

研究报告

枯草芽孢杆菌胞外氨肽酶对菌体生长的作用研究

房月芹¹ 高新星² 周哲敏² 刘中美^{2*}

(1. 江南大学 环境与土木工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】利用基因敲除技术构建突变菌株 BS-AP-K 来研究枯草芽孢杆菌的分泌型氨肽酶对菌体生长的作用。【方法】基于 Xer/dif 重组系统敲除 *Bacillus subtilis* 168 基因组中 *ywaD* 基因, 研究比较野生型与 BS-AP-K 菌株在不同培养基中的生长情况。【结果】通过比较两菌株的生长情况, 发现敲除分泌型氨肽酶会对菌体生长带来不利影响, 而这种影响可以通过在培养基中添加多种游离氨基酸来弥补。【结论】研究结果表明胞外氨肽酶通过酶切外源蛋白质以及多肽来为细胞生长提供营养所需。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 氨肽酶, Xer/dif 重组系统, 基因敲除

Effect of secretory aminopeptidase in *Bacillus subtilis* on the growth

FANG Yue-Qin¹ GAO Xin-Xing² ZHOU Zhe-Min² LIU Zhong-Mei^{2*}

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Aim to study the effect of secretory aminopeptidase in *Bacillus subtilis* 168 on the growth, a gene knock-out mutant BS-AP-K was constructed. [Methods] Based on the Xer/dif recombinant system, the *ywaD* gene was deleted from the genome. The growth of wild type and BS-AP-K in different media was monitored. [Results] It turned out that the deletion of secretory aminopeptidase had a negative effect on the growth of the strain. The impaired growth rate of BS-AP-K strain can be overcome by amino acid supplements. [Conclusion] This study indicated that the secretory aminopeptidase played an important role in supplying amino acids required for growth by hydrolyzing proteins or peptides.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Aminopeptidase, Xer/dif recombinant system, Gene knock-out

氨肽酶是一类能从蛋白质和多肽 N 端选择性切除氨基酸残基产生游离氨基酸的外切蛋白酶, 广泛存在于不同微生物中。除了在蛋白质降解和成熟方面发挥作用, 氨肽酶还有其它的生理功能: 在大

肠杆菌中 PepA 与胞内质粒的稳定性有关^[1]; 人苍白杆菌来源的 D-AP 特异性地水解 D 型氨基酸, 在合成或者降解肽聚糖方面起着重要作用^[2]; 大肠杆菌来源的 PepN 以及沙门杆菌来源的 PepN 和 PepA

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK20140151); 国家自然科学基金项目(No. 31400078)

*通讯作者: Tel: 86-510-85197551; 信箱: zliu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-03-20; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

在胞内起着活化阿波霉素的作用, 缺失这些基因会增强菌株对相关抗生素的抗性^[3]; 研究者对乳酸链球菌和瑞士乳杆菌中多种氨肽酶(PepX、PepC、PepO、PepT 以及 PepN)进行单个或多个敲除, 构建了不同的氨肽酶缺陷型突变体, 发现氨肽酶敲除个数越多, 菌体生长速率越慢, 同时敲除上述 5 种氨肽酶, 菌体生长速率降低为原来的 $1/10^{[4-5]}$ 。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)作为一种模式微生物被广泛用于研究各种生理现象, 如芽孢的形成、蛋白的分泌、生物膜的形成等^[6-7]。有关枯草芽孢杆菌中氨肽酶的报道主要集中在酶的分离纯化和酶学性质研究方面^[8-9], 氨肽酶的生理功能方面的研究还未见报道。

本研究通过敲除枯草芽孢杆菌中氨肽酶基因(*ywaD*), 探讨其编码的胞外氨肽酶(BSAP)的生理功能。通过研究野生型和基因敲除菌株在不同培养基中的生长情况, 以及培养上清中游离氨基酸的种类、含量的差别, 阐述 BSAP 对枯草芽孢杆菌的菌种生长的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 为本实验室保藏菌株, 质粒 p7Z6 为本校刘龙教授所赠。

1.2 试剂

限制性内切酶、Marker、琼脂糖、Primer STAR HS DNA 聚合酶均购于 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购于天根生化科技有限公司; Mag Extractor-PCR&Gel Clean up 胶回收试剂盒, TOYOBO 公司; 胰蛋白胨和酵母提取物, OXIOD 公司; Leu-*p*NA, Bachem 公司; 碱性蛋白酶, 上海佳和生物科技有限公司; 其他相关试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0。

SPM 培养基(g/L): 可溶性淀粉 5, 大豆分离蛋

白 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, KH_2PO_4 3。

将甘油菌种在 LB 培养平板上划线, 37 °C 过夜培养后, 挑取单菌落至 LB 培养基中, 200 r/min、37 °C 培养 10 h 后收集菌体, 用 0.85% NaCl 溶液洗涤和重悬菌体, 以避免转接时带入营养成分。将悬浮后的菌液分别转接至 LB 和 SPM 培养基中至最终细胞密度为 1×10^6 CFU/mL 和 4×10^6 CFU/mL, 200 r/min、37 °C 培养 24 h, 每隔 2 h 取样测定细胞密度。

1.4 基因敲除

基因敲除方法参考 Xer/*dif* 重组系统基因组改造方法^[10], 具体步骤见图 1。从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增 *ywaD* 基因上游同源臂 FR1000 和下游同源臂 BR1000, 以 p7Z6 为模板扩增片段 *dif/zeo/dif*, 利用融合 PCR 技术将上述片段融合, 构建整合片段 FR1000/*dif/zeo/dif*/BR1000。将整合片段转化 *B. subtilis* 168, 经同源重组后, 利用 *zeo* 抗性筛选阳性转化子。挑取 3–5 个转化子在 LB 培养基中进行传代培养, 菌体自身具有的 Xer 内源重组酶可识别 *dif* 位点并删除两个 *dif* 位点之间的 *zeo* 抗性基因。每隔 12 h 转接一次进行传代, 培养 24 h 后稀释并涂布无抗性平板, 同时利用抗性平板验证抗性基因丢失情况。

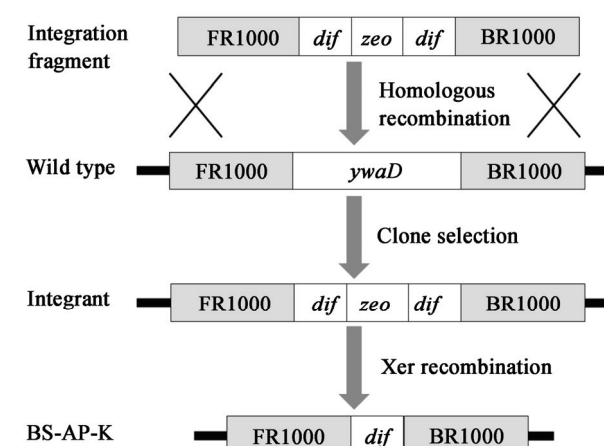


图 1 基因敲除示意图

Figure 1 Sketch of the process of gene knockout

1.5 细胞密度测定和生长速率计算方法

菌液 OD_{600} 值由分光光度计测定, 菌液测定前需稀释至测定线性范围内($OD_{600}=0.03-0.60$), 活菌数利用稀释涂平板法测定。根据测定的 OD_{600} 值绘制菌株的生长曲线, 利用 Least-squares-based lattice Boltzmann 方程对生长曲线进行拟合, 计算曲线最大斜率并定义为最大生长速率(μ_{max}), 单位为 h^{-1} , 其中曲线拟合系数 r^2 不低于 0.99。

1.6 氨基酸分布测定方法

称取一定量的大豆蛋白粉溶于去离子水中, 沸水浴中煮 5 min 后冷却至室温, 用 NaOH 调整溶液 pH 至 8.5 (终浓度为 5%)。BSAP 协同碱性蛋白酶水解大豆蛋白, 纯酶 BSAP 添加量为 0.1 g/L, 碱性蛋白酶添加量为 1 g/L, 水解反应在 50 °C 进行 5 h, 期间不断搅拌反应液。以单独添加碱性蛋白酶进行水解作为对照组。

将水解产物与 10% 磺基水杨酸按 1:1 混匀, 4 °C 静置 5 h 充分沉淀蛋白质和多肽, 10 000×g 离心 10 min 去除沉淀, 上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后利用 HITACHI-8900 氨基酸分析仪测定水解产物中游离氨基酸分布。

1.7 氨肽酶活性测定

以 Leu-pNA 为底物(4 mmol/L), 在 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.5)中加入适量的酶, 37 °C 进行反应, 利用酶标仪连续测定 405 nm 下的吸光值, 以测定数呈线性部分斜率计算酶活。37 °C 下每分钟催化底物形成 1 mol 对硝基苯胺[pNA, $OD_{405}=9.98 L/(mmol \cdot cm)$]所需的酶量即为 1 个酶活力单位(U)。以不添加酶进行反应作为空白对照组。

2 结果与分析

2.1 突变菌株构建及鉴定

为提高枯草芽孢杆菌转化和整合效率, 将两端同源臂长度延长为 1 000 bp, 构建了整合片段 FR1000/*dif*/*zeo*/*dif*/BR1000。如图 1 所示, 利用 *B. subtilis* 168 中自身所带的 Xer 重组酶在菌株传代中完成抗性基因的删除, 获得突变菌株 BS-AP-K

(*ywaD::dif*)。根据基因组中同源臂两侧基因序列设计引物, 以野生型和 BS-AP-K 基因组为模板进行 PCR 验证, 对应的 PCR 产物与理论值(分别为 3 468 bp 和 2 128 bp)一致(图 2), 表明基因组中 *ywaD* 基因已被成功敲除。

2.2 菌株的生长情况分析

为研究敲除 *ywaD* 基因对菌体生长的影响, 对野生型和 BS-AP-K 菌株在 LB 培养基(富含游离氨基酸)和 SPM 培养基(缺乏游离氨基酸)中的生长情况进行监测。如图 3 所示, 两菌株在 LB 培养基中的生长情况没有明显差别, 最大生长速率为 $1.6 h^{-1}$; 在 SPM 培养基中, 两者的生长速率有所下降, 野生型和 BS-AP-K 的最大生长速率分别是 $0.7 h^{-1}$ 和 $0.5 h^{-1}$, BS-AP-K 较野生型菌株下降了 30%。结果说明在 SPM 培养基中敲除 *ywaD* 基因对菌体生长有不利的影

2.3 培养上清液中游离氨基酸的差异分析

通过检测野生型和 BS-AP-K 菌株在 SPM 培养基中的培养上清中游离氨基酸的组成和含量(表 1), 进一步探究 BSAP 影响菌体生长的原因。在两种菌株的培养上清液中检测到 12 种游离氨基酸, BS-AP-K 培养上清中游离氨基酸的总量较野生型

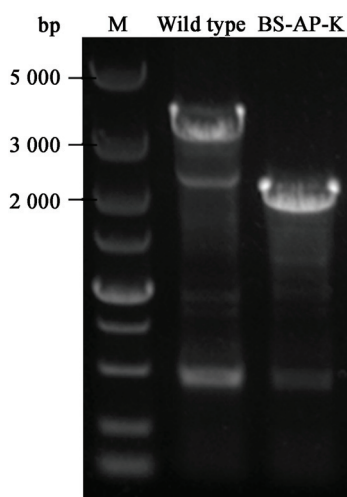


图 2 基因敲除 PCR 验证结果

Figure 2 PCR product from genome of wild type and BS-AP-K

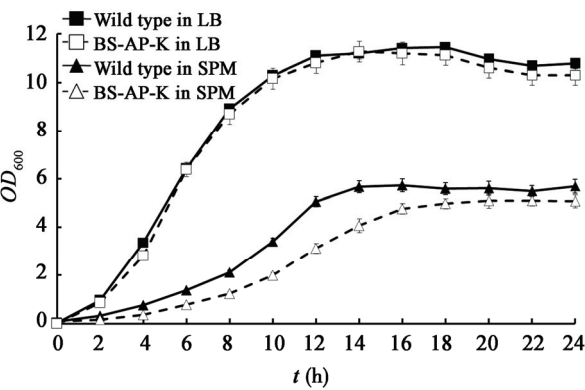


图 3 培养基对菌体生长的影响
Figure 3 Effect of different culture media on the growth of *B. subtilis* 168

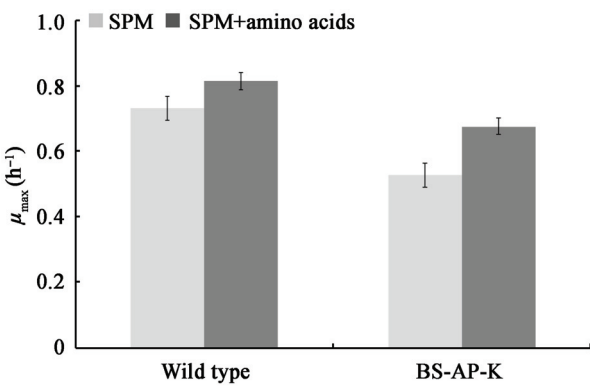


图 4 添加氨基酸对菌体生长速率的影响
Figure 4 Effect of amino acid supplements on the maximum growth rate

表 1 培养上清中游离氨基酸含量
Table 1 Free amino acid compositions in the supernatant of culture (mg/L)

Amino acid	Wild type	BS-AP-K
Gly	9 510±388.0	3 720±128.0
Ala	450±20.5	170±7.4
Val	8 150±403.0	2 970±133.0
Leu	8 290±37.6	2 380±46.8
Ile	1 780±75.8	470±17.6
Thr	2 310±97.3	2 670±107.0
Met	1 670±9.2	480±8.4
Phe	11 290±483.0	15 330±721.0
Tyr	6 960±313.0	9 350±443.0
Glu	1 380±67.4	1 640±75.3
Arg	8 610±401.0	1 460±57.4
Lys	4 190±204.0	780±34.9
Total	64 590	41 420

菌种降低约 40%，主要是由 Gly、Val、Leu、Ile、Met、Arg、Lys 这 7 种氨基酸引起的，而这一结果与 BSAP 的底物特异性是一致的^[9]。

2.4 添加游离氨基酸对突变菌株生长的影响

根据培养上清液中游离氨基酸的组成，添加 7 种氨基酸(Gly、Val、Leu、Ile、Met、Arg、Lys, 4 mg/L)至 SPM 培养基中，考察添加游离氨基酸对菌株生长的影响。如图 4 所示，同时添加 7 种氨基酸时，

两种菌株的最大生长速率均有明显提高；BS-AP-K 的最大生长速率接近于野生型菌株在不添加氨基酸时的最大生长速率，由此可见敲除 *ywaD* 基因对菌体生长的不利影响是可以通过添加游离氨基酸来弥补的。

3 结论

在 *B. subtilis* 168 基因组中，利用基因组注释找到了 12 个氨肽酶编码基因，其中 4 个基因(*dppA*、*mapA*、*yflG*、*ywaD*)编码的蛋白质的功能得到了解析。*dppA* 基因编码的蛋白质具有 D-AP 的催化性能，这种蛋白在芽孢形成前期大量表达，可能对芽孢的形成有引导作用^[8]；*mapA* 和 *yflG* 基因编码不同底物谱的甲硫氨酸氨肽酶，能降解蛋白质 N 端第一个甲硫氨酸残基，推测在胞内蛋白质成熟过程中起重要作用^[11]；而 *ywaD* 基因编码的蛋白质 BSAP 属于 M28 家族，具有 Leu、Arg、Lys 等底物特异性^[9]。本研究基于 *Xer/dif* 重组系统成功敲除 *B. subtilis* 168 基因组中 *ywaD* 基因，阐述了 BSAP 对菌体生长的作用。

信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析结果表明，在 12 个氨肽酶基因中只有 *ywaD* 基因编码的氨肽酶具有信号肽序列，因此推测 BSAP 是唯一分泌至胞外的氨肽酶。在 SPM 培养基中，由于 *ywaD* 基因缺失导致 BS-AP-K 的最大

生长速率降低了约 30%，而这个影响可以通过添加与 BSAP 底物特异性相关的氨基酸来弥补。虽然 BS-AP-K 含有其他胞内氨肽酶，但是在氨基酸缺乏的培养环境中，他们不能弥补 BSAP 缺失产生的影响。

在 LB 培养基中，BS-AP-K 的生长情况与野生型相近，生长稳定期 OD_{600} 值达到 11 左右。在这个过程(0–24 h)中，菌株培养上清中没有检测到 BSAP 氨肽酶活性(酶活为 0)，说明在富含游离氨基酸的培养环境中菌体基本不表达 BSAP。而在 SPM 培养基中，野生型菌株在生长稳定期的菌体密度 OD_{600} 值为 5.6，其培养上清中检测到 BSAP 氨肽酶的活性(酶活约为 0.1 U/mL)，表明在缺乏游离氨基酸的情况下，菌株会分泌 BSAP 水解外源蛋白质获得氨基酸，为菌体生长提供有效的氮源。上述结果表明 *B. subtilis* 168 菌株可根据生长环境调节 BSAP 的分泌，而 BSAP 的主要生理功能是通过降解外源蛋白质和多肽为枯草芽孢杆菌细胞生长提供所需氮源。

参 考 文 献

- [1] Lazdunski AM. Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989,

- 63(3): 265-276
- [2] Delmarcelle M, Boursiot MC, Filee P, et al. Specificity inversion of *Ochrobactrum anthropi* D-aminopeptidase to a D,D-carboxypeptidase with new penicillin binding activity by directed mutagenesis[J]. Protein Science, 2005, 14(9): 2296-2303
- [3] Braun VGK, Hantke K, Zimmermann L. Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 156(1): 308-315
- [4] Mierau I, Kunji ER, Leenhouts KJ, et al. Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(10): 2794-2803
- [5] Christensen JE, Steele JL. Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(11): 3297-3306
- [6] Jenal U, Hengge-Aronis R. Regulation by proteolysis in bacterial cells[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(2): 163-172
- [7] Traag BA, Pugliese A, Eisen JA, et al. Gene conservation among endospore-forming bacteria reveals additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195 (2): 253-260
- [8] Cheggour A, Fanuel L, Duez C, et al. The *dppA* gene of *Bacillus subtilis* encodes a new d-aminopeptidase [J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(3): 504-513
- [9] Yifat FH, Larisa R, Smadar Shulami, et al. The *ywad* gene from *Bacillus subtilis* encodes a double-zinc aminopeptidase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243: 157-163
- [10] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2520-2525
- [11] You CH, Lu HY, Sekowska A, et al. The two authentic methionine aminopeptidase genes are differentially expressed in *Bacillus subtilis*[J]. BMC Microbiology, 2005, 5: 57