

两株芽孢杆菌的鉴定及淀粉酶基因的克隆

胡苗清 姚明泽 张耀华 付月君 梁爱华

(山西大学 生物工程教育部重点实验室 生物技术研究所,山西 太原 030006)

摘要: 对分离得到的两个菌株(B. H 和 B. M) 进行鉴定,并对它们在芽孢杆菌培养基和淀粉富集培养基上的形态进行观察,通过对其 16S rDNA 序列的分析,构建系统进化树,确定 B. H 为枯草芽孢杆菌, B. M 为解淀粉芽孢杆菌。根据已报道的枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌淀粉酶基因保守区域设计引物,分别以两个菌株的基因组 DNA 为模板,采用 PCR 扩增的方法成功获得两个淀粉酶基因,其编码区的长度分别为 1 434 bp 和 1 563 bp,为该菌株的进一步利用开发提供了数据支持。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 解淀粉芽孢杆菌; 16S rDNA; 淀粉酶基因

中图分类号: Q939.124 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0103-04

Identification of Two Species of *Bacillus* and Gene Cloning of Amylase

HU Miao-qing, YAO Ming-ze, ZHANG Yao-hua, FU Yue-jun, LIANG Ai-hua

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Two isolated strains of *Bacillus* (B. H and B. M) were identified. Morphologic observation on the *Bacillus* medium and the starch enrichment medium, and the analysis of the 16S rDNA sequences and Phylogenetic Trees showed that B. H is *Bacillus subtilis* and B. M is *Bacillus amyloliquefaciens*. The primers were designed according to conservative sequences of amylase of *Bacillus*, using each genomic DNA of two strains as templates. The lengths of coding area are 1 434 bp and 1 563 bp respectively. These genes provide the experimental data for further genetic and industrial development of *Bacillus*.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Bacillus amyloliquefaciens*; 16S rDNA; Amylase gene

芽孢杆菌属芽孢杆菌科,是好氧或兼性厌氧的杆菌,一般为革兰氏染色阳性。芽孢杆菌在快速繁殖过程中,产生大量多种维生素、有机酸、氨基酸、蛋白酶(特别是碱性蛋白酶)、糖化酶、脂肪酶、淀粉酶^[1-3]。这些代谢产物能降解植物性饲料中复杂的有机物,从而促进动物的消化吸收,提高饲料利用率,防止动物消化不良,出现饲料便等。由于芽孢杆菌具有在培养时营养要求比较简单,环境适应能力比较强的特点^[4],目前,在工业上大量使用的淀粉酶主要来源于芽孢杆菌属,比如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),另外,黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)也作为生产菌株产生淀粉酶^[5-6]。16S rDNA

序列分析法由于准确、灵敏的特性,在菌种鉴定的开发利用中已得到广泛应用^[7-9]。

本研究分离得到两株芽孢杆菌,根据其形态学特征和 16S rDNA 分析,鉴定两菌株分别为枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌,并分别获得了两个菌株的淀粉酶基因,为优质高效产淀粉酶基因的改造及其利用提供了材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 从土壤中分离出的两个待定菌种(一株由山西大学生命科学院韩建荣老师实验室分离,取名为 B. H;另一株为山西大学生物技术研究所本实验分离,取名为 B. M),于 4℃ 冰箱保存。大

收稿日期: 2011-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071924); 山西省自然科学基金项目(2009011059-3; 2010011040-1)

作者简介: 胡苗清(1988-),女,山西文水人,在读博士,主要从事分子生物学研究。

通讯作者: 梁爱华(1957-),女,山西榆社人,教授,主要从事分子生物学研究。

肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 由山西大学生物技术研究所本实验室保存。质粒 pMDTM-48T 购自 Takara 公司。

1.1.2 试剂和工具酶 质粒抽提试剂盒(Mini-Plasmid Rapid Isolation Kit) 和 DNA 胶回收试剂盒(Mini-DNA Rapid Purification Kit) 购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; PCR 引物由北京奥科生物技术有限公司合成; DNA 序列测定由 Takara 公司完成。革兰氏染色试剂、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶购自 Takara 公司; 氨苄青霉素购自上海生物工程公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养条件 芽孢杆菌培养基(氯化钠 0.5 g, 牛肉膏 1 g, 蛋白胨 1 g, 水 100 mL, pH 7.2)、LB 培养基(氯化钠 1 g, 胰代蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, 水 100 mL, pH 7.4)、筛选重组质粒培养基(含有 Amp 的 LB 培养基, 其 Amp 浓度为 100 g/mL)、淀粉富集培养基(淀粉 6 g, 蛋白胨 3 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, NaCl 0.01 g)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取待测菌株在芽孢杆

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used for all the experiments

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途(基因克隆) Usage(gene cloning)
B. H 上游 F1	ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACC	B. H 菌株中淀粉酶基因
B. H 下游 R2	TCATTGAAAGAATGTGTACACCTG	B. H 菌株中淀粉酶基因
B. M 上游 F2	GCCCCGCACATACGAAAAGACTG	B. M 菌株中淀粉酶基因
B. M 下游 R2	CCCACGTTGTGATTAAGAGCAGCG	B. M 菌株中淀粉酶基因
16S rDNA 上游 F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	两种芽孢杆菌 16S r DNA
16S rDNA 下游 R	CTACGGCTACCTTGTACGA	两种芽孢杆菌 16S r DNA

1.2.4 序列分析及同源性比对 将 B. M 和 B. H 菌株的 16S rDNA 及淀粉酶基因测序结果分别在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 并采用序列比对软件 Vector NTI 8 对基因序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌落形态

由图 1-A 可知, B. H 菌株培养在芽孢杆菌平板培养基上, 菌落呈白色, 显微镜下菌体为杆状, 可形成芽孢, 革兰氏染色为阳性。在淀粉培养基上呈淡黄色, 圆形或不规则形, 边缘不光滑、有锯齿形、无光泽不透明, 表面粗糙干燥, 有明显的水解圈。

由图 1-B 可知, B. M 菌株培养在芽孢杆菌平板培养基上, 菌落呈浅黄色, 显微镜下菌体为短杆状, 染色均匀, 可形成内生芽孢, 芽孢囊膨大, 呈椭圆形, 革兰氏染色阳性。在淀粉培养基上呈浅黄色不透明

菌培养基上划线, 置于 30℃ 培养箱中培养 30 h 时形成单菌落, 将活化好的单克隆菌株于 5 mL 芽孢杆菌液体培养基中培养 18~20 h, 并取 1.5 mL 新鲜菌体于离心管中, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。基因组 DNA 按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取。

1.2.2 两种芽孢杆菌 16S rDNA 以及淀粉酶基因的 PCR 扩增 以基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 本研究所用引物如表 1 所示。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收, 将目的 DNA 片段与质粒载体 pMDTM-48T 16℃ 过夜连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 37℃ 培养待转化子出现。

1.2.3 高效快速筛选阳性克隆 挑取转化子至 800 μ L 含有 Amp(氨苄) 的 LB 培养基培养 6 h, 或者 5 mL 含有 Amp(氨苄) 的 LB 培养基过夜培养, 取 500 μ L 菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 50 μ L Cracking Buffer, 剧烈振荡后 12 000 r/min 离心 2 min; 取 5 μ L 上清, 经 1% 琼脂糖核酸胶电泳检测, 初步筛选阳性克隆, 提取质粒交 Takara 公司测序。

菌落, 近圆形, 边缘光滑, 无锯齿, 表面湿润, 有明显的水解圈。

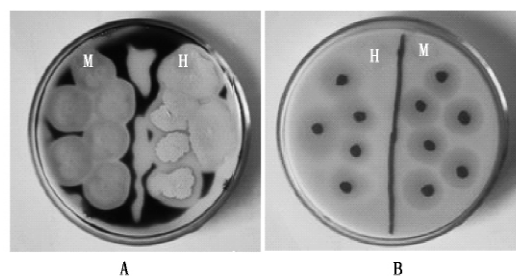


图 1 B. H 和 B. M 在芽孢杆菌平板培养基(A)和淀粉富集培养基(B)上的形态观察
Fig. 1 Morphologic observation of B. H and B. M on the Bacillus medium (A) and the starch enrichment medium(B)

2.2 生长曲线图

分别挑取 B. H 和 B. M 菌株单菌落于 5 mL 芽孢杆菌液体培养基中, 在 30℃, 180 r/min 振荡培养 26 h, 观察两种菌株的生长状态, 生长曲线如图 2 所

示。从图 2 可以看出, B. H 和 B. M 菌株均呈指数生长, 在 20 h 左右均进入稳定期。

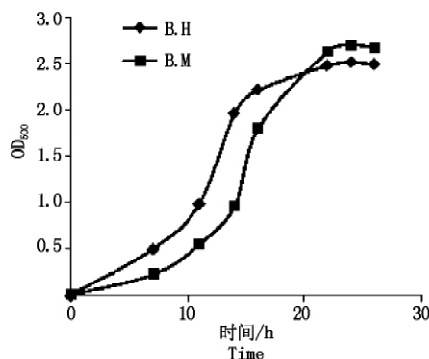


图 2 B. H 和 B. M 的生长曲线(0~26 h)

Fig. 2 Growth curves of B. H and B. M

2.3 16S rDNA 序列分析

常规的菌种鉴定分为形态特征和理化性质两种方法, 目前, 分子生物学方法从遗传进化角度阐明微生物种群之间的分类学关系, 是微生物分类学研究普遍采用的分类学方法, 由于 16S rDNA 序列分析

快速、准确、灵敏, 目前其他一些分子生物学方法很难替代它的作用, 16S rDNA 序列分析法已成为对微生物进行分类鉴定的很重要的方法^[10-13]。

取振荡培养 18~20 h 的 B. H 和 B. M 菌株, 提取基因组 DNA, 电泳检测显示两个菌株基因组 DNA 大小相近, 电泳图上主要集中在 12 000 bp 左右。分别以 B. H 和 B. M 基因组为模板, 利用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 产物均为一条大小为 1 500 bp 左右的特异性条带。PCR 产物测序后, 将其序列与 NCBI 已报道的芽孢杆菌 16S rDNA 序列进行比对, 并构建了基于 16S rDNA 的系统进化树(图 3)。分析表明, B. H 菌株与 *Bacillus subtilis* 的同源性达到 99%, B. M 菌株与 *Bacillus amyloliquefaciens* AB201122 同源性达到 99%。16S rDNA 同源性大于 97% 一般认为属于同一菌种, 而且从构建的 16S rDNA 系统进化树也可以得出 B. H 与枯草芽孢杆菌亲缘关系比较近, 而 B. M 与解淀粉芽孢杆菌亲缘关系比较近。

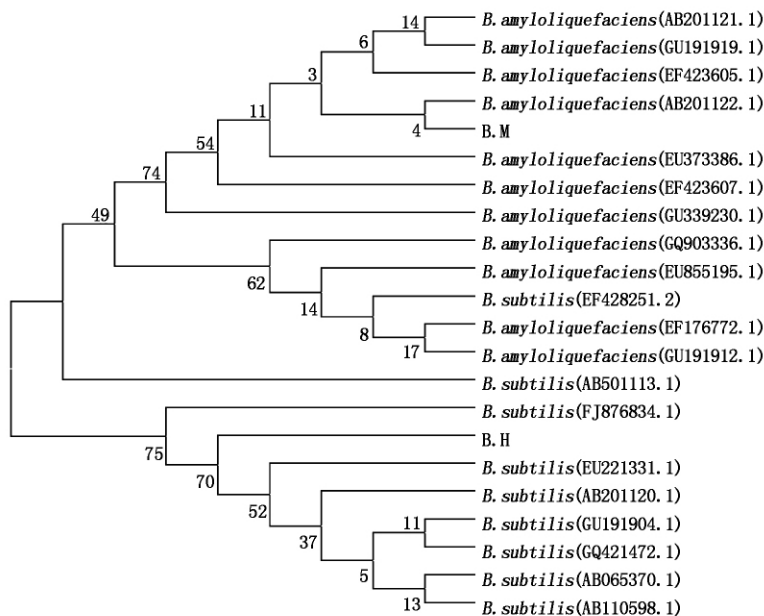
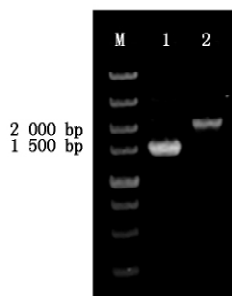


图 3 基于 16S rDNA 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Bacillus* based on the 16S rDNA sequence



M. DL5000; 1. PCR 产物 B. H; 2. PCR 产物 B. M。

M. DL5000; 1. PCR product B. H; 2. PCR product B. M.

图 4 淀粉酶基因的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 4 Agrose gel electrophoret of PCR product of Amylase

根据上述形态特征和 16S rDNA 序列分析, 确定待定菌种 B. H 属于枯草芽孢杆菌, B. M 属于解淀粉芽孢杆菌。

2.4 淀粉酶基因的扩增与序列分析

根据已报道的 *Bacillus subtilis* 和 *Bacillus amyloliquefaciens* 淀粉酶基因序列, 分别设计引物, 从 B. H 和 B. M 基因组中扩增淀粉酶基因, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 400 bp 和 2 100 bp 处出现明显的特异性条带(图 4), 与预期结果吻合。测序结果与已报道的芽孢杆菌淀粉酶基因序列比

对 结果显示 B. H 和 B. M 的淀粉酶基因开放阅读框大小分别为 1 434 bp 和 1 563 bp。由基因推导的氨基酸序列与已报道的枯草芽孢杆菌淀粉酶氨基酸序列和解淀粉芽孢杆菌氨基酸序列同源性分别达到 99% 和 100%。

3 讨论

芽孢杆菌不但能分泌大量蛋白,而且能将蛋白分泌到体外,这一特性受到了广大学者和生产厂家的极大关注。目前,枯草芽孢杆菌已是一种重要的生产蛋白制剂的来源,仅由枯草芽孢杆菌就可表达将近 20 种蛋白。由芽孢杆菌生产的碱性蛋白酶、淀粉酶及耐热性淀粉酶等几种重要的酶制剂,已广泛应用于工业领域^[14-17]。芽孢杆菌具有良好的分泌特性,其发酵工艺和产物回收技术也较成熟,用作外源蛋白的分泌型宿主菌,具有很大的潜力^[18,19]。

本试验分离得到了两种芽孢杆菌,经鉴定分别为枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌,并从这两株芽孢杆菌中获得了淀粉酶基因,为该菌株的进一步应用开发提供了数据支持。

参考文献:

- [1] 尹清强,韩彪,郑秋红,等. 枯草杆菌的淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(6): 7-9.
- [2] 谢凤行,赵玉洁,周可,等. 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.
- [3] 蔡恒,陈忠军,万红贵,等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶信号肽的序列分析及其大肠杆菌中的分泌特性[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 106-109.
- [4] 权春善,王军华,徐洪涛,等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [5] Shafique S, Bajwa R, Shafique S. Condition stabilization for *Aspergillus niger* FCBP-198 and its hyperactive mutants to yield high titres of alpha-amylase [J]. Mikrobiologia, 2010, 79: 301-306.
- [6] Altikatoglu M, Tavukcuoglu O, Mustafaev M. Characterization of water-soluble complexes of polyacrylic acid with alpha-Amylase from *Aspergillus oryzae* [J]. Protein, 2010, 29: 120-126.
- [7] 潘康成,冯兴,崔恒敏,等. 利用 16S rDNA 序列对两种芽孢杆菌的鉴定[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(6): 550-554.
- [8] Parola P, Maurin M, Alimi Y, et al. Use of 16SrRNA gene sequencing to identify *Lactobacillus casei* in septicaemia secondary to a paraprostatic enteric fistula [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998, 17: 203-205.
- [9] Priscilla E D, LeeAnn K J, Sara T Z, et al. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2572-2577.
- [10] Korbelt C P, Persing D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2: 299-305.
- [11] Lin L L. ctose-induced expression of *Bacillus* sp. TS-23 amylase gene in *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 365: 235-239.
- [12] 周贤轩,杨波,陈新华. 几种分子生物学方法在菌种鉴定中的应用[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 36-38.
- [13] Zhang C X, Zhao X, Han F, et al. Comparative proteome analysis of two antagonist *Bacillus subtilis* strains [J]. Microbiol Biotechnol, 2009, 19: 351-357.
- [14] Hutcheon G W, Vasist N, Bolhuis A. Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* [J]. Extremophiles, 2005, 9: 487-495.
- [15] Liu Y H, Lu F P, Li Y, et al. Characterisation of mutagenised acid-resistant alpha-amylase expressed in *Bacillus subtilis* WB600 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78: 85-94.
- [16] Kurosawa K, Hosaka T, Tamahiro N, et al. Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168 [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 71-77.
- [17] 刘旭东,徐岩. 一种新的中温酸性 α -淀粉酶的分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 235-239.
- [18] Gryczan T J, Dubnau D. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978, 75: 1248-1432.
- [19] Wong S L, Ye R, Nathoo S. Engineering and Production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 517-523.