

芽胞杆菌  $\beta$ -甘露聚糖酶基因部分序列的克隆及相似性分析\*

李雅楠 孟 昆 杨培龙 王亚茹 姚 斌\*\*

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

**摘要:** 通过平板筛选, 从 28 株芽胞杆菌中筛选出 16 株产  $\beta$ -甘露聚糖酶的菌株。利用一对兼并引物, 通过 PCR 分别从不同来源芽胞杆菌基因组 DNA 上扩增出  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因的一段保守序列。将基因片段测序并同已发表的  $\beta$ -甘露聚糖酶基因进行相似性分析, 并构建进化树。结果表明: 克隆到的  $\beta$ -甘露聚糖酶部分基因序列与报道的相比, 其最高同源性在 62% ~ 98% 之间。环状芽胞杆菌  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因间相似性较低, 枯草芽胞杆菌及其它芽胞杆菌的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因间相似性较高。

**关键词:** 芽胞杆菌,  $\beta$ -甘露聚糖酶基因, 相似性分析

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-2654 (2007) 01-0043-05

Cloning and Alignment of the Partial Mannanase Gene of *Bacillus* spp. \*

LI Ya-Nan MENG Kun YANG Pei-Long WANG Ya-Ru YAO Bin\*\*

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** By functional plates, 16 strains which can produce  $\beta$ -mannanase were isolated from 28 *Bacillus* spp. Using a pair of degenerated primers, the conserved fragments of  $\beta$ -mannanase gene from the selected strains were amplified by PCR. The obtained nucleotide fragments were sequenced and compared with the homologous  $\beta$ -mannanase genes in GenBank and a phylogenetic tree was generated. Comparing to the genes coding  $\beta$ -mannanase published, the cloned nucleotide fragments show the highest sequence identity between 62% and 98%. The genes coding for  $\beta$ -mannanase of *Bacillus circulans* have low identity while the  $\beta$ -mannanase genes of *Bacillus subtilis* and other *Bacillus* spp. have high identity.

**Key words:** *Bacillus* spp.,  $\beta$ -mannanase gene, Homology analysis

$\beta$ -甘露聚糖酶 ( $\beta$ -Mannanase, endo-1, 4- $\beta$ -D-mannanmannohydrolase, EC3.2.1.78) 是一类能水解含有  $\beta$ -1, 4-D-甘露糖苷键的甘露多糖的内切水解酶, 属于半纤维素酶类<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶主要来源于微生物, 植物和低等动物中<sup>[2-4]</sup>。微生物则是产  $\beta$ -甘露聚糖酶的重要来源, 已报道的有芽胞杆菌、假单胞菌、弧菌等, 真菌中有曲霉、里氏木霉等。微生物来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶具有活力高、成本低、来源稳定、提取方便等明显优点。芽胞杆菌是  $\beta$ -甘露聚糖酶的重要来源, 来源于芽胞杆菌的  $\beta$ -甘露聚糖酶具有比活较高<sup>[5]</sup>, 良好的耐碱性<sup>[6]</sup>等优点, 具有较大的工业应用价值。本研究通过平板筛选和酶活测定, 筛选出 16 株产  $\beta$ -甘露

聚糖酶的芽胞杆菌菌株, 通过 PCR, 分别得到这些菌株  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因的部分保守序列, 通过基因相似性比对和进化树的构建对不同芽胞杆菌来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因进行相似性的分析。

## 1 材料与方法

## 1.1 菌株、载体和试剂

28 株芽胞杆菌为本实验室保存。大肠杆菌 JM109, TaqDNA 聚合酶及限制性内切酶 *EcoR* I 均为 TaKaRa 公司产品。克隆载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司。

\* 国际科技合作重点项目计划 (No. 2004DFA060800)

其他作者: 柏映国 罗会颖

\*\* 通讯作者 Tel: 86-10-68975126, Fax: 86-10-68975127, E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2006-03-14, 修回日期: 2006-04-17

## 1.2 培养基和培养方法

**1.2.1 培养基:** (1) 芽孢杆菌培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉提取物 3 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容到 1L, pH7.0。 (2) 平板筛选培养基: 角豆胶 2.5 g, 酵母粉 4 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水定容到 1L, pH7.5。 (3) 产酶发酵培养基: 魔芋粉 20 g, 酵母提取物 20 g, NH<sub>4</sub>Cl 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, CaCl<sub>2</sub> 3 g, MgCl<sub>2</sub> 0.6 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3.5 g, 蒸馏水定容到 1L, pH7.5。

**1.2.2 培养方法:** 250mL 三角瓶装 30mL 产酶发酵培养基, 将菌种在芽孢杆菌培养基中活化 16h 后, 按 1% (v/v) 接种量接种, 220r/min, 30℃ 振荡培养 48h。

## 1.3 菌株的平板筛选

将 28 株芽孢杆菌于 30℃, 用芽孢杆菌培养基活化 12~16 h 后, 于芽孢杆菌固体培养基上划线, 过夜培养。挑取单个细菌菌落, 点接角豆胶筛选培养基。37℃ 培养 16h, 利用 Bruce D 等报道的检测 β-甘露聚糖酶活性的刚果红染色方法<sup>[7]</sup>, 测量角豆胶水解圈直径 (H) 和菌落直径 (C), 计算 H/C 比值。

## 1.4 β-甘露聚糖酶活力测定

将发酵产酶培养基于 4℃, 10,000r/min 离心 5min, 取上清作为粗酶液。在 0.4mL 0.3% 的角豆胶底物中 (pH7.0 柠檬酸-NaOH 缓冲液配制) 加入适当稀释的酶液 0.1mL, 52℃ 水浴反应 10min, 用 Somogyi-Nelson<sup>[8]</sup> 方法测定产生的还原糖量。酶活力定义为: 在一定条件下, 每分钟分解甘露聚糖释放出 1μmol 相当于 D-甘露糖的还原糖基所需的酶量为 1 个酶活力单位 (IU)。

## 1.5 引物设计与合成

对已报道的芽孢杆菌 β-甘露聚糖酶编码基因进行相似性比对, 根据基因的保守序列设计一对兼并引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。

P1 5' AATGC (A/C/G) (A/C) A (C/G) CA (A/G) AC (A/G) ACA (A/G) A 3';

P2 5' CCACCA (A/G) AACCA (C/T) TC (A/G/T) (C/G) (C/T) 3', PCR 产物大小约为 500bp。

## 1.6 细菌基因组 DNA 的提取和 PCR 反应

细菌基因组 DNA 的提取按参考文献[9]方法进行。PCR 反应用提取的菌株基因组 DNA 10ng 做模板, 于 PCR 自动循环仪内扩增。PCR 反应参数为: 95℃ 5min; 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 50s, 32 个循环; 最后延伸 72℃ 10min。PCR 产物用 TaKa-Ra DNA 回收试剂盒按操作说明进行纯化。

## 1.7 目的基因的克隆和筛选

将已纯化的 PCR 扩增片段与 pGEM-T Easy 载体在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶的作用下于 4℃ 过夜连接。将连接产物电击转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 涂布 LB 平板 (含有 100μg/mL 氨苄青霉素, 0.5mmol/L IPTG, 40μg/mL X-gal), 37℃ 培养过夜, 挑取白色菌落进行培养。按文献[10]提取质粒, 用 EcoR I 酶切消化, 电泳鉴定阳性重组质粒。

## 1.8 核苷酸序列分析

将阳性重组质粒送北京三博生物工程有限公司测序。用 Vector NTI 软件对基因序列进行比对。将克隆到的 16 个芽孢杆菌 β-甘露聚糖酶编码基因片段连同 GenBank 中来源于芽孢杆菌的 13 个 β-甘露聚糖酶编码基因的相应片段一起用 DNAMAN 软件绘制芽孢杆菌来源的 β-甘露聚糖酶编码基因的进化树。

## 2 结果

### 2.1 产酶菌株的筛选

通过平板筛选, 选取透明环比值大于 1 的 16 个菌株。通过产酶发酵培养基, 测定 28 个菌株产生的 β-甘露聚糖酶的活力。结果表明: 透明环比值大于 1 的 16 株芽孢杆菌可以产生 β-甘露聚糖酶, 其中枯草芽孢杆菌 B36 酶活力最高为 37.63IU/mL, 坚强芽孢杆菌 B31 酶活力最低为 2.98 IU/mL (见表 1)。

表 1 β-甘露聚糖酶产生菌的筛选及克隆片段情况

菌株编号	菌株种类	H/C 值	酶活力 (IU/mL)	克隆片段长度 (bp)	NCBI 注册号
B6	<i>Bacillus subtilis</i>	2.47	25.42	502	DQ438203
B8	<i>Bacillus licheniformis</i>	1.53	28.81	502	DQ438210

续表 1

B11	<i>Bacillus subtilis</i>	2. 13	14. 62	501	DQ438204
B12	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	-	-
B16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2. 21	4. 15	501	DQ438211
B17	<i>Bacillus subtilis</i>	2. 3	17. 2	501	DQ438205
B18	<i>Bacillus subtilis</i>	1. 71	16. 59	502	DQ438212
B19	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	-	-
B20	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	-	-
B21	<i>Bacillus subtilis</i>	1. 35	14. 54	501	DQ438206
B23	<i>Bacillus</i> sp.	1. 98	29. 78	501	DQ438207
B24	<i>Bacillus subtilis</i>	1. 77	10. 18	501	DQ438208
B25	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	-	-
B28	<i>Bacillus subtilis</i>	2. 93	15. 35	501	DQ438209
B29	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	0	-	-
B30	<i>Bacillus licheniformis</i>	2. 1	13. 4	501	DQ438213
B31	<i>Bacillus firmus</i>	1. 32	2. 98	499	DQ438214
B32	<i>Bacillus megaterium</i>	1. 48	3. 46	501	DQ438215
B36	<i>Bacillus subtilis</i>	3. 1	37. 63	501	DQ351940
B37	<i>Bacillus megaterium</i>	1	0	-	-
B38	<i>Bacillus megaterium</i>	1	0	-	-
B39	<i>Bacillus megaterium</i>	1	0	-	-
B40	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	-	-
B47	<i>Bacillus circulans</i>	1	0	-	-
B48	<i>Bacillus circulans</i>	1. 35	5. 86	577	AY907668
B49	<i>Bacillus circulans</i>	1. 78	8. 32	536	AY913796
B50	<i>Bacillus circulans</i>	1	0	-	-
B51	<i>Bacillus circulans</i>	1	0	-	-

## 2.2 PCR 和目的基因克隆筛选

以 16 株产  $\beta$ -甘露聚糖酶的芽孢杆菌基因组 DNA 为模版, PCR 扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 符合预期扩增片段的相对大小。将扩增的特异性片段连接到克隆载体上, 经酶切鉴定, 筛选出阳性克隆。

## 2.3 序列测定与相似性分析

两株环状芽孢杆菌 B48 与 B49 的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因片段分别长 577bp 和 536bp, 其余均为 500bp 左右 (克隆片段大小及 GenBank 注册号见表 1)。B6、B11、B17、B18、B31 和 B36 序列间相似性较高, 为 93.8% ~ 98.6%。B16、B21、B23、B24、B28、B30 和 B32 序列间相似性较高, 为 97.4% ~ 99%。B8、B48、B49 同以上测得序列相似性均较低, 其最高相似性分别为 76.5%, 43.8%, 43.0%。利用 NCBI 上的 BLAST 功能, 将测定的 16 株芽孢杆菌的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因保

守区域核苷酸序列与 GenBank 中已报道的  $\beta$ -甘露聚糖酶核苷酸序列比对。结果表明: B6、B11、B17、B18、B31 和 B36 克隆到的片段与已发表的 *Bacillus subtilis*  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因 (GenBank 注册号 AY827489) 相似性最高, 为 97% ~ 98%。B16、B21、B23、B24、B28、B30、B32 克隆到的片段与 *Bacillus subtilis* WL-3 (GenBank 注册号 DQ167409) 的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因相似性最高, 为 96% ~ 98%。B8 克隆到的片段与 *Bacillus subtilis* WL-3 的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因有 76.5% 相似性。B48、B49 克隆的片段同 *Bacillus circulans* k-1 (GenBank 注册号 AB007123) 的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因只有 62% 的相似性。

## 2.4 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因进化树分析

进化树分析表明: 芽孢杆菌  $\beta$ -甘露聚糖酶基因序列分为 3 个大组, 第 1 组基因主要是来源于环状芽孢杆菌; 第 2 组基因成员较多, 主要是来源

于枯草芽孢杆菌、芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌及解淀粉酶芽孢杆菌。第2组又细分为两个亚组。第3组包括两个基因序列,分别来自嗜热脂肪芽孢杆菌和芽孢杆菌。本实验中克隆到的16条 $\beta$ -甘露聚糖酶基因序列中,两条来源于环形芽孢杆菌B48与B49的序列包含在第1组中,其余14条序列均包含在第2组(结果见图1)。

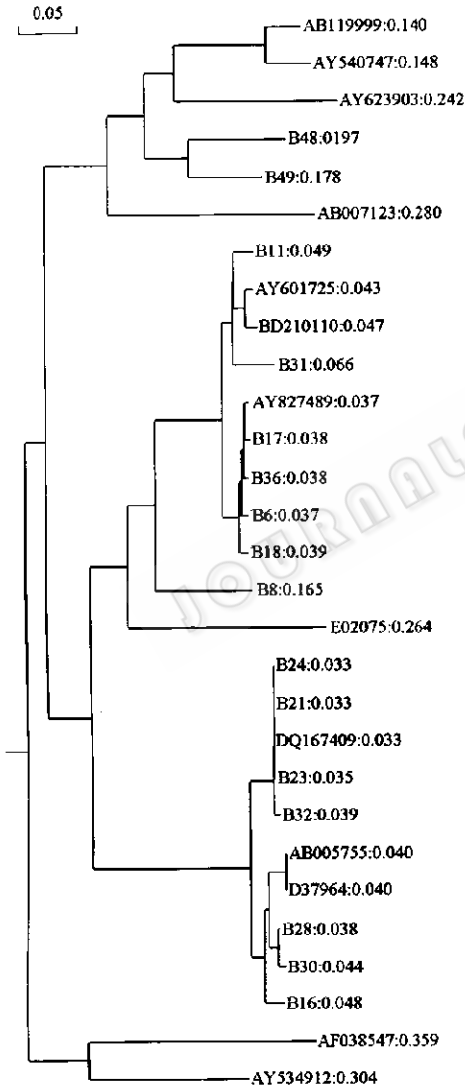


图1 芽孢杆菌 $\beta$ -甘露聚糖酶部分基因序列进化树

来源于 GenBank 的基因序列用其注册号表示, 本实验克隆的基因序列用其菌株号表示:

DQ167409、AY601725、BD210110、AY827489、D37964 为 *Bacillus subtilis*, AB005755、AB119999、AY534912、E02075 为 *Bacillus* sp., AF038547 为 *Bacillus stearothermophilus*, AB007123、AY540747、AY623903 为 *Bacillus circulans*。

### 3 讨论

芽孢杆菌是 $\beta$ -甘露聚糖酶的重要产生菌,一方面许多芽孢杆菌均能产生 $\beta$ -甘露聚糖酶,如本文所用的28株芽孢杆菌材料中,就有16株产生该酶,另一方面,目前在实际生产上应用的 $\beta$ -甘露聚糖酶基本上均来源于芽孢杆菌,因此研究芽孢杆菌 $\beta$ -甘露聚糖酶在理论上和实际应用上都是有意义的。

在筛选平板中,产生透明环的菌株在摇床培养后其培养液均可检测到 $\beta$ -甘露聚糖酶活性,而无透明环的菌株则检测不到,说明利用筛选平板初步筛选产 $\beta$ -甘露聚糖酶菌株是有效的。但不同菌株产生的透明环其大小与酶活性高低并不成正比,原因是同一个培养条件对不同的菌株其酶的产量有影响,同时培养温度和培养基的pH值等培养条件与酶的作用条件不一定一致。

利用本实验设计的一对兼并引物,对能够产生 $\beta$ -甘露聚糖酶的16株芽孢杆菌均克隆到其部分 $\beta$ -甘露聚糖酶基因序列,包括相似性很低的B48和B49的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因。证明这对兼并引物具有很好的有效性,有望利用此对引物对不同芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因进行部分序列克隆,从而可快速评价其基因的新颖性并进一步通过反向PCR, TAIL-PCR及构建基因组文库等方法克隆到全长基因。我们已经通过反向PCR克隆到B48和B49的全长 $\beta$ -甘露聚糖酶基因,其氨基酸序列同源性报道的相比最高仅为62.7%和62.2%,而两个基因相互之间的相似性也仅为68.6%,均为新基因(详情另文发表)。

本实验9株枯草芽孢杆菌中有8株可诱导产生 $\beta$ -甘露聚糖酶,且酶活性普遍较高。5株环形芽孢杆菌和3株地衣芽孢杆菌中各有2株可产 $\beta$ -甘露聚糖酶。而4株蜡样芽孢杆菌和4株巨大芽孢杆菌中的3株均无可检测的酶活性,仅有1株巨大芽孢杆菌可产生较低的酶活性。序列分析表明,枯草芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因之间的相

似性较高。不过,两个 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因相似性较高的菌株(例如B36和B17),其酶活性也存在一定差异。而环状芽孢杆菌来源的酶编码基因之间相似性则较低。

进化树分析研究可用来评价基因或蛋白在进化过程中的演变和亲缘关系。本实验是针对芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的保守区进行分析,目标序列约为500bp,因此本实验得到的进化树可以从一定程度上代表芽孢杆菌 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因之间的进化关系。通过了解不同芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因在该保守区的碱基差异情况,对于筛选新的 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因具有一定的理论指导意义。本实验构建的进化树表明:环状芽孢杆菌的 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因同其它芽孢杆菌的 $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因进化关系较远,因此在环状芽孢杆菌中更容易筛选到新的酶编码基因,进而得到新的 $\beta$ -甘露聚糖酶。目前GenBank中有13条来源于芽孢杆菌的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因,本实验克隆了16条芽孢杆菌的 $\beta$ -甘露聚糖酶部分编码基因,丰富了芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露

聚糖酶基因资源,对于从基因水平分析或筛选芽孢杆菌来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶有一定帮助。

## 参考文献

- [1] Pula J. *Macromol Symp*, 1997, 120: 183~196.
- [2] Stalbrand H, Saloheimo A, Vehmaanpera J, et al. *Bioseparation*, 1996, 6 (3): 147~157.
- [3] Dutta S, Bradford K J, Nevins D J. *Plant Physiol*, 1997, 113 (1): 155~161.
- [4] Xu B, Hagglund P, Stalbrand H, et al. *J Biotechnol*, 2002, 92 (3): 267~277.
- [5] Yu H Y, Sun Y M, Wang W J, et al. *生物工程学报*, 2003, 19 (3): 327~331.
- [6] 谭秀华, 武玉永, 马立新, 等. *微生物学报*, 2005, 45 (4): 543~546.
- [7] Downie B, Hilhorst H W M, Benley J D. *Phytochemistry*, 1994, 36 (4): 829~835.
- [8] Colowick S P, Kaplan N O. *Method Enzymol*, 1988, 160: 253.
- [9] Wang S Y, Wu S J, Thottappilly G, et al. *J BioSci Bioeng*, 2001, 92 (1): 59~66.
- [10] 奥斯伯(颜子颖译). *精编分子生物学指南*. 北京: 科学出版社, 1998. 625~626.

## • 科技信息 •

### 苜蓿根瘤菌专一性研究与应用

苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti* 或称 *Sinorhizobium meliloti*) 专一性及应用研究取得新进展。该菌与豆科植物(苜蓿)建立共生关系而成为独立的“苜蓿根瘤菌互接种族”,一般说表现其严格的寄主专一性,也就是说,该族根瘤菌不侵染其它豆科植物结瘤固氮,对这方面基础研究在国内不多见有关报道;然而对其实际应用研究颇为活跃,它与苜蓿建立共生固氮关系已应用于农业实践,有益于发展饲料业、养殖业;同时有益于农业如改造盐碱地等。据报道,这种共生体有很好耐盐碱、抗干旱能力。在我国,河北省有6万亩含盐量2%的荒地,通过种植苜蓿使盐碱荒地得改造而变为良田,全部可种植粮食作物如小麦等,为农民增收起了重要作用;另一方面苜蓿根瘤菌与其共生体为增加土壤有机质,改善土壤结构,增强土壤肥力起重要作用,这样起到改土、肥田的良好效果。至于“苜蓿根瘤菌互接种族”研究,我国研究者在这方面研究有新的突破,从新疆种植苜蓿植物的根瘤中获得一种苜蓿根瘤菌定名为苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*),不仅可在紫花苜蓿上结瘤固氮,而且还在大豆植物根上结瘤固氮,这是一个新的突破;然而,大豆根瘤菌(*Rh. japonicum*)与苜蓿根瘤菌两个完全不同的“互接种族”,它能否在苜蓿植物上结瘤固氮呢?不清楚,这里面涉及各“族”寄主专一性问题,值得进一步探究的未知数!此其一;其次,既然苜蓿根瘤菌能在另一“族”大豆植物结瘤固氮,那么有没有可能它与不定型的“豇豆族根瘤菌”(含其寄主植物)实现交互感染性(结瘤)或共生固氮呢?这是一个“空白”。可做进一步探索!现代生物技术的有效应用有可能突破各“互接种族”的交互感染性(结瘤固氮),待做试验研究,这是一个基础的有趣的课题。