

海水小球藻抗菌蛋白的分离纯化及性质研究

陈晓清^{1*}, 郑怡², 林雄平³

(1. 漳州师范学院生物科学与技术系, 福建漳州 363000; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350007;
3. 宁德高等师范专科学校生物系, 福建宁德 352100)

摘要:海水小球藻(*Chlorella pacifica*)提取液经硫酸铵沉淀、DEAE-52 离子交换层析和 SephadexG-200 凝胶过滤层析后分离纯化出 1 种抗菌蛋白。经 SDS-PAGE 测定, 两个亚基的相对分子量分别为 61 kD 和 70 kD; 该抗菌蛋白对热稳定, 氨基酸组成分析表明含 17 种氨基酸, 其中谷氨酸的含量最高, 其次为甘氨酸与天冬氨酸, 胱氨酸的含量最低。在抗菌活性中, 纯化的蛋白质对产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和中华根霉(*Rhizopus chinensis*)有较强的抑制作用, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和肠炎病原菌(*Aeromonas punctata*)也有抑制作用, 其抗真菌活性比抗细菌强。

关键词:海水小球藻; 抗菌蛋白; 纯化; 性质

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)05-0442-04

Purification and Characteristics of Antimicrobial Protein from *Chlorella pacifica*

CHEN Xiao-qing^{1*}, ZHENG Yi², LIN Xiong-ping³

(1. Department of Biology Science & Technology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China; 2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 3. Department of Biology, Ningde Teachers' College, Ningde 352100, China)

Abstract: A antimicrobial protein was isolated and purified from *Chlorella pacifica* using ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-52, and then gel filtration on SephadexG-200. By SDS-PAGE determination, the protein appears two bands with molecular weight of 61 kD and 70 kD, respectively. The protein consists of seventeen amino acids, in which the contents of Glu, Gly and Asp are abundant. The protein had strong antifungal activity against *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus chinensis*, and also exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas punctata*. The protein was stable under heat stress. Antifungal activities were stronger than antibacterial activities in the antimicrobial protein from *Chlorella pacifica*.

Key words: *Chlorella pacifica*; Antimicrobial protein; Purification; Characterization

自从 20 世纪 40 年代发现杆菌肽及短杆菌肽以来, 已经从多种植物中分离到不同种类的抗菌蛋白^[1-3], 有数百种之多, 如玉米(*Zea mays*)中的类甜蛋白、烟草(*Nicotiana tabacum*)中的 PR 蛋白、紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)、萝卜(*Raphanus sativus*)和尾穗苋(*Amaranthus caudatus*)种子中的抗微生物蛋白以

及几丁质酶、核糖体失活蛋白等^[4-5]。然而, 有关藻类抗菌蛋白的报道极少, 在大型海藻方面, Melo 等^[6]报道红藻(*Hypnea musciformis*)的粗蛋白具有抗真菌作用及从墨角藻(*Fucus vesiculosus* L.)中提取的类凝集素(一种蛋白质)能抑制大肠杆菌和脑膜炎双球菌生长, 但对微藻抗菌蛋白的研究报道较少。在

我们的前期工作中发现海水小球藻(*Chlorella pacifica*)的粗蛋白具有抗菌活性^[7]。本文进一步对此抗菌蛋白进行分离纯化,并测定其部分性质,为开发利用微藻资源提供基础性的资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验藻种为海水小球藻(*Chlorella pacifica*),引自中国科学院海洋研究所藻种库,采用海水培养基进行振荡培养,培养光强为 $3\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光/暗=12 h/12 h,培养温度为 $25\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$,取对数期(培养8 d后)的培养物,离心洗涤,收集藻泥, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。菌种来自福建师范大学生命科学学院微生物实验室和福建农林大学植保系(植物病原菌)及中国科学院水生研究所(鱼类病原菌)。

1.2 抗菌蛋白质的提取与纯化

将培养收获的海水小球藻泥悬浮于 $0.06\ \text{mol/L}$, pH 7.5的磷酸缓冲液(PBS)中,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,反复冻融并结合超声波破碎,离心,取上清液,往上清液中加入硫酸铵至饱和度达30%,充分搅匀,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,离心,收集沉淀并溶于少量的磷酸盐缓冲液中,透析,获上清液,即为蛋白质提取物,检测抗菌活性,获得抗菌蛋白粗制品, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

将适量脱盐浓缩后的抗菌蛋白粗提液上DEAE-52柱,用 $0.06\ \text{mol/L}$, pH 7.5的PBS淋洗,再用含 $0.5\ \text{mol/L}$ NaCl的PBS进行洗脱,流速 $30\ \text{ml h}^{-1}$,收集具抗菌活性组分,再经SephadexG-200分子筛层析,以 $0.06\ \text{mol/L}$, pH 7.5的PBS洗脱,流速 $12\ \text{ml h}^{-1}$,紫外检测,收集较浓的具抗菌活性的蛋白质部分,经风干浓缩,获得纯化样品,蛋白质浓度测定采用考马氏亮蓝染色法(CBB-G250),纯化样品用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定纯度。

1.3 分子量的测定

参考Laemmli的方法^[8],进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分离胶浓度12%,浓缩胶浓度3.9%。

1.4 氨基酸组成分析

取蛋白质纯品1 mg,加入 $6\ \text{mol/L}$ 盐酸,至安瓿瓶 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水解6 h,用蒸馏水反复蒸去盐酸,采用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。

1.5 对细菌和真菌的抑制作用

取纯化后的蛋白质,配制成 $10\ \text{mg ml}^{-1}$ 的溶液,采用圆形纸片法检测其抑菌活性^[9]:分别刮取供试菌(16种)菌苔于5 ml无菌水中,振荡摇匀得菌悬液,倒入溶化并冷却至 $40\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养基中,摇匀后,迅速分装于培养皿中,待凝固后,取已消毒过的圆形滤纸(直径6 mm)分别用移液枪注入蛋白质提取液 $20\ \mu\text{l}$,略干后贴于培养基平板上,同时作一溶剂空白对照。置恒温培养箱中培养(细菌 $36\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $18\sim 24\ \text{h}$;真菌 $28\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $48\sim 72\ \text{h}$)后,分别观察测量抑菌圈直径的大小。以上步骤均在无菌条件操作,每个样品设2个平行样,结果取平均值。

1.6 热稳定性分析

将纯化的抗菌蛋白($10\ \text{mg ml}^{-1}$)分别置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理30 min,以未经处理的样品为对照,以最敏感菌产黄青霉为指示菌,检测其抑菌活性。

2 结果和分析

2.1 海水小球藻抗菌蛋白的分离纯化

海水小球藻蛋白质粗提液透析浓缩后上DEAE-52柱层析,得到1个洗脱主峰(图1),用产黄青霉为指示菌检测具有抗菌活性,收集此洗脱峰透析除盐、浓缩后上SephadexG-200柱进一步纯化,得到一个洗脱峰(图2),透析除盐、浓缩后检测其具有抗菌活性,即为纯化的抗菌蛋白。该蛋白经PAGE电泳检测为单一条带,说明抗菌蛋白的纯化已能满足分析各种理化性质的要求。

2.2 抗菌蛋白的性质

2.2.1 分子量的测定

海水小球藻的抗菌蛋白经SDS-PAGE电泳,显示出2条带,表明是由2个亚基组成,通过与标准蛋白的相对迁移率(Rf)比较,分子量约为61 kD和70 kD。

2.2.2 氨基酸组成

从表1氨基酸组成分析来看,除色氨酸全部被破坏未测出以外,海水小球藻抗菌蛋白可测出有17种氨基酸,其中,谷氨酸含量最高,占氨基酸总数的16.99%,其次为天冬氨酸与甘氨酸,分别为11.85%与12.1%,组氨酸与胱氨酸含量最少,仅为0.634%与0.346%。

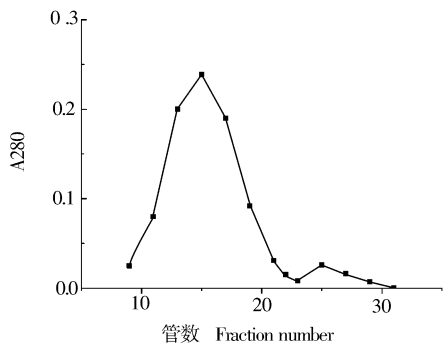


图 1 海水小球藻蛋白质的 DEAE-52 柱层析

Fig. 1 DEAE-52 chromatography of protein from *Chlorella pacifica*

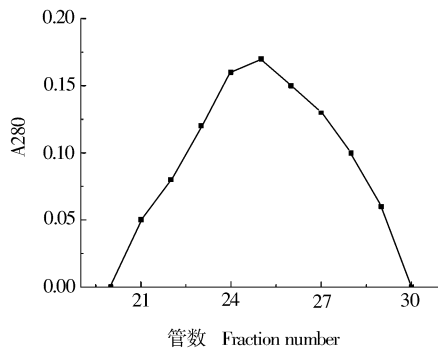


图 2 海水小球藻蛋白质的 SephadexG-200 柱层析

Fig. 2 SephadexG-200 chromatography of protein from *Chlorella pacifica*

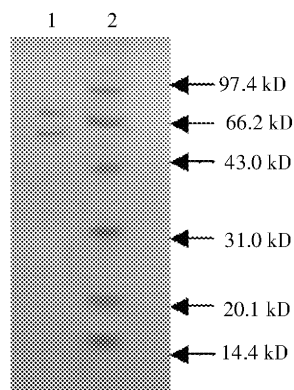


图 3 抗菌蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of antimicrobial protein

1. 样品 Sample; 2. 标准分子量蛋白 Marker

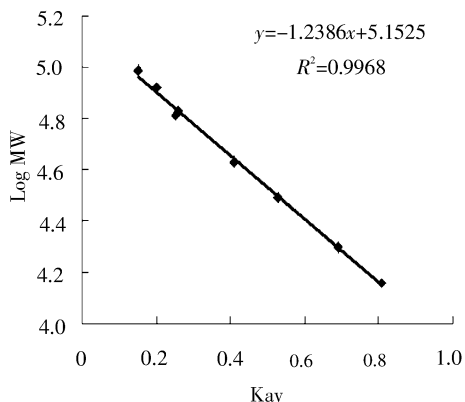


图 4 SDS-PAGE 测定的抗菌蛋白亚基分子量

Fig. 4 Determination of molecular weight of the subunits of antimicrobial protein on SDS-PAGE

表 1 海水小球藻抗菌蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of antimicrobial protein from *Chlorella pacifica* ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

氨基酸 Amino acid	含量 Content	氨基酸 Amino acid	含量 Content
天冬氨酸 Asp	36.26	谷氨酸 Glu	52
胱氨酸 Cys	1.06	异亮氨酸 Ile	14.16
苯丙氨酸 Phe	6.32	色氨酸 Try	未测出 No detect
苏氨酸 Thr	19.02	甘氨酸 Gly	37.02
缬氨酸 Val	18.9	亮氨酸 Leu	32.12
赖氨酸 Lys	12.12	精氨酸 Arg	18.66
丝氨酸 Ser	17.92	丙氨酸 Ala	25.42
蛋氨酸 Met	2.6	酪氨酸 Tyr	30.52
组氨酸 His	1.94	脯氨酸 Pro	7.0

2.2.3 抗菌蛋白对细菌和真菌的抑制作用

在供试的 9 种细菌中, 海水小球藻抗菌蛋白对 4 种细菌有抑制作用(表 2), 其中, 对藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 的抑制作用较大, 抑菌圈直径为 9.2 mm; 其次为烂尾病病原菌 (*Aeromonas sobria*), 抑菌圈直径为 9.0 mm, 海水小球藻抗菌蛋白对 4 种细菌的抑制作用并没有明显的差异。

供试的 7 种真菌中, 海水小球藻抗菌蛋白对 5 种真菌有抑制作用, 其中, 对产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 的抑制效果最为明显, 抑菌圈直径为 15.6 mm, 因此可选择产黄青霉作为抗菌蛋白纯化的指示菌。其次为甘蔗黑穗病病原菌 (*Ustilago scitaminea*), 抑菌圈直径为 14.4 mm, 对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和玉米大斑病菌 (*Helminthos*

porium turcicum)没有抑制作用。海水小球藻抗菌蛋白对真菌的抑制作用比对细菌的抑制强,这也与许多已报道的抗菌蛋白性质相一致。

2.2.4 抗菌蛋白的热稳定性

抗菌蛋白在 50℃、60℃、70℃、80℃ 下分别处理 30 min, 和没有经过热处理的蛋白进行比较, 其抑菌活性没有明显下降, 说明该抗菌蛋白在 80℃ 下稳定。

表2 海水小球藻蛋白质抗菌活性

Table 2 Antimicrobial activities of the protein from *Chlorella pacifica*

		抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
细菌	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	8.6
Bacteria	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0
	藤黄八叠球菌 <i>Sarcina lutea</i>	9.2
	甘薯薯瘟病原菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	0
	赤皮病病原菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	8.8
	烂尾病病原菌 <i>Aeromonas sobria</i>	9
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0
	普通变形杆菌 <i>Proteas vulgaris</i>	0
	肠炎病病原菌 <i>Aeromonas punctata</i>	0
真菌	啤酒酵母 <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	8.8
Fungi	产黄青霉 <i>Penicillium chrysogenum</i>	15.6
	中华根霉 <i>Rhizopus chinensis</i>	8.8
	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	0
	玉米大斑病菌 <i>Helminthosporium turcicum</i>	0
	稻瘟病菌 <i>Piricularia oryzae</i>	8.4
	甘蔗黑穗病病原菌 <i>Ustilago scitaminea</i>	14.4

3 讨论

许多研究表明, 从植物中分离纯化的大部分抗菌蛋白一般只对几种真菌有较强的抑制作用, 对细菌的抑制作用不明显^[10]。本实验中, 海水小球藻蛋白对供试的几种细菌和真菌均有不同程度的抑制作用, 对真菌的抑制活性比细菌的强, 该抗菌蛋白对热较为稳定, 在 80℃ 处理 30 min 仍有抑菌活性。在其它植物中也发现能耐高温的抗菌蛋白, 如从银杏(*Ginkgo biloba*)种仁中获得的抗菌蛋白, 在 90℃ 下抗黄瓜镰刀孢菌活性并没有明显下降^[10]。

从植物中纯化的抗菌蛋白的抗菌机理并不完全相同^[11], 例如, 蛋白酶抑制剂是通过阻止病原菌蛋白酶对寄主组织的降解, 使病原菌营养不足, 生

长和增值受限, 侵染与扩展受阻, 从而达到抗菌的目的; 几丁质酶和葡聚糖酶主要作用于病原菌的细胞壁; 硫蛋白素是直接或间接作用于病原菌的细胞膜并破坏其结构, 从而抑制细胞的生长等等。由于本实验所纯化的蛋白质属于哪类抗菌蛋白还不能确定, 因此, 其抑制病原菌的生长机理也不清楚, 只有对其氨基酸序列测定之后, 再作进一步的研究。

微藻抗菌蛋白作为天然活性物质, 有着潜在的应用前景。到目前为止, 国内对微藻蛋白抗菌活性尤其是抗动植物病原菌的研究几乎没有。因此, 本实验的研究可为以后的开发利用抗菌药物提供有用的资料。

参考文献

- [1] Bohlman H. The role of thionins in plant protection [J]. Crit Rev Plant Sci, 1994, 13: 1-6.
- [2] Broekaert W F, Cammue B P A, De Bolle M F C, et al. Antimicrobial peptides from plants [J]. Crit Rev Plant Sci, 1997, 16: 297-323.
- [3] Broglie K E, Chet I, Holliday M, et al. Transgenic plant with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Science, 1991, 254: 1194-1197.
- [4] Cammue P A, Ddbollem F C, Terrasf R G, et al. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* seeds [J]. J Biolchem, 1992, 267: 2228-2233.
- [5] Terrasf R G, Schoofsh M E, Debollem F G. Analysis of two novel classes of plant antifungal protein from radish seeds [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 15301-15309.
- [6] Melo K, Medeiros I L, Rios A H, et al. Antifungal properties of proteins (Agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux [J]. Bot Mar, 1997, 40: 281-284.
- [7] Chen X Q (陈晓清), Zheng Y (郑怡), Lin X P (林雄平). Antimicrobial activities of the polysaccharide and protein extracts from two species of microalgae [J]. J Fujian Norm Univ (福建师范大学学报), 2005, 21(2): 76-79. (in Chinese)
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. Nature, 1970, 227: 681-685.
- [9] Zheng Y, Chen Y S, Lu H S. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2001, 19(4): 326-331.
- [10] Niu W N (牛卫宁), Guo A G (郭嵩光). Purification and characterization of an antimicrobial protein from seed of *Ginkgo biloba* [J]. Acta Bot Borea-Occid Sin (西北植物学报), 2003, 23(9): 1545-1549. (in Chinese)
- [11] Li C B (李诚斌), Shi Q S (施庆珊), Shu X L (疏秀林), et al. Plants antimicrobial proteins nsLTPS [J]. Plants Physiol Commun (植物生理学通讯), 2006, 42(3): 539-543. (in Chinese)