



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102167732 A

(43) 申请公布日 2011.08.31

(21) 申请号 201010582886.7

(22) 申请日 2010.12.10

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M2010210 2010.08.30

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 郑天凌 王宾香 吕静琳

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

C07K 14/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01P 13/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

蛋白类杀藻化合物及其制备方法

(57) 摘要

蛋白类杀藻化合物及其制备方法,涉及一种杀藻化合物。所述化合物从假单胞交替菌 DHQ25 分离获得。将 DHQ25 活化后培养离心,取上清过滤后无菌检验得 DHQ25 的无菌培养滤液,收集超滤液;超滤后上清液经分离纯化,收集其中的 8 个组分,各组分冻干成粉,杀藻活性检测,取具有杀藻活性的 3 个组分 P5、P6 和 P7,检测蛋白条带数,P7 显示出一条带,再将 P7 的冻干粉处理,共分离出两个峰,记为 P71 和 P72,再处理后杀藻检测,P71 具有杀藻活性,经处理后显示 P71 一条带,经原位 PAGE 鉴定是单条带的纯蛋白;P71 经 ESI-MS/MS 鉴定分析,得知分子式为  $C_{610}H_{971}N_{209}O_{181}S_2$ 。

1. 蛋白类杀藻化合物,其特征在于是从假单胞交替菌 DHQ25 (*Pseudoalteromonas* sp. DHQ25) 分离获得,所述假单胞交替菌 DHQ25 (*Pseudoalteromonas* sp. DHQ25) 已于 2010 年 8 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO :M2010210。

2. 如权利要求 1 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 将假单胞交替菌 DHQ25 活化后,接种于液体培养基中培养,将培养液离心,取上清过滤后,进行无菌检验,得到假单胞交替菌 DHQ25 的无菌培养滤液,再进行超滤处理,收集超滤液;

2) 超滤后上清液经分离纯化,收集其中的 8 个组分,各组分冻干成粉,分别对各组分进行杀藻活性检测,取具有杀藻活性的 3 个组分,记为 P5、P6 和 P7,检测各组分中的蛋白条带数,其中 P7 经 SDS-PAGE 检测,显示出一条带,再将 P7 的冻干粉重溶,透析除盐,进 HPLC 重新分离纯化;

3) P7 再进行分离纯化,共分离出两个峰,记为 P71 和 P72,冻干处理,重新溶解,透析除盐,进行杀藻检测,其中 P71 具有杀藻活性,经 SDS-PAGE 还原和非还原处理后都显示是 P71 一条带,P71 经原位 PAGE 鉴定是单条带的纯蛋白;

4) P71 经 ESI-MS/MS 鉴定分析,得知分子式为  $C_{610}H_{971}N_{209}O_{181}S_2$ ,其氨基酸序列如下:

Met	Ala	Ser	Gln	Lys	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	His	Gly	Ser	Lys	Tyr	Leu
1				5						10					15
Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Met	Asp	His	Ala	Arg	His	Gly	Phe	Leu	Pro	Arg
				20						25					30
His	Arg	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	Arg	Phe	Phe	Ser	Gly
				35						40					45
Asp	Arg	Gly	Ala	Pro	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	His	Thr	Arg
				50						55					60
Thr	Thr	His	Tyr	Gly	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Ser	Gln	Arg	Thr	Gln	Asp
65						70					75				80
Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro	Arg	Thr
						85					90				95
Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Arg	Phe
				100						105					110
Ser	Trp	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Pro	Ile	Ala	Arg	Arg
				115						120					125。

3. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述液体培养基采用 2216E 液体培养基。

4. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述培养的条件为 25℃ 180rpm 培养 24h。

5. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述培养液离心,是采用 8000g 离心 10min。

6. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述过滤,是采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤;所述无菌培养滤液的 pH 值为 8.1 ~ 8.4。

7. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述分离纯化,是采用 Varian C18-HPLC 分离纯化,以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂;所述对各组分进行杀藻活性检测,是以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为空白对照。

8. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述 P7 的冻干粉重溶,是以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为溶解液,所述透析除盐,是用  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为透析液。

9. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 3) 中,所述分离纯化,是采用 Agilent C18-HPLC 分离纯化,以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂。

10. 如权利要求 2 所述的蛋白类杀藻化合物的制备方法,其特征在于在步骤 3) 中,所述重新溶解,用  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 重新溶解,控制浓度  $10\text{mg/L}$ ;所述透析除盐,用  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为透析液;所述杀藻检测,以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0Tris-HCl 为空白对照;所述蛋白是一个的单链蛋白,分子量大小为  $14.5\text{kD}$ 。

## 蛋白类杀藻化合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种杀藻化合物,尤其是涉及一种蛋白类杀藻化合物及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 赤潮的频繁发生在造成海洋生态系统巨大破坏的同时,也给各国经济带来巨大损失。由于物理和化学方法治理赤潮存在难以大面积施用及易造成二次污染等原因,利用生物相互之间的生态作用来治理赤潮已成为当前研究热点。

[0003] 近年来,围绕海洋细菌在赤潮生消过程中的作用,科学家做了大量关于菌藻关系的研究。研究表明,海洋细菌同赤潮藻类之间存在错综复杂关系:一方面表现为互利共生,细菌吸收藻类产生的有机物质,并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子,从而调节藻类的生长;另一方面表现为特异性抑制甚至杀灭,细菌可以通过直接或间接的作用抑制藻类的生长,甚至裂解藻细胞,从而表现为杀藻效应。藻菌共培养的研究结果表明,杀藻细菌的作用方式可以归结为两种:一是细菌同藻细胞直接接触、导致藻细胞死亡的直接杀藻作用;二是细菌不同藻细胞直接接触,而通过释放某种化学物质导致藻细胞死亡的间接杀藻作用。

[0004] 对于需要同目标藻直接接触才能表现杀藻作用的细菌,目前尚未见有关对其杀藻物质的研究报道,有可能是一些胞外酶如纤维素酶、蛋白酶、酯酶等,细菌通过释放胞外酶,破坏藻细胞细胞壁、细胞膜,从而杀死藻细胞([1] 杨小茹. 海洋高效杀藻菌及其活性物质的研究 [M]. 厦门:厦门大学出版社,2008;[2] Su JQ, Yang XR, Zheng TL. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against a toxic algae. *Harmful Algae*, 2007, 6(6):799-810)。

[0005] 对于不需要同目标藻直接接触而表现杀藻作用的细菌,目前所发现的杀藻细菌多数属于该类,其一般是通过分泌溶解性杀藻物质杀死藻细胞,这些胞外活性物质包括胞外酶、表面活性剂、抗生素等([3] 苏建强. 海洋高效杀藻菌及其活性物质的研究 [M]. 厦门:厦门大学出版社,2006)。

[0006] 如 Lee 等([4] Lee, S. O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., Ohtake, H. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10):4334-4339) 从 *Pseudoalteromonas* A25 菌株培养滤液中分离到一种能杀死骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 的胞外蛋白酶,该蛋白水解酶为单体蛋白,分子量约为 50kD, N 末端的氨基酸序列经测定为 Ala-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro; Amaro 等分离到的杀藻细菌的培养液表现出多种胞外酶活性和杀藻活性,表明其可能是通过胞外酶来杀死藻细胞。

[0007] 随着对海洋认识的提高,现代生物技术的飞速发展,研究中深度与广度的结合,使得近年来海洋活性蛋白多肽的实际应用体系得到良好建构与改进。由于来源丰富、结构新颖、活性独特,因此逐步实现了海洋蛋白在工业养殖业、医药卫生、环境保护等领域中的应

用。

[0008] 至今为止,大多数筛选到的杀藻细菌是通过分泌特异的具有杀藻活性的物质来起杀藻作用的。已经报道的杀藻活性物质包括:色素、多肽、氨基酸、抗生素、含氮化合物等其他尚未定性的杀藻化合物。通过筛选高效、专一、能够生物降解的杀藻活性物质成为开发杀藻剂用于赤潮治理的一个新思路。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种蛋白类杀藻化合物及其制备方法。

[0010] 所述蛋白类杀藻化合物是从一株海洋细菌假单胞交替菌 DHQ25 (*Pseudoalteromonas* sp. DHQ25) 分离获得,所述假单胞交替菌 DHQ25 (*Pseudoalteromonas* sp. DHQ25) 已于 2010 年 8 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO :M2010210,中国典型培养物保藏中心的地址为中国武汉武汉大学。

[0011] 所述假单胞交替菌 DHQ25 是由来自长江口海水样品中筛选得到。

[0012] 所述蛋白类杀藻化合物的制备方法包括以下步骤:

[0013] 1) 将假单胞交替菌 DHQ25 活化后,接种于液体培养基中培养,将培养液离心,取上清过滤后,进行无菌检验,得到假单胞交替菌 DHQ25 的无菌培养滤液,再进行超滤处理,收集超滤液;

[0014] 在步骤 1) 中,所述液体培养基可采用 2216E 液体培养基;所述培养的条件可为 25℃ 180rpm 培养 24h;所述培养液离心,可采用 8000g 离心 10min;所述过滤,可采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤;所述无菌培养滤液的 pH 值可为 8.1 ~ 8.4。

[0015] 2) 超滤后上清液经分离纯化,收集其中的 8 个组分,各组分冻干成粉,分别对各组分进行杀藻活性检测,取具有杀藻活性的 3 个组分,记为 P5、P6 和 P7,检测各组分中的蛋白条带数,其中 P7 经 SDS-PAGE 检测,显示出一条带,再将 P7 的冻干粉重溶,透析除盐,进 HPLC 重新分离纯化;

[0016] 在步骤 2) 中,所述分离纯化,可采用 Varian C18-HPLC 分离纯化,以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂;所述对各组分进行杀藻活性检测,可以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为空白对照;所述 P7 的冻干粉重溶,可以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为溶解液,所述透析除盐,可用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为透析液。

[0017] 3) P7 再进行分离纯化,共分离出两个峰,记为 P71 和 P72,冻干处理,重新溶解,透析除盐,进行杀藻检测,其中 P71 具有杀藻活性,经 SDS-PAGE 还原和非还原处理后都显示是 P71 一条带,P71 经原位 PAGE 鉴定是单条带的纯蛋白;

[0018] 在步骤 3) 中,所述分离纯化,可采用 Agilent C18-HPLC 分离纯化,以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂;所述重新溶解,可用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 重新溶解,控制浓度 10mg/L;所述透析除盐,可用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为透析液;所述杀藻检测,可以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为空白对照;所述蛋白是一个的单链蛋白,分子量大小为 14.5kD,说明 P71 里不存在同分异构体,其所在的峰是一个纯峰。

[0019] 4) P71 经 ESI-MS/MS 鉴定分析,得知分子式为 C<sub>610</sub>H<sub>971</sub>N<sub>209</sub>O<sub>181</sub>S<sub>2</sub>,其氨基酸序列如下:

[0020] Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 [0021] 1 5 10 15  
 [0022] Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 [0023] 20 25 30  
 [0024] His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Ser Gly  
 [0025] 35 40 45  
 [0026] Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His Thr Arg  
 [0027] 50 55 60  
 [0028] Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln Arg Thr Gln Asp  
 [0029] 65 70 75 80  
 [0030] Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr  
 [0031] 85 90 95  
 [0032] Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe  
 [0033] 100 105 110  
 [0034] Ser Trp Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Ile Ala Arg Arg  
 [0035] 115 120 125

[0036] 本发明应用活体荧光染色剂荧光素双醋酸酯 FDA 对活体塔玛亚历山大藻细胞进行染色,进行杀藻活性试验,以杀藻效率为导向进行杀藻活性物质的提取纯化和制备。方法是:塔玛亚历山大藻于三角瓶中培养至指数期,然后分装到 12 孔细胞培养板中,每孔分装 4mL 均匀藻细胞悬液,适应生长 1 ~ 2d,进行杀藻活性试验。根据以下公式计算杀藻效率:杀藻率(%) = (Nc-Nt)/Nc × 100 (Nc 表示加入 2216E 藻细胞培养基对照组的活藻细胞数, Nt 表示加入无菌培养滤液对照组或不同处理方式无菌培养滤液实验组的活藻细胞数)。

[0037] 本发明通过超滤和反相高效液相两种手段从海洋细菌 DHQ25 中分离纯化得到一种蛋白类杀藻化合物,利用电喷雾质谱、ESI-MS/MS 质谱等鉴定,经 Mascot 检索发现其一级结构与髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 有最高的匹配度,这也是首次发现蛋白类化合物对塔玛亚历山大藻具有杀藻活性。

[0038] 本发明联合运用超滤体系和高效液相色谱分离体系(依次用 Varian C18-HPLC 高效液相和 Agilent C18-HPLC 高效液相)来进行制备。

#### 附图说明

[0039] 图 1 为 Varian C18-HPLC 高效液相图。在图 1 中, A 为液相谱图,横坐标为时间 (min),纵坐标为 OD 值 (280nm) (mAU);各谱峰从左至右依次为 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8; B 为 P7 和超滤液的 SDS-PAGE 图,其中,“原”表示超滤液。

[0040] 图 2 为 Agilent C18-HPLC 高效液相图。在图 2 中,横坐标为时间 (min),纵坐标为 OD 值 (280nm) (mAU);其中 2 个谱峰为 P7 再进行分离纯化所得,记为 P71 和 P72。

[0041] 图 3 为 P71SDS-PAGE 电泳图谱。在图 3 中, M 表示标准分子量, 1 表示还原处理后 P71, 2 表示非还原处理后 P71。

[0042] 图 4 为 P71 的原位 PAGE 电泳图谱。在图 4 中,箭头指向为 P71。

## 具体实施方式

[0043] 以下实施例是对本发明的进一步说明。

[0044] 1) 海洋细菌 DHQ25 活化后,接种于 2216E 液体培养基中,25℃ 180rpm 培养 24h,培养液 8000g 离心 10min,上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,平板涂布进行无菌检验,可得到 DHQ25 无菌培养滤液,其 pH 值为 8.1 ~ 8.4。对该无菌培养滤液进行超滤处理,收集超滤液 4℃ 保存。所有操作均在 4℃ 下进行。

[0045] 2) 超滤后上清液经 Varian C18-HPLC 分离纯化(以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂),收集其中的 8 个组分(对应于图 1A 中的谱峰 P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8),各组分冻干成粉,分别对各组分进行杀藻活性检测,发现 P5、P6 和 P7 有杀藻活性(以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为空白对照),其余各峰未检测到活性或活性较低。SDS-PAGE 检测各峰中的蛋白条带数,P7 显示出一条带(如图 1B),而原位 PAGE 表征后发现 P7 含有两个条带,P7 的冻干粉重溶(以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为溶解液),透析除盐(用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为透析液),进 HPLC 重新分离纯化。

[0046] 3) P7 再经 Agilent C18-HPLC 进行分离纯化(以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为洗脱剂),共分离出 2 个峰(参见图 2),收集这两个峰,冻干处理,并用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 重新溶解(控制浓度 10mg/L),透析除盐(用 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为透析液),进行杀藻检测(共培养一天后检测,以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为空白对照)。其中 P71 具有杀藻活性,经还原和非还原处理后都显示是 P71 一条带(参见图 3),说明该蛋白是一个的单链蛋白,分子量大小为 14.5kD ;P71 经原位 PAGE 鉴定是单条带的纯蛋白,说明 P71 里不存在同分异构体,其所在的峰是一个纯峰(如图 4)。

[0047] 4) P71 经 ESI-MS/MS 鉴定分析,得知分子式为 C<sub>610</sub>H<sub>971</sub>N<sub>209</sub>O<sub>181</sub>S<sub>2</sub>,氨基酸序列如下:

[0048] Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu

[0049] 1 5 10 15

[0050] Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg

[0051] 20 25 30

[0052] His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Ser Gly

[0053] 35 40 45

[0054] Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His Thr Arg

[0055] 50 55 60

[0056] Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln Arg Thr Gln Asp

[0057] 65 70 75 80

[0058] Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr

[0059] 85 90 95

[0060] Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe

[0061] 100 105 110

[0062] Ser Trp Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Ile Ala Arg Arg

[0063] 115 120 125

[0064] 以下给出具体实施例。

[0065] 1. 菌种、藻种

[0066] 菌种 :DHQ25 来源于厦门大学资源与环境微生物研究所于 2003 年赤潮 973 项目 MC2003-2 航次从长江口及其毗邻海域海水样品中(包括表层、中层和底层)分离,是一株具有杀藻作用的弧菌。

[0067] 藻种 :*Alexandrium tamarense* (AT) 无菌株,藻种购自暨南大学水生生物研究所,经本申请人无菌藻技术除菌得到的塔玛亚历山大藻无菌株。藻类所用培养液为 f/2 培养液。藻类置于室内三角瓶中培养,温度为  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照条件为 12h 光照,12h 黑暗。

[0068] 2. 培养基

[0069] 培养基 (2216E) :蛋白胨 (Peptone) 5g,酵母提取物 (YeastExtract) 1g,磷酸高铁 0.1g,琼脂粉 10g(固体培养基),pH7.6 ~ 7.8,陈海水定容到 1L。

[0070] 实施例 1 :荧光素双醋酸酯 FDA 的藻细胞染色与杀藻效率计算

[0071] 将荧光素双醋酸酯 FDA 溶于丙酮中,配成浓度为 5mg/mL 的溶液,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中避光保存。染色时,取 200  $\mu\text{L}$  样品(不同处理均匀藻细胞培养液)于 1.5mL 离心管中;加入荧光素双醋酸酯 FDA 4  $\mu\text{L}$ ,使其终浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,室温静置染色 5min 后,放入冰盒避光待镜检;染色样品混匀后,取 20  $\mu\text{L}$  于藻细胞计数板,用荧光显微镜在蓝光激发光下 (495nm) 和可见光下分别进行观察计数,发出亮绿色荧光的细胞为活细胞,计数 3 次,取平均值。根据以下公式计算杀藻效率:

[0072] 杀藻率 (%) =  $(N_c - N_t) / N_c \times 100$

[0073] 其中  $N_c$  表示加入 2216E 对照组的活藻细胞数,  $N_t$  表示加无菌培养滤液对照组或不同处理方式无菌培养滤液实验组的活藻细胞数。

[0074] 实施例 2 :蛋白类活性物质杀藻谱的研究

[0075] P71 杀藻谱(参见表 1)表现出一定的特质(共培养一天后检测,以  $20\text{mmol L}^{-1}$  pH 8.0 Tris-HCl 为空白对照),它在 Dinoflagellata 和 Bacillariophyta 中起作用较大,而在另外两个属中,则没有检测到杀藻活性。

[0076] 表 1P71 杀藻谱



	藻种名称	无菌处理	P71 杀藻率 (%)
	盐生杜氏藻	无菌	—
	微小原甲藻	无菌	—
	自养小球藻	无菌	—
	海洋卡盾藻	无菌	—
	青岛大扁藻	无菌	26.8±11.5
	小球藻	无菌	—
	威氏海链藻	无菌	—
	东海原甲藻	无菌	10.4±9.5
[0077]	热带骨条藻	无菌	—
	中肋骨条藻	无菌	—
	链状亚历山大藻	无菌	14.9±12.6
	微小亚历山大藻	无菌	24.8±10.3
	三角褐指藻	无菌	43.8±6.3
	塔玛亚历山大藻	无菌	36.3±4.0
	塔玛亚历山大藻 02	有菌	30.4±7.2
	球形棕囊藻	无菌	—
	叉鞭金藻	无菌	—
	球等鞭金藻	无菌	—

[0078] 实施例 3 :活性蛋白浓度依赖性分析

[0079] 当 P71 稀释 2 倍时,活性迅速降至 5%,基本无活性,这个数据显示该蛋白的活性具有明显的浓度依赖性特性(共培养一天后检测,以 20mmol L<sup>-1</sup>pH 8.0Tris-HCl 为空白对照)。

[0080] 表 2 浓度依赖性分析

	浓度梯度(×12 uM)	杀藻率 (%)
	2 <sup>0</sup>	46
[0081]	2 <sup>-1</sup>	—
	2 <sup>-2</sup>	—
	2 <sup>-3</sup>	—
	2 <sup>-4</sup>	—

[0082] 以下给出假单胞交替菌 DHQ25 的筛选方法:

[0083] 1) 将从长江口海域海水样品中(包括表层、中层和底层)分离获得的 13 株能够杀灭有毒赤潮藻 *Alexandrium tamarense* 的细菌作为出发菌株,培养 14 ~ 18h 到稳定期,离心获得培养上清液;采用的培养基(2216E)的配方为:蛋白胨(Peptone)5g,酵母提取物(Yeast Extract)1g,磷酸高铁 0.1g,琼脂粉 10g(固体培养基),pH7.6-7.8,陈海水定容到

1L。

[0084] 2) 取步骤 1) 所得的部分培养上清液孵化后进行杀藻活性检测, 得到 6 株具有杀藻活性的细菌, 分别记为 HH2、DHY3、DHY11、DHY20、DHY36、DHQ28; 所述孵化的条件为在 100 ~ 110℃ 下孵化 30 ~ 40min。

[0085] 进行杀藻活性检测的藻株 *Alexandrium tamarense* (AT) 购自暨南大学水生生物研究所, 经本申请人无菌藻技术除菌得到的塔玛亚历山大藻无菌株 (参见中国专利 CN1887353)。藻类所用培养液为 f/2 培养液。藻类置于室内三角瓶中培养, 温度为 20±1℃, 光照条件为 12h 光照, 12h 黑暗。

[0086] 3) 取步骤 1) 所得的另一部分培养上清液经超滤, 取超滤后的上清液进行杀藻活性检测, 得到 6 株具有杀藻活性的细菌, 分别记为 HH5、DHY3、DHY28、DHQ5、DHQ19、DHQ25; 所述超滤采用超滤离心管 5000g 下超滤离心 1.5h, 所述超滤离心管选用 3kD 超滤离心管 (参见表 3)。

[0087] 4) 挑选出具有杀藻活性的细菌 DHQ25, 即为假单胞交替菌 DHQ25 (*Pseudoalteromonassp.* DHQ25)。

[0088] DHQ25 在超滤处理后保留了杀藻活性, 在 100℃ 高温处理后失去了杀藻活性, 而超滤液在蛋白质特征反应 (茚三酮试剂反应) 中呈阳性特性, 显示是蛋白 / 多肽 / 氨基酸类物质, 表明 DHQ25 是一株能产胞外杀藻活性蛋白的海洋细菌。

[0089] 表 3

	菌株	上清液	100℃处理的上清液	超滤处理的上清液(3kD)
	HH2	+	+	
	HH5	+		+
	DHY3	+		+
	DHY11	+	+	
	DHY20	+	+	
	DHY28	+		+
[0090]	DHY31	+		
	DHY36	+	+	
	DHQ4	+		
	DHQ5	+		+
	DHQ17	+		
	DHQ19	+		+
	DHQ25	+		+
	DHQ28	+	+	

[0091] DHQ25 培养液杀藻活性的检测如下:

[0092] 荧光素双醋酸酯 (FDA) 配成浓度为 5mg/mL 的溶液, 置于 4℃ 冰箱中避光保存。染色时, 取 200 μL 样品 ( 不同处理均匀藻细胞培养液 ) 于 1.5mL 离心管中 ; 加入荧光素双醋酸酯 FDA 4 μL, 使其终浓度为 100 μg/mL, 室温静置染色 5min 后, 放入冰盒避光待镜检 ; 染色样品混匀后, 取 20 μL 于藻细胞计数板, 用荧光显微镜在蓝光激发光下 (495nm) 和可见光下分别进行观察计数, 发出亮绿色荧光的细胞为活细胞, 发出红色荧光的细胞为死细胞, 计数活细胞 3 次, 取平均值。根据以下公式计算杀藻效率 :

[0093] 杀藻率 (%) =  $(N_c - N_t) / N_c \times 100$

[0094] 其中,  $N_c$  表示加入 2216E 对照组的活藻细胞数,  $N_t$  表示加无菌滤液对照组或不同处理方式无菌滤液实验组的活藻细胞数。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 厦门大学

&lt;120&gt; 蛋白类杀藻化合物及其制备方法

&lt;130&gt; 2010

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 11

&lt;400&gt; 1

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
1                    5                    10                    15  
Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
                  20                    25                    30  
His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Ser Gly  
                  35                    40                    45  
Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His Thr Arg  
                  50                    55                    60  
Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln Arg Thr Gln Asp  
65                    70                    75                    80  
Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr  
                  85                    90                    95  
Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe  
                  100                    105                    110  
Ser Trp Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Ile Ala Arg Arg  
                  115                    120                    125

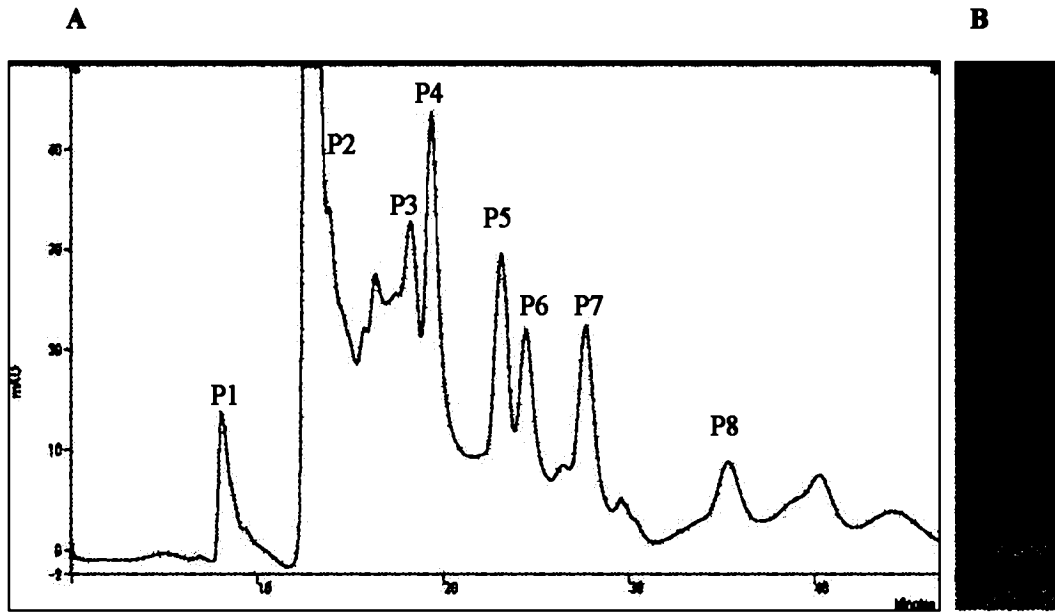


图 1

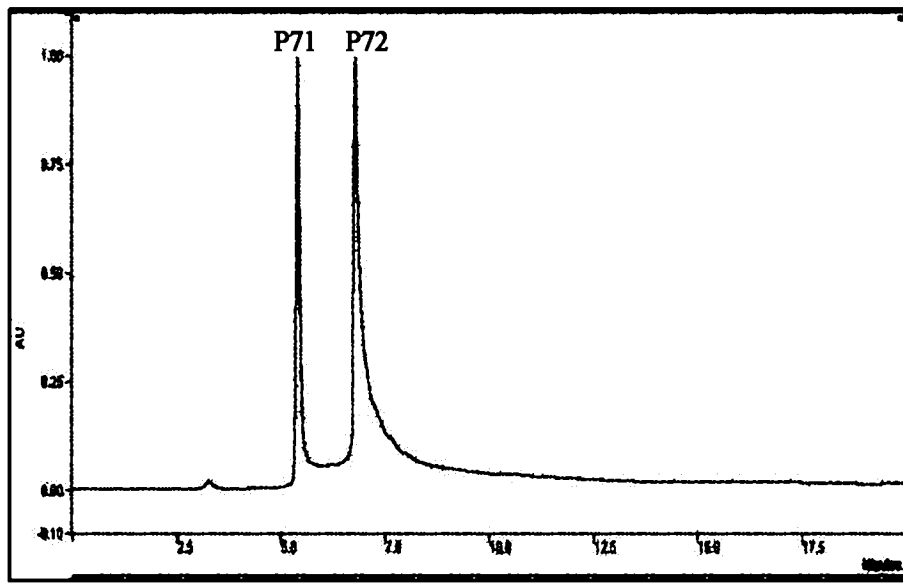


图 2

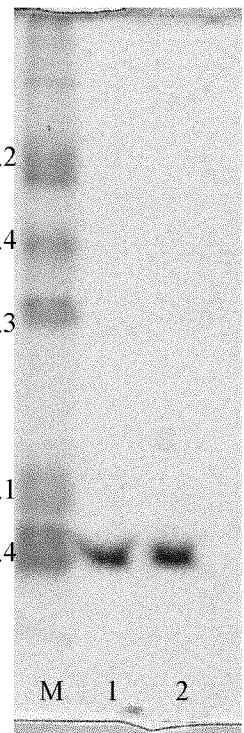


图 3

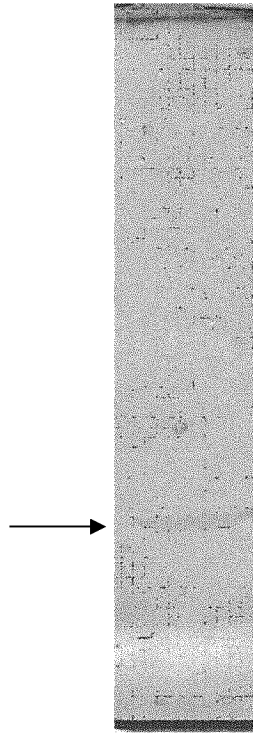


图 4