

拮抗水霉菌株的筛选及抑菌蛋白的分离纯化

刘莉莉, 路福平, 刘浩, 周闯

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 水霉病是一种广泛存在于水体中的真菌性病原菌, 无寄主选择性, 目前渔业生产上主要依赖化学药物防治, 导致病原菌的抗药性增强. 本研究通过平板对峙培养法, 筛选到 5 株具有拮抗活性的菌株. 通过硫酸铵盐析、葡聚糖凝胶和离子交换树脂等方式进行分离纯化, 从 *Bacillus subtilis* strain TCCC11201 发酵液中分离得到一个对水霉病菌具有抑制活性的蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 其相对分子质量为 2×10^4 . 菌株 TCCC 11201 代谢产生的活性蛋白具有防治水霉病的潜在应用价值.

关键词: 水霉; 拮抗菌; 筛选; 抑菌蛋白; 分离纯化

中图分类号: Q939.92 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)04-0018-04

Selection of Antagonistic Bacteria for *Saprolegnia parasitica* and Isolation of Its Antibiotic Protein

LIU Li-li, LU Fu-ping, LIU Hao, ZHOU Chuang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Saprolegnia parasitica* is a pathogenic fungal of the fish, which is prevalence without host selectivity. Recently, it was prevented and treated mainly depend on the chemicals. Five bacterial from the strain bank of our laboratory were sieved out with the dural culture method. A kind of protein was separated out from the fermentation broth of the *Bacillus subtilis* strain TCCC 11201 which can inhibit the growth of water mold through sephadex gel, ion exchange resin and so on. After detected with SDS-PAGE protein electrophoresis, its molecular weight is about 2×10^4 . This protein has potential application for the prevention and treatment of saprolegnia.

Keywords: *Saprolegnia parasitica*; antagonistic bacterial; screening; antibiotic protein; separation and purification

水霉是一种广泛存在于水体中的条件致病真菌, 对寄主无严格选择性, 如果鱼类皮肤受伤则不分种类均可感染^[1]. 水霉病又名肤霉病, 一年四季均可发病, 给养殖产业造成巨大的伤害^[2], 目前主要采用化学方法防治. 由于化学药剂的使用量大, 容易对水体造成污染而破坏生态平衡, 而且化学药剂的频繁施用也会导致发生严重的水霉耐药性, 近年来通过生物途径来防治水霉病受到广泛重视^[3]. 本研究通过平板对峙培养法, 筛选到 5 株具有拮抗活性的菌株, 其中菌株 TCCC 11201 经鉴定, 确定其为枯草芽孢杆菌. 通过硫酸铵盐析从 *Bacillus subtilis* strain TCCC11201 发

酵液中粗提抑菌蛋白, 再用葡聚糖凝胶和离子交换树脂等方式对其分离纯化, 得到一个对水霉病原菌具有抑制活性的蛋白, 经 SDS-PAGE 检测, 其相对分子质量为 2×10^4 , 对水霉病的防治具有潜在的应用价值.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

水霉病原菌 *Saprolegnia parasitica*、拮抗菌株 *Bacillus subtilis* strain TCCC11201, 由本实验室

收稿日期: 2010-12-11; 修回日期: 2010-03-10

基金项目: 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21204-10)

作者简介: 刘莉莉(1984—), 女, 山东德州人, 硕士研究生; 通信作者: 刘浩, 教授, liuhao@tust.edu.cn.

提供.

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母浸出物 5, NaCl 10, pH 7.5; 共培培养基:马铃薯淀粉 20,葡萄糖 5,牛肉膏 3,蛋白胨 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2; 发酵培养基^[4]:可溶性淀粉 15,蛋白胨 15,氯化铵 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5, pH 7.0.

1.1.3 药品试剂

硫酸铵,天津市化学试剂一厂;葡聚糖凝胶 Sephadex G-25、DEAE-Sepharose F.F 弱碱性阴离子交换树脂、Tris-base、过硫酸铵, Solarbio 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺, Sanland Chemical 公司; TEMED, Sigma 公司;硝酸银、甲醛,天津市化学试剂三厂.

1.1.4 实验仪器

超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司; TD5A-WS 低速台式离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;蛋白纯化仪,美国伯乐生命医学产品有限公司;垂直电泳仪, Baygene Biotech 公司;冷冻干燥机,北京若比邻信息技术有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 拮抗菌株的筛选

筛选时先将供试菌株活化,即将斜面菌株转接至试管 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 12 h,采用琼脂扩散法,将供试菌株与水霉同时接在共培培养基中.水霉切块(直径 5 mm)接于平板中央位置,距离培养皿边缘 2 cm,沿四周等间距处,放入无菌滤纸片,在滤纸片上滴加 10 μ L 除菌的供试菌株发酵液(1×10^8 mL⁻¹),28 °C 培养 48 h 后观察抑菌效果,测量抑菌圈半径.以滤纸片圆点至受抑制的水霉菌落边缘为抑菌圈半径^[4].

1.2.2 拮抗菌发酵液的蛋白酶稳定性检测

取 2 份 1 mL 发酵液,分别加入蛋白酶 K、胰蛋白酶,使其质量浓度达到 1 mg/mL,以不经蛋白酶处理的发酵液作为空白对照,37 °C 保持 1 h 后,100 °C 水浴 15 min 使蛋白酶失活,采用滤纸片法测量各个样品的抑菌圈直径.

1.2.3 抑菌蛋白粗提液的制备

从斜面上取 1 环 *Bacillus subtilis* strain TCCC 11201,接入装有 50 mL 的 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 培养 12 h,以 5% 的接种量转接入 100 mL 发酵培养基中,于 37 °C、180 r/min 培养 48 h. 发酵液经 10 000 r/min 离心 20 min 除去菌体,收集上清液,并将上清液分成 5 等份,分别用饱和度为 10%、20%、

30%、40%、50% 的硫酸铵 4 °C 盐析过夜^[5],之后经 10 000 r/min 离心 20 min 弃上清液,5 个样品用 1 mL 纯净水溶解,再次离心弃沉淀,即得抑菌蛋白粗提液.

1.2.4 抑菌蛋白的分离纯化

盐析粗提液用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶脱盐,以超纯水为洗脱剂,流量为 1 mL/min,检测波长为 280 nm,按出峰时间分段收集洗脱液,以水霉病原菌为指示菌进行活性跟踪.将经 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶脱盐过程中收集到的活性组分冻干浓缩(用真空冷冻干燥机,-50 °C 抽真空至压力小于 30 Pa),再用 1 mL 的 Tris-HCl(pH 8.0、0.02 mol/L)溶解之后,用 DEAE-Sepharose F.F 弱碱性阴离子交换树脂进一步分离纯化该活性组分.以 Tris-HCl(pH 8.0)与 0.8 mol/L 氯化钠溶液体积比为 100/0 ~ 0/100 进行梯度洗脱,流量为 1 mL/min,以 280 nm 为检测波长,按出峰时间分段收集洗脱液,以水霉病原菌为指示菌进行活性跟踪,收集有活性的部位备用^[6].

1.2.5 活性峰的 SDS-PAGE 检测

参照文献[7],采用 SDS 不连续垂直板电泳,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%,采用银染法染色.

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选结果

通过平板对峙培养法,对供试的 110 株菌株进行活性测试.测试结果表明,110 株供试菌株中的 TCCC11201、TCCC11214、TCCC11322、TCCC11324、TCCC11331 这 5 株菌对水霉病原菌具有较强的拮抗活性,抑菌圈半径测试结果见表 1.由表 1 可见,这 5 株菌中,TCCC11201 的抑菌圈直径最大,抑菌活性最好.经鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌,因此选择该菌株进行分离纯化.

表 1 5 株拮抗菌株对水霉生长的抑制作用

Tab.1 Growth inhibition of five antagonistic bacterial for water mold

| 供试菌 | 抑菌圈半径/mm |
|-------|----------|
| 11201 | 9.1 |
| 11214 | 8.7 |
| 11322 | 9.0 |
| 11324 | 8.7 |
| 11331 | 8.5 |

2.2 发酵液的蛋白酶稳定性

发酵液经蛋白酶 K 处理后抑菌圈直径为对照的

40%，经胰蛋白酶处理后抑菌圈直径为对照的 48%，这说明抗菌物质对蛋白酶 K 和胰蛋白酶都比较敏感，证明发酵液中含有抑菌蛋白。

2.3 发酵液中抑菌蛋白的粗提

用硫酸铵盐析法提取发酵液中的抑菌蛋白，饱和度分别为 10%、20%、30%、40%和 50%的硫酸铵 4℃盐析过夜，离心收集抑菌蛋白粗提物，室温下晾干；然后用超纯水溶解至质量浓度为 1 g/L，取 50 μL 用滤纸片法测试抑菌活性^[8]，结果如图 1 所示。硫酸铵饱和度为 50%时的粗提物抑菌活性最强。

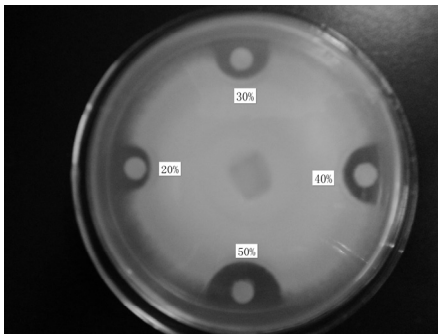


图 1 硫酸铵盐析饱和度的平板检测
Fig.1 Flat detection of ammonium sulfate saturation

2.4 抑菌蛋白的分离纯化

菌株 11201 的抑菌蛋白粗提液以超纯水为洗脱剂经葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 脱盐纯化时，分别有出峰时间为 12~20 min 和 30~34 min 的两个峰，如图 2 所示。以水霉病原菌为指示菌进行活性跟踪，其中出峰时间为 12~20 min 的峰具有很强的抑菌活性，因此，将此段峰进一步分离纯化。

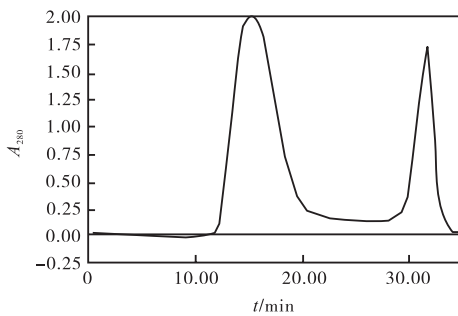


图 2 SephadexG-25脱盐纯化曲线
Fig.2 Desalting purification curve of Sephadex G-25

粗提液经葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 脱盐纯化后，将出峰时间为 12~20 min 的活性峰冻干后用 Tris-HCl 缓冲液溶解，再用 DEAE-Sepharose F.F 弱碱性阴离子交换树脂分离纯化，分成 4 个部分，如图 3

所示。经活性跟踪测试发现，其中出峰时间为 21~27 min 的峰为活性峰，对水霉病原菌具有很强的抑制活性，抑菌活性测试结果如图 4 所示。

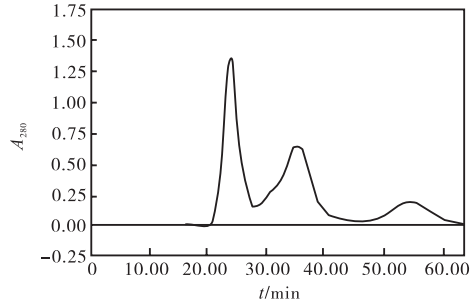


图 3 DEAE-Sepharose F.F 离子交换树脂纯化曲线图
Fig.3 Purification curve of DEAE-Sepharose F.F ion-exchange resin

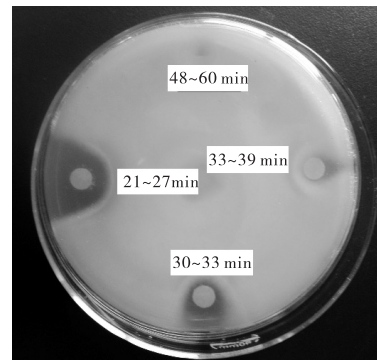


图 4 纯化后各组分对水霉病原菌的抑制活性
Fig.4 Inhibition of each constituent to water mold after purification

2.5 活性峰的 SDS-PAGE 检测结果

经离子交换凝胶分离纯化后，出峰时间为 21~27 min 的活性成分峰用 SDS-PAGE 检测。由于银染的灵敏度很高，电泳检测时只有一条蛋白条带，说明粗提液经分离纯化后抑菌蛋白纯度很高。电泳结果如图 5 所示，抑菌蛋白相对分子质量约为 2×10^4 。

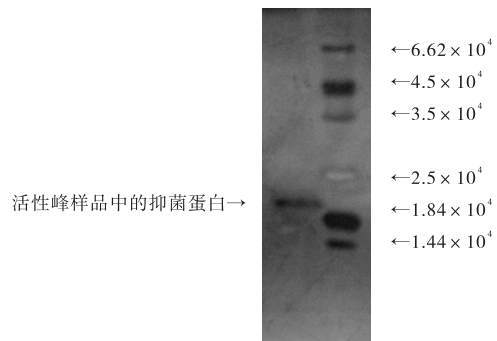


图 5 蛋白电泳检测图
Fig.5 Detection of the active constituent with protein electrophoresis

3 讨论

水霉病的发生主要因为紧迫造成的二次性感染,鱼会因拥挤、移动或其他不良环境因素的影响造成体表组织受伤,水中的水霉病游孢子即伺机附着,进而贯穿真皮深入肌肉,使皮肤与肌肉坏死崩解。过去人们常用孔雀石绿治疗水霉病,而孔雀石绿对人类有致畸、致癌等毒副作用,而且长期使用会造成环境污染及其他不良后果,2002年孔雀石绿因其潜在的致癌性被列为禁用渔药^[9]。目前市场上销售的防治水霉病的药物主要有:水霉净、克霉净、霉净和渔瘟康等。这些药物的大量使用造成了环境污染的加剧,耐药菌株越来越多,加上食用安全问题,因此这些药物被限制使用。现在国际市场对水产品质量要求更加严格,养殖鱼体内抗生素的残留问题已到了不容忽视的地步,能否借助于生物技术制备可取代化学药物的高效抑菌蛋白,用于水霉病的防治,成为我们关注的重点和突破的方向。

Hussein 等^[10]从受水霉病损害的类鲑鱼表面分离出一株体外具有抑菌活性的细菌;Balcázar 等^[11]发现乳酸菌产生的拮抗混合物对水霉病原菌有拮抗作用;国内也有水霉病拮抗菌筛选及活性物质的性质研究等方面的报道。枯草芽孢杆菌产生的抑菌物质主要有抗生素类和抑菌蛋白类,LIU 等^[12]从 *B. subtilis* B-916 的发酵液中分离到相对分子质量为 4.19×10^4 的蛋白 Bacisubin;李晶等^[13]从枯草芽孢杆菌 B29 菌株的发酵液中分离得到相对分子质量约为 4.23×10^4 的抑菌蛋白 B29I;刘静等^[14]从枯草芽孢杆菌 JA 的发酵液中分离到相对分子质量约为 1.0×10^4 的环状脂肽;Motta 等^[15]从枯草芽孢杆菌的发酵液中分离到一种相对分子质量为 5.0×10^4 的抗菌肽。本研究从枯草芽孢杆菌菌株 TCCC11201 的发酵液中分离出一个相对分子质量为 2.0×10^4 左右的蛋白,其对水霉病原菌具有很强的抑制活性,其结构有待于进一步分析鉴定。

参考文献:

- [1] 黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996:142-143.
[2] 倪达书. 鱼类水霉病的防治研究[M]. 北京:农业出版

- 社,1982:8-10.
[3] 张书俊,杨先乐,李聘,等. 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗作用的初步研究[J]. 水生生物学报,2008,32(3):301-307.
[4] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2008:349-354.
[5] 贾洁. 枯草芽孢杆菌 R₂₁₋₄ 抗菌蛋白的分离提取与应用[D]. 北京:中国农业大学食品科学与营养工程学院,2005.
[6] 赵涛. 枯草芽孢杆菌 A₃₋₂ 菌株的分离鉴定及抗菌蛋白的分离纯化与性质研究[D]. 山东:山东农业大学生物学院,2002.
[7] 郭尧君. 蛋白电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1992:80-91.
[8] 廖文彬,鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌菌活性物质的分离纯化研究[J]. 药物生物技术,2004,11(6):376-380.
[9] 翟毓秀,郭莹莹,耿霞,等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(1):27-30.
[10] Hussein M M A, Hatai K. Pathogenicity of *Saprolegnia* species associate with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan[J]. Fisheries Science,2002,68(5):1067-1071.
[11] Balcázar J L, Vendrell D, de Blas I, et al. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens[J]. Veterinary Microbiology,2007,122(3/4):373-380.
[12] LIU Yongfeng, CHEN Zhiyi, Ng T B, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916[J]. Peptides,2007,28(3):553-559.
[13] 李晶,杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(1):106-111.
[14] 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[J]. 微生物学报,2004,44(4):511-513.
[15] Motta A S, Lorenzini D M, Brandelli A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by normal *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin[J]. Current Microbiology,2007,54(4):282-286.