离子加合物峰。结果表明分离的两种化合物的分子量分别为 1042.4Da 和 1056.5Da,推测两种化合物为脂肪酸链相差一个亚甲基(-CH₂)的同系物。

2.4 纯化物的分子结构分析

ESI/MS 质谱法分析脂肽类化合物分子结构的原理是通过碰撞诱导解离技术(CID)获得的质子化或碱金属加合离子碎片值与理论计算产生的相应碎片值进行比较,来推导其分子结构。将 HPLC 分离的化合物 1、2 做 ESI/MS-CID 分析,质子化[M+H]⁺峰(m/z 1043.5)产生的 CID 片断如图 3 所示。

图中各峰是实验测定的质子化离子片断质核比(m/z)。箭头朝左表示断裂产生的是 N 端系列 b 型离子峰,箭头朝右表示产生的是 C 端系列 y 型离子峰。根据 b 型和 y 型碎片获得的片断结构分别为

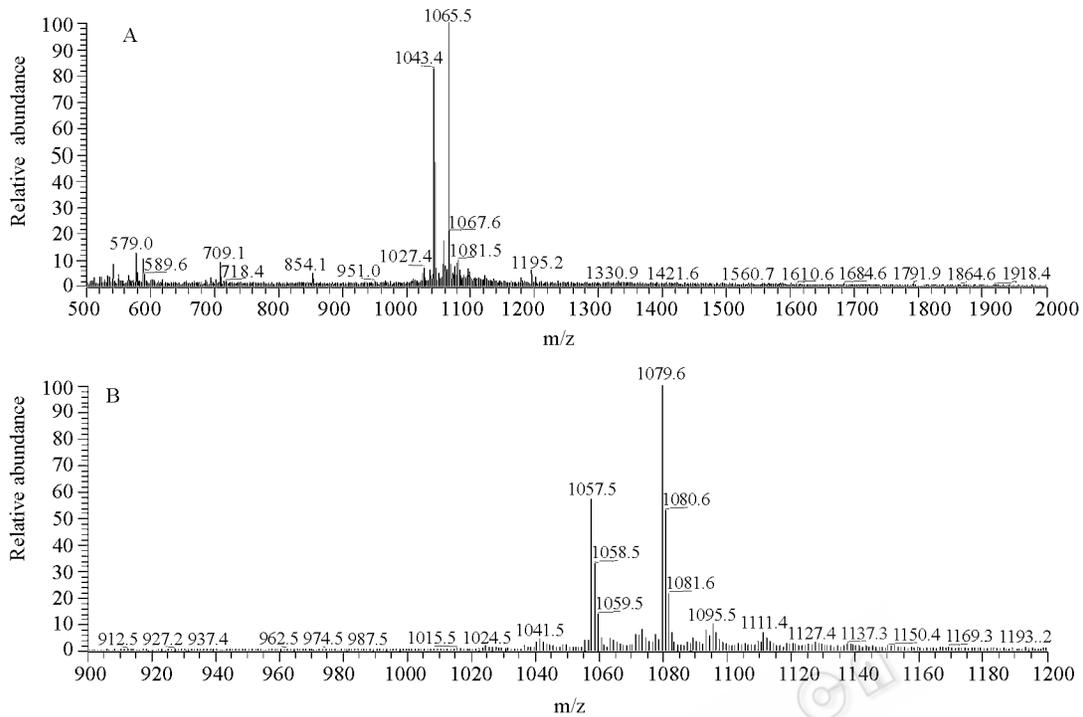


图 2 JA 产生的脂肽类抗生素的 ESI/MS 质谱图

Fig. 2 Electrospray ionization mass spectrum of separated lipopeptide produced by *B. subtilis* JA. A: peak 1; B: peak 2.

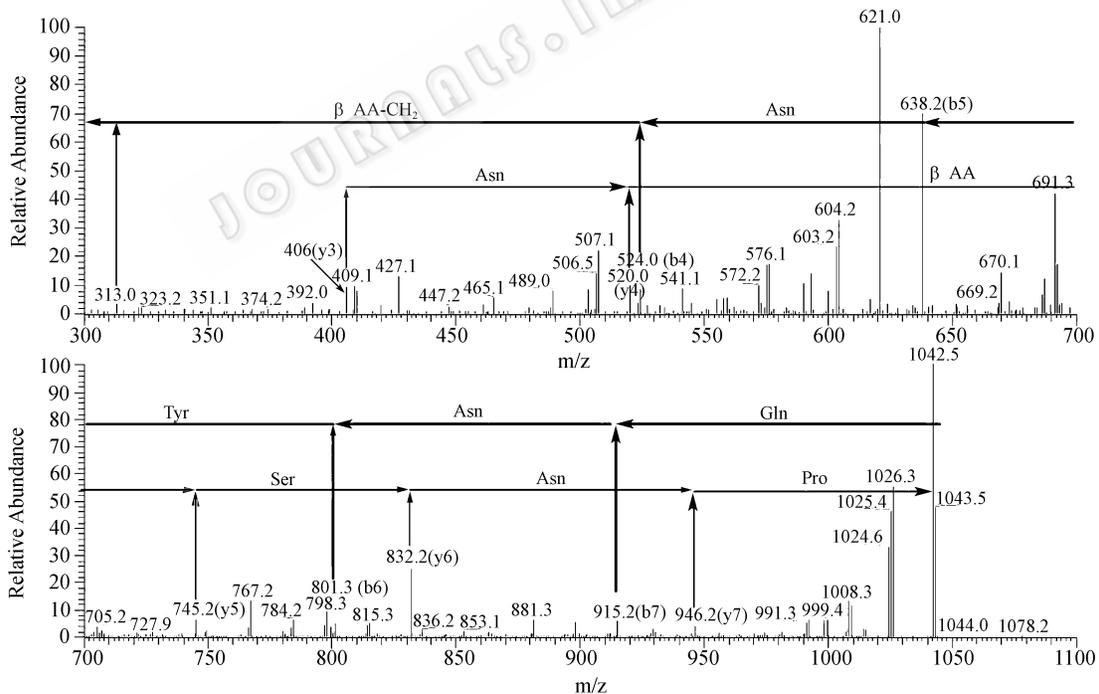


图 3 JA 产生的脂肽类化合物 1 的 ESI/MS-CID 质谱图

Fig. 3 ESI/MS-CID spectra of the compound 1 produced by *B. subtilis* JA.

β AA-Asn-Tyr-Asn-Gln、Pro-Asn-Tyr- β AA-Asn (β AA 为氨基脂肪酸)。其中 β AA-Asn 片断为两部分的 共有结构, 结合两个片断可以推测化合物的一级结构为: Pro-Asn-Tyr- β AA-Asn-Tyr-Asn-Gln。根据 β AA 的

质核比 $m/z = y5 - y4 = 225.2$, 可以推断脂肪酸链的长度应为 14 个碳原子, 其质子化结构为 $(-H_2N^+ = CH-C_{12}H_{25}-CO-)$ 。根据以上分析, *Bacillus subtilis* JA 产生的分子量为 1042.4Da 的抗生素属于 iturin A。

图 4 是 iturin A 产生的 b 型和 y 型特征碎片离子, 说明测定的结果和理论值相符。同样可以分析化合物 2 多一个亚甲基的 iturin A 同系物。

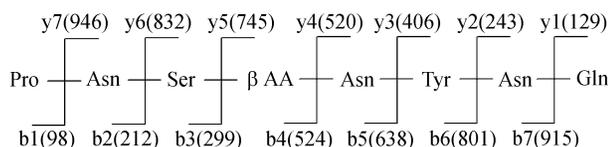


图 4 iturin A 通过 CID 产生的 b 型和 y 型离子碎片

Fig. 4 Possible b-and y-type fragments produced by CID from iturin A.

3 讨论

本研究运用反相 HPLC 方法从 *B. subtilis* JA 发酵液粗提物中分离出两个具有抗真菌活性的化合物, 通过 ESI/MS-CID 分析, 确定了化合物的结构, 为脂肽类抗生素 iturin A。传统的脂肽分离方法先将粗提物过分子筛、薄层层析或进行固相萃取等步骤^[5, 7, 12], 再进行 HPLC 分离, 方法繁琐费时, 本研究尝试直接将粗提物过反相 HPLC, 摸索出新的分离条件, 方法简便快速且分离效果较好。测定脂肽类化合物氨基酸序列常用的方法是 Edman 降解法, 根据水解后分离的各肽段推导出氨基酸序列^[13], 这种方法成本高、耗时长, 且不能直接用于 N-端封闭的多肽序列分析。*B. subtilis* 产生的脂肽类化合物往往具有很多结构相似的同系物或异构体, 因此很难分离得到单一的化合物, 这就进一步增加了运用 Edman 降解法测定脂肽类抗生素氨基酸序列的难度。ESI/MS 是近年来引入生命科学的功能强大的新技术, 其突出的优点是快速简便和高灵敏度, 不仅可以一次性测定粗产物中各成分分子量, 还可以获得目标产物的结构信息^[14, 15]。本研究证明, ESI/MS 质谱技术尤其适用于同时分析具有相似结构的同系物, 是测定脂肽类化合物分子量及鉴定其结构的有效工具。

迄今为止, 本实验室已从 *B. subtilis* JA 发酵液中分离出两类抗生素, 分别为 fengycin^[11]和 iturin A。体外抗菌实验表明 iturin A 能够抑制多种重要植物病原真菌的生长, 例如对 *F. graminearum* 的 MIC 值为 6.25 μg/mL。而 *F. graminearum* 引起的小麦赤霉病是世界温暖潮湿和半潮湿地区的一种毁灭性小麦病害, 已成为影响小麦产量的主要限制性因素^[16]。对于这些真菌病害的防治研究证明 *B. subtilis* JA 的潜在应用价值。

参 考 文 献

- [1] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*, 2005, 56 (4): 845–857.
- [2] Peypoux F, Guimand M, Michel G, et al. Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1978, 17: 3992–3996.
- [3] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biot*, 1999, 51: 553–563.
- [4] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, et al. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J Antibiot*, 1986, 39: 888–901.
- [5] 高学文, 姚仕义, Pham H, 等. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的表面活性素变异体的纯化和鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43 (5): 647–652.
- [6] Liu J, Liu M, Wang J, et al. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. *Appl Microbiol Biot*, 2005, 69: 223–228.
- [7] Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34: 955–963.
- [8] Vater J, Kablitz B, Wilde C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (12): 6210–219.
- [9] Klich MA., Arthur KS, Lax AR. et al. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia*, 1994, 127 (2): 123–127.
- [10] 刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44 (4): 511–514.
- [11] Wang J, Liu J, Wang XQ, et al. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39: 98–102.
- [12] Akpa E, Jacques P, Wathélet B, et al. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotech*, 2001, 91–93: 551–561.
- [13] Yang S, Wei D, Mu B. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *J Biochem Bioph Meth*, 2006, 68: 69–74.
- [14] Mikkola R, Kolari M, Andersson MA, et al. Toxic lactic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 4068–4074.
- [15] 王贤纯, 梁宋平. 反相高效液相色谱/电喷雾质谱法分析化学合成七肽粗产物. *分析化学 (Chinese J Anal Chem)*, 2004, 32(9): 1219–1222.
- [16] Yu GY, Muehlbauer GJ. Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to *Fusarium* head blight. *Physiol Mol Plant P*, 2001, 59: 129–136.

Purification and identification of iturin A from *Bacillus subtilis* JA by electrospray ionization mass spectrometry

Hua Chen, Chengling Yuan, Kezhou Cai, Zhiming Zheng*, Zengliang Yu

(Key Laboratory of Ion Beam Engineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JA antagonized a broad spectrum of plant fungal pathogens. The purification and identification of the lipopeptide antibiotics plays an important role for further research. Crude lipopeptides were extracted with methanol from the precipitate, which was obtained by adding 6mol/L HCl to the cell-free culture broth and then stored at 4°C overnight. The crude extract was run on reversed-phase HPLC system with a Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, Dikma) to separate the lipopeptides. Two antifungal compounds, which had strong inhibitory activity against various plant fungal pathogens, such as *Fusarium graminearum*, were purified. The molecular weights of two compounds were determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS). Two compounds, with molecular weights of 1042.4 Da and 1056.5 Da, were homologues differed by a structure of -CH₂. ESI collision induced dissociation mass spectrometry analysis was used to sequence the structure of purified compounds. Typical b- and y- type fragments showed that compound 1 (with a molecular weight of 1042.4 Da) had a primary structure of Pro-Asn-Tyr-βAA-Asn-Tyr-Asn-Gln (βAA represented β-amino acid), which was consistent with lipopeptide iturin A. Compound 2 was a homologue of iturin A.

Keywords: *Bacillus subtilis*; lipopeptide antibiotics; purification; electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS); collision induced dissociation (CID); iturin A

Supported by the Chinese National Natural Foundation (20576132)

*Corresponding author. Tel: +86-551-5593145; Fax: +86-551-5591310; E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn

Received: 22 May 2007/Revised: 10 October 2007

科学出版社新书推介

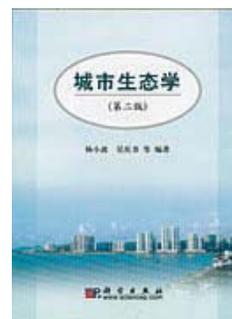
城市生态学(第二版)

杨小波 吴庆书 等编著

978-7-03-017532-8/X.189; ¥45.00; 2006年9月5日出版

城市生态学是生态学的重要分支,是研究城市居民与城市环境相互关系的科学。本书广泛吸收了国内外有关城市生态学各分支领域、各学派的最新成就,特别是重点概括了我国城市生态近二十年来的研究成果,较紧密地结合了中国地研究案例,具有中国特色。全书共9章,主要内容有:生态系统基础理论、城市生态系统、城市人口、城市环境、城市环境灾害及其防治、城市景观生态、城市环境质量评价与可持续发展、城市化与社区发展等。

本书可作为高等院校生态学各相关专业本科生教材,也可供从事相关工作的科研人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目