

文章编号:1003-8701(2009)01-0017-03

一株铰链孢属真菌培养条件及激活蛋白的提取

高茹媛^{1,2},徐文静²,杜茜²,李启云^{2*},许修宏^{1*}

(1. 东北农业大学,哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究中心,长春 130033)

摘 要 本研究以 PD 培养液为测定培养基,对一株铰链孢属(*Alternaria* spp.)真菌的培养条件进行了初步研究,通过正交试验设计,确定其最佳培养条件为 26℃,160 r/min,装液量 120 mL/250 mL,培养 72 h 时菌丝干重量最高。使用超声波破碎法,从所培养的铰链孢属真菌中提取到分子量为 42~43kD 的激活蛋白。

关键词 铰链孢属真菌;激活蛋白;培养条件

中图分类号:Q949.32

文献标识码:A

Optimization of Cultural Condition of *Alternaria*.spp and Extraction of Plant Activator Protein

GAO Ru-yuan^{1,2}, XU Wen-jing², DU Qian², LI Qi-yun^{2*}, XU Xiu-hong^{1*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: The fermentation conditions of *Alternaria* spp. were determined through quadrature experiment. The optimum fermentation parameters were as follows: culture temperature 26℃, 120mL liquid medium in 250mL flake, 160r/min for 72 h. Plant activator protein from *Alternaria* spp. were extracted using ultrasonic and the molecular weight is 42KD with SDS- PAGE.

Key words: *Alternaria* spp.; Plant activator protein; Cultural condition

近年来,随着激发子类物质在植物与病原物互作上的深入研究,其在生物农药上的应用也逐渐兴起。激活蛋白是一类新型的微生物蛋白农药,本身不具有杀菌作用,但可以激发植物的系统抗病性,从而促进植物生长和提高植物抗病防虫的能力^[1]。激活蛋白可从多种病原真菌中提取获得,本试验选取了易于获得的铰链孢属真菌,对其培养条件进行了优化并使用超声波破碎法从中提取蛋白,为选择提取优质激活蛋白的方法提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

铰链孢属真菌为吉林省农科院生物中心生物农药实验室分离并保存。

1.2 铰链孢属真菌培养条件筛选

1.2.1 最佳培养时间

在 250 mL 三角瓶中分别加入等量 PD 液体培养基,接种固体 PDA 上生长的铰链孢属真菌菌块,设置培养时间分别为 48、60、72、84、96 h,然后将各处理的菌丝真空抽干,置于 60℃烘干,称重,选择最佳培养时间。

1.2.2 摇床转速

设置 140、160、180、200、220 r/min 摇床转速,以 1.2.1 得出的最佳培养时间培养,菌丝烘干称重,选择最佳摇床转速。

1.2.3 培养温度

分别在 22、24、26、28、30、32℃下,以最佳培养时间和最佳摇床转速培养,得到的菌丝烘干称重,选择最佳培养温度。

收稿日期:2008-08-01

作者简介:高茹媛(1983-),女,硕士,从事生物农药研究。

通讯作者:李启云,博士,研究员,E-mail:qyli@cjaas.com

许修宏,博士,教授,E-mail:howard2857@hotmail.com

1.2.4 装液量

在 250 mL 三角瓶中分别装入 40、60、80、100、120、140 mL PD 液体培养基,接种后以最佳培养时间、最佳摇床转速及最适培养温度培养,菌丝烘干称重,选择最佳装液量。

1.2.5 综合培养条件研究最佳条件组合试验

表 1 培养条件正交试验中选用因素和水平

因素水平	培养时间(h)	培养温度(°C)	转速(r/min)	装液量(mL/250mL)
1	60	26	160	100
2	72	28	180	120

表 2 培养条件正交试验组合方案

因素水平	A	B	A×B	C	A×C	B×C	D
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

注:A代表培养时间,B代表培养温度,A×B代表培养时间和培养温度间的交互,C代表摇床转速,D代表装液量,A×C代表培养时间和摇床转速的交互,B×C代表培养温度和摇床转速的交互。

根据 1.2.1 至 1.2.4 中得出的各个最佳培养条件进行正交试验以考察各条件复合使用的情况,按照表 1 设计不同的因素和水平,选用正交表 L8(2⁷)进行正交设计,同时参照此表对培养条件进行组合,得到表 2。铰链孢属真菌在各组合条件下进行培养后称量各处理菌丝干重。

1.3 激活蛋白提取

在 250 mL 三角瓶中装入 PD 培养液,接种直径为 8 mm 的铰链孢属真菌菌块 2 块,按照正交试验得出的最佳培养条件进行培养。将培养后的菌丝真空抽干,加适量 0.05 mol/L pH6.8 的磷酸缓冲液,超声波破碎,8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为激活蛋白原液。将其分装在 1.5 mL 离心管中,于 -20℃ 保存。

1.4 SDS-PAGE 电泳检测

将激活蛋白原液分装在 1.5 mL 离心管中,放入离心干燥机中浓缩至 1/2 体积,每次以 10 μL 浓缩后的激活蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳检测。具体方法参照《分子克隆》第二版进行。

2 结果与分析

2.1 铰链孢属最佳培养条件的筛选

2.1.1 培养时间对菌丝干重的影响

如图 1 所示,在培养 72 h 内菌丝生长量急剧增加,72 h 时菌丝平均干重为 0.98 g,之后菌丝平

均干重略有增加(84 h 菌丝干重为 0.99 g),但增加量不明显,由此判断培养 72 h 时该菌株处于对数生长期,故最佳培养时间为 72 h。

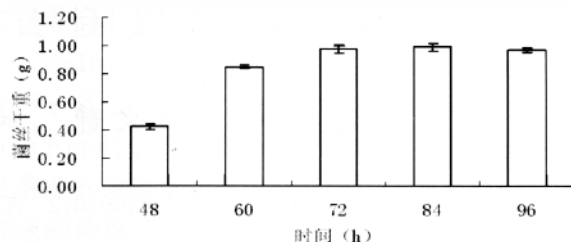


图 1 不同培养时间的菌丝干重

2.1.2 培养转速对菌丝干重的影响

菌丝的最佳生长转速表明,转速为 160 r/min 时菌丝平均干重值最大,为 1.01g,160 r/min 为该菌株的最佳培养转速(图 2)。

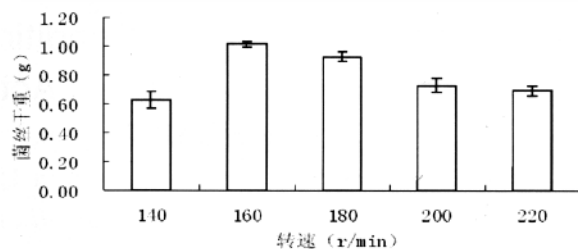


图 2 不同转速培养的菌丝干重

2.1.3 培养温度对菌丝干重的影响

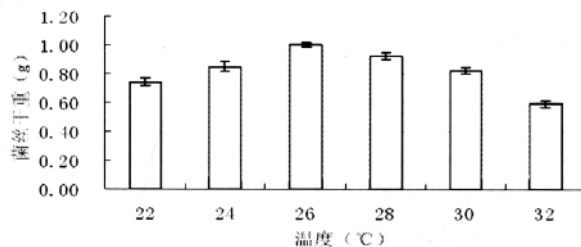


图 3 不同培养温度下菌丝干重

从图 3 可以看出,22~26℃范围内,菌丝生长量随温度的升高而增加,26℃时达到最高,菌丝平均干重为 1.00 g。当温度继续升高,菌丝量逐渐下降,高温对菌丝的生长产生了抑制作用,因此该菌株的最佳培养温度为 26℃。

2.1.4 装液量对菌丝干重的影响

摇瓶装量实验表明,以 250 mL 三角瓶装液量为 120 mL 为最佳,菌丝产量最高,平均干重为 1.04 g。装液量小于 120 mL/250 mL,菌体生长因得不到充足的营养而受到限制;而装液量大于 120 mL/250 mL,因为通气量不足,菌丝生长受到抑制。

2.1.5 培养条件综合研究

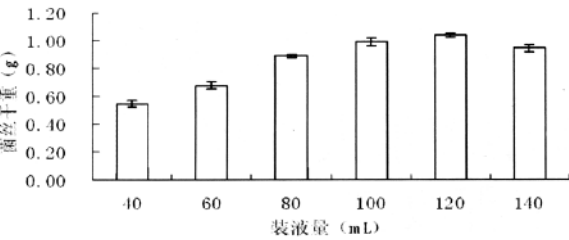


图 4 不同装液量的菌丝干重

从水平 1 与水平 2 的差值的绝对值来看 ,培养温度及温度与摇床转速的交互作用对菌丝干重的影响相对较大 ,比较 K1 与 K2 的大小 ,选择较大值所对应的水平作为各因素的最佳水平 ,确定培养条件最优组合为 :26℃ ,摇床转速 160 r/min ,装液量为 120 mL/250 mL ,培养 72 h ,与组合 5 条件相同(表 3)。

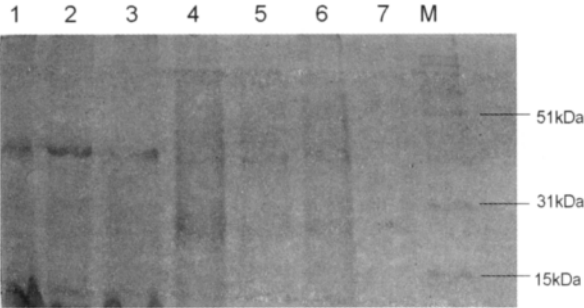
表 3 各培养条件正交试验结果

组合	因 素							菌丝干重(g)
	A	B	A× B	C	A× C	B× C	D	
1	1	1	1	1	1	1	1	0.84
2	1	1	1	2	2	2	2	0.88
3	1	2	2	1	1	2	2	0.87
4	1	2	2	2	2	1	1	0.86
5	2	1	2	1	2	1	2	1.01
6	2	1	2	2	1	2	1	0.90
7	2	2	1	1	2	2	1	0.96
8	2	2	1	2	1	1	2	0.88
K1	3.45	3.63	3.56	3.68	3.49	3.59	3.56	-
K2	3.75	3.57	3.64	3.52	3.71	3.61	3.64	-
K1-K2	0.30	0.06	0.08	0.16	0.22	0.02	0.08	-

注 K1 代表该因素第一水平和其它因素不同水平组合时菌丝干重之和 K2 代表该因素第二水平和其它因素不同水平组合时菌丝干重之和 ,|K1-K2| 代表 K1 与 K2 之差的绝对值。

2.2 激活蛋白的 SDS- PAGE 结果

如图 5 所示 ,激活蛋白粗提液经 SDS- PAGE 电泳检测结果显示 ,1、2、3 泳道在 31kD 与 51kD 中间偏上的位置有一条清晰的条带 ,分子量约为 42~43kD ,其超声波提取时间为 20 min。4~7 泳道没有明显的条带 ,其中 4~6 泳道提取时间为 30 min ,7 提取时间为 40 min。



注 :1、2、3 样品为超声波提取提取 20min;4、5、6 为提取 30min; 7 为提取 40min;M 为蛋白分子标准样品

图 5 激活蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

培养条件中 ,培养时间及培养时间与摇床转速的交互作用对菌丝干重的影响相对较大 ,需严格控制 ,其余因素对其影响较小。

常用的蛋白提取方法有反复冻融法、酶法及超声波破碎法等。由于真菌具有细胞壁厚的特点 ,反复冻融获得的蛋白量有限 ,而溶壁酶的作用也很难获得原生质体 ,与之相比 ,超声波破碎法具有迅速、高效的优点。本试验以激活蛋白的粗提液进行 SDS- PAGE 电泳 ,其中 ,超声波提取时间设置为 20 min 时 ,出现的条带比较单一、清晰 ,几乎无杂带 ;提取时间为 30、40 min 时电泳条带显示不明显 ,可能是由于超声波破碎时间过长导致了蛋白降解。因此选择超声波破碎 20 min 作为激活蛋白的最佳提取时间。

仲新华等^[2]从铰链孢属真菌中提取到分子量为 42kD 的激活蛋白 ,本试验的激活蛋白粗提液经 SDS- PAGE 电泳检测 ,与蛋白 Marker 相对照 ,分子量约为 42~43kD ,与报道的结果相吻合。可将此蛋白提取液进一步纯化并检验其对植物抗病性的影响。

参考文献 :

[1] 邱德文 . 微生物蛋白农药研究进展[J]. 中国生物防治 ,2004 ,20 (2) :91- 94 .
[2] 仲新华 ,邱德文 ,王纯利 ,等 . 植物激活蛋白的分离、纯化及等电点的测定[J]. 新疆师范大学学报 (自然科学版) ,2005 ,24(4) :65- 68 .

3 小结与讨论

铰链孢属(*Alternaria*) ,也称链格孢属真菌 ,是农作物的主要致病菌之一 ,来源相当广泛 ,与同样可以提取激活蛋白的稻瘟菌 (*Pyricularia grisea*) 相比 ,具有生长速度快 ,在不加入其他营养物质的 PDA 培养基上长势好 ,且利于培养的优点。在各