

枯草芽孢杆菌紫外诱变异甘露聚糖酶基因突变的研究

穆昭艳,汪立平,赵勇,王娜,李安雪,汪欣

(上海海洋大学,上海 201306)

摘要: 异甘露聚糖酶是制备益生元甘露寡糖的关键酶。对分泌异甘露聚糖酶枯草芽孢杆菌 K-6(*Bacillus subtilis* K-6) 的紫外诱变正突变株 K-6-9(*Bacillus subtilis* K-6-9) 的诱变机理进行了研究。通过对出发菌株和正突变株的异甘露聚糖酶基因进行克隆和表达,以生物信息学的方法对异甘露聚糖酶基因序列和蛋白序列进行分析,得到突变株的突变碱基以及突变氨基酸。基因序列研究结果显示,突变体的总碱基突变频率为 1.02%,碱基突变类型包括碱基的颠换、转换。在检测到的 11 个碱基突变中,转换的频率(54.5%)是颠换频率(45.5%)的 1.2 倍,其中 C/T 之间的转换所占比例最大,A-G 和 A-T 也具有较高的替换频率,说明胸腺嘧啶(T)具有较高的辐射敏感。通过蛋白序列的比较分析,有 2 个氨基酸发生突变,由第 21 位保守氨基酸脯氨酸变异为非保守氨基酸丝氨酸,第 23 位非保守氨基酸丝氨酸变异为保守氨基酸谷氨酸。综合分析表明:保守区氨基酸与非保守区氨基酸的相互突变可能对其蛋白的正确组装及功能的发挥起重要作用。

关键词: 异甘露聚糖酶;紫外线诱变;基因克隆;突变

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)04-0036-06

Study on Frequency of Isomannanase Locus Mutation in *Bacillus subtilis* Induced by UV

MU Zhao-yan, WANG Li-ping, ZHAO Yong, WANG Na, LI An-xue, WANG Xin
(Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Isomannanase is the key enzymes of making probiotics-Mannan oligosaccharides(MOS). A *Bacillus subtilis* K-6 strain that can secret isomannanase preserved in the laboratory was induced by UV. The mutation mechanism of a positive mutant K-6-9 was studied. Initial *Bacillus subtilis* K-6 and positive mutant *Bacillus subtilis* K-6-9 was cloned and expressed, then analyzed the gene and protein sequence of isomannanase mutation gene by bioinformatics, the total base mutation and amino acids mutations of the mutants obtained. The results indicated that the total base mutation rate of mutants was 1.02%, the types of base changes included base transition and transversion. Among the 11 base mutations that had detected, the frequency of base transitions(54.5%) was 1.2 times higher than the base transversions(45.5%), the transitions between C and T accounted for largest proportion, A-G transitions and A-T transversions were also interchanged at high frequency. After of protein sequences, there were two point mutation forms, which were Pro (conservative amino acid) -Ser (non-conservative amino acid) at 21nt and Ser (non-conservative amino acid) -Glu (conservative amino acid) at 23nt. From a comprehensive and comparative data analysis, the mutual mutations between conservative amino acid and non-conservative amino acid may play an important role in proteins assemble correctly and execute their function effectively.

Key words: Isomannanase; UV-mutation Cloning; Mutation

甘露聚糖酶是一种内切水解酶^[1],作用底物主要是甘露聚糖,其主要水解产物为单糖、二糖、三糖、四糖等低聚糖^[2]。根据其作用底物不同,甘露聚糖酶可分为 β -甘露聚糖酶和异甘露聚糖酶^[3],经甘露

聚糖酶水解得到的甘露寡糖经研究发现对动物的生长发育具有一系列积极作用,如促进动物生长、提高动物的饲料转化效率^[4-6];促进消化,改善动物肠道微生物生态环境及健康状况^[7];促进动物肠道有益

收稿日期:2012-03-25

基金项目:上海市教育委员会项目(07ZZ137);上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704)

作者简介:穆昭艳(1986-),女,吉林白山人,在读硕士,主要从事食品微生物、生物技术研究。

通讯作者:汪立平(1968-),女,湖南衡山人,副教授,博士,主要从事功能性低聚糖、酿酒科学与技术研究。

菌的生长^[8]; 提高机体免疫活性和抑制肿瘤生长^[9-10]; 能够吸附真菌毒素, 减少抗生素等化学药物的使用是生产绿色动物食品的添加剂^[11]。作为一种新型的饲料添加剂, 酶制剂在饲料工业中表现出巨大的潜在价值, 因而越来越受到饲料营养界的重视。

微生物的诱变育种是一种改良微生物菌种提高酶分泌量的重要手段, 它以人工诱变手段诱发微生物基因突变改变遗传结构和功能。过去, 采用紫外诱变枯草芽孢杆菌^[12-13]来提高微生物酶活的研究较多, 而有关诱变后对突变菌株进行分子机理的研究较少。虽然物理诱变具有很多优点^[14], 但同时也存在许多问题, 如有益突变频率仍然较低, 变异的方向和性质具有盲目性。诱变因素有物理因素和化学因素, 物理因素中的 α 粒子、 β 粒子、 γ 射线、 x 射线、和中子都可以对DNA产生大量的、种类繁多的DNA损伤^[15-16]: 如碱基修饰、AP位点、链断裂等^[17-21]。Jian Wu等^[22]分别用紫外线、 $^{60}\text{Co-}\alpha$ 和氮离子束诱变庆大霉素产生菌 *Micromonospora purpurea*。其结果为紫外线的诱变效果不是很理想, 但连续诱变之后效果提高并且正突变率较高; $^{60}\text{Co-}\alpha$ 辐照有很强的致突变作用, 但负突变太多; N^+ 注入可得到较高的突变率, 且正突变率较高。紫外线的剂量-存活率曲线为指数曲线, 随剂量的升高存活率下降。将紫外诱变育种与分子生物学和生物信息学结合, 弥补了紫外诱变育种的不足, 还可以推测出相应的保守区氨基酸与结构域等; 紫外诱变育种也可以为分子育种的定点突变等提供理论基础, 为快速定向地获得高活性等类型的突变体开辟了新的途径。两者相结合互补, 可以大大提高育种的效果, 这方面研究还未见详细报道。

本试验对分泌异甘露聚糖酶枯草芽孢杆菌 K-6 (*Bacillus subtilis* K-6) 及其紫外诱变正突变株 K-6-9 (*Bacillus subtilis* K-6-9) 的异甘露聚糖酶基因进行克隆和表达, 并利用生物信息学对克隆测序结果进行分析, 初步得到该枯草芽孢杆菌的紫外诱变的分子机理, 为进一步筛选高酶活异甘露聚糖酶菌株以及该菌株的定点突变提供分子水平上的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 (*Bacillus subtilis* K-6) 及紫外诱变突变株 K-6-9 (*Bacillus subtilis* K-6-9) 由本试验室保藏; 克隆质粒 PBS-T II, 大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10, BL21 购自天根公司。本试验于 2011 年 6 月在上海海洋

大学食品学院完成。

1.1.2 主要试剂 *Bam*H I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶及蛋白质低分子量标准均购自宝生生物工程有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、普通质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒、X-Gal、IPTG、*Taq* PCR Master Mix、1 kb DNA Ladder Marker 等 DNA 分子量标准购自天根公司; 琼脂粉、酵母浸膏、蛋白胨等均购自国药集团化学试剂有限公司; 酵母细胞壁为实验室自制^[23]。

1.1.3 培养基 LB 基础培养基(%) : 蛋白胨 1.0, 酵母提取物 0.5, NaCl 0.5, 调节 pH 值 7.4~7.6; 菌种保藏培养基(%) : 酵母细胞壁 0.3, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, pH 值 7.0~7.2。

1.1.4 主要仪器设备 PCR 仪(杭州博日科技), 台式高速冷冻离心机(Beckman), 凝胶成像系统(Bio-Rad), 电热恒温水浴槽, 漩涡混合器, 全温振荡培养箱, 紫外可见分光光度计。

1.2 异甘露聚糖酶基因的克隆

1.2.1 菌体的培养 将枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 (*Bacillus subtilis* K-6) 及紫外诱变突变株 K-6-9 (*Bacillus subtilis* K-6-9) 进行液体培养, 以 1% 的接种量接到 LB 基础培养基中, 37℃, 180 r/min 培养到对数生长期 OD_{600} 约为 0.6~0.8, 备用。

1.2.2 总 DNA 的提取 枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 总 DNA 的提取参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作手册进行。

1.2.3 引物的设计合成 出发菌株: 据 GeneBank 中枯草芽孢杆菌甘露聚糖酶的基因, 设计特异性引物(在引物中引入适当的限制性酶识别序列) 如下: (F) 5'-CGGGATCCATGCTTAAAAAGTTAGCAGTCTGC-3' (*Bam*HI) 和 (R) 5'-GCAAGCTTTTATTCGCGATCG-GCGTC-3' (*Hind* III), 由上海生工公司合成。

突变株: 据 Genebank 中枯草芽孢杆菌甘露聚糖酶的基因, 设计简并特异性引物(在引物中引入适当的限制性酶识别序列) 如下: (F) 5'-CGGGATC-CCGATTGAAGCACATACAGTTTATCCNGTNAAYCC-3' (*Bam*H I) 和 (R) 5'-GCAAGCTTCCATTCCAAATTTCGCCTTTTTRTTNARNGTCCA-3' (*Hind* III), 由上海生工公司合成。

1.2.4 异甘露聚糖酶基因的克隆 分别以提取的枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 总 DNA 为模板, 25 μL PCR(聚合酶链式反应)体系扩增异甘露聚糖酶基因。扩增条件: 95℃预变性 4 min, 94℃变性 45 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸合成 1 min, 共 30 个循环后, 72℃最后延伸

合成 5 min。同时以灭菌双蒸水作为阴性对照。将扩增出预期大小的目的基因切胶回收,与 PBS-T II 载体连接,转入感受态细胞 *E. coli* TOP10 中,获得阳性克隆由上海生工公司代测序。

1.2.5 异甘露聚糖酶基因的表达 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 作为插入目的基因的酶切位点,分别对枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 提取的质粒和 pET-30(a) 进行双酶切后回收酶切产物。将酶切产物连接后转化到感受态细胞 *Escherichia. coli* BL21(DE3) 中。加入卡那霉素(Kan) 筛选阳性克隆转化子,经测序表明克隆正确,将重组表达载体 pET-M 和 pET-M' 转化到感受态大肠杆菌宿主菌 BL21(DE3) 中,获得的阳性菌用 12% SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 电泳检验。

1.2.6 异甘露聚糖酶活力测定 发酵液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为粗酶液,采用 DNS 法测定酶活力^[24]。用 0.1 mol/L 柠檬酸和 0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液配置成 pH 值 6.5 的底物溶液 0.5 g/L。取底物缓冲液 0.9 mL 预热至 60℃,添加 0.1 mL 的粗酶液,60℃ 反应 10 min,加入 1 mL DNS 试剂,然后在沸水浴中显色 5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至 10 mL 摇匀,于 540 nm 波长处测定 OD 值,从标准曲线上查得相应的 D-甘露糖含量,计算出甘露聚糖酶活力。甘露聚糖的定义为:底物每分钟释放出相当于 1 μmol D-甘露糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3 突变株分子机理的分析

1.3.1 突变株碱基突变分析 将枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 的异甘露聚糖酶基因测序结果在 NCBI 上用 BLAST 进行比较,检出碱基突变类型。

1.3.2 突变株蛋白质理化性质及结构预测 将枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 的异甘露聚糖酶基因编码序列全长翻译成氨基酸序列。利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对紫外诱变突变株 K-6-9 的异甘露聚糖酶氨基酸序列进行理化性质的推测,并且采用 NPS 中 GOR4 对突变株异甘露聚糖酶二级结构进行分析。在 NCBI 网站里的 BLAST 中 Basic Local Alignment Search Tool 工具下对异甘露聚糖酶蛋白质保守结构域进行预测。通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 Blast 进行核酸和蛋白序列相似性检索。使用 Clustal W (Version 1.83) 软件对挑选出不同来源与异甘露聚糖酶同源性最高的 3 种甘

露聚糖酶进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 异甘露聚糖酶基因的克隆与表达

枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 总 DNA 中 PCR 扩增异甘露聚糖酶基因后,挑取的阳性克隆转化子送到上海生工公司进行序列测定。测定结果表明,枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6,该片段全长 1 083 bp,编码 360 个氨基酸。通过 BioEdit 软件将目的基因序列翻译成蛋白质序列后预测其大小约为 42 kDa,加上表达载体上的组氨酸序列约为 45 kDa。经过 12% SDS-PAGE 电泳检测,结果显示在 45 kDa 处出现明显异甘露聚糖酶表达带。重组载体测序结果已提交到 GenBank,其登录号为: HQ902141。紫外诱变突变株 K-6-9 中异甘露聚糖酶基因 DNA 片段全长 1 083 bp,编码 360 个氨基酸。通过 BioEdit 软件将目的基因序列翻译成蛋白质序列,并预测其大小约为 42 kDa,加上表达载体上的组氨酸序列约为 45 kDa。经过 12% SDS-PAGE 电泳检测,结果显示,在 45 kDa 处出现明显异甘露聚糖酶表达带。重组载体测序结果已提交到 GenBank,其登录号为: JN850956。

2.2 突变株 DNA 碱基变异情况分析

突变株中的异甘露聚糖酶克隆出 1 083 个碱基中,碱基突变位点为 11 个,碱基变异率为 1.02%。由于紫外诱变突变株与未紫外诱变对照组的所有实验条件都一样,排除一些 PCR 反应条件和测序误差的影响,可以初步认为,枯草芽孢杆菌紫外诱变突变株与未紫外诱变对照组相比,确实在 DNA 序列上发生了变异。碱基突变类型见表 1。由表 1 可知:碱基突变类型包括碱基的颠换、转换。在碱基置换中,转换的频率(54.5%) 是颠换频率(45.5%) 的 1.2 倍。构成 DNA 的 4 种碱基均可以被紫外线诱变发

表 1 异甘露聚糖酶突变体 DNA 碱基突变的类型

Tab.1 The types of isomannanase nucleotide mutations by UV

碱基突变的类型 Mutation type	发生次数 Number of occurrence	突变频率/% Mutation frequency
碱基置换 Base substitution	11	100.0
转换 Transition	6	54.5
C-T	5	45.5
G-A	1	9.1
颠换 Transversion	5	45.5
T-A	1	9.1
A-T	1	9.1
T-G	1	9.1
C-A	2	18.2
总计 Total	11	100.0

生变异,其中 C/T 之间的转换所占比例最大,胞嘧啶(C)发生变异 7 次,胸腺嘧啶(T)发生变异 2 次,腺嘌呤(A)发生变异 1 次,鸟嘌呤(G)发生变异 1 次。相对而言,胞嘧啶(C)具有更高的辐射敏感性^[25]。

2.3 突变株蛋白序列变异情况分析

2.3.1 出发菌株及突变株蛋白序列结构分析 分别将枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 异甘露聚糖酶基因翻译成氨基酸序列。利用 SignalP 3.0 软件网上分析系统对出发菌株及突变株中异甘露聚糖酶进行信号肽的研究,发现二者中异甘露聚糖酶末端均含有 24 个氨基酸残基为标准信号肽序列。利用丹麦技术大学穿膜区预测服务器 TMHMM 2.0 对 2 株菌进行跨膜区的预测,结果显示,出发菌株及突变株中异甘露聚糖酶均没有典型跨膜区的存在,理论上为可溶性较好的球蛋白。采用 NPS 中 GOR4 对二者进行二级结构分析,在线预测结果表明,出发菌株中异甘露聚糖酶蛋白中 α -螺旋结构占 26.94%,无规则卷曲占 50.00%,

延长链占 23.06%。而正突变株中异甘露聚糖酶蛋白中有 α -螺旋结构占 28.89%, β -折叠结构占 11.67%,无规则卷曲占 36.67%,延长链占 22.78%。在蛋白质的二级结构中, α -螺旋和 β -折叠结构具高度稳定性,为蛋白质的有序结构;而 β -转角和无规则卷曲为蛋白质的无序结构,为此可将 α -螺旋和 β -折叠结构含量用于衡量蛋白质结构的稳定性^[26-27]。从上述可以得出,紫外诱变后的突变株中异甘露聚糖酶的蛋白质中有序结构高于无序结构,出发菌株中异甘露聚糖酶的蛋白质中有序结构低于无序结构,从而可以得知,诱变后突变株的蛋白结构相对出发菌株更稳定。蛋白质保守结构域预测是在 NCBI 网站里的 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)工具下完成的,图 1 显示了出发菌株及紫外诱变后异甘露聚糖酶全长蛋白质保守结构域的信息,可见二者中的异甘露聚糖酶蛋白呈现非常保守的纤维素酶超家族结构域的一级结构,进一步分析结果表明均属于糖水解酶第二十六家族。

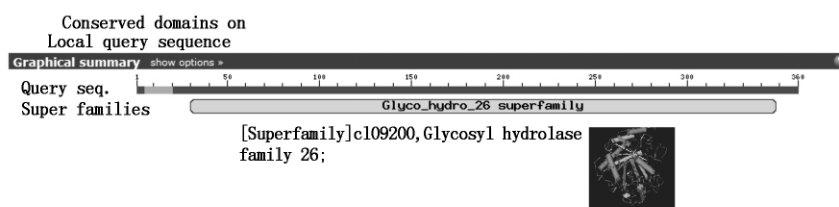
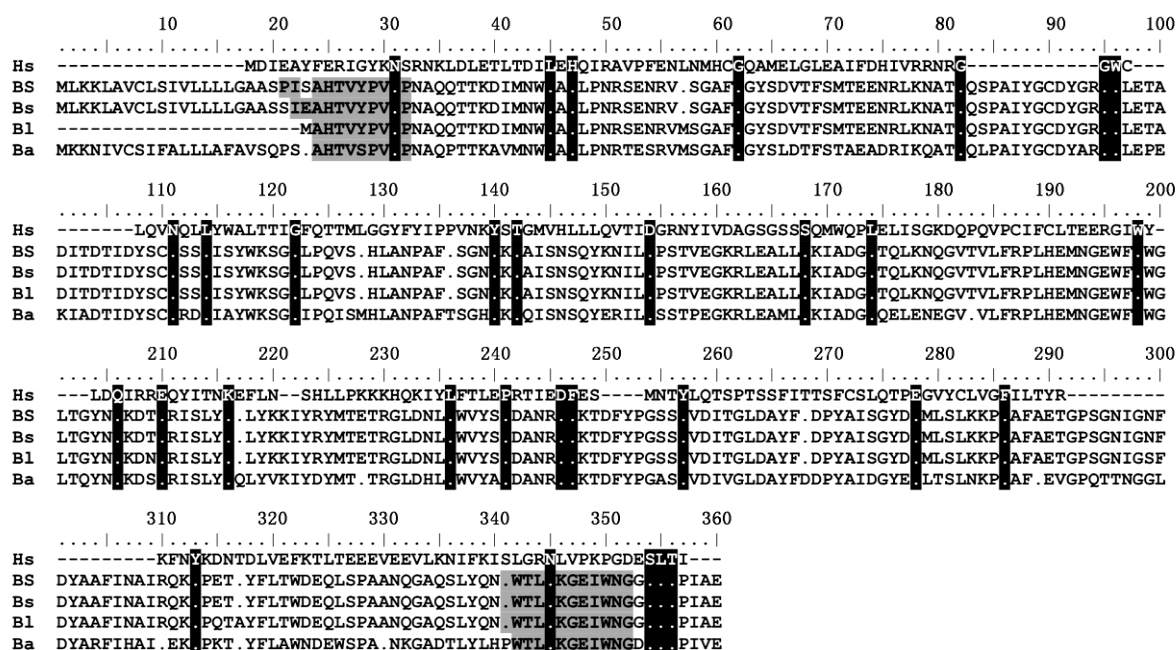


图 1 异甘露聚糖酶蛋白序列结构分析

Fig. 1 Protein structural analysis of isomannanase



Hs. GenBank accession No. DQ904091.1; BS. 未诱变的异甘露聚糖酶; Bs. 紫外诱变的异甘露聚糖酶;

B1. GenBank accession No. ACM44687.1; Ba. GenBank accession No. ABQ81811.1)。

Hs. GenBank accession No. DQ904091.1; BS. Isomannanase was not induced by UV;

Bs. Isomannanase was induced by UV; B1. GenBank accession No. ACM44687.1; Ba. GenBank accession No. ABQ81811.1.

图 2 异甘露聚糖酶蛋白序列对比

Fig. 2 Sequence of *Bacillus subtilis* with other known isomannanase

2.3.2 突变株蛋白质变异情况分析 将紫外诱变后突变株的异甘露聚糖酶蛋白序列和未诱变的异甘露聚糖酶蛋白序列与来源于其他微生物的分子量为 40 kDa 左右的异甘露聚糖酶蛋白序列进行比对。图 2 显示了紫外诱变突变株和未诱变的异甘露聚糖酶与其它微生物之间在甘露聚糖酶基因编码的氨基酸序列上的对比结果,可以发现,紫外诱变突变株与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* sp.) 之间显示了最高的序列同源性为 98%。由图的浅灰色阴影部分可以发现,在 N 和 C 末端显示了高度保守氨基酸区域 PISAHTUSPVNP 和 SWTLNKGEIWNG。参考其他纤维素酶的保守序列,以及 TmCel5A 和来自褐热单胞菌(*Thermobifida fusca* KW3) [28] 的 β -甘露聚糖酶 TlMan5A 的结构得知异甘露聚糖酶中的与发挥催化作用密切相关的保守氨基酸残基有 8 个,分别为 Arg46、His47、Asn100、Glu121、His190、Tyr202、

Glu231 和 Trp249; 其中,His47、Glu121、His190 和 Glu231 这 4 个氨基酸残基可能与催化机制密切相关 [29-30]。紫外诱变后突变株的异甘露聚糖酶蛋白序列与无诱变的异甘露聚糖酶蛋白序列同源性高达 99%。突变株蛋白质的氨基酸结构有 2 处发生突变,为第 21 个氨基酸由 P(脯氨酸)突变为 S(丝氨酸),第 23 个 S(丝氨酸)突变为 E(谷氨酸),氨基酸突变率为 0.6%。与甘露聚糖酶的保守氨基酸序列相比较,2 个突变点正位于 N 端的高度保守氨基酸区域中。

2.3.3 异甘露聚糖酶蛋白质理化性质分析 利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 Protparam 对出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 中异甘露聚糖酶基因编码蛋白的理化性质进行了预测。推断出的结果如表 2 所示。

表 2 异甘露聚糖酶出发菌株与突变株的理化性质的对比

Tab. 2 Compared physicochemical property of Initial and positive mutant isomannanase

理化性质 Physicochemical property	枯草芽孢杆菌 K-6 Bacillus subtilis K-6	诱变正突变株 K-6-9 Positive mutant Bacillus subtilis K-6-9
分子式 Molecular formula	C ₁₈₂₂ H ₂₇₅₇ N ₄₆₇ O ₅₄₉ S ₉	C ₁₈₂₂ H ₂₇₅₇ N ₄₆₇ O ₅₅₁ S ₉
等电点 Isoelectric point	5.36	5.25
分子量 Molecular weight	40 276.2	40 308.2
负电荷总数残基 Negative electric residue	(Asp + Glu) 36	(Asp + Glu) 37
正电荷总数残基 Positive charge	(Arg + Lys) 30	(Arg + Lys) 30
不稳定系数 Unsteady coefficient	30.93	31.47
脂肪系数 Fat coefficient	78.92	78.92
亲水性系数 Hydrophilic coefficient	-0.358	-0.363

结果显示,枯草芽孢杆菌紫外诱变出发菌株 K-6 及紫外诱变突变株 K-6-9 二者的理化性质基本相似,但诱变正突变株 K-6-9 异甘露聚糖酶的等电点,分子量及亲水性有细微的变化,这可能是因为第 23 位的丝氨酸不带有电荷而变异为的谷氨酸带有负电荷,所以导致诱变后的正突变株 K-6-9 的负电荷总数增加了 1 个,从而使诱变正突变株 K-6-9 中蛋白质等电点下降、分子量增大且疏水性增强。

2.4 突变株代谢产物的比对分析

根据方法 1.5.6 测的原始菌株酶活为 205.9 U/mL,紫外诱变突变株酶活为 349.3 U/mL,高于原始菌株 65.0%。紫外诱变突变株的酶活没有得到大幅度的提高可能是由于突变株的第 21 个氨基酸由 P(脯氨酸)突变为 S(丝氨酸)是由保守氨基酸突变为非保守氨基酸,而第 23 个 S(丝氨酸)突变为 E(谷氨酸)是由非保守氨基酸突变为保守氨基酸,从而相互抵消掉了突变对蛋白质的影响,进而酶活没有得到大幅度的提升。

3 结论与讨论

本试验研究了经紫外诱变的突变株和未经诱变的枯草芽孢杆菌菌株的异甘露聚糖酶基因组之间的差异。结果表明,枯草芽孢杆菌突变后编码异甘露聚糖酶的基因碱基序列出现了变化,这些变化的出现可能是由于紫外线的照射引起了结合位点的碱基突变,导致结合位点的减少或增加。通过对本试验中出现的碱基突变类型的分析,发现胸腺嘧啶(T)具有更高的辐射敏感性。另外,据报道,传统的辐射处理方法:紫外线、X 射线、以及 γ 射线等都可以导致 G/C-A/T 的发生 [31-32],与本试验结果 C/T 之间的替换所占比例最大为 45.5% 相一致。此外,以生物信息学手段,通过对枯草芽孢杆菌紫外诱变突变株蛋白序列的比较分析,第 21 位保守氨基酸脯氨酸变异为非保守氨基酸丝氨酸,而第 23 位非保守氨基酸丝氨酸变异为保守氨基酸谷氨酸。原始菌株与正突变株两者中异甘露聚糖酶末端均含有 24 个氨基

酸残基为标准信号肽序列,即信号肽酶切位点在第24位和25位氨基酸之间,正突变株的突变基因就位于标准信号肽序列内,成熟的异甘露聚糖酶很有可能要将N-端24个氨基酸切除。而前24位氨基酸的突变主要是影响酶的分泌,但诱变后正突变菌株的酶活却没有大幅度的提高,由此推断,可能是由于二者的突变会抵消掉氨基酸突变对异甘露聚糖酶蛋白结构的影响。在接下来的试验中,可以采取定点突变的方法进一步验证其结果。

参考文献:

- [1] Schomburg D, Salzmann. Ezyme handbook [J]. Springer Verlag Berlin Heideberg, 1991 (4): 1-5.
- [2] Akino T, Nakamura N, Horikosh K. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp [J]. Appl Microbiology Biotechnology, 1987, 26(4): 323-327.
- [3] 张 闻, 汪立平, 汪之和. 甘露糖产生菌 F1-5 的鉴定及发酵条件的研究 [J]. 食品科学, 2009, 37(4): 1469-1470, 1478.
- [4] 李自金, 邱 波, 董运彬. 啤酒酵母取代鱼粉在草鱼上的应用 [J]. 饲料工业, 2009, 30(20): 25-26.
- [5] Walldrop A L, Skinner J T, Hierholzer R E. An evaluation of fructooligosaccharide in diets for broiler chickens and effects on salmonella contamination of Carcasses [J]. Poultry Sci, 1993, 72: 643-650.
- [6] Shafey T M, Al Mufarej S, Shalaby M J. The effect of feeding mannaoligosaccharides (Bio-MOS) on the performance of meat chickens under two different vaccination programs [J]. Asian Oust J Any Sci, 2001, 14(4): 559-563.
- [7] 肖 宇, 林英庭. 甘露寡糖对动物免疫功能的影响 [J]. 饲料添加剂, 2010, 7: 27-28.
- [8] 曹功明, 卢建雄, 马桂兰. 甘露寡糖对动物肠道环境及生长性能影响的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2011, 12(1): 226-227, 345.
- [9] 马志红, 张庆波, 史相国. 甘露寡糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7462-7463.
- [10] Demain A L, Adrio J L. Contributions of microorganisms to industrial biology [J]. Mol Biotechnol, 2008, 38(1): 41-55.
- [11] 李春松, 戴晋军, 李 彪. 酵母细胞壁多糖对免疫功能的作用机制 [J]. 饲料研究, 2012, 02: 22-23.
- [12] Shikha A S, Darmwal N S. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate [J]. Bioresour Technol, 2007, 4: 881-885.
- [13] Ravichandra P, Subhakar C, Annapuran J. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes [J]. Biochem Eng J, 2007, 34(2): 185-192.
- [14] 谢凤行, 赵玉洁, 周 可. 产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及其紫外诱变育种 [J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 78-82.
- [15] Miller J H. Mutagenic specificity of ultraviolet light [J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 182(1): 45-68.
- [16] Yu Z L, China Nuclear Science Technology Report [M]. Beijing: Atomic Energy Press, 1993: 3-8.
- [17] Kanbashi K, Wang X, Komura J. Base substitutions and minute deletions constitute X-ray-induced mutation in the endogenous tonB gene of *Escherichia coli* K12 [J]. Mutat Res, 1997, 385: 259-267.
- [18] Maaik P G, Caro M, Micheline G G. Site-specific analysis of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in nucleotide excision repair-proficient and -deficient hamster cells correlation with mutational spectra [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2009, 6(26): 7-14.
- [19] Cannistraro Vincent J, Taylor John-Stephen. Acceleration of 5-Methylcytosine Deamination in Cyclobutane Dimers by G and Its Implications for UV-Induced C-to-T Mutation Hotspots [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 12(9): 1145-1157.
- [20] Halliday Gary M, Byrne Scott N, Damian Diona L. Ultra-violet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis [J]. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 2011, 12: 214-221.
- [21] Takashi Watanabe, Itsuki Watanabe, Mami Yamamoto et al. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. Biore-source Technology [J]. 2011, 1: 1844-1848.
- [22] Wu Jian, Mingjie S, Guifu D. The mutation effects of low energy N^+ ions, UV and $^{60}Co-\alpha$ on micromonospora purpurea [J]. Biological Effects and Molecular Mechanisms, 2002: 225-229.
- [23] 马相杰, 汪立平, 冷向军. β -甘露聚糖酶水解酵母细胞壁水解条件的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(2): 7-10.
- [24] Akino T, Nakamura H K. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp [J]. Appl Microbio Biotechnol, 1987, 26(4): 323-327.
- [25] 邓传良, 贾彦彦, 任映雪. 离子注入诱变莲花突变体分子机理的初步研究 [J]. 遗传, 2011, 33(1): 81-87.
- [26] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白二级结构与 B 细胞表位预测 [J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 45-49.
- [27] 高 慧, 刘海军, 黄亚群. 玉米寡肽转运蛋白基因 (ZmOPT0212) 的克隆及其生物信息学分析 [J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 99-104.
- [28] Hilge M, Gloor S M, Rypniewski W. High-resolution native and complex structures of thermostable beta mannanase from *Thermomonospora fusca* substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5 [J]. Structure, 1998, 6(11): 1433-1444.
- [29] 赵月菊, 薛燕芬, 马延和. 甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望 [J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1131-1137.
- [30] 黄小葵, 姚冬生, 刘大岭. β -甘露聚糖酶的基因与表达 [J]. 纤维素科学与技术, 2006, 14(2): 59-64.
- [31] 常凤启, 刘选明, 李银心. 低能 N^+ 辐照拟南芥诱导基因组 DNA 碱基变异分析 [J]. 中国科学: C 辑, 2003, 33(2): 117-124.
- [32] 杨剑波, 昝李君, 李 莉. 离子束辐照 M13mpl 8DNA (RFI) 诱导 lacZ 突变的序列分析 [J]. 中国科学: B 辑, 1995, 25(12): 1273-1278.