

基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究

高学文¹, 姚仕义¹, Huong Pham², Joachim Vater², 王金生¹

(¹南京农业大学/农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095; ²柏林理工大学生物化学和分子生物学研究所, 柏林 10587)

摘要: 利用 MALDI-TOF-MS 技术, 鉴定了将 *lpaB3* 基因转入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 菌株所构建的工程菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素种类。结果表明, GEB3 仅产生表面活性素(surfactin)1 种脂肽类抗生素。经 LC-MS 分析, GEB3 产生由 13、14 和 15 个碳原子的脂肪酸链构成的标准表面活性素变体(standard surfactin isoforms)。生物活性检测表明, 该工程菌产生的脂肽类抗生素表面活性素具有抑制小麦纹枯病菌和稻瘟病菌菌丝生长的作用。

关键词: 工程菌 GEB3; 基质协助激光解吸/离子化-飞行时间质谱; 液相色谱-质谱; 脂肽类抗生素; 表面活性素; 植物病原真菌; 抑制作用

094 A

Lipopeptide Antibiotics Produced by the Engineered Strain *Bacillus subtilis* GEB3 and Detection of Its Bioactivity

GAO Xue-wen¹, YAO Shi-yi¹, Huong Pham², Joachim Vater², WANG Jin-sheng¹

(¹Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture/ Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

²Institut für Biochemie und Melkulare Biologie für Berlin Technische Universität, Berlin D-10587, Germany)

Abstract: MALDI-TOF-MS technology was used for identification of lipopeptide antibiotics produced by GEB3 strain, a derivative of *Bacillus subtilis* 168 which transformed by *lpaB3* gene. The result showed GEB3 produced only lipopeptide antibiotic surfactin. The analysis by LC-MS demonstrated that GEB3 produced standard surfactin isoforms with side chain lengths of 13, 14 and 15 carbon atoms. The bioactivity detection of the surfactin indicated that the surfactin produced by GEB3 had inhibition effect to plant pathogens *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia solani*.

Key words: Engineered strain GEB3; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS); LC-MS; Lipopeptide antibiotics; Surfactin; Plant pathogenic fungi; Inhibition effect

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 具有良好的遗传操作性, 已作为革兰氏阳性细菌的典型代表第一个完成全基因组序列测定^[1]。基因组分析表明, *B. subtilis* 168 含有 2 种脂肽类抗生素合成酶编码基因, 即表面活性素合成酶基因(*sf* genes)和 fengycin 合成酶基因(*pps* genes)。表面活性素合成酶基因操纵子(*sf* operon)为 25 kb, 含 *sfA-A*、*sfA-B*、*sfA-C* 和 *sfA-D* 4 个开放阅读框(ORFs), 组成 7 个氨基酸活

化组件(modules); fengycin 合成酶基因操纵子(*pps* operon)为 37.8 kb, 含有 5 个开放阅读框, 共组成 10 个氨基酸活化组件^[2,3]。

枯草芽孢杆菌产生的脂肽类抗生素是通过非核糖体途径合成的, 其合成酶需要翻译后经修饰才有活性, 该过程由共价调节酶磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTases)催化, 将辅酶 A(coenzyme A)的 4'-phosphopantetheinyl(P-pant)转

收稿日期: 2003-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170623)

作者简介: 高学文(1965-), 男, 黑龙江依兰人, 副教授, 博士, 从事植物与病原物互作分子机理和植物病害生物防治研究。E-mail: gaouxew@yahoo.com

移到脂肽类抗生素合成酶的乙酰载体蛋白(peptidyl carrier protein, ACP)的丝氨酸残基上,使合成酶从无活性的脱辅基蛋白(apo-protein)转变为有活性的全酶形式(holo-forms)^[4]。在 *B. subtilis* 168 中由于没有编码 PPTases 的基因,尽管其含有 surfactin 和 fengycin 两种脂肽类抗生素合成酶基因,却不产生任何脂肽类抗生素。

最近,笔者从枯草芽孢杆菌 B3 菌株中克隆到与脂肽类抗生素产生有关的调控基因 *lpaB3*^[5],该基因与 *sfp*^[6] 和 *lpa-14*^[7] 具有很高的同源性,皆编码 PPTases。将 *lpaB3* 基因转入 *B. subtilis* 168 菌株中构建了工程菌 GEB3,通过 *lpaB3* 基因的调控作用使

之产生脂肽类抗生素。本研究旨在鉴定 *B. subtilis* GEB3 产生的脂肽类抗生素和测定其对植物病原真菌的抑菌效果,以评价其作为植物病害生防工程菌的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

研究中使用的枯草芽孢杆菌菌株和植物病原真菌见下表。DC-60 硅胶板购于 Merck 公司(Darmstadt, FRG),Sephadex LH-20 葡聚糖和 Luna RPC18 层析柱购于 Pharmacia Biosystems (Freiburg, FRG)。甲醇、乙酸和乙腈等试剂皆为分析纯或色谱纯。

表 枯草芽孢杆菌菌株和植物病原真菌

Table *Bacillus subtilis* strains and plant pathogenic fungi

菌株 Strains	特征 Characteristic	来源 Source or reference
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	168 基因转化的受体菌,不产生脂肽类化合物 Parental strain for gene transformation, lipopeptide non-producer	南京农业大学病虫实验室 Key Laboratory of Plant Diseases and Insects of Nanjing Agricultural University
GEB3	168 转携带 <i>lpaB3</i> 的质粒 pMK4 的转化子 Transformant of 168 with the plasmid pMK4 carrying <i>lpaB3</i> gene	南京农业大学病虫实验室 Key Laboratory of Plant Diseases and Insects of Nanjing Agricultural University
OKB105	168 衍生菌株,转 <i>sfp</i> 基因,高产表面活性素 Derivative of 168 which was transformed with <i>sfp</i> gene, surfactin high-producer	文献[8] Reference[8]
植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	<i>Pyricularia oryzae</i> 稻瘟病菌 Pathogen of rice blast	南京农业大学病虫实验室 Key Laboratory of Plant Diseases and Insects of Nanjing Agricultural University
<i>Rhizoctonia solani</i>	小麦纹枯病菌 Pathogen of wheat sharp eyespot	南京农业大学病虫实验室 Key Laboratory of Plant Diseases and Insects of Nanjing Agricultural University

1.2 菌体培养和脂肽类化合物的制备

B. subtilis 培养使用 Landy 培养基^[9](20 g glucose, 5 g L-glutamic acid, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g KCl, 1 g KH₂PO₄, 0.15 mg Fe₂SO₄·6H₂O, 5.0 mg MnSO₄·H₂O, 0.16 mg CuSO₄·5H₂O, 1 000 ml distilled water)培养, *B. subtilis* GEB3、168 和 OKB105 菌株分别在含 500 ml Landy 培养基的 2-L 三角瓶中,在 33 ℃、180 r/min 条件下培养 30 h。培养结束后,将培养物离心去除菌体细胞,去细胞培养液加入 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 2.0,然后轻微搅动 2 h 或过夜。离心收集沉淀,加入甲醇后用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 7.0,再用甲醇抽提 2 次并将抽提液合并,获得脂肽类化合物粗提物。将脂肽类化合物粗提物过 Sephadex LH-20(2 cm × 50 cm)层析柱后,获得脂肽类化合物纯化物。-20 ℃ 冰箱保存备用。植物病原真菌在 27 ℃ 条件下,PDA 培养基培养。

1.3 MALDI-TOF-MS 质谱分析脂肽类化合物

利用基质协助激光解吸离子化-飞行时间质

谱(MALDI-TOF-MS),分析 GEB3 产生的脂肽类化合物种类, MALDI-TOF-MS 以 Bruker Reflex MALDI-TOF 仪记录,使用 337 nm 氮激光源解吸附和电离,基质为 α -氰-4-羟肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)。

1.4 LC-MS 分析 GEB3 的表面活性素变异体

LC-MS 系统为 Micromass Quattro LC/HP1100, Luna RPC18(150 mm × 3 mm)层析柱,梯度洗脱,溶液 A 为 0.05% 的甲酸水溶液,溶液 B 为 100% 乙腈。梯度变化的时间为:①0.00→37.00 min, A(%)90→5, B(%)10→95;②37.00→39.00 min, A(%)5→80, B(%)95→20;③39.00→45.00 min, A(%)80→80; B(%)20→20。ES+ 技术(positive ion electrospray acquisition technology),检测[M+H]⁺。

1.5 GEB3 产生的表面活性素抑制植物病原真菌的生物活性测定

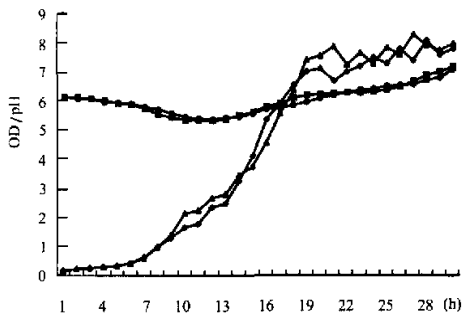
将植物病原真菌点接在 PDA 平板中央,待菌落生长至直径约 2 cm 后在菌落的四周等距离点接表面活性素纯化物(先将圆形纸碟排列好,然后滴加 5

μl 表面活性素纯化物),待真菌菌丝生长超过圆形纸碟后开始记录。

2 结果与分析

2.1 *B. subtilis* GEB3 与 168 菌株生长的生物学特性比较

在 Landy 液体培养基中,33 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 的条件下,用分光光度计(551S UV/VIS, Perkin-Elmer)和 pH 仪(PHC3006L, radiometer analytical)每隔 1 h 测定 1 次 GEB3 和 168 的生长曲线和 pH 曲线(图 1)。GEB3 与 168 的生长曲线和 pH 曲线相似,说明 *B. subtilis* 168 转 *lpaB3* 基因后对其生长未产生显著影响。



◆GEB3 细胞生长 OD 值;▲168 细胞生长 OD 值;■GEB3 培养液 pH 值;●168 培养液 pH 值
◆OD value of GEB3 growth;▲OD value of 168 growth;■pH value of GEB3 culture medium;●pH value of 168 culture medium

图 1 GEB3 与 168 菌株生长的生物学特性

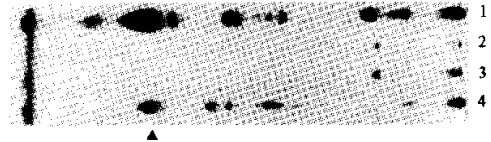
Fig.1 Growth of GEB3 and 168

2.2 *B. subtilis* GEB3 和 OKB105 过 LH-20 层析柱后的薄层层析

将 GEB3 和 OKB105 的脂肽类抗生素粗提物过 LH-20 层析柱后收集脂肽类抗生素部分,获纯化物。将纯化物在 DC-60 硅胶板上层析,展着剂为氯仿、甲醇和水(体积比为 65:25:4),显色剂为含 5% 浓硫酸的甲醇溶液。图 2 显示 GEB3 与 OKB105 同样产生表面活性素,其 Rf 值为 0.65(箭头所示)。而 168 菌株不产生任何脂肽类化合物。

2.3 MALDI-TOF-MS 分析 *B. subtilis* GEB3 产生的脂肽类抗生素种类

为更准确了解 GEB3 产生的脂肽类化合物并验证薄层层析结果,将脂肽类化合物纯化物进行 MALDI-TOF-MS 分析,*B. subtilis* 产生的脂肽类抗生



1:GEB3; 2.3:168; 4:OKB105

图 2 GEB3 脂肽类化合物纯化物的 DC-60 薄层层析图

Fig.2 Thin layer chromatography of pure lipopeptide of GEB3 on silica gel DC-60

素的相对分子质量在 900~2 000 范围内^[10],MALDI-TOF-MS 图谱显示,GEB3 仅在 m/z 值为 1 061 处有离子峰出现(图 3, A),该离子峰相对应于表面活性素的质量, $[M+H]^+$ 的理论计算值为 1 059.4,说明 GEB3 只含有表面活性素 1 种脂肽类抗生素。而作为对照的转化受体菌株 168 没有脂肽类化合物离子峰出现(图 3, B),证明其不产生脂肽类化合物。此外, m/z 值 714、843 为芽孢杆菌属的特征谱带,可用于该属的鉴定^[10]。

2.4 LC-MS 分析 *B. subtilis* GEB3 产生的表面活性素变异体

LC-MS ES+ 全扫描图谱(图 4, A)中,GEB3 在 33~37 min 相继有 5 个表面活性素变异体的 $[M+H]^+$ 离子峰出现,图中标记的是分别在 31.57、35.04 和 37.73 min 的 1 022.73、1 008.70 和 1 036.74 3 个峰,而不产生脂肽类抗生素的用于转化的受体菌株 168 不存在表面活性素的 $[M+H]^+$ 离子峰,这说明 168 菌株转 *lpaB3* 后的工程菌 GEB3 产生了表面活性素。而在表面活性素变异体各离子峰的 ES+ 图谱中(图 4, B), $[M+H]^+$ 的 m/z 值分别为 1 008.7、1 022.7 和 1 036.7,对应于 C_{13} 、 C_{14} 和 C_{15} 标准表面活性素变异体,其理论计算值分别为 1 008.74、1 022.76 和 1 036.77。

2.5 *B. subtilis* GEB3 产生的表面活性素抑菌植物病原真菌的生物活性检测

GEB3 和 2 个对照菌株(168 和转空载体质粒 pMK4 的 168)以相同条件提取脂肽类化合物并检测生物活性,只有产生表面活性素的 GEB3 对稻瘟病菌 *P. oryzae* 和小麦纹枯病菌 *R. solani* 的菌丝生长有抑制作用(图 5, A 和 B)。另外,GEB3 和 OKB105 的表面活性素纯化物抑制植物病原真菌的对比试验结果显示,二者均抑制稻瘟病菌 *P. oryzae* 和小麦纹枯病菌 *R. solani* 的菌丝生长,并具有较好的效果(图 5, C 和 D)。

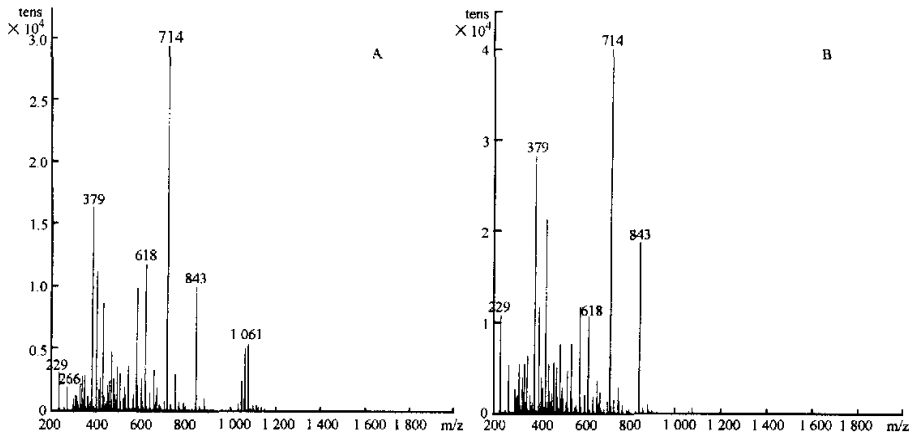
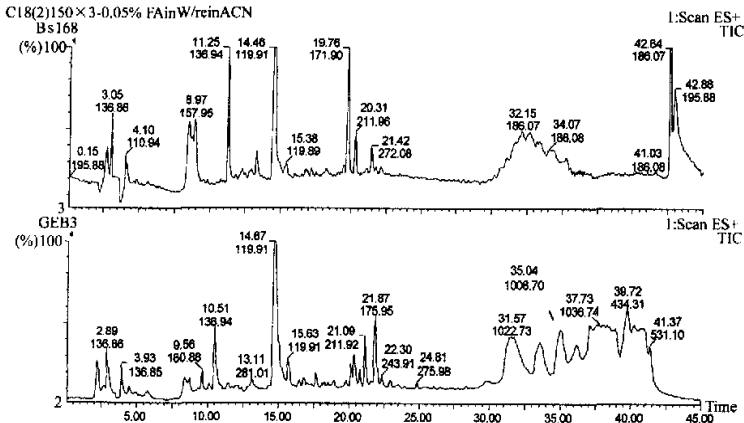


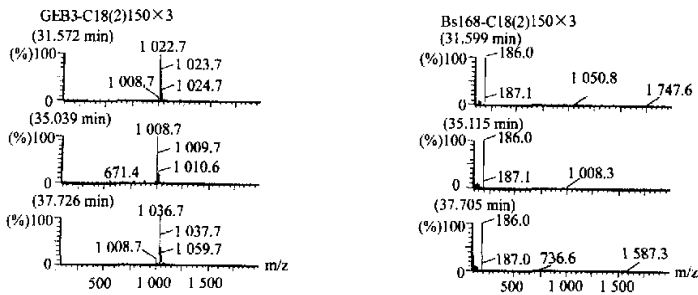
图 3 GEB3(A)和 168(B)纯化物的 MALDI-TOF-MS 图谱

Fig.3 MALDI-TOF mass spectrum of pure lipopeptide of GEB3(A) and 168(B)



A. GEB3 和对照 168 的 LC-MS ES+ 的全扫描图谱

A. Full scan spectrum of LC-MS ES+ of pure lipopeptide of GEB3 and reference 168

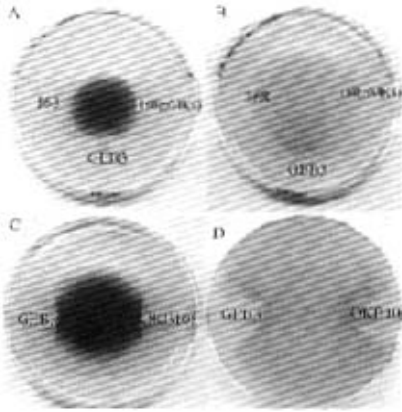


B. GEB3 的表面活性素变异体各离子峰和对照 168 相对应时间的 ES+ 图谱

B. LC-MS ES+ spectrum of peaks of surfactin isoforms of GEB3 and reference 168

图 4 GEB3 和对照 168 的 LC-MS ES+ 分析

Fig.4 Analysis of LC-MS ES+ of pure lipopeptide of GEB3 and reference 168



A. GEB3 产生的表面活性素对 *P. oryzae* 的抑制; B. GEB3 产生的表面活性素对 *R. solani* 的抑制; C. 表面活性素对 *P. oryzae* 的抑制; D. 表面活性素对 *R. solani* 的抑制

A. Inhibition of surfactin produced by GEB3 to *P. oryzae*; B. Inhibition of surfactin produced by GEB3 to *R. solani*; C. Inhibition of surfactin to *P. oryzae*; D. Inhibition of surfactin to *R. solani*

图 5 GEB3 产生的表面活性素纯化物对植物病原真菌的抑制作用

Fig.5 Inhibition effect of GEB3 pure surfactin to plant pathogenic fungi

3 讨论

枯草芽孢杆菌产生的脂肽类抗生素有 surfactin、fengycin 和 iturins 3 大类。surfactin 是高活性的生物表面活性剂,也是具有广泛用途的生物活性物质。它表现出抗病毒、抗肿瘤和支原体、抗真菌以及一定程度的抗细菌活性^[9,11]。而 fengycin 对真菌,尤其对丝状真菌有极好的抑制效果^[12]。*B. subtilis* 168 具有 surfactin 和 fengycin 两种脂肽类抗生素合成酶基因,但没有编码 PPTases 的基因而不表达任何脂肽类抗生素。本研究旨在通过转 *lpaB3*(编码 PPTases)使 *B. subtilis* 168 菌株能够产生脂肽类抗生素 surfactin 和 fengycin,尝试用于植物病害的生物防治。但试验结果表明,转 *lpaB3* 后 *B. subtilis* 168 只产生 surfactin 1 种脂肽类抗生素,并没有产生 fengycin。分析 fengycin 不能产生的原因,可能是 *B. subtilis* 168 虽含 fengycin 合成酶基因,因某种原因不表达,或能表达 fengycin 合成酶但由于 *LpaB3* 的 PPTases 活性具有专化性,对 fengycin 合成酶失去调控作用。已有研究表明,*lpaB3* 的类似基因 *spf* 基因的表达产物 PPTases 活性具有广泛的调控活性^[11]。而且 *lpa14* 和 *lpa8* 可以分别调控 surfactin 和 iturinA, surfactin 和

plipastatins(与 fengycin 相似)表达^[5,12]。因而,进一步研究 *lpaB3* 的功能专化性和 lipopeptides 共同表达的调控机理在理论和实践上将具有重要意义。

本研究发现基因工程菌 GEB3 产生的 surfactin 对重要的植物病原真菌 *P. oryzae* 和 *R. solani* 具有较好的抑制作用,并具有失活衣壳病毒 VSV(vesicular stomatitis virus)、SHV-I(suid human herpes virus type I)和 SFV(semliki forest virus)的作用(将另文报道),是潜在的植物病害生防和医用工程菌。

References

- [1] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini A M, Alloni G, Azevedo V, Bertero M C, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell S C, Bron S, Brouillet S, Bruschi C V, Caldwell B, Capuano V, Carter N M, Choi S K, Codani J J, Connerton I F, Danchin A, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390:249 - 256.
- [2] Tognoni A, Franchi E, Magistrelli C, Colombo E, Cosmina P, Grandi G. A putative new peptide synthetase operon in *Bacillus subtilis*: Partial characterization. *Microbiology*, 1995, 141:645 - 648.
- [3] Tosato V, Albertin A M, Zotti M, Sonda S, Bruschi C V. Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*, 1997, 143:3 443 - 3 450.
- [4] Lambalot R H, Gehring A M, Flugel R S, Zuber P, LaCelle M, Marahial M A, Reid R, Khosla C, Walsh C T. A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, 1996, 3:923 - 936.
- [5] Yao S Y, Gao X W, Fuchsbauer N, Hillen W, Vater J, Wang J S. Identification of the genetic region of *Bacillus subtilis* B3 renders *Bacillus subtilis* 168 biosynthesis of lipopeptide surfactin positive. *Bio-control Science and Technology*, 2003, 13(7):691 - 697.
- [6] Nakano M M, Corbell N, Besson J, Zuber P. Isolation and characterization of *spf*: A gene that function in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 1992, 232:313 - 321.
- [7] Huang C C, Ano T, Shoda M. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturinA and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *Journal Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76:445 - 450.
- [8] Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, Kamp R M, Pauli G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 1997, 25:289 - 297.
- [9] Landy M, Warren G H, Rosenman S B, Colio L C. Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1948, 67:539 - 541.
- [10] Leenders F, Stein T H, Kablitz B, Franke P, Vater J. Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using Matrix-Assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of intact cells.

- Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 1999, 13: 943 - 949.
- [11] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(1):44 - 49.
- [12] Loeffler W, Tschen J S M, Vanittanakom N, Kugler M, Knorpp E, Wu T C. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F 29 - 3; A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*, 1986, 115:204 - 213.
- [13] Mootz H D, Finking R, Marahiel M A. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276:37 289 - 37 298.
- [14] Kenji T, Ano T, Shoda M. Isolation of gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Archives of Microbiology*, 1996, 165:243 - 251.

(责任编辑 王红艳)