

枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质

沈锦玉 尹文林 曹 铮 潘晓艺 吴颖蕾

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要:枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B115 分离自水产养殖池塘, 对鱼类细菌性败血症致病菌具有较强的拮抗能力。除去菌体培养液用浓盐酸沉淀, 乙醇抽提所得的拮抗物粗提液对热不稳定, 4℃ 保存不能超过两周, -18℃ 保存不能超过 45d, 对胰蛋白酶不敏感, 对蛋白酶 K 部分敏感, 对氯仿敏感, 其作用活性 pH 范围较广, 对 pH 不敏感。粗提液经 CM 柱离子交换层析和 P-60 柱层析, 得到一个拮抗活性峰 P2。粗提物经丙酮分级沉淀及高压液相色谱分离, 得到较纯的 LP, 经质谱仪测定分子量为 803.6D。1L 发酵的细菌培养液可得到约 1mg LP 纯品。

关键词: 枯草芽孢杆菌 B115; 抗菌物质; 分离纯化; 理化特性

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)06-0689-05

水产养殖的细菌性病害是造成农业损失的主要原因之一^[1], 施用化学杀菌药及抗生素等尽管有一定效果, 但长期使用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及药物残留。利用微生物来抑制动物病原细菌为细菌病害的防治提供了新的可能。近年来, 已筛选了许多防治植物病害的拮抗菌如芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*), 并阐明了其抗菌物质对植物病原菌的抑制作用, 抗菌机理及抗菌物质的理化特性等^[2-5]。而在水产上枯草芽孢杆菌抗菌蛋白的性质未见报道。本室从池塘土壤中分离到一株强烈抑制鱼类细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌 (BSK-10)^[1] 的拮抗菌 (*Bacillus subtilis*) B115, 并从中分离到抗菌蛋白, 这种物质除对鱼类出血性败血病病菌表现出强烈抑制作用外, 对大黄鱼致病菌、中华绒螯蟹致病菌及金黄色葡萄球菌也有强烈的抑制作用, 经同步营养, B115 对 BSK-10 的抑菌圈为 14mm, 对大黄鱼哈维氏弧菌的抑菌圈为 15mm, 对中华绒螯蟹致病菌 CL99920 的抑菌圈为 13mm, 对大黄鱼副溶血弧菌的抑菌圈为 13mm, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈为 10mm (另文报道)。本文报道 B115 菌株产生的一种抗菌物质的分离纯化及其部分性质初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种 供试菌种为本室分离的一株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B115。

1.2 主要仪器及试剂 高速低温离心机 (Sigma); 冷冻干燥机 (German); 层析系统 (Biologic LP, BIO-RAD); 离心真空干燥浓缩仪 (SPD 111V, Thermo Savant); CM (Econo-Pac, Catalog No. 732-0001, BIO-RAD); Bio-Gel P-60 Gel (BIO-RAD); Waters 515; Bruker Daltonis (esquire 3000); 蛋白酶 K (Merck Germany); 胰蛋白酶为 Sigma 产品, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 粗样品的制备 将 B115 菌株接种于 BPY (牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, 酵母浸膏 5g, 氯化钠 5g, 葡萄糖 5g, 水 1000mL) 培养基, 28℃ 摇床培养 24h, 摇床转速 180r/min, 4℃ 离心 30min, 6000r/min, 收集上清液, 以孔径为 0.45μm 的细菌滤器过滤, 得无细胞培养滤液。向上清液中加入浓盐酸, 调节 pH 至 3.0, 8000r/min 离心 15min, 弃去上清。沉淀用 80% 乙醇抽提 3 次, 抽提液直空抽干, 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 pH3.0, 8000r/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。每步实验中取少量进行抗菌活性

收稿日期: 2004-06-07; 修订日期: 2004-06-22

基金项目: 中国水产科学院科研基金资助项目 (编号: 2001-2-8)

作者简介: 沈锦玉 (1963—), 女, 浙江湖州人; 硕士, 副研究员; 主要从事水生动物病害防治研究。本研究过程中得到浙江大学动物科学学院余旭平博士和生物技术研究所陈卫良博士的帮助与指导, 在此深表谢意

检测。

1.4 粗提液的稳定性测定 热稳定性:粗提液在不同温度下处理 30min,100 ℃ 水浴中处理 5min、10min、15min 及样品在 4 ℃ 及 - 18 ℃ 冰箱放置 46d(每隔 2d 取样),各取 50μL 进行抗菌活性测定。对蛋白酶的稳定性:粗提液分别用胰蛋白酶和蛋白酶 K,浓度为 100μg/mL,在 37 ℃ 下处理 1h,取 50μL 进行抗菌活性检测。对氯仿稳定性:粗提液与等量氯仿混合振荡抽提 60min,离心,分层后取上层水相,待残留氯仿挥发后,取 50μL 进行拮抗活性检测。对 pH 稳定性:粗提液的 pH 分别调至不同值,取 50μL 进行抗菌活性检测。

1.5 CM 离子交换层析 缓冲液 A 为 0.02mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.0)加 0.05mol/L 的氯化钠,缓冲液 B 为 0.02mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.0)加 1.5mol/L 的氯化钠。用缓冲液 A 充分平衡层析柱(20cm ×1.5cm),流速 6—8mL/min。取 1.3 制备的粗提液上样,流速 1mL/min,用缓冲液 A 洗涤至出现基线,而后进行梯度洗脱,0~100%B 梯度洗脱,流速 1mL/min,按每管 2mL 进行收集,收集在 280nm 处光密度值高的部分,同时测定各峰抑菌活性。保留有抑菌活性的蛋白峰。

1.6 Bio-Gel P-60 凝胶过滤层析 对 1.5 中有抑菌活性的部分进行纯化:Bio-Gel P-60 与 Sephadex G-100 相当,参照郑怡等^[6]方法进行,用 0.02mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH7.2)平衡层析柱(100cm ×1.5cm),取 1.5 中经抑菌检测有活性部分合并后上样,流速为 0.4mL/min,使样品进入凝胶。最后用同样的缓冲液洗脱,流速 0.4mL/min,自动部分收集器收集,1mL/管。收集在 280nm 处光密度值高的部分,同时测定各峰抑菌活性。

1.7 高压液相色谱分离法 丙酮分级沉淀: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,12000r/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,12000r/min 4 ℃ 离心 10min,收集沉淀,溶解于少量 0.02mol/L pH6.8 磷酸缓冲液中。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,离心真空干燥浓缩,再将其冷冻干燥,即为 LP。

采用 Bruker Daltonics(esquire 3000)质谱仪测定分子量。取冷冻干燥的样品 LP 少许,溶于甲醇中,用微量移液器吸取溶液,缓慢加入到质谱仪中;流动相为甲醇。

采用考马斯亮蓝染色法^[7],以牛血清白蛋白为标准蛋白。测定蛋白质浓度。

1.8 抑菌实验 选用鱼类细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌(BSK-10)为测定抑菌活性的指示菌,该菌由本实验室保存。将 BSK-10 培养于普通肉汤培养基,培养 24h,取细菌浓度为 1 ×10⁷ 个/mL 的菌悬液 0.1mL,均匀地铺在装有 20mL LB、直径为 90mm 的培养皿上,用一个直径为 4.5mm 的打孔器在培养皿的中心及边缘均匀打 5 孔,再分别接种 50μL 处理液于孔内,每处理 3 个培养皿,用封口膜密封后培养在 30 ℃,1d 后测定抑菌圈的直径。

2 结 果

2.1 粗提物的稳定性

2.1.1 热稳定性 粗提液分别在不同温度下处理 30min,取 50μL 检测拮抗活性,结果如表 1。粗提物经 60 ℃ - 100 ℃ 处理 30min 后仍保持部分抗菌活性,100 ℃ 处理时间越长,部分抗菌活性越弱,120 ℃ 处理 30min 后丧失抗菌活性。样品在 4 ℃ 冰箱放置 15d 后,-18 ℃ 冰箱放置 44d 后,抗菌活性完全消失(表 2),说明该抗菌物质不具有耐高温性,4 ℃ 保存不能超过两周,-18 ℃ 保存不能超过 45d。

2.1.2 对蛋白酶的稳定性 粗提液经不同蛋白酶处理后,取 50μL 检测活性,结果如表 3。粗提液对胰蛋白酶不敏感,对蛋白酶 K 部分敏感。

2.1.3 对氯仿的稳定性 粗提液经氯仿处理后,用 50μL 样品进行活性检测,结果发现抗菌圈直径为 0mm;而未经氯仿处理的粗提液抗菌圈直径为 14mm。因此粗提液对氯仿敏感。

2.1.4 对 pH 值的稳定性 粗提液在不同 pH 值下

表 1 B115 粗提液经不同温度热处理后的抗菌活性
Tab. 1 Antagonistic activity of crude extract of B115 treated with various temperatures

	处理温度(t, ℃)						煮沸时间(min)		
	40	60	70	80	100	120	5	10	15
抗菌圈直径(mm)	13	10	10	9	9	-	12	12	10

表 2 B115 粗提液经不同时间保存后的抗菌活性

Tab.2 Antagonistic activity of crude extract of B115 stored in various days																		
天数(d)		1	4	7	10	13	15	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	46
抗菌圈直径(mm)	4	14	12	11	9	8	6	-	-									
	- 18	14	13	13	12	12	12	11	11	11	10	10	10	9	9	8	6	-

“ - ”表示没有抑菌圈

表 3 处理后抗菌物质的抗菌活性

Tab.3 Antagonistic activity of crude extract of B115 with various treatments							
	pH			蛋白酶 K	胰蛋白酶	氯仿	未处理
	4	5	9				
抗菌圈直径(mm)	14	14	14	11	14	-	14

处理后,抗菌活性检测表明(表 3),B115 粗提液活性 pH 范围较宽,无论 pH 值为中性或偏酸性和偏碱性,滤液均对病菌有抑制活性,且三种 pH 值下的抑菌活性无差异,说明抗菌物质对 pH 不敏感。

2.2 分离纯化

2.2.1 粗样品的制备 培养上清液用浓盐酸将 pH 调至 3 时,测定样品上清及沉淀的抑菌圈直径,证明大部分抑菌物质在沉淀中,故用调节 pH 的方法可初步浓缩抑菌物质。沉淀用 80 % 乙醇抽提 3 次,测定每次抽提时上清及沉淀的抑菌圈直径,证明抑菌物质全溶在乙醇中,且乙醇容易挥发。利用抑菌物质的性质得到它的粗制样品。

2.2.2 凝胶层析的纯化 取 1.3 制备的粗提液经 CM 柱离子交换层析,洗脱曲线见图 1,洗脱液经抑菌活性检测,第 10—14 管抑菌圈最大见图 2。收集 CM 柱离子交换层析的活性部分(图 1),上 Bio- Gel P-60 柱,得到两个主要吸收峰(图 3)。经活性检测,约 1 小时后出现的是没有活性的小峰 P1,约 5.5 小时出现的是有抑菌活性的峰 P2。

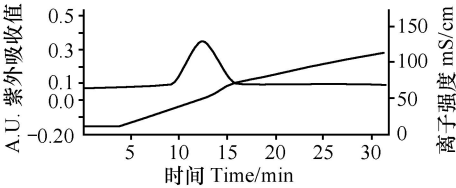


图 1 抗菌物质的 CM 柱离子交换层析洗脱曲线
Fig.1 Elution pattern of antibacterial production through CM ion-exchange chromatography

2.2.3 高压液相色谱的纯化 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。反相柱层析时,得到的几个峰,只有峰 3 有抑菌活性(图 4)。

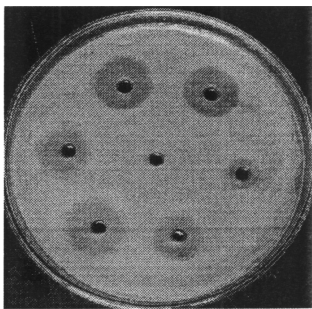


图 2 抑菌物质经 CM 柱后的抑菌活性
Fig.2 The antibacterial activity test of production after CM ion-exchange chromatography

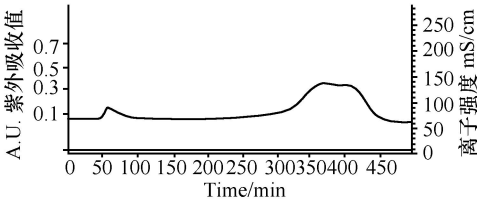


图 3 图 1 中活性峰经 P-60 柱的色谱图
Fig.3 Column chromatography of fig. 1 peak on P-60

经分析峰 3 的含量大于 80 %。经质谱测定,抑菌物质 LP 的分子量为 803.6D(图 5)。由于 LP 的分子量较小,用常规的 SDS-PAGE 或者凝胶过滤色谱无法测定。

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

3 讨论

从拮抗菌 B115 菌株中分离纯化到抗菌物质。其粗提液的 pH 值为中性或偏酸性和偏碱性时均对指示菌 BSK-10 有抑制活性。pH 为 4、5、9 时,滤液抑菌活性与对照组一致,而当 pH 为 3 时,滤液中产生

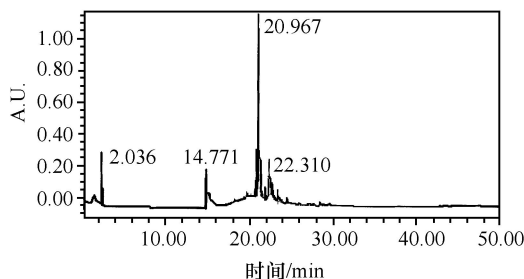


图4 反相柱分离的色谱图

Fig. 4 Isolation of LP on reversed phase column

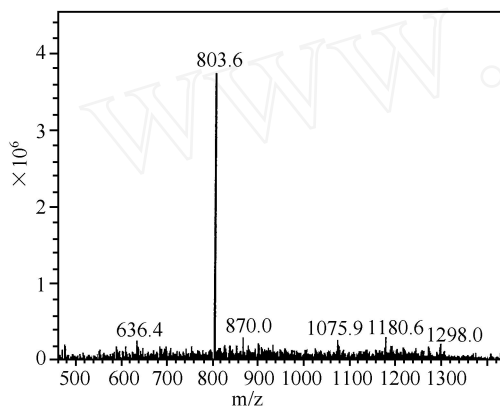


图5 抗菌物质 LP 的质谱图谱

Fig. 5 MS profile of LP

絮凝物质,离心后取沉淀,用 pH 为 7 的生理盐水溶解,此溶液的抑菌活性并没有减弱,说明此抗菌物质对 pH 不敏感。但经煮沸处理后,抗菌物质的抗菌活性随着煮沸时间的延长而减弱,经高压灭菌后,完全失去抑菌活性;在 4℃ 冰箱放置 15d 及 -18℃ 冰箱放置 44d 后,活性也完全消失,说明该抗菌物质不具有耐高温性,4℃ 保存不能超过两周, -18℃ 保存不能超过 45d。

由于本文中抗菌物质的分离是按照蛋白质的特性进行分离纯化的,因此不排除该菌株同时产生其他非蛋白物质的可能。在进行分离物质 P2 的纯度及分子量的测定时,对 P2 进行 SDS-PAGE 电泳,结果 P2 在凝胶的最前缘,说明其分子量太小,不能用此电泳法测出。故改用 HPLC 及质谱法测定该物质的纯度及分子量。对 LP 样品用 Mr 截留为 1×10^3 的超滤杯超滤浓缩后,上清液及浓缩液中均有部分抗菌活性,说明抑菌物质的分子量 (Mr) 较小,不到 1×10^3 。用质谱测定其分子量仅为 803.6 的小肽。抗菌谱表明它是一种广谱的抗鱼类病原细菌的抗菌小肽,对许多危害严重的病原细菌都表现出很强的抗菌活性,在水产养殖中有很好的应用前景。由于

抑菌物质的含量很低,因此,本文仅进行了抗菌活性测定、分离纯化及部分理化特性研究。至于它的组成成分、抗细菌机理等有待进一步研究。

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,又陆续分离出多种抗真菌肽^[8]。这些小肽有许多共同特征:分子量很小,仅 1000D 左右。从已知的性质来看,LP 同文献报道的各种小肽类都有一定差别。芬枯草菌素 A (Fengycin A) 不溶于水,而且分子量为 1447D,同分离到的 LP 有很大区别;但 LP 与刘颖等^[9]从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗真菌肽性质很相似(分子量 1057.3),但分子量相差 253;与童有仁等^[12]从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗菌肽分子量 (50.3kD) 相差悬殊,所以,LP 为不同于其他已发表的抗菌物质的一种抗菌小肽。

参考文献:

- [1] Shen J Y, Chen Y Y, Shen Z H, et al. Study on Pathogen of Outbreaks of Infectious Disease of Fishes in Zhejiang Province: Isolation, Pathogenicity, Physiological and Biochemical and Biochemical Characteristics of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 1993, (6): 397—401 [沈锦玉, 陈月英, 钱冬, 等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病原的研究: 嗜水气单胞菌的分离、致病性及生理生化特性. 科技通报, 1993, (6): 397—401]
- [2] Kong J, Wang W X, Zhao B G, et al. The studies on the antibiotic substances from *Bacillus subtilis* B-903 strain [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1992, 32 (6): 445—449 [孔建, 王文夕, 赵白鸽, 等. 枯草芽孢杆菌 B-903 抗菌物质的研究 [J]. 微生物学报, 1992, 32 (6): 445—449]
- [3] Zhang X J, Liu H L, Pan X M, et al. Condition on antagonistic substance production of B3 used for biocontrol of sharp eyespot of Wheat [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1995, 18 (1): 26—30. [张学君, 刘焕利, 潘小玫, 等. 小麦纹枯病生防菌株 B3 产生抗菌物质条件的研究 [J]. 南京农业大学学报, 1995, 18 (1): 26—30]
- [4] Handelsman J, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens [J]. *The plant cell*, 1996, 8: 1855—1869
- [5] Wilson C L, Chalutz E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonist yeast and bacteria [J]. *Sci. Hortic.*, 1989, 40: 105—112
- [6] Zheng Y, Yu P and Liu Y R. Purification and Partial Characterization of *Chlorella pyrenoidosa* Lectin [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, 27 (1): 36—40. [郑怡, 余萍, 刘艳如. 蛋白核小球藻凝集素的分离纯化及部分性质研究. 水生生物学报, 2003, 27 (1): 36—40]
- [7] Li J W, Xiao N G, Yu R Y. Principle and Methods of Biochemical Experiment [M]. Beijing: Beijing University Press, 1994. [李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994]

- [8] Kajimura Y, Sugiyama M, Kaneda M. Bacillopetins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *J Antibiotics*, 1995, **48**(10):1095—1103
- [9] Liu Y, Xu Q, Chen Z L. Purification and Characterization of Antifungal Peptide LP-1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*. 1999, **39**(5):441—447. [刘颖,徐庆,陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析[J]. 微生物学报,1999,39(5):441—447]
- [10] Tong Y R, Ma Z C, Chen W L *et al.* Purification and Partial Characterization of Antagonistic Proteins from *Bacillus Subtilis* B034[J]. *Acta Microbiologica Sinica*. 1999, **39**(4):339—343. [童有仁,马志超,陈卫良,李德葆. 枯草芽孢杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析[J]. 微生物学报,1999,39(4):339—343]

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTAGONISTIC SUBSTANCE FROM *BACILLUS SUBTILIS* B115

SHEN Jin-Yu, YIN Wen-Lin, CAO Zheng, PAN Xiao-Yi and WU Ying-Lei

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract: *Bacillus subtilis* B115, an antagonistic bacteria isolated from the mud of aquaculture pond, strongly inhibited the growth of *Aeromonas hydrophila* which caused the bacterial septicemia disease of freshwater fish. B115 bacteria were cultured in BPY medium for 24h at 28℃. The supernatant was collected by centrifugation at 6000r/min for 30min at 4℃, then filtered by a 0.45μm filter. Crude extract of Antagonistic Substance was obtained by precipitation of the cell free supernatant of B115 with HCl and then extracted by alcohol. Assays for crude extract inhibiting bacteria activity were done on agar plates. The results showed that crude extract strongly inhibited *Aeromonas hydrophila* BSK-10 and other pathogens of fish and river crab, and it was thermal-unstable, resistant to trypsin, partial sensitive to proteinase K, sensitive to chloroform and stable in various pH. Its active pH range was wide, from 4 to more than 9. The activity of Antagonistic Substance would lost when it kept in 4℃ more than 15d and in -18℃ more than 45d. One antagonistic peak P2 was obtained from the crude extract of B115 by CM ion exchange chromatography, followed by P-60 column chromatography. An antibacterial peptide LP was purified by acetone precipitation and reversed phase column chromatography. The molecular weight of LP is 803.6 D determined by mass spectrometry. 1 mg pure LP could be obtained from 1L supernatant of B115.

Key words: *Bacillus subtilis* B115; Antagonistic substance; Purification; Characterization