

内芽孢杆菌属细菌(*Paenibacillus daejeonensis*)SS02 抗菌蛋白的分离纯化和其性质的研究

Studies on Purification and Properties of Antagonistic Protein from Bacteria SS02 of *Paenibacillus daejeonensis*

祝 凯, 张晓喻, 任 智, 冯定胜, 王一丁*

ZHU Kai, ZHANG Xiao-Yu, REN Zhi, FENG Ding-Sheng and WANG Yi-Ding*

四川师范大学生命科学学院, 成都 610068

College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China

摘 要 内芽孢杆菌属细菌(*Paenibacillus daejeonensis*)SS02, 是一株能强烈抑制玉米纹枯菌(*Rhizoctonia cerealis*)、白色念珠菌(*Candidal vaginitis*)等病害真菌的拮抗菌株。SS02 菌株培养液经硫酸铵分级盐析、Sephadex G-75 凝胶柱层析和 DEAE-32 纤维素柱层析分离纯化出一种抗菌蛋白, 命名为 SD22。蛋白电泳分析结果表明, 此蛋白分子量为 56000, 等电点为 6.4。此蛋白对热和紫外线稳定, 对蛋白酶部分敏感。纯化后的 SD22 对玉米纹枯菌(*Rhizoctonia cerealis*)、油菜菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricala*)、绿色木霉(*Trichodema viride*)、绿色粘帚霉(*Gliocladium viride*)、弯孢霉(*Curvularia leaf spot*)、镰刀霉菌(*Fusarium sp.*)、赤霉菌(*Fusarium head blight*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylo-coccus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candidal vaginitis*)、冬瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum* Schl. emend. Snyder & Hanse)等菌有很强的抑制作用。

关键词 抗菌蛋白, 纯化, 抗菌谱

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0681-05

Abstract The antifungal, anti-bacterial, anti-brine shrimp activities of SD22 isolated from *Paenibacillus daejeonensis* Bacteria SS02 were studied. The separation steps included ultracentrifugation, ultrafiltration and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, further purification was performed by SephadexG-75 and DEAE-32 chromatography. Its molecular weight determined by SDS-PAGE was 56.0kD and its isoelectric point was 6.4. SD22 was thermostable to some extent and stable to ultraviolet, but sensitive to some of the enzyme. SD22 could kill most pathogens from propagation, such as *Rhizoctonia cerealis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Physalospora piricala*, *Trichodema viride*, *Gliocladium viride*, *Curvularia leaf spot*, *Fusarium sp*, *Fusarium head blight*, *Beauveria Bassiana*, *Escherichia coli*, *Staphylo-coccus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candidal vaginitis*, *Fusarium oxysporum* Schl. emend. Snyder&Hansem et al. The results will be helpful to find out a novel antifungal protein.

Key words antifungal protein, purification, antibacterial spectrum

真菌病害是造成农业生产损失的主要原因之一, 近年来由于不合理使用各种农药, 给人类及环境

带来极大的危害, 而抗生素使用的泛滥导致人类的抗药性迅速增强, 急需开发新的替代产品。因此利

Received: November 16, 2006; Accepted: December 20, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China(No.30670218).

* Corresponding author. Tel: +86-28-84766411; E-mail: wwwyiding@163.net

国家自然科学基金资助项目(No.30670218)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

用生物技术防治植物病原真菌,动物病原细菌是近年来研究热点。

我们最近从内芽孢杆菌属细菌(*Paenibacillus daejeonensis*) SS02 代谢产物中分离纯化出一种抗菌蛋白,命名为 SD22,它具有广谱的抗菌特性,对玉米纹枯菌、白色念珠菌、油菜菌核病、赤霉菌、金黄色葡萄球菌等病菌等有很强的抑制作用。本文将对该抗菌活性物质——抗菌蛋白 SD22 的分离纯化及其性质的研究做报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:内芽孢杆菌属细菌(*Paenibacillus daejeonensis*) SS02 由本实验室筛选分离。冬瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schl. emend. Snyder&Hansem)、玉米纹枯菌(*Rhizoctonia cerealis*)、油菜菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricala*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、绿色粘帚霉(*Gliocladium viride*)、弯孢霉菌(*Curvularia leaf spot*)、镰刀霉菌(*Fusarium sp.*)、赤霉菌(*Fusarium head blight*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida vaginitis*)为本实验室保存。

1.1.2 试剂:Sephadex G-75 为 Pharmacia 公司产品,DEAE-32、标准分子量蛋白、标准等电点蛋白、考马斯亮蓝、TEMED、聚丙烯酰胺、蛋白酶 K 为 Amresco 公司产品,胰蛋白酶为 Hyclone 公司产品,透析膜为进口分装,其他为国产试剂。

1.1.3 培养基:细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,病原真菌用 PDA 培养基^[3]。

1.2 方法

1.2.1 培养条件的优化:将 SS02 菌株接种在牛肉膏蛋白胨液体培养基里,分别用不同温度,不同 pH 值,不同培养时间振荡培养,测定其抗菌活性^[4]。

1.2.2 抗菌蛋白的制备与纯化:

供试品的制备:将发酵液于 4℃,12 000r/min 离心 15min 取上清液,加入 20% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,4℃静置过夜,分别收集上清液和沉淀,将沉淀溶于适量磷酸缓冲液(20mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH6.8),蛋白浓度稀释至 1mg/mL,检测其抑菌活性。上清液用同样的方法制备 30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析蛋白溶液,稀释至相同的蛋白浓度,分别检测抑菌活性,根据抑菌活性确定分级盐析的两个饱和度。将分级盐析后得到的粗蛋白液加入透析袋(22mm,14 000D)内,在蒸馏水中静置 24h 透析脱盐后,水浴 40℃浓缩得浓缩粗蛋白液。以牛肉膏蛋白胨液体培养基相同方法的提取液为空白对照。

分离纯化:根据供试品和凝胶的性质,将供试品过 Sephadex G-75 色谱柱,用 20mmol/L pH 6.8 磷酸缓冲液洗脱,将收集到的活性组分过 DEAE32-纤维素色谱柱,用 0.2mol/L NaCl 溶液洗脱,收集活性组分,透析浓缩至合适体积。

1.2.3 分子量测定:按文献^[5]方法进行 SDS-PAGE 电泳,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%。

1.2.4 等电点测定:聚丙烯酰胺凝胶等电聚集电泳(PAGE-IEF)参见文献^[6]。

1.2.5 对温度的敏感性:将纯化抗菌蛋白(1mg/mL)分别置于 30~120℃处理 20min,每 10℃为一个梯度,其中 100℃,110℃用灭菌锅处理 20min。用没经处理的样品作为对照,重复 3 组,检测其抑菌活性,将对照的抑菌活性定为 100%^[7]。

1.2.6 抗紫外辐射测定:25W 紫外灯距离约 5cm 分别照射处理 1~12h 后,按 1.2.9 方法测定其抗菌活性。

1.2.7 pH 耐受性测定:用 0.1mol/L 柠檬酸-0.2mol/L 磷酸氢二钠缓冲液(pH2.6~7.6)和 0.2mol/L 甘氨酸-0.1mol/L NaOH 缓冲液(pH7.6~10.6)调节样品 pH 值后按 1.2.9 方法测定抗菌活性。

1.2.8 对蛋白酶敏感性:将提纯蛋白(1mg/mL)与蛋白酶 K、胰蛋白酶、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),按 1.2.9 方法测其抑菌活性,不用酶液处理作对照,定其抑菌活性为 100%。

1.2.9 抑菌谱:用杯碟法分别检测抗菌蛋白(1mg/mL)对各种病原菌的抑菌活性。对病原真菌抑制作用测定:在 PDA 培养基平板均匀涂布测试菌孢子液后插入牛津杯后加入 1mg/mL 纯化蛋白溶液注入孔内,在 28℃恒温培养箱内培养 48h,测量抑菌圈大小,以无菌水处理为对照。对病原细菌抑制作用测定:取 28℃培养 24h 的病原细菌,用 NB 培养基制成带菌平板,在平板上中央插入牛津杯后加入 1mg/mL 纯化蛋白溶液注入孔内,在 28℃箱内培养 24h,测量抑菌圈大小,每平板重复 3 组,以无菌水处理为对照。

2 结果

2.1 内生细菌 SS02 培养条件的优化

由图 1 可知,SS02 菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基培养,当 pH 为 7.0,培养温度为 32℃,转速为 160r/min 振荡培养 72h 后抗菌活性相对处于最高。

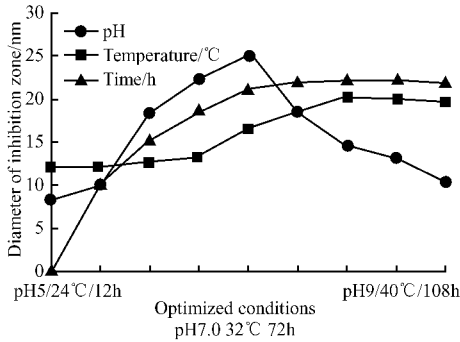


图 1 培养条件优化
Fig.1 Optimized cultivating conditions

2.2 SD22 的分离纯化

2.2.1 硫酸铵盐析:由图 2 可知,在 50% 以上饱和度条件下,抑菌活性不再加强,在 20% 饱和度以下,抑菌活性较小,由此确定 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级饱和度为 20% 和 50%。为了方便纯化,先在发酵上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 20% 饱和度,4℃ 过夜去沉淀,上清液补加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 60% 饱和度,收集沉淀用于进一步纯化。

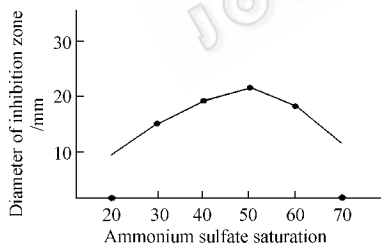


图 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度与提取抗菌抑菌蛋白活性的关系
Fig.2 Relation of ammonium sulfate saturation on antifungal protein activity

2.2.2 Sephadex G-75 柱层析:在分离过程中收集两个蛋白峰,以油菜菌核病和白色念珠菌为指示菌,分别检测两个峰的抑菌活性。结果表明,峰 II 显示出很强的抑菌活性,而峰 I 无抑菌活性。以活性最大与最小一半处为上、下限,合并收集峰 II,浓缩后低温保存(图 3)。

2.2.3 DEAE32-纤维素柱层析:用磷酸缓冲液平衡 DEAE 32 柱,然后把 Sephadex G-75 柱层析收集的活性峰 I 浓缩处理后上样,用 0.2mol/L NaCl 洗脱,结果如图 4 所示,分离得到 4 个主峰,经检测峰 I,III,

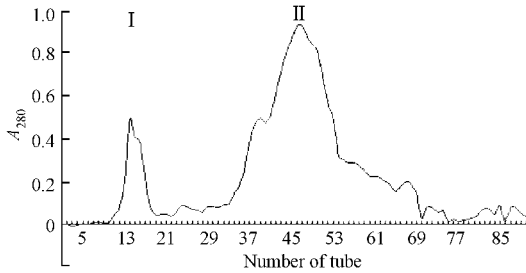


图 3 抗菌活性物质 Sephadex G-75 柱层析图
Fig.3 Elution profile of antifungal substance by Sephadex G-75 chromatography

IV 均无抑菌活性,而峰 II 显示出极强的抑菌活性。将收集得到活性组分命名为 SD22 蛋白。用蒸馏水透析脱盐,浓缩后于 -20℃ 保存。

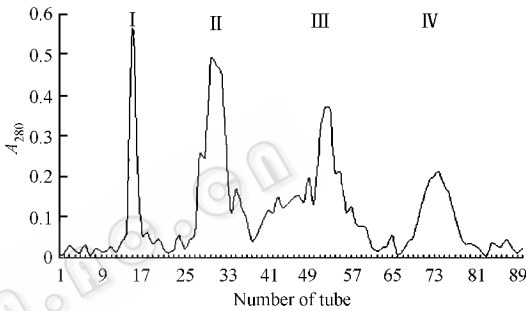


图 4 抗菌活性物质 DEAE32-纤维素层析图
Fig.4 Elution profile of antifungal substance by DEAE-cellulose chromatography

2.3 SD22 的性质鉴定

2.3.1 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分子量的测定:经 SDS-PAGE 鉴定此抗菌蛋白 SD22 为单一的蛋白带,其表观分子量为 56 000(图 5)。

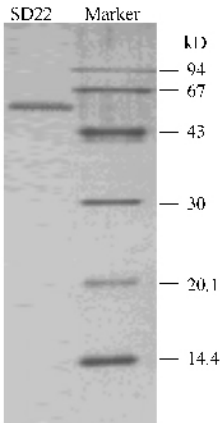


图 5 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱
Fig.5 Antifungal protein SDS-PAGE spectrum

2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(PAGE-IEF)等电点的测定:选择 pI 3~10 标准参照蛋白与抗菌蛋白 SD22 进行。PAGE-IEF 结果如图 6,SD22 为单一一条带,pI 约为 6.4。

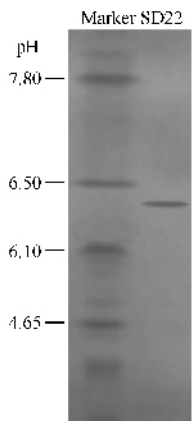


图 6 抗菌蛋白 PAGE-IEF 图谱
Fig.6 Antifungal protein PAGE-IEF spectrum

表 1 紫外线对抗菌蛋白 SD22 抗菌活性的影响

Table 1 The antimicrobial influence of ultraviolet radiation on antifungal protein SD22							
Time of ultraviolet radiation	0	0.5	1	2	4	8	12
Diameter of inhibition zone	30.9	28.9	29.5	30.1	32.6	30.3	29.9

表 2 pH 对抗菌蛋白 SD22 抗菌活性的影响

Table 2 The antimicrobial influence of pH on antifungal protein SD22												
pH	2	3	4	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8	9	10
Diameter of inhibition zone	7	7.3	8.5	22	23.3	28.3	32.4	32.8	30	8.9	7.2	7.2

2.3.7 抗菌蛋白 SD22 的抑菌谱图 :经测定 ,SD22 对玉米纹枯菌、油菜菌核病、苹果轮纹病菌、冬瓜枯萎病菌、绿色木霉菌、绿色粘帚霉、弯孢霉菌、镰刀霉菌、赤霉菌、球孢白僵菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 ,有很强的抑菌效果 见表 3。

表 3 抗菌蛋白 SD22 的抑菌谱

Table 3 Antibacterial spectrum of antifungal protein SD22	
Microzyme	anti-bacterial activity
<i>Candidal vaginitis</i>	+ +
Pathogenetic bacterium	anti-bacterial activity
<i>Escherichia coli</i>	+ + +
<i>Staphylo-coccus aureus</i>	+ + +
<i>Bacillus subtilis</i>	+ + +
Pathogenetic epiphyte	anti-bacterial activity
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	+ + +
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+ + +
<i>Physalospora piricala</i>	+ + +
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl . emend . Snyder & Hansm	+ + +
<i>Gliocladium viride</i>	+ +
<i>Curvularia</i> leaf spot	+ + +
<i>Fusarium</i> sp.	+ +
<i>Fusarium</i> head blight	+ + +
<i>Beauveria bassiana</i>	+ +

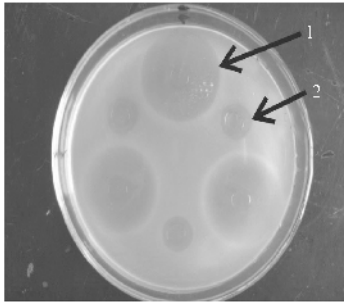


图 7 SD22 对蛋白酶敏感性
Fig.7 The sensitivity of SD22 to enzyme

1 :inhibition zone of SD22 ; 2 : inhibition zone of SD22 by enzymatic hydrolysis.

3 讨论

内芽孢杆菌属 SS02 分泌产生的蛋白通过硫酸铵分级沉淀 ,Sephadex G-75 柱层析和 DEAE32-纤维素柱层析后得到纯化蛋白 ,SDS-PAGE 电泳表明该蛋白分子量约为 56 000 ,等电点电泳表明该蛋白等电点约为 6.4 ,通过对该蛋白抗紫外线活性测定 ,pH 稳定性以及该蛋白对蛋白酶敏感性实验表明该蛋白是一种相当稳定的蛋白。抑菌实验证实该蛋白对玉米纹枯菌、油菜菌核病、苹果轮纹病菌、冬瓜枯萎病菌、绿色木霉菌、绿色粘帚霉、弯孢霉菌、镰刀霉菌、赤霉菌、球孢白僵菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等具有很强的抑菌效果 ,说明它是一种广谱抗菌蛋白 ,在

生物农药和抗生素生产中具有很好的应用前景。

目前对于从微生物中分离纯化抗菌成分的成果主要集中在小分子水平上^[8],国外的研究主要是从放线菌中分离得到抗生素^[9],而国内目前尚未见到有关从内生细菌资源中分离得到抗菌蛋白以及性质研究的相关报道。我们的研究证实 SD22 蛋白是一种广谱的抗病害的抗菌蛋白,对植物病害真菌、动物病原细菌和酵母菌等都显示出了强烈的抑制作用,并具有一些特殊性质,以及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。目前该实验只完成了抗菌蛋白的分离纯化和抗菌作用的初步研究,下一步我们需进一步明确抑菌机制,为生物农药和新抗生素应用奠定基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zou WX(邹文欣),Tan RX(谭仁祥). Recent advances on endophyte. *Acta Botanica Sinica*(植物学报) 2001 ,**43**(9):881 – 892.
- [2] Yang ZQ(杨正强),Zhang YX(张耀兮),Chen XJ(陈小静), *et al.* . Studies on the isolation and antibiotic activities of endophytes in *Paris polyphylla* var. *Chinensis* franch. *Microbiology*(微生物学通报) 2006 **33**(2) 54 – 58.
- [3] Wu GY(吴冠芸). Biochemistry and Molecular Biology experiment data enrichment. Science Press(科学出版社),2002 ,pp. 119 – 132.
- [4] Zhang LX(张丽霞),Li XR(李荣禧),Qi JS(齐俊生), *et al.* . Optimization of ferment culture medium for *Bacillus subtilis*. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报),2005 **35**(Suppl):209 – 209.
- [5] Wang JX(汪家政),Fan MK(范明). Protein Methods Enrichment. Beijing : Science Press(科学出版社) 2001 ,pp. 77 – 144.
- [6] Wang YH(王廷华),Zou XL(邹晓莉). Protein Theoretics and Technology. Beijing : Science Press(科学出版社), 2005 ,pp. 95 – 121.
- [7] Zheng IP(郑爱),Li P(李平),Wang SQ(王世全), *et al.* . Screening ,taxonomy of antagonistic strain B34 against *Rhizoctonia solani* and acquirement of the antiseptic protein. *Chinese Journal of Rice Science*(中国水稻科学), 2002 **16**(4) 356 – 360.
- [8] Shi JY(石晶盈),Chen WX(陈维信),Liu AY(刘爱媛). Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases. *Acta Ecologica Sinica*(生态学报),2006 **26**(7):2395 – 2401.
- [9] Sturz V ,Christie BR ,Norwak J. Bacterial endophytes : potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Review in Plant Sciences* ,2000 **19**(1):1 – 30.