

## 棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化

周艳芬<sup>1,2</sup>, 杜红方<sup>2</sup>, 袁洪水<sup>1</sup>, 张元亮<sup>2</sup>, 朱宝成<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001, 2. 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

**摘要:**从棉花叶组织中分离到的类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)LC105 菌株对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌具有明显的拮抗作用。该菌株发酵液分别用过滤、高压灭菌及有机溶剂处理,初步证明对大丽轮枝菌产生拮抗作用的物质为蛋白质。LC105 菌株发酵液经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析及 Sephacryl S-100 凝胶层析分离纯化,得到了分子量为 27 kDa 的抗菌蛋白。

**关键词:**棉花黄萎病;大丽轮枝菌;类芽孢杆菌;抗菌蛋白;分离纯化

**中图分类号:** S435.621 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2007)02-0098-04

## Isolation and Purification of Antifungal Protein from *Paenibacillus* to *Verticillium dahliae*

ZHOU Yan-fen<sup>1,2</sup>, DU Hong-fang<sup>2</sup>, YUAN Hong-shui<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-liang<sup>2</sup>, ZHU Bao-cheng<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; China; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** Cotton *Verticillium* wilt, caused by soilborne fungi, *Verticillium dahliae*, is found worldwide in cultivated soil. These fungi are important pathogens of crop and landscape plants. *Verticillium dahliae*, which can pose serious threat to cotton production, is a vascular wilt pathogen that primarily invades xylem as it moves from the root into the stem. Thus, brown, gray or green streaking in xylem of infected branches are also common symptoms. Some antagonistic bacteria to *Verticillium dahliae* have been reported. Purification of antagonistic protein produced by antagonistic bacteria and thereafter cloning the related gene is also an effective strategy.

*Paenibacillus* LC105 was screened from mesophyll tissue of cotton in Baoding, China. It showed strong antagonistic activity to *Verticillium dahliae*. The fermented broth of LC105 was treated by the three following methods: filtrated sterilization with microvoid filter film, heated at 121°C for 10 min or deposited in the same volume of chloroform, respectively. The result indicated that the component of strain LC105 responsible for antagonistic activity was protein. Fifty to seventy percent ammonium sulfate was added to the fermented broth for fractional precipitation. The suspension of the precipitate was loaded onto the DEAE-Sephadex A-50 column and eluted by the gradient of NaCl from 0 to 1 mol · L<sup>-1</sup> in 0.1 mol · L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.5). A-III, one of the fractions, showed the antagonistic activity to *Verticillium dahliae*. Collected sample of A-III was loaded onto the Sephacryl S-100 column and washed by 0.1 mol · L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.5). One eluted fraction (A-III-1) showed antagonistic activity to *Verticillium dahliae* V190, which was shown one single band by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular weight of the antagonistic protein was about 27 kDa.

**Key Words:** cotton *Verticillium* wilt; *Verticillium dahliae*; *Paenibacillus*; antifungal protein; isolation and purification

收稿日期:2006-06-06 作者简介:周艳芬(1964-),女,在读博士;\*,通讯作者:zhu2222@126.com

基金项目:河北省自然科学基金项目(398152)

棉花黄萎病(cotton *Verticillium wilt*)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)侵染引起的真菌性维管束系统病害,是棉花最严重病害之一<sup>[1-3]</sup>。大丽轮枝菌的菌丝体能产生大量微菌核,这些微菌核在土壤中存活时间长<sup>[4-6]</sup>,且寄主广泛<sup>[7]</sup>,传播途径多,严重威胁棉花生产,给我国棉花生产造成严重损失<sup>[8-9]</sup>。国内外越来越多的研究表明,大丽轮枝菌在代谢活动中产生的毒素为分泌型蛋白,是棉花致萎的关键因子<sup>[10-18]</sup>。同时棉花黄萎病的发生也受环境气候条件的影响和控制,病菌变异快,较难培育高抗病品系<sup>[14]</sup>。另外由于土壤中黄萎病微菌核的存在,化学防治也很难<sup>[4]</sup>。学者们对于生物防治黄萎病也作了一些报道,如 Linda 报道<sup>[15]</sup>利用干木霉菌(*Trichoderma virens*)制备的生防治剂处理棉花种子后,可减轻黄萎病症。Liu 等<sup>[16]</sup>报道灌木菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AM fungi)可以增加植物对土传病原菌的抗性,能够用于棉花黄萎病的生物控制。Sarah 等<sup>[17]</sup>报道,黄蓝状菌(*Talaromyces flavus*)产生的葡萄糖氧化酶对大丽轮枝菌的微菌核的萌发有抑制作用。因此应用拮抗微生物防治棉花黄萎病是有前景的防治方法之一。

本室从棉花叶组织中筛选出了对棉花黄萎病具有明显拮抗作用的类芽孢杆菌(*Paenibacillus*) LC105,其发酵液分别采用过滤除菌、高压灭菌及有机溶剂处理,初步证明对大丽轮枝菌产生拮抗作用的物质为蛋白质。本研究对 LC105 菌株产生的拮抗蛋白进行了分离和纯化。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)落叶型菌系 V-190 菌株,由中国农科院植保所石磊岩先生惠赠。类芽孢杆菌(*Paenibacillus*) LC105 菌株,本实验室分离保存。

### 1.2 培养基

LBG 培养基:蛋白胨 1%、酵母膏 0.5%、NaCl 0.5%、葡萄糖 0.5%,pH 7.2,用于 LC105 菌株的培养。

PDA 培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 18 g,pH 自然,加水 1000 mL,用于培养大丽轮枝菌。

### 1.3 LC105 菌株拮抗物质的确定

将 LC105 菌株接种于装有 LBG 培养液的三角瓶中,30℃,180 r·min<sup>-1</sup>摇床培养 18~20 h 后转接,继续培养 48 h,将发酵液于 4000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心 10 min,上清液中加入 80%饱和度的硫

酸铵,放置过夜,8000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心 10 min 收集沉淀,并用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.5 的磷酸缓冲液将其溶解,采用三种不同的方法对其处理并检测抗菌活性,一份直接过滤除菌;一份进行 121℃加热处理 10 min;第三份用等体积的氯仿处理 30 min。

### 1.4 蛋白质粗提液的制备

LC105 菌株发酵液,离心收集上清液,缓慢加入硫酸铵,使其饱和度达到 50%,静置离心,收集上清液,继续向其中加入硫酸铵至 70%饱和度,离心收集沉淀,将沉淀用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.5 的磷酸缓冲液溶解,并用相同的缓冲液透析,将透析液离心,弃不溶沉淀物,上清液即为拮抗菌的蛋白质粗提液。

### 1.5 抑菌活性检测

用接种针从大丽轮枝菌斜面上刮取孢子,放入 10 mL 带玻璃珠的无菌水中充分振荡,血球板计数(约 10<sup>7</sup>个·mL<sup>-1</sup>)。将孢子悬液 5 mL 加入融化后冷却到 45℃左右的 PDA 培养基中,倒平板,于 24℃培养过夜,制成病原菌平板。

在病原菌平板上放置牛津杯,杯中加入经微孔滤膜(0.22 μm,Φ25 mm)过滤除菌的 200 μL LC105 菌株培养液的粗提液或纯化的组分,24℃培养 9~10 d,测抑菌圈直径。

### 1.6 抗菌蛋白 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析

在 AKTA explorer 液相层析系统中将 DEAE-Sephadex A-50 柱(1.6 cm×20 cm)用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.5 的磷酸缓冲液充分平衡后,用同种缓冲液平衡至 OD<sub>280</sub>基线,加入粗蛋白提取液 5 mL。用浓度为 0~1 mol·L<sup>-1</sup>的 NaCl 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.5 的磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱,流速为 3 mL·min<sup>-1</sup>,280 nm 紫外光下检测。分步收集的样品进行抑菌活性检测,收集具有拮抗作用的组分,对水透析,蔗糖低温包埋浓缩。

### 1.7 抗菌蛋白 Sephacryl S-100 凝胶层析

Sephacryl S-100 凝胶柱(1.6 cm×20 cm)用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.5 的磷酸缓冲液充分平衡后,将 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析后的活性组分 0.5 mL 加到凝胶柱上,用相同的缓冲液洗脱,流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>。分步收集的样品进行抑菌活性检测,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<sup>[18]</sup>。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 抗菌物质性质的确定

LC105 菌株发酵液直接过滤除菌的样品在抑菌实验中出现了抑菌圈,表明起拮抗作用的物质为菌株的分泌物。采用 121℃ 加热处理 10 min 和用等体积的氯仿处理 30 min 的样品没有抑菌圈出现,初步说明该菌株所产生的拮抗物质为蛋白质。

### 2.2 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析

将拮抗菌的蛋白质粗提液加到平衡后的 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱上进行分离,结果见图 1。经抑菌活性检测,峰 III (A-III) 对大丽轮枝菌 V190 菌株的生长具有明显抑制作用(图 2),表明  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 可以将活性组分洗脱下来。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,A-III 为混合蛋白质组分,因此将 A-III 的洗脱液对水透析后用蔗糖包埋浓缩,利用 Sephacryl S-100 凝胶层析进一步纯化蛋白。

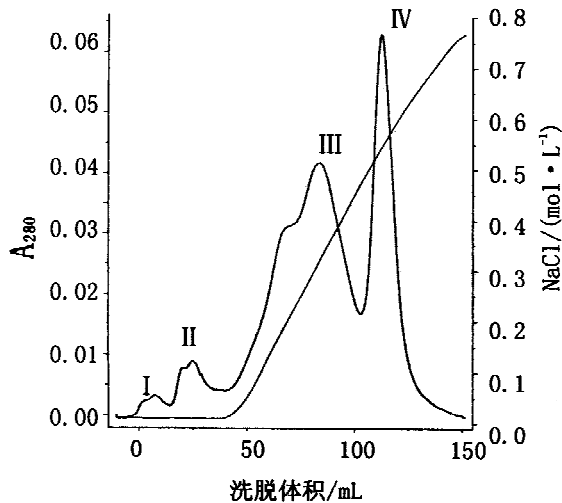


图 1 抗菌蛋白 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析  
Fig. 1 DEAE-Sephadex A-50 chromatography of antifungal protein of *Paenibacillus* LC105 strain

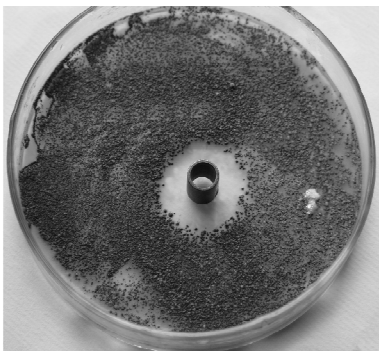


图 2 A-III 组分的抑菌活性

Fig. 2 Antagonistic activity of A-III to *Verticillium dahliae*

### 2.3 Sephacryl S-100 凝胶层析

将 A-III 组分进行 Sephacryl S-100 凝胶层析,进一步分离纯化抗菌蛋白,分离结果见图 3。经抑菌活性检测,峰 1 (A-III-1) 和峰 2 (A-III-2) 对棉花黄萎病大丽轮枝菌 V190 均具有抑制作用(图 4)。

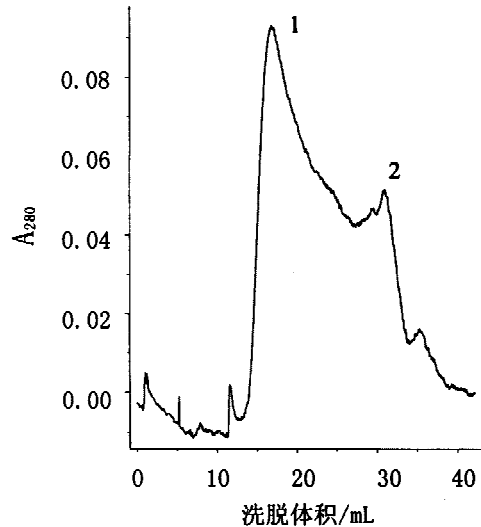


图 3 抗菌蛋白的 Sephacryl S-100 凝胶层析

Fig. 3 Sephacryl S-100 chromatography of antifungal protein

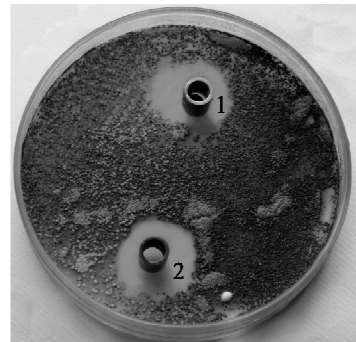


图 4 组分 A-III-1 和组分 A-III-2 的抑菌效果

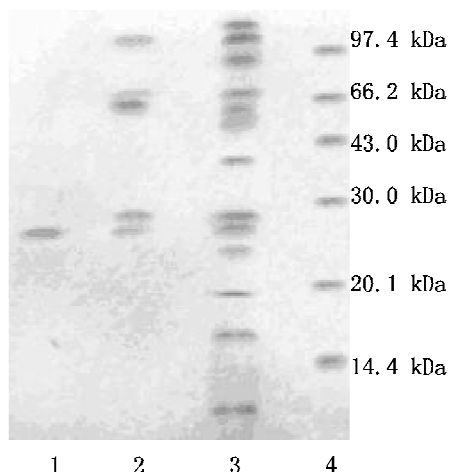
Fig. 4 Antagonistic activity of components A-III-1 and A-III-2 to *Verticillium dahliae* V190

### 2.4 抗菌蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

将硫酸铵沉淀的粗蛋白、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephacryl S-100 凝胶层析各纯化步骤中收集的蛋白组分进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 5),从图 5 中可以看出,经三步纯化后收集到的 A-III-1 为单一组分的抗菌蛋白,表观分子量为 27 kDa。

## 3 讨论

为了减轻化学杀菌剂和杀虫剂对环境 and 人体健康的影响,学者们开始寻找更安全、更有效的替代产品。目前许多真菌或细菌能够产生具有生物学活性的多肽或蛋白类物质,尤其是芽孢杆菌,它是土壤和植物微生态的优势微生物种群,具有很



1: A-III-1; 2: A-III; 3:粗蛋白; 4:标准蛋白质

图 5 抗菌蛋白的纯化效果

Fig. 5 SDS-PAGE of antifungal protein

强的抗逆能力和抗菌防病作用,许多性状优良的自然分离株已经成功地用于防治植物病害<sup>[19-20]</sup>,因此在生防制剂的应用中前景广阔。本研究从棉花叶组织中分离得到类芽孢杆菌 LC105,该菌能够产生具有体外抑制大丽轮枝菌生长的蛋白质,经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephacryl S-100 凝胶层析分离纯化,得到了单一组分 A-III-1,并证明该组分具有明显抑制黄萎病菌生长的作用,进一步的实验正在进行中。

本室分离到的类芽孢杆菌 LC105 对大理轮枝菌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棉花黄萎病。另外,分离得到的抗菌蛋白可以通过基因工程技术改造棉花对黄萎病的抗病性。

#### 参考文献:

[1] 石磊岩,冯洁,王莉梅,等. 北方棉区棉花黄萎病菌生理分化类型研究[J]. 棉花学报, 1997, 9(5): 273-280.

[2] 杜威世,杜雄明,马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(3): 20-24.

[3] 陈旭升,陈永莹,黄骏麒. 棉花黄萎病菌致病性生理生化研究进展[J]. 棉花学报, 2001, 13(3): 183-187.

[4] GABRIELE B, Nicolle R, Anette S, et al. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(7): 3328-3338.

[5] 张进霞,袁洪水,王世英,等. 几种氨基酸铜对大丽轮枝菌产生毒素蛋白的影响[J]. 棉花学报, 2006, 18

(2): 79-82.

[6] 张进霞,袁洪水,王世英,等. 几种氨基酸铜对大丽轮枝菌微菌核形成的抑制作用[J]. 棉花学报, 2006, 18(1): 58-59.

[7] LAURA O, Daniel D, Robert N G M. Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts[J]. Fitopatol bras, 2004, 29(4): 441-446.

[8] 沈其益. 棉花病害—基础研究与防治[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 139-141.

[9] 石磊岩. 我国棉花黄萎病研究进展[J]. 棉花学报, 1995, 7(4): 243-245.

[10] 吕金殿,甘莉,牛淑贞,等. 棉花黄萎病菌致萎毒素的初步研究[J]. 西北农业大学学报, 1988, 16(1): 17-20.

[11] 陈旭升,陈永莹,黄骏麒. 棉花黄萎病菌株 VDS 的外泌毒蛋白生化特性研究[J]. 江苏农业学报, 1998, 14(2): 126-128.

[12] NACHMIAS A, Buchner V, Krikum J. Comparison of protein-lipopolysaccharide complexes produced by pathogenic and non-pathogenic strain of *Verticillium dahliae* Kleb. from potato[J]. Physiological Plant Pathology, 1982, 20: 213-221.

[13] HAR N G, Harish C D. Effect of ouabain and phytotoxic metabolites from *Verticillium dahliae* on the cell membranes of cotton plants[J]. Physiological Plant Pathology, 1985, 27: 109-118.

[14] 简祥良,邹亚飞,马存. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策[J]. 中国棉花, 2003, 30(3): 13-14.

[15] LINDA E H. Reduction of *Verticillium* wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*[J]. The Journal of Cotton Science, 2000, 4: 224-231.

[16] LIU B, Liu R. Physiological mechanisms involved in resistance to cotton *Verticillium* wilt induced by AM fungi[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Sciences), 2004, 30(4): 427-427.

[17] SARAH K S, Deborah R F, Daniel P R. In Vitro analysis of the role of glucose oxidase from *Talaromyces flavus* in biocontrol of the plant pathogen *Verticillium dahliae*[J]. Applied and environmental microbiology, 1996, 62(9): 3183-3186.

[18] 李建武,肖能庚,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: 216-223.

[19] 周艳芬,赵晓瑜,张玉,等. 透明颤菌血蛋白基因在苏云金杆菌中的表达[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2006, 26(1): 33-37.

[20] 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[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103. ●