



吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 抗菌蛋白的分离纯化

任嘉红^{1,2} 吴小芹¹ 刘辉¹ 叶建仁^{1*}

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院 江苏 南京 210037)

(2. 长治学院生化系 山西 长治 046011)

摘要: 对拮抗细菌吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*) JK-SH007 菌株抗菌蛋白进行了初步研究。研究发现, JK-SH007 菌株的抗菌粗蛋白对热和蛋白酶 K 不敏感, 碱性环境不利于抑菌蛋白活性的发挥。JK-SH007 菌株的无菌发酵滤液经硫酸铵沉淀、透析(3.5 kD)、冷丙酮沉淀(-20°C)、Sephadex G-50 葡聚糖凝胶分子筛层析及 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析分离纯化, 得到了蛋白组分 A-II-2, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测不是单一组分, 该复合组分具有明显抑制 3 种杨树溃疡病病原真菌金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)、七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)生长的作用。

关键词: 杨树溃疡病, 吡咯伯克霍尔德氏菌, 抗菌蛋白, 分离纯化, 拮抗细菌

Isolation and Purification of Antifungal Protein from *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007

REN Jia-Hong^{1,2} WU Xiao-Qin¹ LIU Hui¹ YE Jian-Ren^{1*}

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

(2. Department of Biochemistry, Changzhi College, Changzhi, Shanxi 046011, China)

Abstract: A preliminary study on the antagonistic protein produced by *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 was carried out. The results showed it was stable to heat, not sensitized to proteinase K and partially sensitive to alkali. Cell culture was obtained after centrifuging and filtering (0.22 μ m) of ferment liquid of *B. pyrrocinia* JK-SH007 by shake-flask fermentation. The crude proteins were obtained by fractionation with (NH₄)₂SO₄ (20%–60%). Active proteins(A-II-2) were obtained after purification of the crude proteins by 3.5 kD dialysis bag dialysis, cold acetone precipitation (-20°C), Sephadex G-50, DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange column chromatography. A-II-2 were shown three bands by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins showed good inhibition activity to three pathogens *Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospore* and *Fusicoccum aesculi* which caused poplar canker.

Keywords: Poplar canker, *Burkholderia pyrrrocinia*, Antifungal protein, Isolation and purification, Antagonistic bacteria

杨树溃疡病是一类危害严重的杨树枝干病害,防治十分困难,该病害严重威胁着我国杨树产业的健康发展^[1-3]。对杨树溃疡病的有效治理已经成为杨树产业中急需解决的问题。大量研究表明,生物防治在植物病害综合控制中有着不可替代的作用。利用拮抗细菌产生的活性成分在植物病害防治中起到非常重要的作用。目前已经分离获得了数百种对植物病害有明显拮抗效果的生防细菌,研究较多的拮抗物质是细菌素和抗生素以及细菌的次生代谢产物。近年来抗菌蛋白的研究日益受到重视,研究的进一步发展可通过基因定点突变技术对其分子结构进行修饰,以提高其活性。

Kavitha 等从多粘芽孢杆菌 VLB16 菌株中分离纯化出一种对稻瘟病菌、水稻纹枯病菌均有较好抑菌作用的抗菌蛋白,且耐热性和稳定性好^[4]。裴炎等从蜡状芽孢杆菌 S-1 菌中分离出抗真菌多肽 APS-1 环状多肽,浓度为 2 mg/L 即可抑制黑曲霉和瓜果腐霉^[5]。翟茹环等从温室土壤中分离得到一株枯草芽孢杆菌 G8,该菌对黄瓜核病菌具有较高拮抗活性,且对其他病原菌具有广谱抑制活性,研究表明,G8 的抑菌作用机制为产生高度耐热的抗菌蛋白^[6]。

洋葱伯克氏菌群(*Burkholderia cepacia* complex, 简称 Bcc)的许多菌株是常见的生防菌,具有生物防治、生物降解及促进植物生长等多种功能^[7-11]。到目前为止,已发现 Bcc 包括 10 个不同的基因型“genomovar”(I-X)^[12-17]。Bcc 的某些菌株能引起“洋葱伯克氏菌综合症”(CF),在国内外已有不少死亡病例,已引起不少国家的高度重视,并停止或禁止一些 Bcc 菌株在农业上的使用^[18]。微生物农药的风险评估日益成为全球关注的问题。有益 Bcc 菌株在应用前必须评估它们在中环境中释放的风险性,开发 Bcc 群体中可在环境中安全使用的菌株具有重要意义。

本实验室分离了对引起杨树溃疡病的金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)和七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)3 种病原真菌具有强烈抑制作用的拮抗细菌,吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrrocinia*) JK-SH007 菌

株,该菌株隶属于 Bcc 的基因型 IX: *B. pyrrrocinia*。在前期研究中,我们通过接种洋葱、烟草(用于判断菌株对植物的致病性)、苜蓿(用于判断菌株对动物的致病性),进行毒力基因 *BCESM* 和 *cblA* 基因的 PCR 检测等方法,初步证明该菌株对人、动物及植物无致病性(待发表)。对 JK-SH007 的发酵液采用过滤除菌、硫酸铵盐析等处理,初步证明对 3 种病原真菌产生拮抗作用的物质有蛋白质。所以,本研究对 JK-SH007 菌株产生的抗菌蛋白进行了初步研究,为生物农药的开发奠定基础,提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

植物病原真菌:金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)和七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)由本实验室分离保存。分离于江苏省泗洪 895 杨树干部病组织。

拮抗细菌:吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrrocinia*) JK-SH007,由本实验室分离筛选所得。已保藏于中国典型培养物保藏中心 CCTCC,保藏编号: M 209028,保藏日期: 2009 年 2 月 18 日。

1.2 培养基

病原菌活化培养基采用 PDA 培养基(200 g/L 马铃薯浸汁 1000 mL,蔗糖 20 g,琼脂 20 g);拮抗培养基采用 PDA 培养基;液体发酵培养基为修改过的 NB 培养基(牛肉膏 2 g,蛋白胨 20 g, NaCl 5 g,水 1000 mL, pH 7.0)。

1.3 JK-SH007 蛋白提取物对病原菌的拮抗作用

1.3.1 粗蛋白的获得:将 JK-SH007 液体培养物,4℃、10000 r/min 离心 20 min 后,收集上清过 0.22 μm 微孔滤膜获取无菌滤液,100 mL 无菌滤液中加入硫酸铵使饱和度达 100%,于冰箱中静置过夜后,4℃、10000 r/min 离心 20 min 后,沉淀溶于 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液中,并置于透析袋(截留分子量 3.5 kD)中,两端用透析袋夹夹紧,用无离子水透析直至用 1% BaCl₂ 溶液检测无盐,在透析液中加入 2 倍体积的冷丙酮(-20℃),置于-20℃静置 2 h 后,10000 r/min 离心 20 min,沉淀冷冻干燥获取粗蛋白粉,置于-80℃备用。

蛋白浓度采用 2-D quant kit (Amersham Biosciences, USA)方法(480 nm)测定。以小牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3.2 粗蛋白抑菌活性的检测: 蛋白用 0.1 mol/L、pH 7.0 的 PBS 溶解,使终浓度是原液的 20 倍,过 0.22 μm 微孔滤膜除菌,即为所得的蛋白粗提液。用灭菌的打孔器分别从 3 种病原菌菌落边缘打取直径 5 mm 的同质同量的菌块。将菌丝块接种 PDA 平板距中心点 3.5 cm 处的两侧,中心点放置牛津杯,并向里面加入 250 μL 的蛋白粗提液。以牛津杯加修改过的 NB 培养基作为对照,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,4 d 后观察蛋白粗提液对 3 种病原菌的生长抑制作用。

1.4 抗菌粗蛋白敏感性测定

1.4.1 抗菌蛋白对不同 pH 敏感性测定: 将 JK-SH007 液体培养物,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 20 min 后,收集上清过 0.22 μm 微孔滤膜获取无菌滤液,220 mL 无菌滤液中加入硫酸铵使饱和度达 100%^[19],于冰箱中静置过夜后,将其摇匀平均分成 11 份,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 20 min 后,沉淀溶于 0.1 mol/L 不同 pH (6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8 及 8.0)的磷酸缓冲液中,并置于透析袋中透析直至用 BaCl_2 试剂检测无盐。用聚乙二醇 6000 浓缩,使终浓度是原液的 20 倍,经 0.22 μm 微孔滤膜除菌后备用。采用杯碟法,在 PDA 平板上距离牛津杯 3.5 cm 处的垂直方向各接上一块病原菌,牛津杯内注入 200 μL 的蛋白粗提液。以牛津杯加相应 pH 的修改过的 NB 培养基作为对照,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,4 d 后观察蛋白粗提液对 3 种病原菌的生长抑制作用。

1.4.2 抗菌蛋白对蛋白酶 K 敏感性测定: 将抗菌粗蛋白溶于 0.1 mol/L、pH 6.2 的磷酸缓冲液中,蛋白浓度为 1 g/L,向粗蛋白液中加入蛋白酶 K,使蛋白酶 K 的最终浓度达到 0.20 g/L,将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 h,使其充分反应完全。以未加蛋白酶 K 为对照。采用牛津杯法比较蛋白酶 K 处理抗菌蛋白的活性变化。

1.4.3 抗菌蛋白的温度敏感性测定: 将抗菌粗蛋白溶于 0.1 mol/L、pH 6.2 的磷酸缓冲液中,粗蛋白浓度同 1.4.2,30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 及 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中分别处理 20 min 和 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min。以未加热处理为对照,采用牛津杯法比较不同温度处理蛋白抗菌蛋白的活性变化。

1.5 JK-SH007 发酵液 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析

将 JK-SH007 的 NB 液体培养基发酵 48 h 的无菌滤液加入 20%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。离心收集沉淀,得到 0–20%的粗蛋白,蛋白溶于 0.2 mol/L, pH 6.2 的磷酸缓冲液。将粗蛋白液转入透析袋内(MWCO 3.5 kD)用无离子水透析脱盐。上清液继续向其中加入硫酸铵至 30%饱和度,同法制备得到 20%–30%的盐析蛋白,依次类推,分别制备得到 30%–40%、40%–50%、50%–60%、60%–70%、70%–80%、90%–100%段的粗蛋白^[19]。各盐析段蛋白除盐后加入 2 倍体积的冷丙酮(–20 $^{\circ}\text{C}$),置于 –20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h 后,10000 r/min 离心 20 min,沉淀用真空冷冻干燥仪进行冷冻干燥,获得粗蛋白粉,置于 –80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。采用牛津杯法检测每段蛋白的抑菌活性。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5–7 d 观察抑菌带的有无,有抑菌带的记录其宽度。并确定分级盐析的饱和度。

1.6 抗菌蛋白 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶层析

Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱(1 cm \times 50 cm)用 0.05 mol/L, pH 6.2 的磷酸缓冲液充分平衡后,将硫酸铵 20%–60%沉淀的粗蛋白粉溶于磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.2)中,使终浓度是原液的 20 倍,经 0.44 μm 滤器过滤,将此粗蛋白提取液(1.5 mL)加入层析柱。用相同的缓冲液洗脱,流速约为 0.67 mL/min。洗脱液分步收集,分步收集的样品按峰合并,采用真空冷冻干燥仪冻干得到干粉,进行抑菌活性检测,收集具有拮抗作用的组分。

1.7 抗菌蛋白 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析

在 Amersham Biosciences 公司 AKTA Prime Plus 液相层析系统中将 DEAE-Sephadex A-25 柱(1.6 cm \times 20 cm)用磷酸缓冲液(0.05 mol/L、pH 6.2)充分平衡后,将 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶层析后的活性组分 0.5 mL 加到 DEAE-Sephadex A-25 柱中。用浓度为 0–1 mol/L 的 NaCl 的 0.1 mol/L、pH 6.2 的磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,280 nm 检测。分步收集样品,按峰合并,用无离子水透析脱盐后冷冻干燥浓缩,并采用管碟法进行抑菌活性检测。收集具有拮抗作用的组分。

1.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照文献[20]进行。按 4%浓缩胶、12%分离胶进行电泳,完成后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果与分析

2.1 蛋白粗提取物对病原菌的拮抗作用

对硫酸铵盐析出的粗蛋白进行活性检测，结果表明，JK-SH007 的蛋白类代谢产物对 3 种杨树溃疡病的病原菌金黄壳囊孢 (*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)和七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)均具有一定抑菌作用，抑菌斑直径分别是 30.47 mm、25.82 mm 和

15.66 mm (图 1)。
2.2 抑菌蛋白敏感性试验
2.2.1 抑菌蛋白对不同 pH 的敏感性: 经活性检测，不同 pH 条件对抗菌蛋白的抗菌活性有较大影响(图 2)。用不同 pH 缓冲液处理菌株 JK-SH007 的粗蛋白后，粗蛋白对 3 种病原菌的拮抗性发生变化，在 pH 6.2–6.4 范围内蛋白活性最大，对 3 种病原菌的抑菌效果最好。随着 pH 的增加，抗菌活性略有降低，说明碱性环境不利于抑菌蛋白活性的发挥。



图 1 粗蛋白对 3 种病原菌的拮抗
Fig. 1 The antifungal activities of rough proteins of antifungal bacteria

Note: A: *C. chrysosperma*; B: *P. macrospore*; C: *F. aesculi*.

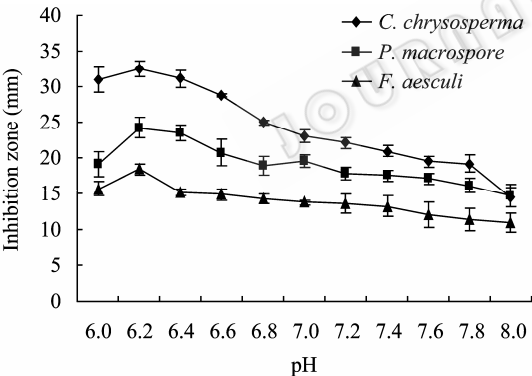


图 2 不同 pH 对蛋白活性的影响
Fig. 2 The test of stabilization of the purified antifungal protein at different pH

2.2.2 抑菌蛋白的蛋白酶 K 敏感性试验: 将拮抗菌株 JK-SH007 的粗蛋白抗菌用蛋白酶 K 处理 5 h 后检测其抑菌活性，结果如表 1 所示。由表 1 可以看出，JK-SH007 的粗抗菌蛋白经蛋白酶 K 处理后对 3 种病原菌的抑制活性略有下降，活性分别降低了 12.75% (金黄壳囊孢)、16.49% (拟茎点)及 19.33% (七叶树壳梭孢)。蛋白酶 K 是以线性蛋白为底物的蛋白质内切酶，JK-SH007 粗蛋白经蛋白酶 K 处理后

活性没有完全丧失，只是略有降低，这说明 JK-SH007 抗菌蛋白不只是一种蛋白构成，活性之所以略有降低，极有可能是非主要的线性抗菌蛋白与蛋白酶 K 作用的结果。这也间接说明主要的抗菌蛋白极有可能不是线性蛋白。

表 1 JK-SH007 粗蛋白蛋白酶 K 敏感性的测定			
Table 1 The test of sensativity of the rough protein done by proteinase K			
处理 Treatment	抑菌圈直径 The diameter of inhibition zone (mm)		
	<i>C. chrysosperma</i>	<i>P. macrospore</i>	<i>F. aesculi</i>
蛋白酶 K Proteinase K	30.93b	21.52b	14.31b
CK	35.45a	25.77a	17.74a

注: $P < 0.05$, 同列不同行小写字母不相同代表差异显著。
Note: Followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at $P < 0.05$ by T-test.

2.2.3 抑菌蛋白的热敏感试验: 菌株 JK-SH007 的粗蛋白分别在不同温度下处理 20 min 后，拮抗活性结果见表 2。抗菌粗蛋白经 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 及 100℃ 处理 20 min 仍保持抗菌活性，

抗菌活性与对照相比变化不大;将温度提高到 121℃ 并且高压处理 20 min 后,仍保持部分对 3 种杨树溃疡病原菌的抗菌活性,抗菌活性比对照下降了 11.52% (金黄壳孢)、14.62% (拟茎点)和 17.50% (七叶树壳梭孢)。以上说明拮抗细菌吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 抗菌蛋白具有相当好的热稳定性;而且该蛋白经蛋白酶 K 处理后也仍有活性,对蛋白酶 K 耐受性比较好,这说明 JK-SH007 菌株的主要抗菌蛋白极有可能是一种小分子的环形肽,而非线性蛋白。抗菌粗蛋白的拮抗活性经 121℃ 处理 20 min 后有所降低,应该是受其他不耐热的非主要抗菌蛋白的影响。具体的原因仍需要进一步研究。

表 2 JK-SH007 粗蛋白提取物经不同温度处理后对病原菌的抗菌活性

Table 2 Antagonistic activity of crude antimicrobial protein from JK-SH007 treated with various temperatures

温度 (°C)	抑菌圈直径 The diameter of inhibition zone (mm)		
	<i>C. chrysosperma</i>	<i>P. macrospora</i>	<i>F. aesculi</i>
40	34.49b	25.19a	15.87ab
50	33.75b	25.03a	16.13a
60	35.10b	25.15a	16.49a
70	37.06a	25.17a	16.38a
80	34.90b	24.88a	15.71ab
90	33.69b	24.91a	16.10a
100	33.23b	26.38a	16.50a
121	30.57c	21.26b	13.67b
CK	34.55b	25.05a	16.57a

注: $P < 0.05$, 同列不同行小写字母不相同代表差异显著。

Note: Followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at $P < 0.05$ by T-test.

2.3 硫酸铵分级盐析条件的确定

从图 3 可以看出, 20%饱和度以下的硫酸铵不能使抗菌蛋白从发酵液中沉淀出来, 当硫酸铵饱和度大于 20%以上开始有抗菌蛋白析出, 20%–30%、30%–40%、40%–50%、50%–60%段蛋白均表现出较强抑菌活性, 对杨树溃疡病的 3 种病原菌均有抑制作用, 60%–70%、70%–80%、80%–90%、90%–100%段蛋白活性微弱或者没有。这说明 20%–60%硫酸铵饱和度可以把主要发挥抑菌作用的蛋白沉淀出, 由此可以确定抗菌蛋白盐析时硫酸铵的最佳饱和度为 20%–60%, 此范围蛋白具有明显的抑菌活性, 所以在后面的试验中采用该范围蛋白进行深入研究。

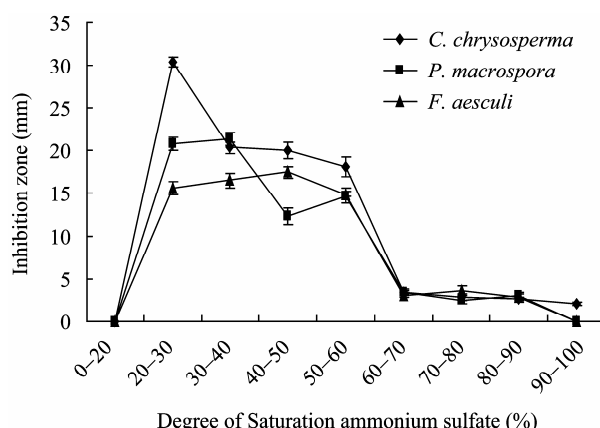


图 3 不同硫酸铵饱和度盐析段蛋白的抑菌作用

Fig. 3 The result of classification salting-out with ammonium sulfate

2.4 Sephadex G-50 凝胶分子筛层析

将 20%–60%硫酸铵盐析段蛋白质粗提液加到平衡后的 Sephadex G-50 凝胶分子筛层析柱上进行分离, 结果见图 4。经牛津杯抑菌活性检测, 峰 II (A-II) 洗脱蛋白对金黄壳孢 (*C. chrysosperma*)、拟茎点霉 (*P. macrospora*)、七叶树壳梭孢 (*F. aesculi*) 的生长具有明显抑制作用 (图 5), 峰 I 洗脱蛋白抑制作用微弱。表明采用 0.05 mol/L, pH 6.2 的磷酸缓冲液可以将活性组分洗脱下来。峰 II (A-II) 蛋白将利用 DEAE-Sephadex A-25 阴离子柱层析进一步纯化蛋白。

2.5 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析

将 A-II 组分进行 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析, 进一步分离纯化抗菌蛋白, 采用阴离子交换层析, 可根据抑菌蛋白与其他成分带电性质的不同将其进一步纯化, 分离结果见图 6, 经 280 nm

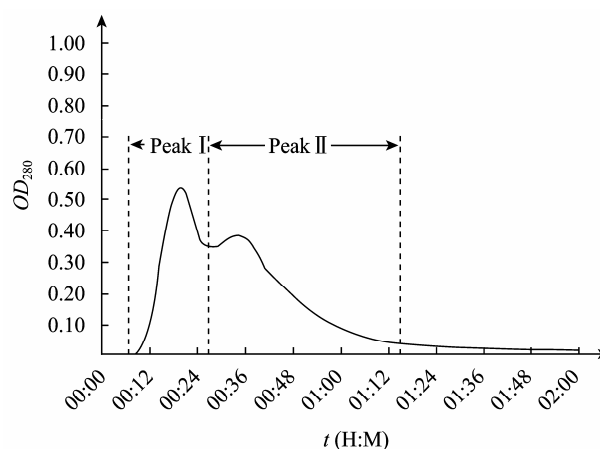


图 4 抗菌蛋白 Sephadex G-50 凝胶层析

Fig. 4 The purification result of antifungal protein by Sephadex G-50



图 5 Sephadex G-50 凝胶层析峰 II(A-II)洗脱蛋白对 3 种病原菌的抑制作用

Fig. 5 Antagonistic activity of protein A-II to three pathogens

注: A: *C. chrysosperma* 的抑菌作用; B: *P. macrospore* 的抑菌作用; C: *F. aesculi* 的抑菌作用。

Note: A: *C. chrysosperma*; B: *P. macrospore*; C: *F. aesculi*.

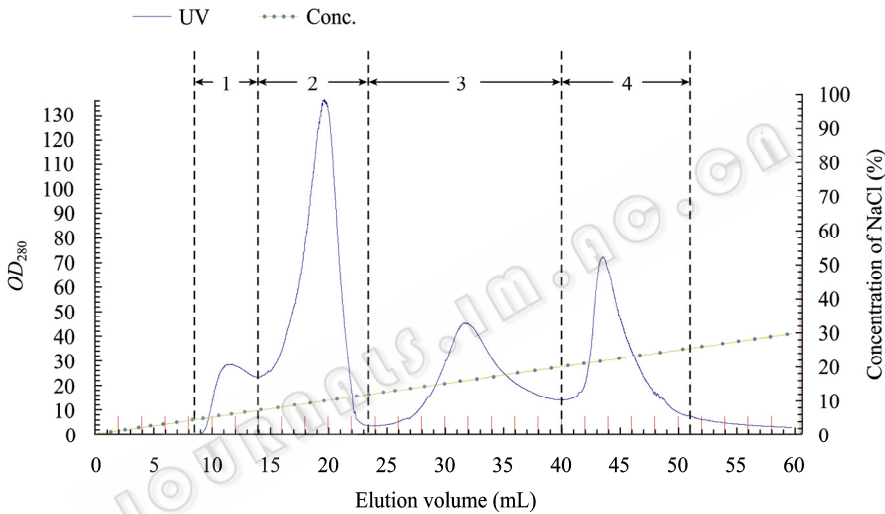


图 6 峰 II(A-II)蛋白 DEAE-Sephadex A-25 阴离子柱层析图谱

Fig. 6 The purification result of antifungal protein of peak II(A-II) by DEAE-sephadex A-25

波长检测, 该样品峰图中除流穿峰外出现 3 个蛋白吸收峰。

经抑菌活性检测, 峰 2 (A-II-2)对金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)、拟茎点霉(*P. macrospore*)及七叶树壳梭孢(*F. aesculi*)的生长具有抑制作用(表 3), 对 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 抑菌作用较强, 对 *F. aesculi* 作用较弱, 抑菌圈分别是 25.46 mm、23.78 mm 和 19.91 mm; 峰 4 (A-II-4)对 3 种病原菌具有微弱的抑菌活性; 峰 2 (A-II-2)与峰 4 (A-II-4)蛋白均具有抗菌作用, 这进一步说明 JK-SH007 的抗菌蛋白类型较多, 但峰 4 蛋白抗菌作用微弱, 所以在后面的进一步纯化工作中我们选择了峰 2 蛋白继续进一步研究。

表 3 抗菌蛋白 DEAE-Sephadex A-25 阴离子柱 pH 6.2 时各蛋白峰抑菌活性			
Table 3 The activities of antifungal proteins of peaks of the curve by DEAE-Sephadex A-25 at pH 6.2			
蛋白峰编号 No. of peak	抑菌圈直径 The diameter of inhibition zone (mm)		
	<i>C. chrysosperma</i>	<i>P. macrospore</i>	<i>F. aesculi</i>
1	0	0	0
2	25.46	23.78	19.91
3	0	0	0
4	9.12	8.27	5.09

2.6 抗菌蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

将经过 20%–60%硫酸铵饱和度沉淀、透析 (3.5 kD)、冷丙酮沉淀、Sephadex G-50 凝胶分子筛层析及 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析各纯化

步骤中收集的蛋白活性组分 A-II-2 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 7), 由电泳结果可知经 5 步纯化后收集到的 A-II-2 抗菌蛋白主要包括 3 个组分(I、II 及 III), 仍没有达到纯化目的。该蛋白的纯化工作仍需进行。由图 6 可以看出, 在分子量较小地方(< 14.4 kD)处有一明显蛋白条带(III), 该蛋白条带极有可能是我们所需要的目的蛋白。因为在抗菌蛋白的敏感性试验中研究发现其对热及蛋白酶 K 不敏感, 高温 121°C 或蛋白酶 K 处理后, 抗菌粗蛋白活性只是略有降低, 这暗示 JK-SH007 菌株的主要抗菌蛋白是分子量较小的非线性蛋白。

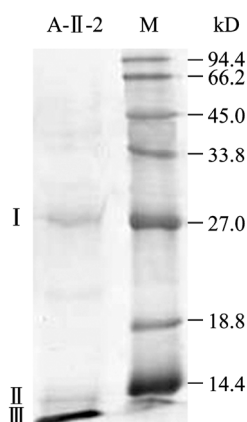


图 7 A-II-2 抗菌蛋白的纯化效果

Fig. 7 SDS-PAGE of antifungal protein of A-II-2

3 结论与讨论

几乎所有的植物都受到不同程度真菌性病害的危害, 真菌病害是植物病害中最严重的一类。大量的研究表明, 许多微生物菌株产生的抗菌蛋白能够分泌到胞外, 在植物病害防治中起重要作用。目前, 一些性状优良天然分离菌株已成功地用于防治植物病害^[21-22]。

Bcc 菌株可产生多种次级代谢产物如硝吡咯菌素、吩嗪、Cepabactin、Cepaciamide A、Cepacidine A、木假丝菌素、CF66I 以及其它未被鉴定的挥发或不挥发的物质来发挥其抗菌作用^[23-29]。本研究分离到 Bcc 菌株吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 可产生抑制金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)、拟茎点霉(*P. macrospore*)及七叶树壳梭孢(*F. aesculi*) 3 种溃疡病原真菌生长的抗菌蛋白。目前, 该方面的研究未见报道。

研究拮抗细菌对植物病原菌的拮抗作用及其抗

菌蛋白, 一方面能充分发掘有益微生物资源, 将其用于植物病害生物防治; 另一方面为研究抗菌蛋白的分子遗传基础、克隆抗菌蛋白基因以及构建转基因工程菌打下理论基础。Yoshida 等研究发现拮抗炭疽病菌的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) RC-2 菌株能分泌几种抗真菌物质, 其中包含一种环状多肽^[30]。Mendo 等报道 *Bacillus licheniformis* 189 菌株产生分子量为 3249.7 D 的多肽, 可以抑制革兰氏阳性菌的生长^[29]; Sadfi 等报道, I32 菌株代谢产生几丁质酶^[31-33]; Stanislav 等研究的地衣芽孢杆菌 603 菌株可以产生新型脂蛋白, 其具有较强抑菌活性^[34]; 纪兆林等研究发现地衣芽孢杆菌 W10 菌株分泌的抗菌蛋白为分子量 46049.2 D 的糖蛋白^[35]。宋永燕等采用盐析法提取获得了多粘类芽孢杆菌 LM-3 的抗菌粗蛋白, 抑菌活性测定该抗菌蛋白对辣椒炭疽病菌等多种植物病原真菌有强烈的抑制作用^[36]。

因此, 寻找具有广谱抗真菌活性的蛋白质, 克隆其基因, 利用基因工程的方法导入植物培育抗病品种或者转入大肠杆菌或酵母菌里大量表达, 生产微生物农药, 已成为近年来生物技术研究的一个热点。Hao JJ 等从绿色木霉(*Trichoderma viride*)中分离到一个 285 bp 的抗真菌蛋白基因, 能与巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*) MDH 18894 的 cDNA 为探针进行 Southern 杂交, 它除了缺少 2 个内含子以外, 其余的核苷酸序列与 *A. giganteus* 的 336-479、568-649、705-765 的位置完全相同, 但它在 *T. viride* 中不能转录, 把该基因转入 *E. coli* 中表达, 得到的重组抗真菌蛋白同样具有抗真菌活性^[37]。

本研究从杨树枝干部分离得到吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*) JK-SH007, 该菌能够产生具有体外抑制金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)、拟茎点霉(*P. macrospore*)和七叶树壳梭孢(*F. aesculi*)生长的抗菌蛋白, 该蛋白对热、蛋白酶 K 不敏感, 碱性环境不利于其活性的发挥。我们采用硫酸铵盐析法对拮抗细菌 JK-SH007 菌株的无菌发酵液进行抗菌蛋白的获取, 研究发现 20%-60%硫酸铵饱和度可以把最大量的抗菌蛋白沉淀出。JK-SH007 的无菌发酵滤液经硫酸铵分段沉淀、透析(3.5 kD)、Sephadex G-50 凝胶分子筛层析、DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析分离纯化, 得到了组分 A-II-2, 经 SDS 聚

丙烯酰胺凝胶电泳检测不是单一组分, 该复合组分具有明显抑制杨树溃疡病真菌生长的作用。以上说明研究中所采用的蛋白分离纯化方法仍需进一步深入和完善, 今后的纯化工作中, 因 JK-SH007 菌株主要的抗菌蛋白具有抗热性, 可考虑采用加热处理去除杂蛋白。而且吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*) JK-SH007 菌株的抗菌蛋白纯化工作迫切需要进行, 因为得到抗菌蛋白的单一成分后, 研究这些单一抗菌蛋白的分子遗传基础, 充分利用各抗菌蛋白基因, 将会加快 JK-SH007 菌株在杨树溃疡病生物防治中的应用步伐。

目前, 国内外抗菌蛋白的研究工作中, 蛋白的纯化大多采用本文中的传统方法进行, 所以一些作用相对微弱的抗菌蛋白极有可能被忽略掉, 但拮抗细菌的抗菌作用是多种抗菌蛋白的作用结果, 因此要想更科学、更完全的揭示出拮抗细菌抗菌蛋白的抗菌机制, 就需要去寻找更完善的研究方法。在 JK-SH007 菌株抗菌蛋白的深入研究中, 我们结合了蛋白质双相电泳技术, 可以尽量避免其他非主要抗菌蛋白的丢失, 目前已取得部分研究工作进展。

综上所述, 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 对金壳囊孢(*C. chrysosperma*)、拟茎点霉(*P. macrospore*)及七叶树壳梭孢(*F. aesculi*)的生长具有明显的抑制作用, 因此可以作为生防制剂用于防治杨树溃疡病。另外, 分离得到的抗菌蛋白可以通过基因工程技术改造杨树对溃疡病的抗病性。因此, 纯化 *B. pyrrocinia* JK-SH007 菌株的抗菌蛋白, 分析其氨基酸组成及部分序列克隆其基因, 用于植物基因工程技术培育杨树抗溃疡病新品种或者是构建高效表达抗菌蛋白的工程菌进行生物农药的开发, 这具有重要的研究价值和应用前景。

参 考 文 献

- [1] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害. 北京: 中国林业出版社, 2003: 93-139.
- [2] 王勇, 吴小芹. 苏北杨树黑斑型溃疡病的研究. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32**(4): 101-104.
- [3] 王勇, 吴小芹. 不同定植处理对杨树溃疡病发生发展的影响. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2009, **33**(1): 11-14.
- [4] Kavitha S, Senthilkumar S, Gnanamanickam S, *et al.* Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry*, 2005, **40**(10): 3236-3243.
- [5] 裴炎, 李先碧, 彭红卫, 等. 抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性. 微生物学报, 1999, **39**(4): 348-349.
- [6] 翟茹环, 尚玉珂, 刘峰, 等. 枯草芽孢杆菌 G8 抗菌蛋白的理化性质和抑菌作用. 植物保护学报, 2007, **34**(6): 592-596.
- [7] Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, *et al.* *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology*, 2006, **14**(6): 278-286.
- [8] 于晓庆, 郝丽君, 刘永光, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌株 Lyc2 的鉴定及对棉苗的防病促生作用. 植物病理学报, 2007, **37**(4): 426-432.
- [9] 郑维, 权春善, 范圣第. 产生多种抗真菌活性物质菌种的筛选分离和鉴定. 大连民族学院学报, 2004, **6**(5): 37-42.
- [10] Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, *et al.* Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 on disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, 2000(31): 225-231.
- [11] Sijam K, Dikin A. Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2005, **7**(3): 385-388.
- [12] Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, *et al.* Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(7): 3917-3927.
- [13] Vandamme P, Holmes B, Coenye T, *et al.* *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. -a new twist to an old story. *Research in Microbiology*, 2003, **154**(2): 91-96.
- [14] Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, *et al.* Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, **47**(4): 1188-1200.
- [15] Coenye T, Lipuma JJ, Henry D, *et al.* *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001(51): 271-279.
- [16] Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, *et al.* *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis related isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001(51): 1481-1490.
- [17] Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, *et al.* DNA-based diagnostic approaches for the identification of

- Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000(38): 3165–3173.
- [18] 罗远婵, 谢关林. 洋葱伯克氏细菌是我们的敌人还是朋友. *微生物学报*, 2005, **45**(4): 647–652.
- [19] 吴冠芸, 潘华珍, 吴翠. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 2000: 161–163.
- [20] 李健武, 肖能庚, 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: 216–223.
- [21] 周艳芬, 赵晓瑜, 张玉, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在苏云金杆菌中的表达. *河北大学学报: 自然科学版*, 2006, **26**(1): 33–37.
- [22] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. *植物病理学报*, 2003, **33**(2): 97–103.
- [23] Banna NE, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, **85**(1): 69–78.
- [24] Alison H, Govan J, Richard G. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerging Infectious Diseases*, 1998, **4**(2): 221–227.
- [25] Upadhyay R, Visintin L, Jayaswal R. Environmental factor affecting antagonisms of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991(37): 880–884.
- [26] Jiao Y, Yoshihara T, Ishikuri S, *et al.* Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Letters*, 1996(37): 1039–1042.
- [27] Meyers E, Bisacchi GS, Dean L, *et al.* Xylocandin: a new complex of antifungal peptide. I. Taxonomy, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 1987(21): 1515–1519.
- [28] Roitman JN, Mahoney NE, Janisiewicz WJ. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, **34**(3): 381–386.
- [29] Quan CS, Zheng W, Liu Q, *et al.* Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **72**(6): 1276–1284.
- [30] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, *et al.* Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Biological Control*, 2001, **91**(2): 181–187.
- [31] Mendo S, Faustino AN, Sarmiento AC, *et al.* Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermo tolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(2): 115–119.
- [32] Sadfi N, Cherif M, Fliss I, *et al.* Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of fusarium dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 2001, **83**(2): 101–118.
- [33] Sadfi N, Cherif M, Hajlaoui M R, *et al.* Biological control of the potato tubers dry rot caused by *Fusarium roseum* var. *sambucinum* under greenhouse field and storage conditions using *Bacillus* spp. isolates. *Journal of Phytopathology*, 2002(150): 640–648.
- [34] Stanislav GB, Tatiana AR, Stanislav EE, *et al.* A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, **1634**(3): 107–115.
- [35] 纪兆林, 唐丽娟, 张清霞, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白的分离纯化及其理化性质研究. *植物病理学报*, 2007, **37**(3): 260–264.
- [36] 宋永燕, 李平, 郑爱萍, 等. 生防细菌 LM-3 的鉴定及其抗菌蛋白的研究. *四川大学学报: 自然科学版*, 2006, **43**(5): 1110–1115.
- [37] Hao JJ, Ye JQ, Yang Q, *et al.* A silent antifungal protein(AFP)-like gene lacking two introns in the mould *Trichoderma viride*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1475**(2): 119–124.