

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0362 - 05

## 耐盐红螺菌拮抗物质的分离纯化及特性分析

邱宏端, 徐姗楠, 林娟, 陈朝洋

(福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350002)

**摘要:**耐盐红螺菌的无菌代谢产物经 CM - Sephadex C - 50 弱阳离子交换色谱柱分离, 获得 3 个蛋白吸收峰: PSB2 - 1 峰, PSB2 - 2 峰, PSB2 - 3 峰。其中 PSB2 - 1 峰对病原菌具有拮抗作用。PSB2 - 1 峰组分样品经透析脱盐, 后进行 SDS - PAGE 电泳检测, 其冷冻干燥样品进行毛细管电泳与 MALDI - TOF 质谱鉴定, 结果表明 PSB2 - 1 峰的抑菌蛋白质已达到较高纯度, 其准确分子量为 9290 Da。耐盐红螺菌拮抗物质具有较好的热稳定性, 对紫外线不敏感, 但对酸碱性较敏感; 用蛋白酶处理, 其抑菌活性受枯草杆菌蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶的影响。耐盐红螺菌产生的拮抗物质可初步归属于小分子热稳定肽 (SHSP)。

**关键词:**耐盐红螺菌; 拮抗物质; 分离纯化; 特性

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Purification and characteristic analysis of antagonistic substances produced by salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria

QIU Hong-duan, XU Shan-nan, LIN Juan, CHEN Chao-yang

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In order to characterize the property of metabolic substances of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria, the aseptic metabolic substances were purified by column chromatography on CM - Sephadex C - 50. Three protein peaks: PSB2 - 1', PSB2 - 2', PSB2 - 3' were obtained. The protein peak of PSB2 - 1' had inhibiting activity against the pathogens. The antibacterial protein peak of PSB2 - 1' was confirmed as electrophoresis purity with SDS - PAGE. Only one band was shown when antibacterial protein was checked by capillary zone electrophoresis. And the molecular weight of antibacterial protein was 9290 Da checked by mass spectrometry. The antagonistic products produced by salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria were heat-stable and were not sensitive to ultraviolet radiation, but sensitive to acidity and alkalinity. And the inhibitory activity was influenced by treatment with trypsin, pepsin and subtilisin. The antagonistic substances produced by salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria could be preliminarily classified with small heat-stable peptide (SHSP).

**Key words:** salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria; antagonistic substance; purification; characteristics

长期以来,人们对光合细菌应用于水产养殖中具有减少动物病害的原因,归结为光合细菌细胞蛋白质含量丰富,能促进动物生长、提高动物免疫力,而且光合细菌参与净化水质,改善鱼虾生存条件,从而使病害减少<sup>[1-3]</sup>。近年来,关于光合细菌具有直接拮抗功能的研究已有一些进展,如黄美珍<sup>[4]</sup>报道了光合细菌对致病弧菌具有抑制作用;我们的前期研究结果也表明 4 株红螺菌对 20

多株水产养殖病原菌具有抑制作用,拮抗物质在细胞生长稳定期与衰亡期时分泌最大量<sup>[2]</sup>。目前,国内外对抗菌物质(如细菌素)的研究已有较多报道<sup>[5-7]</sup>。但关于水产养殖的抗菌物质研究很少,光合细菌抗菌物质的研究至今未有报道。为此,本文继前期工作基础,研究耐盐红螺菌(拮抗高效菌株)拮抗物质的分离纯化与初步表征。该研究为探明红螺菌剂对水产养殖病原菌直接拮抗

收稿日期:2004-10-08

资助项目:福建省自然科学基金(B0210004);福建省海洋与渔业局资助项目(闽海渔科0411号)

作者简介:邱宏端(1955 - ),女,福建连江人,教授,主要从事微生物菌种选育及应用等研究。Tel: 0591 - 87893046, E-mail: hongduanq@163.com

作用的物质基础,和促进光合细菌生物防治水产养殖病害的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 光合细菌

荚膜红假单胞菌 (*Rhodospirillaceae capsulate*) PSB - 2 耐盐菌株,为本实验室选育保存菌种<sup>[8]</sup>;嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 病原菌株由福建省淡水水产研究所提供。

### 1.2 培养基

光合细菌基础培养,肉汤培养基与营养琼脂培养基<sup>[9]</sup>。

### 1.3 主要器材

高速离心机 (Avanti™ J - 251, 美国 BECKMAN 公司);冻干机 (ALPHA1 - 2/LD - 2, 德国 MARTIN CHRIST 公司);台面式 pH/ISE 测试仪 (868, 美国 ORION 公司);毛细管电泳仪 (P/ACETM MDQ, 美国 Beckman 公司);MALDI - TOF 质谱仪 (Reflex™, 德国 Bruker 公司);CM - Sephadex C - 50 (瑞典 Pharmacia 公司);细菌微孔膜过滤器 (膜孔径 0.22 μm, 上海亚东核级树脂有限公司);蛋白酶 K (500 U · mg<sup>-1</sup>, 上海生工生物工程有限公司);糜蛋白酶 (800 U · mg<sup>-1</sup>, 上海试剂厂);胃蛋白酶 (2500 U · mg<sup>-1</sup>, 美国 Sigma 公司);胰蛋白酶 (2500 U · mg<sup>-1</sup>, 中国医药集团上海化学试剂公司);枯草杆菌蛋白酶 (200 U · mg<sup>-1</sup>, 华美生物工程公司);以及测试试剂、缓冲液等。

### 1.4 实验方法

耐盐红螺菌去细胞上清液 (CFS) 的制备参照文献<sup>[2]</sup>方法。

耐盐红螺菌代谢产物抑菌活性的测定 培养对数期的病原细菌,制成菌体浓度为 1.5 ~ 2.5 × 10<sup>8</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>,涂布,于 30 °C 恒温箱中干燥 30 min,后将无菌滤纸片 (6 mm) 贴于平板,滴加 10 μL 光合细菌去细胞上清液 (CFS),在 30 °C 温度下培养 24h 观察抑菌效果。

耐盐红螺菌代谢产物中拮抗物质的分离纯化 菌株去细胞上清液 (CFS) 真空浓缩 (25 °C) 10 倍,于 0.02 mol · L<sup>-1</sup>、pH 5.4 的醋酸 - 醋酸钠缓冲液在 4 °C 下充分透析,采用 CM - Sephadex C - 50 色谱柱 (3 cm × 30 cm) 分离,用含有 0.09 ~ 0.2 mol · L<sup>-1</sup>

NaCl 的上述醋酸缓冲液线性梯度洗脱,流速恒定 0.3 mL · min<sup>-1</sup>。洗脱组分进行紫外分光光度计检测 (OD<sub>280nm</sub>),收集具有抑菌活性的色谱峰,冷冻干燥后备用。

耐盐红螺菌代谢产物中拮抗物质的纯度与分子量标定 (1) 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE):按参考文献<sup>[10]</sup>方法,恒压 120 V 进行电泳,分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 4%,染色脱色方法参考文献<sup>[11]</sup>。(2) MALDI - TOF 质谱测定:由厦门大学生命科学院分析测试中心检测。MALDI - TOF 质谱仪,配置脉冲氮激光 (337 nm) 为离子解吸电离源,分析模型使用高分辨率延迟引出和线性模型,加速电压 23 kV。(3) 毛细管区带电泳分析:毛细管区带电泳中性熔融硅毛细管柱 61 cm × 75 μm,有效分离长度 50 cm。进样前用 pH 7.6、20 mmol · L<sup>-1</sup> 的硼酸缓冲液润洗 5 min。耐盐红螺菌的抑菌蛋白样品压力进样 (30 mPa),进样时间 5 s,分析电压 18 kV,达到基线分离,检测波长 207 nm。

耐盐红螺菌拮抗物质的特性 测试菌株去细胞上清液在不同温度、pH 以及蛋白酶等处理条件下的稳定性能。

## 2 结果

### 2.1 耐盐红螺菌代谢产物中拮抗物质的分离纯化

菌株去细胞上清液充分透析后,通过 CM - Sephadex C - 50 弱阳离子交换色谱柱,分离出 3 个蛋白峰:PSB2 - 1 峰,PSB2 - 2 峰,PSB2 - 3 峰 (图 1),在代谢产物的洗脱组分中,分别取第 57 ~ 135 管检测其对病原指示菌 (伤寒菌与嗜水气单胞菌) 的抑菌活性。结果 (图 2) 显示,PSB2 - 1 峰的第 57 ~ 72 管具有抑菌活性,其抑菌活性变化与 OD<sub>280nm</sub> 的洗脱峰形重叠一致,而 PSB2 - 2 峰和 PSB2 - 3 峰的第 77 ~ 135 管则无抑菌活性。该试验结果表明 PSB2 - 1 峰具有抑菌活性物质,并可初步认定为蛋白质类物质。

### 2.2 耐盐红螺菌代谢产物中抑菌蛋白的纯度鉴定与分子量

SDS - PAGE 电泳分析 CM - Sephadex C - 50 分离的组分样品透析脱盐后,经 SDS - PAGE 电泳检测,结果显示,荚膜红假单胞菌 PSB - 2 代谢产物中的 1 峰呈现一条带,这表明 PSB2 - 1 峰

已达到了电泳纯。PSB2 - 1 '峰'的抑菌蛋白分子量小于 14.4 kD(图 3)。

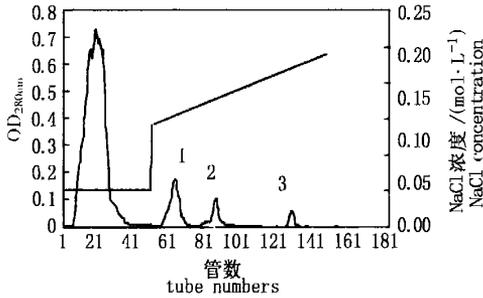


图 1 荚膜红假单胞菌 PSB - 2 代谢产物的 CM - Sephadex C - 50 弱阳离子交换色谱图

Fig.1 CM - Sephadex C - 50 ion-exchange chromatography of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial metabolic products 曲线表示 OD280nm,直线表示盐浓度梯度;色谱条件:色谱柱: 3 cm ×30 cm,流速:18 mL h<sup>-1</sup>,NaCl 浓度:0.09 ~ 0.2 mol L<sup>-1</sup>线性梯度洗脱;检测波长 280 nm

The absorbance of collected fractions was monitored at 280 nm (left axis) with the different concentration of NaCl (right axis). salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial metabolic products was applied on a CM - Sephadex C - 50 column (3 cm ×30 cm) at a flow rate of 18 mL h<sup>-1</sup> using a linear NaCl gradient (0.09 - 0.2 mol L<sup>-1</sup>)

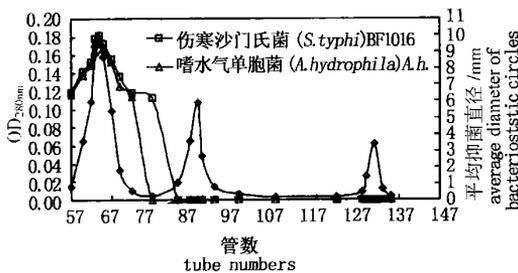


图 2 荚膜红假单胞菌 PSB - 2 代谢产物洗脱组分的抑菌活性变化曲线

Fig.2 Inhibitory activity of each fraction of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial metabolic products

MALDI - TOF 质谱分析 由于 PSB2 - 1 ' 抑菌蛋白的分子量超出所使用标准蛋白分子量的线性范围,故采用 MALDI - TOF 质谱技术进行分子量测定和纯度鉴定。MALDI - TOF MS 采用反射正电压、延时脉冲离子抽取 PIE - Pulsed Ion Extraction 方式检测,质量分析器:3.0 m,IS/1:20.00 kV,IS/2:16.85 kV,RefFull:23.00 kV,Lens:9.80 kV。结果显示,耐盐荚膜红假单胞菌 PSB - 2 代谢产物中的抑菌蛋白(PSB2 - 1 '峰)准确分子量为 9290 Da(图 4)。

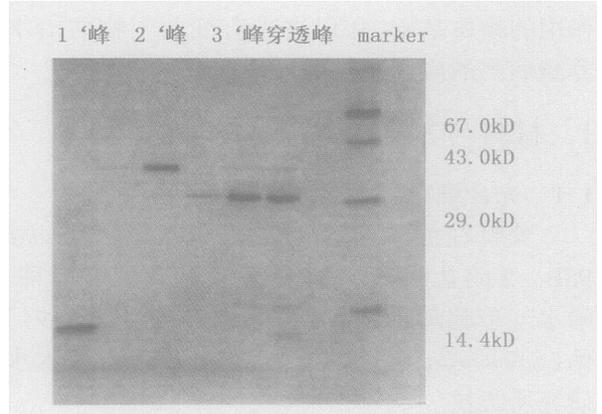


图 3 荚膜红假单胞菌 PSB - 2 代谢产物分离组分的 SDS - PAGE 电泳图

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis of isolated fractions of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial metabolic products

15%分离胶,恒压:120 V,银染 silver-stained SDS-polyacrylamide gels with resolving gel concentration of 15% at 120 V

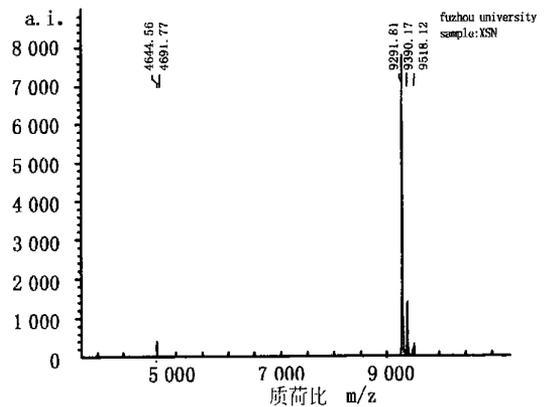


图 4 耐盐荚膜红假单胞菌 PSB - 2 抑菌蛋白(PSB2 - 1 '峰)的质谱图

Fig.4 Mass spectrometry of antibacterial protein (the peak of PSB2 - 1 ' ) produced by salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria

毛细管区带电泳分析 将 CM-Sephadex C-50 弱阳离子交换色谱柱分离获得的抑菌蛋白(PSB2 - 1 '峰)冷冻样品,溶解于石英水中,透析后进行毛细管电泳分析。结果也显示,耐盐荚膜红假单胞菌 PSB - 2 的抑菌蛋白(PSB2 - 1 '峰)已达到较高纯度(基本上为一条谱带)(图 5)。

### 2.3 耐盐红螺菌拮抗物质的特性

对温度的敏感性 耐盐荚膜红假单胞菌的去细胞上清液(CFS),在 60、80、90、100 水浴与 121 下加热处理 20 min 进行抑菌试验(以未处理细胞上清液的抑菌活性定为 100%作

对照,下同)。结果显示,当温度大于 80 时,随着温度升高,抑菌活性有所减弱(图 6)。如 100 处理,抑菌活性下降 6.7%~13.3%;121 高温高压处理,抑菌活性下降 11.1%~17%。该试验结果表明菌株抑菌蛋白具有很好的热稳定性。

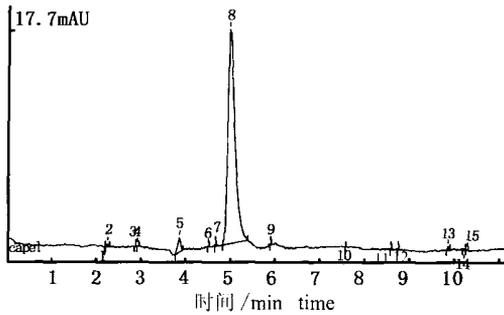


图 5 耐盐荚膜红假单胞菌抑菌蛋白的毛细管区带电泳图谱

Fig. 5 Capillary zone electrophoresis of antibacterial protein produced by salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria

检测条件:pH 7.6,20 mmol L<sup>-1</sup>硼酸缓冲液,30 mPa 压力进样 5 s,分析电压 18 kV,检测波长 207 nm

salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial antibacterial protein was dissolved in 20 mmol L<sup>-1</sup> borax-boric acid buffer, pH 7.6 sample was electrokinetically injected using 30 mPa voltage for a duration of 5 s. The analytical voltage was 18 kV and the detection wavelength was 207 nm

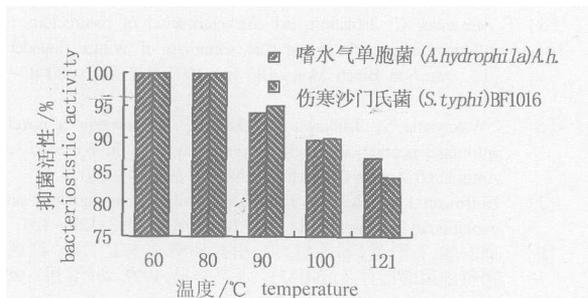


图 6 温度对耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质抑菌活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial antagonistic products

**对 pH 的敏感性** 调节菌株去细胞上清液(初始 pH 9.01)pH 4~11,测定其抑菌活性。结果显示,pH 7~9 抑菌活性较高,pH 小于 7 或大于 9 时,抑菌活性逐渐减弱,但碱性下的抑菌活性强于酸性条件。该结果表明菌株抑菌蛋白的活性对酸碱度较为敏感(图 7)。

**对蛋白酶的敏感性** 耐盐荚膜红假单胞菌去细胞上清液添加蛋白酶(酶液浓度 1 mg · mL<sup>-1</sup>),在 37 温度下反应 60 min 后进行抑菌试

验。结果表明:菌株拮抗物质对蛋白酶 K 和 -糜蛋白酶不敏感,对胃蛋白酶和胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶较敏感。胃蛋白酶处理,抑菌活性下降 5%~13.3%,胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶处理,抑菌活性下降 11.6%~25%(图 8)。

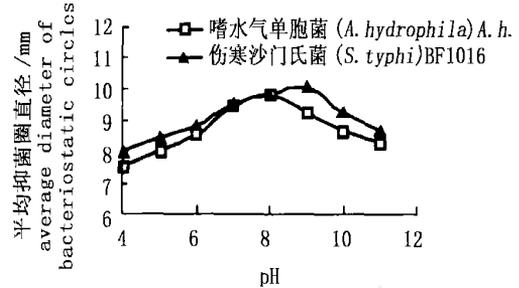


图 7 耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质对 pH 的敏感性

Fig. 7 Sensitivity of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial antagonistic products to pH

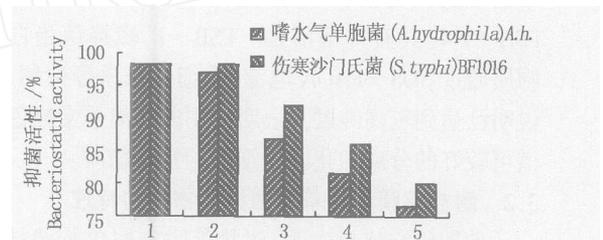


图 8 耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质对蛋白酶的敏感性

Fig. 8 Sensitivity of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial antagonistic products to proteinase

1. 蛋白酶 K; 2. -糜蛋白酶; 3. 胃蛋白酶; 4. 胰蛋白酶; 5. 枯草杆菌蛋白酶

1. proteanase K; 2. -chymotrypsin; 3. pepsin; 4. trypsin; 5. subtilisin

**对紫外照射的敏感性** 耐盐荚膜红假单胞菌的去细胞上清液置于紫外灯下照射 0.25、0.5、1、1.5 和 2 h 后,测定抑制病原菌的活性。结果显示,菌株抑菌蛋白物质对紫外线照射不敏感(图 9)。

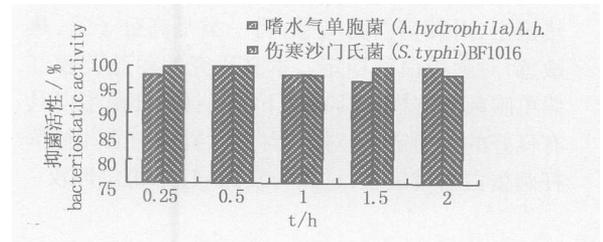


图 9 耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质对紫外线照射的敏感性

Fig. 9 Sensitivity of salt-resistant Rhodospirillaceae bacterial antagonistic products to ultraviolet radiation

### 3 讨论

#### 3.1 耐盐荚膜红假单胞菌代谢产物中拮抗物质的分离纯化

在耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质的分离纯化试验中,曾尝试采用亲和色谱材料(Blue 胶)、凝胶过滤色谱材料(Sephadex G-100)、强阳离子交换色谱材料(Porosp)、阴离子交换色谱材料(Toyopearl DEAE-650)等,但都难以有效的将光合细菌拮抗物质分离出来。由于耐盐荚膜红假单胞菌培养至稳定期,发酵液 pH 9.0 以上,推测其分泌物可能为碱性蛋白,为此,改用弱阳离子交换色谱进行分离纯化。耐盐荚膜红假单胞菌的去细胞上清液(CFS)经 CM-Sephadex 弱阳离子交换色谱柱分离,后进行抑菌实验,通过多次重复试验均获得同样的结果,即分离得 3 个蛋白峰,其中 PSB-1 峰具有抑菌活性。PSB-1 峰抑菌蛋白质通过 SDS-PAGE 电泳、毛细管电泳等检测,说明已达到较高纯度。表明采用弱阳离子交换色谱可较好的分离纯化光合细菌的拮抗物质。

#### 3.2 耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质的特性

前期研究结果表明:耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质是在细胞生长对数期后产生并分泌到细胞外,在细胞进入稳定期及衰亡期达到最大量<sup>[2]</sup>,这种在对数期产生的具有蛋白质特性的拮抗物质为细菌素<sup>[12]</sup>。细菌素为细菌代谢产生的抑菌活性产物之一,近年来,其研究的热点主要集中在新菌株和高产菌株的选育以及对细菌素结构基因的克隆和排序上。在现有研究中,一般认为细菌素的抑菌活性谱较窄,只作用于与产生菌同种的其他菌株或亲缘关系很近的种,但一些革兰氏阳性细菌素也有表现出较广谱的抑菌活性<sup>[13]</sup>。Bradley<sup>[14]</sup>将细菌素分为两类:一类是低分子量,热稳定,对胰蛋白酶敏感;另一类是高分子量,热敏感,对胰蛋白酶稳定。本文研究的耐盐荚膜红假单胞菌拮抗物质具有以下特征:(1)抑菌蛋白具有良好的热稳定性,对胰蛋白酶、胃蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶较敏感,过高与较低 pH 下稳定性较

差;拮抗组分物质(PSB2-1 峰)经 MALDI-TOF 质谱检测,抑菌蛋白分子量为 9290 Da。根据以上结果,可初步将拮抗物质(细菌素)归为小分子热稳定肽(SHSP)一类;(2)耐盐荚膜红假单胞菌为革兰氏阴性细菌,但其拮抗物质(小分子肽)具有广谱的抑菌活性,对 20 多株水产养殖病原菌(如嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、恶臭假单胞菌等)均具有较强的抑菌活性。在抑菌试验中,我们曾采用纸片法与液体培养法,进行了包括耐盐红螺菌在内的 4 株红螺菌对水产养殖病原菌的抑菌试验,结果均较为相似。红螺菌对水产养殖病原菌的这种广谱的抑菌性能,有可能是新的蛋白肽类物质。同时,这种广谱的拮抗性能在水产养殖生物防治病害的应用前景广阔。

#### 参考文献:

- [1] 李勤生,王业勤. 水产养殖与微生物[M]. 武汉:武汉出版社,2000. 53-133.
- [2] 邱宏端,陈智伟,袁重桂,等. 耐盐红螺菌对水产养殖病原菌的拮抗作用[J]. 水产学报,2003,27(1):69-74.
- [3] 邱宏端,徐姗姗,朱航,等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J]. 水产学报,2002,26(3):231-236.
- [4] 黄美珍. 光合细菌对致病弧菌的抑制作用[J]. 台湾海峡,1999,18(1):92-94.
- [5] Alexander C. Isolation and characterization of pieurocidin, antimicrobial peptide in the skin secretions of Winter flounder [J]. Am Soc Biochem Moles Bio Inc,1997,272(18):12008-12013.
- [6] Wakayama S, Jshikawa F, Oshii K. Mycocetein a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus* [J]. Antimicrob Agents Chemother,1984,26(6):939-940.
- [7] Hoffmann J A, Reichart J M. Drosophila ionate immunity an evolutionary perspective[J]. Nat Immunol,2002,3:121-126.
- [8] 邱宏端,石贤爱,郭养浩,等. 耐盐和降高  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$  红螺菌科细菌的选育及应用[J]. 水产学报,1999,23(增刊):92-96.
- [9] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭,等. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227:680-685.
- [11] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999. 57-142.
- [12] Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W. Bacteriocins of gram-positive bacteria[J]. Bacteriol Rev, 1976,40:722-756.
- [13] 李平兰,张虎. 细菌素研究概述[J]. 中国畜产品与食品,1998,5(2):82-84.
- [14] Bradley D E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins [J]. Bacteriol Rev, 1967,31:230-314.